918004-04

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

포스트게놈 다부처 유전체 사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004038-01

마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발

2022.04.07

주관연구기관 / 중앙대학교 산학협력단
협동연구기관 / 롯데푸드

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발

2021

농 림 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발"(개발기간 : 2018.04.25 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.03.29

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 고중혁 (인)
협동연구기관명 : 롯데푸드 (대표자) 이진성 (인)

주관연구책임자 : 김 원 용
협동연구책임자 : 박 재 웅

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서

보안등급: 일반[ ], 보안[O]

중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	포스트게놈 다부처 유전체 사업	
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)	산업화 지원 미생물유전체 전략연구 (조기성과 창출)	
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
		연구개발과제번호		918004-4	

기술분류								
국가과학기술 표준분류	LB1801	50 %	LA0906	30 %	LA0706	20 %		
농림식품과학기술분류	PA0201	50 %	PA0102	30 %	CA0105	20 %		

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	-
	영문	-
연구개발과제명	국문	마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발
	영문	Development of probiotic materials for ameliorating stress and type 2 diabetes using microbiome analysis

주관연구개발기관	기관명	중앙대학교 산학협력단	사업자등록번호	108-82-05979
	주소	(우) 06974 서울특별시 동작구 흑석로 84	법인등록번호	-

연구책임자	성명		김원용	직위	교수
	연락처	직장전화	02-820-5685	휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	

연구개발기간	전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3년 9개월)
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 04. 25 - 2019. 12. 31 (1년 9개월)
		2단계	2020. 01. 01 - 2021. 12. 31 (2년 개월)

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		1,128,000	169,200	958,800	-	-	-	-	1,297,200	958,800	2,256,000	-
1단계	1년차	217,000	32,550	184,450	-	-	-	-	249,550	184,450	434,000	-
	2년차	285,000	42,750	242,250	-	-	-	-	327,750	242,250	570,000	-
2단계	3년차	313,000	46,950	266,050	-	-	-	-	359,950	266,050	626,000	-
	4년차	313,000	46,950	266,050	-	-	-	-	359,950	266,050	626,000	-

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관	중앙대학교 산학협력단	황광우	교수			2세부	대학
	롯데푸드	박재웅	팀장			1협동	대기업
위탁연구개발기관	마크로젠	신상흠	이사			위탁	중견기업
연구개발기관 외 기관	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-

연구개발담당자 실무담당자	성명		김종화	직위	연구전담교수
	연락처	직장전화	02-822-5685	휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	

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

2022 년 02 월 07 일

연구책임자: 김원용 (인)

주관연구개발기관의 장: 중앙대학교 산학협력단장 (직인)
공동연구개발기관의 장: 롯데푸드 대표이사 (직인)
위탁연구개발기관의 장: 마크로젠 대표이사 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="2">포스트게놈 다부처 유전체 사업</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="2">산업화 지원 미생물유전체 전략 연구 (조기성과 창출)</td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td colspan="2">918004-4</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LB1801</td><td>50 %</td><td>LA0906</td><td>30 %</td><td>LA0706</td><td>20%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>PA0201</td><td>50 %</td><td>PA0102</td><td>30 %</td><td>CA0105</td><td>20%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2018. 04. 25. ~ 2021. 12. 31. (3년 9개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 2,256,000 천원
(정부지원연구개발비: 1,128,000 천원, 기관부담연구개발비: 1,128,000 천원,
지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="2">기초[ ] 응용[ ] 개발[O]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td colspan="2">기술성숙도
(해당 시 기재)</td><td colspan="2">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">-</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구개발 목표 및 내용</td><td>최종 목표</td><td colspan="6">○ 최근 염증-스트레스-당뇨병의 연관성에 관한 많은 연구가 수행되고 있으나 스트레스와 당뇨병을 함께 개선할 수 있는 프로바이오틱스 소재는 현재 개발되지 않은 실정임.
○ 본 연구에서는 마이크로바이옴 분석기술을 이용하여 염증 억제력이 우수한 유산균주를 발굴하고 세포시험, 질환 모델 동물 효능실험, 전임상시험, 대량 생산, 최적화, 제형화를 통해 스트레스와 당뇨병을 개선 또는 예방할 수 있는 고기능성 프로바이오틱스 소재를 개발하고 실용화하고자 함.</td></tr>
<tr><td>전체 내용</td><td colspan="6">○ 마이크로바이옴 분석 기반 고기능성 식품 허용 미생물 및 GRAS급 프로바이오틱스를 지속적으로 선별 진행함.
○ 발굴 프로바이오틱스 소재에 대한 생리·생화학적 특성 분석, 효능 평가, 기능성 평가를 진행함.
○ 프로바이오틱스 소재에 대한 스트레스 및 2형 당뇨 관련 기능성 유전자 보유 확인 및 metabolic pathway 등 분석을 진행함.
○ 면역 반응 매개 조절 기전 및 염증·당뇨에서 스트레스가 미치는 영향을 확인함.
○ 대식세포 분화에 대한 프로바이오틱스 소재의 기능을 M1과 M2 대식세포의 대표적인 표면 발현 인자, mRNA 및 biomarker로 확인함.
○ 프로바이오틱스 소재에 대한 독성평가 진행하고, 스트레스-2형 당뇨 질환 마우스 모델에서 기능성 평가를 진행함.
○ 스트레스에 의한 염증반응이 제2형 당뇨병 유발에 미치는 영향 확인함.
○ 다양한 종류 및 농도에 대한 배지 성분에 따른 생장성 및 생균수 확인 및 기존의 OFAT 방법에서 확대하여, Response Surface</td></tr>
</table>

			Method (RSM)을 적용하여 더욱 정확한 최적 성분과 조건을 확립하고 배양공정의 스케일 확대 진행함. ○ 확립된 현장 생산용 최적 배지와 배양공정을 토대로 현장 수준에서 생산 가능한 배양액을 표준화하고 프로바이오틱스 소재의 제품 적용을 위해 동결건조를 통한 분말화를 진행함. ○ 현장 원료 생산 및 실험실 수준 배합 테스트를 통한 시생산 진행과 시생산된 분유에 대한 유산균수 및 영양성분 분석을 진행함. ○ 시생산된 제품에 대한 패키지 및 디자인 개발을 진행함. ○ 판매용 제품으로 생산하기 위한 등록/인허가 신청 및 유통 안전성 테스트를 진행함. ○ 개발된 프로바이오틱스의 개별인정형 신청을 위한 확보된 과학적 근거를 기반으로 CRO 컨설팅 진행 및 원료신청 전략을 확보함. ○ 대량생산을 통한 제품화와 제과 및 음료 제품 확대 적용을 위한 보관안정성 검증을 진행함.
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	2단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	○ 해당 연구개발을 통해 전략 미생물 3건, 유용 유전자원 5건을 확보하였으며, 표준 유전체 해독 4건을 통해 12건의 NABIC을 등록함. ○ 학술성과로 SCI급 논문 6편과 비SCI급 논문 1편(총 7편)을 게재함. ○ 지식재산권으로 특허출원 5건과 특허등록 2건을 진행함. ○ 학술발표 성과로 총 7번의 국제/국내 학술대회에서 발표함. ○ 인력양성으로 총 7명 연구인력양성을 달성함. ○ 기술거래로 “장내 마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술” 노하우(Know-how) 이전 계약을 진행함. ○ 사업화로 제품화 2건, 고용 창출 2명, 매출 발생 약 76억원을 달성함. - 제품화 2건(닥터액티브, 위드맘제왕) - 고용 창출 2명(롯데 중앙연구소 연구인력 2명) - 매출 발생 약 76억 원의 실적 ○ 개발된 제품을 다양한 매체(신문, 저널, 광고)를 활용하여 홍보를 진행함.
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	○ 스트레스와 당뇨 개선 브랜드로서 성장시킬 수 있도록. 국내외 특허와 학회 발표 및 학술등재지 이상의 다양한 논문에 게재하여 연구성과를 객관적 근거로 활용함. ○ 상기의 확보된 객관적 근거를 토대로 하여, 개별인정형을 획득하고 임상시험을 진행하여, 향후 건강기능식품 시장으로 진출을 확대하고 또한 병원 연구진들과 협업하여 인체 임상연구로도 추진해나갈 계획임. ○ 관련 산업 및 국내 기술경쟁력 강화를 통해 건강기능 식품시장으로의 진출과 글로벌 시장진출로 확대하여 판매 및 수익을 창출해나갈 계획임. ○ 최근 산업적, 의학적으로 중요한 미생물들의 유전체 해독에 의한 미생물 자원의 효율적 이용과 신개념의 환자 맞춤형 신약 및 건기식 개발에 활용함. ○ 다양한 제형(음료, 스낵, 비스켓, 유제품 등)으로 제품 적용 확대를 추진하고, 홍보 및 마케팅으로 활용함 ○ 타켓 맞춤형 개별인정형 원료로서, 환자 맞춤형 신약 및 건기식 개발에 활용하여 국민 건강에 기여할 수 있음.

<table>
<tr><td>연구개발성과의
비공개여부 및 사유</td><td colspan="11">○ 본 과제 보고서에는 협동 기관의 롯데푸드의 시니어 영양식 및 케어푸드 중장기 전략의 핵심소재인 당뇨-스트레스 개선에 대한 연구내용이 상세하게 포함되기에 보안이 필요함.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구개발성과의
등록·기탁 건수</td><td rowspan="2">논문</td><td colspan="2">특허</td><td rowspan="2">보고서
원문</td><td rowspan="2">연구
시설
·장비</td><td rowspan="2">기술
요약
정보</td><td rowspan="2">소프트
웨어</td><td rowspan="2">표준</td><td colspan="2">생명자원</td><td rowspan="2">화합물</td><td colspan="2">신품종</td></tr>
<tr><td>출원</td><td>등록</td><td>생명
정보</td><td>생물
자원</td><td>정보</td><td>실물</td></tr>
<tr><td></td><td>7</td><td>5</td><td>2</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>12</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구시설·장비
종합정보시스템
등록 현황</td><td>구입
기관</td><td colspan="2">연구시설
·장비명</td><td>규격
(모델명)</td><td>수량</td><td>구입
연월일</td><td>구입가격
(천원)</td><td>구입처
(전화)</td><td colspan="2">비고
(설치장소)</td><td colspan="2">ZEUS
등록번호</td></tr>
<tr><td>-</td><td colspan="2">-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td colspan="2">-</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td colspan="3">마이크로바이옴</td><td colspan="3">차세대염기서열
분석법</td><td colspan="2">프로바이오틱스</td><td colspan="2">스트레스</td><td colspan="2">당뇨</td></tr>
<tr><td>영문핵심어
(5개 이내)</td><td colspan="3">Microbiome</td><td colspan="3">Next-generatio
n sequencing</td><td colspan="2">Probiotics</td><td colspan="2">Stress</td><td colspan="2">Diabetes</td></tr>
</table>

〈 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

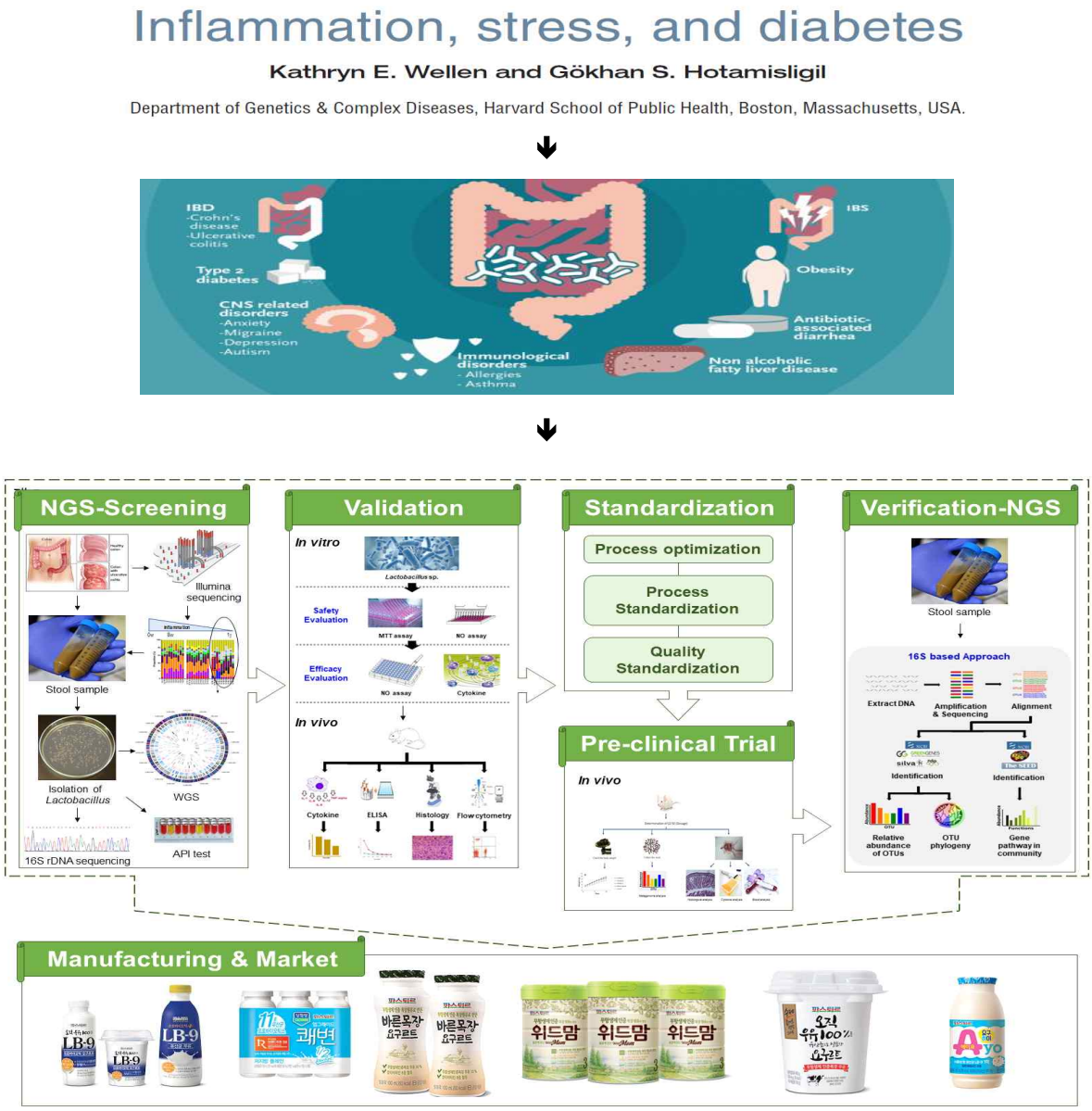
별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발의 목표

○ 최근 염증-스트레스-당뇨병의 연관성에 대한 많은 연구가 수행되고 있으나 스트레스와 당뇨병을 함께 개선할 수 있는 프로바이오틱스 소재는 현재 개발되지 않은 실정임. 본 연구에서는 마이크로바이옴 분석기술을 이용하여 염증 억제력이 우수한 유산균주를 발굴하고 세포 시험, 질환 모델 동물 효능실험, 전임상시험, 대량 생산, 최적화, 제형화를 통해 스트레스와 당뇨병을 개선 또는 예방할 수 있는 고기능성 프로바이오틱스 소재를 개발하고 실용화하고자 함.

2) 연구개발 개요



<그림 1> 연구개발 모식도

3) 연구개발의 필요성 및 중요성

(1) 장내 마이크로바이옴과 질병 연구의 필요성

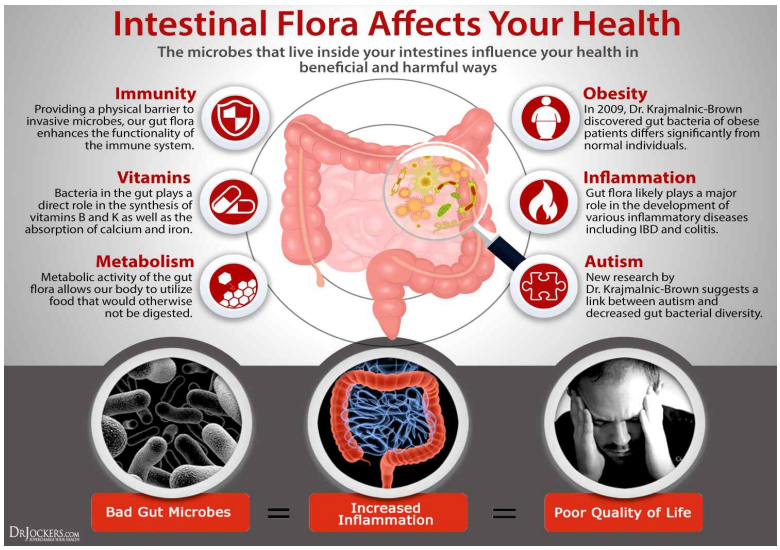
○ 현재까지 미생물로부터 약 70,000종 정도의 천연물이 분리되었고, 그중에 약 500종 정도가 의약품으로 개발되었으나, 새로운 천연물을 찾기가 어려워 신규 천연물 발굴을

위한 새로운 미생물자원의 탐색이 세계적으로 이루어지고 있음.

○ 생명 과학 분야에서 세계 최고의 학술지 중의 하나인 'Cell' 지는 2013년 1월에 장내 미생물을 활용한 신약개발 연구를 표지논문으로 소개했으며, 세계경제포럼에서도 인간의 장내 미생물을 이용한 질병 치료와 신약개발을 '2014년 10대 유망기술'에 선정하였을 만큼 세계적으로 주목을 받고 있음.

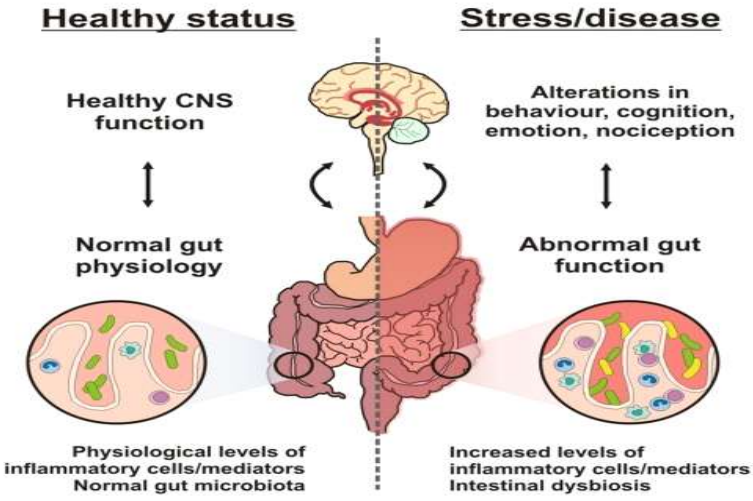
○ 사람의 장내 마이크로바이옴은 태어날 때부터 인종, 유전, 식습관 등에 따라 개개인별로 다양한 조성을 가지고 있지만 한 개인에서는 장내 미생물의 분포가 균형을 이루며 안정적인 군집을 유지하고 있음(Neth J Med. 2015 Feb;73(2):61-8).

○ 장내 마이크로바이옴은 인체로부터 나오는 대사산물 등을 통해 대사물질을 생성하며, 이를 통해 다른 미생물과 상호작용을 하고 인체의 면역체계, 대사, 신경계 등 인체 건강에 영향을 미쳐, 비만, 심혈관 질환, 제2형 당뇨와도 깊은 관련성을 가지고 있다는 보고가 있음(Nat Rev Immunol. 2013 May;13(5):321-335; Nature. 2012 Sep;489:242-249) (그림 2).



<그림 2> 질병과 장내 마이크로바이옴의 연관성

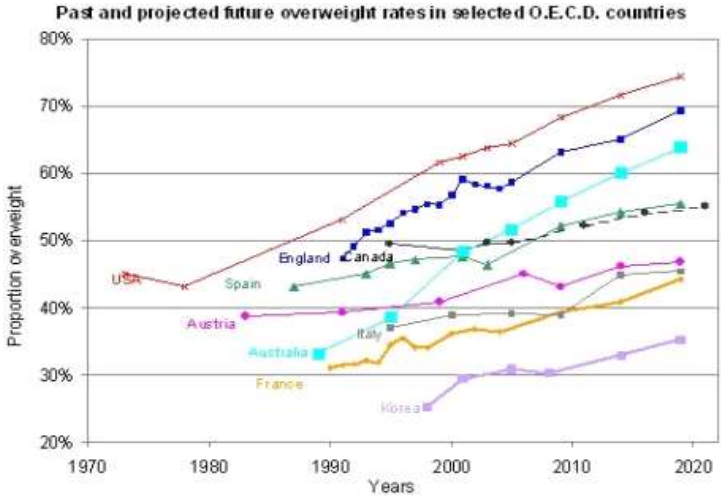
○ 최근에는 장내 마이크로바이옴이 위장관-뇌 축(brain-gut axis)이라고 불리는 상호작용을 통해 인체의 뇌와 감정, 행동에도 영향을 주는 것으로 알려지고 있음(Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009 May;6(5):306-14) (그림 3).



<그림 3> 스트레스와 장내 마이크로바이옴의 연관성

(2) 당뇨 질환 연구의 필요성

○ 전 세계적으로 비만은 증가하는 추세로 2004년 10억 명 정도였던 전 세계 성인 과체중 인구가 2014년 20억 명 이상으로 급속히 높아짐 (그림 4). 특히 선진국에서 나타나는 과체중의 증가세는 더욱 커서 미국의 경우 2020년에는 비만 인구가 70%가 넘을 것으로 예상되고 있음.



<그림 4> OECD 가입국의 연도별 비만 인구

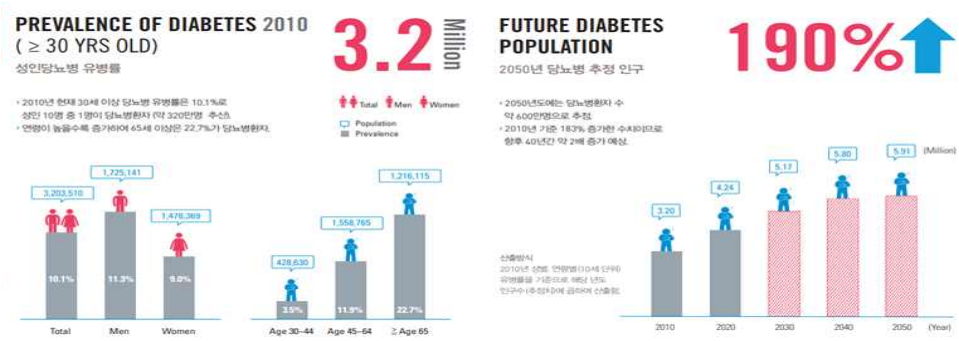
○ 비만으로 인한 합병증 중 당뇨병이 최근 남녀노소를 가리지 않고 환자가 늘고 있어 주의가 요구됨. 당뇨병이란 혈액 속의 포도당 수치가 정상인보다 높은 상태를 말하며, 인슐린이 정상적으로 분비되지 않거나, 분비되더라도 제 기능을 하지 못하는 질환임.

○ 당뇨병에는 2가지 유형이 있으며, 제1형 당뇨와 제2형 당뇨의 가장 큰 차이는 인슐린 생산 여부 원인이며, 제1형 당뇨는 인슐린이 분비되지 않는 유전적인 원인이 크지만, 제2형 당뇨는 스트레스나 비만으로 인한 환경적인 원인이 큼(표 1).

<표 1> 제1형 당뇨와 제2형 당뇨의 차이

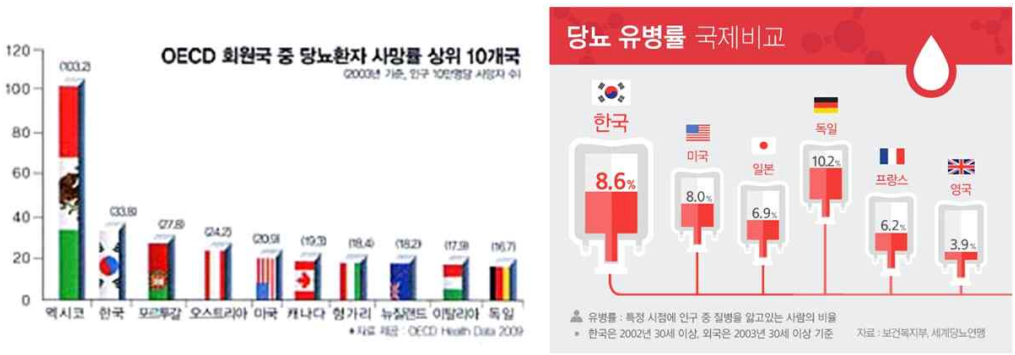
특징	제1형 당뇨 (인슐린 의존형 당뇨병)	제2형 당뇨 (인슐린 비의존형 당뇨병)
발생연령	일반적으로 40세 이전에 발생	일반적으로 40세 이후에 발생
체중	과체중이 아님 (마른 체격)	일반적으로 과체중
증상	갑자기 나타남	증상이 없거나 서서히 나타남
인슐린 생산	생산되지 않음	소량 분비 또는 작용이 제대로 되지 않음
인슐린 치료	반드시 필요함	필요할 수도 있음
발병비율	전체 당뇨병의 10%	전체 당뇨병의 90%

○ 소아, 청소년 당뇨병 (제1형 당뇨), 성인 당뇨병 (제2형 당뇨)의 유병률 모두 점점 심각하게 증가하는 추세로 (그림 4), 전 국민의 약 10%가 당뇨병 환자이며 매년 10%씩 새로운 당뇨병 환자가 발생하고 있음. 또한, 2050년의 당뇨병 인구는 2010년 기준 당뇨병 인구의 190% 증가한 수치로 향후 40년간 약 2배 증가할 것으로 예상함 (그림 5).



<그림 5> 당뇨병 유병률 및 2050년 당뇨병 추정 인구 예상

○ 2000년대 이후, 당뇨병은 국내에서 5대 사망 원인 중 하나로 대두되었으며, OECD 국가 중 당뇨병 및 당뇨 합병증으로 인한 사망률은 우리나라가 2위를 차지하고 있으며, 국제당뇨연합(IDF)이 발표한 통계에 따르면 전 세계 인구 중 4억 1500만 명이 당뇨병 진단을 받았고, 그중 우리나라의 당뇨병 유병률은 다른 나라에 비해 높은 수치로 나타남 (그림 6).



<그림 6> 당뇨병 사망률 및 유병률 국제 비교

○ 당뇨병은 만성 질환의 특성상, 환자들이 조기 치료의 시기를 놓치면서 치명적인 합병증으로 악화되는 경우가 많고 젊은 당뇨병 환자가 증가하고 평균 수명의 연장으로 유병기간이 늘어남에 따라 당뇨병으로 인한 사회경제적 비용은 나날이 치솟고 있음. 당뇨병은 근래에 이르러 국가적 위기 상황에 봉착할 수 있을 만큼 시급한 대책이 필요한 상황임.

○ 당뇨병이 늘어남에 따라 그에 관련한 의료비용은 1995년 2142억 원에서 2002년 1조 원을 돌파했고 2005년에는 1조 7000억 원으로 10년간 무려 7.99배가 증가함.

○ 인위적으로 인슐린을 주사하는 제1형 당뇨병의 치료와는 달리, 현재 제2형 당뇨병의 치료에서 혈당강하제로 사용하는 약물의 부작용이 크고 장기사용 시 안전성이 확보되지 않음.

○ 당뇨병을 치료하는 약물의 국내 연구가 활발하지만, 점점 늘어나는 당뇨병의 환자 수와 그 심각성에 비해 아직 근본적인 치료제는 발견되지 못함.

(3) 당뇨 질환과 스트레스의 연관성

○ 현대인의 스트레스 연구에서 연구대상자의 15.5%가 5년 이상 심각한 스트레스를 받고 있었고 이들은 스트레스가 없던 사람들에 비해 당뇨병에 걸릴 확률이 45% 높은 것으로 확인되었음.

○ 스트레스를 받게 되면 아드레날린, 글루카곤, 에피네프린, 노르에피네프린, 코르티졸, 성장호르몬, β-엔돌핀 등과 같은 호르몬들이 방출되는데 이들은 인체 저항력을 높이는

과정에서 혈당 수치와 인슐린 분비를 증가시킴.

○ 스트레스가 장기화되면 인슐린 수치도 장기적으로 올라가며 결과적으로 인슐린 저항성을 유발해 당뇨병을 유도한다는 증거들이 제시됨 (그림 7).

<그림 7> 당뇨와 스트레스의 연관성

○ 인슐린 저항증으로 인해 증가된 인슐린은 혈당을 높이고, 결과로 혈당을 지방으로 바꿔 체내에 축적되기 시작함.

○ 인체에는 정상적인 스트레스에 대항하기 위한 다양한 형태의 항산화 방어 체계가 구축되어 있으며, 스트레스를 유발시키는 원인 물질에 의해 세포 내 중요한 구성 물질들을 손상시켜 세포를 파괴시킬 수 있음.

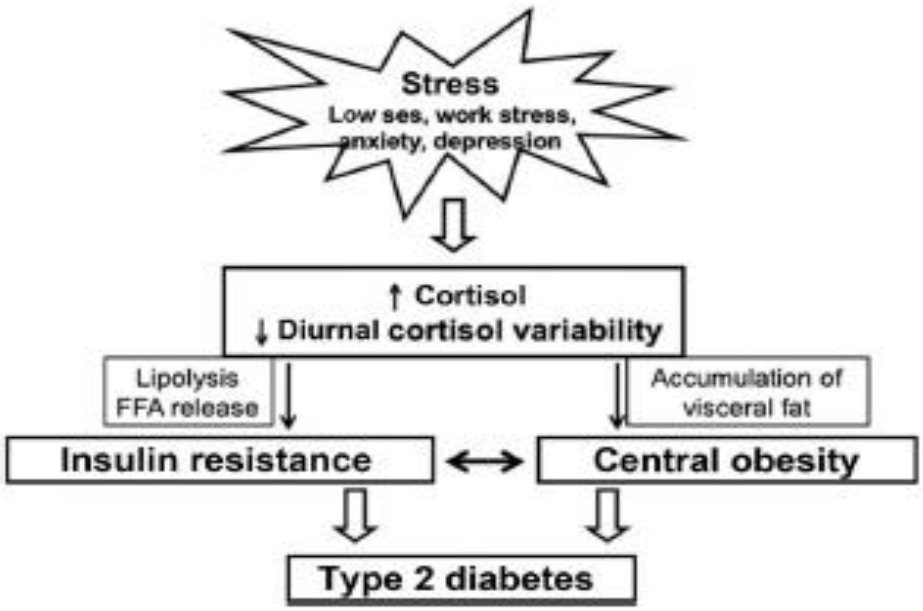
○ Nitric oxide(NO)는 내피세포에서 발생되는 가장 중요한 물질로서 산화스트레스와 연관이 있으며, NO의 발생 혹은 작용이 당뇨병 유발과 관련이 있다는 보고가 많이 있음.

○ 항산화제의 하나인 vitamin E의 농도가 낮을수록 당뇨병 발생률이 증가하였다는 연구와 vitamin C 섭취량이 적을수록 혈당 수치가 높은 것으로 나타난 연구결과를 통하여, 스트레스가 당뇨병 발생에 중요한 역할을 할 것이라는 증거가 보고되고 있음.

○ 스트레스와 생리적 기능 사이의 연관성을 중재하는 적응에 관여하는 것에는 시상하부 뇌하수체-부신(HPA) 축, 자율 신경계, 면역계가 포함되며, HPA 축은 급성 및 만성 스트레스에 반응함.

○ 최근 연구에서는 코르티솔 분비의 변화는 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병과 관련이 있으며, 당뇨병이 여러 생물학적 시스템에 걸친 스트레스 관련 과정의 붕괴, 노출된 스트레스 증가의 특징으로 한다는 것이 보고되고 있음(Ann. N. Y. Acad. Sci., 2017, 1391(1): 20-34.)

- 그러나, 당뇨병, 스트레스, 우울증의 역할에 논란이 있으며, 아직 스트레스의 형태, 확증과 당뇨병과의 연관성은 분명하지 않음.



<그림 8> 스트레스와 당뇨병의 Mechanical link

(4) 염증 조절과 당뇨 질환과의 상관성

○ 염증은 면역계의 복합반응으로 감염체를 제거하기 위한 일련의 반응을 말하며, 감염을 조절하고 조직 재생을 증진시키려는 보호적 기능을 수행하나, 과도한 염증반응 또는 만성으로 진행되는 염증반응은 조직 손상과 질병을 초래하게 됨.

○ 염증은 감염을 조절하고 조직 재생을 증진시키려는 보호적 기능을 수행하나 과도한 염증반응 또는 만성 염증을 유발하여 많은 질병의 원인이 되며, 당뇨병의 합병증 중 동맥경화와 동맥 플라크 파열 등에도 중요한 역할을 함.

○ 지방조직이 면역에서 중요한 역할을 하고 있으며, 면역에 의한 전형적인 염증은 대식세포 및 TNF-α의 관여, NF-κB 활성화 유도와 연관성을 가지며, 지방조직에서의 TNF-α의 mRNA 발현 증가가 인슐린 저항성을 유발할 수 있음(Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Jun;296(6):H1850-8).

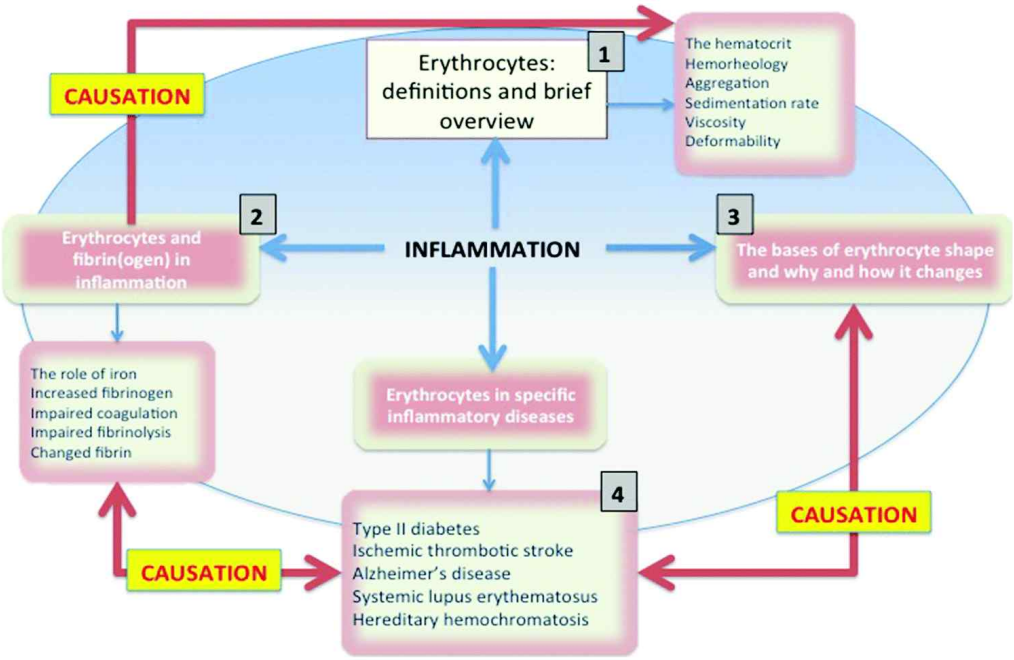
○ 대표적으로 알려진 염증성 단백질(C-reactive protein; CRP, TNF-α, IL-6 등)의 혈중 농도가 증가하면서 지방조직 내 염증성 신호 전달계인 NF-κB가 활성화된다는 보고가 있으며, 이 염증성 단백질들은 지방세포 및 근육세포의 인슐린 저항성을 유도하여 당뇨를 유발시키며, 혈관 내벽에 대식세포의 축적을 유도하여 동맥경화 발생 과정에도 깊이 관여되고 있음이 보고됨(Nat Rev Immunol. 2011 Feb;11(2):98-107).

