

310827-04

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

발간등록번호

11-1543000-004103-01

프로바이오틱스 기반 생애주기별 인지능력 개선 제품 개발

2022.06.03

주관연구기관 / 엠테라파마(주)

공동연구기관 / 경희대학교 산학협력단

공동연구기관 / 건국대학교 산학협력단

공동연구기관 / (주)에치와이

공동연구기관 / 경희의료원

프로바이오틱스

기반

생애주기별

인지능력

개선

제품

개발

2021

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “프로바이오틱스 기반 생애주기별 인지능력 개선 제품 개발”(개발기간 : 2018. 04. 30. ~ 2022. 03. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.06.03.

주관연구기관명 : 엠테라파마(주)

(대표자) 손 미 원

공동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

(대표자) 김 윤 혁

공동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

(대표자) 송 창 선

공동연구기관명 : (주)에치와이

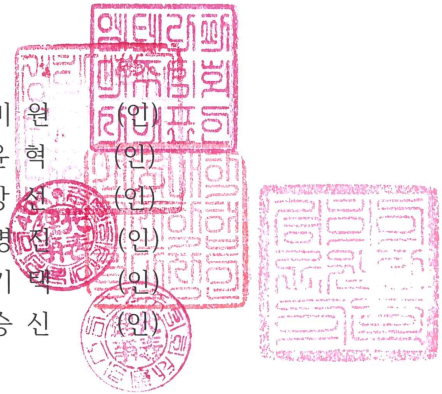
(대표자) 김 병 진

공동연구기관명 : 경희의료원

(대표자) 김 기 혁

참여연구기관명 : (주)헬릭스미스

(대표자) 유 승 신



주관연구책임자 : 손 미 원

협동연구책임자 : 오 명 숙

협동연구책임자 : 이 충 환

협동연구책임자 : 최 일 동

협동연구책임자 : 임 성 빈

협동연구책임자 : 김 동 현

참여기관책임자 : 유 진 상

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[√], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부				사업명		사업명		고부가가치식품개발사업	
전문기관명		농림식품기술기획평가원				내역사업명		내역사업명		기능성·전통식품	
공고번호		제 농축 2018-61호				총괄연구개발 식별번호		연구개발과제번호		318027-04	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0906	40%	2순위 LB1801	20%	3순위 LB1703	20%	4순위 LC0208	20%		
	농림식품과학기술분류	1순위 CA0105	60%	2순위 PA0201	20%	3순위 PA0102	20%			%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		프로바이오틱스 기반 생애주기별 인지능력 개선 제품 개발							
		영문		Development of probiotics-based functional foods regulating cognitive functions in life cycle stages							
주관연구개발기관		기관명				엠테라파마 주식회사		사업자등록번호		448-81-01914	
		주소				(07793) 서울시 강서구 마곡중앙8로1길 38, 102		법인등록번호		110111-7382693	
연구책임자		성명		손미원		직위		대표이사			
		연락처		직장전화		휴대전화		전자우편			
연구개발기간		전체		2018. 04. 30 - 2022. 03. 31(3년 11개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계							
		n단계									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		지방자치단체		기타()	
		현금		현금		현물		현금		현물	
		합계		합계		합계		합계		연구개발비 외 지원금	
		총계		2,519,000		471,885		1,033,115		2,990,885	
		1년차		525,000		17,500		157,500		542,500	
		2년차		700,000		60,710		406,290		760,710	
		3년차		594,000		180,675		215,325		774,675	
		4년차		700,000		213,000		254,000		913,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		역할		비고		연구개발비 외 지원금					
		경희대학교 산학협력단		오명숙		교수				공동 대학	
		건국대학교 산학협력단		이충환		교수				공동 대학	
		(주)에치와이		최일동		수석연구원(팀장)				공동 중견기업	
		경희의료원		임성빈		교수				공동 병원	
		경희대학교 산학협력단		김동현		교수				공동 대학	
		(주)헬릭스미스		유진상		연구소장				참여 중소기업	
연구개발담당자		성명		최진규		직위		수석연구원			
실무담당자		연락처		직장전화		휴대전화		전자우편		국가연구자번호	

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

2022 년 6 월 3 일

연구책임자: 손 미 원

주관연구개발기관(엠테라파마(주))의 장: 손 미 원 (직인)

공동연구개발기관(경희대학교 산학협력단)의 장: 김 윤 희 (직인)

공동연구개발기관(건국대학교 산학협력단)의 장: 송 창 선 (직인)

공동연구개발기관(주)에치와이)의 장: 김 병 진 (직인)

공동연구개발기관(경희의료원)의 장: 김 기택 (직인)

참여연구개발기관(주)헬릭스미스)의 장: 유 승 선 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	고부가가치식품개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)	기능성·전통식품			연구개발과제번호				318027-04	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0906	40%	2순위 LB1801	20%	3순위 LB1703	20%	4순위 LC0208	20%
	농림식품 과학기술분류	1순위 CA0105	60%	2순위 PA0201	20%	3순위 PA0102	20%		%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명	프로바이오틱스 기반 생애주기별 인지능력 개선 제품 개발								
전체 연구개발기간	2018. 04. 30 - 2022. 03. 31 (3년 11개월)								
총 연구개발비	총 4,024,000 천원 (정부지원연구개발비: 2,519,000 천원, 기관부담연구개발비 : 1,505,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)								
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[v] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)			착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	지정공모								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)									
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p>1. 대사체학을 기반한 신경정신질환별 특이적 장내균총 및 바이오마커 발굴을 통해 상관성 및 분자생물학적 기전 규명</p> <p>2. 생애주기별 인지능력 저하 관련 신경정신질환 대상 장내균총 조절을 통해 개선 효능을 가지는 제품 개발 및 임상적 검증 가. 천연식품에 기반한 기능성 pre/pro/synbiotics 소재 발굴 5건 이상 나. 기능성의 소재 제품화 4건 이상/ 식약처 개별인정형 원료 신청 1건 이상 다. 생애주기별(유, 청소년기/중장년기/노년기) 각 20개 이상(총 60개) 균총 확보</p> <p>3. 천연식품 기반 pre/pro/synbiotics 소재들의 장내균총 조절 기전 규명</p> <p>4. 연구개발 성과를 기술이전 3건 이상</p>							
	전체 내용	<p>1. 생애주기별 신경정신질환 및 장내균총 관련 기초 분석 연구 가. 대사체학 기반 신경정신질환 모델의 생체시료(brain, fecal, serum 등)에서 내인성 대사체 및 개선 소재 분석법 확립 나. 다변량 통계분석 및 대사경로 분석을 통한 특이 마커 발굴 및 질환 발병 기전 탐색 다. 메타분석을 활용한 질환 특이적 장내균총 상관성 및 핵심미생물 규명</p> <p>2. 신경정신질환 모델에서 인지능력 개선 소재 발굴 및 장내균총 조절 기전 연구 가. 신경정신질환 in vitro 시스템에서 전통소재 기반 후보 소재 스크리닝 나. 신경정신질환 및 인지능력 감퇴 모델 구축 및 전통소재 기반 pre/pro/synbiotics 소재 도출 및 효능 최적화 다. Pre/pro/synbiotics 소재의 장내균총 조절 약리 기전 규명</p> <p>3. 인지능력 개선 소재의 인체 적용을 통한 장내균총 조절 임상 검증 연구 가. 고기능성 소재의 인지능력 개선 및 장내균총 조절 임상 검증을 위한 인 프라 구축(인체 대변 샘플 확보 시스템 및 장내균총 분석 연계 구축) 나. 경도인지장애, 불안/우울증 대상 인지능력 개선 인체적용시험 수행 다. ADHD 환자 대상 임상시험 및 기능성 소재가 뇌기능에 미치는 영향 분석을 위한 fMRI 연구</p> <p>4. 생애주기별 인지능력 개선 기능성 소재의 제품화 연구 가. 인지기능 개선 소재 생산 공정 및 품질규격 연구 나. 원료/완제 제형 및 안정성, scale up 생산 등 제품화 연구 다. 안전성 확보 GLP 비임상 독성시험(단회, DRF독성, 유전독성, 반복독성)</p>							

		라. 신규및상용균주를 활용한 유제품 개발, 생산공정, 품질관리 표준화 연구 마. 제품 카테고리 구축 전략을 통한 신제품 개발 및 출시 바. 식약처 개별인정 및 미국 NDI 신청
1단계	목표	
	내용	
n단계	목표	
	내용	

연구개발성과	1. 논문 및 학술발표 등의 학술성과 가. 본 연구과제 결과를 바탕으로 SCI급 국제학술지에 15건, 국내외 학술발표 17건 발표
	2. 특허 등의 지식재산권 성과 가. 본 연구과제 수행을 통해 장내균총 조절에 의한 신경정신질환 및 인지기능 개선 제품 개발 원천기술을 확보하여 특허출원 8건, 등록 2건 완료
	3. 사업화 성과 가. 본 연구과제 수행을 통해 제품화 2건 및 기술이전 1건 완료 나. 제품 누적 매출 149억원 달성
	4. 연구 인프라 구축 성과 가. 신경정신질환과 장내균총의 상관성 규명 및 장내균총 유래 대사체 기반 질환 특이적 바이오 마커 발굴 등을 통해 장내균총-뇌-장축 조절 신경정신질환 극복 연구를 위한 인프라 구축 나. 식품/미생물 자원의 신규 효용성 창출을 통한 고부가가치 생물자원 확보 및 기탁/등록

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	1. 활용계획 가. 대사체학 기반 신경정신질환별 인지능력 개선 소재의 바이오마커 발굴을 통한 원천기술 확보에 활용 나. 신경정신질환 개선 효능 관련 대사체 기반 예측 모델 개발에 활용 다. 인지능력개선 소재 유래 유효성분 규명 및 신약 후보물질 합성 등의 기초자료 활용
	2. 기대효과 가. 식품 및 미생물 자원을 활용한 제품개발을 통해 유용자원의 활용도 및 부가가치 증대 기대 나. 장내균총과 인지감퇴와의 상관성 연구를 통해 관련 산업 기술 발전에 기여 다. 체계화된 장내균총과 인지능력 개선 상관 연구를 통해 장내균총 조절 제품 개발 원천 기술 확보 및 국가 기술력 증대 도모 라. 대사체학을 적용한 신경정신질환별 인지기능 개선 소재의 효능 예측 및 알고리즘 구축을 통한 핵심기술 확보 마. 고기능성 원료의 재배, 연구개발, 제품생산, 유통 관련 분야의 중소기업 활성화 및 매출 증가에 따른 연계산업의 일자리 창출에 기여 바. 생애주기별 신경정신질환을 예방 및 인지능력을 증진 제품 개발을 통한 인지 장애 관련 의료비 절감 효과 기대 사. 경쟁 제품들(인지능 관련 제품군은 연 4,000억 규모에서 2020년 약 1.7조원 규모로 예상) 시장 성장은 연 25% 이상으로 다른 기능성 제품군들보다 월등히 높은 성장성이 있어 제품 초기 시에도 100억 이상의 매출 증대 기대

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당사항 없음
-----------------------	---------

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장 비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
17		8(출원) 2(등록)						1	1			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	장내균총		인지능력		신경정신질환		프로바이오틱스		기능성식품			
영문핵심어 (5개 이내)	Gut microbiome		Cognitive function		Neuropsychosis		Probiotics		Health functional foods			

〈 목 차 〉

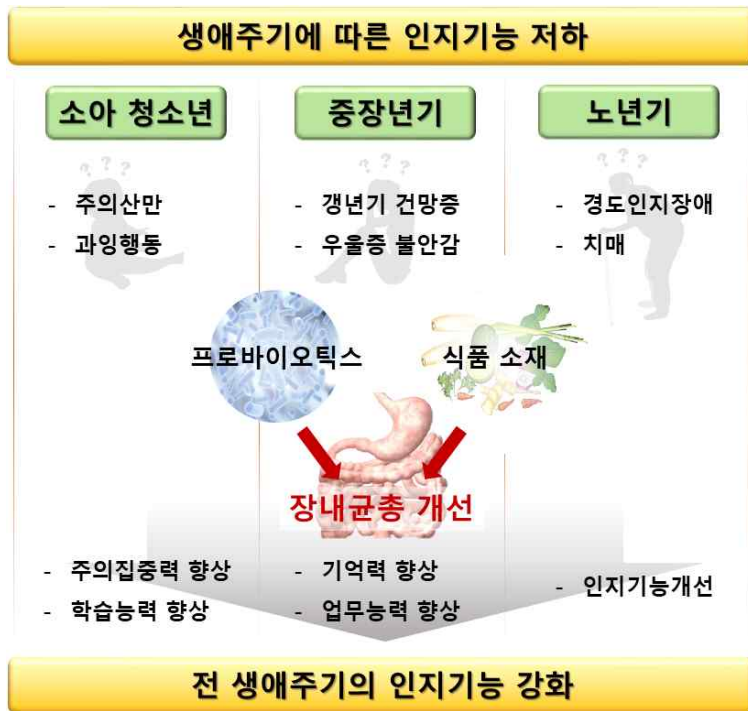
1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용	6
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	21
4. 목표 미달 시 원인분석	224
5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도	225
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	226

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 개요

가. 본 연구의 전체 목표 및 내용 총 요약

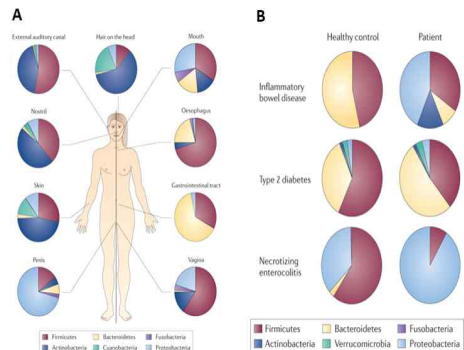
- 1) 최근 장내균총이 신경정신질환의 발병 및 인지기능 장애에 중요한 역할을 하는 것이 보고됨.
- 2) 장내균총 조절을 통한 신경정신질환 및 인지능력 개선에 관한 연구는 기초 단계에서 활발히 진행 중이나, 임상 및 제품화 연구는 초기 단계임.
- 3) 본 연구 과제는 장내균총 개선을 통한 생애주기별 인지능력 개선 프로바이오틱스 및 식품 소재를 개발하여 임상적 검증을 통해 제품화하고자 함.
- 4) 신경정신질환별 대사체학 기반 장내균총 및 바이오마커를 발굴하여 동물/인체 간 특성을 중개연구를 통해 규명하고자 함.
- 5) 기존 뇌 중심의 접근법에서 벗어나 장내균총을 활용한 신경정신질환 및 인지능력 개선 제품 개발을 통해 새로운 패러다임의 고기능성 유제품 및 식품 소재 개발 가능성을 제시할 수 있음.



[생애주기별 인지능력 증진 제품화를 위한 연구개발 개념도]

나. 연구개발 주요 개념

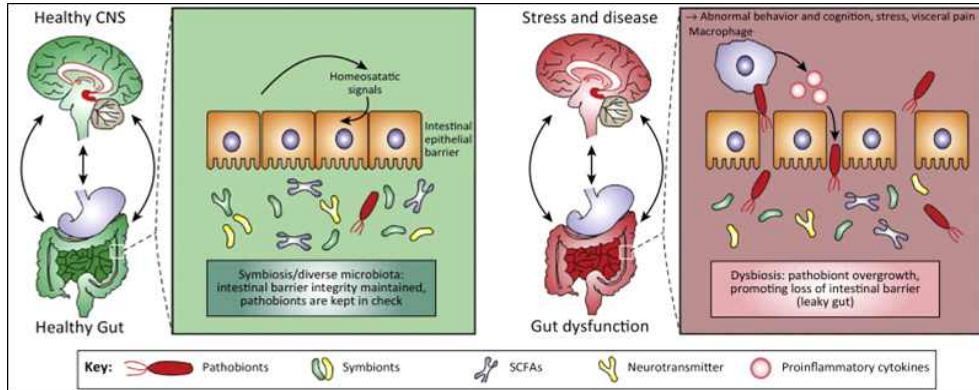
- 1) 장내균주-장-뇌축(Microbiota-Gut-Brain axis)
 - 가) 인체의 피부, 구강, 생식기, 내장에는 수많은 미생물이 공생하고 있으며, 최근 이들 미생물이 인체의 생리병리학적 변화에 많은 영향을 끼치는 것이 보고되고 있음(Spor et al., Nat Rev Microbiol. 2011).
 - 나) Microbiota-Gut-Brain (MGB) axis는 장내균주-장-뇌 사이의 생화학적 상호작용을 통해 인체의 항상성(homeostasis)을 유지하는 시스템으로 뇌에서 분비되는 신경전달물질이나 호르몬 등을 통한 뇌에 의한 장 조절과 장내균주에 의해 생성되는 신경전달물질 및 환경변화인자로부터 뇌 기능의 조절이 이루어지는 것을 의미함.



[(A) 인체 내 장내균주 분포, (B) 장내균주 불균형(dysbiosis)과 질환의 상관관계]

다) 정상 상태에서는 공생균과 유해균이 서로 균형을 이루는 공생(symbiosis) 상태를 유지하나,

외부 스트레스 등에 의한 유해균 군집의 증가로 공생이 깨지면서(dysbiosis) MGB axis 신호 전달체계의 이상이 발생하여 병리 상태가 유도되는 것으로 알려져 있음(Borre et al., Adv Exp Med Biol. 2014).



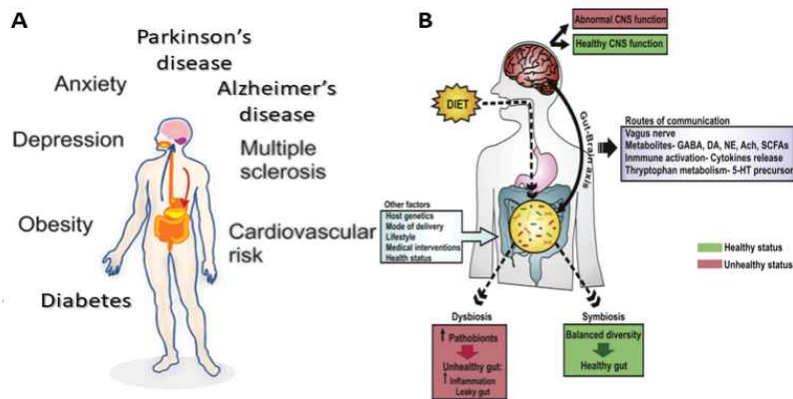
[정상 상태(symbiosis)와 병리 상태(dysbiosis)의 MGB axis]

2) 장내균주에 의한 MGB axis와 신경정신질환 발병의 상관성

가) 뇌/장내 미생물의 상호작용이 관여하는 질환으로는 비만, 당뇨 등의 대사성 질환부터 불안, 우울, 자폐증, 정신분열증 등의 정신질환과 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증 등의 퇴행성 뇌질환에 이르기까지 다양한 것으로 알려져 있음(Montiel-Castro et al., Front Integr Neurosci. 2013).

3) MGB axis에서의 식이섭취의 중요성 및 역할

가) 식이섭취(diet)는 인체 장내균주의 발달에 관여하는 가장 중요한 요소 중 하나로, 식이섭취의 변화에 따라 장내 공생균(symbiont)과 유해균(pathobiont)의 군집 구성 종류 및 비율이 지속적으로 변화하고 이로 인한 장내균주 유래 대사체의 함량 변화를 초래함. 이는 장내 환경 변화 뿐만 아니라 장내균주에 의한 MGB axis 조절에도 영향을 끼쳐 뇌 내 병리상태를 유도함(Oriach et al., Clinical Nutrition Experimental. 2016).



[(A) MGB axis 관여 질환의 종류. (B) 식이섭취(diet)로 인한 MGB axis 조절]

4) 신경정신질환별 장내균총과의 상관성

가) 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)

(1) 정의

(가) Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)는 아동에 있어서 가장 흔한 행동장애로 주의력 결핍, 충동성향, 과잉행동이 특징이며, 아동기에 시작해서 종종 성인까지 지속됨.

나) 발병원인 및 장내균총과의 관계

(1) 최근 연구에 의하면 ADHD 증후를 보이는 아이들은 항생제, 음식, 스트레스 등의 요인에 의해 장내균총의 이상을 보이는 것으로 밝혀졌고, 실제 가공식품, 정크푸드 등에 많이 노출된 미국 등 산업화 국가에서 ADHD 발병률이 높은 것으로 분석됨(Petra et al., Clin Ther. 2015).

(2) 또한 살리실레이트, 인공식품색소, 식품보존제 등을 제거한 식품 섭취 결과, ADHD 아동의 과잉행동 감소의 효과를 보였고(Petra et al., Clin Ther. 2015), 미네랄, 비타민B군, 오메가

-3.6, 플라보노이드 등의 섭취를 통한 장내미생물 균총 이상의 정상화가 ADHD 증상 개선에 도움을 주었음이 보고됨(Lidy et al., PLoS One. 2017; Esther, PLoS One. 2017).

나) 우울증(Depression)

(1) 정의

(가) 다양한 요인으로 인한 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로, 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상생활에 지장을 초래하는 질환임. 또한 생애 주기에 따라 다양한 증상을 나타내는 것으로 알려져 있음. 특징적으로 소아청소년기/중년/노년기에 따라 주요 증상이 다르게 나타남.

(2) 발병원인 및 장내균총과의 관계

(가) 프로바이오틱스가 염증 사이토카인 억제 및 ROS 감소를 통해 영양상태를 증진시켜 궁극적으로 뇌에서 유도되는 신경친화성 인자(BDNF, Brain-derived neurotrophic factor)를 증가시키게 됨. 증가된 BDNF는 신경세포 생존 및 성장을 도와 우울증 치료 보조제가 될 수 있음이 보고됨(Longan and Katzman, Med Hypotheses. 2005; Jiang et al., Brain Behav Immun. 2015). 또한 장 점막기능 이상에 의한 장 누수가 IgA, IgM을 증가시켜 우울증의 병리학적인 원인으로 보고된 점(Maes et al., Neuro Endocrinol Lett. 2008)에서 장내 환경과 우울증은 깊이 관여되어 있음이 시사됨.

소아청소년	중년	노인
등교 거부	상실 및 공허감	외로움
짜증	건망증	불안증
감정 기복 심함	건강 염려증	불면증
과격한 행동	죄책감과 후회	기억력 저하
극단적 언행		
흥미 상실		
학습력 저하		

[생애 주기에 따른 우울증 주요 증상]

다) 불안장애(Anxiety disorder)

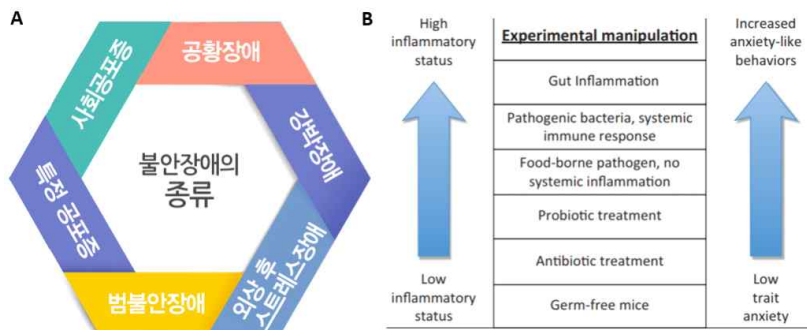
(1) 정의

(가) 불안장애는 다양한 형태의 비정상적, 병적인 불안과 공포로 인하여 일상생활에 장애를 일으키는 정신 질환을 통칭하며. 불안으로 교감신경이 흥분되어 두통, 심장 박동 증가, 호흡수 증가, 위장관계 이상 증상과 같은 신체적 증상이 나타나 불편하고 일상생활을 수행하기 어려운 경우 불안장애로 진단함. 불안장애에 해당하는 질환으로는 공황장애(광장공포증을 동반하거나 하지 않는), 특정 공포증(고소 공포증 등), 사회 공포증, 강박장애, 외상 후 스트레스 장애, 범불안장애, 급성 스트레스 장애가 포함됨(서울대학교병원 의학정보).

(2) 발병원인 및 장내균총과의 관계

(가) 각기 다른 성격의 여러 정신질환(공황 장애, 강박 장애, 외상 후 스트레스 장애, 특정 공포증 등)이 속해 있어 복합적인 원인이 존재하며, 일반적으로 불안이나 우울 등의 정서적인 부분을 담당하는 뇌신경 내의 신경전달물질의 부족 또는 과다, 유전적 원인, 뇌의 기능적 또는 구조적 변화와 사회심리학적 측면, 인지행동적 원인을 포함함. 외상 후 스트레스 장애나 급성 스트레스 장애 같은 경우 극심한 정신적 충격을 일으키는 사고나 재해 등이 원인으로 주로 발병함.

(나) 여러 연구에서는 외부의 스트레스가 장내균총 중 유해균의 증가를 유도하여 장내 염증을 일으킬 뿐만 아니라 불안 및 우울증을 유발하는 것으로 보고하였음(Foster et al., Cell. 2016).



[(A) 불안장애의 종류, (B) 장내균주의 장내 염증 및 불안 유도]

라) 알츠하이머병(Alzheimer's disease)

(1) 정의

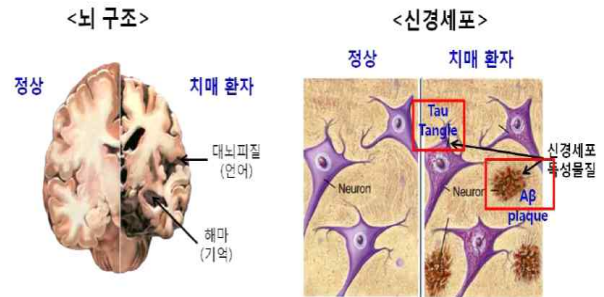
(가) 알츠하이머병은 전체 치매의 70.5%를 차지하는 대표적인 퇴행성 뇌질환으로 질환 발병 시, 기억력 감퇴, 언어 능력 저하 등의 전반적인 인지 능력의 저하가 나타남.

(2) 발병원인 및 장내균총과의 관계

(가) 전체 알츠하이머병은 아직까지 명확한 원인 기전이 규명되지 않음. 현재까지 연구된 주요 발병 기전은 아밀로이드 베타 플라크 또는 타우 단백질 과인산화에 의한 신경세포 손상, 콜린성 신경 전달 저하에 의한 인지 기능 저하 등이 있음.

(나) 최근 연구에 따르면, 알츠하이머병을 앓고 있는 쥐의 장내균총을 정상 쥐의 장에 주입한 결과, 알츠하이머병의 원인으로 알려진 베타 아밀로이드의 축적이 높아짐을 확인하였음(Brandscheid et al., J Alzheimers Dis. 2017).

(다) 프로바이오틱스 섭취가 알츠하이머 환자의 인지 능력 개선에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험을 진행한 결과, 프로바이오틱스를 섭취한 환자군의 인지 기능이 향상됨을 확인함 (Akbari et al., Front Aging Neurosci. 2016). 이러한 연구 결과들은 프로바이오틱스 섭취를 통한 장내균총의 변화가 알츠하이머병의 증상 개선 효과를 나타낼 수 있음을 시사함.



[알츠하이머병의 신경 세포 사멸 및 뇌 조직 위축]

1-2. 본 연구개발의 필요성

가. 인지기능 개선 식품 수요 증가

1) 고연령 인구의 증가

가) 2011년 우리나라 통계청 자료에 따르면 전체 인구 중 65세 이상 인구 비율이 2023년에는 24%, 2060년에는 40%가 될 것으로 전망됨. 따라서, 노인 및 미래세대를 위한 건강기능식품은 미래의 핵심 산업으로 성장할 것이며, 그 중 개별인정형 기능성 식품이 주를 이룰 것으로 보고함.

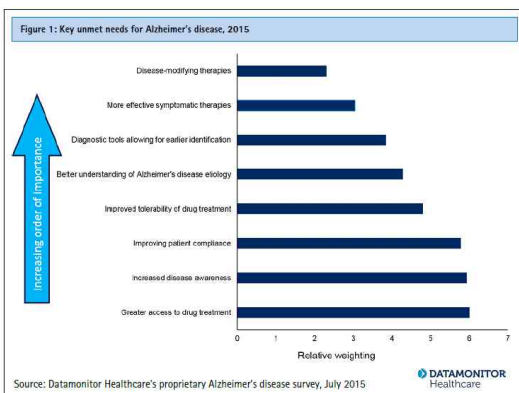
2) 건강에 대한 관심도 증가

가) 건강한 삶을 추구하는 웰빙 트렌드는 소비자로서 하여금 기능성식품에 대한 관심 및 수요를 증가 시킴. 기능성식품은 향후 국내외에서 성장 잠재력이 풍부한 매력적인 시장임.

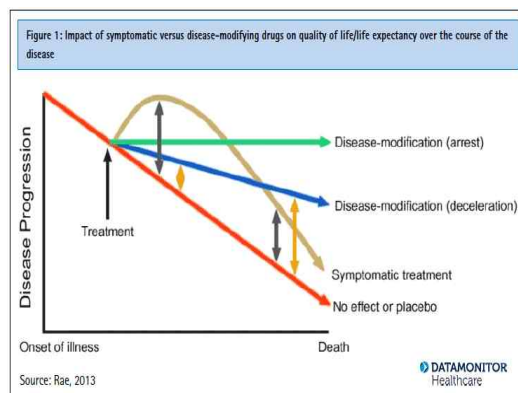
나. 기존 제품의 한계 극복

1) 증상 완화 수준의 기능 개선을 넘어선 인지기능 장애 원인 파악

가) 전 세계적으로 인구증가와 고령화로 인해 노화 관련 질환이 사회적인 이슈로 부각되는 추세임. 특히, 인지능력의 급속한 감퇴를 가장 큰 특징으로 하는 치매 등이 큰 문제로 대두되고 있으나, 현재까지 발병기전에 기인한 치료제는 개발된 바가 없음.



[시장의 미충족 요구(Datamonitor, 2015)]

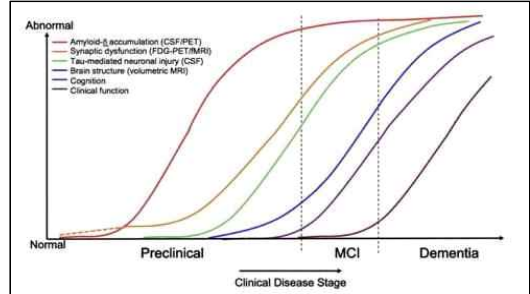


[증상완화제 및 질환개선제의 질병 진행 양상]

- 2) 다양한 인지기능 장애 병리 기전 조절 및 장기간 복용 시 안전성 필요
- 가) 인지기능 장애를 포함한 신경정신질환의 발병은 단일 요인이 아니라 여러 가지 요인이 복합되어 발병함. 따라서 기존 단일 기전 조절 식품 개발의 재고가 요구되고 있으며, multi-target의 중심에 장내균총의 변화가 있을 것으로 예상함.
- 나) 병의 원인을 근본적으로 치료할 수 있는 다중 표적(multi-target)이면서 장기 복용에 안전한 고기능성 식품소재/유산균 소재가 상대적 우위를 차지할 것으로 예상됨.
- 3) 높은 개발 비용

가) 질환개선제 임상 효능 증명의 어려움

(1) **인지기능 관련 신경정신질환은 인지기능 저하가 나타나기 수년 전부터 병리적 변화가 진행되기 때문에 (Fleisher et al., Lancet Neurol. 2012) 질환을 진단 받은 시점에는 이미 신경세포가 다수 파괴되었거나, 질환의 상태가 매우 심각한 상황일 가능성이 매우 높음.** 이 때문에 단시간 질환개선제를 처방하여 인지기능을 개선시키기는 매우 어려움.

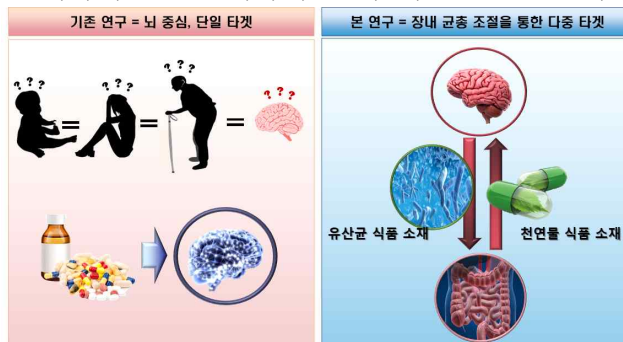


(2) 위 문제를 해결하기 위해 1990년대 주로 투약기간 3~6개월로 진행되던 임상연구가 1994년 이후 12개월로 진행되기 시작하였으며, 2000년대에 들어서는 질환개선제의 경우 임상이 주로 투약 기간을 18개월로 하여 진행되고 있음. 그러나 투약기간의 연장과 질환개선 증명을 위한 생체지표의 도입은 임상연구에 필요한 비용을 급격히 증가시켜, 비용 절감과 리스크를 최소화할 위한 전략이 필요함. 따라서, 이미 경험적으로 안전성과 임상 효능이 입증된 천연식품 소재를 활용하여 고기능성 식품소재/유산균 소재로 개발할 필요가 있음.

[알츠하이머병 진행에 따른 병인 축적과 인지기능 저하 그래프: 인지기능 저하 이전에 병인들의 축적이 일어남]

다. 국내 원천기술 확보

- 1) 한국인 고유의 장내균총 특징 규명 및 생애주기별/ 건강상태별 그룹화, 표준화
- 가) HMP, MetaHIT 등을 통한 전 세계 지역 별 최근 인체 장내균총 연구는 인체 부위별, 인종별로 유의적인 차이가 있음이 밝혀짐. 또한 생애주기와 건강상태(모유 수유, 영양상태, 항생제 처리, 비만 등)에 따라 장내균총이 서로 다르게 분포하는 것으로 나타남. 이러한 결과는 한국인 고유의 장내균총 특징 규명의 중요성과 생애주기별 그룹화, 표준화의 필요성을 보여줌.
- 2) 고유 원료생산 기술 미흡으로 인한 기능성 식품 소재 산업의 국가 경쟁력 약화
- 가) 기술적 분야에서 선진국 대비 국내 기술수준의 특징은 가공기술(70% 이상)은 높으나, 원료생산 기술(30~40%)이 낮아 기능성식품 소재산업의 국제 경쟁력이 매우 취약함. 농산물, 자생 약용식물, 생약성분 등 기초 연구는 지속적으로 수행되었으나 원천기반연구 및 산업계와의 연계 미흡으로 산업화가 저조한 실정임.
- 나) 현재 우리나라의 건강기능식품 또는 기능성원료는 자체 연구개발보다는 수입의존도가 높고 다른 나라에 비해 원천기술력도 낮은 수준임. 농산물, 자생 약용식물, 생약성분 등 기초 연구는 지속적으로 수행되었음.
- 3) 장내균총 활용 인지기능 장애 개선 소재/제품 개발 산업화의 저조
- 가) 장내균총을 활용한 인지능력개선 프로바이오틱스 및 신바이오틱스 소재/제품 개발은 원천기술이 부족하고 선도적인 연구가 부족한 국내의 기능성 식품 시장에서 긍정적인 원료소재 확보에 의미가 있음. 그러나 현재까지는 산업계와의 연계 미흡으로 산업화가 저조한 실정임.



→ 뇌 중심의 기존 연구와 차별화된 생애주기별 장내균총 조절을 통한 인지기능 개선 천연 식품 및 유산균 소재를 발굴하고자 함.

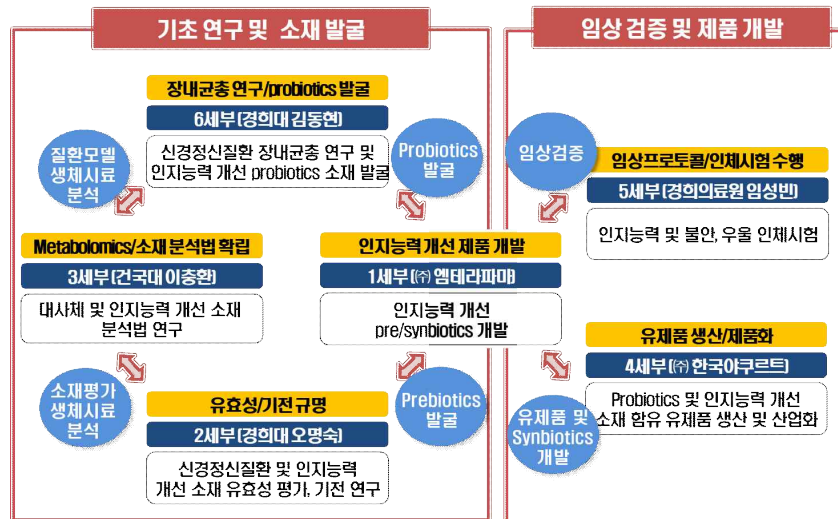


2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 주관연구기관/1세부 추진방법

1) 세부과제 연구기관과의 지속적인 협업을 통한 효율적 연구

추진 체계도



2) 천연물 건강기능식품 개발 전문 기업의 인프라를 이용한 제품 개발

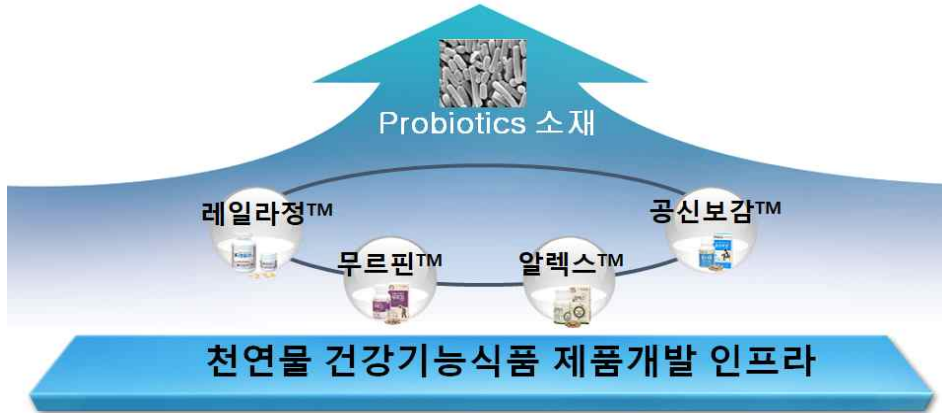
가) 천연물 식의약 소재는 원재료부터 추출공정 등 다양한 요인에 의하여 최종 제품의 효능 및 품질이 영향을 받으므로, 제품의 개발과정 및 품질관리가 매우 어려움. 주관연구기관(바이로메드(주))은 천연물 의약품 및 다양한 기능성식품을 개발한 경험이 풍부하고 인프라가 구축되어 있으므로 효율적인 제품 개발이 가능함

3) 인지능력 개선 prebiotics 및 synbiotics 제품 개발을 위해 자사의 개별인정형 기능성 원료를 활용

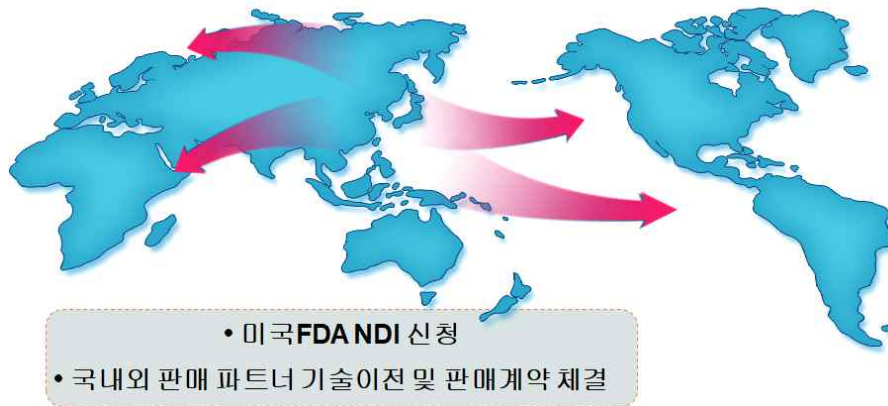
가) 생애주기별 인지기능 개선에 필수적인 주의집중력 및 작업기억력 개선 효능을 확인한 기능성 소재를 우선적으로 활용하여 prebiotics 활성을 확인하고 나아가 synbiotics 제품으로 확장함으로써 제품개발의 실패 가능성을 낮추고 빠른 제품 출시 전략을 모색함

4) 글로벌 시장 진출 가능성이 높은 생애주기별 인지능력 개선 pre/pro/synbiotics 제품 개발

Synbiotics/발효유제품개발



가) 연구개발 연차에 따라 다양한 제품들의 생애주기별 인지능력 개선 효능을 확인하고 비교함으로써, 글로벌 시장에 적용 가능한 제품을 선별하고 NDI 신청 등을 통해 글로벌 진출 가능성 확보



5) 과제를 통해 효능 검증된 소재를 활용한 제품라인 다각화 전략

가) 인지능력 개선, 항불안 유효성 평가를 통해 확보될 소재들에 대하여 복합 원료 개발을 통해 맞춤형 제품 개발 및 제품라인 다각화

6) HX106의 ADHD 개선 근거 확보

가) ADHD 소아청소년 대상 임상시험(위탁연구기관 중앙대학교) 결과를 통해 임상근거 확보

나) ADHD 동물모델 및 세포모델 실험(제2세부연구기관 경희대학교) 및 도파민 대사 관련 스크리닝 분석 진행을 통해 실험과학적 기전 근거 확보

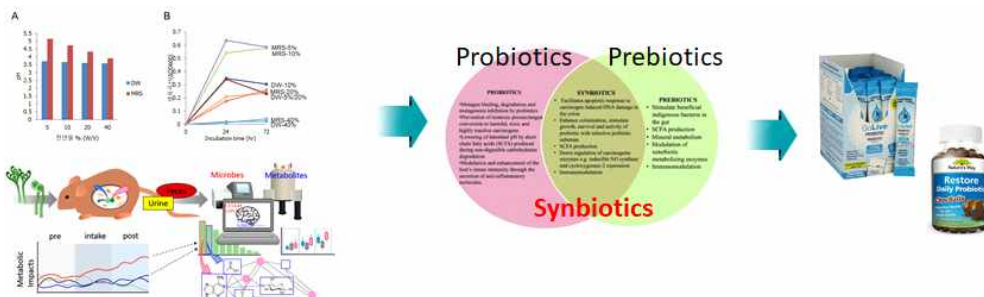
7) Prebiotics 효능 연구를 통한 Synbiotics 소재 도출

가) in vitro 평가 : prebiotics 후보 소재가 선별된 유산균의 성장에 미치는 영향을 평가함.

(1) 선별된 유산균에 생육 조건 맞춘 prebiotic의 환경 변화 연구

(2) prebiotics 소재와 함께 유산균 배양을 통한 유산균의 성장을 평가

나) in vivo 평가 : 프리바이오틱스 투여 후 분변의 유산균을 평가함



[소재 도출 및 배합 최적화 연구 모식도]

8) 소재 물성 연구

가) prebiotics 및 synbiotics 후보물질 원료의 물리적, 화학적 변화 확인

나) 후보물질의 열, 빛, 수분, 산/염기 등에 대한 안정성 확인

다) 유해물질 및 미생물 오염 및 증식 가능성 확인

라) 추출조건(용매, 시간, 온도 조건 등) 다양화 통한 후보물질의 물질 성상 평가, 가속/가혹 조건에서의 성분학적 변화 및 유해물질, 미생물 변화 확인

9) 개별인정형 신청 자료 항목에 기반한 원료 및 제제 규격화 연구

□ 신청원도 개요

개별인정 신청 자료 목록	
1	제품자료 신청의 종류 및 목적 기원, 개발경위, 국내외 인건 및 사용현황 등에 관한 자료
2	3-1. 제조공정도 3-2. 합제법부터 단위공정별 제조방법 설명 3-3. 사후인 공정에서 사용될 물 및 용액의 원천에 대한 시험방법
3	3-4. 단위공정별 기능성분 또는 지표성분 함량연장 3-5. 단위공정별 수율연장 4-1. 원료물 특성을 수 있는 성상, 물성 등
4	4-2. 기능성분 또는 지표성분 및 근거 4-3. 영양성분 정보(지방산, 단백질, 탄수화물, 식이섬유, 불용성)
5	5-1. 기능성분 또는 지표성분의 규격 및 근거 * 기능성분 또는 지표성분의 시험 상세서 및 분석자료 포함 5-2. 표준물 정보 (표시표준물의 경우 순도, 구조형식, 유효기간 등 정보 추가) 5-3. 기능성분/지표성분의 시험방법 (표시방법과 경우 불충족시 안전 자료 추가)
6	6-1. 유해물질 규격항목별 원료/제품별 수량/순도/잔여 규격 및 근거 (유해물질 규격 항목의 시험상세서 및 분석자료 포함) 6-2. 유해물질 규격 항목별 시험상세서 및 분석자료 (원료, 중간품, 최종품, 완제품, 포장)
7	안전성에 관한 자료 상해균거 정보, 기능성분 또는 원료 물성에 대한 안전성 정보, 상해균 거 정보, 영양평가, 영양학적 특성, 안전성 시험 상세서, 원료, 최종품 정보
8	기능성 내용 및 그에 관한 자료 8-1. 시험관 시험 (시험방법 대상 50% 포함) 8-2. 동물 시험 (시험방법 대상 50% 포함) 8-3. 인체시험 (시험방법 대상 50% 포함)
9	신약성, 성분학적 검사 시 주의사항 및 그 실험에 관한 자료 신약성 및 검사 시 주의사항 및 그 실험에 관한 자료

□ 제품자료 체크리스트

구분	항목	필수	선택	비고
1. 제품 기본 정보	1-1. 제품명 (제품명, 상품명 등)	필수		
	1-2. 제조업체명 (제조업체명, 제조업체명 등)	필수		
	1-3. 제품용도	필수		
	1-4. 제품특성 (기능성, 효능 등)	필수		
	1-5. 제품구성 (원료, 첨가물 등)	필수		
	1-6. 제품제조 방법	필수		
	1-7. 제품품질 관리	필수		
	1-8. 제품안전성	필수		
	1-9. 제품유통	필수		
	1-10. 제품판매	필수		
2. 원료 특성	2-1. 원료명	필수		
	2-2. 원료특성	필수		
	2-3. 원료용도	필수		
	2-4. 원료특성 (기능성, 효능 등)	필수		
	2-5. 원료구성 (원료, 첨가물 등)	필수		
	2-6. 원료제조 방법	필수		
	2-7. 원료품질 관리	필수		
	2-8. 원료안전성	필수		
	2-9. 원료유통	필수		
	2-10. 원료판매	필수		

[개별인정형 신청자료 목록]

가) 원재료 규격 확보

(1) DNA 종 감별법을 활용하여 정확한 학명(속, 종)이 확인된 원재료 확보 및 규격화

나) 지표성분 탐색 및 표준 물질 확보

(1) 특이성, 안정성, 대표성, 용이성, 안전성 등 지표성분 설정에 필요한 조건을 충족하는 성분 탐색 및 표준품 확보

다) 지표성분 기준 및 시험법 확립

(1) 후보물질의 원료추출물 제제의 제조방법 설정 및 평가

(2) HPLC, LC/MS, NMR 등의 최신 분석 장비를 이용하여 선별 된 후보물질을 구성하고 있는 지표 성분 및 활성성분을 찾고, 구조를 규명

라) 제제 형태에 따른 가속, 가혹 조건 평가

(1) 후보물질의 원료추출물 제제의 가속, 가혹 조건 평가를 통한 최종 조성 및 제조방법 확립

마) 확정 후보물질의 기준 및 시험법 확립

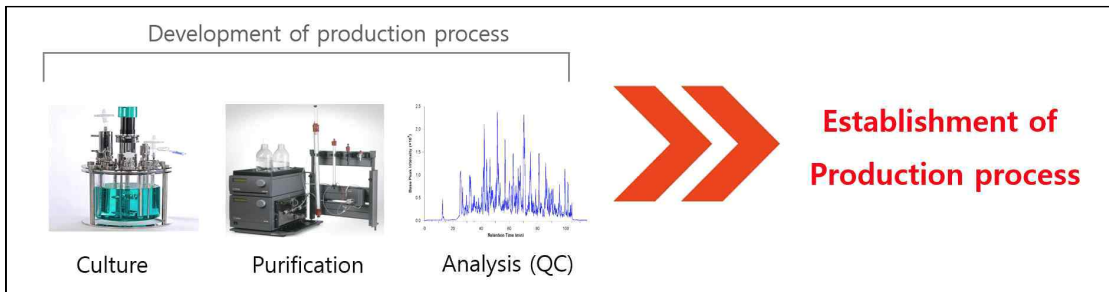
(1) 후보물질 원료 기준 및 시험방법 확립

(2) 후보물질 제제 기준 및 시험방법 확립

10) 원료 생산 공정개발 연구

가) 추출 공정 개발 및 최적화

(1) 선별 된 후보물질 원료 생산 조건을 탐색하여, 재현성을 가지고 높은 수율 및 성분 함량을 나타 내는 최적화 추출조건 확립



[공정 최적화]

나) 제품화를 위한 대량생산 scale up 및 validation 연구

다) 정제공정 개발

(1) 임상시료생산을 위한 정제공정 개발 실시

11) 인체시험용 제제의 CMO 생산 및 제제 연구

가) 기능성 원료 및 프로바이오틱스 배합비, 사용량, 안정성, 상업성 고려 최적 제형(액제, 캡슐제, 정제, 과립제 등) 탐색

나) 안정성 시험 통한 유통기한 설정

다) 계획된 프로토콜을 따라 적합 제형 및 용량의 제제 GMP 규격 생산

라) 기준 규격 분석 및 성적서 확보

12) 비임상시험관리기준(GLP) 독성시험 및 안전성 연구

가) 후보물질의 안전성 평가를 통해

(1) 사람에서의 안전한 최초 투여용량 및 용량 증량 계획 확립

(2) 독성이 나타날 수 있는 장기 및 독성의 가역성 여부 확인

(3) 임상시험 모니터링을 위한 안전성 평가변수의 확인이 가능함.

나) 독성시험은 「비임상시험관리기준」(식약처 고시)에 적합하게 실시하여, GLP수준으로 결과를 확보함.

다) 「생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정」(식약처 고시)에 따라 안전성 평가는 아래의 항목 중 시험물질의 특성에 따라 외부 GLP기관에서 수행됨.

가. 단회투여독성시험자료
나. 반복투여독성시험자료
다. 유전독성시험자료
라. 발암성시험자료
마. 생식발생독성시험자료
바. 기타 독성시험자료(항원성시험, 면역독성시험, 국소독성시험(국소내성포함), 의존성 등)

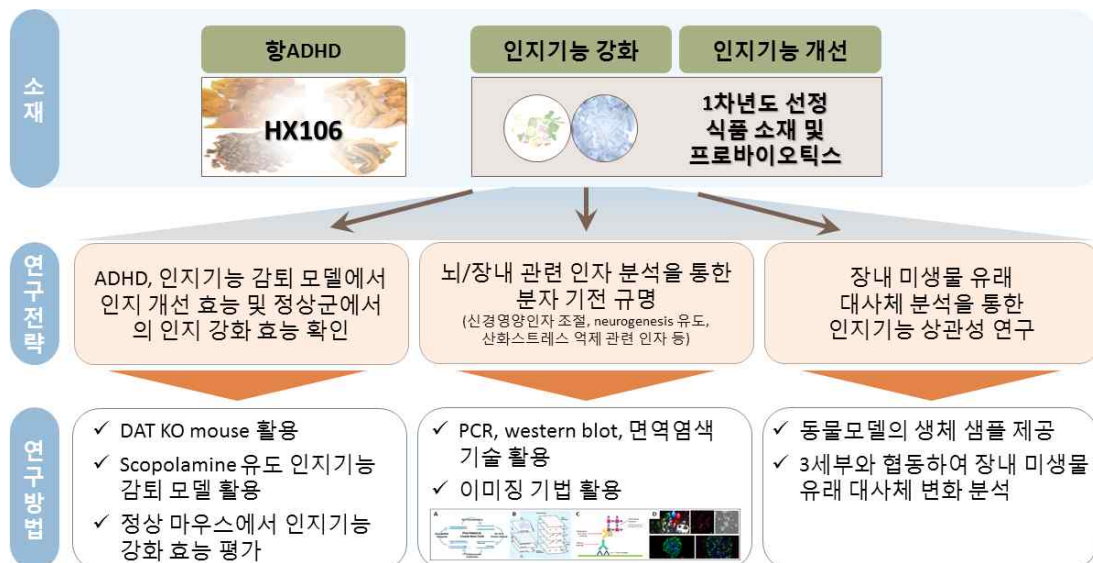
「생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정」항목 '4. 독성에 관한 자료'

13) 임상시험을 위한 제제 생산

가) 계획된 프로토콜을 따라 적합 제형 및 용량의 제제 GMP 규격 생산

나) 기준 규격 분석 및 성적서 확보

나. 2세부 추진방법

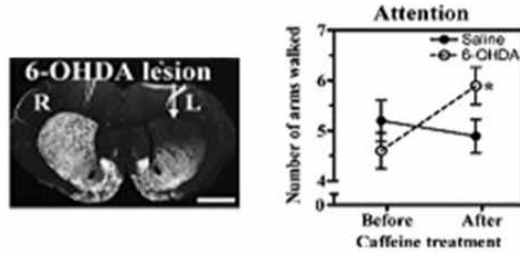


1) 인지기능 및 신경정신질환 모델에서의 식품 소재 유효성 검증 및 기전 규명

- 가) 생애주기별 신경정신질환(ADHD, 인지기능 장애) 모델 구축
- 나) 인지기능 개선 식품 및 프로바이오틱스 소재의 유효성 평가를 통한 신바이오틱스 후보소재 선정
- 다) 조직학적/분자생물학적 최신 기법을 활용한 후보 소재의 약리 기전 규명
- 라) 인체시험 적용을 위한 신바이오틱스 제품의 인지기능 개선 유효성 검증

2) ADHD 동물 모델 구축 및 후보소재의 효능 평가

- 가) neonatal rat의 뇌내에 6-OHDA를 주입하여 도파민의 보상기전으로 인한 상대적 증가로 과잉 행동 증상과 부주의성 등 ADHD 유사 행동을 보이는 모델을 사용함.



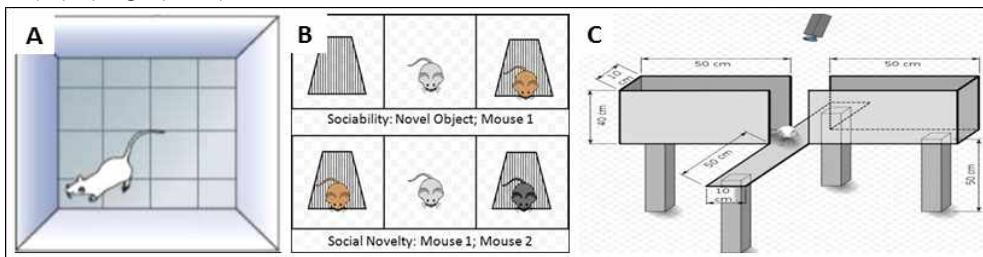
[6-OHDA로 유도한 선조체 병변과 부주의 행동 분석 결과] (Caballero et al., Neurosci Lett. 2014)

- 나) 위 실험동물들의 ADHD 유발 정도를 행동실험, 바이오마커 분석을 분석하여 비교 평가함
- 다) - 위 동물에서 ADHD 개선 약물의 효능을 평가하여 미래 이용가능성에 대한 유효성 평가
- 라) - 위 동물에서 ADHD 개선 후보도출소재의 유효성 평가

3) 동물 모델 평가 방법

가) ADHD 모델 평가

- (1) 행동 평가 : 개방장 실험, 사회적 상호 작용 실험, 고가식 십자미로 실험 등을 통하여 과잉행동과 주의력에 대하여 평가한다.

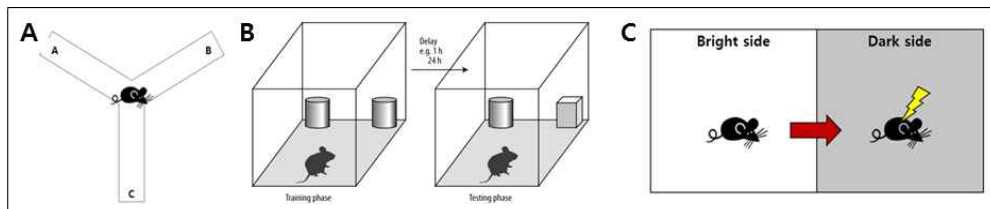


[(A) 개방장 실험 (B) 사회적 상호작용 실험 (C) 고가식 십자미로 실험]

- (2) 조직학적 평가 : Immunohistochemistry assay, western blot, neurotransmitter 측정법을 이용한 도파민 신경세포의 사멸, 도파민 방출/분해와 도파민 수송체의 감소, 세로토닌 수용체의 발현 증가 분석

나) 인지능력 손상 모델 평가

- (1) 행동 평가 : Y자 미로 시험, 신물질 탐색시험, 수동회피시험 등을 통하여 기억 손실에 대하여 평가한다.



[(A) Y자 미로 시험 (B) 신물질 탐색시험 (C) 수동회피시험]

- (2) 조직학적 평가 : Immunohistochemistry assay, western blot, neurotransmitter 측정법을 이용한 아세틸콜린 방출/분해와 시냅스 전·후 인자(synaptophysin, PSD-95 등) 분석

4) 유효 식품 소재 도출을 위한 스크리닝 시스템

가) in vitro 시스템

- (1) 신경세포에 H₂O₂ 또는 glutamate를 처리하여 산화 스트레스 또는 흥분독성을 유도하고 식품 소재 추출물을 처리하여 세포보호 효과를 평가한다.
- (2) 신경아교세포주에 식품 소재 추출물을 처리하여 세포에서 분비되어 신경조직의 성장을 도와 인지 기능에 관여하는 인자인 신경성장인자(nerve growth factor) 분비 유도 효능을 측정하여 인지향상 효과를 예측한다.
- (3) 인지 기능에서 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 효소 아세틸콜린에스터라제에 대한 식품소재의 억제효과를 시험관 실험 수준에서 평가한다.

5) 인지기능 개선 식품소재 유효성 연구

가) 생애주기별 유효성 평가 모델

(1) 소아청소년기

(가) 생애 주기별 인지기능 특성: ADHD 유도 인지기능 감퇴

(나) 연구 방법

- ① ADHD 유도 인지기능 감퇴 개선 평가: 식품소재 추출물을 구축한 6-OHDA 유도 ADHD 신생아 랫트 모델에 투여하여 행동학적·조직학적 분석을 통해 ADHD 유도 인지기능 손상에 대한 개선 효능을 평가한다.

(2) 노년기

(가) 생애 주기별 인지기능 특성: 경도인지장애

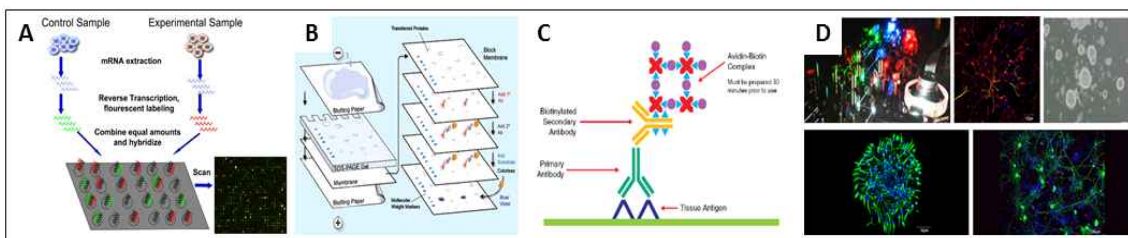
(나) 연구 방법

- ① 경도인지장애: 식품 소재 추출물을 스코플라민 유도 경도인지장애 마우스 모델에 투여하여 행동학적·조직학적 분석을 통해 경도인지장애의 개선 효능을 평가한다.

6) 식품소재의 분자 기전 규명

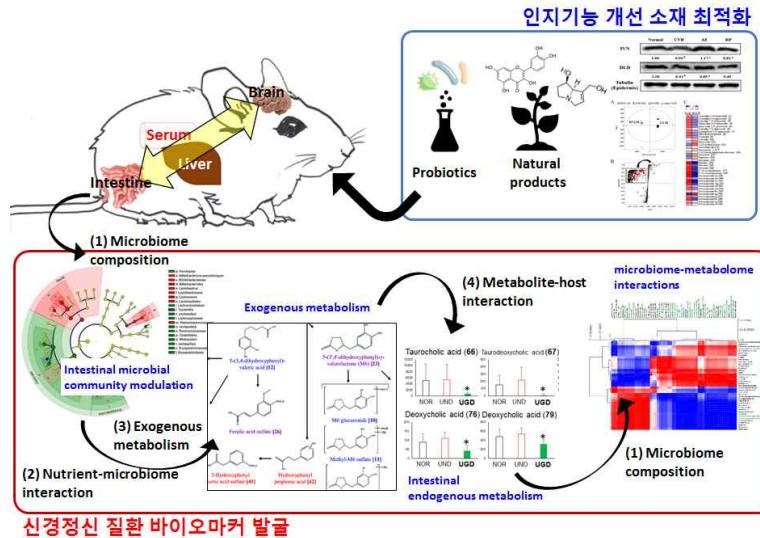
가) 식품소재의 신경정신질환 및 인지 개선 효능에 대한 분자 기전 규명을 위해 제3협동과제의 metabolomics 분석 등을 이용한 식품소재의 약리 타겟을 규명한다.

- (1) Microarray 기법 활용 타겟 인자를 도출하여 siRNA silencing 등을 이용한 기전 연구를 시행한다.
- (2) Immunohistochemistry, Immunofluorescence, PCR, Western blot 및 Flow cytometry 등을 이용 특정 타겟 인자의 세포 및 조직 내 변화를 통해 한약의 단계별 효능 기전을 탐색한다.
- (3) 실시간 공초점/이광자현미경(Confocal/2P microscope)을 이용해 보다 직관적이고 정교한 이미징 분석으로 타겟 인자 발현을 확인한다.



[(A) Microarray, (B) western blot, (C) immunohistochemistry, (D) 이미징 기법 활용 타겟 인자 발현 분석]

다. 3세부 추진방법



신경정신 질환 바이오마커 발굴

[신경정신 질환 관련 모델 인지기능 개선 소재 적용의 대사체 연구 전략]

1) 인지기능 개선 소재 및 내인성 시료의 대사체 분석법 확립

- 가) 인지기능 개선 소재 및 내인성 시료의 대사체 변화를 최소화된 상태로 만들기 위해 정확한 quenching 및 전처리, 추출법의 표준화가 필수적임.
- 나) 소재의 경우, 수분 함량 및 점성을 고려한 동결건조기를 이용함. 이를 통해 분말 형태로 만들어 대사체의 변화가 최소화되도록 함.
- 다) 내인성 시료(brain, fecal, serum 등)의 경우, 효소 및 기타 외부 자극에 의한 대사체 변화를 최소화하기 위해 딥 프리저(-80°C) 보관이 필수적임.
- 라) 소재 및 내인성 시료의 대사체 중 주성분 및 부성분의 효율적인 추출을 위해 극성도 또는 분자량, 구조에 따른 2차 추출, 분리 등의 전처리 과정이 필요함.
- 마) 다양한 문헌 참고를 통해 여러 유기용매 및 추출법을 참고하여 대사체를 추출하고, 질량분석기 분석을 통해 최대한의 많은 수의 대사체 발굴이 중요함.

2) 질량분석기 기기 분석법 확립

- 가) 인지기능 개선 소재 및 모델 내 내인성 대사체의 총체적 해석을 위해서는 다양한 질량분석기의 분석이 필수적임.
- 나) GC-TOF-MS는 주로 1차 대사산물을 분석하는 용도로 사용되며, 아미노산, 당, 지방산, 유기산 등의 분석이 가능함. 이동상으로 가스를 이용하기 때문에 시료의 유도체화가 필수적임.
- 다) UPLC-Q-TOF-MS는 다른 질량분석기와는 다르게 분리된 대사체들의 소수점 4자리까지 정보를 제공함으로써, molecular formula를 제공함.
- 라) UHPLC-LTQ-IT-MS/MS는 주로 생리활성과 관계된 2차 대사산물이 분석 가능함. 이동상으로 액체가 사용되며, MS/MS fragment 정보를 얻게 됨. 이를 통해 저분자 대사체의 구조 유추가 가능함.
- 마) LC-triple q-MS/MS는 다른 액체크로마토그래피 질량분석기와는 다르게, 표적 대사체의 정량 및 추적에 용이함.

3) MS data의 프로세싱 및 다변량 통계분석

- 가) GC 및 LC-MS로부터 나온 raw data를 실험자가 다룰 수 있는 형태로의 변환이 필요함. Metalign과 같은 프로그램을 통해 peak alignment를 실시한 후, 다변량 통계분석을 실시함. 다변량 통계분석은 principle component analysis (PCA) 및 partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) 등과 같이 다중 크로마토그램을 평면화 하여 그룹 간의 차이를 시각화 해줌. 또한, VIP value를 통해 각각의 대사체가 그룹 간의 차이를 보여주는 변수를 제공함.

4) 인지기능 개선 소재 및 내인성 대사체 동정 및 시각화

가) Retention time, m/z, λ max, molecular formula, MS/MS fragment 등의 정보를 이용하여 대사체의 동정을 실시함. 구축된 in-house library, 문헌, HMDB 등과 비교하여 동정을 실시하게 됨. 다변량 통계분석을 통해 선정된 차이나는 대사체들의 경우, Statistica, MeV, SPSS 등의 다양한 통계프로그램으로 validation 및 시각화함.

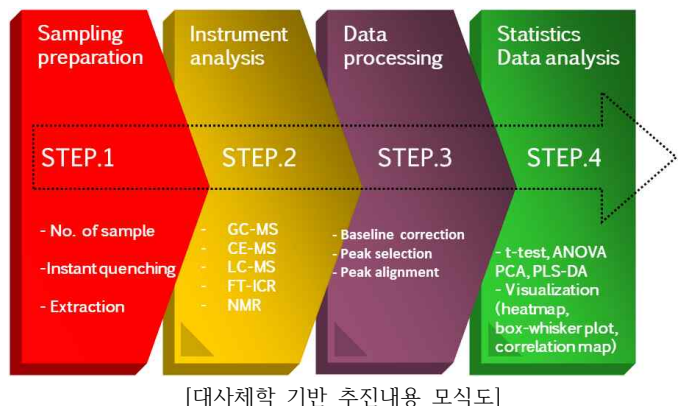
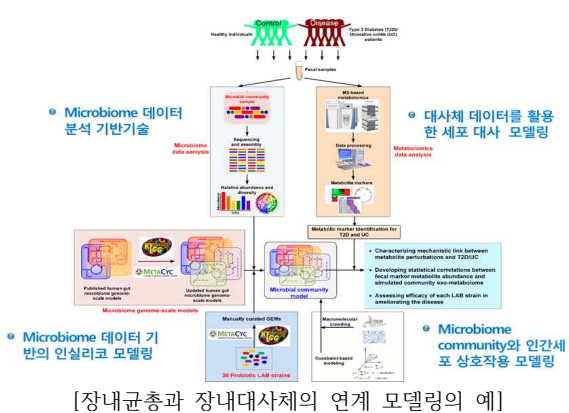
5) 대사경로 및 상관관계 분석

가) 동정된 대사체들을 이용하여 KEGG 및 문헌을 참고해 대사경로 분석이 가능함. 이를 통해 소재의 생합성 경로를 규명하여 소재 최적화 및 품질관리 지표 설정에 도움을 줄 수 있음.

나) 장내균총 및 장내대사체 상관관계 분석을 통하여, 신경정신 질환 관련 대사체 특이마커의 발굴이 가능함. 이를 적용하여 인지기능 개선 소재 섭취시 치유 효과를 보이는 바이오마커의 발굴 또한 가능함.

다) 또한, 인지기능 개선 효과를 보이는 다양한 지표들과 대사체간의 상관관계 분석을 통해 인지기능 개선 관련 내인성 바이오 마커의 발굴이 가능하고, 알고리즘 구축을 통해 다른 분야로의 적용이 가능함.

라) 장내균총과 장내대사체의 연계 모델링 구축을 통해 신경정신 질환과 장내균총 변화 간의 상호작용 및 장내균총 변화와 장내 대사체 변화의 상호작용을 총체적으로 해석하는 것이 가능함.

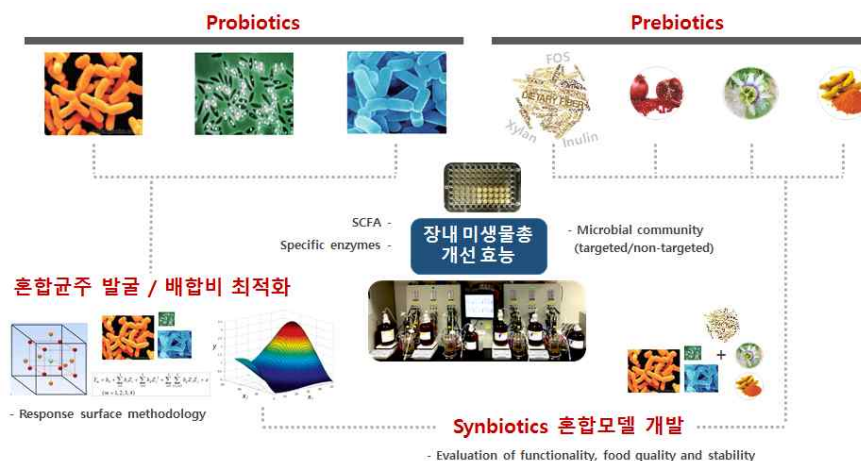


라. 4세부 추진방법

1) 장내 미생물총 개선용 혼합균주 발굴 및 표준 배합비 연구

가) 장내 미생물총 개선 균주의 특성검사

나) 발효유 제조에 필수적인 우유 발효능 및 배양조건 확립을 위한 기초특성 파악



2) 신규 장내 미생물총 개선 소재 생산 공정 구축

가) 단일/혼합 기능성 균주 별 최적배지 및 배양조건을 확립20)

- (1) 선별 균주의 종·속에 따른 표준 식용배지 개발
- (2) DOE (Design of Experiment)를 이용한 성장필수인자 및 성장촉진인자 선별
- (3) 배지성분 및 농도를 조절하여 최대 생균수를 생산하는 배지최적화 연구
- (4) 최대 생산성을 보이는 배양시간, 배양온도, pH 및 교반속도를 확인하여 배양조건 최적화
- (5) 유통안정성 개선에 적합한 배지 및 배양 조건 최적화를 통한 고밀도배양 연구

나) 단일/혼합 기능성 균주 대량생산 공정 구축 및 최적화

- (1) Lab scale 연구를 기반으로 plant scale 적용 연구
- (2) Pilot 및 시생산을 통한 공정 적합성 확인 및 산업화 가능균주 선별
- (3) 당사 probiotics plant에 선발균주 생산적용
- (4) 공정 최적화를 통한 생산량 증대

3) 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구

가) 당사보유 종균 안정화기술 적용 선별균주의 기능성을 유지할 수 있는 안정화기술 개발

- (1) 농축, 동결, 건조 등의 가공공정에서 상용화 생산 적합 판단
- (2) 제품적용을 위한 농축종균 개발 시 최적 농축 비 및 공적압력을 조절하여 균체영향 최소화
- (3) 농축종균의 저장 안정성을 극대화 할 수 있는 균주별 최적 액상 보호제 선별 및 개발21)
- (4) 분말종균 개발 시 균체사멸 최소화를 위한 균주별 최적 동결건조 조건 탐색
- (5) 분말종균의 저장안정성을 높일 수 있는 최적 동결보호제 및 코팅물질의 선정 및 개발
- (6) 미생물 신속검사법을 통한 기능성균주의 저장안정성 및 오염 모니터링 기술 구축

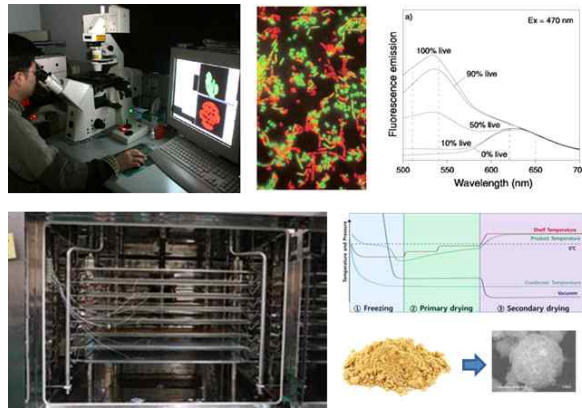


[균주 대량생산 공정 구축을 위한 모식도]

4) 제품 대량생산 공정 구축 및 품질 관리 표준화 설정 연구

가) 기능성 균주의 발효유 제품 적용 가능성 검토

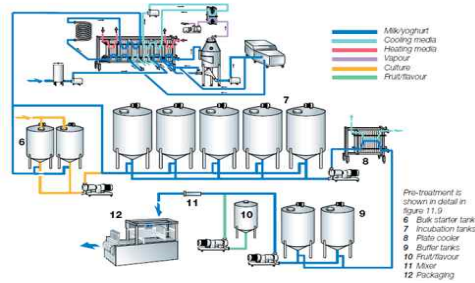
- (1) 기능성 균주의 향미, 산미, 효소 및 물성 등 발효유 적용 적합성 평가
- (2) 우유의 발효 및 물성변화에 따른 발효균종으로의 적합성 검토
- (3) 기능성균주 첨가 시 우유 발효액의 저장성, 우유 발효액의 후숙성 연구
- (4) 발효유 저장온도별 관능 특성 파악



[유산균 농축, 동결건조, 코팅 및 분말화 기술 적용]

5) 기능성 균주 및 기능성소재 적용 제품 대량생산 공정 구축

- (1) 적용소재 특성에 따른 적용제품 선정(액상발효유, D.Y, 호상발효유)
- (2) 액상발효유, 농후발효유(드링크, 호상) 제품에 대한 기존 대량생산 공정 활용
- (3) 주요 공정 : 배양액 전처리 → 배양 → 시럽 제조 및 조합 → 제품 충전 및 포장 → 출하
- (4) 조합 단계에서 기능성 원료 투여
- (5) 발효유 제품 생산을 위한 생산 plot 설정
- (6) 시제품 생산 및 관능검사
- (7) 저장 안정성 검증



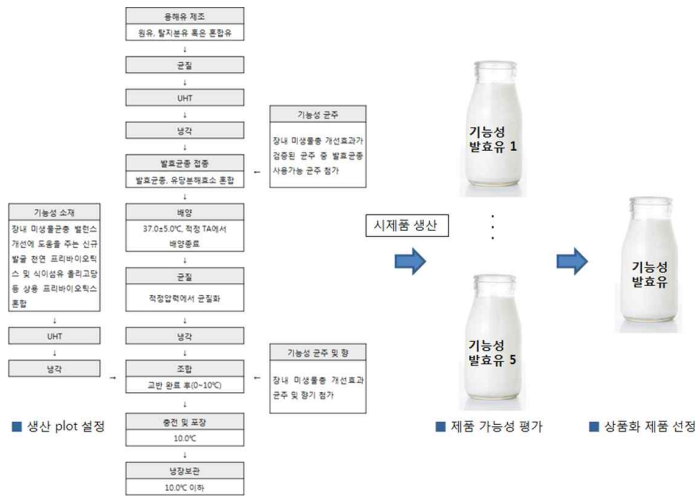
[발효 유제품 대량생산 공정 구축]

6) 관리 표준화를 위한 기능성분 설정 및 시험법

- 가) 건강기능식품 법률 및 가이드라인에 따른 기능성분(지표성분) 설정
 - 나) 혼합균주: 발효유 내 스타터 균주와 구분지를 수 있는 선발 배지 확보
 - 다) 프리바이오틱스: 발효유내에서 검출이 용이한 기능성분(지표성분) 설정
 - 라) 축산물 가공기준 및 성분규격에 따른 기준 및 규격 설정
 - (1) 법적규격: 성상, 이물, 무지유고형분, 유산균 수, 대장균 균
 - (2) 품질관리규격: pH, 산도, 당도, 비중, 점도, 진균 수 등

7) 제품 카테고리 구축 전략을 통한 신제품 출시

- 가) 시장성 및 소비자 선호도 분석을 통한 대표 효능 카테고리 선정
 - (1) 아토피, 항노화, 면역증진, 피부미용, 활력증진 등 시장성 분석 및 전문가 조언 활용
 - (2) 연령별, 성별 및 건강상태별 제품형태 소비자 선호도 조사
 - (3) 액상, 호상, DY 및 발효유 캡슐 복합소재(LOOK, 쿠퍼스) 등 소비자 선호도에 따른 제품 타입 선정
 - (4) 시장성 높은 카테고리 맞춤형 제품 출시
 - (5) '내 몸 속의 또 다른 나, 균을 변화시켜 나를 변화시키자!' 는 컨셉으로 제품 홍보
 - (6) 연구력뿐만 아니라 제품개발력까지 가지고 있다는 기업이미지 활용 홍보(과학성 연구)
 - (7) 소비자 평가단 및 체험단 선정을 통한 제품 모니터링
 - (8) 제품 장기섭취 시 고객의 기존 장내 균총에서 카테고리 별 표준화된 균총으로 개선을 유도



● 개발 제품 컨셉

구분	중장년 계층		신비양 계층
	인형(세대별)	30~50 중장년층	
타겟	인형(세대별)	30~50 중장년층	65세 이후 노년층
건강상태별	장내 면역발전소, 콩피로 BBS(Drivable bowel syndrome)나 BBO(Inflammatory bowel disease)로 고생하는 중장년층	전반적인 면역 약화로 각종 감염증, 무가력증, 피로 등을 호소하는 노년 계층	
제품컨셉	강한 항균 발효소 없(LP)	새로 태어난 듯한 건강함으로 일상 및 여가 생활에 활력을 주는 발효유	
제품차별성 (USP)	<ul style="list-style-type: none"> 집중력 향상 기능이 있는 신바이오틱스(프로바이오틱스+프리바이오틱스) 함유로 과민성대장질환(IBS, IBS)에 도움을 줄 수 있음 유당분해효소: 대장 건강에 효과적인 천연물을 최소화해서 사용하여 대장 건강에 도움을 줌 	<ul style="list-style-type: none"> 인지기능개선 기능이 있는 신바이오틱스(프로바이오틱스+프리바이오틱스) 함유로 면역 약화로 인한 증상들을 개선할 노년층에게 부족한 단백질, 칼슘 등을 보충해주는 그릭(Greek) 타입의 기능성 발효유 	
제품이미지/제형&용량		 농후발효유 / 140ml	 농후발효유(Greek) / 120g
원재료	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 원료: 혼합균주+프리바이오틱스 부원료: 원유, 고당농축액, 유기농아기베시킵, 유당분해효소, 천연물분해효소, 천연착염료, 유산균 스타터 	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 원료: 혼합균주+프리바이오틱스 부원료: 원유, 마누카 꿀, 유기농아기베시킵, 말크칼슘과우더, 천연착염료, 유산균 스타터 	

[시제품 생산 및 출시용 제품 선정을 위한 모식도]

마. 5세부 추진방법

- 1) 정상인과 환자군에서 혈액 및 대변 샘플의 모집 및 분석을 위한 기반 인프라 구축
 - 가) 인체유래물은행을 통한 샘플의 모집
 - (1) 경희의료원은 인체유래물은행을 운영하고 있으며 이를 통한 검체의 수집이 가능함
 - (2) 대변 등 특별한 목적의 검체의 수집에 대한 SOP 등 제반 시스템의 구축이 필요함
 - : SOP 개정 후 운영위원회를 통하여 모집 시스템 구축
 - (가) 대변의 모집은 유전자 연구기관 IRB를 통해 모집하는 경우 특정 연구 목적에만 사용 가능하나 인체유래물은행을 통한 모집은 향후 연구계획을 제출하면 다양한 연구가 가능하고 대변의 보관 또한 우수한 품질의 관리 시스템을 갖고 있는 경희의료원에서 가능함

- 나) 정상인과 환자군에서의 혈액 및 대변 샘플의 모집
 - (1) 대변에서 장내균총을 분석하기 위해서는 정상 대조군의 샘플이 필수적임
 - (2) 정상인의 샘플은 인체유래물은행을 통하여 모집하여 관리하는 것이 효율적임
 - (3) 환자군의 경우, 특히 정신질환은 환자군의 특성 때문에 대변 샘플의 수집이 어려운 경우도 있어 과제 수행 및 정신질환과 장내 균총의 연관관계를 분석하기 위해서는 우울증 등 환자가 대변을 제공할 수 있는 질환에 국한해야 함
 - (4) 3,4 년차에는 경도인지기능 장애 등을 대상으로 장내 균총을 분석할 수 있어서 연구가 활성화 될 것으로 예측됨
 - (5) 1차년도에는 정상인 위주로 50예, 2차년도에는 정신 질환 환자 샘플 150예의 샘플을 모집할 예정임

- 다) 장내균총 분석을 위한 IRB 통과
 - (1) 인체유래물은행에 모집된 대변에서 장내 균총 분석을 위한 연구계획서의 IRB 통과
 - (2) 연구팀 내 세부과제와 유기적인 연계로 샘플 및 임상 정보 제공
 - (3) 향후 고기능성 유제품의 인지기능개선을 위한 인체적용시험에서 인지기능 개선에 미치는 장내 균총의 역할에 대한 자료 도출을 위한 기초 자료 확립을 위한 연구 계획 수립

2) 임상연구 수행을 위한 프로토콜 개발 및 IRB 통과

- 가) 임상 프로토콜 개발
 - (1) 경도인지장애 시험대상자에서 유산균 추출물의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
 - (2) 불안증상을 가진 건강인을 대상으로 유산균추출물의 불안증상 개선 등 기능성 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

나) IRB 통과

- (1) 2, 3, 4 차년도 빠른 임상시험 진행을 위하여 1차년도에 임상시험 계획 통과

3) 인체적용시험계획서 요약 (경도인지장애)

시 험 제 목	MT104의 인지 기능 개선 등 기능성 및 안전성 검증을 위한 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
시 험 의뢰자	엠테라파마㈜
시 험 책임자	경희대학교병원 신경과 이진산 교수
시 험 공동연구자	별첨0 참조
시 험 담당자	별첨0 참조
시 험 실시기관명 및 주소	실시기관명: 경희대학교병원 주소: 서울시 동대문구 경희대로 23
시 험 기간	IRB 승인일 ~ 2022년 6월 30일
시 험 대상	문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성
시 험 목적	경도인지장애 시험대상자에서 MT104 (실새삼: 새삼: 락토바실러스파라카제이 복합물, 3:1:0.5의 비율)를 투여했을 때 인지기능 개선 등 기능성 및안전성을 평가하고자 한다.
디자인	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교인체적용시험
시 험 식품	실새삼(<i>Cuscuta australis</i> R. Br.), 새삼(<i>C. japonica</i> Choisy) 및 락토바실러스파라카제이(<i>Lactobacillus paracasei</i>) 복합물(MT104) 480mg을 함유한 1000mg 정제
대 조 식품	Placebo(MT104 복합물이 함유되어 있지 않고, 시험식품과 외관과 성상이 동일한 정제 1000mg의 위약)
투여방법 및 투여기간	시험식품은 1일 1회, 1회 1정제를 총 12주간 투여한다. 가) MT104 (실새삼, 새삼 및 락토바실러스 파라카제이 복합물 480mg을 함유한 1000mg 정제) 나) 대조식품
대상자수	drop-out 10% 고려하여 각 군당 43명씩, 총 86명
선정기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 선정한다. 가) 문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 나) 경도인지장애 진단기준에 부합한 자 (1) 환자나 보호자가 인지장애를 호소 (2) 신경심리검사(SNSB)의 언어적 또는 시각적 기억력 점수가 나이와 학력 수준의 -1SD 이하로 저하된 자 (3) 일상생활장애가 없어야 함(K-IADL 테스트에서 0.43 이상인 자) 다) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자
제외기준	다음 기술된 조건에 해당되는 자를 제외시킨다. 가) 건강기능식품과 의약품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 자 (1) 치매, 뇌졸중, 수두증을 진단받은 자 (2) 위장장애 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 자(정신분열증, 간질, 알코올중독, 거식증, 이상식욕항진 등) (3) 뇌졸중, 심질환 (심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장 (narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압 대상자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준) 또는 폐질환이 있는 자 (4) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치 x 2.5) (5) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dL 이상)와 혈소판 (15만/mm3이하), 혈액소 수치 (남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하인 자 (6) 최근 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 자 (7) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고있는 자 (8) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 자 (9) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법 (경구용 피임약, 호르몬 이식, 자궁내 기구, 콘돔, 살정제)의 선택에 동의하지 않는 가임여성 (10) 최근 2개월 이내에 헌혈을 하거나 1개월 이내에 성분 헌혈을 한 자 (11) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 자
평가변수	기능성 (Functionality) 평가변수 가) 1차 기능성 평가변수 (Primary endpoint) (1) K-MMSE 총점의 개선율 나) 2차 기능성 평가변수 (Secondary endpoint) (1) - K-MoCA 총점의 개선율 (2) SNSB의 서울언어학습검사 (Seoul Verbal Learning Test, SVLT) 지연회상 점수의 개선율 (3) SNSB의 레이복합도형검사(Rey Complex Figure Test, RCFT) 지연회상 점수의 개선율 (4) SNSB의 SVLT 즉각회상, 재인 점수의 개선율 (5) SNSB의 RCFT 즉각회상, 재인 점수의 개선율 안전성 (Safety) 평가변수 활력징후, 이학적 검사, 실험실적검사, 이상반응

4) 인체적용시험진행일정표

Period	Screening	Intervention			Follow-up ¹³
		1	2	3	
Visit	1	2	3	4	
Week	-2	0 ¹⁾	6	12	
Window period			±8	±8	
서면동의	✓				
인구학적 조사(성별, 생년월일, 연령)	✓				
활력징후(맥박, 혈압, 체온) ²⁾	✓	✓	✓	✓	✓
신체 검사 ³⁾	✓				
병력 조사 및 이학적 검사 ⁴⁾	✓	✓	✓	✓	✓
약물 및 건강기능식품 섭취 조사	✓	✓	✓	✓	✓
생활습관 조사(음주력 및 흡연력 등) ⁵⁾	✓				
실험실적검사(혈액, 소변 검사) ⁶⁾	✓	✓	✓	✓	✓
임신반응검사 ⁷⁾	✓	✓	✓	✓	✓
SNSB, K-IADL ⁸⁾	✓			✓	
시험대상자 적합성 평가 ⁹⁾	✓				
무작위배정		✓			
K-MMSE, K-MoCA ¹⁰⁾		✓		✓	
시험/대조식품 처방		✓	✓		
반납식품 회수/순응도 확인 ¹¹⁾			✓	✓	
분변 수집 ¹²⁾		✓		✓	
이상반응 확인			✓	✓	✓

5) 인체적용시험계획서 요약 (불안)

시험제목	경도인지장애 시험대상자에서 유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 HP7A의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험
시험의뢰자	(주)에치와이 (구 한국야쿠르트(주))
시험책임자	경희대학교병원 임상약리학과 강원섭 교수
시험공동연구자 및 담당자	별첨 0 참조
시험기관명 및 주소	경희대학교병원 (서울시 동대문구 경희대로 23 경희의료원)
시험기간	IRB 승인일 ~ 2022년 2월 28일
시험대상	경도인지장애(CERAD-K 총점이 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상 감소한 사람)증상을 가진 문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성
시험목적	경도인지장애 시험대상자에서 유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 (HP7A)을 투여했을 때 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다.
디자인	무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교인체적용시험
시험식품	유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 (HP7A)과 함유된 캡슐 (유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물) 389mg (캡슐당 복합물 300mg 함유)
대조식품	Placebo(유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물이 함유되어 있지 않고, 시험식품과 외관과 성상이 동일한 캡슐, 캡슐당 389mg의 위약)
투여방법 및 투여 기간	시험식품은 1일 1회, 1회 2캡슐을 총 12주간 투여한다. 가) HP7A (유산균 HP7과 쇠비름 복합물, 389mg(캡슐당 복합물 300mg 함유) 나) 대조식품
대상자수	최종 평가가능 예수 32례
대상자 선정기준	가) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 나) 2) 문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 다) 3) CERAD-K 평가에 의해 경도인지장애에 해당하는 자: CERAD-K 총점이 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD미만 ~ 하위 5% 이상 범위에 있는 자 또는 CERAD-K 기억력과제 점수 (Word list memory or Word list recall or Word recognition or Constructional recall)와 비기억력과제 점수(Verbal fluency or Boston naming test or Constructional praxis or Stroop test)가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD미만 ~ 하위 5% 이상 범위에 있는 자 라) 4) 정신질환 진단 및 통계편람 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5, DSM-5)의 치매의 정의에 부합되지 않는 자.
대상자 제외기준	가) 건강기능식품과 의약품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 시험대상자 가) 2) 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받은 시험대상자 나) 3) 위장장애 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 시험대상자(정신분열증, 간질, 알코올중독, 거식증, 이상식욕항진 등) 다) 4) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장(narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압 대상자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준) 또는 폐질환이 있는 시험대상자 라) 5) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 시험대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치 x 2.5) 마) 6) 혈당강화제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강화제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dL 이상)와 혈소판(15만/mm ³ 이하), 혈액색 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하인 시험대상자 바) 7) 최근 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 시험대상자 사) 8) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 시험대상자 아) 9) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 시험대상자 자) 10) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법 (경구용 피임약, 호르몬 이식, 자궁내 기구, 콘돔, 살정제)의 선택에 동의하지 않는 가임여성 차) 11) 최근 2개월 이내에 헌혈을 하거나 1개월 이내에 성분 헌혈을 한 시험대상자 카) 12) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 시험대상자
평가기준	기능성 (Functionality) 가) 1차 기능성 평가 (Primary endpoint) (1) - ADAS-cog 총점 (2) - ADAS-cog 기억요인 개선율 나) 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint) 각 검사의 baseline 대비 개선율 (1) - 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category fluency) (2) - 숫자폭 검사(Digit Span Test: DST) (3) - 간편형 단서 회상 검사(The Short Cued Recall Test: SCRT) (4) - 단서 회상 과제(Enhanced Cued Recall Task: ECRT) 안전성 (Safety) 시험식품 투여 전과 투여 중, 투여 12주 후에 실험실적 검사, 활력징후를 측정하고 연구기간 내에 이상반응을 평가한다.

- 6) 인지기능 개선 인체적용시험 실시 및 결과 확보(기능성 입증을 위한 근거자료 확보를 위한 임상 시험)
- 가) 경도인지장애를 가진 정상인 시험대상자에서 유산균 추출물의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험 실시
- 나) 불안/우울증 증상을 가진 정상인 시험대상자에서 유산균 추출물의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험 실시
- 다) 데이터 입력 및 통계분석
- 라) 장내균총 분석을 통한 인지기능 개선 등 정신질환 증상 개선과 장내균총의 변화와의 관계 분석
- 마) 결과보고서 작성

바. 6세부 추진방법

AD, 불안/우울증 질환 동물 모델 제작	질환 모델의 Metagenomics, Metabolomics 분석	프로바이오틱스/프리바이오틱스 선별	신경 질환 개선 후보 물질 발굴을 위한 인프라 구축
<ul style="list-style-type: none"> - 선행 연구 결과를 토대로 한 AD, 불안/우울증 동물 모델 제작 - AD, 불안/우울증 환자 분변 FMT 기법 및 유발 원인 장내 세균을 이용하여 질환 모델 제작 - 환자의 분변, 원인 미생물을 무균 동물에 이식하여, 유발 동물 모델 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - 신경 질환 환자 분변의 대사체 분석 - 정신 신경 질환 동물 모델의 분변, 장 (대장>소장), 뇌 조직의 대사체 분석 - 분변의 미생물 군집 분석 [Metagenomics] 및 군집의 상관성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 인지 기능 개선 천연물 소재가 포함된 유산균 배지를 이용한 유산균 선별 - 천연물 소재의 프리바이오틱스 효능 평가 (in vitro-단독유산균 또는 사람의 분변군집, in vivo 평가) - In vivo 유효성 평가를 통한 AD 및 불안/우울증 개선 최종 후보 물질 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - 무균 동물에 신경 질환 환자 분변의 FMT 또는 원인 세균을 통해 질환 모델 개발 - 원인 미생물을 SPF 동물에 이식하여 질환 동물 모델 개발 - 위의 동물 모델을 비교하여 미래의 신경 질환 예방/치료 후보 물질 개발에 활용 가능한 인프라 구축

정신 신경 질환 원인 미생물 이식 마우스 모델 플랫폼 개발 / 프로바이오틱스 및 신바이오틱스의 후보 물질 도출

- 1) Probiotics 소재 발굴
 - 가) 발효식품(김치, 된장 등)에서 MRS, GAM 배지 등을 이용하여 신규 유산균, 고초균을 분리하고 동정함
 - 나) 건강한 사람의 분변미생물군집에서 GAM, BL, M10 배지로 신규 유산균, Facalibacteria, Eubacteria를 분리하고 동정함
 - 다) BV2세포에서 NF-kB 활성화를 억제하는 유산균, 고초균, Facalibacteria, Eubacteria를 분리함
 - 라) NF-kB 활성화를 억제하는 신규 균주 중에서 SH-SY5Y세포에서 α -synuclein을 발현을 억제하는 신규 균주를 분리하고, 구속스트레스 및 KO 유도 불안/우울증 유발 마우스로 Elevated plus maze test, Light-dark test, 강제수영 실험을 수행하여 불안/우울증 개선 후보물질 도출
 - 마) NF-kB 활성화를 억제하는 신규 균주 중에서 SH-SY5Y세포에서 BDNF 발현을 증가시키고, NF-kB 활성화를 억제하는 신규 균주를 분리하고, EC 및 scopolamine 유도 기억력 손상 마우스로 Y-maze, Morris water maze, 사물인식실험을 수행하여 AD 개선 후보물질 도출
- 2) Prebiotics 소재 발굴 및 신경정신질환 개선 probiotics / synbiotics의 후보물질 도출
 - 가) 기존에 유산균 증식인자로 발굴한 인삼, 다당체를 포함한 30여가지 소재와 인지기능이 있는 소재로 분리한 10여개의 천연물소재를 GAM 배지에서 사람 또는 생쥐의 장내미생물군집 배양하였을 때 유산균만을 선택적으로 증식시키는 효과가 있는지 측정함
 - 나) 위에서 분리한 소재에 대해 생쥐에 투여하고 유산균을 선택적으로 증식시키는지를 선택배지와 qPCR로 분석함
 - 다) 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 혼합물(신바이오틱스), 인지기능개선 천연물소재와 프로바이오틱스의 혼합물(신바이오틱스)의 신경정신질환 개선 효능을 제 3세부과제와 함께 평가함
- 3) 인지장애 동물 모델 구축 및 후보소재의 효능 평가
 - 가) 2,4,6,-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)로 유도된 대장염 동물 모델 제작 : 50% 에탄올에 녹인 2.5% TNBS 용액을 C57BL/6 수컷 생쥐의 직장 내 투여 - 대장염/인지기능장애가 동시에 일어남.
 - 나) EC(인지기능손상 미생물)로 유도한 동물 모델 제작 : EC를 5-10일간 경구 투여 - 인지기능장애가 나타남.
 - 다) Lipopolysaccharide (LPS)로 투여한 동물 모델 제작 : C57BL/6 수컷 생쥐에게 EC의 LPS를

분리하여 5일 간 복강 내 투여 - 인지기능장애가 나타남.

- 라) 5FAD Tg 동물 구입 및 사육 : 유전자 변형 생쥐로써 6-8개월령부터 인지 기능 장애가 나타남.
- 마) 무균동물에서 FMT(인지기능 손상 환자의 분변) 또는 원인미생물을 이식하여 인지기능 손상모델 동물 제작
- 바) SPF동물에 FMT(인지기능 손상 환자의 분변) 또는 원인미생물을 이식하여 인지기능 손상모델 동물 제작
- 사) 위 실험동물들의 인지기능손상을 행동실험, 바이오마커 분석을 분석하여 비교 평가함
- 아) 위 동물에서 인지기능개선 약물의 효능을 평가하여 미래 이용가능성에 대한 유효성 평가
- 자) 위 동물에서 인지기능 개선 후보도출소재의 유효성 평가

4) 불안/우울 정신질환 동물 모델 구축 및 후보소재의 효능 평가

- 가) Chronic Unpredictable Stress (CUS) 모델 구축 : C57BL/6 수컷 생쥐를 하루 1번 2시간씩 10일 동안 구속(immobilization)하여 스트레스를 가함 - 불안/우울증 행동이 나타남.
- 나) 침수 구속 스트레스(water immersion restraint stress) 모델 구축 : C57BL/6 수컷 생쥐를 물을 채운 실린더에 넣어 매일 1-6 시간씩 4주 동안 진행 - 불안/우울증 행동이 나타남
- 다) 불안/우울증 행동을 보이는 동물의 분변을 이식하거나, 그 분변으로부터 분리한 불안/우울증 유발 KO를 5-10일간 투여
- 라) 무균동물에서 FMT(우울/불안 환자의 분변) 또는 원인미생물을 이식하여 인지기능 손상모델 동물 제작
- 마) SPF동물에 FMT(우울/불안 환자의 분변) 또는 원인미생물을 이식하여 인지기능 손상모델 동물 제작
- 바) 위 실험동물들의 불안/우울증 유발 정도를 행동실험, 바이오마커 분석을 분석하여 비교 평가함
- 사) 위 동물에서 불안/우울증 개선 약물의 효능을 평가하여 미래 이용가능성에 대한 유효성 평가
- 아) 위 동물에서 불안/우울증 개선 후보도출소재의 유효성 평가

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

가. 연구수행 결과

< 최종목표 대비 달성한 연구결과 요약표 >

최종목표 (협약시 연구계획서 상)	최종목표 대비 달성한 연구결과
① 대사체학을 기반한 신경정신질환별 특이적 장내 균총 및 바이오마커 발굴을 통해 상관성 및 분자생물학적 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> • GC-TOF-MS 기반 대사체 프로파일링 통해 대사체와 신경정신질환의 상관성 규명 • 신경정신질환 마우스 분변에 대한 PLS-DA 모델 기반 바이오마커 분석을 통해 총 47개의 신경정신질환 특이적 대사체 선정 • 신경정신질환 동물모델별 특이적 장내균총 및 분자생물학적 인자 변화 확인
② 생애주기별 인지능력 저하 관련 신경정신질환 대상 장내균총 조절을 통해 개선 효능을 가지는 제품 개발 및 임상적 검증 (ㄱ) 천연식품에 기반한 기능성 pre/pro/synbiotics 소재 발굴 5건 이상 (ㄴ) 기능성의 소재 제품화 4건 이상/ 식약처 개별인정형 원료 신청 1건 이상 (ㄷ) 생애주기별(유, 청소년기/중장년기/노년기) 각 20개 이상(총 60개) 균총 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 천연물 기반 Prebiotics 6종 (실새삼, 새삼, 싸리나무, 해바라기씨, 백편두, 양하) 및 발효식품 또는 건강인 분변에서 분리한 Probiotics 12종 이상, 복합제제인 Synbiotics 소재 (MT104) 발굴 • 기능성 소재 자체 제품화 (MPRO 프로바이오틱스 윌) 및 HX106 원료 OEM 제품화 (테라브레인, 기역엔7103 등)를 통한 누적 매출액 149억 달성 (2022.03월 기준) • 인지기능 개선 소재 MT104는 올해말까지 인체적용시험 완료 및 식약처 개별인정형 원료 신청 계획 • 생애주기별 건강인 분변 수집을 통한 유익 균주 분리 및 240여 종 균주 확보 (2022.03월 기준)

<p>③ 천연식품에 기반한 pre/pro/synbiotics 소재들의 장내균총 조절 기전 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 천연물 Prebiotics 2종 (실새삼, 새삼) 및 Probiotics (L. paracasei NK112), Synbiotics 인지기능 개선 소재 MT104 투여 후 신경정신질환 동물모델에서의 장내균총 및 Gut-brain axis 관련 인자 변화 확인
<p>④ 연구개발 성과물 기술이전 3건 이상</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 인지기능 개선 Probiotics (L. paracasei NK112) 및 MT104 특허 양도를 통한 기술이전 1건 달성 • 현재 인지기능 개선 소재 MT104의 특허 기술이전에 대해 국내외 제약사와 협의중이며, 향후 개별인정형 기능성 획득 후 추가 기술이전 예상 (추가로 프로바이오틱스 신규균주들 기술이전 검토 중)

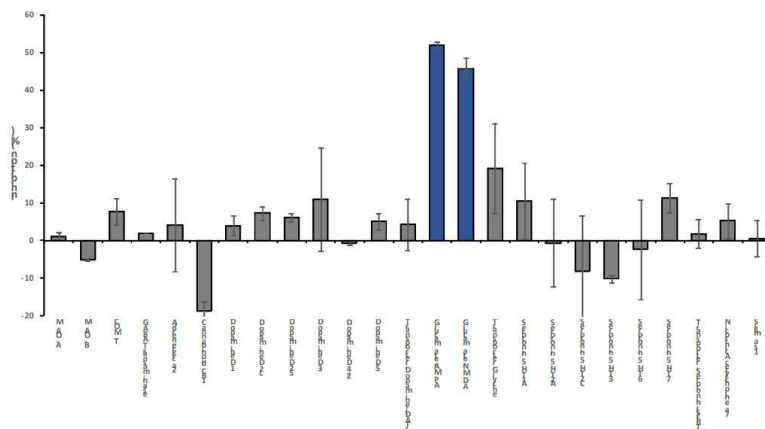
1) 정성적 연구개발성과

주관/1세부 (1차년도 (바이로메드), 2차년도 (헬릭스미스 (바이로메드 상호변경)), 3-4차년도 (주관연구기관 헬릭스미스 -> 엠테라파마 이관, 연구책임자: 손미원)

<p><주요 성과 요약></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 인지기능 개선 천연물 소재 2개 (실새삼, 새삼), 유산균 소재 1개(L. paracasei NK112) 연구, 개별인정형 기능성 복합 소재 MT104 1개 도출 2) 산업성과 유효성을 고려한 ADHD 소재(HX106) 및 인지기능개선 소재(MT104, 장내균총 상관성 규명한 천연물-프로바이오틱스 복합소재)의 추출 공정 연구, 품질관리 지표설정 및 원료 규격 확보, 장기/가속/가혹 안정성 확보 3) 최적 제제/제형 확정 및 인체시험용 제제 생산 완료 4) 비임상 GLP 독성시험 (설치류 단회투여, 13주반복투여, 유전독성시험) 완료하여 MT104 안전성 확보 5) HX106 인체시험(ADHD) 완료 및 MT104 인체시험 (제5세부 지원, 엠테라파마 자체 연구비, CRO, 고려대안암병원, 전북대병원)

가) ADHD 대상 prebiotics 후보 도출

- (1) 작업기억(working memory) 개선 소재 천마복합추출물(HX106) 시료 생산
- (2) 신경전달물질 수용체 관련 활성 스크리닝
 - (가) 천마복합추출물(HX106)의 25종 신경전달물질 수용체 및 수송체 등에 대한 결합 활성 스크리닝
 - ① Eurofins Pharma Discovery Services를 이용하여, HX106 30 µg/mL의 농도, duplicate로 dopamine 및 serotonin, glutamate 수용체(receptor) 및 수송체(transporter)에 결합하는 활성을 측정
 - ② 30 µg/mL 농도의 HX106에서는 glutamate AMPA 수용체 및 NMDA 수용체에서 각 52.6%, 43.7% glutamate 길항작용을 나타냄



[천마복합추출물(HX106)의 25종 신경전달물질 수용체 및 수송체 등에 대한 결합 활성]

2세부(S1801, S1802, S1803) 및 3세부 소재(해바라기씨, 방울양배추, 자색당근, 싸리나무, 전나무)의 45종 신경전달물질 수용체 및 수송체 등에 대한 결합 활성 스크리닝

- ③ Eurofins Pharma Discovery Services를 이용하여, HX106 30 µg/mL의 농도, duplicate로 dopamine 및 serotonin, noradrenalin, glutamate 수용체(receptor), 수송체(transporter) 결합 및 monoamine metabolism에 미치는 활성을 측정
- ④ 50% 이상 수용체 및 수송체에 대한 길항 작용을 나타내는 목록은 아래 표와 같음. 유효 신경전달물질 관련 항목에 대하여 각 개별 추출물을 적용 및 향후 진행할 세포 및 동물실험 결과와 종합하여 기전 연구 결과로 활용

ASSAY NAME	RESPONSE/READOUT	MEASUREMENT	UNITS VALUE	VALUE
D5 Human Dopamine GPCR Binding (Antagonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	50
DAT Human Dopamine Transporter Binding (Antagonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	84
DAT Human Dopamine Transporter Functional Antagonist Uptake Assay, Panlabs	Antagonist	IC50	ug/mL	115
Glutamate (AMPA, Non-Selective) Rat Ion Channel [3H] AMPA Binding Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	88
Glutamate, Kainate	Antagonist	Mean Inhibition	%	97
Glutamate, NMDA, Glycine [3H] MDL 105,519 Binding Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	59
NET Human Norepinephrine Transporter Binding (Antagonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	69
NET Human Norepinephrine Transporter Functional Antagonist Uptake Assay, Panlabs	Antagonist	IC50	ug/mL	99
SET Human Serotonin Transporter Functional Antagonist Uptake Assay, Panlabs	Antagonist	IC50	ug/mL	76
sigma2 Human Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	68

[2세부 소재의 45종 신경전달물질 수용체 및 수송체, 효소 활성 등에 대한 활성]

ASSAY NAME	RESPONSE/READOUT	MEASUREMENT	UNITS VALUE	VALUE
5-HT1A Human Serotonin GPCR Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	72
5-HT2C Human Serotonin GPCR Binding (Antagonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	69
5-HT6 Human Serotonin GPCR Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	79
5-HT7 Human Serotonin GPCR Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	58
Catechol-O-Methyltransferase Pig Enzymatic Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	62
DAT Human Dopamine Transporter Functional Antagonist Uptake Assay, Panlabs	Antagonist	IC50	ug/mL	69
Glutamate (NMDA, Non-Selective) Rat Ion Channel [3H] CGP-39653 Binding Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	83
Glutamate, Kainate	Antagonist	Mean Inhibition	%	87
M1 Human Acetylcholine (Muscarinic) GPCR Binding (Antagonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	73
mGlu5 Human Glutamate (Metabotropic) GPCR Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	50
NET Human Norepinephrine Transporter Functional Antagonist Uptake Assay, Panlabs	Antagonist	IC50	ug/mL	35
NK3 Human Tachykinin GPCR Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	52
OT Human Vasopressin / Oxytocin GPCR Binding (Agonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	77
SET Human Serotonin Transporter Functional Antagonist Uptake Assay, Panlabs	Antagonist	IC50	ug/mL	16
VMAT2 Rat Vesicular Monoamine Transporter Binding (Antagonist Radioligand) Assay, Panlabs	Antagonist	Mean Inhibition	%	64

[3세부 소재의 45종 신경전달물질 수용체 및 수송체, 효소 활성 등에 대한 활성]

나) 생산공정/품질규격 연구

(1) 추출조건 및 지표성분 변화 확인

- (가) 천마복합추출물(HX106)을 lab scale 수준에서 추출시간을 다양화 하여 생약 중량의 10배 증류수를 넣은 뒤 90±5°C 온도에서 각 3, 6, 9, 12, 24시간 동안 열수 추출 후 감압농축 및 동결건조 하여 분말을 얻음.
- (나) 천마복합추출물(HX106)의 정량 지표성분인 salvianolic acid B 및 gastrodin의 함량 변화를 하기 조건의 HPLC 분석을 통해 측정함.

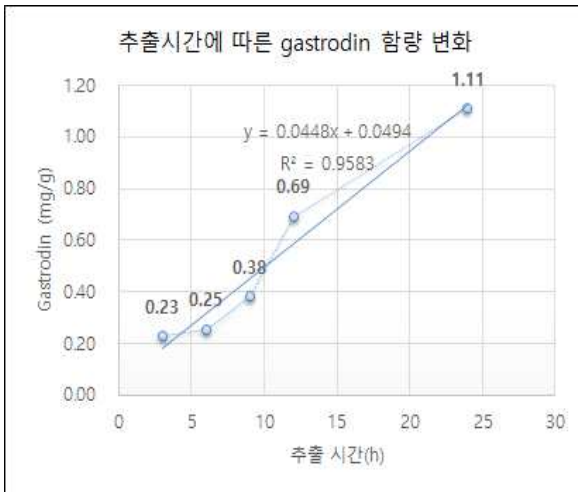
Instrument	Agilent Infinity II UHPLC																					
Detector	Diode Array Detector (DAD)																					
Wavelength	220 nm																					
Column	Shiseido Capcell PAK MG (250 mm*4.6 mm, 5 μm)																					
Mobile phase	A: DW B: 10% Acetonitrile <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p style="margin-left: 20px;">* ISET Mode</p>	Time (min)	A (%)	B (%)	0	100	0	5	100	0	10	0	100	15	0	100	17	100	0	20	100	0
Time (min)	A (%)	B (%)																				
0	100	0																				
5	100	0																				
10	0	100																				
15	0	100																				
17	100	0																				
20	100	0																				
Flow rate	1.0 mL/min																					
Injection volume	10 μL																					
Oven temperature	25°C																					

Instrument	Waters Alliance 2695 HPLC																		
Detector	Photodiode Array Detector (PDA)																		
Wavelength	288 nm																		
Column	Shiseido Capcell PAK MG (250 mm*4.6 mm, 5 μm)																		
Mobile phase	A: 0.026% Phosphoric acid B: Acetonitrile <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>71.5</td> <td>28.5</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>71.5</td> <td>28.5</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0	98	2	20	77	23	35	71.5	28.5	40	71.5	28.5	45	98	2
Time (min)	A (%)	B (%)																	
0	98	2																	
20	77	23																	
35	71.5	28.5																	
40	71.5	28.5																	
45	98	2																	
Flow rate	1.0 mL/min																		
Injection volume	10 μL																		
Oven temperature	20°C																		

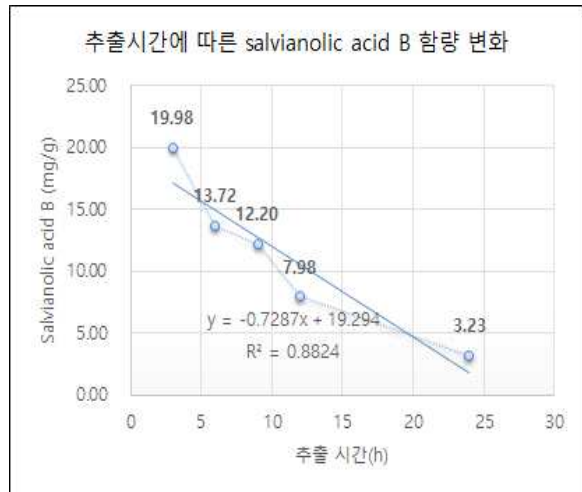
[Gastrodin 정량 분석법]

[Salvianolic acid B 정량 분석법]

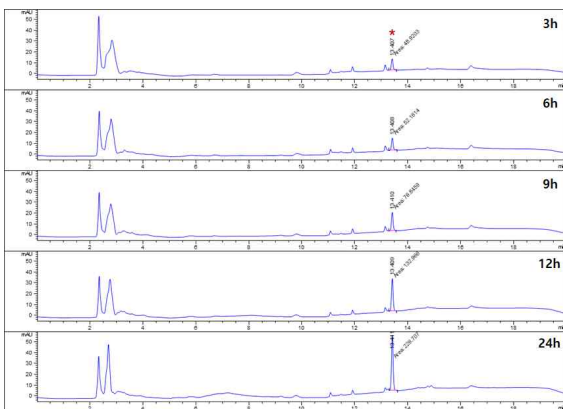
① 정량 분석 결과, 추출시간이 증가할수록 gastrodin은 함량이 증가하지만 이와 반대로 salvianolic acid B는 함량이 감소함을 확인. 이는 크로마토그램을 통해서도 확인할 수 있었음.



