

<표지>

(옆면)

(앞면)

117051-3

원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를  
갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발

2020

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

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

고부가가치식품기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003277-01

# 원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발

2020.09.29.

주관연구기관 / (주)종근당바이오  
제1협동연구기관 / 고려대학교  
제2협동연구기관 / 분당서울대학교병원

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발”(개발기간 : 2017. 06. 15 ~ 2020. 06. 30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 09. 29.

주관연구기관명 : ㈜종근당바이오 (대표자) 이 정 진



제1협동연구기관명 : 고려대학교 (대표자) 고려대학교 산학협력단장



제2협동연구기관명 : 분당서울대학교병원 (대표자) 분당서울대학교병원장



주관연구책임자 : 김 병 국

제1협동연구책임자 : 김 세 헌

제2협동연구책임자 : 이 경 민

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117051-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.01.01.~ 2020.06.30	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농림축산식품연구개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발			
연구책임자	김병국	해당단계 참여연구원 수	총: 25명 내부: 24명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:200,000천원 민간:133,400천원 계:333,400천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 25명 내부: 25명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:510,000천원 민간:340,800천원 계:850,800천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)중근당바이오 프로바이오틱스팀 고려대학교 생명과학대학 생명공학과 분당서울대학교병원 정형외과			참여기업명	(주)중근당바이오
국제공동연구	-			-	
위탁연구	-			-	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	8	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 1) 세포 및 동물실험을 통한 골다공증 개선 효능 프로바이오틱스 균주 선발
  - 조골세포에서 골 형성 대사 촉진 효능 균주 선발
  - 이차성 골다공증 모델에서 골밀도 개선 효능 균주 선발
- 2) 원발성 골다공증 동물모델에서 프로바이오틱스 효능 확인 및 기전 규명
  - 폐경 유도 원발성 골다공증 동물모델에서 골밀도 개선 효능 확인
  - 골 대사 및 칼슘 대사 관련 유전자 발현 분석을 통한 효능 기전 규명
- 3) 배양 최적화 및 제품의 규격·유통기한 설정 완료
  - 배양 최적화 및 scale-up 완료
  - 안정성 테스트를 통한 유통기한 설정
  - 공인기관분석을 통한 안전성 검증 및 제품의 규격 설정
- 4) 대량생산기술 확립 및 제품화
  - 대량생산기술을 적용한 원말 생산 및 캡슐 제품 제조
  - 품목제조신고 완료 및 제품화 추진
- 5) 인체적용시험을 통한 안전성 및 효능 평가 수행
  - 폐경 여성 대상 24주간 인체적용시험 수행
  - 뼈 건강 개선 관련 유효성 평가 수행 (골밀도, 신체계측, 혈액지표)
  - 인체 내 안전성 평가 (이상반응, 임상병리검사)

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i> 및 <i>in vitro</i> 모델에서 골다공증 개선 기능성 프로바이오틱스 선발</li> <li>• 인체적용시험을 통해 선발된 프로바이오틱스의 골다공증 개선 효능 검증</li> <li>• 골다공증 개선 기능성 프로바이오틱스 대량 생산 기반 구축</li> <li>• 골다공증 개선 기능성 프로바이오틱스 제품화 및 실용화 추진</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 골다공증 개선 기능성 프로바이오틱스 발굴 및 효능 메커니즘 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 골다공증 주요 원인별(원발성, 이차성 골다공증) 효능 검증 완료</li> <li>• 골 대사 및 칼슘 대사 바이오마커 분석을 통한 다양한 효능 기전 검토</li> </ul> </li> <li>2) 대량생산공정 확립을 통한 제품 원말 및 캡슐 제조 및 품목제조신고 완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 유통기한·제품 규격 설정 완료 및 품목제조신고 완료</li> <li>• 배양 최적화를 통한 대량 생산 완료 및 제품화 추진</li> </ul> </li> <li>3) 인체적용시험을 통한 안정성 및 유효성 평가 진행 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 폐경 여성 대상 원발성 골다공증 인체적용시험 수행</li> <li>• 안전성 및 골다공증 개선 유효성 평가 수행</li> </ul> </li> <li>4) 연구 성과 도출 <ul style="list-style-type: none"> <li>• SCI(E)급 논문 8편, 특허 출원 2건, 등록 1건, 다수 해외학회 발표 추진</li> <li>• 전시회 부스 내 연구 포스터 게재 및 연구 내용 소개, 홍보</li> </ul> </li> </ol>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> <li>• (주)중근당바이오 가족사를 통한 고시형 원말 판매 추진</li> <li>• 반려동물을 위한 장 건강 &amp; 관절 유산균 LABIVET(라비벳)으로 제품화</li> <li>• 뼈 건강 개별인정형 원료 등재 후 개별인정형 건강기능식품으로 판매 추진</li> <li>• 본 연구 결과로 획득한 지식재산권을 활용하여 해외 원말 판매 추진</li> </ul> </li> <li>2) 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 골다공증 개선 효능을 갖는 신규 프로바이오틱스 시장 창출</li> <li>• 골다공증 치료제의 부작용을 보완 할 수 있는 제품으로 국민 보건 향상에 기여</li> <li>• 국내 기능성 프로바이오틱스 시장 확대 및 수출 증대 효과</li> <li>• 유효 기능성 물질 연구를 통한 파마바이오틱스로의 후속연구 기반 마련</li> </ul> </li> </ol>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>골다공증</p>	<p>프로바이오틱스</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>인체적용시험</p>	<p>제품화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Osteoporosis</p>	<p>Probiotics</p>	<p>Health functional food</p>	<p>Clinical Trial</p>	<p>Commercialization</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	5
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	10
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	61
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	64
붙임. 참고 문헌 .....	65

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 원발성 및 이차성 골다공증 개선 프로바이오틱스 발굴 및 그 효능 기전 규명
- 인체적용시험을 통한 프로바이오틱스의 안전성·유효성 검증 및 건강기능식품 소재 가능성 확인
- 기능성 프로바이오틱스 대량생산 기반 구축 및 상용화 추진

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 골다공증이란

#### (1) 골다공증의 정의

- 골다공증(Osteoporosis)은 가장 흔한 대사성 골질환으로 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환임
- 세계보건기구(WHO)는 골다공증을 “골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환”으로 정의함

#### (2) 골다공증의 종류

- 골다공증은 원발성 골다공증과 이차성 골다공증으로 분류할 수 있음. 원발성 골다공증에는 폐경 후 골다공증과 노인성 골다공증이 있으며, 이차성 골다공증은 소아 뇌성 마비와 같은 특정 질병이나 수술, 약물 복용 등에 의해 골량 형성 장애가 있거나 골소실이 증가하는 경우에 발생함

### 나. 골다공증 환자 현황

- 건강보험심사평가원에 따르면 국내 골다공증 환자 수가 최근 5년간 지속적으로 증가하여 2015년 82만 명을 넘어섰으며, 골다공증에 대한 요양 급여 역시 매년 약 6%씩 증가하여 928억 9천만 원에 육박함

Table 1. 골다공증 환자 수 및 요양 급여

	2011	2012	2013	2014	2015
요양급여(천원)	72,241,724	74,573,985	80,561,220	86,589,303	92,890,812
환자수(명)	773,130	794,618	805,304	822,986	821,754

- 성별을 나누어 살펴보면 2008년부터 2013년까지 매년 여성이 남성에 비해 12.3배 이상 많았고, 특히 2013년 진료인원 기준으로 여성이 남성보다 13.4배 더 높게 나타남

Table 2. 2008~2013년 골다공증 진료인원의 성별 분포

(단위 : 명, %)

구 분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	연평균 증가율
전체	614,397 (100.0%)	688,257 (100.0%)	743,966 (100.0%)	773,314 (100.0%)	789,708 (100.0%)	807,137 (100.0%)	5.6%
남성	41,847 (6.8%)	50,169 (7.3%)	55,653 (7.5%)	58,267 (7.5%)	56,726 (7.2%)	56,133 (7.0%)	6.1%
여성	572,550 (93.2%)	638,088 (92.7%)	688,313 (92.5%)	715,047 (92.5%)	732,982 (92.8%)	751,004 (93.0%)	5.6%
여성/남성 (배)	13.7	12.7	12.4	12.3	12.9	13.4	-

#### 다. 골다공증 치료제 및 건강기능식품 현황

- 국내 골다공증 치료제 시장은 2011년 1,200억 원에서 2013년 1,633억 원으로 성장하였으며, 골다공증 치료제는 폐경 후 여성 골다공증 치료제인 ‘에비스타(미국, 일라이 릴리)’의 국내 판권을 소유한 한국 다케다 제약이 매출액 1위를 유지하고 있음. 대웅 제약, 로슈, MSD 등은 에비스타의 주성분인 라록시펜과 비타민D 성분인 콜레칼시페롤을 결합한 골다공증 치료제를 판매중임. 국내 도입된 골다공증 치료제의 대부분은 비스포스포네이트 계열 치료제로 이는 정맥주사로 환자 순응도가 낮으며, 장기간 치료시 턱뼈괴사가 발생할 수 있다는 부작용이 있음
- 국내 식품의약품안전처에서 인정한 “뼈 건강” 기능성 원료 중 고시형 원료로는 대두이소플라본이 있으며 개별인정형 원료로는 인삼추출물(농촌진흥청), 유단백추출물(주영엔에스(주)), 가시오가피숙지황복합추출물((주)오스코텍), 흑효모배양액분말((주)글루칸)이 있음. 현재 뼈 건강을 위한 프로바이오틱스가 인체적용시험을 통하여 건강기능식품 원료로 개별인정을 받거나 제품으로 출시된 사례는 없음

#### 라. 골다공증 연구 현황

- 국내 골다공증 연구 및 이를 활용한 응용기술 관련 특허는 최근 20년 동안 한국 특허청에 약 3,000건 이상 등록 되었으며, 이 중 뼈 건강 관련 소재 특허 380건, 뼈 건강 유제품 제조 관련 특허 422건이 확인됨. 천연물에 의한 골형성 및 저해 관련 특허가 주를 이루고 있으며 락토바실러스 카제이에 의한 골대사 개선용 특허 1건 있으나 인체적용시험 결과가 부재함 (출처: 특허 정보넷 키프리스)
- 골다공증 완화 프로바이오틱스 관련해서 최근 5년간 가장 많은 특허를 보유하고 있는 국가는 일본으로 9건의 특허를 가지고 있으나(한국 2건) 모두 인체적용시험을 거치지 않아 효능이 완전히 입증되었다고 보기 어려움 (출처: 특허 정보넷 키프리스)
- 갱년기 여성 골다공증 동물 모델에 프로바이오틱스를 활용하여 증상을 완화하려는 연구가 시도되고 있음. LGG를 포함한 VSL#3 섭취 시 뼈 손상이 억제된다는 동물실험 결과가 있으나 이 또한 동물시험 수준에 그치고 있기 때문에 유효성 검증을 위해 갱년기 여성을 대상으로 한 임상시험이 수행되어야 함

#### 마. 골다공증 개선 프로바이오틱스 연구개발의 필요성

- 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 골다공증 환자는 증가하고 있으나 이를 치료할 수 있는 치료제의 경우 치료요법이 불편하고 부작용을 야기시켜 치료를 중도 포기하는 환



자가 늘고 있음. 따라서 평소 뼈 건강을 관리하는 목적과 골다공증 치료 중 보조요법의 목적으로 활용할 수 있는 건강기능 소재의 개발이 절실함

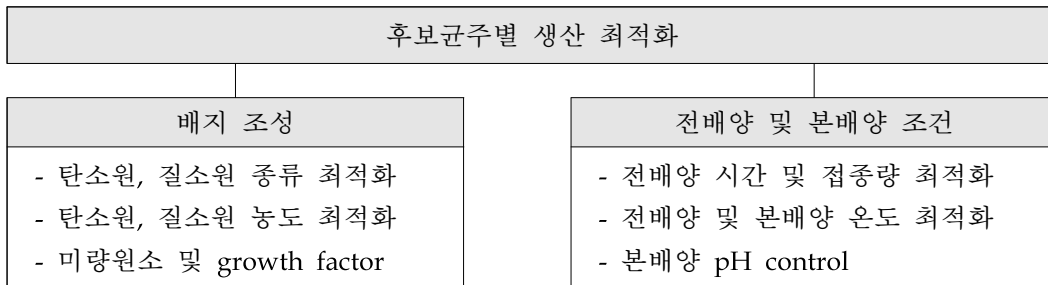
- 국내외적으로 골다공증 개선 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 대부분이 천연물 소재를 활용한 동물실험에 그치고 있음. 최근 프로바이오티스가 면역시스템을 조절하여 뼈 밀도를 증가시킨다는 연구 가설이 제시됨에 따라 뼈 건강 개선 프로바이오티스를 발굴하고 인체적용시험을 통해 유효성을 검증하여 국내 최초 뼈 건강 개선 프로바이오티스 소재를 개발하고자 함

### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 주관연구기관 (종근당바이오)

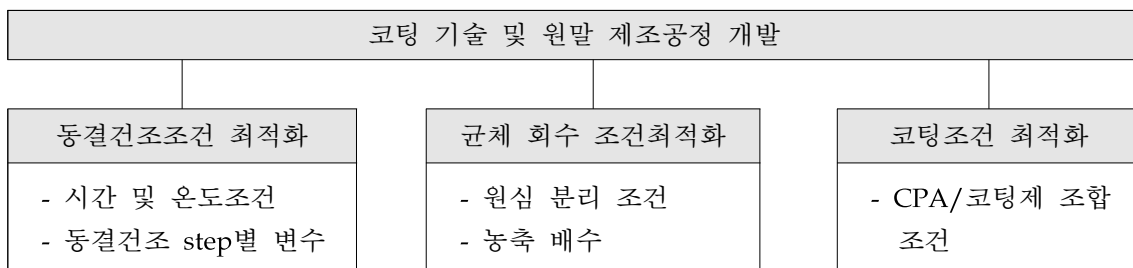
##### (1) 1차년도

- 다양한 농축산물로부터 분리한 자체 균주 450균종 제공
- 배지 조성(탄소원/질소원/미량원소 및 growth factor 종류 및 농도) 최적화 연구
- 전배양 및 본배양 (시간, 접종량, 온도, pH)조건 최적화
- 동물실험을 위한 샘플 제조



##### (2) 2차년도

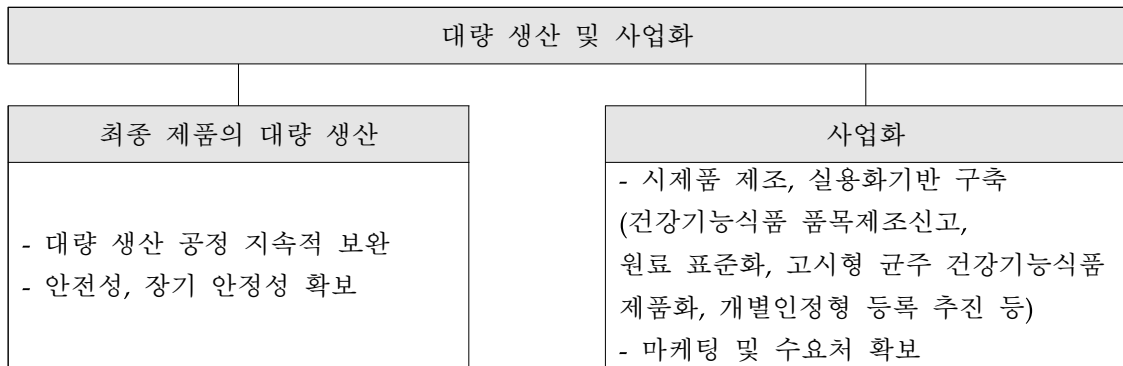
- 코팅기술 및 원말 제조공정 개발
- 배양 및 원말 제조공정 scale-up
- 인체적용시험을 위한 원료 표준화 및 샘플 제조



##### (3) 3차년도

- 안정성 테스트 및 유통기한 설정

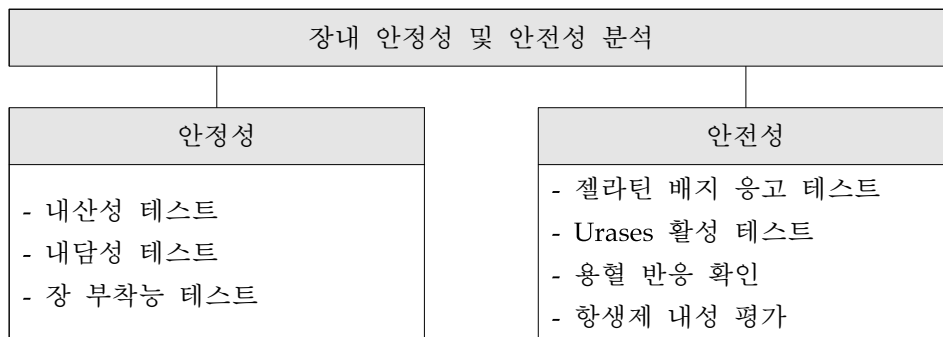
- 대량생산 설비를 활용한 시제품 제조
- 사업화



### 나. 제1협동연구기관 (고려대학교)

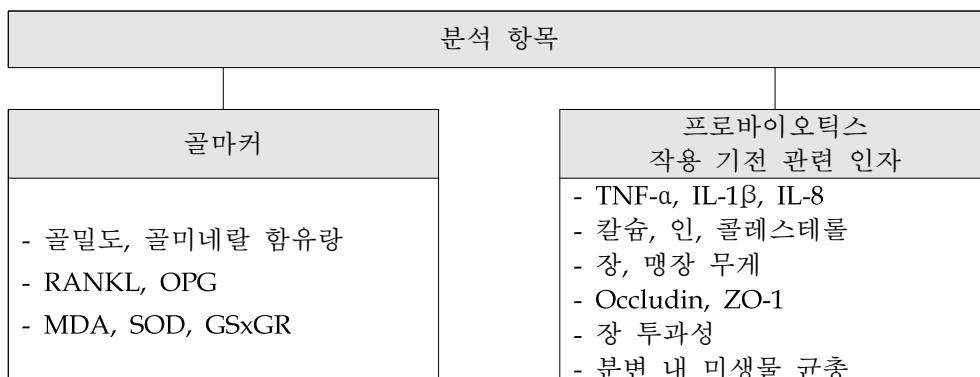
#### (1) 1차년도

- (주)중근당바이오 균주 및 자체 보유 균주 스크리닝
- 균주의 장내 안정성 및 안전성 분석
- 골대사 마커, 소장 염증인자 및 칼슘 관련 인자 조절 균주 선발
- 적절한 실험 동물모델 구축을 위한 사전조사



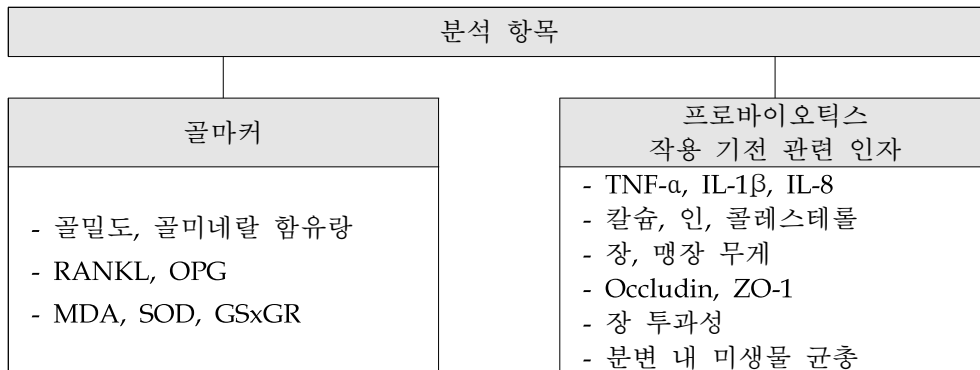
#### (2) 2차년도

- 폐경 후 골다공증을 유도한 동물모델에서 프로바이오틱스 효능 평가 및 메카니즘 분석



(3) 3차년도

- 이차성 골다공증 동물모델을 대상으로 한 프로바이오틱스의 효능 평가 및 메카니즘 분석



다. 제2협동연구기관 (분당서울대병원)

(1) 1차년도

- IRB승인을 획득하여 연구 윤리적 타당성 확립 및 연구 대상자 보호 장치 마련
- 건강한 일반인, 원발성 골다공증 환자, 이차성 골다공증 환자 대상 인체적용시험을 수행하여 프로바이오틱스 부작용(안전성) 평가 및 단기 투여 시 골대사 마커 변화 관찰 (「건강기능식품 기능성 평가 가이드 - 뼈, 관절 건강에 도움」 참조)

(2) 2차년도

- 안전성 확인 인체적용시험 지속 수행
- 유효성 검증 인체적용시험 IRB 획득

(3) 3차년도

- 유효성 검증 인체적용시험 지속 수행
- 추시 검사 및 데이터 수집
- 통계분석 및 결과보고서, 논문 작성

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 1-1. 주관연구기관 : (주)종근당바이오

#### 가. 동물실험 후보균주 안전성 평가

##### (1) 연구 방법

##### ① 용혈 활성 여부 평가

- *In vitro* 스크리닝을 통하여 선발된 10균주에 대한 프로바이오틱스의 용혈 활성 실험을 위해 5% defibrinated sheep blood가 첨가된 blood agar를 사용하였고 각 균을 도말하여 37°C에서 2일간 혐기 배양 후 관찰함. 양성 대조균은  $\beta$ -hemolysis 활성을 갖는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923을 사용함

##### ② 항생제 내성 여부 평가

- 프로바이오틱스의 항생제 내성 여부는 MIC Evaluator Strips (Oxoid)을 구매하여 확인함. 유산균주의 최소 저해 농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)를 확인하기 위한 배지로 LSM (LAB susceptibility medium)을 사용함. LSM 배지의 조성은 90% Isosensitest broth, 10% MRS broth, 1.5% agar로 구성되고, Bifidobacterium spp.는 혐기 배양 조건을 위해 0.05% L-cysteine hydrochloride를 추가로 첨가함. 균주는 0.05% L-cysteine hydrochloride MRS broth에서 overnight, 37°C 혐기 조건으로 미리 배양하고, 멸균된 면봉으로 LSM agar에 도말한 후 살균 포셉으로 항생제 strip을 각각 한 개씩 올려놓음. Lactobacillus spp.와 Bifidobacterium spp.가 도말된 plate는 각각 37°C 호기 또는 혐기 조건에서 24시간, 48시간 동안 배양한 뒤 MIC 수치를 측정함. 사용된 항생제의 종류는 Table 3에 명시함

Table 3. 항생제 종류

GEN	Gentamycin
KAN	Kanamycin
STR	Streptomycin
AMP	Ampicillin
CHL	Chloramphenicol
TET	Tetracycline
CLI	Clindamycin
ERY	Erythromycin

##### ③ 생체 아민 생성 여부 평가

- 생체 아민 (Biogenic amine, BA)은 부적절한 발효과정에서 미생물의 아미노산 탈카르복실화 (decarboxylase) 활성에 의해 주로 생성됨. 프로바이오틱스의 생체 아민 생성 여부 확인 배지 (Decarboxylase media)에 주요 생체 아민인 히스타민 (Histamine), 티

라민 (Tyramine), 푸트레신 (Putrescine), 카다베린 (Cadaverine)의 전구체인 histidine monohydrochloride, tyrosine free base, ornithine monohydrochloride, lysine monohydrochloride를 모두 섞어 첨가하는 방식으로 진행함. Overnight으로 배양된 실험 균주를 배지에 도말하여 37°C에서 4일간 혐기 배양한 후 plate의 색 변화를 관찰함. pH 5.3 decarboxylase media의 구성성분인 bromocresol purple이 indicator로서, 염기성인 아민 성분이 생성되면 배지가 보라색으로 변하기 때문에 색 변화를 관찰하여 생체 아민 생성 여부를 확인함

(2) 연구 결과

① 용혈 활성 여부 평가

- *In vitro* 스크리닝을 통하여 선발된 10균주에 대한 용혈 활성 여부 확인 결과, 모두 모두 음성으로 나타남

② 항생제 내성 여부 평가

- 항생제 내성 여부 확인 시험 결과, 10균주 모두 항생제 내성이 없는 것으로 나타남

Table 4. 항생제 내성 여부 평가 결과

(n.r) = not required

No.	Antimicrobial agents Strains	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )								
		AMP	VAN	GEN	ERY	CU	TET	STR	KAN	CHL
1	<i>L. plantarum</i> A41	0.75	n.r	0.5	0.75	1.5	12	n.r	16	8
2	<i>L. fermentum</i> SRK414	0.25	n.r	0.19	0.25	0.023	4	6	12	6
3	<i>L. brevis</i> K35	1.5	n.r	0.19	0.094	0.047	12	6	12	8
4	<i>L. acidophilus</i> CKDB 013	0.38	1	0.75	0.047	1	1.5	1.5	6	4
5	<i>L. acidophilus</i> CKBD 009	0.25	0.5	0.125	0.047	6	1.5	0.38	1	2
6	<i>L. gasseri</i> CKDB O20	0.25	0.5	0.125	0.047	6	1.5	0.38	1	2
7	<i>L. gasseri</i> CKDB 027	0.094	1	2	0.047	0.5	3	0.125	64	6
8	<i>L. reuteri</i> CKDB 030	0.19	1	2	0.016	1.5	3	16	96	6
9	<i>Le. mesenteroides</i> CKDB 008	n.r	n.r	0.5	0.125	0.064	n.r	12	48	6
10	<i>L. brevis</i> A42	0.30	n.r	1	0.125	0.064	12	7	12	3

③ 생체 아민 생성 여부 평가

- 선발된 10개 균주에 대한 생체 아민 생성 여부 확인 실험결과 *L. brevis* A42는 tyramine과 cadaverine을 생성하는 것으로 나타나 후보균주에서 제외함