○ 또한, Pro-inflammatory와 Anti-inflammatory Cytokine 사이의 균형은 정상적인 세포 기능에 필수적인데, 일부 Cytokine 유전자 이상으로 인한 췌장 β-세포의 기능장애는 제2형 당뇨병 발병률 증가와 관련이 있는 것으로 밝혀짐(Interdiscip J Microinflammation. 2014 Sep;1(110):2).

○ IL-1β는 췌장의 β-세포를 손상시켜 Cytokine 수치에 영향을 주고 제1형 당뇨병 발생과 인슐린 저항성을 유도하며, β-세포의 손상으로 인한 인슐린 저항성은 제2형 당뇨병의 위험성을 높임(Sci Rep. 2017 Aug;7(1):7633).

○ Omega-3, 6 지방산의 균형은 염증조절에 중요하지만 Omega-6의 증가는 염증 생성을 촉진키는 것으로 알려졌으며, 이와 당뇨 간의 인과 관계에 대한 연구들이 다수 수행되고 있음(Biomed Pharmacother. 2002 Oct;56(8):365-79).

○ 당뇨와 염증의 연관성이 밝혀지고 있지만, 당뇨를 유발하는 염증 Pathway는 완벽히 규명되지 못해 염증을 줄이기 위한 치료제 개발에 어려움이 있음 (Sci Rep. 2017 Aug;7(1):7633).



<그림 9> 당뇨와 염증의 연관성

(5) 면역체계 조절과 당뇨 질환의 연관성

○ 일반인의 2.8%만이 암에 걸리는 반면 당뇨병 환자는 5%인 높은 비율로 암에 걸리는데 원인은 면역력 약화 때문이며, 특히 소아 당뇨의 주된 원인은 면역력 결핍임.

○ 면역은 생체의 내부 환경이 외부인자인 항원에 대하여 방어하는 현상인데 이러한 면역기능에 이상이 발생하여 면역세포들이 체내 장기나 조직을 공격하여 발생하는 것이 자가 면역 질환임.

○ 제1형 당뇨병은 면역체계가 췌장 β-세포를 파괴시켜 신체가 인슐린을 생성하지 못하는 생성하지 않는 '자가 면역 질환'인 것으로 밝혀짐.

○ 체내 면역계를 담당하는 B-Lymphocyte, T cell, Macrophage 등이 당뇨를 유발한다고 밝혀졌는데 그 중 B-Lymphocyte는 항체를 생성해 지방세포를 손상시켜 인슐린 저항성을 띄게 만들어 제2형 당뇨병을 발생시킬 수 있음(Cell Mol Life Sci. 2014 Mar;71(6):1033-43).

○ Leukocyte와 Macrophage는 외부에서 침입하는 항원을 제거하는 기능을 하는데, 당뇨병 환자는 이 기능이 약화되어 신체의 작은 상처에도 조직이 괴사되는 등 심각한 상태로 발전될 가능성이 큼.

○ 당뇨로 인한 갈증과 소변량 증가는 수면장애를 일으켜 면역기능이 감소시켜 결론적으로 병세를 더욱 악화됨.

(6) 기능성 유산균주 발굴을 통한 제품개발의 중요성

○ 미생물은 적은 투자비용으로 천연물, 유전자, 단백질 정보 등을 확보할 수 있는 생명공학 산업의 핵심소재 중 하나인 고부가가치 자원이며, 산업적으로 세계 바이오 시장의 30%, 국내 바이오산업의 60%를 차지하고 있는 큰 산업임.

○ 미국의 FDA에서 GRAS로 인정된 유산균은 식품의 발표 소재로 식품 산업 분야에서

폭넓게 이용이 되고 있으며, 사람이나 각종 동물의 장내 마이크로바이옴의 일원으로 이들의 우수한 생리적 기능이 인정되어 건강 및 기능성 식품의 소재로 널리 이용되고 있음.

○ 그러나, 유산균을 생으로 섭취할 경우, 100억 마리를 섭취했을 때 실제 장에 도달하는 균량은 20% 정도로 매우 낮아 유산균 제제 섭취만으로는 그 효능에 한계가 있음.

○ 유산균을 이용한 발효 식품은 특유의 풍미와 생성된 유산에 의한 우수한 보존성, 단백질의 부분 분해에 의한 소화 흡수성 향상 등 기호적, 영양적인 우수성을 나타내며 전 세계를 통하여 엄청난 시장 규모를 형성하고 있음.

○ 유산균을 소재로써 이용하여 발효제품으로 개발할 경우 유산균의 영양분이 포함되어 유산균의 장내 생존력을 향상시켜주며, 유산균으로부터 분비되어 나오는 대사체 물질 분비에 의한 동반 상승효과를 보인다는 연구결과들도 보고되면서 발효제품 개발의 중요성이 요구되고 있음(Diabetes Obes Metab. 2018 Feb, accepted).

○ 유용 균주를 핵심소재로 하여 제품을 개발하는 제품 중 가장 대중적 인지도가 높은 제형은 발효유이며, 이는 유용 균주를 원료화하여 투여하는 것 외에도 발효 중 분비되는 유용 대사산물을 함께 섭취한다는 점에서 높은 기능성학적 및 영양학적 이점이 예상됨. 그러나 특정 연령층 이상의 경우, 발효유 특유의 신맛에 대한 거부감을 느끼는 소비자가 많으며 특히 한국의 유당불내증 보유 환자가 70% 이상임을 고려하여 최근 락토프리(lacto-free), 비우유 (non-dairy) 트렌드가 증가하고 있음.

○ 본 연구에서 목표로 하는 당뇨 개선 균주를 기반으로 한 대사증후군 시장의 경우, 40대 이상의 중장년층에서 높은 수요가 예상되나 발효유에 대한 중장년층의 인식과 식감 등을 고려하면 발효유를 기반으로 한 제품은 주요 소비층에서 외면받을 확률이 높을 것으로 예상됨. 따라서 성장률이 월등히 앞서면서도 기능성과 웰빙을 강조할 수 있는 발효음료 제품을 기반으로 하는 것이 유리할 것으로 여겨짐.

○ 또한, 본 연구에서 최종 목표로 하는 마이크로바이옴 기반 당뇨 개선 균주를 이용한 발효음료의 경우, 균주 자체의 당뇨 관련 마이크로바이옴 조절에 관련된 핵심 기작이 제품의 주 효능이 될 것이나 그 이상의 부가가치 창출이 가능할 것으로 여겨짐. 즉 일반적으로 미생물이 기질을 이용하여 (본 연구의 경우, 우유 및 식물, 작물 등) 발효 과정을 거치면서 발생하는 수많은 유용 대사산물을 비롯하여 이 대사산물들과 균주와의 시너지 발생이 예상됨, 덧붙여 발효 후 건조 과정을 거친 분말 제품에 비하여 발효과정을 거치면서 당뇨 개선 균주의 활성 역시 재차 증가시켜줄 것으로 여겨져 체내 도달률과 기능성 역시 더욱 높을 것으로 예상됨.

(7) 기능성 유산균주 발굴을 통한 당뇨-스트레스 개선 제품개발의 중요성

○ 기존의 유산균을 이용한 당뇨 연구는 당뇨 환자를 모집하여 동결건조 상태의 유산균주를 투여하여 유산균 섭취의 혈당 증가 여부를 확인하는 연구가 많음.

○ 장내 마이크로바이옴에 대한 관심이 높아지면서 마이크로바이옴과 당뇨 연구가 활발히 진행되고 있으며, 마이크로바이옴-당뇨 연구를 기반으로 유산균의 효능에 대한 연구도 활발히 진행 중임(Postgrad Med J. 2016 May;92(1087):286-300).

○ 최근에는 당뇨 환자의 염증 수치 증가에 따른 미생물 군집 다양성 감소 또는 당뇨 환아의 분변으로부터 마이크로바이옴을 분석하여 자가 면역 발달에 미치는 영향에 대한 연구 등과 같이 당뇨뿐만 아니라 당뇨와 관련된 질환과 연관되는 통합연구 방향으로 진행되고 있음(Cell Host Microbe. 2015 Feb;17(2):260-73).

○ 또한, 당뇨병 중 제2형 당뇨병에 대해서는 넓은 의미의 스트레스가 그 위험성을 가중시킬

수 있다는 연계성 연구도 진행되었으나, 인과 관계 입증에는 아직 미흡한 실정임.

○ 최근 인체 외부와의 연결되는 주요 통로이며 다양한 대사 과정이 일어나는 장내에 서식하는 미생물 군집은, 장벽에 영향을 미치기도 하고 다양한 질병뿐만 아니라 뇌와도 관련이 있다는 장-미생물-뇌 축 이론이 최근 발표되고 있음(Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009 May;6(5):306-14).

○ 각각의 장내 마이크로바이옴-당뇨, 당뇨-스트레스, 장내 마이크로바이옴-스트레스의 연관성에 대한 연구는 있으나 이들을 통합적으로 진행한 연구는 아직 미비한 수준임.

○ 또한, 유산균이 장내 미생물 군집의 정상화를 돕거나 당뇨의 증상을 완화한다는 연구결과는 있지만, 아직 대사물질, 면역학, 인과 관계 등 통합 pathway는 정확히 밝혀지지 않음.

○ 본 연구팀의 유산균 관련 선행 연구결과들을 토대로 유산균에 대한 당뇨-스트레스-염증-면역체계를 통합적으로 연결하기 위한 연구의 필요성이 요구됨.

○ 염증 억제력이 우수한 유산균주 항당뇨-스트레스-염증-면역체계의 체계적인 상관성 연구를 통하여 복합 질환에 대한 유산균의 효능에 대한 최신의 지견을 제공하며, 이 유산균 소재를 이용한 당뇨-스트레스-염증-면역체계를 통합적으로 개선 또는 예방할 수 있는 고부가가치 건강기능식품 소재를 개발할 수 있을 것임.

(8) 기존 연구개발 대비 차별성

○ 식품에 첨가하는 미생물에 대한 안전성 평가 기준은 미국 FDA(Food and Drug Administration)가 사용하고 있는 Generally Recognized as Safe (GRAS)와 유럽연합 European Food Safety Agency (EFSA)의 Qualified Presumption of Safety (QPS)가 대표적으로 적용되고 있음.

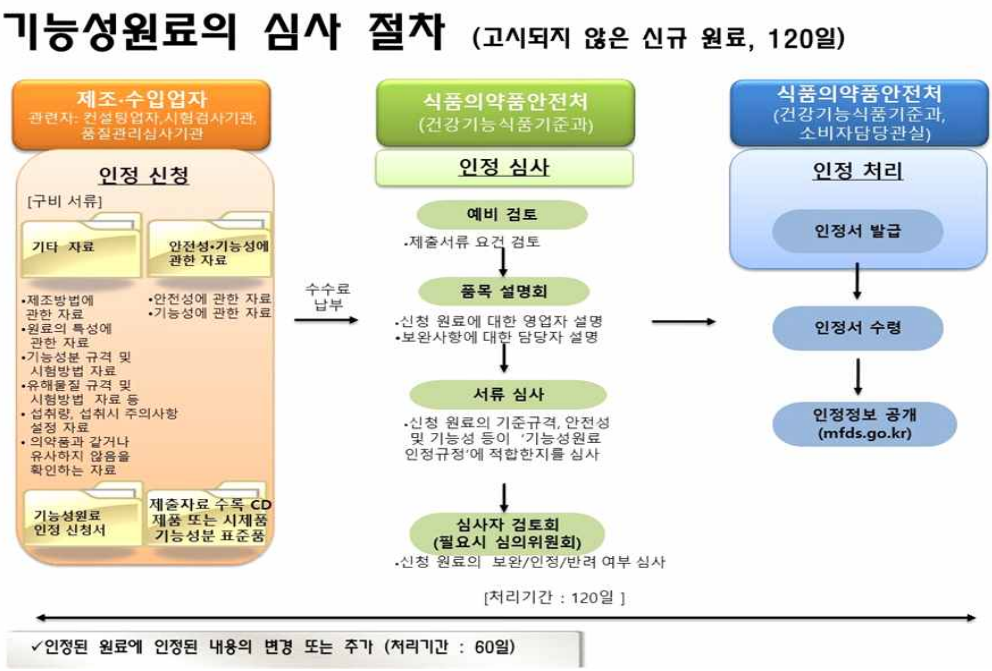
○ FAO/WHO 합동 프로바이오틱스 전문가위원회에서는 기능성과 안전성을 고려하여 *Lactobacillus* 와 *Bifidobacterium* 를 사용하는 것을 권장하였음.

○ 한국의 경우, 현재 식품위생법에 정의된 식품첨가물에 요구르트 제조에 사용하는 유산균 외에 사용 허가된 것이 없으며, 건강 기능성 식품법에는 프로바이오틱스로 허가된 유산균 품목이 고시되어있음.

○ 유산균의 경우는 균주 수준에서의 특이적 사항에 대한 제시와 사용허가를 위한 기준조건이 없고, 같은 속, 같은 종이라 할지라도 그 생화학적, 유전적 특성이 각기 다르기 때문에 유산균의 확인 및 동정은 원료 및 완제의약품의 품질관리에서도 필수적인 항목일 뿐만 아니라 유효성 평가가 중요함.

○ 최근, 장내 마이크로바이옴 분석을 통하여 질병 조절과 관련된 표적 균주 발굴 연구가 활발히 진행되고 있으며, 대표적으로 비만 연구에서는 *Akkermansia muciniphila* (Gut. 2014 May;63(5):727-35), 비만·당뇨에는 *Bacteroides acidifaciens* (Mucosal Immunol. 2017 Jan;10(1):104-116), 아토피 피부염에서는 *Faecalibacterium prausnitzii* (J Allergy Clin Immunol. 2016 Mar;137(3):852-60) 등이 높은 관련성이 있다고 보고되었음.

○ 이 균주들의 조절이 질병에 영향을 미치는 것을 확인했음에도 불구하고, 해당 질환에 대한 건강기능식품 소재로써 활용, 상용화를 위해서는 크게 신청, 자료검토, 각종 평가, 승인 순의 절차를 거쳐야 하는 등 많은 비용과 시간이 소모되는 어려움이 있음.



<그림 10> 식약처 제공 기능성 원료의 심사절차

○ 그러나, 이미 FDA 승인이 된 GRAS 등재 및 건강 기능성 식품법에는 프로바이오틱스로 허가된 유산균 품목을 발굴하여 식품에 첨가할 경우 이미 안전성 있다고 평가가 되었기 때문에 간단한 자료 제출을 통해 허가를 받을 수 있다는 장점이 있음.

○ 최근에는 장의 기능 또는 장내 미생물과 당뇨병의 연관성이 주목을 받고 있으며, 그 결과 다양한 속의 유산균이 연구되어 프로바이오틱스(probiotics) 제품으로 개발되고 있음.

○ 국내·외 프로바이오틱스 균주를 활용한 제품은 개별인정형 원료를 주로 이용하거나 균주 혼합 제품으로 이루어져 있으나, 마이크로바이옴을 기반으로 한 기작 조절, 효능 평가 등을 나타낸 사례는 의약품에 한정되어 있음.

○ 유산균 연구는 주로 항당뇨 효과 분야에 치중되어 있으며, 유산균의 항당뇨 효과 대비 심리 스트레스 완화 효과에 대하여 소수의 논문만 게재되어있음.

○ 특히 유산균의 심리 스트레스 완화 효과 및 항당뇨 효과를 모두 기재한 논문은 없으며, 기존 특허도 유산균의 당뇨 치료제 분야에 치중되어 있음.

○ 본 단위연구기관인 중앙대학교 김원용 교수 연구팀이 진행한 선행연구에서 한국인의 궤양성 대장염 환자의 분변 시료에서 마이크로바이옴을 분석한 결과 약물 투여에 의해 염증이 완화된 환자의 경우 *Lactobacillus*가 증가하는 것을 확인하고, 염증 억제력이 우수한 유산균주를 발굴하였음.

○ 따라서, 본 연구개발은 마이크로바이옴을 기반으로 한 염증 억제력이 우수한 유산균주의 발굴 결과를 기초로 염증-스트레스-당뇨와의 상관성에 대한 메커니즘에 대한 최신 지견을 제공하고, 이와 관련된 고기능성 프로바이오틱스 발효음료를 개발하는 데 유용하게 이용될 것임.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발과제의 수행 과정

(1) 연구개발과제의 수행 과정 및 모식도

○ 단위연구기관인 중앙대학교 의과대학에서는 소재 스크리닝, 생리·생화학적 특성 분석, *in vitro* 및 *in vivo*를 통한 효능 및 기능성 검증을 진행함.

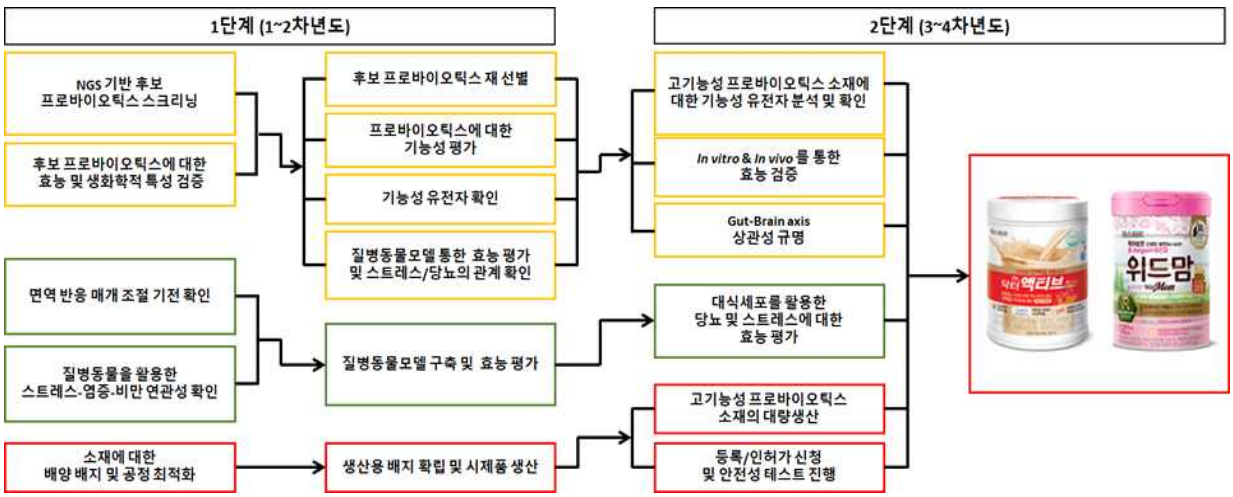
○ Next generation sequencing(NGS) 기반 메타지놈 대용량 분석 및 프로파일링, 스트레스 및 2형 당뇨 관련된 기능성 유전자 기능성 탐색 및 확인에 대하여, 단위연구기관인 중앙대학교 의과대학과 위탁연구기관인 마크로젠과 협업으로 진행됨.

○ NGS (Miseq, Illumina) 분석으로 생성된 fasta 파일을 이용하여, QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)으로 장내 마이크로바이옴의 군집 분석을 실시하였으며, 장내 세균총의 기능 예측 및 시각적 분석을 위해 R studio를 이용함.

○ 2세부 연구기관인 중앙대학교 약학대학에서는 *in vitro* 및 *in vivo*를 통한 효능 평가를 진행하여 면역 반응 매개 조절 기전 및 스트레스-염증-당뇨의 대한 연관성 검증을 진행함.

○ 1협동 연구기관인 롯데푸드에서는 소재에 대한 배양 및 배지의 최적화를 통해 시제품을 생산하고 제품 출시를 위한 등록/인허가 및 안전성 테스트를 진행함.

○ 연구개발과제 수행 과정의 모식도는 아래 그림 11과 같음.



<그림 11> 연구개발과제 수행과정 모식도

2) 연구개발과제의 수행 내용

(1) 1단계(1차년도~2차년도)

○ 마이크로바이옴 기반 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 스크리닝

- 정상인 분변, 장 점막 회복이 된 궤양성 대장염 환자의 분변 및 전통 발효식품 (각종 김치) 시료들을 고체 배지에 도말하여 분리 후 DNA를 추출하여 library를 제작한 후 Illumina sequencing을 진행함 (위탁연구기관: 마크로젠과 협업).
- 확보한 raw data로 taxonomic 프로파일링을 확인하고, 미생물 군집 분석과 장내 마이크로바이옴의 연관성 분석을 통해 식품 허용 미생물 및 GRAS급 프로바이오틱스를 지속적으로 선별함.

○ 프로바이오틱스 소재에 대한 생리·생화학적 특성 분석

- 기본적으로 Raw 264.7 세포주를 활용하여 프로바이오틱스의 독성 여부와 NO assay 및 cytokine 분비량의 차이를 통해 항염증 효능 평가를 진행하고, 형태학적 및 생화학적 특성, 탄수화물 발효 패턴, 균체 지방산 분석 등을 API 20E, API 50CH 등을 이용하여 특성을 분석함.
- HCl 또는 Ox-gall이 첨가된 배지를 이용하여 프로바이오틱스의 내산성 및 내담즙성을 분석하고 Caco-2 cell line을 이용한 발굴 프로바이오틱스의 장 정착능을 평가함.
- 프로바이오틱스 소재 CAU 1365의 탄소원 대사경로 및 비타민 B6 생합성 경로를 바탕으로 단당류로부터 피루브산 및 비타민 B6 생성을 확인하였고 HPLC를 통해 뛰어난 비타민 B6 합성능을 확인함. 이러한 결과를 바탕으로 '최종당화산물 형성을 억제하는

효능을 가진 CAU 1365'에 대한 특허를 출원함.

- 프로바이오틱스 소재 CAU 1538의 특성을 평가하고 세포에 적용하여 우수한 단쇄지방산 생성능을 기반한 장 보호 효과를 확인함. 이러한 결과는 바탕으로 '단쇄지방산 생성 기반 장 환경을 개선하는 효능을 가진 CAU 1538'에 대한 특허를 출원함.

○ 염증 반응에 스트레스가 미치는 영향을 확인하기 위한 면역 반응 매개 조절 기전 규명

- T cell과 내재 면역세포 활성에 프로바이오틱스가 미치는 영향을 확인하기 위해, 비장을 사용하여 T cell의 growth factor와 Th2의 면역 반응에 해당하는 인자들을 분석함.

○ 고지방식이로 비만이 유도된 마우스에서 마우스 체내에 바이오마커와 지방세포에 미치는 영향 분석

- 비만 및 2형 당뇨 유도에 대한 정보를 확보하기 위해 주기적으로 체중, 공복혈당을 확인하고 혈액을 가지고 혈중 인슐린 농도와 콜레스테롤의 수치를 확인함.
- 확보한 생체시료를 가지고 지방 조직의 무게를 측정하고, 지방분해와 관련된 인자들 및 스트레스-염증-당뇨와 관련된 대표적인 인자들을 real-time PCR을 통해 발현량의 차이를 확인함.

○ 고기능성 프로바이오틱스 소재의 배양 배지 및 공정 최적화

- 20여 개의 탄소원, 질소원, 당 이용성, 무기염류들의 농도별과 종류별을 가지고 분석을 진행함.
- 배양온도, 시간, pH, 통기 조건에 변화를 주어 생장성을 분석하고 배양 부피에 따른 평균적인 생장성과 생균수를 측정함.

○ 생체 내 수준에서 진행된 안전성 평가를 통한 30건의 균주 재선별과 가능성 평가

- Raw 264.7 세포주를 활용하여 독성 여부를 확인하고, LPS에 의해 염증이 유도되는 것을 이용하여 NO 생산량 및 inflammatory cytokine의 분비량 차이를 비교하여 항염증 효능을 평가함.
- LPS로 스트레스가 유도된 H295R 세포주를 이용하여 cortisol의 분비 저해능과 지방세포주인 3T3-L1 세포주를 활용하여 지방전구세포를 DMI를 처리하여 지방세포로 분화한 뒤 지방분화와 중성지방의 축적 정도를 확인하고 지방 합성과 관련된 인자들을 real-time PCR을 통해 항비만효과 효과를 확인함.
- 프로바이오틱스를 이용하여 당분해 효소인 α-amylase 및 α-glucosidase에 대한 활성 저해능을 비교하여 항당뇨효과를 확인함.

○ 프로바이오틱스의 스트레스 및 당뇨 조절에 대한 기능성 유전자 확인

- Pacbio SMRT sequencing 방법을 사용하여 선별된 프로바이오틱스 및 추가 후보 균주에 대한 전장 유전체 분석을 진행함.
- 단백질 기능 분석용 데이터베이스 EggNOG를 통해 유전자를, 단백질 구조 모델링 프로그램인 SWISS-MODEL을 통해 유전자의 구조를, 데이터베이스인 Conserved Domains Database(CDD)를 통해 해당 유전자의 구조와 유사한 정도를 확인하고 마지막으로 유전자와 관련된 세포 기작, 분자 기능 등의 데이터베이스인 QuickGO를 활용하여 발현 대사체 경로를 분석함.

○ 스트레스를 통해 당뇨가 유도된 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여(LRCC5310 및 LRCC5314)에 따른 효능 평가 및 스트레스와 제2형 당뇨병의 관계 연구

- Cold exposure를 통해 스트레스를 준 뒤, LRCC5310 및 LRCC5314를 투여한 후, 혈중 corticosterone의 농도를 측정함.
- 확보된 스트레스 유도 당뇨 마우스 분변 샘플로부터 DNA를 추출한 뒤, 마크로젠을 통하여서 illumina sequencing을 이용하여 미생물 군집을 분석함.

- 일반식이와 고지방식이를 사용하여, 주기적으로 체중의 변화량을 확인하여 억제되는 정도를 확인하고 당뇨 진단 테스트인 공복혈당, 혈청 내 인슐린 농도, 포도당 내성 검사, 인슐린 내성 검사를 실시함.
- 생체시료를 확보하여 혈액으로는 corticosterone의 농도를 조직으로는 무게를 측정하고 포도당 대사 관련 인자, 지방 조직 내 스트레스 조절 인자, 염증 조절 인자를 qPCR를 통해 발현량의 차이를 확인함.

○ 2형 당뇨병과 스트레스 질환 통합 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재 실용화
- 전년도에 확립한 미생물의 최적 배지를 토대로 하여 현장 수준에서 사용이 가능한 생산용 배지를 만들고, 배양 스케일-업을 진행한 뒤, 생산을 위한 분말화를 진행하기 위해 동결건조를 진행함.
- ㈜락토메이슨에서 현장 원료를 생산하고, 실험실 수준 배합 테스트를 통해 시생산 테스를 진행하고, 시생산된 분유에 대해 유산균수 및 영양성분을 분석하면서 시제품 패키지 및 디자인 개발을 함.

(2) 2단계(3차년도~4차년도)

○ 고기능성 프로바이오틱 소재(LRCC5314)에 대한 기능성 유전자 확인 및 *in vitro*와 *in vivo*에서의 기능성 검증
- 전장 유전체의 유전자 기능 분석을 통해, 스트레스 및 2형 당뇨 관련된 기능성 유전자를 확인하고 COG, KASS, KEGG, Cytoscape software 등을 이용하여 대사체 분석을 진행함.
- 3T3-L1 지방세포주를 활용하여 LRCC5314에 대한 지방분화 억제 및 중성지방의 함량을 확인함.
- 사균체 소재에 대한 독성평가를 진행하고 고지방식이와 cold exposure을 통해 스트레스를 유도하여 스트레스성 2형 당뇨 동물 모델을 만든 뒤, 주기적으로 체중의 변화량을 확인하여 억제되는 정도를 확인하고 당뇨 진단 테스트인 공복혈당, 포도당 내성 검사, 인슐린 내성 검사를 실시함.
- 생체시료를 확보하여 혈액으로 corticosterone의 농도를 조직으로는 무게를 측정하고 포도당 대사 관련 인자, 지방 조직 내 스트레스 조절인자. 염증인자들을 qPCR를 통해 발현량의 차이를 확인함. 또한, 분변시료를 가지고 illumina sequencing을 이용한 메타분석을 통해 장내 마이크로바이옴을 분석함.

○ 프로/포스트바이오틱스 소재(LRCC5310과 LRCC5314)가 대식세포 분화에 미치는 영향 분석
- 인간 단핵구 세포주 (THP-1)에 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화 조건을 확립한 뒤, IFN-γ와 LPS를 통해서 M1 대식세포로의 분화를 IL-4와 IL-13을 통해서 M2 대식세포로의 분화를 유도한 뒤, 표면 분자 인자들을 확인함.
- THP-1을 이용한 프로바이오틱스 소재 처리 실험 프로토콜 정립하고 프로바이오틱스 소재를 처리하여 M1과 M2 대식세포의 바이오마커를 real-time PCR을 통해 발현량의 차이를 확인함.
- 마찬가지로, 마우스 복강 대식세포를 이용하여 대식세포를 이용한 M1, M2 분화 실험 프로토콜 정립하고 이를 토대로, 프로바이오틱스 소재를 처리하여 M1과 M2 대식세포의 바이오마커를 real-time PCR을 통해 발현량의 차이를 확인함.

○ 시제품에 대한 2형 당뇨병과 스트레스 질환 통합에서의 효능 검증
- 고지방식이와 cold exposure을 통해 스트레스를 유도하여 스트레스성 2형 당뇨 동물 모델을 만든 뒤, 주기적으로 체중의 변화량을 확인하여 억제되는 정도를 확인하고 당뇨

진단 테스트인 공복혈당, 혈청 내 인슐린 농도, 포도당 내성 검사, 인슐린 내성 검사를 실시함.

- 생체시료를 확보하여 혈액으로 corticosterone의 농도를 확인하고 뇌 조직, 지방 조직, 장 조직을 확보하여 포도당 대사 관련 인자, 스트레스 조절인자, 염증 조절인자를 qPCR를 통해 발현량의 차이를 확인함. 또한, 분변 시료를 가지고 SCFAs를 분석하고 Illumina sequencing 분석을 통해 스트레스 및 2형 당뇨에 따른 장내 마이크로바이옴을 분석함. 이들의 결과를 종합하여, gut-brain axis의 상관성을 규명함.

○ 스트레스-당뇨 모델에서 프로바이오틱스의 면역조절 기전을 규명

- 인슐린종 세포주 MIN6를 이용하여, 프로토콜을 확립하고 산화적 스트레스를 유발하여 프로바이오틱스에 의한 스트레스 감소를 확인하고 인슐린 분비능의 회복을 확인함. 또한, 스트레스-염증-당뇨 축에서 TGF-β 신호전달 기작을 통해 염증 관련 인자들의 발현량의 차이를 비교하여 치유 효과에 대한 연구를 진행함.

○ 2형 당뇨병과 스트레스 질환 통합 개선 프로바이오틱스 소재의 실용화

- 확보한 LRCC5314 프로바이오틱스 및 포스트바이오틱스 혹은 대사산물의 지표성분에 대한 소재화에 대량 생산을 진행하고 이를 적용한 분유 시제품을 실제 판매용 제품으로 생산하기 위한 등록/인허가 신청과 제품 적용 및 유통 안정성 테스트를 진행함.
- 제품 적용성을 위해 제조, 살균 공정, 유통조건 조사를 진행하고 분유 및 성인 영양식 적용을 위한 자체 브랜드 및 육성전략 개발을 실시함.
- 공정 조건별 안전성을 확인하고 생균 원료에 대해 유통기간 설정을 위한 보관 안전성을 실시함. 또한, 다양한 제형으로의 확대를 위해 각각의 제형에 대한 보관 안전성을 실시함.

○ 포스트바이오틱스 소재화 및 제품 출시

- 소재화를 위해 '락토바실러스 플랜타럼 LRCC5314 포스트바이오틱스'의 명칭으로 품목 신고 완료 및 대량 생산을 진행함.
- 또한, 제품에 적용하여 출시하기 위해 경시 안전성을 확인하고 제품으로 개발함.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

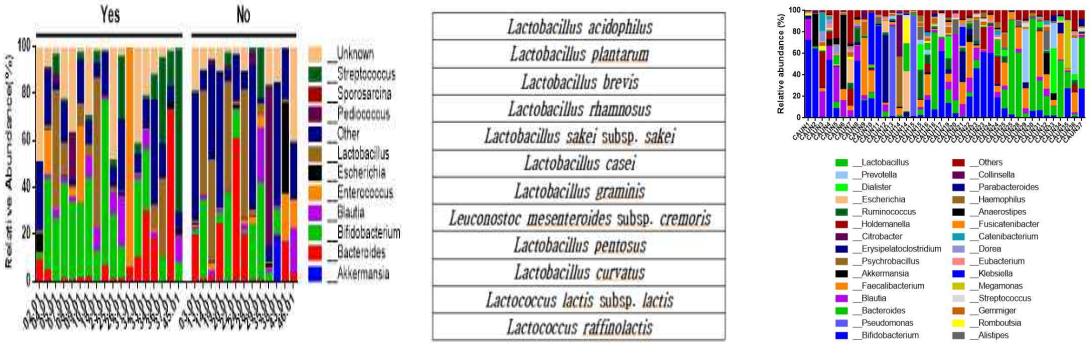
(1) 정성적 연구개발성과

○ 대용량 NGS 기술을 이용한 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 스크리닝

- 마이크로바이옴 기반 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재를 스크리닝함.
  - 중앙대학병원 소화기내과로부터 제공받은 정상인 분변 시료 및 로컬마켓에서 구매한 전통발효식품 (각종 김치) 시료를 수집함.
  - 장 점막 회복이 된 궤양성 대장염 환자와 정상인 분변 시료로부터 FastDNA spin kit(MP Biomedicals, USA)를 사용하여 세균의 DNA를 추출함(위탁연구기관: 마크로젠과 협업).
  - 각각의 시료를 각각 분쇄한 후 액상 부분을 취하여 십진 희석법으로 희석 후 고체 배지에 도말하여 분리 접종 후 염기 서열을 분석함(위탁연구기관: 마크로젠과 협업).
    - 2018년도 3월부터 중앙대학교 병원 윤리위원회의 승인을 받아 궤양성 대장염 환자와 정상인으로부터 분변 시료를 모으고 임상 데이터베이스를 구축하였음.
    - 장 점막 회복이 된 궤양성 대장염 환자로부터 얻은 분변 시료로부터 52건에 대한

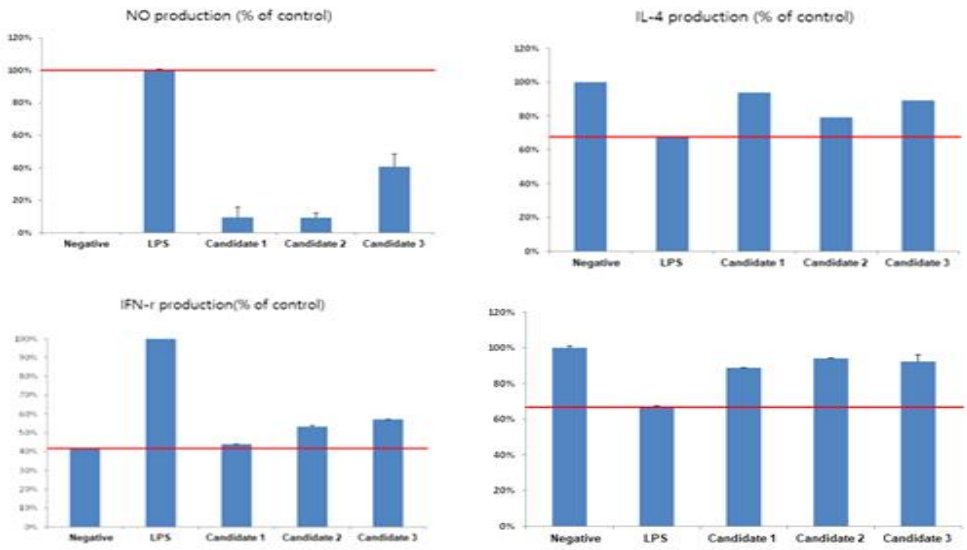
illumina sequencing을 이용한 미생물 군집 분석하여, 454.3MB의 Raw data, 총 1,556,702 reads를 얻었음.