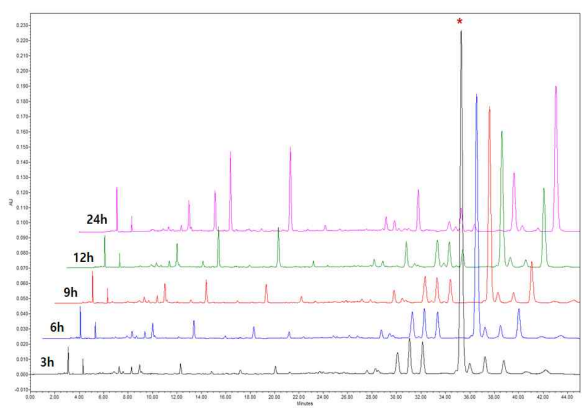
[추출시간에 따른 gastrodin 함량 변화 그래프]



[추출시간에 따른 salvianolic acid B 함량 변화 그래프]







[추출시간에 따른 gastrodin 함량 분석 HPLC 크로마토그램]



[추출시간에 따른 salvianolic acid B 함량 분석 HPLC 크로마토그램]

(2) 연구용 시료 대량생산

(가) 연구과제 기간 동안 실험연구에 사용할 천마복합추출물(HX106)을 OEM 업체((주)보락)에서 대량생산 및 COA 확보

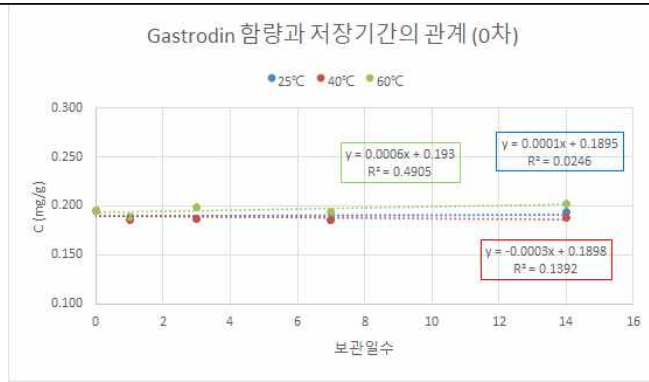
<p>시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS</p> <p>(주)비오메드 ViroMed Co., Ltd.</p> <table border="1"> <tr> <th>품명</th> <td>천마 등 복합추출물</td> <th>제조일자</th> <td>2018.07.16</td> </tr> <tr> <th>제조번호 (Lot. No.)</th> <td>HX106-20180716</td> <th>시험일자</th> <td>2018.07.16 ~ 2018.09.31</td> </tr> </table> <p>시험 항목 및 결과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 방법</th> <th>기준</th> <th>결과</th> <th>판정</th> <th>시험 기법</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 색상</td> <td>육안관찰</td> <td>흰색 갈색리 유동성 액상</td> <td>적합</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>2. 고형분 함량</td> <td>건조감량법</td> <td>50~60%</td> <td>54%</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>3. 중금속</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 납</td> <td></td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.1</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 용비소</td> <td>시용공전</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.2</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>- 카드뮴</td> <td>중금속시험법</td> <td>0.5 ppm 이하</td> <td>0.0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 수은</td> <td></td> <td>0.1 ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4. 미생물</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 대장균</td> <td>대장균</td> <td>음성</td> <td>음성</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>- 세균수</td> <td>비생분시험법</td> <td>100 CFU 이하/g</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>5. 광학이득소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 총 아플라톡신</td> <td>광광미 독소시험법</td> <td>15µg/kg 이하 (외, B1은 10이하)</td> <td>불검출</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 오크라톡신A</td> <td></td> <td>10µg/kg 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. 함량시험</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Gastrodin</td> <td>HPLC법</td> <td>0.56~0.84 mg/g</td> <td>0.651</td> <td></td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>- Salvianolic acid B</td> <td>HPLC법</td> <td>5.92~8.88 mg/g</td> <td>7.975</td> <td>적합</td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Spicataoside A</td> <td>HPLC-ELSD법</td> <td>정성</td> <td>확인</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- Ellagic acid</td> <td>LC/MS법</td> <td>정성</td> <td>확인</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>비고 : 본 제품은 농축액 50brix 기준으로 생산되고 있음.</p> <p>판정 : 적합</p> <p>담당자 : 박 현 화  02-479-8022</p> <p>확인자 : 이 학 수  02-479-8022</p> <p>08826 서울서 울주도 1 서울특별시 구로구 구로동 303호 Tel. 02-2102-7200 Fax. 02-479-8022</p> <p style="text-align: center;">CONFIDENTIAL</p>	품명	천마 등 복합추출물	제조일자	2018.07.16	제조번호 (Lot. No.)	HX106-20180716	시험일자	2018.07.16 ~ 2018.09.31	시험 항목	시험 방법	기준	결과	판정	시험 기법	1. 색상	육안관찰	흰색 갈색리 유동성 액상	적합	적합	외보막	2. 고형분 함량	건조감량법	50~60%	54%	적합	외보막	3. 중금속						- 납		1 ppm 이하	0.1			- 용비소	시용공전	1 ppm 이하	0.2	적합	외보막	- 카드뮴	중금속시험법	0.5 ppm 이하	0.0			- 수은		0.1 ppm 이하	불검출			4. 미생물						- 대장균	대장균	음성	음성	적합	외보막	- 세균수	비생분시험법	100 CFU 이하/g	0			5. 광학이득소						- 총 아플라톡신	광광미 독소시험법	15µg/kg 이하 (외, B1은 10이하)	불검출	적합	한국기능식품 연구원	- 오크라톡신A		10µg/kg 이하	불검출			6. 함량시험						- Gastrodin	HPLC법	0.56~0.84 mg/g	0.651		외보막	- Salvianolic acid B	HPLC법	5.92~8.88 mg/g	7.975	적합		- Spicataoside A	HPLC-ELSD법	정성	확인		한국기능식품 연구원	- Ellagic acid	LC/MS법	정성	확인			<p>시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS</p> <p>(주)비오메드 ViroMed Co., Ltd.</p> <table border="1"> <tr> <th>품명</th> <td>천마 등 복합추출물</td> <th>제조일자</th> <td>2018.08.06</td> </tr> <tr> <th>제조번호 (Lot. No.)</th> <td>HX106-20180806</td> <th>시험일자</th> <td>2018.08.06 ~ 2018.09.12</td> </tr> </table> <p>시험 항목 및 결과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 방법</th> <th>기준</th> <th>결과</th> <th>판정</th> <th>시험 기법</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 색상</td> <td>육안관찰</td> <td>흰색 갈색리 유동성 액상</td> <td>적합</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>2. 고형분 함량</td> <td>건조감량법</td> <td>50~60%</td> <td>54%</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>3. 중금속</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 납</td> <td></td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.1</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 용비소</td> <td>시용공전</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.3</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>- 카드뮴</td> <td>중금속시험법</td> <td>0.5 ppm 이하</td> <td>0.0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 수은</td> <td></td> <td>0.1 ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4. 미생물</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 대장균</td> <td>대장균</td> <td>음성</td> <td>음성</td> <td>적합</td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>- 세균수</td> <td>비생분시험법</td> <td>100 CFU 이하/g</td> <td>20</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>5. 광학이득소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 총 아플라톡신</td> <td>광광미 독소시험법</td> <td>15µg/kg 이하 (외, B1은 10이하)</td> <td>불검출</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 오크라톡신A</td> <td></td> <td>10µg/kg 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. 함량시험</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Gastrodin</td> <td>HPLC법</td> <td>0.56~0.84 mg/g</td> <td>0.657</td> <td></td> <td>외보막</td> </tr> <tr> <td>- Salvianolic acid B</td> <td>HPLC법</td> <td>5.92~8.88 mg/g</td> <td>6.779</td> <td>적합</td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Spicataoside A</td> <td>HPLC-ELSD법</td> <td>정성</td> <td>확인</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- Ellagic acid</td> <td>LC/MS법</td> <td>정성</td> <td>확인</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>비고 : 본 제품은 농축액 50brix 기준으로 생산되고 있음.</p> <p>판정 : 적합</p> <p>담당자 : 박 현 화  02-479-8022</p> <p>확인자 : 이 학 수  02-479-8022</p> <p>08826 서울서 울주도 1 서울특별시 구로구 구로동 303호 Tel. 02-2102-7200 Fax. 02-479-8022</p> <p style="text-align: center;">CONFIDENTIAL</p>	품명	천마 등 복합추출물	제조일자	2018.08.06	제조번호 (Lot. No.)	HX106-20180806	시험일자	2018.08.06 ~ 2018.09.12	시험 항목	시험 방법	기준	결과	판정	시험 기법	1. 색상	육안관찰	흰색 갈색리 유동성 액상	적합	적합	외보막	2. 고형분 함량	건조감량법	50~60%	54%	적합	외보막	3. 중금속						- 납		1 ppm 이하	0.1			- 용비소	시용공전	1 ppm 이하	0.3	적합	외보막	- 카드뮴	중금속시험법	0.5 ppm 이하	0.0			- 수은		0.1 ppm 이하	불검출			4. 미생물						- 대장균	대장균	음성	음성	적합	외보막	- 세균수	비생분시험법	100 CFU 이하/g	20			5. 광학이득소						- 총 아플라톡신	광광미 독소시험법	15µg/kg 이하 (외, B1은 10이하)	불검출	적합	한국기능식품 연구원	- 오크라톡신A		10µg/kg 이하	불검출			6. 함량시험						- Gastrodin	HPLC법	0.56~0.84 mg/g	0.657		외보막	- Salvianolic acid B	HPLC법	5.92~8.88 mg/g	6.779	적합		- Spicataoside A	HPLC-ELSD법	정성	확인		한국기능식품 연구원	- Ellagic acid	LC/MS법	정성	확인		
품명	천마 등 복합추출물	제조일자	2018.07.16																																																																																																																																																																																																																																																		
제조번호 (Lot. No.)	HX106-20180716	시험일자	2018.07.16 ~ 2018.09.31																																																																																																																																																																																																																																																		
시험 항목	시험 방법	기준	결과	판정	시험 기법																																																																																																																																																																																																																																																
1. 색상	육안관찰	흰색 갈색리 유동성 액상	적합	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
2. 고형분 함량	건조감량법	50~60%	54%	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
3. 중금속																																																																																																																																																																																																																																																					
- 납		1 ppm 이하	0.1																																																																																																																																																																																																																																																		
- 용비소	시용공전	1 ppm 이하	0.2	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
- 카드뮴	중금속시험법	0.5 ppm 이하	0.0																																																																																																																																																																																																																																																		
- 수은		0.1 ppm 이하	불검출																																																																																																																																																																																																																																																		
4. 미생물																																																																																																																																																																																																																																																					
- 대장균	대장균	음성	음성	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
- 세균수	비생분시험법	100 CFU 이하/g	0																																																																																																																																																																																																																																																		
5. 광학이득소																																																																																																																																																																																																																																																					
- 총 아플라톡신	광광미 독소시험법	15µg/kg 이하 (외, B1은 10이하)	불검출	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																																																																																
- 오크라톡신A		10µg/kg 이하	불검출																																																																																																																																																																																																																																																		
6. 함량시험																																																																																																																																																																																																																																																					
- Gastrodin	HPLC법	0.56~0.84 mg/g	0.651		외보막																																																																																																																																																																																																																																																
- Salvianolic acid B	HPLC법	5.92~8.88 mg/g	7.975	적합																																																																																																																																																																																																																																																	
- Spicataoside A	HPLC-ELSD법	정성	확인		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																																																																																
- Ellagic acid	LC/MS법	정성	확인																																																																																																																																																																																																																																																		
품명	천마 등 복합추출물	제조일자	2018.08.06																																																																																																																																																																																																																																																		
제조번호 (Lot. No.)	HX106-20180806	시험일자	2018.08.06 ~ 2018.09.12																																																																																																																																																																																																																																																		
시험 항목	시험 방법	기준	결과	판정	시험 기법																																																																																																																																																																																																																																																
1. 색상	육안관찰	흰색 갈색리 유동성 액상	적합	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
2. 고형분 함량	건조감량법	50~60%	54%	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
3. 중금속																																																																																																																																																																																																																																																					
- 납		1 ppm 이하	0.1																																																																																																																																																																																																																																																		
- 용비소	시용공전	1 ppm 이하	0.3	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
- 카드뮴	중금속시험법	0.5 ppm 이하	0.0																																																																																																																																																																																																																																																		
- 수은		0.1 ppm 이하	불검출																																																																																																																																																																																																																																																		
4. 미생물																																																																																																																																																																																																																																																					
- 대장균	대장균	음성	음성	적합	외보막																																																																																																																																																																																																																																																
- 세균수	비생분시험법	100 CFU 이하/g	20																																																																																																																																																																																																																																																		
5. 광학이득소																																																																																																																																																																																																																																																					
- 총 아플라톡신	광광미 독소시험법	15µg/kg 이하 (외, B1은 10이하)	불검출	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																																																																																
- 오크라톡신A		10µg/kg 이하	불검출																																																																																																																																																																																																																																																		
6. 함량시험																																																																																																																																																																																																																																																					
- Gastrodin	HPLC법	0.56~0.84 mg/g	0.657		외보막																																																																																																																																																																																																																																																
- Salvianolic acid B	HPLC법	5.92~8.88 mg/g	6.779	적합																																																																																																																																																																																																																																																	
- Spicataoside A	HPLC-ELSD법	정성	확인		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																																																																																
- Ellagic acid	LC/MS법	정성	확인																																																																																																																																																																																																																																																		
HX106-20180716	HX106-20180806																																																																																																																																																																																																																																																				

(3) 액상 및 과립 원료 가혹시험 안정성 평가

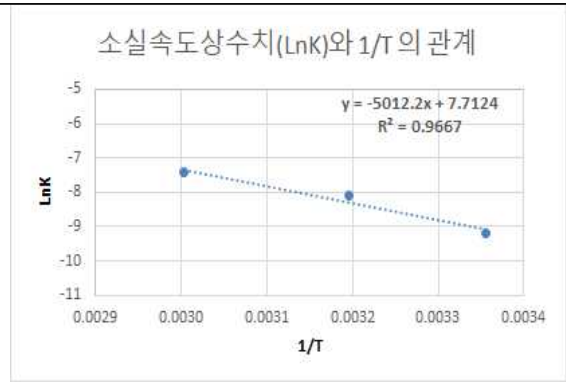
(가) 과립 원료의 반감기 예측을 통한 안정성 평가를 위해 시료를 25, 40, 60°C에 14일간 보관하면서 0, 1, 3, 7, 14일차에 시료를 수거하여 gastrodin과 salvianolic acid B 함량을 측정하였음. 결과를 통해 품질지표의 반응차수를 결정하고 온도 영향에 따른 활성화 에너지를 산출한 뒤, 반응속도상수를 산출하여 반감기를 예측하였음.

기간(D)	Gastrodin					
	0차			1차		
일/온도	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C
0	0.196	0.196	0.196	-1.631	-1.631	-1.631
1	0.188	0.186	0.190	-1.672	-1.682	-1.663
3	0.187	0.187	0.198	-1.675	-1.675	-1.619
7	0.185	0.185	0.194	-1.686	-1.686	-1.641
14	0.195	0.188	0.203	-1.637	-1.672	-1.597
최종/초기	99.40	96.01	103.49			
Slope (K)	0.0001	-0.0003	0.0006	0.0007	-0.0014	0.0006
Intercept	0.1895	0.1898	0.1930	-1.6636	-1.6621	-1.6402
R2	0.0246	0.1392	0.4905	0.0245	0.1372	0.0105

[온도에 따른 gastrodin 함량 변화 및 0차, 1차 회귀방정식의 상관계수]



[Gastrodin의 0차 회귀 직선]

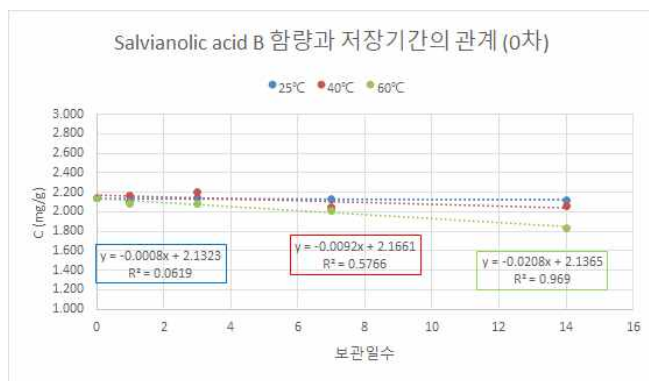


[온도와 반응 속도 간 방정식]

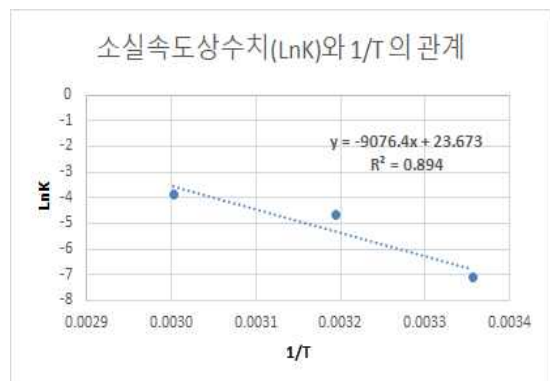
- ① 상관계수를 고려하여 0차 반응식을 이용하여 반감기를 예측. Gastrodin의 0차 회귀방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출. Gastrodin의 활성화 에너지는 9959.338565 (Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은 $\text{LnK} = -5012.2(1/T) + 7.7124$ 임을 확인. 이에 따라 실온유통 최고온도인 35°C에서 gastrodin의 반감기는 17.04개월로 산출

기간(D)	Salvianolic acid B					
차수	0차			1차		
일/온도	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C
0	2.142	2.142	2.142	0.76	0.76	0.76
1	2.105	2.163	2.086	0.74	0.77	0.74
3	2.148	2.199	2.087	0.76	0.79	0.74
7	2.128	2.042	2.015	0.75	0.71	0.70
14	2.119	2.054	1.833	0.75	0.72	0.61
최종/초기	98.92	95.86	85.56			
Slope (K)	-0.0008	-0.0092	-0.0208	-0.0004	-0.0044	-0.0105
Intercept	2.1323	2.1661	2.1365	0.7571	0.7729	0.7604
R2	0.0619	0.5766	0.9690	0.0609	0.5805	0.9662

[온도에 따른 salvianolic acid B 함량 변화 및 0차, 1차 회귀방정식의 상관계수]



[Salvianolic acid B의 0차 회귀 직선]



[온도와 반응 속도 간 방정식]

- ② 상관계수를 고려하여 0차 반응식을 이용하여 반감기를 예측. Salvianolic acid B의 0차 회귀 방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출. Salvianolic acid B의 활성화 에너지는 18034.83609 (Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은 $\text{LnK} = -9076.4(1/T) + 23.673$ 임을 확인. 이에 따라 실온유통 최고온도인 35°C에서 salvianolic acid B의 반감기는 11.74개월로 산출

다) ADHD 임상시험용 시료 생산

(1) ADHD 청소년 대상 위약 및 임상시료 과립제형 제조 및 성적서 발급

(가) 원재료인 천마, 맥문동, 용안육, 단삼을 5:3:3:1 비율로 혼합하여, 정제수로 3~5분간 세척함. 이후 혼합물에 10배수의 증류수를 넣고 90±5°C에서 3시간 환류 추출을 진행하여 추출액은 여과를 거쳐, 고형분 50%까지 감압농축을 진행하고 이를 과립 생산의 원료로 사용함. 50% 농축액에 덱스트린을 첨가하고, 유동층 건조기를 이용하여 과립화를 진행함. 이후 과립에 이산화규소 및 레몬밤분말향을 첨가하여 최종 과립 제품으로 생산함.

(나) 임상 시료(시험 식품 및 대조식품)의 중금속 4종, 잔류 농약 5종, 미생물 및 함량 시험 1종 (Ellagic acid)의 경우, 공인분석기관인 한국기능식품연구원에 본 시험을 의뢰하여 성적서를 발급하였으며, 함량 시험 3종(Salvianolic acid, Gastodin, Spicatoside A)의 경우, 기지법을 개발한 주관연구기관(바이로메드)에서 시험을 진행하여 성적서를 발급하였음.

<p style="text-align: center;">시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS</p> <p style="text-align: center;">바이로메드 ViroMed Co., Ltd.</p> <table border="1"> <tr> <th>종 명</th> <th>대표시험</th> <th>제조일자</th> <th>2018.07.30</th> </tr> <tr> <td>제조번호 (Lot. No.)</td> <td>대표시험-180730</td> <td>시험일자</td> <td>2018.08.01 ~2018.08.20</td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <th colspan="5">시험 항목 및 결과</th> </tr> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 방법</th> <th>기 준</th> <th>결과</th> <th>판정</th> <th>시험 기관</th> </tr> <tr> <td colspan="6">1. 중금속</td> </tr> <tr> <td>- 납</td> <td>용해성</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.0353</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 용해성</td> <td>용해성</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.0023</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 카드뮴</td> <td>균속시험법</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.0018</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 용수준</td> <td></td> <td>0.8 ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td colspan="6">2. 미생물</td> </tr> <tr> <td>- 대장균군</td> <td>막힘법</td> <td>음성</td> <td>음성</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td colspan="6">비 고:</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">판정 : 적합 담당자 : 김 주 영 직 인 : 이 학 수</p> <p style="text-align: center;">ViroMed</p> <p style="text-align: center;">0820 서울시 용인구 용인동 1 서울특별시 구로구 화곡동 223 부 Tel: 02-2392-7900 Fax: 02-873-8922</p> <p style="text-align: center;">CONFIDENTIAL</p> <p style="text-align: center;">대조 식품</p>	종 명	대표시험	제조일자	2018.07.30	제조번호 (Lot. No.)	대표시험-180730	시험일자	2018.08.01 ~2018.08.20	시험 항목 및 결과					시험 항목	시험 방법	기 준	결과	판정	시험 기관	1. 중금속						- 납	용해성	1 ppm 이하	0.0353		한국기능식품 연구원	- 용해성	용해성	1 ppm 이하	0.0023	적합	한국기능식품 연구원	- 카드뮴	균속시험법	1 ppm 이하	0.0018		한국기능식품 연구원	- 용수준		0.8 ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원	2. 미생물						- 대장균군	막힘법	음성	음성	적합	한국기능식품 연구원	비 고:						<p style="text-align: center;">시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS</p> <p style="text-align: center;">바이로메드 ViroMed Co., Ltd.</p> <table border="1"> <tr> <th>종 명</th> <th>HX106</th> <th>제조일자</th> <th>2018.07.30</th> </tr> <tr> <td>제조번호 (Lot. No.)</td> <td>HX106-180730</td> <td>시험일자</td> <td>2018.08.01 ~2018.08.20</td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <th colspan="6">시험 항목 및 결과</th> </tr> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 방법</th> <th>기 준</th> <th>결과</th> <th>판정</th> <th>시험 기관</th> </tr> <tr> <td colspan="6">1. 중금속</td> </tr> <tr> <td>- 납</td> <td>용해성</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.0502</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 용해성</td> <td>용해성</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.0021</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 카드뮴</td> <td>균속시험법</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.0036</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- 용수준</td> <td></td> <td>0.8 ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td colspan="6">2. 잔류농약</td> </tr> <tr> <td>- BHC</td> <td>잔류농약 분석법</td> <td>0.1ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- DDT</td> <td>잔류농약 분석법</td> <td>0.1ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- Aldrin</td> <td>잔류농약 분석법</td> <td>0.1ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- Dieldrin</td> <td>잔류농약 분석법</td> <td>0.1ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- Endrin</td> <td>잔류농약 분석법</td> <td>0.1ppm 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td colspan="6">3. 미생물</td> </tr> <tr> <td>- 대장균군</td> <td>막힘법 시험법</td> <td>음성</td> <td>음성</td> <td>적합</td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td colspan="6">4. 함량시험</td> </tr> <tr> <td>- Salvianolic acid</td> <td>HPLC 법</td> <td>1.628~2.442 mg/g</td> <td>2.240 mg/g</td> <td></td> <td>바이로메드</td> </tr> <tr> <td>- Gastodin</td> <td>HPLC 법</td> <td>0.154~0.231 mg/g</td> <td>0.217 mg/g</td> <td>적합</td> <td>바이로메드</td> </tr> <tr> <td>- Spicatoside A</td> <td>HPLC-MSD 법</td> <td>불량</td> <td>검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> <tr> <td>- Ellagic acid</td> <td>LC/MS 법</td> <td>검출</td> <td>검출</td> <td></td> <td>한국기능식품 연구원</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">판정 : 적합 담당자 : 김 주 영 직 인 : 이 학 수</p> <p style="text-align: center;">ViroMed</p> <p style="text-align: center;">0820 서울시 용인구 용인동 1 서울특별시 구로구 화곡동 223 부 Tel: 02-2392-7900 Fax: 02-873-8922</p> <p style="text-align: center;">CONFIDENTIAL</p> <p style="text-align: center;">시험 식품</p>	종 명	HX106	제조일자	2018.07.30	제조번호 (Lot. No.)	HX106-180730	시험일자	2018.08.01 ~2018.08.20	시험 항목 및 결과						시험 항목	시험 방법	기 준	결과	판정	시험 기관	1. 중금속						- 납	용해성	1 ppm 이하	0.0502		한국기능식품 연구원	- 용해성	용해성	1 ppm 이하	0.0021	적합	한국기능식품 연구원	- 카드뮴	균속시험법	1 ppm 이하	0.0036		한국기능식품 연구원	- 용수준		0.8 ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원	2. 잔류농약						- BHC	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원	- DDT	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원	- Aldrin	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출	적합	한국기능식품 연구원	- Dieldrin	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원	- Endrin	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원	3. 미생물						- 대장균군	막힘법 시험법	음성	음성	적합	한국기능식품 연구원	4. 함량시험						- Salvianolic acid	HPLC 법	1.628~2.442 mg/g	2.240 mg/g		바이로메드	- Gastodin	HPLC 법	0.154~0.231 mg/g	0.217 mg/g	적합	바이로메드	- Spicatoside A	HPLC-MSD 법	불량	검출		한국기능식품 연구원	- Ellagic acid	LC/MS 법	검출	검출		한국기능식품 연구원
종 명	대표시험	제조일자	2018.07.30																																																																																																																																																																																																	
제조번호 (Lot. No.)	대표시험-180730	시험일자	2018.08.01 ~2018.08.20																																																																																																																																																																																																	
시험 항목 및 결과																																																																																																																																																																																																				
시험 항목	시험 방법	기 준	결과	판정	시험 기관																																																																																																																																																																																															
1. 중금속																																																																																																																																																																																																				
- 납	용해성	1 ppm 이하	0.0353		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- 용해성	용해성	1 ppm 이하	0.0023	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- 카드뮴	균속시험법	1 ppm 이하	0.0018		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- 용수준		0.8 ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
2. 미생물																																																																																																																																																																																																				
- 대장균군	막힘법	음성	음성	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
비 고:																																																																																																																																																																																																				
종 명	HX106	제조일자	2018.07.30																																																																																																																																																																																																	
제조번호 (Lot. No.)	HX106-180730	시험일자	2018.08.01 ~2018.08.20																																																																																																																																																																																																	
시험 항목 및 결과																																																																																																																																																																																																				
시험 항목	시험 방법	기 준	결과	판정	시험 기관																																																																																																																																																																																															
1. 중금속																																																																																																																																																																																																				
- 납	용해성	1 ppm 이하	0.0502		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- 용해성	용해성	1 ppm 이하	0.0021	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- 카드뮴	균속시험법	1 ppm 이하	0.0036		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- 용수준		0.8 ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
2. 잔류농약																																																																																																																																																																																																				
- BHC	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- DDT	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- Aldrin	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- Dieldrin	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- Endrin	잔류농약 분석법	0.1ppm 이하	불검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
3. 미생물																																																																																																																																																																																																				
- 대장균군	막힘법 시험법	음성	음성	적합	한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
4. 함량시험																																																																																																																																																																																																				
- Salvianolic acid	HPLC 법	1.628~2.442 mg/g	2.240 mg/g		바이로메드																																																																																																																																																																																															
- Gastodin	HPLC 법	0.154~0.231 mg/g	0.217 mg/g	적합	바이로메드																																																																																																																																																																																															
- Spicatoside A	HPLC-MSD 법	불량	검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															
- Ellagic acid	LC/MS 법	검출	검출		한국기능식품 연구원																																																																																																																																																																																															

[임상시료 공인기관 COA]

(다) 시험식품

- ① 중량 및 규격: 2 g/포
- ② 용법 및 용량: 1일 2회(아침, 저녁), 1회 1포
- ③ 조성 및 분량

원료명	배합비율(%)	함량(g)	제조사
천마복합추출물(HX106) (고형분 50% 기준)	15.125	0.343	네추럴웨이
덱스트린	81.875	1.599	
이산화규소	2.000	0.039	
레몬밤분말향	1.000	0.020	
합계	100.000%	2.000g	

(라) 대조식품

- ① 중량 및 규격: 2 g/포
- ② 용법 및 용량: 1일 2회(아침, 저녁), 1회 1포
- ③ 조성 및 분량

원료명	배합비율(%)	함량(g)	제조사
덱스트린	97.000	1.940g	네추럴웨이
이산화규소	2.000	0.040g	
레몬밤분말향	1.000	0.020g	
합계	100.000%	2.000g	

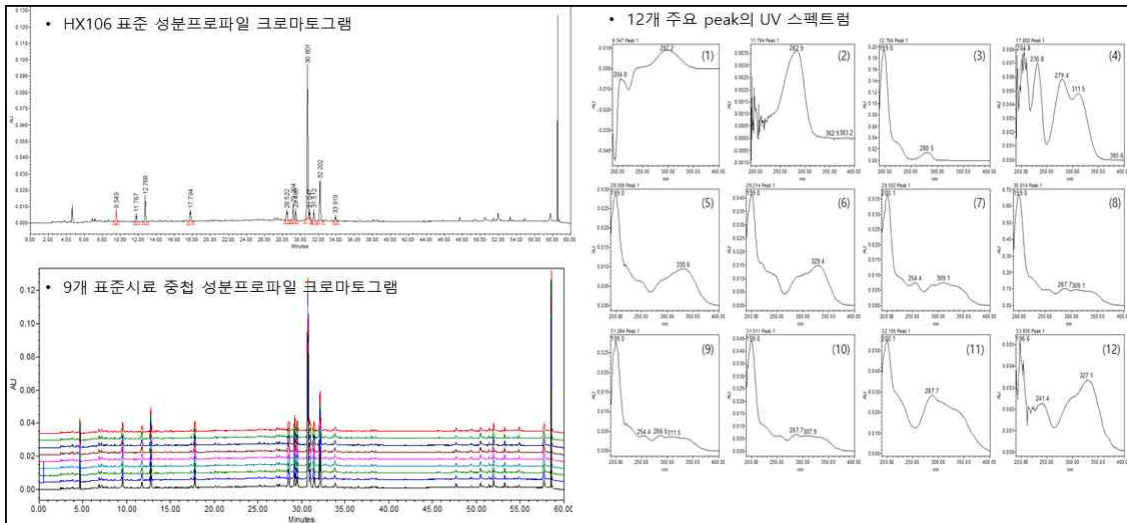
- (마) 임상 시료(시험 식품 및 대조 식품)은 과립 생산 완료 후, 1회 섭취량(2g)씩 스틱포장을 진행하여, 4주분(스티크 포장 총 56개+여유분 4개)씩 포장하여, 임상 시험 기관인 중앙대학교로 송부함.
- (바) 시험제품 및 대조제품은 제품의 외형 및 중량이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않음. 또한 시험식품과 대조식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 피험자 및 연구자에 대한 이중맹검을 유지하도록 하였음. 인체시험용 건강기능식품 라벨의 기재는 약사법 시행규칙 제 71조 제5항에 따르며 균별 차이가 노출되지 않도록 무작위번호를 기입하여 포장을 진행함.

	
<p>대조 식품</p>	<p>시험 식품</p>
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>임상시험용</p> <ul style="list-style-type: none"> • 임상시험계획서 번호 : VM_HX106 • 제품의 코드명 : HX106 또는 Placebo • 제조 번호 : HX106_20180730 (유효 기한 : 2020.07.29) • 연구의뢰기관 : ㈜바이로메드, 서울시 관악구 관악로1 서울대학교 자연과학대학 기초과학연구동 203동 5층 / 02-2102-7200 • 보관방법 : 직사일광을 피하고 가능한 습기가 적고 서늘한 곳에 보관 • 섭취방법 : 1일 2회(아침, 저녁), 1회 1포씩 충분한 물과 함께 섭취 • 무작위배정 : MR-021 (4주분) <p>※ 본 제품은 "임상시험" 이외의 목적으로 사용할 수 없습니다.</p>  </div>
<p>임상 시료 (4주분)</p>	<p>임상 시료 무작위 라벨</p>

[임상시료 포장 및 라벨]

라) ADHD 개선 후보 HX106 품질규격 연구 및 시생산

- (1) HX106 원료의 품질규격을 위한 표준 성분프로파일 분석법 개발
- (가) 지표성분 분석 외 원료간의 동등성 확보를 위하여 식약처 한약(생약)제제의 성분프로파일 설정 가이드라인(2016.12; 안내서-0297-01)에 근거하여 표준성분프로파일 분석법을 확립함.
- (나) 서로 다른 HX106 원료 3배치를 사용하여, 각 배치의 다른 위치로부터 3개의 시료를 취해서, 총 9개의 표준시료를 이용하여 분석을 수행함. 분석방법 개발을 위해 5개의 컬럼과 4개의 검출 파장을 비교하였고, 전처리 용매 변경을 통해 분리능을 향상시켰으며, 분석법 validation (특이성, 반복성, 정밀성) 수행함.




[HX106 표준 성분프로파일 크로마토그램]

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RT	9.540	11.760	12.762	17.793	28.516	29.193	29.476	30.782	31.029	31.489	32.181	33.895
RRT	0.310	0.382	0.415	0.578	0.926	0.948	0.958	1.000	1.008	1.023	1.045	1.101
PA	39131	29459	98946	52044	53345	62281	39131	673885	20448	46990	166050	23323
RPA	0.058	0.044	0.147	0.077	0.079	0.092	0.058	1.000	0.030	0.070	0.246	0.035

[HX106 표준 성분프로파일 각 피크의 유지시간 및 피크면적]

- 12개 peak의 확인을 위하여 HPLC로 분석하여 표준물질과 비교한 결과 7개 peak 성분의 구조를 danshensu(3), protocatechuic aldehyde(4), rosmarinic acid(6), lithospermic acid(7), salvianolic acid B(8), salvianolic acid E(10), salvianolic acid A(11) 로 확인할 수 있었음. 성분프로파일 대상 피크로 선택된 12개 모든 peak에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였고, 이들의 면적 합이 전체 면적의 80 % 이상임을 확인함.
- 3 개의 표준 시료로부터 얻어진 9 개의 크로마토그램과 피크 유지시간, 피크 면적 등을 종합하여 표준성분프로파일을 확립함.

(2) 유산균 복합제제 시제품 생산에 사용하기 위한 HX106 원료 scale-up 생산 및 성적서 확보
 (가) 과제 성과 목표로서 인지능력 개선 효능을 기대하는 유산균과 복합제제를 개발하고자 하며, 시제품 제작에 사용할 HX106 원료를 OEM 업체((주)보락)를 통해 생산 및 성적서를 발급함.

<div style="text-align: center;">  <p>(주) 보락</p> </div> <p style="text-align: center;">경기도 화성시 양감면 조곡로 720-37 전화 : (031) 950-3411 ~ 4 Fax : (031) 959-0811</p> <p style="text-align: center;">제품 시험 성적서</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>제 품 명</th> <th>천마 등 복합추출물</th> <th>출 화 일 자</th> <th>2019. 10. 14</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>시행의뢰번호</td> <td>201909041</td> <td>판 권 (승인) 일 자</td> <td>2019. 10. 14</td> </tr> <tr> <td>제 조 일 자</td> <td>2019. 09. 09</td> <td>시 행 자</td> <td>영나래</td> </tr> <tr> <td>제 조 번 호</td> <td>201909004</td> <td>유 행 분 류</td> <td>건강기능식품</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">제품 시험 결과</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>시험항목</th> <th>규격(자기규격)</th> <th>결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성상</td> <td>흰색 알갱이 유향성 액상</td> <td>적합</td> </tr> <tr> <td>대장균</td> <td>불검</td> <td>불검</td> </tr> <tr> <td>일반세균</td> <td>100 cfu/ml(g) 이하</td> <td>30 cfu/ml</td> </tr> <tr> <td>Brix</td> <td>55</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>Solid</td> <td>50 ~ 80 %</td> <td>54 %</td> </tr> <tr> <td>납</td> <td>1.0 ppm 이하</td> <td>적합</td> </tr> <tr> <td>비소</td> <td>1.0 ppm 이하</td> <td>적합</td> </tr> <tr> <td>카드뮴</td> <td>0.5 ppm 이하</td> <td>적합</td> </tr> <tr> <td>수은</td> <td>1.0 ppm 이하</td> <td>적합</td> </tr> </tbody> </table> <p>특기사항 : 상기 제품 시험 결과를 보증합니다.</p> <p style="text-align: center;">품 질 관 리</p>	제 품 명	천마 등 복합추출물	출 화 일 자	2019. 10. 14	시행의뢰번호	201909041	판 권 (승인) 일 자	2019. 10. 14	제 조 일 자	2019. 09. 09	시 행 자	영나래	제 조 번 호	201909004	유 행 분 류	건강기능식품	시험항목	규격(자기규격)	결과	성상	흰색 알갱이 유향성 액상	적합	대장균	불검	불검	일반세균	100 cfu/ml(g) 이하	30 cfu/ml	Brix	55	55	Solid	50 ~ 80 %	54 %	납	1.0 ppm 이하	적합	비소	1.0 ppm 이하	적합	카드뮴	0.5 ppm 이하	적합	수은	1.0 ppm 이하	적합	<div style="text-align: center;"> <p>시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS</p> <p style="text-align: right;">헬릭스미스 Helixmith Co., Ltd.</p> </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>품 명</th> <th>천마 등 복합추출물</th> <th>제조일자</th> <th>2019.09.09</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>제조번호 (Lot.No.)</td> <td>HX106-190909</td> <td>유효기간</td> <td>2021.09.08</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">시험 항목 및 결과</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 방법</th> <th>기 준</th> <th>결과</th> <th>판정</th> <th>시험 기관</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 성상</td> <td>육안관찰</td> <td>흰색 알갱이 유향성 액상</td> <td>적합</td> <td>적합</td> <td>㈜보락</td> </tr> <tr> <td>2. 고형분 함량</td> <td>건조감량법</td> <td>50~60%</td> <td>53%</td> <td>적합</td> <td>㈜보락</td> </tr> <tr> <td>3. 중금속</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 납</td> <td></td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.047</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 중비소</td> <td>식품공전</td> <td>1 ppm 이하</td> <td>0.163</td> <td>적합</td> <td>㈜보락</td> </tr> <tr> <td>- 카드뮴</td> <td>중금속시험법</td> <td>0.5 ppm 이하</td> <td>0.010</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 용수은</td> <td></td> <td>0.1 ppm 이하</td> <td>0.0013</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4. 미생물</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 대장균</td> <td>대장균</td> <td>음성</td> <td>음성</td> <td>적합</td> <td>㈜보락</td> </tr> <tr> <td>- 세균수</td> <td>미생물시험법</td> <td>100 CFU 이하/g</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>5. 곰팡이독소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- 총 아플라톡신</td> <td>곰팡이</td> <td>15µg/kg 이하</td> <td>불검출</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>- 오크라톡신A</td> <td>독소시험법</td> <td>(단, B1은 10이하) 10µg/kg 이하</td> <td>불검출</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. 함량시험</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Gastrodin</td> <td>HPLC법</td> <td>0.56~0.84 mg/g</td> <td>0.760</td> <td></td> <td>㈜헬릭스미스</td> </tr> <tr> <td>- Salvianolic acid B</td> <td>HPLC법</td> <td>5.92~8.88 mg/g</td> <td>6.028</td> <td>적합</td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Spicataoside A</td> <td>HPLC-HLSD법</td> <td>정성</td> <td>확인</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- Ellagic acid</td> <td>LC/MS법</td> <td>정성</td> <td>확인</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>비 고 : 본 제품은 농축액 55brix 기준으로 생산하고 있음.</p> <p>판정 : 적합 담당자 : 박 현 화 책임자 : 이 학 수</p> <p style="text-align: center;">HELIXMITH</p> <p style="font-size: small;">08826 서울시 원하구 관악로 1 서울대학교 자연과학대학 기초과학연구원 203 동 Tel. 02-2102-7200 Fax. 02-873-8022</p> <p style="text-align: center;">CONFIDENTIAL</p>	품 명	천마 등 복합추출물	제조일자	2019.09.09	제조번호 (Lot.No.)	HX106-190909	유효기간	2021.09.08	시험 항목	시험 방법	기 준	결과	판정	시험 기관	1. 성상	육안관찰	흰색 알갱이 유향성 액상	적합	적합	㈜보락	2. 고형분 함량	건조감량법	50~60%	53%	적합	㈜보락	3. 중금속						- 납		1 ppm 이하	0.047			- 중비소	식품공전	1 ppm 이하	0.163	적합	㈜보락	- 카드뮴	중금속시험법	0.5 ppm 이하	0.010			- 용수은		0.1 ppm 이하	0.0013			4. 미생물						- 대장균	대장균	음성	음성	적합	㈜보락	- 세균수	미생물시험법	100 CFU 이하/g	0			5. 곰팡이독소						- 총 아플라톡신	곰팡이	15µg/kg 이하	불검출	-	-	- 오크라톡신A	독소시험법	(단, B1은 10이하) 10µg/kg 이하	불검출			6. 함량시험						- Gastrodin	HPLC법	0.56~0.84 mg/g	0.760		㈜헬릭스미스	- Salvianolic acid B	HPLC법	5.92~8.88 mg/g	6.028	적합		- Spicataoside A	HPLC-HLSD법	정성	확인			- Ellagic acid	LC/MS법	정성	확인		
제 품 명	천마 등 복합추출물	출 화 일 자	2019. 10. 14																																																																																																																																																																						
시행의뢰번호	201909041	판 권 (승인) 일 자	2019. 10. 14																																																																																																																																																																						
제 조 일 자	2019. 09. 09	시 행 자	영나래																																																																																																																																																																						
제 조 번 호	201909004	유 행 분 류	건강기능식품																																																																																																																																																																						
시험항목	규격(자기규격)	결과																																																																																																																																																																							
성상	흰색 알갱이 유향성 액상	적합																																																																																																																																																																							
대장균	불검	불검																																																																																																																																																																							
일반세균	100 cfu/ml(g) 이하	30 cfu/ml																																																																																																																																																																							
Brix	55	55																																																																																																																																																																							
Solid	50 ~ 80 %	54 %																																																																																																																																																																							
납	1.0 ppm 이하	적합																																																																																																																																																																							
비소	1.0 ppm 이하	적합																																																																																																																																																																							
카드뮴	0.5 ppm 이하	적합																																																																																																																																																																							
수은	1.0 ppm 이하	적합																																																																																																																																																																							
품 명	천마 등 복합추출물	제조일자	2019.09.09																																																																																																																																																																						
제조번호 (Lot.No.)	HX106-190909	유효기간	2021.09.08																																																																																																																																																																						
시험 항목	시험 방법	기 준	결과	판정	시험 기관																																																																																																																																																																				
1. 성상	육안관찰	흰색 알갱이 유향성 액상	적합	적합	㈜보락																																																																																																																																																																				
2. 고형분 함량	건조감량법	50~60%	53%	적합	㈜보락																																																																																																																																																																				
3. 중금속																																																																																																																																																																									
- 납		1 ppm 이하	0.047																																																																																																																																																																						
- 중비소	식품공전	1 ppm 이하	0.163	적합	㈜보락																																																																																																																																																																				
- 카드뮴	중금속시험법	0.5 ppm 이하	0.010																																																																																																																																																																						
- 용수은		0.1 ppm 이하	0.0013																																																																																																																																																																						
4. 미생물																																																																																																																																																																									
- 대장균	대장균	음성	음성	적합	㈜보락																																																																																																																																																																				
- 세균수	미생물시험법	100 CFU 이하/g	0																																																																																																																																																																						
5. 곰팡이독소																																																																																																																																																																									
- 총 아플라톡신	곰팡이	15µg/kg 이하	불검출	-	-																																																																																																																																																																				
- 오크라톡신A	독소시험법	(단, B1은 10이하) 10µg/kg 이하	불검출																																																																																																																																																																						
6. 함량시험																																																																																																																																																																									
- Gastrodin	HPLC법	0.56~0.84 mg/g	0.760		㈜헬릭스미스																																																																																																																																																																				
- Salvianolic acid B	HPLC법	5.92~8.88 mg/g	6.028	적합																																																																																																																																																																					
- Spicataoside A	HPLC-HLSD법	정성	확인																																																																																																																																																																						
- Ellagic acid	LC/MS법	정성	확인																																																																																																																																																																						

[유산균 복합제제 시제품 제작용 HX106 원료 성적서]

마) 최적 제제/제형 및 안정성 연구

- (1) HX106 과립 원료 시생산 및 연구
- (가) HX106 과립 원료 시생산

① HX106 과립 원료를 OEM 업체((주)한국씨엔에스팜)를 통해 아래와 같은 배합비율로 시생산함.

- ② 제형: 2g 분말스티크포 (25*120mm)
 ③ 섭취방법: 1일 2회, 1회 1포 물과 함께 섭취
 ④ 원료명 및 배합비율

No.	원료명	성분함량(%)	배합비율(%)	1포 섭취량(mg)	일일 섭취량(mg)
1	천마등복합추출물(HX106)	100	27.500	550.000	1,100.000
2	덱스트린	100	69.470	1,389.400	2,778.800
3	이산화규소	100	2.000	40.000	80.000
4	레몬향분말	100	1.000	20.000	40.000
5	비타민B1염산염	78	0.010	0.156	0.312
6	비타민B2	100	0.010	0.200	0.400
7	비타민B6염산염	82	0.010	0.164	0.328
	합계		100.000		



HX106 과립 원료 (포장)

HX106 과립 원료

(나) HX106 과립 원료의 지표성분 분석

- ① HX106 과립 원료의 정량 지표성분인 gastrodin 및 salvianolic acid B의 함량을 하기 조건의 HPLC 분석을 통해 측정함.
 ② 정량 분석 결과, gastrodin 함량이 0.157 mg/g, salvianolic acid B 함량이 1.631 mg/g으로 과립원료의 기준규격에 적합함을 확인.

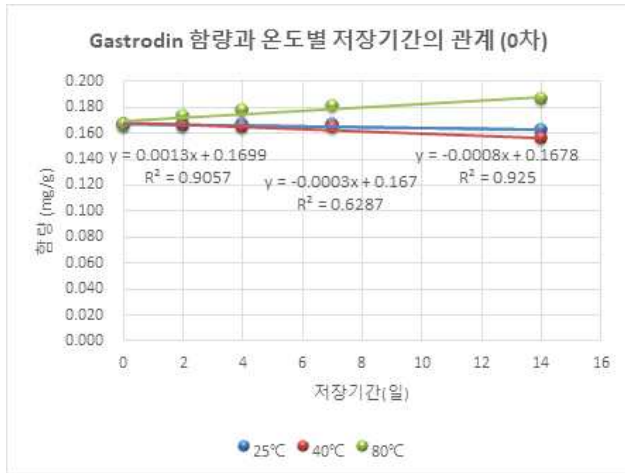
지표성분	평균 (mg/g)	기준규격
Gastrodin	0.157	0.154~0.231 mg/g
Salvianolic acid B	1.631	1.628~2.442 mg/g

(다) HX106 과립 원료의 가혹시험 안정성 평가

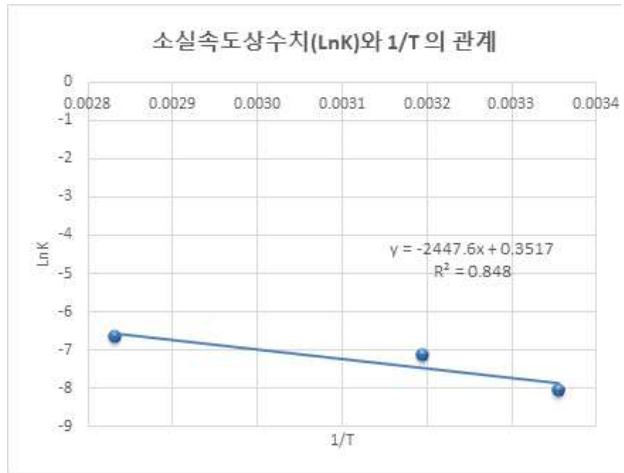
- ① 과립 원료의 반감기 예측을 통한 안정성 평가를 위해 시료를 25, 40, 80°C에 14일간 보관하면서 0, 1, 3, 7, 14일차에 시료를 수거하여 gastrodin과 salvianolic acid B 함량을 측정하였음. 결과를 통해 품질지표의 반응차수를 결정하고 온도 영향에 따른 활성화 에너지를 산출한 뒤, 반응속도상수를 산출하여 반감기를 예측하였음.

기간(D)	Gastrodin					
차수	0차			1차		
일/온도	25°C	40°C	80°C	25°C	40°C	80°C
0	0.167	0.167	0.167	-1.791	-1.791	-1.791
1	0.165	0.167	0.173	-1.800	-1.791	-1.754
3	0.166	0.164	0.177	-1.795	-1.808	-1.731
7	0.167	0.164	0.180	-1.790	-1.807	-1.714
14	0.162	0.156	0.186	-1.822	-1.858	-1.682
최종/초기	96.96	93.52	111.46			
Slope (K)	-0.0003	-0.0008	0.0013	-0.0019	-0.0048	0.0071
Intercept	0.1660	0.1669	0.1682	-1.7956	-1.7904	-1.7823
R ²	0.0723	0.7166	0.9344	0.0723	0.7162	0.9289

[온도별 보관 기간에 따른 gastrodin 함량 변화 및 0차, 1차 회귀방정식의 상관계수]



[Gastrodin의 0차 회귀직선]

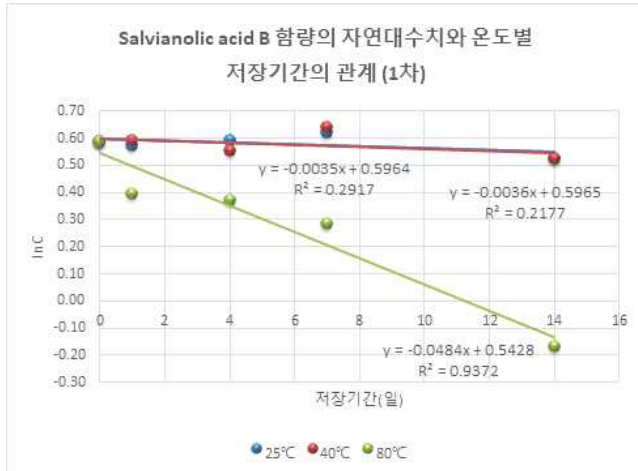


[온도와 반응 속도 간 방정식]

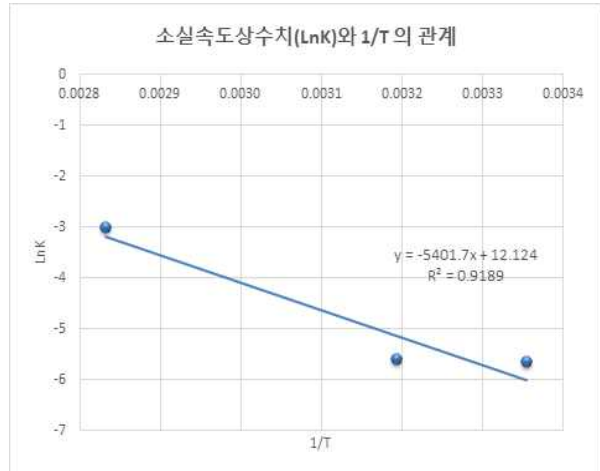
- 상관계수를 고려하여 0차 반응식을 이용하여 반감기를 예측. Gastrodin의 0차 회귀방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출. Gastrodin의 활성화 에너지는 4863.342 (Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은 $\text{LnK} = -2447.6(1/T) + 0.3517$ 임을 확인. 이에 따라 실온유통 최고온도인 35°C에서 gastrodin의 반감기는 5.53개월로 산출.
- 실험결과 gastrodin의 반감기가 매우 낮게 산출되었으나, 기율기의 절대값을 고려하는 방정식의 특성상 80°C에서 gastrodin의 함량이 높아지는 결과에 기인한 것으로 판단됨. 이는 높은 온도(80°C)에서 parishin이 gastrodin으로 분해되는 과정을 통해 gastrodin의 함량이 저장기간에 따라 증가하기 때문이며, 실제로 gastrodin의 안정성은 높은 온도에서도 매우 높음. (HX106과 유산균 복합제의 가혹시험 결과 참고)

기간(D)	Salvianolic acid B					
차수	0차			1차		
일/온도	25°C	40°C	80°C	25°C	40°C	80°C
0	1.794	1.794	1.794	0.585	0.585	0.585
1	1.771	1.808	1.480	0.572	0.592	0.392
3	1.809	1.738	1.447	0.593	0.553	0.370
7	1.860	1.891	1.324	0.621	0.637	0.281
14	1.686	1.684	0.843	0.522	0.521	-0.171
최종/초기	93.96	93.83	46.96			
Slope (K)	-0.0060	-0.0062	-0.0590	-0.0035	-0.0036	-0.0484
Intercept	1.8151	1.8155	1.6848	0.5964	0.5965	0.5428
R ²	0.2771	0.2019	0.9243	0.2917	0.2177	0.9372

[온도별 저장기간에 따른 salvianolic acid B 함량 변화 및 0차, 1차 회귀방정식의 상관계수]



[Salvianolic acid B의 1차 회귀 직선]



[온도와 반응 속도 간 방정식]

- ④ 상관계수를 고려하여 1차 반응식을 이용하여 반감기를 예측. Salvianolic acid B의 1차 회귀 방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출. Salvianolic acid B의 활성화 에너지는 10733.135 (Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은 $\text{LnK} = -5401.7(1/T) + 12.124$ 임을 확인. 이에 따라 실온유통 최고온도인 35°C에서 salvianolic acid B의 반감기는 5.19개월로 산출.

(2) HX106과 유산균 복합제제 시생산 및 연구

(가) HX106과 유산균 복합제제 시생산.

- ① HX106과 유산균 복합제제를 OEM 업체((주)한국씨엔에스팜)를 통해 아래와 같은 배합비율로 시생산함.
- ㉠ 제형: 2g 분말스틱포 (25*120mm)
- ㉡ 섭취방법: 1일 2회, 1회 1포 물과 함께 섭취
- ㉢ 원료명 및 배합비율

No.	원료명	성분함량(%)	배합비율(%)	1포 섭취량(mg)	일일 섭취량(mg)
1	천마등복합추출물(HX106)	100	27.500	550.000	1,100.000
2	L. acidophilus (2,000억)	100	0.600	12.000	24.000
3	9종혼합유산균 (120억)	100	1.000	20.000	40.000
4	덱스트린	100	67.870	1,357.400	2,714.800
5	이산화규소	100	2.000	40.000	80.000
6	레몬향분말	100	1.000	20.000	40.000
7	비타민B1염산염	78	0.010	0.156	0.312
8	비타민B2	100	0.010	0.200	0.400
9	비타민B6염산염	82	0.010	0.164	0.328
	합계		100.000		

(나) HX106과 유산균 복합제제의 지표성분 분석

- ① HX106과 유산균 복합제제의 정량 지표성분인 gastrodin 및 salvianolic acid B의 함량 변화를 하기 조건의 HPLC 분석을 통해 측정함.

Instrument	Agilent Infinity II UHPLC	Instrument	Waters Alliance 2695 HPLC																																					
Detector	Diode Array Detector (DAD)	Detector	Photodiode Array Detector (PDA)																																					
Wavelength	220 nm	Wavelength	288 nm																																					
Column	Shiseido Capcell PAK MG (250 mm*4.6 mm, 5 μm)	Column	Shiseido Capcell PAK MG (250 mm*4.6 mm, 5 μm)																																					
Mobile phase	A: DW B: 10% Acetonitrile * ISET Mode	Mobile phase	A: 0.026% Phosphoric acid B: Acetonitrile																																					
	<table border="1"> <tr><th>Time (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>10</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>15</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>17</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>20</td><td>100</td><td>0</td></tr> </table>		Time (min)	A (%)	B (%)	0	100	0	5	50	50	10	30	70	15	0	100	17	100	0	20	100	0	<table border="1"> <tr><th>Time (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>20</td><td>77</td><td>23</td></tr> <tr><td>35</td><td>71.5</td><td>28.5</td></tr> <tr><td>40</td><td>71.5</td><td>28.5</td></tr> <tr><td>45</td><td>98</td><td>2</td></tr> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0	98	2	20	77	23	35	71.5	28.5	40	71.5	28.5	45
Time (min)	A (%)	B (%)																																						
0	100	0																																						
5	50	50																																						
10	30	70																																						
15	0	100																																						
17	100	0																																						
20	100	0																																						
Time (min)	A (%)	B (%)																																						
0	98	2																																						
20	77	23																																						
35	71.5	28.5																																						
40	71.5	28.5																																						
45	98	2																																						
Flow rate	1.0 mL/min	Flow rate	1.0 mL/min																																					
Injection volume	10 μL	Injection volume	10 μL																																					
Oven temperature	25°C	Oven temperature	20°C																																					

[Gastrodin 분석법]

[Salvianolic acid B 분석법]

㉞ 정량 분석 결과, gastrodin 함량이 0.157 mg/g, salvianolic acid B 함량이 1.631 mg/g으로 과립 원료의 기준규격에 적합함을 확인.

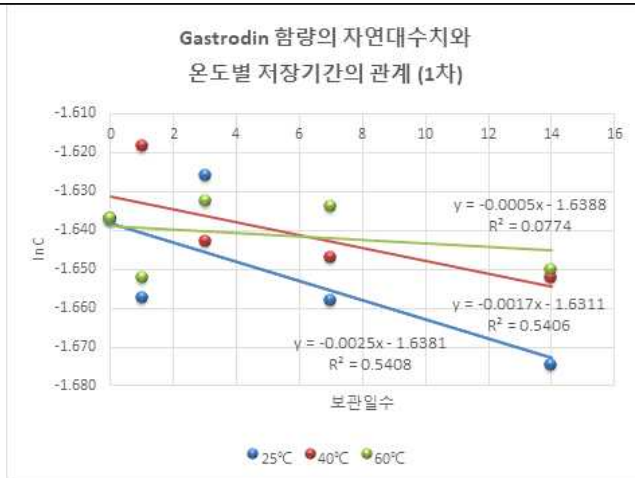
지표성분	평균 (mg/g)	기준규격
Gastrodin	0.209	0.154~0.231 mg/g
Salvianolic acid B	1.877	1.628~2.442 mg/g

(다) HX106과 유산균 복합제제의 가혹시험 안정성 평가

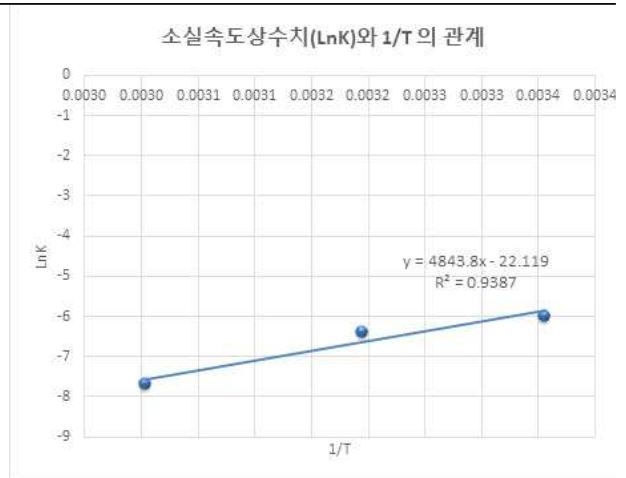
㉟ HX106과 유산균 복합제제의 반감기 예측을 통한 안정성 평가를 위해 시료를 25, 40, 60°C에 14일간 보관하면서 0, 1, 3, 7, 14일차에 시료를 수거하여 gastrodin과 salvianolic acid B 함량을 측정하였음. 결과를 통해 품질지표의 반응차수를 결정하고 온도 영향에 따른 활성화 에너지를 산출한 뒤, 반응속도상수를 산출하여 반감기를 예측하였음.

기간(D)	Gastrodin					
	0차			1차		
일/온도	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C
0	0.195	0.195	0.195	-1.637	-1.637	-1.637
1	0.191	0.198	0.192	-1.657	-1.618	-1.652
3	0.197	0.193	0.195	-1.626	-1.643	-1.632
7	0.191	0.193	0.195	-1.658	-1.647	-1.634
14	0.187	0.192	0.192	-1.675	-1.652	-1.650
최종/초기	96.31	98.51	98.70			
Slope (K)	-0.0005	-0.0003	-0.0001	-0.0025	-0.0017	-0.0005
Intercept	0.1943	0.1957	0.1942	-1.6381	-1.6311	-1.6388
R ²	0.5347	0.5359	0.0775	0.5408	0.5406	0.0774

[온도별 저장기간에 따른 gastrodin 함량 변화 및 0차, 1차 회귀방정식의 상관계수]



[Gastrodin의 1차 회귀직선]

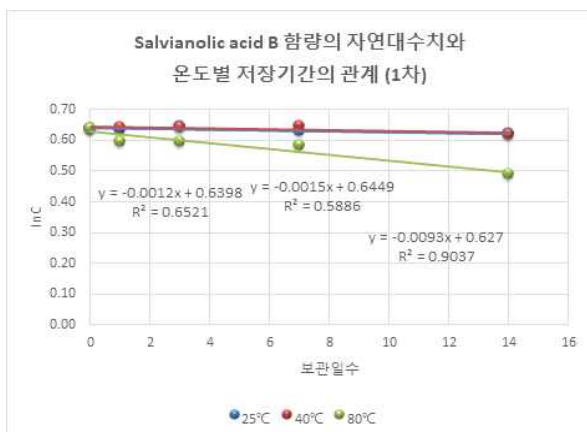


[온도와 반응 속도 간 방정식]

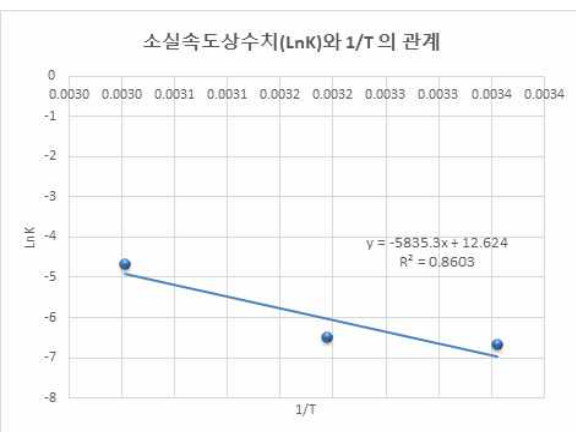
㉓ 상관계수를 고려하여 1차 반응식을 이용하여 반감기를 예측. Gastrodin의 1차 회귀방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출. Gastrodin의 활성화 에너지는 9624.695 (Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은 $\text{LnK} = -4843.8(1/T) - 22.119$ 임을 확인. 이에 따라 실온유통 최고온도인 35°C에서 gastrodin의 반감기는 무한대에 가까운 긴 기간으로 산출됨.

기간(D) 차수	Salvianolic acid B					
	0차			1차		
일/온도	25°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C
0	1.893	1.893	1.893	0.64	0.64	0.64
1	1.884	1.901	1.815	0.63	0.64	0.60
3	1.906	1.904	1.815	0.64	0.64	0.60
7	1.879	1.906	1.795	0.63	0.64	0.58
14	1.861	1.855	1.629	0.62	0.62	0.49
최종/초기	98.35	98.01	86.07			
Slope (K)	-0.0023	-0.0028	-0.0162	-0.0012	-0.0015	-0.0093
Intercept	1.8961	1.9058	1.8703	0.6398	0.6449	0.6270
R2	0.6488	0.5862	0.9024	0.6521	0.5886	0.9037

[온도별 저장기간에 따른 salvianolic acid B 함량 변화 및 0차, 1차 회귀방정식의 상관계수]



[Salvianolic acid B의 1차 회귀 직선]



[온도와 반응 속도 간 방정식]

㉔ 상관계수를 고려하여 1차 반응식을 이용하여 반감기를 예측. Salvianolic acid B의 1차 회귀 방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출. Salvianolic acid B의 활성화 에너지는 11594.817 (Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은 $\text{LnK} = -5835.3(1/T) + 12.624$ 임을 확인. 이에 따라 실온유통 최고온도인 35°C에서 salvianolic acid B의 반감기는 12.86개월로 산출.

(라) HX106과 유산균 복합제제의 유통기한 설정용 가속시험

- ① HX106과 유산균 복합제제의 유통기한 설정용 원료 생산
- ② HX106과 유산균 복합제제의 유통기한 설정 실험을 위하여 OEM 업체((주)한국씨엔에스팜)를 통해 아래와 같은 배합비율로 원료를 생산함.

No.	원료명	성분함량(%)	배합비율(%)	1포 섭취량(mg)	일일 섭취량(mg)
1	천마등복합추출물(HX106)	100	27.500	550.000	1,100.000
2	한국야쿠르트유산균 (2,000억)	100	0.625	12.500	25.000
3	덱스트린	100	68.845	1,376.900	2,753.800
4	이산화규소	100	2.000	40.000	80.000
5	레몬향분말	100	1.000	20.000	40.000
6	비타민B1염산염	78	0.010	0.156	0.312
7	비타민B2	100	0.010	0.200	0.400
8	비타민B6염산염	82	0.010	0.164	0.328
	합계		100.000		

- ③ HX106과 유산균 복합제제의 유통기한 설정 가속시험
- ④ HX106과 유산균 복합제제의 유통기한을 산출하고자, 한국기능식품연구원을 통해 유통기한 설정 실험이 진행 중에 있음.
- ⑤ 시료를 가속조건 (25°C(H 65%), 35°C(H 65%), 40°C(H 75%)) 하에서 5개월간 저장하며 일정 기간마다 품질지표의 변화를 측정하고, 아레니우스식을 이용한 통계처리를 이용하여 유통기한을 산출하고자 함.
- ⑥ 시료의 분석항목은 식품 유통기한 설정 가이드라인, 원료 및 제조공정을 참고하여 선정되었음. 중금속은 제품에 문제가 없는지 확인하기 위하여 초기 1회 분석하며, 정량지표인 프로바이오틱스, gastrodin, salvianolic acid B는 각 시기별로 3반복 실험 진행하며, 정성지표인 spicatoside A, ellagic acid, 대장균군은 각 시기별로 1반복 실험 진행.

분류	검사항목	실험방법
관능적 검사	성상	식품공전 제8. 일반시험법 1.1 성상(관능시험)
이화학적 검사	프로바이오틱스	식품공전 제8. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.9 유산균수 4.9.1 유산균수
	Gastrodin	건강기능식품 기능성원료 인정서 제 2015-17호
	Salvianolic acid B	
	Spicatoside A	
	Ellagic acid	
	납	식품공전 제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질시험법 9.1 중금속 (금속별 시험)
카드뮴		
총비소 총수은		
미생물	대장균군	식품공전 제9. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7 대장균군 4.7.1 정성시험

바) MT104 추출 공정 연구

- (1) MT104 원생약의 기원 감별 및 수급
- (가) 천연물의 경우 동속의 유사식물이 혼입되어 유통되는 경우가 있기에, DNA barcode 기술을 활용하여 원생약에 대한 기원감별을 진행함
- (나) 본 연구에서는 DNA 중 ITS 영역을 이용하여 원생약 기원감별을 진행하였으며, 분석 방법은 아래와 같음

- ① DNA 추출
- ② 분석 의뢰된 시료 약 0.05g을 DNA 추출용 시료로 사용하였으며 CTAB buffer를 이용하여 DNA를 추출(Phillips & simon, 1995)

- ㉠ 시료에 CTAB buffer 500μl 와 5μl β-mercaptoethanol을 혼합하고 65°C에서 30분간 반응
- ㉠ CIA(chloroform : Isoamyl alcohol, 24:1)로 2회 처리하고 원심분리 해 핵산이 포함된 상층액을 취하고 silica magnetic bead로 핵산을 분리
- ㉠ Bead를 70% ethanol 500μl로 2회 세척하고 건조시킨 후 50μl의 TE buffer에 핵산을 용출
- ㉠ DNA 중합효소연쇄반응(PCR)
- ㉠ PCR 반응물의 조성은 주형 DNA 약 5ng, 1 unit hot-start Taq polymerase, 2μl의 10X PCR buffer, 2mM MgCl2, 0.2mM dNTP, 각 5p M의 primer 쌍을 혼합하고 증류수를 넣어 총량 20μl로 준비
- ㉠ ProFlex PCR system에서 94°C에서 10분간 per-denaturation 후, 94°C에서 20초, 55°C에서 20초, 72°C에서 1분으로 설정하여 30 cycle 수행하고 72°C에서 10분간 final extension 진행
- ㉠ 반응물은 1% 아가로스 젤에서 전기영동을 해 PCR 증폭 여부 확인

DNA	Forward 5'-3'	Forward 3'-5'	Annealing temp.
ITS	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55°C

[실험에 사용된 primer 염기서열과 반응온도]

- ㉠ 염기서열 해독(sequencing)
- ㉠ 젤 정제된 PCR 증폭 DNA 10ng, 2μl 5× sequencing buffer, 한팔꽃나무의 primer 3.75pM 그리고 BigDye 3.1을 혼합하여 98°C 5초, 50°C 5초, 60°C 4분의 조건으로 25 cycle 수행
- ㉠ BigDye cycling PCR 후 Magnesil Green (Promega, USA) 100μl를 넣어 정제 후 20μl의 증류수에 dye-termination 된 핵산 단편들을 용출
- ㉠ 염기서열해독에는 3730xl (ThermoFisher scientific, USA) 자동염기서열분석 장치를 사용하였으며 모세관 전기영동 매질은 POP-7TM polymer를 사용하고 36cm 길이의 모세관을 사용하여 분석
- ㉠ 데이터의 분석
- ㉠ 염기서열이 해독된 데이터 forward 방향과 reverse 방향의 염기서열을 토대로 하나의 완성된 contig 염기서열 제작
- ㉠ 식물 종을 결정하기 위해 유전자은행(NCBI) Blast 검색으로 이미 보고된 식물 종들과 염기서열 일치 정도를 비교분석

(다) DNA 분석 결과, 실새삼 (*Cuscuta australis* R.Br.), 새삼 (*Cuscuta japonica* Choisy)로 각각 기원이 확인되었음

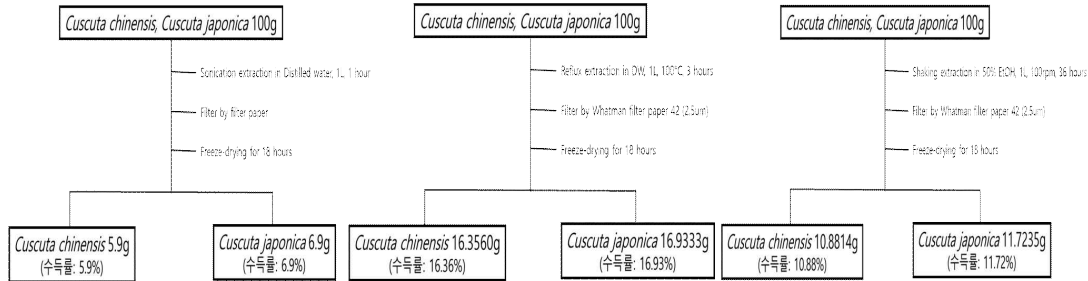
분석 결과 요약	분석 결과 요약	분석 결과 요약	분석 결과 요약	분석 결과 요약																														
<p>해독된 염기서열에 대해 BLAST 분석을 실시한 결과 시료 1번 (Internal transcribed spacer) DNA를 주형으로 염기서열을 분석하였을 때 100% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 99.99% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)로 확인되었습니다. 따라서 시료 1번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시료 번호</th> <th>DNA 분석을 통해 확인된 종명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 100798_Cuscuta</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> <tr> <td>2. 100798_Cuscuta japonica</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> </tbody> </table> <p>1. 100798_Cuscuta 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 1번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 1번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <p>2. 100798_Cuscuta japonica 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 2번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 2번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p>	시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명	1. 100798_Cuscuta	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	2. 100798_Cuscuta japonica	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	<p>해독된 염기서열에 대해 BLAST 분석을 실시한 결과 시료 2번 (Internal transcribed spacer) DNA를 주형으로 염기서열을 분석하였을 때 100% 일치로 <i>Cuscuta australis</i> (accession: J011111)와 99.99% 일치로 <i>Cuscuta australis</i> (accession: J011111)로 확인되었습니다. 따라서 시료 2번의 DNA는 <i>Cuscuta australis</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시료 번호</th> <th>DNA 분석을 통해 확인된 종명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 100798_Cuscuta</td> <td><i>Cuscuta australis</i> (동서양)</td> </tr> <tr> <td>2. 100798_Cuscuta</td> <td><i>Cuscuta australis</i> (동서양)</td> </tr> </tbody> </table> <p>1. 100798_Cuscuta 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta australis</i> (accession: J011111)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 1번의 DNA는 <i>Cuscuta australis</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 1번의 DNA는 <i>Cuscuta australis</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <p>2. 100798_Cuscuta 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta australis</i> (accession: J011111)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 2번의 DNA는 <i>Cuscuta australis</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 2번의 DNA는 <i>Cuscuta australis</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p>	시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명	1. 100798_Cuscuta	<i>Cuscuta australis</i> (동서양)	2. 100798_Cuscuta	<i>Cuscuta australis</i> (동서양)	<p>해독된 염기서열에 대해 BLAST 분석을 실시한 결과 시료 3번 (Internal transcribed spacer) DNA를 주형으로 염기서열을 분석하였을 때 100% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 99.99% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)로 확인되었습니다. 따라서 시료 3번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시료 번호</th> <th>DNA 분석을 통해 확인된 종명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 101028_Cuscuta(1)</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> <tr> <td>2. 101028_Cuscuta(2)</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> </tbody> </table> <p>1. 101028_Cuscuta(1) 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 3번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 3번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <p>2. 101028_Cuscuta(2) 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 4번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 4번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p>	시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명	1. 101028_Cuscuta(1)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	2. 101028_Cuscuta(2)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	<p>해독된 염기서열에 대해 BLAST 분석을 실시한 결과 시료 4번 (Internal transcribed spacer) DNA를 주형으로 염기서열을 분석하였을 때 100% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 99.99% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)로 확인되었습니다. 따라서 시료 4번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시료 번호</th> <th>DNA 분석을 통해 확인된 종명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 101028_Cuscuta(1)</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> <tr> <td>2. 101028_Cuscuta(2)</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> </tbody> </table> <p>1. 101028_Cuscuta(1) 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 5번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 5번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <p>2. 101028_Cuscuta(2) 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 6번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 6번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p>	시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명	1. 101028_Cuscuta(1)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	2. 101028_Cuscuta(2)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	<p>해독된 염기서열에 대해 BLAST 분석을 실시한 결과 시료 5번 (Internal transcribed spacer) DNA를 주형으로 염기서열을 분석하였을 때 100% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 99.99% 일치로 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)로 확인되었습니다. 따라서 시료 5번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시료 번호</th> <th>DNA 분석을 통해 확인된 종명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 101028_Cuscuta(1)</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> <tr> <td>2. 101028_Cuscuta(2)</td> <td><i>Cuscuta japonica</i> (동서양)</td> </tr> </tbody> </table> <p>1. 101028_Cuscuta(1) 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 7번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 7번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p> <p>2. 101028_Cuscuta(2) 해독된 ITS DNA는 <i>Cuscuta japonica</i> (accession: J011110)와 100% 일치로 일치로 확인되었습니다. 이를 통해 시료 8번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다. 따라서 시료 8번의 DNA는 <i>Cuscuta japonica</i>에 속하는 것으로 판단됩니다.</p>	시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명	1. 101028_Cuscuta(1)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)	2. 101028_Cuscuta(2)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)
시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명																																	
1. 100798_Cuscuta	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
2. 100798_Cuscuta japonica	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명																																	
1. 100798_Cuscuta	<i>Cuscuta australis</i> (동서양)																																	
2. 100798_Cuscuta	<i>Cuscuta australis</i> (동서양)																																	
시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명																																	
1. 101028_Cuscuta(1)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
2. 101028_Cuscuta(2)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명																																	
1. 101028_Cuscuta(1)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
2. 101028_Cuscuta(2)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
시료 번호	DNA 분석을 통해 확인된 종명																																	
1. 101028_Cuscuta(1)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	
2. 101028_Cuscuta(2)	<i>Cuscuta japonica</i> (동서양)																																	

[실새삼 및 새삼의 DNA 분석 결과]

(라) 총 실새삼 원생약 8 lot와 새삼 원생약 3 lot를 수급하였으며, 수급된 원생약 중 기원이 감별된 lot를 대량으로 수급하여 비임상연구 및 인체적용시험용 원료를 생산하였음

(2) 추출용매 및 추출방법의 설정

- (가) MT104 소재 (실새삼, 새삼)의 추출용매 및 추출방법을 3가지로 하여 활성 평가를 위한 추출물을 제조
- (나) 제조된 추출물의 활성을 평가한 결과, 추출용매 (증류수), 추출방법 (환류추출 3시간)으로 추출한 추출물에서 효과가 우수함을 확인



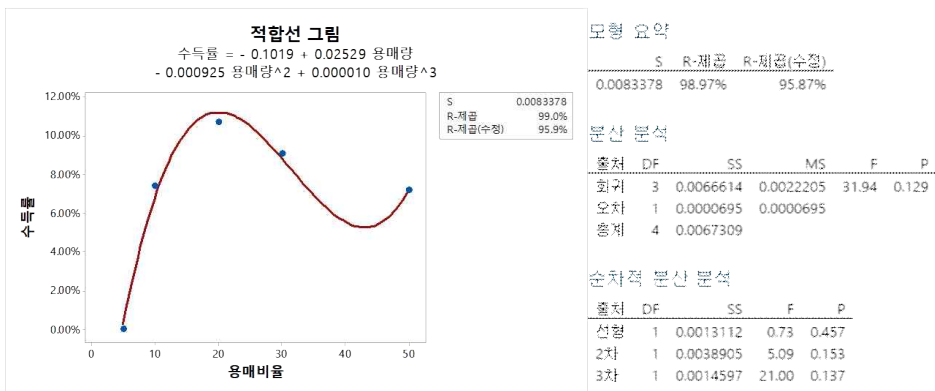
[추출 용매 및 추출 방법 비교 공정도]

(3) 소재의 혼합비의 설정

- (가) 도출 소재(실새삼, 새삼)의 개별추출물을 다양한 중량비로 혼합하여 활성을 확인한 결과, 3:1 중량비로 혼합하였을 때, 가장 높은 활성을 나타냄을 확인

(4) 용매 비율의 설정

- (가) 3:1의 비율로 혼합한 약재 4 g에 용매 비율을 다음과 같이(5, 10, 20, 30, 50 배) 변경하여 선정된 표준추출법으로 추출 후 회귀분석을 하였으며, 최대 수득률을 갖는 용매 비율은 투입 약재량의 20배수인 것으로 확인됨.

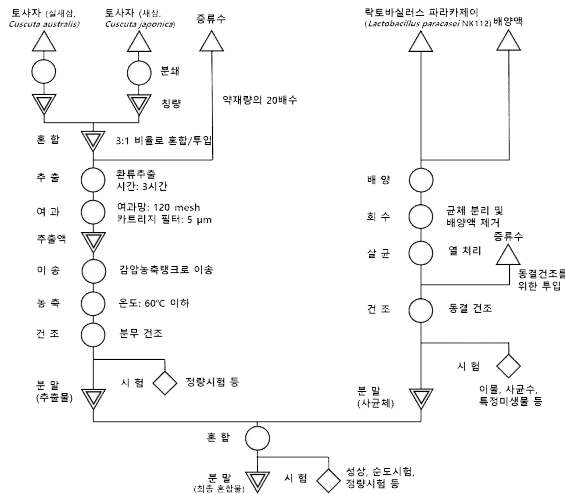


[용매비율에 따른 수득률 변화]

- (나) MT104 소재인 실새삼과 새삼의 혼합 추출물의 추출방법은 증류수를 약재 투입량의 20배수 하여 3시간 동안 환류추출하는 것으로 설정함

사) MT104 원료 및 완제 제형/제제 연구, 제품 생산을 위한 scale-up 연구

- (1) 제형 연구, 독성시험 및 안정성 시험용 MT104 원료 시생산
- (가) 상기연구로 도출된 표준추출법으로 MT104 전임상 연구 및 인체적용시험용 원료 생산
- (나) 제조 공정도에 따라, KGC예본 (BGMP시설)에서 실새삼 및 새삼 추출물을 생산, 메디오젠 (BGMP시설)에서 사균체 생산 후 KGC 예본에서 추출물과 사균체를 8:1의 중량비로 혼합. 혼합된 원료를 전임상연구 (제형 연구, 독성시험, 안정성시험, 기준 및 시험법 설정 연구) 및 인체적용시험 등에 사용



[MT104 제조 공정도]

KGC대한		제조지시 및 기록서		제조번호	제조일자
제조명	MT104	제조코드	MT104	제조번호	06
제조원	MT104	제조코드	MT104	제조일자	-

구분	부서	담당	사명	사명
제조명	제조명	담당	사명	사명
제조원	제조원	담당	사명	사명
제조일자	제조일자	담당	사명	사명

[MT104 제조지시 및 기록서]

KGC대한		제조지시 및 기록서		제조번호	제조일자
제조명	MT104	제조코드	MT104	제조번호	06
제조원	MT104	제조코드	MT104	제조일자	-

구분	부서	담당	사명	사명
제조명	제조명	담당	사명	사명
제조원	제조원	담당	사명	사명
제조일자	제조일자	담당	사명	사명

KGC대한		시험성적서		제조번호	제조일자
제조명	MT104	제조코드	MT104	제조번호	06
제조원	MT104	제조코드	MT104	제조일자	-

NO	시험 항목	시험 기준	결과
1	외관	외관	적합
2	수분 함량	5.0 ppm 이하	적합
3	중금속	5.0 ppm 이하	적합
4	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
5	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
6	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
7	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
8	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
9	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
10	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
11	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
12	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
13	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
14	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
15	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
16	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
17	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
18	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
19	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
20	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
21	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
22	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
23	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
24	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
25	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
26	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
27	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
28	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
29	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
30	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
31	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
32	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
33	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
34	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
35	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
36	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
37	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
38	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
39	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
40	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
41	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
42	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
43	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
44	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
45	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
46	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
47	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
48	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
49	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합
50	잔류 용매	0.2 ppm 이하	적합

[MT104 시험성적서]

- (2) MT104 함유 정제 개발을 위한 부형제 스크리닝
- (가) MT104 추출물의 정제화를 위한 부형제 선택을 위해 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 건강기능식품 공전, 식품공전을 통한 부형제 스크리닝 검토를 하여 희석제, 고결방지제 (anti-caking agent), 활택제, 결합제를 검토하여 다음의 부형제를 선정함
- 희석제 : Dextran, Dextrin, Isomalt, Maltodextrin, Mannitol, Lactose, Sucroset, 결정셀룰로오스, Starch
 - 고결방지제 (분말이 뭉쳐지는 것을 방지) : 규산칼슘, 이산화규소
 - 활택제 : 스테아린산 마그네슘, 탈크
 - 결합제 : 하이드록시프로필메틸셀룰로오스

- (3) MT104 함유 흐름성이 우수한 분체 제조
- (가) MT104 추출물을 직접 과립물로 제조하기 위하여 상용화 가능성과 추출물의 흡착이 우수한 유동층 과립기 (Fluid bed granulator, Glatt사)를 이용하여 과립을 다음 표 1의 조건을 통하여 과립을 제조하고 흐름성 및 압축성 평가를 위해 안식각, Carr's index, Hausner ratio를 평가함
- 안식각, Carr's index, Hausner ratio
 - * 안식각 : 완전 평면인 기준판 위의 일정한 높이에 고정된 깔대기를 통해 과립형태의 시료를 통과시켜 얻어진 퇴적물을 최대 경사각으로 측정되며 안식각이 작을수록 흐름성이 좋음
 - * Carr's index : $100 \times (\text{겉보기 밀도} - \text{탭 밀도}) / \text{탭 밀도}$, 값이



[MT104 추출물의 과립화를 위한 유동층 과립기]

낮을수록 압축성과 흐름성이 좋음

* Hausner ratio : 탭밀도/겉보기 밀도 값이 낮을수록 흐름성이 좋음

- ① 유동층 과립기를 통한 과립제조 방법 및 조건
- ② MT104 추출물과 결합제를 사용할 경우 결합제와 MT104를 증류수에 완전하게 녹이고 결합제를 사용하지 않을 경우 MT104 추출물만 증류수에 녹임
- ④ 유동층 과립기 내에 희석제와 고결방지제를 균일하게 혼합시킨 혼합물을 유동층 과립기 내에서 유동시킴
- ⑤ a의 MT104 추출물 혼합액을 유동층 과립기에서 분무하면서 다양한 건조온도, 분무속도 및 부유압력으로 조정하며 실험하여 다음의 유동층 과립기 조건에 따라 과립을 제조함

[유동층 과립기 조건]

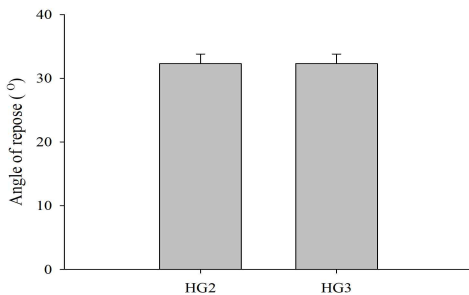
분무 속도	5 rpm
분무 압력	1.5 bar
부유 압력	0.4 bar
건조 온도	55도

* MT104 추출물 6 g/결정셀룰로오스 29.4 g/이산화규소 0.6 g/결합용매(증류수) 30 g을 이용하여 유동층 과립기 조건 결정

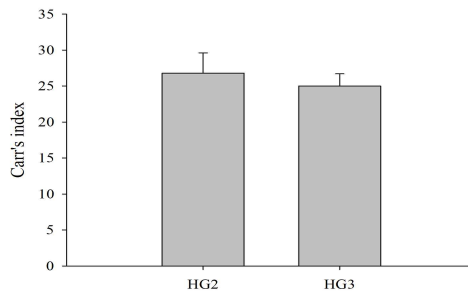
- ② MT104 추출물 과립제의 희석제 비율에 따른 영향
- ⑦ MT104 추출물을 과립물로 제조할 때 수분 안정성을 고려하여 고결방지제를 첨가하여 과립 제조

[MT104 추출물과 희석제 비율에 따른 처방 (단위 : g)]

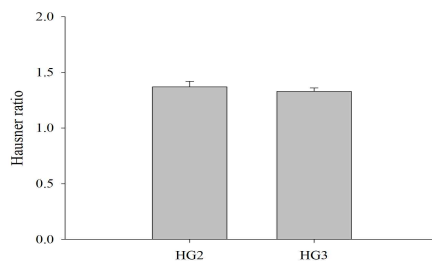
	HG1	HG2	HG3
MT104 추출물	6	6	6
결정셀룰로오스	23.4	29.4	35.4
이산화규소	0.6	0.6	0.6
결합용매 (증류수)	30	30	30
과립 생성유무	형성은 되나 제조 중 문제 발생	형성	형성
주성분/부형제 비율	1:4	1:5	1:6



[희석제 비율에 따른 안식각의 변화]



[희석제 비율에 따른 Carr's index의 변화]

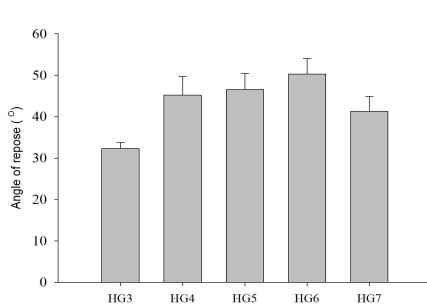


[희석제 비율에 따른 Hausner ratio의 변화]

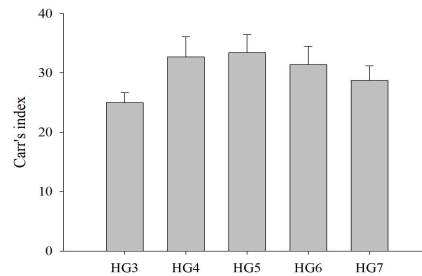
- ④ MT104 추출물과 희석제 비율에 따른 영향을 평가했을 때 MT104와 희석제의 비율이 1:4 비율에서는 과립은 형성되었으나 점조정이 있는 성상으로 흐름성과 압축성은 평가할 수 없었음. 1:5, 1:6의 비율에서는 모두 과립 형성이 되었음. 그러나 1:5의 비율과 1:6의 비율 모두 흐름성과 압축성에서 유의성 있는 차이가 나지 않았으며 이후 최소한의 정제를 제조하는 것으로 목표로 하기 때문 MT104와 희석제의 비율을 1:5로 하여 이후 실험을 진행함
- ⑤ 과립화 과정 중에 함량 저하가 나타나는지 확인하기 위하여 함량 평가를 진행하였음. 함량 평가 결과 이론값 대비해서 유동층 과립기를 이용한 과립 제조시 함량의 저하가 나타나지 않음
- ③ MT104 추출물 과립제의 희석제 종류에 따른 영향
- ⑦ MT104 추출물을 과립물로 제조할 때 희석제의 종류를 다르게 하여 과립 제조

[MT104 추출물과 희석제 종류에 따른 처방 (단위 : g)]

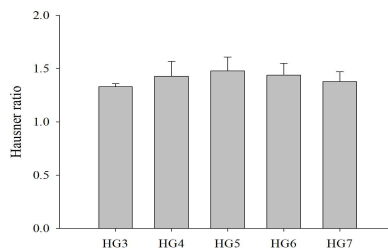
	HG3	HG4	HG5	HG6	HG7	HG8	HG9	HG10	HG11	
MT104 추출물	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
결정셀룰로오스	29.4	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dextran	-	29.4	-	-	-	-	-	-	-	
Dextrin	-	-	29.4	-	-	-	-	-	-	
Isomalt	-	-	-	29.4	-	-	-	-	-	
Maltodextrin	-	-	-	-	29.4	-	-	-	-	
Mannitol	-	-	-	-	-	29.4	-	-	-	
Lactose	-	-	-	-	-	-	29.4	-	-	
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	29.4	-	
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	29.4	
이산화규소	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
결합용매 (증류수)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
과립 생성유무	형성	형성	형성	형성	형성	미형성	미형성	미형성	미형성	
주성분/부형제 비율						1:5				



[희석제 종류에 따른 안식각의 변화]



[희석제 종류에 따른 Carr's index의 변화]



[희석제 종류에 따른 Hausner ratio의 변화]

- ④ 희석제의 종류에 따라 과립을 제조하고 과립의 흐름성과 압축성을 평가하였을 때 Mannitol, Lactose, Sucrose, Starch의 경우는 과립이 제대로 형성이 되지 않았으며 Dextran,

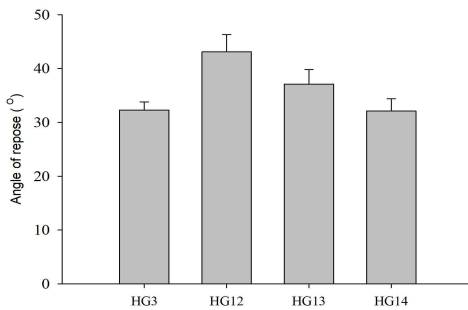
Dextrin, Isomalt, Maltodextrin의 경우는 과립이 형성은 되었으나 결정셀룰로오스에 비해서 흐름성과 압축성이 좋지 않은 결과를 나타냄. 흐름성과 압축성 결과에 따라 결정셀룰로오스를 선정하여 이후 실험을 진행함

(4) MT104 추출물 과립제의 고결방지제 비율에 따른 영향

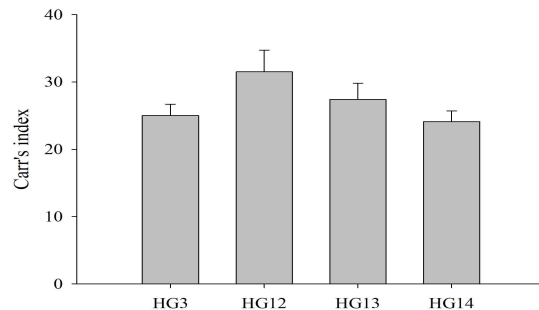
(가) MT104 추출물을 과립물로 제조할 때 수분 안정성을 고려하여 고결방지제를 첨가하여 과립 제조

[MT104 추출물과 고결방지제 비율에 따른 처방 (단위 : g)]

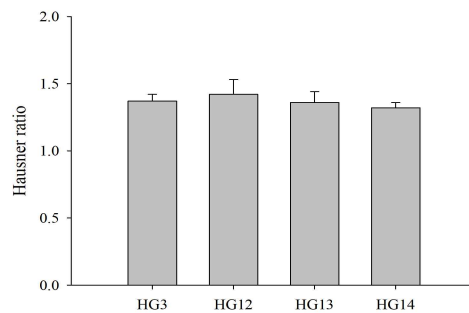
	HG3	HG12	HG13	HG14
MT104 추출물	6	6	6	6
결정셀룰로오스	29.4	30	29.7	29.1
이산화규소	0.6	-	0.3	0.9
결합용매 (증류수)	30	30	30	30
과립 생성유무	형성	형성	형성	형성
주성분/부형제 비율	1:5	1:5	1:5	1:5



[고결방지제 비율에 따른 안식각의 변화]



[고결방지제 비율에 따른 Carr's index의 변화]



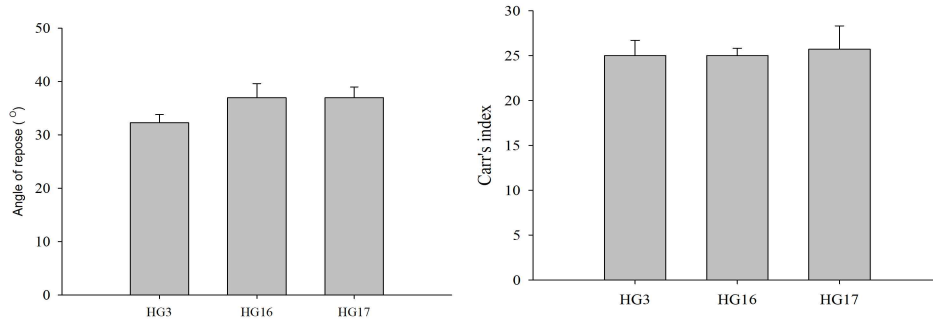
[고결방지제 비율에 따른 Hausner ratio의 변화]

(5) MT104 추출물 과립제의 결정셀룰로오스와 이산화규소 비율에 따른 영향

(가) MT104 추출물을 과립물로 제조할 때 수분 안정성을 고려하여 고결방지제를 첨가하여 과립 제조

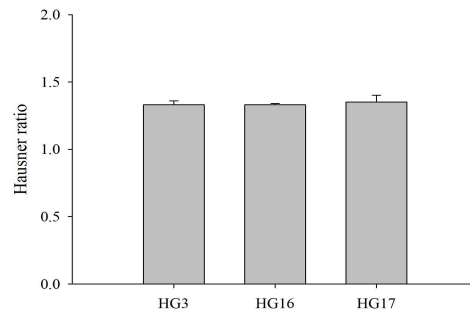
[MT104 추출물과 희석제/고결방지제 비율에 따른 처방 (단위 : g)]

	HG3	HG15	HG16	HG17
MT104 추출물	6	11	11	11
결정셀룰로오스	29.4	37.5	42.9	48.3
이산화규소	0.6	1.0	1.1	1.2
결합용매 (증류수)	30	30	30	30
과립 생성유무	형성	미형성	형성	형성
주성분/부형제 비율	1:5	1:3.5	1:4	1:4.5



[결정셀룰로오스와 이산화규소 비율에 따른 안식각의 변화]

[결정셀룰로오스와 이산화규소 비율에 따른 Carr's index의 변화]



[결정셀룰로오스와 이산화규소 비율에 따른 Hausner ratio의 변화]

(나) MT104 추출물과 첨가제의 비율이 1:3.5 비율에서는 과립이 제조가 안되는 결과가 나타남. MT104 추출물과 1:4와 1:4.5 비율 혼합물 과립에서의 유동성과 압축성의 차이는 나타나지 않아서 MT104 추출물을 최대량 함유할 수 있는 비율은 1:4로 판단됨. (정제를 최소한으로 제조할 수 있는 최소한의 첨가제 비율)

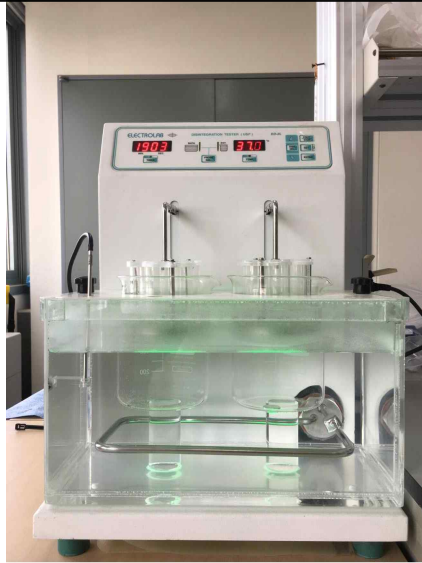
(6) MT104 함유 과립을 이용한 정제화

(가) 정제화를 위해 앞에 단계에서의 과립물에 부형제와 활택제를 후 혼합 과정을 거친 이후 그림 51의 단발 타정기 (Erweka사)를 이용하여 정제를 제조하고 붕해평가를 진행함



[단발타정기 (Erweka 사)]

(나) 붕해 평가 : 대한약전 시험법에 따라 물에서 다음 그림 52의 붕해시험기 (Electrolab 사)를 이용하여 정제의 붕해도 평가를 진행함



[봉해시험기 (Elecetrolab 사)]

(다) 경도측정 : 정제의 기계적 특성을 측정하는 방법으로 정제가 파괴될 때의 힘의 정도로서 측정하며 경도의 값이 클수록 기계적인 특성이 우수함을 나타냄. 본 실험에서는 타정장애가 발생하지 않는 최대 경도를 측정하였음

[MT104와 후혼합 부형제 비율에 따른 처방 (단위 : mg)]

	T1	T2	T3	T4
MT104 추출물	150	150	150	150
결정셀룰로오스(PH101)	70.5	70.5	70.5	70.5
옥수수 전분	75	75	75	75
이산화규소	3	3	3	3
히드록시프로필메틸셀룰로오스	1.5	1.5	1.5	1.5
결정셀룰로오스(PH102)	-	49	74	99
스테아린산마그네슘	1	1	1	1
총 무게 (mg)	301	350	375	400
경도 (KP)	-	17.1 ± 2.1	19.1 ± 2.3	20.3 ± 3.4
붕해 (분)	-	20.3 ± 0.1	19.7 ± 1.5	18.2 ± 2.4
정제 성형 유무	타정장애	이상없음	이상없음	이상없음

(라) MT104와 후혼합 부형제 중 가장 타정성이 우수한 결정셀룰로오스의 양을 변화시키며 정제를 제조하고 최대 경도와 붕해도를 측정하였음. 후혼합 부형제인 결정셀룰로오스를 첨가하지 않았을 경우는 타정장애가 발생하여 정제가 제조되지 않았으며 결정셀룰로오스를 증량할수록 경도와 붕해도가 우수함을 확인하였음. 하지만 최종 제형의 크기가 작을수록 복용편의성이 증가 될 수 있어 최종 제형을 T2 제형을 선정하였음



[최종 MT104 함유 정제]

(7) 신규 MT104 함유 정제 조성 및 제조방법 선정

(가) 신규 MT104 함유 정제는 최종 처방으로 T2 처방인 MT104 150 mg, 결정셀룰로오스 70.5 mg, 옥수수전분 75 mg, 이산화규소 3 mg, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 1.5 mg, 결정셀

룰로오스 (후혼합) 49 mg, 스테아린산 마그네슘 1 mg 로서 총 350 mg을 최적 처방으로 선정하였음. 제조방법은 유동층과립기를 이용하여 과립물을 제조 후 타정하는 제조방법을 선정하였음

(나) MT104 150 mg, 결정셀룰로오스 70.5 mg, 옥수수전분 75 mg, 이산화규소 3 mg, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 1.5 mg, 결정셀룰로오스 (후혼합) 49 mg, 스테아린산 마그네슘 1 mg 으로 총 350 mg을 최적 처방으로 선정함

(8) 인체적용시험용 제제생산

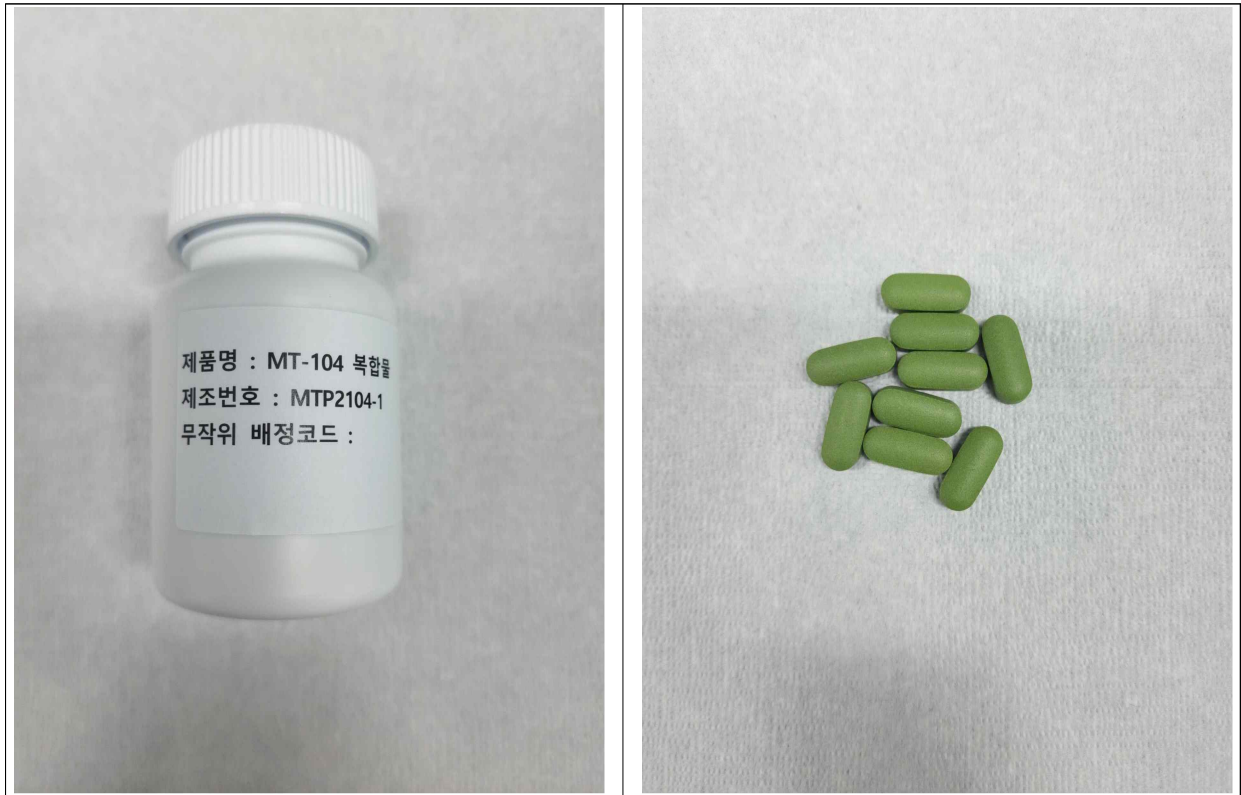
(가) 상기의 제형연구를 토대로 하여 아래의 임상용 제제 (주약 및 위약)를 생산함.

[MT104 임상제제(주약)의 배합비율]

원료명	배합비 (%)	단위중량 (mg)
【배합비율】-내용물		
MT104	48.0000	480.0000
결정셀룰로스(102D)	37.8000	378.0000
크로스카멜로스나트륨(Ac-di-sol)	5.0000	50.0000
프락토올리고당분말	3.0000	30.0000
이산화규소	1.8000	18.0000
스테아린산마그네슘	1.0000	10.0000
[코팅]		
HPMC(히드록시프로필메틸셀룰로스)	2.1150	21.1500
글리세린지방산에스테르	0.2162	2.1620
이산화티타늄	0.6940	6.9400
치자청색소(치자블루에스비#M1637)	0.2206	2.2060
치자황색소(치자황색600(#M4015))	0.1542	1.5420
주정 (코팅용)	25.5605	255.6050
주정 (과립용)	21.0000	210.0000
합계	100.0000	1000.0000

[MT104 위약의 배합비율]

원료명	배합비 (%)	단위중량 (mg)
【배합비율】-내용물		
결정셀룰로스(102D)	60.0000	600.0000
유당	33.8000	338.0000
이산화규소	1.8000	18.0000
스테아린산마그네슘	1.0000	10.0000
[코팅]		
HPMC(히드록시프로필메틸셀룰로스)	2.1150	21.1500
글리세린지방산에스테르	0.2162	2.1620
이산화티타늄	0.6940	6.9400
치자청색소(치자블루에스비#M1637)	0.2206	2.2060
치자황색소(치자황색600(#M4015))	0.1542	1.5420
주정 (코팅용)	25.5605	255.6050
합계	100.0000	1000.0000



[MT104 포장 용기 및 정제 사진]

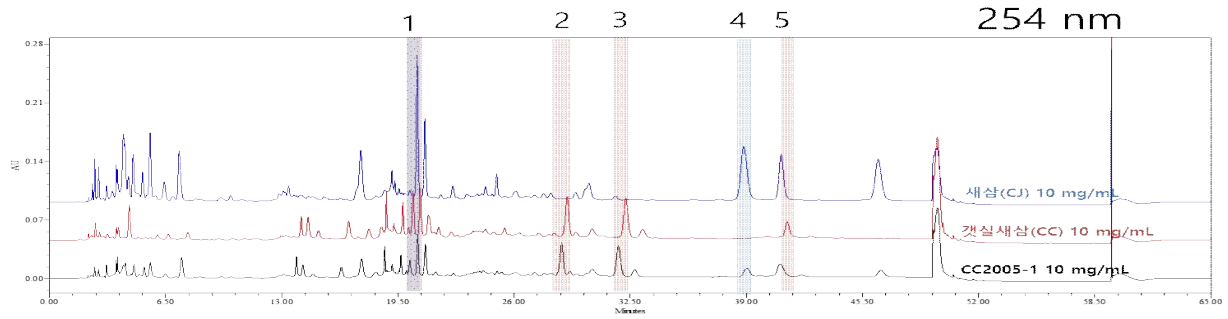
아) MT104 지표성분의 설정 및 분석법 개발

(1) MT104 소재 (실새삼 및 새삼) 추출물의 성분프로파일링 연구

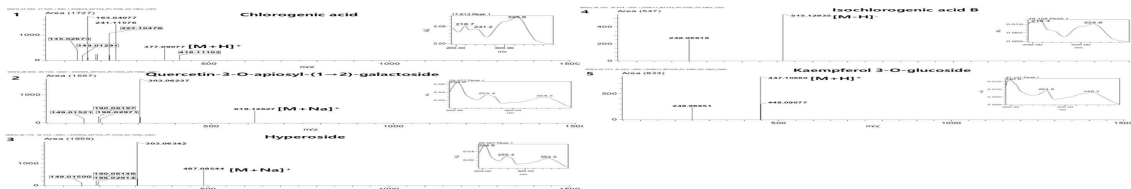
(가) HPLC-PDA-ESI-MS를 이용하여 실새삼 및 새삼 복합추출물의 성분 프로파일링 연구를 진행하였으며, 분석조건은 기기 분석 조건표에 나타냄

Instrument	Waters Alliance e2695 HPLC	Instrument	IMS-T100TD																																													
Detector	Photodiode Array Detector (PDA)	Ion source	ESI-MS																																													
Wavelength	254 nm	Ion mode	Positive ion, Negative ion mode																																													
Column	Shiseido Capcell PAK UG (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	scan range	m/z 50-1500																																													
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 0.1% Formic acid deionized water <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4</td><td>96</td></tr> <tr><td>8</td><td>4</td><td>96</td></tr> <tr><td>9</td><td>8</td><td>92</td></tr> <tr><td>14</td><td>8</td><td>92</td></tr> <tr><td>15</td><td>15</td><td>85</td></tr> <tr><td>19</td><td>15</td><td>85</td></tr> <tr><td>20</td><td>18</td><td>82</td></tr> <tr><td>35</td><td>18</td><td>82</td></tr> <tr><td>36</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>46</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>47</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>56</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>57</td><td>4</td><td>96</td></tr> <tr><td>65</td><td>4</td><td>96</td></tr> </tbody> </table>	Time	A(%)	B(%)	0	4	96	8	4	96	9	8	92	14	8	92	15	15	85	19	15	85	20	18	82	35	18	82	36	20	80	46	20	80	47	100	0	56	100	0	57	4	96	65	4	96	Instrument voltage	orifice 1: 80 V orifice 2: 10 V ring lens voltage: 5 V peak voltage: 1000 V detector voltage: 1900 V
Time	A(%)	B(%)																																														
0	4	96																																														
8	4	96																																														
9	8	92																																														
14	8	92																																														
15	15	85																																														
19	15	85																																														
20	18	82																																														
35	18	82																																														
36	20	80																																														
46	20	80																																														
47	100	0																																														
56	100	0																																														
57	4	96																																														
65	4	96																																														
Flow rate	1.0 mL/min	Instrument temp.	desolvating chamber: 250°C orifice 1: 80°C																																													
Injection volume	10 μL	Nitrogen flow rate	nebulizing gas: 1.0 L/min desolvating gas: 3.0 L/min																																													
Auto sampler temp.	25°C																																															
Oven temp.	30°C																																															

[기기 분석 조건]



[실새삼 및 새삼 개별추출물, 혼합추출물의 크로마토그램]

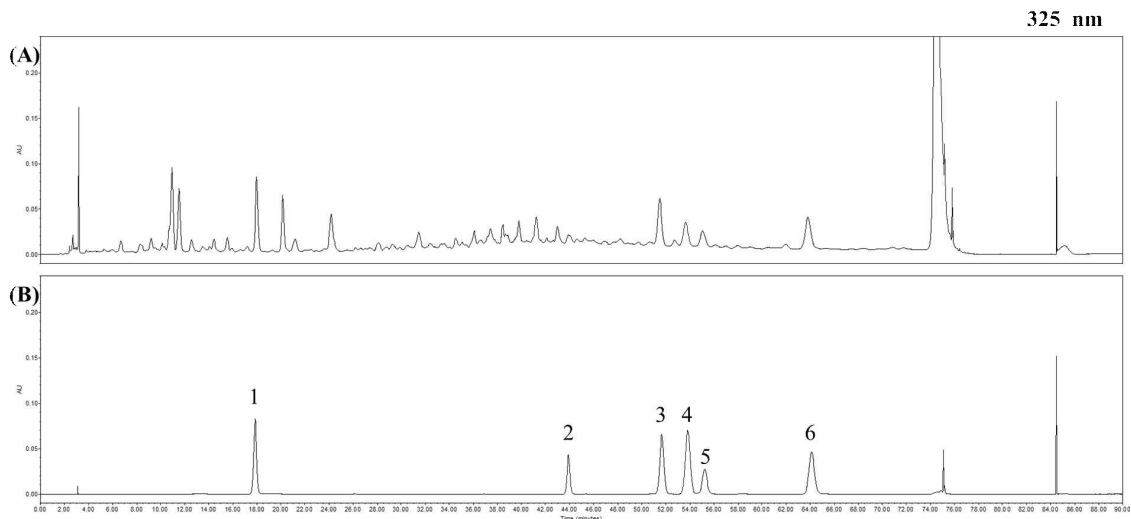


[피크 1-5번의 대한 ESI-MS 스펙트럼과 UV 스펙트럼]

- (나) HPLC-PDA-ESI-MS를 이용한 성분 프로파일을 진행한 결과 실새삼과 새삼 추출물에서 공통적으로 나오는 피크 1은 chlorogenic acid로 확인되었고, 실새삼에서 유래된 피크 2, 3, 5는 각각, hyperoside, quercetin-3-O-apiosyl-(1→2)-galactoside, Kaempferol-3-O-glucoside (astragaline) 로 확인 되었고, 피크 4는 새삼에서 유래되는 피크로 isochlorogenic acid B로 확인됨
- (다) 지표성분으로 선정된 hyperoside와 isochlorogenic acid B 외에 성분 프로파일에서 지표 성분 구조적으로 유사한 화합물의 함량 측정을 추가로 진행함. 그 결과 MT104 (Lot no. CC2009-1) 에서, chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, astragaline 의 함량은 각각 2.84, 1.30, 2.53, 그리고 2.48 mg/g로 확인됨

(2) 지표성분의 설정 근거

- (가) 식품의약품안전처의 식품의약품안전평가원에서 발간한 실새삼 감별 자료집(2018.10)과 본사에서 진행한 MT104 소재 (실새삼 및 새삼) 추출물의 성분프로파일링 연구를 기반으로 실새삼 (*Cuscuta australis* R. Br.)은 하이페로시드 (Hyperoside) 새삼 (*Cuscuta japonica* Choisy)은 이소클로로제닉 산 B (Isochlorogenic acid B)를 지표성분으로 설정하여 분석법을 개발함



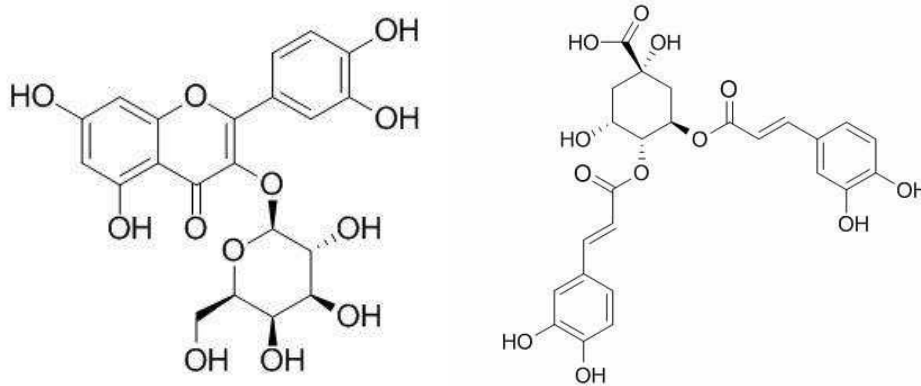
[MT104 (CC2009-1) 와 표준혼합액의 HPLC크로마토그램]

(3) 지표성분 분석법 개발 및 검증

(가) 개요 (Introduction)

- ① 인지기능개선제 MT104 (CC2009-1)은 건조엑스 상태의 원료임. MT104 (CC2009-1)은 실새삼과 새삼 복합추출물과 유산균 (*L.paracasei* NK112)의 사균체 원말로 구성되어 있으며, 실

새삼과 새삼의 지표 물질인 Hyperoside와 Isochlorogenic acid B를 함유하고 있음. Hyperoside (CAS Number 482-36-0)의 분자량은 분자식은 464.38 g/mol C₂₁H₂₀O₁₂ 이며, Isochlorogenic acid B (CAS Number 14534-61-3)은 분자량 516.45 g/mol, 분자식은 C₂₅H₂₄O₁₂으로 구성되어 있음 (그림 58)



[Hyperoside와 Isochlorogenic acid B의 구조]

(나) 목적 (Purpose)

- ① 본 시험의 목적은 MT104 (CC2009-1)에서 지표물질인 Hyperoside와 Isochlorogenic acid B의 함량을 측정하기 위하여 개발한 분석법의 유효성을 검증하는데 있음. 시험법 밸리데이션에서 평가한 항목은 특이성(specificity), 직선성(Linearity), 범위(Range), 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)이며, 평가 방법은 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성가이드(민원인 안내서)을 참조함

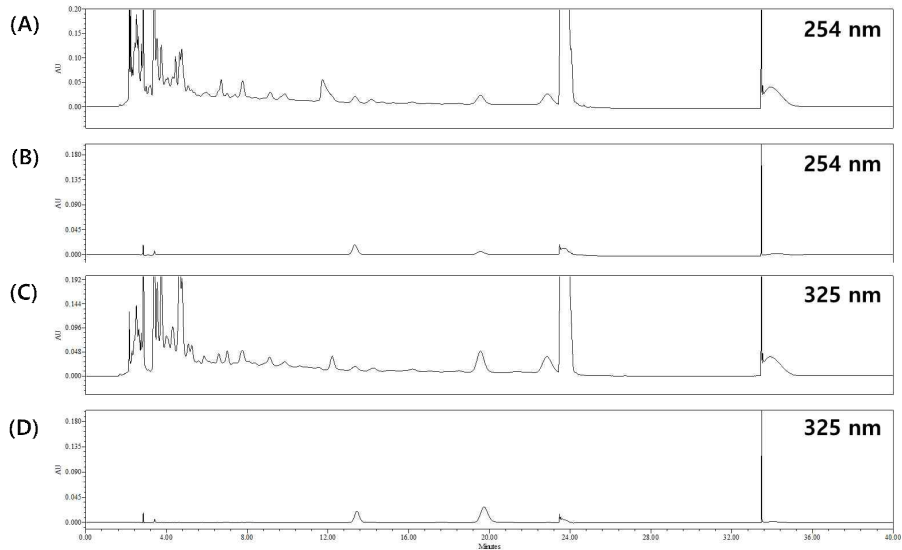
(다) 실험기구 (Experimental)

- ① 시약 (Reagents)
 - ㉠ Acetonitrile [Fisher Scientific Korea(Seoul, South Korea), HPLC grade]
 - ㉡ Ethanol [Fisher Scientific Korea(Seoul, South Korea), HPLC grade]
 - ㉢ Water [Fisher Scientific Korea(Seoul, South Korea), HPLC grade]
 - ㉣ Formic acid [Wako Chemical(Tokyo, Japan), HPLC grade]
- ② 시료 (Samples)
 - ㉠ MT104 (CC2009-1)
 - ③ 표준품 (Standards)
 - ㉠ Hyperoside (ChemFaces, Wuhan, Hubei, China)
 - ㉡ Isochlorogenic acid B (ChemFaces, Wuhan, Hubei, China)
- ④ 기기 Instrumentation
 - ㉠ HPLC: Alliance 2695 HPLC-PDA (2998) system (Waters Corp., Milford, USA)
 - ㉡ Sonicator: PowerSonic 600 (Hwashin Technology Co., Gyeonggi-do, Republic of Korea)
 - ㉢ Balance: EX224KR (Ohaus, NJ, USA)

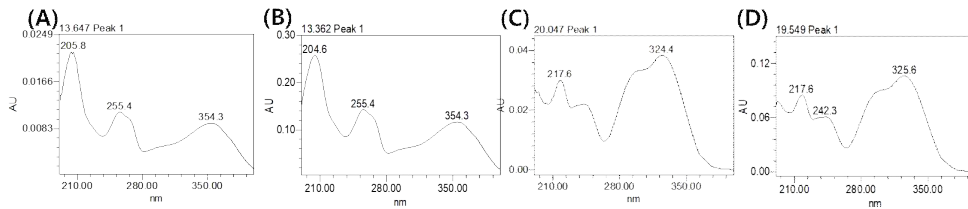
(라) 결과 및 논의 (Results & Discussion)

① 특이성 (Specificity)

시험용액 (15000 µg/mL) 및 표준액 혼합 용액 (12.5 µg/mL; Hyperoside)의 크로마토그램을 확인한 결과 254 nm 파장에서 RT약 13.5분에 hyperoside 피크를 확인하였음. 시험용액 (15000 µg/mL) 및 표준품 혼합 용액 (25 µg/mL; Isochlorogenic acid B) 325 nm 파장에서 약 19.8분에 isochlorogenic acid B 피크를 각각 확인함. 주변 분석 방해인자가 없음이 확인되었고, 표준품 피크에 해당하는 UV spectrum이 일치함이 확인됨.



