

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

발간등록번호

11-1543000-003848-01

청소년기 장 건강 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발

2022.02.14

주관연구기관 / 서울우유협동조합
협동연구기관 / 고려대학교
세종대학교
서울대학교
삼성서울병원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "청소년기 장 건강 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발"(개발기간 : 2018.11.9 ~ 2021.11.8)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.02.14

주관연구기관명 : 서울우유협동조합	(대표자)	문진섭 (인)
협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단	(대표자)	조석주 (인)
세종대학교 산학협력단	(대표자)	송진우 (인)
서울대학교 산학협력단	(대표자)	최해천 (인)
삼성서울병원	(대표자)	박승우 (인)
참여기관명 : 서울우유협동조합	(대표자)	문진섭 (인)

주관연구책임자 : 서울우유협동조합	강신호
협동연구책임자 : 고려대학교	김세현
세종대학교	김형욱
서울대학교	이주훈
삼성서울병원	최연호
참여기관책임자 : 서울우유협동조합	강신호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서

보안등급

일반 , 보안
고부가가치식품기술개발사업

중앙행정기관명		사업명		사업명		보안등급			
전문기관명 (해당 시 작성)		사업명 -		내역사업명 (해당 시 작성)		일반 <input checked="" type="checkbox"/> , 보안 <input type="checkbox"/>			
광고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		318090-3			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1801	40%	LB1803	20%	LB1804	20%	LB1805	20%
	농림식품과학기술분류	PA0201	40%	PA0204	20%	PA0205	20%	PA0103	20%
연구개발과제명		국문	청소년기 장 건강 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발 Development of functional dairy products for improvement of gut health in adolescence					영문	
주관연구개발기관		기관명	서울우유협동조합		사업자등록번호	134-82-00745			
		주소	(우)15407 경기도 안산시 단원구 성곡로 153		법인등록번호				
연구책임자		성명	강신호		직위	팀장			
		연락처	직장전화	031-481-0104	휴대전화	010-****-0549			
			전자우편	shkang@seoulmilk.co.kr	국가연구자번호				
연구개발기간		전체	2018. 11. 09 - 2021. 11. 08(3년)						
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원	기관부담		합계			연구개발비 외 지원금		
	연구개발비	연구개발비	연구개발비	연구개발비	연구개발비	연구개발비			
	현금	현금	현물	현금	현물	합계			
	총계	1,240,930	186,141	1,054,791	1,427,071	1,054,791		2,481,862	
	1년차	513,860	77,079	436,781	590,939	436,781		1,027,720	
2년차	393,070	58,961	334,110	452,031	334,110	786,141			
3년차	334,000	50,101	283,900	384,101	283,900	668,001			
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고			
						역할	기관유형		
	고려대학교	김세현	교수	02-3200-4055	sehkim@korea.ac.kr	공동	대학		
	세종대학교	김형욱	교수	02-3408-3202	hmhyung@sejong.ac.kr	공동	대학		
	서울대학교	이주훈	교수	031-201-3483	juhlee@knu.ac.kr	공동	대학		
삼성서울병원	최연호	교수	02-3410-3527	h01016@skku.edu	공동	병원			
위탁연구개발기관	서울대학교	김영훈	교수	063-270-2506	yky2584@trn.u.ac.kr	위탁	대학		
	우석대학교	문용일	교수	063-230-1488	wmoon@woosuk.ac.kr	위탁	대학		
연구개발담당자 실무담당자	성명	정재연		직위	과장				
	연락처	직장전화	031-481-0172		휴대전화	010-****-01****			
		전자우편	lyc0123@seoulmilk.co.kr		국가연구자번호				

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

2022 년 2 월 14 일

연구책임자: 강신호

주관연구개발기관의 장: 서울우유협동조합 강신호

공동연구개발기관의 장: 고려대학교 김세현

세종대학교 김형욱

서울대학교 이주훈

삼성서울병원 최연호

위탁연구개발기관의 장: 서울대학교 김영훈

우석대학교 문용일

< 요약 문 >

사업명		고부가가치식품기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		318090-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1801	40%	LB1803	20%	LB1804	20%	LB1805	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0201	40%	PA0204	20%	PA0205	20%	PA0103	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명		청소년기 장 건강 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발							
전체 연구개발기간		2018. 11. 09 - 2021. 11. 08(3년)							
총 연구개발비		총 2,481,862 천원 (정부지원연구개발비: 1,240,930 천원, 기관부담연구개발비 : 1,240,932 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)							
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)									
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)									
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ 청소년기 장 건강 (과민성 및 장내 미생물 불균형 유래) 관련 장내 미생물 메커니즘 규명 연구 ○ 청소년 과민성 장 질환 개선을 위한 생물소재 및 우유 유래 기능성 소재 개발 및 질환 완화 임상 검증 ○ 청소년 과민성 장 질환 완화를 위한 유제품 제품화 및 출시 					
		전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 청소년기 만성스트레스 및 장내 미생물 불균형 유래 장 질환 마이크로바이옴 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 청소년기 장질환과 장내미생물 균총의 상호 메카니즘 규명 및 미생물학적 마커 발굴 - 청소년기 장질환 완화 기능성 프로바이오틱스 스타터 컬처 개발 - 동물모델을 활용한 장질환 개선 프로바이오틱스 기작 규명 ○ 청소년기 장 건강 증진 및 장 질환 개선을 위한 우유 내 기능성 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 원유 내 고기능성 소재 개발 연구(마이크로 RNA, 엑소좀, 멜라토닌) - 고기능성 소재 함량이 높은 국내산 원유 및 소재 확보 표준화 - 기능성 소재의 장 건강 개선 메커니즘 규명 ○ 장내 균총 개선 및 장 질환 개선을 위한 기능성 유제품 제품화 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 장 건강 개선을 위한 기능성 소재 식품 임상 효용성 평가 - 고기능성 소재 및 프로바이오틱스를 활용한 발효 유제품 생산 최적화 - 청소년기 장 질환 완화 기능성 유제품 제품화 및 출시 					
		1단계 (해당 시 작성)	목표						
	내용								

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 청소년기 만성 스트레스 및 장내 미생물 불균형 유래 장 질환 개선 연구 기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 학술등재지 논문 게재 (SCI급) 6건 - 국내외 학회 발표 8건 - 인력양성 12건 - 홍보전시 3건 - 고용창출 1건 ○ 청소년기 장 건강 개선을 위한 고기능성 식품소재 및 유제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 특허 출원 2건 - 생물자원 등록 69건 - 기술이전 1건 - 제품화 4건 (우유류 1종, 제제 2종, 발효유 1종) 											
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 청소년 만성 스트레스성 장 질환 완화 및 장내 균총 개선 프로바이오틱스 및 원유 유래 고기능성 소재의 제품화에 따른 신규 시장 개척 및 수익 모델 창출 ○ 스트레스로 인한 장 질환 및 장내 균총 개선 전임상/임상 기술 확립은 신규 프로바이오틱스 및 기능성 물질 발굴과 다양한 정신 질환 및 뇌 질환 연구에 활용 가능함 											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제 18조에 따라 기 과제의 연구결과를 포함 하는 지식재산권(특허) 취득 및 학술논문 게재를 위한 비공개											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	6	2						67	2		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	기능성소재		유제품		청소년		프로바이오틱스		멜라토닌			
영문핵심어 (5개 이내)	functional food		dairy products		adolescence		Probiotics		melatonin			

< 목 차 >

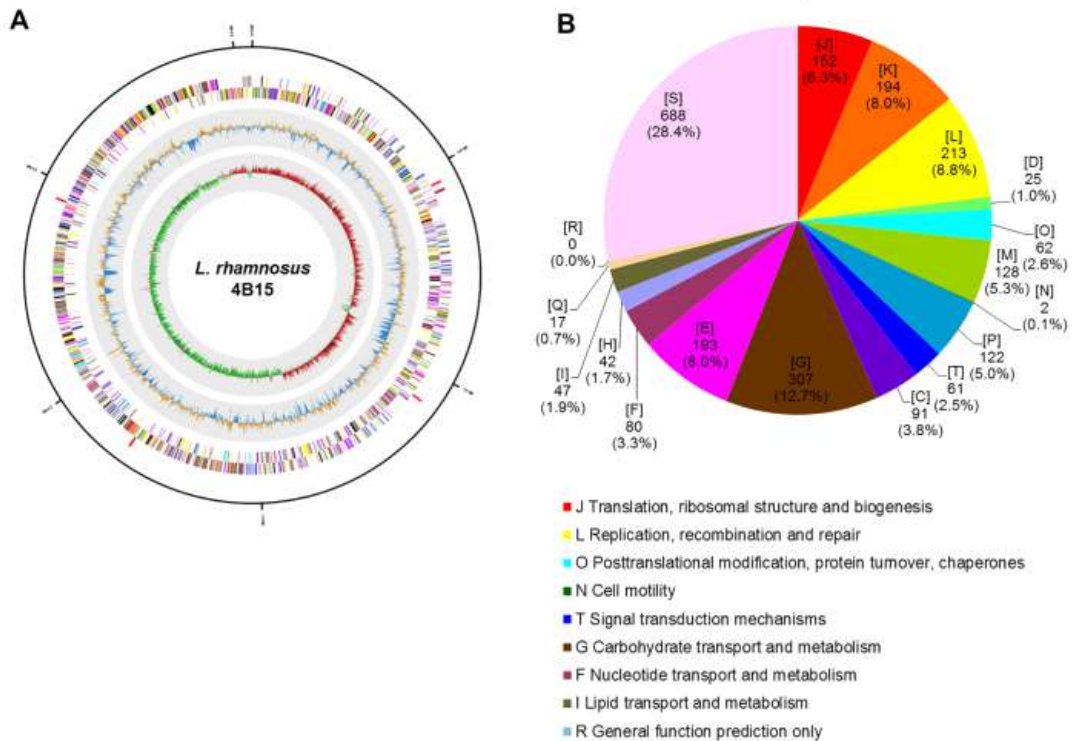
1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1) 스트레스로 인한 장 질환 및 뇌기능 완화 선행연구를 통한 프로바이오틱스 소재 개발 완료

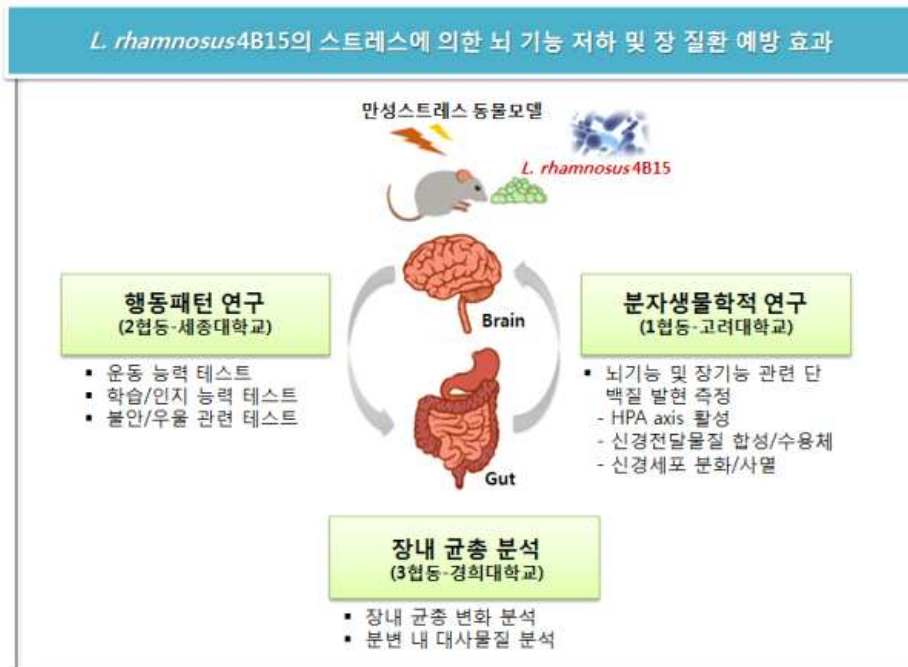
- ① 서울우유협동조합 보유 유산균주인 *L. rhamnosus* 4B15는 영유아 분변에서 분리하였으며, *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통해 높은 항산화 및 장내 염증 억제 활성을 가지고 있는 것으로 확인됨 (오남수 외, 2017).
- ② 기능성 프로바이오틱스 *L. rhamnosus* 4B15 균주는 genomic sequencing 분석을 완료하였으며, 한국미생물보존센터에 국제특허기탁 및 NCBI에 등록을 완료하였음 (오남수 외, 2018).



균주명	KCCM 국제특허기탁번호	NCBI 등록번호
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	KCCM11983P	CP021426

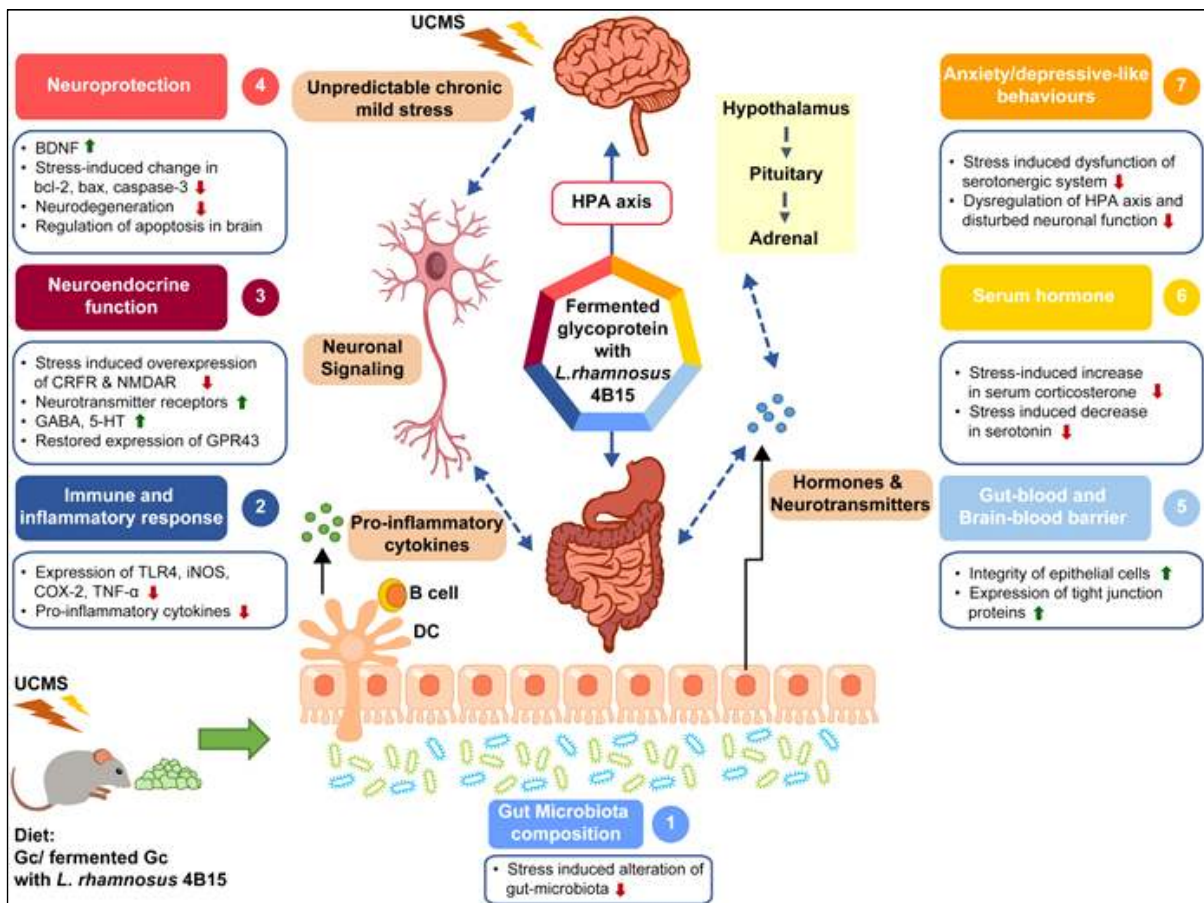
<서울우유협동조합 보유 기능성 프로바이오틱스 L. rhamnosus 4B15 정보>

- ③ 만성 스트레스 동물모델을 통한 L. rhamnosus 4B15의 뇌기능 저하 및 장 질환 완화 효과 확인 완료
 - 본 과제 참여 협동연구기관(고려대학교, 세종대학교, 서울대학교[기존 경희대학교])과 함께 선행연구로써, 만성 스트레스 동물모델을 통한 스트레스성 뇌 기능 저하 및 장 질환 완화 기능성 프로바이오틱스로 *L. rhamnosus* 4B15 균주를 선발하였음.



<스트레스에 의한 뇌 기능 저하 및 장 질환 완화 효과 선행연구>

- 스트레스로 인한 장 질환 및 뇌 기능 저하 메커니즘에 따른 선발 프로바이오틱스인 *L. rhamnosus* 4B15의 질환 예방 효과 연구결과는 다음과 같음.



<L. rhamnosus 4B15의 스트레스성 뇌 기능 저하 및 장 질환 예방 효과 및 기작>

- 대표적인 뇌 유래 신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)는 4B15 식이 그룹에서 유의적으로 가장 높은 발현을 보였으며, 스트레스 반응에 중점적인 역할을 하는 뇌하수체-시상하부-부신 축 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)의

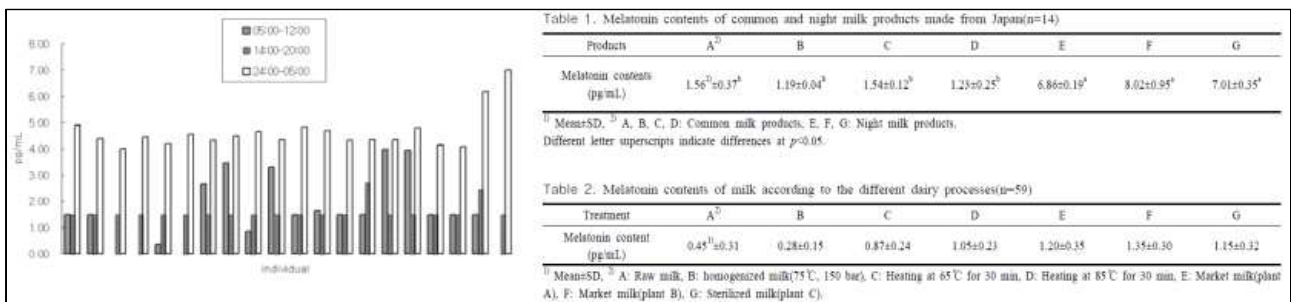
활성을 억제하였음.

- 신경전달물질인 serotonin의 80%는 장에서 합성되어 신체 각 부위로 전달됨. 4B15 식이 그룹에서 tryptophan으로부터 serotonin을 합성하는 효소인 TPH-1의 발현이 유의적으로 가장 높게 나타남.
 - 신경조절인자의 이동은 각 기관의 막 기능에 의해 조절됨. Tight junction은 막의 투과성에 영향을 미치며, gut-blood barrier와 blood-brain barrier (BBB) 기능은 4B15 식이 그룹에서 가장 높은 수준으로 유지됨을 확인함.
- 만성 스트레스/ 장질환 복합 동물모델을 통한 probiotics 의 뇌기능 저하 및 장 질환 완화 효과 확인을 위한 전임상 및 임상적 효용성 검증 연구 필요
- 본 과제의 목표를 위해 구축될 만성 스트레스/장질환 복합 동물모델을 이용한 효능 검증 및 멜라토닌, 엑소좀 및 마이크로RNA의 우유 유래 기능성 물질에 대한 전임상 및 임상 연구는 수행되지 않았기에 인체적용시험 전 전임상 실험을 통한 기능성 규명과 더불어 인체적용연구 결과가 확보되어야함.

2) 우유 내 기능성 유효성분 선정 완료

① 멜라토닌 고함유 우유 제품 개발 및 출시 경험

- 숙면을 돕는 식품으로 널리 알려진 우유에 있어 착유 시간대별 개체별 젖소 원유 내 멜라토닌 함량의 변화를 조사하고, 숙면을 돕기 위한 우유로 알려진 야간 착유 우유 내 멜라토닌 함량을 조사하는 한편, 살균유 및 멸균유 제품 샘플을 분석하여 상업적 균질, 살균 조건에서 멜라토닌 활성 저하 유무를 분석하였음 (강신호 외, 2008).



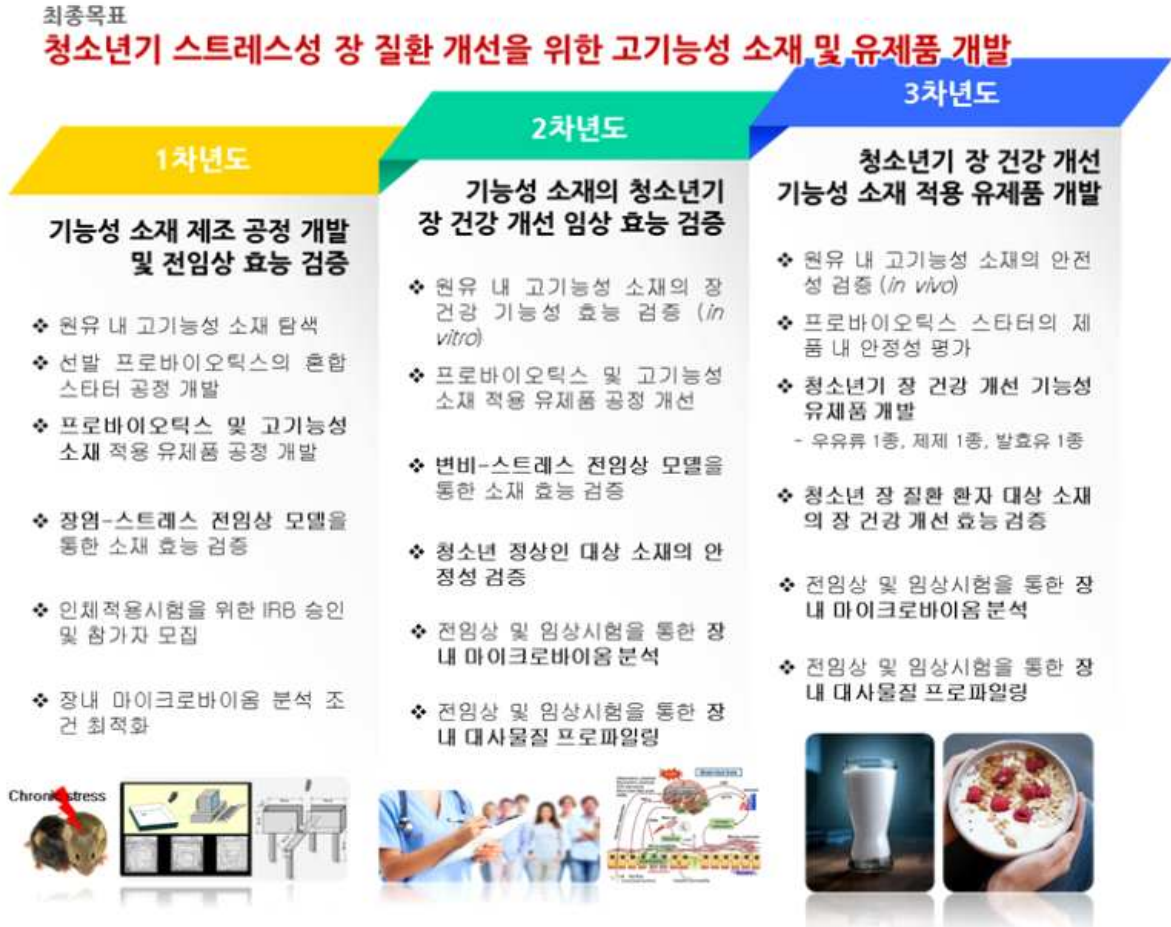
<착유시간과 가공 공정에 따른 원유 및 우유 제품 내 멜라토닌 함량>

- 주관기관인 서울우유협동조합 목장은 자동착유설비를 보유하고 있으며, 멜라토닌 고함유 원유의 착유를 위한 야간 착유 및 추후 제품 생산을 위한 안정적인 원유 공급이 가능함.
- 다음과 같은 연구 결과를 토대로 서울우유협동조합에서는 멜라토닌 고함유, 저지방 ‘굿나잇밀크’를 출시한 경험이 있으며, 관련 생산설비를 보유하고 있음.



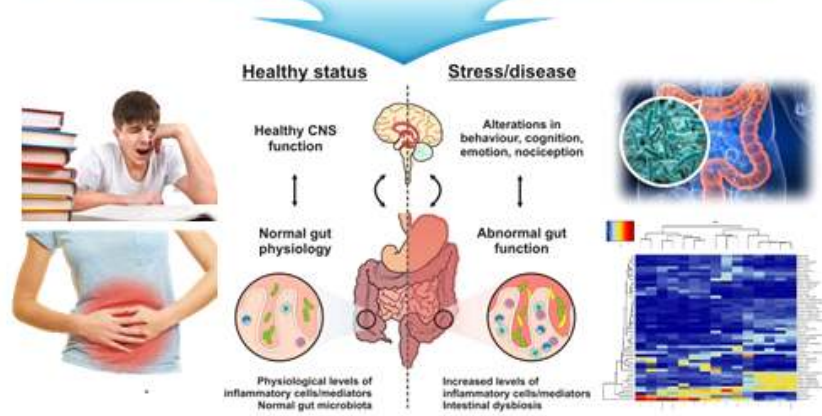
<서울우유협동조합 목장 내 자동착유시스템과 ‘굿나잇 우유’ 제품>

3) 청소년기 스트레스성 장 질환 완화 기능성 유제품 개발 연구추진체계



<청소년기 장 건강 개선 기능성 유제품 개발을 위한 연구체계>

- 스트레스 완화 기능성 프로바이오틱스(*L. rhamnosus* 4B15)의 스타터 대량생산 및 유제품 적용 공정 기술 개발
- 국내산 원유 내 고기능성 소재 탐색(마이크로 RNA, 엑소좀, 멜라토닌 등) 및 유제품 내 안정성 확보
- 스트레스로 인한 장 질환 (과민성 장 증후군[irritable bowel syndrome, IBS], 변비) 동물모델을 활용한 장 질환 개선 기능성 검증 및 장내 균총과의 상호 메커니즘 규명
- 청소년기 장 질환 환자를 대상으로 프로바이오틱스 및 프로바이오틱스 첨가 고기능성 우유의 장 질환 개선 임상 효용성 평가
- 프로바이오틱스 및 고기능성 소재의 전임상 및 인체적용시험 연구기반 안전성 및 기능성 (청소년기 장 질환 및 장내 균총 개선) 검증을 통한 개별인정형 건강기능식품 원료 등록 추진
- 프로바이오틱스 및 원유 내 고기능성 소재를 활용한 기능성 유제품 (우유류 1종, 프로바이오틱스 제제 1종, 발효유 1종) 개발



<스트레스 완화 기능성 프로바이오틱스와 멜라토닌 고함유 우유의 청소년기 장 건강 개선 효과>

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발의 목표 및 내용

(1) 최종목표

- 장 질환 및 스트레스 완화 기능성 유제품 개발을 위한 프로바이오틱스 및 원유 내 고기능성 식품소재의 유제품 적용 기술 개발
- 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 장 질환 (만성스트레스 및 장내 미생물 불균형 유래) 개선 효능 전임상 검증 및 장내 미생물의 상관관계 규명 연구
- 청소년 과민성 장 질환 개선을 위한 유제품 유래 기능성 생물 소재의 질환 완화 임상 검증
- 청소년 과민성 장 질환 완화를 위한 유제품 제품화 (우유류 1종, 프로바이오틱스 제제 1종, 발효유 1종)



(2) 세부목표

- 선발 프로바이오틱스의 스타터 대량생산 공정 개발
- 원유 내 고기능성 소재의 안전성 및 기능성 검증 (in vitro, in vivo)
- 선발 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 유제품 적용 기술 개발 및 제품 내 안정성 평가
- 청소년기 장 질환 완화 연구를 위한 스트레스성 장 질환(IBS/변비) 동물 모델 및 평가시스템 구축

- 스트레스성 장 질환(IBS/변비) 복합 동물 모델에서의 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 유효성 검증
- 동물/인체 장내 마이크로바이옴 분석 조건 최적화 및 기능성 미생물의 전장 유전체 분석
- 스트레스성 장 질환(IBS/변비) 완화 작용 메커니즘 및 장내 미생물과의 상관관계 규명
- 청소년 장 질환(IBS/변비) 환자를 대상으로 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 질환 완화 효과의 생물정보학적 검증
 - IBS-QOL 수치의 임상적 호전 평가
 - Insomnia severity index 임상적 호전 평가
- 유효성이 검증된 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 개별인정형 기능성 원료 인정
- 프로바이오틱스 및 기능성 소재 적용 유제품 3종 개발 (우유류 1종, 프로바이오틱스 제제 1종, 발효유 1종)

(3) 연차별 개발목표 및 내용

구분	연구기관	연구개발 목표	연구개발 내용
1차 년도	주관 서울우유 협동조합	프로바이오틱스 및 원유 내 고기능성 소재 대량생산 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원유 내 멜라토닌 함량 표준화 공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 착유시간에 따른 원유 내 트립토판 및 대사체 함량 평가 - 착유시간에 따른 원유 내 멜라토닌 함량 평가 ○ 선발 프로바이오틱스 스타터 대량생산 공정 확립 ○ 우유 엑소좀 특성 분석 및 엑소좀 유래 마이크로RNA 프로파일링
	제1협동 고려 대학교	스트레스와 염증성 장 질환 복합 동물 모델에서의 분자기전 연구를 통한 유효성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 만성스트레스에 노출된 염증성 장 질환 동물 모델 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - DSS 농도 및 처리 기간에 따른 스트레스성 장 질환 동물모델 탐색 ○ 분자기전연구를 통한 소재의 유효성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 뇌, 소장, 대장, 혈청에서 장 기능 관련 바이오마커 확인
	제2협동 세종 대학교	스트레스와 염증성 장 질환 복합 동물 모델에서의 행동실험을 통한 유효성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 스트레스성 장 질환 동물모델에서 장 기능 완화 평가 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 배변상태를 통한 평가 시스템 구축 - 수면패턴 평가 시스템 구축 - 학습/인지 능력 평가 시스템 구축 ○ 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증
	제3협동	동물 장내 마이크로바이옴 분석	○ 동물모델 미생물총 분석을 위한 total

	서울대학교	조건 최적화 및 기능성 미생물의 전장 유전체 분석	fecal DNA 분리 방법 최적화 - 동물모델 분변샘플로부터의 total fecal DNA 분리 방법 최적화 - 분변샘플로부터 total fecal DNA 분리 정제 후 bacterial DNA 수율 검증 ○ 기능성 미생물에 대한 전장 유전체 분석 - PacBio system을 활용한 기능성 미생물의 전장 유전체 확보 및 유전자 탐색 - 기능성 미생물 유전체에 대한 신규성 규명
	제4협동 삼성서울병원	IRB승인 및 임상시험 준비	○ 삼성서울병원 IRB 승인 ○ 임상시험 준비를 위한 준비 - 통계미팅, 연구계획, 임상군 모집

구분	연구기관	연구개발 목표	연구개발 내용
2차 년도	주관 서울우유협동조합	프로바이오틱스 스타터 대량생산 및 원유 내 고기능성 소재 표준화에 따른 제품 규격화	○ 프로바이오틱스 및 기능성 소재 제조 및 제공 ○ 제품 내 프로바이오틱스 및 기능성 소재 표준화 및 제품 규격 검토 - 제품 내 저장기간에 따른 프로바이오틱스 안정성 평가 - 기능성 소재 지표물질 안정성 평가 ○ 프로바이오틱스 혼합 스타터 대량생산 공정 개선 ○ 우유 엑소좀의 장 건강 기능성 검증 (in vitro) ○ 동물/인체 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석 - 분변 내 대사물질 프로파일링 - 뇌 멜라토닌/세로토닌 분석
	제1협동 고려대학교	스트레스와 변비 유도 복합 동물 모델에서의 분자기전 연구를 통한 유효성 검증	○ 만성스트레스에 노출된 장 질환 (변비) 동물 모델 표준화 - 변비유도 물질(loperamide) 농도 및 처리기간에 따른 스트레스성 장 질환 동물모델 탐색 ○ 분자기전연구를 통한 소재의 유효성 검증 - 뇌, 소장, 대장, 혈청에서 장 기능 관

			<p>련 바이오마커 확인</p> <p>○ 스트레스성 변비 유도 동물 모델에서 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배변상태 확인 - 수면패턴 평가 - 운동능력 평가 - 학습/인지 능력 평가
	제2협동 세종 대학교	스트레스와 변비 유도 복합 동물 모델에서의 행동실험을 통한 유효성 검증	
	제3협동 서울 대학교	기능성 소재에 대한 동물모델 장내 미생물과 장 질환의 상관관계 분석 및 효능 검증	<p>○ 동물모델 장내 마이크로바이옴 분석 및 소재의 효능 검증과 상관관계 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 스트레스에 인한 장 질환(IBS/변비)에 대한 장내 균총 조성 변화 분석 - 기능성 소재에 의한 동물모델의 장내 균총 변화와 생물정보학적 분석 - 장내균총 변화에 따른 스트레스성 장 질환 완화 연관성 규명
	제4협동 삼성 서울병원	인체적용시험을 통한 청소년 스트레스성 장 질환 완화 및 장내균총개선 유효성 검증	<p>○ 청소년 만성 스트레스성 장 질환 환자 대상 임상 효용성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 샘플 투여 후, 혈액검사, 대변검사, IBS QOL, insomnia severity index 통한 증상 개선 효과 검증

구분	연구기관	연구개발 목표	연구개발 내용
3차 년도	주관 서울우유 협동조합	청소년기 장 질환 개선 프로바이오틱스 및 기능성 소재 적용 유제품 개발	<p>○ 청소년기 장 질환 및 장내 균총 개선 기능성 유제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대량시험을 통한 제조공정도 작성 - 제품의 화학적, 미생물학적 및 관능적 특성 평가 - 시제품 내 프로바이오틱스 및 기능성 소재 함량 평가 <p>○ 개별인정형 기능성 원료 인정 신청 준비</p> <p>○ 동물/인체 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 분변 내 대사물질 프로파일링 - 뇌 멜라토닌/세로토닌 분석 <p>○ 프로바이오틱스 혼합 스타터의 유제품 적용 공정 최적화</p> <p>○ 우유 엑소좀의 안전성 평가 (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>)</p>

제1협동 고려 대학교	유효성 검증된 프로바이오틱스와 기능성 소재의 작용 메커니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 프로바이오틱스와 기능성 소재의 스트레시성 장 질환 완화 작용 기전 규명 - 연구결과에 대한 통계학적 분석을 통한 샘플과 질환의 연관성 확립 ○ 선행 연구결과들의 메타분석을 통한 메커니즘 탐색
제2협동 세종 대학교	유효성 검증된 프로바이오틱스와 기능성 소재의 작용 메커니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생화학/분자생물학 기법을 통한 기능성 소재의 작용기전 규명 ○ 시제품의 유효성 검증
제3협동 서울 대학교	프로바이오틱스와 기능성 소재에 대한 인체적용시험을 통한 장 질환 개선 효과의 생물정보학적 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 청소년 장 질환 환자에 대한 기능성 소재의 효능 메타게놈 검증 - 청소년 장 질환 환자의 프로바이오틱스 및 기능성 소재 투여 후 분변샘플 수집 - 장내 미생물총 분석 및 통계학적 분석
제4협동 삼성 서울병원	인체적용시험을 통한 청소년 만성 스트레스성 장 질환 완화 및 장내 균총 개선 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1~2차년도 연구 결과 통계학적 분석 ○ 유제품 투여 환자군 장기 예후 관찰 비교

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

1. 만성스트레스 유래 과민성 장 질환 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발

[주관기관 : 서울우유협동조합 강신호]

가. 프로바이오틱스 및 원유 내 고기능성 소재 대량생산 공정 확립

1) 원유 내 멜라토닌 함량 표준화 공정 확립

① 착유시간 및 축종에 따른 원유 내 멜라토닌 함량 측정

(가) 원유 샘플의 준비

- 원유는 주관기관인 서울우유협동조합의 조합 목장의 홀스타인종(44두)과 저지종(20두) 총 64두로부터 오전 4시, 오후 4시에 착유한 후, -20°C 이하로 보관하며 분석에 사용함.
- 원유 내 멜라토닌의 농축을 위해 동결건조하여 -20°C 이하로 보관하며 분석에 사용함.

(나) 멜라토닌을 포함하는 트립토판 대사물질 분석법 확립

- 멜라토닌은 뇌의 송과선에서 분비되는 수면에 중요한 역할을 하는 호르몬으로, 낮에 비하여 밤에 10~15배 높은 농도로 생성되어 숙면 및 신경안정에 중요한 역할을 함. 뿐만 아니라, 항산화, 항암, 항노화 및 면역조절 효과를 나타낸다는 연구 결과가 보고되었음 (Song et al., 2018).
- 멜라토닌은 단백질 아미노산인 트립토판으로부터 세로토닌을 거쳐 생성됨. 따라서 트립토판 및 세로토닌과 멜라토닌 함량이 높은 우유 섭취 시, 스트레스 및 수면장애를 완화 시킬 수 있음 (그림 1-1).
- 세로토닌은 대표적인 신경전달물질로서 의식수준이나 건강상태 등에 큰 영향을 미치는 지표물질임.
- 세로토닌의 분비량이 적어지면 우울장애, 성격장애, 섭식장애, 불안장애 등이 올 수 있음.

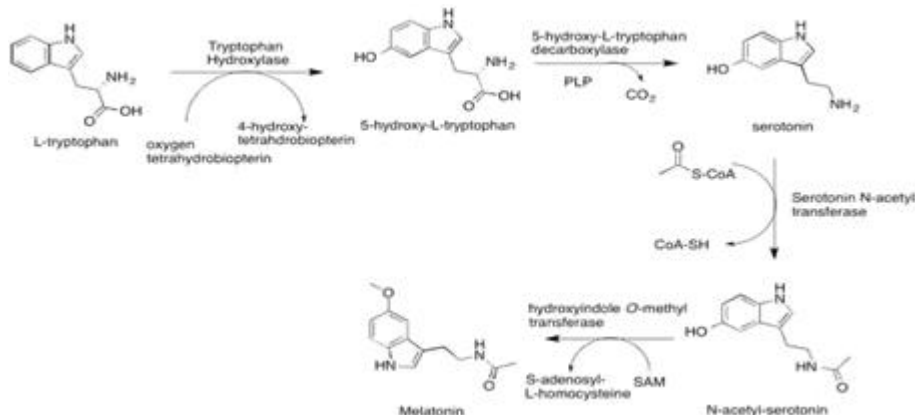


그림 1-1. 트립토판 대사과정 및 대사물질

- 멜라토닌을 포함한 트립토판 대사물질 5종(L-Tryptophan, 5-Hydroxy-L-tryptophan, Serotonin, N-acetylserotonin, Melatonin)의 분석조건을 확립하였으며, 다음과 같음 (그림 1-2, 1-3; 표 1-1,1-2).

표 1-1. 트립토판 대사물질 분석 조건

	분석조건
Mobile Phase	5mM Ammonium Formate in 20% MeOH(A) 100% MeOH(B)
Gradient	Isocratic
Flow rate	0.5 mL/min
Column	C18 100mm x 4.6mm x 1.8uM
Column temp.	40°C
Mode	ESI negative

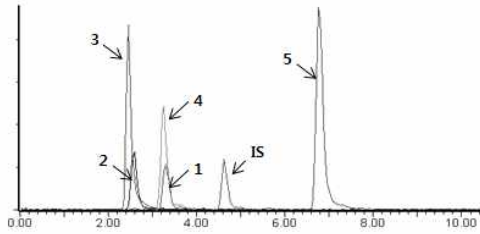
표 1-2. 트립토판 대사물질 분석 MRM 조건

Metabolite	parent (m/z)	Daughter (m/z)	Cone/Collision (V)
L-Tryptophan	205.04	146.01/160*	20/15,10
5-Hydroxy-L-Tryptophan	221.01	115.02/133.97*	20/25
Serotonin	177.04	115.04/132.02/160*	15/25,20,10
N-Acetyl-Serotonin	219.05	106.95/131.57*	20/30,20
Melatonin	233.05	173.9*/216.2	20/15,10
Melatonin D4	236.97	163/178.02*	20/30,15
O-Desvenlafaxine	264.11	58.03*/106.95	25/15,30

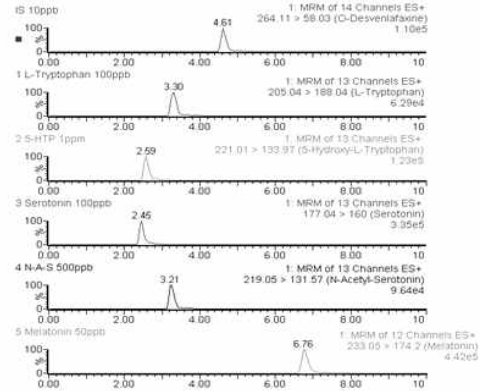


그림 1-2. 트립토판 대사물질 분석장비 LC/MS/MS

1. L-Tryptophan
2. 5-Hydroxy-L-Tryptophan
3. Serotonin(5-HydroxyTryptamine (5-HT))
4. N-acetyl Serotonin
5. Melatonin(N-acetyl-5-methoxy tryptamine)



Overlaid Extracted Ion (Quantification ion) Chromatogram of Tryptophan metabolite and Internal Standard (O-Desvenlafaxine, categorized as a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor)



MRM Chromatogram of Tryptophan metabolite and Internal Standard

그림 1-3. 트립토판 대사물질 표준품 크로마토그램

(다) 착유시간 및 축종에 따른 원유 내 멜라토닌 함량

- 홀스타인종 및 저지종의 원유 내 멜라토닌 함량 분석 결과, 저녁 착유 우유(오후 4시)의 경우 두 가지 축종의 원유에서 모두 멜라토닌이 불검출 되었으며, 새벽 착유 우유(새벽 4시)의 경우는 홀스타인종의 경우 50~300pg/mL 수준의 멜라토닌이 함유되어 있었으며, 저지종의 경우 50~250pg/mL 수준의 멜라토닌이 검출됨 (그림 1-4).
- 원유 내 멜라토닌 함량은 축종에 따라 큰 차이가 없는 것으로 판단되며, 축종 보다는 개체별로 멜라토닌 함량이 차이가 나는 것을 확인할 수 있었음.
- 또한, 착유시간에 따라 멜라토닌 함량이 유의적인 차이를 나타냄.

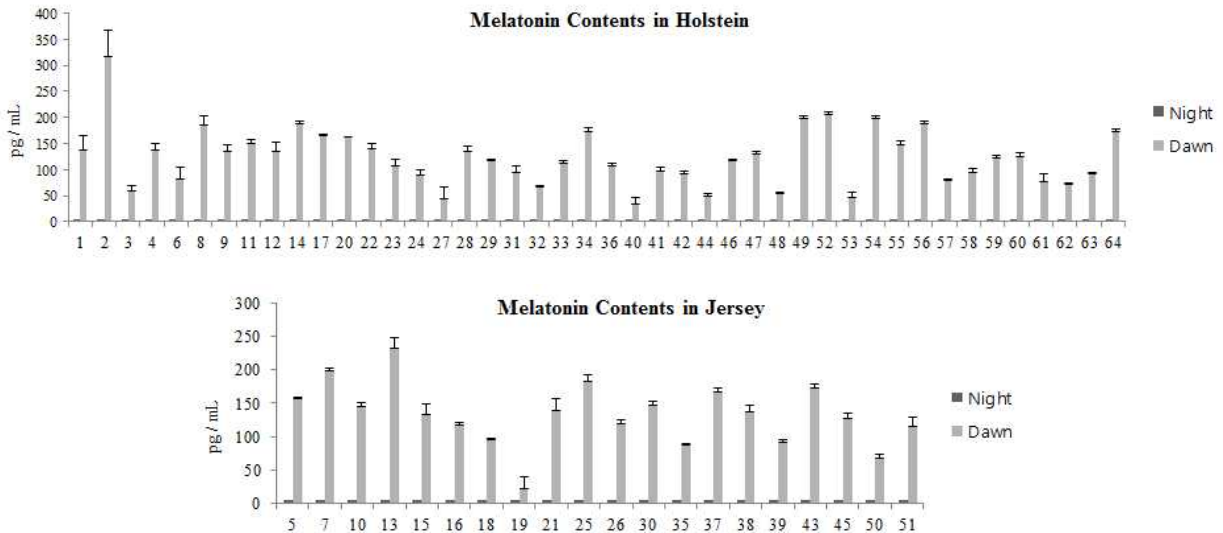


그림 1-4. 축종 및 착유시간 별 원유 내 멜라토닌 함량 (LC/MS/MS 분석)

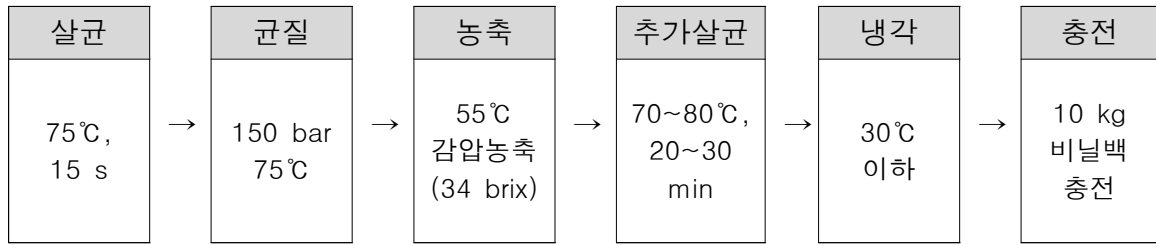
나. 프로바이오틱스 스타터 대량생산 및 원유 내 고기능성 소재 표준화에 따른 제품 규격화

1) 프로바이오틱스 및 기능성 소재 제조 및 제공

- ① 새벽 착유 우유(멜라토닌 고함유 우유) 분무 건조

- AM 5:00 이전 새벽 착유 -> OEM공장(농축공정) 이송

- 농축 공정(범산목장)



- 분무 공정(춘천바이오산업진흥원) (그림 1-5)

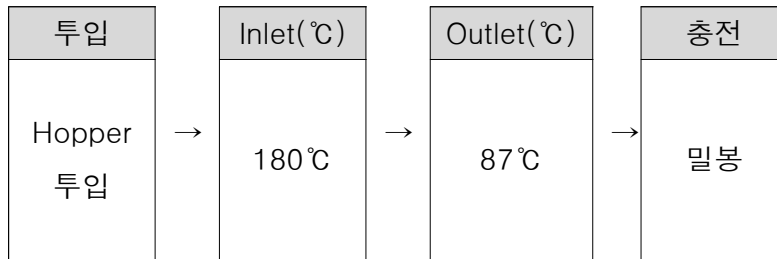


그림 1-5. 분무 건조 설비(춘천바이오산업진흥원)

② 프로바이오틱스 제제 제조

- 선발 프로바이오틱스 *L. rhamnosus* 4B15를 사용하여 분말제제 제조 (그림 1-6)



그림 1-6. 프로바이오틱스 제제 제조 공정

③ 임상시험용 혼합 분말 제제 생산

- 멜라토닌 고함유 우유 분말과 프로바이오틱스의 혼합 분말 제제를 생산함 (그림 1-7).
- 생산 공장 : ㈜다움
- 제품특징

분류	배합비	내용	비고
혼합분말 1 (40 g)	전지분유 75%, 포도당 25%	일반우유 분말	
혼합분말 2 (41 g)	새벽착유유 농축 분유 73.62%, 포도당 24.54%, 유산균 분말 1.84%	멜라토닌 고함유 우유 분말 + 유산균	새벽착유 우유
혼합분말 3 (41 g)	전지분유 73.62%, 포도당 24.54%, 유산균 분말 1.84%	일반우유 분말 + 유산균	

*유산균 - *Lactobacillus rhamnosus* 4B15



그림 1-7. 1/2회 분량 파우치[좌], 1번들(파우치 7개입) 실사[우]

2) 제품 내 프로바이오틱스 및 기능성 소재 표준화 및 제품 규격 검토

① 멜라토닌 함량 분석

(가) 축종 및 착유시간에 따른 원유 내 멜라토닌 함량

- 실제 새벽 착유 우유의 대량 생산이 가능한 서울우유협동조합 목장의 젖소 30두에서 새벽 착유(새벽 4시) 및 저녁 착유(저녁 4시)를 통해 총 66개의 원유 샘플을 채취하였으며, ELISA 분석 원리를 활용한 melatonin quantification kit (Salimetrics, Pennsylvania, USA)를 사용하여 분석하였음.
- 새벽 착유 우유와 저녁 착유 우유의 멜라토닌 함량은 각각 4.6 ± 5.9 pg/mL와 10.6 ± 2.6 pg/mL로 나타났으며, 총 30두 중 5두를 제외하고는 새벽 착유 우유에서 저녁 착유 우유보다 높은 멜라토닌 함량을 보였음. 이는 멜라토닌의 합성과 분비는 암기에 촉진되고, 명기에 억제된다는 보고(Wurtman et al., 1963; Kim et al., 2013)와 일치하는 결과임 (그림 1-8).

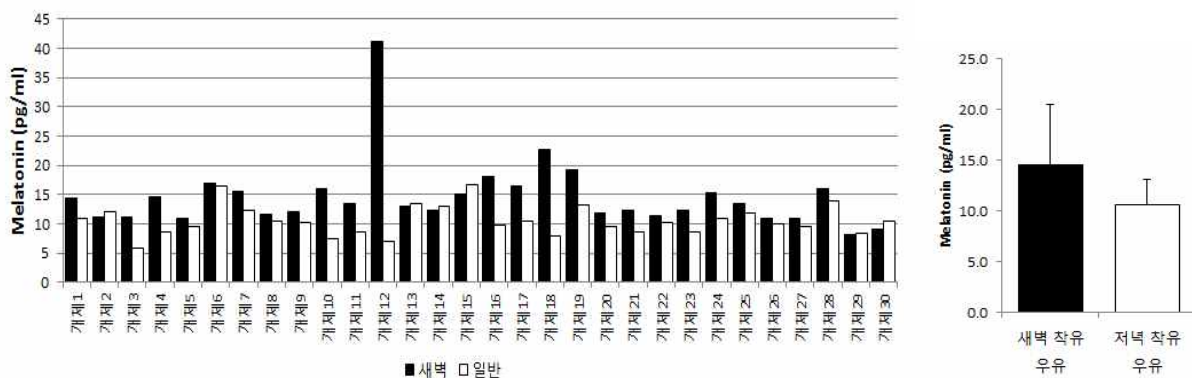


그림 1-8. 착유시간 별 원유 내 멜라토닌 함량 (ELISA 분석)

- 추가적으로, 본 연구진의 선행연구결과 축종에 따른 원유 내 멜라토닌 함량 차이를 규명하고자 서울우유협동조합 양평 생명공학 연구소에서 사육 중인 홀스타인종과 저지종 각 6두의 새벽 착유 우유와 저녁 착유 우유의 멜라토닌 함량 분석을 ELISA법을 통해 측정하였음.
- 홀스타인종과 저지종의 새벽 착유 우유 내 멜라토닌 함량은 각각 17.7 ± 2.0 pg/mL와 13.4 ± 0.7 pg/mL, 저녁 착유 우유 내 멜라토닌 함량은 각각 10.4 ± 0.4 pg/mL, 8.7 ± 0.4 pg/mL로 홀스타인종에서 착유한 원유 내 멜라토닌 함량이 저지종에 비해 높았음 (표 1-3).

- 따라서 본 연구진은 홀스타인종에서 새벽 착유를 통해 멜라토닌 함량이 비교적 높은 원유를 수거하였으며, 제품화를 위한 원료의 안정적인 대량 공급이 가능함을 확인하였음.

표 1-3. 저지 종 원유와 홀스타인 종 원유 내 멜라토닌 함량¹⁾

	Individuals	03:30 AM (pg/mL)	15:30 PM (pg/mL)
저지종	7462	10.8 ± 0.5 ^d	7.0 ± 0.4 ^{ef}
	8677	17.6 ± 0.9 ^{abc}	12.9 ± 1.3 ^{ab}
	6628	14.3 ± 0.8 ^{bcd}	9.8 ± 0.3 ^c
	6990	14.2 ± 0.7 ^{bcd}	7.6 ± 0.3 ^{def}
	4144	12.2 ± 0.6 ^{cd}	9.3 ± 0.6 ^{cd}
	4922	11.0 ± 2.5 ^d	5.6 ± 0.2 ^{fg}
	Mean	13.4 ± 0.7 ^B	8.7 ± 0.4
홀스타인종	1477	19.7 ± 0.6 ^{ab}	11.3 ± 0.5 ^{bc}
	5739	12.9 ± 1.1 ^{cd}	9.8 ± 0.3 ^c
	0644	23.0 ± 1.3 ^a	13.0 ± 1.2 ^{ab}
	3622	15.4 ± 1.7 ^{bcd}	9.1 ± 0.9 ^{cde}
	1476	23.2 ± 1.3 ^a	14.5 ± 0.8 ^a
	6235	11.8 ± 0.8 ^{cd}	4.6 ± 1.2 ^g
	Mean	17.7 ± 2.0 ^A	10.4 ± 0.4

¹⁾ 평균 ± 표준편차, a,b,c,d,e,f,g 젖소 개체 간의 차이 (p<0.05)

^{A,B} 저지종과 홀스타인종 그룹간의 차이 (p<0.05)

(나) 원료의 가공 공정 중 멜라토닌 안정성 검증

- 새벽 착유 우유의 살균, 농축 및 분말화 공정 과정 중 멜라토닌 성분의 안정성 확인을 위해 공정 단계별(▼표시) 샘플링을 하여 멜라토닌 함량을 측정하였음 (그림 1-9).
- 원유의 살균, 농축, 분말화 공정 후 샘플 내 멜라토닌 안정성 확인을 위해 2배치로 실험을 수행하였으며, 분석 결과는 표 1-4와 같음.
- 원유 내 멜라토닌 함량은 약 10.0 pg/mL이었으며, 살균 후 멜라토닌 함량은 약 12.6 pg/mL로 약간 증가하였음. 농축 공정의 경우, 농축이 약 3~4배 진행되었으며, 농축 샘플 내 멜라토닌 함량 (약 35.4 pg/mL) 역시 비례하여 증가하는 경향을 나타내었음. 농축한 원유를 분무건조하여 얻은 분말 샘플의 경우 약 97.6 pg/g의 멜라토닌을 함유하고 있었음.
- 원유 내 고형분은 약 12% 정도 차지하고 있는 것으로 알려져 있으며, 살균, 농축, 분말 공정을 거친 분말 샘플 내 멜라토닌 함량은 원유와 비교하였을 때 약 9.8 배 농축된 것으로 보임에 따라 기능성 지표물질인 멜라토닌 성분은 80 % 이상의 공정 안정성을 나타내는 것으로 판단하였음.

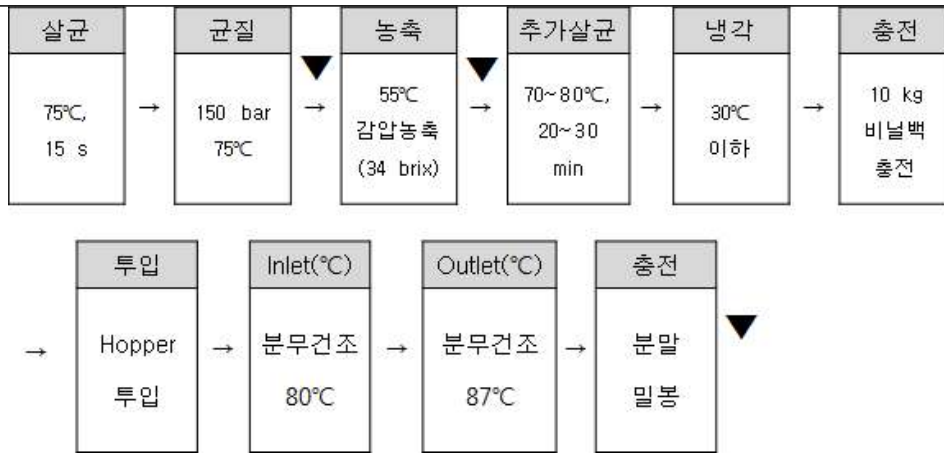


그림 1-9. 원료(새벽 착유 우유)의 가공 공정 중 멜라토닌 안정성 검증을 위한 샘플링

표 1-4. 원유의 가공 공정에 따른 원료 내 멜라토닌 함량

가공 공정	배치1	배치2	평균
원유 melatonin (pg/mL)	10.51	9.49	10.00
살균 melatonin (pg/mL)	15.40	9.88	12.64
농축 melatonin (pg/mL)	38.84	31.88	35.36
분말 melatonin (pg/g)	103.40	91.70	97.55

② 프로바이오틱스 제제 내 유산균 수 측정

(가) 분말 제제 내 프로바이오틱스 안정성 평가

- 인체적용시험을 위한 분말 제제를 제조하였으며, 제제 내 프로바이오틱스 안정성 평가를 위해 총 유산균수를 측정하였으며, 이론치와 실측치를 비교(공정 중 손실 비교 평가)하였음.
- 프로바이오틱스가 혼합되는 임상제제 2종의 총 유산균수 측정 결과, 이론치 대비 약 0.6~3배 차이가 발생하였음 (표 1-5).
- 프로바이오틱스 포함 제품의 균수 표기사항 특성 상 log값으로 표기됨에 따라 공정 중 발생하는 유산균 손실을 반영하여 추후 제제 제조 시 프로바이오틱스 배합비를 2배 이상으로 늘리는 것으로 확정함.

