

발간등록번호

11-1543000-002868-01

디톡스·안티에이징을 타겟으로 한 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화 최종보고서

2019. 06. 13.

주관연구기관 / 리부트

협동연구기관 / 건국대학교 산학협력단

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “디톡스·안티에이징을 타겟으로 한 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화”(개발기간 : 2018.04.30. ~ 2019.04.29.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 6. 13.

주관연구기관명 : 리부트

(대표자) 이 승 아

위탁연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

(대표자) 송 창 선 (인)



주관연구책임자 : 이 승 아

위탁연구책임자 : 백 현 동

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	818019-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.30. ~ 2019.04.29.	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품연구성과후속지원사업			
	사 업 명	벤처창업바우처지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화			
연구책임자	이 승 아	해당단계 참여연구원 수	총: 3명 내부: 1명 외부: 2명	해당단계 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 0천원 계: 50,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 3명 내부: 1명 외부: 2명	총 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 0천원 계: 50,000천원
연구기관명 및 소속부서명					참여기업명: 리부트
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:
위탁연구	연구기관명: 건국대학교 산학협력단				연구책임자: 백 현 동

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

1. 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화

- 1) 시제품 제작
- 2) 판매전략 수립

2. 프로바이오틱스 소재의 선별 및 기능성 평가

- 1) 계획 수립 및 자료 조사
- 2) 프로바이오틱스 특성 평가
- 3) 간 기능 개선
- 4) 향산화 평가

보고서 면수
76

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 본 연구는 디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재를 확보하고, 이를 실용화하는 기술의 확보 및 제품화를 하고자 함. 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 디톡스 및 안티에이징과 관련한 선행연구 및 문헌조사를 실시하였음. • 프로바이오틱스의 생리적 특성인 내산·내담즙성, 효소 생산능, 장 부착능, 항생제 저항성 활성, 간 기능 개선능, 항산화능, 장 환경 개선능 등을 평가하여 우수 균주를 스크리닝하였음. • 분리균주를 적용한 시제품을 개발하였으며, ‘리부트 클렌즈 유산균’ 출시하였음. • 판매 전로 OEM 제조방식을 통해 제품을 생산하였으며, 출시 전 1명의 고용창출로 업무의 효율을 높임. • 본 연구를 통해, SCI급 논문 1건, 국내·외 학술발표 2건, 특허 출원 1건, 고용창출 1명, 인력양성 1명의 연구성과를 얻었으며, 기술이전 1건을 수행하였음. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 부작용을 최소화하고 효과를 극대화 시킨 디톡스 및 안티에이징 제품 개발의 최적 생산법과 그 주요기능을 검증함으로써 새로운 고부가가치 제품 개발에 대해 이론적 배경을 확립할 수 있으며 관련 연구의 기초자료를 제공하고, 기능성 소재의 활용 면에서 국제경쟁력 확보를 기대할 수 있음. • 건강한 다이어트를 통해, 외적 아름다움뿐만 아니라 건강까지 지킴으로서 전반적 삶의 질을 향상시킬 수 있을 것이며 장기적으로 모든 연령층에게 건강한 다이어트의 중요함에 대한 인식을 키워줄 수 있을 것임. • 본 연구를 통해 개발된 새로운 디톡스 및 안티에이징의 고부가가치 제품은 식의약 소재 및 기능성 식품으로의 이용 가능할 것이며, 새로운 디톡스를 위한 영양식품이라는 시장을 개척할 수 있을 것임. • 본 연구를 통해 국내 디톡스 및 안티에이징 제품 개발 및 생산 방안을 제시함으로써 국가 경제 활성화에 이바지할 수 있으며, 최근까지 수입에 의존하던 제품을 국산제품으로 대체 할 수 있을 뿐만 아니라 더 나아가 수출까지 연결할 수 있음. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>디톡스</p>	<p>안티에이징</p>	<p>프로바이오틱스</p>	<p>기능성</p>	<p>웰빙</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Detox</p>	<p>Anti-aging</p>	<p>Probiotics</p>	<p>Functionality</p>	<p>Well-being</p>

〈 목 차 〉

제 1장 연구개발과제의 개요	6
제 1절 연구개발 목적	6
제 2절 연구개발의 필요성	6
제 3절 연구개발 범위	11
제 2장 연구수행 내용 및 결과	16
제 1절 프로바이오틱스 소재의 선별 및 기능성 평가	16
제 2절 시제품의 기술적·경제적 성과	50
제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	52
제 1절 목표 달성도	52
제 2절 목표 달성 여부	53
제 4장 연구결과의 활용 계획	54
제 1절 추가 연구의 필요성	54
제 2절 타 연구에서의 응용	54
제 3절 연구개발 결과의 활용방안	54
제 4절 기업화 추진방안	55
붙임. 참고문헌	65
<별첨1> 연구개발보고서 초록	
<별첨2> 주관연구기관의 자체평가의견서	
<별첨3> 연구성과 활용계획서	

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발 목적

1. 연구개발의 개요

- 세계적인 웰빙 트렌드와 인구 고령화로 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강기능식품, 특히 프로바이오틱스 건강기능식품에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있는 추세임.
- 프로바이오틱스 균주 자체만의 디톡스 및 안티에이징 기능성과 관련한 기술이 과학적으로 입증된 현황은 미미한 실정임.
- 건국대학교에서 분리한 균주를 이용하여 디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재를 연구하여 기술이전을 통해 차별화된 프로바이오틱스 제품을 개발하고자 함.

2. 연구개발의 목표

- 디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재를 확보하고, 이를 실용화하는 기술의 확보 및 제품화를 하고자 함.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 중요성

- 세계적인 웰빙 트렌드와 인구 고령화로 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강기능식품, 특히 프로바이오틱스 건강기능식품에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있는 추세임.
- 현대 사회의 변화에 따라 정신적, 육체적, 환경적 스트레스를 해결하기 위한 디톡스·안티에이징에 대한 관심이 증대되고 있으며 이에 따라 운동과 피로회복 등의 효능이 있는 건강기능식품 시장이 증가하고 있는 추세임.
- 질병을 예방하여 건강하게 살고 싶은 욕구가 반영되면서 프로바이오틱스의 섭취 인구가 증가하는 등 안정적으로 시장이 성장할 것으로 전망됨.
- 식품산업에서는 건강에 대한 관심이 증대되어, 운동능력 향상, 체중관리 식품 등으로 식품에서도 ‘기능성’과 ‘체내 유용성이 높은 원료’로 통곡물, 영양 흡수가 느린 원료 등이 고려되고 있음.
- 세계 건강기능식품 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있으며, 이들 중 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 시장 규모 또한 증가하고 있는 실정임.

- 프로바이오틱스 균주 자체만의 디톡스 및 안티에이징 기능성과 관련한 기술이 과학적으로 입증된 현황은 미미한 실정임.
- 전통발효식품에서 분리한 균주를 이용하여 디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재를 연구하여 차별화된 프로바이오틱스 제품을 개발하고자 함.
- 프로바이오틱스의 특성 중 함암효과, 면역 조절능에 대한 연구가 집중되고 있음. 특히, 면역 조절능의 병원성 미생물에 대한 항균성 물질의 생산, 암세포에 대한 세포독성 등으로 밝혀지거나 사이토카인의 생산에 의해 간접적으로 영향을 주기도 함. 프로바이오틱스의 면역조절 활성화에 영향을 끼치는 인자로는 1) 프로바이오틱스의 종류, 2) 면역체계에 사용되는 프로바이오틱의 용량에 따른 효과, 3) 균의 형태(생균 또는 사균), 4) 제공되는 형태(발효식품에서 면역활성이 높게 나타났음)로 알려져 있음 (Herich and Levkut, 2002).
- 디톡스는 해독이라 할 수 있으며, 피부(박테리아, 바이러스, 중금속, 화학독소 등을 차단), 호흡기(자체 필터 작용), 면역체계(바이러스와 기생충 등의 병원체를 감지), 장(외부 유해물질의 차단), 간(중금속, 독소 등 유해물질 제거), 신장(필요없는 물질 배출)으로 나눌 수 있음. 디톡스와 관련한 물질을 클렌저라 부르며 레몬, 오이, 자몽 등이 사용되고 있음.
- 유산균의 디톡스 작용으로 예상할 수 있는 기능성으로는, 간 기능 개선, 항균효과, 중금속 흡착능, 항산화 효과, 면역 조절능 등이 있음.
- 프로바이오틱스와 관련된 원료로는 총 14건이 보고되고 있으며, 이들 중 디톡스 및 안티에이징과 관련된 원료로는 유산균발효마늘추출물(제2016-16호), 유산균발효다시마추출물(제2011-22호)의 2건이 보고되고 있음.

In-vitro test		In-vivo test	
Target cell (in-vitro) Hepatocyte (Human)	Preparation dead/live cell Culture supernatant	Toxicity model (in-vivo) Alcohol Galactosamine, ICR mice/SD rat	Preparation live cell Symbiotics
	Test sample Cell culture supernatant, protein, mitochondrial supernatant, RNA		Test sample Plasma, Liver
간세포 손상지표	<ul style="list-style-type: none"> ALT (Aminotransferase) AST (Aspartate aminotransferase) LDH (Lactate dehydrogenase) 	지방생성 억제	<ul style="list-style-type: none"> ORO (Oil-red O) staining 지방함량측정
산화손상 억제	<ul style="list-style-type: none"> GSH (Glutathione, oxidized from GSSG) TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) 	산화손상 억제	<ul style="list-style-type: none"> GPs (Glutathione peroxidase) CAT (Catalase) SOD (Superoxide dismutase) TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)
지방함량	<ul style="list-style-type: none"> TG (Total glycerol) & TC (Total cholesterol) Oil-Red O 	간조직 손상지표	<ul style="list-style-type: none"> ALP (Alkaline phosphatase) OCT (Ornithine carbamyl transferase) r-GTP (r-glutamyltranspeptidase) CYP2E1 (Cytochrome P450 2E1) CYP450 (PROD) CYP450 (MROD) Methoxyresorufin CYP450 (BROD) Benzyloxyresorufin
지방분해 증가	<ul style="list-style-type: none"> AMPK (AMP-activated protein kinase) PPAR-a (Peroxisome proliferator activated receptors) 		
지방합성 억제	<ul style="list-style-type: none"> FAS (Fatty acid synthase) SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein) 		

그림 1. 간 기능 개선 활성 검증을 위한 실험법 모식도(한국식품연구원, 2018).

- 간 건강관련 2건의 원료는 프로바이오틱스 단일 균주가 아니라, 마늘, 다시마를 원료로 발효물에 해당됨. 프로바이오틱스 균주만으로 이루어진 디톡스·안티에이징 관련 원료는 보고되지 않음.

표 1. 프로바이오틱 균주와 관련된 기능성 원료(2019년 6월 기준)

기능성 원료	기능성 내용	일일 섭취량
<i>L. rhamnosus</i> IDCC 열처리배양건조물	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능)	<i>L. rhamnosus</i> IDCC 열처리배양건조물로서 400 mg/일(열처리배양균체수로서 1×10^{10} cells)
<i>Lactobacillus</i> sp. 복합물 HY7601+KY1032	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음	<i>Lactobacillus</i> sp. 복합물 HY7601+KY1032로서 1×10^{10} CFU/일
<i>L. gasseri</i> BNR17	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능)	<i>L. gasseri</i> BNR17로서 1×10^{10} CFU/일
유산균발효마늘추출물	간 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	유산균발효마늘추출물로서 1.5 g/일
<i>L. plantarum</i> HY7714	피부 보습에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 1×10^{10} CFU/일
<i>L. plantarum</i> HY7714	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강 유지에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 1×10^{10} CFU/일
UREX 프로바이오틱스	유산균 증식을 통한 여성 질 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 9.7 mg/일 (프로바이오틱스로서 10^9 CFU/일)
프로바이오틱스 ATP	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함(생리활성기능 3등급)	신청원료로서 2×10^9 CFU/일
<i>L. helveticus</i> 발효물	노화로 인해 저하된 인지력 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡(생리활성기능 3등급)	<i>L. helveticus</i> 발효물로서 1 g/일
<i>L. sakei</i> Probio65	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	<i>L. sakei</i> Probio65로서 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/일
프로바이오틱스(VSL#3)	유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활/장면역을 조절하여 장건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{12}$ CFU/일
과채유래 유산균 (<i>L. plantarum</i> CJLP133)	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	과채유래유산균 (<i>L. plantarum</i> CJLP133)로서 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/일

유산균발효다시마추출물	알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음/기억력 개선에 도움을 줄 수 있음	유산균발효다시마추출물로서 1.5 g/일
<i>E. faecalis</i> FK-23 효소 및 가열처리 분말(LFK)	꽃가루에 의해 나타나는 코막힘의 개선에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능 2등급)	<i>E. faecalis</i> FK-23 효소 및 가열처리분말로서 1 g/일

- 본 연구개발은 디톡스·안티에이징 관련 프로바이오틱스 균주를 이용한 실용화기술 개발이며 기존의 사례와 비교해 볼 때 산업재산권 출원을 통해 독창성 및 혁신성을 확보할 수 있을 것임.

나. 국내 기술 수준 및 시장현황

(1) 국내·외 시장현황

- 현대 사회의 변화에 따라 정신적, 육체적, 환경적 스트레스를 해결하기 위한 디톡스·안티에이징에 대한 관심이 증대되고 있음. 이와 더불어 건강에 대한 관심의 증대에 따라 운동과 피로회복 등의 효능이 있는 건강기능식품 시장이 증가하고 있음.
- 식품산업에서는 건강에 대한 관심이 증대되어 운동능력 향상, 체중관리 식품 등으로 식품에서도 ‘기능성’과 ‘체내 유용성이 높은 원료’로 통곡물, 영양 흡수가 느린 원료 등이 고려되고 있음(웰니스 향노화 식품산업 비즈니스 모델 개발 및 제도화, 한국보건산업진흥원, 2014. 12.).
- 세계 건강기능식품 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있으며, 이들 중 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 시장 규모 또한 증가하고 있는 실정임.

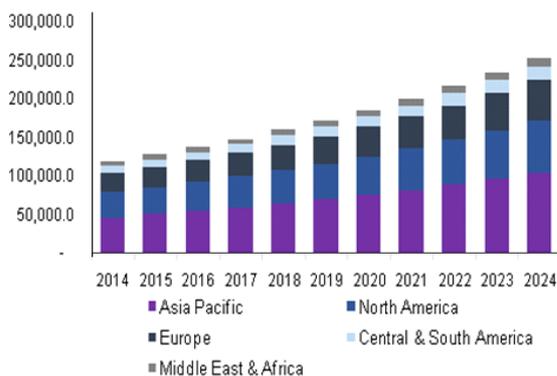


그림 2. 세계 건강기능식품 시장 (2014년~2022년, USD million)
(출처, Market Research Report, 2016. 11.)

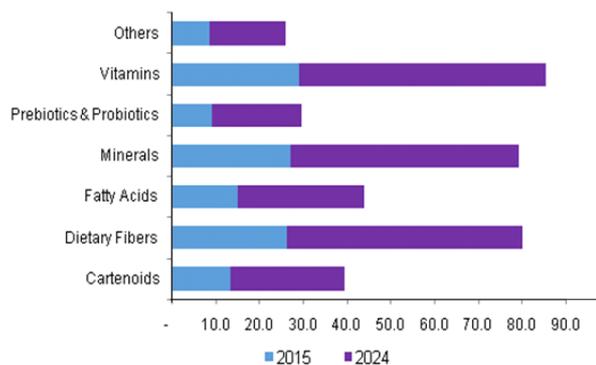


그림 3. 세계 건강기능식품 제품별 시장 (2014년~2022년, USD million)
(출처, Market Research Report, 2016. 11.)

(2) 세계시장의 성격

- 건강에 대한 관심이 증가하면서 질병을 예방하여 건강하게 살고 싶은 욕구가 반영되면서 프로바이오틱스 섭취 인구가 증가하는 등 안정적으로 시장이 성장할 것으로 전망됨.
- 초고령화 사회로의 빠른 진입과 프로바이오틱스가 본격적인 각광을 받기 시작한 지 5년이 채 되지 않아 여전히 성장 여력이 충분하므로, 향후 높은 시장 성장이 예상됨(국내·외 시장 17~23 CAGR 9% 이상 전망).
- 프로바이오틱스 시장은 건강기능식품 중 성장성이 가장 높은 그룹에 속하는데, 여전히 국내 시장은 초기 단계이기 때문에 선점 경쟁이 치열함.

(3) 경쟁기관 현황

- 디톡스·안티에이징과 관련한 제품으로는 주로 천연물인 레몬, 클로렐라, 라임, 프로바이오틱스 등이 이용되고 있음. 이들의 경우 주로 장운동 개선, 간 기능 개선 등에 집중되어 있음. 간 기능 개선과 관련한 사례는 (주)한국야쿠르트의 ‘헛개나무 쿠퍼스’로 간 기능 개선으로 제품이 출시되어 있음.
- 국내 프로바이오틱스 관련 기업으로는 (주)셀바이오텍, (주)일동제약, (주)한국야쿠르트, (주)CJ제일제당 등이 있음.
- (해외회사) 해외 프로바이오틱스 관련 기업으로는 다니스코, 크리스찬한센, 띠레망로셀, 모리나가, 일본 야쿠르트 등이 있음.

(4) 지식재산권 현황

- 디톡스와 관련한 기술현황은 1) 혼합 유산균 스타터를 이용한 디톡스 활성 촉진용 과채 발효물 및 이의 이용(출원번호 제10-2013-0164054호)이 있으며 이는 니코틴 분해능, 알콜분해능, endotoxin 억제능, 체중 감소 등의 효과를 분석한 바 있음. 2) 밝은 피부 혈색 및 날씬한 몸을 위해 디톡스 및 에너지 증강효과를 갖는 음료 조성물(등록, 출원번호 제10-2016-0084589호)으로는 연꽃, 산사나무, 히비스커스 및 인삼추출물을 포함-endotoxin 억제능, 체중 감소, 에너지 증가 효과가 검증된 바 있음. 3) 디톡스용 조성물(출원번호: 제10-2015-0081008호)은 해독용 조성물에 관한 것으로 녹차추출물, 인진쑥추출물, 돈나물추출물, 삼백초추출물, 아욱추출물 등으로 구성되는 것으로 체내의 항산화능과 지질의 과산화를 억제하여 독소의 생성 저감, 니코틴의 배출을 도와주는 것으로 보고되고 있음.
- 디톡스 활성을 촉진시키기 위한 건강 기능식품에 관한 내용으로, 니코틴과 내독성 등 체내 독성 물질을 효과적으로 체외 배출하는 특허가 2018년 2월에 보고됨(등록번호: 제10-1831109호). 내용물로는 생약 발효추출물로 해조 분말, 혼합 비타민 미네랄 분말, 클로렐라 분말, L-카르니틴 분말 및 가르시니아 캄보지아(*Garcinia cambogia*) 추출 분말을 구성 성분으로 진피, 광굴피, 작약, 오미자, 인진쑥, 적하수오, 생강, 황금, 당귀,

우슬, 백작약, 황금, 백출로 이루어져 있음. 또한 발효를 위해 통상의 효모를 사용한 것으로 보고되어 있음.