[시험용액의 HPLC 크로마토그램(254 nm) (A); 표준액 혼합액 (hyperoside, isochlorogenic acid B; 12.5 μ g/mL) (B)의 HPLC 크로마토그램(254 nm); 시험용액의 HPLC 크로마토그램(325 nm) (C); 표준액 혼합액 (isochlorogenic acid B; 25 μ g/mL)의 HPLC 크로마토그램(325 nm) (D)]



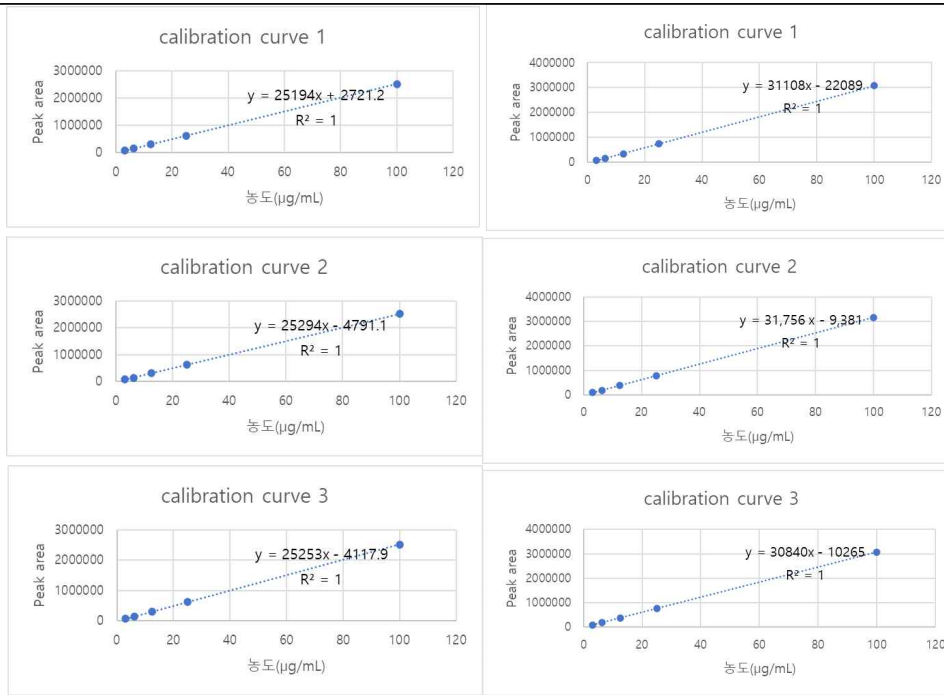
[시험용액(A) 및 표준액 혼합액(B)에서의 Hyperoside의 UV spectrum; 시험용액(C) 및 표준액 혼합액(D)에서의 Isochlorogenic acid B의 UV spectrum]

② 직선성 (Linearity)

직선성은 시험 용액 내의 표준품 농도 3.125~100 μ g/mL 범위 내에서 표준품을 5가지 농도로 제조한 것을 분석하여 평가함. 각 용액은 hyperoside와 isochlorogenic acid B 500 μ g/mL 단일 stock을 혼합하여 희석한 후 제조하였으며 3회 반복 측정함. Hyperoside와 isochlorogenic acid B 함량 농도로서 3.125~100 (3.125, 6.25, 12.5, 25 및 100) μ g/mL의 범위에서 원점은 배제하고 선형 회귀 분석을 수행함. 회귀 직선의 상관계수 (r²) 값은 1.0000 을 나타내며 직선성을 확인함

[Hyperoside 직선성 데이터]

Hyperoside	1		2		3	
	농도 (μ g/mL.)	피크면적	농도 (μ g/mL.)	피크면적	농도 (μ g/mL.)	피크면적
1	3.125	78675	3.125	75257	3.125	76965
2	6.25	159227	6.25	152757	6.25	154681
3	12.5	318172	12.5	314175	12.5	307195
4	25	636750	25	623700	25	628253
5	100	2521176	100	2525271	100	2521295
기울기	25194		25294		25253	
y 절편	2721.2		-4791.1		-4117.9	
r ²	1.0000		1.0000		1.0000	



[Hyperoside 검량선]

[Isochlorogenic acid B 검량선]

[Isochlorogenic acid B 직선성 데이터]

Isochlorogenic acid B	1		2		3	
	농도 (µg/mL)	피크면적	농도 (µg/mL)	피크면적	농도 (µg/mL)	피크면적
1	3.125	86875	3.125	92174	3.125	90081
2	6.25	173738	6.25	188551	6.25	182301
3	12.5	356672	12.5	390501	12.5	371096
4	25	750445	25	778759	25	760637
5	100	3090796	100	3167204	100	3074110
기울기	31108		31756		30840	
y 절편	-22089		-9381.4		-10265	
r ²	1.0000		1.0000		1.0000	

③ 범위 (Range)

직선성, 정확성 및 정밀성이 모두 확인된 Hyperoside 및 Isochlorogenic acid B 시험 농도는 3.125 ~ 100 µg/mL 범위를 가짐.

④ 정확성 (Accuracy)

정확성은 시험 용액에 이미 알고 있는 양의 표준품 용액을 4 가지 단계의 농도로 첨가하여 분석한 후 회수된 두 물질의 회수율로 평가함. 이론 면적은 직선성 회귀직선으로부터 계산하여 표시함. 계산된 회수율 결과는 아래 표에 표시함

[Hyperoside 정확성 데이터]

	No	실측 면적(PEAK AREA)	이론 면적(PEAK AREA)	회수율(%)
hyperoside (3.125 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	155033	155372.1	99.78
	2	154502	155372.1	99.44
	3	153420	155372.1	98.74
	평균	154318.3		99.32
	표준편차	822.04		0.53

hyperoside (6.25 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	195959	195648.3	100.16
	2	193989	195648.3	99.15
	3	192980	195648.3	98.64
	평균	194309.3		99.32
	표준편차	1515.11		0.77
hyperoside (12.5 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	272662	275120.6	99.11
	2	272617	275120.6	99.09
	3	271027	275120.6	98.51
	평균	272102		98.9
	표준편차	931.25		0.34
hyperoside (100 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	1364525	1376623	99.12
	2	1359030	1376623	98.72
	3	1351395	1376623	98.17
	평균	1358317		98.67
	표준편차	6594		0.48
평균 회수율(% , n=12)		99.05		
회수율 표준편차		0.55		
95% 신뢰구간		98.70 ~ 99.40%		

[Isochlorogenic acid B 정확성 데이터]

	No	실측 면적(PEAK AREA)	이론 면적(PEAK AREA)	회수율(%)
Isochlorogenic acid B (3.125 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	605363	600133.4	100.87
	2	604094	600133.4	100.66
	3	602244	600133.4	100.35
	평균	603900.3		100.63
	표준편차	1568.49		0.26
Isochlorogenic acid B (6.25 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	666003	643564.8	103.49
	2	659822	643564.8	102.53
	3	656516	643564.8	102.01
	평균	660780.3		102.68
	표준편차	4815.56		0.75
Isochlorogenic acid B (12.5 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	760308	735031.9	103.44
	2	747556	735031.9	101.7
	3	748904	735031.9	101.89
	평균	752256		102.34
	표준편차	7005.73		0.95
Isochlorogenic acid B (100 µg/mL): CC2009-1 (15000 µg/mL) 1:1(v/v)	1	2171193	2102094	103.29
	2	2168478	2102094	103.16
	3	2152919	2102094	102.42
	평균	2164197		102.95
	표준편차	9860.64		0.47
평균 회수율(% , n=12)		102.15		
회수율 표준편차		1.1		
95% 신뢰구간		101.45 ~ 102.85%		

⑤ 정밀성 (Precision)

⑦ 반복성 (Repeatability)

반복성의 경우 3개 이상의 함량에 대해 3회 이상 반복 측정하고, 측정값들의 평균, 표준편차 및 상대표준편차를 산출함

④ 재현성 (Reproducibility)

시험 농도의 100%에 해당하는 농도로 다른 시험일에 6회 반복 측정하여 평균, 표준편차 및 상대표준편차를 산출함

[Hyperoside의 반복성 데이터 a]

No	검체량(CC2009-1)		
	120.0 mg	150.0 mg	180.0 mg
1	185066	236114	277881
2	186017	237747	278395
3	186589	238838	276015
평균	185890.7	237566.3	277430.3
표준편차	769.3	1371	1252.4
상대표준편차(%)	0.4	0.6	0.5

[Isochlorogenic acid B 반복성 데이터 a]

No	검체량 (CC2009-1)		
	120.0 mg	150.0 mg	180.0 mg
1	878199	1157181	1332286
2	885258	1153641	1340843
3	877872	1155652	1325809
평균	880443	1155491	1332979
표준편차	4173.1	1775.5	7540.9
상대표준편차(%)	0.5	0.2	0.6

[Hyperoside 재현성 데이터 b]

No	2020년 10월 27일	2020년 10월 31일
	CC2009-1-1(150.0 mg)	CC2009-1-3(150.0 mg)
1	232793	232352
2	232297	229467
3	231148	232269
4	232255	231626
5	232370	231528
6	231552	230892
평균	232069	231356
표준편차	602.8	1068.8
상대표준편차(%)	0.3	0.5
총 평균	231712.4	
총 표준편차	907.3	
총 상대표준편차(%)	0.4	

[Isochlorogenic acid B 재현성 데이터 b)]

	2020년 10월 27일	2020년 10월 31일
No	CC2009-1(150.0 mg)	CC2009-1(150.0 mg)
1	1119113	1117441
2	1107795	1112495
3	1110600	1109191
4	1124426	1108246
5	1109255	1106717
6	1109162	1125049
평균	1113392	1113190
표준편차	6761.8	6950.2
상대표준편차(%)	0.6	0.6
총 평균	1113291	
총 표준편차	6538.4	
총 상대표준편차(%)	0.6	

(마) 결론 (Conclusion)

- ① MT104 (CC2009-1)에서 Hyperoside 및 Isochlorogenic acid B 함량을 분석하기 위한 HPLC 방법이 검증되었으며, MT104 (CC2009-1)에서 Hyperoside 및 Isochlorogenic acid B의 함량은 각각 0.62, 2.52 mg/g으로 측정됨. 이 분석법은 시험 용액의 표준용액의 농도 범위인 3.125 ~ 100 µg/mL의 범위에서 내에서 선택적이고 정확하며 직선성을 나타내는 것을 확인함

(바) 분석 방법 (Analytical Method)

- ① MT104 (CC2009-1)에서 지표성분 Hyperoside와 Isochlorogenic acid B 함량을 측정하기 위한 HPLC 분석법
- ㉠ 시액 (Reagents)
- Acetonitrile, Fisher Scientific Korea (Seoul, South Korea), HPLC grade
 - Ethanol, Fisher Scientific Korea (Seoul, South Korea), HPLC grade
 - Water, Fisher Scientific Korea (Seoul, South Korea), HPLC grade
 - Formic acid [Wako Chemical(Tokyo, Japan), HPLC grade]
- ㉡ 이동상 제조 (Mobile Phase Preparation)
- Mobile Phase A: Acetonitrile
 - Mobile Phase B: Distilled water (0.1% formic acid)
 - 각 이동상은 Ultrasonic water batch에서 700 W, 40 kHz, 10분간 degassing하여 사용
- ㉢ 표준품 용액 제조 (Standard Preparation)
- Hyperoside 표준품을 약 10 mg을 정밀하게 달아 50 mL volume flask에 넣고, 30% Ethanol 50 mL를 넣어 정용한 후 0.2 µm PVDF syringe filter로 여과하여 표준액_1로 함
 - Isochlorogenic acid B 표준품을 약 10 mg을 정밀하게 달아 50 mL volume flask에 넣고, 30% Ethanol 50 mL를 넣어 정용한 후 0.2 µm PVDF syringe filter로 여과하여 표준액_2로 함
 - 표준액_1과 표준액_2를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 표준용액으로 함. 표준용액에 30% Ethanol을 넣어 5가지 농도(3.125, 6.25, 12.5, 25 및 100)로 희석하여 사용함
- ㉣ 시험 용액 제조 (Sample Preparation)
- MT104(CC2009-1) 10 mL volume flask에 150 mg을 정밀히 재어, 30% ethanol을 10 ml 부피 선까지 맞추어 넣고 30분간 sonication함. 10분간 6,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 취하여 0.2 µm PVDF syringe filter (Whatman, Clifton, NJ, USA) 로 여과하여 시험용

액으로 함

㉔ 분석 조건 (Chromatographic Conditions)

[Chromatographic Conditions]

Parameters	Conditions																					
Dectector	Ultraviolet ($\lambda=254, 325 \text{ nm}$)																					
Column	Capcell pak C18 UG120 (250 × 4.6 mm ID, 5 μm , SHISEIDO, Tokyo, Japan)																					
Column oven temperature	30 °C																					
Auto-sampler temperature	25 °C																					
Mobil Phase	A: Acetonitrile, B: Deionized water <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Time (minute)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>18.0</td> <td>82.0</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>18.0</td> <td>82.0</td> </tr> <tr> <td>21.0</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>31.0</td> <td>18.0</td> <td>82.0</td> </tr> <tr> <td>40.0</td> <td>18.0</td> <td>82.0</td> </tr> </tbody> </table>	Time (minute)	A (%)	B (%)	0	18.0	82.0	20.0	18.0	82.0	21.0	100.0	0.0	30.0	100.0	0.0	31.0	18.0	82.0	40.0	18.0	82.0
Time (minute)	A (%)	B (%)																				
0	18.0	82.0																				
20.0	18.0	82.0																				
21.0	100.0	0.0																				
30.0	100.0	0.0																				
31.0	18.0	82.0																				
40.0	18.0	82.0																				
Flow rate	1.0 mL/min																					
Injection volume	10 μL																					
Needle wash	30% ethanol																					
Run time	40 minutes, injection delay 5 minutes																					
Data processing	Empower 2 (Version 2471)																					

㉔ 계산식 Calculations

F. 계산식 Calculations

1) 평균 (\bar{X}) = $\frac{\sum x}{n}$

2) 표준편차 = $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$

3) 상대표준편차(%) = $\frac{\text{측정값의 표준편차}}{\text{측정값의 평균}} \times 100$

4) 회수율(%) = $\frac{\text{측정값}}{\text{이론값}} \times 100$

5) 지표성분의 함량 ($\frac{\text{mg}}{\text{g}}$) = $\frac{SP+SC}{RP+RC} \times P$

Sample Peak Area (SP) = 검액 중 타겟 성분의 피크면적 (mAU * min)

Sample Concentration (SC) = 검액 농도 (mg/mL)

Reference Standard Peak Area (RP) = 표준품의 피크면적 (mAU * min)

Reference Standard Concentration (RC) = 표준품 농도($\mu\text{g/mL}$); 표준액을 단계별로 희석하여 작성한 검량선에 대한 농도

Purity (P) = 표준품 순도(%100)

(사) Reference

- ① 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서(행정간행물등록번호 11-1470000-001693-01; 식품의약품안전청 의약품안전국 및 의약품평가부, 2015.12.)
- ② 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성가이드(민원인 안내서)(발간등록번호 안내서-0769-03; 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원)

(4) MT104 기준규격 설정

(가) 원생약 수득률 증가를 위해 용매 비율을 조정하여 총 8배치 생산하였고, 배치의 수득률은

3.2~20.0%로 나타났으며, 평균 수득률은 약 10.8%임. 지표성분인 hyperoside 및 isochlorogenic acid B의 함량은 각각 0.58~1.18, 0.58~2.67 (mg/g)으로 측정됨. 원료의 생산 및 기준규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2020-12호(2020.02.25. 개정)을 참고하여 다음과 같이 설정함.

MT104 기준 규격			
No	항목	시험방법	기준
1	성상	육안관찰	미황색 분말
	용해성	① 증류수 ② 30% 에탄올	-
2	순도시험	1) 중금속시험법	-
		① 납	5 ppm 이하
		② 비소	3 ppm 이하
		③ 수은	0.2 ppm 이하
		④ 카드뮴	0.3 ppm 이하
		2) 잔류농약	-
		① 총 디디티	0.1 ppm 이하
		(p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합)	-
		② 디엘드린	0.01 ppm 이하
		③ 총 비에이치씨(α,β,γ 및 δ-BHC의 합)	0.2 ppm 이하
④ 알드린	0.01 ppm 이하		
⑤ 엔드린	0.01 ppm 이하		
3	미생물한도	1) 총호기성미생물성수	1 x 10 ⁵ CFU이하/mL
		2) 총진균수	1 x 10 ² CFU이하/mL
		3) 특정미생물	-
		① 대장균	불검출
		② 살모넬라	불검출
4	곰팡이독소	③ 녹농균	불검출
		④ 황색포도상구균	불검출
		① 아플라톡신 B1	아플라톡신 B1 5.0 ppb 이하
5	강열잔분시험	② 아플라톡신 B1, B2, G1 및 G2의 총합	총 아플라톡신 20.0 ppb 이하
		회분 측정	-
6	정량시험	HPLC법	-
		Hyperoside	0.46~1.42 mg/g
		Isochlorogenic acid B	0.41~3.20 mg/g

[MT104 기준 규격]

자) MT104 유통기한 설정

(1) 원료의 안정성 평가 연구 (지표성분, pH)

(가) 원료의 저장방법 및 사용기간 등을 설정하기 위해 안정성 평가를 진행함

(나) ICH guideline에 따라 보관 조건을 3가지 (①5±3°C, ②25±2°C, RH 60±5%, ③40±2°C, RH 75±5%)로 하여 개시부터 냉장 조건 기준으로 18개월 (0, 1, 3, 6, 9, 12, 18) 까지 지표 성분 함량 및 pH를 평가함



[MT104의 안정성 평가 결과 (지표성분, pH)]

(다) 안정성 평가를 진행한 결과, 지표성분 hyperoside와 isochlorogenic acid B의 모두 냉장 조건 (5±3°C)에서는 18개월까지, 실온 조건 (25±2°C, RH 60±5%)에서는 12개월까지 안정함을 확인하였음. 가혹 조건 (40±2°C, RH 75±5%)에서는 1개월까지 안정하였으며, 이후 감소하는 경향을 나타냄

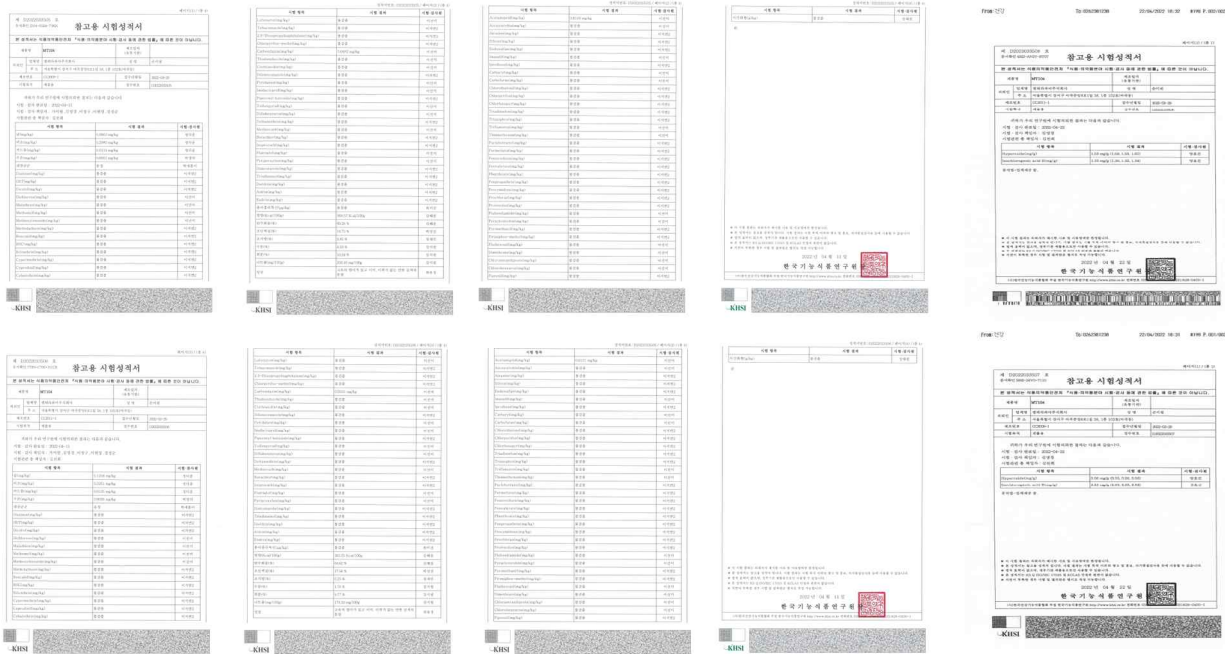
(라) pH의 경우 냉장 조건 (5±3°C)에서는 18개월까지, 실온 조건 (25±2°C, RH 60±5%)에서는 12개월까지 안정함을 확인하였음. 가혹 조건 (40±2°C, RH 75±5%)에서는 1개월까지 안정하였으며, 이후 감소하는 경향을 나타냄

(마) 지표성분 및 pH 측정 결과 모두 비슷한 양상을 나타내었으며, 냉장 조건 및 실온 조건은 24개월까지 진행할 예정임

차) 개별인정신청용 공인시험기관 분석 결과

(1) MT104의 공인시험성적서를 확보하기 위해 아래의 시험 항목을 공인시험기관(건강기능식품 연구원)에 의뢰하였음

- (가) 기능(또는 지표)성분 함량
- (나) 중금속(납, 카드뮴, 비소 및 수은)
- (다) 대장균군
- (라) 잔류농약 69종 + 3종(디엘드린, 알드린, 엔드린)
- (마) 곰팡이독소: 총 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합)
- (바) 영양성분 (조단백질, 탄수화물, 조지방, 회분, 수분, 열량, 나트륨)
- (사) 성상
- (아) 이산화황



[MT104 공인시험성적서 (중금속, 대장균군, 잔류농약, 곰팡이독소, 영양성분, 성상, 이산화황)]

[MT104 공인시험성적서 (지표성분함량)]

카) (12) GLP 비임상 독성 연구를 통한 안전성 확보

(1) 비임상 독성시험 개시

(가) 개별인정형 원료 신청을 위해 필요한 안전성 자료 확보를 위해 전임상 GLP CRO 기관((주)디티앤씨알오)에서 독성시험 완료

① 시험항목: 랫드 단회경구투여독성시험, 13주반복투여 및 4주회복시험, 유전독성시험(복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험(마우스))

연구내용	2020.10월			11월			12월			2021.1월			2월			~7월		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
조제물분석 Validation(HPLC법/ 지표성분1종)																		
랫드 단회																		
랫드 2주 DRF																		
랫드 13주반복+4주회복																		
복귀돌연변이시험 DRF 예비시험																		
복귀돌연변이시험																		
염색체이상시험 DRF 예비시험																		
염색체이상시험																		
소핵시험(mouse) DRF 예비시험																		
소핵시험(mouse) 본 시험																		

[MT104 비임상 독성시험(GLP) 일정]

㉞ Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험(시험번호: DTN200771)

- 시험목적: 시험물질인 MT104를 Sprague-Dawley계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량(Approximately Lethal Dose; ALD)을 구하기 위하여 실시함.



- 실험계획 및 군 구성: 시험물질 5,000 mg/kg 투여군과 대조군으로 구성하였고, 군당 암수 각 5마리에 단회 경구 투여 하였음. 투여 후 14일 동안 일반증상 관찰 및 체중 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 안락사시켜 부검함.
- 실험결과: 관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았음. 일반증상 관찰 결과, 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 2일에 시험물질색변 (compound-colored stool)이 관찰되었고, 투여 3일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았음. 체중 및 부검에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

→ MT104를 암수 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량 (approximately lethal dose)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단함.

㉠ Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복경구투여 용량 결정(DRF) 독성시험(시험번호: DTN200772)



- 시험목적: 시험물질 MT104를 Sprague-Dawley 랫드에 2주간 1일 1회 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 13주 반복 경구투여 독성시험의 용량설정에 참고하기 위하여 실시함.
- 실험계획 및 군 구성: 시험물질 MT104의 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군 및 대조군 (주사용수)으로 구성하고, 군당 암수 각 5마리에 2주간 1일 1회 반복 경구투여 하였음. 투여 후 14일 동안 일반증상, 체중 및 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 부검 및 장기의 중량 측정을 실시함.

- 실험결과: 관찰기간 동안, 사망동물은 관찰되지 않았음. 일반증상 관찰 결과, 시험물질색변 (compound-colored stool)이 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰되었고, 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- 13주 반복 경구투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day로 설정하고, 중용량 및 저용량은 공비 2를 적용하여 2,500 및 1,250 mg/kg/day로 설정하는 것이 타당할 것으로 판단함.

㉡ Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복경구투여 독성시험(시험번호: DTN200773)



- 시험목적: 시험물질 MT104를 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4주간의 회복기간을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시함.
- 실험계획 및 군 구성: 시험물질 MT104의 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군 및 대조군 (주사용수)으로 구성하고, 군당 암수 각 10마리에 13주간 1일 1회 반복 경구투여 하였음. 또한, 회복군에 대해서는 대조군, 5,000 mg/kg/day 투여군에 군당 암수 각 5마리씩 추가하여 4주간의 회복기간을 두었음. 관찰기간 동안, 독성시험군에 대하여 일반증상 관찰, 체중 측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 요검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정,

부검 및 병리조직학적 검사를 실시함.

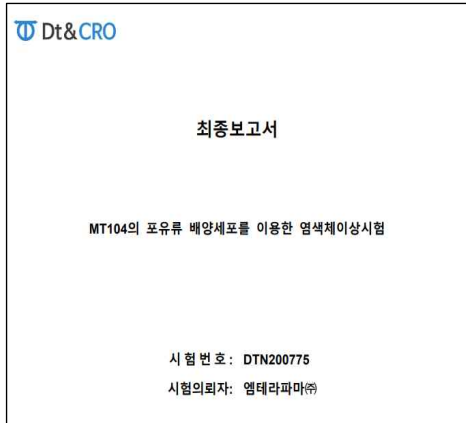
- 실험결과: 관찰기간 동안, 사망동물은 관찰되지 않았음. 시험물질색변이 모든 시험물질 투여

군에서 산발적으로 관찰되었으나 이는 시험물질 과량투여에 의한 일시적인 현상으로 판단함. 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

→ 13주 반복 경구투여 독성시험에서 MT104의 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단함.

㉔ 유전독성시험(복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험(마우스))

- 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험(시험번호: DTN200775)



시험목적: 포유류 배양세포주(Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 시험물질의 염색체이상 유발성을 확인하기 위하여 실시함.

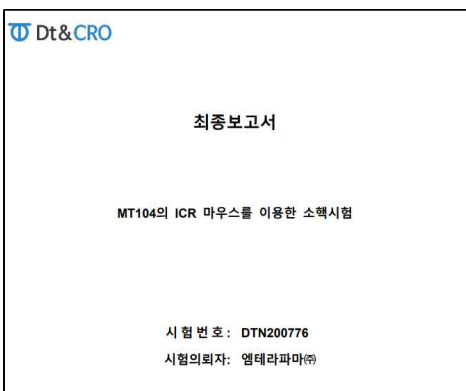
- 실험계획 및 군 구성
- ※ 예비시험 진행: 본시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/mL를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL로 용량설정시험을 실시한 결과, 모든 계열에서 50% 이상 세포증식을 억제하는 용량이 확인됨. 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화(S9 mix) 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화(S9 mix) 비존재하에서 각각 661, 1,022 및 135 µg/mL였음. 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화(S9 mix) 비존재하 및 존재하의 1,250 µg/mL 이상, 연속처리법의 대사활성화(S9 mix) 비존재하의 313 µg/mL 이상에서 시험물질 처리 종료시에 관찰되었으나, 세정 후에는 관찰되지 않았으므로 아래와 같이 본시험의 용량을 설정하여 진행함.

계열	S9 mix	본시험의 용량(µg/mL)
단시간처리법	-	660, 330, 165, 82.5
	+	1,000, 500, 250, 125
연속처리법	-	140, 70.0, 35.0, 17.5

- 실험결과: 단시간처리법의 대사활성화(S9 mix) 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 시험물질군에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음. 각 계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가함.

→ 본 시험조건 하에서 시험물질 MT104는 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단함.

- ICR 마우스를 이용한 소핵시험(시험번호: DTN200776)



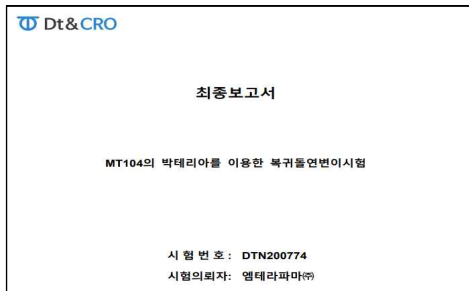
시험목적: ICR 마우스를 이용하여 24시간 간격으로 2회 경구투여하여 마우스 골수세포에 대한 시험물질의 소핵 유발성을 검토하기 위해 실시함.

- 실험계획 및 군 구성
- ※ 예비시험 진행: 본시험의 용량을 설정하기 위하여 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625 mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 암수 모두 사망례가 관찰되지 않았음. 따라서, 5,000 mg/kg을 본시험의 고용량으로 설정하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500 및 1,250 mg/kg을 중용량 및 저용량으로 설정하였음. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였음. 암수 성차가 없었기 때문에 본시험에서는 소핵 유발에

감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하여 진행함.

- 실험결과: 모든 시험물질군에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았음. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았음. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 확인되었고, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 감소가 확인됨.
→ 본 시험조건 하에서 시험물질 MT104는 마우스 골수세포에 대하여 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단함.

- 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험(시험번호: DTN200774, DTN210307(treat and wash method))
박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험(기존 방법으로 진행, 시험번호: DTN200774)



- 시험목적: MT104의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균(WP2uvrA 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 검토함.
- 실험계획 및 균 구성

※ 예비시험 진행: 본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate로 용량설정시험을 실시한 결과, 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 시험물질에 의한 생육저해 및 침전이 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정함.

균주명	S9 mix	본시험의 용량(µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

- 실험결과: 시험물질군에서는 대사활성화비존재하의 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니 수가 음성대조군에 비하여 2배를 초과하지 않았음. 대사활성화존재하에서는 TA98 및 TA1537 균주의 1,250, 2,500, 5,000 µg/plate에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하였음. TA100, TA1535 및 WP2uvrA 균주에서는 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 2배를 초과하지 않았음. 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였음.
→ 본 시험조건 하에서 시험물질 MT104는 유전자돌연변이 유발성이 있는 것으로 나타났으나, 천연물의 경우 시험물질 내 histidine 또는 histidine 전구체가 포함되어 있는 경우에는 유전독성 여부와 상관없이 양성이 나올 수 있음. 이러한 양성은 진정한 유전독성이 아니므로 이를 배제하기 위한 시험법으로 균과 시험물질을 90분간 혼합해 두어 충분히 DNA의 손상을 준 이후에 균을 세척하여 시험물질을 제거한 이후에 배양하는 treat and wash방법 (참고문헌: Mutagenesis. 2005 Sep;20(5):345-50, 시험물질에 포함된 histidine이 작용할 시간이 충분치 않아서 세균이 과도하게 증식하지 못하므로 진정한 유전독성이 아닌 경우 음성(negative)으로 확인됨)을 사용하여 재시험을 진행함. 재시험은 non-GLP로 확인 후, 최종 GLP 시험으로 확인 시험 진행하였음.

- 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험(treat and wash 방법으로 진행, 시험번호: DTN210307)
- 시험목적: MT104의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(TA98, TA100,

최종보고서

MT104의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: DTN210307

시험의뢰자: 엠테라파마㈜

TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균 (WP2uvrA 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 검토함.

- 실험계획 및 균 구성
- ※ non-GLP시험 (시험번호: DTN210149) 진행: 본 시험은 modified pre-incubation method인 ‘treat and wash’법으로 실시하였음. 본 시험의 최고용량은 5,000 µg/plate로 하고, 이하 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625 및 313 µg/plate의 시험물질균을 설정하였음. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정함. 결과의 판정은 ‘1개 이상의 균주에서

복귀변이콜로니수가 음성대조균에 비하여 2배 이상 증가하고 증가에 따른 용량의존성이 있을 것’의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였음. 본 시험조건 하에서, 시험물질균에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조균과 비교하여 2배를 초과하지 않았음. 각 균주에 대한 양성대조균의 복귀변이콜로니수는 음성대조균과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였음. 시험물질에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았음. 이상의 결과로부터, 시험물질 MT104의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단하여 본 시험(GLP)을 진행함.

- 실험결과: 실험방법 및 실험균 설정은 non-GLP 시험과 동일하게 진행한 결과, 시험물질균에서는 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조균에 비하여 2배를 초과하지 않았고, 시험물질에 의한 생육저해 및 침전은 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았음. 각 균주에 대한 양성대조균의 복귀변이콜로니수는 음성대조균과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였음.
→ 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 MT104는 유전자돌연변이 유발성이 없는 것으로 최종 판단하였음.

2세부 (경희대학교 산학협력단, 연구책임자: 오명숙)

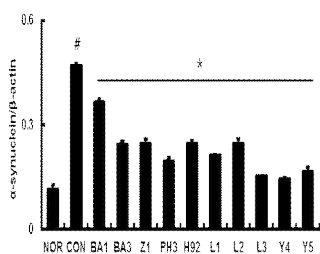
<주요 성과 요약>

- 1) 신경정신질환 (인지기능 감퇴/ADHD/불안·우울) 효능 평가 시스템 구축
- 2) HX106의 항ADHD 효능 확인 및 기전 규명
- 3) 천연 프리바이오틱스 소재 4종 (싸리나무, 해바라기씨, 백편두, 양하) 및 유산균 6종의 인지 기능 감퇴 효능 확인
- 4) MT104 구성 소재의 인지 기능 개선 효능 확인
- 5) MT104의 인지 기능 개선 및 알츠하이머병 제어 효능 확인과 기전 규명

가) 세포수준의 검색방법으로 정신신경질환 개선 프로바이오틱스/프리바이오틱스 후보소재 확보

(1) 유산균의 분리 및 동정

(가) SH-SY5Y 세포의 α-synuclein 생산을 억제하는 균주를 선별함

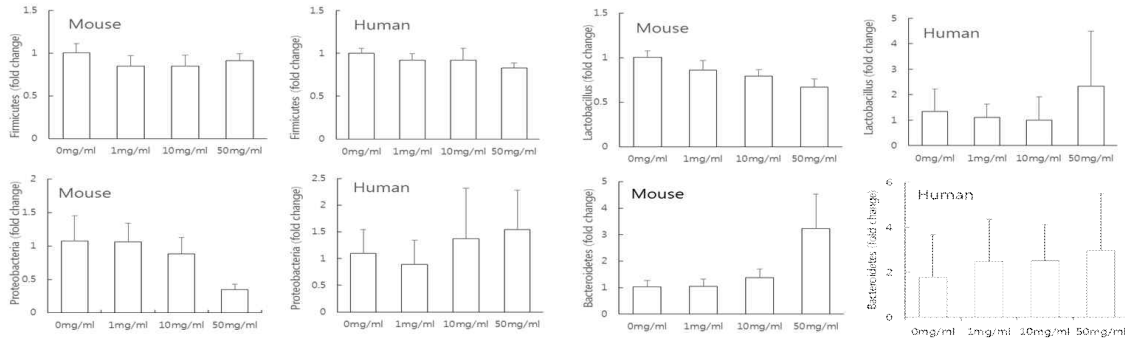


Strain	
BA1	Bifidobacterium longum subsp. longum
BA3	Bifidobacterium pseudocatenulatum
Z1	Bifidobacterium longum subsp. longum
PH3	Lactobacillus curvatus
H92	Lactobacillus plantarum
L1	Lactobacillus gasseri
L2	Pediococcus acidilactici
L3	Enterococcus faecium
Y4	Lactobacillus sakei
Y5	Lactobacillus gasseri 1-6

(2) HX106의 prebiotic 효과

- HX106을 1세부로부터 제공받아 prebiotic 효과 여부를 평가하였음

(가) 사람 및 생쥐의 장내세균군집에 은 마우스의 Proteobacteria 및 Lactobacillus를 감소시키는, Bacteroidetes는 증가시키는 경향이 있었으나, 그 외의 문에는 유의한 영향은 없었음



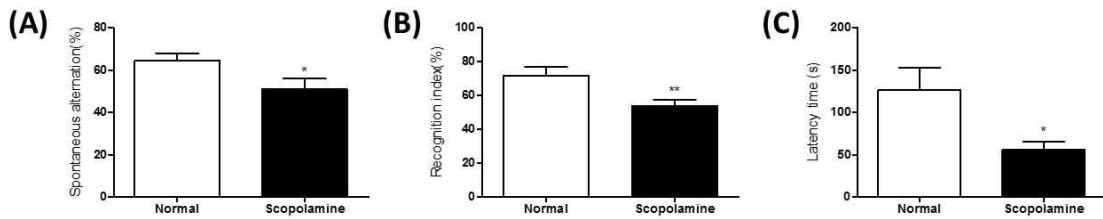
[HX106이 사람 및 마우스 장내세균군집에 미치는 효과]

나) 실험동물모델 구축

(1) 인지기능 감퇴 동물 모델

(가) Scopolamine 유도 인지기능 장애 동물 모델 구축

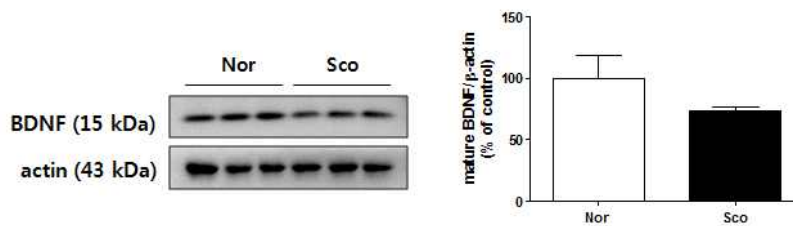
① 노년기를 포함하는 다양한 생애주기에서 나타나는 인지기능 저하를 동물에서 재현하기 위해 인지기능을 매개하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 신경전달을 차단하는 scopolamine을 처리하여 인지기능 장애가 재현되는 것을 확인함



[Scopolamine 유도 인지 기능 장애 행동 실험 결과]

(A) y-maze (B) Novel object recognition test (C) Passive avoidance test

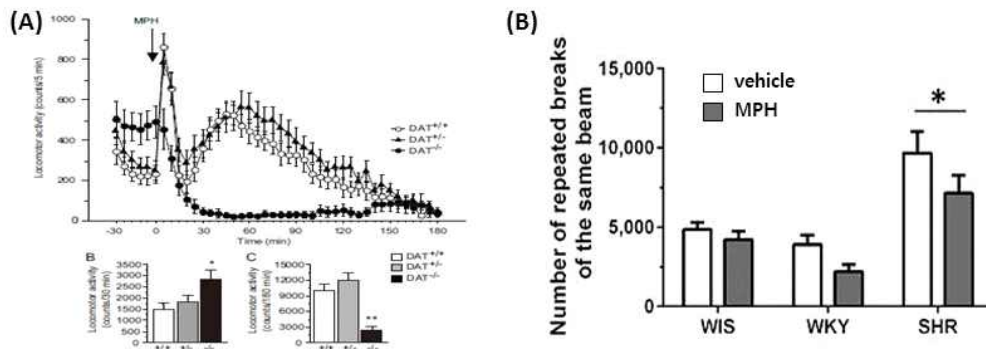
② Scopolamine 투여에 의해 신경영양인자 중 하나인 BDNF (brain-derived neurotrophic factor; 뇌유래신경성장인자)의 감소가 유도되는 것을 확인함



[Scopolamine 유도 BDNF의 감소]

(2) ADHD 동물 모델

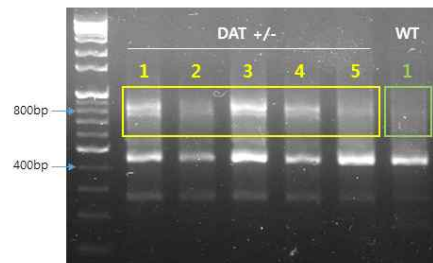
(가) ADHD는 전전두엽 피질, 선조체 등에서 도파민과 노르에피네프린의 신경전달에 이상이 있으며 주의력결핍, 충동성, 과잉행동 등의 증상이 나타남. 이러한 ADHD 증상이 재현되는 대표적인 동물모델로 dopamine transporter knockout (DAT-KO) mouse, spontaneous hypertensive rat (본태성 고혈압 랫트) 등이 사용됨



[ADHD 동물모델에서 hyperactivity 증상의 발현과 methylphenidate(MPH, 양성대조군)에 의한 개선 (A) DAT KO mouse *Curr Mol Med.* 2015;15(3):245-52. (B) Spontaneous hypertensive rat *Pharmacol Biochem Behav.* 2016 Feb;141:66-77.]

(나) DAT 유전자 조작 유도 ADHD 동물 모델 구축

- 본 연구팀은 과잉행동과 충동성, 인지기능 장애가 일어나는 DAT-KO mouse 모델을 선정하여 이탈리아 기술연구원(Istituto Italiano di Tecnologia)의 Francesco Papaleo 팀으로부터 동물을 분양받았으며(2018. 08. 23, DAT +/- 마우스 5수 수령) 수령 후 genotype에 대한 확인 실험을 자체적으로 진행하였음

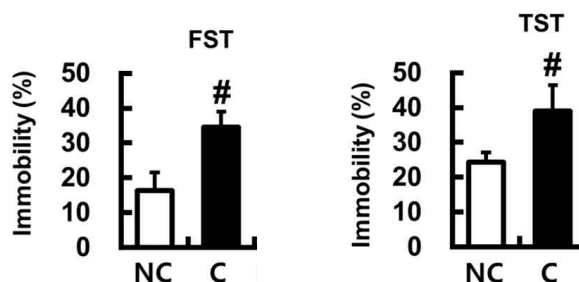


[DAT +/- 마우스 5수와 wild type (WT)의 genotype 확인]

(3) 불안·우울 동물 모델

(가) 구속스트레스 유발 불안/우울 모델 구축

- 구속스트레스는 강제수영 및 꼬리매달기 실험을 통해 유발 불안/우울의 유발됨을 확인하였음

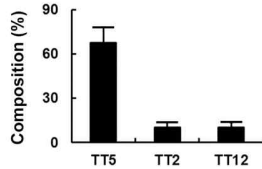


- 구속스트레스 동물들로부터 장내세균을 분리하고, 불안/우울을 유도한 균주는 NK1001균주였음

- NK1001균주는 16S rDNA 분석과 당이용능, 생화학적 특성을 분석해 *E. coli*로 동정하였음

API 20E
Escherichia coli 1 (97.9%)

16s rDNA sequencing
Escherichia coli strain KV7
 genome assembly, chromosome.
 (99%)

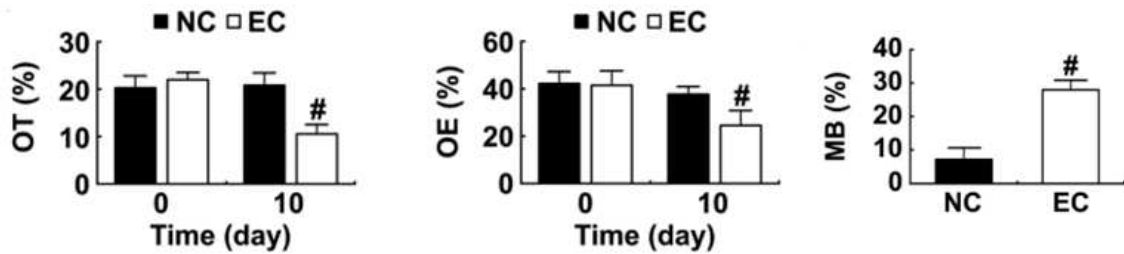


Test	Substrate	Reaction	(-) Results	(+) Results
ONPG	ONPG	β -galactosidase	colorless	yellow
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	yellow	red/orange
LDC	L-lysine	Lysine decarboxylase	yellow	red/orange
DOC	L-ornithine	Ornithine decarboxylase	yellow	red/orange
OT	tryptone citrate	Citrate utilization	pink to gray/yellow	blue-green/blue
H ₂ S	sodium thiosulfate	H ₂ S production	colorless/gray	black deposit
URE	urea	urea hydrolysis	yellow	red/orange
TDA	L-tryptophan	tryptophanase	yellow	brown/red
IND	L-tryptophan	indole production	yellow	red (in 2 min)
VP	sodium pyruvate	acetoin production	colorless	pink/red (in 10 min)
GEL	Casein	gelatinase	no diffusion of black	black diffuse
SUL	Sulfur	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
MAN	D-mannitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
SDH	Inositol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
INVA	L-inosose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
AMY	Almygdalin	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
OX	oxidase	oxidase	blue/blue-green	no/late
NO ₂	potassium nitrate	NO ₂ production	yellow	red
NI	nitrate	reduction to nitrate	orange/red	yellow
MDB	API M Medium or microscope	motility	non-motile	motile
MC	MacConkey medium	growth	absence	presence
OF-D	glucose (API OF Medium)	oxidation - exposed to the air	green	yellow
OF-F	glucose (API OF Medium)	fermentation - under mineral oil	green	yellow

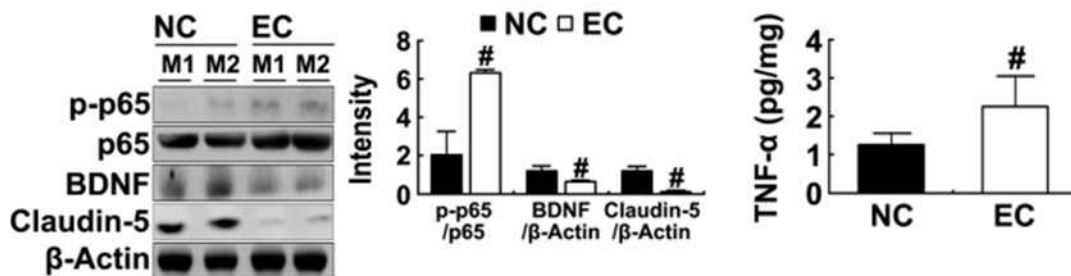
CTCAGATTGAACGCTGCCGGCAGGGCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTCTGTTTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTGGGAAAGCTGCCTGATGG
 AGGGGGATAACTCTCGAAACGGTAGCTAATACCGCATACCTCGAAGATCAAGAGGGGACCTTCGGCCCTTGGCATCGGATGTGCACAGATGGGATTAATTTGTGGTGGGGTAA
 CGBCTCAACANBCCGAGGATCCCTAGCTGATCTGAGAGGATGACAGACACACTGGACACTGAGACTGAGACCTGACAGACTCTACGGAGGACAGGATGGGATATTCAGAGTGGGGGA
 AGCCTGATGCGAGCATCGCGCTGTATGAAGAAGCCCTTCGGTGTAAAGACTCTTCAGCGGGGAGGAAAGGAGTAAAGTAAATACCTTGGCTCATTGACGCTTACCGGACAAAGAGGCAC
 CGGGTAACCTCGTCCAGCAGCCGGGTAATAGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAAATACGGGCTAAAGGCCACCGAGCGGTTGTGTAAGTCAGATGTAATCCCGGGCTCAAC
 CTGGGAACCTGCATCTGATCTGGCAAGCTTGAAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAABATGGTATGABATCTGGAGGAATACCGGTGGCAGAGCGGCCCTCGTGA
 CGAGAGCTGACGCTCAGGTGCGAAGGCTGGGAGGACAAAGGATGATACCTTGGTATGCTACCGCTGTAACGATGTGACTTGGAGGTGTGCTCGTGGGCGTGGCTTCGGAGCT
 AAGCCGTTAAGTGCACCGCTCGTGGAGGATGAGCCAGGTTAAGGATTAAGTTCAGCGGGCTCCAGACAGCGGGTGGGATGCTTAATCTGATGAGAGCGGAGACTTA
 CCTGCTTGCACATCCACGSAAGTTTTCAGAGATGAGATGTGCTTCGGGAACTCGAGACAGGTCCTGCTATGCTGCTCAGCTGGTGTGTGTAATGTGGSTTAAGTCCCGCAAGCAG
 CGCAACCTTATCTTTGTTGCCAGCGGCTCGGCCGGGAACTCAAGAGGACTCCGAGTGAATAACTGGAGGAAGGTGGGATGACTCAAGTCAATAGGCCCTTACGACAGGGCTAC
 ACACGTGCTCAATGGCGCATCAAGAGAGAGCGACTCGGAGAGGAGCGGACTCATAAAGTGGCTGTAGTCCGGATTGGAGTTCGCACTCGACTCCAGTGAAGTGGGAATGGCTA
 GTAATGTTGATAGAAATCCACCGTGAATATGTTCCGGGCTTGTACACAGCCCGCTCACACTGGGGAGTGGGTTCCAAAAGAGTAAAGTAACTAACCTTCGGAGAGCGGCTTAC
 CACTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGCTGA

(나) NK1001균주(EC) 유도 불안/우울 유발 모델 구축

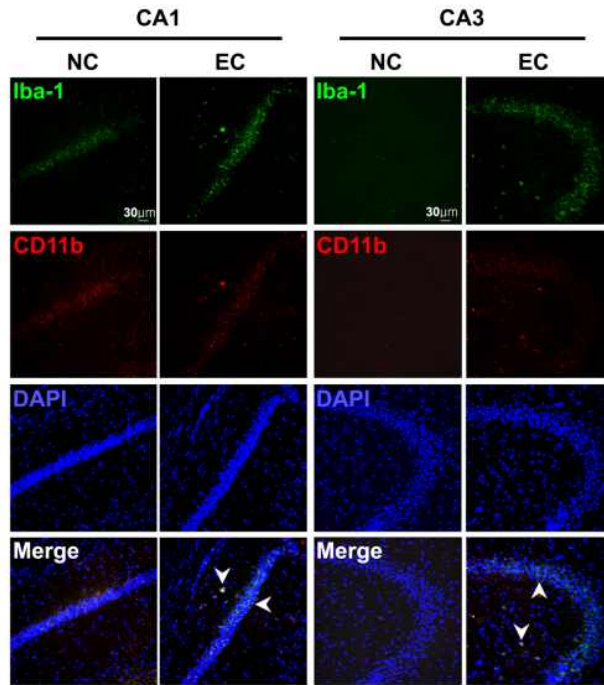
① EC의 투여는, EPM, LDT 등에서 불안/우울 행동을 보였음



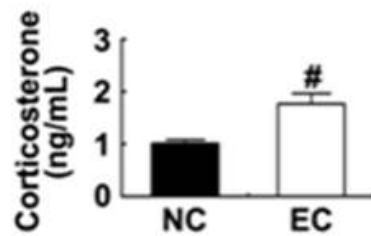
② EC는 해마의 BDNF의 발현을 억제하고, NF-kB 활성화, TNF- α 발현증가를 보였음



③ EC는 해마 CA1, CA3영역의 활성화된 microglia를 증가시켰음



④ EC는 혈중 corticosterone의 농도를 높였음



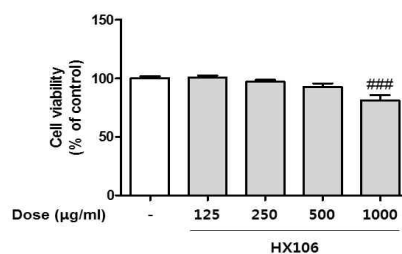
다) In vitro 모델에서의 인지기능 식품 후보 소재 스크리닝

(1) HX106의 항ADHD 효능 평가

• 1세부로부터 제공받은 HX106에 대하여 in vitro에서 관련 인자 변화에 대한 영향을 평가하였음. 신경정신질환 개선에 대한 HX106의 다양한 가능성을 분석하기 위해 3세부와 협력하여 in vitro 효능 평가를 진행하였음. 다양한 assay에서 확인된 결과를 취합하여 결론을 도출하였음

(가) PC12 신경세포 생존율에 대한 영향 평가

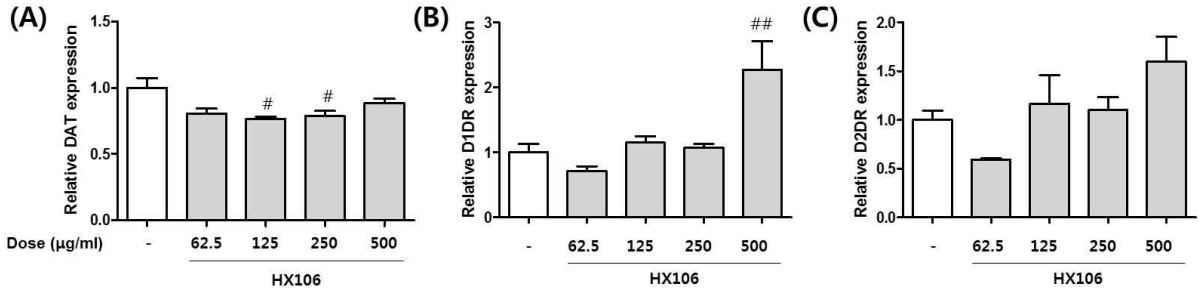
① 세포 단위에서의 실험을 위해 신경세포 생존율에 대한 의 농도의존적 영향을 평가하였음. 은 고농도인 1,000 µg/ml에서 독성이 확인되어 125, 250, 500 µg/ml 농도에서 이후 실험 진행하였음



[HX106의 신경 세포 생존율에 대한 영향]

(나) ADHD의 특징적 신경전달에 관여하는 인자 발현에 대한 영향 평가

① 도파민은 전두엽에서 신경세포간 전달을 통해 인지능력 및 주의력에 관여하며, ADHD 뇌에서는 도파민 신호전달이 약한 것으로 알려져 있음. 본 연구팀은 도파민을 재흡수하여 도파민 신호전달을 감소시키는 dopamine transporter (DAT)와 도파민 수용체(dopamine receptor; DR)인 D1DR과 D2DR 발현에 대한 영향을 PC12 세포에서 평가하였음. 그 결과 HX106이 DAT 발현 억제 및 D1DR 발현 증가를 유도하는 것을 확인함. 이에 대한 활성 재현 확인 실험이 필요하며, 이 결과를 통해 HX106이 도파민 신호전달을 조절할 가능성이 확인되었음



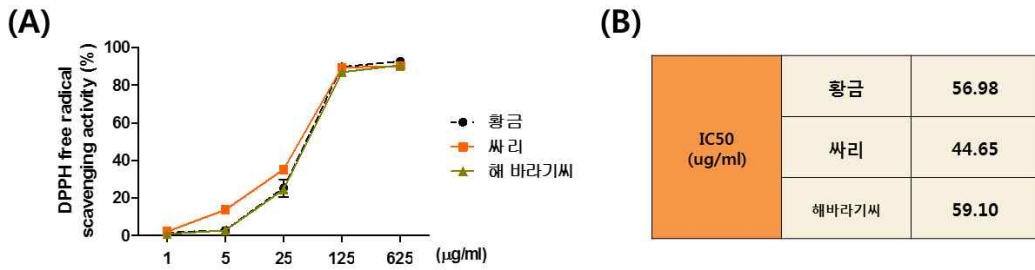
[HX106의 DAT, D1 dopamine receptor, D2 dopamine receptor mRNA 발현량에 대한 영향]

(2) 싸리나무, 해바라기씨 추출물

① 싸리나무와 해바라기씨 추출물은 당 독성(glucotoxicity)에 대한 세포보호효과가 뛰어난 것으로 기 연구된 바 있으며, 본 연구에서 자유 라디칼 소거능, 아세틸콜린에스터라제 억제 활성, 신경세포보호 효능을 평가하였음

(가) 자유 라디칼 소거능 평가

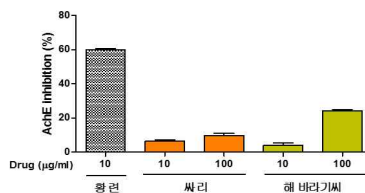
① 노화와 세포독성을 일으키는 활성산소종에 대한 추출물의 효과를 간접적으로 평가하기 위해 DPPH 자유 라디칼 소거능을 평가하였음. 싸리나무와 해바라기씨 추출물은 양성대조군인 황금 추출물과 유사한 수준의 자유 라디칼 소거능을 확인함



[싸리, 해바라기씨 추출물의 DPPH 자유라디칼 소거능. 황금: 양성대조군]

(나) 아세틸콜린에스터라제 억제 활성 평가

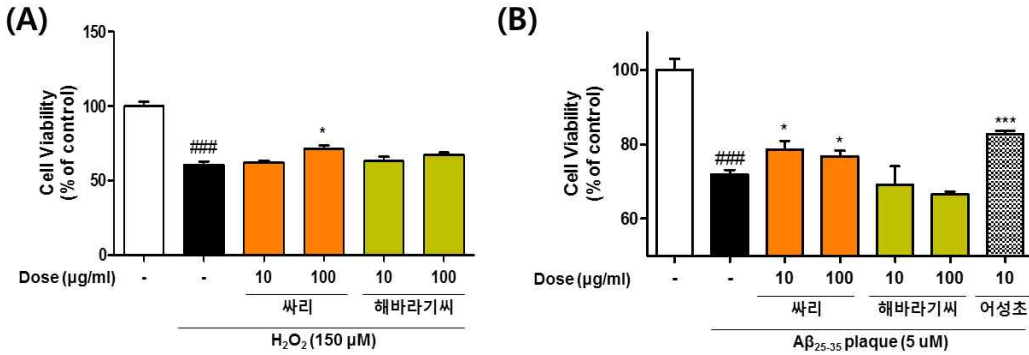
① 아세틸콜린 분해 효소인 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase, AChE)에 대한 싸리나무, 해바라기씨 추출물의 억제 활성을 평가하였음. 싸리나무, 해바라기씨 추출물은 양성대조군인 황련 추출물과 비교하였을 때 유의미한 활성을 보이지 않았음



[싸리, 해바라기씨 추출물의 AChE 억제 활성. 황련: 양성대조군]

(다) 해마세포에서 신경독성에 대한 신경세포 보호효능 평가

① 산화스트레스를 유발하는 과산화수소와 Aβ 신경독성에 대하여 신경세포 보호효능을 평가하였음. 싸리나무 추출물은 과산화수소, Aβ에 대하여 유의한 세포 보호 효능을 나타냄



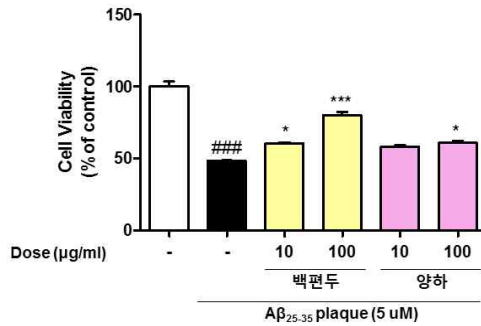
[싸리, 해바라기씨 추출물의 신경세포 보호효과. 어성초: 양성대조군]

(3) 백편두, 양하

① 백편두와 양하는 한의학적으로 건비 또는 건위하는 효능이 있어 소화기계에 작용함. 해마세포에서 아밀로이드 베타 등 신경독성에 대한 보호 효과를 보였으므로 신경세포 보호효과와 인지 기능 개선 효과를 같이 나타내는 인지 기능 개선 식품 소재로서의 잠재력을 평가하고자 하였음

(라) 해마세포에서 신경독성에 대한 신경세포 보호효능 평가

① 알츠하이머병의 특징적 독성물질인 Aβ에 대하여 신경세포 보호효능을 평가하였음. 백편두, 양하 추출물은 Aβ에 대하여 유의한 세포 보호 효능을 나타냄



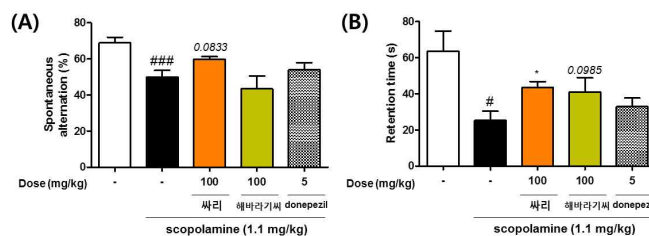
[백편두, 양하 추출물의 신경세포 보호효과]

라) In vivo 모델에서의 인지 기능 식품 후보 소재 스크리닝

(1) 인지 기능 감퇴를 동물에서 재현하기 위해 구축한 스코폴라민 유도 인지 기능 장애 모델에서 후보소재들의 인지 기능 개선 효과를 평가하였음

(가) 싸리나무, 해바라기씨 추출물

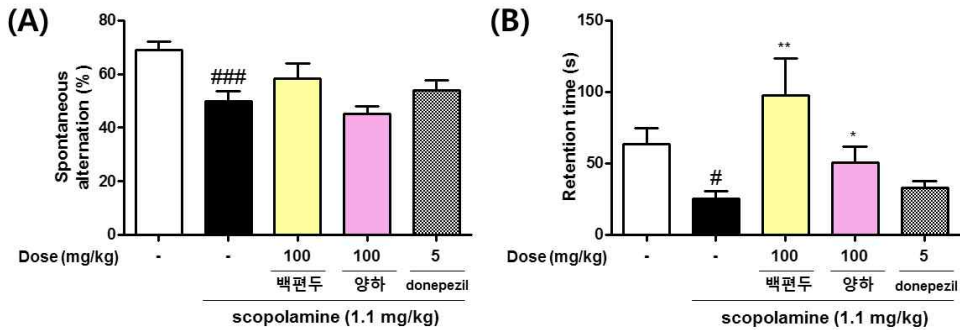
① 싸리나무 추출물 투여군에서 scopolamine 유도 인지 기능 감퇴를 유의하게 개선하는 효능이 확인됨



[싸리, 해바라기씨 추출물의 scopolamine 유도 인지 기능 감퇴에 대한 개선 효능. donepezil: 양성대조군]

(나) 백편두, 양하 추출물

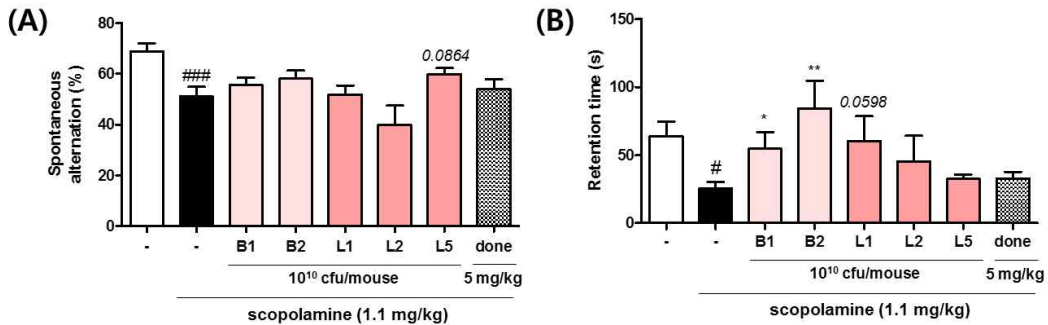
① 백편두, 양하 추출물 투여군에서 scopolamine 유도 인지기능 감퇴를 유의하게 개선하는 효능이 확인됨



[백편두, 양하 추출물의 scopolamine 유도 인지기능 감퇴에 대한 개선 효능. donepezil: 양성대조군]

(다) 유산균 후보 소재

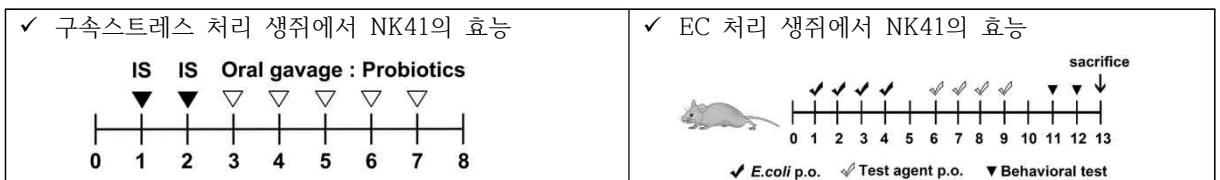
① 유산균 후보 소재 도출을 위해 4세부 연구기관으로부터 유산균 후보 소재 5종(B1, B2, L1, L2, L5)을 제공받았으며, 단순 기억 감퇴 개선 효능을 평가하기 위해 scopolamine 유도 기억 감퇴 모델을 효능 평가 플랫폼으로 채택하였음. In vitro 실험은 3세부에서 진행되었음
 ② 유산균 후보 소재 5종(B1, B2, L1, L2, L5) 중 B1, B2 투여군에서 scopolamine 유도 인지기능 감퇴를 유의하게 개선하는 효능이 확인됨

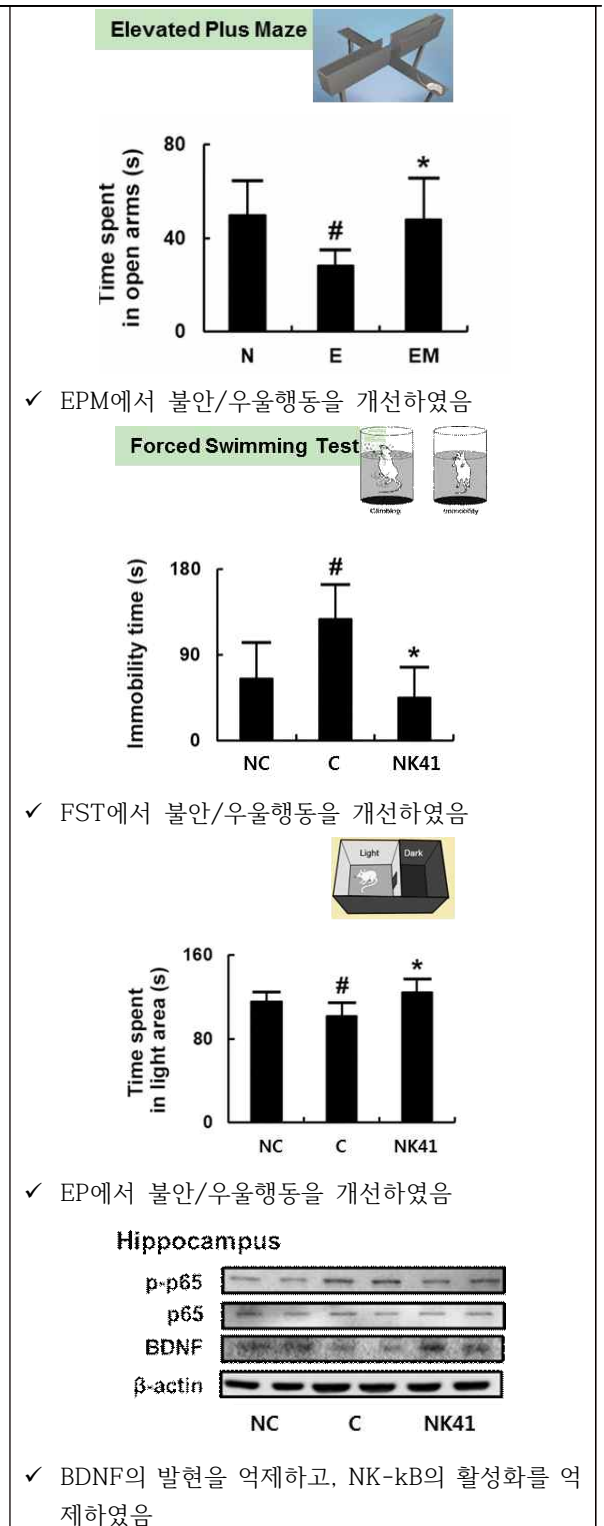
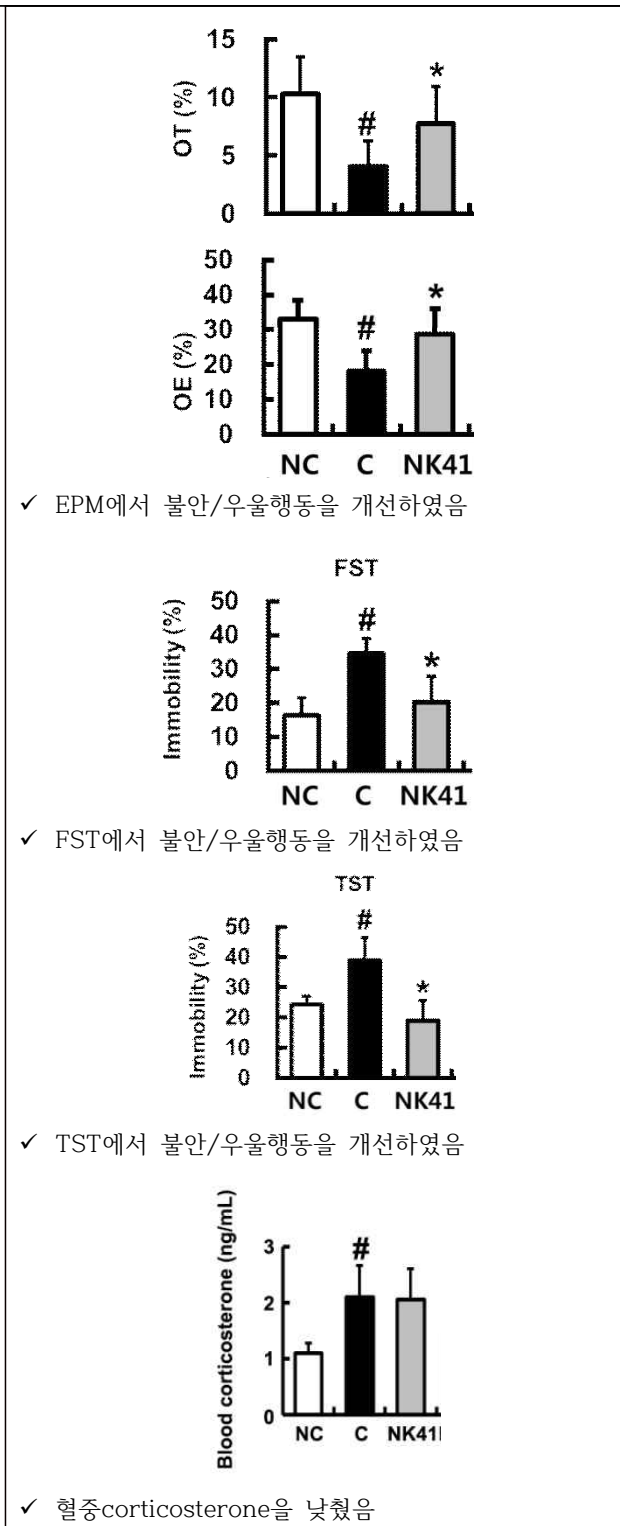


[유산균 5종의 scopolamine 유도 인지기능 감퇴에 대한 개선 효능. donepezil (done): 양성대조군]

마) In vivo 모델에서의 프로바이오틱스 후보 소재의 항우울 효능 평가

(1) 구속스트레스 유발 우울 생쥐와 EC 유발 우울 생쥐의 항우울프로바이오틱스 NK41 효능 비교
 (가) 구속스트레스 유발 불안/우울행동과 EC 유발 불안/우울행동은 유사한 경향을 보였음
 (나) 장내세균군집이 불안/우울 유발에 중요하며, EC유발 불안/우울 생쥐는 실험동물로 사용이 가능하다고 생각됨





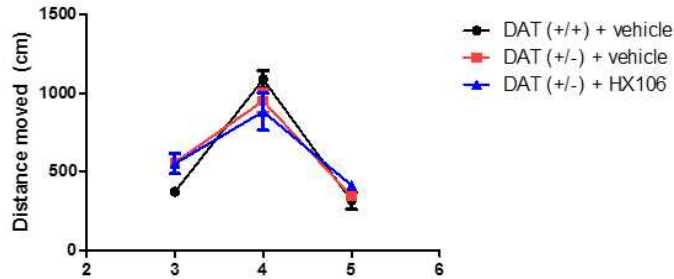
바) HX106의 항ADHD 효능 평가

- 평가 소재: HX106

시료명	용량	제조날짜	번호	기타 정보
HX106	300 g	2018/1/4	HX106-180104	연조엑스(58%)

(1) Dopamine transporter (DAT) hypofunctional mice에서 HX106의 항ADHD 효능 평가
 (가) DAT (-/-) mice에서 충동성, 인지기능 장애가 나타난다는 보고에 근거하여 이탈리아 기술연구원(Istituto Italiano di Tecnologia)의 Francesco Papaleo 팀으로부터 동물을 분양받아 사육함(Curr Mol Med. 2015;15(3):245-52)
 (나) DAT (-/-) mice는 신생아가 거의 사망하였음

- (다) DAT (+/-) mice에서도 hyperactivity를 나타낸다는 보고에 근거하여 동물을 사육하여 개체 확보 및 실험 진행함(Neuropharmacology (2017) 121:179-94)
- (라) 실험 방법: 출생 3주 후 1주 간격으로 locomotor activity를 측정하였으며 3주차 행동실험 직후 HX106을 2주간 투여하였음
- (마) DAT (+/+) mice 대비 DAT (+/-) mice의 hyperactivity가 나타나지 않았으므로 본 모델에서 약물 효과를 확인할 수 없었음

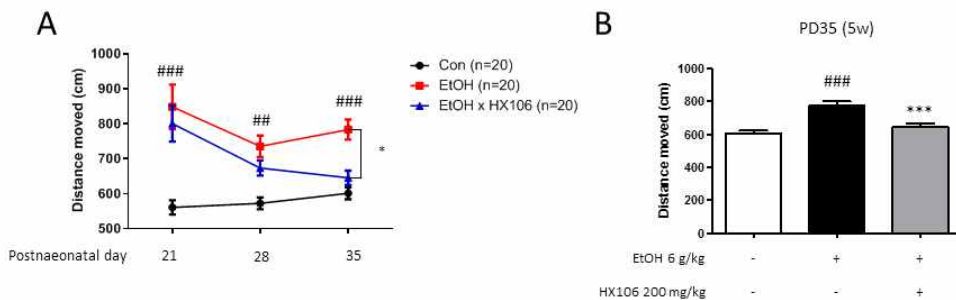


[Dopamine transporter (DAT) hypofunctional mice에서 HX106 투여에 따른 hyperactivity 변화]

(2) Prenatal alcohol exposure (PAE) 유도 ADHD-like mice에서 HX106의 항ADHD 효능 평가

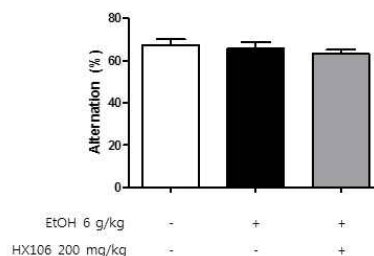
(가) ADHD 행동 개선 효능 평가

- ① 임신 마우스에 EtOH을 과량 투여 시 offspring이 hyperactive behavior를 나타낸다는 보고에 근거하여 실험을 진행함(Neurochem Res (2013) 38(3):620-31)
- ② 실험 방법: 임신 6일차 마우스에 EtOH을 6 g/kg을 10일간 투여하였음. Pup 출생 3주 후 1주 간격으로 pup의 locomotor activity를 측정하였으며 3주차 행동실험 직후 HX106을 2주간 투여하였음
- ③ Locomotor activity를 분석한 결과 대조군 대비 EtOH을 투여한 마우스의 pup에서 통계적으로 유의한 수준의 hyperactivity가 나타나는 것을 확인하여 본 모델로 실험 진행하였으며, HX106 투여 시 유의한 hyperactivity 개선 효과가 나타남



[ADHD-like model에서 HX106 투여에 따른 hyperactivity 변화]

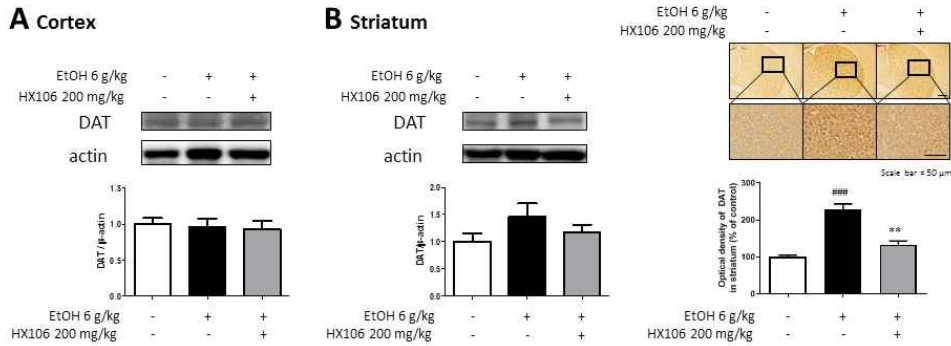
- ④ 단기/작업기억을 평가하기 위해 Y-maze test를 실시한 결과 군간 기억력의 차이는 나지 않았음



[ADHD-like model에서 HX106 투여에 따른 기억 관련 행동 변화]

(나) 도파민 신호 전달에 대한 영향 분석

① 대조군 대비 EtOH 투여 마우스의 대뇌피질(cortex)에서는 DAT의 차이가 없었으나, 선조체(striatum)에서는 EtOH 투여 마우스에서 DAT 발현이 증가하며 HX106 투여 마우스에서 DAT 발현이 감소함



[ADHD-like model에서 HX106 투여에 따른 dopamine transporter (DAT) 발현 변화
대뇌 피질(cortex) 및 선조체(striatum)에서의 DAT 발현 변화]

② 대사체 분석을 통한 ADHD의 병리 기전 및 HX106의 효능 기전 규명을 위해 3세부에 생체 샘플을 제공함

사) 후보 소재의 인지기능 감퇴 개선 또는 강화 효능 평가

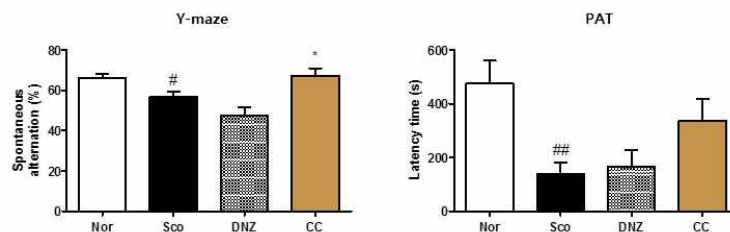
(1) 실새삼, 새삼의 인지기능 감퇴 개선 또는 강화 효능 평가

- ✓ 인지기능 감퇴 개선/강화 후보 소재 2종의 효능 평가를 위해, in vitro 및 in vivo 실험을 수행하였음. 정확한 효능 평가를 위해 3세부와 협력하여 다양한 신경병리에 대한 추출물의 영향을 분석하였음. 다양한 assay에서 확인된 결과를 취합하여 결론을 도출하였음
- ✓ 평가 소재: 실새삼, 새삼

시료명	정보
실새삼(CC)	- <i>Cuscuta australis</i> Lamark (Convolvulaceae)의 씨(중국산) - 물을 용매로 하여 초음파 추출(상온)
새삼(CJ)	- <i>Cuscuta japonica</i> Choisy (Convolvulaceae)의 씨(국산) - 물을 용매로 하여 초음파 추출(상온)

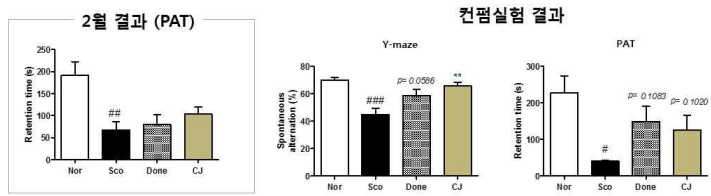
(가) Scopolamine 유도 기억 손상에 대한 개선 효능 평가

① Scopolamine 투여에 의한 기억 손상에 대하여 실새삼 투여군에서 개선 효과를 보임



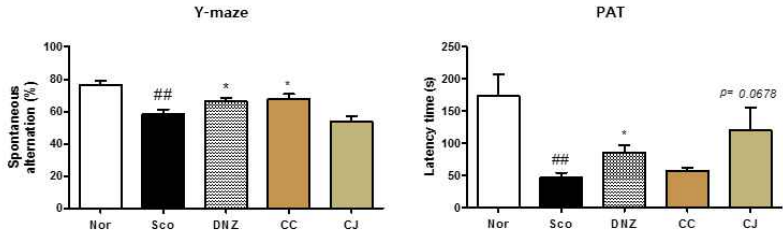
[실새삼의 scopolamine 유도 인지기능 감퇴에 대한 개선 효능.
DNZ: 양성대조군, CC: 실새삼]

② 스코폴라민 투여에 의한 기억 손상에 대한 새삼의 개선 효과가 재현됨



[새삼의 scopolamine 유도 인지기능 감퇴에 대한 개선 효능. Done; 양성대조군, CJ; 새삼]

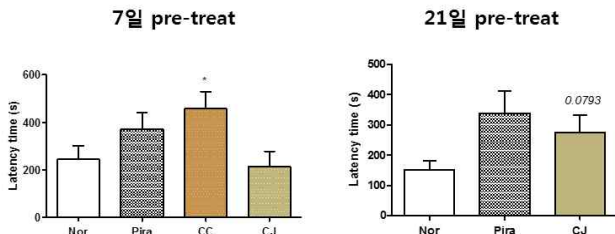
③ 실새삼은 공간 기억에 대하여, 새삼은 공포기억에 대하여 효과를 보임



[실새삼 및 새삼의 scopolamine 유도 인지기능 감퇴에 대한 개선 효능. DNZ; 양성대조군, CC; 실새삼, CJ; 새삼]

(나) 정상 쥐에 대한 memory enhancing 효능 평가

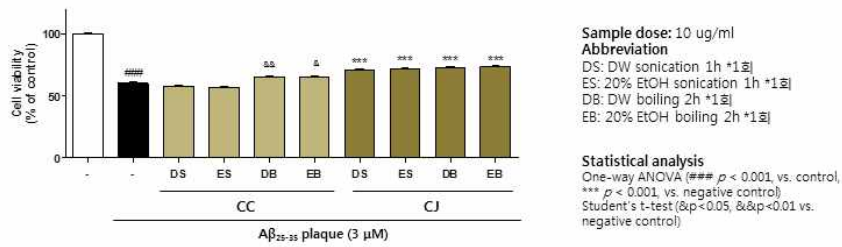
① 정상 쥐에 투여할 경우 실새삼이 memory enhancing 효과를 나타내며, 장기투여 시 새삼도 효과를 나타냄



[7일 또는 21일 투여시 실새삼 및 새삼의 인지 강화 효과. Pira; 양성대조군, CC; 실새삼, CJ; 새삼]

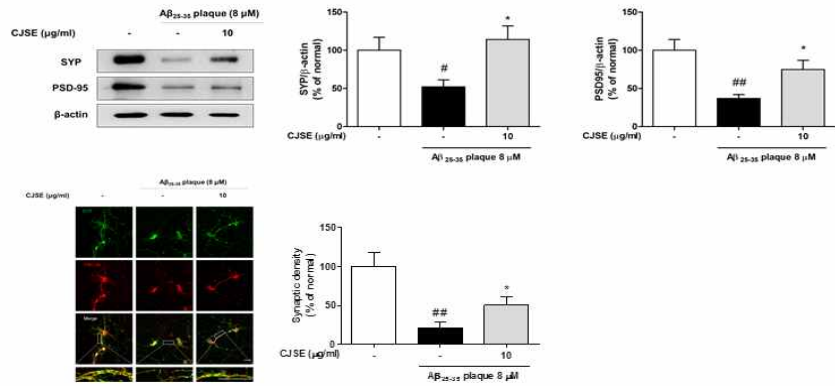
(다) 알츠하이머병 모델에서 Aβ에 의한 기억 감퇴 개선 효능 평가

① 산화 스트레스를 유발하는 과산화수소와 알츠하이머병 유도 독성물질인 Aβ에 대하여 실새삼, 새삼 추출물의 신경세포 보호 효능을 평가하였음. HT22 해마 세포에서 실새삼, 새삼 추출물이 Aβ 독성에 대하여 세포 보호 효과를 보이며 새삼 추출물에서 더 강한 것으로 보임



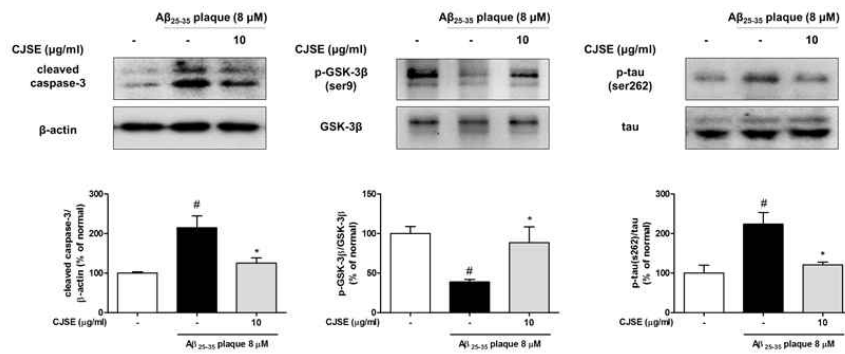
[HT22 해마세포에서 세포생존률 측정]

② 일차 배양 해마 세포(primary hippocampal neuron)에서 새삼 추출물이 Aβ 독성에 의한 시냅스 손상을 회복시킴



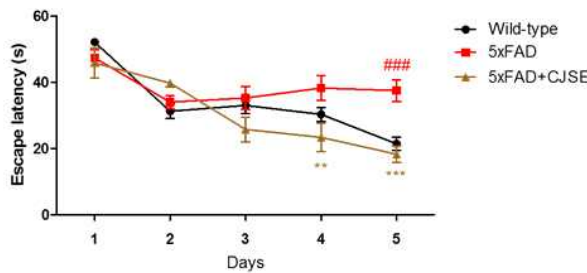
[Primary hippocampal neuron에서 시냅스 인자 측정; SYP, PSD95: 시냅스 전, 후 인자]

③ 새삼 추출물은 caspase-3, GSK-3β, tau pathway를 조절하여 Aβ 독성으로부터 시냅스를 보호함

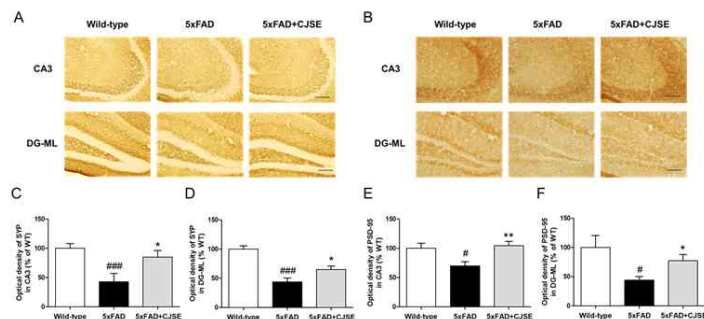


[Aβ 유도 caspase-3, GSK-3β 활성화 및 tau 인산화에 대한 새삼의 영향]

④ 유전자 조작에 의해 Aβ의 축적이 일어나는 동물 모델인 5xFAD 형질전환 모델에 새삼 추출물을 투여하여 항알츠하이머 효과를 평가하였음. 새삼 추출물은 Aβ 축적에 따른 기억감퇴를 개선시키며, 이는 시냅스 손상의 회복에 의한 것으로 보여짐



[5xFAD mice에서의 기억 손상 행동 개선(Morris water maze)]



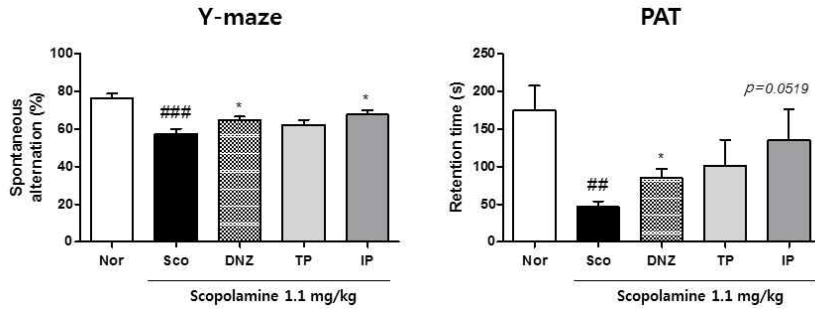
[5xFAD mice에서의 시냅스 손상 회복(SYP, PSD95 immunostaining)]

(2) 유산균 시료의 인지기능 감퇴 개선 효능 평가

- ✓ 유산균 후보 소재 도출을 위해 6세부 연구기관으로부터 유산균 후보 소재 2종을 제공받았으며, 단순 기억 감퇴 개선 효능을 평가하기 위해 scopolamine 유도 기억 감퇴 모델을 효능 평가 플랫폼으로 채택하였음. In vitro 실험은 3세부에서 진행되었음
- ✓ 평가 소재: 유산균 사균체(TP) 및 유산균 표면(IP)

(가) Scopolamine 유도 기억 손상 개선 효능 평가

- ① Scopolamine 투여에 의한 기억 손상에 대하여 유산균의 표면 투여군에서 사균체 투여군보다 더 우수한 개선 효과를 보임



[유산균 소재의 scopolamine 유도 인지기능 감퇴에 대한 개선 효능. DNZ: 양성대조군, TP: 사균체, IP: 유산균 표면]

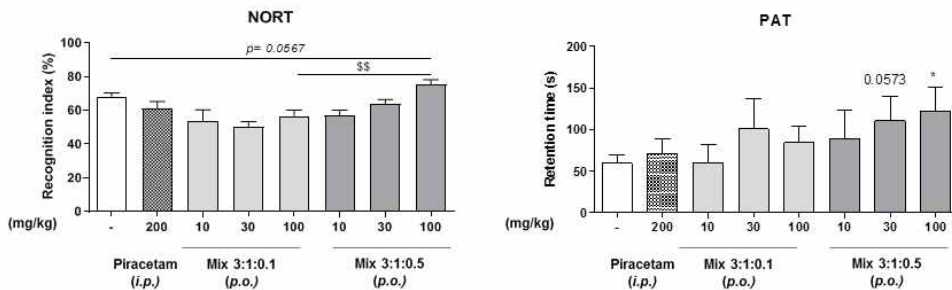
(3) 최종 후보 도출을 위한 구성 소재 배합비율별/용량별 효능 평가

- ✓ 비율 도출을 위해 3세부와 협력하였음. 3세부에서 in vitro 실험을 통해 후보 비율을 제시하였으며, 본 연구 결과를 반영하여 최종 비율을 선정하고자 하였음
- ✓ 평가 소재: 실새삼, 새삼 추출물 및 유산균 소재 혼합물

시료명	정보
Mix 3:1:0.1	실새삼 추출물:새삼 추출물:유산균 소재=3:1:0.1 혼합물
Mix 3:1:0.5	실새삼 추출물:새삼 추출물:유산균 소재=3:1:0.5 혼합물

(가) 구성 소재 배합비율별/용량별 인지 강화 효능 평가

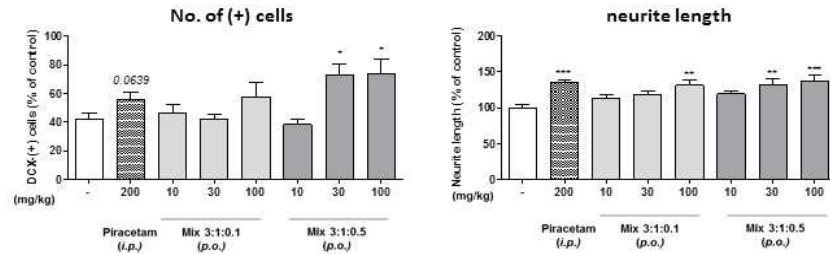
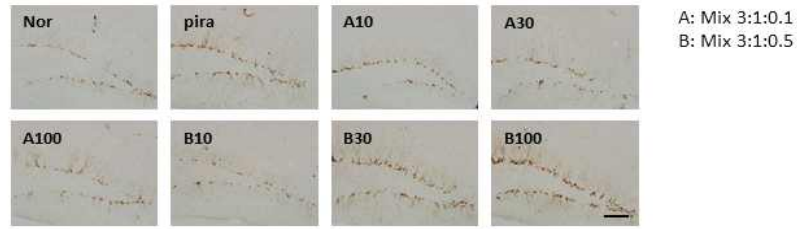
- ① 실새삼, 새삼, 유산균 소재의 혼합물은 정상 쥐에 투여 시 인지 강화 효과를 나타냈으며, 두 배합 비율 중 3:1:0.5 비율 혼합물에서 효능이 더 우수하였음



[구성 소재의 배합비율별/용량별 인지 강화 효능 평가. Piracetam: 양성대조군]

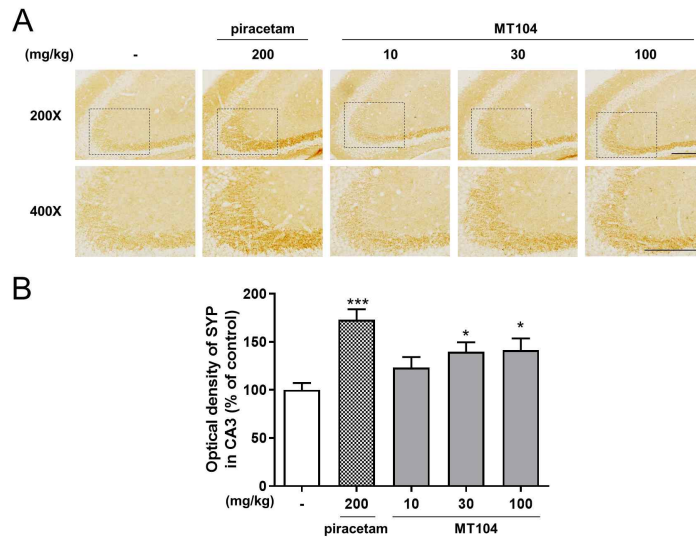
(나) 구성 소재 배합비율별/용량별 신경생성에 대한 영향 평가

- ① 실새삼, 새삼, 유산균 소재의 혼합물은 정상 쥐에 투여시 신경생성 효과를 나타냈으며 두 배합 비율 중 3:1:0.5 비율 혼합물에서 효과가 더 우수하였음



[Doublecortin (DCX) 양성 세포 수 및 neurite length에 대한 구성 소재 혼합물의 촉진 효능. Piracetam: 양성대조군]

② MT104(실새삼 추출물:새삼 추출물:유산균 소재=3:1:0.5 혼합물)은 정상 마우스에 투여 시 synaptogenesis를 유도함



[Synaptic protein인 synaptophysin (SYP)에 대한 구성 소재 혼합물의 발현 유도 효능. piracetam: 양성대조군]

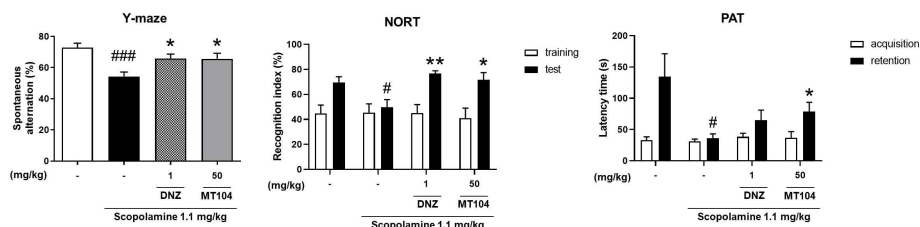
③ 대사체 분석을 통한 MT104의 효능 기전 규명을 위해 3세부에 생체 샘플을 제공함

(4) 최종 후보의 인지 감퇴 개선 효능 확인

✓ 평가 소재: MT104(실새삼 추출물:새삼 추출물:유산균 소재=3:1:0.5 혼합물)

(가) 최종 후보 MT104의 scopolamine 유도 인지 감퇴 개선 효능 평가

① MT104 50 mg/kg은 scopolamine으로 유도된 기억 감퇴에 대하여 개선 효능을 보임



[MT104의 scopolamine 유도 인지감퇴에 대한 개선 효능. DNZ: 양성대조군]

(나) 최종 소재의 효능 기전 규명을 위한 대사체 분석 연구

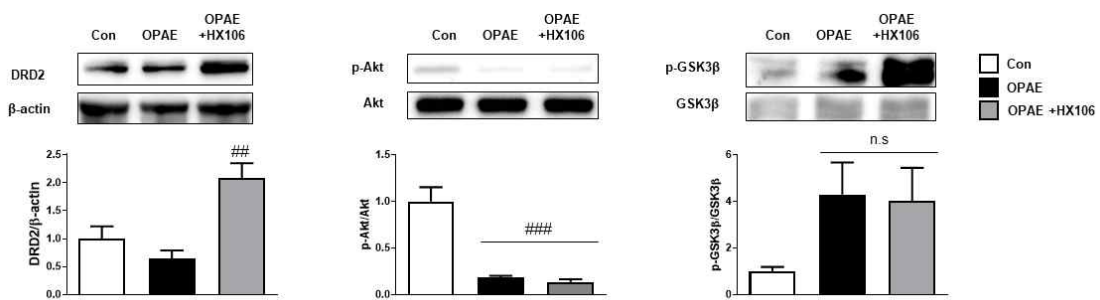
① 대사체 분석을 통한 식품 소재의 효능 기전 규명을 위해 3세부에 생체 샘플을 제공함

아) HX106의 항ADHD 효능에 대한 기전 규명

(1) Prenatal alcohol exposure (PAE) model에서 HX106의 ADHD 개선 약리 기전 분석

(가) 도파민 수용체 D2 변화 측정 및 하위 기전 분석

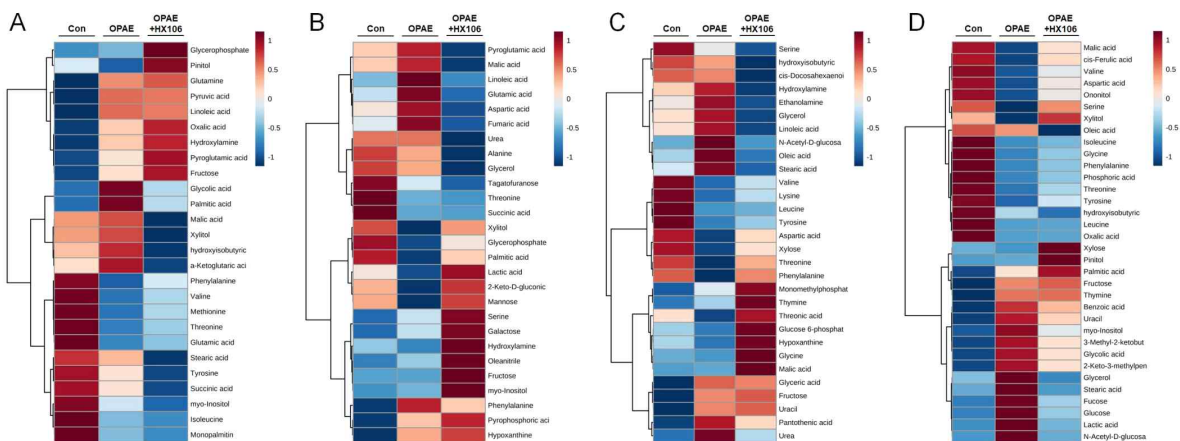
- ① 2차년도에서 확인된 ADHD-like 증상에 대한 HX106의 개선 기전을 확인하기 위해 도파민 수용체 D2의 발현량을 확인한 결과, PAE 유도 모델(OPAE)군에 비해 HX106을 투여받은 군의 선조체에서 발현이 유의하게 증가한 것으로 나타났음
- ② 도파민 수용체 D2의 하위 신호전달 경로 중 하나로 알려져 있는 Akt/GSK3 β pathway의 활성화 여부를 확인하기 위해 Akt와 GSK3 β 의 인산화를 측정된 결과, OPAE군에서 Akt/GSK3 β 의 인산화가 각각 감소/증가하였으나, 변화의 경향이 HX106 투여에 의하여 역전되지 않는 것으로 확인하였음



[PAE 유도 모델(OPAE)에 HX106 투여 후 선조체 내 도파민 신경전달 관련 인자 변화]

(나) 행동 변화와 관련된 대사체 pathway 변화 분석

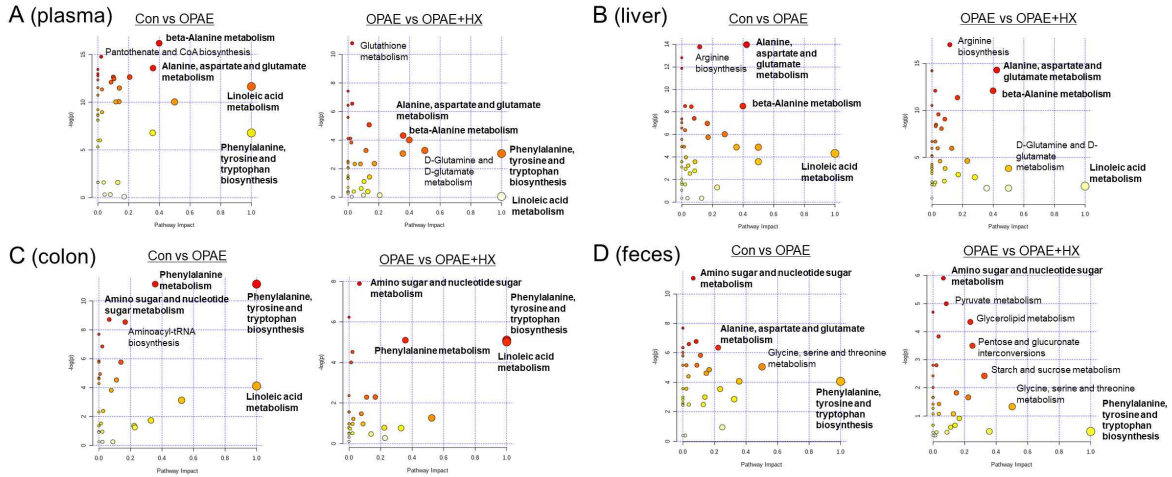
- ① 혈장, 간, 대장, 변에 대한 대사체 프로파일 dataset을 3세부에서 제공받아 hierarchical clustering heat map 분석, pathway 분석을 진행함
- ② hierarchical clustering heat map 분석 시 네 가지 조직 샘플(혈장, 간, 대장, 변) 모두에서 그룹 간 뚜렷한 차이를 나타내며, OPAE 군에서 변화되는 많은 대사체 종류가 HX106 투여군에서 그 경향이 역전되는 것이 확인됨



[PAE 및 HX106 투여에 의해 변화된 대사체 프로파일에 대한 hierarchical clustering heat map]

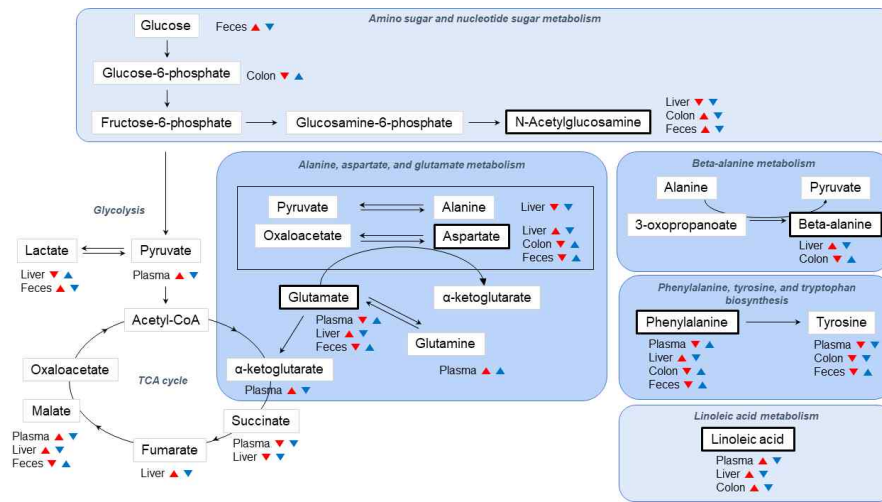
- ③ 대사체 프로파일 dataset을 pathway 분석 module에 적용하여, 중요도가 높고 의미 있는 대사체 pathway를 판별하고자 하였음
- ④ 혈장(plasma)과 간(liver) 샘플에서는 <beta-alanine metabolism>, <alanine, aspartate, and glutamate metabolism>, <linoleic acid metabolism>, <phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis> pathway가 PAE 및 HX106 투여에 의해 영향을 받는 것으로 보여짐

⑤ 대장(colon)과 변(feces) 샘플에서는 <amino sugar and nucleotide sugar metabolism>, <phenylalanine metabolism>, <linoleic acid metabolism>, <phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis>, <alanine, aspartate, and glutamate metabolism> pathway가 PAE 및 HX106 투여에 의해 영향을 받는 것으로 보여짐



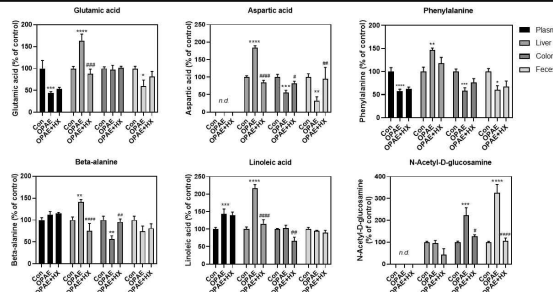
[PAE 및 HX106 투여에 의해 변화된 대사체 프로파일에 대한 pathway 분석]

⑥ PAE 및 HX106 투여에 의해 영향을 받는 것으로 보여지는 중요도가 높은 대사체 pathway를 pathway map에 표시하였을 때 pathway들의 변화가 유기적으로 일어나는 것으로 확인되었으며, PAE에 유도되는 대사체 불균형이 HX106에 의해 조절되는 것으로 보여짐