표 1-5. 프로바이오틱스 포함 제제 내 총 유산균수 이론치 및 실측치

항목		총 유산균수 (CFU/g)
이론치		1 x 10 ⁸
실측치	임상 제제 2	3 x 10 ⁸
	임상 제제 3	6 x 10 ⁷

(나) 저장기간에 따른 분말 제제 내 프로바이오틱스 안정성 평가

- 임상 제제 3종 중 새벽 착유 우유 및 프로바이오틱스를 포함하는 임상 제제 2에 대한 저장기간 및 온도조건에 따른 유산균 생균수 변화를 측정하여 유산균 안정성을 평가하였음.
- 저장 온도는 상온, 4°C, 15°C, 25°C, 35°C, 40°C로 설정하였으며, 저장기간 동안 1개월 단위로 10개월 동안 총 유산균수를 측정하였음.



그림 1-10. 임상 제제 2의 온도별 저장테스트

- 저장기간 및 저장온도에 따른 제제 내 총 유산균수 측정 결과 (표 1-6), 온도가 낮을수록 생존율이 높았으며, 저장기간에 길어짐에 따라 총 유산균수가 감소하였음. 대장균군은 제조 직후 및 저장기간 동안 검출되지 않았음.
- 제제 내 프로바이오틱스 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15의 생존율이 가장 높았던 저장 온도인 4°C에서는 저장 4개월 차에 균수가 급격히 감소하여 82.6%의 생존율을 나타내었으며 (1개월, 102.5%; 2개월, 102.4%; 3개월, 101.9%), 15°C 저장 샘플에서도 4개월 이후 급격히 균수가 감소하였음.
- 25°C 이상의 온도에서 저장 시에는 저장 1개월 차부터 80% 이하의 생존율을 나타내어 4°C 이하 냉장 보관하는 것이 적합하다고 판단함.

표 1-6. 저장기간 및 저장온도에 따른 제제 내 총 유산균수 변화

저장기간	저장 온도 (°C)	총 유산균수 (LogCFU/g)	생존율 (%)	대장균군
제조 직후		9.49	100.0	N.D.
1개월	4°C	9.73	102.5	N.D.
	15°C	9.36	98.7	N.D.
	25°C	7.54	79.5	N.D.
	35°C	4.63	48.8	N.D.

	40°C	2.20	23.2	N.D.
	상온	7.75	81.7	N.D.
2개월	4°C	9.72	102.4	N.D.
	15°C	9.24	97.4	N.D.
	25°C	7.36	77.6	N.D.
	35°C	3.00	31.6	N.D.
	40°C	2.22	23.4	N.D.
	상온	7.15	75.4	N.D.
3개월	4°C	9.66	101.9	N.D.
	15°C	9.32	98.2	N.D.
	25°C	6.95	73.3	N.D.
	35°C	2.38	25.1	N.D.
	40°C	2.00	21.1	N.D.
	상온	7.04	74.2	N.D.
4개월	4°C	7.84	82.6	N.D.
	15°C	6.54	69.0	N.D.
	25°C	6.57	69.3	N.D.
	35°C	1.70	17.9	N.D.
	40°C	-	-	-
	상온	6.81	71.8	N.D.
5개월	4°C	7.64	80.5	N.D.
	15°C	6.72	70.9	N.D.
	25°C	6.58	69.4	N.D.
	35°C	-	-	-
	40°C	-	-	-
	상온	6.81	71.8	N.D.
6개월	4°C	7.25	76.4	N.D.
	15°C	6.84	72.1	N.D.
	25°C	6.78	71.5	N.D.
	35°C	-	-	-
	40°C	-	-	-
	상온	6.76	71.3	N.D.
9개월	4°C	6.95	73.3	N.D.
	15°C	6.53	68.8	N.D.
	25°C	6.53	68.9	N.D.
	35°C	-	-	-
	40°C	-	-	-
	상온	6.37	67.1	N.D.
10개월	4°C	6.81	71.7	N.D.
	15°C	6.40	67.5	N.D.
	25°C	6.66	70.2	N.D.
	35°C	-	-	-
	40°C	-	-	-
	상온	5.79	61.0	N.D.

다. 청소년기 장 질환 개선 프로바이오틱스 및 기능성 소재 적용 유제품 개발

1) 만성 스트레스성 장 질환 개선 기능성 프로바이오틱스 포함 유산균 제제 개발

① 건강기능식품으로의 유산균 제제 관련 법령

표 1-7. 프로바이오틱스의 기준 및 규격 (건강기능식품의 기준 및 규격, 고시 제2021-95호)

2-51 프로바이오틱스

1) 제조기준

(1) 원재료 : 다음의 미생물 또는 이를 혼합한 균과 균 또는 배양체를 배양시키기 위한 배지 및 보호제

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

고시 제2021-65호(2021.7.29.), 시행일(2024.1.1.)

(1) 원재료 : 다음의 미생물 또는 이를 혼합한 균과 균 또는 배양체를 배양시키기 위한 배지 및 보호제

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

(2) 제조방법

(가) (1)의 원재료를 이용하여 배양하거나 배양·건조하여 제조하여야 하며, 배양하여 제조하는 경우에는 「식품의 기준 및 규격」의 발효유류(발효유분말 제외)의 제조·가공기준 및 규격(대장균군, 살모넬라, 리스테리아모노사이토제네스, 황색포도상구균만 해당한다)에 적합하여야 함

(나) *Enterococcus* 속 균주는 항생제 내성 유전자 및 독성 유전자가 없는 경우에 한하여 사용 가능함

(3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 생균을 100,000,000 CFU/g 이상 함유하고 있어야 함

고시 제2021-65호(2021.7.29.), 시행일(2024.1.1.)

(3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 생균을 100,000,000(1억) CFU/g 이상 함유하고 있어야 함

2) 규격

- (1) 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없어야 함
- (2) 프로바이오틱스 수 : 표시량 이상
- (3) 대장균군 : 음성

3) 최종제품의 요건

- (1) 기능성 내용 : 유산균 증식 및 유해균 억제·배변활동 원활·장 건강에 도움을 줄 수 있음
- (2) 일일섭취량
100,000,000 ~ 10,000,000,000 CFU

고시 제2021-65호(2021.7.29.), 시행일(2024.1.1.)

(2) 일일섭취량
100,000,000(1억) ~ 10,000,000,000(100억) CFU

(3) 섭취 시 주의사항

- (가) 질환이 있거나 의약품 복용 시 전문가와 상담할 것
- (나) 알레르기 체질 등은 개인에 따라 과민반응을 나타낼 수 있음
- (다) 어린이가 함부로 섭취하지 않도록 일일섭취량 방법을 지도할 것
- (라) 이상사례 발생 시 섭취를 중단하고 전문가와 상담할 것

4) 시험법

- (1) 성상 : 제 4. 2-7 성상시험법
- (2) 프로바이오틱스 수 : 제 4. 3-57 유산균수, 3-58 유산간·구균 및 비피더스균
- (3) 대장균군 : [별표 4] 참조

② 제조공정도 및 배합비 설정

(가) 선발 프로바이오틱스 분말 표준화

- 유산균 제제 제조를 위한 원료로써 선발 프로바이오틱스인 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 균주의 분말화 및 대량생산을 위해 프로바이오틱스 전문업체인 (주)락토메이슨과 함께 보장균수 확보를 위한 배양최적화와 저장안정성 연구를 통한 분말 표준화를 진행하였음.



그림 1-11. 선발 프로바이오틱스 원료의 분말화 및 대량생산

- (주)락토메이슨에서 제공 받은 QC 결과, 선발 프로바이오틱스 분말 내 생균수는 6×10^{11} CFU/g이었으며, QC 결과 검증을 위해 분말 내 생균수를 측정해 본 결과, $5.3 \sim 5.6 \times 10^{11}$ CFU/g로 비슷한 수준으로 나타났음.
- 또한, 프로바이오틱스 분말 공정에 따른 균주의 생육활성도는 300L 배양 시 3.86 kg이 나오는 것으로 우수한 편이었음.

표 1-8. 선발 프로바이오틱스 분말 생균수 측정

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15
QC 측정	6×10^{11} CFU/g
BCP agar	5.3×10^{11} CFU/g
MRS agar	5.6×10^{11} CFU/g

- 추가적으로 (주)락토메이슨에서 제공 받은 프로바이오틱스 분말 내 균주 오염 여부를 확인하였음.
- 분말을 MRS agar spreading 한 후, colony를 여러 개 취해 MALDI-TOF를 통한 미생물 동정 분석 결과, *Lactobacillus rhamnosus*로 확인되었음.

(나) 선발 프로바이오틱스 포함 유산균 제제 제조공정도 및 배합비 설정

- 선발 프로바이오틱스 균주와 추가 혼합 유산균주를 함께 배합하였으며, 이중 기능성을 위한 소재로 면역 제제에는 아연을, 체지방 감소 제제에는 가르시니아캄보지아추출물을 추가하여 배합비를 설정하였음 (표 1-9).
- 표 1-의 배합비에 따라 일부 원료를 칭량한 후, 유동층 건조를 실시함. 유동층 건조는 분말의 물성을 개선하여 섭취 및 배합 용이성을 도모하기 위해 수행함. 나머지 원료를 투입하여 혼합한 후, 스틱포에 충전 포장함.

표 1-9. 유산균 제제 2종 배합비

유산균 제제 (면역)		유산균 제제 (체지방 감소)	
원료명	배합비(%)	원료명	배합비(%)
프락토올리고당	0.5132	프락토올리고당	0.3002

포도당	0.05	요거트분말	0.19
덱스트린	0.12	포도맛분말	0.02
옥수수전분	0.05	옥수수전분	0.05
포도맛분말	0.168	가르시니아	0.3
자일리톨	0.05	캄보지아 추출물	0.0098
7종 혼합유산균 400B	0.0098	L. rhamnosus 4B15	0.012
L. rhamnosus 4B15	0.012	L. gasseri 505	0.003
L. gasseri 505	0.003	자일리톨	0.1
글루콘산아연	0.012	구연산	0.005
구연산	0.002	이산화규소	0.01
이산화규소	0.005	합계	1
포도향 분말	0.005		
합계	1		



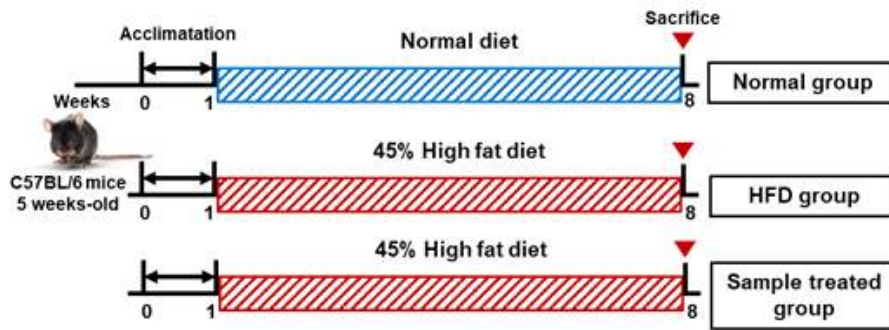
그림 1-12. 유산균제 제조공정도

(다) 유산균 제제 2종 대량생산

- 배합비와 제조공정도 확정 후, 유산균 제제 2종 시제품을 제작하였음.
- 제조한 유산균 제제2종 관련 세부 특징은 표 1-10과 같음.
- 개발 유산균 제제의 출시를 위해 2종의 제품 중 유산균 제제(체지방 감소) 제품에 대한 품목제조신고를 완료하였으며, 2022년 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 출시 예정임.

※ *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 균주의 체지방 감소 효과 검증

- 1) 전임상 시험을 통한 4B15 균주의 항비만 활성 및 장내 균총 개선 효과 검증
 - (1) 동물실험 및 마우스 그룹



- ① ND : normal diet
- ② HFD : 45% high fat diet
- ③ PRO : 45% high fat diet + 4B15 (10^8 CFU/kg/day)

2) 실험 방법

(1) 체중변화

- (2) 지방무게 측정 : 부고환 지방(epididymal fat)과 서혜부 지방(inguinal fat)으로부터 백색 지방 조직(white adipose tissue, WAT)을 적출하여 무게와 크기를 측정함.
- (3) 혈청 내 지질 함량 측정 : 채취한 혈액 시료에서 혈청을 분리한 후, 중성지방, 총 콜레스테롤, 렙틴 함량을 측정함.
- (4) 지방 조직 내 비만 조절 인자의 유전자 발현 수준 평가
- (5) 분변 샘플 pyrosequencing을 통한 장내 균총 분석

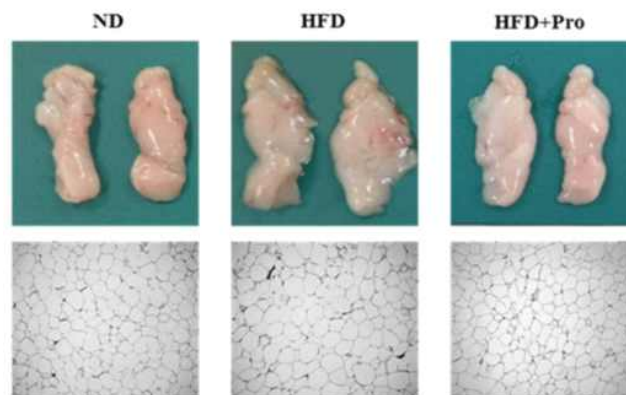
3) 실험 결과

(1) 체중변화 및 지방무게

- ① 4B15 섭취군의 경우, 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 체중 증가율이나 내장 지방의 증가 정도가 훨씬 낮아지는 것을 확인

그룹	체중 증가율(%)	지방 무게(g)
ND	27.9 ± 3.5	1.2 ± 0.2
HFD	58.3 ± 6.7	3.5 ± 0.4
PRO	49.7 ± 7.7	2.6 ± 0.6

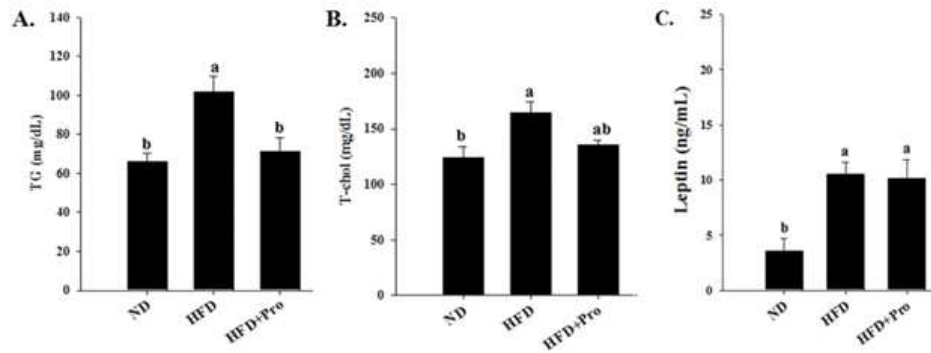
- ② 4B15 섭취군의 부고환 지방 크기가 정상 식이를 섭취시킨 음성 대조군(ND)의 경우와 비슷하여, 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 훨씬 작은 것으로 확인. 또한, 지방세포의 크기 역시 4B15 섭취군의 경우 정상 식이를 섭취시킨 음성 대조군(ND)의 경우와 비슷하여, 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 훨씬 작은 것으로 확인



(2) 혈액 내 지질 함량

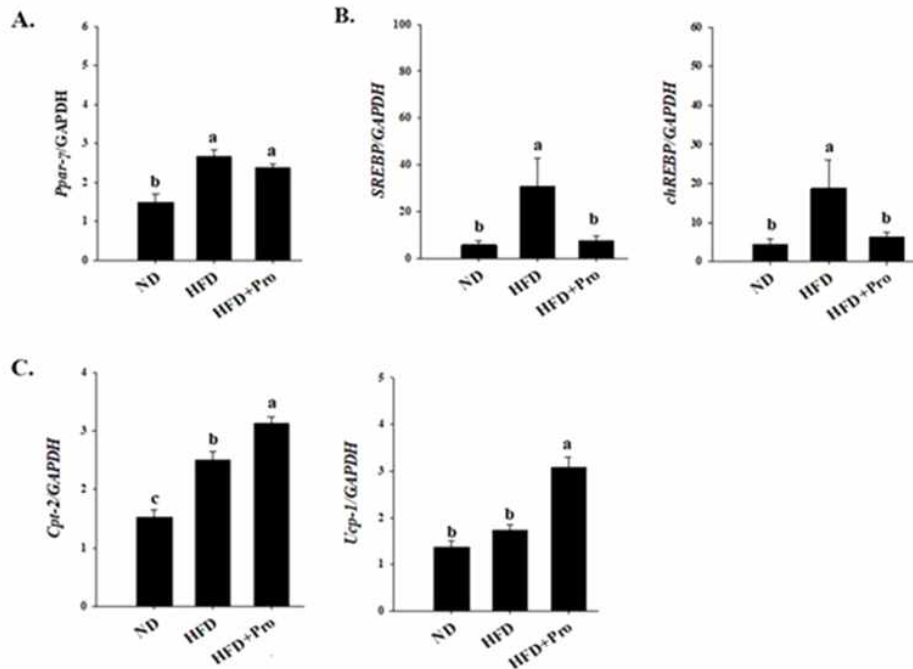
- 4B15 균주를 처리한 그룹의 경우에는 중성지방의 함량, 총 콜레스테롤의 함량 및 렙틴의 함량

이 모두 정상 식이를 섭취시킨 음성 대조군(ND)의 경우와 비슷하여, 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 훨씬 낮은 것으로 확인



(3) 비만 조절 인자 유전자 발현 수준

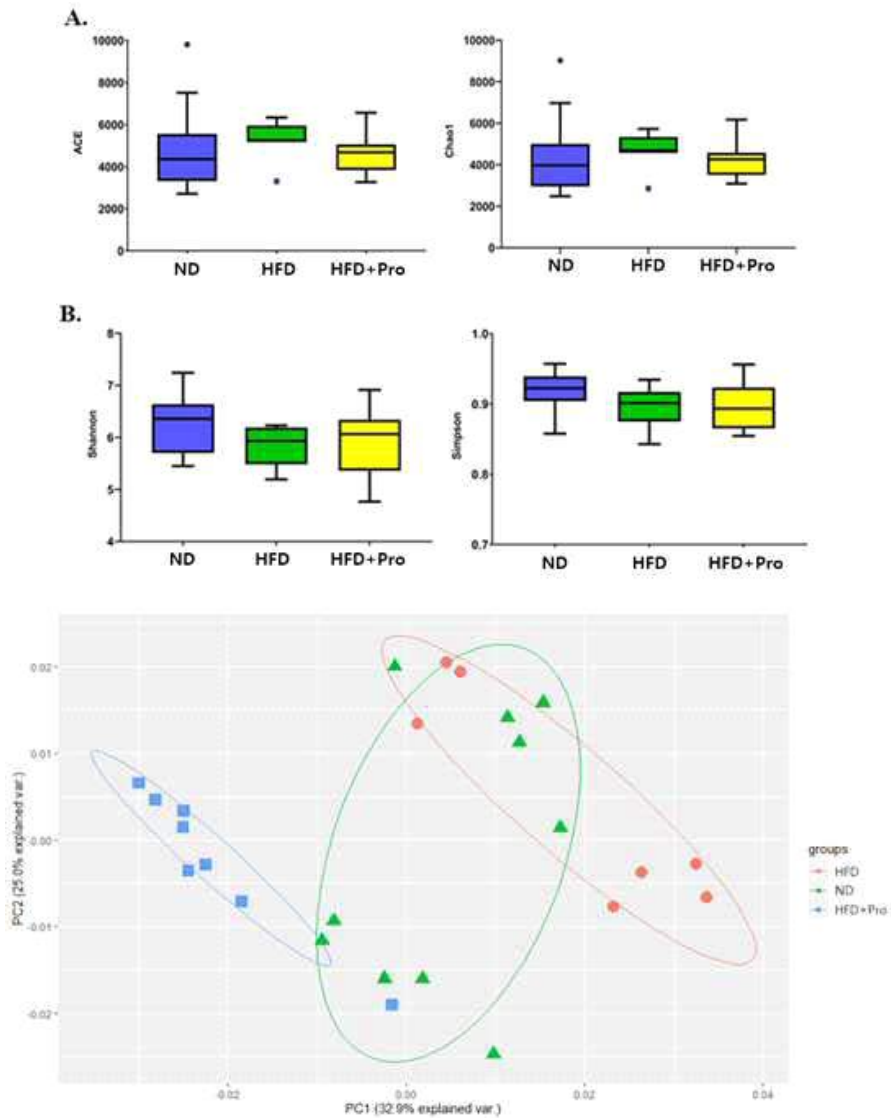
- ① 4B15 균주를 처리한 실험군(HFD+Pro)의 경우에 PPAR- γ 의 mRNA 발현량이 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 낮은 것으로 확인
- ② 4B15 균주를 처리한 실험군(HFD+Pro)의 경우에 Cpt-2와 Ucp-1의 mRNA 발현이 모두 정상 식이를 섭취시킨 음성 대조군(ND)나 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 훨씬 높은 것으로 확인
- ③ 4B15 균주를 처리한 실험군(HFD+Pro)의 경우에 SREBP-1와 chREBP의 mRNA 발현이 모두 정상 식이를 섭취시킨 음성 대조군(ND)의 경우와 비슷하여, 고지방 식이만을 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에 비해 훨씬 낮은 것으로 확인

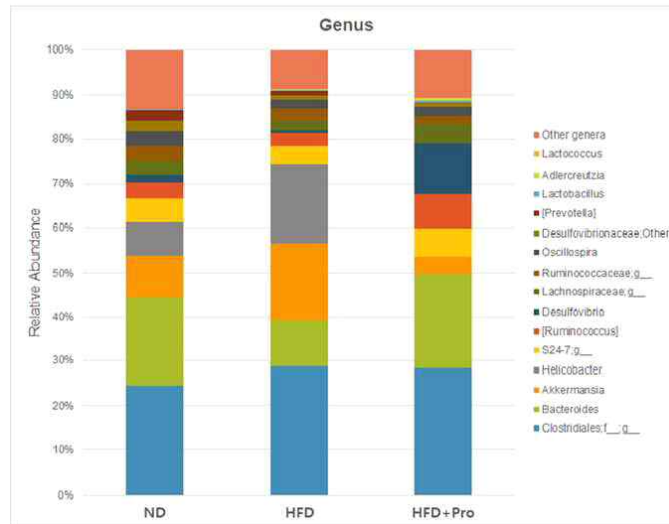
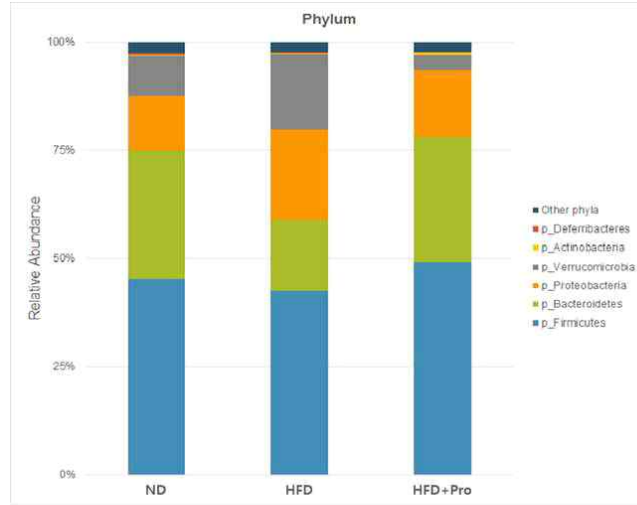


(4) 장내 균총 분석

- 문 수준에서는 모든 군에서 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* 문이 주로 분포하는 것을 확인
- 대표적으로 비만과 양의 상관관계를 갖는 것으로 알려진 *Firmicutes/Bacteroidetes* 비율이 고지방 식이를 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에서 증가하는 반면, 락토바실러스 람노시스 4B15 균주를 처리한 실험군(HFD+Pro)에서는 감소하는 것을 확인

- 비만과 음의 상관관계를 가지고 있다고 알려져 있는 Bacteroidetes 문이 실험군(HDF+Pro)에서 상대적으로 높은 비율로 존재하는 것으로 확인
- 속 수준에서는 지방분해 효소 분비를 촉진하는 Bacteroides와 염증이나 비만 예방 효과가 있는 미생물 Akkermansia가 고지방 식이를 섭취시킨 양성 대조군(HFD)에서 감소하는 반면, 락토바실러스 람노시스 4B15 균주를 처리한 실험군(HFD+Pro)에서 높은 비율로 존재하는 것을 확인
- 또한 락토바실러스 람노시스 4B15 균주의 섭취로 인해 대표적 장내 유익 유산균 중 *Lactobacillus* 속이 높은 비율로 증가하였으며, 양성 대조군(HFD)에서 높은 비율로 존재하는 유해균인 *Helicobacter* 속이 락토바실러스 람노시스 4B15 균주의 처리로 인해 상당 부분 감소된 것으로 확인





- 추가적으로 시제품의 만성 스트레스성 염증 완화 기능성 검증을 위해 유산균 제제를 포함한 마우스 사료를 제작하였으며, 1,2협동기관인 고려대학교 및 세종대학교에 전달하여 전임상 효능 검증 실험을 수행하였음.

표 1-10. 유산균 제제 2종 관련 세부내용 요약

제품유형	건강기능식품	
제품	프로바이오틱스+면역	프로바이오틱스+체지방감소
주요균주	<i>L. plantarum</i> <i>B. lactis</i> <i>L. rhamnosus</i> 4B15 (조합) <i>L. gasseri</i> 505 (조합)	<i>L. plantarum</i> <i>B. lactis</i> <i>L. rhamnosus</i> 4B15 (조합) <i>L. gasseri</i> 505 (조합)
주원료	프로바이오틱스, 아연	프로바이오틱스, 가르시니아캄보지아추출물
부원료	프락토올리고당	-
기능성 표기사항	[프로바이오틱스] 유산균 증식 및 유해균 억제, 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음 [아연]	[프로바이오틱스] 유산균 증식 및 유해균 억제, 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음 [가르시니아캄보지아추출물]

③ 제품 내 프로바이오틱스 함량 평가

(가) 제품 내 총 유산균수 및 대장균군 측정

- 제조한 유산균 제제 내 총 유산균수와 대장균군을 측정하였으며, 제품 내 대장균군은 발견되지 않았음.
- 유산균 제제(면역)의 경우 총 유산균수는 약 240억 CFU 포함하고 있었으며, 이 중 선발 프로바이오틱스가 속해있는 *Lactobacillus*는 약 160억 CFU, *Bifidobacterium*은 약 16억 CFU 포함하고 있는 것을 확인함.
- 유산균 제제(체지방 감소)의 총 유산균수는 약 65억 CFU였으며, 이 중 *Lactobacillus*는 약 56억 CFU, *Bifidobacterium*은 약 9억 CFU 포함하고 있었음.
- 선발 프로바이오틱스와 추가 복합 유산균의 배합비율이 두 제품에서 동일했지만 균수에 차이가 나타났으며, 이는 제품 내 당원인 프리바이오틱스나 기능성 원료로 첨가된 아연, 가르시니아카ம்ப오지아추출물 등이 미생물의 생육에 영향을 미친 것으로 판단됨.

표 1-11. 유산균 제제 내 균수 측정

	총 유산균수 (Log CFU/g)	<i>Lactobacillus</i> (Log CFU/g)	<i>Bifidobacterium</i> (Log CFU/g)	대장균군
유산균 제제 (면역)	10.38	10.21	9.21	N.D.
유산균 제제 (체지방 감소)	9.81	9.75	8.97	N.D.

(나) 저장기간에 따른 제품 내 프로바이오틱스 및 유산균 안정성 평가

- 프로바이오틱스 저장 안정성을 평가하기 위해 유산균 제제 2종을 온도별로 저장하며 4개월까지 보존테스트를 진행하였음.
- 유산균 제제(면역)의 경우 20°C 이상의 온도에서 2개월 차부터 균수가 감소하기 시작함.
- 유산균 제제(체지방 감소)의 경우 25°C 이상의 온도에서 2개월 차부터 균수가 감소하기 시작함.
- 제제 2종에서 모두 *Lactobacillus*보다 *Bifidobacterium*의 저장 안정성이 낮은 것으로 나타남.

표 1-12. 유산균 제제(면역)의 균주 안정성 보존테스트

	저장 온도	총 유산균수 (CFU/g)	<i>Lactobacillus</i> (CFU/g)	<i>Bifidobacterium</i> (CFU/g)
제조 시	-	2.40E+10	1.61E+10	1.62E+09
2개월	4°C	1.40E+10	1.49E+10	1.31E+09
	10°C	1.22E+10	1.30E+10	1.00E+09
	15°C	1.43E+10	1.45E+10	1.05E+09
	20°C	9.66E+09	1.01E+10	6.27E+08
	25°C	6.83E+09	5.29E+09	3.39E+08
	30°C	3.19E+08	2.72E+08	7.30E+08
	35°C	2.04E+06	1.86E+06	1.97E+07
	40°C	1.98E+05	1.51E+05	1.10E+05
4개월	4°C	1.89E+10	1.93E+10	1.97E+09

	10°C	1.42E+10	1.70E+10	1.77E+09
	15°C	1.28E+10	1.47E+10	1.33E+09
	20°C	7.90E+09	6.03E+09	4.37E+08
	25°C	2.64E+09	2.60E+09	2.53E+08
	30°C	1.37E+07	1.53E+07	1.47E+07
	35°C	1.64E+06	1.91E+06	1.53E+06
	40°C	1.19E+05	1.07E+05	-

표 1-13. 유산균 제제(체지방 감소)의 균주 안정성 보존테스트

	저장 온도	총 유산균수 (CFU/g)	<i>Lactobacillus</i> (CFU/g)	<i>Bifidobacterium</i> (CFU/g)
제조 시	-	6.53E+09	5.60E+09	9.30E+08
2개월	4°C	6.20E+09	6.60E+09	3.45E+08
	10°C	6.00E+09	5.85E+09	2.30E+08
	15°C	5.55E+09	5.85E+09	2.00E+08
	20°C	3.60E+09	4.25E+09	1.20E+08
	25°C	1.97E+09	2.01E+09	9.50E+07
	30°C	5.05E+07	6.50E+07	1.35E+07
	35°C	6.00E+05	3.40E+06	1.59E+06
4개월	4°C	1.85E+05	8.15E+05	3.55E+05
	10°C	6.55E+09	5.75E+09	4.10E+08
	15°C	4.60E+09	5.40E+09	3.15E+08
	20°C	5.20E+09	4.50E+09	1.08E+08
	25°C	2.77E+09	2.58E+09	1.31E+08
	30°C	1.11E+09	1.05E+09	6.55E+07
	35°C	1.46E+07	2.14E+07	2.57E+07
40°C	1.26E+06	2.32E+06	8.60E+05	
	40°C	1.74E+05	1.87E+05	1.29E+04

2) 만성 스트레스성 장 질환 개선 기능성 우유 개발 (우유)

① 만성 스트레스성 장 질환 개선 기능성 우유 관련 법령

표 1-14. 가공우유의 기준 및 규격 (식품의 기준 및 규격, 고시 제2021-114호)

<p>19-2 가공우유(*축산물)</p> <p>1) 정의 가공우유라 함은 원유 또는 유가공품에 식품 또는 식품첨가물을 가한 액상의 것을 말한다. 다만 커피 고형분이 0.5% 이상인 제품은 제외한다.</p> <p>2) 원료 등의 구비요건</p> <p>3) 제조·가공기준 (1) 식품 또는 식품첨가물을 가한 후 살균 또는 멸균 처리를 하거나, 살균 또는 멸균처리 후 식품 또는 식품첨가물을 무균적으로 가하여야 한다. (2) 우유에 강화제를 보강하는 경우에는 열안정성과 미생물 오염을 고려하여 적절한 시기에 첨가하여야 한다.</p> <p>4) 식품유형 (1) 강화우유 : 우유류에 비타민 또는 무기질을 강화할 목적으로 식품첨가물을 가한 것을 말한다(우유</p>
--

류 100%, 단, 식품첨가물 제외).

- (2) 유산균첨가우유 : 우유류에 유산균을 첨가한 것을 말한다(우유류 100%, 단, 유산균 제외).
- (3) 유당분해우유 : 원유의 유당을 분해 또는 제거한 것이나, 이에 비타민, 무기질을 강화한 것으로 살균 또는 멸균처리한 것을 말한다.
- (4) 가공유 : 원유 또는 유가공품에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 식품유형 (1)~(3)에 정하여 지지 아니한 가공유류를 말한다.

5) 규격

- (1) 산도(%) : 0.18 이하(젖산으로서, 유산균첨가우유, 가공유는 제외한다.)
- (2) 무지유고형분(%) : 8.0 이상(강화우유, 유산균첨가 우유에 한한다.), 4.0 이상(가공유에 한한다.)
- (3) 유지방(%)

항목 \ 유형	강화우유	유산균첨가우유	유당분해우유
유지방(%)	3.0 이상 (다만, 저지방제품은 0.6~2.6, 무지방제품은 0.5 이하)		

(4) 조지방(%)

항목 \ 유형	가공유
조지방(%)	2.7 이상 (다만, 저지방제품은 0.6~2.6, 무지방제품은 제외한다.)

- (5) 유당(%) : 1.0 이하(유당분해우유에 한한다.)
- (6) 세균수 : n=5, c=2, m=10,000, M=50,000(멸균제품의 경우 55°C에서 1주 또는 30°C에서 2주 보관 후 일반세균수 시험법에 의할 때 n=5, c=0, m=0이어야 한다. 다만, 유산균 첨가제품은 제외한다)
- (7) 대장균군 : n=5, c=2, m=0, M=10(멸균제품은 제외한다.)
- (8) 포스파타제 : 음성이어야 한다(저온장시간 살균제품, 고온단시간 살균제품에 한한다. 유당분해우유, 가공유는 제외한다.)
- (9) 유산균수 : 1 mL당 1,000,000 이상(단, 유산균 첨가제품에 한한다)
- (10) 살모넬라 : n=5, c=0, m=0/25g
- (11) 리스테리아 모노사이토제네스 : n=5, c=0, m=0/25g
- (12) 황색포도상구균 : n=5, c=0, m=0/25g

② 제조공정도 및 배합비 설정

(가) 새벽 착유 우유를 포함하는 멜라토닌 고함유 우유 제조

- 멜라토닌 고함유 가공유를 제조하기 위해 새벽 착유 우유와 타트체리 농축액을 함께 배합하였음.
- 제조방법
 - ㉠ 정수에 구연산나트륨을 넣고 타트체리 농축과즙 용해
 - ㉡ 당류 2종 용해
 - ㉢ 탈지분유 용해
 - ㉣ 원유 첨가
 - ㉤ 계속 교반하며 향 투입
 - ㉥ water bath 100°C, 10분 간 살균

표 1-15. 타트체리 우유 배합비

원료명	배합비(%)
새벽 착유 우유	48
탈지분유	3.578
타트체리농축액	0.65
설탕	2.5
고과당	3.5
향료	0.06
정제수	41.712
합계	100



그림 1-15. 타트체리 우유

③ 제품 내 멜라토닌 및 영양성분 함량 평가

(가) 제품 내 지표물질(멜라토닌) 함량 및 저장 안정성 평가

- 타트체리 우유 원료인 새벽 착유 우유와 타트체리 농축액 및 제품 내 지표성분으로 멜라토닌 함량을 측정하였음.
- 우유류의 유통기한은 보통 10일이며, 이에 따라 제조한 타트체리 우유를 4°C에 저장하며 저장 10일 후 멜라토닌을 분석하여 저장 기간 중 멜라토닌의 안정성을 확인하였음.
- 타트체리 우유 제조 시 사용한 새벽 착유 분유 내 멜라토닌 함량은 약 75 pg/g 이었으며, 제조 직 후 타트체리 우유 내 멜라토닌 함량은 약 43 pg/g로 나타났음.
- 타트체리 우유 제조 10일 후 멜라토닌 함량 측정 결과, 약 50 pg/g으로 저장에 따른 안정성이 우수한 것으로 확인되었음.

(나) 제품 영양성분 분석

- 멜라토닌 고함유 타트체리 우유의 영양성분 분석을 진행하였으며, 아래 표와 같음.

표 1-16. 타트체리 우유 영양정보

영양성분	영양정보		
	총 내용량 200 mL 176 kcal		
	나트륨 86 mg 4%	탄수화물 18 g 6%	당류 18 g 18%
	지방 3.9 g 7%	트랜스지방 0 g	포화지방 2.4 g 16%
	콜레스테롤 15 mg 5%	단백질 5 g 9%	
	1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000 kcal 기준이므로 개인의 필요열량에 따라 다를 수 있습니다.		

멜라토닌 함유 40~45 pg/g

3) 체지방 감소 기능성 발효유 개발

① 체지방 감소 기능성 발효유 관련 법령

표 1-17. 발효유류의 기준 및 규격 (식품의 기준 및 규격, 고시 제2021-114호)

18-4 발효유류							
1) 정의 발효유류라 함은 원유 또는 유가공품을 유산균 또는 효모로 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것을 말한다.							
2) 원료 등의 구비요건							
3) 제조·가공기준 (1) 배합된 원료(유산균, 효모는 제외한다)는 살균 또는 멸균, 냉각공정을 거친 후 원료로 사용한 유산균 또는 효모 이외의 다른 미생물이 오염되지 않도록 하여야 한다. (2) 유산균 또는 효모는 적절한 온도를 유지하여 배양 또는 발효하여야 한다. (3) 발효유류는 냉동 공정을 거칠 수 있다.							
4) 식품유형 (1) 발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 3% 이상의 것을 말한다. (2) 농후발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 8% 이상의 호상 또는 액상의 것을 말한다. (3) 크림발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 3% 이상, 유지방 8% 이상의 것을 말한다. (4) 농후크림발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 8% 이상, 유지방 8% 이상의 것을 말한다. (5) 발효버터유 : 버터유를 발효시킨 것으로 무지유고형분 8% 이상의 것을 말한다. (6) 발효유분말 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나 이에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 분말화한 것으로 유고형분 85% 이상의 것을 말한다.							
5) 규격							
항목	유형	발효유	농후발효유	크림발효유	농 후 크림발효유	발효버터유	발효유분말
(1) 수분(%)		-	-	-	-	-	5.0 이하
(2) 유고형분 (%)		-	-	-	-	-	85 이상
(3) 무지유 고형분(%)		3.0 이상	8.0 이상	3.0 이상	8.0 이상	8.0 이상	-
(4) 유지방(%)		-	-	8.0이상	8.0이상	1.5이하	-
(5) 유산균수 또는 효모수		1 mL당 10,000,000 이상	1 mL당 100,000,000 이상 (단, 냉동제품은 10,000,000 이상)	1 mL당 10,000,000 이상	1 mL당 100,000,000 이상 (단, 냉동제품은 10,000,000 이상)	1 mL당 10,000,000 이상	-
(6) 대장균군		n=5, c=2, m=0, M=10					
(7) 살모넬라		n=5, c=0, m=0/25g					
(8) 리스테리아 모노사이토 제네스		n=5, c=0, m=0/25g					

(9) 황색포도상
구균

n=5, c=0, m=0/25g

6) 시험방법

제7. 일반시험법에 따라 시험한다.

② 제조공정도 및 배합비 설정

(가) 발효유 및 농후발효유 혼합액 제조

- 위탁연구기관인 우석대학교에서 수행한 선발 프로바이오틱스 스타터 컬처를 사용한 발효유제조 베이스 조성을 참고하여 발효액을 제조하였음.

- 제조방법

㉠ 정제수 계량 및 가온

㉡ 분말 자재 계량 및 투입 (유산균 분말 제외)

㉢ 교반 (1,500 rpm, 30분)

㉣ 살균 (95℃, 2hr)

㉤ 냉각 (41-42℃)

㉥ 유산균 접종 및 혼합

㉦ 배양(41℃, 24 hr/ pH 3.99±0.05 배양 종료)

㉧ 커드 파쇄 및 냉각

- 제조된 발효액은 당액 혼합 전까지 냉장보관함.

표 1-18. 선발 프로바이오틱스 스타터 컬처를 사용한 발효액 배합비율

원료명	함량(%)
정제수	77.47
탈지분유	17.5
함수결정포도당	5
유산균 분말(4B15)	0.03
합계	100



그림 1-16. 체지방 감소 기능성 발효유 발효액

(나) 체지방 감소 소재 함유 당액 제조

- 이종 기능성을 위해 체지방 감소 소재로써 가르시니아캄보지아 추출물을 사용하였으며, 풍미에 가장 영향을 미치지 않는 소재를 선발하였음.
- 추가 기능성 소재로 HCA를 추가하였으며, 건강기능식품 클레임 표기를 위해 HCA 함량을 1병 기준 750 mg을 초과하도록 배합비율을 검토하였음.
- 저당, 저칼로리 컨셉을 위해 대체 당류를 사용하였으며, 효소처리 스테비아와 올리고당을 사용하여 풍미를 조정하였음.
- 당액 배합비율은 표 1-20와 같음.

(다) 체지방 감소 기능성 발효유 발효액 및 당액 혼합액 제조

- 제조한 당액과 발효액 혼합비율을 조절하여 발효유와 농후발효유의 배합비율을 검토하였음.
- SNF와 유산균수에 대한 기준을 맞춰 당액 및 배합비율을 조정하였으며, 그 중 관능이 가장 우수한 비율로 배합비를 설정하였음.
- 발효유는 아래 표의 배합비에 따라 다음과 같은 순서로 제조하였음.
 - ㉠ 당액 제조
 - ㉡ 발효액 및 당액 계량 및 투입 (발효액 : 당액 = 8 : 2)
 - ㉢ 교반
 - ㉣ 균질 (180 bar)
 - ㉤ 냉각
- 냉각이 끝난 혼합액은 150mL 병에 포장하였음.

표 1-19. 체지방 감소 발효유 발효액 및 당액 배합비

원료명	함량(%)
발효액	20
정제수	70.784
이소말토올리고당	6.4
가르시니아	1.6
레몬농축액(65bx)	0.8
효소처리스테비아	0.24
안정제	0.16
요구르트향	0.008
레몬향	0.008
합계	100



그림 1-17. 체지방 감소 기능성 발효유

표 1-20. 기능성 발효유 관련 세부내용 요약

제품유형	건강기능식품
제품	프로바이오틱스+체지방감소
발효종균	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 (조합)
주원료	프로바이오틱스, 가르시니아캄보지아 추출물
부원료	올리고당
기능성 표기사항	[프로바이오틱스] 유산균 증식 및 유해균 억제, 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음 [가르시니아캄보지아 추출물] 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음
용량	150ml
기능성 물질 함량 (150ml 기준)	1. Hydroxycitric acid 1,440mg (체지방 감소 소재) 2. 프로바이오틱스 수 30억 CFU (2×10^8 cfu/ml)
특징	조합 개발 유산균 단독 사용 발효유 40 kcal/ 당류 3g/ 지방 0g (150ml 기준 계산치)
기타	섭취방법 : 1일 1회 1병 씩 섭취

③ 제품 내 프로바이오틱스 및 영양성분 함량 평가

(가) 저장기간에 따른 제품 내 프로바이오틱스 및 유산균 안정성 평가

- 제조한 발효유 내 총 유산균수와 대장균군을 측정하였으며, 제품 내 대장균군은 발견되지 않았음.
- 2배치로 발효유를 제조하였으며, 제조 직후, 발효유 내 총 유산균수는 $2.05 \sim 2.08 \times 10^8$ CFU/mL (약 200억) 로 나타났음.
- 발효유 유통기한은 보통 10일이며, 유통기한 경과 후 약 10일 정도 소비기한을 두고 섭취하는 것을 감안하여, 4°C에 저장하며 제조 20일 후 총 유산균수를 측정하여 저장기간 중 프로바이오틱스 안정성을 확인하였음.
- 제조 20일 후 발효유 내 총 유산균수는 $1.50 \sim 1.58 \times 10^8$ CFU/mL (약 150억)으로 유통기한 및 소비기한 동안 유산균수가 제조 직후와 유사하게 유지되는 것을 확인하였음.
- 선발 프로바이오틱스의 단일 균주를 스타터 컬처로 하여 발효유를 제조하였음에도 높은 프로바이오틱스 안정성을 나타내었음.

표 1-21. 체지방 감소 기능성 발효유 총 유산균수 (2배치 실험)

저장기간	총 유산균 수 (CFU/mL)	
	발효유1	발효유2
제조 시	2.08×10^8	2.05×10^8

저장 20일 차	1.58 x 10 ⁸	1.50 x 10 ⁸
----------	------------------------	------------------------

(나) 제품 영양성분 분석

- 체지방 감소 기능성 발효유의 영양성분 분석을 진행하였음.
- 체지방 감소의 제품 컨셉과 적합하게 일반 발효유에 비해 낮은 칼로리와 당류, 지방 함량을 확인하였음 (40 kcal/ 당류 3g/ 지방 0g [150ml 기준]).

표 1-22. 체지방 감소 기능성 발효유 영양정보

영양성분	영양정보 총 내용량 150 mL 40 kcal		
	나트륨 32 mg 2 %	탄수화물 8 g 3 %	당류 3 g 3 %
	지방 0 g 0 %	트랜스지방 0 g	포화지방 0 g 0 %
	콜레스테롤 0 mg 0 %	단백질 2 g 4 %	
	1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000 kcal 기준이므로 개인의 필요열량에 따라 다를 수 있습니다.		

HCA 1,440 mg 및 프로바이오틱스 300억 마리

라. 선발 균주 Lactobacillus rhamnosus 4B15 개별인정형 원료 등록 진행

1) 프로바이오틱스 개별인정형 기능성 원료 인정 서류 작성

- 스트레스성 장 질환 및 수면활동 개선 기능성 프로바이오틱스의 장 질환 개선 개별인정형 원료 인정을 위한 「건강기능식품의 기준 및 규격」 관련 법령 검토

표 1-23. 기능성원료 인정 신청을 위한 제출자료 목록

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7. 안전성에 관한 자료 [의사결정도 :]			
7.1	섭취근거 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
		3개월 반복투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
		유전독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료			
8.1	시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :	
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.2	동물시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :	
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.3	인체적용시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 :	

		<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)	
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취량 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	1. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10.2	2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	

1-1. 우유 내 엑소좀 및 마이크로RNA 표준화 기술 개발

[위탁기관 : 서울대학교 김영훈]

가. 우유 엑소좀의 특성 분석 및 엑소좀 유래 마이크로RNA 프로파일링

1) 초유 및 원유 샘플의 준비

- 본 실험에 필요한 홀스타인종과 저지종의 초유 및 원유는 산유능력검정에 참여하고 있는 서울우유협동조합에 소속된 목장의 신선한 상유를 수거함. 수거한 시료는 빠르게 -20°C에서 냉동시키고 신속하게 실험실로 이동시킨 후 -80°C에서 보관하고, 채취한 우유는 유지방, 체세포, 단백질 등을 제거하기 위해 기본 두 단계의 원심분리(4°C)를 이용함. 1,200×g에서 10분, 21,000×g에서 30분 원심분리 후 0.45와 0.22 μm filter로 여과한 후 -80°C에 보관함.

2) 고순도 우유 엑소좀의 분리

- 고순도 우유 엑소좀의 분리에 필요한 방법을 최적화시키기 위해 전처리된 원유 시료를 대상으로 본 연구진이 확립한 침전유도제 사용법을 이용하여 추출함.

3) 분리된 우유 엑소좀 입자 및 크기 분석

- 본 실험에서 사용된 방법으로 우유에서 엑소좀 분리가 잘 수행되었는지 확인하기 위하여 분리된 엑소좀의 입자 및 크기 분석을 평가하기 위해 Particle size Analyzer를 이용하여 동적 광산란(Dynamic Light Scattering) 방식으로 분석하였으며, 우유에서 분리된 exosome의 평균 particle 사이즈는 167.2 nm으로 확인되었음.

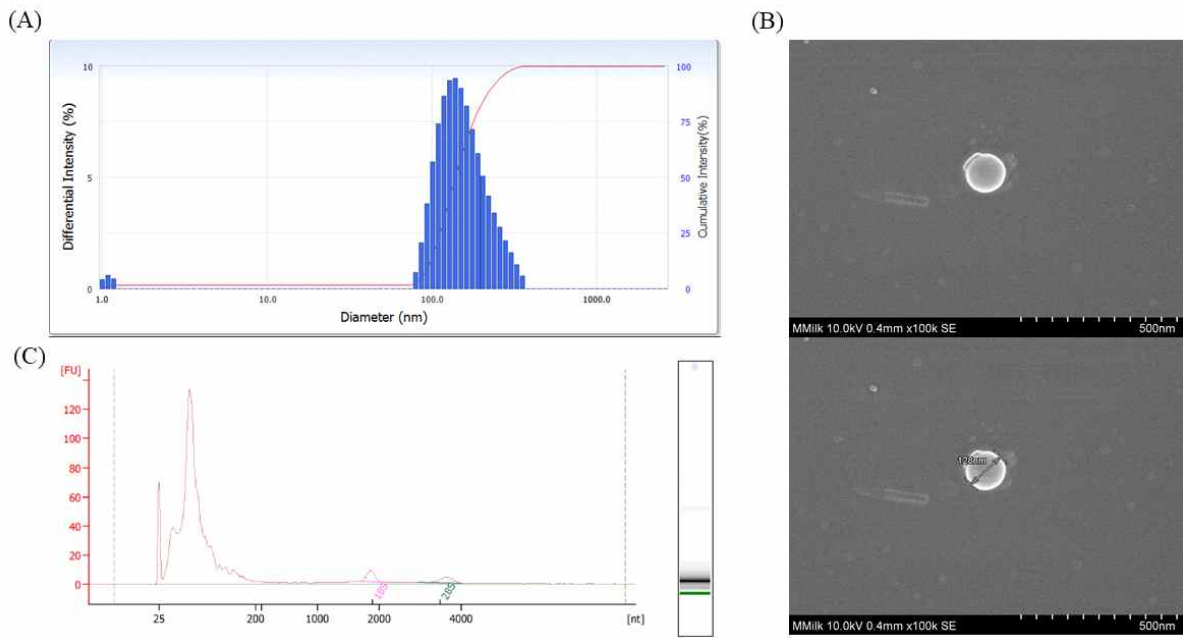


그림 1-18. 고순도 우유 엑소좀의 분리. 우유 엑소좀을 10 ml의 전유 (whole milk)를 연속적인 원심분리 및 필터를 이용하여 탈지유 분획을 얻었으며, exoquick-TC와 5:1의 비율로 섞은 후 4℃에서 12시간 반응시킨 뒤, 원심분리를 통해 얻어낸 exosome을 현탁하여 분석해 사용하였으며, (A) 우유 exosome의 입자크기, (B) 주사전자현미경 (SEM) 이미지 분석을 통한 크기 확인, (C) Bioanalyzer2100을 통해 small RNA fragment분포를 확인하였음.

- 또한, 분리된 우유 유래 exosome을 주사전자현미경을 이용하여 육안으로 확인하였음.
- 분리된 우유 엑소좀을 대상으로 miRNA_mini kit(Qiagen)를 이용하여 엑소좀 유래 마이크로RNA를 분리함. 추출된 마이크로RNA 샘플은 Agilent 2100 bioanalyzer를 이용하여 최종 마이크로RNA 양과 순도를 측정함.

4) RNA-seq을 이용한 엑소좀 유래 마이크로RNA 프로파일링 연구

- 준비된 고순도의 마이크로RNA의 프로파일링을 위하여 Illumina 기반의 HiSeq 2500 system을 이용하여 small RNA sequencing을 실시함. 시퀀싱 결과는 clustering 후 miRBase v21 (www.mirbase.org/)를 기반으로 기존의 알려진 마이크로RNA 또는 신규 마이크로RNA로 매칭시킨 후 프로파일링 결과를 최종 분석함.
- 홀스타인종과 저지종에서 각각 분리된 엑소좀의 small RNA의 구성을 확인하였으며, 분석결과 홀스타인의 경우 miRNA가 약 1.69%가 확인되었으며, 저지종에서는 7.19%가 확인되었음. 전체적으로 저지종에서 miRNA가 약 4.25배 정도 더 많은 것으로 확인됨.
- 각 mature miRNA별, 전체 2개 샘플의 50% 이상 0인 count 값을 가지는 Mature miRNA는 분석에서 제외함. 따라서, 총 793개 Mature miRNA 중에서 539개를 제외한 254개 Mature miRNA를 대상으로 통계분석을 진행하였음.
- 홀스타인종과 저지종 각각에서 가장 풍부하게 존재하는 마이크로 RNA를 Venn Diagram으로 도식화해 본 결과 총 254개 중 233개가 공통적으로 존재하였으며, 이 중에는 홀스타인종과 저지종에서 얻어진 원유에서 엑소좀 유래의 마이크로RNA profiling 결과를 서로 비교하였을 때, 홀스타인 원유에만 존재하는 엑소좀 유래의 마이크로 RNA는 bta-miR-1777a, bta-miR-18a, bta-miR-2436-3p, bta-miR-338, bta-miR-490, bta-miR-503-3p, bta-miR-96 총 7가지로 나타남. 반면 저지종 고유

의 마이크로 RNA는 bta-miR-142-3p, bta-miR-181d, bta-miR-193b, bta-miR-222, bta-miR-2284j, bta-miR-2284m, bta-miR-2285o, bta-miR-2285u, bta-miR-2320-3p, bta-miR-3431, bta-miR-376e, bta-miR-432, bta-miR-502b, bta-miR-9-3p 으로 총 14가지로 나타남.

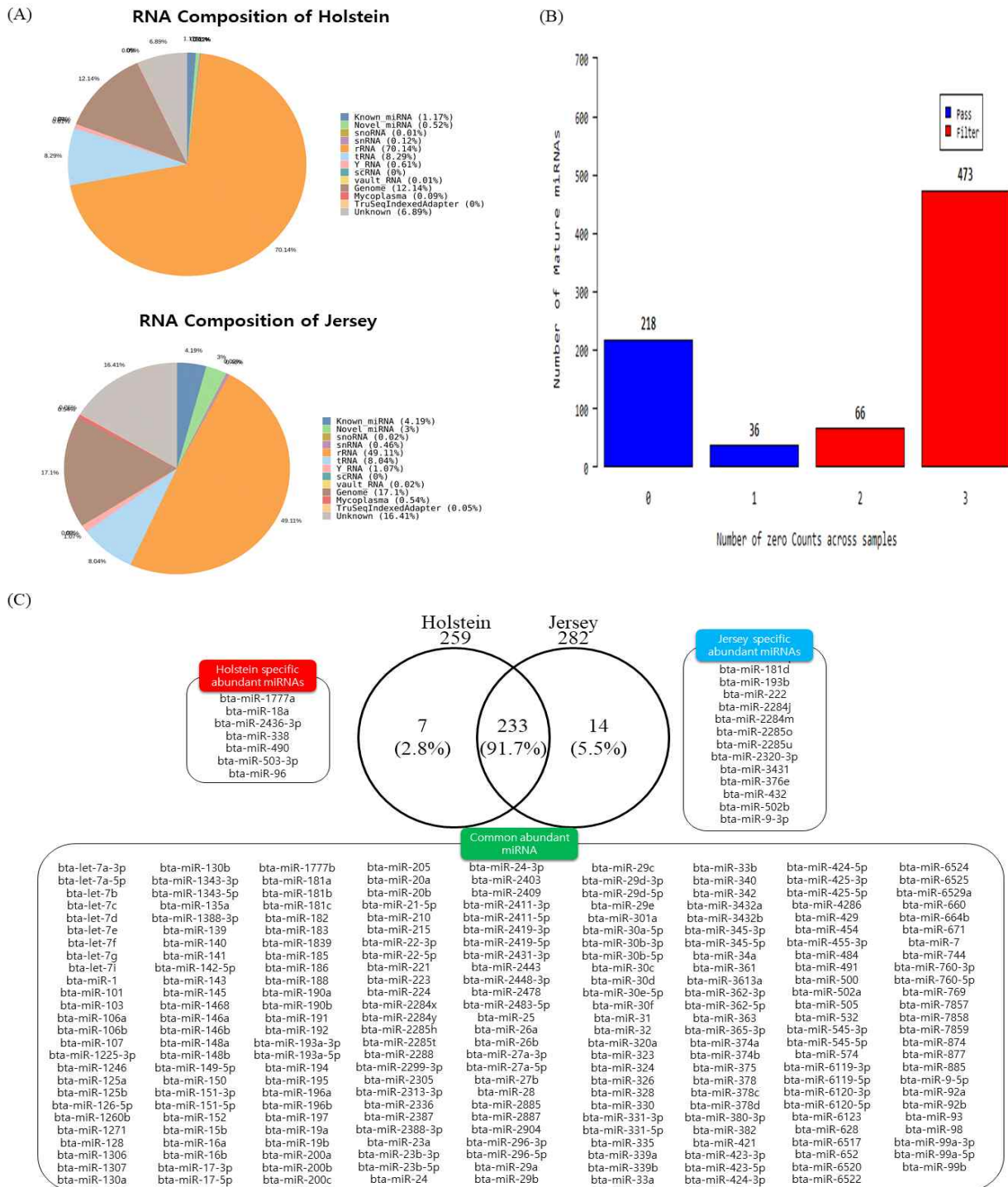


그림 1-19. 홀스타인종과 저지종의 상유에서 분리된 엑소솜의 마이크로 RNA 비교. 홀스타인 종과 저지종의 분리된 엑소솜 마이크로 RNA의 프로파일링 및 각 샘플의 특이적 분자를 스크리닝 함으로써 기능연구의 기초를 마련함. (A) 홀스타인종 (상) 및 저지종 (하)의 small RNA composition (B) 홀스타인종과 저지종에 존재하는 마이크로 RNA 즉 793 개 Mature miRNA 중에서 539개를 제외한 254개 Mature_miRNA를 대상으로 통계분석을 진행함 (C) 공통으로 존재하는 마이크로 RNA와 특이적으로 존재하는 마이크로 RNA를 나타냄.