Table 5. 생체 아민 생성 여부 평가 결과

No.	Strains	Biogenic amines			
		Tyramine	Cadaverine	Histamine	Putrescine
1	<i>L. fermentum</i> SRK414	-	-	-	-
2	<i>L. plantarum</i> A41	-	-	-	-
3	<i>L. brevis</i> K35	-	-	-	-
4	<i>L. acidophilus</i> CKBD 009	-	-	-	-
5	<i>L. acidophilus</i> CKDB 013	-	-	-	-
6	<i>L. gasseri</i> CKDB 027	-	-	-	-
7	<i>Le. mesenteroide</i> CKDB 008	-	-	-	-
8	<i>L. gasseri</i> CKDB O20	-	-	-	-
9	<i>L. reuteri</i> CKDB 030	-	-	-	-
제외	<i>L. brevis</i> A42	+	+	-	-

나. 최종 후보균주의 특성 파악

(1) 균주 동정 및 프로바이오틱스로서 기본적 특징

① 균주명 : *Lactobacillus fermentum* SRK414

\* 제1협동연구기관에서 *in vivo* 실험을 통해 인체적용시험을 위한 최종 후보주로 상기 균주를 선정하였음

② 균주기원 : 유아 분변

③ 포자생성 : 음성

④ Morphology : 그람 양성, 간균

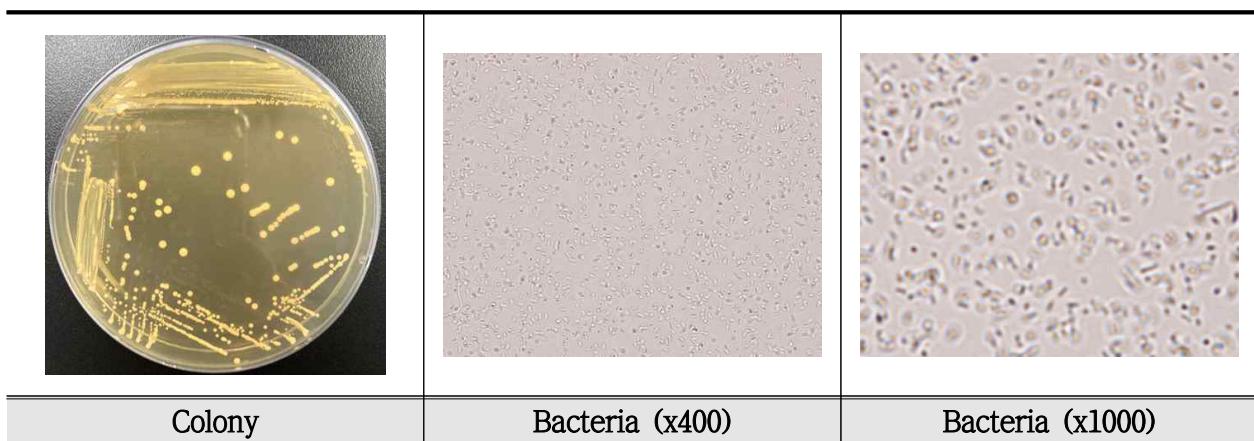


Figure 1. 후보균주 morphology


⑤ 당 이용성

Table 6. 후보균주 당 이용성

No.	Source	결과	No.	Source	결과
0	Control	-	25	Esculin ferric citrate	±
1	Glycerol	-	26	Salicin	-
2	Erythritol	-	27	D-Celiobiose	-
3	D-Arabinose	-	28	D-Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	D-Lactose	+
5	D-Ribose	+	30	D-Melibiose	+
6	D-Xylose	+	31	D-Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	D-Trehalose	-
8	D-Adonitol	-	33	Inulin	-
9	Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	34	D-Melezitose	-
10	D-Galactose	+	35	D-Raffinose	+
11	D-Glucose	+	36	Amidon (starch)	-
12	D-Fructose	+	37	Glycogen	-
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	Gentiobiose	-
15	L-Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	D-Mannitol	-	43	D-Fucose	-
19	D-Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	Methyl-α-D-Mannopyranoside	-	45	D-Arabitol	-
21	Methyl-α-D-Glucopyranoside	±	46	L-Arabitol	-
22	N-AcetylGlucosamine	-	47	Potassium Gluconate	+
23	Amygdalin	-	48	Potassium 2-KetoGluconate	-
24	Arbutin	-	49	Potassium 5-KetoGluconate	+

⑥ 16s rRNA sequencing data

Figure 2. 후보균주 16s rRNA sequencing data

<pre> CTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGT TGGCCCAATTGATTGATGGTGTCTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAA CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGG GGGACAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTCG CATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGAC CTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGCGATGA TGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACG GCCATACTCCTACGGGAGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAATGGGCG CAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGT AAAGCTCTGTGTTAAAGAAGAACCGTATGAGAGTAACTGTTTCATACG TTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGA GAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCG GAGAAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTATGTG GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAG TGGCGAAGGCGGCTACTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCA TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGAT GAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGC ATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCCGAA GCTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCTTGGCCCAACCCTAGA GATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGC GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCC GGTGACAACCCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAGATCATATGCCCC TTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAACGAGTCCG GAACTCGGAGGGCAAGCAATCTCTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACT GCAGGCTGCAACTCGCTGCACGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA TCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACACCATGAGAGTTTGAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACTTTTATG GAGCCAGCCGCTAAGTGGGACAGATGATTA                 </pre>	 <p><b>Microbial Identification Analysis Report</b></p> <p>Document No. 20200707-001      Receipt No. 10401</p> <table border="1"> <tr> <td>Institution</td> <td>홍근당바이오</td> <td>Order Date</td> <td>2020-05-18</td> </tr> <tr> <td>Customer Name</td> <td>김유힐</td> <td>Sample Name</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>Customer No.</td> <td>9573</td> <td>Method</td> <td>16S rRNA gene Sequencing</td> </tr> </table> <p><b>Result</b></p> <p>의뢰하신 시료를 분석한 결과 아래에 표기된 1번과 가장 유사성이 높은 것으로 분석되었습니다. 자세한 내용은 첨부된 자료를 참고하시기 바랍니다.</p> <p>- 아 래 -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Lactobacillus fermentum</i> strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA, partial sequence (Gene Bank Data Homology search result; 99%)</li> <li>2. <i>Lactobacillus fermentum</i> (99%)</li> <li>3. <i>Lactobacillus gottii</i> (98%)</li> <li>4. <i>Lactobacillus gastricus</i> (96%)</li> <li>5. <i>Lactobacillus ingluviei</i> (96%)</li> </ol> <p>Operator: Oh, Jun-uk Department: Sequencing team Contract us: sequencing@solgent.com</p> <p>SolGent Co., Ltd. 11-13 Yuseon-ro, Yuseong-gu, Daejeon 30511 Korea   Tel: 82-42-608-5685, Fax: 82-42-608-5689   www.solgent.com</p> <p>F-QP-15-15(1)</p>	Institution	홍근당바이오	Order Date	2020-05-18	Customer Name	김유힐	Sample Name	A	Customer No.	9573	Method	16S rRNA gene Sequencing
Institution	홍근당바이오	Order Date	2020-05-18										
Customer Name	김유힐	Sample Name	A										
Customer No.	9573	Method	16S rRNA gene Sequencing										
<b>Sequencing raw data</b>	<b>Microbial identification analysis report</b>												

⑦ Whole genome sequencing data

- Sequencing 방법

Table 7. WGS 방법

시퀀싱 플랫폼	PacBio sequencing
<i>de novo</i> genome assembly	Canu v1.7
Gene Prediction	Prokka v1.13
Gene Annotation	HMMER, BLAST



- Sequencing 결과
  - 전장 유전체 de novo assembly 결과

Table 8. 전장 유전체 de novo assembly 결과

No. of bases	Assembled contigs	Total length of assembled contigs	N50
1133294306	1	2090572	2090572

- General genome information

Table 9. genome information

Feature		<i>Lactobacillus fermentum</i> SRK414
Total genome size (bp)		2,090,572
No. of plasmid		0
GC contents (%)		50.74
No. of	Coding sequence (CDS)	2103
	rRNA	15
	tRNA	59
	tmRNA	1
	Repeat region	1
	Total genes	2206

- 종 동정 blast 결과 : *Lactobacillus fermentum* strain

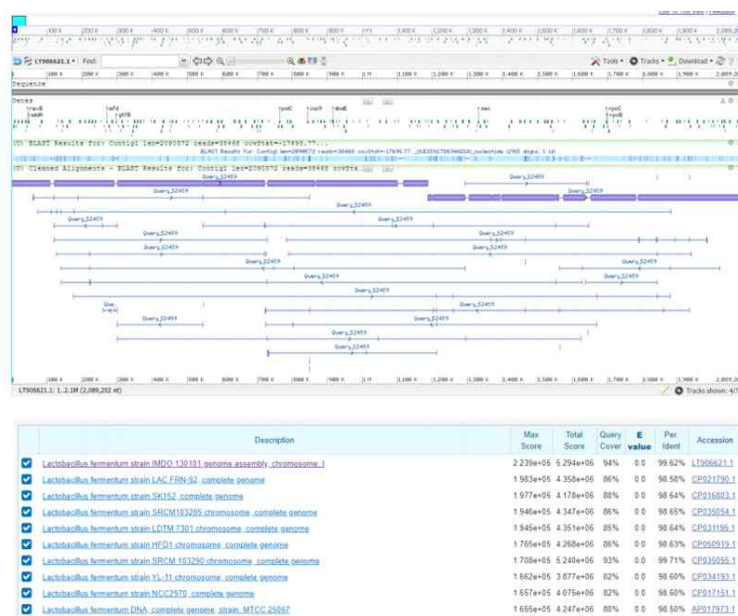


Figure 3. 종 동정 blast 결과

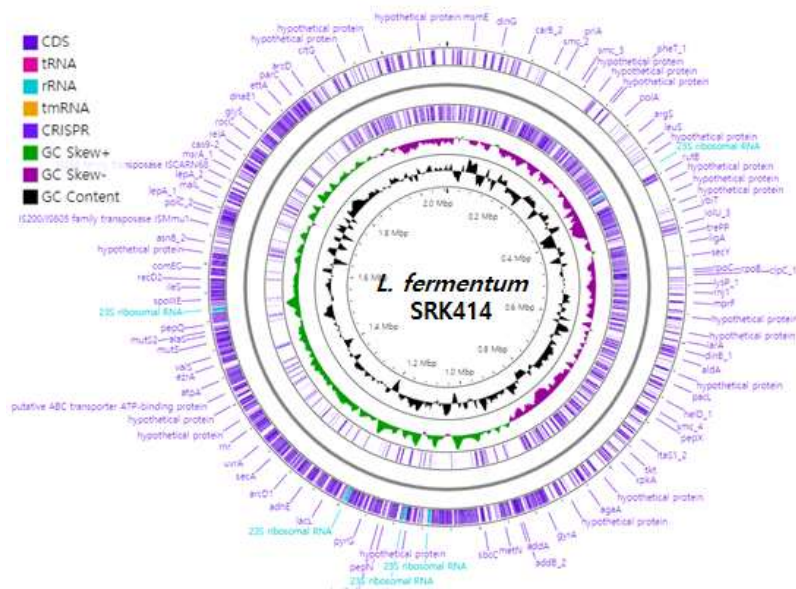


Figure 4. Circular genome map of *L. fermentum* SRK414

Reference	Lactobacillus fermentum SRK (6666666.633745)
Comparison Organism 1	Lactobacillus fermentum IFO 3956 (334390.3) <a href="#">BlastDotPlot</a>
	Percent protein sequence identity
Bidirectional best hit	100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10
Unidirectional best hit	100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10

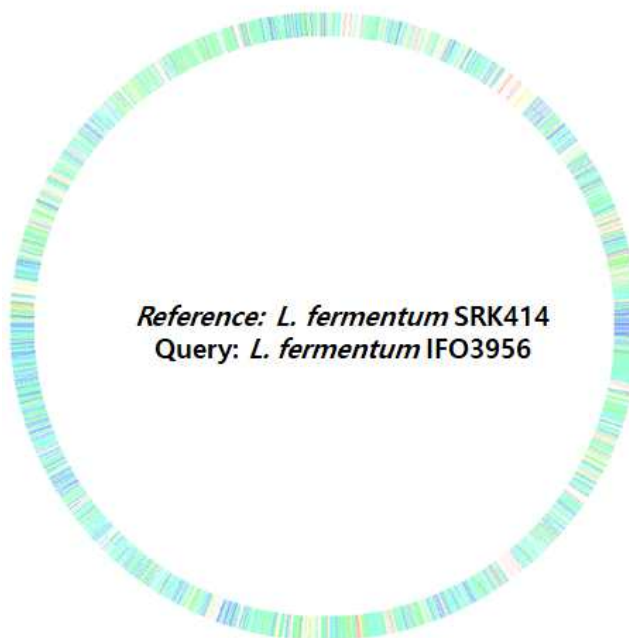


Figure 5. 단백질 서열 상동성 비교

(2) 균주 배양성 평가

① 배양 조건

- MRS broth 배지
- $37 \pm 3^\circ\text{C}$ , 0~24시간 정치배양

② 배양 결과

- 2L-bottle을 사용한 정치 배양 시 배양 10시간에 배양성(생균수, CFU)이 가장 높으며, 배양 12시간에 도달하였을 때 glucose가 고갈됨
- CFU :  $4 \times 10^9$  CFU/ml, OD : 0.343, pH : 4.197

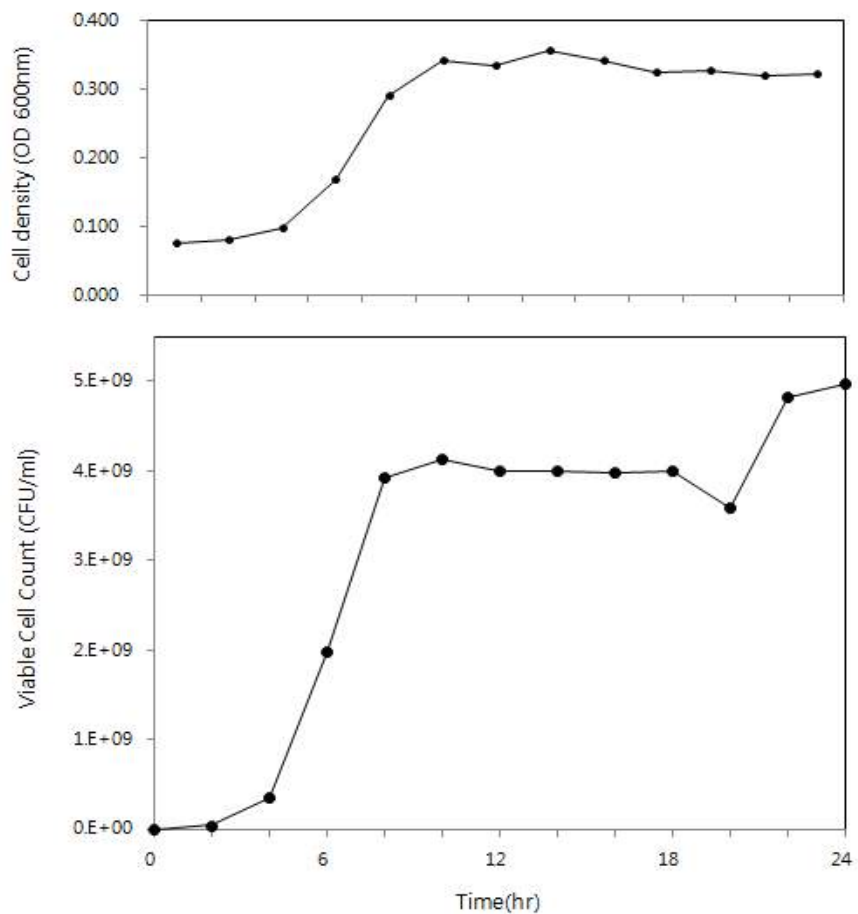


Figure 6. *L. fermentum* SRK414 배양성 그래프 (bottle scale)

나. 동물실험용 시료 제조

(1) 연구 방법

① 배양 최적화

- 배양 용기 : 5L mini-jar fermentor (working volume : 4L)
- 배양 온도 :  $37^\circ\text{C}$
- 배양 pH : 초기 pH 6.0. 배양 중 pH 5.0 이하 하락 시 5.0으로 control (암모니아수)

- 배지 조성
  - 탄소원(glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose 등) 및 질소원(yeast extract, peptone 등) 의 조합 조건 및 C/N ratio 최적화 연구 수행
    - glucose, yeast extract, soy peptone을 주요 에너지원으로 선정함
  - 미량원소 최적화 : Mg 이온 및 Mn 이온 사용 농도 결정함
  - 기타 유기산 및 소포제 조건 최적화 진행함
- *L. fermentum* SRK414 균주에 대한 배양조건 및 배지조건 최적화 진행

② 농축 및 동결건조 조건 확립

- 농축 배수 : 균체를 회수하기 위한 농축 실험 결과 20배 농축 시 안정성 높음
- 코팅 조건 : 농축액에 보호제 또는 코팅제 첨가 조건 최적화 진행함
- 동결 건조
  - 동결 : -45°C 까지 급속 냉동
  - 1차 건조 : -45에서 37°C 까지 점진적 상승을 통해 액화를 방지하고 승화 조건 유지
  - 2차 건조 : 37°C 에서 overnight (12hr) 건조를 통해 수분 활성도 최소화

(2) 연구 결과

① 배양 최적화

- Mini-jar level(4L)에서 *L. fermentum* SRK414 균주를 배양 시, 배양 10시간 경과 시점 까지 배양성은 지속적으로 상승하였으며, 그때 생균수는  $1.1 \times 10^{10}$  CFU/ml로 확인됨

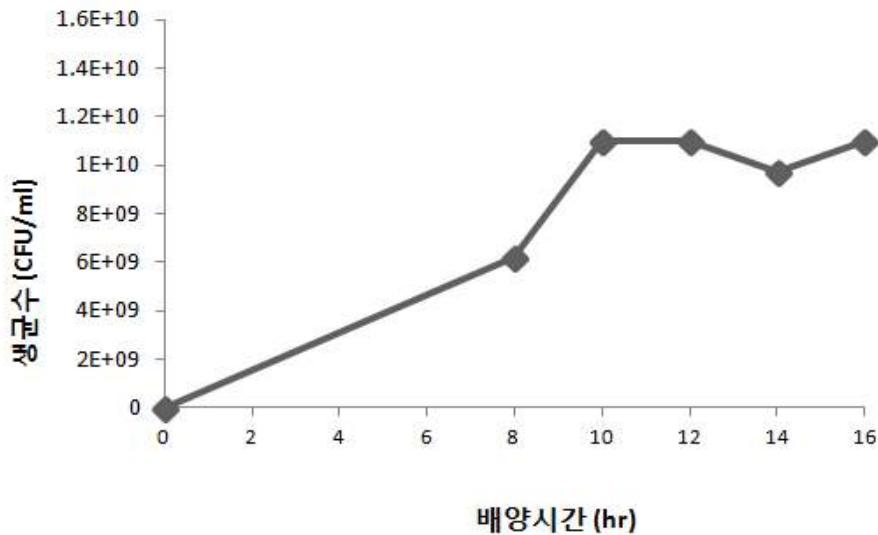


Figure 7. 동물실험용 시료 배양성 그래프 (Mini-jar scale)

② 농축 및 동결건조 조건 확립

- 동결건조를 통하여 제조한 동물실험 시료용 원말의 초기 생균수는  $1.4 \times 10^{12}$  CFU/g 로 확인됨. 동결건조생존율은 약 90%로서 우수한 것으로 확인됨

Table 10. 동물실험 시료용 원말 농축 및 동결건조 조건 확립 결과

배양성 (CFU/ml)	농축배수	코팅조건	초기원말 (CFU/g)	동결건조생존율 (%)
1.1. x 10 <sup>10</sup>	20	비코팅	1.4 x 10 <sup>12</sup>	90

다. 인체적용시험 시험식품용 원말 제조

(1) 연구 방법

① 배양 최적화

- 배양 용기 : 2000L fermentor (working volume : 1400L)
- 배양 온도 : 37°C
- 배양 pH : pH 6.0으로 시작한 후 pH 5.0 이하 하락 시 5.0으로 control (NH<sub>3</sub> gas)
- 배지 조성
  - Lab scale에서 최적화한 결과 탄소원으로 glucose, 질소원으로 yeast extract와 soy peptone 조합 조건 사용함
  - 미량원소로 Mg 이온 및 Mn 이온 사용하였으며 소포제로 Tween80 사용함

② 농축 및 동결건조 조건 확립

- 농축 배수 : lab scale에서 20배 농축이 최적이었으나, 생산 scale-up에서는 batch type 이 아닌 연속식 원심분리기를 사용하여 30배까지 농축 시 우수한 결과 확인
- 코팅 조건 : lab scale 조건 적용
- 동결 건조
  - 동결 : -45°C 까지 급속 냉동
  - 1차 건조 : -45에서 37°C 까지 점진적 상승을 통해 액화를 방지하고 승화 조건 유지
  - 2차 건조 : 37°C 에서 overnight (12hr) 건조를 통해 수분 활성도 최소화

(1) 연구 방법

① 원말 배양 결과

- 본 배양 결과는 Table 11과 같으며 생산 설비 적용 시 배양 15시간 시점에 1.1 x 10<sup>10</sup> CFU/ml의 배양성을 보였음. 배양은 14시간까지 배양성이 빠르게 증가하였으며, 흡광도는 배양 종료시점까지 지속적으로 증가하는 것을 확인함

Table 11. 인체적용시험 시험식품용 원말 배양 결과

배양 조건		배양시간 (hr)	배양성 (CFU/ml)
식균량	rpm		
0.1%	60	15	1.1×10 <sup>10</sup>

① 농축 및 동결건조 결과

- 동결건조를 통해 제조한 인체적용시험 시험식품용 원말의 초기 균수를 측정한 결과는 Table 12와 같음. 인체적용시험 시험식품용 원말은 본 시험생산 시 150kg의 동결건조기를 이용하여 건조를 진행하였으며, 제품 회수결과 생산량은 5.7kg, 초기 생균수는  $1.4 \times 10^{12}$  CFU/g의 결과를 확인함

Table 12. 인체적용시험 시험식품용 원말 농축 및 동결건조 결과

배양	원 말	
배양성 (CFU/ml)	농축 배수	초기 생균수 (CFU/g)
$1.1 \times 10^{10}$	30	$2.0 \times 10^{12}$

라. 인체적용시험용 시험식품 제조

(1) 제조 방법

① 캡슐 제조

- 상기 언급된 공정을 통해 제조한 원말을 사용하여 경질캡슐 형태의 시험식품과 대조식품을 제조하였음. 캡슐 제조를 위해 캡슐의 크기, 부형제의 종류 및 비율 등을 선정하였음
- 부형제의 종류와 비율 결정을 위해 식품의약품안전평가원에서 발간한 의약품 첨가제 가이드라인 등을 참고하였음. 혼합 후 캡슐 충전 시 편의성 등을 고려하여 결정 셀룰로오스를 최종 선정하였음
- 결정 셀룰로오스 이외에도 충전 시 분말이 기계에 달라붙는 것을 방지하고 일정량이 균일하게 캡슐 내 충전될 수 있도록 스테아린산 마그네슘과 이산화규소를 함께 사용하였음
- 본 시험식품 제조 시 젤라틴 경질캡슐 0호 (충진 가능 내용물 무게: 500mg) 와 PET 병을 사용함



Figure 8. 시험식품 (병)



Figure 9. 시험식품 및 대조식품(캡슐)

(2) 제조 결과

① 캡슐 내 생균수 평가

- 최종 시험제품 생산 후 시험제품 내 생균수를 확인하였음
- 상기 시험제품의 경우 건강기능식품의 기준 및 규격에 명시된 기준 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/g 이상)을 충족하는 것으로 확인됨

② 공인기관 분석 의뢰를 통한 안전성 평가

- 제조된 대조식품과 시험식품의 안전성을 평가하기 위해 한국식품과학연구원에 의뢰하여 대장균군, 중금속 검사를 실시하였음
- 대장균군의 경우 음성으로 확인되어 건강기능식품의 기준 및 규격에 명시된 기준 (음성)을 충족하는 것으로 확인됨
- 중금속 (총비소, 총수은, 납, 카드뮴) 항목의 경우 기준 및 규격에서 제안하는 기준을 충족하는 것으로 확인됨

Table 13. 대조식품 및 시험식품의 안전성 평가

항목		대조식품	시험식품	기준 규격
대장균군		음성	음성	음성
중금속(mg/kg)	총비소	불검출	0.04	150 $\mu$ g/일 미만
	총수은	불검출	불검출	2.1 $\mu$ g/일 미만
	납	0.01	0.01	10.8 $\mu$ g/일 미만
	카드뮴	불검출	0.10	3.0 $\mu$ g/일 미만

③ 공인기관 분석 의뢰를 통한 영양성분 평가

- 제조된 대조식품과 시험식품의 영양성분을 평가하기 위해 한국식품과학연구원에 의뢰하여 영양성분 검사를 실시하였음
- 분석 결과는 아래와 같음

Table 14. 대조식품 및 시험식품의 영양성분 평가

항목	대조식품	시험식품
열량 (kcal/100g)	397.5	360.0
탄수화물 (%)	92.0	41.0
조단백질 (%)	0.4	40.0
조지방 (%)	3.1	4.0
나트륨 (mg/100g)	16.53	525.59