[PAE 및 HX106 투여에 의해 변화된 대사체프로파일에 대한 pathway map]

⑦ HX106을 투여받은 군은 OPAE군에서 증가/감소하는 glutamic acid, aspartic acid, phenylalanine, beta-alanine 등의 아미노산, linoleic acid 등 지방산, N-acetyl-D-glucosamine과 같은 당 유도체 등의 대사체들의 변화 경향을 역전시켰음. 이를 통해, 해당 대사체들이 HX106의 대사체 불균형에 대한 조절 역할에 중요한 역할을 할 것으로 예상하였음

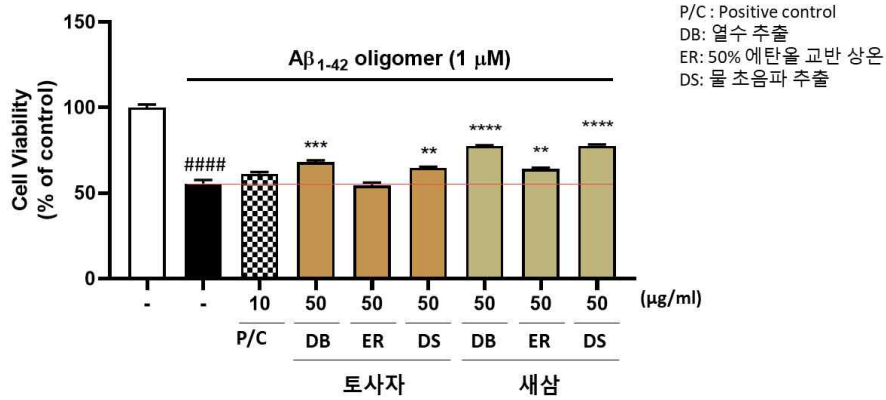


[PAE 및 HX106 투여에 의해 변화된 중요도가 높은 대사체]

자) MT104 구성 소재의 최적화

(1) 실새삼, 새삼의 추출법 변경에 따른 효능 재현성 확인

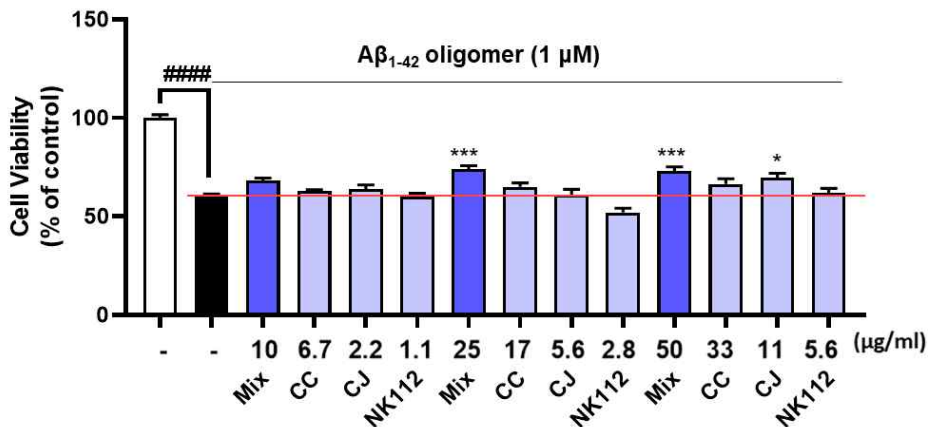
(가) 알츠하이머병에서 신경세포 사멸을 유도하는 Aβ oligomer (AβO)에 대하여 실새삼, 새삼 추출물의 신경세포 보호 효능을 평가하였음. HT22 해마 세포에서 실새삼, 새삼 추출물 모두 AβO에 대한 신경세포 보호 효과를 나타내며, 물 열수 추출물(DB), 물 초음파 추출물(DS), 에탄올 추출물(ER) 순으로 강한 효과를 보임. 본 결과로부터, 추출법 변경(DS → DB) 시 효능 변화가 거의 없거나 변경 후 조금 더 우수한 것으로 확인하였음



[HT22 세포에서 실새삼, 새삼 처리 시 AβO에 대한 신경세포 보호효과 측정]

(2) 실새삼, 새삼, 유산균 소재 혼합 시 시너지 효과 평가 및 특허 출원을 위한 자료 확보

(가) 실새삼 열수 추출물, 새삼 열수 추출물, 유산균 소재 3:1:0.5 혼합물의 25, 50 μg/ml 농도에서 유의한 신경세포 보호 효능을 보이며, 혼합 시 함유된 각 개별 소재보다 신경세포 보호 효능이 우수함

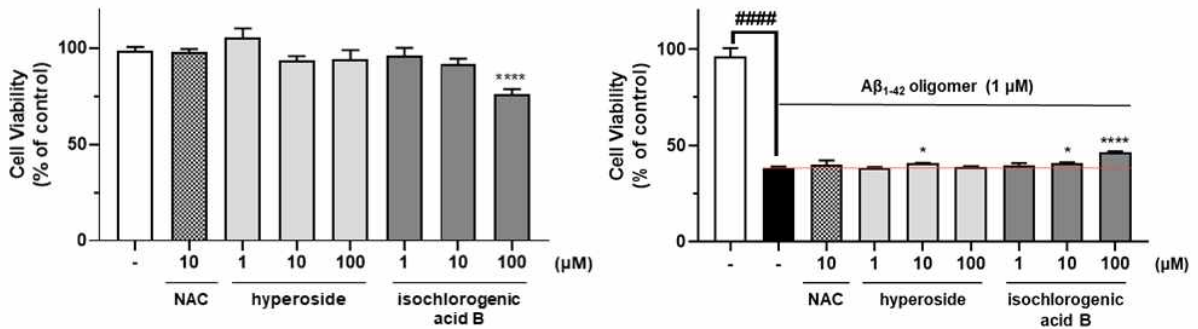


[HT22 세포에서 실새삼(CC), 새삼(C), 유산균 소재(NK112) 3:1:0.5 혼합 시 농도별 신경세포 보호 효능 및 개별 소재 대비 효능 비교 평가]

차) MT104 유효 성분의 활성 평가

(1) MT104의 지표성분인 hyperoside, isochlorogenic acid B의 활성 평가

- (가) HT22 해마 세포에서 지표성분인 hyperoside, isochlorogenic acid B의 농도별 세포 독성을 평가하였음. Hyperoside는 세포독성을 보이지 않으며, isochlorogenic acid B는 100 μM에서 세포독성을 보임
- (나) 알츠하이머병에서 신경세포 사멸을 유도하는 Aβ oligomer (AβO)에 대하여 hyperoside, isochlorogenic acid B의 농도별 신경세포 보호 효능을 평가하였음. HT22 해마 세포에서 hyperoside, isochlorogenic acid B는 10 μM에서 AβO에 대한 신경세포 보호 효과를 보이며, isochlorogenic acid B는 100 μM에서도 신경세포 보호 효과를 보임

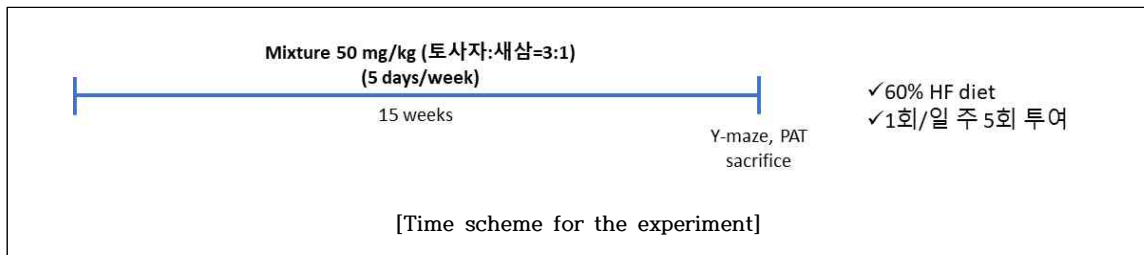


[HT22 세포에서 MT104 지표 성분인 hyperoside, isochlorogenic acid B 농도별 처리 시 세포 독성 및 AβO에 대한 신경세포 보호 효과 측정. NAC: 양성대조군]

카) 후보 소재의 고지방 식이 유도 기억 감퇴 개선 효능 평가

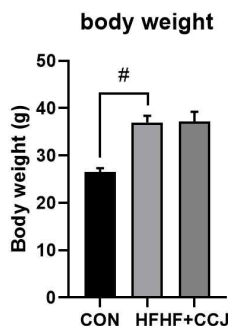
(1) 고지방 식이 유도 기억 감퇴 모델 구축 및 후보 소재 투여

- (가) 비만에 의해 유발되는 기억 감퇴에 대한 식품 후보소재의 영향을 평가하기 위해 고지방 식이 급여 쥐 모델을 사용하였음. 고지방 식이(60% high fat) 급여와 함께 실새삼, 새삼 3:1 혼합물(CCJ)을 15주간 경구로 투여하여 체중 변화 및 행동 변화(Y-maze, PAT 이용)를 측정하고, 치사 후 뇌 조직을 분석하였음
- (나) 해당 연구는 유산균 소재를 혼합하기 전 실새삼과 새삼 추출물의 혼합비 최적화 단계에서 진행되었으며, 중간 후보 소재(실새삼 및 새삼 추출물 혼합물; CCJ)의 유효성 평가를 목적으로 하였음



(다) 후보 소재 투여에 의한 체중 변화 여부 확인

- ① 실새삼:새삼 3:1 혼합물(CCJ)을 고지방 식이 급여와 함께 투여하였을 때 체중 증가에 대한 억제 효과가 없는 것을 확인함

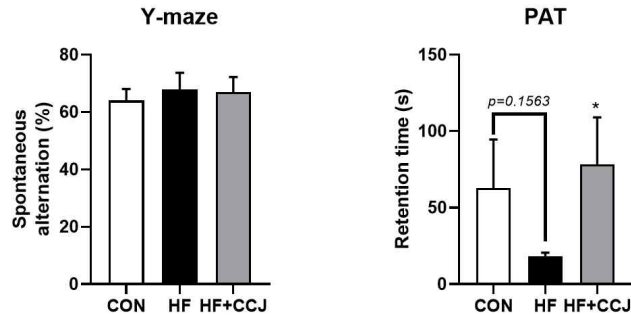


[고지방 식이 유도 기억 감퇴 모델에 실새삼, 새삼 3:1 혼합물(CCJ) 투여 시 체중 변화]

(2) 기억/인지 기능 관련 지표 분석

(가) 기억력 개선 효능 평가

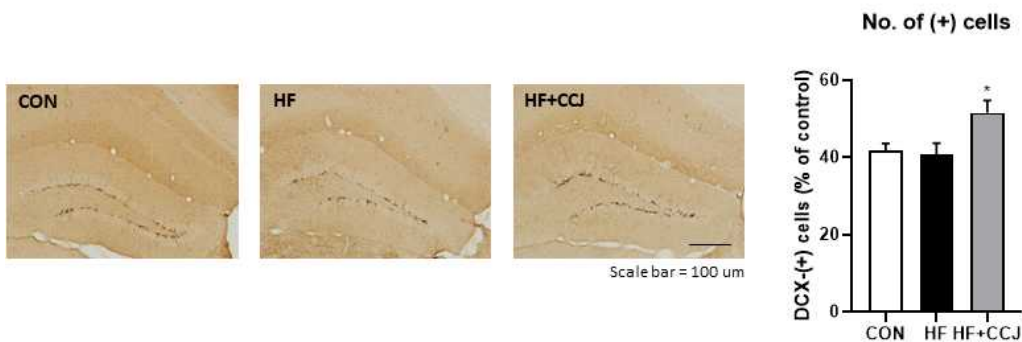
① 고지방 식이에 의한 기억 감퇴에 대하여 실새삼:새삼 3:1 혼합물(CC)은 공포기억 개선 효과를 보임



[고지방 식이 모델에 실새삼, 새삼 3:1 혼합물(CC) 투여 시 기억력에 대한 영향 평가]

(나) 신경생성에 대한 영향 분석

① 고지방 식이 유도 기억 감퇴 모델에서 신경 생성 여부를 확인하기 위해 immature neuron marker인 doublecortin (DCX)에 대한 immunostaining을 하여 관찰하였음. HF군에서 DCX 양성 세포수는 정상군과 차이가 없었으나, 실새삼, 새삼 3:1 혼합물(CC)을 투여 시 DCX 양성 세포수가 증가하였음. 이를 통해 CCJ가 신경생성 효능을 나타내는 것을 확인하였음



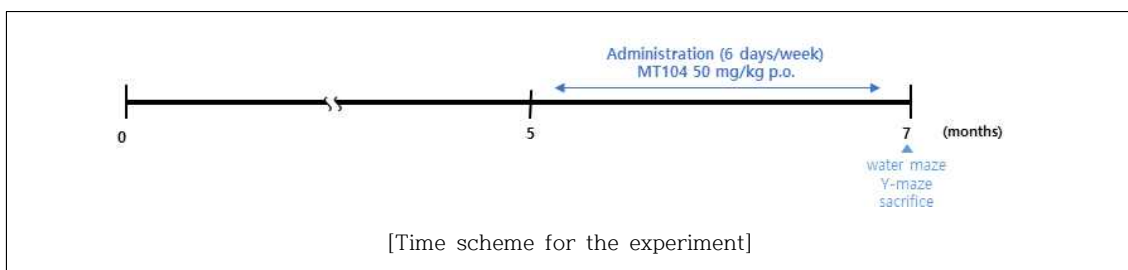
[고지방 식이 유도 기억 감퇴 모델에서 실새삼, 새삼 3:1 혼합물(CC) 투여에 의한 신경세포 분화 촉진 효능]

타) MT104의 Aβ 유도 기억 감퇴 개선 효능 평가

(1) 알츠하이머병 모델에서 후보소재(MT104)의 기억 개선 효능 평가

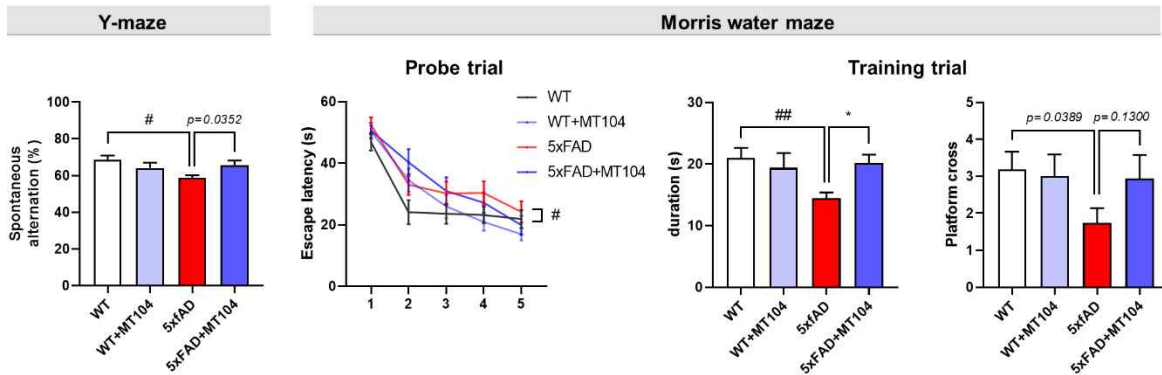
(가) 알츠하이머병 모델 구축 및 MT104 투여

① 유전자 조작에 의해 뇌 내에 Aβ이 과량 축적되는 쥐 모델인 5xFAD 형질전환 쥐에 MT104를 투여하여 항알츠하이머 효과를 평가하고자 하였음. 5개월령 wild-type (WT) 및 5xFAD 쥐에 2개월 간 MT104를 경구로 투여하여 생후 7개월이 되는 시기에 Morris water maze, y-maze를 이용하여 행동 변화를 측정하고, 치사 후 뇌 및 장 조직을 분석하였음



(나) 기억력 개선 효능 평가

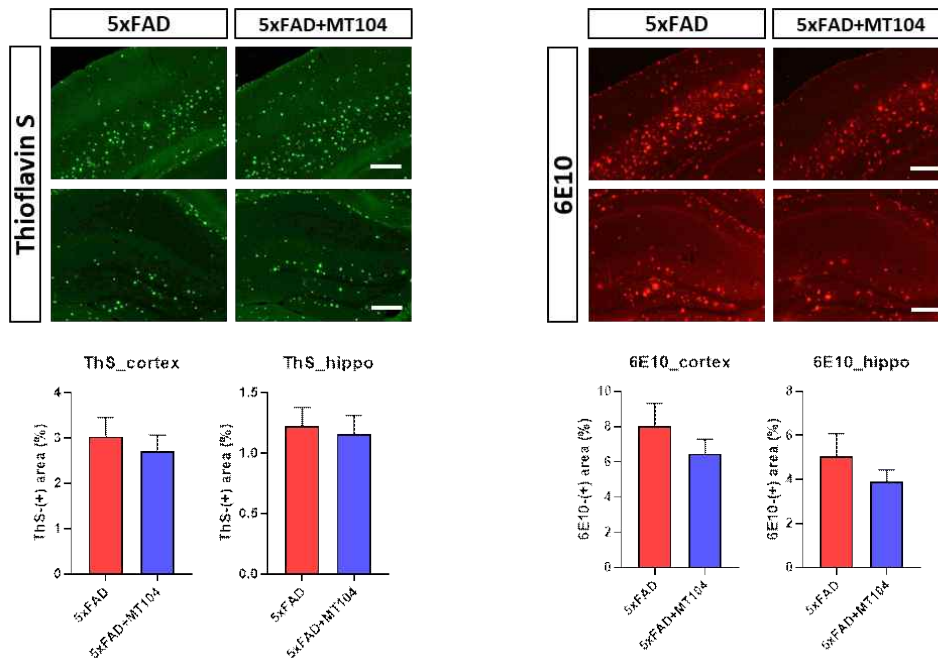
① 알츠하이머병에서 나타나는 기억 감퇴에 대한 MT104의 개선 효능을 평가하기 위해 Y-maze, Morris water maze를 이용하여 행동 변화를 측정된 결과, MT104 투여군에서 5xFAD군 대비 기억 감퇴가 개선됨을 확인함



[5xFAD 마우스에서 MT104의 기억 손상 개선 효능]

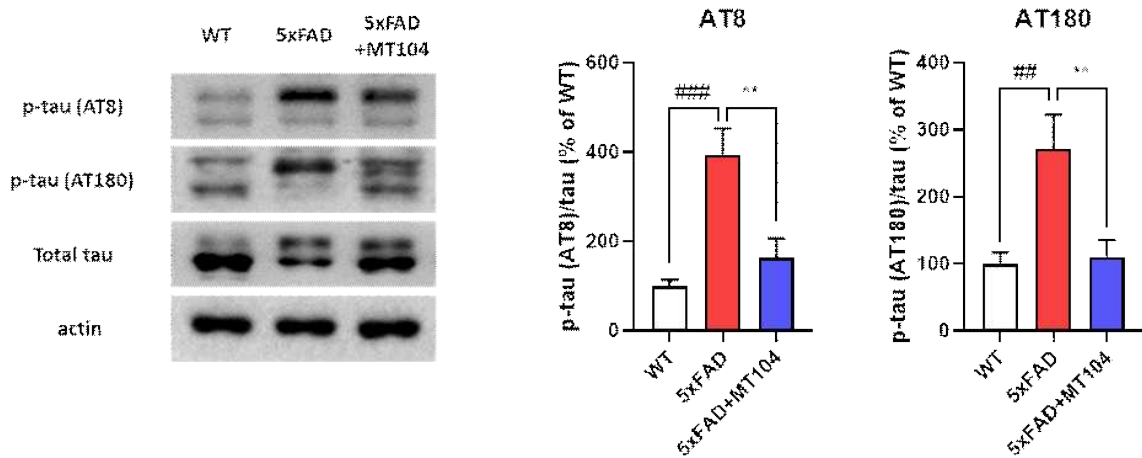
(다) 기억/인지기능과 관련된 뇌 인자 변화 분석

① MT104에 의한 기억 감퇴 개선이 Aβ 축적과 관련되는지 확인하기 위해 조직분석(Thioflavin S staining, 6E10 immunostaining)을 통해 Aβ 축적을 측정함. MT104 투여군에서 대뇌피질 (cortex), 해마(hippocampus)의 Aβ 축적이 5xFAD군 대비 감소하지 않아 MT104에 의한 기억 감퇴 개선이 Aβ 축적 억제에 의한 것이 아님을 확인함



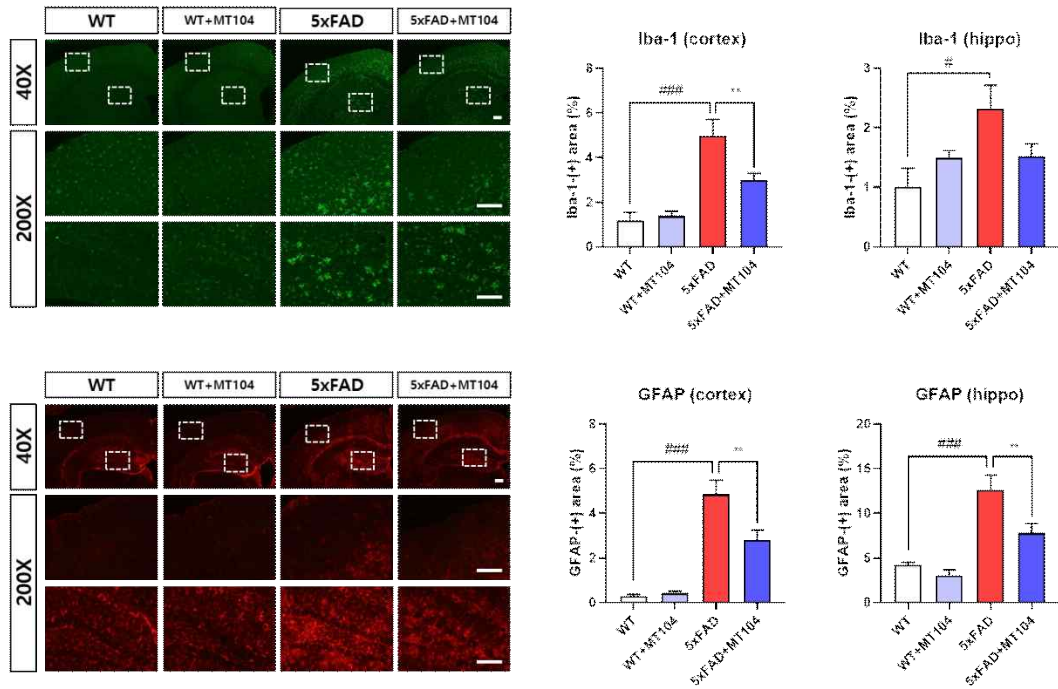
[5xFAD 마우스에서 MT104의 Amyloid beta 축적 억제 효능. Scale bar=200 μm]

② Aβ 축적으로 유도된 tau의 과인산화(hyperphosphorylation)을 억제하여 tau pathology와 관련되는 신경세포 사멸 등을 억제할 수 있는지 확인하고자 조직분석을 진행함. 해마 (Hippocampus)에서 AT180 및 AT8 antibody로 검출되는 phosphorylated tau가 WT군 대비 5xFAD군에서 유의하게 증가하였으며, MT104 투여 시 5xFAD군 대비 tau의 인산화가 유의하게 억제됨



[5xFAD 마우스에서 MT104의 tau 인산화 억제 효능]

③ A β 축적으로 유도된 뇌 내 염증 변화를 확인한 결과 WT군 대비 5xFAD군의 해마 (hippocampus)와 대뇌피질(cortex)에서 microglia (marker: Iba-1)와 astrocyte (marker: GFAP)의 활성화가 증가했으며, 이는 MT104 투여 시 유의하게 억제됨

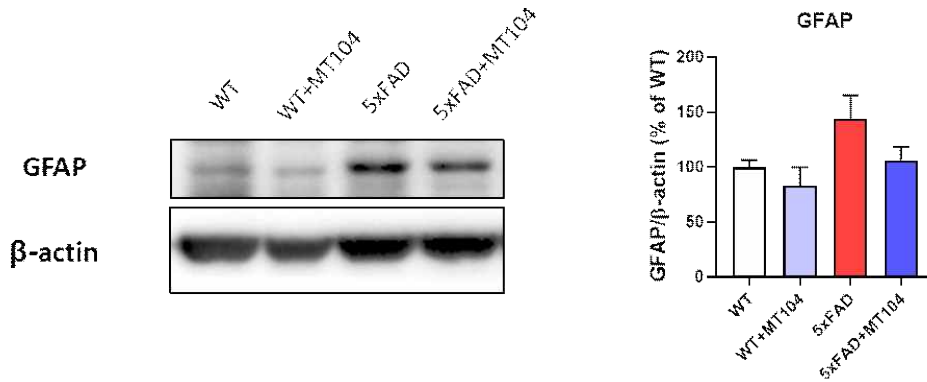


[5xFAD 마우스에서 MT104의 microglia, astrocyte 활성화 억제 효능. Scale bar= 100 μ m]

- ④ 해당 결과는 3세부에서 확인한 뇌염증 모델에서의 개선 효과 규명 결과와 상호보완되며, 알츠하이머병 모델에서의 직접적인 효과 확인으로 임상 목표와 유사한 모델에서 효과가 확인되었다는 의의를 가짐
- ⑤ 대사체 분석을 통한 AD 병리 현상 분석 및 MT104의 효능 기전 규명을 위해 3세부에 생체 샘플(뇌조직, 혈액, 간조직)을 제공함

(라) 장염증 억제 효능 평가

- ① 장내 염증 증가를 측정하기 위해 enteric glial cell marker인 GFAP를 WB를 이용해 확인하였음. 그 결과, 5xFAD 군에서 증가한 GFAP 발현량이 MT104 투여군에서 유의하게 감소한 것을 확인하였음



[5xFAD 마우스에서 MT104의 대장 염증(glial cell 증가)에 대한 영향]

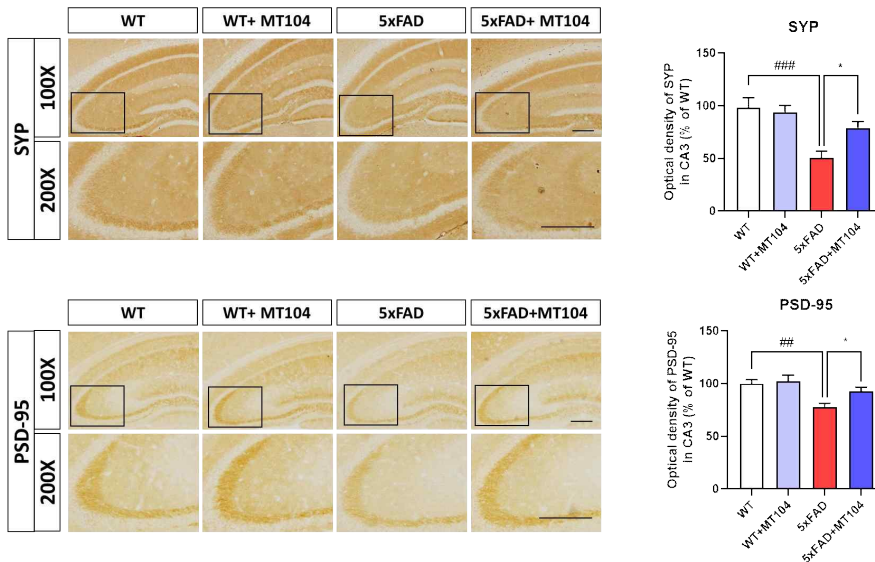
- ⑥ 대사체 분석을 통한 AD 환경에서 장 인자 변화 분석 및 MT104의 효능 기전 규명을 위해 3세 부에 생체 샘플(대장 및 분변)을 제공함

파) MT104의 알츠하이머병 제어 기전 분석

(1) Aβ 유도 기억 감퇴 모델에서 MT104의 기억 개선 약리 기전 분석

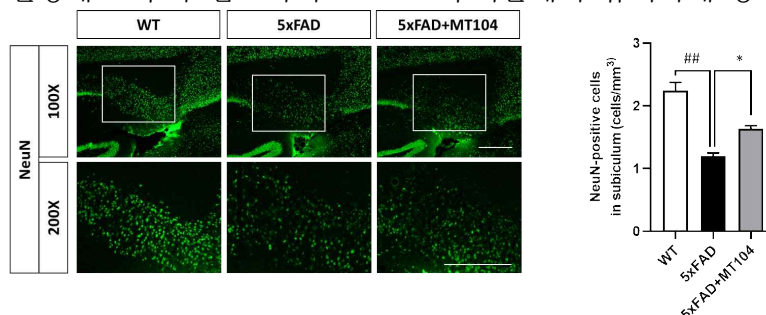
(가) 시냅스 및 신경세포 손상 관련 인자 변화 분석

- ① 축적된 Aβ로 인한 시냅스(Synapse) 손상 개선 여부를 확인하기 위해, 뇌 내에서 synaptophysin 과 PSD-95을 해마에서 확인하였음. 그 결과, 시냅스 단백질 발현이 WT군 대비 5xFAD군에서 현저하게 감소하며, MT104 투여군에서 5xFAD군 대비 유의하게 증가함을 확인하였음



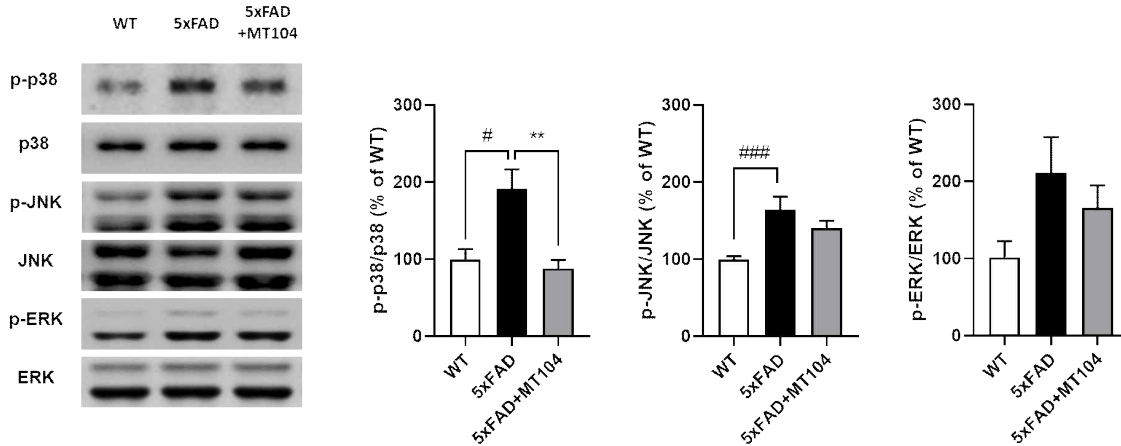
[5xFAD 마우스에서 시냅스 손상에 대한 MT104의 개선 효능. Scale bar=200 μm]

- ② 축적된 Aβ로 인한 신경세포 손상 개선 여부를 확인하기 위해 해마의 자실체형균사층(Subiculum) 부위에서 Neuronal marker인 NeuN을 확인하였음. 그 결과, WT군 대비 5xFAD군에서 신경세포 수가 감소하며 MT104 투여군에서 유의하게 증가함을 확인하였음



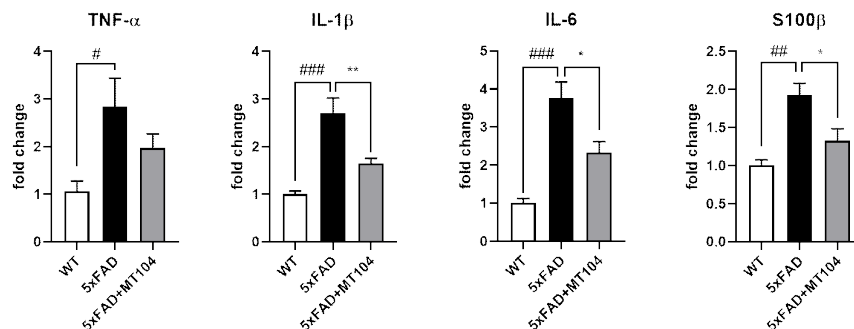
[5xFAD 마우스에 MT104 투여 시 신경세포 사멸 억제 효능. Scale bar=200 μm]

- ③ 축적된 A β 로 인한 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) pathway의 활성화 억제 여부를 평가하기 위해 p38과 JNK, ERK의 인산화를 측정하였음. 분석 결과, WT군 대비 5xFAD군에서 p38, JNK, ERK의 인산화가 모두 증가했으며 MT104를 투여했을 때 p38의 인산화가 유의하게 감소함



[5xFAD 마우스에서 MT104의 MAPK pathway 활성화 억제 효능]

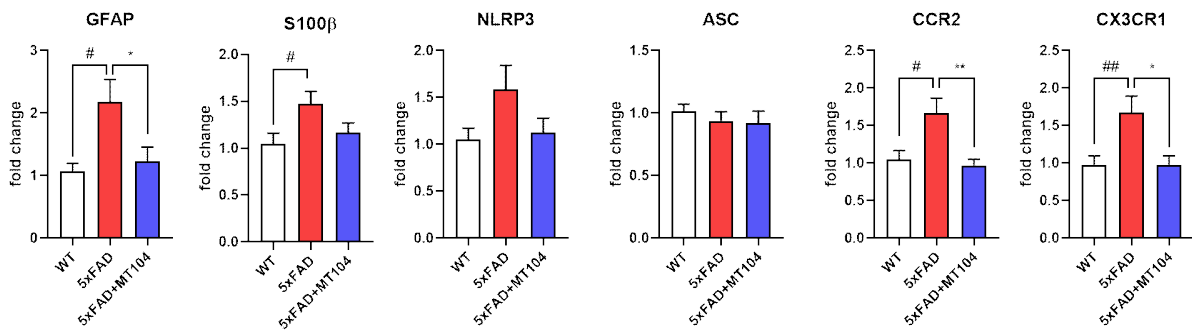
- ④ A β 축적에 의한 뇌내 염증성 사이토카인 생성을 제어하는지 확인하기 위해 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 정상교세포(Astrocyte)에 의해 분비되는 S100 β 를 qPCR을 통해 분석함. WT군 대비 5xFAD군의 대뇌피질(Cortex)에서 모든 인자의 발현이 유의하게 증가했고 MT104는 염증성 사이토카인 증가를 억제하는 효과를 보임.



[5xFAD 마우스의 해마에서 염증성 사이토카인 증가에 대한 MT104의 억제 효능]

(나) 장 염증 관련 인자 변화 분석

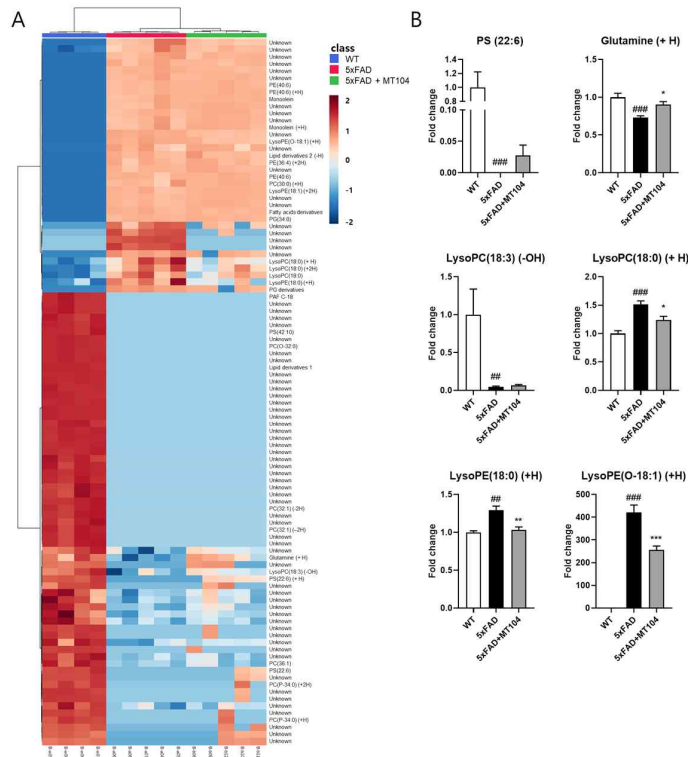
- ① 장내 염증 증가를 확인하기 위해 enteric glial cell marker인 GFAP와 glial cytokine인 S100 β , chemokine 수용체인 CCR2, CXCR1과 염증소체의 핵심 단백질인 NLRP3과 ASC를 qPCR을 이용해 분석하였음. 그 결과, 5xFAD군에서 증가한 GFAP 발현량이 MT104를 투여한 군에서 유의하게 감소한 것을 확인하였음. Chemokine 수용체 중 CCR2와 CXCR1은 WT군과 비교했을 때 5xFAD군에서 현저하게 증가했고 MT104는 효과적으로 Chemokine 수용체의 발현을 억제하였음. 염증소체 중 NLRP3은 WT군 대비 5xFAD군에서 유의적으로 증가하였으며 MT104 투여에 의해 감소하는 경향이 나타남
- ② 해당 결과는 신경정신질환(장내 병리)와 장내 대사체 간의 상관성을 분석할 수 있는 데이터로 활용되었음(3세부와 협력)



[5xFAD 마우스의 장(Colon)에서 염증성 인자 증가에 대한 MT104의 억제 효능]

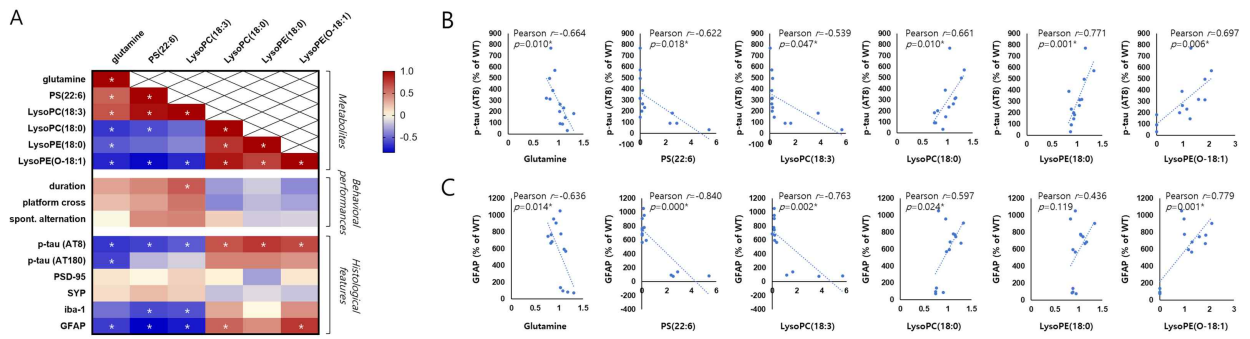
(다) 뇌 내 대사체 변화 분석 및 비정상 대사에 대한 MT104의 조절 효능 평가

① MT104 약리 효과에 관여하는 대사 산물을 찾기 위해 해마 조직을 UHPLC로 분석한 결과를 3세로부터 제공받아, component 1에 대한 VIP (variable importance in projection) 값이 큰 peak으로 hierarchical clustering heatmap을 구성하여 시각화하였음. 그 결과, 각 실험군이 각각 군집하며, WT군 대비 5xFAD 군에서 변하는 대사체 중 일부가 MT104군에서 WT과 유사한 농도를 나타냄을 확인하였음. 각 군을 군집하는 Component 1에 대한 VIP 값이 큰 대사체 중 identification이 가능한 6종을 확인하였을 때, (lyso)phospholipid 및 glutamine이 5xFAD에서 증가 또는 감소하며 MT104 투여에 의해 경향이 반전됨을 확인하였음



[5xFAD 마우스 해마에서의 대사체 변화]

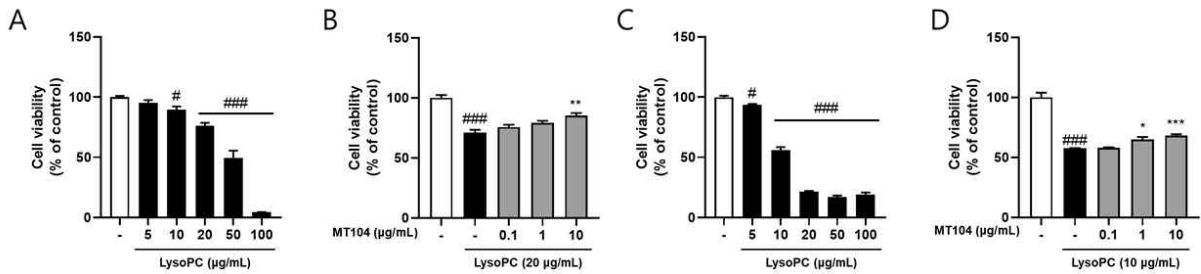
② VIP 값을 기반으로 선택된 6개 대사체와 행동 수행 및 조직학적 특징을 포함하는 알츠하이머병 신경병리학적 지표 간의 상관관계를 분석한 결과, glutamine, PS(22:6) 및 lysoPC(18:3)는 기억력 및 시냅스 단백질 발현과 양의 상관관계가 있으며, p-tau 및 gliosis 마커 단백질 발현과 음의 상관관계를 보였음. 반면, lysoPC(18:0), lysoPE(18:0), lysoPE(O-18:1)는 상기 대사체와 반대의 경향을 보였음. 이를 통해, MT104 투여 시 나타난 대사체 변화가 MT104에 의한 알츠하이머병 개선 결과와 밀접하게 관련됨을 확인하였음



[5xFAD 마우스 해마에서의 대사체 변화와 알츠하이머병 신경병리학적 지표의 상관성 분석]

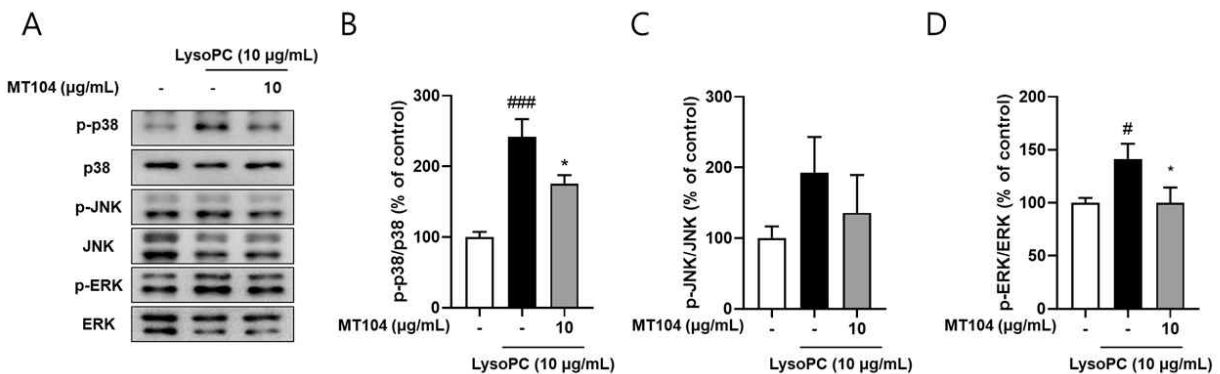
(라) 비정상 지질 대사 유도 신경 독성에 대한 신경 세포 보호 효능 평가

① 비정상 지질 대사를 유도하는 lysoPC의 신경 독성 평가와 lysoPC 독성에 대하여 MT104의 신경세포 보호 효능을 평가하였음. HT22 해마 세포에서 lysoPC 처리 시 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 75% 독성을 나타냈으며, MT104 처리 시 lysoPC 독성에 대한 세포 보호 효과를 나타냄. 일차 배양 신경세포(primary cultured neuron)에서 lysoPC 독성 처리 시 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 50% 독성을 나타냈으며, MT104 처리 시 lysoPC 독성에 대해 농도 의존적인 신경세포 보호 효과를 보임



[HT22 해마세포와 일차 배양 신경세포(primary cultured neuron)에서 lysoPC의 독성 조건 확립 및 MT104 처리 시 세포 보호 효과 측정. (A), (B) HT22 해마 세포, (C), (D) 일차 배양 신경세포(primary cultured neuron)]

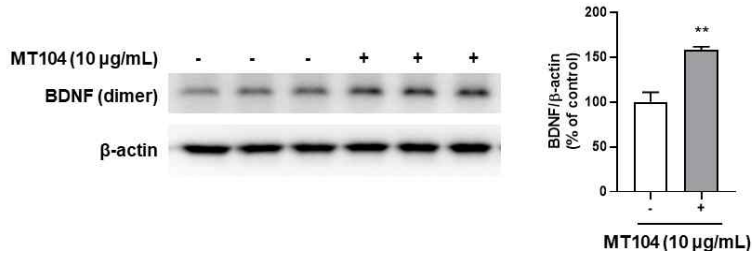
② 일차 배양 신경세포(primary cultured neuron)에서 lysoPC로 인한 MAPK pathway의 활성화 억제 효능을 평가하기 위해 p38, JNK, ERK의 인산화를 분석한 결과, lysoPC 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 의해 인산화가 증가했으며 MT104를 처리했을 때 p38과 ERK의 인산화가 유의하게 감소함



[일차 배양 신경세포(primary cultured neuron)에서 lysoPC 유도 MAPK pathway 활성화에 대한 MT104의 억제 효능]

(마) 장 조절 인자 유도 효능 평가

① 대장암세포주인 caco-2 세포에 MT104를 처리하여 장 조절 인자 변화 여부를 확인하였음. 장 환경에서 밀착결합 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 BDNF의 발현을 확인한 결과, MT104 처리에 의해 발현이 증가하는 것이 확인되었음

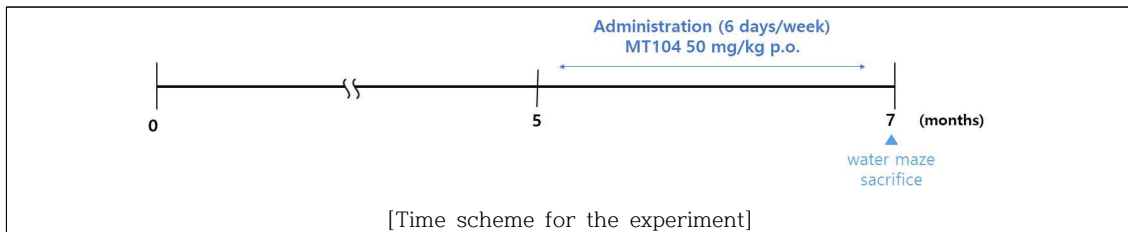


[대장암세포주(Caco-2)에 MT104 처리 시 BDNF 발현 변화]

(2) 비정상적 타우 축적 유도 기억 감퇴 모델에서 MT104의 기억 개선 효능 평가 및 약리 기전 분석

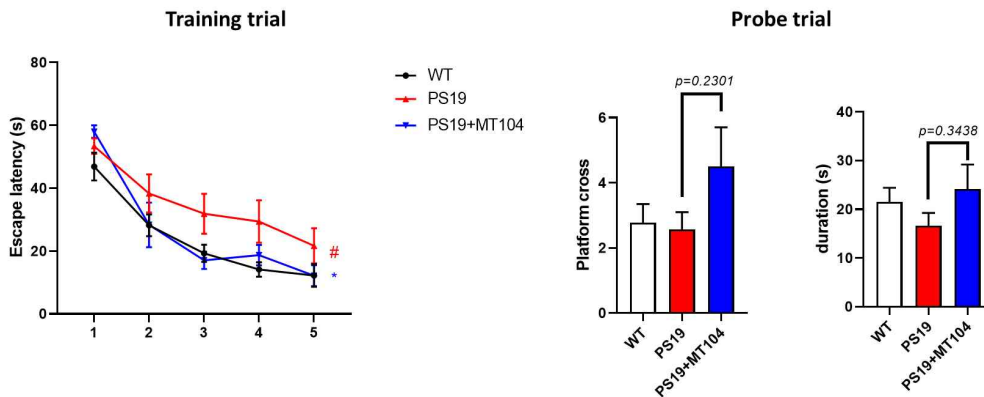
(가) 비정상적 타우 축적 유도 기억 감퇴 모델 구축 및 MT104 투여

- ① 유전자 조작에 의해 뇌 내에 타우 단백질이 과량 축적되는 쥐 모델인 PS19 형질전환 쥐에 MT104를 투여하여 타우병증 개선 효과를 평가하고자 하였음. 5개월령 wild-type (WT) 및 PS19 쥐에 2개월간 MT104를 경구로 투여하여 생후 7개월이 되는 시기에 Morris water maze를 이용하여 행동 변화를 측정하고, 치사 후 뇌 조직을 분석하였음



(나) 기억력 개선 효능 평가

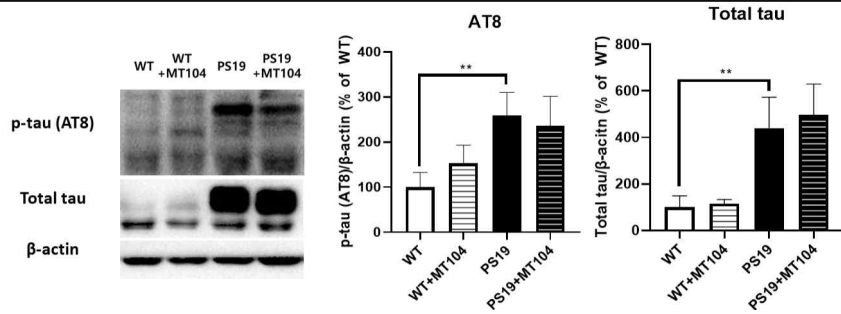
- ① 타우병증에 의해 나타나는 기억 감퇴에 대한 MT104의 개선 효능을 평가하기 위해 Morris water maze를 이용하여 행동 변화를 측정한 결과, MT104 투여군에서 PS19군 대비 기억력 개선 경향을 나타냄



[PS19 마우스에 MT104 투여 시 행동 변화]

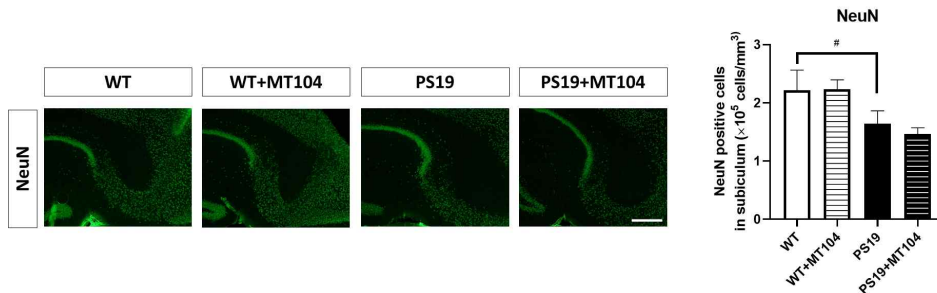
(다) 타우 인산화 및 신경세포사멸에 대한 영향 분석

- ① Tau 축적 및 tau의 과인산화(hyperphosphorylation)을 억제하여 tau pathology와 관련되는 신경세포 사멸 등을 억제할 수 있는지 확인하고자 조직분석을 진행함. 해마 (Hippocampus)에서 AT8 antibody로 검출되는 phosphorylated tau를 β-actin 대비로 분석 시 WT군 대비 PS19군에서 유의하게 증가하였으나, MT104 투여 시 PS19군 대비 차이를 보이지 않음. Tau의 전체적인 양 차이를 확인하기 위해 total tau를 β-actin 대비로 분석 시 WT군 대비 PS19군에서 유의하게 증가하였으나, MT104 투여 시 PS19군 대비 차이를 보이지 않음



[PS19 마우스 타우 축적 및 과인산화에 대한 MT104의 영향]

② 축적된 tau로 인한 신경세포 사멸에 대한 개선 여부를 확인하기 위해 실험을 진행함. 해마의 자실체형균사층(Subiculum) 부위에서 Neuronal marker인 NeuN을 확인했을 때 WT군 대비 PS19군에서 감소하였으며 MT104 투여군에서는 PS19군 대비 차이를 보이지 않음



[PS19 마우스 해마 신경세포 사멸에 대한 MT104의 영향; scale bar=200 μ m]

하) 식품 개발 후보 제품의 인지/기억기능 강화 효능 및 신경정신질환 개선 유효성 검증

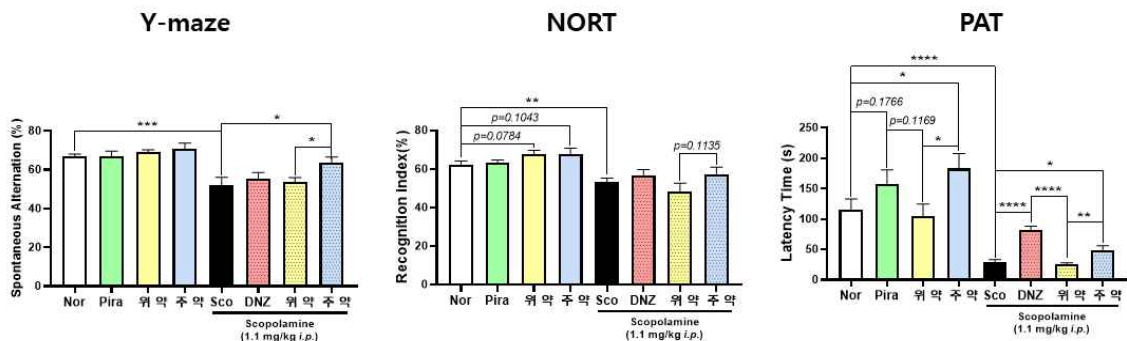
(1) 정상 쥐에 대한 기억력 향상 및 Scopolamine 유발 쥐의 기억 감퇴에 대한 개선 효능 평가

(가) 공정을 통해 생산된 식품 후보 제품 (인체적용시험용 시료)의 유효성 검증을 위해 제품을 1세부로부터 제공받아 기억력 향상 및 기억 감퇴 개선 효능을 평가하였음

(나) Y-maze 결과, Scopolamine 투여 시 유도된 단기 기억 손상을 주약 100 mg/kg 투여했을 때 개선하는 효과를 보임

(다) NORT 결과, 정상 쥐에 주약 100 mg/kg 투여 시 장기 기억력 및 인지력 강화 경향을 보였으며, scopolamine으로 유도된 기억력 및 인지력 저하에 대해 주약 100 mg/kg 투여 시 개선 경향이 나타남

(라) PAT 결과, 정상 쥐에 주약 100 mg/kg 투여 시 위약(placebo)군 대비 공포/장기 기억력이 강화되는 효과가 확인되었음. 또한, Scopolamine 투여에 의한 공포 및 장기 기억력 감퇴가 주약 100 mg/kg 투여 시 유의하게 개선됨



[MT104(후보 제품)의 정상 쥐에 대한 기억력 향상 효능 및 scopolamine 유도 기억감퇴 쥐모델에서 기억감퇴 개선 효능 검증 결과. Piractam: 기억력 향상에 대한 양성대조군, DNZ: scopolamine 유도 기억감퇴 개선에 대한 양성대조군]

<주요 성과 요약>

- 1) 신경정신질환 관련 내인성 대사체(brain, feces, serum 등) 기반 특이 마커 분석법 최적화 확립 및 대사경로 분석
- 2) 장내균총 유래 미생물의 신경정신질환 관련 총 47종의 차이나는 대사체 분석 및 마커 발굴
- 3) ADHD 마우스 대비 HX106 투여 마우스 샘플 (혈장, 간, 대장, 분변)의 차이나는 대사체 6종 확인을 통한 바이오마커 제시
- 4) 5XFAD 알츠하이머 마우스 대비 MT104 투여 마우스 뇌조직의 차이나는 대사체 19종 확인을 통한 바이오마커 제시
- 5) 대사체학 기반 다변량 통계분석을 통한 인지기능 개선 신바이오텍스 소재 MT104의 품질 관리 지표 확보 및 생체 내 기전 규명
- 6) 장관 유래 미생물에 의한 우울증 및 효능 관련 대사체 변화 확인

가) 인지기능 개선 소재 품질관리 지표설정

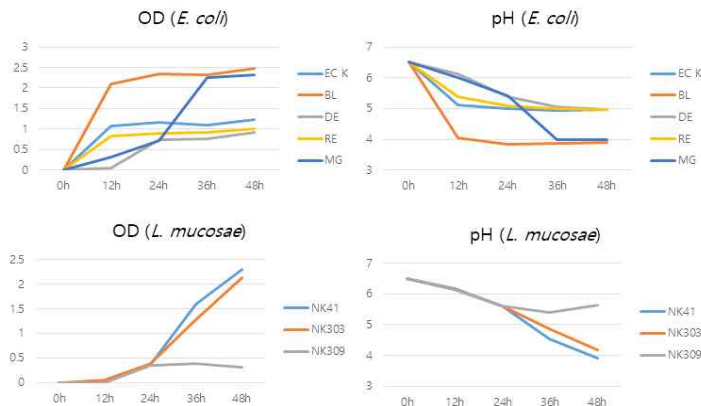
(1) 인지 기능 개선 관련 소재의 대사체 분석법 확립 및 다변량 통계분석

(가) 인지기능 장애 유발 및 개선 균주의 세포 내 대사 기전 규명

- ① 인지기능 장애를 일으키는 E. coli 및 산업 균주로 이용되는 E. coli의 내인성 대사를 비교함으로써, 인지기능 장애 유발 관련 내인성 대사 메커니즘을 규명하고, 장애를 개선시키는 유산균 및 비개선 균주간의 내인성 대사 비교에 따른 인지기능 장애 유발 및 개선 관련 내인성 대사 메커니즘을 규명하고자 함.
- ② 실험에 사용된 균주는 총 8종으로, E. coli 5 종과 Lactobacillus mucosae 3 종임.
- ③ 배양조건은 MRS 배지를 이용하여, 37°C, 혐기 조건에서 12시간 간격으로 48시간 까지 샘플링을 진행하였음. 배양시간 별 OD 및 pH 측정을 통하여 성장 정도를 확인하였음.
- ④ E. coli 균주의 성장정도 비교결과, E. coli BL 및 인지기능 장애 유발 균주인 E. coli K 균주가 가장 빠르고 높은 성장 결과를 보였음. 다음은 E. coli MG, E. coli RE, E. coli DE 순으로 높은 성장률을 보임.
- ⑤ L. mucosae의 경우, 인지기능 장애 개선 균주인 NK41과 NK303이 NK309 균주에 비해 높은 성장률을 보임.

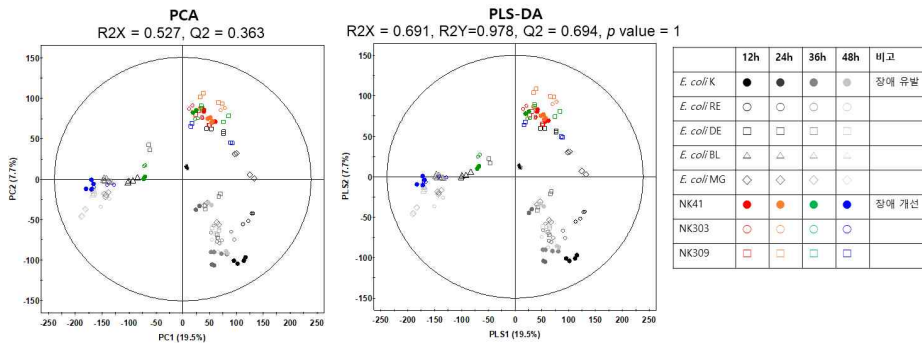
[인지기능 장애 유발 및 개선 균주 리스트]

Strain	Genus & Species	비고
EC K	<i>Escherichia coli</i>	인지기능 장애 유발
RE	<i>Escherichia coli</i>	표준 산업 균주
BL	<i>Escherichia coli</i>	표준 산업 균주
MG	<i>Escherichia coli</i>	표준 산업 균주
DE	<i>Escherichia coli</i>	표준 산업 균주
NK41	<i>Lactobacillus mucosae</i>	인지기능 장애 개선
NK303	<i>Lactobacillus mucosae</i>	인지기능 장애 개선 X
NK309	<i>Lactobacillus mucosae</i>	인지기능 장애 개선 X



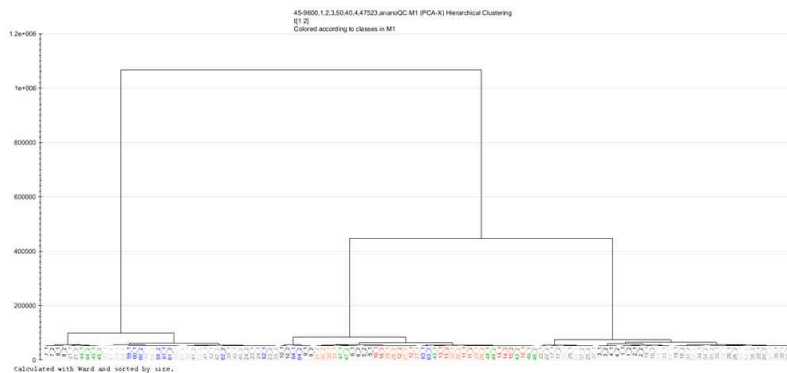
[인지기능 장애 유발 및 개선 균주의 OD 및 pH 측정결과]

- ⑥ 인지기능 장애 유발 및 개선 균주의 내인성 대사체 프로파일링을 위하여 GC-TOF-MS 및 다변량 통계분석을 실시하였음. 먼저 quality control 시료 분석 결과를 통하여 기기 분석 및 추출간의 문제가 없음을 확인하였음.
- ⑦ 인지기능 장애 유발 5 균주 및 개선 균주 3종의 PCA 및 PLS-DA 분석결과, 전반적으로 E. coli 와 L. mucosae로 나뉘는 경향이 확인됨. 그 중 E. coli는 종 및 배양 시간에 따른 차이를 보임.



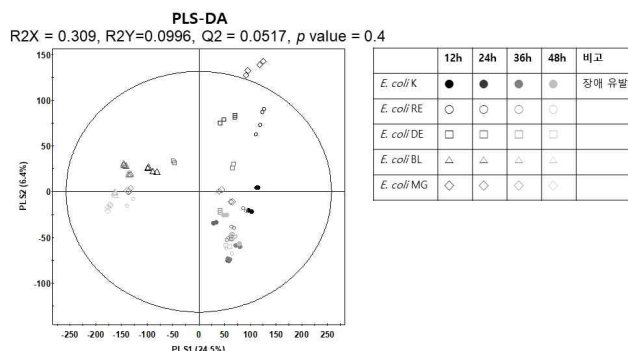
[GC-TOF-MS 분석을 통한 인지기능 장애 유발 및 개선 균주 전체 PCA 및 PLS-DA 결과]

- ⑧ PCA 분석 기반 계통분석 결과, E. coli 및 L. mucosae 간의 약간은 혼재되는 경향성을 보이거나 균주 간의 차이가 있음을 확인하였음.

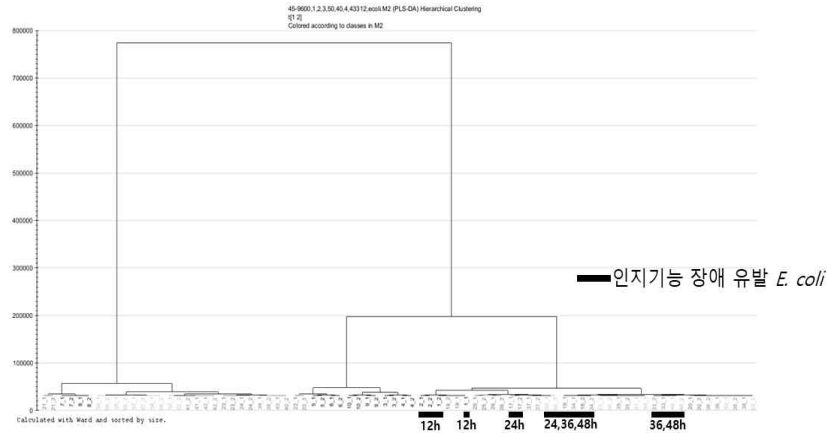


[GC-TOF-MS 분석을 통한 인지기능 장애 유발 및 개선 균주 전체 PCA 기반 계통 분석 결과]

- ⑨ 따라서, E. coli와 L. mucosae를 나누어서 다변량 통계분석을 통해 균주 내 내인성 대사의 차이를 확인하고자 함.
- ⑩ 먼저 E. coli 균주의 다변량 통계분석 결과, PLS-DA 상에서 인지기능 장애를 일으키는 E. coli K 균주가 다른 산업 균주와 약간 혼재되나 clustering을 이루고 있는 것을 확인함.
- ⑪ PLS-DA 기반의 계통 분석 결과, 인지기능 장애를 유발하는 E. coli K 균주 가 마찬가지로 어느 정도 clustering을 형성하고 있음.

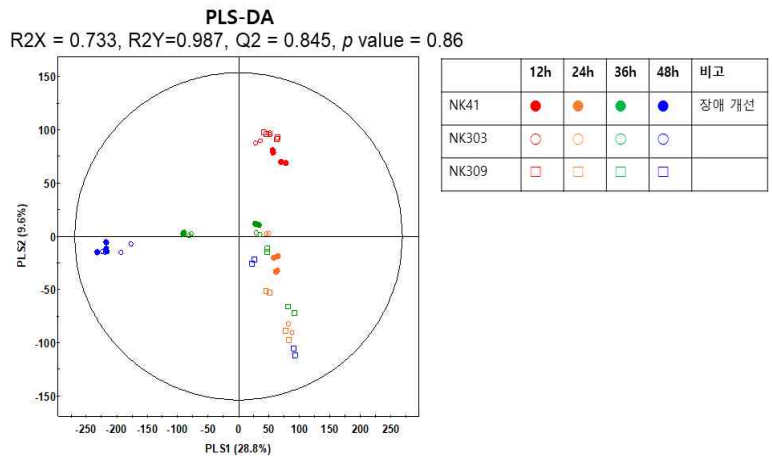


[GC-TOF-MS 분석을 통한 인지기능 장애 유발 균주 및 산업 균주 E. coli 간 PLS-DA 분석 결과]

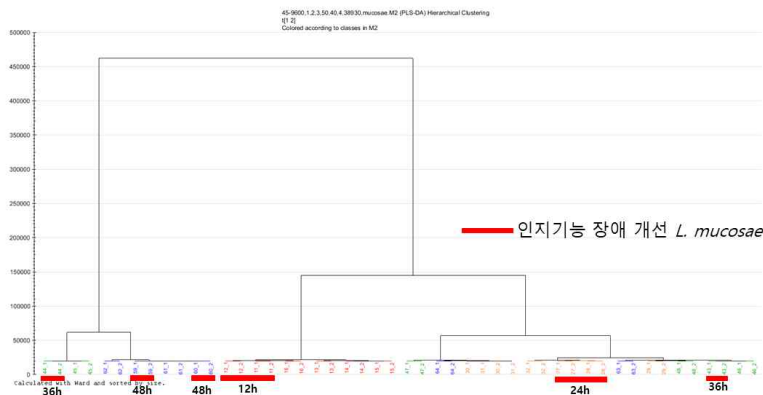


[GC-TOF-MS 분석을 통한 인지기능 장애 유발 균주 및 산업 균주 *E. coli* 간 PLS-DA 기반 계통 분석 결과]

- ⑫ 인지기능 장애 개선 균주 및 비 개선 균주인 *L. mucosae* 간의 내인성 대사 차이를 보기 위하여 다변량 통계분석을 통한 PLS-DA 모델을 구축하였음.
- ⑬ PLS-DA 분석결과, 균주 별 차이보다는 배양 시간에 따른 내인성 대사의 차이를 보임.
- ⑭ 또한, PLS-DA 기반 계통분석에서도 비슷한 경향을 보임.
- ⑮ 추후 인지기능 장애 유발 균주 및 산업균주, 인지기능 장애 개선 균주 및 비개선 균주 간 차이나는 대사체 동정 및 대사경로 분석, 상관관계 분석을 통한 총체적 해석으로 인지기능 장애 및 개선 조절 미생물 연구의 실마리를 제공하고자 함.



[GC-TOF-MS 분석을 통한 인지기능 장애 개선 균주 및 비개선 균주 *L. mucosae* 간 PLS-DA 분석 결과]

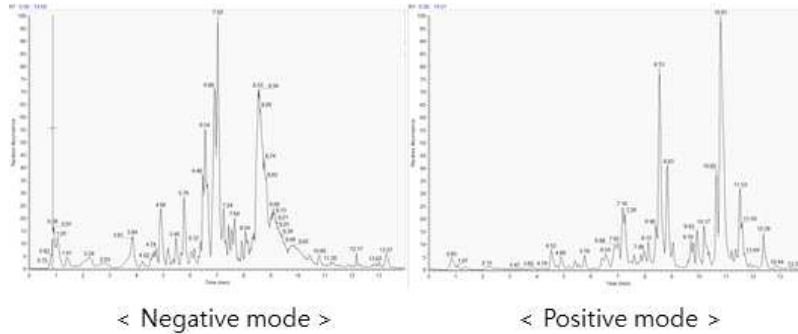


[GC-TOF-MS 분석을 통한 인지기능 장애 개선 균주 및 비개선 균주 *L. mucosae* 간 PLS-DA 기반 계통]

(2) 신바이오틱스 관련 소재의 대사체 추출법 확립 및 대사체 프로파일링

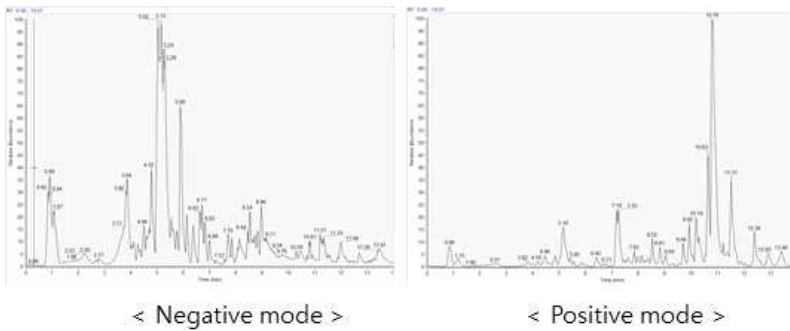
(가) 인지기능 개선 효능이 우수한 후보 소재(실새삼, 새삼, 싸리, HX106) 대사체 프로파일링함

- ① UHPLC-LTQ-Orbitra-MS/MS 분석 후 다음과 같은 크로마토그램을 각각 얻음
- ② 실새삼 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램



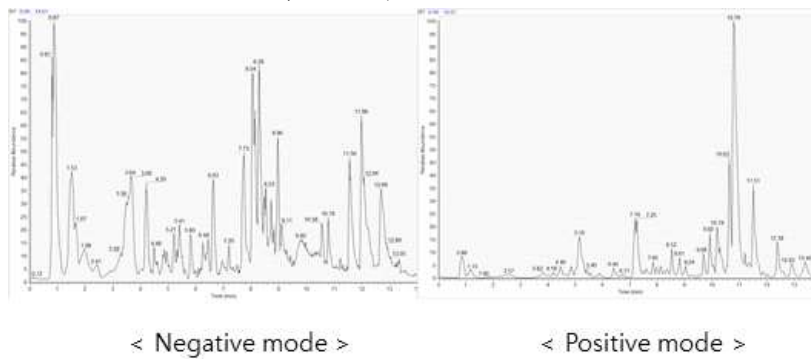
[실새삼 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램]

- ③ 새삼 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램



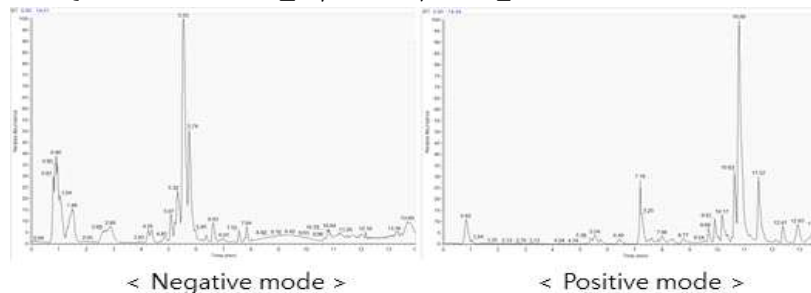
[새삼 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램]

- ④ 싸리 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램



[싸리 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램]

- ⑤ HX106 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램



[HX106 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석 크로마토그램]

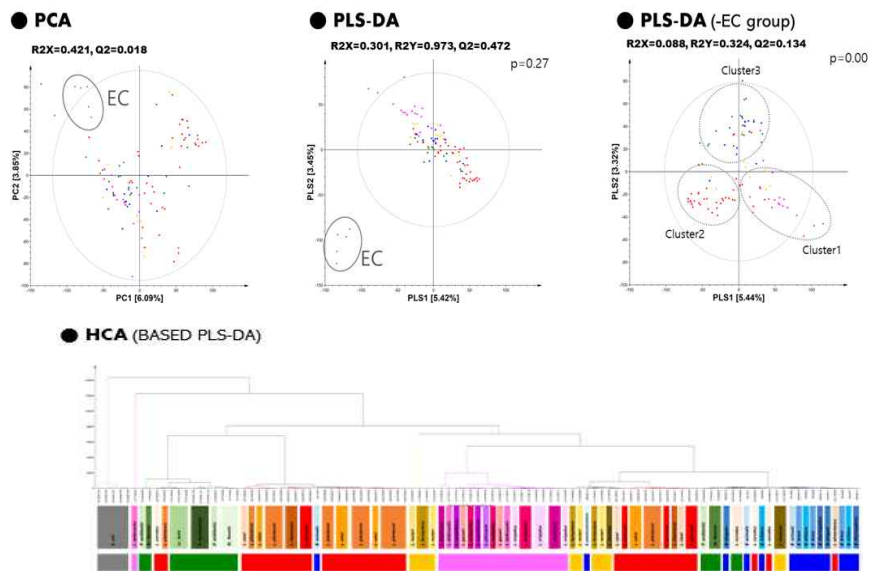
(3) 인지기능 개선 관련 지표물질 발굴을 위한 프로바이오틱스 후보 균주의

UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 기반 대사체 프로파일링

(가) 인지기능 개선 효능 유산균을 포함한 106종 유산균의 호기·혐기 환경별

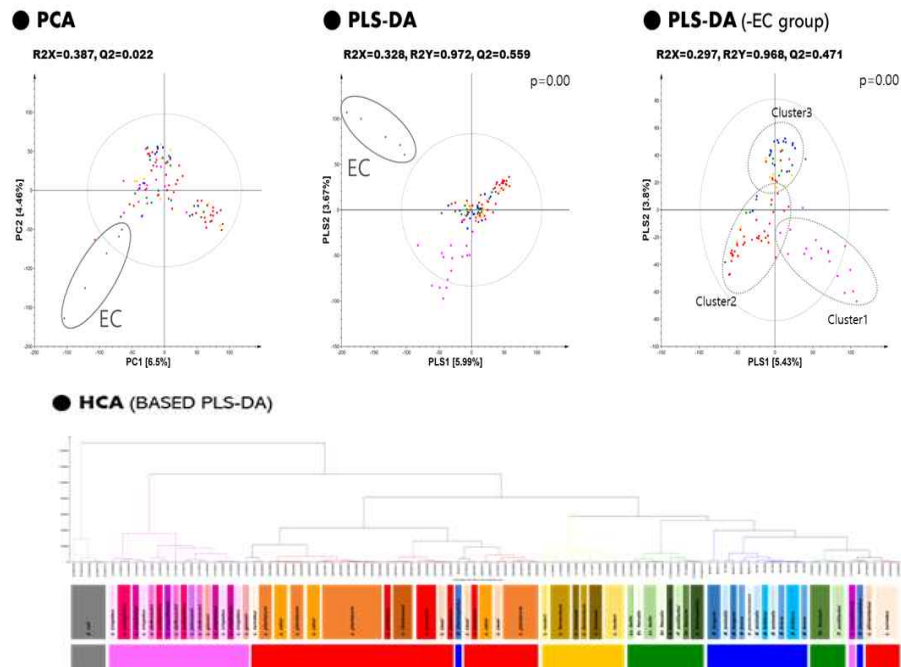
UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 기반 대사체 프로파일링

- ① Probiotics로 이용되는 균주에는 Lactobacillus, Bifidobacterium 등 여러 genes가 포함되어 있고, 산업적으로 호기 혹은 혐기 배양으로 이루어지고 있음. 따라서 6가지 subgroup에 속하는 106종의 균주를 호기·혐기배양 한 후 내인성 대사체 프로파일링을 수행함으로써 유산균에 주로 이용되는 genes level의 subgroup에 대한 주요 대사지표를 알아보고자 함
- ② 배양한 106종 유산균의 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 분석 데이터를 이용하여 다변량 통계분석(PCA, PLS-DA, HCA)을 수행함
- ③ 각 subgroup간의 차이는 대사체를 알아보기 위해서 5개의 subgroup에 대한 PLS-DA 기반으로 VIP (Variable Importance in the Projection) score 0.7이상인 유의성 있는 변수를 추출한 후, Retention time, m/z, MS/MS fragment를 in house library, standard, online 등과 비교하여 tentative identification 한 후, 선정된 대사체에 대하여 그룹간의 대사체 함량차이를 비교하고자 전체 평균에 각 수치를 fold change로 visualization 하였음
- ④ 호기배양한 균주의 분석 데이터 다변량 통계분석 결과, PCA, PLS-DA, HCA 모두 대조구인 EC가 probiotics 후보균과의 뚜렷한 구분을 보이거나 probiotics 그룹간은 혼재되는 경향을 보였음. EC를 제외한 PLS-DA 모델에서는 LA, LB&LC, OT&BI으로 세 개의 Cluster가 형성되었음



[호기 배양한 균주 내인성 대사체의 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 기기분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

- ⑤ 혐기배양한 균주의 분석 데이터 다변량 통계분석 결과, PCA에서 대조구인 EC가 probiotics 후보균과의 뚜렷한 구분을 보임. PLS-DA 상에서도 마찬가지로 EC 그룹과 나머지의 구분을 보이며, probiotics 그룹간에서 LA그룹이 구분되는 형상을 보였음. HCA 상에서 EC, LA, LB, LC&OT&BI로 네 개의 cluster를 보였으며, EC를 제외한 PLS-DA 모델에서도 마찬가지로 LA, LB, LC&OT&BI으로 세 개의 Cluster가 형성되었음

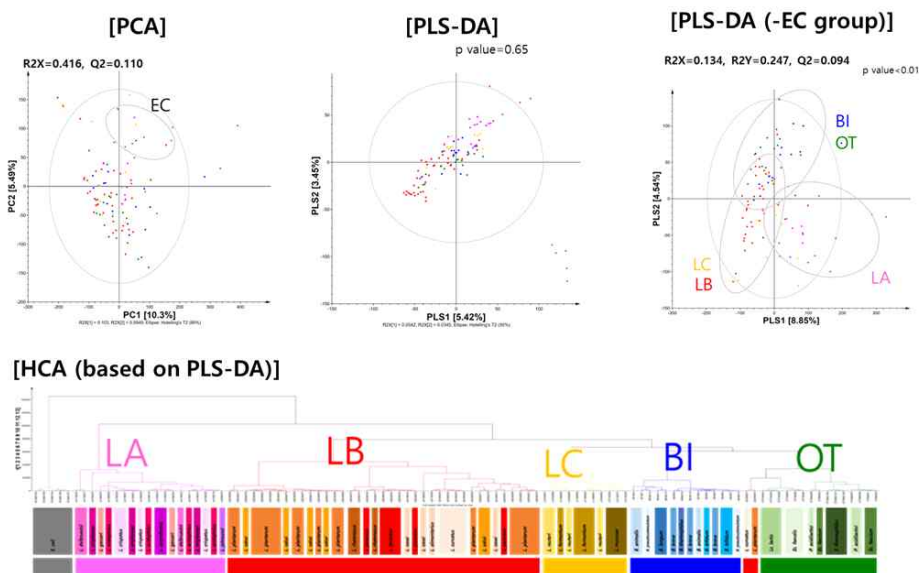


[혐기 배양한 균주 내인성 대사체의 UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 기기분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

(4) 인지기능 개선 관련 지표물질 발굴을 위한 프로바이오틱스 후보 균주의 GC-TOF-MS 기반 대사체 프로파일링

(가) 인지기능 개선 효능 유산균을 포함한 106종 유산균의 호기·혐기 환경별 GC-TOF-MS

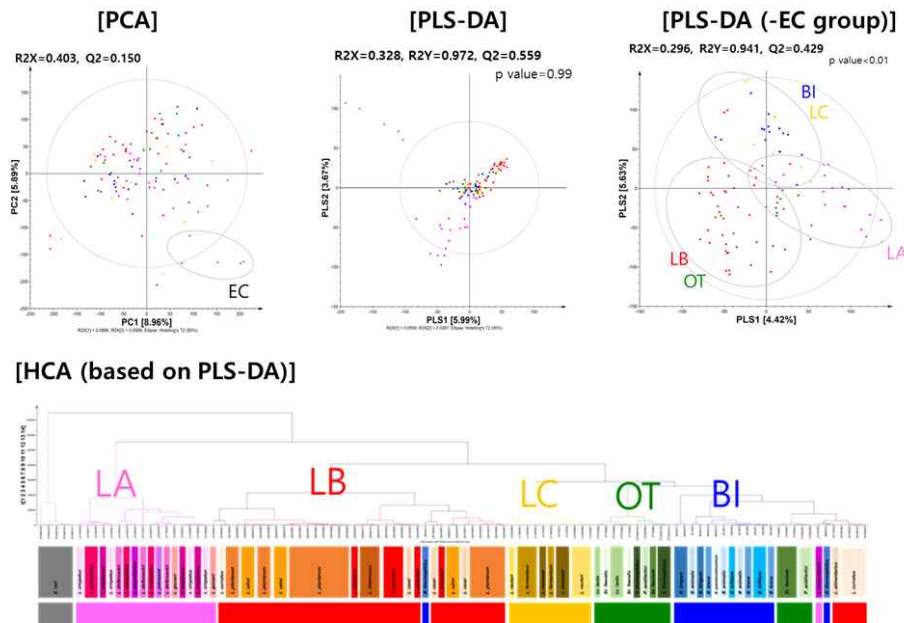
- ① Probiotics 관련 균주 106종에 대해서 호기, 혐기 환경에서 배양 후 내인성 대사체를 얻어 GC-TOF-MS 기기분석을 통해 결과를 얻고 다변량 통계분석(PCA, PLS-DA, HCA)을 수행함
- ② 호기 환경에서 배양한 균주의 분석 데이터 다변량 통계분석 결과, PCA, PLS-DA, HCA 모두 대조구인 EC가 probiotics 후보균과의 뚜렷한 구분을 보이거나 probiotics 그룹간은 혼재되는 경향을 보였음. EC를 제외한 PLS-DA 모델에서는 LA, LB&LC, OT&BI으로 세 개로 Cluster 되는 경향을 보임



[호기 배양한 균주 내인성 대사체의 GC-TOF-MS 기기분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

- ③ PLS-DA 모델의 VIP 수치를 기반으로 15 amino acids, 8 fatty acids, 15 carbohydrates, 5 organic acids, 6 pyrimidines & pyridines, 2 phenylpropanoids, 3 etc를 그룹 간의 차이 나는 대사체를 선정함

- ④ 선별한 대사체에 대한 함량비교 분석 결과, 아미노산, 당류 계열은 LA, BI, OT 그룹이 상대적으로 높은 함량을 보였음
- ⑤ 지방산 계열은 LA 그룹이 뚜렷하게 다른 그룹에 비해서 높은 함량을 보였고, 유기산은 Lactobacillus 인 LA, LB, LC 그룹이 BI, OT 그룹과 보다 높은 함량을 보였음
- ⑥ 방향족 아미노산의 대사산물로 나타나는 phenylpropanoids는 LC그룹에서 높은 함량을 보였고, pyrimidines 계열은 개별 물질마다 패턴이 상이하게 나타났음
- ⑦
- ⑧ 혐기 환경에서 배양한 균주의 분석 데이터 다변량 통계분석 결과, PCA에서 대조구인 EC가 probiotics 후보군과의 뚜렷한 구분을 보임. PLS-DA 상에서도 마찬가지로 EC 그룹과 나머지의 구분을 보이며, probiotics 그룹간에서 LA그룹이 구분되는 형상을 보였음. HCA 상에서 EC, LA, LB, LC&OT&BI로 네 개의 cluster를 보였으며, EC를 제외한 PLS-DA 모델에서도 마찬가지로 LA, LB&OT, LC&BI으로 세 개의 Cluster가 형성되었음

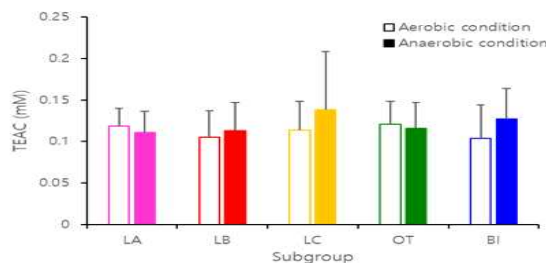


[혐기 배양한 균주 내인성 대사체의 GC-TOF-MS 기기분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

(5) 산화스트레스 감소를 위한 항산화 효능 후보 물질 선발

(가) 유산균 cell 대사체 추출물의 항산화 효능 및 대사체 간의 상관관계 분석

- ① 인지기능 저해와 관련이 있는 산화스트레스의 완화를 위해 유산균 cell 대사체의 ABTS assay를 이용해 항산화 효과를 측정하고 GC-TOF-MS, UHPLC-LTQ-Orbitra-MS 분석으로 얻은 대사체 정보를 바탕으로 correlation analysis을 진행하여 항산화 효과에 기여하는 대사체를 찾고자 함
- ② Subgroup간의 activity를 보면 호기 환경에서 OT>LA>LC>LB>BI순으로 높았으며, 혐기 환경에선 LC>BI>OT>LB>LA순으로 높았음. 또한 배양환경 간의 차이를 살펴보면 LA, OT는 호기 환경에서 활성이 더 높게 나타났으며, LB, LC, BI는 혐기 환경에서 활성이 더 높게 나타났음



[유산균 내인성 대사체 추출물의 배양 환경 및 Subgroup별 ABTS assay 결과]

나) 인지기능 개선 소재 활성 검증

(1) 천연물 및 유산균 후보소재들의 1차 효능평가

(가) MGO (Methglyoxal), GO (glyoxal)-AGEs (Advanced Glycation End Products) formation assay

<시료 정보>

[천연물 시료 (4종)]

번호	이름	시료 코드
1	어성초	S1808
2	건강	S1809
3	실새삼	S1810
4	종대항	S1811

[유산균 시료 (10종)]

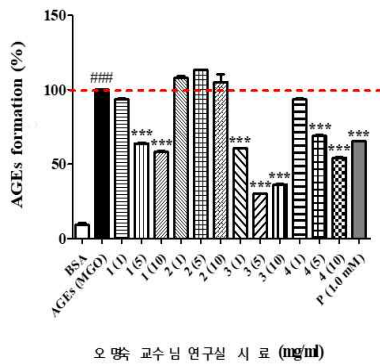
번호	이름	종
1	H92	Lactobacillus H92
2	Y4	Lactobacillus Y4
3	PH3	Lactobacillus PH3
4	Y5	Lactobacillus Y5
5	L1	Lactobacillus L1
6	L2	Pediococcus L2
7	L3	Enterococcus L3
8	BA1	Bifidobacterium BA1
9	BA3	Bifidobacterium BA3
10	Z1	Bifidobacterium Z1

[회사 시료]

번호	이름
1	HX106

<실험 결과>

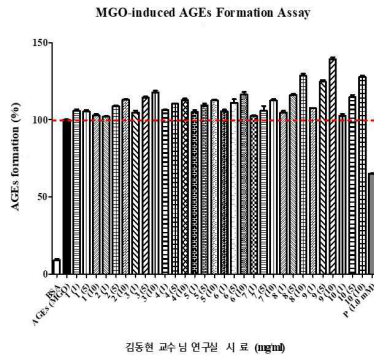
MGO-induced AGEs Formation Assay



오명숙 교수님 연구실 시료 (mg/ml)

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with BSA
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with AGEs

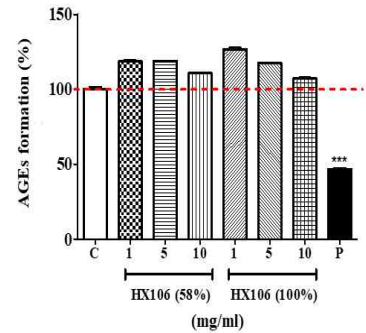
[MGO-induced AGEs Formation assay]



김동현 교수님 연구실 시료 (mg/ml)

[MGO-induced AGEs Formation assay]

MGO-induced AGEs Formation Assay



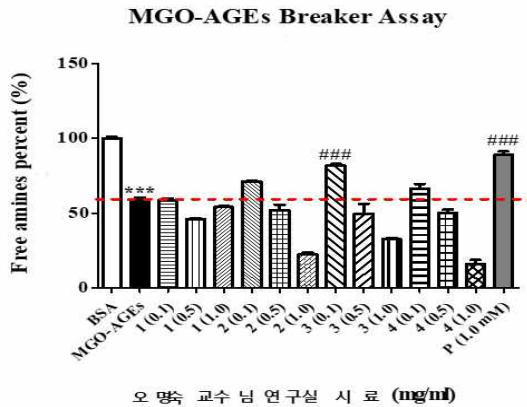
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with AGEs

[MGO-induced AGEs Formation assay]

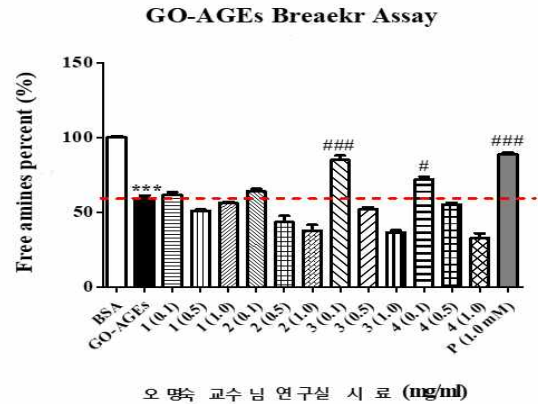
- ① 4종 추출물 시료를 MGO-induced AGEs 형성을 억제하는 영향을 분석하였을 때, 1 (어성초), 3 (실새삼), 4 (종대항) 3 가지 추출물이 유의적인 효과를 보였으며 3번 샘플의 경우 1 mg/ml에서도 큰 효과를 보였으며 더 낮은 농도로 확인해 볼 필요성이 있음.
- ② 10종의 추출물 시료를 MGO-induced AGEs 형성을 억제하는 영향을 분석하였을 때, AGEs 생성 억제 효과를 보이지는 않음.
- ③ HX106 시료를 MGO-induced AGEs 형성을 억제하는 영향을 분석하였을 때, AGEs 생성 억제 효과를 보이지는 않음.

(나) MGO (Methglyoxal), GO (glyoxal)-AGEs (Advanced Glycation End Products) breaker assay

<실험 결과>



오 명숙 교수님 연구실 시료 (mg/ml)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with BSA
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with AGEs

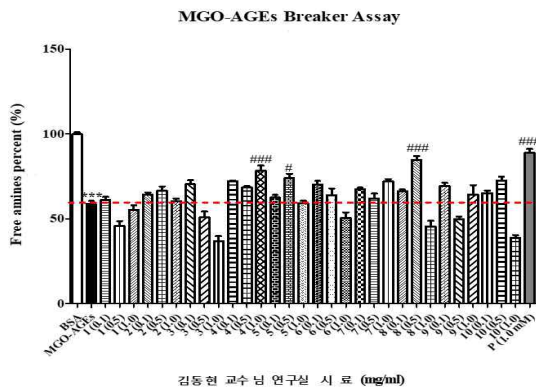


오 명숙 교수님 연구실 시료 (mg/ml)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with BSA
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with AGEs

[MGO-induced AGEs Formation assay]

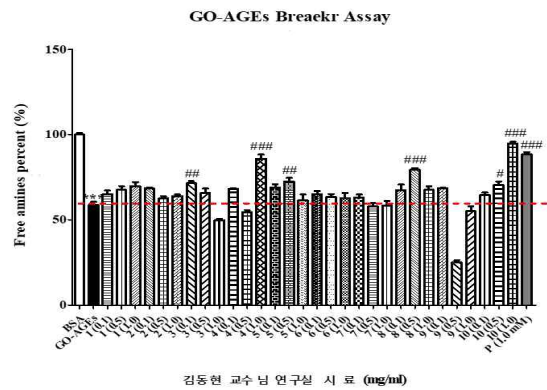
[MGO-induced AGEs Formation assay]

- ① 4종 추출 시료를 MGO-AGEs 파쇄 효과를 분석했을 때, 3번 샘플 (실새삼) 의 경우 유의적인 효과를 보였으며 0.1 mg/ml에서도 큰 효과를 보였으므로 더 낮은 농도로 확인해 볼 필요성이 있음. 한편, GO-AGEs 파쇄 효과를 분석했을 때, 3 (실새삼), 4번 (종대황) 샘플의 경우 유의적인 효과를 보였으며 3번 샘플의 경우는 0.1 mg/ml에서도 큰 효과를 보였으므로 더 낮은 농도로 확인해 볼 필요성이 있음.



김동현 교수님 연구실 시료 (mg/ml)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with BSA
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with AGEs

[MGO-AGEs Breaker Assay]

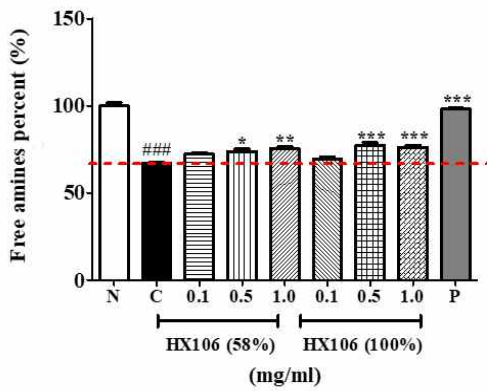


김동현 교수님 연구실 시료 (mg/ml)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with BSA
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with AGEs

[GO-AGEs Breaker Assay]

- ② 10종 추출물 시료를 MGO-AGEs 파쇄 효과를 분석했을 때, 4 · 5 · 8번 샘플의 경우 유의적인 효과를 보였으며 4번 샘플의 경우는 농도 의존적으로 효과를 보였음. 반면, GO-AGEs 파쇄 효과를 분석했을 때, 3 · 4 · 5 · 8 · 10번 샘플의 경우 유의적인 효과를 보였으며 10번의 경우 농도 의존적으로 효과를 보였으며 양성대조군 (Aminoguanidine 1 mM) 보다도 더 효과적으로 보였음.

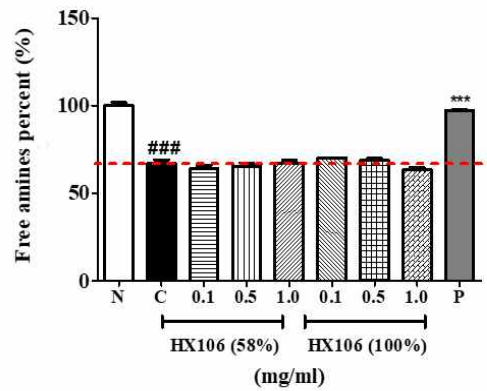
MGO-AGEs Breaker Assay



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$:
Compared with N (BSA)
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$:
Compared with C (AGEs)

[MGO-AGEs Breaker Assay]

GO-AGEs Breaker Assay



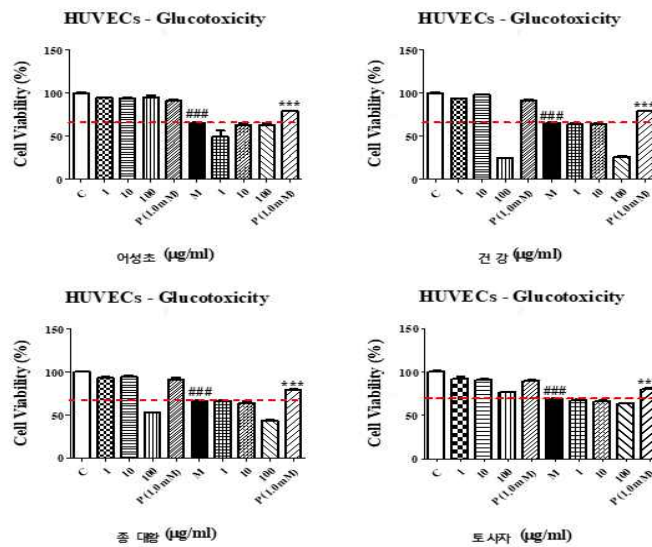
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$:
Compared with N (BSA)
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$:
Compared with C (AGEs)

[MGO-AGEs Breaker Assay]

③ 본 연구자는 HX106 시료를 처리했을 시에 MGO-AGEs 파쇄효과를 유의성 있게 보였음. 한편, GO-AGEs 파쇄 효과를 분석했을 때, 효과를 보이지 않음.

(다) 인간 제대정맥 혈관내피세포 (Human vein umbilical endothelial cells; HUVECs)에서 MGO에 대한 세포보호 효능 평가

<실험 결과>

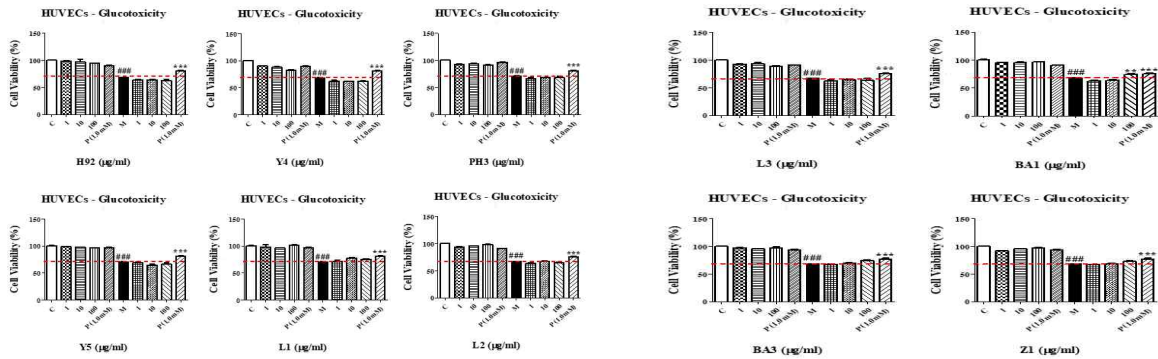


$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with Control (C)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with MGO (M)

[추출물 4종의 세포활성 평가]

① 4종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 효과를 보이지는 않았으며 건강 및 종대황의 샘플의 경우 독성을 보임.



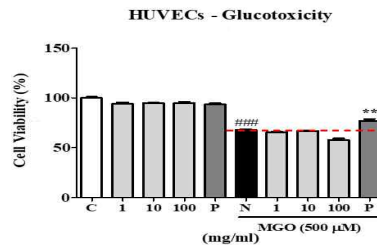
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with MGO (M)

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with MGO (M)

[추출물 6종의 세포활성 평가]

[추출물 4종의 세포활성 평가]

② 10종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, BA1 샘플의 경우 100 mg/ml 농도에서 유의성 있게 효과를 보임.



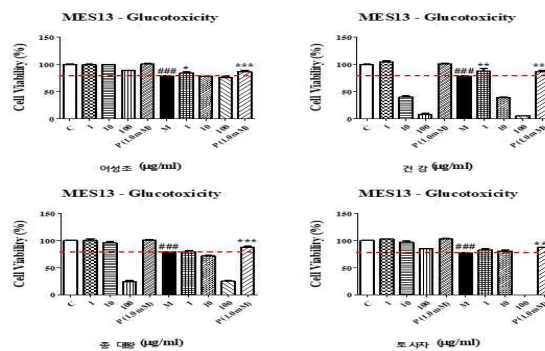
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with MGO (M)

[HX106 시료의 세포활성 평가]

③ HX106 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 효과 및 독성을 보이지는 않음.

(라) Mouse 유래 혈관간막세포 (mouse mesangial cell, SV40 MES 13)에서 MGO에 대한 세포보호 효능 평가

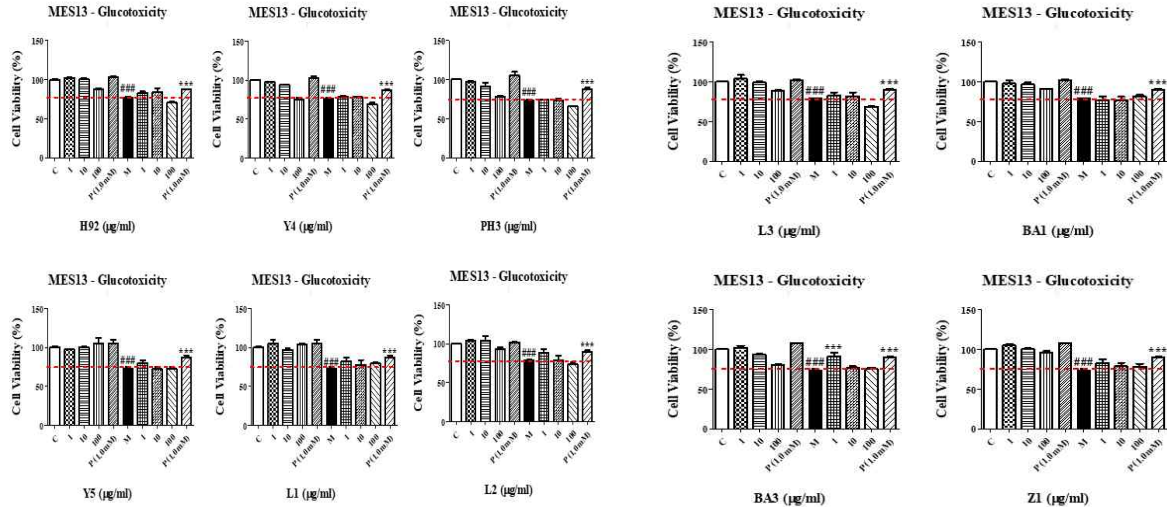
<실험 결과>



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with MGO (M)

[추출물 4종의 세포활성 평가]

① 4종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 효과를 보이지는 않았으며 건강 및 중대황의 샘플의 경우 독성을 보임.



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control (C)

P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with MGO (M)

[추출물 6종의 세포활성 평가]

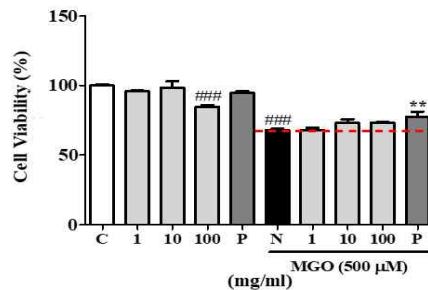
#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control (C)

P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with MGO (M)

[추출물 4종의 세포활성 평가]

- ② 본 연구자는 10종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 유의성 있게 효과를 나타내는 샘플이 없음.

MES13 - Glucotoxicity



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control (C)

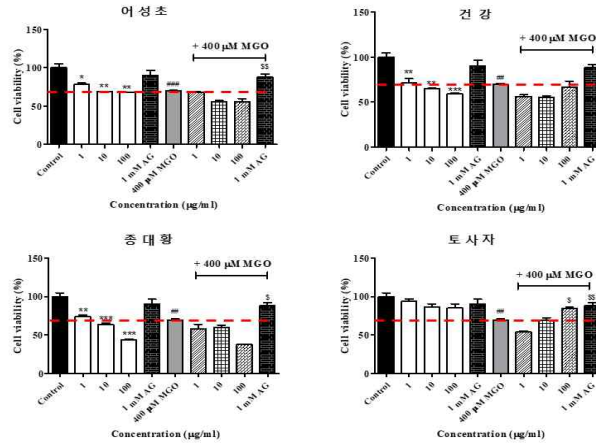
P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with MGO (M)

[HX106 시료의 세포활성 평가]

- ③ 본 연구자는 HX106 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 효과를 나타내지는 않았으며 100 mg/ml 농도에서 세포독성을 보임.

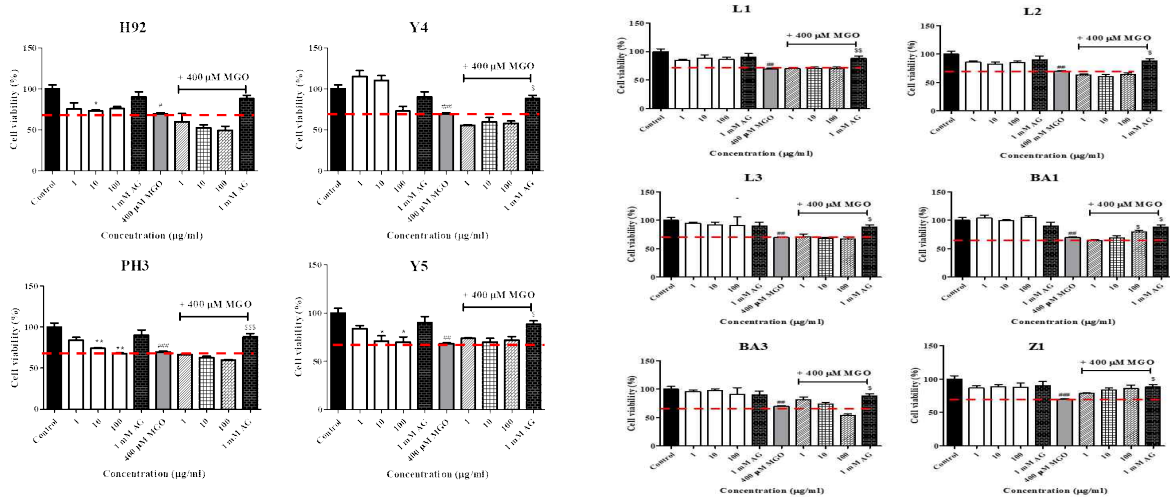
(마) N2a murine neuroblastoma cell (쥐 유래 신경 아세포종 세포)에서 MGO에 대한 세포보호 효능 평가

<실험 결과>



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [추출물 4종의 세포활성 평가]

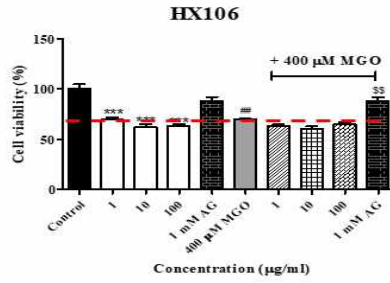
① 4종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 실새삼의 경우 100 ug/ml 농도에서 세포보호 효과를 보임.



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Y4 Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [추출물 4종의 세포활성 평가]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [추출물 10종의 세포활성 평가]

② 10종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, BA1 샘플의 경우 유의성 있게 효과를 보였으며 BA3, Z1의 경우도 효과를 나타냄.

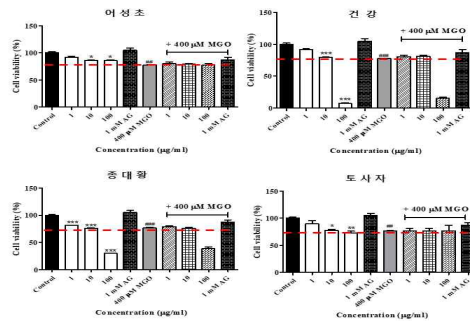


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [HX106 시료의 세포활성 평가]

③ 본 연구자는 HX106 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 효과를 나타내지 않았으며 세포독성을 보임.

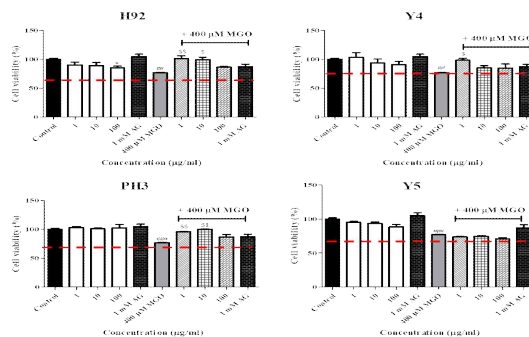
(바) SH-SY5Y Human Neuroblastoma cell (인간 유래 신경모세포종)에서 MGO에 대한 세포보호 효능 평가

<실험 결과>

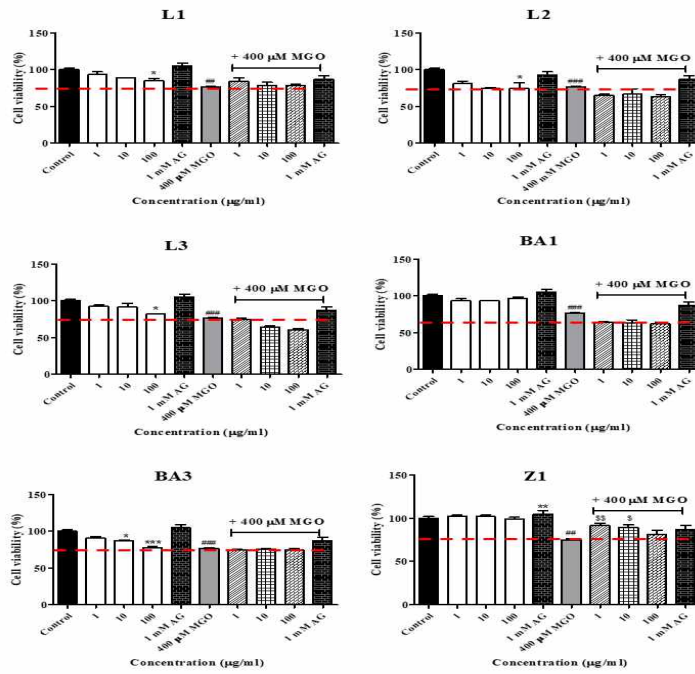


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [추출물 4종의 세포활성 평가]

① 4종 추출물 시료를 처리 시, MGO 보호효과를 보이지 않음.

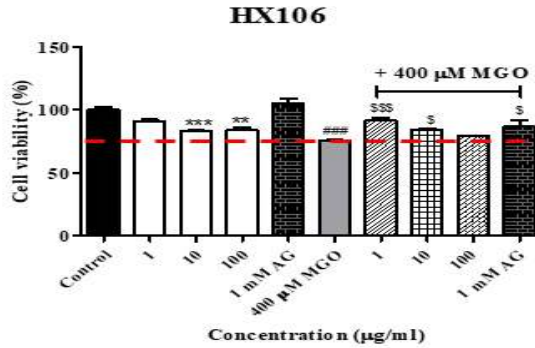


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [추출물 4종의 세포활성 평가]



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [추출물 6종의 세포활성 평가]

② 본 연구자는 10종 추출물 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, H92, Y4, PH3 및 Z1 샘플의 경우 유의성 있게 세포보호 효과를 보임.



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control (C)
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control (C) vs. MGO (M)
 \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ or \$\$\$ $P < 0.001$: Compared with MGO (M)
 [HX106 시료의 세포활성 평가]

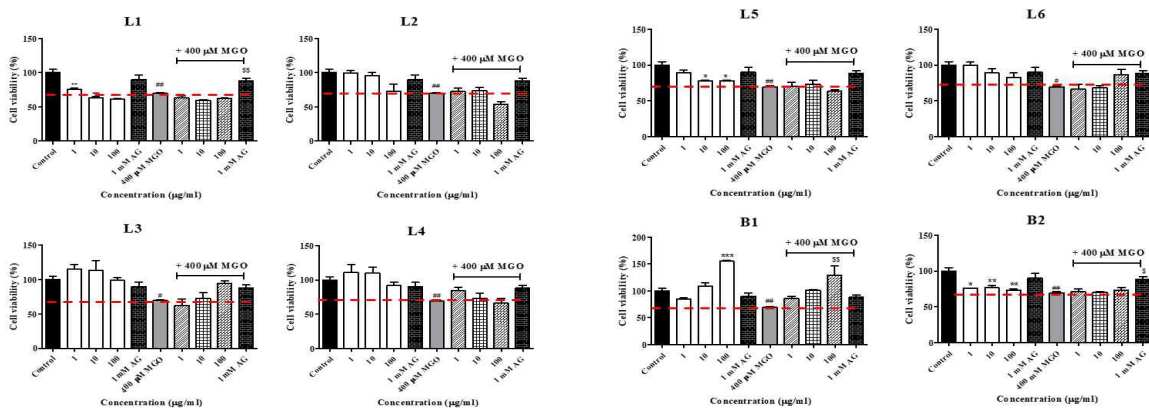
③ 본 연구자는 HX106 시료를 처리하여 MGO에 대한 세포보호 효과를 측정하였을 때, 유의성 있게 세포보호 효과를 보였지만 세포독성도 보임.

