

318091-03

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003847-01

# 바이오컨버전 기술을 활용한 우유 및 유가공 부산물의 고부가가치 소재화 기술개발

2022. 02. 16

주관연구기관 / (주)삼익유가공  
협동연구기관 / 한국식품연구원  
협동연구기관 / 중앙대학교  
협동연구기관 / 숙명여자대학교  
협동연구기관 / 동국대학교  
협동연구기관 / 바이텍

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

소 및 바  
재 화 이  
화 유 오  
기 가 컨  
술 공 버  
개 부 전  
발 산 기  
의 술 을

고 활  
부 용  
가 한  
가 우  
치 유

2021

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “바이오컨버전 기술을 활용한 우유 및 유가공 부산물의 고부가가치 소재화 기술개발”(개발기간 : 2018. 11. 09 ~ 2021. 11. 08)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 02. 16

주관연구기관명 : (주)삼익유가공	(대표자) 이 봄 이
협동연구기관명 : 한국식품연구원	(대표자) 백 형 희
협동연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단	(대표자) 고 중 혁
협동연구기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단	(대표자) 이 명 석
협동연구기관명 : 동국대학교 산학협력단	(대표자) 정 영 식
협동연구기관명 : (주)바이텍	(대표자) 이 도 행



주관연구책임자 : 이 해 창  
협동연구책임자 : 임 상 동  
협동연구책임자 : 김 근 배  
협동연구책임자 : 윤 요 한  
협동연구책임자 : 강 석 성  
협동연구책임자 : 손 연 경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[ √ ], 보안[ ]	
중앙행정기관명						사업명					
전문기관명 (해당 시 작성)						내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
						연구개발과제번호		318091-03			
기술 분류	국가과학기술 표준분류		1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명				
	농림식품과학기술 분류		1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)			국문								
			영문								
연구개발과제명			국문		바이오컨버전 기술을 활용한 우유 및 유가공 부산물의 고부가가치 소재화 기술개발						
			영문		Development of High Value Added Food Materials from Milk and Milk Processing By-Products Using Bioconversion Technology						
주관연구개발기관			기관명		(주) 삼익유가공		사업자등록번호		211-81-39249		
			주소		전북 김제시 봉황공단 1길 303		법인등록번호		110111-0553051		
연구책임자			성명		이해창		직위		차장		
			연락처		직장전화 02-539-4511		휴대전화				
					전자우편		국가연구자번호		10114759		
연구개발기간			전체		2018.11.09 - 2021.11.08 (36 개월)						
			1 단계 (해당 시 작성)		1년차		2018.11.09 - 2019.11.08 (12 개월)				
					2년차		2019.11.09 - 2020.11.08 (12 개월)				
					3년		2020.11.09 - 2021.11.08 (12 개월)				
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발 비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계		810,000	27,340	246,060	0	0	0	0	837,340	246,060	1,083,400
1단계	1년차	320,000	11,000	99,000	0	0	0	0	331,000	99,000	430,000
	2년차	245,000	8,170	73,530	0	0	0	0	253,170	75,530	326,700
	3년차	245,000	8,170	73,530	0	0	0	0	253,170	75,530	326,700
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고			
		한국식품연구원		임상동	책임연구원			역할	기관유형	공통 정부출연연	
		중앙대학교		김근배	교수					공통 대학	
		숙명여자대학교		윤요한	교수					공통 대학	
		동국대학교		강석성	교수					공통 대학	
		바이텍		손연경	실장					공통 중소기업	
연구개발담당자 실무담당자		성명		이해창		직위		차장			
		연락처		직장전화 02-539-4511		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					

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

2022년 1월 3일

연구책임자: 이 해 창 (인)

주관연구개발기관의 장: 이 봄 이 (직인)

공동연구개발기관의 장: (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호					
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		바이오컨버전 기술을 활용한 우유 및 유가공 부산물의 고부가가치 소재화 기술개발					
전체 연구개발기간		2018.11.09 - 2021.11.08 (36 개월)					
총 연구개발비		총 1,083,400천원 (정부지원연구개발비: 810,000천원, 기관부담연구개발비: 273,400천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ √ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3단계 ) 종료시점 목표(8단계 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기 확보한 다수 균주 및 다년간의 바이오컨버전 기술 산업화·건강증진효과 규명연구 경험을 통해 바이오컨버전에 최적화된 고효율 균주 발굴 및 건강증진 효과(비만, 치주염 완화)가 있는 잉여유·유가공부산물 유래 고부가가치 식품소재(발효유분말, 발효유청분말) 개발</li> <li>○ 국내 유가공 부산물 가공산업 분야 선도적 기술력, 기 구축된 영업망 및 유사제품 판매경험을 활용한 낮은 생산원가의 가격 경쟁력 있는 바이오컨버전 활용 기능성 식품 소재 시장의 우위 선점 및 낙농업 소득 증대에 기여</li> </ul>			
		전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 건강증진 효과 및 바이오컨버전 기술에 최적화된 고효율 균주를 활용하여 그린바이오에 적합한 친환경 기술 확립</li> <li>○ 만성질환(비만, 치주염) 보유 인구집단의 규모 대비 부족한 관련 건강보조 식품시장에 적합한 잉여유 및 유청 유래 고부가가치 제품 생산</li> <li>○ 기 구축된 유가공 부산물 가공시설, 관련 산업분야 내 확보된 영업망, 유사제품 판매경험을 통해 생산비를 절감하고 수집된 소비자 수요정보를 활용하여 소비자 니즈를 충족시키는 가격 경쟁력 우위의 바이오컨버전 활용 고부가가치 제품 생산</li> </ul>			
		1년차	목표	○ 건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위해 바이오컨버전 기술 활용한 우유 및 유청 유래 고부가가치 소재 개발기술 확립 및 최적화			
			내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물 내 유효성분 분리 및 효능 검증</li> <li>- 우유 및 유청으로부터 고부가가치 소재 확보를 위한 바이오컨버전 기술 최적화</li> <li>- 바이오컨버전 산물의 분말 샘플 제조공정 확립</li> </ul>			
	2년차	목표	○ 바이오컨버전 산물에 의한 비만, 치주염 억제 기전 규명, 동물 모델을 이용한 우유 및 유청 바이오컨버전 산물의 건강 증진(비만, 치주염 완화) 효과 확인				



	3년차	내용	- 바이오컨버전 산물 내 비만, 치주염 억제 원인 유효성분 규명 - 바이오컨버전 산물의 비만, 치주염 억제 세포 내 신호전달 기전 규명
		목표	○ 유효 바이오컨버전 산물을 활용한 건강 증진(비만, 치주염 완화) 고부가가치 소재 개발 및 제품화
		내용	- 유효 바이오컨버전 산물의 품질 특성 평가 - 현장 대량시험을 통한 바이오컨버전 산물 제품 제조공정 최적화 - 건강 증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청분말 제품 개발 및 양산 - 향후 제품 판매 사업화 계획 제시

연구개발성과	○ 우유 및 유청 유래의 건강 증진(비만, 치주염 억제) 고부가가치 소재 개발 4건 ○ 우유 및 유청 유래 기능성 소재를 활용한 제품개발 2건 ○ 우유 및 유청 유래 고부가가치 제품화 바이오컨버전 기술 확보
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	○ 건강증진 효과 및 바이오컨버전 기술에 최적화된 고효율 균주를 활용하여 그린바이오에 적합한 친환경 기술 확립 ○ 만성질환(비만, 치주염) 보유 인구집단의 규모 대비 부족한 관련 건강보조 식품시장에 적합한 잉여유 및 유청 유래 고부가가치 제품 생산 ○ 기 구축된 유가공 부산물 가공시설, 관련 산업분야 내 확보된 영업망, 유사제품 판매 경험을 통해 생산비를 절감하고 수집된 소비자 수요정보를 활용하여 소비자 니즈를 충족시키는 가격 경쟁력 우위의 바이오컨버전 활용 고부가가치 제품 생산
---------------------	--

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

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	6	4	1						3			

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)	유가공	기능성소재	비만	치주염	
영문핵심어 (5개 이내)	Milk processing	Functional products	Obesity	Periodontal disease	

## < 목 차 >

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

별첨 자료 (참고 문헌 등)

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1. 바이오컨버전 기술의 우수성 및 본 기술의 필요성

- 바이오컨버전 기술은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용하여 전구물질로부터 산물을 생산한다는 점에서 기존 발효 공정과 차이를 보이고 있으며 종균 발굴 및 그에 따른 생성 산물의 특이성이 바이오컨버전 기술 내 우수성 및 차별성을 나타내는데 핵심 요소임
- 바이오컨버전을 하는 이유는 우유 및 유가공 부산물인 유청은 그 자체로도 영양가치가 높은 식품소재이나, 주 구성성분인 단백질 그 자체로 섭취되는 것보다 바이오컨버전을 통해 펩타이드 형태로 분해될 경우 소화 용이 및 체내 흡수가 높아지고 기능성 물질이 생성될 경우 건강증진 효과까지 기대되므로 최근 문제시 되고 있는 국내산 잉여우유 및 유청을 바이오컨버전 기술을 활용하여 고부가가치화 시키는 것이 중요하게 인식되고 있음
- 그러나, 국내에서도 바이오컨버전 기술을 이용한 유가공품 개발 연구가 이루어졌음에도 불구하고 상업화 성공으로 이어지지 못하였음. 그 원인은 1) 원료인 우유의 높은 단가 2) 바이오컨버전을 위한 핵심 요소인 효소나 기능성 미생물 발굴·검증 부족 3) 건강증진 효과의 기능성 검증 기술의 미비 4) 제품 컨셉 또는 타겟 고객층 확립 미흡 등이 있음. 이에 본 연구팀은 차별성을 위한 바이오컨버전 기술 확립·최적화와 전문 분야 연구진의 건강증진 효과 기능성 검증, 성공적인 제품화를 위한 산업체의 경험과 차별적 연구수행을 통해 위에서 제시한 상업화 실패 원인을 해결하고자 하며 해당 내용은 아래와 같음

## 2. 바이오컨버전 기술을 활용한 연구개발 목표 및 주요 내용

- 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구개발 목표는 기 확보한 다수 균주 및 다년간의 바이오컨버전 기술 산업화·건강증진효과 규명연구 경험을 통해 바이오컨버전에 최적화된 고효율 균주 발굴 및 건강증진 효과(비만, 치주염 완화)가 있는 잉여우유·유가공부산물 유래 고부가가치 식품소재(발효유분말, 발효유청분말) 개발을 하는 것임. 더불어, 국내 유가공 부산물 가공산업 분야 선도적 기술력, 기 구축된 영업망 및 유사제품 판매경험을 활용하여 낮은 생산원가의 가격경쟁력 있는 바이오컨버전 활용 기능성 식품소재 시장을 우위 선점하고 낙농업 소득 증대에 기여하고자 함
- 본 목적을 달성하기 위해 연구개발의 주요 내용은 1) 비만·치주염 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 소재 개발 기술 확립 및 최적화 2) 동물모델 경구 투여를 통한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물 및 유효성분의 건강증진(비만, 치주염 완화) 효과 확인 3) 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물에 의한 비만 및 치주염 억제 기전 규명 4) 건강증진(비만, 치주염 완화)을 위한 바이오컨버전 산물(발효유분말, 발효유청분말) 제품 실효성 평가 5) 유효 바이오컨버전 산물을 활용한 건강증진(비만, 치주염 완화)을 위한 고부가가치 소재로서 발효유분말 및 발효유청분말 생산조건 최적화 및 제품화임

## 3. 본 연구를 통해 생산된 제품의 적용 분야

- 본 연구팀이 개발하려고 하는 고부가가치 소재는 비만과 치주염 증상을 완화시킬 수 있는 건강증진의 효과를 나타낼 수 있음. 그동안 식품에 사용되어 온 소재는 식품의 물성을 조절하거나 단백질과 같은 영양소를 보충하는 역할에만 머물렀으나, 기존의 특성을 가지면서 건강증진 효과를 기대할 수 있는 식품소재를 개발하여 저 가치의 폐기자원을

고부가가치화하여 수익 창출이 가능함. 본 연구의 고부가가치 소재는 식품에의 그 활용도가 다양하여 건강기능식품 부가 소재, 건강 음료, 유가공품에 활용, 또는 스틱 충전 등의 포장을 통해 건강보조식품으로서 분말 자체를 섭취할 수도 있음. 또한, 바이오컨버전 산물에서 정제하여 대량화하지 않고 우유 및 유청을 이용한 바이오컨버전 산물을 분말화하여 제품화하여 정제 비용이 소요되지 않으면서 보관 및 처리가 용이함에 따라 생산 및 활용에 있어 가격 경쟁력이 높을 것으로 기대함

#### 4. 본 연구팀의 차별성 및 목표달성 가능성

- 연구목표 달성을 위한 본 연구팀의 차별성 및 높은 목표달성 가능성에 대한 근거는 다음과 같음
  - 우유 및 유가공 부산물 유래 식품소재 생산을 위한 제품생산 기반 기 구축 및 확보
  - 바이오컨버전 기술 및 기능성 검증에 관한 다수 선행 연구실적(논문, 특허) 보유
  - 위와 관련한 산업화 경험(기술이전) 및 기술력 확보
- 바이오컨버전 기술의 효율을 극대화하는 데 핵심 요소인 미생물 균주 확보에 우위를 점하고 있어 연구 수행 시 우수 균주 선발에 용이하며, 본 연구팀은 총 1,100개 이상의 미생물 분리 균주를 보유하고 있음. 또한, 기존 연구 수행에서 바이오컨버전 기술 개발, 항염증·항비만·항산화·항고혈압 등의 효과를 나타내는 미생물 균주 발굴, 동물모델을 활용한 기능성 소재의 건강개선 효능 검증, 질환 발생 및 억제 기전 규명 등의 연구 경험이 다수 있으며, 이를 통한 기술 이전 및 특허 등록 등의 산업화 경험이 풍부함. 또한, 치과대학 교수가 자문위원으로 구성되어 있어 치주염 개선 및 그 기전 연구 수행 시 보다 전문적인 자문을 얻을 수 있음
- 본 연구의 주관기관인 (주)삼익유가공은 국내 최초로 유청분말을 제조한 회사로서 유가공 부산물의 제조에 높은 기술력과 경험을 보유하고 있으며, 본 연구에서 개발하고자 하는 최종 제품 생산라인 및 공정이 확립되어 있을뿐만 아니라 축적된 B2B 영업망을 통해 향후 개발된 제품을 사업화하는 데 있어 유리함. 협동기관으로 참여하는 (주)바이텍은 기능성 소재를 개발 및 건강기능식품을 제조하는 업체로서 본 연구를 통해 개발되는 고부가가치 식품소재의 실효성 평가 및 물성 특성 분석을 수행함에 있어 높은 전문성을 가질 것으로 예상됨

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### <주관연구기간 (주)삼익유가공>

#### [1차년도] 바이오컨버전 산물 분말 제조 공정 확립

##### 1. 비만 억제 바이오컨버전 산물 분말 제조

가. 비만 억제 바이오컨버전 산물 분말 제조공정을 확립하였음.

나. 바이오컨버전 산물 제조를 위해 공정 변수(유입 및 유출 온도, 건조시간, 노즐압력)를 조절하여 분무건조 공정을 확립하였음.

#### [2차년도] 바이오컨버전 산물 제품 제조공정 최적화

##### 1. 현장 대량시험을 통한 최종 제조공정 확립

가. 1차년도에 확립한 제조공정을 현장에서 적용하기 위해 다음과 같은 기계와 방법(표 1)을 이용하여 대량 제조 시험을 진행하였음.

표 1. 바이오컨버전 산물 분말 제조공정 확립 및 최적화

순서	공정명	주요설비	작업방법 및 조건
1	유청액 보관 	원료탱크, 냉동컨테이너	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료를 -18℃이하 냉동컨테이너에 보관함.</li> </ul>
2	예열 및 냉각 접종 및 배양 	배양탱크	<ul style="list-style-type: none"> <li>순환시킨 원료를 80℃ 이상 10분간 예열한 후 35-40℃까지 냉각함.</li> <li>탱크 주변에 소독액을 분무하고 냉각된 원료액에 선발된 발효능 유산균을 투입함. 유산균이 투입된 배양액을 5-10분간 교반 후 교반기를 끄고 탱크 온도를 35-40℃로 유지시키며 24시간 배양함.</li> </ul>
3	여과 	바스켓 필터	<ul style="list-style-type: none"> <li>40 mesh의 여과망을 통해 원료의 균질화를 돕고 혼입된 이물을 제거함.</li> </ul>
4	균질 	균질기	<ul style="list-style-type: none"> <li>여과망을 통과한 믹스를 1차압 50 bar, 2차압 150 bar 압력을 가해 원료를 균일한 크기로 분해함.</li> </ul>
5	살균 및 분무 	살균기, 고압펌프, 믹스분무노즐	<ul style="list-style-type: none"> <li>균질된 믹스를 75±2℃ 조건에서 50초 이상 살균함.</li> <li>살균된 믹스를 고압펌프(120-150 bar)를 통해 건조기 상부로 이송하여 노즐을 통해 분무함</li> </ul>
6	건조 및 냉각	드라이챔버, 싸이클론, 냉/열풍 교환기	<ul style="list-style-type: none"> <li>분무된 믹스를 180℃ 이상의 열풍으로 건조하며, 미립된 반제품은 싸이클론에서 회수하여</li> </ul>

			입자를 형성하여 건조한 후 냉각된 공기를 유입시켜 제품을 냉각함.
7	사별 	사별체	<ul style="list-style-type: none"> <li>냉각된 제품을 사별체(6-18 mesh)에서 선별하여 초분 및 덩어리진 제품을 사별함.</li> </ul>
8	최종 제품 생산 	제봉기	<ul style="list-style-type: none"> <li>사별된 제품을 내포장재(P.C), 외포장재(크라프트 지)에 담아 제봉기에서 포장함.</li> </ul>

나. 최적 제조공정을 확립하기 위해 배양 시간, 온도, 교반 속도를 조절해가면 생산 라인에 적합하게 적용하였음. 분무건조 조건중 송풍온도와 배풍 온도는 기존에 비슷한 유형의 제품에 맞춰 진행하였음.

**[3차년도] 확립된 최적 바이오컨버전 조건을 통한 건강증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청분말 제품 개발 및 생산**

**1. 제품 생산 규격화 및 최종제품 양산**

- 가. 발효유분말, 발효유청분말 제품 대량 생산을 규격화, 제품화
- 나. 발효유분말, 발효유청분말 제품의 저장 기간과 조건에 따른 제품의 안정성 평가하여 건강 증진(비만, 치주염 완화) 제품 양산

**2. 향후 제품 사업화 추진 계획 제시**

- 가. 시장 내 포지셔닝 맵 수립
- 나. SWOT 분석
- 다. 수익 창출 방안 및 마케팅·홍보 및 판매 전략 수립

**3. 향후 기능성식품 개별인정형 추진 계획**

- 가. 추진 프로세서

**<제1협동연구기관 한국식품연구원>**

**[1차년도] 비만 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립**

**1. 유산균 분리 및 발효능 균주 선발**

- 가. 젖산균의 분리 및 수집
  - 1) 김치에서 젖산균 분리
    - 지역과 종류가 다른 김치를 수집하여, 브롬크레졸 퍼플(bromcresol purple)과 소듐 아자이드(sodium azide)를 첨가한 변형 MRS 배지(Lim et al., 2011)에 0.1 mL씩

---

평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하고 균락을 변형 MRS 배지에서 순수 분리한 다음 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였음. 선발된 균주는 전기 변형 MRS 배지에 도말한 후, 호기 배양하여 순수 분리하였음. 순수 분리 후 Lactobacilli MRS broth (Difco, USA)에서 37°C, 18시간 배양한 다음 tryptic soy agar (Difco, USA) slant에 37°C에서 18시간 배양하여 보관하였음.

## 2) 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 남부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소 및 경북 가축위생시험소에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS 배지에서 bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37°C에서 48시간 배양하였음. 이후, 노란색 colony 중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 tryptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 보관하였음.

## 나. 우유 및 유청을 이용한 발효능 균주 선발

원유(194종) 및 김치(158종)에서 분리한 총 352종의 유산균의 skim milk와 유청에 접종하여 발효능을 측정하였음. Skim milk 및 유청을 살균하기 위해 10%로 제조한 후 중심부 온도가 80°C에서 1분간 살균된 10% skim milk에 1%의 유산균을 접종한 후 37°C, 18시간 및 24시간 후 응고 여부를 확인하였음.

## 다. 선발 균주 동정

분리·선정된 젖산 균주는 MRS broth에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였음. 젖산균의 동정은 Hammes et al.(1992)의 방법에 의하여 실시하였음. 순수 분리된 균주는 gram 염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia 생성, 현미경 관찰을 하였음. 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였음. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분 30초를 30회 시행하였으며 72°C, 5분으로 마무리하였음. 서열분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석하였음.

## 라. 선발 균주 특성 조사

### 1) 당 발효 특성

*Lactobacillus* 균은 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를, *Streptococcus* 균은 API Strep20 kit 를 이용하여 당 발효 실험을 실시하였음.

### 2) 항생제 내성 시험

MRS broth에 각 균주를 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone용액에 적정농도로 희석하였음. 각 항생제가 농도별로 포함된 tryptic soy broth에  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 성장여부를 결정하였음. 항생제 내성 측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였음. 항생제는 Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Penicillin-G, Methicillin, Oxacillin, Ampicillin, Bacitracin, Rifampicin, Novobiocin, Lincomycin, Polymyxin B 및 Chloramphenicol를 시험에 사용하였음.

### 3) 효소활성 실험

---

MRS broth에서 37°C, 18시간동안 배양한 균주를 suspension medium(2 mL)에 희석하여 5-6 McFarland로 탁도를 맞춘 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 37°C에서 4시간 호기배양 또는 혐기배양 한 다음 효소 반응시켰음. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, β-fucosidase 효소의 활성을 측정하였음.

#### 4) 내담즙성 실험

Gilliland & Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine이 함유된 MRS broth에서 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin을 증층한 다음 MRS broth에서 37°C, 18시간 배양된 균주를 1% 접종하였음. 이를 37°C에서 1시간 간격으로 7시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone 용액에서 희석하여 BCP plate count agar 평판에 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 배양하여 계수하였음.

#### 5) pH 내성 실험

Clark et al.(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 1, 2, 3 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양된 각각의 균주를 1 mL씩 섞은 후 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 37°C, 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였음.

#### 6) 항균력 실험

Gilliland & Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품연구원으로부터 분양받았으며, 지시균의 증식배지로서 *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*는 nutriunt broth에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였음. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS broth로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였음. 선택배지로서 *E. coli*는 EMB agar, *Salmonella typhimurium*은 bismuth sulfite agar, *S. aureus*는 baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였음. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였음.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{대조군의 균수 CFU/mL}) - (\text{혼합배양 후의 균수 CFU/mL})}{(\text{대조군의 균수 CFU/mL})}$$

#### 7) 장내 부착성

실험에 사용한 HT-29 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)을 통하여 구입하였고, Kim 등(2008)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S; Gibco, USA)이 첨가된 RPMI 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air가 공급되는 조건의 항온기(incubator)에서 배양하였음. HT-29 세포를 배양하기 위하여 세포를 12 well plate의 각 well에 10<sup>6</sup> cells/well로 분주하였고, 2일에 한 번씩 배지를 교체하였음. 실험 전날, 95%까지 세포가 찼을 때 serum free medium으로 교체하여 cell이 더 이상 차는 것을 막아주었으며 균주의 장내 부착능을 실험하기 위해 2차 계대배양한 균주 1 mL를 취해 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 serum free medium을 이용해 두 번 세척하

---



고 세척한 균주를 RPMI 배지로 희석하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 0.5 값이 나오도록 맞추었음. 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring 하여 초기 균수를 측정하였음. OD 값을 맞춘 균체 100 mL를 well에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 배양한 뒤 PBS를 이용해 붙지 않은 균을 5번 세척하였음. Trypsin-EDTA 1 mL를 첨가하여 cell-bacteria를 떼어낸 후 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring하여 균수를 측정하였음.

#### 8) Biogenic amine(BA) 생성능

BA는 다량 생성 시 면역 과민반응을 유발 할 수 있어 BA 생성능이 과도한 균주를 확인하여 안전성을 확보하였음. 아미노산 전구체(L-Tyrosine disodium salt, L-Histidine monohydrochloride monohydrate, L-Ornithine monohydrochloride, L-Lysine monohydrochloride)를 0.1% 첨가한 MRS broth를 만든 다음 18 시간 배양한 균주 1% 접종한 뒤 5-10번 교대 배양하여 decarboxylase 효소를 활성화시켰음. Bover-Cid & Holzapfel(1999)에 의해 고안된 decarboxylase media에 효소 활성화된 균을 도말하고 37°C에서 24-48시간 배양 후 보라색으로 변함을 통하여 BA 생성균을 판별하였음.

## 2. 바이오컨버전 산물에 대한 비만 억제능 평가

### 가. Pancreatic lipase 활성 억제능

Porcine pancreatic lipase를 이용하여 lipase 활성 저해능을 측정하였음. p-Nitrophenylpalmitate(PNP)를 acetonitrile에 10 mM 농도로 녹인 후 얻어진 용액을 다시 ethanol(1:2=acetonitrile:ethanol)에 녹여 결과적으로 3.33 mM의 PNP 용액을 만들어 사용하였음. Porcine pancreatic lipase는 5 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 사용하였음. 다음과 같은 농도로 reaction mixture를 만들어 37°C에서 10 분간 반응시켰음(표 2). 반응 후 405 nm에서 absorbance를 측정하였으며 blank는 enzyme을 증류수로, control은 시료를 용매로 대체하였음. 각각 농도별 시료마다 enzyme을 뺀 blank의 absorbance를 측정하여 시료의 색상을 보정하였음.

$$\text{Lipase inhibition activity(\%)} = \{1 - (A/B)\} \times 100$$

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

표 2. 반응용액의 조성

Buffer	Volume
Total reaction mixture	200 µL
Enzyme(porcine pancreatic lipase)	0.30 mg/mL
Sample	0.1 mg/mL
PNP	0.167 mM
Tris-HCl buffer	0.061 M(pH 8.5)

### 나. α-amylase 및 α-glucosidase 활성 억제능 측정

#### 1) α-amylase 활성 저해능 측정

---

$\alpha$ -amylase를 0.1 g/10 mL 농도로 증류수를 이용해 희석시키고, 기질인 가용성 전분은 증류수로 0.5%로 제조한 후 시료와 혼합하여 25°C에서 10 분간 반응시켰음. 0.1N HCL 용액으로 반응을 정지시킨 후 iodine 용액을 이용하여 30 분간 발색하여 660 nm로 흡광도를 측정하였음. 결과는  $\alpha$ -amylase만을 처리하였을 때와 시료를 혼합하여 처리하였을 때의 흡광도를 비교하여 나타내었음.

$$\alpha\text{-amylase inhibitory activity(\%)} = \{1-(A/B)\} \times 100$$

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

## 2) $\alpha$ -glucosidase 활성억제 효과 측정

Tibbot & Skadsen(1996) 등의 방법을 이용하여 측정하였으며, 효소는 효모로부터 얻어진  $\alpha$ -glucosidase(Sigma-Aldrich, USA)를, 기질은 p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였음.  $\alpha$ -Glucosidase는 0.2% BSA와 0.02%  $\text{NaN}_3$ 가 포함된 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 0.7  $\mu$ /mL가 되도록 녹여서 효소 용액으로 사용하였고, p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside는 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 10 mM이 되게 녹여서 기질 용액으로 사용하였음. 이후 각 시료를 microplate에 50  $\mu$ L씩을 첨가하고  $\alpha$ -glucosidase 효소를 100  $\mu$ L 취한 다음 25°C에서 5 분간 실온에서 incubation하고 multi detection reader(Infinite 200, TECAN Group Ltd, Switzerland)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였음. 그리고 기질용액을 50  $\mu$ L 을 더하고 2분 뒤 multi detection reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 저해율을 산출하였음.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibitory activity(\%)} = \{1-(A/B)\} \times 100$$

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

## 다. 3T3-L1 세포를 이용한 비만 세포 분화 억제능

3T3-L1 세포배양 방법은 Hemati et al.(1997)의 방법을 변형하여 사용하였음. Adipogenesis(지방세포분화) 측정은 3T3-L1 세포주를 분화시키고 지방축적(adipogenesis)을 유도하여 특정한 소재의 첨가가 지방축적에 미치는 영향을 측정하는 방법으로서 pre-adipocyte 상태의 3T3-L1 세포에 dexamethasone, 3-isobuthylmethyl-xanthine 그리고 insulin으로 처리하여 세포의 분화(differentiation)를 유도하면 PPAR- $\gamma$  등의 지방합성촉진 인자들의 발현이 일어나고 궁극적으로 지방의 세포내 축적이 이루어짐. 대체적으로 3T3-L1 세포의 pre-adipocyte 기간을 포함하여 9일 안에 지방의 축적이 일어나며 이들 축적된 지방구를 Oil Red O 용액으로 추출하고 520 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포내 지방축적 정도를 측정하였음(Ramirez- Zacarias et al., 1992).

## [2차년도] 비만 억제 소재 확보를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 최적화

### 1. 비만 억제 소재 확보를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 최적화

가. 반응표면분석법(RSM)을 이용한 배양조건의 최적화

#### 1) 재료 및 방법

##### 가) 공시재료

유청분말은 삼익유가공에서 제공받아 사용하였음. *Pediococcus pentosaceus*

---

KI13과 *Weissella cibaria* KI35 균주는 1차년도에서 김치에서 분리하였으며, 멸균된 MRS broth에 균주 1%를 접종하여 37°C, 24시간동안 배양한 후, 6,000 rpm, 15분간 원심분리하여 cell paste 형태로 회수하였음. 동결보호제로서 증류수를 첨가하여 10% skim milk를 제조한 후 110°C, 5분간 2회 간헐 멸균하여 사용하였음. 회수된 cell paste 15 g에 멸균된 10% skim milk 50 mL을 첨가하여 잘 섞고, -70°C deep freezer에 3시간 동결한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조시켜 powder 형태로 제조하였음. 이때의 제조된 stater에 들어있는 생균수는 KI13은  $1.75 \times 10^{11}$  CFU/g, KI35는  $1.00 \times 10^{11}$  CFU/g이었음.

나) 방법

① 조건설정

1차년도에서 비만 억제 효능이 입증된 *P. pentosaceus* KI13과 *W. cibaria* KI35 균주에 의한 유청발효물에 대한 배양조건을 최적화하기 위하여 독립변수( $X_i$ )로 유청농도( $X_1$ ), 스타터첨가량( $X_2$ ), 배양온도( $X_3$ ), 배양시간( $X_4$ )을 설정하고 5단계로 부호화하여 27개 구간으로 설계하여 배양조건을 실시하였음. 종속변수( $Y_n$ )로는 pH( $Y_1$ ), 산도( $Y_2$ ), 유산균( $Y_3$ ), lipase 억제능( $Y_4$ ),  $\alpha$ -glucosidase 억제능( $Y_5$ )을 설정하였음. 이때 *W. cibaria* KI35 균주는 유당발효능이 미약하여 glucose 1.0%를 고정하여 추가하였음. 통계처리는 MINITAB statistical software (Version 13, Minitab Inc., USA)를 사용하였음.

② 배양조건의 최적화를 위한 반응표면실험법

실험계획은 중심합성계획(Central composite design, Box and Wilson, 1951)을 적용하였음. 독립변수로는 예비실험과 마찬가지로 유청농도( $X_1$ ), 스타터 첨가량( $X_2$ ), 배양온도( $X_3$ ), 배양시간( $X_4$ )을 설정하였음. 독립변수의 중심값과 범위는 예비 실험을 바탕으로 설정되었으며, -2, -1, 0, 1, 2의 5가지 수준으로 부호화하였고 (표 3), 이에 따른 실험조건은 표 4와 같음. 종속변수로는 pH( $Y_1$ ), 산도( $Y_2$ ), 유산균( $Y_3$ ), lipase 억제능( $Y_4$ ),  $\alpha$ -glucosidase 억제능( $Y_5$ )을 설정하였으며, lipase 억제능 및  $\alpha$ -glucosidase 억제능이 높은 값을 만족하는 최적화를 실시하였음. 통계 분석 결과를 바탕으로 반응표면 모델식을 구하고 반응표면 그래프(response surface plots)는 maple software(Version 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원으로 나타내었음.

표 3. 선별된 유산균의 배양조건을 최적화하는 4-factor, 5-level 중심 복합 로타 테이블 설계에서 독립변수와 그 수준

Independent variable	Symbol	Level				
		-2	-1	0	1	2
Whey con. (%)	$X_1$	7	10	13	16	19
Starter Added amount (%)	$X_2$	0.01	0.0325	0.055	0.0775	0.1
Incubation temp. (°C)	$X_3$	28	31	34	37	40
Incubation time (h)	$X_4$	6	10.5	15	19.5	24

표 4. 선별된 유산균의 반응표면분석법(RSM) 조건

Run Order	Whey con.(%)	Starter added amount(%)	Incubation temp.(°C)	Incubation time(h)
1	10	0.0325	31	10.5
2	16	0.0325	31	10.5
3	10	0.0775	31	10.5
4	16	0.0775	31	10.5
5	10	0.0325	37	10.5
6	16	0.0325	37	10.5
7	10	0.0775	37	10.5
8	16	0.0775	37	10.5
9	10	0.0325	31	19.5
10	16	0.0325	31	19.5
11	10	0.0775	31	19.5
12	16	0.0775	31	19.5
13	10	0.0325	37	19.5
14	16	0.0325	37	19.5
15	10	0.0775	37	19.5
16	16	0.0775	37	19.5
17	7	0.0550	34	15.0
18	19	0.0550	34	15.0
19	13	0.0100	34	15.0
20	13	0.1000	34	15.0
21	13	0.0550	28	15.0
22	13	0.0550	40	15.0
23	13	0.0550	34	6.0
24	13	0.0550	34	24.0
25	13	0.0550	34	15.0
26	13	0.0550	34	15.0
27	13	0.0550	34	15.0

③ pH 및 적정산도 측정

pH는 pH meter를 사용하여 측정하였으며, 적정산도는 발효액 10 g에 증류수 10 mL를 혼합한 후 0.1N NaOH 용액을 첨가하여 pH가 8.3에 도달할 때까지 소요된 양으로부터 산출하여 유산함량으로 표시하였음.

---

#### ④ 유산균수 측정

유산균수 측정은 발효액 1 mL를 십진희석법으로 희석하여 평판배양법으로 BCP 한천배지에 1 mL씩 분주하고, 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 노란색 콜로니를 계수하여 시료 1 g 당 CFU(colony forming unit)로 표시하였음.

#### ⑤ Pancreatic lipase 활성 억제능

Porcine pancreatic lipase를 이용하여 lipase 활성 저해능을 측정하였음. Porcine pancreatic lipase(Sigma-Aldrich L3126, 114 U/g)를 20 mg/mL의 농도로 증류수에 용해시킨 다음 16,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하고 상층액을 효소액으로 사용하였음. Buffer는 pH 8.2의 100 mM Tris 완충액이었으며, p-nitrophenyl laurate (pNP laurate)를 반응 기질로 사용하였음. 기질은 1% Triton X-100을 함유하는 5mM sodium acetate(pH 5.0)에 용해시킨 0.1% (w/v) pNP laurate였으며 용해를 돕기 위해 끓는 물에서 2분 동안 가열하여 식힌 후 사용하였음. Sample은 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리 후 상층액을 이용하였으며, 대조군은 발효시키지 않은 유청액을 sample 처리와 동일한 방법으로 사용하였음. 200 µL의 buffer, 250 µL의 기질 용액, 75 µL의 sample 및 150 µL의 리파아제를 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 배양하였음. 배양된 반응액은 16,000 rpm에서 2분 30초 동안 원심 분리하고 상층액을 취하여 마이크로 플레이트 리더기를 사용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였음. Blank는 효소액을 증류수로, control은 시료를 용매로 대체하였음. 각각 농도별 시료마다 enzyme을 뺀 blank의 absorbance를 측정하여 시료의 색상을 보정하였으며, 결과는 다음과 같이 계산하였음.

$$\text{lipase 활성 억제능 (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}} \times 100}$$

OD ; 광학 밀도

#### ⑥ α-glucosidase 억제 활성능

Tibbot & Skadsen(1996) 등의 방법을 변형하여 측정하였으며, 효소는 효모로부터 얻어진 α-glucosidase(Sigma-Aldrich, USA)를, 기질은 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였음. α-Glucosidase는 증류수에 0.5 U/mL가 되도록 녹여서 효소 용액으로 사용하였고, p-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside는 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 3 mM이 되게 녹여서 기질 용액으로 사용하였음. Sample은 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리 후 상층액을 증류수로 10배 희석하여 사용하였음. 각 50 µL sample, 25 µL 효소, 및 25 µL reaction buffer (0.2 M potassium phosphate buffer, pH 6.5) 취한 다음 37°C에서 15분간 실온에서 incubation한 후 기질용액을 50 µL 을 더하고 37°C에서 10분간 shaking하며 배양하였음. 그 후 반응 정지 시약인 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 375 µL를 첨가하여 반응을 정지시켰음. 마이크로 플레이트 리더기를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 저해율을 산출하였음.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibitory activity(\%)} = \{1-(A/B)\} \times 100$$

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

---

---

## [3차년도] 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 유효성분 분리 및 비만 억제능 평가

### 1. 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 유효성분 분리 및 유효성분 중 기능성 성분 선별

#### 가. 한외여과

10% 유청분말에 *P. pentosaceus* KI13과 *W. cibaria* KI35를 각각 1%씩 접종하고 37°C에서 pH 4.5에 도달할 때까지 배양시켰음. 얻어진 발효산물을 cut-off 10,000 Da의 membrane을 장착한 한외여과 장치로 10,000 Da 이상의 획분과 10,000 Da 이하의 획분으로 분리하고 이것을 다시 1,000 Da의 membrane으로 한외여과하여 1,000-10,000 Da의 획분과 1,000 Da 이하의 획분으로 분리하였으며 감압농축 후 진공동결 건조하였음.

#### 나. 유효성분 분석

##### 1) 시료추출

유청에서 대사물질들을 추출하기 위하여 동결 건조한 시료 powder를 표준물질 (terfenadien)이 들어있는 50% methanol로 혼합한 후 bullet blender(Next Advance, NY, USA) 로 추출하였음. 원심분리 후 상등액은 UPLC-Q-TOF MS(Waters, USA) 분석하였음. GC/MS를 이용하여 대사물질들을 분석하기 위하여 시료 0.02 g에 50% methanol 1 mL로 추출한 후 상등액 50 uL를 CentriVap vacuum concentrator(LABCONCO Co., Kansas City, MO, USA)을 이용하여 완전히 건조시킨 후, methoxyamine hydrochloride과 N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide(BSTFA)를 사용한 silylation의 방법을 이용하였음. Pyridine과 methoxyamine hydrochloride을 넣고 37°C에서 90분간 반응 시킨 후 BSTFA을 첨가하고 70°C에서 30분간 반응시킨 유도체화된 추출물은 vial에 옮겨 담아 GC/MS(Shimadzu, Japan)로 분석하였음. 유기산 분석은 HPLC로 분석을 진행하였음. 시료 0.02 g에 증류수 800 uL를 첨가하여 추출한 후 원심분리하여 상등액을 HPLC(Shimadzu, Japan)로 분석하였음.

##### 2) UPLC-Q-TOF MS 분석

유청 추출물은 Waters Acquity UPLC-Q-TOF를 이용하여 분석하였음. 시료추출물은 Acquity UPLC BEH C18 column(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm; waters)에 주입하였으며 이동상은 0.1% formic acid를 함유하고 있는 물(A)과 0.1% formic acid를 함유하고 있는 acetonitrile(B)로 flow rate은 0.35 mL/min이며 분석시간은 12 분이고 컬럼온도는 40°C이었음. 컬럼으로 통과하여 나온 eluents는 negative electrospray ionization(ESI) mode를 갖고있는 Q-TOF MS로 분석하였음. TOF MS data의 scan range는 50-1500 m/z, scan time은 0.2 s, capillary와 sampling cone voltages는 3 kV와 40 V, desolvation flow rate은 800 L/h, desolvation 온도는 400°C, source 온도는 100°C이었음. Leucine-enkephalin ([M+H]=556.2771)는 lock mass을 위한 reference compound로 사용되었으며 10 s 당 분석되었음. MS/MS spectra은 collision energy ramp(10-30 eV), m/z 50-1500 조건 하에서 얻었음. M/Z, retention time, ion intensity를 포함하는 mass spectrometry data 프로세싱은 MakerLynx software(Waters)을 사용하여 진행하였음.

##### 3) GC/MS 분석

유도체 된 시료 1 uL는 DB-5 column(30 m×0.25 mm id, 0.25 μm film thickness; J & W Scientific, USA)이 연결된 GC로 주입하여 분석을 진행하였음.

---

Carrier gas로 사용된 helium은 1 mL/min 유속으로 흘러 보냈으며 injector 온도는 200°C로 유지하였음. 초기 oven 온도를 70°C로 2 분간 유지시킨 후 10°C/min 비율로 320°C까지 증가시키고 동일 온도에서 3분간 유지시켰음. GC column을 통해 분석되어 나오는 물질들은 electron impact(EI) ionization mode(70 eV)로 작동하는 Shimadzu GCMS-TQ 8030(Tokyo, Japan)로 분석하였음. Ion source와 interface 온도는 각각 230°C와 280°C였으며 GC column을 통해 분석되어 나오는 물질들은 full scan mode(m/z 45-550)로 모니터링되었으며 scan event time과 scan 속도는 각각 0.3 sec와 2,000 u/sec이었음. Detector voltage은 0.1 kV이고 threshold은 100를 사용하였음.

#### 4) HPLC 분석

0.1% phosphoric acid가 포함된 3차 증류수를 용매로 사용하여 15 분간 210 nm에서 유기산 분석을 진행하였음. 컬럼온도는 40°C이며 column은 YMC-Triart C18(150×30 mm id, S-3 um, 12nm)을 사용하였음.

#### 5) Data processing

UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 얻어진 LC-MS data 의 collection, normalization, alignment는 UNIFI version 1.8.2 프로그램(Waters)을 이용하여 진행하였음. 모든 data는 표준물질을 이용하여 normalization하였음. 대사물질들은 UNIFI version 1.8.2.169(Waters), ChemSpider(www. chemspider.com), human metabolome databases(www.hmdb.ca), METLIN database(metlin. scripps.edu)을 사용하여 동정하였음.

#### 6) Statistical analysis

SIMCA-P+version12.0.1(Umetrics,Umeå,Sweden)는 UNIFI를 통해 프로세싱된 LC/MS data의 통계분석을 위해 사용되었음. 특히 Partial least squares discriminant analysis(PLS-DA)는 분석한 결과를 시각화하기 위하여 사용되었음. 분석된 PLS-DA를 평가하기 위하여 R2X, R2Y, Q2, permutation test를 사용하였으며 R2X와 R2Y는 goodness of fit measure, Q2Y는predictive ability, permutation test는 PLS-DA를 교차검증하였음. 또한, 대사물질의 relative abundances는 SPSS 17.0(SPSS Inc., Chicago, IL)의 one-way analysis of variance(ANOVA) with Duncan's test( $p < 0.05$ )를 이용하여 분석하였음.

### 다. 구성 아미노산 분석

#### 1) 시료 전처리

시료 약 0.2-5.0 g를 시험관에 취하고 6N-HCl 10 mL를 가하여 vortex mixer로 1분간 교반, 질소가스를 충전시켜 관내의 산소를 제거한 후 즉시 마개를 막았음. 105°C dry oven에서 22시간 동안 가수분해 하였음. 분해가 끝난 후 실온까지 방냉시킨 다음 시험관 내 여액은 50 mL 정용 flask로 옮기고 3차 증류수로 정용한 후 혼합하여 여과지를 이용 여과하였음. 이 중 1 mL을 취해서 10 mL 정용 flask에 3차 D.W.로 정용한 후 이를 0.2 µm PTFE membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였음.

#### 2) 사용기기 및 기기분석 조건

히타치 L-8900 아미노산 자동분석기를 이용하여 분석하였으며 조건은 다음 표 5와 같음.

---

표 5. 기기분석 조건

분류	조건
Standard	표준원액 : 아미노산 표준용액(Sigma-Aldrich AAS18-10mL) 표준용액 : 위의 표준원액을 0.02 N HCl로 10, 25, 50, 100, 250배 희석하여 사용
Column	Ion exchange column Packed with Hitachicustom ion Exchange resin(4.6 mm × 60 mm )
Detection	Visible Detector Wavelength : 570 nm, 440 nm(for Proline)
Column Flow	0.999 mL/min
Temp. program	Column oven : 20 to 85°C(increase 1°C/step) Reaction unit : 50 to 140°C(increase 1°C/step)
Mobile phase	1.Buffer Solution : PH-1, PH-2, PH-3, PH-4, PH-RG (Mitsubishi Chemical Corporation) 2. Ninhydrin solution, Buffer (Wako, Ninhydrin Coloring Solution Kit for HITACHI)

<제2협동연구기관 중앙대학교>

[1차년도] 치주염 관련 세균 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오 컨버전 기술 확립 및 바이오컨버전 산물 내 유효성 분리·효능 검증

1. 박테리옌 생성 유산균주의 Screening

가. 항균활성 균주의 screening

1) 한국식품연구원에서 분양받은 원유 등에서 분리한 유산균(LAB) 107종의 균주를 대상으로 항균활성 균주를 선별하였음. 분리 균주는 37°C에서 De Mann, Rogosa, Sharpe(MRS) 배지에서 배양하였음. 글리세롤 stock은 12시간 배양된 균주를 원심 분리하여 10% 탈지유와 글리세롤(3:1, v/v) 혼합액에 재현탁하여 -80°C에서 보관하였음. 분리된 균주의 항균활성은 지표 균주로 *Listeria monocytogenes* ATCC7644를 사용하여 screening 하였음. 원유에서 분리된 유산균 목록은 다음과 같음(표 6). 유산균주는 MRS 배지에 37°C에서 12시간 동안 배양한 다음, 원심분리(13,000 rpm, 10분, 4°C)를 통해 균체를 제거하여 crude cell-free supernatant (CFS)를 얻었으며, 단백질 분해효소 활성을 제거하기 위하여 95°C에서 10분간 열처리한 다음, 0.45 µm syringe 필터(Pall Corporation)을 통해 필터링하여 항균활성 능력을 시험할 CFS를 준비하였음.



표 6. 원유에서 분리된 유산균 목록

순번	균주명	순번	균주명	순번	균주명	순번	균주명	순번	균주명
1	M18	26	M172	51	M279	76	M494	101	Y158
2	M19	27	M174	52	M282	77	M512	102	Y161
3	M20	28	M176	53	M284	78	M515	103	Y174
4	M37	29	M180	54	M291	79	M524	104	Y175
5	M52	30	M182	55	M325	80	M530	105	Y176
6	M76	31	M183	56	M326	81	M554	106	Y179
7	M77	32	M184	57	M328	82	M556	107	Y215
8	M78	33	M186	58	M329	83	M576		
9	M119	34	M187	59	M330	84	M591		
10	M130	35	M189	60	M341	85	M597		
11	M138	36	M190	61	M345	86	M598		
12	M139	37	M196	62	M349	87	M605		
13	M144	38	M197	63	M351	88	M611		
14	M149	39	M199	64	M355	89	M613		
15	M151	40	M200	65	M360	90	Y77		
16	M153	41	M204	66	M429	91	Y101		
17	M155	42	M225	67	M452	92	Y104		
18	M157	43	M227	68	M456	93	Y114		
19	M164	44	M232	69	M457	94	Y116		
20	M165	45	M234	70	M458	95	Y117		
21	M166	46	M244	71	M484	96	Y122		
22	M167	47	M245	72	M485	97	Y140		
23	M168	48	M255	73	M486	98	Y143		
24	M169	49	M264	74	M488	99	Y144		
25	M171	50	M277	75	M493	100	Y151		

2) Bacteriocin 활성 분석은 준비된 CFS를 사용하였음. *L. monocytogenes* ATCC7644는 tryptic soy agar(TSA; BD Difco)에 100  $\mu$ L spreading 하였음. 이후, 각 균주의 CFS 10  $\mu$ L을 그 위에 spotting을 하고 건조하고 배지를 37°C에서 24시간 동안 배양하고 억제환을 관찰하였음.

나. 항균활성 균주의 동정

1) M157 균주와 연구실에서 보유 중인 박테리옌 생성균주 LDTM6804에 대한 동정은 16S rRNA sequencing을 통해 확인하였음. 두 균주의 Genomic DNA는 제조사의 지시사항을 따라 QIAamp® PowerFecal® DNA Kit(QIAGEN, 독일)을 이용해 추출하였음. 이후, 16S rRNA 유전자는 27F, 1492R 와 785F, 805R 프라이머를 사용해 증폭하였으며, amplicon은 PCR cleaning 후에 sequencing을 위해 SolGent

---

Co. Ltd.(Korea)에 분석의뢰하였음. Sequence data는 MEGA X 소프트웨어를 사용해 정렬한 다음, NCBI와 EzTaxon을 이용한 BLAST 검색은 분리 균주의 유사성 확률을 확인하기 위해 사용되었음.

다. 우유 배지에서 생장 특성 평가

- 1) LDTM6804 균주의 생장 특성을 치즈 스타터인 R-704(Chr. Hansen, Denmark)와 *L. monocytogenes* 균주들과 비교 평가하였음. 네 개의 균주를 10% 탈지유 + 1.75% glucose 배지에서 배양하였음. 유산균과 *L. monocytogenes* 균주는 초기에 MRS와 tryptic soy broth(TSB; BD Difco)에서 각각 1차 배양하였으며 이후 배양액의 1%를 탈지유 배지에 접종 후 37°C에서 배양하였음. 배양액을 십진희석으로 연속 희산 한 다음, 각 희석액 100 µL을 MRS(유산균), Oxford agar(*Listeria*)에 분주한 후 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30시간마다 viable cell count를 측정하였음.
- 2) 실험 균주들의 우유 발효 패턴은 젖산 생산에 따른 pH 변화 관찰을 통해 확인하였음. 각 시점에서의 생산된 총 젖산량은 pH indicator인 phenolphthalein을 첨가하고, 0.1N NaOH로 적정을 하면서 endpoint에 도달할 때까지 소요된 양을 가지고 계산하여 적정산도(T.A, %)로 나타내었음.

라. LDTM6804 균주의 anti-listerial 활성 평가

- 1) 배양 시간에 따른 LDTM6804 균주 배양액 상등액을 가지고 5개 균주의 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 확인하였음. 지시균으로 이용된 균주의 혈청형 중에서 serotype 1/2a 는 listeriosis를 유발하는 대표적인 혈청형이며 serotype 4b 는 인간에게서의 listeriosis와 연관이 있었음. 상층액의 pH는 젖산에 의한 억제효과를 없애기 위해 pH 6.5-7.0으로 중화시킨 후 실험에 이용하였음. *L. monocytogenes* 균주들을 TSB에서 하룻밤 동안 배양하였고, TSA 배지 위에 *L. monocytogenes* 100 µL 분주해 lawn을 준비하였음. 그 위에 실험균주 배양액 상층액을 10 µL spotting 하였음. 이후 plate를 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 억제 구역의 존재 여부를 확인하였음.
- 2) 혼합배양 과정에서의 항균활성을 측정하기 위하여 LDTM6804 균주와 *L. monocytogenes* 균주를 1.75% glucose가 첨가된 10% 탈지유 배지에서 접종하여 배양 시간에 따른 두 균주의 생균수를 측정하였음. ATCC19115와 LDTM6804의 배양액 1%를 탈지유 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였음. 배양 후 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30시간에 시료를 채취하였으며. ATCC19115는 Oxford agar를 이용해 확인했고, LDTM6804는 MRS 배지를 이용하여 평판도말법으로 균수의 변화를 확인하였음.

마. 치주염 유발 균주에 대한 bacteriocin 활성

- 1) 치주염은 치아의 손실이나 다른 합병증을 유발하는 심각한 잇몸 질환임. 치주염을 일으키는 원인균으로는 *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 등이 있음. 이 실험에서는 선발된 유산균주들이 생산하는 박테리오신의 항균활성을 치주염 유발균주를 대상으로 실시하였음(표 7).

표 7. 치주염 유발 균과 배양 배지

치주염 유발 균주		Gram-reaction	배지 사용 정보	Source
<i>P. intermedia</i> KCTC15693T	PI	-	KOCM 제조 broth	KCTC
<i>F. nucleatum</i> KCTC2488T	FN	-	Wilkins broth	KCTC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> KCTC2581T	AA	-	Wilkins broth	KCTC

2) 우선 bacteriocin을 생산하는 균주들(M157, GH-24, LDTM6804)을 10% 탈지유 + 1.75% glucose 배지에 배양하였음. CFS는 앞에서 기술한 방법과 동일하게 준비하였고, 이를 타겟이 되는 지시균의 lawn 위에 spotting하였음. 서로 다른 유산균 균주의 2개 또는 3개의 CFS 조합에 의한 항균활성의 상승효과를 확인하기 위하여 표 8과 같은 방법으로 조합을 실시하였음. 준비된 배지는 24-48시간 동안 혐기성 조건에서 배양한 후 억제환의 여부를 관찰하였음.

표 8. 유산균 균주의 CFS 조합에 의한 항균활성 상승효과 확인을 위한 조합

Lactic Acid Bacteria	
Single-strain	M157
	GJ-24
	LDTM6804
Combination (2)	M157 + GJ-24
	M157 + LDTM6804
	GJ-24 + LDTM6804
Combination (3)	M157 + GJ-24 + LDTM6804

3) 유산균의 bacteriocin 생산에 대한 배양 배지의 효과는 MRS, 10% 탈지유 + 1.75% glucose 혼합 배지 및 변형된 유청 배지에서 bacteriocin 생산 균주를 키워 실험을 진행하였음. 변형 유청 배지는 알칼리성 단백질분해 효소를 처리한 후 약한 열처리를 통해 제조하였음. 그런 다음, bacteriocin 생산 유산균을 각 배지에서 37°C에서 12시간 동안 배양시킨 후 bacteriocin 활성을 앞에서 설명한 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC7644 및 치주염 유발 균주에 대해 확인하였음.

바. 상업용 nisin을 이용한 병원성 세균의 억제

1) Nisin은 유산균에서 생산되는 polycyclic 항균 펩타이드로 FDA 승인을 받은 GRAS (일반적으로 안전한 것으로 간주되는) 펩타이드임. Nisin은 임상 용도로 인정되었으며 질병 관련 그람 양성 및 그람 음성 병원체에 모두 항균 활성을 갖는 것으로 알려져 있음. 따라서 본 프로젝트에서 연구하고 있는 병원체에 대한 상업용 nisin의 항균활성을 알아보았음. Nisin(Sigma-Aldrich)은 50 IU/mL의 용액을 준비한 다음 40, 20, 10, 5, 4, 2 및 1 IU/mL로 희석하였음. 항균 활성 분석은 표 9에 나열된 대상균주들에 대해 앞에서 설명된 바와 같이 실험을 진행하였음.

표 9. 상업용 nisin을 이용한 병원균의 억제

Test Organisms		Nisin MIC (IU/μL)
<i>Periodontitis-causing bacteria</i>	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693 <sup>1</sup>	2.0
	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2488 <sup>1</sup>	1.0
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> KCTC2581 <sup>1</sup>	-
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> KCTC 5352	40.0
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064 <sup>1</sup>	2.0
	<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569	2.0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	1.0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	1.0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	1.0
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> PCFA 261	2.0
	<i>S. aureus</i> PCFA 263	1.0
	<i>S. aureus</i> PJFA 521	10.0
	<i>S. aureus</i> PJFH 522	10.0

사. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CAU2013 및 *Enterococcus faecalis* M157의 bacteriocin 항균 범위

- 1) Bacteriocin은 생성 박테리아와 연관성이 높은 분류군의 세균들을 억제하는 것으로 알려져 있음. 따라서 bacteriocin을 생산하는 유산균은 자신의 bacteriocin에 내성이 없는 다른 유산균을 억제할 가능성이 있음. 따라서 *L. lactis* subsp. *lactis* CAU2013과 *E. faecalis* M157의 bacteriocin 활성 범위를 평가할 필요가 있음. 실험에 사용된 균주 및 각각의 성장 조건은 표 10에 나열되었음. *L. lactis* CAU2013 및 *E. faecalis* M157의 CFS가 bacteriocin 공급원으로 사용되었음. Bacteriocin 활성 분석은 이전에 설명된 바와 같이 실험을 진행하였음.

표 10. *L. lactis* CAU2013과 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 항균 범위

Bacteriat Strain	Growth Conditions	CAU2013		M157	
		ZOI ± SD	Activity*	ZOI ± SD	Activity*
<b>Gram-Positive</b>					
<i>Lactococcus lactis</i> CAU2013	MRS, 37°C	-	-	14.50 ± 0.44	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> M157	MRS, 37°C	8.67 ± 0.58	++	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3018 <sup>†</sup>	MRS, 37°C	10.67 ± 0.58	+++	13.67 ± 0.54	+++
<i>L. salivarius</i> G124	MRS, 37°C	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i> 391	MRS, 37°C	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> 214	MRS, 37°C	10.67 ± 0.58	+++	10.33 ± 0.29	+++
<i>L. casei</i> MCL	MRS, 37°C	-	-	11.22 ± 0.19	+++
<i>L. casei</i> AFCC9029	MRS, 37°C	-	-	13.67 ± 0.17	+++
<i>L. paracasei</i> 2782	MRS, 37°C	-	-	13.78 ± 0.19	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	TSA, 37°C	7.17 ± 0.29	++	12.44 ± 0.51	+++
<i>List. monocytogenes</i> ATCC19114	TSA, 37°C	8.67 ± 0.76	++	13.44 ± 0.19	+++
<i>List. monocytogenes</i> ATCC19115	TSA, 37°C	10.67 ± 0.76	+++	12.78 ± 0.25	+++
<i>Streptococcus mutans</i> AFCC5356	BHI, 37°C	9.67 ± 0.58	++	8.59 ± 0.10	++
<i>Staphylococcus aureus</i> AFCC33591	LB, 30°C	-	-	7.94 ± 0.10	**
<i>S. aureus</i> RN6390	LB, 30°C	-	-	8.39 ± 0.70	**
<b>Gram-Negative</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	LB, 30°C	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1750 <sup>‡</sup>	LB, 30°C	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis YH5383	LB, 30°C	-	-	-	-
<i>Prevotella tatevedii</i> KCTC15695 <sup>§</sup>	BYC/Wilkins, 37°C	10.33 ± 0.58	+++	4.17 ± 0.29	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i> KCTC2488 <sup>§</sup>	BYC, 37°C	11.33 ± 0.58	+++	10.33 ± 0.29	+++
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> KCTC2581 <sup>§</sup>	BY, 37°C	-	-	-	-

<sup>†</sup>혐기성 챔버와 GasPak(BD Difco)을 사용하여 혐기적으로 배양.

<sup>‡</sup>LB - Luria-Bertani 배지

<sup>§</sup>BYC - BHI(Brain-Heart Infusion) 배지는 1% 효모 추출물, 0.1% L-시스테인, 5 µg/mL hemin 및 0.5µg/mL menadione으로 보충.

<sup>¶</sup>BY - BHI는 0.5% 효모 추출물로 보충.

\*활성은 ZOI의 직경을 기준으로 표현: (-) 억제 없음; (+) 0.1-5.0 mm; (++) 5.1-10.0 mm; (+++) 10.1-15.0 mm; (++++) ≥ 15.1 mm.

2) Bacteriocin의 활성은 각 생산 균주에 대해 추가로 실험을 진행하였음. 화학적으로 합성된 *E. faecalis* M157 bacteriocin과 상업용 nisin을 사용하여 각 bacteriocin의 MIC를 결정하였음. 상업용 nisin 및 화학적으로 합성된 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 초기 농도는 100 µg/mL이었고 bacteriocin 활성 분석을 위해 two-fold 연속 희석 방법으로 희석을 진행하였음.

[2차년도] 치주 염증 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립

1. *E. faecalis* M157의 성장과 Bacteriocin 생성

가. 유청 배지의 평가

1) 앞선 연구를 통해 유산균의 성장을 위한 유청배지의 최적화가 진행되었음. *E. faecalis* M157의 성장과 bacteriocin 생산을 위한 대체 배양 배지로서의 가능성에 대해 다양한 열처리 방법을 비교하였음. MRS 및 유청 배지를 사용하여 *E. faecalis* M157의 성장 및 bacteriocin 생산능력을 확인하였음. 이를 위해, *E. faecalis* M157은 MRS, 저온 살균 유청 및 단백질을 제거한 유청에서 12시간 및 24시간 동안 배양하였음. 배양 후, 생균수 및 bacteriocin 생산은 각각 평판도말법 및 spot-on-lawn 분석으로 확인하였음.

나. MRS에서 *E. faecalis* M157의 성장 패턴 및 bacteriocin 생산

1) Bacteriocin 생산에 대한 온도의 영향은 성장 동역학, 발효패턴 및 bacteriocin 생산 측면에서 MRS에서 조사되었음. 배양시간에 따른 생균수, pH 및 bacteriocin 생산을 측정하는 시점 실험을 수행하여 bacteriocin 활성이 검출되기 시작하는 배양시

간을 결정하고 이를 성장 단계 및 발효양상과 연관시켰음. 요약하면, *E. faecalis* M157의 0.1% 배양물을 MRS 배지에 접종하고 25°C 및 37°C에서 배양하였음. 성장, pH 및 bacteriocin 생산은 0에서 24시간까지 3시간마다 측정되었음. Bacteriocin 생산은 이전에 설명한 대로 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 통해 결정되었음.

다. 유청 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장 패턴 및 bacteriocin 생산

1) Bacteriocin 생산에 대한 온도의 영향은 유청 배지에서 추가로 조사되었음. 배양 시간에 따른 생균수, pH 및 bacteriocin 생산을 측정하는 시점 실험을 수행하여 bacteriocin 활성이 검출되기 시작하는 배양시간을 결정하고 이를 성장 단계 및 발효양상과 연관시켰음. 유청배지는 앞에서 설명한 방법으로 준비하였음. *E. faecalis* M157의 0.1% 배양물을 유청 배지에 접종하고 25°C 및 37°C에서 배양하였음. 성장, pH 및 bacteriocin 생산은 0에서 24시간까지 3시간마다 측정되었음. Bacteriocin 생산은 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn을 통해 결정되었음.

라. 유청배지에 질소원 공급원의 보충

1) 앞선 연구에서 *E. faecalis* M157의 더 높은 bacteriocin 생산을 위해서는 유청조성의 최적화가 필요함을 보여주었음. 여러 연구에서 bacteriocin 생산에 대한 질소 보충의 긍정적인 효과가 보고되었음. 이 연구에서 질소 공급원의 보충은 그림 1에 설명된 절차에 따라 1% tryptone 또는 soytone의 추가를 통해 이루어졌음. *E. faecalis* M157의 성장, pH 분석 및 bacteriocin 생산을 모니터링하고 MRS 및 유청 배지에서 얻은 결과들과 비교하였음.

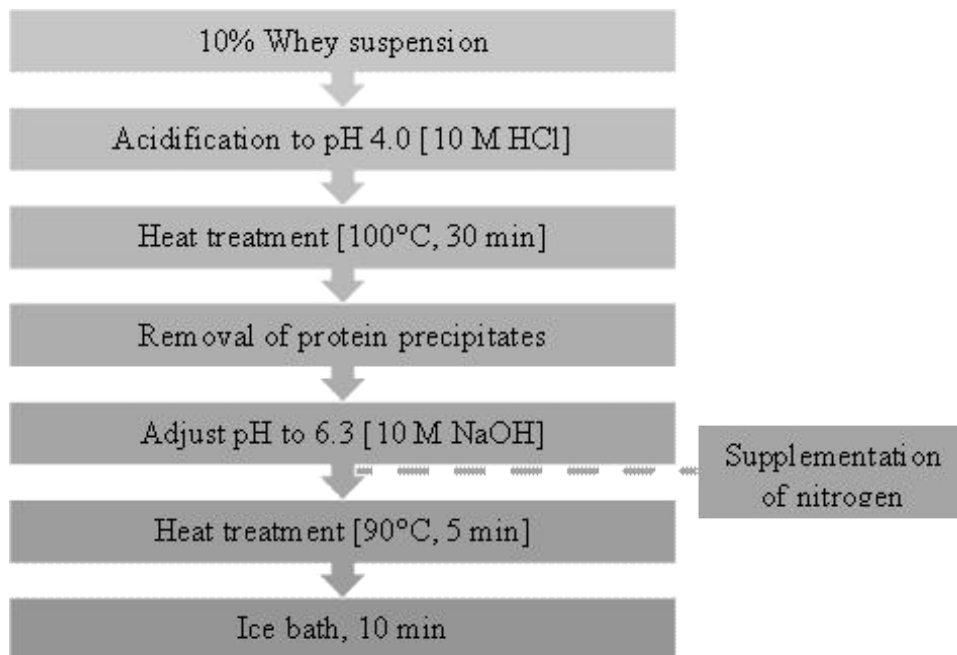


그림 1. Sabo et al.(2019) 방법의 유청 배지의 살균

## 2. M157 bacteriocin의 정제 및 특성 연구

가. 탈염(salting out) 기술을 통한 정제

1) M157 bacteriocin 정제에 대한 예비 실험으로 탈염 기술을 사용하여 진행하였음. 이 기술은 이온 강도가 높은 용액 중에서 어떤 분자의 용해도가 감소한다는 특성을

---

이용하는 기술임. 이 실험에서는 MRS 배지(25°C, 21-24 시간)에서 배양된 *E. faecalis* M157의 CFS를 준비하고, CFS의 pH는 1.0N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정하였음.

- 2) 이후, 2.5M 또는 5.0M NaCl을 첨가하여 CFS의 이온 강도를 증가시킴. 해당 농도의 염을 완전히 용해한 다음 10분간 방치하고 나서 혼합물을 20,000 ×g에서 90분 동안 원심분리를 진행하였음. 상층액을 제거하고 나서 얻어진 펠렛을 1× PBS (pH 7.0)에 재현탁하였음. 이 분획들의 활성은 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 통해 결정되었음.

#### 나. Cation-exchange chromatography를 이용한 정제

- 1) Cation-exchange chromatography(양이온 교환수지 크로마토그래피)는 일반적으로 중성 pH 조건에서 양전하를 띠고 있는 박테리오신을 정제하는 대표적인 chromatography의 한 형태임. 구체적으로, 양전하는 띠는 분자와 친화력이 높은 음전하는 띠 이온 교환 레진을 사용하였음. 본 실험에서는 CFS를 chromatography 레진에 직접 로딩하여 효과를 조사하였음. 황산 암모늄 침전 단계를 건너뛰면 분리 정제 시간을 크게 감소시킬 수 있었는데, 이는 박테리오신의 대규모 정제에서 큰 장점이 될 수 있을 것으로 판단됨.
- 2) 약 1 L의 MRS가 *E. faecalis* M157의 bacteriocin 정제에 사용되었음. CFS는 이전에 설명된 바와 같이 제조되었고, CFS의 pH는 1.0N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정되었음. 초기 실험을 위해 CFS를 10 column 부피의 로딩 완충액(10 mM 인산칼륨 완충액, pH 7.0)으로 평형화된 양이온 교환 수지 (SP Sepharose® Fast Flow, Sigma-Aldrich, USA)에 직접 적용하고 20 mM NaCl이 포함된 3 column 부피의 로딩 완충액으로 세척하였음. 로딩 조건은 대략 1.75-2.0 mL/min 유속으로 설정된 진공 펌프를 사용하여 확인했으며 또 다른 조건에서는 중력을 통해 자유 로딩하였음.
- 3) 컬럼에 결합된 시료는 NaCl (0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M) 순으로 농도를 증가시키며 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)을 사용하며 용출시켰음. 이후 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 이용하여 각 분획의 bacteriocin 활성을 평가하였음. 또한, chromatography 후 bacteriocin과 그 용출 패턴을 보기 위해 Tris-tricine SDS-PAGE를 진행하였음.
- 4) Stacking gel은 4% acrylamide, intermediate gel은 10% acrylamide, resolving gel은 15% acrylamide를 사용하여 겔을 제조함. 샘플을 로딩 버퍼(1:1,v/v)와 혼합하고 로딩 전에 10분 동안 100°C로 가열하였음. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD Laboratories, USA)을 사이즈 마커(10-250 kDa)로 사용하였음. 전기영동은 PowerPac300 전기영동 챔버(BIO-RAD Laboratories, USA)에서 120 V, 80-90분 동안 진행하였음. 그 후, 겔을 Coomassie blue 염색액 (0.025%, w/v Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad)); 10%, v/v 아세트산; 45%, 메탄올; 45%, v/v 증류수)에 1시간 동안 처리하였음. 이후 겔을 탈색액 (10% v/v 아세트산; 45%, v/v 메탄올, 45%, v/v 증류수)에 3시간 동안 넣어 탈색을 진행하였음. 탈색된 겔을 증류수에 담그고 밤새 부드럽게 흔들면서(40 rpm) washig 하였음.

#### 다. M157 bacteriocin의 대규모 정제

- 1) Bacteriocin 정제를 통한 bacteriocin 생산을 위해 더 많은 양의 배양액을 가지고 분리 정제를 실시하였음. Bacteriocin의 초기 농도를 증가시킴으로써 양이온 교환수
-

---

지의 용량이 최대로 활용될 수 있고 따라서 더 높은 최종 분리 수율로 이어질 것임. 정제할 bacteriocin의 초기 농도를 높이기 위해 *E. faecalis* M157 균주를 더 많은 부피(2 L 및 3 L)의 배지에 접종하여 배양하였음. 발효 후 CFS는 앞에서 설명된 방법으로 준비하였음.

- 2) 이후, 4°C에서 70%까지 황산암모늄을 서서히 첨가하여 침전을 진행하였음. 혼합물을 교반하고(150 rpm) 4°C에 overnight 하였음. 그 후, 단백질 침전물을 원심분리(13,000 rpm, 1시간30분, 4°C)시켰음. 단백질 펠렛은 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)에 재현탁하고 3.0 kDa membrane tube(SpectraPor, Repligen)를 사용하여 잔류 황산염을 추가로 제거하였음. 투석은 4°C 150 rpm에 교반하며 진행되었음. 3시간마다 투석용 버퍼를 새로운 것으로 3회 교체하였음.
- 3) 투석된 샘플을 수집한 뒤 이전에 설명된 바와 같이 미리 평형 시킨 Cation-exchange column에 로딩하였음. 앞서 설명한 방법으로 NaCl 농도(0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M)를 증가시키면서 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)을 사용하여 용출을 진행하였음. 모든 분획은 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 bacteriocin 활성에 대해 테스트를 진행하였음.

라. Cation-exchange 및 hydrophobic interaction chromatography의 정제 수율 비교

- 1) Cation-exchange 과 HIC를 비교하는 정제과정은 그림 2에 나타내었음. 먼저 MRS에 밤새 키운 M157의 1%를 접종하고 이전에 설명한 바와 같이 배양을 진행하였음. 이후 원심분리를 통해 세포를 제거한 뒤 열처리하여 CFS를 제조하였음. 황산암모늄 침전을 이전과 같이 실험하고 이후 수집하였음.
  - 2) Cation-exchange chromatography의 경우 이전과 같은 실험 방법을 이용하였으며, HIC를 위해 Poly-Prep® chromatography columns(BIO-RAD Laboratories, USA)에 phenyl-Sepharose 6 Fast Flow column(Sigma-Aldrich, Sweden)을 충전한 다음, 컬럼 부피의 10배 용량에 해당하는 로딩 버퍼(20 mM 인산나트륨 완충액, pH 7.0, 40% 황산암모늄)로 레진의 평형을 잡아주고, 단백질 침전물의 재현탁액을 컬럼에 넣어주고, 컬럼 부피의 3배 용량의 로딩 버퍼로 washig 하였음. 수지에 결합된 박테리오신은 황산 암모늄 농도 40%로부터 10%씩 감소되는 농포를 포함하는 pH 7.0 인산나트륨 완충액을 이용하여 단계적으로 용출시킴. 활성 분획은 실온에서 40-60분 동안 5,000 ×g에서 3.0 kDa Amicon® 필터(Merck Millipore, Ireland)를 사용하여 탈염을 진행하였으며, 탈염된 bacteriocin을 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)에 재현탁시켰음. 그런 다음, 각 정제 단계 후 bacteriocin 활성을 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 진행하여 측정하였음. Tris-tricine SDS-PAGE를 진행하여 두 가지 chromatography에서 M157 박테리오신의 순도 및 용출 패턴을 확인하였음.
-



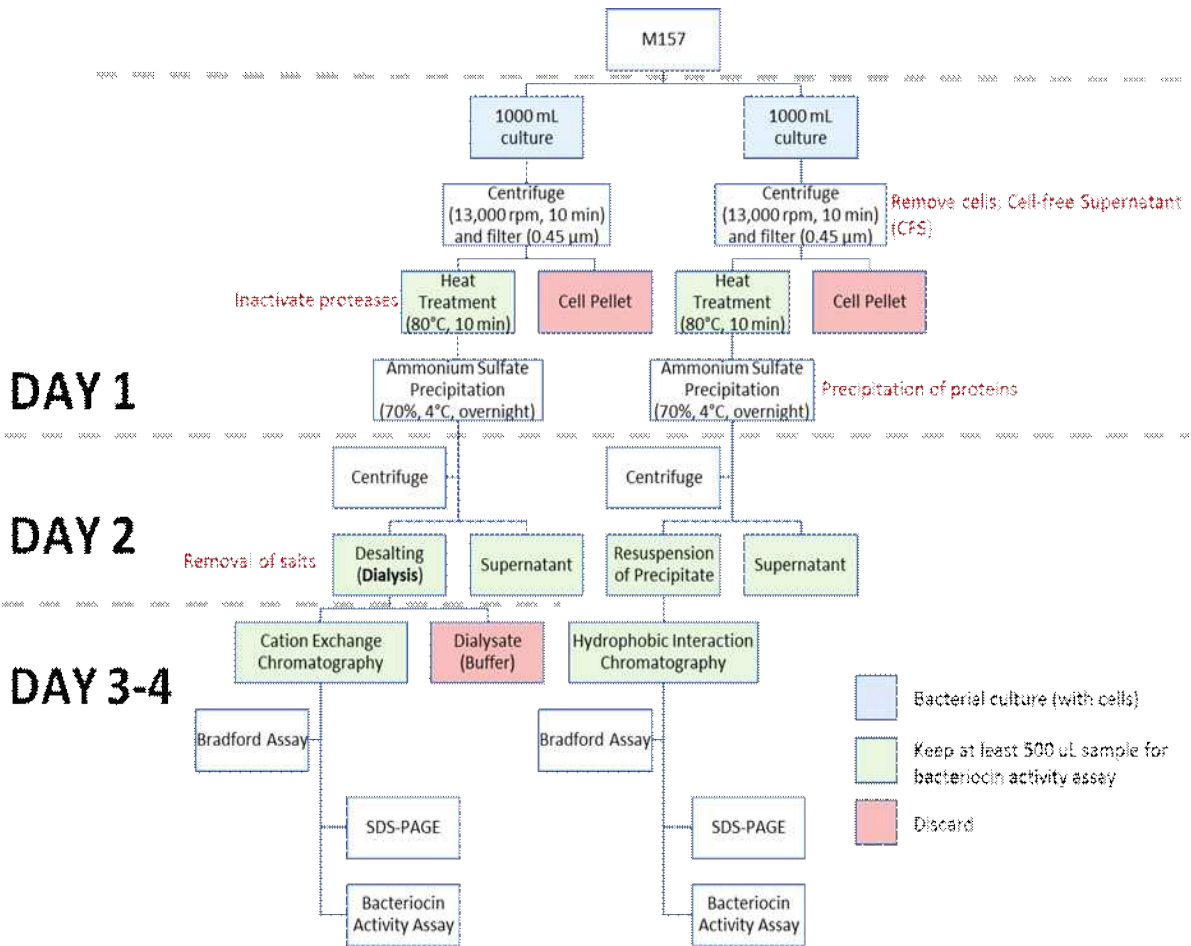


그림 2. M157 bacteriocin의 정제 과정 개략도

마. 최적화된 조건에서 M157 bacteriocin의 분리 정제

- 1) *E. faecalis* M157의 bacteriocin은 hydrophobic interaction과 cation-exchange chromatography를 결합한 최적화된 실험 방법을 사용하여 정제되었음. 또한, chromatography 레진의 과부하를 줄이기 위해 더 적은 부피의 샘플을 초기 물질 (100 mL MRS)로 사용하였음.
- 2) Crude CFS는 25°C에서 21시간 동안 배양된 *E. faecalis* M157 100 mL + 0.05% L-cysteine으로 준비되었음. 활성 상층액을 80°C에서 10분 동안 열처리하여 protease 활성과 내열성이 약한 단백질들을 불활성화하였음. 그 다음, 황산암모늄 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 70% 포화도까지 점진적으로 첨가하여 황산암모늄 침전을 실행하고, 4°C를 유지하면서 150 rpm으로 밤새 교반시켰음. 단백질 침전물을 원심분리 (20,000 ×g, 30분, 4°C)를 통해 수집하고 생성된 펠릿을 20 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0, 30%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)에 재현탁하였음.
- 3) Hydrophobic interaction chromatography(HIC)를 위해 준비된 시료를 컬럼 부피의 10배에 해당하는 로딩 완충액(20 mM 인산나트륨 완충액, pH 7.0, 30% 황산암모늄)으로 미리 평형화된 HIC 레진에 로딩하고 3 column 부피의 로딩 완충액으로 세척을 진행하였음. Bacteriocin은 황산암모늄(30%, 20%, 15%, 10%, 5% 및 0%)로 pH 7.0 인산나트륨 완충액의 점진적으로 용출되었음. 활성 분획은 실온에서 40-60분 동안 5,000 ×g에서 3.0 kDa Amicon® 필터(Merck Millipore, Ireland)를 사용하여 탈염되었음. 탈염된 bacteriocin을 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)에 재현탁시켰음.

---

4) 위에서 부분 정제된 박테리오신을 cation-exchange chromatography에 추가로 적용하였음. 컬럼 부피의 10배에 해당하는 로딩 완충액(10 mM 인산칼륨 완충액, pH 7.0)으로 미리 평형화시킨 레진에 시료 2 mL를 로딩한 다음, 3 column 부피의 로딩 완충액으로 20 mM NaCl로 세척하였음. 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)에서 NaCl (200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1,000 mM)의 농도를 증가시켜 bacteriocin을 단계적으로 용출하였음.

5) HIC 및 cation-exchange chromatography 후에 Tris-tricine SDS-PAGE를 수행하여 bacteriocin의 용출 패턴을 확인하고 상대적 순도를 확인하였음. 또 다른 젤은 활성 염색(active staining) 분석을 실시하였음. 먼저 젤을 탈색 완충액에 고정 후 증류수로 1시간 동안 3회 세척함. 젤을 멸균 페트리 접시로 옮기고 0.1%(v/v) *L. monocytogenes* ATCC19115가 접종된 0.75% TSA로 덮고 밤새 배양을 진행하였음.

6) Bacteriocin 밴드에 해당하는 곳에서 지시균을 억제하는 양상이 나타났음. Bacteriocin 활성(AU/mL)을 결정하기 위해 각 정제 단계 후에 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 연속 2배 희석하여 진행하였음.

바. *L. monocytogenes*의 성장 속도에 대한 M157 bacteriocin의 효과

1) Crude CFS를 사용하여 *L. monocytogenes* ATCC19111, ATCC19114 및 ATCC19115의 성장에 대한 M157 bacteriocin의 효과를 확인하였음. BHI에 overnight한 *L. monocytogenes* 균주를 사용하여  $10^8$  CFU/mL로 조정된 후 crude CFS와 1:1 비율로 혼합한 다음, 150  $\mu$ L을 멸균된 96-well plate에 분액하였음. BHI의 *L. monocytogenes* 및 멸균 BHI + CFS(1:1)는 각각 positive 및 blank 대조군으로 사용되었음. Plate를 37°C에 배양하고 10시간 동안 매 시간마다 Spectramax190 microplate reader(Molecular Devices, California, USA)를 사용하여 박테리아 성장을 600 nm의 흡광도(O.D.)에서 확인하였음.

사. 치주염 유발균의 억제

1) 예비 실험을 통해 치주 질환을 유발하는 병원체의 성장을 억제하는 bacteriocin의 능력을 확인하였음. 이 실험에서는 M157 균주가 생산하는 bacteriocin의 활성을 화학적으로 합성된 bacteriocin 및 상업용 nisin 및 구강용 살균제인 chlorhexidine gluconate CHG)와 비교하였음.

아. Bacteriocin의 단백질성 특성의 확인

1) Bacteriocin은 protease의 작용에 민감한 항균활성 펩타이드임. Protease K와 같은 protease를 사용한 효소 처리는 대부분의 항균성 펩타이드를 불활성화시킬 것임. 본 연구에서는 생합성 및 화학적으로 합성된 M157 bacteriocin을 protease K와 pepsin으로 효소 처리하여 활성을 잃는지에 대한 여부를 확인하였음.

2) 두 세트의 bacteriocin 샘플을 준비하였고, 그중 하나는 pH 7.0, 다른 하나는 pH 2.0의 조건에서 실험을 진행하였음. Protease K 및 pepsin(5.0 mg/mL) 처리는 37°C에서 30분 동안 진행되었음. 잔류 bacteriocin 활성을 측정하기 전에 100°C에서 5분간 열처리하여 효소 활성을 제거시켰음.

자. M157 bacteriocin의 안정성 및 특성 연구

1) Bacteriocin의 잠재적인 적용을 평가하려면 특정 효소 및 detergent의 존재뿐만 아니라 다양한 온도 및 pH 조건에서의 안정성도 중요한 특성이 될 수 있음. CFS는 다음 효소(5 mg/mL)로 처리되었음: Protease K, pepsin, lipase,  $\alpha$ -amylase, cellulase, trypsin-EDTA, catalase(Sigma-Aldrich-Aldrich). 모든 실험 조건은 37°C

---

---

water bath에서 2시간 동안 배양되었음. 효소의 활성은 잔류 bacteriocin 활성을 확인하기 전에 100°C에서 5분 동안 열처리하여 불활성화시켰음.

- 2) 다양한 detergent가 bacteriocin의 활성에 미치는 영향을 조사하였음. 요약하자면, 1%(v/v)의 detergent( $\beta$ -mercaptoethanol, urea, Triton X-100, Tween 80, Tween 20, SDS, EDTA)를 부분정제된 bacteriocin과 혼합하고 37°C에서 2시간 동안 유지한 다음 잔류 bacteriocin 활성을 평가하였음.
- 3) 다양한 온도에서 bacteriocin의 안정성을 결정하기 위해 CFS를 -80°C, -20°C, 4°C, 37°C, 60°C, 80°C 및 100°C에서는 30분 동안 실험을 진행하였고, 멸균 조건으로는 121°C에 15분 동안 처리한 다음 잔여 bacteriocin 활성을 평가하였음.
- 4) 3 N NaOH 또는 3 N HCl을 사용하여 pH 2-10 (1 pH 단위)에서 부분적으로 정제된 bacteriocin의 pH를 조정하여 그 효과를 확인하기 위하여 처리된 시료를 37°C에서 2시간 동안 배양하였음. 배양 후, 잔류 bacteriocin의 활성을 확인하기 전에 3 N NaOH 또는 3 N HCl을 사용하여 pH를 7.0으로 중화시켰음.
- 5) 잔류 항균 활성은 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 사용하여 확인하였으며 처리되지 않은 CFS를 대조군으로 사용하였음. 모든 분석은 3번 반복하였음. 억제환 크기의 차이가 대조군의 표준 편차(S.D.) 값의 3배 이상인 경우 bacteriocin 활성이 감소된 것으로 간주하였음.

#### 차. M157 bacteriocin과 항생제의 상승 작용

- 1) M157 bacteriocin은 광범위한 범위를 나타내며 치주염을 유발하는 *S. aureus* 균주 및 여러 병원성 세균을 억제하였음. 본 연구에서는 bacteriocin과 항생제의 시너지 효과를 조사하였음. Bacteriocin과 항생제는 10  $\mu$ g/mL의 최종 농도로 사용하였고, 1:1(v/v) 비율로 혼합하였음. 활성을 이전에 설명한 바와 같이 spot-on-lawn 분석으로 확인하였음.

#### 카. M157 bacteriocin의 생물막(biofilm) 형성 억제능

- 1) 이 실험에서는 미리 형성된 생물막을 파괴하는 M157 bacteriocin의 능력을 확인하였음. 초기에 10<sup>8</sup> CFU/mL의 *L. monocytogenes* 또는 *S. mutans*를 96-well plate에 37°C에서 24시간 동안 배양하여 적절한 탄수화물(*Listeria*의 경우 0.5% glucose, *Streptococcus*의 경우 0.2%의 sucrose)이 보충된 BHI 배지 조건에서 생물막을 형성하였음. 그런 다음 미리 형성된 생물막을 37°C에서 24시간 및 48시간 동안 박테리옌이 포함된 CFS로 처리하여 생물막 파괴 능력을 확인하였음. BHI 배지는 blank로 사용되었음.
- 2) 생물막의 측정은 다음과 같이 수행되었음. 우선, 배양이 완료된 배지 상층액을 버린 후 5분 동안 100  $\mu$ L의 메탄올을 첨가하여 생물막을 고정하였음. 그런 다음, well을 1× PBS(pH 7.0)로 부드럽게 씻은 뒤 약 20분 동안 공기 건조시켰음. 이후 well을 0.5% crystal violet으로 20분 동안 염색하였음. 염색약을 따라 버린 후 PBS 완충액으로 세척하였음. 생물막에 흡착된 염색약을 150  $\mu$ L 30% 아세트산으로 추출한 뒤 10분 동안 그대로 두었음. 그런 다음 추출액 125  $\mu$ L를 멸균된 96-well plate에 옮긴 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였음.

### 3. *E. faecalis* M157의 whole genome sequencing

#### 가. *E. faecalis* M157 균주의 유전체 서열 분석

- 1) *E. faecalis* M157의 전체 genome은 제조업체의 지침에 따라 QIAamp® PowerFecal® DNA Kit(QIAGEN, Germany)를 사용하여 추출하였음. 균주 M157의

---

genome DNA를 ChunLab(한국)으로 보내고 20 kb SMRTbell™ 서식 라이브러리가 있는 Pacific Biosciences(PacBio, USA) RSII SMRT(Single Molecule Real-Time) 플랫폼을 사용하여 시퀀싱하였음. PacBio 판독값은 PacBio SMAR Analysis 버전 2.3.0 프로그램 사용하여 de novo로 조립되었음.

#### 나. Bacteriocin 유전자 분석

- 1) 검출된 bacteriocin 유전자 집단에 대한 심층 분석을 수행하여 bacteriocin의 핵심 펩타이드를 코딩하는 두 개의 open-reading frame를 확인하였음. 추가로, 박테리 오신에 대한 자체 면역 및 수송 단백질은 또한 core 펩타이드의 downstream에서 검출되었음. Core 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하고 BLAST를 사용하여 데이터 베이스의 기존 염기서열과 비교하였음.
- 2) 박테리 오신 아미노산 서열을 기반으로 I-TASSER 서버(미시간 대학 전산 의학 및 생물 정보학과)를 사용하여 펩타이드 3차 구조를 예측하였음.
- 3) 또한, ProtScale 온라인 소프트웨어(<https://web.expasy.org/protscale/>)를 사용하여 펩타이드의 소수성을 측정하였음.

#### 다. 독성 인자 및 항균제 내성 유전자의 결정

- 1) *E. faecalis* M157의 잠재적인 프로바이오틱스 후보균주로서의 안전성과 적용 가능성을 예측하기 위해 Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)과 PathogenFinder 1.1, ResFinder 4.0, Resistance Gene Identifier 5.2.0(RGI)을 이용하여 전반적인 병원성과 항생제 내성 유전자의 존재를 각각 예측하였음. *E. faecalis* M157의 병독성 인자는 병원성 세균 데이터베이스의 병독성 인자 (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Database)에서 BLAST를 사용하여 검색하였음.

### [3차년도] 치주염 억제 소재 확보를 위한 바이오컨버전 기술 최적화

#### 1. 유청 배지의 최적화

##### 가. 유청의 살균

- 1) 유청 배지는 80℃에서 1분간의 열처리를 통한 살균 후 즉시 얼음에 넣어 냉각하였음. 그러나 이러한 방법은 모든 오염세균, 특히 세균 포자를 불활성화하기에는 충분하지 않은 것으로 여겨짐. 따라서 다른 열처리 조건에 따른 유청배지의 살균 효과를 평가할 필요가 있음. 10% 유청배지에 대한 열처리를 위한 온도와 시간의 조합은 표 11에 나열되어 있음. 다양한 온도와 처리 시간의 조합을 갖는 1단계 및 2 단계 열처리는 조건이 생존 가능한 세포와 박테리아 내세포자를 불활성화시키는 효과에 대해 평가하였음. 열처리된 유청 배지를 37℃에서 밤새 배양하여 박테리아 생장 여부를 관찰하였음. 희석되지 않은 시료를 nutrient agar 또는 luria-bertani (LB, BD Difco) agar에 도말하였음. 배양 후 고체 배지 표면에서 미생물 균락이 관찰되면 열처리 조건에서 생존하는 미생물로 간주하였음.

표 11. 유청 배지 살균을 위한 열처리 조건

처리	용량
90°C, 1 min	5 mL
90°C, 5 min	5 mL
70°C, 1 min; 80°C, 5 min	5 mL
70°C, 1 min; 80°C, 5 min	500 mL

나. 유청 배지 오염균주의 동정

- 오염 세균은 그람 염색을 위해 LB agar에서 순수분리하였음. 순수분리된 균주는 nutrient agar slant에 도말하여 3-7 일 동안 장기 배양을 통해 내생포자 형성을 유도하였음. 그 후, 다음과 같이 내생포자 염색을 수행함. 먼저, agar 배지 경사면에 증식한 세균을 깨끗한 유리 슬라이드에 도말을 준비하였음. 도말을 공기 건조하고 열로 고정한 다음 7.6% 말라카이트 그린으로 10분 동안 염색하였음. 도말을 증류수로 세척하고 safranin을 15초 동안 첨가하여 대조염색을 적용함. 슬라이드를 세척하고 건조한 후 현미경으로 관찰하였음.

다. 유청 배지의 최적화

- 대량 배양을 위하여 유청배지의 살균 조건 최적화가 필요하게 되었으며, 이를 위해 Sabo et al.(2019)의 방법이 연구에서 채택되었음(그림 3).