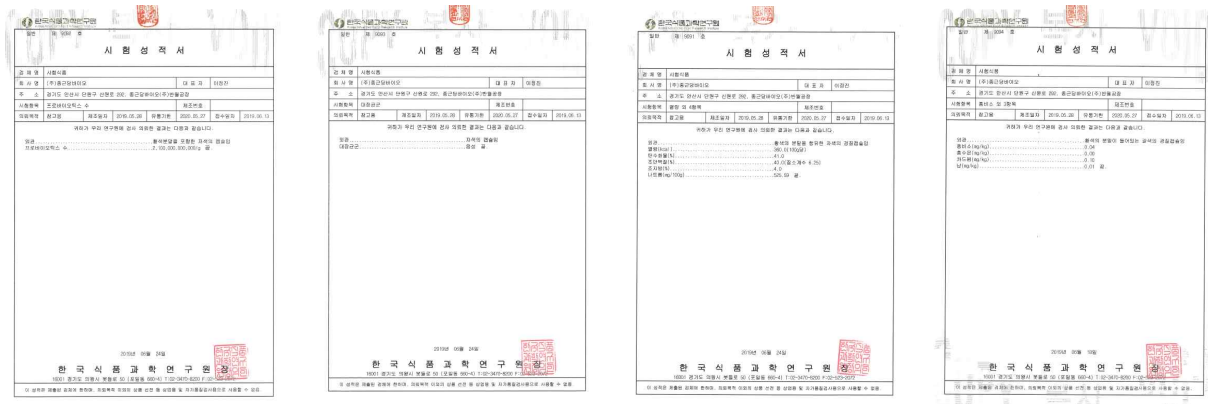


Figure 10. 시험식품 공인기관 시험성적서

마. 유통기한 설정을 위한 안정성 평가

(1) 연구 방법

① 가혹 조건 하 생균수 측정

- 대량 생산된 *L. fermentum* SRK414 원말을 40°C, 수분 75%의 조건에서 보관하며 생균수 및 생존율을 평가하였음

② 온도별 생균수 측정

- 대량 생산된 *L. fermentum* SRK414 원말을 5°C, 25°C의 조건에서 보관하며 생균수를 측정하였음

(2) 연구 결과

① 가혹 조건 하 안정성 결과

- *L. fermentum* SRK414은 가혹 조건 하 24주까지 생균수를 분석한 결과,  $1.0 \times 10^{11}$  CFU/g 이상을 유지하고 있어 높은 안정성이 확인되었음

Table 15. 가혹 조건 하 안정성 분석 결과

시간	생균수 (CFU/g)	생존율 (%)
초기	$2.0 \times 10^{12}$	100.0
1 개월	$1.9 \times 10^{12}$	93.5
2 개월	$1.4 \times 10^{12}$	69.0
3 개월	$5.9 \times 10^{11}$	29.5
4 개월	$5.7 \times 10^{11}$	28.5
8 개월	$1.7 \times 10^{11}$	8.5
12 개월	$8.3 \times 10^{10}$	4.1
24 개월	$3.1 \times 10^{10}$	1.5

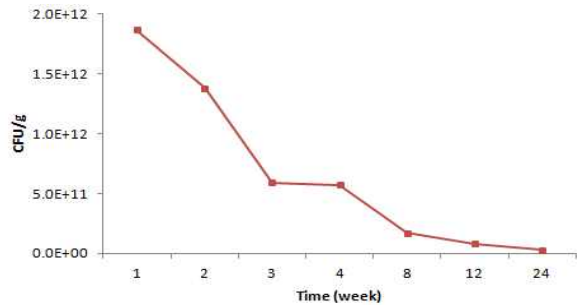


Figure 11. 가혹조건 하 안전성 분석 결과



② 온도 조건별 안정성 결과

- *L. fermentum* SRK414 원말은 18개월까지 모든 온도 조건에서  $1.0 \times 10^{11}$  CFU/g 이상을 유지하고 있어 높은 안정성이 확인되었음

Table 16. 온도 조건별 안정성 분석 결과

시간 (Times)	저장 안정성	
	가속 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , $60 \pm 5\%$ )	장기 ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ )
초기 (Initial)	$2.0 \times 10^{12}$	$2.0 \times 10^{12}$
1 개월	$1.2 \times 10^{12}$	$1.8 \times 10^{12}$
2 개월	$1.3 \times 10^{12}$	$1.7 \times 10^{12}$
3 개월	$1.3 \times 10^{12}$	$1.6 \times 10^{12}$
6 개월	$1.3 \times 10^{12}$	$1.6 \times 10^{12}$
9 개월	$1.5 \times 10^{12}$	$8.7 \times 10^{11}$
12 개월	$8.1 \times 10^{11}$	$9.2 \times 10^{11}$
15 개월	$3.5 \times 10^{11}$	$9.0 \times 10^{11}$
18 개월	$2.4 \times 10^{11}$	$7.5 \times 10^{11}$

바. 제품화

(1) 생물자원 등록

① 특허절차를 위한 미생물 기탁 (한국생명공학연구원 생물자원센터)

- 미생물의 표시(균주명) : *Lactobacillus fermentum* SRK414


BIODIVERSITY TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT**

issued pursuant to Rule 7.1

TO: **Chang-Kim Chang Ho**  
Chang-Kim Chang Ho  
292, Sinsosong-Daero, Ansan-si, Gyeonggi-do  
Republic of Korea

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <b><i>Lactobacillus fermentum</i> SRK414</b>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: <b>KCTC 13687BP</b>
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>October 25, 2018</b> .	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY</b>	
Name: <b>Korean Collection for Type Cultures</b> Address: <b>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)</b> 181, Ipsim-gil, Jeongseup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  RIM, Sang-Gun, Director Date: <b>October 25, 2018</b>

Form DE/1-DE/1-CV Form 171 6/16/2009

Figure 12. *L. fermentum* SRK414 균주기탁증

(2) 품목제조신고

① 제품화를 위한 건강기능식품 품목제조신고 완료 (식품의약품안전처)

- 영업허가(번호) : 제 2016000600748 호
- 제품명 : 락토바실러스 퍼멘텀 에스알케이 414 (유형 : 프로바이오틱스)



Figure 13. *L. fermentum* SRK414 품목제조신고증

(3) 제품화 (진행 중)

① (인체적용시험 결과 도출 전) 반려동물용 유산균 제품화

- 제품 배합비 및 구성 설계를 완료함
- 제품의 타겟 및 컨셉 등 마케팅 전략 수립을 완료함 (제품소개서 일부 수록)
- 제품(원말) 생산을 완료함
- 완제품 제조처 및 유통사를 확정하여 10월 제품 출시 예정임

Table 17. 라비벳 장 & 관절 유산균 제품화 전략

제품명	• 라비벳 장 & 관절 유산균
제조사	• 유산균 ( <i>L. fermentum</i> SRK414) : (주)종근당바이오 • 완제품 : (주)뉴팜
유통사	• (주)이글벳
타겟	• 소형견종 견주 (마르티즈, 푸들 등 슬개골 탈구가 빈번한 견종 대상)
주요 기능성 원료	• 뼈 건강을 위한 특허 유산균 <i>L. fermentum</i> SRK414 & 비타민D • 관절 건강을 위한 글루코사민 & 콘드로이친 • 장 건강을 위한 변비 유산균 3종
주요 홍보수단	• 팻샵, 온라인몰



**NEW 신제품** 하루 한 포도! (400mg가량) 장 건강과 관절 건강까지

- 1 믿을 수 있는 전문 기업이 만듭니다. 프로바이오틱스 전문기업 종근당바이오 & 동물약품 전문기업 이클레브
- 2 관절 건강을 위한 글루코사민 & 콘드로이틴
- 3 뼈 건강을 위한 비타민 D & 특허유산균
- 4 장 건강을 위한 종근당바이오 배비 유산균 & 표본된 유산균
- 5 유산균의 증식을 돕는 프리바이오틱스 산소화성 알부민-스트리프린소 이소알트
- 6 체중 걱정 없는 영양제 트리트 슈루 X
- 7 100% Human Grade

**소형견의 95%, 반려견의 80% 이상이 경험하는 "관절 질환 Top3"**



모두 관절 연골에 손상을 주어 **보행장애** 와 **통증** 을 유발할 수 있습니다.

**장 & 관절 건강 지키미 LABIVET의 포인트**

**1. 믿을 수 있는 전문 기업**

양적/질적 우수성도 확인! **그린 마인드 제조공장**

종근당 바이오 × 이클레브  
최고급 동물약품 제조공장 × 동물약품 전문기업

이클레브는 한국에서 [제 10-2110479-2] 특허 받은 제조공입니다. 그리고, 건강기능식품 안전제품을 허가 받은 식품안전 국제 표준 "FSQ22200" 획득, 식용미생물안전관리시스템(GMP-HACCP) 인증을 인정받을 수 있는 제조사입니다. 또한, 영양성분 및 품질을 관리할 수 있는 방위동물용 유산균입니다.

**장 & 관절 건강 지키미 LABIVET의 포인트**

**3. 뼈 건강을 위한 비타민 D와 특허 유산균 함유**

반려동물은 노화가 진행되면서 장 내 비타민 D 수용체의 기능이 약해질 수 있습니다. 밀 박진 독에 불꽃이 이제 그만! **비타민의 흡수율을 높여주는 특허 유산균과 함께 즐겨주세요!**



[특허 제 10-2110479-2] 프로바이오틱스를 주요 성분으로 포함하는 미생성 발효유산균 배양 또는 제조용 조성물



Figure 14. 라비벳 장 & 관절 유산균 제품소개서

**1-2. 제1협동연구기관 : 고려대학교**

**가. 프로바이오틱스 균주 스크리닝 및 in vitro 효능 평가 (주관연구기관과 함께 진행)**

**(1) 연구 방법**

**① 기본적인 프로바이오틱스 특성 평가**

- 다양한 근원에서 분리한 483 균주(고려대학교 보유 균주 192종, 종근당바이오 보유 균주 291종)에 대한 내산성, 내담즙성, 항산화능, 안전성 평가(용혈 활성, 항생제 내성, 생체 아민 생성)를 실시함

**② 장 부착능 평가**

- 장 부착능 실험은 프로바이오틱스가 체내에서 지속적으로 작용하기 위해 장 세포에 부착할 수 있는 능력을 평가하는 실험으로 장세포(HT-29)에 균을 처리하여 일정시간

배양 후 장 세포에 부착하는 유산균수를 측정하여 확인함

③ 장세포에서 tight junction protein 유전자 발현 및 항염증 효능 평가

- 장벽을 보호하는 기능을 가지는 유산균을 선별하기 위해 장세포(HT-29) integrity의 증가를 간접적으로 평가할 수 있는 tight junction protein의 유전자 발현을 RT-PCR로 측정함. 또한 염증이 유도된 장 세포에서 염증성 사이토카인을 발현을 억제하는지 항염증 효능을 평가함. 분석한 유전자의 primer 염기서열은 Table 18에 나타내었으며 house keeping gene으로 GAPDH를 선택하여 유전자 발현을 비교분석하였음

④ 골 대사 바이오마커 조절 효능 평가

- 조골세포(MC3T3-C1)에서 조골세포 분화 핵심인자인 RUNX2의 유전자 발현 및 조골세포 분화 표지 인자인 OCN(osteocalcin), BSP(bone sialoprotein)의 유전자 발현을 RT-PCR로 측정함. 분석한 유전자의 primer 염기서열은 Table 18에 나타내었으며 house keeping gene으로 GAPDH를 선택하여 유전자 발현을 비교분석하였음

Table 18. real-time PCR에 활용된 primer 염기서열

유전자명	구분	염기서열
<i>Occludin</i>	Forward	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC
	Reverse	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT
<i>ZO-1</i>	Forward	CAACATACAGTGACGCTTCAC
	Reverse	CACTATTGACGTTTCCCCACT
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	Forward	AGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGAC
	Reverse	TGAGTCGGTCACCCCTTCTCCAG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Forward	CCAGCTACGAATCTCGGACCACC
	Reverse	TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGT
<i>RUNX2</i>	Forward	ATCCAGCCACCTTCACTTACACC
	Reverse	GGGACCATTGGGAAGTGTATAGG
<i>OCN</i>	Forward	CAGTAAGGTGGTGAATAGACTCCG
	Reverse	GGTGCCATAGATGCGCTTG
<i>BSP</i>	Forward	AGAAAGAGCAGCACGGTTGAGT
	Reverse	GACCCTCGTAGCCTTCATAGCC
<i>GAPDH</i>	Forward	CTGACTTCAACAGCGACACC
	Reverse	TAGCCAAATTCGTTGTCATACC

(2) 연구 결과

① 기본적인 프로바이오틱스 특성 평가

- 내산성 80% 이상, 내담즙성 100% 이상, 항산화능 75% 이상 그리고 안전성 평가 결과 용혈활성, 항생제 내성, 생체아민 생성 반응을 보이지 않는 9종의 균주를 선발함

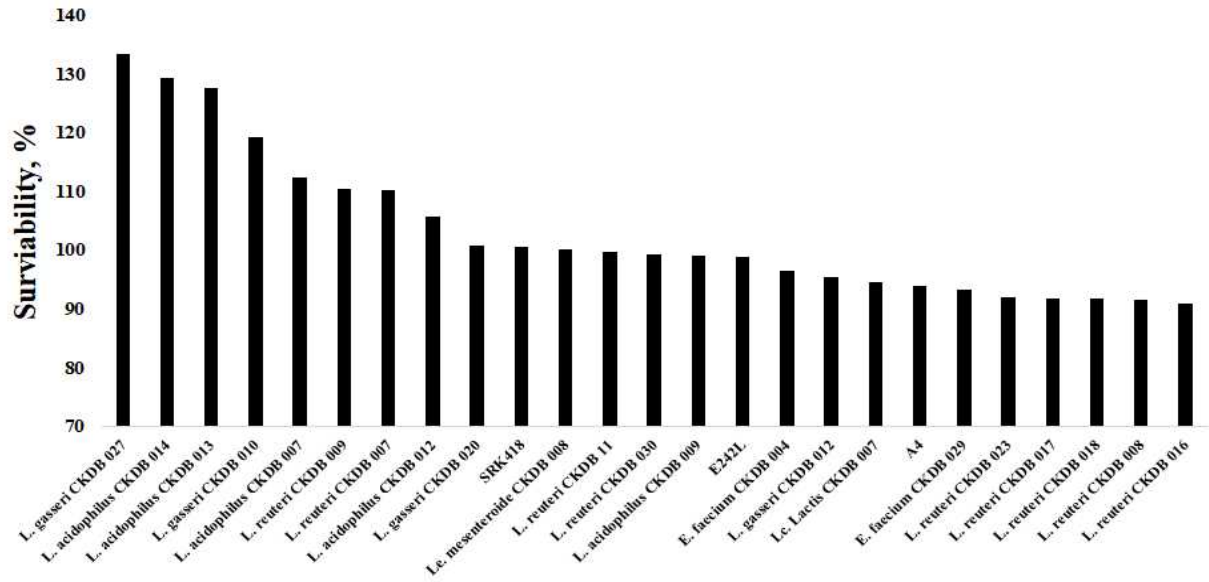


Figure 15. 내산성 평가 결과

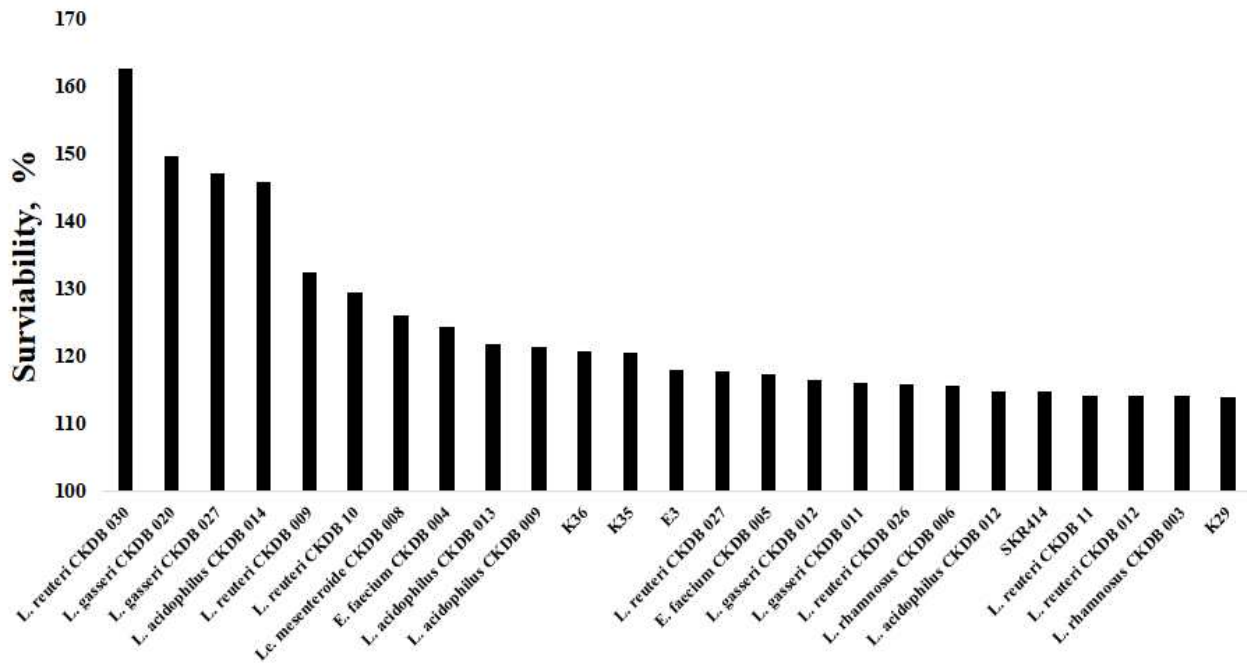


Figure 16. 내담즙성 평가 결과

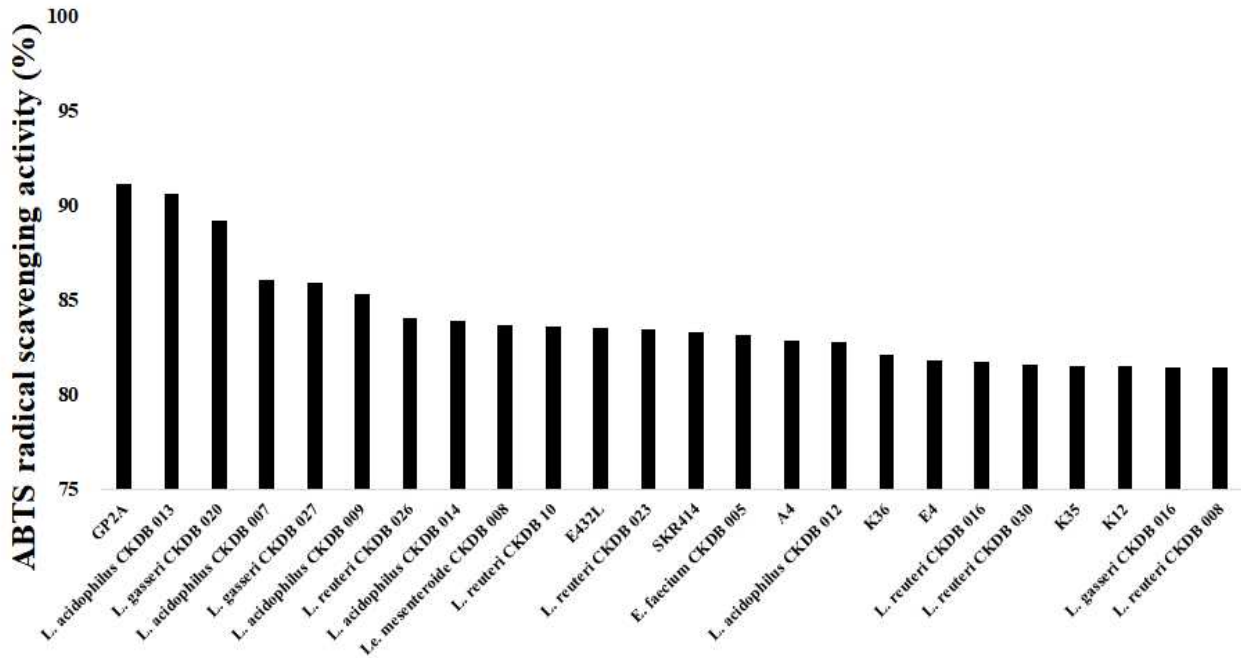


Figure 17. 항산화능 평가 결과

- 실험결과를 종합하여 Table 19와 같이 총 9균주를 선발하였으며 각 균주의 기원은 다음과 같음 (출처: Lee, Chul Sang, and Sae Hun Kim. “Anti-inflammatory and anti-osteoporotic potential of *Lactobacillus plantarum* A41 and *L. fermentum* SRK414 as probiotics.” Probiotics and Antimicrobial Proteins (2020):12, 623-634.)

Table 19. 선발 균주 9종 목록

Genus	Species	Strain number	Origin
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> A41	Infant feces
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> SRK414	Infant feces
<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	<i>L. brevis</i> K35	Korean food kimchi
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	<i>L. gasseri</i> CKDB 027	Infant feces
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	<i>L. gasseri</i> CKDB 020	Infant feces
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> CKDB 009	Adult feces
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> CKDB 013	Adult feces
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	<i>L. reuteri</i> CKDB 030	Infant feces
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>Le. mesenteroides</i> CKDB 008	Korean food kimchi

② 장 부착능 평가

- 선발된 9균주 모두 장 부착능이 우수했으며, 그 중 *L. plantarum* A41, *L. gasseri* CKDB020, *L. acidophilus* CKDB009, *L. brevis* K35, *L. fermentum* SRK414에서 특히 우수함을 확인하였음

Table 20. 장 부착능 평가 결과

Strain	Viability <sup>1</sup> in 2 h (log CFU/ml)	Adhesion activity (log %)
<i>L. fermentum</i> SRK414	7.79 ± 0.03 <sup>a</sup>	87.9 <sup>a</sup>
<i>L. plantarum</i> A41	8.43 ± 0.11 <sup>a</sup>	94.7 <sup>a</sup>
<i>L. brevis</i> K35	6.81 ± 0.11 <sup>b</sup>	71.3 <sup>c</sup>
<i>L. acidophilus</i> CKDB 009	6.36 ± 0.17 <sup>bc</sup>	85.9 <sup>ab</sup>
<i>L. acidophilus</i> CKDB 013	4.89 ± 0.3 <sup>d</sup>	66.7 <sup>c</sup>
<i>L. gasseri</i> CKDB 027	5.87 ± 0.21 <sup>c</sup>	85.1 <sup>ab</sup>
<i>Le. mesenteroide</i> CKDB 008	6.81 ± 0.21 <sup>b</sup>	87.8 <sup>a</sup>
<i>L. gasseri</i> CKDB 020	6.18 ± 0.42 <sup>bc</sup>	86.5 <sup>a</sup>
<i>L. reuteri</i> CKDB 030	4.66 ± 0.42 <sup>d</sup>	75.8 <sup>bc</sup>

③ 장세포에서 tight junction protein 유전자 발현 및 항염증 효능 평가

- tight junction protein 유전자 발현 결과  
: LPS로 인해 감소된 occludin의 유전자 발현이 *L. plantarum* A41 처리 시 월등히 높아졌으며, ZO-1의 유전자 발현은 *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414 처리 시 증가하는 것으로 나타남

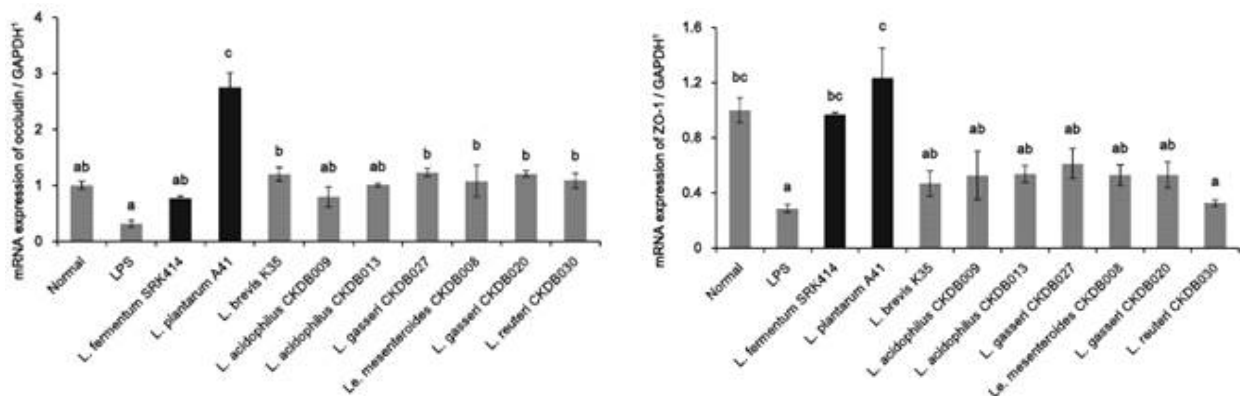


Figure 18. tight junction protein 유전자 발현 결과

- 항염증 효능 평가 결과  
: LPS로 인해 증가된 TNF  $\alpha$  유전자 발현은 선발된 9균주에 의해 대부분 감소하는 것

으로 확인됨. 그 중 *L. plantarum* A41 처리 시 가장 우수함을 확인함. IL-1 $\beta$  유전자 발현도 대부분 감소했으며 그 중 *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414, *L. gasseri* CKDB020 처리 시 특히 감소함을 확인함

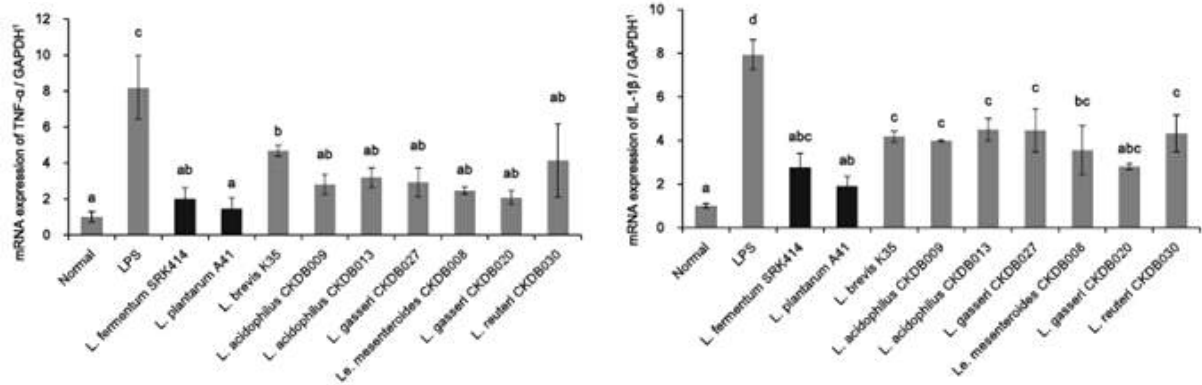


Figure 19. 항염증 효능 평가 결과

④ 골 대사 바이오마커 조절 효능 평가

- 조골세포 분화 촉발인자 유전자 발현 결과

: Dex(Dexamethasone)의 처리로 감소한 RUNX2의 유전자 발현을 증가시킨 균주는 *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414, *L. gasseri* CKDB020 인 것으로 나타남