(사) N2a murine neuroblastoma cell (쥐 유래 신경 아세포종 세포)에서 MGO에 대한 세포보호 효능 평가

<시료 정보>

균주명	균수(cfu/g)	배양온도 및 조건	배양배지
Bifidobacteria animalis lactis B1	8.E+11	37°C, 혐기, 정치배양	BL broth 혹은 agar
Bifidobacteria longum B2	8.E+11	37°C, 혐기, 정치배양	BL broth 혹은 agar
Lactobacillus curvatus L1	3.E+11	34°C, 호기, 정치배양	MRS broth 혹은 agar
Lactobacillus plantarum L2	1.E+11	34°C, 호기, 정치배양	MRS broth 혹은 agar
Lactobacillus casei L3	3.E+11	37°C, 호기, 정치배양	MRS broth 혹은 agar
Lactobacillus plantarum L4	3.E+11	37°C, 호기, 정치배양	MRS broth 혹은 agar
Lactobacillus plantarum L5	1.E+12	34°C, 호기, 정치배양	MRS broth 혹은 agar
Lactobacillus plantarum L6	1.E+11	34°C, 호기, 정치배양	MRS broth 혹은 agar

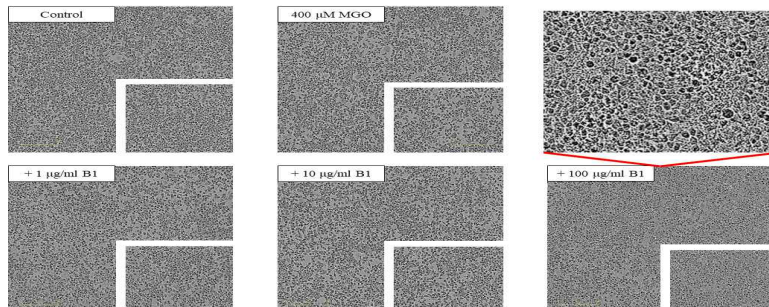
<실험 결과>



P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with Control (C)
 #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Control (C) vs. MGO (M)
 §*P* < 0.05, §§*P* < 0.01 or §§§*P* < 0.001 : Compared with MGO (M)
 [4종 시료의 세포활성 평가]

P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with Control (C)
 #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Control (C) vs. MGO (M)
 §*P* < 0.05, §§*P* < 0.01 or §§§*P* < 0.001 : Compared with MGO (M)
 [4종 시료의 세포활성 평가]

① 본 연구자는 한국야구르트 8종을 처리하여 세포활성을 평가하였지만 아래의 사진과 같이 활성을 평가하는데 영향을 주므로 정확한 비교가 어려움. 이러한 이유는 추출물이 아닌 살아있는 유산균이므로 세포 조건에서 비교가 불가하므로 새로운 배양 또는 추출법을 다시 고안해 실험계획을 세우고 진행해야 될 것으로 예상됨.



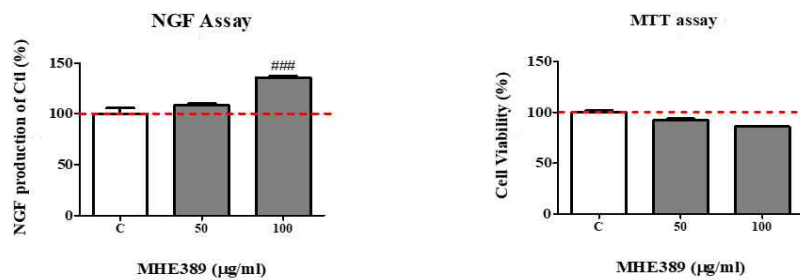
[한국야구르트 시료 처리 시 세포 images]

(2) 선발소재 (13종 후보소재)들의 효능 검증
 (가) C6 glioma 세포에서의 NGF 생성 및 세포 독성 평가

<시료정보 (13종)>

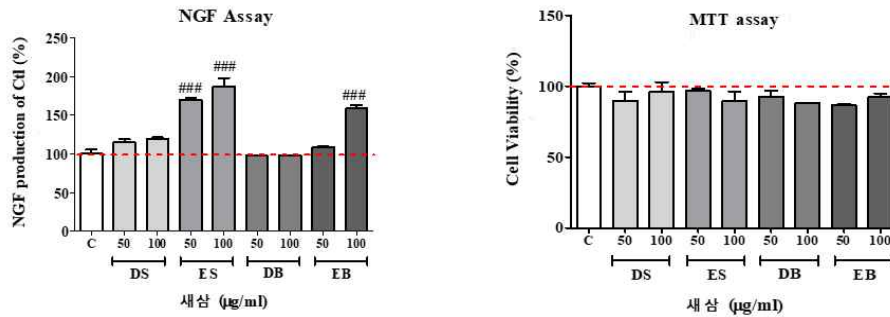
시료교련 일련번호	추출물 이름	추출물 코드	용량	원료	추출 방법	수득률
iPS1904	MHE389	MHE389	67.9	새삼 C. japonica	10x DW sonication 1h*3	16.0
iPS1905	토사자 DS	MHE470	50.6	토사자 C. chinensis	10x DW sonication 1h	5.0
iPS1906	토사자 ES	MHE471	35.4	토사자 C. chinensis	10x 20%EtOH sonication 1h*3	4.5
iPS1907	토사자 DB	MHE472	34.8	토사자 C. chinensis	10x DW boiling 2h	8.9
iPS1908	토사자 EB	MHE473	43.6	토사자 C. chinensis	10x 20%EtOH boiling 2h	5.6
iPS1909	토사자(주중) DS	MHE474	30.9	토사자(주중) C. chinensis	10x DW sonication 1h	5.9
iPS1910	토사자(주중) ES	MHE475	61.9	토사자(주중) C. chinensis	10x 20%EtOH sonication 1h	8.0
iPS1911	토사자(주중) DB	MHE476	64.0	토사자(주중) C. chinensis	10x DW boiling 2h	6.0
iPS1912	토사자(주중) EB	MHE477	38.0	토사자(주중) C. chinensis	10x 20%EtOH boiling 2h	6.1
iPS1913	새삼 DS	MHE478	38.0	새삼 C. japonica	10x DW sonication 1h	6.9
iPS1914	새삼 ES	MHE479	85.8	새삼 C. japonica	10x 20%EtOH boiling 1h	4.9
iPS1915	새삼 DB	MHE480	32.0	새삼 C. japonica	10x DW boiling 2h	6.6
iPS1916	새삼 EB	MHE481	32.3	새삼 C. japonica	10x 20%EtOH boiling 2h	5.2

<실험결과>



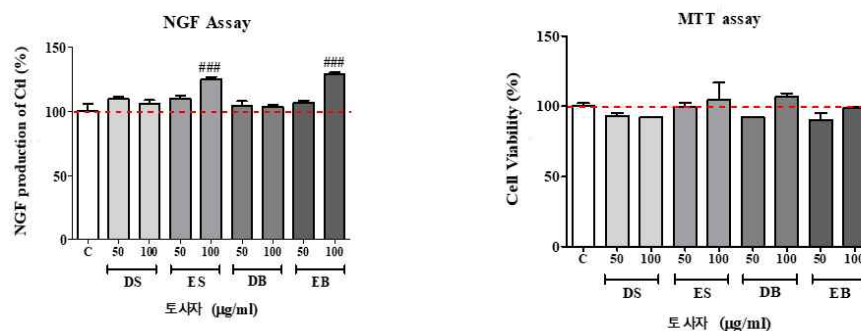
$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ or $^{***}P < 0.001$: Compared with Control group
 [MHE389소재의 NGF 및 MTT assay]

① NGF 생성을 MHE 389 추출물 (10X DW sonication 1 h*3) 100 ug/ml에서 유의적으로 증가시키는 것으로 보임.



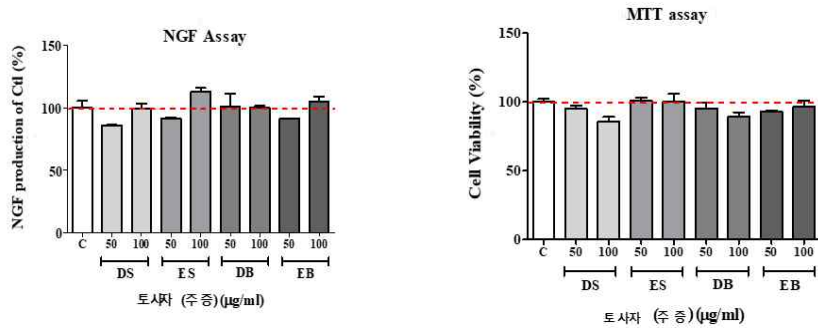
$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ or $^{***}P < 0.001$: Compared with Control group
 [새삼 추출물의 NGF 및 MTT assay]

② 새삼 ES (10X 20% EtOH sonication 1 h) 추출물의 경우 가장 효과적으로 나타났으며, EB (10X 20% EtOH boiling 2 h) 추출물 경우도 유의성 있게 큰 효과를 보임



$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ or $^{***}P < 0.001$: Compared with Control group

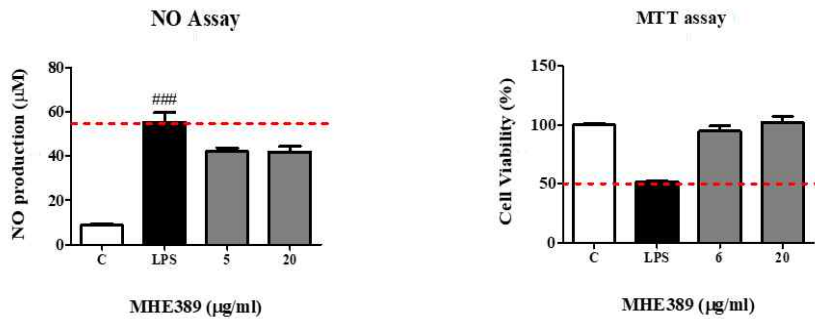
③ NGF 생성을 실새삼 ES (10X 20% EtOH sonication 1 h), EB (10X 20% EtOH boiling 2 h) 추출물의 경우 유의성 있게 증가시키는 것으로 나타남.



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
[실새삼 (주증) 추출물의 NGF 및 MTT assay]

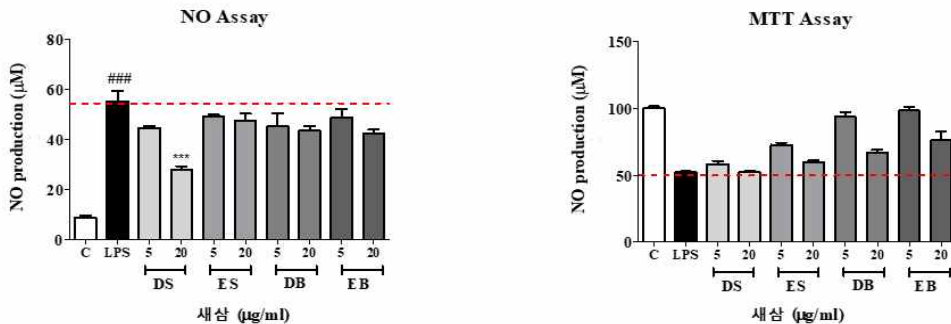
④ NGF 생성을 실새삼 (주증) 추출물에서는 효과를 나타내지 않았음.

(나) BV2 세포에서의 NO 억제능 및 세포독성평가



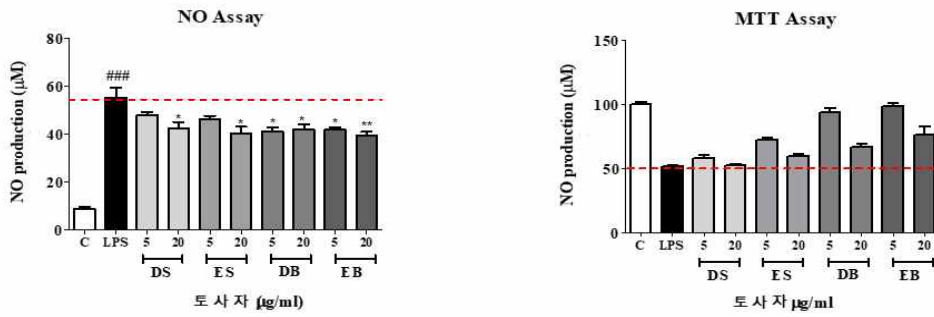
#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : LPS group v.s. Treated sample group
[MHE389 소재의 NO 및 MTT assay]

① MHE 389 추출물 (10X DW sonication 1 h*3)은 유의적이지 않으나, NO생성을 억제하였음.



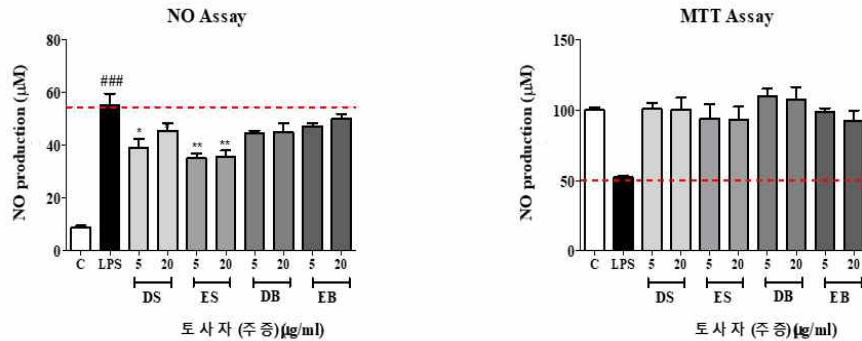
#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : LPS group v.s. Treated sample group
[새삼 소재의 NO 및 MTT assay]

② 새삼 DS (10X DW sonication 1 h) 추출물의 경우 가장 효과적으로 나타났음



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
 P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : LPS group *v.s.* Treated sample group
 [실새삼 소재의 NO 및 MTT assay]

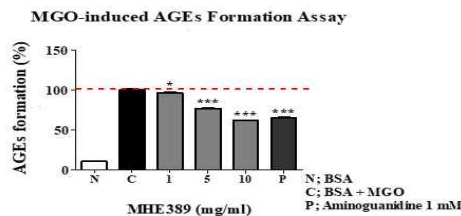
③ NO 생성을 모든 실새삼 시료 20 ug/ml에서 유의적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 특히, 실새삼 EB (10X 20% EtOH sonication 2 h)에서 우수한 활성을 나타내었음



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
 P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : LPS group *v.s.* Treated sample group
 [실새삼 (주증) 소재의 NO 및 MTT assay]

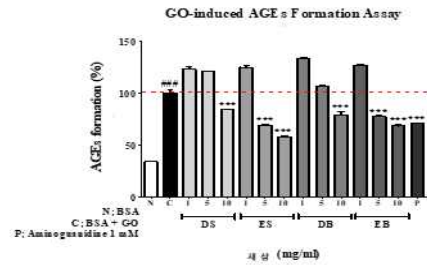
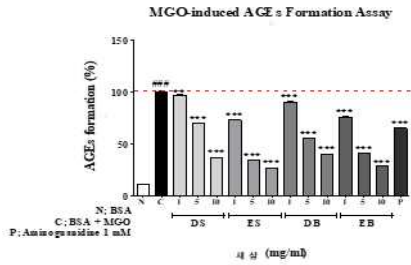
④ 실새삼 (주증) 추출물의 경우는 DS (10X sonication 1h) 과 ES(10X 20%EtOH boiling 1h)에서 유의적으로 억제하였음.

(다) 후보 소재들의 처리에 따른 MGO-, GO-AGEs formation assay



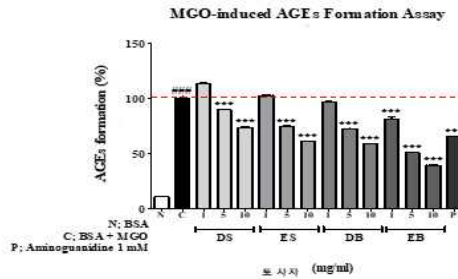
P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Control group *V.S.* Treated sample groups
 [MHE389소재의 MGO-,GO-AGEs formation assay]

① MGO-induced AGEs Formation assay 경우는 MHE389 샘플의 경우 억제 효과를 보이며, GO-induced AGEs Formation assay의 경우는 효과를 보이지 않음.



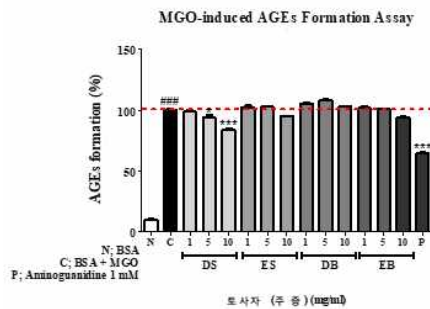
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Normal group *V.S.* BSA+MGO or BSA+GO group
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group *V.S.* Treated sample groups
 [새삼 소재의 MGO-,GO-AGEs formation assay]

- ② MGO-induced AGEs Formation assay 경우 전체적으로 효능을 보였으며 ES (10X 20%EtOH sonication 1 h), EB (10X 20%EtOH boiling 2h) 추출물에서 가장 큰 억제 효과를 보임.
- ③ GO-induced AGEs Formation assay의 경우 ES (10X 20%EtOH sonication 1 h), EB (10X 20%EtOH boiling 2h) 추출물에서 가장 큰 억제 효과를 보임.



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Normal group *V.S.* BSA+MGO or BSA+GO group
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group *V.S.* Treated sample groups
 [실새삼 소재의 MGO-,GO-AGEs formation assay]

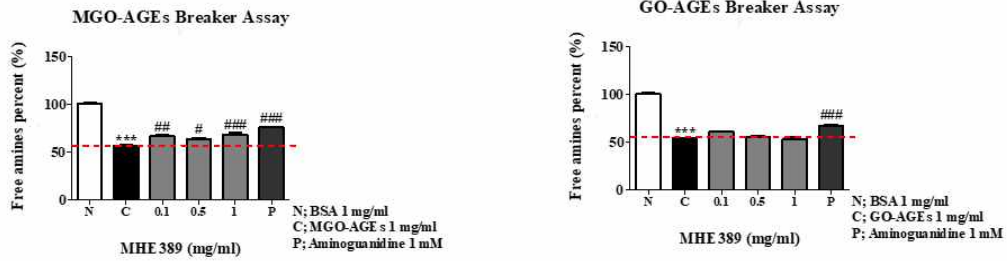
- ④ MGO-induced AGEs Formation assay 경우 전체적으로 효능을 보였음. 특히, EB (10X 20%EtOH boiling 2h) 추출물의 경우 가장 큰 억제 효과를 나타내었음. 반면, GO-induced AGEs Formation assay의 경우는 효과를 보이지 않음



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Normal group *V.S.* BSA+MGO or BSA+GO group
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group *V.S.* Treated sample groups
 [실새삼 (주증) 소재의 MGO-,GO-AGEs formation assay]

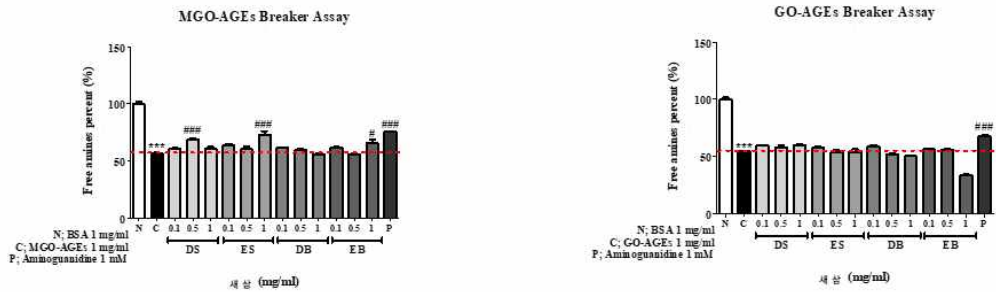
- ⑤ MGO-induced AGEs Formation assay 경우 큰 효능을 보이지 않았지만 DS (10X DW sonication 1h) 추출물의 경우 고농도에서 감소하는 경향을 보였으며, GO-induced AGEs Formation assay의 경우는 효과를 보이지 않음.

(라) 후보 소재들의 처리에 따른 MGO-, GO-AGEs breaker assay



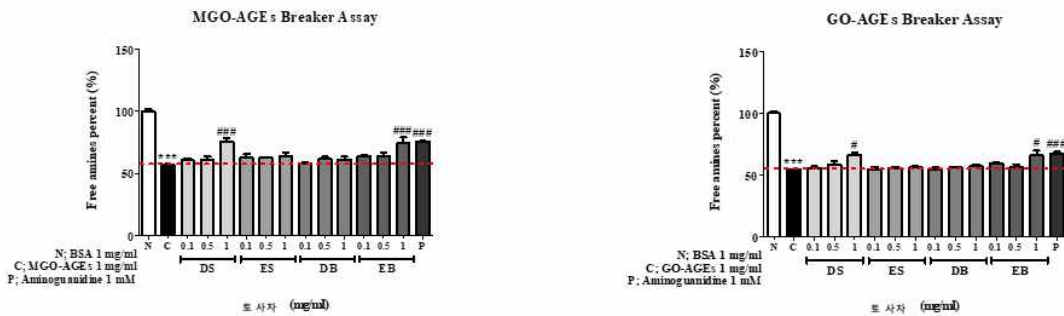
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Normal group V.S. BSA+MGO or BSA+GO group
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group V.S. Treated sample groups
 [MHE389 소재의 MGO-,GO-AGEs breaker assay]

① MGO-AGEs Breaker Assay 경우는 유의성 있게 효과를 보였으며, GO-AGEs Breaker Assay의 경우 파쇄 효과를 보였지만 유의성은 보이지 않음.



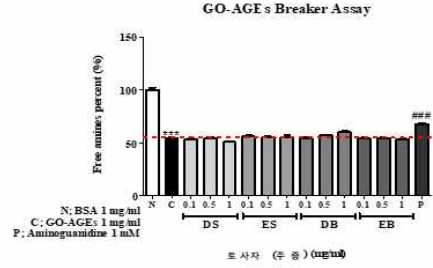
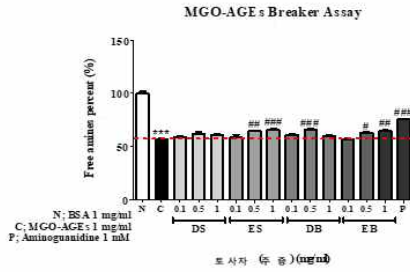
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Normal group V.S. BSA+MGO or BSA+GO group
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group V.S. Treated sample groups
 [새삼 소재의 MGO-,GO-AGEs breaker assay]

② 새삼 DS (10X DW sonication 1 h), ES (10X 20% EtOH sonication 1 h), EB (10X 20% EtOH boiling 2 h) 샘플의 경우 MGO-AGEs 파쇄 효과를 보임.



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Normal group V.S. BSA+MGO or BSA+GO group
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group V.S. Treated sample groups
 [실새삼 소재의 MGO-,GO-AGEs breaker assay]

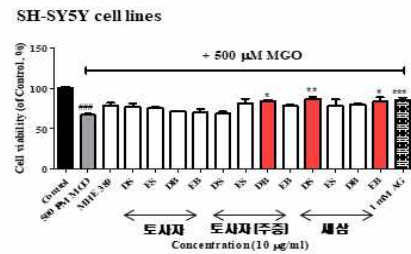
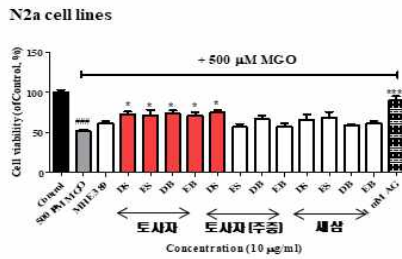
③ 실새삼 DS (10X DW sonication 1 h), EB (10X 20% EtOH boiling 2 h) 샘플의 경우 MGO, GO-AGEs 파쇄 효과를 보임.



$^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ or $^{\#\#\#}P < 0.001$: Normal group V.S. BSA+MGO or BSA+GO group
 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ or $^{***}P < 0.001$: BSA+MGO or BSA+GO group V.S. Treated sample groups
 [실새삼 (주증) 소재의 MGO-,GO-AGEs breaker assay]

④ 실새삼 (주증) ES (10X 20% EtOH sonication 1 h), DB (10X DW boiling 2 h) 샘플의 경우 MGO-AGEs 파쇄 효과를 보임.

(마) 후보 소재들의 처리에 따른 MGO 독성 보호 효능



$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ or $^{***}P < 0.001$: Compared with Control group
 $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ or $^{\#\#\#}P < 0.001$: Control group V.S. MGO group
 $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ or $^{\$\$\$}P < 0.001$: Control group V.S. Treated sample groups
 [각 소재의 MGO 독성 보호 효능]

① MGO에 대한 세포 보호 효과를 측정하였을 때, N2a세포주에서는 실새삼 4가지의 시료와 실새삼 (주증) DS (10X DW sonication 1 h)가 효과가 유의적으로 나타났음. 한편, SH-SY5Y 세포주에서는 실새삼 (주증) DB (10X DW boiling 2h), 새삼 DS (10X DW sonication 1 h), 새삼 EB (10X 20%EtOH boiling 2h)에서 효과가 유의적으로 나타났음.

(3) 실새삼DS, 새삼DS 및 358 균주의 생리활성 효능 검증

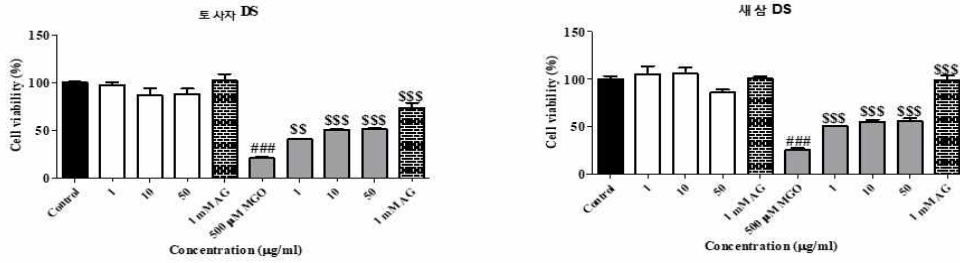
- 각 소재들의 추출물 조건은 DS (10X DW sonication 1h)가 가장 좋은 것으로 나타났음.
- 후보소재 13종의 1차 스크리닝을 통하여 실새삼 (주증) DS (10X DW sonication 1h)와 새삼 DS (10X DW sonication 1h)을 선정하였으며, 더불어 358 균주를 활용하여 2차 스크리닝을 진행하였음.
- 특히, 358 균주는 균사체, 표면 및 내부물질로 분리하여 효능 검증을 구체적으로 검증하고자 하였음.

<시료 정보 (13종)>

추출물 이름	추출물 코드	용량 (mg)
토사자 (주증) DS	MHE483	19.2
새삼 DS	MHE485	36.8
358 균사체	유산균 시료	4.5 [1 × 10 ¹⁰ cfu/ml]
358 표면		6.3 [1 × 10 ¹⁰ cfu/ml]
358 내부물질		1 × 10 ⁸ cfu/ml

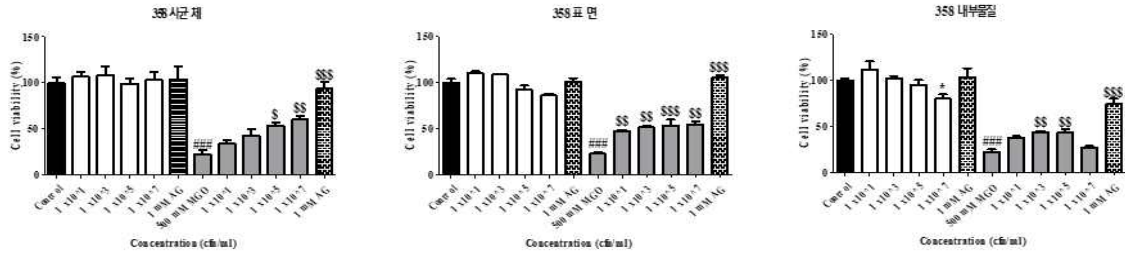
<실험 결과>

(가) MGO 독성 보호효능



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Compared with Control group
 #P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 \$P < 0.05, \$\$P < 0.01 or \$\$\$P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 [실새삼 DS 및 새삼 DS의 MGO 독성 보호 효능]

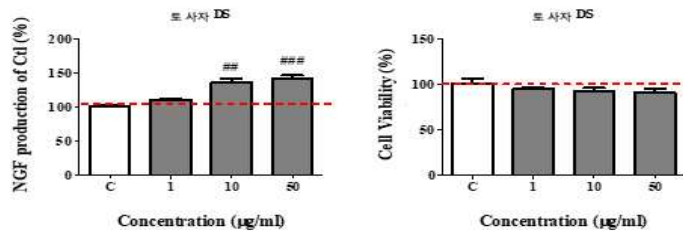
① 2차 스크리닝에서 선정된 실새삼 DS (DW sonication 1h) 및 새삼 DS (DW sonication 1h) 은 농도의존적으로 MGO로 유도된 N2a 세포주에서 보호능이 있음을 확인할 수 있었음



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Compared with Control group
 #P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 \$P < 0.05, \$\$P < 0.01 or \$\$\$P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 [358 사균체, 표면 및 내부물질의 MGO 독성 보호 효능]

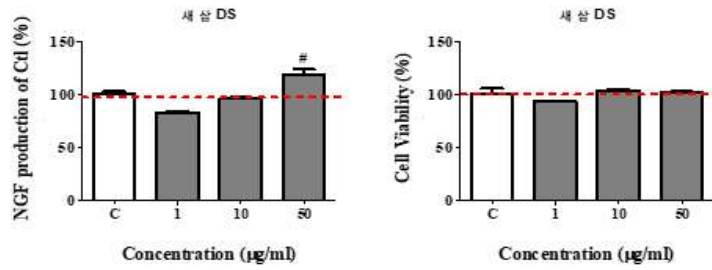
- ② 358 사균체에서는 MGO로 유도된 신경세포주에서 고 농도(1X10⁵ 및 1X10⁷ cfu/ml)에서 보호 효능이 있었으며, 358표면에서는 저 농도까지 보호 효능이 있음을 확인할 수 있었음.
- ③ 내부물질에서는 1X10⁷ cfu/ml에서 독성이 있는 것을 확인할 수 있었으며, MGO로 유도된 신경세포주에서 1X10³ cfu/ml 및 1X10⁵ cfu/ml에서 보호 효능이 있는 것을 확인할 수 있었음.

(나) NGF assay



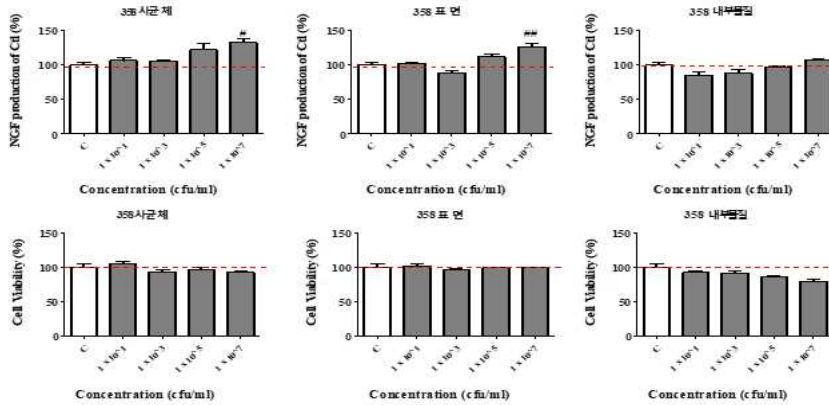
*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Compared with Control group
 [실새삼 DS의 NGF assay]

① NGF 생성을 실새삼 DS 10, 50 ug/ml에서 유의적으로 증가시키는 것으로 보임



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
[새삼 DS의 NGF assay]

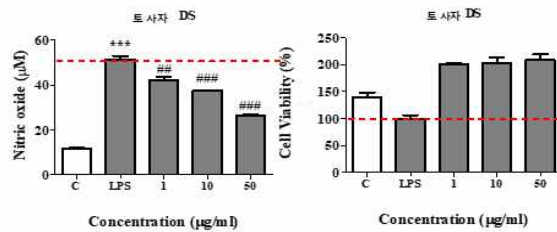
② NGF 생성을 새삼 DS 50 ug/ml에서 유의적으로 증가시키는 것으로 보임



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
[358사균체, 표면 및 내부물질의 NGF assay]

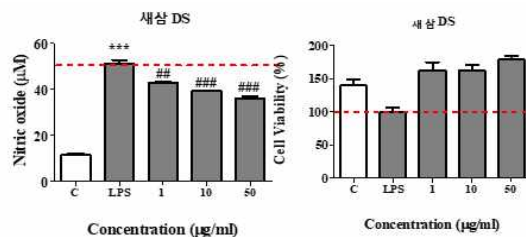
③ NGF 생성을 358사균체 및 표면 1 X 10⁷ cfu/ml에서 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났음.

(다) NO assay



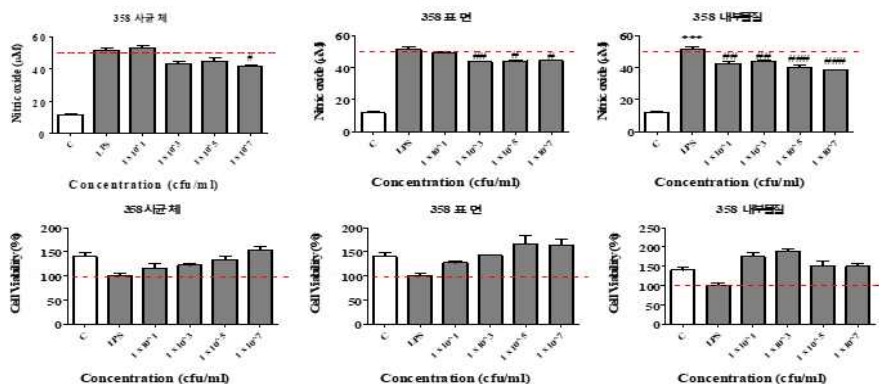
#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Treated sample groups
[실새삼 DS의 NO assay]

① 실새삼 DS는 농도의존적으로 NO를 억제시키는 것으로 나타났음



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Treated sample groups

② 새삼 DS는 농도의존적으로 NO를 억제시키는 것으로 나타났음.



P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with Control group

P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Treated sample groups

[358사균체, 표면 및 내부물질의 NO assay]

- : 358사균체 1 X 10⁷ cfu/ml에서 유의적으로 NO를 억제시키는 것으로 보임.
- : 358표면 1 X 10⁵ cfu/ml, 1 X 10⁷ cfu/ml에서 유의적으로 NO를 억제시키는 것으로 보임.
- : 358내부물질 1 X 10⁵ - 10⁷ cfu/ml에서 유의적으로 NO를 억제시키는 것으로 보임.

추출물 이름	MGO protection	NGF assay	NO assay
토사자 DS	1 - 50 µg/ml ^{###}	10 - 50 µg/ml ^{SS}	1 - 50 µg/ml ^{###}
새삼 DS	1 - 50 µg/ml ^{###}	유의성은 없지만 효과를 보임.	1 - 50 µg/ml ^{###}
358 균사체	1 X 10 ³ - 10 ⁷ cfu/ml ^{###}	1 X 10 ⁷ ^S	1 X 10 ³ - 10 ⁷ cfu/ml ^{###}
358 표면	1 X 10 ³ - 1 X 10 ⁷ cfu/ml ^{###}	1 X 10 ⁷ ^{SS}	1 X 10 ³ - 1 X 10 ⁷ cfu/ml ^{###}
358 내부	1 X 10 ³ - 1 X 10 ⁷ cfu/ml ^{###}	1 X 10 ⁷ cfu/ml 에서 독성 있음	1 X 10 ³ - 1 X 10 ⁷ cfu/ml ^{###}

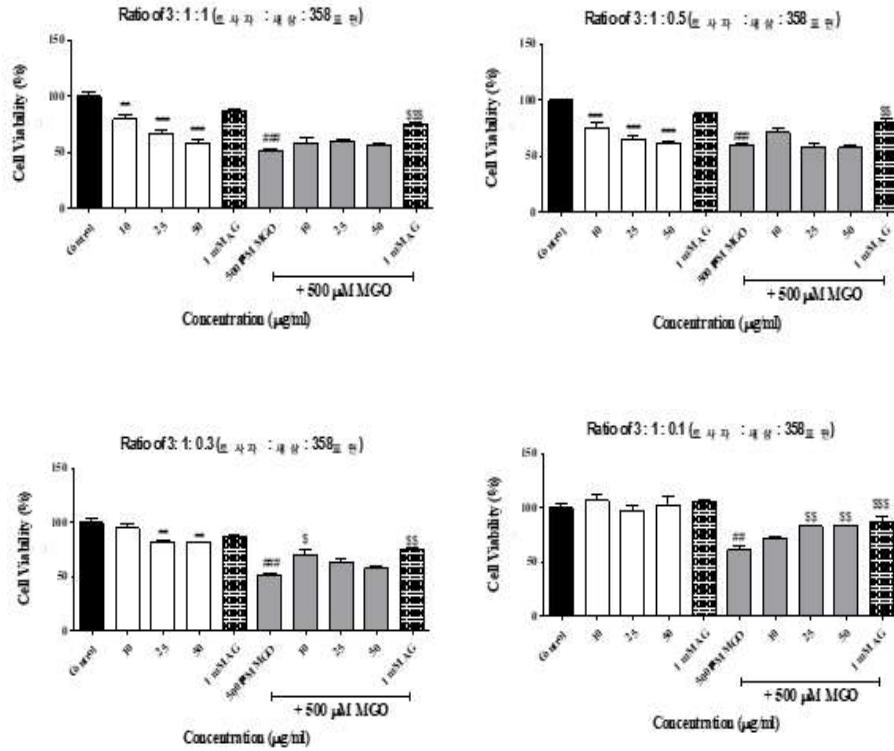
③ 상위의 표에서 보이는 바와 같이 실새삼, 새삼 및 358표면이 우수한 활성을 나타냈으며, 이를 바탕으로 최적비율로 혼합하여 3차 스크리닝을 진행하고자 하였음.

(4) 실새삼DS, 새삼DS 및 358 표면의 최적비율 확립

- 상기의 시료를 아래와 같은 비율로 설정하여 각 효능을 검증하였음.
 - : 실새삼 DS : 새삼 DS : 358표면 비율 = 3 : 1 : 1
 - : 실새삼 DS : 새삼 DS : 358표면 비율 = 3 : 1 : 0.5
 - : 실새삼 DS : 새삼 DS : 358표면 비율 = 3 : 1 : 0.3
 - : 실새삼 DS : 새삼 DS : 358표면 비율 = 3 : 1 : 0.1

<실험 결과>

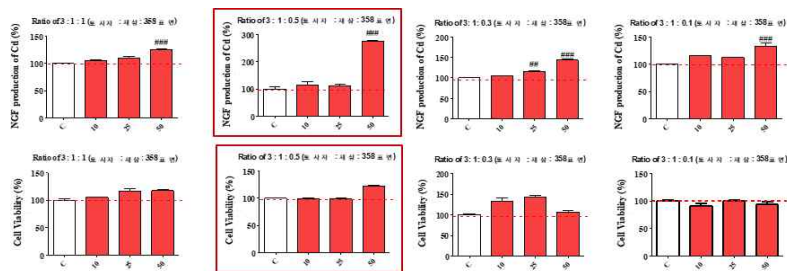
(가) MGO 독성 보호효능



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$: Compared with Control group
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Control group *V.S.* MGO group
 § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$ or §§§ $P < 0.001$: Control group *V.S.* Treated sample groups
 [각 비율의 MGO 독성 효능 평가]

① 신경세포주에서는 358표면의 함량이 적을수록 우수한 보호 효능을 나타내었음.

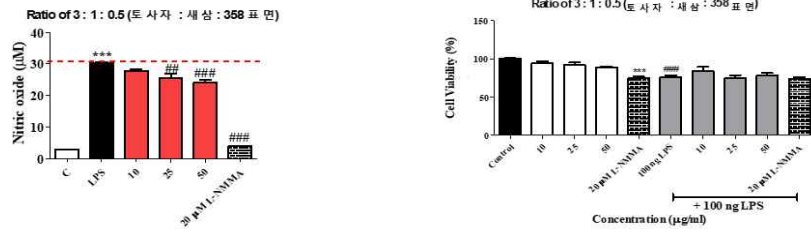
(나) NGF assay



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$: Compared with Control group
 [각 비율의 NGF assay]

① NGF assay에서 확인한 결과, 각 비율에서 농도의존적으로 NGF를 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히, 실새삼 : 새삼 : 표면358 비율 중 3 : 1: 0.5 에서 NGF를 가장 높게 증대시키는 것으로 확인되었음.

(다) NO assay



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
 P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with LPS group
 [3 : 1 : 0.5 비율의 NO assay]

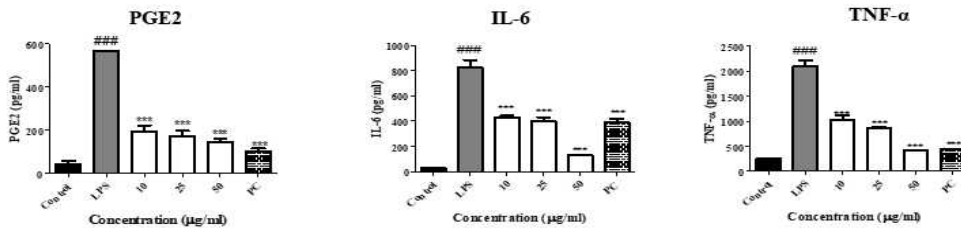
① NO assay에서 확인한 결과, 실새삼 : 새삼 : 358표면 비율인 3 : 1 : 0.5에서 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났음

(5) 실새삼DS, 새삼DS 및 358 표면 (3 : 1 : 0.5, Mixture)의 기전 연구

- 3차 스크리닝을 통하여 실새삼, 새삼 및 358표면의 최적 비율은 3 : 1 : 0.5였으며, 이를 기반으로 분자 생물학적 기전을 검증하고자 하였음.

<실험 결과>

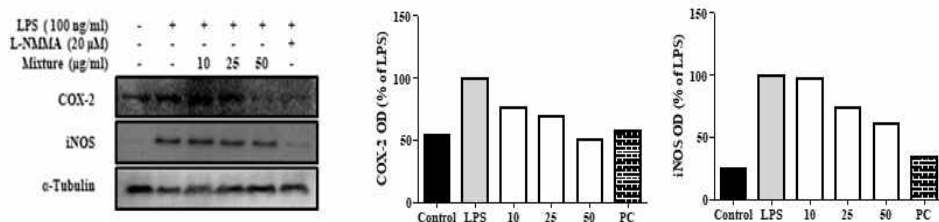
(가) 염증성 사이토카인 측정결과



#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 or ###*P* < 0.001 : Compared with Control group
 P* < 0.05, *P* < 0.01 or ****P* < 0.001 : Compared with LPS group
 [Mixture의 사이토카인 측정]

① 상위 그림과 같이 BV2세포주에서 LPS를 쳤을 경우, 100 nM의 LPS에서 염증성 인자인 PGE2, IL-6 및 TNF-α의 분비량을 증가시키는 것으로 확인되었음. 한편, mixture는 농도의존적으로 염증성 인자들을 억제하는 것으로 확인되었음. 따라서, 본 연구진은 염증성 개선 인자에 관하여 기전연구를 먼저 진행하고자 하였음.

(나) COX-2, iNOS 발현

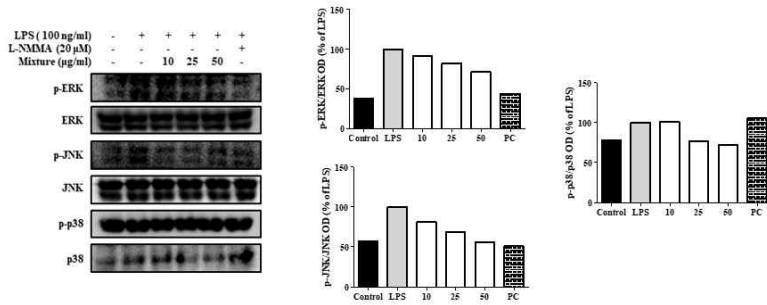


[COX-2, iNOS의 발현]

① LPS로 유도시에 염증 유발 인자들인 COX-2, iNOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였음. Mixture을 처리 시 이들의 발현이 양성대조군인 (20 µM L-NMMA)만큼 억제되는 것을 확인

하였음.

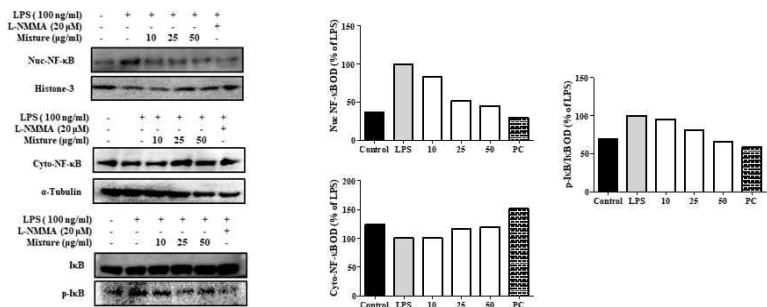
(다) MAPKs 기전 (ERK, JNK, p38)



[MAPKs 기전]

① 상위에서 보이는 바와 같이 LPS로 유도된 그룹에서 염증성 인자 발현량을 증대시키는 것을 확인할 수 있었음. 특히, mixture의 처리는 BV2 세포주에서 인산화된 p-ERK, p-JNK 및 p-p38의 발현양이 줄어드는 것을 확인할 수 있었음.

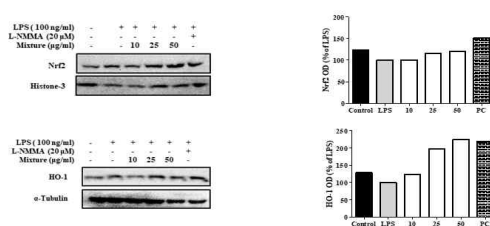
(라) NF-κB 전사



[NF-κB pathway]

① 또한, mixture는 cytosol에서 nuclear로 NF-κB 전사를 억제하는 것으로 확인되었음. 이러한 전사 억제를 통하여 염증성 분비 및 단백질 발현량을 억제시키는 것으로 확인되었음.

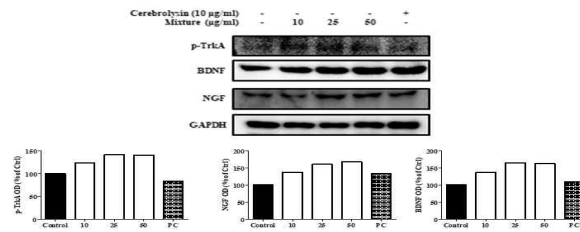
(마) 산화적 스트레스 반응 억제 인자 (Nrf2/HO-1)



[산화적 스트레스성 반응 억제 인자]

① LPS로 유도된 그룹에 비하여, mixture는 염증성 관련 기전을 억제해 줄 뿐 만아니라, 농도의 존적으로 산화적 스트레스 반응 억제 인자인 Nrf2와 HO-1를 증대시키는 것으로 나타났음.

(바) Neurotrophins 인자



[Mixture의 neurotrophins 발현 인자]

① Mixture는 NGF production & Neurite outgrowth 관련 단백질 증가를 보이며 독성을 나타내지 않아 in vivo (Behavior test) 연구에서 효과가 있을 것으로 예상됨.

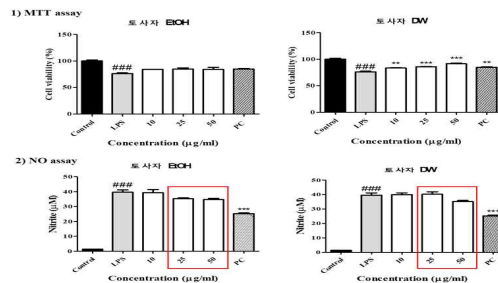
(6) 복합소재의 당독성 보호 및 neurotrophin 기전 검증

- 2차 년도에서 진행되었던 결과를 활용하여 각 추출물 및 유산균 (표면)의 최적 조건을 *in vitro* 상에서 재검증하였음.

추출물 이름	원물	추출 방법
도사자 DW	도사자 <i>C. chinensis</i>	DW extract
도사자 EtOH	도사자 <i>C. chinensis</i>	50% EtOH extract
새삼 DW	새삼 <i>C. japonica</i>	DW extract
새삼 EtOH	새삼 <i>C. japonica</i>	50% EtOH extract

<실험 결과>

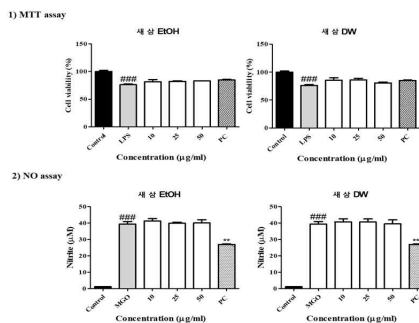
(가) NO (Nitric oxide) assay



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. LPS group,
*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : LPS group V.S. Treated sample groups
PC : 20 µM L-NMM

[실새삼 추출물들의 NO 억제능]

① 실새삼 각 추출물은 유의적이지 않으나, 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었음.

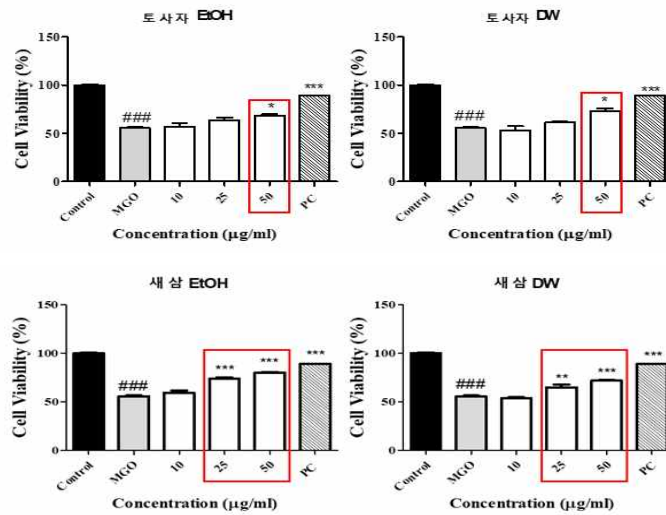


#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. LPS group
*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : LPS group V.S. Treated sample groups
PC : 20 µM L-NMMA

[새삼 추출물들의 NO 억제능]

② 새삼 각 추출물은 유의적이지 않으나, 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었음.

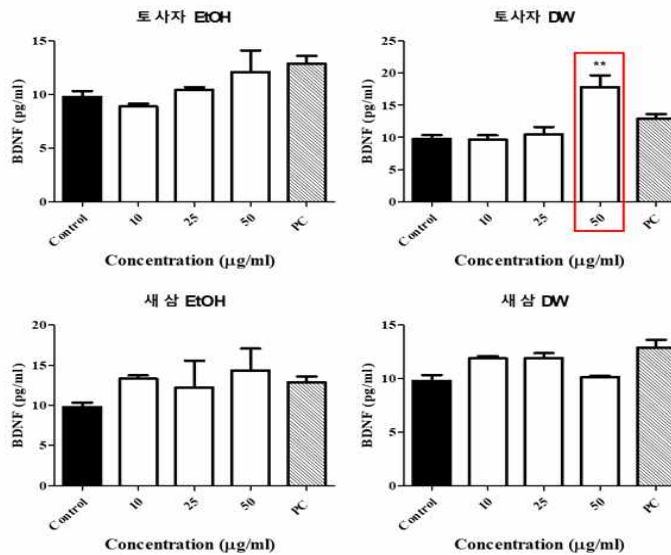
(나) MGO 보호능



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 *P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : MGO group V.S. Treated sample groups
 PC : 1 mM Aminoguanidine
 [실새삼 및 새삼 추출물들의 MGO 보호능]

① 새삼 각 추출물은 농도의존적으로 MGO독성에 대한 뇌세포 보호효능을 나타냄. 한편, 새삼 추출물들이 실새삼추출물보다 MGO독성에 대한 뇌세포 보호효능이 우수함.

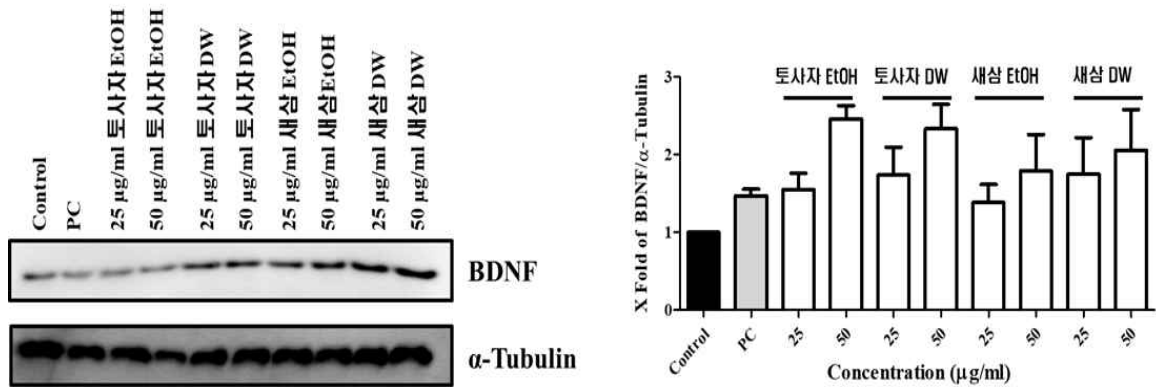
(다) BDNF assay (ELISA kit)



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 PC : 10µg/ml Cerebrolysin
 [BDNF 함량 측정]

① 분비된 BDNF 함량은 실새삼 DW에서 유의적으로 증가되는 것을 확인되었으며, 새삼 추출물들에서는 유의적인 차이를 보이지 않음.

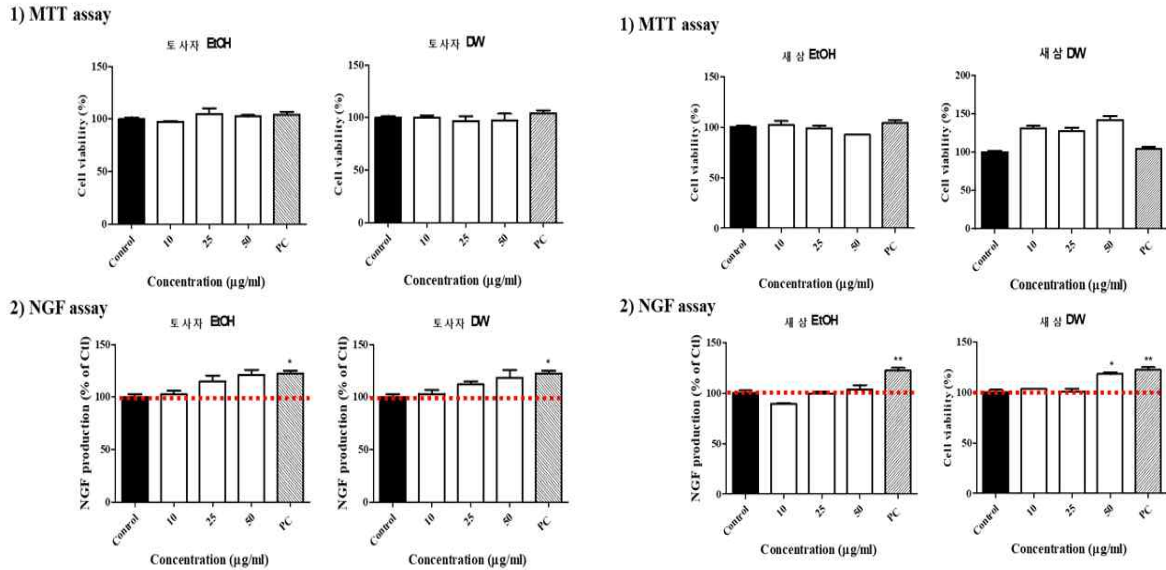
(라) BDNF 발현량 측정



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 PC : 10 μg/ml Cerebrolysin
 [BDNF 발현량 측정]

① BDNF 단백질 발현량을 확인한 결과, 각 시료는 BDNF 발현을 농도의존적으로 증가시키나 유의성은 없었음. 실새삼 및 새삼 물추출물이 EtOH 추출물보다 BDNF 발현을 증가시키는 효능이 우수함.

(마) NGF assay (ELISA kit)

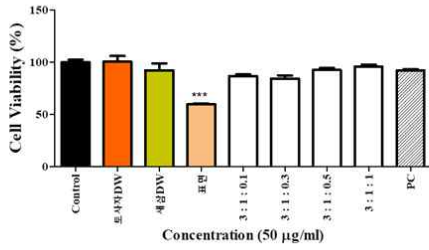


*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 PC : 10 μg/ml Cerebrolysin
 [NGF 함량 측정 (좌) 실새삼, (우) 새삼]

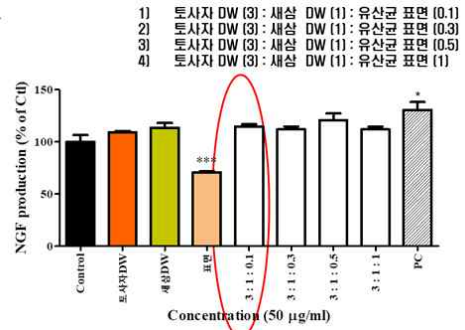
① 실새삼 추출물들은 NGF를 농도의존적으로 분비를 증가시키나 유의성은 없음. 한편, 새삼의 물추출물이 그 효능이 우수함.

(바) NGF assay (ELISA kit)

1) MTT assay



2) NGF assay



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups

PC : 10 μg/ml Cerebrolysin

[최적비율을 재검증을 위한 NGF 함량 측정]

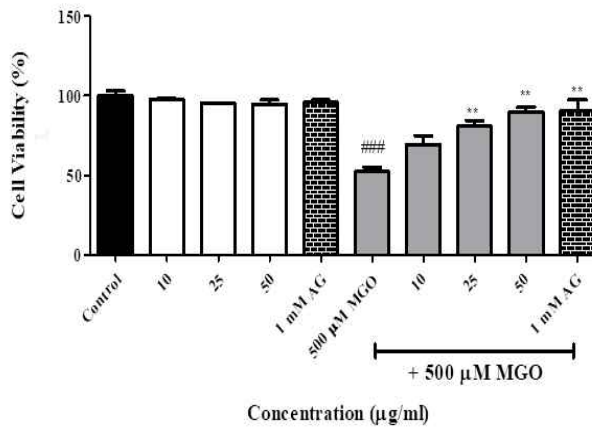
- ① 유산균 (표면)은 50 μg/ml에서는 독성을 나타내는 것을 확인됨.
- ② 각 비율은 독성을 지니지 않았으며, 실새삼 : 새삼 : 유산균 (표면)의 비율은 3 : 1 : 0.5가 가장 적절한 것으로 확인되었음.

(7) 당독성에 대한 후보소재의 보호효능 및 기전연구

- 최종적으로 확립한 복합물 (MT104 지칭)을 활용하여 당독성 기전 연구를 먼저 확인하고자 하였음.

<실험결과>

(가) MGO 유도 뇌세포 독성에 대한 보호효과



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group

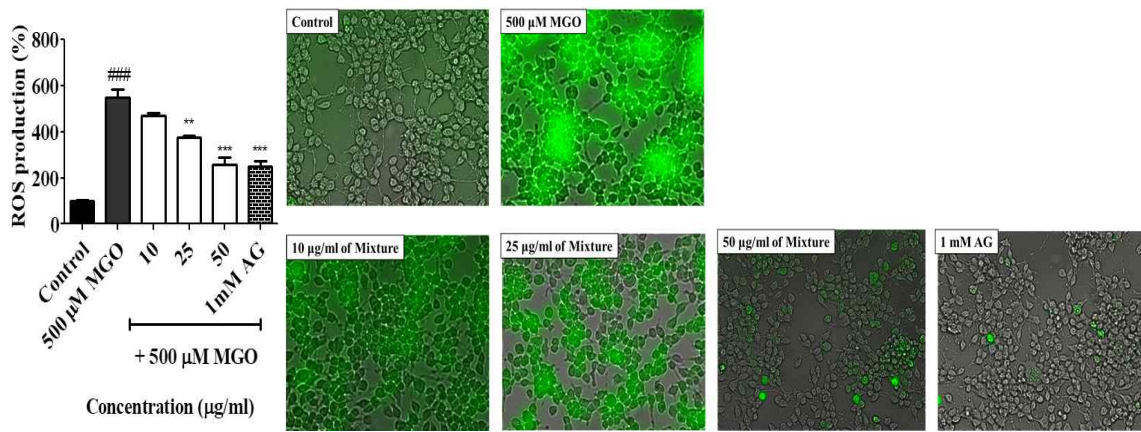
*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : MGO group V.S. Treated sample groups

PC : 1 mM Aminoguanidine

[MT104 복합물의 MGO 보호능]

- ① MT104의 복합물은 세포독성을 보이지 않으며, MGO독성에 대한 농도의존적으로 뇌세포 보호능을 나타냄.

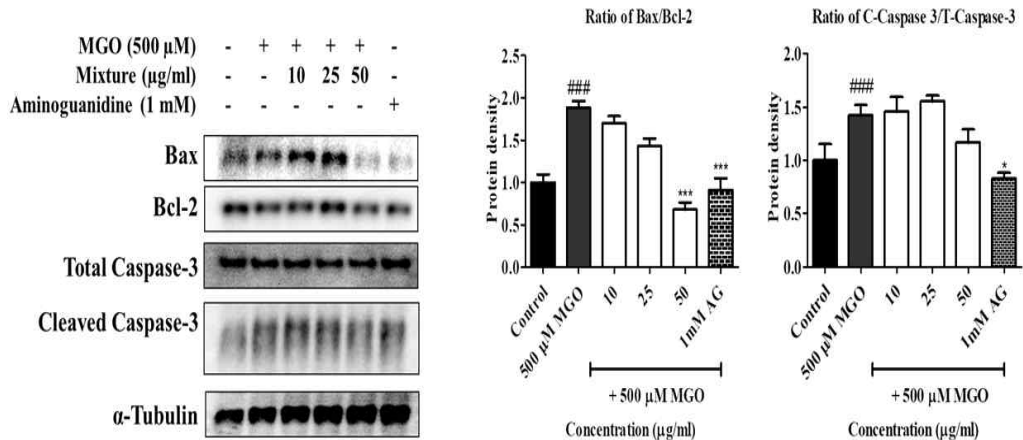
(나) 후보소재의 MGO유도 ROS (reactive oxidative species) 성장에 미치는 영향



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 *P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : MGO group V.S. Treated sample groups
 PC : 1 mM Aminoguanidine
 [MT104 복합물의 ROS 억제능]

① 후보소재는 MGO처리에 의한 ROS생성에 대하여 농도의존적으로 ROS를 감소시킴

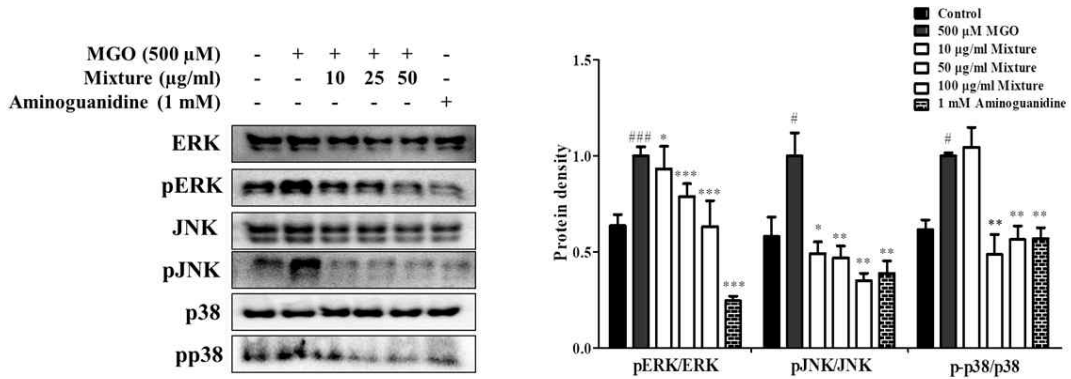
(다) 후보소재의 MGO처리에 유도된 뇌 세포사에 미치는 영향



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 *P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : MGO group V.S. Treated sample groups
 PC : 1 mM Aminoguanidine
 [Apoptosis pathway 검증]

① Bax/Bcl-2 비율을 조사한 결과 역시 농도의존적으로 현저하게 세포사멸사 (apoptosis) 유발단백질의 발현이 메틸글리옥살 (MGO)의 처리에 의하여 조절되고 있는 것으로 나타났음. 반면, 본 발명의 MT104를 처리한 군에서는 세포사멸사(apoptosis) 유발을 촉진하는 Bax의 발현이 억제되고 세포사멸사(apoptosis)를 저해시키는 Bcl-2의 발현이 억제되어, 본 발명의 유산균은 세포사멸사(apoptosis)를 저해함으로써 세포 생존을 유지시키는 것을 확인함. 또한, 세포사멸사 (apoptosis)를 유도하는 자극에 의하여 활성화되는 caspase-3를 직접적으로 억제하는 것을 확인함

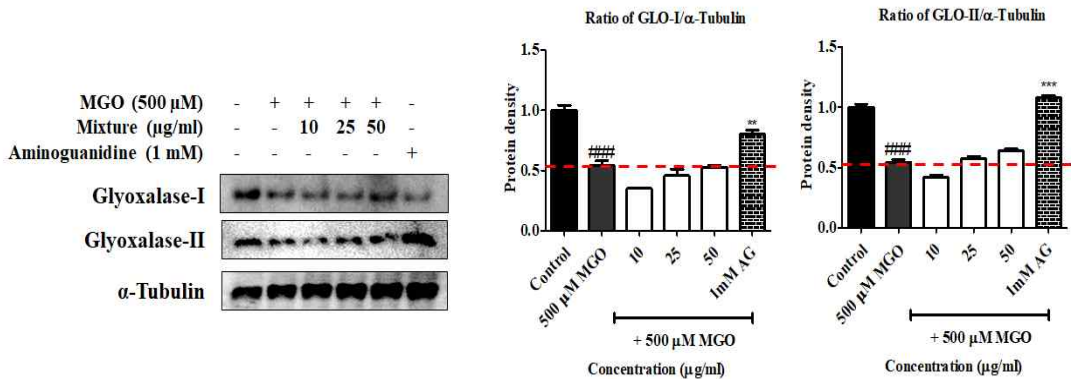
(라) 후보소재의 MGO로 유도된 MAPKs signaling 활성화에 미치는 영향



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 *P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : MGO group V.S. Treated sample groups
 PC : 1 mM Aminoguanidine
 [MAPKs signaling 검증]

① MGO만을 처리하였을 때 p38, pERK1/2, 및 pJNK의 발현이 정상 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인함. 반면, 본 발명의 MT104을 전처리한 군에서는 농도의존적으로 상기 단백질의 발현이 현저히 억제되었음. 이는 MT104 복합물이 MAPK 신호전달경로의 억제를 통해 항염증 작용을 발휘하는 것임을 알 수 있음

(마) 후보소재의 MGO처리에 따른 증가되는 당독성의 해독에 미치는 영향



#P < 0.05, ##P < 0.01 or ###P < 0.001 : Control group V.S. MGO group
 *P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : MGO group V.S. Treated sample groups
 PC : 1 mM Aminoguanidine
 [Glyoxalase 단백질 발현 검증]

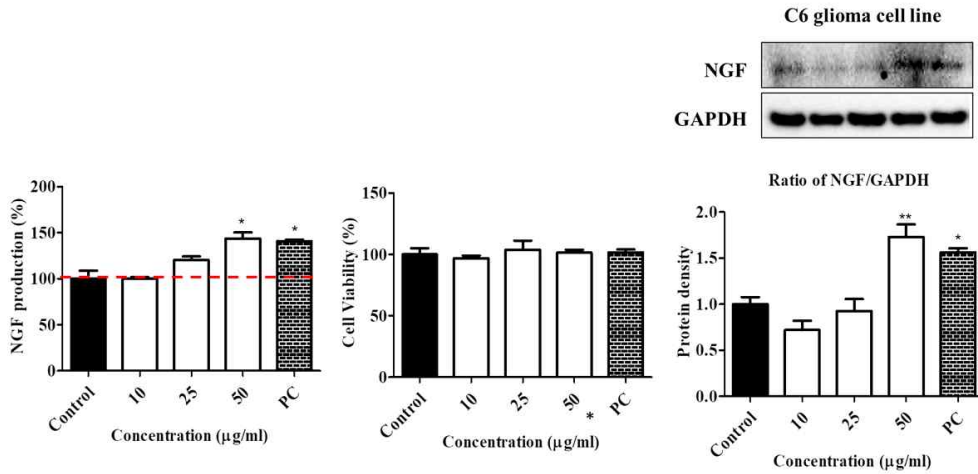
① 후보소재는 MGO로 처리로 유도된 당독성모델에서 감소된 Glyoxalase system을 증가시키는 효능은 없음. 즉, 후보 소재는 MGO에 의해 유도된 세포사를 억제하여 뇌세포 보호효능을 나타내는 것으로 판단됨

(8) Neurotrophin에 대한 후보소재의 기전연구

- MT104 복합물이 Neurotrophins (BDNF, NGF 등)을 표적으로 함으로써, 뇌유래 신경 영양 인자의 발현 및 또는 그 기능을 조절하는 물질인지를 확인하였음.

<실험결과>

(가) 후보소재의 신경성장영양인자의 인장의 증가에 미치는 영향



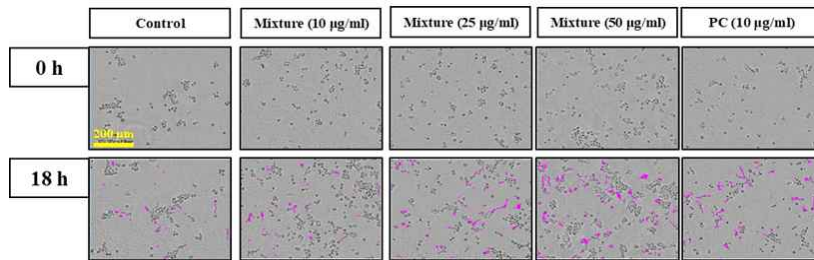
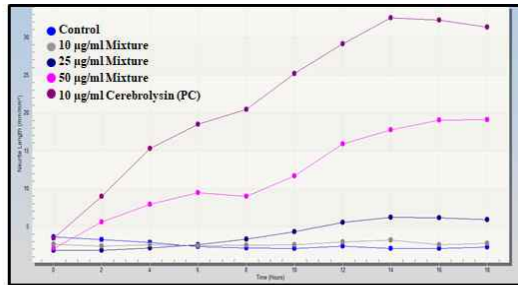
*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups

PC : 10 μg/ml Cerebrolysin

[Astrocyte cell에서의 NGF 함량 및 발현량 확인]

- ① Rat astrocytes 유래 C6 glioma 세포주에 후보소재를 처리한 후 NGF Production 생성량 및 발현량을 측정하였음. MT104는 농도의존적으로 NGF 분비량 및 그 단백질 발현량을 증가시킴.

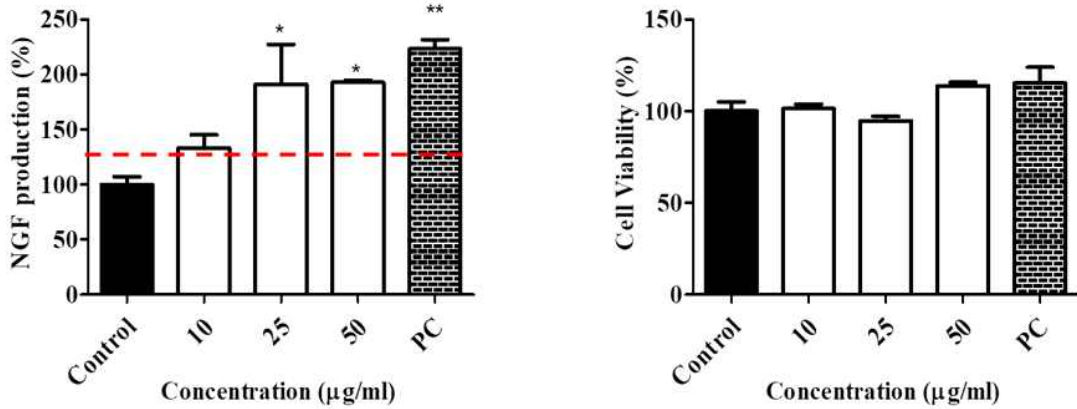
(나) 후보소재의 신경세포 신경돌기 증강에 미치는 영향



[Neurite outgrowth assay]

- ① NGF는 신경성장인자로서 신경세포의 성장에 관여함. 그러므로 N2a 세포에서 시료처리 후 Neurite outgrowth 측정을 통하여 MT104가 신경성장인자 증가에 따른 신경돌기 증가에 미치는 영향을 확인하고자 하였음. 정상 대조군에 비하여 후보소재는 농도의존적으로 neurite outgrowth에 미치는 효능이 우수함.

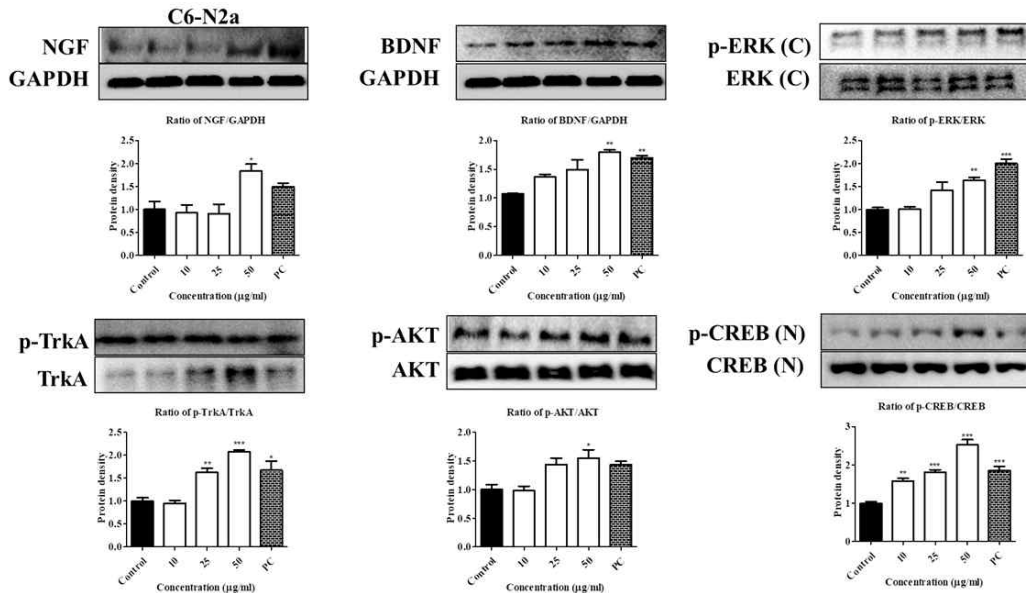
(다) 후보소재의 NGF 분비 증가에 따른 뇌세포 보호능에 미치는 영향



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 PC : 10 μg/ml Cerebrolysin
 [CNS (C6-N2a) 세포주에서의 NGF 측정]

① C6-N2a 처리 방법 후에 NGF 함량을 확인한 결과, MT104는 유의적으로 NGF 함량을 증대시키는 것을 확인할 수 있었음

(라) 후보소재의 neurotrophin 관련 단백질 발현 확인



*P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 : Control group V.S. Treated sample groups
 PC : 10 μg/ml Cerebrolysin
 [CNS (C6-N2a) 세포주에서의 neurotrophin 기전 확인]

① 시료가 처리된 C6 세포의 배지를 N2a 세포주에 처리 시, 후보소재는 농도의존적으로 TrkA/ERK/CREB signaling을 통해 neurotrophin 효능을 나타냄

다) 신바이오텍스 성분의 생체 내 대사 작용 연구

(1) 정상 마우스 모델의 MT104A 투여에 대사체 프로파일링

(가) 정상 마우스 모델의 MT104A 투여에 따른 대사체 분석 및 다변량 통계분석

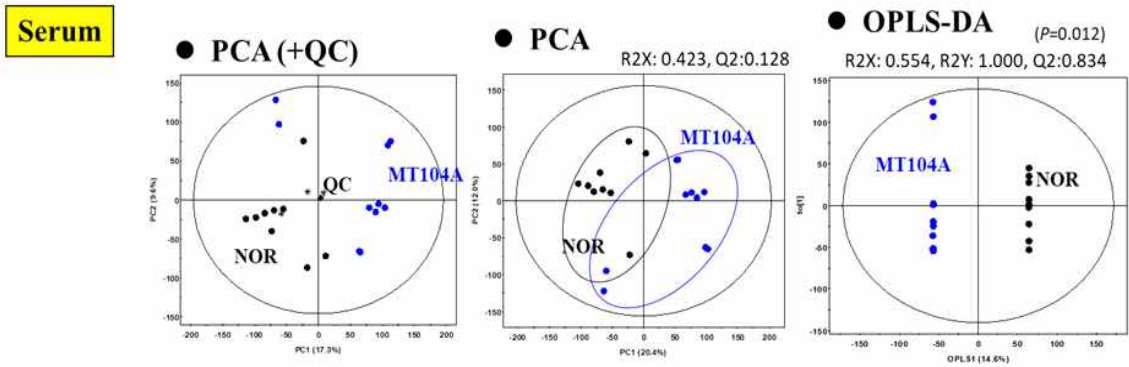
- ① 정상 마우스 내 MT104A (실새삼+새삼+유사균 혼합물) 투여에 따른 인지기능 관련 내인성대사체 변화 확인하고자 프로파일링을 수행함
- ② 대사체 프로파일링에 사용한 시료는 아래와 같음

[MT104A 투여 마우스 모델 유래 시료 중 대사체 프로파일링에 사용한 시료 목록]

	Liver	Serum	Brain		Colon with feces	
			hippocampus	cortex	Colon	feces
Normal	6	6	6	6	6	6
MT104A treated	5	5	5	5	5	5

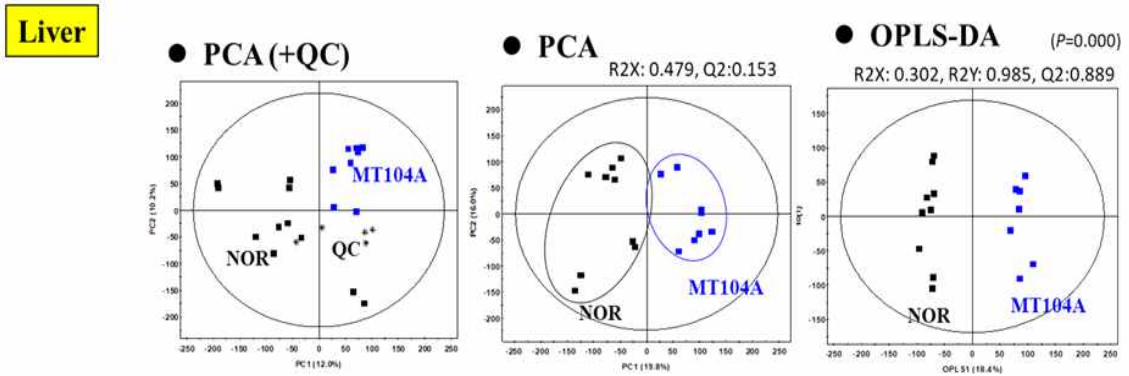
* MT104A: 토사자+생삼+유산균 혼합물

- ③ GC-TOF-MS 분석 후 다변량 통계분석을 통해 패턴분석을 수행함
- ④ 혈청 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군과 MT104A 섭취군이 PCA, OPLS-DA 상에서 PC1(19.2%), OPLS(13.9%)에 의해 뚜렷하게 구분되어짐



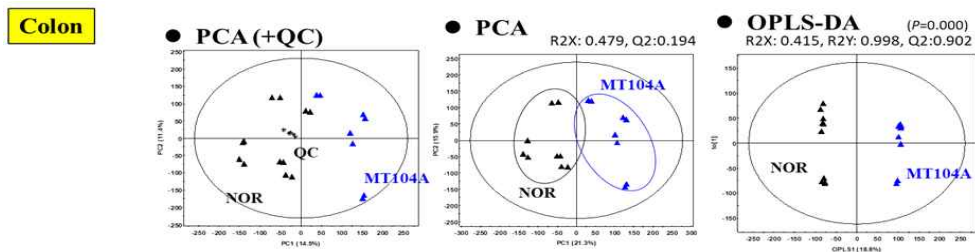
[MT104A 투여 마우스 모델 유래 혈청시료의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

- ⑤ 간조직 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군과 MT104A 섭취군이 PCA, OPLS-DA 상에서 PC1(15.1%), OPLS(14.0%)에 의해 뚜렷하게 구분되어짐



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 간조직의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

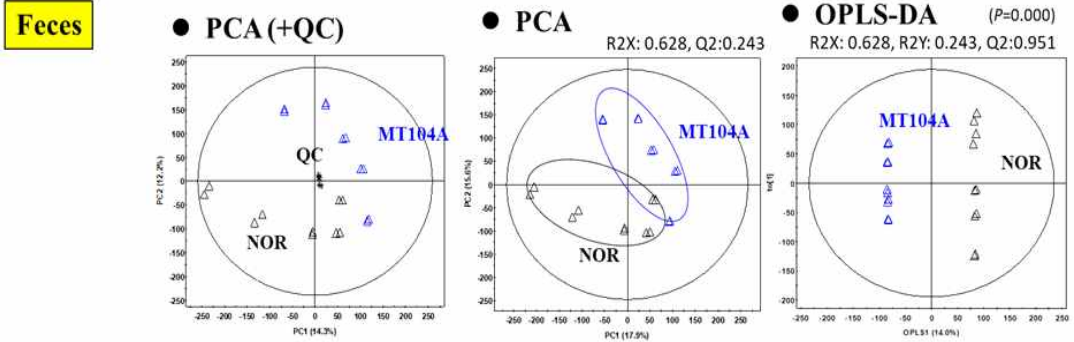
- ⑥ 대장조직 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군과 MT104A 섭취군이 PCA, OPLS-DA 상에서 PC1(16.0%), OPLS(13.2%)에 의해 뚜렷하게 구분되어짐



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 대장조직의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

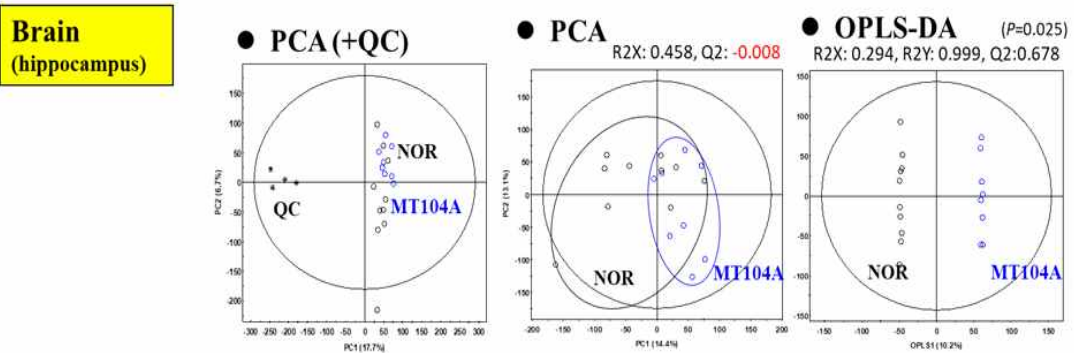
- ⑦ 분변시료 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군과 MT104A 섭취군이 PCA, OPLS-DA

상에서 PC1(15.6%), OPLS(12.4%)에 의해 뚜렷하게 구분되어짐



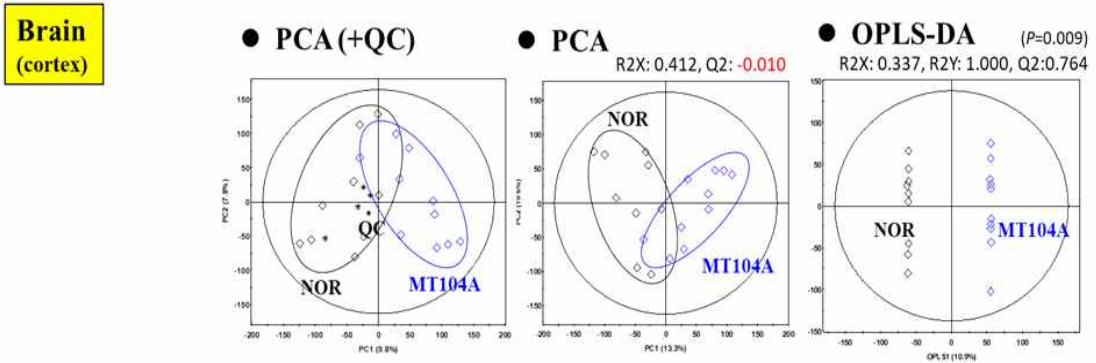
[MT104A 투여 마우스 모델 유래 분변시료의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

⑧ 뇌조직(hippocampus) 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군과 MT104A 섭취군이 PCA, OPLS-DA 상에서 PC1(10.0%), OPLS(8.0%)에 의해 뚜렷하게 구분되어짐



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 뇌조직(hippocampus)의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

⑨ 뇌조직(cortex) 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군과 MT104A 섭취군이 PCA, OPLS-DA 상에서 PC1(11.3%), OPLS(9.5%)에 의해 뚜렷하게 구분되어짐

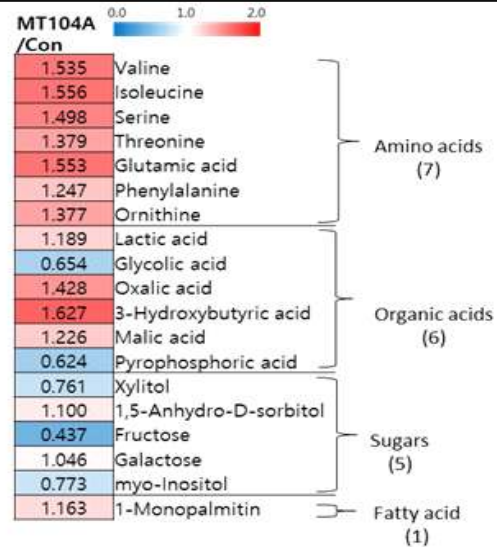


[MT104A 투여 마우스 모델 유래 뇌조직(cortex)의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

(나) 정상 마우스 모델의 MT104A 투여에 따른 대사체 마커 및 대사 경로 분석

- ① 정상 마우스 내 MT104A (실새삼+새삼+유산균 혼합물) 투여에 따른 인지기능 관련 내인성대사체 변화 확인하고자 프로파일링 후 다변량 통계분석을 진행하였음.
- ② 분석 결과를 바탕으로 그룹별로 함량 패턴에 대해서 차이가 나는 대사체를 선정하고 함량 패턴을 비교하였음
- ③ 혈청에 대한 OPLS-DA 결과, 두 그룹 간의 차이나는 대사체를 선정하고 함량패턴을 비교하였음.
- ④ 혈청분석 대사체 함량비교 결과, MT104A 섭취에 의하여 amino acid, organic acid, fatty acid가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였음

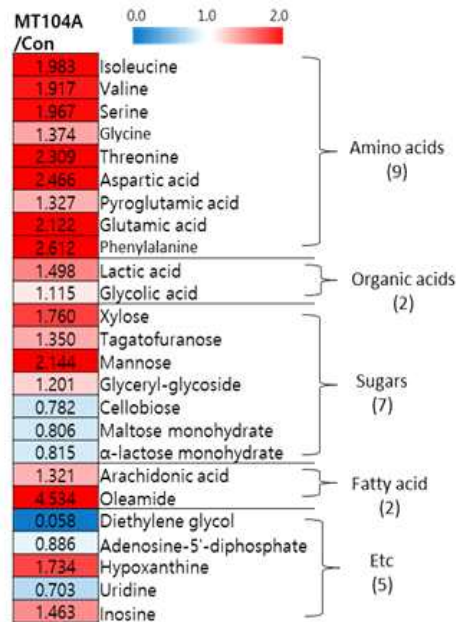
■ Serum



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 혈청시료의 GC-TOF-MS분석에 따른 처리군 간의 대사체 함량비교]

- ⑤ 간조직 대사체 시료의 그룹간의 비교를 위해서, OPLS-DA를 기반으로 차이나는 대사체를 선정하고 함량패턴을 비교하였음.
- ⑥ 간조직 분석 대사체 함량비교 결과, MT104A 섭취에 의하여 amino acid, organic acid, fatty acid가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였음

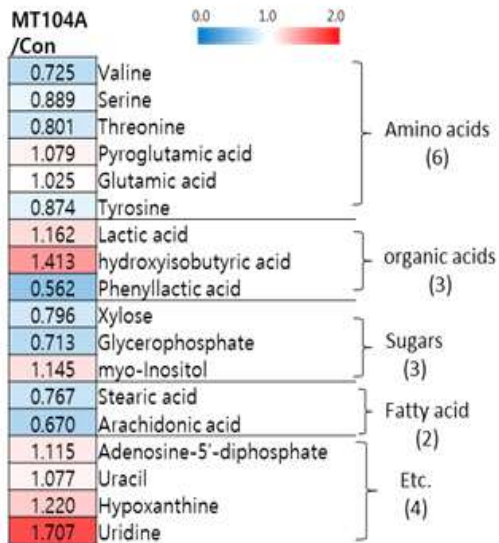
■ Liver



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 간조직 시료의 처리군 간의 대사체 함량비교]

- ⑦ 대장조직 대사체 시료의 그룹간의 비교를 위해서, OPLS-DA를 기반으로 차이나는 대사체를 선정하고 함량패턴을 비교하였음. 대장조직 분석 대사체 함량비교 결과, MT104A 섭취에 의하여 amino acid, sugar, fatty acid가 대체적으로 대조구에 비하여 감소하였고, 반면에 organic acid는 증가하는 경향을 보였음

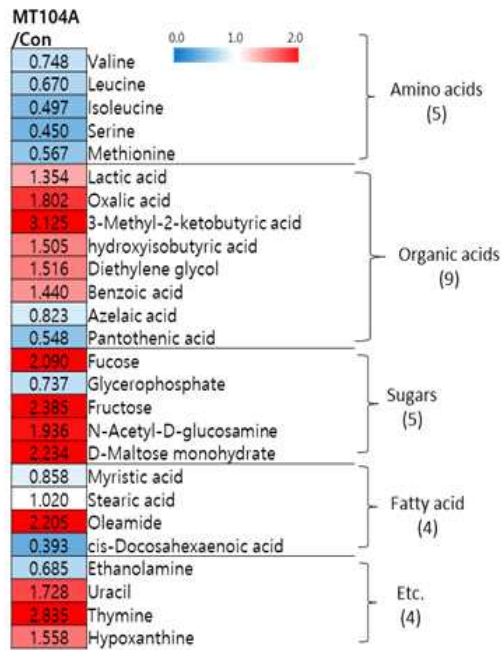
▪ **Colon**



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 대장조직 시료의 처리군 간의 대사체 함량비교]

- ⑧ 분변의 대사체 추출물의 그룹간의 비교를 위해서, OPLS-DA를 기반으로 차이나는 대사체를 선정하고 함량패턴을 비교하였음.
- ⑨ 분변분석 대사체 함량비교 결과, MT104A 섭취에 의하여 amino acid, fatty acid, 일부 organic acid (malic acid, azelalic acid, pantothenic acid)가 MT104A01 섭취에 의해 대체적으로 control에 비해 감소함. Sugar와 앞서 명시된 3가지를 제외한 organic acid는 control에 비해 증가함

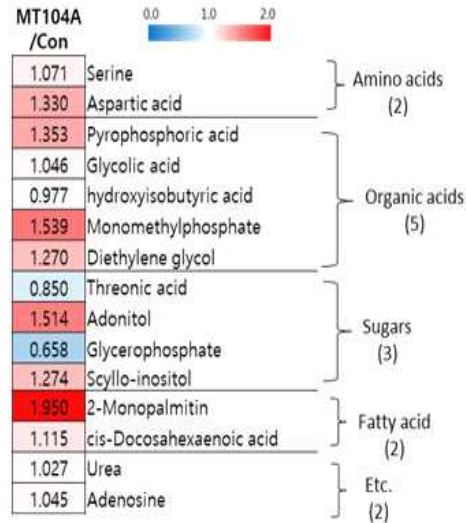
▪ **Feces**



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 분변시료의 처리군 간의 대사체 함량비교]

- ⑩ Hippocampus의 대사체 추출물의 그룹간의 비교를 위해서, OPLS-DA를 기반으로 차이나는 대사체를 선정하고 함량패턴을 비교하였음. 뇌조직(hippocampus) 분석 대사체 함량비교 결과, MT104A01 섭취 시 hippocampus 내 hydroxyisobutyric acid, theronic acid, glycerophosphate를 제외하고 control에 비해 증가함

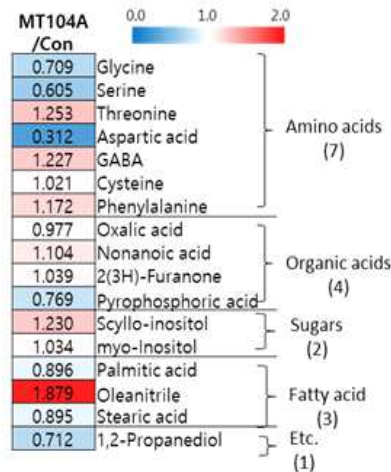
**Brain
(Hippocampus)**



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 뇌조직 (Hippocampus) 시료의 처리군 간의 대사체 함량비교]

- ⑪ 뇌조직(cortex) 대사체 추출물의 그룹간의 비교를 위해서, OPLS-DA를 기반으로 차이나는 대사체를 선정하고 함량패턴을 비교하였음. 뇌조직(cortex) 분석 대사체 함량비교 결과, Cortex에서는 MT104A 섭취에 따라 amino acid (glycine, serine, aspartic acid 제외), organic acid (oxalic acid, pyriphosphoric acid 제외), sugar는 control에 비해 섭취 시 증가했고, 반면에 fatty acid (oleanitrile 제외)는 감소하는 경향을 확인함

**Brain
(Cortex)**



[MT104A 투여 마우스 모델 유래 뇌조직 (Cortex) 시료의 처리군 간의 대사체 함량비교]

- ⑫ 정상 마우스 모델에서 MT104A 섭취로 인해 각 조직별 (혈청, 간조직, 대장, 분변, 뇌의 해마, 뇌피질) 에서 생체 내 대사변화에 대해서 알아봄

라) Metabolomics 기반 신경 정신 질환 및 신바이오텍스 효능 관련 생체 내 기전 규명

(1) 에탄올 유도 ADHD 모델의 HX106 소재에 대한 대사 대인지 기능 개선 관련 소재의 대사체 분석법 확립 및 다변량 통계분석

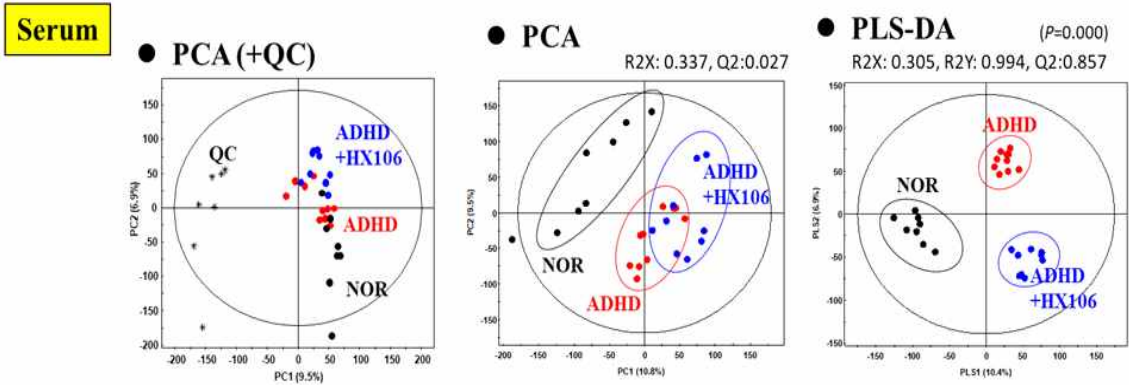
(가) 에탄올 유도 ADHD 모델 및 HX106 투여구에 대한 다변량 통계분석

- ① 에탄올 유도 ADHD 모델 내 HX106 섭취에 따른 효능 특이적 내인성 대사체 변화 확인하고자 대사체 프로파일링 수행함
- ② 대사체 프로파일링에 사용한 시료는 아래와 같음

	Liver	Serum	Brain		Colon with feces	
			striatum	cortex	Colon	feces
Normal	5	5	4	4	5	5
ADHD	5	5	4	4	5	5
ADHD+HX106	5	5	4	4	5	5

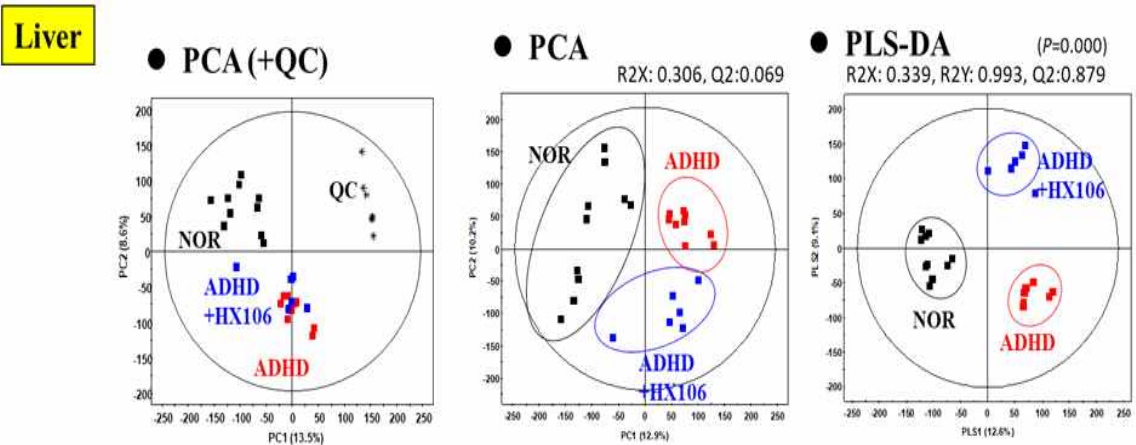
*HX106: 천마 등 혼합물

- ③ GC-TOF-MS 분석 후 다변량 통계분석을 통해 패턴분석을 수행함
- ④ 혈청 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군이 PCA, PLS-DA 상에서 각각의 그룹화로 뚜렷하게 구분되어짐



[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 혈청시료의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

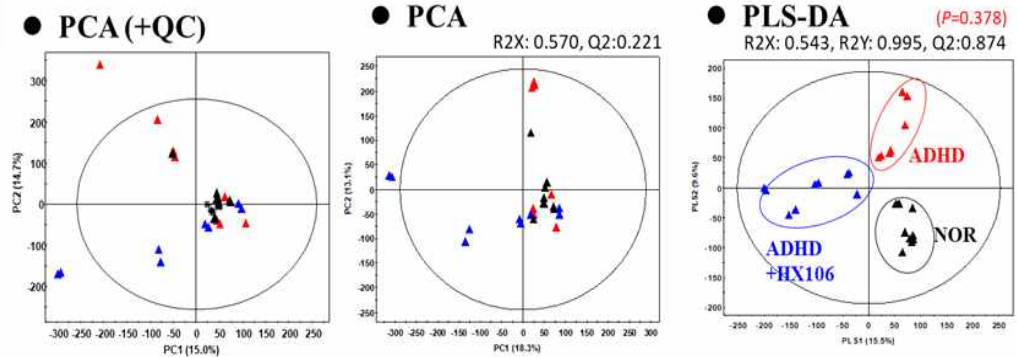
- ⑤ 간조직 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군이 PCA, PLS-DA 상에서 각각의 그룹화로 뚜렷하게 구분되어짐



[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 간조직 시료의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

- ⑥ 대장조직 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군이 PCA상에서는 다소 그룹이 혼재되어 있지만, PLS-DA 상에서 각각의 그룹화로 뚜렷하게 구분되어짐

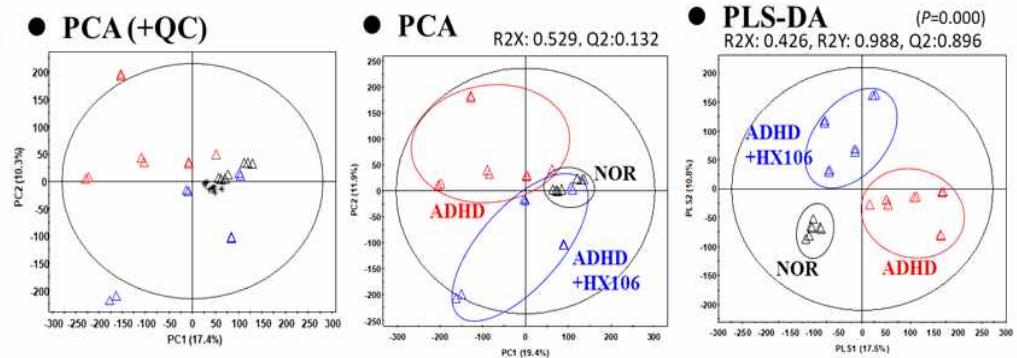
Colon



[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 대장조직 시료의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

⑦ 분변시료 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군이 PCA, PLS-DA 상에서 각각의 그룹화로 뚜렷하게 구분되어짐

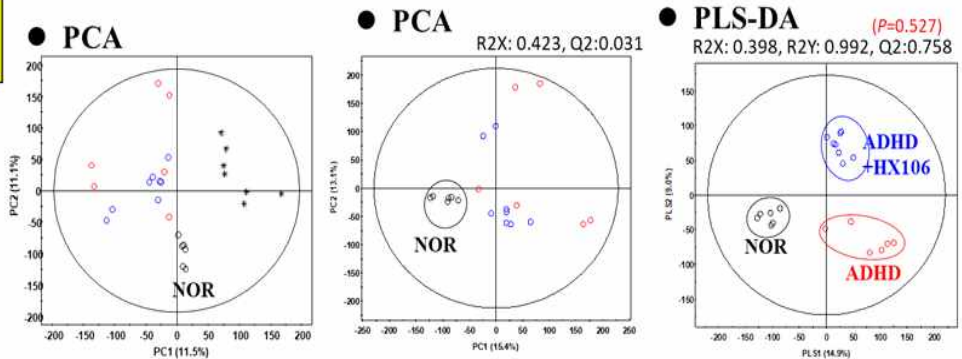
Feces



[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 분변 시료의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

⑧ 뇌조식(Striatum) 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군이 PCA상에서는 다소 그룹이 혼재되어 있지만, PLS-DA 상에서 각각의 그룹화로 뚜렷하게 구분되어짐

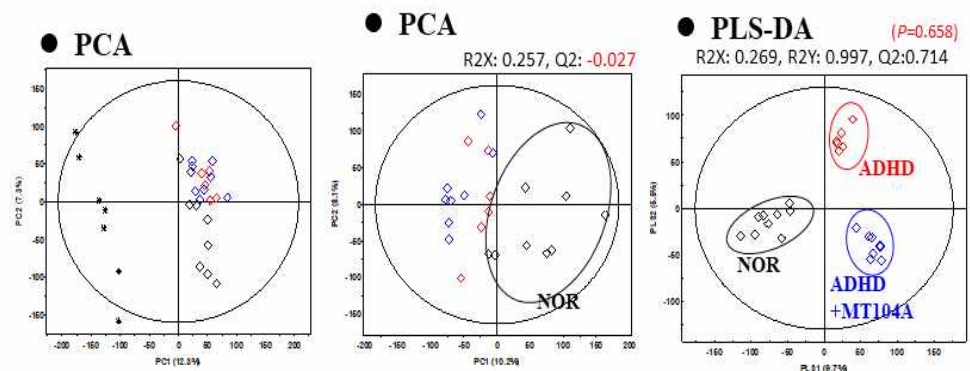
Brain (striatum)



[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 뇌조식(striatum)의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

⑨ 뇌조식(cortex) 분석 데이터 다변량 통계분석 결과 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군이 PCA상에서는 다소 그룹이 혼재되어 있지만, PLS-DA 상에서 각각의 그룹화로 뚜렷하게 구분되어짐

Brain (cortex)



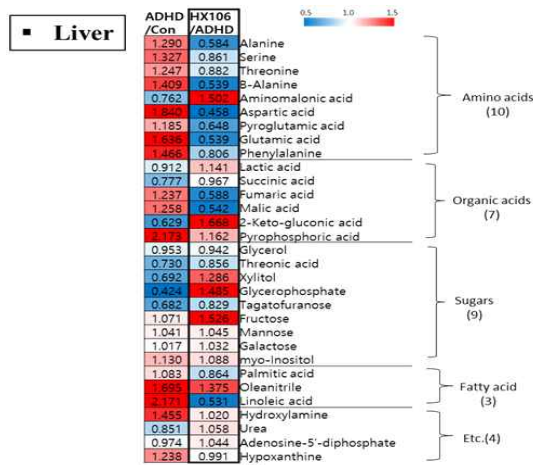
[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 뇌조직(cortex)의 GC-TOF-MS 분석에 따른 다변량 통계분석 결과]

- 마) 에탄올 유도 ADHD 모델 및 HX106 투여구에 대한 대사체 마커 및 대사 경로 분석
- (1) GC-TOF-MS 분석 후 다변량 통계분석을 통해 패턴분석을 수행함
 - (2) 각 시료별로 대조군, ADHD군, ADHD+HX106군 내의 차이나는 대사체를 알아보기 위해서 PLS-DA 기반으로 VIP (Variable Importance in the Projection) score 1.0이상인 유의성 있는 변수를 추출한 후, Retention time, m/z, MS/MSfragment를 in house library, standard, NIST 등과 비교하여 tentative identification 한 후, 선정된 대사체에 대하여 그룹간의 대사체 함량차이 비교하고자 대조군 대비 실험군에 대한 fold change로 visualization 하였음
 - (3) 혈청 분석 대사체 함량비교 결과, amino acid, sugar 계열의 대사체의 경우 ADHD 모델의 경우 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보이는 반면, 대조적으로 ADHD+HX106 모델은 증가하는 경향을 보임. 또한 ADHD+HX106을 투여 모델의 경우, organic acid, fatty acid 계열의 대사체가 섭취에 의해 감소되는 결과를 보였음

Serum		ADHD /Con	HX106 /ADHD		
0.308	1.343	Valine		Amino acids (10)	
0.333	1.055	Isoleucine			
0.810	0.914	Threonine			
1.125	1.026	B-Alanine			
0.387	1.198	Methionine			
3.028	1.883	Pyroglutamic acid			
0.440	1.212	Glutamic acid			
0.576	1.082	Phenylalanine			
1.065	1.001	Glutamine			
0.719	0.959	Tyrosine			
1.181	1.024	Pyruvic acid		Organic acids (7)	
1.421	0.716	Glycolic acid			
1.54	1.419	Oxalic acid			
1.035	0.584	hydroxyisobutyric acid			
0.748	0.764	Succinic acid			
0.947	0.560	Malic acid			
1.030	0.577	α-Ketoglutaric acid			
0.744	1.028	Threonic acid		Sugars (7)	
0.786	0.917	Xylitol			
1.020	1.703	Glycerophosphate			
0.430	2.509	Pinitol		Fatty acid (4)	
1.031	1.238	Fructose			
1.054	0.992	Glucose			
0.775	1.058	myo-Inositol			
1.081	0.885	Palmitic acid		Etc.(1)	
1.437	0.969	Linoleic acid			
0.882	0.927	Stearic acid			
0.900	0.944	Monopalmitin			
1.164	1.170	Hydroxylamine			

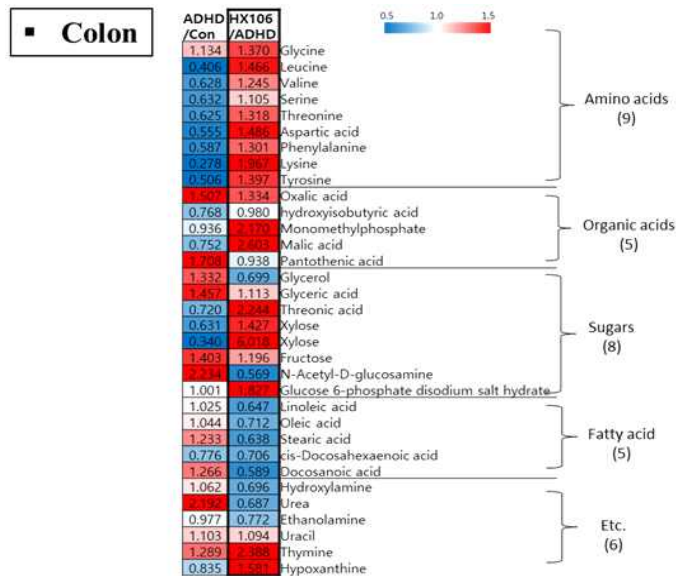
[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 혈청시료의 GC-TOF-MS분석에 따른 처리군간의 대사체 함량비교]

- ① 간 조직에 대한 데이터 다변량 통계분석 결과, 그룹별 차이나는 대사체를 선별하고 함량 패턴을 비교하였음
- ② 간 조직 분석 대사체 함량비교 결과, amino acid, fatty acid는 ADHD 모델의 경우 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보이는 반면, 대조적으로 ADHD+HX106 모델은 감소하는 경향을 보였음. 또한 ADHD+HX106을 투여 모델의 경우, organic acid, sugar 계열의 대사체가 섭취에 의해 증가되는 결과를 보였음



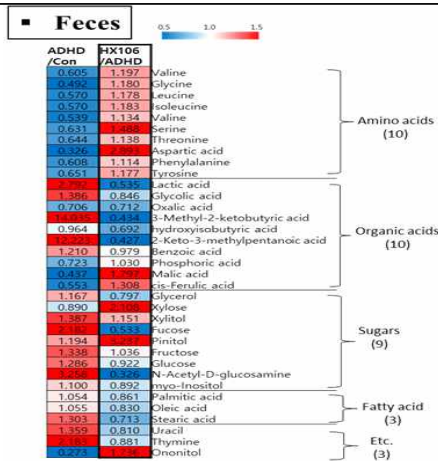
[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 간조직 시료의 GC-TOF-MS분석에 따른 처리군간의 대사체 함량비교]

- ③ 대장조직에 대한 PLS-DA 모델을 기반으로 차이나는 대사체를 선정하고 함량 패턴을 비교하였음.
- ④ 대장조직 분석 대사체 함량비교 결과, amino acid, organic acid, sugar 계열의 대사체가 ADHD 모델의 경우 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보이는 반면, 대조적으로 ADHD+HX106 모델은 증가하는 경향을 보였으며, ADHD+HX106을 투여 모델의 경우, fatty계열의 대사체가 섭취에 의해 감소되는 결과를 보였음



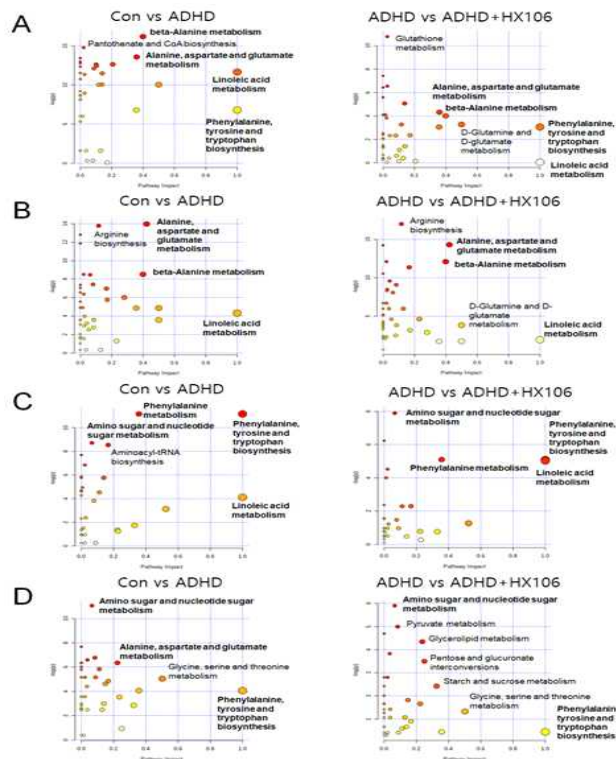
[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 대장조직 시료의 GC-TOF-MS분석에 따른 처리군간의 대사체 함량비교]

- ⑤ 분변 시료부터 얻어진 PLS-DA 모델을 통해 차이나는 대사체를 선정하고, 함량 패턴을 비교하기 위해 heatmap analysis을 진행하였음
- ⑥ 분변 분석 대사체 함량비교 결과, amino acid 계열의 대사체가 ADHD 모델의 경우 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보이는 반면, 대조적으로 ADHD+HX106 모델은 증가하는 경향을 보였음
- ⑦ 반대로, fatty acid 계열은 ADHD 모델의 경우 대조군에 비하여 증가하는 경향을, ADHD+HX106 모델은 감소하는 경향을 보였음
- ⑧ 또한 ADHD+HX106을 투여 모델의 경우, pinitol, benzoic acid와 같은 일부 compound를 제외하고 대체적으로 organic acid, sugar가 HX106 섭취에 의해 대체적으로 감소되는 결과를 보였음



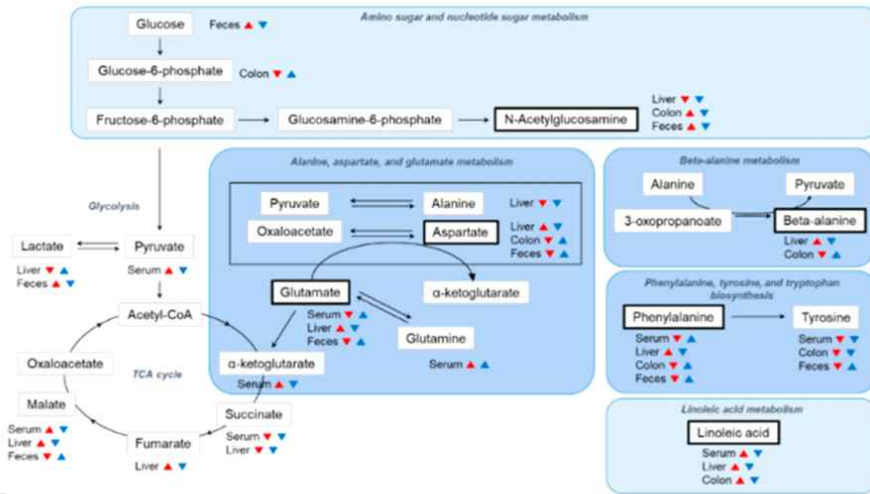
[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 분변 시료의 GC-TOF-MS분석에 따른 처리군간의 대사체 함량비교]

- ⑨ 뇌조직(Striatum) PLS-DA 모델은, 그룹간의 차이는 보이나, ADHD군과 ADHD+HX106군이 혼재되는 경향을 보이며, PCA 모델에 대한 R2X, Q2의 값이 낮아 정확도가 낮음
- ⑩ PLS-DA를 통해 세 그룹간의 차이를 보이나 모델의 통계적 수치가 적합하지 않아 그룹별 비교를 진행하지 않음
- ⑪ 6가지 생체 시료 중 처리 군 간의 비교에 신뢰가 높은 통계모델이 나온 혈청, 간, 대장, 분변 조직 중에서 차이 나는 대사체 및 경로를 살펴보고, 이를 통해 대사 변화는 혈청과 간, 대장과 분변간에 유사하게 나타났음. 혈장 및 간 샘플에서 알라닌, 아스파르테이트 및 글루탐아메이트 대사 및 베타-알라닌 대사가 ADHD 및 ADHD+HX106 처리 모두에 의해 크게 변경되는 것으로 나타났으며, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 생합성 및 리놀레산 대사는 결장 샘플에서, 아미노 당과 뉴클레오타이드 당 대사는 결장 및 대변 샘플 모두에서 강조되었음



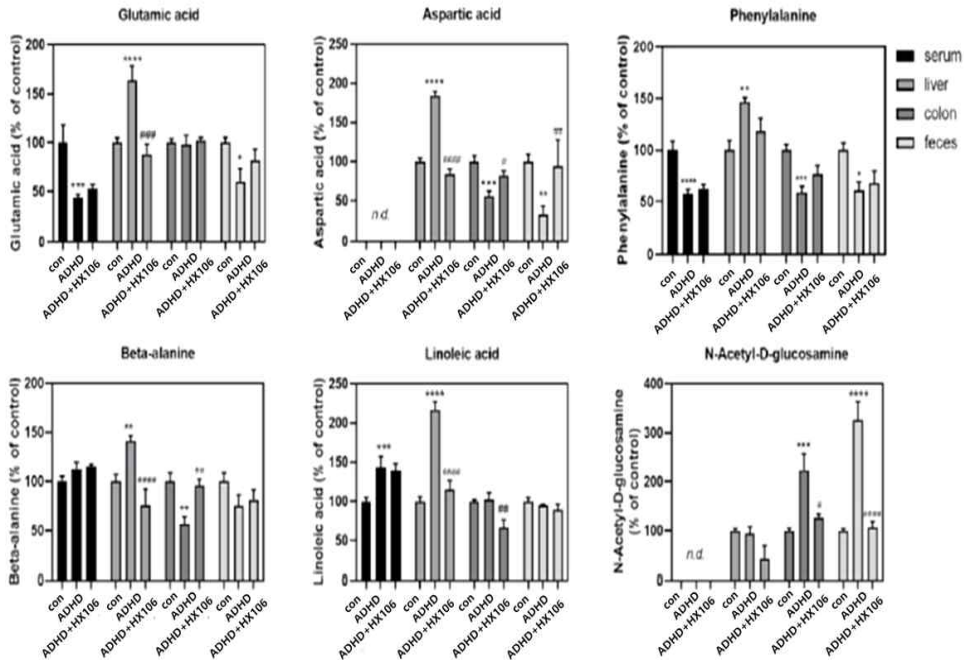
[에탄올 유도 ADHD 모델간 변화된 대사체의 조직별 대사경로 비교. (A) 혈장, (B) 간, (C) 대장, (D) 분변]

- ⑫ ADHD 군과 ADHD+HX106군이 대조구 대비 증감패턴이 다른 것을 바이오마커로 선별하기 위해서 각각의 대사체를 면밀히 살펴보기 위해서 Box plot 및 metabolic pathway로 살펴보고, glutamic acid, aspartic acid, phenylalanine, beta-alanine, linoleic acid, N-acetyl-D-glucosamine의 증감변화를 살펴봄으로써 바이오마커로 제시할 수 있을 것으로 사료됨



Red arrow : 대조군 대비 ADHD군에서의 대사체 증가
 Blue arrow : ADHD군 대비 ADHD+HX106군에서의 대사체 증가

[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 생체 시료 (혈청, 간, 대장, 분변)의 처리군 간의 변화된 대사체와 대사경로]



[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 생체 시료 (혈청, 간, 대장, 분변)의 GC-TOF-MS 분석 주요 대사체에 대한 상대적인 함량 비교결과]

(4) 알츠하이머 유도 모델의 MT104 투여에 따른 혈청 및 뇌 조직 대사체 프로파일링에 따른 효능 관련 마커 발굴

(가) MT104 투여에 의한 변화를 알고자 정상 대조군 (W), 정상 대조군+MT104 투여군 (WM), 알츠하이머 질환 모델 (A), 알츠하이머 질환모델+MT104 투여군 (AM)의 4개의 실험군에 대한 뇌, 혈청에 대한 1,2차 대사체에 대한 프로파일링을 수행함

① 대사체 프로파일링에 사용한 시료는 아래와 같음

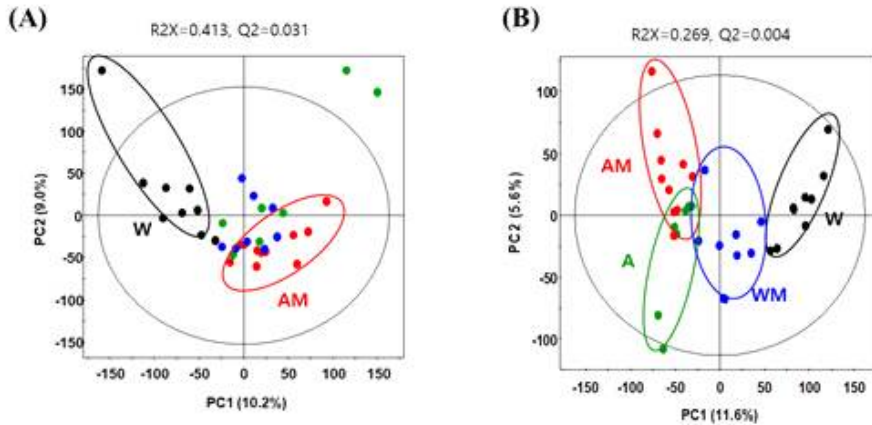
[에탄올 유도 ADHD 모델 유래 시료 중 대사체 프로파일링에 사용한 시료 목록]

Tissue	실험군별 분석 개체수
brain	W (n=4), WM(n=4), A(n=5), AM(n=5)
plasma	W (n=8), WM(n=9), A(n=8), AM(n=10)

- ② 알츠하이머 유도 모델 내 MT104 섭취에 따른 효능 특이적 내인성 대사체 변화 확인하고자 대사체 프로파일링 수행함

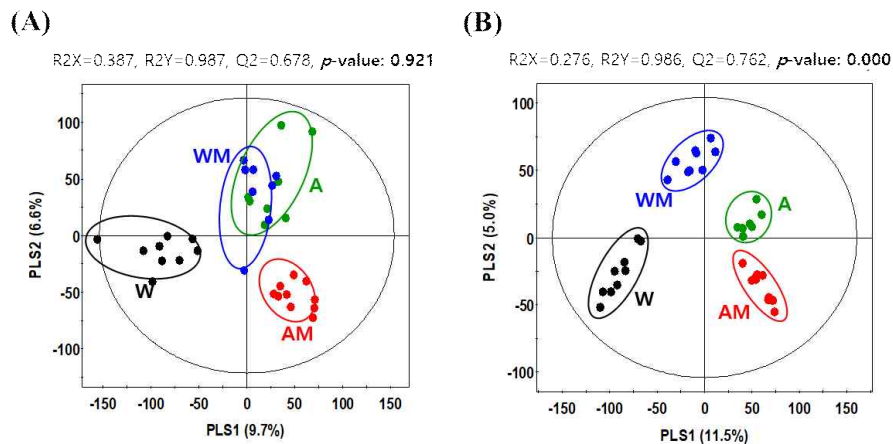
(나) 혈청 시료에 대한 대사체 분석

- ① 혈청 대사체 추출물 이용 기기분석 후 다변량 통계분석을 수행하였음
 ② PCA 분석을 통해 실험 군 간 대사체 pattern analysis를 수행하였음
 ③ PCA 분석 결과, GC-TOF-MS는 정상대조군(W)이 나머지 실험 군과 PC1(10.2%)에 의하여 구분지어지는 경향이 보임
 ④ UHPLC-Q-Orbitrap-MS에 의한 프로파일링에서는 PC1 (11.6%)에 의해서 정상군(W, WM)과 알츠하이머 유도군 (A, AM)으로 구분지어지는 경향이 보임



[GC-TOF-MS (A) 와 UHPLC-Q-Orbitrap-MS (B) 분석에 따른 혈청 대사체 프로파일링의 Principal component analysis (PCA) 결과]

- ⑤ PLS-DA 분석 결과, 두 기기분석 모두 각 처리 그룹별로 clustering 되었음
 ⑥ GC-TOF-MS 는 크게 [W] / [WM, A] / [AM]으로 PLS1 (9.7%)과 PLS2 (6.6%)에 의해 나뉘는 확인함
 ⑦ UHPLC-Q-Orbitrap-MS 분석 결과, PLS1 (11.5%)에 의해서 Wild type [W, WM]과 5Xfad [A, AM]로 나뉘었고, PLS2 (5.0%)에 의해서 크게 [W, AM], [WM, A]로 구분됨
 ⑧ 두 기기분석을 비교할 때 LC-MS에서는 각 그룹별로 모두 뚜렷하게 구분되나, GC-TOF-MS에서는 [WM]과 [A]가 혼재되는 경향을 보임



[GC-TOF-MS (A) 와 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 분석에 따른 혈청 대사체 프로파일링의 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) 결과]

- ⑨ GC-TOF-MS로부터 얻은 dataset를 그림2.A의 PLS-DA에서 얻은 VIP1, VIP2 수치를 기준(>0.7)으로 혈청 내 각각 실험군간 차이나는 대사물질을 선별 및 동정하였음

- ⑩ 혈청에서 아미노산 9종, 당류 11종, 지방산 및 지질류 10종, 유기산 2종, 기타 2종이 차이나는 대사체로 선별되었음.
- ⑪ Heatmap analysis을 통해 그룹간의 차이를 보기 위해 선별된 혈청 대사체에 대한 상대적 함량비교를 나타내고 분석을 수행하였음
- ⑫ 아미노산의 경우, 대체적으로 MT104 투여군인 WM, AM이 각 대조군 W, A에 비해 공통적으로 증가하는 패턴을 보였음.
- ⑬ 그 중, glycine, serine, valine 은 정상 대조군인 W와 질병 대조군인 A를 비교하였을 때 감소한 것을 미루어 보아 알츠하이머 유발에 의해 아미노산이 감소하는데 반해 MT104 섭취에 의하여 반대로 증가하는 패턴을 보이는 것이 특징적임.
- ⑭ 반대로 isoleucine은 알츠하이머 유발에 의해 증가하는 패턴을 보인 반면, MT104 투여에 의해 WM, AM 모두 각 대조군 대비 감소하는 패턴을 보여 상반되는 결과를 보였음.
- ⑮ 당 관련 대사체는 ribose, arabinose, adonitol, mannose, glucose, myo-inositol 등 대체로 wild type에선 MT 104 투여에 의해 증가하는 패턴을 보였으나, 5xFAD에선 MT104 투여군에서 감소하며 상이한 패턴을 보임.
- ⑯ 그러나, acetyl-coenzyme A, anhydroglucitol은 공통되게 증가하는 패턴을 보였고. 그 중, anhydroglucitol은 알츠하이머 유발인 A와 wild type W를 비교했을 때 반대로 감소하는 패턴을 보였음.
- ⑰ 지방산의 경우, 정상군 대비 알츠하이머 유발군과 알츠하이머 유발 군내에서의 MT 104에서 모두 감소하는 경향을 보였음.
- ⑱ 정상군 내에서의 MT104투여군은 대조군 대비 각 대사체 마다 상이한 패턴을 보였고, 3-Hydroxyisovaleric acid, Nonanoic acid, Oleamide, Palmitic acid는 감소하는 패턴을 보여 알츠하이머 유발군의 MT104 투여군과 같은 패턴을 보임.
- ⑲ 유기산의 경우, citric acid는 MT104투여군 WM, AM에서 공통적으로 각 대조군에 비해서 상대적으로 증가하는 패턴을 보였고, 알츠하이머 유발인 A와 W와 비교에서도 증가하는 패턴을 보임.
- ⑳ glycolic acid는 AM는 상대적으로 증가하는 반면 WM, A는 대조군 대비 상대적으로 감소하는 패턴을 보였음.