표 2. 디톡스·안티에이징 관련 특허 목록(2019년 6월 기준)

특허명	특허 출원 번호	특허 등록 번호	상태
디톡스 활성 촉진용 건강 기능 식품	제10-2017-0078814호	제10-1831109호	등록
혼합 유산균 스타터를 이용한 디톡스 활성 촉진용 과채 발효물 및 이의 이용	제10-2013-0164054호	-	거절
밝은 피부 혈색 및 날씬한 몸을 위해 디톡스 및 에너지 증강효과를 갖는 음료 조성물	제10-2016-0084589호	-	거절
디톡스용 조성물	제10-2015-0081008호	-	공개

(5) 표준화 현황

- 프로바이오틱스의 표준화는 포함된 유산균 수에 한정되어 있으며, 그 기능성은 기능성 소재로서 기능성 입증에 기초를 두고 있음.

제 3절 연구개발 범위

1. 주관연구기관: 리부트

가. 개발목표

- 프로바이오틱스 소재의 실용화기술 확보 및 제품화

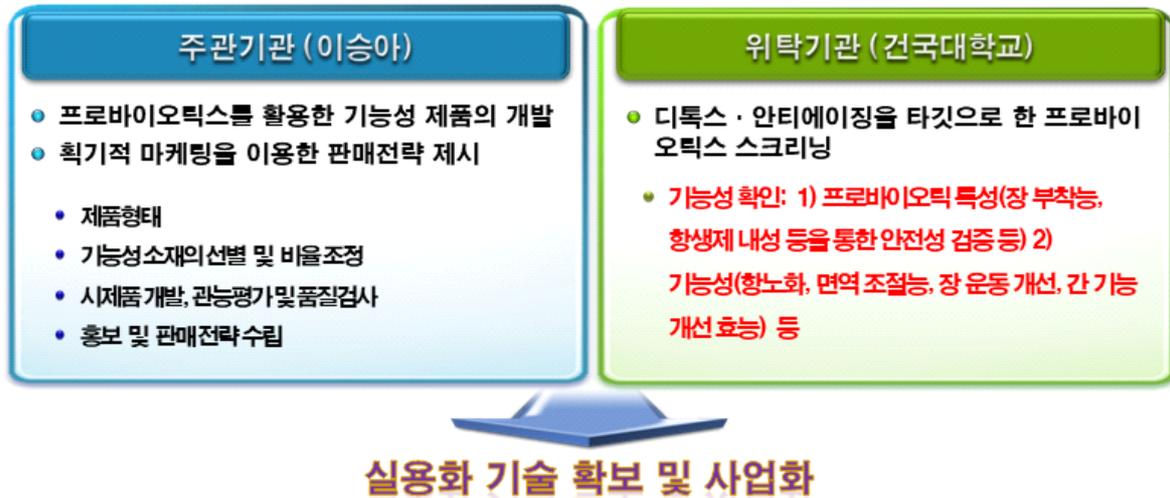
나. 개발내용 및 범위

- 프로바이오틱스를 활용한 기능성 시제품 개발
- 마케팅 기술을 적용한 판매전략 제시

2. 위탁연구기관: 건국대학교 산학협력단

가. 개발목표

디톡스·안티에이징을 타겟으로 한 프로바이오틱스소재의 실용화 기술 확보 및 제품화



- 프로바이오틱스 소재의 선별 및 기능성 평가

나. 개발내용 및 범위

- 프로바이오틱스 균주의 선정: *Weissella cibaria* D30와 *Lactobacillus brevis* KU15313 균주 중에서 1 균주 선정
- 디톡스·안티에이징 기능성 검증: 간세포를 이용한 간 기능 개선능, 항산화능, 장 환경 개선능 등

다. 주요 연구내용

(1) 프로바이오틱 특성 평가

- 균주의 배양 및 활성화: *W. cibaria* D30과 *L. brevis* KU15313을 이용함. 유산균은 lactobacilli MRS 배지(BD company, USA), 37°C에 배양하여 실험에 사용하였음. 이들 균주는 20% glycerol이 첨가된 상태로 -75°C에 보관하고 있으며, 2회 계대 배양하여 실험에 사용하였음.
- 내산성 및 내담즙성: 내산성은 인공위액(pH 2.5, 1% pepsin)을 제조하여 2시간 동안 배양시킨 후, 균수를 확인하였음. 내담즙성은 인공담즙액(0.3% oxgall)을 제조하여 24시간 동안 배양시킨 후, 균수를 확인하였음.
- 동물세포의 배양: 장 부착능 및 면역활성, 간세포에 끼치는 영향은 세포주를 통해 검증하였음. 세포주 배양 조건으로 각 배지에 10% heat inactivated FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여, 5% CO₂ incubator, 37°C에 배양하여 monolayer가

형성되어진 후 계대 배양하여 사용하였음.

표 3. 본 실험에 사용된 동물세포주

Cell line	Origin	Medium
HT-29	Colon	RPMI
HepG2	Liver	MEM
Raw 264.7	Macrophage	DMEM

- 장 부착능: 장세포인 HT-29 세포주를 이용하여 정착능을 검토함. Cell line을 24-well tissue plate에 10^5 cells/mL 정도 되게 접종하여 monolayer가 형성될 때까지 배양한 후 균주가 약 10^8 CFU/mL 정도 자라면 PBS로 washing 하였음. 이를 RPMI 배지에 현탁하여 HT-29 세포주에 균주를 접종하였으며, 시료를 처리한 세포주는 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 2시간 동안 배양하였음. 배양 후, PBS로 4회 washing 하고 부착된 프로바이오틱스 균주는 1 mL의 0.1% ice-cold Triton X-100에 회수하여 회석하고 도말하였음. 장 정착능은 아래의 식을 이용하여 계산하였음.

$$\text{Adherence (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{\text{cell number after 2 h}}{\text{cell number in inoculum}} \right) \right\} \times 100$$

(2) 간 기능 개선 기능성 평가

- HepG2 세포의 시료 처리: 세포배양: HepG2 세포를 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin을 포함하는 MEM 배지를 이용하여 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 100 mm culture dish에 90% 정도 confluence 될 때까지 배양하였음.
- * 유효물질 처리: HepG2 세포를 24-well plate에 3×10^5 cells/well로 분취한 후 24시간 배양하였음. 농도 별 유효물질을 처리 한 후 24 시간 더 배양하였음.
- 간 독성 유발 시 간 보호 기능: Fetal bovine serum(10%)과 penicillin G(100 unit/mL), streptomycin(100 µg/mL)을 포함하는 Modified Eagle's Medium(MEM) 배지로 HepG2 세포를 37°C, 5% CO₂ atmosphere의 조건에서 100 mm culture dish에 confluence(70-80%) 정도로 증식시켰음.
- 세포 간 독성(ethanol) 유도는 6 well plate에 7.8×10^6 의 세포 수로 분주하고, 24시간 배양하였음. 배양 후, FBS가 무첨가 된 MEM 배지로 바꿔 4시간 동안 배양하였음. 농도 별 후보물질 처리하여 1시간 후에 ethanol(100 mM)를 세포에 처리하여 12시간

동안 배양하였음.

- Post mitochondrial supernatant의 제조를 위해 6 well plate의 배양액 상등액을 제거하고, 66 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 3 mL를 가하여 세포 현탁액을 얻었음. 15초 간 균질화시킨 후, 원심분리(12,500×g, 15 min)하여 post mitochondrial supernatant를 얻었음.

(3) 항산화 평가

- Glutathione 측정법: Total glutathione의 측정은 post mitochondrial supernatant에 0.3 mM NADPH 700 μ L와 6 mM DTNB 100 μ L를 가한 후 약 5분 간 30°C water bath에 방치하였음. 50 units GSH reductase/mL 용액 10 μ L을 첨가한 후 약 3분 정도 실온에 방치한 후 412 nm에서 흡광도 증가를 측정하였음.
- 과산화지질(malondialdehyde) 측정법: Cell homogenate 500 μ L에 20 mol/L FeSO₄와 2 mmol/L의 cysteine을 넣어 37°C에서 30분 간 incubation한 후, 3,200×g에서 15분 간 원심분리하여 상등액을 회수하였음. 상등액과 0.6% thiobarbituric acid를 1:1로 혼합하여 100°C에서 15분 간 incubation 한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(4) *In vitro* 상에서 항염증 효능 검증

- SNP assay: Sodium nitroprusside(SNP)를 이용한 NO scavenging activity 측정 실험에서 항염 활성을 확인하였음. 495 μ L의 5 mM SNP와 여러 농도의 균주 혼합액 5 μ L를 잘 섞은 다음, 실온에서 2시간 30분 동안 반응시켰음. SNP에 의해 생성된 NO에 대한 균주의 효과는 Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in water)와 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였으며, 결과는 % inhibition으로 환산하여 표기하였음.
- RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) assay를 통한 gel electrophoresis와 real-time qPCR: RAW 264.7 세포주에 monolayer가 형성된 후, LPS(lipopolysaccharide)를 처리, 무처리군으로 나눠 처리하고, 균을 농도에 맞춰 첨가하였음. 대조군은 균 처리하지 않은 세포주로 하였음. 세포주는 2회 washing을 거친 후, RNA isolation kit를 사용하여 순수한 RNA를 얻어 실험에 사용하였음. RT-PCR 시약을 이용하여 cDNA로 전환시켜 PCR을 실시하였음. iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, IL-10 등의 프라이머를 이용하여 사이토카인의 발현 여부를 확인하였음.
- Real-time qPCR assay에서도 RT-PCR과 같이 합성된 cDNA를 주형 가닥으로 SYBR Green master mix (2 \times), 400 μ M primer, RNase free water와 혼합하여 총 부피 20 μ L로 하고 95°C 2분, 40 cycle을 95°C 30초, 60°C 30초 실행한 후, 마지막 신장 60°C 20초 조건으로 real-time qPCR을 진행하였음. Housekeeping gene으로 β -actin을

사용하며 이를 표준으로 하여 $\Delta\Delta Cq$ ($\Delta\Delta Cq$) 분석법을 통해 증폭결과를 구하고 상대적 정량을 실시하였고, qPCR reaction의 melting curve를 확인하여 증폭산물의 purity를 검증하였으며 상대적 정량 결과로 나타내었음.

표 4. 염증관련 프라이머 서열

Gene	Description	Primer sequence
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Sense: 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'
		Antisense: 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	Cyclooxygenase-2	Sense: 5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'
		Antisense: 5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'
IL-1 β	Interleukine-1 β	Sense: 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'
		Antisense: 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'
IL-6	Interleukine-6	Sense: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
		Antisense: 5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'
IL-10	Interleukine-10	Sense: 5'-TAAGGCTGGCCACACTTGAG-3'
		Antisense: 5'-AGTTTTTCAGGGATGAAGCGG-3'
β -Actin	Reference gene	Sense: 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'
		Antisense: 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'

제 2장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 프로바이오틱스 소재의 선별 및 기능성 평가

1. 프로바이오틱스 소재의 선별 및 기능성 평가

가. 계획수립 및 자료조사

- 프로바이오틱스의 특성 중 항암효과, 면역 조절능에 대한 연구가 집중되고 있음. 특히, 면역 조절능의 병원성 미생물에 대한 항균성 물질의 생산, 암세포에 대한 세포독성 등으로 밝혀지거나 사이토카인의 생산에 의해 간접적으로 영향을 주기도 함. 프로바이오틱스의 면역조절 활성화에 영향을 끼치는 인자로는 1) 프로바이오틱스의 종류, 2) 면역체계에 사용되는 프로바이오틱의 용량에 따른 효과, 3) 균의 형태 (생균 또는 사균), 4) 제공되는 형태(발효식품에서 면역활성이 높게 나타났음)로 알려져 있음.
- 프로바이오틱스와 관련된 원료로는 총 12건이 보고되고 있으며, 이들 중 디톡스 및 안티에이징과 관련된 원료로는 유산균발효마늘추출물(제2016-16호), 유산균발효다시마추출물(제2011-22호)의 2건이 보고되고 있음.
- 간 건강관련 2건의 원료는 프로바이오틱스 단일 균주가 아니라, 마늘, 다시마를 원료로 발효물에 해당됨. 프로바이오틱스 균주만으로 이루어진 디톡스·안티에이징 관련 원료는 보고되지 않았음.

표 5. 프로바이오틱 균주와 관련된 기능성 원료(2019년 6월 기준)

기능성 원료	기능성 내용	일일 섭취량
<i>L. rhamnosus</i> IDCC 열처리배양건조물	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능)	<i>L. rhamnosus</i> IDCC 열처리배양건조물로서 400 mg/일(열처리배양균체수로서 1×10^{10} cells)
<i>Lactobacillus</i> sp. 복합물 HY7601+KY1032	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음	<i>Lactobacillus</i> sp. 복합물 HY7601+KY1032로서 1×10^{10} CFU/일
<i>L. gasseri</i> BNR17	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능)	<i>L. gasseri</i> BNR17로서 1×10^{10} CFU/일
유산균발효마늘추출물	간 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	유산균발효마늘추출물로서 1.5 g/일
<i>L. plantarum</i> HY7714	피부 보습에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 1×10^{10} CFU/일

<i>L. plantarum</i> HY7714	자외선에 의한 피부손상으로 부터 피부 건강 유지에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 1×10^{10} CFU/일
UREX 프로바이오틱스	유산균 증식을 통한 여성 질 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 9.7 mg/일 (프로바이오틱스로서 10^9 CFU/일)
프로바이오틱스 ATP	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함(생리활성기능 3등급)	신청원료로서 2×10^9 CFU/일
<i>L. helveticus</i> 발효물	노화로 인해 저하된 인지력 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡(생리활성기능 3등급)	<i>L. helveticus</i> 발효물로서 1 g/일
<i>L. sakei</i> Probio65	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	<i>L. sakei</i> Probio65로서 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/일
프로바이오틱스(VSL#3)	유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활/장면역을 조절하여 장건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{12}$ CFU/일
과채유래 유산균 (<i>L. plantarum</i> CJLP133)	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	과채유래유산균 (<i>L. plantarum</i> CJLP133)로서 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/일
유산균발효다시마추출물	알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음/기억력 개선에 도움을 줄 수 있음	유산균발효다시마추출물로서 1.5 g/일
<i>E. faecalis</i> FK-23 효소 및 가열처리 분말(LFK)	꽃가루에 의해 나타나는 코막힘의 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	<i>E. faecalis</i> FK-23 효소 및 가열처리분말로서 1 g/일

나. 프로바이오틱스 특성 평가

(1) *W. cibaria* D30 균주의 프로바이오틱스 특성 평가

(가) 김치 유래 유산균 분리

- 유용 유산균을 확보하기 위하여 김치에서 유산균을 분리하였고 lactobacilli MRS agar 를 이용하여 배양하였으며, partial 16S rRNA 염기서열을 분석하여 균주를 동정하였음.

(나) 분리 유산균의 내산성·내담즙성 확인

- 프로바이오틱스 특성인 중 중요한 실험으로 구분되어지는 내산성, 내담즙성 및 장 부착능을 평가하였고, 김치에서 분리한 유산균 중에서 유용 균주 선별을 위한 스크리닝을 위하여 분리 균주에 대한 내산성, 내담즙성을 병행 확인하였음.
- 내산성 확인을 위한 실험방법은 다음과 같음. MRS broth에 분리 미생물을 16시간 이상 배양시킨 후 0.3% pepsin을 첨가하고 pH 2.5로 조정된 MRS broth 9 mL에 균 배양액 1 mL을 접종시킨 후 37°C에서 3시간 배양하여 배양 3시간 뒤의 균수를 비교하여 생존율을 측정하는 방법을 사용하였음.
- 내담즙성 확인을 위한 실험방법은 다음과 같음. MRS broth에 분리 미생물을 16시간 이상 배양시킨 후 0.3% Oxgall을 첨가한 MRS broth 9 mL에 균 배양액 1 mL을 접종시킨 후 37°C에서 24시간 배양하여 배양 24간 뒤의 균수를 비교하여 생존율을 측정하는 방법을 사용하였음.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Log } N_1 \text{ (CFU/mL)}}{\text{Log } N_0 \text{ (CFU/mL)}} \times 100$$

N_0 , total viable count of strains after treatment by simulated gastrointestinal juices.

N_1 , total viable count of stains before treatment.

- *W. cibaria* D30 균주의 내산성 실험결과 초기 균수에 비해 배양 후 균수가 0.95 Log CFU/mL 정도 감소하였지만 충분한 저항성을 나타내는 것으로 사료됨.
- 내 담즙성의 실험결과 초기 균수에 비해 배양 후 균수가 0.02 Log CFU/mL 정도 감소하였으며 비교 상용균주인 *Lactobacillus rhamnosus* GG와 비교하였을 시에 통계적으로 유의적 차이를 보이지 않았음.
- *W. cibaria* D30 균주의 경우에는 체내의 소화 환경에 대한 충분한 저항성을 갖고 있다고 판단되며, 따라서 장까지 균주가 전달된 후 정착하여 프로바이오틱스로서 활성을 나타낼 수 있을 것으로 사료됨.

표 6. *W. cibaria* D30 균주의 내산성 및 내담즙성

Treatment		Cell no. (Log CFU/mL)	
		<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>W. cibaria</i> D30
Tolerance to artificial gastric acid and bile salts	Initial cell no.	8.34±0.01 ^a	8.30±0.01
	0.3% (w/v) Pepsin, pH 2.5 after 2 h	8.29±0.03 ^a	7.35±0.02
	Survival rate (%)	99.40	88.55
	0.3% (w/v) Oxgall after 24 h	8.35±0.04 ^a	8.28±0.03
	Survival rate (%)	100.12	99.76

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in acid- and bile salt-tolerance compared to initial cell number ($p < 0.05$).

(다) 알코올 내성 평가

- MRS 액체배지에 균주를 접종하고 37°C에서 18시간 활성화한 후, 알코올(ethyl alcohol)을 첨가하고(5, 10, 20%) 37°C에서 2시간, 4시간 배양하여 초기 균수와 비교하였음.
- *W. cibaria* D30 균주의 경우 알코올(ethyl alcohol) 함량 5, 10, 20%에 대해 배양 2시간 후 각각 99.76±0.67, 95.14±1.09, 79.96±1.21%의 생존률을 보였으며 배양 4시간 후에는 96.85±1.06, 84.90±0.39, 74.79±0.59%의 생존률을 보였음.
- 알코올(ethyl alcohol) 함량과 배양시간에 관계없이 90% 이상의 생존률을 보인 *L. rhamnosus* GG와 달리 *W. cibaria* D30 균주의 알코올에 대한 내성은 비교적 약한 것으로 나타났지만, 70% 이상의 생존률을 통해 장 내에서 프로바이오틱 활성을 충분히 나타낼 것이라 사료됨.