- 정상인 분변 시료, 장 점막 회복이 된 궤양성 대장염 환자, 로컬 마켓에서 구매한 전통 발효식품으로부터 총 383건의 식품 허용 미생물 및 GRAS급 프로바이오틱스를 선별 및 발굴함.
- 정상인으로부터 얻은 분변 시료로부터 40건에 대한 illumina sequencing을 이용하여 미생물 군집을 분석하여, 942.6 MB의 Raw data, 총 2,857,299 reads를 얻었음.
- Taxonomic 군집 분석을 통해 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 종이 장내 마이크로바이옴을 구성하는 주요 Genus인 것으로 나타남.
- 2019년도 중앙대학교 병원 윤리위원회의 승인을 받아 정상인으로부터 분변 시료를 모으고 임상데이터베이스를 구축하였음.



<그림 12> 장 점막 회복에 따른 미생물 군집 분포 및 대표 발굴 프로바이오틱스 목록

- MTT assay를 통한 발굴 프로바이오틱스의 독성 여부를 확인함.
- NO assay 및 cytokine 분비량 차이를 통한 발굴 균주의 항염증 효능을 평가함.
  - 383건에 대한 발굴 프로바이오틱스에 대하여 Raw 264.7 cell line과 J774A.1 cell line을 이용하여 생체 내 수준에서 안전성 평가를 진행하였으며, 이를 통해 독성이 없는 것을 확인함.
  - 발굴 프로바이오틱스에 대하여 세포 수준에서의 염증성 싸이토카인을 분석하였으며, 염증과 관련된 TNF-α, IFN-ɣ, IL-1β, IL-4 등에서 우수한 항염증 효과를 보이는 35건의 프로바이오틱스를 확보함.



<그림 13> 대표 발굴 프로바이오틱스의 독성평가 & 염증관련 인자에 대한 결과

▪ 식품의약품안전처 고시에 따라 식품 허용 미생물 및 GRAS급 프로바이오틱스를 선별 및 발굴하여, 독성이 없고 우수한 항염증 효과를 보이는 발굴 프로바이오틱스에 대하여 API 20E, API 50CH 등을 이용하여 생리·생화학적 특성을 조사하였음.

▸ 발굴 균주들은 주로 D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-Acetyl glutamin, D-maltose, D-lactose, D-trehalose, Sodium pyruvate, D-mannitol, Amygdalin 등을 carbon utilization 물질로 이용하는 것을 확인함.

<그림 14> API 50CH 결과

○ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 특성 및 유전체 분석

- 프로바이오틱스 소재의 특성을 분석함.

▪ 발굴 프로바이오틱스에 대하여 내산성 및 내담즙성을 평가함.

▸ HCl로 pH 2.0 환경을 조성한 MRS에서 모든 발굴 프로바이오틱스가 120분 동안 생존하며 10^8cells/ml 이상으로 성장하는 결과를 보여 내산성을 지님을 확인하였음.

▸ Ox-gall이 첨가되지 않은 MRS에서의 증식률을 100%로 두고 Ox-gall 0.2%, 0.4% 가 첨가된 MRS에서의 증식률을 비교하였을 때, 두 농도에서 9시간에서 95% 이상, 12시간에서 85% 이상의 증식률을 보여 내담즙성을 지님을 확인함.

▪ Caco-2 cell line을 이용한 발굴 프로바이오틱스의 장 정착능을 평가함.

▸ 확보한 35건의 프로바이오틱스에 대하여 장 상피세포를 이용한 장 정착성 평가를 진행한 결과, 초기 접종량 1 x 10^7 CFU/ml에서 평가 후 평균 3.7 x 10^6 CFU/ml이 정착하여 생존 된 것을 확인함.

- 프로바이오틱스 소재의 특성 분석 및 안전성을 평가함.

▪ RAW 264.7 cell line을 이용하여 발굴한 프로바이오틱스에 대한 독성 여부 확인 및 안전성이 우수한 균주를 선별함.

▪ LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 cell line을 이용하여 NO assay 및 cytokine 분비량 차이를 통한 선별 균주의 항염증 효능을 평가함.

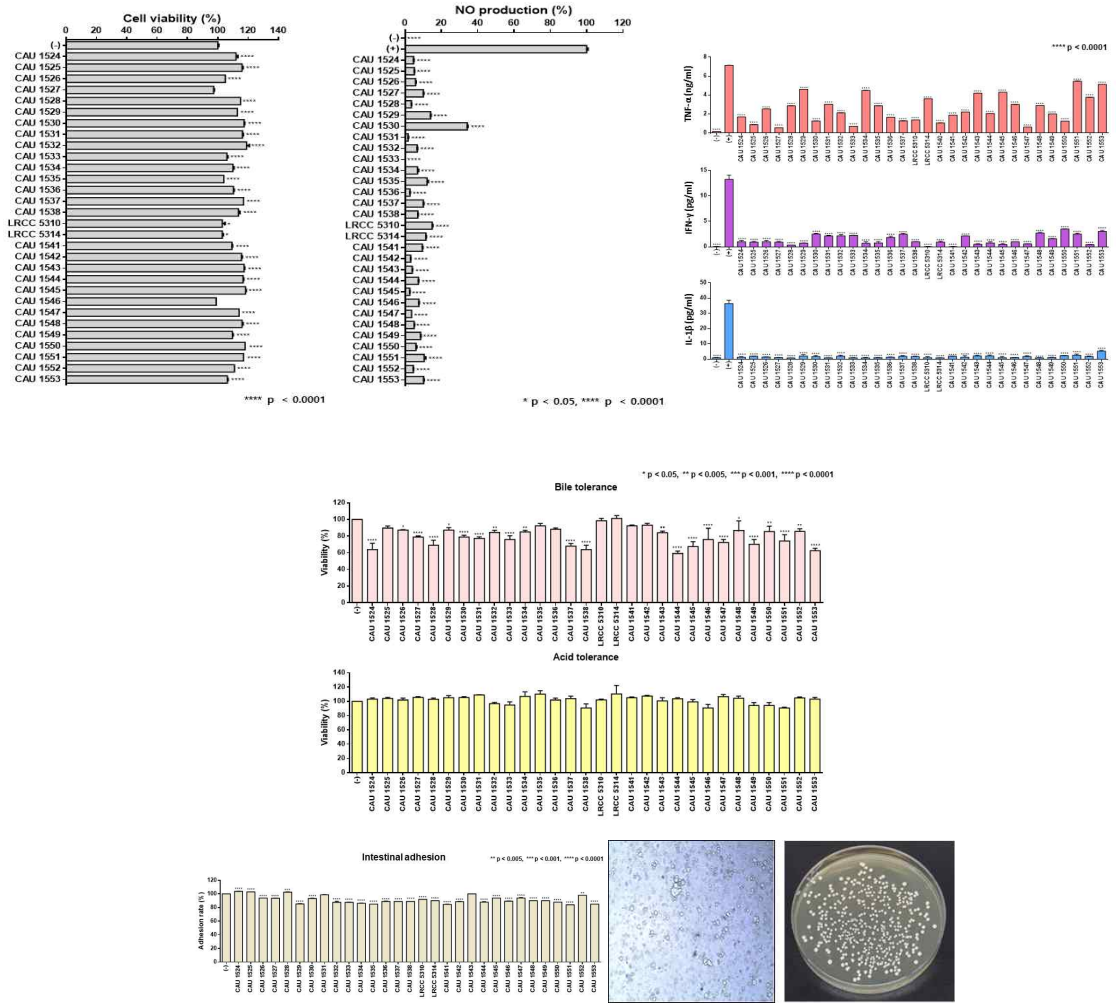
▪ HCl 또는 Ox-gall이 첨가된 배지에서의 배양을 통해 선별 프로바이오틱스의 내산성 및 내담즙성을 평가함.

▪ Caco-2 cell line을 이용한 선별 프로바이오틱스의 장 정착능을 평가함.

▸ 1차년도 발굴 프로바이오틱스 35개 중, 생체 내 수준에서 안전성 평가를 진행하여 90% 이상의 세포 생존율을 보이는 30건의 균주를 재선별함.

▸ 30건의 선별 프로바이오틱스에 대하여 세포 수준에서의 염증 인자 및 염증성 싸이토카인 분석하였으며, 염증과 관련된 TNF-α, IFN-ɣ, IL-1β 등에서 우수한 항염증 효과가 있음을 확인함.

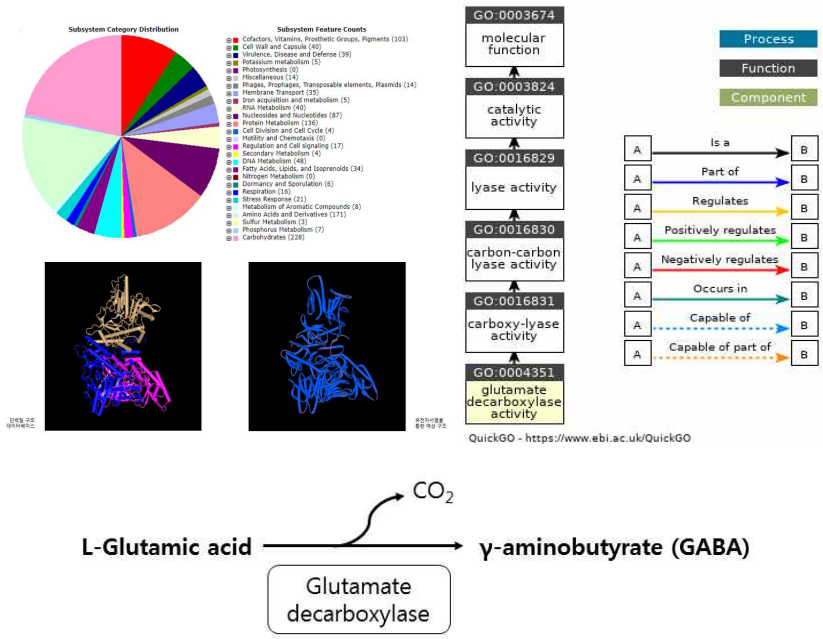
- HCl로 pH 2.0 환경을 조성한 MRS에서 모든 발굴 균주가 120분 동안 80% 이상의 세포 생존율을 보였으므로 내산성을 지님을 확인함.
- Ox-gall이 첨가되지 않은 MRS에서의 증식률을 100%로 두고 Ox-gall 0.2%, 0.4%가 첨가된 MRS에서의 증식률을 비교하였을 때, 두 농도에서 9시간에서 95% 이상, 12시간에서 85% 이상의 증식률을 보여 내담즙성을 지님을 확인함.
- 확보한 30건의 프로바이오틱스에 대하여 장 상피세포를 이용한 장 정착성 평가를 진행한 결과, 초기 접종량 1 x 10^7 CFU/ml에서 평가 후 평균 3.7 x 10^6 CFU/ml이 정착하여 생존 된 것을 확인함.



<그림 15> 선별 프로바이오틱스의 특성(내담즙/내산성, 장정착능) 및 안전성(독성, 항염증 효능) 평가

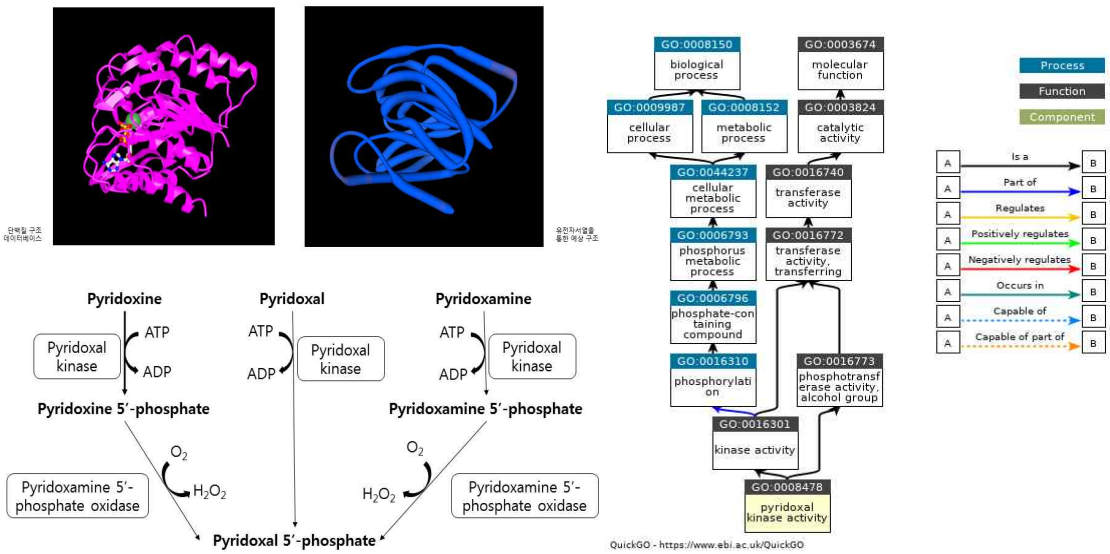
- 프로바이오틱스 소재 LRCC5314의 유전체를 분석함.
  - 프로바이오틱스 소재에 대하여 스트레스 및 2형 당뇨 관련 기능성 유전자 보유를 확인함.
  - COG, KASS, KEGG, Cytoscape software 등을 이용하여 해당 균주의 metabolic pathway, regulatory pathway, metabolite 등을 통합 분석함.
  - Pacbio SMRT sequencing 방법을 통한 전장 유전체를 분석함.
    - 프로바이오틱스 소재 LRCC5314의 전장 유전체의 유전자 기능 분석을 통하여 vitamins 생합성, amino acid metabolism 등 스트레스 및 2형 당뇨 관련된 기능성 유전자를 확인함.
    - 프로바이오틱스 소재 LRCC5314에서 발견된 GABA 생성 유전자의 서열을 통한 예상 구조가 단백질 구조 데이터베이스의 GABA 생성 유전자와 같은 구조를 형성하는 것을 확인함.

- 유전자의 기능 분석을 위해 유전자와 관련된 세포 기작, 분자 기능 등의 데이터베이스인 QuickGO를 활용, GABA 생성 유전자의 기능 지도를 작성. 촉매 반응을 통하여 GABA 생성에 관여하는 것을 확인함.
- GABA 생성 유전자의 metabolic pathway를 확인함.



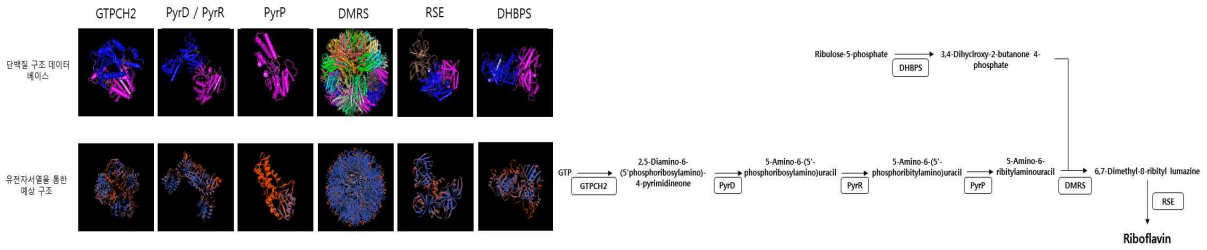
<그림 16> 기능성 유전자 분석 및 유용유전자 확보, GABA 생성 유전자 단백질 구조, 기능 지도 및 metabolic pathway

- 프로바이오틱스 소재 LRCC5314에서 발견된 비타민 B2 생성 유전자의 서열을 통한 예상 구조가 단백질 구조 데이터베이스의 비타민 B2 생성 유전자와 같은 구조를 형성하는 것을 확인함.
- 유전자의 기능 분석을 위해 유전자와 관련된 세포 기작, 분자 기능 등의 데이터베이스인 QuickGO를 활용, 비타민 B2 생성 유전자의 기능 지도를 작성. 비타민 합성을 위한 촉매 반응과 물질대사의 과정에 관여하는 기능을 가지는 것을 확인함.
- 비타민 B2 생성 유전자의 metabolic pathway를 작성함.



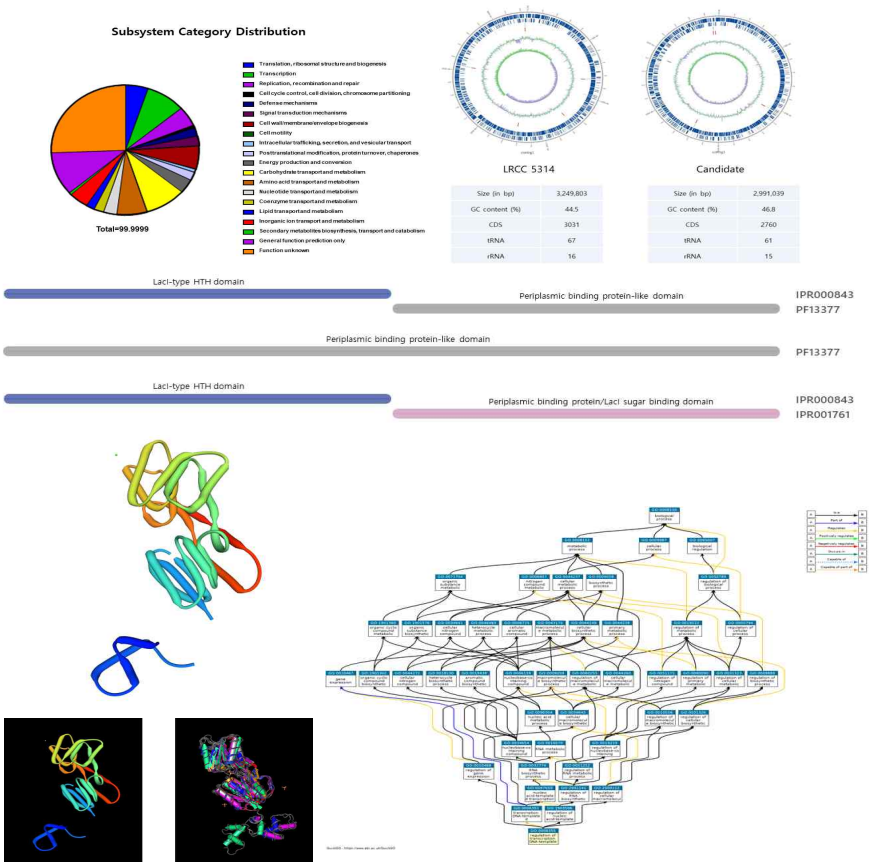
<그림 17> 비타민 B2 생성 단백질 구조, 유전자 기능 지도 및 metabolic pathway

- 프로바이오틱스 소재 LRCC5314에서 발견된 비타민 B6 생성 유전자의 서열을 통한 예상 구조가 단백질 구조 데이터베이스의 비타민 B6 생성 유전자와 같은 구조를 형성하는 것을 확인함.
- 비타민 B6 생성 유전자의 metabolic pathway를 작성함.



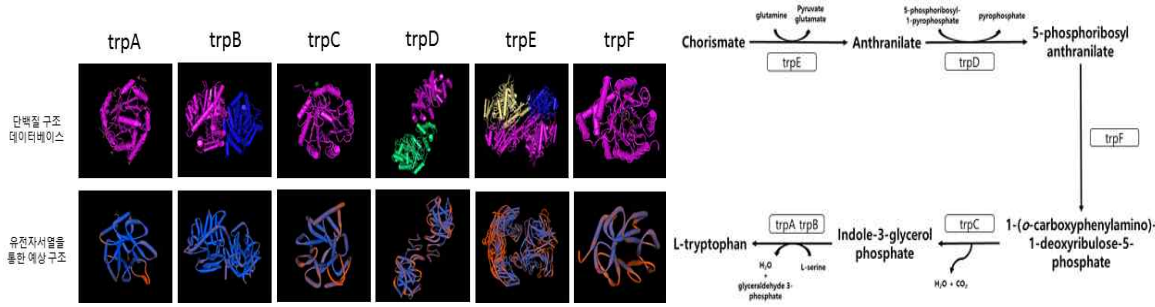
<그림 18> 비타민 B6 생성 단백질 구조 및 metabolic pathway

- 단백질 기능 분석용 데이터베이스 EggNOG를 통해 콜레스테롤 감소에 관여하는 유전자인 Catabolite control protein A (ccpA) 생산 유전자를 보유하고 있음을 확인함.
- 단백질 구조 모델링 프로그램인 SWISS-MODEL을 활용하여 선별 균주의 ccpA 유전자 구조를 확인하였으며 데이터베이스인 Conserved Domains Database (CDD)를 활용하여 다른 균주에 존재하는 ccpA의 구조와 유사함을 확인함.
- 유전자와 관련된 세포 기작, 분자 기능 등의 데이터베이스인 QuickGO를 활용하여 유전자와 관련된 기능에 대한 지도를 토대로 ccpA 유전자 분석을 진행한 결과, ccpA 유전자는 전사 및 발현 기능을 가진 유전자들과 상호작용을 하며, 거대분자 생합성, 대사 과정 등의 기능을 가진 유전자의 활성에도 관여하는 것을 확인함.



<그림 19> 유용 단백질 생산 유전자 분석과 ccpA 생산 유전자의 발굴

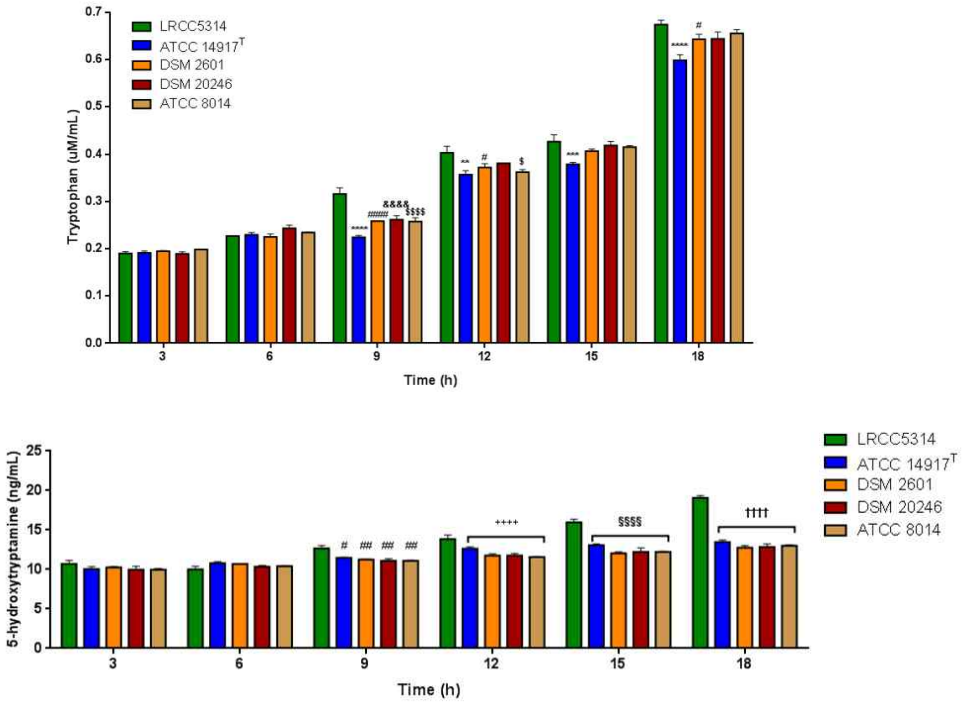
▸ 트립토판 생합성 유전자집단의 metabolic pathway를 작성함.



<그림 20> Tryptophan 생성 단백질 구조 및 metabolic pathway

▸ Tryptophan Assay를 통해 프로바이오틱스 소재 LRCC5314의 트립토판 생산량을 확인하였으며, 다른 *L. plantarum* 균주들과의 트립토판 생산량을 비교하여 LRCC5314의 트립토판 생산량이 다른 균주들에 비하여 우수함을 확인함.

▸ HT-22 cell line에 LRCC5314의 생산 트립토판이 포함된 배양 상층액을 처리하여 세로토닌 분비량을 확인, 다른 *L. plantarum* 균주들의 배양 상층액 처리군과 세로토닌 분비량을 비교하여 LRCC5314의 배양 상층액의 세로토닌 분비 촉진능이 우수함을 확인함.



<그림 21> 트립토판 생산량 및 Serotonin 분비량 비교

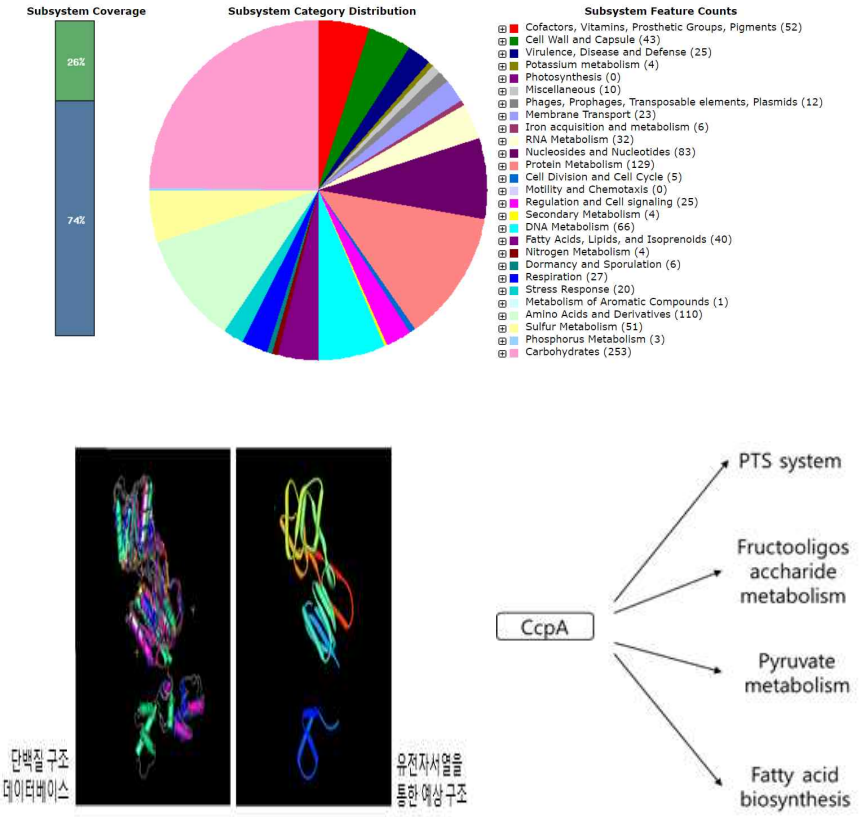
- 프로바이오틱스 소재 CAU 1365의 유전체를 분석함.

▪ 프로바이오틱스 소재 CAU 1365의 전장 유전체 분석 및 기능성 유전자를 확인함.

▸ Pacbio SMRT sequencing 분석을 통해 46.8%의 GC 함량을 지닌 2,991,039 bp의 chromosome을 확인함. 2,658개의 단백질 암호화 유전자와 80개의 RNA (15개의 rRNA, 62개의 tRNA, 3개의 noncoding RNA)를 보유하고 있음을 확인함. Vitamins 생합성, amino acid metabolism 등의 기능성 유전자를 확인함.

▸ 콜레스테롤 감소에 관여하는 유전자인 Catabolite control protein A (ccpA) 생산 유전자를 보유하고 있음을 확인함.

▸ CcpA 유전자가 관여하는 대사과정에 대한 pathway를 작성함.



<그림 22> 기능성 유전자 분석과 ccpA 생산 유전자의 발굴

– 프로바이오틱스 소재 LRCC5310의 유전체를 분석함.

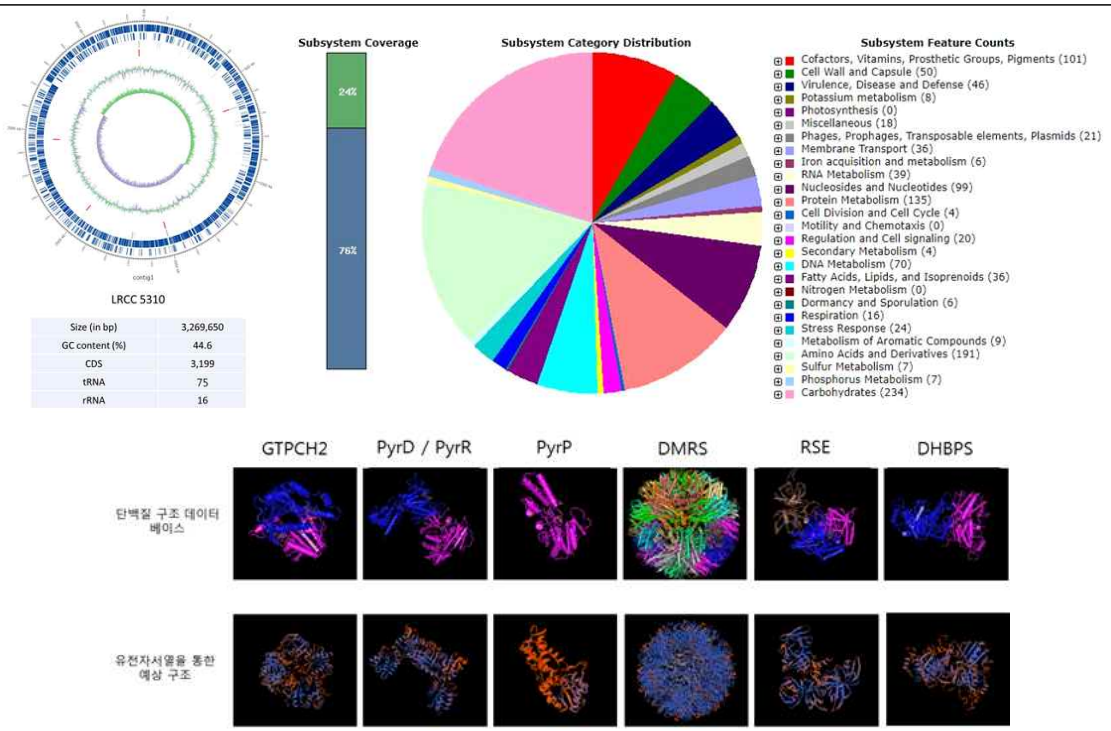
▪ 프로바이오틱스 소재에 대한 전장 유전체 분석 및 비타민 B6 기능성 유전자를 확인함.

▪ 프로바이오틱스 소재 LRCC5310에서 발견된 트립토판 생합성 유전자집단의 서열을 통한 예상 구조가 단백질 구조 데이터베이스의 트립토판 생합성 유전자집단과 같은 구조를 형성하는 것을 확인함.

▸ 프로바이오틱스 소재 LRCC5310는 Pacbio SMRT sequencing 분석을 통해 44.6%의 GC 함량을 지닌 3,269,650 bp의 chromosome을 확인함. 3,199개의 단백질 암호화 유전자와 95개의 RNA (16개의 rRNA, 75개의 tRNA, 4개의 noncoding RNA)를 보유하고 있음을 확인함.

▸ Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) server를 이용한 전장 유전체 분석을 통하여 vitamins 생합성, amino acids metabolism, 탄소원 대사 등의 기능을 가진 기능성 유전자를 보유하고 있음을 확인함.

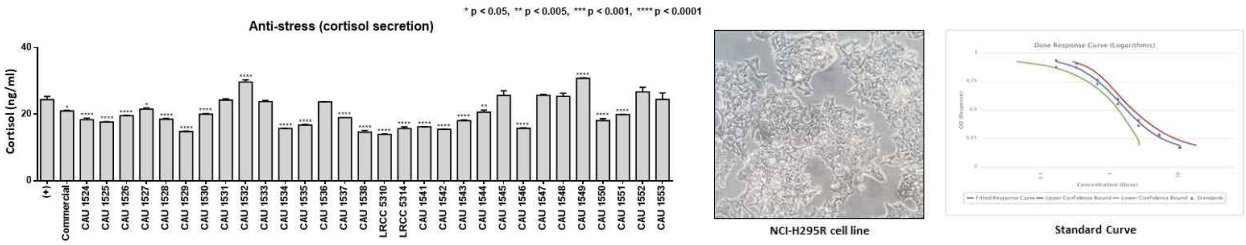
▸ 프로바이오틱스 소재 LRCC5310의 전장 유전체 내에 당뇨병 개선 효과를 보이는 비타민 B6 생합성에 관여하는 유전자집단을 보유하고 있음을 확인함. 해당 유전자집단의 염기서열을 통해 도출한 예상 구조가 단백질 구조 데이터베이스상의 비타민 B6 생합성 유전자집단과 같은 구조를 형성하는 것을 확인함.



<그림 23> 전장 유전체 분석 및 비타민 B6 단백질 구조

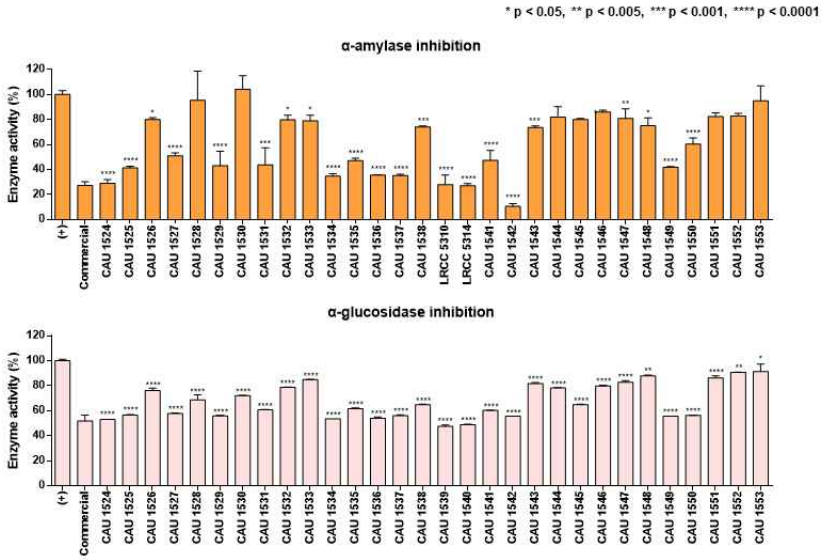
○ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 스트레스 및 2형 당뇨병에 대한 기능성 분석

- 프로바이오틱스 소재의 항스트레스 효능을 평가함. (*in vitro*)
  - LPS로 스트레스가 유도된 H295R cell line을 이용하여 발굴 프로바이오틱스의 Cortisol 분비 저해능을 평가함.
    - 확보한 30건의 프로바이오틱스에 대하여 부신 세포에서 분비되는 Cortisol 분해 저해 효과 확인한 결과, LRCC5310 및 LRCC5314를 처리한 세포에서 우수한 Cortisol 분비 저해능을 보임.