- Raw Signal(Count), CPM(Counts per Million reads)+1 의 Logarithm (based 2) 한 값, TMM Normalization 한 값에 대하여 해당 샘플 별 expression 분포를 위해 백분위수, 중앙값, 25백분위수, 75백분위수, 최대값, 최소값을 이용하여 시각적으로 표현함.
- 각 샘플 별 normalized value 를 사용하여 샘플 간 유사성 정도 (Pearson's coefficient)를 살펴봄으로써 반복 샘플의 재현성 여부를 확인할 수 있음. (Range: $-1 \leq r \leq 1$). 상관 계수 값이 1에 가까울수록 샘플 간 유사성이 높음을 의미하며, 홀스타인종과 저지종간의 마이크로 RNA는 굉장히 유사한 것으로 나타남.
- 홀스타인종과 저지종간의 발현비교는 엑셀기반 read count를 중심으로 이루어졌으며, 각 샘플의 비교를 통해 2배 발현의 차이를 보이는 마이크로 RNA를 확인하였으며, 저지종에서는 홀스타인종보다 2배 이상 증가한 마이크로 RNA는 12개, 홀스타인종에서 저지종보다 2배 이상 증가한 마이크로 RNA는 24개로 나타남. 그 중에서도 bta-miR-96의 경우 저지종에 비하여 약 71배 증가한 것으로 나타남.

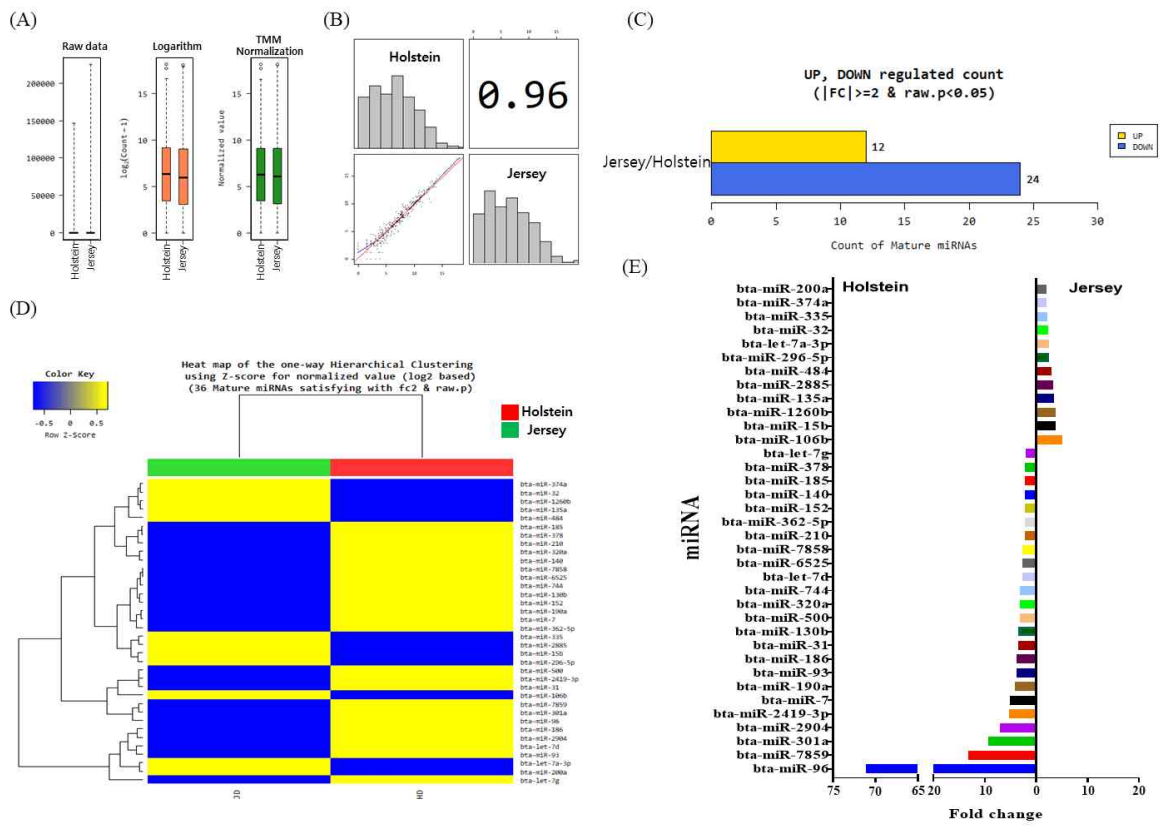


그림 1-20. 홀스타인종과 저지종의 상유에서 분리된 엑소좀의 마이크로 RNA의 발현차이 비교. 홀스타인종과 저지종에서 분리된 엑소좀 마이크로 RNA의 유사정도 및 마이크로 RNA의 발현차이를 나타냄. (A) 홀스타인종과 저지종별 expression 분포를 나타냄. (B) 홀스타인종과 저지종 별 normalized value를 사용하여 샘플 간 유사성 정도를 나타냄. (C) 각 샘플에서 다른 샘플보다 증가한 마이크로RNA를 숫자로 표시함. (D) 통계적으로 유의하게 증가한 샘플별, 마이크로RNA별 발현값을 이용하여 발현정도가 유사한 것들을 Hierarchical Clustering analysis (Euclidean Method, Complete Linkage)를 통하여 그룹화함. (E) 각 마이크로 RNA의 발현값을 표시함.

- 홀스타인종과 저지종의 상유 간에 다른 발현을 보인 마이크로RNA와 사람의 모유에서 발현하는 마이크로RNA의 상동성을 비교하기 위해 miRviewer: A multispecies microRNA viewer (<http://people.csail.mit.edu/akiezun/microRNAviewer/index.html>)를 이용하여 분류정리를 하였으며, 홀스타인종에서 많이 발현된 마이크로RNA 중 1종, 저지종에서 많이 발

현된 마이크로RNA 중 2종이 사람의 모유와 상동성을 보이는 것으로 확인되었으며 (표 1, 노란박스), 사람에서 면역에 잘 알려진 마이크로RNA가 홀스타인종에서는 6종, 저지종에서는 3종의 마이크로RNA가 확인되었음 (표2, 빨간색 글자표기)

표 1-23. 소와 사람의 마이크로RNA의 상동성 (miRBase에 존재하는 것들만 표기)

conservation		1.0	0.97	0.94	0.91	0.88	0.85	0.82	0.79	0.76	0.73	0.7	0.67	0.64	0.61	0.58	0.55	0.52	0.49	
Holstein										Jersey										
miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus	miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus	miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus	miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus	miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus	miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus	miRNA	Homo Sapiens	Bos Taurus
mir-96	•	•	mir-744	•	•	mir-106b	•	•	mir-106b	•	•	mir-106b	•	•	mir-106b	•	•	mir-106b	•	•
mir-301a	•	•	let-7d	•	•	mir-15b	•	•	mir-15b	•	•	mir-15b	•	•	mir-15b	•	•	mir-15b	•	•
mir-2904	•	•	mir-210	•	•	mir-1260	•	•	mir-1260	•	•	mir-1260	•	•	mir-1260	•	•	mir-1260	•	•
mir-7	•	•	mir-362	•	•	mir-135a	•	•	mir-135a	•	•	mir-135a	•	•	mir-135a	•	•	mir-135a	•	•
mir-190a	•	•	mir-152	•	•	mir-484	•	•	mir-484	•	•	mir-484	•	•	mir-484	•	•	mir-484	•	•
mir-93	•	•	mir-140	•	•	let-7a-3	•	•	let-7a-3	•	•	let-7a-3	•	•	let-7a-3	•	•	let-7a-3	•	•
mir-186	•	•	mir-185	•	•	mir-296	•	•	mir-296	•	•	mir-296	•	•	mir-296	•	•	mir-296	•	•
mir-31	•	•	mir-378	•	•	mir-32	•	•	mir-32	•	•	mir-32	•	•	mir-32	•	•	mir-32	•	•
mir-130b	•	•				mir-335	•	•	mir-335	•	•	mir-335	•	•	mir-335	•	•	mir-335	•	•
mir-500	•	•				mir-374a	•	•	mir-374a	•	•	mir-374a	•	•	mir-374a	•	•	mir-374a	•	•
mir-320	•	•				mir-200a	•	•	mir-200a	•	•	mir-200a	•	•	mir-200a	•	•	mir-200a	•	•

- 따라서 본 연구결과를 바탕으로 식이성 마이크로 RNA를 포함하는 우유 엑소좀의 섭취에 따른 인체 내 주요 건강기능성 특히 장건강을 위한 다양한 기능성 평가도 실시할 예정임. 또한 저지종과 홀스타인 종의 상유를 구분할 수 있는 biomarker로써 연구결과에 의해 도출된 특이적 마이크로RNA를 활용이 가능할 것으로 판단됨.

나. 비교오믹스 분석 기술을 이용한 우유 엑소좀의 장 건강 기능성 검증

1) 전사체학 분석을 이용한 우유 엑소좀과 장상피세포의 상호작용 검토

- 본 연구에 사용된 장 상피세포는 HT-29로써 ATCC에서 분양받아 사용하였음. 완전 monolayer를 형성한 HT-29 세포는 25°C의 PBS buffer를 이용하여 5회 세척하고 홀스타인초유, 홀스타인종상유, 저지종 상유에서 분리한 우유 엑소좀 샘플[5종; Col (Colostrum), HD (Holstein day), HN (Holstein night), JD (Jersey day), JN (Jersey night), NC (Negative control)]을 배지에 첨가한 후 5% CO2 존재 하에 37°C에서 6시간 동안 배양을 실시하였음. 배양후 PBS로 세척한 후 cell scraper로 부착되어 있는 세포를 떼어내고 RNeasy Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 total RNA를 추출하였음. 최종 RNA를 추출한 후 Agilent 2100 Bioanalyzer를 이용하여 total RNA의 quality를 측정함. 추출된 RNA는 -80oC에 보관하며 실험직전 사용하였음.
- RNA-seq을 위해 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 매뉴얼에 따라 사용하였고 cDNA 라이브러리는 Illumina가 제공하는 기본 프로토콜에 따라 수행되었으며 Illumina HiSeq 2000 장비를 사용하여 flow cells의 Paired-end sequencing을 진행하였음.
- 총 시퀀싱 염기의 수와 quality score는 표 1과 같으며 모든 샘플에서 우수한 품질의 기준인 phred score 30이 96% 이상으로 나타난 것을 알 수 있음. Sequencing raw-data는 trimmomatic 0.38를 사용해 adapter sequence를 제거하고, reads의 ends로부터 base quality 3미만인 bases와 슬라이딩 윈도우 trim기법으로 window size=4, mean quality=15를 만족하지 않으면 bases를 제거함. 그 후, min length = 36bp 보다 짧은 reads를 제거하는 단계를 거쳐 trimmed data를 생성하였고(그림 4)

이러한 quality control을 통해 높은 수준의 quality reads에 기반하여 이후의 분석을 진행하였으며 Hisat2 v2.1.0 프로그램을 사용하여 reference genome의 인덱스를 구축하고 human genome reference(GRCh38)의 paired-end clean reads를 판독하고 비교하였음. 다음으로 고유하게 매핑된 reads는 ENSEMBL version 82 transcriptome definitions를 사용하여 Subread / featureCounts 버전 1.5.1로 정량화 되었음. 생성된 데이터는 R 패키지 edgeR을 적용하여 다양한 유형의 샘플 간의 차등 발현 분석을 수행하였고 임계 값 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ & $P\text{-value} < 0.05$ 가 유의하게 차별적으로 발현되는 유전자를 정의하기 위해 본 연구에서 사용되었음.

표 1-24. RNA-sequencing 결과에 대한 quality control

Sample	Lane	Total Reads	Total Bases	N Bases	Q20	Q30	GC
NC	1	20036102 (20.04 M)	3025451402 (3.03 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
	2	21127702 (21.13 M)	3190283002 (3.19 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
Col	1	19120768 (19.12 M)	2887235968 (2.89 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
	2	19962060 (19.96 M)	3014271060 (3.01 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
JD	1	21879952 (21.88 M)	3303872752 (3.30 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
	2	23125118 (23.13 M)	3491892818 (3.49 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
JN	1	21335934 (21.34 M)	3221726034 (3.22 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
	2	22375790 (22.38 M)	3378744290 (3.38 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
HD	1	16791784 (16.79 M)	2535559384 (2.54 G)	0.00%	97.00%	96.00%	44.00%
	2	17568232 (17.57 M)	2652803032 (2.65 G)	0.00%	97.00%	96.00%	44.00%
HN	1	19274630 (19.27 M)	2910469130 (2.91 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%
	2	20207040 (20.21 M)	3051263040 (3.05 G)	0.00%	98.00%	96.00%	44.00%

GC(%) : GC 함량, Q20(%) : Phred quality score 20 이상의 품질을 갖는 염기의 비율

Q30(%) : Phred quality score 30 이상의 품질을 갖는 염기의 비율

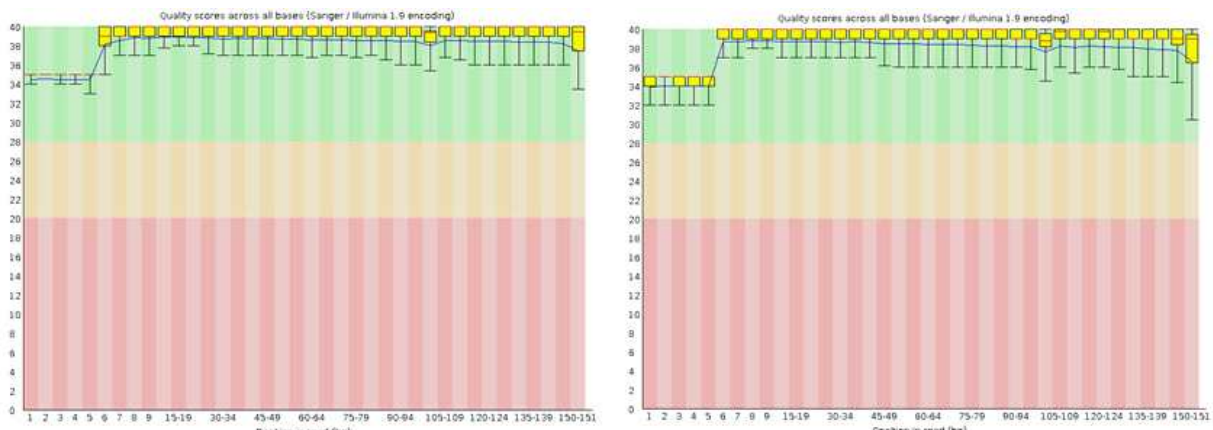


그림 1-21. Trimming 후 사이클별 평균 염기 품질 (A) sample 1 (read1) (B) sample 2 (read1)

Yellow box : 사이클별 염기 품질 점수의 interquartile range (25~75%)를 나타냄
 Red line : 사이클별 염기 품질 점수의 중앙 값, Blue line : 사이클별 염기 품질 점수의 평균 값
 Green background : 우수한 품질을 나타냄, Orange background : 양호한 품질을 나타냄
 Red background : 나쁜 품질을 나타냄

- Read mapping 결과로 얻은 known gene에 대한 데이터 quality를 확인한 결과, 한 샘플 이상에서 0인 count값을 가지는 유전자는 분석에서 제외함. Col은 2892개, HD는

4873개, HN는 4852개, JD는 3347개, JN은 4880개의 gene이 mapping 되었고 총 344개의 gene이 공통적으로 mapping 된 것으로 나타남. 샘플 별로 다양하게 공통적인 gene을 가지고 있었지만 독립적으로 mapping 된 gene이 가장 많은 비중을 차지하는 것으로 나타남.

- Heat map of hierarchical clustering을 통해 샘플간의 유전자 발현 패턴을 Euclidean distances 계산을 통해 관찰한 결과 그룹들 간의 변화를 나타내는 cluster 군으로 나눌 수 있었으며 크게 두 개의 cluster로 나뉘었는데 Col, JD, NC가 한 그룹 HN, JN, HD가 다른 한 그룹으로 cluster 되는 것으로 나타났음. 더 세부적으로는 Col과 JD가 같은 cluster, HN과 JN가 또 다른 cluster를 이루는 것을 알 수 있었음.

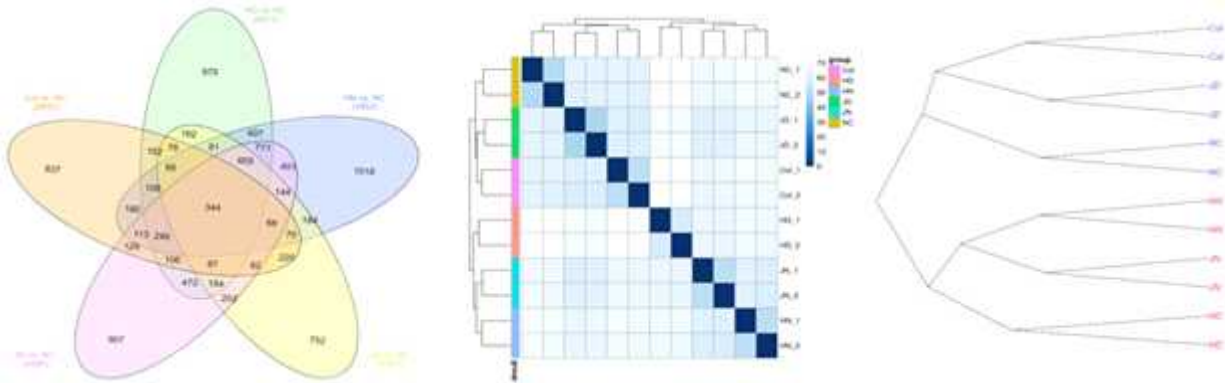


그림 1-22. RNA-seq 분석 Mapping data(A)과 Hierarchical clustering 분석을 통한 heat map(B)과 tree structure(C)

- 모든 유전자의 데이터를 사용하여 표현 데이터의 주요 구성 요소를 계산하기 위해 Euclidean distances를 기반으로 한 주 구성 요소 분석(PCA)을 이용하여 값들의 거리를 분석하였음. 샘플은 처음 두 가지 주요 구성 요소(PC)에 투영되며, 이러한 PC에 의해 설명된 백분율 분산은 x와 y 축을 따라 표시되며 이상적으로는 샘플들이 그룹 식별자에 따라 클러스터를 이룸. 분석 결과 hierarchical clustering과 비슷하게 NC, Col, JD 처리구가 서로 가까운 곳에 위치하였고 HD, JN, HN은 서로 떨어진 거리에 위치하였음. 이를 통해 NC, Col, JD는 유전자의 발현 변화가 서로 비슷하다는 것을 알 수 있었고 HN, HD, JN은 서로 유전자의 발현 변화에 차이를 보인다는 것을 알 수 있음.
- Col 샘플에서는 총 458개의 유전자가 유의적인 발현 차이를 보였으며 203개의 유전자가 상향 조절되었고 255개의 유전자가 하향 조절되었음. HD 샘플에서는 총 677개의 유전자가 유의적인 발현 차이를 보였으며 224개의 유전자가 상향 조절되었고 453개의 유전자가 하향 조절되었음. HN 샘플에서는 총 632개의 유전자가 유의적인 발현 차이를 보였으며 209개의 유전자가 상향 조절되었고 423개의 유전자가 하향 조절되었음. JD 샘플에서는 총 449개의 유전자가 유의적인 발현 차이를 보였으며 242개의 유전자가 상향 조절되었고 207개의 유전자가 하향 조절되었음. JN 샘플에서는 총 569개의 유전자가 유의적인 발현 차이를 보였으며 193개의 유전자가 상향 조절되었고 376개의 유전자가 하향 조절되었음. JD 샘플을 제외한 나머지 4개의 샘플에서는 모두 하향 조절된 유전자가 상향 조절된 유전자 보다 많은 수 발현 차이를 보이는 것으로 나타남.

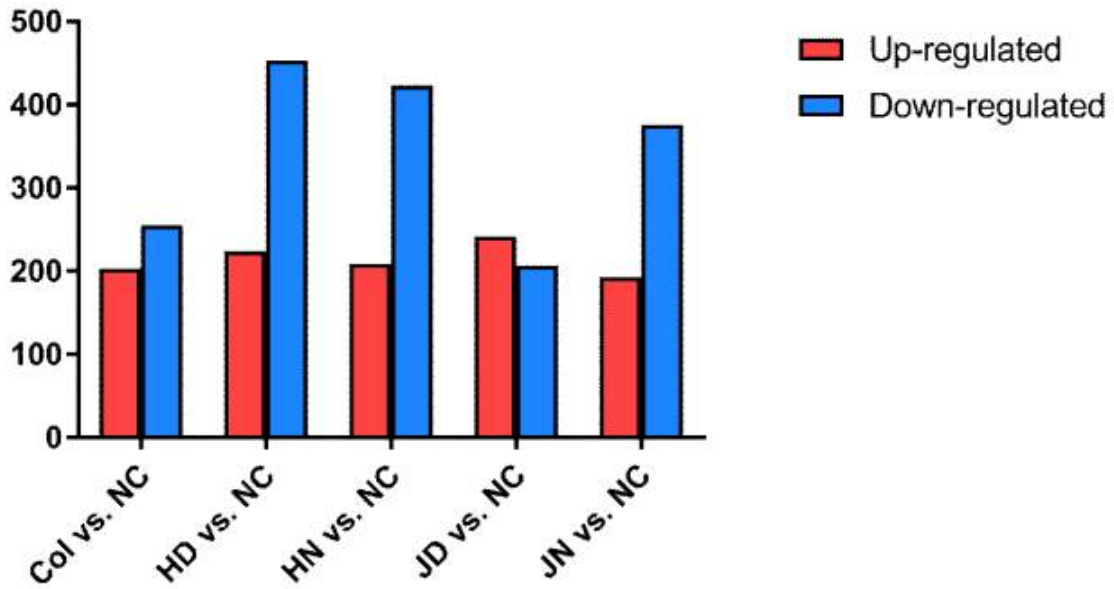


그림 1-23. RNA-seq 분석 차별 발현 유전자(DEGs)의 통계 그래프

- 다음으로 Volcano plot 통해 차별 발현 유전자(DEGs)가 어떻게 분포하는지 시각화하였고 결과적으로 NC와 비교하여 각각의 샘플 간 서로 발현의 정도가 다른 유전자들이 다양하게 존재한다는 것을 알 수 있었음.

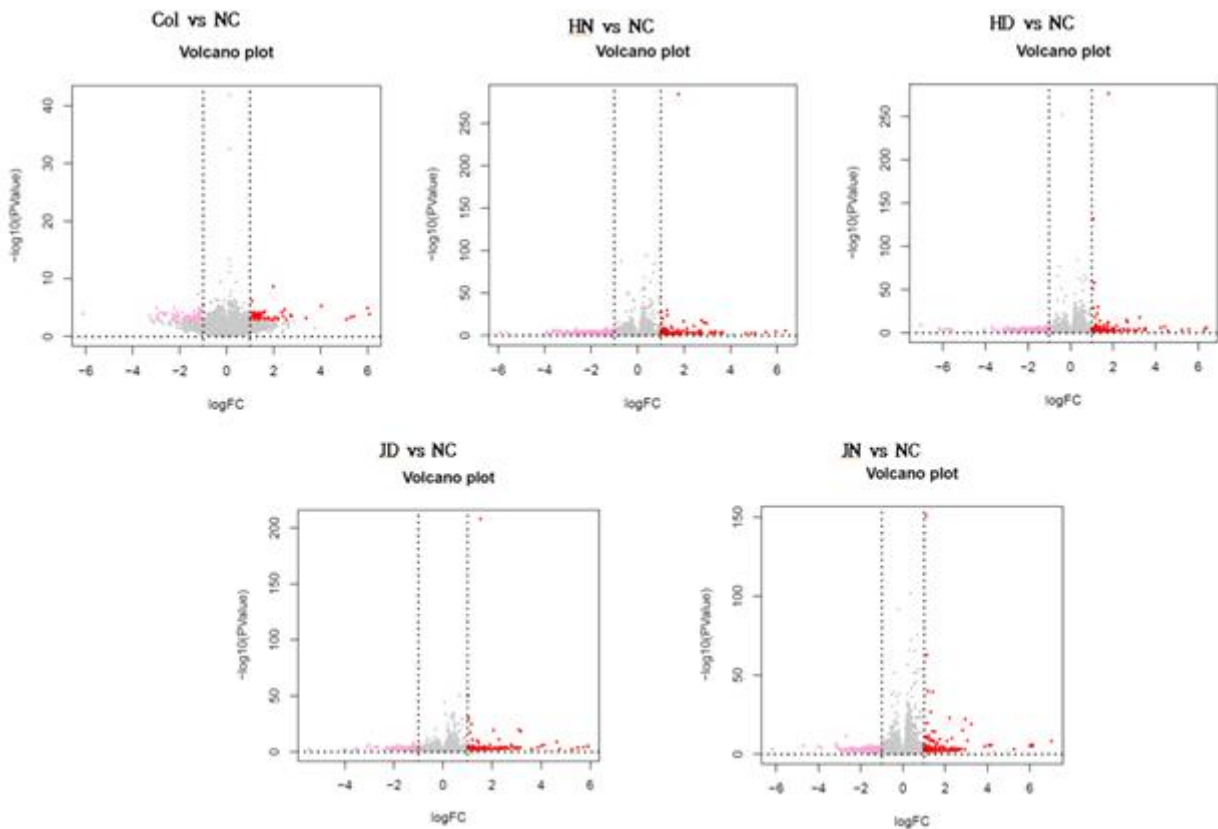


그림 1-24. RNA-seq 분석 차별 발현 유전자(DEGs)의 분포 그래프 Volcano plot

- GO(gene ontology) annotations 분석은 DAVID 온라인 도구 및 clusterProfiler를 사용하여 선별된 DEG에서 수행되었고 세포 구성 요소(CC), 생물학적 과정 (BP), 분자 기능(MF)의 ontology를 포함한 GO의 functional annotations에 초점을 맞추어 분석을 진행

행하였음.

- Col 샘플의 경우 cell development, regulation of cell development와 같은 cell의 발달과 관련한 부분의 활성이 증가한 것으로 나타났으며 특히, positive regulation of neurogenesis, regulation of neuron differentiation, positive regulation of nervous system development와 같은 신경과 관련한 부분의 활성이 증가한 것으로 관찰됨. 반면에 transition metal ion binding, zinc ion binding, negative regulation of protein modification process와 같은 미네랄과 단백질 관련 부분의 활성이 억제된 것으로 나타남.
- HD 샘플에서는 cellular response to external stimulus, cellular response to transforming growth factor beta stimulus와 같은 세포간의 자극과 관련된 부분을 비롯하여 collagen-containing extracellular matrix, bone trabecula morphogenesis, bone trabecula formation, trabecula formation등 뼈와 섬유주에 관련된 부분이 활성이 증가한 것으로 나타남. 반면에 gene silencing by RNA, gene silencing by miRNA, regulation of gene expression, epigenetic 등과 같은 주요 유전자 발현과 관련한 부분들의 활성이 억제된 것으로 관찰되었음.

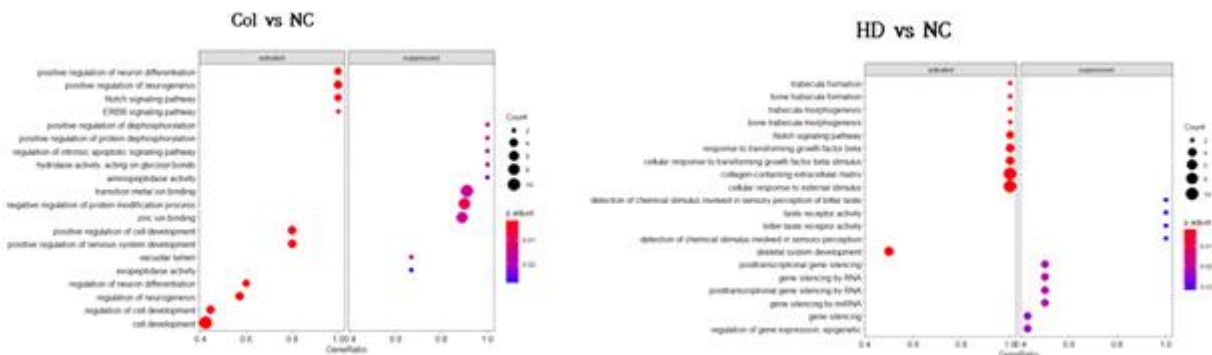


그림 1-25. 차별 발현 유전자(DEGs)의 GO(gene ontology) enrichment 분석

(A: Col vs NC, B: HD vs HD)

- HN 샘플에서는 developmental cell growth, developmental growth involved in morphogenesis, regulation of extent of cell growth, regulation of cell size와 같은 cell growth와 관련한 부분의 활성과 함께 skeletal system development, embryonic skeletal system development, supermolecular fiber organization과 같은 골격 발달과 관련한 기능의 활성이 증가하였음. 반면에 ATPase activity, cellular polysaccharide metabolic process, cellular carbohydrate biosynthetic process와 같은 에너지 생성과 관련한 부분의 활성이 억제된 것으로 관찰되었음.
- JD 샘플에서는 ossification, trabecula formation, bone trabecular morphogenesis와 같은 골격 형성과 관련한 부분, lipid binding, developmental growth, regulation of cell motility와 같은 다양한 부분에서 활성이 증가한 것으로 나타났음. 반면에 sphingolipid biosynthetic process, membrane lipid biosynthetic process, ceramide biosynthetic process 등과 같은 생합성과 관련한 부분의 활성이 억제된 것으로 나타남.
- JN 샘플에서는 nervous system development, multicellular organism development와 같은 신경 관련 부분의 활성 증가와 함께 특히 T cell differentiation, T cell activation, lymphocyte differentiation, adaptive immune response와 같은 면역 관련 부분의 활성이 증가한 것으로 나타남. 반면에 mitochondrial part, mitochondrial envelope, mitochondrial membrane과 같은 미토콘드리아 관련 부분의 활성 억제와 glycerolipid

biosynthetic process, glycerophospholipid biosynthetic process와 같은 글리세롤지질과 관련한 부분의 활성이 억제된 것으로 확인되었음.

- 향후 보다 장기능과 관련된 기능을 바탕으로 유전자 기능의 체계적인 분석을 위해 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로를 활용한 추가분석을 실시할 예정임.

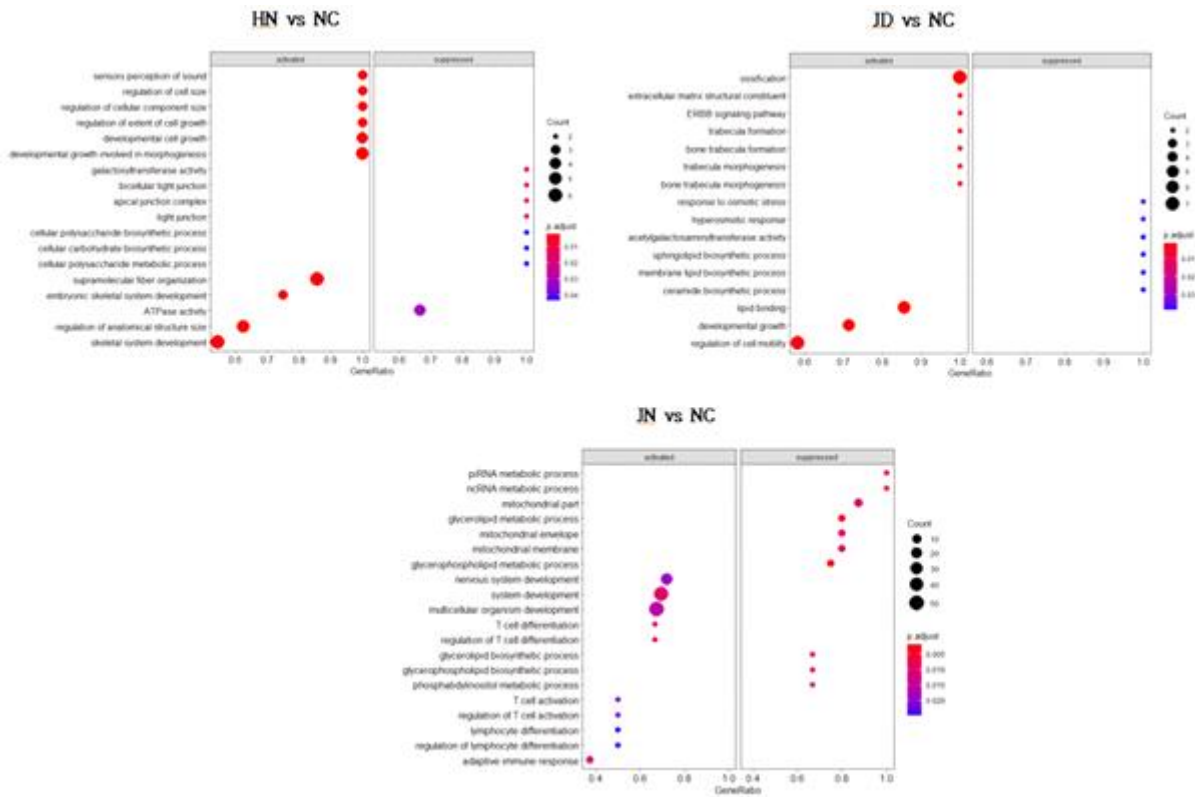


그림 1-26. 차별 발현 유전자(DEGs)의 GO(gene ontology) enrichment 분석

(A: HN vs NC, B: JD vs HD, C: JN vs NC)

- 외래 물질로부터 보호를 위한 장상피세포의 1차 barrier는 mucin layer 층으로 알려져 있음. 본 연구에서는 우유 엑소좀 처리에 따라 장상피세포의 mucin관련 유전자의 특이적인 발현변화를 관찰하였음. 처리구 별로 뮤신 관련 유전자(MUC2, MUC6, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17, MUC20, MUCL3, MUC3A, MUC5AC, MUC20P1)의 발현 양의 차이를 특이적으로 분석해본 결과 HD, JD, JN 처리구에서 MUC17의 유전자 발현이 상대적으로 증가한 것을 알 수 있었음. MUC17은 Mucin-17 단백질 생성과 관련 있는 유전자로 Mucin-17 단백질은 장 상피 세포에서 기능하여 세포 보호를 제공하고, 장관 구조를 유지하며, 신호 전달을 제공하고, 정단/기저 분극을 잃은 암 세포에 대해 항접착성을 부여하는 것으로 알려져 있어 우유 엑소좀과의 상호작용에 관한 세부적인 연구를 추후 실시할 예정임.

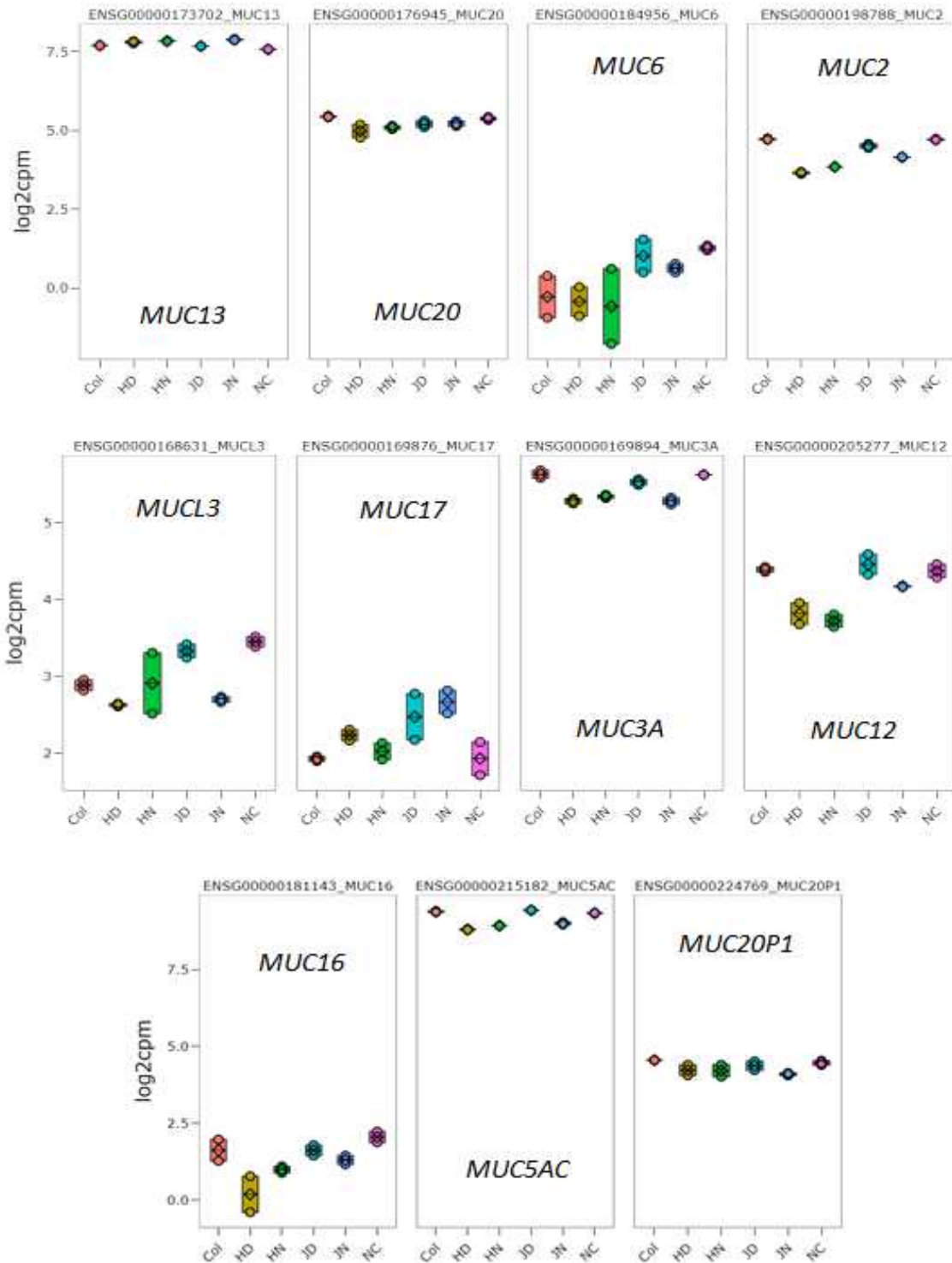


그림 1-27. 우유 엑소좀 처리에 따른 HT-29 장상피세포주의 Mucin 관련 유전자군 발현차이 분석

2) *In vitro* 발효 시스템을 통한 우유 엑소좀과 장내미생물과의 상호작용 검토

- 본 연구에서는 인체 분변을 이용한 생체 외 *In vitro* 발효 시스템을 구축하였음. *In vitro* 에서 장환경 모사시스템 구축을 위하여 3가지 batch fermenter를 이용함. 인공 위-소장-대장의 모사를 위한 각각의 배지조성과 환경설정도 그림 8과 같음. 각 처리구는 인간의 장관운동도 함께 모사하기 위해 60 rpm으로 흔들어주면서 37°C에서 배양하였음. 본 연구에서는 우유 엑소좀의 활성유지를 위하여 위-소장을 거치지 않고 direct하게 대장환경에 우유 엑소좀을 처리하였음.

- 아무것도 처리되지 않은 대조구와 함께 다양한 우유 엑소좀이 1 ug과 100 ug 첨가된

처리구를 각각 처리[총 11 샘플; Col (Colostrum; 1 ug과 100 ug), HD (Holstein day; 1 ug과 100 ug), HN (Holstein night; 1 ug과 100 ug), JD (Jersey day; 1 ug과 100 ug), JN (Jersey night; 1 ug과 100 ug), NC (Negative control)]하여 각각의 장내 미생물 변화를 측정하였음. 대장에 사용되는 분변 sample은 건강한 영유아 분변을 대상으로 준비하였으며 대장 모사환경에서 10% slurry형태로 첨가하였음.



그림 1-28. 본 연구에서 사용된 *In vitro* 발효 시스템 Fermenter of the Intestine Microbiota Model (FIMM)과 혐기 챔버 안에서 배양하는 모습

- 1차적으로 24시간 배양 후 pH를 측정한 결과 다양한 농도 및 종류의 우유엑소좀 처리에 따라서는 유의적으로 변화하지 않았음(data not shown).

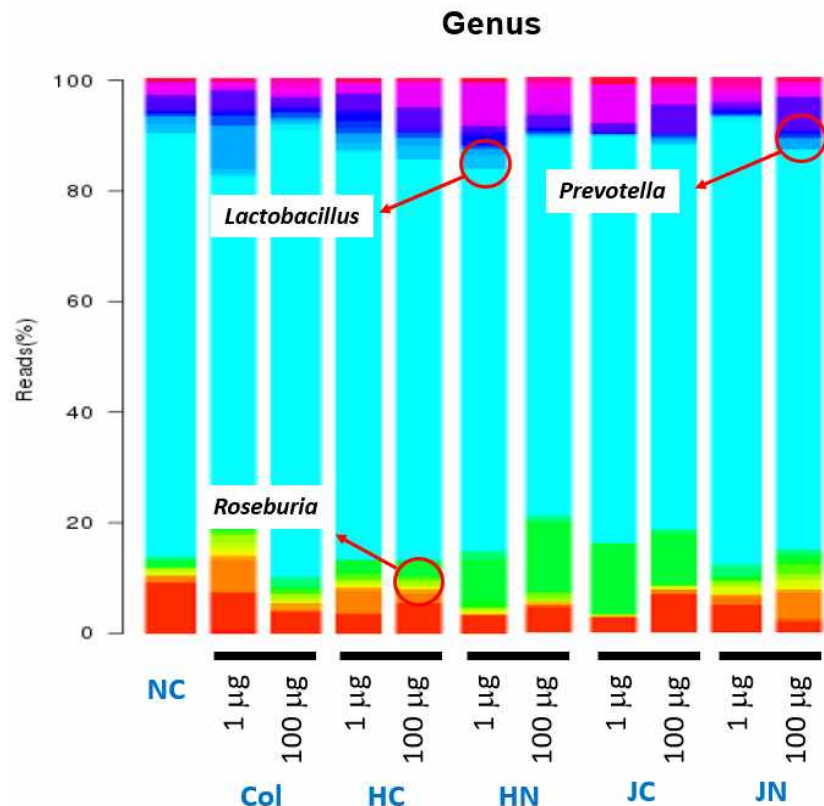


그림 1-29. *In vitro* 발효 시스템에서 메타지놈 분석을 통한 우유 엑소좀 처리에 따른 장내미생물 변화 탐색

- 속(Genus) 수준에서 분석한 결과 예측과는 다르게 우유 엑소좀의 농도와 종류에 따라 일정하게 변화하지는 않는 것을 확인하였음. 이중 흥미롭게도 일부 우유 엑소좀 처리구의 경우 *Lactobacillus*와 *Prevotella*의 abundance 증가가 관찰되었음(그림 6). 또한, 대장 내 butyrate생성에 관여하는 것으로 알려진 *Lachnospiraceae*에 속하는 미생물 군집인 *Roseburia*가 대조구와 비교하였을 때 우유엑소좀의 처리에 따라 전반적으로 증가하는 것을 관찰하였음.

3) 따라서 본 연구에서의 일부 부분적이기는 하지만 우유 엑소좀의 처리가 장내 유익균으로 알려진 *Lactobacillus*와 *Prevotella*의 분포를 유의적으로 향상시킬 수 있는 것을 확인하였으며 또한, 장내 다양한 건강기능성을 나타내는 short chain fatty acid (SCFA)인 butyrate의 생성과 관련된 미생물 군총인 *Lachnospiraceae*의 균주중 하나인 *Roseburia*도 증가시키는 결과를 확인한 바 종합하였을 때 명확하게 작용기작을 확인할 수는 없지만 전반적으로 우유 엑소좀의 처리는 장내미생물의 균총에 영향을 미칠 수 있으며 대장에서의 미생물과의 상호작용을 통해 다양한 기능성 대사체들의 생성에도 긍정적으로 작용할 수 있을 것으로 예측되었음.

다. 인체 대장 세포주 및 동물모델을 통한 우유 엑소좀의 안전성 평가

1) 인체 대장 세포주를 대상으로 인지기능 개선 소재 처리에 따른 안전성 평가

- 본 연구에서는 면역세포주인 RAW264.7 대식세포주와 인체 대장 세포주 HT-29를 대상으로 초유에서 분리한 우유 엑소좀 처리에 따른 독성을 평가하였음. 각 cell line (1×10^5 cell/mL)를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였으며 우유 엑소좀을 다양한 농도로 처리한 후 다시 24시간과 48시간동안 배양한 뒤 MTT 용액 100 μ L를 4시간 동안 처리하였음. 상등액을 제거하고 DMSO (dimethylsulfoxide) 100 μ L를 분주하여 5분간 교반한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 식이성 우유 엑소좀의 독성을 평가하였음.

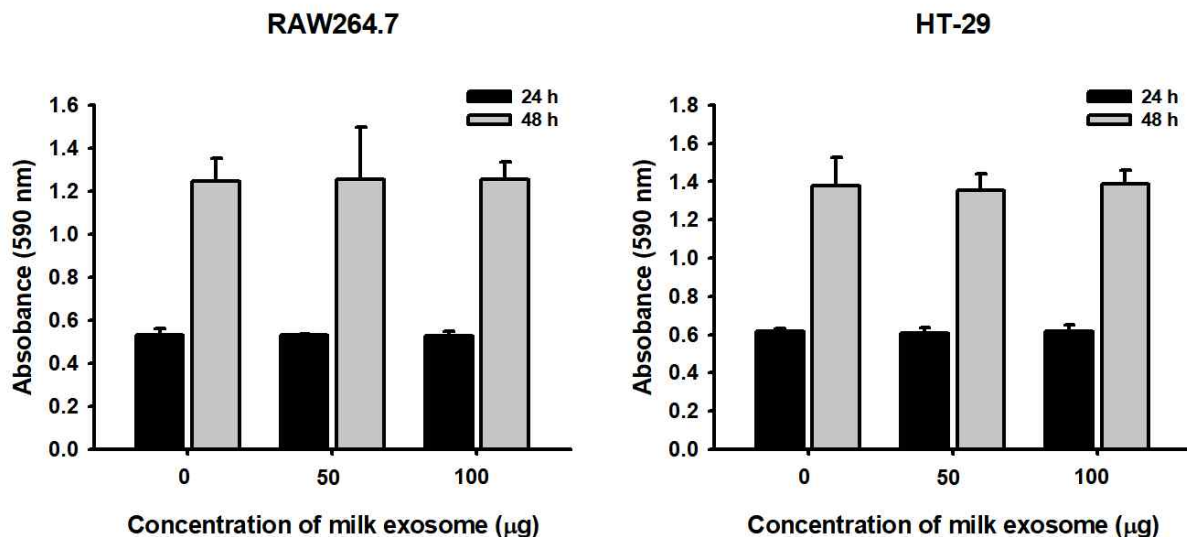


그림 1-30. MTT assay를 이용한 우유엑소좀의 RAW264.7 대식세포주(왼쪽)와 HT-29 장상피세포주(오른쪽)의 세포생존을 평가

- 면역세포주인 RAW264.7 대식세포주와 인체 대장 세포주 HT-29를 대상으로 농도에 따른 우유엑소좀의 처리에 따른 세포의 생존율을 평가한 결과 24시간과 48시간 배양기간 동안 비처리 대조구와 비교하여 세포의 생존에는 유의적인 변화를 탐색할 수 없었음. 이러한 결과는 본 연구결과에 의해 분리된 우유엑소좀이 독성이 없는 것으로 관찰되었으며 향후 세포 및 동물실험이 가능할 것으로 판단되었음.

2) 동물모델을 대상으로 소재 처리에 따른 혈액학적/혈액생화학적 검사를 통한 독성 평가

- 동물실험 및 장기무게 측정 : 동물실험은 4주령의 C57BL/6 (18-20 g)을 대상으로 1주일 동안의 적응기간과 4주 동안의 본 사육 실험을 수행함. 사육실의 온도는 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하고 12시간 간격으로 점등시키며 모든 실험쥐들은 물과 사료를 자유롭게 섭취시킴. 매일 사료 섭취량을 기록하며 실험시작 이후 2일 간격으로 30일 동안 체중을 측정함. 우유 엑소좀 (1 mg per mouse)은 매일 1회 정해진 시간에 경구 투여하며 체중 변화를 관찰하고 실험 종료 후 장관의 외형, 무게, 용모구조 등을 측정하였음.
- 장내미생물 변화 탐색 : 동물실험과정을 통해 수거한 분변샘플을 대상으로 MiSeq (Illumina) 플랫폼 기반의 16S amplicon sequencing을 통한 장관 마이크로바이옴 변화를 탐색하였음.
- 마우스 동물모델을 이용하여 30일동안 우유엑소좀을 급여하였을 때 비처리구인 대조구와 비교하여 유의적인 체중변화를 탐색하지 못하였음.

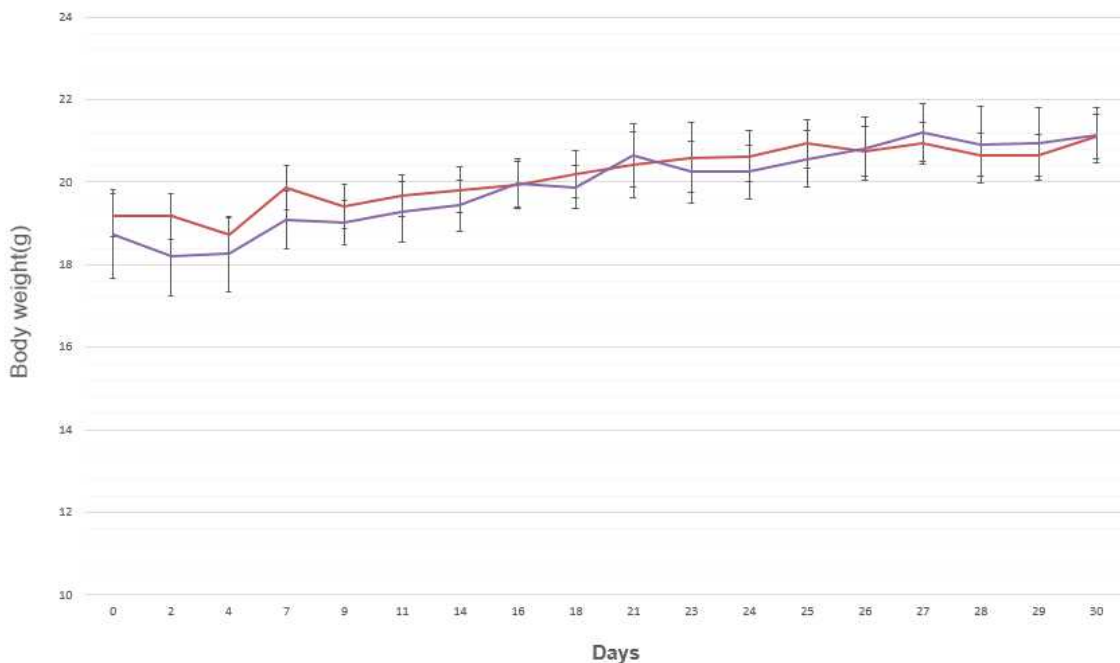


그림 1-31. 우유엑소좀 처리에 따른 C57BL/6 마우스의 체중 변화 모니터링

- 실험종료 후 장관의 길이 및 장용모 구조의 형태를 관찰하였을 때 비처리 대조구와 유사한 길이와 용모 구조가 관찰된 바 본 연구결과에 의해 분리된 우유엑소좀은 생체 특히 장관조직에는 독성이 미비한 것으로 판단되었음.

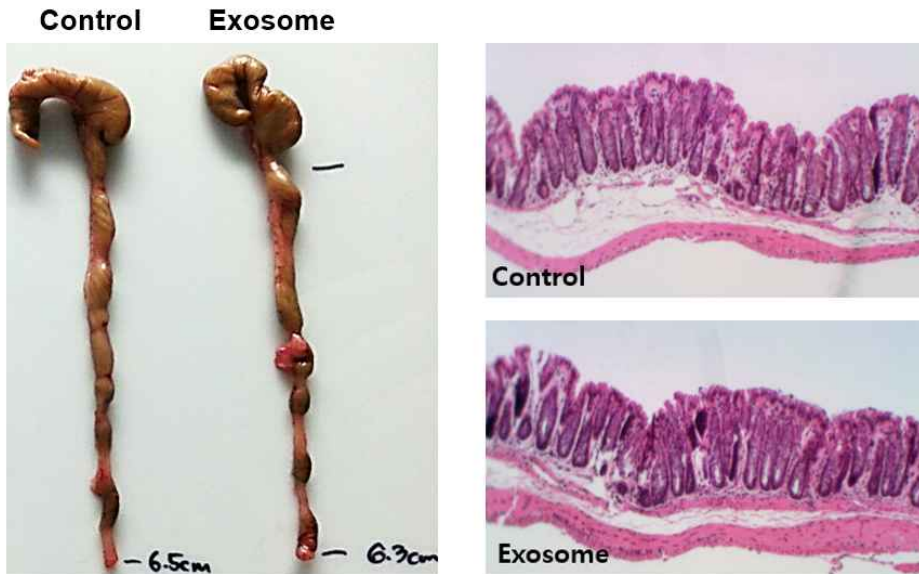


그림 1-32. 우유엑소솜 처리에 따른 C57BL/6 마우스 장관의 길이 및 용모구조 평가

- 혈액 생화학분석기를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol, triglyceride 등을 측정하여 우유엑소솜의 생체 대사지표에 미치는 영향을 평가한 결과 통계적으로 유의미한 변화를 확인할 수 없었음.

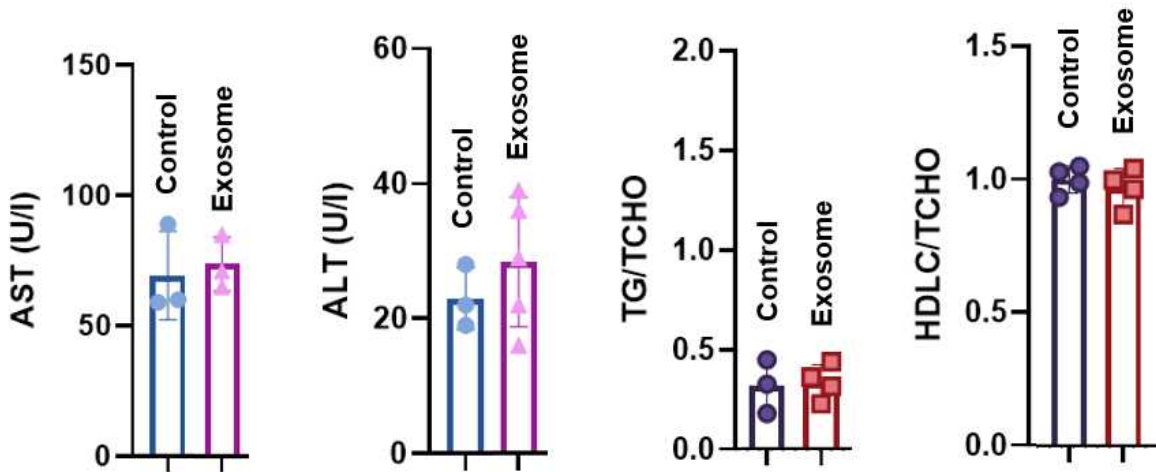


그림 1-33. 우유엑소솜 처리에 따른 마우스 혈액 내 생체 대사지표 변화탐색

- 또한, 메타지놈 분석을 통해 실험종료 후 장내미생물 분석을 실시한 결과 우유엑소솜의 처리에 따른 마이크로바이옴 변화는 비처리 대조구와 유의적인 차이가 거의 관찰되지 않아 이들 우유엑소솜의 처리는 장내미생물 균총변화에 제한적인 것으로 판단되었음.

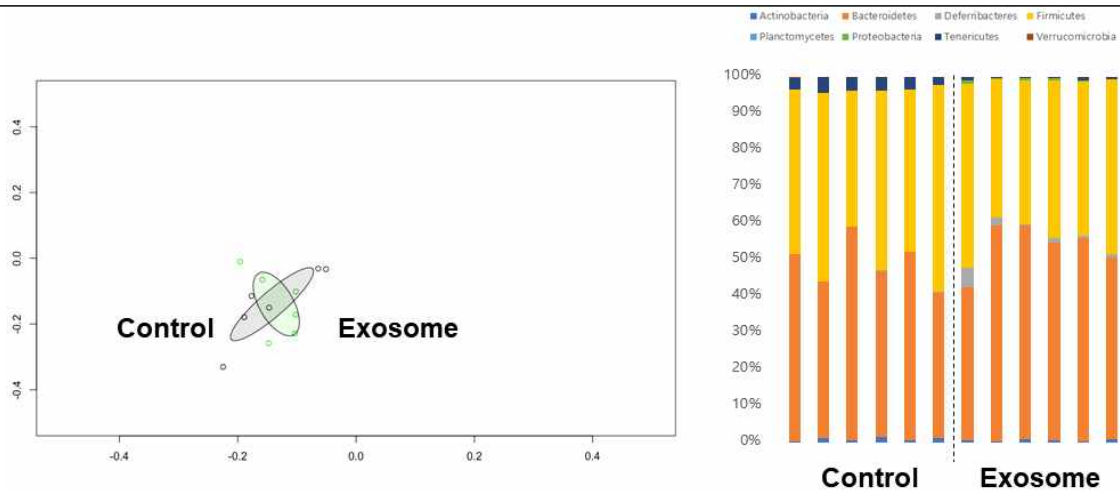


그림 1-34. 우유엑소좀 처리에 따른 C57BL/6 마우스 분변 마이크로미옴 변화 탐색

- 이러한 결과를 종합하였을 때 본 연구에서 평가되고 있는 우유엑소좀의 경우 우유유래의 기능성 소재임과 동시에 생체내 안전성 측면에서는 문제가 없을 것으로 판단되며 향후 식품소재로 안전성이 확보될 수 있을 것으로 판단됨.