표 7. Ethyl alcohol에 대한 *W. cibaria* D30 균주의 내성

Strains	Incubation time (h)	Viable cells (Log CFU/mL)/ Alcohol concentration (%)		
		5	10	20
<i>L. rhamnosus</i> GG	0	9.41±0.03 ^b	9.32±0.05 ^b	9.45±0.06 ^c
	2	9.41±0.01 ^b	9.30±0.03 ^b	8.56±0.01 ^b
	4	9.32±0.04 ^a	9.08±0.10 ^a	8.39±0.02 ^a
<i>W. cibaria</i> D30	0	8.90±0.03 ^a	8.97±0.06 ^c	8.95±0.05 ^c
	2	8.88±0.06 ^a	8.53±0.10 ^b	6.89±0.10 ^b
	4	8.62±0.09 ^b	7.61±0.04 ^a	6.44±0.05 ^a

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in survived viable cells of each strains compared to initial cell number during incubation ($p<0.05$).

(라) 장 부착능 평가

- 건강 기능성 식품 종균으로서 가장 큰 특징으로 정장작용을 꼽을 수 있으며, 효소 생산능 실험에서 인체에 유해한 효소를 생산하지 않는 김치 유래 분리 균주에 대해 대장암세포(HT-29)를 이용한 장 부착능을 측정하였음.
- 장 부착능 실험방법은 다음과 같음. 24 well plate에 대장암세포(HT-29)를 1×10^5 cells/well로 깔아 놓은 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양시켰음. 미리 MRS broth에 접종시킨 균액을 원심분리기(14,260×g, 10분)를 이용하여 균체를 회수한 후 항생제가 첨가되지 않은 RPMI 배지를 넣어 희석하였음. 미리 배양시킨 대장암세포(HT-29)에 접종시켜 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한 후, 배양 상등액을 제거하고 PBS buffer로 3번 washing 후 1% Triton X-100 용액을 10분 간 처리한 뒤 상등액을 회수하고 희석·도말하여 부착 균수를 측정한 후 부착 전 균수와 부착 균수를 비교하여 장 부착능을 측정하였음.
- 장 부착능을 측정하는 식은 다음과 같음.

$$\text{Cell adhesion (\%)} = \frac{V_1}{V_0} \times 100$$

V_0 , initial viable bacterial count tested.

V_1 , viable bacterial count obtained from the HT-29 cells after 2 h.

- *L. rhamnosus* GG 경우에는 장 부착능 활성이 17.83±5.75 %로 8.26 Log CFU/mL로 접종하였을 때, 7.58 Log CFU/mL의 균수가 부착되었음을 확인하였음.
- *W. cibaria* D30 경우에는 장 부착능 활성이 37.63±4.96%로 균주를 8.09 Log CFU/mL로 접종하였을 때 7.65 Log CFU/mL의 균수가 부착됨을 확인하였음.
- 장 부착 활성의 경우 *W. cibaria* D30 균주가 통계적으로 유의적인 결과를 보였음.

표 8. *W. cibaria* D30 균주의 장 부착능 평가

Treatment	Cell no. (Log CFU/mL)	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>W. cibaria</i> D30
Initial cell no.	8.26±0.03	8.09±0.09
Adhesion to HT-29 cell		
Adhesion cell no. after 2 h	7.58±0.08	7.65±0.06
Adhesion rate (%)	17.83±5.75 ^a	37.63±4.96 ^b

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same row indicate statistical differences in adhesion ability between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30 against human intestinal epithelial cell line, HT-29 ($p < 0.05$).

(마) 효소 생산능 평가

- 김치 유래 분리 균주를 MRS broth에서 37°C 배양기에서 16시간 배양하였으며 원심분리를 이용하여 균 상등액을 제거한 후 균체를 수집한 후 10⁶ CFU/mL로 희석하고 API zym kit에 각각 65 µL씩 접종하였음. 37°C에서 4시간 반응시킨 후 Zym A, Zym B 시약을 순서대로 떨어뜨린 뒤 10분 간 반응 후의 색깔 변화를 통해 측정하였음.
- API zym kit의 색깔 변화를 통하여 사람에게 유해한 효소인 β-glucuronidase 생성 여부를 확인하였음. *W. cibaria* D30 균주는 발암 유해 효소로 알려진 β-glucuronidase를 생산하지 않는 것을 확인하였음.
- 유용 효소 중 하나인 β-glucosidase의 활성이 높은 것으로 확인되었으며 유용 물질의 생물 전환을 기대할 수 있을 것으로 사료됨.

표 9. *W. cibaria* D30 균주의 효소 생산능 평가

Enzymes	Enzyme activity ¹⁾	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>W. cibaria</i> D30
Control	-	-
Alkaline phosphate	+	+
Esterase	+	+
Esterase lipase	+	+
Lipase	+	-
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	+	+
Cystine arylamidase	+	+
Trypsin	-	-
α -Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
α -Galactosidase	+	-
β -Galactosidase	+	+
β -Glucuronidase	-	-
α -Glucosidase	+	-
β -Glucosidase	+	+
N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	-
α -Mannosidase	-	-
α -Fucosidase	+	+

¹⁾ +, positive; -, negative.

(마) 용혈성 평가

- Sheep blood를 5% 첨가한 Columbia agar 배지에 *W. cibaria* D30 균주를 희선도말하여 용혈여부를 판단함. 생성된 콜로니 주위에 clear zone의 생성 여부와 형태에 따라서 α -용혈, β -용혈, 및 γ -용혈로 판단하였음.
- Hemolysin의 생성에 의해 β 형 용혈 현상을 일으켜 blood agar 상에서 투명환이 생성된 *Vibro parahaemolyticus*와 달리 *W. cibaria* D30 균주의 경우, γ 형으로으로써 유의적인 용혈을 일으키지 않음을 확인하였음.

(A)



(B)

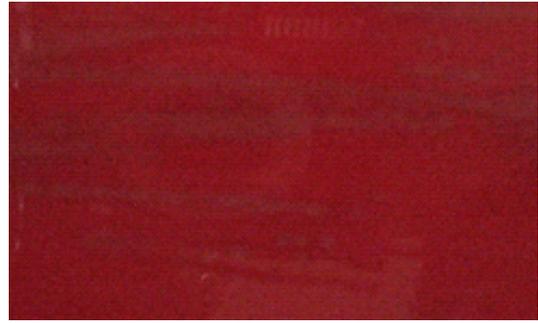


그림 4. Sheep blood agar를 이용한 *W. cibaria* D30 균주의 hemolysin 활성평가.

(A) *V. parahaemolyticus*, (B) *W. cibaria* D30.

(아) 항생제 저항성 측정 평가

- 항생제 저항성은 저항 유전자의 전이라는 측면에서 문제가 생길 수 있는 부분으로 이 또한 중요하게 판단되는 실험으로 장 부착능 실험에서 장 부착능에 우수한 김치 유래 분리 균주 4주에 대해 paper disc를 이용한 항생제 저항성을 측정하였음.
- 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(14,260×g, 15분)를 이용하여 균체를 회수한 후 10^5 CFU/mL로 희석한 후 고체배지에 도말을 하였음. 위에 미리 멸균시킨 paper disc를 올려놓은 뒤 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) 기준에 사용되는 항생제(ampicillin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol, doxycycline)를 이용하여 50 μ L씩 접종시킨 후 37°C에서 24시간 배양 후에 inhibition zone의 크기에 따라 항생제 저항성 정도를 판별하여 측정하였음.
- 항생제 저항성 정도를 판별하는 기준은 다음과 같음.

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria ($\mu\text{g/mL}$)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
A	Ampicillin	10 μg	≥ 17	14-16	≤ 13	≤ 8	16	≥ 32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See comment (2).
B	Piperacillin	100 μg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 16	32-64	≥ 128	
O	Mecillinam	10 μg	≥ 15	12-14	≤ 11	≤ 8	16	≥ 32	(5) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only.
β-LACTAMIB-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
B	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 μg	≥ 18	14-17	≤ 13	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 μg	≥ 15	12-14	≤ 11	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 μg	≥ 21	18-20	≤ 17	$\leq 16/4$	32/4-64/4	$\geq 128/4$	
B	Ticarcillin-clavulanate	75/10 μg	≥ 20	15-19	≤ 14	$\leq 16/2$	32/2-64/2	$\geq 128/2$	
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
(6) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., first- and second-generation cephalosporins and cephamycins may appear active <i>in vitro</i> , but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.									
(7) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised interpretive criteria for cephalosporins (cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftioxcime, and ceftioxcime) and aztreonam were first published in January 2010 (M100-S20) and are listed in this table. Cefazolin interpretive criteria were revised again in June 2010 and are listed below. Cefepime and cefturoxime (parenteral) were also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required for the dosages indicated below. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (i.e., it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins from susceptible to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in Table 2A Supplemental Table 1.									
Note that interpretive criteria for drugs with limited availability in many countries (e.g., moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone) were not evaluated. If considering use of these drugs for <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , or <i>Proteus</i> spp., ESBL testing should be performed (see Table 2A Supplemental Table 1). If isolates test ESBL positive, the results for moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone should be reported as resistant.									
(8) <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , and <i>Serratia</i> may develop resistance during prolonged therapy with third-generation cephalosporins as a result of derepression of AmpC β -lactamase. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.									
A	Cefazolin	30 μg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 2	4	≥ 8	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h. See comment (7).
U	Cephalothin	30 μg	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	(10) Cephalothin interpretive criteria can be used only to predict results to the oral agents, cefadroxil, cefbutoxime, cephalexin, and loracarbef. Older data that suggest that cephalothin results could predict susceptibility to some other cephalosporins may still be correct, but there are no recent data to confirm this.

그림 5. 장내 미생물에 대한 항생제 저항성 기준(CLSI, 2014).

- CLSI antibiotic breakpoint의 경우, *Weissella* spp. 에 대한 기준이 아직 정립되지 않아 주요 유산균이 속하는 *Lactobacillus* sp. 기준에 준해 평가하였음.
- 항생제에 대한 *W. cibaria* D30 균주의 감수성은 *L. rhamnosus* GG와 비슷한 양상을 보였으나, 생성된 투명환의 지름이 조금씩 작은 경향을 보임. 이는 *Weissella* spp.가 기준의 다른 유산균들에 비해 항생제 저항성이 비교적 높다는 연구 보고와 일치하였음 (Abriouel et al., Front. Microbiol., 6: 1197, 2015).

(자) 항균 활성 평가

- 균주가 장에 부착하여 병원균의 colonization을 막거나 항균의 기능성은 장내 총 균수 조절이라는 측면에서 프로바이오틱스가 갖춰야 할 조건으로 알려져 있음 (FAO/WHO, 2002).
- MRS broth에 김치 유래 유산균을 12시간 이상 배양시킨 후 MRS agar plate에 균 배양액 3 μL 를 떨어뜨린 후 37°C에서 24시간 배양하였음. 병원성 균주들을 TS broth에서 16시간 이상 배양한 후, 배양시킨 병원성균을 0.75% soft agar를 만들어 배양시켜 두었던 MRS agar plate에 부어준 뒤 37°C에서 24시간 동안 배양하였음. Inhibition zone의 크기에 따라 항균 활성의 정도를 판별하여 측정하였음.

표 10. Deferred antagonism method를 이용한 *W. cibaria* D30 균주의 병원성 세균 생육 억제 활성 평가

Pathogenic strains	Antimicrobial activity (mm) ^A	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>W. cibaria</i> D30
<i>Micrococcus flavus</i> KCCM 10240	38.0±0.52 ^b	34.5±0.82 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 32395	24.5±1.25 ^a	24.5±10.8 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> 1573	22.5±2.45 ^a	23.5±2.45 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	24.0±0.45 ^a	25.0±0.94 ^b
<i>Bacillus cereus</i> KCCM 29544	12.0±0.85 ^a	11.5±0.94 ^a
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 5124	17.5±0.25 ^a	18.5±1.25 ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21.0±0.84 ^a	22.5±0.94 ^b
<i>Escherichia coli</i>	20.0±1.05 ^a	20.5±0.84 ^a
<i>Salmonella</i> Typhimurium	19.0±0.55 ^a	21.5±0.45 ^b
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	21.0±0.85 ^a	23.0±0.54 ^b
<i>Campylobacter jejuni</i>	21.5±0.94 ^a	22.0±0.84 ^a
<i>Campylobacter coli</i>	18.0±0.85 ^a	21.0±0.94 ^b
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 11965	19.0±0.45 ^a	18.5±0.95 ^a

^AAntimicrobial activity was determined by measuring the diameter of clear zone.

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different letters represent statistical significance in comparison of antimicrobial activity between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30.

- *W. cibaria* D30 균주의 주요 병원성 세균의 생육 억제 활성은 deferred antagonism method를 이용하여 확인하였음.
- *B. cereus*에 대한 생육 억제 활성은 다른 병원성 세균들에 비해 상대적으로 약한 것을 확인하였으며 *B. cereus*를 제외하고는 그람 양성균, 그람 음성균을 구분하지 않고 병원성 세균에 대한 넓은 생육 억제 활성을 보였으며 *L. rhamnosus* GG 균주에 비교하여 비슷하거나 유의적으로 높은 활성을 나타내었음.

(차) 자가 응집성과 장 병원성 세균과의 공동 응집성 평가

- 배양한 균주를 원심분리를 통해서 균체를 회수하고, PBS로 세 번 세척 한 후 PBS에 재현탁하여 600 nm에서의 흡광도를 0.30 ± 0.01 로 조정하였음. 37°C에서 4시간, 24시간 배양하여 각각 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 자가 응집성 (auto-aggregation)을 평가하였음.

$$\text{Auto-aggregation (\%)} = (1 - A_2/A_1) \times 100$$

A_1 , the absorbance at initial time.

A_2 , the absorbance at a specific incubation time.

- 공동 응집성(co-aggregation)은 흡광도를 각각의 장 병원성 세균과 *W. cibaria* D30 균주의 현탁액을 동량 혼합한 후, 37°C에서 배양하였음. 4시간, 24시간 후 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 공동 응집성을 평가하였음.

$$\text{Co-aggregation (\%)} = [1 - A_1/\{(A_2 + A_3)/2\}] \times 100$$

A_1 , the absorbance of mixed strains (pathogens + LAB).

A_2 , the absorbance of pathogens.

A_3 , the absorbance of LAB.

- W. cibaria* D30 균주의 자가 응집성 및 주요 병원성 세균에 대한 공동 응집성을 측정하였음.
- W. cibaria* D30 균주의 자가 응집성의 경우, 4시간 배양 후, *L. rhamnosus* GG에 비해 다소 낮은 활성을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았음.
- 24시간 배양 후에는 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적으로 높은 자가 응집성을 보였으며, 장 부착 활성과 우수한 자가 응집성 활성으로 미루어 *W. cibaria* D30 균주는 장내에서 colonization을 통해 효과적으로 장 부착을 할 것으로 사료됨.
- W. cibaria* D30 균주의 주요 장 병원성 세균에 대한 공동 응집성의 경우, *L. monocytogenes* ATCC 15313 균주에 대해서는 *L. rhamnosus* GG와 비교하여 다소 낮은 공동 응집성을 보였음.
- S. aureus* KCCM 32395, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 25922에 대해서

는 *L. rhamnosus* GG와 비교하여 비슷하거나 유의적으로 높은 공동 응집성을 나타냄. 병원성 세균의 생육 억제 활성과 높은 공동-응집성으로 미루어 *W. cibaria* D30 균주는 주요 장 병원성 세균들의 장 환경 내 colonization을 저해할 수 있을 것이라 사료 됨.

표 11. *W. cibaria* D30 균주의 자가 응집성

Strains	Auto-aggregation (%)	
	A _{4 h}	A _{24 h}
<i>L. rhamnosus</i> GG	24.84±2.21 ^b	59.55±1.13 ^a
<i>W. cibaria</i> D30	22.95±1.54 ^a	66.25±1.10 ^b

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in comparing auto-aggregation ability between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30 ($p<0.05$).

표 12. 주요 장 병원성 세균에 대한 *W. cibaria* D30 균주의 공동 응집성

Pathogenic strains	Incubation time (h)	Co-aggregation ability (%)	
		<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>W. cibaria</i> D30
<i>S. aureus</i> KCCM 32395	4	22.23±1.36 ^a	23.10±1.15 ^a
	24	58.34±1.36 ^a	58.58±1.61 ^a
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	4	27.25±2.44 ^b	18.81±1.49 ^a
	24	61.19±1.73 ^b	58.93±1.16 ^a
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	4	16.66±0.56 ^a	19.18±1.08 ^b
	24	35.84±1.82 ^a	40.69±1.51
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	18.02±2.35 ^a	18.31±2.26 ^a
	24	52.70±2.18 ^a	56.16±1.76 ^b

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same row indicate statistical differences in comparing co-aggregation ability between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30 ($p<0.05$).

(카) 장 병원성 세균에 대한 장 부작 저해능 측정 평가

- 2×10^5 cells/well의 농도로 접종한 HT-29 cell이 mono-layer를 형성할 때까지 배양하고 병원성 세균과 *W. cibaria* D30 균주를 각각 10^7 CFU/mL의 농도로 동량 접종한 뒤 37°C에서 2시간 동안 배양하였음. 배양 후 PBS로 세 번 세척하여, HT-29 cell에 부착되지 않은 균을 제거한 뒤 1%의 Triton X-100 용액으로 부착된 cell을 떼어낸 후 각각의 병원성 세균에 해당하는 선택배지를 이용해 균수를 측정하였음.

표 13. *W. cibaria* D30 균주의 주요 장 병원성 세균에 대한 장 부착 억제 활성

Pathogenic strains	LAB strains	Cell number (CFU/mL)		Anti-adhesion activity (%) ³⁾
		N ₀ ¹⁾	N ₂ ²⁾	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	<i>L. rhamnosus</i> GG	9.0×10^6	5.4×10^6	40.00±4.80 ^a
	<i>W. cibaria</i> D30		3.7×10^6	59.02±9.23 ^b
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>L. rhamnosus</i> GG	4.5×10^6	2.4×10^6	47.41±9.99 ^a
	<i>W. cibaria</i> D30		1.9×10^6	56.76±10.84 ^b
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. rhamnosus</i> GG	7.3×10^6	4.4×10^6	39.70±8.47 ^a
	<i>W. cibaria</i> D30		3.5×10^6	52.27±9.07 ^b

¹⁾Initial cell number; ²⁾Cell number after 2 h of incubation; ³⁾ Anti-adhesion activity was determined by comparison of adhesive entero-pathogenic strains and initial inoculated cell number.

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters represent statistical differences in comparison of anti-adhesion activity between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30 against each entero-pathogenic strains.

- 주요 장 병원성 세균에 대한 *W. cibaria* D30 균주의 장 부착 억제 활성은 HT-29 세포주를 이용해 확인하였음. *W. cibaria* D30 균주는 *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli*의 장 부착을 유의적으로 억제하였으며, *L. rhamnosus* GG 균주에 비교하여 통계적으로 유의적인 활성을 나타냄.

(카) 유기산 활성 평가

- 유기산 분석은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하였으며 방법은 다음과 같음. MRS broth에 *W. cibaria*를 12시간 이상 배양시킨 후, 원심분리기 (14,260×g, 10분)를 이용하여 상등액을 회수하며, 회수한 상등액을 0.45 μm 멤브레인

필터를 이용하여 여과하여 이 샘플을 HPLC에 주입하여 분석하였음.