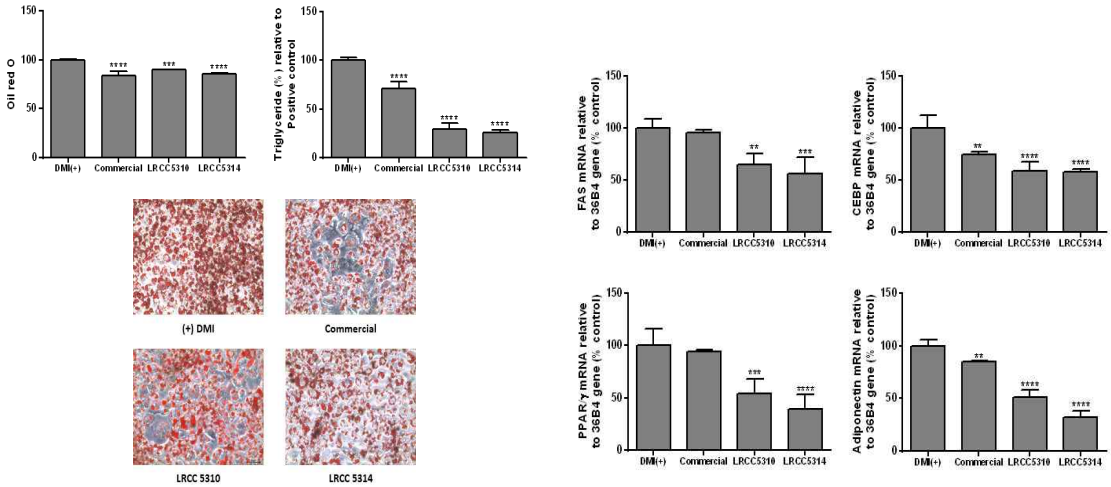
<그림 24> 선별 프로바이오틱스의 Cortisol 분비 억제능 평가

- 프로바이오틱스 소재의 항당뇨 효능을 평가함. (*in vitro*)
  - 선별 프로바이오틱스의 당분해 효소(α-amylase 및 α-glucosidase)에 대한 활성 저해능을 평가함.
  - DMI에 의해 지방분화가 유도된 3T3-L1 cell line을 이용하여 당분해효소 활성 저해능이 뛰어난 LRCC5310 및 LRCC5314의 지방분화 억제능을 평가함.
    - 확보한 30건의 프로바이오틱스에 대하여 당분해 효소에 대한 활성 저해 효과를 확인한 결과, LRCC5310 및 LRCC5314에서 α-amylase 및 α-glucosidase 활성 저해율이 우수함을 확인함.



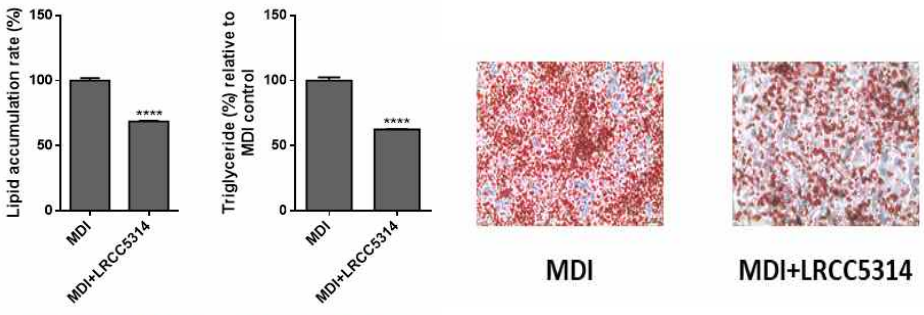
<그림 25> 선별 프로바이오틱스의 당분해 효소에 대한 활성 저해 효과

- Oil red 염색을 통해 세포의 지방분화를 비교한 결과, LRCC5310 및 LRCC5314에서 지방분화가 억제됨을 확인하였으며 중성지방인 Triglyceride가 크게 감소함을 보임을 확인함.
- 지방 축적에 관여하는 인자들의 mRNA 발현량을 비교한 결과, LRCC5310 및 LRCC5314에서 발현량이 크게 감소함을 보임을 확인함.



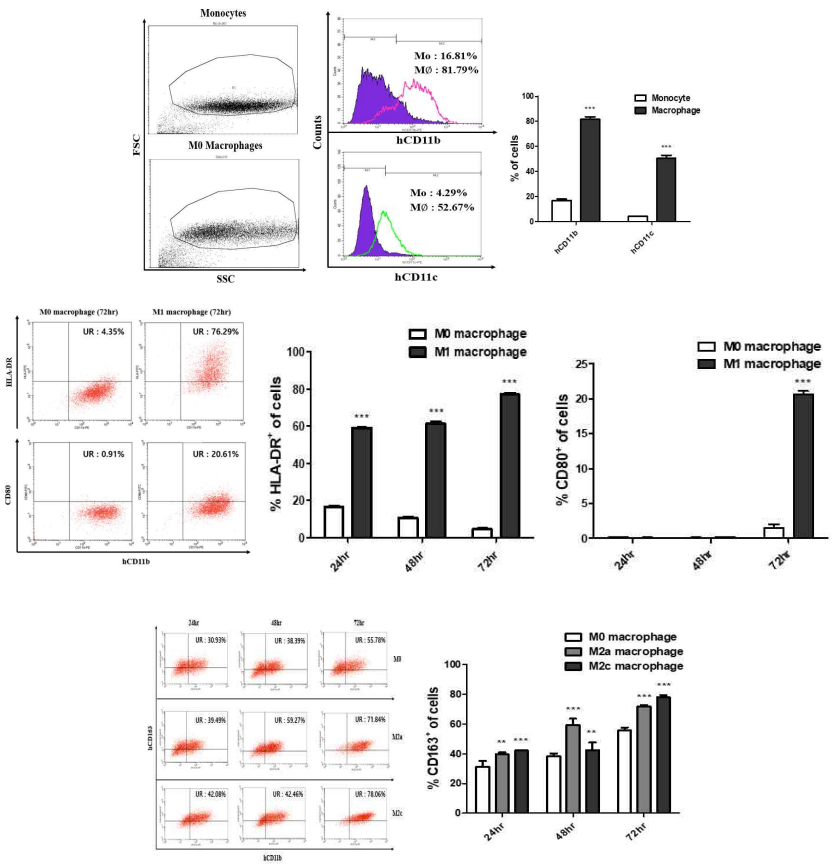
<그림 26> LRCC5310 및 LRCC5314의 지방분화 억제 및 지방 축적 관련 mRNA 발현량 비교

- LRCC5314 사균체 소재의 항비만 효능을 평가함. (*in vitro*)
  - 3T3-L1 세포에 LRCC5314 사균체를 처리하여 지방분화 억제 및 중성지방 생성 억제 효능을 확인함.
    - LRCC5314 사균체가 지방세포 분화를 억제하고 중성지방 생성 억제를 확인함.



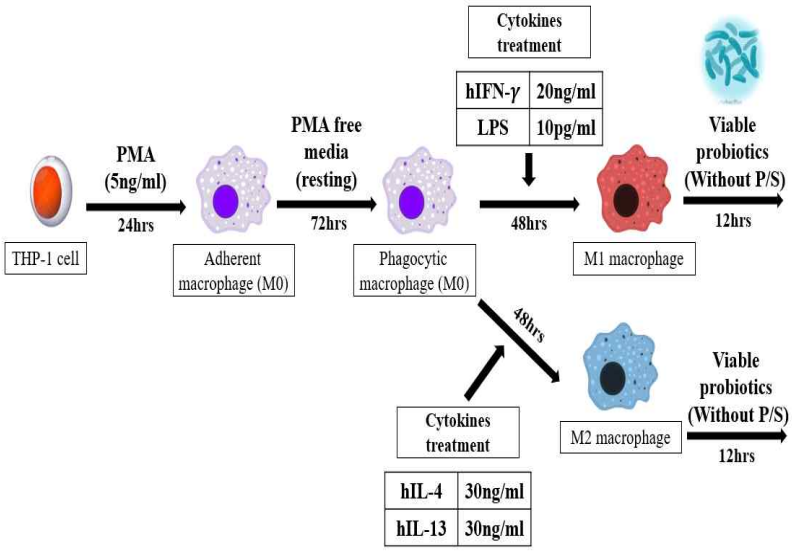
<그림 27> LRCC5314의 지방 분화 및 중성지방 생성 억제능 평가

- 인간 단핵구 세포주 (THP-1)를 이용한 프로바이오틱스 소재가 대식세포 분화에 미치는 영향을 연구함. (*in vitro*)
  - 인간 단핵구 세포주를 PMA를 통해서 대식세포로의 분화 실험 조건을 확립함.
  - 대식세포로 분화시킨 후 IFN-γ와 LPS를 통해서 M1 대식세포로의 분화를 유도함.
  - 대식세포로 분화시킨 후 IL-4와 IL-13을 통해서 M2 대식세포로의 분화 실험 조건을 확립함.
    - PMA 처리군에서 FSC, SSC가 증가되었고, 대식세포의 대표적인 마커인 CD11b와 CD11c가 증가됨.
    - 분화된 대식세포의 morphology를 확인함.
    - IFN-γ + LPS 처리군에서 M1 대식세포의 대표적인 표면 분자 마커인 HLA-DR과 CD80이 증가됨.
    - IL-4 + IL-13 처리군에서 M2 대식세포의 대표적인 표면 분자 마커인 CD163이 증가됨.



<그림 28> 분화된 대식세포, M1 및 M2 대식세포의 표면 분자 확인

▸ THP-1을 이용한 LRCC5314 사균체 처리 실험 프로토콜을 정립함.

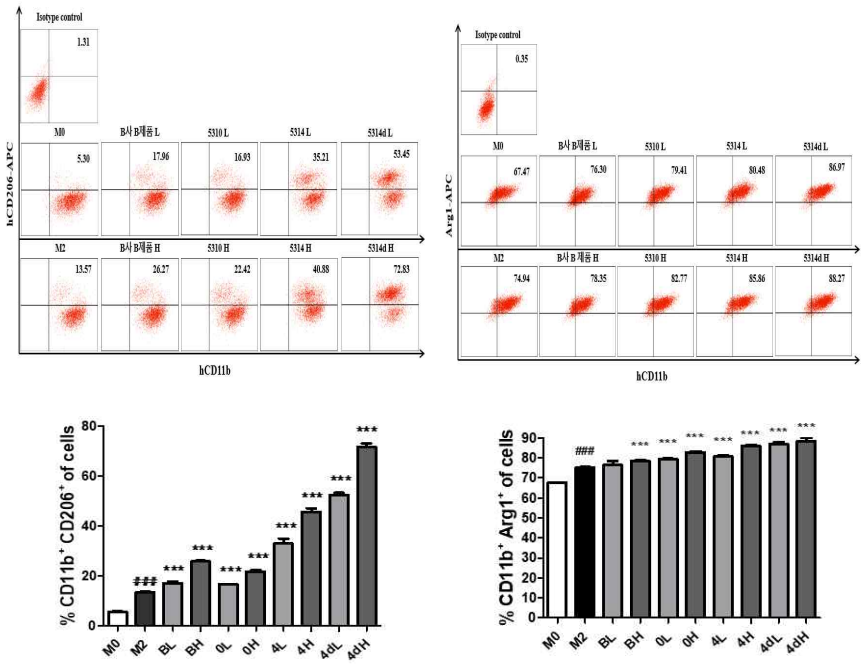


<그림 29> 프로바이오틱스 처리 실험 protocol 정립

▪ 인간 단핵구 세포주를 PMA를 통해서 대식세포로 분화시킨 후 IFN-ɣ와 LPS를 통해서 M1 대식세포로 분화 유도함.

▸ 분화된 세포에 프로바이오틱스 소재 (B사 B제품, LRCC5310, LRCC5314, LRCC5314 사균)을 저농도, 고농도로 공동배양하여 M1 대식세포의 biomarker CD11b+HLA-DR+, CD11b+iNOS+ cells를 Flow cytometry를 통해 확인함.

▸ 프로바이오틱스 소재 처리군에서 LRCC5310, 5314, 5314 사균에 의해 세포막 hCD206과 세포질 내 Arg1가 증가됨.

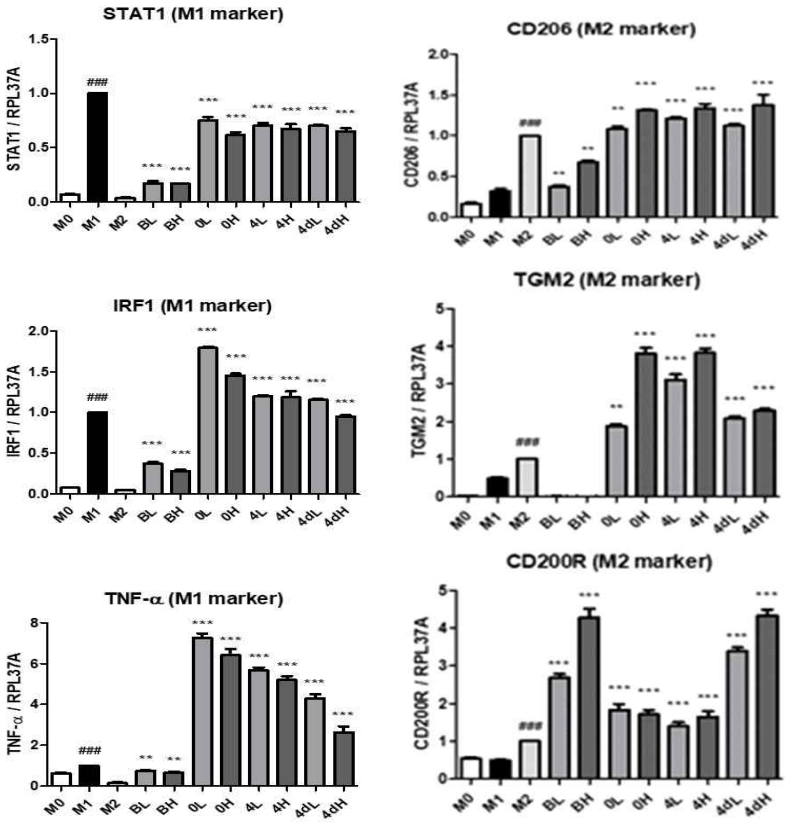


<그림 30> 프로바이오틱스 소재 처리에 따른 M1 대식세포 인자 확인

▪ M1 대식세포로 분화된 세포에 프로바이오틱스 소재(B사 B제품, LRCC5310, LRCC5314, LRCC5314 사균)을 저농도, 고농도로 공동배양하여 M1 대식세포의 biomarkers, TNF-α, STAT1, IRF1의 mRNA 발현량과 M2 대식세포의 biomarkers

hCD206, TGM2, CD200R의 mRNA 발현량을 Real-Time PCR을 통해 확인함.

- ▸ LRCC5310, 5314, 5314 사균체에 의해 M1 대식세포 활성화에 중요 인자인 STAT1의 mRNA 발현량이 감소함.
- ▸ LRCC5310, 5314, 5314 사균체에 의해 M2 대식세포의 모든 biomarkers mRNA 발현량이 증가함.

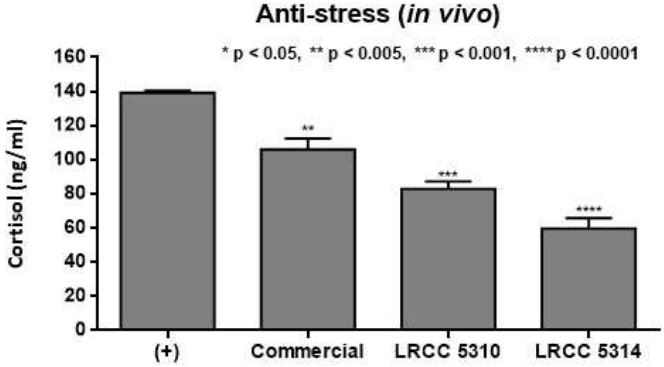


<그림 31> 프로바이오틱스 소재 처리에 따른 M1 대식세포 활성화 인자 확인 및 M2 대식세포 인자 확인

- Knock-out 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능을 평가함. (*in vivo*)

▪ Cold exposure method를 통해 stress가 유도된 Knock-out 마우스에 대하여 프로바이오틱스 소재인 LRCC5310 및 LRCC5314를 투여한 후 혈중 Corticosterone의 양을 측정함.

- ▸ 스트레스를 유도한 Knock-out 마우스에서 혈중 Corticosterone을 비교한 결과, LRCC5310 및 LRCC5314 를 처리한 마우스에서 Corticosterone의 분비가 저해됨을 확인함.

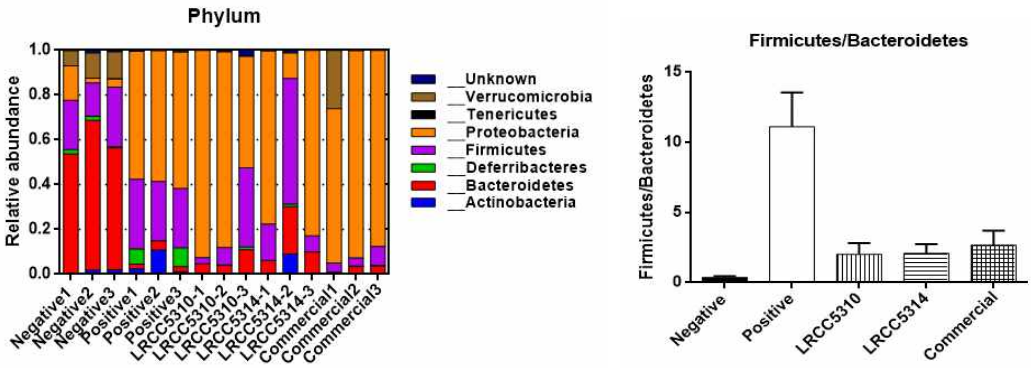


<그림 32> LRCC5310 및 LRCC5314의 Cortisol 분비 억제

▪ Knock-out 마우스 분변 시료로부터 FastDNA spin kit (MP Biomedicals, USA)를 사용하여 세균의 DNA를 추출함 (위탁연구기관: 마크로젠과 협업).

▸ Knock-out 마우스의 분변 시료로부터 illumina sequencing을 이용하여 미생물 군집을 분석한 결과, 총 837,313 reads를 확보함.

▸ Taxonomic 군집 분석을 통해 Phylum 수준에서는 Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes가 우점하는 것으로 나타났음. 또한, Firmicutes/Bacteroidetes ratio가 정상과 비슷하게 감소함.



<그림 33> LRCC5310 및 LRCC5314에 의한 미생물 군집 및 Firmicutes/Bacteroidetes 비율 변화

– 면역반응 매개 조절 기전 규명을 통한 스트레스가 염증 및 당뇨에 미치는 영향을 연구함.

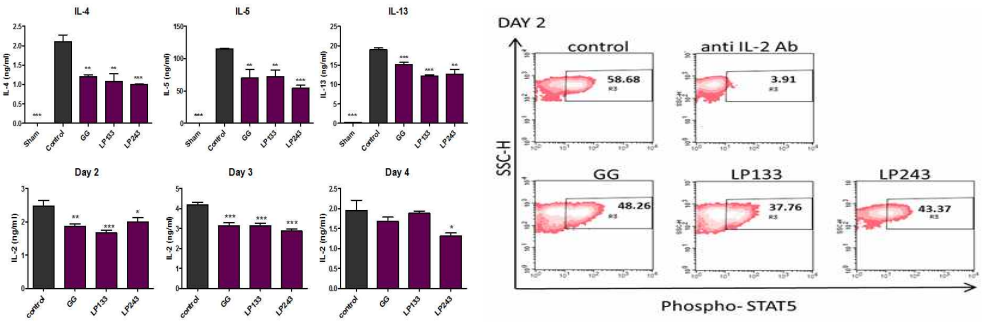
▪ 프로바이오틱스가 T cell에 미치는 영향을 연구함.

▪ 내재 면역세포 활성에 프로바이오틱스가 미치는 영향을 연구함.

▸ 프로바이오틱스가 전반적인 Th2 면역 반응을 감소시켰음. (IL-4, IL-5, IL-13)

▸ 프로바이오틱스가 spleen에서 T cell의 growth factor인 IL-2 생성을 감소시킴.

▸ 프로바이오틱스에 의한 IL-4 생성 감소는 T cell에서 생성되는 IL-2 생성 감소에 의한 것임.



<그림 34> Th2 면역반응 및 T cell growth facter 조절과 IL-4의 감소와 IL-2 생성 감소의 상관성

– 고지방식 유도 마우스에서 마우스 체내에 바이오마커와 지방세포에 미치는 영향에 대해 분석함.

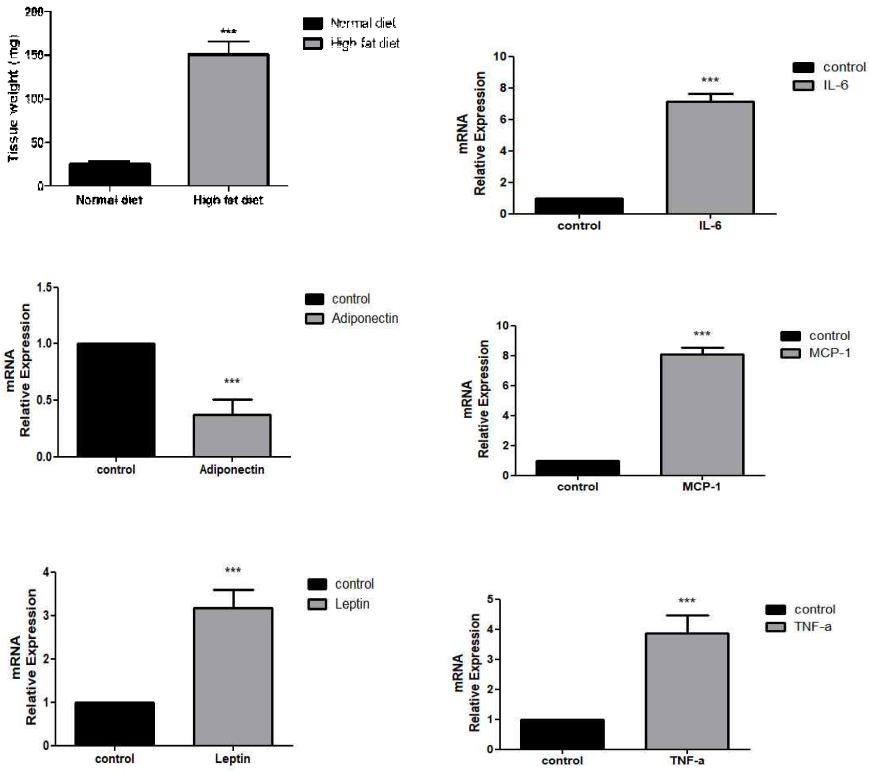
▪ 고지방식이를 통해 유도한 비만 마우스와 일반식이를 통해 유도를 시킨 마우스를 희생시킨 후, Subcutaneous adipose tissue를 채취하고 무게를 측정함.

▪ 채취한 생체시료를 qPCR을 통하여 Adipokines (adiponectin, leptin), inflammatory factors (IL-6, MCP-1, TNF-alpha), Lipolysis-related factors (HSL, perilipin)의 mRNA expression을 측정함.

▸ 비만 마우스에서 adipose tissue weight가 증가함.

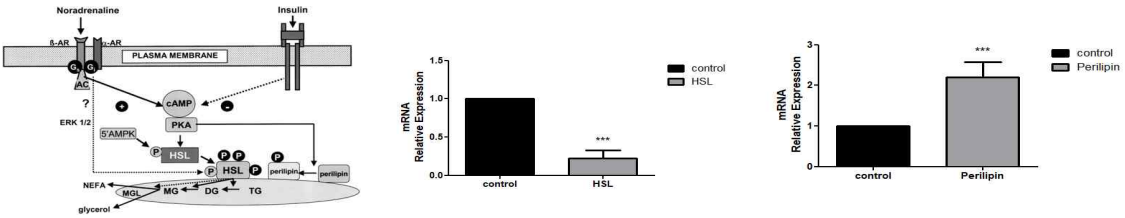
▸ 비만 마우스의 adipose tissue에서 Adiponectin이 감소하고 Leptin은 증가함.

▸ 비만 마우스의 adipose tissue에서 inflammatory 인자가 모두 증가함.



<그림 35> Adipose tissue 무게와 adiponectin, leptin, inflammatory 인자의 발현

▸ 비만 마우스의 adipose tissue에서 PKA-dependent lipolysis factors인 HSL이 감소하였고, Perilipin이 증가함.

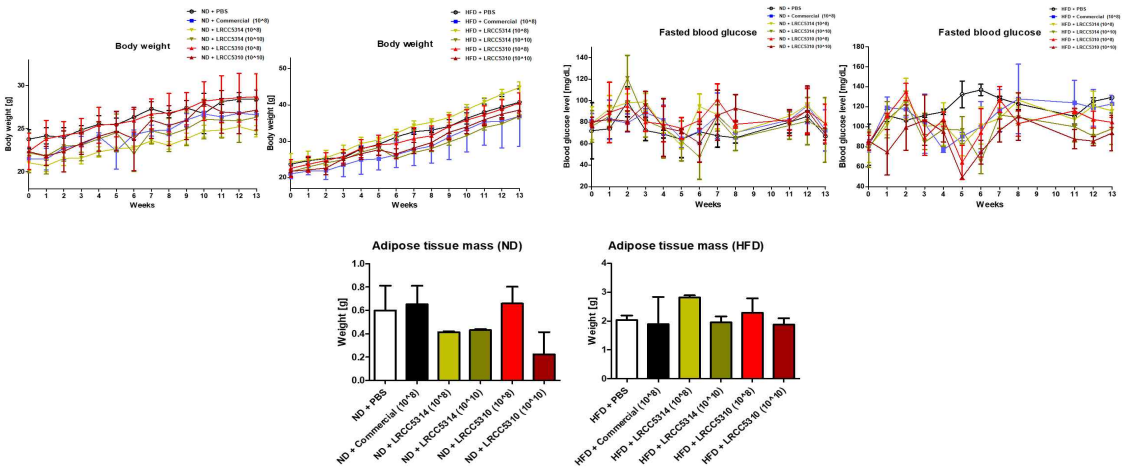


<그림 36> Adipocyte에서의 Lipolysis와 HSL 및 Perilipin의 발현량

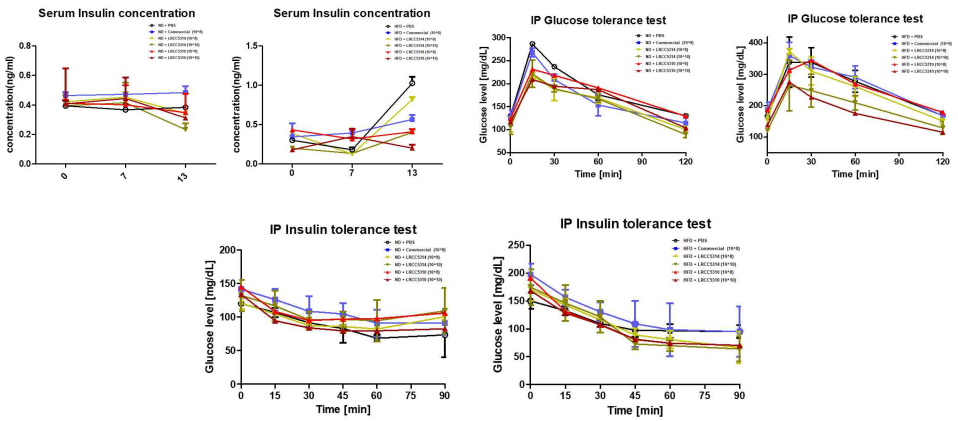
- 제 2형 당뇨 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능을 평가함.
  - 일반식이 마우스와 고지방식이를 통해 유도시킨 제 2형 당뇨 마우스에 프로바이오틱스(Commercial, LRCC5310, LRCC5314)를 주 5회 경구 투여하여 시간에 따른 무게를 측정함.
  - 당뇨 진단 테스트 (체중, 공복혈당, 혈청 내 인슐린 농도, 포도당 내성 검사, 인슐린 내성 검사)를 실시하고, 마우스를 희생시킨 후, Epididymal adipose tissue를 채취하고 무게를 측정함.
  - 혈청 내 corticosterone 농도를 측정하고, 채취한 생체시료를 qPCR을 통하여 포도당 대사 관련 인자(GLUT4, Adiponectin), 지방 조직 내 스트레스 인자 (NPY, Y2R), pro-inflammatory factors (TNF-alpha, IL-6, CCL2, Leptin)의 mRNA expression을 확인함.
    - ▸ 일반, 고지방식이군에서 LRCC5310 및 LRCC5314에 의해 체중증가가 억제됨을 확인함.
    - ▸ 일반, 고지방식이군에서 LRCC5310 및 LRCC5314에 의해 공복혈당이 감소함.
    - ▸ 일반, 고지방식이군에서 LRCC5310 및 LRCC5314에 의해 Epididymal adipose tissue의

무게가 감소됨을 확인함.

- 혈청 내 인슐린 농도는 일반, 고지방식이군에서 LRCC5310 및 LRCC5314에 의해 전반적으로 감소한 것을 확인함.
- 고지방식이군에서 LRCC5310, LRCC5314에 의해 glucose sensitivity가 증가함을 확인함.
- 고지방식이군에서 LRCC5310, LRCC5314에 의해 insulin sensitivity가 증가함을 확인함.

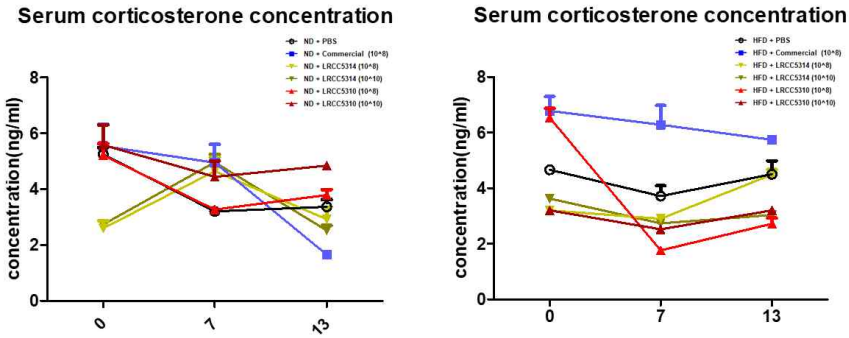


<그림 37> Body weight 변화, 공복 혈당, Epididymal adipose tissue weight



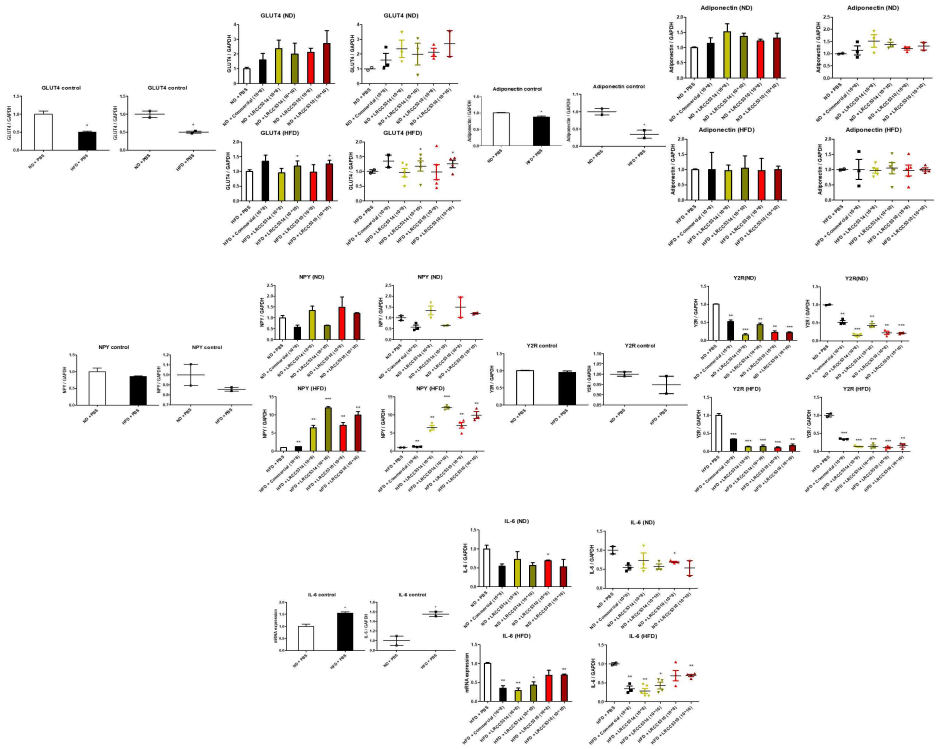
<그림 38> 혈청 내 인슐린 농도, Glucose sensitivity, Insulin sensitivity

- 고지방식이군에서 LRCC5310, LRCC5314에 의해 혈청 내 corticosterone 농도가 유지되거나 감소된 것을 확인함.



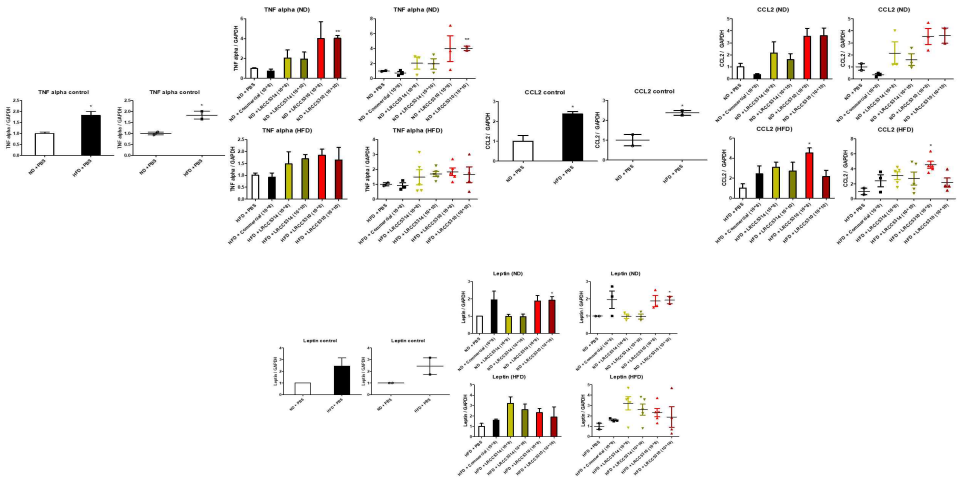
<그림 39> 혈청 내 Corticosterone 농도 확인

- 일반 및 고지방식이군의 지방 조직에서 LRCC5310, LRCC5314 모두 포도당 대사 인자인 GLUT4의 발현량이 증가함을 확인함.
- 일반식이군의 지방 조직에서 LRCC5310, LRCC5314 모두 포도당 대사 인자인 Adiponectin의 발현량이 증가함을 확인함.
- 일반 및 고지방식이군의 지방 조직에서 LRCC5310, LRCC5314 모두 스트레스에 따른 지방세포 분화인자 NPY의 발현량이 증가함을 확인함.
- 일반, 고지방식이군의 지방 조직에서 LRCC5310, LRCC5314 모두 스트레스에 따른 지방세포 분화인자 NPY의 receptor인 Y2R 발현량이 감소함을 확인함.
- 일반, 고지방식이군의 지방 조직에서 LRCC5310, LRCC5314 모두 pro-inflammatory cytokine (IL-6) 발현량이 감소함을 확인함.