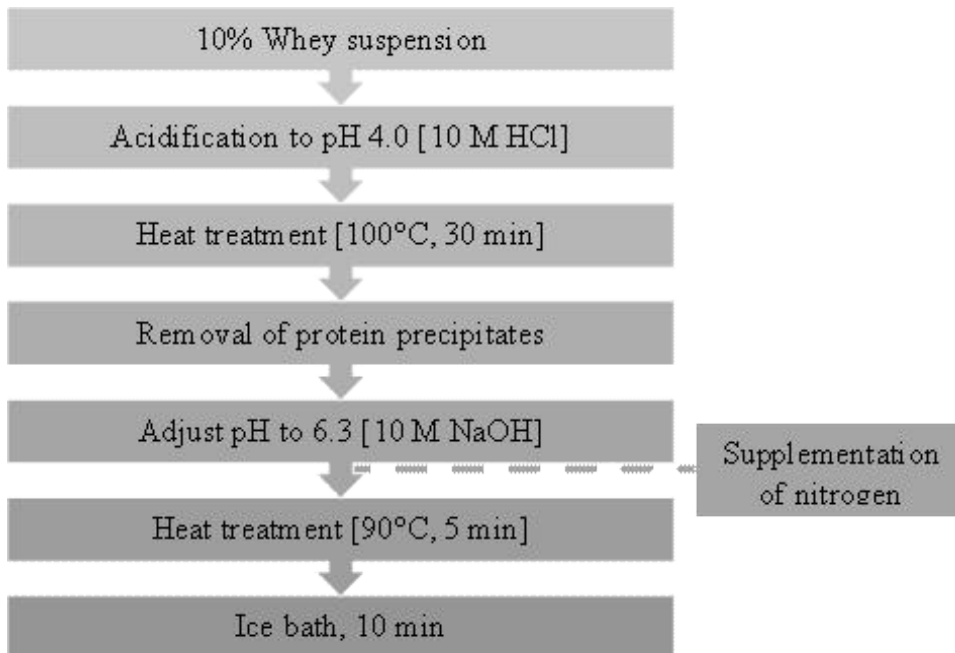


그림 3. Sabo et al.(2019)의 방법의 유청 배지의 살균

라. 변형된 유청배지에서 *E. faecalis* M157의 발효 패턴 분석

- 위의 방법으로 준비된 유청 배지에 1% tryptone 또는 soytone을 첨가하고 유산균의 성장에 미치는 효과를 평가하였음. 이 실험을 수행하기 위해 활성화 시킨 *E. faecalis* M157의 배양액 0.1%를 준비된 유청 배지에 접종하고 37°C와 25°C에서

배양하였음. 배양시간별(0시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 15시간, 18시간, 21시간 및 24시간)로 시료를 채취하여 pH 미터(Peak Instruments, USA)를 사용하여 배양 시간에 따른 pH의 변화 측정하였음.

- 2) 유청 배지는 미네랄, 특히 MRS 배지에 포함되어있는 황산마그네슘/황산망간의 보충을 통해 더욱 최적화되었음. 유청배지는 앞에서 기술한 방법으로 준비하여 최종 열처리 전에 soytone 및 황산마그네슘/황산망간을 첨가하였음. 그런 다음 0.1% M157을 변형된 유청 배지에 접종하고 37°C에서 배양함. 세포 농도와 pH를 3시간 마다 24시간 동안 관찰하였음.

마. 유청 농도가 bacteriocin 생산에 미치는 영향

- 1) *E. faecalis* M157의 성장과 bacteriocin 생산을 위한 최적의 유청 분말 농도를 결정하기 위해 앞서 설명한 방법으로 다양한 농도의 유청 배지(5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, w/v)를 준비하였음. 그런 다음, *E. faecalis* M157의 1.0% 배양액을 유청 배지에 접종하고 25°C에서 21-24시간 동안 배양함. 배양 후 최종 생균수는 MRS agar에 도말하여 측정하였음. pH는 pH 미터를 사용하여 측정됨. Bacteriocin 활성은 이전에 설명된 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석으로 결정되었음.

바. Aeration의 영향

- 1) *E. faecalis* M157은 산소가 있든 없든 성장할 수 있는 일종의 통성 혐기성 세균임. 이 실험에서는 *E. faecalis* M157의 bacteriocin 생산 및 성장 분석에 대한 aeration 이 미치는 영향을 조사하였음. 다양한 배양 조건을 표 12에 나열된 대로 실험을 진행하였음. 균을 25°C에서 21-30시간 동안 배양시켰음. 세포 농도는 MRS 한천에 도말하여 측정하고 pH는 pH 측정기를 사용하여 측정하였음. Bacteriocin 활성은 이전에 기술된 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석으로 결정되었음.

표 12. *E. faecalis* M157 배양 조건

균의 배양 조건	배양 조건
50 mL (limited aeration)	25°C, 21 h
	25°C, 30 h
20 mL (w/o shaking)	25°C, 21 h
	25°C, 30 h
20 mL (w/ shaking, 120 rpm)	25°C, 21 h
	25°C, 30 h

사. 균주의 접종량이 bacteriocin 생산에 미치는 영향

- 1) 배양된 균의 bacteriocin 생산에 대한 초기 접종 농도의 영향을 조사하였음. 초기 접종량을 늘리면 더 빠른 bacteriocin 생산을 촉진할 수 있는 인자와 대사산물이 도입될 수 있음. 여러 연구에서 nisin의 발현이 배지에 존재하는 페로몬에 의해 촉진된다는 점을 지적함. 이를 확인하기 위하여, *E. faecalis* CAU M157의 배양된 균의 1% 및 5% 농도로 유청 배지에 접종하고 25°C에서 21-30시간 동안 배양시켰음. 21시간 및 30시간 배양 후 세포 농도, pH 및 bacteriocin 활성(AU/mL)을 측정하였음.

## 2. 유청의 대규모 발효

### 가. 10% 유청 배지의 발효

- 1) 분무 건조를 통한 생리 활성 유청 분말을 제조하기 위하여 용량을 키워 발효를 진행하였음. 10% 유청을 총 20 L 준비했으며 *E. faecalis* M157과 *L. lactis* subsp. *lactis* CAU2013을 사용하여 발효를 진행하였음. 유청은 5,000 mL 증류수에 500 g씩 4개로 나누어 준비하였음. 열처리는 80°C까지 1분간 가열한 후 즉시 얼음에 10분간 담가두었음. 준비된 유청배지에 두 균주 중 하나를 접종하고 표 13에 나열된 대로 배양하였음. 배양완료 후에 시료는 혼합(A+D, B+C)한 다음 분무 건조하여 두 종류의 생리활성 유청분말을 제조하였음.

표 13. 유청 배지의 발효와 배양 조건

	유청배지	접종 균주	접종량	배양 조건
A	10% 유청(5 L)	<i>L. lactis</i> CAU2013	50 mL	37°C, 24 h
B	10% 유청(5 L)	<i>E. faecalis</i> M157	50 mL	37°C, 24 h
C	10% 유청(5 L)	<i>E. faecalis</i> M157	50 mL	37°C, 24 h
D	10% 유청(5 L)	<i>E. faecalis</i> M157	50 mL	25°C, 48 h

- 2) 각 처리구에서 약 3-5 mL의 샘플을 수집해 생균수, pH 및 bacteriocin 활성을 측정하였음. MRS 배지에 희석된 샘플( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ )을 도말하여 생균수를 확인하고 희석되지 않은 샘플의 pH를 측정하였음. 이후, 발효 유청의 bacteriocin 활성을 *L. monocytogenes* ATCC19115, *S. aureus* RN6390 및 bacteriocin 생성 균주들에 대해 평가하였음.

- 3) 발효된 유청을 원심분리(13,000 rpm, 10분, 4°C)하여 세균과 기타 불순물을 제거하였음. 이후 얻어진 상층액을 0.45 µm 필터를 통해 여과했고 1× PBS(pH 7.0)에 two-fold 방법으로 희석함. CFS를 대상 지시균의 lawn 위에 spotting(10 µL)하였음.

### 나. 발효유청 분무건조물의 제조

- 1) 발효된 유청은 한국식품연구원에 있는 아래의 분무건조기를 이용하여 분무건조를 실시하였음(그림 4).



▲ 대형 분무건조기



▲ 분무 건조 조건

그림 4. 발효유청분말 제조에 이용된 분무건조기 및 분무건조 조건

- 2) 분무건조기의 세부 사항은 아래와 같음.

- 제조사명: 화창기연

- model: SSSD-1
- Apply: 380V\_3Φ\_15KW
- spray method: atomizer disk type
- 온도설정범위: 250℃ 이하
- 수분증발량: 2-3 kg/hr(Max. 5 kg/hr)

다. 분무 건조한 발효 유청의 생균수 및 bacteriocin 활성

1) 분무 건조 처리 후, 살아남은 생균수와 bacteriocin 활성을 확인하였음. 먼저, 유청 분말은 1× PBS(pH 7.0)을 사용해 10% 환원유 형태로 만들었음. 농도를 맞춘 샘플을 1× PBS(pH 7.0)에 추가로 희석하고 100 μL를 MRS 및 Bile Esculin 배지에 도말 한 뒤 생균수를 계수하였음. 그리고 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 spot-on-lawn 분석을 통해 분무 건조 후 잔류 bacteriocin 활성을 평가하였음.

라. 단백질 분해 활성 측정

1) 단백질 분해는 효소, 특히 protease의 활성을 통해 단백질 또는 펩타이드를 해당 아미노산으로 분해하는 것임. 이 실험은 발효유청에서 단백질 분해 활성에 의한 박테리오신의 안정성을 평가하기 위해 수행되었음. 서로 다른 접종량 및 저장 시간을 표 19에 나타낸 바와 같이 평가하였음. 배양 발효 후, 원심분리(13,000 rpm, 10분, 4℃) 및 필터 멸균(0.45 μm)을 통해 불필요한 세포를 제거한 후 CFS를 제조하였음. Bacteriocin 활성은 앞에서 설명한 바와 같은 방법으로 확인하였음. 이후, 처리구 시료는 열처리(80℃, 10분)를 진행하였고 대조구는 열처리를 진행하지 않았음. 각각의 시료는 25℃에서 24-48시간 동안 보관하였음. 이후 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 bacteriocin 활성을 측정하였음.

마. 12.5% 유청 배지의 발효

- 1) 12.5% 유청 배지(증류수 4,000 mL에 500 g)를 사용하여 변형된 2단계 열처리를 통해 유청배지를 분비하였음. 1차 열처리는 80℃에서 1분 동안 처리한 후 ice bath에서 10분간 냉각하였음. 2차 열처리는 90℃에서 5분 동안 처리함. *E. faecalis* M157은 총 16 L의 유청 배지(4 L 4 회분)를 발효시키는 데 사용됨. 준비된 유청 배지에 1%(v/v)의 *E. faecalis* M157 overnight culture를 접종하여 25℃에서 30시간 동안 배양하였음.
- 2) 발효된 유청은 각각 8 L의 두 회분으로 나누었음. 하나는 화학적으로 합성된 bacteriocin(약 3,200 AU/mL)을 추가하였으며, 이에 따라 “Bioactive”로 설계했고, 다른 하나는 “M157”로 설계해 보충하지 않았음. 배양완료된 시료를 열처리후에 냉각하고 bacteriocin 추가 후 샘플을 수집하여 각 단계에서 bacteriocin 활성과 생균수를 확인하였음. 그 이후 앞에서 진행한 것과 동일한 방법으로 분무 건조를 실시하였음(그림 5).

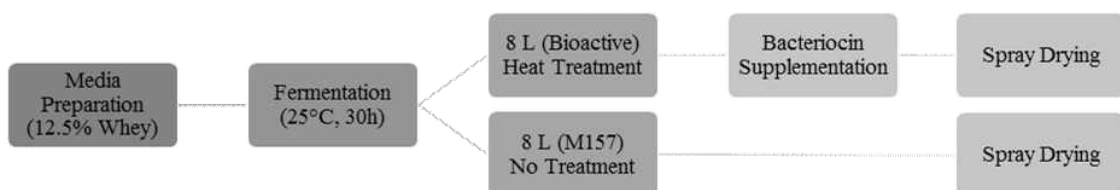


그림 5. 12.5% 유청 배지의 발효 과정 개략도

3) 분무 건조된 시료에 대하여 잔류 bacteriocin의 활성을 확인하였음. 간략하게 설명



하자면, 1.0 g의 분말 샘플(Bioactive 및 M157)을 10 mL 멸균 1× PBS 완충액 (pH 7.0)에 재현탁하여 환원유처럼 만들어서 실험을 진행하였음. 환원유를 원심분리 (13,000 rpm, 10분, 4°C)한 후 여과 (0.45 μm)하여 bacteriocin 활성을 위한 시료를 준비하였음. Two-fold 희석 spot-on-lawn assay를 사용하여 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 항균활성을 측정하였음.

- 4) Bioactive 및 M157 샘플(각각 10 mL)의 분취량과 보충 전 열처리된 샘플도 동결 건조시켰음. 생성된 분말을 2.5 mL 멸균 1× PBS 완충액(pH 7.0)에 재현탁하였음. Bacteriocin 활성은 위에 설명된 바와 같이 확인하였음. 분무 건조 및 동결 건조된 샘플의 경우 bacteriocin 활성도 AU/g으로 나타냈으며, 총 활성(AU)을 재현탁 전 고형물의 중량(g)으로 나누어 계산하였음.

#### 바. 분무 건조 유형의 저장 안정성

- 1) 분무 건조 유형의 저장 안정성에 대해 평가하였음. 적절한 보관 조건의 확립은 시료의 생리 활성을 적절히 유지하는 데 아주 중요함. Bacteriocin의 경우 -20°C에서 보관하면 억제 활성을 연장하는 데 도움이 될 수 있음. 튜브 당 1.0 g 함유된 분무 건조된 샘플 (Bioactive 및 M157)을 실온(25°C) 및 냉장온도(4°C)에서 보관하고 잔류 활성을 5주 동안 매주 확인하였음. Bacteriocin 활성은 이전에 설명한 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대해 확인되었음.

### <제3협동연구기관 숙명여자대학교>

#### [1차년도] 동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증

##### 1. 마우스 구입 및 사육환경

- 가. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위하여 5 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 (주)오리엔트바이오로부터 구입하여 실험에 사용하였음.
- 나. 사육은 개체의 그룹 간 체중 차이가 최소화되도록 군 분리를 실시한 후, 한 케이지당 3-4 마리씩 숙명여대 실험 동물실에서 사육하였음. 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20-23°C, 습도 40-60%로 유지하였음.

##### 2. 젖산균 및 바이오컨버전 산물 제조 및 비만 유도

###### 가. 시험 균액의 제조

- 1) 10% whey 또는 10% skim milk : whey 분말과 skim milk 분말을 10%의 농도가 되도록 phosphate buffer solution(PBS, pH 7.4; NaCl 8.0 g, NaHPO<sub>4</sub> 1.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, KCl 0.2 g/distilled water 1L)에 녹여 80°C에서 1분간 살균하여 준비하였음.
- 2) 제 1협동으로부터 받은 분리균주 *Pediococcus pentosaceus* KI13, *Weissella cibaria* KI35, *Lactobacillus plantarum* KI134, *Enterococcus faecalis* M37을 각각 10 mL의 MRS broth(Becton Dickinson, NJ, USA)에서 37°C, 24시간 호기 배양한 후, 다시 새로운 10 mL의 MRS broth에 같은 조건으로 배양하였음. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 15분, 4°C)하여 동량의 PBS로 2회 세척하고 98°C에서 10분간 사균화 과정을 거쳤음. 10% whey 또는 10% skim milk에 10배 희석하여 이를 시험균액으로 사용하였음.
- 3) 제 1협동에서 제조한 바이오컨버전 산물을 전달받아 1,500 mg/kg이 되도록 PBS에 균질화하여 사용하였음.

나. 실험동물의 사육 조건

1) 1 주간의 순화기간과 4 주간의 비만 유도기간 후 마우스에게 PBS, 사균, 바이오컨버전 산물을 2 일 간격으로 총 10 주 동안 200  $\mu$ L씩 경구투여 하였음. 일반식이군(normal fat diet, NF)과, 고지방식이군(high fat diet, HF)으로 나누어 사육하였음. 일반식이의 경우, 10% fat 실험동물용 사료(DK Bio, Korea)를 공급하였고, 고지방식이의 경우, 비알콜성 비만 유도를 위하여 60% fat 실험동물용 사료(DK Bio)를 공급하였으며 짝집은 주 1회 교체하였음(표 14).

표 14. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증 실험 그룹

군	식이	투여 물질	n
Non-treated	일반식이	PBS	5
NF-KI13W		Whey+KI13*	4
NF-KI35W		Whey+KI35*	4
Control	고지방식이	PBS	8
HF-whey		Whey+PBS	8
HF-KI13W		Whey+KI13*	8
HF-KI35W		Whey+KI35*	8
HF-KI13B		KI13 바이오컨버전 산물**	8
HF-KI35B		KI35 바이오컨버전 산물**	8
NF-M37S	일반식이	Skim milk+M37*	4
NF-KI134S		Skim milk+KI134*	4
HF-skim milk	고지방식이	Skim milk+PBS	8
HF-M37S		Skim milk+M37*	8
HF-KI134S		Skim milk+KI134*	8
HF-M37B		M37 바이오컨버전 산물**	8
HF-KI134B		KI134 바이오컨버전 산물**	8

\*KI13, KI35, M37, KI134 군주 : 사균화하여 사용함

\*\*바이오컨버전 산물 : 1,500 mg/kg

3. 체중 및 식이섭취량, 체중 증가율 측정

체중과 식이섭취량은 일주일에 1회 일정한 시간에 측정하였음.

4. 마우스 부검 및 지표 분석

가. 경구 투여 종료 다음 날 부검을 실시하였음. 혈액 채취 및 장기(대장, 소장, 맹장, 간, 부고환 지방, 측복부 지방, 비장, 신장)를 적출하였음. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 효과를 판단하기 위해 간, 부고환 지방, 측복부 지방은 무게를 측정하였음.

나. 바이오컨버전 산물 투여를 통한 비만 억제 효과 확인 및 관련 매커니즘 규명을 위하여 전사체 분석을 실시하였음.

1) 간, 부고환 지방 조직에서 RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 mRNA를 추출하였음.

- 2) Quantitect Reverse Transcription kit(Qiagen)를 이용하여 cDNA를 합성하였음.  
 3) 표 15의 프라이머를 이용하여 cDNA로 RT-PCR을 진행하여 Ct 값을 구하였고  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 을 계산하여 분석하였음.

표 15. 비만 및 염증 관련 유전자 염기서열

Primer		Sequence (5'-3')	Reference
β-actin	F	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	Zhang et al., 2012
	R	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA	
FAS	F	TCTGGGCCAACCTCATTGGT	Ritze et al., 2014
	R	GAAGCTGGGGGTCCATTGTG	
SREBP-1c	F	AGCAGCCCCTAGAACAAACAC	Ji et al., 2019
	R	CAGCAGTCAGTCTGCCTTGAT	
PPAR-γ	F	GCTTCCACTATGGAGTTCATGCT	Ronis et al., 2013
	R	CCGGCAGTTAAGATCACACCTAT	
CPT-2	F	GCCTGCTGTTGCGTGACTION	Yoo et al., 2013
	R	TGGTGGGTACGATGCTGTGC	
IL-6	F	CCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC	Song et al., 2012
	R	ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCC	
MCP-1	F	GACCCGTAAATCTGAAGCTAA	Tesch et al., 2015
	R	CACACTGGTCACTCCTACAGAA	
Leptin	F	TCTCCGAGACCTCCTCCATCT	Chen et al., 2002
	R	TTCCAGGACGCCATCCAG	
FIAF	F	GTTTGCAGACTCAGCTCAAGC	Mandard et al., 2004
	R	CCAAGAGGTCTATCTGGCTCTG	

다. 바이오컨버전 산물 투여를 통한 비만 억제 효과 확인 및 관련 매커니즘 규명을 위하여 단백질 발현량 분석을 실시하였음.

- 1) 간 조직과 부고환 지방 조직에서 Pro Prep protein extraction solution(Intron Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)을 이용하여 단백질을 추출하였고 DC Protein assay(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량한 후, 단백질 농도를 계산하였음.
- 2) 추출한 단백질 20 μg과 표 16의 1차 항체를 이용하여 western blot을 진행한 후 LAS-3000 Imager(Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 band를 확인하였고 GelQuant software v.2.7.(DNR Imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel)을 사용하여 band의 크기와 진하기를 정량하여 β-actin을 기준으로 단백질 발현량을 확인하였음.

표 16. 비만 및 염증 관련 1차 항체 정보

Antibody	Concentration	Size (kDa)	Cat No.	Clonal type
$\beta$ -actin	1:1,000	43	sc-81178(Santa Cruz)	Mouse monoclonal
IL-6	1:300	20	sc-57315(Santa Cruz)	

### 5. 혈액 분석

혈액 채취 후 serum sep clot activator tube(Becton Dickinson)에 넣고 상온에서 30분 -1시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10분, 4°C)하여 혈청을 얻어 이를 Korea Pathology Technical Center(KPNT, Cheong-Ju, Korea)에 혈액 분석을 의뢰하였음.

### 6. 조직병리학적 분석

간과 지방조직에서 비만으로 인한 염증 발생 유무 확인을 위해 swiss roll 방법을 이용하여 조직병리 분석을 실시하였음. 조직병리학적 검사를 위한 검체는 간과 부고환 지방 조직을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경(Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였음.

### 7. 장내균총 분석

바이오컨버전 산물 투여로 인한 장내균총의 군집 변화 확인을 위해 맹장에서 분변을 채취하여 메타지노믹스 분석을 실시하였음.

## [2차년도] 동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능성 검증

### 1. 마우스 구입 및 사육환경

- 가. 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능성 검증을 위하여 6 주령의 수컷 wistar 랫드를 (주)오리엔트바이오로부터 구입하여 실험에 사용하였음.
- 나. 사육은 개체의 그룹 간 체중 차이가 최소화되도록 군 분리를 실시한 후, 한 케이지당 2 마리씩 숙명여대 동물실험실에서 사육하였음. 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20-23°C, 습도 40-60%로 유지하였음. 1 주간 동물실험실 환경에 적응시킨 후, 구강 미생물을 제어하기 위해 2 일간 항생제 식수((1 mg/mL sulfamethoxazole(Sigma), 200  $\mu$ L/mL trimethoprim(Sigma-Aldrich))와 1 일간 일반 식수를 공급하였고, 깔집은 주 1회 교체하였음.

### 2. 치주염 유발 및 시료 투여

- 가. 정상균을 제외한 모든 균의 랫드는 zoletile(1 mg/mL)(Virbac, France)과 rompun (Bayer, Germany)[4:1(v/v)]을 1 mL/kg으로 복강 내 주사하여 마취시킨 후 우측 하악 제 1 대구치에 멸균된 봉합사로 결찰하여 치주염을 유발하였음.
- 나. 시료는 제 1, 2협동에서 제조한 *E. faecalis* M157, *L. lactis* CAU2013 바이오컨버전 산물을 전달받았음. 바이오컨버전 산물을 1,500 mg/10 mL/kg의 농도가 되도록 PBS로 현탁하여 경구 투여 시료로 사용하였음(표 17).
- 다. 1 주간 적응기간과 2 일간 항생제 식수 제공 기간 후 7 주령의 랫드에 치주염을 유발하였고 2 주 후 PBS와 바이오컨버전 산물을 1 일 간격으로 총 8 주 동안 10

mL/kg의 용량으로 경구에 투여하였고, 500 µL를 걸찰된 우측 하악 제 1 대구치에 도포하였음.

표 17. 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능성 검증 실험 그룹

군	치주염 유발	투여 물질	n
Non-treated	정상군	PBS	8
Control	치주염 유발	PBS	8
M157		M157로 제조한 바이오컨버전 산물*	8
M157+CAU2013		M157, CAU2013으로 제조한 바이오컨버전 산물	8

\* 바이오컨버전 산물 : 1,500 mg/10 mL/kg

### 3. 랫드 부검 및 지표 분석

- 가. 경구 투여 종료 다음 날 희생 및 부검을 실시하였음. 혈액 채취 및 장기(치주 조직, 대장, 소장, 맹장, 간, 비장, 신장)를 적출하였음.
- 나. 바이오컨버전 산물 경구 투여와 도포가 랫드에 미치는 영향을 판단하기 위해 경구 투여 기간 동안 1 주에 한 번 체중을 측정하였고, 부검 시 간, 비장, 신장의 무게를 측정하였고, 소장 및 대장의 길이를 측정하였음.

### 4. 혈액 분석

혈액 채취 후 serum sep clot activator tube(Becton Dickinson)에 넣고 상온에서 30분-1시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10분, 4℃)하여 혈청을 얻어 이를 KPNT에 혈액 분석을 의뢰하였음.

### 5. 분변 분석

- 가. 경구 투여 1 주차 및 8 주차에 분변을 채취하여 분변 내 구강유해균(*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*)을 정량하기 위해 분변 분석을 실시하였음.
- 나. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*을 wilkins-charlgren anaerobe broth에 배양하고, 십진 희석하여 농도별 균액을 준비한 후 DNA를 추출하였음. 표 18의 프라이머를 사용하여 RT-PCR 진행을 통해 Ct 수치를 구하여 농도별 균액과 Ct 수치의 표준곡선을 준비하였음.
- 다. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 분변 내 DNA를 추출하였고 표 18의 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 통해 DNA의 Ct 수치를 표준곡선에 적용하여 균 수로 변환하여 정량하였음.

표 18. 구강유해균 프라이머 정보

구강유해균	프라이머 정보		출처
<i>P. gingivalis</i>	F	ACCTTACCCGGGATTGAAATG	Pan et al., 2017
	R	CAACCATGCAGCACCTACATAGAA	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F	AGACCCAATGCAAAAAGTAACG	Soleimani et al., 2013
	R	GCAGTTCTGGGCTGAATTG	
<i>F. nucleatum</i>	F	ACCTAAGGGAGAAACAGAACCA	Park, 2013
	R	CCTGCCTTTAATTCATCTCCAT	

## 6. Micro-computed tomography(micro-CT) 분석

- 가. 치주 조직에서 치주염으로 인한 골 소실을 확인하기 위해 micro-CT 분석을 실시하였음.
- 나. Micro-CT 분석을 위해 치주 조직을 10% 중성 포르말린으로 고정시킨 후 치조골 소실 부피를 측정하기 위해 Quantum FX micro-CT scanner(Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 2차원 평면 영상을 측정하였고 CTAn software(Skyscan, Aartselaar, Belgium)를 사용하여 치주 조직의 총 부피 당 골 부피, 골 부피 당 표면적, 골 소실 부피 등을 분석하였음.

## 7. 조직병리학적 분석

- 가. 치주 조직에서 치주염으로 인한 염증 발생 유무 확인을 위해 Mecklenburg et al.(2013)을 참고하여 조직병리학적 분석을 실시하였음.
- 나. 검체는 치주 조직을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였음.

## 8. 전사체 분석

- 가. 바이오컨버전 산물 투여로 인한 치주 조직 및 대장 조직의 염증, 산화적 스트레스의 억제를 확인하기 위해 전사체 분석을 실시하였음.
- 나. 치주 조직과 대장 조직에서 RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 mRNA를 추출하였고, Quantitect Reverse Transcription Kit(Qiagen)을 이용하여 cDNA를 합성하였음.
- 다. 표 19의 프라이머를 이용하여 cDNA로 RT-PCR을 진행하여 Ct 수치를 구하였고  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법으로 계산하였음.

표 19. 염증 및 산화적 스트레스 유전자 염기서열

프라이머	염기서열		출처	
β-actin	F	AAGTCCCTCACCCCTCCCAAAG	Peinnequin et al., 2004	
	R	AAGCAATGCTGTACCTTCCC		
TNF-α	F	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC		
	R	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC		
IL-1β	F	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG		
	R	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC		
IL-6	F	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC		
	R	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC		
IL-10	F	GCCCAGAAATCAAGGAGCATT		Fang et al., 2017
	R	CAGCTGTATCCAGAGGGTCTTCA		
SOD1	F	CATTCCATCATTGGCCGTACTION		
	R	CCACCTTTGCCCAAGTCATC		
GPx1	F	GCGCTGGTCTCGTCCATT		
	R	TGGTGAAACCGCCTTTCTTT		
CAT	F	GTACAGGCCGGCTCTCACA		
	R	ACCCGTGCTTTACAGGTTAGCT		
SOD2	F	TGGACAAACCTGAGCCCTAA	Strobel et al., 2011	
	R	GACCCAAAGTCACGCTTGATA		

### 9. 단백질 발현량 분석

- 가. 바이오컨버전 산물 투여로 인한 치주 조직 및 대장 조직의 염증, 산화적 스트레스의 억제 효과를 확인하기 위해 단백질 발현량 분석을 실시하였음.
- 나. 치주 조직과 대장 조직에서 Pro Prep protein extraction solution을 이용하여 단백질을 추출하였고, DC Protein assay를 이용하여 정량한 후, 단백질 농도를 계산하였음.
- 다. 추출한 단백질 17 µg과 표 20의 1차 항체를 이용하여 western blot을 진행한 후 LAS-3000 Imager을 이용하여 band를 확인하였고 GelQuant software v.2.7.을 사용하여 band의 크기와 진하기를 정량하여 β-actin을 기준으로 단백질 발현량을 확인하였음.

표 20. 염증 및 산화적 스트레스 관련 1차 항체 정보

Antibody	Concentration	Size (kDa)	Cat No. (Manufacturer)	Clonal type
β-actin	1:1,000	43	sc-81178(Santa Cruz)	Mouse monoclonal
TNF-α	1:300	26	sc-52746(Santa Cruz)	
IL-6	1:300	20	sc-57315(Santa Cruz)	
IL-10	1:300	20	sc-365858(Santa Cruz)	
GPx-1	1:300	23	sc-133160(Santa Cruz)	
SOD1	1:300	18-23	sc-101523(Santa Cruz)	

## 10. 장내균총 분석

바이오컨버전 산물 투여로 인한 장내균총의 군집 변화 확인을 위해 맹장에서 분변을 채취하여 메타지노믹스 분석을 실시하였음.

### [3차년도] 동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 비만·치주염 억제 원인 유효성분 규명

#### <동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 원인 유효성분 규명>

##### 1. 마우스 구입 및 사육환경

- 가. 바이오컨버전 산물 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위하여 5 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 (주)오리엔트바이오로부터 구입하여 실험에 사용하였음.
- 나. 사육은 개체의 그룹 간 체중 차이가 최소화되도록 군 분리를 실시한 후, 한 케이지당 3-4 마리씩 숙명여대 실험 동물실에서 사육하였음. 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20-23℃, 습도 40-60%로 유지하였음.

##### 2. 비만 유도 및 유효성분 투여

- 가. 1 주간의 순화기간과 4 주간의 비만유도기간 후 마우스에게 유효성분을 2일 간격으로 총 10 주 동안 200 μL씩 경구투여 하였음. 일반식이의 경우, 10% fat 실험동물용 사료(DK Bio, Korea)를 공급하였고, 고지방식이의 경우, 비알콜성 비만 유도를 위하여 60% fat 실험동물용 사료(DK Bio)를 공급하였으며 깔집은 주 1회 교체하였음.
- 나. 추출물에서 기능성을 나타내는 유효성분으로는 저분자 크기에 해당하는 유기산 및 당과 중분자 크기에 해당하는 펩타이드가 주로 알려져있음. 1차년도에 비만 억제 효과가 확인된 *P. pentosaceus* KI13 바이오컨버전 산물, *W. cibaria* KI35 바이오컨버전 산물에서의 비만 억제 유효성분을 저분자(1kDa 미만), 저분자+중분자(1kDa 미만 +1-3 kDa 또는 3-5 kDa), 중분자(1-3 kDa 또는 3-5 kDa) 크기 별로 추출하여 경구투여를 통해 비만 억제 기능성을 확인하였음(표 21-표 22).
  - 1) 펩타이드 추정 유효성분 : 제 1협동으로부터 받은 펩타이드 추정 유효성분을 1,500 mg/kg이 되도록 PBS에 현탁하여 사용하였음.
  - 2) 유기산 및 당 추정 유효성분: 제 1협동으로부터 받은 유기산 및 당 추정 유효성분을 1,500 mg/kg이 되도록 PBS에 현탁하여 사용하였음.



표 21. 비만 억제 효능 검증 실험 그룹-① 펩타이드 추정 유효성분

군	비만유도	투여물질	n
Non-treated	정상	PBS	9
Control	비만유도	PBS	9
KI13P		KI13 유효성분 1-3 kDa*	9
KI35P		KI35 유효성분 3-5 kDa*	9

\* 펩타이드 추정

표 22. 비만 억제 효능 검증 실험 그룹-② 유기산 및 당 추정 유효성분

군	식이	투여물질	n
Non-treated	일반식이	PBS	9
Control	고지방식이	PBS	9
KI13A		KI13 유효성분 1 kDa 미만*	9
KI13B		KI13 유효성분 1 kDa 미만:KI13 유효성분 1-3 kDa**=1:1	9
KI35A		KI35 유효성분 1 kDa 미만*	9
KI35B		KI35 유효성분 1 kDa 미만:KI35 유효성분 3-5 kDa**=1:1	9

\*유기산 및 당 추정

\*\*펩타이드 추정

### 3. 체중 및 식이섭취량, 체중 증가율 측정

체중과 식이섭취량은 일주일에 1회씩 일정시간에 측정하였음.

### 4. 마우스 부검 및 지표 분석

경구 투여 종료 다음 날 부검을 실시하였음. 혈액 채취 및 장기(대장, 소장, 맹장, 간, 부고환 지방, 측복부 지방, 비장, 신장)를 적출하였음. 유효성분의 비만 억제 효과를 판단하기 위해 간, 부고환 지방, 측복부 지방 무게를 측정하였음.

### 5. 혈액 분석

혈액 채취 후 serum sep clot activator tube(Becton, Dickinson and Company, USA)에 넣고 상온에서 30분-1시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10분, 4℃)하여 혈청을 얻어 이를 KPNT에 혈액 분석을 의뢰하였음.

### 6. 조직병리학적 분석

간과 지방조직에서 비만으로 인한 염증 발생유무 확인을 위해 swiss roll 방법을 이용하여 조직병리분석을 실시하였음. 조직병리학적 검사를 위한 검체는 간과 부고환 지방 조직을 식정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였음.

## 7. 단백질 발현량 분석

- 가. 유효성분 투여로 인한 간, 부고환 지방의 염증 및 비만 억제를 확인하기 위해 단백질 발현량 분석을 실시하였음.
- 나. 간 조직과 부고환 지방 조직에서 Pro Prep protein extraction solution을 이용하여 단백질을 추출하였고 DC Protein assay를 이용하여 정량한 후, 단백질 농도를 계산하였음.
- 다. 추출한 단백질 17 µg과 표 23의 1차 항체를 이용하여 western blot을 진행한 후 LAS-3000 Imager을 이용하여 band를 확인하였고 GelQuant software v.2.7.을 사용하여 band의 크기와 진하기를 정량하여 β-actin을 기준으로 단백질 발현량을 확인하였음.

표 23. 염증 및 비만 관련 1차 항체 정보

Antibody	Concentration	Size (kDa)	Cat No. (Manufacturer)	Clonal type
β-actin	1:1,000	43	sc-81178(Santa Cruz)	Mouse monoclonal
TNF-α	1:300	26	sc-52746(Santa Cruz)	
IL-6	1:300	20	sc-57315(Santa Cruz)	
COX-2	1:500	70-72	sc-376861(Santa Cruz)	
SREBP-1	1:300	125	sc-13551(Santa Cruz)	
PPAR-γ	1:500	54/57	sc-7273(Santa Cruz)	
IL-1β	1:300	31	sc-12742(Santa Cruz)	Hamster monoclonal

### <동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 치주염 억제 원인 유효성분 규명>

#### 1. 실험동물 및 사육조건

- 가. 바이오컨버전 산물 유효성분의 치주염 억제 기능성 검증을 위하여 6 주령의 수컷 wistar 랫드를 (주)오리엔트바이오로부터 구입하여 실험에 사용하였음.
- 나. 사육은 개체의 그룹 간 체중 차이가 최소화되도록 군 분리를 실시한 후, 한 케이지당 2 마리씩 숙명여대 동물실험실에서 사육하였음. 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20-23℃, 습도 40-60%로 유지하였음. 1 주간 동물실험실 환경에 적응시킨 후, 구강 미생물을 제어하기 위해 2 일간 항생제 식수((1 mg/mL sulfamethoxazole(Sigma-Aldrich), 200 µL/mL trimethoprim(Sigma-Aldrich))와 1 일간 일반 식수를 공급하였고, 깔집은 주 1회 교체하였음.

#### 2. 치주염 유발 및 시료 투여

- 가. 정상군을 제외한 모든 군의 랫드는 zoletile(1 mg/mL)(Virbac, France)과 rompun (Bayer, Germany)[4:1(v/v)]을 1 mL/kg으로 복강 내 주사하여 마취시킨 후 우측 하악 제 1 대구치에 멸균된 봉합사로 결찰하여 치주염을 유발하였음.
- 나. 시료는 주관연구기관으로부터 제공받은 유청(whey), 제 1, 2협동에서 제조한 *E. faecalis* M157 바이오컨버전 산물(M157), 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물(M157+)을 제공받아 사용하였음. 각각의 시료를 1,500 mg/10 mL/kg의 농도가 되도록 PBS로 현탁하여 경구 투여 시료로 사용하였음(표 24).

다. 1 주간 적응기간과 2 일간 항생제 식수 제공 기간 후 7 주령의 랫드에 치주염을 유발하였고, 2 주 후 PBS와 바이오컨버전 산물을 1 일 간격으로 총 8 주 동안 10 mL/kg의 용량으로 경구에 투여하였고, 500  $\mu$ L를 걸찰된 우측 하악 제 1 대구치에 도포하였음.

**표 24. 박테리오신 추정 유효성분의 치주염 억제 기능성 검증 실험 그룹**

군	치주염 유발	투여 물질	n
Non-treated	정상군	PBS	8
Control	치주염 유발	PBS	8
Whey		Whey	8
M157		M157로 제조한 바이오컨버전 산물*	8
M157+		박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물	8

\* 바이오컨버전 산물 : 1,500 mg/10 mL/kg

### 3. 랫드 부검 및 지표 분석

- 가. 경구 투여 종료 다음 날 희생 및 부검을 실시하였음. 혈액 채취 및 장기(치주 조직, 대장, 소장, 맹장, 간, 비장, 신장)를 적출하였음.
- 나. 바이오컨버전 산물 경구 투여와 도포가 랫드에 미치는 영향을 판단하기 위해 경구 투여 기간 동안 1주에 한 번 체중을 측정하였고, 부검 시 간, 비장, 신장의 무게를 측정하였고, 소장 및 대장의 길이를 측정하였음.

### 4. Micro-CT 분석

- 가. 치주 조직에서 치주염으로 인한 골 소실을 확인하기 위해 micro-CT 분석을 실시하였음.
- 나. Micro-CT 분석을 위해 치주 조직을 10% 중성 포르말린으로 고정시킨 후 치조골 소실 부피를 측정하기 위해 Quantum FX micro-CT scanner를 이용하여 2차원 평면 영상을 측정하였고, CTAn software를 사용하여 치주 조직의 총 부피 당 골 부피, 골 부피 당 표면적, 골 소실 부피 등을 분석하였음.

### 5. 조직병리학적 분석

- 가. 치주 조직에서 치주염으로 인한 염증 발생 유무 확인을 위해 Mecklenburg et al. (2013)을 참고하여 조직병리학적 분석을 실시하였음.
- 나. 검체는 치주 조직을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경을 이용하여 조직 병리학적 변화를 관찰하였음.

### 6. 단백질 발현량 분석

- 가. 유효성분 투여로 인한 치주 조직 및 대장 조직의 염증 및 산화적 스트레스 억제 효과를 확인하기 위해 단백질 발현량 분석을 실시하였음.
- 나. 치주 조직과 대장 조직에서 Pro Prep protein extraction solution을 이용하여 단백질을 추출하였고, DC Protein assay를 이용하여 정량한 후, 단백질 농도를 계산하였음.

다. 추출한 단백질 17 µg과 표 25의 1차 항체를 이용하여 western blot을 진행한 후 LAS-3000 Imager을 이용하여 band를 확인하였고 GelQuant software v.2.7.을 사용하여 band의 크기와 진하기를 정량하여 β-actin을 기준으로 단백질 발현량을 확인하였음.

표 25. 염증 및 산화적 스트레스 관련 1차 항체 정보

Antibody	Concentration	Size (kDa)	Cat No. (Manufacturer)	Clonal type
β-actin	1:1,000	43	sc-81178(Santa Cruz)	Mouse monoclonal
TNF-α	1:300	26	sc-52746(Santa Cruz)	
IL-6	1:300	20	sc-57315(Santa Cruz)	
IL-10	1:300	20	sc-365858(Santa Cruz)	
CAT	1:1,000	64	sc-271803(Santa Cruz)	
GPx-1	1:300	23	sc-133160(Santa Cruz)	
SOD1	1:300	18-23	sc-101523(Santa Cruz)	

<제4협동연구기관 동국대학교>

[1차년도] 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능 탐색 및 비만 억제 조건 규명

1. 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포의 사멸 및 분화

가. 지방전구세포의 사멸 분석

1) 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포(3T3-L1)의 사멸 여부를 MTT 분석법에 의해 확인함.

나. 지방전구세포의 분화 억제 분석

1) 지방전구세포(3T3-L1)에 바이오컨버전 산물을 처리한 후 중성지방 형성 여부를 Oil Red O 염색법과 Triglyceride의 생성량을 측정하였음.

2. 지방전구세포의 사멸 및 분화와 관련된 유전자 발현 조절

가. 지방전구세포의 사멸 및 증식 조절 분석

1) 지방전구세포의 사멸과 증식과 관련된 유전자 변화를 RT-PCR을 통해 확인하였음.

[2차년도] 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능 탐색 및 치주염 억제 조건 규명

1. 바이오컨버전 산물에 의한 치주염 관련 염증매개인자의 발현 조절 연구

가. 대식세포에서 염증성 사이토카인 및 케모카인 발현 억제 분석

1) 대식세포(RAW264.7)에 *Porphyromonas gingivalis* LPS에 의해 증가된 IL-1β, IL-6, TNF-α, NO 등의 염증매개인자를 바이오컨버전 산물에 의해 억제되는지 유전자와 단백질 레벨에서 확인하였음.

2. 바이오컨버전 산물에 의한 항치주염 최적 조건 연구

가. 항치주염 효과를 가지는 바이오컨버전 산물의 최적 농도 및 처리시간 연구

1) *P. gingivalis* LPS에 의해 증가된 IL-1β, IL-6, TNF-α, NO 억제의 바이오컨버전 산물의 최적 농도와 시간을 유전자와 단백질 레벨에서 확인하였음.

2) 치주인대세포(Periodontal ligament cells)에서 *P. gingivalis* LPS에 의해 유도된 염

---

증대개인자 억제에 바이오컨버전 산물의 최적 농도와 시간을 유전자와 단백질 레벨에서 확인하였음.

### [3차년도] 바이오컨버전 산물의 비만 개선 및 항치주염과 관련된 세포 내 신호전달물질 기전 규명

#### 1. 지방전구세포 분화 억제와 관련된 세포 내 신호전달기전 연구

가. 지방전구세포의 분화와 관련된 전사인자와 비만 관련 호르몬 억제 분석

- 1) 분화 전기, 후기 전사인자 PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , SREBP-1c의 발현 억제와 호르몬 resistin, leptin, aP2, LPL을 유전자와 단백질 레벨에서 확인하였음.
- 2) 특정 전사인자와 관련된 비만 관련 호르몬의 조절을 통한 기전 규명하고자 함.

#### 2. 항치주염 관련 세포 내 신호전달기전 연구

가. 염증반응과 관련된 신호전달물질 및 전사인자 억제 분석

- 1) 염증을 유도하는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현과 관련된 MAPK(p-38, JNK, ERK)의 발현 억제를 단백질 레벨에서 확인을 통해 세포 내 신호전달기전을 규명하고자 함.
- 2) 염증반응에 관여하는 대표적 전사인자 NF- $\kappa$ B의 조절을 단백질 레벨 확인을 통해 세포 내 신호전달기전을 규명하고자 함.

### <제5협동연구기관 (주)바이텍>

### [3차년도] 건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품 실효성 평가

#### 1. 개발된 건강증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청분말 제품의 특성 평가 및 사업화 제형을 위한 배합비 개발

가. 유청발효분말에 대한 특성 평가

- 1) 유청발효분말 제품의 기준규격을 설정하고, 특성 평가를 진행하였음.

나. 유청발효분말의 사업화 제형을 위한 배합비 개발

- 1) 연구개발 물질에 대해서 분말스틱형 시제품 개발을 위하여 과립분말에 대한 제형개발을 위한 시험을 진행하였음.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

### <주관연구기관 (주)삼익유가공>

### [1차년도] 바이오컨버전 산물 분말 제조 공정 확립

#### 1. 비만 억제 바이오컨버전 산물 분말 제조

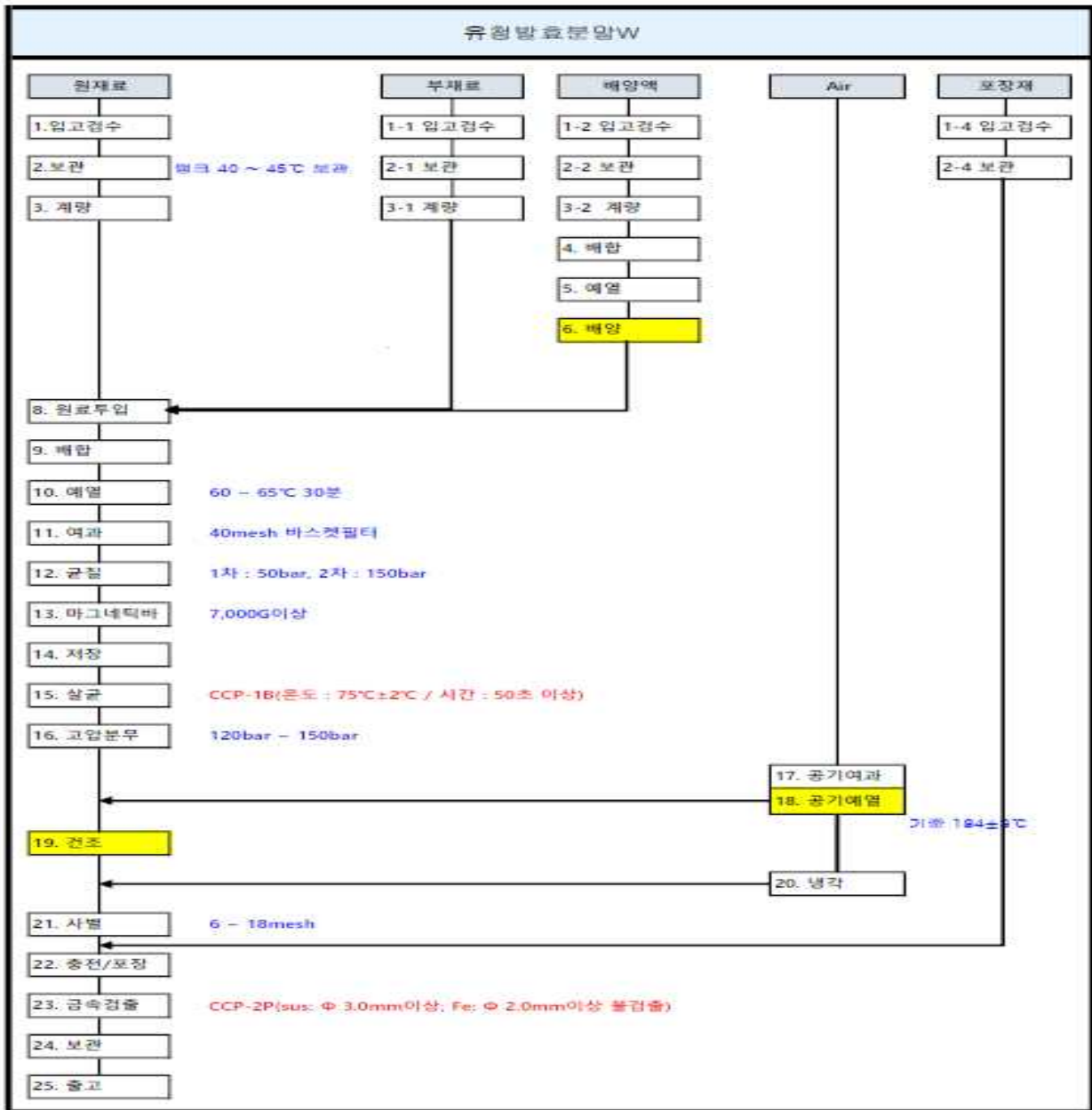
가. 비만 억제 바이오컨버전 산물 분말을 제조하여 각 협동에 전달하였음.

### [2차년도] 바이오컨버전 산물 제품 제조공정 최적화

#### 1. 현장 대량시험을 통한 최종 제조공정 확립

가. 1차년도에 확립한 제조공정을 현장에서의 적용하기 위한 대량 제조 시험을 진행하였고, 이를 바탕으로 최종 제조공정을 확립하였음.

나. 최적 제조공정도



[3차년도] 확립된 최적 바이오컨버전 조건을 통한 건강증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청분말 제품 개발 및 생산

1. 제품 생산 규격화 및 최종제품 양산

가. 생산 규격화를 통해 최종제품을 양산하고 각 협동에 전달하였음.

2. 향후 제품 사업화 추진 계획 제시

가. 포지셔닝 맵 수립

1) 시장 내 포지셔닝 맵을 수립하고(그림 6), 시장 내 고부가가치 식품소재의 위치 파악을 통해 개발 제품의 사업화 추진방향을 설정하였음.

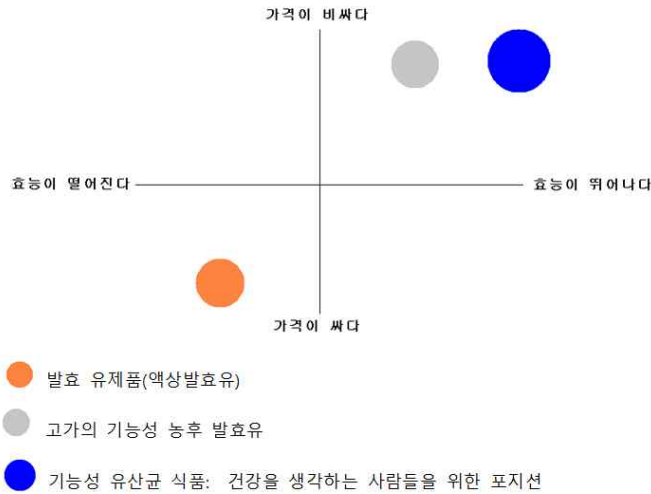


그림 6. 수립된 포지셔닝 맵

나. SWOT 분석

- 1) 개발제품에 대하여 기업 내부환경과 외부환경을 분석하여 강점(strength), 약점(weakness), 기회(opportunity), 위협(threat) 요인을 규정하고 이를 토대로 사업화 전략을 수립하였음(그림 7).

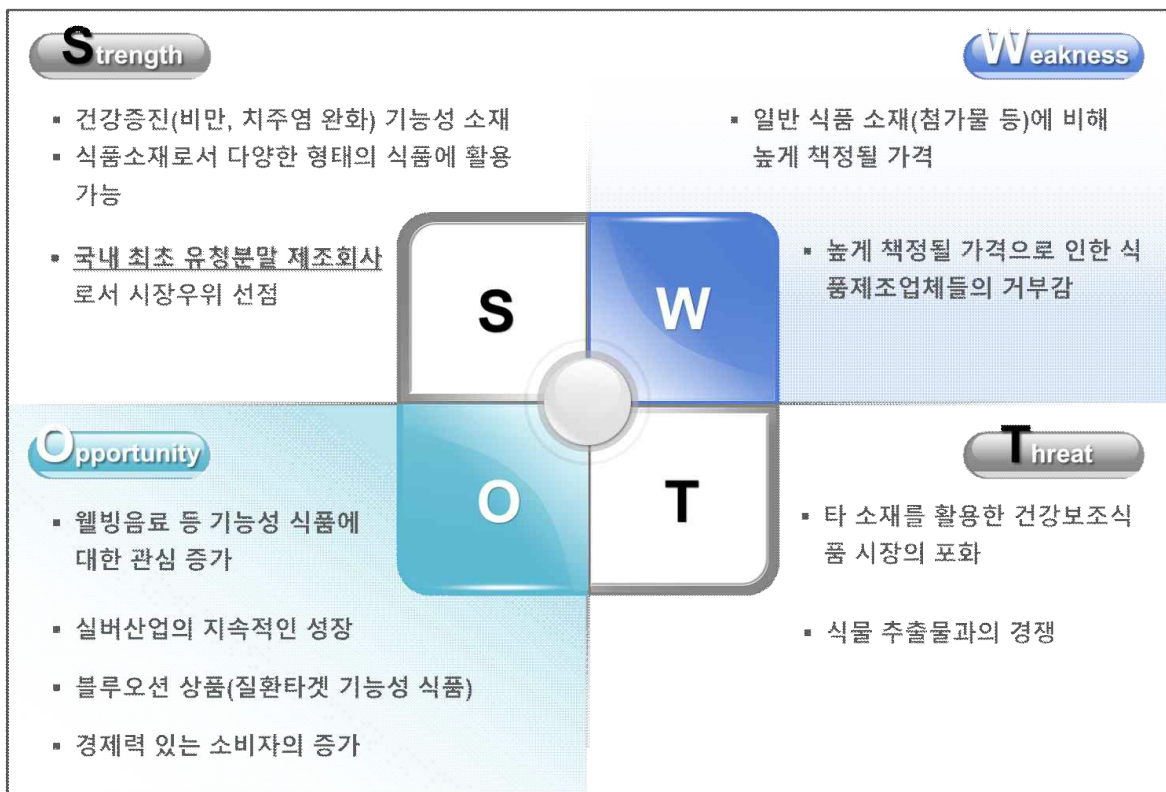


그림 7. SWOT 분석 예시

다. 수익 창출 방안 및 마케팅·홍보 및 판매 전략 수립

- 1) 기 구축된 약 200여개 식품 제조업체와의 영업망을 활용하여 식품 제조업체로의 원료 공급하고자 하고자 함.
- 2) 협력 업체의 판매경로를 이용하고자 함.
- 3) 중기청 등의 지원사업을 통한 판로를 확보하고 기 거래 업체에 홍보를 통한 판로를

개척하고자 함.

- 4) 발효유분말, 발효유청분말의 식품 소재를 활용하여 베이커리, 빙과류, 카페 등으로 활용 식품을 개발하고자 함.
- 5) 건강보조식, 환자식, 대용식 등으로의 활용 식품을 개발하고자 함(그림 8).

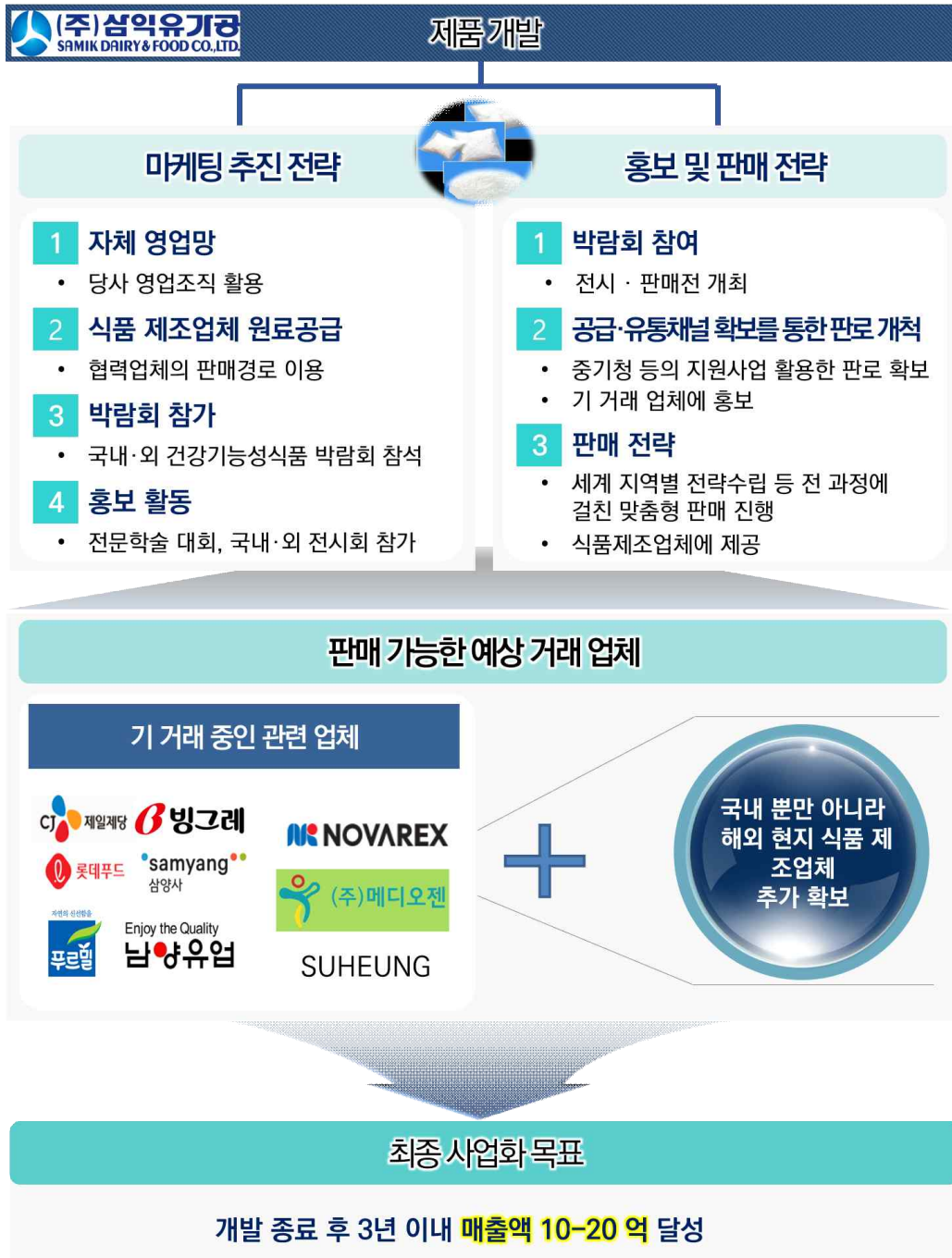
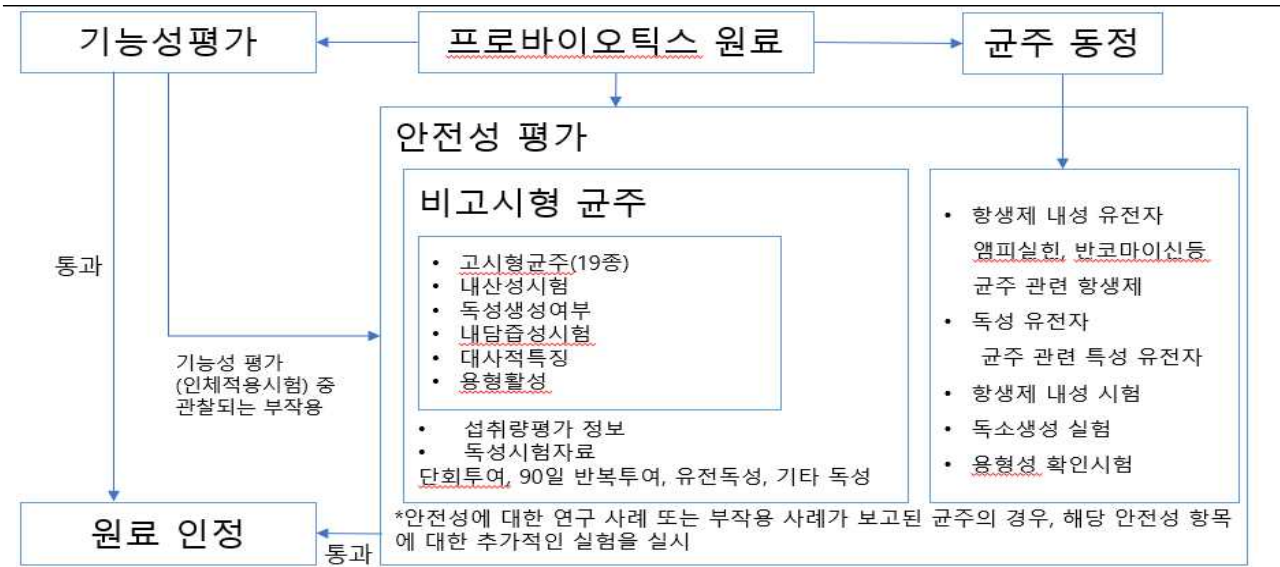


그림 8. 개발된 제품의 사업화 추진 계획

### 3. 향후 기능성식품 개별인정형 추진 계획

가. (주)삼익유기공에서는 바이오컨버전 산물을 제품화하기 위하여 선발 배양조건을 최적화시켜 제품을 제형화하고 바이오컨버전 제품을 개발. 본 연구 결과물의 제형화된 제품을 in vitro, in vivo 실험을 통하여 기능성을 검증 후 최종적으로 전임상시험 (안전성, 독성시험)과 임상시험을 거쳐 식품의약품안전처에 개별인정형 원료로 신청.





<추진 프로세스>

<제1협동연구기관 한국식품연구원>

[1차년도] 비만 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립

1. 유산균 분리 및 발효능 균주 선발

가. 젖산균의 분리 및 수집

김치 50종에서 분리한 유산균 158종, 원유 180종에서 분리한 유산균 194종을 이용하여 본 연구에 활용하였음.

나. 우유 및 유청을 이용한 발효능 균주 선발

원유 194종 중 157종의 유산균이 응고하였으며, 김치 유래 158종 중 98종의 유산균이 응고하여 발효능이 확인되었음. 살균된 10% 유청은 pH 5.6이었으며, 1%의 유산균을 접종한 후 37℃, 24시간 후 pH 감소가 일어났을 때 발효능이 있는 것으로 설정하였음. 모든 352종의 유산균에서 발효능이 확인되었음(표 26).

표 26. Skim milk 및 유청에서의 발효능 확인

	유산균 수	Skim milk		Whey	
		응고 O	응고 X	pH 감소 O	pH 감소 X
원유	194	157	37	194	-
김치	158	98	60	158	-
총계	352	255	97	352	-

다. 선발 균주 동정

바이오컨버전 산물에 대한 비만 억제능 평가에서 선발된 젖산균 6 균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생화학적, 생리적 시험을 하였음(표 27). 선발된 균주들은 공히 gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 2종은 cocci 형태였고, 4종은 rod 형태이었으며, 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났음. 또한, 모든 균주가 15℃에서 성장하지 않았고, 6종이 45℃에서 성장하였음. 5종의 균주는 glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않았으나 KI138균주는 glucose에서 gas를 생성하였음.

표 27. 우유 및 김치에서 분리된 유산균의 생화학적 및 생리학적 특성

Strains	M37	KI134	KI138	KI13	KI32	KI35
Gram stain	+	+	+	+	+	+
Cell morphology	cocci	rod	rod	cocci	rod	cocci
Spore formation	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	+	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-

16S rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로 증폭하여 서열분석 하였음. 분석된 염기서열을 그대로 이용하여 BLAST search한 결과 젖산균에 따라 99%의 상동성을 보였음(표 28). 선발된 6종의 젖산균 중 *Enterococcus* 균주가 1종, *Lactobacillus* 균주가 2종, *Pediococcus* 균주가 1종, *Weissella* 균주가 2종으로 나타났다.

표 28. 선발 균주 16s rRNA 동정 결과

Strains	Species	Identities
Skim milk	M37	<i>E. faecalis</i> 1530/1538(99%)
	KI134	<i>L. plantarum</i> 1523/1524(99%)
	KI138	<i>L. fermentum</i> 1501/1502(99%)
Whey	KI13	<i>P. pentosaceus</i> 1549/1554(99%)
	KI32	<i>W. cibaria</i> 1526/1529(99%)
	KI35	<i>W. cibaria</i> 1526/1529(99%)

라. 선발 균주 특성 조사

1) 당 발효 특성

당 발효 시험은 간균일 경우 API 50 CHL kit(BioMereux, France)를 이용하였고, 구균일 경우, API 20 STREP kit를 이용하여 실시하였음(표 29-표 30). API 50 CHL 49종의 당 중 *L. plantarum* KI134균주는 21종, *L. fermentum* KI138균주는 20종, *W. cibaria* KI32균주와 *W. cibaria* KI35균주는 공히 13종을 이용하였고, API 20 STREP 20종의 당 중 *E. faecalis* M37균주는 11종, *P. pentosaceus* KI13균주는 9종을 이용하였음.

표 29. *E. faecalis* M37, *L. plantarum* KI134, *L. fermentum* KI138, *P. pentosaceus* KI13, *W. cibaria* KI32 and *W. cibaria* KI35의 당 발효

No.	Strains	KI134	KI138	KI32	KI35
0	Control	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+
5	D-Ribose	+	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	+	±
7	L-Xylose	-	-	-	-
8	D-Adonitol	-	-	-	-
9	Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	-	-
10	D-Galactose	+	+	+	+
11	D-Glucose	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-
15	L-Rhamnose	±	±	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-
18	D-Mannitol	+	+	-	-
19	D-Sorbitol	+	+	-	-
20	Methyl-αD-Mannopyranoside	+	-	-	-
21	Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-
22	N-AcetylGlucosamine	+	+	±	+
23	Amygdalin	+	+	±	±
24	Arbutin	+	+	±	±
25	Esculin ferric citrate	+	+	+	+
26	Salicin	+	+	±	±
27	D-Celiobiose	+	±	+	+
28	D-Maltose	+	+	+	+
29	D-Lactose	+	+	-	-
30	D-Melibiose	-	+	-	+
31	D-Saccharose	+	+	+	+
32	D-Trehalose	+	+	+	+

33	Inulin	-	-	-	-
34	D-Melezitose	+	±	-	-
35	D-Raffinose	-	+	-	-
36	Amidon(starch)	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-
39	Gentiobiose	±	±	±	±
40	D-Turanose	+	+	-	-
41	D-Lyxose	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	+	±
43	D-Fucose	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-
47	Potassium Gluconate	±	±	-	±
48	Potassium 2-KetoGluconate	-	-	-	-
49	Potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-

표 30. API 20 STREP kit 결과

No.	Strains	M37	K113
1	Pyruvate	+	+
2	Hippurate	+	+
3	Esculin	+	+
4	Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	+	-
5	6-Bromo-2-naphyl- $\alpha$ -D-glucuronate	-	-
6	NaphtolAS-BI- $\beta$ -D-glucuronate	-	-
7	2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	-	+
8	2-naphthyl phosphate	-	-
9	L-leucine-2-naphthylamide	+	+
10	Arginine	+	+
11	Ribose	+	+
12	L-Arabinose	-	+
13	Mannitol	+	-
14	Sorbitol	+	-
15	Lactose	+	-
16	Trehalose	+	+
17	Inulin	-	-
18	Raffinose	-	-
19	Starch	-	-
20	Glycogen	-	-

2) 항생제 내성

항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 생장 여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 그 결과는 표 31에서 보는 바와 같음.

표 31. *E. feacalis* M37, *L. plantarum* KI134, *L. fermentum* KI138, *P. pentosaceus* KI13, *W. cibaria* KI32 and *W. cibaria* KI35의 항생제 내성

Antimicrobial agents	MIC (ug/mL)					
	M37	KI134	KI138	KI13	KI32	KI35
Amikacin	64	8	16	16	16	16
Gentamycin	32	2	8	8	4	8
Kanamycin	128	32	64	128	64	64
Streptomycin	2048	32	64	128	64	64
Ampicillin	2048	4096<	4096<	2048	2048	4096<
Penicillin-G	0.5	1	0.125>	0.25	0.25	0.5
Oxacillin	16	4	0.5	2	1	2
Bacitracin	16	128	0.5>	32	16	16
Polymyxin B	2048	256	128	128	128	128
Ciprofloxacin	0.5	64	8	32	8	16
Tetracycline	16	64	2	32	8	16
Clindamycin	64	0.0625	0.0312	1	1	0.25
Erythromycin	32	0.125	0.125	0.5	0.125	0.25
Rifampicin	2	4	32	1	16	32
Vancomycin	2	4096<	1024	2048	2048	2048
Chloramphenicol	16	4	2	2	2	2

*E. feacalis* M37 균주는 다른 5종의 균주에 비해 Amikacin, Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin, Ampicillin, Oxacillin, Polymyxin B, Clindamycin, Erythromycin 및 Chloramphenicol에 대한 내성이 높은 반면, Ciprofloxacin, Vancomycin에 내성이 약한 것으로 나타났음. *L. plantarum* KI134 균주는 Ampicillin, Penicillin-G, Bacitracin, Ciprofloxacin, Tetracycline 및 Vancomycin에 대한 내성이 높은 반면, Amikacin, Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin에 내성이 약한 것으로 나타났음. *L. fermentum* KI138 균주는 Ampicillin, Rifampicin에 대한 내성이 높은 반면, Penicillin-G, Oxacillin, Bacitracin, Tetracycline, Clindamycin, Erythromycin, Chloramphenicol에 내성이 약한 것으로 나타났음. *P. pentosaceus* KI13 균주는 Kanamycin에 내성이 강한 반면 Rifampicin에 내성이 약하였음. *W. cibaria* KI32 균주는 Erythromycin와 Chloramphenicol에 내성이 약하였으며, *W. cibaria* KI35 균주는 Ampicillin, Rifampicin에 내성이 강한 반면 Chloramphenicol에 내성이 약하였음. 전체 16종의 항생제 중 *E. feacalis* M37 균주가 가장 항생제에 대한 내성이 강하고, *L. fermentum* KI138 균주가 내성이 약한 것으로 나타났음.

### 3) 효소활성

6종의 유산균의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 표 32에서 보는 바와 같음. 6종 모두 Acid phosphatase와 Naphtol-AS-BI-phosphohydro

lase에서 효소활성이 높은 반면 Lipase, Trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -mannosidase 및  $\alpha$ -fucosidase 등의 효소에 대해 활성이 거의 없거나 없는 것으로 나타났음. *E. faecalis* M37 균주는 다른 균주에 비해 Esterase 활성이 높았고, *L. plantarum* KI134 균주는 Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystinearylamidase- $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase 및 N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase 등의 효소 활성이 높았음. *L. fermentum* KI138 균주는 Esterase, Leucine arylamidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase 및  $\alpha$ -glucosidase 등의 효소 활성이 높았음. *P. pentosaceus* KI13 균주는 Leucine arylamidase 및 Valine arylamidase 등의 효소 활성이 높았음. 특히. 유산균 6종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인  $\beta$ -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인하였음.

표 32. *E. faecalis* M37, *L. plantarum* KI134, *L. fermentum* KI138, *P. pentosaceus* KI13, *W. cibaria* KI32 and *W. cibaria* KI35의 효소 패턴

Enzyme	M37	KI134	KI138	KI13	KI32	KI35
Alkaline phosphatase	1	2	0	0	2	2
Esterase(C4)	4	1	4	0	1	1
Esterase Lipase(C8)	2	2	2	0	1	1
Lipase(C14)	0	1	0	1	0	0
Leucine arylamidase	1	5	5	5	0	3
Valine arylamidase	0	5	3	5	0	2
Cystinearylamidase	0	4	2	3	0	0
Trypsin	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -chymotrypsin	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	4	5	5	4	5	5
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	4	4	4	4	4	4
$\alpha$ -galactosidase	0	0	5	0	0	0
$\beta$ -galactosidase	1	5	5	1	0	0
$\beta$ -glucuronidase	1	0	0	0	0	0
$\alpha$ -glucosidase	1	4	5	0	0	0
$\beta$ -glucosidase	0	5	0	3	0	0
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	0	5	0	2	0	0
$\alpha$ -mannosidase	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -fucosidase	1	0	0	0	0	0

#### 4) 내담즙성

담즙에 대한 균주의 내성을 시험하기 위하여 oxgall(Difco)을 첨가하지 않은 것과 첨가한 배지에서 각 균주의 내성을 시험한 결과는 각각 그림 9와 그림 10에서 보는 바와 같음.

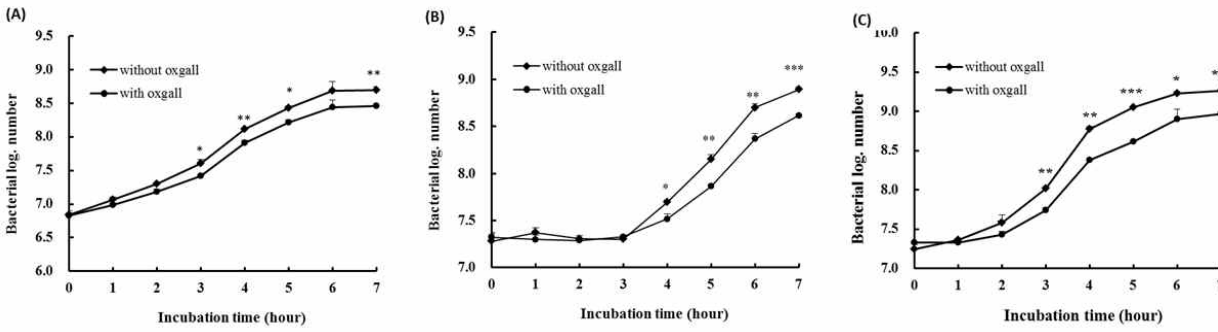


그림 9. 0.3% oxgall의 유무에 따른 (A) *E. feacalis* M37 (B) *L. plantarum* KI134 (C) *L. fermentum* KI138의 생육

All values are within the mean  $\pm$  standard deviation of the three replicates; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  between with oxgall and without oxgall(t-test)

*E. feacalis* M37, *L. plantarum* KI134, *L. fermentum* KI138의 생존율은 각각 97.3%, 96.9%, 96.9%로서 크게 영향을 받지 않은 것으로 나타났음.

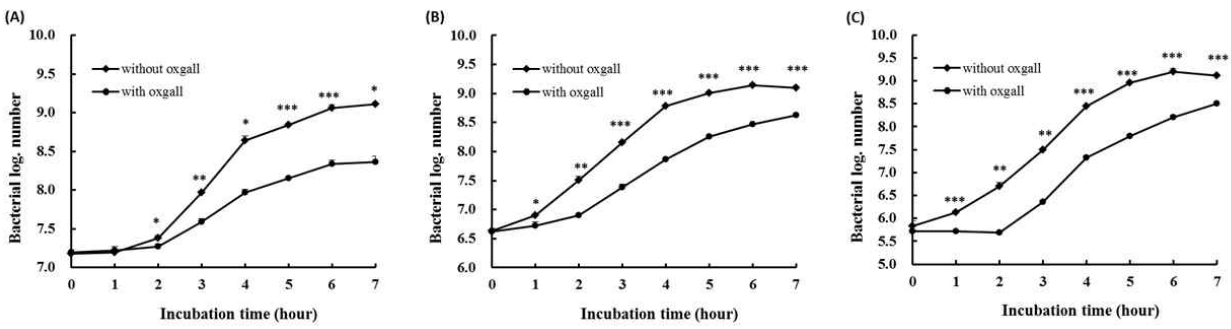


그림 10. 0.3% oxgall의 유무에 따른 (A) *P. pentosaceus* KI13 (B) *W. cibaria* KI32 (C) *W. cibaria* KI35의 생육

All values are within the mean  $\pm$  standard deviation of the three replicates; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  between with oxgall and without oxgall(t-test)

*P. pentosaceus* KI13, *W. cibaria* KI32 and *W. cibaria* KI35 균주의 생존율은 각각 91.8%, 94.8%, 93.3%를 나타내 약간 억제를 받았지만 1 log 이하로 크게 영향을 받지 않았음. 6종의 유산균 중 *E. feacalis* M37 균주가 가장 생존율이 높은 반면 *P. pentosaceus* KI13 균주가 가장 낮은 것으로 나타났음.

5) pH 내성

위산과 비슷한 정도의 pH에 대한 내성을 알아보기 위하여 유산균을 pH 2, 3, 4 및 6.4의 증류수에서 3시간까지의 생존여부를 시험한 결과는 그림 11과 그림 12에서 보는 바와 같음.



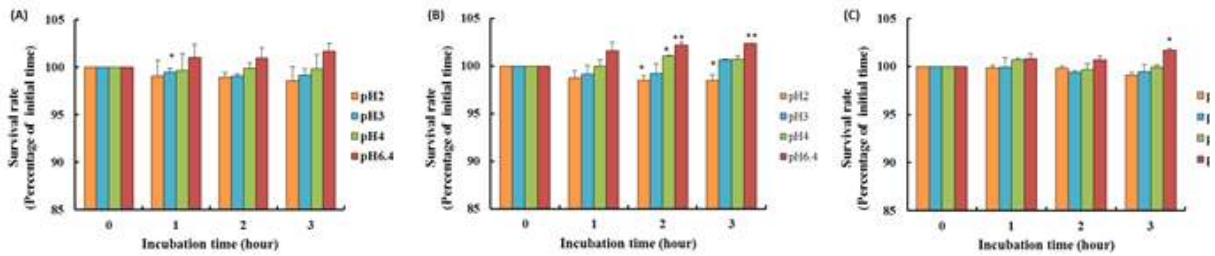


그림 11. HCl 용액(pH 2.0, 3.0, 4.0 and 6.4)에서 3시간 후 (A) *E. feacalis* M37 (B) *L. plantarum* KI134 (C) *L. fermentum* KI138의 생존율

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with initial time (t-test)

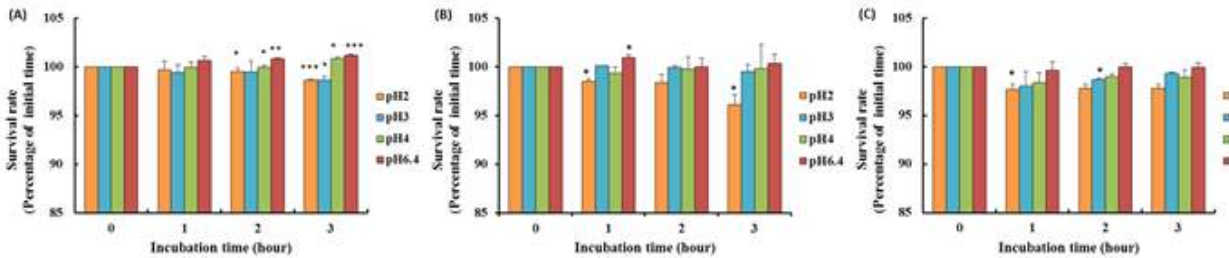


그림 12. HCl 용액(pH 2.0, 3.0, 4.0 and 6.4)에서 3시간 후 (A) *P. pentosaceus* KI13 (B) *W. cibaria* KI32 (C) *W. cibaria* KI35의 생존율

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with initial time(t-test)

*E. feacalis* M37 균주는 1시간 경과 시 pH 3에서 유의성 있게 감소하였으나, 3시간 경과 후에 pH에 의한 유의성은 없었음. *L. plantarum* KI134 균주는 2시간 경과 시 pH 2에서 유의성 있게 감소한 반면, pH 3과 pH 6.4는 증가하였고, 3시간 경과 시에도 비슷한 양상을 보였음. *L. fermentum* KI138 균주는 3시간 경과 시 pH 6.4만이 유의성 있게 증가하였음.

*P. pentosaceus* KI13 균주는 pH 2에서 2시간 경과 시 유의성 있게 감소하다가 3시간 경과 시 생존율이 많이 감소한 반면 pH 4 이상은 유의성 있게 증가하였음. *W. cibaria* KI32 균주는 pH 2에서 1시간과 3시간 경과 시 유의성 있게 감소하였음. *W. cibaria* KI35 균주는 1시간 경과 시 pH 2, 2시간 경과 시 pH 3에서 감소하였으나 3시간 경과 시는 유의성이 없었음.

#### 6) 항균력 실험

젖산균이 식중독균에 대해 어느 정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 표 33-표 38과 같음.

6종의 젖산균 중 *E. coli*에 대해 *L. fermentum* KI138 균주가 75%의 억제 효과를, *Salmonella typhimurium*에 대해 *W. cibaria* KI34 균주가 81.36%, *L. monocytogenes*에 대해 *E. feacalis* M37 균주가 97.14%, *S. aureus*에 대해 *W. cibaria* KI32균주가 85.21%의 억제 효과를 각각 나타내 타 균주에 비해 가장 높은 억제율을 보였음.

표 33. MRS 배지에서 *E. faecalis* M37의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		M37 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>E. coli</i>	1.00±0.27×10 <sup>5</sup>	5.96	6.50±0.70×10 <sup>4</sup>	4.96	35.00
<i>S. typhimurium</i>	1.10±0.14×10 <sup>7</sup>	6.09	2.80±0.40×10 <sup>6</sup>	5.00	75.00
<i>L. monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 <sup>4</sup>	6.07	2.00±0.00×10 <sup>3</sup>	5.05	97.14
<i>S. aureus</i>	3.20±0.26×10 <sup>6</sup>	5.58	8.50±2.10×10 <sup>5</sup>	5.03	73.44

\*Initial count of M37: 1.77±0.32×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup>Determined after 6h of incubation at 37°C

표 34. MRS 배지에서 *L. plantarum* KI134의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		KI134 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>E. coli</i>	1.00±0.27×10 <sup>5</sup>	5.96	3.00±1.4×10 <sup>4</sup>	4.75	70.00
<i>S. typhimurium</i>	1.10±0.14×10 <sup>7</sup>	6.09	3.50±0.70×10 <sup>6</sup>	4.76	68.18
<i>L. monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 <sup>4</sup>	6.07	2.90±0.20×10 <sup>4</sup>	4.83	59.05
<i>S. aureus</i>	3.20±0.26×10 <sup>6</sup>	5.58	1.90±0.36×10 <sup>6</sup>	4.82	40.63

\*Initial count of KI134: 6.90±0.28×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup>Determined after 6h of incubation at 37°C

표 35. MRS 배지에서 *L. fermentum* KI138의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		KI138 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>E. coli</i>	1.00±0.27×10 <sup>5</sup>	5.96	2.50±0.7×10 <sup>4</sup>	4.63	75.00
<i>S. typhimurium</i>	1.10±0.14×10 <sup>7</sup>	6.09	3.50±0.70×10 <sup>6</sup>	4.64	68.18
<i>L. monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 <sup>4</sup>	6.07	1.00±0.30×10 <sup>4</sup>	4.65	85.71
<i>S. aureus</i>	3.20±0.26×10 <sup>6</sup>	5.58	5.80±0.40×10 <sup>5</sup>	4.65	82.03

\*Initial count of KI138: 5.80±0.14×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup>Determined after 6h of incubation at 37°C

표 36. MRS 배지에서 *P. pentosaceus* KI13의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		KI13 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>E. coli</i>	1.00±0.27×10 <sup>5</sup>	5.96	4.0±1.4×10 <sup>4</sup>	4.66	60.00
<i>S. typhimurium</i>	1.10±0.14×10 <sup>7</sup>	6.09	8.50±0.70×10 <sup>6</sup>	4.68	22.73
<i>L. monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 <sup>4</sup>	6.07	2.00±0.40×10 <sup>4</sup>	4.71	70.95
<i>S. aureus</i>	3.20±0.26×10 <sup>6</sup>	5.58	6.00±2.80×10 <sup>5</sup>	4.7	81.25

\*Initial count of KI13: 4.45±0.07×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup>Determined after 6h of incubation at 37°C

표 37. MRS 배지에서 *W. cibaria* KI32의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		KI32 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>E. coli</i>	1.00±0.27×10 <sup>5</sup>	5.96	3.0±1.4×10 <sup>4</sup>	4.5	70.00
<i>S. typhimurium</i>	1.10±0.14×10 <sup>7</sup>	6.09	9.50±0.70×10 <sup>6</sup>	4.53	13.64
<i>L. monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 <sup>4</sup>	6.07	7.00±1.00×10 <sup>3</sup>	4.51	90.71
<i>S. aureus</i>	3.20±0.26×10 <sup>6</sup>	5.58	4.70±1.00×10 <sup>5</sup>	4.5	85.21

\*Initial count of KI32: 2.90±0.46×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup>Determined after 6h of incubation at 37°C

표 38. MRS 배지에서 *W. cibaria* KI34의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens <sup>a</sup>		KI34 <sup>a</sup>		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>E. coli</i>	1.00±0.27×10 <sup>5</sup>	5.96	4.50±0.70×10 <sup>4</sup>	4.48	55.00
<i>S. typhimurium</i>	1.10±0.14×10 <sup>7</sup>	6.09	2.10±0.07×10 <sup>6</sup>	4.51	81.36
<i>L. monocytogenes</i>	7.00±2.80×10 <sup>4</sup>	6.07	1.00±0.35×10 <sup>4</sup>	4.48	86.43
<i>S. aureus</i>	3.20±0.26×10 <sup>6</sup>	5.58	5.00±1.80×10 <sup>5</sup>	4.51	84.38

\*Initial count of KI34: 2.27±0.38×10<sup>6</sup> CFU/mL

<sup>a</sup>Determined after 6h of incubation at 37°C

7) 장내 부착성

대조구인 *L. rhamnosus* GG 균주는 상피세포에 부착능이 우수한 것으로 알려지고 있음. HT-29 세포에서의 균주별 부착능을 보면 그림 13과 그림 14와 같음.

*E. faecalis* M37, *L. plantarum* KI134, *L. fermentum* KI138 균주의 부착능은 각각 14.01±1.23%, 23.01±1.71%, 1.94±0.46%로서 대조구인 *L. rhamnosus* GG 16.32±2.91%에 비교하였을 때 *L. plantarum* KI134 균주는 유의성이 있었음. 반면 *L. fe*

*rmentum* KI138 균주는 부착능이 떨어지는 것으로 나타났음.

*P. pentosaceus* KI13, *W. cibaria* KI32 and *W. cibaria* KI35 균주의 부착능은 각각  $15.30 \pm 0.37\%$ ,  $11.30 \pm 3.05\%$ ,  $19.10 \pm 1.42\%$ 로서 대조구인 *L. rhamnosus* GG 16.  $32 \pm 2.91\%$ 에 비교하였을 때 *W. cibaria* KI35 균주는 유의성이 있었음.

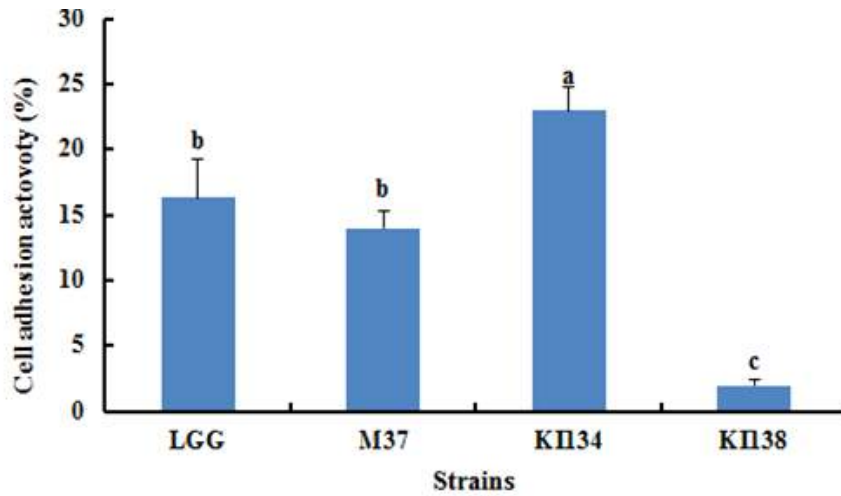


그림 13. HT-29 세포에서의 M37, KI134 및 KI138의 장 부착성

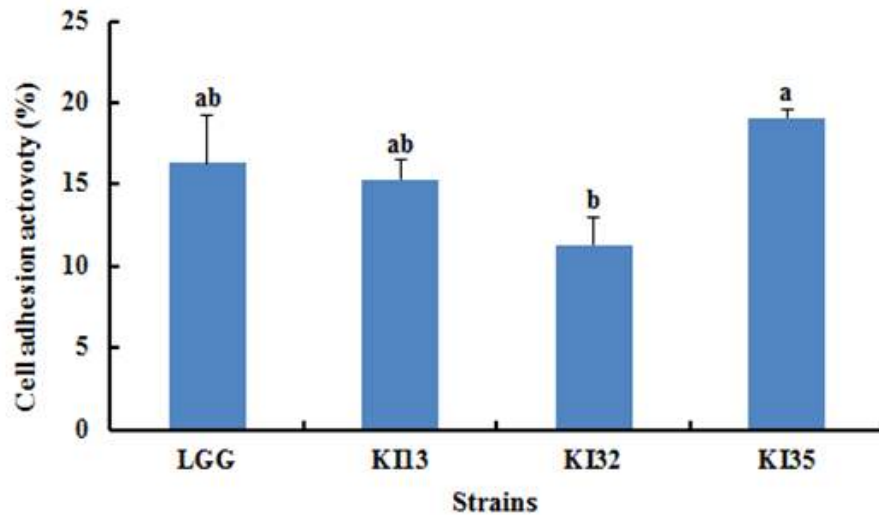


그림 14. HT-29 세포에서의 KI13, KI32 및 KI35의 장 부착성

8) Biogenic amine(BA) 생성능

6개의 선발 균주는 전구물질 아미노산인 tyrosine, histidine, ornithine 및 lysine으로부터 BA를 생성하지 않았음(표 39).

표 39. 선발 균주의 바이오제닉 아민 생성능

Strains	Biogenic amines			
	Putrescine	Tyramine	Histamine	Cadaverine
<i>E. feacalis</i> M37	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> KI134	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> KI138	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> KI13	-	-	-	-
<i>W. cibaria</i> KI32	-	-	-	-
<i>W. cibaria</i> KI35	-	-	-	-

## 2. 바이오컨버전 산물에 대한 비만 억제능

### 가. Pancreatic lipase 활성 억제능

#### 1) Skim milk 발효물

10% skim milk에서 발효능이 확인된 255종의 균주의 발효물의 pancreatic lipase 활성 억제능을 측정한 결과임(표 40). 50% 이하의 활성 억제능을 가지는 균주는 총 113종이었으며, 70% 이상의 높은 활성을 가지는 균주는 총 21종으로 측정되었음. 70% 이상의 높은 억제 활성을 가지는 균주 발효물의 3회 반복 실험을 수행하였음(그림 15). KI134, KI138 및 M37 균주를 접종한 발효물의 pancreatic lipase 활성 억제능은  $94.57 \pm 1.25$ ,  $90.01 \pm 0.54$ ,  $91.94 \pm 6.13\%$ 로 각각 나타났으며, 90% 이상의 높은 활성 억제율을 보였음.

표 40. 10% skim milk 발효물의 pancreatic lipase inhibition activity

Skim milk	30% 이하	30-50%	50-70%	70-90%	90% 이상	총계
원유	7	61	74	13	2	157
김치	6	39	47	5	1	98
총계	13	100	121	18	3	255

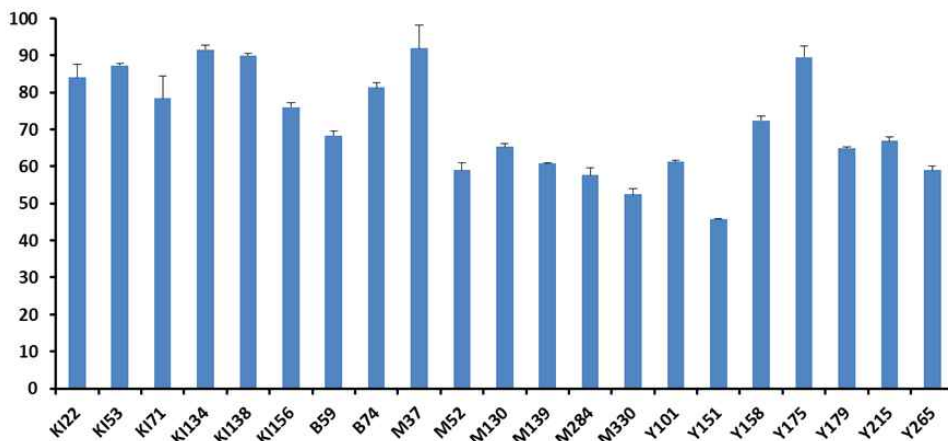


그림 15. 선발 균주 skim milk 발효물의 pancreatic lipase inhibition activity

#### 2) 유청 발효물

10% 유청에서 발효능이 확인된 352종의 균주의 발효물의 pancreatic lipase 활성 억제능을 측정한 결과임(표 41). 30% 이하의 낮은 활성 억제능을 가지는 균주는 총 211종이었으며, 50% 이상의 높은 활성을 가지는 균주는 총 19종으로 측정되었음. 50% 이상의 높은 억제 활성을 가지는 균주 발효물의 3회 반복 실험을 수행하였음(그림 16). KI13 균주를 접종한 발효물의 pancreatic lipase 활성 억제능은  $77.33 \pm 2.72\%$ 로 가장 높은 활성 억제율을 보였음.