- HPLC 실험조건은 다음과 같음.
 - Column: Hypersil GOLD aQ column(4.6 mm×150 mm, 5 μm)
 - Solvent: 50 mM potassium phosphate buffer(pH 2.8)
 - Detector UV detector: 210 nm
 - Column temperature: 25°C
- HPLC를 이용하여 유기산(formic acid, lactic acid, acetic acid propionic acid, butyric acid)을 분석하였음.

표 14. *W. cibaria* D30 균주의 생육에 따른 MRS 배지에서의 유기산 생성

Strains	Organic acid (g/L)			
	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Pyroglutamic acid
<i>L. rhamnosus</i> GG	22.89±3.54 ^b	0.41±3.11 ^a	0.13±2.12	0.08±4.85 ^a
<i>W. cibaria</i> D30	13.08±2.45 ^a	1.08±2.45 ^b	N.D. ¹⁾	0.11±2.34 ^b

¹⁾N.D., Not detected.

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in same column indicate statistical significance in comparison of production of each organic acids between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30.

- *W. cibaria* D30 균주의 생육에 따른 유기산 생산능을 HPLC를 이용하여 검증하였음. *W. cibaria* D30 균주는 *L. rhamnosus* GG와 달리 citric acid를 생산하지 않았으며, lactic acid와 acetic acid를 각각 13.08±2.45 g/L, 1.08±2.45 g/L 생성하였으며 비교적 약한 산 생성능을 보였음. 이들 장내의 유기산 생성 정도에 따라 장 환경의 변화에 영향을 끼칠 수 있는 것으로 보고되고 있음.
- *W. cibaria* D30 균주는 체내에서 독성 물질 또는 산화적 스트레스에 대해 항산화 작용에 있어 중요한 역할을 하는 GSH(glutathione)의 중간 대사물질로써 작용하거나 항균활성을 나타내는 pramanicin의 전구체로써 작용하는 pyroglutamic acid를 생성하였으며 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적인 생산능을 나타내었음.

(타) *W. cibaria* D30 균주의 항산화 평가

- 균주의 항산화 평가를 다양한 작용기작에 맞춰 검증하였음. 다음의 항산화 평가를 위해 *W. cibaria* D30 균주를 MRS 액체배지에서 24시간 배양하고 원심분리기를 이용하여 균체를 회수한 후, PBS 세척 후에 최종적으로 PBS에 재현탁하여 사용하였음.

① DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능

- DPPH 라디칼 소거능은 100 μ M로 제조한 DPPH 용액 1 mL과 균주 현탁액 200 μ L를 혼합한 뒤 실온의 암소에서 20분 간 반응시켰음. 517 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 능을 평가하였음.
- 다음의 식을 이용함.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

A_s , the absorbance of the samples.

A_c , the absorbance of the distilled water with DPPH solution.

② ABTS⁺(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 라디칼 소거능

- ABTS⁺ 라디칼 소거능은 동량의 7.4 mM의 ABTS 시약과 2.6 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 24시간 반응시킨 후, 732 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.01 이 되도록 물로 희석한 뒤 1 mL을 취하여 균주 현탁액 100 μ L과 혼합하였음. 실온의 암소에서 20분 간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 능을 평가하였음
- 다음의 식을 이용함.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

A_s , the absorbance of the samples.

A_c , the absorbance of the distilled water with ABTS⁺ solution.

③ Hydroxyl 라디칼 소거능

- Hydroxyl 라디칼 소거능은 pH 7.4의 potassium phosphate buffer에 ferric chloride, EDTA, deoxyribose, ascorbic acid, hydrogen peroxide를 각각 0.1 mM, 0.1 mM, 2.8 mM, 1 mM, 20 mM의 농도로 용해시키고, 1 mL을 취해 동량의 균주 현탁액과 혼합하였음. 37°C에서 90분 간 반응시킨 뒤, 60 mM TCA(trichloroacetic acid) 1 mL과 200 mM의 TBA 0.3 mL을 첨가하여 15분 간 끓여서 반응시켰으며 상온으로 식힌 뒤, 532 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화능을 평가하였음.

- 다음의 식을 이용함.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

A_s , the absorbance of the samples.

A_c , the absorbance of the distilled water with reaction solution.

④ Superoxide anion 라디칼 소거능

- Superoxide anion 소거능은 pH 7.4의 potassium phosphate buffer에 NBT(nitroblue tetrazolium)과 NADH(nicotinamide adenine dinucleotide)를 각각 78 μM 과 468 μM 로 제조하고 1 mL씩을 취해 균주 현탁액과 혼합하였음. 60 μM 의 PMS(phenazine methosulphate)를 0.4 mL 첨가하여 상온에서 5분 간 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 능을 평가하였음.
- 다음의 식을 이용함.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

A_s , the absorbance of the samples.

A_c , the absorbance of the distilled water with reaction solution.

⑤ 지방 산화 억제능

- Chloroform 10 mL에 β -carotene, linoleic acid 및 Tween 80을 각각 2 mg, 44 μL , 200 μL 첨가하여 혼합하고 50°C에서 감압 농축한 후, 증류수 100 mL을 첨가하여 용해하였음. 제조한 β -carotene 수용액 4.5 mL을 취해 0.5 mL의 균주 현탁액과 혼합하고 50°C에서 반응시키면서 2시간 간격으로 470 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 다음의 식을 이용함.

$$\beta\text{-Carotene bleaching inhibition activity (\%)} = [A_s/A_I] \times 100$$

A_s , the absorbance of the samples.

A_I , the absorbance of the D.W. mixed with β -carotene-linoleic acid solution.

⑥ *W. cibaria* D30 균주의 항산화 활성 결과

- *W. cibaria* D30 균주의 항산화 효과를 다양한 라디칼에 대해 검증함. *W. cibaria* D30

균주는 유리라디칼 모델인 DPPH, ABTS⁺에서 각각 22.06±0.56%, 61.63±1.10%의 라디칼 소거능을 보였으며 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적인 소거능을 나타내었음.

- 산화라디칼 모델인 hydroxyl 라디칼과 Superoxide anion의 경우, 각각 70.28±2.31%, 68.51±1.99%의 소거능을 나타냄. Hydroxyl 라디칼의 경우에만 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적인 소거능을 나타내었음.
- 지방산 산화 모델인 β-carotene 표백 억제능의 경우, *W. cibaria* D30 균주는 51.98±0.47%의 표백 억제 활성을 보였으며 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적으로 효과적인 억제 활성을 나타내었음. *W. cibaria* D30 균주는 독성 물질, 스트레스 및 대사 과정에서 발생하는 다양한 라디칼이나 산화 물질들의 소거를 통해 항산화 작용을 할 수 있을 것으로 사료됨.

표 15. *W. cibaria* D30 균주의 항산화 활성

Antioxidant assays	Antioxidant activity (%)	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>W. cibaria</i> D30
DPPH radical scavenging activity	19.28±0.20 ^a	22.06±0.56 ^b
ABTS ⁺ radical scavenging activity	45.79±0.20 ^a	61.63±1.10 ^b
Hydroxyl radical scavenging activity	66.04±1.16 ^a	70.28±2.31 ^b
Super oxide anion scavenging activity	86.08±0.22 ^b	68.51±1.99 ^a
β-Carotene bleaching assays	28.63±0.50 ^a	51.98±0.47 ^b

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in same row indicate statistical significance in comparison of each antioxidant activities between *L. rhamnosus* GG and *W. cibaria* D30.

(파) 면역 조절능 검증

- 균주의 면역증진 활성은 쥐의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 확인하였음.
- MRS 액체배지에서 배양한 *W. cibaria* D30의 균체를 원심분리기를 이용하여 회수하고 85°C에서 30분 간 열처리하여 사균화함. PBS로 3회 세척한 후, DMEM(Dulbecco's Modified Essential Medium) 배지에 1×10⁶, 1×10⁷ CFU/mL의 농도로 각각 현탁하여 이용하였음.

① Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성

- RAW 264.7 세포주를 96-well plate에 2×10^5 cells/well의 농도로 접종하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양함. 2시간 후, 1×10^6 , 1×10^7 CFU/mL 농도로 현탁한 사균화 *W. cibaria* D30 균주를 처리하고 2시간 배양한 후, 내독소인 LPS를 1 µg/mL의 농도로 처리하여 염증을 유도한 뒤 24시간 배양함.
- LPS로 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS로 염증 반응을 유도하였을 경우, *W. cibaria* D30 균주의 처리에 따른 NO의 생성 억제 활성을 Griess reagent를 이용하여 검증하였음.
- LPS의 처리는 RAW 264.7 세포에 대하여 유의적으로 NO의 발현을 유도하였으며 *W. cibaria* D30 및 *L. rhamnosus* GG의 처리는 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였음. *W. cibaria* D30 균주는 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적인 NO 생성 억제능을 나타냈으며 그람 음성의 병원성 세균의 내독소에 의한 염증 반응의 과발현을 완화시킬 수 있을 것이라 사료됨.

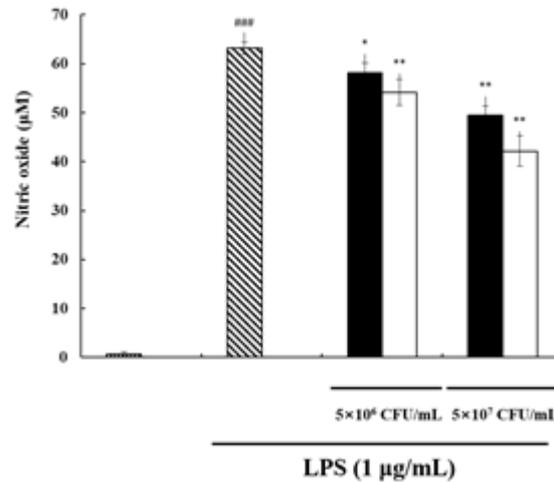


그림 6. *W. cibaria* D30 균주의 LPS 유도 대식세포주 RAW 264.7 cell에 대한 NO 생성 억제능. ▨, LPS negative; ▩, LPS positive; ■, *L. rhamnosus* GG; □, *W. cibaria* D30.

② 염증매개물질 생성 억제 활성

- RAW 264.7 세포주를 6-well plate에 5×10^5 cells/well의 농도로 접종하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양함. 1×10^6 , 1×10^7 CFU/mL 농도로 현탁한 사균화 *W. cibaria* D30 균주를 처리하고 2시간 배양한 후, 내독소인 LPS를 1 µg/mL의 농도로 처리하여 염증을 유도한 뒤 24시간 배양함. LPS의 염증 유도에 대한 염증 매개 물질들의 생성 억제 활성은 RT-PCR을 이용하여 검증하였음.
- LPS로 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS로 염증 반응을 유도하였을 경우, *W. cibaria* D30 균주의 처리에 따른 염증 반응 매개물질들의 생성을 조절하는 주요 인자들의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 이용하여 검증하였음. LPS의 처리 시, iNOS,

COX-2를 비롯한 염증 반응 매개 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, 및 TNF- α 의 발현이 유의적으로 유도된 반면 *W. cibaria* D30 균주의 처리는 iNOS, COX-2, 및 염증 반응 매개 사이토카인들의 mRNA 발현을 유의적으로 억제하였으며 동일한 처리 농도에서 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적인 억제 활성을 나타내었음.

- 따라서 LPS와 같은 내독소에 의한 염증 발현 시, 염증 매개 효소 및 사이토카인의 발현을 억제함으로써, NO, PGE2와 같은 염증 대사산물의 생성을 억제하여 염증성 질환 및 독소 축적을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 사료됨.

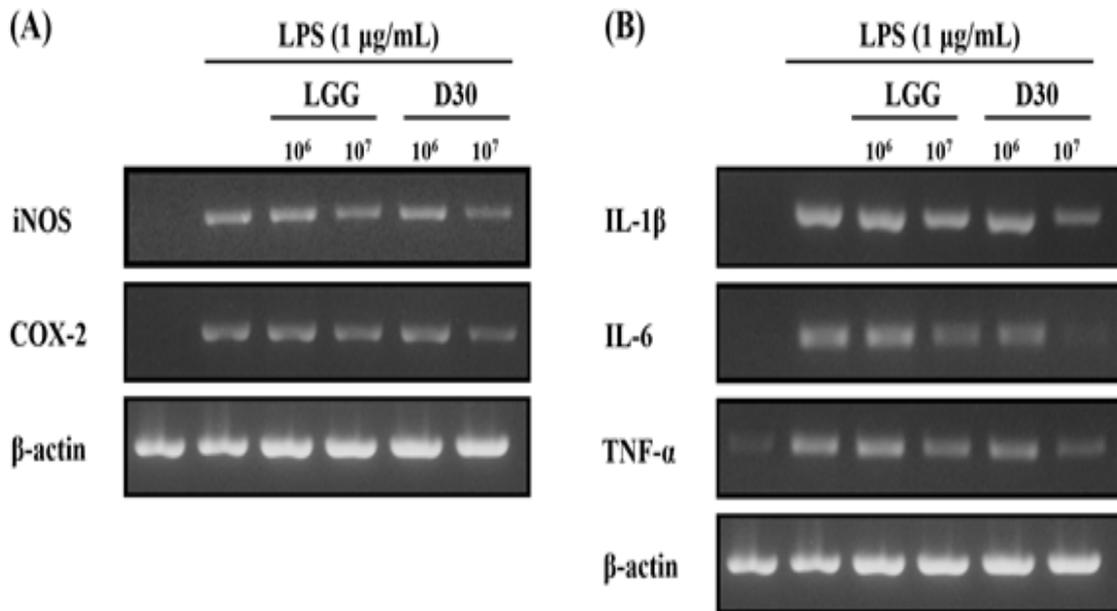


그림 7. LPS 유도 대식세포주 RAW 264.7에 대한 *W. cibaria* D30 균주의 염증매개물질 mRNA 생성 억제능 (A) 염증매개효소, iNOS 및 COX-2; (B) 염증매개 사이토카인, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α (LGG, *L. rhamnosus* GG; D30, *W. cibaria* D30).

(2) *L. brevis* KU15153 균주의 프로바이오틱스 특성 평가

(가) 김치 유래 유산균 분리

- 유용 유산균을 확보를 위해 전통발효식품인 김치에서 유산균을 분리하였으며 lactobacilli MRS agar를 이용하여 배양한 뒤, partial 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하였음.

(나) 분리 유산균의 내산성·내담즙성 확인

- 프로바이오틱스 특성 중 중요한 실험으로 구분되어지는 내산성, 내담즙성 및 장 부착

능을 평가하였음.

- *L. brevis* KU15153 균주의 내산성 실험결과 초기 균수에 비해 배양 후 균수가 0.15 Log CFU/mL 정도 감소하였으며 충분한 저항성을 나타내는 것으로 사료됨.
- 내 담즙성의 실험결과 초기 균수에 비해 배양 후 균수가 0.65 Log CFU/mL 정도 증가하는 결과를 확인하였음.
- *L. brevis* KU15153 균주의 경우에는 체내의 소화 환경에 대한 충분한 저항성을 갖고 있다고 판단되며, 따라서 장까지 균주가 전달된 후 정착하여 프로바이오틱스로서 활성을 나타낼 수 있을 것으로 사료됨.

표 16. *L. brevis* KU15153 균주의 내산성 및 내담즙성

Treatment		Cell no. (Log CFU/mL)	
		<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. brevis</i> KU15153
	Initial cell no.	8.76±0.06 ^b	8.30±0.02 ^b
Tolerance to artificial gastric acid and bile salts	0.3% (w/v) Pepsin, pH 2.5 after 2 h	8.48±0.03 ^c	8.15±0.10 ^c
	Survival rate (%)	96.80	98.19
	Initial cell no.	8.76±0.06 ^b	8.30±0.02 ^b
	0.3% (w/v) Oxgall after 24 h	9.04±0.03 ^a	8.95±0.02 ^a
	Survival rate (%)	103.19	107.83

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in acid- and bile salt-tolerance compared to initial cell number ($p < 0.05$).

(다) 장 부착능 평가

- *L. rhamnosus* GG 경우에는 8.77 Log CFU/mL로 접종하였을 때, 7.51 Log CFU/mL의 균수가 부착되었음을 확인하였음. *L. brevis* KU15153 경우에는 7.94 Log CFU/mL로 접종하였을 때 6.89 Log CFU/mL의 균수가 부착됨을 확인하였음.
- 장 부착 활성의 경우 *L. brevis* KU15153 균주가 상업용 균주인 *L. rhamnosus* GG 균주의 장 부착능 보다도 좋은 효과를 확인할 수 있었음.

표 17. *L. brevis* KU15153 균주의 장 부착능 평가

Treatment	Cell no. (Log CFU/mL)	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. brevis</i> KU15153
Initial cell no.	8.77±0.04 ^a	7.94±0.01 ^a
Adhesion to HT-29 cell		
Adhesion cell no. after 2 h	7.51±0.14 ^b	6.89±0.06 ^b
Adhesion rate (%)	85.63%	86.77%

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in adhesion ability between *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KU15153 against human intestinal epithelial cell line, HT-29 ($p<0.05$).

(라) 효소 생산능 평가

- API zym kit의 색깔 변화를 통하여 사람에게 유해 효소인 β -glucuronidase 생성 여부를 확인하였음. *L. brevis* KU15153 균주는 발암 유해 효소로 알려진 β -glucuronidase를 생산하지 않는 것을 확인하였음.
- 유용 효소 중 하나인 β -galactosidase의 활성이 높은 것으로 확인되었으며 소화 기능에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

표 18. *L. brevis* KU15153 균주의 효소 생산능 평가

Enzymes	Enzyme activity ¹⁾	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. brevis</i> KU15153
Control	-	-
Alkaline phosphate	+	-
Esterase	+	+
Esterase lipase	+	-
Lipase	+	-
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	+	+
Cystine arylamidase	+	-
Trypsin	-	-
α -Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
α -Galactosidase	+	-
β -Galactosidase	+	+
β -Glucuronidase	-	-
α -Glucosidase	+	-
β -Glucosidase	+	+
N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	-
α -Mannosidase	-	-
α -Fucosidase	+	-

¹⁾ +, positive; -, negative.

(마) 용혈성 평가

- Hemolysin의 생성에 의해 β 형 용혈 현상을 일으켜 blood agar 상에서 투명환이 생성된 *V. parahaemolyticus*와 달리 *L. brevis* KU15153 균주의 경우, γ 형으로 용혈을 일으키지 않음을 확인하였음.

(A)



(B)

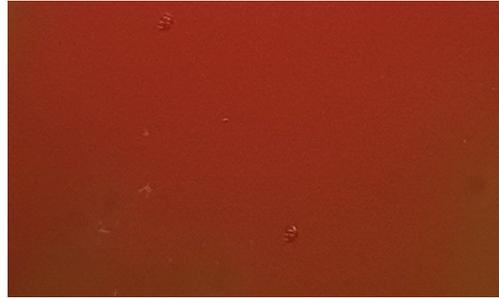


그림 8. Sheep blood agar를 이용한 *L. brevis* KU15153 균주의 hemolysin 활성평가.

(A) *V. parahaemolyticus*; (B) *L. brevis* KU15153.

(바) 항생제 저항성 측정 평가

- CLSI 기준에 따라 항생제 저항성을 평가하였으며, 항생제에 대한 *L. brevis* KU15153 균주는 8개의 항생제 중에서 스트렙토마이신과 시프로플록사신에만 저항성이 있는 것으로 확인됨. 다음의 결과로 저항성 유전자의 전이 우려는 없는 것으로 확인됨.