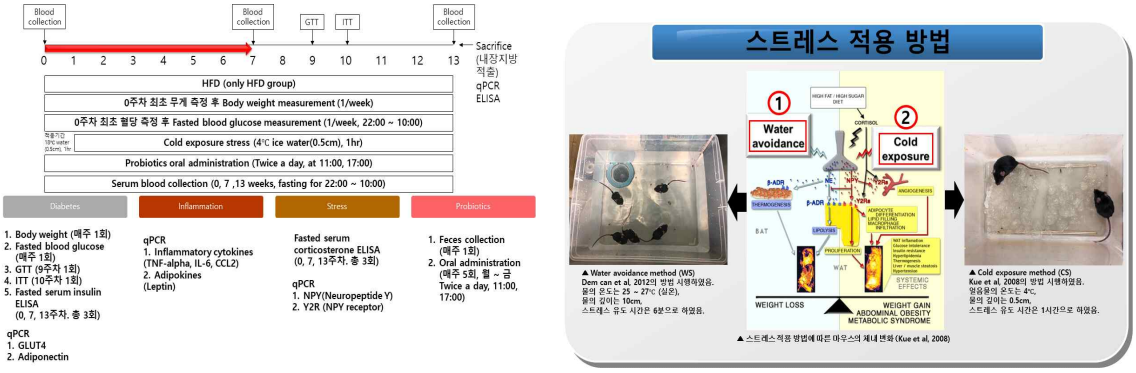
<그림 40> 지방조직 내 GLUT4, Adiponectin, NPY, Y2R, Cytokine 발현량

- 일반, 고지방식이군의 지방 조직에서 LRCC5310, LRCC5314 모두 pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, CCL2, Leptin) 발현량이 증가함을 확인함.



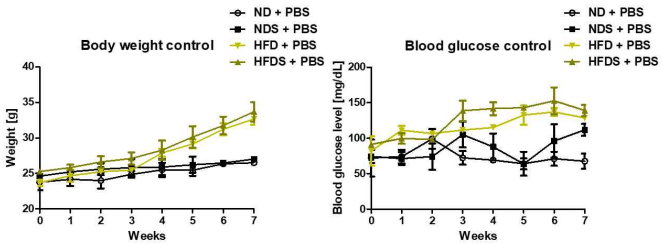
<그림 41> 지방조직 내 염증성 사이토카인 발현량

- 스트레스성 제 2형 당뇨 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능을 평가함.
  - 일반식이 마우스와 고지방식이 마우스에 Cold exposure method를 통한 stress를 주 5회 유도함.
  - LRCC5310, LRCC5314을 주 5회 경구 투여하고, 체중과 공복 혈당을 측정함.



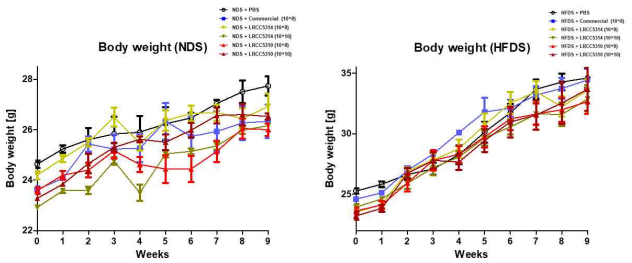
<그림 42> Stress group experimental table 및 Cold exposure method

- Cold exposure stress에 따라 체중과 혈당이 증가함.



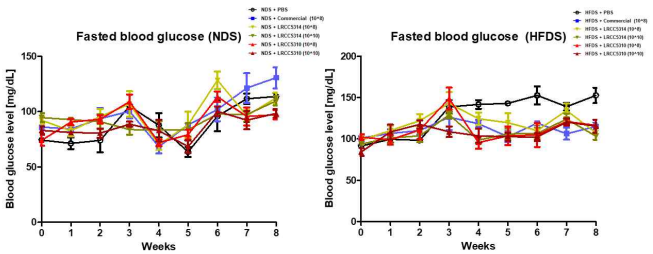
<그림 43> 체중 및 공복 혈당 비교

- LRCC5310, LRCC5314 모두 고지방식이+스트레스군에 고농도로 투여하였을 때 체중증가가 억제됨.



<그림 44> 체중 비교

- LRCC5310, LRCC5314 모두 고지방식이+스트레스군에 고농도로 투여하였을 때 공복 혈당이 감소됨.



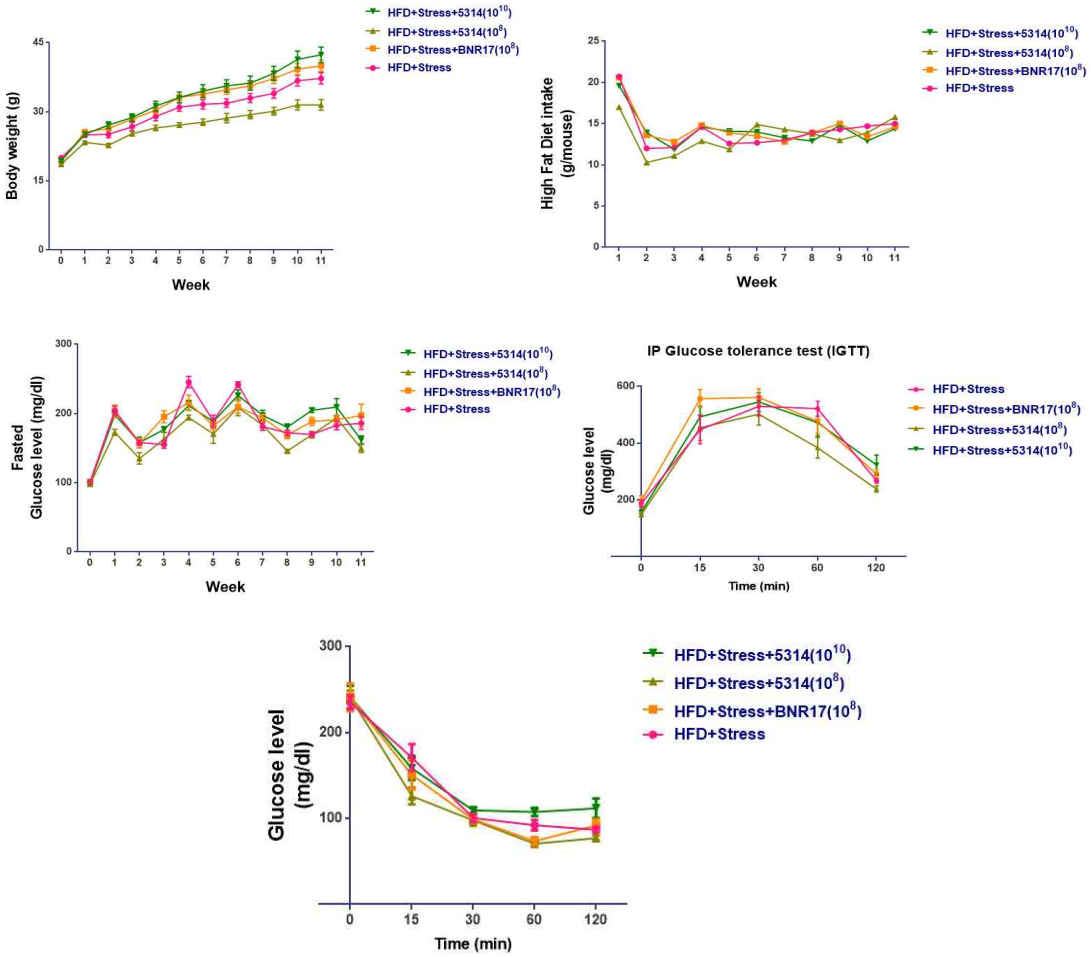
<그림 45> 공복 혈당 비교

- LRCC5314 사균체 소재 대한 독성평가를 진행함.
  - LRCC5314 사균체를 고지방식이+스트레스군에 투여한 후 체중과 사망률을 기록함.
    - 무게 측정 결과 체중 감소 보이지 않음.
    - 사망률을 측정한 결과 마우스가 사망하지 않음.
    - 부검에 따른 육안적 소견을 관찰한 결과, LRCC5314(10^8), LRCC5314(10^{10}), BNR17(10^8) 사균체에 따른 실험군 모두에서 유의성 있는 변화나 투여로 인한 특이적인 이상 징후는 발견되지 않음.

	Weeks of treatment												
실험군	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PBS	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
BNR17(10^8)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
5314(10^8)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
5314(10^{10})	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

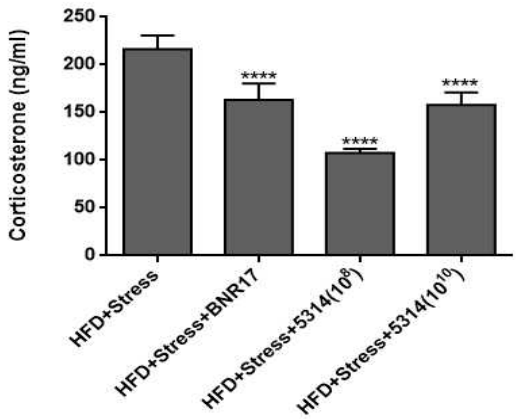
<그림 46> 사망률 측정

- LRCC5314 사균체 소재에 대한 기능성을 검증함. (*in vivo*)
  - 고지방식이를 통해 유도시킨 제2형 당뇨 유발 마우스에 Cold exposure method로 stress를 주 6회 유도함.
  - LRCC 5314와 BNR17 사균체에 대하여, 주 6회 경구투여함.
  - LRCC 5314와 BNR17 사균체를 주 6회 경구투여 및 식이 섭취량 (Food intake)를 측정함.
  - 당뇨 진단 테스트(주 1회 공복혈당, 포도당 저항성 (IGTT)을 측정, 인슐린 저항성 (IITT)을 측정함.
    - LRCC5314(10^8) 사균체를 투여한 그룹이 고지방식이+스트레스군에 투여하였을 때, 체중 증가율이 감소함.
    - 모든 그룹 간, 식이 섭취량에 큰 차이가 없음을 확인함.
    - 고지방식이+스트레스군에 LRCC5314(10^8), LRCC5314(10^{10}) 사균체를 투여한 그룹이 BNR17(10^8) 사균체를 투여한 그룹보다 공복 혈당이 감소하였음.
    - 고지방식이+스트레스군에 LRCC5314(10^8) 사균체를 투여하였을 때, 가장 낮은 공복 혈당을 보였음.
    - 고지방식이+스트레스군에 LRCC5314(10^8) 사균체를 투여한 그룹에서 glucose sensitivity가 가장 많이 증가함.
    - 고지방식이+스트레스군에 LRCC5314(10^8) 사균체를 투여한 그룹에서 insulin sensitivity가 가장 많이 증가함.



<그림 47> 투여에 의한 체중, 식이 섭취량, 공복 혈당, Glucose sensitivity 및 insulin sensitivity 비교

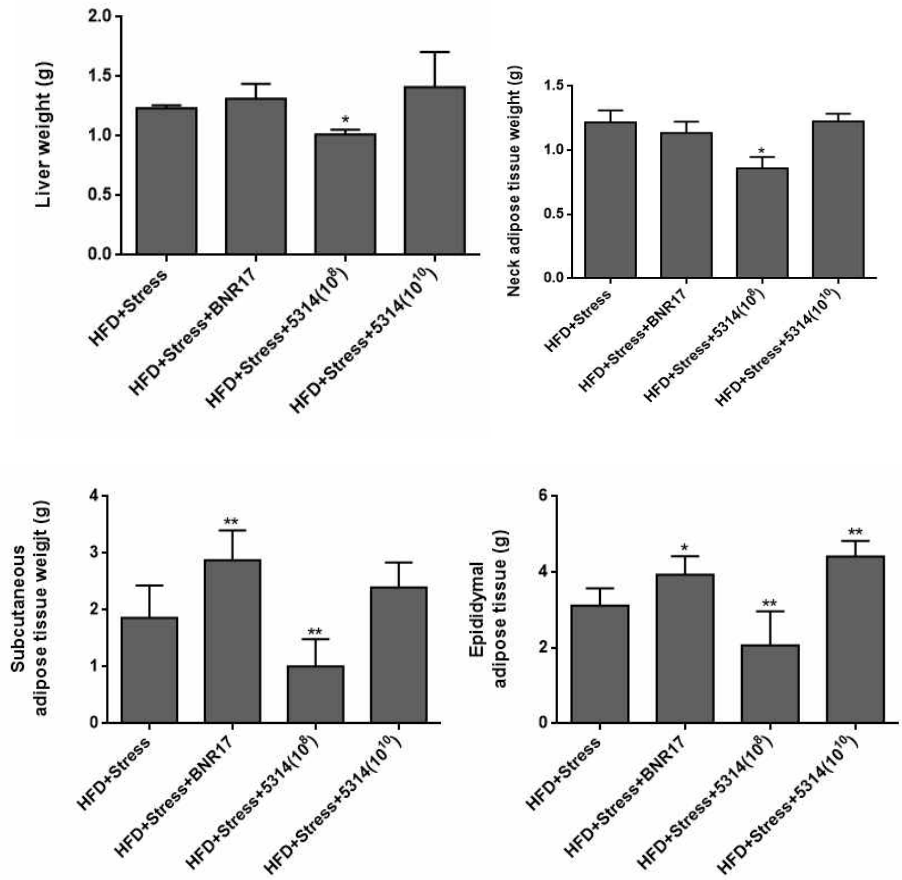
- 제2형 당뇨 유발 마우스에 cold exposure method로 스트레스를 유도함.
- LRCC5314 사균체의 농도별 투여에 따른 혈중 Corticosterone 농도를 측정함.
  - 고지방식이+스트레스군에 LRCC5314(10^8) 사균체를 투여한 그룹이 다른 그룹에 비해 혈중 Corticosterone 함량이 낮게 측정됨.



<그림 48> 혈중 Corticosterone 농도 비교

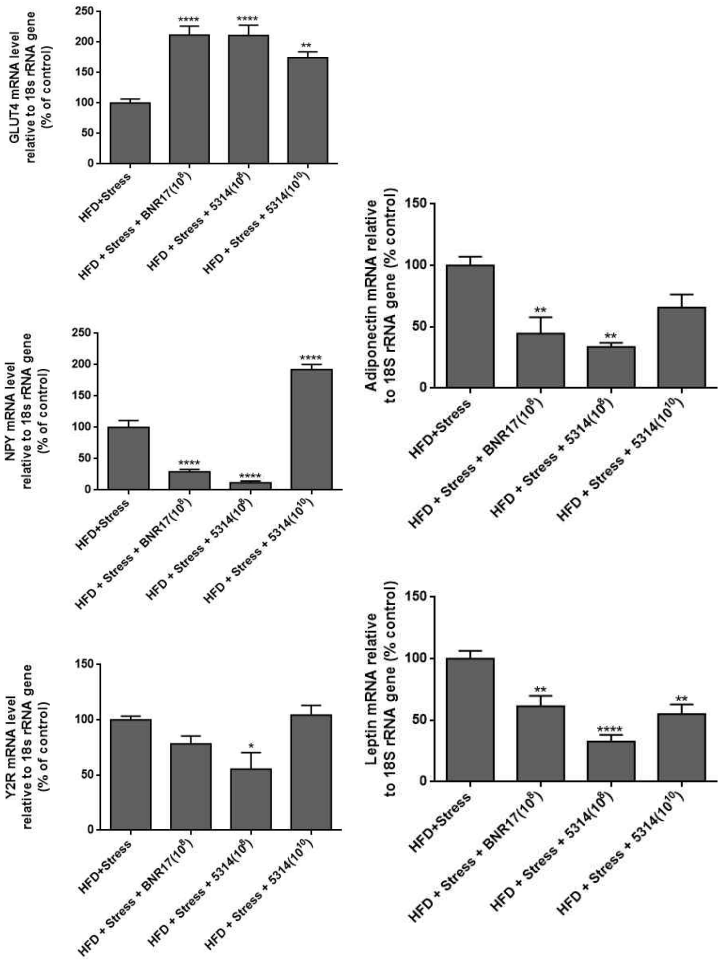
- 간 무게 측정을 통해 비알콜성 지방간과의 연관성을 확인함.
- Neck adipose tissue, Epididymal adipose tissue, Subcutaneous adipose tissue의 무게를 측정함.

- 고지방식이+ 스트레스군에 LRCC5314(10^8) 사균체를 투여한 그룹이 다른 그룹에 비해 고지방 섭취량 대비 간의 무게가 많이 증가하지 않음.
- 고지방식이+ 스트레스군에 LRCC5314(10^8) 사균체를 투여한 그룹이 다른 그룹에 비해 Neck adipose tissue, Epididymal adipose tissue, Subcutaneous adipose tissue의 무게가 감소함.



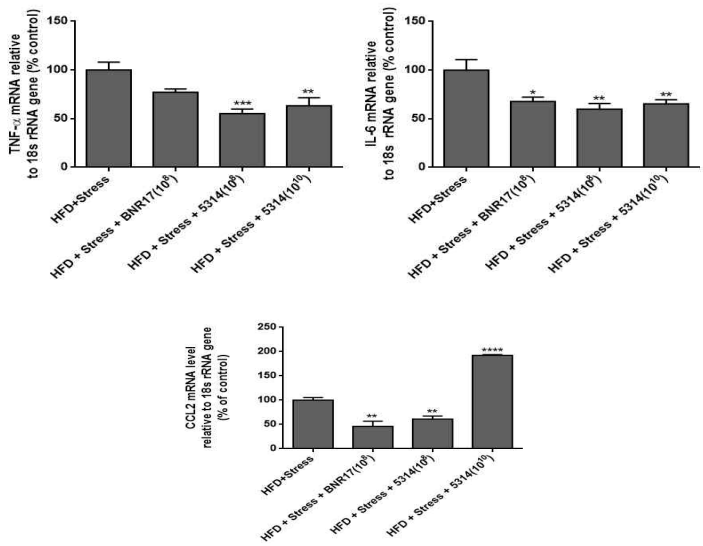
<그림 49> 간 무게, Neck, Epididymal, Subcutaneous adipose tissue 비교

- 포도당 대사 관련 인자(GLUT4), 스트레스 관련 인자(NPY, Y2R), 지방 합성 관련 인자 (Adiponectin, Leptin)의 mRNA expression을 확인함.
- Pro-inflammatory 관련 인자 (TNF-α, IL-6, CCL2)의 mRNA expression을 확인함.
  - 고지방식이+스트레스군 내 LRCC5314(10^8), LRCC5314(10^{10}), BNR17(10^8) 사균체를 투여한 그룹의 지방 조직에서 모두 포도당 대사 인자인 GLUT4의 발현량이 증가함.
  - LRCC5314(10^8), BNR17(10^8) 사균체를 투여한 그룹에서 포도당 대사 인자인 GLUT4의 발현량이 가장 많이 증가함.
  - 고지방식이+스트레스군 내 LRCC5314(10^8), BNR17(10^8) 사균체를 투여한 그룹의 지방 조직에서 스트레스에 따른 지방세포 분화인자 NPY의 발현량이 감소함.
  - 고지방식이+스트레스군 내 LRCC5314(10^8), BNR17(10^8) 사균체를 투여한 군의 지방 조직에서 스트레스에 따른 지방세포 분화인자 NPY의 receptor인 Y2R 발현량이 감소함.
  - 고지방식이+스트레스에 LRCC5314(10^8), LRCC5314(10^{10}), BNR17(10^8) 사균체를 투여한 그룹의 지방 조직에서 지방 합성 관련 인자인 Adiponectin, Leptin의 발현량이 감소함.



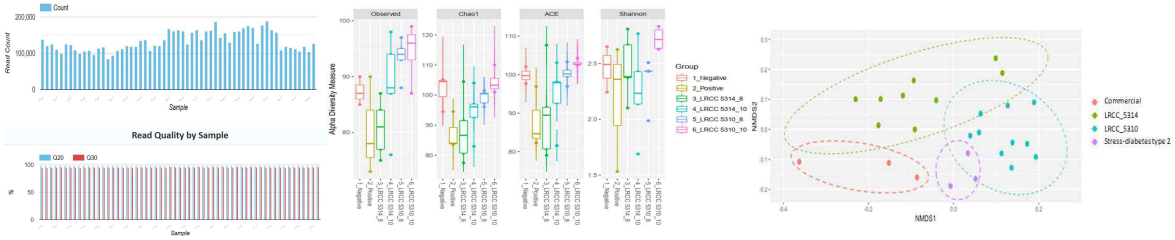
<그림 50> GLUT4, NPY, Y2R 및 지방 합성 관련 인자
(Adiponectin, Leptin) 발현량 비교

- 고지방식이+스트레스에 LRCC5314(10^8), LRCC5314(10^{10}), BNR17(10^8) 사균체를 투여한 그룹의 지방 조직에서 염증 관련 인자인 TNF-a, IL-6의 발현량이 감소함.
- 또한 지방 조직에서 염증 관련 인자인 CCL2의 발현량이 감소함.
- LRCC 5314(10^8)을 투여한 그룹의 발현량이 크게 감소함.



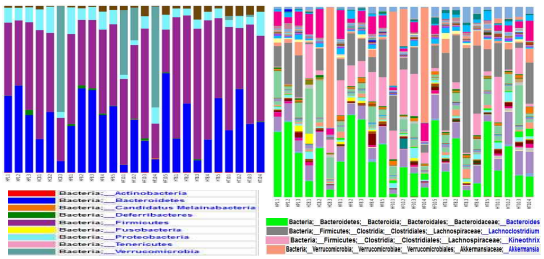
<그림 51> Pro-inflammatory 관련 인자 mRNA 발현량 비교

▪ LRCC5314 사균체에 대하여 스트레스 및 2형 당뇨 관련 gut microbiome을 분석함.
▪ 스트레스 및 2형 당뇨 마우스의 미생물 군집 및 비교분석을 진행함.
▸ 분변 시료에 대한 Illumina sequencing을 이용한 메타분석을 통해 각 샘플별 read 수 (Aver. 158,623 reads) 를 얻었고, 시퀀스의 정확성을 위해 read quality를 통해 불분명한 염기서열과 짧은 시퀀스가 제외됨.
▸ α-diversity 분석을 통해 LRCC5314(10^8) 사균체 그룹이 스트레스 및 2형 당뇨 (Neg)그룹과 비교하여 미생물 다양성을 확인함.
▸ β-diversity 분석을 통해 미생물의 군집 차이를 분석하였으며 스트레스 및 2형 당뇨 마우스와 사균체를 처리한 마우스와의 군집 차이를 확인함.



<그림 52> Illumina sequencing을 이용한 메타분석을 통한 샘플별 read 수 확보, α-diversity 및 β-diversity 분석

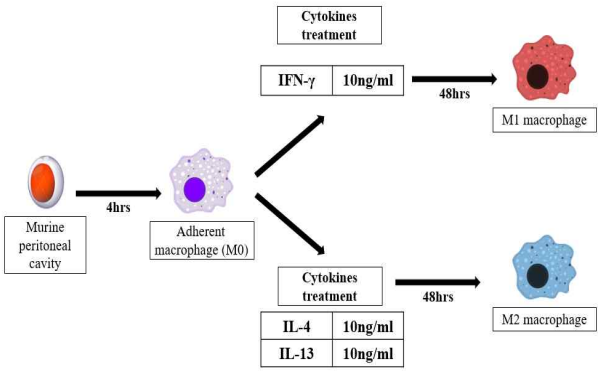
▪ 스트레스 및 2형 당뇨 마우스와 사균체를 처리한 마우스의 미생물 분류 (taxonomy 분석)를 진행함.
▸ Phylum level에서 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*가 모든 그룹에서 높은 비율로 우점함을 보임.
▸ Genus level의 모든 그룹에서 *Bacteroides*, *Lachnoclostridium* 그룹이 우점함
▸ 스트레스 및 2형 당뇨 마우스와 비교하였을 때, LRCC5314(10^8) 사균체 그룹은 *Kineothrix*, *Akkermansia*가 우점함을 보임.
▸ Species level에서 스트레스 및 2형 당뇨 마우스에서 *Acetatifactor muris*가 우점하였으며, LRCC 5314(10^8) 사균체를 처리한 그룹에서는 *Kineothrix alysoides*가 다른 그룹에 비해 우점함을 보임.
▸ LRCC5314(10^8), LRCC5310(10^8) 사균체 그룹에서 *Bacteroides massiliensis*가 우점함.



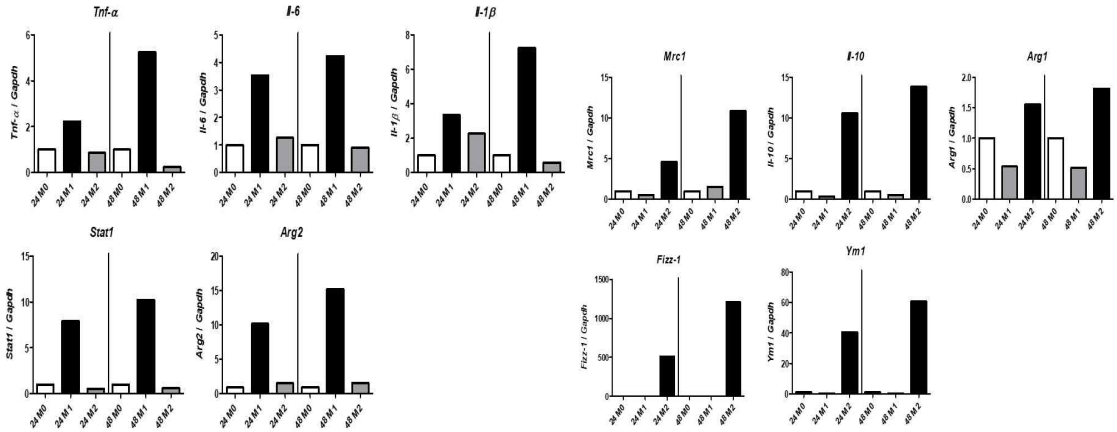
<그림 53> Phylum, Genus level

– 마우스의 복강 대식세포를 이용한 프로바이오틱스 소재가 대식세포 분화에 미치는 영향 및 기전을 연구함.
▪ 프로바이오틱스 소재 대식세포를 이용한 M1, M2 분화 실험 프로토콜을 정립함.
▪ 마우스의 복강 대식세포를 4% thioglycolate media를 통해서 collection한 후 IL-4, IL-13를 통해서 M2 대식세포로의 분화 실험 조건을 확립함.
▸ 마우스 대식세포를 이용한 M1, M2 분화 실험 프로토콜을 정립함.

- 분화된 대식세포의 morphology를 확인함.
- IFN-γ 처리군에서 M1 대식세포의 대표적인 마커인 TNF-α, Il-6, Il-1β, Stat1, Arg2 mRNA levels가 증가됨.
- IL-4, IL-13 처리군에서 M2 대식세포의 대표적인 마커인 Mrc1, Il-10, Arg1, Fizz-1, Ym1 mRNA levels가 증가됨.



<그림 54> M1, M2 분화 protocol

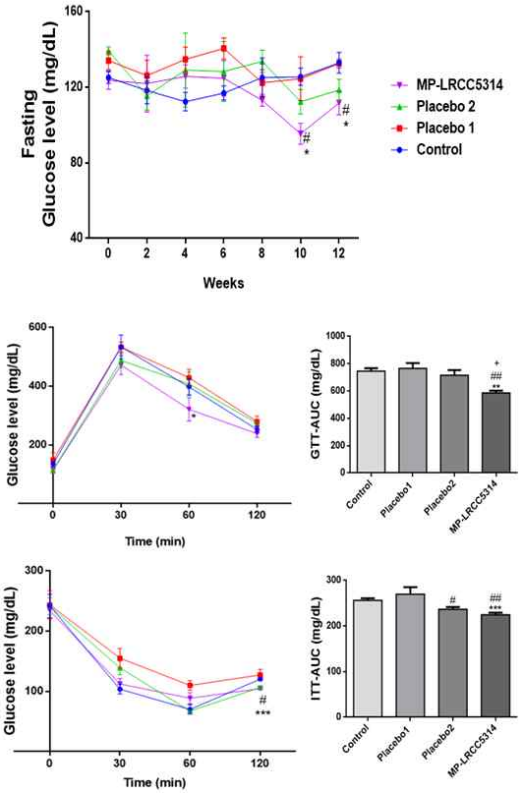


<그림 55> M1 및 M2 대식세포 인자 mRNA 발현량 비교

○ **스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로비아오틱스 소재 전임상시험(*in vivo*)**

– 프로바이오틱스 소재 제형에 대한 기능성을 검증함. (*in vivo*)

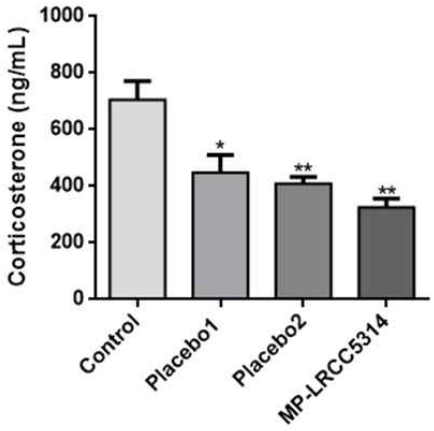
- 고지방식이를 통해 제2형 당뇨를 유발한 마우스에 Cold exposure method로 stress를 주 6회 유도함.
- 당뇨 진단 테스트를 진행함.(주 1회 공복혈당, 포도당 저항성 (IGTT), 인슐린 저항성(IITT) 측정)
  - 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품을 투여한 그룹의 공복 혈당이 감소함.
  - 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품을 투여한 그룹에서 glucose sensitivity가 가장 증가함.
  - 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품을 투여한 그룹에서 insulin sensitivity가 가장 증가함.



<그림 56> 당뇨 진단 결과 분석

▪ LRCC5314(제형) 섭취에 따른 혈중 Corticosterone 농도를 측정함.

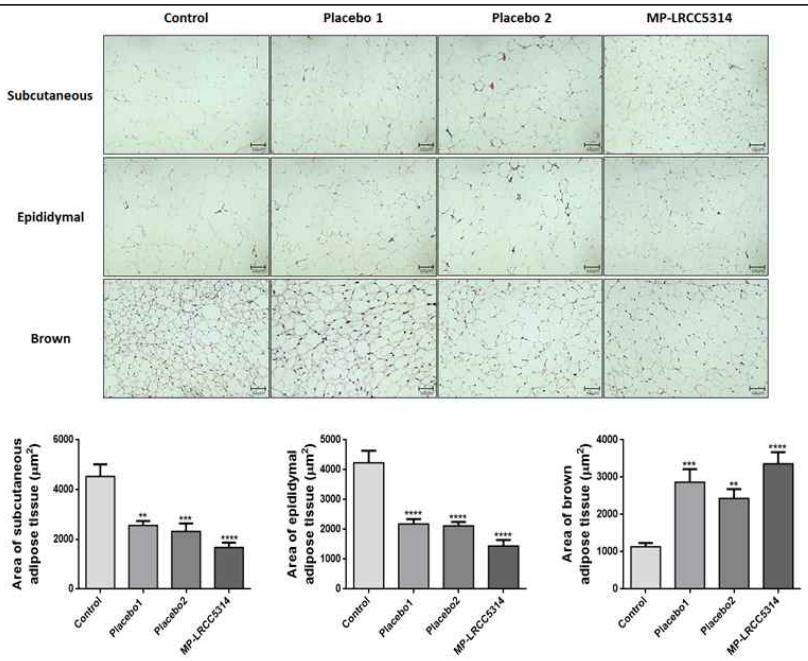
▸ 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품 섭취에 따라 혈중 Corticosterone 농도가 감소함.



<그림 57> 혈중 Corticosterone 비교

▪ LRCC 5314 시제품 섭취에 따른 Subcutaneous adipose tissue 면적을 측정함.

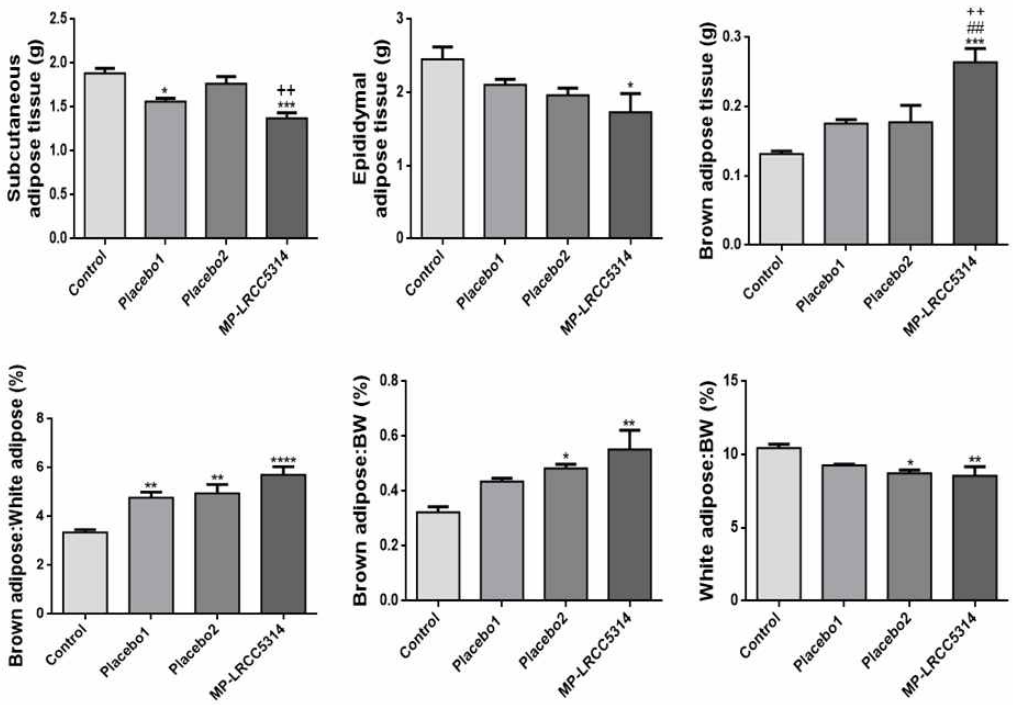
▸ 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품 그룹의 Subcutaneous adipose tissue 면적이 감소함.



<그림 58> Subcutaneous adipose tissue 면적 비교

▪ LRCC5314 시제품 섭취에 따른 Adipose tissue를 분석함.

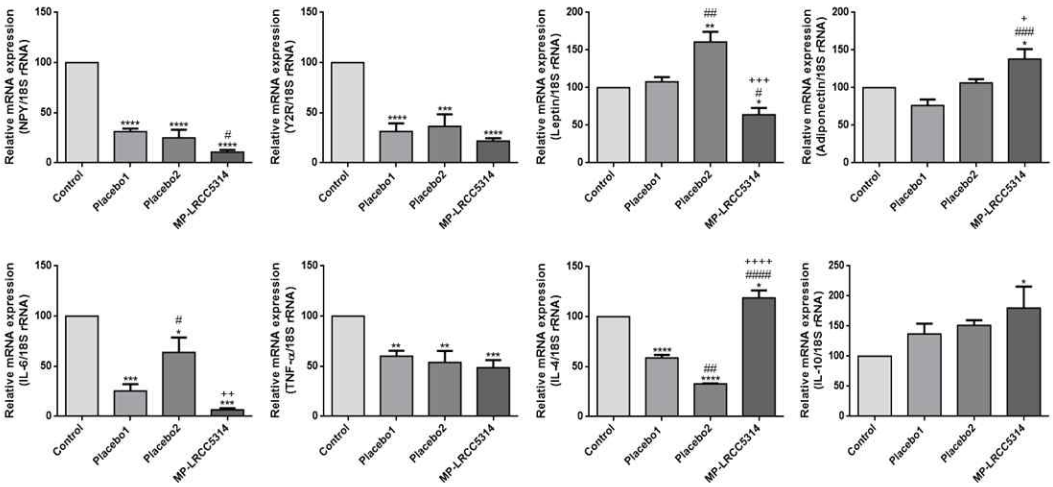
- ▸ Subcutaneous adipose, Epidermal adipose tissue의 무게는 감소한 반면, Brown adipose tissue의 무게는 증가함.
- ▸ Brown adipose:White adipose 비율(%)을 측정한 결과 LRCC5314 시제품 그룹에서 비율이 증가함.
- ▸ Brown adipose:body weight 비율(%)이 증가하였고, White adipose:body weight 비율(%)은 감소함.