표 41. 10% 유청 발효물의 pancreatic lipase inhibition activity

Whey	10% 이하	10-30%	30-50%	50-60%	60% 이상	총계
원유	26	125	40	1	2	194
김치	10	50	82	10	6	158
총계	36	175	122	11	8	352

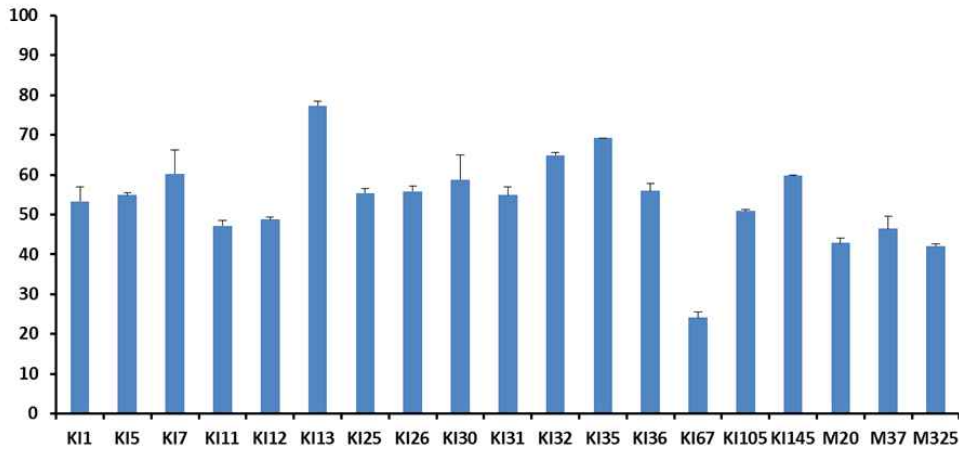


그림 16. 선발된 19종 균주의 10% 유청 발효물 pancreatic lipase inhibition activity

나.  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능

1) Skim milk 발효물

선발된 21종 균주 skim milk 발효물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 측정하는 결과는 표 42와 같음. 또한 MRS broth에 균주 1% 접종하여 37°C, 18시간 동안 배양한 배양물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 측정하였음. M284 균주에 의한 skim milk 발효물의  $\alpha$ -amylase 활성 억제능이 44.73%로서 가장 우수한 반면 MRS 배양물에서는 KI53과 KI134 균주가 각각 93.24%와 91.24%로서 우수하였음.  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능은 M284 균주에 의한 skim milk 발효물이 10.02%로서 가장 우수한 반면 MRS 배양물에서는 KI156과 KI134균주가 각각 108.55%와 105.36%로서 우수하였음.

표 42. 선발 균주 skim milk 발효물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능

(단위 : %)

Strain	$\alpha$ -amylase		$\alpha$ -glucosidase	
	Skim milk	MRS	Skim milk*	MRS
KI22	27.81±3.07	88.62±0.17	3.09±0.92	78.75±1.50
KI53	23.92±3.63	93.24±1.81	4.95±0.93	74.80±4.32
KI71	26.60±0.13	62.42±8.95	4.74±0.24	-4.82±0.63
KI134	9.44±2.85	91.24±2.70	2.74±1.24	105.36±9.92
KI138	4.92±0.44	43.39±12.97	7.64±0.63	8.91±0.43
KI156	13.99±1.71	89.71±1.19	7.78±0.25	108.55±2.59
B59	24.90±7.89	41.24±0.12	1.53±1.45	38.53±3.05
B74	10.32±1.69	40.66±1.39	7.85±0.71	72.49±5.61
M37	17.17±5.03	36.01±11.09	7.12±0.89	88.77±2.80
M52	20.26±1.95	34.08±4.20	9.57±0.78	37.09±3.29
M130	28.08±10.78	38.24±3.92	3.42±0.53	50.88±4.49
M139	28.25±2.98	29.13±2.94	6.63±1.23	77.07±2.20
M284	44.73±11.70	27.58±0.99	10.02±0.27	90.52±3.59
M330	22.83±14.11	26.43±3.66	5.50±0.13	89.62±3.72
Y101	26.41±5.10	33.30±1.21	2.31±0.54	55.92±4.12
Y151	17.73±2.93	32.50±1.03	4.32±0.20	74.71±15.12
Y158	13.94±8.88	27.20±2.53	4.98±1.10	88.58±2.59
Y175	9.52±6.02	25.63±2.60	4.19±1.11	84.98±2.85
Y179	26.40±10.00	29.29±0.89	0.75±0.24	58.42±6.16
Y215	24.61±14.02	27.51±1.46	4.45±1.66	94.25±.71
Y265	30.78±2.85	23.47±2.60	9.34±1.38	61.29±1.77

\*10배 희석 후 측정

2) 유청 발효물

선발된 19종 균주 유청 발효물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 측정한 결과는 표 43과 같음. 또한 MRS broth에 균주 1% 접종하여 37℃, 18시간 동안 배양한 배양물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 측정하였음. KI105 균주에 의한 유청 발효물의  $\alpha$ -amylase 활성 억제능이 70.3%로서 가장 우수한 반면 MRS 배양물에서는 KI25 균주가 100.18%로서 우수하였음.  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능은 KI12 균주에 의한 유청 발효물이 10.54%로서 가장 우수한 반면 MRS 배양물에서는 M37 균주가 88.77%로서 우수하였음.

표 43. 선발 균주 유청 발효물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능

(단위 : %)

Strain	$\alpha$ -amylase		$\alpha$ -glucosidase	
	Whey*	MRS	Whey	MRS
KI1	33.19±0.77	24.22±2.80	5.47±0.94	73.08±9.75
KI5	23.50±4.29	59.08±8.25	3.81±0.45	15.92±3.59
KI7	20.49±2.44	98.39±2.39	0.22±1.03	76.52±8.25
KI11	26.00±3.83	97.44±1.18	7.49±1.31	62.80±0.67
KI12	18.62±1.07	86.93±0.11	10.54±2.59	38.46±0.83
KI13	18.97±1.37	98.08±4.45	7.96±1.38	29.44±8.55
KI25	19.83±3.38	100.18±5.24	1.82±2.43	86.01±4.06
KI26	27.96±8.28	41.13±2.02	5.29±2.55	60.31±2.32
KI30	27.79±3.19	95.57±0.42	8.71±0.96	70.92±6.59
KI31	23.00±4.68	87.46±7.49	9.79±0.61	58.42±2.37
KI32	29.88±1.43	72.70±3.99	2.18±1.46	-24.00±12.89
KI35	15.69±7.08	87.18±0.84	6.41±0.36	75.90±4.89
KI36	37.56±3.10	42.60±1.23	9.49±1.19	60.63±1.34
KI67	53.45±4.48	83.69±0.04	8.58±0.43	53.93±7.49
KI105	70.30±10.33	96.33±3.19	3.10±0.65	87.47±2.92
KI145	18.45±0.01	36.79±6.55	7.29±1.10	-17.52±2.12
M20	20.57±3.03	28.50±0.34	8.15±1.16	71.44±0.63
M37	29.68±8.60	36.07±11.09	7.04±0.49	88.77±2.80
M325	56.96±0.95	42.68±4.60	1.13±0.78	56.94±8.50

\*10배 희석 후 측정

표 44는 skim milk와 유청 발효물 중 pancreatic lipase 활성 억제능,  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능이 우수한 균주를 5종씩 선발하였음.



표 44. 최종 선발 균주의 lipase,  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능

(단위 : %)

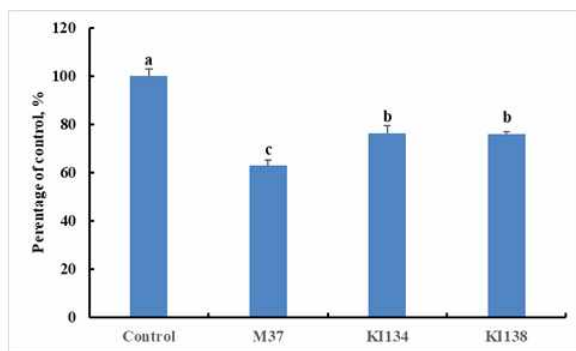
Strains		Lipase	$\alpha$ -amylase	$\alpha$ -glucosidase*
Skim milk	M37	91.94±6.13	17.17±5.03	7.12±0.89
	M284	57.66±1.86	44.73±11.70	10.02±0.27
	Y265	59.06±1.13	30.78±2.85	9.34±1.38
	KI134	94.57±1.25	9.44±2.85	2.74±1.24
	KI138	90.01±0.54	4.92±0.44	7.64±0.63
Whey	KI13	77.33±2.72	18.97±1.37	7.96±1.38
	KI31	54.92±1.56	23.00±4.68	9.79±0.61
	KI32	64.88±2.31	29.88±1.43	2.18±1.46
	KI35	69.20±6.44	15.69±7.08	6.41±0.36
	KI36	55.95±1.18	37.56±3.10	9.49±1.19

\*10배 희석 후 측정

다. 3T3-L1 세포를 이용한 비만 세포 분화 억제능

1) Skim milk 발효물

Skim milk 발효물 중 pancreatic lipase 활성 억제능이 우수한 M37, KI134, KI138 균주를 대상으로 세포 분화억제능을 측정한 결과는 그림 17과 같음. 대조구 대비 3 균주 공히 유의성이 있었고, 그 중 M37 균주가 가장 세포 분화억제능이 우수하였음.



Strain	Percentage of control
Control	100.00±2.93
M37	62.88±2.21
KI134	76.40±3.25
KI138	76.08±0.96

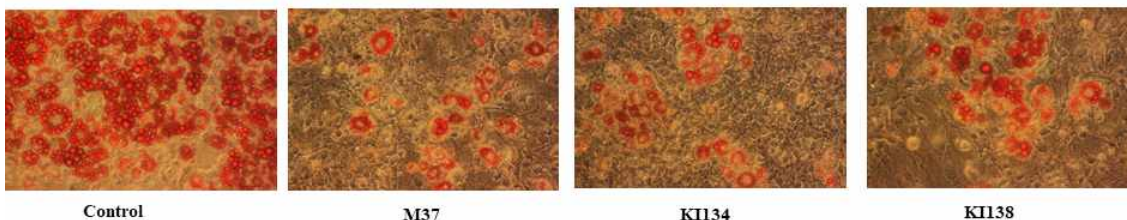
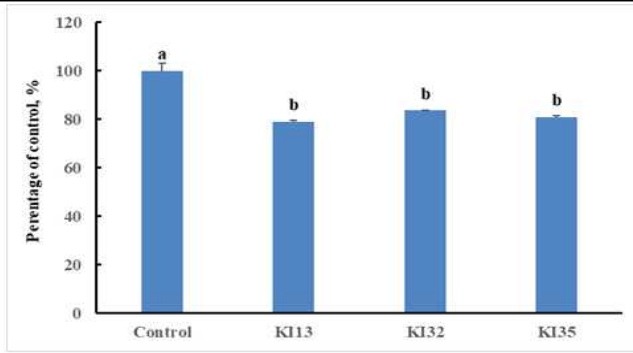


그림 17. Skim milk 발효물의 비만 세포 분화 억제능

2) 유청 발효물

유청 발효물 중 pancreatic lipase 활성 억제능이 우수한 KI13, KI132, KI135 균주를 대상으로 세포 분화억제능을 측정한 결과는 그림 18과 같음. 대조구 대비 3 균주 공히 유의성이 있었고, 그 중 KI13 균주가 가장 세포 분화억제능이 우수하였음.



Strain	Percentage of control
Control	100.00±2.93
KI13	78.99±0.62
KI32	83.60±0.19
KI35	80.93±0.63

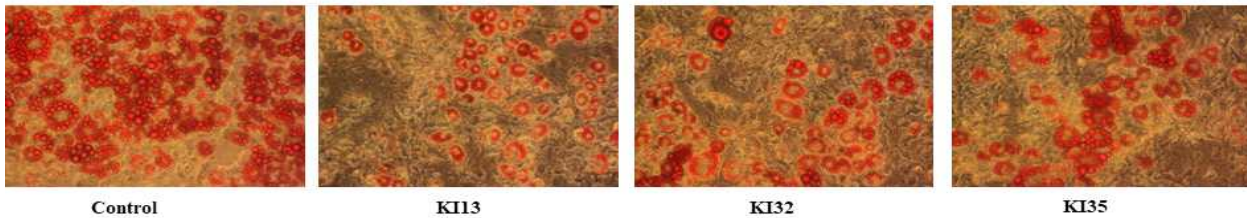


그림 18. 유청 발효물의 비만 세포 분화 억제능

## [2차년도] 비만 억제 소재 확보를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 최적화

### 1. 비만 억제 소재 확보를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 최적화

가. 반응표면분석법(RSM)을 이용한 배양조건 최적화

#### 1) *P. pentosauce* KI13 균주 배양조건 최적화

모두 27개의 구간에서 실험이 행해졌으며, 각각의 구간에 따른 종속변수( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ )를 표 45에 나타내었음. 비만과 관련된 조건을 보면 lipase 억제능이 유청농도가 16%, 스타터양이 0.0775%, 배양온도가 31℃에서 10.5시간 배양하였을 때 86.09%로서 가장 높았고,  $\alpha$ -glucosidase 억제능은 유청농도가 19%, 스타터 양이 0.055%, 배양온도가 34℃에서 15시간 배양하였을 때 17.20%이었음.

표 45. *P. pentosauce* KI13 균주의 RSM 조건 시험 결과

Run Order	Independent variables				Response				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>
1	-1	-1	-1	-1	5.33	0.21	8.18	50.77	7.49
2	1	-1	-1	-1	5.60	0.35	8.14	79.21	9.12
3	-1	1	-1	-1	5.05	0.23	8.29	47.58	6.86
4	1	1	-1	-1	5.34	0.38	8.57	86.09	10.88
5	-1	-1	1	-1	5.21	0.27	8.13	45.75	9.99
6	1	-1	1	-1	5.41	0.39	8.27	50.95	10.56
7	-1	1	1	-1	4.99	0.27	8.32	22.67	8.73
8	1	1	1	-1	5.15	0.41	8.24	40.96	9.97
9	-1	-1	-1	1	4.99	0.28	8.38	47.14	10.24
10	1	-1	-1	1	5.23	0.39	8.41	43.80	11.81
11	-1	1	-1	1	4.83	0.28	8.51	28.84	8.41
12	1	1	-1	1	4.95	0.44	8.54	44.22	9.40
13	-1	-1	1	1	4.62	0.32	8.51	17.04	11.32
14	1	-1	1	1	4.97	0.44	8.27	34.10	12.05
15	-1	1	1	1	4.68	0.29	8.68	26.58	12.60
16	1	1	1	1	4.74	0.51	8.65	49.63	14.26
17	-2	0	0	0	4.84	0.20	8.59	18.97	16.91
18	2	0	0	0	4.32	0.45	8.26	51.63	17.20
19	0	-2	0	0	5.44	0.29	8.28	26.35	4.28
20	0	2	0	0	4.86	0.36	8.88	26.97	2.29
21	0	0	-2	0	5.33	0.33	8.40	27.05	1.87
22	0	0	2	0	4.88	0.37	8.36	23.20	7.51
23	0	0	0	-2	5.37	0.31	8.20	32.18	5.46
24	0	0	0	2	4.65	0.40	8.55	24.66	5.94
25	0	0	0	0	5.09	0.35	8.45	22.77	1.40
26	0	0	0	0	5.11	0.33	8.40	50.65	1.30
27	0	0	0	0	5.05	0.34	8.41	28.87	1.24

X<sub>1</sub>: whey conc. (%), X<sub>2</sub>: stater conc. (%), X<sub>3</sub>: temperature (°C), X<sub>4</sub>: incubation time (h)

Y<sub>1</sub>: pH, Y<sub>2</sub>: acidity (%), Y<sub>3</sub>: cell viability, Y<sub>4</sub>: lipase inhibition (%), Y<sub>5</sub>: α-glucosidase inhibition (%)

배양조건을 최적화하기 위하여 4가지 독립변수들의 조합에 대한 종속변수의 반응 값을 표 46에 나타내었음. 그 결과 Y<sub>1</sub>은 X<sub>1</sub>을 제외한 대부분의 일차항에서 유의수준( $p$ -

---

value)이 0.05 보다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타난 반면 교차항은  $X_1X_1$ 을 제외하고 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났음.  $Y_2$ 는 모든 일차항에서 유의수준( $p$ -value)이 0.05 보다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타났음. 반면 교차항은  $X_1X_2$ 을 제외하고 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났음.  $Y_3$ 은  $X_2$ 와  $X_4$  일차항에서 유의수준( $p$ -value)이 0.05 보다 낮게 나와 통계적으로 유의성이 있는 반면 교차항은 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났음.  $Y_4$ 는  $X_1$ 만이 일차항에서 통계적으로 유의성이 나타났고 교차항은 유의성이 없는 것으로 나타났음.  $Y_5$ 는  $X_3$ 만이 일차항에서 통계적으로 유의성이 나타난 반면 교차항인  $X_1X_1$ ,  $X_3X_3$ ,  $X_4X_4$  이 유의성이 있는 것으로 나타났음.

---

표 46. *P. pentosauce* K113의 coefficients 계산 결과

	Y <sub>1</sub>		Y <sub>2</sub>		Y <sub>3</sub>		Y <sub>4</sub>		Y <sub>5</sub>	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
Intercept	5.0833	0.000	0.3400	0.00	8.4200	0.000	34.0967	0.003	1.3133	0.300
X <sub>1</sub>	0.0271	0.476	0.0692	0.000	-0.0237	0.326	8.6629	0.021	0.5412	0.230
X <sub>2</sub>	-0.1162	0.008	0.0125	0.005	0.1129	0.000	-0.8729	0.793	-0.2271	0.606
X <sub>3</sub>	-0.1021	0.017	0.0175	0.000	-0.0012	0.958	-6.1529	0.084	1.1062	0.024
X <sub>4</sub>	-0.1880	0.000	0.0258	0.000	0.1046	0.004	-6.1529	0.084	0.7271	0.115
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-0.1080	0.017	-0.0033	0.401	-0.0086	0.731	2.9395	0.412	4.3601	0.000
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.0344	0.395	-0.0033	0.401	0.0301	0.244	0.7795	0.825	0.9176	0.066
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0.0232	0.563	0.0029	0.461	-0.0199	0.434	0.3957	0.911	1.2688	0.016
X <sub>4</sub> X <sub>4</sub>	-0.0005	0.990	0.0042	0.298	-0.0211	0.407	1.2195	0.731	1.5213	0.006
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0.0269	0.563	0.0112	0.026	0.0194	0.508	2.9919	0.468	0.2131	0.692
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0.0094	0.839	0.0025	0.582	-0.0319	0.283	-0.9619	0.814	-0.2506	0.641
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	-0.0094	0.839	0.0037	0.413	-0.0319	0.283	-2.3931	0.560	-0.1569	0.770
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.0206	0.656	-0.0025	0.582	-0.0056	0.846	0.3869	0.924	0.2969	0.582
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.0256	0.581	0.0012	0.782	0.0069	0.813	2.2856	0.578	-0.0019	0.997
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	-0.0269	0.563	-0.0000	1.000	0.0306	0.302	4.1669	0.317	0.3419	0.527

X<sub>1</sub>: whey conc. (%), X<sub>2</sub>: stater conc. (%), X<sub>3</sub>: temperature (°C), X<sub>4</sub>: incubation time (h)

Y<sub>1</sub>: pH, Y<sub>2</sub>: acidity (%), Y<sub>3</sub>: cell viability, Y<sub>4</sub>: lipase inhibition (%), Y<sub>5</sub>: α-glucosidase inhibition (%)

상기에서 얻어진 결과를 바탕으로 구한 반응식은 표 47과 같음. 실험 결과 얻어진 data를 Minitab software를 이용하여 반응표면 분석한 결과를 바탕으로 적합한 2차 다항식의 모델을 구하였음. 각각의 독립변수에 대한 각각의 식은 아래 모델식과 같으며, 종속변수인 Y<sub>2</sub>의 결정계수(R<sup>2</sup>)는 0.975로 나타났으며, p=0.000으로 나타났음. 다만, 비만 억제와 관련 있는 종속변수인 Y<sub>4</sub>와 Y<sub>5</sub>는 결정계수가 0.592와 0.899, p값이 0.003과 0.300을 나타내어 낮게 나왔음.

표 47. Polynomial 방정식으로 계산한 *P. pentosauce* KI13 발효 조건의 RSM 결과

Responses	Quadratic polynomial model	R <sup>2</sup>	p-value
Y <sub>1</sub>	$Y_1 = 5.0833 + 0.0271X_1 - 0.1162X_2 - 0.1021X_3 - 0.1880X_4 - 0.0269X_1X_2 - 0.0094X_1X_3 - 0.0094X_1X_4 + 0.0206X_2X_3 + 0.0256X_2X_4 - 0.0269X_3X_4 - 0.1880X_1^2 + 0.0344X_2^2 - 0.09375X_3^2 - 0.0005X_4^2$	0.829	0.000
Y <sub>2</sub>	$Y_2 = 0.03400 + 0.0692X_1 + 0.0125X_2 + 0.0175X_3 + 0.0258X_4 + 0.0112X_1X_2 + 0.0025X_1X_3 + 0.0037X_1X_4 - 0.0025X_2X_3 + 0.0012X_2X_4 - 0.0000X_3X_4 - 0.0033X_1^2 - 0.0033X_2^2 + 0.0029X_3^2 + 0.0042X_4^2$	0.975	0.000
Y <sub>3</sub>	$Y_3 = 8.4200 - 0.0237X_1 + 0.1129X_2 - 0.0012X_3 + 0.1046X_4 + 0.0194X_1X_2 - 0.0319X_1X_3 - 0.0319X_1X_4 - 0.0056X_2X_3 + 0.0069X_2X_4 + 0.0306X_3X_4 - 0.0086X_1^2 + 0.0301X_2^2 - 0.0199X_3^2 - 0.211X_4^2$	0.818	0.000
Y <sub>4</sub>	$Y_4 = 34.0967 + 8.6629X_1 - 0.8729X_2 - 6.1529X_3 - 6.1529X_4 + 2.9919X_1X_2 - 0.9619X_1X_3 - 2.3931X_1X_4 + 0.3869X_2X_3 + 2.2856X_2X_4 + 4.1669X_3X_4 + 2.9395X_1^2 + 0.7795X_2^2 + 0.3957X_3^2 + 1.2195X_4^2$	0.592	0.003
Y <sub>5</sub>	$Y_5 = 1.3133 + 0.5412X_1 - 0.2271X_2 + 1.1062X_3 + 0.7271X_4 + 0.2131X_1X_2 - 0.2506X_1X_3 - 0.1569X_1X_4 + 0.2969X_2X_3 - 0.0019X_2X_4 + 0.3419X_3X_4 + 4.3601X_1^2 + 0.9176X_2^2 + 1.2688X_3^2 + 1.5213X_4^2$	0.899	0.300

X<sub>1</sub>: whey conc. (%), X<sub>2</sub>: stater conc. (%), X<sub>3</sub>: temperature (°C), X<sub>4</sub>: incubation time (h)

Y<sub>1</sub>: pH, Y<sub>2</sub>: acidity (%), Y<sub>3</sub>: cell viability, Y<sub>4</sub>: lipase inhibition (%), Y<sub>5</sub>: α-glucosidase inhibition (%)

표 48은 pH에 대한 ANOVA(analysis of variance) 결과를 나타낸 것임. Regression 과 linear는 각각 유의수준이 0.009와 0.001로써 매우 유의성이 높게 나타났으나 square와 2-way interactions는 각각 0.053과 0.962로 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났음.

표 48. *P. pentosauce* KI13의 Y<sub>1</sub>(pH) 결과

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>1</sub>	Regression	14	1.8977	0.1356	4.16	0.009
	Linear	4	1.4395	0.3599	11.04	0.001
	Square	4	0.4149	0.1037	3.18	0.053
	Interaction	6	0.0432	0.0072	0.22	0.962
	Residual error	12	0.3910	0.0326	-	-
	Lack of fit	10	0.3892	0.0389	41.70	0.024
	Pure error	2	0.0018	0.0009	-	-
	Total	26	2.2888	-	-	-

표 49는 산도에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression과 linear는 모두 유의 수준이 0.000으로써 매우 유의성이 높게 나타난 반면 square와 2-way interactions는 각각 0.349과 0.320으로 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났음.

표 49. *P. pentosauce* KI13 의 Y<sub>2</sub>(acidity) 결과

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>2</sub>	Regression	14	0.1459	0.0104	33.36	0.000
	Linear	4	0.1419	0.0355	113.55	0.000
	Square	4	0.0015	0.0004	1.23	0.349
	Interaction	6	0.0024	0.0004	1.32	0.320
	Residual error	12	0.0037	0.0003	-	-
	Lack of fit	10	0.0035	0.0003	3.55	0.240
	Pure error	2	0.0002	0.0001	-	-
	Total	26	0.1497	-	-	-

표 50은 유산균 수에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression과 linear는 각각 유의수준이 0.012와 0.000으로써 매우 유의성이 높게 나타난 반면 square와 2-way interactions는 각각 0.404과 0.650으로 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났다.

표 50. *P. pentosauce* KI13 의 Y<sub>3</sub>(cell viability) 결과

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>3</sub>	Regression	14	0.6932	0.0495	3.84	0.012
	Linear	4	0.5821	0.1455	11.29	0.000
	Square	4	0.0563	0.0141	1.09	0.404
	Interaction	6	0.0548	0.0091	0.7	0.650
	Residual error	12	0.1547	0.0129	-	-
	Lack of fit	10	0.1533	0.0153	21.90	0.044
	Pure error	2	0.0014	0.0007	-	-
	Total	26	0.8479	-	-	-

표 51은 lipase 억제능에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression의 유의수준은 0.356으로 유의성이 없었으나 linear는 0.039로 유의성이 있었음. 반면 square와 2-way interactions는 각각 0.938과 0.865로 유의성이 없는 것으로 나타났다.

표 51. *P. pentosauce* KI13 의 Y<sub>4</sub>(lipase inhibition) 결과

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>4</sub>	Regression	14	4446.8	317.63	1.24	0.356
	Linear	4	3636.6	909.15	3.56	0.039
	Square	4	196.8	49.20	0.19	0.938
	Interaction	6	613.4	102.24	0.40	0.865
	Residual error	12	3062.9	255.24	-	-
	Lack of fit	10	2633.3	263.33	1.23	0.530
	Pure error	2	429.6	214.81	-	-
	Total	26	7509.7	-	-	-

표 52는 α-glucosidase 억제능에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression의 유의수준은 0.001으로 유의성이 있는 반면 linear는 0.071로 유의성이 없었음. Square는 0.000로 유의성이 높았지만 2-way interactions는 0.969로 유의성이 없는 것으로 나타났음.

표 52. *P. pentosauce* KI13 의 Y<sub>5</sub>(α-glucosidase inhibition) 결과

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>5</sub>	Regression	14	469.444	33.532	7.62	0.001
	Linear	4	50.327	12.582	2.86	0.071
	Square	4	413.711	103.428	23.50	0.000
	Interaction	6	5.406	0.901	0.20	0.969
	Residual error	12	52.811	4.401	-	-
	Lack of fit	10	52.798	5.280	808.13	0.001
	Pure error	2	0.013	0.007	-	-
	Total	26	522.254	-	-	-

이에 따라 본 디자인에서는 교차항보다 일차항에 대한 영향이 큰 것으로 나타났음. 반응표면 분석 결과 나타난 최적 조건에서의 coded 값과 uncoded 값을 표 53에 나타내었음. 최적 조건일 때의 code 값은 X<sub>1</sub>=19, X<sub>2</sub>=0.0515, X<sub>3</sub>=31.73 그리고 X<sub>4</sub>=13.05로 나타났음. 즉 유청농도(X<sub>1</sub>)는 19%, 스타터 첨가량(X<sub>2</sub>)은 0.0515%, 배양 온도(X<sub>3</sub>)는 31.73℃, 배양 시간(X<sub>4</sub>)은 13.05 hrs 일 때 최적 pH, 산도, 유산균수, lipase 억제능, 및 α-glucosidase 억제능을 보이는 것으로 나타났으며 예상되는 pH는 4.9216, 산도 0.4304%, 유산균수 8.3413 Log CFU/mL, lipase 억제능 75.2683%, α-glucosidase 억제능 20.3473% 이었음. 그러나 비만 억제에 직접 관련이 있는 pH, lipase 억제능 및 α-glucosidase 억제능을 중심으로 최적조건을 설정했을 때 유청농도(X<sub>1</sub>)는 19%, 스타터 첨가량(X<sub>2</sub>)은 0.10%, 배양 온도(X<sub>3</sub>)는 38.13℃, 배양 시간(X<sub>4</sub>)은 6.49 hrs 이었으며, 이때 예측 최적 pH는 4.80, lipase 억제능 72.7557%, α-glucosidase 억제능 31.74533% 이었고, 실험값은 pH는 4.96, lipase



억제능  $70.51 \pm 1.75\%$ ,  $\alpha$ -glucosidase 억제능  $27.52 \pm 0.16\%$ 이었음(표 54).  
따라서 종속변수가 5개 보다 3개로 했을 때 lipase 억제능이 약간 낮아졌지만  $\alpha$ -glucosidase 억제능은 많이 증가함을 볼 수 있었음.

표 53 *P.pentosauce* KI13의 최적 발효 조건

Dependent		Independent variables	Critical value (uncoded)	Predicted value	Stationary point
Y <sub>1</sub> (pH)		X <sub>1</sub>	19.0	4.80	Target
		X <sub>2</sub>	0.0477		
		X <sub>3</sub>	28.0001		
		X <sub>4</sub>	23.6481		
Y <sub>2</sub> (acidity)		X <sub>1</sub>	11.9232	0.4	Target
		X <sub>2</sub>	0.01		
		X <sub>3</sub>	40.0		
		X <sub>4</sub>	24		
Y <sub>3</sub> (cell viability)		X <sub>1</sub>	18.9895	8.3	Target
		X <sub>2</sub>	0.10		
		X <sub>3</sub>	39.9790		
		X <sub>4</sub>	8.0057		
Y <sub>4</sub> (lipase inhibition)		X <sub>1</sub>	13.0	90.0	Target
		X <sub>2</sub>	0.0292		
		X <sub>3</sub>	28.0		
		X <sub>4</sub>	6.0		
Y <sub>5</sub> ( $\alpha$ -glucosidase inhibition)		X <sub>1</sub>	13.0	90.0	Target
		X <sub>2</sub>	0.0292		
		X <sub>3</sub>	28.0		
		X <sub>4</sub>	6.0		
Multiple response optimization	Y <sub>1</sub> , Y <sub>2</sub> , Y <sub>3</sub> , Y <sub>4</sub> , Y <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	19.0	-	-
		X <sub>2</sub>	0.0515		
		X <sub>3</sub>	31.7322		
		X <sub>4</sub>	13.0525		
	Y <sub>1</sub> , Y <sub>4</sub> , Y <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	19.0	-	-
		X <sub>2</sub>	0.10		
		X <sub>3</sub>	38.1342		
		X <sub>4</sub>	6.4868		

표 54. *P. pentosauce* KI13 의 최적화된 조건에서의 검증 예측 결과

Dependent	Predicted value		Experimental value
Y <sub>1</sub>	4.9216	4.8	4.96
Y <sub>2</sub>	0.4304	-	-
Y <sub>3</sub>	8.3413	-	-
Y <sub>4</sub>	75.2683	72.7557	70.51±1.75
Y <sub>5</sub>	20.3473	31.7453	27.52±0.16

독립변수(X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>)가 종속변수(Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub>)에 미치는 영향을 Maple software(Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었음(그림 19).

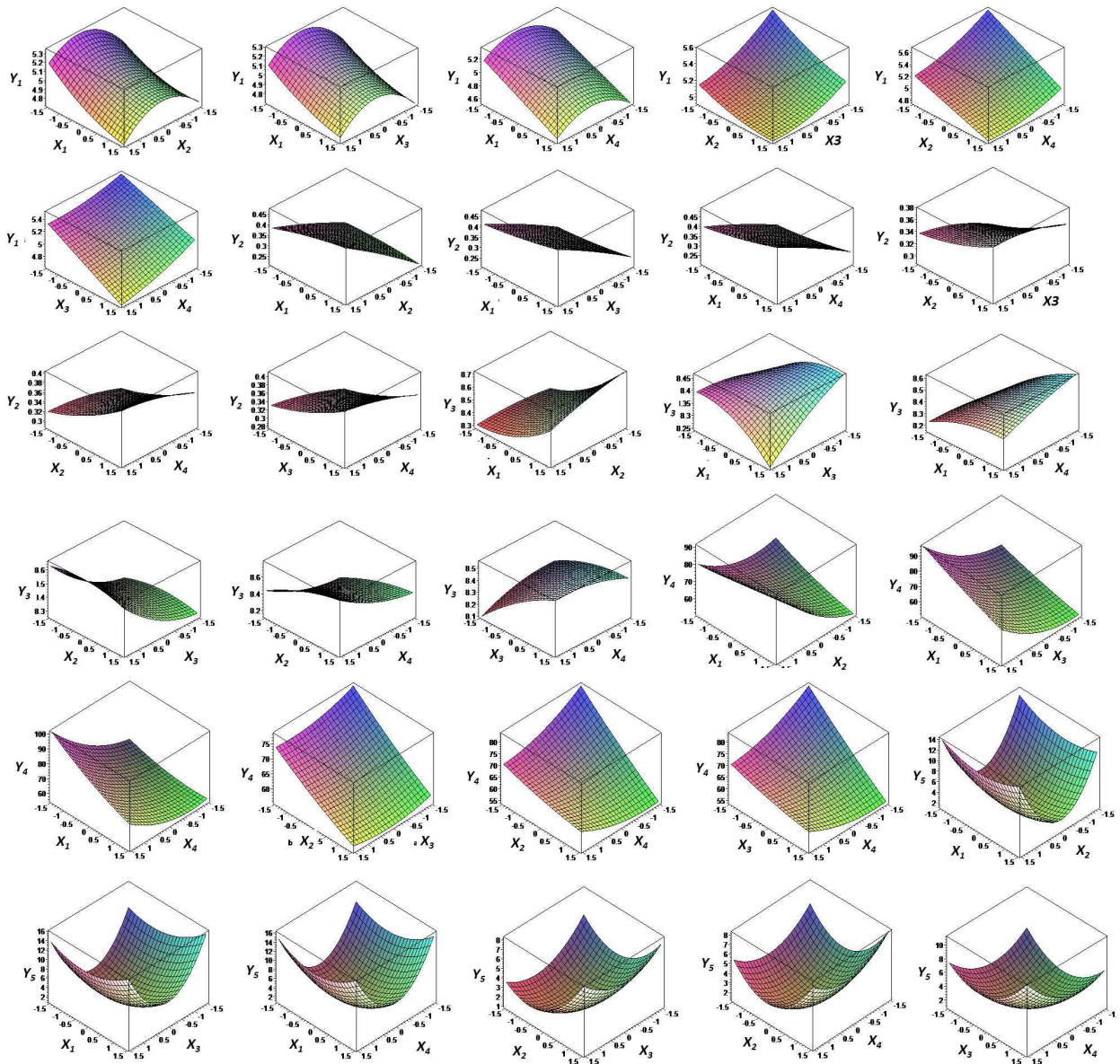


그림 19. *P. pentosauce* K13에서 종속 변수(pH, 산성도, 세포 생존율, 리파제 억제 및  $\alpha$ -글루코시다제 억제)에 대한 독립 변수의 효과에 대한 반응 표면 플롯

$X_1$ : whey conc. (%),  $X_2$ : stater conc. (%),  $X_3$ : temperature ( $^{\circ}$ C),  $X_4$ : incubation time (h),  $Y_1$ : pH,  $Y_2$ : acidity (%),  $Y_3$ : cell viability,  $Y_4$ : lipase inhibition (%),  $Y_5$ :  $\alpha$ -glucosidase inhibition (%)

2) 반응표면분석법(RSM)을 이용한 *W. cibaria* K135 균주 배양조건의 최적화

모두 27개의 구간에서 실험이 행해졌으며, 각각의 구간에 따른 종속변수( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ )를 표 55에 나타내었음. 비만과 관련된 조건을 보면 lipase 억제능이 유청농도가 13%, 스타터양이 0.055%, 배양온도가 34 $^{\circ}$ C에서 6시간 배양하였을 때 79.1%로써 가장 높았고,  $\alpha$ -glucosidase 억제능은 유청농도가 7%, 스타터양이 0.055%, 배양온도가 34 $^{\circ}$ C에서 15시간 배양하였을 때 14.94%이었음.

표 55. *W. cibaria* KI35 균주의 RSM 결과

Run Order	Independent variables				Response				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>
1	-1	-1	-1	-1	5.74	0.28	7.57	9.09	1.90
2	1	-1	-1	-1	6.03	0.32	7.55	31.45	2.94
3	-1	1	-1	-1	5.40	0.36	7.83	13.31	2.24
4	1	1	-1	-1	5.73	0.47	7.60	4.15	5.26
5	-1	-1	1	-1	5.50	0.27	7.46	24.41	4.64
6	1	-1	1	-1	5.58	0.38	8.15	11.40	2.81
7	-1	1	1	-1	5.14	0.37	7.67	13.91	1.17
8	1	1	1	-1	5.40	0.50	7.70	22.35	6.72
9	-1	-1	-1	1	4.80	0.34	7.67	15.93	0.73
10	1	-1	-1	1	5.14	0.46	8.08	32.46	-0.06
11	-1	1	-1	1	4.45	0.48	7.97	20.13	-1.97
12	1	1	-1	1	4.76	0.60	8.11	50.97	-1.97
13	-1	-1	1	1	4.77	0.34	7.45	10.89	0.23
14	1	-1	1	1	4.97	0.48	8.04	38.71	2.35
15	-1	1	1	1	4.58	0.74	7.37	18.06	5.36
16	1	1	1	1	4.80	0.52	7.39	31.45	3.32
17	-2	0	0	0	4.66	0.29	7.19	16.31	14.94
18	2	0	0	0	5.11	0.47	8.28	31.47	1.48
19	0	-2	0	0	5.24	0.38	7.67	36.22	2.01
20	0	2	0	0	4.59	0.56	7.94	26.02	2.61
21	0	0	-2	0	5.02	0.48	7.93	19.48	-0.41
22	0	0	2	0	4.96	0.42	7.78	18.32	0.61
23	0	0	0	-2	6.20	0.29	6.10	79.10	0.41
24	13	0.055	34	24	4.50	0.53	7.78	45.43	-1.07
25	13	0.055	34	15	4.83	0.48	8.05	20.75	0.53
26	13	0.055	34	15	4.93	0.45	8.08	24.96	0.23
27	13	0.055	34	15	4.87	0.46	8.15	24.26	0.66

X<sub>1</sub>: whey conc. (%), X<sub>2</sub>: stater conc. (%), X<sub>3</sub>: temperature (°C), X<sub>4</sub>: incubation time (h)

Y<sub>1</sub>: pH, Y<sub>2</sub>: acidity (%), Y<sub>3</sub>: cell viability, Y<sub>4</sub>: lipase inhibition (%), Y<sub>5</sub>: α-glucosidase inhibition (%)

배양조건을 최적화하기 위하여 4가지 독립변수들의 조합에 대한 종속변수의 반응 값을 표 56에 나타내었음. 그 결과 Y<sub>1</sub>은 모든 일차항에서 유의수준(*p*-value)이 0.05 보

다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타난 반면 교차항은  $X_4X_4$ 와  $X_3X_4$ 가 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났음.  $Y_2$ 는  $X_3$ 을 제외한 대부분의 일차항에서 유의수준( $p$ -value)이 0.05 보다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타난 반면 교차항은 모두 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났음.  $Y_3$ 은  $X_1$ 과  $X_4$ 가 일차항에서 유의수준( $p$ -value)이 0.05 보다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타낸 반면, 교차항은  $X_4X_4$ 만이 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났음.  $Y_4$ 는 모든 일차항에서 통계적으로 유의성을 없었고 교차항은  $X_4X_4$ 만이 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났음.  $Y_5$ 는  $Y_4$ 와 마찬가지로 모든 일차항에서 통계적으로 유의성이 없었고, 교차항은  $X_1X_1$ 만이 유의성이 있는 것으로 나타났음.

표 56. *W. cibaria* KI35의 t-통계량을 기반으로 하는 다양한 응답에 대한 적합된 2차 다항식의 추정된 계수

	Y <sub>1</sub>		Y <sub>2</sub>		Y <sub>3</sub>		Y <sub>4</sub>		Y <sub>5</sub>	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
intercept	4.8767	0.000	0.4633	0.000	8.0933	0.000	23.3233	0.016	0.4733	0.794
X <sub>1</sub>	0.1221	0.000	0.0379	0.016	0.1587	0.031	5.3137	0.097	-0.8271	0.212
X <sub>2</sub>	-0.1487	0.000	0.0637	0.001	0.0087	0.895	-0.8504	0.778	0.2412	0.707
X <sub>3</sub>	-0.0596	0.024	0.0071	0.610	-0.0604	0.370	-0.3596	0.905	0.8154	0.218
X <sub>4</sub>	-0.4021	0.000	0.0621	0.001	0.1629	0.027	0.8829	0.770	-0.9437	0.158
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	0.0253	0.321	-0.0201	0.187	-0.0659	0.357	-1.9003	0.556	1.8770	0.015
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.0328	0.204	0.0024	0.870	-0.0484	0.495	-0.0928	0.977	0.4020	0.557
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0.0516	0.057	-0.0026	0.859	-0.0359	0.611	-3.1478	0.335	-0.1505	0.825
X <sub>4</sub> X <sub>4</sub>	0.1416	0.000	-0.0126	0.397	-0.2647	0.002	7.6934	0.030	-0.2580	0.705
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.0131	0.650	-0.0169	0.329	-0.1069	0.204	-0.6369	0.863	0.3744	0.635
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0.0319	0.281	-0.0144	0.403	0.0644	0.434	-1.4956	0.687	0.0331	0.966
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0.0069	0.812	-0.0144	0.403	0.0431	0.597	4.9969	0.138	-0.5306	0.503
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.0294	0.319	0.0094	0.582	-0.1006	0.230	0.0456	0.990	0.5306	0.503
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.0056	0.845	0.0169	0.329	-0.0294	0.718	2.8281	0.450	-0.1006	0.898
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0.0781	0.017	0.0069	0.686	-0.1256	0.140	-2.1531	0.563	0.7206	0.367

X<sub>1</sub>: whey conc. (%), X<sub>2</sub>: stater conc. (%), X<sub>3</sub>: temperature (°C), X<sub>4</sub>: incubation time (h)

Y<sub>1</sub>: pH, Y<sub>2</sub>: acidity (%), Y<sub>3</sub>: cell viability, Y<sub>4</sub>: lipase inhibition (%), Y<sub>5</sub>: α-glucosidase inhibition (%)

상기에서 얻어진 결과를 바탕으로 구한 반응식은 표 57과 같음. 실험 결과 얻어진 data를 Minitab software를 이용하여 반응표면 분석한 결과를 바탕으로 적합한 2차 다항식의 모델을 구하였음. 각각의 독립변수에 대한 각각의 식은 아래 모델식과 같으며, 종속변수인 Y<sub>1</sub>의 결정계수(R<sup>2</sup>)는 0.973으로 나타났으며,  $p=0.000$ 으로

나타났음. 다만, 비만 억제와 관련 있는 종속변수인  $Y_4$ 와  $Y_5$ 는 결정계수가 0.592와 0.610, p값이 0.016과 0.794를 나타내어 낮게 나왔음.

표 57. *W. cibaria* KI35가 포함된 유청의 발효 조건에 대해 RSM 프로그램으로 계산한 다항식

Responses	Quadratic polynomial model	R <sup>2</sup>	p-value
$Y_1$	$Y_1 = 4.8767 + 0.1221X_1 - 0.1487X_2 - 0.0596X_3 - 0.4021X_4 + 0.0131X_1X_2 - 0.0319X_1X_3 + 0.0069X_1X_4 + 0.0294X_2X_3 + 0.0056X_2X_4 + 0.0781X_3X_4 + 0.0253X_1^2 + 0.0328X_2^2 + 0.0516X_3^2 - 0.1416X_4^2$	0.973	0.000
$Y_2$	$Y_2 = 0.4633 + 0.0379X_1 + 0.0637X_2 + 0.0071X_3 + 0.001X_4 - 0.0169X_1X_2 - 0.0144X_1X_3 - 0.0144X_1X_4 + 0.0094X_2X_3 + 0.0169X_2X_4 + 0.0069X_3X_4 - 0.0201X_1^2 + 0.0024X_2^2 - 0.0026X_3^2 - 0.0126X_4^2$	0.829	0.000
$Y_3$	$Y_3 = 8.0933 + 0.1587X_1 + 0.0087X_2 - 0.0604X_3 + 0.1629X_4 - 0.1069X_1X_2 + 0.0644X_1X_3 + 0.0431X_1X_4 - 0.1006X_2X_3 - 0.0294X_2X_4 - 0.1256X_3X_4 - 0.0659X_1^2 - 0.0484X_2^2 - 0.0359X_3^2 - 0.2647X_4^2$	0.749	0.000
$Y_4$	$Y_4 = 23.3233 + 5.3137X_1 - 0.8504X_2 - 0.3596X_3 + 0.8829X_4 - 0.6369X_1X_2 - 1.4956X_1X_3 + 4.99691X_1X_4 + 0.0456X_2X_3 + 2.8281X_2X_4 - 2.1531X_3X_4 - 1.9003X_1^2 - 0.0928X_2^2 - 3.1478X_3^2 + 7.6934X_4^2$	0.592	0.016
$Y_5$	$Y_5 = 0.4733 - 0.8271X_1 + 0.2412X_2 + 0.8154X_3 - 0.9437X_4 + 0.3744X_1X_2 + 0.0331X_1X_3 - 0.5306X_1X_4 + 0.5306X_2X_3 - 0.1006X_2X_4 + 0.7206X_3X_4 + 1.8770X_1^2 + 0.4020X_2^2 - 0.1505X_3^2 - 0.2580X_4^2$	0.610	0.794

$X_1$ : whey conc. (%),  $X_2$ : stater conc. (%),  $X_3$ : temperature (°C),  $X_4$ : incubation time (h)

$Y_1$ : pH,  $Y_2$ : acidity (%),  $Y_3$ : cell viability,  $Y_4$ : lipase inhibition (%),  $Y_5$ :  $\alpha$ -glucosidase inhibition (%)

표 58은 pH에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression과 linear는 각각 유의수준이 0.000으로써 매우 유의성이 높게 나타났음. Square는 0.002로서 0.05% 수준에서 유의성이 있었으나 2-way interactions는 0.199로서 유의성이 없는 것으로 나타났음.

표 58. *W. cibaria* KI35 Y<sub>1</sub>(pH)의 반응에 대한 분산 분석

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>2</sub>	Regression	14	5.4304	0.38789	30.43	0.000
	Linear	4	4.8540	1.21351	95.19	0.000
	Square	4	0.4446	0.1112	8.72	0.002
	Interaction	6	0.1317	0.0220	1.72	0.199
	Residual error	12	0.1530	0.0127	-	-
	Lack of fit	10	0.1479	0.0148	5.84	0.155
	Pure error	2	0.0051	0.0025	-	-
	Total	26	5.5834	-	-	-

표 59는 산도에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression과 linear는 각각 0.009와 0.000으로 매우 유의성이 높게 나타난 반면 square와 2-way interactions는 각각 0.595와 0.671로 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났음.

표 59. *W. cibaria* KI35 Y<sub>2</sub>(acidity)의 반응에 대한 분산 분석

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>2</sub>	Regression	14	0.2563	0.0183	4.13	0.009
	Linear	4	0.2257	0.0564	12.83	0.000
	Square	4	0.0126	0.0032	0.72	0.595
	Interaction	6	0.0179	0.0030	0.68	0.671
	Residual error	12	0.0528	0.0044	-	-
	Lack of fit	10	0.0523	0.0052	22.42	0.043
	Pure error	2	0.0005	0.0002	-	-
	Total	26	0.3091	-	-	-

표 60은 유산균수에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression과 2-way interactions는 각각 유의수준이 0.056과 0.385로써 유의성이 낮은 반면 linear와 square는 각각 0.049와 0.030으로 0.05% 수준에서 유의성이 있는 것으로 나타났음.

표 60. *W. cibaria* KI35 에서 Y<sub>3</sub>(cell viability)의 반응에 대한 분산 분석

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>3</sub>	Regression	14	3.6173	0.2584	2.56	0.056
	Linear	4	1.3313	0.3328	3.29	0.049
	Square	4	1.5789	0.3947	3.90	0.030
	Interaction	6	0.7071	0.1179	1.17	0.385
	Residual error	12	1.2133	0.1011	-	-
	Lack of fit	10	1.2081	0.1208	45.88	0.022
	Pure error	2	0.0053	0.0026	-	-
	Total	26	4.8307	-	-	-

표 61은 lipase 억제능에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression의 유의수준은 0.355, linear는 0.517, square는 0.079, 2-way interactions는 0.788로써 모두 유의성이 없는 것으로 나타났음.

표 61. *W. cibaria* KI35 에서 Y<sub>4</sub>(lipase inhibition)의 반응에 대한 분산 분석

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>4</sub>	Regression	14	3653.01	260.929	1.25	0.355
	Linear	4	716.83	179.208	0.86	0.517
	Square	4	2292.21	573.053	2.74	0.079
	Interaction	6	643.96	107.327	0.51	0.788
	Residual error	12	2514.05	209.505	-	-
	Lack of fit	10	2503.88	250.388	49.20	0.020
	Pure error	2	10.18	5.089	-	-
	Total	26	6167.06	-	-	-

표 62는 α-glucosidase 억제능에 대한 ANOVA 결과를 나타낸 것임. Regression의 유의수준은 0.309, linear는 0.274, square는 0.081, 2-way interactions는 0.897로써 모두 유의성이 없는 것으로 나타났음.



표 62. *W. cibaria* KI35 에서  $Y_5$ ( $\alpha$ -glucosidase inhibition)의 반응에 대한 분산 분석

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y <sub>5</sub>	Regression	14	176.994	12.6425	1.34	0.309
	Linear	4	55.148	13.7870	1.46	0.274
	Square	4	102.105	25.5263	2.71	0.081
	Interaction	6	19.741	3.2901	0.35	0.897
	Residual error	12	113.213	9.4344	-	-
	Lack of fit	10	113.116	11.3116	232.59	0.004
	Pure error	2	0.097	0.0486	-	-
	Total	26	290.207	-	-	-

반응표면 분석 결과 나타난 최적 조건에서의 coded 값과 uncoded 값을 표 63에 나타내었음. 최적 조건일 때의 code 값은  $X_1=19$ ,  $X_2=0.0715$ ,  $X_3=36.98$  그리고  $X_4=21.59$ 로 나타났음. 즉, 유청농도( $X_1$ )는 19%, 스타터 첨가량( $X_2$ )은 0.0715%, 배양 온도( $X_3$ )는 36.98°C, 배양 시간( $X_4$ )은 21.59 hrs 일 때 최적 pH, 산도, 유산균수, lipase 억제능, 및  $\alpha$ -glucosidase 억제능을 보이는 것으로 나타났으며 각각의 그 결과 값은 표 64와 같음. 예상되는 pH는 4.954, 산도 0.5148%, 유산균수 7.5127 Log CFU/mL, lipase 억제능 50.6563%,  $\alpha$ -glucosidase 억제능 5.8379% 이었음. 그러나 비만 억제와 직접 관련이 있는 pH, lipase 억제능 및  $\alpha$ -glucosidase 억제능을 중심으로 최적조건을 설정했을 때 유청농도( $X_1$ )는 19%, 스타터 첨가량( $X_2$ )은 0.10%, 배양 온도( $X_3$ )는 36.70°C, 배양 시간( $X_4$ )은 23.905 hrs 이었으며, 이 때, 예측 최적 pH는 5.0392, lipase 억제능 75.2677%,  $\alpha$ -glucosidase 억제능 7.4466% 이었고, 실험값은 pH 5.04, lipase 억제능  $68.49 \pm 1.24\%$ ,  $\alpha$ -glucosidase 억제능  $7.07 \pm 1.05\%$  이었음(표 64).

따라서 종속변수가 5개 보다 3개로 했을 때 lipase 억제능과  $\alpha$ -glucosidase 억제능은 많이 증가함을 볼 수 있었음.

표 63. *W. cibaria* KI35 의 발효 최적 조건

Dependent	independent variables	critical value (uncoded)	predicted value	Stationary point	
Y <sub>1</sub> (pH)	X <sub>1</sub>	7.0636	4.80	Target	
	X <sub>2</sub>	0.0988			
	X <sub>3</sub>	39.7414			
	X <sub>4</sub>	15.4358			
Y <sub>2</sub> (acidity)	X <sub>1</sub>	7.0014	0.50	Target	
	X <sub>2</sub>	0.10			
	X <sub>3</sub>	39.9999			
	X <sub>4</sub>	11.6362			
Y <sub>3</sub> (cell viability)	X <sub>1</sub>	18.9998	8.0	Target	
	X <sub>2</sub>	0.0418			
	X <sub>3</sub>	40.0			
	X <sub>4</sub>	9.8706			
Y <sub>4</sub> (lipase inhibition)	X <sub>1</sub>	12.7104	60.0	Target	
	X <sub>2</sub>	0.10			
	X <sub>3</sub>	28.0			
	X <sub>4</sub>	24.0			
Y <sub>5</sub> (α-glucosidase inhibition)	X <sub>1</sub>	7.0	14.93	Target	
	X <sub>2</sub>	0.10			
	X <sub>3</sub>	40.0			
	X <sub>4</sub>	24.0			
Multiple response optimization	Y <sub>1</sub> , Y <sub>2</sub> , Y <sub>3</sub> , Y <sub>4</sub> , Y <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	19.0	-	-
		X <sub>2</sub>	0.0715		
		X <sub>3</sub>	36.9786		
		X <sub>4</sub>	21.5864		
	Y <sub>1</sub> , Y <sub>4</sub> , Y <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	19.0	-	-
		X <sub>2</sub>	0.10		
		X <sub>3</sub>	36.6981		
		X <sub>4</sub>	23.9053		

표 64. *W. cibaria* KI35 에서 최적화된 조건에서의 검증 예측 결과

Dependent	Predicted value		Experimental value
$Y_1$	4.9540	5.0392	5.04
$Y_2$	0.5148		
$Y_3$	7.5127		
$Y_4$	50.6563	75.2677	$68.49 \pm 1.24$
$Y_5$	5.8379	7.4466	$7.07 \pm 1.05$

독립변수( $X_1, X_2, X_3, X_4$ )가 종속변수( $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5$ )에 미치는 영향을 Maple software(Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었다(그림 20).

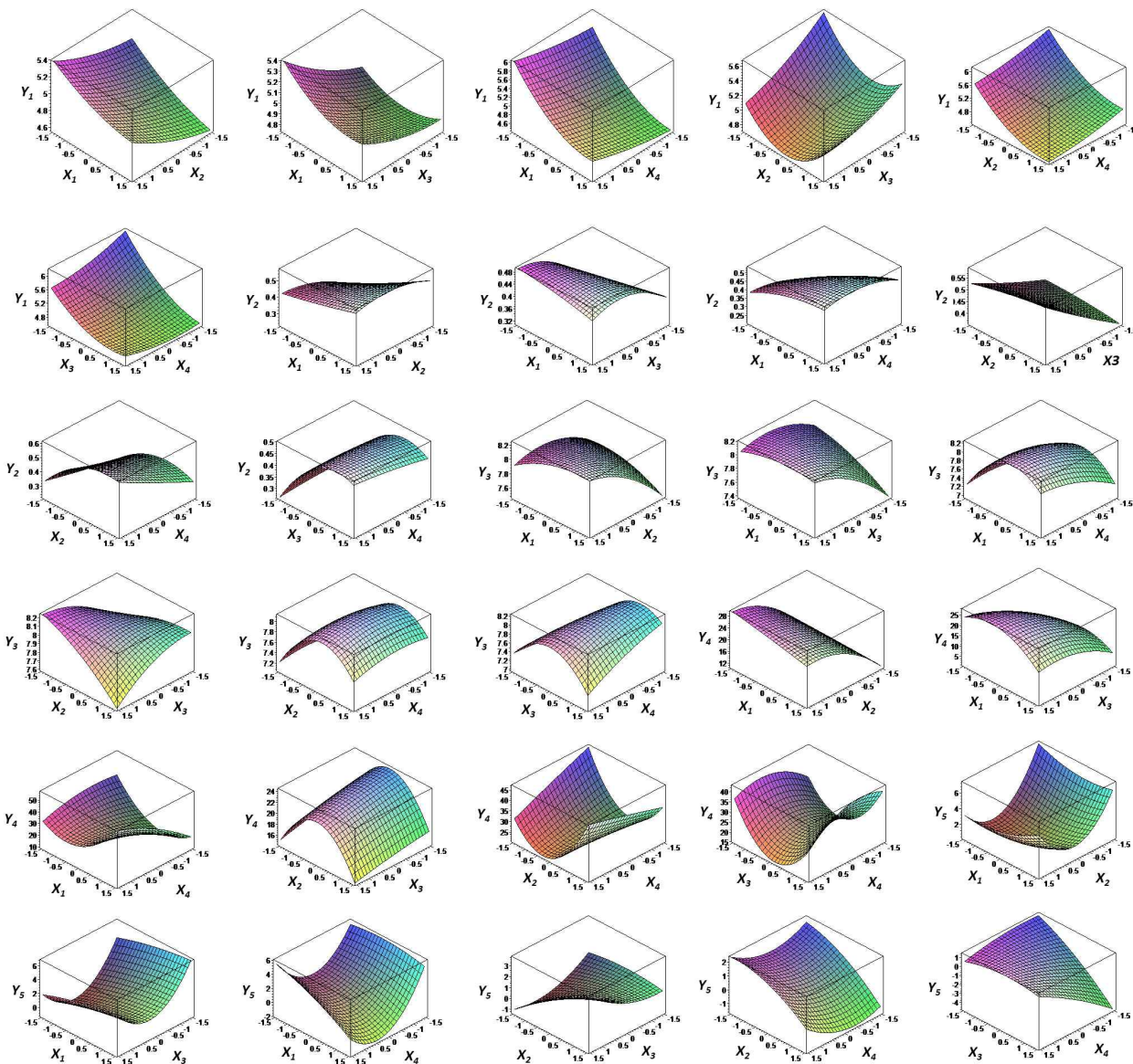


그림 20. *W. cibaria* KI35에서 독립 변수가 종속 변수(pH, 산성도, 세포 생존율, 리파제 억제 및  $\alpha$ -글루코시다제 억제)에 미치는 영향에 대한 반응 표면 플롯

$X_1$ : whey conc. (%),  $X_2$ : stater conc. (%),  $X_3$ : temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $X_4$ : incubation time (h),  $Y_1$ : pH,  $Y_2$ : acidity (%),  $Y_3$ : cell viability,  $Y_4$ : lipase inhibition (%),  $Y_5$ :  $\alpha$ -glucosidase inhibition (%)

[3차년도] 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 유효성분 분리 및 비만 억제능 평가

1. 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 유효성분 분리 및 유효성분 중 기능성 성분 선발

가. 한외여과

10% 유청분말에 *P. pentosaceus* KI13과 *W. cibaria* KI35를 각각 1%씩 접종하고 37°C에서 pH 4.5에 도달할 때까지 배양시켜 얻어진 발효산물을 cut-off 10,000 Da의 membrane(YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치(Amicon Co)로 1 kDa 이하, 1-3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa, 10 kDa 이상의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 시료로 사용하였음.

*P. pentosaceus* KI13 균주에 의한 한외여과 유청발효물을 membrane으로 분획한 결과(표 65), MW 1 kDa이하가 12.13%, 1-3 kDa이 63.26%, 3-5 kDa이 14.66%, 5-10 kDa이 9.95%로서 1-3 kDa이 가장 회수율이 높게 나왔음. 또한 lipase 억제능 및  $\alpha$ -glucosidase 억제능에서도 1-3 kDa에서 18.72%와 16.69%로서 가장 높게 나왔음.

표 65. *P. pentosaceus* KI13에 의한 한외여과 발효유청 가수분해물의 회수율 및 항비만

Membrane	Recovery rates(%)	Lipase inhibitory activity(%)	$\alpha$ -glucosidase inhibitory activity(%)
Whole	100	-	-
5-10 kDa	9.95	1.53±1.82	14.53±0.70
3-5 kDa	14.66	12.58±1.98	15.12±0.52
1-3 kDa	63.26	18.72±1.89	16.69±0.80
1 kDa 이하	12.13	12.02±0.39	11.45±0.03

*W. cibaria* KI35 균주에 의한 한외여과 유청발효물을 membrane으로 분획한 결과(표 66), MW 1 kDa이하가 6.93%, 1-3 kDa이 21.26%, 3-5 kDa이 49.48%, 5-10 kDa이 22.32%로서 3-5 kDa이 가장 회수율이 높게 나왔음. 또한 lipase 억제능은 3-5 kDa에서 23.86%로 가장 높은 반면  $\alpha$ -glucosidase 억제능은 1-3 kDa에서 26.41%로서 가장 높게 나왔음.

표 66. *W. cibaria* KI35의 한외여과 발효유청 가수분해물의 회수율 및 항비만

Membrane	Recovery rates(%)	Lipase inhibitory activity(%)	$\alpha$ -glucosidase inhibitory activity(%)
Whole	100	-	-
5-10 kDa	22.32	7.55±0.29	15.25±1.65
3-5 kDa	49.48	23.86±1.29	20.79±1.15
1-3 kDa	21.26	14.37±3.58	26.41±1.11
1 kDa 이하	6.93	12.05±2.64	14.34±0.36

나. 유효성분 분석

1) 유청발효물

LC/MS, GC/MS, HPLC를 이용하여 유청분말과 유청분말 발효물 (KI13 발효물과

KI35 발효물에 들어있는 대사물질들의 차이를 분석(그림 21-그림 22)한 후 PLS-DA를 이용하여 대변량통계 분석(그림 23)을 실시한 결과, 유청분말, KI13 발효물, KI35 발효물은 PLS-DA score plot상에서 유의적으로 분리되는 것을 확인하였음.

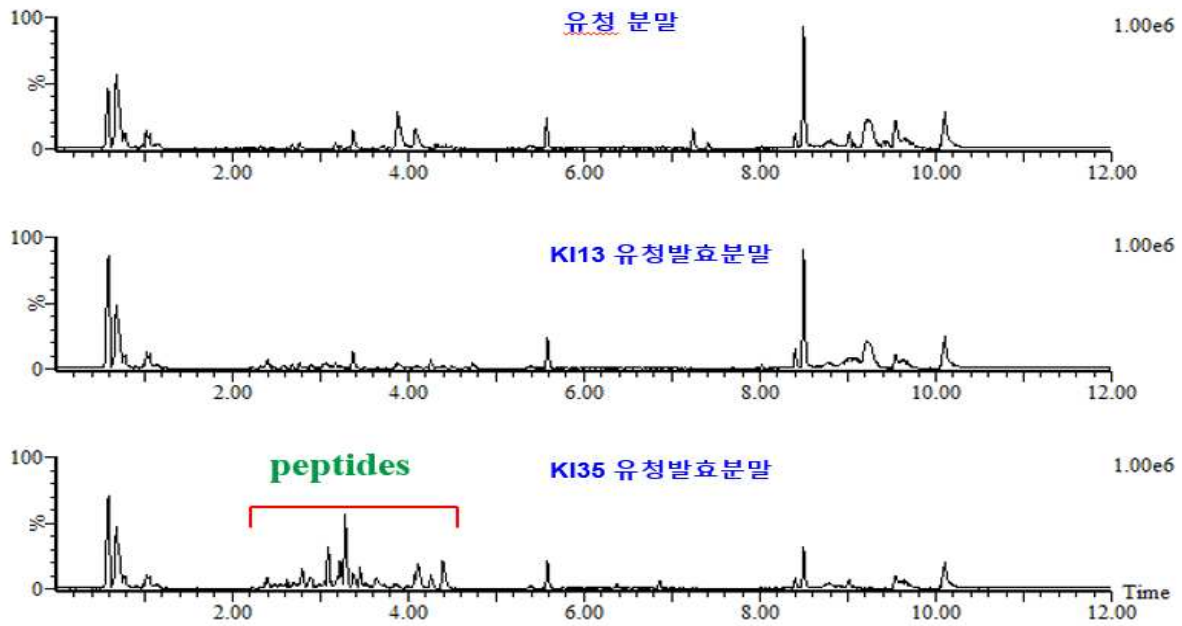


그림 21. 유청분말 및 유청발효물의 UPLC-Q-TOF MS chromatogram

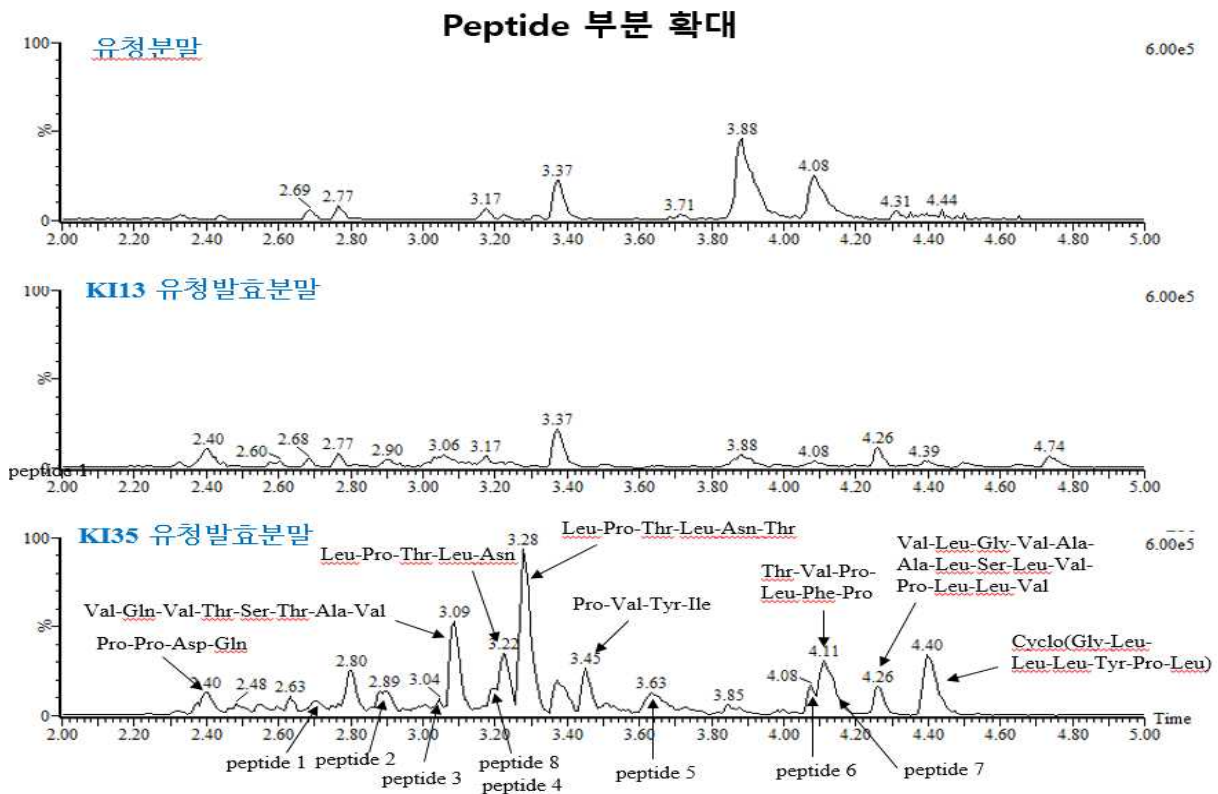


그림 22. UPLC-Q-TOF MS를 이용한 유청분말 및 유청발효물의 펩타이드 분석

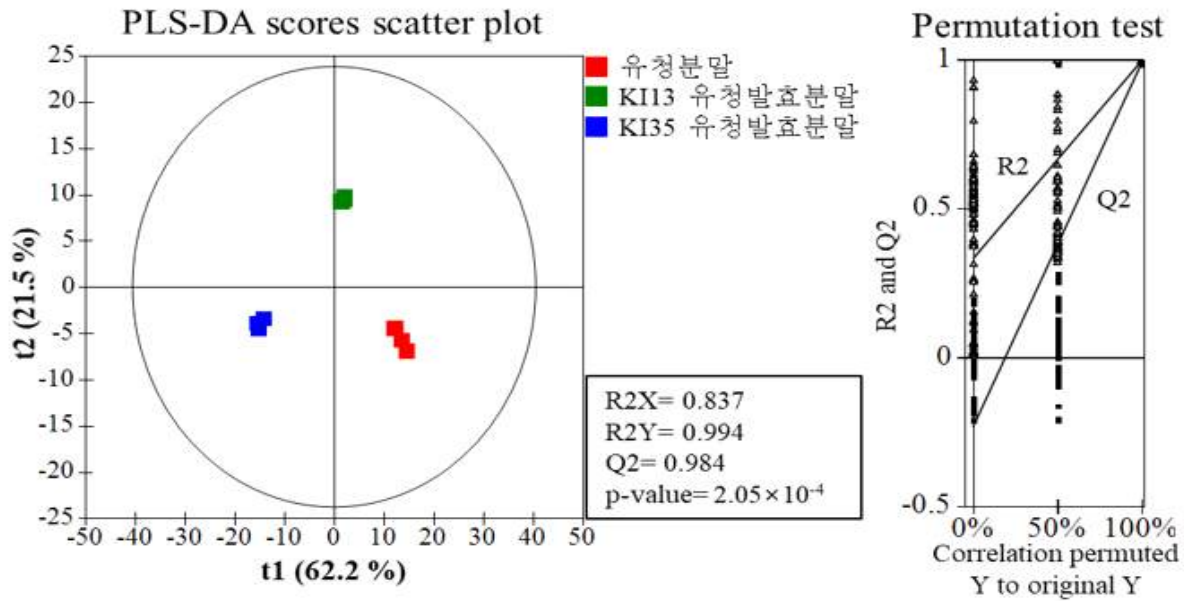


그림 23. 유청분말 및 유청발효물의 다변량통계분석

PLS-DA quality parameter( $R^2X=0.837$ ,  $R^2Y=0.994$ ,  $Q^2=0.984$ ,  $p\text{-value}=0.0002$ )와 permutation test를 이용한 교차검증결과는 분석에 사용된 PLS-DA 모델이 통계적으로 전혀 문제가 없는 것을 보여주고 있음. PLS-DA score plot상에서 보여진 시료들간의 차이에 관여하는 물질을 확인하기 위하여 분석된 모든 물질들에 대해 통계 분석을 진행한 결과, LC/MS에서는 fragments 포함 204개의 물질들이 차이를 보인 반면, GC/MS(그림 24)에서는 galactose, HPLC(그림 25-그림 26)에서는 lactic acid와 acetic acid만이 발효에 의해 차이가 있는 것으로 확인되었음.

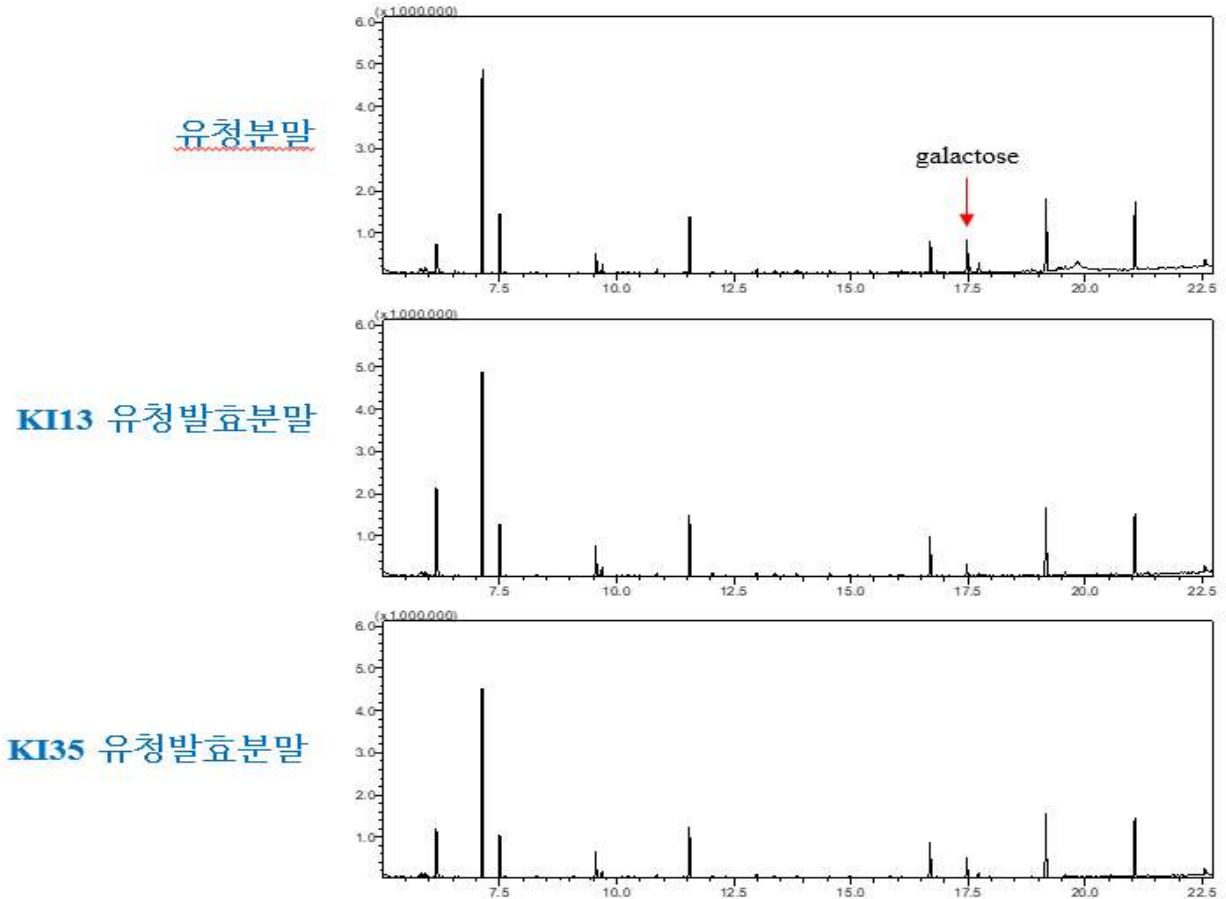


그림 24. 유청분말 및 유청발효물의 GC/MS chromatogram

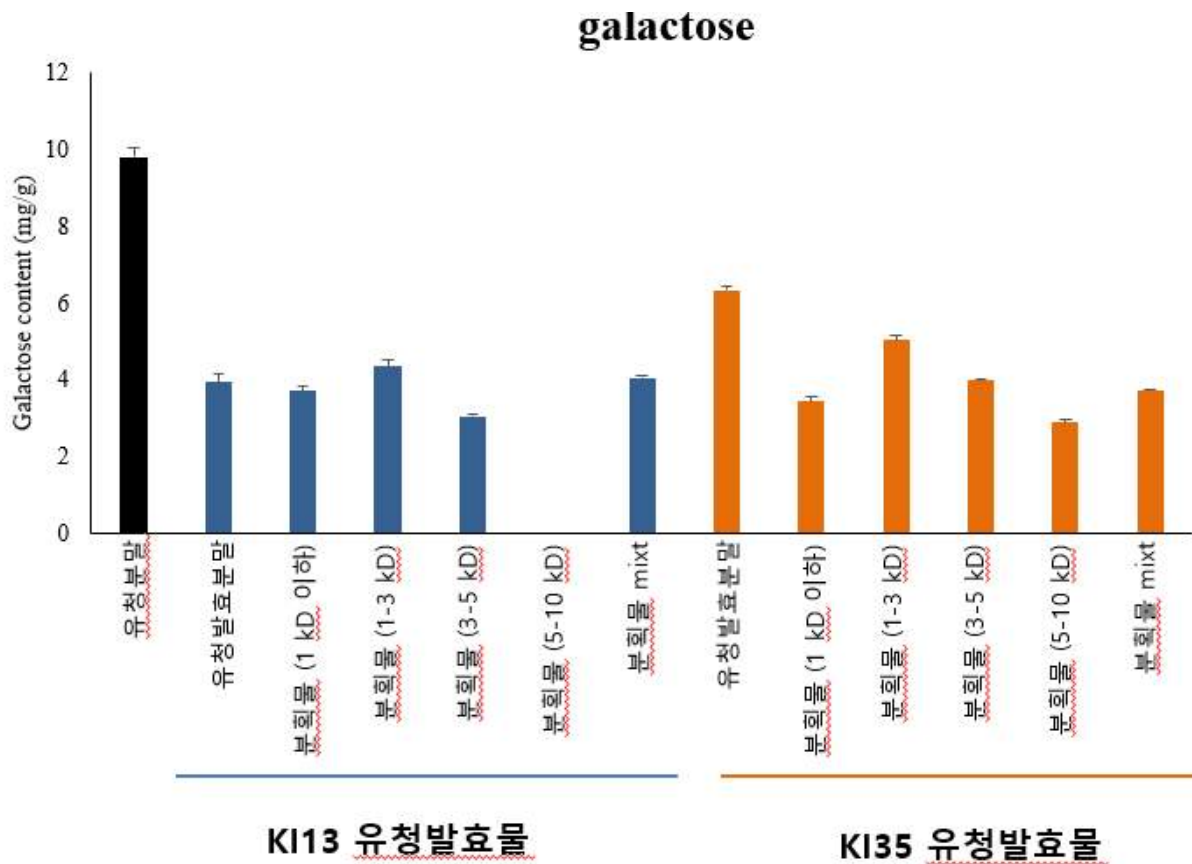


그림 25. 유청분말 및 유청발효물 분획물의 galactose 함량 비교



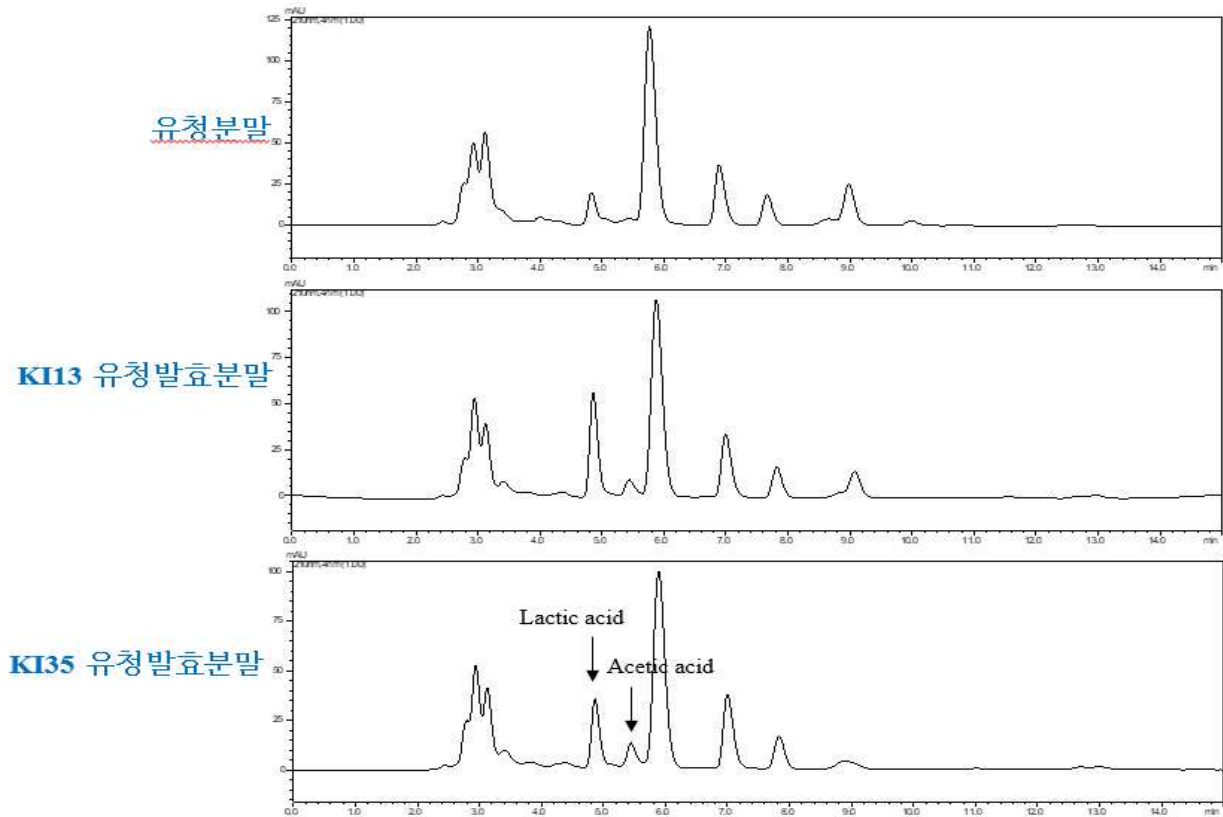


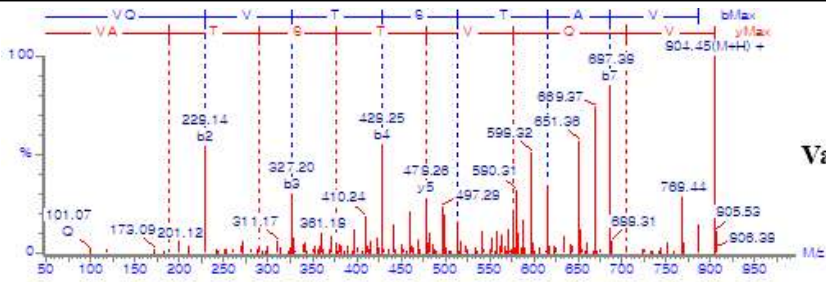
그림 26. 유청분말 및 유청발효물의 HPLC chromatogram

Lactic acid의 함량은 KI13과 KI35에 의해 각각 3배와 2배 증가한 반면 galactose는 2배 이상 감소하였으며 acetic acid는 발효물에서 나오지 않았음. 그러나 LC/MS로 분석한 결과(표 67, 그림 27)는 유청분말에서 관찰되지 않았던 Pro-Pro-Asp-Gln, Pro-Val-Tyr-Ile, Val-Gln-Val-Thr-Asn-Val, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr, Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu), Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro, Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val을 포함하는 16개 이상의 펩타이드들이 발효에 의해 생성되는 것을 확인할 수 있었음. 이들 펩타이드 중 Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr가 가장 높은 함량을 보였으며, 그 다음으로는 Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Asn-Val, Thr-Ile-Ala-Thr-Val-Ser-Asn-Val, Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu), Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn, Pro-Val-Tyr-Ile 순이었음.

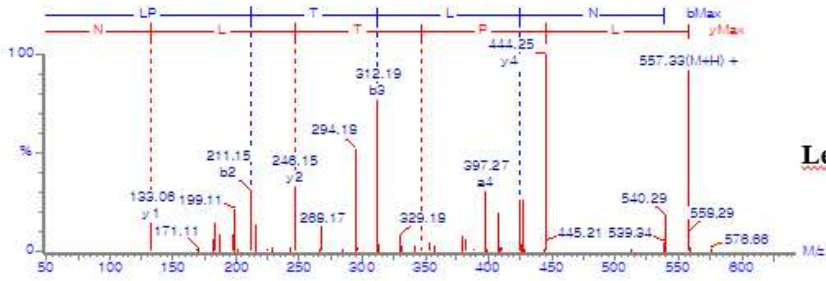


표 67. UPLC-Q-TOF MS 를 이용하여 분석한 주요 유청발효물 펩타이드

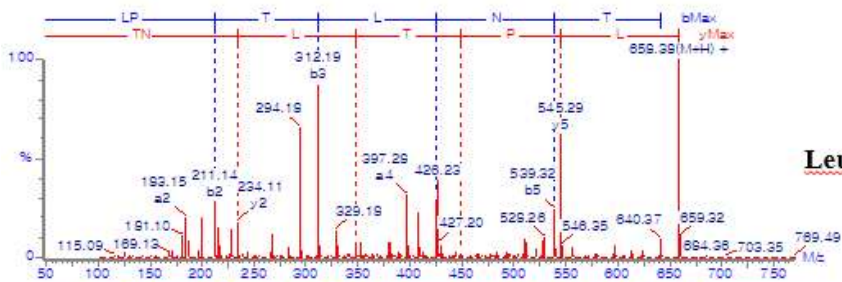
No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	charge	VIP	p-value
1	2.40	Pro-pro-asp-gln	456.2057	+1	0.95	9.58E-12
2	2.70	peptide 1	573.2882	+1	1.03	4.92E-10
3	2.87	peptide 2	681.3233	+1	0.95	4.60E-10
4	3.04	peptide 3	1128.5477	+1	0.99	3.28E-04
5	3.09	Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val	804.4454	+1	1.02	2.17E-10
6	3.20	peptide 8	674.4033	+1	1.02	2.85E-07
7	3.20	peptide 4	982.4776	+1	1.02	2.73E-06
8	3.23	Leu-Pro-Thr-Leu-Asn	557.3282	+1	1.02	2.03E-08
9	3.28	Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr	658.3771	+1	1.03	2.67E-09
10	3.45	Pro-Val-Tyr-Ile	491.2853	+1	1.02	1.20E-09
11	3.63	peptide 5	439.2900	+1	0.97	1.39E-05
12	4.07	peptide 6	499.3128	+2	1.00	1.94E-07
13	4.12	Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro	735.4057	+1	1.02	6.15E-09
14	4.14	peptide 7	1124.6252	+1	0.95	2.62E-05
15	4.26	Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val	682.4240	+2	0.95	1.70E-07
16	4.40	Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu)	770.4793	+1	1.01	7.10E-14



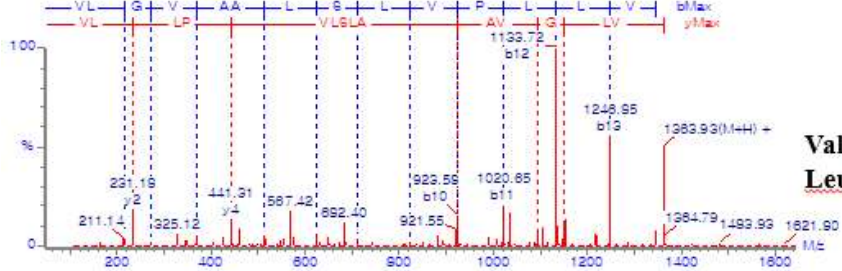
**Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val**



**Leu-Pro-Thr-Leu-Asn**



**Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr**



**Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val**

그림 27. 주요 펩타이드들의 *de novo* peptide sequencing

Heatmap과 상대적 함량 비교 결과(그림 28, 그림 29)에서 보듯이 이들 펩타이드는 KI13 균주보다는 KI35균주에 의해서 주로 생성되는 것으로 확인되었음.

**Color Key**

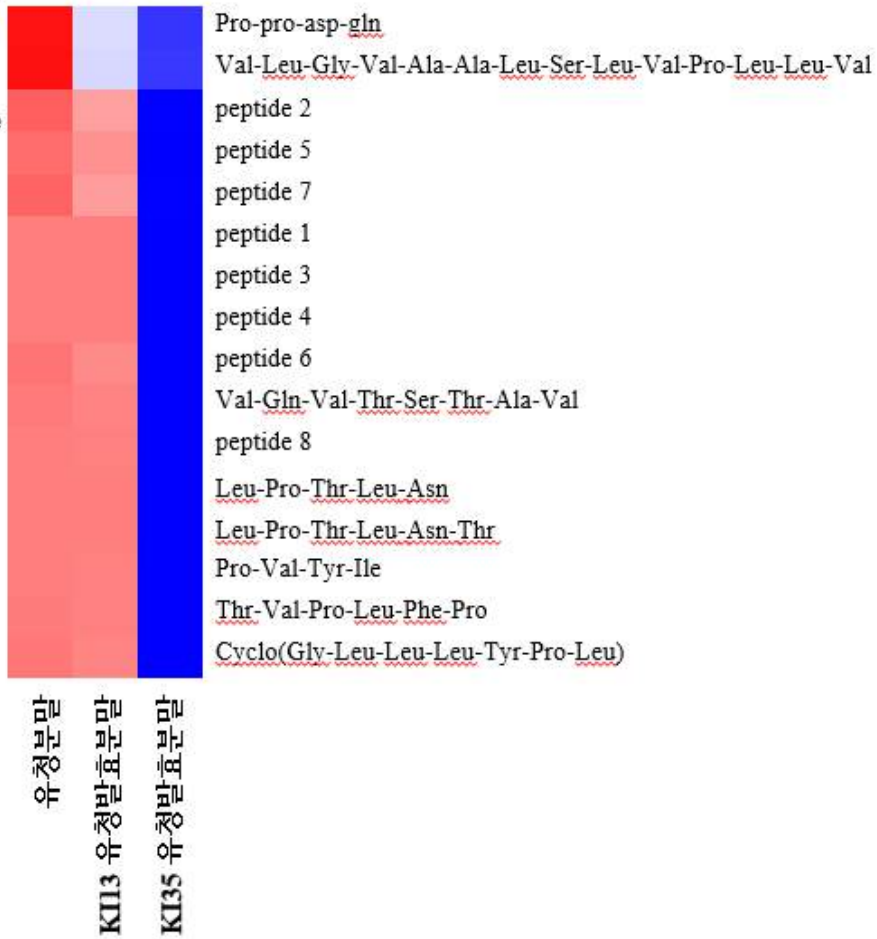


그림 28. Heatmap을 이용한 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교

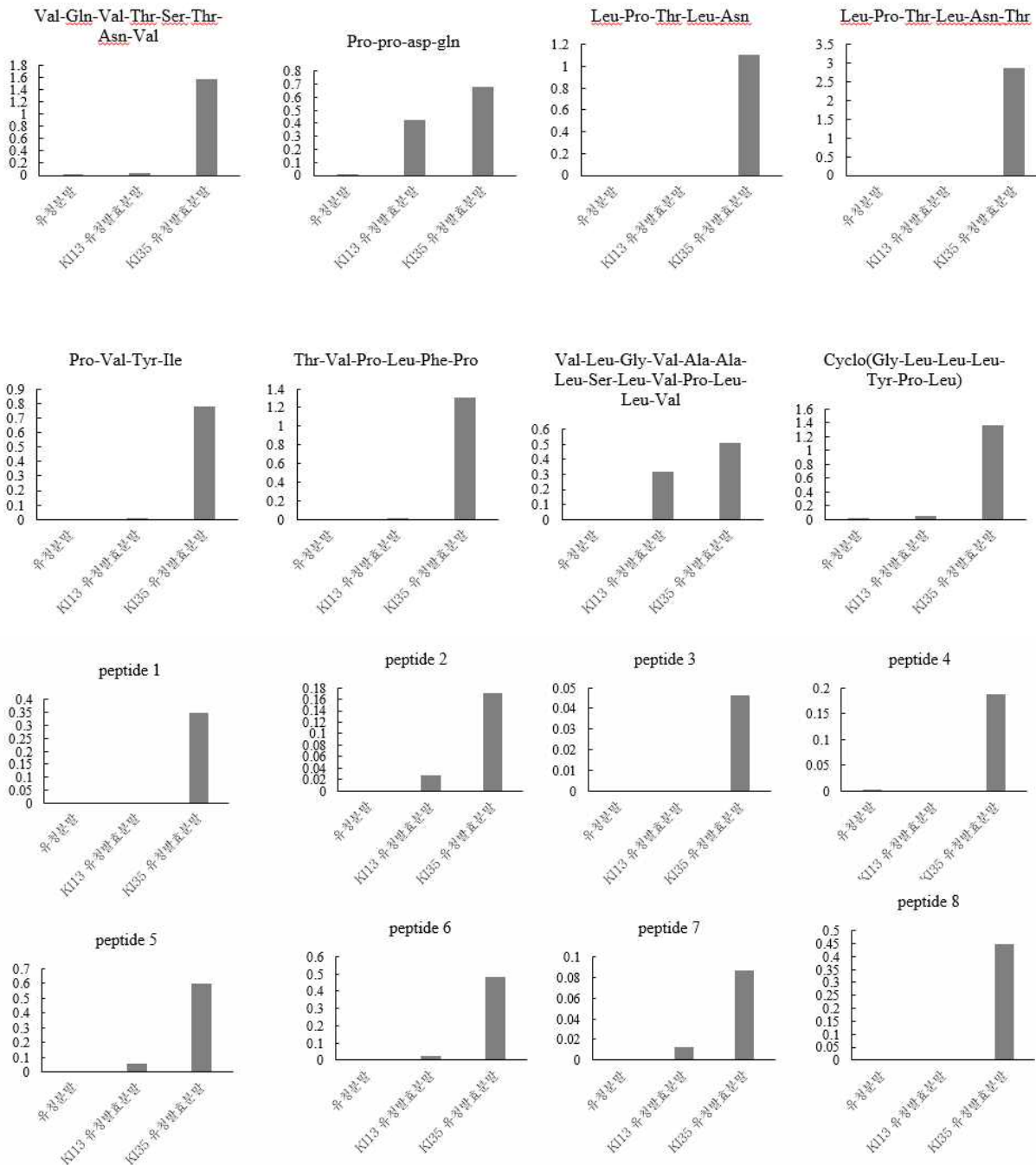


그림 29. 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교

Pro-pro-asp-gln와 Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val인 경우 KI13에서도 일부 관찰되기는 했지만 KI35에 비해 약 40% 낮은 수준이었으며 그 외 대부분의 펩타이드들인 경우 KI13에서는 거의 관찰되지 않거나 매우 낮은 함량을 보였음. 우유나 유청 유래 많은 펩타이드들이 항비만 및 비알콜성 지방간 개선 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 것으로 보아, 항비만 및 지방간 개선 효능이 관찰된 KI13과 KI35 발효물에서 주로 관찰되는 이들 펩타이드들이 항비만 및 지방간 개선 효능과도 밀접한 관계를 갖고 있을 것으로 사료됨.