(A)

A/W	WM/W	AW/A	
0.91	1.35	1.81	Glycine *
0.75	1.15	1.61	Serine
0.74	1.23	1.81	Valine
1.24	0.96	0.75	Isoleucine
1.15	1.16	1.06	Phenylalanine
1.05	1.49	1.16	Pyroglutamic acid
1.00	1.18	1.45	Methionine
1.89	1.35	0.83	Taurine
0.87	0.83	1.23	Tryptophan
0.90	1.00	1.20	1,5-Anhydroglucitol
1.12	1.16	1.06	Acetyl coenzyme A2 *
1.01	1.00	1.00	Glucose
1.93	1.72	0.22	Glycerol
1.91	1.14	0.71	Allantoin
1.31	1.44	0.75	Arabinose
1.31	1.57	0.86	Ribose *
1.28	1.10	0.81	Myo-Inositol
1.26	1.14	1.00	Threonic acid
1.02	1.06	0.85	Adonitol
0.58	0.83	1.58	Fructose
0.95	1.06	0.93	Mannose
0.99	0.72	0.59	3-Hydroxyisovaleric acid *
0.91	0.89	0.96	Nonanoic acid
0.87	0.86	0.99	Oleamide *
0.51	0.91	0.54	Palmitic acid *
2.20	1.34	0.56	2-Hydroxyisobutyric acid
1.00	1.13	0.81	Myristic acid
0.93	1.24	0.85	1-Monopalmitin
0.90	1.08	0.88	Stearic acid
0.89	1.09	0.65	Oleic acid
0.84	1.37	0.93	1-Monostearin
1.19	1.41	1.06	Citric acid
0.79	0.78	1.03	Glycolic acid *
0.97	1.01	1.01	Ethylene glycol

(B)

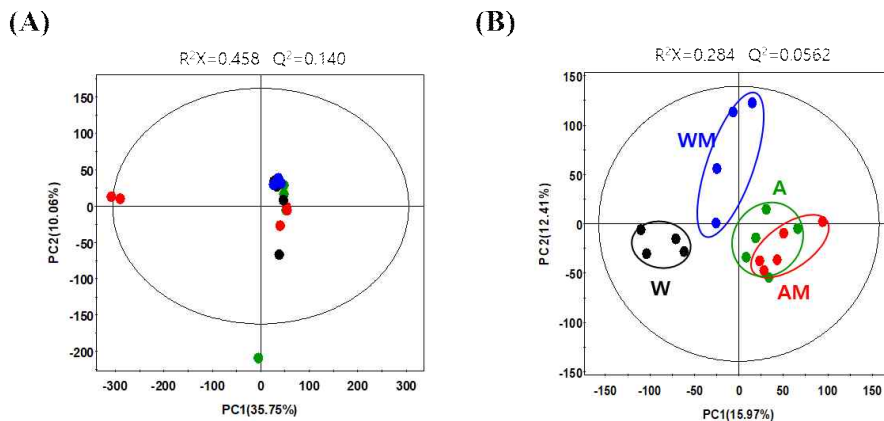
A/W	WM/W	AW/A	
1.15	1.05	1.02	Phosphatytrosine
0.90	0.92	1.15	tert-butylloxycarbonyl-O-phosphotyrosine
1.18	1.15	1.03	Linoleamide
1.09	1.07	1.01	Oleamide
1.27	1.19	1.04	Palmitamide
1.44	1.30	0.80	Stearamide
1.13	0.98	1.01	Monoethanolamine myristate
1.28	0.95	0.88	Lys oPC(22:6)
1.51	2.70	1.05	Lys oPC(18:4)
1.40	1.17	0.82	Lys oPE (20:4)
1.41	1.31	0.88	Lys oPC(16:1)
3.02	2.28	0.76	Lys oPC(18:1)
0.90	0.88	1.07	Lys oPC(18:2)*
1.05	0.92	1.07	Lys oPC(20:3)
1.11	0.95	1.02	Lys oPC(20:4)
0.96	0.92	0.93	Lys oPC(16:0)*
0.94	0.97	0.95	Lys oPC(18:0)*
0.96	1.29	0.90	Lys oPC(19:0)
1.45	1.15	1.03	Sphinganine
1.06	0.97	1.04	Tetradecaphtos phingosine

[GC-TOF-MS 분석 (A)과 UHPLC-Q-Orbitrap-MS (B)에 따른 각 실험군의 차이나는 혈청 대사체 상대적인 함량 비교분석 결과]

- ㉓ UHPLC-Q-Orbitrap-MS로부터 얻은 PROFILING DATA를 PLS-DA에서 얻은 VIP1, VIP2 수치를 기준(>0.7)으로 혈청 내 각각 실험군간 차이나는 대사물질을 선별 및 동정하였음.
- ㉔ 혈청에서 아미노산 2종, fatty amide 5종, glycerophospholipids 11종, sphingolipids 2종이 차이나는 대사체로 선별되었음.
- ㉕ 그룹간의 차이를 보기 위해 선별된 혈청 대사체에 대한 상대적 함량비교를 나타내고 분석을 수행하였음
- ㉖ 아미노산의 경우, Phosphatytrosine 은 알츠하이머 유발에 의해서 대조군 대비 함량이 증가하는 패턴을 보였고, MT104 투여군 WM, AM 모두 동일하게 대조군 대비 함량이 증가하는 패턴을 보였음.
- ㉗ tert-butylloxycarbonyl-O-phosphotyrosine은 WM, AM의 패턴이 대조군 대비 상이하게 나타났음.
- ㉘ Fatty amide의 경우, 알츠하이머 유발 A가 W대비 증가하는 경향을 보이고, MT투여군 WM, AM 이 동일하게 대조군 대비 증가하는 패턴을 보임.
- ㉙ Unsaturated glycerophospholipids는 대체로 알츠하이머 유발 시 증가하는 경향을 보였고, WM, AM 은 대조군 대비 증감에 대해서 compounds 마다 상이한 패턴을 보였으며, WM, AM의 패턴이 동일하지 않았음.
- ㉚ Saturated glycerophospholipid는 알츠하이머 유발 시 감소하는 경향을 보였으며, MT104 투여에 의해서도 두 집단 WM, AM 모두 대조군 대비 동일하게 감소하는 패턴을 보였음.
- ㉛ Shingolipid는 알츠하이머 유발 시 증가하는 경향을 보였고, MT104 투여에 의해 대체로 증가하는 경향을 보였음.

(다) 뇌 조직에 대한 대사체 프로파일링

- ① 뇌조직 대사체 추출물 이용 기기분석 후 다변량 통계분석을 수행하였음
- ② PCA 분석을 통해 실험 군 간 대사체 pattern analysis를 수행하였음
- ③ PCA 분석 결과, GC-TOF-MS는 실험군이 다소 혼재되는 경향을 보임. 그러나, UHPLC-Q-Orbitrap-MS는 각 그룹간의 clustering을 보이면서 PC1 (15.97%)에 의해서 정상군(W, WM)과 알츠하이머 유도군 (A, AM)으로 구분지어지는 경향이 보임

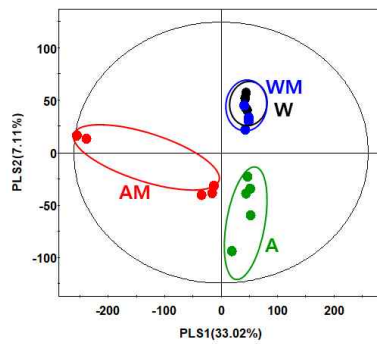


[GC-TOF-MS (A) 와 UHPLC-Q-Orbitrap-MS (B) 분석에 따른 뇌조직 대사체 프로파일링의 Principal component analysis (PCA) 결과]

- ④ PLS-DA 분석 결과, 두 기기 분석 모두 각 처리 그룹별로 clustering을 보였음
- ⑤ GC-TOF-MS 기반 프로파일링에 의한 모델의 경우, [W, WM]/[A]/[AM]으로 PLS1 (33.02%)과 PLS2 (7.11%)에 의해 나뉘는 확인함
- ⑥ UHPLC-Q-Orbitrap-MS의 경우, PLS1 (15.69%)에 의해서 Wild type [W, WM]과 5xFAD [A, AM]로 나뉘었고, PLS2 (11.86%)에 의해서 크게 [W], [WM, A, AM]로 구분됨

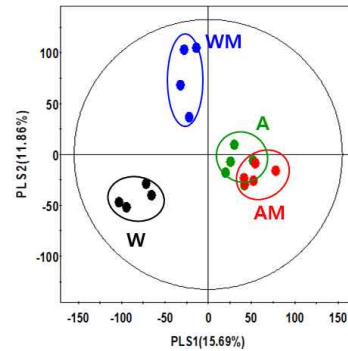
(A)

$R^2X=0.690$ $R^2Y=0.995$ $Q^2=0.852$ $p\text{-value} : 0.999$



(B)

$R^2X=0.499$ $R^2Y=0.994$ $Q^2=0.745$ $p\text{-value} : 0.819$



[GC-TOF-MS (A) 와 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 분석에 따른 뇌조직 대사체 프로파일링의 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) 결과]

- ⑦ GC-TOF-MS로부터 얻은 프로파일링 데이터를 PLS-DA에서 얻은 VIP1, VIP2 수치를 기준(>0.7)으로 뇌조직 내 각각 실험군간 차이나는 대사물질을 선별 및 동정하였음
- ⑧ 뇌조직에서 아미노산 12종, 지방산 및 지질류 12종, 유기산 6종, 퓨린 및 피리미딘류 5종, 당류 4종, 비타민 2종이 차이나는 대사체로 선별되었음
- ⑨ Heatmap analysis를 통해 그룹간의 차이를 보기 위해 선별된 뇌조직 대사체에 대한 상대적 함량비교를 나타내고 분석을 수행하였음
- ⑩ 아미노산의 경우, 알츠하이머 유발 시 대체로 감소하는 경향을 보였고, MT104 투여에 의해서 대사체마다 상이한 패턴을 보였음
- ⑪ 그 중, aspartic acid, phenylalanine, threonine은 MT104투여에 의해 WM, AM 모두 증가하는 패턴을 보여 알츠하이머 유발로 반대되는 경향을 보임
- ⑫ 또한 GABA, glutamic acid는 정상군에서는 감소하였으나, 5xFAD 유발 모델의 MT104투여에서 증가하는 패턴을 보였음
- ⑬ 반대로 valine, isoleucine은 알츠하이머 유발 시 증가하는 경향을 보였으나, 질병 모델의 MT104투여군에서 대조군 대비 다소 감소하는 경향을 보임
- ⑭ 당류의 경우, 알츠하이머 유발 시 증가하는 경향을 보였고, MT104 투여에 의해 WM, AM에서 공통적으로 감소 패턴을 보인 것은 Scyllo-Inositol였음
- ⑮ 지방산의 경우, 알츠하이머 유발 시 감소하는 경향을 보였고, Arachidonic acid, Monostearin, Oleamide는 MT104투여군 WM, AM에서 대조군 대비 다소 증가하는 경향을 보임
- ⑯ 유기산의 경우, 대체로 알츠하이머 유발 시 감소하는 경향을 보였고, malic acid, oxalic acid는 MT104 투여에 의해 다소 증가하는 경향을 보였음
- ⑰ Succinic acid는 5xFAD의 MT104 투여군에서만 대조군 대비 증가하는 경향을 보였음
- ⑱ Hydroxyglutaric acid는 알츠하이머 유발에 의해 증가하는 패턴을 보였고, MT104 투여에 의해 공통적으로 감소하는 경향을 보였음.

(A)

A/W	WM/W	AW/A	
0.59	1.01	1.18	Aspartic acid
0.68	1.11	1.14	Phenylalanine
0.82	1.12	1.06	Threonine
0.58	1.00	0.68	Acetyl Aspartic acid *
0.80	0.26	0.55	Lysine
0.67	0.99	1.09	Gaba
0.71	0.97	1.03	Glutamic acid
1.25	1.40	0.97	Isoleucine
1.25	1.29	1.00	Valine
0.80	1.02	0.97	Glycine
0.89	1.05	0.98	Serine
0.67	1.12	0.76	Tryptophan *
3.27	0.90	0.24	Scyllo-Inositol
1.60	1.00	1.17	Myo-Inositol
2.05	1.53	0.60	Fructose *
2.27	1.29	0.70	Mannose
2.43	0.41	1.25	Inositol *
0.91	1.00	1.08	Arachidonic acid
0.96	1.01	1.03	Monostearin
0.71	1.10	1.06	Oleamide
0.84	1.01	0.97	Octadecanoic acid
0.94	1.02	0.94	Oleic acid
0.86	1.00	1.00	Palmitic acid
0.82	1.03	1.07	Malic acid
0.74	1.00	1.18	Oxalic acid
1.31	0.93	0.65	Hydroxyglutaric acid
0.82	0.98	0.92	Lactic acid
0.40	0.91	1.85	Succinic acid
0.75	1.20	0.36	Urea *
0.55	0.93	1.16	Guanosine
0.67	0.97	1.11	Inosine
1.28	1.01	0.91	Uridine
0.68	1.01	0.93	Hypoxanthine
0.93	1.01	0.87	Uracil
0.96	1.00	1.12	Ascorbic acid
1.62	0.89	1.17	Pantothenic acid

(B)

A/W	WM/W	AW/A	
12.30	9.97	1.08	LysoPE(22:4)
1.18	0.92	1.07	LysoPC(16:1)
1.04	0.93	1.07	LysoPC(22:6)
1.06	0.90	1.09	LysoPC(20:4)
1.07	0.92	1.01	LysoPC(18:2)
1.19	0.93	1.04	LysoPC(18:1)
1.20	0.89	0.98	LysoPE(16:0)
1.10	0.82	0.92	LysoPC(17:0)
1.38	0.92	0.87	LysoPC(15:0)
1.36	0.99	0.85	LysoPC(18:0)
1.31	0.97	1.04	LysoPC(16:0)
0.86	0.98	0.89	Oleamide
0.65	0.95	0.82	Octadecanamide
0.73	1.01	0.71	Palmitic amide
0.95	1.13	0.76	Linoleamide
1.20	1.13	0.95	Tetradecanaphinganine
1.19	1.41	0.97	Phytosphingosine
1.06	0.94	1.04	Pantothenic acid
1.18	1.06	0.92	Glutamyl-Phenylalanine

[GC-TOF-MS 분석 (A) 과 UHPLC-Q-Orbitrap-MS (B) 에 따른 각 실험군의 차이나는 뇌조직 대사체 상대적인 함량 비교분석 결과. W, wild-type 정상 대조군; WM, wild type+MT104 투여군; A: 5xFAD 알츠하이머 질환 대조군; AM, 5xFAD + MT104 투여군; *, $p < 0.05$]

- ㉑ 퓨린과 피리미딘 계열은, 알츠하이머 유발에 의해 대체로 감소하는 경향을 보였고, Guanosine, Inosine이 5xFAD의 MT104 투여군에서 증가하는 경향을 보임
- ㉒ 비타민의 ascorbic acid는 알츠하이머 유발 시 감소하는 경향을 보였고, MT104 투여군 WM, AM에서 공통적으로 증가하는 경향을 보였음.
- ㉓ UHPLC-Q-Orbitrap-MS 로부터 얻은 프로파일링 데이터를 PLS-DA에서 얻은 VIP1, VIP2 수치를 기준(>0.7)으로 뇌조직내 각각 실험군간 차이나는 대사물질을 선별 및 동정하였음
- ㉔ 뇌조직에서 glycerophospholipids 11종, fatty amide 4종, sphingolipid 2종, 기타 2종이 차이나는 대사체로 선별되었음
- ㉕ Heatmap analysis을 통해 그룹간의 차이를 보기 위해 선별된 뇌조직 대사체에 대한 상대적 함량비교를 나타내고 분석을 수행하였음
- ㉖ Unsaturated glycerophospholipid는 알츠하이머 유발에 의해 증가하는 경향을 보였고, WM의 경우 대조군 대비 감소하는 경향을, AM은 증가하는 경향을 보였음
- ㉗ Saturated glycerophospholipid는 알츠하이머 유발 시 증가하는 경향을 보였고, 대체로 MT104 투여에 의해 WM, AM 모두에서 감소하는 경향을 보였음.
- ㉘ Fatty amide 계열은 알츠하이머 유발 시 감소하는 경향을 보였고, MT104투여에 의해서도 마찬가지로 감소하는 경향을 보였으며, Sphingolipids는 알츠하이머 유발 시 증가하는 경향을 보였고, 5xFAD의 MT104 투여군에서만 반대로 감소하는 경향을 보였음

(라) 장관 유래 미생물에 의한 우울증 및 효능 관련 대사체 연구

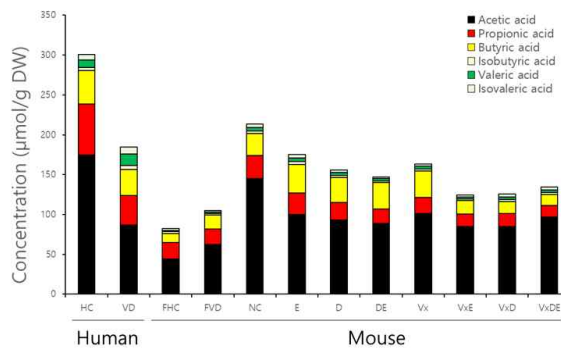
- ① 우울증 관련인 균주 및 대사체 상관관계를 알아보기 위해, 건강한 사람과 우울 지수가 높은 사람의 feces를 마우스 모델에 대하여 fecal microbiota transplantation (FMT), 균주 투여 등을 함으로써 생체 간 차이를 알기 위해 대사체 프로파일링을 진행함
- ② 그룹별 정보 및 시료 수에 대한 정보는 아래와 같음

Host	Group	Description	Sample	Number
Human	HC	건강한 사람	Feces	7
	VD	우울 지수 높은 지원자	Feces	7
Mouse	FHC	건강한 사람 분변 투여	Feces	7
			Plasma	9
	FVD	우울증 사람 분변 투여	Feces	7
			Plasma	9
	NC	비저리군	Feces	7
			Plasma	9
	E	E균 투여	Feces	7
			Plasma	9
	D	D균 투여	Feces	7
			Plasma	9
	DE	D+E균 투여	Feces	7
			Plasma	9
	Vx	미주신경절제 수술 군	Feces	7
			Plasma	9
	VxE	수술 후 E균 투여	Feces	7
			Plasma	9
	VxD	수술 후 D균 투여	Feces	7
			Plasma	9
VxDE	수술 후 D+E균 투여	Feces	7	
		Plasma	9	

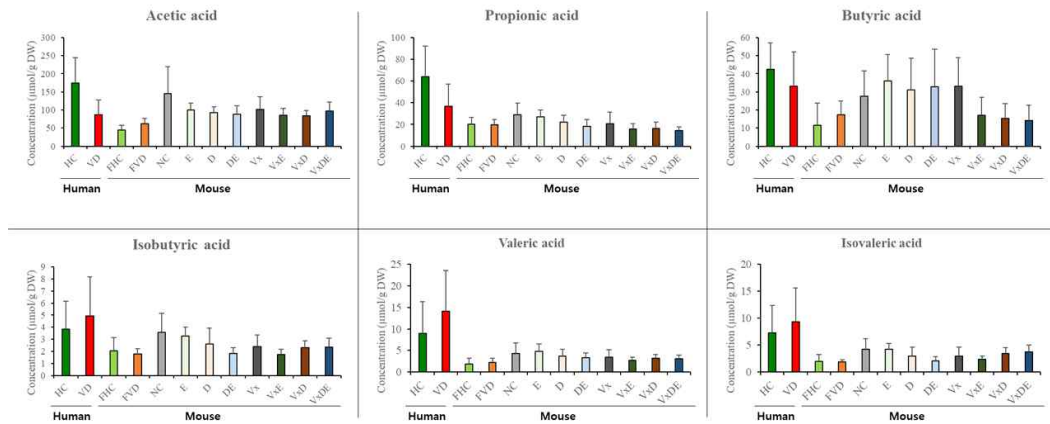
[우울증 관련 인체 및 마우스 모델의 생체 시료 정보]

(마) 우울증 질환 관련 분변 내 short chain fatty acids (SCFAs) 정량 분석

- ① 분변 시료 내 SCFAs 와의 상관관계를 알아보기 위해서 UPLC-Q-TOF-MS를 이용하여 6가지 물질에 대하여 정량분석을 진행하였음.
- ② 6가지 SCFAs에 대한 Total SCFAs의 양을 비교하였을 때, Human 그룹에선 건강한 사람이 우울 지수가 높은 사람에 비해 총량이 높은 것을 알 수 있음. 또한 Mouse 그룹은, NC>E>Vx>D>DE>VxDE>VxD>VxE>FVD>FHC순으로 높게 나타났음
- ③ 각각의 SCFAs에 대한 그룹별 함량비교 결과, Human 분변시료는 주요 단쇄지방산인 Acetate, Propionate, Butyrate가 건강한 사람에서, Isobutyrate, Valerate, Isovalerate 는 우울한 사람에서 상대적으로 높은 함량을 보였음
- ④ Mouse 분변시료에서는 대체로 정상 쥐 대조구가 가장 높은 함량을 보였고, Butyrate, Valerate는 E균 투여구가 정상 쥐 대조구보다 높은 함량을 보였음



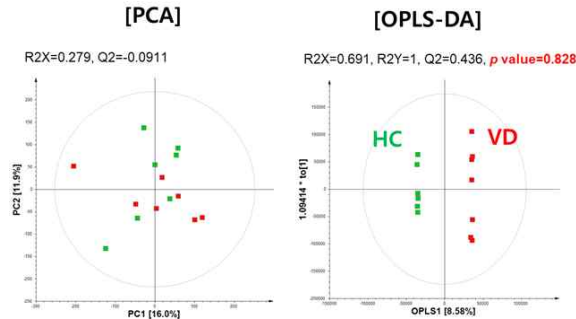
[분변 시료의 각 그룹별 단쇄 지방산 총량]



[분변 시료 내의 6가지 SCFAs의 그룹별 함량]

(바) 우울증 질환 관련 human feces 시료의 다변량 통계분석

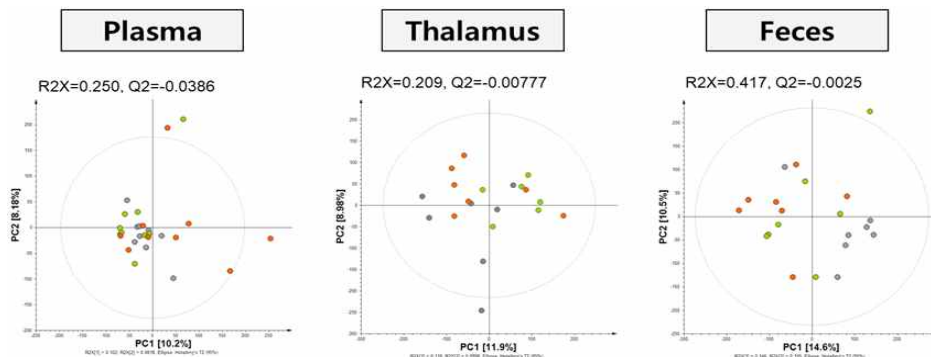
- ① 사람 분변 대사체 추출물에 대하여 GC-TOF-MS 기기분석 후 다변량 통계분석을 수행하였음
- ② PCA 분석 결과, 건강한 사람 그룹 (HC) 과 우울 지수가 높은 그룹이 (VD)가 혼재되는 경향을 보였으며, OPLS-DA 분석 결과, OPLS1 (8.58%)에 의해서 HC와 VD 그룹이 뚜렷하게 구분되어짐



[사람 분변의 대사체 시료에서 건강한 사람과 우울 지수가 높은 두 그룹에 대한 GC-TOF-MS 분석에 대한 다변량 통계분석 결과]

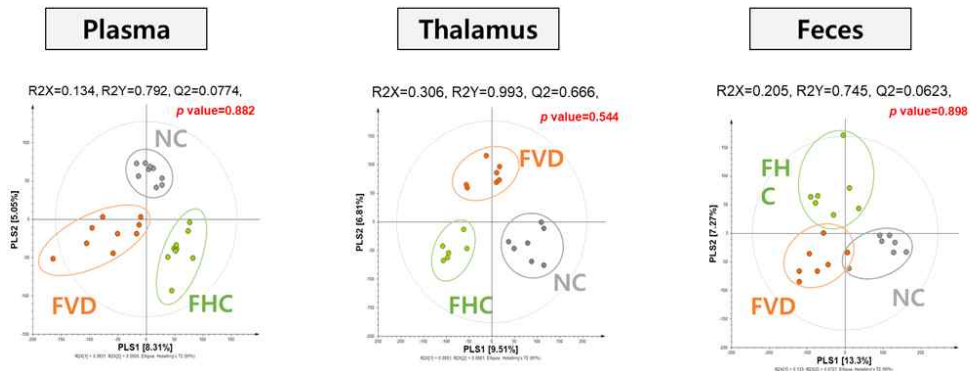
(사) 우울증 질환 분변 및 장관 유래 미생물을 통한 마우스 모델의 생체 시료 대사체 분석

- ① 분변 및 장관 유래 미생물을 이용한 총 10개의 마우스 그룹에 대하여 FMT군, 정상쥐에 대한 균주 투여군, 수술 쥐에 대한 균주 투여군 간의 차이를 알아보기 위해서 3가지 SET로 나누어 다변량 통계분석을 진행함
- ② 먼저, Set1은 FMT에 대한 영향을 알아보기 위해, 건강한 사람 분변을 이식한 FHC, 우울지수가 높은 사람의 분변을 이식한 FVD, 아무것도 투여하지 않은 정상 쥐 NC 그룹을 비교하였음
- ③ PCA 분석 결과, 세 그룹이 혼재되는 경향을 보임



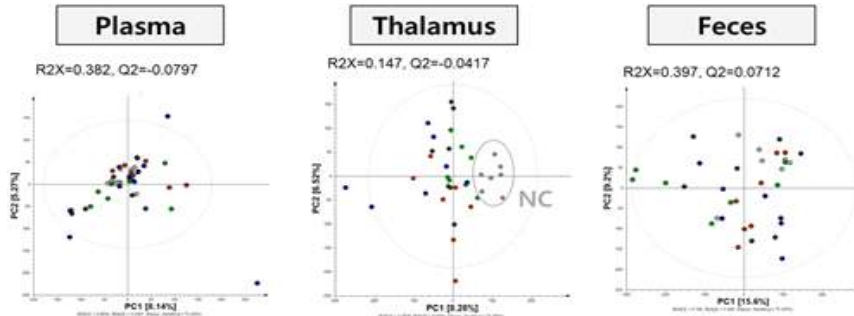
[FMT 이식 마우스 모델의 혈청, 뇌조직, 분변 샘플의 GC-TOF-MS 분석에 대한 Principal component analysis (PCA) 결과]

- ④ PLS-DA 분석 결과, 각 처리군별로 나뉘었으며, Feces은 PLS1에 의해 [NC, FVD], [FHC]로 나뉘었고, Plasma, Thalamus는 PLS1 혹은 2에 의해 [NC, FHC], [FVD]로 나뉠



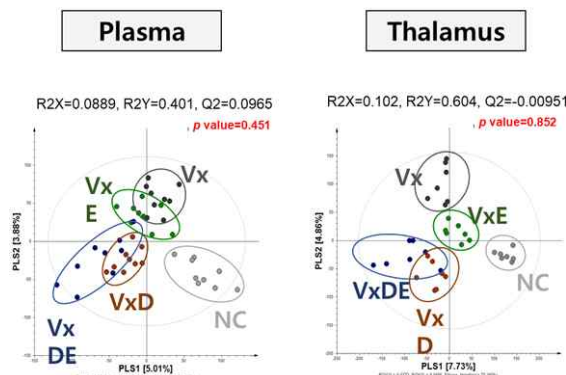
[FMT 이식 마우스 모델의 혈청, 뇌조직, 분변 샘플의 GC-TOF-MS 분석에 대한 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) 결과]

- ⑤ Set2은 미주신경절제 수술에 의해서 장-뇌-축 관련 연관성을 살펴보고자 하였고, 아무것도 투여하지 않은 정상 쥐 NC 그룹, 아무것도 투여하지 않은 수술 쥐 Vx, 수술 쥐에 우울증을 유발하는 것으로 추정되는 D군 투여군 VxD그룹, 유익균이라고 알려진 E군 투여군 VxE그룹, D,E 동시 투여군 VxDE그룹으로 5군을 비교하였음
- ⑥ PCA 분석 결과, 혈청과 분변 시료는 다섯 개의 그룹이 혼재되는 경향을 보였고, thalamus 시료는 NC 그룹과 나머지 나뉠 경향을 보였음



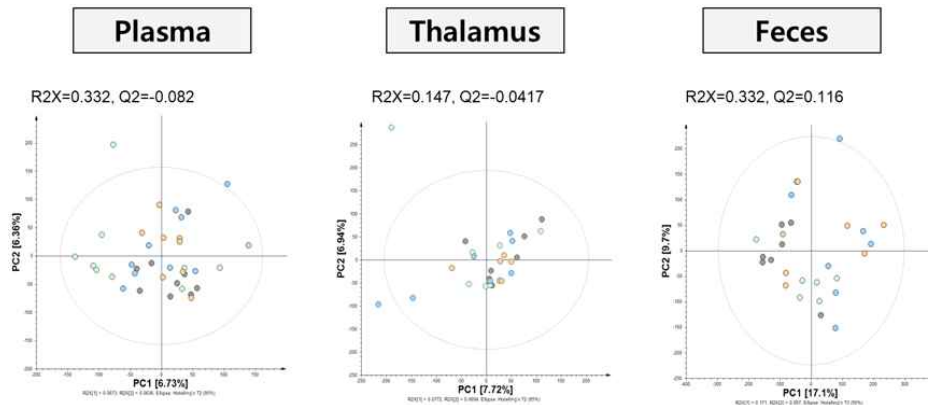
[미주신경 절제술을 시행한 마우스에 균주 투여에 대한 그룹에 대한 혈청, 뇌조직, 분변 샘플의 GC-TOF-MS 분석 기반 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) 결과]

- ⑦ PLS-DA 분석 결과, 분변 시료를 그룹 간의 차이를 보기 위한 모델 형성이 되지 않고, Plasma, Thalamus는 정상쥐 대조군 (NC)와 수술쥐의 뚜렷한 구분을 보였으며, 수술구 내에서 PLS2에 의해서 [Vx, VxE] [VxD, VxDE]로 나뉠



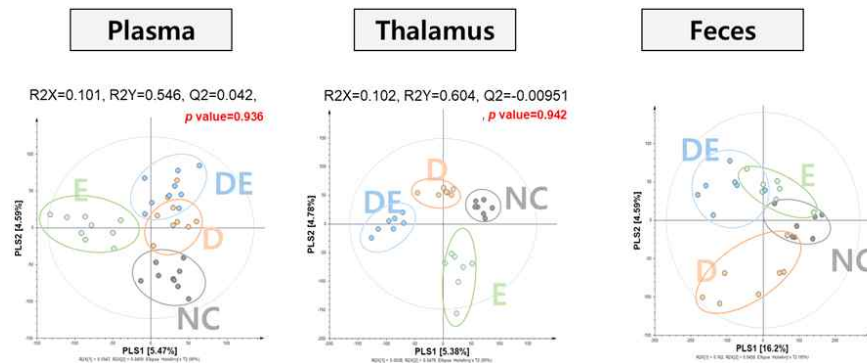
[미주신경 절제술을 시행한 마우스에 균주 투여에 대한 그룹에 대한 혈청, 뇌조직, 분변 샘플의 GC-TOF-MS 분석 기반 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) 결과]

- ⑧ Set3는 사람 분변으로부터 분리한 장관 유래 미생물 투여에 의한 영향을 알아보기 위해, 아무것도 투여하지 않은 정상 쥐 NC 그룹, 정상 쥐에 우울증을 유발하는 것으로 추정되는 D균 투여군 D그룹, 유익균이라고 알려진 E균 투여군 E그룹, D,E 동시 투여군 D+E그룹으로 4군을 비교하였음
- ⑨ 분변으로부터 분리한 장관 유래 미생물 투여에 의한 영향을 알아보기 위해, 아무것도 투여하지 않은 정상 쥐 NC 그룹, 정상 쥐에 우울증을 유발하는 것으로 추정되는 D균 투여군 D그룹, 유익균이라고 알려진 E균 투여군 E그룹, D,E 동시 투여군 D+E그룹으로 4군을 비교하였음
- ⑩ PCA 분석 결과, 네 그룹이 혼재되는 경향을 보임

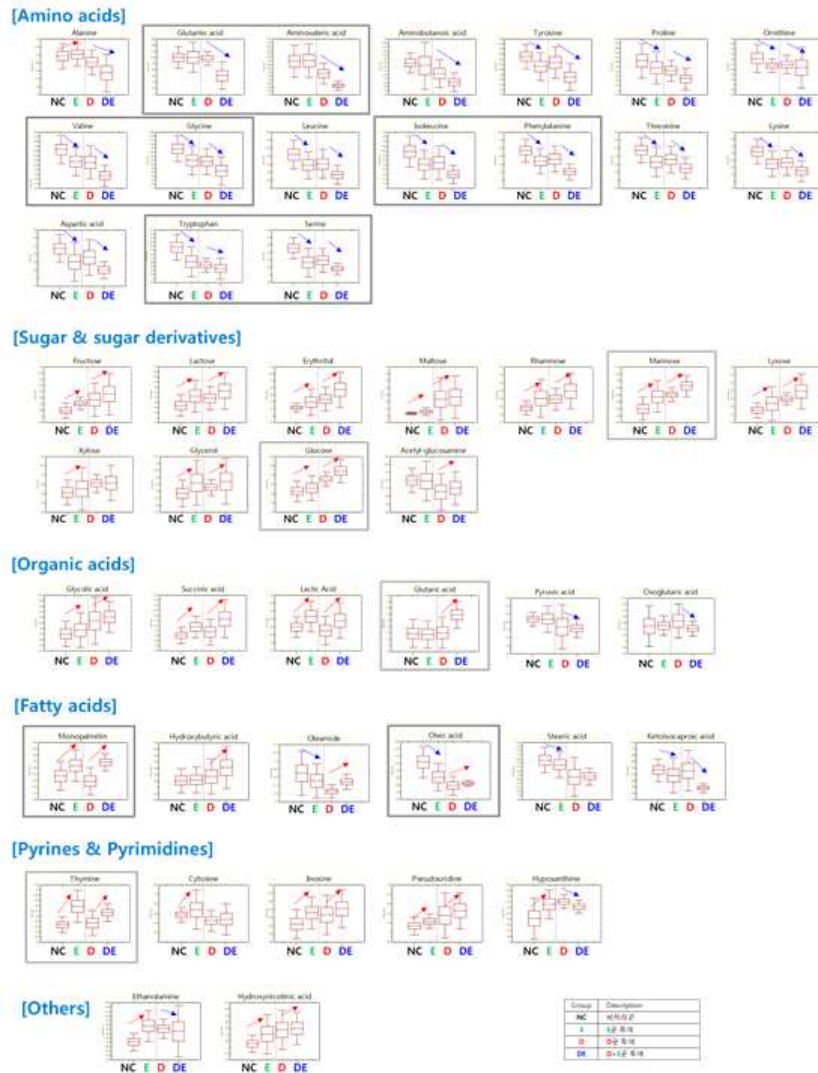


[정상 마우스에 균주 투여에 대한 그룹에 대한 혈청, 뇌조직, 분변 샘플의 GC-TOF-MS 분석 기반 Principal component analysis (PCA) 결과]

- ⑪ PLS-DA 결과, SET3 정상쥐 균주 투여군은 각 처리군별로 나뉘었으며, PLS1에 의해서 Feces는 [NC, E], [D, DE]로, Plasma는 [NC, D, DE] [E], Thalamus는 [NC, D, E] [DE]로 나뉘는 경향을 보임



[정상 마우스에 균주 투여에 대한 그룹에 대한 혈청, 뇌조직, 분변 샘플의 GC-TOF-MS 분석 기반 Principal component analysis (PCA) 결과]



[정상 마우스 투여구의 분변 시료의 그룹별 대사체 함량 비교]

- ⑫ 신바이오틱스 소재 적용 신경정신질환 모델에서의 바이오마커 분석을 위해서 분변에서 분리한 균주 투여구 (SET3, 정상쥐)의 PLS-DA 모델을 기반으로 총 47개의 차이나는 대사체를 선정하고, Box-whisker plot을 통해서 그룹별 함량 패턴을 비교함
- ⑬ 아미노산의 경우, 대체적으로 대조구과 D균 투여구 모두 E균 투여구인 E, DE 에서 상대적으로 함량이 감소하였음
- ⑭ Alanine 은 E균 투여구인 E그룹이 대조구에 비해 상대적으로 함량이 증가한 반면, D균 투여구는 E균 복합 투여구인 DE보다 상대적으로 함량이 감소하였음
- ⑮ 당 관련 대사체의 경우, 대체적으로 대조구과 D균 투여구 모두 E균 투여구인 E, DE 에서 상대적으로 함량이 증가하였음.
- ⑯ 유기산의 경우, 대체적으로 대조구과 D균 투여구 모두 E균 투여구인 E, DE 에서 상대적으로 함량이 증가하였음
- ⑰ Pyruvic acid, Oxoglutaric acid는 E그룹이 대조구에 비해 상대적으로 함량이 유사한 반면, E균 복합 투여구인 DE가 D균 투여구에 비해 상대적으로 함량이 감소하였음
- ⑱ Monopalmitin, Hydroxybutyric acid의 경우, 대조구과 D균 투여구 모두 E균 투여구인 E, DE 에서 상대적으로 함량이 증가한 반면, Stearic acid, 3-Ketobutyric acid 는 감소하는 경향을 보임
- ⑲ Oleamide, Oleic acid 은 E균 투여구인 E그룹이 대조구에 비해 상대적으로 함량이 감소한 반면, D균 투여구는 E균 복합 투여구인 DE보다 상대적으로 함량이 증가하였음
- ⑳ Purine, pyrimidine 대사 관련 물질의 경우, 대조구과 D균 투여구 모두 E균 투여구인 E, DE 에서 상대적으로 함량이 증가하는 경향을 보임

- ㉓ Hypoxanthine 은 E균 투여구인 E그룹이 대조구에 비해 상대적으로 함량이 증가한 반면, D균 투여구는 E균 복합 투여구인 DE보다 상대적으로 함량이 감소하였음
- ㉔ Amine 계열의 Ethanolamine 은, E균 투여구인 E그룹이 대조구에 비해 상대적으로 함량이 증가한 반면, D균 투여구는 E균 복합 투여구인 DE보다 상대적으로 함량이 감소하였음
- ㉕ Vitamin 계열의 Hydroxynicotinic acid 은 대조구과 D균 투여구 모두 E균 투여구인 E, DE에서 상대적으로 함량이 증가하는 경향을 보임
- ㉖ 유의적으로 차이나는 대사체 15개 중, E균 투여 (E, DE)에 의해서 비교구 (NC 정상쥐, D 질환모델쥐) 에서 동일한 패턴을 보이는 것을 E균에 의한 영향으로 추정하고 8개의 대사체를 선정하여 바이오마커로 제시하고자 함
- ㉗ 선정한 바이오마커는 아미노산 계열의 valine, isoleucine, glycine, phenylalanine 4종은 E균 투여에 의해서 감소하는 경향을 보였고, mannose, glyucose 당2종, monopalmin인 lipid 1종, thymine인 pyrimidine 1종은 E균 투여에 의해서 증가하는 경향을 보였음

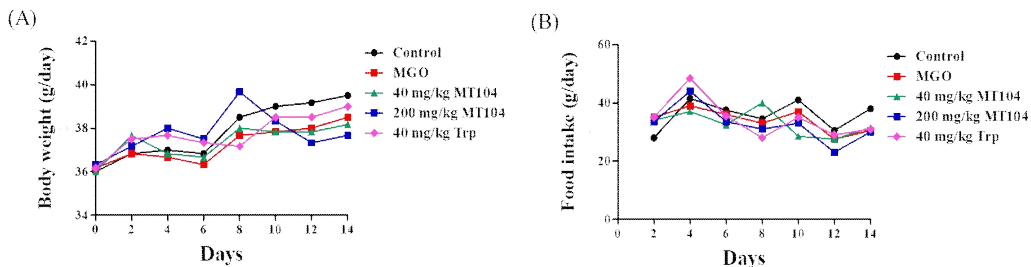
(5) 당독소 관련 연구 기반 신경정신질환 및 신바이오틱스 효능 관련 생체 내 기전 규명

(가) MGO 직장 투여에 의한 우울증 동물모델 구축 및 MT104의 효능 검증

- ① 직장에 당독성 물질인 MGO를 투여한 우울증 유사 모델에서 MT104의 효능을 검증함.

<실험 결과>

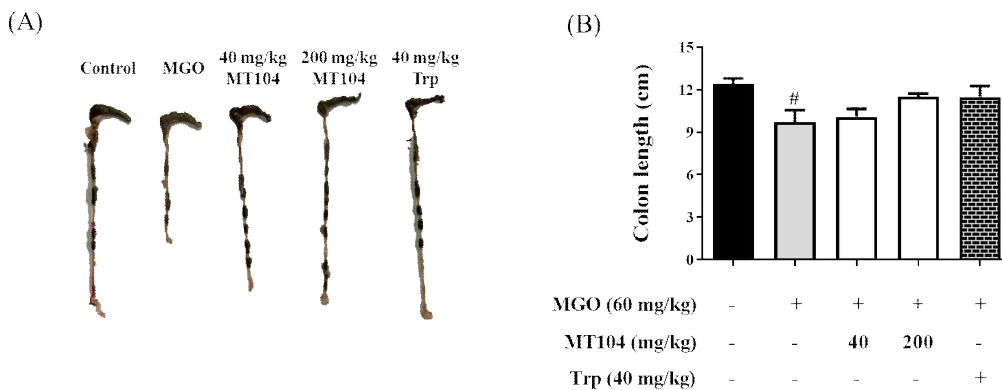
(나) 체중 변화 및 식이 섭취량



[체중 변화 및 식이 섭취량 (위쪽, 체중 변화; 아래쪽, 식이섭취)]

- ① 정상군과 비교시 각 그룹들은 몸무게의 변화는 없었으며, 식이섭취량 또한 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 또한, MGO 직장 투여군들은 정상군에 비하여 혈변 등과 같은 외관상의 이상 병변을 나타내지 않았음

(다) 대장 길이 측정



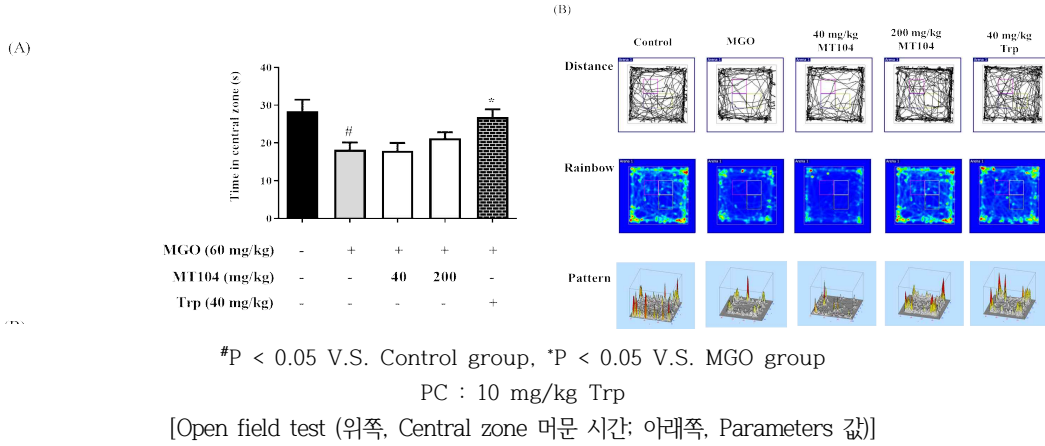
#P < 0.05 V.S. Control group, PC : 10 mg/kg Trp

[대장 길이 측정 (왼쪽, 대장길이 사진; 아래쪽, 대장길이 평균값)]

- ① 각 처리군에서 대장 길이 변화를 확인한 결과, 그림 6과 같이 정상군에 비해 60 mg/kg MGO를 직장으로 투여한 군에서 유의적으로 대장의 길이가 감소됨을 확인할 수 있었음. 따라서, 당독소 물질인 MGO의 고용량 단독처리가 장의 염증 유발에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었음

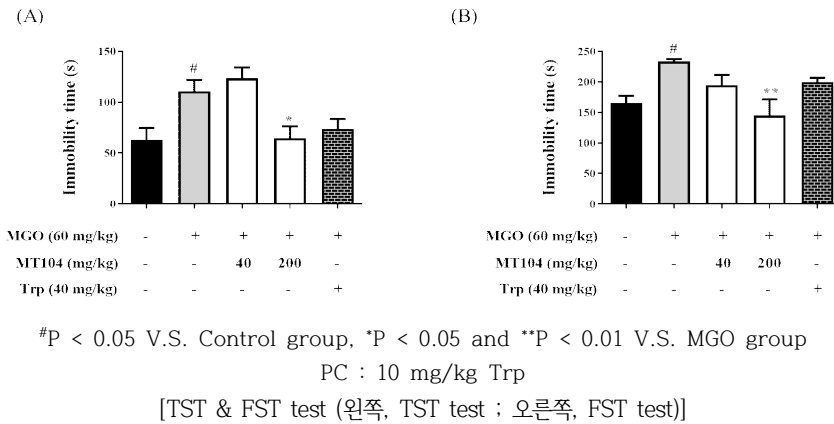
- ② 한편, MT104를 경구투여한 그룹에서는 유의적이지는 않지만 농도의존적으로 대장 길이를 회복하는 것을 확인할 수 있었음. 특히, 200 mg/kg MT104 처리군은 항우울용 물질로 사용되고 있는 Trp (40 mg/kg) 경구투여군과 유사한 장길이 회복 효능을 보이는 것을 확인할 수 있었음

(라) Open field test



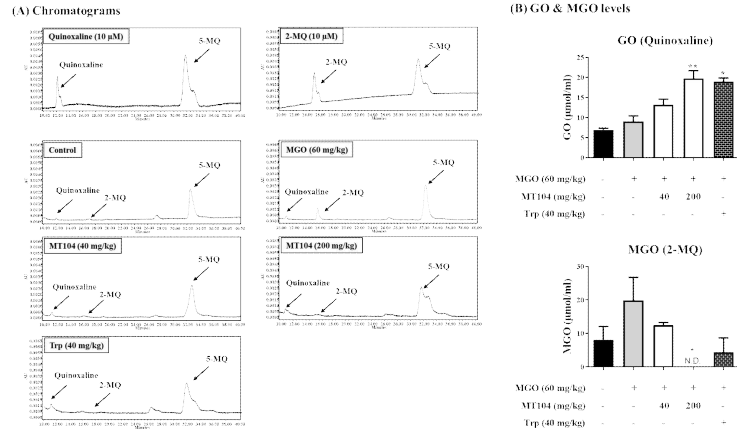
- ① MGO로 유도된 동물모델에서 MT104 및 Trp을 동시 경구투여한 후 탐색활동 정도를 측정한 결과임. 5분 동안 활동도를 측정한 결과, MGO 처리군에서는 중심영역 (central zone)을 지나가는 정도가 유의적으로 감소하는 경향을 나타냄을 확인할 수 있었음. 반면, MT104 처리군에서는 유의적이지 않으나 중심영역을 지나가는 정도가 증가됨을 확인함.
- ② 즉, MGO를 처리군에서의 보행활동 정도가 정상군에 비하여 감소되고, 주로 변두리 영역을 보행하는 것을 보아 우울증 증상과 유사한 행동패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었음. 한편, MT104는 MGO 직장 투여로 인한 우울증 증상을 개선시킴을 알 수 있었음.

(마) TST & FST test



- ① 꼬리현수법 (tail suspension test, TST)에 의한 우울증 유사행동에 미치는 활성을 측정한 결과, MGO처리군은 정상군 (control) 대비 유의적으로 부동자세를 취하는 정도가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었음. 한편, MT104 고농도군 (200 mg/kg)에서는 MGO처리에 의한 부동자세 증가가 유의적으로 감소함을 확인함
- ② 강제수영법 (forced swimming test)에 의한 우울증 유사행동에 미치는 영향을 측정한 결과, MGO 처리군은 TST 결과와 동일하게 정상군에 비하여 유의적으로 유의존적으로 부동자세를 취하는 것을 확인하였음. 반면, 한편, MT104 고농도 처리군 (200 mg/kg)에서는 MGO처리에 의한 부동자세를 유의적으로 감소시켰고 그 효능은 PC군 (40 mg/kg Trp) 보다 우수하였음

(바) GO 및 MGO level 측정 (Plasma)

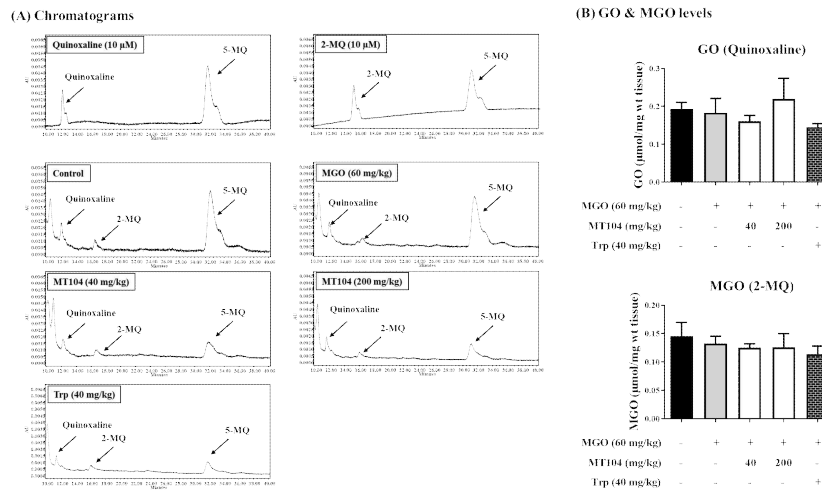


*P < 0.05 and **P < 0.01 V.S. Control group, PC : 10 mg/kg Trp
N.D.: Not detect

[MGO level 측정 (왼쪽, chromatogram ; 오른쪽, mgo level test)]

- ① 혈중 GO의 함량은 MGO 직장 투여군에 비하여 200 mg/ml MT104에서 유의적으로 GO level이 높았음.
- ② 한편, 혈중 MGO의 함량을 측정한 결과, 정상군에 비하여 MGO 직장투여 군에서 MGO가 증가되는 것을 확인하였고, 반면 MT104는 용양의존적으로 감소됨을 확인함.
- ③ : MGO 및 시료 처리에 의한 GO의 증가는 그 이유에 대하여 추가적인 연구가 필요함.
- ④ 혈중 plasma에서 확인한 결과, mgo 유도군에서 정상군에 비해 유의적이지 않으나 mgo level이 증대됨을 확인함. 한편, MT104 처리군 (40, 200 mg/kg)에서는 mgo 유도군에 비해 감소됨을 확인함.

(사) GO 및 MGO level 측정 (Large intestine)

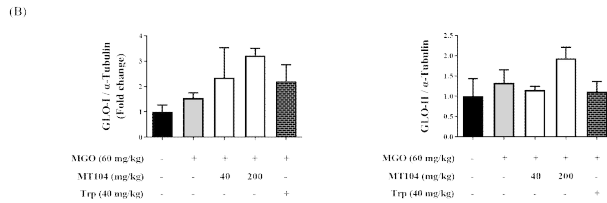
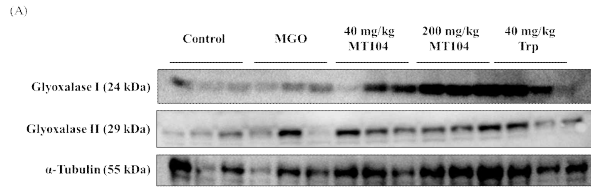


* PC : 10 mg/kg Trp

[대장 내 GO 및 MGO level 측정 (왼쪽, Chromatograms ; 오른쪽, 정량)]

- ① 각 군들의 대장내 GO 및 MGO의 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았음. 따라서, 구체적인 확인을 위하여 immunohistochemistry staining 등 추가적인 연구가 필요함

(아) Glyoxalase I (GLO-I) & II (GLO-II) 발현

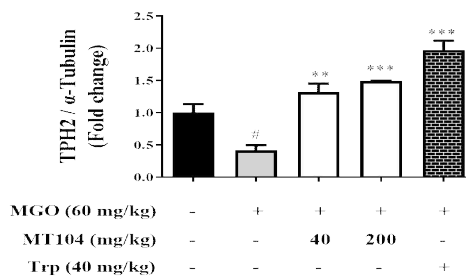
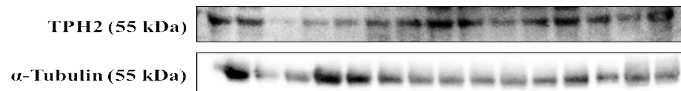


PC : 10 mg/kg Trp

[Glyoxalase I (GLO-I) & II (GLO-II) 발현 (위쪽, 측정된 밴드 ; 아래쪽, 정량)]

- ① 시료가 처리된 각 그룹의 간 조직에서 MGO같은 당독소물질의 해독작용에 관여하는 GLO-I & II의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과임. 정상군과 MGO 처리군에서는 각 발현량은 차이를 보이지 않았으나, MT104 처리군은 농도의존적으로 이들의 발현량을 증대시키는 것으로 확인되었음.

(자) TPH2 발현량 측정



#P < 0.05 V.S. Control group, **P < 0.01 and ***P < 0.001 V.S. MGO group, PC : 10 mg/kg Trp

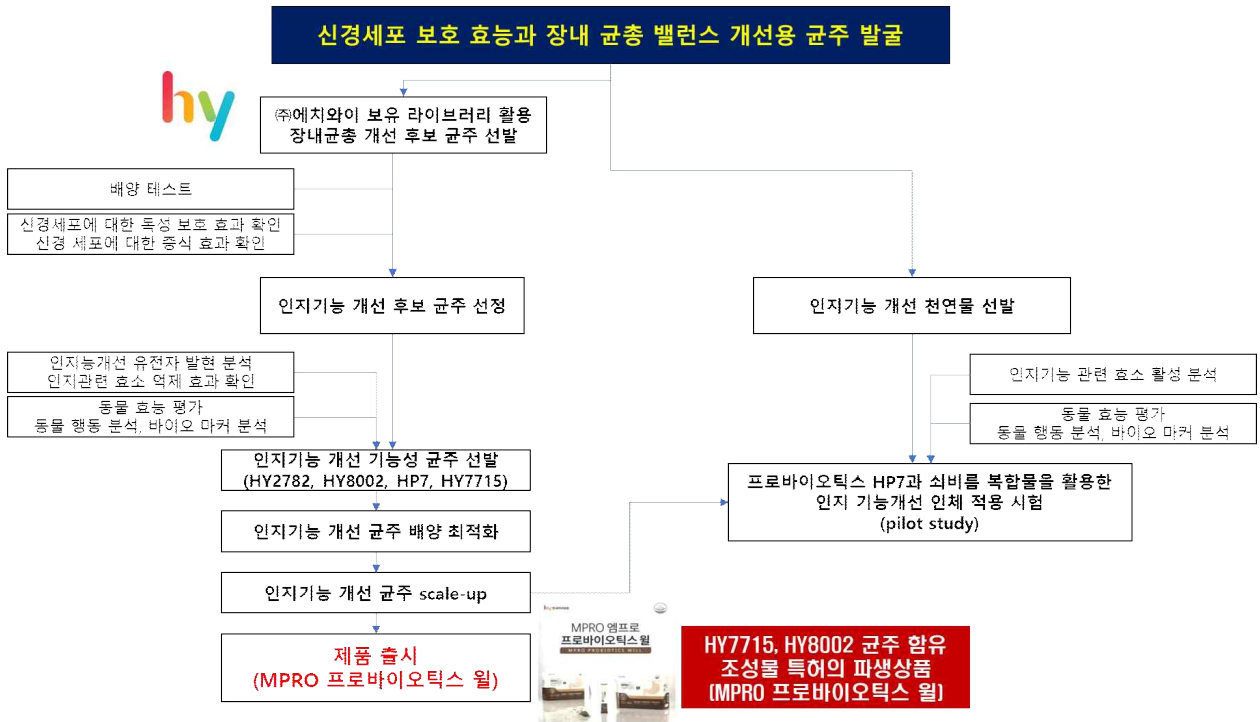
[TPH2 발현]

- ① Trp은 tryptophan hydroxylase (TPH)효소에 의하여 serotonin으로 전환되는 것으로 알려져 있고 이의 발현정도 여부가 우울증과 연관되어 있는 것으로 보고됨. 따라서, 뇌에 존재하는 TPH2의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였음. MGO 처리군에서는 정상군에 비하여 TPH2의 발현량을 유의적으로 감소시켰으며, MT104 처리군은 용량의존적으로 PC군 (40 mg/kg Trp)과 유사하게 TPH2의 발현량을 증대시키는 것으로 확인됨. 따라서, MT104의 소재는 직접적으로 TPH2의 발현량을 증대시켜 항우울증 효과에 기여하는 것으로 사료됨

4세부 (에치와이(주) (구 한국야쿠르트(주)), 연구책임자: 최일동)

<주요 성과 요약>

- 1) 신경세포보호 효능을 가지는 장내균총 밸런스 개선용 혼합 균주(HY7715, HY8002, HY8004, HY2782, HP7) 발굴 및 장관면역 기능 개선 검증
- 2) 인지개선 후보 균주(10종) 및 천연물(234종) 기능성 평가를 통한 유산균 4종(HY2782, HY7715, HY8002, HP7), 천연물 1종(쇠비름) 발굴
- 3) 신경세포보호 기전 마커 분석을 통한 맞춤 균주(HP7) 및 천연 프리바이오틱스(쇠비름) 복합물 발굴
- 4) 인지보호 기능 선발 균주 배양 및 분말 최적화 연구를 통한 기능 유지·보존 기술 확립
- 5) 제품화를 위한 대량배양 공정 구축 및 품질관리 표준화 설정
- 6) 특허 균주의 제품 카테고리 구축 전략을 통한 신제품 개발 및 출시



[4세부 연구 flow chart]

1. 신경세포 보호 효능을 가지는 인지기능 개선 유산균 발굴

가. 유산균 시료 준비

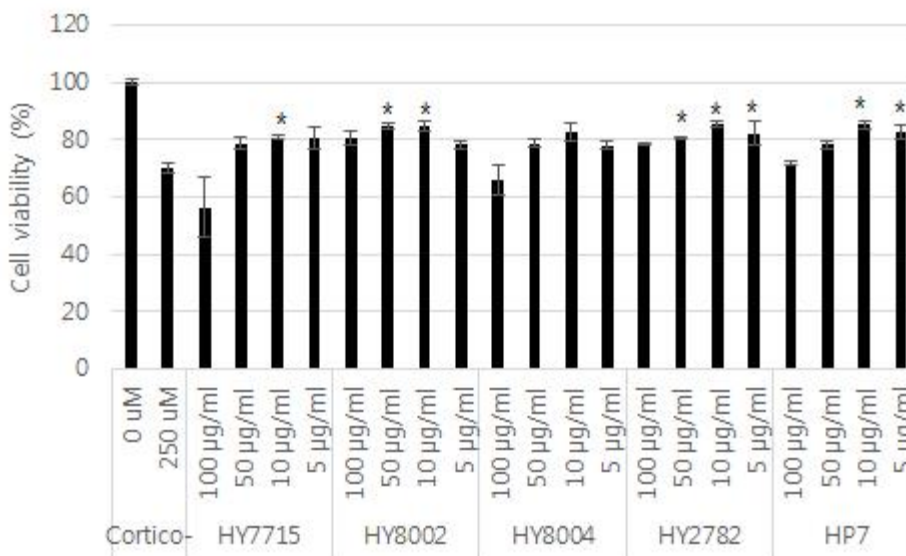
- 1) 유산균 10종 시료제조 공정 : BL 또는 MRS 배지 200ml에 배양 → PBS 세척 1회 → PBS 희석 20ml → 100 °C 10~15분 살균 → 동결건조

균주	10 ⁷		average	CFU/ml	동결건조	CFU/g
HY8002	77	78	77.5	7.75E+08	0.3	5.17E+11
HY8004	60	80	70	7E+08	0.3	4.67E+11
HP7	135	101	118	1.18E+09	0.7	3.37E+11
KY1032	241	262	251.5	2.52E+09	0.4	1.26E+12
HY2782	335	304	319.5	3.2E+09	1.4	4.56E+11
HY7207	119	124	121.5	1.22E+09	1.4	1.74E+11
HY7601	60	57	58.5	5.85E+08	0.4	2.93E+11
HY7712	159	191	175	1.75E+09	0.9	3.89E+11
HY7714	158	159	158.5	1.59E+09	1.5	2.11E+11
HY7715	217	207	212	2.12E+09	0.8	5.30E+11

[유산균(사균체) 시료 CFU/g]

나. 신경세포 독성 보호효과를 나타내는 유산균 스크리닝

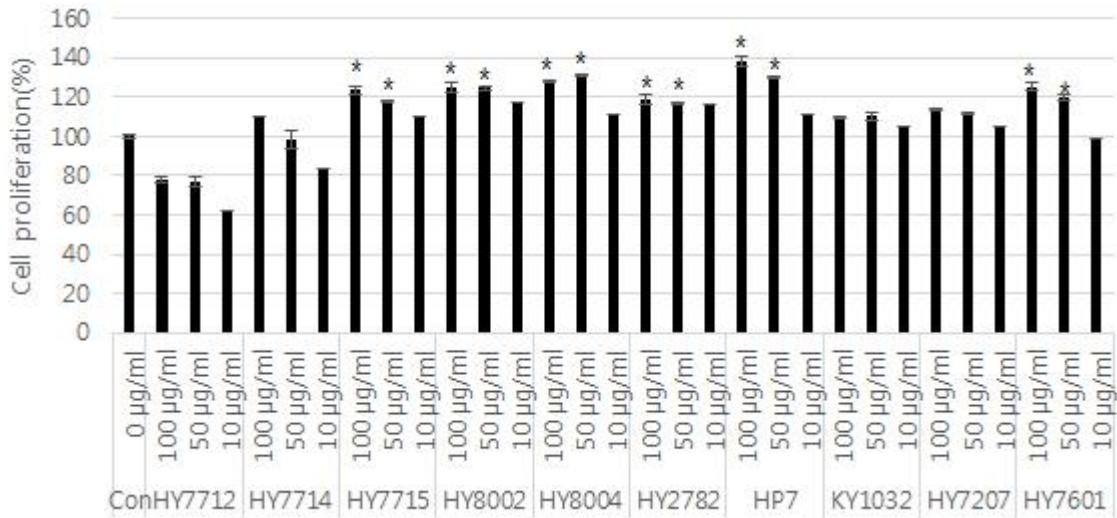
- ① 뇌신경세포: 사람의 신경모세포종 SK-N-SH2
- ② 인지 및 기억능력 손상물질 : 아밀로이드-베타, L-글루타메이트, 코르티코스테론
- ③ 신경세포에서 세포독성반응을 나타내는 손상물질 선정: 코르티코스테론
- ④ 코르티코스테론에 의해 유도되는 신경세포 독성반응에 대한 보호 효과를 나타내는 유산균 스크리닝
- ⑤ 유산균 10종에서 HY7715, HY8002, HY8004, HY2782, HP7 5종 유산균 선별



[Corticosterone에 의한 신경세포 독성 보호 효과]

다. 신경세포 증식능력을 나타내는 유산균 스크리닝

- ① 코르티코스테론에 의해 유도되는 신경세포 증식능력 저해를 개선하는 유산균 스크리닝
- ② 유산균 10종에서 HY7715, HY8002, HY8004, HY2782, HP7, HY7601 6종 유산균 선별

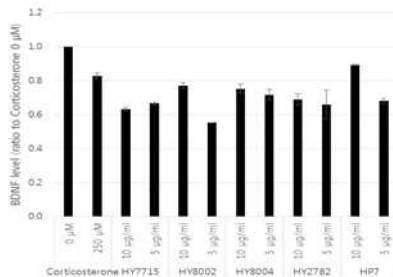


[신경세포 세포증식 능력 변화 검토]

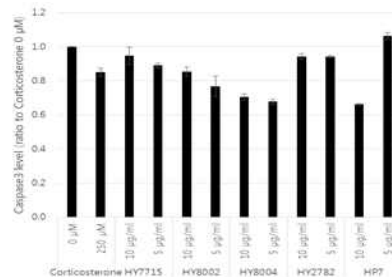
2. 인지능 개선 후보 유산균주의 기능성 평가

가. 인지능 개선 유전자 발현 분석

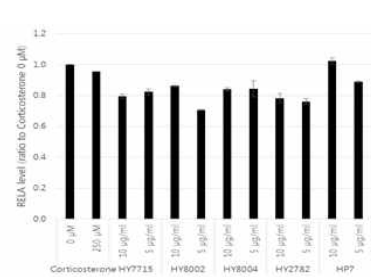
- ① 스트레스호르몬(코르티코스테론)에 의한 뇌신경세포 사멸 억제 관련 유전자 발현 분석
- ② BDNF (뇌신경세포 활성화 유전자) 유전자 발현 분석
- ③ Caspase 3 (세포 사멸 관련 유전자) 유전자 발현 분석
- ④ RELA (세포 생존 관련 유전자) 유전자 발현 분석



[BDNF 유전자 변화 검토]



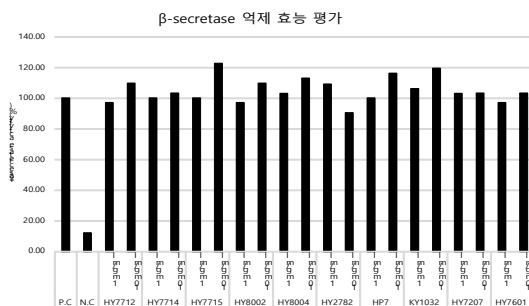
[caspase 3 유전자 변화 검토]



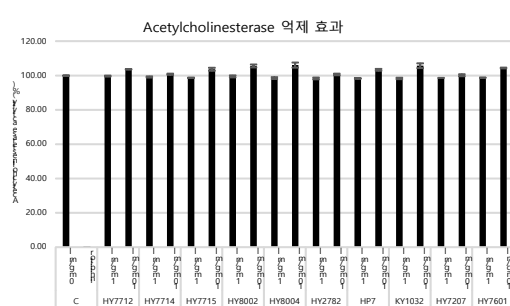
[RELA 유전자 변화 검토]

나. 인지관련 효소억제 효과 확인

- ① 인지개선 관련 효소 억제 효과를 나타내는 유산균주 스크리닝
- ② 베타-세크리테아즈 억제 효능 평가
- ③ 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능평가



[베타-세크리테아즈 억제효능 평가]

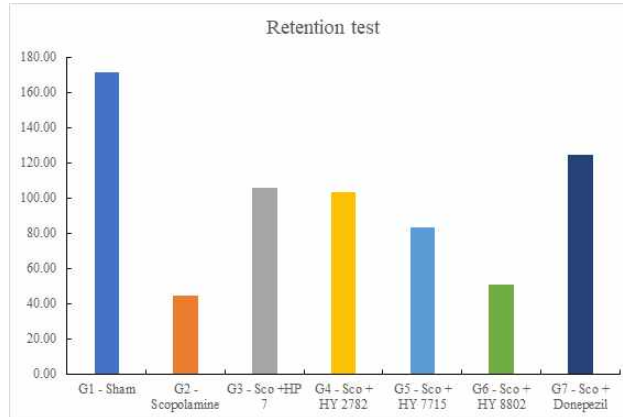


[아세틸콜린에스테라아제 억제효능 평가]

3. 인지능 개선 후보 유산균의 동물 효능 평가

가. 동물 행동 실험 - 수동회피실험을 통한 기억력과 주의력 개선 효과 확인

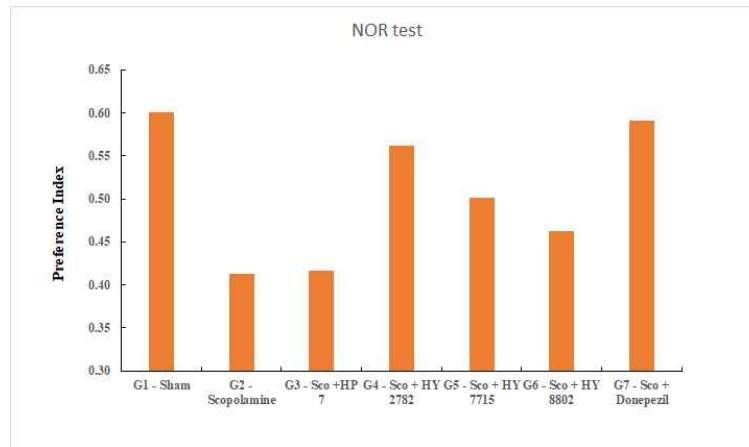
- ① 음성대조군인 scopolamine 투여시 기억력이 유의적으로 감소하는 것을 확인함
- ② Scopolamine과 유산균 동시 투여할 경우 scopolamine 단독투여시보다 기억력 증가함
- ③ HP7, HY2782, HY7715의 기억력 및 주의력 개선 효과 확인



[수동 회피실험]

나. 동물 행동 실험 - 신물질 탐색실험을 통한 인지력 확인

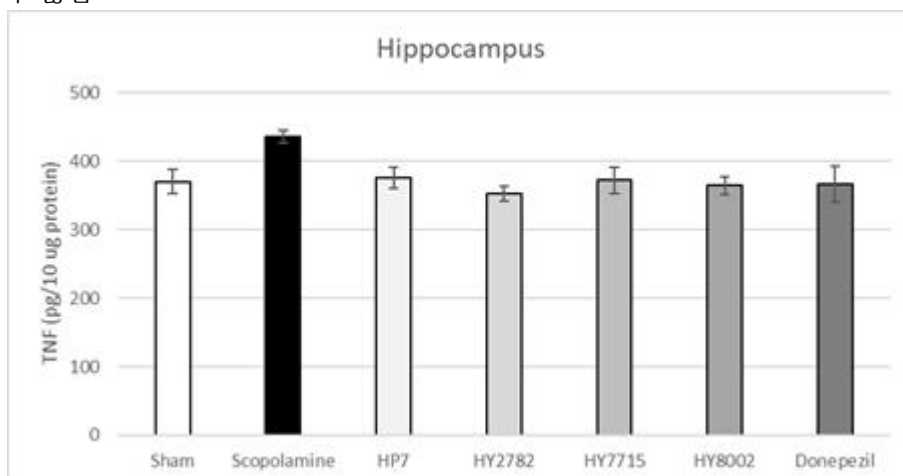
- ① 음성대조군인 scopolamine 투여시 인지력이 유의적으로 감소하는 것을 확인함
- ② Scopolamine과 유산균 동시 투여할 경우 scopolamine 단독투여시보다 인지력이 증가함
- ③ HY2782, HY7715, HY8002의 효능 확인함



[신물질 탐색 실험]

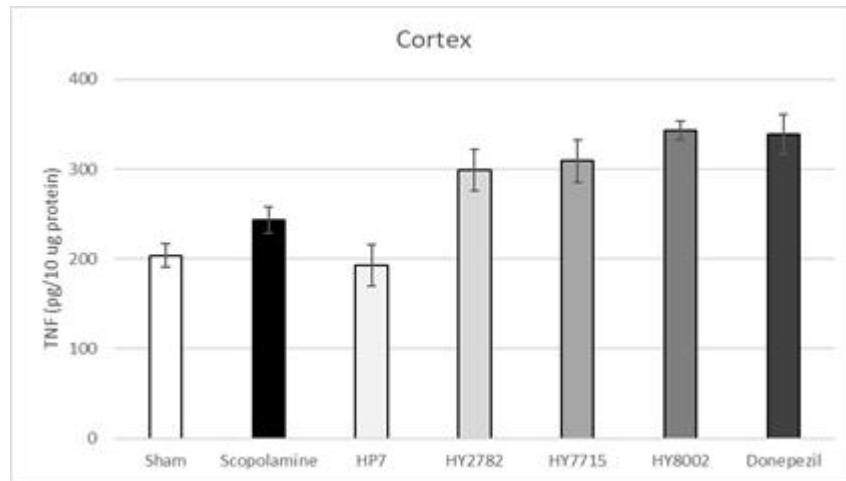
다. 인지능개선 효과 발굴 유산균의 바이오 마커 분석

- ① 뇌 해마조직에서의 염증 사이토카인 TNF 측정
 - : Scopolamine 처리군이 정상군보다 오히려 조금 감소함
 - : 유산균 처리군 및 양성 대조군(donepezil)에서 Scopolamine 처리군과 유의적인 차이를 나타내지 않음



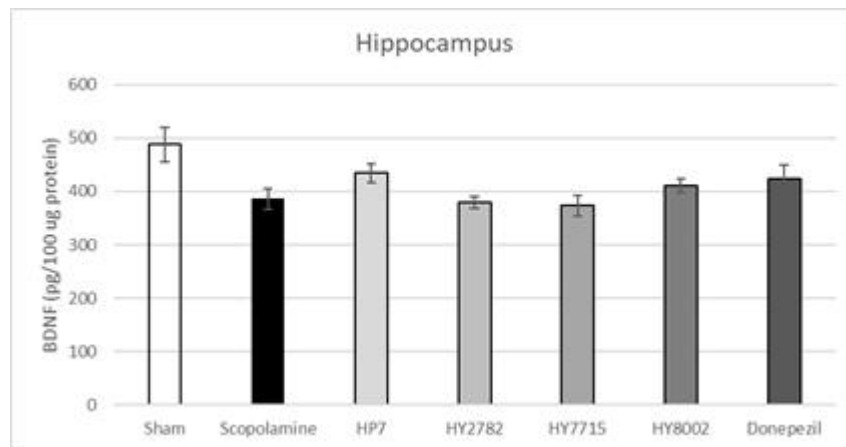
- ② 뇌 피질조직에서의 염증 사이토카인 TNF 측정

: Scopolamine 처리군이 정상군과 비슷하게 나타났고, HP7은 감소하고 나머지 HY2782, HY7715, HY8002 유산균 처리군과 양성 대조군(donepezil)에서 정상군과 Scopolamine 처리군보다 증가함



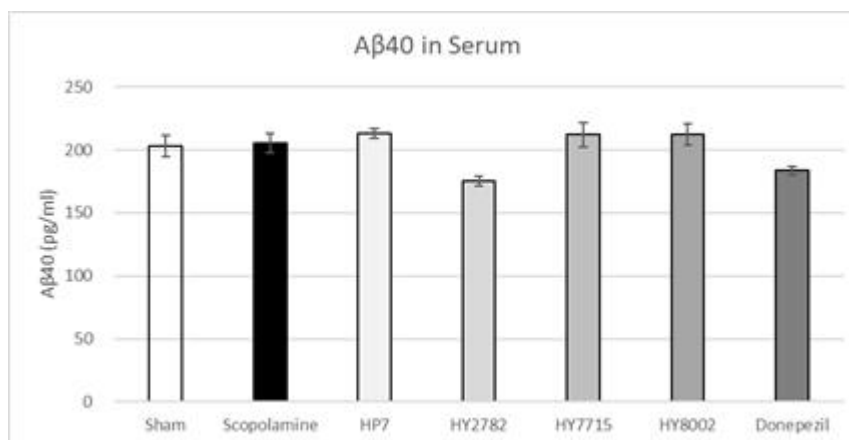
③ 뇌 해마조직에서의 뇌유래영양인자 BDNF 측정

: Scopolamine 처리군이 정상군보다 오히려 조금 감소하였고, 유산균 처리군 및 양성 대조군 (donepezil)에서 Scopolamine 처리군과 유의성있는 차이는 없었음 HY2782 처리군에서 오히려 조금 더 감소함이 나타남



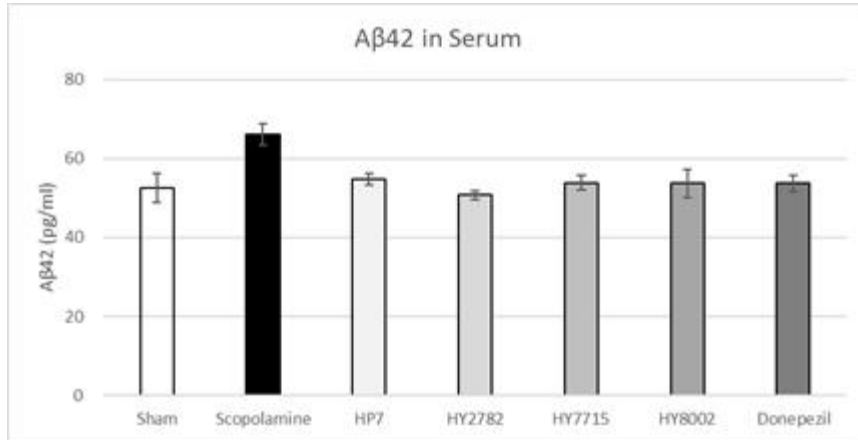
④ β -amyloid(A β) 40 농도 측정

: Scopolamine 처리군과 정상군이 차이가 없었고, HY2782 유산균 처리군



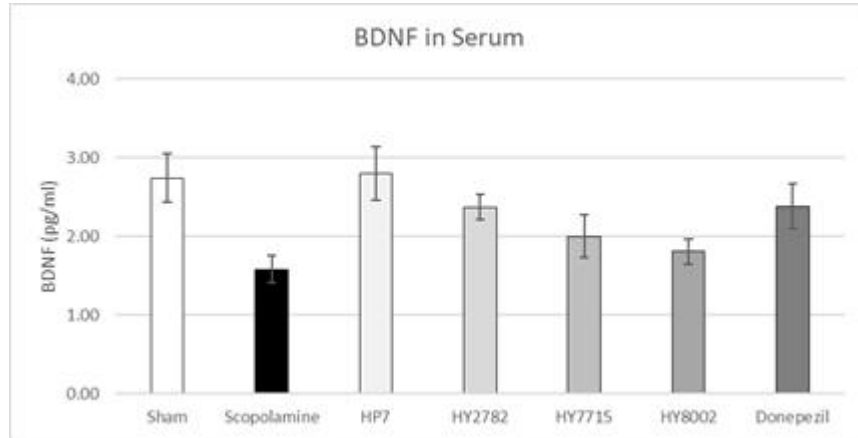
⑤ 혈액에서의 β -amyloid(A β) 42 농도 측정

: Scopolamine 처리군이 정상군보다 유의성 있게 증가하였고, HP7, HY2782, HY7715, HY8002 유산균 처리군과 양성 대조군(donepezil)에서 유의성있게 감소하였음



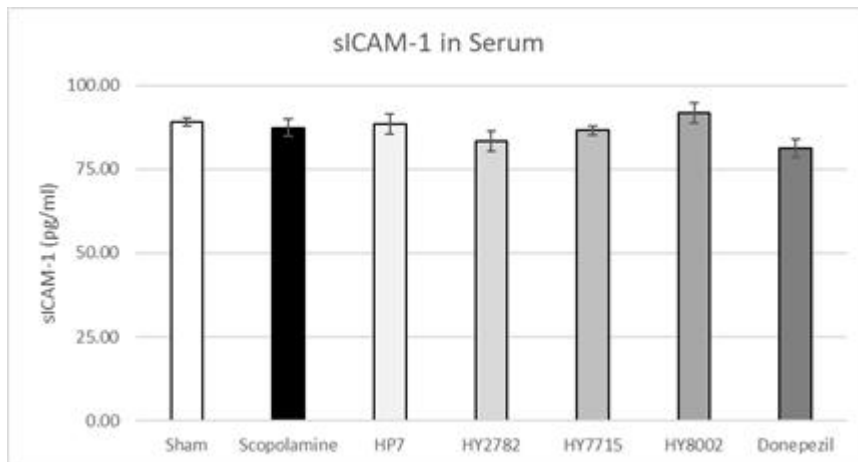
⑥ 신경세포 보호인자(BDNF) 농도 측정

: Scopolamine 처리군이 정상군보다 유의적으로 감소하였고, HP7, HY2782, HY7715 유산균 처리군 및 양성 대조군(donepezil)에서 유의적으로 증가하였음



⑦ 혈액에서의 sICAM-1 농도 측정

: Scopolamine 처리군이 정상군보다 오히려 조금 감소하였고, 유산균 처리군 및 양성 대조군(donepezil)에서 Scopolamine 처리군과 유의성있는 차이는 없었음



4. 인지개선 후보 천연물 선별

가. 신경세포 보호 효능 천연물 소재 스크리닝

N2a 신경아세포에서 corticosterone 250 uM 독성에 대한 보호 효능 평가하여 70% 이상 소재 선별

빨강	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	보리수 열수	합환피 70	합환피 50	사과박 주정	목련 열수	질신나무 열수	목련 25	미꾸도 열수	아관문 열수	복분자 70	꾸지뽕잎 70	목련 50
B	꾸지뽕잎 30	목련 75	강화손무 열수	왕금 50	감초 90	곡은화 70	왕금 90	오리나무 50	생강나무가지 50	생강나무가지 80	생강나무잎 80	생강나무가지 30
C	갈매 열수	건강 열수	고향강 열수	아이스플랜트 열수	계지 열수	야초 열수	곽향 열수	미꾸도 열수	내복자 열수	독활 열수	석창표(중) 열수	신조인 열수
D	삼릉 열수	애엽 열수	용안육 열수	우술 열수	육계 열수	토사자 100	마지연 50	지구자 열수	꾸지뽕열매 70	생강나무줄기 80	적양배수 열수	현문동 열수
E	생강나무잎 50	생강나무잎 30	쇠비름 50	비파엽 열수	백합 열수	마지연 10	사과박 주정	생강나무줄기 30	모근 50	토사자 25	토사자 50	합환피 열수
F	인동(중) 열수	인동(중) 25	인동(중) 50	인동(중) 50	인동(국) 25	인동(국) 50	인동(국) 75	마지연 25	마지연 25	마지연 열수	마지연 열수	갈근 열수
G	육계 50	과각 열수	마지연 30	맥문동 열수	구기자 열수	모근 열수	모근 25	맥문동(중) 열수	복령(중) 열수	산수위(국) 열수	상지 열수	구월초 열수
H	생강나무줄기 50	삼백초 열수	복령(국) 열수	마 열수	오리나무 열수	원지 열수	석창표(국) 열수	사인 열수	작약 열수	지황 열수	참나리 25	왕금 열수

파랑	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	삼릉 50	야초 50	갈매 50	건강 50	건물 50	결명자 50	사인 50	산약 50	익지 50	산조인 50	향개 50	자소엽 50
B	계지 50	고향강 50	곽향 50	자실 50	고분 50	지각 50	결명 50	내복자 50	외이인 50	청피 50	애엽 50	진피 50
C	독활 50	우술 50	용안육 50	창출 50	현문동 50	참나리주정 50	참나리주정 75	참나리주정 열수	개통육 50	사삼 50	오가피열매 50	지자 50
D	오가피뿌리 50	대추 50	석창표(중) 50	인모초 50	머위잎 50	산수위(국) 50	석창표 50	산수위(중) 50	산사(중) 50	현초 50	오가피 50	왕금(중) 50
E	현공(중) 50	복령(중) 50	봉잎 50	산들배 50	맥문동(중) 50	현공(국) 50	수세미 50	맥문동 50	작약(국) 50	원지(중) 50	가시오가피 50	우영근 50
F	자가비섯 열수	가시오가피 열수	오가피뿌리 열수	오가피 열수	왕기 열수	산들배 열수	사삼 열수	우영근 열수	수세미 열수	쇠비름 열수	구기자 열수	오가피열매 열수
G	창오(개통육) 열수	봉잎 열수	머위잎 열수	현초 열수	생강나무잎 80	오미자(국) 열수	식방풍 열수	목과 70	합환피 열수	합환피 30	삼백초 70	보로골리새끼 열수
H	백년초분말 70	산천목 50	산천목 70	상백피 90	꾸지뽕열매 90	생강나무잎 50	죽여 70	생강나무잎 30	우조백감초 90	산천목 30	창이자 열수	외떡 70

검정	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	건물 열수	고분 열수	복분자(국) 열수	결명 열수	진피 열수	창출 열수	익지 열수	자소엽 열수	지각 열수	자실 열수	청피 열수	향개 열수
B	마지연 75	토사자 25	감초 열수	대추 열수	국화 열수	당귀 열수	산사(중) 열수	산사(국) 열수	인모초 열수	왕금 열수	하수오 열수	현공(국) 열수
C	백과 열수	복분자(중) 열수	죽백엽 열수	목과 열수	오로파 열수	현공(중) 열수	명월초 열수	결명자 열수	외떡 열수	지자 열수	산약 열수	오미자(중) 열수
D	자가 열수	광곽향 열수	아트가이 열수	도인 열수	백강잠 열수	연자육 열수						

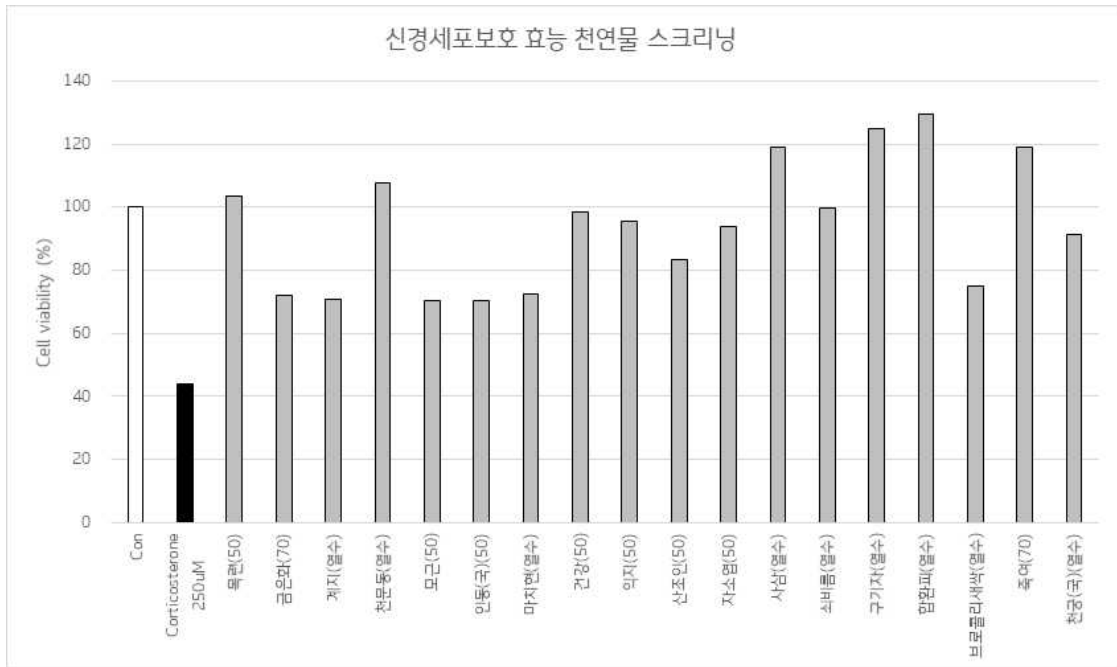
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	43.81	22.71	27.47	53.68	33.03	29.80	36.80	46.68	38.33	59.61	34.83	103.41
B	33.48	30.25	55.57	49.55	36.18	72.17	37.52	45.69	63.82	35.01	30.79	23.16
C	24.96	54.76	46.32	42.82	71.01	52.51	65.35	43.36	46.68	59.87	26.30	46.50
D	44.08	60.50	56.46	59.34	50.27	51.26	44.79	55.66	46.77	47.13	32.41	107.90
E	22.71	37.61	38.51	38.15	45.15	42.55	37.70	70.20	44.79	53.23	36.27	23.61
F	36.09	54.49	62.30	47.40	50.81	70.38	47.76	56.19	72.35	41.65	26.12	46.77
G	63.11	25.67	60.50	44.17	47.31	48.83	48.29	40.84	53.68	27.92	26.84	64.99
H	31.33	29.89	24.96	34.38	42.46	30.16	57.36	31.87	43.63	45.06	61.22	39.77

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	22.35	24.96	48.20	98.29	60.68	55.39	57.09	69.93	95.69	83.57	34.02	93.90
B	57.36	35.01	46.59	40.66	44.17	36.80	40.75	37.79	45.60	55.03	39.59	39.95
C	34.11	41.47	59.52	35.19	39.23	39.14	66.43	34.65	41.92	41.47	50.09	30.25
D	28.99	41.92	38.33	34.47	66.07	38.69	36.62	56.37	36.62	64.99	61.76	35.01
E	21.27	66.34	42.91	47.49	49.28	33.03	46.95	41.56	44.70	44.88	68.67	34.38
F	58.17	31.78	42.73	44.79	48.92	44.34	118.85	43.63	62.75	99.82	124.69	41.11
G	27.65	29.62	39.59	40.93	46.23	47.94	44.70	53.86	129.71	51.44	43.54	75.13
H	58.80	35.91	45.60	47.22	41.74	65.08	119.03	58.44	42.55	45.51	36.36	33.48

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	52.24	62.48	34.47	40.66	50.00	54.40	51.97	34.74	33.12	51.62	50.00	38.24
B	31.78	55.03	33.03	56.91	48.65	49.37	47.31	43.45	28.82	31.87	41.29	91.20
C	39.14	59.61	27.29	34.83	37.43	32.50	37.43	45.15	44.79	41.02	21.54	56.19
D	48.29	39.41	37.79	35.28	41.20	56.55	40.93	30.07	39.32	52.69	41.83	56.73

나. 신경세포 보호 효과 천연물 소재 선발

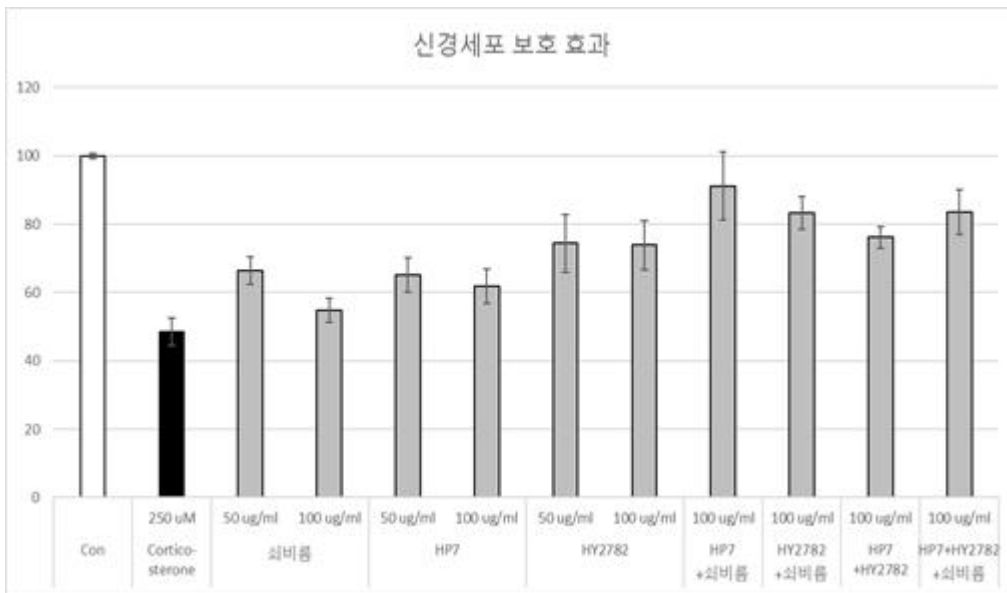
계지, 천문동, 마치현, 사삼, 쇠비름, 구기자, 합환피, 브로콜리새싹, 천궁 9종의 천연물 추출물에서 N2a 신경아세포에서 corticosterone의 독성에 대한 보호 효과 확인



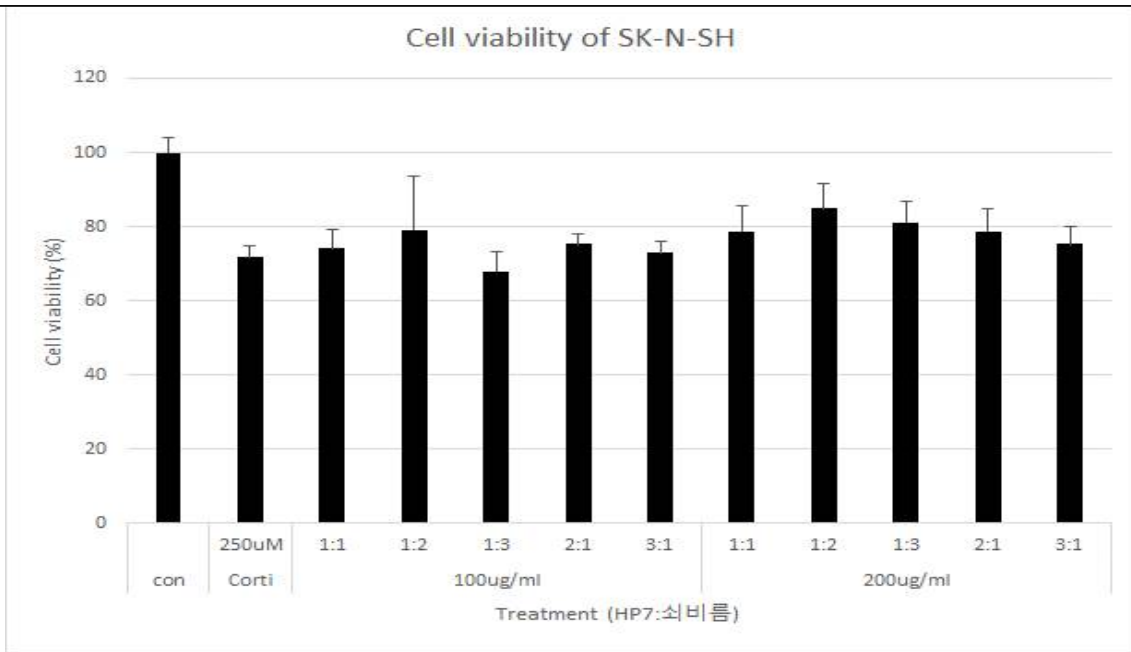
5. 인지개선 유산균·쇠비름 복합물의 효능 평가

가. SK-N-SH 신경세포 보호 효능 평가

① 쇠비름 단독 및 유산균과 복합 처리 시 모두 좋은 효과가 나타났으며, 복합 소재의 경우 HP7+쇠비름 조합이 가장 효과가 좋은 것으로 나타남



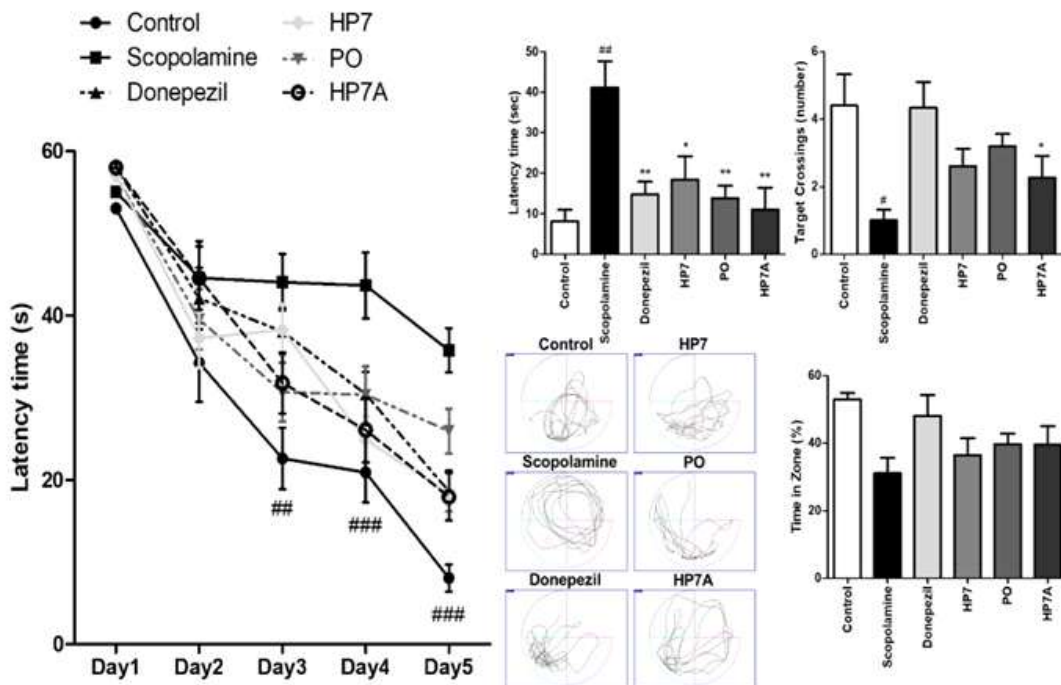
② HP7+쇠비름 비율별 효능 평가: HP7+쇠비름 복합소재 처리 시 100 ug/ml보다 200 ug/ml에서 더 좋은 효과가 나타났으며, 복합 소재의 경우 1:2 비율 조합이 가장 효과가 좋은 것으로 나타남



③ 기존 인지개선 소재인 천연물 추출물과 다르게 차별적으로, 프리+프로바이오틱스를 이용하여 장내 균총을 조절하고 더 나아가, 장-뇌축(gut-brain axis)를 통해 인지개선 효과를 나타내는 기전을 가질 것으로 생각됨