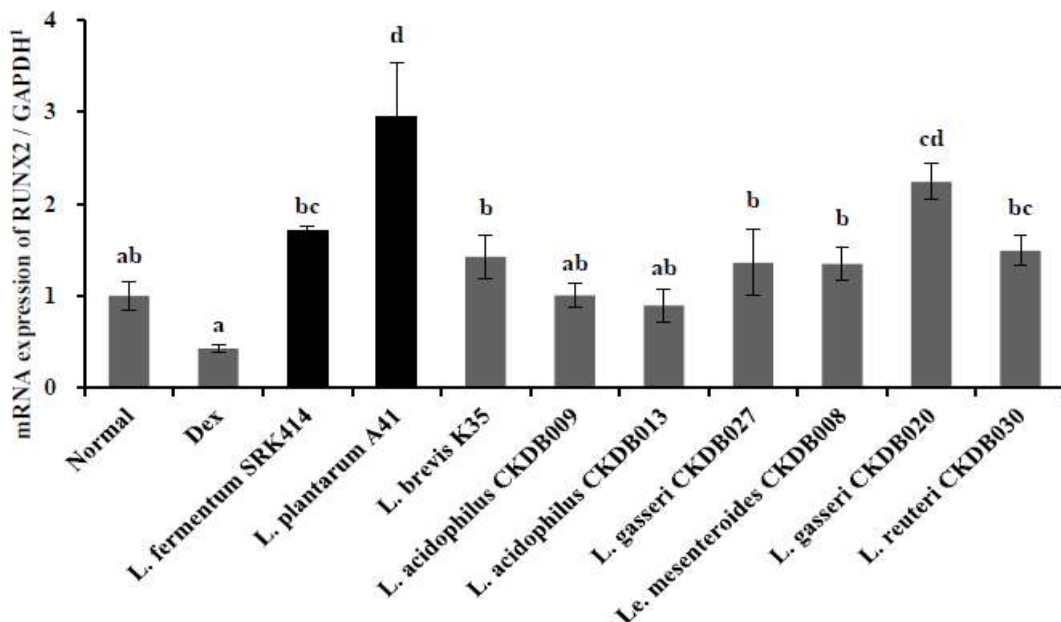


Figure 20. 조골세포 분화 촉발 인자 유전자 발현 결과



- 조골세포 분화 표지인자 발현 결과

: 조골세포 분화 표지인자인 OCN(osteocalcin), BSP(bone sialoprotein)의 유전자 발현을 증가시킨 균주는 *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414 인 것으로 나타남

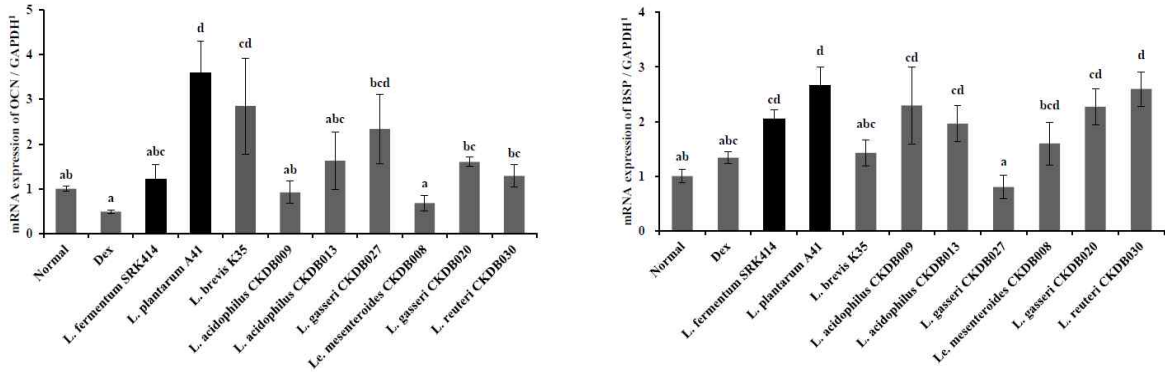


Figure 21. 조골세포 분화 표지인자 유전자 발현 결과

- 프로바이오틱스 기본 특성 및 안전성 평가(주관연구기관 수행)와 세포실험을 통한 균주 스크리닝 결과 *Lactobacillus fermentum* SRK414 , *Lactobacillus plantarum* A41 두 균주를 동물실험 후보 균주로 선발함

## 나. 이차성 골다공증 개선 효능 확인

### (1) 연구 방법

#### ① 이차성 골다공증 동물모델 설계

- 이차성 골다공증 모델은 Lucinda et al. 와 Sousa et al.에 의거하여 근육 내 주사법으로 글루코코르티코이드(glucocorticoid)의 일종인 덱사메타손(dexamethasone)을 투여하여 확립하였음. 체중 175~185g 내외의 8주령의 암컷 쥐(Wister rat)를 펠렛형 사료와 물을 충분히 공급하여 1주일 간 개별 케이지에 적응시킨 후 시험에 사용함. 쥐들은 임의로 다음과 같이 6 그룹으로 나눔. 그룹1= Normal + saline; 그룹2= Dex + saline; 그룹3= Dex + SMP; 그룹4= Dex+ *Lactobacillus plantarum* A41 ( $10^{10}$  CFU/day); 그룹5= Dex + *Lactobacillus fermentum* SRK414 ( $10^{10}$  CFU/day); 그룹6= Dex + alendronate (0.16mg/kg). 5주 동안 각 그룹에 해당하는 샘플을 경구 투여로 처리함. Dex는 7mg/kg의 농도로 주 1회 근육주사 방법으로 처리함. 이때 사육실의 온도는 일정하게  $22 \pm 2$  ° C 로 조절되고, 12시간 싸이클로 밤낮이 조절됨

Table 21. 원발성 골다공증 동물실험 실험군 내용

실험군 명	골다공증 유도물	투여물
Normal	-	saline
Dex	Dexamethasone	saline
SMP		skim milk product
A41		<i>Lactobacillus plantarum</i> A41 ( $10^{10}$ CFU/day)
SRK414		<i>Lactobacillus fermentum</i> SRK414 ( $10^{10}$ CFU/day)
Drug		alendronate (0.16mg/kg)

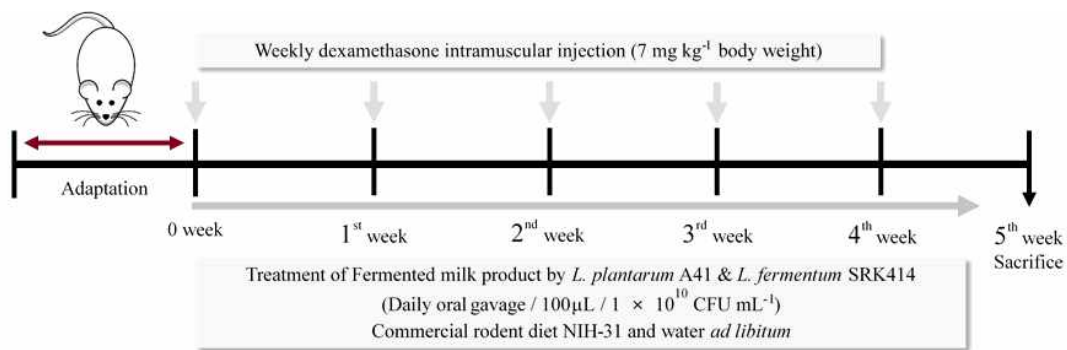


Figure 22. 이차성 골다공증 동물실험 일정 및 계획

② 골의 형태학적 분석

- 골밀도(bone mineral density)와 골 부피분율(percent bone volume, BV/TV)은 뼈의 강도를 측정할 때 가장 기본적으로 확인하는 지표임. 프로바이오틱스 균주의 골밀도 개선 효과를 측정하기 위하여 넓적다리뼈와 골피질을 수집하여 Micro Ct 영상 분석기(Sky Scan 1176)를 통해서 분석하였고, 이를 재구성하는 프로그램(NRecon), 그리고 이를 분석하는 프로그램(CTAn)을 이용하여 골밀도와 골 부피분율을 측정함

③ 장내 칼슘, 비타민D 수용체 유전자 발현 확인

- 프로바이오틱스 투여에 따른 장내 칼슘과 비타민D 수용 단백질의 유전자 발현량에 미치는 효과를 알아보기 위해서 qRT-PCR 분석을 진행함. 구체적으로, 실험 기간 종료 후 각 실험동물의 회장을 적출하여 균질화 (homogenized)과정을 거친 후 TRIzol(Invitrogne)을 사용하여 조직에 포함되어 있는 RNA를 추출함. 정제된 RNA는 역전사효소 oligo(dT) 프라이머와 함께 cDNA합성에 사용되었으며, PCR 조건은 95 °C에서 3분 이후, 94 °C에서 10초 60 °C에서 30초로, 총 44주기 반복함. qRT-PCT 분석을 위한 프라이머는 Table 22에 나타냄. 총전사의 정도는 β-actin 전사 레벨로부터 정규화(normalization)하여 그래프로 나타냄

Table 22. real-time PCR에 활용된 primer 염기서열

유전자명	구분	염기서열
<i>TRPV6</i>	Forward	GATGGCACGACCCTTTGG
	Reverse	CTTCGGGAGGTACTTCGAGACA
<i>Calbindin-D9K</i>	Forward	CGCTAAGAAATCTCCCGAAG
	Reverse	CTCCATCACCGTTCTTATCCA
<i>PMCA1</i>	Forward	ACTCTGGGGCCAGCTTATTT
	Reverse	GTTCGGCATGGTCAATCTCT
<i>VDR</i>	Forward	TGAAGGCTGCAAAGGTTTCT
	Reverse	AGCTTGGGCCTCAGACTGT
<i><math>\beta</math>-actin</i>	Forward	AGCCATGTACGTAGCCAT
	Reverse	AGGAAGGAAGGCTGGAAG

④ 혈중 칼슘 농도 조절 효과 확인

- 프로바이오틱스 투여가 혈중 칼슘 농도에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혈중 칼슘 농도를 확인함. 구체적으로, 동물실험 기간 종료 후 심장천자(heart puncture)법으로 혈액을 채취하였으며 원심분리(2500 g, 15분, 4°C)하여 수집한 혈청을 분석 전까지 -70 °C에 보관하였다. 혈청 내에 있는 칼슘(Ca) 농도는 Calcium activity assay kit (주엠비엘, Korea)를 사용하여 분석하였음

⑤ 골 대사 관련 지표 분석

- 프로바이오틱스 투여가 골 대사에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 조골세포 분화 촉발인자(BMP-1, RUNX2), 골 형성 마커(osteocalcin, bone sialoprotein), 골 흡수 마커(RANKL), 골 흡수 억제 마커(OPG)의 mRNA 발현양을 qRT-PCR을 통해 분석함. 구체적으로, 실험동물의 넙다리뼈와 골피질을 균질화 (homogenization)한 후 TRIzol reagent(Thermofisher, USA)를 이용해 총 RNA를 추출함. 정제된 총 RNA는 cDNA합성을 위해 사용함. PCR은 Biorad RT-PCR을 사용하였으며 95 °C에서 3분간 처리한 후, 94 °C에서 10초, 60 °C에서 30초를 총 44주기 반복하였다. qRT-PCT 분석을 위한 프라이머는 Table 23에 나타냄. 총 전사의 정도는  $\beta$ -actin 전사 레벨로부터 정규화(normalization)하여 그래프에 나타냄

Table 23. real-time PCR에 활용된 primer 염기서열

유전자명	구분	염기서열
<i>BMP-2</i>	Forward	ACATCCACTCCACAAACGAG
	Reverse	GTCATTCCACCCACATCAC
<i>RUNX2</i>	Forward	GACTGTGGTTACCGTCATGGC
	Reverse	ACTTGGTTTTTTCATAACAGCGGA
<i>OCN</i>	Forward	CAGTAAGGTGGTGAATAGACTCCG
	Reverse	GGTGCCATAGATGCGCTTG
<i>BSP</i>	Forward	AGAAAGAGCAGCACGGTTGAGT
	Reverse	GACCCTCGTAGCCTTCATAGCC
<i>RANKL</i>	Forward	CCCATCGGGTTCCCATAAAGTC
	Reverse	GCCTGAAGCAAAGTTGGCGTA
<i>OPG</i>	Forward	ACGGTTTGCAAAGATGTCC
	Reverse	GTGAGCTGCAGTTGGTGTGT
<i>β-actin</i>	Forward	AGCCATGTACGTAGCCAT
	Reverse	AGGAAGGAAGGCTGGAAG

⑥ H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색

- 10% formalin에 고정된 넓적다리뼈, 골피질은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 조직 절편을 제작하고 박절하고, H&E 염색 (hematoxylin & eosin stain)을 실시하였음

(2) 연구 결과

① 골의 형태학적 분석 결과

- 덱사메타손을 투여한 dex 그룹에서는 골밀도 및 골비율이 normal 그룹 대비 유의적으로 감소한 것으로 보아 이차성 골다공증이 유도됨을 확인할 수 있었음. 이차성 골다공증 약물(alendronate)을 덱사메타손과 함께 투여한 drug 그룹에서는 덱사메타손 투여로 인해 감소된 골밀도와 골비율이 회복된 것으로 나타남. *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414 그룹도 drug와 유사한 정도의 골밀도 및 골비율 회복 효과를 나타냄

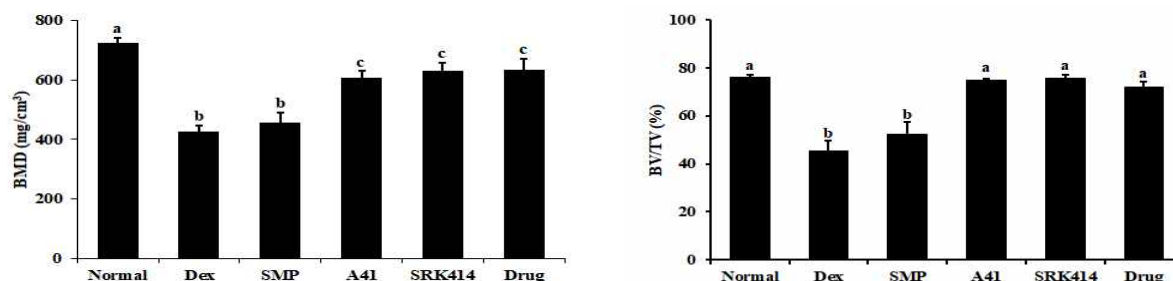


Figure 23. 골밀도 및 골비율 결과

② 장내 칼슘, 비타민D 수용체 유전자 발현 확인

- *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 투여 시 장내 칼슘 수용체 단백질(TRPV6, Cabindin-d9k, PMCA1)의 유전자 발현량이 높아졌으며, 비타민D 수용체 유전자 발현량도 높아진 것을 확인하였음

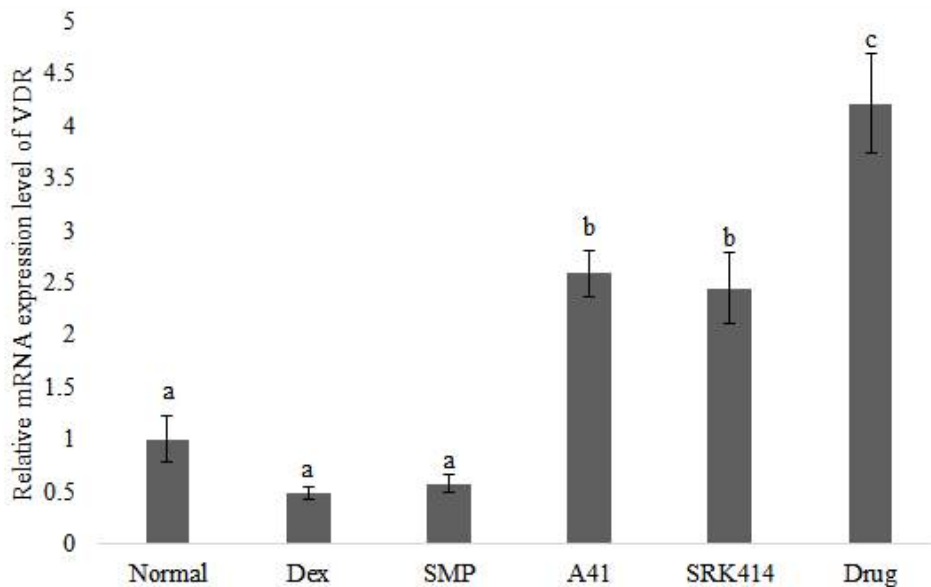
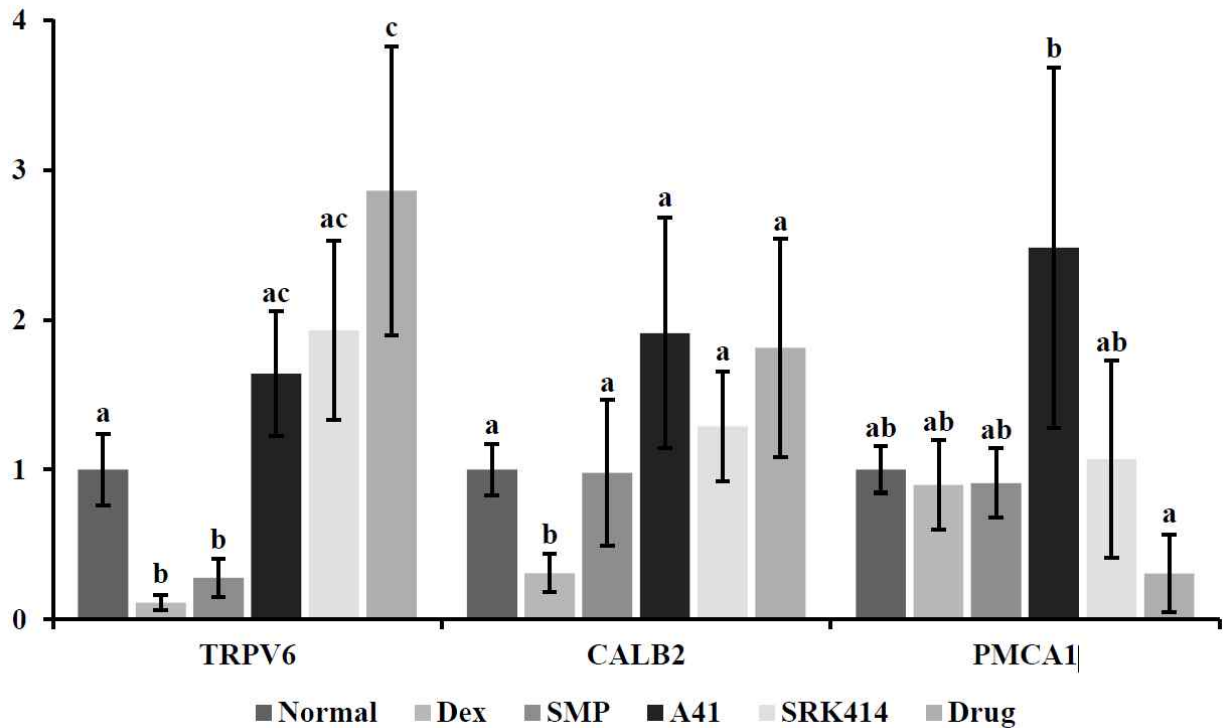


Figure 24. 장내 칼슘, 비타민D 수용체 유전자 발현 결과

③ 혈중 칼슘 농도 조절 효과 확인

- *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 투여 그룹에서 높은 혈중 칼슘 농도를 나타냄을 확인함. 따라서 *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414가 소장 내 칼슘 흡수를 촉진시킴으로써 높은 혈중 칼슘 농도를 유지하여 골소실을 효과적으로 예방할 수 있다고 사료됨

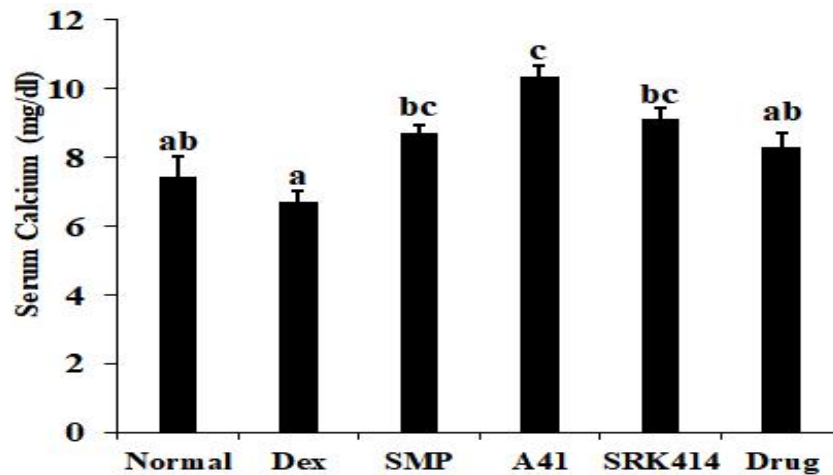
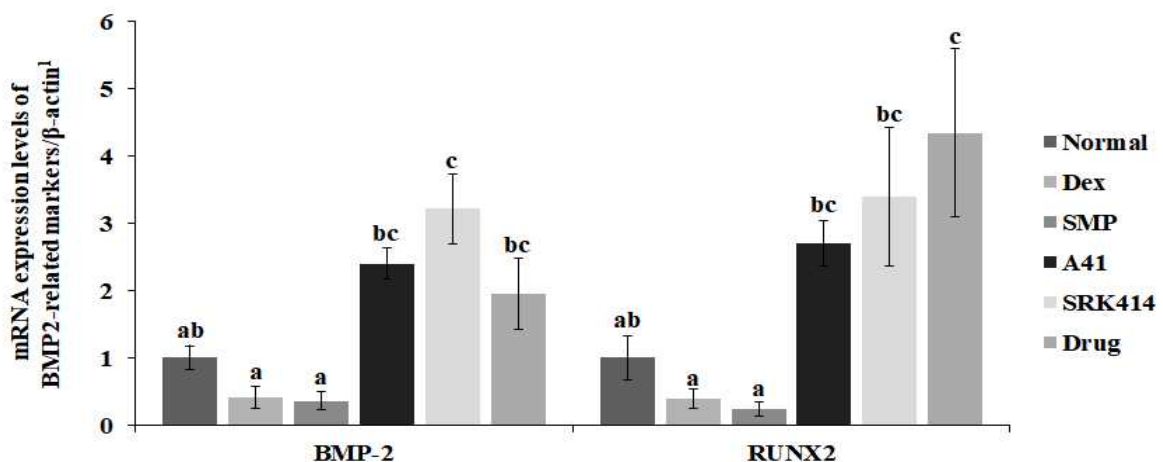


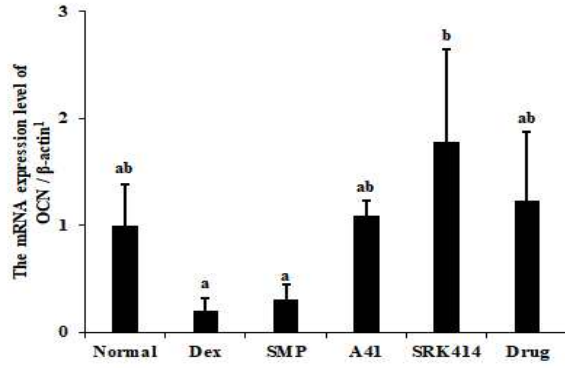
Figure 25. 혈중 칼슘 농도 결과

④ 골 대사 관련 지표 분석

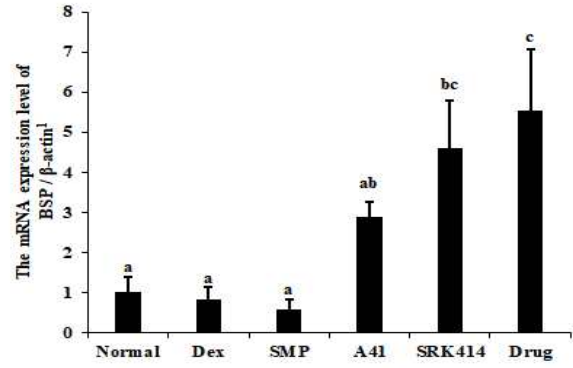
- *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 그룹에서 Dex 그룹에 비해 조골세포 촉발 인자(BMP-2, RUNX2)와 골 형성 마커(Osteocalcin(OCN), bone sialoprotein(BSP)의 mRNA 발현량이 유의하게 증가하였음. 또한, 골 흡수 마커(RANKL)는 감소하고 골 흡수 억제 마커(OPG)는 증가한 것으로 보아 두 균주는 조골세포의 분화는 촉진시키면서 파골세포의 분화는 억제시켜 골 형성에 도움이 된다고 판단됨. 그 중 특히 *L. fermentum* SRK414의 효능이 더 뛰어났음



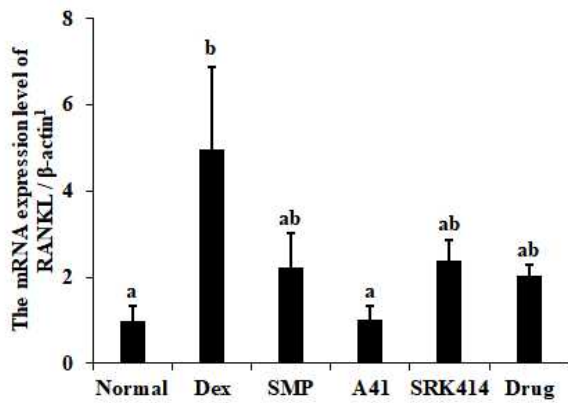
BMP-2, RUNX2



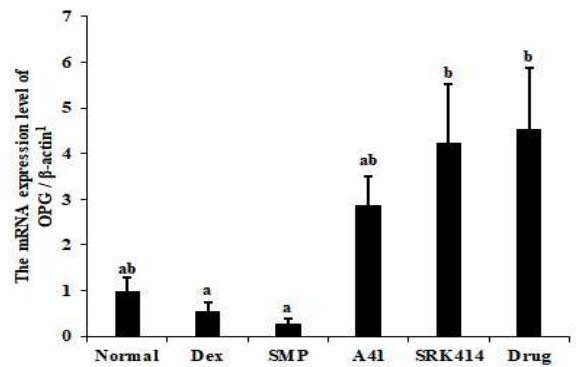
osteocalcin



bone sialoprotein



RANKL



OPG

Figure 26. 골 대사 지표 유전자 발현 분석 결과

⑤ H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색

- DEX와 SMP 그룹에서는 골 내부를 구성하고 있는 해면골 양이 감소하여 골 간 간격이 넓어져 골 소실이 발생하였으나, *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414를 투여한 그룹에서는 normal 그룹과 같이 정상화 되어 골 소실이 개선된 것을 확인함