## 2) 유청발효분획물

### 가) KI13 균주에 의한 유청발효분획물

LC/MS, GC/MS, HPLC를 이용하여 KI13 유청발효분획물에 들어있는 대사물질들의 차이를 분석(그림 30)한 후 PLS-DA를 이용하여 대변량통계 분석(그림 31)을 실시한 결과, 분획물간에 PLS-DA score plot상에서 유의적으로 분리되는 것을 확인하였음.

다만, 유청발효분획물 mix(1 kDa 이하 : 1-3 kDa = 1:1)는 1-3 kDa와 약간 중첩됨을 볼 수 있음.

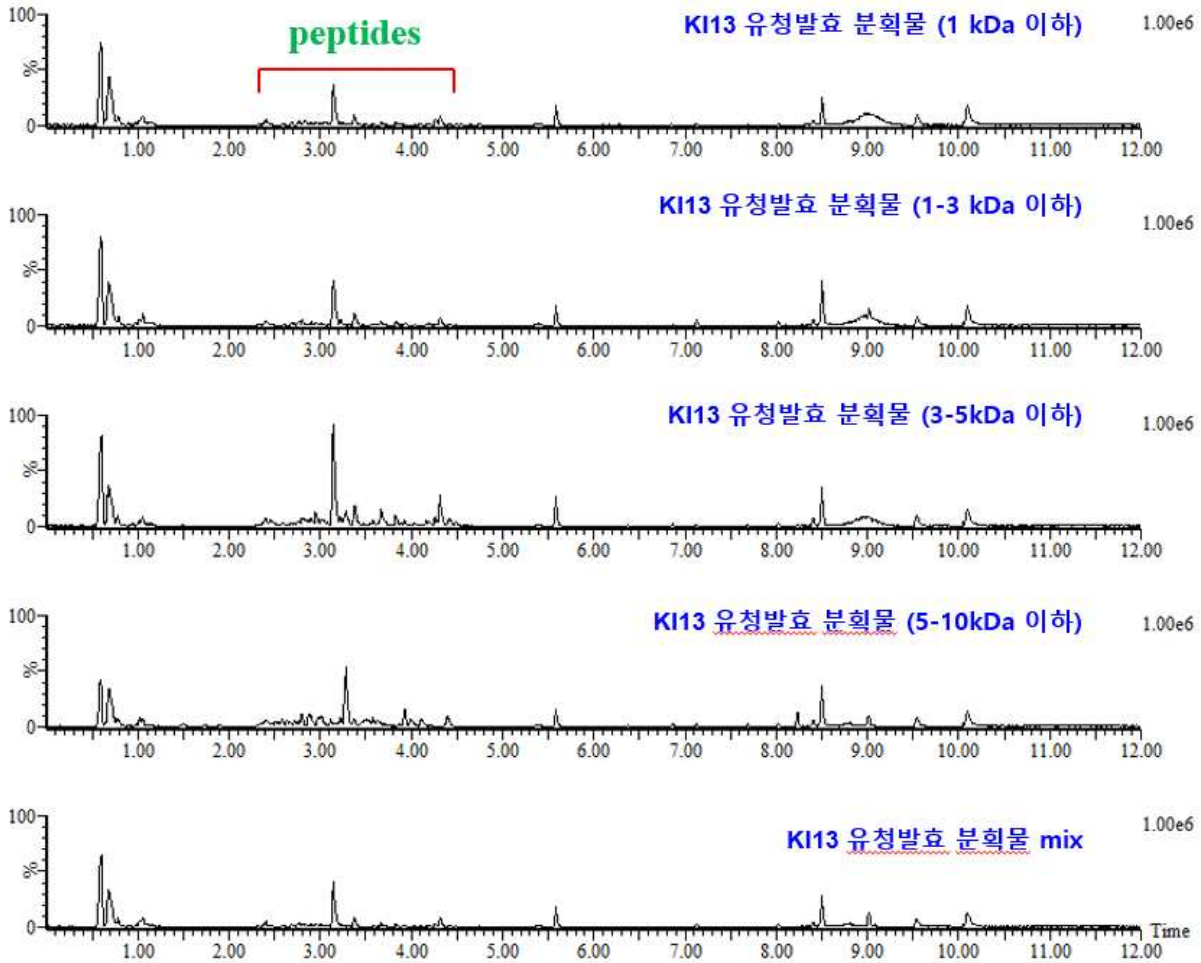


그림 30. KI13 유청발효물 분획물의 UPLC-Q-TOF MS chromatogram

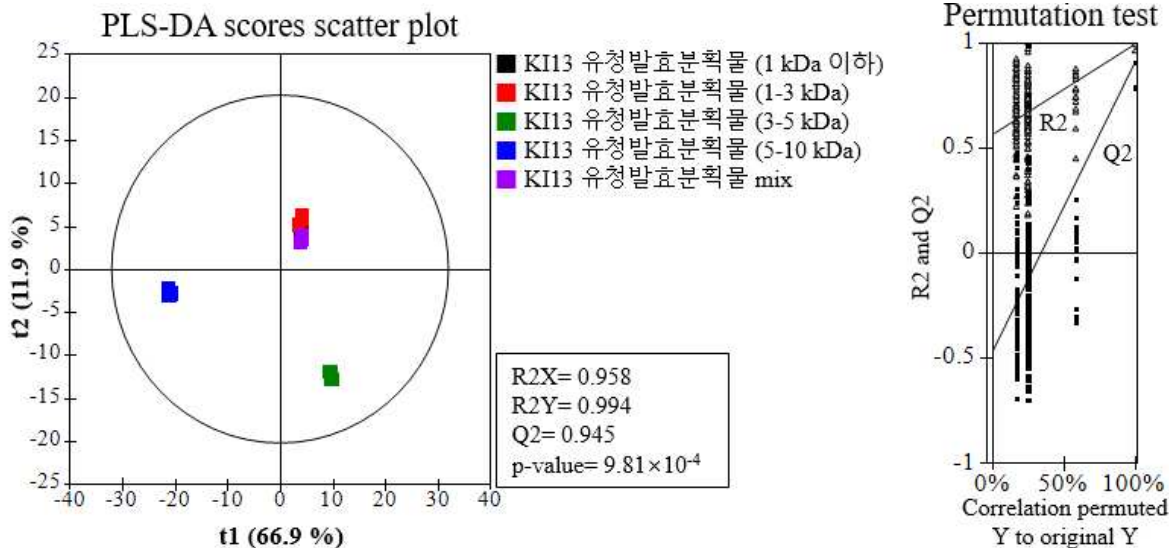


그림 31. KI13 유청발효물 분획물의 다변량통계분석

Heatmap을 이용하여 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교 결과(그림 32)를 보면 5-10 kDa 분획물이 다른 분획물보다 많이 관찰되었음.



**Color Key**

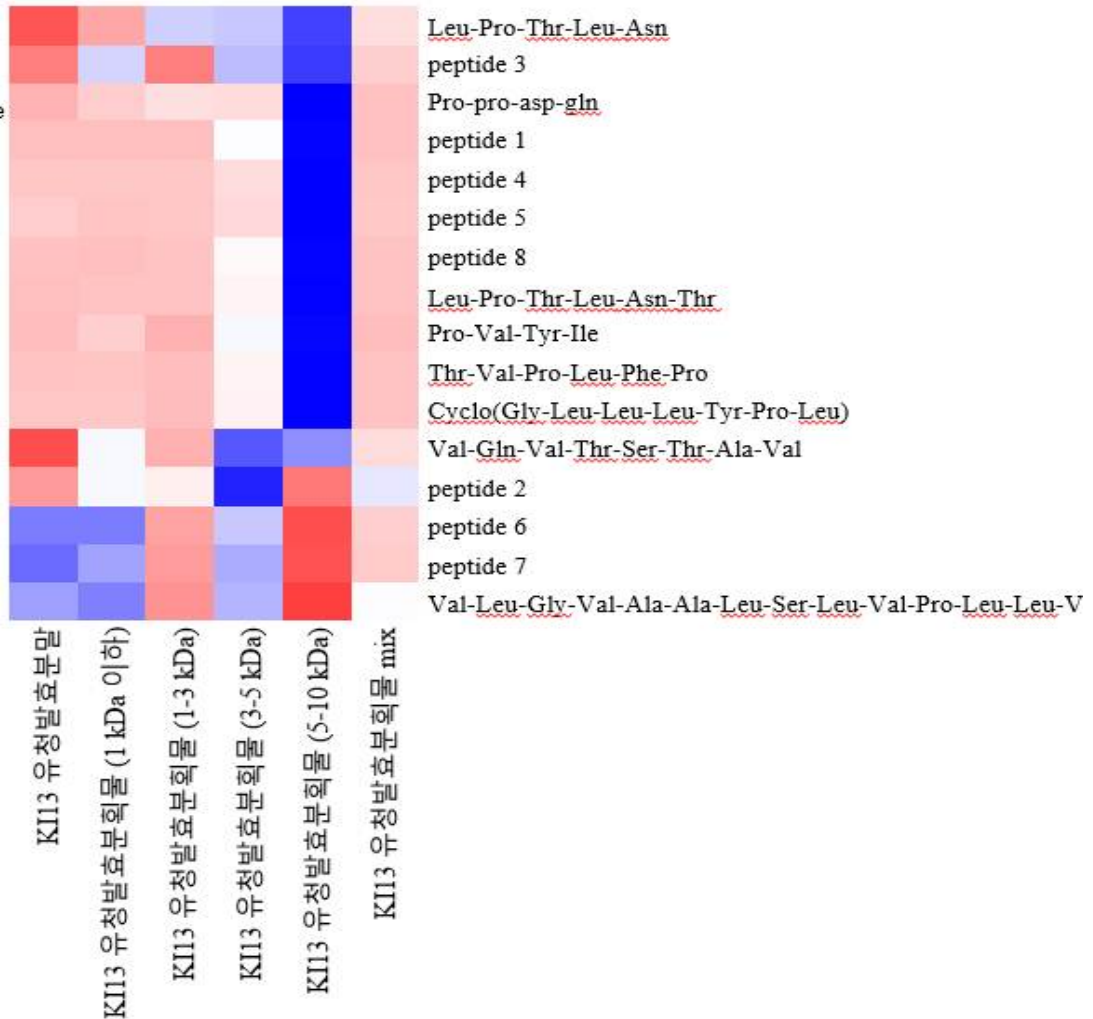


그림 32. Heatmap을 이용한 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교

LC/MS로 분석한 결과(그림 33)는 유청발효분말에서 관찰되었던 Pro-Pro-Asp-Gln, Pro-Val-Tyr-Ile, Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr, Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu), Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val, Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val을 포함하는 16개 이상의 펩타이드들이 발효에 의해 생성되는 것을 확인할 수 있었음. 분획물 중 1 kDa 이하에서는 Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val 펩타이드, peptide 6와 7이 가장 높은 함량을, 3-5 kDa에서는 Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val과 peptide 2가, 5-10 kDa에서는 Pro-Pro-Asp-Gln, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr, Pro-Val-Tyr-Ile, Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro, Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu), peptide 1, peptide 3, peptide 4, peptide 5와 peptide 8 등에서 높은 함량을 보였음.

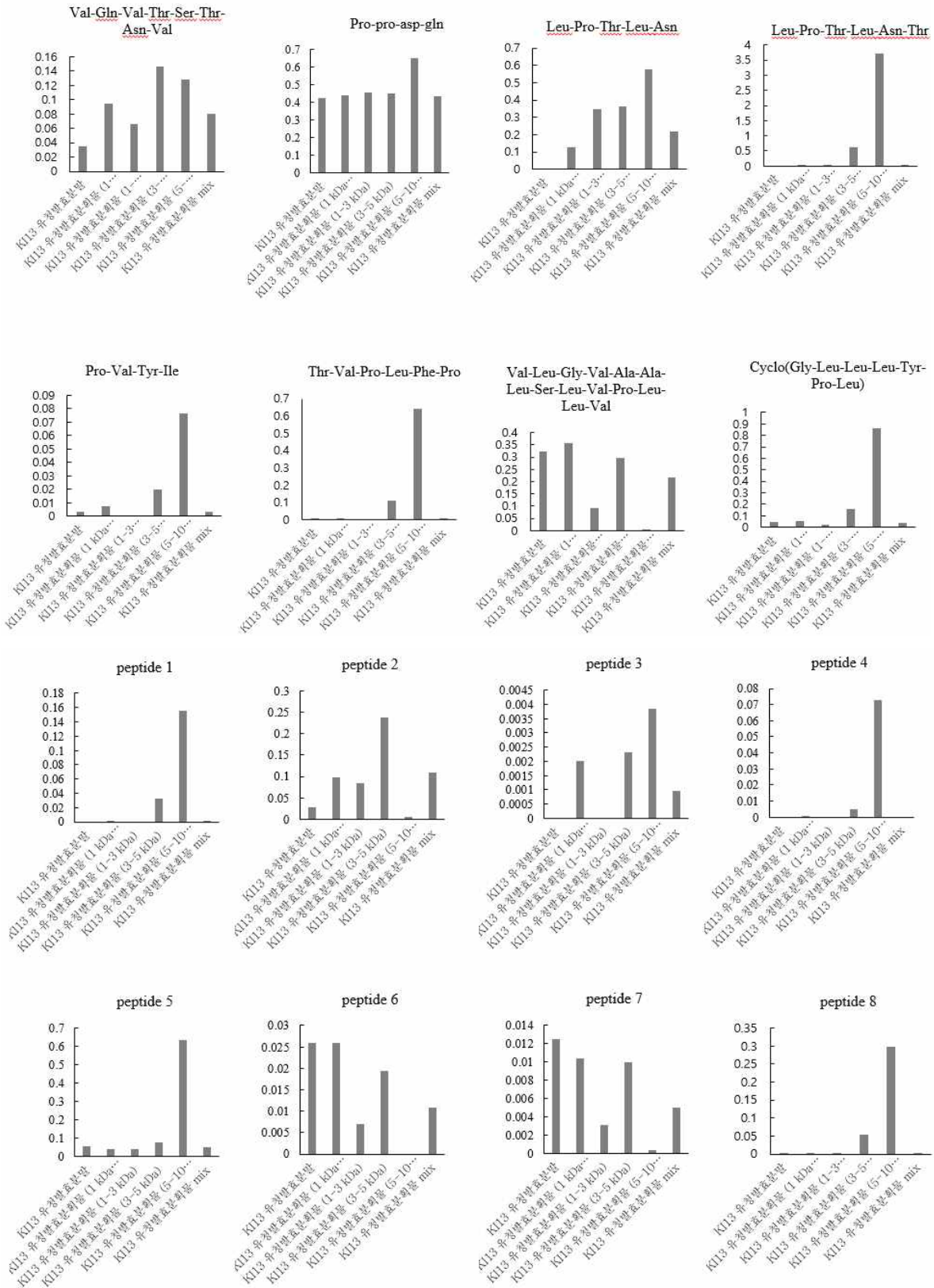


그림 33. 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교

나) KI135 균주에 의한 유청발효분획물

LC/MS, GC/MS, HPLC를 이용하여 KI35 유청발효분획물에 들어있는 대사물질들의 차이를 분석(그림 34)한 후 PLS-DA를 이용하여 대변량통계 분석(그림 35)을 실시한 결과,  $p$ -value가 0.497로 높아서 PLS-DA 상에서 그룹 간에 차이가 보이는 것처럼 보이지만 실제로 분획물 간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났음.

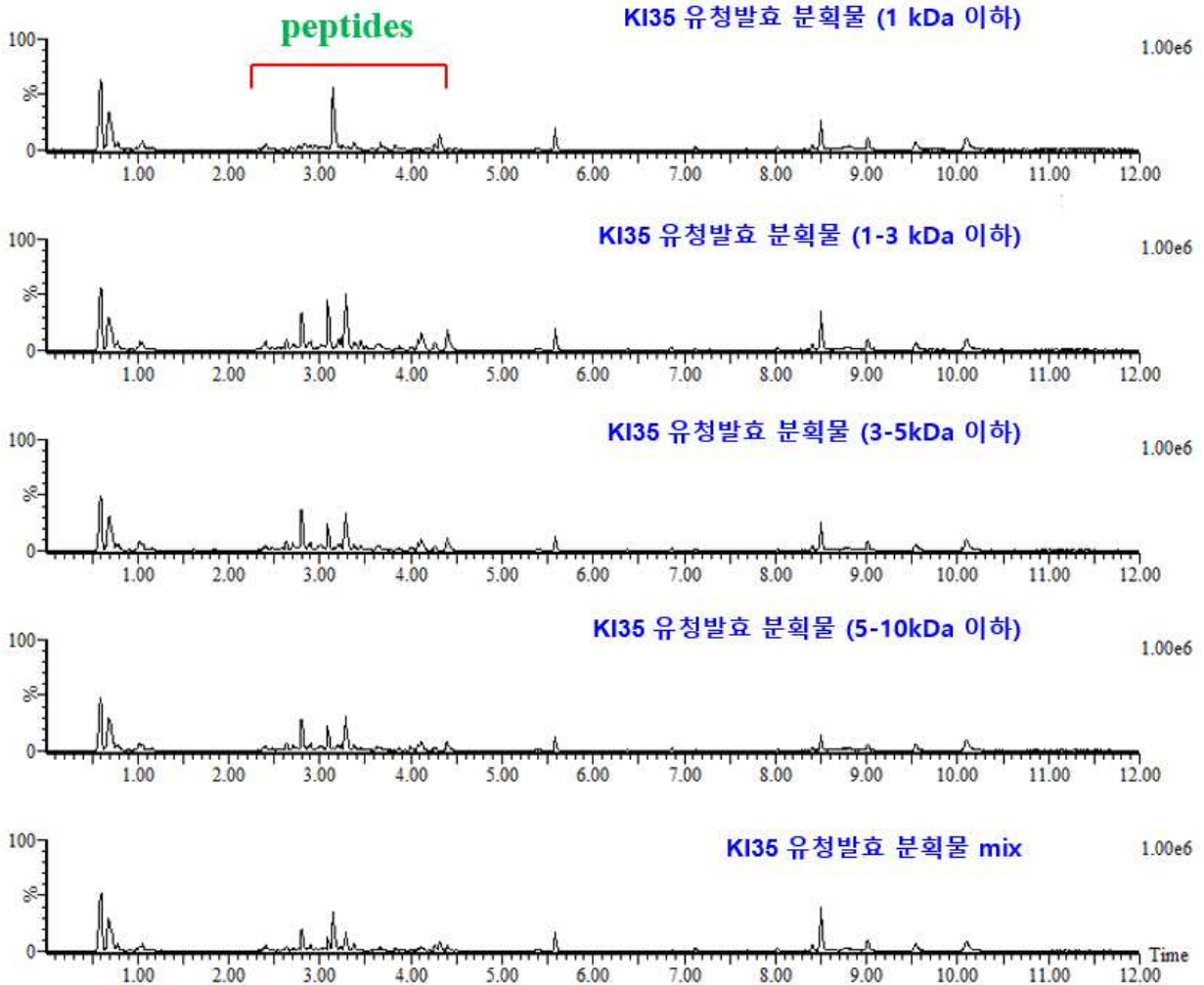


그림 34. KI35 유청발효물 분획물의 UPLC-Q-TOF MS chromatogram

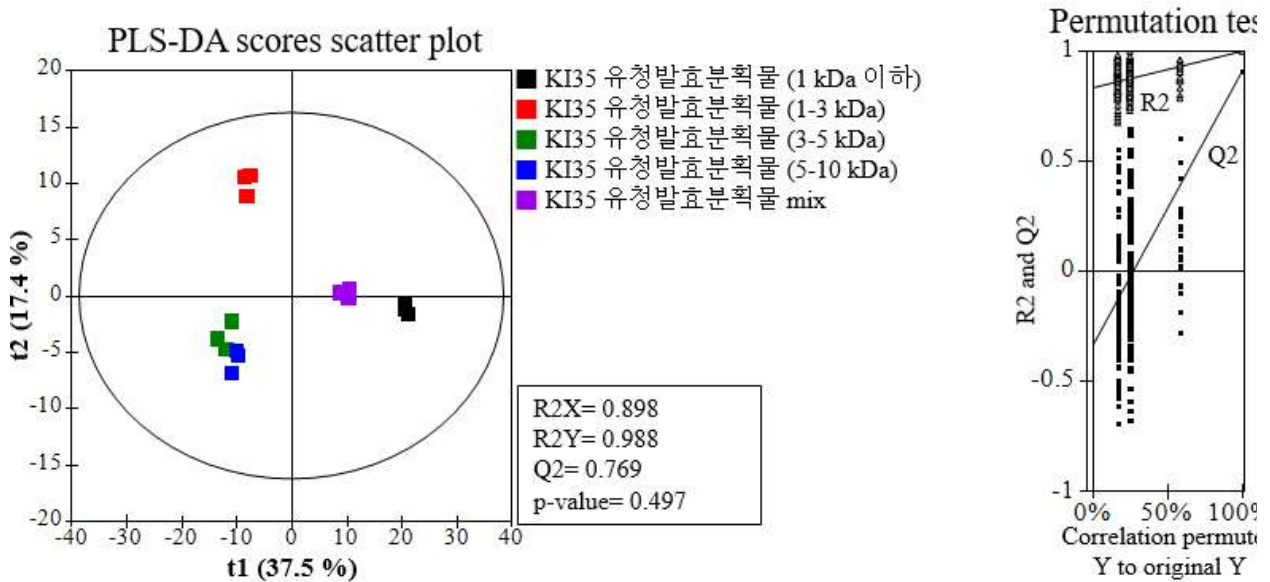


그림 35. KI35 유청발효물 분획물의 다변량통계분석

Heatmap을 이용하여 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교 결과(그림 36)를 보면 대부분의 펩타이드들의 분자량이 1 kDa 이하임에도 불구하고 KI35 발효물의 분획물에서는 1-3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa 에서 유사하게 관찰된 반면 1 kDa 이하에서는 거의 관찰되지 않았음.



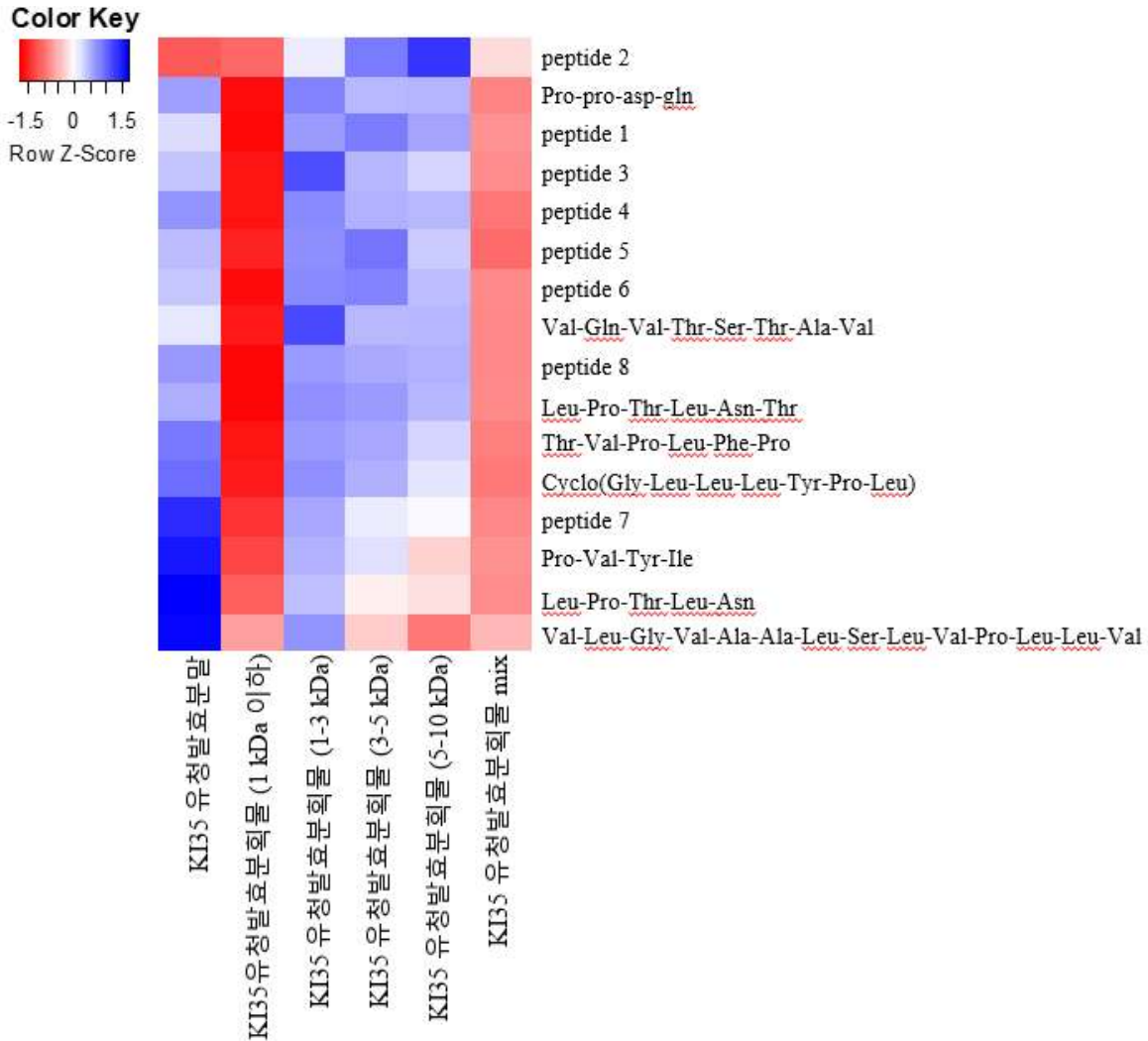


그림 36. Heatmap을 이용한 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교

LC/MS로 분석한 결과(그림 37)는 유청발효분말에서 관찰되었던 Pro-Pro-Asp-Gln, Pro-Val-Tyr-Ile, Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr, Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu), Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val, Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val을 포함하는 16개 이상의 펩타이드들이 발효에 의해 생성되는 것을 확인할 수 있었음. 분획물 중 1-3 kDa에서는 Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val, Pro-Pro-Asp-Gln, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn, Leu-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr, Pro-Val-Tyr-Ile, Thr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro, Val-Leu-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Leu-Val, Cyclo(Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr-Pro-Leu), peptide 3, peptide 4, peptide 7, peptide 8 등에서 높은 함량을 보였으며, 3-5 kDa에서는 peptide 1, peptide 5, peptide 6, 5-10 kDa에서는 peptide 2가 높은 함량을 보였으나, 대부분의 펩타이드들의 분자량이 1 kDa 이하임에도 불구하고 거의 관찰되지 않았음. 이는 분획하는 과정에서 유실되지 않았나 사료됨.

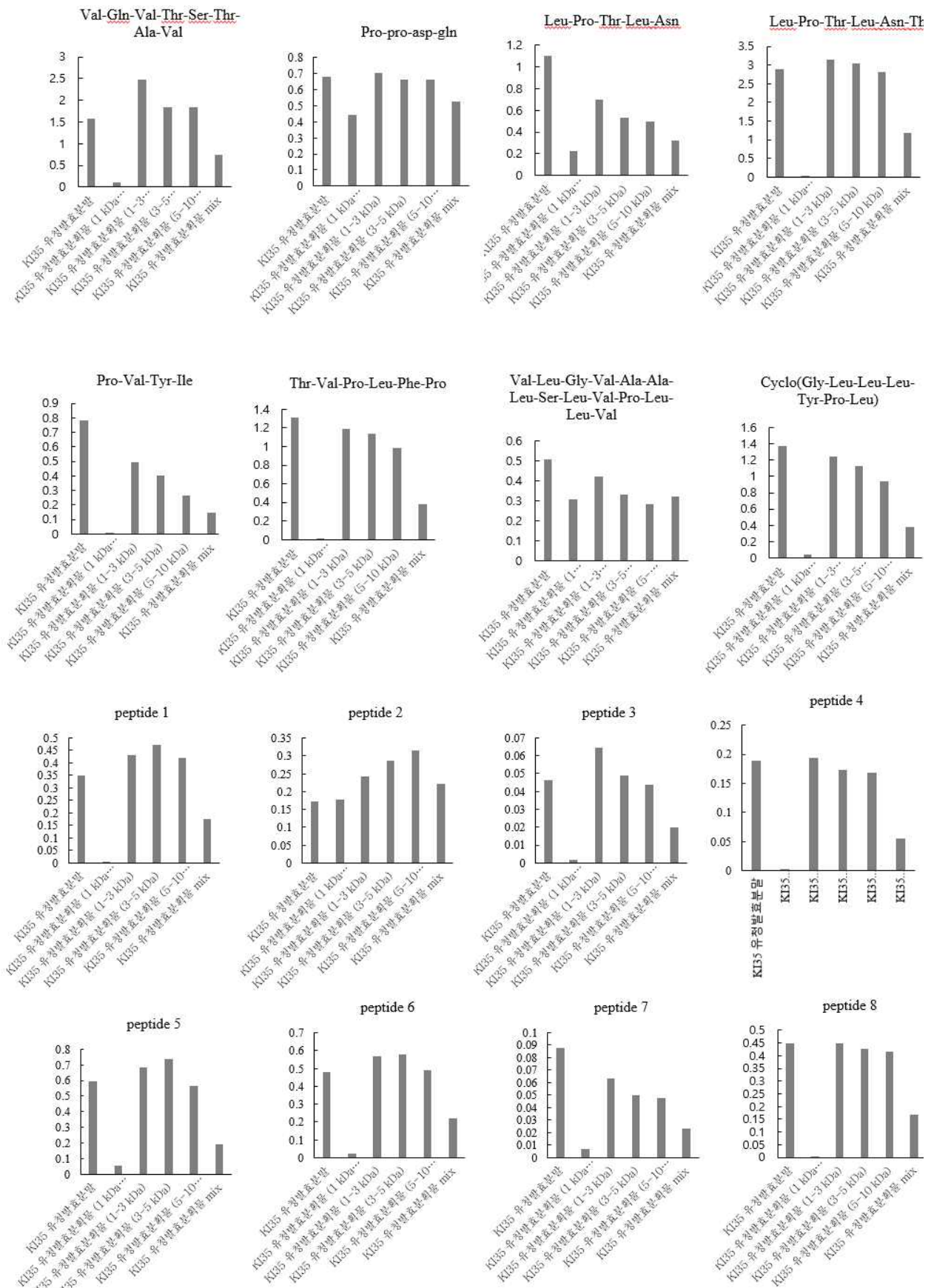


그림 37. 주요 펩타이드들의 상대적 함량 비교

다) 유청발효분획물의 galactose 및 유기산

유청발효물 분획물의 galactose 함량을 비교한 결과 KI35 유청발효물이 KI13 유청발효물보다 약간 높았으며, 이에 따라 분획물에서도 약간 차이를 보였고, KI13 유청발효분획물 중 5-10 kDa에서는 관찰되지 않았음. 유기산 함량을 비교(그림 38)한 결과

lactic acid는 KI13 유청발효물이 KI35 유청발효물보다 높았으며, 이에 따라 분획물에서도 비슷한 추이를 보였음. 분획물 간에는 KI13 유청발효분획물 중 1-3 kDa, KI35 유청발효분획물 중 1 kDa 이하에서 높은 함량을 보였음.

Acetic acid는 KI13 유청발효분획물 및 KI35 유청발효분획물 공히 3-5 kDa와 5-10 kDa에서만 관찰되었지만 그 함량은 lactic acid의 5배 정도 낮은 값을 보였음.

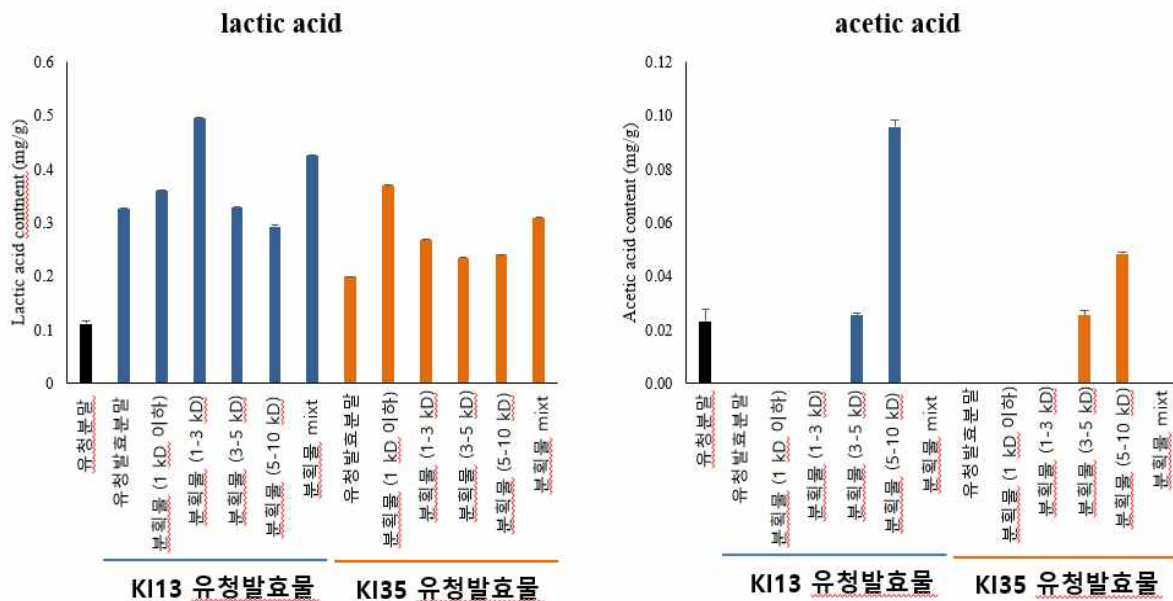


그림 38. 유청분말 및 유청발효물 분획물의 유기산 함량 비교

다. 구성 아미노산 분석

유청분말 및 *P. pentosauce* KI13 균주에 의해 발효된 유청분말 및 분획물의 아미노산 함량을 분석한 결과는 다음 표 68과 같음.

표 68. *P. pentosauce* KI13 균주에 의해 발효된 유청분말 및 분획물의 아미노산 함량  
(단위 : mg/100g)

아미노산	유청분말	유청발효분말	유청발효분획물			
			1 kDa 이하	1-3 kDa 이하	3-5 kDa 이하	5-10 kDa 이하
Asp	876.0±10.8	897.9±11.2	827.0±6.0	227.3±8.8	943.2±6.7	813.0±8.7
Thr	572.2±9.3	572.7±8.5	528.7±8.8	168.1±7.5	631.8±0.2	502.4±1.6
Ser	446.5±5.0	443.1±9.7	415.8±15.3	125.5±6.9	472.6±3.6	410.1±1.3
Glu	1579.9±26.4	1600.2±27.4	1498.7±15.7	475.2±20.7	1751.2±6.6	1548.9±13.0
Pro	433.0±0.3	438.3±3.7	383.6±4.6	121.1±5.1	425.1±32.9	340.7±9.6
Gly	167.9±3.4	175.9±1.5	150.5±1.1	49.1±2.5	180.2±0.6	161.0±7.1
Ala	417.3±4.2	434.5±6.7	400.2±12.3	119.8±5.8	474.5±0.6	446.7±7.1
Val	388.9±3.2	416.6±0.6	407.2±8.8	118.0±6.5	486.1±1.0	413.8±25.6
Met	216.8±8.1	225.8±10.1	190.9±3.8	57.4±2.7	234.3±0.8	194.1±2.0
Ile	460.5±5.4	473.6±3.2	454.2±5.5	110.6±17.8	601.6±10.8	471.9±12.8
Leu	935.6±8.4	917.6±11.3	993.5±24.5	257.8±29.2	1071.0±17.3	1037.8±2.9
Tyr	136.0±20.5	147.2±3.6	185.0±9.6	38.9±0.5	157.9±20.2	222.2±13.7
Phe	268.0±3.0	265.4±8.2	311.1±13.1	98.2±9.3	321.5±2.2	339.6±13.2
Lys	715.8±8.8	676.2±9.2	631.7±1.5	172.6±7.0	732.2±1.8	598.1±4.7
His	154.8±0.7	161.2±1.1	158.1±3.1	47.8±1.4	177.4±4.6	165.3±0.1
Arg	163.4±2.0	180.5±4.3	117.0±4.2	36.3±3.0	179.6±5.7	101.9±4.5
Total	7,769.2	7,846.2	7,537.2	2,188.4	8,663.6	7,670.6

유청분말에 비해 유청발효분말의 아미노산 함량이 더 높았으며, 16종의 아미노산 중 Ser, Leu, Phe, Lys 을 제외하고 14종이 더 높았음. 유청발효분획물 중에서는 3-5 kDa이 가장 높은 함량을 차지한 반면 1-3 kDa이 가장 낮은 함량을 차지하였고, 아미노산 중 3-5 kDa이 Tyr과 Phe을 제외하고 가장 높은 함량을 나타내었음.

Ma 등(2020)에 따르면 트레오닌을 포함한 식이 보충제가 고지방식이 그룹과 비교하여 체중, 부고환 및 말초 지방 패드 무게, 포도당, 트리아실글리세롤, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤의 혈청 농도를 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다고 보고하였는데, 유청분말과 유청발효분말과는 함량차이가 거의 없었고, 유청발효분획물 중 3-5 kDa에서 가장 높은 함량을 보였음.

유청분말에 비해 유청발효분말이, 유청발효분획물 중 3-5 kDa에서 히스티딘 함량이 높았는데, DiNicolantonio et al.(2018)에 따르면 식이 히스티딘은 비만을 억제한다고 보고하였으며, Sun et al.(2014)은 히스티딘 보충 후 혈청과 지방조직 모두에서 아디포넥틴의 발현이 현저하게 증가되었고, PPAR- $\gamma$ 의 활성화도 동반( $p=0.021$ )되었다고 하였음.

유청분말 및 *W. cibaria* KI35 균주에 의해 발효된 유청분말 및 분획물의 아미노산 함량을 분석한 결과는 다음 표 69와 같음.

표 69. *W. cibaria* KI35 균주에 의해 발효된 유청분말 및 분획물의 아미노산 함량  
(단위 : mg/100g)

아미노산	유청분말	유청발효분말	유청발효분획물			
			1 kDa 이하	1-3 kDa 이하	3-5 kDa 이하	5-10 kDa 이하
Asp	876.0±10.8	868.0±9.7	815.3±34.0	739.4±8.0	752.5±19.0	807.6±4.6
Thr	572.2±9.3	570.6±4.6	535.2±30.3	511.0±2.3	516.0±18.4	551.4±0.4
Ser	446.5±5.0	441.1±1.8	412.6±0.3	384.3±17.9	385.8±9.1	412.4±4.2
Glu	1579.9±26.4	1605.1±13.6	1485.3±58.2	1407.8±24.4	1430.6±27.5	1484.5±3.2
Pro	433.0±0.3	391.5±13.3	338.8±45.3	348.3±27.8	372.8±6.5	414.5±33.7
Gly	167.9±3.4	172.8±1.9	147.6±8.5	133.9±1.7	138.9±1.5	146.0±2.2
Ala	417.3±4.2	426.6±3.0	396.1±21.5	364.6±2.9	375.6±11.6	398.7±0.4
Val	388.9±3.2	433.0±1.8	407.0±23.7	389.3±10.4	405.8±5.5	390.1±7.7
Met	216.8±8.1	218.8±0.5	186.7±22.9	161.2±15.5	169.3±10.1	165.4±1.6
Ile	460.5±5.4	477.1±15.0	466.1±7.4	446.6±2.1	467.0±19.5	449.3±3.2
Leu	935.6±8.4	895.7±14.9	1018.5±21.6	908.8±40.9	946.5±15.3	969.2±5.5
Tyr	136.0±20.5	130.5±4.5	187.0±0.9	160.4±8.7	186.8±10.9	188.4±0.9
Phe	268.0±3.0	262.0±1.2	331.6±3.5	304.2±39.2	304.7±1.8	313.6±8.7
Lys	715.8±8.8	647.2±12.5	624.7±37.4	540.2±14.1	555.4±8.7	575.0±5.9
His	154.8±0.7	161.6±0.0	158.4±6.6	147.8±3.2	150.0±5.7	149.4±5.5
Arg	163.4±2.0	181.2±2.0	121.7±3.8	101.2±9.3	115.0±8.8	131.5±0.9
Total	7,769.2	7,701.6	7,511.9	6,948.8	7,160.7	7,420.5

유청분말이 유청발효분말에 비해 아미노산 함량이 더 높았으며, 16종의 아미노산 중 8종씩 비슷하게 차지하였음. 유청발효분획물 중에서는 1 kDa 이하가 가장 높은 함량을 차지한 반면 1-3 kDa이 가장 낮은 함량을 차지하였고, 아미노산 중 1 kDa 이하가 10종, 5-10 kDa이 5종을, 3-5 kDa이 1종이 가장 높은 함량을 나타내었음. 트레오닌 함량은 유청분말이 거의 비슷하였고 유청발효분획물 중 5-10 kDa 분획물이 가장 높은 함량을 보였음. 히스티딘 함량은 유청분말에 비해 유청발효분말이, 유청발효분획물 중 1 kDa 이하에서 가장 높았음.

<제2협동연구기관 중앙대학교>

[1차년도] 치주염 관련 세균 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립 및 바이오컨버전 산물 내 유효성 분리·효능 검증

가. 항균활성 균주의 screening

- 1) 107개의 균주 중 M1576으로 명명된 18번 균주만이 지시균인 *Listeria monocytogenes* ATCC7644에 대한 억제 활성을 보였음(그림 39).

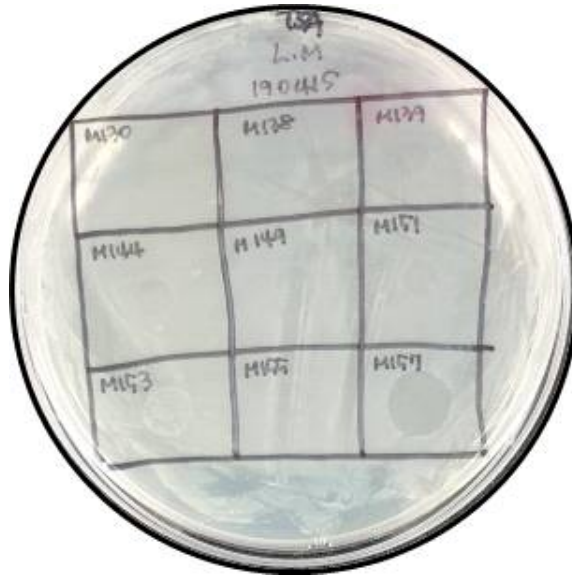


그림 39. *L. monocytogenes* ATCC7644에 대한 배양 상층액의 spot-on-lawn 분석

나. 항균활성 균주의 동정

- 1) 16S rRNA 동정 결과, M157 균주는 *Enterococcus faecalis*이며, strain은 ATCC19433T과 100% 일치율을 보였음(표 70). 반면에, LDTM6804 분리 균주는 대부분 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*로 추정되며, strain JCM5808T와 100% 일치율을 보였음. 분리 균주에 형태학적 특성을 확인하기 위한 그람 염색과 현미경 관찰을 통하여 두 균주 모두 그람 양성 구균으로 나타났음(그림 40).

표 70. M157과 LDTM6804 균주의 BLAST 결과

균주	프라이머	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	일치율 (%)	Diff/ Total nt
M157	27F, 1492R	<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433(T)	ASDA010000 01	100.00	0/1397
LDTM6804	27F, 1492R	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 5805(T)	BALX010000 47	99.93	1/1347
	785F, 805R	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 5805(T)	BALX010000 47	100.00	0/1467



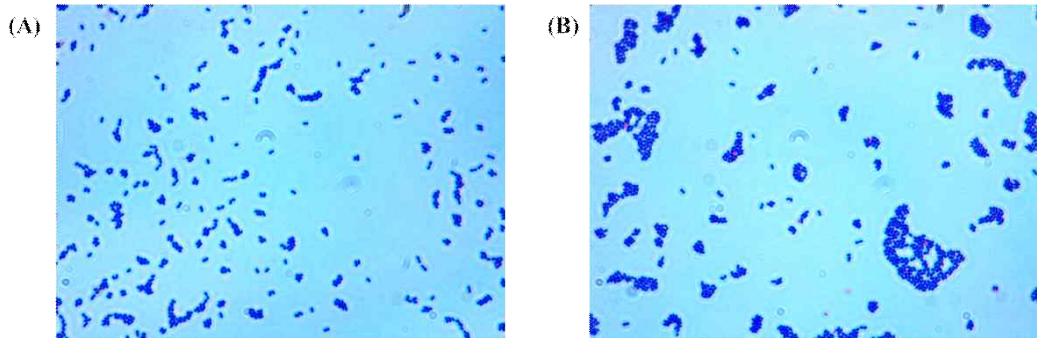


그림 40. *E. faecalis* M157 (A)와 *L. lactis* subsp. *lactis* LDTM6804 (B)의 그람 염색 후 현미경 관찰 결과

다. 우유 배지에서의 성장 특성 평가

- 1) 그림 40에서 보는 바와 같이, LDTM6804 균주는 탈지유 배지에서 잘 자라는 것을 알 수 있었음. 그러나, 치즈 스타터인 R-704는 24시간 배양 후 0.5 Log unit 더 높은 생균수를 보였음. 반면에, *L. monocytogenes* 균주들은 탈지유 배지에서 유산균주들 만큼의 성장을 나타내지 못했음. 특히 *L. monocytogenes* ATCC19115는 30시간 배양 후 7.6 Log CFU/mL 정도밖에 도달하지 못했음. LDTM6804와 R-704 균주의 성장 과정에서 우유배지의 pH가 상당히 감소되는 것으로 보아, 우유에서의 젖산 발효가 이루어졌음을 알 수 있었음. 그러나, LDTM6804에서는 생산된 젖산의 양이 적었고, *L. monocytogenes*는 배양 후 pH나 titratable acid 값의 변화가 거의 나타나지 않았음(그림 42).

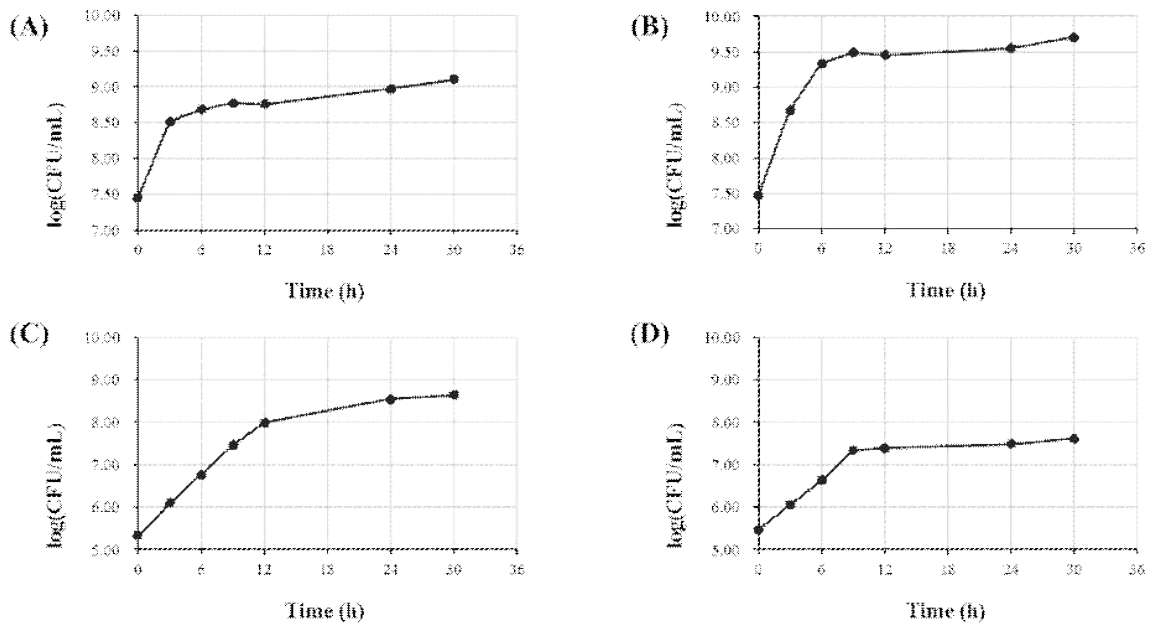


그림 41. 탈지유 배지에서의 *L. lactis* subsp. *lactis* LDTM6804 (A), 치즈 스타터 R-704 (B), *L. monocytogenes* ATCC19111 (C), *L. monocytogenes* ATCC19115 (D) 의 성장 특성

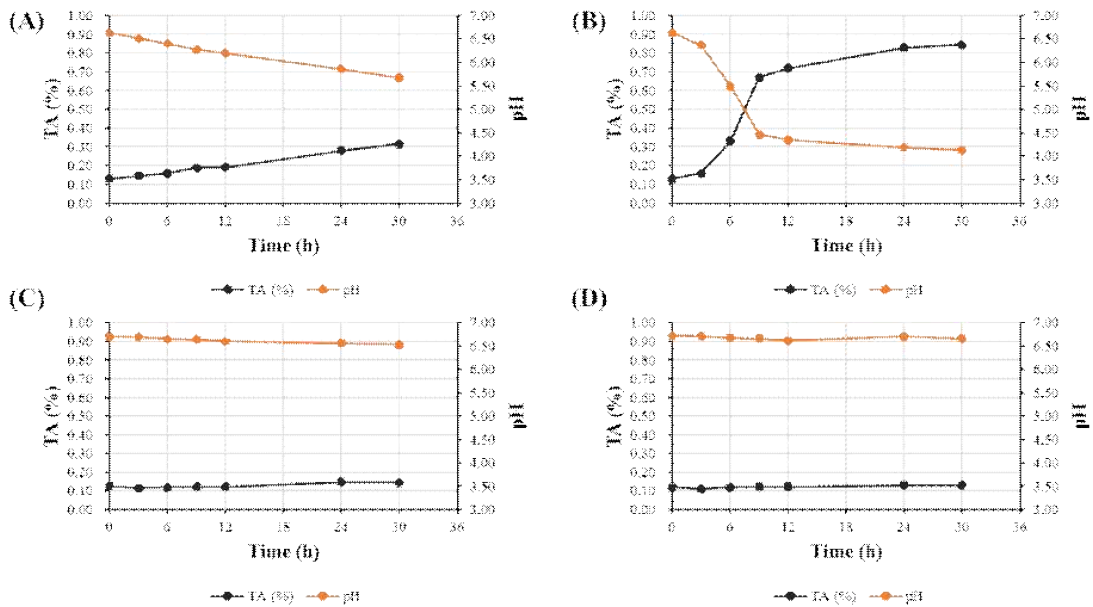


그림 42. 탈지유 배지에서의 *L. lactis subsp. lactis* LDTM6804 (A), 치즈 스타터 R-704 (B), *L. monocytogenes* ATCC19111 (C), *L. monocytogenes* 19115 (D)의 발효 패턴

라. LDTM6804 균주의 anti-listerial 활성 평가

- 1) 5개의 *L. monocytogenes* 균주 중에서 ATCC19115에 대한 항균활성이 가장 높게 나타났으며, 9시간 배양액으로부터 억제환이 관찰되기 시작하였음. 이는 LDTM6804 균주에 의해 생성된 항균활성 물질은 배양 9시간 이후부터 상당한 양이 된다는 것을 나타내었음(표 71). 이러한 이유로 인해 이후의 실험에서는 *L. monocytogenes* ATCC19115을 대표적인 감수성 균주로 사용하였음.

표 71. *L. monocytogenes*에 대해 다른 시간에서의 LDTM6804 상층액의 억제 활성

	Serotype	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	30 h
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064	1a or 1/2a	-	-	-	-	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569	1/2a	-	-	-	-	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	1/2c	-	-	-	-	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	4a	-	-	-	-	+	++	++
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	4b	-	-	-	+	+	++	++

- 2) 그림 43은 *L. monocytogenes* ATCC19115 생장에 미치는 LDTM6804의 효과를 나타내었음. 배양 후 3시간만에, ATCC19115의 균수는 감소하기 시작했고, 30시간 후에 최종 농도는 6.024 Log CFU/mL로 측정되었음. 반면에, LDTM6804는 정상적인 성장 곡선을 보이며 12시간 후에 이른 정체기에 도달하였음. 이러한 결과는 LDTM6804 균주가 *L. monocytogenes* 생장의 초기단계부터 생장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었음. 이는 항균 물질의 생산, 배양 배지의 산성화 및 영양소에 대한 경쟁 등에 의해 나타나는 효과라고 할 수 있음.

- 3) 다른 박테리오파지 생성균주들도 *L. monocytogenes* 균주와의 혼합배양 과정에서의



억제 효과도 측정하였음. *L. monocytogenes* ATCC19111 과 ATCC19115는 1.75% glucose가 첨가된 10% 탈지유 배지에서 bacteriocinogenic 유산균주와 혼합 배양을 진행하면서 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30시간 배양 후에 시료를 채취하여, 배양시간에 따른 *L. monocytogenes* 균수의 변화는 Oxford 배지를 선택배지로 이용하여 평판도말법으로 계수를 진행하였음. 대조군과 비교해, *L. monocytogenes*는 유산균이 존재 시 생장이 억제되는 것으로 확인되었음. *L. monocytogenes* ATCC19111의 경우, 세 가지 유산균 균주에 의하여 비슷한 억제 양상을 보였음(그림 44). *L. monocytogenes* ATCC19115에 대해서는 GJ-24 균주가 가장 강력한 억제 활성을 보였으며 M157과 LDTM6804 순으로 억제 활성은 상대적으로 낮게 나타났음. 이 실험의 결과를 통해 연구 중인 세 개의 유산균준 정도의 차이는 있으나 모두 anti-listerial 활성을 가지고 있다는 것을 알 수 있었음.

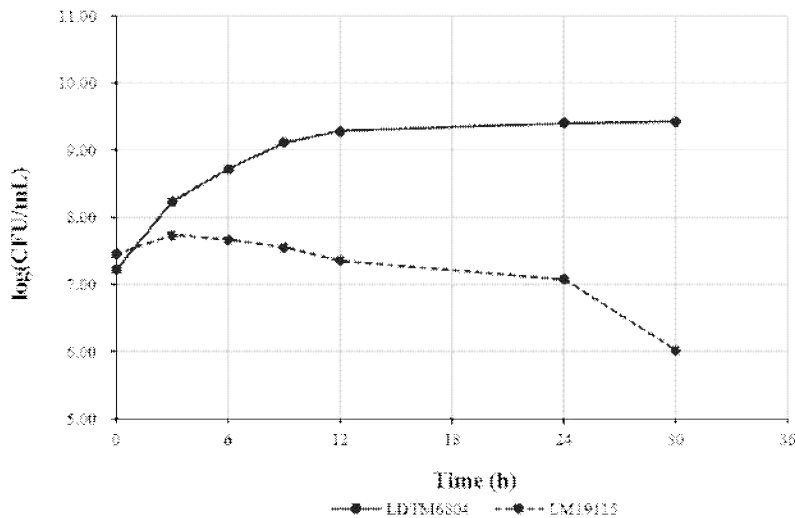


그림 43. 10% 탈지유 배지에서 *L. lactis* subsp. *lactis* LDTM6804와 함께 배양된 *L. monocytogenes* ATCC19115의 균수 변화

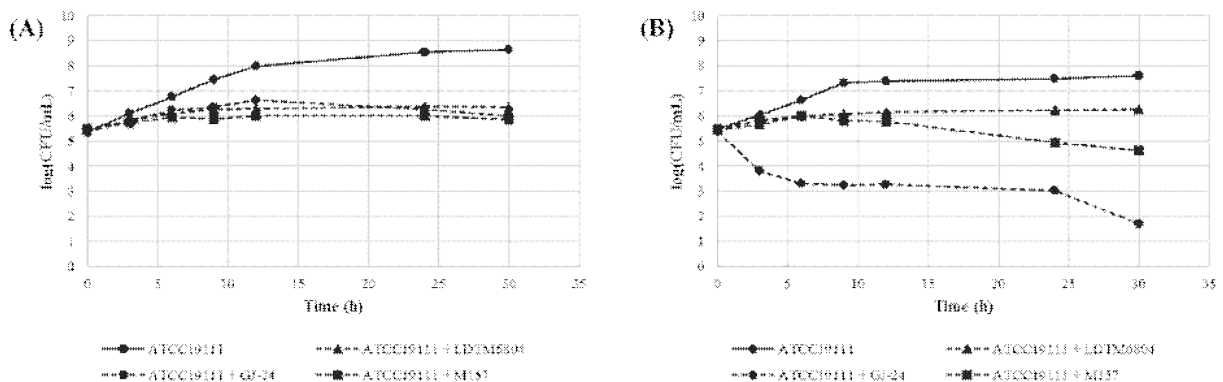


그림 44. 탈지유 배지의 bacteriocinogenic 유산균과 같이 배양된 *L. monocytogenes* ATCC19111 (A), ATCC19115 (B)의 억제 결과

마. 치주염 유발 균주에 대한 bacteriocin 활성

- 1) 실험 결과, *P. intermedia* KCTC15693T과 *F. nucleatum* KCTC2488T는 단일 균주 또는 cell free supernatant(CFS)의 조합에 의해 억제되었음을 보여주었음. 단일균주를 비교하면 M157은 치주염 유발 병원균에 대해 가장 높은 억제 능력을 나타냈고, GJ-24 및 LDTM6804의 CFS와 결합 시 *P. intermedia* KCTC 15693TT에 대한

억제능이 향상됨을 알 수 있었음. 그러나 *A. actinomycetemcomitans* KCTC2581TT는 모든 균주들이 생산하는 bacteriocin의 단독 처리 또는 혼합 처리에 대해서도 억제가 되지 않는 것으로 나타났음(표 72).

표 72. 유산균이 생산하는 bacteriocin에 의한 치주염 유발균의 억제

Lactic Acid Bacteria		Test Organisms		
		PI	FN	AA
Single-strain	M157	+	+	-
	GJ-24	-	+	-
	LDTM6804	-	++	-
Combination (2)	M157 + GJ-24	+	+	-
	M157 + LDTM6804	++	++	-
	GJ-24 + LDTM6804	-	+++	-
Combination (3)	M157 + GJ-24 + LDTM6804	+++	+++	-

2) 유산균의 bacteriocin 생산에 배지의 종류가 미치는 영향에 대한 많은 선행연구 결과들이 보고되었음. 이 연구의 결과에서도 영양소 함량이 풍부한 배지가 더 높은 농도의 bacteriocin을 생성하는데 도움이 된다는 것을 뒷받침하였음. MRS에서 생장한 유산균주들은 *A. actinomycetemcomitans* KCTC2581T을 제외한 다른 치주염 유발균주에 대한 더 높은 억제양상을 나타내었음. 그렇지만 탈지유와 유청 기반 배지에서 자란 유산균주도 상당한 bacteriocin 생산을 보였으며, 경제성을 고려하면 유청배지도 고가의 유산균 전용 배양 배지를 대체 할 수 있음을 알 수 있었음(표 73).

표 73. 다른 배지에서 배양된 유산균의 bacteriocin 활성 평가

Media	Organism	Test Organisms			
		LM7644	PI	FN	AA
MRS	GJ-24	++	+	+++	-
	LDTM6804	++	++	+++	-
	M157	+++	++	+++	-
10% Skim milk + 1.75% glucose	GJ-24	++	-	+	-
	LDTM6804	-	-	++	-
	M157	+++	++	+++	-
Modified Whey	GJ-24	++	+	+++	-
	LDTM6804	+	+	+++	-
	M157	+++	++	+++	-

3) 유산균의 bacteriocin 활성으로 인한 치주염 유발균의 억제는 현재의 항생제 내성 문제를 고려할 때(그림 45) 일반적인 항생제에 대한 잠재적인 대안이 될 수 있음. 항생제에 대한 의존성을 줄이기 위해서는 유산균의 bacteriocin 생산에 대한 추가적

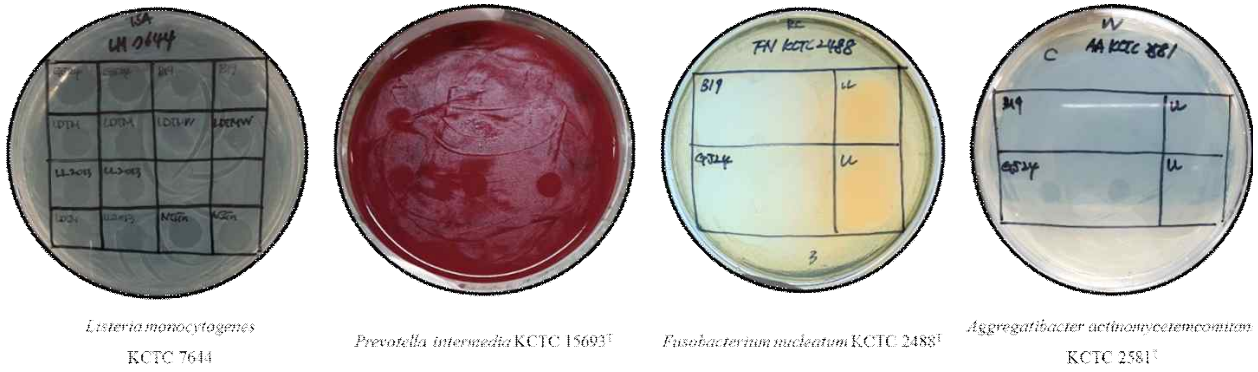


그림 45. Spot-on-lawn assay를 통한 *L. monocytogenes* ATCC7644와 치주염 유발 균주의 억제

바. 상업용 nisin을 이용한 병원성 세균의 억제

1) 생장의 억제를 나타내는 가장 낮은 농도를 최소 억제 농도(MIC)로 간주하였음. 검사한 병원균 중 *L. monocytogenes*의 MIC 값이 1.0–2.0 IU/mL로 가장 큰 억제를 보였음. 치주염을 유발하는 병원균인 *P. intermedia*와 *F. nucleatum*도 억제되었으며, 분리된 유산균의 bacteriocin의 결과가 유사하였음. *P. gingivalis*도 억제되었지만 높은 nisin 농도(40.0 IU/mL)에서 억제되었고 *A. actinomycetemcomitans*는 nisin에 의해 억제되지 않았음. *S. aureus* 균주는 1.0–10.0 IU/mL의 MIC를 같은 상업용 nisin에 의해 억제되었음(표 74). 다양한 종류 병원성 세균에 대한 억제는 항균 펩타이드의 유리한 특성이며, 다양한 연구 및 산업 분야에서의 사용 가능성을 증가시킬 수 있다고 할 수 있음.

표 74. 상업용 nisin을 이용한 병원균의 억제

Test Organisms		Nisin MIC (IU/μL)
Periodontitis-causing bacteria	<i>P. intermedia</i> KCTC15693 <sup>T</sup>	2.0
	<i>F. nucleatum</i> KCTC2488 <sup>T</sup>	1.0
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> KCTC2581 <sup>T</sup>	–
	<i>P. gingivalis</i> KCTC5352	40.0
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> KCTC13064 <sup>T</sup>	2.0
	<i>L. monocytogenes</i> KCTC3569	2.0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	1.0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19114	1.0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	1.0
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> PCFA261	2.0
	<i>S. aureus</i> PCFA263	1.0
	<i>S. aureus</i> PJFA521	10.0
	<i>S. aureus</i> PJFH522	10.0

사. *L. lactis* subsp. *lactis* CAU2013 및 *E. faecalis* M157의 bacteriocin 항균 범위

1) *E. faecalis* M157의 bacteriocin은 *L. lactis* CAU2013에 비해 더 넓은 항균활성 스펙트럼을 보여 실험에 사용된 많은 세균들을 억제하였음(표 75). 또한 *E. faecalis* M157 bacteriocin만이 *S. aureus* 균주를 억제하여 병원체 조절을 위한 잠재적인 적용가능성을 보였음. 또한 *E. faecalis* M157 bacteriocin은 일반적으로 *L. lactis* CAU2013보다 더 큰 억제 영역을 나타냈으며, 이는 박테리아 성장 후 더 강력한 억제 활성 또는 더 높은 농도를 갖고 있음을 시사함. 반면, *L. lactis* CAU2013 bacteriocin은 *P. intermedia*와 *F. nucleatum*에 대해 더 큰 억제를 보였음. 흥미롭게도, 두 bacteriocin 생산 균주는 서로에 대해서도 항균활성 능력을 보였음.

표 75. *L. lactis* CAU2013과 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 항균 범위

Bacterial Strain	Growth Conditions	CAU2013		M157	
		ZOI ± SD	Activity*	ZOI ± SD	Activity*
<b>Gram-Positive</b>					
<i>Lactococcus lactis</i> CAU2013	MRS, 37°C	-	-	14.50 ± 0.44	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> M157	MRS, 37°C	8.67 ± 0.58	++	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3018 <sup>b</sup>	MRS, 37°C	10.67 ± 0.58	+++	13.67 ± 0.34	+++
<i>L. salivarius</i> G124	MRS, 37°C	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i> 391	MRS, 37°C	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> 214	MRS, 37°C	10.67 ± 0.58	+++	10.33 ± 0.29	+++
<i>L. casei</i> MCL	MRS, 37°C	-	-	11.22 ± 0.19	+++
<i>L. casei</i> AFCC9029	MRS, 37°C	-	-	13.67 ± 0.17	+++
<i>L. paracasei</i> 2782	MRS, 37°C	-	-	13.78 ± 0.19	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	TSA, 37°C	7.17 ± 0.29	++	12.44 ± 0.51	+++
<i>List. monocytogenes</i> ATCC19114	TSA, 37°C	8.67 ± 0.76	++	13.44 ± 0.19	+++
<i>List. monocytogenes</i> ATCC19115	TSA, 37°C	10.67 ± 0.76	+++	12.78 ± 0.25	+++
<i>Streptococcus mitis</i> AFCC5556	BHI, 37°C	9.67 ± 0.58	++	8.59 ± 0.10	++
<i>Staphylococcus aureus</i> AFCC35594	LB, 30°C	-	-	7.94 ± 0.19	++
<i>S. aureus</i> RN6390	LB, 30°C	-	-	8.89 ± 0.20	++
<b>Gram-Negative</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	LB, 30°C	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1756 <sup>b</sup>	LB, 30°C	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis YENS83	LB, 30°C	-	-	-	-
<i>Prevotella intermedia</i> KCTC15693 <sup>b,c</sup>	BYC/Wilkins, 37°C	10.33 ± 0.58	+++	4.17 ± 0.29	+
<i>Fructobacterium nucleatum</i> KCTC2488 <sup>b,c</sup>	BYC, 37°C	11.33 ± 0.58	+++	10.33 ± 0.29	+++
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> KCTC2581 <sup>b,c</sup>	BY, 37°C	-	-	-	-

<sup>a</sup>혐기성 챔버와 GasPak(BD Difco)을 사용하여 혐기적으로 배양.

<sup>b</sup>LB – Luria-Bertani 배지

<sup>c</sup>BYC – BHI(Brain-Heart Infusion) 배지는 1% 효모 추출물, 0.1% L-시스테인, 5 µg/mL hemin 및 0.5µg/mL menadione으로 보충.

<sup>d</sup>BY – BHI는 0.5% 효모 추출물로 보충.

\*활성은 ZOI의 직경을 기준으로 표현: (-) 억제 없음; (+) 0.1-5.0 mm; (++) 5.1-10.0 mm; (+++) 10.1-15.0 mm; (++++) ≥ 15.1 mm.

2) 상업용 nisin은 각각 0.781 µg/mL 및 1.563 µg/mL의 MIC 값을 갖는 *E. faecalis* M157 및 *L. lactis* CAU2013을 모두 효과적으로 억제하였음. 화학적으로 합성된 M157 bacteriocin은 *E. faecalis* M157(MIC=50.0 µg/mL)에 대해 거의 억제를 나타내지 않았지만 *L. lactis* CAU2013(MIC=1.563 µg/mL)에 대해 nisin과 비슷한 억제 효과를 나타내었음. 또한, 이전에 관찰된 바와 같이, *E. faecalis* M157 bacteriocin은 *E. faecalis* M157(AU=200)에 대해 *L. lactis* CAU2013 bacteriocin보다 *L. lactis* CAU2013(AU=800)을 더 크게 억제할 수 있었음(표 76). 이 결과는 두 bacteriocin 및 관련 면역 단백질의 작용 방식에 잠재적인 차이가 있음을 시사함. 더욱이, 이 결과로부터 두 bacteriocin 생산자의 공동 배양은 bacteriocin의 교차 활성으로 인해 더 높은 bacteriocin 활성을 초래하지 않을 수 있음을 추론할 수 있었음.

표 76. *E. faecalis* M157과 *L. lactis* CAU2013에 대한 bacteriocin 활성

대상 균	펩타이드	억제 부위 (cm)									AU	MIC (µg/ml)
		2 <sup>0</sup>	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>		
<i>E. faecalis</i> M157	Nisin	1.30	1.25	1.20	1.10	1.10	1.00	1.00	0.80	-	12,800	0.781
	C h e m . M157	0.80	0.30	-	-	-	-	-	-	-	200	50.0
	Nisin+Chem. M157	1.20	1.20	1.20	1.10	1.00	1.00	-	-	-	3,200	3.125
	M157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CAU2013	0.95	0.80	-	-	-	-	-	-	-	200	-
<i>L. lactis</i> CAU2013	Nisin	1.25	1.25	1.20	1.15	1.05	0.95	0.75	-	-	6,400	1.563
	C h e m . M157	1.30	1.25	1.25	1.20	1.05	1.00	0.90	-	-	6,400	1.563
	Nisin+Chem. M157	1.25	1.20	1.15	1.10	0.95	0.40	0.10	-	-	6,400	1.563
	M157	1.15	1.10	1.05	0.90	-	-	-	-	-	800	-
	CAU2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[2차년도] 치즈 염증 억제제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립

1. *E. faecalis* M157의 성장과 Bacteriocin 생성

가. 유청 배지의 평가

- 1) 실험 결과, 25°C와 37°C에서 MRS와 저온 살균 유청 배지에서 유사한 세균의 생장이 확인되었으며, 이는 유청이 유산균의 성장 배지로서 잠재력이 있음을 시사하였음. 그러나 deproteinized 유청배지에서는 두 온도 모두에서 배양 후 훨씬 낮은 생균수를 보였음. 이는 유청에 포함되어 있는 단백질과 기타 영양성분이 멸균 과정에서 제거되어 세균의 성장에 영향을 미쳤기 때문으로 여겨짐. 유청 단백질의 제거는 *E. faecalis* M157의 성장에 부정적인 영향을 미쳤으며, 이는 세균의 성장을 지원하기 위한 추가적인 영양소의 보충이 필요함을 시사함(그림 46).
- 2) Bacteriocin 생산의 측면에서, 영양소가 풍부한 MRS 배지는 두 온도에서 24시간 배양 후 최대 800 AU/mL의 bacteriocin 활성이 확인되었음. Bacteriocin 생산이 높이기 위해서는 여러 영양소가 필요하다는 이러한 관찰을 뒷받침하는 다양한 보고가 이루어졌음. 두 유청 배지는 온도 조건과 관계없이 최대 200 AU/mL까지만 bacteriocin을 생산하였음. 그러나 25°C에서 12시간 배양 후 deproteinized 유청의 bacteriocin 생산이 저온 살균 유청보다 높다는 점에 유의해야함. 이를 통해

deproteinized 유청의 세포 농도가 더 낮았지만 bacteriocin 생산은 저온 살균 유청과 유사하게 이루어짐을 알 수 있었음.

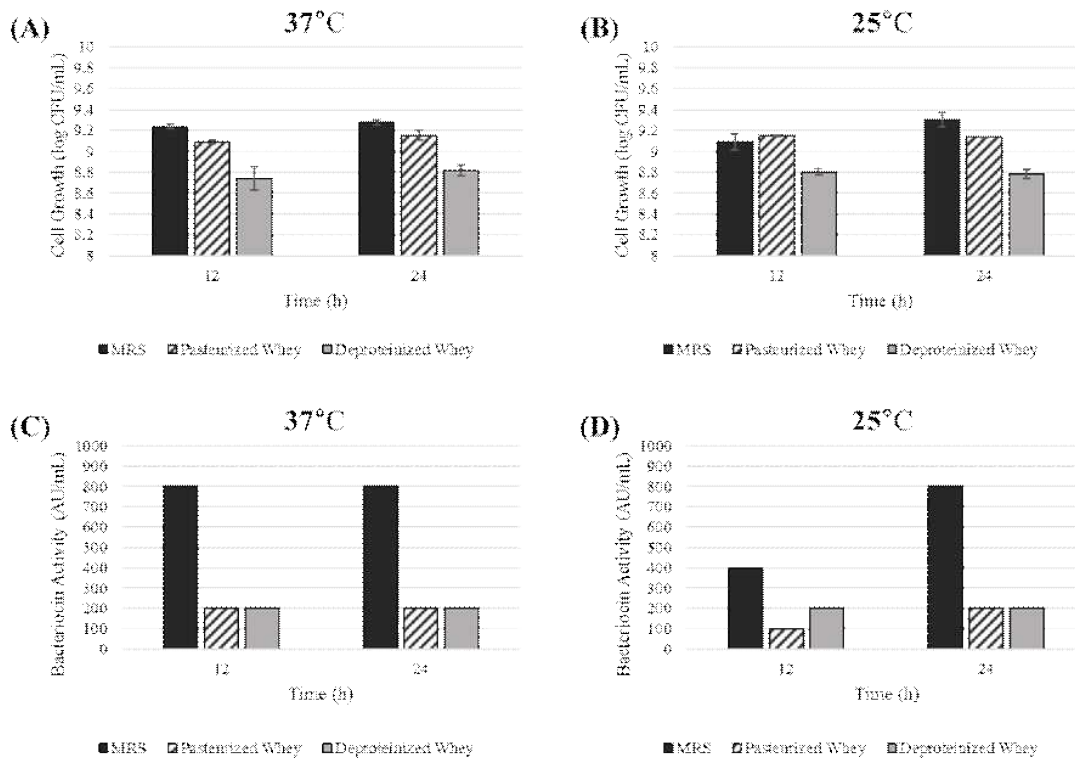


그림 46. MRS 및 유청 배지에서 배양한 *E. faecalis* M157의 생균수(A, B) 및 bacteriocin 활성(C, D)

나. MRS에서 *E. faecalis* M157의 성장 패턴 및 bacteriocin 생산

- 1) 그림 47를 기반으로 낮은 온도에서의 배양은 검사된 모든 측정값의 이동이 발생한다고 추론할 수 있었음. 25°C에서 배양하면 균의 성장 속도와 배지의 산성화 속도가 더 늦게 진행되었음. 또한, bacteriocin 생산은 12시간 배양 후에만 관찰되었음. 반면에 37°C에서 배양하면 성장속도도 더 빠르고, 배양 6시간 만에 bacteriocin 활성이 확인되었음. 그럼에도 불구하고, 두 온도 조건에서 모두 배양 18시간후에는 bacteriocin 최고 활성이 1,200 AU/mL에 도달하였음.
- 2) 실험 결과, MRS 배지에서 *E. faecalis* M157의 유리한 성장과 최종 pH 4.3-4.5 정도에 도달하는 특징적인 발효 패턴을 보여주었으며, 측정된 bacteriocin 활성은 배양 온도와 관계없이 높게 나타났음. 이는 bacteriocin과 같은 대사 산물의 생산에는 영양소 함량이 풍부한 MRS와 같은 복합 배지가 적합하다는 것을 의미하였음.

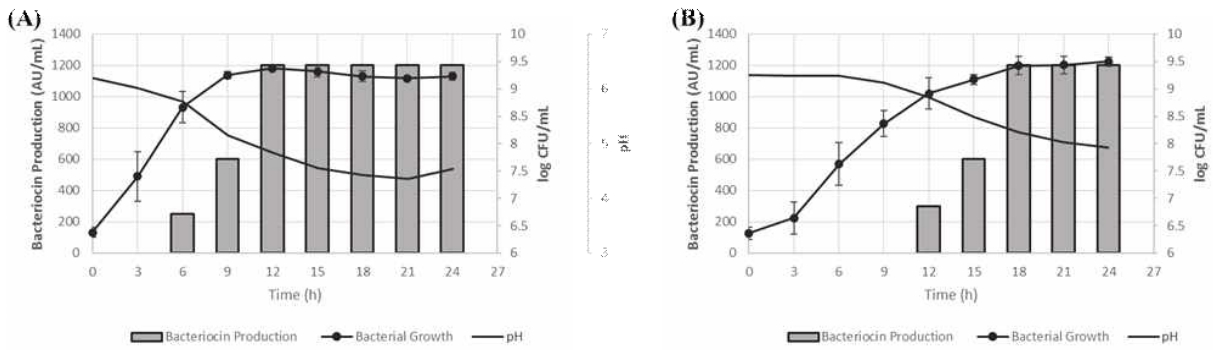


그림 47. MRS 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장, 발효 패턴 및 bacteriocin 생산 배양온도: 37°C(A) & 25°C(B)

다. 유청 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장 패턴 및 bacteriocin 생산

- 1) 세균 생장의 측면에서 유청 배지는 두 온도 모두에서 충분한 성장을 지원하여 약 9.0 Log CFU/mL의 최종 세포 농도에 도달하였음. 발효양상도 MRS와 유사하였음. 따라서 *E. faecalis* M157은 실험에 이용된 유청 배지에 존재하는 영양소를 이용하여 적당한 성장과 발효가 진행됨을 알 수 있었음. 그러나 bacteriocin 생산은 MRS 배지에 비하여 현저히 낮았음. 두 온도 조건 모두에서 bacteriocin 활성은 100 AU/mL까지만 도달하였음. MRS배지에서와 마찬가지로, bacteriocin 생산은 25°C (T=15시간)보다 37°C(T=9시간)에서 더 일찍 관찰되었음. 이 연구를 통하여 유청 배지의 영양 성분이 *E. faecalis* M157의 성장을 뒷받침하기에 충분했지만, 결과는 더 높은 bacteriocin 생산을 달성하기 위해 추가적인 영양소 보충의 필요성이 확인되었음(그림 48)

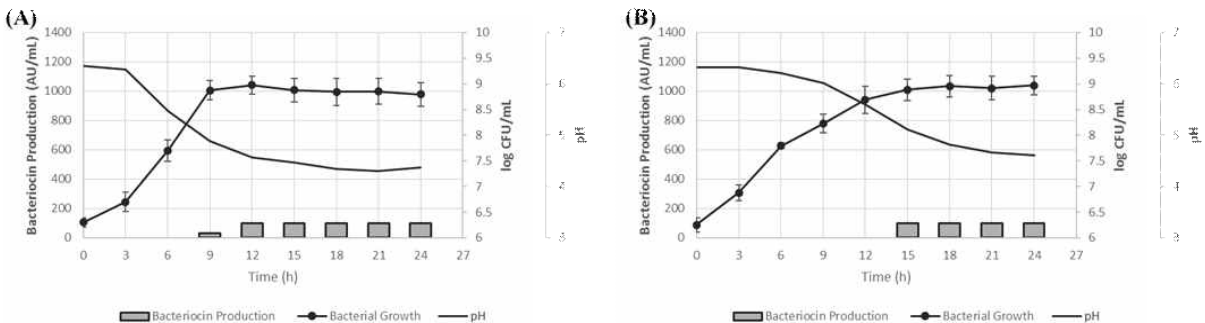


그림 48. 유청 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장, 발효 패턴 및 bacteriocin 생산 배양온도: 37°C(A) & 25°C(B)

라. 유청배지에 질소원 공급원의 보충

- 1) 그림 49는 tryptone 또는 soytone이 보충된 유청 배지가 기존 유청 배지와 비교할 때 세균의 성장에 더 유리하다는 것을 보여주었음. 흥미롭게도 bacteriocin 생산은 더 높아서 24시간 배양 후 약 300-400 AU/mL에 도달하였음. 더욱이, soytone은 배양 후 6시간 만에 bacteriocin 생산을 가능하게 하지만, tryptone 보충은 9시간 배양 후 bacteriocin 생산을 보여주었음. 관찰된 bacteriocin 활성은 여전히 MRS에서보다 낮았지만, 유청 배지의 최적화는 *E. faecalis* M157의 bacteriocin 생산을 더 높혀 줄 수 있다는 가능성을 보여주었음. 따라서 유청 배지를 사용하여 최대 bacteriocin 생산을 가능하게 하는 성분의 최적화를 위해 이러한 방향으로 더 많은 노력이 필요하다고 생각됨.

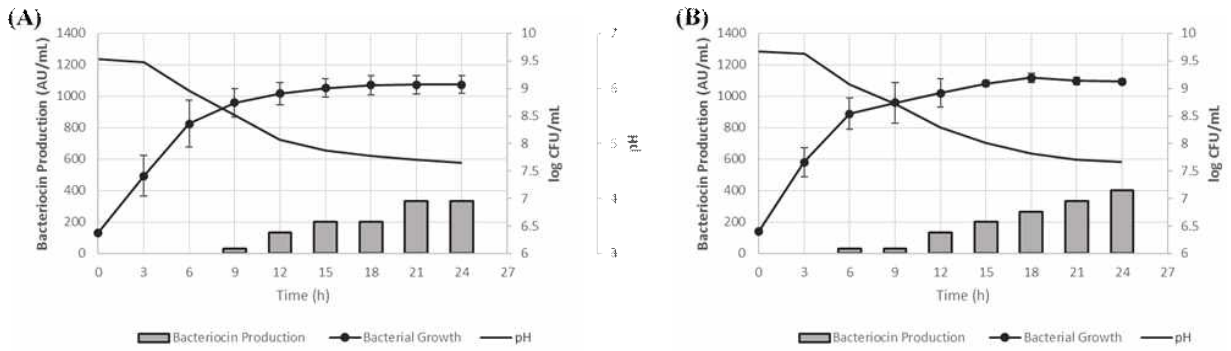


그림 49. 1% tryptone(A)과 1% soytone(B)이 첨가된 유청 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장 동역학, 발효 분석 및 bacteriocin 생산

배양온도: 37°C

## 2. M157 Bacteriocin의 정제 및 특성 연구

*E. faecalis* M157 균주가 생산하는 bacteriocin의 특성을 확인하기 위해 일련의 분리 정제 및 특성화 실험을 진행함. M157 bacteriocin의 분리 정제를 위해 탈염 및 column chromatography를 포함한 다양한 정제 기술을 사용하였음.

가. 탈염(salting out) 기술을 통한 정제

- 1) 그림 50에 표시된 바와 같이 단백질의 탈염은 M157 bacteriocin 정제에 효과적이지 않았으며, 상층액으로부터 활성이 관찰되었음(표 77). 이 결과를 통해 bacteriocin 활성이 상층액에 남아있고 염을 첨가한 후에도 침전되지 않았음을 알 수 있었음. 따라서 salting out에 의한 부분정제 기술이 nisin의 정제에 활용된 보고는 있지만, M157 bacteriocin을 침전시키는 데 비효율적이어서 아래와 같은 다른 정제기술을 적용하게 되었음.

표 77. 탈염 기술을 이용한 M157 bacteriocin의 정제

분획	부피(mL)	억제 부위 (mm)				AU/mL	총 활성	
		2 <sup>0</sup>	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>			
Crude	Crude	50	7	6.5	w	-	200	10,000
CFS	pH 7.0	50	8	6.5	6	-	400	20,000
2.5 M NaCl	펠릿	2	-	-	-	-	-	-
	상층액	50	8	7.5	6.5	-	400	20,000
5.0 M NaCl	펠릿	2	-	-	-	-	-	-
	상층액	50	8.5	7.5	w	-	200	10,000



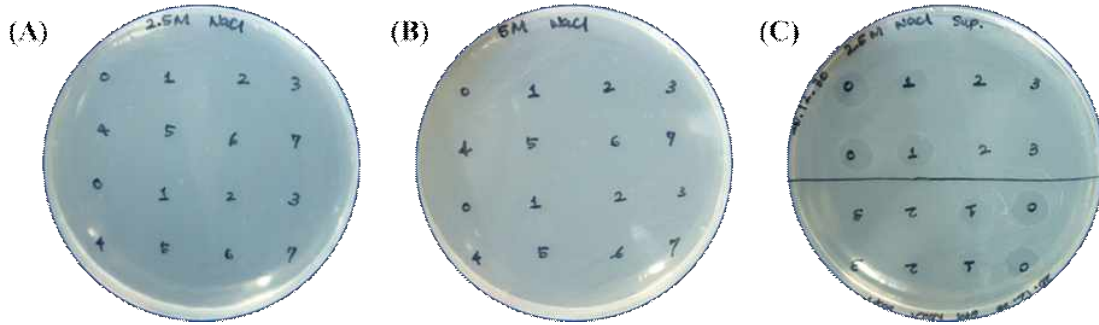


그림 50. 2.5 M NaCl(A), 5.0 M NaCl(B), 침전 및 상층액(C) 처리 후의 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 bacteriocin spot-on-lawn 분석

나. Cation-exchange chromatography를 이용한 정제

1) M157 bacteriocin의 이론적인 등전점(pI)는 약 10.0-10.2임. 따라서 pH 7.0에서 bacteriocin의 순 표면 전하는 양전하를 띄게 되고, 따라서 양이온 교환수지에 결합할 것으로 예상되었음. 그러나 정제후에 확인된 수율은 0.54-0.58%에 불과했으며, 활성 분획은 0.4 M NaCl에서 용출되었음. Tris-tricine SDS-PAGE는 표적 펩타이드에 상응하는 별개의 밴드를 나타내었음(그림 51). 이론적인 박테리오신의 분자량에 해당하는 뚜렷한 밴드가 확인으나, 정제된 박테리오신의 활성은 예상한 것보다 훨씬 낮은 값으로 나타났음(표 78).

표 78-A. Cation-exchange column을 이용한 bacteriocin 정제 (중력에 의한 로딩)

정제 단계	분획	부피 (mL)	억제 부위 (mm)				AU/mL	총 활성
			2 <sup>0</sup>	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>		
발효	Crude CFS	430	8.0	6.5	w	-	200	86,000
Cation-exchange Chromatography [중력] Flow Rate: 약. 0.25mL/min	Flowthrough	430	8.0	7.0	w	-	200	86,000
	Sample Wash	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 0.2 M	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 0.4 M	5	7.0	-	-	-	100	500
	Eluent: 0.6 M	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 0.8 M	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 1.0 M	5	-	-	-	-	-	-

표 78-B. Cation-exchange column을 이용한 bacteriocin 정제(펌프로 로딩)

정제 단계	분획	부피 (mL)	억제 부위 (mm)				AU/mL	총 활성
			2 <sup>0</sup>	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>		
발효	Crude CFS	460	8.0	5.0	w	-	200	92,000
Cation-exchange Chromatography [진공] Flow Rate: 약. 1.75-2.0 mL/min	Flowthrough	460	7.5	6.0	w	-	200	92,000
	Sample Wash	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 0.2 M	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 0.4 M	5	7.0	w	-	-	100	500
	Eluent: 0.6 M	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 0.8 M	5	-	-	-	-	-	-
	Eluent: 1.0 M	5	-	-	-	-	-	-

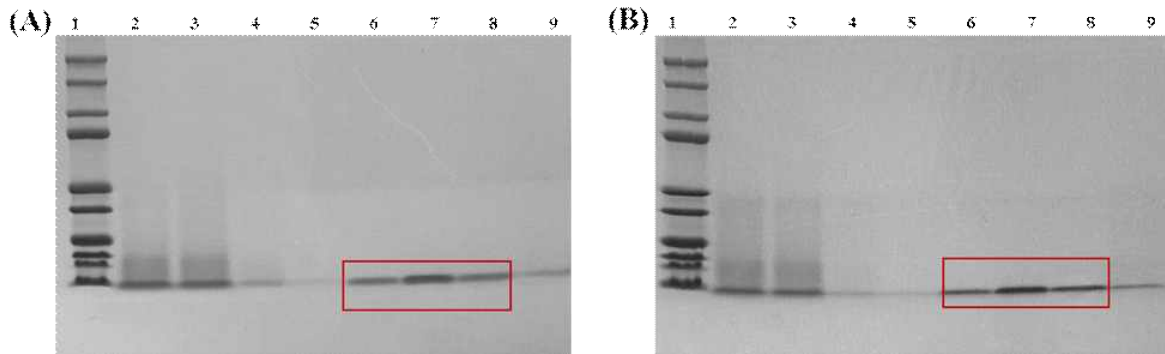


그림 51. 중력(A), 진공(B)설정에 의한 *E. faecalis* M157 bacteriocin 정제의 Tris-tricine SDS-PAGE

Lane 1: Protein marker; Lane 2: Crude CFS; Lane 3: Flowthrough; Lane 4: Sample wash; Lane 5: Elution (200 mM NaCl); Lane 6: Elution (400 mM NaCl); Lane 7: Elution (600 mM NaCl); Lane 8: Elution (800 mM NaCl); Lane 9: Elution (1 M NaCl)

3) 기존에 보고된 연구결과를 토대로, 황산암모늄 침전을 통한 단백질의 농축과정은 포함하여 박테리옌을 정제하면 그 수율이 증가할 것이라는 전제로 실험을 진행하였음. 황산암모늄 침전의 원리는 고농도의 작고 고하전된 이온이 단백질에 수화되어 있는 물 분자와 경쟁하게 되어, 단백질 표면을 물을 제거하여 용해도를 감소시킴으로써 단백질이 침전됨. 이를 통해, Cation-exchange 레진에 대한 단백질의 결합에 영향을 줄 수 있는 배양 성분들이 제거되어 정제 과정에 도움을 줄 수 있게 되었음.