<그림 59> Adipose tissue 분석

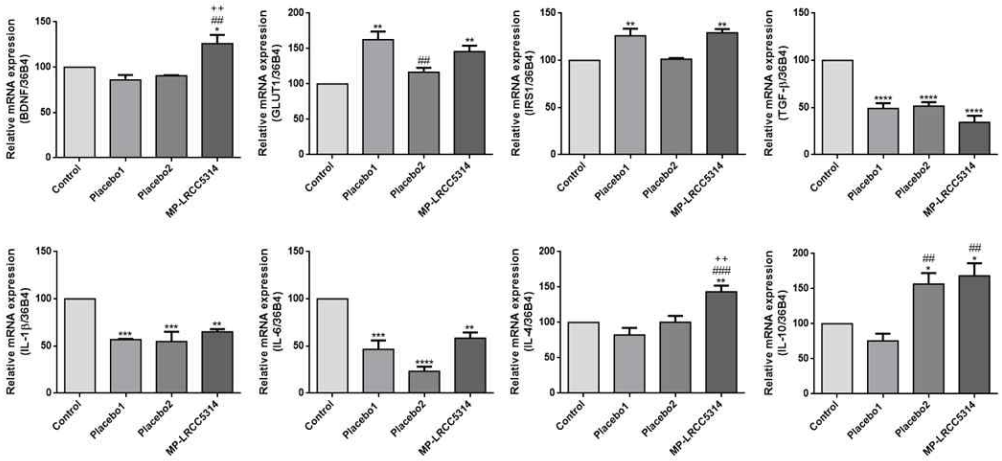
▪ Adipose tissue 내 스트레스 조절, 당 대사, 염증 관련 인자 mRNA expression을 확인함.

- 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품 그룹의 지방 조직에서 스트레스 관련 인자(NPY) 및 receptor(Y2R)의 발현량이 감소함.
- 지방 합성 관련 인자에서 Leptin의 발현량은 감소한 반면, Adiponectin의 발현량은 증가함.
- Pro-inflammatory 관련 인자(IL-6, TNF-α)의 발현량이 감소함.
- Anti-inflammatory 관련 인자(IL-4, IL-10)의 발현량은 증가함.



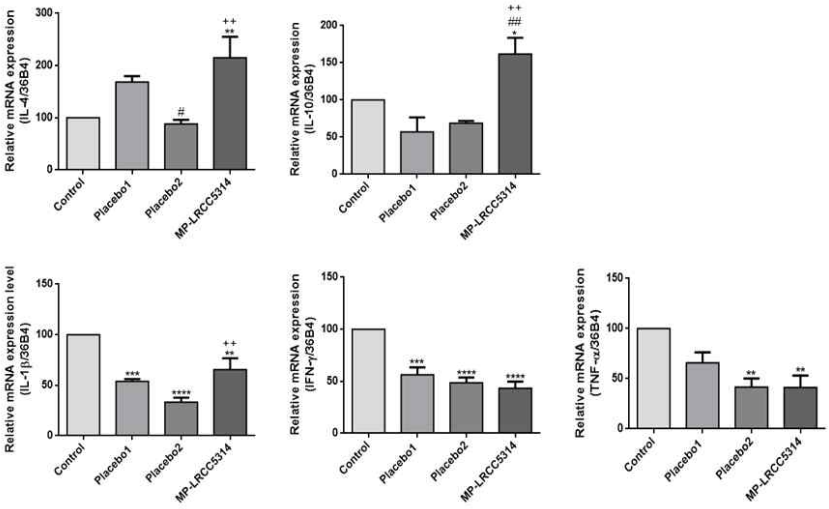
<그림 60> 지방 조직 mRNA expression 비교

▪ Brain tissue 내 스트레스 조절, 당 대사, 염증 관련 인자 mRNA expression을 확인함.
- 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품 그룹의 뇌 조직에서 스트레스 조절 관련 인자(BDNF) 발현량이 증가함,
- 당 대사 관련 인자(GLUT1, IRS1)의 발현량이 증가함,
- Pro-inflammatory 관련 인자(TGF-β, IL-1β, IL-6)의 발현량이 감소함,
- Anti-inflammatory 관련 인자(IL-4, IL-10)의 발현량은 증가함.



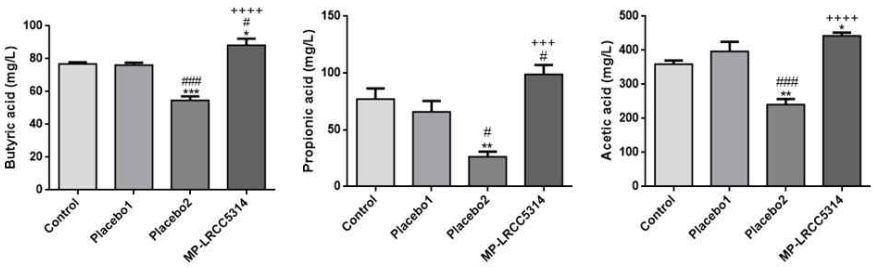
<그림 61> 뇌 조직 mRNA expression 비교

▪ Intestinal tissue 내 염증 관련 인자 mRNA expression을 확인함.
- 고지방식이+스트레스 및 LRCC5314 시제품 그룹의 장 조직에서 Pro-inflammatory 관련 인자(IL-1β, IFN-γ, TNF-α)의 발현량이 감소함.
- Anti-inflammatory 관련 인자(IL-4, IL-10)의 발현량은 증가함.



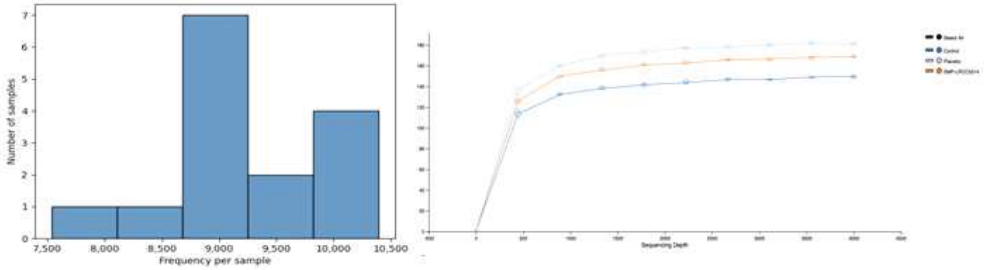
<그림 62> 장 조직 mRNA expression 비교

- Brain 및 Intestinal tissue의 histology를 분석함.
  - 고지방식이+스트레스에 의한 뇌 조직의 손상을 확인한 결과, LRCC5314 시제품 그룹에서 뇌 조직의 손상이 개선됨.
  - 고지방식이+스트레스에 의한 장 점막의 손상이 개선됨.
- 단쇄지방산(Short chain fatty acid)을 분석함.
  - 분변 내의 단쇄지방산 분석을 수행한 결과 대표적인 인자인 Butyric acid, Propionic acid, Acetic acid의 함량이 증가함.



<그림 63> 단쇄지방산(Short chain fatty acid) 비교

- LRCC5314 시제품에 대한 스트레스 및 2형 당뇨 관련 gut microbiome 분석을 수행한 결과, 분변 시료에 대한 Illumina sequencing (Miseq)을 이용한 메타분석을 통해 각 샘플별 read 수 (Aver. 139,252 reads)를 얻었고, 각 시퀀스의 정확성을 위해 불분명한 염기서열과 짧은 시퀀스가 제거되었음.



<그림 64> Illumina sequencing을 이용한 메타분석을 통한 샘플별 reads수 확보

- 스트레스 및 2형 당뇨 마우스의 미생물 다양성 분석을 수행하였으며, α-diversity 분석을 통해 LRCC5314 시제품 그룹이 고지방식이+스트레스 그룹과 비교하여 미생물 다양성을 확인함.

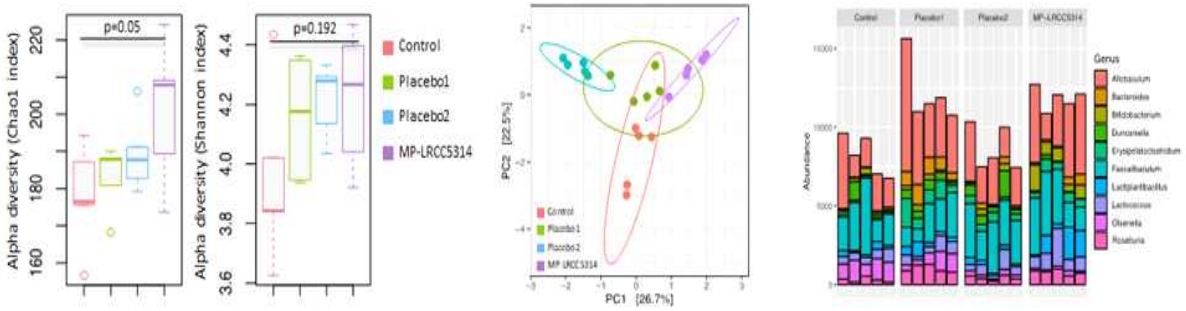
▪ β-diversity 분석을 통해 미생물의 군집 차이를 분석하였으며 고지방식이+스트레스 그룹과 LRCC5314 시제품 그룹과의 군집 차이를 확인함.

▪ Taxonomy 분석 (Genus level)을 통해 고지방식이+스트레스 그룹과 LRCC5314 시제품 그룹의 장내 미생물 차이를 분석함.

▸ LRCC5314 시제품 그룹에서 Chao1, Shannon 다양성이 증가함.

▸ 그룹 간 군집 차이를 보임.

▸ 고지방식이+스트레스 그룹과 비교 시, LRCC5314 시제품 그룹에서 *Bifidobacterium, Bacteroides, Lactiplantibacillus, Roseburia*종이 우점함.



<그림 65> α-diversity, β-diversity, Genus level 분석

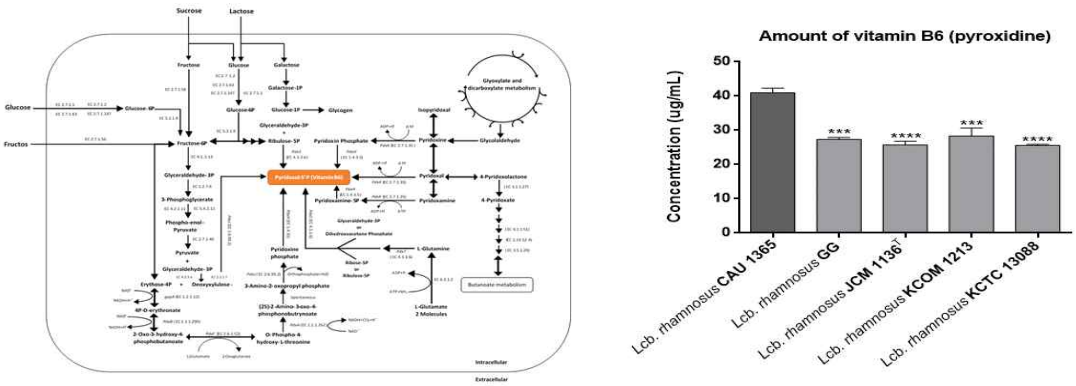
- 유용유전자 보유 프로바이오틱스 소재에 대한 특허출원을 진행함.

▪ COG 데이터베이스를 활용하여 전장 유전체 기반 생성 단백질의 기능을 분류하였으며, KEGG 데이터베이스와 단당류, 다당류 대사 관련 유전자를 적용하여 프로바이오틱스 소재 CAU 1365의 탄소원 대사경로 및 비타민 B6 생합성 경로를 하나의 대사경로로 구성함.

▪ 배양 상층액으로부터 HPLC를 통해 비타민 B6의 합성량을 확인함.

▸ 프로바이오틱스 소재 CAU 1365는 해당 과정 경로를 통해 단당류로부터 피루브산 및 비타민 B6를 생성함을 확인하였고, HPLC 결과를 통해 높은 수치의 비타민 B6 합성능을 평가함.

▸ 이러한 결과를 바탕으로 최종당화산물 형성을 억제하는 효능을 가진 CAU 1365에 대한 특허를 출원함.



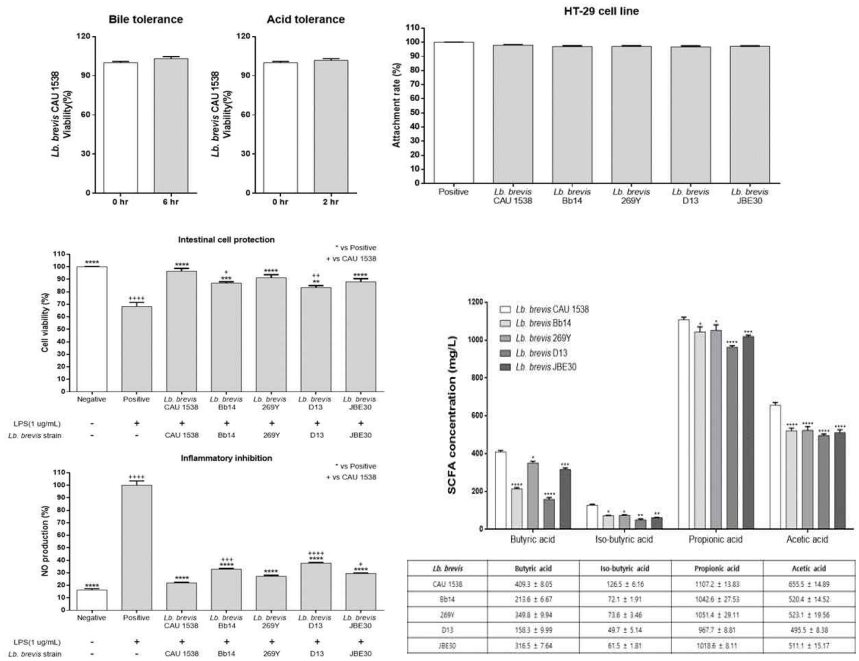
<그림 66> 탄소원 대사/비타민 B6 pathway 및 검증시험

▪ 프로바이오틱스 소재 CAU 1538의 특성을 평가하고 세포에 적용하여 우수한 단쇄지방산 생성능 기반 장 보호 효능을 검증함.

▸ 프로바이오틱스 소재 CAU 1538은 내담즙/내산성이 높으며 세포를 적용한 연구에서 장 부착 효능 또한 우수함.

▸ 단쇄지방산 생성능이 우수하여 염증에 의한 세포의 손상 및 염증을 억제함.

▸ 이러한 결과를 바탕으로 단쇄지방산 생성 기반 장 환경을 개선하는 효능을 가진 CAU 1538에 대한 특허를 출원함.



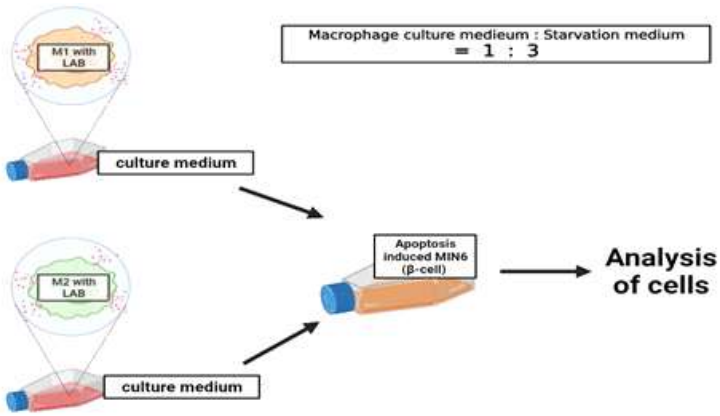
Lb. brevis	Butyric acid	Iso-butyric acid	Propionic acid	Acetic acid
CAU 1538	409.3 ± 8.05	126.5 ± 6.16	1107.2 ± 13.83	655.5 ± 14.89
Bb14	213.6 ± 6.67	72.1 ± 1.91	1042.6 ± 27.53	520.4 ± 14.52
269Y	349.8 ± 9.94	73.6 ± 3.46	1051.4 ± 29.11	523.1 ± 19.56
D13	158.3 ± 9.99	49.7 ± 5.14	967.7 ± 8.81	495.5 ± 8.38
JBE30	316.5 ± 7.64	61.5 ± 1.81	1018.6 ± 8.11	511.1 ± 15.17

<그림 67> 우수한 단쇄지방산 생성능을 활용한 장 환경 개선

- 프로바이오틱스에 의해 활성화된 M2 대식세포가 산화적 스트레스 유도된 췌장 β 세포의 생존율, 인슐린 분비 및 세포자멸사에 미치는 영향과 기전 연구를 진행함.

▪ 균 처리 대식세포에 의한 MIN6에 healing process를 촉진함.

▪ 인슐린종 세포주인 MIN6를 이용하여 스트레스와 2형 당뇨 모델에 대한 프로바이오틱스의 면역조절 기전 규명 프로토콜을 확립함.



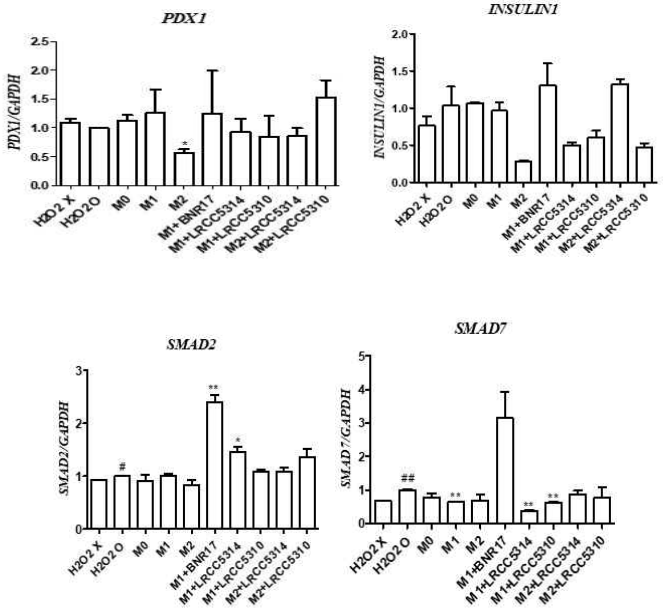
<그림 68> 스트레스-2형 당뇨 면역조절기전 규명 프로토콜

▪ Anti-inflammatory 기전을 규명함

▸ MIN6의 maturation 인자인 pdx1이 프로바이오틱스와 함께 분화된 대식세포에 의해 발현이 증가함.

▸ 과산화수소(H_2O_2)는 MIN6에 산화적 스트레스를 유발하여 인슐린 분비를 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 프로바이오틱스를 처리한 대식세포에 의해 인슐린의 합성이 감소함. (세포 내 산화적 스트레스 감소)

▸ M2 대식세포의 항염증성 사이토카인인 TGF-β에 의해 MIN6의 healing process가 일어날 것으로 예상되어, SMAD2가 증가, SMAD7이 감소하여 TGF-β 신호전달이 일어남.



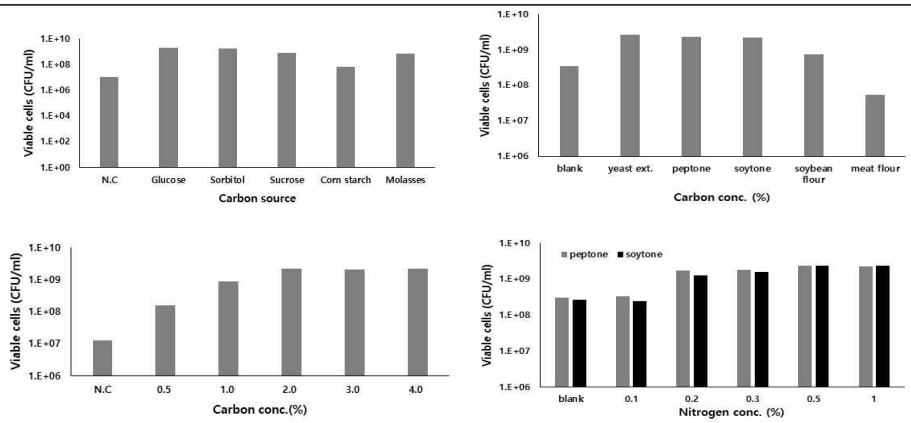
<그림 69> β-cell의maturation factor, 인슐린 분비능 회복 및 TGF-β의 신호전달의 진행 확인

○ 스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재의 최적화, 표준화 및 실용화

- 배양 배지 최적화함.
  - 당이용성, 탄소원, 질소원, 무기염류 종류별, 농도별 분석을 진행함.
    - 20여개 탄소원 이용성 확인함.
    - Glucose 외 fructose, sucrose를 사용함.
    - beef ext, yeast ext를 사용함.
    - 무기염류 영향 없음을 확인함.
    - 최적농도의 조건을 찾음.

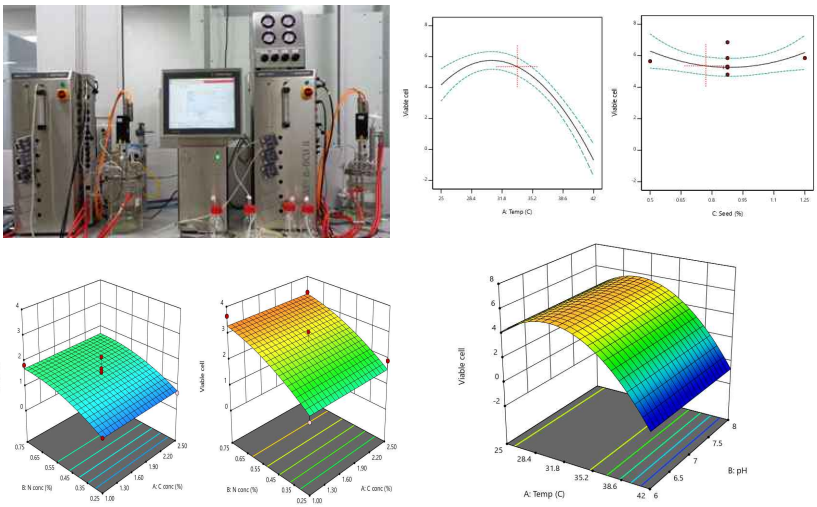
    a. 탄소원 2%, 질소원 0.1%

    b. 무기염류 영향 없으나 5% 이상 시 생장속도 둔화를 보임.
- 배양공정 최적화함.
  - 배양온도, pH, 통기 조건, 시간에 따른 생장성을 분석함.
    - 33℃, pH 6~7, 통기 X 확인함.
    - 12시간의 생장곡선을 비교함.
- 배양 표준화함.
  - 배양 scale 별 (50~500ml) 평균 생장성 및 생균수를 측정함.
    - 배양 scale 별 생균수를 측정함.
- 현장 생산용 배지 확립함.
  - 현장 생산 수준의 배지 확립을 위하여 탄소원 (corn starch, molassess), 질소원 (soybean flour, meat flour)등의 생장성을 비교함.
    - 탄소원 glucose, 2% 조건에서 우수함을 보임.
    - 질소원 soytone 및 peptone 0.2% 조건에서 우수함을 보임.



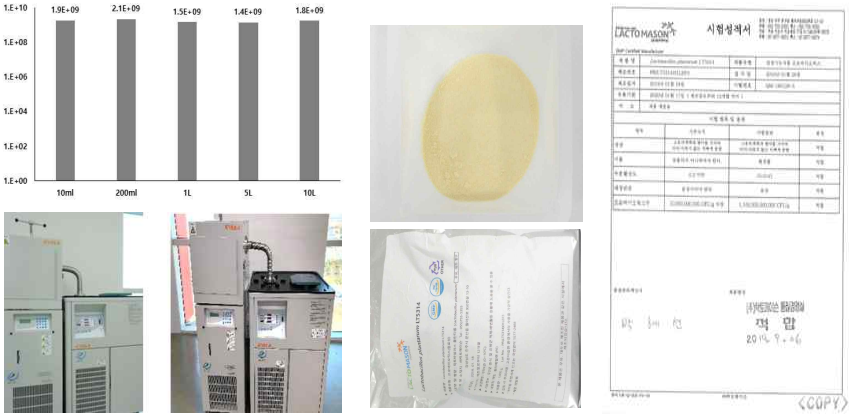
<그림 70> 탄소원 및 질소원 생장성 비교

- RSM 활용 최적 배지 및 배양 조건 확립함.
  - 배지 및 배양 조건 확보를 위한 1.5L fermentor 배양 후 RSM 통계를 수행함.
    - 배지 및 배양 조건 확보를 위하여 1.5L fermentor 배양 후 RSM 통계 수행함.(총 26회 배양)
    - 배지 최적화 결과, glucose 2%, soytone 0.5% 가장 우수함.
    - 배양 최적화 결과, 온도에 의한 영향이 큰 것으로 확인되며, 32℃에서 가장 우수함.



<그림 71> RSM 활용과 Glucose, Soytone 최적화 및 배양온도 최적화

- 배양 스케일-업, 소재 표준화 및 현장 생산함.
  - 배양액 volume 별 생장성 측정함.(10ml, 200ml, 1L, 5L, 10L)
  - 원료 분말화를 위하여 10L 배양 후 동결건조 진행함.(-80℃, 5mtorr, 72시간)
  - 확립된 최적 배지와 배양조건을 토대로 현장 수준에서의 배양을 위하여 ㈜락토메이슨에서 현장 원료를 생산함.
    - 배양액 volume별 생장성의 유의적 차이 없으며, 모든 배양액에서 1.4x10^{9} CFU/ml 이상의 생장성 확인됨.
    - 분말 중량 116g 생산, 생균수는 1.2x10^{11} CFU/g이었으며, 최종 동결건조 수율은 약 81.1%가 나옴.
    - 기준규격 1x10^{10}CFU/g 설정함.
    - LRCC5314 유산균 12kg 생산 완료, 실제 생산원료 생균수 분석결과, 1.1x10^{11} CFU/g으로 확인되었음.



<그림 72> 배양액 volume 별 생장성, 동결건조 수율 및 현장 원료 생산

- 시제품을 개발함.
  - 원재료 및 실험실 수준 배합 테스트 진행함.
  - 현장 수준 시생산 테스트 진행함.(롯데푸드 횡성공장)
  - 시생산된 분유의 영양성분 및 유산균수 분석 진행함.
  - 시제품 패키지 및 디자인 개발을 함.
    - 실험실 수준에서 배합 테스트 진행하여, 배합비 결정하였으며 유산균($1.1x10^{11}$ CFU/g) 0.5% 투여하여 시제품 생균수 $3.9x10^{11}$ CFU/g 확보함.
    - 2차례에 걸친 시생산 테스트를 수행함.
    - 영양성분과 유산균수 등은 일반적인 식품공전 기준하여 기기분석 및 다단희석/배양법을 이용하였으며, 0.5% 투여 시 $2.6x10^{8}$ CFU/g, 0.1% 투여 시 $1.1x10^{8}$ CFU/g 유산균수를 확보함.
    - 기존의 캔 형태에서 벗어나, 시니어 층 개봉할 때 안전하고 친환경적인 프리미엄 플라스틱 패키지를 선정함.
    - 시니어 층 및 중장년층 타겟을 고려한 패키지 디자인을 개발함.

원재료명	투여량(%)
1급A원유	19.6
덱스트린	10.5
탈지분유	11.4
카제인단백질	14.6
농축유청	11.3
유청단백분말	15.0
미네랄/영양소 외	17.1
LRCC5314 유산균	0.5
총 계	100

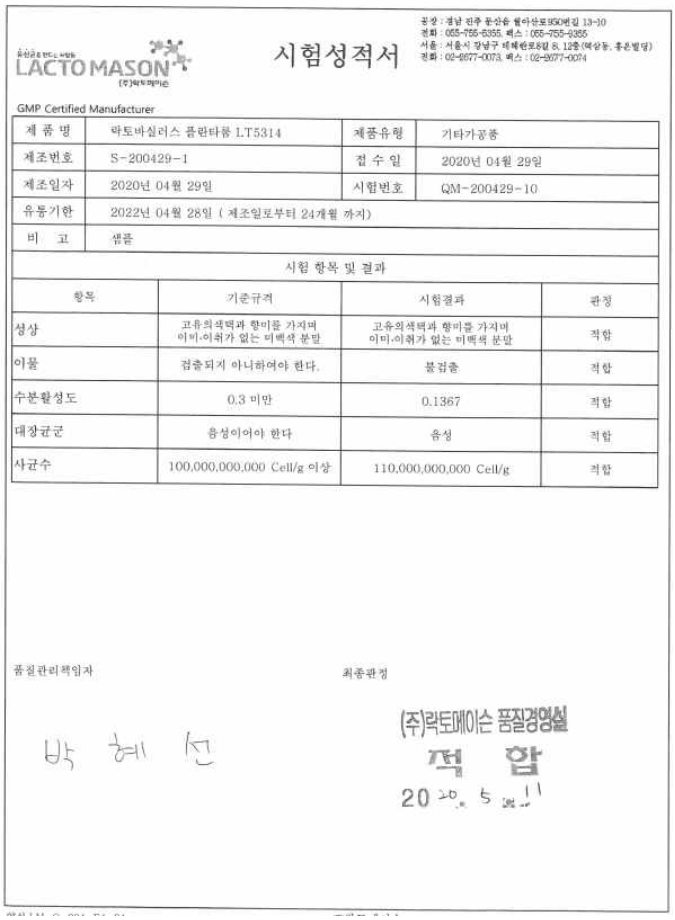
조건	1차	2차
생산량 (kg)	110	105
균질압 (bar)	150~180	170~200
살균	75~80℃/30초 이내	
농축 (%)	45~55	
유산균 투여(%)	0.5	0.1
수분 (%)	3 미만	
밀도 (g/ml)	0.5 미만	

원재료명		함량/100m g
탄수화물		7.4 g
지방		3.1 g
단백질		2.5 g
미네랄		0.28 g
기타성분		2.1 g
유산균수	0.5%	
	0.1%	

<그림 73> 실험실 수준 배합, 현장 수준 시생산 테스트 및 영양성분/유산균수 분석

<그림 74> 패키지 및 디자인 개발

- LRCC5314 프로바이오틱스 소재화 및 대량 생산을 진행함.
  - 현장 수준 적용을 위한 생균 소재화를 함.
    - LRCC5314 원료를 생산함.
    a. 1x10^{11} CFU/g 이상
    b. 35만원/kg 이상
    c. 유통기한 18개월
  - 제품 적용 및 유통 안정성 테스트를 위한 현장 수준의 LRCC5314 프로바이오틱스 소재를 생산함.
    - 사균체로 소재화함.
    a. 1x10^{11} cell/g 이상
    b. 42만원/kg 이상
    c. 품질 표준화



LACTO MASON (주)락토메이슨

공장 : 경남 진주 문산읍 월아산로950번길 13-10
전화 : 055-755-5355, 팩스 : 055-755-9355
서울 : 서울시 강남구 테헤란로8길 8, 12층 (역삼동, 홍은빌딩)
전화 : 02-6077-0073, 팩스 : 02-6077-0074

시험성적서

GMP Certified Manufacturer

제 품 명	락토바실러스 플란타룸 LT5314	제품유형	기타가공품
제조번호	S-200429-1	접 수 일	2020년 04월 29일
제조일자	2020년 04월 29일	시험번호	QM-200429-10
유통기한	2022년 04월 28일 (제조일로부터 24개월 까지)		
비 고	샘플		

시험 항목 및 결과

항목	기준규격	시험결과	판정
성상	고유의색택과 향미를 가지며 이미.이취가 없는 미백색 분말	고유의색택과 향미를 가지며 이미.이취가 없는 미백색 분말	적합
이물	검출되지 아니하여야 한다.	불검출	적합
수분활성도	0.3 미만	0.1367	적합
대장균군	음성이어야 한다	음성	적합
사균수	100,000,000,000 Cell/g 이상	110,000,000,000 Cell/g	적합

품질관리책임자 박 혜 진

최종판정 (주)락토메이슨 품질경영실 적 합 2020. 5. 11

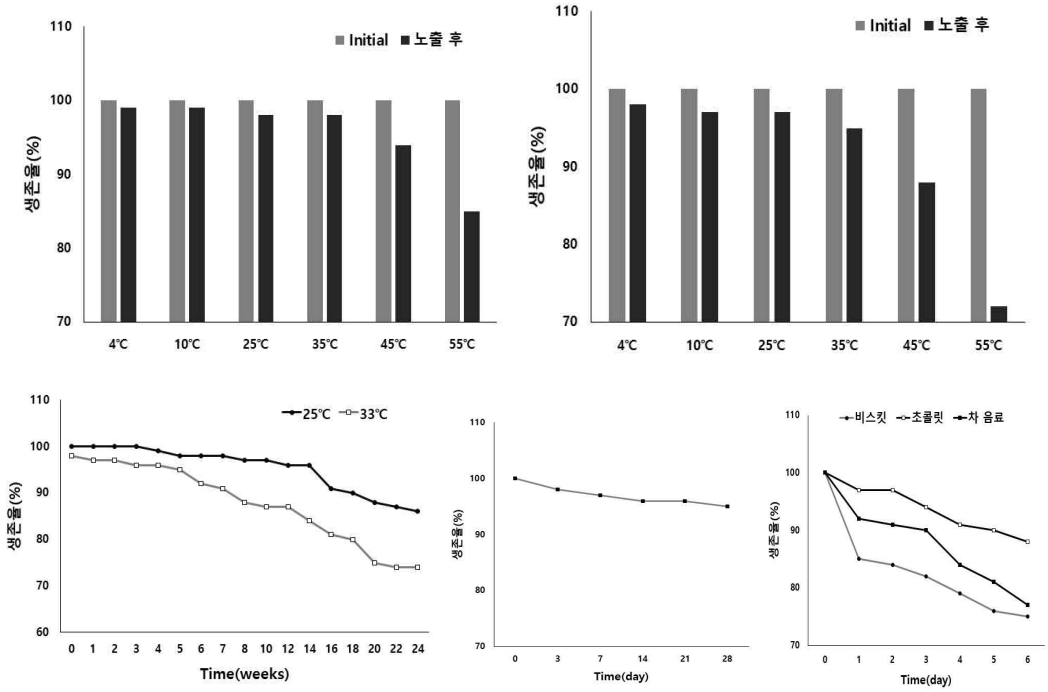
<그림 75> 현장 수준의 사균체 소재화

- 제품 적용성을 연구함.
  - 분유 및 성인영양식 적용을 위한 자체 브랜드 및 육성전략 개발함.
  - 특수 용도 식품 외 일반 식품 적용을 위한 제조, 살균 공정, 유통조건 조사 및 적합 카테고리 선정함.
    - 브랜드를 개발함.(당사 제품로드맵 반영, 성인영양식 브랜드 개발(마케팅-연구소), '혈당케어', 기능성 식물성 유산균 제품군)
    - 카테고리별 적용 검토를 진행함. (그룹 식품사 소재적용, 제조공정, 유통 조건(샌드류, 초콜릿, 발효음료 선정))

구 분		온도(℃)	pH	Pressure(bar)	후살균(O/X)	유통(개월)
스낵		120~130	3~8	1~2	X	18
비스킷				1 이하		
샌드류		40~60	5~7			
초콜릿		30~50				12
껌		120~130	3~6	1~2		24
캔디		50~70				
음료	과채	40~80	3~8	1 이하	O	6~12
	탄산					
	다류					
	워터		5~6			
발효유		30~40	4~6		X	2주
발효음료						6주

<그림 76> 브랜드 개발 및 카테고리 선정

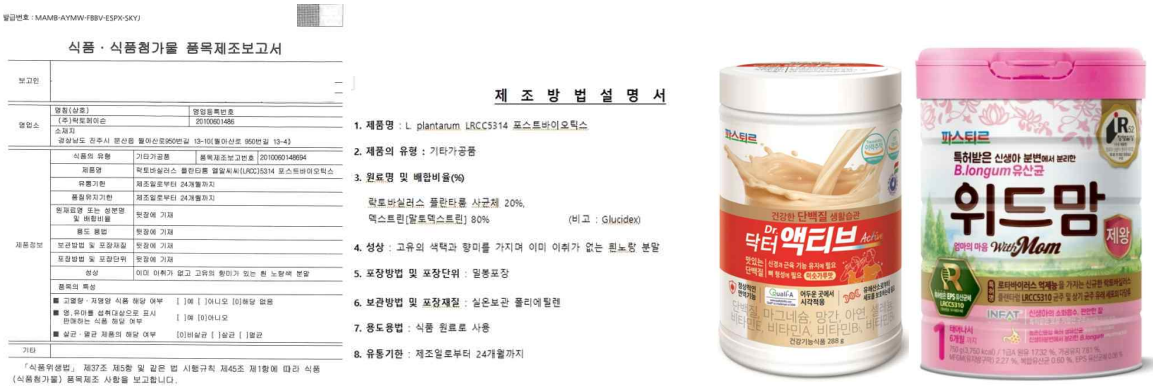
- 공정 조건, 원료 보관 안정성 검증 및 제형 확대 적용함.
  - 생균 원료의 공정조건별 안정성 검증을 진행함.
  - 생균 원료의 유통기한 설정을 위한 보관 안정성 검증을 진행함.
  - 비스킷, 초콜릿 등 일반식품 적용을 위한 제품별 시제품을 제조하여 보관 안정성을 측정하였으며, 원료 0.1~0.5% 투여함. (비스킷, 초콜릿, 차음료, 발효유 제조)
    - 원료의 온도별 노출하여 생균수를 측정함. (4~55℃, 2시간, 노출 전후 생균수 측정, 분말/액상 제형 전환)
    - 분말 및 액상 온도별 안정성을 평가함. (예상 결과)
    - 현장 생산원료의 보관온도별 생균수 측정함. (200g, 파우치 포장, 2개 온도(25, 33℃), 6개월 이상 측정)
    - 보관온도별 안정성을 평가함. (예상 결과('21. 04 완료))
    - 최대 28일 혹은 6개월 보관 및 생균수를 측정함.
    - 발효유 내 안정성(4℃ 보관, 28일 이내) 측정 결과, 95% 이상의 생존율 확인함
    - 비스킷, 초콜릿, 차음료 내 안정성(25℃ 보관, 6개월) 측정 결과, 비스킷과 차음료에서는 1개월이 지났을 때, 생존율이 급격히 감소하며 6개월 경과 시 75%의 생존율을 보였고 초콜릿의 경우에는 6개월이 지난 후에도 90%의 생존율을 나타냄.