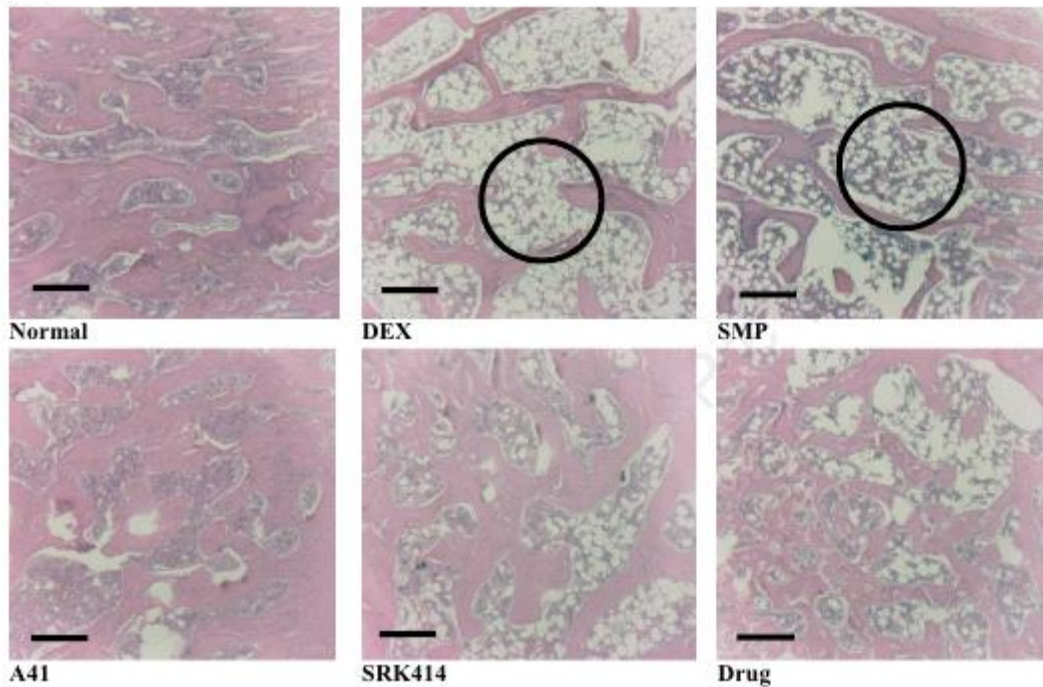


Figure 27. 대퇴골 H&E 염색 결과

- 골밀도, 골 대사 지표, 칼슘 및 비타민D 수용체 지표 등 골다공증 바이오마커에서 효능이 우수한 *L. fermentum SRK414* 를 인체적용시험 군주로 최종 선발하였음

#### 다. 원발성(폐경 유도) 골다공증 개선 효능 확인

##### (1) 연구 방법

##### ① 원발성(폐경 유도) 골다공증 동물모델 설계

- 4주령의 암컷 쥐(Spargue-Dawley rat)를 실험의 대상으로 함. 모든 쥐들은 개별적으로 케이지에 사육되고, 물과 식이가 실험기간 동안 공급됨. 적응기간 1주일 후, 임의로 쥐들을 다음과 같이 6 그룹으로 나눔. 그룹1= Sham + saline; 그룹2= OVX + saline; 그룹3= OVX + SMP(skim milk product); 그룹4= OVX+ *Lactobacillus plantarum* A41( $10^{10}$  CFU/day); 그룹5= OVX + *Lactobacillus fermentum* SRK414( $10^{10}$  CFU/day); 그룹6= OVX + alendronate (0.16mg/kg) 4주 동안 각 그룹에 해당하는 샘플을 경구 투여로 처리함
- 4주의 샘플 처리기간 후, 난소절제 수술을 진행함. 그룹 1은 정상 대조구로서 어떠한 수술도 시행하지 않음. 그룹1의 경우 SHAM 그룹으로 동일한 스트레스를 주기위해 난소 노출 후에 절제하지 않고 원상태로 넣음. 그룹2-6는 난소 절제 수술을 진행함. 수술 후에 모든 쥐들은 개별적으로 케이스에서 사육됨. 이때 사육실의 온도는 일정하게  $22 \pm 2$  °C 로 조절되고, 12시간 싸이클로 밤낮이 조절됨. 수술 당일에는 물 섭취만 가능하게 함. 수술 후, 회복기간 1주일동안은 기본식이와 물을 섭취하게 함. 회복기간 후, 8주 동안 각 샘플을 경구투여로 처리함



- 모든 쥐(rat)를 대상으로 희생이 진행 됨. 분변, 맹장, 뼈(넙다리뼈, 골피질), 혈청, 소장 등이 이후의 분석실험을 위해 수집됨

Table 24. 원발성 골다공증 동물실험 실험군 내용

실험군 명	골다공증 유도	투여물
Sham	-	saline
OVX	Ovariectomize (난소절제술)	saline
SMP		skim milk product
A41		<i>Lactobacillus plantarum</i> A41 ( $10^{10}$ CFU/day)
SRK414		<i>Lactobacillus fermentum</i> SRK414 ( $10^{10}$ CFU/day)
Drug		alendronate (0.16mg/kg)

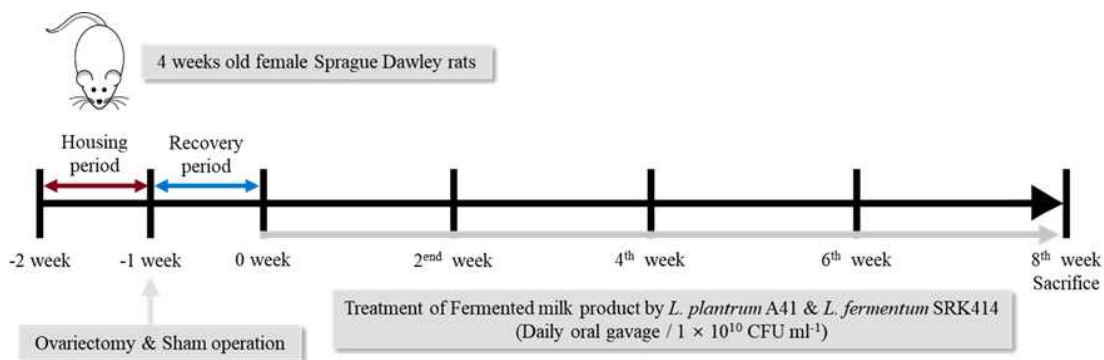


Figure 28. 원발성 골다공증 동물실험 일정 및 계획

## ② 골의 형태학적 분석

- 골 대사에 대한 프로바이오틱스의 효과는 넙적다리뼈, 골피질, 두 개의 다른 부위에서 평가됨. 이 부위의 뼈는 수집되어 micro-computed tomography를 통해서 분석되며 여기서 얻어낸 이미지는 골밀도(bone mineral density), 골 부피분율(bone volume fraction, BV/TV), 섬유주 공간(trabecular space), 섬유주 두께(trabecular thickness)의 분석을 위해 사용됨

## ③ 장내 칼슘, 비타민D 수용체 유전자 발현 확인

- 프로바이오틱스 투여에 따른 장내 칼슘과 비타민D 수용 단백질의 유전자 발현량에 미치는 효과를 알아보기 위해서 qRT-PCR 분석을 진행함. 구체적으로, 실험 기간 종료 후 각 실험동물의 회장을 적출하여 균질화 (homogenized)과정을 거친 후 TRIzol(Invitrogne)을 사용하여 조직에 포함되어 있는 RNA를 추출함. 정제된 RNA는 역전사효소 oligo(dT) 프라이머와 함께 cDNA합성에 사용되었으며, PCR 조건은 95 °C에서 3 이후, 94 °C에서 10초 60 °C에서 30초로, 총 44주기 반복함. qRT-PCT 분석을 위한 프라이머는 Table 25에 나타냄. 총 전사의 정도는  $\beta$ -actin 전사 레벨로부터 정규화(normalization)하여 그래프로 나타냄

Table 25. real-time PCR에 활용된 primer 염기서열

유전자명	구분	염기서열
<i>TRPV6</i>	Forward	GATGGCACGACCCTTTGG
	Reverse	CTTCGGGAGGTACTTCGAGACA
<i>PMCA1</i>	Forward	ACTCTGGGGCCAGCTTATTT
	Reverse	GTTCGGCATGGTCAATCTCT
<i>ICABP</i>	Forward	CTGGATAAGAACGATGATGGAGAA
	Reverse	GGTGGTGTCCGAGCTCCTT
<i>CALB2</i>	Forward	CGCTAAGAAATCTCCCGAAG
	Reverse	CTCCATCACCGTTCTTATCCA
<i>VDR</i>	Forward	TGAAGGCTGCAAAGGTTTCT
	Reverse	AGCTTGGGCCTCAGACTGT

④ 혈중 칼슘 농도 조절 효과 확인

- 프로바이오틱스 투여가 혈중 칼슘 농도에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혈중 칼슘 농도를 확인함. 구체적으로, 동물실험 기간 종료 후 심장천자(heart puncture)법으로 혈액을 채취하였으며 원심분리(2500 g, 15분, 4℃)하여 수집한 혈청을 분석 전까지 -70 ℃에 보관하였다. 혈청 내에 있는 칼슘 농도는 Calcium activity assay kit (주엠비엘, Korea)를 사용하여 분석하였음

⑤ 골 대사 관련 지표 분석

- 프로바이오틱스 투여가 골 대사에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 조골세포 분화 촉발 인자(BMP-1, RUNX2), 골 형성 마커(osteocalcin, bone sialoprotein), 골 흡수 마커(RANKL), 골 흡수 억제 마커(OPG), 파골세포 분화 촉진 마커(TRAP)의 mRNA 발현양을 qRT-PCR을 통해 분석함. 구체적으로, 실험동물의 넓다리뼈와 골피질을 균질화(homogenization)한 후 TRIzol reagent(Thermofisher, USA)를 이용해 총 RNA를 추출함. 정제된 총 RNA는 cDNA합성을 위해 사용함. PCR은 Biorad RT-PCR을 사용하였으며 95 ℃에서 3분간 처리한 후, 94 ℃에서 10초, 60 ℃에서 30초를 총 44주기 반복하였다. qRT-PCR 분석을 위한 프라이머는 Table 26에 나타냄. 총 전사의 정도는  $\beta$ -actin 전사 레벨로부터 정규화(normalization)하여 그래프에 나타냄

Table 26. real-time PCR에 활용된 primer 염기서열

유전자명	구분	염기서열
<i>BMP-2</i>	Forward	ACATCCACTCCACAAACGAG
	Reverse	GTCATTCCACCCCACATCAC
<i>RUNX2</i>	Forward	GACTGTGGTTACCGTCATGGC
	Reverse	ACTTGGTTTTTTCATAACAGCGGA
<i>OCN</i>	Forward	CAGTAAGGTGGTGAATAGACTCCG
	Reverse	GGTGCCATAGATGCGCTTG
<i>BSP</i>	Forward	AGAAAGAGCAGCACGGTTGAGT
	Reverse	GACCCTCGTAGCCTTCATAGCC
<i>RANKL</i>	Forward	CCCATCGGGTTCACATAAAGTC
	Reverse	GCCTGAAGCAAAGTTGGCGTA
<i>OPG</i>	Forward	ACGGTTTGCAAAAGATGTCC
	Reverse	GTGAGCTGCAGTTGGTGTGT
<i>TRAP</i>	Forward	GTGCATGACGCCAATGACAAG
	Reverse	TTTCCAGCCAGCACGTACCA

⑥ 혈액 생화학 분석

- 각 실험동물의 혈액을 심장천자법을 통해 채취하여 원심분리 (2500 g, 15분, 4℃)하여 혈장을 취하여 혈액 생화학적 지표를 분석함. 혈장에서의 CTX-1, OCN, 에스트로겐, PTH, TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ 의 단백질 발현량을 ELISA kit (Cusabio, USA)를 사용하여 확인함

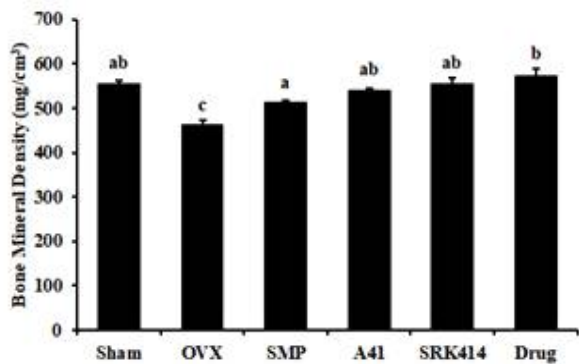
⑦ H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색

- 10% formalin에 고정된 넓적다리뼈, 골피질은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 조직 절편을 제작하고 박절하고, H&E 염색 (hematoxylin & eosin stain)을 실시하였음

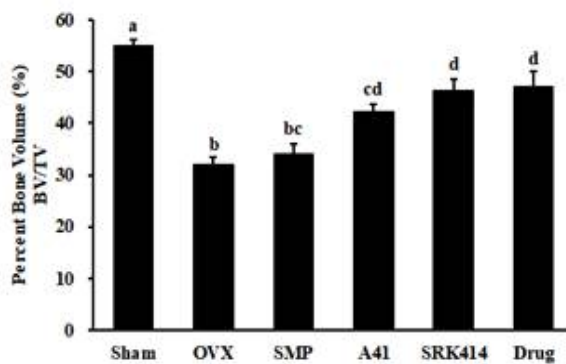
(2) 연구 결과

① 골의 형태학적 분석 결과

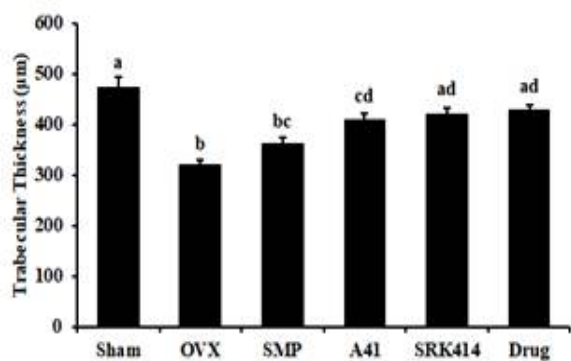
- OVX 그룹에서는 normal 그룹 대비 골밀도, 골 부피분율, 섬유주 두께가 유의적으로 감소하고, 섬유주 공간이 넓어진 것으로 보아 골다공증이 유도됨을 확인할 수 있었음. 골다공증 약물(alendronate)을 투여한 drug 그룹에서는 골밀도, 골 부피분율, 섬유주 두께가 증가하고 섬유주 공간이 줄어들어 회복 된 것으로 나타남. *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414 그룹도 drug와 유사한 정도의 골밀도 및 골비율 회복 효과를 나타냄. 그 중에서도 *L. fermentum* SRK414의 효과가 더 우수했음



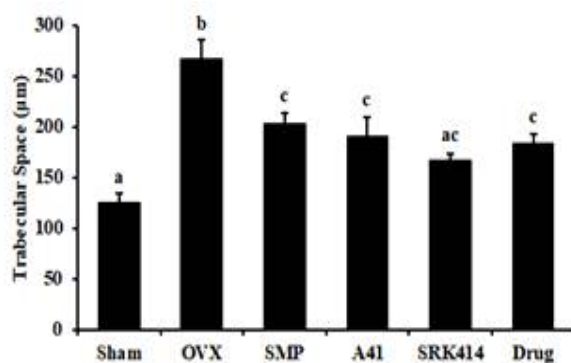
골밀도



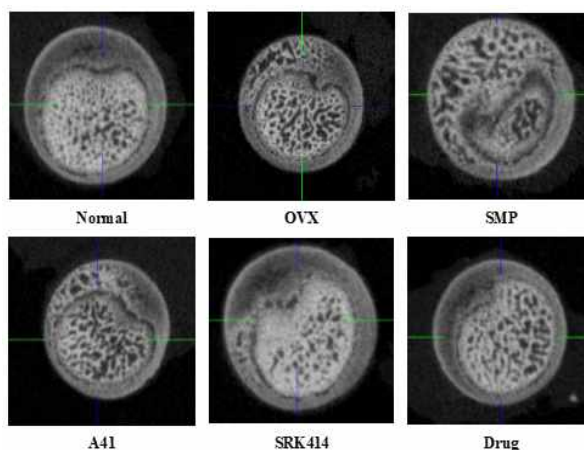
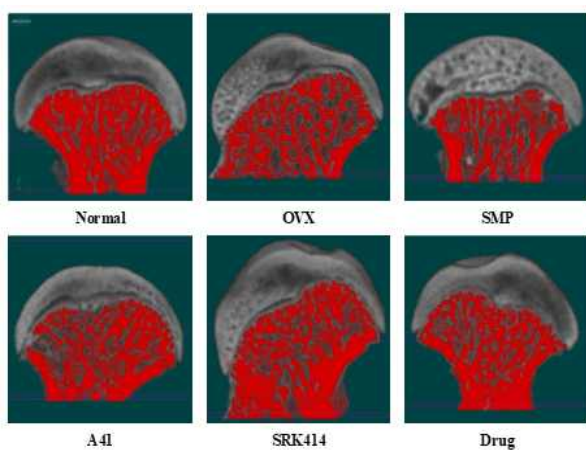
골 부피분율



섬유주 두께



섬유주 공간



골밀도 사진

Figure 29. 골의 형태학적 분석 결과

② 장내 칼슘, 비타민D 수용체 유전자 발현 확인

- 장내 칼슘 및 비타민D 흡수 지표 유전자 발현량 분석 결과 ICABP, CALB2, PMCA1에서는 유의적 차이가 없었으나, TRPV6와 비타민D 수용체인 VDR의 발현량은 골다공증 유발군 (OVX) 대비 *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414 투여 그룹에서 유의적으로 증가함을 확인함. 특히 *L. fermentum* SRK414 투여시 우수했음

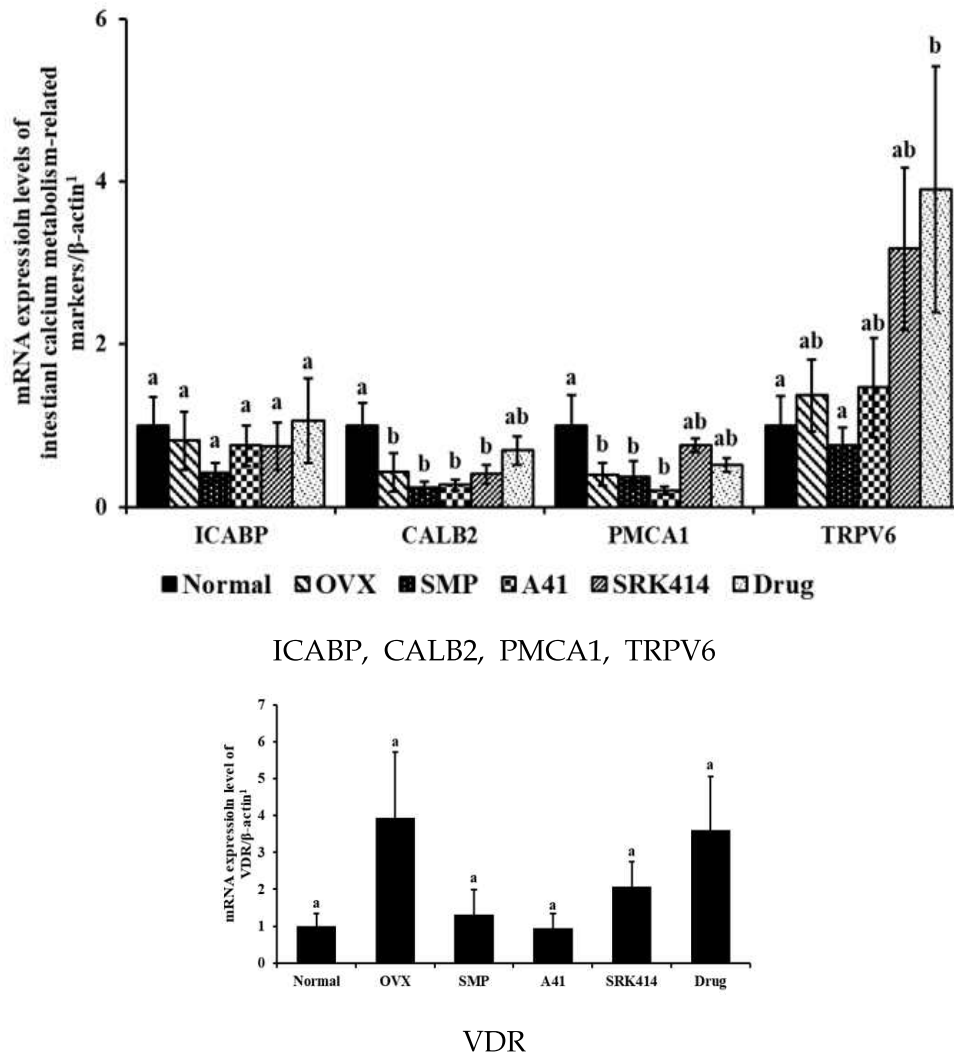


Figure 30. 장내 칼슘 및 비타민D 수용체 유전자 발현 비교

③ 혈중 칼슘 농도 조절 효과 확인

- L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 투여 그룹에서 높은 혈중 칼슘 농도를 나타냄을 확인함. 따라서 *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414가 소장 내 칼슘 흡수를 촉진시킴으로써 높은 혈중 칼슘 농도를 유지하여 골소실을 효과적으로 예방할 수 있다고 기대할 수 있음

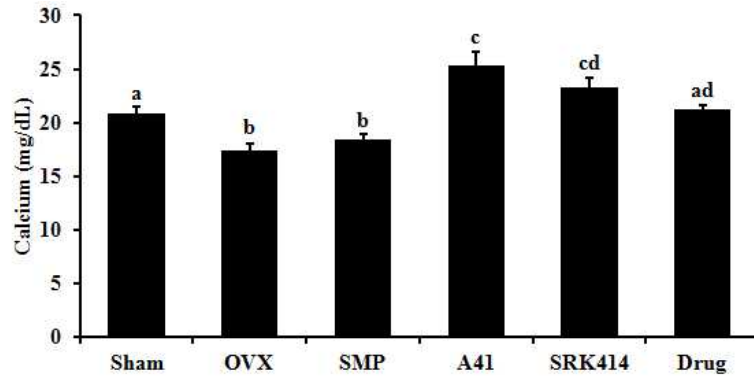
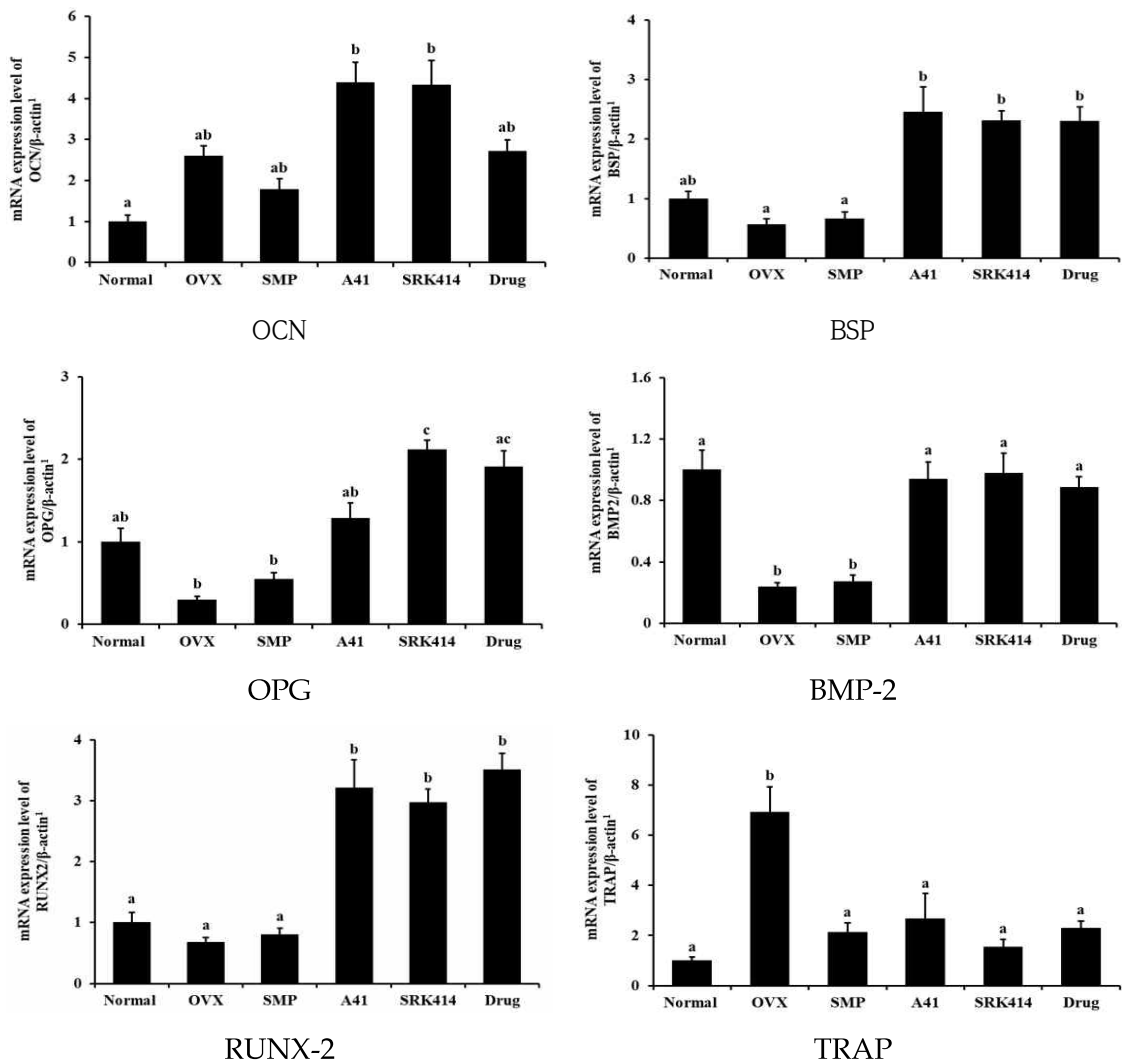