다. M157 bacteriocin의 대규모 정제

1) 3 L 배양액을 이용한 2 반복의 정제 과정에서 대략 10.6%의 정제 수율을 얻을 수 있었으며, 이는 실험에 이용된 양이온 교환수지의 결합능력에 의한 것으로 판단되었음(표 79). 대부분의 bacteriocin은 이전 결과와 마찬가지로 400-600 mM NaCl 농도에서 용출되었음. 실험에 이용된 오픈 컬럼은 최대 2 mL까지의 레진만 채울 수 있으며, 이는 대량의 배양 상층액의 모든 생리활성 펩타이드가 결합하기에는 용량이 충분하지 않아 그대로 빠져나가게 됨을 의미하였음.

표 79. Cation-exchange chromatography를 사용한 M157 bacteriocin의 대규모 정제

회분	분획	부피	총 단백질 (mg)	총 활성 (AU)	정제 (Fold)	결과 (%)	
2 L MRS 발효	CFS	2,000	547.151	800,000	1.00	100.00	
	황산암모늄 침전	100	413.155	640,000	1.06	80.00	
	투석	130	361.457	832,000	1.57	104.00	
	Cation-exchange(A)	Flowthrough	10	6.894	8,000	0.79	1.00
		400 mM	5	2.395	32,000	9.14	4.00
		600 mM	5	-0.045	1,000	-15.08	0.13
	Cation-exchange(B)	Flowthrough	10	30.385	8,000	0.18	1.00
		400 mM	5	7.244	32,000	3.02	4.00
		600 mM	5	0.226	1,000	3.02	0.13
3 L MRS 발효	CFS	3,000	729.817	1,200,000	1.00	100.00	
	황산암모늄 침전	120	529.143	768,000	0.88	64.00	
	투석	170	336.400	1,088,000	1.97	90.67	
	Cation-exchange(A)	Flowthrough	85	66.611	17,000	0.16	1.42
		400 mM	5	5.545	64,000	7.02	5.33
		600 mM	5	3.139	64,000	12.40	5.33
	Cation-exchange(B)	Flowthrough	85	60.154	17,000	0.17	1.42
		400 mM	5	4.826	64,000	8.07	5.33
		600 mM	5	9.409	64,000	4.14	5.33

라. Cation-exchange 및 hydrophobic interaction chromatography의 정제 수율 비교

- 1) 단백질 정제에 일반적으로 사용되는 또 다른 chromatography 기술은 hydrophobic interaction chromatography(HIC)임. HIC의 원리는 소수성을 기반으로 분자를 분리하여 더 많은 소수성 분자가 레진에 결합하도록 하는 것임. 황산암모늄의 침전 후, 높은 염 농도는 bacteriocin을 더 소수성으로 만듦. 따라서, 정제용 시료는 황산암모늄 침전 직후 바로 HIC에 적용 될 수 있어 투석 또는 탈염 단계가 필요하지 않은 것이 장점임.
- 2) 두 종류의 크로마토그래피에서 M157 bacteriocin의 부분 정제가 가능하였음. 양이온 교환 수지와 HIC를 통해 정제된 박테리오신의 순도를 Tris-tricine SDS PAGE를 기반으로 하여 비교해 보면(그림 52), 양이온 교환 수지를 통해 정제한 것이 순도가 높다는 것이 젤 사진을 통해서 확인되었음. 그러나, 수율적인 측면에서는 HIC가

약 18% 정도로 양이온 교환수지의 8% 정도보다는 더 높게 나타났음(표 80).

3) 이 실험을 통해 찰된 순도와 수율의 차이를 고려하여 두 chromatography 기술을 결합하여 더 높은 순도의 박테리옌을 얻기위한 실험을 진행하게 되었음.

표 80-A. Hydrophobic interaction chromatography을 이용한 bacteriocin의 정제

정제 단계	분획	부피(mL)	AU/mL	총 활성	결과(%)
발효	Crude CFS	1,000	800	800,000	100
황산암모늄 침전	재현탁액	100	6,400	640,000	80
	상층액	1,200	-	-	-
Hydrophobic interaction Chromatography	Flowthrough	100	400	40,000	5
	Sample Wash	15	100	1,500	0.1875
	Eluent: 40%	10	100	1,000	0.1250
	Eluent: 30%	10	200	2,000	0.25
	Eluent: 20%	10	800	8,000	1
	Eluent: 10%	10	12,800	128,000	16
	Eluent: 0%	10	800	8,000	1
	End Wash	10	-	-	-

표 80-B. Cation-exchange chromatography을 이용한 bacteriocin의 정제

정제 단계	분획	부피(mL)	AU/mL	총 활성	결과(%)
발효	Crude CFS	1,000	400	400,000	100
황산암모늄 침전	재현탁액	100	1,600	320,000	80
	상층액	1,200	-	-	-
탈염	활성 분획	10	6,400	64,000	16
	투석액	200	-	-	-
Cation-exchange Chromatography	Flowthrough	10	50	1,500	0.375
	Sample Wash	2.5	100	250	0.063
	Eluent: 0.2 M	5	-	-	-
	Eluent: 0.4 M	5	6,400	32,000	8
	Eluent: 0.6 M	5	200	1,000	0.25
	Eluent: 0.8 M	5	-	-	-
	Eluent: 1.0 M	5	-	-	-

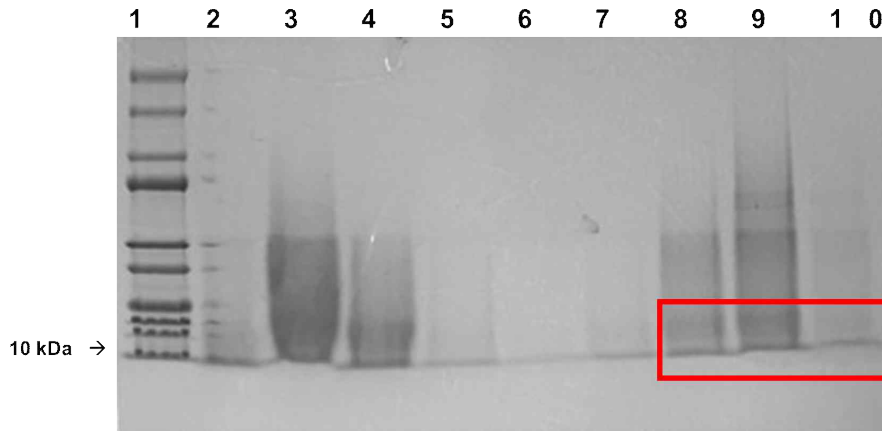


그림 52-A. Hydrophobic interaction chromatography 후 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 Tris-tricine SDS-PAGE

Lane 1: Protein marker; Lane 2: CFS; Lane 3: Concentrated bacteriocin; Lane 4: Flowthrough; Lane 5: Sample Wash; Lane 6: Elution (40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); Lane7: Elution (30% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); Lane8: Elution (20% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); Lane9: Elution (10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); Lane10: Elution (0% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

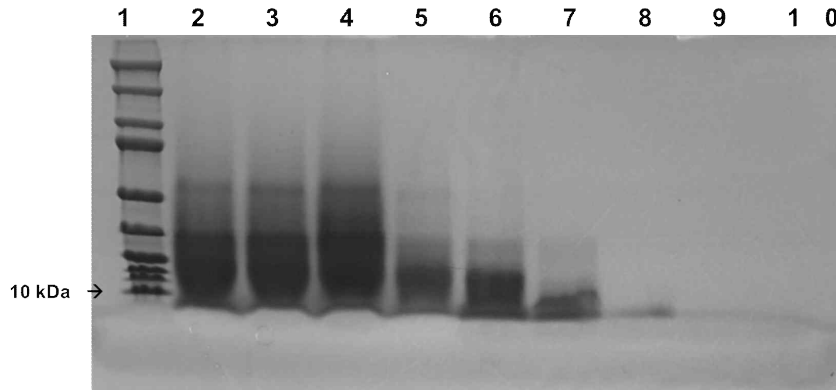


그림 52-B. Cation-exchange chromatography 후 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 Tris-tricine SDS-PAGE

Lane 1: Protein marker; Lane 2: Concentrated, desalted bacteriocin; Lane 3: Sample wash; Lane 4: Flowthrough 1; Lane 5: Flowthrough 2; Lane 6: Elution (200 mM NaCl); Lane 7: Elution (400 mM NaCl); Lane 8: Elution (600 mM NaCl); Lane 9: Elution (800 mM NaCl); Lane 10: Elution (1 M NaCl)

마. 최적화된 조건에서 M157 bacteriocin의 분리 정제

- 1) 이 실험을 통하여 *E. faecalis* M157의 bacteriocin이 성공적으로 분리 정제되었음 (표 81). Hydrophobic interaction 및 cation-exchange chromatography를 사용한 수정된 정제 실험 방법은 연속적으로 이전 실험(그림 52)과 비교하였을 때 더 높은 순도(그림 53)와 더 높은 수율(약 20-25%)을 나타냈음. 또한, 활성 염색을 통해서도 정제 과정이 진행됨에 따라 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 억제 강도가 증가하는 것으로 나타났음.
- 2) 그림 53에서 각 정제 단계(C) 후 bacteriocin 분획에 해당하는 밴드는 *L. monocytogenes* ATCC19115를 지표 균주로 사용하여 활성 염색(D)을 통해 확인하였음.

표 81. M157 bacteriocin의 정제

정제 단계	분획	부피(mL)	AU/mL	총 활성	결과(%)
발효	Crude CFS	100	800	80,000	100
황산암모늄 침전	70% 펠릿	20	3,200	64,000	80
	상층액	124	-	-	-
Hydrophobic interaction Chromatography	Flowthrough	20	0	0	-
	Sample Wash	5	0	0	-
	Eluent: 30%	5	0	0	-
	Eluent: 20%	5	0	0	-
	Eluent: 15%	5	100	500	0.625
	Eluent: 10%	5	800	4,000	5
	Eluent: 5%	5	6,400	32,000	40
	Eluent: 0%	5	200	1,000	1.25
	End Wash	10	100	1,000	1.25
탈염	Pooled Bacteriocin	10	3,200	32,000	40
Cation-exchange Chromatography	Flowthrough	20	100	2,000	-
	Sample Wash	5	0	0	-
	Eluent: 0.2 M	5	0	0	-
	Eluent: 0.4 M	5	3,200	16,000	20
	Eluent: 0.6 M	5	800	4,000	5
	Eluent: 0.8 M	5	100	500	0.625
	Eluent: 1 M	5	0	0	-
	End Wash	5	0	0	-

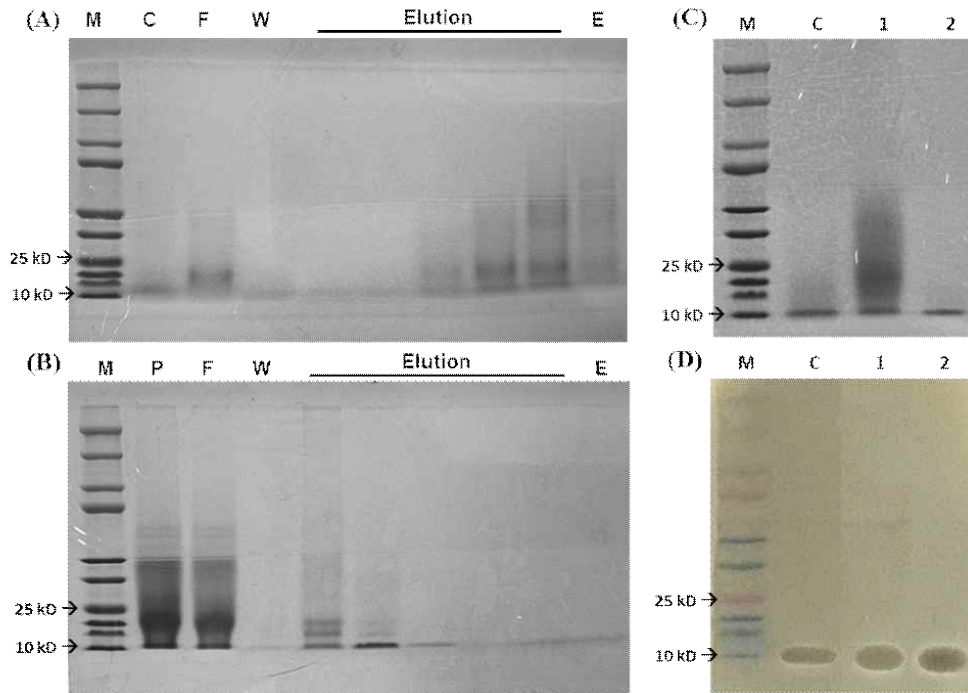


그림 53. Hydrophobic interaction chromatography(A), Cation-exchange chromatography(B) 후 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 용출 패턴을 보여주는 Tris-tricine SDS PAGE

Lanes: M - size marker, C - crude cell-free supernatant, F - flowthrough, W - sample wash, P - pooled bacteriocin fraction, E - end wash, 1 - bacteriocin fraction after HIC, and 2 - bacteriocin fraction after cation exchange chromatography.

바. *L. monocytogenes*의 성장 속도에 대한 M157 bacteriocin의 효과

- 1) Bacteriocin이 첨가된 경우에는 실험에 이용된 모든 *L. monocytogenes* 균주들의 생장이 억제되었음(그림 54). 이는 M157의 bacteriocin이 배양 초기에 존재하는 살아있는 *Listeria* 균에 대한 항균활성이 높아서 균주들을 완전히 억제시켰음을 의미 하였음. 반면에 bacteriocin이 없는 대조군의 경우에는 모든 균들이 정상적인 생장을 나타냄. 이러한 결과는 병원성 세균을 억제하기 위하여 생균 형태의 프로바이오틱스 균주를 사용할 때에 초래될 수 있는 항생제 내성 유전자 및 기타 독성 인자의 전파와 관련된 위험성이 없이 활용할 수 있는 포스트바이오틱스로서의 *E. faecalis* M157 박테리오신의 장점이라고 할 수 있음.

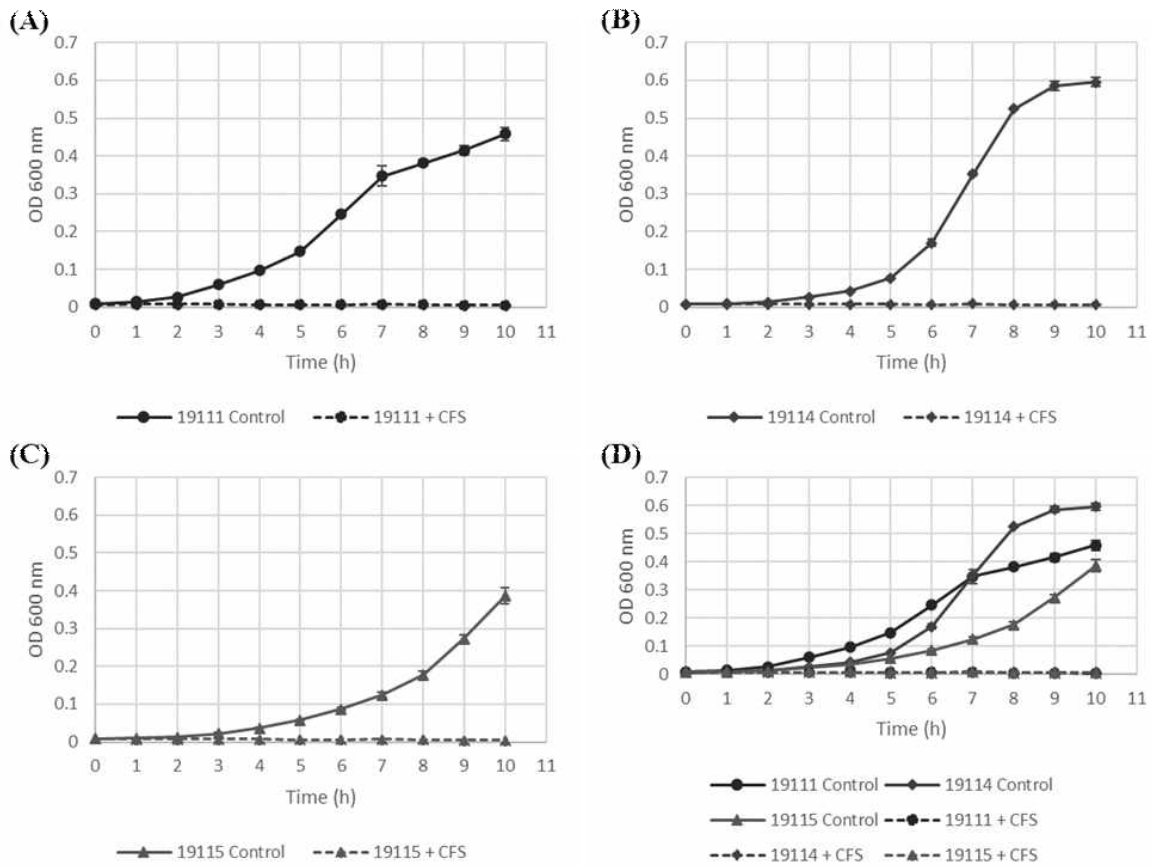


그림 54. M157 bacteriocin에 의한 *L. monocytogenes* ATCC19111(A), ATCC19114(B), ATCC19115(C)의 억제

사. 치주염 유발균의 억제

- 1) 이전 결과와 마찬가지로 *P. intermedia*와 *F. nucleatum*만이 bacteriocin에 의해 억제되었음(표 82). MRS 배지에서 생합성된 bacteriocin은 유청 기반 배지보다 상대적으로 더 높은 bacteriocin 활성을 보이며, 이는 이전 보고와 결과가 일치하였음. 상업용 nisin과 화학적으로 합성된 M157 bacteriocin은 bacteriocin 농도와 순도가 높아서 bacteriocin 활성이 더 높았음. 반면 CHG는 치주염을 유발하는 3가지 병원균을 모두 억제할 수 있었음.
- 2) CHG는 일반적으로 입안의 박테리아 수를 줄이고 치은염을 치료하기 위한 구강 세정제로 사용됨. 흥미롭게도 상업용 nisin과 화학적으로 합성된 bacteriocin은 *F. nucleatum*에 대해 CHG(MIC=18.750)보다 더 큰 억제 활성(MIC=0.391, 0.098  $\mu$ g/mL)을 보였음. *P. intermedia*와 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 CHG의 MIC는 더 낮았으며, 이는 bacteriocin보다 더 강력한 활성을 지님을 시사하였음. 또 다른 실험은 잠재적인 상승 작용을 위해 nisin과 M157 bacteriocin 조합을 활용하였음. 그러나 두 bacteriocin 사이에는 시너지 효과가 없는 것으로 나타났음.



표 82. M157 bacteriocin에 의한 치주염균 억제

Test Organism: *Prevotella intermedia* KCTC 15693T

Peptide	Zone of Inhibition (cm)										AU	MIC (µg/ml)				
	1	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>			2 <sup>-10</sup>			
MRS Culture	w	w	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Whey + 1% Tryptone Culture	w	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chemically synthesized A + B <sup>a</sup>	0.95	0.90	0.80	0.75	0.75	0.70	-	-	-	-	-	-	-	-	3,200	3,125
Nisin <sup>b</sup>	1.15	1.10	1.05	0.90	0.85	0.70	-	-	-	-	-	-	-	-	3,200	3,125
0.12% CHG <sup>c</sup>	2.40	2.20	1.90	1.70	1.50	1.20	0.90	0.85	0.80	0.60	-	-	-	51,200	2,344	

Test Organism: *Fusobacterium nucleatum* KCTC 2488T

Peptide	Zone of Inhibition (cm)										AU	MIC (µg/ml)			
	1	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>			2 <sup>-10</sup>		
MRS Culture	1.05	0.90	0.80	0.75	0.70	-	-	-	-	-	-	-	-	1,600	-
Whey + 1% Tryptone Culture	1.05	0.80	0.75	0.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	800	-
Chemically synthesized A + B <sup>a</sup>	1.10	1.00	0.90	0.85	0.80	0.75	0.75	0.75	0.70	-	-	-	-	25,600	0,391
Nisin <sup>b</sup>	2.10	2.10	2.10	1.80	1.65	1.50	1.40	1.00	0.80	0.80	0.80	0.80	-	102,400	0,098
0.12% CHG <sup>c</sup>	2.40	2.10	1.90	1.40	1.10	0.95	0.70	-	-	-	-	-	-	6,400	18,750

Test Organism: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* KCTC 2581T

Peptide	Zone of Inhibition (cm)										AU	MIC (µg/ml)				
	1	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>			2 <sup>-10</sup>			
MRS Culture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Whey + 1% Tryptone Culture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chemically synthesized A + B <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nisin <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.12% CHG <sup>c</sup>	1.95	1.60	1.30	1.0	0.90	0.85	0.60	0.35	-	-	-	-	-	12,800	9,375	

<sup>a</sup>w - weak activity

아. Bacteriocin의 단백질성 특성의 확인

- 1) Protease 처리 후 bacteriocin의 활성이 표 83에 제시되어 있음. 흥미롭게도, 화학적으로 합성된 bacteriocin만이 protease에 의해 비활성화되었음. CFS와 부분적으로 정제된 bacteriocin은 모두 효소 처리 후에도 활성을 유지하여 이러한 protease의 활성에 내성이 있음을 알 수 있었음. 별도의 실험에서, N-말단에 N-formyl methionine이 존재하는 화학적으로 합성된 M157 bacteriocin은 또한 protease K의 단백질 분해 활성에 내성이 있었음. 항균 펩타이드에서 N-formylation의 역할은 bacteriocin의 효능을 증가시키는 것으로 알려져 있음. 그러나 그러한 변형이 protease에 대한 내성을 부여하는지는 분명하지 않음.
- 2) 또한, 화학적으로 합성된 M157 bacteriocin은 pH를 2.0으로 조정한 후 활성을 잃었지만, 생합성 bacteriocin은 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 이러한 차이는 *E. faecalis* M157의 생합성된 M157 bacteriocin이 N-formylation되고 더 높은 안정성과 효능을 갖는다는 것을 시사함.

표 83. Bacteriocin에 대한 단백질 분해효소의 처리 효과

샘플	효소 처리군		
	대조군	Proteinase K	pepsin
CFS	9.75	8.75	9
CFS*	9.25	8.25	9
정제 bacteriocin	10.5	10	9
정제 bacteriocin*	10.25	10	10
Chem. synthesized	7	-	-
Chem. synthesized*	-	-	-

숫자는 억제환의 크기(mm)를 나타냄

\*pepsin 활성을 위한 최적의 조건을 위해 pH 2.0으로 조정하였음

자. M157 bacteriocin의 안정성 및 특성 연구

- 1) Proteinase K 및 pepsin을 포함하는 단백질 분해 효소로의 처리는 생합성된 bacteriocin의 활성 손실을 초래하지 않았음(표 84). N-formyl Methionine을 갖도록 화학적으로 합성된 bacteriocin에서는 동일한 결과가 관찰되었지만 N-formyl 그룹이 없는 Methionine을 갖도록 합성된 bacteriocin에는 관찰되지 않았음 (data 생략).  $\beta$ -mercaptoethanol, SDS, EDTA, 및 urea를 포함한 다양한 detergent에 노출되어도 활성 손실이 발생하지 않았음. 그러나 Tween 20과 Triton X-100의 존재하에서는 억제환의 크기가 증가하였음.
- 2) CFS를 함유하는 bacteriocin은 다른 온도 및 pH 조건이 추가로 적용되었음. Bacteriocin의 안정성은 CFS를 영하 80–121°C 범위의 다양한 온도 조건에 30분 동안 적용하여 평가를 진행하였음. Bacteriocin 활성에 대한 다양한 pH 조건의 영향은 CFS의 pH 조건(pH 2.0–10.0)을 변경하여 확인하였음. *E. faecalis* M157 bacteriocin은 다양한 온도 및 pH 조건에 노출된 후에도 ZOI가 많이 감소하지 않고 활성은 그대로 유지되어, 이 박테리오신의 pH 안정성과 내열성이 확인되었음.

표 84. *E. faecalis* M157 bacteriocin의 억제 활성에 대한 온도, pH, 효소 및 detergent의 영향

처리군	잔류 활성 <sup>a</sup>	처리군	잔류 활성
효소		detergent	
Proteinase K	++	β-Mercaptoethanol	++
Pepsin	++	Urea	++
Lipase	++	Triton X-100	+++
α-Amylase	++	Tween 80	++
Cellulase	++	Tween 20	+++
Trypsin-EDTA	++	SDS	++
Catalase	++	EDTA	++
온도(°C)		pH	
-80	++	2	++
-20	++	3	++
4	++	4	++
37	++	5	++
60	++	6	++
80	++	7	++
100	++	8	++
121	++	9	++
		10	++
대조군	++		

<sup>a</sup>잔존활성은 ZOI의 직경을 바탕으로 표현: (-) 억제 없음; (+) 0.1-5.0 mm; (++) 5.1-10.0 mm; (+++) 10.1-15.0 mm.

<sup>b</sup>사용된 효소 농도: 5 mg/mL.

차. M157 bacteriocin과 항생제의 상승 작용

- 1) M157 bacteriocin은 실험에 사용된 지시균에 대해 억제 활성을 나타내었음. Ampicillin은 *L. monocytogenes* ATCC19115를 효과적으로 억제하였음. Kanamycin은 *L. monocytogenes* ATCC19115와 *S. aureus* RN6390을 모두 억제하였음. Ciprofloxacin은 두 *S. aureus* 균주를 모두 억제한 반면 vancomycin은 세 가지 균주를 모두 억제하였음. 그러나, bacteriocin과 항생제를 조합하였을 때 억제 환의 크기는 증가하지 않았으며, 이는 적어도 실험에 사용된 지시균에 대해 항균 화합물 사이의 상승 작용이 없음을 나타내었음(표 85).

표 85. *L. monocytogenes* ATCC19115, *S. aureus* ATCC33591 및 RN6390에 대한 항생제 및 bacteriocin의 억제 영역

처리군		<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	<i>S. aureus</i> ATCC33591	<i>S. aureus</i> RN6390
M157 bacteriocin		+	+	+
항생제	Ampicillin	++	-	-
	Kanamycin	++	-	++
	Vancomycin	++	++	weak
	Ciprofloxacin	-	+++	++++
Bacteriocin + 항생제	Bac + Amp	++	-	-
	Bac + Kan	++	-	++
	Bac + Van	++	++	weak
	Bac + Cip	-	+++	++++

카. M157 bacteriocin의 생물막(biofilm) 형성 억제능

- 1) Bacteriocin과 같은 항균활성 펩타이드의 또 다른 중요한 응용분야는 생물막 (biofilm) 및 생물막 생성 세균에 대한 억제능력임. 그림 55에서 보는 바와 같이, M157 bacteriocin은 *L. monocytogenes* 균주들에 대한 항균 활성을 가지고 해당 균주를 생장을 효과적으로 억제하였음. *Listeria* 세균이 죽게 되면 이제는 더 이상 생물막을 형성할 수 없음.
- 2) 세 균주의 *L. monocytogenes*를 가지고 생물막 형성과 그 억제능력을 평가하였음 (그림 55). 세 균주 중에서 ATCC19114가 가장 높은 생물막 형성을 보였고, ATCC19115와 ATCC19111이 그 뒤를 이었음. 24시간과 48시간 동안 박테리오신이 포함된 CFS로 처리하면 균주들의 생물막이 상당히 감소하였으며 생물막의 가장 높은 감소율을 보인 균주는 ATCC19114이었음.
- 3) *Streptococcus mutans*의 경우 2개의 균주에 대해 조사하였고, 혼합 배양물의 생물막 형성에 대해서도 평가하였음. *S. mutans* KCTC3065T는 KCTC5365 균주보다 높은 생물막 형성을 나타내었음. 두 균주를 혼합했을 때 24시간 배양 후 관찰된 생물막 형성은 두 균주의 중간 정도를 나타내었음. 미리 형성된 생물막에 M157 bacteriocin의 적용하면 두 균주의 결과가 서로 상이하게 나타났음. *S. mutans* KCTC5365 생물막은 24시간 노출 후 부분적으로 파괴되었으나, *S. mutans* KCTC3065T는 bacteriocin에 의해 생물막이 감소하지 않았으며, 오히려 시간이 지남에 따라 생물막이 증가하였음. 혼합 배양의 단독으로 배양한 KCTC3065T 균주보다 생물막 형성이 낮았지만 bacteriocin 첨가 후에는 부분적으로 억제가 나타났음.
- 4) 미리 형성된 생물막의 파괴는 생물막 처리의 어려움을 고려할 때 항균활성 펩타이드의 유리한 특성이 될 수 있음. 생물막 형성은 박테리아가 자연계와 인위적으로 만들어진 조건에서 생존할 수 있도록 하는 중요한 생존 전략임. 따라서 *L. monocytogenes*의 생물막을 파괴하는 M157 bacteriocin의 활성은 잠재적인 포스트 바이오틱스로 후보균으로서의 가치를 높혀준다고 할 수 있음.

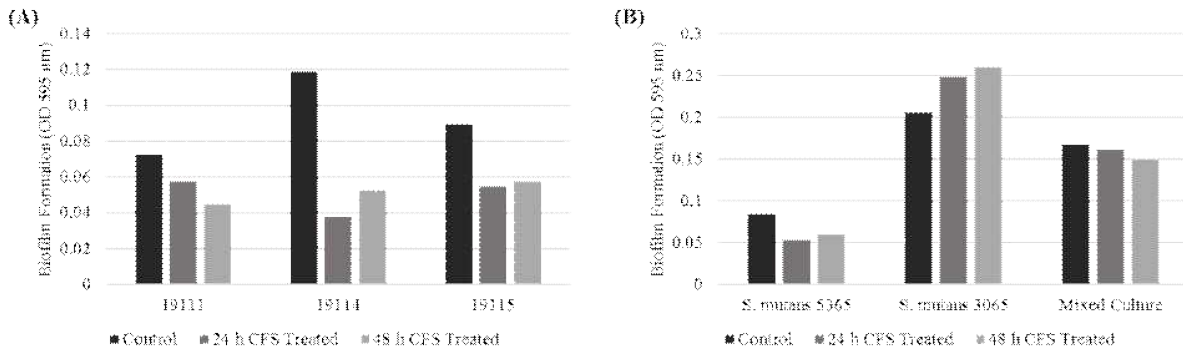


그림 55. M157 bacteriocin에 의한 *L. monocytogenes* (A)와 *S. mutans* (B)의 생물막 제거 능력

### 3. *E. faecalis* M157의 whole genome sequencing

가. *E. faecalis* M157의 bacteriocin 생성에 관한 분자생물학적인 이해를 위하여 균주에 대한 전체 genome 염기서열을 수행하였음. 전체 게놈의 분석은 면역과 수송을 위한 관련 유전자뿐만 아니라 bacteriocin 생산을 위해 암호화하는 유전자를 결정할 수 있게 할 것임. 게다가, genome mining은 항균 저항성 유전자와 프로바이오틱스 균주로의 개발에 중요한 다른 독성 인자의 존재 유무를 확인할 수 있음(그림 56).

나. *E. faecalis* M157 균주의 유전체 서열 분석

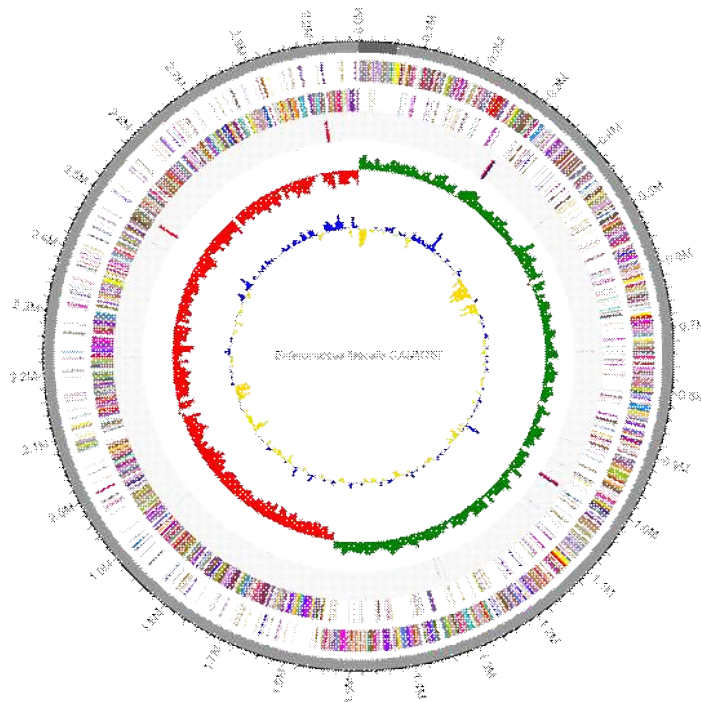


그림 56. *E. faecalis* M157의 원형 genome map

원은 가장 바깥쪽 원에서 중심까지 다음과 같은 특성을 나타냄

(1) contig 정보, (2) 정방향 가닥의 코딩 서열, (3) 역방향 가닥의 코딩 서열, (4) 전이 RNA(tRNA) 및 리보솜 RNA(rRNA), (5) GC skew, (6) GC 비율.

- 1) *E. faecalis* M157의 genome 특징은 표 86에 나열되어 있음. 전체 유전체의 크기는 2,972,812 bp이고 G+C 비율은 37.44%이며 두 개의 contig로 조립되었음. Annotation 분석을 통해 2,830개의 코딩 서열, 12개의 rRNA 및 61개의 tRNA를 밝혀냄. 또한, BAGEL4 online 도구를 사용한 in silico 분석에서 하나의 bacteriocin 유전자 cluster를 찾아내었음.

표 86. *E. faecalis* M157의 genome 특징

유전체 분석 항목	측정값
Genome size(bp)	2,972,812
GC content(%)	37.4
No. of contigs	2
Total genes	2903
Protein-coding gene	2,830
tRNA	61
rRNA	12
Plasmids	0
GenBank Accession No.	JACSYK000000000

다. Bacteriocin 유전자 분석

1) *E. faecalis* M157의 두 펩타이드 bacteriocin은 *E. faecium* MRR10-3의 bacteriocin MR10A 및 MR10B와 동일한 서열을 가지고 있었음. 이 펩타이드는 MR10A에서 보존적 변화(Glu 38에서 Asp로)와 MR10B에서 2개의 residue 변화(Thr 9에서 Ala로, Leu 15에서 Phe로)를 제외하고는 L50A 및 L50B bacteriocin과 유사한 서열을 공유하였음. 전체적인 아미노산서열과 구조분석을 통하여 *E. faecalis* M157 bacteriocin은 클래스 IIb bacteriocin으로 분류되었음(그림 57-그림 58).

Enterococcus faecalis CAUM157 contigs.fasta AOI\_01

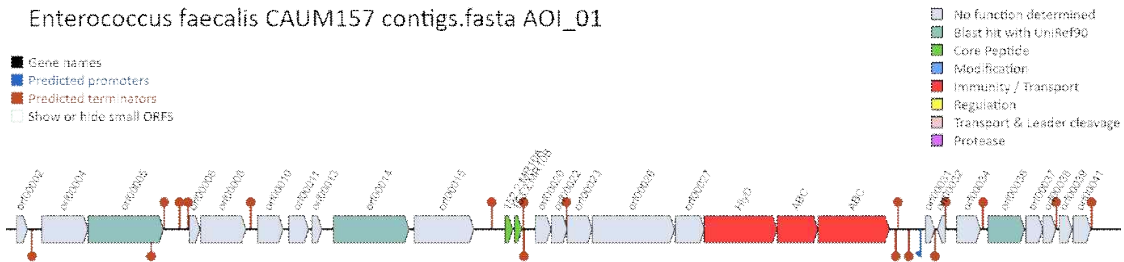


그림 57. BAGEL4 software를 사용하여 bacteriocin의 core 펩티드를 encoding 하는 두 개의 open reading frames이 있는 *E. faecalis* M157에서 예측된 bacteriocin 유전자 집단

```

M157_A      MGATAKLVAKFCWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIDWIKKHI
(A) MR10A    MGATAKLVAKFCWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIDWIKKHI
L50A       MGATAKLVAKFCWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIDWIKKHI

M157_B      MGATAKLVAKFCWPFIIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH
(B) MR10B    MGATAKLVAKFCWPFIIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH
L50B       MGATAKLVAKFCWPFIIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH
    
```

그림 58. Bacteriocin의 아미노산 서열: (A) *E. faecalis* M157 A의 아미노산 서열 정렬; (B) *E. faecalis* M157의 아미노산 서열 정렬.

B. 다른 잔류물이 강조 표시됨

2) 예측된 bacteriocin 모델은  $\alpha$ -나선을 보여주었으며, 이는 표적 박테리아의 세포막에 통합되고 항균 활성을 유도하기 위해 서로 상호작용하는 것으로 추정되었음. 예측된 소수성 특성과 접근 가능한 아미노산 잔기를 통해서 bacteriocin의 어느 부분이 박테리오신의 사슬 간에 그리고 세균의 세포막과 상호 작용하는지에 대한 추측

을 가능하게 하였음(그림 59).

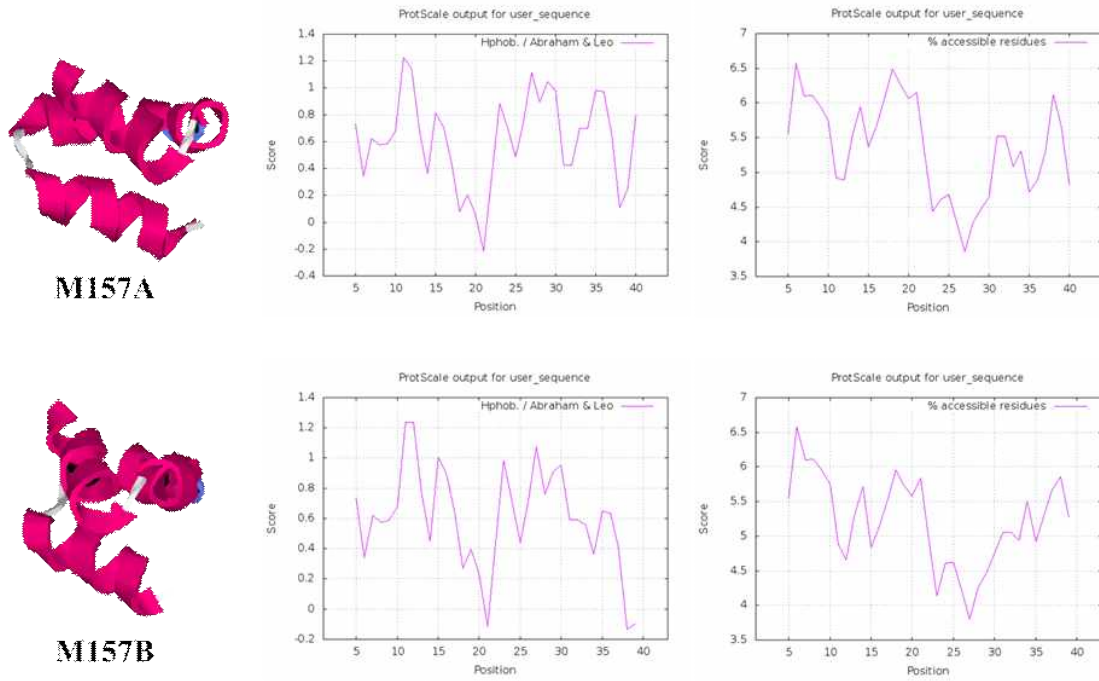


그림 59. 온라인 소프트웨어를 사용하여 예측된 *E. faecalis* M157A(위) 및 M157B(아래) bacteriocin의 예측된 단백질 모델, 소수성 및 접근 가능한 아미노산 잔기(%)

라. 독성 인자 및 항균제 내성 유전자의 결정

- 1) 총 6개의 항생제 내성 유전자가 *E. faecalis* M157의 게놈에서 검출되었음. 이 유전자들은 표 87에 나열된 6가지 종류의 항균제에 대한 내성을 제공하였음. 구체적으로, *E. faecalis* M157은 21개의 항균제에 대한 저항 표현형을 가지고 있다고 예측되었으며, 특히 에리트로마이신과 테트라사이클린에 대한 내성은 추가적인 연구를 통해 그 내성의 정도를 확인해야될 것으로 판단됨.

표 87. *E. faecalis* M157 genome에 존재하는 항생제 내성 유전자 목록

Gene	Predicted Antimicrobial Resistance Phenotype	Class
aph(3')-III <sup>a</sup>	Amikacin	Aminoglycoside
	Butirosin	
	Isepamicin	
	Kanamycin	
	Lividomycin	
	Neomycin	
	Paromomycin	
	Ribostamycin	
ant(6)-Ia <sup>a</sup>	Streptomycin	
Isa(A) <sup>b</sup>	Clindamycin	Lincosamide
	Lincomycin	
erm(B) <sup>a</sup>	<b>Erythromycin</b>	Macrolide
Isa(A) <sup>b</sup>	Dalfopristin	Streptogramin A
	Pristinamycin IIA	
	Virginiamycin M	
erm(B) <sup>a</sup>	Pristinamycin IA	Streptogramin B
	Quinupristin	
	Virginiamycin S	
tet(L) <sup>a</sup>	Doxycycline	Tetracycline
	<b>Tetracycline</b>	
tet(M) <sup>a</sup>	Minocycline	

<sup>a</sup>Percent ID(%ID)는 100임. 완벽하게 일치.

<sup>b</sup>Query 길이가 독성 유전자 길이보다 짧음(%ID=100). 완벽하지 않은 일치.

<sup>c</sup>Query 길이는 독성 유전자 길이와 동일함(%ID<100). 완벽하지 않은 일치.

Database와 Query에서 가장 잘 일치하는 독성 유전자 사이의 최소 동일성 비율은 90%로 설정되었음. 적중 감지를 위한 coverage 겹침의 최소 길이는 60%로 설정되었음.

2) *E. faecalis* M157이 인간 병원체일 확률은 0.885로 예측되었으며 전체 44개의 병원성 families와 일치하였음. 또한, 15개의 독성 인자가 검출됨(표 88). 이 중 6개는 srtA 효소, 세포 관련 페로몬 펩타이드 cCF10, 성 페로몬 전구체 cAD1, 심내막염 및 생물막 관련 pili 단백질, gelatinase를 인코딩하는 유전자에 대해서는 완벽한 일치율을 보였음. 다양한 독성 인자와 항생제 내성 유전자의 존재는 *E. faecalis* M157을 프로바이오틱 개발에 걸림돌이 될 수 있음. 그럼에도 불구하고, 2개의 펩타이드로 구성된 *E. faecalis* M157 bacteriocin의 분리 및 특성화에 초점을 맞춘 이 연구의 결과는 특히 *L. monocytogenes* 및 치주 질환을 유발하는 병원체를 억제하는 항균 펩타이드를 활용한 포스트바이오틱 소재의 개발에 대한 커다란 가능성을 제공한다고 할 수 있음.



표 88. *E. faecalis* M157 genome에서 예측되는 독성 인자

Virulence Factor	Predicted Function
elrA <sup>c</sup>	Enterococcal Leucine Rich protein A
SrtA <sup>a</sup>	SrtA enzyme
ace <sup>c</sup>	Collagen adhesin precursor
agg <sup>b</sup>	Aggregation substance
cCF10 <sup>a</sup>	Cell-associated pheromone peptide cCF10
cOB1 <sup>c</sup>	Pheromone peptide cOB1
cad <sup>a</sup>	Sex pheromone precursor cAD1
camE <sup>c</sup>	Sex pheromone cAM373 precursor
ebpA <sup>a</sup>	Endocarditis and biofilm-associated pili protein
ebpC <sup>a</sup>	
efaAfs <sup>c</sup>	<i>Enterococcus faecalis</i> antigen A
fsrB <sup>c</sup>	Biofilm formation
gelE <sup>a</sup>	Gelatinase
hylB <sup>c</sup>	Hyaluronidase
tpx <sup>b</sup>	Stress response protein

<sup>a</sup>Percent ID(%ID)는 100임. 완벽하게 일치.

<sup>b</sup>Query 길이가 독성 유전자 길이보다 짧음(%ID=100). 완벽하지 않은 일치.

<sup>c</sup>Query 길이는 독성 유전자 길이와 동일함(%ID<100). 완벽하지 않은 일치.

Database와 Query에서 가장 잘 일치하는 독성 유전자 사이의 최소 동일성 비율은 90%로 설정되었음. 적중 감지를 위한 coverage 겹침의 최소 길이는 60%로 설정되었음.

### [3차년도] 치주염 억제 소재 확보를 위한 바이오컨버전 기술 최적화

#### 1. 유청 배지의 최적화

##### 가. 유청의 살균

- 1) 실험 결과에 따르면 소량의 10% 유청에 대한 멸균 처리는 1단계 또는 2단계 열처리가 효과적이었음. 유지 시간을 늘리지 않고 온도를 80℃에서 90℃로 높이는 것은 모든 영양 세포와 가능한 모든 내세포자를 죽이기에 충분하였음. 2단계 열처리는 소량의 배지 살균에도 효과적이었음. 그러나 배지의 부피가 500 mL로 증가하면 살아남는 내열성 균주가 확인되었음(표 89). 부피가 증가할 경우에 심부의 온도가 살균 온도에 도달하는데 시간이 오래 걸리게 되는데, 500 mL 부피로 살균된 유청에 존재하는 생존 균주는 이러한 사실로 설명할 수 있을 것임.

표 89. 유청 배지 살균을 위한 열처리 조건 비교

처리	용량	오염물질 존재 여부
90℃, 1 min	5 mL	-
90℃, 5 min	5 mL	-
70℃, 1 min; 80℃, 5 min	5 mL	-
70℃, 1 min; 80℃, 5 min	500 mL	+

#### 나. 유청 배지 오염균주의 동정

1) LB 한천에서 서로 다른 균락 형태를 보인 4개의 isolates를 순수분리하여 동정하였음. 고체배지 표면에서 자라는 균락의 형태는 네 균주가 모두 전형적인 *Bacillus* 속의 균락 특성을 보여주었음. 모든 분리균주의 균락은 흰색에서 크림색을 띄고 있었음. Isolate 1은 후광이 있는 매끄럽고 볼록한 균락을 가지고 있으며 broth 배지에서 pellicle 형성을 보였음. Isolate 2와 3은 거칠고 볼록한 균락을 가지고 있지만, isolate 3은 더 큰 콜로니를 가지고 있으며 broth 배지의 바닥에 가라앉는 특성이 있었음. Isolate 4는 배지 표면에서 퍼져서 자라는 특성이 있고 거칠고 주름진 균락을 가지고 있으며 broth 배지에 pellicle을 형성하였음. 그람 염색 후 현미경 관찰을 통해 모든 isolates는 세포의 크기는 서로 다르지만 모두 그람 양성 간균임을 보여주었음. 또한 모든 균주들은 내생포자를 형성할 수 있다는 것이 관찰되었음. 포자 형태의 세균은 생식 세포로 존재할 때 보다 높은 온도 및 다양한 pH 조건에서 생존하는 능력이 더 강하므로, 미생물 오염의 위험성을 높이는 미생물의 형태라고 할 수 있음. 내생포자 형성능력은 유청의 오염 세균들이 낮은 열처리 조건에서 살아남는데 도움을 줄 수 있고 내열성 포자들은 상황이 호전되면 생식 세포로 깨어나서 증식을 하여 오염의 문제를 일으킬 수 있음. 내생포자를 형성하는 오염 균주들의 분자생물학적인 동정을 위하여 16S rRNA 염기서열분석을 수행한 결과 이들은 모두 *Bacillus* 속에 속하는 균주임을 확인하였음(그림 60).

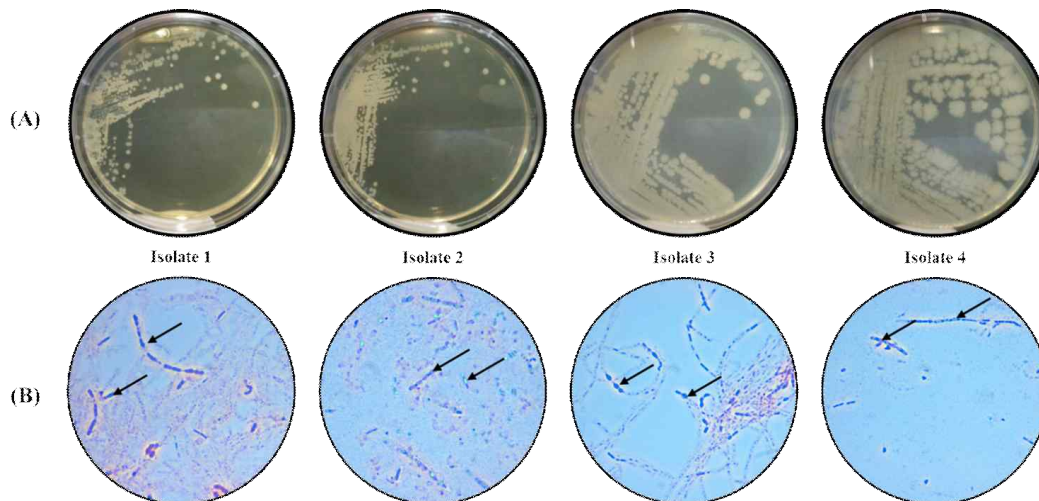


그림 60. Luria-Bertani 한천의 집락 형태(A)와 유청 배지 오염물질의 내생포자 염색(B)

#### 다. 유청 배지의 최적화

1) 이 방법에서는 유청 단백질을 열변성시켜 그 침전물을 제거하기 때문에 비교적 맑은 유청 배지를 얻었음. 또한, 실험의 필요에 따라 배지의 최종 pH를 조정할 수 있어 잠재적인 적용 측면에서 더 나은 다양성을 제공하였음. 이론적으로 이렇게 준비된 유청 배지는 고농도의 유청 단백질이 제거되어 생리 활성 화합물의 크로마토그래피 정제를 방해하지 않는다는 점을 고려할 때 bacteriocin을 더 쉽게 정제할 수 있었음. 단백질의 제거는 또한 열처리 과정에서 열이 용액 전체에 더 고르게 분포되기 때문에 존재하는 오염 세균의 불활성화에도 도움을 줄 수 있었음(그림 61).

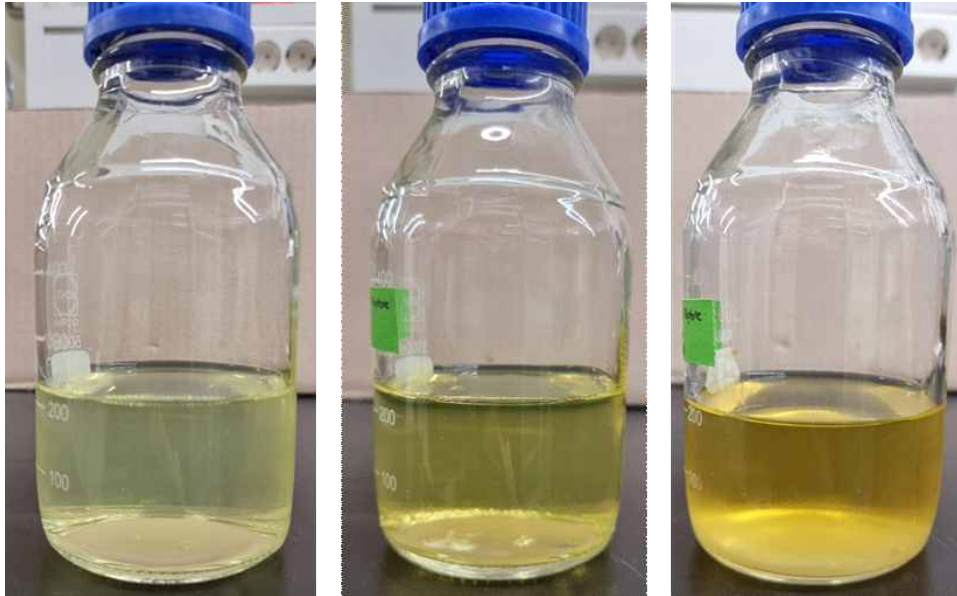


그림 61. Sabo et al.(2019)의 열처리 방법을 이용하여 준비된 유청 배지\*

\*왼쪽에서 오른쪽으로: 10% 유청, 10% 유청 + 1% tryptone, 10% 유청 + 1% soytone.

라. 변형된 유청배지에서 *E. faecalis* M157의 발효 패턴 분석

1) *E. faecalis* M157의 발효패턴은 세균이 우유배지에서 증식하면서 생산하는 젖산의 양에 비례하여 pH 값의 변화가 일어나기 때문에 배양시간에 따른 변화하는 pH값의 측정을 통해 간접적인 세균의 성장을 확인하였음. 일반적으로 25℃에서 배양된 균은 유청배지의 종류에 상관없이 37℃에서 배양된 균에 비하여 더 느리게 정체기에 도달하였음. 이것은 37℃에서 배양하는 균주는 배양 초기(t=0-3시간)에 생균수가 가파르게 증가하고 배양 후 8-10시간만에 정체기 도달하는 균수의 측정을 통해서도 확인되었음. 반면에 25℃에서 배양된 균은 12-15시간 후에 정체기에 도달하였음. 37℃에서 배양한 유청배지의 pH는 배양 3시간 후에 급격히 떨어지는 경향이 있고 15시간 후에 대략 pH 4.5에 도달하였음. 25℃에서 배양된 균은 pH가 감소되는 속도가 느리지만, 배양 24시간 후에는 37℃에서 배양한 것과 비슷한 pH 값에 도달하였음. 25℃에서 배양된 배양액의 pH는 6시간 후에 떨어지기 시작하고 24시간 후에 낮은 정점에 도달하였음(그림 62).

2) *E. faecalis* M157 세균수의 증식은 미네랄이 보충된 배지에서 더 낮게 일어나는 것으로 나타났으며, 이는 두 배양온도에서 공통적으로 확인되었음(그림 63). 그러나 발효패턴의 측면에서 미네랄 보충 배지의 pH는 유청 + soytone 단독의 pH보다 낮았음. 흥미롭게도, 미네랄이 보충된 배지의 초기 pH는 정상보다 약 0.8 높았음. 이는 미네랄의 보충이 유청배지에서 세균의 산생성 능력을 증가시키지만, 생균수의 증가를 촉진하지는 않는다는 것을 시사함.

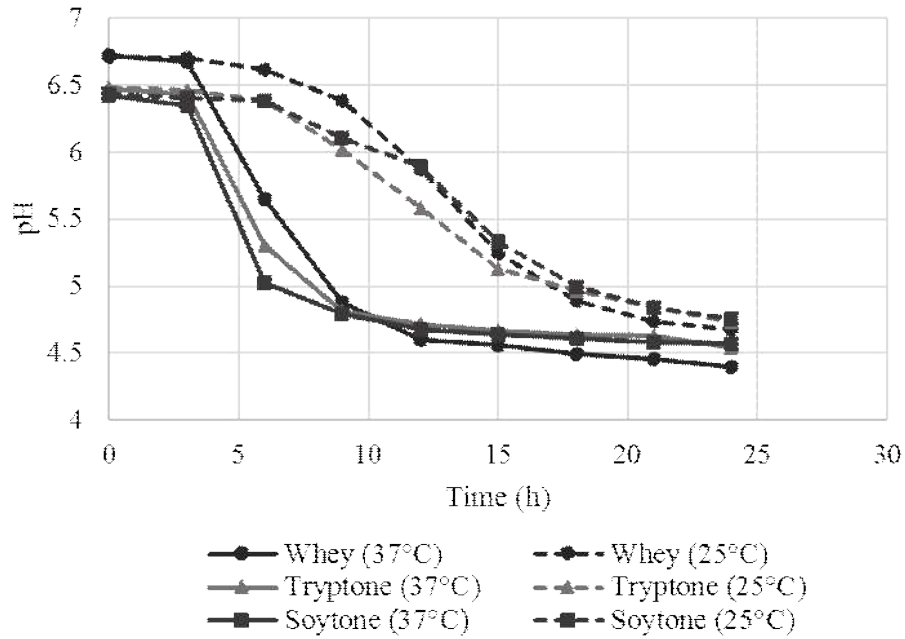


그림 62. 다양한 배양 온도에서 유청 배지에 따른 *E. faecalis* M157의 발효패턴

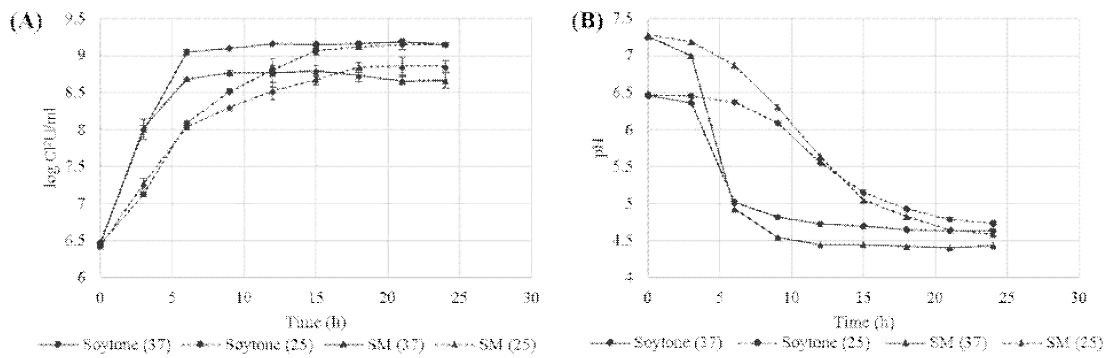


그림 63. Soytone와 미네랄이 첨가된 유청 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장곡선(A)과 발효패턴(B)

마. 유청 농도가 bacteriocin 생산에 미치는 영향

- 1) 유청 농도에 따른 배양된 균주의 생균수와 pH에서 일반적인 경향을 볼 수 있었음. 유청 농도가 증가하면 생균수가 증가하고 pH의 감소폭은 줄어들음. 유청의 함량이 증가할수록 더 높은 biomass가 관찰되었으며, 고형분 함량의 증가에 버퍼능력의 향상에 따라 젖산의 증가에 대한 pH 감소는 완만했을 것으로 예상됨(표 90). 10% 이상의 유청 농도에서 박테리오신의 추가적인 활성 증가는 확인되지 않아서 이후의 실험에서는 10% 유청 배지를 기본으로 이용하였음.

표 90. 유청 농도가 *E. faecalis* M157의 성장, pH 및 bacteriocin 활성에 미치는 영향

유청 농도	CFU/mL	Log CFU/mL	pH	박테리오신 활성 (AU/mL)
5%	1.27E+09	9.104	4.07	0
7.5%	1.68E+09	9.224	4.125	100
10%	2.10E+09	9.322	4.22	200
12.5%	2.20E+09	9.343	4.275	200
15%	2.48E+09	9.395	4.345	200

바. Aeration의 영향

1) 50 mL 튜브에 50 mL의 유청배지로 거의 가득 채운 조건에서의 배양은 실험구 중에서 가장 낮은 생균수를 보였으며, 동일한 용기에 절반 이하인 20 mL 유청배지를 이용한 배양에서는 더 높은 생균수를 확인할 수 있었음(표 91). 그러나 배양 후 pH 값에서 거의 차이가 나지 않았음. 배양액의 교반을 통한 aeration와 낮은 부피의 배지량은 더 높은 bacteriocin 활성을 얻을 수 있었음. 그렇지만, aeration을 통해서 기존에 얻었던 유청 배지의 박테리오신 활성보다 높지는 못했음. 따라서 LAB의 성장과 bacteriocin 생산을 위해서는 용기에 대한 배지의 부피비와 배양 조건 등을 종합적으로 고려할 필요가 있을 것으로 사료됨.

표 91. Aeration이 *E. faecalis* M157의 성장, pH 및 bacteriocin 활성에 미치는 영향

균의 배양 조건	배양 조건	CFU/mL	Log CFU/mL	pH	활성(AU/mL)
50 mL (limited aeration)	25°C, 21 h	2.05E+09	9.31	4.77	100
	25°C, 30 h	2.52E+09	9.40	4.60	100
20 mL (w/o shaking)	25°C, 21 h	2.51E+09	9.40	4.75	200
	25°C, 30 h	3.08E+09	9.49	4.57	200
20 mL (w/ shaking, 120 rpm)	25°C, 21 h	2.33E+09	9.37	4.79	200
	25°C, 30 h	3.44E+09	9.54	4.60	200

사. 균주의 접종량이 bacteriocin 생산에 미치는 영향

1) 접종량의 증가는 대사산물과 새로운 배양균의 성장에 영향을 미칠 수 있는 오래된 배양균의 여러 요인을 도입할 수 있음. 그러나, 결과는 접종 농도를 1%에서 5%로 증가시키는 것이 배양 후 배양균의 생존 세포 수를 증가시키지 않는다는 것을 보여 주었음. 흥미롭게도, 두 실험구의 배양물의 pH는 크게 다르지 않았고 관찰된 bacteriocin 활성도 같았음(AU/mL).

2) 이상의 다양한 실험결과를 통하여 변형된 유청 배지에서 *E. faecalis* M157의 성장과 박테리오신의 생성능력을 확인하였음(표 92). Bacteriocin 생산에 대한 다양한 선행 연구들에서도 유청배지에 실험 균주를 접종하여 특정 온도 조건에서 21-24 시간 배양하면 유청 배지 상층액에서 bacteriocin 활성이 나타나는 것으로 확인되었으며, 이는 유청이 유산균의 배양과 박테리오신 생산을 위한 경제적인 배지로 이용될 수 있다는 가능성을 시사함. 이후의 실험을 위하여 10% 유청 배지(보충제 유무와 관계없이)를 기본으로 하고 37°C와 25°C에서 21-24시간 동안 배양 조건을 설정하였음.

표 92. 접종량이 *E. faecalis* M157의 성장, pH 및 bacteriocin 활성에 미치는 영향

균의 배양 조건	배양 조건	CFU/mL	Log CFU/mL	pH	활성 (AU/mL)
1%	25°C, 21 h	2.09E+09	9.32	4.34	100
	25°C, 30 h	2.09E+09	9.32	4.34	100
5%	25°C, 21 h	1.82E+09	9.26	4.33	100
	25°C, 30 h	1.75E+09	9.24	4.32	100

## 2. 유청의 대규모 발효

### 가. 10% 유청 배지의 발효

- 1) 37°C에서 24시간 배양 후, 억제환을 확인할 수 있었음(표 93). *L. monocytogenes* ATCC19115는 모든 발효 유청 샘플에서 억제되었으며, *L. lactis* CAU2013(37°C) 및 *E. faecalis* M157(25°C)에 의해 발효된 유청에서 더 높은 억제현상이 확인되었음(표 94). Bacteriocinogenic 균주 사이의 교차 억제도 관찰되었는데, *E. faecalis* M157은 *L. lactis* CAU2013에 의해 발효된 유청에 의해 억제되었고, 그 반대도 마찬가지였음. 반면 *S. aureus* RN6390은 생리활성 유청에서 성장 억제를 나타내지 않았음.

표 93. 발효 후 유청 배지의 미생물 load 및 pH

접종 균주		배양 조건	pH	CFU/mL	Log CFU/mL
A	<i>L. lactis</i> CAU2013	37°C, 24 h	4.38	8.23E+08	8.916
B	<i>E. faecalis</i> M157	37°C, 24 h	4.43	1.19E+09	9.077
C	<i>E. faecalis</i> M157	37°C, 24 h	4.42	1.14E+09	9.056
D	<i>E. faecalis</i> M157	25°C, 48 h	4.29	1.11E+09	9.053
E	Uninoculated	37°C, 24 h	4.71	3.15E+07	7.498

표 94. 발효 후 유청 배지의 bacteriocin 활성

Bacteriocin 샘플		Bacteriocin 활성 (AU/mL)			
		<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	<i>S. aureus</i> RN6390	<i>E. faecalis</i> M157	<i>L. lactis</i> CAU2013
A	<i>L. lactis</i> CAU2013	1600	-	100	-
B,C	<i>E. faecalis</i> M157 (37°C)	400	-	-	800
D	<i>E. faecalis</i> M157 (25°C)	1600	-	-	800

### 나. 분무 건조한 발효 유청의 생균수 및 bacteriocin 활성

- 1) M157 발효 유청은 분무 건조 전 약 9.0 Log CFU/mL을 나타내었음. 분무 건조

후 M157 샘플에서 생균수는 대략 7.8 Log CFU/mL로 감소하였음(표 95). CAU2013 + M157 샘플의 경우 생존 세포 수는 약 6.7 Log CFU/mL로 감소하였음. 발효 유청의 생균수 감소는 분무 건조 과정 중 조건으로 인한 것으로 예상됨. Bile Esculin 배지는 혼합 샘플에서 *L. lactis* CAU2013를 분별계수하는데 사용되었음. M157 : CAU2013의 비율을 계산한 결과는 3993 : 1157 이었음. 이는 분무 건조 후 혼합 샘플에 약  $3.993 \times 10^6$  CFU/mL의 *E. faecalis* M157과  $1.157 \times 10^6$  CFU/mL의 *L. lactis* CAU2013이 있음을 의미함.

표 95. 환원유 형태로 만든 분무 건조 발효 유청의 생균수 측정

샘플	반복수	배지	CFU/mL	Log CFU/mL
M157	1	MRS	6.75E+07	7.829
		Bile Esculin	1.02E+07	7.006
	2	MRS	5.70E+07	7.756
		Bile Esculin	1.10E+07	7.039
CAU2013+M157	1	MRS	5.50E+06	6.740
		Bile Esculin	7.25E+05	5.860
	2	MRS	4.80E+06	6.681
		Bile Esculin	6.35E+05	5.803

2) 환원유의 형태로 만든 분무 건조 발효 유청의 억제 활성은 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대해 평가되었음. 이에 대한 결과는 유청 배지에서 bacteriocin 활성이 분무 건조 과정 후에도 유지되는 것으로 나타났음(표 96). M157 발효 유청은 약 400-800 AU/mL를 나타내는 반면 혼합 샘플은 800 AU/mL를 나타내었음. Spot-on-lawn 분석에서 2-4회석 샘플에서 산재된 억제현상이 관찰됐으며, 이는 분무 건조 유청의 물리 화학적 특성 변화로 인해 발생하는 것으로 추측됨.

표 96. 환원유 형태로 만든 분무 건조 발효 유청의 bacteriocin 활성

Crude Bacteriocin	반복수	억제환 (cm)						AU/mL
		2 <sup>0</sup>	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	
M157	1	0.65	0.60	0.50	s	s	-	400
	2	0.70	0.65	0.05	0.05	s	-	800
CAU2013 + M157	1	0.70	0.60	0.50	0.40	s	-	800
	2	0.70	0.60	0.06	0.05	s	-	800

S는 single spot 대신 산재된 억제 영역을 의미함

#### 다. 단백질 분해 활성 측정

1) 1% 접종을 한 배양의 경우 열처리 및 비열처리 설정 모두에서 보관 전후의 bacteriocin 활성에 차이가 관찰되지 않았음. 그러나 열처리 과정 없이 5% 접종한 배양물의 경우 24시간 배양 후 활성이 손실되는 반면 열처리를 한 경우 활성이 절반으로 감소하였음(표 97). 이 결과를 통해 저장 중 bacteriocin 활성이 감소했음을 시사하며, 이는 아마도 protease 활성에 의한 것으로 추측됨. 따라서 발효유청에서

박테리오신의 활성의 저장안정성 향상을 위한 열처리 조건으로는 80°C에서 10분이 제안되었음.

표 97. 열처리가 *E. faecalis* M157의 bacteriocin 활성 안정성에 미치는 영향

접종 농도	열 처리	보관 조건 (h)	초기 활성	열처리 후 활성
1%	X	25°C, 24 h	100	100
		25°C, 48 h	100	100
	O	25°C, 24 h	100	100
		25°C, 48 h	100	100
5%	X	25°C, 24 h	100	-
		25°C, 48 h	100	-
	O	25°C, 24 h	100	50
		25°C, 48 h	100	50

라. 12.5% 유청 배지의 발효

- 1) 발효된 유청의 이론적인 활성은 *L. monocytogenes* ATCC19115에 대한 bacteriocin 분석 후 관찰된 활성(AU/mL)과 유청 배지의 총 부피를 곱하여 계산하였음. Bioactive 샘플의 경우 약 200 mL의 화학적으로 합성된 bacteriocin(336,000 AU)이 보충되었음. 발효 유청의 총 활성(800,000 AU/mL)을 기준으로 예상되는 생리 활성 샘플의 이론적인 활성은 138.54 AU/mL로 M157 샘플보다 38.54% 더 높음. Bioactive 샘플의 실제 활성은 M157 샘플보다 2.05배 높은 200 AU/mL로 결정하였음.
- 2) 잔류 bacteriocin 활성 또한 동결 건조 및 분무 건조된 샘플에서 측정하였음(표 98). 동결 건조된 샘플은 2.5 mL PBS에 재현탁 한 후 감소 된 활성을 나타내었음. 그러나 분무 건조된 샘플은 동일한 수준의 bacteriocin 활성을 보여 분무 건조 조건에서 bacteriocin 활성의 감소 없이 생리 활성 유청을 생산할 수 있음을 알 수 있었음. 또한 분무 건조는 동결 건조에 비해 더 많은 양의 시료를 처리할 수 있어 생리 활성 유청 분말을 더 빠르고 저렴하게 생산할 수 있음.

표 98. 발효된 유청의 bacteriocin 활성

샘플		부피 (mL)	CFU/mL	AU/mL	총 활성	Solids(g)	AU/g
유청	M157	8000	2.17E+09	100	800,000	-	-
	Heat-Treated	8000	0	100	800,000	-	-
	Bioactive	8200	0	200	1,640,000	-	-
동결 건조	M157	2.5	-	100	250	1.099	227.5
	Heat-treated	2.5	-	200	500	1.085	460.8
	Bioactive	2.5	-	400	1000	1.057	946.1
분무 건조	M157	10	-	100	1000	1.0	1000
	Bioactive	10	-	200*	2000	1.0	2000



마. 분무 건조 유청의 저장 안정성

1) 4°C에서 보관된 분무 건조된 샘플의 bacteriocin 활성은 M157 과 Bioactive 시료에 대해 각각 보관 2 주차, 3 주차 까지 변화가 없었음. 일반적으로 4°C에서 보관된 샘플은 25°C에서 보관된 샘플보다 더 긴 기간(>1 주) 동안 활성을 유지하였음. 또한, 저장온도에 상관없이 배양 후 열처리 과정이 없이 제조한 M157 시료는 열처리를 하고 분무건조한 생리 활성 시료보다 적어도 1 주일 먼저 활성을 잃기 시작하였음. 모든 시료는 보관 온도에 상관없이 보관 5 주차에 활성을 잃었음. Bacteriocin 및 기타 생리 활성 단백질은 일반적으로 자연 분해를 방지하기 위해 -20°C에서 보관하는 것이 일반적임. 이를 통해 분무 건조 유청이 4°C에서 5 주간 보관된 후 활성을 잃은 이유를 설명할 수 있음(그림 64).

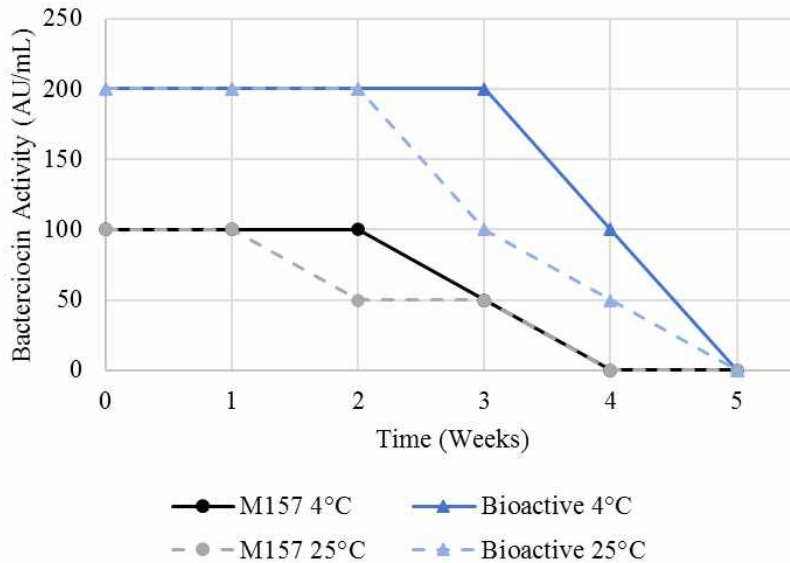


그림 64. 저장온도에 따른 분무 건조 발효 유청 중 항균활성의 저장 안정성

<제3협동연구기관 숙명여자대학교>

[1차년도] 동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증

1. 체중 증가율

가. 바이오컨버전 산물 투여에 따른 마우스의 체중 변화를 측정하기 위해 비만 유도 기간 4 주에 이어 경구투여 기간 10 주, 총 14 주의 연구기간 동안 매주 1회 일정한 시간에 체중을 측정하여 체중 증가율을 계산하였음.

나. Whey가 투여 물질에 포함되어있는 군 중 일반식이 섭취군(non-treated, NF-KI13W, NF-KI35W)과 고지방식이 섭취군(control, HF-whey, HF-KI13W, HF-KI35W, HF-KI13B, HF-KI35B)의 체중 증가율을 비교한 결과, 고지방식을 섭취한 군의 체중 증가율이 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 65). 고지방식이 섭취 후 whey를 포함하여 PBS를 투여한 군(HF-whey)의 경우 control군과 비교하였을 때 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 65).

다. Control 대비 고지방식이 섭취 후 KI13 균주를 사균화하고 whey를 포함하여 투여한 군(HF-KI13W), 고지방식이 섭취 후 KI35 균주를 사균화하고 whey를 포함 후 투여한 군(HF-KI35W)의 체중 증가율이 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 65).

라. Control군 대비 고지방식이 섭취 후 whey를 이용하여 KI13 균주 발효로 얻은 바이오

컨버전 산물을 투여한 군(HF-KI13B), 고지방식이 섭취 후 whey를 이용하여 KI35 균주를 발효로 얻은 바이오컨버전 산물을 투여한 군(HF-KI35B)의 체중 증가율은 유의적으로 낮게 관찰되었으며( $p < 0.05$ )(그림 65), 이 결과 KI13 균주와 KI35 균주를 발효시켜 얻은 바이오컨버전 산물은 비만 억제에 효과가 있는 것이 관찰되었음.

마. HF-KI13W군과 HF-KI13B군의 체중 증가율을 비교한 결과, 바이오컨버전 산물을 투여한 군의 체중 증가율이 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 65).

바. HF-KI35W군과 HF-KI35B군의 체중 증가율을 비교한 결과, 바이오컨버전 산물을 투여한 군의 체중 증가율에 유의적인 차이는 없지만 다소 낮게 관찰되었음(그림 65). 따라서, KI13 균주, KI35 균주를 사균화하여 투여하는 것보다 이들의 바이오컨버전 산물을 투여하는 것이 비만 억제에 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

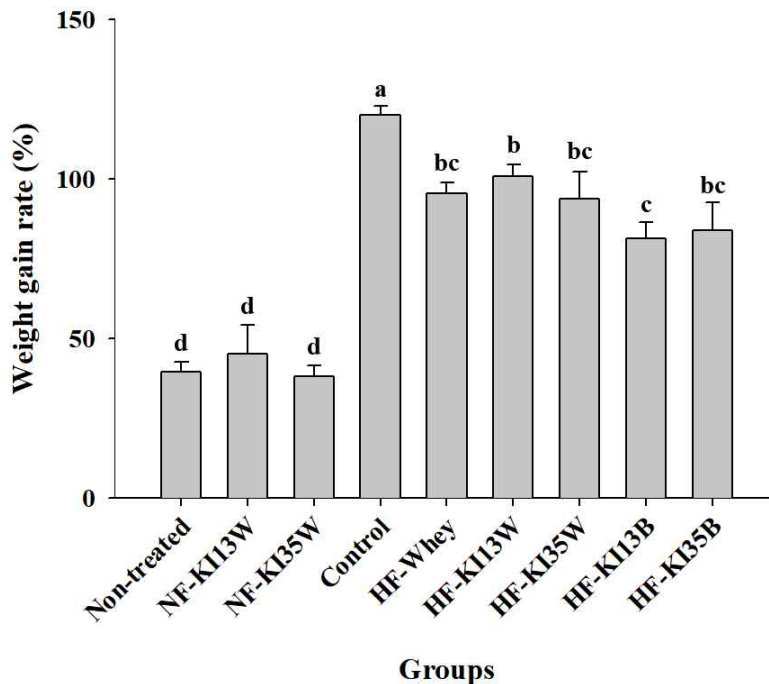


그림 65. Whey 발효 산물 투여군 체중 증가율

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-KI13W : 일반식이 + whey + KI13사균 투여, NF-KI35W : 일반식이 + whey + KI35사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-whey : 고지방식이 + whey투여, HF-KI13W : 고지방식이 + whey + KI13사균 투여, HF-KI35W : 고지방식이 + whey + KI35사균 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

사. Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 군 중 일반식이 섭취군(non-treated, NF-M37S, NF-KI134S)과 고지방식이 섭취군(control, HF-skim milk, HF-M37S, HF-KI134S, HF-M37B, HF-KI134B)의 체중 증가율을 비교한 결과, 고지방식이를 섭취한 군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 66). 고지방식이 섭취 후 skim milk를 포함하여 PBS를 투여한 군(HF-skim milk)의 경우 control군과 비교하였을 때 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 66).

아. Control군 대비 고지방식이 섭취 후 M37 균주를 사균화하고 skim milk를 포함하여 투여한 군(HF-M37S), 고지방식이 섭취 후 KI134 균주를 사균화하고 skim milk를 포함 후 투여한 군(HF-KI134S)의 체중 증가율이 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 66). 따라서 M37 균주와 KI134 균주는 비만 억제에 효과가 있는 것으로 관찰

되었음.

자. Control군 대비 고지방식이 섭취 후 skim milk를 이용하여 M37 균주 발효로 얻은 바이오컨버전 산물을 투여한 군(HF-M37B)의 체중증가율은 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), 고지방식이 섭취 후 skim milk를 이용하여 KI134 균주 발효로 얻은 바이오컨버전 산물을 투여한 군(HF-KI134B)의 체중 증가율은 유의적이지는 않지만 낮게 관찰되었음(그림 66). 따라서, M37 균주를 발효시켜 얻은 바이오컨버전 산물은 비만 억제에 효과가 있고, KI134 균주를 발효시켜 얻은 바이오컨버전 산물은 비만 억제에 효과가 다소 적은 것으로 관찰되었음.

차. HF-M37S군과 HF-M37B군, HF-KI134S군과 HF-KI134B군의 체중 증가율을 각각 비교한 결과, 체중이 유의적으로 낮게 관찰되지 않았으며 특히 KI134 균주 투여군에서는 바이오컨버전 산물을 투여하였을 때 높게 관찰되었음(그림 66). 따라서 skim milk를 이용하여 발효시킨 바이오컨버전 산물은 사균화하여 투여한 것에 비하여 비만 억제 효과가 다소 적은 것으로 관찰되었음.

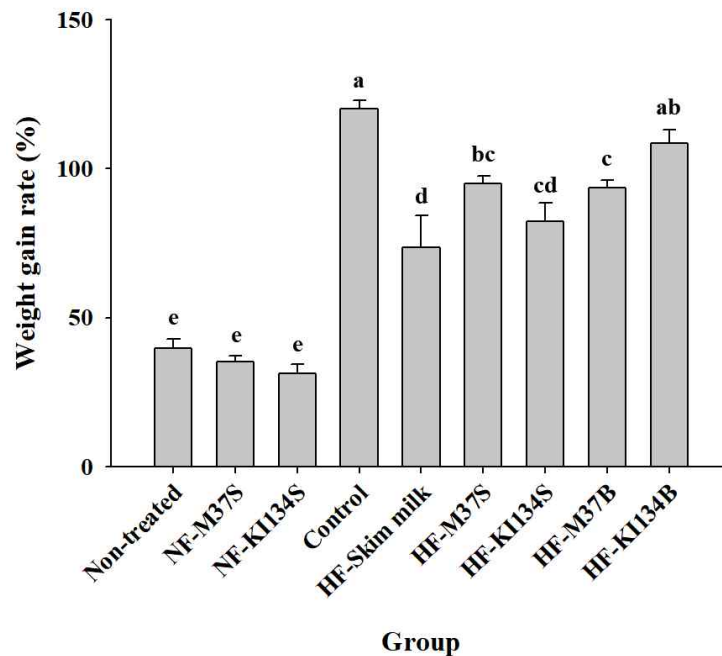


그림 66. Skim milk 발효 산물 투여군 체중 증가율

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-M37S : 일반식이 + skim milk + M37사균 투여, NF-KI134S : 일반식이 + skim milk + KI134사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-skim milk : 고지방식이 + skim milk 투여, HF-M37S : 고지방식이 + skim milk + M37사균 투여, HF-KI134S : 고지방식이 + skim milk + KI134사균 투여, HF-M37B : 고지방식이 + M37바이오컨버전산물 투여, HF-KI134B : 고지방식이 + KI134바이오컨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## 2. 장기의 물리적인 변화 측정

가. 바이오컨버전 산물 투여에 따른 마우스의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직후 간, 부고환 지방, 측복부 지방 무게를 측정하고 간과 부고환 지방은 사진 촬영을 진행하였음.

나. Whey가 투여 물질에 포함되어있는 군의 간 무게 확인 결과, control군과 HF-whey 군, HF-KI13W군, HF-KI35W군의 간 무게를 비교하였을 때 유의적으로 차이가 없는

것을 확인하였음(그림 67). 그러나 HF-KI13B군, HF-KI35B군의 간 무게를 control군의 간 무게와 비교하였을 때 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), 일반식이 섭취한 군(non-treated, NF-KI13W, NF-KI35W)의 간 무게와 유의적으로 차이가 없는 것을 확인하였음(그림 67).

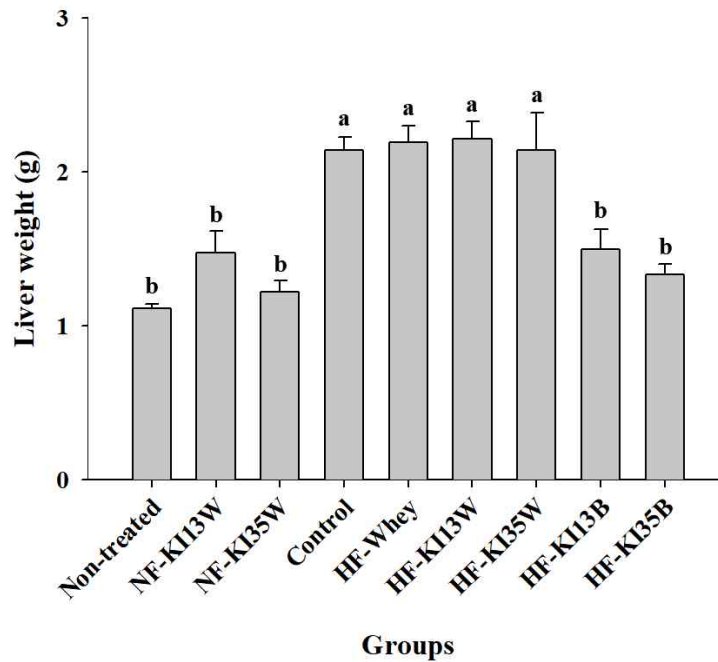


그림 67. Whey 발효 산물 투여군의 간 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-KI13W : 일반식이 + whey + KI13사균 투여, NF-KI35W : 일반식이 + whey + KI35사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-whey : 고지방식이 + whey투여, HF-KI13W : 고지방식이 + whey + KI13사균 투여, HF-KI35W : 고지방식이 + whey + KI35사균 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

다. Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 군의 간 무게 확인 결과, control군과 HF-skim milk군, HF-M37S군, HF-KI134S군의 간 무게를 비교하였을 때 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 68). 그러나 skim milk를 이용하여 바이오컨버전 산물을 투여한 군의 간 무게가 M37, KI134 균주만 투여한 군의 간 무게보다 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 68).

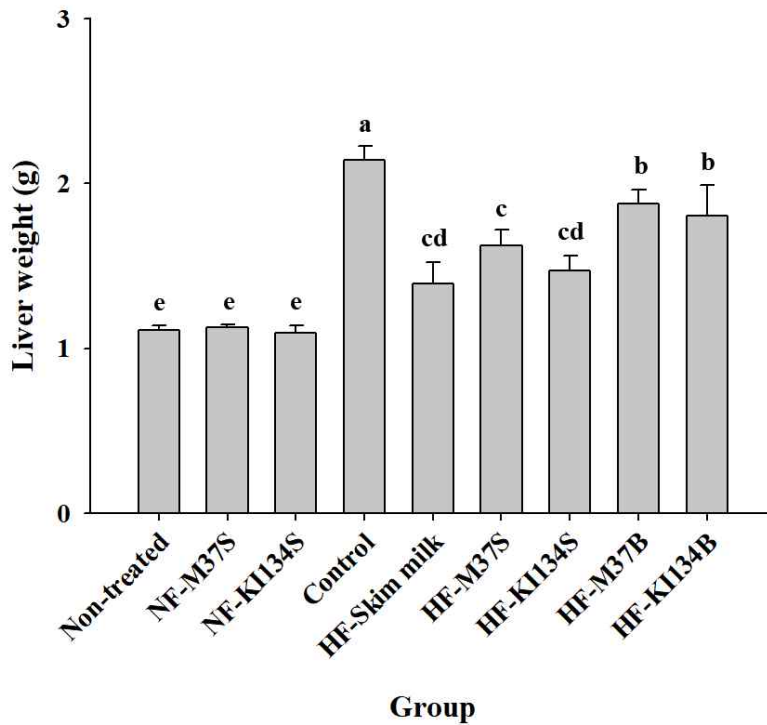


그림 68. Skim milk 발효 산물 투여군의 간 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-M37S : 일반식이 + skim milk + M37사균 투여, NF-KI134S : 일반식이 + skim milk + KI134사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-skim milk : 고지방식이 + skim milk 투여, HF-M37S : 고지방식이 + skim milk + M37사균 투여, HF-KI134S : 고지방식이 + skim milk + KI134사균 투여, HF-M37B : 고지방식이 + M37바이오킨버전산물 투여, HF-KI134B : 고지방식이 + KI134바이오킨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

라. Whey가 투여 물질에 포함되어있는 균의 부고환 지방 무게 확인 결과, non-treated군 대비 control군, HF-KI135W군, HF-KI13B군, HF-KI135B군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ) (그림 69). HF-KI13W군, HF-KI135W군, HF-KI13B군, HF-KI135B군의 부고환 지방의 무게를 control군 부고환 지방 무게와 비교하였을 때 유의적이지는 않지만 약간 낮게 관찰되었음(그림 69).

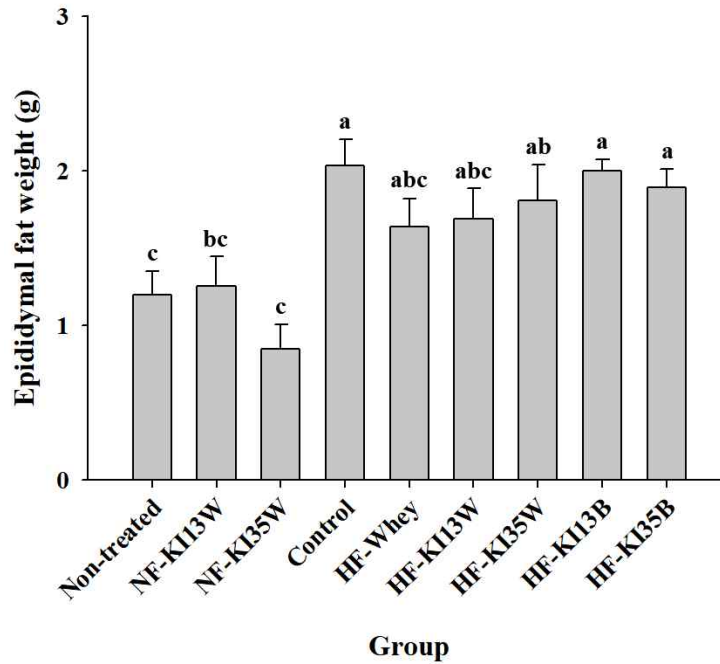


그림 69. Whey 발효 산물 투여군의 부고환 지방 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-KI13W : 일반식이 + whey + KI13사균 투여, NF-KI35W : 일반식이 + whey + KI35사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-whey : 고지방식이 + whey투여, HF-KI13W : 고지방식이 + whey + KI13사균 투여, HF-KI35W : 고지방식이 + whey + KI35사균 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오키티콘버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오키티콘버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

마. Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 균의 부고환 지방 무게 확인 결과, control군, HF-M37S군, HF-KI134S군, HF-M37B군, HF-KI134B군에서 모두 일반식이 섭취군 (non-treated, NF-M37S, NF-KI134S)에 비해 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). HF-M37B군, HF-KI134B군의 부고환 지방의 무게를 control군의 부고환 지방 무게와 비교하였을 때 유의적이지는 않지만 낮게 관찰되었음(그림 70).

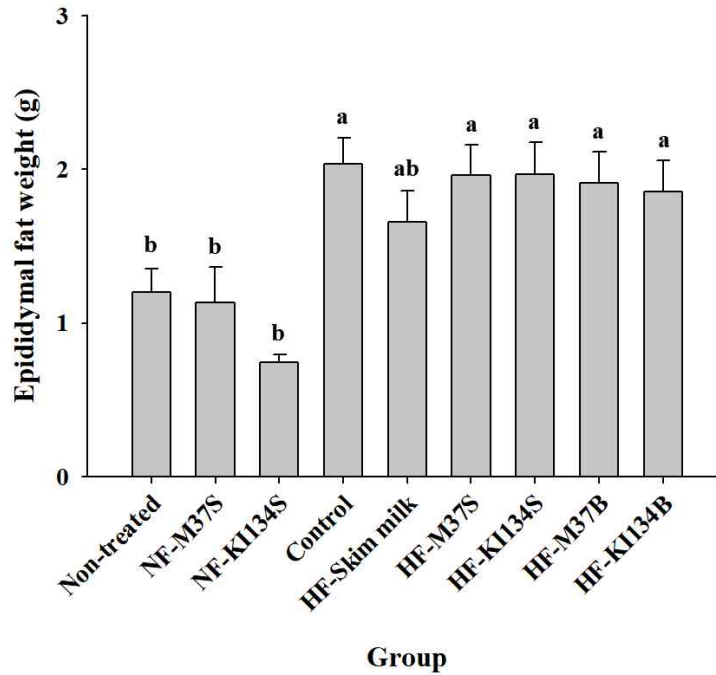


그림 70. Skim milk 발효 산물 투여군 부고환 지방 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-M37S : 일반식이 + skim milk + M37사균 투여, NF-KI134S : 일반식이 + skim milk + KI134사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-skim milk : 고지방식이 + skim milk 투여, HF-M37S : 고지방식이 + skim milk + M37사균 투여, HF-KI134S : 고지방식이 + skim milk + KI134사균 투여, HF-M37B : 고지방식이 + M37바이오킨버전산물 투여, HF-KI134B : 고지방식이 + KI134바이오킨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

바. Whey가 투여 물질에 포함되어있는 군의 측복부 지방 무게 확인 결과, non-treated군 대비 고지방식이 섭취군(control, HF-Whey, HF-KI13W, HF-KI35W, HF-KI13B, HF-KI35B)에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 71). HF-KI13B군, HF-KI35B군의 측복부 지방의 무게를 control군의 측복부 지방 무게와 비교하였을 때 유의적이지는 않지만 다소 낮게 관찰되었음(그림 71).