표 19. *L. brevis* KU15153 균주의 항생제 저항성

Strain	A ^a	G	K	ST	TE	CI	CH	D
<i>L. brevis</i> KU15153	S ^b	S	S	R	S	R	S	S

^aA, ampicillin; G, gentamicin; K, kanamycin; ST, streptomycin; TE, tetracycline; CI, ciprofloxacin; CH, chloramphenicol; D, doxycycline.

^bS, susceptible; I, intermediate; R, resistance.

(사) 항균 활성 평가

- *L. brevis* KU15153 균주의 주요 병원성 세균의 생육 억제 활성은 deferred antagonism method를 이용하여 확인하였음.
- 모든 식중독 원인균에 대한 항균효과를 확인할 수 있었음. 특히 *S. aureus* KCCM 11335 균주에 대해서 가장 큰 clear zone을 확인하였음.
- *S. Typhimurium* P99, *L. monocytogenes* ATCC 15313과 *Escherichia coli* ATCC 25922는 비슷한 항균력을 확인하였음.

표 20. Deferred antagonism method를 이용한 *L. brevis* KU15153 균주의 병원성 세균 생육 억제 활성 평가

Pathogenic strains	Antimicrobial activity (mm) ^A	
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. brevis</i> KU15153
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18.6±4.73 ^a	13.00±2.00 ^c
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	22.33±0.58 ^a	14.67±1.15 ^b
<i>S. Typhimurium</i> P99	3.00±0.00 ^b	16.67±2.89 ^{ab}
<i>S. aureus</i> KCCM 11335	22.33±8.69 ^a	18.00±3.00 ^a

^AAntimicrobial activity was determined by measuring the diameter of clear zone.

All values are presented as mea±S.D. from triplicate of independent experiments. Different letters represent statistical significance in comparison of antimicrobial activity between *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KU15153.

(아) 자가 응집성과 장 병원성 세균과의 공동 응집성 평가

- *L. brevis* KU15153를 원심분리를 통해서 균체를 회수하고, PBS로 세 번 세척한 후 자가 응집성 및 공동 응집성을 평가하였음.
- *L. brevis* KU15153 균주의 자가 응집성의 경우, 4시간 배양 후, *L. rhamnosus* GG에 비해 다소 낮은 활성을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않음.
- 24시간 배양 후에는 *L. rhamnosus* GG에 비교하여 유의적으로 높은 자가 응집성을 보였으며, 장 부착 활성과 우수한 자가 응집성 활성으로 미루어 *L. brevis* KU15153 균주는 장내에서 colonization을 통해 효과적으로 장 부착을 할 것으로 사료됨.
- *L. brevis* KU15153 균주의 주요 장 병원성 세균에 대한 공동 응집성의 경우, *L. rhamnosus* GG와 비교하여 다소 낮은 공동 응집성을 보이나 전반적으로 비슷하거나 유의적으로 높은 공동 응집성을 나타냄. 병원성 세균의 생육 억제 활성과 높은 공동 응집성으로 미루어 *L. brevis* KU15153 균주는 주요 장 병원성 세균들의 장 환경 내 colonization을 저해할 수 있을 것이라 사료됨.

표 21. *L. brevis* KU15153 균주의 자가 응집성

Strains	Auto-aggregation (%)	
	A _{4 h}	A _{24 h}
<i>L. rhamnosus</i> GG	22.68±4.84 ^a	44.70±3.81 ^b
<i>L. brevis</i> KU15153	22.41±5.55 ^b	52.55±5.54 ^a

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in comparing auto-aggregation ability between *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KU15153 ($p<0.05$).

표 22. 주요 장 병원성 세균에 대한 *L. brevis* KU15153 균주의 공동 응집성

Pathogenic strains	Incubation time (h)	Co-aggregation ability (%)	
		<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. brevis</i> KU15153
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	4	39.06±1.44 ^b	36.76±2.60 ^c
	24	48.82±2.46 ^c	44.95±1.84 ^b
<i>S. Typhimurium</i> P99	4	43.69±2.60 ^a	41.60±1.66 ^b
	24	61.39±1.46 ^a	45.39±2.10 ^a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	43.38±1.83 ^a	45.20±3.04 ^a
	24	60.05±1.45 ^a	57.00±1.37 ^a
<i>S. aureus</i> KCCM 11335	4	35.28±2.37 ^c	33.93±1.89 ^c
	24	54.92±1.95 ^b	52.52±1.24 ^b

All values are expressed as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in the same column indicate statistical differences in comparing co-aggregation ability between *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KU15153 ($p<0.05$).

(자) 장 병원성 세균에 대한 장 부착 저해능 측정 평가

- HT-29 세포주에 병원성 세균과 *L. brevis* KU15153 균주를 이용하여 장 병원성 세균에 대한 장 부착 저해능을 평가하였음.

- 주요 장 병원성 세균에 대한 *L. brevis* KU15153 균주의 장 부착 억제 활성은 HT-29 세포주를 이용해 확인하였음.
- *L. brevis* KU15153 균주는 *L. monocytogenes* ATCC 15313, *S. Typhimurium* P99, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* KCCM 11335에서 균수가 감소함. 특히 *S. Typhimurium* P99와 *L. brevis* KU15153 동시 배양 시 0.95 log CFU/mL 정도로 가장 크게 감소하였음. 따라서 *L. brevis* KU15153 균주는 장내 살모넬라균이 원인이 되어 발병할 수 있는 질병의 예방에 도움을 줄 것으로 확인하였음.

표 23. *L. brevis* KU15153 균주의 주요 장 병원성 세균에 대한 장 부착 억제 활성

Pathogenic strains	Adherent cell no. (Log CFU/mL)	
	Pathogen	Pathogen with <i>L. brevis</i> KU15153
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7.49±0.84 ^a	6.90±0.09 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	5.17±0.17 ^c	5.05±0.14 ^c
<i>Salmonella</i> Typhimurium P99	5.70±0.11 ^c	4.75±0.26 ^d
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11335	6.99±0.02 ^b	6.50±0.01 ^b

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters represent statistical differences in comparison of anti-adhesion activity against pathogenic strains.

(차) 유기산 및 단쇄지방산 활성 평가

- *L. brevis* KU15153를 MRS broth에 배양하여 HPLC를 이용하여 유기산(formic acid, lactic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid)을 분석하였음.
- 유기산 분석 결과 *L. brevis* KU15153은 발효 시 유기산 및 단쇄지방산의 함량이 높게 분석됨. 특히 formic acid와 lactic acid의 양이 상업용 균주인 *L. rhamnosus* GG보다 월등하게 높게 분석됨. 면역 및 장 건강 활성에 좋은 butyric acid 또한 상업용 균주인 *L. rhamnosus* GG보다 높게 분석됨. 따라서 *L. brevis* KU15153은 장 건강을 돕는 유산균으로서 활용가치가 높다고 판단됨.

표 24. *L. brevis* KU15153 균주의 생육에 따른 MRS 배지에서의 유기산 생성

Strains	Organic acid (mg/kg)				
	Formic acid	Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
<i>L. rhamnosus</i> GG	1319.29 ±75.06 ^b	10026.64 ±264.66 ^b	743.66 ±98.88 ^b	2001.57 ±201.61 ^a	126.73 ±98.92 ^b
<i>L. brevis</i> KU15153	1846.78± 118.74 ^a	11077.75 ±259.62 ^a	960.18 ±79.04 ^a	143.01 ±11.44 ^b	576.48 ±84.77 ^a

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in same column indicate statistical significance in comparison of production of each organic acids between *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KU15153.

- 장내 pH를 조절하여 장 환경을 개선하는 데 반드시 유기산이 필요하다고 알려져 있음. 여러 가지 유기산 중에서 특히 분자 구조상 탄소가 6개 미만인 것을 단쇄지방산이라고 총칭하는데 단쇄지방산은 난소화성 올리고당을 장내세균이 분해해서 만들어내는 대사산물로 지방의 축적을 억제하고 면역작용에 도움을 주며 최근 항암작용에도 도움을 준다고 보고되고 있음.
- *L. brevis* KU15153 균주는 formic acid와 lactic acid는 *L. rhamnosus* GG 균주보다 많은 양을 분비한 것으로 확인하였고(1,846.78 mg/kg, 11,077.75 mg/kg), 중요한 단쇄지방산의 일종인 acetic acid와 butyric acid는 *L. rhamnosus* GG 균주보다 확연하게 많이 분비한 것을 확인한 것을 알 수 있었으며 특히 butyric acid는 4배 정도 많이 분비한 것을 확인하였음(960.18 mg/kg, 576.48 mg/kg). 이를 통하여 정상작용을 증대하여 장 환경 개선을 통하여 독소 감소 개선에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 사료됨.

(타) 프로바이오틱 균주의 항산화 평가

- DPPH 자유 라디칼 소거능과 β-carotene bleaching assay를 통한 지방 산화 억제능 항산화 평가를 확인하였음. DPPH 자유라디칼 소거능에서는 *L. brevis* KU15153 균주에서는 44.14%를 확인하였고 β-carotene bleaching assay에서는 71.62%로 높은 항산화 능을 보였음.
- *L. brevis* KU15153 균주의 두 가지 항산화능은 상용균주인 *L. rhamnosus* GG 균주보다 모두 높은 항산화능을 확인하였음. 따라서 높은 항산화능을 갖고 있는 *L. brevis* KU15153 균주는 노화 방지 및 독소 제거 및 예방에 도움이 될 것으로 사료됨.

표 25. *L. brevis* KU15153 균주의 항산화 활성

Strains	Antioxidant activity (%)	
	DPPH radical scavenging activity	β -Carotene bleaching inhibitory activity
<i>L. rhamnosus</i> GG	19.21±2.92 ^a	64.25±6.27 ^a
<i>L. brevis</i> KU15153	44.14±0.23 ^b	71.62±6.87 ^a

All values are presented as mean±S.D. from triplicate of independent experiments. Different superscript letters in same column indicate statistical significance in comparison of each antioxidant activities between *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KU15153.

2. 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화

가. BM 수립 배경

- 건강한 디톡스 및 안티에이징을 위해 효율적인 영양섭취에 관심을 갖고 칼슘과 과일 등의 섭취를 늘려 비타민과 무기질을 충분히 섭취하고자 하지만 적절한 영양을 섭취하지는 못하는 실정임.
- 디톡스 및 다이어트의 부작용을 최소화하고 효과를 극대화하는 새로운 타입의 안전한 먹거리 제공하고자 함.
- 건강한 디톡스와 항노화 효과를 통해, 외적 아름다움뿐만 아닌 건강까지 지킴으로서 전반적 삶의 질을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되며 장기적으로 모든 연령층에게 이너뷰티의 중요함에 대한 인식을 키워 줄 수 있을 것임.

나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- 현재 수입제품에 의존된 디톡스 및 다이어트를 위한 특성화 식품을 개발 및 유통하여 국내뿐만 아니라 중국, 베트남, 싱가포르 등 수출을 통한 수익의 극대화를 목표로 하고 있음.
- 이너뷰티, 특히 디톡스 및 다이어트 관련 '전자상거래+커뮤니티' 추세의 발전으로 콘텐츠와 상품을 겸비한 플랫폼들이 형성될 것으로 전망임.
- 종전에는 디톡스 및 다이어트에 대한 정보를 교환하는 커뮤니티와 전자상거래 플랫폼이 분리됐으나, 향후 전자상거래 플랫폼에 정보교환, 온라인 서비스 제공 등 다양한 기능을 겸비한 일체화된 플랫폼 조성이 확대될 전망임.
- 모바일 온라인 사용 범위의 확대에 따라 향후 온라인 이너뷰티 시장은 높은 성장률을 지속할 전망임.

- 정보교류 활성화에 따라서 사용자들은 제품에 대한 평가와 신뢰도에 더욱 많은 관심을 가지게 하며 향후 온라인 커뮤니티는 사용자들의 플랫폼 충성도, 수요도, 재구매율을 제고하는 중요한 요소로 자리 잡을 것임.

(2) 핵심경쟁요인

- **시장의 틈새 공략:** 기존의 획일화 되어있는 식품군에서 디톡스 및 다이어트, 항노화를 위한 균형적인 영양을 공급하여 부작용을 최소화하고 효과를 극대화하는 새로운 먹거리를 제공함.
- **연구진의 전문화:** 기존 고객층은 식품안전을 크게 고려해 유명 브랜드 또는 수입제품을 선호하는 것으로 나타났음. 이는 어느 회사에서 누가 개발에 참여했느냐가 제품 선택 시 크게 작용하는 것을 반영하는 것임.
- **제품의 세분화:** 디톡스 및 항노화를 위한 기능성 식품의 경우 체형 및 연령에 따라 제품을 더 세분화할 필요가 있으며 이에 따른 적절한 영양 성분을 연구하여 개발할 예정임.
- **인증:** 디톡스 및 항노화 제품의 고객층은 트렌드와 안전성에 매우 민감하므로 객관적으로 이를 검증할 수 있는 ‘인증’을 통해 고객 안심을 확보하고 수출을 위한 필수인증 외에 신뢰도를 확보할 수 있는 해외 안전 인증 등의 자격을 취득하여 유통할 예정임.
- **특허출원:** 새로운 디톡스 및 안티에이징을 위한 고부가가치 제품 개발 및 기능성을 평가한 신제품에 대한 특허를 출원/등록함으로써 산업재산권을 확보함.

다. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

- 디톡스·안티에이징과 관련한 제품으로는 주로 천연물인 레몬, 클로렐라, 라임, 프로바이오틱스 등이 이용되고 있음. 이들의 경우 주로 장운동 개선, 간 기능 개선 등에 집중되어 있음. 간 기능 개선과 관련한 사례는 (주)한국야쿠르트의 ‘헛개나무 쿠퍼스’로 간 기능 개선으로 제품이 출시되어 있음.
- 국내 프로바이오틱스 관련 기업으로는 (주)셀바이오텍, (주)일동제약, (주)한국야쿠르트, (주)CJ제일제당 등이 있음.
- 해외 프로바이오틱스 관련 기업으로는 다니스코, 크리스찬한센, 띄레망로셀, 모리나가,

일본 야쿠르트 등이 있음.

(2) 시장진입 장벽

- 특수용도식품이라 함은 영·유아, 병약자, 노약자, 비만자 또는 임신·수유부 등 특별한 영양관리가 필요한 특정 대상을 위하여 식품과 영양성분을 배합하는 등의 방법으로 제조·가공한 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류 조제식, 기타 영·유아식, 특수의료용도 등 식품, 체중조절용 조제 식품, 임신·수유부용 식품을 말함.
- 특수용도식품에 관한 제한은 제품의 유형에 따라 달라지며 제품의 종류와 기능에 따라 특수용도식품의 규제제한 부분이 다르게 적용되어 차후 진행되는 제품의 종류와 성향에 따른 변경적용 예정임.

(3) 주요 고객군

- 다양한 고객층, 특히 30~40대 고객층의 기능성 식품에 대한 인식의 업그레이드 현상. 소비자들의 소득 증가에 따른 구매력 증가로 건강, 특히 이너뷰티를 위해 많은 비용을 투자하고 있으며, 이와 동시에 건강한 먹거리에 대한 관심도 증가하고 있음.
- 소비자들은 기능성 식품 구매 시 식품안전에 더 신중한 소비행동을 보이고, 고급 수입제품 및 전문 제품을 더 선호하는 경향이 나타나며 트렌드에 많은 영향을 받음.
- 새로운 형태의 식품을 제안하여 디톡스 및 항노화를 위한 기능성 제품의 우위를 선점함.

(4) BM의 수익창출 방안

- 백화점, 대형마트, 병원, 전문매장, 온라인 판매점이 주요 판매 경로임.
- 최초 개발 시 제품의 라벨, 비타민 및 칼슘 함량 준수, 미생물 함량 등 수출에 방해 요소를 사전에 차단하여 전 세계 수출 제품을 기본으로 개발할 예정임.
- 국내산 차별화 제품 진출 기대함.
- 현재 디톡스 관련 기능성 식품시장의 경우 한국 브랜드의 중국을 비롯한 동남아 진출이 미미한 상황임.
- ‘프리미엄’, ‘프로바이오틱스’, ‘친환경’을 키워드로 내세워 디톡스 및 다이어트 제품을 개발. 또한, 식품안전에 대한 관심이 높은 소비자 니즈를 반영해 브랜드의 신뢰도를 높여 소비자들에게 마케팅 할 예정임.
- 이너뷰티 시장은 생명주기가 짧은 특성을 가지고 있으나, 각종 관련 플랫폼과 연계, 커뮤니티 및 디톡스, 안티에이징과 관련된 다양한 서비스 상품 개발을 통해 고객층을 넓힐 수 있음.

- 온라인 커뮤니티를 통해 관련 정보와 지식 등을 얻는 비중이 확대되고 있으며, 고객 간 정보교류를 통해 제품 선택이 이루어지는 경우가 많으므로 시장과 관련된 각종 플랫폼들을 통한 제품 노출이 효과적인 홍보방법이 될 것임.
- 본 제품의 경우, 웰빙, 양질의 소비 트렌드를 겨냥한 프리미엄 컨셉의 제품으로 기존의 프로바이오틱스 및 디톡스·안티에이징 제품들에 비해 가격이 높은 편임. 이에 재구매 할인 적용, 2+1, 지인 추천, 적립금 등과 같은 마케팅 전략을 통해 가격적인 약점을 극복할 계획임.
- 앞서 형성된 시장에 대한 진입 장벽을 낮추고, 상기 제품의 시장 점유율의 가속 및 확대를 위하여 기존에 구축된 인프라를 이용하여 국내외 유명한 피트니스 센터, 문화 센터 등에 입점시킴으로써 제품의 인지도를 높일 계획임.
- 또한, REBORN의 온라인 플랫폼 및 오프라인 센터를 통하여 제품의 꾸준한 재구매 및 새로운 소비자들을 흡수하게 될 예정임.

라. 시제품 개발

- 본 과제로 개발된 *W. cibaria* D30 유산균을 활용하여 다음과 같이 시제품을 제조하였음.

(1) 제품명

- 리부트 클렌즈 유산균

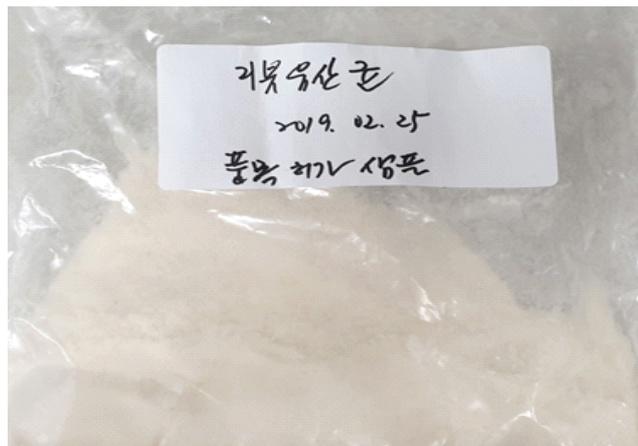


그림 9. 유산균 시제품

(가) 사용 유산균 및 주재료

- 본 과제를 통해 개발된 *W. cibaria* D30을 이용하여 리부트에서 프리바이오틱스로서 쌀 발효 추출물, 프락토올리고당, 갈락토올리고당 및 치커리 식이섬유와 해독작용에

탁월하다고 알려져 있는 양배추, 바나나, 브로콜리 새싹 및 당근의 과채 추출 분말을 첨가하여 제조하였음.