Figure 31. 혈중 칼슘 농도 결과

④ 골 대사 관련 지표 분석

- 대퇴골에서 뼈 대사 관련 지표의 mRNA 발현량 분석 결과, *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 투여그룹 에서 OCN, BSP, OPG, BMP-2, RUNX-2의 발현량이 유의적으로 증가하고, TRAP, RANKL 발현량은 유의적으로 감소하는 것을 확인함



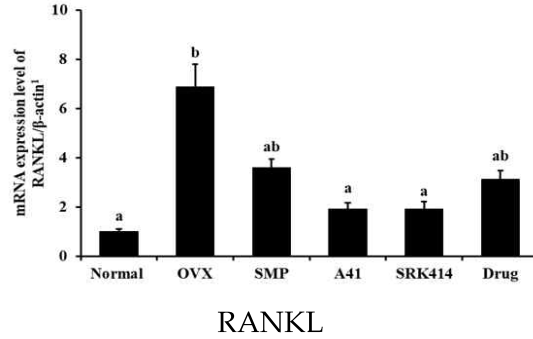
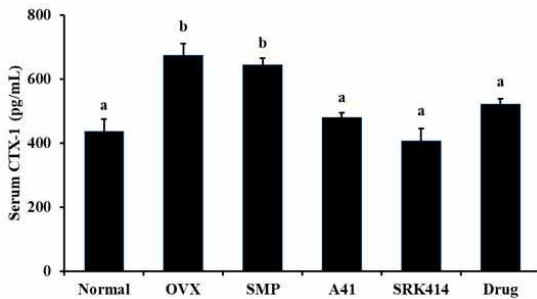


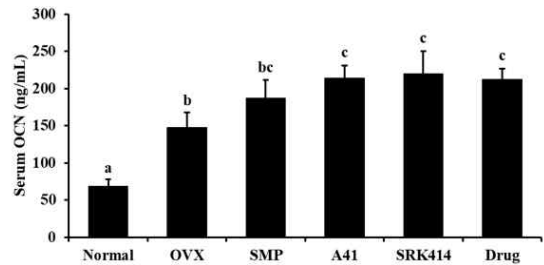
Figure 32. 골 대사 지표 유전자 발현 비교

⑤ 혈액 생화학 분석

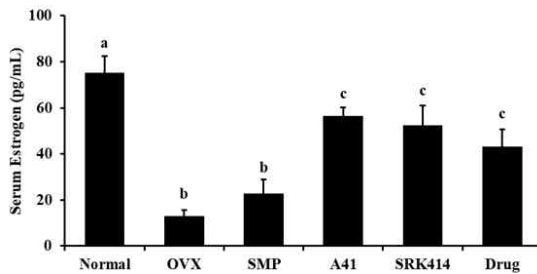
- 혈중에서 뼈 대사 관련 지표의 단백질 발현량 분석 결과, *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 투여그룹에서 골 흡수 핵심 바이오마커인 CTX-1는 유의적으로 감소하고, 골 형성 핵심 바이오마커인 osteocalcin(OCN) 발현량은 유의적으로 증가함을 확인함
- 폐경으로 인해 감소한 에스트로젠 양이 *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414 투여 그룹에서 회복됨이 확인됨
- 혈중 칼슘농도가 부족할 때 증가하는 부갑상선호르몬인 PTH도 유의적으로 감소했으며, 염증성사이토카인인 TNF $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 도 유의적으로 감소한 것을 확인함



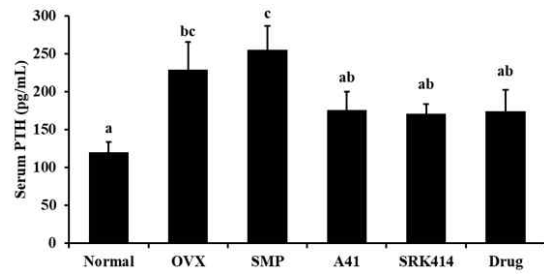
CTX-1



OCN



에스트로젠



PTH

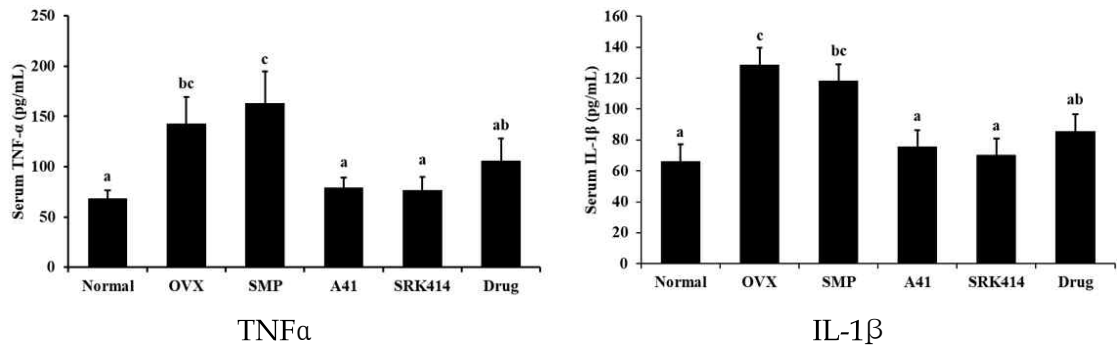


Figure 33. 혈액 생화학 분석 결과

⑥ H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색

- OVX와 SMP 그룹에서는 골 내부를 구성하고 있는 해면골 양이 감소하여 골 간 간격이 넓어져 골 소실이 발생하였으나, *L. plantarum* A41과 *L. fermentum* SRK414를 투여한 그룹에서는 normal 그룹과 같이 정상화 되어 골 소실이 개선된 것을 확인함

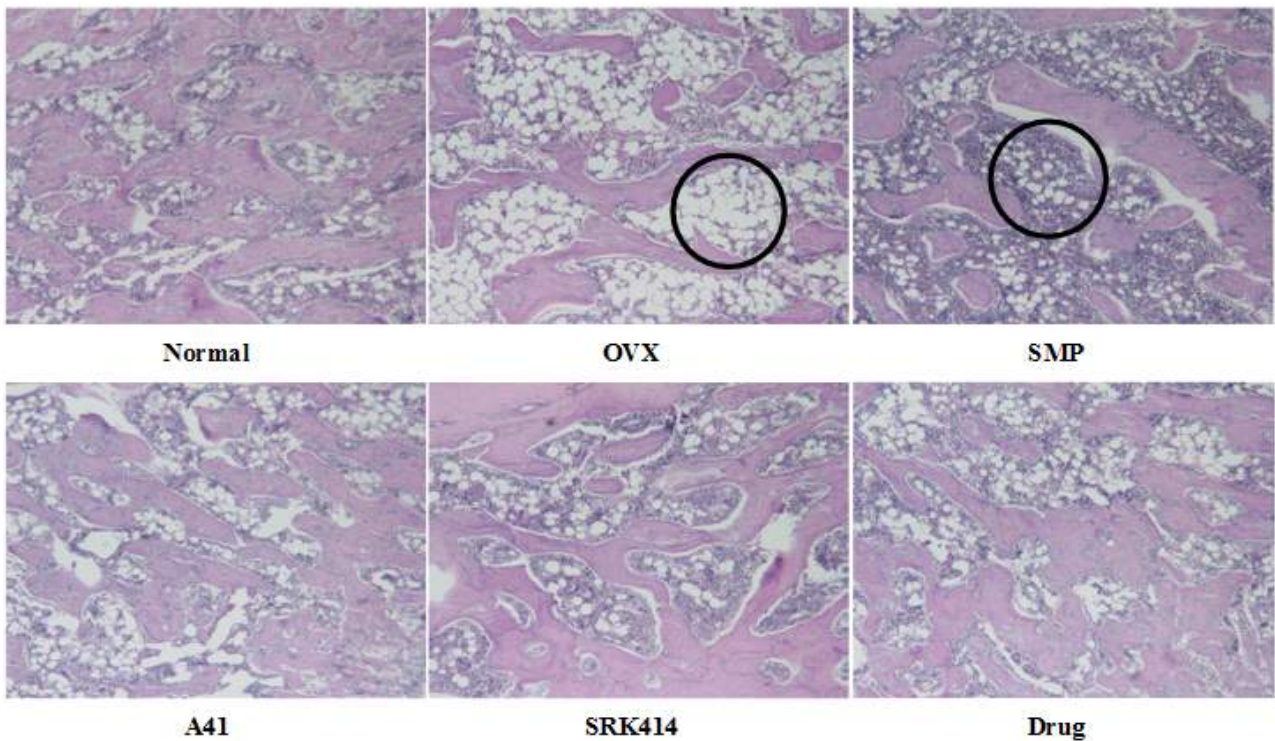
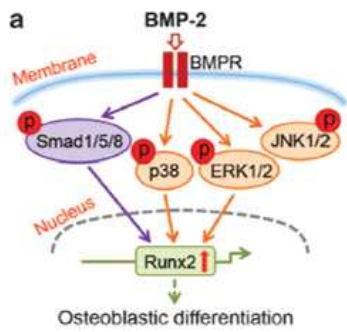


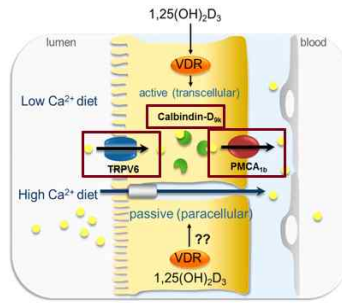
Figure 34. 대퇴골 H&E 염색 결과

- 효능기전 파악을 위하여 뼈 대사, 칼슘 흡수, 호르몬 조절 관련 지표의 mRNA, 단백질 발현 등을 확인한 결과 Figure 35와 같이 ① BMP-2 signaling을 통한 조골세포 분화 촉진 ② 칼슘 및 비타민D 흡수 촉진을 통한 체내 칼슘, 비타민D 함량 증가 ③ 염증반응 조절을 통한 뼈 세포 흡수/사멸 억제 등의 효능 기전을 추측할 수 있었음

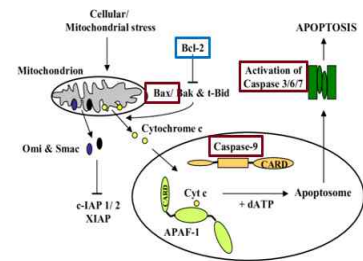




① BMP-2 signaling을 통한 조골세포 분화 촉진



② 칼슘 및 비타민D 흡수 촉진을 통한 체내 칼슘, 비타민D 함량 증가



③ 염증반응 조절을 통한 뼈 세포 흡수/사멸 억제

Figure 35. *L. fermentum* SRK414 균주의 항골다공증 예상 효능 기전

### 1-3. 제2협동연구기관 : 분당서울대학교병원

#### 가. 안전성 확립 인체적용시험 (1~2차년도)

##### (1) 인체적용시험 연구계획서(protocol) 개발

###### ① 연구목적

- 다양한 균에서 프로바이오틱스를 단기간 투여하면서 프로바이오틱스 섭취의 안전성을 확보하고 부작용 및 이상반응 등을 조사함
- 골 대사 지표의 단기 변화를 확인하여 유효성 검증 인체적용시험 계획 수립에 활용함

###### ② 연구대상자 선정 기준

- 만 7세이상 ~ 만 70세 이하의 건강한 청소년, 성인, 소아뇌성마비 환자 (이차성 골다공증), 폐경기 여성 또는 노인성 골다공증 환자 (일차성 골다공증: 폐경 후 여성 및 노인)

###### ③ 연구대상자 제외 기준

- 연구 참여 4주전까지 골다공증 약이나 건강 보조제(비타민, 미네랄, probiotics, prebiotic, synbiotics, isoflavones)등 보조제 섭취한 이력이 있는 자, 기타 골대사 이상을 가지고 있는 자

###### ④ 시험식품

- 시험식품: 제1협동연구기관의 선행연구에서 골다공증 개선 효능이 확인된 균주가 함유되어 있는 캡슐 ( $4.0 \times 10^9$  CFU/day)
- 1일 2회 12주 동안 섭취

Table 27. 시험식품의 특징

주성분명	락토바실러스 플랜타럼 B719 (4.0 x 10 <sup>9</sup> CFU/day)
성상 및 제형	분말
함량	2g/포
보관방법	냉장 보관 (4~8℃)
용법 및 용량	1일 2회, 1회 2g

(2) IRB 승인

① 제출서류 개발 완료

- 임상프로토콜, 증례기록서, 섭취 자가기록지, 연구대상자 모집 공고

② IRB 승인 획득

- 연구 윤리적 타당성 확립 및 연구대상자 보호 장치 마련 (승인일 : 2017년 12월 11일)



Version No: 5.0

책임연구자 소속: 질병위과  
책임연구자 이름: 이 영 만



17. 증례기록서(CRF)



18. 섭취 자가기록지



19. 연구대상자 모집 공고

임상 프로토콜

증례기록서

섭취 자가기록지

연구대상자 모집  
공고

Figure 36. 분당서울대병원 IRB 초기 심의 제출서류



분당서울대학교병원 생명윤리심의위원회

IRB No: 2017-02-05-159-198 2017.05.15

심의결과통보서



분당서울대학교병원 생명윤리심의위원회

생명윤리심의위원회 위원장

본 연구의 목적, 연구 내용, 연구 방법, 연구 윤리, 연구 기간 등 연구의 목적과 내용을 설명합니다.

본 연구의 목적과 연구의 내용, 연구 방법, 연구 윤리, 연구 기간 등 연구의 목적과 내용을 설명합니다.

본 연구의 목적과 연구의 내용, 연구 방법, 연구 윤리, 연구 기간 등 연구의 목적과 내용을 설명합니다.

본 연구의 목적, 연구 내용, 연구 방법, 연구 윤리, 연구 기간 등 연구의 목적과 내용을 설명합니다.

본 연구의 목적과 연구의 내용, 연구 방법, 연구 윤리, 연구 기간 등 연구의 목적과 내용을 설명합니다.

본 연구의 목적과 연구의 내용, 연구 방법, 연구 윤리, 연구 기간 등 연구의 목적과 내용을 설명합니다.

Figure 37. 분당서울대병원 IRB 초기심의 승인서

(3) 인체적용시험 수행

① 샘플 모집 및 처리

- 초기(0주차) 및 마지막(12주차) 총 2회 방문하여 방문 시 10ml 채혈 및 5ml 채뇨 진행

② 단기 유효성 평가를 위한 검사 수행

- 연구대상자로부터 제공받은 혈액과 소변에서 골 대사 지표인 C-telopeptide(CTx), N-telopeptide(NTx), osteocalcin 검사 수행

③ 안전성 평가를 위한 검사 수행

- 매 방문 시 신체계측 (Inbody)
- 초기(0주차) 및 마지막(12주차) 방문 시 임상병리검사로 이상 유무 확인
- 부작용(복통, 설사를 비롯한 소화기계 증상) 및 이상반응에 대한 질의조사

(4) 시험 결과

① 대상자 모집 현황

- Alpha error 0.05, power 0.8로 가정하고, 이전 연구를 바탕으로 프로바이오틱스 투여 시 osteocalcin이 25.2ng/ml (SD 10ng/ml)에서 34ng/ml (SD 10ng/ml)로 증가하는 것으로 대상자수를 계산하면 40명이고, 탈락율 20%를 고려하여 48명으로 계산함
- 등록된 48명 중 43명이 시험을 완료하였고, 시험기간 동안 제1군(건강한 성인)에서 3명과 제4군(뇌성마비 환자)에서 2명인 총 5명은 중도 포기함
- 연구계획에 따라 최종 평가 연구대상자수 40명 이상 확보되어 대상자 모집을 완료함

Table 28. 연구대상자 분류

분류	대상자 특징	모집인원	등록인원	비고
제1군	건강한 성인	12명	9명	중도포기 3명
제2군	건강한 청소년	12명	12명	
제3군	폐경기 여성	12명	12명	
제4군	뇌성마비 환자	12명	10명	중도포기 2명

② 부작용 및 이상반응

- 시험식품과 관련된 중대한 부작용 및 이상반응은 발생하지 않았음

③ 검사 결과  
 • Raw data  
 - 투여 전

Table 29. 투여 전 검사 분석 결과

No.	군	연구시작일	Ctx (C-telopeptide)	NTX	Osteocalcin	CRP	ESR	WBC	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW(CV)	RDW(SD)	Platelet	Seg.neut	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil	LUC
1	1	2018-04-27	0.173	18	17.9	0.02	7	6.25	4.88	14	42.8	87.7	28.7	32.7	13.1	39.2	255	66.2	27.5	5.3	0.5	0.5	0
2	1	2018-05-03	0.194	28	19.4	0.04	5	3.82	4.4	11.8	36.8	83.6	26.8	32.1	13.4	41.4	190	66.7	23.6	7.1	1.6	1	0
3	1	2018-05-04	0.188	25	12.8	0.05	18	6.21	4.44	13	40	90.1	29.3	32.5			301	67.8	26.1	5.2	0.6	0.3	0
4	1	2018-06-21	0.123	20	16.7	1	40	8.31	4.53	12.9	39.4	87	28.5	32.7			277	66.6	24.8	7.3	0.7	0.6	0
5	1	2018-05-09	0.18	25	14.3	0.35	8	6.5	3.61	12	34.4	95.3	33.2	34.9			223	62.1	26.2	7.4	3.7	0.6	0
6	1	2018-05-11	0.1	16	7.8	0.16	30	8.15	4.99	9.4	32.9	65.9	18.8	28.6			436	57.1	33.6	6.7	1.7	0.9	0
7	1	2018-05-16	0.306	23	15	0.04	7	5.76	4.47	13.6	40.9	91.5	30.4	33.3			209	49.8	39.8	6.6	2.8	1	0
8	1	2018-05-18	0.285	32	34.7	0.04	7	6.27	4.3	12.9	39.4	91.6	30	32.7	12.2	40.7	250	66.6	25.8	5.9	1.1	0.6	0
9	1	2018-05-24	0.223	36	16.5	0.02	3	4.8	4.27	13.2	39.9	93.4	30.9	33.1	12.1	42	232	51.2	39.4	7.1	1.7	0.6	0
10	1	2018-06-07	0.294	29	21.2	0.07	8	9.14	4.76	13.8	42	88.2	29	32.9			377	62.2	29.2	5.9	1.9	0.8	0
11	1	2018-06-19	0.329	20	21.2	0.01	6	8.11	4.79	14.7	45.3	94.6	30.7	32.5			300	62.1	28.9	7.5	0.9	0.6	0
12	1	2018-06-19	0.114	33	14.2	0.02	3	4.94	4.15	12.6	38.3	92.3	30.4	32.9			230	42.7	46.5	6.3	3.7	0.8	0
13	2	2018-07-10	0.719	52	33.9	0.23	21	5.75	4.7	14.3	42.5	90.4	30.4	33.6			322	48.5	37.6	5.7	7.5	0.7	0
14	2	2018-07-13	1.27	236	68	0.01	2	6.98	4.08	12.2	36.8	90.2	29.9	33.2			286	45.5	42.7	6.2	5.2	0.4	0
15	2	2018-05-25	1.51	212	74.2	0.01	2	6.09	5.07	13.2	41.4	81.7	27	33.1			248	32.7	58.3	6.2	2.6	0.2	0
16	2	2018-05-04	0.535	41	48.9	0.06	5	5.39	4.54	13.7	40.9	90.1	29.1	32.3			349	47.6	39	8.2	4.5	0.7	0
17	2	2018-07-19	0.703	73	46.7	0.05	4	8.09	5.55	15.9	49.1	88.5	28.6	32.4			310	55.6	34.2	7.2	2.5	0.5	0
18	2	2018-07-20	1.23	100	50.5	0.11	3	4.42	4.97	14.8	44.3	89.1	29.8	33.4			208	45.9	43.2	6.8	3.6	0.5	0
19	2	2018-07-20	1.43	261	80.2	0.15	6	4.39	5.54	15.9	46.8	84.5	28.7	34			290	42.2	44.6	9.1	3.4	0.7	0
20	2	2018-07-20	1.22	109	75.8	0.02	2	4.08	5.16	15.1	46	89.1	29.3	32.8			239	40.9	44.4	9.8	4.2	0.7	0
21	2	2018-07-20	0.516	31	29.2	0.02	2	5.18	4.324	12.4	37.8	89.2	29.2	32.8			271	44.5	41.7	9.5	4.1	0.2	0
22	2	2018-07-20	0.791	62	33.7	0.05	7	7.71	4.37	12.9	38.7	88.6	29.5	33.3			305	58.1	34.4	4.8	2.1	0.6	0
23	2	2018-07-25	0.505	112	33.6	0.26	12	3.69	4.31	12.6	39.4	91.4	29.2	32	11.9	40.2	170	59.3	31.2	7	2.2	0.3	0
24	2	2018-07-26	1.25	340	82.9	0.04	2	6.92	4.52	12.8	38.2	84.5	28.3	33.5	11.6	35.6	248	51.9	36.7	7.1	3.9	0.4	0
25	3	2018-07-25	0.29	21	26.6	0.03	13	5.67	3.75	10.8	34.4	91.7	28.8	31.4	12	40.5	202	52.3	37.9	7.8	1.6	0.4	0
26	3	2018-07-25	0.26	16	20.8	0.08	17	5.84	4.34	13.2	40	92.2	30.4	33	12.1	41.1	229	42.6	49	6.5	1.7	0.2	0
27	3	2018-07-25	0.619	62	38.4	0.19	14	6.03	4.56	13.8	40.9	89.7	30.3	33.7	12.6	41.3	316	53.6	35	7.1	3.3	1	0
28	3	2018-07-25	0.275	33	16.6	0.16	17	5.29	4.34	13.4	40.2	92.6	30.9	33.3	12.7	43.5	221	58.5	30.2	10	0.9	0.4	0
29	3	2018-07-25	0.642	59	42.4	0.03	12	5.95	4.02	11.8	37.6	93.5	29.4	31.4	13.7	46.5	187	56.9	33.6	7.2	1.8	0.5	0
30	3	2018-07-25	0.271	42	15.9	0.13	24	7.11	4.49	14.1	43	95.8	31.4	32.8	11.8	41.1	217	58.1	34.3	6.3	1	0.3	0
31	3	2018-07-25	0.515	69	27	0.02	12	6.27	3.67	11.4	35.3	96.2	31.1	32.3	13	46.3	242	46.4	43.1	8.9	0.6	1	0
32	3	2018-07-25	0.201	36	16.3	0.06	6	6.3	4.23	11.8	37.1	87.7	27.9	31.8	13.2	42.6	175	46.1	41.6	10	1.7	0.6	0
33	3	2018-07-26	0.463	40	30.4	0.03	12	7.32	4.04	12.3	37.3	92.3	30.4	33	12.2	41.6	211	57.2	33.6	7	1.8	0.4	0
34	3	2018-07-26	0.22	51	17.4	0.03	4	4.97	3.86	12.2	37.7	97.7	31.6	32.4	11.8	42.1	172	46.1	40.4	8.9	4	0.6	0
35	3	2018-07-26	0.307	21	13.6	0.01	2	5.34	4.41	13.2	40.1	90.9	29.9	32.9	12.8	42.6	198	50.4	40.3	8.2	0.7	0.4	0
36	3	2018-07-26	0.149	25	18.6	0.28	15	6.81	4.28	12.4	37.7	88.1	29	32.9	12.7	41.2	252	61.4	26	8.2	3.5	0.9	0
37	4	2018-07-05	0.331	54	21	0.04	2	7.73	5.24	15.7	46.7	89.1	30	33.6			302	39.4	48.4	9.5	1.7	1	0
38	4	2018-07-26	0.693	116	35.9	0.04	9	4.48	5.2	14.7	44.6	85.8	28.3	33	13.5	41.9	330	49.3	40.2	8.3	1.8	0.4	0
39	4	2018-07-31	1.25	764	127	0.03	5	5.71	5.46	15.6	47.2	86.4	28.6	33.1	11.9	37.8	343	48	38.9	9.5	2.5	1.1	0
40	4	2018-07-31	0.385	19	37.8	0.14	25	6.45	4.06	12.3	38.3	94.3	30.3	32.1	11.9	41.5	270	52.3	37.2	8.7	1.6	0.2	0
41	4	2018-07-31	0.334	53	36.4	0.02	3	7.35	5.19	15.7	47	90.6	30.3	33.4	11.9	39.7	273	61.7	27.3	7.9	1.9	1.2	0
42	4	2018-07-31	0.635	215	58.7	0.02	14	8.11	4.82	12.7	39.1	81.1	26.3	32.5	12.6	37	291	69	23.1	6.4	1.1	0.4	0
43	4	2018-08-02	1.37	334	103.3	0.04	4	5.52	4.78	13.9	42	87.9	29.1	33.1	12.5	40.7	206	62.7	30.4	4.9	1.6	0.4	0
44	4	2018-08-02	0.416	51	25.5	0.04	14	6.88	4.5	12	37.1	82.4	26.7	32.3	13.2	39.6	261	54.9	34.6	7.8	2.3	0.4	0
45	4	2018-08-02	2.12	534	129.1	0.02	13	7.41	5.29	14.7	44.9	84.9	27.8	32.7	12.7	39.1	357	44.7	44.1	8	2.8	0.4	0
46	4	2018-07-19	0.772	269	45.9	0.01	2	3.73	4.06	13.3	39.8	98	32.8	33.4			173	50.1	37.8	8.6	2.7	0.8	0
47	4	2018-07-19	0.96	76	45	0.06	7	7.87	5.22	15.1	45.8	87.7	28.9	33			318	57.6	31.4	8.6	1.9	0.5	0
48	4	2018-06-08	1.88	294	87.4	0.02	2	5.34	5.41	14.8	45.6	84.3	27.4	32.5			371	54.3	35.6	8.6	1.3	0.2	0