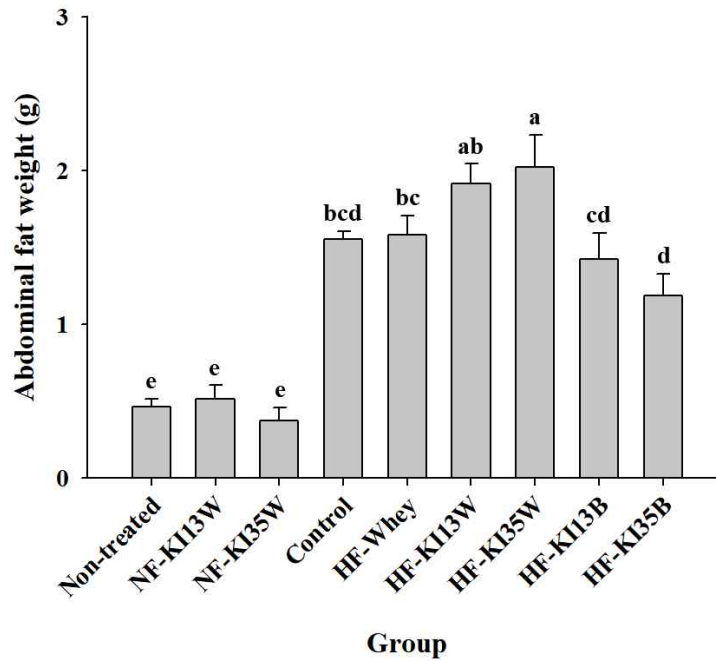


그림 71. Whey 발효 산물 투여군의 측복부 지방 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-KI13W : 일반식이 + whey + KI13사균 투여, NF-KI35W : 일반식이 + whey + KI35사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-whey : 고지방식이 + whey투여, HF-KI13W : 고지방식이 + whey + KI13사균 투여, HF-KI35W : 고지방식이 + whey + KI35사균 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오키티버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오키티버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

사. Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 군의 측복부 지방 무게 확인 결과, non-treated군 대비 고지방식이 섭취군(control, HF-Skim milk, HF-M37S, HF-KI134S, HF-M37B, HF-KI134B)에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 72). HF-M37S군, HF-KI134S군의 측복부 지방의 무게를 control군과 비교하였을 때 유의적이지는 않지만 다소 낮게 관찰되었음(그림 72).



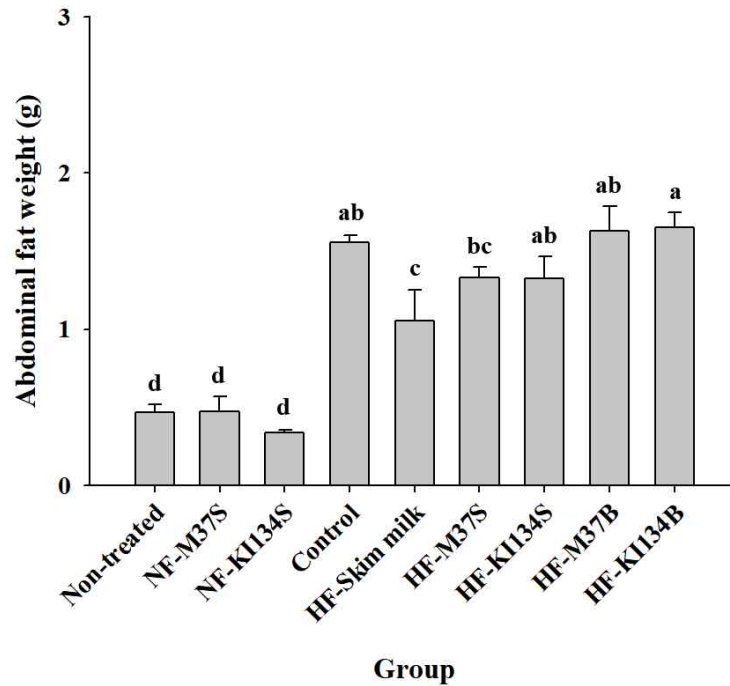




그림 72. Skim milk 발효 산물 투여군 측복부 지방 무게

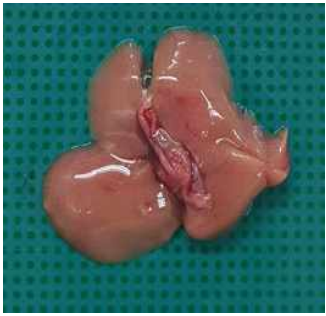





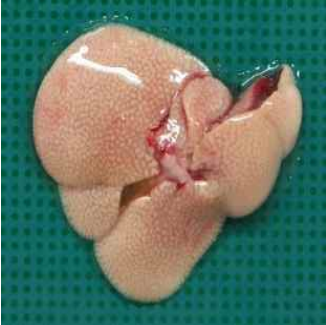

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-M37S : 일반식이 + skim milk + M37사균 투여, NF-KI134S : 일반식이 + skim milk + KI134사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-skim milk : 고지방식이 + skim milk 투여, HF-M37S : 고지방식이 + skim milk + M37사균 투여, HF-KI134S : 고지방식이 + skim milk + KI134사균 투여, HF-M37B : 고지방식이 + M37바이오컨버전산물 투여, HF-KI134B : 고지방식이 + KI134바이오컨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

아. 비장, 신장의 무게는 모든 군 간에서 차이가 없었음(Data not shown).

자. 일반식이 섭취군(non-treated, NF-KI13W, NF-KI35W)과 고지방식이 섭취군(control, HF-KI13W, HF-KI35W, HF-KI13B, HF-KI35B)의 간과 부고환 지방을 육안으로 확인한 결과, 바이오컨버전 산물을 투여한 군(HF-KI13B, HF-KI35B)의 간에서 두드러지는 차이가 관찰되었음. Control군, HF-KI13W군, HF-KI35W군의 간은 옅은 황색을 띠고 각 엽의 크기가 크며 지방이 관찰된 반면, HF-KI13B군, HF-KI35B군은 고지방식이를 실시하였음에도 불구하고 붉은색을 띠고 엽의 크기가 작게 관찰되었음(그림 73). 부고환 지방의 경우, 일반식이 섭취군보다 고지방식이 섭취군에서 크게 관찰되었음.

군	장기 및 조직	
	간	부고환 지방
Non-treated		

NF-KI13W		
NF-KI35W		
Control		
HF-Whey	-	-
HF-KI13W		

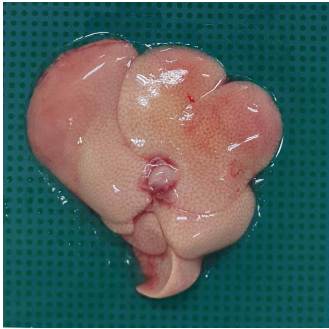

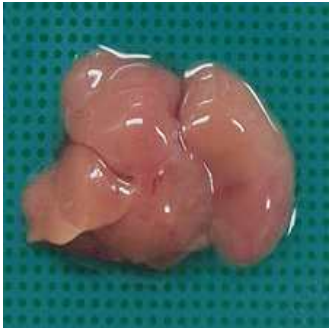

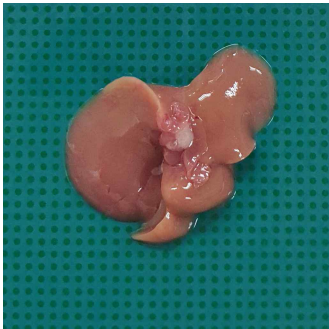
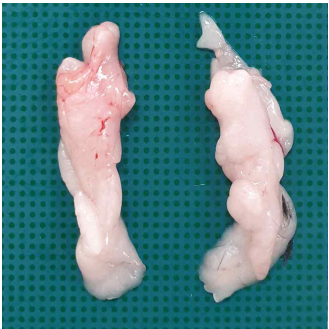
HF-KI35W		
HF-KI13B		
HF-KI35B		



그림 73. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스



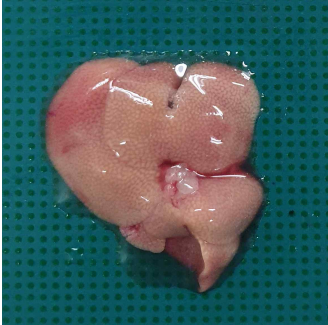

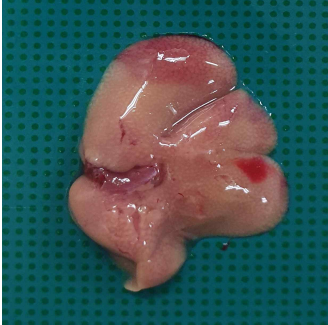
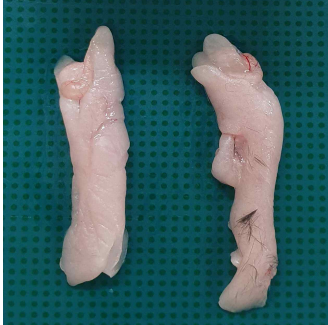
**장기 및 조직 사진(Whey가 투여 물질에 포함되어있는 군)**

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-KI13W : 일반식이 + whey + KI13사균 투여, NF-KI35W : 일반식이 + whey + KI35사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-whey : 고지방식이 + whey투여, HF-KI13W : 고지방식이 + whey + KI13사균 투여, HF-KI35W : 고지방식이 + whey + KI35사균 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

\*- : Control군과 유사하였음

차. 간의 육안관찰 결과, non-treated군 대비 control군에서 옅은 황색을 띠며, 간의 엷이 크고, 지방이 관찰되었음. Control군 대비 HF-M37S군, HF-KI134S군, HF-M37B군, HF-KI134B군의 간이 붉은색을 띠는 것으로 관찰되었음. 부고환 지방의 육안관찰 결과, 모든 군에서 비슷하게 나타났음(그림 74).

군	장기 및 조직	
	간	부고환 지방
Non-treated		

NF-M37S	-*	-
NF-KI134S	-	-
Control		
HF-Skim milk		
HF-M37S		



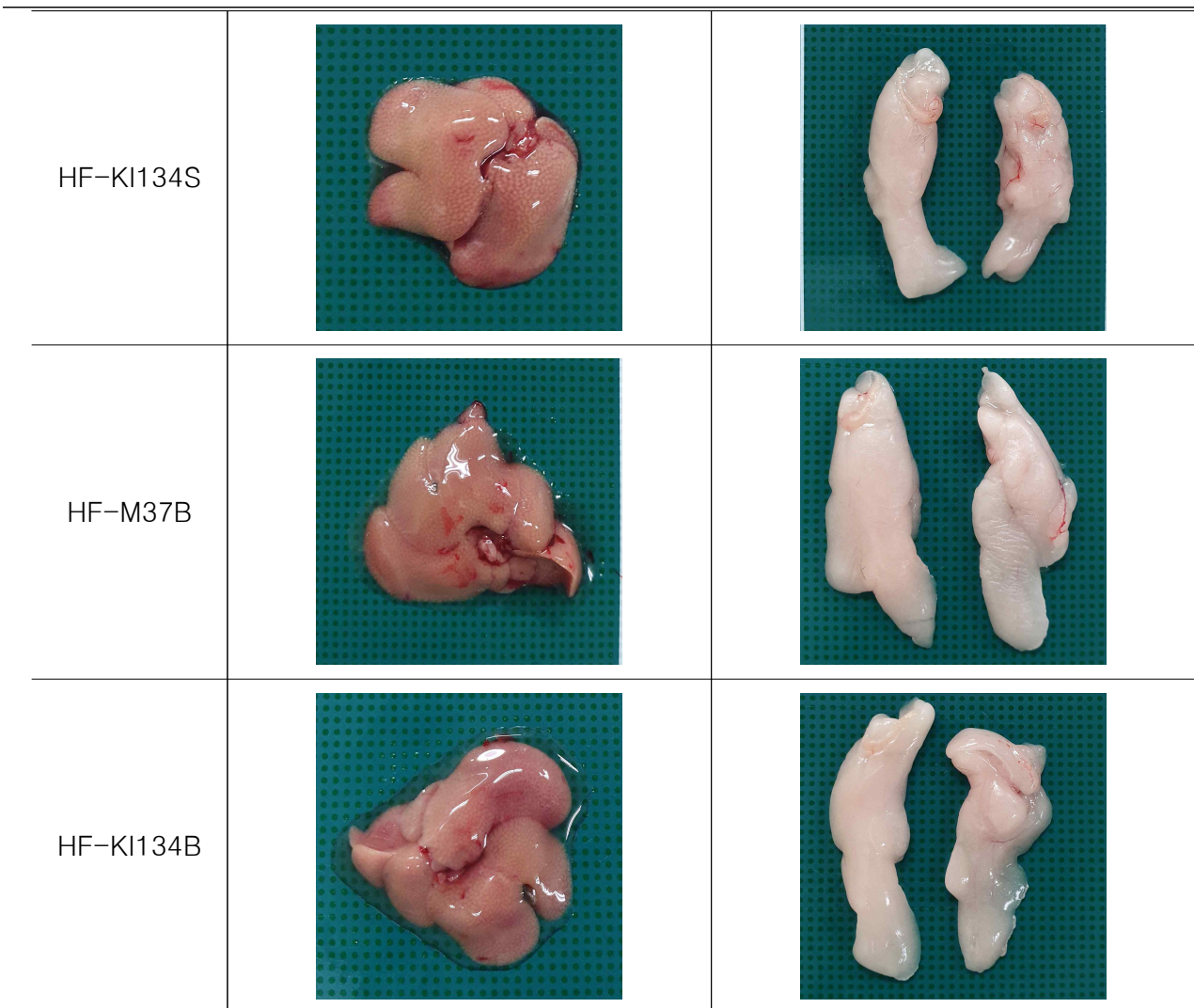


그림 74. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스

장기 및 조직 사진(Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 군)

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-M37S : 일반식이 + skim milk + M37사균 투여, NF-KI134S : 일반식이 + skim milk + KI134사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-skim milk : 고지방식이 + skim milk 투여, HF-M37S : 고지방식이 + skim milk + M37사균 투여, HF-KI134S : 고지방식이 + skim milk + KI134사균 투여, HF-M37B : 고지방식이 + M37바이오컨버전산물 투여, HF-KI134B : 고지방식이 + KI134바이오컨버전산물 투여

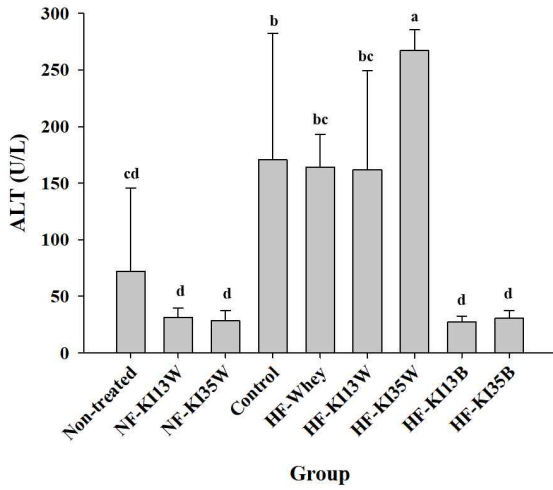
\*- : Non-treated군과 유사하였음

### 3. 혈액 분석

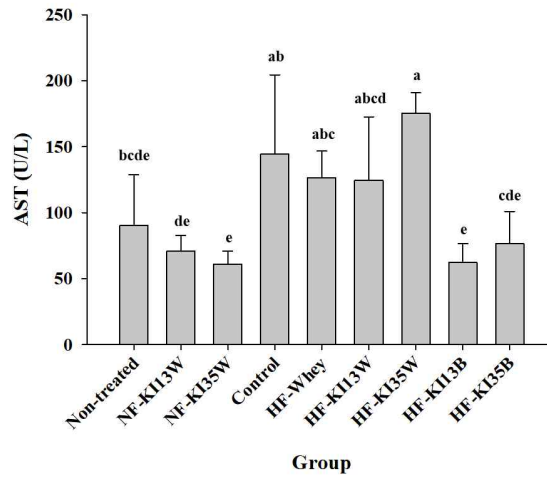
가. 바이오컨버전 산물 투여에 따른 비만 억제 기능성 검증을 위해 경구투여 마우스의 혈액 분석을 실시하였음. Alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST), 총 콜레스테롤(T-Chol), 중성지방(TG), 혈당(GLU), HDL-콜레스테롤(HDL), LDL-콜레스테롤(LDL)농도를 확인하였음.

나. Whey가 투여 물질에 포함되어있는 군의 혈액 분석 결과, HF-KI13B군, HF-KI35B군에서 ALT, AST, T-Chol, TG, LDL 수치가 control군과 대비하여 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 75).

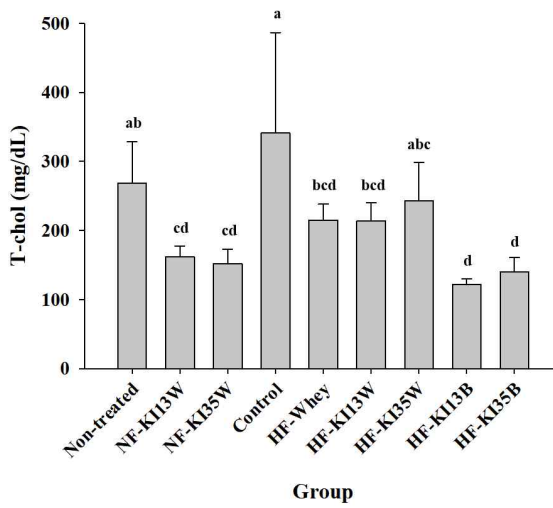
(A) ALT



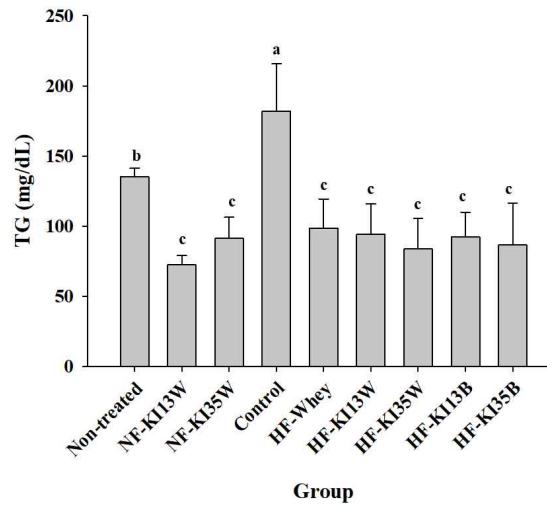
(B) AST



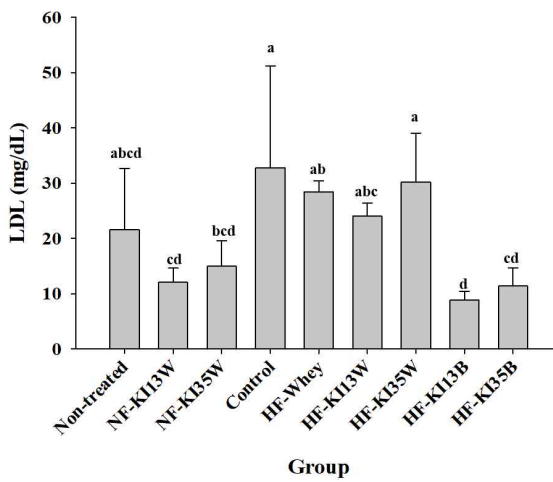
(C) T-cho



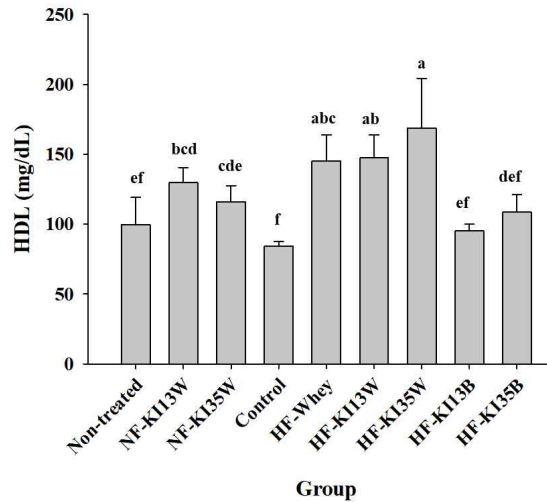
(D) TG



(E) LDL



(F) HDL



(G) GLU

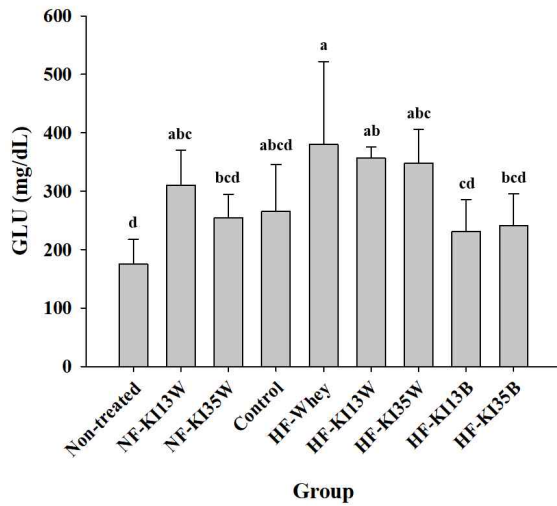


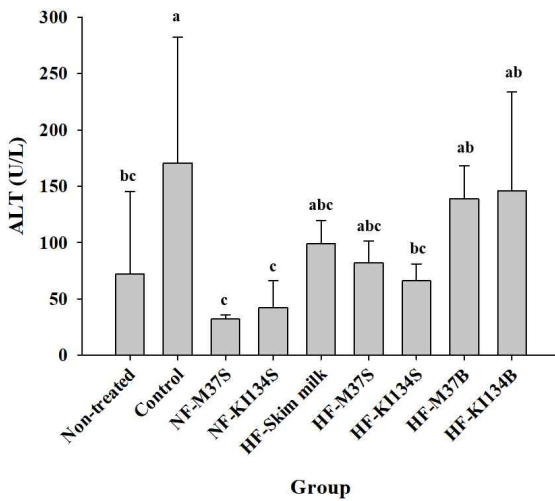
그림 75. 혈액 분석 결과(Whey가 투여 물질에 포함되어있는 군)

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-KI13W : 일반식이 + whey + KI13사균 투여, NF-KI35W : 일반식이 + whey + KI35사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-whey : 고지방식이 + whey투여, HF-KI13W : 고지방식이 + whey + KI13사균 투여, HF-KI35W : 고지방식이 + whey + KI35사균 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

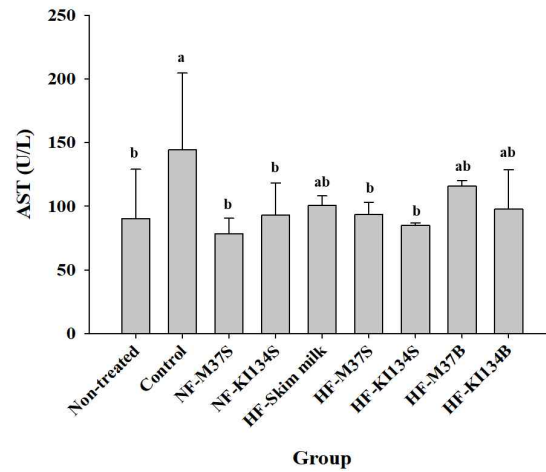
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

다. Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 군의 혈액 분석 결과, control군 대비 바이오 컨버전 산물 투여군(HF-M37B, HF-KI134B)에서 T-chol, TG는 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), HDL은 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 76).

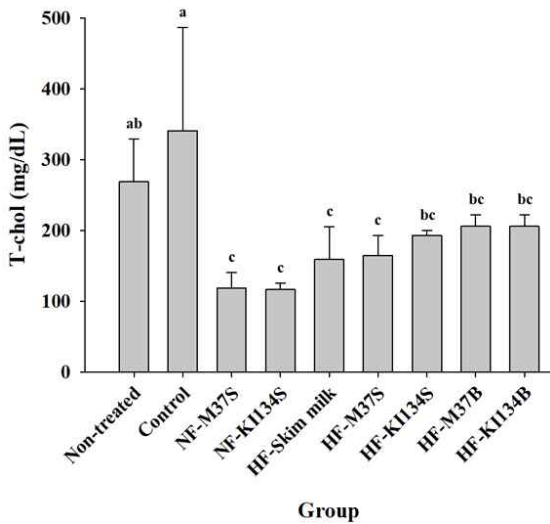
(A) ALT



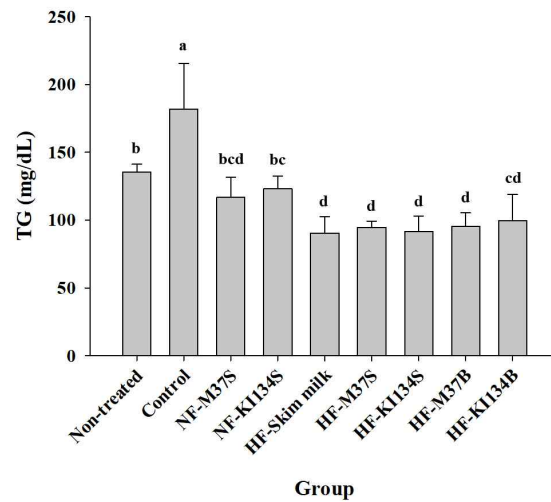
(B) AST



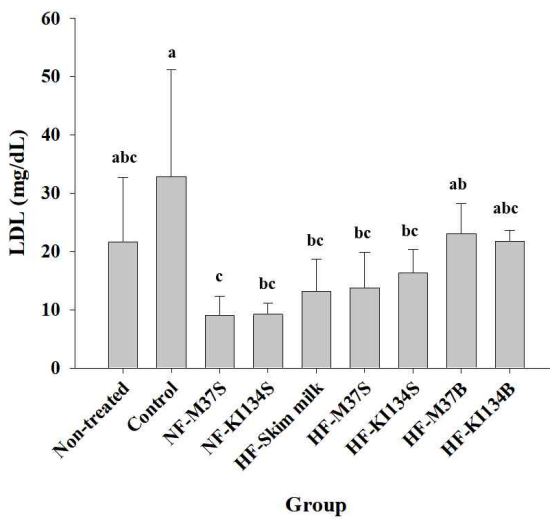
(C) T-chol



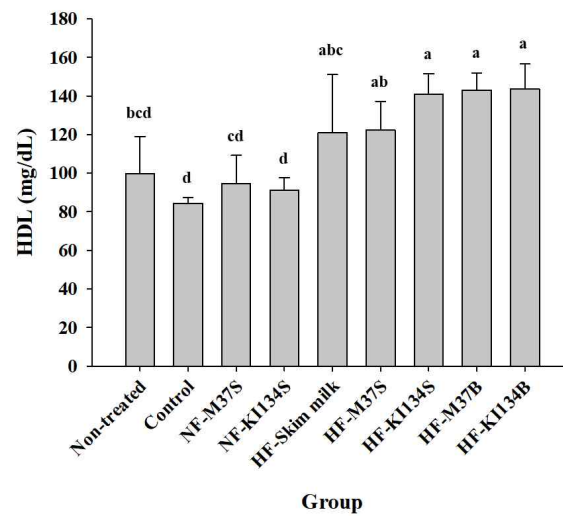
(D) TG



(E) LDL



(F) HDL



(G) GLU

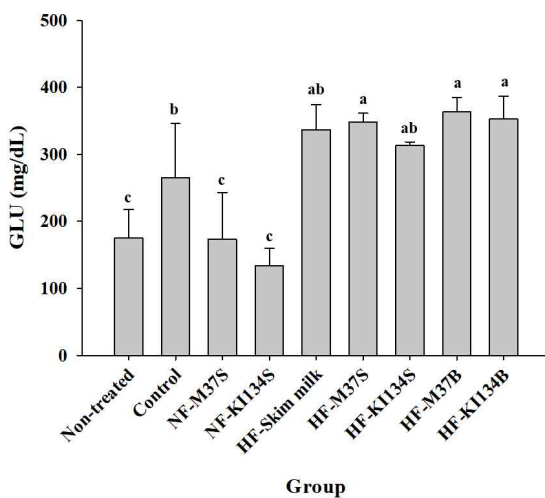


그림 76. 혈액 분석 결과(Skim milk가 투여 물질에 포함되어있는 군)

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, NF-M37S : 일반식이 + skim milk + M37사균 투여, NF-KI134S : 일반식이 + skim milk + KI134사균 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-skim milk : 고지방식이 + skim milk 투여, HF-M37S : 고지방식이 + skim milk + M37사균 투여, HF-KI134S : 고지방식이 + skim



milk + KI134사균 투여, HF-M37B : 고지방식이 + M37바이오키퍼전산물 투여, HF-KI134B : 고지방식이 + KI134바이오키퍼전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

#### 4. 비만 및 염증 지표 분석

가. Whey를 발효시킨 산물 투여군, skim milk로 발효시킨 산물 투여군의 마우스 체중 및 장기, 조직 무게를 측정한 결과 전반적으로 skim milk로 발효시킨 산물 투여군보다 whey로 발효시킨 산물 투여군에서 비만 효과가 있는 것으로 관찰되었음. 따라서 whey로 발효시킨 산물 투여군에서의 비만 억제 효과를 검증하기 위한 분석을 실시하였음.

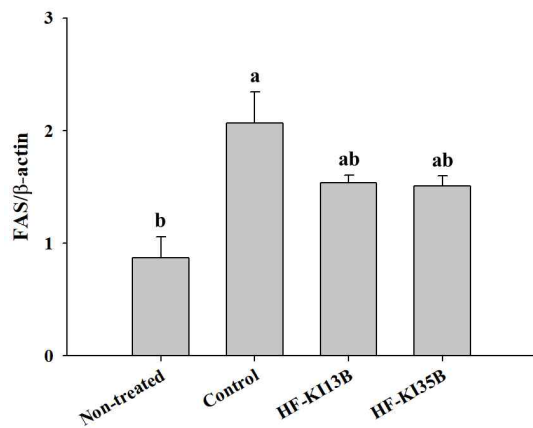
나. 마우스에서의 염증 발생 확인 및 비만 관련 매커니즘 규명을 위하여 간, 부고환 지방에서 해당 지표를 mRNA 수준으로 분석을 진행하였음.

1) 간에서 비만 관련 사이토카인으로 fas cell surface death receptor(FAS), sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c), proliferator-activated receptor- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ), carnitine palmitoyltransferase-2(CPT-2)를 분석하였음.

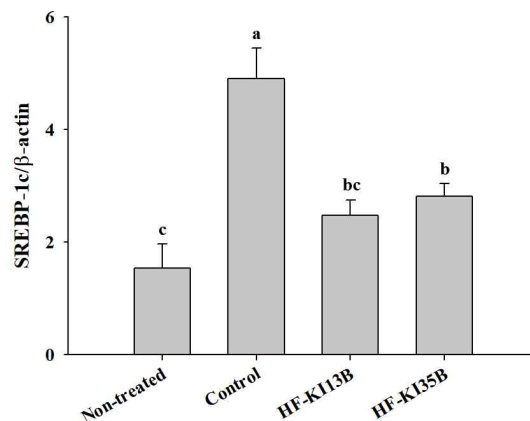
가) 간에서 비만 관련 지표를 분석한 결과, FAS가 control군 대비 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 유의적이지는 않지만 낮게 발현되었고, SREBP-1c는 control군 대비 바이오컨버전 산물을 투여한 군에서 유의적으로 낮게 발현되었음( $p < 0.05$ ) (그림 77).

나) PPAR- $\gamma$ 는 control군 대비 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 control군보다 유의적으로 높게 발현되었고( $p < 0.05$ ), CPT-2는 바이오컨버전 산물을 투여한 군이 control군보다 유의적으로 낮게 발현되었음( $p < 0.05$ )(그림 77).

(A) FAS



(B) SREBP-1c



(C) PPAR- $\gamma$

(D) CPT-2

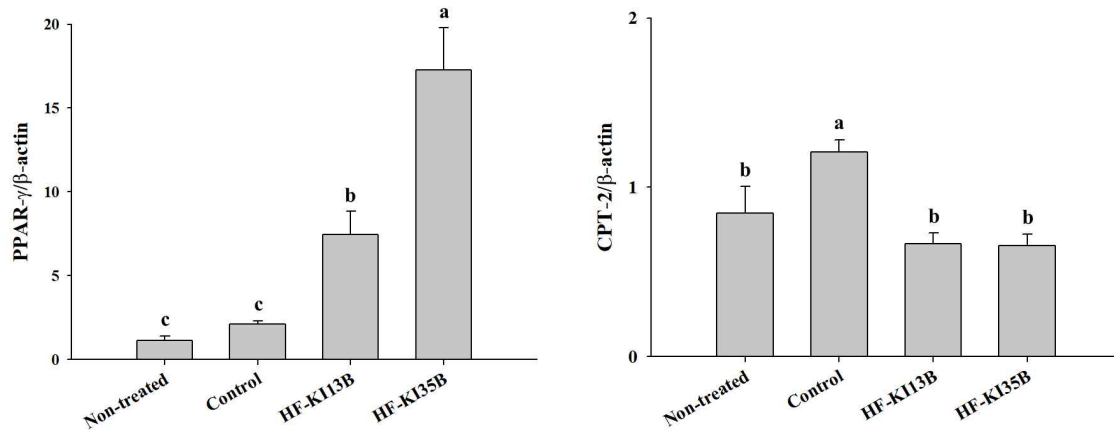


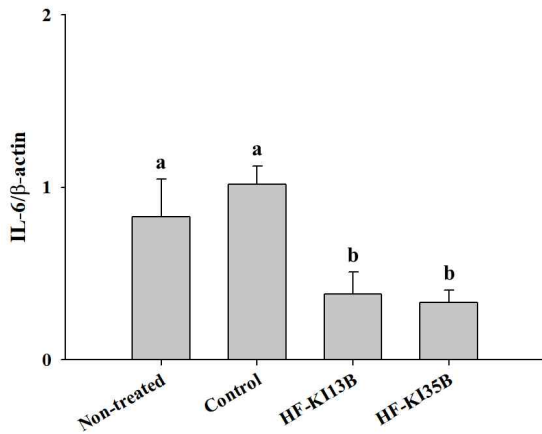
그림 77. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간에서의 비만 관련 유전자 상대적 발현량 분석

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13 바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

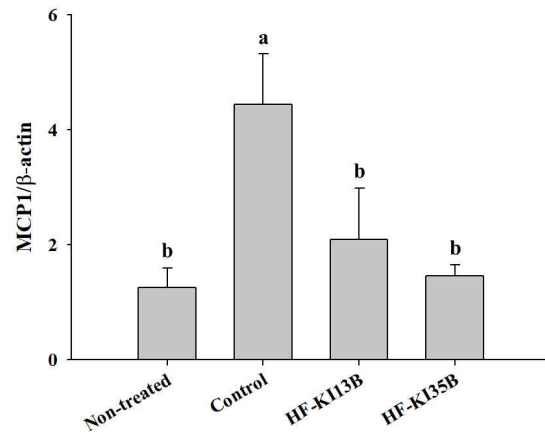
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

- 2) 부고환 지방에서 염증 발현 마커 사이토카인으로 interleukin-6(IL-6), 비만 관련 지표로는 monocyte chemoattractant protein 1(MCP1), leptin, fasting-induced adipose factor(FIAF)을 분석하였음.
  - 가) 부고환 지방 조직에서 전염증 지표인 IL-6를 분석한 결과, IL-6는 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 고지방식이 대조군인 control군보다 유의적으로 낮게 발현되었음( $p < 0.05$ )(그림 78).
  - 나) 부고환 지방 조직에서 비만 지표를 분석한 결과, MCP1은 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 control군보다 유의적으로 낮게 발현되었음( $p < 0.05$ ). Leptin은 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 control군보다 유의적이지는 않으나 낮게 발현되었음. FIAF는 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 control군보다 유의적이지는 않으나 높게 발현되었음.

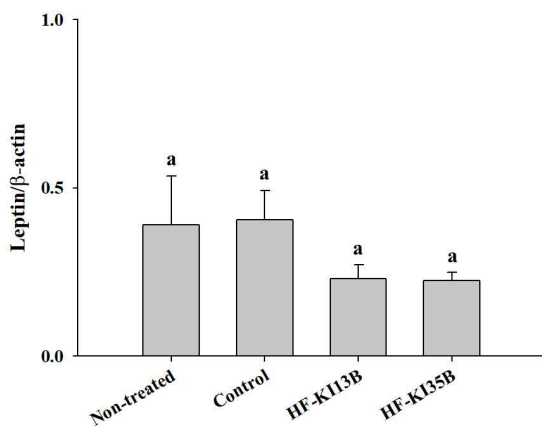
(A) IL-6



(B) MCP1



(C) Leptin



(D) FIAF

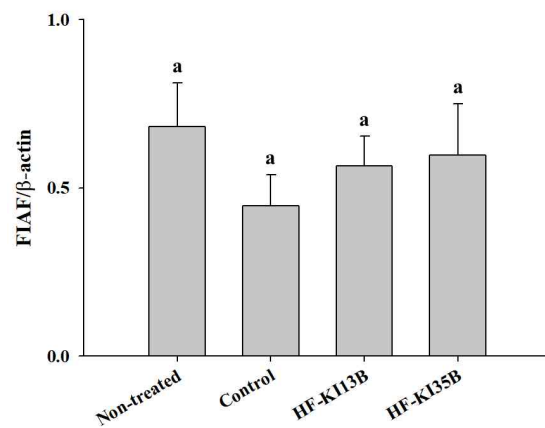


그림 78. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 부고환 지방에서의 유전자 상대적 발현량 분석

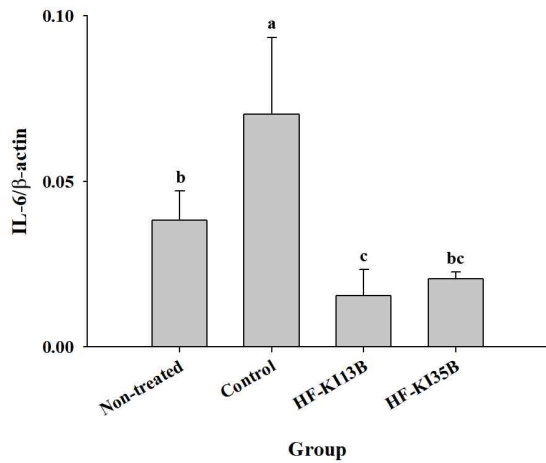
Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오 컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

다. 바이오컨버전 산물 투여에 따른 마우스에서의 염증 발생 확인 및 비만 관련 매커니즘 규명을 위하여 간, 부고환 지방에서 전염증 지표 IL-6를 단백질 수준으로 분석하였음.

- 1) 간 및 부고환 지방 조직에서의 전염증 지표 IL-6 분석 결과는 다음 그림 79와 같음. 간의 경우, control군 대비 HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), 부고환 지방의 경우, 모든 군에서 유의적인 차이가 없었음. 단백질 발현량 분석 결과, KI13과 KI35 바이오컨버전 산물은 모두 간의 염증 억제 효과가 있는 것으로 확인되었음.

(A)



(B)

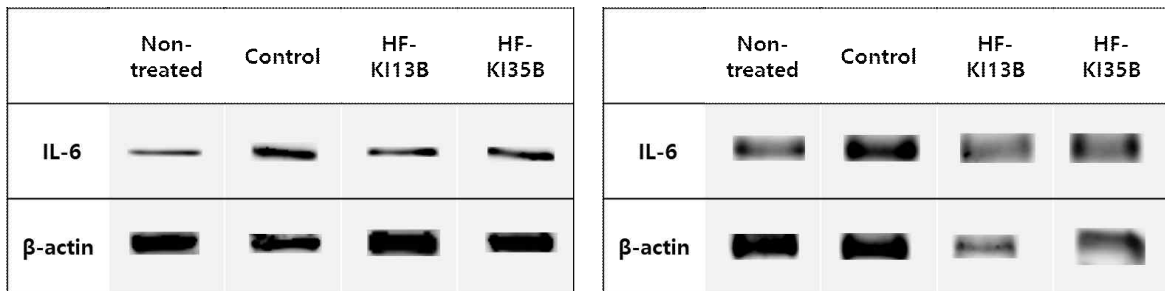
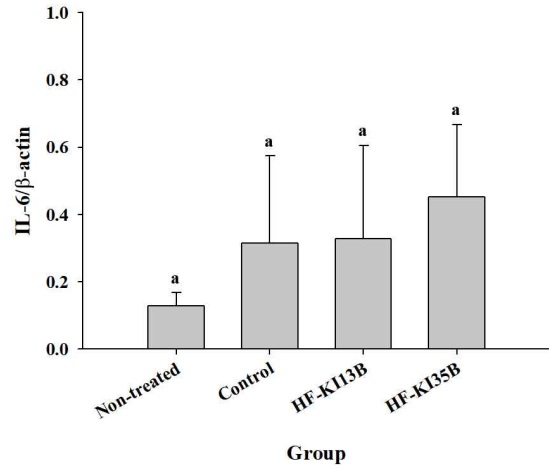


그림 79. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간(A), 부고환 지방(B)에서의 단백질 발현량 분석

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13B 바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35 바이오컨버전산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## 5. 조직병리학적 분석

가. 바이오컨버전 산물의 효과를 확인하기 위해 고지방식이 섭취군 중 HF-KI13B군과 HF-KI35B군의 간조직에서 지방증을 확인하였음(그림 80).

- 1) 검경 결과, non-treated군과 비교하였을 때 control군의 간조직에서 높은 지방증 score를 나타내었음.
- 2) Control군과 비교하였을 때, HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 간조직의 지방증 score가 낮게 관찰되었음. 따라서 KI13 균주와 KI35 균주를 이용해 발효시킨 바이오컨버전 산물이 간조직의 지방증 감소에 효과가 있는 것으로 관찰되었음(표 99).



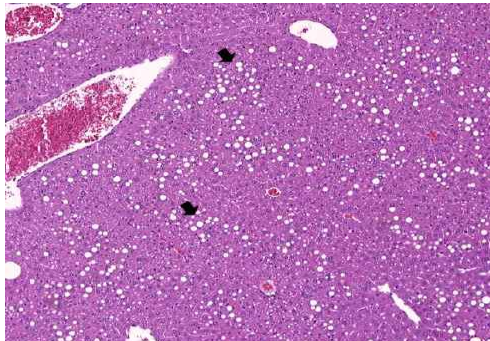
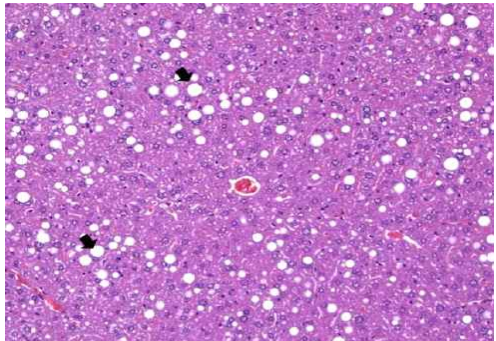
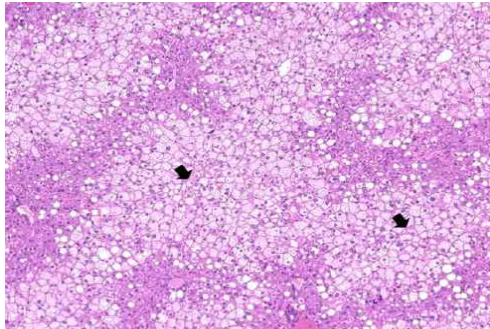
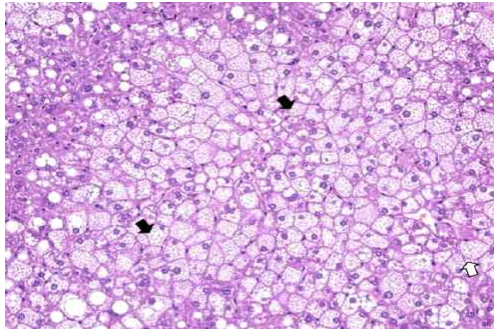
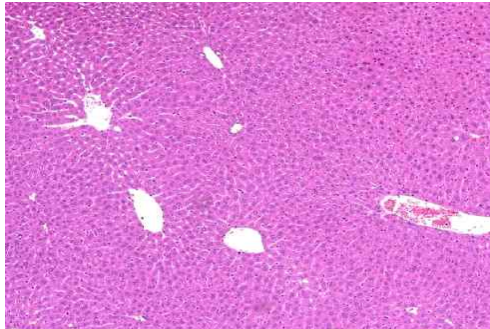
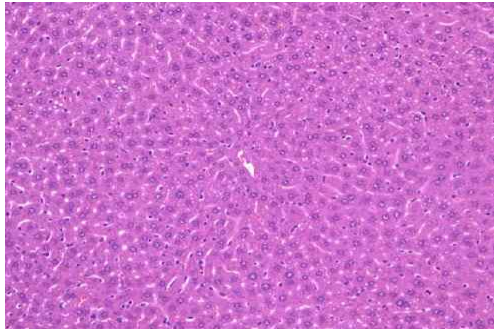
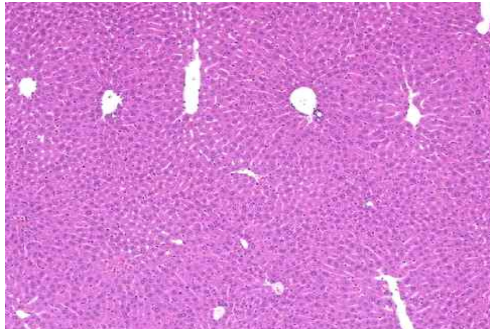
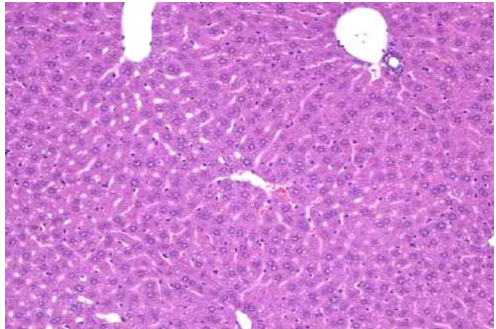
군	간세포 검경 사진	
Non-treated		
Control		
HF-KI13B		
HF-KI35B		

그림 80. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간세포 검경 사진

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여



**표 99. 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간세포 조직병리 분석결과**

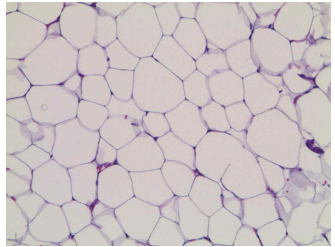
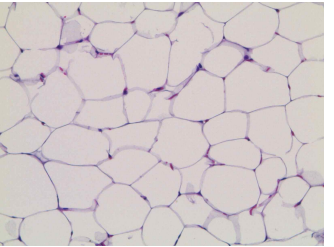
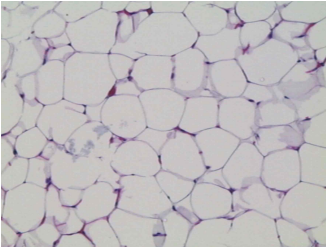
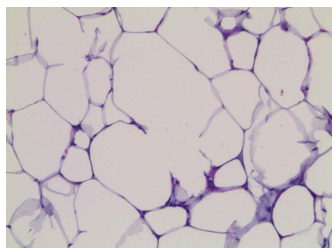
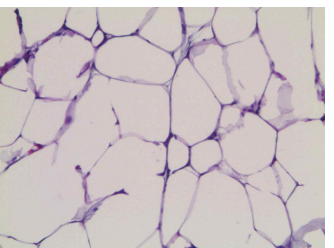
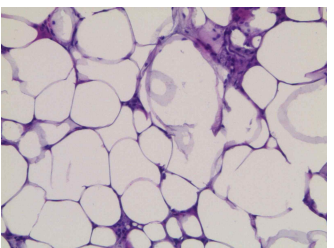
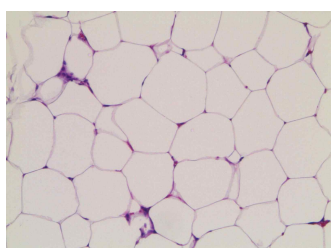
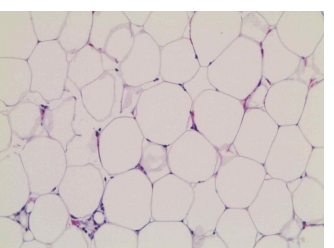
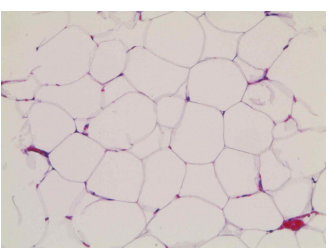
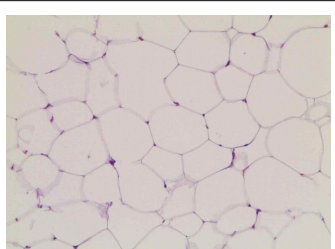
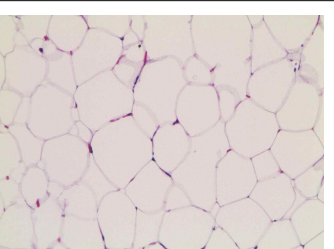
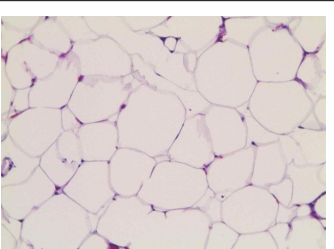
군	Non-treated			Control			HF-KI13B			HF-KI35B		
	±	+	-	++	+++	++	-	±	-	-	-	+
간세포 지방증	±	+	-	++	+++	++	-	±	-	-	-	+

-: no lesion, ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked, ++++: severe

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

나. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 효과를 확인하기 위해 부고환 지방 조직에서 고지방식이 섭취군 중 HF-KI13B군과 HF-KI35B군의 지방구 크기를 확인하였음(그림 81).

- 1) 검경 결과, non-treated군의 지방구 크기가 작고, 균일하게 배열되어있는 반면, control군에서는 지방구 크기가 크고 불규칙하게 배열된 것을 확인하였음.
- 2) Control군과 비교하였을 때, HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 고지방식이를 투여했음에도 불구하고 지방구 크기가 작고, 규칙적으로 배열된 것이 확인되었음.

군	부고환 지방의 지방구 검경 사진		
Non-treated			
Control			
HF-KI13B			
HF-KI35B			

**그림 81. 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스**

**부고환 지방의 지방구 사진**

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

## 6. 장내균총 분석

- 가. 바이오컨버전 산물의 비만 억제에 따른 장내균총 변화를 확인하기 위해 non-treated 군, control군, HF-KI13B군과 HF-KI35B군의 맹장 분변에서 추출한 DNA에서 장내균총 분석을 진행하였음.
- 나. 전체 12개 시료의 세균 군집에 대해 PcoA 분석을 수행한 결과, 그림 82와 같은 그래프를 얻었음. Control군, HF-KI13B군, HF-KI35B군에 비해 non-treated군의 균총이 분산되어 나타났음.
- 다. 선행 연구들에 의하면 비만인 사람의 장내 미생물 균총에서 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율이 증가하는 것으로 알려져 있음. 본 연구 결과에서는 non-treated군과 control군에서 해당 비율이 69.0%, 28.1%로 나타났고, HF-KI13B군과 HF-KI35B군에서 해당 비율이 48.5%, 42.9%로 상반된 결과를 나타냈음(그림 83-그림 84). 이는 non-treated군, control군 개체의 차세대 염기서열(NGS) 분석 시 도출된 read의 수가 HF-KI13B군, HF-KI35B군 개체의 read 수에 비해 적어 균총을 구분할 수 있는 염기서열 분석이 충분히 이루어지지 않았기 때문이라고 추정됨.

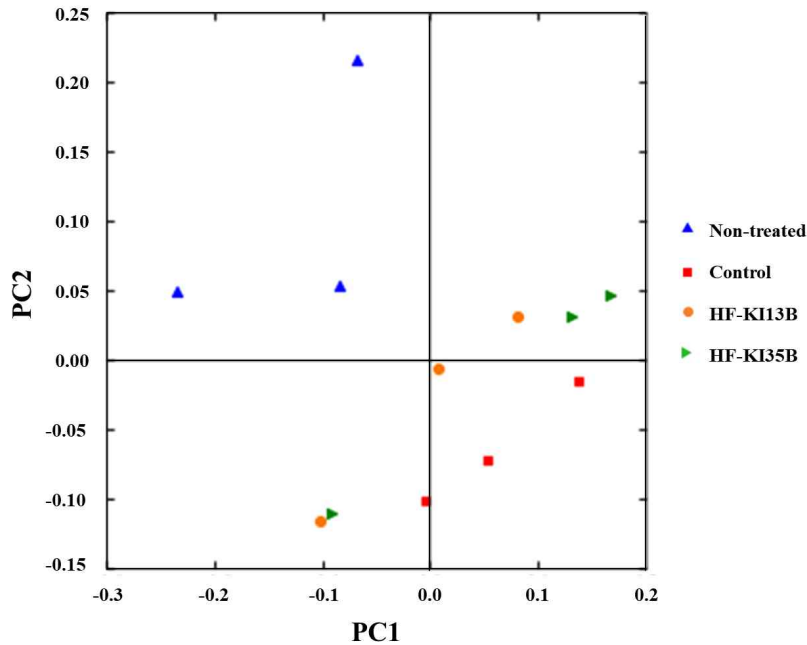


그림 82. 군간 세균총 유사도 비교

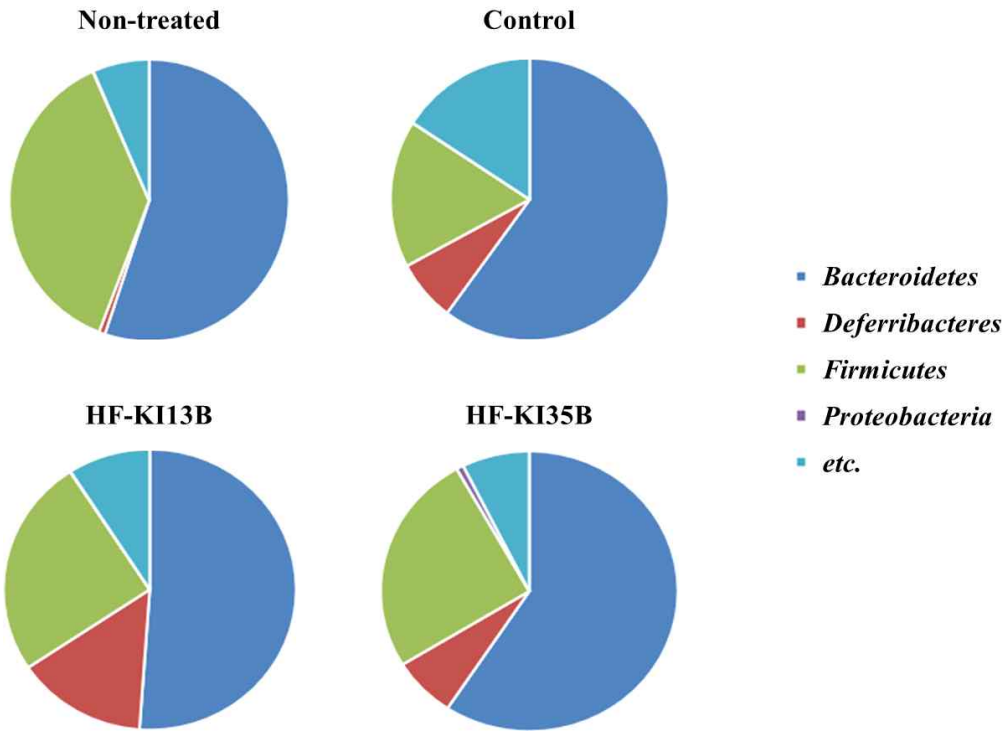


그림 83. Phylum 수준에서 주요 장내 균총의 비율 분석

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13 바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여

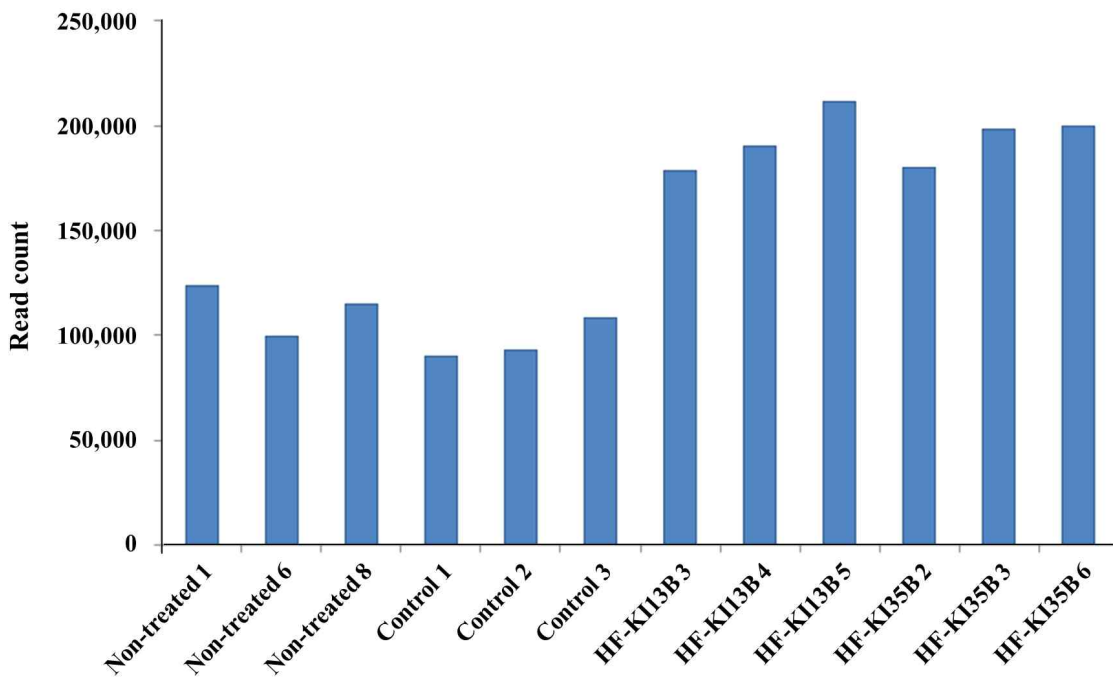


그림 84. 개체별 NGS assembly 결과

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, HF-KI13B : 고지방식이 + KI13 바이오컨버전산물 투여, HF-KI35B : 고지방식이 + KI35바이오컨버전산물 투여



1. 체중 증가율 및 장기 무게

가. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 랫드 체중의 변화를 확인하기 위해 치주염 유발 2 주와 경구 투여 기간 8 주, 총 10 주의 연구 기간 동안 매주 1회 일정 시간에 체중을 측정하여 체중 변화를 확인하였음. 측정 결과는 다음 그림 85와 같음. Control군과 비교하여 M157군, M157+CAU2013군의 체중 증가율이 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

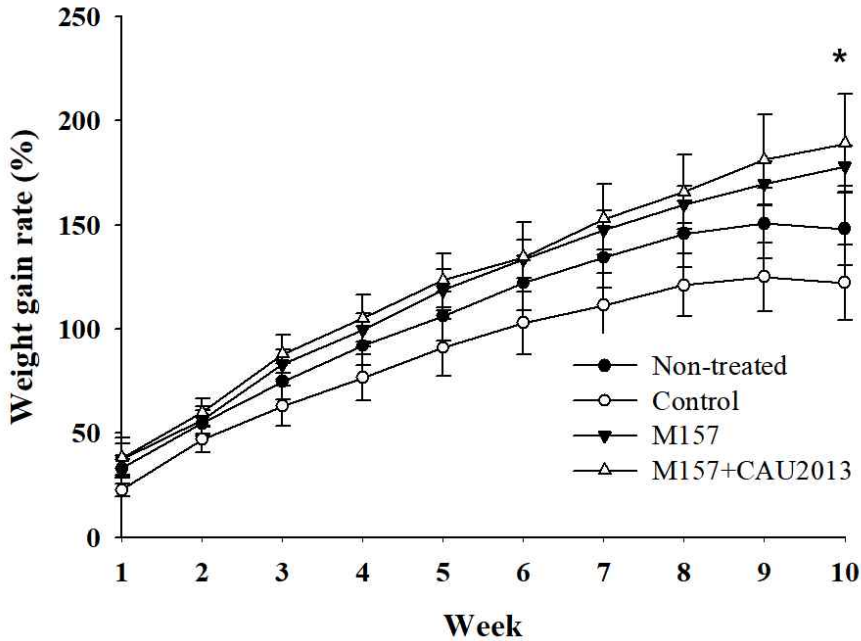


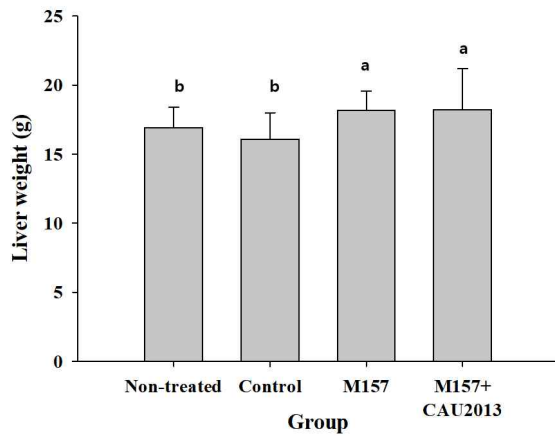
그림 85. 체중 증가율

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

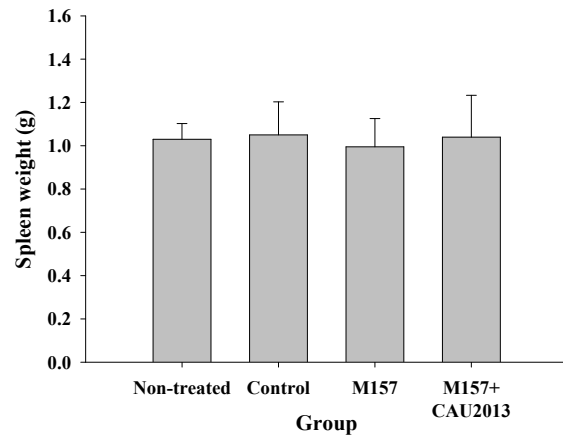
\*Statistically different from control,  $p < 0.05$

나. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 랫드의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직후 간, 비장, 신장의 무게를 측정하였고, 소장 및 대장의 길이를 측정하였음. 측정 결과는 다음 그림 86과 같음. 간의 경우, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 무게가 유의적으로 높게 측정되었음( $p < 0.05$ ). 신장의 경우, non-treated군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 무게가 유의적으로 높게 측정되었음( $p < 0.05$ ). 소장의 경우, non-treated군 대비 control군, M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 길게 측정되었고( $p < 0.05$ ), control군 대비 M157군에서 유의적으로 길게 측정되었음( $p < 0.05$ ). 비장과 대장의 경우, 모든 군에서 유의차가 관찰되지 않았음.

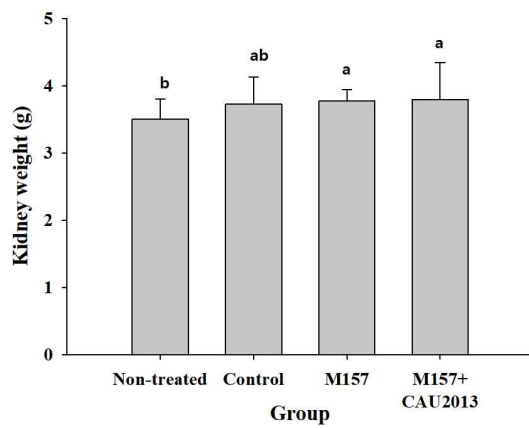
(A) 간



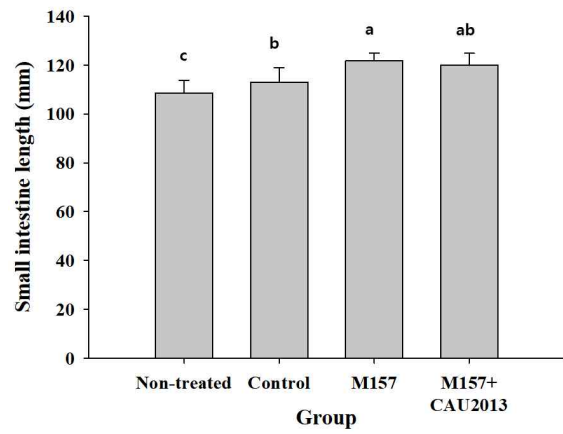
(B) 비장



(C) 신장



(D) 소장



(E) 대장

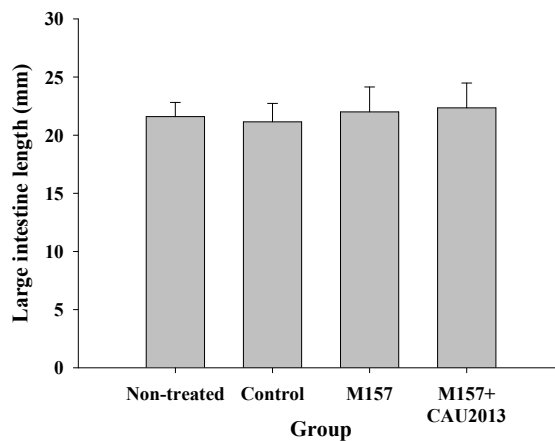


그림 86. 장기 무게 및 길이

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

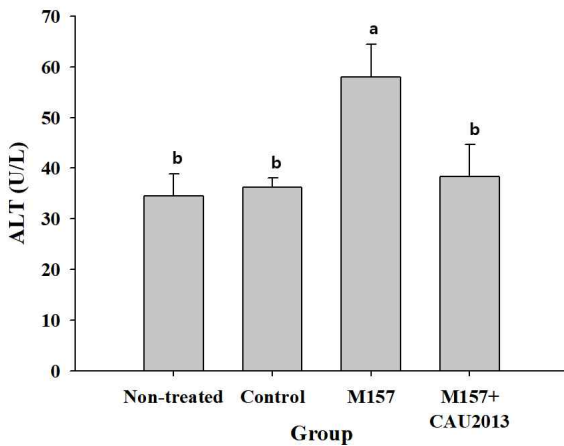
## 2. 혈액 분석

가. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 치주염 억제 효과를 검증하기 위해 혈액 분석을 실시하였음. ALT, AST, ALP, GLU, HDL, LDL, TG, T-Chol 농도를 확인하였음.

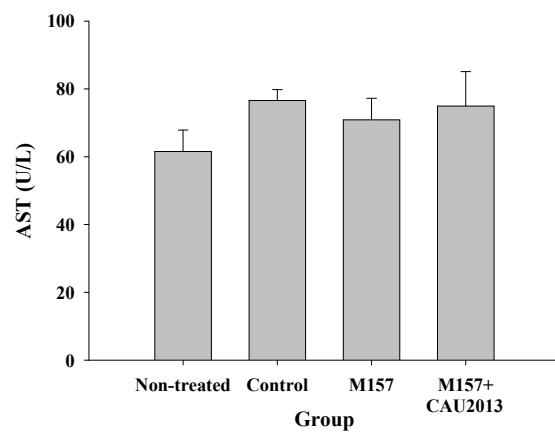
나. 혈액 분석 결과는 다음 그림 87과 같음. ALT의 경우, control군 대비 M157군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). HDL의 경우, control군 대비 M157군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). LDL, T-chol의 경우, non-treated군 대비 M157+CAU2013군에서 유의적인 차이가 없었음. ALP, AST, GLU, TG의 경우, 모든 군 간의 유의적인 차이가 없었음.

다. 혈액 분석 결과, non-treated군 대비 M157군에서 HDL이 유의적으로 높게 관찰되었으나 ALT, LDL, T-chol에서도 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

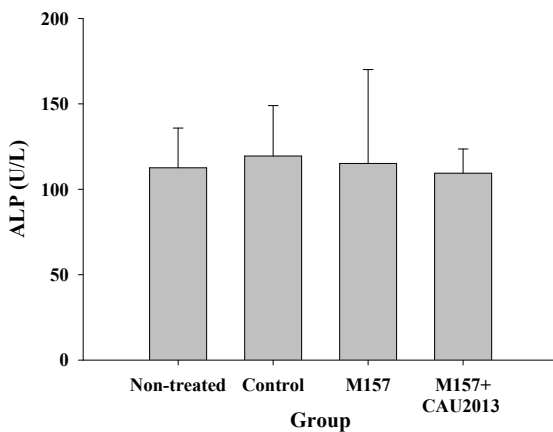
(A) ALT



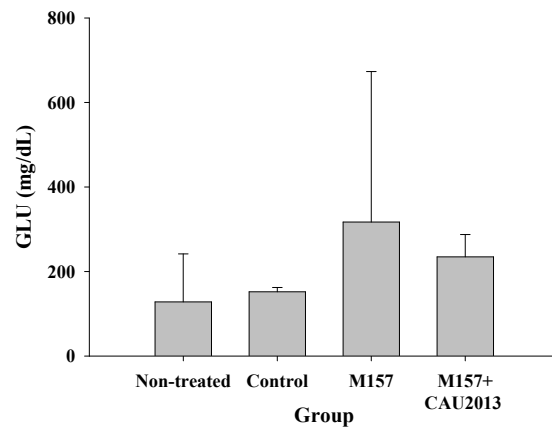
(B) AST



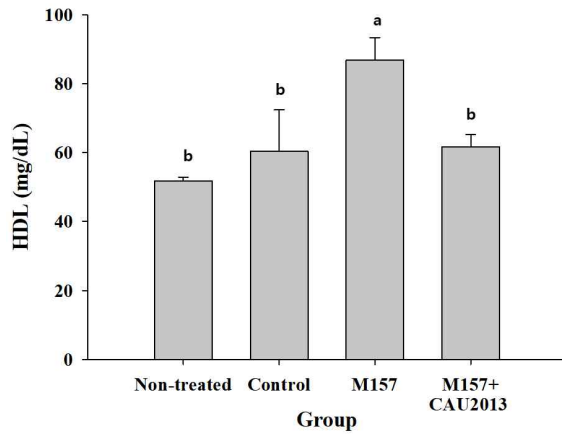
(C) ALP



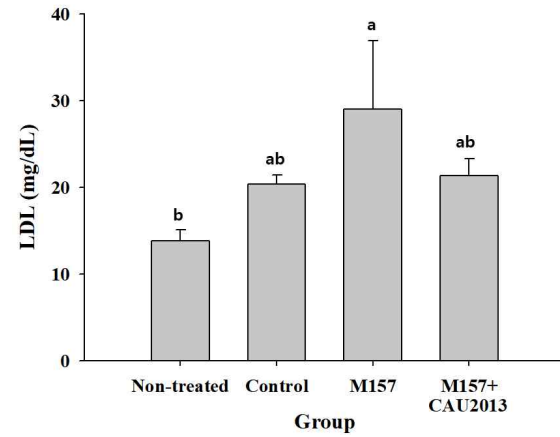
(D) GLU



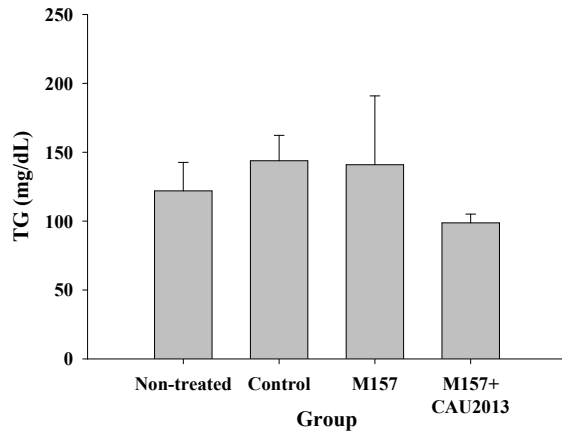
(E) HDL



(F) LDL



(G) TG



(H) T-chol

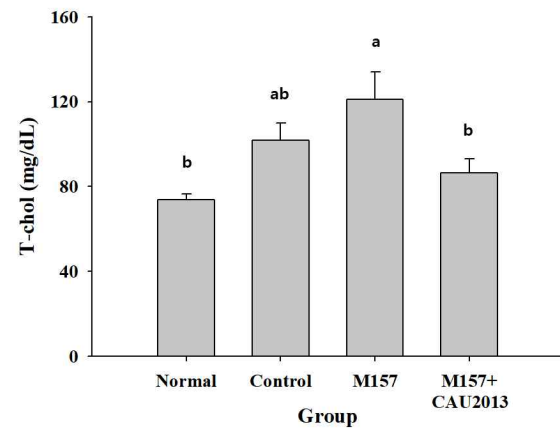


그림 87. 혈액 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

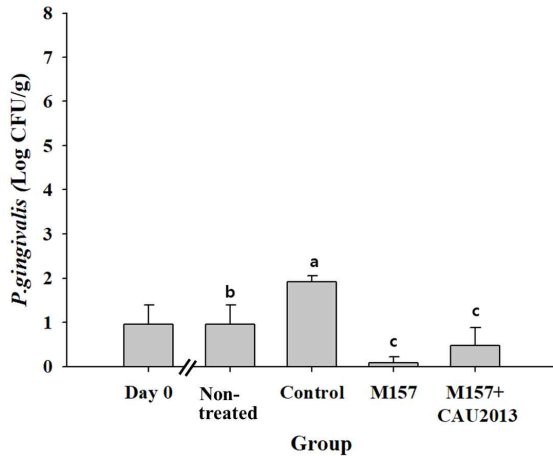
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

### 3. 분변 내 구강유해균 분석

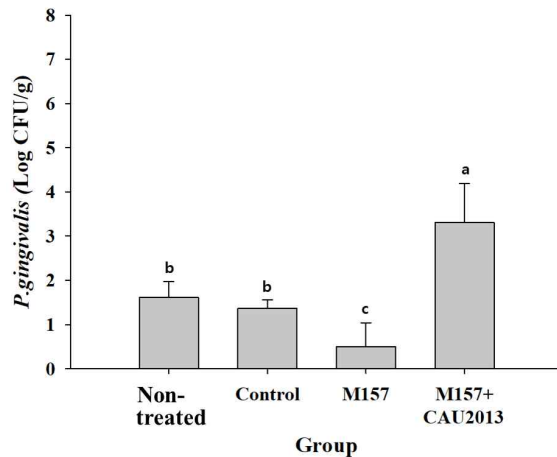
가. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 랫드의 구강내 유해 미생물의 억제를 확인하기 위해 치주염 유발 1 주차, 8 주차 때 분변을 채취하여 구강유해균(*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*)을 정량적으로 분석하였음.

나. *P. gingivalis* 분석 결과 다음 그림 88과 같음. 경구 투여 1 주차에 control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 경구 투여 8 주차에 control군 대비 M157군에서는 유의적으로 낮게 관찰되었으나 M157+CAU2013군에서는 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

(A) 1 주차



(B) 8 주차

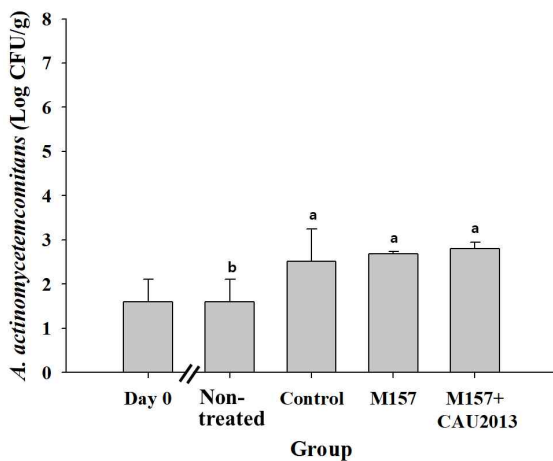
그림 88. 분변에서 *P. gingivalis* 정량 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

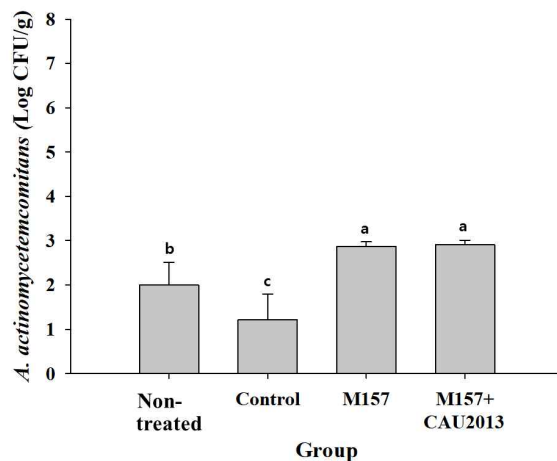
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

다. *A. actinomycetemcomitans* 분석 결과 다음 그림 89와 같음. 경구 투여 1 주차에 non-treated군 대비 모든 군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 경구 투여 8 주차에 control군 대비 산물 투여군인 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

(A) 1 주차



(B) 8 주차

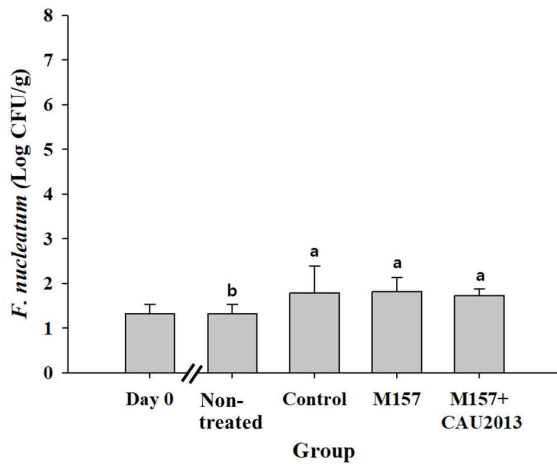
그림 89. 분변에서 *A. actinomycetemcomitans* 정량 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

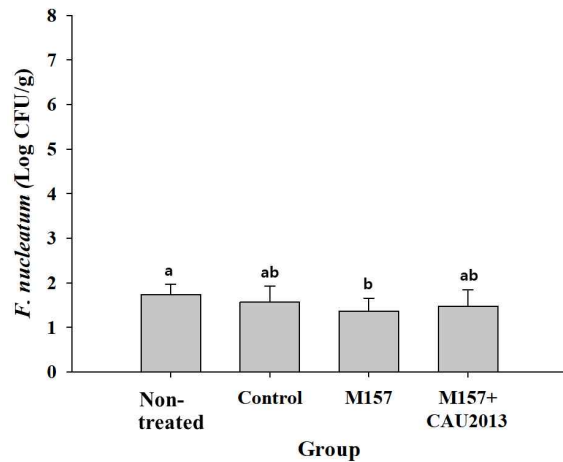
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

라. *F. nucleatum* 분석 결과 다음 그림 90과 같음. 경구 투여 1 주차에 non-treated군 대비 모든 군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 경구 투여 8 주차에 non-treated군 대비 M157군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

(A) 1 주차



(B) 8 주차

그림 90. 분변에서 *F. nucleatum* 정량 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

마. 분변 내 구강유해균 분석 결과, 경구 투여 8 주차에 control군 대비 M157군에서 *P. gingivalis*가 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), 경구 투여 8 주차에 non-treated 군 대비 M157군에서 *F. nucleatum*이 유의적으로 낮게 관찰되어( $p < 0.05$ ) M157로 제조한 산물이 구강유해균 억제 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

#### 4. Micro-CT 분석

가. 총 부피 당 골 부피(BV/TV) 분석 결과, control군 대비 non-treated군, M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 높게 측정되었음( $p < 0.05$ ). BV/TV 수치외의 경우, 높을수록 피질골의 양이 많음을 의미함. 골 부피 당 표면적(BS/BV) 분석 결과, control군 대비 non-treated군, M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 측정되었음( $p < 0.05$ ). BS/BV 수치외의 경우, 높을수록 소주골의 양이 많음을 의미함. 골 소실 부피(bone loss volume) 분석 결과, control군 대비 non-treated군, M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 측정되었음( $p < 0.05$ )(표 100, 그림 91).



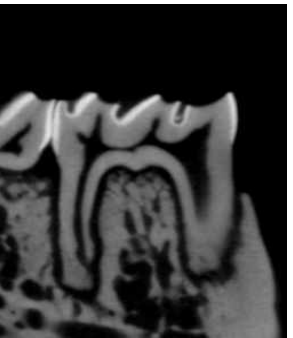


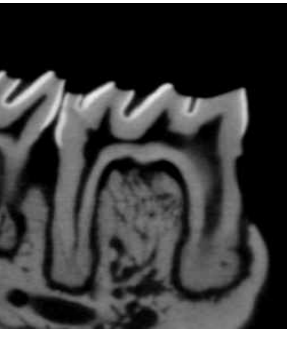
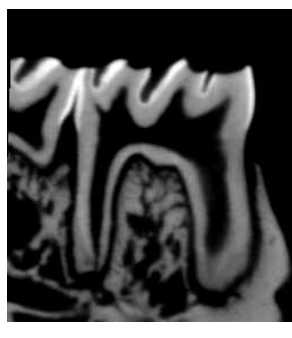
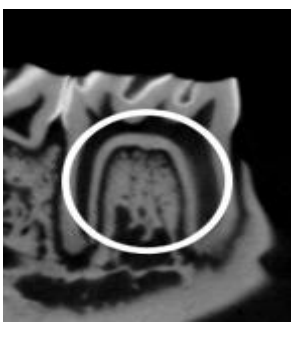
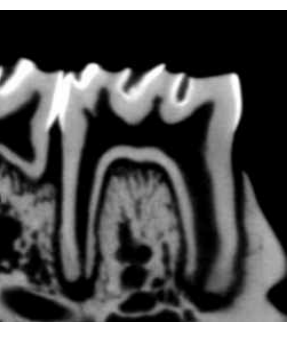
표 100. 치주 조직 micro-CT 분석 결과

군	Bone volume /Total volume (%)	Bone surface /Bone volume (1/mm)	Bone loss volume (mm <sup>3</sup> )
Non-treated	87.392±1.374*	12.078±0.222*	0.045±0.005*
Control	53.057±0.573	18.667±3.035	0.157±0.021
M157	80.712±13.695*	12.825±3.647*	0.069±0.049*
M157+CAU2013	80.990±5.022*	11.499±0.820*	0.068±0.018*

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

\*Statistically different from control,  $p < 0.05$

나. 치주 조직의 micro-CT 분석 결과, M157군, M157+CAU2013군에서 BS/TV, BS/BV, bone loss volume이 non-treated군과 유의적 차이가 없는 것으로 나타나 M157, M157+CAU2013로 제조한 산물이 치주염 억제에 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

처리군	치주조직 mirco-CT 분석 사진		
Non-treated			
Control			
M157			

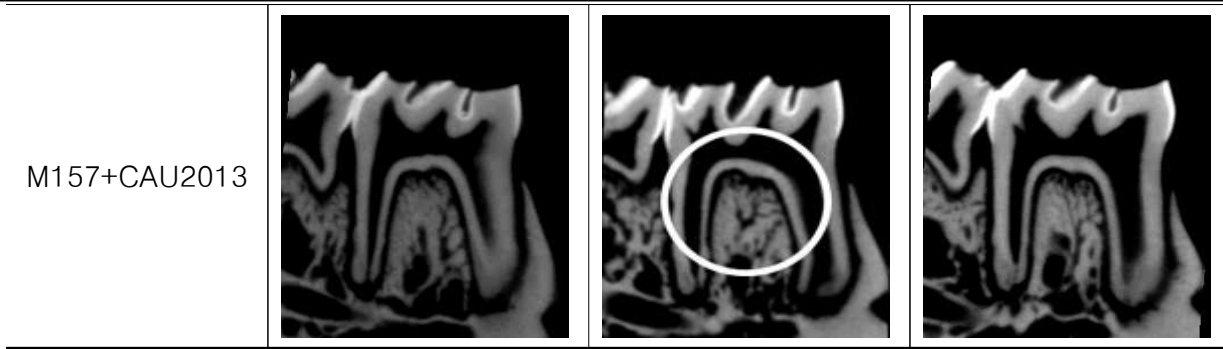


그림 91. 치주 조직 micro-CT 분석 사진

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

### 5. 조직병리학적 분석

가. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 치주염 억제 효과를 검증하기 위해 랫드의 치주 조직에서 조직형태학적 변화, 치조골, 파골세포, 조골세포 수 등을 측정하였음. 분석 결과, control군에서 염증세포 침윤과 상피증식이 관찰되었음. M157군, M157+CAU2013군에서 non-treated군과 같이 병변이 확인되지 않아 치주염 억제 효과가 있는 것으로 관찰되었음(그림 92, 표 101).

처리군	치주 조직 사진	
Non-treated		
Control		



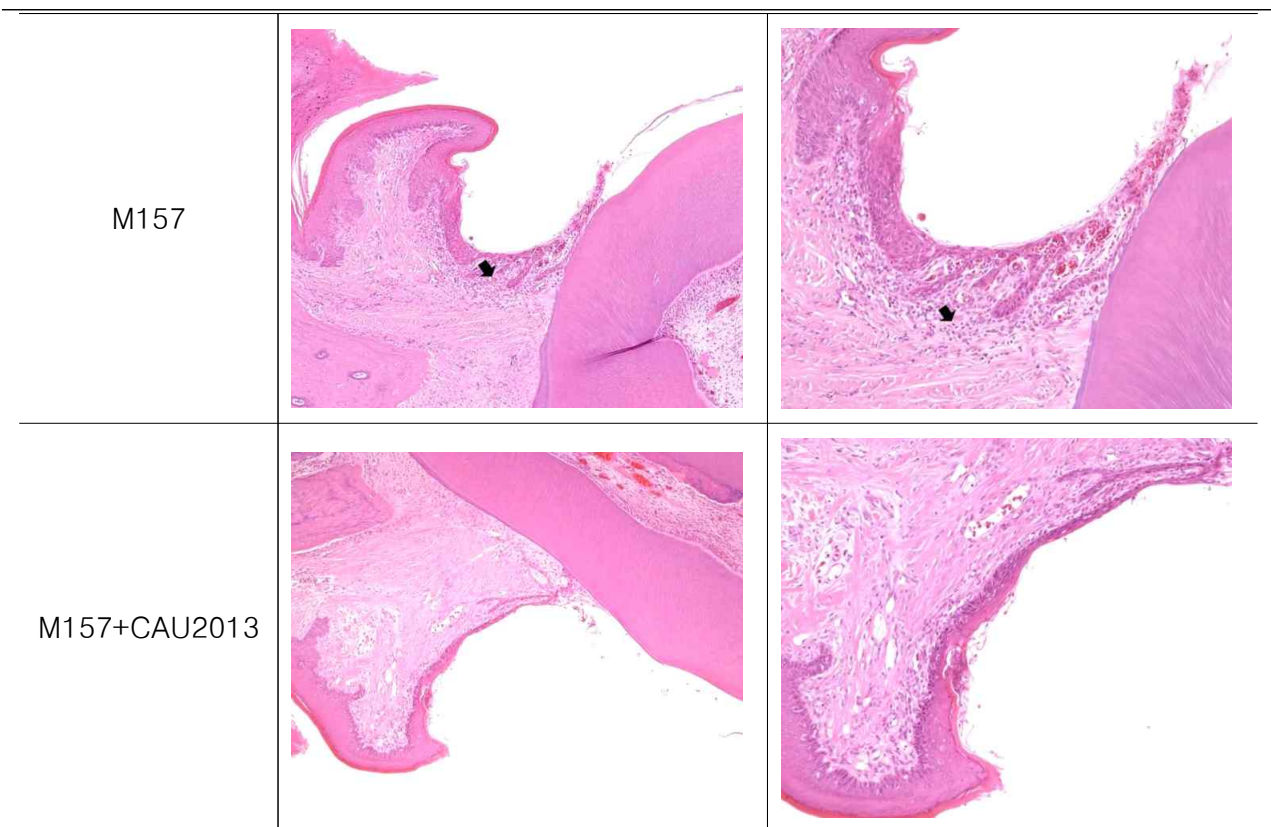


그림 92. 우측 하악 제 1 어금니에 대한 조직병리학적 분석

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

Arrow: inflammatory cell infiltration, head of arrow: epidermal hyperplasia

표 101. 조직병리학적 분석 정보

군	Non-treated	Control	M157	M157 +CAU2013
치은 점수(Total score)	- - -		- -	- - -
- 염증세포 침윤		+ ± ±	±	
- 상피증식		+ + ±		

-: no lesion, ±: minimal, +: mild

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

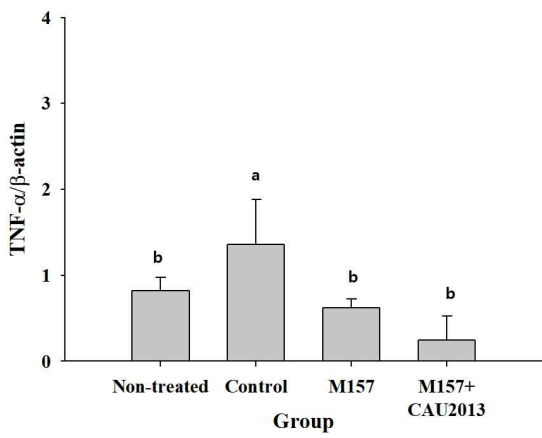
## 6. 전사체 분석

가. 바이오컨버전 산물 투여로 인한 치주 조직 및 대장 조직의 염증 및 산화적 스트레스의 억제 효과를 확인하기 위해 전사체를 이용하여 면역 지표(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, CAT, SOD1, SOD2, GPx1)를 분석하였음.

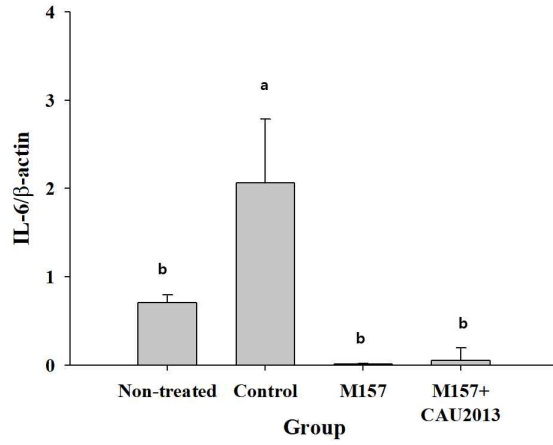
나. 치주 조직의 면역 지표 분석 결과는 다음 그림 93과 같음. 전염증 지표 TNF- $\alpha$ 와 IL-6, IL-1 $\beta$  분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항염증 지표 IL-10 분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, control군 대비 M157+CAU2013군에서 높게 관찰되었음. 항산화 지표 SOD1 분석 결과, non-treated군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적인 차이

를 나타내지 않았음. 항산화 지표 GPx1 분석 결과, control군 대비 M157군에서 낮은 값을 나타내었으나, M157+CAU2013군과 유의적인 차이는 없었음.