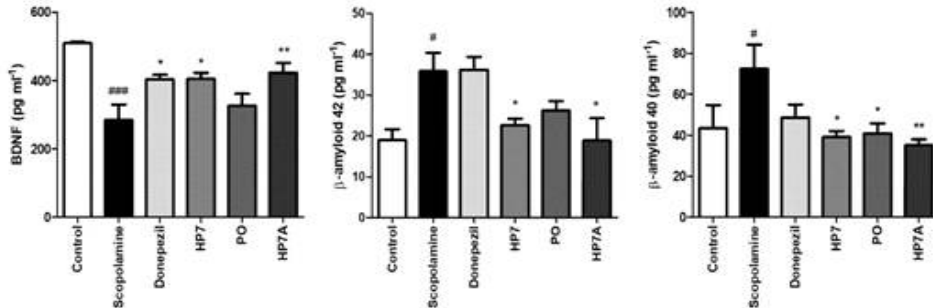
나. B6 mouse에서 유산균 쇠비름 복합물의 인지개선 효능평가

Scopolamine을 처리한 B6 mouse에서 *Lactobacillus paracesei* HP7 및 쇠비름 (*Portulaca oleracea*) 복합물인 HP7A 처리 시 Morris maze test에서 공간지각 능력인 latency가 유의적으로 감소하고 Target crossing 횟수가 유의적으로 증가함

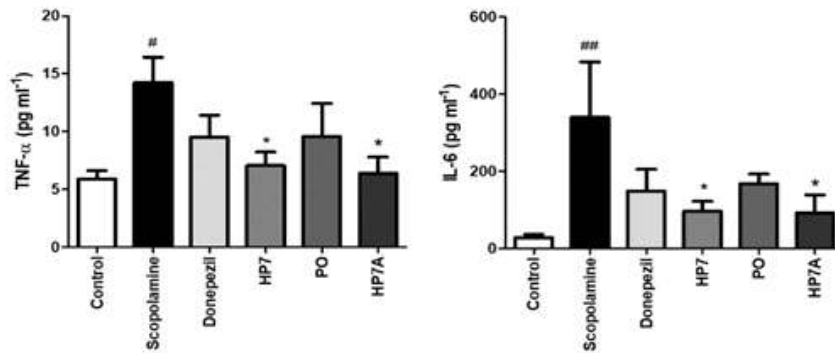


다. 유산균·쇠비름 복합물의 인지관련 바이오마커 분석

Scopolamine을 처리한 B6 mouse에서 *Lactobacillus paracesei* HP7과 쇠비름 (Portulaca oleracea) 복합물인 HP7A 처리 시 인지기능 지표인 BDNF 유의적 증가, β -amyloid 42 유의적 감소, β -amyloid 40 유의적 감소 나타남



Scopolamine을 처리한 B6 mouse에서 *Lactobacillus paracesei* HP7 및 쇠비름 (Portulaca oleracea) 복합물인 HP7A 처리 시 염증지표인 TNF- α 유의적 감소, IL-6 유의적 감소 나타남



6. 인지기능 개선 유산균의 배양 및 생산 공정 최적화

가. *Bifidobacterium lactis* HY8002 균주의 배양 및 분말 최적화 연구

① HY8002배양 최적화 - 탄소원 조건 탐색

실험조건: 1L fermentor 배양, 37도, pH 5.5, rpm 60

7% glucose에서 배양하였을 때, 생균수가 기존보다 높은 배양 생균수를 나타냄
분말 생균수의 경우 5% glucose에서 배양하였을 때 더 높게 나타남

실험 No.	배지 조성	
1-1	FA02+HY-SOY	glucose 5%
1-2		glucose 7%

5% glu	Viable cell no. (cfu/ml or g)	Yield (%)
배양액	6.45E+09	100.0
분말	6.15E+11	83.4

7% glu	Viable cell no. (cfu/ml or g)	Yield (%)
배양액	7.80E+09	100.0
분말	5.70E+11	83.1

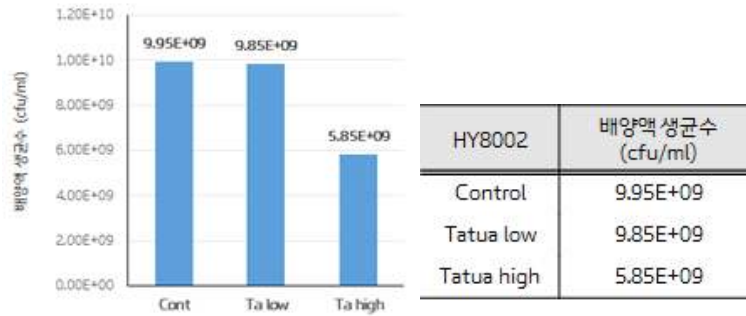
Condition	Viable Cell Count (cfu/ml)
5% glucose	~6.45E+09
7% glucose	~7.80E+09

② HY8002배양 최적화 - 질소원 조건 탐색

실험조건: 1L fermentor 배양, 37도, pH 5.5, rpm 60

질소원 변경에 따른 생균수 증진효과 없었으며, 오히려 감소하는 경향을 나타냄

실험 No.	배지 조성	
1-1	Control	FA02 3.2% + HY-SOY 1.8%
1-2	Tatua low	FA02 3.2% + HY-SOY 0.9% + Tatua2016 0.9%
1-3	Tatua high	FA02 3.2% + Tatua2016 1.8%

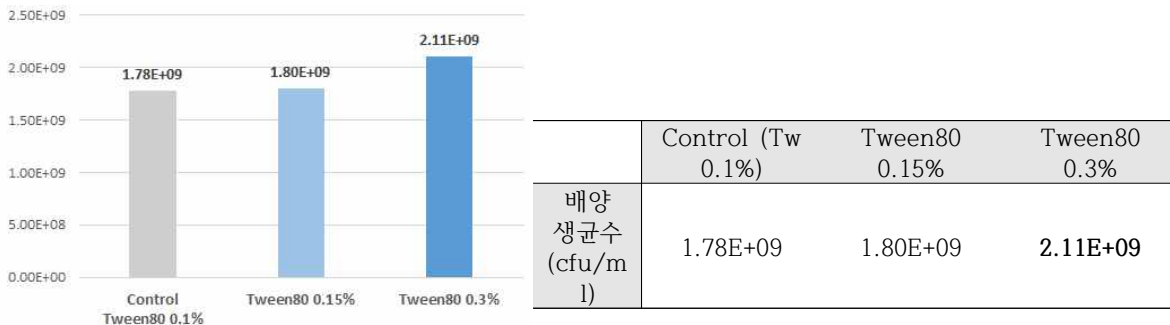


③ HY8002배양 최적화 - 배양 생균수 최적화

유산균의 경우 생육능 자체가 낮아 배양 생균수를 높이는 것이 중요함

기존배지에 Tween80은 0.1%가 포함되어 있는데 이를 고농도로 처리하여 생균수 변화를 측정함

Tween80 함량이 증가할수록, 배양액 생균수가 소폭 증가하는 경향을 확인함



④ HY8002 동결보호제 변경에 따른 유산균 생존율 향상

대조군과 큰 차이는 없지만, 당성분으로만 구성된 실험군보다 탈지분유 함량이 높은 2번 실험군이 생존율이 높게 나타남을 확인함

구분	control	1	2	3	4	5	6
Trehalose	7	7	7	7	7	7	7
dextrin	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5
말토올리고당	1.5	1.5	1.5	1.5	1	1	1
skim milk	0.5	2	4	6	6	6	6
sucrose	-	-	-	-	1	-	1
sorbitol	-	-	-	-	-	1	1
최종 함량	6	6.75	7.75	8.75	8.25	8.25	8.75
초기균수	1.10E+12	8.70E+11	8.40E+11	9.45E+11	7.90E+11	9.40E+11	8.30E+11
FD 후 생존율	112%	93%	95%	104%	87%	108%	82%
1주생균수	3.70E+10	4.95E+10	5.50E+10	4.35E+10	1.65E+10	7.50E+10	1.20E+10
2주 생균수	1.35E+10	1.15E+10	1.24E+10	1.21E+10	2.40E+09	7.50E+09	1.80E+09
2주생존율	1.22%	1.32%	1.48%	1.28%	0.30%	0.80%	0.22%

⑤ HY8002 Heat shock 처리에 의한 유산균 생존율 향상
분말 저장성 향상을 위해 heat shock 각각 온도에서 2h 처리 → 40°C 조건이 가장 좋게 나타남

구분	배양완료	혼합액	분말생균수	1주차 생균수	2주차 생균수	2주차생존율
Non heat shock	1.93E+10	1.22E+11	8.85E+11	2.00E+11	1.34E+11	15%
37°C	1.97E+10	1.34E+11	1.14E+12	2.60E+11	1.42E+11	12%
40°C	2.16E+10	1.19E+11	1.01E+12	3.85E+11	2.01E+11	20%
43°C	1.91E+10	1.30E+11	8.40E+11	2.90E+11	1.14E+11	14%

나. *Lactobacillus plantarum* HY7715 균주의 배양 및 분말 최적화 연구

① 유산균 생존율 향상 - 동결보호제 변경

대조군에 비해 5, 7번으로 구성된 보호제에서 생존율이 높게 나타남
솔비톨의 영향이 유산균 분말 생존율 향상에 도움을 나타냄

동결보호제	C	1	2	3	4	5	6	7
skim milk	4	4	4	4	4	4	4	4
FOS	4	2	2	2	2	2	2	2
trehalose	4	4	4	4	4	4	4	4
코코넛오일		1	2				1	1
해바라기유				1	2		1	1
sorbitol						1		1
실제함량	6	5.5	6	5.5	6	5.5	6	6.5
FD 후 생존율	92%	101%	119%	78%	102%	92%	81%	77%
초기균수	7.50E+11	8.65E+11	1.01E+12	6.85E+11	8.70E+11	7.85E+11	6.70E+11	6.35E+11
2주차 생균수	4.60E+10	7.80E+10	4.75E+10	4.50E+10	3.80E+10	8.60E+10	4.35E+10	6.35E+10
2주차 생존율	6.1%	9.0%	4.7%	6.6%	4.4%	11.0%	6.5%	10.0%

② 유산균 생존율 향상 - Heat shock 처리

분말 저장성 향상을 위해 heat shock 35°C대, 1~2h 처리 → 분말저장성 개선에 효과 없음

구분	18h	stress 후 생균수	혼합액	분말생균수	1주차 생균수	2주차 생균수	2주차생존율
control	1.17E+10	-	1.56E+11	4.90E+11	1.66E+11	1.04E+10	2.11%
heat shock 1h	-	1.24E+10	1.09E+10	5.50E+11	7.40E+10	1.70E+09	0.31%
heat shock 2h	-	1.25E+10	1.01E+11	7.20E+11	4.95E+10	2.30E+09	0.32%

③ 유산균 생존율 향상 - 옥수수전분 적용

옥수수전분을 적용한 분말의 생존율이 향상됨을 확인하였음

1차 생산			
원말	0개월	1개월	생존율
HY8002	9.55E+11	2.18.E+11	23%
HY7715	5.10E+11	7.75.E+10	15%
옥수수전분	0개월	1개월	생존율
HY8002	5.05E+11	3.50E+11	69%
HY7715	2.35E+11	1.95E+11	83%

다. *Lactobacillus casei* HY2782 균주의 배양 및 분말 최적화 연구

① HY2782 배양 최적화 작업

- 질소원 : 기존, 85%, 75% 진행함
- 탄소원 : 기존 3%, 변경 4.5% 배양 테스트 진행함

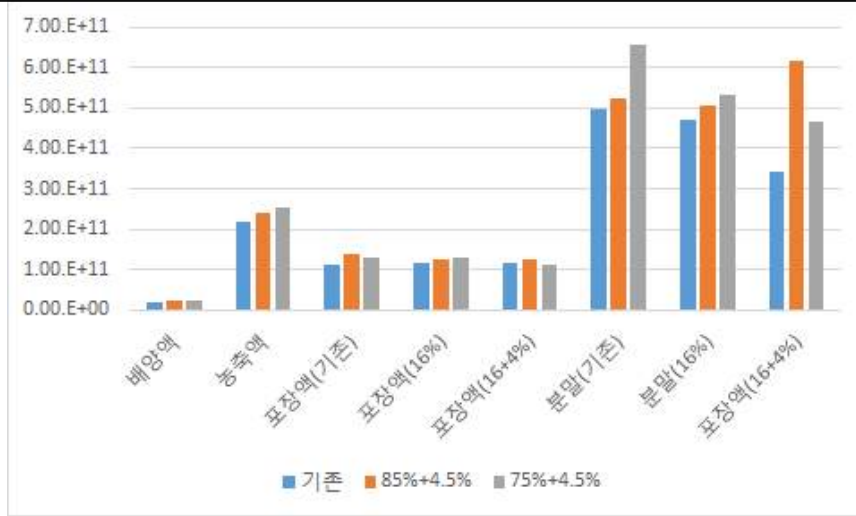
제조 공정	pH: 5.5		
C 배합비 총합	3.00	4.50	4.50
N 배합비 총합	11.50	9.78	8.63
N/C ratio	3.83	2.2	1.9
기존대비 비율(확인)	100%	57%	50%

② 보호제 : 기존 동결보호제의 변경에 따른 유산균 보호 효과 확인

- 변경1(16% 덱스트린 복합물)
- 변경2(16% 덱스트린복합물+4%수크로스)

유산균수 (CFU/ml)	배양액	농축액	포장액(기 존)	포장액 (16%)	포장액 (16+4%)	분말(기존)	분말(16%)	분말 (16+4%)
기존	1.80.E+10	2.18.E+11	1.10.E+11	1.16.E+11	1.15.E+11	4.97.E+11	4.70.E+11	3.44.E+11
85%+4.5%	2.52.E+10	2.40.E+11	1.41.E+11	1.27.E+11	1.26.E+11	5.25.E+11	5.07.E+11	6.15.E+11
75%+4.5%	2.37.E+10	2.52.E+11	1.28.E+11	1.30.E+11	1.13.E+11	6.59.E+11	5.31.E+11	4.65.E+11

기존대비 증균율 (%)	배양액	농축액	포장액(기 존)	포장액 (16%)	포장액 (16+4%)	분말(기존)	분말(16%)	분말 (16+4%)
85%+4.5%	140.4	109.9	127.7	109.1	109.6	105.7	107.8	178.8
75%+4.5%	132.0	115.6	115.9	112.1	98.3	132.6	112.9	135.0



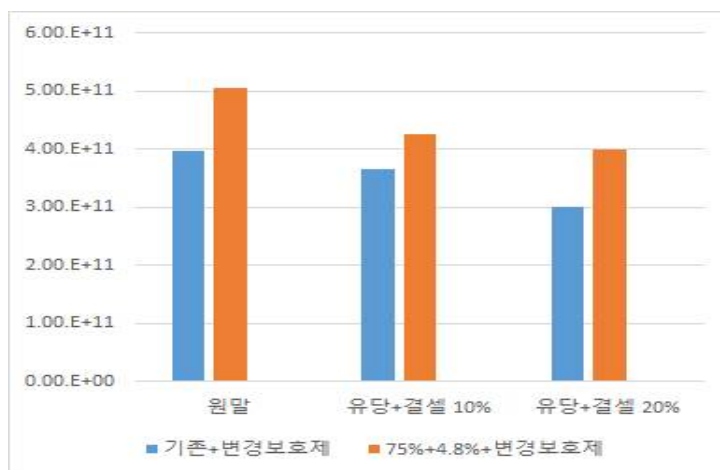
- 보호제 16%덱스트린 복합물 + 4% 수크로스 적용결과 FD 성상이 좋지 않음
- 덱스트린 복합물 16% 동결보호제 최종 보호제로 선발함
- 85% 질소원 대비 75% 질소원에서 균수 높게 나타남 (동결보호제 기준 및 16% 덱스트린 복합물 경우)

③ 부형제

- 부형제 혼합비율 선정 (유당, 결정셀룰로스)
- HY2782 증균배양실험 균주 부형제 혼합 후 유산균수 측정

유산균수 (CFU/ml)	원말	유당+결셀 10%	유당+결셀 20%
기준	5.27.E+11	-	3.97.E+11
기준+변경보호제	3.96.E+11	3.65.E+11	3.02.E+11
75%+4.8%+변경보호제	5.05.E+11	4.26.E+11	3.99.E+11

기준대비 증균율 (%)	원말	유당+결셀 10%	유당+결셀 20%
기준+변경보호제	75.1	-	76.0
75%+4.8%+변경보호제	95.8	-	100.5



[기준배양액+기준보호제 원말/부형제 20%], [기준배양액+변경보호제 원말/부형제 10%/부형제 20%], [기준배양액+변경보호제 원말/부형제10%/부형제20%] 등 8가지 경우로 나누어 냉장/상온 안정성을 확인함

구분	시험제		0	2주차	4주차	8주차	9주차	10주차	12주차	18주차	22주차	생존율 (%)
기존	원말	25°C 저장	5.27E+11	1.69E+11	6.65E+09	6.20E+09	3.35E+08	5.00E+07	1.35E+06	1.20E+06	1.15E+05	0.0
	무형제 20%	25°C 저장	3.97E+11	1.34E+11	5.75E+09	4.15E+09	1.30E+08	4.50E+07	4.75E+06	7.70E+05	9.15E+04	0.0
기존+변보	원말	25°C 저장	3.96E+11	1.98E+11	4.90E+10	7.20E+10	1.63E+10	1.40E+10	8.40E+09	3.13E+09	4.70E+09	1.2
	무형제 10%	25°C 저장	3.65E+11	2.21E+11	4.85E+10	3.40E+10	1.20E+10	1.06E+10	5.15E+09	2.35E+09	4.05E+09	1.1
변경+변보	원말	25°C 저장	3.02E+11	1.56E+11	3.96E+10	3.25E+10	9.35E+09	7.95E+09	5.30E+09	2.18E+09	5.25E+09	1.7
	무형제 20%	25°C 저장	5.05E+11	2.73E+11	1.51E+10	5.15E+10	1.69E+10	1.73E+10	8.30E+09	4.09E+09	5.25E+09	1.0
변경+변보	원말	25°C 저장	4.26E+11	2.41E+11	3.72E+10	4.20E+10	1.30E+10	1.29E+10	8.65E+09	2.99E+09	4.20E+09	1.0
	무형제 20%	25°C 저장	3.99E+11	2.14E+11	3.03E+10	3.10E+10	1.14E+10	1.04E+10	6.00E+09	2.26E+09	2.15E+09	0.5

[HY2782 상온 저장 안정성 실험결과_22주차]

구분	시험제		0	4주차	8주차	9주차	11주차	12주차	18주차	22주차	생존율 (%)
기존	원말	10°C 저장	5.27E+11	3.04E+11	3.88E+11	3.47E+11	3.11E+11	2.35E+11	2.25E+11	2.60E+11	49.3
	무형제 20%	10°C 저장	3.97E+11	2.80E+11	4.25E+11	2.53E+11	2.35E+11	1.95E+11	1.92E+11	1.80E+11	45.3
기존+변보	원말	10°C 저장	3.96E+11	1.96E+11	1.69E+11	2.93E+11	2.39E+11	2.31E+11	1.62E+11	2.05E+11	51.8
	무형제 10%	10°C 저장	3.65E+11	2.14E+11	2.49E+11	2.20E+11	2.06E+11	1.89E+11	1.37E+11	2.10E+11	57.5
변경+변보	원말	10°C 저장	3.02E+11	1.92E+11	3.29E+11	1.64E+11	1.98E+11	1.62E+11	1.44E+11	1.60E+11	53.0
	무형제 20%	10°C 저장	5.05E+11	2.80E+11	4.50E+11	2.43E+11	2.90E+11	3.25E+11	1.90E+11	2.20E+11	43.6
변경+변보	원말	10°C 저장	4.26E+11	2.53E+11	3.56E+11	2.74E+11	2.74E+11	2.42E+11	1.925E+11	2.10E+11	49.3
	무형제 20%	10°C 저장	3.99E+11	2.48E+11	2.99E+11	2.53E+11	2.54E+11	2.315E+11	1.865E+11	1.80E+11	45.1

[HY2782 냉장 저장 안정성 실험결과_22주차]

HY2782 분말 균주의 냉장 저장안정성 결과는 생존율 약 40~50%이상 전체그룹 모두 잘 유지됨

HY2782 분말 균주의 상온 저장안정성 결과는 생존율 약 0~2%로 현저히 감소함

④ HY2782 상온 저장안정성 개선

HY2782 상온 저장안정성을 향상시키기 위해 열충격(Heat-shock) 단계를 적용함

구분	시험제	수분(%)	0주차	2주차	3주차	4주차	5주차	6주차	7주차	8주차	12주차	14주차	14W 생존율
기존+변보+HS	원말	7.69	4.30E+11	1.96E+11	2.30E+11	2.65E+11	1.93E+11	2.11E+11	1.70E+11	1.70E+11	1.04E+11	9.75E+10	23%
변경+변보	원말	5.47	4.67E+11	1.06E+11	2.20E+11	1.75E+11	1.45E+11	1.16E+11	1.40E+11	1.65E+11	1.05E+11	1.62E+11	35%
세척+HS	무형제 20%	4.63	3.65E+11	1.70E+11	1.90E+11	1.23E+11	1.26E+11	9.05E+10	1.15E+11	1.29E+11	1.03E+11	1.11E+11	30%

- 기존에 진행되고 있는 HY2782의 경우 보호제를 변경하여도 상온 6주차에서 생존율이 약 3~12% 밖에 유지되지 못하였지만, 열충격을 적용한 뒤 상온안정성을 측정한 결과 5주차 실험에서 약 26.9~44.9%로 향상되는 것을 확인함

- 16주차 실험결과에서 균수는 1×10^{11} 이상을 유지하고 있으며, 특히 변경배양액을 사용했을 때 높은 생존율을 나타냄

라. *Lactobacillus paracasei* HP7 균주의 배양 및 분말 최적화 연구

① 미네랄 함량 증가

- 미네랄 함량 증가: 기존 배양 배합비에서 황산망간(0.00001%에서 0.0001%), 황산마그네슘(0.00001%에서 0.0001%)으로 함량을 증대

- 배양 조건: 온도 32-37°C, pH 5.5-6.5의 조건으로 약 18~24시간 배양 후 3시간 동안 48°C에서 heat shock을 가한 후 20배 농축하여 기존 보호제로 1:1로 혼합한 후 동결건조 진행함

- 마그네슘, 망간의 함량을 기존(0.00001%)보다 10배(0.0001%) 높였을 때 냉장과 상온에서 상온 안정성이 개선됨

- 망간이 초기의 냉장과 상온의 안정성을 유지시킨다는 것을 확인함

주치수			0	3	6	10	16	32
HP7 비교군	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.37E+11	6.15E+11	7.83E+11	4.90E+11	3.45E+11	3.75E+11
		생존율	100%	66%	84%	52%	37%	40%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.37E+11	5.95E+11	5.83E+11	4.25E+11	3.85E+11	2.30E+11
		생존율	100%	64%	62%	45%	41%	25%
유동기한 예측								
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 비교군-냉장(10°C)			$y = 753.9205444x - 460.097$	-0.028	7.54E+11	1.00E+11	72.15	16.65
HP7 비교군-상온(25°C)			$y = 742.993157x - 209.902$	-0.039	7.43E+11	1.00E+11	51.42	11.87
HP7 실험군 1 (마그네슘x10)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	1.03E+12	6.35E+11	8.60E+11	6.15E+11	4.31E+11	3.60E+11
		생존율	100%	61%	83%	60%	42%	35%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	1.03E+12	6.05E+11	6.53E+11	4.30E+11	2.95E+11	1.95E+11
		생존율	100%	59%	63%	42%	29%	19%
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 1 (마그네슘x10)-냉장(10°C)			$y = 864.198254x - 168.423$	-0.031	8.64E+11	1.00E+11	69.57	16.05
HP7 실험군 1 (마그네슘x10)-상온(25°C)			$y = 901.896774x - 200.419$	-0.049	8.02E+11	1.00E+11	42.49	9.80
HP7 실험군 2 (망간x10)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.33E+11	8.75E+11	1.10E+12	6.15E+11	4.82E+11	3.90E+11
		생존율	100%	94%	118%	66%	52%	42%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.33E+11	6.5E+11	8.8E+11	5.70E+11	3.80E+11	2.05E+11
		생존율	100%	70%	94%	61%	41%	22%
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 2 (망간x10)-냉장(10°C)			$y = 973.506484x - 199.074$	-0.031	9.74E+11	1.00E+11	73.41	16.94
HP7 실험군 2 (망간x10)-상온(25°C)			$y = 910.021298x - 146.615$	-0.047	9.10E+11	1.00E+11	46.99	10.84
HP7 실험군 3 (마그네슘, 망간x10)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.43E+11	8.25E+11	1.18E+12	7.40E+11	5.32E+11	3.70E+11
		생존율	100%	88%	125%	79%	56%	39%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.425E+11	6.25E+11	7.1E+11	6.40E+11	3.40E+11	1.55E+11
		생존율	100%	66%	75%	68%	36%	16%
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 3 (마그네슘, 망간x10)-냉장(10°C)			$y = 1028.526619x - 499.180$	-0.033	1.03E+12	1.00E+11	70.63	16.30
HP7 실험군 3 (마그네슘, 망간x10)-상온(25°C)			$y = 909.024165x - 128.835$	-0.054	9.09E+11	1.00E+11	40.87	9.43

② 보호제 변경에 따른 안정성 확인

- 동결보호제의 경우 매트릭스를 형성하여 안정성을 높이고 그 안정성을 높이는 데 있어서 보호제 구성이 중요함
- 솔비톨 1%, 2%에서 냉장과 상온에서의 안정성이 높아짐을 확인함
- 트레할로스 4%, 6%에서 냉장에서의 안정성이 높아짐을 확인함

주치수			0	3	6	10	14	23
HP7 비교군	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.85E+11	8.15E+11	5.00E+11	5.15E+11	3.20E+11	2.93E+11
		생존율	100%	83%	51%	52%	32%	30%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.85E+11	5.45E+11	4.35E+11	2.6E+11	2E+11	2.07E+11
		생존율	100%	55%	44%	26%	20%	21%
유동기한 예측								
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 비교군-냉장(10°C)			$y = 953.027162x - 715.668$	-0.077	9.63E+11	1.00E+11	29.41	6.79
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 비교군-상온(25°C)			$y = 862.455320x - 936.655$	-0.111	8.62E+11	1.00E+11	19.41	4.48
HP7 실험군 1 (솔비톨 1%)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.85E+11	1.07E+12	7.55E+11	6.50E+11	8.05E+11	5.30E+11
		생존율	100%	109%	77%	66%	82%	54%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.85E+11	1.125E+12	6.6E+11	3.7E+11	3.05E+11	2.40E+11
		생존율	100%	114%	67%	38%	31%	24%
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 1 (솔비톨 1%)-냉장(10°C)			$y = 987.961261x - 197.187$	-0.025	9.88E+11	1.00E+11	91.62	21.14
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 1 (솔비톨 1%)-상온(25°C)			$y = 169.925196x - 715.450$	-0.099	1.17E+12	1.00E+11	24.84	5.73
HP7 실험군 2 (솔비톨 2%)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.70E+11	1.02E+12	7.70E+11	7.80E+11	8.15E+11	7.50E+11
		생존율	100%	105%	79%	80%	84%	77%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.7E+11	1.025E+12	7.5E+11	4.55E+11	3.45E+11	2.11E+11
		생존율	100%	106%	77%	47%	36%	22%
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 2 (솔비톨 2%)-냉장(10°C)			$y = 965.562147x - 901.239$	-0.017	9.67E+11	1.00E+11	133.45	30.80
구분			추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 실험군 2 (솔비톨 2%)-상온(25°C)			$y = 128.665155x - 103.210$	-0.083	1.13E+12	1.00E+11	29.20	6.74

주사주			0	3	6	10	14	23
HP7 비교군	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	9.85E+11	8.15E+11	5.00E+11	5.15E+11	3.70E+11	3.10E+
		생존율	100%	83%	51%	52%	38%	31%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	9.85E+11	5.45E+11	4.35E+11	2.6E+11	3.1E+11	2.04E+
		생존율	100%	55%	44%	26%	31%	21%
유동기한 예측								
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월		
HP7 비교군-냉장(10°C)	$y = 54.141871411.773 \cdot e^{-0.02x}$	-0.05	8.54E+11	1.00E+11	42.90	9.90		
유동기한 예측								
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월		
HP7 비교군-상온(25°C)	$y = 701.9224356881557 \cdot e^{-0.02x}$	-0.061	7.02E+11	1.00E+11	31.95	7.37		
HP7 실험군 1 (트레할로스 4.5%)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	8.53E+11	6.90E+11	6.70E+11	5.35E+11	3.80E+11	4.80E+
		생존율	100%	81%	79%	63%	45%	56%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	8.53E+11	6.20E+11	5.3E+11	3.15E+11	2.75E+11	2.29E+
		생존율	100%	73%	62%	37%	32%	27%
유동기한 예측								
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월		
HP7 실험군 1 (트레할로스 4.5%)-냉장(10°C)	$y = 755.791548799829 \cdot e^{-0.02x}$	-0.028	7.56E+11	1.00E+11	72.24	16.67		
유동기한 예측								
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월		
HP7 실험군 1 (트레할로스 4.5%)-상온(25°C)	$y = 726.094724442707 \cdot e^{-0.02x}$	-0.058	7.26E+11	1.00E+11	34.18	7.89		
HP7 실험군 2 (트레할로스 6.0%)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)	1.09E+12	8.05E+11	7.40E+11	6.05E+11	6.05E+11	5.65E+
		생존율	100%	74%	68%	56%	56%	52%
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)	1.09E+12	5.2E+11	5E+11	4.55E+11	3.65E+11	8.58E+
		생존율	100%	48%	45%	42%	33%	8%
유동기한 예측								
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월		
HP7 실험군 2 (트레할로스 6.0%)-냉장(10°C)	$y = 808.172504507789 \cdot e^{-0.02x}$	-0.026	9.09E+11	1.00E+11	84.90	19.59		
유동기한 예측								
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월		
HP7 실험군 2 (트레할로스 6.0%)-상온(25°C)	$y = 972.4272475833008 \cdot e^{-0.02x}$	-0.095	9.72E+11	1.00E+11	23.94	5.53		

③ 부형제 작용에 따른 안정성 확인

- 계속적으로 높은 온도와 습도의 환경에서 노출된 경우 원말과 말토덱스트린에 의한 상온 안정성 효과를 확인함
- 초기 균수 대비 균수가 안정적으로 유지됨을 확인하고 생산성 개선 효과를 확인함

7. 인지 기능 개선 유산균의 산업화(Scale-up)

가. *Bifidobacterium lactis* HY8002 균주의 산업화를 위한 scale-up 연구

① 타정 예비실험 진행

- 타정 과정 중 35~62.5%의 유산균 생존 (추어블 원재료인 당, 산 등의 성분이 추가 시 25% 수준으로 예상)
- 원말과 최종제품(타품)을 비교했을 때, 약 28~59% 생존

No.	구분	HY7715	HY8002	DDS-1
1	제조사	한국야쿠르트	한국야쿠르트	UASLABS(미국)
2	균종	<i>L. plantarum</i>	<i>B. nimalis subsp. lactis</i>	<i>L. acidophilus</i>
3	스펙(cfu/g)	4.0*10 ¹¹	4.0*10 ¹¹	2.5*10 ¹¹
4	가격(원/kg)	105,440	198,610	650,000
실험결과				
1	원말-실측	5.65*10 ¹¹	9.2*10 ¹¹	2.8*10 ¹¹
2	혼합물-이론(3.14% 배합)	1.77*10 ¹⁰	2.89*10 ¹⁰	8.79*10 ¹⁰
3	혼합물-실측	2.8*10 ¹⁰	2.89*10 ¹⁰	4.0*10 ¹⁰
4	타정-실측	1.06*10 ¹⁰	1.12*10 ¹⁰	2.5*10 ⁹
비교 정리				
1	원말-혼합물 비교	혼합과정 100% 생존	혼합과정 100% 생존	혼합과정 45.5% 생존
2	혼합물-타정 비교(타정 후)	37.9% 생존	38.8% 생존	62.5% 생존
3	원말(3.14%)-최종물 비교	59.9% 생존	38.8% 생존	28.4% 생존

② 캡슐 제형 유통 안정성 실험

상온 12주차 저장성 실험 결과 초기 대비 기존 액티브(DDS-1) 배합은 약 100% 수준으로 잘 유지되고 있으나, 자사균주 2종(HY7715, HY8002)은 약 80% 수준으로 유지되고 있음

		주차(주)		0	3	6	13	21							
HP7 기존 원말	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)		1.34E+12	9.75E+11	1.09E+12	4.80E+11	4.95E+11							
		생존율		100%	73%	82%	36%	37%							
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)		1.335E+12	6.45E+11	6.7E+11	3.85E+11	2.05E+11							
		생존율		100%	48%	50%	29%	15%							
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7 원말-냉장(10°C)		$y = 1.246,389,003,537.170$ $e^{-0.051}$	-0.051	1.25E+12	1.00E+11	49.47	11.42								
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7 원말-상온(25°C)		$y = 1.073,388,871,639.730$ $e^{-0.080}$	-0.08	1.07E+12	1.00E+11	29.67	6.85								
원말 : 말토맥스트린 (9:1)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)		1.31E+12	8.00E+11	6.40E+11	6.20E+11	5.05E+11							
		생존율		100%	61%	49%	47%	39%							
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)		1.31E+12	5.25E+11	6.50E+11	4.25E+11	2.50E+11							
		생존율		100%	40%	50%	32%	19%							
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7:말덱 (9:1)-냉장(10°C)		$1,004,117,618,973.720 e^{-0.05}$	-0.037	1.00E+12	1.00E+11	62.34	14.39								
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7:말덱 (9:1)-상온(25°C)		$-951,144,192,263.934 e^{-0.09}$	-0.065	9.51E+11	1.00E+11	34.65	8.00								
원말 : 말토맥스트린 (8:2)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)		1.02E+12	7.65E+11	6.85E+11	4.95E+11	4.05E+11							
		생존율		100%	75%	67%	49%	40%							
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)		1.02E+12	4.9E+11	5.5E+11	3.55E+11	2.80E+11							
		생존율		100%	48%	54%	35%	27%							
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7:말덱 (8:2)-냉장(10°C)		$918,337,693,956.777 e^{-0.04}$	-0.042	9.18E+11	1.00E+11	52.80	12.18								
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7:말덱 (8:2)-상온(25°C)		$y = 764,290,995,638.785 e^{-0.052}$	-0.052	7.64E+11	1.00E+11	39.11	9.03								
원말 : 말토맥스트린 (7:3)	냉장(10°C)	생균수 (cfu/g)		9.80E+11	5.15E+11	5.50E+11	3.80E+11	5.10E+11							
		생존율		100%	53%	56%	39%	52%							
	상온(25°C)	생균수 (cfu/g)		9.8E+11	5.2E+11	4.7E+11	3.25E+11	2.04E+11							
		생존율		100%	53%	48%	33%	21%							
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7:말덱 (7:3)-냉장(10°C)		$y = 691,752,209,484.853 e^{-0.025}$	-0.025	6.92E+11	1.00E+11	77.36	17.85								
유통기한 예측															
구분		추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월								
HP7:말덱 (7:3)-상온(25°C)		$y = 771,461,979,635.777 e^{-0.066}$	-0.066	7.71E+11	1.00E+11	30.96	7.14								
샘플명	균주 배양비 (%)	원말 Spec.	원말 실측값	Spec. 적용 배양물 이론값	실측 적용 배양물 이론값	배양물 실측값	결합 실측값	공정 생존율	저장 온도(°C)	0주차 cfu/g	4주차 cfu/g	8주차 cfu/g	12주차 cfu/g	0주차 대비 생존율(%)	
액티브	DDS-1	26.5	2.5E+11	2.4E+11	7.2E+10	7.5E+10	1.1E+11	5.1E+10	67%	20°C		5.1E+10	4.1E+10	4.9E+10	97%
	HY8002	1.1	4.0E+11	9.1E+11						25°C	5.1E+10	1.9E+10	3.4E+10	5.1E+10	101%
	HY7715	0.225	4.0E+11	7.1E+11						35°C		2.0E+10	3.0E+10	5.2E+10	103%
HY 8002	27.825	4.0E+11	9.1E+11	1.1E+11	2.5E+11	1.0E+11	1.4E+11	55%	20°C		2.1E+11	2.0E+11	1.1E+11	79%	
									25°C	1.4E+11	9.6E+10	1.9E+11	1.1E+11	78%	
									35°C		8.1E+10	1.2E+11	7.3E+10	52%	
HY 7715	27.825	4.0E+11	7.1E+11	1.1E+11	2.0E+11	9.7E+10	1.6E+11	81%	20°C		1.4E+11	1.5E+11	1.3E+11	81%	
									25°C	1.6E+11	1.9E+11	1.6E+11	1.2E+11	78%	
									35°C		1.4E+11	7.5E+10	6.3E+10	40%	
DDS-1	27.825	2.5E+11	2.4E+11	7.0E+10	6.7E+10	8.7E+10	1.6E+10	24%	20°C		2.0E+10	2.1E+10	3.7E+10	229%	
									25°C	1.6E+10	3.1E+10	1.4E+10	2.7E+10	167%	
									35°C		6.0E+10	1.3E+10	3.9E+10	239%	

유통기한 예측모델을 기준으로, 18개월 후 HY8002, HY7715, DDS-1은 각 11.15%, 15.60%, 16.07%의 생존율이 예측됨

균주번호 /균주명	가격(원/kg)	유산균수 기준 단위	보관조건	초기 유산균수	18개월후 예측	
					유산균수	생존율(%)
HY8002	1,118,501	cfu/g	25℃	1.39E+11	1.55E+10	11.15%
HY7715	1,038,039			1.59E+11	2.48E+10	15.60%
DDS-1 (UASLABS)	650,000			1.63E+10	2.62E+09	16.07%

③ 츠어블 제형 유통 안정성 실험

혼합에서 타정까지의 공정 생존율은 패밀리 58%, 자사 균주 HY7715 47%, HY8002 26%로 HY8002의 공정 생존율이 가장 낮았음
 저장안정성은 패밀리가 36%, HY7715가 39%로 동등한 수준이고, HY8002는 13%로 가장 낮았음

생물명	균주 배양비		원말		혼합물			정제 공정 생존율 %	저장성 결과					
			원말 Spec	원말 실측값	Spec. 적용 배양물 여드값	실측 적용 배양물 여드값	배양물 실측값		저장온도(℃)	0주차	4주차	8주차	12주차	0주차 대비 저장 생존율
			%	cfu/g	cfu/g	cfu/g	cfu/g			cfu/g	cfu/g	cfu/g	cfu/g	cfu/g
패밀리	HY7715	2.4	4.0E+11	6.5E+11	9.6E+09	1.66E+10	1.94E+10	58%	20℃	1.12E+10	1.22E+10	1.00E+10	4.70E+09	42%
	R-11ME	0.6	5.0E+10	7.9E+10	3.0E+08				25℃	1.12E+10	1.31E+10	5.40E+09	4.00E+09	36%
	NCFM	0.14	2.5E+11	3.0E+11	3.5E+08				35℃	1.12E+10	4.60E+09	2.90E+09	3.30E+09	29%
HY8002	3.14	4.0E+11	1.0E+12	1.2E+10	3.30E+10	3.60E+10	26%	20℃	9.50E+09	8.50E+09	4.10E+09	5.00E+08	25%	
								25℃	9.50E+09	4.50E+09	2.12E+09	6.90E+08	13%	
								35℃	9.50E+09	3.50E+09	2.02E+09	6.20E+08	2%	
HY7715	3.14	4.0E+11	6.5E+11	1.2E+10	2.04E+10	3.50E+10	47%	20℃	1.63E+10	7.10E+09	7.80E+09	8.60E+09	53%	
								25℃	1.63E+10	7.70E+09	6.40E+09	6.30E+09	39%	
								35℃	1.63E+10	5.80E+09	5.10E+09	3.60E+09	22%	
DDS-1	3.14	2.5E+11	2.7E+11	7.8E+09	8.73E+09	7.30E+09	41%	20℃	3.00E+09	1.95E+09	1.45E+09	1.8E+09	60%	
								25℃	3.00E+09	1.44E+09	1.55E+09	1.6E+09	53%	
								35℃	3.00E+09	9.75E+08	2.05E+09	1.6E+09	52%	

유통기한 예측모델을 기준으로, 18개월 후 HY8002, HY7715, DDS-1은 각 7.62%, 6.75%, 4.90%의 생존율이 예측됨

균주번호 /균주명	가격(원/kg)	유산균수 기준 단위	보관조건	초기 유산균수	18개월후 예측	
					유산균수	생존율(%)
HY8002	1,118,501	cfu/g	25℃	9.50E+09	7.24E+08	7.62%
HY7715	1,038,039			1.60E+10	1.08E+09	6.75%
DDS-1 (UASLABS)	650,000			3.00E+09	1.47E+08	4.90%

④ 이중제형 유통저장성

이중제형의 자사균주 테스트를 위하여 HY8002, HY7715, DDS-1를 이중제형 포장에 적용하는 라인테스트를 진행함

수치	실험일	HY8002						HY7715						DDS-1					
		25도			35도			25도			35도			25도			35도		
		변형1	변형2	평균	변형1	변형2	평균	변형1	변형2	평균	변형1	변형2	평균	변형1	변형2	평균	변형1	변형2	평균
05	2019-05-29	2.47E+11	2.25E+11	2.36E+11	2.47E+11	2.25E+11	2.36E+11	1.23E+11	1.32E+11	1.28E+11	1.23E+11	1.32E+11	1.28E+11	8.20E+10	7.10E+10	7.65E+10	8.20E+10	7.10E+10	7.65E+10

유통기한 예측모델을 기준으로, 18개월 후 HY8002, HY7715, DDS-1은 각 0%, 0%, 7.64%의 생존율이 예측됨

균주번호 / 균주명	가격(원/kg)	유산균수 기준 단위	보관조건	초기 유산균수	18개월후 예측	
					유산균수	생존율(%)
HY8002	1,118,501	cfu/g	25℃	2.36E+11	6.09E+03	0.00%
HY7715	1,038,039			1.28E+11	2.48E+05	0.00%
DDS-1 (UASLABS)	650,000			7.65E+10	5.84E+09	7.64%

나. *Lactobacillus casei* HY2782 균주의 산업화를 위한 scale-up 연구

① HY2782 라인테스트 시생산

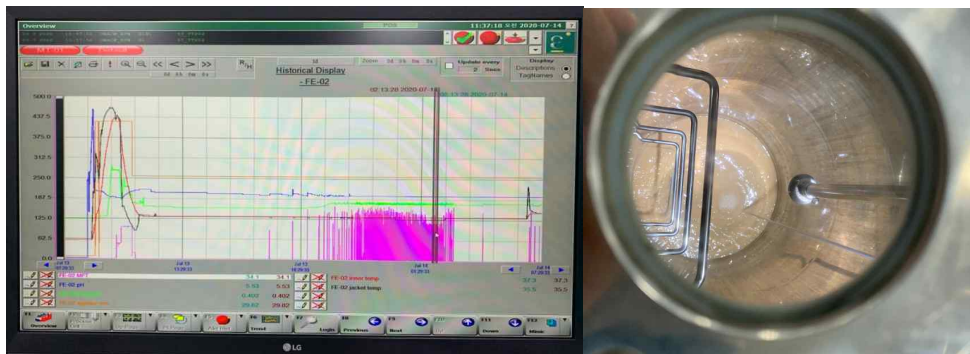
-배양: 18시간 배양

생산 라인 적용 유산균의 배양균 수 확인

구분	유산균 수 cfu/ml
배양액	4.8*10 ¹⁰
농축액	5.3*10 ¹¹
혼합액	2.8*10 ¹¹

-농축

FD 2호기 사용으로 인하여 기존과 동일하게 농축배수 15배로 진행
1800L배양을 진행하여 농축배수 15배로 120L 농축액과 120L 보호제를 혼합하여,
혼합액 240L 제조

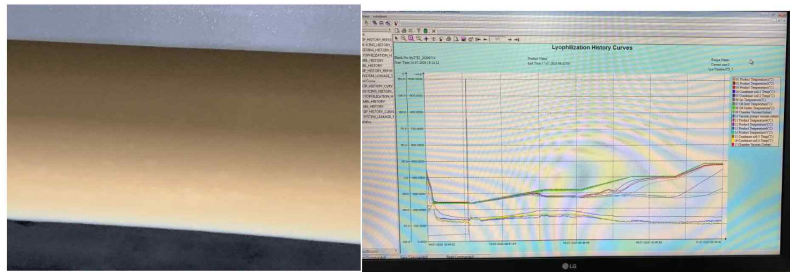


-동결건조(FD, Freeze Dryer)

FD 로딩양 : 1셀브당 36kg으로 진행함

FD 셀브에 로딩 후 HY2782 기존에서 나타나는 몽글몽글한 특성이 혼합액에서 나타나는 것을 확인함

48h 후 FD트렌트 확인결과 5, 6번, 7번 셀브의 온도 상승이 지연되는 것으로 확인됨



- 건조 분말

기존 HY2782 대비 변경 HY2782의 분말 성상이 많이 개선되었음을 확인함



셀브	분말무게(kg)	비고
1번	5.444	이상없음
2번	5.465	
3번	5.370	
4번	4.894	
5번	5.013	
6번	5.335	컬랩스 미량 발생
7번	5.092	
합계	36.613	-

기존 HY2782 1800L 배양 및 15배 농축 : FD분말 약 30kg 생산

변경 HY2782 1800L 배양 및 15배 농축 : FD분말 약 36kg 생산 (약 20% 증가)

② 상온저장안정성 검토

8주차까지 실험결과 생존율 약 72.9%로, 상온저장안정성 생존율이 우수하게 나타남

구분	부형제	조건	0 주차	2 주차	4 주차	5 주차	8 주차	생존율 (%)
변경+변보+열충격 (10배)	부형제 20%	25°C 저장	3.36E+11	2.61E+11	1.90E+11	2.50E+11	2.45E+11	72.9

다. *Lactobacillus paracasei* HP7 균주의 산업화를 위한 plant scale의 scale-up 연구

① 스틱포 및 캡슐 등 다양한 제형을 통해 산업화 기능성 확인

② 온도별 저장성 및 유통 안정성 실험

- 스틱포의 경우 유지기한이 10°C에서 101.9개월임을 확인

- 캡슐의 경우에는 유지기한이 10°C에서 26.5개월, 25°C에서는 15개월 임을 확인

- 미네랄 함량 증가, 솔비톨 1% 보호제 적용하여 시생산 진행

구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 기존 스틱-냉장(10°C)	$y = 82,582,939,965.02 e(0.01)x$	(0.010)	8.26E+10	1.00E+09	441.38	101.9
HP7 기존 스틱-상온(25°C)	$y = 278,135,652,713.54 e(0.39)x$	(0.390)	2.78E+11	1.00E+09	14.43	3.3
구분	추세선식	상수1	상수2	품질규격서 기준	유지기한 주차	유지기한 개월
HP7 기존 캡슐-냉장(10°C)	$y = 312,599,748,043.32 e(0.03)x$	(0.030)	3.13E+11	1.00E+10	114.74	26.5
HP7 기존 캡슐-상온(25°C)	$y = 259,502,646,821.50 e(0.05)x$	(0.050)	2.60E+11	1.00E+10	65.12	15.0

③ 스틱포 및 캡슐 제형에 개선 원말 적용하여 시생산

- 솔비톨 1% 동결보호제를 농축액 대비 보호제를 4:6 비율로 혼합하여 시생산 진행하고 동일한 배합비를 적용한 분말로 스틱포, 캡슐 제형에서 안정성 테스트를 진행함
- FD 분말 총량 10.073 KG, 68KG 로딩 시 수율 7.5%, 60KG 로딩시 8.3%로 나타남 (68KG 로딩하는 경우 Collapse로 일부 Loss 발생). 평균 수율은 약 7.9%으로 나타남

구분	로딩 (kg)	FD 분말 (kg)	수율 (%)	평균수율 (%)
7번 셀브	68	5.085	7.5	7.9
8번 셀브	60	4.988	8.3	
총량	128	10.073		-

구분	유산균수 검사결과(cfu/ml or g)			
	배양액	농축액	혼합액	개별 분말
HP7	1.56E+10	5.55E+11	2.27E+10	1.06E+12

[시생산 단계별 균수 측정]

- 스틱포와 캡슐 16주차 기준 안정성을 확인하였을 때 스틱포와 캡슐 모두 안정성이 12개월 이상임을 확인함

- 기존 HP7 스틱포와 캡슐 데이터를 비교했을 때 개선된 HP7 분말을 스틱포와 캡슐에 적용했을 때 상온 안정성이 개선됨을 확인함

주차(주)	0	2	4	6	8	12	16	20	24	28	36
HP7 기존 스틱포-냉장(10℃)	6.65E+10	7.65E+10	1.01E+11	9.10E+10	8.15E+10	6.30E+10	7.15E+10	6.50E+10	6.25E+10	6.60E+10	5.80E+10
HP7 기존 스틱포-상온(25℃)	6.65E+10	6.35E+10	5.70E+10	2.87E+10	1.55E+10	3.35E+09	1.16E+10	1.25E+09	2.70E+06	8.10E+05	-

주차(주)	0	2	4	6	8	12	16	20	24	28	36
HP7 기존 캡슐-냉장(10℃)	4.10E+11	2.28E+11	2.74E+11	2.58E+11	2.94E+11	1.70E+11	1.73E+11	1.70E+11	9.45E+10	1.26E+11	1.10E+11
HP7 기존 캡슐-상온(25℃)	4.10E+11	2.24E+11	2.08E+11	1.82E+11	1.81E+11	1.18E+11	1.27E+11	9.50E+10	5.33E+10	8.00E+10	7.05E+10

④ 보호제에 따른 안정성 확인

- *L. paracasei* HP7 보호제 조성

	#1(기존 보호제)	#2(개선 보호제)
원료 1	13.4	3.0
원료 2	3.15	3.0
탄소원	3.45	
프리바이오틱스		6.0
총 합량(%)	20	12

- *L. paracasei* HP7 보호제에 따른 생균수

	#1(기존 보호제)	#2(개선 보호제)
FD 전 생균수(cfu/ml)	5.3.E+10	9.6.E+10
FD 후 생균수(cfu/g)	3.8.E+11	6.6.E+11

- *L. paracasei* HP7의 분말 안정성을 향상시키기 위하여 동결 보호제에 따른 균주 안정성을 비교하고자 실험을 진행함

- HP7의 경우 배양 후 농축과정에서 균주의 소실이 일어나지 않고 농축이 잘 되는 특성이 있어 분말로 제조하는데 타 균주에 비해 장점을 가지고 있었음

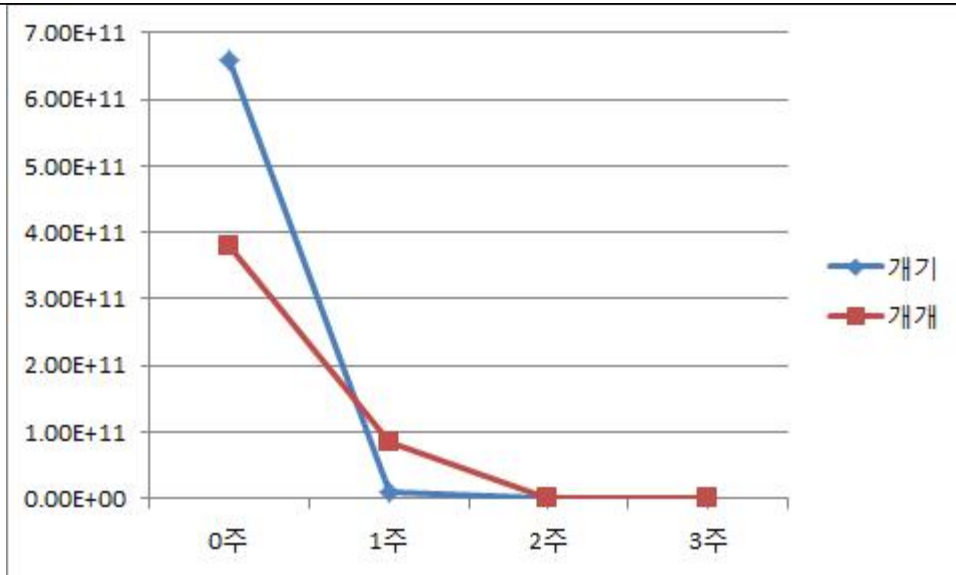
- FD후 보호제와 혼합한 샘플의 생균수의 경우 6.6E+11 cfu/ml로 매우 높은 생균수를 나타내는 것을 확인함

⑤ *L. paracasei* HP7 안정성 확인

- FD 직후 생존율의 경우 개선 보호제인 생존율이 가장 우수하였고 기존보호제는 생존율을 낮게 나타냈으나 절대적인 생균수의 차이는 크지 않음

- 실험결과 #2 보호제가 #1 기존 보호제에 비해 균주 안정성에 더 효과적인 것으로 나타남

- HP7의 경우 가속실험결과 #2 보호제가 고온 다습한 환경에서 균주의 안정성이 다른 보호제에 비하여 향상되었으나 가속실험의 결과가 실측실험과 비례하다고만 볼 수 없어 추가적인 실측실험 결과가 필요함



	#1(기존 보호제)	#2(개선 보호제)
FD분말 초기 생균수 (생존율)	3.80E+11	6.60E+11
1주차 생균수 (생존율)	8.50E+09	8.45E+10
2주차 생균수 (생존율)	0.00E+00	0.00E+00
3주차 생균수 (생존율)	0.00E+00	1.55E+09

⑥ 부형제에 따른 분말의 상온 안정성 확인

- HP7 분말의 유통안정성 결과 9개월을 이상을 유지하였음 (기준 균수 1.0 x 10¹¹ cfu/g)
- 상온에서 저장한 경우 원말 및 무수결정포도당은 2개월을 넘기지 못하고 기준 균수 이하로 떨어진 반면 옥수수 전분을 부형제로 사용한 샘플의 경우 9개월까지는 기준 균수를 유지하여 원말보다 높은 안정성을 보여 부형제에 의한 안정성 향상 효과를 확인함

상온	0개월	2개월	4개월	5개월	6개월	8개월	9개월	생존율
원말	7.00E+11	7.70E+10						
옥수수전분	2.45E+11	2.46E+11	1.61E+11	1.32E+11	2.25E+11	8.5E+10	1.44E+11	59%
dextrin	2.55E+11	2.35E+11	8.05E+10	6.90E+10				
무수결정포도당	2.25E+11	4.10E+10						

8. 장내미생물총 밸런스 개선 및 인지능력 개선 선발균주를 적용한 유제품 개발

가. 특히 자사균주인 HY7715, HY8002, HP7를 이용한 신제품 개발

- 유산균 HY7715, HY8002, HP7 3종을 배합하여 제품의 1일 섭취량은 2g, 2포 섭취 및 5억 보증으로 설계함

[제품 품질 규격 설정]

검사 항목		기준	규격	비고
1	성상	점박이가 있는 황회색 분말	법적*	
2	이물	불검출	법적***	
3	총 유산균수 (cfu/4g)	5.0 × 10 ⁸ 이상 (500,000,000 이상)	법적*	
4	Glabridin(mg/4g)	5.4(표시량의 80 ~ 120%)	법적**	
5	대장균군(cfu/g)	음성	법적*, 법적**	
6	납(ppm)	1.0 이하	법적**	
7	총비소(ppm)	1.0 이하	법적**	
8	카드뮴(ppm)	0.1 이하	법적**	
9	총수은(ppm)	0.1 이하	법적**	
10	아세트론(mg/kg)	30 이하	법적**	
11	내용량	120 g (2.0 g x 60포)의 ± 2.0%	법적****	
12	수분함량(%)	3.0 이하	관리	
13	유통기한	12개월, 실온(25°C 이하)		

* 건강기능식품의 기준 및 규격 제3. 개별 기준 및 규격 2. 기능성 원료 2-51 프로바이오틱스

** 건강기능식품 기능성 원료 인정서. 감초추출물(제2014-4호)

*** 식품공전 제2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격 5. 식품일반의 기준 및 규격 2) 이물

**** 건강기능식품의 표시기준 제5조 표시방법 11. 기타 건강기능식품의 세부표시기준에서 정하는 사항 제7조 중량 등의 허용오차

***** 식품공전 제2. 식품일반에 대한 공통기준에 대한 규격 5. 식품일반의 기준 및 규격 15) 멜라민 기준

나. 제품 대량 생산을 위한 라인 테스트

- 라인테스트 진행 결과, 균주 실측치 반영 이론 균수와 비교할 때 크게 떨어지지 않는 수준임을 확인함

- 제품의 수분함량은 2.3%, 수분활성도는 0.229로 안정한 수준임을 확인함

[제품 관리 규격 확인]

검사항목	기준	당사 규격/기준	생산제품 점검	비고
성상	미백색의 분말	미백색의 분말	점박이가 있는 회갈색 분말	
이물	불검출	불검출	불검출	
대장균군	음성	음성	음성	
프로바이오틱스수 (cfu/4g)	5.0 × 10 ⁸ 이상 (500,000,000 이상)	1.82 X 10 ¹⁰	2.78 X 10 ¹⁰	
Glabridin	표시량 (5.43 mg / 4g) 의 80~120%	-	6.32 (117%)	공인기관분석 결과
아세톤(mg/kg)	30 이하	-	3.21	
수분(%)	설정 예정	2.3	2.28	
수분활성도	-	0.229	0.247	

다. 제품 저장성/안정성 점검

- 보관 조건 3구간 : 20도/75%RH, 25도/75%RH, 35도/75%RH)
- 제품의 프로바이오틱스 기준규격 : 5억cfu/4g
- 실험 기간 : 2019 .09 ~ 2020. 10 (13개월)
- 저장성 확인 결과, 예상 유통기한이었던 12개월차에서 16억(20도), 1억(25도) 수준으로 확인함

프로바이오틱스수	0주	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월	9개월	11개월	12개월	13개월	생존율	비고
20도 75%RH	1.82E+10	1.76E+10	1.32E+10	1.52E+10	1.12E+10	2.40E+10	9.60E+09	9.20E+09	4.80E+09	1.60E+09	2.48E+09	14%	
25도 75%RH	1.82E+10	1.24E+10	1.12E+10	9.36E+09	1.00E+10	4.80E+09	5.92E+09	1.44E+09	6.40E+08	1.00E+08	2.40E+08	1%	12개월차 규격이탈
35도 75%RH	1.82E+10	1.92E+09	1.60E+08	8.00E+07	x	x	5.60E+06	x	x	x	x	0%	2개월차 규격이탈

5세부 (경희의료원, 연구책임자: 임성빈)

<주요 성과 요약>

- 1) 한국인 정상인(306건) 및 정신질환자(59건) 분변 수집과 microbiome 분석을 통한 신경정신질환 관련 장내균총 변화 확인
- 2) 인지기능 개선 인체적용시험 1건 (에치와이(주) 소재) 종료, 1건 (엠테라파마(주) 소재) 진행 중. 복용 전후 분변 수집 (6세부 협력연구)

1. 분변 연구

가. 한국인 정상인에서 혈액, 분변, 소변 수집을 통한 멀티오믹스분석을 위한 연구 결과

1) 프로토콜 작성

- 가) 한국인에서 분변 microbiome의 대조군 설정을 위한 샘플 수집
- 나) Database 축적을 위해 초기 50예 수집 목표를 280명으로 상향
- 다) Database 축적을 위해 분변, 혈액, 소변을 동시에 수집
- 라) 식사 설문을 첨부하여 향후 식품 분야에서 활용 가능하도록 프로토콜 작성

2) 프로토콜

가) 프로토콜 개요

연구 제목	한국인 정상인에서 혈액, 분변, 소변 수집을 통한 멀티오믹스분석을 위한 연구
영문 제목	Multiomics Research Proposal by using samples of blood, stool, and urine in Koreans
연구 책임자	경희대학교병원 임상약리학과 임성빈 교수
공동 연구자	경희대학교병원 임상약리학과 김보형 교수 경희대학교병원 임상약리학과 박상인 교수 경희대학교병원 신장내과 정경환 교수
시험 담당자	경희대학교병원 임상약리학과 이화영 연구원 경희대학교병원 임상약리학과 정금란 연구원 경희대학교병원 임상약리학과 강형미 연구원 경희대학교병원 임상약리학과 신지선 연구원 경희대학교병원 임상약리학과 유새별 연구원 경희대학교병원 임상약리학과 이호정 연구원
시험 기관 명 및 주소	경희대학교병원 (서울시 동대문구 경희대로 23 경희의료원)
분석 기관	경희대학교 약학대학 (주)테라젠이텍스 건국대학교 융합과학기술원
시험 기간	IRB 승인일로부터 24개월
시험 대상	각 연령대별 남녀
시험 목적	한국인의 분변 대조군 모집을 통해 장내 microbiome의 대조군을 유전자 분석(미생물 유전자)을 통하여 확립하고 혈액, 소변을 동시에 수집하여 인체유래물은행에 보관하여 향후 멀티오믹스 및 분변과의 대조 연구에 활용하고자 함
대상자 수	본 연구의 각 군당 목표 대상자 수는 30명으로 하되, 청년, 청장년, 중년, 및 노년 그룹은 임상실험실검사에서 정상 범주를 벗어날 수 있는 가능성을 고려하여 40명으로 한다. 각 연령군에서 남녀 50%로 동일 샘플을 수집한다. (만 나이) 1. 영아 (출생 후 1개월 - 24개월 미만) 2. 어린이 1군 (24개월 이상 - 7세 미만) 3. 어린이 2군 (7세 이상 - 12세 미만) 4. 청소년 (12세 이상 - 19세 미만) 5. 청년 (19세 이상 - 30세 미만) 6. 청장년 (30세 이상 - 45세 미만) 7. 중년 (45세 이상 - 60세 미만) 8. 노년 (60세 이상 -)
대상자 선정 기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 선정한다. 1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2) 문맹자를 제외한 한국인 남녀 3) 미성년자의 경우 법정대리인의 동의를 득한 자
대상자 제외 기준	다음 기술된 조건에 해당되는 자를 제외시킨다. 1) 최근 3개월 이내에 유산균 제제를 일주일 이상 지속적으로 복용한 자 1. 최근 1주일 이내에 진통제, 소염제 등 위장관에 영향을 줄 수 있는 약물을 복용한 자 2. 한달 이내에 경구용 항생제를 복용한 자 3. 최근 1주일 이내에 설사, 복통 등의 급성 위장관계 증상을 호소하는 자 4. 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 경우

SBank Ver. 1.0

CONFIDENTIAL

증 례 기 록 지

(CASE REPORT FORM)

Protocol No. SBank	
한국인 정상인에서 혈액, 분변, 소변 수집을 통한	
멀티오믹스분석을 위한 연구	

시 험 자 정 보	시 험 기 관	경희대학교병원								
	시 험 책 임 자	임성빈 교수								
시 험 대 상 자 정 보	시 험 대 상 자 이 니 셜	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="font-size: 8px; text-align: center;">Family</td> <td style="font-size: 8px; text-align: center;">First Name</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>					Family	First Name		
	Family	First Name								
스 크 리 닝 번 호	S	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> </table>								
시 험 대 상 자 배 정 번 호	SB-	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> </table>								

CONFIDENTIAL
본 임상증례기록서와 관련된 모든 정보는 기밀사항이며
경희대학교병원의 소유입니다.

CRF_Ver.1.0

CONFIDENTIAL

페이지 1 / 21

3) 모집 결과

가) 총 226명 모집

나) 6세부 김동현 교수팀, 2세부 오명숙 교수팀, 3세부 이충환 교수님과 샘플 분석 진행

다) 코로나 영향으로 1-24개월 영아 샘플 모집이 부진함

라) 연구 목적인 퇴행성 질환 환자 연구를 위한 대조군 샘플 수집 목적 달성

마) 국내 최대 대조군 연구로 생각되며 혈액, 소변까지 구비한 연구는 향후 여러 연구자들이 연구 과제를 수행하는데 중요한 자료로 사용될 것임

나이	군	남	여	총합
1개월 - 24개월미만	1	2	1	3
24개월이상 - 7세미만	2	15	15	30
7세이상 - 12세미만	3	15	11	26
12세이상 - 19세미만	4	8	6	14
19세이상 - 30세미만	5	19	20	39
30세이상 - 45세미만	6	19	20	39
45세이상 - 60세미만	7	17	20	37
60세이상	8	18	20	38
총계				226

4) Microbiome 분석 결과

가) Microbiome 분석

(1) 분변 대조군 1차 분석

(가) 총 96개의 샘플 분석 (마크로젠 수행)

(나) Illumina Miseq을 이용한 미생물 군집 분석

General Information						
Order Number	HN00132739	Name of Customer	임성빈	Date of Order	2020-07-31	
Final QC Result of DNA sample(s)						
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold	
2020-08-04	2020-08-18	96	95	1	0	
Final QC Result of RNA sample(s)						
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold	
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

* Pass : Proceed with the library construction.
 * Fail : Further processes are on hold until the replacement samples received.
 We do not recommend in proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.
 * Hold : A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.
 Macrogen does not proceed the next step until we have received your permission.
 As 3 ul was taken from the sample for sample (library) QC purposes, the indicated volume represents 3ul less than the total volume received.

(2) 조현병 환자 분석

(가) 정신건강의학과 김종우 교수와 59명의 조현병 환자 공동 분석

General Information						
Order Number	HN00132739	Name of Customer	임성빈	Date of Order	2020-07-31	
Final QC Result of DNA sample(s)						
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold	
2020-08-04	2020-08-07	59	59	0	0	
Final QC Result of RNA sample(s)						
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold	
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

The QC criteria refer to the specification requirements of a single run. In any cases, we may encounter the shortage of sample volume or amount due to various reasons such as a library construction failure. In these cases a request of an additional sample will be inevitable. Therefore, we recommend double the amount to be supplied at first place to minimize any delay of the whole procedure.
 * Pass : Proceed with the library construction.
 * Fail : Further processes are on hold until the replacement samples received.
 We do not recommend in proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.
 * Hold : A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.
 Macrogen does not proceed the next step until we have received your permission.
 As 3 ul was taken from the sample for sample (library) QC purposes, the indicated volume represents 3ul less than the total volume received.

(3) 2차 대조군 분석

(가) 소화기 내과 이창균 교수와 41명의 대조군 분석함

Project Information	
Client Name	이창균
Company / Institution	경희대학교
Order Number	HN00163604
Type of Read	Paired-end
Read Length	301
Number of Samples	41
Library Kit	Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index V2 Kit
Library Protocol	16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Part # 15044223 Rev. B
Type of Sequencer	Illumina platform

(나) 6세부 김동현 교수팀과의 샘플 공유

① 1차 59개 분변을 수령하였으며, 이중 43개 사용이 가능하여 생균분석 및 NGS로 군집을

분석함

- ② 2차 51개 분변을 수령하였으며, 모두 생균분석 및 NGS로 균집을 분석함
- ③ 3차로 인지기능 손상한 사람의 분변을 30명분 받았으나, 아직 분석은 하지못했음
- ④ 분변시료중 6개는 MRC의 연구사업의 대장염/우울환자의 분변균집과 비교를 위해 사용
- ⑤ 분변시료중 4개는 MRC의 연구사업의 인지기능손상환자의 분변균집과 비교를 위해 사용

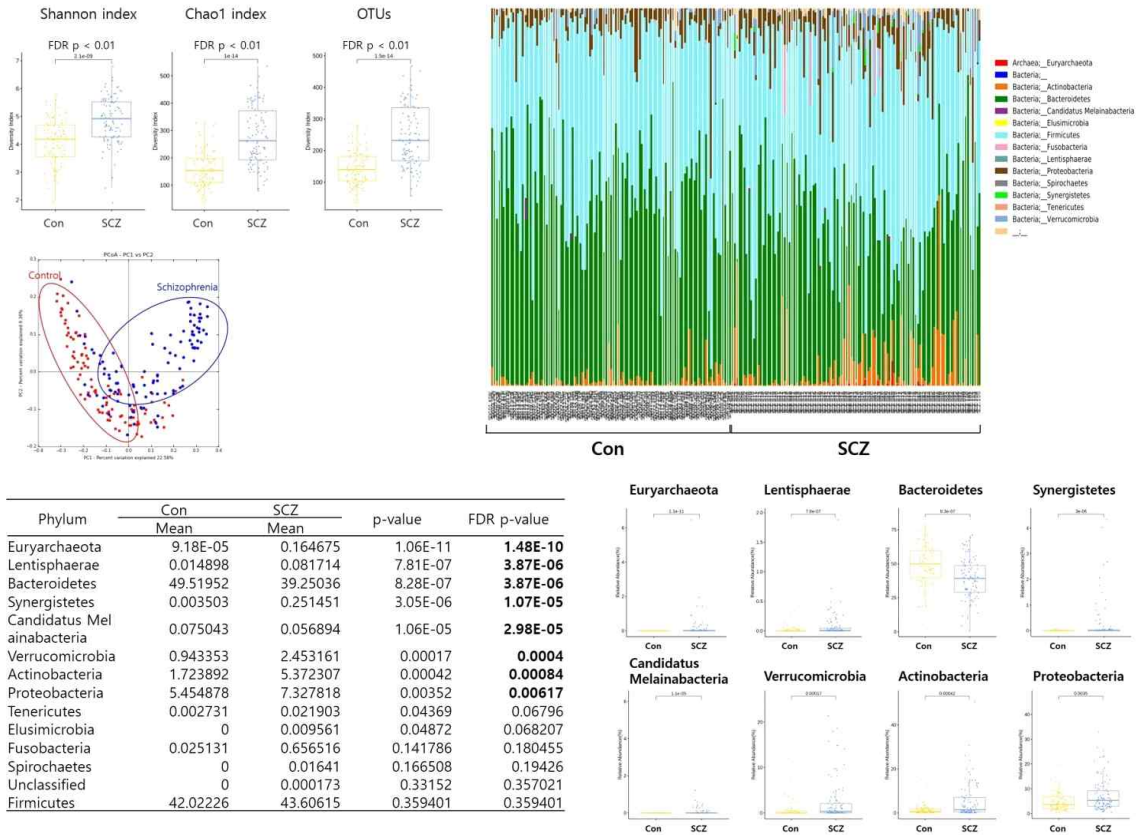
(다) 2세부 오명숙 교수팀과의 샘플 공유

- ① 퇴행성 뇌질환 연구자인 오명숙 교수팀과 microbiome 분석을 위한 분변 공유
- ② 정상인 115명 (4/14까지 123명)
- ④ 정신과 32명 (총 검체 개수: 63개) : 야쿠르트과제 인체적용시험 샘플 (복용 전후)
- ⑤ 신경과 6명 (총 검체 개수: 10개) : 엠테라파마 인체적용시험 샘플 (복용 전후)

(4) 정신질환자 분변과의 microbiome 분석 결과

(가) 경희대 의대 김종우 교수팀과 샘플 공유

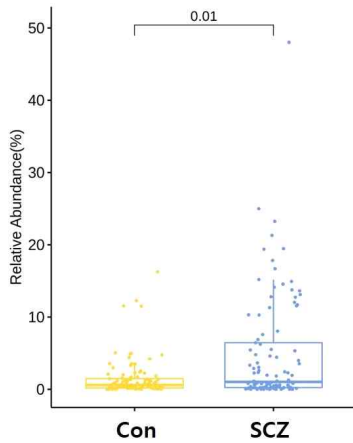
- ① 대조군(n=101)과 조현병(n=105) 환자에서 High-throughout seq 기법으로 장내 미생물 균집을 분석함
- ② 대조군과 조현병 사이에 microbial diversity(alpha-diversity)의 차이가 확인되었으며, phylum level에서 Euryarchaeota, Lentisphaerae, Bacteroidetes phylum 등의 차이가 확인되었음.



[조현병 환자의 분변에서 microbiota 분석]

- ③ 선행 연구들은 조현병에서 lactic acid bacteria인 Bifidobacterium genus의 상대적 개체 수가 증가함을 보고했는데, 우리 결과에서도 이러한 증가를 확인할 수 있었고 특히 Bifidobacterium genus 중 Bifidobacterium callitrichidarum, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium bifidum species 등의 증가를 확인하였음.

Bifidobacterium genus



Species	Con	SCZ	p-value	FDR p-value
	Mean	Mean		
Bifidobacterium breve	0.03998	0.019949	5.46E-05	0.00034
Bifidobacterium callitrichidarum	7.77E-05	0.001669	0.00116	0.00502
Bifidobacterium adolescentis	0.001234	0.006803	0.00536	0.01827
Bifidobacterium bifidum	2.65E-05	0.000441	0.0061	0.02045
Bifidobacterium pseudocatenulatum	1.128566	4.083369	0.00711	0.02337
Bifidobacterium animalis	0.000835	0.010424	0.079698	0.17141
Bifidobacterium pullorum	0	0.000249	0.088868	0.184023
Bifidobacterium longum	0.368793	0.718305	0.160785	0.285951
Bifidobacterium biavatii	7.64E-05	0.000346	0.327984	0.396838
Bifidobacterium pseudolongum	0	8.52E-05	0.33152	0.396838

[조현병 환자의 분변에서 Bifidobacterium genus에 속하는 species의 상대적 개체수 차이]

2. 인지기능 인체적용시험 (4세부 에치와이(주) 소재)

가. 경도인지장애 시험대상자에서 유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 HP7A의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용 시험

1) 프로토콜 개요

시험제목	경도인지장애 시험대상자에서 유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 HP7A의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험
시험의뢰자	한국야쿠르트(주)
시험책임자	경희대학교병원 임상약리학과 강원섭 교수
시험공동연구자 및 담당자	별첨 0 참조
시험기관명 및 주소	경희대학교병원 (서울시 동대문구 경희대로 23 경희의료원)
시험기간	IRB 승인일 ~ 2022년 2월 28일
시험대상	경도인지장애(CERAD-K 총점)이 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상 감소한 사람) 증상을 가진 문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성
시험목적	경도인지장애 시험대상자에서 유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 (HP7A)을 투여했을 때 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다.
디자인	무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교인체적용시험
시험식품	유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물 (HP7A)과 함유된 캡슐 (유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물) 389mg (캡슐당 복합물 300mg 함유)
대조식품	Placebo(유산균 HP7과 쇠비름 추출물의 복합물이 함유되어 있지 않고, 시험식품과 외관과 성상이 동일한 캡슐, 캡슐당 389mg의 위약)
투여방법 및 투여 기간	시험식품은 1일 1회, 1회 2캡슐을 총 12주간 투여한다. - HP7A (유산균 HP7과 쇠비름 복합물, 389mg((캡슐당 복합물 300mg 함유) - 대조식품
대상자수	최종 평가가능 예수 32례
대상자 선정기준	1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2) 문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 3) CERAD-K 평가에 의해 경도인지장애에 해당하는 자: CERAD-K 총점이 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 미만 ~ 하위 5% 이상 범위에 있는 자 또는 CERAD-K 기억력과제 점수(Word list memory or Word list recall or Word recognition or Constructional recall)와 비기억력과제 점수 (Verbal fluency or Boston naming test or Constructional praxis or Stroop test)가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 미만 ~ 하위 5% 이상 범위에 있는 자 4) 정신질환 진단 및 통계편람 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental

	Disorders 5, DSM-5)의 치매의 정의에 부합되지 않는 자.
대상자 제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1) 건강기능식품과 의약품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 시험대상자 2) 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받은 시험대상자 3) 위장장애 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 시험대상자(정신분열증, 간질, 알코올중독, 거식증, 이상식욕항진 등) 4) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장(narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압 대상자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준) 또는 폐질환이 있는 시험대상자 5) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 시험대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치 x 2.5) 6) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dL 이상)와 혈소판(15만/mm³ 이하), 혈액소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL) 이하인 시험대상자 7) 최근 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 시험대상자 8) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 시험대상자 9) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 시험대상자 10) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법 (경구용 피임약, 호르몬 이식, 자궁 내 기구, 콘돔, 살정제)의 선택에 동의하지 않는 가임여성 11) 최근 2개월 이내에 헌혈을 하거나 1개월 이내에 성분 헌혈을 한 시험대상자 12) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 시험대상자
평가기준	<p>기능성 (Functionality)</p> <p>① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint)</p> <ul style="list-style-type: none"> - ADAS-cog 총점 - ADAS-cog 기억요인 개선을 <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint)</p> <p>각 검사의 baseline 대비 개선을</p> <ul style="list-style-type: none"> - 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category fluency) - 숫자 폭 검사(Digit Span Test: DST) - 간편형 단서 회상 검사(The Short Cued Recall Test: SCRT) - 단서 회상 과제(Enhanced Cued Recall Task: ECRT) <p>안전성 (Safety)</p> <p>시험식품 투여 전과 투여 중, 투여 12주 후에 실험실적 검사, 활력징후를 측정하고 연구기간 내에 이상반응을 평가한다.</p>

2) 임상시험 결과 - 유효성 평가지표 분석

가) 총 35명의 대상자가 스크리닝에 참여하여 32명의 대상자가 등록하였고, **총 32명의 대상자**가 시험 완료

나) 인체적용시험을 진행하는 동안 아래와 같은 **3건의 이상반응이 발생**하였으나 **시험식품과 무관**한 것으로 나타남

Rando m No.	증상 및 증후	발현일	소실일	정도	보고방 법	SAE 여부	인과 관계	예측 여부	처치	결과
17	대변을 자주 보고 불편해요	2021-11-06	21-11-14	경증	자발적	No	없음	예측 되지 않음	임상 약 투여 중단	회복 후유증 없음
23	대변을 자주 봄	2021-11-03	2021-11-18	경증	자발적	No	없음	예측 되지 않음	임상 약 투여 일시 중단	회복 후유증 없음
27	신쇄석술	2022-01-24	2022-01-24	경증	자발적	No	없음	예측 되지 않음	0	회복 후유증 없음

- 다) 1, 2차 기능성 평가지표 분석 결과 **유의한 차이를 보이는 평가 지표는 나타나지 않았음**
라) 본 인체적용시험은 향후 인체적용시험에 적용하기 위한 pilot 연구의 성격을 띠고 있어 ADAS-Cog 총점 (ITT) 분석에서 유의한 결과를 나타내지 않은 것으로 판단됨
마) 그러나, **2차 평가변수인 언어 유창성 과제의 슈퍼마켓 범주에서** t-test와 ANCOVA를 통해 분석한 **시험군과 대조군의 복용 전후 평균 점수의 변화**는 0.094 (t-test)와 0.110 (ANCOVA)를 나타내어 **유의한 경향성을 보여** 향후 추가적인 분석을 진행하는 경우 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상됨
바) 연구를 진행하면서 **HP7A 식품 복용 전후의 분변 63예를 수집**하여 식품 복용 전후의 분변 변화 분석이 가능할 것으로 보인다. 향후 연구비 확보시에 활용이 가능할 것이며 복용 전의 분변은 대조군으로도 활용 가능

① 1차 기능성 평가 변수: ADAS-Cog 총점(ITT) 분석 결과

대조군과 시험군의 시험식품 복용 전후의 ADAS-Cog 총점 차이는 p value가 t-test에서 0.721, ANCOVA에서 0.567을 나타내어 **유의한 차이 없었음**

평가 변수	Visit	시험군	대조군	p-value	p-value
		Mean±SD (N=16)	Mean±SD (N=16)		
ADAS-Cog 총점	Visit 2	11.06±2.86	11.06±3.84	0.721 ¹⁾	0.567 ²⁾
	Visit 4	8.88±3.24	8.44±2.71		
	%Change	-19.44±22.23	-22.08±19.16		

1) t-test

2) ANCOVA

② 2차 기능성 평가 변수: 언어 유창성 과제 분석 결과

대조군과 시험군의 시험식품 복용 전후의 언어 유창성 과제의 동물범주는 p value가 t-test에서 0.610, ANCOVA에서 0.626을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았고**, 언어유창성과제의 슈퍼마켓범주는 p value가 t-test에서 0.094, ANCOVA에서 0.110을 나타내어 **유의한 차이 없었음**

평가 변수	Visit	시험군	대조군	p-value	p-value	
		Mean±SD (N=16)	Mean±SD (N=16)			
언어 유창성 과제	동물범주	Visit 2	13.00±3.74	13.25±4.96	0.610 ¹⁾	0.626 ²⁾
		Visit 4	14.19±3.21	14.81±4.46		
		%Change	12.84±26.03	18.00±30.40		
	슈퍼마켓 범주	Visit 2	17.31±4.59	17.25±6.42	0.094 ¹⁾	0.110 ²⁾
		Visit 4	17.00±5.45	19.94±6.87		
		%Change	0.75±30.72	22.62±40.13		

1) t-test

2) ANCOVA

③ 2차 기능성 평가 변수: 숫자 폭 검사 분석 결과

대조군과 시험군의 시험식품 복용 전후의 숫자 폭 검사의 DSF Score는 p value가 Mann-Whitney test에서 0.224, Nonparametric ANCOVA에서 0.546을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았고**, DSF Span에서 Mann-Whitney test에서 0.239, Nonparametric ANCOVA에서 0.415을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았고**, DSB Score에서 Mann-Whitney test에서 0.381, Nonparametric ANCOVA에서 0.272을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았고**, DSB Span에서 Mann-Whitney test에서 1.000, Nonparametric ANCOVA에서 0.709을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았음**

평가 변수	Visit	시험군	대조군	p-value	p-value	
		Mean±SD (N=16)	Mean±SD (N=16)			
숫자폭 검사	DSF Score	Visit 2	8.19±2.59	9.56±2.22	0.224 ¹⁾	0.546 ²⁾
		Visit 4	9.63±2.87	9.88±3.03		
		%Change	30.31±76.87	3.57±28.80		
	DSF Span	Visit 2	4.06±1.34	4.31±1.35	0.239 ¹⁾	0.415 ²⁾
		Visit 4	4.62±1.31	4.38±1.26		
		%Change	25.65±58.46	11.56±56.83		
	DSB Score	Visit 2	3.94±1.88	4.12±2.22	0.381 ¹⁾	0.272 ²⁾
		Visit 4	4.44±2.48	4.94±2.26		
		%Change	13.45±40.07	25.26±32.86		
	DSB Span	Visit 2	1.62±0.89	1.88±1.15	1.000 ¹⁾	0.709 ²⁾
		Visit 4	1.81±1.05	2.06±1.12		
		%Change	20.83±62.80	17.50±45.09		

¹⁾ Mann-Whitney test

²⁾ Nonparametric ANCOVA

④ 2차 기능성 평가 변수: 간편성 단서 회상 검사 분석 결과

대조군과 시험군의 시험식품 복용 전후의 간편성 단서 회상 검사 (회상)는 p value가 Mann-Whitney test에서 0.747, Nonparametric ANCOVA에서 0.1192을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았음**

평가 변수	Visit	시험군	대조군	p-value	p-value
		Mean±SD (N=16)	Mean±SD (N=16)		
간편성 단서 회상 검사(회상)	Visit 2	2.56±1.79	3.62±2.53	0.747 ¹⁾	0.1192 ²⁾
	Visit 4	4.69±1.70	5.94±1.84		
	%Change	146.05±198.44(15)	100.24±121.62(14)		

¹⁾ Mann-Whitney test

²⁾ Nonparametric ANCOVA

⑤ 2차 기능성 평가 변수: 간편성 단서 회상 과제 분석 결과

대조군과 시험군의 시험식품 복용 전후의 간편성 단서 회상 과제는 p value가 Mann-Whitney test에서 0.616, Nonparametric ANCOVA에서 0.695을 나타내어 **유의한 차이를 보이지 않았음**

평가 변수	Visit	시험군	대조군	p-value	p-value
		Mean±SD (N=16)	Mean±SD (N=16)		
단서 회상 과제	Visit 2	14.56±1.55	13.87±2.19	0.616 ¹⁾	0.695 ²⁾
	Visit 4	15.38±1.15	15.69±0.48		
	%Change	6.67±13.62	16.23±21.74		

¹⁾ Mann-Whitney test

²⁾ Nonparametric ANCOVA

3. 인지기능 인체적용시험 (주관/1세부 엠테라파마(주) 소재)

가. MT014의 인지 기능 개선 등 기능성 및 안전성 검증을 위한 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

1) 프로토콜 개요

시험 제목	MT104의 인지 기능 개선 등 기능성 및 안전성 검증을 위한 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
시험 의뢰자	엠테라파마(주)
시험 책임자	경희대학교병원 신경과 이진산 교수
시험공동연구자	별첨0 참조
시험 담당자	별첨0 참조
시험 실시기관명 및 주소	실시기관명: 경희대학교병원 주소: 서울시 동대문구 경희대로 23
시험 기간	IRB 승인일 ~ 2022년 6월 30일
시험 대상	문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성
시험 목적	경도인지장애 시험대상자에서 MT104 (실새삼: 새삼: 락토바실러스 파라카제이 복합물, 3:1:0.5의 비율)를 투여했을 때 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다.
디자인	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교인체적용시험
시험 식품	실새삼(<i>Cuscuta australis</i> R. Br.), 새삼(<i>C. japonica</i> Choisy) 및 락토바실러스 파라카제이(<i>Lactobacillus paracasei</i>) 복합물(MT104) 480mg을 함유한 1000mg 정제
대조 식품	Placebo(MT104 복합물이 함유되어 있지 않고, 시험식품과 외관과 성상이 동일한 정제 1000mg의 위약)
투여방법 및 투여 기간	시험식품은 1일 1회, 1회 1정제를 총 12주간 투여한다. - MT104 (실새삼, 새삼 및 락토바실러스 파라카제이 복합물 480mg을 함유한 1000mg 정제) - 대조식품
대상자 수	drop-out 10% 고려하여 각 군당 43명씩, 총 86명
선정 기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 선정한다. 1. 문맹자를 제외한 만 50세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 2) 경도인지장애 진단기준에 부합한 자 - 환자나 보호자가 인지장애를 호소 - 신경심리검사(SNSB)의 언어적 또는 시각적 기억력 점수가 나이와 학력 수준의 -1SD 이하로 저하된 자 - 일상생활장애가 없어야 함(K-IADL 테스트에서 0.43 이상인 자) 3) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자
제외 기준	다음 기술된 조건에 해당되는 자를 제외시킨다. 1)건강기능식품과 의약품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 자 5. 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받은 자 6. 위장장애 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 자(정신분열증, 간질, 알코올중독, 거식증, 이상식욕항진 등) 7. 뇌졸중, 심질환 (심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장 (narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압 대상자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준) 또는 폐질환이 있는 자 8. 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 자 (serum creatinine> 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase> 정상 상한치 x 2.5) 9. 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dL 이상)와 혈소판 (15만/mm ³ 이하), 혈색소 수치 (남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하인 자 10. 최근 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 자 11. 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강식품, 남용우려 있는 약물

	투여)를 받고 있는 자 12. 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 자 13. 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법 (경구용 피임약, 호르몬 이식, 자궁내 기구, 콘돔, 살정제)의 선택에 동의하지 않는 가임여성 14. 최근 2개월 이내에 헌혈을 하거나 1개월 이내에 성분 헌혈을 한 자 15. 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 자
평가 변수	기능성 (Functionality) 평가변수 ① 1차 기능성 평가변수 (Primary endpoint) - K-MMSE 총점의 개선율 ② 2차 기능성 평가변수 (Secondary endpoint) - K-MoCA 총점의 개선율 - SNSB의 서울언어학습검사 (Seoul Verbal Learning Test, SVLT) 지연회상 점수의 개선율 - SNSB의 레이복합도형검사(Rey Complex Figure Test, RCFT) 지연회상 점수의 개선율 - SNSB의 SVLT 즉각회상, 재인 점수의 개선율 - SNSB의 RCFT 즉각회상, 재인 점수의 개선율 안전성 (Safety) 평가변수 활력징후, 이학적 검사, 실험실적검사, 이상반응

2) 임상시험 진행 경과 및 향후 계획

가) 2차년도부터 시작되어야 하는 인체적용시험이 COVID-19 팬데믹 등으로 4차년도 2분기부터 시작

나) COVID-19 유행으로 인체적용시험기관 연구진의 감염과 환자 내원이 어려워져 대상자 모집에 어려움

다) 다기관 임상시험으로의 전환

(1) 주관연구기관인 엠테라파마에서는 경희대병원 1개 기관에서 진행되던 임상시험의 빠른 진행을 위하여 네오뉴트라를 CRO로 선정하고 전북대학교병원, 고려대학교 안암병원을 임상시험기관으로 추가하여 다기관 임상시험으로 진행함

(2) 병원 비용 추가 1.5억원 이상을 투자하고 CRO (네오뉴트라) 비용도 투자하면서 적극적으로 임상시험에서 좋은 결과를 도출하기 위하여 연구자와 협력하여 총력을 다하고 있음

라) 현재 모집 현황

기관	경희대학교병원	전북대학교병원	고대안암병원	합계
배정 대상자 수	36	25	25	86
스크리닝	34	32	3	
스크리닝 탈락	22	7	2	
등록	12	25 (완료)	1	38
중도탈락	0	0	0	
진행 중	3	24	1	
완료	9	1	0	

마) 분변 수집 (경희대병원만 진행)

(1) 6명에서 복용 전후 10예 수집

바) 향후 계획

- (1) 본 과제 종료와 상관없이 경희대학교병원 및 추가 인체시험진행기관에서는 주관기관 엠테라 파마와 함께 임상시험을 성실하게 수행하여 2022.12월까지 완료할 계획임
 (2) 비용은 타 기관은 엠테라파마에서 지원하고 경희대학교병원은 자체 조달할 예정임

6세부 (경희대학교 산학협력단, 연구책임자: 김동현)

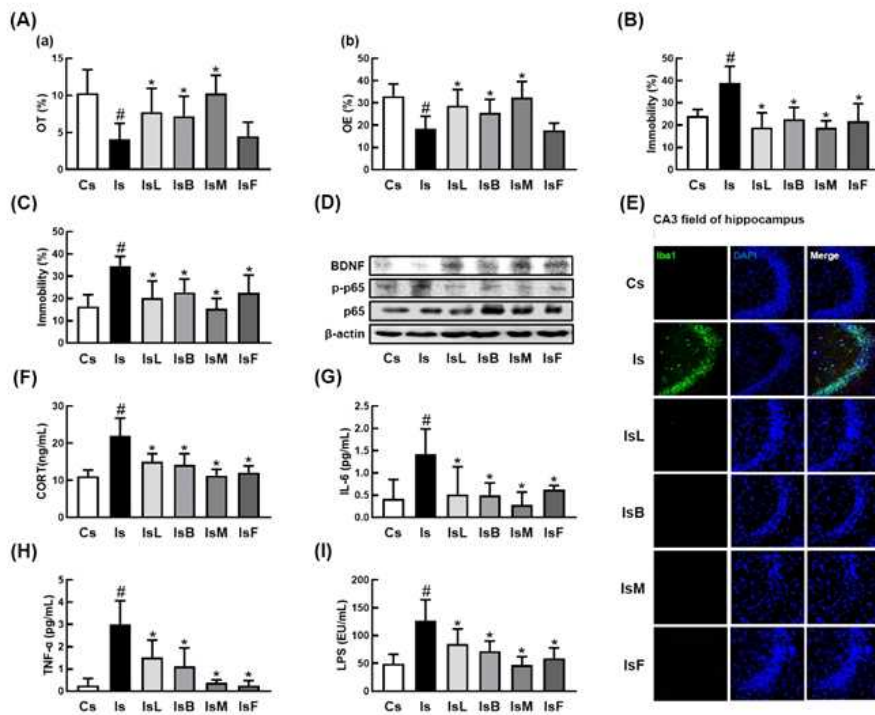
<주요 성과 요약>

- 1) 정신질환환자 분변 유래 대장균 K1 유도 신경정신질환(우울/불안/인지능 손상) 동물모델 구축
- 2) 유산균 소재 4종(NK41, NK46, NK109, NK112)와 천연물 복합소재 MT104의 신경정신질환 (우울/불안/인지능 손상) 개선 효능 확인
- 3) 장내미생물 이식 gnotobiotite 및 conventional 동물모델 제작 및 플랫폼 구축
- 4) 한국인 분변 장내균총 분포 분석을 통해 건강인과 인지능 손상인 사이의 장내균총 변화 상관성 확인 (5세부 협력 연구)

1. 기 확보 유산균으로부터 인지기능/우울불안개선 개선 후보소재 개발

가. 구속스트레스로 유도한 불안/우울마우스모델에서 NK41, NK46은 EPM, TST, FST에서 불안/우울 행동 개선효과

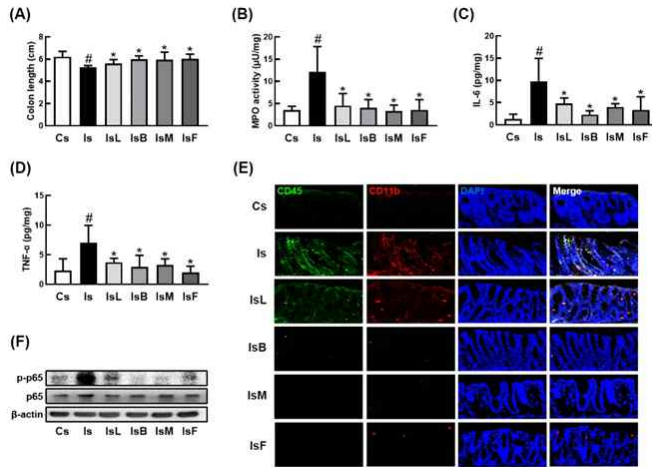
- 1) NK41, NK46은 혈중 corticosterone, IL-6, TNF-a, LPS 농도를 억제하였고, 해마의 BDNF 발현을 높이고, NF-kB 활성화를 억제하였음



[NK41(M), NK46(B), 및 fluxetine(F)의 인지기능/우울불안개선 개선 효과]

나. 구속스트레스 유도 불안/우울마우스모델에서 대장염개선 효과

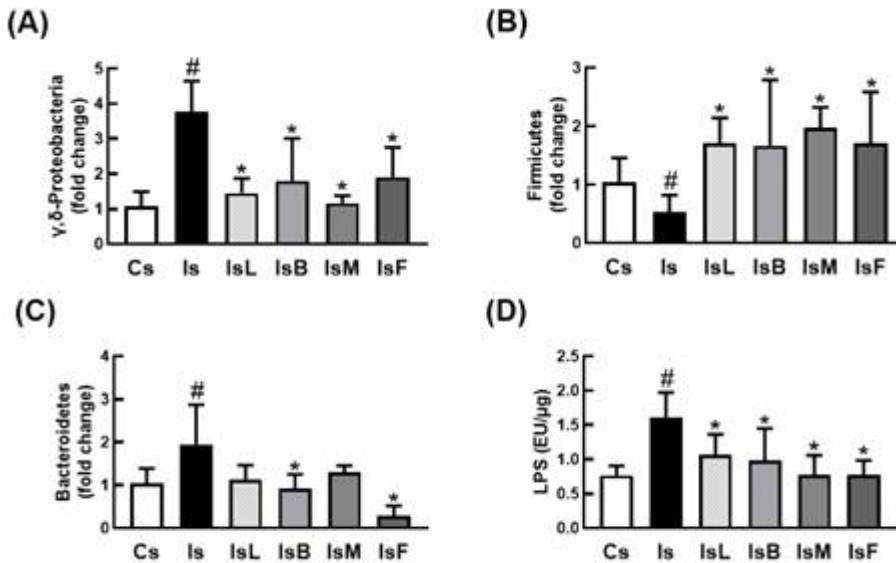
- 1) NK41, NK46은 혈중 corticosterone, IL-6, TNF-a, LPS 농도를 억제하였고, 해마의 BDNF 발현을 높이고, NF-kB 활성화를 억제하였음



[NK41(M), NK46(B), 및 fluxetine(F)의 대장염 개선 효과]

다. 구속스트레스 유도 불안/우울마우스모델에서 장내균집개선 효과

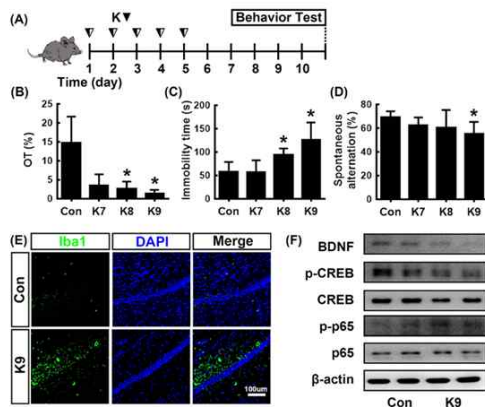
1) NK41, NK46은 혈중 corticosterone, IL-6, TNF-a, LPS 농도를 억제하였고, 해마의 BDNF 발현을 높이고, NF-kB 활성화를 억제하였음



[NK41(M), NK46(B), 및 fluxetine(F)의 대장염 개선 효과]

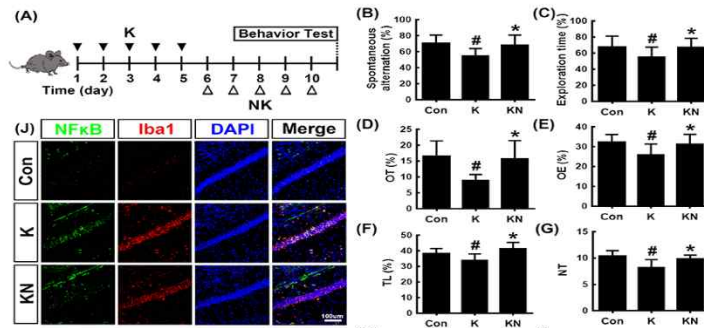
라. 대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 NK41의 인기능 및 우울증 개선 효과

1) 대장균 K1은 Y-maze, EPM, FST에서 불안과 기억력은 손상시키는 효과를 보였으며, 해마의 activated microglia 증가, BDNF 발현, CREB의 활성화를 억제하는 효과를 보였음



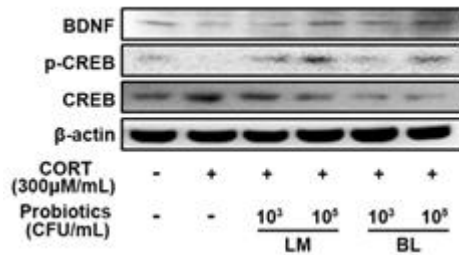
[대장균 K1의 인기능손상/우울증 유발효과]

2) 대장균 K1로 유도한 불안/우울마우스모델에서 NK41은 Y-maze, NORT, EPM, LDT에서 기억력 및 불안/우울 행동을 개선효과를 보였음



[대장균 K1 유도 인지능손상/우울증 유발마우스에서 NK41의 기억력 및 우울증 개선효과]

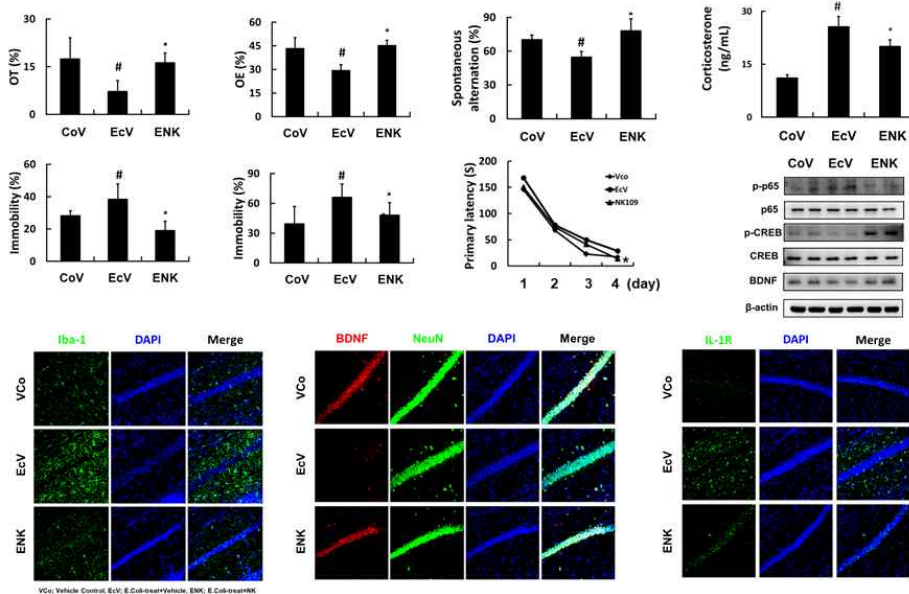
3) NK41(LM)과 NK46(BL)은 in vitro에서 SH-SY5Y세포를 corticosterone 자극으로 억제된 BDNF 발현 및 CREB의 활성화를 개선하는 효과가 있었음



[NK41(LM)과 NK46(BL)의 corticosterone 자극한 SH-SY5Y세포의 BDNF 발현 및 CREB의 활성화 개선 효과]

마. 대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과

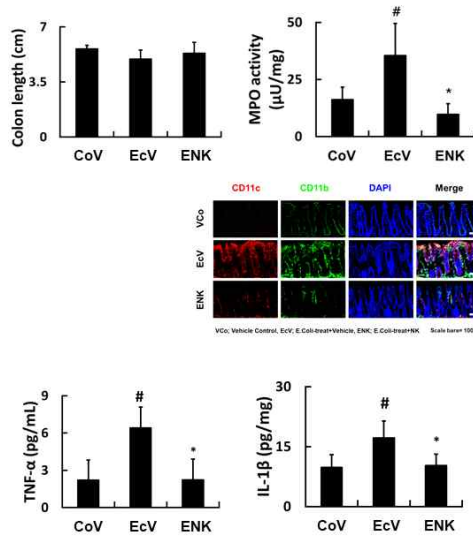
- 1) NK109는 Y-maze, Barnes maze, EPM, FST에서 불안과 기억력은 개선하는 효과를 보였음
- 2) 해마의 microglia 및 IL-1R발현을 억제시키고, BDNF 발현, CREB의 활성화를 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과]

바. 대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 대장염 개선 효과

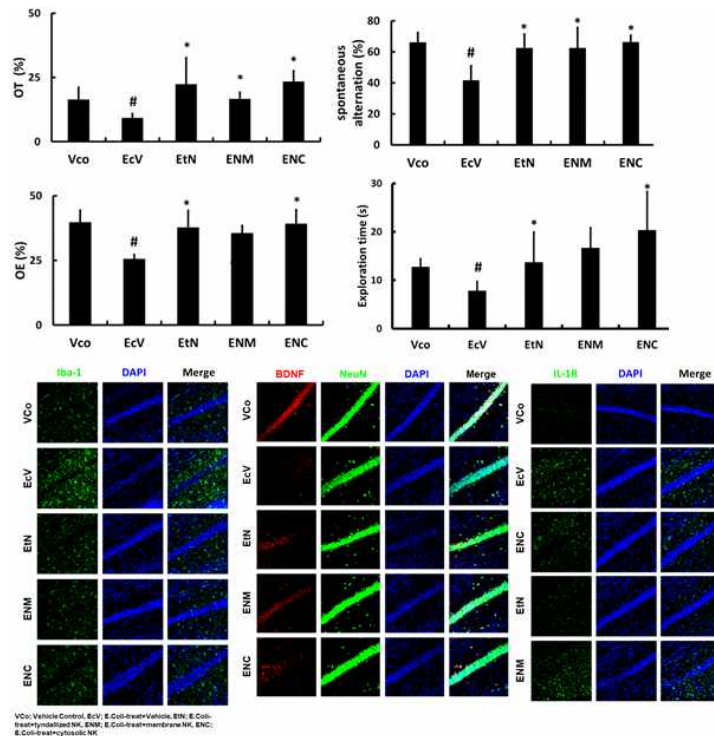
- 1) 대장균 K1로 유도된 myeloperoxidase활성, TNF-a, IL-1beta을 억제하였고, 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 억제하였음



[대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 대장염 개선 효과]

사. 대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 틴탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)의 인지능 및 우울증 개선 효과

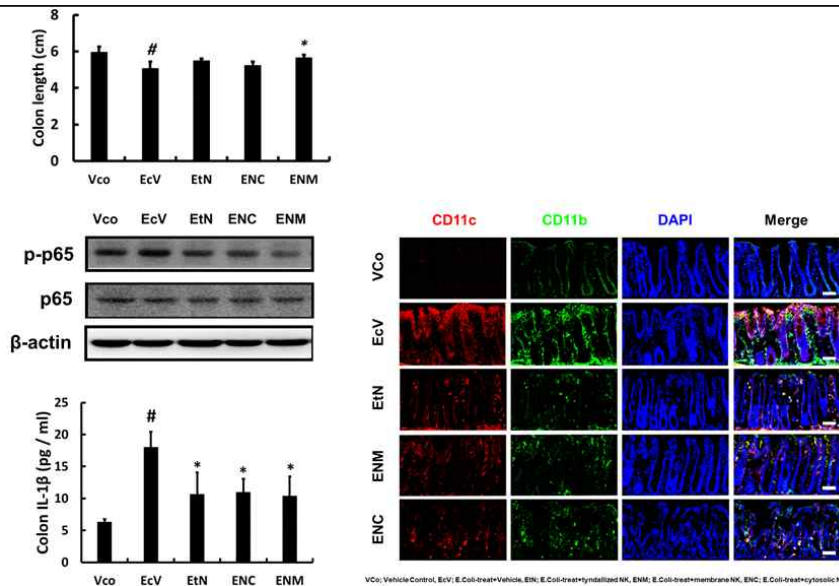
- 1) 틴탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 Y-maze, NORT, EPM에서 불안과 기억력은 개선하는 효과를 보였음
- 2) 해마의 microglia 및 IL-1R 발현을 억제시키고, BDNF 발현을 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 틴탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)의 인지능 및 우울 장내균집개선 효과]

아. 대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 NK112의 대장염 개선 효과

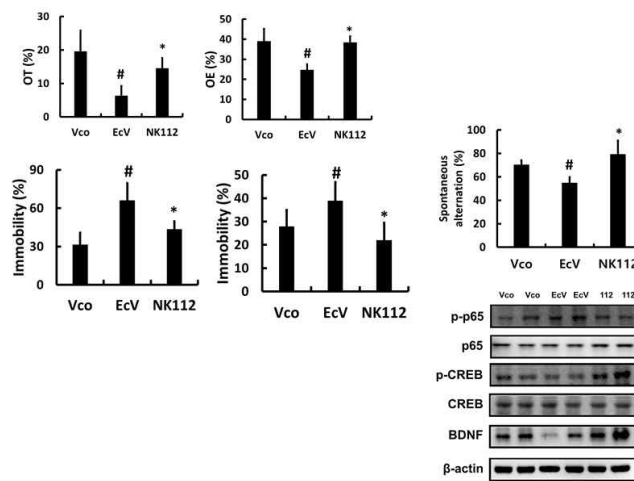
- 1) 틴탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 대장균 K1로 유도된 myeloperoxidase 활성, TNF-a, IL-1beta을 억제하였고, 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 억제하였음



[대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 틴탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)의 대장염 개선 효과]

자. 대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과

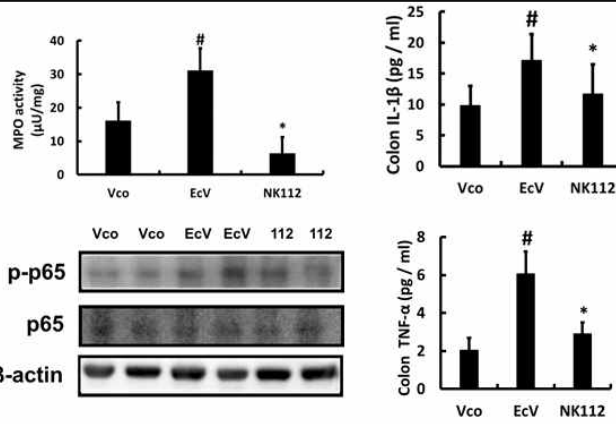
- 1) NK109는 Y-maze, EPM, FST, TST 에서 불안과 기억력은 개선하는 효과를 보였음
- 2) 해마의 microglia 및 NF-kB 활성화를 억제시키고, BDNF 발현, CREB의 활성화를 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과]

차. 대장균 K1로 유도한 인기능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 대장염 개선 효과

- 1) 대장균 K1로 유도된 myeloperoxidase 활성화, TNF-a, IL-1beta을 억제하였고, 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 억제하였음



[대장균 K1로 유도한 인지기능손상/우울증 마우스모델에서 NK112의 대장염 개선 효과]

카. 천연물과 프로바이오틱스의 인지능 개선 효과

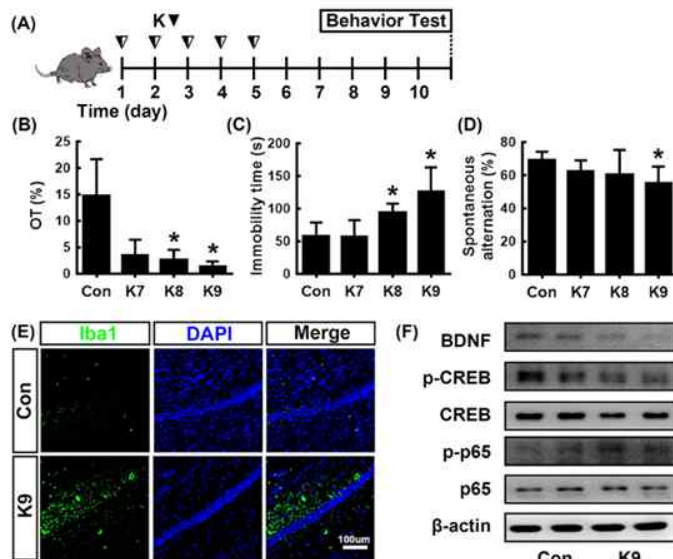
1) 프리바이오틱스로 확보한 홍삼은 NK109, NK112와 병용하였을 때 단독보다 상승하는 인지능개선효과를 보였음

실험군	Y-maze task T(%)
정상군	67.6
Escherichia coli 투여군	53.4
E. coli +NK109	63.5
E. coli+NK112+홍삼	64.7
E. coli+NK112	63.1
E. coli+NK112+홍삼	64.5
E. coli+홍삼	59.7
E. coli+Donepezil	63.2

[대장균 K1로 유도한 인지기능손상/우울증 마우스모델에서 프로바이오틱스와 천연물의 병용효과]

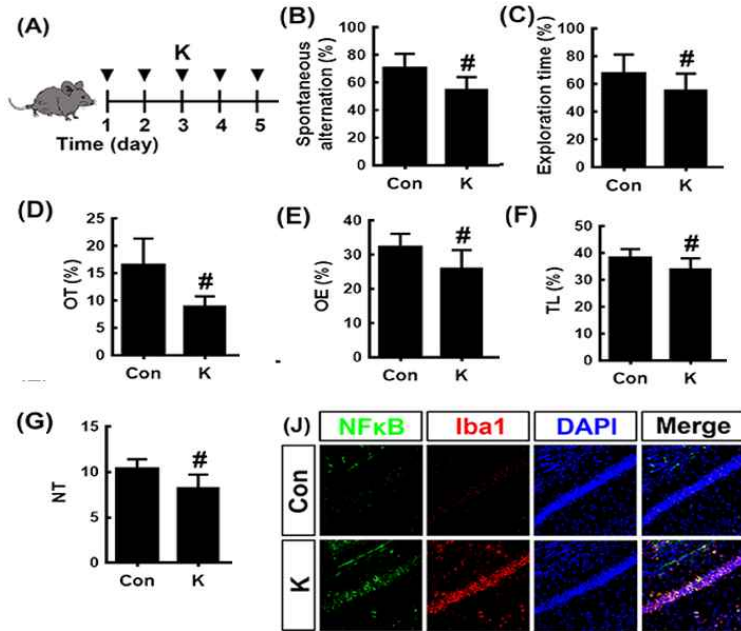
타. SPF 마우스에 대장균 K1로 유도한 인지기능손상/우울증 마우스모델

1) 대장균 K1은 Y-maze, EPM, FST에서 불안 및 기억력을 손상시키는 효과를 보였음
 2) 해마의 microglia를 증가시키고, BDNF 발현, CREB의 활성화를 억제하는 효과를 보였음



[대장균 K1의 인지기능손상/우울증 유발효과]