- 투여 후

Table 30. 투여 후 검사 분석 결과 (raw data)

No.	군	3개월 섭취 후	Ctx (C-telopeptide)	NTX	Osteocalcin	CRP	ESR	WBC	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW(CV)	RDW(SD)	Platelet	Seg.neut	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil	LUC	
1	1	2018-07-27	0.322	31	19.9	0.04	17	8.44	4.99	13.9	42.1	84.4	27.9	33	12.6	38.6	272	66.7	27.6	5.1	0.2	0.4	0	
2	1	2018-08-02	0.283	25	15.9	0.02	2	5.03	4.42	11.8	37	83.7	26.7	31.9	12.2	38.6	214	64.2	27	64	1.6	0.8	0	
3	1																							
4	1	2018-09-21	0.28	38	20.6	0.1	18	5.65	4.46	12.9	39.4	88.3	28.9	32.7	13.4	43.5	239	57.5	35.4	5.7	0.7	0.7	0	
5	1	2018-08-09	0.288	16	15.3	0.16	4	4.81	3.86	12.5	37.5	97.2	32.4	33.3	12.3	43.8	262	43.1	46.4	6.2	3.5	0.8	0	
6	1	2018-08-10	0.173	22	6.3	0.12	26	8.91	5.01	9.4	33	65.9	18.8	28.5	19.2	43.8	379	57.2	35	5.9	1.3	0.6	0	
7	1																							
8	1	2018-08-17	0.265	29	24.8	0.04	18	6.61	4.38	13.2	40.4	92.2	30.1	32.7			297	63.3	27.8	7.1	0.9	0.9	0	
9	1	2018-08-24	0.252	28	15.1	0.01	7	5.49	4.48	13	40.2	89.7	29	32.3			260	53	38.1	6.9	1.5	0.5	0	
10	1	2018-09-07	0.357	22	21.6	0.31	11	10.3	4.49	13	40.3	89.8	29	32.3	12.1	39.8	408	65.3	25.7	7.1	1.3	0.6	0	
11	1	2018-09-19	0.196	23	19.7	0.01	4	7.39	4.57	14.2	42.6	93.2	31.1	33.3	12	41.5	239	62.1	27.6	8.8	0.8	0.7	0	
12	1																							
13	2	2018-10-13	0.923	107	31.2	0.29	13	6.04	4.68	14	42.3	90.4	29.9	33.1	12.1	39.8	316	47.8	35.8	6.3	9.3	0.8	0	
14	2	2018-10-23	2.62	483	109.2	0.01	5	6.13	4.11	12.2	36.7	89.3	29.7	33.2	12.6	41.2	286	41.4	45.7	6.9	5.7	0.3	0	
15	2	2018-08-23	1.37	340	113.5	0.01	2	5.94	5.25	14.2	42.9	81.7	27	33.1	12.4	37	241	35	55.2	7.7	1.9	0.2	0	
16	2	2018-08-06	1.03	71	45	0.02	2	4.44	4.76	13.7	43.9	92.2	28.8	31.2			298						0	
17	2	2018-11-03	1.14	67	42.1	0.14	10	6.76	5.41	15.5	48.1	88.9	28.7	32.2	12.4	40.8	311	47.2	42	8.6	1.9	0.3	0	
18	2	2018-10-13	1.21	124	40.8	0.07	6	4.28	5.43	15.9	47.2	86.9	29.3	33.7	12.3	39.1	213	44.9	40.7	7.9	5.8	0.7	0	
19	2	2018-10-13	1.48	221	66	0.04	2	3.73	5.56	15.8	47	84.5	28.4	33.6	12	36.7	307	40.8	44.5	8.8	5.1	0.8	0	
20	2	2018-10-26	0.765	59	55.3	0.08	4	6.44	4.79	13.8	43.6	91	28.8	31.7	12.2	41.1	251	58.8	28.6	10.7	1.7	0.2	0	
21	2	2018-10-26	0.292	39	24.2	0.01	5	7.61	4.33	12.8	39.5	91.2	29.6	32.4	11.6	39.1	302	48.1	40.3	8.5	2.6	0.5	0	
22	2	2018-10-22	0.665	42	27	0.06	10	8.23	4.34	12.5	38.7	89.2	28.8	32.3	11.2	35.9	328	49.9	41.6	5.6	2.3	0.6	0	
23	2	2018-10-25	0.486	98	33.3	0.02	2	6.13	4.28	12.1	39	91.1	28.3	31	13.2	44.5	208	57.4	34.3	6	2	0.3	0	
24	2	2018-10-26	1.48	244	73.9	0.08	2	5.93	4.27	12.2	37.1	86.9	28.6	32.9	12.2	39.1	278	53.8	35.6	7.9	1.9	0.8	0	
25	3	2018-10-25	0.434	38	24.8	0.04	16	6.46	4.16	11.7	37.2	89.4	28.1	31.5	12.1	38.6	188	49.2	40.2	8.4	2	0.2	0	
26	3	2018-10-30	0.205	13	16.5	0.11	15	6.03	4.3	13.5	39.9	92.8	31.4	33.8	11.9	40.8	268	39.9	50.1	8	1.3	0.7	0	
27	3	2018-10-30	0.329	48	35.6	0.13	18	5.86	4.38	13.3	39	89	30.4	34.1	12.8	41.6	359	55.7	33.8	6.5	3.1	0.9	0	
28	3	2018-10-25	0.269	37	20.8	0.06	16	4.76	4.17	12.9	38.6	92.6	30.9	33.4	11.9	40.5	223	62.4	27.5	8.4	1.5	0.2	0	
29	3	2018-10-26	0.278	40	33.2	0.01	6	3.73	4.27	12.5	40.6	95.1	29.3	30.8	13.2	45.9	188	51.8	36.7	9.4	1.6	0.5	0	
30	3	2018-10-25	0.163	30	13.8	0.22	24	6.64	4.55	14.3	43.9	96.5	31.4	32.6	12	43.2	222	55.8	36	7.1	0.8	0.3	0	
31	3	2018-10-25	0.542	48	24.3	0.02	26	5.22	3.61	11.3	34.8	96.4	31.3	32.5	13	46.2	230	47.8	43.1	7.5	1	0.6	0	
32	3	2018-10-24	0.307	37	16.8	0.17	16	8.06	4.28	11.9	37.8	88.3	27.8	31.5	12.9	41.9	212	60.3	30.8	7.8	0.7	0.4	0	
33	3	2018-10-24	0.418	35	31.8	0.04	18	5.08	3.98	12.1	37.4	94	30.4	32.4	12.2	42.8	233	52.3	38.8	7.7	0.8	0.4	0	
34	3	2018-10-25	0.136	25	17.5	0.03	10	6.4	3.82	12	36.9	96.6	31.4	32.5	12.2	43.3	168	52.4	37	7.8	2.5	0.3	0	
35	3	2018-10-26	0.182	17	15.4	0.01	2	5.88	4.26	12.9	38.2	89.7	30.3	33.8	12.8	42.1	202	55	36.6	6.5	1.4	0.5	0	
36	3	2018-10-25	0.078	38	15.9	0.09	18	7.02	4.14	12	36.7	88.6	29	32.7	12.5	40.7	248	70.6	20.9	5.8	2.1	0.6	0	
37	4	2018-10-05	0.388	40	26.6	0.04	2	7.3	5.01	15.5	45.5	90.8	30.9	34.1	12.3	40.7	275	43.8	45.5	8.6	1.1	1	0	
38	4	2018-10-25	0.907	40	42.2	0.05	4	6.87	5.03	14.7	44.9	89.3	29.2	32.7	13	42.4	365	44.7	43.4	10.2	1.3	0.4	0	
39	4	2018-10-27	0.818	156	78.1	0.02	4	4.6	5.12	14.8	44.5	86.9	28.9	33.3	11.9	38.3	291	45	41.5	9.8	2.8	0.9	0	
40	4																							
41	4	2018-10-31	0.256	24	32.6	0.02	2	6.22	5.26	15.5	48.6	92.4	29.5	31.9	12	40.8	292	51.9	33	8.8	5	1.3	0	
42	4	2018-10-30	0.957	318	57.5	0.03	21	7.37	5.37	13.9	43.4	80.8	25.9	32	12.6	36.3	329	56.6	35.8	5.7	1.2	0.7	0	
43	4																							
44	4	2018-11-15	0.356	33	20.8	0.15	23	6.76	4.07	11.3	34.4	84.5	27.8	32.8	12.8	39.2	270	64.3	25.9	6.4	3	0.4	0	
45	4	2018-11-01	1.18	178	93.2	0.02	8	7.16	4.89	13.6	40.6	83	27.8	33.5	12.9	38.6	348	48.4	40.5	8.1	2.7	0.3	0	
46	4	2018-10-13	1.78	377	56.7	0.01	2	3.33	4.32	14.1	41.7	96.5	32.6	33.8	11.5	41.1	168	45.7	40.2	8.4	4.8	0.9	0	
47	4	2018-11-03	0.784	78	47.1	0.05	5	5.6	5.36	15.4	47.6	88.8	28.7	32.4	12.2	39.8	300	50.2	39.5	8.4	1.4	0.5	0	
48	4	2018-09-07	1.7	355	83.2	0.59	4	5.06	5.47	14.5	44.8	81.9	26.5	32.4	13.3	39	388	57.1	32.4	7.9	2.2	0.4	0	

• 통계분석 결과

- 1군 (건강한 성인, n=9) : 혈액검사 결과, 모든 항목에서 정상 수준임을 확인하였음. 섭취 전후 골 대사 지표의 변화는 없음

Table 31. 1군 (건강한 성인) 섭취 전후 통계 분석 결과

	Week 0		Week 12		p value
	MEAN	SD	MEAN	SD	
CTX	0.211	0.078	0.268	0.057	0.086
NTX	24.888	6.846	26.000	6.364	0.953
Osteocalcin	18.855	7.215	17.689	5.345	0.514
CRP	0.190	0.323	0.090	0.098	0.352
ESR	12.666	13.000	11.889	8.268	1.000
WBC	6.816	1.762	6.959	1.926	0.678
RBC	4.503	0.423	4.518	0.342	0.678
Hb	12.744	1.557	12.656	1.409	0.528
Platelet	282.222	78.492	285.556	65.862	0.953
Seg.neut	62.311	5.267	59.156	7.485	0.327

- 2군 (건강한 청소년, n=12) : 혈액검사 결과, 모든 항목에서 정상 수준임을 확인하였음. 섭취 전후 골 대사 지표의 변화는 없음

Table 32. 2군 (건강한 청소년) 섭취 전후 통계 분석 결과

	Week 0		Week 12		p value
	MEAN	SD	MEAN	SD	
CTX	0.9733	0.37893	1.1218	0.6066	0.433
NTX	135.75	100.98076	157.9167	138.41273	0.638
Osteocalcin	54.8	20.29801	55.125	30.26553	0.209
CRP	0.0842	0.08597	0.0692	0.07994	0.918
ESR	5.6667	5.67824	5.25	3.81683	0.796
WBC	5.7242	1.45889	5.9717	1.31133	0.937
RBC	4.7608	0.49109	4.7675	0.52331	0.906
Hb	13.8167	1.34491	13.725	1.41879	0.655
Platelet	270.5	50.62967	278.25	40.6048	0.182
Seg.neut	47.725	7.64688	47.7364	7.1846	0.689

- 3군 (폐경기 여성, n=12) : 혈액검사 결과, 모든 항목에서 정상 수준임을 확인하였음. 골 대사 지표 변화에 유의미한 차이는 관찰할 수 없었으나, 시험식품 섭취 후 골 흡수 지표인 CTX와 NTX가 감소하는 경향을 확인함 (P=0.117, 0.147)

Table 33. 3군 (폐경기 여성) 섭취 전후 통계 분석 결과

	Week 0		Week 12		p value
	MEAN	SD	MEAN	SD	
CTX	0.351	0.16584	0.2784	0.13654	0.117
NTX	39.5833	17.57301	33.8333	10.89481	0.147
Osteocalcin	23.6667	9.40061	22.2	7.66385	0.146
CRP	0.0875	0.08487	0.0775	0.06784	0.859
ESR	12.3333	6.08027	15.4167	6.77507	0.074
WBC	6.075	0.73016	5.9283	1.13553	0.875
RBC	4.1658	0.29346	4.16	0.25363	0.529
Hb	12.5333	1.01115	12.5333	0.86795	0.753
Platelet	218.5	39.42196	228.4167	49.52586	0.209
Seg.neut	52.4667	6.11114	54.4333	7.7534	0.433

- 4군 (뇌성마비 환자, n=12) : 혈액검사 결과, 모든 항목에서 정상 수준임을 확인하였음. 섭취 전후 골 대사 지표의 변화는 없음

Table 34. 4군 (뇌성마비 환자) 섭취 전후 통계 분석 결과

	Week 0		Week 12		p value
	MEAN	SD	MEAN	SD	
CTX	0.939	0.630	0.913	0.526	0.721
NTX	242.600	238.720	159.900	141.644	0.508
Osteocalcin	61.190	39.826	53.800	24.692	0.646
CRP	0.030	0.015	0.098	0.177	0.236
ESR	7.100	5.087	7.500	7.863	0.944
WBC	6.461	1.541	6.027	1.351	0.074
RBC	5.039	0.447	4.990	0.461	0.575
Hb	14.430	1.312	14.330	1.257	0.678
Platelet	301.900	57.533	302.600	61.590	0.838
Seg.neut	52.900	8.557	50.770	6.739	0.262

- 모든 연구대상자에서 프로바이오틱스 복용으로 인한 부작용 및 이상반응은 없었으며 혈액 검사 결과에서도 모든 항목이 정상 수준임이 확인되어 안전성 검증의 목적을 달성함
- 네 유형의 균 중 폐경기 여성 균에서 시험식품 섭취 후 골 흡수 지표(CTX, NTX)가 감소하는 경향이 관찰되어 프로바이오틱스의 폐경기 여성 대상 골 소실 개선 가능성을 확인하였음. 골 재형성 주기가 6 ~ 9개월이기 때문에 본 연구의 섭취기간인 3개월 내에는 골 대사 지표의 유의미한 변화까지 관찰하기 어려웠다고 판단됨
- 따라서 유효성 검증을 위한 인체적용시험에서는 폐경기 여성을 대상으로 하며, 섭취기간과 연구 대상자 인원을 늘려서 진행하기로 결정함

## 나. 유효성 검증 인체적용시험 (3차년도)

### (1) 인체적용시험 연구계획서(protocol) 개발

#### ① 연구목적

- 폐경 여성에게 시험식품 및 대조식품을 24주간 섭취시킨 후 *Lactobacillus fermentum* SKR414 섭취에 의한 뼈 대사 관련 지표를 비교함

#### ② 연구대상자 선정 기준

- 만 55세 이상의 폐경기 여성 (12개월 이상 무월경)

#### ③ 연구대상자 제외 기준

- 골다공증으로 진단을 받은 자
- 첫 번째 방문 1개월 이내에 다음의 약물을 복용하였거나 연구기간 동안 복용이 예측되는 경우 : 프로바이오틱스, 프리바이오틱스(식이섬유, 올리고당류 등), isoflavone(에스트로젠 등), 호르몬제(부갑상선호르몬, 칼시토닌, 라록시펜, 에스트로젠, 경구피임약, 성장호르몬제, 스테로이드 등), 이 외에 뼈 대사에 영향을 미칠 수 있는 의약품
- 골대사에 영향을 미치는 질환을 앓고 있는 경우: 갑상선 질환, 난소암, 뇌성마비 등
- 다음의 만성 질환을 앓고 있는 경우: 신장질환, 간질환, 당뇨, 호흡기 질환, 소화기계 질환 등
- 다음의 중증 질환을 앓고 있는 경우 : 입원 또는 약물치료가 필요한 중증의 중추신경계 장애(우울증, 정신분열증, 알코올중독, 약물중독 등), 중증의 뇌혈관질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 악성종양 등

#### ④ 시험/대조식품

- 시험식품: 본 연구결과 골다공증 개선 효능이 확인된 *Lactobacillus fermentum* SKR414 균주가 함유되어 있는 캡슐 ( $4.0 \times 10^9$  CFU/day)
- 대조식품: 프로바이오틱스 균주가 함유되어 있지 않고, 시험식품과 외형과 성상이 동일한 캡슐
- 1일 2회 24주 동안 섭취



Table 35. 시험식품과 대조식품의 특징

	시험식품	대조식품
주성분명	락토바실러스 퍼멘텀 SRK414 ( $4.0 \times 10^9$ CFU이상/day)	결정 셀룰로오스
성상 및 제형	캡슐	캡슐
함량	280mg/캡슐	280mg/캡슐
보관방법	냉장 보관 (4~8°C)	냉장 보관 (4~8°C)
용법 및 용량	1일 2회, 1캡슐	1일 2회, 1캡슐

⑤ 연구개요

- 방문 1(-2주)에 자의에 의해 인체적용연구 동의서에 서명한 지원자는 선정 및 제외기준에 따라 적합성 여부를 판정함
- 선정된 대상자는 2주간의 run-in period 후 방문 2(0주)에 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군에 무작위 배정되어 24주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한 후 기능성 바이오 마커를 분석함

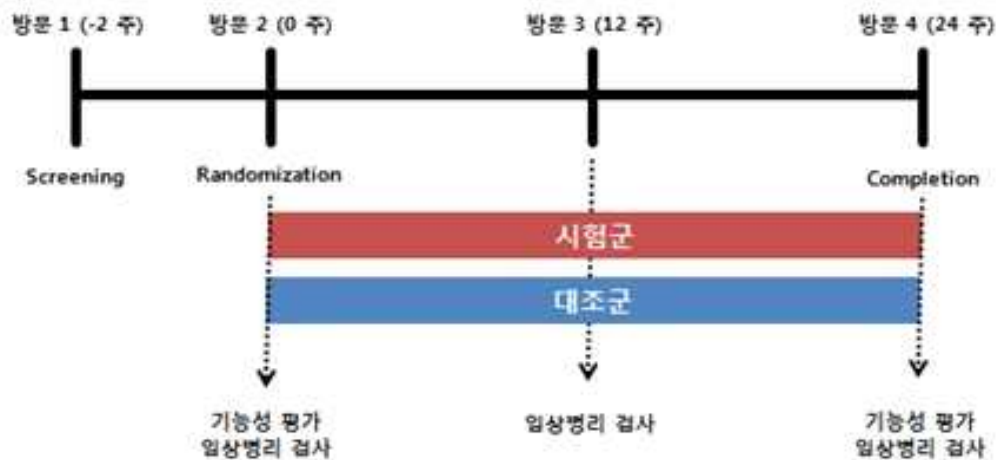


Figure 38. Experimental scheme

(2) IRB 승인

① 제출서류 개발 완료

- 임상프로토콜, 증례기록서, 섭취 자가기록지, 연구대상자 모집 공고, 연구대상자 설명문, 식이 및 생활습관 지침 등

② IRB 승인 획득

- 연구 윤리적 타당성 확립 및 연구대상자 보호 장치 마련 (초기심의승인일 : 2019년 4월 16일)

**17. 증례기록서(CRF)**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

A clinical trial of the effects of *Lactobacillus fermentum* SRK414 supplementation on bone health

Version No: 3.1

책임연구자 소속: 서울대학교  
책임연구자 직책: 임상연구관

**17. 증례기록서(CRF)**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

구분	자	비	비	비	비	비	비	비	비	비	비
연령	18~24	25~34	35~44	45~54	55~64	65~74	75~84	85~94	95 이상		
성별	남	여									

연구자: \_\_\_\_\_, 연구원: \_\_\_\_\_

연구 시작 일자: \_\_\_\_\_, 연구 종료 일자: \_\_\_\_\_

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구자: \_\_\_\_\_, 연구원: \_\_\_\_\_

연구 시작 일자: \_\_\_\_\_, 연구 종료 일자: \_\_\_\_\_

임상프로토콜

증례기록서

**18. 섭취 자기기록지**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연월	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
월												
일												

연구자: \_\_\_\_\_, 연구원: \_\_\_\_\_

연구 시작 일자: \_\_\_\_\_, 연구 종료 일자: \_\_\_\_\_

섭취 자기기록지

**인체적용연구 대상자 모집**

프로바이오틱스(*Lactobacillus fermentum* SRK414)의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

**연구 목적**: 박테리아 균형을 대상으로 *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강 개선에 미치는 영향과 연관성을 평가

**연구 대상**: 만 55세 이상의 폐경기 여성

**연구 방법**: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

**연구 참여**: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

**연구 참여**: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구대상자 모집공고

**연구대상자 설명문**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 목적: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 대상: 만 55세 이상의 폐경기 여성

연구 방법: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구 참여: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

**연구 종료 시까지 아래 사항을 준수하시요.**

이외의 사항은 평소 식이-생활습관을 유지해주세요.

**아래 건강기능식품과 약물은 섭취하지 마세요.**

- 프로바이오틱스(유산균 등), 프리바이오틱스 (식이섬유, 프락토올리고당 등), 신바이오틱스
- 칼슘, 비타민D, 이소플라본
- 부갑상선호르몬, 칼시토닌, 라록시펜, 예스트로겐, 경구임약, 성장호르몬제, 스테로이드제

**규격적으로 운동해주세요.**

- 하루 20-30분씩 주 3회

**방문하시기 전에 다음을 지켜주세요.**

- 방문 48시간 전 - 과도한 음주를 삼가주시고 과도한 활동을 금지
- 방문 12시간 전 - 두 번째 및 네 번째 방문 전에는 금식
- 방문 일: 연구 완료 시까지 지연

**인체적용연구 동의서**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 목적: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 대상: 만 55세 이상의 폐경기 여성

연구 방법: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구 참여: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

**인체적용시험 연구자 자료집**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414

연구 목적: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 대상: 만 55세 이상의 폐경기 여성

연구 방법: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구 참여: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구대상자 설명문

식이 및 생활습관 지침

인체유래물 연구

인체적용시험

Figure 39. 분당서울대병원 IRB 초기 심의 제출서류

**분당서울대학교병원 생명윤리심의위원회**

**심의결과통보서**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 목적: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 대상: 만 55세 이상의 폐경기 여성

연구 방법: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구 참여: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

**분당서울대학교병원 생명윤리심의위원회**

**심의결과통보서**

연구 제목: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 목적: *Lactobacillus fermentum* SRK414의 섭취가 배 건강에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용연구

연구 대상: 만 55세 이상의 폐경기 여성

연구 방법: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

연구 참여: 1) 대상자 적합 여부 판정 후, 대조군 또는 시험군에 배정하여 연구기간 동안 섭취를 하는 대조군을 실험군 (1) 실험군, 2) 배정된 기간, 3) 배정된 기간 종료 후, 4) 배정된 기간 종료 후 (연구기간) 4주(연구기간)

Figure 40. 분당서울대병원 IRB 초기심의 승인서

### (3) 인체적용시험 수행

#### ① 인체적용시험 수행

- 연구대상자 동의 : 방문1(-2주)에서 연구시작 전 본 연구의 목적과 내용에 대하여 연구대상자에게 상세히 설명한 후 연구대상자 동의 취득. 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호(Screening No.)를 부여하고 그 번호를 증례기록서에 기재
- 인구학적 특성 : 방문1(-2주)에 성별, 생년월일, 무월경기간 조사
- 체성분 검사 : 방문 2(연구시작)부터 방문 4(24주)까지 매 방문 시 Inbody 측정, 체성분 분석 실시
- 병력 및 수술력 확인 : 방문 1(-2주)부터 방문 4(24주)까지 매 방문 시 제외기준에 포함된 병력 및 수술력 여부를 질의응답을 통해 확인. 방문 1(-2주)에서는 방문시점을 기준으로 5년 이내 제외기준에 포함된 병력 및 외과적 수술력 여부를 질의응답을 통해 확인
- 약물 및 건강기능식품 섭취 확인 : 방문 1(-2주)부터 방문 4(24주)까지 매 방문 시 제외기준에 포함된 의약품 및 건강기능식품 섭취여부를 질의응답을 통해 확인. 방문 1(-2주)에서는 방문시점을 기준으로 1개월 이내 제외기준에 포함된 의약품 및 건강기능식품 섭취 여부를 질의응답을 통해 확인
- 식이 및 생활습관 교육 : 방문 1(-2주)부터 방문 4(24주)까지 매 방문 시 아래의 식이·생활습관 지침을 교육. 섭취 금지 식품에 대해 정리한 자료를 배포하여 지속적으로 인식할 수 있도록 함

Run-in period부터 연구 종료 시까지 아래 사항을 준수하되, 이외의 사항은 평소 식이 및 생활습관을 유지한다.