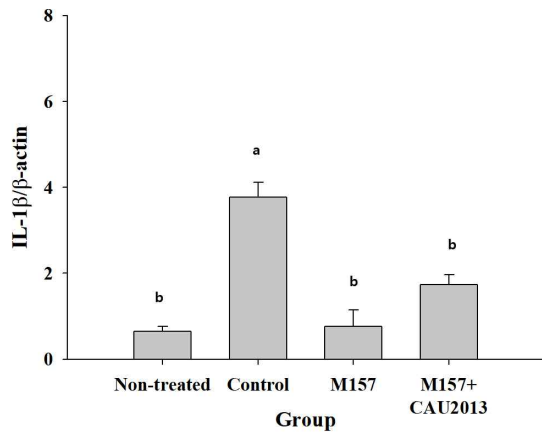
(A) TNF- $\alpha$



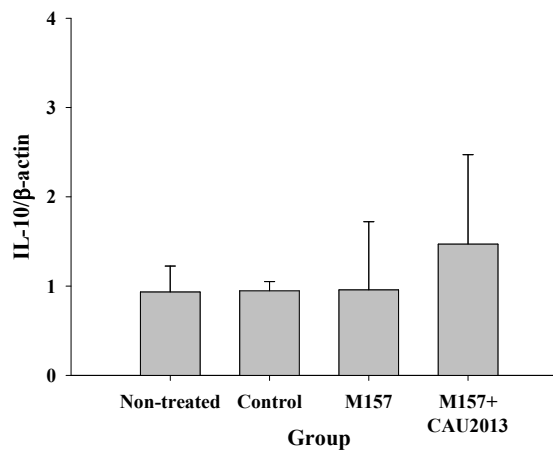
(B) IL-6



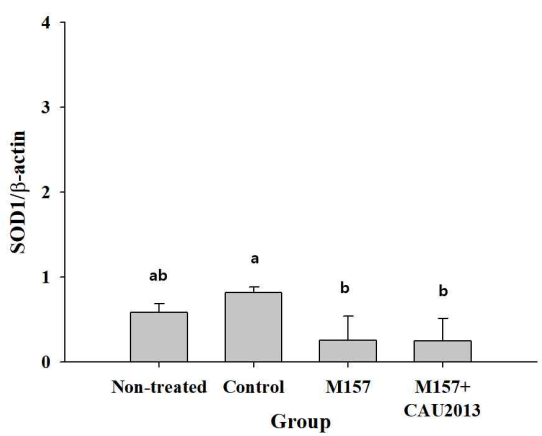
(C) IL-1 $\beta$



(D) IL-10



(E) SOD1



(F) GPx1

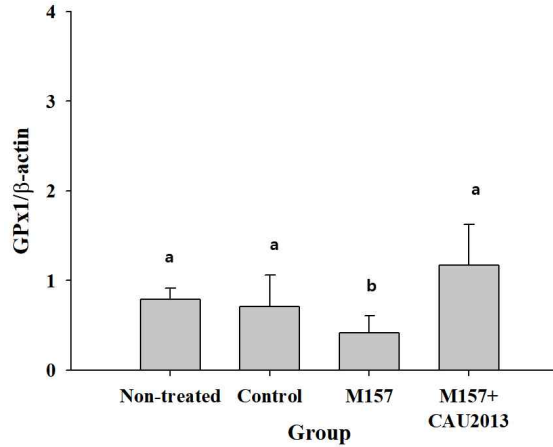


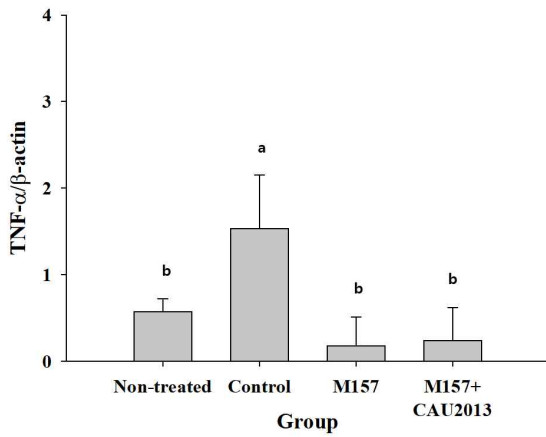
그림 93. 치주 조직 면역 지표 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

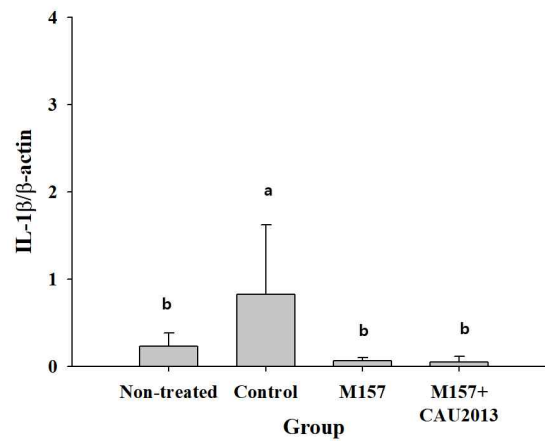
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

다. 대장 조직의 면역 지표 분석 결과는 다음 그림 94와 같음. 전염증 지표 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항염증 지표 IL-10 분석 결과, non-treated군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 항산화 지표 SOD2 분석 결과 M157군, M157+CAU2013군에서 non-treated군과 유사한 수치를 나타냈음. 항산화 지표 CAT 분석 결과, non-treated군 대비 control군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항산화 지표 SOD1 분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이가 없었음.

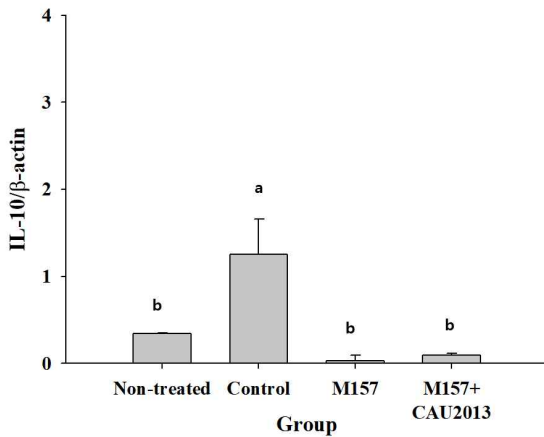
(A) TNF- $\alpha$



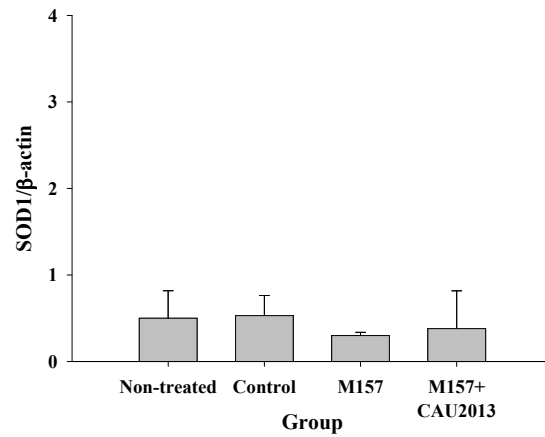
(B) IL-1 $\beta$



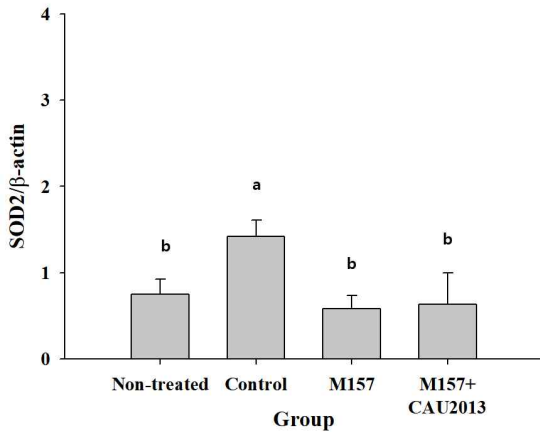
(C) IL-10



(D) SOD1



(E) SOD2



(F) CAT

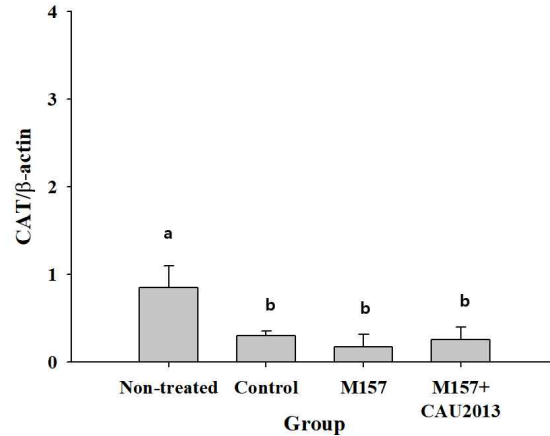


그림 94. 대장 조직에서의 면역 지표 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

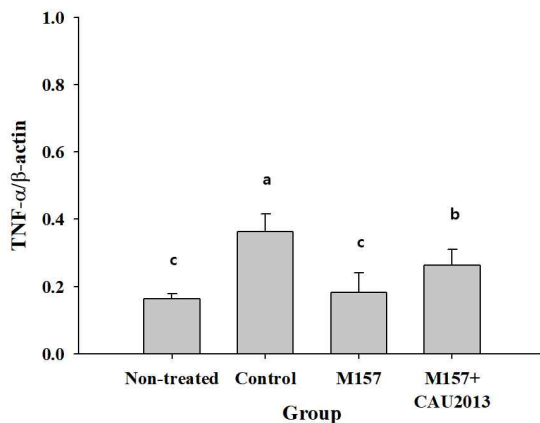
Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

라. 치주 조직, 대장 조직에서의 전사체 분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013 군에서 전염증 지표 값이 유의적으로 낮게 관찰되어 염증 억제 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

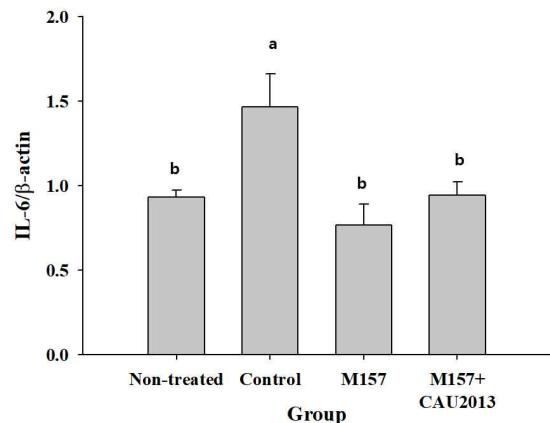
## 7. 단백질 발현량 분석

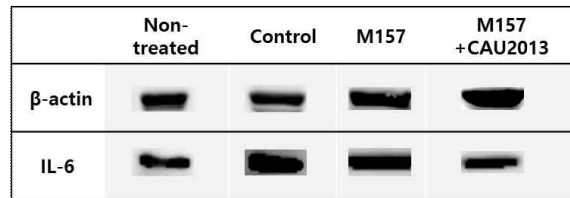
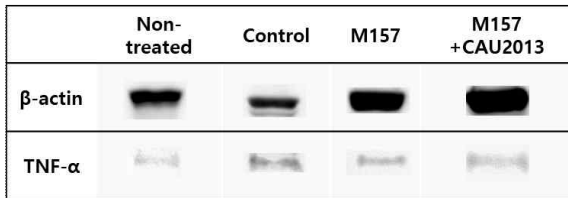
가. 바이오컨버전 산물 투여로 인한 치주 조직 및 대장 조직의 염증 및 산화적 스트레스의 억제 효과를 확인하기 위해 단백질 발현량을 이용하여 면역 지표(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, SOD1, GPx1)를 분석하였음.

나. 치주 조직 단백질에서의 면역 지표 분석 결과는 다음 그림 95와 같음. 전염증 지표 TNF- $\alpha$ , IL-6 분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), M157군의 경우, non-treated군과 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 항산화 지표 SOD1 분석 결과, control군 대비 M157+CAU2013군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항산화 지표 GPx1 분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

(A) TNF- $\alpha$ 

(B) IL-6





(C) SOD1

(D) GPx1

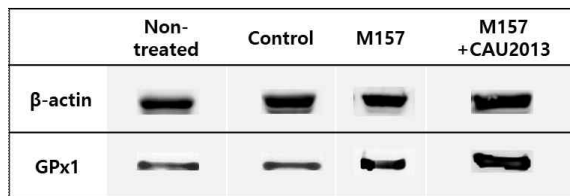
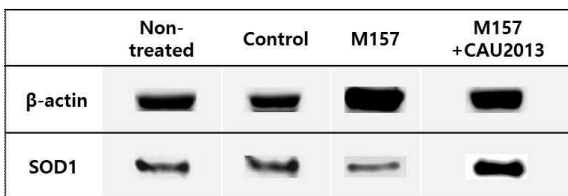
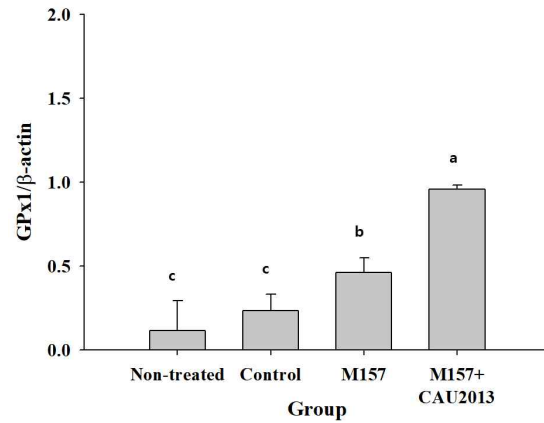
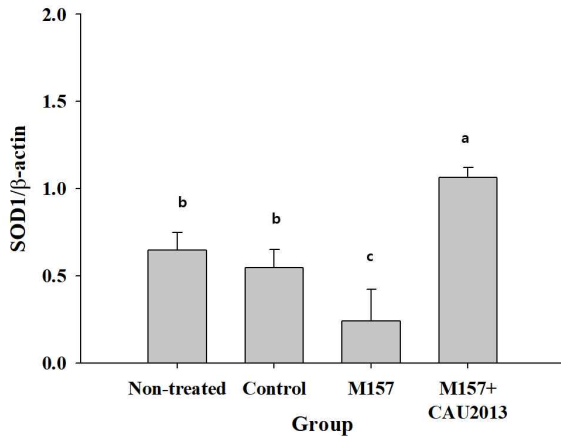
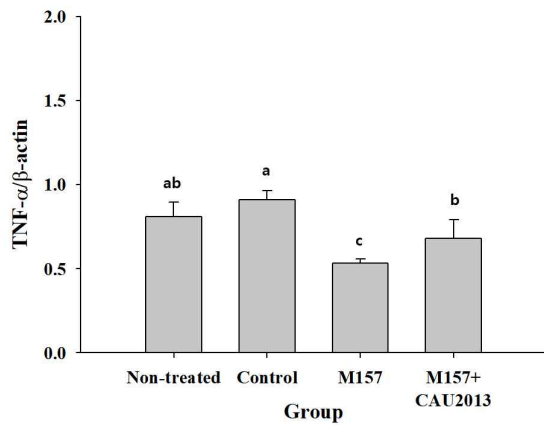


그림 95. 치주 조직 면역 지표 분석 결과

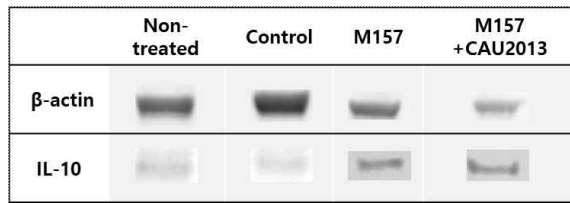
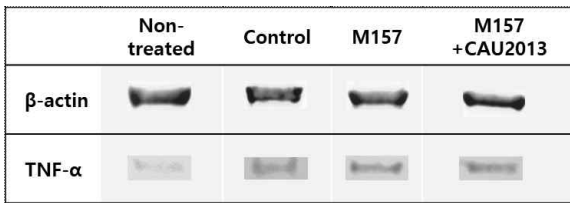
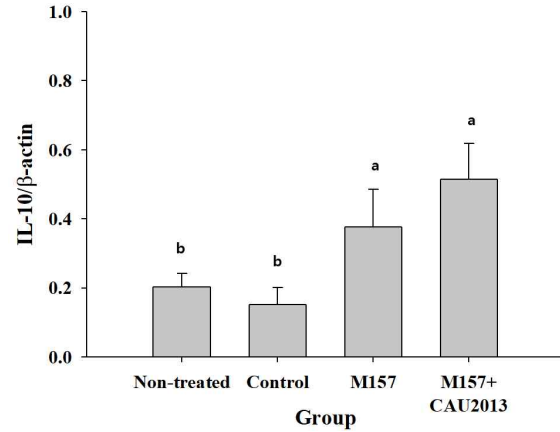
Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

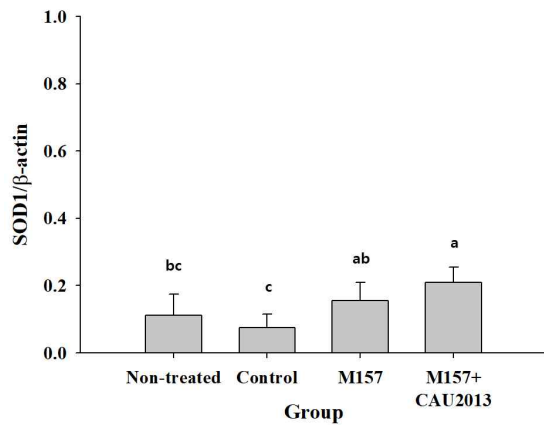
다. 대장 조직 단백질에서의 면역 지표 분석 결과는 다음 그림 96과 같음. 전염증 지표 TNF- $\alpha$  분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항염증 지표 IL-10 분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항산화 지표 SOD1 분석 결과, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 항산화 지표 GPx1 분석 결과, 유의적 차이는 없지만 control군 대비 M157+CAU2013군에서 높게 관찰되었음.

(A) TNF- $\alpha$ 

(B) IL-10



(C) SOD1



(D) GPx1

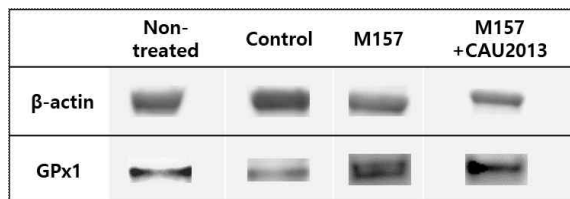
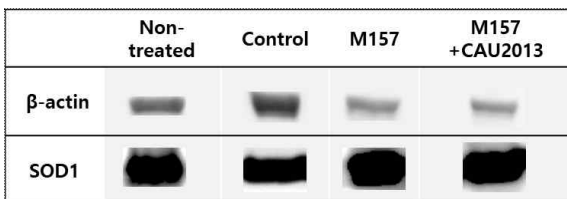
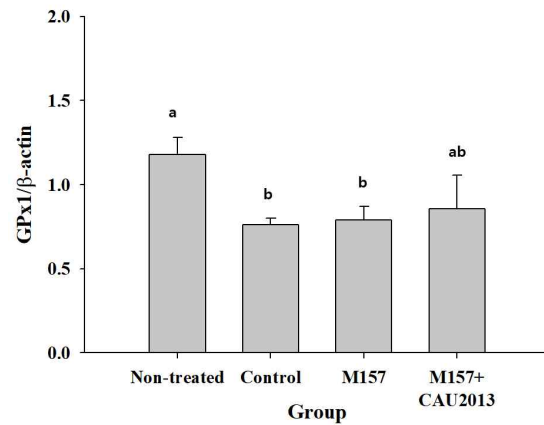


그림 96. 대장 조직 면역 지표 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## 8. 장내균총 분석

가. 동물 모델 맹장 분변 내 DNA를 이용하여 메타지노믹스 시퀀싱을 진행하였고, Illumina platform을 이용하여 미생물 군집(microbial community) 분석을 실시하였고, 그림 97과 같이 read 수가 측정되었음.

나. 많은 연구 결과들에 의하여 구강 질환자의 장내 미생물 군총에서 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율이 증가하는 것이 관찰되어왔음. 본 연구 결과, Firmicutes/Bacteroidetes의 비율이 non-treated군, control군, M157군, M157+CAU2013군에서 각각 1.27%, 1.67%, 3.02%, 3.35%로 나타났음(그림 98).

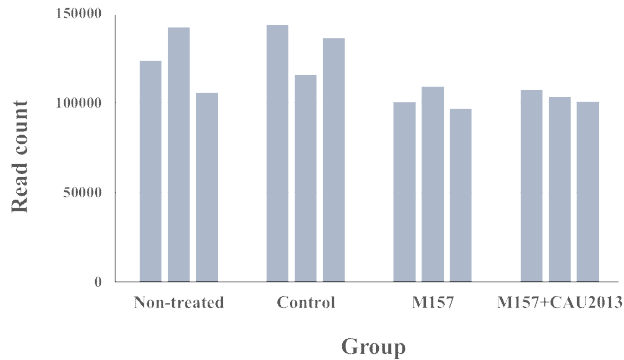


그림 97. 개체별 NGS assembly 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

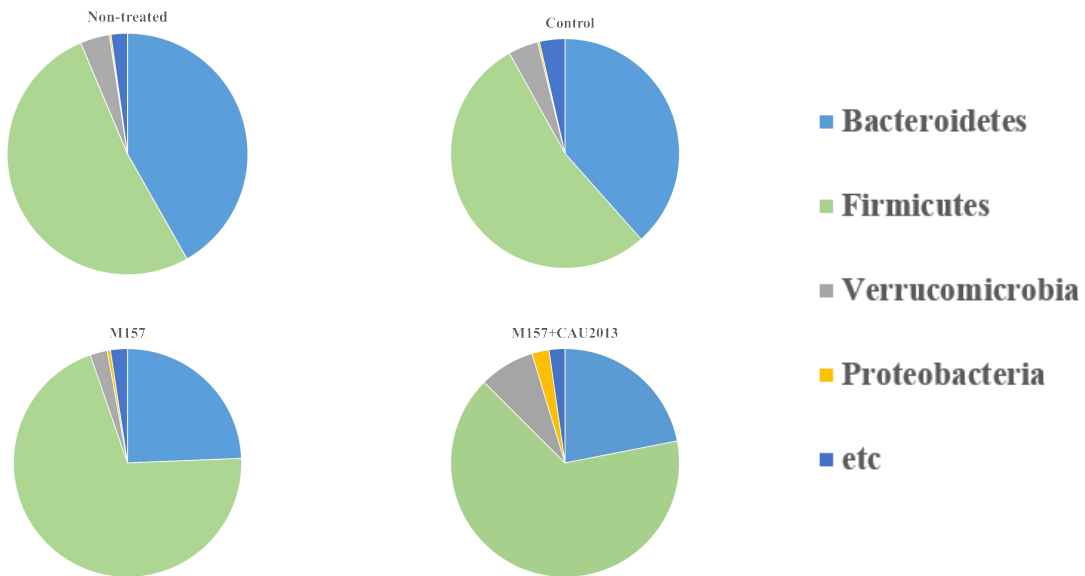


그림 97. Phylum 수준에서 주요 장내 군총의 비율 분석

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, M157 : 치주염 유발 + M157 바이오 컨버전 산물 투여, M157+CAU2013 : 치주염 유발 + M157과 CAU2013 바이오컨버전 산물 투여

다. 이는 non-treated군, control군 대비 M157군, M157+CAU2013군에서 체중 증가율이 높았기 때문에 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율이 높게 관찰되었음.

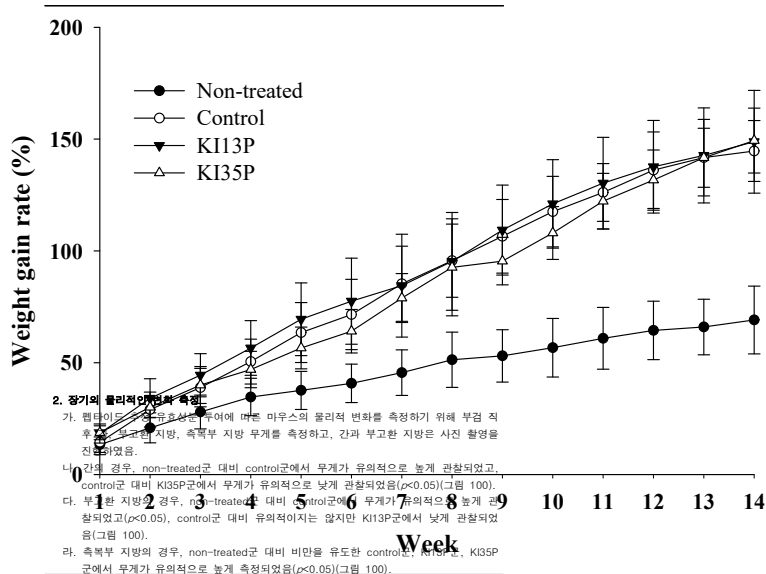
[3차년도] 동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 비만·치주염 억제 원인 유효성분 규명

<동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 원인 유효성분규명>

i. 펩타이드 추정

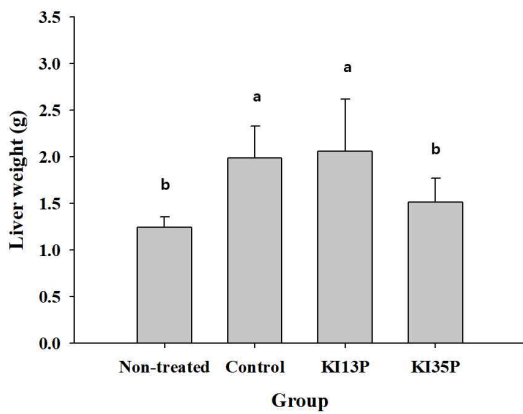
1. 체중 증가율

가. 바이오컨버전 산물 유효성분 급여에 따른 마우스의 체중 감소를 유발하였는지 확인하기 위해 비만 유도 기간 4 주에 이어 경구투여 기간 10 주, 총 14 주의 연구기간 동안 매주 1회씩 일정시간에 체중을 측정하여 체중 변화를 확인하였음. Non-treated군과 비교하였을 때, control군, KI13P군, KI35P군에서 체중 증가율이 높게 관찰되었음 (그림 99).

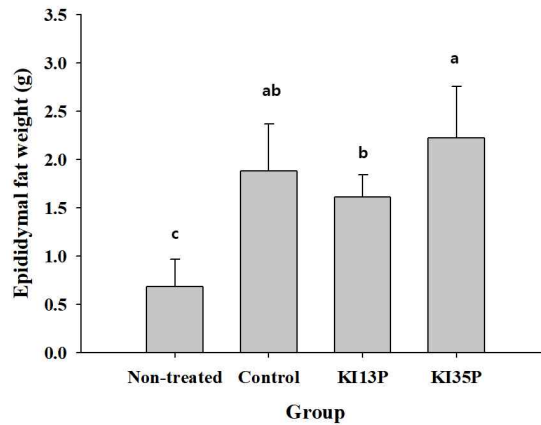




(A) 간



(B) 부고환 지방



(C) 측복부 지방

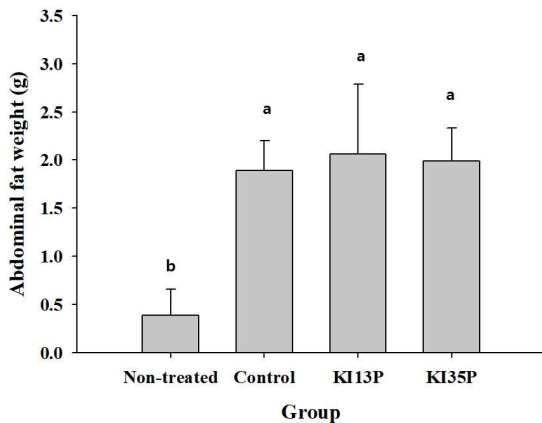


그림 100. 펩타이드 추정 유효성분 투여군 장기 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

마. 간의 육안관찰 결과, non-treated군 대비 control군에서 옅은 황색을 띠며, 엽이 크고, 지방이 관찰되었음. Control군 대비 펩타이드 추정 유효성분 투여군(KI13P, KI35P)에서는 non-treated군의 간과 엽의 크기가 유사하였고 붉은색을 나타내었음(그림 101).

바. 부고환 지방의 육안관찰 결과, non-treated군 대비 control군, KI13P군, KI35P군에서 크게 관찰되었음(그림 101). 따라서 KI13 산물, KI35 산물의 펩타이드 추정 유효성분은 간에서의 지방증 억제 효과를 나타내었지만, 지방의 무게 및 크기 감소에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었음.





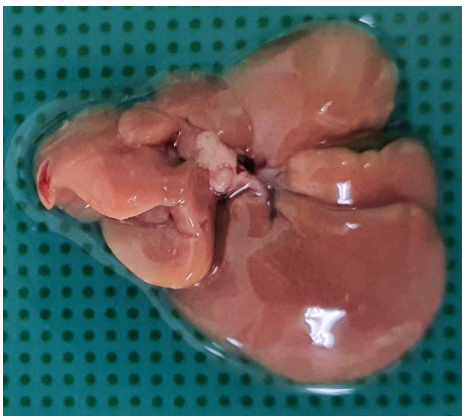

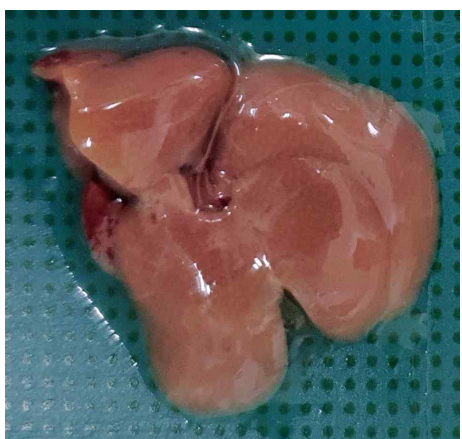

군	장기 및 조직	
	간	부고환 지방
Non-treated		
Control		
KI13P		
KI35P		

그림 101. 간 및 부고환 지방의 육안관찰

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

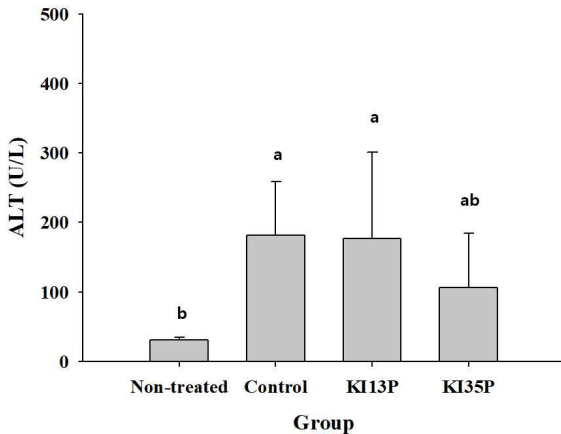
### 3. 혈액 분석

가. 펩타이드 추정 유효성분 투여에 따른 비만 억제 기능성 검증을 위해 마우스의 혈액 분석을 실시하였음. ALT, AST, T-Chol, TG, GLU, HDL, LDL 농도를 확인하였음(그림 102).

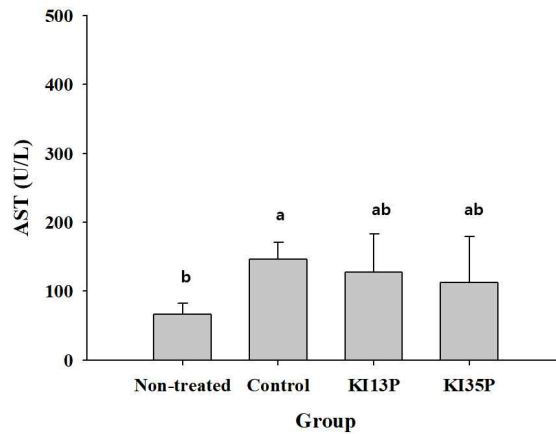
나. 간 지표 분석 결과, ALT의 경우, non-treated군 대비 control군에서 유의적으로 높게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), control군 대비 유의적이지는 않지만 KI35P군에서 낮게 관찰되었음. AST의 경우, non-treated군 대비 control군에서 유의적으로 높게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13P군, KI35P군에서 낮게 관찰되었음(그림 102).

다. 지질 및 혈당 지표 분석 결과, T-cho의 경우, non-treated군 대비 control군에서 유의적으로 높게 측정되었고, control군 대비 KI35P군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). TG의 경우, non-treated군 대비 control군에서 유의적이지는 않지만 낮게 관찰되었음. LDL의 경우, control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13P군, KI35P군에서 낮게 관찰되었음. HDL의 경우, non-treated군 대비 control군, KI13P군에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). GLU의 경우, non-treated군 대비 control군, 펩타이드 추정 유효성분 투여군(KI13P, KI35P)에서 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ )(그림 102).

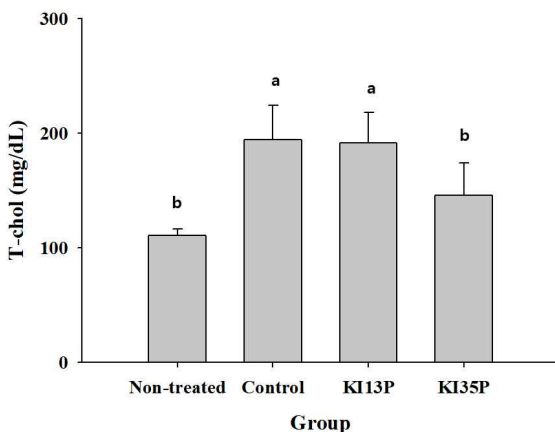
(A) ALT



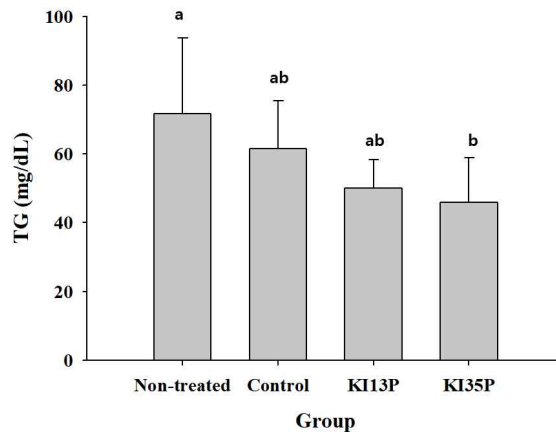
(B) AST



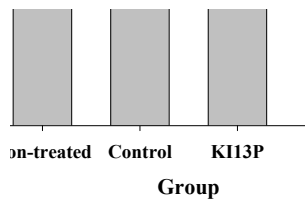
(C) T-cho



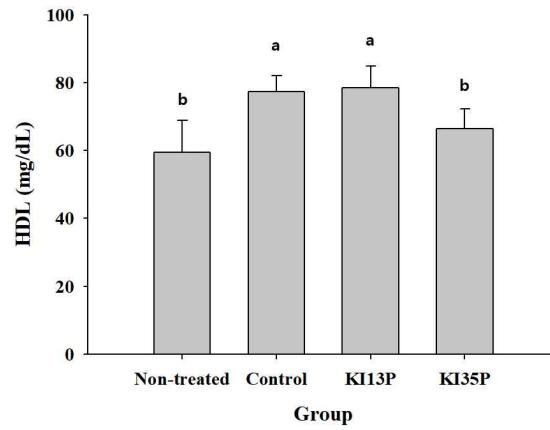
(D) TG



(E) LDL



(F) HDL



(G) GLU

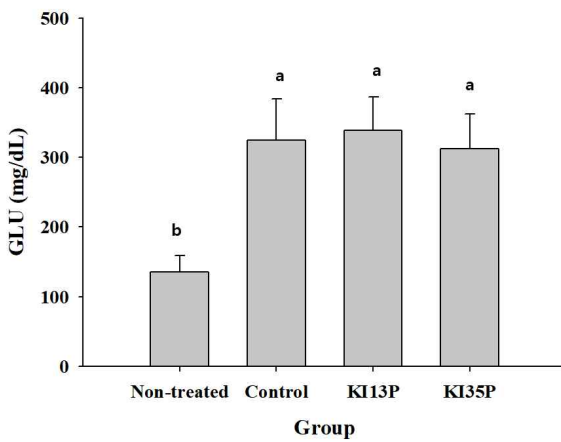


그림 102. 혈액 분석 결과

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

#### 4. 조직병리학적 분석

가. 펩타이드 추정 유효성분의 비만 억제 효과를 확인하기 위해 간조직에서 지방증을 확인하였음.

- 1) 검경 결과, non-treated군 대비 control군의 간조직에서 지방 방울의 크기가 크게 관찰되었고, 지방증 score가 높게 관찰되었음(그림 103).
- 2) Control군 대비 펩타이드 추정 유효성분 투여군(KI13P, KI35P)에서 지방 방울의 크기가 작게 관찰되었고, 지방증 score가 낮게 관찰되었음(그림 103, 표 102). 특히, 조직병리학적 분석 결과, KI35 산물의 펩타이드 추정 유효성분은 비만으로 유도된 간조직의 지방증 억제에 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

표 102. 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간 조직병리 분석결과

군	Non-treated				Control				KI13P			KI35P				
간조직 지방증	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	++	±	++	+	±	+	+	+

-: no lesion, ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked



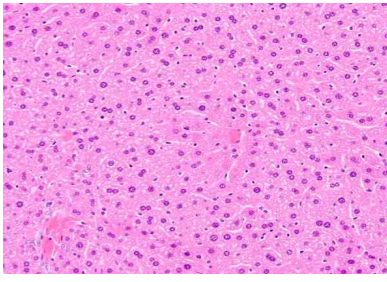
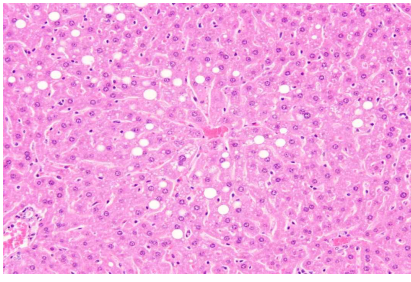
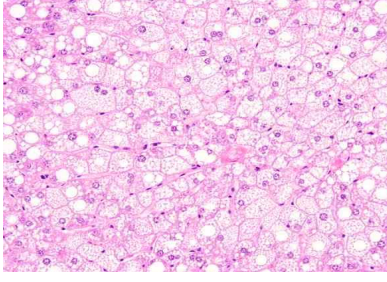
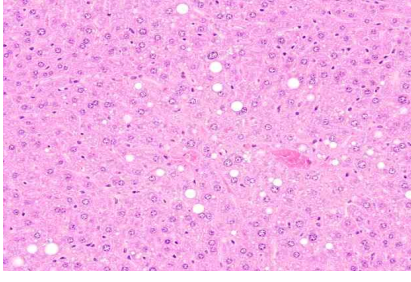
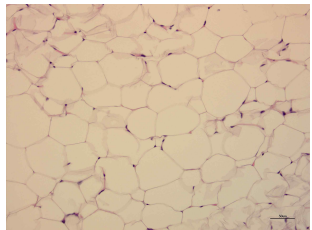
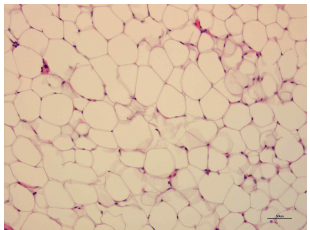
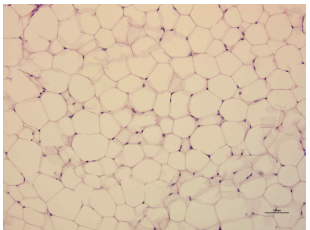
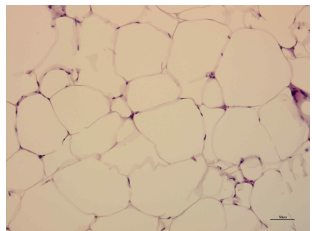
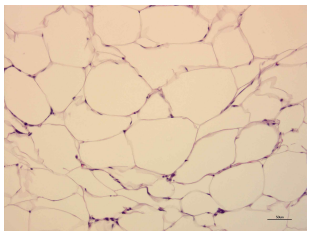
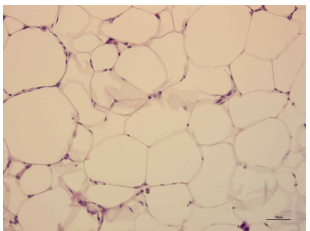
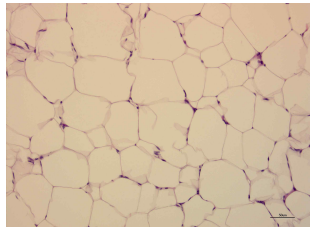
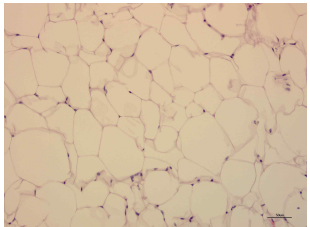
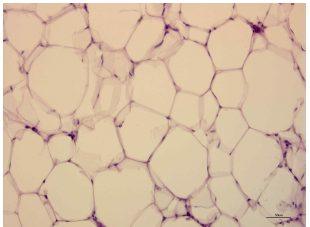
군	간조직 검경 사진	군	간조직 검경 사진
Non-treated		KI13P	
Control		KI35P	

그림 103. 펩타이드 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간세포 검경 사진

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

나. 펩타이드 추정 유효성분의 비만 억제 효과를 확인하기 위해 부고환 지방에서 지방구 크기를 확인하였음.

- 1) 검경 결과, non-treated군 대비 control군에서 지방구의 크기가 크고, 불규칙하게 배열된 것을 확인하였음(그림 104).
- 2) Control군 대비 펩타이드 추정 유효성분 투여군(KI13P, KI35P)에서 지방구의 크기가 다소 작게 관찰되었으나 non-treated군 부고환 지방의 지방구 크기만큼 작게 관찰되지는 않았음(그림 104).

군	부고환 지방의 지방구 검경 사진		
Non-treated			
Control			
KI13P			

KI35P

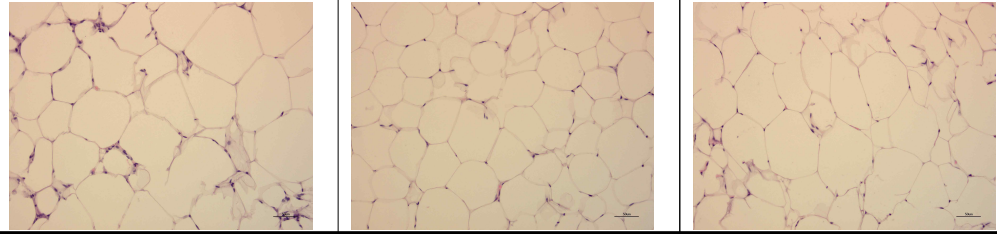


그림 104. 펩타이드 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 부고환 지방 검경 사진

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

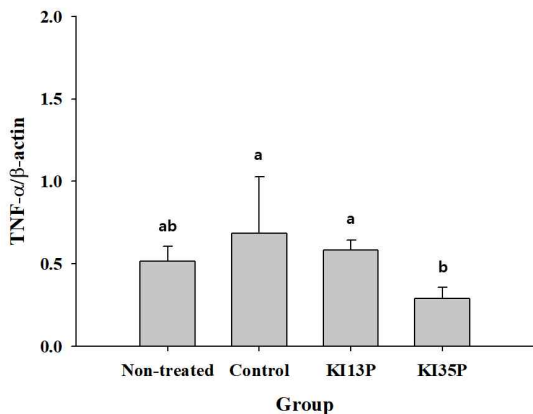
## 5. 비만 및 염증 지표 분석

가. 펩타이드 추정 유효성분의 투여로 인한 간, 부고환 지방 조직의 비만 및 염증 억제 효과를 확인하기 위해 단백질 발현량을 이용하여 염증(TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$ ) 및 비만 지표(SREBP-1, PPAR- $\gamma$ )를 분석하였음.

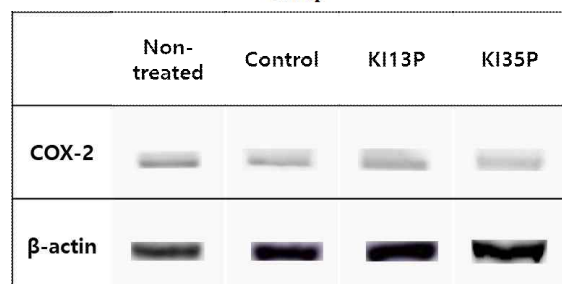
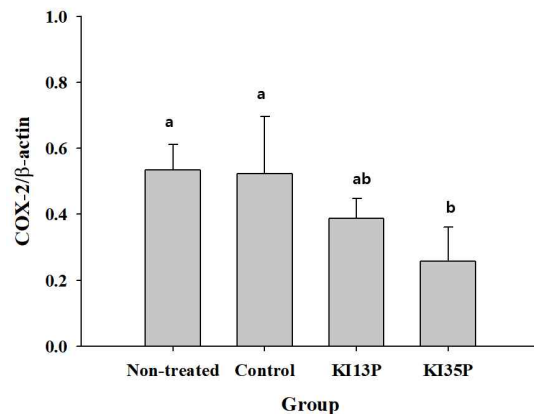
나. 간 조직에서의 염증 및 비만 지표 분석 결과는 다음 그림 105와 같음.

- 1) 전염증 지표 TNF- $\alpha$ , COX-2 분석 결과, control군 대비 KI35P군에서 발현량이 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), KI13P군의 경우, 유의적이지는 않지만 발현량이 낮게 관찰되었음. 전염증 지표 IL-6 분석 결과, control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13P군에서 발현량이 낮게 관찰되었음.
- 2) 지방 합성 지표 SREBP-1 분석 결과, control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13P군에서 발현량이 낮게 관찰되었음. 지방 산화 관련 지표 PPAR- $\gamma$  분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 따라서, 간 조직의 단백질 발현량 분석 결과, KI13, KI35 산물의 펩타이드 추정 유효성분은 비만으로 유도된 간 염증과 간의 지방증을 다소 억제하는 것으로 관찰되었음.

(A) TNF- $\alpha$

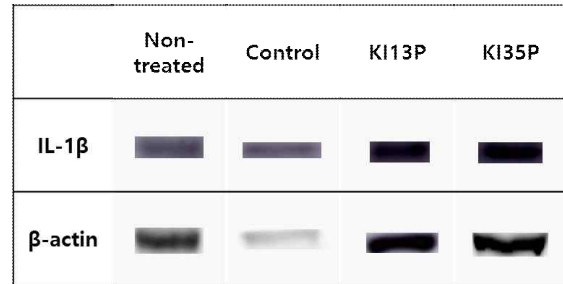
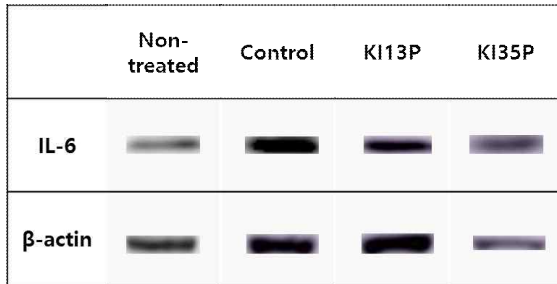
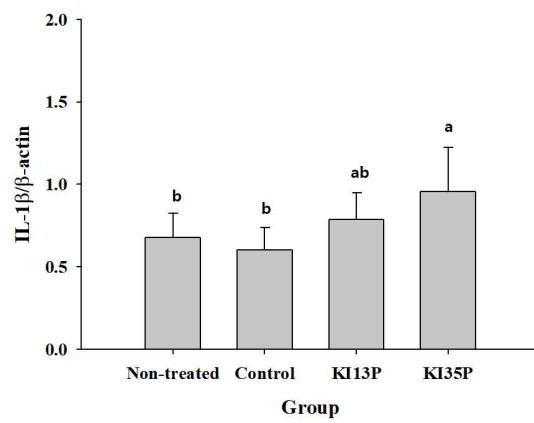
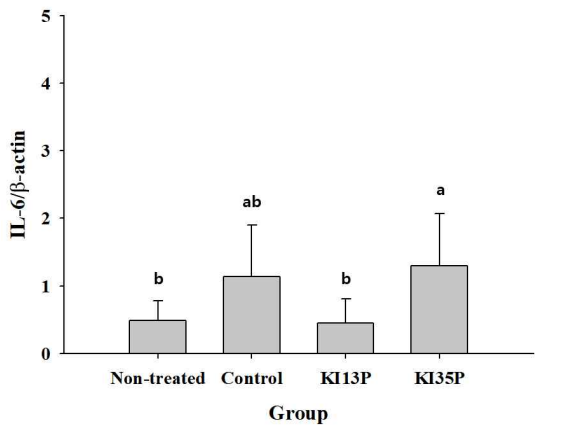


(B) COX-2



(C) IL-6

(D) IL-1 $\beta$



(E) SREBP-1

(F) PPAR-γ

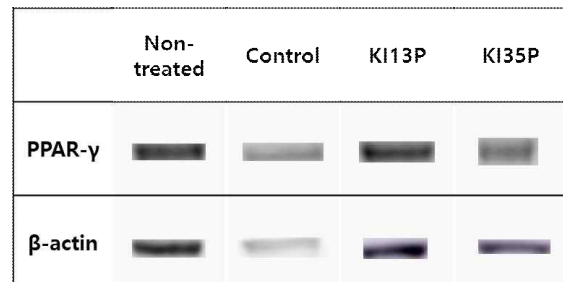
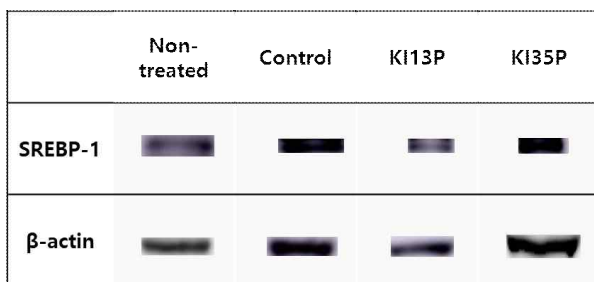
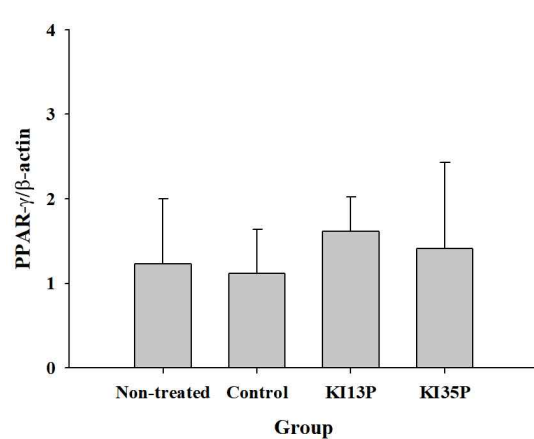
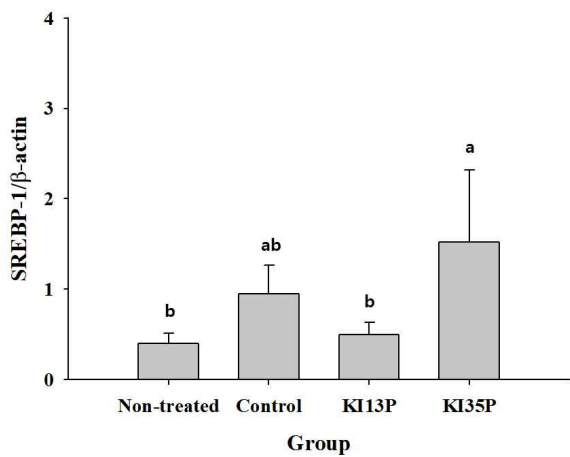


그림 105. 펩타이드 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간에서의 단백질 발현량 분석

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

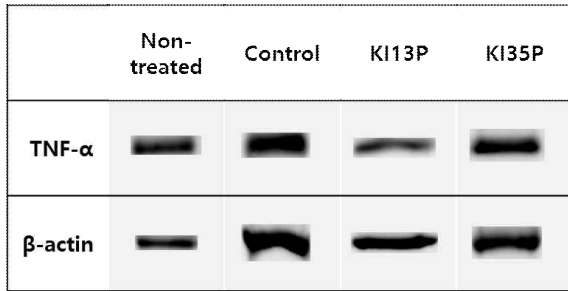
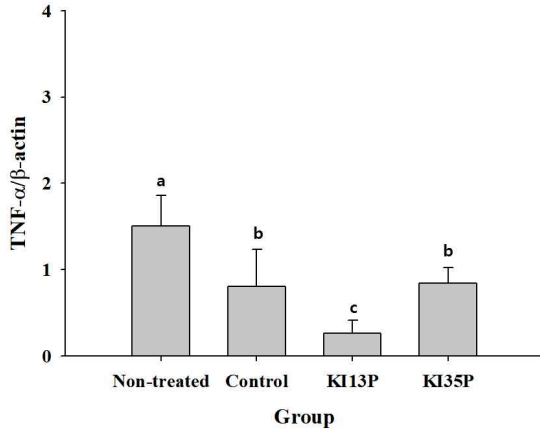
다. 부고환 지방 조직에서의 염증 및 비만 지표 분석 결과는 다음 그림 106과 같음.

- 1) 전염증 지표 TNF- $\alpha$  분석 결과, control군 대비 KI13P군에서 유의적으로 발현량이 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 전염증 지표 IL-6 분석 결과, control군 대비 KI13P군과 KI35P군에서 유의적으로 발현량이 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 전염증 지표 IL-1 $\beta$

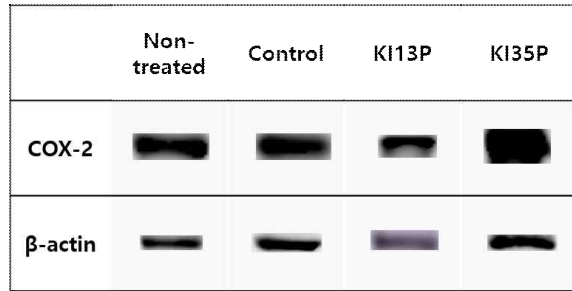
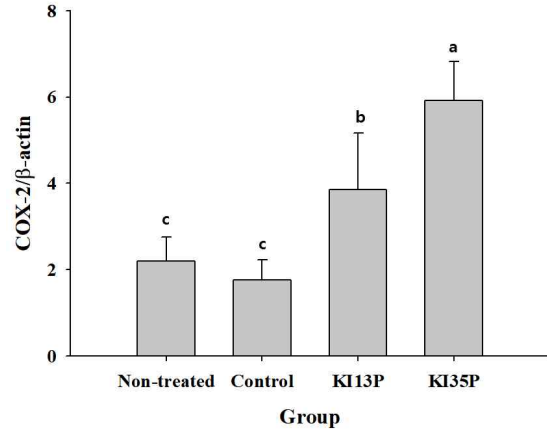
분석 결과, control군 대비 KI13P군에서 유의적으로 발현량이 낮게 관찰되었고 ( $p < 0.05$ ), KI35P군에서 유의하지는 않지만 발현량이 낮게 관찰되었음.

2) 지방 합성 지표 SREBP-1 분석 결과, control군 대비 KI13P군에서 유의적으로 낮게 ( $p < 0.05$ ), KI35P군에서 유의적이지는 않지만 발현량이 낮게 관찰되었음. 지방 산화 관련 지표 PPAR- $\gamma$  분석 결과, control군 대비 KI13P군에서 발현량이 유의하지는 않지만 낮게 나타났음. 따라서, 부고환 지방 조직의 단백질 발현량 분석 결과, KI13, KI35 산물의 펩타이드 추정 유효성분은 지방 조직의 염증 및 비만 억제에 다소 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

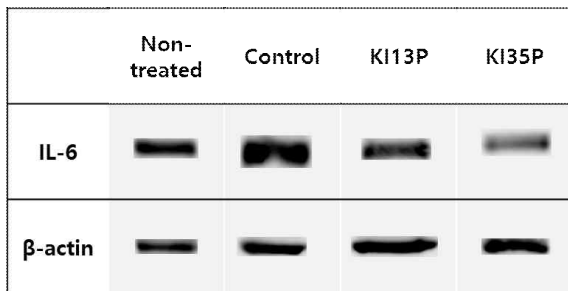
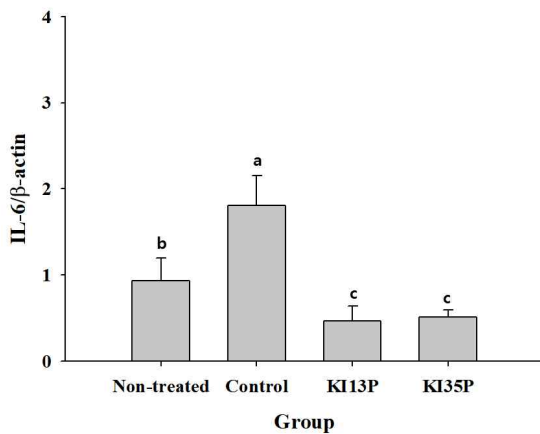
(A) TNF- $\alpha$



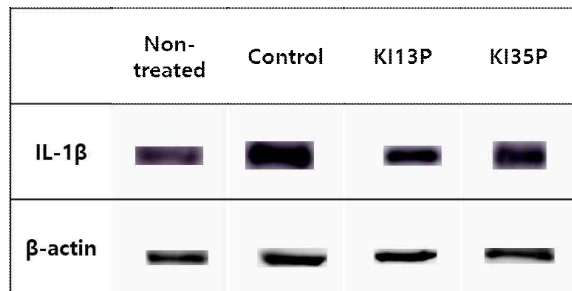
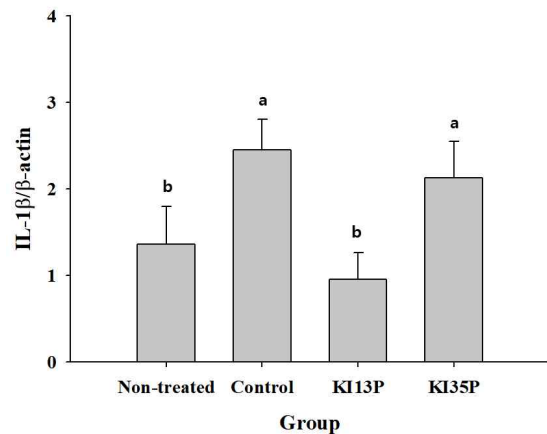
(B) COX-2



(C) IL-6

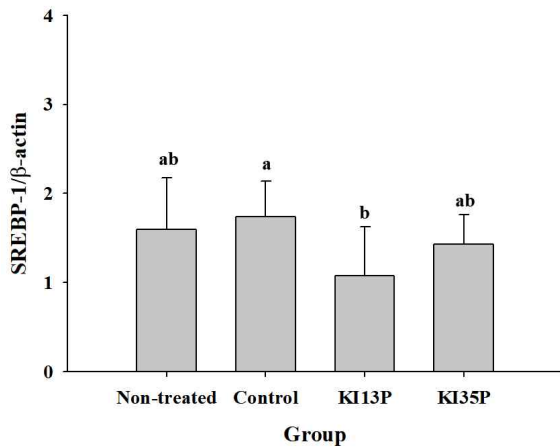


(D) IL-1 $\beta$





(E) SREBP-1



(F) PPAR-γ

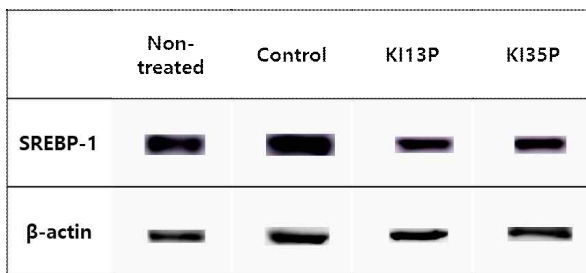
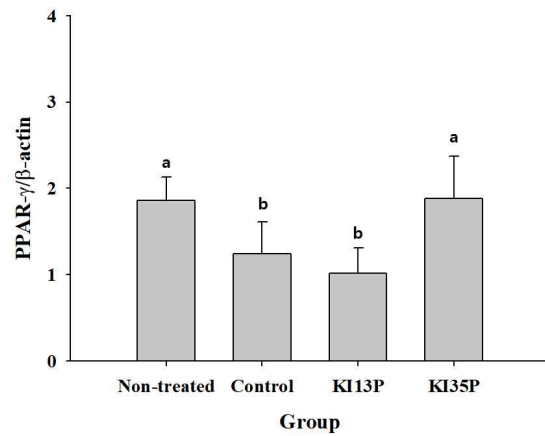


그림 106. 펩타이드 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 부고환 지방에서의 단백질 발현량 분석

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13P : 고지방식이 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35P : 고지방식이 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## ii. 유기산 및 당 추정

### 1. 체중 증가율

가. 바이오컨버전 산물 유효성분 급여에 따른 마우스의 체중 감소를 유발하였는지 확인하기 위해 비만 유도 기간 4 주에 이어 경구투여 기간 10 주, 총 14 주의 연구기간 동안 매주 1회씩 일정시간에 체중을 측정하여 체중 변화를 확인하였음. 14 주차 체중 증가율의 경우, control군(159.7%)과 비교하였을 때, KI13A군(150.7%), KI13B군(146.6%), KI35A군(157.9%)에서 체중 증가율이 낮게 관찰되었음(그림 107).

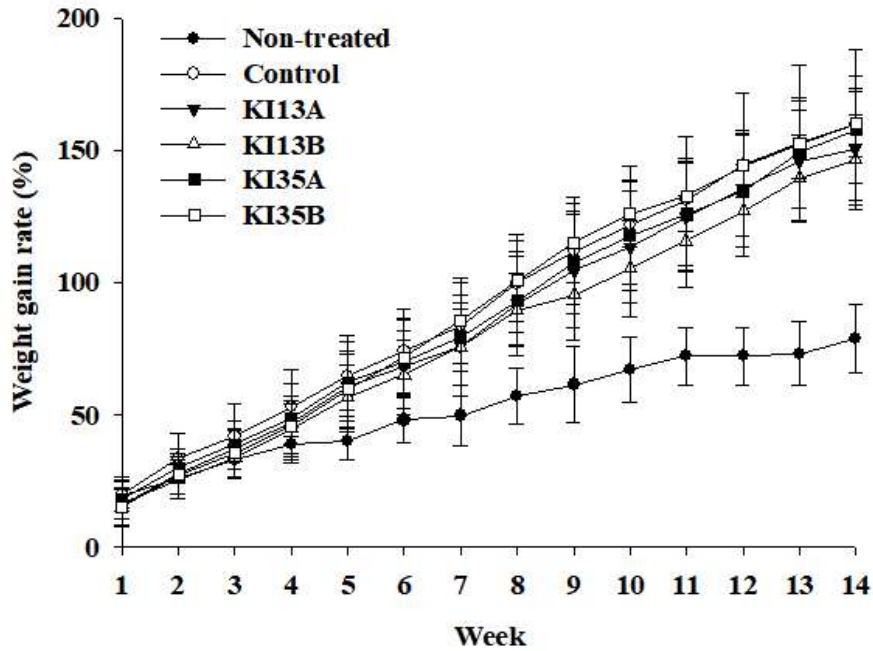


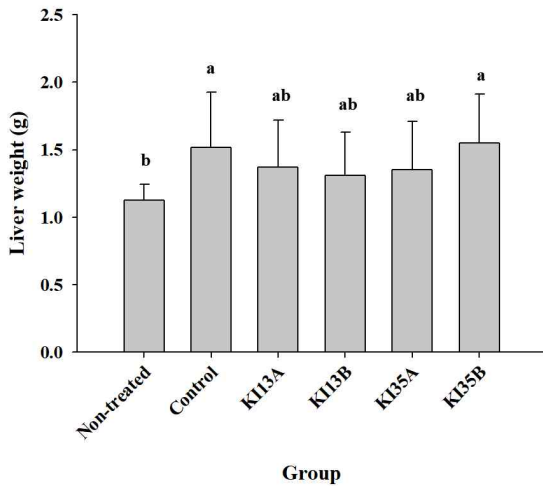
그림 107. 유기산 및 당 추정 유효성분 투여군 체중 증가율

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

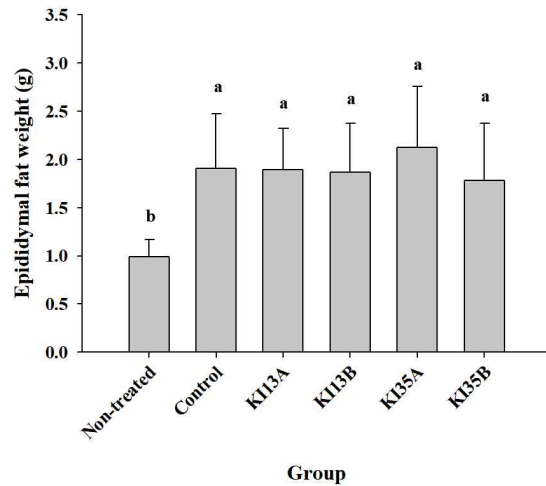
## 2. 장기의 물리적인 변화 측정

- 가. 유기산 및 당 추정 유효성분 투여에 따른 마우스의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직후 간, 부고환 지방, 측복부 지방 무게를 측정하고 간과 부고환 지방은 사진 촬영을 진행하였음.
- 나. 간의 경우, non-treated군 대비 control군에서 무게가 유의적으로 높게 관찰되었음 ( $p < 0.05$ ), control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13A군, KI13B군, KI35A군에서 무게가 낮게 관찰되었음(그림 108).
- 다. 부고환 지방의 경우, non-treated군 대비 control군에서 무게가 유의적으로 높게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), control군 대비 유의적이지는 않지만 KI35B군에서 낮게 관찰되었음(그림 108).
- 라. 측복부 지방의 경우, non-treated군 대비 control군에서 무게가 유의적으로 높게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), control군 대비 KI35B에서 무게가 유의적으로 높게 관찰되었음 ( $p < 0.05$ )(그림 108).

(A) 간



(B) 부고환 지방



(C) 측복부 지방

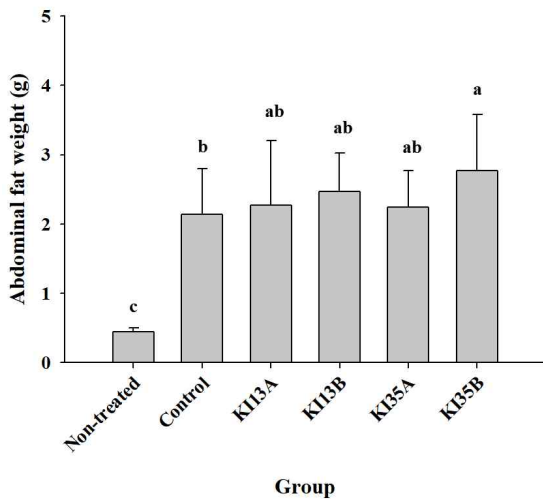


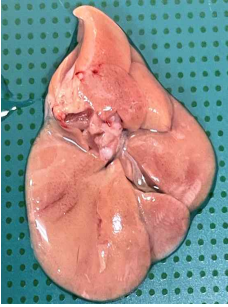

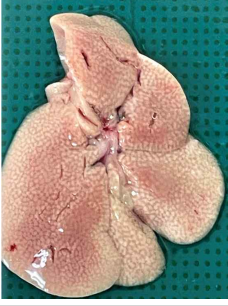






그림 108. 유기산 및 당 추정 유효성분 투여군 장기 무게

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

마. 간의 육안관찰 결과, non-treated군 대비 control군에서 옅은 황색을 띠며, 엽의 크기가 크고, 지방이 관찰되었음. Control군 대비 유기산 및 당 추정 유효성분 투여군(KI13A, KI13B, KI35A, KI35B)에서는 선홍색을 나타내었으나 지방이 관찰되었고 non-treated군의 간과 유사하게 관찰되지는 않았음(그림 109).

바. 부고환 지방의 육안관찰 결과, non-treated군 대비 control군, 유기산 및 당 추정 유효성분 투여군(KI13A, KI13B, KI35A, KI35B)에서 크게 관찰되었음(그림 109).

군	장기 및 조직	
	간	부고환 지방
Non-treated		
Control		
KI13A		
KI13B		
KI35A		
KI35B		

### 그림 109. 간 및 부고환 지방의 육안관찰

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

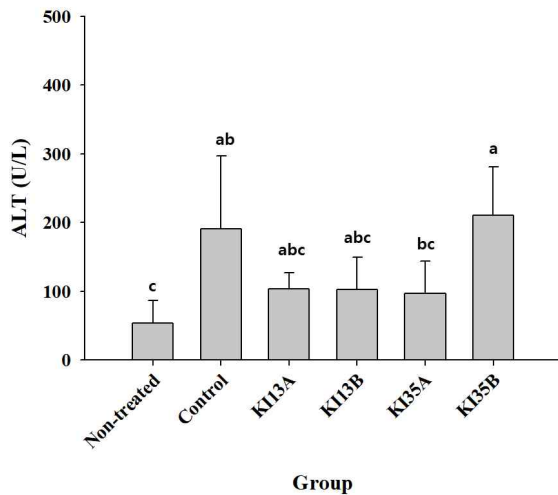
### 3. 혈액 분석

가. 유기산 및 당 추정 유효성분 투여에 따른 비만 억제 기능성 검증을 위해 마우스의 혈액 분석을 실시하였음. ALT, AST, T-Chol, TG, GLU, HDL, LDL 농도를 확인하였음 (그림 110).

나. 간 지표 분석 결과, ALT의 경우, non-treated군 대비 control군에서 유의적으로 높게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13A군, KI13B군, KI35A군에서 낮게 관찰되었음. AST의 경우, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음.

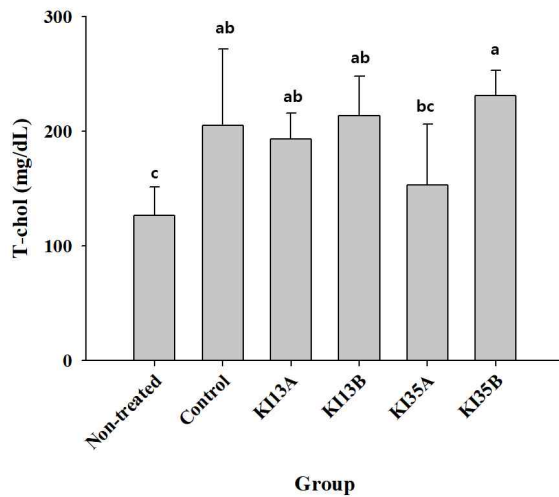
다. 지질 및 혈당 지표 분석 결과, T-chol의 경우, control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13A군, KI35A군에서 낮게 관찰되었음. TG의 경우, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. LDL의 경우, control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13A군에서 낮게 관찰되었고, 유의적으로 KI35A군에서 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). HDL의 경우, non-treated군 대비 모든 그룹에서 높게 관찰되었음. GLU의 경우, control군 대비 유의적이지는 않지만 유기산 및 당 추정 유효성분 투여군(KI13A, KI13B, KI35A, KI35B)에서 낮게 관찰되었음.

(A) ALT



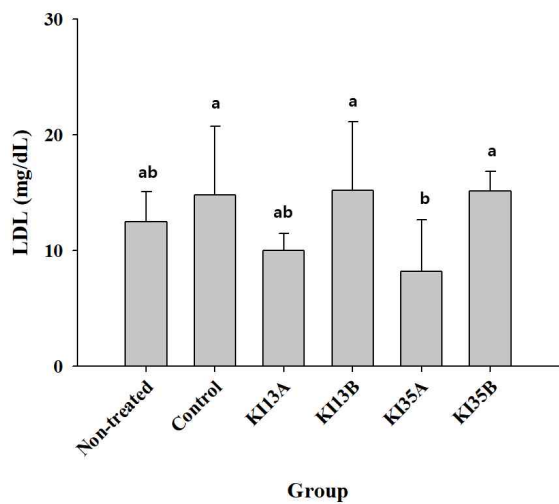
(B) AST

(C) T-chol

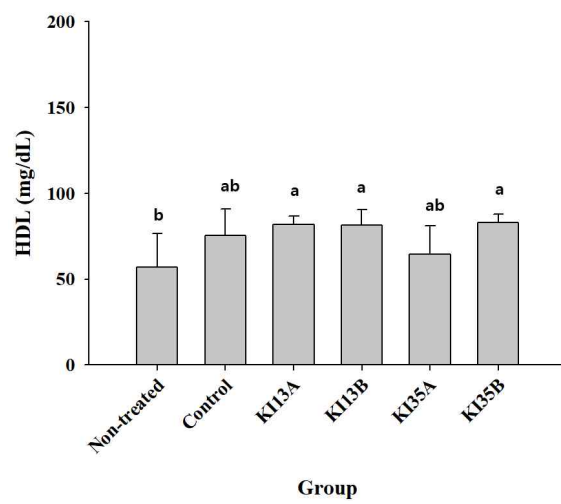


(D) TG

(E) LDL



(F) HDL



(G) GLU

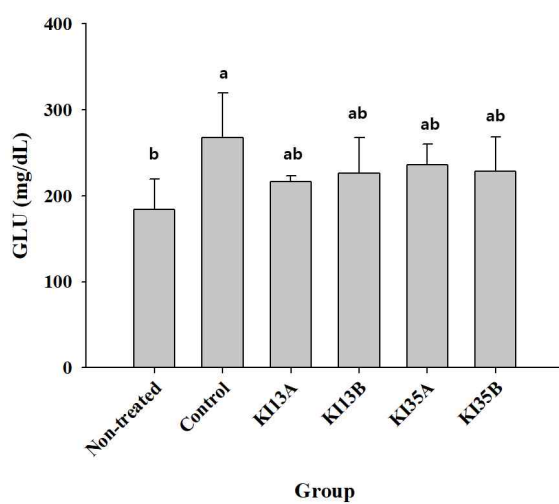


그림 110. 혈액 분석 결과

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



#### 4. 조직병리학적 분석

가. 유기산 및 당 추정 유효성분의 비만억제 효과를 확인하기 위해 간조직에서 지방증을 확인하였음.

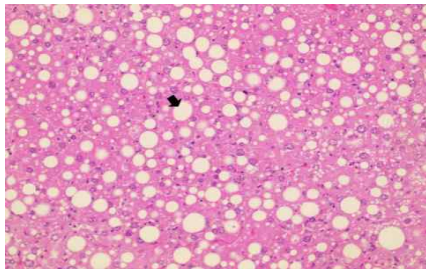
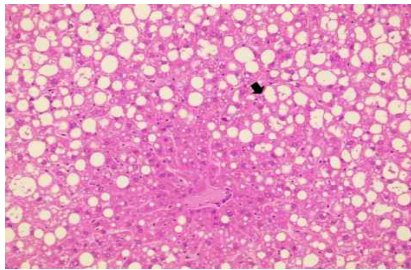
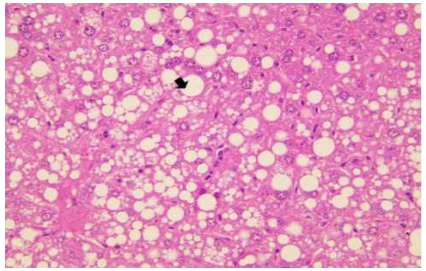
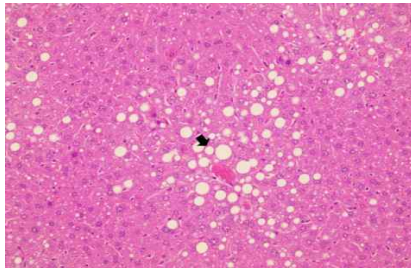
- 1) 검경 결과, non-treated군 대비 control군의 간조직에서 지방 방울의 크기가 크게 관찰되었고, 지방증 score가 높게 관찰되었음(그림 111).
- 2) Control군 대비 유기산 및 당 추정 유효성분 투여군(KI13A, KI13B, KI35A, KI35B)에서 지방 방울의 크기가 다소 작게 관찰되었음(그림 111). 특히, control군 대비 KI35A군에서 지방증 score가 낮게 관찰되었음(표 103). 따라서, 조직병리학적 분석 결과, KI35 산물의 유기산 및 당 추정 유효성분은 비만으로 유도된 간조직의 지방증 억제에 다소 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

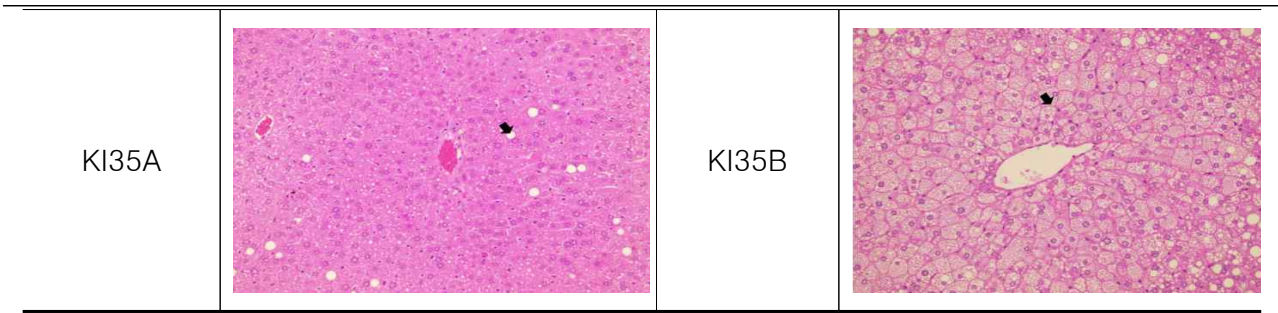
표 103. 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간세포 조직병리 분석결과

군	Non-treated				Control				KI13A				KI13B			
간세포 지방증	±	+++ +	+++	±	+++	+++	+++	+++ +	++	++	+++	+	+	++	+	+++
군	KI35A				KI35B											
간세포 지방증	++	+	++	+	+++ +	+	+++	++								

-: no lesion, ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked, ++++: severe

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

군	간세포 검경 사진	군	간세포 검경 사진
Non-treated		Control	
KI13A		KI13B	

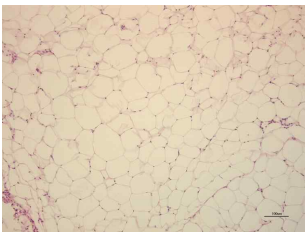
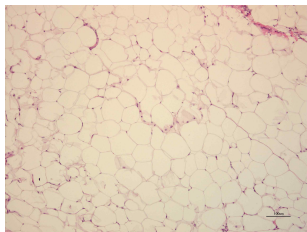
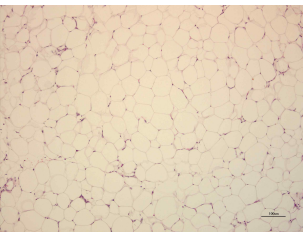
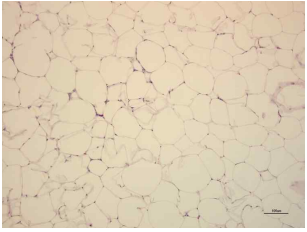
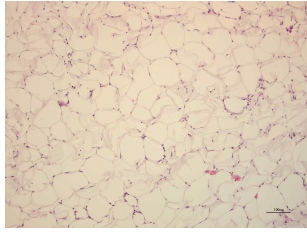
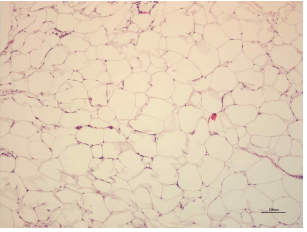
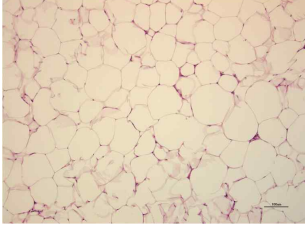
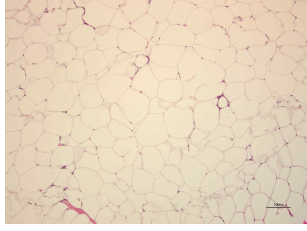
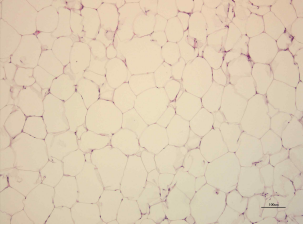
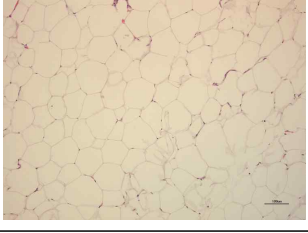
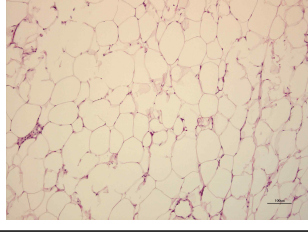
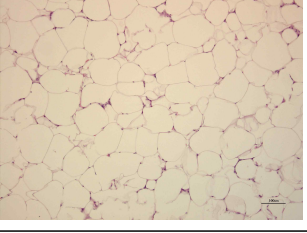


**그림 111. 유기산 및 당 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간세포 검경 사진**

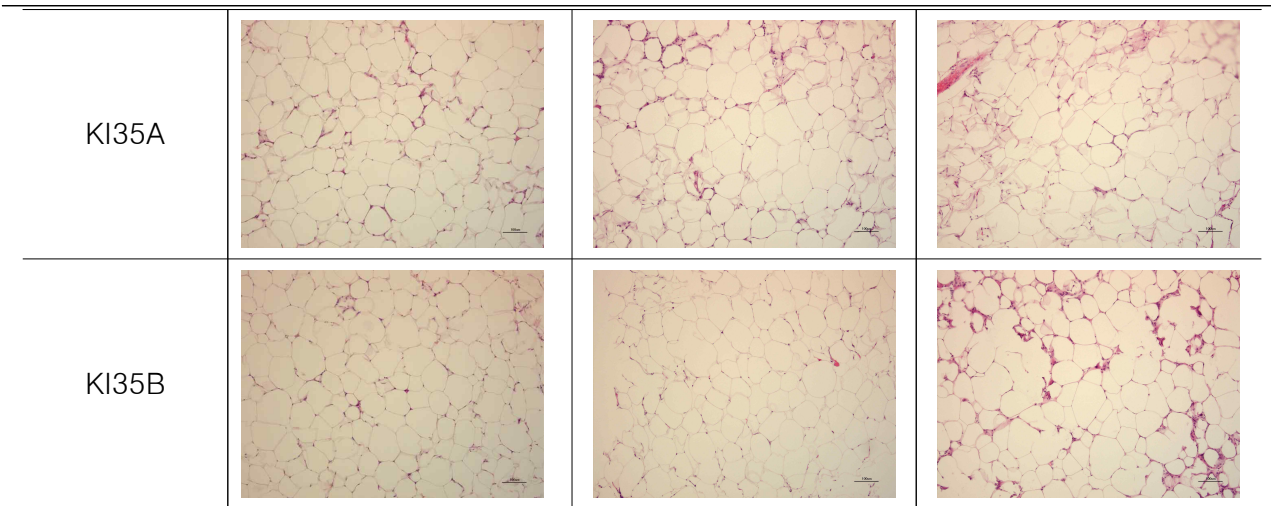
Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

나. 유기산 및 당 추정 유효성분의 비만억제 효과를 확인하기 위해 부고환 지방의 지방구 크기를 확인하였음.

1) 검경 결과, 모든 군에서 부고환 지방의 지방구 크기가 비슷하게 관찰되었음(그림 112).

군	부고환 지방의 지방구 검경 사진		
Non-treated			
Control			
KI13A			
KI13B			





**그림 112. 유기산 및 당 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 부고환 지방 검경 사진**

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

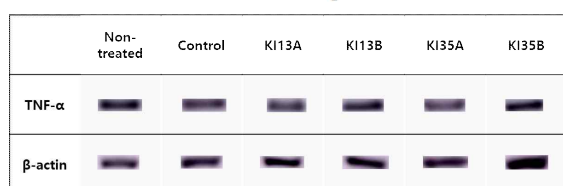
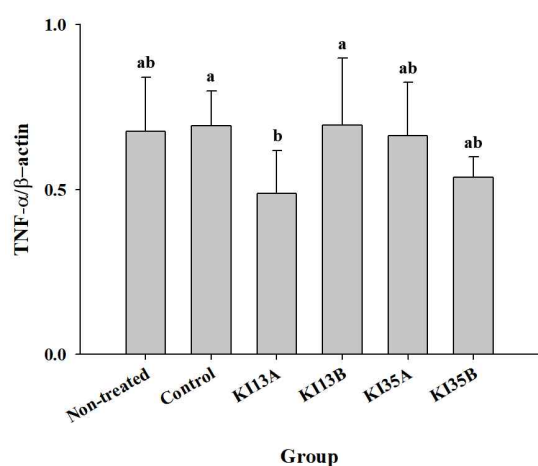
## 5. 비만 및 염증 지표 분석

가. 유기산 및 당 추정 유효성분의 투여로 인한 간, 부고환 지방 조직의 비만 및 염증 억제 효과를 확인하기 위해 단백질 발현량을 이용하여 염증(TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$ ) 및 비만 지표(SREBP-1, PPAR- $\gamma$ )를 분석하였음.

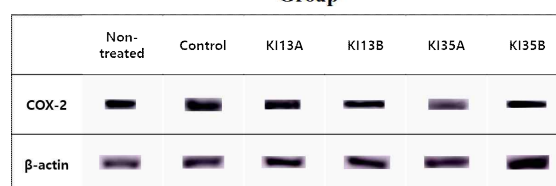
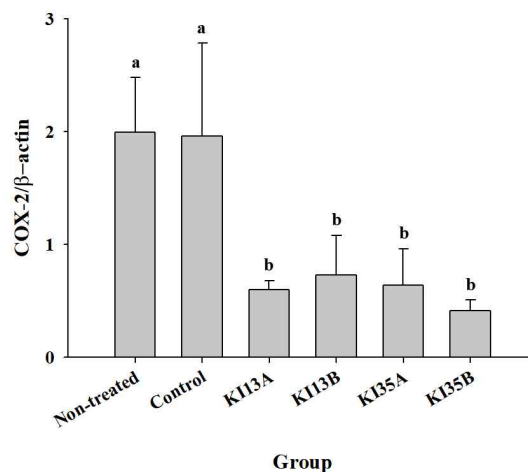
나. 간 조직에서의 염증 및 비만 지표 분석 결과는 다음 그림 113과 같음.

- 1) 전염증 지표 TNF- $\alpha$  분석 결과, control군 대비 KI13A군에서 발현량이 유의적으로 낮게 관찰되었고( $p < 0.05$ ), KI35B군의 경우, 유의적이지는 않지만 발현량이 낮게 관찰되었음. 전염증 지표 COX-2 분석 결과, control군 대비 유효성분 투여군에서 발현량이 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 전염증 지표 IL-6의 경우, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 전염증 지표 IL-1 $\beta$  분석 결과, control군 대비 KI35A, KI35B군에서 유의적이지는 않지만 발현량이 낮게 관찰되었음.
- 2) 지방 합성 지표 SREBP-1 분석 결과, control군 대비 KI13A, KI35B군에서 유의하게 발현량이 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 지방 산화 관련 지표 PPAR- $\gamma$  분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 따라서, 간 조직의 단백질 발현량 분석 결과, KI35 산물의 유기산 및 당 추정 유효성분은 비만으로 유도된 간세포의 염증 억제 및 지방 합성의 감소에 다소 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

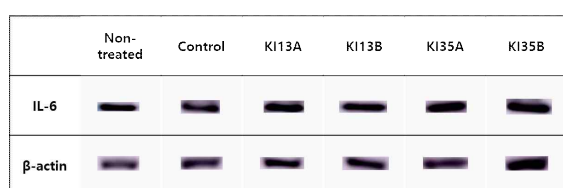
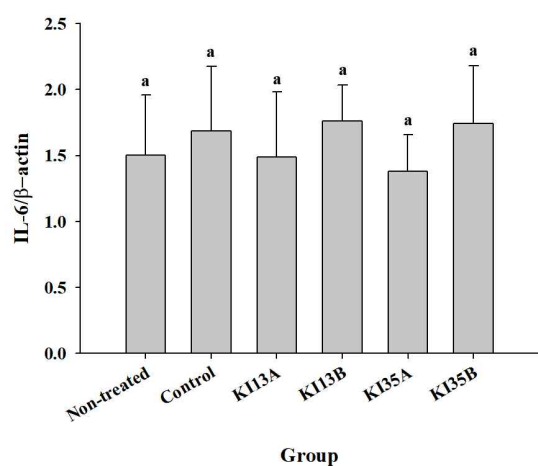
(A) TNF- $\alpha$



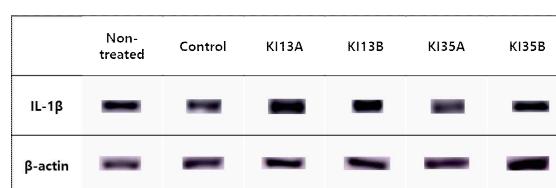
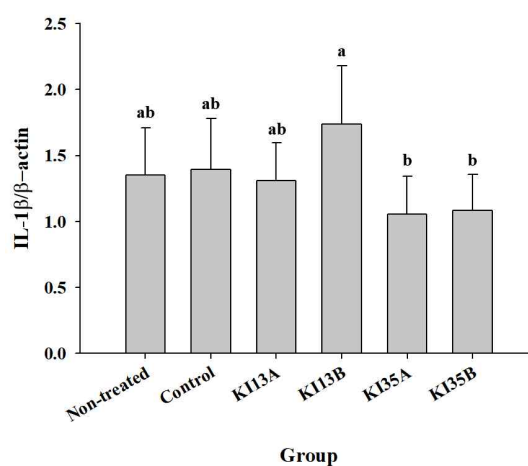
(B) COX-2



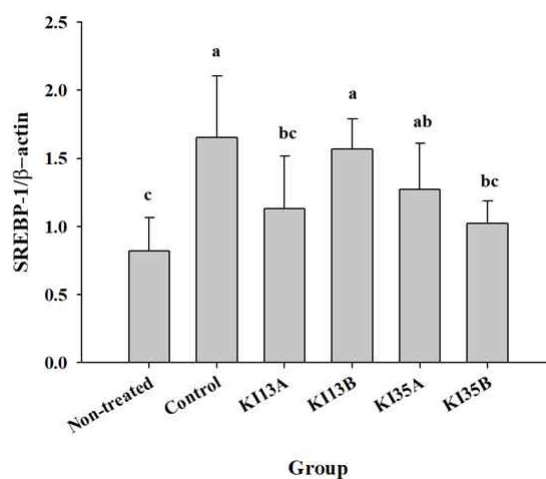
(C) IL-6



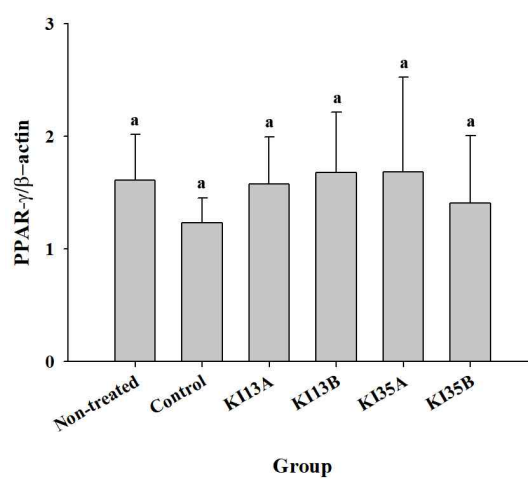
(D) IL-1 $\beta$



(E) SREBP-1



(F) PPAR- $\gamma$



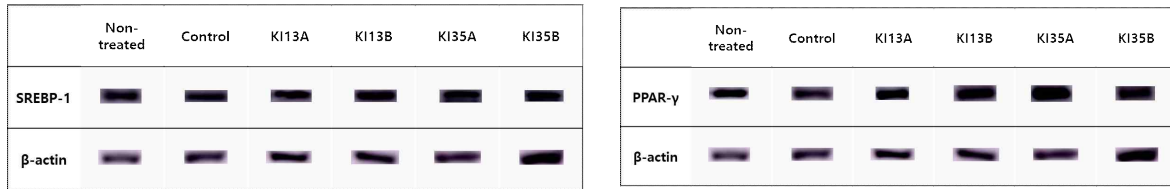


그림 113. 유기산 및 당 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 간에서의 단백질 발현량 분석

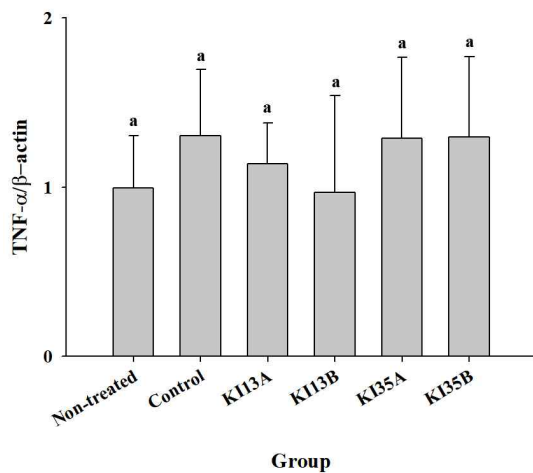
Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

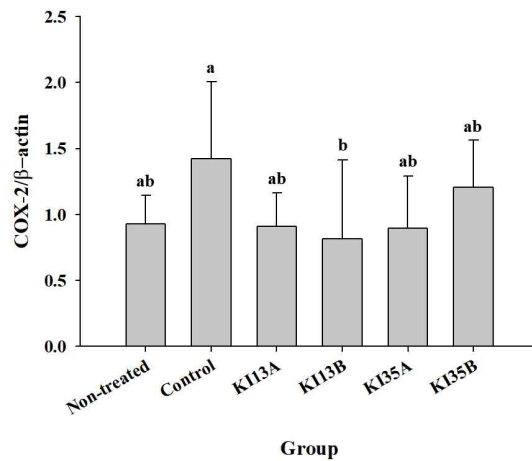
다. 부고환 지방 조직에서의 염증 및 비만 지표 분석 결과는 다음 그림 114와 같음.