1-2. 프로바이오틱스 혼합 스타터 개발 및 유제품 적용 기술 개발

[위탁기관 : 우석대학교 문용일]

가. 선발 프로바이오틱스의 스타터 대량생산 공정 확립

1) 선발 프로바이오틱스의 증균 배지 성분 별 생육 효율 평가

- 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 선발한 기능성 프로바이오틱스 균주인 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15의 상업화를 위한 대량생산 공정 확립을 위해 증균 배지 및 동결보호제 성분 최적화 연구를 진행함.
- 유산균주의 대량 분말 제조 시, 균주의 증균에 사용되는 배지는 식품 원료로 구성되어야 하며, 균주의 안정성을 위해 매우 중요한 역할을 함.
- 선발 프로바이오틱스인 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15는 2차 계대하여 활성화시킨 후, 해당 균주 배양액 0.1%를 5종의 배지(표 1-26)에 각각 접종 한 뒤 37°C에서 18시간동안 정지 배양하여 생균수를 측정하였음. 대조균은 유산균 증균 배지인 MRS broth (Difco)를 사용하였음.

표 1-25. 식품용 증균 배지 조성

식품용 증균 배지1

원료명	함량 (%)
Soy peptone PR	1
Yeast extract	1.5
Glucose	2
Polysorbate 80	0.1
Sodium acetate	0.5
Maganese sulfate	0.005
Water	94.895
합계	100

식품용 증균 배지2

원료명	함량 (%)
Soy peptone F	1
Yeast extract	1.5
Glucose	2
Polysorbate 80	0.1
Sodium acetate	0.5
Maganese sulfate	0.005
Water	94.895
합계	100

식품용 증균 배지3

원료명	함량 (%)
Soy peptone PR	1
Yeast extract	1
Glucose	2
Polysorbate 80	0.1
Sodium acetate	0.5
Maganese sulfate	0.01
Water	95.39
합계	100

식품용 증균 배지4

원료명	함량 (%)
Soy peptone PR	1
Yeast extract	1.5
Glucose	2
Polysorbate 80	0.1
Sodium acetate	0.5
Magnesium sulfate	0.01
Maganese sulfate	0.005
Dipotassium phosphate	0.2
Water	94.685
합계	100

식품용 증균 배지5

원료명	함량 (%)
Peptonized milk	2
Glucose	2
Primatone	2
Yeast extract	1
Polysorbate 80	0.1
Maganese sulfate	0.01
Water	92.89
합계	100

식품용 증균 배지6

원료명	함량 (%)
Peptonized milk	2
Glucose	2
Primatone	2
Yeast extract	1
Polysorbate 80	0.1
Water	92.9
합계	100

식품용 증균 배지7

원료명	함량 (%)
Hy peptone	2.2
Glucose	2.2
Polysorbate 80	0.1
Sodium acetate	0.5
Magnesium sulfate	0.02
Maganese sulfate	0.0057
Dipotassium phosphate	0.2
Water	94.7743
합계	100

- 식품용 증균 배지를 사용하여 선발 프로바이오틱스 증균 시 대조균인 MRS와 비교하여 *L. rhamnosus* 4B15의 활성은 비슷하거나 약간 감소하는 경향을 보였으나, 10배 내외 수준을 유지했음. 특히, 배지2, 3, 5에서 선발 프로바이오틱스의 활성이 MRS 대비 70% 이상으로 나타나 추후 4B15 균주의 식품용 원료로의 대량생산 및 제품화를 위한 공정에 사용할 예정임.

표 1-26. 식품용 증균 배지 성분에 따른 선발 프로바이오틱스 생균수 측정

배지명	<i>L. rhamnosus</i> 4B15 (CFU/mL)
MRS	1.54E+09
식품용 증균 배지1	9.53E+08
식품용 증균 배지2	1.12E+09
식품용 증균 배지3	1.79E+09
식품용 증균 배지4	1.01E+09
식품용 증균 배지5	1.11E+09
식품용 증균 배지6	7.30E+08
식품용 증균 배지7	4.17E+08

2) 선발 프로바이오틱스의 동결보호제 성분 별 생육 효율 평가

- 증균된 프로바이오틱스 균주는 장기간 안정적으로 보관하고 상업적 활용을 용이하게 하기 위해 분말 형태로 제조하여 유통·보관함. 이 과정에서 증균된 균주의 균체를 농축 및 동결건조하여 분말형태로 제작하는데, 건조하는 과정에서 세포의 손상 등으로 인해 유산균 일부가 사멸하는 것을 방지하기 위해 동결보호제를 처리함. 동결보호제의 처리는 유산균의 동결 및 건조 과정 중 세포 손상을 최소화시키고, 건조 수율 향상 및 저장기간 중에 안정성을 높이는 역할을 함.
- 선발 프로바이오틱스 *L. rhamnosus* 4B15를 위한 동결보호제로 표 1-28와 같은 조성의 동결보호제 5가지를 사용하여 동결건조 후 균주 안정성을 비교 평가하였음.
- 동결보호제 종류에 따른 선발 프로바이오틱스 균주의 안정성 테스트 결과, 10% 덱스트린과 10% 트레할로스를 적용하였을 때 균주의 안정성이 가장 높은 것으로 나타남 (표 1-28; 그림 1-35). 트레할로스는 동결 시 생성되는 얼음 결정의 구조를 조정하여 세포 손상을 덜어주는 효과가 있어 유산균 분말 제조 시 많이 사용되고 있다고 알려져 있음.
- 따라서, 추후 4B15 균주의 식품용 원료로의 대량생산 및 제품화를 위한 균주의 동결건조 시, 10% 덱스트린 또는 10% 트레할로스를 사용할 예정임.

표 1-27. 동결보호제 종류에 따른 프로바이오틱스 안정성 평가

동결보호제 종류	<i>L. rhamnosus</i> 4B15 균수 (CFU/g)
동결건조 전	3.36×10^{10}
10% 덱스트린	1.14×10^{11}
10% 트레할로스	1.46×10^{11}
30% 트레할로스	6.00×10^{10}
10% 탈지분유	3.54×10^{10}
10% 탈지분유 + 2% 수크로스	8.23×10^{10}

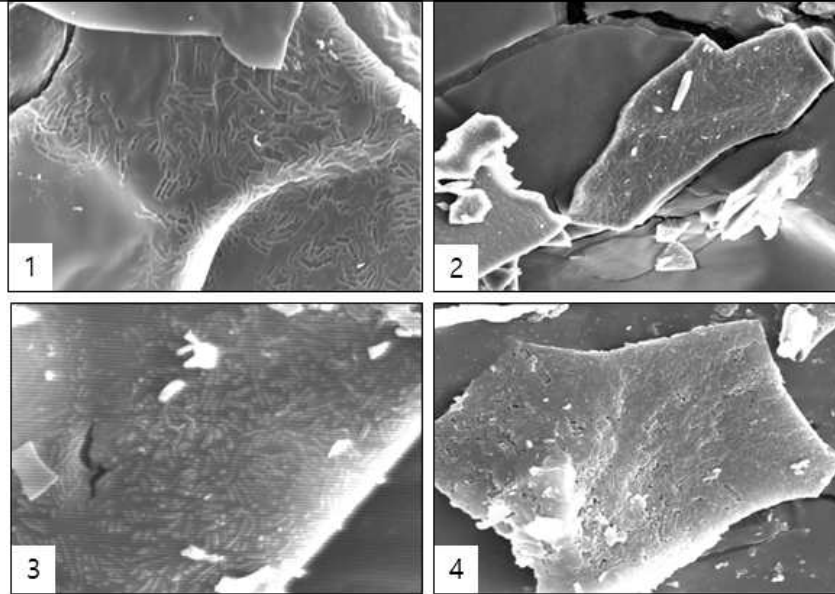


그림 1-35. 동결보호제 처리 후 유산균 분말 SEM 촬영 이미지

- 1 10% 덱스트린 처리(5000배율)
- 2 10% 덱스트린 처리(2000배율)
- 3 10% 트레할로스 처리(5000배율)
- 4 10% 탈지분유 + 2% 수크로스 처리(5000배율)

나. 프로바이오틱스 혼합 스타터 대량생산 공정 개선

1) 선발 동결보호제의 저장 온도별 균주 안정성 평가

- *Lactobacillus rhamnosus* 4B15의 동결보호제 테스트 결과 동결건조 후 해당 균주의 손실이 가장 적었던 10% 덱스트린과 10% 트레할로스를 적용하여 4B15 균주의 동결건조 분말을 제작하였으며, -80°C, -20°C, 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 온도에서 보관하며 12개월 후 균수를 측정하여 동결보호제를 통한 균주 안정성을 평가하였음.
- 10% 덱스트린과 10% 트레할로스를 사용하여 제작한 4B15 동결건조 분말을 12개월 저장한 후 온도별 생균수를 비교한 결과, 10% 트레할로스를 사용한 분말의 초기균수 및 저장 후 보존 균수 결과가 10% 덱스트린 분말에 비해 우수하였음.
- 10% 트레할로스를 처리한 경우, -80°C ~ 4°C 저장 시 12개월까지 균수 보장이 가능한 것으로 판단되며, 10% 덱스트린을 처리한 경우는 -80°C ~ -20°C 저장 시 12개월까지 균수 보장이 가능하다고 판단됨.

표 1-28. 10% 트레할로스 처리 4B15 동결건조 분말의 온도별 저장 테스트

저장조건	12개월 저장 유산균수 (CFU/g)	비고
초기균수 (0일차)	1.7×10^{11}	균수 보장 가능
-80°C	1.5×10^{11}	균수 보장 가능
-20°C	1.1×10^{11}	균수 보장 가능
4°C	4.9×10^{10}	균수 보장 가능
10°C	6.5×10^8	
15°C	4.5×10^8	
20°C	N.D.	
25°C	N.D.	
30°C	N.D.	

표 1-29. 10% 덱스트린 처리 4B15 동결건조 분말의 온도별 저장 테스트

저장조건	12개월 저장 유산균수 (CFU/g)	비고
초기균수 (0일차)	9.2 x 10 ¹⁰	균수 보장 가능
-80°C	5.8 x 10 ¹⁰	균수 보장 가능
-20°C	3.5 x 10 ¹⁰	균수 보장 가능
4°C	1.0 x 10 ⁸	
10°C	1.0 x 10 ⁸	
15°C	6.3 x 10 ³	
20°C	N.D.	
25°C	N.D.	
30°C	N.D.	

2) 선발 프로바이오틱스 코팅(encapsulation) 조건 설정

① 선발 프로바이오틱스의 encapsulation 코팅 제조

(가) 유산균 캡슐 조성 조건 설정

- Encapsulation을 위한 encapsulator로서 캡슐 안쪽의 core와 shell의 조성을 설정하여 전달 목적에 부합하는 coating matrix를 설정하는 것이 중요함.
- 유산균은 생균으로 온도와 수분 등에 민감하여 분말 상태로 캡슐화하는데, 코팅을 통해 사람의 구강을 통해 섭취되고 장까지 살아 정착할 수 있도록 그에 맞는 캡슐에 대한 조성이 필요함.
- Shell의 경우, 인체 내 적합성 뿐만 아니라 적절하게 응고되는지에 따른 물성 등도 중요하며, 그에 따라 shell 성분의 응고를 위한 buffer의 조성 연구도 함께 필요함.
- Core의 조성 또한 유산균의 활성을 떨어뜨리지 않아야 하며, encapsulator의 노즐을 이동함에 있어 크게 영향을 받지 않아야 함.
- 이러한 영향인자들을 고려하여 선발 프로바이오틱스의 캡슐화를 위한 캡슐 조성을 아래 표와 같이 제조하였음.

표 1-30. 유산균 캡슐화 조성 조건

Core	Shell	Buffer	비고
Coconut oil 90%	2% Alginate	CaCl 2%	이중코팅
유산균분말 10%	2% Gelatin	Ice water	
Coconut oil 40%	2% Alginate	CaCl 2%	
DW	11% WPI		
유산균 분말	18% MRP		
PGPR 1%	(12% WPI + 6% glucose)		
2% Alginate 용액 87%		CaCl 2%	단일코팅
Starch 8%			
유산균 분말 5%			

(나) 유산균 이중코팅 캡슐 조성 조건 설정

- 단일 코팅을 한 것 외에 이중코팅 중 shell의 조성을 젤라틴으로 한 것은 젤라틴이 잘 굳지 않아 제외시켰음.

- 또한, core의 조성 중 코코넛 오일을 90%로 했을 경우, encapsulator 노즐을 통과하면서 중간에 노즐이 막혀 부적합하다 판단하였음.
- 두 가지 성분을 제외한 이중코팅 성분 조성 및 제조 공정과 encapsulated 유산균은 아래 표, 그림과 같음.

표 1-31. 유산균의 encapsulation 성분 조성

		제조 공정
Core		1. 59% (유산균주 + distilled water) + 40% 코코넛 오일 + 1% PGPR (유화제) 혼합 후 교반기를 통해 60°C, 1500 rpm에서 30 min 예비 교반 2. 호모믹서를 통해 약 8000 rpm에서 1 min 교반
Shell	Alginate	1. 2% alginate + distilled water 혼합 2. 4°C에서 overnight 후 사용
	Whey protein isolate (WPI)	1. 11% WPI + distilled water 혼합 후 4°C에서 overnight 2. pH 7로 조정 후 78°C water bath에서 45 min 겔화 반응 3. 4°C에서 overnight 후 사용
	Maillard reaction product (MRP)	1. 12% WPI + 6% Glucose + distilled water 혼합 후 65°C water bath에서 24h 반응 2. 4°C에서 overnight 3. pH 7로 조정 후 78°C water bath에서 35 min 겔화 반응 4. 4°C에서 overnight 후 사용

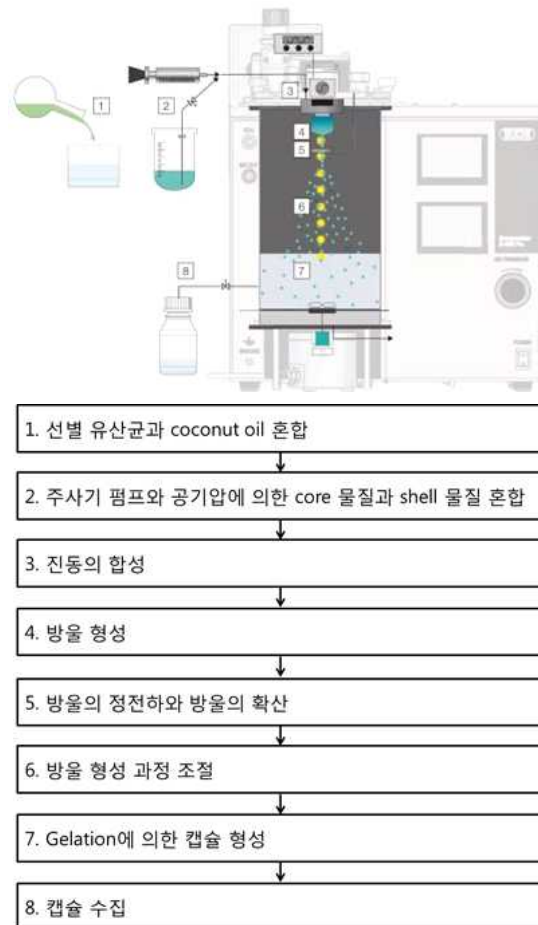


그림 1-36. 유산균 encapsulation 공정

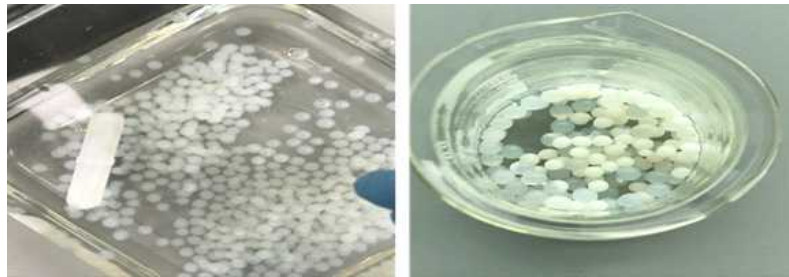


그림 1-37. Encapsulated 유산균

② GI(Gastro intestinal) track *in vitro* digestion model을 통한 코팅 유산균의 체내 안정성 검증

(가) GI tract *in vitro* digestion model 설정

- 입 : 입에서는 음식물이 침, 혀, 구강과 접촉하나, *In vitro* model에서는 혀와 구강 접촉을 생략하였으며, sample 0.1g에 Simulated salivary fluid (SSF) 1.2ml 첨가하여 5분간 반응시켰음.
- 위 : Simulated gastric fluid (SGF) 2.4ml를 첨가한 후 2시간 동안 반응시켰음.
- 소장 : 1M NaHCO₃ 0.4ml, bile juice 1.2ml, duodenal juice 2.4ml(simulated intestinal fluid (SIF))을 첨가하여 0, 15, 30, 60, 120분 동안 반응시켰음.
- 결장 : 결장에는 수많은 박테리아가 포함되어 실험실에서 구현하기 어려운 부분이 있으며, 보통 동물실험으로 대체하기 때문에 제외시켰음.
- *In vitro* model 시험용액 조성과 시험방법은 아래 표와 같음.

표 1-32. *In vitro* model의 시험용액 조성

	Stock.conc	SSF(mL)	SGF(mL)	SIF(mL)
KCl	3.73g/100mL	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	6.8g/100mL	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	8.4g/100mL	6.8	12.5	42.5
NaCl	11.7g/100mL	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	3.05g/100mL	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	4.8g/100mL	0.06	0.5	-

*Simulated salivary fluid (SSF), simulated gastric fluid (SGF), 및 simulated intestinal fluid (SIF)

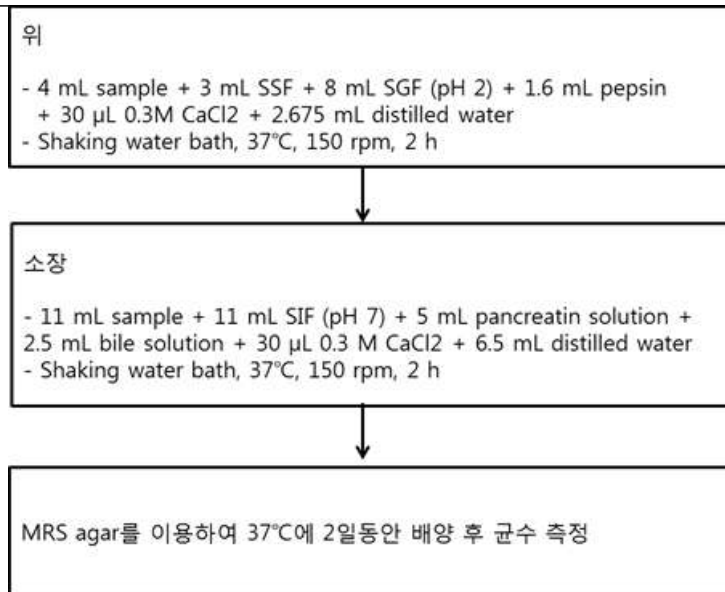


그림 1-37. *In vitro* digestion model

(나) GI tract *in vitro* digestion model을 통한 코팅 유산균의 안정성 검증

- 캡슐화 유무에 따른 4B15 유산균의 위 모델 내 생존률을 평가한 결과, 캡슐화 되지 않은 control의 경우 위에서 74.29%의 생존률을 보여주었으며, 실험군인 alginate, WPI, 및 MRP에서 각각 94.27, 88.00, 및 94.68%의 생존률을 나타내었음.
- 소장 모델에서는 캡슐화 되지 않은 control의 경우 소장에서 59.63%의 생존율을 나타낸 반면, alginate, WPI, 및 MRP에서 각각 80.06%, 77.93%, 79.33%를 나타내었음.
- 캡슐 조성으로 선발 프로바이오틱스인 4B15 균주의 체내 안정성이 가장 높을 것으로 판단되는 성분은 alginate와 MRP로 추후 4B15의 안정성을 위해 활용이 가능 할 것으로 판단됨.

표 1-33. Encapsulation 유산균의 *in vitro* digestion model 생존율

Encapsulation cell viability (%)		
캡슐 조성	위 모델 (%)	소장 모델 (%)
Control	74.29 ± 0.50	59.63 ± 0.71
Alginate	94.27 ± 0.59	80.06 ± 0.66
WPI	88.00 ± 0.68	77.93 ± 0.54
MRP	94.68 ± 0.52	79.33 ± 0.30

다. 프로바이오틱스 혼합 스타터의 유제품 적용 공정 최적화

1) 선발 프로바이오틱스 스타터 발효유 적용 평가

① 우유 베이스 제조 및 발효

- 선발 프로바이오틱스를 단독으로 발효유 스타터 컬처로의 사용 가능 유무를 확인하기 위해 우유 베이스를 다양하게 제조(원유, 원유와 탈지분유 혼합, 탈지분유와 포도당 혼합)하여 배양 테스트를 진행하였음.
- 발효 후 커드 생성 유무와 색상, 이취 여부를 확인하였음.

표 1-34. 우유 베이스 배합 조성

원료명	우유	우유+탈지분유	탈지분유+포도당
	함량(%)	함량(%)	함량(%)
우유	99.97	96.37	-
탈지분유	-	3.6	17.5
포도당	-	-	5
정제수	-	-	77.47
유산균 분말	0.03	0.03	0.03
합계	100	100	100

- 배합비 조성 중 유산균을 제외한 원료를 가온 하여 충분히 혼합한 뒤, 95°C에서 2시간 살균 진행 후 냉각시킨 뒤 배양하였음.
- 배양 조건은 41°C, 72시간 배양으로 하였으며, 72시간 배양 후 발효액의 색상, 이취, pH 등을 확인한 뒤, BCP agar를 사용하여 총 유산균수를 측정하였음.

② 선발 프로바이오틱스 스타터 발효유제품 적용 배양테스트

- 발효유 스타터로 사용되기 위해서는 커드 생성을 해야 하며, 이미나 이취가 크게 나지 않아야 제품 적용이 적합함.
- 우유에서는 커드가 생성되지 않았으며, 균수도 다른 종류의 베이스에 비해 10배 정도 적었음. 또한, 신내 등 이취가 강하게 나타났음.
- 우유와 탈지분유 혼합 조성에서는 피막이 형성된 정도로 커드가 약하게 생성되었으며, 시큼한 냄새 등 이미/이취가 나타났음. 균수는 1.4×10^9 로 균주가 증식한 걸로 나타났음.
- 액상 발효유와 동일한 조건으로 탈지분유에 포도당을 첨가하여 배양한 경우, 커드 생성 및 풍미 등이 적합하였음. 선발 프로바이오틱스 균주인 *L. rhamnosus* 4B15를 발효유 스타터 컬처로 사용하기에 탈지분유와 포도당 혼합 조성으로 진행하는 것이 적합하다고 판단되었음.

표 1-35. 단일 균주 발효유제품 적용 배양테스트 결과 비교

베이스	배양 결과			
	pH	커드 생성 유무	이취/이미	총유산균수
우유	5.20	X	○ (신내)	2.4×10^8
우유+탈지분유	4.88	△ (약함, 피막)	△ (시큼한 냄새)	1.4×10^9
탈지분유+포도당	4.39	○	△ (시큼한 냄새)	2.8×10^9

- 추가적으로 발효 시간 조건을 설정하기 위한 실험을 진행하였음.
- 배양 시작 후 커드가 생성되는 16시간부터 2시간 간격으로 pH를 측정해본 결과, 24시간 이후로는 pH가 더 이상 떨어지지 않고 유지되어 최종 배양시간은 24시간으로 하는 것이 적합하다고 판단되었음.

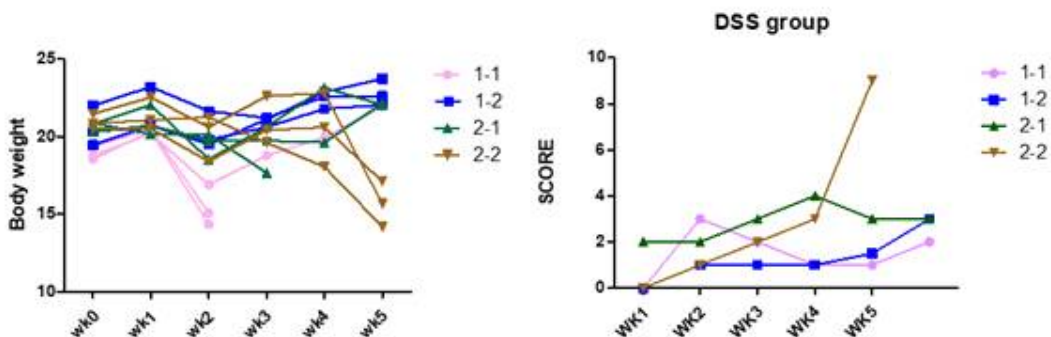
2. 스트레스성 장 질환 동물모델 및 분자기전 연구를 통한 소재의 유효성 검증

[제1협동 : 고려대학교 김세현]

가. 만성 스트레스에 노출된 염증성 장 질환 청소년기 동물모델에서의 유효성 검증

1) 만성 스트레스에 노출된 염증성 장 질환 동물 모델 설정

- ① 염증성 장 질환 유도에는 dextran sodium sulfate (DSS, MW 36,000–50,000)를 사용함.
- ② 만성스트레스와 함께 유도하는 데엔, unpredictable chronic mild stress (UCMS)를 처리한 후, DSS water를 *Ad libitum*으로 먹임. 이 때, water intake를 측정함.
- ③ 1차 DSS 농도 결정 동물 실험 (1.3%, 1.5%, 1.7%), 2차 DSS 농도 결정(1%) 동물실험을 진행함

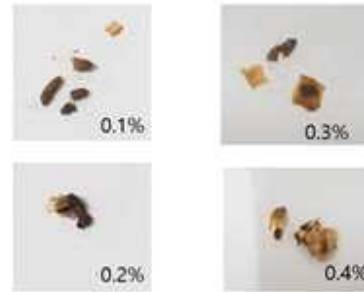


- 최종적으로 설사 유도를 위해 DSS water 1%를 7일 투여 했다가 다시 5일 water를 투여해주는 cycle 방법을 통하여 약2주간 투여 후 농도를 0.5% 정도로 낮추어 적당한 설사유지 동물모델을 설정함.

- ④ 스트레스와 DSS 복합 모델 설정을 위해 저 농도 DSS 투여와 함께 Mouse에 stress 유도 행동 실험 진행하여 stress 유도 후 경과 및 마우스의 행동 양상, 분변 상태차이를 확인함.



농도 별 설사 정도



- 최종적으로 장 염증 동물모델 설립 후 stress를 약 2주간 유도하여 DSS 단독 처리 그룹, Stress 단독 처리 그룹, Stress + DSS 복합 처리 그룹을 설정함.

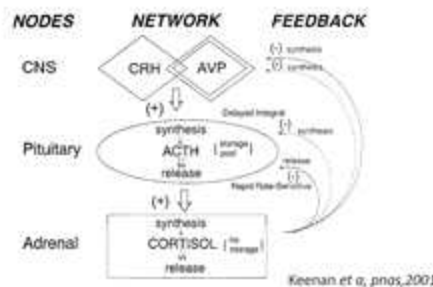
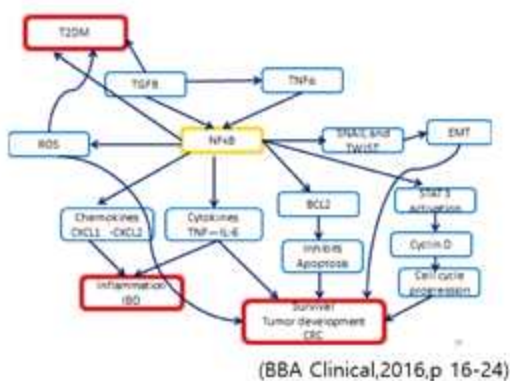
- ⑤ Stress 처리 후, DSS water를 먹인 그룹과, 스트레스 처리 없이 DSS water를 먹이는 그룹과의 비교를 통해, stress가 장 질환에 주는 역할을 유추함.
- ⑥ Stress 처리 자체만으로도 장 질환을 유도할 수 있기에, stress 처리 후 tap water를 먹인 그룹과도 비교, 확인함. 이를 통하여 stress와 장염증 간의 상관관계 파악 및 최종 cycle 설정

DSS 염증성 장 질환 유도 모델 cycle



2) 분자기전연구를 통한 소재의 유효성 검증을 위한 분석인자 설정

- ① Stress와 DSS 처리 전, pre-treatment를 통해 샘플의 prevention 효능을 확인함.
- ② Inflammatory bowel disease 관련 메커니즘과 stress 관련 메커니즘을 토대로 분석인자를 정리하고 설정함.



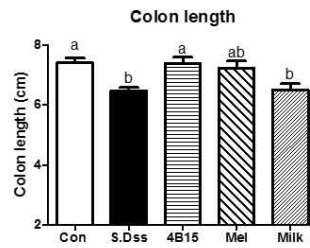
③ 장(colon, ileum)에서의 바이오마커 설정 및 분석

(가) Colon length 측정

- Dss 와 Stress 로 인한 장 길이의 차이를 측정함.

(나) 장관 면역 조절 : 조직 변화

- 조직학적 손상 정도를 측정하기 위해, colon과 ileum을 H&E staining 결과를 통해 Vili, crypt 등의 histology 변화를 확인함.



- Stress 와 DSS 모델에서 loss of crypt architecture, flattend villi 등이 관찰됨.
- DSS+stress 복합모델에서는 loss of crypt architecture, flattend villi, leukocyte infiltration 등이 보여 짐을 확인함.

H and E staining (colon)

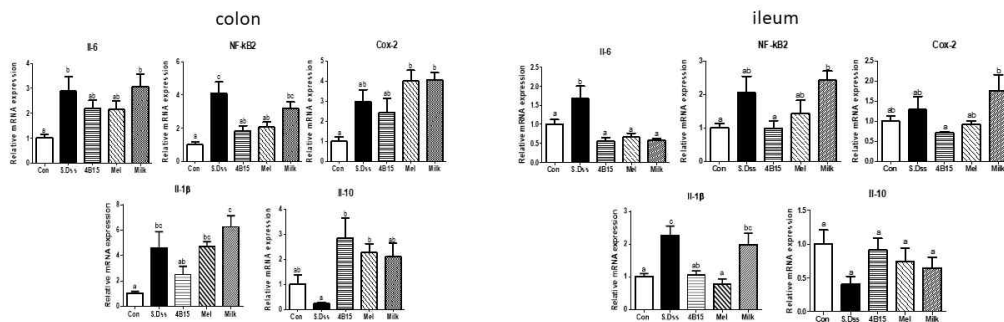


H and E staining (ileum)

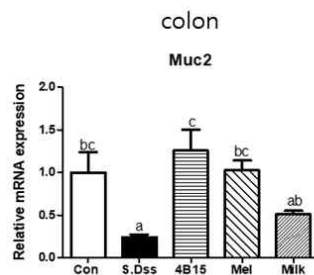


(다) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

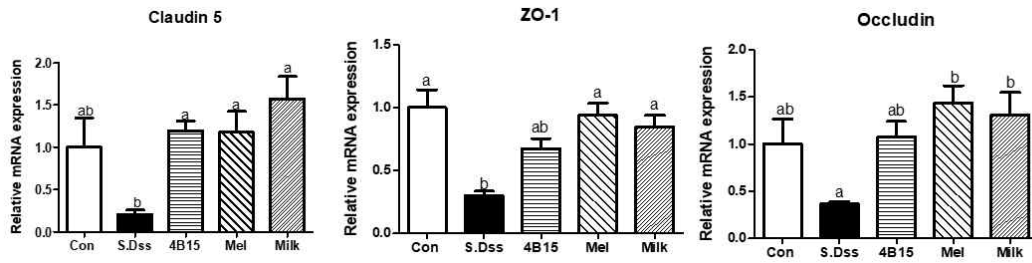
- 염증 사이토카인 IL-6, NF- κ B, Cox-2, IL-1 β 와, 항염증 사이토카인 IL-10를 분석을 통해 염증 정도를 확인함.



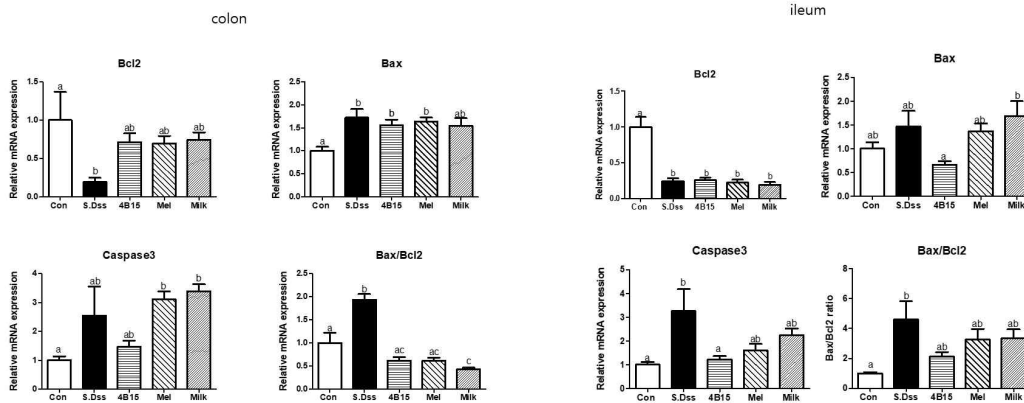
- 뮤신을 생성하는 유전자(Muc2)의 발현 정도를 확인함.



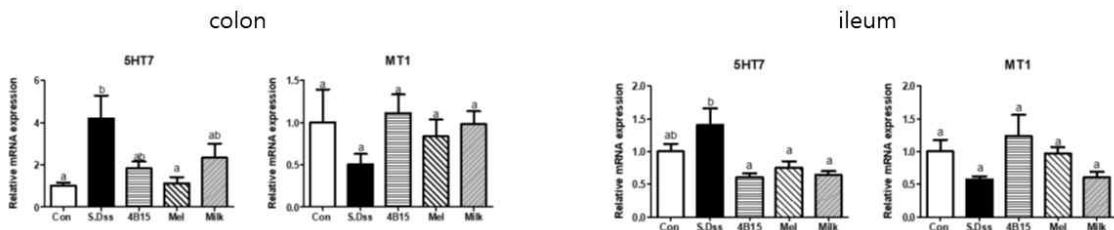
- Tight junction protein인 Claudin 5, ZO-1, Occludin의 mRNA의 발현을 확인하여, intestinal tight junction barrier의 손상 및 회복 정도를 확인함.



- 세포사멸인자인 Caspase 3, Bcl2, Bax의 mRNA의 발현을 확인함.



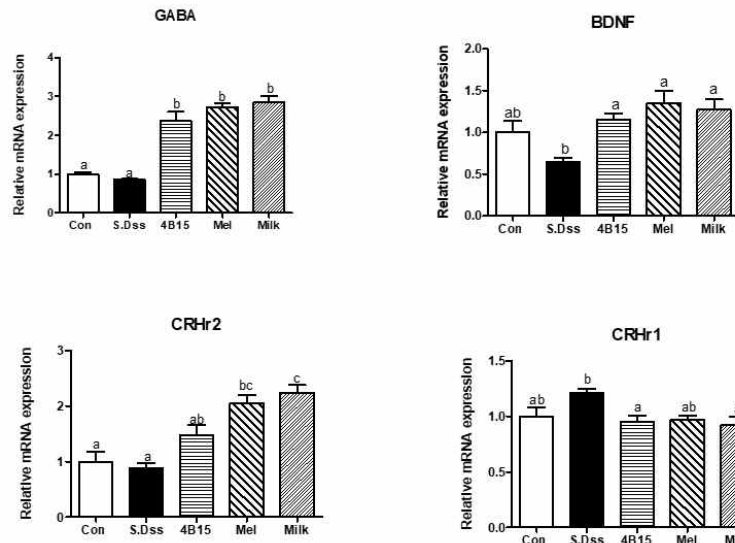
- serotonin receptor (5HT7)와 멜라토닌 관련 인자인 MT1의 mRNA 발현정도를 측정하여 anti-anxiety 정도를 분석함.



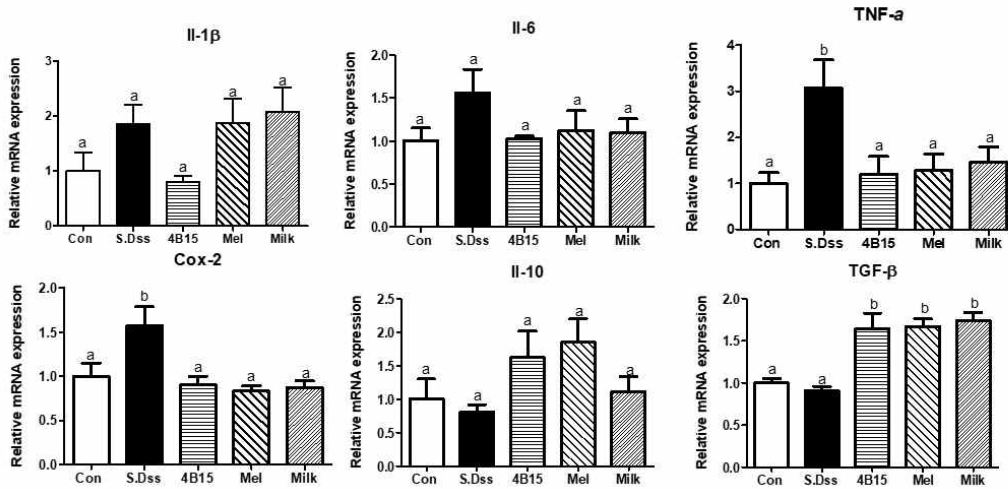
④ 뇌에서의 바이오마커 설정 및 분석

(가) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

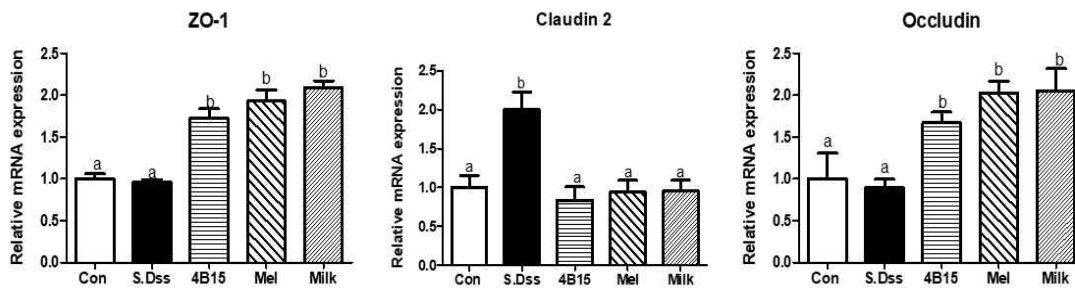
- neuro-transmitter인 GABA receptor, BDNF와 stress 관련 인자인 CRHr의 발현정도를 측정하여 anti-anxiety 정도를 확인함.



- 염증 사이토카인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , Cox-2와, 항염증 사이토카인 IL-10, TGF- β 를 분석을 통해 염증 정도를 확인함.



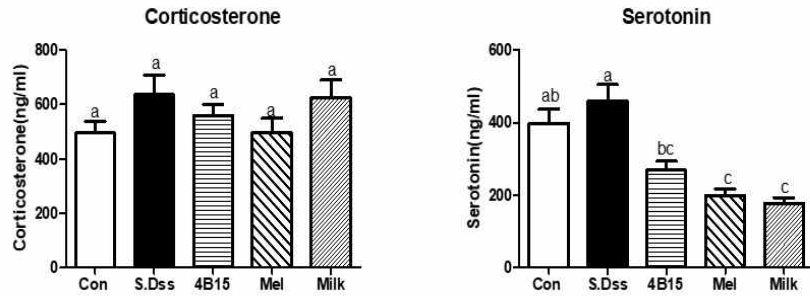
- Tight junction protein인 ZO-1, occludin, claudin 5의 mRNA의 발현을 확인하여, blood brain barrier의 손상 및 회복 정도를 확인함.



⑤ 혈청에서의 바이오 마커 설정 및 분석

(가) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

- Serum에서 stress-related hormone인 corticosterone, serotonin의 농도 변화를 ELISA를 이용하여 측정함.

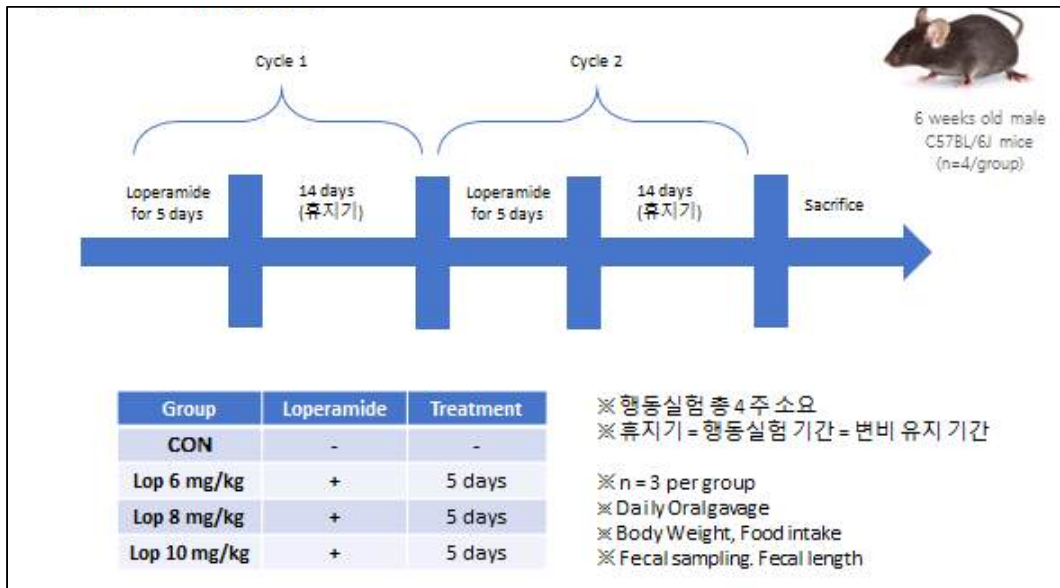


나. 스트레스와 변비 유도 복합 동물 모델에서의 분자기전 연구를 통한 유효성 검증

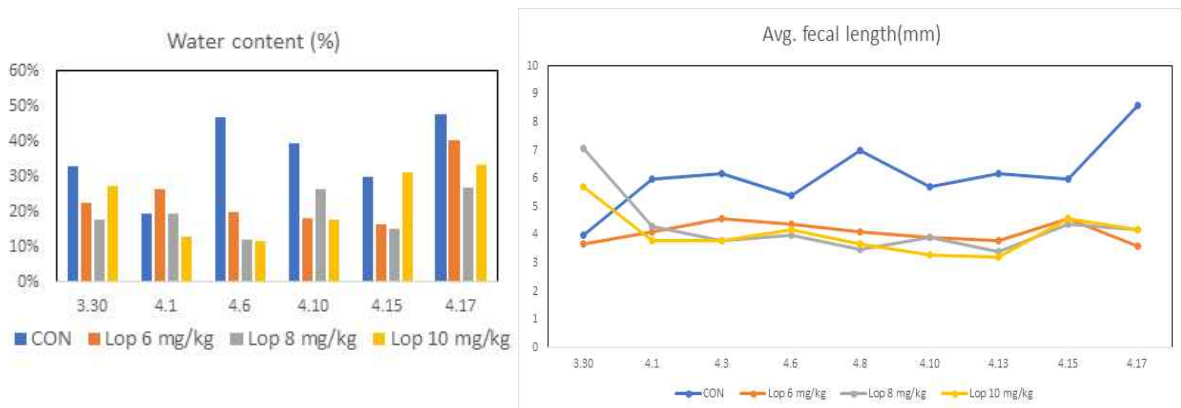
1) 만성스트레스에 노출된 장 질환 (변비) 동물 모델 표준화

- ① 변비유도 물질(loperamide) 농도 및 처리기간에 따른 스트레스성 장 질환 동물모델 탐색
 - 선행 자료 조사 결과에 따라 다양한 농도(6, 8, 10mg/kg)의 loperamide를 처리하여 예비실험을 진행함.
 - 희생 후 변비 지표(constipation parameter)로는 Fecal water content 및 Fecal length를 측정하고 각 주차별 Food intake, Water intake를 측정함.

(가) 실험 Cycle



(나) 변비 지표(Fecal water content, Fecal length) 분석 결과

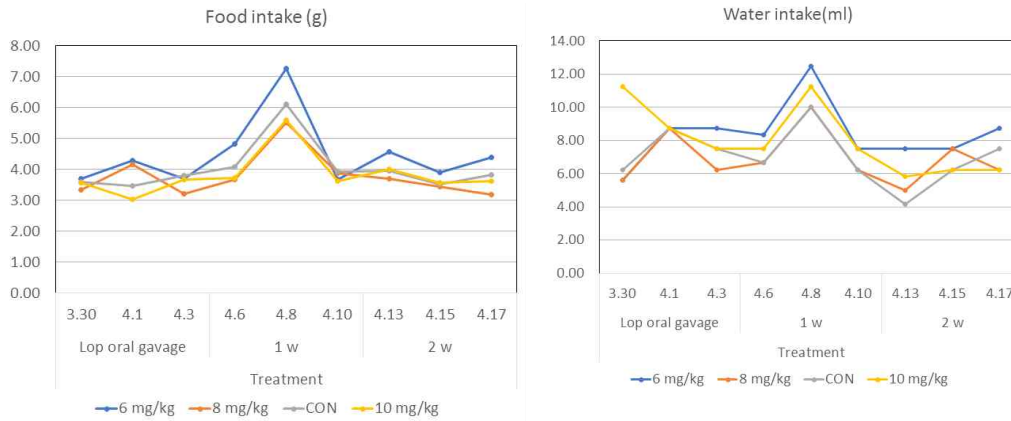


- Loperamide 처리 그룹에서 fecal water content(%)가 control 그룹에 비해 낮게 나타났으며, 특히 8mg/kg과 10mg/kg에서 낮은 fecal water content(%)를 보여 본실험에

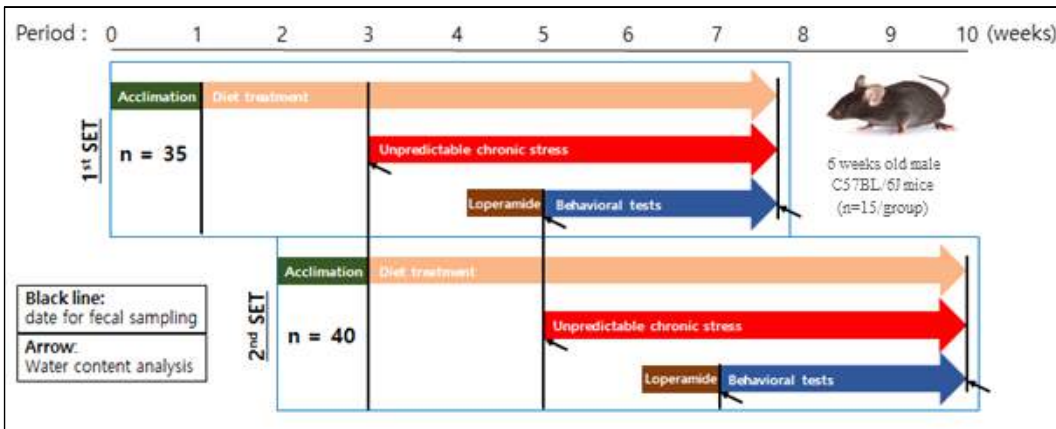
서의 loperamide 처리 농도를 10mg/kg으로 설정함.

- Fecal length는 개체별 차이가 있었지만 loperamide 처리 그룹에서 control 그룹에 비해 낮게 나타났음.

(다) Food intake, Water intake 측정 결과



② 예비 실험을 바탕으로 스트레스성 변비 유도 동물 모델 구축

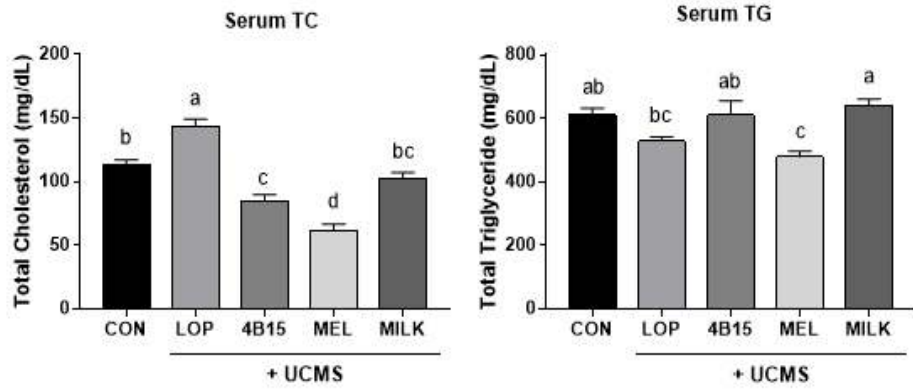


- 주관기관에서 제공한 Lacticaseibacillus rhamnosus 4B15, 멜라토닌 첨가 우유, 새벽 착유 우유를 각각 배합하여 제조한 마우스 사료를 이용하여 그림 ~ 와 같은 변비/만성 스트레스 복합 마우스 모델을 통해 본 실험이 진행되었음.
- 실험 종료 후, 설정된 바이오마커를 이용한 분자기전연구를 진행함.

2) 동물 모델에서의 분자기전연구를 통한 소재의 유효성 검증을 위한 바이오마커 설정

① 혈청(Serum)에서의 바이오마커 설정 및 분석

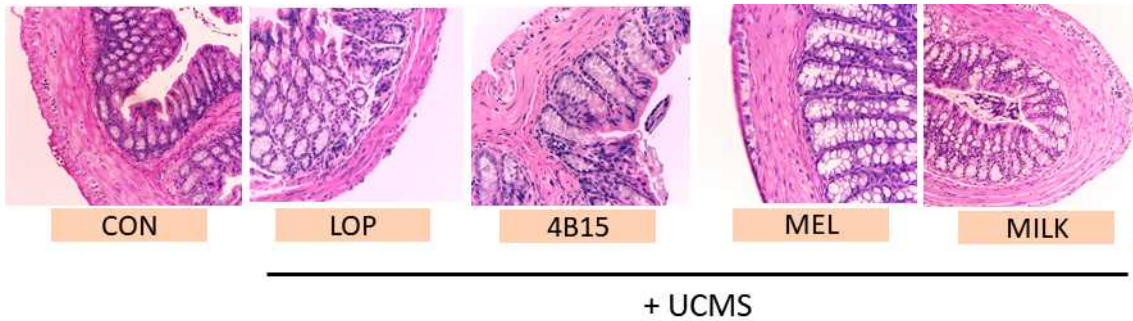
- Triglyceride, Total cholesterol 함량을 분석 kit를 이용해 확인.
- Stress-related hormone인 corticosterone, serotonin의 농도 변화를 ELISA를 통해 확인.



② 소장(Ileum)과 대장(Colon)에서의 바이오마커 설정 및 분석

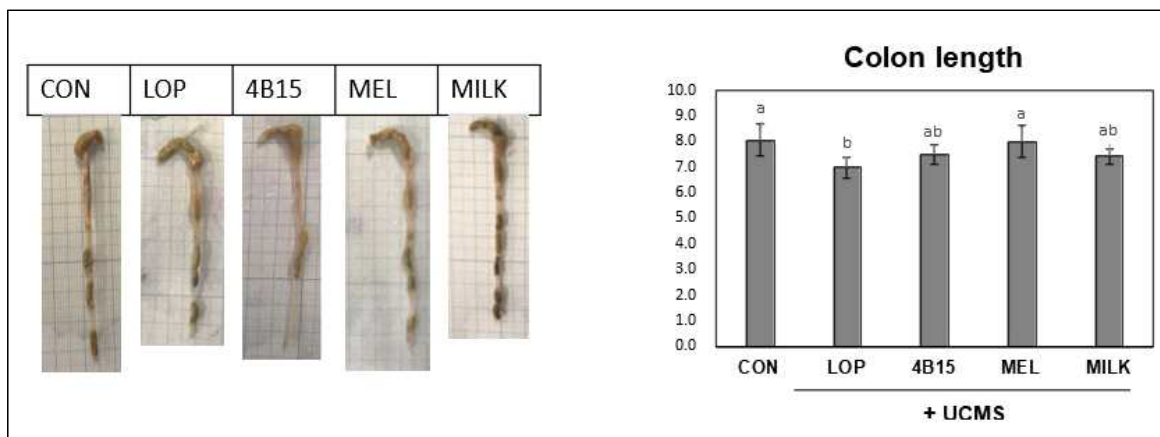
(가) 장관 조직 변화

- 조직학적 손상 정도를 측정하기 위해 Colon을 H&E staining 결과를 통해 histology를 분석함.



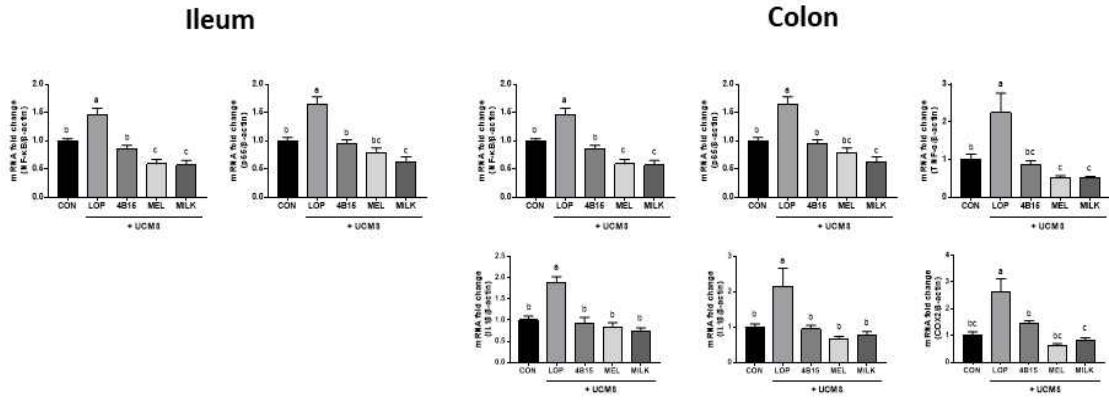
(나) Colon length 측정

- Loperamide 처리와 Stress로 인해 발생한 장 길이의 차이를 측정함.

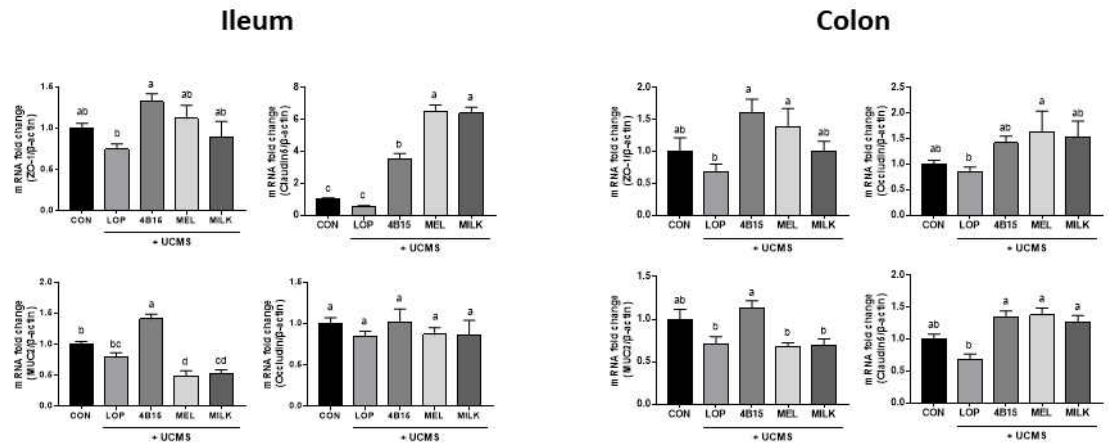


(다) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

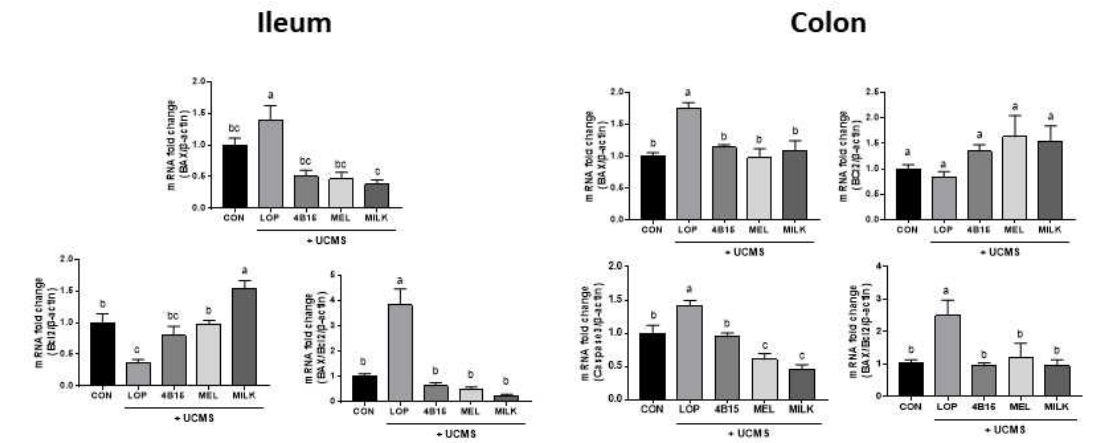
- Inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β , Cox-2, NF- κ B와 anti-inflammatory cytokine인 IL-10의 발현량을 분석하여 염증 정도를 확인함.



- 밀착연접단백질(tight junction protein) 인자인 ZO-1, Claudin5, Claudin2, Occludin과 뮤신 관련 인자인 MUC2의 발현량을 분석하여 intestinal tight junction barrier의 손상 및 회복 정도를 확인함.