(나) 포장 형태

- 포장은 폴리에틸렌(PE)을 사용하여 충전하였으며 1 포당 2,000 mg으로 포장되어 있음.

(다) 제품의 특징

- 쌀 발효 추출물과 프리바이오틱스 성분을 이용하여 장 연동 운동 개선 및 장내균총 개선의 이중 기능성 효과를 기대할 수 있음.
- 독소 제거에 탁월하다고 알려진 해독주스의 원료인 양배추, 바나나, 브로콜리 새싹 및 당근은 장 청소를 통한 이너 클렌징과 더불어 부족해진 과채 영양소의 보충 효과를 기대할 수 있음.
- 합성 감미료, 합성 향료, 합성 착색료, 식물성 크림 분유, 스테아린산 마그네슘, 이산화규소 및 HPMC의 무첨가 제품으로 임산부와 아이들도 안전하게 섭취할 수 있음.
- 항산화 기능을 통해 독성 물질의 축적을 막고 산화적 스트레스로 인해 생성된 활성산소의 감소를 기대할 수 있음.
- 파우더 타입으로 물 없이 간편하게 섭취가 가능함.
- 1포씩 포장되어 휴대성이 용이함.

(라) 원재료명 및 함량

- 프랑스산 유산균 14종(*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus fermentum*), *Weissella cibaria* D30, 김치유산균 추출 분말, 쌀 발효 추출물, 프락토올리고당, 갈락토올리고당, 자일리톨, 말토덱스트린, 치커리식이섬유, 무수결정포도당, 양배추추출물분말, 당근농축분말, 바나나농축분말, 브로콜리새싹추출분말, 그릭요구르트분말.

(마) 영양·기능정보

표 26. 시제품의 1일 섭취량(1포/2,000 mg)

1일 섭취량	합량	영양성분 기준치
열량	8 kcal	-
탄수화물	2 g	1%
단백질	0	0%
지방	0	0%
나트륨	2 mg	0%
프로바이오틱스 수	3,000,000,000 CFU	

*영양성분 기준치는 1일 영양성분 기준치에 대한 비율임.

마. 시제품의 기능성 검증

(1) 식품공전 시험법 (유산균수 측정)

- 유산균수 측정방법은 MRS 배지를 사용하여 유산균의 집락을 계수함. 시험용액 제조 희석액은 멸균생리식염수 또는 펩톤식염완충액을 사용하였음. 검사시료 10~25 g에 9배 희석액을 가하여 100~250 mL가 되게 하고 균질화하였음. 시험용액 1 mL에 희석액을 가하여 10 mL가 되게 하고 10⁻² 시험용액을 만든 후 동일하게 조작하여 희석하였음.
- MRS 배지는 일반세균수의 표준평판법에 준하여 시험하고, BL 한천배지는 각 희석 시험용액 0.1 mL씩을 BL 한천배지 2매 이상에 접종하여 멸균초자봉으로 도말하였음. 시료가 접종된 페트리디쉬는 35~37°C에서 48~72±3시간 혐기배양(발효유류의 경우 호기 배양 가능) 하였음. 배양 후 생성된 집락수를 측정하고 희석배수를 곱하여 검사시료 g 당 균수를 산출하였음.
- 시제품 리부트 클렌즈 유산균에서 10.09 Log CFU/mL 유산균수를 확인하였음.

(2) 식품공전 시험법(일반세균수 측정)

- 시료 1 mg/mL과 10배 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균적으로 취하여 43~45°C로 유지한 TSA배지 약 15 mL를 무균적으로 분주하고 페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하고, 좌우로 회전하면서 검체와 배지를 잘 혼합하여 응고시켰음. 확산집락의 발생을 억제하기 위하여 다시 표준한천배지 3~5 mL를 가하여 중첩시켰음. 응고시킨 페트리접시를 거꾸로 하여 35~37°C에서 24~48시간 배양한 후, 집락수를 측정하여 일반세균수를 측정하였음
- 시제품 리부트 클렌즈 유산균에서 9.73 Log CFU/mL 일반세균수를 확인하였음.

(3) 식품공전 시험법(병원성 식중독균)

- *E. coli* O157:H7의 검출 여부를 확인하기 위하여 시료 25 g을 취하여 225 mL의 mEC 배지에 가한 후 35~37°C에서 24시간 동안 증균 배양시켰음. 증균 배양액을 MacConkey sorbitol 한천배지에 접종하여 35~37°C에서 18시간 배양한 후, sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB 한천배지에 접종하여 35~37°C에서 24시간 배양하고 녹색의 급속성 광택이 확인된 집락을 확인시험을 실시하였음.
- *S. aureus*의 검출 여부를 확인하기 위하여 시료 25 g을 취하여 225 mL의 10% NaCl을 첨가한 TSB 배지에 가한 후 35~37°C에서 18~24시간 동안 증균 배양시켰음. 증균 배양액을 Baird-Parker 한천배지에 접종하여 35~37°C에서 18~24시간 배양한 후, 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검정색 집락을 선별하여 확인시험을 실시하였음.
- *Salmonella* spp.의 검출 여부를 확인하기 위하여 시료 25 g을 취하여 225 mL의 펩톤수에 가한 후 35~37°C에서 24시간 동안 증균 배양시켰음. 증균 배양액을 XLD 한천배지에 접종하여 35~37°C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 선별하여 확인시험을 실시하였음.
- *Listeria* spp.의 검출 여부를 확인하기 위하여 시료 25 g을 취하여 225 mL의 *Listeria* 증균배지를 가한 후 30°C에서 48시간 증균 배양시켰음. 증균 배양액을 Oxford 한천배지에 접종하여 30°C에서 24~48시간 배양한 후 집락을 선별하여 확인시험을 실시하였음.
- 시제품 리부트 클렌즈 유산균에서 병원성 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella* spp., 및 *Listeria* spp.가 검출되지 않음을 확인하였음.

(4) 시제품의 항산화 평가

- 시제품 리부트 클렌즈 유산균 제품의 항산화 평가를 시험한 결과 DPPH radical scavenging activity와 ABTS⁺ radical scavenging activity에서 시제품의 1 mg/mL당 86.03% 와 90.57%의 높은 항산화 효과를 확인할 수 있었음.
- 따라서 시제품 리부트 클렌즈 유산균 제품은 디톡스·안티에이징에 뛰어난 효과를 보이는 제품이라고 할 수 있었음.

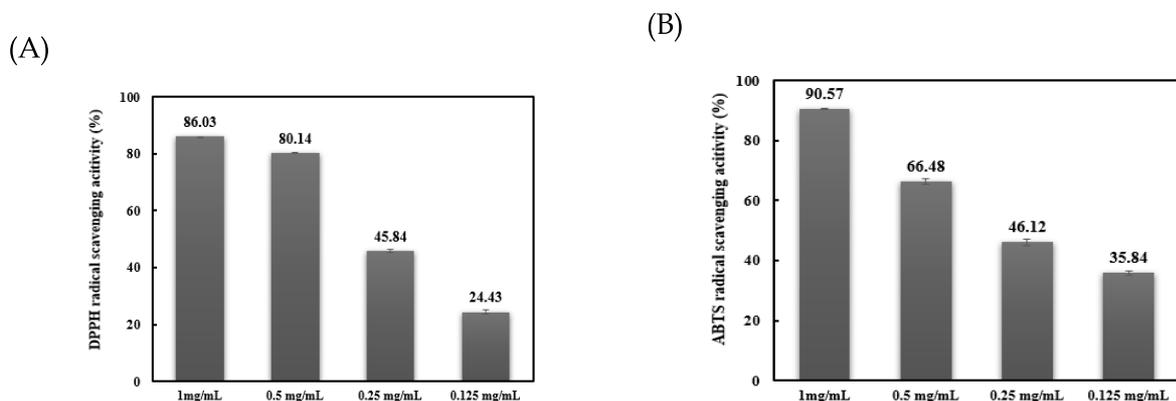


그림 11. 시제품의 항산화 효과

(A) DPPH radical scavenging activity, (B) ABTS⁺ radical scavenging activity.

제 2절 시제품의 기술적·경제적 성과

1. 기술적 성과

- *W. cibaria* D30는 균주 자체만으로 디톡스, 항산화효능이 있는 균주이기 때문에 프로바이오틱스 성분과 기능성 성분을 따로 첨가하는 타제품들과는 차별성이 있음.
- 김치유산균 제품 중 (주)CJ제일제당(BYO 생 멀티유산균), (주)정관장(알파프로젝트 장건강)에는 면역기능이 포함된 성분을 첨가하거나 기능성분 자체가 포함 되지 않음. 하지만 리부트 제품은 균 자체 내에 항산화와 디톡스 기능이 포함된 균주이기 때문에 내구성에서 차별성이 있음.
- 기존 디톡스 제품은 단지 독소배출에만 집중된 제품이라면 당사 제품은 근본적인 장내 독소 및 숙변을 배출을 시켜주면서 간으로 유입되었던 독소를 청소해 주는 이중 기능성의 유산균 제품임.

2. 경제적 성과

- 개발균주를 활용하여 ‘리부트 클렌즈 유산균’ 출시하였음.
- 출시 전 1명의 고용창출로 업무의 효율을 높임.
- (주)아람 OEM 제조방식으로 제품을 생산함.
- 가장 관심이 높은 다이어트 시장에 디톡스 유산균으로서 다이어트식품과 함께 섭취했을 때 장내 환경을 개선시키고 디톡스 작용으로 안정성과 차별성 두가지 시너지 효과를 기대할 수 있음.

3. 논문게재 성과

- Hye Ji Jang, Na-Kyoung Lee, Hyun-Dong Paik. (2019). Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. Food Sci. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00576-x>.

4. 특허성과

- 특허명: 신규 락토바실러스 브레비스 균주 및 이의 용도 (Novel strain of *Lactobacillus brevis* and use thereof), 출원연도: 2019년, 출원인: 건국대학교 산학협력단, 출원번호: 제 10-2019-0040637호.

5. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0원	
			향후 3년간 매출	3.8억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0원	
			향후 3년간 매출	3.8억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 15% 국외 : 0%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 15 % 국외 : 0%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

6. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년			
	소요예산(백만원)	88,423,060원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		없음	3.8억원	5억원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	없음		
국외		없음			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	고령층을 위한 장 건강 및 디톡스 관련 제품 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	없음			
	수 출	없음			

제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1절 목표 달성도

1. 연구개발 목표 달성도

연구개발의 목표	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
□ 주관연구기관 (리부트, 이승아) 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화	시제품 제작	100	분리 균주 및 소재 선정을 통하여 시제품 제작
	판매전략 수립	100	OEM 생산을 통한 제품 생산 등의 판매 전략 수립
□ 위탁연구기관 (건국대학교, 백현 동) 프로바이오틱스 소재의 선별 및 기 능성 평가	계획수립 및 자료조사	100	선행연구 및 문헌조사를 통하여 연구 계획 수립
	프로바이오틱스 특성 평가	100	유산균 선별
		100	분리 유산균의 내산성·내담즙성 확인
		100	분리 유산균의 효소 생산능 확인
		100	분리 유산균의 장정착능 평가
		100	분리 유산균의 효소 생산능 평가
		100	분리 유산균의 항생제 저항성 확인
	간 기능 개선	100	간 독성 유발 시 간 보호 기능 확인
항산화 평가	100	유산균의 항산화 평가	

제 2절 목표 달성 여부

1. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	지식재산권			논문		학술 발표	기술 거래	보고서	시제품	산업화	인력양성	교육지도	기타
	출원	등록	품종 등록	SCI	비SCI								
최종 목표	1					1	1		1				
연구기간 내 달성 실적	1			1 ¹⁾		2	1		1		1 ²⁾		
달성율 (%)	100			조기 달성		200	100		00		초과 달성		

¹⁾연구기간 내 조기달성; ²⁾연구기간 내 초과달성.

2. 특허 출원

- 특허명: 신규 락토바실러스 브레비스 균주 및 이의 용도 (Novel strain of *Lactobacillus brevis* and use thereof), 출원연도: 2019년, 출원인: 건국대학교 산학협력단, 출원번호: 제 10-2019-0040637호.

3. 논문 성과 (SCI급)

- Hye Ji Jang, Na-Kyoung Lee, Hyun-Dong Paik. (2019). Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. Food Sci. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00576-x>.

제 4장 연구결과의 활용 계획 등

제 1절 추가 연구의 필요성

1. 디톡스 제품 개발 시 첨가되는 균주에 대한 다양한 기능성에 관한 연구

- 본 연구에서는 기초 생리활성이 뛰어나고, 안전성이 입증된 김치 유래 유산균을 이용하여 디톡스·안티에이징을 타겟으로 한 프로바이오틱스 특성과 항산화 효능 및 간 기능 개선 등 다양한 기능성을 평가하여 과제를 통해 디톡스 시제품을 생산 및 산업화하였음.
- 그러나 디톡스 및 안티에이징의 기능성에 대한 차별성의 강화를 위해, 프로바이오틱 유용 균주들의 *in vivo* 및 임상실험을 통한 디톡스 및 안티에이징 관련 기능성에 관한 추가 연구를 수행하여 근거를 제시함으로써 제품 개발 시 균주의 활용가능성 및 신뢰성을 높일 방안이 필요함.
- 또한, NGS 등의 실험 기법을 이용하여 본 연구에서 이용된 프로바이오틱스 섭취에 따른 장내 균총의 변화 및 이에 따른 개체에의 영향 검증과 같은 체계적인 연구 과정이 요구되는 것으로 사료됨.

제 2절 타 연구에서의 응용

1. 타 연구에 대한 응용 가능성

- 본 연구를 통해서 20~30 연령대에 국한된 디톡스·안티에이징 기능성뿐만 아니라 디톡스·안티에이징 및 다이어트가 필요한 다양한 연령층 대상 연구에 많은 도움이 될 수 있을 것이라고 생각됨.
- 개발 소재를 활용한 다양한 타입의 제품 개발(파우더, 시리얼 류 등)

제 3절 연구개발 결과의 활용방안

1. 기술적 측면

- 부작용을 최소화 하고 효과를 극대화 시킨 디톡스 및 안티에이징 제품의 최적 생산법과 그 기능을 검증함으로써 새로운 고부가가치 제품 개발에 대한 이론적 배경을 확립할 수 있으며 관련 연구의 기초 자료를 제공하고, 기능성 소재의 활용 면에서 국제경쟁력 확보를 기대할 수 있음.

2. 사회적 측면

- 건강한 다이어트를 통해, 외적 아름다움뿐만 아닌 건강까지 지킴으로서 전반적 삶의 질을 향상시킬 수 있을 것임. 장기적으로 모든 연령층에게 건강한 다이어트의 중요함에 대한 인식을 키워 줄 수 있을 것임.

3. 산업적 측면

- 새로운 디톡스 및 안티에이징을 위한 고부가가치 제품 개발 및 기능성을 평가한 신제품에 대한 특허를 출원/등록함으로써 산업재산권을 확보할 수 있음.
- 본 연구를 통해 개발된 새로운 디톡스 및 안티에이징의 고부가가치 제품은 식·의약 소재 및 기능성 식품으로의 이용이 가능할 것이며, 새로운 디톡스를 위한 영양식품이라는 시장을 개척할 수 있을 것임.
- 또한, 본 개발 제품은 기존에 생리활성이 검증된 프리바이오틱스뿐만 아니라 높은 기능성을 나타내는 프로바이오틱스가 복합적으로 첨가된 제품으로 다이어트, 건강, 면역, 디톡스 기능성 프로바이오틱스 소재 건강기능식품시장에서 차별성을 확보할 수 있음.

4. 경제적 측면

- 본 연구를 통해 국내 디톡스 및 안티에이징 제품 개발 및 생산 방안을 제시함으로써 국가 경제 활성화에 이바지할 수 있으며, 최근까지 수입에 의존하던 제품을 국산제품으로 대체할 수 있을 뿐만 아니라 더 나아가 수출까지 연결할 수 있을 것임.
- 디톡스 유산균으로서 다이어트 식품과 함께 섭취했을 때 장내 환경을 개선시키고 디톡스 작용으로 안정성과 차별성 두 가지 시너지 효과를 독보적으로 나타냄으로써 소비자의 관심이 가장 높은 다이어트 시장 섹터에서 우위를 점할 수 있을 것임.
- OEM 방식을 이용하여 디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재의 다양한 기능성 제품을 생산할 수 있을 것임.

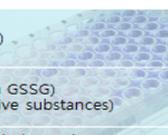
제 4절 기업화 추진방안

1. 기업화 배경

- 세계적인 웰빙 트렌드와 인구 고령화로 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강기능식품, 특히 프로바이오틱스 건강기능식품에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있는 추세임.
- 현대 사회의 변화에 따라 정신적, 육체적, 환경적 스트레스를 해결하기 위한 디톡스·안티에이징에 대한 관심이 증대되고 있으며 건강에 대한 관심의 증대에 따라 운동과 피로회복 등의 효능이 있는 건강기능식품 시장이 증가하고 있는 추세임.

- 건강에 대한 관심이 증가하면서 질병을 예방하여 건강하게 살고 싶은 욕구가 반영되면서 프로바이오틱스의 섭취 인구가 증가하는 등 안정적으로 시장이 성장할 것으로 전망됨.
- 식품산업에서는 건강에 대한 관심이 증대되어, 운동능력 향상, 체중관리 식품 등으로 식품에서도 ‘기능성’과 ‘체내 유용성이 높은 원료’로 통곡물, 영양 흡수가 느린 원료 등이 고려되고 있음.
- 세계 건강기능식품 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있으며, 이들 중 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 시장 규모 또한 증가하고 있는 실정임.
- 프로바이오틱스 균주 자체 만의 디톡스 및 안티에이징 기능성과 관련한 기술이 과학적으로 입증된 현황은 미미한 실정임.
- 전통발효식품에서 분리한 균주를 이용하여 디톡스·안티에이징을 타겟으로 한 프로바이오틱스 소재를 연구하여 차별화된 프로바이오틱스 제품을 개발하고자 함.
- 프로바이오틱스의 특성 중 항암효과, 면역 조절능에 대한 연구가 집중되고 있음. 특히, 면역 조절능의 병원성 미생물에 대한 항균성 물질의 생산, 암세포에 대한 세포독성 등으로 밝혀지거나 사이토카인의 생산에 의해 간접적으로 영향을 주기도 함. 프로바이오틱스의 면역조절 활성화에 영향을 끼치는 인자로는 1) 프로바이오틱스의 종류, 2) 면역체계에 사용되는 프로바이오틱의 용량에 따른 효과, 3) 균의 형태(생균 또는 사균), 4) 제공되는 형태(발효식품에서 면역 활성이 높게 나타났음)로 알려져 있음.
- 디톡스는 해독이라 할 수 있으며, 피부(박테리아, 바이러스, 중금속, 화학독소 등을 차단), 호흡기(자체 필터 작용), 면역체계(바이러스와 기생충 등의 병원체를 감지), 장(외부 유해 물질의 차단), 간(중금속, 독소 등 유해물질 제거), 신장(필요 없는 물질 배출)으로 나눌 수 있음. 디톡스와 관련한 물질을 클렌저라 부르며 레몬, 오이, 자몽 등이 사용되고 있음.
- 유산균의 디톡스 작용으로 예상할 수 있는 기능성으로는, 간 기능 개선, 항균효과, 중금속 흡착능, 항산화 효과, 면역 조절능 등이 있음.
- 프로바이오틱스와 관련된 원료로는 총 14건이 보고되고 있으며, 이들 중 디톡스 및 안티에이징과 관련된 원료로는 유산균발효마늘추출물(제2016-16호), 유산균발효다시마추출물(제2011-22호)의 2건이 보고되고 있음.