<그림 77> 분말 및 액상 온도별 안정성, 보관온도별 안정성, 발효유 및 시제품 내 안정성

○ 스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재 실용화

– 포스트바이오틱스 소재화를 위하여 '락토바실러스 플랜타럼 엘알씨씨 (LRCC)5314 포스트바이오틱스'의 명칭으로 품목 신고 완료 및 대량 생산(1x10^{11} cells/g) 진행하였으며, 제품에 적용하여 출시하였고 경시 안정성(6개월)을 확인함.



<그림 78> 소재화 및 제품 출시

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

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		3	5	-	4	-	3	-	-	-
1차 년도	목표	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	실적	-	-	-	1	-	1	-	-	-
2차 년도	목표	2	2	-	1	-	1	-	-	-
	실적	2	2	-	1	-	5	-	-	-
3차 년도	목표	1	3	-	1	-	1	-	-	-
	실적	-	3	-	1	-	4	-	-	-
4차 년도	목표	-	-	-	1	-	1	-	-	-
	실적	1	-	-	1	-	2	-	-	-
계	목표	3	5	-	4	-	3	-	-	-
	실적	3	5	-	4	-	12	-	-	-

○ 나. 기타 성과목표

성과목표		사업화지표											연구기반지표								
		지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	건	만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		10	10	-	5	5	10	5	-	5	-	-			20	15	-	10	-	5	-
최종목표		2	2	-	1	43	2	800	-	1	-	-	4	-	2.5	4	-	5	-	1	-
1차 년도	목표	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	실적	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
2차 년도	목표	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2.5	1	-	1	-	-	-
	실적	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	3.082	1	-	2	-	-	-
3차	목표	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2.5	2	-	2	-	-	-

년도	실적	–	2	–	–	–	1	–	–	1	–	–	–	–	–	2	–	3	–	–	–
4차년도	목표	–	1	–	–	–	1	100	–	1	–	–	2	–	2.5	1	–	1	–	1	–
	실적	4	–	–	1	220	1	7,605	–	–	–	–	5	1	17.284	4	–	2	–	–	–
소계	목표	2	2	–	–	–	1	100	–	1	–	–	4	–	2.5	4	–	5	–	1	–
	실적	5	2	–	1	220	2	7,605	–	2	–	–	6	1	20.366	7	–	7	–	1	–
종료 1차년도		–	–	–	1	43	–	200	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–
종료 2차년도		–	–	–	–	–	1	500	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
종료 3차년도		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
종료 4차년도		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
종료 5차년도		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
소 계		–	–	–	1	43	1	700	–	–	–	–	–	–	2.5	4	–	–	–	–	–
합 계		5	2	–	1	220	2	7,605	–	2	–	–	5	1	20.366	7	–	7	–	2	–

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

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	*Lactobacillus* LRCC 5314 전장유전체	○ 분석목적: 후보 프로바이오틱스의 기능성 유전자 발굴 ○ 분석방법: PacBio SMRT Sequencing 기반 전장 유전체 분석(위탁기관 협업) ○ 분석결과: 총 3,249,803 bp, 16개의 rRNAs (5S rRNA 6개, 16S rRNA 5개, 23S rRNA 5개), 67개의 tRNAs로 구성되었으며 3,031개의 protein-coding sequences를 포함함. G+C content (mol%)는 44.5 mol%	2019.11.05	igem-0000912	6.3M
2	*Lactobacillus* CAU 1365 전장유전체	○ 분석목적: 후보 프로바이오틱스의 기능성 유전자 발굴 ○ 분석방법: PacBio SMRT Sequencing 기반 전장 유전체	2019.11.05	igem-0000918	6.3M

		분석(위탁기관 협업) ○ 분석결과:총 2,991,039 bp, 15개의 rRNAs (5S rRNA 5개, 16S rRNA 5개, 23S rRNA 5개), 61개의 tRNAs로 구성되었으며 2,760개의 protein-coding sequences를 포함함. G+C content (mol%)는 46.8 mol%			
3	*Lactobacillus* LRCC 5310 전장유전체	○ 분석목적: 후보 프로바이오틱스의 기능성 유전자 발굴 ○ 분석방법: PacBio SMRT Sequencing 기반 전장 유전체 분석(위탁기관 협업) ○ 분석결과:총 3,434,822 bp, 16개의 rRNAs (5S rRNA 6개, 16S rRNA 5개, 23S rRNA 5개), 52개의 tRNAs로 구성되었으며 3,061개의 protein-coding sequences를 포함함. G+C content (mol%)는 44.4 mol%	2021.10.05	igem-0002176	7.1M

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	*Lactobacillus* LRCC 5314 Catabolite control protein A (ccpA) 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석,결과, 혈중 저밀도 콜레스테롤(LDL)의 수치를 낮추는 기능을 가진 Catabolite control protein A (CcpA)를 생산하는 유전자를 확보함.	2019.11.06	igem-0000930	1.0K
2	*Lactobacillus* CAU 1365 Catabolite control protein A (ccpA) 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 혈중 저밀도 콜레스테롤(LDL)의 수치를 낮추는 기능을 가진 Catabolite control protein A (CcpA)를 생산하는 유전자를 확보함.	2019.11.06	igem-0000932	1.0K

3	*Lactobacillus* LRCC5314 비타민 B2 생합성 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 항염증 효과와 인슐린 저항성을 감소시키는 효과를 가진 비타민 B2(Riboflavin)을 생산하는 유전자를 확보함.	2020.10.21	igem-0001634	8.2K
4	*Lactobacillus* LRCC5314 비타민 B6 생합성 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 2형 당뇨병에서 당화혈색소의 농도를 낮추고 랑게르한스섬의 β세포의 기능을 회복시키는 효과를 보이는 비타민 B6(Pyridoxine)을 활성화 시키는 Pyrisoxal kinase를 생산하는 유전자를 확보함.	2020.10.21	igem-0001635	1.7K
5	*Lactobacillus* LRCC5314 GABA 생성 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 뉴런의 활동을 감소시켜 신체 이완과 스트레스 감소를 유도하는 효과를 가진 GABA를 생산하는 유전자를 확보함.	2020.10.21	igem-0001636	1.4k

□ 표준유전체 해독 (해당사항 없음)

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	인체 분변 시료	○ 시료로부터 illumina sequencing 기반 세균의 DNA 추출 및 16S rRNA gene 기반 대용량 메타지놈 분석함. ○ 대용량 염기 서열 분석용 서버 Python, R, Qiime 등을 활용하여 OTU 및 개체 수에 대한 정보를 획득한 후, 추정된 수를 계산하여 α-diversity 및 β-diversity를 분석함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2018.11.09	igem-0000195	454.3M

2	인체 정상인 분변 시료	○ 정상인으로부터 얻은 분변시료로부터 40건에 대한 illumina sequencing을 이용하여 미생물 군집을 분석하여, 942.6 MB의 Raw data, 총 2,857,299 reads를 얻었으며, *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 종이 우점함을 확인함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2019.11.05	igem-0000898	898.9M
3	Stress-type 2 diabetes 마우스의 분변시료	○ 분변 시료 56건에 대한 Illumina sequencing (Miseq)을 통해 총 1.3 GB Raw data를 얻었으며, 스트레스 유도 당뇨 그룹 내 프로바이오틱스 LRCC5314를 투여한 그룹이 스트레스 유도 당뇨 그룹과 비교했을 때, 다양성이 높았으며 다양하고 *Clostridium* 및 *Dorea*종이 감소하였으며, *Akkermansia* 종이 우점함을 확인함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2020.10.21	igem-0001651	1.3G
4	사균체를 투여한 Stress-type 2 diabetes 마우스의 분변시료	○ 분변 시료 20건에 대한 Illumina sequencing을 통해 총 268.2 MB의 Raw data를 얻었으며, 스트레스 유도 당뇨 그룹 내 사균화한 프로바이오틱스 LRCC5314를 투여한 그룹이 스트레스 유도 당뇨 그룹과 비교한 결과, 그룹 간 군집 차이가 있었으며 *Bacteroides* 종이 감소하였으며, *Bifidobacterium* 및 *Lactiplantibacillus* 종이 우점함을 확인함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2021.11.10	igem-0002175	268.2M

□ 유전체 분석기술 개발 (해당사항 없음)

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	*Lactobacillus* LRCC 5314 전장유전체	○ 분석목적: 후보 프로바이오틱스의 기능성 유전자 발굴 ○ 분석방법: PacBio SMRT Sequencing 기반 전장 유전체 분석(위탁기관 협업) ○ 분석결과: 총 3,249,803 bp,	2019.11.05	igem-0000912	6.3M

		16개의 rRNAs (5S rRNA 6개, 16S rRNA 5개, 23S rRNA 5개), 67개의 tRNAs로 구성되었으며 3,031개의 protein-coding sequences를 포함함. G+C content (mol%)는 44.5 mol%			
2	*Lactobacillus* CAU 1365 전장유전체	○ 분석목적: 후보 프로바이오틱스의 기능성 유전자 발굴 ○ 분석방법: PacBio SMRT Sequencing 기반 전장 유전체 분석(위탁기관 협업) ○ 분석결과:총 2,991,039 bp, 15개의 rRNAs (5S rRNA 5개, 16S rRNA 5개, 23S rRNA 5개), 61개의 tRNAs로 구성되었으며 2,760개의 protein-coding sequences를 포함함. G+C content (mol%)는 46.8 mol%	2019.11.05	igem-0000918	6.3M
3	*Lactobacillus* LRCC 5310 전장유전체	○ 분석목적: 후보 프로바이오틱스의 기능성 유전자 발굴 ○ 분석방법: PacBio SMRT Sequencing 기반 전장 유전체 분석(위탁기관 협업) ○ 분석결과:총 3,434,822 bp, 16개의 rRNAs (5S rRNA 6개, 16S rRNA 5개, 23S rRNA 5개), 52개의 tRNAs로 구성되었으며 3,061개의 protein-coding sequences를 포함 함. G+C content (mol%)는 44.4 mol%	2021.10.05	igem-0002176	7.1M
4	*Lactobacillus* LRCC 5314 Catabolite control protein A (ccpA) 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과 혈중 저밀도 콜레스테롤(LDL)의 수치를 낮추는 기능을 가진 Catabolite control protein A (CcpA)를 생산하는 유전자를 확보함.	2019.11.06	igem-0000930	1.0K
5	*Lactobacillus* CAU 1365 Catabolite control protein A (ccpA) 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과 혈중 저밀도 콜레스테롤(LDL)의 수치를 낮추는 기능을 가진 Catabolite control protein A (CcpA)를 생산하는 유전자를 확보함..	2019.11.06	igem-0000932	1.0K
6	*Lactobacillus* LRCC5314 비타민 B2 생합성 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 항염증 효과와 인슐린 저항성을 감소시키는 효과를 가진 비타민 B2(Riboflavin)을 생산하는 유전자를 확보함.	2020.10.21	igem-0001634	8.2K
7	*Lactobacillus* LRCC5314 비타민 B6 생합성 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 2형 당뇨병에서 당화혈색소의 농도를 낮추고	2020.10.21	igem-0001635	1.7K

		랑게르한스섬의 β세포의 기능을 회복시키는 효과를 보이는 비타민 B6(Pyridoxine)을 활성화 시키는 Pyrisoxal kinase를 생산하는 유전자를 확보함.			
8	*Lactobacillus* LRCC5314 GABA 생성 유전자	○ Pacbio SMRT sequencing 방법을 통하여 확보한 전장 유전체 분석 결과, 뉴런의 활동을 감소시켜 신체 이완과 스트레스 감소를 유도하는 효과를 가진 GABA를 생산하는 유전자를 확보함.	2020.10.21	igem-0001636	1.4k
9	인체 분변 시료	○ 시료로부터 illumina sequencing 기반 세균의 DNA 추출 및 16S rRNA gene 기반 대용량 메타지놈 분석함. ○ 대용량 염기 서열 분석용 서버 Python, R, Qiime 등을 활용하여 OTU 및 개체 수에 대한 정보를 획득한 후, 추정된 수를 계산하여 α-diversity 및 β-diversity를 분석함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2018.11.09	igem-0000195	454.3M
10	인체 정상인 분변 시료	○ 정상인으로부터 얻은 분변시료로부터 40건에 대한 illumina sequencing을 이용하여 미생물 군집을 분석하여, 942.6 MB의 Raw data, 총 2,857,299 reads를 얻었으며, *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 종이 우점함을 확인함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2019.11.05	igem-0000898	898.9M
11	Stress-type 2 diabetes 마우스의 분변시료	○ 분변 시료 56건에 대한 Illumina sequencing (Miseq)을 통해 총 1.3 GB Raw data를 얻었으며, 스트레스 유도 당뇨 그룹 내 프로바이오틱스 LRCC5314를 투여한 그룹이 스트레스 유도 당뇨 그룹과 비교했을 때, 다양성이 높았으며 다양하고 *Clostridium* 및 *Dorea*종이 감소하였으며, *Akkermansia* 종이 우점함을 확인함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.	2020.10.21	igem-0001651	1.3G
12	사균체를 투여한 Stress-type 2 diabetes 마우스의 분변시료	○ 분변 시료 20건에 대한 Illumina sequencing을 통해 총 268.2 MB의 Raw data를 얻었으며, 스트레스 유도 당뇨 그룹 내 사균화한 프로바이오틱스	2021.11.10	igem-0002175	268.2M

		LRCC5314를 투여한 그룹이 스트레스 유도 당뇨 그룹과 비교한 결과, 그룹 간 군집 차이가 있었으며 *Bacteroides* 종이 감소하였으며, *Bifidobacterium* 및 *Lactiplantibacillus* 종이 우점함을 확인함. ○ 위탁연구기관 (마크로젠)과 협업함.			

□ 병원성미생물진단마커 개발 (해당사항 없음)

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 병원성미생물 정보 완성 (해당사항 없음)

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 미생물 병발생 기작 규명 (해당사항 없음)

번호	분석대상 (유전체,유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

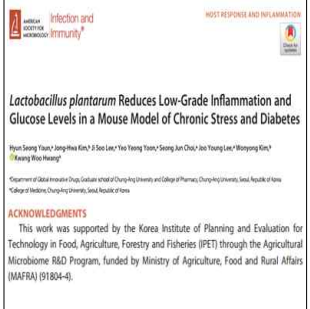
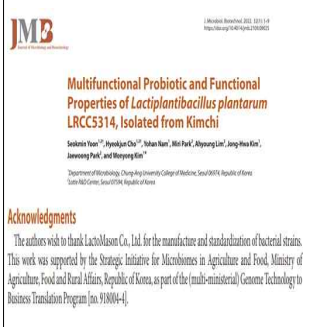
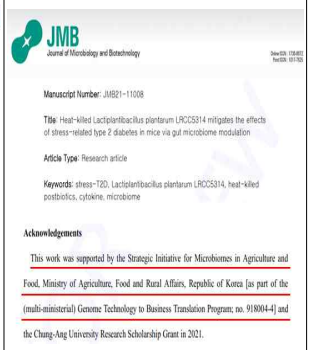
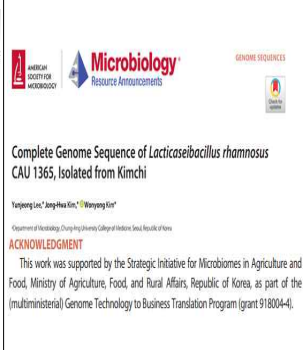
[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	*Kazachstania turicensis* CAU Y1706 ameliorates atopic dermatitis by regulation of the gut-skin axis	Journal of Dairy Science	Jong-Hwa Kim	102	*Kazachstania turicensisis* CAU Y1706의 장 피부축 조절을 통한 아토피성 피부염 개선	Elsevier	SCI	2019.04	0022-0302	50
2	*Lactobacillus plantarum* reduces low-grade inflammation and glucose levels in a mouse model of chronic stress and diabetes	Infection and Immunity	Hyun Seong Youn	89	만성 스트레스 및 당뇨 마우스 모델에서 *Lactobacillus plantarum*의 낮은 염증 조절 및 혈당 조절	American Society for Microbiology	SCI	2021.05	0019-9567	100
3	Improvement of Cutaneous Wound Healing via	Nutrients	YoHan Nam	13	당뇨마우스에서 사균화된 *Lactococcus chungang*	MDPI	SCI	2021.07	2072-6643	100

	Topical Application of Heat-Killed *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 on Diabetic Mice				*ensis* CAU 1447의 상처 치유 효과					
4	Multifunctional probiotic and functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* LRCC5314, isolated from kimchi	Journal of microbiology and biotechnology	Seokmin Yoon	32	김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* LRCC5314의 다기능 프로바이오틱스 및 기능적 특성	Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCI	2021.11	1017-7825	100
5	*Lactiplantibacillus plantarum* LRCC5314 includes a gene for serotonin biosynthesis via the tryptophan metabolic pathway	Journal of microbiology	Jiseon Jeong	59	트립토판 대사 경로를 통한 세로토닌 생합성을 위한 유전자를 포함하는 *Lactobacillus plantarum* LRCC5314	Microbiological Society Of Korea	SCI	2021.12	1225-8873	100
6	Heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* LRCC5314 mitigates the effects of stress-related type 2 diabetes in mice via gut microbiome modulation	Journal of microbiology and biotechnology	YoHan Nam	32	스트레스성 2형 당뇨 마우스에서 Heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* LRCC5314를 통한 장내 마이크로바이옴 조절	Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCI	2021.12	1017-7825	100
7	Complete Genome Sequence of *Lacticaseibacillus rhamnosus* CAU 1365, Isolated from Kimchi	Microbiology Resource announcements	Yunjeong Lee	10	김치에서 분리된 *Lacticaseibacillus rhamnosus* CAU 1365의 완전한 게놈 서열	American Society for Microbiology	비SCI	2021.12	2576-098X	100

<표 2> 논문 게재 성과

번호	1	2	3	4
논문게재				
번호	5	6	7	
논문게재				

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	13th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health (IPC 2019)	이은주	2019. 06. 19	Prague Congress Centre	체코
2	대한 미생물학회 추계 학술대회 (2020)	백지혜	2020. 09. 24	경상대학교 GNU컨벤션 센터	대한민국
3	International Union of Microbiological societies (2020)	박미리	2020. 11. 16 ~ 11. 20	대전 컨벤션 센터	대한민국
4	대한 미생물학회 추계 학술 대회 (2021)	남요한	2021. 10. 08	한국 파스퇴르 연구소	대한민국
5	대한 미생물학회 추계 학술 대회 (2021)	이윤정	2021. 10. 08	한국 파스퇴르 연구소	대한민국
6	mBiome International Conference (2021)	남요한	2021. 12. 10	연세대학교	대한민국
7	mBiome International Conference (2021)	윤석민	2021. 12. 10	연세대학교	대한민국

□ 기술 요약 정보 (해당사항 없음)

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

□ 보고서 원문 (해당사항 없음)

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	인체 분변 시료	igem-0000195	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2018
2	인체 정상인 분변시료	igem-0000898	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2019
3	*Lactobacillus* LRCC 5314 Catabolite control protein A (ccpA) 유전자	igem-0000930	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2019
4	*Lactobacillus* CAU 1365 Catabolite control protein A (ccpA) 유전자	igem-0000932	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2019
5	*Lactobacillus* LRCC 5314 전장유전체	igem-0000912	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2019
6	*Lactobacillus* CAU 1365 전장유전체	igem-0000918	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2019
7	*Lactobacillus* LRCC5314 비타민 B2 생합성 유전자	igem-0001634	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2020
8	*Lactobacillus* LRCC5314 비타민 B6 생합성 유전자	igem-0001635	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2020
9	*Lactobacillus* LRCC5314 GABA 생성 유전자	igem-0001636	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2020
10	Stress-type 2 diabetes 마우스의 분변시료	igem-0001651	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2020
11	사균체를 투여한 Stress-type 2 diabetes 마우스의 분변시료	igem-0002175	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2021
12	*Lactobacillus* LRCC5310 전장유전체	igem-0002176	IGEM 미생물유전체전략연구사업단	2021

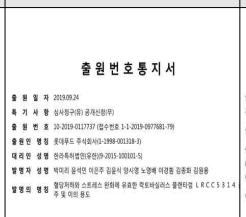
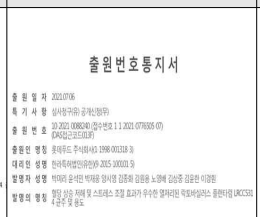
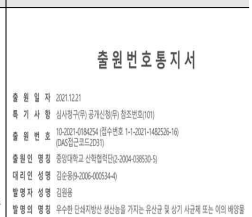
[기술적 성과]

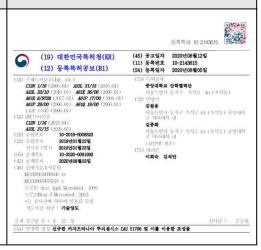
□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	혈당저하와 스트레스 완화에 유효한 락토바실러스 플랜타럼 LRCC5314 균주 및 이의 용도	대한민국	롯데푸드 주식회사	2019. 09. 24	10-2019-0117737						
2	혈당저하와 스트레스 완화에 유효한 락토바실러스 플랜타럼 LRCC5314 균주 및 이의 용도	대한민국					롯데푸드 주식회사	2020. 03. 20	10-2091757		
3	신규한 카자츠타니아 투리센시스 CAU Y1706 및 이를 이용한 조성물	대한민국					중앙대학교 산학협력단	2020. 08. 05	10-2143615		

4	혈당 상승 저해 및 스트레스 조절 효과가 우수한 열처리된 락토바실러스 플랜타럼 LRCC5314 균주 및 용도	대한민국	롯데푸드 주식회사	2021. 07. 06	10-2021-0088240						
5	락토코커스 중앙젠시를 포함하는 피부 손상 또는 치료용 조성물	대한민국	중앙대학교 산학협력단	2021. 11. 01	10-2021-0147719						
6	최종당화산물 형성 억제 효능을 갖는 락티카제이 바실러스 람노서스 균주의 및 그 용도	대한민국	중앙대학교 산학협력단	2021. 12. 21	10-2021-0184238						
7	우수한 단쇄지방산 생산능을 가지는 유산균 및 상기 사균체 또는 이의 배양물	대한민국	중앙대학교 산학협력단	2021. 12. 21	10-2021-0184254						

<표 3> 특허 출원 및 등록 성과

번호	1	2	3	4	5
특허(출원)					

번호	1	2
특허(등록)		

ㅇ 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) (해당사항 없음)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정 (해당사항 없음)

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증 (해당사항 없음)

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

□ 표준화 (해당사항 없음)

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1]	인증여부[2]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3]	제안/인증일자

ㅇ 국제표준

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

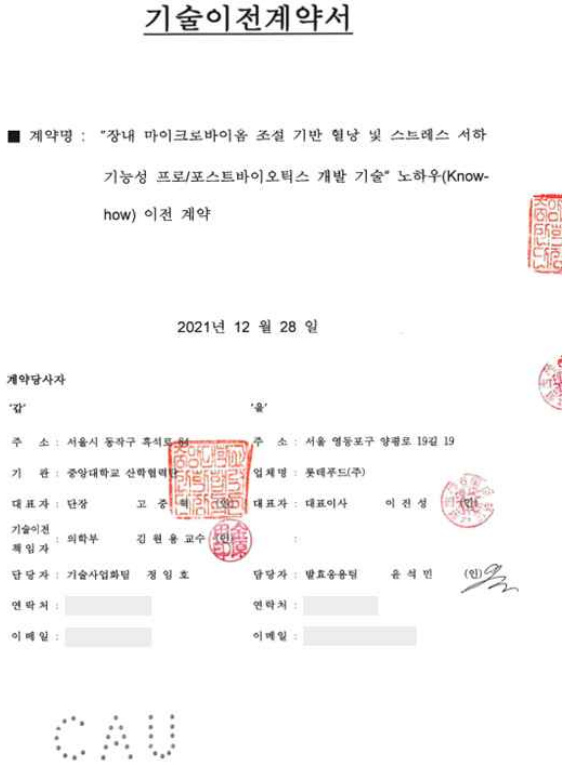
[경제적 성과]

□ 시제품 제작 (해당사항 없음)

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 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	노하우	“장내 마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술” 노하우(Know-how) 이전 계약	중앙대학교 산학협력단	2021.12.28	0	0



기술이전계약서

■ 계약명 : “장내 마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술” 노하우(Know-how) 이전 계약

2021년 12 월 28 일

계약당사자

‘갑’ ‘을’

주 소 : 서울시 동작구 흑석로 84 주 소 : 서울 영등포구 양평로 19길 19

기 관 : 중앙대학교 산학협력단 업체명 : 롯데푸드(주)

대표자 : 단장 고 중 혁 (인) 대표자 : 대표이사 이 진 성 (인)

기술이전 책임자 : 의학부 김 원 용 교수 (인)

담당자 : 기술사업화팀 정 임 호 담당자 : 발효융용팀 윤 석 민 (인)

연락처 : 연락처 :

이메일 : 이메일 :

CAU

<그림 79> 기술 이전 계약서

□ 사업화 투자실적 (해당사항 없음)

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1]	사업화 형태[2]	지역[3]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	제왕 위드맘	마이크로바이옴 조절 분유	롯데푸드	7.605,117	-	2020	특허등록 후 20년
2	자기실시	신제품 개발	국내	닥터액티브 (혈당케어)	고혈당 보유 시니어 맞춤 영양식	롯데푸드	-	-	-	특허등록 후 20년

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발		
주관연구기관	중앙대학교 산학협력단	참여기관	롯데푸드(주)
연구책임자	김 원 용	연구기간	2018년04월 ~ 2021년12월(총45개월)
총 정부출연금	1,328,000 원		

해당 기술의 제품출시 유형

시제품(제품출시 예정)	(○)	기존 제품 공정개선	( )
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )

제품 출시 실적

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
닥터액티브 -혈당케어		고혈당 보유 시니어 맞춤 영양식	2021. 11	30

* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)
↔식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수

상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.

2020년 12월 28일

연구책임자 : 김 원 용 (인)

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발		
주관연구기관	중앙대학교 산학협력단	참여기관	롯데푸드(주)
연구책임자	김 원 용	연구기간	2018년04월 ~ 2021년12월(총45개월)
총 정부출연금	1,328,000 원		

해당 기술의 제품출시 유형

시제품(제품출시 예정)	(○)	기존 제품 공정개선	( )
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )

제품 출시 실적

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
제왕 위드맘		마이크로바이옴 조절 분유	2020.9.15	30

* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)
↔식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수

상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.

2021 년 12월 28일

연구책임자 : 김 원 용 (서명 또는 인)

<그림 80> 마이크로바이옴 분석기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발에 대한 제품 출시 확인서

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
제왕 위드맘	2020-2021	7,605,117	-	7,605,117	매출 합산
합계		7,605,117		7,605,117	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과 (해당사항 없음)

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	박소정	롯데제과 (롯데 중앙연구소)	1	-	1
2	임아영	롯데제과 (롯데 중앙연구소)	-	1	1
합계					

□ 고용 효과 (해당사항 없음)

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적) (해당사항 없음)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과 (해당사항 없음)

(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) (해당사항 없음)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역 (해당사항 없음)

(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 (해당사항 없음)

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

□ 정책활용 내용 (해당사항 없음)

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

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영 (해당사항 없음)

번호	구 분 (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				
1	렁라비 칸자나순트리	2019	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1				1	1				
2	길기철	2019	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1			1		1				
3	남요한	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1			1		1				
4	Vu Huu Truong	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1			1		1				
5	윤여영	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1			1		1				
6	백지혜	2021	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1				1	1				
7	윤현성	2021	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1			1		1				

□ 산업 기술 인력 양성 (해당사항 없음)

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

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용 (해당사항 없음)

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과 (해당사항 없음)

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	뉴스	신아일보 등	롯데푸드-중앙대, 당뇨·스트레스 개선 프로바이오틱스 연구 박차	2018.05.24.

☐ **포상 및 수상 실적** (해당사항 없음)

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

☐ **연구시설・장비** (해당사항 없음)

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

- 해당사항 없음

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

○ **전시회 참가**

- Vitafood Asia (2018, 싱가포르)
  - 개별 맞춤형 영양, 장 건강, microbiome 주제에 대한 컨퍼런스
- 4th European Microbiome Congress (2018, 영국)
  - 건강기능성 마이크로바이옴 조절(프로/프리바이오틱스, 대사사물), 최신 분석기술(post NGS) 등 최신 연구 동향 확인 및 공동 연구 연계 방안 모색

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
○ 대용량 NGS 기술을 이용한 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 스크리닝	○ 스크리닝을 위한 시료 수집 - 인체 유래 분변 시료 및 전통 발효식품(각종 김치)을 확보함.	100
	○ 프로바이오틱스 발굴 및 확보 - 식품 허용 미생물 및 GRAS급 선별함.	100
	○ 프로바이오틱스 선별 - 독성평가 및 항염증을 평가함. - 생리·생화학적 특성을 조사함.	100
○ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 특성 및 유전체 분석	○ 소재 특성 평가 - 내담즙/내산성 및 장 정착능을 평가함. - 독성 및 항염증을 평가함. (LPS 유도된 세포)	100
	○ 기능성 유전자 분석 - LRCC5314(GABA, 비타민 B2, 비타민 B6, ccpA 생성 유전자) 확인함. - CAU 1365(ccpA 생산 유전자) 확인함. - LRCC5310(비타민 B6) 확인함.	100
	○ 유용유전자 보유 소재 특허출원(2건) - CAU 1365(최종 당화산물 형성을 억제 효능) - CAU 1538(단쇄지방산 생성 기반 장 환경 개선 효능)	100
○ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 스트레스에 대한 기능성 분석	○ 세포 수준에서의 항스트레스 효능 평가 - Cortisol (H295R cell line)을 측정함.	100
	○ 스트레스 유도한 Knock-out 마우스에 대한 효능 평가 - 혈중 Corticosterone 측정함. - 분변시료를 통한 장내 마이크로바이옴을 분석함.	100
	○ 프로바이오틱스 소재 면역조절 효능 검증 - M1/M2 대식세포 분화(THP-1 cell line) 유도함. - M1/M2 대식세포 인자를 분석함. - 마우스 복강 유래 대식세포 추출, 분화 유도 및 대표 인자를 확인함.	100
	○ 스트레스 및 2형 당뇨에 대한 면역조절 기전 - 면역조절 기전 규명 확립함. (MIN6 cell line) - 항염증 기전 규명함.	100
	○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 항스트레스 기능성 검증(*in vivo*) - 혈중 Corticosterone 농도를 측정함. - 지방 조직 내 스트레스 인자를 확인함. (NPY, Y2R)	100

○ 스트레스 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 2형 당뇨병에 대한 기능성 분석	○ 프로바이오틱스 소재의 항당뇨 효능 평가 (*in vitro*) - 당분해 효소 활성 저해 효과를 확인함. - 지방분화 억제 효능을 평가함.	100
	○ 2형 당뇨 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능 평가 (*in vivo*) - 당뇨 진단 테스트를 수행함. - 포도당 대사, 염증 관련 인자들을 분석함.	100
	○ 스트레스성 2형 당뇨 마우스를 활용한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능 평가 (*in vivo*) - 체중증가 유무 확인 및 공복혈당을 측정함.	100
	○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 항당뇨 기능성 검증 (*in vivo*) - 체중 및 식이 섭취량를 측정함. - 당뇨 진단 테스트를 수행함. - 간 및 Adipose tissue 무게를 측정함. - Adipose tissue 내 포도당 대사, 지방 합성, 염증 관련 인자들을 분석함.	100
○ 표준화	○ 최적화 및 표준화 - 배양 배지 최적화함. - 배양공정 최적화함. - 배양조건 표준화함. - 현장 생산용 배지 확립함. - 최적 배지 및 배양조건 확립함. - 배양 스케일-업, 원료 분말화함. - 현장 원료 생산함. (확립된 최적 배지, 배양조건 기반)	100
	○ 시제품 개발 - 배합 테스트 및 시생산 테스트를 진행함. - 안전 및 친환경적 프리미엄 플라스틱 패키지로 선정함. - 시니어, 중장년층을 고려한 패키지 디자인으로 개발함. - 자체 브랜드 및 육성전략 개발을 진행함. - 제조, 살균 공정, 유통조건 조사 및 적합 카테고리를 선정함. - 공정조건별 안정성, 보관 안정성을 검증함.	100
○ 스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재 전임상시험	○ 프로바이오틱스 소재 제형에 대한 기능성 검증 (*in vivo*) - LRCC5314 시제품에 대한 검증을 수행함. - 당뇨 진단 테스트를 실시함. - 혈중 Corticosterone 농도를 확인함. - Adipose에 대해 분석함. - Adipose tissue 내 당 대사, 스트레스 조절,	100

	염증 관련 인자들 분석함. - Brain tissue 내 당 대사, 스트레스 조절, 염증 관련 인자들 분석함. - Intestinal tissue 내 염증 관련 인자들 분석함. - 조직학적 Brain과 Intestine을 분석함.	
	○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 스트레스성 2형 당뇨 관련 gut microbiome을 분석함.	100
○ 스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재의 실용화	○ 소재화 및 제품 출시 - '락토바실러스 플랜타럼 엘알씨씨(LRCC)5314 포스트바이오틱스'의 명칭으로 품목 신고 완료 및 제품으로 출시함.(6개월의 경시적 안정성)	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다) (해당사항 없음)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 꾸준히 연구되고 있는 스트레스와 당뇨의 발병기전 및 연관성에 비해 치료제는 개발단계이지만, 본 연구개발과제를 통해 국내 최초로 마이크로바이오를 기반으로 하여 스트레스 및 당뇨 개선 효능을 검증하는 프로/포스트바이오틱스 소재와 제품을 개발하였으며. 특허출원 5건, 특허등록 2건 및 7편의 SCI 논문을 게재하였음.