ㄱ. 장건강에 영향을 줄 수 있는 건강기능식품 섭취 금지

예 : 프로바이오틱스(유산균 등), 프리바이오틱스(식이섬유, 올리고당 등), 신바이오틱스 등

ㄴ. 뼈건강에 영향을 줄 수 있는 건강기능식품 및 의약품 섭취 금지

예 : 칼슘, 비타민D, 이소플라본, 부갑상선호르몬, 칼시토닌, 라록시펜, 에스트로젠, 경구피임약, 성장호르몬제, 스테로이드제 등

ㄷ. 0주 방문부터는 규칙적으로 운동을 하도록 권장 (하루 20~30분 정도씩 주 3회 운동)

ㄹ. 방문 48시간 내 알코올 섭취 금지

ㅁ. 방문 48시간 내 과도한 활동 및 운동 금지

ㅂ. 방문일 당일에는 방문 완료시까지 금연

#### ② 임상병리검사

- 방문 2(0주), 방문 3(12주), 방문 4(24주)에 8시간 공복상태에서 다음과 같이 임상병리검사 실시. 실험실적 정상치 기준을 과도하게 벗어나는 임상병리검사 결과는 연구대상자의 증례기록서(CRF)의 연구자 의견란에 특이사항을 기재, 연구자의 판단에 따라 평가를 실시

- ㄱ. 혈액학 검사 : Hemoglobin, Hematocrit, RBC, WBC, Platelet, ESR, PCT
- ㄴ. 생화학 검사 : Total protein, Albumin, AST, ALT, ALP, Glucose, BUN, Creatinin
- ㄷ. 소변 검사 : Color, S.G, pH, Leukocyte, Nitrite, Albumin, Glucose, Urobilinogen, Ketone, Bilirubin, Blood, RBC, WBC

③ 유효성 검사 수행

- 방문 2(0주), 방문 3(12주), 방문 4(24주)에 8시간 공복 상태에서 아래의 기능성 평가 지표를 측정

- ㄱ. 골밀도 검사 : DEXA(Dual-energy X-ray absorptiometry) (방문 2, 4)
- ㄴ. 혈액 검사 : CTX, Osteocalcin, ALP, BAP, 칼슘, 인, 부갑상선호르몬, 에스트로겐, 비타민D 등 (방문 2, 3, 4)
- ㄷ. 소변 검사 : NTX (방문 2, 3, 4)
- ㄹ. 변 검체 수거 (방문 2, 4)

④ 관찰 검사 방법 (방문별)

방문1 (시작 2주전)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ㄱ. 연구 진행에 관련 설명</li> <li>ㄴ. 연구대상자 동의서 작성</li> <li>ㄷ. 연구대상자의 인구학적 특성, 병력 및 수술력, 약물 및 건강기능식품 섭취력 확인</li> <li>ㄹ. 연구대상자 선정 및 제외기준에 따라 적합성 여부 판정</li> <li>ㅁ. 식이 및 생활습관 교육</li> <li>ㅂ. 다음 방문일자 지정</li> </ul>
방문2 (연구시작)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ㄱ. 무작위배정번호 부여</li> <li>ㄴ. 공복 채혈(20ml), 채뇨(3ml), 채변(5g), 골밀도, 인바디(Inbody) 측정</li> <li>ㄷ. 식이 및 생활습관 교육</li> <li>ㄹ. 시험식품 또는 대조식품 배부</li> <li>ㅁ. 다음 방문일자 지정</li> </ul>
방문3 (복용 12주)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ㄱ. 섭취 자가기록지 및 반납식품 회수</li> <li>ㄴ. 이상반응 확인</li> <li>ㄷ. 공복 채혈(20ml), 채뇨(3ml), 인바디(Inbody) 측정</li> <li>ㄹ. 식이 및 생활습관 교육</li> <li>ㅁ. 시험식품 또는 대조식품 배부</li> <li>ㅂ. 다음 방문일자 지정</li> </ul>
방문4 (복용 24주)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ㄱ. 섭취 자가기록지 및 반납식품 회수</li> <li>ㄴ. 이상반응 확인</li> <li>ㄷ. 공복 채혈(20ml), 채뇨(3ml), 채변(5g), 골밀도, 인바디(Inbody) 측정</li> <li>ㄹ. 연구종료</li> </ul>

Table 36. 검사 수행 일정

Period		Screening		Intervention	
Visit		1	2	3	4
연구대상자 동의		V			
인구학적 특성		V			
체성분 검사 (Inbody)		V	V	V	V
병력 및 수술력 확인		V			
약물 및 건강기능식품 섭취 확인		V	V	V	V
임상병리검사 (혈액 및 소변 검사)			V	V	V
기능성 평가	콜밀도 검사		V		V
	혈액 검사		V	V	V
	소변 검사		V	V	V
	변 검체 수거		V		V
시험식품 또는 대조식품 배부			V	V	
반납식품 회수				V	V
이상반응 확인		V	V	V	V

## (4) 시험결과

## ① 대상자 모집 현황

- 이전 연구(Nilsson et al. 2018)에서 *Lactobacillus*를 투여한 군과 투여하지 않은 군의 N-telopeptide 수치를 근거로 시험군의 평균 -0.35 (표준편차 3.8), 대조군의 평균 4.6 (표준편차 7.3)로 하여 sample size를 계산하면, 각 군당 목표 연구 대상자 수는 각 23 명씩으로 탈락률 40%를 고려하여 선정기준에 적합한 대상자를 군당 38명씩 총 76명 으로 계산함
- 등록된 75명은 난수표를 이용하여 프로바이오틱스 투여군과 placebo 투여군에 무작위 로 배정되어 이 중 58명이 시험을 완료하였고, 시험기간 동안 총 17명이 중도 탈락함
- 연구계획에 따라 최종 평가 연구대상자수 46명 이상이 확보되어 대상자 모집을 완료 함

## ② 연구 결과 데이터 확인 (진행 중)

- 샘플 검사 진행 중 (장내 균총 분석 - 주관연구기관)
  - 총 112개 샘플(대변샘플 확보 인원 56명 x 섭취 전후 총 두 차례 수거)에 대한 샘플 링 및 total genomic DNA 추출, gDNA 농도 측정 완료
  - 16s RNA(V3-V4) 라이브러리 제작 완료 (Target amplification PCR, bead purification, DNA library 농도 측정, 전기영동, DNA library 희석)
  - 그 중 먼저 총 80개 샘플에 대한 시퀀싱 템플릿 제작 및 Ion GeneStudio S5 시퀀싱 기기를 작동하여 시퀀싱 완료
  - 남은 32개 샘플에 대한 시퀀싱 완료(9월 내) 후 마이크로바이옴 데이터 분석을 완료 할 계획임 (10월 내)

- 다양한 혼동 요인을 고려한 데이터 검사를 진행한 후 통계분석 예정
  - Kolmogorov-Smirnov test를 통해 데이터의 정규성을 평가함
  - 두 그룹 간의 각각 검사 시점에서의 골대사마커 수치 및 골밀도 수치의 차이를 통계적으로 분석함 (Student t-test 이용)
  - 각 그룹에서 연구시작 전과 비교해서 연구 종료 시점에서의 검사 수치 변화를 분석함 (Paired t-test 이용)

(5) 진행사항 및 향후계획

- 인체적용시험 추진 내역은 Table 37과 같음. 현재 IRB 승인, 연구대상자 모집, 시험식품 섭취, 샘플 모집이 모두 완료됨
- 현재 인체적용시험은 종료되었으며 주관연구기관에서 대변샘플 내 미생물 균총 변화 분석을 진행 중(10월 완료 예상)이므로 추후 데이터 검사 및 통계 분석을 실시하여 금년 하반기에는 최종 결과가 도출 될 것으로 예상함

Table 37. 인체적용시험 추진 내역

No	진행사항	월별 추진 내역											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1차년도 (2017년)													
1	총괄 계획 수립						■	■	■				
2	문헌 고찰						■	■	■	■			
3	(안전성) 인체적용시험 프로토콜 개발 및 IRB 승인							■	■	■	■	■	
4	(안전성) 연구대상자 모집, 시험식품 섭취												■
5	(안전성) 샘플 모집 및 검사 수행												■
2차년도 (2018년)													
1	(안전성) 연구대상자 모집, 시험식품 섭취	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	(안전성) 샘플 모집 및 검사 수행	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3	(안전성) 데이터 확인 및 통계 분석 실시												■
4	(유효성) 인체적용시험 프로토콜 개발 및 IRB 승인												■
3차년도 (2019년)													
1	(안전성) 데이터 확인 및 통계 분석 실시	■	■	■									
2	(유효성) 인체적용시험 프로토콜 개발 및 IRB 승인	■	■	■	■								



### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표 ~ 3.2 목표 달성여부

##### (1) 정성적 목표

구분	연구기관	연구목표	달성여부	달성도
1 차 년 도	(주)종근당바이오	<i>In vitro</i> 균주 제공	291균주 제공 완료	100
		균주 안전성 평가	용혈활성, 생체아민생성, 항생제 내성 평가 완료	100
		Lab-scale 제조공정 확립	배양최적화 완료	100
	고려대학교	프로바이오틱스 기본 특성실험을 이용한 스크리닝	10균주 스크리닝 완료	100
		<i>In vitro</i> 실험을 통한 프로바이오틱스 선발		100
분당서울대병원	프로바이오틱스 임상 시험에 관한 IRB 승인 획득	IRB 획득 완료	100	
2 차 년 도	(주)종근당바이오	균주 Scale-up 제조공정 확립	4L mini-jar scale 배양 완료	100
	고려대학교	노화성 골다공증 동물실험	이차성 골다공증 동물실험 우선 수행 및 완료	100
	분당서울대병원	안전성 확인 인체적용시험 수행	인체적용시험 수행 완료 및 프로바이오틱스 복용 안전성 확립 완료	100
		유효성 확인 인체적용시험 수행	IRB 획득 및 인체적용시험 연구대상자 모집	100
3 차 년 도	(주)종근당바이오	대량생산기술 확립 및 유통기한 설정	1,800L 대량생산공정 확립 및 안정성 평가 완료	100
		시제품 제조 및 산업화	시제품 제조 완료 및 제품화 진행 중	100
	고려대학교	균주 whole-genome sequencing 확보	주관연구기관에서 수행 완료	100
		복합균주 기능성 평가	후보균주의 원발성 골다공증 동물실험으로 대체 수행 및 완료	100
	분당서울대병원	유효성 확인 인체적용시험 지속	인체적용시험 수행 완료 및 통계 분석 진행 중	100



(2) 정량적 목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30		10										40				20		
최종목 표	2	2	1	1	1	6,500	2,720	6			5	2	7				1		
1차 년 도	목 표							1				1	1						
	실 적							0				0	1						
2차 년 도	목 표	1	-	-				1			2		3						
	실 적	2	1	2				2			2		4						
3차 년 도	목 표	1		1				1			3	1	3				1		
	실 적	0		0				1			6*	0	5				1		
소 계	목 표	2	-	1				3			5	2	7				1		
	실 적	2	1	2				3			8*	0	10				1		
종료 1차년도		1		1		1	500	170	1										
종료 2차년도		1					2,000	850	2										
종료 3차년도							4,000	1,700											
소 계		2					6,500	2,720	3										
합 계		2	2	1	1		6,500	2,720	6				7				1		

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

#### (1) 목표 미달성 시 원인(사유)

##### ① 논문 성과

- 본 과제의 논문 성과 목표는 총 7편(SCI 5편, 비SCI 2편)인데, 본 연구팀은 8편(SCI 8편)의 논문을 등재하여 목표를 초과 달성했음. 그러나 그 중 5편은 웹 퍼블리시 논문으로 fris에 성과 등록이 안되어 공식 publish가 완료되면 성과등록을 실시 예정임

No	게재 년월	논문명	주저자명	학술지명	권(호)	국명	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	2018.07	Syndesmosis Fixation in Unstable Ankle Fractures Using a Partially Threaded 5.0-mm Cannulated Screw	이경민 (교신)	J Foot Ankle Surg	57(4)	미국	SCI
2	2018.10	Use of iliac crest allograft for Dega pelvic osteotomy in patients with cerebral palsy	이경민 (공동), 성기혁 (제1)	BMC Musculoskelet Disord	19(1)	영국	SCI
3	2019.12	Inverse Relationship Between Radiographic Lateral Ankle Instability and Osteochondral Lesions of the Talus in Patients With Ankle Inversion Injuries	이경민 (교신)	Foot Ankle Int	40(12)	미국	SCI
4	2019.12 (E-pub)	Bone-protective effects of Lactobacillus plantarum B719-fermented milk product	이철상 (제1)	International Journal of Dairy Technology	-	미국	SCI
5	2019.2 (E-pub)	A suspicious atypical fracture of 5th metatarsal bone: A case report	이경민 (교신)	J Orthop Sci	-	일본	SCI
6	2020.3 (E-pub)	Post-traumatic avascular necrosis of tibial plafond following an ankle fracture	이경민 (교신)	J Orthop Sci	-	일본	SCI
7	2020.6 (E-pub)	Anti-inflammatory and Anti-osteoporotic Potential of Lactobacillus plantarum A41 and L. fermentum SRK414 as Probiotics	이철상 (제1)	Probiotics and Antimicrobial Proteins	12	미국	SCI(E)
8	2020.10 (E-pub)	Prevention of bone loss by using Lactobacillus-fermented milk products in a rat model of glucocorticoid-induced secondary osteoporosis	이철상 (제1)	International Dairy Journal	109	미국	SCI

#### (2) 차후대책(후속연구의 필요성)

##### ① 인체적용시험 통계분석 및 최종보고

- 현재 인체적용시험은 종료로 되었으며 데이터 전처리, 통계 분석 등의 단계는 진행 중에 있어 금년 하반기에는 최종 분석 완료 및 보고를 진행할 계획임

##### ② 개별인정 신청 준비

- 인체적용시험 결과 도출 후 개별인정 신청을 위한 기능성 평가 자료 준비 및 신청 추진 진행 예정

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### (1) 제품화 및 사업화

#### ① 반려동물용 유산균으로 제품화

- 본 연구를 통해 개발된 *L. fermentum* SRK414 균주는 두 차례 동물실험을 통해 뼈 건강에 도움을 준다는 효능을 입증했으며 관련 특허도 보유함. 따라서 이러한 연구결과를 활용하여 반려동물용 유산균 “라비벳 장 & 관절 유산균”으로 제품화 추진 중임

#### ② 국내 고시형 프로바이오틱스로 상용화

- 본 연구를 통해 개발된 *L. fermentum* SRK414는 고시형 프로바이오틱스에 속하는 균주로서 즉시 상용화가 가능함. 품목제조신고를 완료했기 때문에 우선 고시형 원말로써 국내 판매를 추진할 계획임

#### ③ 해외 시장 진출

- 동물실험 결과 및 그 지식재산권 (논문, 특허)를 마케팅에 적극 활용할 계획임. 특허 특허의 경우 국내뿐만 아니라 PCT출원도 완료했기 때문에 해외시장 진출에 유리할 것으로 사료됨. 주관연구기관의 해외 유통망(싱가폴, 베트남 등) 또는 해외지사(호주) 등을 통한 해외진출을 추진할 계획임 (PCT 출원 번호 : PCT/KR2019/007317)
- 추후 인체적용시험 성공 시 논문자료를 활용하여 해외 판매를 추진 할 수 있음

#### ④ 국내 개별인정형 건강기능식품으로 상용화

- 인체적용시험 성공 시 개별인정형을 신청하여 뼈 건강 프로바이오틱스 개별인정형 건강기능식품으로 제품화 할 계획임

### (2) 추가 연구의 필요성

- 골다공증 동물모델에서 확인한 *L. fermentum* SRK414의 조골세포 분화 촉진, 칼슘 및 비타민D 흡수 촉진 효능에 대한 MOA를 다양한 각도에서 고찰해 볼 필요가 있음
- 본 연구에서는 폐경 여성 대상 원발성 골다공증과 약물치료의 부작용으로 인한 이차성 골다공증 동물모델에서 프로바이오틱스의 효능을 평가함. 현재 고령화 추세가 가속됨에 따라 노인 골다공증 환자가 급증하고 있으므로 노인성 골다공증 동물모델을 구축하여 효능 평가를 실시하고 나아가 인체적용시험을 통해서 유효성을 검증하는 연구가 필요할 것으로 사료됨

### (3) 타 연구에의 응용

- 본 연구는 프로바이오틱스의 골다공증 개선 효능을 검증하고 작용기전을 규명하였음. 이 과정에서 *L. fermentum* SRK414 균주가 원발성, 이차성 골다공증 외의 관절 건강 혹은 성장기 어린이 뼈 건강 연구 등에 응용할 수 있는 가능성을 확인하였음
- 인체적용시험에서의 인체 내 대장 미생물 균총 분석을 진행 중이므로 추후 이 결과는 미생물 균총 변화 관찰 측면에서 유용한 기초자료로 활용 가능함

## 붙임. 참고문헌

1. 2013.02 (이선희) Osteoprotective Effect of Fermented Milk Product by *Lactobacillus plantarum* B719
2. 건강보험심사평가원 보도자료 “우리나라 골다공증 환자 중 58%만 의료 이용하는 것으로 나타나” (2010)
3. 골다공증의 병인 및 골다공증 골절의 예방. 대한고관절학회지. (2009) 21(1):6-16
4. 골다공증의 치료. 대한내과학회지. (2000) 58(6):698-702
5. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. Oral and maxillofacial surgery. (2006) 102(4):433
6. Chronic treatment with prebiotics, probiotics and synbiotics attenuated cardiac dysfunction by improving cardiac mitochondrial dysfunction in male obese insulin-resistant rats. Eur J Nutr. (2018) 57(6):2091
7. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. Sci Rep. (2017) 28(7):45176
8. *Bifidobacterium animalis* in combination with human origin of *Lactobacillus plantarum* ameliorate neuroinflammation in experimental model of multiple sclerosis by altering CD4+ T cell subset balance. Biomed Pharmacother. (2017) 95:1535
9. Effects of a Multispecies Probiotic Supplement on Bone Health in Osteopenic Postmenopausal Women: A Randomized, Double-blind, Controlled Trial. J Am Coll Nutr. (2017). 36(7):497-506

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발				
	(영문) Development of probiotic functional for the treatment of primary- and secondary osteoporosis				
주 관 연구 기관	(주)종근당바이오		주 관 연 구 자	(소속) 프로바이오틱스팀	
참 여 기 업	(주)종근당바이오		책 임 자	(성명) 김 병 국	
총 연구개발비 (888,500 천원)	계	850,800	총 연 구 기 간	2017.06.15 ~ 2020.06.30 (3년)	
	정부출연 연구개발비	510,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	25명
	기업부담금	340,800		내부인원	25명
	연구기관부담금	-		외부인원	0
<p><b>○ 연구개발 목표 및 성과</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 원발성 및 이차성 골다공증 개선 프로바이오틱스 발굴 및 그 효능 기전 규명</li> <li>• 인체적용시험을 통한 프로바이오틱스의 안전성·유효성 검증</li> <li>• 기능성 프로바이오틱스 대량생산 기반 구축 및 상용화 추진</li> </ul> <p><b>○ 연구내용 및 결과</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 프로바이오틱스 기본 특성 및 세포실험을 통한 프로바이오틱스 균주 선발             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 조골세포에서 골 형성 대사 촉진 효능 균주 선발</li> </ul> </li> <li>2) 골다공증 동물모델에서 프로바이오틱스 효능 확인 및 기전 규명             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 원발성, 이차성 골다공증 동물모델에서 골밀도 개선 효능 확인</li> <li>• 골 대사 및 칼슘 대사 관련 유전자 발현 분석을 통한 효능 기전 규명</li> </ul> </li> <li>3) 배양 최적화 및 대량생산기술 확립             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 배양 최적화 및 scale-up 완료</li> <li>• 대량생산기술을 적용한 원말 생산 및 캡슐 제품 제조</li> </ul> </li> <li>4) 제품화             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 안정성 테스트를 통한 유통기한 설정</li> <li>• 품목제조신고 완료 및 제품화 추진</li> </ul> </li> <li>5) 인체적용시험을 통한 안전성 및 효능 평가 수행             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 폐경 여성 대상 24주간 인체적용시험 수행</li> <li>• 뼈 건강 개선 관련 유효성 평가 수행 (골밀도, 신체계측, 혈액지표)</li> </ul> </li> </ol> <p><b>○ 연구성과 활용실적 및 계획</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 반려동물용 유산균으로 제품화</li> <li>• 국내 고시형 및 개별인정형 프로바이오틱스로 상용화</li> <li>• 지식재산권을 활용한 해외 시장 진출</li> </ul>					

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	117051-3		
사업구분	고부가가치식품개발사업				
연구분야	기능성 식품소재		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발		과제유형	개발	
연구기관	㈜종근당바이오		연구책임자	김병국	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.06-2017.12	110,000	74,000	184,000
	2차연도	2018.01-2018.12	200,000	133,400	333,400
	3차연도	2019.01-2020.06	200,000	133,400	333,400
	계	2017.06-2020.06	510,000	340,800	850,800
참여기업	㈜종근당바이오				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 08. 14

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
㈜종근당바이오	이사	김병국

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

## 1. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

본 연구는 골다공증 유발 동물모델에서 프로바이오틱스의 골다공증 개선 효능 평가를 실시하여 가장 우수한 최종 후보균주를 선별하였음. 최종 선발된 균주를 활용하여 인체적용시험을 실시하여 인체 내 유효성 평가를 수행하였음. 향후 인체적용시험 결과 유의성 확인 시 *in vitro*, *in vivo* 실험으로부터 도출한 효능기전 규명 내용이 개별인정신청을 위한 충분한 근거자료로 활용 가능함

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

본 연구는 원발성, 이차성 두 가지 유형의 골다공증 동물모델을 구축하여 골 대사 및 칼슘 대사 연관 유전자 분석, 혈액 생화학 분석 등을 실시하여 프로바이오틱스의 골다공증 개선 효능기전을 규명한 바 있음. 폐경 유도 원발성 골다공증 모델뿐만 아니라 글루코코르티코이드를 통한 이차성 골다공증 모델을 구축하여 연구를 수행했다는 점에서 향후 관련 연구에 좋은 연구사례가 될 것으로 사료됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

본 연구를 통해 개발된 균주는 동물실험을 통해 뼈 건강에 도움을 준다는 효능을 입증하였으며, 관련 논문과 국내특허, PCT특허를 보유하고 있음. 따라서 이러한 지식재산권을 활용하여 국내외 시장을 타겟으로 다양한 형태로 제품화 가능할 것으로 사료됨. 실제로 동물실험 연구결과 및 그 특허를 활용하여 반려동물 유산균 “라비벳 장 & 관절 유산균”을 제품화 추진 중임

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

본 연구의 최종 목표를 달성하기 위해 연차별로 단계적 연구목표를 계획하고 이를 근거로 하여 연구를 수행하였음. 코로나 바이러스 등의 이유로 연구 진행에 다소 어려움이 있었음에도 목표를 달성하였으며 인체적용시험 추가 분석 및 통계 분석도 진행 중에 있음

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

연구 결과를 활용하여 논문 8편, 특허 등록 2건, 생물자원 등록 2건, 학술발표 10건, 전시회 1건을 수행하였음. 향후 인체적용시험 결과에 대해서도 분석 후 논문 투고 계획임

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
프로바이오틱스 기본특성 및 세포실험을 통한 균주 스크리닝	10	100	총 483균주에서 2균주 선발완료
동물실험을 통한 효능 평가	10	100	이차성 골다공증 동물모델에서 효능 평가 완료
동물실험을 통한 기전 규명	10	100	원발성 골다공증 동물모델에서 효능 평가 및 기전 규명 완료
배양 최적화	15	100	배양 최적화 및 scale-up 완료
대량생산기술 확립	15	100	대량생산기술 확립 완료
시제품 제조 및 제품화	15	80	시생산 완료 및 제품화 추진 중
안전성 확인 인체적용시험 수행	10	100	안전성 확인 인체적용시험 완료
유효성 확인 인체적용시험 수행	15	100	유효성 확인 인체적용시험 완료
합계	100점	97점	-

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구의 목표는 골다공증 개선 효능 프로바이오틱스 선발 및 인체적용시험 수행, 그리고 생산 공정 확립을 통한 실용화였음. 1차년도에는 세포실험을 통해 후보균주를 선발하고, 배양 최적화를 수행하였으며, 2차년도에는 이차성 골다공증 동물실험을 통한 효능 균주 선발 및 대량생산기술 확립을 완료하였고, 3차년도에는 원발성 골다공증 동물실험을 통한 효능 검증 및 효능기전 규명, 시제품 생산, 인체적용시험을 수행하였음. 본 연구목표에 따른 연차별 연구내용에 근거하여 성실히 연구를 수행하였으며 In vivo에서 프로바이오틱스의 골다공증 개선효능 입증 자료를 확보하였음. 따라서 이러한 연구 결과를 바탕으로 반려동물용 유산균 제품을 출시 할 계획임 (10월 출시 예정)

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

인체적용시험 개시 이후, 코로나 사태로 인해 원활한 연구 진행에 어려움이 있었으나, 인체적용시험 연구대상자 모집 및 등록을 완료하였음. 바이오마커 및 장내균총 분석이 완료되면 통계 분석을 진행할 계획임 (10월 예상)

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

In vivo 연구를 통해 확보한 지식재산권을 활용하여 반려동물용 유산균 제품화를 추진 중이며, 현재 진행 중인 인체적용시험 데이터 추가 분석 및 통계 분석 완료 후 개별인정 신청도 추진할 계획임



#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

해당없음

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	기능성 식품소재
연구과제명	원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발			
주관연구기관	(주)종근당바이오		주관연구책임자	김 병 국
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	510,000,000	340,800,000	-	850,800,000
연구개발기간	2017. 06. 15 ~ 2020. 06. 30			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타( 제품화 및 판매 ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 골다공증 동물모델에서 프로바이오틱스의 효능 평가 및 효능기전 규명	• 두 가지 유형의 골다공증 동물모델에서 효능 평가 완료 및 효능기전 규명 완료
② 프로바이오틱스 대량생산 공정 확립	• 대량생산 공정 확립 및 시제품 제조 완료
③ 인체적용시험을 통한 안전성 및 유효성 검증	• 폐경 여성 대상 인체적용시험 수행 완료
④ 골다공증 개선 고부가가치 제품의 산업화 추진	• 품목제조신고 완료 및 제품화 추진 (출시 10월)

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연구 활용)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건 수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균			학술 발표	정책 활용		홍보 전시

														IF					등)
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건		건		명	건	건
가중치	30		10												40				20
최종목표	2	2	1	1		1	6,500	2,720	6			5	2		7				1
연구기간내 달성실적	2	1	2						3			8*	0		10				1
달성율(%)	100		100						100			100			100				100

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	골다공증 기능성 균주 선발 및 효능기전 규명
②	골다공증 기능성 균주 대량생산 공정 확립
③	골다공증 기능성 균주 완제품 생산

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술						V				
②의 기술								V		
③의 기술							V			

\* 각 해당란에 v 표시

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	반려동물 유산균으로 제품화 및 개별인정 신청을 위한 연구자료로 활용
②의 기술	다양한 프로바이오틱스의 대용량 산업화에 적용
③의 기술	다양한 프로바이오틱스 완제품 생산에 적용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	30		10										40				20		
최종목표	2	2	1	1		1	6,500	2,720	6			5	2	7				1	
연구기간내 달성실적	2	1	2						3			8*	0	10				1	
연구종료후 성과창출 계획	0	1	0	1		1	6,500	2,720	3			0	0	0				0	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

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

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.