In-vitro test

Target cell (in-vitro) Hepatocyte (Human)	Preparation dead/live cell Culture supernatant	Test sample Cell culture supernatant, protein, mitochondrial supernatant, RNA
간세포 손상지표	<ul style="list-style-type: none"> ALT (Aminotransferase) AST (Aspartate aminotransferase) LDH (Lactate dehydrogenase) 	
산화손상 억제	<ul style="list-style-type: none"> GSH (Glutathione, oxidized from GSSG) TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) 	
지방함량	<ul style="list-style-type: none"> TG (Total glycerol) & TC (Total cholesterol) Oil-Red O 	
지방분해 증가	<ul style="list-style-type: none"> AMPK (AMP-activated protein kinase) PPAR-a (Peroxisome proliferator activated receptors) 	
지방합성 억제	<ul style="list-style-type: none"> FAS (Fatty acid synthase) SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein) 	

In-vivo test

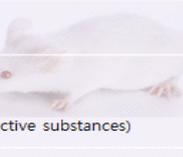
Toxicity model (in-vivo) Alcohol Galactosamine, ICR mice/SD rat	Preparation live cell Symbiotics	Test sample Plasma, Liver
지방생성 억제	<ul style="list-style-type: none"> ORO (Oil-red O) staining 지방함량측정 	
산화손상 억제	<ul style="list-style-type: none"> GPs (Glutathione peroxidase) CAT (Catalase) SOD (Superoxide dismutase) TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) 	
간조직 손상억제	<ul style="list-style-type: none"> ALP (Alkaline phosphatase) OCT (Ornithine carbamyl transferase) r-GTP (r-glutamyltransferase) CYP2E1 (Cytochrome P450 2E1) CYP450 (PROD) CYP450 (MROD) Methoxyresorufin CYP450 (BROD) Benzyloxyresorufin 	

그림 10. 간 기능 개선 활성 검증을 위한 실험법 모식도(한국식품연구원, 2018).

- 간 건강 관련 2건의 원료는 프로바이오틱스 단일 균주가 아니라, 마늘, 다시마를 원료로 발효물에 해당됨. 프로바이오틱스 균주 만으로 이루어진 디톡스·안티에이징 관련 원료는 보고되지 않음.

표 27. 프로바이오틱 균주와 관련된 기능성 원료(2019년 6월 기준)

기능성 원료	기능성 내용	일일 섭취량
<i>L. rhamnosus</i> IDCC 열처리배양건조물	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능)	<i>L. rhamnosus</i> IDCC 열처리배양건조물로서 400 mg/일(열처리배양균체수로서 1×10^{10} cells)
<i>Lactobacillus</i> sp. 복합물 HY7601+KY1032	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음	<i>Lactobacillus</i> sp. 복합물 HY7601+KY1032로서 1×10^{10} CFU/일
<i>L. gasseri</i> BNR17	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능)	<i>L. gasseri</i> BNR17로서 1×10^{10} CFU/일
유산균발효마늘추출물	간 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	유산균발효마늘추출물로서 1.5 g/일
<i>L. plantarum</i> HY7714	피부 보습에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 1×10^{10} CFU/일
<i>L. plantarum</i> HY7714	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강 유지에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 1×10^{10} CFU/일
UREX 프로바이오틱스	유산균 증식을 통한 여성 질 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 9.7 mg/일 (프로바이오틱스로서 10^9 CFU/일)
프로바이오틱스 ATP	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함(생리활성기능 3등급)	신청원료로서 2×10^9 CFU/일
<i>L. helveticus</i> 발효물	노화로 인해 저하된 인지력 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡(생리활성기능 3등급)	<i>L. helveticus</i> 발효물로서 1 g/일
<i>L. sakei</i> Probio65	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	<i>L. sakei</i> Probio65로서 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/일
프로바이오틱스(VSL#3)	유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활/장면역을 조절하여 장건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	신청원료로서 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{12}$ CFU/일

과채유래 유산균 (<i>L. plantarum</i> CJLP133)	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	과채유래유산균 (<i>L. plantarum</i> CJLP133)로서 1×10^{10} ~ 1×10^{12} CFU/일
유산균발효다시마추출물	알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음/기억력 개선에 도움을 줄 수 있음	유산균발효다시마추출물로서 1.5 g/일
<i>E. faecalis</i> FK-23 효소 및 가열처리 분말(LFK)	꽃가루에 의해 나타나는 코막힘의 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	<i>E. faecalis</i> FK-23 효소 및 가열처리분말로서 1 g/일

- 본 연구개발은 디톡스·안티에이징 관련 프로바이오틱스 균주를 이용한 실용화기술 개발이며 기존의 사례와 비교해 볼 때 출원을 통해 독창성 및 혁신성을 확보할 수 있을 것임.

가. 국내 기술 수준 및 시장현황

(1) 국내·외 시장현황

- 현대 사회의 변화에 따라 정신적, 육체적, 환경적 스트레스를 해결하기 위한 디톡스·안티에이징에 대한 관심이 증대되고 있음. 이와 더불어 건강에 대한 관심의 증대에 따라 운동과 피로회복 등의 효능이 있는 건강기능식품 시장이 증가하고 있음.
- 식품산업에서는 운동능력 향상, 체중관리 식품 등의 식품에서도 ‘기능성’과 ‘체내 유용성이 높은 원료’로 통곡물, 영양 흡수가 느린 원료 등이 고려되고 있음(웰니스 항노화 식품산업 비즈니스 모델 개발 및 제도화, 한국보건산업진흥원, 2014. 12.).
- 세계 건강기능식품 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있으며, 이들 중 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 시장 규모 또한 증가하고 있는 실정임.

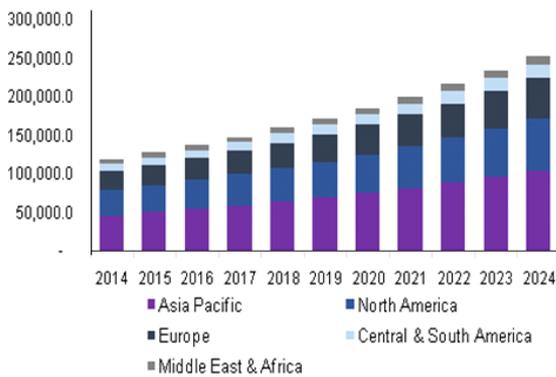


그림 12. 세계 건강기능식품 시장
(2014년~2022년, USD million)
(출처, Market Research Report, 2016. 11.)

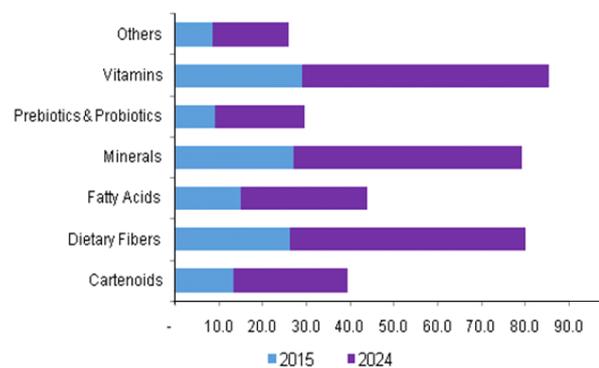


그림 13. 세계 건강기능식품 제품별 시장
(2014년~2022년, USD million)
(출처, Market Research Report, 2016. 11.)

(2) 세계시장의 성격

- 건강에 대한 관심이 증가하면서 질병을 예방하여 건강하게 살고 싶은 욕구가 반영되면서 프로바이오틱스 섭취 인구가 증가하는 등 안정적으로 시장이 성장할 것으로 전망됨.
- 초고령화 사회로의 빠른 진입과 프로바이오틱스가 본격적인 각광을 받기 시작한 지 5년이 채 되지 않아 여전히 성장 여력이 충분하므로, 향후 높은 시장 성장이 예상됨(국내·외 시장 17~23 CAGR 9% 이상 전망).
- 프로바이오틱스 시장은 건강기능식품 중 성장성이 가장 높은 그룹에 속하는데, 여전히 국내 시장은 초기 단계이기 때문에 선점 경쟁이 치열함.

(3) 경쟁기관 현황

- 디톡스·안티에이징과 관련한 제품으로는 주로 천연물인 레몬, 클로렐라, 라임, 프로바이오틱스 등이 이용되고 있음. 이들의 경우 주로 장운동 개선, 간 기능 개선 등에 집중되어 있음. 간 기능 개선과 관련한 사례는 (주)한국야쿠르트의 ‘헛개나무 쿠퍼스’로 간 기능 개선으로 제품이 출시되어 있음.
- 국내 프로바이오틱스 관련 기업으로는 (주)셀바이오텍, (주)일동제약, (주)한국야쿠르트, (주)CJ제일제당 등이 있음.
- 해외 프로바이오틱스 관련 기업으로는 다니스코, 크리스찬한센, 탈레망로셀, 모리나가, 일본 야쿠르트 등이 있음.

(4) 지식재산권 현황

- 디톡스와 관련한 기술현황은 1) 혼합 유산균 스타터를 이용한 디톡스 활성 촉진용 과채 발효물 및 이의 이용(출원번호 제10-2013-0164054호)이 있으며 이는 니코틴 분해능, 알콜분해능, endotoxin 억제능, 체중 감소 등의 효과를 분석한 바 있음. 2) 밝은 피부 혈색 및 날씬한 몸을 위해 디톡스 및 에너지 증강 효과를 갖는 음료 조성물(등록, 출원번호 제10-2016-0084589호)으로는 연꽃, 산사나무, 히비스커스 및 인삼추출물을 포함-endotoxin 억제능, 체중 감소, 에너지 증가 효과가 검증된 바 있음. 3) 디톡스용 조성물(출원번호: 제10-2015-0081008호)은 해독용 조성물에 관한 것으로 녹차추출물, 인진쑥추출물, 돈나물추출물, 삼백초추출물, 아욱추출물 등으로 구성되는 것으로 체내의 항산화능과 지질의 과산화를 억제하여 독소의 생성 저감, 니코틴의 배출을 도와주는 것으로 보고되고 있음.
- 디톡스 활성을 촉진시키기 위한 건강 기능식품에 관한 내용으로, 니코틴과 내독성 등 체내 독성 물질을 효과적으로 체외 배출하는 특허가 2018년 2월에 보고됨(등록번호:

제10-1831109호). 내용물로는 생약 발효추출물로 해조 분말, 혼합 비타민 미네랄 분말, 클로렐라 분말, L-카르니틴 분말 및 가르시니아 캄보지아(*Garcia cambogia*) 추출 분말을 구성 성분으로 진피, 광굴피, 작약, 오미자, 인진쑥, 적하수오, 생강, 황금, 당귀, 우슬, 백작약, 황금, 백출로 이루어져 있음. 또한 발효를 위해 통상의 효모를 사용한 것으로 보고되어 있음.

표 28. 디톡스·안티에이징 관련 특허 목록(2019년 6월 기준)

특허명	특허 출원 번호	특허 등록 번호	상태
디톡스 활성 촉진용 건강 기능 식품	제10-2017-0078814호	제10-1831109호	등록
혼합 유산균 스타터를 이용한 디톡스 활성 촉진용 과채 발효물 및 이의 이용	제10-2013-0164054호	-	거절
밝은 피부 혈색 및 날씬한 몸을 위해 디톡스 및 에너지 증강효과를 갖는 음료 조성물	제10-2016-0084589호	-	거절
디톡스용 조성물	제10-2015-0081008호	-	공개

2. 핵심경쟁요인

가. 시장의 틈새 공략

- 기존의 획일화 되어있는 식품군에서 디톡스 및 다이어트, 항노화를 위한 균형적인 영양을 공급하여 부작용을 최소화하고 효과를 극대화하는 새로운 먹거리를 제공함.

나. 연구진의 전문화

- 기존 고객층은 식품안전을 크게 고려해 유명 브랜드 또는 수입제품을 선호하는 것으로 나타났음. 이는 어느 회사에서 누가 개발에 참여했느냐가 제품 선택 시 크게 작용하는 것을 반영하는 것으로 나타남.

다. 제품의 세분화

- 디톡스 및 항노화를 위한 기능성 식품의 경우, 제품을 섭취하는 소비자의 체형, 연령 및 건강상태를 고려하여 적절한 영양분을 배합함으로써 소비자의 니즈를 구체적으로 충족시킬 수 있도록 제품을 더 세분화하여 개발할 예정임.

라. 인증

- 디톡스 및 항노화 제품의 고객층은 트렌드와 안전성에 매우 민감하므로 객관적으로 이를 검증할 수 있는 ‘인증’을 통해 고객 안심을 확보하고 수출을 위한 필수인증 외에

신뢰도를 확보할 수 있는 해외 안전인증 등의 자격을 취득하여 유통할 예정이다.

마. 특허출원

- 기존의 검증된 소재에 국한되지 않고 프로바이오틱스와 같은 소재의 기능성을 검증하고 관련된 제품의 특허를 출원/등록함으로써 산업 재산을 확보하고 새로운 디톡스 및 안티에이징을 위한 고부가가치 제품 개발 및 시장 개척의 발판을 마련할 계획이다.

3. 시장 구조

가. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

- 디톡스·안티에이징과 관련한 제품으로는 주로 천연물인 레몬, 클로렐라, 라임, 프로바이오틱스 등이 이용되고 있음. 이들의 경우 주로 장운동 개선, 간 기능 개선 등에 집중되어 있음. 간 기능 개선과 관련한 사례는 (주)한국야쿠르트의 ‘헛개나무 쿠퍼스’로 간 기능 개선으로 제품이 출시되어 있음.
- 국내 프로바이오틱스 관련 기업으로는 (주)셀바이오텍, (주)일동제약, (주)한국야쿠르트, (주)CJ제일제당 등이 있음.
- 해외 프로바이오틱스 관련 기업으로는 다니스코, 크리스찬한센, 띄레망로셀, 모리나가, 일본 야쿠르트 등이 있음.

(2) 시장진입 장벽

- 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품을 말함.
- 소비자의 영양 요구성, 건강상태를 고려한 다양한 형태의 디톡스 및 항노화 기능성뿐만 아니라, 당류, 방부제 등을 포함한 각종 합성 첨가물을 배제하여 웰빙 및 고급 제품을 더 선호하는 트렌드에 맞게 제품을 출시하여 다양한 고객층을 확보할 예정이다.

(3) 주요 고객군

- 다양한 고객층, 특히 30~40대 고객층의 기능성 식품에 대한 인식의 업그레이드 현상. 소비자들의 소득 증가에 따른 구매력 증가로 건강, 특히 이너뷰티를 위해 많은 비용을 투자하고, 동시에 먹거리에 대한 관심도 증가하고 있음.
- 소비자들은 기능성 식품 구매 시 식품안전에 더 신중한 소비행동을 보이고, 고급

수입제품 및 전문 제품을 더 선호하는 경향이 나타나며 트렌드에 많은 영향을 받음.

- 새로운 형태의 식품을 제안하여 디톡스 및 항노화를 위한 기능성 제품의 우위를 선점함.

(4) 수익확보 방안

- 백화점, 대형마트, 병원, 전문매장, 온라인 판매점이 주요 판매 경로임.
- 최초 개발시 제품의 라벨, 비타민 및 칼슘 함량 준수, 미생물 함량 등 수출에 방해 요소를 사전에 차단하여 전 세계 수출 제품을 기본으로 개발할 예정임.
- 현재 디톡스 관련 기능성 식품시장의 경우 한국 브랜드의 중국을 비롯한 동남아 진출이 미미한 상황임.
- 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 복합 투여를 통한 시너지 효과와, 합성 첨가물의 무첨가를 통해 국내산 차별화 제품 진출 기대함.
- 이에 ‘프리미엄’, ‘프로바이오틱스’, ‘친환경’을 키워드로 내세워 디톡스 및 다이어트 제품을 개발. 또한, 식품안전에 대한 관심이 높은 소비자 니즈를 반영해 브랜드의 신뢰도를 높여 소비자들에게 마케팅할 예정임.
- 이너뷰티 시장은 생명주기가 짧은 특성을 가지고 있으나, 각종 관련 플랫폼과 연계, 커뮤니티 및 디톡스, 안티에이징과 관련된 다양한 서비스 상품 개발을 통해 고객층을 넓힐 수 있음.
- 온라인 커뮤니티를 통해 관련 정보와 지식 등을 얻는 비중이 확대되고 있으며, 고객 간 정보교류를 통해 제품 선택이 이루어지는 경우가 많으므로 시장과 관련된 각종 플랫폼들을 통한 제품 노출이 효과적인 홍보방법이 될 것임.
- 앞서 형성된 시장에 대한 진입 장벽을 낮추고, 상기 제품의 시장 점유율의 가속 및 확대를 위하여 기존에 구축된 인프라를 이용하여 국내외 유명한 피트니스 센터, 문화 센터 등에 입점시킴으로써 제품의 인지도를 높일 계획임.
- REBORN의 온라인 플랫폼 및 오프라인 센터를 통하여 제품의 꾸준한 재구매 및 새로운 소비자들을 흡수하게 될 예정임.

4. 제품의 형태

- 본 과제로 개발된 *W. cibaria* D30 유산균을 활용하여 다음과 같이 시제품을 제조하였음. 또한 기존 제품들과 다르게 유산균의 안정제로써 당류가 아닌 다양한 프리바이오틱스를 이용함.

가. 제품명

- 리부트 클렌즈 유산균

(1) 사용 유산균 및 주재료

- 본 과제를 통해 개발된 *W. cibaria* D30을 이용하여 리부트에서 프리바이오틱스로서 쌀 발효추출물, 프락토올리고당, 갈락토올리고당 및 치커리 식이섬유와 해독작용에 탁월하다고 알려져 있는 양배추, 바나나, 브로콜리 새싹 및 당근의 과채 추출 분말을 첨가하여 제조하였음.

(2) 포장 형태

- 포장은 폴리에틸렌(PE)을 사용하여 충전하였으며 1포 당 2,000 mg으로 포장되어 있음.