○ NGS를 기반으로 하여 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스를 발굴하고, 프로바이오틱스에 대한 생리·생화학적 특성 및 효능 평가를 진행하고 당뇨 및 스트레스에 대한 기능성 유전자를 전장 유전체 분석을 통해 발굴하였음. 또한, 생명공학 연구의 기본이 되는 생명자원의 대표적인 소재인 미생물에 대해 본 연구개발과제를 통해 총 12건의 생명자원을 확보하였음.

○ 당뇨 및 스트레스에 대한 바이오마커 지표들과 면역 반응 매개 조절에 대해 *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서 확인하여 프로바이오틱스의 기능성을 검증하고, 메타분석을 통한 장내 마이크로바이옴 분석과 SCFAs, 당뇨 및 스트레스 관련 바이오마커들의 결과들을 종합하여, gut-brain axis의 상관성을 규명하였음.

○ 본 연구개발과제에서 우수한 프로바이오틱스를 발굴하고 그 균주의 배양 최적화 및 표준화, 제형화 단계를 연구하고 수행하여 기능성 프로/포스트바이오틱스 제품을 위한 기술을 확보하였음.

○ 당뇨 및 스트레스 개선 효과가 우수한 신규 균주의 실용화 및 사업화를 위하여 최적 배지를 토대로 현장 수준에서 사용 가능한 현장 생산용 배지를 확립하여 스케일-업 테스트 조건을 최적화하여 대량생산을 진행하였으며, 이를 기반으로 제품개발을 추진하여 제형별 안정성 검증을 완료하였음. 마이크로바이옴 기술을 활용한 제품 개발 성과를 이루었음.

○ 국내 마이크로바이옴 시장에서 프로바이오틱스 및 포스트바이오틱스를 단시간에 산업화 및 상용화를 진행하여 두 제품인 '제왕 위드맘' 및 '닥터 액티브' 제품을 출시하는 성과를 나타내었음.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 본 연구개발과제 성과를 기반으로 발굴한 우수한 균주를 분유 제품뿐만 아니라, 음료, 스낵, 비스킷, 유제품 등 제품 적용 확대를 추진하고, 홍보 및 마케팅에 적극적으로 활용할 예정임.

○ 중장기적으로는 현재 식품시장에 주력하고 있으나, 향후에 건강기능식품 시장에 진출하기 위하여 개발된 LRCC5314 프로바이오틱스 소재의 '혈당 조절 효과' 기능성으로 개별인정형 획득을 위한 임상시험을 진행하고자 CRO 컨설팅을 진행하고, 특히 개별인정형 확보 경력이 우수한 ㈜네오뉴트라 등 경험보유 기관과 협업하여 *In vitro* 및 *In vivo* 동물에서 확보된 바이오마커와 기능성 평가 가이드를 비교하여 신청서류를 확보해 나갈 예정임.

○ 특히 국내 중장년과 시니어층을 타겟으로 환자를 모집하고, LRCC5314 소재 복용에 따른 혈당 저하 효과 등을 확보하기 위한 임상연구를 추진함.

○ 국내 병원 연구진과 협력하여 인체 임상연구를 위한 IRB 신청 및 임상연구계획을 확보하고, 특히 비만/당뇨 등 대사 질환자가 많이 방문하는 서울아산병원 혹은 지리적으로 피험자 모집이 유리한 중앙대 병원 등과 협업을 추진해나갈 계획이며, 롯데제과의 건강기능식품 브랜드 부서(헬스원)과 협업하여, 타겟 맞춤형 개별인정형 원료로서 판매 및 수익을 창출해나갈 예정임.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		1건 게재
	비SCIE		-
	계		1건 게재
국내논문	SCIE		-
	비SCIE		-
	계		-
특허출원	국내		-
	국외		-
	계		-
특허등록	국내		-
	국외		-
	계		-
인력양성	학사		-
	석사		-
	박사		-
	계		-
사업화	상품출시		2종(시니어 영양식, 맞춤 간편식 등)
	기술이전		-
	공정개발		3(소재화 및 제품 양산화 기술)
제품개발	시제품개발		2종
비임상시험 실시			-
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	1건(개별인정형 가이드 기준)
		2상	-
		3상	-
	의료기기		-
성과홍보			-
정성적 성과 주요 내용			-

< 별첨 자료 >

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

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체 연구개발사업 미생물 유전체 전략연구사업단 연구개발과제 최종보고서이다.

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

[별첨 1]

자체평가의견서

1.

		과제번호		918004-4	
사업구분	포스트게놈 다부처 유전체 사업				
연구분야	산업화 지원 미생물유전체 전략연구 (조기성과 창출)			과제구분	단위
사 업 명	포스트게놈 다부처 유전체 사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	마이크로바이옴 분석 기술을 이용한 스트레스 및 2형 당뇨병 개선 프로바이오틱스 소재 개발			과제유형	개발
연구개발기관	중앙대학교 산학협력단			연구책임자	김원용
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.04.25.~ 2018.12.31.	217,000	217,000	434,000
	2차년도	2019.01.01.~ 2019.12.31.	285,000	285,000	570,000
	3차년도	2020.01.01.~ 2020.12.31.	313,000	313,000	626,000
	4차년도	2021.01.01.~ 2021.12.31	313,000	313,000	626,000
	5차년도	-	-	-	-
	계	2018.04.25.~ 2021.12.31	1,128,000	1,128,000	2,256,000
참여기업	롯데푸드				
상 대 국	-		상대국연구개발기관	-	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.07.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
중앙대학교	교수	김원용

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	김원용

[별첨 1]

Ⅰ. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

○ 프로/포스트바이오틱스 소재 섭취에 의한 장내 마이크로바이옴 변화–장내 대사물질 변화–면역반응 통합 분석 기반 스트레스 및 당뇨 개선 효능을 검증하는 연구는 국내 최초임.
○ 장내 마이크로바이옴의 변화–면역조절 상관관계 분석을 기반으로 염증, 스트레스 및 당뇨 개선 메커니즘을 규명한 연구를 통해 개발된 프로/포스트바이오틱스 소재는 국내 최초임.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

○ 염증–스트레스–당뇨 개선 메커니즘을 규명함으로써, 관련 질환에 대한 예방, 개선, 치료에 대하여 산업적, 의학적 소재 개발에 초석을 제공함.
○ 마이크로바이옴 분석 기반 염증/스트레스/당뇨 증상 개선 맞춤형 프로/포스트바이오틱스 소재 및 이를 활용한 식품 또는 건강기능식품 개발이 가능하여, 국민 건강에 이바지함.
○ 스트레스/당뇨 개선 또는 스트레스–당뇨 통합 개선 및 예방 식품 개발을 통해 새로운 기능성 식품시장 형성 유도가 가능하며, 글로벌 시장진출 확대가 가능함.

3. 연구개발결과에 대한 활용 가능성

■ 등급 : 우수

○ 염증–스트레스–2형 당뇨 개선 등에 관련된 메커니즘 규명 및 유전체 해독에 의한 소재 자원의 확보로, 기능성 식품, 개별인정형 건기식 및 의학적(예방, 개선, 치료) 소재로의 활용이 가능할 것임.
○ 마이크로바이옴을 기반으로 한 메커니즘 조절, 효능 평가 등을 통해 고부가가치 건강기능식품 소재 개발이 가능함.
○ 복합적으로 발생된 질환에 대한 면역 증강 기전을 규명함으로써, 스트레스/당뇨 관련 합병증 등에 대한 탐색, 개선 및 예방법에 대한 기초 원천기술 확보가 가능함.
○ 특히 확보된 기술을 활용하여 '혈당 저하' 기능성 원료 확보를 위한 임상연구를 추진하고자 하며, 이는 협동기관인 롯데푸드(주)의 자체 연구투자비를 활용할 예정으로서 2022년 IRB 승인을 목표로 함. 본격적인 환자모집 및 임상연구는 2022년 말부터 2023년까지 걸쳐서 진행하고자 하며, 2024년에 최종 인허가를 신청하는 것을 목표로 함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

○ 원활한 과제수행을 위하여, 연구개발 수행기간 동안 고기능성 프로바이오틱스 소재 발굴을 지속적으로 수행하였으며, 발굴된 소재에 대한 기능성 및 전임상 검증을 위해 중앙대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 최종 목표를 달성할 수 있도록 성실히 수행하였음.
○ 발굴된 프로바이오틱스 소재에 대해 다기능 소재로 활용을 위해 지속적인 유전체 분석 및 검증 실험을 지속적으로 실시하였음.
○ 다양한 제형 및 사업화를 하기 위하여, 발굴된 프로/포스트바이오틱스 소재 모두에 대하여 기능성 검증 실험을 성실히 수행하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

○ 연구수행 기간 동안, 발굴한 우수한 프로바이오틱스 균주의 다기능적 특성, 장내 마이크로바이옴 및 유전체 분석을 기반으로 만성 스트레스, 혈당, 염증 조절에 관한 내용으로 논문 총 7편, 특허출원 5건, 특허등록 2건을 달성하였으며, 또한, 국제/국내학술대회 총 7편을 발표 등의 연구개발 성과를 달성함.
○ 본 연구수행을 통해 구축된 '장내 마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술'에 대한 기술 이전 계약(1건)을 체결함.
○ 분리 확보된 2개의 프로바이오틱스 소재를 활용하여 제왕위드맘(마이크로바이옴 조절 및 면역 증강), 닥터액티브(혈당케어) 제품 2건을 사업화함.

[별첨 1]

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 대용량 NGS 기술을 이용한 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 스크리닝	15	100	○ 프로바이오틱스 소재 스크리닝을 위한 시료 수집 - 2018년 3월부터 중앙대학교 병원 윤리 위원회의 승인을 받아 궤양성 대장염 분변, 정상인 분변 시료를 수집함. - 로컬마켓에서 전통 발효식품(각종 김치)를 수집함. ○ 장 점막이 회복이 된 궤양성 대장염 분변, 정상인 분변, 전통 발효식품으로부터 식품 허용 미생물 및 GRAS급 프로바이오틱스를 선별 및 발굴 ○ 발굴 프로바이오틱스에 대한 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스를 확보 - RAW 264.7 cell line을 활용하여 안전성을 확보(독성평가)함. - NO, cytokine 분비량(항염증평가)을 분석함. ○ 독성이 없고 항염증 효과를 보이는 발굴 프로바이오틱스에 대하여 생리·생화학적 특성을 조사 - API 20E, API 50CH를 활용함.
○ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 특성 및 유전체 분석	15	100	○ 프로바이오틱스 소재 특성 분석 및 안전성 평가 - 발굴 프로바이오틱스를 특정 조건 (pH2.0 또는 Ox-gall 포함)의 MRS 배지에 배양하여 내산성/내담즙 평가를 수행하고, Caco-2 cell line을 활용하여 발굴 프로바이오틱스의 장 정착능 평가를 수행하여 장 환경에서 생존할 수 있음을 확인함. - LPS가 유도된 RAW 264.7 cell line을 활용하여 NO 및 Cytokine의 분비량 차이를 분석하여 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스를 확인함. ○ 프로바이오틱스 소재 LRCC5314에 대한 기능성 유전자 분석 - COG, KASS, KEGG, Cytoscape software

			등을 활용한 metabolic pathway, regulatory pathway, metabolite 통합 분석을 기반으로 GABA, 비타민 B2, 비타민 B6, ccpA 생성 유전자를 보유함을 확인함. ○ 프로바이오틱스 소재 CAU 1365에 대한 기능성 유전자 분석 - Pacbio SMRT sequencing 분석을 통해 전장 유전체를 분석하였으며, 콜레스테롤 감소 관련 유전자인 ccpA 생성 유전자를 보유함을 확인함. ○ 프로바이오틱스 소재 LRCC5310에 대한 기능성 유전자 분석 - Pacbio SMRT sequencing 분석을 통해 전장 유전체를 분석하였으며, 비타민 B6 생산 유전자를 보유함을 확인함. ○ 유용 유전자 보유 프로바이오틱스 소재에 대한 특허 출원 - KEGG 데이터베이스와 단당류, 다당류 대사 관련 유전자를 적용하여 프로바이오틱스 소재 CAU 1365의 탄소원 대사경로 및 비타민 B6 생합성 경로를 하나의 대사경로로 구성하였고 HPLC를 통해 비타민 B6의 합성량을 확인하여 최종 당화산물의 형성을 억제하는 효능을 가진 CAU 1365에 대한 특허를 출원함. - 프로바이오틱스 소재 CAU 1538의 내담즙/내산성 및 장 부착능 확인, Caco-2 cell line을 활용한 장 세포 손상 및 염증 억제 효과 확인과 단쇄지방산 생성능을 평가하여 장 환경을 개선하는 효능을 가진 CAU 1538에 대한 특허를 출원함.
○ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 스트레스에 대한 기능성 분석	10	100	○ 프로바이오틱스 소재의 항스트레스 효능 평가 (*in vitro*) - LPS로 스트레스가 유도된 H295R cell line을 활용하여 세포 수준에서 발굴 프로바이오틱스의 cortisol 분비 저해능을 확인함. ○ 스트레스를 유도한 knock-out 마우스에 대해 프로바이오틱스 투여에 따른 효능 평가 (*in vivo*) - Cold exposure method를 통해 stress가 유도된 knock-out 마우스에 대하여 프로바이오틱스

			LRCC5314 소재 처리에 따른 혈중 Corticosterone 농도를 비교 분석함. - 분변시료를 활용하여 장내 마이크로바이옴을 분석함. ○ 프로바이오틱스 소재의 면역조절 효능 검증 - THP-1 cell line을 활용하여 M1/M2 대식세포로의 분화를 유도하는 실험 조건을 확립함. - 프로바이오틱스 소재 또는 사균체 처리에 의한 M1 대식세포 및 M2 대식세포 인자를 분석함. - 소재 처리에 의한 비장의 T cell growth factor를 분석함. - 프로바이오틱스 소재 또는 사균체가 대식세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 마우스의 복강으로부터 대식세포를 추출하고 M1/M2 세포 분화를 유도하여 대표 인자(TNF-α, Il-6, Il-1β, Stat1, Arg2, Mrc1, Il-10, Arg1, Fizz-1, Ym1)의 mRNA 발현량을 확인함. - 인슐린종 세포주인 MIN6 cell line을 활용하여 스트레스와 2형 당뇨에 대한 프로바이오틱스 소재의 면역조절 기전 규명을 확립하고 항염증 기전을 규명함. ○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 항스트레스 기능성 검증 (*in vivo*) - 고지방식이와 스트레스를 유도한 2형 당뇨 마우스에 사균체를 투여하여 스트레스 관련 지표를 확인함. - 혈중 Corticosterone 농도를 측정한 결과 낮은 수치의 함량임을 확인함. - Adipose tissue로부터 스트레스 관련 인자(NPY, Y2R)의 mRNA 발현량을 확인하여 항스트레스 효능을 검증함.
○ 스트레스 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 2형 당뇨병에 대한 기능성 분석	10	100	○ 프로바이오틱스 소재의 항당뇨 효능 평가 - 선별 균주에 대한 당분해 효소 (α-amylase 및 α-glucosidase)에 대한 활성 저해 효과를 확인함. - DMI로 지방분화가 유도된 3T3-L1 cell line을 이용하여 프로바이오틱스 소재 및 사균체의 지방분화 억제 효능을 평가하였으며 Oil red 염색을 통해 지방분화가 억제됨을 확인하였으며 중성지방인 Triglyceride가 많이 감소함.

			- 지방 축적 관여 인자들의 mRNA 발현량을 확인함. - 고지방식이 마우스의 adipose tissue 무게를 측정함. - Adipokines (adiponectin, leptin), inflammatory factors (IL-6, MCP-1, TNF-alpha), Lipolysis-related factors (HSL, perilipin)의 mRNA 발현을 확인함. ○ 2형 당뇨 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능 평가 (*in vivo*) - 고지방식이를 통해 유도시킨 2형 당뇨 마우스에 프로바이오틱스 소재 LRCC5314를 투여하고 당뇨 진단 테스트 수행, Adipose tissue weight 및 포도당 대사 관련 인자(GLUT4, Adiponectin)의 mRNA 발현을 측정함. - 염증 인자(TNF-alpha, IL-6, CCL2, Leptin)의 mRNA 발현량을 확인함. ○ 스트레스성 2형 당뇨 마우스에 대한 프로바이오틱스 투여에 따른 효능 평가 (*in vivo*) - 고지방식이와 스트레스(Cold exposure method)로 유도한 마우스의 체중증가 확인 및 공복혈당을 측정하여 효과를 확인함. ○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 독성평가 - 고지방식이와 스트레스로 유도한 2형 당뇨 마우스에 LRCC5314 사균체를 투여하고 체중 및 사망률을 평가함. - 모든 마우스의 체중, 사망률, 부검에 따른 육안적 소견의 종합적 평가로 안전성을 확인함. ○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 항당뇨 기능성 검증 (*in vivo*) - 고지방식이와 스트레스를 유도한 2형 당뇨 마우스에 사균체를 투여하여 관련 인자를 확인함. - 체중 및 식이 섭취량을 측정함. - 당뇨 진단 테스트(주 1회 공복혈당, 포도당 저항성 (IGTT)을 측정, 인슐린 저항성 (IITT)을 측정)를 수행함. - 간 및 Adipose tissue(Neck, Epididymal, Subcutaneous)의 무게를 측정함. - Adipose tissue로부터 포도당 대사 관련

			인자(GLUT4), 지방 합성 관련 인자 (Adiponectin, Leptin), Pro-inflammatory 관련 인자 (TNF-α, IL-6, CCL2)의 mRNA 발현량을 확인함. - 당뇨 관련 인자를 비교 분석하여 항당뇨에 대한 기능성을 검증함. ○ LRCC5314 사균체 소재에 대한 스트레스성 2형 당뇨 관련 gut microbiome 분석 - 분변 시료에 대한 Illumina sequencing을 이용한 메타분석을 수행함. - α-diversity 및 β-diversity 분석을 통해 미생물 다양성과 군집 차이를 확인함. - Taxonomy 분석을 통해 Phylum, Genus, species level의 차이를 확인함.
○ 스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재의 최적화 및 표준화	15	100	○ 최적화 - 당이용성, 탄소원, 질소원, 무기염류 종류별, 농도별 분석을 통해 배양 배지를 최적화함. - 배양온도, pH, 통기 조건, 시간에 따른 생장성을 분석하여 배양공정을 최적화함. - 배양 scale별 (50~500ml) 평균 생장성 및 생균수 측정하여 배양 조건을 표준화함. - 탄소원 (corn starch, molassess), 질소원 (soybean flour, meat flour) 등의 생장성을 비교하여 현장 생산용 배지를 확립함. - Fermenter 배양 후 RSM 통계수행으로 최적 배지 및 배양 조건을 확립함. ○ 표준화 - 배양액 volume 별 생장성 측정을 기반으로 배양 스케일-업을 시행함. - 동결건조(10L)를 통해 원료를 분말화함. - 확립된 최적 배지와 배양 조건을 토대로 현장 원료를 생산함. ○ 시제품 개발 - 배합 테스트를 거쳐 현장 수준 시생산 테스트를 진행하고 시생산된 분유의 영양성분 및 유산균수를 분석함. - 안전하고 친환경적인 프리미엄 플라스틱 패키지를 선정하고 시니어 층 및 중장년층을 고려한 패키지 디자인을 개발함.

			- 분유 및 성인영양식 적용을 위한 자체 브랜드 및 육성전략을 개발하고, 식품 적용을 위해 제조, 살균 공정, 유통조건 조사 및 적합 카테고리를 선정함. - 공정조건별 안정성, 보관 안정성 검증을 수행함.
○ 스트레스와 2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재 전임상시험	15	100	○ 프로바이오틱스 소재 제형에 대한 기능성 검증 (*in vivo*) - 고지방식이와 스트레스를 유도한 2형 당뇨 마우스에 LRCC5314 시제품을 투여하여 관련 인자를 확인을 통해 효능을 확인함. - 당뇨 진단 테스트(주 1회 공복혈당, 포도당 저항성(IGTT)을 측정, 인슐린 저항성 (IITT)을 측정)를 수행하여 효능을 확인함. - 스트레스 관련 인자인 혈중 Corticosterone의 농도를 확인하였으며 농도가 감소한 것을 확인함. - Subcutaneous adipose tissue의 면적이 감소하였으며 그룹 간의 차이가 있음을 확인함. - Adipose 분석을 통해 효능을 확인함. (adipose 무게, brown adipose: white adipose 비율, Brown adipose:body weight 비율) - Adipose tissue 내 당 대사(Leptin, adiponectin), 스트레스 조절(NPY, Y2R), 염증 관련(IL-6, TNF-α, IL-4, IL-10) 인자 mRNA 발현량을 비교함. - Brain tissue 내 당 대사 관련(GLUT1, IRS1), 스트레스 조절 관련(BDNF), 염증 관련(TGF-β, IL-1β, IL-6, IL-4, IL-10) 인자의 mRNA 발현량을 확인하였으며 그룹 간의 차이를 보임. - Intestinal tissue 내 염증 관련(IL-1β, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10) 인자의 mRNA 발현량을 확인하였으며 그룹 간의 차이를 보임. - 마우스 모델에서 스트레스 및 2형 당뇨와 LRCC5314 사균체의 효능을 조직학적(뇌, 장)으로 확인함. - LRCC5314 시제품에 의한 단쇄지방산(Butyric acid, Propionic acid, Acetic acid)의 차이를 분석함. ○ LRCC5314 시제품에 대한 스트레스 및 2형 당뇨 관련 gut microbiome 분석 - α-diversity 및 β-diversity 분석을 통해 미생물 다양성과 군집 차이를 확인함. - Taxonomy 분석을 통해 Phylum, Genus, species level의 차이를 확인함.

○ 스트레스와 제2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재의 실용화	20	100	○ 소재화 및 제품 출시 - 포스트바이오틱스 소재화를 위하여 '락토바실러스 플랜타럼 엘알씨씨 (LRCC)5314 포스트바이오틱스'의 명칭으로 품목 신고 완료 및 대량 생산($1x10^{11}$ cells/g) 진행하였으며, 제품에 적용하여 출시하였고 경시 안정성(6개월)을 확인함.
합계	100점	100	

Ⅲ. 종합의견

1. 대한 종합의견

○ 프로바이오틱스 소재의 스크리닝 및 발굴, 유전체 분석을 통한 소재의 다기능 특성 확보, 마이크로바이옴 분석 기반 소재의 기능성 검증(세포 및 동물수준) 등을 통해 염증-스트레스-2형 당뇨 개선 및 면역 증강 관련 상호 메커니즘을 분석하여 질병의 병인 기전을 규명함. ○ "장내마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술" 에 대한 노하우(Know-how) 기술 이전 및 사업화(제품화) 완료 등 조기성과 창출을 위하여 연구 전반에 걸쳐 성실히 수행하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 분야 상위 10% 이내 저널 1편, 분야 상위 20% 이내 저널 1편을 포함 총 SCI급 저널 6편 게재함.

○ 도출된 결과에 대해, 국내 특허 출원 5건, 특허등록 2건 및 5건의 국제/국내학술대회에서 발표함.

○ 장내 마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술 노하우(Know-how)에 대한 기술 이전 계약을 실시함.

○ 마이크로바이옴 및 유전체 분석을 기반으로 한 고기능성 프로/포스트바이오틱스 소재(LRCC5314, LRCC5310 등) 발굴을 통해, 염증-스트레스-2형 당뇨 개선에 대한 기능성 검증 연구는 국내 최초임.

○ 염증-스트레스-2형 당뇨 개선 및 면역 증강 기전을 규명함으로써, 복합적 발생 질환의 완화 또는 예방에 대한 다기능성 소재 활용의 유용성을 가짐.

3. 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 본 연구결과를 기반으로 발굴된 고기능성 프로/포스트바이오틱스 소재에 대하여 염증-스트레스-2형 당뇨 개선 및 면역 증강 효과를 토대로 소재 유래 유용 대사산물을 확보하여 복합적 질환 맞춤형 소재 확장 개발 및 검증을 통해 복합적으로 발생되는 질환 또는 합병증 등의 예방 및 개선, 치료에 새로운 소재로 제시할 수 있을 것으로 예상됨.
○ 염증, 스트레스 및 2형 당뇨/비만(대사성질환) 개선에 대한 국민 전 연령층에서 높은 수요가 예상되어, 프로/포스트바이오틱스 소재 및 이의 유래 유용 대사산물을 활용하여 기능성과 웰빙을 강조할 수 있는 다양한 제품군으로 확장 개발이 가능할 것으로 예상됨.
○ 국민의 건강 유지, 질병 예방 및 치료 등에 대한 새로운 제품개발 등의 고부가가치 신산업의 원천을 마련하여, 산업/의학계에서 국제적 경쟁력을 도모할 수 있음.
○ 개별인정형 확보 경력을 가지고 있는 경험 보유기관과의 협업 및 CRO 컨설팅을 진행하여 *In vitro* 및 *In vivo* 에서 확보된 바이오마커와 기능성 평가 가이드를 비교하여 국내 병원 연구진들과의 협력을 통해 임상연구계획을 세우고 임상시험을 진행할 계획임.
○ 특히 확보된 기술을 활용하여 '혈당 저하' 기능성 원료 확보를 위한 임상연구를 추진하고자 하며, 이는 협동기관인 롯데푸드(주)의 자체 연구투자비를 활용할 예정으로서 2022년 IRB 승인을 목표로 함. 본격적인 환자모집 및 임상연구는 2022년 말부터 2023년까지 걸쳐서 진행하고자 하며, 2024년에 최종 인허가를 신청하는 것을 목표로 함.
○ 롯데제과의 건강기능식품 브랜드 부서(헬스원)과 협업하여, 타겟 맞춤형 개별인정형 원료로서 판매 및 수익을 창출해나갈 수 있을 것으로 예상됨.

[별첨 1]

Ⅳ. 보안성 검토

○ 본 과제 보고서에는 협동 기관의 롯데푸드의 시니어 영양식 및 케어푸드 중장기 전략의 핵심소재인 당뇨-스트레스 개선에 대한 연구내용이 상세하게 포함되기에 보안이 필요함.

보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

○ 본 과제를 통해 지재권을 확보하였고, 지재권에 포함되지 않은 다양한 연구 방법과 노하우가 포함되어 있으며, 참여기업에서 이를 활용하여 제품을 개발하여 시장에 출시할 예정으로 보안이 요구됨.

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

○ 본 과제를 통해 지재권을 확보하였고, 지재권에 포함되지 않은 다양한 연구 방법과 노하우가 포함되어 있으며, 참여기업에서 이를 활용하여 제품을 개발하여 시장에 출시할 예정으로 보안이 요구됨.

[별첨 2]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	□자유응모과제 ☑지정공모과제		분 야	민간중심 R&D 사업화 지원_포스트게놈 다부처 유전체 사업으로 개발된 기술의 산업화 연구 지원
연 구 과 제 명	마이크로바이옴 조절 기반 간 건강 소재 활용 숙취해소음료 제품 개발 및 사업화			
주관연구개발기관	롯데칠성음료		주관연구책임자	곽웅권
연 구 개 발 비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	199,000,000	199,000,000	-	398,000,000
연구개발기간	2023.04.01.-2024.12.31. (1년 9개월)			
주요활용유형	☑산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 대용량 NGS 기술을 이용한 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 스크리닝	○ 인체 유래 분변 시료 및 전통 발효식품으로부터 프로바이오틱스를 발굴 및 확보(식품 허용 미생물 및 GRAS급)하고 독성평가, 항염증 평가 및 생리·생화학적 특성 분석 등의 스크리닝을 통해 균주를 선별하였음.
② 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재 특성 및 유전체 분석	○ 프로바이오틱스 소재에 대한 특성 평가와 기능성 유전자 분석을 통해 3종의 프로바이오틱스 소재에 대한 유용유전자를 발굴하였으며, CAU 1365 및 CAU 1538은 각각 최종 당화산물 형성 억제, 우수한 단쇄지방산 생성능 기반 장 환경 개선할 수 있는 프로바이오틱스 소재로 특허(2건)를 출원함.
③ 염증 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 스트레스에 대한 기능성 분석	○ 세포 및 동물 수준에서 스트레스와 관련된 corticosterone 농도를 측정하였으며, 지방 조직에서 스트레스 및 염증인자를 분석함으로써 항스트레스 효능을 확인하였음. 또한, 분화된 대식세포를 활용하여 프로바이오틱스 소재에 대한 면역조절 효능을 확인함.
④ 스트레스 억제력이 우수한 프로바이오틱스 소재의 제2형 당뇨병에 대한 기능성 분석	○ 세포 수준에서 제2형 당뇨 및 비만과 관련된 당분해, 지방분화와 관련된 인자를 분석하였고, 동물 수준에서도 프로바이오틱스 소재, 사균체 섭취에 대한 체중, 식이 섭취량 당뇨 진단 테스트, 포도당 대사, 지방 합성, 염증 관련 인자를 분석하여 2형 당뇨병에 대한 기능성을 확인하였음.

⑤ 스트레스와 제2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재의 최적화 및 표준화	○ 배양 배지, 배양공정, 배양 조건 등을 최적화하여 확립한 최적 배지와 배양 조건을 기반으로 현장 원료를 생산함. 시니어, 중장년층을 고려한 패키지 디자인을 개발하고 자체 브랜드와 육성전략을 개발함. 제조, 살균 공정, 유통조건 조사 및 적합 카테고리를 선정하고 공정조건별 및 보관 안정성을 검증함.
⑥ 스트레스와 제2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재 전임상시험	○ LRCC5314 시제품에 대한 전임상시험을 수행함. 당뇨 진단 테스트, 혈중 corticosterone 뿐만 아니라 Adipose, Brain, Intestinal tissue에서의 스트레스와 당뇨에 대한 지표를 확인하였음. 또한, 분변을 수집하여 LRCC5314 사균체 소재에 대한 스트레스성 2형 당뇨 관련 gut microbiome 분석을 수행하여 LRCC5314 시제품의 스트레스성 2형 당뇨에 대한 기능성을 검증함.
⑦ 스트레스와 제2형 당뇨병 개선 고기능성 프로바이오틱스 소재의 실용화	○ '락토바실러스 플랜타럼 엘알씨씨(LRCC)5314 포스트바이오틱스'의 명칭으로 품목 신고를 완료하고 제품 출시함.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		3	5	-	4	-	3	-	-	-
1차 년도	목표	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	실적	-	-	-	1	-	1	-	-	-
2차 년도	목표	2	2	-	1	-	1	-	-	-
	실적	2	2	-	1	-	5	-	-	-
3차 년도	목표	1	3	-	1	-	1	-	-	-
	실적	-	3	-	1	-	4	-	-	-
4차 년도	목표	-	-	-	1	-	1	-	-	-
	실적	1	-	-	1	-	2	-	-	-
계	목표	3	5	-	4	-	3	-	-	-
	실적	3	5	-	4	-	12	-	-	-

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표		사업화지표												연구기반지표									
		지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
														논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	SMART평균등급	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건		건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		10	10	-	-	5	5	10	5	-	5	-	-			20	15	-	10	-	5	-
최종목표		2	2	-	-	1	43	2	800	-	1	-	-	4	-	2.5	4	-	5	-	1	-
당해년도	목표	2	2	-	-	-	-	1	100	-	1	-	-	4	-	2.5	4	-	5	-	1	-
	실적	5	2	-	-	1	220	2	7,605	-	2	-	-	6	1	20.366	7	-	7	-	1	-
달성률(%)		250	100	-	-	100	100	100	100	-	200	-	-	150	100	100	175	-	140	-	100	-

[별첨 2]

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	장내 마이크로바이옴 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발
②	당뇨-스트레스 개선 포스트바이오틱스 LRCC5314
③	당뇨-스트레스 개선 포스트바이오틱스 활용 시니어 푸드 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화·흡수	외국기술개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		v				v				
②의 기술		v				v				
③의 기술		v					v			
· ·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	○ 당뇨, 스트레스와 연계되고 마이크로바이옴을 기반한 다양한 질환 개선 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발에 활용하고자 하며, 특히 비만과 우울증을 비롯하여 향후 치매 등 다양한 증상 개선을 위한 소재를 개발하고자 함.
②의 기술	○ LRCC5314 포스트바이오틱스를 활용하여 고혈당 중장년, 시니어층을 대상으로 인체적용시험을 거치고, 확보된 연구결과를 토대로 '혈당저하' 기능성 관련 개별인정형 소재로 인허가를 받아 기능성표시식품(일반식품)에 적용하고자 함. 이는 협동기관인 롯데푸드(주)의 자체 연구투자비를 활용할 예정으로서 2022년 IRB 승인을 목표로 함. 본격적인 환자모집 및 임상연구는 2022년 말부터 2023년까지 걸쳐서 진행하고자 하며, 2024년에 최종 인허가를 신청하는 것을 목표로 함.
③의 기술	○ 늘어나는 고령 인구를 타겟할 수 있는 고기능성·프리미엄 제품으로 판매하고자 하며, 영양식을 베이스로 하는 다양한 제품 카테고리로 확장하고자 함.(음료, 간편식 등)

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	3	5	-	4	-	3	-	-	-
연구기간내 달성실적	3	5	-	4	-	12	-	-	-
연구종료후 성과장출 계획	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표												연구기반지표							
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART평균등급	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건		건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	10	10	-	-	5	5	10	5	-	5	-	-			20	15	-	10	-	5	-
최종목표	2	2	-	-	1	43	2	800	-	1	-	-	4	-	2.5	4	-	5	-	1	-
연구기간내 달성실적	5	2	-	-	1	220	2	7,605	-	2	-	-	6	1	20.366	7	-	7	-	1	-
연구종료후 성과장출 계획	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

[별첨 2]

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]			
이전형태	□무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	
기술이전시 선행조건[4]			

※ 노하우(Know-how) 유형의 “장내 마이크로바이오 조절 기반 혈당 및 스트레스 저하 기능성 프로/포스트바이오틱스 개발 기술”에 대해 기술이전을 실시하였음. (21. 12. 28)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 유전체 다부처 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 유전체 다부처 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.