- 1) 전염증 지표 TNF- $\alpha$  분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 전염증 지표 COX-2 분석 결과, control군 대비 KI13B군에서 발현량이 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). IL-6 분석 결과, control군 대비 KI13A군과 KI13B군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). 전염증 지표 IL-1 $\beta$  분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음.
- 2) 지방 합성 지표 SREBP-1 분석 결과, control군 대비 유의적이지는 않지만 KI13A군, KI13B군, KI35B군에서 낮게 관찰되었음. PPAR- $\gamma$  분석 결과, control군과 KI13A군, KI13B군, KI35A군, KI35B군 사이에서 유의적인 차이를 보이지 않았음. 따라서, 부고환 지방 조직의 단백질 발현량 분석 결과, KI13 산물의 유기산 및 당 추정 유효성분은 지방 조직의 염증 및 비만 억제에 다소 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

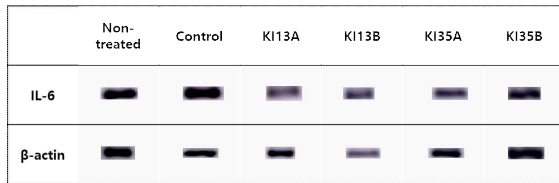
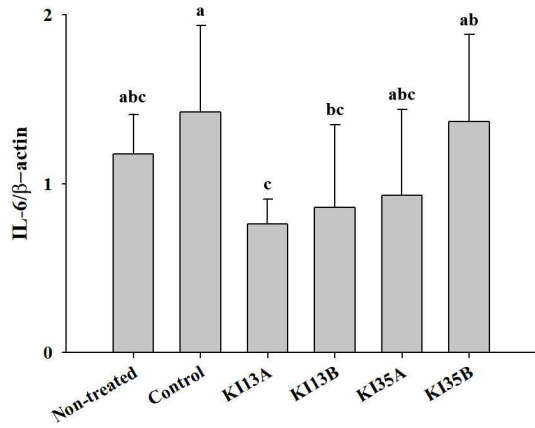
(A) TNF- $\alpha$



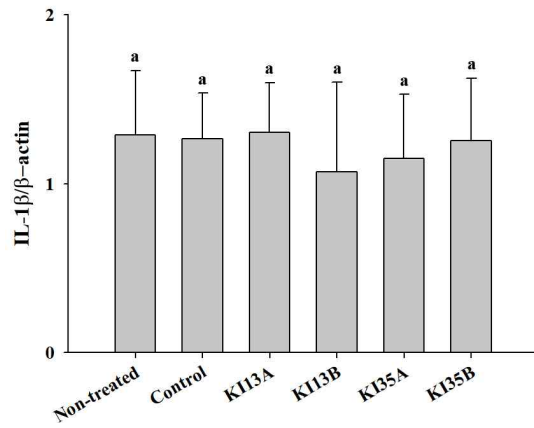
(B) COX-2



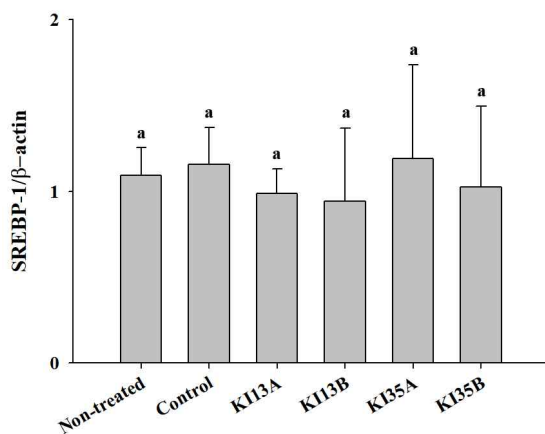
(C) IL-6



(D) IL-1β



(E) SREBP-1



(F) PPAR-γ

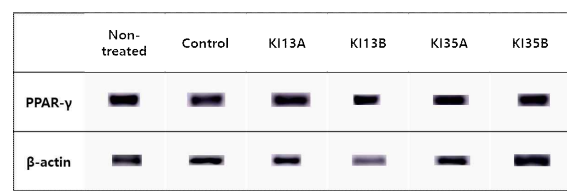
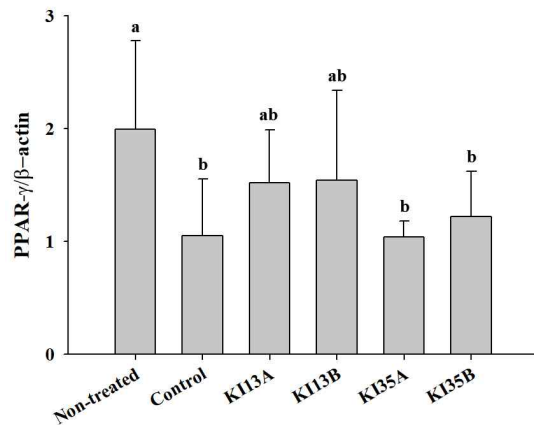


그림 114. 유기산 및 당 추정 유효성분의 비만 억제 기능성 검증을 위한 경구투여 마우스 부고환 지방에서의 단백질 발현량 분석

Non-treated : 일반식이 + PBS 투여, Control : 고지방식이 + PBS 투여, KI13A : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI13B : 고지방식이 + KI13 유효성분 1 kDa 미만 + KI13 유효성분 1-3 kDa 투여, KI35A : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 투여, KI35B : 고지방식이 + KI35 유효성분 1 kDa 미만 + KI35 유효성분 3-5 kDa 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## <동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 치주염 억제 원인 유효성분 규명>

### 1. 체중 증가율 및 장기 무게

가. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 랫드 체중의 변화를 확인하기 위해 치주염 유

발 2 주와 경구 투여 기간 8 주, 총 10 주의 연구 기간 동안 매주 1회 일정시간에 체중을 측정하여 체중 변화를 확인하였음. 측정 결과는 다음 그림 115와 같음. 연구 기간동안 모든 군의 체중 증가율에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았음.

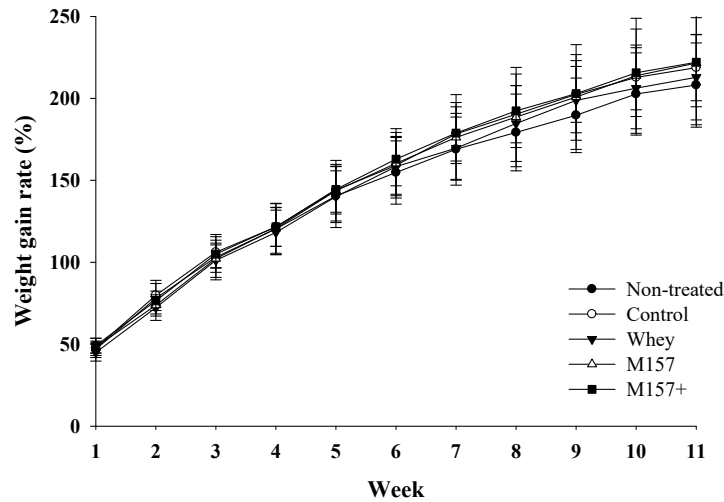
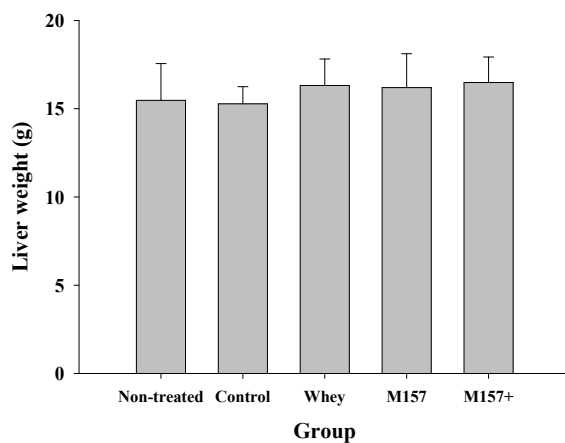


그림 115. 체중 증가율

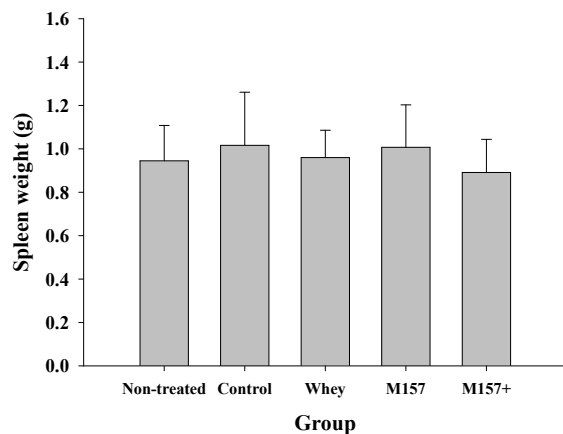
Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey  
M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물 투여

나. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 랫드의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직후 간, 비장, 신장의 무게를 측정하였고, 소장 및 대장의 길이를 측정하였음. 측정 결과는 다음 그림 116과 같음. 간, 신장, 비장의 무게와 소장, 대장의 길이는 모든 군에서 유의차가 발견되지 않았음.

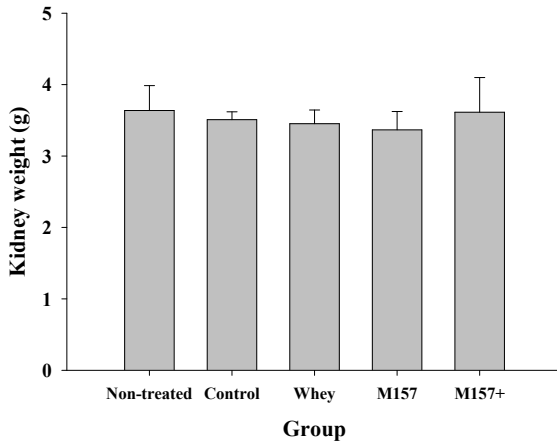
(A) 간



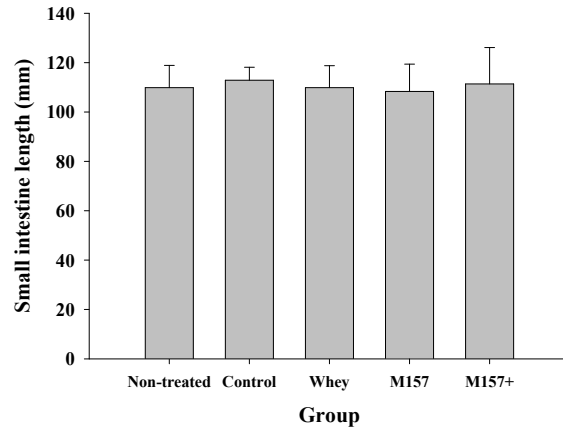
(B) 비장



(C) 신장



(D) 소장



(E) 대장

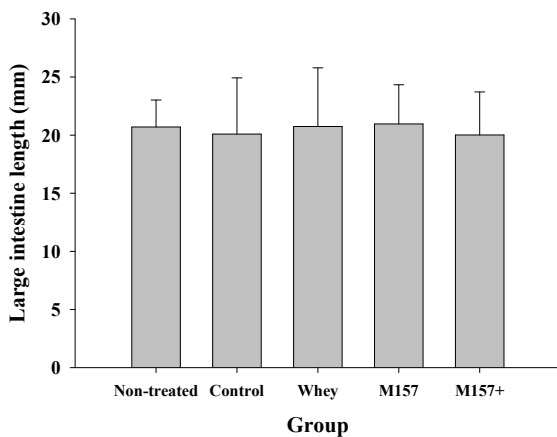


그림 116. 장기 무게 및 길이

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey M157 : 치주염 유발 + M157 바이오킴버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오킴버전 산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## 2. Micro-CT 분석

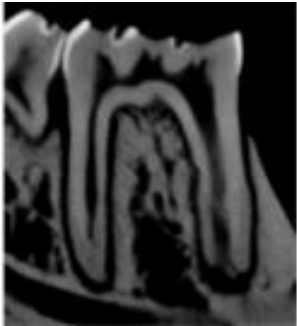
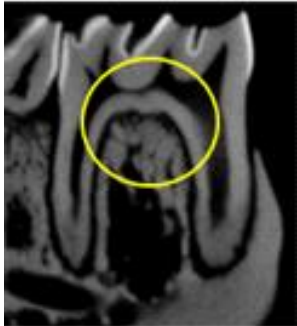
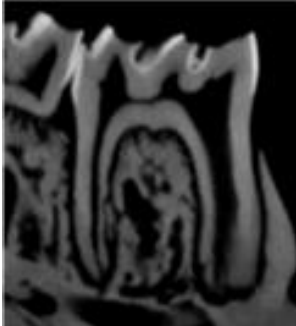


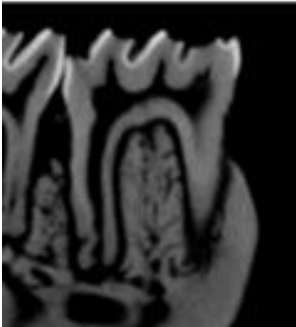
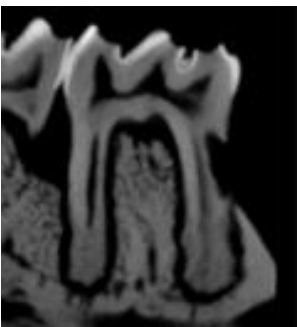

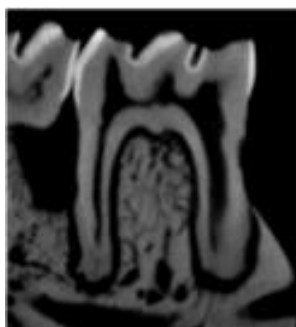
가. 총 부피 당 골 부피(BV/TV) 분석 결과, control군 대비 non-treated군, M157+군에서 유의적으로 높게 측정되었음( $p < 0.05$ ). BV/TV 수치의 경우, 높을수록 피질골의 양이 많음을 의미함. 골 부피 당 표면적(BS/BV) 분석 결과, control군 대비 non-treated군, M157군, M157+군에서 유의적으로 낮게 측정되었음( $p < 0.05$ ). BS/BV 수치의 경우, 높을수록 소주골의 양이 많음을 의미함. 골 소실 부피(bone loss volume) 분석 결과, control군 대비 non-treated군, M157+군에서 유의적으로 낮게 측정되었음( $p < 0.05$ )(표 104, 그림 117).

표 104. 치주 조직 micro-CT 분석 결과

군	Bone volume /Total volume(%)	Bone surface /Bone volume (1/mm)	Bone loss volume (mm <sup>3</sup> )
Non-treated	81.730±7.623*	12.134±1.177*	0.067±0.028*
Control	52.819±2.268	19.996±1.873	0.170±0.008
Whey	56.733±5.668	20.094±1.525	0.156±0.020
M157	58.389±5.142	16.512±3.452*	0.150±0.018
M157+	63.677±6.357*	15.463±2.555*	0.131±0.023*

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey  
M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물 투여

\*Statistically significant compared to control group by pairwise t-test( $p < 0.05$ )

처리군	치주조직 mirco-CT 분석 사진		
Non-treated			
Control			
Whey			



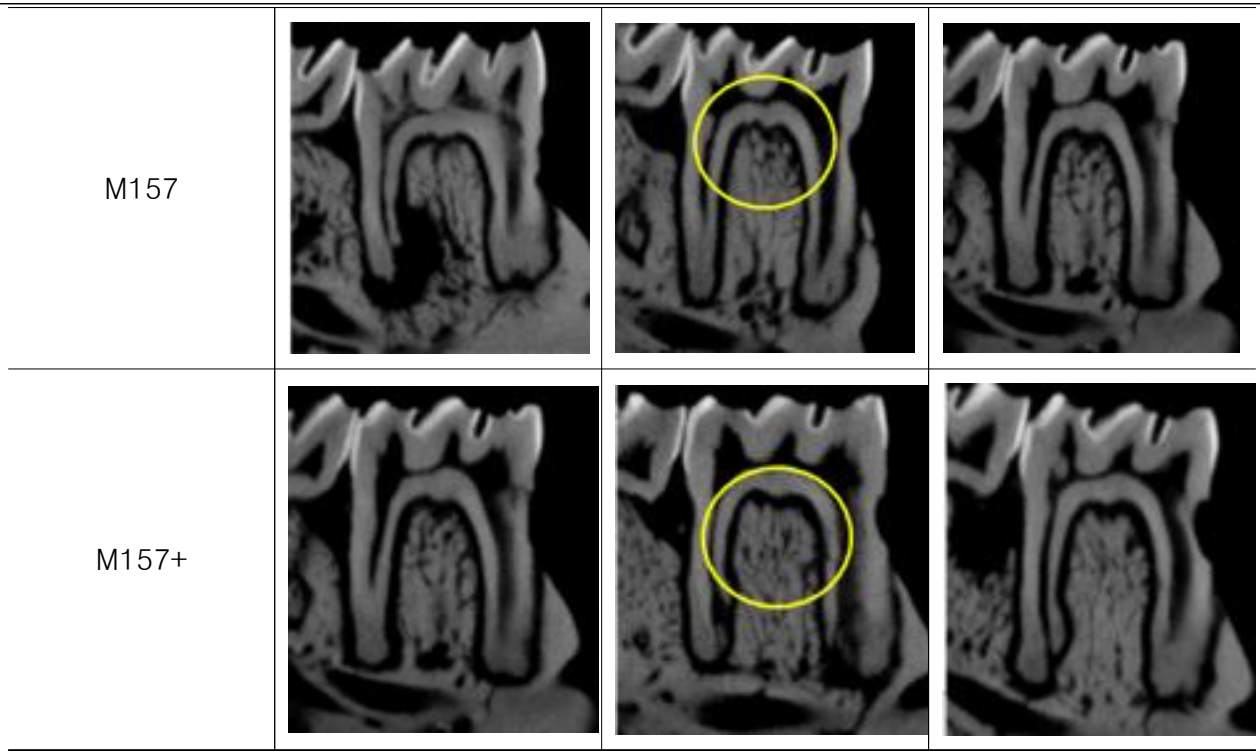


그림 117. 치주 조직 micro-CT 분석 사진

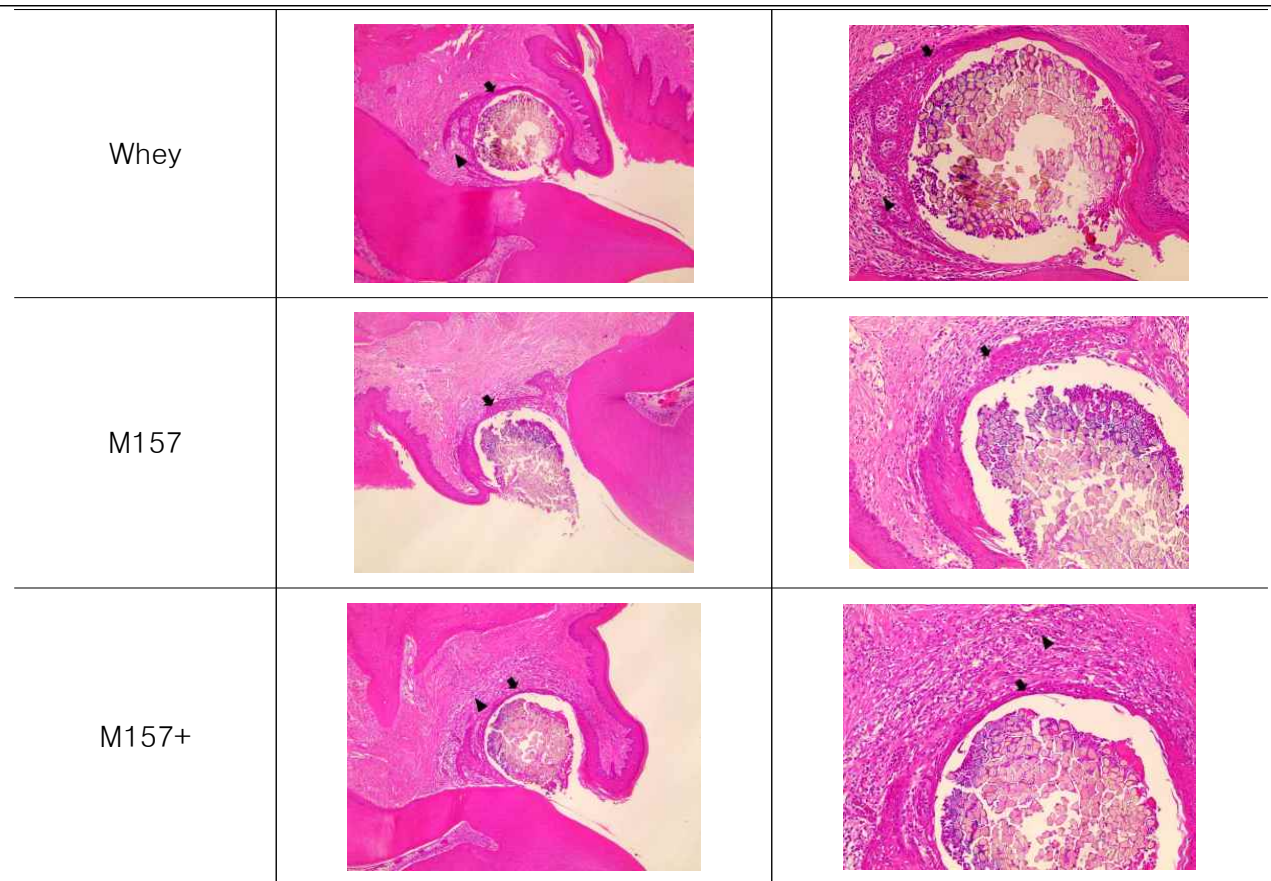
Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오 컨버전 산물 투여

### 3. 조직병리학적 분석

가. 바이오컨버전 산물 투여와 도포에 따른 치주염 억제 효과를 검증하기 위해 랫드의 치주 조직에서 조직형태학적 변화, 치조골, 파골세포, 조골세포 수 등을 측정하였음. 분석 결과, control군에서 염증세포 침윤과 상피증식이 관찰되었음. M157+군에서 control군 대비 병변 score가 낮게 측정되어 치주염 억제 효과가 있는 것으로 관찰되었음(그림 118, 표 105).

처리군	치주 조직 사진	
Non-treated		
Control		





Arrow: inflammatory cell infiltration, head of arrow: epidermal hyperplasia

**그림 118. 우축 하악 제 1 어금니에 대한 조직병리학적 분석**

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물 투여

**표 105. 조직병리학적 분석 정보**

군	Non-treated	Control	Whey	M157	M157+
치은점수	- - - - -				
염증세포 침윤		±	± +	++ +	
상피증식		+ + ± ± + +	± ± ± + ± ++	± ± ± + ± +	± + ± ± ± ±

-: no lesion, ±: minimal, +: mild, ++: moderate

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물 투여

#### 4. 단백질 발현량 분석

가. 바이오컨버전 산물 투여로 인한 치주, 대장 조직의 염증 및 산화적 스트레스 억제 효과를 확인하기 위해 단백질 발현량을 이용하여 면역 지표(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, CAT, GPx1, SOD1)를 분석하였음. 치주 조직 단백질에서의 면역 지표 분석 결과는 다음 그림 119와 같음.

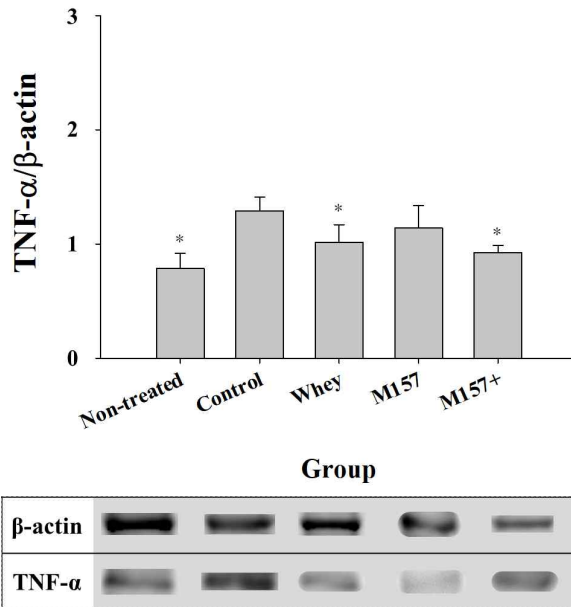
나. 전염증 지표 TNF- $\alpha$  분석 결과, control군 대비 whey군, M157+군에서 발현량이 유의적으로 낮게 관찰되었고, IL-6의 경우, control군 대비 whey군, M157군, M157+군에

서 발현량이 유의적으로 낮게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

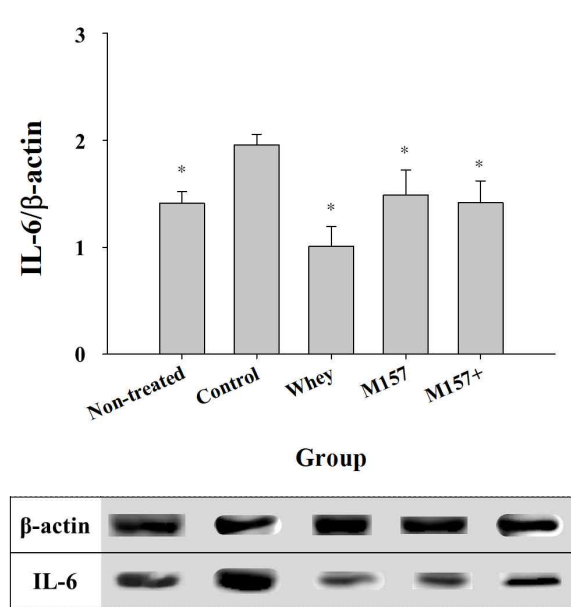
다. 항염증 지표 IL-10 분석 결과, control군 대비 M157군, M157+군에서 발현량이 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

라. 항산화 지표 CAT, GPx1 분석 결과, M157군에서 발현량이 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ). SOD1 분석 결과, control군 대비 whey군, M157군, M157+군에서 발현량이 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

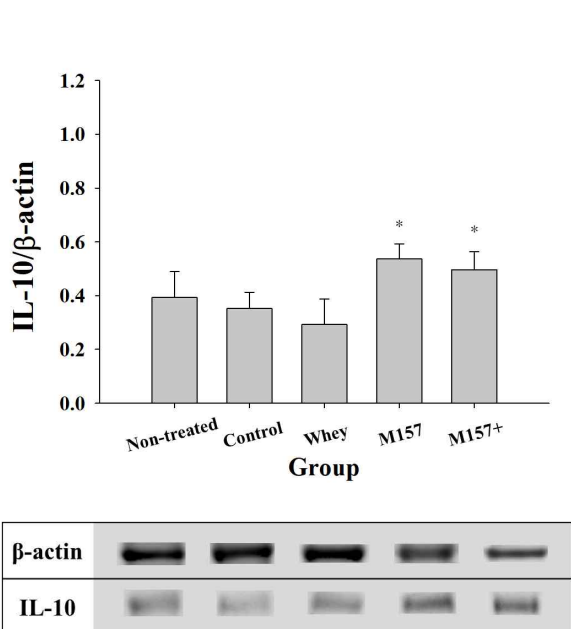
(A) TNF- $\alpha$



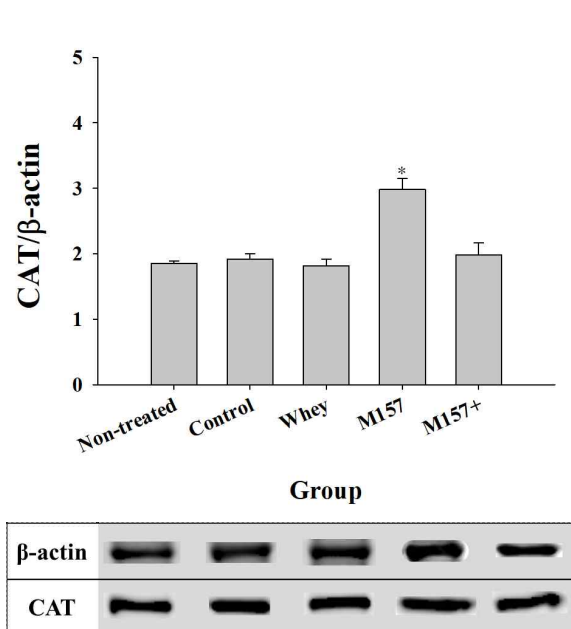
(B) IL-6



(C) IL-10



(D) CAT



(E) GPx1

(F) SOD1

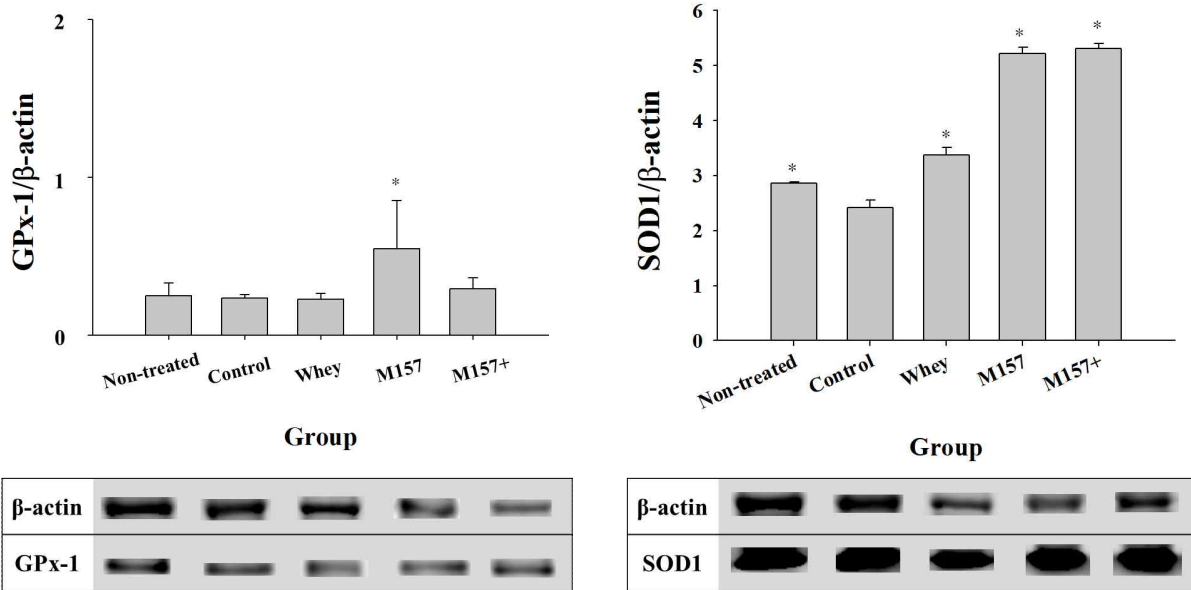


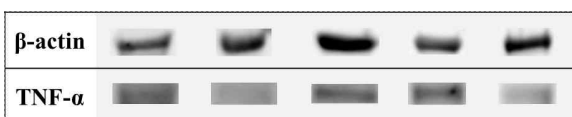
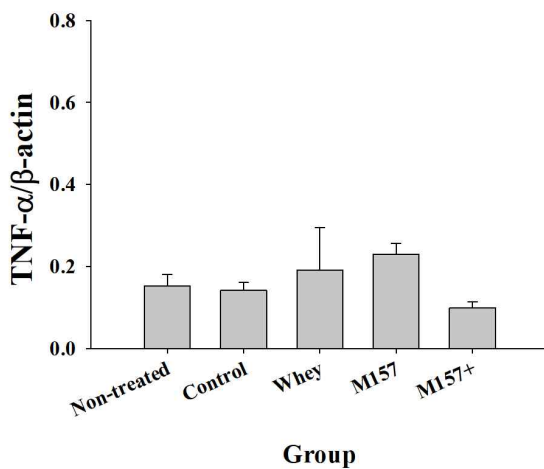
그림 119. 치주 조직 면역 지표 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리옌을 추가한 M157 바이오컨버전 산물 투여

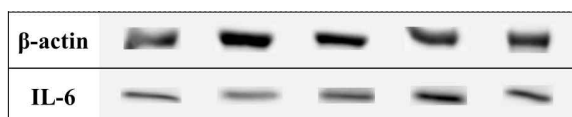
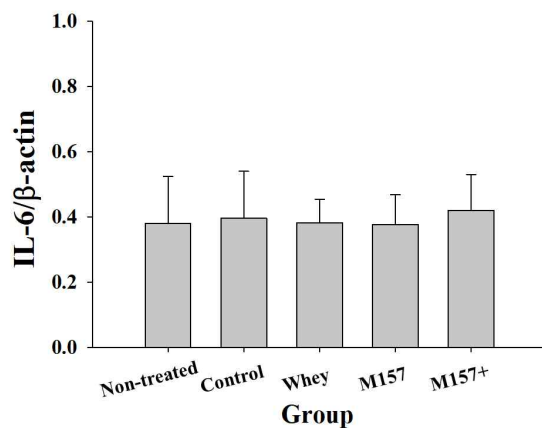
\*Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

- 다. 대장 조직 단백질에서의 면역 지표 분석 결과는 다음 그림 120과 같음. 전염증 지표 TNF- $\alpha$ , IL-6 분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음.
- 라. 항염증 지표 IL-10 분석 결과, control군 대비 whey군에서 발현량이 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).
- 마. 항산화 지표 CAT 분석 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. GPx1 분석 결과, control군 대비 whey군, M157군에서 발현량이 유의적으로 높게 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

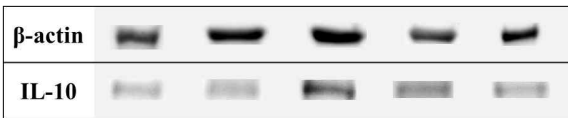
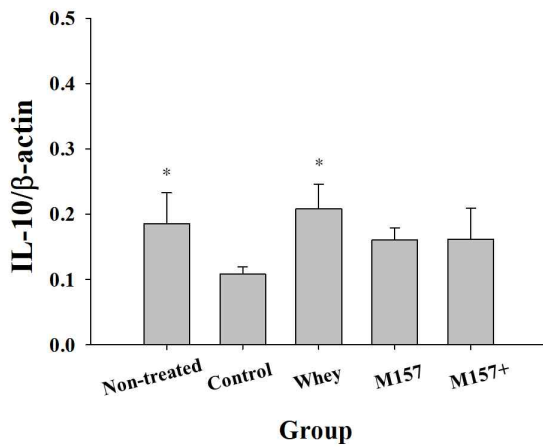
(A) TNF- $\alpha$



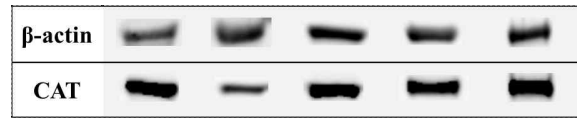
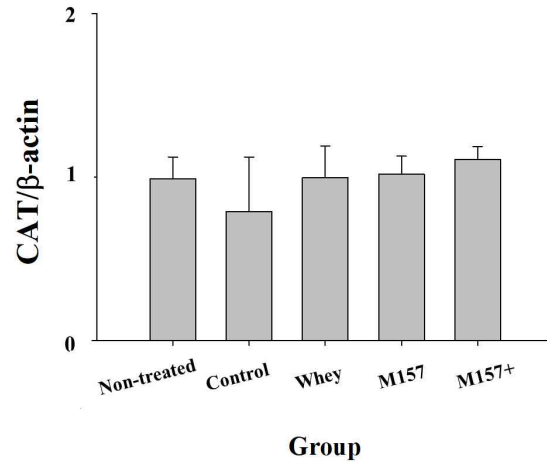
(B) IL-6



(C) IL-10



(D) CAT



(E) GPx1

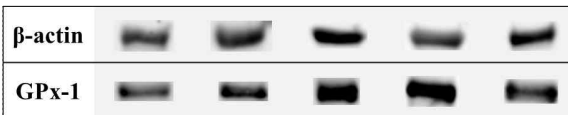
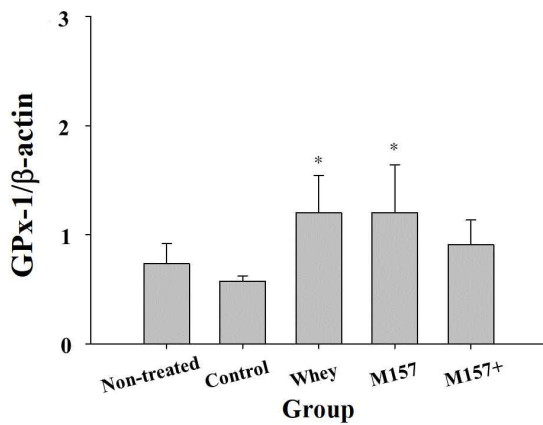


그림 120. 대장 조직 면역 지표 분석 결과

Non-treated : 정상군 + PBS 투여, Control : 치주염 유발 + PBS 투여, Whey : 치주염 유발 + whey M157 : 치주염 유발 + M157 바이오컨버전 산물 투여, M157+ : 치주염 유발 + 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물 투여

Means with different letters are significantly different( $p < 0.05$ ).

## [요약 및 결론]

### 1. 비만 억제

가. 1차년도에 동물 실험을 통해 *P. pentosaceus* KI13과 *W. cibaria* KI35로 제조한 바이오컨버전 산물의 지방간 및 비만 억제 효과를 확인하였음.

나. 3차년도에 바이오컨버전 산물 내 유효성분의 비만 억제를 확인하기 위해 제 2험동에서 제조한 *P. pentosaceus* KI13과 *W. cibaria* KI35 바이오컨버전 산물의 펩타이드(중분자), 유기산 및 당(저분자)으로 추정되는 유효성분을 전달 받아 동물 실험을 진행하였음. 펩타이드, 유기산 및 당 추정 유효성분(분획물)의 지방간 및 비만 억제 효

과가 관찰되었지만 그 효과가 1차년도에 바이오컨버전 산물(crude)의 효과보다는 다소 낮은 것으로 관찰되었음.

다. 많은 선행연구(김선애 외 2011, 윤성진 외 2012, 최두진 외 2019 등)에서 단일 분획물의 형태일 때 보다 crude한 형태일 때 체내 흡수량이 증가하여 물질 효능이 증진되는 것을 미루어 볼 때 본 연구결과에서도 crude한 형태가 분획물보다 그 효능이 좋은 것으로 추정됨.

## 2. 치주염 억제

가. 2차년도에 동물 실험을 통해 *E. faecalis* M157과 *L. lactis* CAU2013으로 제조한 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 효과를 확인하였음.

나. 3차년도에 바이오컨버전 산물 내 유효성분의 치주염 억제를 확인하기 위해 제 1, 2협동에서 제조한 *E. faecalis* M157 바이오컨버전 산물과 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물을 전달 받아 동물 실험을 진행하였음. 실험 결과, M157 바이오컨버전 산물과 박테리오신을 추가한 M157 바이오컨버전 산물이 치주 조직의 염증과 산화적 스트레스 억제에 효과가 있는 것으로 관찰되었음.

다. 특히, 치주염 억제 효과가 있는 것으로 관찰된 M157 바이오컨버전 산물에 박테리오신을 추가하여 동물에게 투여하였을 때, micro-CT 및 조직병리 분석에서 골소실과 병변 score가 낮게 측정되었음. 이를 미루어 볼 때, 박테리오신이 M157 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 효과를 더욱 증진시키는 것으로 사료됨.

### <제4협동연구기관 동국대학교>

#### [1차년도] 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능 탐색 및 비만 억제 조건 규명

##### 1. 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포의 사멸 규명

가. 유청과 탈지유를 각각 유산균 균주 KI32, KI35와 KI134, M37을 이용해 바이오컨버전 후 생성된 산물을 지방전구세포(3T3-L1)에 처리한 다음 사멸 정도를 MTT assay를 통해 확인한 결과, 사멸에 영향을 주지 않는 것으로 확인함(그림 121). 따라서 추후 선별된 바이오컨버전 산물을 통해 지방전구세포의 분화 억제를 규명하였음.

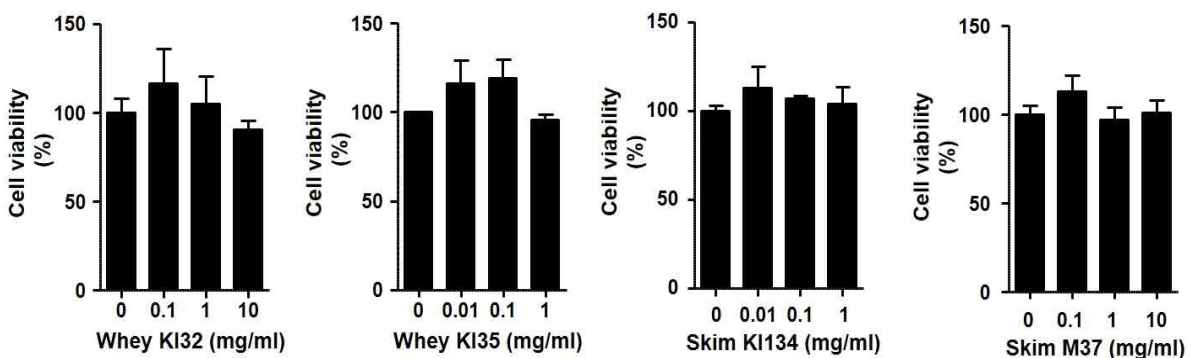


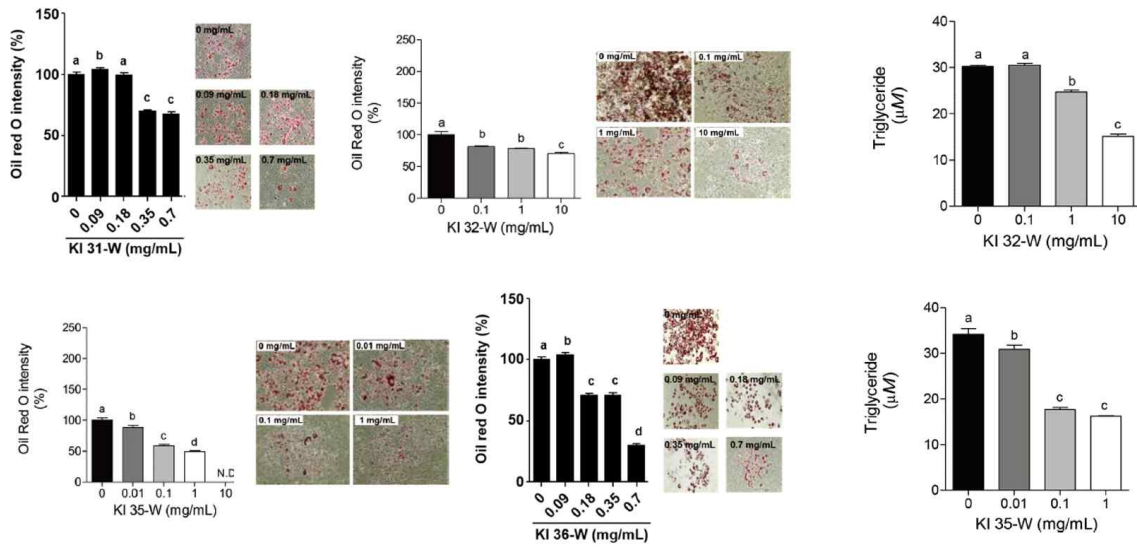
그림 121. 유청 및 탈지유 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 사멸

##### 2. 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 분화 억제 규명

가. 유청 바이오컨버전 산물(KI32, KI35)과 탈지유 바이오컨버전 산물 (KI134, M37)에 의한 지방전구세포 분화 억제를 Oil red O 염색법과 triglyceride 함량 분석을 통해 바이

오컨버전 산물에 의해 농도의존적으로 지방전구세포 분화가 억제됨을 규명함(그림 122).

유청 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 분화 억제 (Oil red O 염색 & triglyceride 함량)



탈지유 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 분화 억제 (Oil red O 염색 & triglyceride 함량)

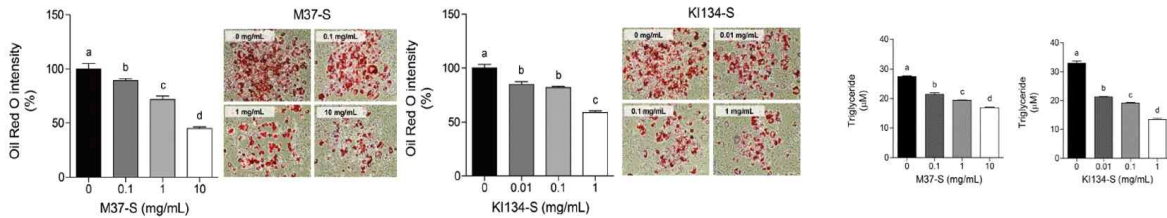


그림 122. 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 분화 억제

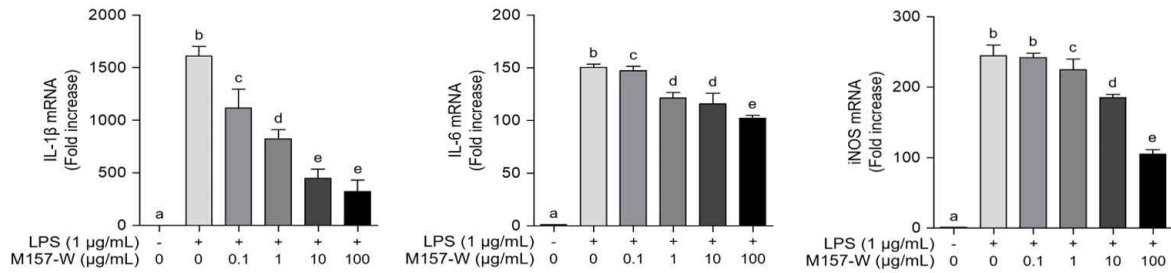
[2차년도] 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능 탐색 및 치주염 억제 조건 규명

1. 바이오컨버전 산물에 의한 치주염 관련 염증매개인자의 발현 조절 연구

가. 대식세포(RAW264.7)에 *P. gingivalis* LPS로 염증을 유발시킨 후 유청 바이오컨버전 산물(M157-W)을 농도별로 처리하여 치주염의 억제를 확인한 결과, 그림 123과 같이 염증매개인자 IL-1 $\beta$ , IL-6, NO의 발현이 억제됨을 규명함. 이와 유사하게 인체에서 유래한 치주인대세포에서도 *P. gingivalis* LPS를 처리하여 염증을 유발시킨 다음 유청 바이오컨버전 산물(M157-W)에 의해 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 발현이 억제됨을 확인하였음. 하지만 바이오컨버전이 되지 않은 대조군 유청은 치주인대세포에서 염증매개인자의 발현을 억제하지 못함을 추가적으로 규명함.



## 대식세포에서 염증매개인자의 발현 조절



## 치주인대세포에서 염증매개인자의 발현 조절

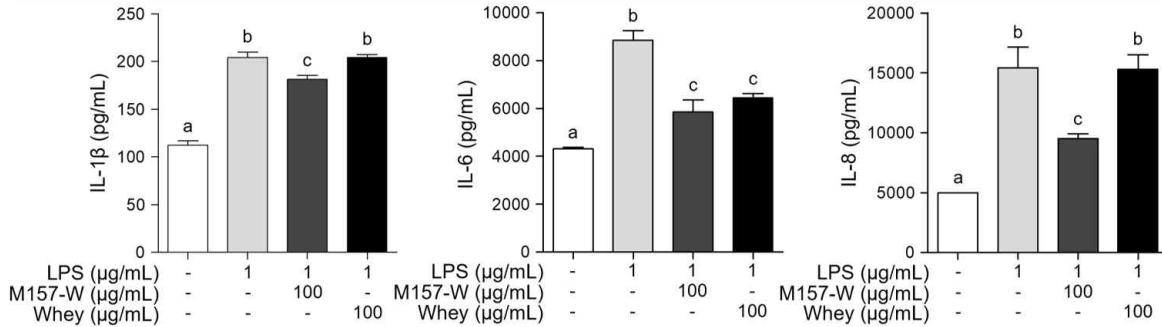
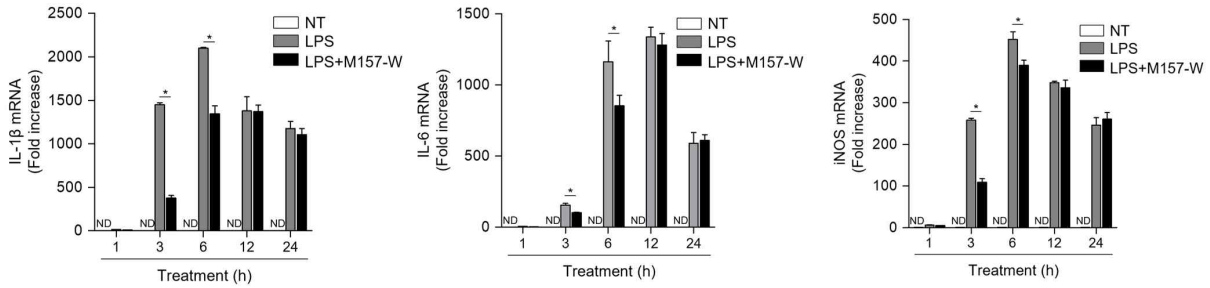


그림 123. 유청 바이오컨버전 산물에 의한 치주염 관련 염증매개인자 발현 억제

## 2. 바이오컨버전 산물에 의한 항치주염 최적 조건 연구

가. 유청 바이오컨버전 산물(M157-W)에 의해 염증매개인자의 발현 억제의 최적 조건을 확인한 결과, 유전자 레벨에서 3, 6시간 처리에서 유의적으로 염증매개인자 IL-1β, IL-6, NO가 강하게 억제함을 규명함. 추가적으로 단백질 레벨에서는 IL-1β는 12시간부터 24시간까지, IL-6는 24시간, NO는 12시간부터 24시간에서 유의적으로 억제함을 규명함(그림 124). 따라서 바이오컨버전 산물에 의한 항치주염 최적 조건은 유전자 레벨에서 3-6시간, 단백질 레벨에서 24시간임을 규명함.

염증매개인자의 유전자 레벨 억제 최적 조건



염증인자의 단백질 레벨 억제 최적 조건

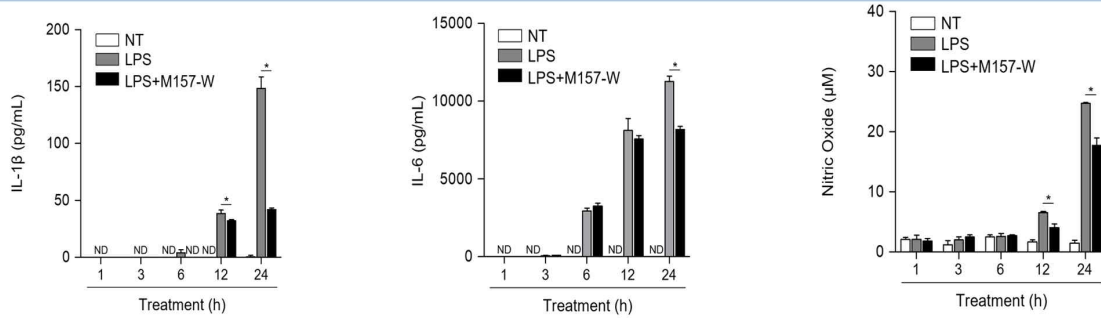


그림 124. 바이오컨버전 산물에 의한 항치주염 최적 조건(유전자, 단백질 레벨)

[3차년도] 바이오컨버전 산물의 비만 개선 및 항치주염과 관련된 세포 내 신호전달물질 기전 규명

1. 지방전구세포 분화 억제와 관련된 세포 내 신호전달기전 연구

가. 지방전구세포 분화와 관련된 전사인자(PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , SREBP-1c)와 비만과 관련된 물질(LPL, aP2 등)의 유전자 및 단백질 발현이 유청 바이오컨버전 산물(KI32-W, KI35-W)에 의해 억제되는지 확인함. KI32-W에 의해 PPAR- $\gamma$ 와 SREBP-1c가 농도의존적으로 감소했으며, KI35-W에 의해서는 PPAR- $\gamma$ 만 감소하였음. 단백질 발현 변화도 유전자 발현 변화와 동일하게 감소하였음. LPL과 aP2 또한 KI32-W와 KI35-W에 의해 유의적으로 감소함을 유전자 및 단백질 레벨에서 규명함(그림 125).



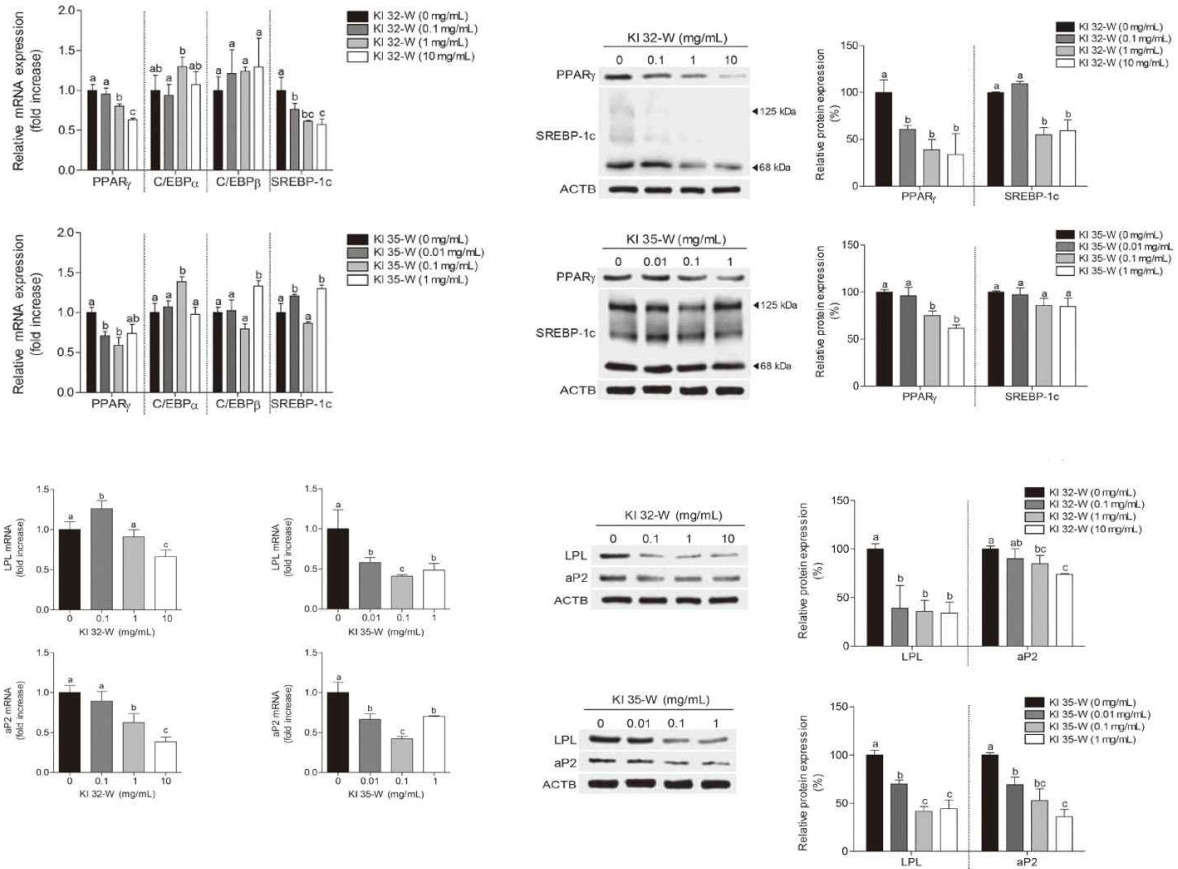


그림 125. 유청 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 분화 관련 물질의 발현 억제

가. 위와 유사하게 탈지유 바이오컨버전 산물(M37-S, KI134-S) 또한 지방전구세포 분화와 관련된 전사인자 중에서 PPAR- $\gamma$ 만 감소시켰으며 이는 유전자 및 단백질 레벨에서 확인하였음. 또한 비만 관련 물질(LPL, aP2) 모두 M37-S와 KI134-S에 의해 유전자 및 단백질을 유의적으로 감소시킴을 규명함(그림 126).

유전자 변화 (전사인자)

단백질 변화 (전사인자)

유전자 변화 (비만유도물질)

단백질 변화 (비만유도물질)

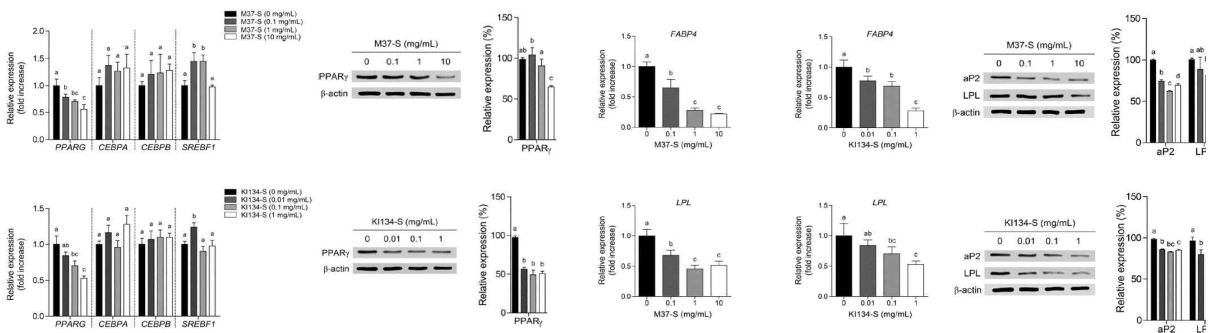


그림 126. 탈지유 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포 분화 관련 물질의 발현 억제

2. 항치주염 관련 세포 내 신호전달기전 연구

가. 치주염과 관련된 세포 내 신호전달은 MAPK(p38, ERK, JNK)과 NF- $\kappa$ B의 활성이 증가하면서 염증매개인자의 발현을 유도함. 대식세포에 *P. gingivalis* LPS를 처리하여 MAPK과 NF- $\kappa$ B의 활성을 증가시킨 후 유청 바이오컨버전 산물(M157-W)에 의해 활성이 감소하는 확인한 결과, 농도의존적으로 각각의 MAPK(p38, ERK, JNK)와 NF- $\kappa$

B의 활성이 감소함을 확인함(그림 127). 따라서 유청 바이오컨버전 산물은 MAPK과 NF- $\kappa$ B를 조절함으로써 염증을 억제하는 것으로 규명함.

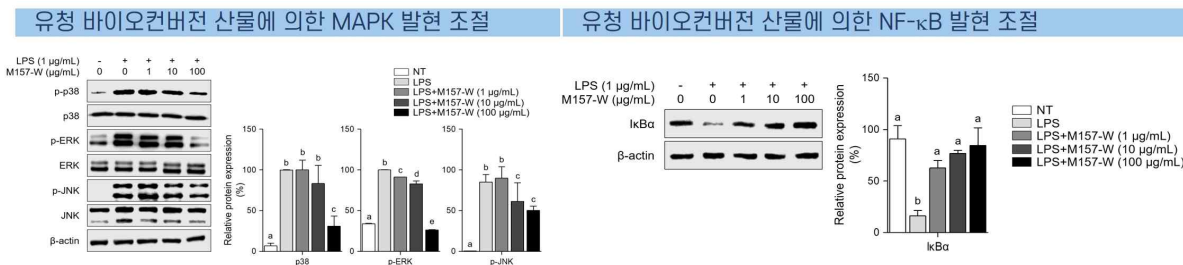


그림 127. 유청 바이오컨버전 산물에 의한 세포 내 신호전달물질 조절

### <제5협동기관 (주)바이텍>

[3차년도] 건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품 실효성 평가

#### 1. 개발된 건강증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청분말 제품의 유효성, 경제성, 물성 특성 평가

가. 유청발효분말에 대한 특성 평가

- 1) 주관기관으로부터 연구개발 과제의 시제품인 유청발효분말에 대한 사업화 제형연구를 진행하였음.
- 2) 바이오컨버전을 통한 유청발효분말 샘플에 대해서 식품공전 상의 유청단백분말 등의 기준규격에 따라 시험 원료에 대한 기준규격을 설정하고 공인시험기관에 의뢰하여 시험을 진행하였음(표 106). 본 시제품에 정확하게 일치하는 기준규격 항목이 없기 때문에 식품공전 상의 '제2 식품일반에 대한 공통기준 및 규격'과 '제 4 식품별 기준 및 규격, 18-11 유청류, 유청단백분말' 참고로 하여 기준규격을 설정하였음.

표 106. 시험 원료에 대한 기준규격

설정규격	규격사항	실측치
성상		고유의 향미가 있고 이미, 이취가 없는 흰 연두색의 분말
<i>E. coli</i>	m=0	음성
Coliform	m=0, M=10	음성
<i>Salmonella</i>	m=0, M=0/25g	음성
<i>L. monocytogenes</i>	m=0, M=0/25g	음성
세균 수(/g)	m=10,000, M=50,000	10
납(mg/kg)	0.02 이하	0.0056
카드뮴(mg/kg)	0.1이하	0.0002
수은(mg/kg)	0.1이하	불검출
비소(mg/kg)	0.1이하	0.0019
유고형분(%)	95 이상	96.85

3) 시험결과 세균수도 적정하게 나타났고 대장균군과 같은 균들에 대해서는 검출되지 않았음.

4) 유청류 중 가장 중요한 유고형분의 경우 96.85%로 나타났음. 본 실측치 시험을 통하여, 시제품에 대한 기준규격을 설정하였음.

나. 유청발효분말의 사업화 제형을 위한 배합비 개발

1) 과립분말제형 제조 연구

연구개발된 유청발효분말에 대해서 분말스틱형 시제품 개발을 위한 과립분말 제형의 최적배합비 개발 연구를 진행하였으며, 시제품 배합비는 다음 표 107과 같고, 제조공정도는 다음 그림 128과 같음.

표 107. 시제품 배합비

원료명	조성배합비(%)	투입량(g)
유청발효분말	67.7	677
유당혼합분말	17.2	172
덱스트린	10.0	100
결정셀룰로오스	2.0	20
히드록시프로필메틸셀룰로오스	1.0	10
스테아린산마그네슘	1.0	10
비타민 C	1.0	10
글리세린지방산에스테르	0.1	1
총계	100	1,000

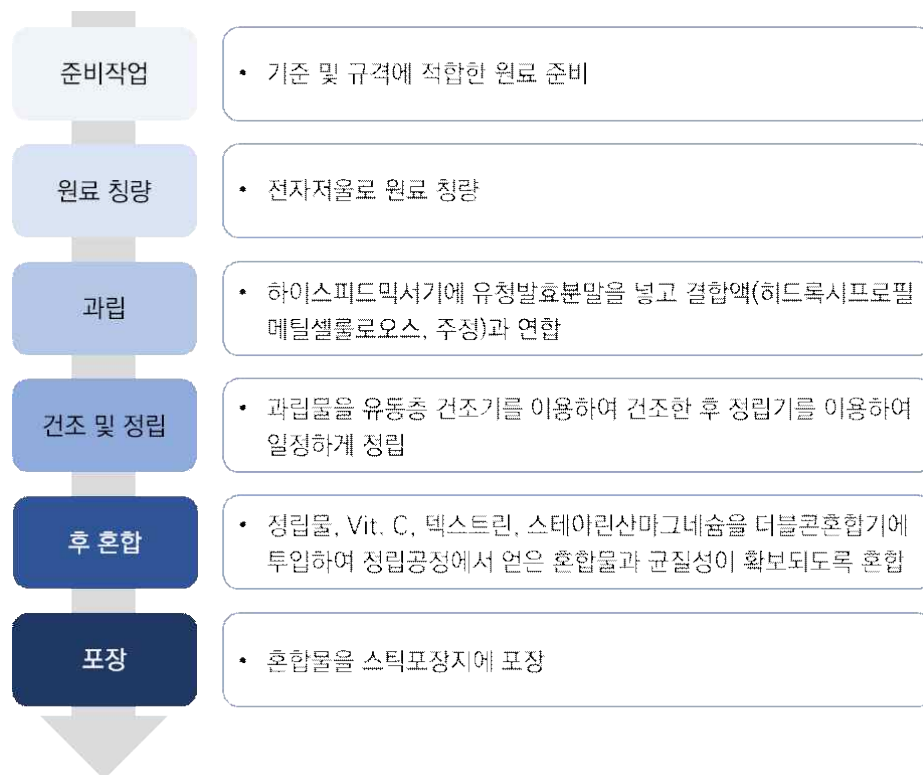


그림 128. 제조공정도

- 2) 연구개발 제품의 사업화를 위하여 우선적으로는 스틱분말 포장에 용이한 유동층 과립 분말에 대한 제조를 진행하여 시제품을 제조하였음(그림 129).
- 3) 현재 본 연구개발을 통하여 확인된 유청발효분말에 대한 사업화를 위한 시장 조사 및 제품 기획 준비 중이며, 본 연구개발 결과를 활용하여 적극적으로 사업화 제형개발을 진행하고자 함.

(A) 과립화 분말 시제품 제형

(B) 스틱포장 시제품

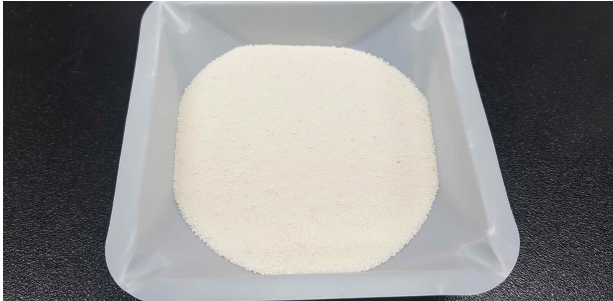


그림 129. 연구개발 제품 사업화를 위한 시제품

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

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (YYYY~YYYY)		n단계 (YYYY~YYYY)		계	가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)	목표(단계별)	실적(누적)		
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>		목표(단계별)					
		실적(누적)					
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>		목표(단계별)					
		실적(누적)					
		목표(단계별)					
		실적(누적)					
계							

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 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, 실제 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(예시) >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

\* 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	유산균을 이용한 유청 바이오컨버전 산물의 병원성 세균 항생물막 효과	Current Topics of Lactic Acid Bacteria and Probiotics	이진호, 강석성	6	대한민국	한국유산균 프로바이오틱스학회	비SCIE	2020.6.25	2287-852X	100%
2	Skimmed milk fermented by lactic acid bacteria inhibits adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes by downregulating PPAR $\gamma$ via TNF- $\alpha$ induction in vitro	Food and Function	현인경, 강석성	12	영국	Royal Society of Chemistry	SCIE	2021.7.16	2042-6496	100%
3	Bioconversion Products of Whey by Lactic Acid Bacteria Exert Anti-Adipogenic Effect	Food Science of Animal Resources	이지수, 강석성	41	대한민국	한국축산식품학회	SCIE	2020.9.9	2636-0772	100%
4	Biotransformation of whey by Weissella cibaria suppresses 3T3-L1 adipocyte differentiation	Journal of Dairy Science	이지수, 강석성	104	미국	American Dairy Science Association	SCIE	2020.12.21	0022-0302	100%
5	Development of Postbiotics by Whey Bioconversion with <i>E. faecalis</i> M157 KACC81148BP and <i>L. lactis</i>	Journal of Dairy Science	박은영, 하지명, 임상동, 김근배, 윤요한	12	미국	American Dairy Science Association	SCIE	2021.09.30	0022-0302	100%

	CAU2013 KACC811 52BP for Treating Periodontal Disease and Improving Gut Health									
6	Physiological Characteristics and Anti-Obesity Effect of milk fermented by <i>Lactobacillus plantarum</i> K1134	Journal of Dairy Science and Biotechnology	김슬기, 임상동	38권 4호	대한민국	한국	비SCIE	20.12.31	2733-4554	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국낙농식품응용생물 학회 제81회 정기학술대회 및 온라인 심포지엄	이지수 외 4인 (구두발표)	2020.10.16	온라인	대한민국
2	한국낙농식품응용생물 학회 제81회 정기학술대회 및 온라인 심포지엄	현인경 외 4인 (구두발표)	2020.10.16	온라인	대한민국
3	젖산균 분리균주를 활용한 발효 유청 산물의 치즈염 개선 효과	최유나 외 4인	2020.08.27.-2020.0 8.28	온라인	대한민국
4	2021년도 한국생명과학회 30주년 기념, 제63회 정기총회 및 국제학술대회	이주현 외 6인 (포스터발표)	2021.08.12.-2021.0 8.13	온라인	대한민국
5	한국유가공학회 정기학술대회	김슬기,임상동	19.5.17	서울우유중앙연구소	대한민국
6	한국축산식품학회 정기학술대회	김슬기,임상동	19.5.23	전남대 컨벤션홀	대한민국
7	한국식품영양과학회 정기학술대회	김슬기,진영욱,홍상필, 이명기,임상동	19.10.25	제주 ICC	대한민국
8	한국축산식품학회 정기학술대회	김슬기,진영욱,임상동	20.10.30	온라인	대한민국
9	한국축산식품학회 정기학술대회	김슬기,홍상필,임상동	20.10.30	온라인	대한민국
10	한국낙농식품응용생물 학회 정기학술대회	김슬기,홍상필,임상동	21.6.2	매일유업 상아목장	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
1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KI13	KACC 81116BP	농촌진흥청 국립농업과학원	2020
2	<i>Weissella cibaria</i> KI35	KACC 81117BP	농촌진흥청 국립농업과학원	2020
3	<i>Enterococcus faecalis</i> M157	KACC 81148BP	농촌진흥청 국립농업과학원	2020

[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	신규한 페디오코커스 펜토사세우스 균주 및 이의 유청 발효물을 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물	대한민국	윤요한, 임상동, 하지명, 김슬기, 강주현, 최유나, 홍상필, 진영욱, 이명기	2020.06.12	10-2020-0071870	윤요한, 임상동, 하지명, 김슬기, 강주현, 최유나, 홍상필, 진영욱, 이명기	2021.11.15	10-2328743	100	비활용	
2	신규한 와이셀라 신규한 와이셀라 시바리아 균주 및 이의 유청 발효물을 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물	대한민국	윤요한, 임상동, 하지명, 김슬기, 강주현, 최유나, 홍상필, 진영욱, 이명기	2020.06.12	10-2020-0071851	윤요한, 임상동, 하지명, 김슬기, 강주현, 최유나, 홍상필, 진영욱, 이명기	2021.11.15	10-2328742	100	활용	
3	신규한 엔테로코커스 패칼리스 균주 및 이의 유청 발효물을 포함하는 구강질환 또는 대장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물	대한민국	윤요한, 임상동, 김슬기, 박은영, 김근배, 아셀엘날, 이주현, 이유헌	2021.02.10	10-2021-0019288				100	비활용	
4	신규한 엔테로코커스 패칼리스 균주 및 락토코커스 락티스 균주, 및 이의 유청 발효물을 포함하는 구강질환 또는 대장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물	대한민국	윤요한, 임상동, 김슬기, 박은영, 김근배, 아셀엘날, 이주현, 이유헌	2021.02.10	10-2021-0019460				100	비활용	

○ 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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

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

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	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	유청발효분말W	2021.12.14	(주)삼익유가공		식품소재원료	1년		

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- \* 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 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 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)		
합계					

**□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과**

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내				
국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			

**□ 고용 창출**

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

**□ 고용 효과**

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

**□ 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					

**□ 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

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	포스터부문	우수포스터상	우수상	김슬기,임상동	19.5.17	한국유가공학회
2	포스터부문	우수포스터상	우수상	김슬기,홍상필,임상동	20.10.30	한국축산식품학회
3	포스터부문	여송미래낙농과학상	우수상	김슬기,홍상필,임상동	21.6.2	한국낙농식품응용생물학회

[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)
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 단백질정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	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(%)
○ 바이오컨버전 산물 분말 제조공정 확립	○ 비만 억제 바이오컨버전 산물 분말 제조	100
○ 바이오컨버전 산물 제품 제조공정 최적화	○ 현장 대량시험을 통한 최종 제조공정 확립	100
○ 확립된 최적 배양 조건 적용한 건강 증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청 분말 제품 개발	○ 제품 생산 규격화 및 최종제품 양산 ○ 향후 제품 판매 사업화 계획	100
○ 비만 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립	○ 유산균 분리 및 발효능 균주 선발 ○ 바이오컨버전 산물에 대한 비만 억제능 평가	100
○ 비만 억제 소재 확보를 위한 바이오컨버전 기술 최적화	○ 바이오컨버전 최적 배양조건 확립	100
○ 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 유효성분 분리 및 비만 억제능 평가	○ 바이오컨버전 산물 내 비만 억제 유효성분 분리 및 유효성분 중 기능성 성분 선발	100
○ 치주염 관련 세균 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오 컨버전 기술 확립 및 바이오컨버전 산물 내 유효성 분리·효능 검증	○ 치주염 관련 위해세균 억제 균주의 선발 ○ 선발된 균주의 바이오컨버전 산물 치주염억제능 평가 ○ 치주염 관련 세균 억제 유효성분 분리, 유효성분 중 기능성 성분 선발	100
○ 치주염증 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 기술 확립	○ 세포주 배양 염증개선 균주의 선발 ○ 선발된 균주의 바이오컨버전 산물 치주염억제능 평가 ○ 항염 소재의 바이오컨버전 산물 내 유효성분 분리, 유효성분 중 기능성 성분 선발	100
○ 치주염 억제 소재 확보를 위한 바이오컨버전 기술 최적화	○ 바이오컨버전 최적 배양조건 확립	100

○ 동물모델 경구 투여를 통한 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능성 검증	○ 비만 유도 동물 모델의 바이오컨버전 산물 경구 투여 ○ 비만 억제효과 확인 ○ 동물 모델에서 발효산물의 비만 억제 및 장내 균총에 대한 효능 확인	100
○ 동물모델 경구 투여를 통한 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능성 검증	○ 치주염 유도 동물 모델의 바이오컨버전 산물 경구 투여 ○ 치주염 억제효과 확인 ○ 동물 모델에서 바이오컨버전 산물의 구강 및 장내 균총에 대한 억제 확인	100
○ 동물모델 경구투여를 통한 바이오컨버전 산물 내 비만·치주염 억제 원인 유효성분 규명	○ 바이오컨버전 산물 내 분리된 비만·치주염 억제 유효성분 경구 투여 ○ 비만 및 치주염 억제 효과 확인 및 유효성분 효능 검증	100
○ 바이오컨버전 산물의 비만 억제 기능 탐색 및 비만 억제 조건 규명	○ 바이오컨버전 산물에 의한 지방전구세포의 사멸 및 분화 ○ 지방전구세포의 사멸 및 분화와 관련된 유전자 발현 조절	100
○ 바이오컨버전 산물의 치주염 억제 기능 탐색 및 치주염 억제 조건 규명	○ 바이오컨버전 산물에 의한 치주염 관련 염증매개인자의 발현 조절 연구 ○ 바이오컨버전 산물에 의한 치주염 억제 반응 연구	100
○ 바이오컨버전 산물 내 유효성분의 비만 및 치주염 억제와 관련된 세포 내 신호전달 기전 규명	○ 지방전구세포 분화 억제와 관련된 세포 내 신호전달기전 연구 ○ 치주염과 관련된 염증매개인자 발현 억제와 관련된 세포 내 신호전달기전 연구	100
○ 건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품 실효성 평가	○ 개발된 건강 증진(비만, 치주염 완화) 발효유분말, 발효유청분말 제품의 유효성, 경제성, 물성 특성 평가	100

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 해당 없음.

##### 2) 자체 보완활동

- 해당 없음.

##### 3) 연구개발 과정의 성실성

- 해당 없음.

#### 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 잉여부산물을 활용한 고부가가치화 소재 개발로 학문적, 산업적, 기술적, 사회적 측면에서 높은 기여를 하였음.

#### 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 잉여부산물을 활용한 고부가가치화 소재 개발로 학문적, 산업적, 기술적, 사회적 측면에서 높은 기여를 하였음. 연구 기간 내 개발 또는 연구한 내용에서 더 나아가 홍보 전시 및 인력창출, 학문적 성과 등을 달성할 계획임.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

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

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
- 해당 없음.	- 해당 없음.

< 참고 문헌 >

1. 김선애, 오혜경, 김지영, 홍진우, & 조수인. 2011. 참당귀, 중국당귀, 일당귀 및 그 구성 생화합물의 약리작용에 대한 고찰. *대한한의학회지*, 32(4), 1-24.
2. 윤성진, 박해찬, 이진석, 최연주, 안수경, 김나미, & 최영기. 2012. 홍삼과 홍삼 혼합물 섭취가 유, 무산소성 운동수행능력, 피로회복능력에 미치는 영향. *한국사회체육학회지*, 47(2), 855-866.
3. 최두진, 최보람, 이대영, 최수임, 이영섭, & 김금숙. 2019. 황기, 지치 복합물의 연골세포에서의 Matrix Metalloproteinases 저해 효과 및 유효성분의 분석. *한국약용작물학회지*, 27(4), 247-258.
4. Chen, H. C., Smith, S. J., Ladha, Z., Jensen, D. R., Ferreira, L. D., Pulawa, L. K., & Farese, R. V. 2002. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1. *J. Clin. Investig.*, 109(8), 1049-1055.
5. Clark, P. A., Cotton, L. N., & Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cul. Dairy Prod. J.* 28, 11-14.
6. DiNicolantonio, J. J., McCarty, M. F., & OKeefe J. H. 2018. Role of dietary histidine in the prevention of obesity and metabolic syndrome. *Open Heart* 5:e000676
7. Fang, T., Wu, X., Cao, W., Jia, G., Zhao, H., Chen, X., & Liu, G. 2017. Effects of dietary fiber on the antioxidant capacity, immune status, and antioxidant-related

- signaling molecular gene expression in rat organs. *RSC Adv.*, 7(32), 19611–19620.
8. Gilliland, S. E., & Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.*, 40, 820–823.
  9. Gilliland, S. E., & Walker D. K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.*, 73, 905–911.
  10. Hammes, W. P., Weiss, N., & Holzapfel, W. 1992. The genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pages 1563–1578 in *The Prokaryotes*. 2nd ed, Springer-Verlag, New York. USA.
  11. Hemati, N., Ross, S. E., Erickson, R. L, Groblewski, G. E., & MacDuygald, O. A. 1997. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes: Correlation with CLUT4 gene expression. *J. Biol. Chem.*, 272, 25913–25919.
  12. Ji, Y., Park, S., Chung, Y., Kim, B., Park, H., Huang, E., & Holzapfel, W. H. 2019. Amelioration of obesity-related biomarkers by *Lactobacillus sakei* CJLS03 in a high-fat diet-induced obese murine model. *Sci. Rep.*, 9(1), 1–11.
  13. Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., & Park, H. J.. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41, 493–500.
  14. Lim, S. D., Kim, K. S., & DO, J. R. 2011. Physiological characteristics and production of vitamin K2 by *Lactobacillus fermentum* LC272 Isolated from Raw Milk. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.*, 31(4), 513–520.
  15. Ma, Q., Zhou, X., Sun, Y., Hu, L., Zhu, J., Shao, C., Meng, Q., & Shan, A. 2020. Threonine, but Not Lysine and Methionine, Reduces Fat Accumulation by Regulating Lipid Metabolism in Obese Mice. *J. Agric. Food Chem.*, 68(17), 4876–4883.
  16. Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, N. S., Escher, P., Patsouris, D., Koenig, W., & Kersten, S. 2004. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J. Biol. Chem.*, 279(33), 34411–34420.
  17. Mecklenburg, L., Kusewitt, D., Kolly, C., Treumann, S., Adams, E. T., Diegel, K., & Bradley, A. 2013. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse integument. *J. Toxicol. Pathol.*, 26(3\_Suppl), 27S–57S.
  18. Pan, C., Liu, J., Wang, H., Song, J., Tan, L., & Zhao, H. 2017. Porphyromonas gingivalis can invade periodontal ligament stem cells. *BMC Microbiol.*, 17(1), 1–10.
  19. Park, S. N., Lim, Y. K., & Kook, J. K. 2013. Development of quantitative real-time PCR primers for detecting 42 oral bacterial species. *Arch. Microbiol.*, 195(7), 473–482.
  20. Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., & Multon, E. 2004. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.*, 5(1), 1–10.
  21. Ritze, Y., Bárdos, G., Claus, A., Ehrmann, V., Bergheim, I., Schwartz, A., & Bischoff, S. C. 2014. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver

- disease in mice. *PLoS One*, 9(1), e80169.
22. Ronis, M. J., Sharma, N., Vantrease, J., Borengasser, S. J., Ferguson, M., Mercer, K. E., & Badger, T. M. 2013. Female mice lacking p47phox have altered adipose tissue gene expression and are protected against high fat-induced obesity. *Physiol. Genom.*, 45(9), 351–366.
  23. Soleimani, M., Zolfaghari, M. R., & Morovvati, A. 2013. Development and Comparison of Conventional PCR and SYBR Green Real Time PCR for Detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Tannerella forsythensis*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 6(8).
  24. Song, Y., Li, J., Zhao, Y., Zhang, Q., Liu, Z., Li, J., & Xiao, X. 2012. Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. *Exp. Diabetes Res.*, 2012.
  25. Strobel, N. A., Peake, J. M., Matsumoto, A., Marsh, S. A., Coombes, J. S., & Wadley, G. D. 2011. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc.*, 43(6), 1017–24.
  26. Sun, X., Feng, R., Li, Y., Lin, S., Zhang, W., Li, Y., Sun, C., & Li, S. 2014. Histidine supplementation alleviates inflammation in the adipose tissue of high-fat diet-induced obese rats via the NF- $\kappa$ B- and PPAR $\gamma$ -involved pathways. *Br. J. Nutr.*, 112(4), 477–485.
  27. Tesch, G. H., Ma, F. Y., Han, Y., Liles, J. T., Breckenridge, D. G., & Nikolic-Paterson, D. J. 2015. ASK1 inhibitor halts progression of diabetic nephropathy in Nos3-deficient mice. *Diabetes*, 64(11), 3903–3913.
  28. Tibbot, B. K., & Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative alpha-glucosidase gene from berley. *Plant Mol. Biol.*, 30, 229–241.
  29. Yoo, S. R., Kim, Y. J., Park, D. Y., Jung, U. J., Jeon, S. M., Ahn, Y. T., & Choi, M. S. 2013. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet induced obesity. *Obes.*, 21(12), 2571–2578.
  30. Zhang, Y., Fan, S., Hu, N., Gu, M., Chu, C., Li, Y., & Huang, C. 2012. Rhein reduces fat weight in db/db mouse and prevents diet-induced obesity in C57Bl/6 mouse through the inhibition of PPAR $\gamma$  signaling. *PPAR Res.*, 2012.



# 자체평가의견서

## 1. 과제현황

		과제번호		318091-03	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	바이오컨버전 기술을 활용한 우유 및 유가공 부산물의 고부가가치 소재화 기술개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	(주)삼익유가공			연구책임자	이해창
	한국식품연구원				임상동
	중앙대학교				김근배
	숙명여자대학교				윤요한
	동국대학교				강석성
	(주)바이텍				손연경
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.11.09 - 2019.11.08	320,000	110,000	430,000
	2차년도	2019.11.09 - 2020.11.08	245,000	81,700	326,700
	3차년도	2020.11.09 - 2021.11.08	245,000	81,7000	326,700
	계	2018.11.09 - 2021.11.08	810,00,	273,400	1,083,400
참여기업	(주)바이텍				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022년 1월 3일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)삼익유가공	차장	이해창

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

잉여유청 활용 고부가 가치화로 기술의 발전에 있어 우수성과 창의성을 나타내었음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

잉여유청 활용 고부가 가치화로 축산산업, 미생물산업, 국내 미생물 소재 개발로 전반적인 산업 분야에 파급효과를 나타내었음.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

산업적인 측면에서는 제품화가 가능하고, 국가적인 측면에서는 기술과 소재로 수출로 인해 경제적인 이익이 증대될 수 있음.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

3년간의 연구개발 목표를 달성하기 위해 성실히 수행하였으며, 정성적 성과와 정량적 성과가 이를 뒷받침함.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

3년간의 연구개발 목표를 달성하기 위해 성실히 수행하였으며, SCI급 논문의 경우, 4건, 기술이전 1건, 학술발표 8건, 특허출원 및 등록 4건 등을 성과를 달성하였음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
비만 및 치주염 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 소재 개발기술 확립 및 최적화	25	100	비만 및 치주염 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 소재 개발기술을 확립하고 최적화하였음.
동물모델 경구 투여를 통한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물 및 유효성분의 건강 증진(비만, 치주염 완화) 효과 확인	25	100	동물모델 경구 투여를 통한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물 및 유효성분의 건강 증진(비만, 치주염 완화) 효과를 확인하였음.
바이오컨버전 산물에 의한 비만 및 치주염 억제 기전 규명	25	100	바이오컨버전 산물에 의한 비만 및 치주염 억제 기전을 규명하였음.
건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품 실효성 평가	25	100	건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품 실효성을 평가하였음.
합계	100	100	기 확보한 다수 균주 및 다년간의 바이오컨버전 기술 산업화·건강증진효과 규명연구 경험을 통해 바이오컨버전에 최적화된 고효율 균주 발굴 및 건강증진 효과(비만, 치주염 완화)가 있는 잉여유·유가공부산물 유래 고부가가치 식품소재(발효유분말, 발효유청분말)를 개발하였음.

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 기 확보한 다수 균주 및 다년간의 바이오컨버전 기술 산업화·건강증진효과 규명연구 경험을 통해 바이오컨버전에 최적화된 고효율 균주 발굴 및 건강증진 효과(비만, 치주염 완화)가 있는 잉여유·유가공부산물 유래 고부가가치 식품소재(발효유분말, 발효유청분말) 개발하였음.
- 국내 유가공 부산물 가공산업 분야 선도적 기술력, 기 구축된 영업망 및 유사제품 판매경험을 활용한 낮은 생산원가의 가격경쟁력 있는 바이오컨버전 활용 기능성 식품 소재 시장의 우위 선점 및 낙농업 소득 증대에 기여하였음.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 해당 없음.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 연구결과의 경우, 학술발표, 논문, 기술이전, 특허출원 및 등록, 홍보전시, 인력창출 등에 활용되었으며 연구 기간 종료 후에도 이와 같은 추가적인 성과를 달성하고, 본 연구와 관련된 다양한 산업의 활성화에 기여할 예정임.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

-해당 없음.

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구 과제 명	바이오컨버전 기술을 활용한 우유 및 유가공 부산물의 고부가가치 소재화 기술개발			
주관연구개발기관	(주)삼익유가공		주관연구책임자	이해창
연구 개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	810,000	273,400		1,083,400
연구개발기간	2018.11.01 - 2021.10.31 (36 개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:      )			

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①비만 및 치주염 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 소재 개발기술 확립 및 최적화	비만 및 치주염 억제를 위한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 소재 개발기술을 확립하고 최적화하였음.
②동물모델 경구 투여를 통한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물 및 유효성분의 건강 증진(비만, 치주염 완화) 효과 확인	동물모델 경구 투여를 통한 우유 및 유청 유래 바이오컨버전 산물 및 유효성분의 건강 증진(비만, 치주염 완화) 효과를 확인하였음.
③바이오컨버전 산물에 의한 비만 및 치주염 억제 기전 규명	바이오컨버전 산물에 의한 비만 및 치주염 억제 기전을 규명하였음.
④건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품 실효성 평가	건강 증진(비만, 치주염 완화)을 위한 발효유분말 및 발효유청분말 제품의 실효성을 평가하였음.

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

## 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용등) (명)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자 유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평판 인덱스	학술 발표		정책 활용
단위	건	건	건	백만원	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건
가중치																				
최종 목표	4	1			2		2						6	3		10				4
당해 년도	목표	4	1										3	2		8				2
	실적	4	2			1							4	2		8				

달성률 (%)	100	100									100	100	100					
---------	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	-----	-----	-----	--	--	--	--	--

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	비만 억제를 유청 유래 바이오컨버전 기술
②	치주염 억제를 유청 유래 바이오컨버전 기술

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v	v			
②의 기술		v				v				

\* 각 해당란에 v 표시

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	비만 완화 유청발효분말 식품 소재 생산 및 판매와 제품군 확충, 일자리 창출을 통해 매출액 증가를 기대. 식품 소재로 활용가능한 범위를 넓히기 위해 추가적인 요구에 대한 대응 개발 전략을 추진하고자 함
②의 기술	치주염 완화 유청발효분말 식품 소재 생산 및 판매와 제품군 확충, 일자리 창출을 통해 매출액 증가를 기대. 건강보조식, 환자식, 대용식 등으로의 활용 식품소재로 가능성이 충분하다고 판단됨

#### 7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인종	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			국민평판 I-F	학술발표	
단위	건	건	건	평균키워드	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치																			
최종목표	4	1			2		2					6	3		10				4
연구기간내 달성실적	4	2			1		1					4	2		8				
연구종료후 성과장출					1		1					2	1		2				2



## 주 의

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