(3) 제품 특징

- 쌀 발효 추출물과 프리바이오틱스 성분을 이용하여 장 연동 운동 개선 및 장내 균총 개선의 이중 기능성 효과를 기대할 수 있음.
- 독소 제거에 탁월하다고 알려진 해독주스의 원료인 양배추, 바나나, 브로콜리 새싹 및 당근은 장 청소를 통한 이너 클렌징과 더불어 부족해진 과채 영양소의 보충 효과를 기대할 수 있음.
- 합성 감미료, 합성 향료, 합성 착색료, 식물성 크림 분유, 스테아린산 마그네슘, 이산화규소 및 HPMC의 무첨가 제품으로 임산부와 아이들도 안전하게 섭취할 수 있음.
- 항산화 기능을 통해 독성 물질의 축적을 막고 산화적 스트레스로 인해 생성된 활성 산소의 감소를 기대할 수 있음.
- 파우더 타입으로 물 없이 간편하게 섭취가 가능함.
- 1포씩 포장되어 휴대성이 용이함.

(4) 원재료명 및 함량

- 프랑스산 유산균 14종(*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus fermentum*), *Weissella cibaria* D30, 김치유산균추출분말, 쌀 발효 추출물, 프락토올리고당, 갈락토올리고당, 자일리톨, 말토덱스트린, 치커리식이섬유, 무수결정포도당, 양배추추출물분말, 당근농축분말, 바나나농축분말, 브로콜리새싹착즙분말, 그릭요구르트분말.

(5) 영양·기능정보

표 29. 시제품의 1일 섭취량(1포/2,000 mg)

1일 섭취량	합량	영양성분 기준치
열량	8 kcal	-
탄수화물	2 g	1%
단백질	0	0%
지방	0	0%
나트륨	2 mg	0%
프로바이오틱스 수	3,000,000,000 CFU	

*영양성분 기준치는 1일 영양성분 기준치에 대한 비율임.

(6) 제품 사진



그림 14. 제품-리부트 클렌즈 유산균

붙임. 참고문헌

1. Aarti C, Khusro A, Varghese R, Varghese R, Arasu MV, Agastian P, Al-Dhabi NA, Ilavenil S, Choi KC. *In vitro* studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. *LWT-Food Sci. Technol.* 86: 438-446 (2017)
2. Abriouel, H, Lerma, LL, Casado Muñoz, MDC, Montoro, BP, Kabisch, J, Pichner, R, Cho, GS, Neve, H, Fusco, V, Franz, CMAP, Gálvez, A, & Benomar N. The controversial nature of the *Weissella* genus: Technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. *Front. Microbiol.*, 6: 1197 (2015)
3. Bae G, Kim J, Kim H, Seok JH, Lee DB, Kim KH, Chung MS. Inactivation of norovirus surrogates by kimchi fermentation in the presence of black raspberry. *Food Control* 91: 390-396 (2018)
4. CLSI (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth informational supplement. M100 - S24. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. Cole CB, Fuller R, Carter SM. Effect of probiotic supplements of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* 2204 on β -glucosidase and β -glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human faecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 223-225 (1989)
6. FAO/WHO. Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario: London (2002)
7. Jang HJ, Song MW, Lee NK, Paik HD. Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *J. Food Sci. Technol.* 55: 3174-3180 (2018)
8. Jeon EB, Son SH, Jeewanthi RKC, Lee NK, Paik HD. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lb41, an isolate from kimchi and its application as a probiotic in cottage cheese. *Food Sci. Biotechnol.* 25: 1129-1133 (2016)
9. Jeon HL, Lee NK, Yang SJ, Kim WS, Paik HD. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* 26: 1641-1648 (2017)
10. Kimoto-Nira H, Suzuki S, Suganuma H, Moriya N, Suzuki C. Growth characteristics of *Lactobacillus brevis* KB290 in the presence of bile. *Anaerobe* 35: 96-101 (2015)
11. Lee KW, Shim JM, Park SK, Heo HJ, Kim HJ, Ham KS, Kim JH. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Sci. Technol.* 71: 130-137 (2016)
12. Lee NK, Han KJ, Son SH, Eom SJ, Lee SK, Paik HD. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT-Food Sci. Technol.* 64: 1036-1041

(2015)

13. Lee NK, Kim SY, Han KJ, Eom SJ, Paik HD. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *LWT-Food Sci. Technol.* 58: 130-134 (2014)
14. Mroczynska M, Gałęcka M, Szachta P, Kamoda D, Libudzisz Z, Roszak D. β -Glucuronidase and β -glucosidase activity in stool specimens of children with inflammatory bowel disease. *Pol. J. Microbiol.* 62: 319-325 (2013)
15. Oh NS, Joung JY, Lee JY, Kim Y. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLoS One.* 13: 1-15(2018)
16. Oliveira LC, Silveira AMM, Monteiro AS, Santos VL, Nicoli JR, Azevedo VAC, Soares SC, Dias-Souza MV, Nardi RMD. In silico prediction, *in vitro* antibacterial spectrum, and physicochemical properties of a putative bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain L156.4. *Font. Microbiol.* 8: 876 (2017)
17. Park SE, Seo SH, Kim EJ, Na CS, Son HS. Effects of different fermentation temperatures on metabolites of kimchi. *Food Biosci.* 23: 100-106 (2018)
18. Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Ye F, Liu C, Liu H, Wang M, Li Y, Sun Y, Li X, Tian M, Jin N. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe* 30: 1-10 (2014)
19. Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trichieri V, Amicosante G, Cifone MG. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 13: 367-385 (2007)
20. Rushdy AA, Gomaa EZ. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Ann. Microbiol.* 63: 81-90 (2013)
21. Saini K, Tumar SK. *In vitro* evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* cultures of human origin capable of selenium bioaccumulation. *LWT-Food Sci. Technol.* 84: 497-504 (2017)
22. Shakibaie M, Mohammadi-Khorsand T, Adeli-Sardou M, Jafari M, Amirpour-Rostami S, Ameri A, Forootanfar H. Probiotic and antioxidant properties of selenium-enriched *Lactobacillus brevis* Lse isolated from an Iranian traditional dairy product. *J. Trace Elem Med Biol.* 40: 1-9 (2017)
23. Sharma A, Kaur J, Lee S, Park YS. Molecular discrimination of *Lactobacillus brevis* strains isolated from food products in South Korea using multilocus sequence typing. *LWT-Food Sci. Technol.* 86: 337-343 (2017)
24. Son SH, Jeon HL, Jeon EB, Lee NK, Park YS, Kang DK, Paik HD. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities. *LWT-Food Sci. Technol.* 85: 181-186 (2017)
25. Son SH, Jeon HL, Yang SJ, Sim MH, Kim YJ, Lee NK, Paik HD. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. *Food Sci. Biotechnol.* 27: 123-129 (2018)

26. Šušković J, Kos B, Beganović J, Pavunc AL, Habjanić K, Matošić S. Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48: 296-307 (2010)
27. Taheur FB, Kouidhi B, Fdhila K, Elabed H, Slama RB, Mahdouani K, Bakhrouf A, Chaieb K. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb. Pathog.* 97: 213-220 (2016)
28. Uugantsetseg E, Batjargal B. Antioxidant activity of probiotic lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Mong. J. Chem.* 15: 73-78 (2014)
29. Vitali B, Minervini G, Rizzello CG, Spisni E, Maccaferri S, Brigidi P, Gobbetti M, Cagno RD. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol.* 31: 116-125 (2012)
30. Waki N, Matsumoto M, Fukui Y, Suganuma H. Effects of probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 on incidence of influenza infection among school children: An open-label pilot study. *Lett. Appl. Microbiol.* 59: 565-571 (2014)

연구개발보고서 초록

과 제 명	디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화 Practical Use of Probiotics Substances for Detoxification and Anti-aging				
주관연구기관	리부트	주 관 연 구 책 임 자	(소속)	리부트	
위탁연구기관	건국대학교 산학협력단		(성명)	이 승 아	
총연구개발비 (50,000천원)	계	50,000천원	총 연구 기간	2018.04.30. ~ 2019.04.29. (12개월)	
	정부출연 연구개발비	50,000천원	총 참 여 연구 원 수	총 인 원	3
	기업부담금	-		내부인원	1
	연구기관부담금	-		외부인원	2
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 연구는 디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재를 확보하고, 이를 실용화하는 기술의 확보 및 제품화를 하고자 함. 후보 프로이오틱스 균주를 대상으로 프로바이오틱 특성 및 디톡스·안티에이징의 기능성을 검증하고, 본 기술과 관련한 특허출원 1건, 학술발표 1건, 시제품 1건을 연구개발 성과로 얻고자 함.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 디톡스 및 안티에이징과 관련한 선행연구 및 문헌조사를 실시하였음. • 프로바이오틱스의 생리적 특성인 내산·내담즙성, 효소 생산능, 장 부착능, 항생제 저항성 활성화, 간 기능 개선능, 항산화능, 장 환경 개선능 등을 평가하여 우수 균주를 스크리닝하였음. • 분리균주를 적용한 시제품을 개발하여 ‘리부트 클렌즈 유산균’를 출시하였음. • 판매 전력으로 OEM 제조방식을 통해 제품을 생산하였으며, 출시 전 1명의 고용창출로 업무의 효율을 높임. • 본 연구를 통해서 SCI급 논문 1건, 국내·외 학술발표 2건, 특허 출원 1건의 연구 성과를 얻었으며, 기술이전 1건을 수행하였음. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>본 연구를 통하여 SCI급 논문 1건, 특허 출원 1건, 학술발표 2건의 연구성과를 얻었으며, 기술이전 1건, 고용창출 1명과 인력양성 1명을 수행하므로 기존 목표에 비해 초과달성 하였음. 본 연구의 성과를 통해 기업에서 디톡스 및 안티에이징에 도움을 줄 수 있는 기능성 제품을 생산하여 고부가가치를 창출하고, 수입제품에 대해 상당 부분 대체함으로써 기업의 이익을 증가시킬 수 있을 것으로 기대됨.</p>					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제 번호		818019-1	
사업구분	농식품연구성과후속지원사업				
연구분야	식품/식품공학/식품미생물·발효		과제구분		단위
사업명	벤처창업바우처지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	디톡스·안티에이징을 타겟으로 한 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화		과제유형	개발	
연구기관	2018.04.30. ~ 2019.04.29.		연구책임자	이승아	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04.30. ~ 2019.04.29.	50,000	-	50,000
	계		50,000	-	50,000
참여기업	리부트				
상대국		상대국연구기관			

2. 평가일 : 2019. 6. 13.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
리부트	대표	이승아

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	--



I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

본 과제에서는 문헌조사를 통하여 디톡스 및 안티에이징에 도움을 줄 수 있는 후보 균주를 이용하여 기초 생리활성, 기능성, 안전성 평가를 통해 균주를 선정하였고, 이와 관련한 우수한 기능성을 토대로 특허 출원 1건, SCI급 논문 1건, 학술발표 2건의 실적을 달성하였음. 선별된 유용 균주를 이용하여 제품화하여 수입 제품에 의존하고 있는 디톡스 및 안티에이징 제품을 개발하였고 제품의 판매전략을 수립함으로써 산업화의 토대를 마련한 성과를 얻었음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

디톡스 및 안티에이징에 대한 제품의 개발이 꾸준히 수행되고 있음. 본 연구를 통해 장 환경 개선 및 항산화 효능을 통한 기능성 소재를 활용하는 제품은 꾸준히 증가할 것으로 예상되며, 뿐만 아니라 수입에 의존하던 제품을 국산제품으로 대체함과 더불어 수출까지 기대함에 따라 국가 경제적 이익 창출이 증대될 것으로 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

최근 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강기능식품에 대한 수요도 꾸준히 증대되고 있는 실정임. 디톡스 및 안티에이징에 대한 개념을 통해 국민 건강의 개선이라는 측면에서 사회·경제적으로 활용 가능성이 높다고 판단됨. 본 연구를 통해 디톡스 및 안티에이징 기능을 가지는 소재의 우수성을 검증하였으며 산업적으로 적용 시 문제가 없음을 확인하였음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

연구개발 기간 동안 수차례 정기 및 상시 과제 회의를 가졌으며, 소재의 기능성을 검증하여 시제품을 개발하였음. 시제품에서 제품화 단계까지 위탁기관과 기업과의 상의를 통해 반영하였음. 또한 연구 개발을 위해 국내·외 학술대회 참석을 통해 최신 연구 동향을 파악하여 연구 수행에 성실히 임하였다고 생각됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

연구개발 기간 동안 특허출원 1건, SCI급 논문 1건, 국내·외 학술발표 2건, 기술이전 1건, 고용창출 1명을 진행함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
계획수립 및 자료조사	5	100	<ul style="list-style-type: none"> • 디톡스 및 안티에이징과 관련한 선행연구 및 문헌조사를 확인함.
프로바이오틱스 특성 평가	40	100	<ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스의 내산·내담즙성, 효소생산성, 장 부착능 및 항생제 저항성 활성평가를 통해 기초 생리활성이 뛰어난 균주를 스크리닝 하였음.
간 기능 개선	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스의 간 기능 개선 효과를 확인함.
항산화 평가	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 기작을 통해서 프로바이오틱스의 항산화 효과를 확인함.
시제품 제작	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • OEM 제조방식을 통해 제품을 생산하였으며 제품의 형태는 분말형으로 포장제는 폴리에틸렌(PE)로 1포 당 2,000 mg으로 제조함.
판매전략 수립	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 건강지향적 웰빙과 고급화를 추구하는 소비자의 니즈를 반영하고, 제품을 세분화 하여 개발함으로써 다양한 연령층 및 성별의 소비자를 흡수할 수 있도록 마케팅할 예정이다. • 앞서 형성된 시장으로의 진입 장벽을 낮추기 위하여 기존에 형성된 인프라 및 소셜 미디어와 같은 관련 플랫폼을 이용하여 제품을 효과적으로 홍보할 예정이다. • 또한, 프리미엄 제품이 가지는 가격적인 부분을 해결하기 위해, 다양한 적립금, 재구매 혜택과 같은 전략을 수립할 계획임. • 주요 판매경로는 백화점, 대형마트, 병원, 전문매장, 온라인 판매점이 주요 판매경로로 예상됨.
합계	100	100	<ul style="list-style-type: none"> • 본 연구과제 수행한 결과 목표치를 달성함.

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구개발 기간 동안 문헌조사를 통하여 디톡스·안티에이징에 관련한 선행연구 조사를 통하여 연구계획을 수립하였고, 유산균의 기초 생리활성, 기능성, 안전성 평가를 통해서 본 과제에서 예정되었던 것을 검증하였음. 사용된 유용 균주를 이용하여 디톡스·안티에이징 기능성 제품을 개발하였음. 또한, 다양한 형태의 제품 개발과 함께 국내 산업은 물론 수출 판로까지 개척하므로써 디톡스·안티에이징 제품의 산업화를 구축할 수 있을 것임. 현재 디톡스 관련 기능성 식품시장의 경우 국내에서는 간 기능 개선 제품을 중심으로 판매가 이루어지고 있으며 디톡스·안티에이징을 위한 제품의 판매는 미미한 실정임. 또한, 중국을 비롯한 동남아 진출이 미미한 상황으로 본 연구를 통해 개발한 디톡스·안티에이징을 위한 기능성 소재를 활용하는 기업이 늘어날 것으로 예상됨. 국내 유통을 통한 국내 산업 이익 창출은 물론 수출을 통하여 국가 경제적 이익 창출이 증대될 것으로 생각되며 따라서 종합적으로 봤을 때 성공적인 과제 수행으로 판단됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

최초 목표보다 초과 달성하여 특허출원 1건, 학술발표 2건, SCI급 논문 1건, 시제품 제작 1건 및 기술이전 1건을 달성함. 국내·외 학술대회 참가를 통해 연구개발의 우수성을 알렸으며 제품 개발을 통해 경제 활성화에 기여할 것으로 예상됨. 디톡스·안티에이징 제품 개발이라는 점에 대해서 긍정적인 평가를 요청함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통해 새로운 고부가가치 제품 개발에 대해 이론적 배경을 확립할 수 있으며 관련 연구의 기초자료를 제공할 수 있었음. 연구개발 기간 동안 프로바이오틱스의 기초 생리활성, 간 기능 개선능, 항산화능, 장 환경 개선능 등의 평가를 통해서 선별된 균주를 이용한 제품화를 통해 제품화 가능성을 확인하였고 다른 형태의 제품을 개발에 활용할 수 있을 것임. 국내 및 해외 시장으로의 판매를 통해 매출 확대가 기대됨. 또한 본 연구를 통해 국내 기업이 과제를 통해 개발한 실용화 기술을 이용하여 경제 발전에 기여하는 기회가 되리라 사료됨. 아울러 다양한 산업화 및 연구가 지속적으로 진행될 수 있다고 생각됨.

IV. 보안성 검토

해당 사항 없음.

1. 연구책임자의 의견

해당 사항 없음.

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당 사항 없음.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처사업	
연구과제명	디톡스·안티에이징을 타깃으로 한 프로바이오틱스 소재의 실용화 기술 확보 및 제품화			
주관연구기관	리부트		주관연구책임자	이 승 아
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	50,000천원	-	-	50,000천원
연구개발기간				
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 계획수립 및 자료조사	<ul style="list-style-type: none"> • 디톡스 및 안티에이징과 관련한 선행연구 및 문헌조사를 통하여 연구계획을 수립함.
② 프로바이오틱스 특성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스의 내산·내담즙성, 효소생산성, 장 부착능 및 항생제 저항성 활성평가를 통해 기초 생리활성이 뛰어난 균주를 스크리닝 하였음.
③ 간 기능 개선	<ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스를 통해서 간 기능 개선 효과를 확인함.
④ 항산화 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 기작을 통해서 프로바이오틱스의 항산화 효과를 확인함.
⑤ 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> • OEM 제조방식을 통해 제품을 생산하였으며 제품의 형태는 분말형으로 포장재는 폴리에틸렌(PE)로 1포당 2,000 mg으로 제조하였음.
⑥ 판매전략 수립	<ul style="list-style-type: none"> • 소비자의 고급화 된 니즈를 반영하고, 다양한 연령층 소비자를 흡수할 수 있도록 마케팅할 예정이다. • 주요 판매경로는 백화점, 대형마트, 병원, 전문매장, 온라인 판매점이 주요 판매경로로 예상됨.

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	1			1	10	1			2					1						
연구기간 내 달성실적	1			1	10	1			1		1			2 ¹⁾	1 ²⁾					
달성율(%)	100			100	100	100			50		조 기 달 성			200	초 과 달 성					

¹⁾연구기간 내 조기달성; ²⁾연구기간 내 초과달성.

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	신규 락토바실러스 브레비스 균주 및 이의 용도에 관한 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√	√			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	해당 균주가 프로바이오틱스로서 생리적 특성 및 항산화 기능과 식중독 원인균에 대한 항균 활성이 우수함에 따라서 기능성 제품으로서의 활용이 가능하며 식중독 원인균 장내 부착 저해능을 가지며 위장관 질환 예방, 치료 또는 개선에 활용될 수 있으며 다양한 유기산 생산을 가지는 특징으로 위장관 내 소화 기능 및 배변 기능 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 활용될 수 있음.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타연구활용등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	1			1	10	1			2					1					
연구기간 내 달성실적	1			1	10	1			1					2					
연구종료 후 성과창출 계획		1 ¹⁾					380 ²⁾		5					1					

1)종료 2차년도; 2)종료 3차년도.

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명	기능성이 확보된 균주 제공 및 기능성 검증		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기	2019년
기술이전시 선행조건	-		