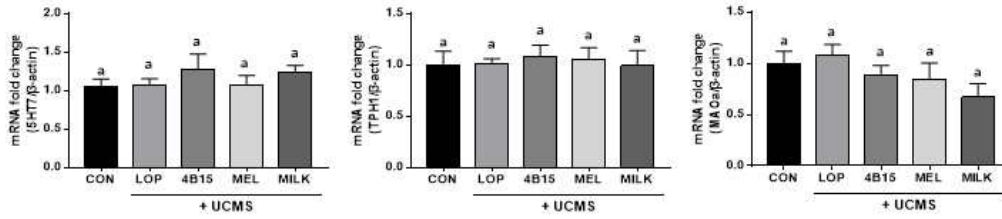


- 세포사멸인자인 Caspase3, Bcl-2, Bax의 발현량을 분석함.



- Neurotransmitter 관련 인자로, MAOa, TPH1, serotonin receptor(5HT7)와 멜라토닌 관련 인자인 MT1의 발현량을 분석하여 anti-anxiety 정도를 확인함.

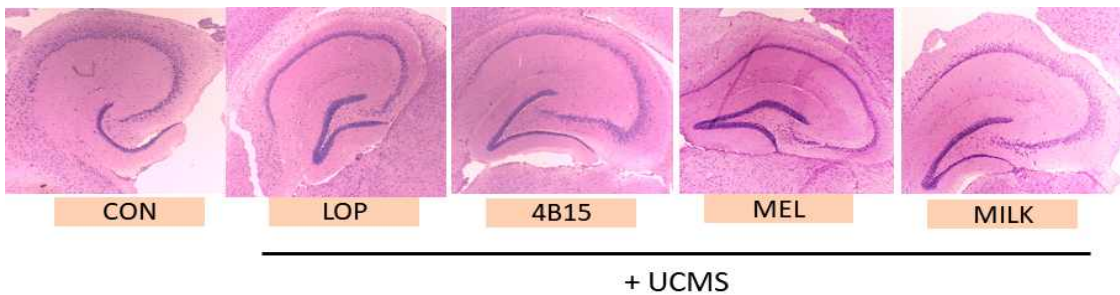
Colon



③ 뇌(Brain)에서의 바이오마커 설정 및 분석

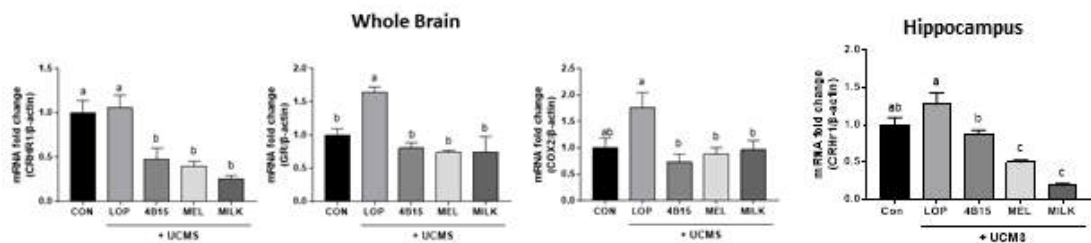
(가) 뇌 조직 변화

- 조직학적 손상 정도를 측정하기 위해, hippocampus의 H&E staining 결과를 통해 histology 변화를 확인함.

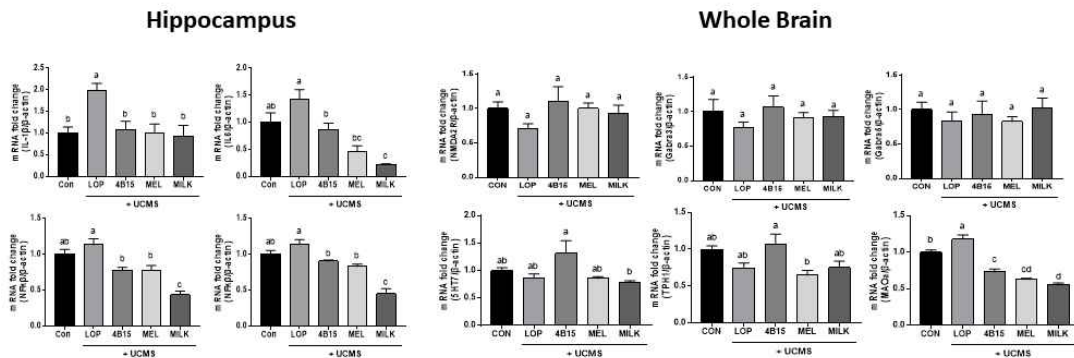


(나) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

- 스트레스 관련 인자인 CRHr1, GR, COX2를 분석하여 스트레스 정도를 확인함.



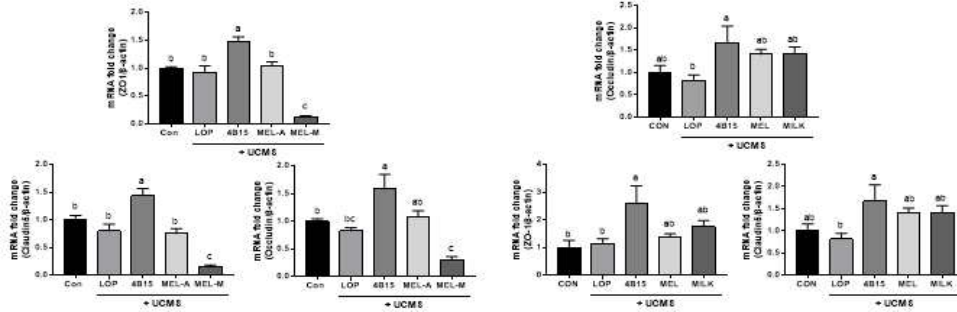
- Neuro-inflammatory marker인 IL-1β, IL-6, TNF-α, NF-κB의 발현 및 anti-inflammatory cytokine인 IL-10, TGF-β를 분석하여 스트레스 정도를 확인함.



- Tight junction protein인 ZO-1, Occludin, Claudin5의 발현량을 확인하여 blood brain barrier(BBB)의 손상 및 회복 정도를 분석함.

Hippocampus

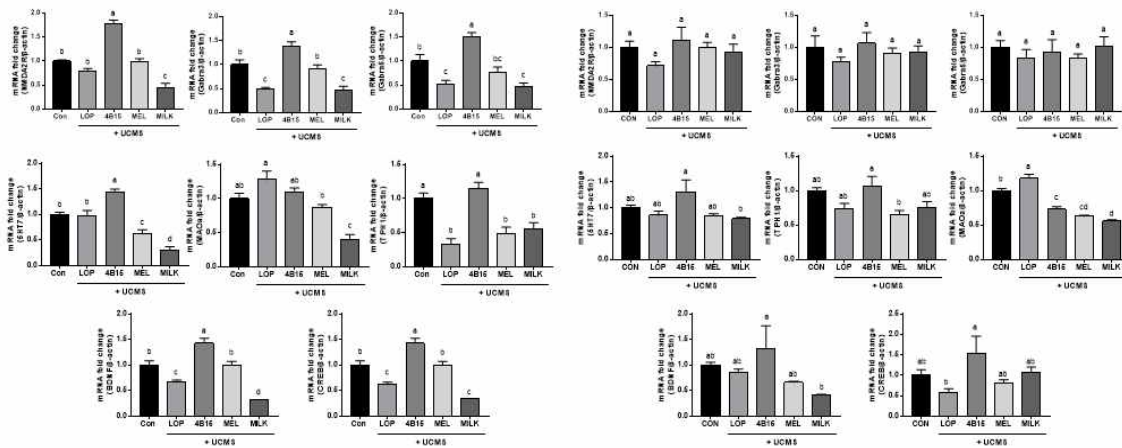
Whole Brain



- Serotonin receptor, neuro-transmitter인 GABA receptor, Brain-derived neurotrophic factor(BDNF), CREB, NMDA2R, Gabra3, Gabra5와 멜라토닌 관련 인자인 5HT7, TPH1, MAOa의 발현량을 분석하여 anti-anxiety를 확인함.

Hippocampus

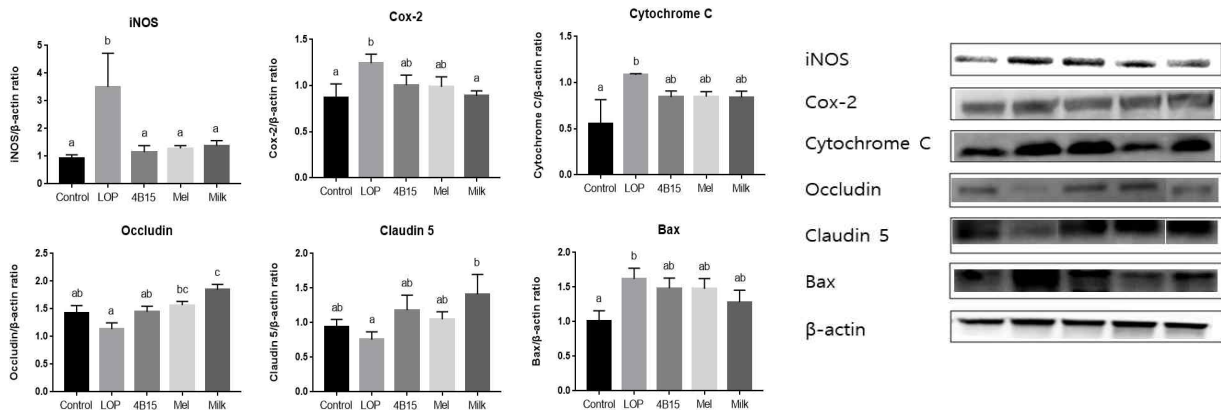
Whole Brain



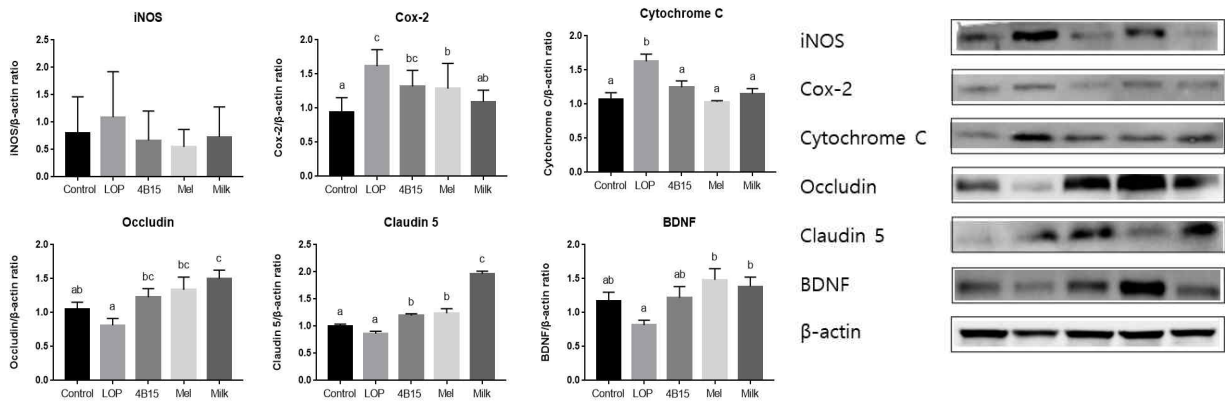
④ 단백질 수준 분석을 통한 소재의 유효성 검증

- 뇌(Brain), 대장(Colon)에서 장 기능 관련 바이오마커를 western blotting을 이용하여 분석함.

(가) 대장(Colon)에서의 단백질 수준 발현 정도 확인



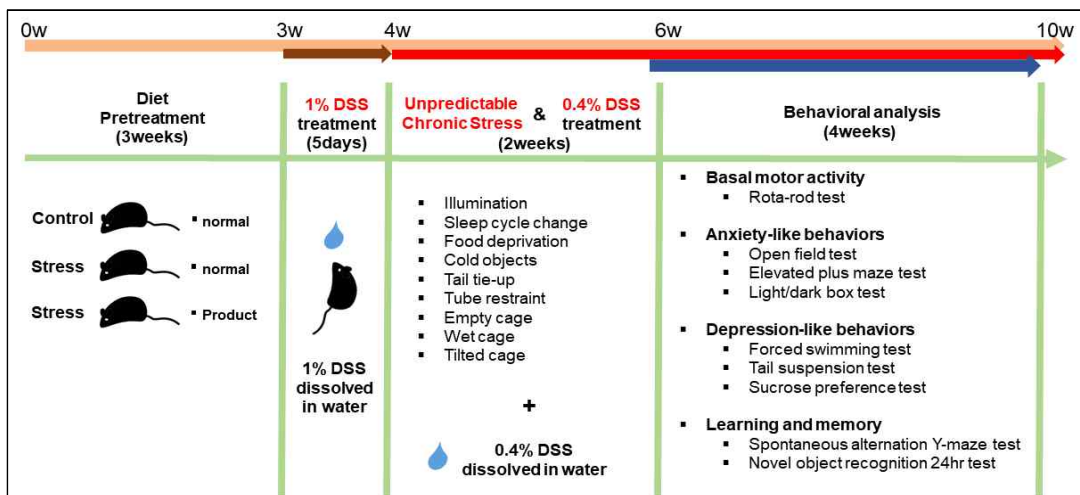
(나) 뇌(Brain)에서의 단백질 수준 발현 정도 확인



다. 유효성 검증된 프로바이오틱스와 기능성 소재의 작용 메커니즘 규명

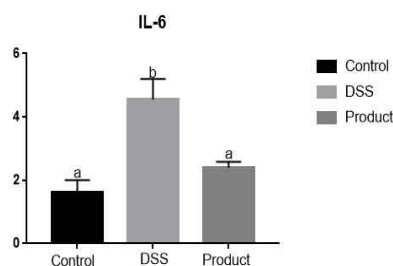
1) 만성스트레스에 노출된 염증성 장 질환 동물 모델에서의 시제품의 유효성 검증

- 염증성 장 질환 유도에는 dextran sodium sulfate (DSS, MW 36,000–50,000)를 사용함.
- 만성스트레스와 함께 유도하는 데에는 unpredictable chronic mild stress (UCMS)를 처리한 후, 0.4% DSS water를 Ad libitum으로 먹임.
- 그룹은 대조군, DSS처리 대조군, DSS처리 시제품군으로 설정함.
- 희생 후 혈청(Serum), 대장(Colon), 뇌(Brain)에서의 분자기전연구를 통해 시제품의 유효성을 검증함.



① 혈청(Serum)에서의 바이오마커 설정 및 분석

- Triglyceride, Total cholesterol 함량을 assay kit를 이용하여 분석함.
- Inflammatory cytokine인 IL-6를 Multiplex assay kit를 사용하여 분석함.
- Stress-related hormone인 corticosterone, serotonin의 농도 변화를 ELISA를 이용하여 확인함.



② 대장(Colon)에서의 바이오마커 설정 및 분석

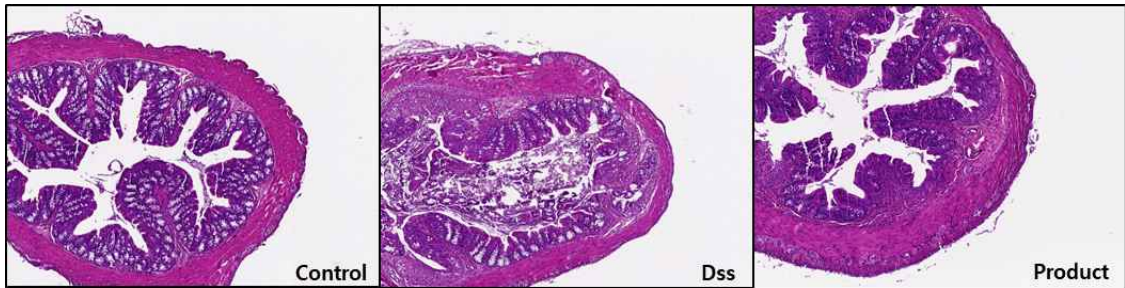
(가) Colon length 측정

- DSS 처리와 Stress로 인해 발생한 대장 길이의 차이를 측정함.



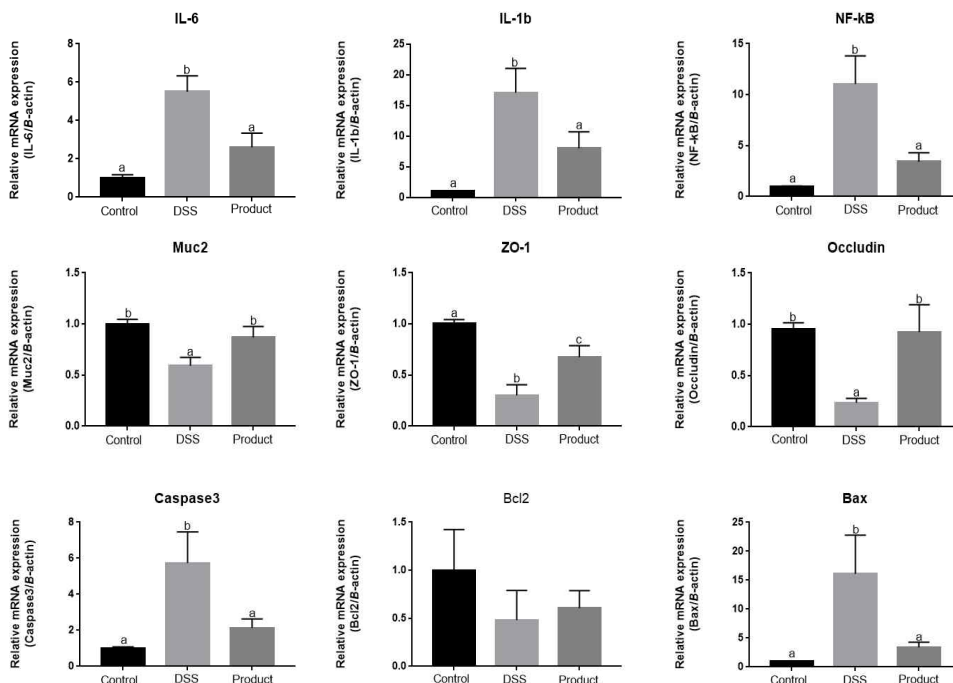
(나) 장관 조직 변화

- 조직학적 손상 정도를 측정하기 위해 Colon을 H&E staining 결과를 통해 histology 변화를 확인함.



(다) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

- Inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β , Cox-2, NF- κ B와 anti-inflammatory cytokine인 IL-10의 발현량을 분석하여 염증 정도를 확인함.
 - 밀착연접단백질 인자(tight junction protein)인 ZO-1, Claudin5, Occludin의 발현량을 분석하여 intestinal tight junction barrier의 손상 및 회복 정도를 확인함.
 - 세포사멸인자(apoptosis marker)인 Caspase3, Bcl2, Bax를 분석함.



③ 뇌(Brain)에서의 바이오마커 설정 및 분석

(나) 뇌 조직 변화

- 조직학적 손상 정도를 측정하기 위해, hippocampus의 H&E staining 결과를 통해 histology 변화를 확인함.



(다) 메커니즘 관련 mRNA expression 발현 정도 확인

- 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β , Cox-2, NF- κ B, TNF- α 를 분석하고, 항염증 사이토카인 IL-10, TGF- β 를 분석함.
 - Neuro-transmitter인 GABA receptor, Brain-derived neurotrophic factor(BDNF), Gabra2, Gabra3, Gabra5의 발현 정도를 분석하여 anti-anxiety를 확인함.
 - 세포사멸인자(apoptosis related gene)인 Bax, Bcl2, Caspase3를 분석함.
 - 스트레스(stress)관련 인자인 CRHr1, HCRHr2, TPH2를 분석하여 스트레스 정도를 확인함.
 - 밀착연접단백질 인자(tight junction protein)인 ZO-1, Claudin2, Claudin5, Occludin을 분석함.
-


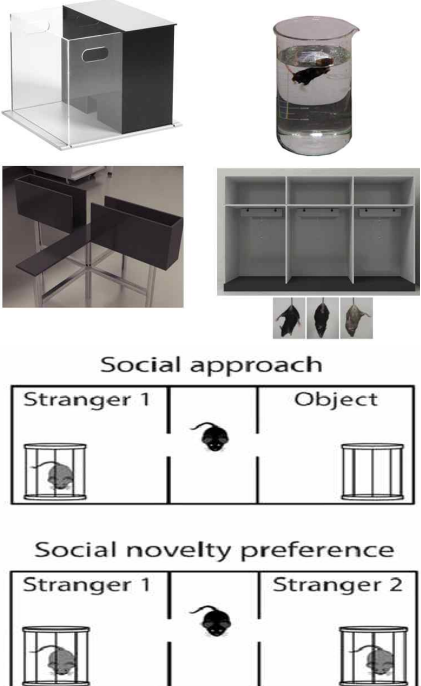
3. 스트레스성 장 질환 동물모델 및 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증

[제2협동 : 세종대학교 김형욱]

가. 스트레스와 염증성 장 질환 복합 동물 모델에서의 행동실험을 통한 유효성 검증

1) 스트레스성 장 질환 동물모델에서 장 기능 완화 평가 시스템 구축

- 마우스 모델에서의 행동 특성 평가 시스템 구축

<p>기본적 운동 능력 평가</p>		<ul style="list-style-type: none"> ○ Open field test: 한정된 공간내의 마우스의 움직임을 추적함으로써 평균 운동 속도, 거리, 공간 선호도 등을 분석. ○ Rotarod test: 회전하는 Rotarod위에 마우스를 놓아두고 회전 속도를 증가시킴으로써 마우스의 지속적 운동능력을 측정. ○ Beam test: 좁은 통로 내의 마우스의 움직임을 추적함으로써 보폭, 이동 속도, 자세 균형 등을 분석. ○ Grip test: 마우스로 하여금 와이어를 당기게 하여 놓치는 순간의 근력을 평가함. 												
<p>우울/불안 증상 평가</p>	 <p style="text-align: center;">Social approach</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 33%;">Stranger 1</td> <td style="width: 33%;">Object</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">Social novelty preference</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 33%;">Stranger 1</td> <td style="width: 33%;">Stranger 2</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Stranger 1	Object					Stranger 1	Stranger 2					<ul style="list-style-type: none"> ○ Light and dark box test: 어두운 공간과 밝은 공간에 각각 머무는 시간 또는 이동시간 (Number of Transition) 을 측정하여 우울/불안 정도를 측정함. ○ Elevated plus maze test: 폐쇄된 팔(closed arms)과 개방된 팔(open arms)에서 머무는 시간과 운동거리를 측정하여 불안정도 혹은 우울 정도를 측정함. ○ Forced swim test: 물이 차있는 원통형 기구에서 강제 수영을 통해 탈출을 포기한 정지시간을 측정함으로써 우울 정도 측정. ○ Tail suspension test: 마우스의 꼬리를 고정시켜 거꾸로 매달아 저항을 포기한 정지시간을 측정함으로써 우울 정도 측정. ○ Social interaction test: 세 부분으로 구획이 나누어진 공간에 실험 마우스를 투입하여 익숙한 마우스 (혹은 빈 공간)와 낯선 마우스의 상호작용을 측정하여 불안, 우울 등의 증상 측정
Stranger 1	Object													
Stranger 1	Stranger 2													

인지/학습 능력 평가

- Y maze test: 세 arm 으로 구획이 나누어진 공간에 실험 마우스를 투입하여 spontaneous alternation을 측정하여 기억 학습 능력 측정
- Morris water maze test: 불투명한 물감 으로 인해 감추어진 탈출 플랫폼을 수영 공간 내에서 찾는 훈련을 반복하여 최단 시간·거리의 탈출 행동을 학습시킴으로써 기억·학습 능력 측정.
- Barnes maze test: 밝은 곳을 피하고자 하는 마우스의 본능을 이용하여, 빛을 회피 할 수 있는 단 하나의 구멍을 찾는 기억·학습 능력 측정.
- Contextual fear test: 바닥의 약한 전기 충격 (2mA~5mA) 과 소리 신호 (>80dB) 를 결합하여, 공간적인 기억(Spatial memory)과 청각적 기억(Cued memory)을 측정함으로써 기억·학습 능력을 분석.
- Novel object test: 마우스의 익숙한 물체와 새로운 물체에 대한 호기심을 이용하여 기억·학습 능력 측정.

2) 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증

- ① 제1협동기관인 고려대학교에서 구축한 염증성 장질환/만성 스트레스 복합 마우스 모델을 이용하였으며, 주관기관에서 *Lacticaseibacillus rhamnosus* 4B15, 멜라토닌 첨가 우유, 새벽 착유 우유를 각각 배합하여 제조한 마우스 사료를 제공받아 인지 기능 개선 효능을 평가하였음 (그림 3-1).

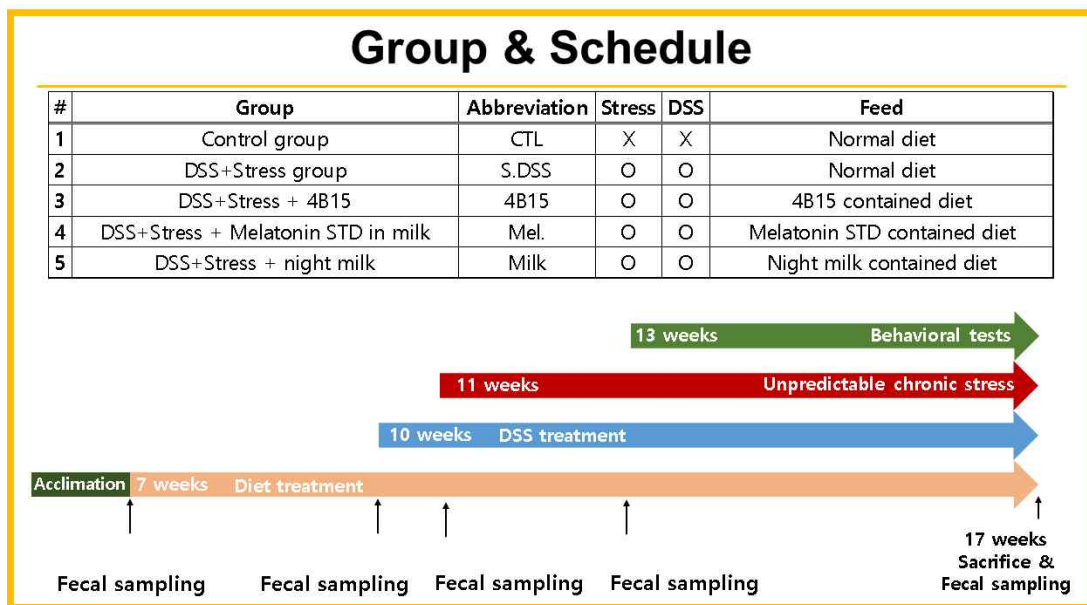


그림 3-1. 소재의 스트레스성 염증 완화 효능 검증 동물실험 디자인

- ② 1차년도에 구축한 마우스 모델에서의 행동 특성 평가 시스템을 활용하여 기본적 운동능력 평가, 우울/불안 증상 평가, 인지/학습 능력을 평가하였음.
- 몸무게의 변화는 16주 동안 대조군, 스트레스 대조군, 실험 조제 사료를 섭취한 그룹 모두 꾸준히 증가하는 것으로 나타났으며, 몸무게에서는 그룹간 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (그림 3-2).

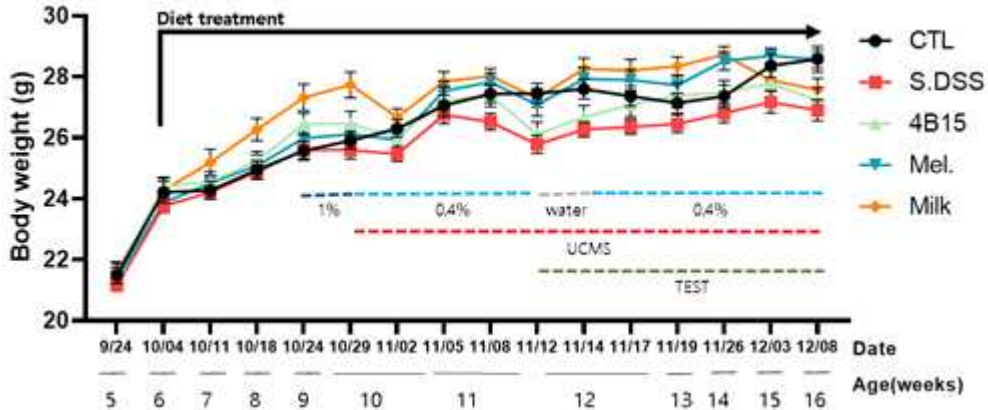


그림 3-2. 스트레스성 염증 질환 및 소재 섭취에 따른 체중 변화

- Open field test의 경우 만성스트레스를 유도한 그룹에 비해 4B15 섭취 그룹에서 이동 거리가 증가되고 불안 정도가 개선되는 것을 관찰함 (그림 3-3).

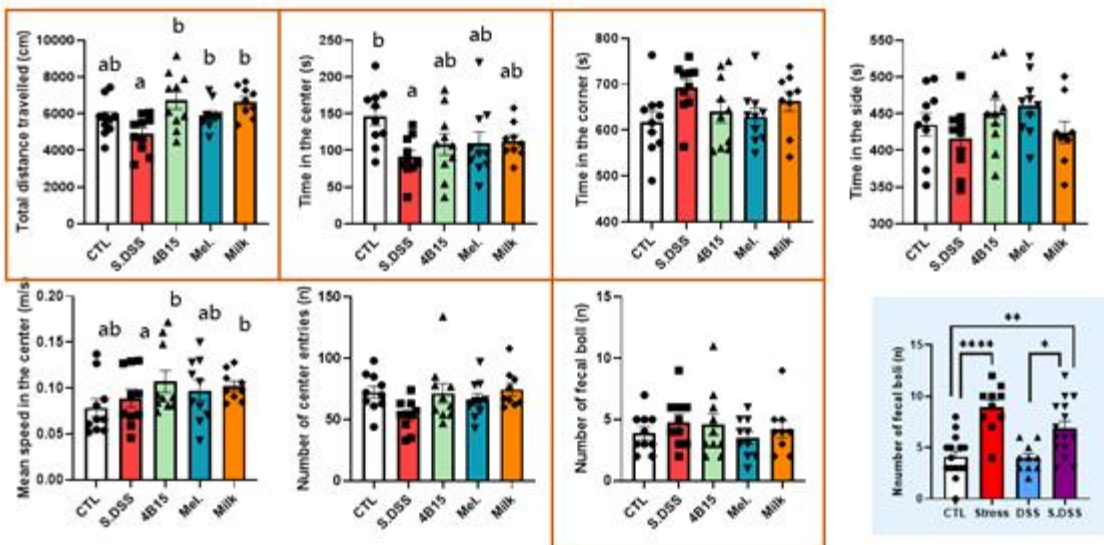


그림 3-3. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 open field test

- Elevated plus maze test의 경우 melatonin-rich milk 섭취 그룹이 만성 스트레스 그룹에 비해 불안 증상 정도가 개선되어 대조군과 유사한 정도로 불안 증상이 개선됨을 확인할 수 있었음 (그림 3-4).

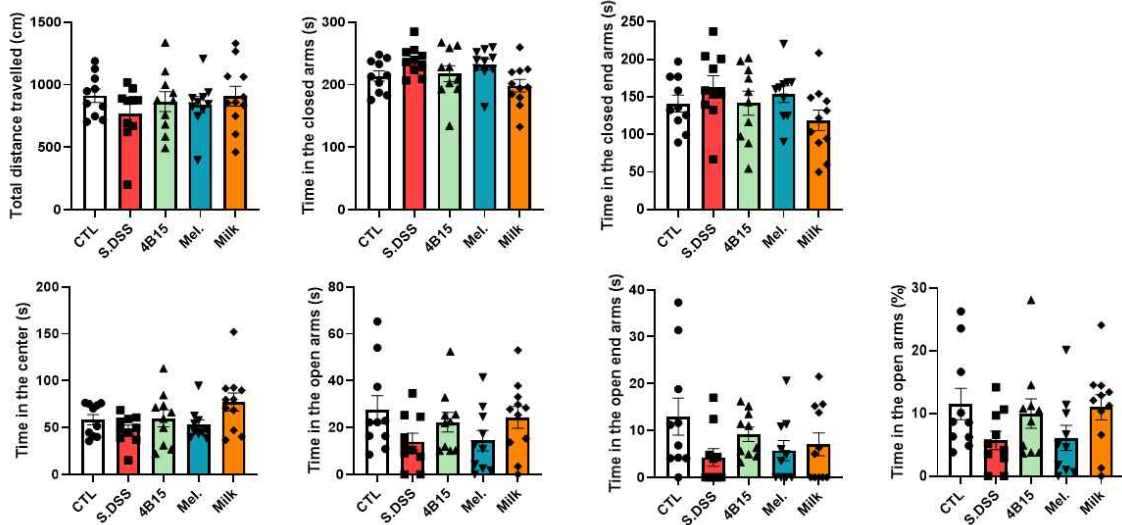


그림 3-4. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 elevated plus maze test

- Light and dark box test의 경우 melatonin-rich milk 섭취 그룹이 만성 스트레스 그룹에 비해 불안 증상 정도가 개선되어 대조군과 유사한 정도로 불안 증상이 개선됨을 확인할 수 있었음 (그림 3-5).

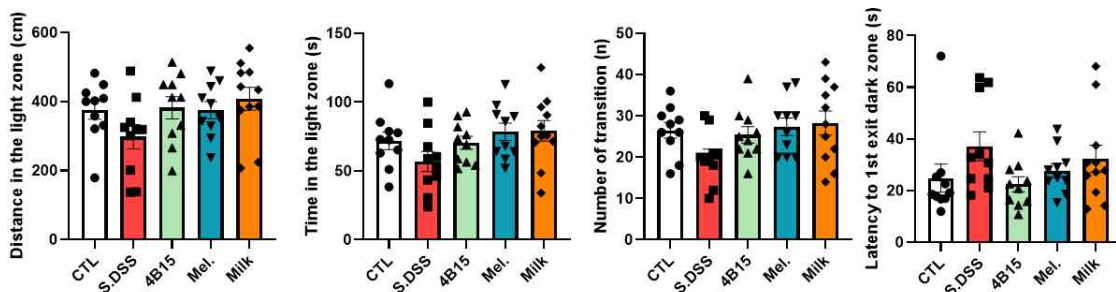


그림 3-5. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 light and dark box test

- Tail suspension test의 경우 4B15, Melatonin, melatonin-rich milk 섭취 그룹 모두 만성 스트레스 그룹에 비해 우울 증상 정도가 개선되어 대조군과 유사한 정도로 불안 증상이 개선됨을 확인할 수 있었음. 반면 Forced swim test에서는 만성 스트레스 그룹에 비해 개선점을 관찰할 수 없었음 (그림 3-6).

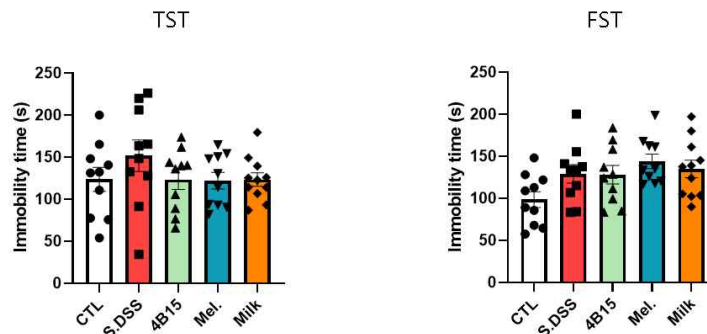


그림 3-6. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 tail suspension/ forced swim test

- Novel object recognition test의 경우 4B15, melatonin-rich milk 섭취 그룹에서 만성 스트레스 그룹에서 관찰되는 인지 기능 감소 증상 정도가 개선되어 대조군과 유사한 정도로 회복됨을 확인할 수 있었음 (그림 3-7).

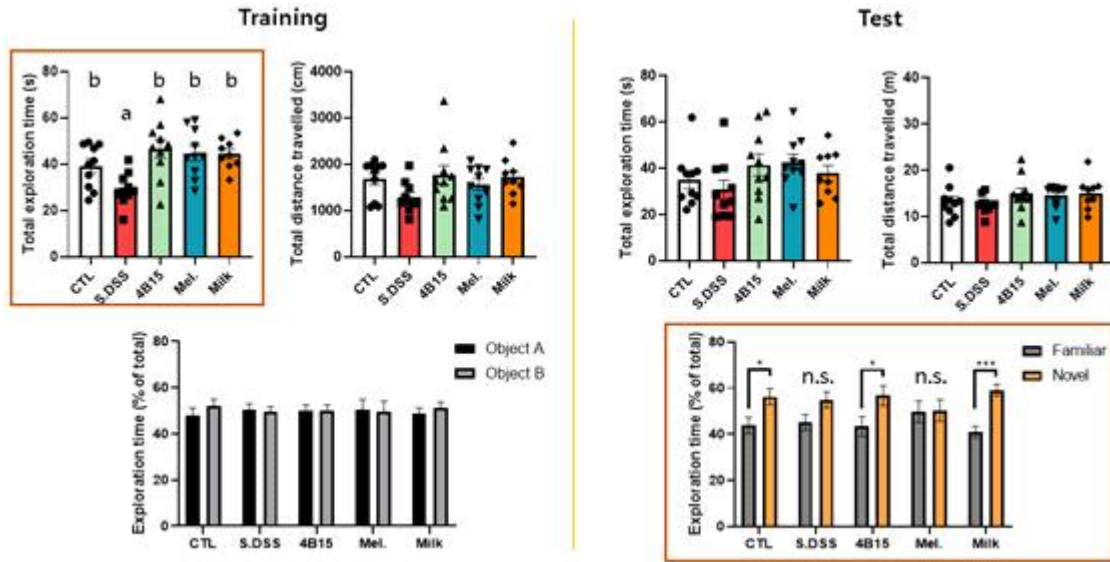


그림 3-7. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 novel object recognition test

- Social interaction test의 경우 4B15섭취 그룹에서 만성 스트레스 그룹에서 관찰되는 사회성 감소 증상 정도가 개선됨을 관찰할 수 있었음 (그림 3-8).

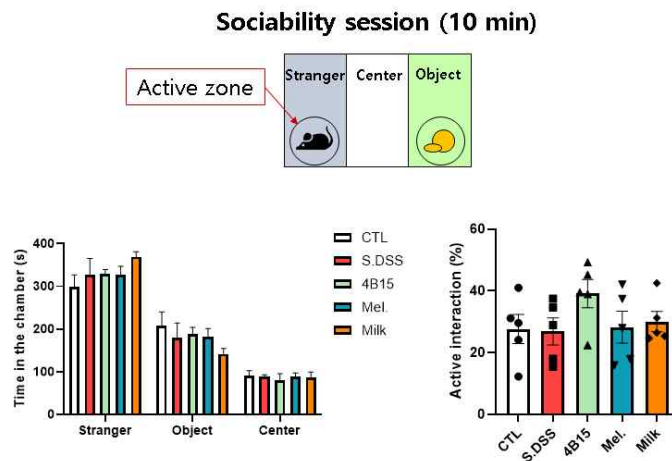


그림 3-8. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 social interaction test

- ③ 실험결과를 종합해보면 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서 관찰되는 우울/불안 증상, 인지기능 감소 증상은 4B15균주 및 melatonin-rich milk pretreatment로 인해 예방 및 회복 될 수 있음을 관찰할 수 있었음.

나. 스트레스와 변비 유도 복합 동물모델에서의 분자기전 연구를 통한 유효성 검증

1) 스트레스성 변비 유도 동물 모델에서 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증

- ① 제1협동기관인 고려대학교에서 구축한 변비/만성 스트레스 복합 마우스 모델을 이용하였으며, 주관기관에서 *Lacticaseibacillus rhamnosus* 4B15, 멜라토닌 첨가 우유, 새벽 착유 우유를 각각 배합하여 제조한 마우스 사료를 제공받아 인지 기능 개선 효능을 평가하였음 (그림 3-9).

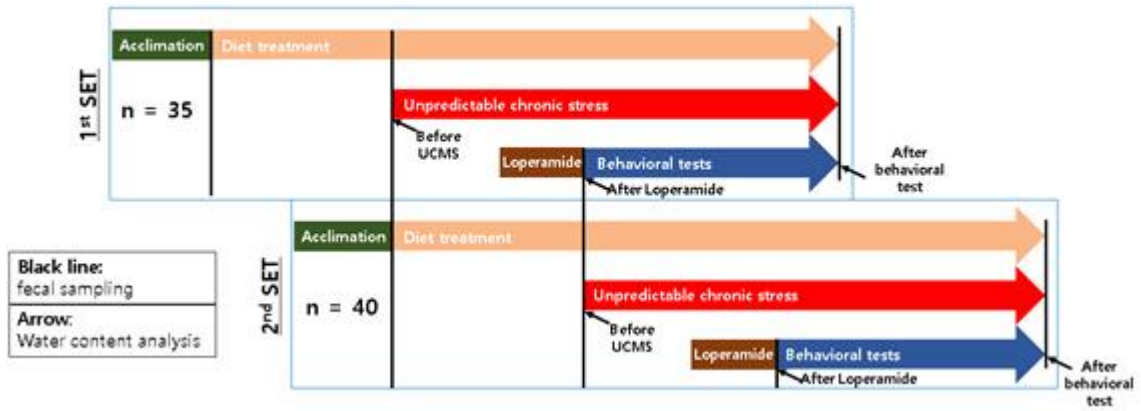


그림 3-9. 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 실험 디자인

② 1차년도에 구축한 마우스 모델에서의 행동 특성 평가 시스템을 활용하여 기본적 운동능력 평가, 우울/불안 증상 평가, 인지/학습 능력을 평가하였음.

- 몸무게의 변화는 11주 동안 대조군, 스트레스 대조군, 실험 조제 사료를 섭취한 그룹 모두 꾸준히 증가하는 것으로 나타났으며, 몸무게에서는 그룹간 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (그림 3-10).

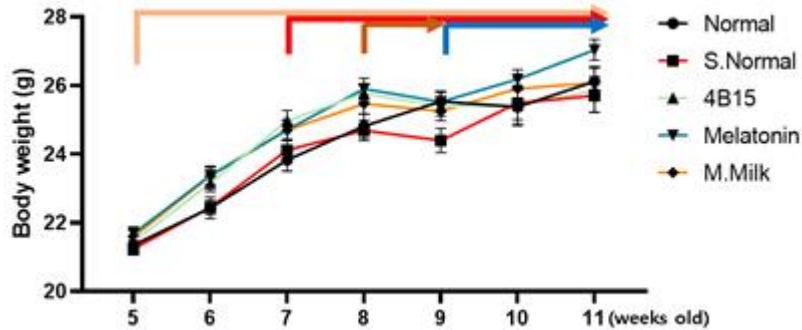


그림 3-10. 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 body weight

- 변비 개선 효과는 분변의 수분 함량을 측정된 결과 4B15와 melatonin-rich milk에서 개선됨을 하는 것으로 나타났음 (그림 3-11).

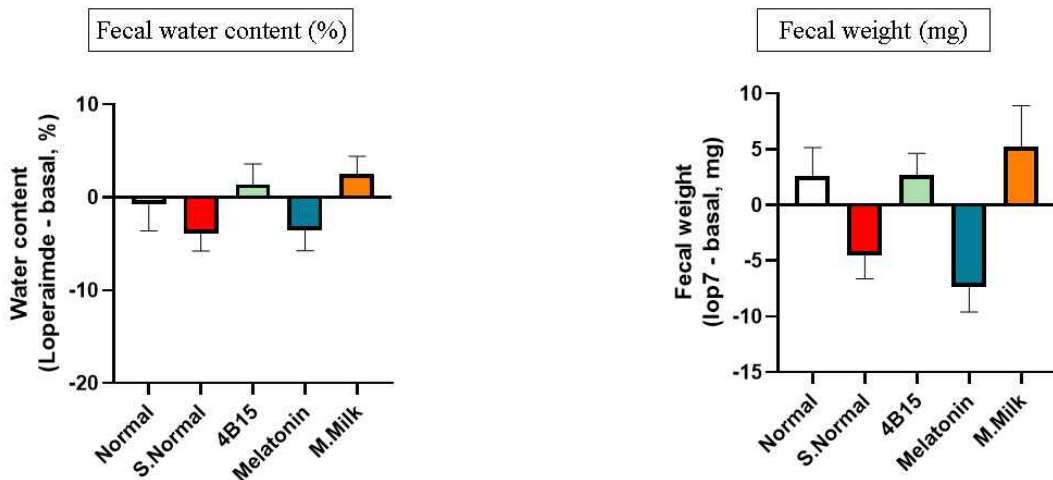


그림 3-11. 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 변비 개선 효과

- Open field test의 경우 대조군 그룹에 비해 melatonin-rich milk 섭취 그룹에서 center zone에서 머무는 시간이 증가되고 불안 정도가 다소 개선되는 것을 관찰함 (그림 3-12).

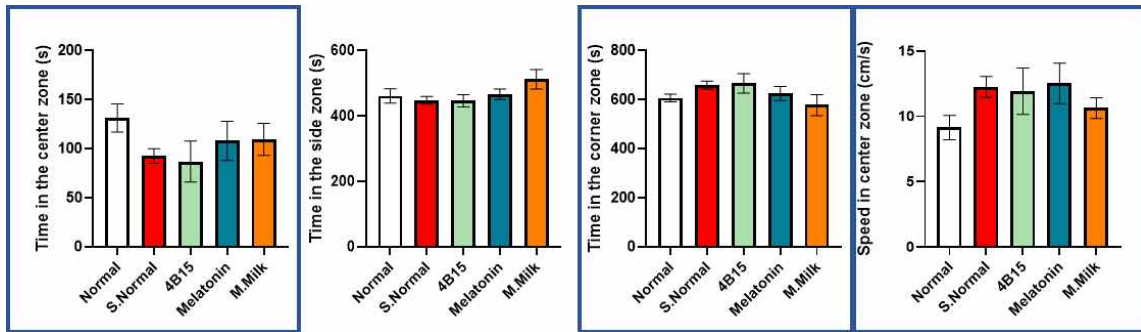


그림 3-12. 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 open field test

- elevated plus maze test의 경우 대조군 그룹에 비해 melatonin-rich milk 섭취 그룹에서 center zone에서 머무는 시간이 증가되고 불안 정도가 다소 개선되는 것을 관찰함 (그림 3-13).

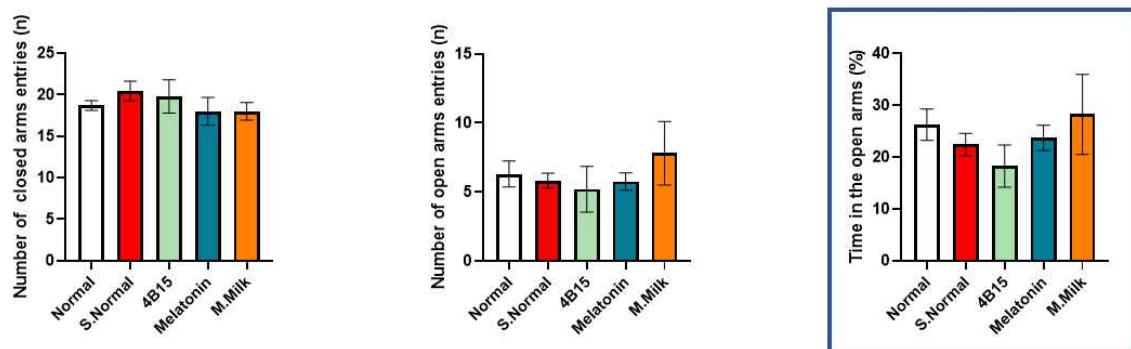


그림 3-13. 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 elevated plus maze test

- Novel object recognition test의 경우 대조군 그룹에 비해 4B15 섭취 그룹에서 물체에 대한 exploration time이 다소 개선되는 것을 관찰함 (그림 3-14).

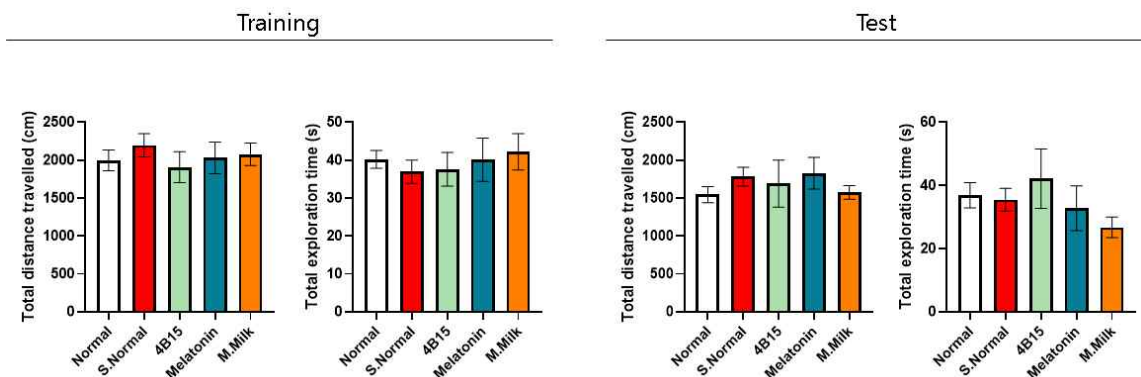


그림 3-14. 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 novel object recognition test

- ③ 실험결과를 종합해보면 변비유도/만성스트레스 복합 마우스 모델에서 관찰되는 변비 증상은 4B15균주 및 melatonin-rich milk pretreatment로 인해 예방 및 회복 될 수 있음을 관찰할 수 있었으나, 우울/불안 증상 및 인지기능개선 효과는 변비유도/만성스트레스 복

합모델에서는 다소 미약함을 확인함.

다. 유효성이 검증된 프로바이오틱스와 기능성 소재의 작용 메커니즘 규명

1) 시제품의 유효성 검증

- ① 1차년도에 제1협동기관인 고려대학교에서 구축한 변비/만성 스트레스 복합 마우스 모델을 이용하였으며, 주관기관에서 개발한 *Lacticaseibacillus rhamnosus* 4B15를 포함하는 유산균제제 시제품을 대상으로 행동실험을 통한 인지 기능 개선 효능을 평가하였음 (그림 3-15).

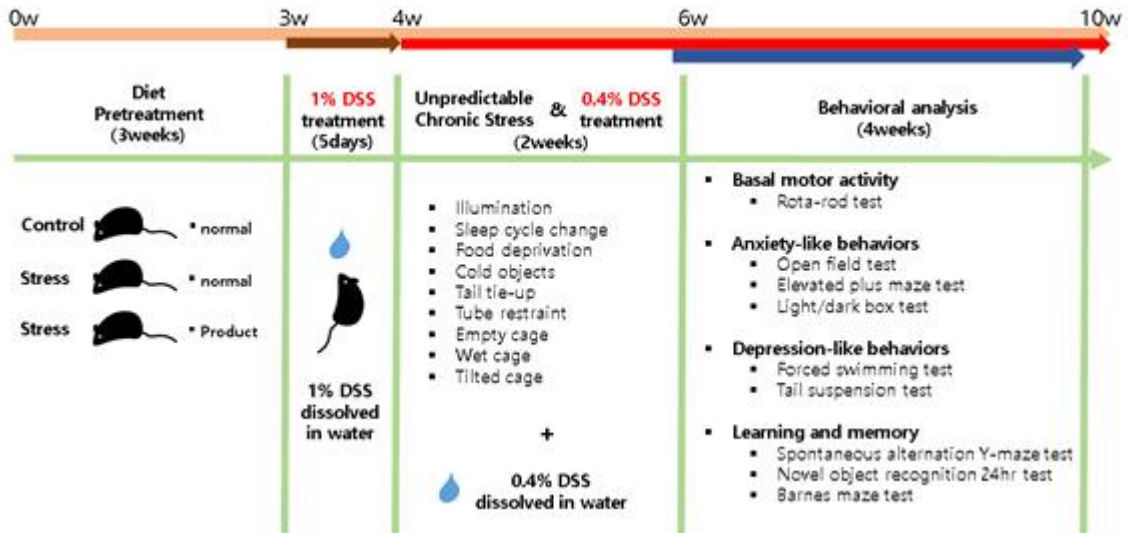


그림 3-15. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 실험 디자인

- ② 1차년도에 구축한 마우스 모델에서의 행동 특성 평가 시스템을 활용하여 기본적 운동능력 평가, 우울/불안 증상 평가, 인지/학습 능력을 평가하였음.

- 염증성 장질환/만성 스트레스 복합 마우스 모델에서 섭취 사료별 몸무게의 변화는 11주 동안 대조군, 스트레스 대조군, 실험 조제 사료를 섭취한 그룹 몸무게에서는 그룹간 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 분변 상태는 stress 그룹에 비해 시제품 그룹에서 개선됨을 관찰하였음 (그림 3-16).

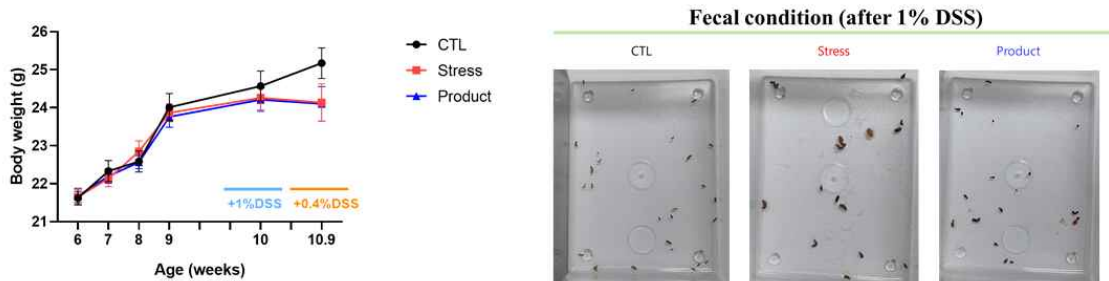


그림 3-16. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 몸무게 변화 및 분변 상태

- Open field test의 경우 만성스트레스를 유도한 그룹에 비해 시제품 섭취 그룹에서 center zone에서 머무는 시간 및 이동 속도가 증가되고 불안 정도가 다소 개선되는 것을 관찰함 (그림 3-17).

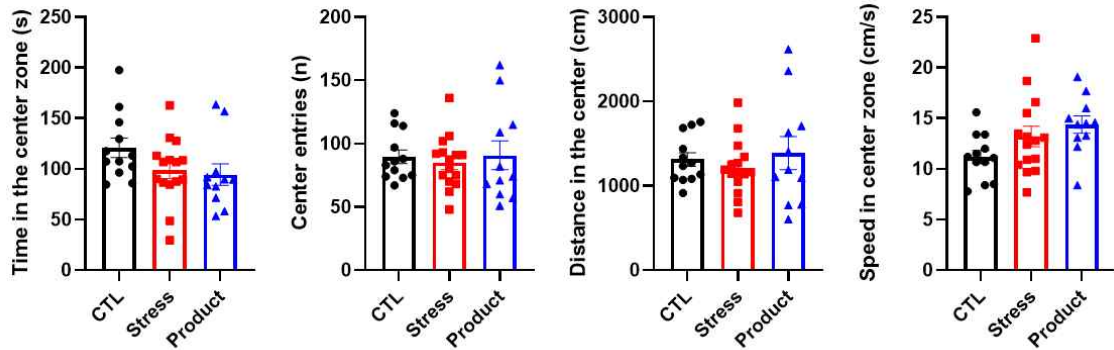


그림 3-17. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 open field test

- elevated plus maze test의 경우 만성스트레스를 유도한 그룹에 비해 시제품 섭취 그룹에서 뚜렷한 개선효과는 관찰하기 어려움 (그림 3-18).

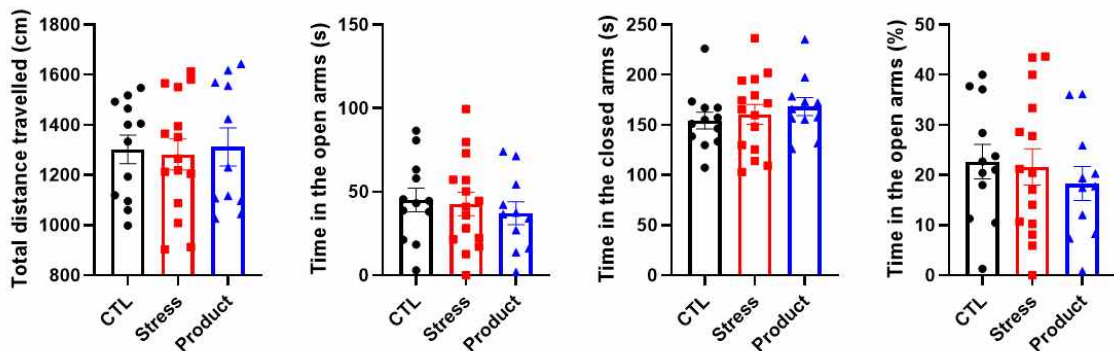


그림 3-18. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 elevated plus maze test

- light and dark box test의 경우 만성스트레스를 유도한 그룹에 비해 시제품 섭취 그룹에서 불안 증상이 다소 개선됨을 관찰할 수 있었음 (그림 3-19).

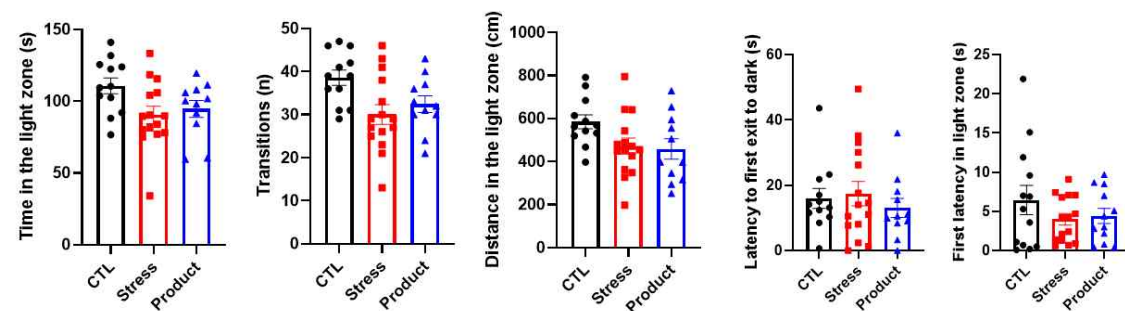


그림 3-19. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 light and dark box test

- Tail suspension test의 경우 시제품 섭취 그룹에서 만성 스트레스 그룹에 비해 우울 증상 정도가 개선되어 대조군과 유사한 정도로 불안 증상이 개선됨을 확인할 수 있었음. 반면 Forced swim test에서는 만성 스트레스 그룹에 비해 개선점을 관찰할 수 없었음 (그림 3-20).

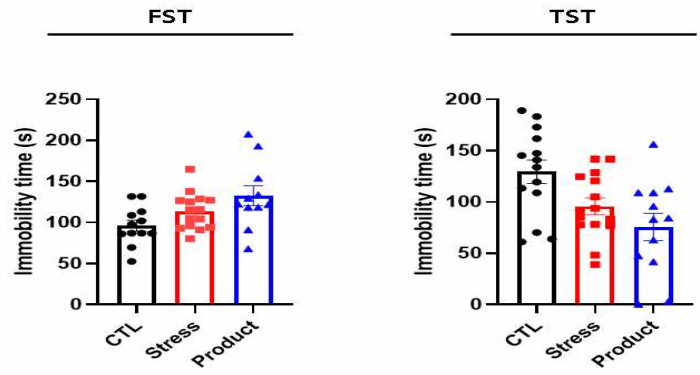


그림 3-20. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 forced swim/tail suspension test

- Spontaneous Y maze test의 경우 시제품 섭취 그룹에서 만성 스트레스 그룹에 비해 인지기능 감소 정도가 개선됨을 확인할 수 있었음 (그림 3-21).

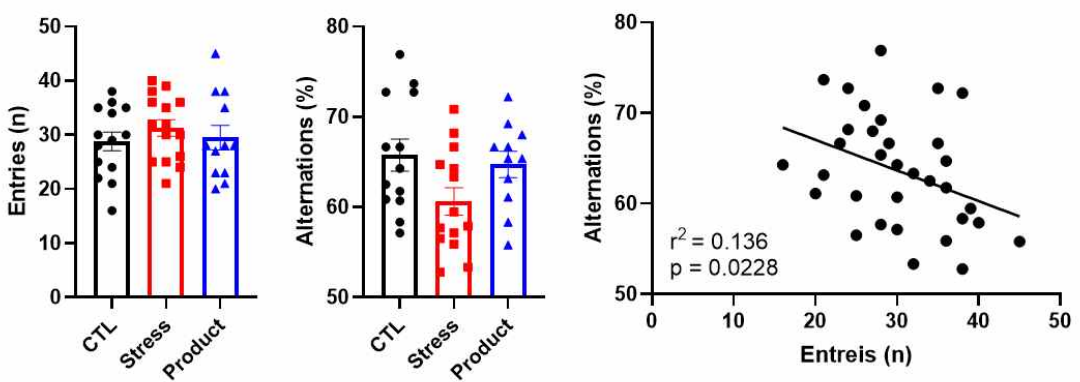


그림 3-21. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 spontaneous Y maze test

- Novel object recognition test의 경우 시제품 섭취 그룹에서 만성 스트레스 그룹에 비해 인지기능 감소 정도가 개선되어 대조군과 유사한 정도로 개선됨을 확인할 수 있었음 (그림 3-22).

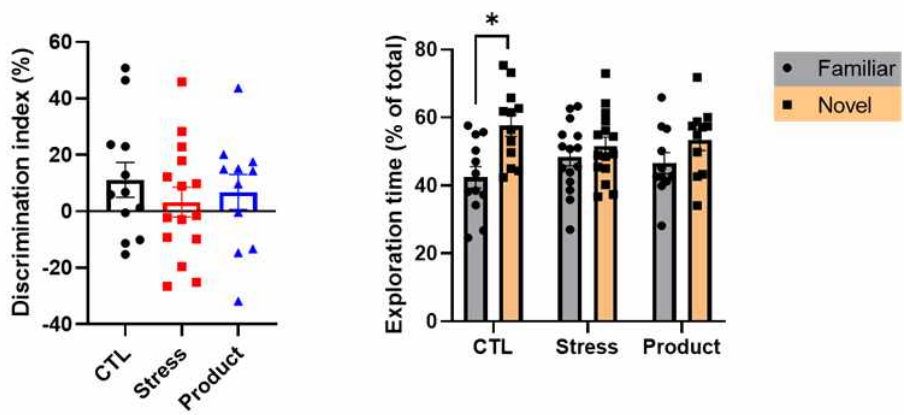


그림 3-22. 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서의 novel object recognition test

③ 실험결과를 종합해보면 염증성 장질환/만성스트레스 복합 마우스 모델에서 관찰되는 인지기능 감소 증상은 시제품 섭취로 인해 예방 및 회복 될 수 있음을 관찰할 수 있었음.

4. 동물 및 인체 마이크로바이옴 분석을 통한 장 질환과 장내균총과의 상호관계 규명

[제3협동 : 서울대학교 이주훈]

가. 동물 장내 마이크로바이옴 분석 조건 최적화 및 기능성 미생물의 전장 유전체 분석

1) 동물 장내 마이크로바이옴 분석 조건 최적화 조건 확립

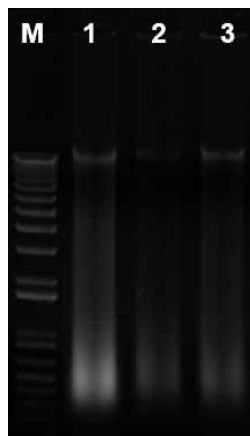
- 마우스의 장내 마이크로바이옴 분석 조건 최적화를 위하여 마우스 분변 샘플의 total DNA 추출 방법을 최적화하였음.

① Total fecal DNA 분리를 위해 bead-beating 기반 물리적 파쇄 방법을 사용한 방법 최적화

- Total fecal DNA 분리에서 전처리 과정으로 200mg 분변에 lysis buffer를 넣은 후 열처리를 진행하였음.
- 사람 분변과 달리 쥐의 분변은 더 건조하고 단단하기 때문에 전처리 과정에서 분변을 얼마나 잘 풀어주는가에 따라 분리된 total fecal DNA의 순도와 농도가 달라짐.
- Bead-beating을 기반으로 물리적으로 미생물을 파쇄하는 방법을 추가하여 분변샘플의 total DNA 추출을 최적화하기 위해 전처리 과정에서 열처리 전과 후로 각각 실험을 진행하여 비교함.
- 공통적인 실험 방법으로 열처리 방법은 100℃에서 10분간 끓임.
- 본 실험에서 2가지 bead(glass bead와 steel bead)를 사용하여 비교함.
- 전처리 이후에는 QIAamp DNA stool mini kit를 이용함.
- 실험 결과 DNA를 전기영동과 nanodrop으로 확인하였음.

(가) 기존의 열처리만을 사용한 방법(control)

- 비교 실험을 위해 control로써 bead를 사용하지 않은 일반적인 방법임.
- 기존의 방법대로 전처리 과정으로 열처리만하고 실험을 진행함.
- 그 결과 순도에는 이상이 없으며 3가지 모두 113~193 ng/ul 농도로 평균 154.7 ng/ul의 DNA를 얻음.



M : 1 kb+ DNA ladder

- 0.8% agarose gel
- 5 μ l loading

	Sample	ng / ul	A260 / A280
1	Control_1	193.7	2.05
2	Control_2	113.7	1.96
3	Control_3	156.8	2.03

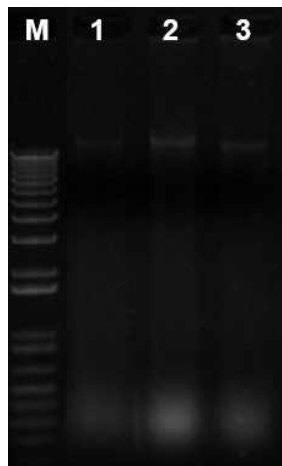
그림 4-1. 기존의 열처리 방법만 사용한 실험 결과

(나) Glass bead를 처리 후 열처리 방법

- 200mg 분변에 lysis buffer를 넣고 추가로 glass bead를 넣은 다음 bead-beating으로

파쇄 후 열처리 방법을 진행.

- 순도가 control에 비해 조금 떨어지며 91~144 ng/ul 농도로 평균 120.4 ng/ul 농도로 컨트롤 조건 보다 낮은 농도의 DNA를 얻음.
- 이는 건조하고 단단한 분변을 glass bead가 제대로 파쇄를 하지 못하여 컨트롤과 비슷한 결과를 얻은 것으로 보임.
- Glass bead의 경우 경도가 약하여 단단한 쥐 분변 샘플이 잘 파쇄가 되지않아서 이러한 결과를 얻은 것으로 예측되어서 glass bead보다 더 경도가 강한 steel bead를 사용해서 진행 해보기로 함.



M : 1 kb+ DNA ladder

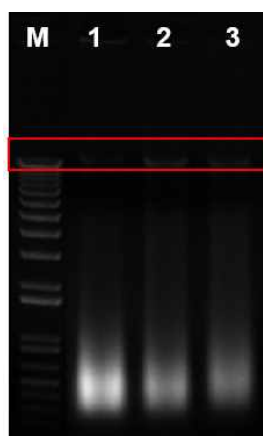
- 0.8% agarose gel
- 5 μ l loading

	Sample	ng / ul	A260 / A280
1	Glass bead 처리 후 열처리_1	124.7	1.98
2	Glass bead 처리 후 열처리_2	144.7	1.83
3	Glass bead 처리 후 열처리_3	91.9	1.97

그림 4-2. Glass bead로 bead-beating 후 열처리한 실험 결과

(다) Steel bead를 처리 후 열처리 방법

- 200mg 분변에 lysis buffer를 넣고 추가로 steel bead를 넣은 다음 bead-beating을 진행 후 열처리 방법을 진행하였음.
- Steel bead로 파쇄하여 분변 샘플의 total DNA를 추출 하였을 경우 control과 같은 순도의 DNA와 227~290 ng/ul 농도로 평균 257.7 ng/ul 농도의 DNA로 컨트롤에 비하여 높은 DNA의 농도를 얻었지만, gel 사진에서 total DNA로 예상되는 위치에 밴드가 잘 보이지 않음.
- 이를 개선하기 위하여 열처리와 bead-beating 기반의 물리적 처리 방법의 순서를 바꿔서도 진행을 하여 결과를 비교해보기로 함.



M : 1 kb+ DNA ladder

- 0.8% agarose gel
- 5 μ l loading

	Sample	ng / ul	A260 / A280
1	Steel bead 처리 후 열처리_1	290.1	2.15
2	Steel bead 처리 후 열처리_2	255.6	2.11
3	Steel bead 처리 후 열처리_3	227.4	2.08

그림 4-3. Steel bead로 bead-beating 후 열처리한 실험 결과

(라) 열처리 후 glass bead를 사용한 방법

- 200mg 분변에 lysis buffer를 넣고 glass bead를 넣은 상태로 열처리 후 bead-beating을 기반으로 물리적으로 파쇄하여 total DNA 추출 농도를 측정함.
- 그 결과 control과 같이 순도가 높으며 207~240 ng/ul 농도로 평균 225 ng/ul의 DNA를 얻었으며, 이는 컨트롤 DNA 농도와 glass bead처리 후 열처리를 했을 때의 DNA 농도보다도 높은 농도가 나온 것으로 확인됨.
- 이는 열처리 후 bead-beating을 진행할 시 분변의 단단함이 부드러워진 상태에서 glass bead를 기반으로 물리적으로 파쇄하게 되어 이전의 방법보다 훨씬 잘 파쇄 되는 것을 육안으로 확인하였고, 이에 따라 total DNA의 농도 또한 bead-beating후 열처리를 한 것에 비하여 더 높은 농도의 DNA를 얻은 것으로 보임.
- 겔 사진에서 total DNA의 위치에 밴드 또한 이전의 결과보다 선명하게 잘 보이는 것을 확인함.
- Steel bead를 사용하게 되면 glass bead보다 더 높은 농도의 분변 total DNA 농도를 얻을 것으로 예측 되어서 열 처리 후 steel bead를 사용하여 분변 total DNA 추출을 진행함.

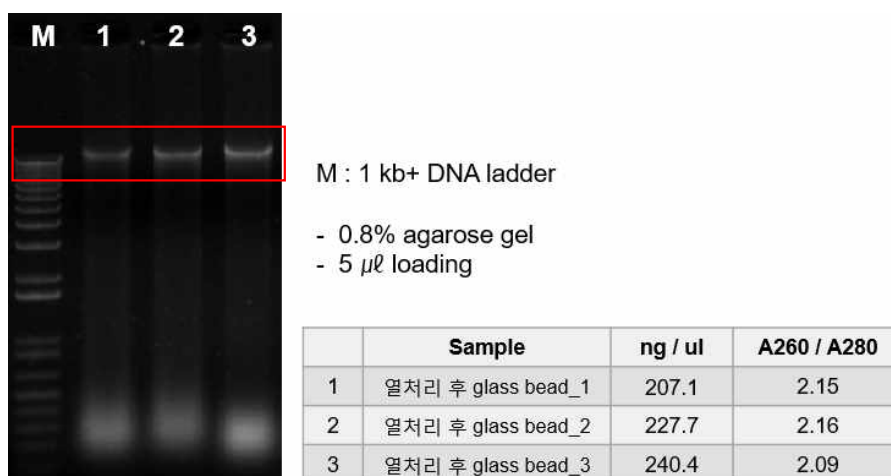


그림 4-4. 열처리 후 glass bead를 사용한 실험 결과

(마) 열처리 후 steel bead를 사용한 방법

- 200mg 분변에 lysis buffer를 넣고 steel bead를 넣은 상태로 열처리 후 bead-beating을 진행함.
- 열처리 후 steel bead로 bead-beating을 진행하여 건조한 분변이 잘 풀어진 것으로 예상됨.
- 그 결과 control과 같은 순도의 DNA와 344~467 ng/ul 농도로 평균 415.5 ng/ul의 컨트롤에 비해 약 2.5배 높은 농도의 DNA를 얻었음.
- 겔 사진 또한 total DNA의 위치에 가장 선명하게 밴드가 나오는 것을 확인함.
- 최종적으로 전체 실험 결과를 비교하여 열처리 후 steel bead를 사용한 방법으로 진행하기로 함.

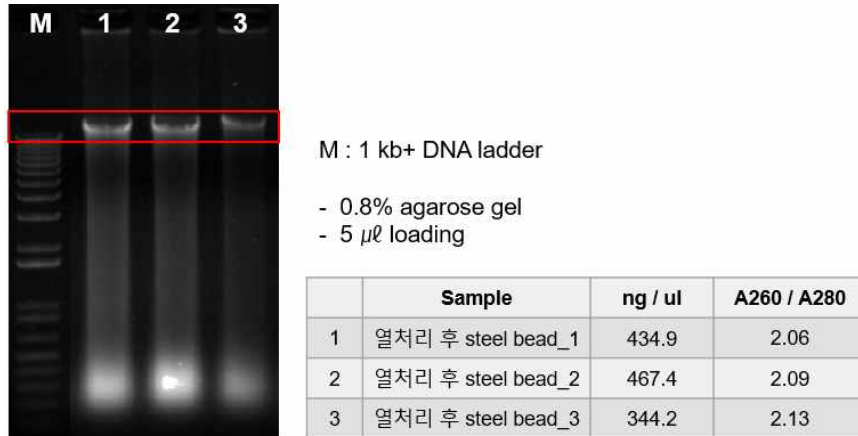


그림 4-5. 열처리 후 steel bead를 사용한 실험 결과

2) 기능성 미생물에 대한 전장 유전체 분석

- 선발 균주인 *Lacticaseibacillus rhamnosus* 4B15균주와 또 다른 기능성 균주로서 *Lactobacillus gasseri* 505균주의 유전체 분석을 진행하였음.

① 미생물의 전장 유전체 확보 및 유전자 탐색

- *L. rhamnosus* 4B15균주의 경우 이전에 PacBio RS II system을 기반으로 유전체 분석이 완료가 되어 유전자 탐색은 완료가 되어있었음 (오남수 외, 2018).
- 하지만 이 균주의 경우 유전자 탐색만 완료되어있고 독성유전자 유무, 항생제 내성 유전자 유무, 유전체 기반 대사활동 분석, 비교유전체 분석 등 다른 유전체 분석은 진행되지 않은 상태임.
- *L. gasseri* 505 균주의 경우 이전에 draft genome은 sequencing이 완료되어 있었으나, complete genome이 없었기 때문에 PacBio RS II system을 기반으로 유전체 분석을 하였고 이에 대한 유전자 탐색을 진행함.
- *L. gasseri* 505 균주는 총 2,119,132bp인 하나의 chromosome DNA로 GC 비율은 34.94 % 이고 총 2,123개의 protein coding gene을 가지고 있으며, 그 중 1,521개의 기능을 갖는 protein으로, 나머지는 hypothetical protein으로 annotation되었음. 또한 61개의 tRNA와 13개의 rRNA 가짐 (그림 4-6).

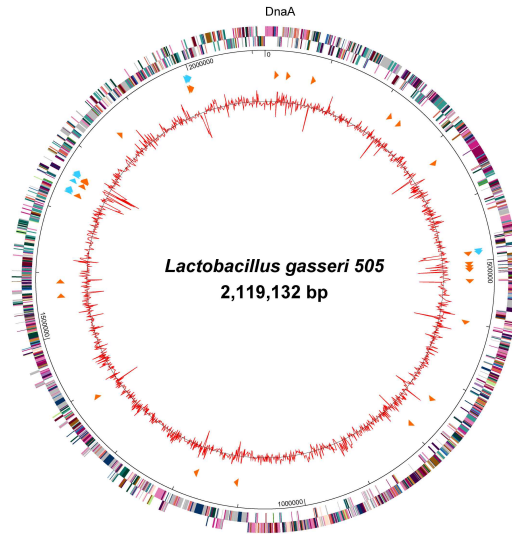


그림 4-6. *L. gasseri* 505의 genome map

- 유전체 수준에서 독소 유전자의 유무와 항생제 내성 유전자의 유무를 확인해 본 결과, 두 균주 모두 독소유전자와 항생제 내성 유전자는 가지고 있지 않음을 확인함 (그림 4-7).

Summary						
Filename	Date (UTC)	RGI Criteria	# Perfect Hits	# Strict Hits	# Loose Hits	Download
L_rhamnosus_4B15	August 28, 2019 10:39:26	Perfect, Strict, complete genes only	0	0	0	Download

Summary						
Filename	Date (UTC)	RGI Criteria	# Perfect Hits	# Strict Hits	# Loose Hits	Download
LG505	August 28, 2019 12:20:07	Perfect, Strict, complete genes only	0	0	0	Download

그림 4-7. *L. rhamnosus* 4B15, *L. gasseri* 505 균주의 항생제 내성 유전자 확인 결과

- 유전체 수준에서 독소 유전자의 유무와 항생제 내성 유전자의 유무를 확인해 본 결과 두 균주 모두 독소유전자와 항생제 내성 유전자는 가지고 있지 않음을 확인함.

② 미생물의 비교 유전체 분석

- NCBI 유전체 정보를 활용하여 총 13종 62개 균주를 활용하여 phylogenetic tree 분석을 진행하였음.
- *L. rhamnosus* 4B15의 경우 phylogenetic tree 분석 결과 *L. rhamnosus* GG와 가장 유사한 유전체를 가지고 있는 것으로 확인됨 (그림 4-8).
- *L. rhamnosus* GG의 경우 상업적으로 가장 많이 사용되는 균주이며, 가장 많이 연구된 프로바이오틱스로 면역 및 기타 효능에 대한 연구 뿐만 아니라 최근에는 gut-brain axis까지도 연관되어 연구가 진행되고 있음.
- *L. rhamnosus* 4B15의 경우 이와 유전체가 유사하기 때문에 비슷한 특징을 가질 것으

로 예측됨.

- *L. gasseri* 505의 경우 phylogenetic tree 분석 결과 *L. gasseri* 4M13과 굉장히 밀접한 것으로 확인됨.
- 또한 *L. gasseri* 균주만 가지고 ANI(Average Nucleotide index) 분석을 통하여 tree를 그릴 시 크게 두 그룹으로 나뉘는 것을 확인함 (그림 4-9).

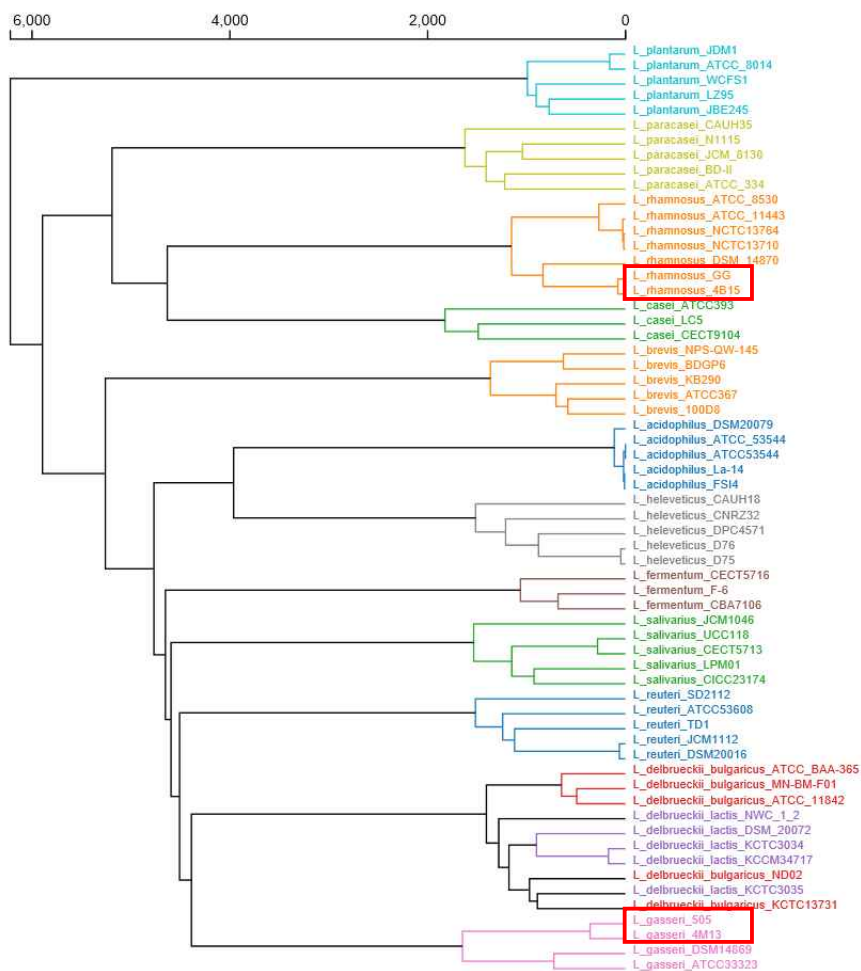


그림 4-8. *Lactobacillus* 균주들의 phylogenetic tree 분석 결과

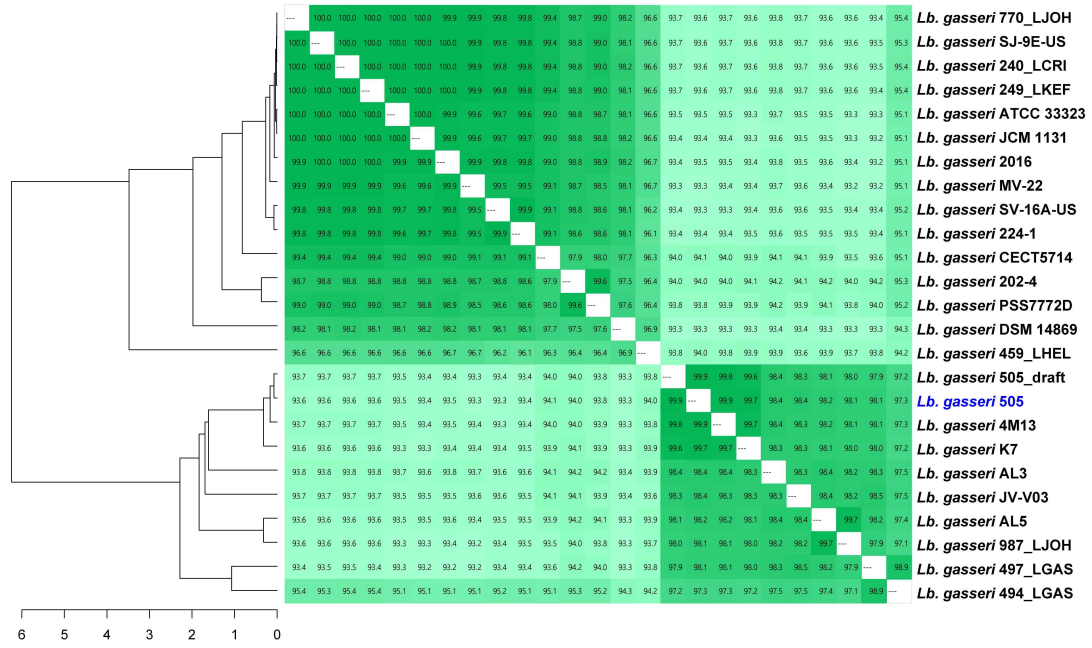
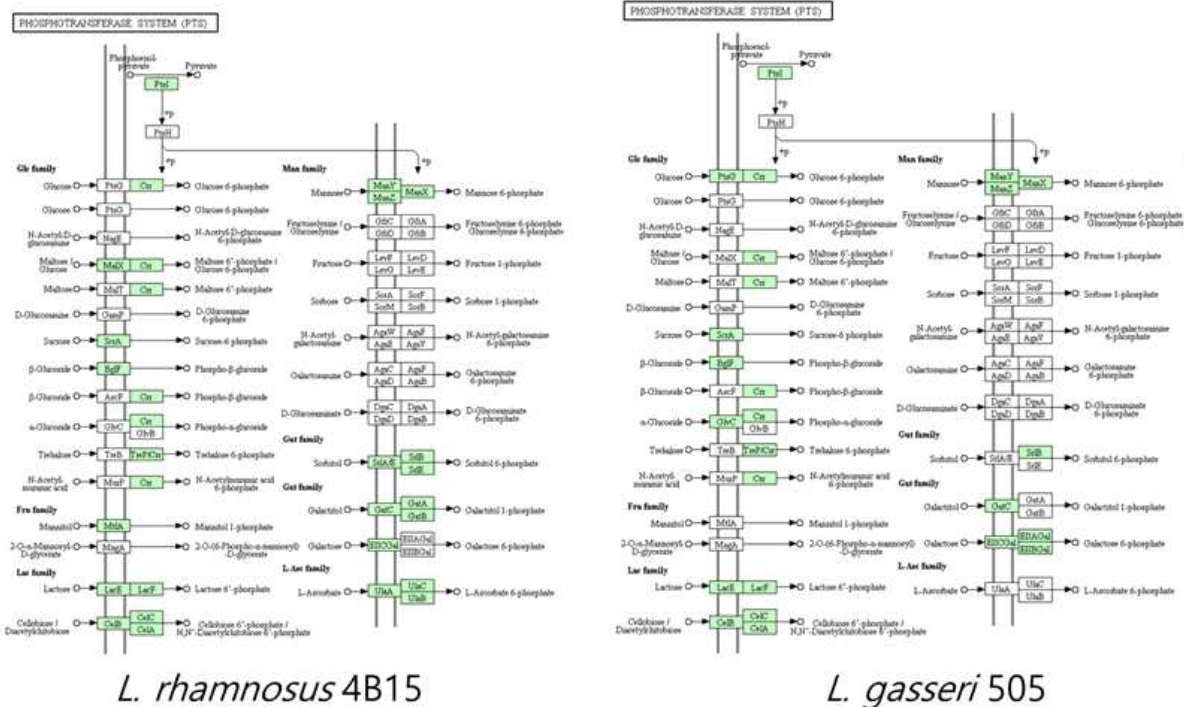


그림 4-9. *L. gasseri* 균주들의 phylogenetic tree 분석 결과

- 두 균주의 KEGG 분석을 통한 metabolic pathway 분석을 통하여 두 균주의 대량생산에 필요한 carbon source가 되는 당을 확인함
- *L. rhamnosus* 4B15의 경우 *L. gasseri* 505와 다르게 PTS system을 통하여 Maltose를 이용하는 것을 확인하였으며, Mannitol, Sorbitol, Galactitol과 같은 당 알코올을 이용하는 것을 확인하였음(그림 4-10)
- 또한 *L. rhamnosus* 4B15의 경우 PTS system을 통하여 비타민 C로 알려져 있는 L-Ascorbate를 이용하여 대사과정을 거쳐 pentose phosphate pathway를 통하여 L-Ascorbate를 탄소원으로 사용하는 것을 확인함



L. rhamnosus 4B15

L. gasseri 505

그림 4-10. 균주의 metabolic pathway 분석 결과

나. 기능성 소재에 대한 동물모델 장내 미생물과 장 질환의 상관관계 분석 및 효능 검증

1) 스트레스로 인한 장 질환에 대한 장내균총 조성 변화 분석

① 스트레스 및 DSS 처리를 통한 장내 균총 조성 변화를 분석하기 위한 분변수집

- 1,2협동기관에서 수행한 염증성 장 질환/만성 스트레스 동물모델을 활용한 소재의 효능 검증 실험으로부터, 스트레스 및 DSS 처리로 인하여 동물모델에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험 진행에 있어 비교하고자 하는 시기의 분변을 각 케이지별로 수집하여 -80°C에서 보관함.
- 총 5개의 그룹(control, DSS+Stress, DSS+Stress+4B15, DSS+Stress+Melatonin STD in milk, DSS+Stress+night milk)으로 나누어 5번의 샘플링을 진행하여 분석하였음.
- 초기 장내 균총을 비교하기 위하여 기능성 소재 처리 전, DSS 처리 시작 전, chronic stress 시작 전, 행동실험 전, 희생 전으로 총 5번의 샘플링을 진행하여 장내 균총의 변화를 비교하였음 (그림 4-11).

Melatonin Group & Schedule

#	Group	Abbreviation	Stress	DSS	Feed
1	Control group	CTL	X	X	Normal diet
2	DSS+Stress group	S.DSS	O	O	Normal diet
3	DSS+Stress + 4B15	4B15	O	O	4B15 contained diet
4	DSS+Stress + Melatonin STD in milk	Mel.	O	O	Melatonin STD contained diet
5	DSS+Stress + night milk	Milk	O	O	Night milk contained diet

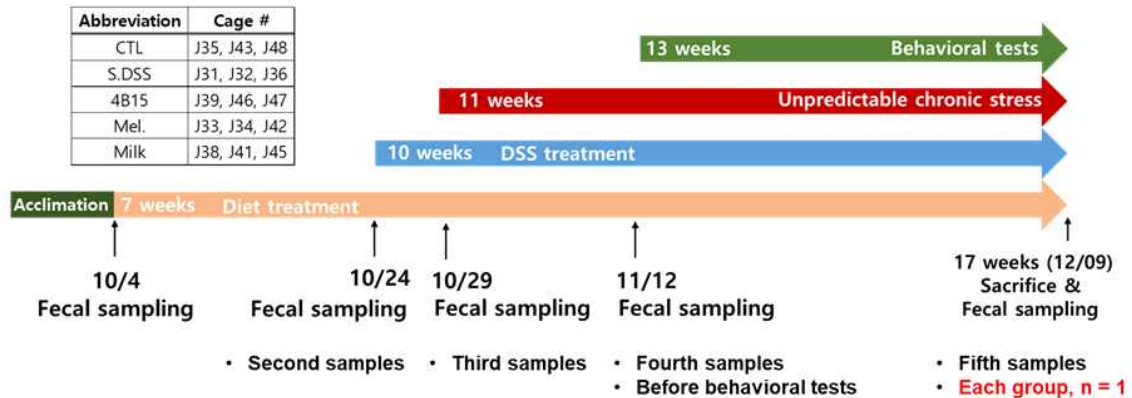


그림 4-11. DSS+Stress group에 대한 실험 순서

② NGS를 활용한 장내균총 16S rRNA amplicon 염기서열 분석

- 확보된 분변샘플로부터 최적화된 방법으로 고순도의 total fecal DNA를 분리하여 16S rRNA의 V3-V4부분을 universal primer를 활용하여 PCR을 통해 증폭해냄.
- 증폭된 partial 16S rRNA를 각 샘플에 대하여 index PCR를 통해 barcode sequence를 부여함.
- MiSeq Sequencer로부터 대용량의 염기서열을 확보하고 얻어진 raw data로부터 quality control을 통하여 정확도 높은 염기서열을 생물정보학 프로그램을 이용하여 filtering 함.
- 각 그룹들로부터 확보된 샘플의 sequenceing depth를 알아보기 위하여 alpha-rarefaction curve로부터 충분한 sequence를 확보가 되었음을 확인하였음 (그림 4-12).

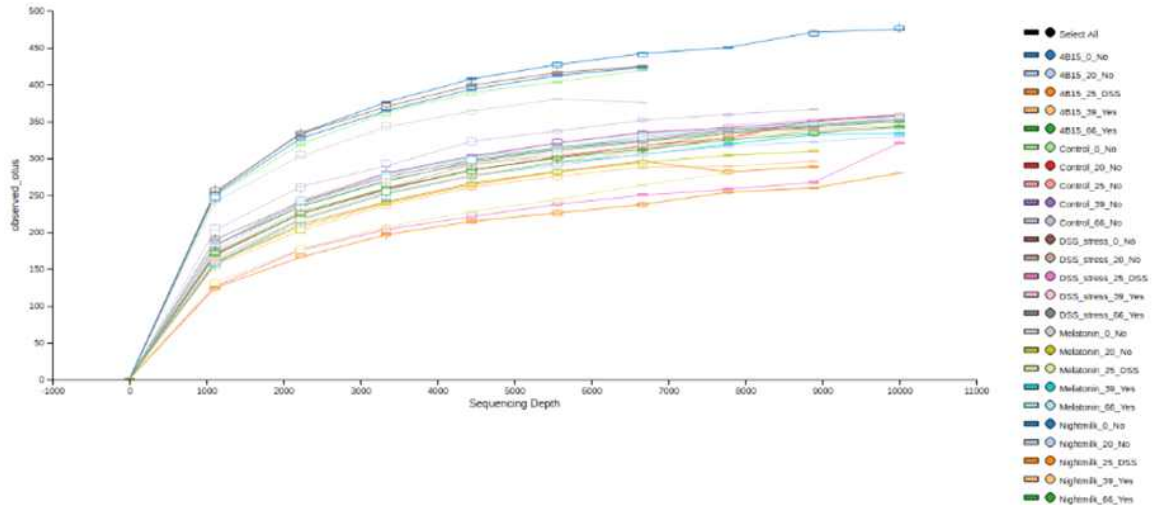


그림 4-12. 그룹 및 샘플에 따른 Alpha-rarefaction curve

③ 그룹에 따른 동물모델 장내균총의 diversity 분석

- 각 그룹에 대하여 장내균총의 다양성을 분석하여 그룹별 차이를 통계적으로 확인함.
- 행동실험을 진행하기 이전 샘플들로부터 장내균총의 변화를 확인하기 위하여 control 을 기준으로 다른 그룹의 변화를 확인함.
- Alpha-diversity 분석 결과 Simpson index가 control 그룹에서 가장 높은 것으로 나타났으며 DSS 및 stress를 처리한 그룹이 control에 비하여 감소되는 것을 확인할 수 있었음.
- 뿐만 아니라 diet를 treatment한 그룹들의 경우 DSS 및 stress만 처리한 그룹에 비해서 감소된 것을 확인하였으며 이들은 control에 비하여 유의적으로 감소되어있는 것을 통계적으로 확인하였음 (그림 4-13).

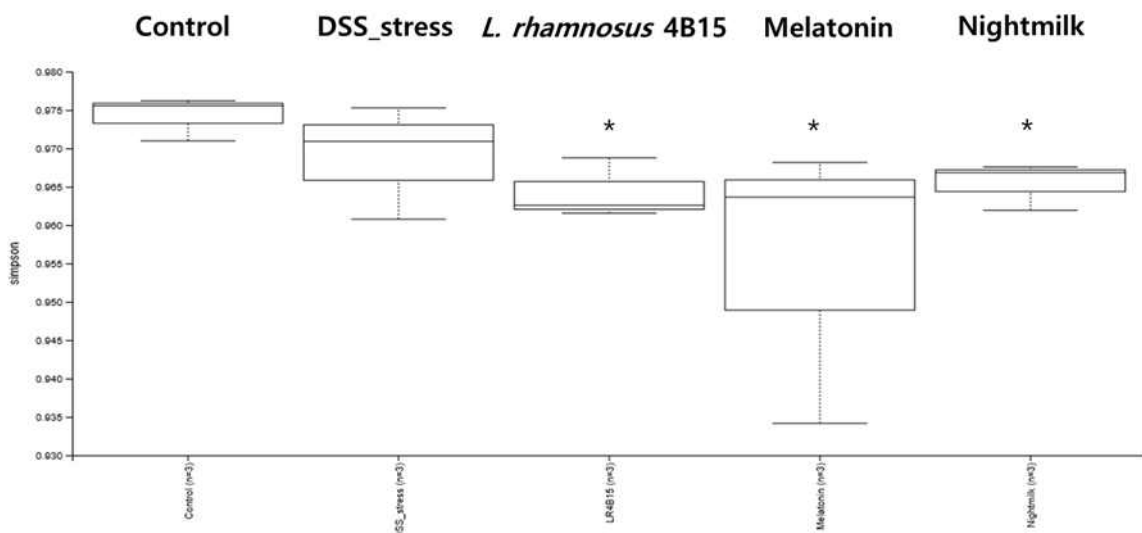


그림 4-13. 그룹에 따른 alpha-diversity 분석 (*, $p < 0.05$)

2) 기능성 소재에 의한 동물모델의 장내 균총 변화와 생물정보학적 분석

① DSS-stress 그룹에 따른 동물모델 장내균총의 beta-diversity 분석

- 확보된 분변샘플 중 동물실험 이전의 샘플로부터 처리한 기능성 소재가 장내 균총에 미

치는 영향을 확인하기 위하여 control 그룹의 균총정보를 제외한 melatonin milk와 night milk, 4B15를 첨가한 milk를 투여한 그룹들로부터 장내균총 beta-diversity를 확인함.

- Alpha-diversity와 유사하게 beta-diversity 결과 control 그룹과 이외의 그룹들의 장내 균총 분포가 상이하게 다른 것을 확인할 수 있었음.
- 또한 DSS 및 스트레스를 처리한 그룹들은 서로 유사한 방향으로 분포하고 있음을 확인할 수 있었음.
- Control group을 제외하고 분석한 결과 DSS 및 stress를 처리한 그룹을 기준으로 Melatonin 처리 그룹과 night milk 처리 그룹이 유사한 방향으로 분포하고 있음을 확인할 수 있었음.
- 4B15를 처리한 그룹의 경우 DSS 및 stress를 처리한 그룹에 가까운 것으로 확인되어 melatonin이나 night milk와 다른 장내균총을 갖는 것으로 예상됨.
- 특이적으로 melatonin을 함유한 우유를 섭취한 동물모델과 밤에 착유한 우유 (night milk)를 섭취한 동물모델의 장내균총이 PCoA(Principal Coordinates Analysis) 상에서 유사한 방향으로 장내 균총이 분포하고 있음을 통해 night milk가 장 내에서 melatonin 과 유사한 기능을 할 것으로 예상됨.
- 따라서 각 그룹별 장내 균총의 분포를 확인함 (그림 4-14).

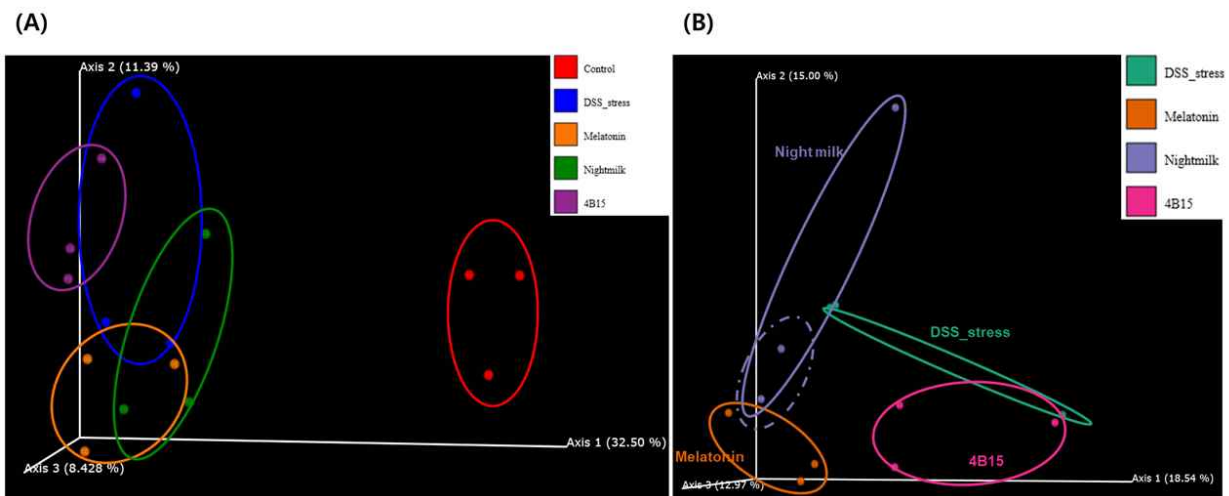


그림 4-14. 그룹에 대한 beta-diversity 분석에 따른
(A) 5그룹, (B) control을 제외한 4그룹의 PCoA

② Genus 수준에서의 장내 균총 분포

- 확보된 장내 균총 정보로부터 균주들의 genus 수준에서의 분포를 확인하여 시기별로 비교분석을 수행하였음 (그림 4-15).
- 3주간 기능성 시료를 섭취하였던 동물모델에서 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15를 섭취한 동물모델의 장내균총에서는 *Lactobacillus*가 증가 하지 않은 것으로 나타남.
- 5일간 DSS를 처리된 동물모델들에서 *Lactobacillus*가 많이 감소하고 병원성 균주인 *Escherichia-Shigella*가 증가하는 것을 확인할 수 있었음.
- 하지만 4B15, Melatonin, Nightmilk를 섭취한 동물모델의 경우 *Escherichia-Shigella* 균주가 적게 증가한 것을 확인할 수 있음.
- Bacteroides와 Parabacteroides의 비율 또한 증가하였으며, Melatonin과 nightmilk를 섭취한 그룹에서 *Parasiutterella*가 증가한 것을 확인하였음.

- Chronic Stress까지 처리된 동물모델들 중 DSS-stress 처리 샘플과 *L. rhamnosus* 4B15 샘플에서 *Escherichia-Shigella*의 비율이 증가 하였으며, control을 제외한 모든 샘플에서 *Parabacteroides* spp.와 *Parasutterella* spp.의 비율이 control에 비하여 증가하였음.

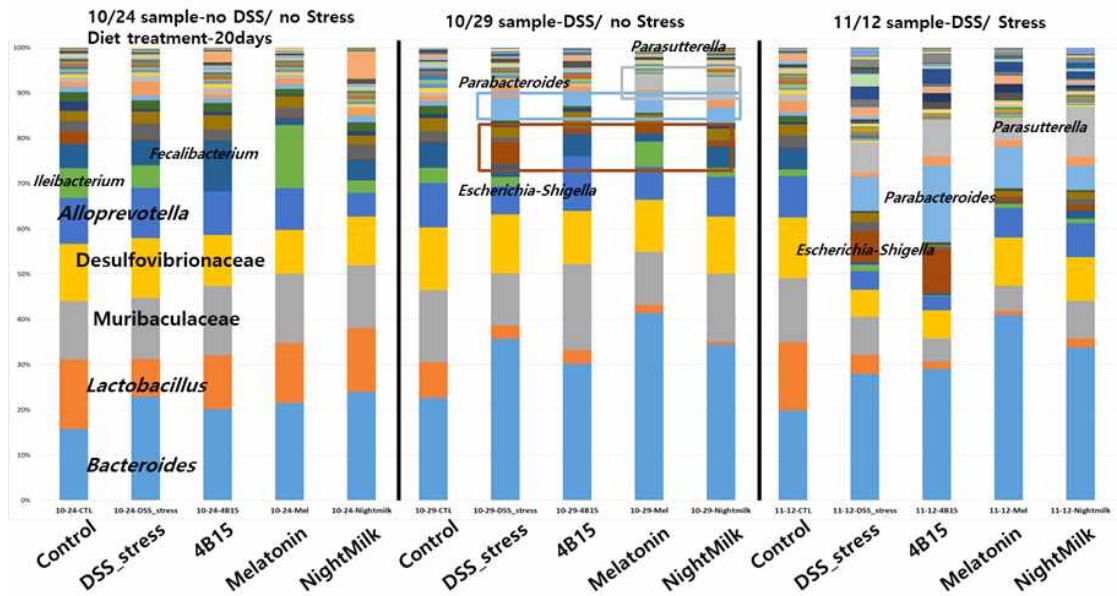


그림 4-15. 시기에 따른 그룹의 장내 균총의 genus 수준에서의 변화

- *Parasutterella* spp.의 경우 최종 발효 산물로 succinate를 생산하여 DSS 유도 대장염 마우스 모델의 relative abundance와 상관 관계가 있다고 최근 연구를 통해서 알려져 있음 (Tingting Ju et al., 2019, The ISME journal).
- Succinate와 같은 Short chain fatty acid(SCFA)는 O_2 와 결합하여 CO_2 를 형성하여 장내를 혐기조건으로 만드는 역할을 함.
- 이에 따라 DSS 처리 이후 DSS control group의 경우 장내 dysbiosis로 인하여 장내균총이 파괴됨에 따라 장내 O_2 의 농도가 높아짐에 따라 facultative anaerobic 균주이며, 병원균인 *Escherichia-Shigella* 균주가 증가하는 반면에 Melatonin과 Night-milk를 섭취한 그룹에서는 *Parasutterella* spp.가 증가함에 따라 succinate의 양이 증가했을 것으로 예측되며, 이에 따라 장내 산소 농도가 혐기로 잘 유지되어 *Escherichia-Shigella*의 증가가 적은 것으로 예측됨 (그림 4-16).

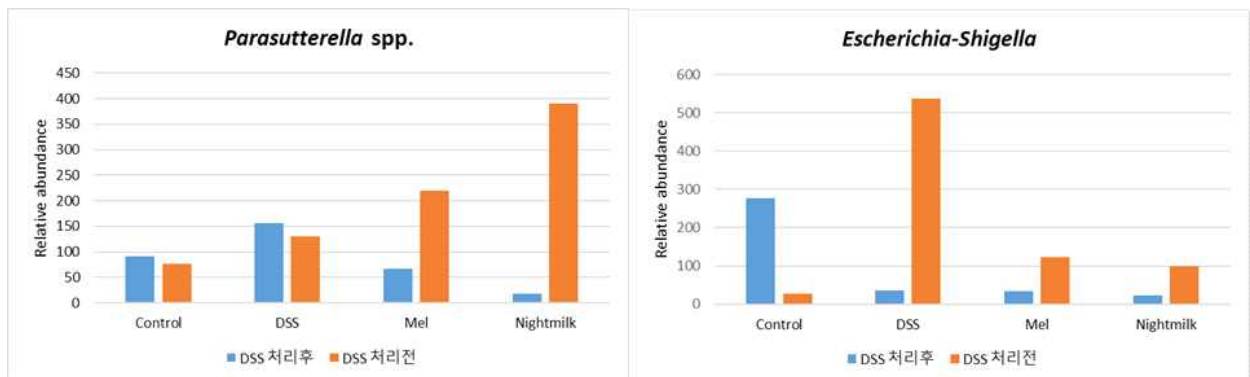
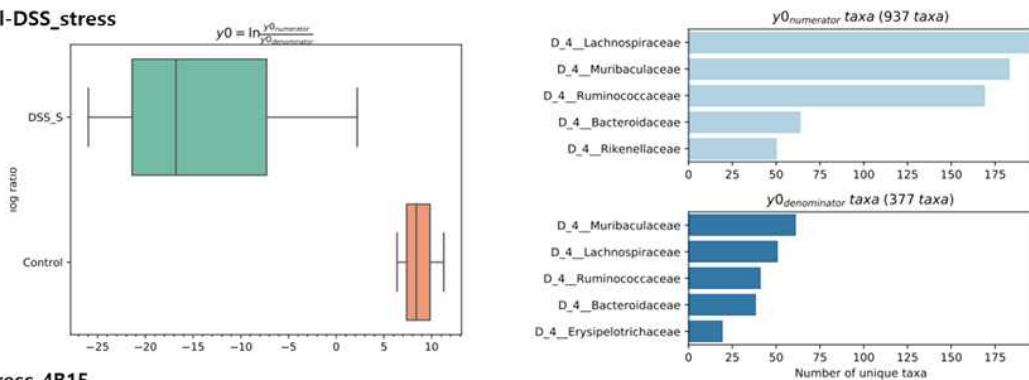


그림 4-16. DSS 처리 전후의 차이가 있는 genus의 변화 양상

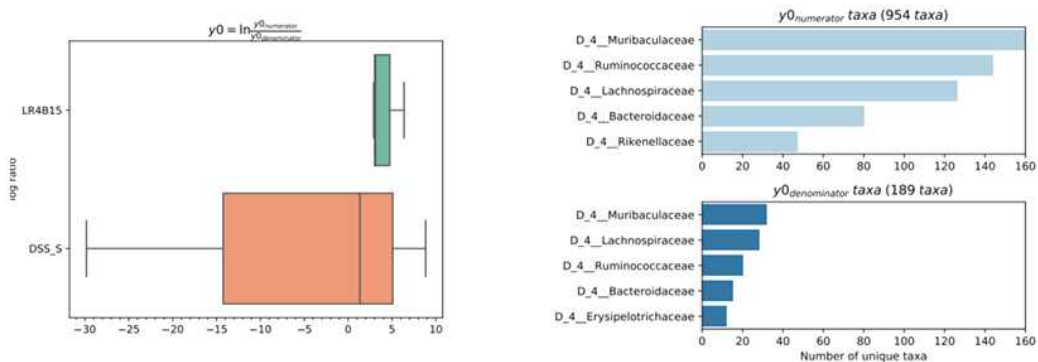
③ Differential abundance 분석을 통한 각 그룹별 우점 분석

- 그룹 간 차이를 확인하는 Differential abundance 분석을 통해 각 그룹이 나타내는 유점 균주를 확인함 (그림 4-17).
- Control그룹과 DSS-stress그룹을 비교분석한 결과 Control에서는 Lachnospiraceae, muribaculaceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae, Rikenellaceae가 937개의 taxa로 우점을 이루고 있으나 DSS-stress그룹의 경우 337개의 taxa로 이루어져있으며 Muribaculaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae로 우점을 이루는 것으로 나타남.
- DSS-stress그룹과 4B15그룹을 비교한 결과 DSS-stress그룹에 비하여 4B15를 섭취한 그룹의 5종 family 분포가 954 taxa로 우점을 이루고 있음을 확인하였음.
- DSS_stress 그룹과 Melatonin을 섭취한 그룹을 비교한 결과 melatonin을 섭취한 그룹에서 Muribaculaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae family가 1013 taxa를 보이며 우점을 나타내고 있음.
- 또한 DSS_stress 그룹과 Night milk를 섭취한 그룹을 비교한 결과 night milk를 섭취한 그룹에서 Muribaculaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae family가 970 taxa를 보이며 우점을 나타내고 있는 것을 확인하였음.
- 이러한 결과를 바탕으로 DSS_stress를 처리함으로써 Control에 비해 장내 균총의 우점이 변하는 것을 확인할 수 있으며 기능성 소재를 투여함으로 그에 따른 장내 균총이 회복되는 것을 우점균주의 비율의 증가로 확인이 가능하였음.

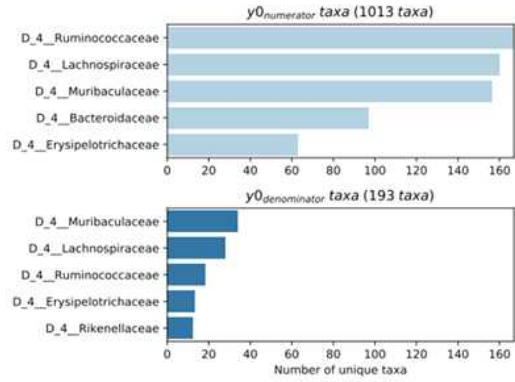
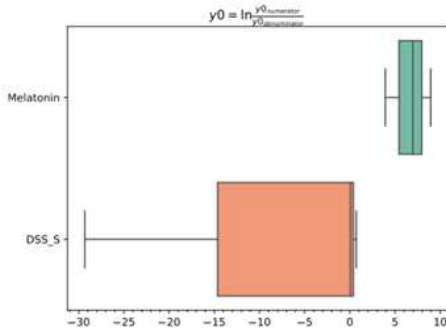
(A) Control-DSS_stress



(B) DSS_stress-4B15



(C) DSS_stress-Melatonin



(D) DSS_stress-Nightmilk

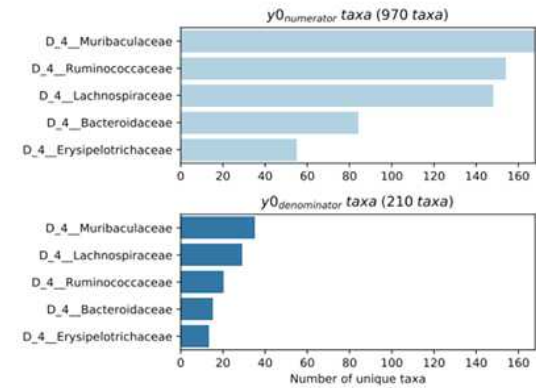
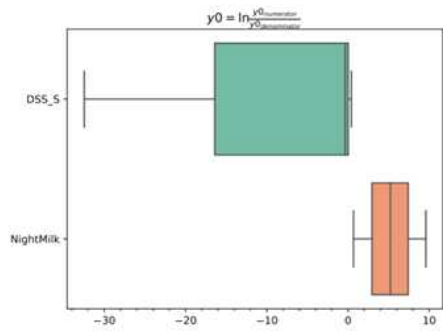


그림 4-17. Differential abundance 분석

- (A) Control vs. DSS_stress, (B) DSS_stress vs. 4B15,
 (C) DSS_stress vs. Melatonin, (D) DSS_Stress vs. Night milk

다. 프로바이오틱스와 기능성 소재에 대한 인체적용시험을 통한 장 질환 개선 효과의 생물정보학적 검증

1) 청소년 장 질환 환자에 대한 기능성 소재의 효능 메타게놈 검증

① 청소년 장 질환 환자의 프로바이오틱스 및 기능성 소재 투여 후 분변샘플 수집

- 청소년 장 질환 환자에 프로바이오틱스 및 기능성 소재가 미치는 영향을 확인하기 위하여 프로바이오틱스 및 기능성 소재 섭취 전과 후의 분변을 각 그룹별로 수집하여 -80°C에서 보관함.
- 총 99명을 3개의 그룹(1번: control, 2번: Probiotics+Melatonin, 3번: Probiotics)으로 나누어 진행하였음 (표 4-1).
- 초기 장내 균총을 비교하기 위하여 프로바이오틱스 및 기능성 소재 처리 전과 후 2번의 샘플링을 진행하여 장내 균총의 변화를 비교하였음.
- 총 99명의 임상균을 모집하였으며, 그 중 중도 탈락한 환자를 제외한 69명의 환자를 대상으로 장내균총 분석을 진행함.

표 4-1. 청소년 장 질환 환자에 대한 분변샘플 현황

No	random	이니셜	성별	나이(만)	분석 여부
S001	3	YMJ	F	17	
S002	1	CSM	M	12	
S003	2	KYG	M	12	
S004	2	JJH	M	10	

S005	1	KKY	F	11	○
S006	1	KMJ	M	14	○
S007	2	KMS	M	18	○
S008	2	SYS	M	18	
S009	1	PJC	M	17	○
S010	3	YYE	F	15	○
S011	3	PSH	F	10	
S012	1	JSY	F	11	○
S013	3	PSH	M	14	
S014	1	JEW	F	9	
S015	2	KEH	M	11	○
S016	3	CSA	M	12	○
S017	2	HHC	M	15	
S018	2	SJW	M	16	○
S019	3	LYC	M	16	○
S020	2	SJU	F	13	○
S021	3	LSW	M	14	○
S022	2	NHU	M	18	○
S023	2	OJY	F	13	○
S024	3	JYG	M	7	○
S025	3	LAJ	M	12	○
S026	3	KES	M	11	○
S027	3	KSU	M	9	○
S028	2	PJM	M	15	○
S029	2	MDH	M	16	○
S030	3	JJH	F	11	○
S031	3	LYH	F	13	○
S032	3	YSM	F	15	○
S033	2	KBJ	M	11	○
S034	1	HYE	F	17	
S035	3	PSJ	M	15	○
S036	2	KBS	M	19	
S037	3	KJY	F	13	○
S038	3	KYU	M	15	
S039	1	JJY	M	12	○
S040	3	LCR	F	17	○
S041	1	SJH	M	13	○
S042	1	YSW	F	9	○
S043	1	LEH	M	15	
S044	2	CJM	M	15	○
S045	2	CHS	F	17	○
S046	1	SΩ	M	18	○
S047	1	CSA	F	16	○
S048	3	LSW	M	13	○
S049	2	KTH	M	15	○
S050	1	KNH	F	17	
S051	1	LCE	F	8	○
S052	1	WDW	M	13	○
S053	2	HSH	M	8	○
S054	2	KYH	M	13	○
S055	1	LJ	F	12	○
S056	2	SYJ	M	11	○
S057	1	PJW	M	11	○
S058	2	WGY	M	10	○

S059	3	JSW	M	18	○
S060	1	KCG	M	9	○
S061	2	KJY	F	14	○
S062	1	SJH	M	13	○
S063	1	KSY	F	17	○
S064	3	LHS	F	9	○
S065	1	KJW	F	14	
S066	2	LJH	M	16	○
S067	2	HCB	F	14	
S068	3	JMG	M	14	
S069	3	WSR	F	8	○
S070	1	KSH	M	8	○
S071	3	WJH	M	14	○
S072	2	JYU	M	14	
S073	1	KYH	M	10	
S074	1	AJU	M	10	○
S075	1	YJW	F	11	○
S076	2	MJW	M	14	○
S077	1	YCY	F	16	
S078	2	KDY	F	10	○
S079	1	KHB	F	7	
S080	2	KYS	F	7	
S081	2	SYS	M	6	○
S082	2	CHJ	F	14	○
S083	2	HMT	M	15	○
S084	3	YSJ	M	8	○
S085	3	JGW	M	14	○
S086	2	KTY	M	12	○
S087	2	KHC	F	16	○
S088	3	KJO	M	14	○
S089	1	KJA	F	11	
S090	3	YJW	M	19	○
S091	3	CSH	F	7	○
S092	1	KSE	F	8	○
S093	3	HJM	F	15	
S094	3	SHM	M	16	
S095	1	KYJ	F	16	
S096	1	JYR	F	9	
S097	3	KDH	M	16	
S098	3	SJS	M	14	
S099	1	KMJ	F	15	

- Extract한 total fecal DNA는 gel electrophoresis와 Nanodrop을 이용하여 quality를 확인함.
- 표 4-2에 total fecal DNA의 Nanodrop 결과로 DNA농도와 purity를 나타냄.
- 두 결과 모두 이상 없이 실험이 진행되었으며, 충분한 양의 농도와 pure한 DNA를 extract하였음을 확인함.

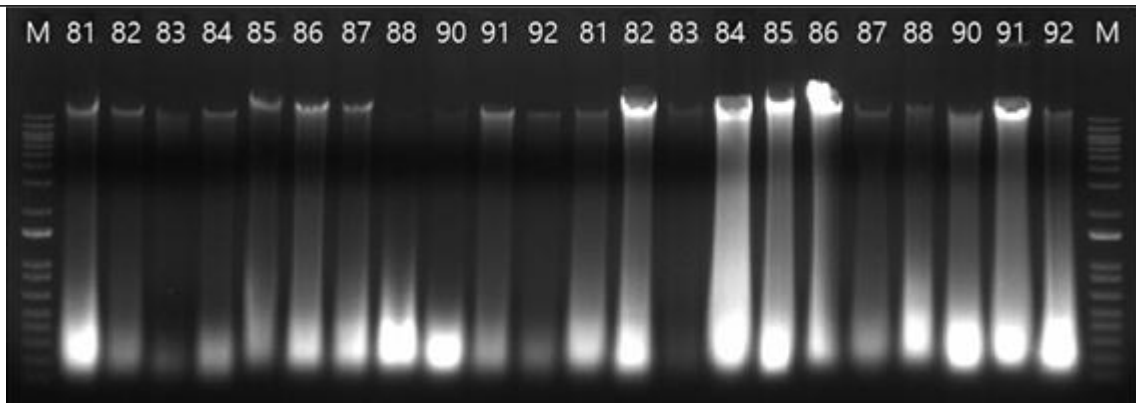


그림 4-18. Total fecal DNA 분리 정제

그림 4-18. Total fecal DNA 분리 정제

섭취 전			섭취 후		
Sample	ng/μl	A260/280	Sample	ng/μl	A260/280
5-1	116.7	1.94	5-2	378.5	2.13
6-1	465.8	2.12	6-2	374.9	2
7-1	1235.4	2.03	7-2	1801.8	2.11
9-1	1164	2.12	9-2	871.4	2.08
10-1	1381.9	1.99	10-2	532	2.04
12-1	405.1	2.14	12-2	394.8	2.08
15-1	649.9	2.01	15-2	450.1	2.03
16-1	357.2	2.06	16-2	492.2	2.05
18-1	1128.9	2.1	18-2	907.2	2.08
19-1	330.9	1.98	19-2	73.6	2.31
20-1	541.4	1.82	20-2	687.9	1.83
21-1	285.3	2.07	21-2	499.5	2.04
22-1	1102.9	1.95	22-2	321.9	2.07
23-1	682.9	2.03	23-2	1192.7	2.13
24-1	951.8	2.03	24-2	129.4	1.86
25-1	350.2	2.07	25-2	703.5	2.08
26-1	967.3	2.07	26-2	180.6	2
27-1	741.6	2.04	27-2	256.6	2.12
28-1	1370.7	1.94	28-2	1155.9	2.02
29-1	1025.9	2.11	29-2	2781.2	2.12
30-1	187.2	2.04	30-2	94.5	1.92
31-1	596	2.06	31-2	695.6	1.86
32-1	609.3	2.11	32-2	365.8	2
33-1	227.4	2.15	33-2	558.2	2.06
35-1	521.7	2.09	35-2	252.8	2.08
37-1	870.2	1.95	37-2	275.3	2.02
39-1	281.8	2.09	39-2	519.6	2.07
40-1	350.5	1.77	40-2	121.8	1.86
41-1	305	2.14	41-2	229.9	2.13
42-1	198.8	2.02	42-2	165.4	2.02
44-1	482.4	1.97	44-2	267	2.03
45-1	93.8	2.08	45-2	113.4	1.91
46-1	369.1	2.12	46-2	204.6	2.02
47-1	380.2	2.03	47-2	177	2.04
48-1	270.8	2.07	48-2	866.5	1.93
49-1	839.3	2.11	49-2	847.7	2.15

51-1	804.6	2.12	51-2	526.9	1.97
52-1	294.7	2.18	52-2	705.2	2.13
53-1	520	2.01	53-2	122.9	2.05
54-1	900.9	2.19	54-2	573.6	2.13
55-1	164.6	1.8	55-2	310.9	2.06
56-1	1596.8	2.12	56-2	1824.8	2.2
57-1	367.3	2.02	57-2	480.4	2.06
58-1	331.8	1.99	58-2	313.1	2.05
59-1	227.2	2.16	59-2	336.1	2.03
60-1	581	2.05	60-2	1138.7	2.13
61-1	248.5	2.02	61-2	66.9	1.81
62-1	1356.5	1.82	62-2	289.5	1.89
63-1	1536.3	2.07	63-2	526.7	2.05
64-1	214.5	2.02	64-2	291	2.03
66-1	198.6	2.08	66-2	979.9	2.08
69-1	640.9	2.01	69-2	351	2.06
70-1	220	2.02	70-2	638.6	2.13
71-1	343.2	2.09	71-2	275.4	2.16
74-1	279.5	2.13	74-2	373	2.06
75-1	565.6	1.92	75-2	206.7	2.08
76-1	377.5	2.14	76-2	174.3	2
78-1	210.3	1.92	78-2	76.9	1.76
81-1	485.8	2.06	81-2	350.9	2
82-1	165.2	1.8	82-2	515.9	2.03
83-1	120.6	1.59	83-2	57.5	1.81
84-1	173.3	2	84-2	576.5	1.69
85-1	225.9	1.83	85-2	436.3	1.85
86-1	279	2.07	86-2	278.2	1.91
87-1	296.8	2.12	87-2	184.8	2.07
88-1	601.3	2.13	88-2	398	2.13
90-1	442	2.05	90-2	585.2	1.84
91-1	140.7	1.93	91-2	565.4	1.79
92-1	106.4	1.95	92-2	621	2.07

- Total fecal DNA로부터 16S rRNA의 V3-V4 amplicon을 제작하기 위해 V3, V4를 타겟으로 하는 프라이머를 사용하여 PCR을 진행함.
- 증폭된 partial 16S rRNA를 각 샘플에 대하여 index PCR를 통해 barcode sequence를 부여함.

PCR

PCR mixture		PCR condition	
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 ul	Initial Denaturation	95°C, 3 min
DNA (5 ng / ul)	5 ul	30 cycle : Denaturation Annealing Extension	95°C, 30 sec
F primer (1 pmol)	10 ul		54°C, 30 sec
R primer (1 pmol)	10 ul		72°C, 30 min
Total	50 ul	Final extension	72°C, 5 min

- * F primer : 341F overhang primer (49 mer)
- * R primer : 805R_M modified overhang primer (55 mer)

그림 4-19. PCR mixture 조성 및 조건

- PCR product를 gel electrophoresis를 통해 16S rRNA의 V3-V4 부분이 증폭되었는지 확인함 (그림 4-20).
- PCR product는 Bionics사의 PCR purification kit를 사용하여 dimer 등 불순물을 제거하고 pure 한 DNA로 정제함 (그림 4-21).

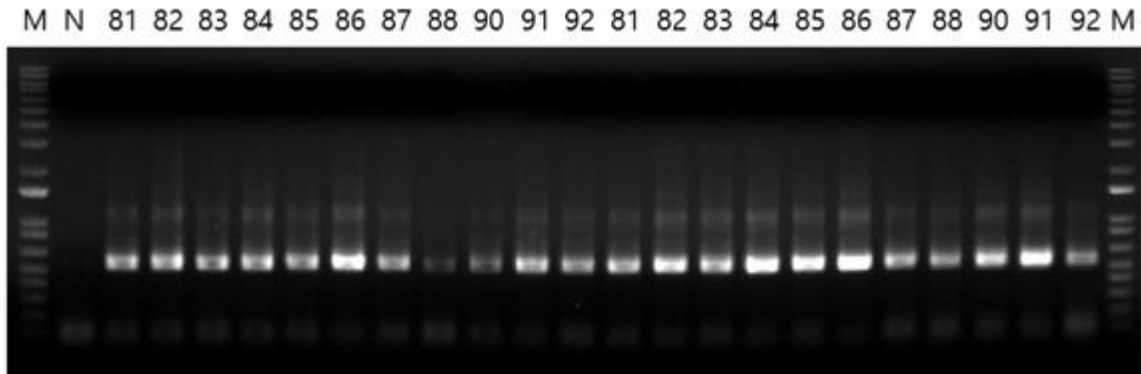


그림 4-20. 16S rRNA V3-V4 PCR 진행

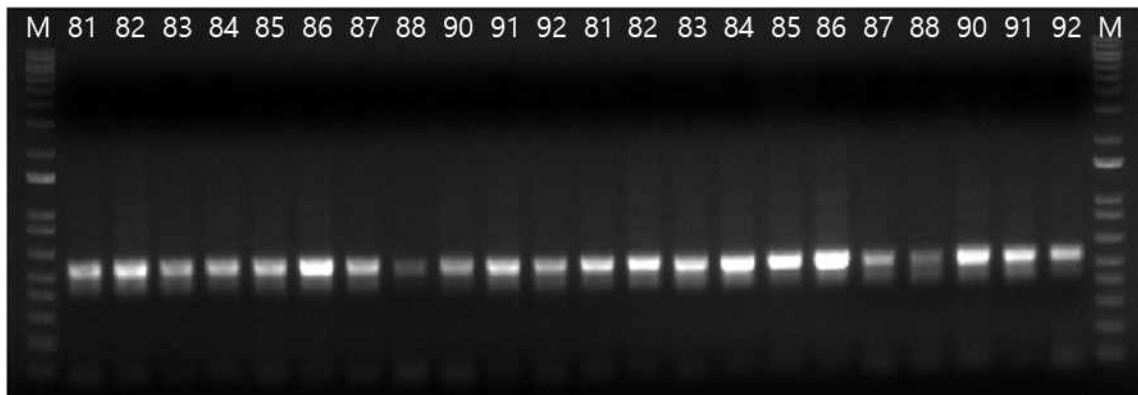


그림 4-21. 16S rRNA V3-V4 PCR 진행 후 purification

- MiSeq Sequencer로부터 대용량의 염기서열을 확보하고 얻어진 raw data로부터 quality control을 통하여 정확도 높은 염기서열을 생물정보학 프로그램을 이용하여 filtering 함.

② 장내 미생물총 분석 및 통계학적 분석을 위한 read count 확인

- 확보된 raw data를 기반으로 생물정보학 기반 통계분석을 진행하였음.
 - Sample당 충분한 read수를 확보하여야 정확한 분석이 가능하므로 이를 확인하기 위해서 alpha rarefaction분석을 진행함.
-

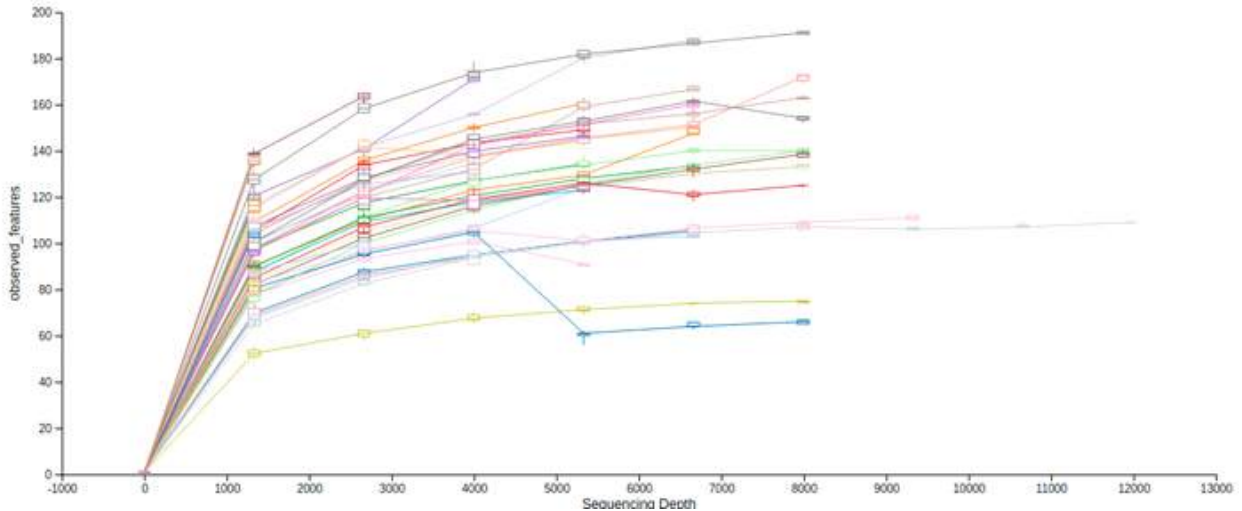


그림 4-22. Alpha rarefaction curve 분석 결과

- Alpha rarefaction curve 분석 결과 모든 샘플의 observed_features가 0에 수렴하여 충분한 read count를 확보함을 확인함.

③ 생물정보학 기반 분석프로그램을 활용한 α, β -diversity 분석

- 확보된 NGS raw data를 기반으로 QIIME2 파이프라인 프로그램을 활용하여 메타게놈 분포도 분석을 진행하였음.
- Raw sequence data를 import한 후 Deblur program을 활용하여 denoising을 진행한 후, Sequence quantification 과정을 통하여 필요없는 sequence들을 제거함.
- 제거되고 남은 고품질의 Qualified DNA sequence reads를 기반으로 α, β -diversity 분석을 각각 수행하였음.
- α -diversity 분석의 경우 Shannon, Chao1, evenness_pielou, rare_abundance 지표에 대해서 분석을 진행하였음 (그림 4-23).

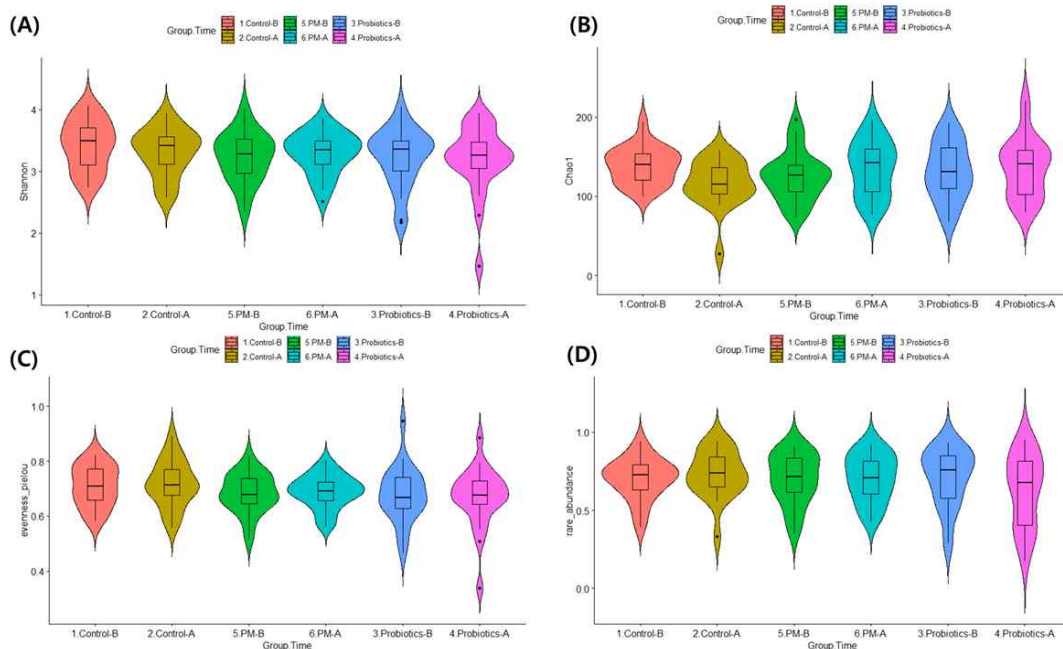


그림 4-23. Alpha diversity 분석 결과

(A) Shannon, (B)Chao1, (C)evenness_pielou, (D)rare_abundance 분석 결과

- 4가지 분석모두 그룹 내에서 섭취 전 후의 α -diversity의 유의적인 차이를 보이지 않았음.
- 샘플간의 diversity 확인하기 위하여 wighted unfrac 알고리즘을 기반으로 PCoA방법을 활용하여 β -diversity분석을 진행하였으며, 69명의 환자 그룹 섭취 전, 후를 포함한 총 138건의 분석 결과를 기반으로 분석함 (그림 4-24).

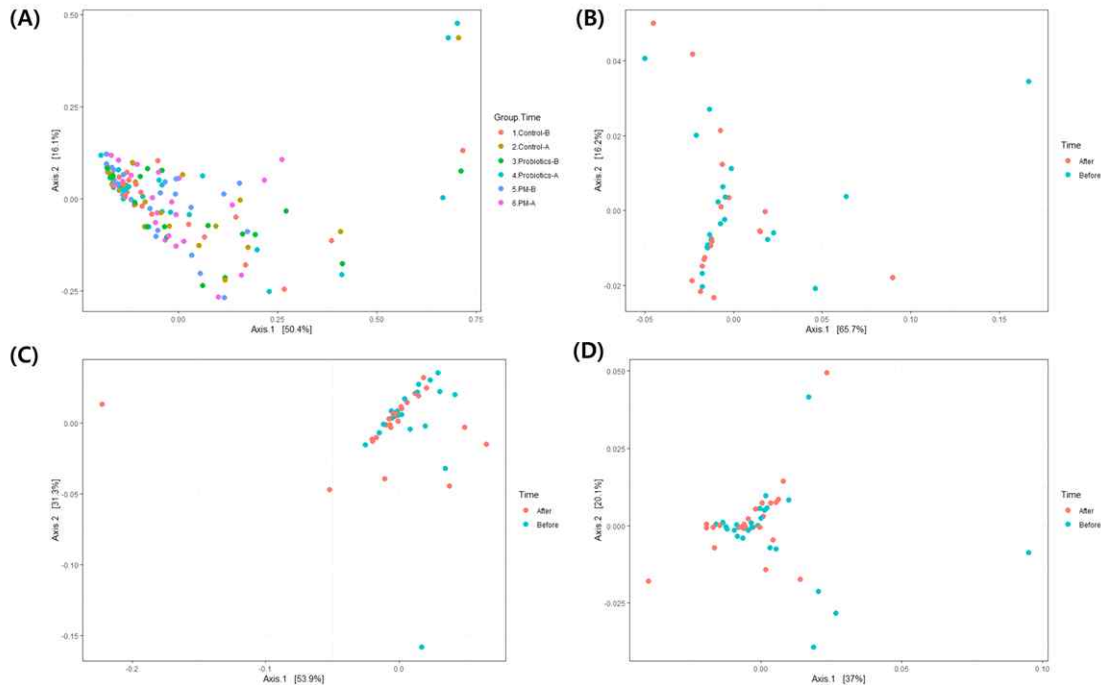


그림 4-24. Beta diversity 분석 결과

(A) 모든 그룹, (B) Control 그룹, (C) Probiotics 섭취 그룹,
(D) Probiotics&Melatonin 섭취 그룹 (Blue dot: Before, Red dot: After)

- β -diversity분석결과 모든 샘플들이 고르게 퍼져있는 것으로 확인되었으며(그림 4-24(A)), 이는 균총 구성에 있어 다양성이 다르며, 섭취 전후 diversity에서 큰 차이가 없는 것으로 확인됨.
- 섭취 전, 후의 차이를 상세하게 확인해보고자 그룹별로 분석결과를 sorting하여 β -diversity분석을 진행함.
- Control그룹, Probiotics섭취 그룹, Probiotics & Melatonin섭취 그룹 모두 섭취 전후 샘플간의 diversity 차이가 명확하게 나뉘지 않음을 확인함.
- 이와 같은 결과는 사람의 경우 섭취 음식이 통일되지 않고 제각각으로 다르고, 입원환자가 아닌 통원환자이기 때문에 Probiotics, Probiotics & Melatonin 섭취가 정확하게 되었는지 확인이 어렵다는 한계점을 가짐.

④ 그룹간 섭취 전, 후의 장내균총 조성 분석

- 대조군과 두 가지 실험군 간의 장내 균총 분석을 Family, Genus수준에서 확인하였음 (그림 4-25).

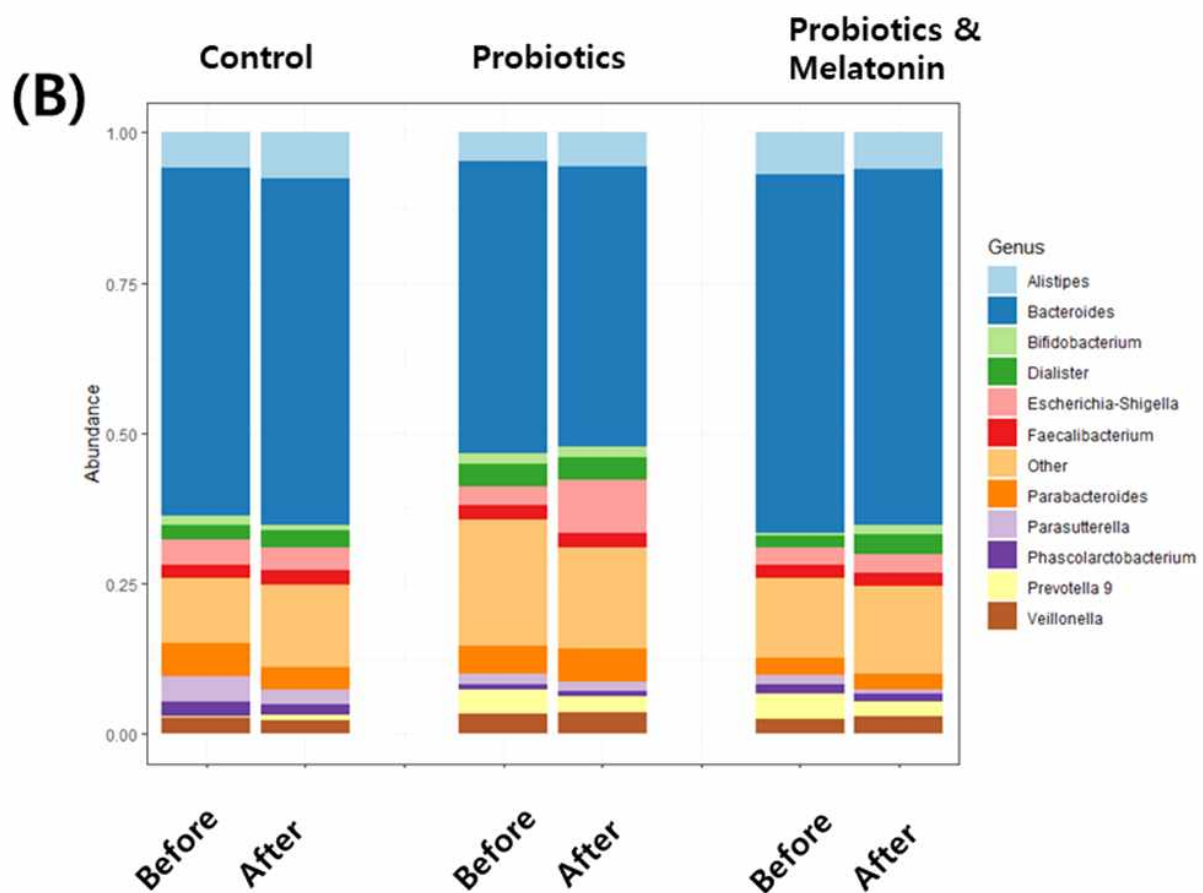
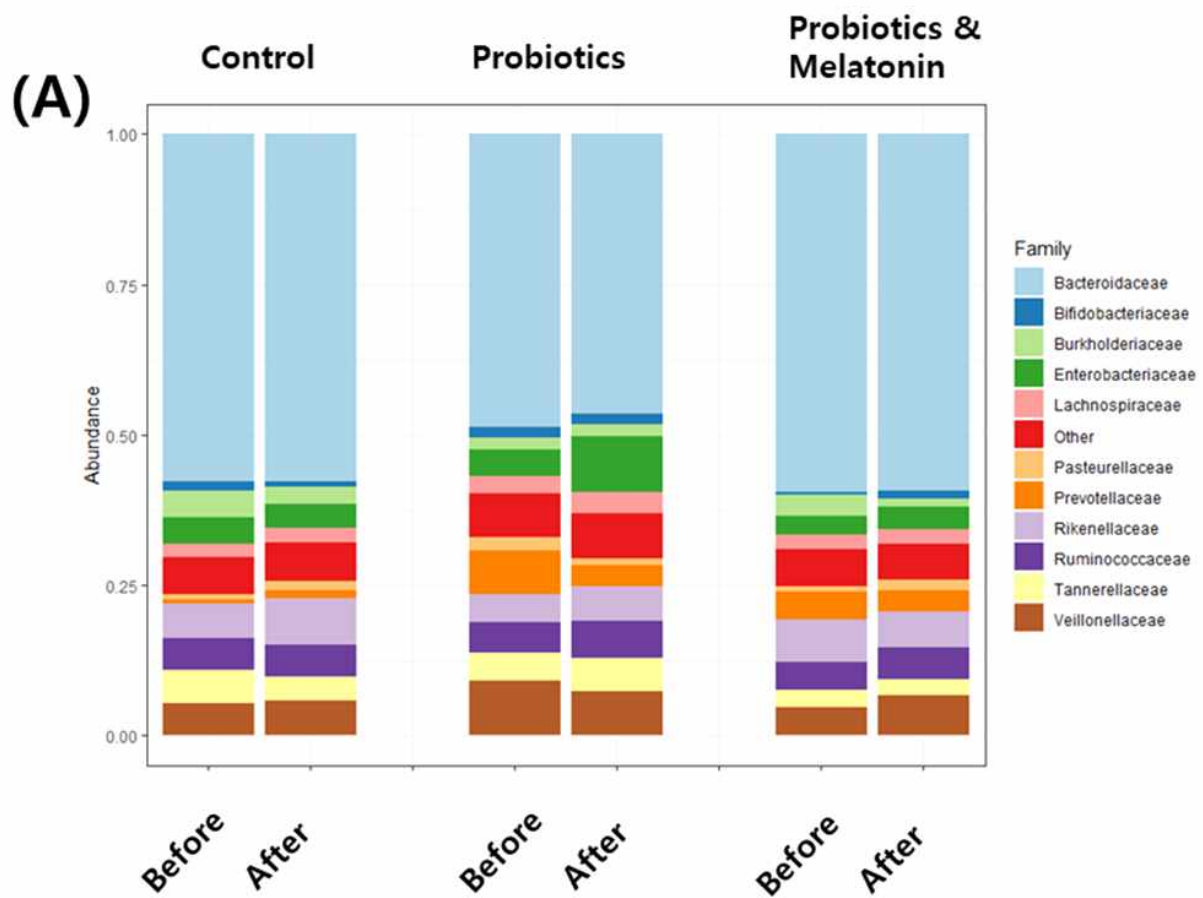


그림 4-25. 장내균총 조성 분석 결과 (A)Family level, (B)Genus level

- 균총 조성 분석 결과 Probiotics, Probiotics & Melatonin 섭취 그룹 모두 Prevotellaceae, *Prevotella* 9의 비율이 감소함을 확인하였음.
- *Prevotella*의 경우 *Prevotella*의 장내 colonization이 장내 염증을 심화시킨다는 이전의 연구결과가 있으며, 이전의 연구결과에서 *P. intestinalis*가 균총 조성을 바꿔 short-chain fatty acid를 감소시키고 이에 따라 IL-18의 생산이 줄어들어 장내 염증을 가속화 시킨다는 연구결과를 발표함 (Aida Ijazovic et al., 2021, Mucosal Immunology).
- 또한 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서 유익균인 Bifidobacteriaceae, *Bifidobacterium*이 증가함을 확인함.
- 또한 해당 분석 결과를 기반으로 Beneficial bacteria (*Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, Lachnospiraceae NK4A136 group, *Lactobacillus*, *Weissella*)와 Harmful bacteria (*Streptococcus*, *Clostridioides*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Prevotella*)의 Abundance 차이를 비교함 (그림 4-26).

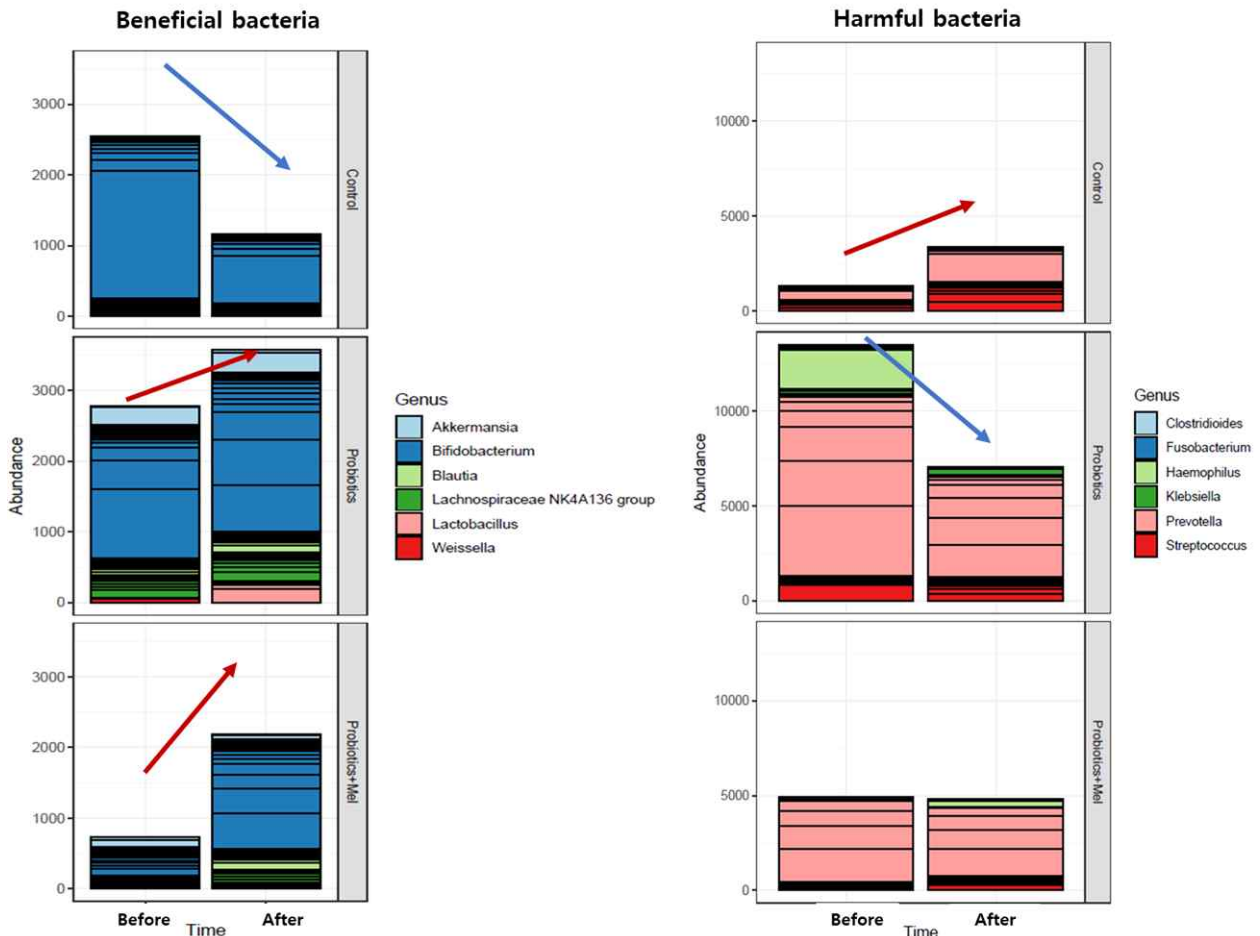


그림 4-26. Beneficial bacteria와 Harmful bacteria의 Group별 abundance 비교 결과

- Probiotics 및 Probiotics & Melatonin을 섭취한 그룹에서는 Beneficial bacteria의 abundance가 증가하는 경향을 확인하였으며, Probiotics를 섭취하지 않은 Control 그룹에서는 Beneficial bacteria가 감소하는 경향을 확인함.
- 또한 Probiotics 를 섭취한 그룹에서는 Harmful bacteria의 abundance가 감소하는 경향을 확인하였으며, Probiotics를 섭취하지 않은 Control 그룹에서는 Harmful bacteria가 증가하는 경향을 확인함.
- 이와 같은 균총 조성 분석 기반으로 균주를 선정하여 환자별 해당 균주의 증감을 분석

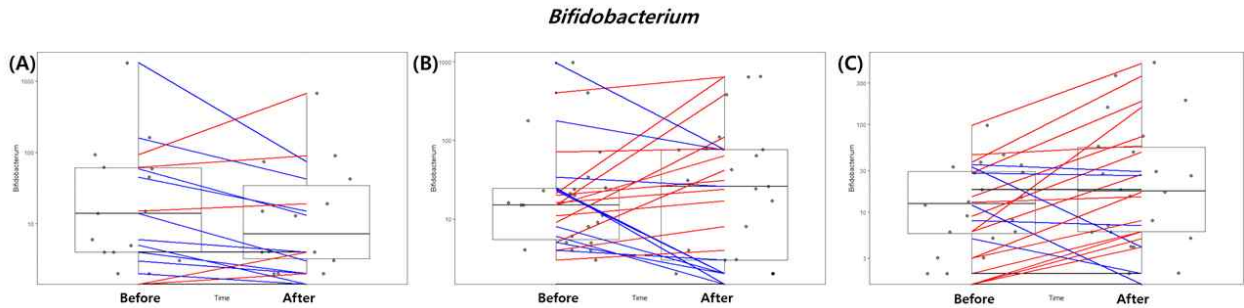


그림 4-27. 환자 별 샘플 섭취 전/후 *Bifidobacterium* 균주 확인 결과
 (A) Control, (B) Probiotics, (C) Probiotics & Melatonin 섭취 그룹
 (Red line: 증가, Blue line: 감소)

- *Bifidobacterium*의 경우 Placebo로 포도당만을 섭취한 Control그룹에 비해서 Probiotics와 Probiotics & Melatonin섭취 그룹에서 확연하게 증가함을 확인함.

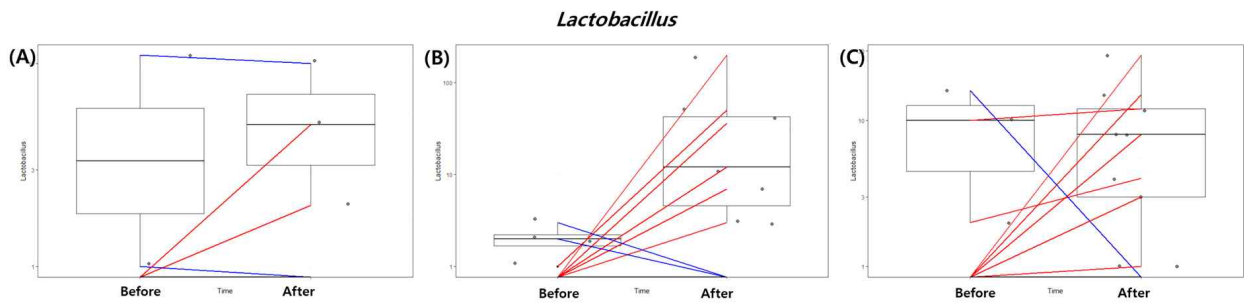


그림 4-28. 환자 별 샘플 섭취 전/후 *Lactobacillus* 균주 확인 결과
 (A) Control, (B) Probiotics, (C) Probiotics & Melatonin 섭취 그룹
 (Red line: 증가, Blue line: 감소)

- *Lactobacillus*의 경우 대부분의 환자에서 거의 없는 것으로 확인되었으나, 그래도 Probiotics, Probiotics & Melatonin섭취 그룹에서 Control그룹에 비해 증가하는 환자가 많음을 확인함.
- *Blautia*와 Lachnospiraceae NK4A136 group의 경우 butyrate producing bacteria로 이 균주들의 감소는 IBD와 관련이 있음이 최근 연구를 통해서 확인되었으며, 해당 균주들을 potential probiotics로서 제안하는 연구도 발표된 바 있음 (Harry Sokol et al., 2017, Gut/Matthias Van Hui et al., 2020, Gut microbes/Xuemei Liu et al., 2021, Gut microbes/Vanessa Stadlbauer et al., 2020, BMC Geriatrics).

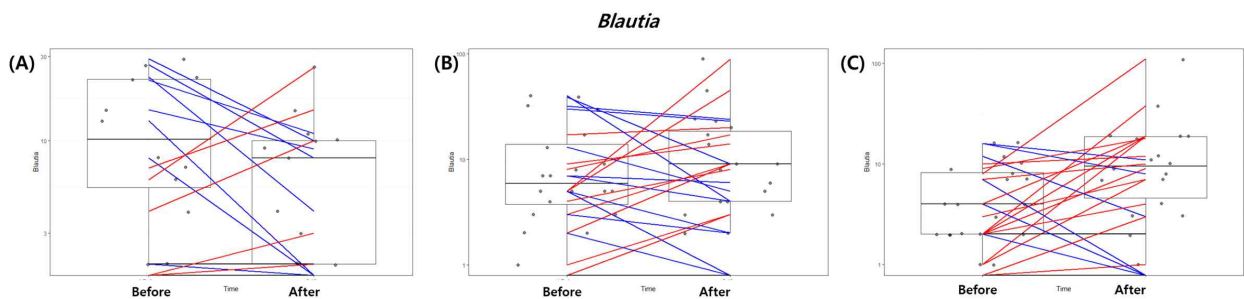


그림 4-29. 환자 별 샘플 섭취 전/후 *Blautia* 균주 확인 결과

(A) Control, (B) Probiotics, (C) Probiotics & Melatonin 섭취 그룹

(Red line: 증가, Blue line: 감소)

- *Blautia*의 경우 Control 그룹에서는 감소하는 경향을 보이지만 Probiotics 섭취 그룹에서는 *Blautia* 균주를 유지하는 것처럼 확인되며, Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서는 증가함을 확인함.

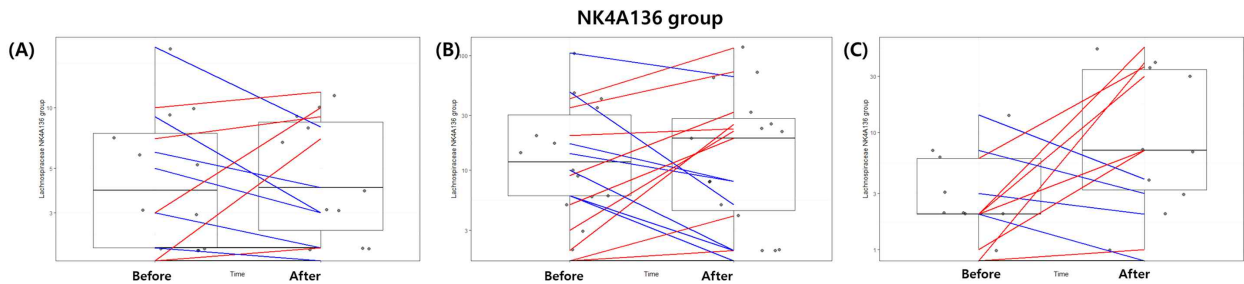


그림 4-30. 환자 별 샘플 섭취 전/후 NK4A136 group 균주 확인 결과

(A) Control, (B) Probiotics, (C) Probiotics & Melatonin 섭취 그룹

(Red line: 증가, Blue line: 감소)

- NK4A136 group의 경우 *Blautia* 와 비슷한 경향으로 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서 가장 많이 증가함을 확인함.

⑤ 임상지표와 장내균총간의 상관관계 분석

- 임상 지표로 복통(Abdominal pain), 헛배부름(Flatulence), 배변불쾌감(Discomfort in defecation), VAS(Visual Analogue Scale; 통증 평가 척도), NRS(Numerical Rating Scale; 통증 평가 척도), IBS-QOL, Insomnia severity index, Calprotectin 지표와 장내 균총과의 상관관계 분석을 통해 임상지표와 장내 균총의 연관성을 확인해보고자 함 (그림 4-31).

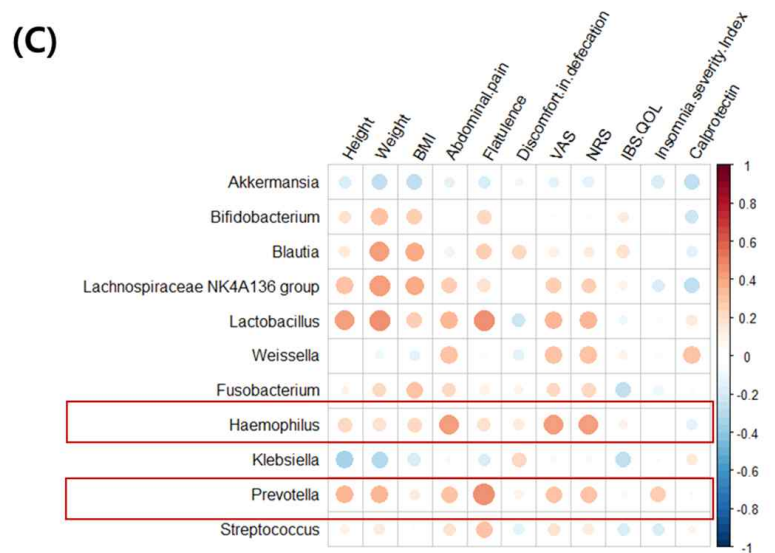
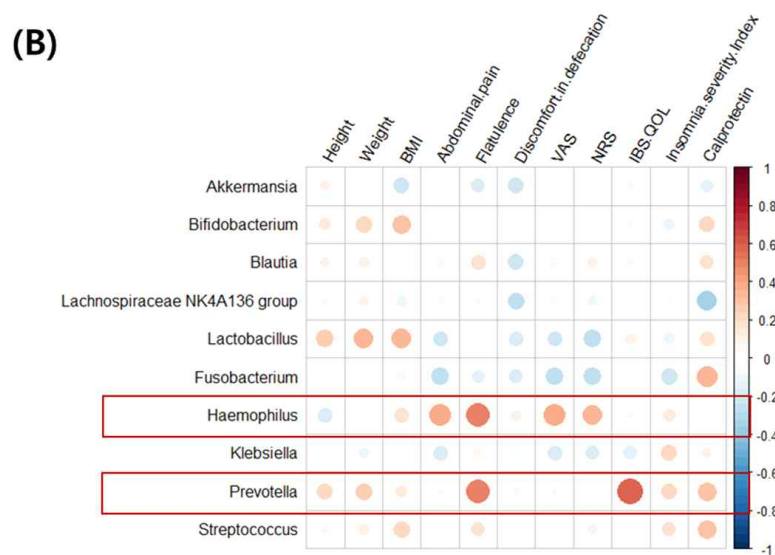
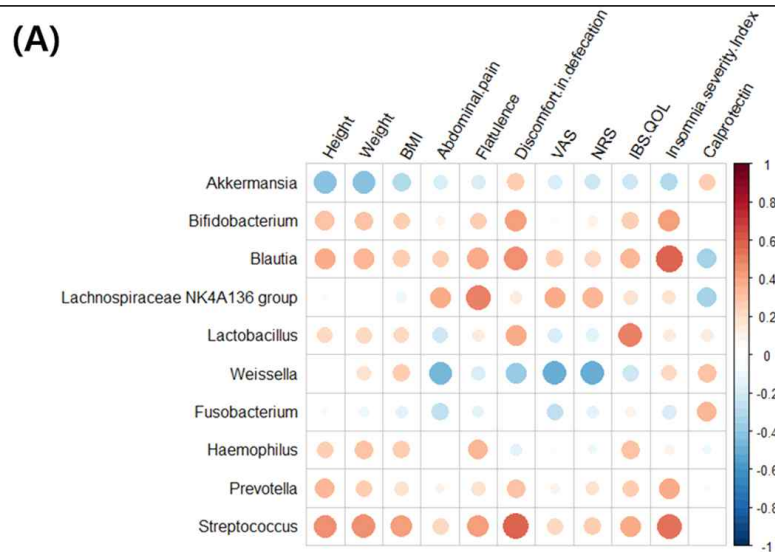


그림 4-31. 임상지표와 장내균총간의 Spearman 상관관계 분석 결과 (A)Control, (B)Probiotics, (C)Probiotics & Melatonin 섭취 그룹

- *Prevotella* 균주의 경우 복통 및 IBS-QOL과 강한 양의 상관관계를 보임을 확인함.
- 이는 *Prevotella*의 비율이 증가 되면 복통 및 장내 염증이 심해짐이 증가한다고 볼 수 있음.
- 앞선 균총 조성 분석에서 *Prevotella* 9의 비율이 Probiotics 및 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서 감소함을 확인함.
- 또한 *Haemophilus* 균주 역시 복통과 헛배부름과 강한 양의 상관관계를 보이는 것을 확인함.
- *Haemophilus parainfluenzae*는 IBD의 증상이 52주간 완화됨을 확인하면서 *H. parainfluenzae*도 감소하는 이전 연구결과를 확인함 (Melanie Schirmer et al., 2018, Cell Host & Microbe).
- 확인 결과 Probiotics 및 Probiotics & Melatonin 섭취한 그룹에서 *Haemophilus*가 감소하는 경향을 확인함 (그림 4-32).

Haemophilus

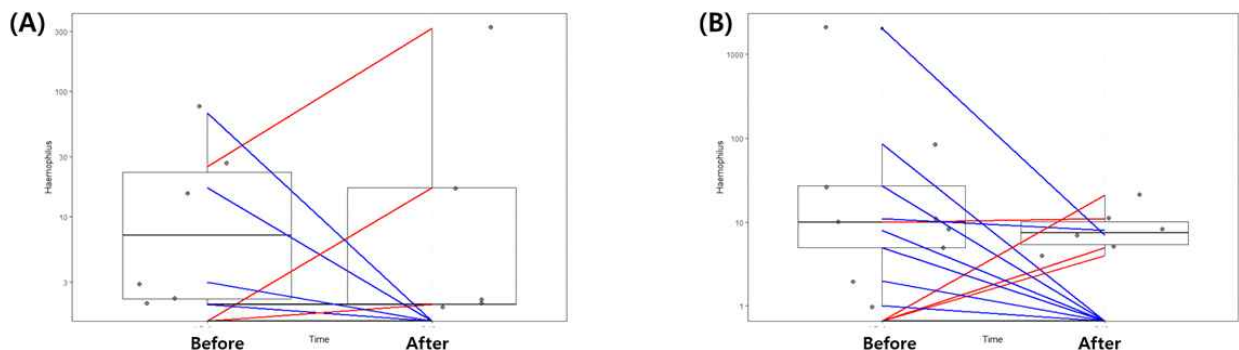


그림 4-32. 환자 별 샘플 섭취 전/후 *Haemophilus* 균주 확인 결과

(A) Probiotics, (B) Probiotics & Melatonin 섭취 그룹 (Red line: 증가, Blue line: 감소)

- 이와 같은 결과는 Probiotics 및 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서 IBD 증상이 완화된다는 결과로 확인됨.
- 결과적으로 임상 환자 분변으로부터 Total fecal DNA 추출 후 생물정보학 분석이 가능한 충분한 read 수를 확보함.
- 생물정보학 분석 결과 Probiotics 및 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹의 α , β -diversity의 큰 변화는 확인되지 않음.
- 이는 Probiotics와 Probiotics & Melatonin 섭취가 장내 균총의 diversity에 큰 변화를 주지 않음을 확인함.
- 장내균총 조성 변화 분석 결과 Probiotics 및 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서 Beneficial bacteria가 증가하고 Harmful bacteria가 줄어드는 것을 확인함.
- 또한 환자 개별로도 확인해본 결과 동일한 경향을 확인함.
- Probiotics 및 Probiotics & Melatonin 섭취 그룹에서 Harmful bacteria인 *Prevotella*와 *Haemophilus* 균주의 감소로 IBD가 개선되는 것으로 추정됨.

5. 청소년 대상 인체적용시험을 통한 만성 스트레스성 장 질환 완화 및 장내 균총 개선 유효성 검증

[제4협동 : 삼성서울병원 최연호]

가. IRB 승인 및 임상시험 준비

1) IRB 승인을 위한 임상시험내용

- 만성 스트레스성 장 질환 환자 90명을 대상으로 피험자의 기본정보와 임상정보를 설문지를 통해 조사하고 IBS-QOL(배변활동 관련 설문) 및 Insomnia severity Index(수면활동 관련 설문)를 확인함.
- 모든 피험자는 첫 주에 혈액 검사 (CBC, CRP, ESR) 등을 확인하여 기저 장내 염증정도를 측정함. 또한 대변검체를 채취하여 치료 전 장내 상재균을 분석함.
- 임상시험 그룹은 총 3그룹으로 대조군(placebo) 30명, 프로바이오틱스 군 30명, 프로바이오틱스 첨가 고기능 소재 고함유 우유 군 30명으로, double blind 방법으로 나눔.
- : A 대조군(placebo), B 프로바이오틱스 군, C프로바이오틱스 첨가 고기능 소재 고함유 우유 군 으로 유의 수준을 0.05로 할 때 가설 검정이 2개 (A vs. B, A vs. C)이므로 다중검정 방법인 bonferroni 방법을 사용하여 유의 수준은 $0.05/2=0.025$ 로 하고 A의 변화량을 0.1로 하고 B의 변화량을 0.46로 했을 경우(ref), 검정력을 80%로 할 때 각 군당 샘플 사이즈는 25명이고 15% 중도 탈락율을 고려하면 각군당 샘플 사이즈는 30명으로 총 90명이 필요함.
- : 탈락률을 15%로 추정한 이유 : 소아 환자를 대상으로 한 연구에서 탈락률이 높을 수 있고, 3개월의 추적 관찰 기간 동안 치료 약제의 변경이나, 질병 악화 등으로 항생제를 사용하는 경우 중도 탈락률이 높아질 수 있어 15%로 추정함.
- 각 그룹에 따라 소재는 6주간 복용함. 6주에 외래에 내원하여 IBS-QOL, Insomnia severity Index 그리고 대변 검체를 채취하여 측정함. 치료 후의 여러 임상 지표를 비교하여 효과를 검증하고, 안정성을 확인함.

표 5-1. 소년 만성 스트레스성 장 질환 대상 유제품 효과 검증 실험계획

방문수	1	2
주수	0	6
동의서	●	
선정/제외 기준	●	
키/체중 측정	●	●
혈액검사(CBC, CRP, ESR)	●	
Calprotectin	●	●
Stool pyrosequencing 샘플링	●	●
이상반응 유무 확인	●	●

2) 피험자의 선정기준, 제외기준, 탈락기준

- ① 선정기준 : 삼성서울병원 소아청소년과 외래에 방문하여 만성 스트레스성 장 질환을 진단(IFS-QOL) 받은 환자로, 연구에 자원한 피험자 후보

- 나이 : 10 ~ 18 세
- 최근의 2개월 내에 약물 복용 이력이 없을 것

② 제외기준

- 염증성 장질환, 복부 수술력
- 임신 및 수유
- 최근 3개월내의 항생제 치료
- 최근 4주 이내에 다른 probiotics/prebiotics 를 복용한 경력이 있는 경우
- 나이 : < 10세, > 18세
- 기타 연구시험 책임자의 판단으로 연구수행이 곤란하다고 판단되는 경우

③ 연구 진행 중 탈락기준

- 연구기간 중 연구진이 요구하는 기본적인 식이, 약물복용을 하지 않는 경우
- 시험약의 투여가 적절히 이루어지지 않은 경우
- 기타 연구시험 책임자의 판단으로 연구수행이 곤란하다고 판단되는 경우

**** IBS-QOL는 만성 스트레스성 장질환 환자의 증상을 평가하는 가장 믿을만한 지표 중 하나로, 배변과 관련된 주관적 증상을 점수화한 설문지이다. 내용은 다음과 같다.**

본 설문지는 만성 스트레스성 장질환 환자의 삶의 질(QOL)을 측정하는 설문 도구입니다. 지난 한 달 (지난 30일) 동안 배변 활동과 관련하여 여러분의 삶에 대해 어떻게 느끼는지에 대해 생각해 주시고 아래의 문항들을 보시기 바랍니다. 각각의 문항에 대해, 당신의 생각을 가장 잘 표현하는 응답에 동그라미를 쳐 주시기 바랍니다.

Q1. 나는 배변 때문에 무력함을 느낀다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q2. 나는 배변으로 인한 냄새에 당황한 적이 있다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q3. 나는 화장실에서 얼마나 많은 시간을 보내는지에 대해 신경이 쓰인다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q4. 나는 배변 때문에 다른 병에도 취약하고 생각한다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q5. 배변 때문에 살이 찌는 것 같이 느껴진다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q6. 배변 때문에 내 삶의 통제력을 잃고 있는 것 같은 생각이 든다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q7. 나는 배변 때문에 삶이 즐겁지 않다고 느낀다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q8. 나는 배변 문제를 이야기할 때 불편함을 느낀다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q9. 나는 배변 때문에 우울한 감정을 느낀다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q10. 배변 때문에 다른 사람으로부터 고립된 기분이다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

Q11. 배변 때문에 먹는 음식의 양을 조심해야 한다고 생각한다.

- ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q12. 나는 배변 때문에 일상 생활에 어려움을 느낀다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q13. 나는 배변 문제 때문에 화가 난다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q14. 나의 배변 문제로 인하여 주변 사람이 짜증을 낸 적이 있다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q15. 배변 문제가 더 심해질까 봐 걱정이 된다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q16. 배변 문제로 인하여 나 자신에 짜증이 난다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q17. 사람들이 내가 배변 문제를 과장한다고 생각할까 봐 걱정이다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q18. 나는 나의 배변 문제로 인해 다른 사람들보다 일을 덜 하는 것 같다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q19. 나는 배변 때문에 스트레스 받는 상황을 피해야 한다고 생각한다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q20. 나의 배변 문제는 나의 욕구를 감소시킨다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q21. 나의 배변 문제는 내가 입을 수 있는 옷을 제한한다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q22. 나는 배변 문제로 인하여 힘든 활동들을 피해야만 한다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q23. 나는 배변 문제로 인하여 먹는 음식을 조심해야 한다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q24. 나는 배변 문제로 인하여 처음 만나는 사람들 곁에 있기가 힘들다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q25. 나는 배변 문제로 인하여 몸이 안 좋다고 느껴진다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q26. 나는 배변 문제로 인하여 내가 깨끗하지 않다고 느껴진다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q27. 나는 배변 문제로 인하여 긴 여행이 힘들다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q28. 나는 배변 문제로 인하여 먹고 싶을 때 못 먹어서 답답하다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q29. 나는 배변 문제로 인하여 화장실 근처에 있는 것이 중요하다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q30. 나는 배변 문제를 중심으로 생활한다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q31. 나는 배변 조절이 안 될까 봐 걱정이다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q32. 종종 대변을 볼 수 없을 것 같이 느껴진다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q33. 내 배변 문제가 나의 가장 가까운 관계에 영향을 미치고 있다
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다
- Q34. 나는 아무도 나의 배변 문제를 이해하지 못한다고 느낀다.
 ① 전혀 그렇지 않다 ② 조금 그렇다 ③ 보통이다 ④ 그렇다 ⑤ 매우 그렇다

- 1일 3회 식사와 상관 없이 1회2봉을 20-40 mL의 물과 섞어 함께 복용함 (아침 8시, 오후 2시, 저녁 8시). 타 약물 복용 시 2시간의 간격을 두고 복용하도록 함.

② 투여기간 : 6주간 복용

③ 섭취 시 주의사항

- 함께 복용하는 물과 음식은 40도 이하로 함.
- 전달된 분말포는 냉장 (2-8℃)보관을 원칙으로 하며 부득이하게 상온 노출 시에는 당일 섭취하도록 함.
- 분말이 미세하므로 입에 털어 넣을 경우는 혀 바깥쪽에 털어 넣고 물과 함께 복용토록 함.
- 찬물에 섞을 때는 완전히 녹지 않고 뭉쳐서 용기에 붙는 경우가 있으므로 잔량이 있는지 확인 하고 완전히 다 섭취 하도록 함.

④ 대조약 사용 시 그 선택사유

- 시험군과 비교하기 위하여 유효 성분을 함유하지 않는 같은 색과 모양의 분말 제형을 복용함으로써 위약효과를 배제할 수 있음. 대조약의 성분은 투약군의 부형제로 이용된 것을 동량으로 혼합한 것을 이용함.

6) 기관윤리심의위원회에 계획서 제출

The screenshot shows the '연구심의 신청 Part 1' (IRB Research Application Part 1) form. The form is titled '연구심의 신청 Part 1' and includes a '복합오류' (Complex Error) button. The form contains the following information:

- 접수처 기재 (IRB에서 기재하는 항목입니다.)**

IRB File No.	2019-09-013	접수처 확인		접수일	
--------------	-------------	--------	--	-----	--
- e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)**

연구책임자	조희	최연호	소아과	삼성서울병원	<input checked="" type="checkbox"/>	신청일	2019.09.04
담당자(1차)	조희				<input checked="" type="checkbox"/>	약리팀	
연구담당자	조희				<input checked="" type="checkbox"/>	약리팀	
- 연구과제명**

국문	청소년 대상 인체적용시험을 통한 만능스트레스성 장 질환 완화 및 장내 균총 개선 유효성 검증
영문	Development of functional dairy products for improvement of gut health in adolescence
- 연구관련자 정보**


No	구분	성명	소속	유대관계	유선전화	e-mail	공적연락처	이메일
1	연구책임자	최연호	삼성서울병원	비공개	비공개	비공개	2021.04.24	<input type="checkbox"/>
2	공동연구자	김미진	삼성서울병원	비공개	비공개	비공개	2021.05.20	<input type="checkbox"/>
3	공동연구자	박지현	삼성서울병원	비공개	비공개	비공개	2020.04.27	<input type="checkbox"/>
4	공동연구자	김은실	삼성서울병원	비공개	비공개	비공개	2021.07.19	<input type="checkbox"/>
5	연구담당자	조희	삼성서울병원	비공개	비공개	비공개	2020.04.01	<input type="checkbox"/>
- 연구구분**
 - 의학용 임상시험(생물 포함)
 - 의료기기 임상시험
 - 임상시험 외 연구
 - PKC, 임상시험용 의학용의 공급사용 등
- 임상시험용 의학용**
 - 관련약사가 관련하는가?
 - 예
 - 아니오
- 연구주최**
 - 연구자 주도
 - 의뢰자 주도
- 분류**
 - 일반
 - 생물학적 제제
 - 세포치료제
 - 건강기능식품
 - 의료기기

그림 5-1. IRB 연구 심의 신청 양식

나. 기관윤리심의위원회 보완 요청 및 시정에 따른 IRB 최종 승인

1) IRB 승인서

SMC202003212002-HE003 2013.12.23 개정본



통지서

※ 본 과제의 문서보존기간은 10 년입니다.

승인	[원할(가람)기관] 농림수산식품부				
연구책임자	소아과 최연호				
IRB File No.	SMC	심사내용	시정계획서	통지일자	2020.05.28
연구과제명	국내 청소년 대상 인체적용시험을 통한 만성스트레스성 장 기능개선 및 장내 균총개선 유효성 검증				
영문	Development of functional dairy products for improvement of gut health in adolescence				
임상시험코드		Study Nick Name			

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료사출 <input type="checkbox"/> 피료기기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급) <input type="checkbox"/> 해당사항없음					
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유체물(감제)연구 <input checked="" type="checkbox"/> 의무기록연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자치료 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포연구 <input type="checkbox"/> 기타 ()					
연구분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 선형적 & 후향적 병행연구 <input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 심문조사 <input type="checkbox"/> 치료분석 및 분석연구					
연구분류4	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 횡단조사연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()					
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)					
일반명	우산균제제	상종명	프로바이오틱스			
전체시험자총래수	전체	99 명	국내	99 명	본원	99 명
연구승인기간	2020.05.27 ~ 2021.05.26					
지원위원회	기관명	농림수산식품부	대표(직위)	장영		
제출서류목록						

1/3

2) IRB 임상시험내용 주요 변경 사항

① 나이: 만 10~만 18세 -> 만 6세~ 만 19세

(변경 사유: 본원 소아청소년과에서 내원하는 스트레스성 장 질환 환자들 중, 초등학생 부터 고등학생까지 폭 넓은 연구대상자 모집을 위해 변경)

② 대상자 수: 90명-> 99명

(가) 대상자 수 산출 배경

- 시험군: 멜라토닌 성분 함유 프로바이오틱스 섭취군
- 대조군: 멜라토닌 성분 미함유 프로바이오틱스 섭취군
- 주 평가 변수 (primary endpoint): **Insomnia severity index (ISI) total score** (7개 문항의 합, 수면을 평가하는 객관화된 지표)
- 관심 모수:

μ_1 =시험군의 임상시험 이전과 이후의 합산점수 차이의 평균 ISI total score

μ_2 =대조군의 임상시험 이전과 이후의 합산점수 차이의 평균 ISI total score

$d=(\mu_1 - \mu_2)/SD = \text{effect size} (= \text{SMD, standardized mean difference})$

→ 참고. Effect size 추측값의 범위: $d=0.2\sim0.73$ (근거: *Figure 3 in reference 1*)

- 연구가설 **$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$**

→ 검정 방법: 양측 이표본 t-검정 (Two-sided two-sample t-test for the difference between two group means with equal-variance)

- 연구 기간 내에 모집 가능한 만성 스트레스성 장질환 소아 대상자의 수: 군당 30~50명

- 목표 검정력: 80%

(나) 대상자 수 산출 결과

표 5-2. sample-size simulation 결과

<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N</i>	<i>d</i>
30	30	60	0.74
33	33	66	0.70
35	35	70	0.68
40	40	80	0.63
45	45	90	0.60
50	50	100	0.57

N1, *N2* = sample sizes of treatment group & reference group, respectively

N = total sample size, *N1* + *N2*

d = minimum effect size detected with *N1* & *N2* when 80% power and significance level of 5% are expected

(Cohen recommended Low = 0.2, Medium = 0.5, and High = 0.8)

※ Table 1의 *N1*, *N2=33* 일 경우

A two-sided two-sample equal-variance t-test with sample sizes of 33 and 33 in treatment and control groups can reject the null hypothesis of zero effect size (i.e., no difference) with at least 80% power when the population effect size is at least 0.70 (i.e., medium to high effect) and the significance level (alpha) is 0.05.

- Software : PASS 2020, v20.0.1

- References :

- i) Ferracioli-Oda, E., Qawasmi, A., & Bloch, M. H. (2013) Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. PloS one, 8(5), e63773.
- ii) Cohen, Jacob. (1988) Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Lawrence Erlbaum Associates. Hillsdale, New Jersey
- iii) Julious, S. A. (2010) Sample Sizes for Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC. Boca Raton, FL

나. 인체적용시험을 통한 청소년 스트레스성 장 질환 완화 및 장내 균총 개선 유효성 검증

1) 만성 스트레스성 장 질환 소아청소년 환자 모집

- ① 원내 오프라인, 온라인 게시판에 연구대상자 모집공고 게시물 부착하여 모집함 (그림 5-2).

연구대상자 모집

임상시험 목적
청소년 대상 인지적행동시행을 통한 만성스트레스성 장 기능 개선 및 장내 균총 개선 유요성 검증

시험대상자 선정기준
-삼성서울병원 소아청소년과 외래에 방문하여 만성 스트레스성 장 질환을 진단(IRS-QOL) 받은 환자로, 연구에 자발한 대상자
-나이: 만 6세 ~ 만 19세 미만
-최근 2개월 내에 약물 복용 이력이 없을 것

임상시험 방법
-시험식물군a, 시험식물군b, 대조식물군에 1:1:1로 무작위 배정
-시험식물군a(프로바이오틱스), 시험식물군b(알라토닌 성분) 함유된 프로바이오틱스, 대조식물군(분유 소제)
-참여기간은 총 6주로 서울주유에서 개발한 시험용 유산균정제를 6주간 복용하고 총 2회 방문 예정
-방문시 신체검사, 체질, 분변검사, 설문지 검사 시행

무작위
-올림픽 시 실선, 동전 또는 영 등을 포함할 수 있음; 드물게, 바늘 삽입 부위에 국한 출혈 또는 통증이 있을 수도 있음
-유용성 기반으로 만든 물감료, 유당과 관련된 설사, 묽은 변, 알레르기 (두드러기, 가려움증, anaphylaxis 이나 발작시스-과민성 쇼크) 등의 부작용이 있을 수 있음
-프로바이오틱스 관련하여 아주 드물게 면역 저하자에게서 패혈증, 심내막염, 폐렴 등의 중대 감염이 보고된 바 있음
-이 외에 예측하지 못한 부작용이 있을 수 있음


제품에 대한 정보
장 기능 개선 효과가 예상되는 연약기능식품으로 개발 중인 유산균 제제입니다.

시험책임자: 삼성서울병원 소아청소년과 최연호 (서울특별시 강남구 일원로 81 삼성서울병원)
연구 담당자: 강소희 연구원 02-2008-4073 (연락가능시간: 09:00~16:00)

그림 5-2. 임상시험 연구대상자 모집글

② 만성 스트레스성 장질환 증세를 호소하며 삼성서울병원 소아청소년과 외래를 찾는 환자를 대상으로 모집함.

- IRS-QOL 설문 조사를 하여, 만성 스트레스성 장 질환 진단을 받은 환자의 동의서를 획득함. 만 15세 이하 대상자는 승낙서와 같이 획득함 (그림 5-3).



[서식 35] <2013.05.20> 페이지 1 / 12

연구 동의서


동의서 버전 또는 버전 날짜: Version 2 date_20200824

연구 제목	청소년 대상 인지적행동시행을 통한 만성스트레스성 장 기능 개선 및 장내 균총 개선 유요성 검증				
연구책임자	(성명) 최 연 호 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-3410-3527				
공동연구자	(성명) 김 미 진 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-3410-0951				
공동연구자	(성명) 김 은 실 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4073				
공동연구자	(성명) 권 이 영 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4073				
공동연구자	(성명) 최 영 옥 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4082				
연구담당자	(성명) 강 소 희 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4073				
24시간 연구자 연락처	(성명) 최 연 호 (연락처) 02-3410-3527				

* 만일 본 연구에 동의사항이 있으시거나, 위험이나 불편 또는 손상이 발생할 경우, 상기 연구책임자 또는 연구담당자에게 연락하여 주시기 바랍니다.

1. 참여 권유
본 연구책임자는 귀하(또는 귀하의 자녀)로부터 임상시험 참여에 대한 동의를 받고 이를 문서화 할 때 관련 규정을 준수하며 핵심키션언어 근거한 윤리적 원칙을 바탕으로 합법적인 절차를 따를 것입니다.
귀하(또는 귀하의 자녀)는 본 임상시험에 참여할 것인지를 여부를 결정하기 전에, 이 동의서를 신중하게 읽어보셔야 합니다. 이 연구가 왜 수행되며, 무엇을 수행하는지 귀하(또는 귀하의 자녀)가 이해하는 것이 중요합니다. 이 임상시험에 대하여 설명한 아래 글을 읽으면서 어떤 질문이라도 할 수 있습니다. 충분한 시간을 가지고 결정해 주십시오.
귀하(또는 귀하의 자녀)께서 궁금해 하는 모든 질문에 대해 답을 얻으셨고, 이 시험에

SAMSUNG MEDICAL CENTER
Jiwon-ro 81, Gangnam-gu
Seoul, Korea



[서식 35-4] 페이지 1 / 5

연구참여 승낙서(assent form)

승낙서 버전 또는 버전 날짜: Version 2 date_20200824

연구 제목: 청소년 대상 인지적행동시행을 통한 만성스트레스성 장 기능 개선 및 장내 균총 개선 유요성 검증

위와 연구목적: 스트레스성 장 질환을 호소하는 청소년을 대상으로 프로바이오틱스와 알라토닌 성분 함유 프로바이오틱스의 비교 평가

연구책임자	(성명) 최 연 호 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-3410-3527
공동연구자	(성명) 김 미 진 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-3410-0951
공동연구자	(성명) 김 은 실 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4073
공동연구자	(성명) 권 이 영 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4073
공동연구자	(성명) 최 영 옥 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4082
연구담당자	(성명) 강 소 희 (소속) 소아청소년과 (연락처) 02-2008-4073

1. 연구(임상시험)란 무엇인가요?
연구(임상시험)이란 학교에서의 과학 프로젝트와 비슷하지만 그보다 조금 더 어려운 것입니다. 의사와 과학자들이 건강에 대해 더 많은 것을 알고자 할 때, 그들은 어떤 치료법이 사람들에게 도움이 되는지 알아보고 사람들에게 해롭지 않은지 확인하기 위해 사람들에게 치료법을 시험해야 합니다.

2. 나에게 왜 이런 이야기를 하시나요?
최근에 유산균이 장 기능 개선 효과가 있다는 연구결과가 많이 있습니다. 특히 청소년들 중에 확립 스트레스나 기타 증상으로 배가 아프거나 소화가 안되어 병원에 오는 경우가 많은데 그런 여러문제를 위해 유산균이 장 건강에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되어서

SAMSUNG MEDICAL CENTER
Jiwon-ro 81, Gangnam-gu
Seoul, Korea

그림 5-3. 임상시험 연구대상자 동의서 및 승낙서

- 선정/제외 기준 확인
- 대상자의 기본정보(나이, 성별) 조사, 키, 체중 측정
- Insomnia severity Index (수면을 평가하는 객관화된 지표) 조사
- 혈액검사(CBC, CRP, ESR): 기저 장내 염증정도 측정
- Stool pyrosequencing 샘플링: 대변 검체를 채취하여 치료 전 장내 상재균을 분석

증례기록서 (Case Report Form)

연구제목: 청소년 대상 인체적용시험을 통한 만성스트레스성 장 질환 개선 및 장내 균총 개선 유효성 검증

등록일 (YY/MM/DD)	
Case No.	
Patient name (initial)	
Diagnosis date (YY/MM/DD)	

선정 기준

1. 만 6 세 이상, 만 19 세 미만의 만성 스트레스성 장 질환 환자로 상경서울병원 소아청소년과 외래에 방문하여 연구에 자원한 피험자 후보	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
2. 시험에 앞서 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분한 설명을 듣고 자발적으로 시험 동의서에 서명한 자	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
3. 시험기간 동안 추적관찰이 가능한 자	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	

제외 기준

1. 위장병 증질환, 복부 수술력	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
2. 임신 및 수유	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
3. 최근 6개월내의 항생제 치료	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
4. 최근 4 주 이내에 다른 probiotics/prebiotics 를 복용한 경력이 있는 경우	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
5. 나이 : < 6 세, > 19 세	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	
6. 기타 연구시험 적절자의 판단으로 연구수행이 곤란하다고 판단되는 경우	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	

1

그림 5-4. 임상시험 증례기록서

2) 인체적용시험을 통한 청소년 스트레스성 장 질환 완화 유효성 검증

- 그룹과 상관없이 Visit 1 (약제 복용 전)과 visit 2 (약제 복용 후)를 비교하였을 때, visit 2의 점수들이 visit 1에 비해 낮아진 것을 볼 수 있었음.
- 주관적인 복통증상에 대해 평가한 점수에서 visit 1의 경우 평균 53.5점으로 평가되었으나, visit 2 때 19.5점으로 감소한 것을 볼 수 있었음.

표 5-3. 복통 증상에 대한 임상 평가 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	0	10	35	50	50	20
환자2	40	40	50	0	50	0
환자3	75	50	70	20	70	20
환자4	50	40	80	40	60	20
환자5	60	20	50	0	50	20
환자6	70	50	70	60	60	10
환자7	65	50	80	10	30	0
환자8	70	50	60	0	80	30
환자9	50	30	30	0	50	10
환자10	40	40	85	40	68	20
환자11	30	0	30	0	85	35

환자12	50	20	70	20	60	10
환자13	85	0	60	20	70	20
환자14	60	20	50	10	30	20
환자15	20	20	60	50	70	0
환자16	60	50	10	0	50	10
환자17	50	40	70	20	30	0
환자18	70	30	30	0	20	0
환자19	60	0	40		80	50
환자20	0	0	50	0	70	30
환자21			75	30	40	0
환자22			80	20	50	10
환자23					50	0
환자24					70	10
환자25					30	0

- 헛배부름의 경우에도 visit 1의 경우 평균 18.2점으로 평가되었으나, visit 2의 경우 3.7점으로 감소하였음.

표 5-4. 헛배부름 증상에 대한 임상 평가 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	0	0	0	30	0	0
환자2	70	50	0	0	0	0
환자3	0	10	0	0	50	10
환자4	30	30	40	0	0	0
환자5	0	0	0	0	0	0
환자6	20	20	100	70	10	0
환자7	0	0	20	0	0	0
환자8	0	0	70	0	60	10
환자9	0	0	70	0	0	0
환자10	0	0	0	0	0	0
환자11	50	0	0	0	85	15
환자12	10	0	20	0	0	0
환자13	0	0	70	10	0	0
환자14	0	0	0	0	0	0
환자15	0	0	0	0	0	0
환자16	10	10	0	0	0	0
환자17	0	0	0	0	10	0
환자18	0	0	0	0	0	0
환자19	30	0	20		0	0
환자20	0	0	30	0	30	0
환자21			10	0	0	0
환자22			50	0	0	0
환자23					10	0
환자24					10	0
환자25					70	10

- 배변 불편감의 경우 visit 1 때 34.2점으로 평가되었으나, visit 2 때 8.8점까지 감소하였음.

표 5-5. 배변 불편감에 대한 임상 평가 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2

환자1	0	0	45	0	60	0
환자2	30	20	0	0	0	0
환자3	20	20	60	0	0	0
환자4	20	20	15	0	0	0
환자5	40	10	30	0	30	10
환자6	50	30	80	50	50	0
환자7	30	30	40	0	30	10
환자8	10	0	80	10	0	0
환자9	10	0	40	0	0	0
환자10	20	10	70	0	25	0
환자11	0	0	10	0	85	20
환자12	50	0	50	10	60	0
환자13	50	0	60	10	0	0
환자14	10	0	20	0	0	0
환자15	70	70	0	0	40	0
환자16	10	10	0	0	10	0
환자17	20	10	10	0	50	0
환자18	0	0	0	0	20	0
환자19	70	0	50		50	50
환자20	0	0	70	10	50	10
환자21			80	30	60	0
환자22			40	10	10	0
환자23					50	0
환자24					50	20
환자25					30	10

- 보통 빈도의 경우 visit 1의 조사에서 1.23회/일, 8.62회/주의 빈도를 보였으나 visit 2에서는 0.37회/일, 2.49회/주 빈도로 감소하였음.

표 5-6. 보통 빈도에 대한 임상 평가 결과

	Placebo				4B15				Melatonin+4B15			
	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주
	Visit 1		Visit 2		Visit 1		Visit 2		Visit 1		Visit 2	
환자1	0	0	0	0	2.5	16	0.3	3	1	7	2	5
환자2	3	21	2	14	0.5	2	0	0	1	7	0	0
환자3	0	2	1	7	2	14	1	7	1	7	0	0
환자4	2	14	1	7	2	14	0	0	0.5	3	0	1
환자5	3	21	0	0	1	7	0	0	2	14	0	0
환자6	1	7	1	7	2	14	1	7	2	14	0	0
환자7	2	14	1	7	2	14	0	0	0.3	2	0	0
환자8	1	5	0	0	0.3	3	0	0	2	14	1	7
환자9	0.7	5	0.3	2	1	7	0	0	1	7	0	0
환자10	1	7	1	7	1	7	0.4	3	1	7	0	2
환자11	0.6	4	0	0	1	7	0	0	2	14	0	2
환자12	0.4	3	0.3	2	2	14	0.3	2	1	7	0	1
환자13	1	7	0	0	1	7	0.3	2	1	7	0	1
환자14	1	7	0.3	2	0.4	3	0	0	1	7	0.3	2
환자15	1	7	1	7	1	7	1	7	0.4	3	0	0
환자16	2	14	1	7	0	0	0	0	1	7	0.3	2
환자17	1	7	1	7	0.4	3	0	1	1	7	0	0
환자18	5	35	2	14	0	1	0	0	0.3	2	0	0
환자19	1	7	0	0	1	7			2	14	1	7
환자20	0	1	0	0	1	7	0	0	2	14	0	0
환자21					2	14	1	1	2	14	0	0

환자22					2	14	0	1	0.4	3	0	1
환자23									0.4	3	0	0
환자24									2	14	0.4	3
환자25									1	7	0	0

- 배변 빈도의 경우 visit 1의 조사에서 1.48회/일, 10.3회/주의 빈도를 보였으나, visit 2에서는 1.01회/일, 7.0회/주 빈도로 감소하였음.

표 5-7. 배변 빈도에 대한 임상 평가 결과

	Placebo				4B15				Melatonin+4B15			
	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주	회/일	회/주
	Visit1		Visit2		Visit1		Visit2		Visit1		Visit2	
환자1	1	7	1	7	2	10	1	7	4	28	2	5
환자2	2	15	2	14	1	7	1	7	1	7	0.6	4
환자3	1	7	1	7	3	18	1	7	1	7	1	7
환자4	3	21	2	14	1	7	1	7	1	7	1	7
환자5	1	7	1	7	2	14	1	7	2	14	1	7
환자6	1	7	1	7	4	28	2	14	2	14	1	7
환자7	1	7	1	7	3	21	1	7	3	21	1	7
환자8	0.5	4	1	7	2	14	1	7	1	7	1	7
환자9	3	21	1	7	0.7	5	1	7	1	7	1	7
환자10	1	7	1	7	3	21	1	7	2	14	1	7
환자11	2	14	1	7	1	7	1	7	2	14	1	7
환자12	0.7	5	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7
환자13	1	7	1	7	3	21	1	7	0.3	3	1	7
환자14	0.3	2	1	7	1	7	1	7	0.4	3	1	7
환자15	1	7	1	7	0.7	5	0.7	5	0.4	3	1	7
환자16	2	14	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7
환자17	1	7	1	7	0.4	3	0.7	5	0.6	4	1	7
환자18	1	7	1	7	1	7	1	7	0.6	4	0.7	5
환자19	1	7	1	7	1	7			1	7	1	7
환자20	0.7	5	0.7	5	2	14	1	7	2	14	1	7
환자21					2	14	0.7	5	3	21	1.3	10
환자22					1	7	1	7	1	7	1	7
환자23									2	14	1	7
환자24									2	14	1	7
환자25									1	7	1	7

- 병적인 증상을 시사하는 야간 배변이나 야간 복통의 경우는 visit 1과 visit 2의 차이점이 확인되지 않았음. 이는 연구에 참여한 환자들이 기질적 질환이 있지 않고 기능적 문제를 가진 것이라는 사실을 뒷받침해주는 근거로 볼 수 있음.

표 5-8. 야간 배변에 대한 임상 평가 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	2	2	2	2	1	2
환자2	2	2	2	2	2	2
환자3	2	2	2	2	2	2
환자4	2	2	2	2	2	2
환자5	2	2	2	2	2	2
환자6	2	2	2	2	2	2
환자7	2	1	2	2	2	2
환자8	2	2	2	2	2	2

환자9	2	2	2	2	2	2
환자10	2	2	2	1	2	2
환자11	2	2	2	2	1	1
환자12	2	2	2	2	2	2
환자13	2	2	2	2	2	2
환자14	2	2	2	2	2	2
환자15	2	2	2	2	2	2
환자16	2	2	2	2	2	2
환자17	2	2	2	2	2	2
환자18	2	2	2	2	2	2
환자19	2	2	2	2	2	2
환자20	2	2	2	2	2	2
환자21			2	2	2	2
환자22			2	2	2	2
환자23					2	2
환자24					2	2
환자25					2	2

표 5-9. 야간 복통에 대한 임상 평가 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	2	2	2	2	2	2
환자2	1	2	2	2	2	2
환자3	2	2	2	2	2	2
환자4	2	2	2	2	2	2
환자5	2	2	2	2	2	2
환자6	2	2	2	2	2	2
환자7	2	2	2	2	2	2
환자8	2	2	2	2	2	2
환자9	2	2	2	2	2	2
환자10	2	2	2	2	2	2
환자11	2	2	2	2	2	2
환자12	2	2	2	2	2	2
환자13	2	2	2	2	2	2
환자14	2	2	2	2	2	2
환자15	2	2	2	2	2	2
환자16	2	2	2	2	2	2
환자17	2	2	2	2	2	2
환자18	2	2	2	2	2	2
환자19	2	2	2	2	2	2
환자20	2	2	2	2	2	2
환자21			2	2	2	2
환자22			2	2	2	2
환자23					2	2
환자24					2	2
환자25					2	2

- 삶의 질을 종합적으로 평가하는 IBS-QOL 점수 평가에서 visit 1의 경우 62.1점이었으나, visit 2 때 46.4점으로 삶의 질이 향상된 것을 볼 수 있었음.

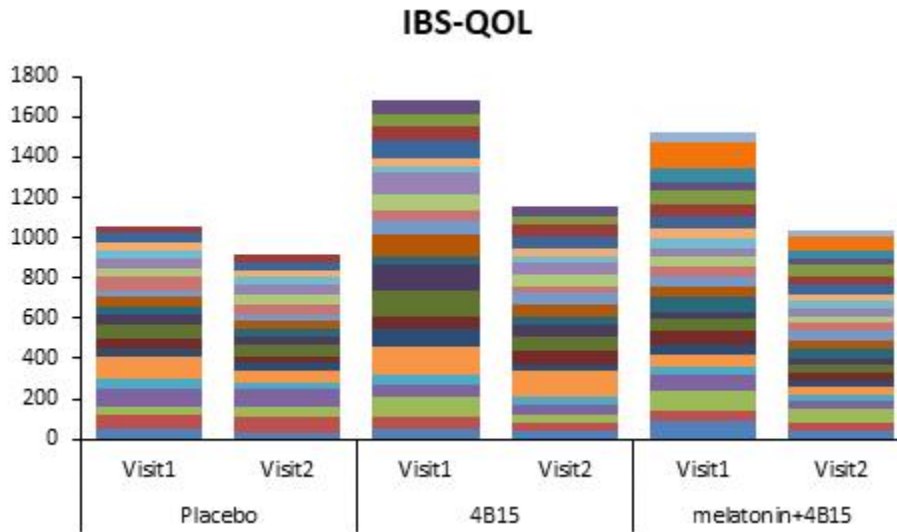


그림 5-5. IBS-QOL 설문조사 결과

표 5-10. IBS-QOL 설문조사 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	50	34	50	38	95	43
환자2	70	76	65	42	50	37
환자3	41	50	91	44	97	72
환자4	91	87	65	49	74	39
환자5	45	34	44	37	42	34
환자6	115	59	147	127	61	36
환자7	41	39	88	36	49	34
환자8	42	34	60	65	66	34
환자9	78	55	127	68	60	36
환자10	42	38	126	66	35	34
환자11	44	40	42	34	78	55
환자12	47	38	110	66	51	35
환자13	34	34	66	52	50	47
환자14	63	50	54	38	53	40
환자15	45	45	81	55	46	35
환자16	49	53	106	57	41	38
환자17	37	37	34	34	45	34
환자18	39	34	39	34	51	34
환자19	49	43	85	63	58	50
환자20	34	34	70	58	58	43
환자21			61	45	77	54
환자22			67	50	41	34
환자23					64	38
환자24					130	66
환자25					54	36

- 수면을 평가하는 insomnia severity index 평가로는 visit 1때 5.5점이었으나, visit 2 때 2.8점으로 수면의 질 또한 향상된 것을 볼 수 있었음.

Insomnia severity Index

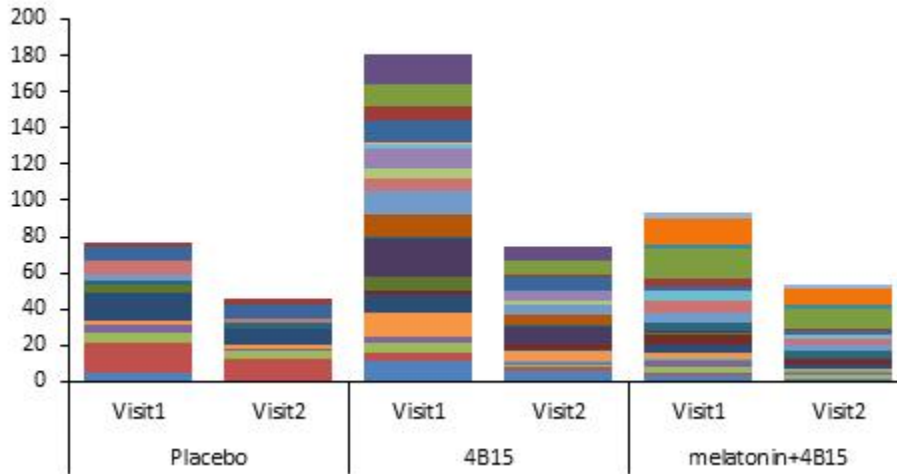


그림 5-6. Insomnia severity index 설문조사 결과

표 5-11. Insomnia severity index 설문조사 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	5	1	12	6	4	2
환자2	16	12	4	2	1	0
환자3	6	4	5	1	3	2
환자4	4	1	4	1	4	1
환자5	0	0	0	1	1	1
환자6	3	2	13	6	3	1
환자7	15	9	10	1	4	2
환자8	0	0	2	2	6	4
환자9	4	0	8	0	1	0
환자10	0	0	21	10	1	0
환자11	3	3	1	1	4	4
환자12	0	0	12	6	1	0
환자13	3	0	13	5	5	3
환자14	8	3	7	0	7	4
환자15	0	0	6	3	0	0
환자16	0	0	11	5	0	0
환자17	0	0	2	0	5	2
환자18	0	0	1	0	0	0
환자19	8	8	12	8	2	2
환자20	2	3	8	1	5	1
환자21			12	8	16	11
환자22			17	7	0	0
환자23					3	3
환자24					14	8
환자25					3	3

- 염증 지표로 평가된 분변 내 calprotectin 분석 결과로는 visit 1때 42.00이었으나, visit 2 때 43.2로 증가하는 경향을 나타내었음. Placebo 그룹과 4B15 섭취 그룹에서는 visit 1에 비해 visit 2에서 calprotectin 함량이 증가하였으나, melatonin+4B15 섭취 그룹에서는 유일하게 감소하였음. Melatonin이 염증 수치를 감소시킨 것으로 확인할 수 있었음.

Calprotectin

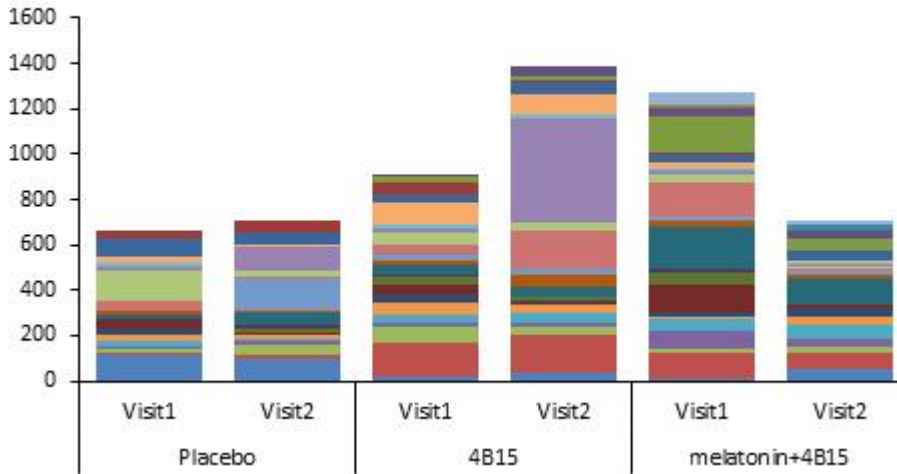


그림 5-7. Calprotectin 분석 결과

표 5-12. Calprotectin 분석 결과

	Placebo		4B15		Melatonin+4B15	
	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2	Visit1	Visit2
환자1	112.9	101.5	13.9	35	8.3	54
환자2	13	17	156	168	115	72
환자3	13	44	69	32	18	28
환자4	15	11	14	19	82	28
환자5	23	16	38	46	49	66
환자6	23	11	57	38	8.7	36
환자7	31	5.8	36	7.7	18	32
환자8	38	4	37	9.7	125	18
환자9	<3.8	19	37	16	50	5.9
환자10	9.8	15	6.9	<3.8	24	<3.8
환자11	17	55	51	42	187	115
환자12	9.9	9.8	11	57	23	15
환자13	8.4	140	33	25	20	14
환자14	38	13	41	164	149	13
환자15	136	25	55	41	35	4.9
환자16	20	103	14	458	16	12
환자17	15	5.7	19	14	9.2	6.5
환자18	21	7.4	102	90	23	7.3
환자19	85	48	30	52	37	49
환자20	36	59	53	11	10	<3.8
환자21			28	18	164	52
환자22			5.1	46	30	32
환자23					11	25
환자24					5.1	6
환자25					56	20

- 대조군(placebo), 프로바이오틱스 군, 프로바이오틱스 첨가 고기능 소재 고함유 우유 군을 각각 나눠서 평가해 보았을 때도 전체 분석과 동일한 경향성을 나타내는 것을 볼 수 있었음.

-
- 이를 통해 기능성 장 질환 환자들의 경우 대조군(placebo)도 복통 및 삶의 질 개선에 효과가 있다는 것을 예측할 수 있음.
 - 멜라토닌이 함유된 프로바이오틱스를 복용한 군의 경우, 다른 군에 비해 수면의 질 향상 정도가 더 뛰어났는데 대조군(placebo) 군에서 visit 1과 visit 2의 수면 개선 차이 1.6점, 프로바이오틱스 군에서 visit 1과 visit 2의 수면 개선 차이 1.8점에 비해 멜라토닌이 함유된 프로바이오틱스 군의 경우 4.7점의 호전도를 보였음.
 - 이를 통해 실제 멜라토닌의 섭취가 수면의 질을 상승시키는 것으로 볼 수 있음.
-

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

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10	10	10		10	10						10	10		10		10	
1차년도	목표			2					-		1		2	3		-			
	실적			2					1		-		-	3		3			
2차년도	목표	1		-							2		2	3		1		1	
	실적	-		69							5		4.27	4		2		1	
3차년도	목표	1	1		1						2		2	3		1		1	
	실적	2	-		1						1		1.95	1		7		2	
소계	목표	2	1	2	1						5		2	9		2		2	
	실적	2	0	69	1				1		6		3.88	8		12		3	
종료 1차년도			1								1		3					1	
종료 2차년도																			
종료 3차년도																			
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소계	0	1	0	0		0	10,000				1		3	0		0		1	
합계	2	2	2	1		3	10,000				6		2.25	9		2		3	

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Ingestion of Gouda cheese ameliorates the chronic unpredictable mild stress in mice	Food Science of Animal Resources (2.471)	김영훈	40(1)	대한민국	한국축산식품학회	SCI	2020.01.01	2636-0772	

2	Microbiome study of Initial gut microbiota from newborn infants to children reveals that diet determines its compositional development Complete	Journal of Microbiology and Biotechnology (2.351)	구혜진, 김유태	30(7)	대한민국	한국미생물생명공학회	SCI	2020.04.09.	1017-7825
3	chromosome and plasmid sequences of <i>Staphylococcus aureus</i> strain JDFM SA01, isolated from a milk filter in Korean dairy farm	Journal of Animal Science and Technology (2.225)	김영훈	62(3)	대한민국	한국축산학회	SCI	2020.05.31	2672-0191
4	Glycated milk protein fermented with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ameliorates the cognitive health of mice under mild-stress condition	Gut Microbes (10.245)	정재연, 김영훈, 김형욱, 김세현	11(6)	US	Taylor and Francis	SCI	2020.06.23	1949-0976
5	Dietary bovine milk-derived exosomes improve bone health in an osteoporosis-induced mouse model	Journal of Dairy Science (4.034)	김영훈	103(9)	US	American Dairy Science Association	SCI	2020.09.01	0022-0302
6	Comparative analysis of dietary exosome-derived microRNAs from human, bovine and caprine colostrum and mature milk	Journal of Animal Science and Technology	윤보현	63(3)	대한민국	한국축산학회	SCI	2021.03.31	2672-0191

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	American Society for Microbiology 46 th Annual Meeting and International Symposium of KMB	김선균	2019.06.21	San Francisco	미국
2	(Characterization of raw milk microbiota and spore-forming bacteria in Korean dairy farms)	류상돈	2019.06.24	제주ICC컨벤션센터	대한민국
3	2019 KoSFoST International symposium and annual meeting 한국미생물생명공학회	박민희	2019.06.27	송도 컨벤시아	대한민국
4	47th Annual Meeting & Symposium 한국미생물생명공학회	김지현	2020.09.23	online e-conference	대한민국
5	47th Annual Meeting & Symposium 한국미생물생명공학회	박민선	2020.09.23	online e-conference	대한민국
6	47th Annual Meeting & Symposium 한국미생물생명공학회	김유태	2020.09.23	online e-conference	대한민국
7	2020 Annual Meeting of Microbiological Society of Korea	김유태	2020.10.07	online e-conference	대한민국
8	2021 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	김영훈	2021.07.07	대전 컨벤션 센터	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>Lactobacillus gasseri</i> 4M05	KCCM 12564P	한국미생물보존센터	2019
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 11R06	KCCM 12563P	한국미생물보존센터	2019
3-69	분변 메타게놈 NGS 정보	KBRS20200908_0000001~KBRS20200908_0000067	한국생명공학연구원 국가생명연구자원정보센터	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	항비만 활성을 갖는 유산균을 함유하는 식품 조성물	대한민국	서울우유협동조합	2020.12.24	10-2020-0183176	-				50%	
2	락토바실러스 람노서스 4B15(<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15) 균주의 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	서울우유협동조합	2021.10.29	10-2021-0146592	-				50%	

○ 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 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

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

* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국

제조준(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	프레쉬바이오 프로바이오틱스(면역)	2020.12.23	서울우유협동조합	-	건강기능식품			
2	프레쉬바이오 프로바이오틱스(체지방감소)	2020.12.23	서울우유협동조합	-	건강기능식품			
3	서울우유 타트체리우유	2021.08.30	서울우유협동조합	-	가공유			
4	서울우유 멀티 바이오 발효유	2021.08.30	서울우유협동조합	-	발효유			

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	항비만 활성을 갖는 유산균을 함유하는 식품의 제조	서울우유협동조합	2021.03.01	농어업경영체 기술료 감면	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」 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
		단위(%)	현재까지	3년 후
	시장 점유율	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
			2019년	yyyy년	
1	연구원 신규채용	서울우유협동조합	1		1
합계			1		1

고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	1	
		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
1	인력양성	2018		3			3		3				
2	인력양성	2019	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2				2	2				
3	인력양성	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			3	4			4	3	7				

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기타	축산식품과학과 산업	항 비만 및 장내 균총 개선 프로바이오틱스 적용 기능성 유제품 개발	2020.06.30
2	기타	축산식품과학과 산업	축산식품 미생물 유전체 연구를 위한 차세대 염기서열(NGS) 분석 및 활용 기술	2021.06
3	기타	축산식품과학과 산업	만성 스트레스성 장 질환 유래 수면 장애 및 뇌 기능 저하 개선 기능성 유제품의 개발 동향	2021.10

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

임상시험실시

- 멜라토닌 고함유 새벽착유우유 및 프로바이오틱스의 IBS 환자에서 배변활동 및 수면활동 개선과 염증 완화 효능을 검증함

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

전임상 및 인체적용시험을 통한 장내 마이크로바이옴 생명정보 등록 67건, 논문 1건, 홍보전시 1건, 고용창출 1건을 추가로 달성하였음

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 만성스트레스 유래 과민성 장 질환 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발	○ 원유 내 멜라토닌 함량 표준화 공정 확립 ○ 프로바이오틱스 및 기능성 소재 제조 및 제공 ○ 제품 내 프로바이오틱스 및 기능성 소재 표준화 및 제품 규격 검토 ○ 청소년기 장 질환 및 장내 균총 개선 기능성 유제품 개발 ○ 개별인정형 기능성 원료 인정 신청 준비 ○ 선발 프로바이오틱스 스타터 대량생산 공정 확립 ○ 프로바이오틱스 혼합 스타터 대량생산 공정 개선 ○ 프로바이오틱스 혼합 스타터의 유제품 적용 공정 최적화 ○ 우유 엑소좀 특성 분석 및 엑소좀 유래 마이크로RNA 프로파일링 ○ 우유 엑소좀의 장 건강 기능성 검증 (<i>in vitro</i>) ○ 우유 엑소좀의 안전성 평가 (<i>in vitro, in vivo</i>)	○ 100%
○ 스트레스성 장 질환 동물모델 및 분자기전 연구를 통한 소재의 유효성 검증	○ 만성스트레스에 노출된 염증성 장 질환 동물 모델 표준화 ○ 만성스트레스에 노출된 장 질환 (변비) 동물 모델 표준화 ○ 분자기전 연구를 통한 소재의 유효성 검증 ○ 동물 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석	○ 100%
○ 스트레스성 장 질환 동물모델 및 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증	○ 스트레스성 장 질환 동물모델에서 장 기능 완화 평가 시스템 구축 ○ 스트레스성 장염 유도 동물 모델에서 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증 ○ 스트레스성 변비 유도 동물 모델에서 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증	○ 100%
○ 청소년 대상 인체적용시험을	○ 삼성서울병원 IRB 승인	○ 100%

<p> 통한 만성스트레스성 장 질환 완화 유효성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임상시험 준비를 위한 준비 ○ 청소년 만성 스트레스성 장 질환 환자 대상 임상 효용성 평가 ○ 임상 연구 결과 통계학적 분석 ○ 소재 투여 환자군 장기 예후 관찰 비교 ○ 인체 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석 	
<p>○ 동물 및 인체 마이크로바이옴 분석을 통한 장 질환과 장내 균총과의 상호관계 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물모델 미생물총 분석을 위한 total fecal DNA 분리 방법 최적화 ○ 기능성 미생물에 대한 전장 유전체 분석 ○ 동물모델 장내 마이크로바이옴 분석 및 소재의 효능 검증과 상관관계 분석 ○ 청소년 장 질환 환자에 대한 기능성 소재의 효능 메타게놈 검증 	<p>○ 100%</p>

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기술적 측면

- 확증된 프로바이오틱스 및 우유 유래 기능성 소재를 활용해 청소년기의 스트레스성 장 질환 개선 효과를 분석함으로써 종합적인 평가 연구 시스템 구축을 통해 새로운 소재 개발에 활용 가능함.
- 스트레스성 장 질환 개선 효과 검증을 위한 전임상 및 임상연구 시스템의 확립은 향후 새로운 동물 모델의 개발 전략과 기능성 물질 검증 기술에 활용 가능함.

○ 경제적 산업적 측면

- 청소년기의 스트레스성 장 질환으로 인한 장내 염증, 변비, 수면장애 개선 효과를 지니는 프로바이오틱스 첨가 기능성 우유를 개발하여 우유의 소비 상승이 기대됨.
- 청소년을 타겟으로 하는 유제품의 개발을 통해 초기 단계인 청소년 스트레스성 질환 관련 산업의 기술경쟁력을 강화하여 글로벌 시장진출 확대 및 미래 성장 동력 산업으로 육성 가능함.
- 국내 낙농산업의 안정적 발전의 측면에서 제품의 고급화와 다양화를 통한 고부가가치 제품의 생산은 필수적 요소이며, 새로운 개념의 기능성 우유 소재 개발은 유가공품의 소비확대에 크게 기여할 수 있고, 대규모 시장 규모를 형성할 수 있을 것으로 기대됨.

○ 사회적 측면

- 청소년기 스트레스성 장 질환 및 수면장애 개선 효능의 검증은 기능성 식품에 의한 특정 시기의 스트레스 관련 질환을 완화시킬 수 있다는 가능성을 제시함.
- OECD 국가 중 가장 높은 자살률을 보이는 우리나라의 사회적 상황을 고려해 볼 때, 스트레스성 질환의 예방 소재 개발은 어려운 진단기준, 신약물질의 부작용 등의 문제 해결을 도움으로써 사회적 현안을 푸는 실마리를 제공할 수 있음.
- 또한, 국내 유가공 업체 및 영농조합으로의 우유 엑소좀 및 마이크로RNA 연구 기술이전을 통하여 낙농산업의 내수시장 확대와 수출 효과를 기대할 수 있으며, 다자간 FTA 대비하여 낙농산업의 국제 경쟁력을 높일 수 있음. 특히, 향후 중국과 같은 거대 수출시장을 염두하였을 때 복합기능성 축산식품 개발은 관련 산업계의 발전과 함께 농가소득에 크게 기여할 수 있는 등 급변하는 국내 유가공 분야의 경쟁력 제고에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

○ 학문적 측면

- 대학, 산업체, 연구소간의 산학연 협력체계의 활성화 및 축산식품 소재분야의 전문인력 양성이 가능함.
- 본 연구과제의 연구 결과를 국내외 저명 학술지에 발표하고 국내외 특허를 취득함으로써 국내외 관련 연구자들의 인적, 연구 네트워크를 구성하여 국내 연구 활성화를 유도할 수 있을 것으로 사료됨.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 우유 유래 엑소좀 및 마이크로RNA 분리 및 분석 기술 확립

- 식품으로 섭취가 가능한 우유 엑소좀 및 마이크로RNA 검출 및 강화기술은 다양한 형태의 제품화가 가능하며 새로운 건강기능성이 강화된 유가공 제품의 제공으로 국민 건강의 향상과 국가적인 손실의 예방에 이바지 할 수 있음.
- 본 연구를 통해 도출되는 스트레스성 장 질환 개선 식품소재로서의 기술개발은 국내외 특허 출원과 함께 해외 및 국내 관련 업체로 기술 이전이 가능함.

○ 청소년기 스트레스성 장 질환(IBS/변비) 전임상 및 임상 연구 시스템 구축

- 스트레스 모델 및 스트레스성 장 질환 모델에 근접한 동물모델을 구축함으로써 질환 예방 및 치료에 실마리를 제공할 수 있는 병리 연구에 활용 가능함.
- 구축된 동물모델과 행동실험 및 임상 연구 시스템은 신규 발굴될 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 증상 개선 효과 검증에 활용가능하며, 기능성 프로바이오틱스 및 식품 소재의 선별 시스템으로 활용이 가능함.

○ 장내균총 분석 기술의 다양한 활용

- 장내 균총 및 정장작용 개선 효과를 과학적으로 검증.
- 스트레스성 장 질환 증상 특이적 장내균총 데이터베이스를 확보하여 새로운 장 질환 진단법 개발이 가능함.
- 한국인 청소년의 스트레스성 장 질환(IBS/변비)과 장내 균총의 연관성 및 상호작용 이해를 통한 치료에 활용 가능함.
- 장내 균총과 혈액검사 등을 통한 임상과의 연관성을 통계학적으로 상관관계를 나타낼 수 있음.

○ 우유 유래 고기능성 소재 및 프로바이오틱스를 이용한 기능성 유제품 개발

- 청소년기 스트레스성 장 질환(IBS/변비) 및 수면장애 개선 효과를 갖는 프로바이오틱스 및 유제품의 개발 (우유류 1종, 프로바이오틱스 제제 1종, 발효유 1종).
- 주관연구기관인 서울우유협동조합의 유통망을 통하여 제품을 출시하고 홍보할 예정임.
- 본 연구과제의 수행 결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체사업화와 선발 기능성 프로바이오틱스 균주의 식약처 개별인정형 원료 등록을 진행할 예정임.

○ 연구결과의 홍보 (과제 종료 후)

- 해외 학술등재지에 연구결과 발표
- 국내외 학술발표
- 국내 특허 출원 2건의 등록 추진 2건
- 연구 개발 제품 매출액 발생

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		308090-03	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	농식품기술개발사업		과제구분	단위	
사업명	고부가가치기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	청소년기 장 건강 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발		과제유형	개발	
연구기관	서울우유협동조합		연구책임자	강신호	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.11.9.~ 2019.11.8	513,860	513,860	1,027,720
	2차연도	2019.11.9.~ 2020.11.8	393,070	393,071	786,141
	3차연도	2020.11.9.~ 2021.11.8	334,000	334,001	668,001
	계	2018.11.9.~ 2021.11.8	1,240,930	1,240,932	2,481,862
참여기업	서울우유협동조합				
상대국	상대국연구기관				

* 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.12.31

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울우유협동조합	팀장	강신호

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 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수

: 연구과제의 최종 목표 및 연차별 연구개발의 목표에 따라 각 세부 및 협동기관이 연계되어 체계적으로 연구가 수행되었음. 새벽 착유 우유 및 프로바이오틱스를 활용하여 다양한 유제품을 시제품 단계까지 개발하였으며, 소재의 만성 스트레스성 장염 완화 효과를 전임상 및 임체 적용시험을 통해 검증하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

: 만성 스트레스로 인한 장염 및 이에 따른 수면장애로 인해 고통받는 환자가 꾸준히 증가하고 있으며, 멜라토닌의 해외 구매 소비자 역시 증가함에 따라 멜라토닌 고함유 소재를 활용한 유제품의 개발은 해당 분야에서 파급력이 높을 것으로 기대됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수

: 본 연구로 발명한 프로바이오틱스로 식품의약품안전처에서 진행하는 건강기능식품 맞춤형 기술상담을 진행하였고 향후 개별인정형 원료 획득을 추진할 예정임.

또한, 본 연구 과제를 통해 확보한 핵심기술인 질환과 장내균총의 상관관계 규명 기술 및 기능성 검증 연구 시스템은 질환 예방 및 치료에 실마리를 제공할 수 있는 병리 연구에 활용 가능하며, 신규 발굴될 기능성 소재의 효과 검증에 활용함으로써 기능성 식품 소재의 개발에 도움을 줄 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수

: 주관 및 협동기관이 체계적으로 연계되어 연구과제의 최종 목표 및 연차별 연구개발의 목표를 100% 달성하였으며, 연구 결과를 바탕으로 논문, 학술발표, 특허 등의 성과를 창출하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수

: 본 연구과제의 결과를 바탕으로 국내외 전문학술지에 논문 6편을 게재하였고 해외전문학술지 (SCI급)에 1편이 게재 진행 중이며, 국내외 관련 학회에 참가하여 7회 발표하였음. 또한, 본 연구 과제를 통해 홍보전시 3건을 완료하였으며, 특히 2건을 출원 완료하여 현재 등록 진행 중 에 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
만성스트레스 유래 과민성 장 질환 개선을 위한 기능성 소재 및 유제품 개발	20	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원유 내 멜라토닌 함량 표준화 공정 확립 ○ 프로바이오틱스 및 기능성 소재 제조 및 제공 ○ 제품 내 프로바이오틱스 및 기능성 소재 표준화 및 제품 규격 검토 ○ 청소년기 장 질환 및 장내 균총 개선 기능성 유제품 개발 ○ 개별인정형 기능성 원료 인정 신청 준비 ○ 선발 프로바이오틱스 스타터 대량 생산 공정 확립 ○ 프로바이오틱스 혼합 스타터 대량 생산 공정 개선 ○ 프로바이오틱스 혼합 스타터의 유제품 적용 공정 최적화 ○ 우유 엑소좀 특성 분석 및 엑소좀 유래 마이크로RNA 프로파일링 ○ 우유 엑소좀의 장 건강 기능성 검증 (<i>in vitro</i>) ○ 우유 엑소좀의 안전성 평가 (<i>in vitro, in vivo</i>)
스트레스성 장 질환 동물모델 및 분자기전 연구를 통한 소재의 유효성 검증	20	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 만성스트레스에 노출된 염증성 장 질환 동물 모델 표준화 ○ 만성스트레스에 노출된 장 질환 (변비) 동물 모델 표준화 ○ 분자기전연구를 통한 소재의 유효성 검증 ○ 동물 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석
스트레스성 장 질환 동물모델 및 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증	20	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 스트레스성 장 질환 동물모델에서 장 기능 완화 평가 시스템 구축 ○ 스트레스성 장염 유도 동물 모델에서 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증 ○ 스트레스성 변비 유도 동물 모델에서 행동실험을 통한 소재의 유효성 검증
청소년 대상 인체적용시험을 통한 만성스트레스성 장 질환 완화 유효성 검증	20	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 삼성서울병원 IRB 승인 ○ 임상시험 준비를 위한 준비 ○ 청소년 만성 스트레스성 장 질환 환자 대상 임상 효용성 평가 ○ 임상 연구 결과 통계학적 분석 ○ 소재 투여 환자군 장기 예후 관찰

			비교 ○ 인체 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석
동물 및 인체 마이크로바이옴 분석을 통한 장 질환과 장내 균총과의 상호관계 규명	20	100	○ 동물모델 미생물총 분석을 위한 total fecal DNA 분리 방법 최적화 ○ 기능성 미생물에 대한 전장 유전체 분석 ○ 동물모델 장내 마이크로바이옴 분석 및 소재의 효능 검증과 상관관계 분석 ○ 청소년 장 질환 환자에 대한 기능성 소재의 효능 메타게놈 검증
합계	100	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

주관 및 협동기관이 체계적으로 연계되어 연구과제의 최종 목표 및 연차별 연구개발의 목표를 100% 달성하였으며, 연구 결과를 바탕으로 논문, 학술발표, 생물자원 등록, 특허, 고용창출, 기술이전 등 다수의 성과를 창출하였음. 멜라토닌 고함유 새벽 착유 우유 및 자체 개발 프로바이오틱스를 활용하여 소재의 만성 스트레스성 염증성 장 질환(설사, 변비) 완화 효능을 검증하였음. 또한, 스트레스성 장염과 이로 인한 수면장애를 겪는 소아청소년 IBS 환자를 대상으로 해당 소재의 배변활동 및 수면활동, 염증 수치가 감소한 것을 확인하였음. 검증이 완료된 멜라토닌 고함유 소재인 새벽 착유 우유와 프로바이오틱스 소재를 적용한 유산균 제제, 가공유, 발효유 총 4종의 시제품을 제조 완료하였으며, 주관연구기관인 서울우유협동조합의 유통망을 통하여 제품을 출시하고 홍보할 예정임. 본 연구과제의 연구결과를 바탕으로 주관연구기관인 서울우유협동조합은 개발 프로바이오틱스 소재의 식약처 개별인정 원료 획득을 추진할 예정임. 또한, 본 연구 과제를 통해 확보한 핵심기술인 복합 질환 동물모델 및 기능성 검증 연구 시스템을 구축함으로써 추후 질환 예방 및 치료에 실마리를 제공할 수 있는 병리 연구에 활용 가능하며, 신규 발굴될 기능성 소재의 효과 검증에 활용이 가능하여 기능성 식품 소재의 개발에 도움을 줄 수 있음.

만성 스트레스로 인한 장염 및 이에 따른 수면장애로 인해 고통받는 환자가 꾸준히 증가하고 있으며, 멜라토닌의 해외 구매 소비자 역시 증가함에 따라 멜라토닌 고함유 소재를 활용한 유제품의 개발은 해당 분야에서 파급력이 높을 것으로 기대됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

연구 성과 목표 중, 미달성 성과는 아래와 같이 진행 중에 있음.

- 특허 출원 2건 완료하였으며, 현재 우선 심사 진행 중으로 2022년 등록완료 예정임.
- 코로나 사태로 학술대회 발표 성과를 달성하지 못하였으나, 홍보전시 1건을 추가로 완료하였음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

서울우유협동조합은 국내 우유 시장 점유율 1위를 차지하는 대표 유업체로서 양주, 용인, 안산 및 거창공장을 운영하여 우유, 발효유, 치즈 등 다양한 제품을 생산하고 있음. 향후 연구결과 활용 및 산업화는 아래와 같이 진행할 예정임.

- 개발 프로바이오틱스의 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정형 소재 등록 추진 예정
- 만성 스트레스성 염증 및 인체적용시험을 통한 배변활동 및 수면활동을 포함한 염증 완화 효과 검증이 완료된 프로바이오틱스를 활용한 유산균 제제 제품을 2022년 출시 계획

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 삼성서울병원 IRB 승인 ○ 임상시험 준비를 위한 준비 ○ 청소년 만성 스트레스성 장 질환 환자 대상 임상 효용성 평가 ○ 임상 연구 결과 통계학적 분석 ○ 소재 투여 환자군 장기 예후 관찰 비교 ○ 인체 유래 뇌 기능 및 장 기능 관련 바이오마커 분석
④ 청소년 대상 인체적용시험을 통한 만성스트레스성 장 질환 완화 유효성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물모델 미생물총 분석을 위한 total fecal DNA 분리 방법 최적화 ○ 기능성 미생물에 대한 전장 유전체 분석 ○ 동물모델 장내 마이크로바이옴 분석 및 소재의 효능 검증과 상관관계 분석 ○ 청소년 장 질환 환자에 대한 기능성 소재의 효능 메타게놈 검증

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10	10	10		10	10						10	10		10	10		
최종목표	2	1	2	1		3					5		2	9		2		2	
연구기간내 달성실적	2	0	69	1		4		1			6		3.25	8		12		3	
달성율(%)	100	0	3450	100		133					120		162	88		600		150	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	기능성 프로바이오틱스 스타터 컬처를 사용한 발효유 제조 기술
②	만성 스트레스성 장 질환 동물모델 내 장내 균총 분석 및 질환과 장내 균총의 상관관계 규명 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					v		v			
②의 기술					v					

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	기능성 프로바이오틱스 균주를 활용한 발효유의 개발에 활용할 예정임. 기존 기능성 프로바이오틱스는 발효유의 제조 후 후첨에 따라 첨가가 되어 왔으나, 기능성 프로바이오틱스 단독 균주로의 발효를 통해 신개념 발효유의 개발이 가능할 것으로 기대됨.
②의 기술	현재 국내외로 질환과 장내 균총과의 관계에 대한 연구가 활발히 진행 중임. 질환에 따른 장내 균총 변화에 대한 데이터베이스 구축을 통해 질환의 진단 및 예방에 도움을 줄 수 있음.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10	10	10	10		10	10						10	10		10		10	
최종목표	2	1	2	1		3						5		2	9		2	2	
연구기간내 달성실적	2	0	69	1		4			1			6		3.25	8		12	3	
연구종료후 성과창출 계획		1					10,000					1		3					

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	항비만 활성을 갖는 유산균을 함유하는 식품의 제조		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	0천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접실시)		
이전소요기간	-	실용화예상시기 ³⁾	1년 후
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	직접실시		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술 이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업 연구개발과제 최종 보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.