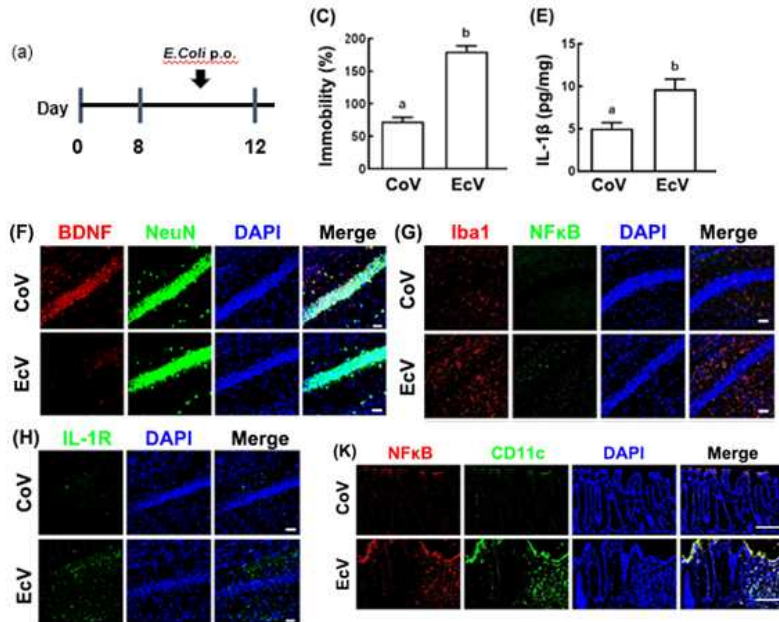
3) 대장균 K1로 유도한 불안/우울 마우스모델에서 NK41은 Y-maze, NORT, EPM, LDT에서 기억력 및 불안/우울 행동을 개선하는 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도 인지능손상/우울증 유발마우스에서 NK41의 기억력 및 우울증 개선효과]

파. GM(germ-free) 마우스에 대장균 K1로 유도한 인지능손상 마우스모델

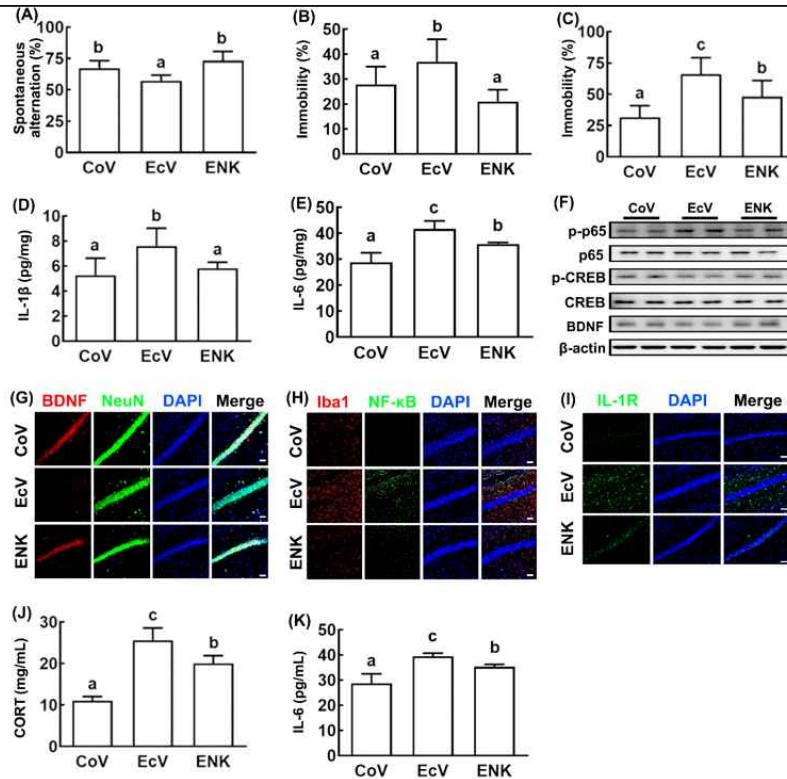
- 1) 대장균 K1은 TST에서 불안과 기억력은 손상시키는 효과를 보였음
- 2) 해마의 microglia를 증가시키는 효과를 보였음



[대장균 K1의 인지능손상/우울증 유발효과]

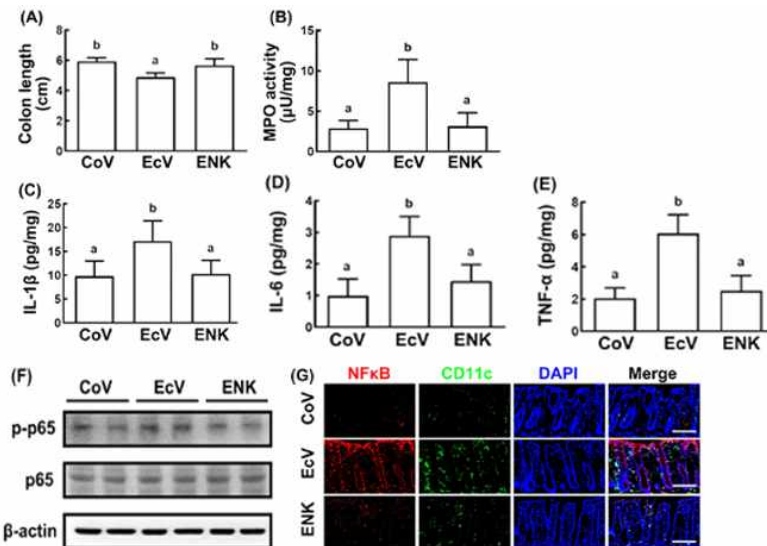
하. 대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 SPF 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과

- 1) NK109는 Y-maze, TST, FST에서 불안 및 기억력 개선 효과를 보였음
- 2) NK109는 해마에서 IL-1β, IL-6를 억제하는 효과를 보였음
- 3) NK109는 스트레스의 호르몬 축 및 전신 염증을 개선하는 효과를 보였음
- 4) 해마의 microglia 및 IL-1R발현을 억제시키고, BDNF 발현, CREB 및 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음



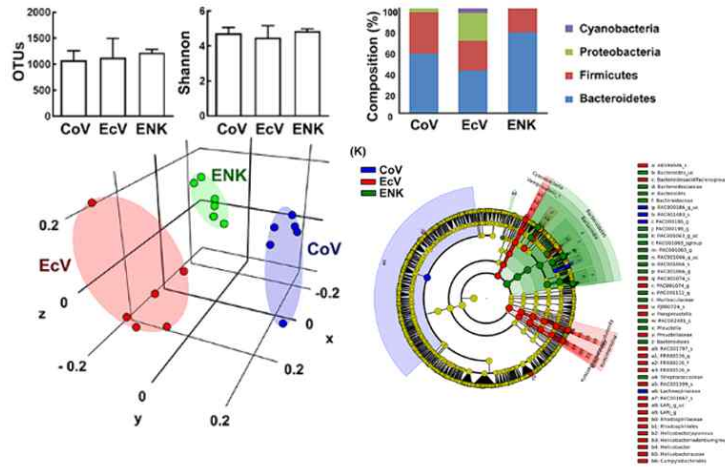
[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과]

- 5) 대장균 K1은 대장염을 유도하였고, NK109으로 완화하는 효과를 보였음
- 6) 대장균 K1로 myeloperoxidase 활성이 유도되었고, NK109으로 콜론에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 을 억제하는 효과를 보였음
- 7) NK109는 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 억제하는 효과를 보였음



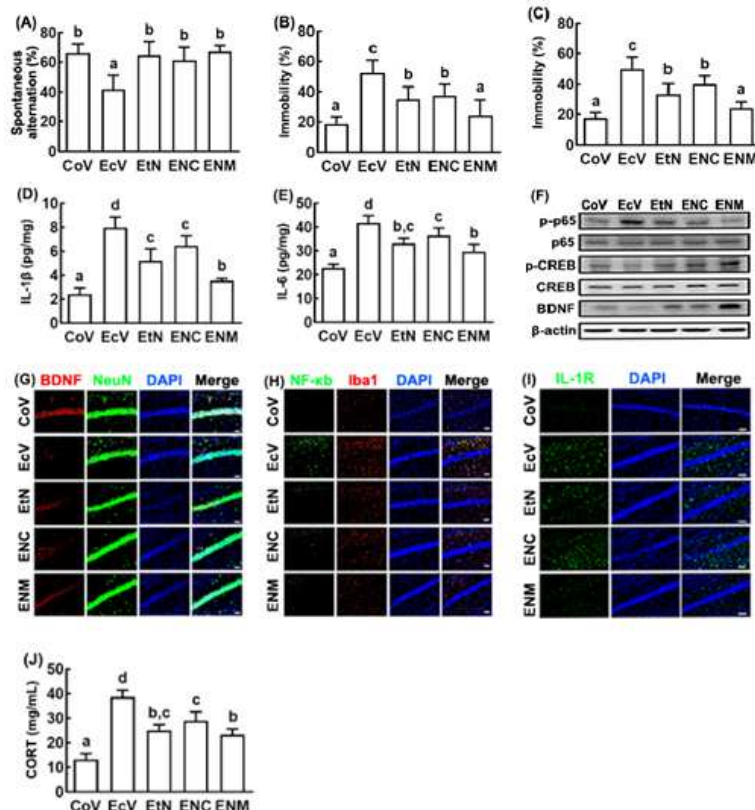
[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 NK109의 대장염 개선 효과]

- 8) NK109는 대장균 K1에 의한 β -diversity 변화를 감소시킨 반면, α -diversity은 영향을 받지 않았음
- 9) NK109는 대장균 K1에 의해 유도된 프로테오박테리아와 시아노박테리아의 수를 감소시켰고, 박테로이데테스의 수를 증가시켰음



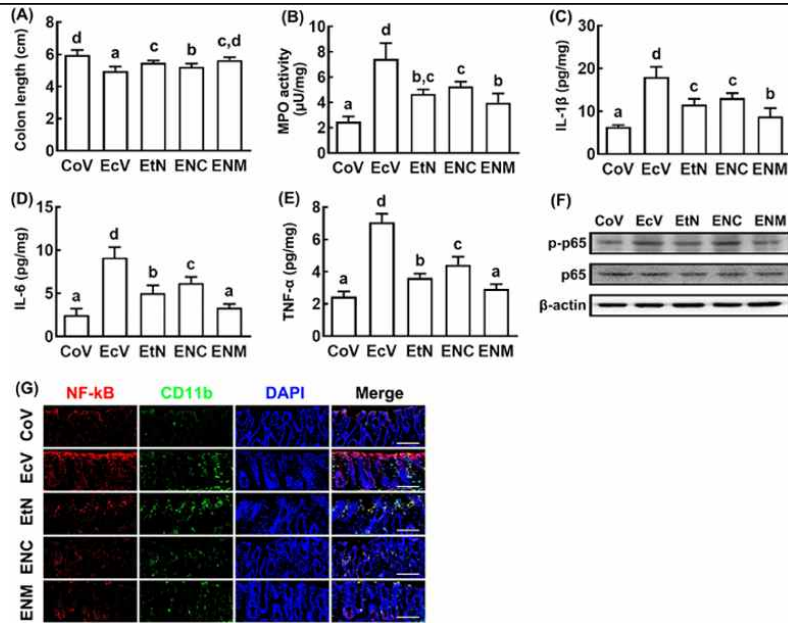
[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 NK109가 장내 마이크로바이오타에 미치는 효과]

- 10) 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 Y-maze, TST, FST에서 불안 및 기억력 개선 효과를 보였음
- 11) 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 해마에서 IL-1 β , IL-6를 억제하는 효과를 보였음
- 12) 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 스트레스의 호르몬 축 및 전신 염증을 개선하는 효과를 보였음
- 13) 해마의 microglia 및 IL-1R발현을 억제시키고, BDNF 발현 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스모델에서 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)의 인지능 및 우울 장내균집개선 효과]

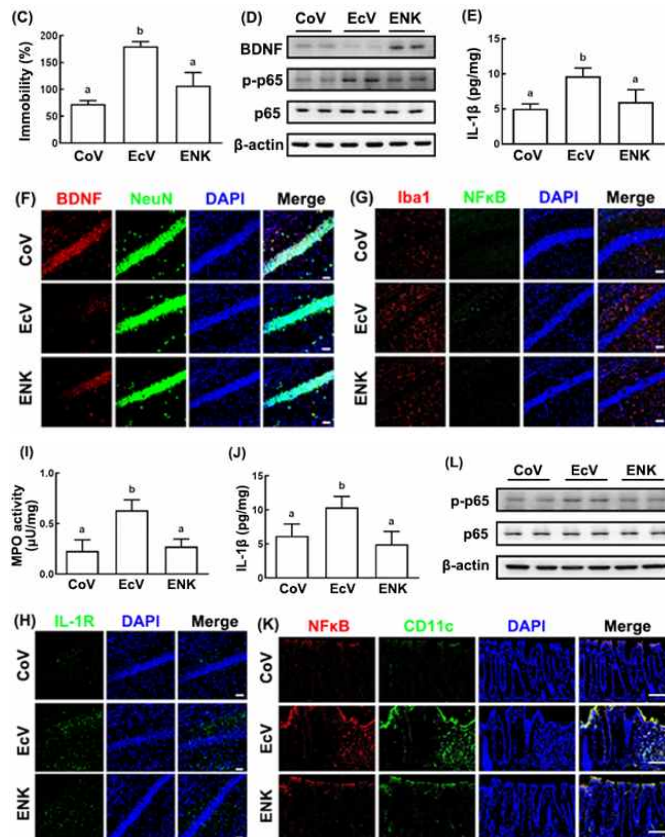
- 14) 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 대장염을 완화하는 효과를 보였음
- 15) 대장균 K1로 myeloperoxidase 활성이 유도되었고, 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)으로 콜론에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 을 억제하는 효과를 보였음
- 16) 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 억제하는 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 SPF마우스모델에서 턴탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)의 대장염 개선 효과]

거. 대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 GM(germ-free) 마우스모델에서 NK109의 인지능 및 우울증 개선 효과

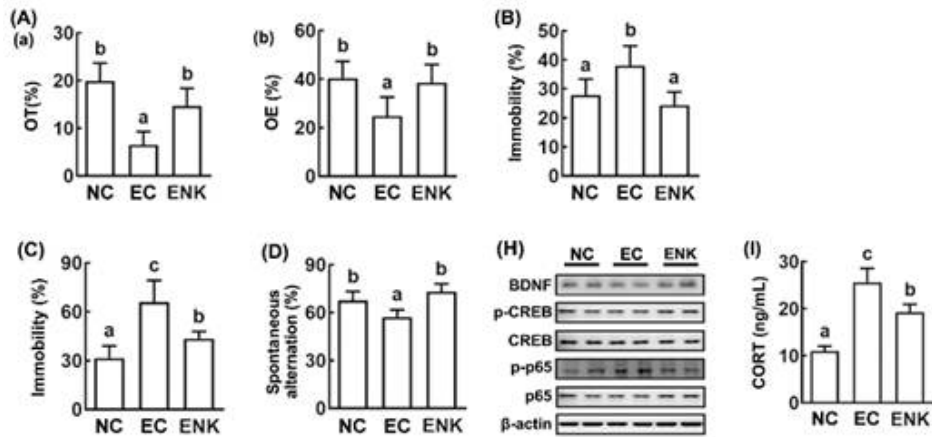
- 1) NK109는 TST에서 불안 개선 효과를 보였음
- 2) NK109는 해마에서 IL-1β를 억제하는 효과를 보였음
- 3) NK109는 스트레스의 호르몬 축 및 전신 염증을 개선하는 효과를 보였음
- 4) 해마의 microglia 및 IL-1R발현을 억제시키고, BDNF 발현, CREB 및 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음
- 5) 대장균 K1로 myeloperoxidase 활성이 유도되었고, NK109로 콜론에서 IL-1β를 억제하는 효과를 보였음
- 6) NK109는 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 억제하는 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 GF마우스모델에서 NK109의 우울증 개선 효과]

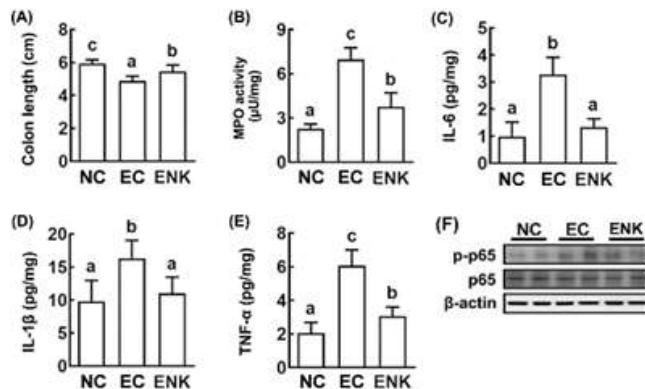
너. 대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 SPF마우스모델에서 NK112의 인지능 및 우울증 개선 효과

- 1) NK112는 EPM, TST, FST, Y-maze에서 불안 및 기억력 개선 효과를 보였음
- 2) NK112는 해마의 BDNF 발현, CREB 및 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음
- 3) NK112는 스트레스의 호르몬 축 및 전신 염증을 개선하는 효과를 보였음



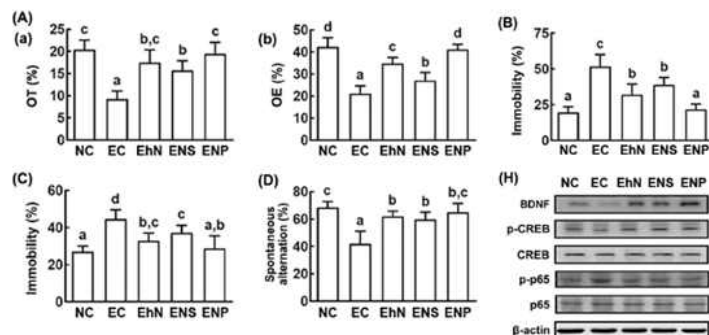
[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스 모델에서 NK112의 인지능 및 우울증 개선 효과]

- 4) 대장균 K1은 대장염을 유도하였고, NK112으로 완화하는 효과를 보였음
- 5) 대장균 K1로 myeloperoxidase 활성이 유도되었고, NK112로 콜론에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 억제 효과를 보였음
- 6) 대장 조직의 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음



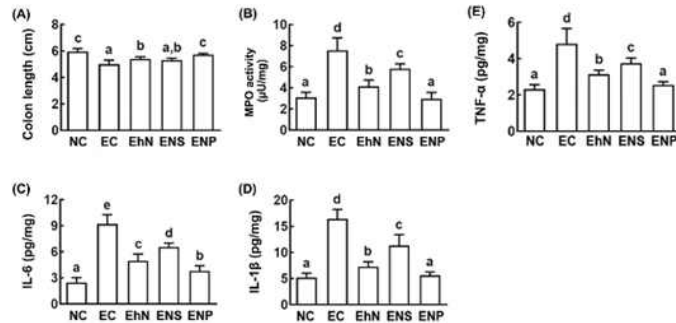
[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스 모델에서 NK112의 대장염 개선 효과]

- 7) 틴탈화NK112(hN), 그 세포질(NS) 및 세포벽(NP)은 EPM, TST, FST, Y-maze에서 불안 및 기억력 개선 효과를 보였음
- 8) 틴탈화NK112(hN), 그 세포질(NS) 및 세포벽(NP)은 해마의 BDNF 발현, CREB 및 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스 모델에서 틴탈화NK112(hN), 그 세포질(NS) 및 세포벽(NP)의 인지능 및 우울증 개선 효과]

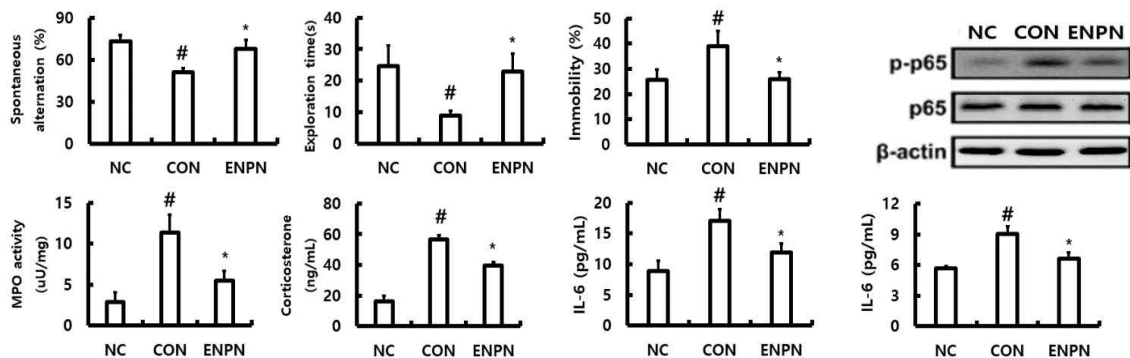
- 9) 대장균 K1로 myeloperoxidase 활성이 유도되었고, 탄탈화NK112(hN), 그 세포질(NS) 및 세포벽(NP)으로 콜론에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 을 억제하는 효과를 보였음
- 10) 탄탈화NK109(tN), 그 세포질(NC) 및 세포벽(NM)은 콜론의 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스 모델에서 탄탈화NK112(hN), 그 세포질(NS) 및 세포벽(NP)의 대장염 개선 효과]

더. 천연물과 프로바이오틱스의 인지능 개선 효과

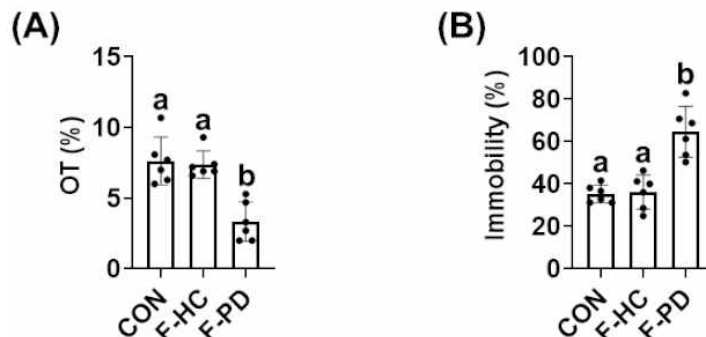
- 1) 천연물인 실새삼, 새삼과 *Lactobacillus paracasei*의 혼합물(ENPN=MT104)은 Y-maze, NOR, TST 에서 불안 및 기억력 개선 효과를 보였음
- 2) 실새삼, 새삼, NK112의 세포벽 혼합물(ENPN)은 myeloperoxidase 활성을 억제하는 효과를 보였음
- 3) 실새삼, 새삼, NK112의 세포벽 혼합물(ENPN)은 콜론 및 해마에서 IL-6을 억제하는 효과를 보였음
- 4) 실새삼, 새삼, NK112의 세포벽 혼합물(ENPN)은 콜론의 p-p65의 활성화 유도 효과를 보였음



[대장균 K1로 유도한 인지능손상/우울증 마우스 모델에서 프로바이오틱스와 천연물의 병용효과]

러. 우울을 동반하는 IBD 환자의 분변으로 유도한 우울증 마우스모델에서의 효과

- 1) F-PD (Feces from patient wit depression)는 EPM, FST에서 불안 및 우울 효과를 보였음



[F-PD으로 유도한 우울증 마우스모델에서 우울/불안 효과]

2. 정신신경질환 후보물질 평가 플랫폼 구축

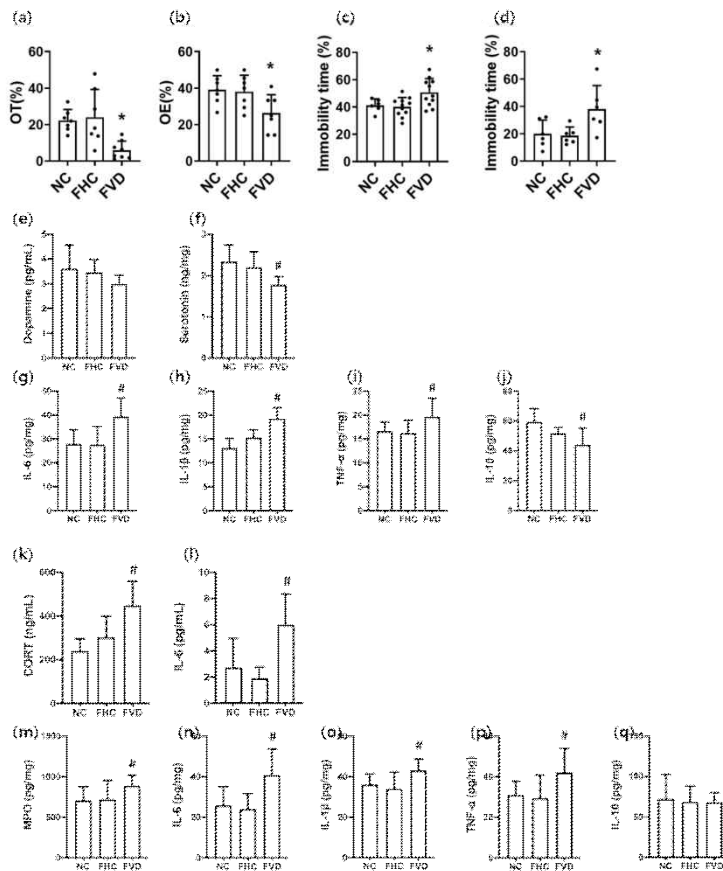
가. 장내세균이식 정신신경질환동물모델 구축

- 1) SPF와 Germ-free (GM) 마우스에 K1로 유도한 정신신경질환의 특성 비교

- 가) SPF마우스와 GM마우스에 *Escherichia coli* K1을 이식하여 제작한 정신신경질환동물모델 제작이 가능하였음
- (1) SPF마우스에는 1x10⁹ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 정신신경질환동물모델 제작이 가능하였음
 - (2) GM마우스에는 1x10⁷ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 정신신경질환동물모델 제작이 가능하였음
 - (3) SPF마우스, GM마우스사이에 해마, 대장에서의 염증지표, 신경세포수, 기억력의 지표 등에서 차이를 보이지 않았음

2) 정신질환(우울/불안) 환자의 동물모델 구축

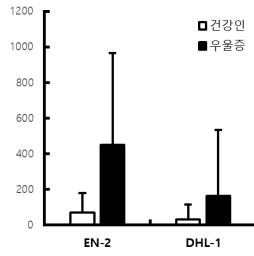
- 가) 우울증반건강인의 장내미생물군의 마우스에 이식
- (1) 우울증반건강인(FHC)과 우울증반건강인(FVD)의 분변을 SPF마우스에 이식하였을 때 건강인의 분변을 이식한 마우스에 비교해, 우울증반건강인의 분변을 이식한 마우스에서 우울행동이 높았음
 - (2) FHC에 비해 FVD군은 시상하부(hypothalamus)에서 serotonin이, 해마(hippocampus)에서 IL-10 발현도 낮았으나, IL-6, IL-1 β 는 높았음
 - (3) FHC에 비해 FVD군은 혈액 corticosterone, IL-6 농도도 높았음
 - (4) FHC에 비해 FVD군은 대장염지표인 MPO, IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 높았으나, IL-10은 유의한 차이를 보이지 않았음



[FHC와 FVD가 이식된 마우스의 우울증 및 대장염 발생에 미치는 영향 NC, 정상 대조군; FHC, 건강한 사람에게 이식된 대변 미생물, FVD, 우울증을 가진 반건강한 사람에게 이식된 FVD. e-f, 시상하부에서는 g-j, 혈액에서는 k-l, 대장에서는 m-q]

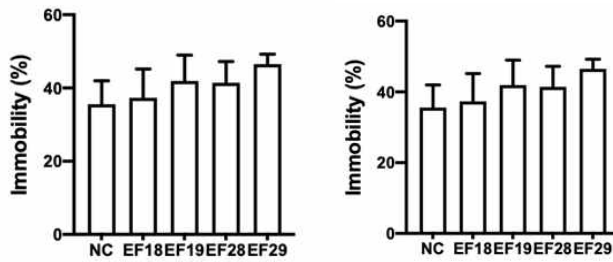
나) 우울증반건강인의 gut microbiota 분리장내세균의 SPF 마우스에 이식

- (1) 우울증반건강인의 분변은 건강인의 분변보다 Enterococcaceae(EN 배지에서 자라나온 장내세균), Enterobacteriaceae(DHL 배지에서 자라나온 장내세균)의 콜로니수가 많았음



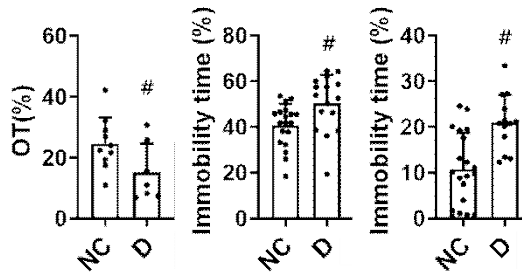
[FHC 및 FVD의 EN 또는 DHL 한천 플레이트에서 콜로니의 수]

- (2) 우울증반건강인에서 EN에서 분리한 균주 중에서는 *Enterococcus faecium*가, DHL 배지에서 분리한 균주중에서는 *Escherichia fergusonii* 가 많았음
- (3) EN배지에서 분리한 *Enterococcus faecium* 균주의 일부 strain(EF-2)는 1x10⁹ CFU/mouse를 SPF마우스에 경구투여하였을 때, 불안/우울증 유사 행동이 증가하였음



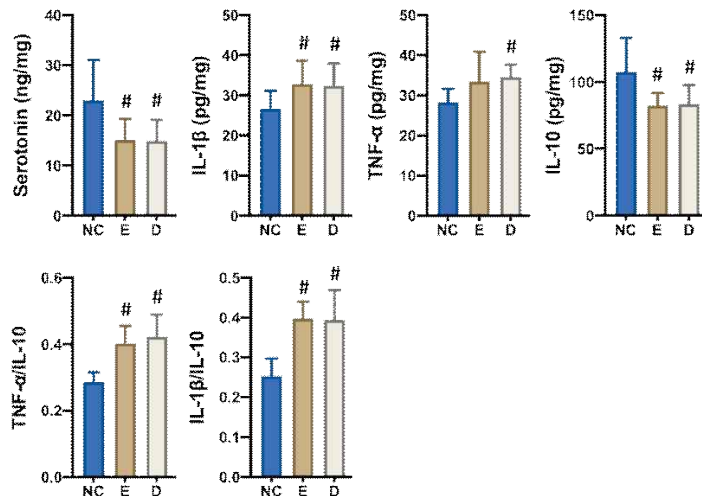
[*Enterococcus faecium* Fe1과 EF2가 마우스의 우울증 발생에 미치는 영향]

- (4) *Escherichia fergusonii* EF-1 1x10⁹ CFU/mouse를 SPF마우스에 경구투여하였을 때, 우울불안행동이 유의적으로 증가하였음



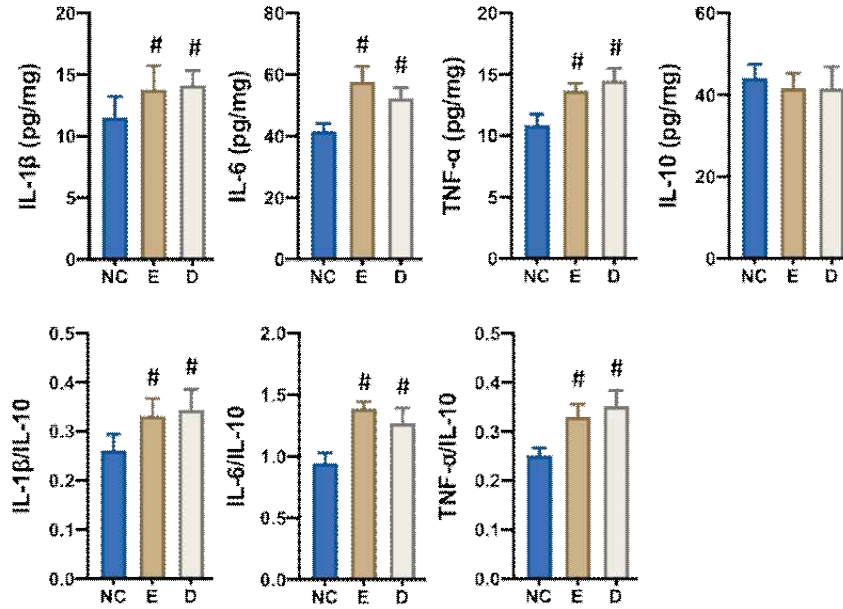
[마우스의 우울증 발생에 대한 *Escherichia fergusonii* EF1의 효과]

- (5) *Enterococcus faecium* 또는 *Escherichia ferugosonii*의 경구투여에 의해 hypothalamus에서 serotonin, IL-10의 발현이 유의적으로 낮았으나, TNF- α , IL-1 β 의 발현은 증가하였고, 결과적으로 TNF- α /IL-10, IL-1 β /IL-10도 높아졌음



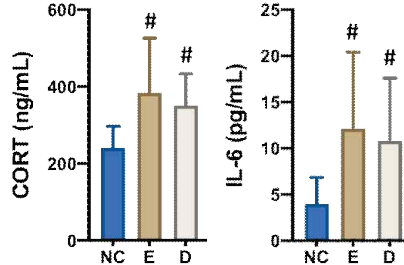
[*Enterococcus faecium* 과 *Escherichia ferugosonii* 가 마우스의 시상하부에서 세로토닌과 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향]

(6) *Enterococcus faecium* 또는 *Escherichia ferugosonii*의 경구투여에 의해 해마에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현은 높아졌고, IL-10 발현에는 영향이 없었음. 결과적으로 TNF- α /IL-10, IL6/IL10, IL-1 β /IL-10은 높아졌음



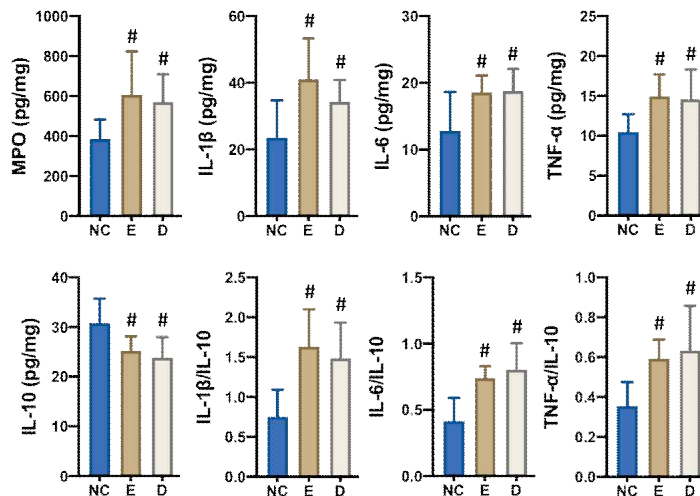
[*Enterococcus faecium*과 *Escherichia ferugosonii*가 마우스 해마에서 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향]

(7) *Enterococcus faecium* 또는 *Escherichia ferugosonii*의 경구투여에 의해 혈액 corticosterone, IL-6 농도도 높아졌음



[(E)*Enterococcus faecium* 또는 (D)*Escherichia ferugosonii*가 혈중 코르티코스테론 및 IL-6 수준에 미치는 영향]

(8) *Enterococcus faecium* 또는 *Escherichia ferugosonii*의 경구투여에 의해 대장에서 염증 지표인 MPO, IL-1 β , IL-6, TNF-a는 높았으나, IL-10은 감소하였음

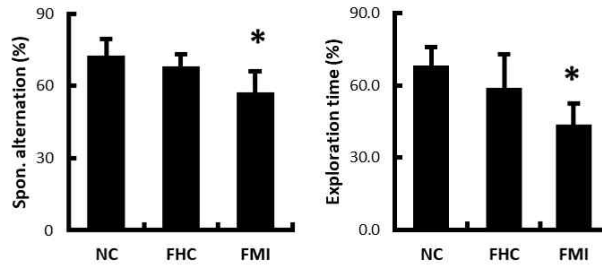


[*Enterococcus faecium*과 *Escherichia ferugosonii*가 콜론의 MPO 및 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향]

3) 정신신경질환(인지능손상) 동물모델 구축

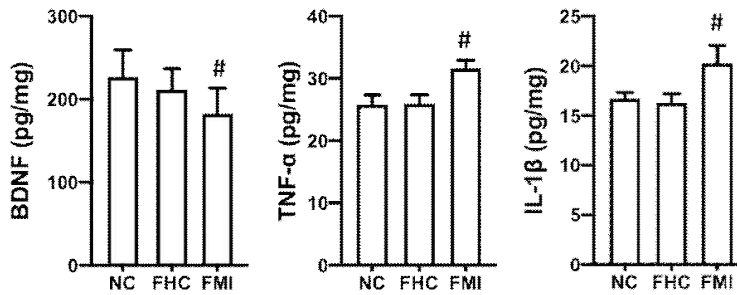
가) 건강한사람분변(FHC)을 어린마우스(7주령)에 경구이식하였을때, 건강한 어린마우스의 인지능행동실험(Y-maze, NOR task)에서 차이를 보이지않았음

나) 그러나, 인지능손상반건강인분변(FMI)을 이식한 마우스는 건강한 마우스의 행동실험에서 인지능이 손상된 행태를 보였음



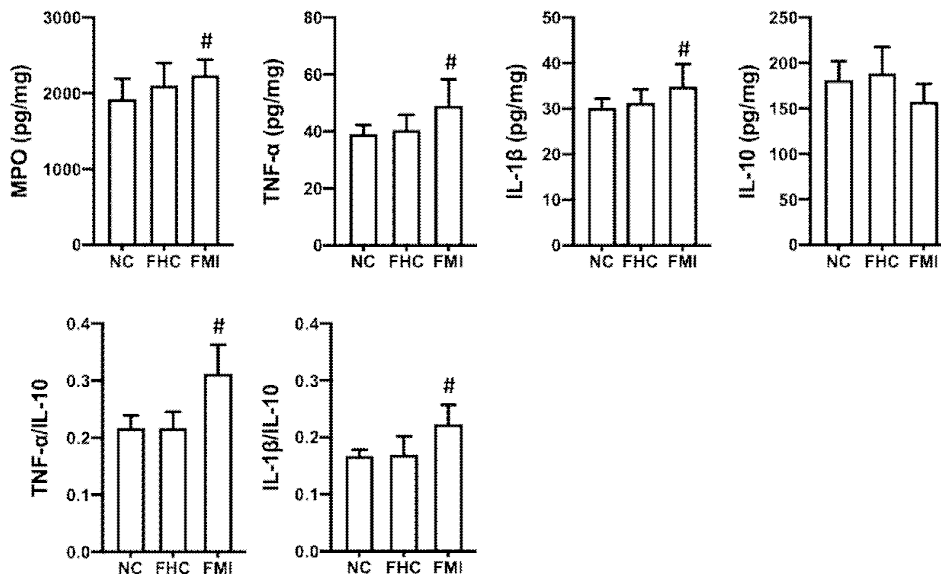
[FHC와 FMI가 번역된 마우스의 인지 기능 유사 행동에 미치는 영향. NC, 정상 대조군; FHC, 건강한 사람에게 이식된 대변 미생물; FMI, 인지 장애가 있는 반 건강한 사람에게 이식된 FMI]

다) FHC에 비해 FMI군은 해마(hippocampus)에서 BDNF는 낮았으나, TNF-a, IL-1β는 높았음



[FHC와 FMI가 해마 BDNF, TNF-a IL-1β 발현에 미치는 영향]

라) FHC에 비해 FMI군은 대장염지표인 MPO, IL-1β, IL-6, TNF-a는 높았으나, IL-10은 유의한 차이를 보이지 않았음



[FHC와 FMI가 MPO, TNF-a, IL-1a, IL-10 발현에 미치는 영향]

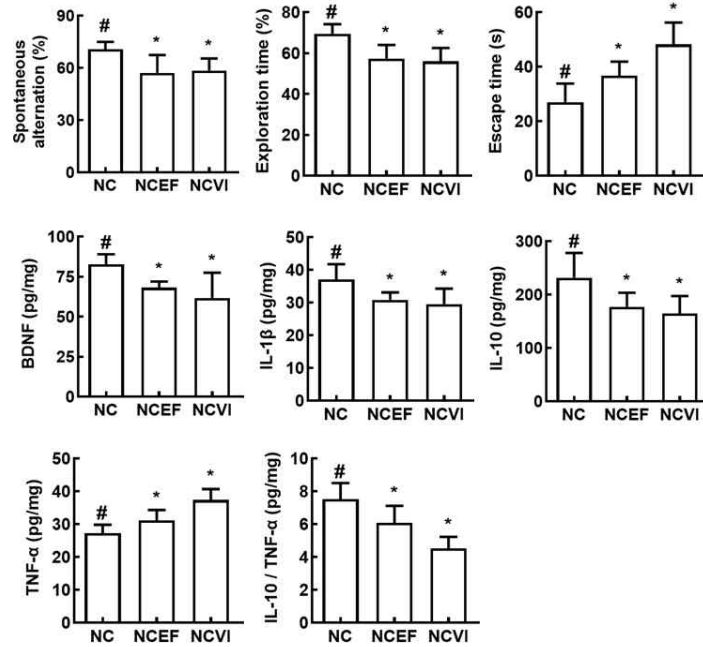
마) 인지능손상반건강인의 gut microbiota 분리장내세균의 SPF 마우스에 이식

(1) 우울증반건강인의 분변은 건강인의 분변보다 Enterococcus faecium(EN배지에서 자라나온 장내세균), Veillonella infantium(BL배지에서 자라나온 장내세균)의 콜로니수가 많았음.

(2) EN배지에서 분리한 Enterococcus faecium, Veillonella infantium를 1x10⁹ CFU/mouse 로 SPF마우스에 경구투여하였을 때, 인지능 손상 행동이 증가하였음

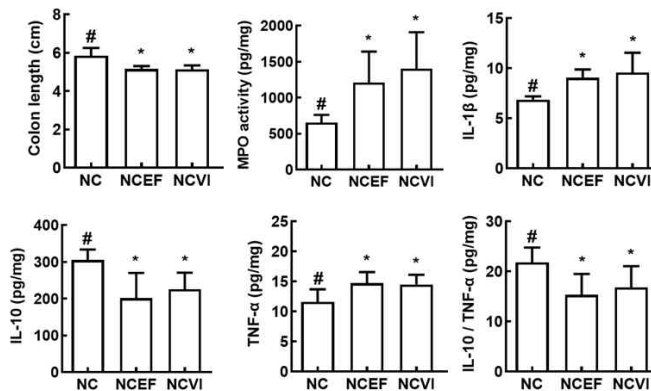
(3) Enterococcus faecium 또는 Veillonella infantium의 경구투여에 의해 해마에서 BDNF,

IL-10 발현은 낮아졌으나 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현은 높아졌음. 결과적으로 IL-10/TNF- α 이 낮아졌음



[*Enterococcus faecium* 과 *Veillonella infantium* 이 마우스의 인지 기능과 관련 바이오마커 수준에 미치는 영향. NC, 정상 대조군, NCEF, 대장균 처리, NCVI, *Veillonella infantium* 처리.]

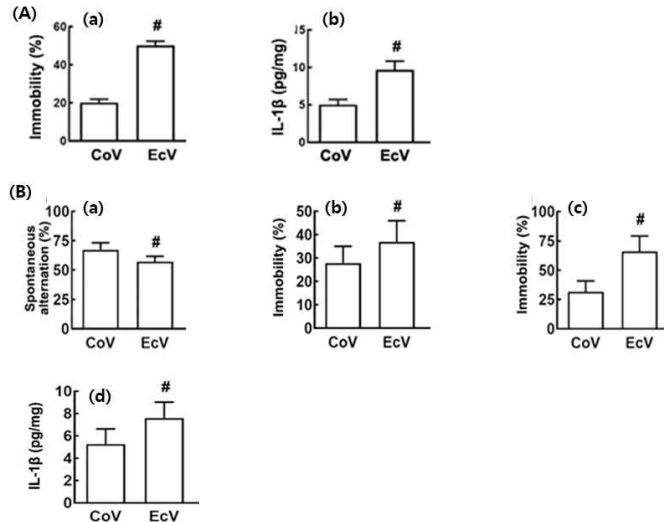
(4) *Enterococcus faecium* 또는 *Escherichia ferugosonii*의 경구투여에 의해 대장에서 염증 지표인 MPO, IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 높았으나, IL-10은 감소하였음



[*Enterococcus faecium* 과 *Veillonella infantium* 이 결장의 MPO 및 염증성 사이토카인 농도에 미치는 영향. NC, 정상 대조군, NCEF, 대장균 처리, NCVI, *Veillonella infantium* 처리]

바) GM과 SPF 마우스의 정신신경질환 발생에 *Escherichia coli* K1의 효과

- (1) *Escherichia coli* K1을 GM마우스와 SPF마우스에 이식하여 불안/우울 유사 행동을 관찰함
- (2) GM마우스에는 1x10⁷ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 불안 및 우울 행동을 보였음
- (3) GM마우스의 해마에서의 염증지표가 증가하고, 신경세포수, 기억력의 지표 등에서 유의적으로 억제하였음
- (4) SPF마우스에는 1x10⁹ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 불안 및 우울 행동을 보였음
- (5) SPF마우스의 해마에서의 염증지표가 증가하고, 신경세포수, 기억력의 지표 등에서 유의적으로 억제하였음
- (6) SPF마우스, GM마우스사이에 해마에서의 염증지표, 신경세포수, 기억력의 지표 등에서 차이를 보이지 않았음



[대장균 K1이 무균(A) 및 SPF 마우스의 인지장애 및 우울증과 유사한 행동에 미치는 영향. (A) 무균 마우스에 대한 영향. (a) 무균 마우스에 대한 TST의 부동 시간에 대한 영향. (b) 해마(B) 자발적 마우스에 대한 영향. TST(b) 및 FST(c)의 부동 시간에 미치는 영향. (d) 해마의 IL-1 α 수준에 미치는 영향]

3. 발효식품 또는 건강인의 분변에서 프로바이오틱스 자원 확보

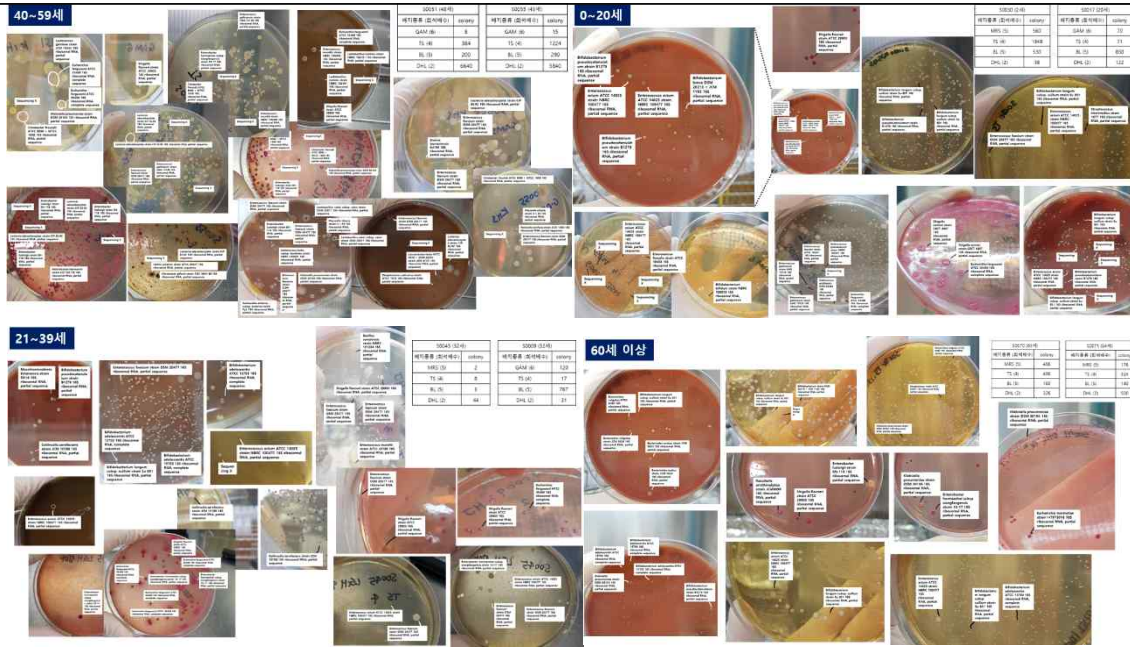
- 가. 대장균의 LPS를 감소하는 *Lactobacillus plantarum* 포함 프로바이오틱스 후보 25개 균주 확보
- 나. SH-SY5Y신경세포의 LPS로 억제된 BDNF 발현을 개선하는 *Lactobacillus brevis* 포함 프로바이오틱스 후보 4개 균주 확보
- 다. 대장균의 LPS를 감소하는 *Lactobacillus paracasei* 포함 프로바이오틱스 후보 14개 균주 확보
- 라. SH-SY5Y신경세포의 LPS로 억제된 BDNF 발현을 개선하는 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 포함 프로바이오틱스 후보 12개 균주 확보

4. 건강한 한국인 분변의 장내세균군집 분석 및 장내세균 분리

- 가. 나이가 들어감에 따라 BL배지(bifidobacteria 선택배지)에 자라는 균주가 감소하고 있음
- 나. 그러나, proteobacteria 선택배지인 DHL에 자라는 균주가 증가하였음
- 다. 현재까지 240 여종의 유익균을 포함하여 240여 종 분리함

연령 구분	Total 도말
0세~20세	10
21세~39세	11
40세~59세	12
60세 이상	10

배지종류 (희석배수)	0~19세	20~39세	40~59세	60세 이상
BL (5)	690	385	245	150
MRS (5) /GAM (6)	315	61	11.5	331
TS (4)	959.5	12.5	804	395
DHL (2)	80	37.5	6240	413



[사람 분변으로부터 분리한 선택배지에 자란 균주와 분리동정한 균주]

1) 사람 분변 및 정신신경질환 동물 모의 분변의 장내세균군집 분석

환자번호	이니셜	성별	연령
S0009	HJ	F	32
S0012	AYJ	F	22
S0013	BSH	M	22
S0015	KOS	F	60
S0016	SSS	F	57
S0017	JSW	F	20
S0018	SYU	F	37
S0020	CDL	F	27
S0021	HHR	M	3
S0022	JMR	F	22
S0023	LHR	F	22
S0024	LJI	F	60
S0025	KKA	F	38
S0028	KBO	F	51
S0029	KJE	F	32
S0030	IYJ	M	2
S0031	SDY	M	2
S0039	YHN	F	52
S0040	L SK	F	46
<i>S0041</i>	JMA	F	45
S0042	MSR	M	11
S0043	MJR	M	10
S0044	BKJ	F	46
S0045	LGH	F	32
<i>S0046</i>	HSB	M	3
S0051	KJH	F	48
S0052	KSH	F	15

S0065	IYJ	F	12
S0068	JJH	M	12
S0069	JYH	M	8
S0070	LEJ	F	63
S0071	HSS	F	64
S0074	SGS	F	60
S0076	LHE	F	3
S0077	KJS	F	64
S0078	KHS	M	60
S0080	LMG	F	62
S0081	LHB	F	62
S0083	YYH	F	63
S0086	PJS	M	4
S0087	PJS	F	6
S0088	LYM	F	65
S0090	KJY	F	63
S0092	PG	M	5
S0093	KIG	M	66
S0098	KMH	F	7
S0099	CGE	F	7
S0100	CGE	F	10
S0101	K-S	F	11
S0103	JJS	M	18

<i>S0053</i>	GSH	M	12
S0054	LCY	F	49
S0055	KHS	F	43
S0056	MNY	F	42
S0057	SJA	M	18
<i>S0059</i>	CMG	M	21
S0061	KJS	M	19
<i>S0062</i>	KDS	M	19
S0064	HHG	F	46

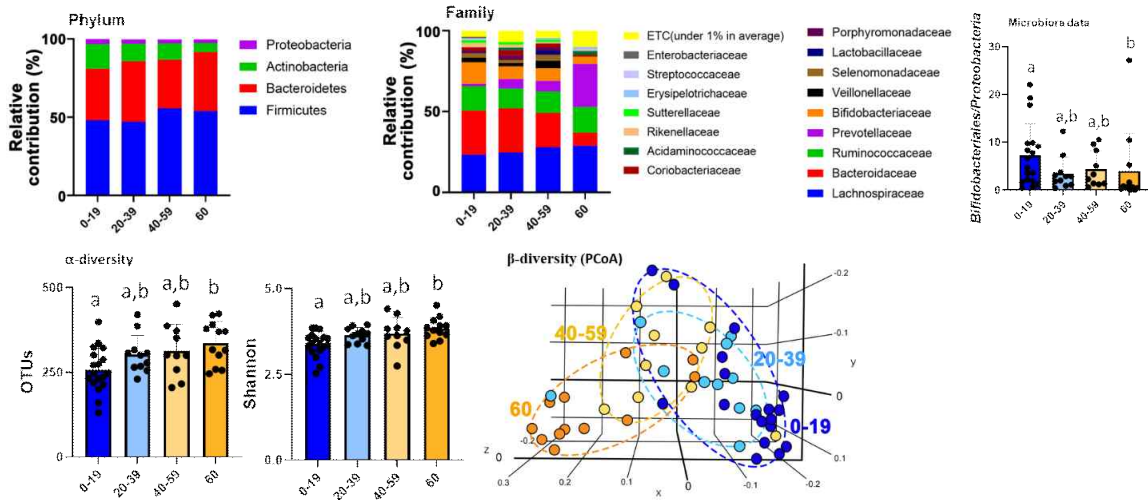
(붉은 표시 : 수집 상의 오류 또는 장염 의심)

2) 한국인의 장내세균군집 구성 정보 확보

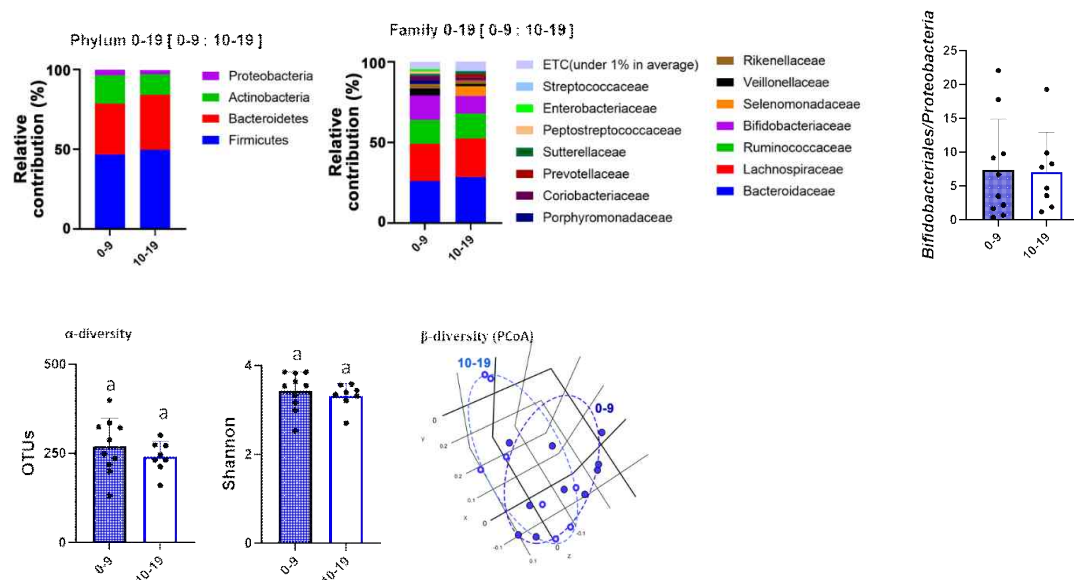
가) 16S rDNA sequencing에 의한 한국인 마이크로바이오타의 구성(연령별)

- (1) 나이가 들어감에 따라 α -diversity와 β -diversity가 증가하였음
- (2) 나이가 들어감에 따라 Actinobacteria, Bifidobacteriales/Proteobacteria비율이 감소하였음
- (3) 그러나, 0-9세, 10-19세 사이에는 차이가 없었음

(A)



(B)



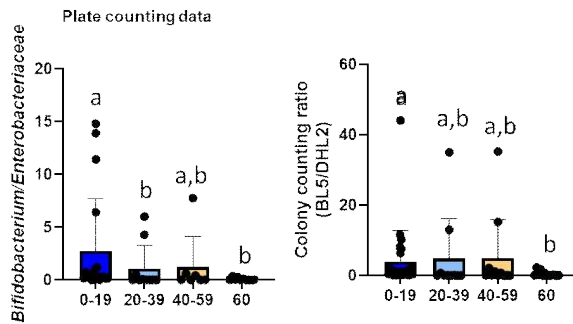
[건강한 한국인의 분변 미생물 성분(A, 1~19세, 20~39세, 40~59세, 60세 이상 차이, B, 0~9세, 10~19세 차이)은 파이로 시퀀싱으로 평가함]

- (4) 나이가 들어감에 따라 Bifidobacteriaceae 선택배지 BL에서 자라 균수는 감소하였으나, Enterobacteriaceae 선택배지 DHL에서 자라난 균수는 증가하였음
 (5) 나이가 들어감에 따라 Bifidobacteriaceae수/Enterobacteriaceae수의 비율이 감소하였음.
 (6) 그러나, 0-9세, 10-19세 사이에는 차이가 없었음

나) 선택배지배양에 따른 한국인 장내마이크로바이오타의 구성(연령별)

배지 종류 (희석배수)	0~9세 (M=4, F=8)	10~19세 (M=4, F=3)	20~39세 (M=7, F=3)	40~59세 (M=7, F=3)	60세 이상 (M=7, F=5)
BL(5)	842.8±740.6	931.6±742.5	710.9±102.6	336.8±667.8	225±416.3
DHL(2)	658.7±851.1	701.9±830.7	672.3±790.6	380.9±373.3	1060.5±920.9
BL(5)/DHL(2)	4.13±10.37	3.76±4.12	4.90±11.32	4.98±11.00	0.44±0.75

	0~9세	10~19세	20~39세	40~59세	60세 이상
<i>Bifidobacterium</i> / <i>Enterobacteriaceae</i>	2.55±4.61	3.28±6.47	1.09±2.18	1.26±2.87	0.09±0.12



[건강한 한국인의 분변 미생물 성분(A, 1~19세, 20~39세, 40~59세, 60세 이상 차이, B, 0~9세, 10~19세 차이)을 선별 매체를 통해 평가함]

(1) 선택배지 자란 한국인 분변 마이크로바이오타의 패턴

0-9세

배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	258
DHL(2)	2000+α

0-9세

배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	274
DHL(2)	192

0-9세

배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	2
DHL(2)	-

0-9세

배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	1020
DHL(2)	135

0-9세

배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	2000+α
DHL(2)	172

0-9세

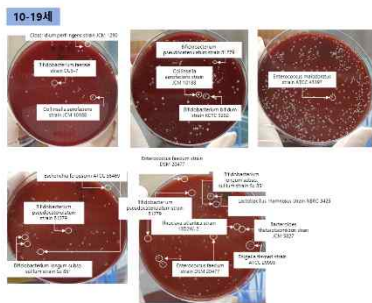
배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	1432
DHL(2)	2000+α

10-19세

배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	258
DHL(2)	2000+α

10-19세

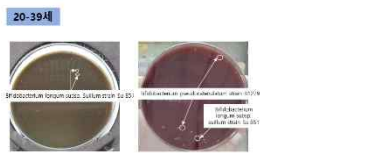
배지종류(희석배수)	colony
BL(5)	1020
DHL(2)	135



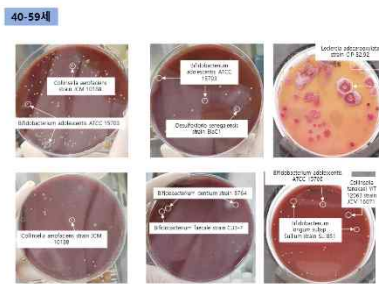
S0144 (18세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	2456
DHL(Z)	2000+α



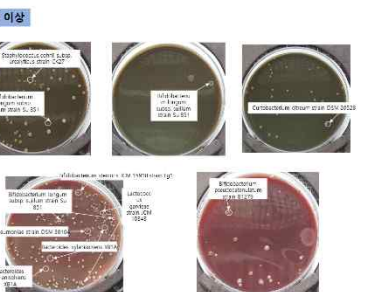
S0116 (30세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	35
DHL(Z)	1



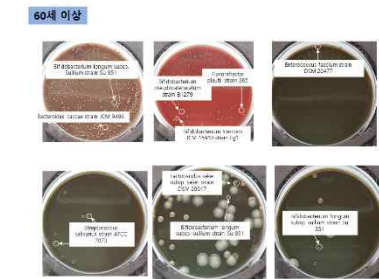
S0105 (37세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	21
DHL(Z)	-



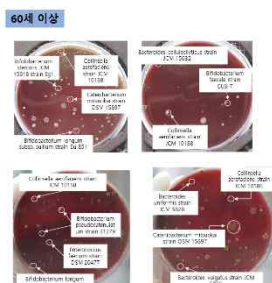
S0119 (23세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	7
DHL(Z)	10



S0124 (82세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	110
DHL(Z)	604



S0106 (55세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	141
DHL(Z)	4



S0128 (80세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	304
DHL(Z)	115

S0130 (70세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	552
DHL(Z)	110

S0131 (65세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	161
DHL(Z)	2000+α

S0111 (54세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	808
DHL(Z)	3

S0113 (46세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	748
DHL(Z)	49

S0116 (61세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	1496
DHL(Z)	2200+α

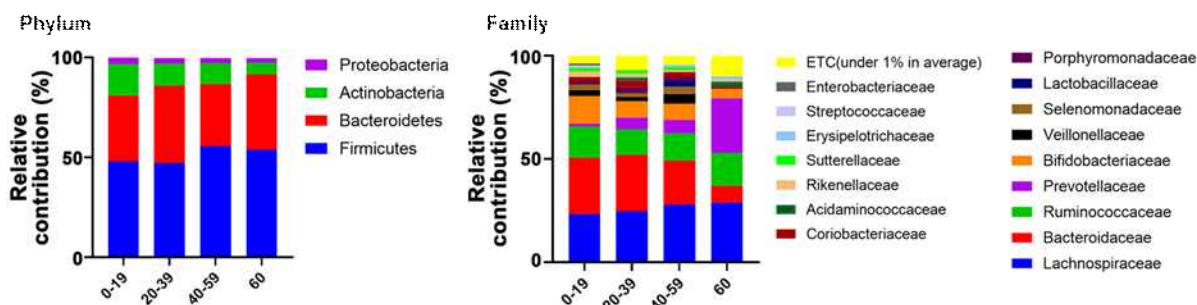
S0122 (64세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	9
DHL(Z)	308

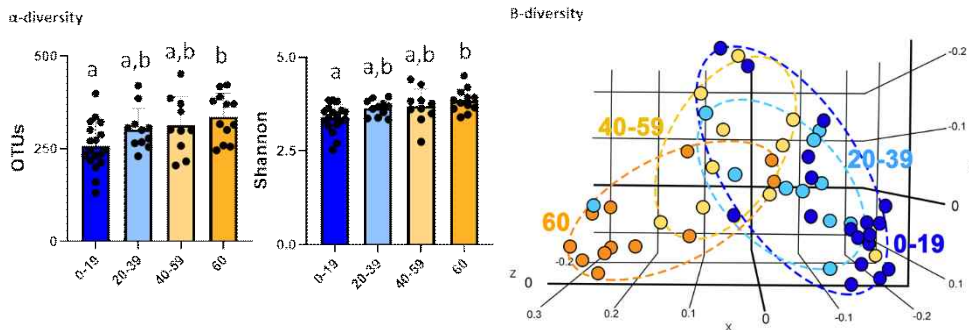
S0123 (66세)	
배지종류(의식배수)	colony
BL(S)	61
DHL(Z)	2000+α

다) [2020년+2021년] 한국인 마이크로바이오타의 구성

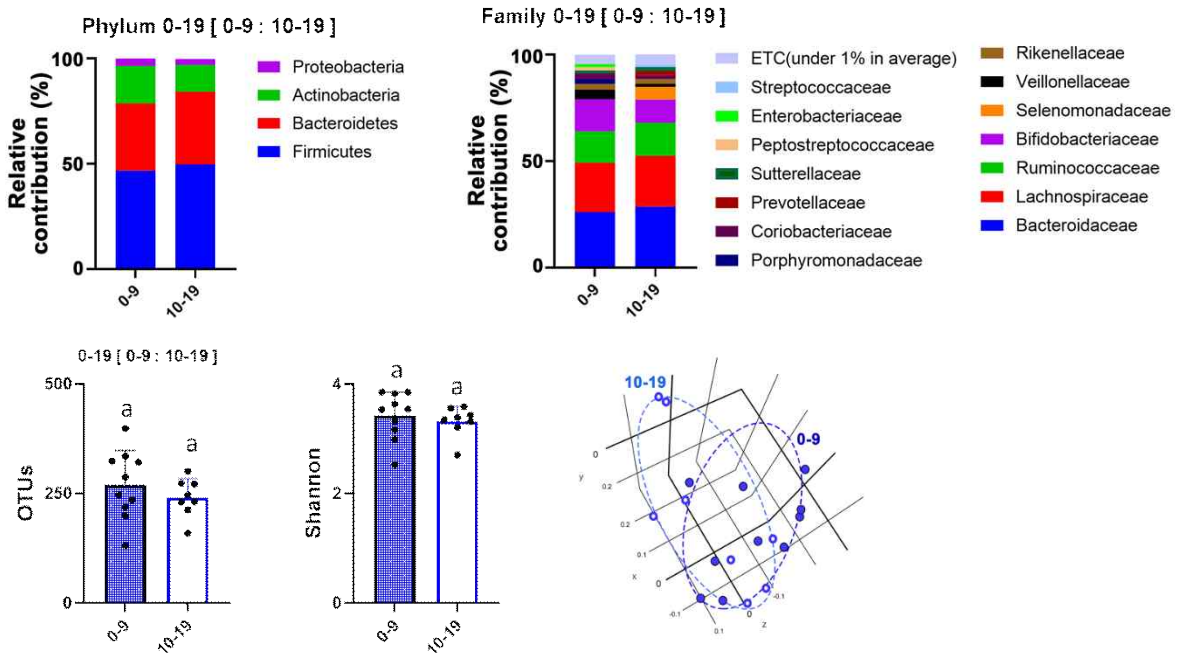
- (1) 2020년과 2021년 결과 합친 결과에서도 나이가 들어감에 따라 α-diversity와 β-diversity가 증가하였음
- (2) 나이가 들어감에 따라 Actinobacteria, Bifidobacteriales/Proteobacteria 비율이 감소하였음.
- (3) 그러나, 0-9세, 10-19세 사이에는 차이가 없었음

(A)





(B)

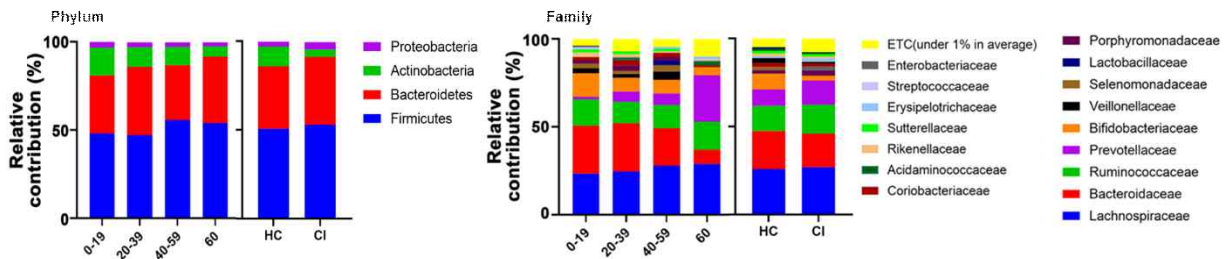


[건강한 한국인의 분변 미생물 성분(A, 1~19세, 20~39세, 40~59세, 60세 이상 차이, B, 0~9세, 10~19세 차이)은 파이로 시퀀싱으로 평가함]

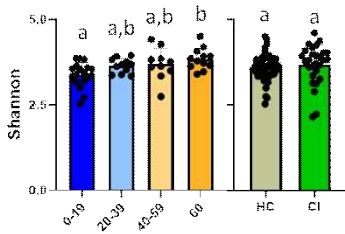
라) 인지능손상건강인과 건강인과의 장내마이크로바이오타와의 상관성

- (1) 건강인(HC)의 α -diversity와 인지능손상인(CI)의 α -diversity와는 유의한 차이는 없었음
- (2) 그러나, 인지능손상인의 β -diversity는 건강인의 60대 이상의 평균과 유사한 양상을 보였음
- (3) 건강인에 비해 인지능손상건강인은 Actinobacteria, Bifidobacteriales/Proteobacteria 비율이 감소하였음

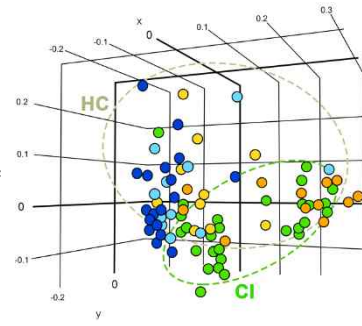
(A)



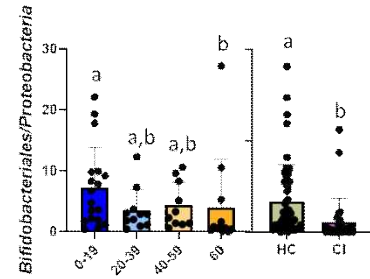
(B)



(C)



(D)



[경도인지장애(CI)가 있고 경도인지장애(HC)가 없는 건강한 한국인의 분변 미생물 구성(A, HC와 CI 사이의 문과 가족 수준의 차이: 1-19세, 20-39세, 40-59세 및 60세 이상의 차이; B, HC와 CI의 a-다양성 차이; C, HC [파란색, 0-19와 20-39년; 노란색, 40-59세 및 >60년; 녹색, CI]; D, HC와 CI 사이의 Bifidobacteriales/Proteobacteria 비율의 차이)는 파이로시퀀싱에 의해 평가됨]

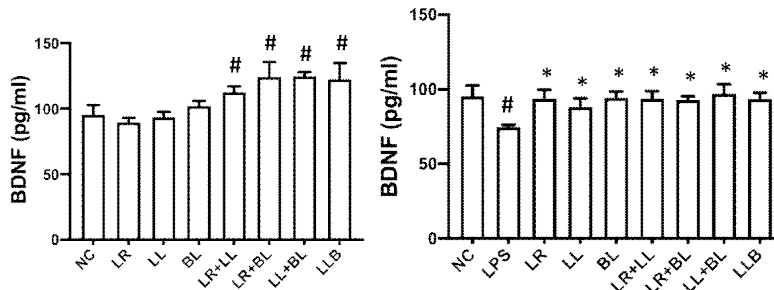
5. 정신신경질환 동물 인프라구축 및 후보물질 발굴

가. 정신신경질환 개선 후보물질 발굴

1) 신경세포(SH-SY5Y cells)의 BDNF 발현 유도 프로바이오틱스의 선별

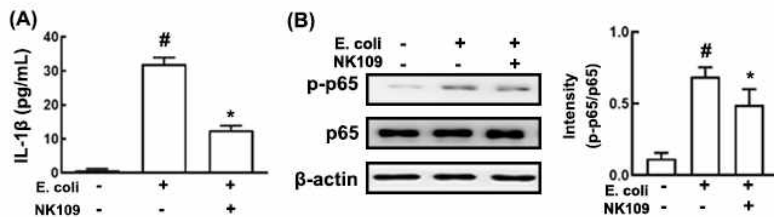
가) LPS 처리 SH-SY5Y cells에서 *Lactobacillus rhamnosus* (LR), *Lactococcus lactis* (LL), *Bifidobacterium longum* (BL)은 발현이 감소한 BDNF의 발현을 높이는 효과를 보였음.

나) 그런, LPS 비처리 SH-SY5Y cells에서는 LR, LL, BL가 BDNF 발현을 증가시키지 못했지만, 이들을 병용처리하였을 때는 BDNF의 발현을 증가시켰음.



[LPS 또는 LPS 없이 처리된 SH-SY5Y 세포에서 LR, LL, BL 및 이들의 혼합물이 BDNF 발현에 미치는 영향 데이터는 평균 ± SD(n = 그룹당 5)를 나타냄. # p < 0.05 대 NC; * p < 0.05 vs LPS]

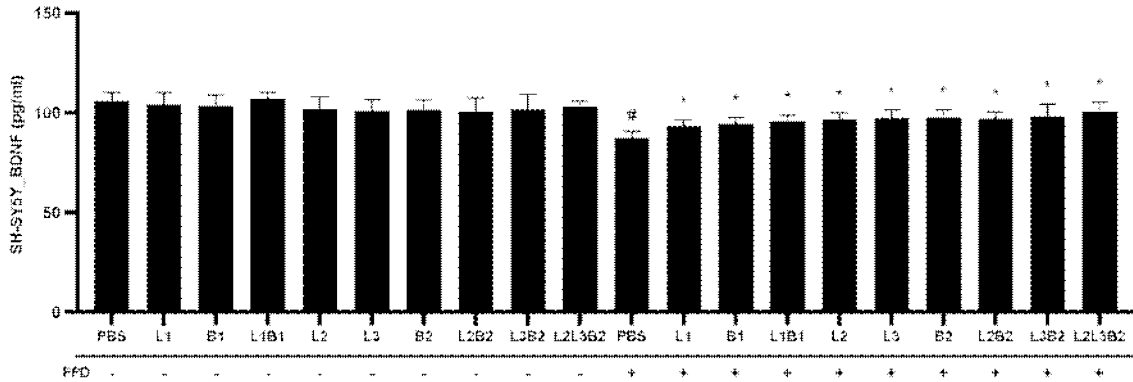
다) *Escherichia coli* K1 자극 탐식세포의 염증성사이토카인 발현은 *Lactobacillus gasseri* NK109에 의해 발현이 억제되었음.



[*Lactobacillus gasseri* NK109가 대식세포에서 대장균 K1 유도 인터류킨(IL)-1α 및 핵인자(NF)-βB 활성화에 미치는 영향. 데이터 값은 평균 ± 표준 편차(SD)(n = 4)로 설명됩니다. # p < 0.05 대 대장균만으로 처리되지 않은 그룹. * p < 0.05 대 대장균 단독 처리 그룹]

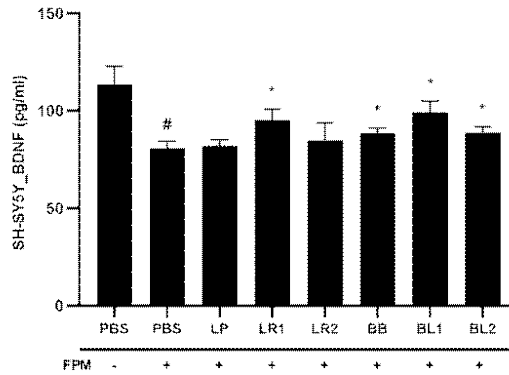
2) 정신질환반건강인의 fecal microbiota 처리 신경세포에서 BDNF의 발현을 유도하는 프로바이오틱스의 선별

가) SH-SY5Y 세포에 우울증반건강인의 분변마이크로바이오타의 처리는 BDNF의 발현을 억제하였으나, 건강한 사람의 장내마이크로바이오타로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* L1, *Lactobacillus pentosus* L2, *Lactobacillus sakei* L3, *Bifidobacterium bifidum* B1, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* B2들이 우수한 증강효과를 보였음.



[인지장애가 있는 반건강인의 내장미생물질로 처리된 SH-SY5Y 세포에서 LP, LR1, LR2, BB, BL1, BL2가 BDNF 발현에 미치는 영향 L1, *Lactobacillus plantarum*, L2, *Lactobacillus pentosus*, L3, *Lactobacillus sakei*, B1, *Bifidobacterium bifidum*, B2, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*]

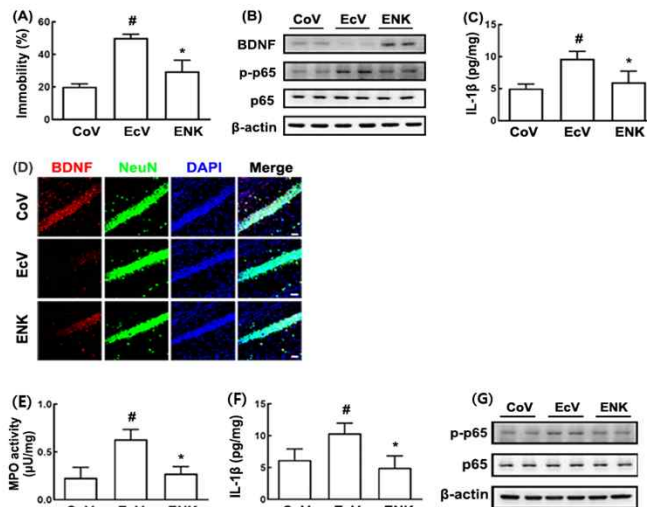
나) SH-SY5Y 세포에 인지가 저하한 반건강인의 분변마이크로바이오타의 처리는 BDNF의 발현을 억제하였으나, 건강한 사람의 장내마이크로바이오타로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* (LP); *Lactobacillus rhamnosus* (LR), *Bifidobacterium bifidum* (BB); *Bifidobacterium longum* (BL) 등은 이를 개선하는 효과가 있었음.



[인지장애가 있는 반건강인의 내장미생물질로 처리된 SH-SY5Y 세포에서 LP, LR1, LR2, BB, BL1, BL2가 BDNF 발현에 미치는 영향 LP, *Lactobacillus plantarum*, LR, *Lactobacillus rhamnosus*, BB, *Bifidobacterium bifidum*, BL, *Bifidobacterium longum*]

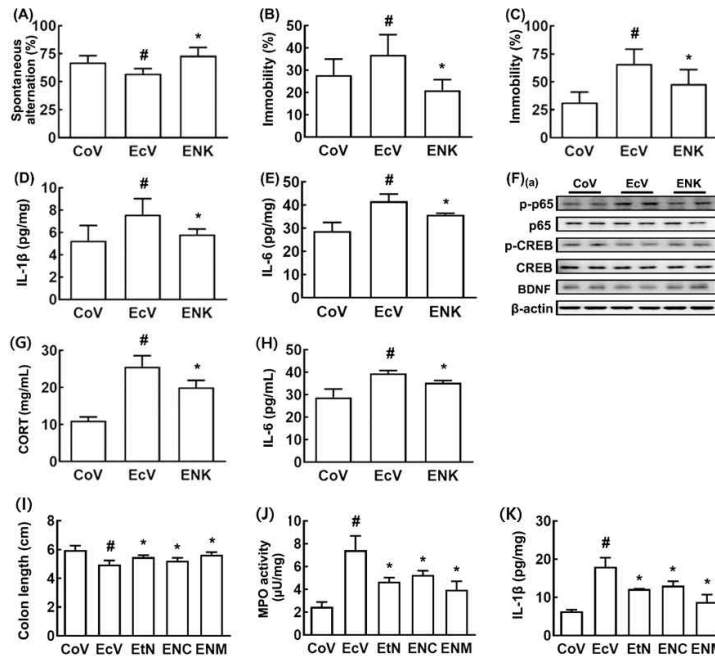
나. 정신질환 유발 실험동물의 제작 및 이 실험동물에서 후보물질(프로바이오틱스)의 정신질환(우울증 및 인지기능) 개선 효과 평가

- 1) K1(*Escherichia coli*)의 무균마우스 및 SPF 마우스에서 NK109의 정신질환개선 효과가 GM마우스에는 1x10⁷ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 불안 및 우울 행동을 보였음
- 나) GM마우스의 해마, 대장에서의 염증지표가 증가하고, 신경세포 수, 기억력의 지표 등에서 유의적으로 억제하였음



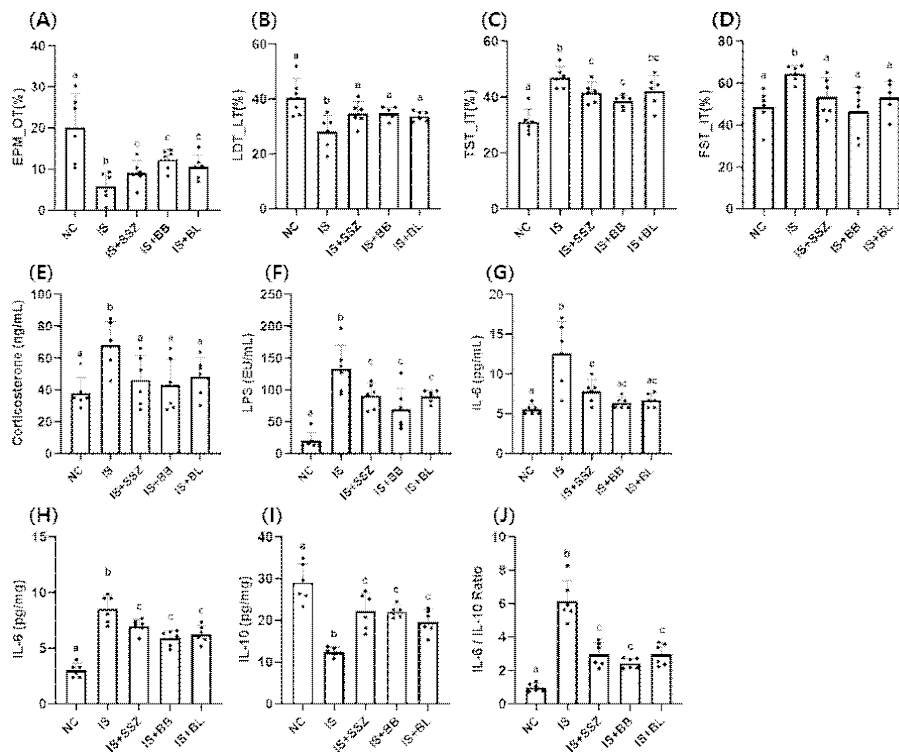
[NK109가 세균이 없는 마우스의 대장균 K1 유도 인지 장애 및 대장염에 미치는 영향. (A) TST의 부동 시간에 미치는 영향. (B) 해마의 BDNF 표현 및 NF-kB 활성화에 미치는 영향. (C) 해마의 IL-1 → 해마 + 인구에 미치는 영향. 결장의 골수산화효소(MPO) 활성(E), IL-1 α 발현(F), NF- β B 활성화(G)에 미치는 영향. 데이터 값은 평균 \pm SD(n = 4)로 설명되었습니다. #p<0.0 vs CoV. *P < 0.05 vs EcV]

- 다) SPF마우스에는 1x10⁹ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 불안 및 우울 행동을 보였음
- 라) SPF마우스의 해마, 대장에서 염증지표가 증가하고, 신경세포수, 기억력의 지표 등에서 유의적으로 억제하였음
- 마) SPF마우스, GM마우스사이에 해마, 대장에서 염증지표, 신경세포수, 기억력의 지표 등에서 차이를 보이지 않았음



[NK109는 마우스의 K1 유도 인지장애와 우울증을 완화시켰다. (A) Y-메이즈 작업에서 인지장애에 미치는 영향 TST(B)와 FST(C)의 우울증 행동에 미치는 영향. 해마 IL-1 α (D) 및 IL-6 레벨(E)에 미치는 영향. (F) 해마 BDNF 발현 및 NF-kB 활성화에 미치는 영향. 혈중 코르티코스테론(G) 및 IL-6 수준(H)에 미치는 영향. 대장 길이(I), MPO 활성(J), 대장 내 IL-1 α 표현에 미치는 영향. 데이터 값은 평균 \pm SD(n = 6)로 설명되었습니다. #p<0.05 vs CoV. *P < 0.05 vs EcV]

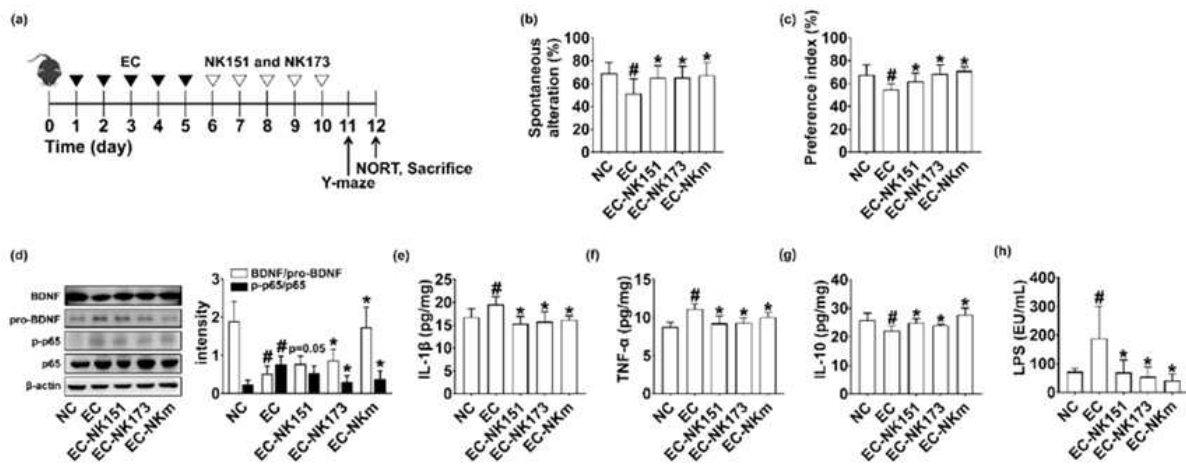
- 2) 구속스트레스 유도 동물에서 BDNF 발현 유도 Bifidobacterium bifidum (BB), Bifidobacterium longum (BL)의 우울증 개선 효과
- 가) 마우스에 IS 처리는 EPM, LDT, TST, FST에서 불안행동을 유도하였고, 해마에서 IL-6 발현을 증가시켰고, IL-10의 발현을 억제하였음(해마에서 IL-6/IL-10을 증가시켰음)
- 나) IS 처리는 혈액 corticosterone, IL-6, LPS 농도를 증가시켰음
- 다) BDNF 발현을 유도하는 BB, BL은 모두 IS 유도 불안 행동, 해마의 IL-6, IL-6/IL10을 억제하였음
- 라) BB, BL은 모두 IS 유도 혈중 corticosterone, IL-6, LPS를 모두 낮춤



[*Bifidobacterium bifidum* (BB), *Bifidobacterium longum* (BL), Sulfasalazine (SSZ)이 마우스의 고정화 스트레스(IS)에 미치는 불안/우울 영향. 데이터 값은 평균 ± SD(n = 8)로 설명됨. #p<0.05 vs NC. *P < 0.05 vs IS]

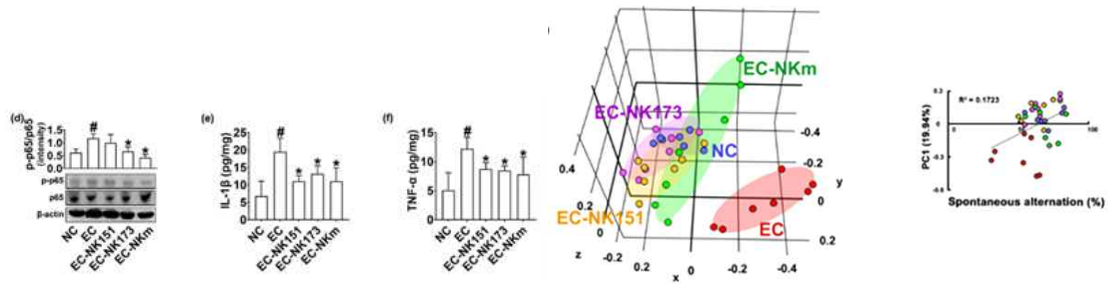
3) Escherichia coli K1 유도 인지능손상 마우스에서 대장균 LPS 생산억제 Lactobacillus plantarum NK151, Bifidobacterium longum NK173의 인지기능 개선 효과

- 가) SPF 마우스에 K1를 1x10⁹ CFU/mouse/day로 5일간 투여하여 인지능 손상이 유도되었으나
- 나) 그러나, NK151, NK173는 단독 또는 병용투여로 K1에 의해 손상된 인지능 손상을 개선하였음
- 다) 해마에서 K1에 의해 발현이 억제된 BDNF 및 IL-10이 개선되었고, K1치리에 의해 증가한 TNF-α를 억제하였으며, 혈액 중의 LPS 농도도 낮았음



[대장균 K1 유도 불안/우울증에 대한 NK151과 NK173의 영향. 데이터 값은 평균 ± SD(n = 7)로 설명됨. #p<0.05 vs. NC. *P<0.05 vs. EC]

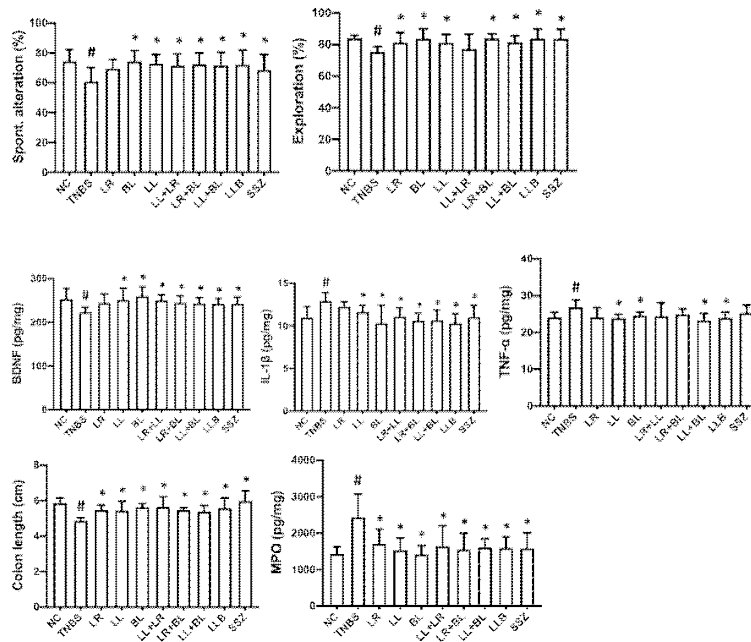
- 라) 대장균 K1 투여에 의해 유도된 대장의 염증지표들은 억제되었으며, 장내마이크로바이오타의 불균형도 개선되었고, 특히 마이크로바이오타의 PC1은 인지능 개선과 정의 상관성을 나타냈었음



[대장균 K1 유도 불안/우울증을 가진 마우스의 대장염 및 장내 미생물 구성에 대한 NK151과 NK173의 영향. 데이터 값은 평균 ± SD(n = 8)로 설명되었습니다. #p<0.05 vs. NC. *P<0.05 vs. EC. IS]

4) TNBS 유도 인지능손상 마우스에서 BDNF 발현 유도 LR (NK210), LL (NK209), BL (NK219)의 인지능 개선 효과

- 가) TNBS의 직장투여는 인지능손상, 신경염, 대장염을 일으켰음
- 나) 그러나, SH-SY5Y신경세포의 BDNF 발현을 유도하는 균주들중 Bifidobacterium longum BL, Lactococcus lactis LL의 경구투여는 TNBS로 손상된 인지능을 회복시켰음
- 다) BL, LL은 모두 TNBS에 의해 감소한 해마의 BDNF발현을 증가시키고, TNBS에 의해 증가한 TNF-α, IL-1β 발현을 억제하였음
- 라) BL, LL은 모두 TNBS에 의해 장길이 감소를 개선하고, 증가한 myeloperoxidase 발현을 억제하였음



[마우스의 TNBS 유도 인지장애, 신경염증, 대장염에 대한 생균제 LR, LL, BL의 영향 데이터 값은 평균 ± SD(n = 8)로 설명됨. #p<0.05 vs. NC. *P<0.05 vs. TNBS]

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

<연구성과 목표 대비 실적>

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	2.5	5		5		45	20		10				2.5		10				
최종목표	5	3	0	3	0	4	5,000	0	3	0	0	11	0	0	16	0	6	0	0
1차년도	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2.766	3	0	1	0	0
2차년도	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	2	15.89	7	0	2	0	0
3차년도	5	0	0	1	20	0	5301	0	2	0	0	6	0	26.104	4	0	2	0	0
4차년도	2	2	0	0	0	1	9573	0	2	0	0	5	0	23.827	3	0	3	0	2
합계	8	2	0	1	20	2	14,874	0	5	0	0	15	2	4.572	17	0	8	0	2

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

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	치담 (治痰) 한약의 항알츠하이머 효능 비교 연구	대한본초학회지	곽채원 (교신저자: 오명숙)	4	대한민국	대한본초학회	비SCIE	2019-07-31	1229-1765	100%
2	防風類 藥材의 신경세포보호효과 및 아세틸콜린에스테라제 저해 효과 비교	대한본초학회지	주인경 (교신저자: 오명숙)	5	대한민국	대한본초학회	비SCIE	2019-09-30	1229-1765	100%

3	Cuscutae Japonicae Semen ameliorates memory dysfunction by rescuing caspase-3-mediated synaptic damage in Alzheimer's disease models	Nutrients	주인경 (교신 저자: 오명숙)	11(11)	Switzerland	MDPI	SCI	2019-10-28	2072-6643	100%
4	Picrorhiza kurroa Prevents Memory Deficits by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and BACE1 Expression in 5xFAD Mice	Neurotherapeutics	김남권 도치민 (교신 저자: 이종길 오명숙)	17(1)	USA	Springer	SCI	2020-01-17	1933-7213	33%
5	Ginger and 6-shogaol protect intestinal tight junction and enteric dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice	Nutritional neuroscience	허유진 (교신 저자: 오명숙)	23(6)	England	Taylor & Francis	SCI	2020-06-19	1028-415X	50%
6	GC-TOF-MS-Based Metabolomic Analysis and Evaluation of the Effects of HX106, a Nutraceutical, on ADHD-Like Symptoms in Prenatal Alcohol Exposed Mice	Nutrients	주인경 이미연 전승호 (교신 저자: 이종길 이충환 오명숙)	12(10)	Switzerland	MDPI	SCI	2020-10-02	2072-6643	100%
7	CCL01, a novel formulation composed of Cuscuta seeds and Lactobacillus paracasei NK112, enhances memory function via nerve growth factor-mediated neurogenesis	Food & Function	주인경 (교신 저자: 오명숙)	12(20)	England	Royal Soc Chemistry	SCI	2021-11-07	2042-6496	100%
8	Non-targeted metabolomics unravels a media-dependent prodiginines production pathway in Streptomyces coelicolor A3(2)	PLoS One	Yongwan Lim (교신 주저자: Choong Hwan Lee)	10	USA	Public Library of Science	SCI	2018-11-16	1932-6203	100%
9	Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF-κB Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation	Cells	Lalita Subedi (교신 주저자: Sun Yeou Kim)	8	Switzerland	MDPI	SCI	2019-02-22	2073-4409	100%
10	Therapeutic Potential of Lespedeza bicolor to Prevent Methylglyoxal-Induced Glucotoxicity in Familial Diabetic Nephropathy	Journal of Clinical Medicine	Moon Ho Do, (교신 주저자: Sun Yeou Kim)	8	Switzerland	MDPI	SCI	2019-07-31	2077-0383	50%

11	Exploring the metabolomic diversity of plant species across spatial (leaf and stem) components and phylogenetic groups	BMC Plant Biology	Sunmin Lee (교신 주저자 : Choong Hwan Lee)	20	United Kingdom	Springer Nature	SCI	2020-01-28	1471-2229	50%
12	Sulforaphane Inhibits MGO-AGE-Mediated Neuroinflammation by Suppressing NF-κB, MAPK, and AGE-RAGE Signaling Pathways in Microglial Cells	Antioxidants	Lalita Subedi (교신 주저자: Sun Yeou Kim)	9	Switzerland	MDPI	SCI	2020-08-26	2076-3921	100%
13	Potential of <i>N-trans</i> feruloyl tyramine from <i>Lycium barbarum</i> fruit extract on neurogenesis and neurotrophins: targeting TrkA/ERK/CREB signaling pathway	Journal of Functional Foods	Zahra Khan (교신 주저자: Sun Yeou Kim)	80	Netherlands	Elsevier	SCI	2021-03-08	1756-4646	100%
14	Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium longum alleviate colitis and cognitive impairment in mice by regulating IFN-γ to IL-10 and TNF-α to IL-10 expression ratios.	Scientific Reports	마샤오양 신윤정 (교신 저자: 김동현)	11(1)	England	Nature Research	SCI	2021-10-19	2045-2322	50%
15	A Probiotic Lactobacillus gasseri Alleviates Escherichia coli-Induced Cognitive Impairment and Depression in Mice by Regulating IL-1β Expression and Gut Microbiota	Nutrients	윤수원 (교신 저자: 김동현)	12(11)	Switzerland	MDPI	SCI	2020-11-10	2072-6643	33%
16	Lactocaseibacillus paracasei NK112 mitigates Escherichia coli-induced depression and cognitive impairment in mice by regulating IL-6 expression and gut microbiota.	Beneficial Microbes	윤수원 (교신 저자: 한명주 김흥현)	12(6)	Netherlands	Wageningen Academic	SCI	2021-11-16	1876-2883	50%
17	Alleviation of cognitive impairment by gut microbiota lipopolysaccharide production-suppressing Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium longum in mice	Food Function	이동연, 신윤정, 김전경, 장호민, 주민경 (교신 저자: 김동현)	12(6)	England	Royal Society of Chemistry	SCI	21-11-01	2042-6496	50%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2018 응용약물학회 추계 학술대회	허유진, 최진규, 주인경, 노동진, 권영지, 오명숙	2018-10-12	서울대학교 호암교수회관	대한민국
2	International Brain Research Organization 2019	주인경, 최진규, 김남권, 오명숙	2019-09-23	대구 EXCO	대한민국
3	2020 KALAS International Symposium	주인경, 이승민, 김선여, 김동현, 오명숙	2020-07-17	평창 알펜시아컨벤션센터	대한민국

4	2021년 제13회 대한퇴행성신경질환학회 정기학술대회	주인경, 이승민, 임혜리, 김성혜, 어혜윤, 김동현, 이충환, 김선여, 오명숙	2021-10-29	online	대한민국
5	KMB 2018 45 th Annual Meeting & International Symposium	Yonghwan Lim	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	대한민국
6	METABOLOMICS 2018	Eun Sung Jung	2018-06-25	Seattle, Washington	미국
7	International Scientific Conference Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota dna Health(IPC)	Dong Ho Suh	2019-06-17	Prague Congress Centre	체코, 프라하
8	International Scientific Conference Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota dna Health(IPC)	Su Hyun kim	2019-06-17	Prague Congress Centre	체코, 프라하
9	2019 한국대사체학회 정기학술대회	Digar singh	2019-04-04	이화여대 ECC 이삼봉홀	대한민국
10	2019 한국대사체학회 정기학술대회	Sunmin Lee	2019-04-04	이화여대 ECC 이삼봉홀	대한민국
11	The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	Su hyun, Kim	2020-09-23	ONLINE	대한민국
12	The 28th Annual Meeting of the Korean Society of Applied Pharmacology	Seong-Min, Hong	2020-10-16	Hoam Convention Center, Seoul National University	대한민국
13	KMB 2021 48 th Annual Meeting & International Symposium	Su hyun, Kim	2021-06-23	벡스코, 부산	대한민국
14	The 29th Annual Meeting of the Korean Society of Applied Pharmacology	Seong-Min, Hong	2021-10-15	Hoam Convention Center, Seoul National University	대한민국
15	2020 대한약학회 추계학술대회	윤수원	2020-10-23	online	대한민국
16	2019 대한약학회 추계학술대회	윤수원, 김전경, 한명주, 김동현	2019-10-14	여수엑스포컨벤션센터	대한민국
17	2019 한국응용약물학회 추계 학술대회	김전경, 최민신, 유혜현, 김동현	2019-10-11	Hoam Convention Center, Seoul National University	대한민국

기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
	Lactobacillus paracasei NK112	KCCM12566P	한국미생물보존센터	2019

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	주의력결핍과잉행동장애 치료용 생약조성물	대한민국	(주)헬릭스 미스	2019.05. 09	10-2019 -005454 7	10-2371 285-000 0	(주)헬릭스 미스	2022.03.0 2	10-23712 85-0000	100	
2	락토바실러스 파라카제이HP7 균주를 함유하는 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)한국야 쿠르트	2020.09. 23	10-2020 -012301 6					100	
3	락토바실러스 카제이HY2782 균주를 함유하는 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)한국야 쿠르트	2020.09. 23	10-2020 -012301 7					100	
4	락토바실러스 플란타룸HY7715균주를 함유하는 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)한국야 쿠르트	2020.09. 23	10-2020 -012301 8					100	
5	비피도박테리움 애니멀리스 서브스페이스 락티스HY8002균주를 함유하는 인지기능장애 및 우울증 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)한국야 쿠르트	2020.09. 23	10-2020 -012301 9					100	
6	락토바실러스 파라카제이 NK112, 갯실 새삼 추출물 및 새삼 추출물을 포함하는 인지기능 및 장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	엠테라파 마(주)	2020.07. 24	10-2020 -009259 4					100	자진 취하(202 1.12.07.) (사유: 기원 정보 오기로 갯실새삼 을 실새삼으 로 변경하여 신규 출원)
7	락토바실러스 파라카제이 NK112, 실새삼 추출물 및 새삼 추출물을 포함하는 인지 기능 및 장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	엠테라파 마(주)	2021.12. 06	10-2021 -017310 8					100	
8	락토바실러스 파라카제이 NK112, 실새삼 추출물 및 새삼 추출물을 포함하는 인지 기능 및 장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물	PCT	엠테라파 마(주)	2021.12. 08	PCT/KR 2021/01 8529					100	
9	신규 유산균 및 이의 용도	대한민국	경희대학 교 산학협력 단	2019.10. 10	10-2019 -012497 8	10-2249 260-000 0	경희대학 교 산학협력 단	2021.04.3 0	10-22492 60-0000	100	

10	쇠비름 추출물 및 락토바실러스 파라카제이 HP7을 포함하는 인지기능 개선용 식품 조성물	대한민국	(주)에치와이(구 한국야쿠르트)	2021.06.23	10-2021-0081711						100
----	--	------	-------------------	------------	-----------------	--	--	--	--	--	-----

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

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

□ 표준화

○ 국내표준

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

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

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

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

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

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	특허 양도	락토바실러스 파라카제이 NK112, 갯실 새삼 추출물 및 새삼 추출물을 포함하는 인지기능 및 장기능 장애의 예방 또는 치료용 조성물	엠테라파마 주식회사	2020.09.07	20,000,000 원	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	MPRO 프로바이오틱스 율	유산균 분말	㈜에치와이	약 8,000,000	-	2021년 12월 기준	
2	자가실시	시제품 개발 (원료 OEM)	국내	큐비엔기억력엔N천마등복합추출물/규비엔기억력엔N천마등복합추출물키즈	과립 분말	㈜헬릭스미스	132,080	-	2020년 12월 기준	

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
MPRO 프로바이오틱스 율	2020	5,168,692	-	5,168,692	당해 연도 매출액 기준 (2020.01.10. ~ 2020.12.31.)
MPRO 프로바이오틱스 율	2021	8,232,305	-	8,232,305	당해 연도 매출액 기준 (2021.01.01. ~ 2021.12.31.)
MPRO 프로바이오틱스 율	2022	1,003,095	-	1,003,095	당해 연도 매출액 기준 (2022.01.01. ~ 2022.03.31.)
큐비엔기억력엔N천마등복합추출물/규비엔기억력엔N천마등복합추출물키즈	2020	132,080	-	132,080	당해 연도 매출액 기준 (2019.11.26. ~ 2020.11.17.)
큐비엔기억력엔N천마등복합추출물/규비엔기억력엔N천마등복합추출물키즈	2021	337,667	-	337,667	당해 연도 매출액 기준 (2021.01.01. ~ 2021.12.31.)
합계		14,873,839	-	14,873,839	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

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

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2019년	2020년	2022년	
1	고용창출	(주)헬릭스미스	1			1
2	고용창출	엠테라파마(주)		1		1
3	고용창출	코스맥스BTI(주)		1		1
4	고용창출	경희대학교 산학협력단			1	1
5	고용창출	경희대학교 산학협력단			1	1
합계			1	2	2	5

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

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

□ 정책활용 내용

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

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	연구인력 양성 (박진용)	2018		1			1		1					
2	연구인력 양성 (주인경)	2019		1				1	1					
3	연구인력 양성 (서동호)	2020	1				1		1					
4	연구인력 양성 (전승호)	2020		1			1		1					
5	연구인력 양성 (권민철)	2020		1			1		1					
6	연구인력 양성 (이승민)	2021		1			1		1					
7	연구인력 양성 (주인경)	2022	1					1	1					
8	연구인력 양성 (이현지)	2021		1				1	1					

□ 산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	약업신문	헬릭스미스, 'HX106' 미국 FDA NDI 승인	2021.06.09
2	Internet/PC통신	PHARMEDAILY	헬릭스미스, ADHD 치료물질 'HX106'의 국내 특허 획득	2022.03.03

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

- 초기 50여의 한국인 분변 수집 계획
 - 대조군 분변 236예 수집 + 인체적용시험 분변 73예 수집
 - 향후 연구자 및 국가 연구비로 얻어진 샘플로 귀한 자료로 활용될 예정
 - 분변과 혈액, 소변을 동시 수집하여 향후 통합적 분석에 활용 가능
- 타 세부과제와 연계를 통하여 분변 metabolome 분석

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

- 계획서에 반영되지 않은 분변 microbiome 유전자 분석을 수행함
 - 정신건강의학과와 연구 수행을 통하여 대조군 샘플의 중요성을 보여줌

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 인지기능 개선 프리바이오틱스/신바이오틱스 최적 소재 발굴 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 기 확보 소재를 활용한 ADHD 대상 prebiotics 후보 도출 <ul style="list-style-type: none"> - ADHD 관련 세포 및 동물실험 시료 생산 - HX106 AMPA 및 NMDA 글루타메이트 수용체 길항 활성 확인, 도파민 대사 관련 실험에서 기타 소재 결과 확보 • 인지기능 개선 천연물 2종(실새삼, 새삼) 및 유산균 소재(L. paracasei NK112)과 복합제제 MT104 도출 	100%
○ 추출 공정 연구 및 지표성분 탐색, 함량범위 설정 등 품질규격 연구 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 생산공정/품질규격 연구 (산업성과 유효성을 고려한 추출 공정 연구, 품질관리 지표 설정 및 원료 규격 확보) 완료 <ol style="list-style-type: none"> 1) ADHD 소재 (HX106) <ul style="list-style-type: none"> - 지표성분(Salvianolicacid, Gastrodin) 설정 및 성분 프로파일링을 함량 변화 확인 - 기준규격 설정 2) 인지기능개선 소재 (MT104) <ul style="list-style-type: none"> - 표준추출공정 확립 - 지표성분(hyperoside, isochlorogenic acid B) 설정 및 성분 프로파일링 분석 - 기준규격 설정 	100%
○ 원료 및 완제 제형/제제 연구, 제품 생산을 위한 scale-up 연구 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> • ADHD 임상시험을 위한 시료 생산 <ul style="list-style-type: none"> - ADHD 청소년 대상 위약 및 임상시료 과립제형 제조 및 성적서 발급 - 임상 시료 생산 및 임상 진행 (ADHD 치료제인 메틸페니데이트 (methylphenidate) 투약 및 식품 소재 섭취가 ADHD 증상 개선에 미치는 효과 연구 (위탁, 중앙대학교)) • 최적 제제/제형 및 안정성 연구 <ol style="list-style-type: none"> 1) ADHD 소재 (HX106) <ul style="list-style-type: none"> - 최적 제제/제형 확정 및 인체시험 제제 생산 - HX106 및 HX106 유산균 복합제제의 냉장/실온/가속 조건에서 안정성 확보 2) 인지기능개선 소재 (MT104) <ul style="list-style-type: none"> - 천연물 및 유산균 원료 scale-up GMP 생산 - 최종 제제/제형 확정 및 인체시험용 제제의 CMO 생산 - 공인시험기관 성적서 발급 - 유통기한 설정 연구를 통해 냉장조건 18개월, 실온조건 12개월, 가혹조건 1개월까지 안정성 확보. 향후 24개월까지 연구 진행 예정 	100%
○ 단회 및 DRF 독성, 유전독성, 반복 독성을 통한 안전성 확보 비임상 독성연구 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 비임상 GLP 독성시험(설치류 단회투여독성, 13주반복투여독성, 유전독성시험 3종) 완료하여 MT104의 안전성 확보 	100%

○ 인체적용시험자자료집 작성 및 개별 인정형 원료 신청 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> • MT104 인체적용시험자자료집 작성 완료 • 인체적용시험 일정 지연으로 식약처 인지기능개선 개별인정형 원료 신청은 인체적용시험 완료되는 대로 바로 진행 예정 	80%
○ 효능 평가 시스템 구축 및 후보 소재 스크리닝/확보 (2세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 확보 • 인지기능 감퇴(스코폴라민 모델), ADHD 동물모델 구축 • In vitro 모델(H₂O₂, glutamate 독성 세포보호/NGF 분비 유도/AChE 억제)에서의 인지기능 식품 후보 소재 스크리닝 	100%
○ 식품 소재/프로바이오틱스의 항 ADHD 및 인지기능 개선/강화에 대한 유효성 평가 (2세부)	<ul style="list-style-type: none"> • HX106의 항ADHD 효능 평가 • 후보 소재의 인지기능 감퇴 개선 또는 강화 효능 확인 	100%
○ 프로바이오틱스/프리바이오틱스의 인지기능 개선 효능 확인 및 약리 기전 규명 (2세부)	<ul style="list-style-type: none"> • HX106의 항ADHD 효능에 대한 기전 규명 • MT104 구성 소재의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 고지방 식이 유도 기억 감퇴 개선 효능 확인 - Aβ 유도 기억 감퇴 개선 효능 확인 • MT104 유효 성분의 in vitro 활성 확인 	100%
○ 식품 개발 후보의 인지/기억 기능 관련 유효성 검증 및 기전 연구 (2세부)	<ul style="list-style-type: none"> • MT104의 알츠하이머병 제어 기전 분석 • 식품 개발 후보 제품의 인지/기억기능 강화 효능 및 신경정신질환 개선 유효성 검증 	100%
○ 신경정신질환 관련 생체 내 특이마커 발굴 (3세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 신경정신질환 모델에 대한 내인성 대사체(brain, fecal, serum 등) 분석법 최적화 확립 • 다변량 통계분석을 통한 신경정신질환 (알츠하이머, ADHD 유도 모델) 관련 생체 내 바이오마커 및 대사경로 분석 • 장내 균총 유래 미생물의 우울증 관련 대사체 분석 및 마커 발굴 	100%
○ 인지기능 개선 소재 품질관리 지표 설정 (3세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 인지기능 개선 소재의 대사체 분석법 확립 • 다변량 통계분석을 통한 소재 별 품질관리 지표 확보 • 인지기능 개선 소재 활성 검증 	100%
○ 신경정신 질환 예방 관련 신바이오틱스 소재 최적화 (3세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 신바이오틱스 소재의 공정 및 혼합소재 별 품질관리 지표 확보 • 신바이오틱스 성분의 정상 쥐에 대한 대사경로 확인 • 신바이오틱스 소재의 신경정신 질환 개선 (알츠하이머, ADHD 유도 모델) 관련 생체 내 기전 규명 	100%
○ 장내 미생물총 밸런스 개선용 혼합 균주 발굴 및 표준 배합비 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 신경세포 독성 보호효과 평가를 통한 HY7715, HY8002, HY8004, HY2782, HP7 효능확인 및 신경세포 증식능력 평가를 통한 HY7715, HY8002, HY8004, HY2782, HP7, HY7601 효능 확인 	100%
○ 개발된 발효 유제품의 장관면역 기능개선 검증 (4세부)		
○ 맞춤 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발 (4세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오마커(BDNF, TNF, Aβ40, Aβ42, sICAM-1)를 분석한 결과 HP7 > HY2782 > HY7715 > HY8002 순으로 효능 확인 • 천연물 234종 중 후보소재 9종(계지, 천문동, 마치 	100%

	<p>현, 사삼, 쇠비름, 구기자, 합환피, 브로콜리새싹, 천궁)를 선정하고, 특허 및 가격 등을 고려하여 최종 쇠비름 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> • HP7+쇠비름 복합물의 효능이 가장 우수하였으며, 최적효능비율은 1:2로 나타남 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구 ○ 장내 미생물 개선 소재의 규격화 ○ 신규 장내 미생물총 개선 소재 생산 공정 구축 ○ 제품 대량생산 공정 구축 및 품질 관리 표준화 설정 연구 (4세부) 	<ul style="list-style-type: none"> • HY8002 균주의 배양 및 분말 최적화 연구로 탄소원과 질소원 배양 최적화 및 Tween80 농도에 따른 배양 생균수 최적화 • HY7715 균주 배양 시 동결보호제 변경 및 Heat shock 처리로 유산균 생존율 향상 확인 및 옥수수 전분 적용에 따른 유산균 생존율 향상 확인 • HY2782균주의 배양 및 분말 최적화 연구로 탄소원과 질소원 배양 최적화로 배양 생균수 최적화, 동결보호제 변경 및 Heat shock 처리로 유산균 생존율 향상 확인 • 균주의 산업화를 위한 plant scale의 scale-up 연구를 진행하여 타정, 캡슐, 츄어블, 이중제형 등 다양한 제형을 통해 산업화 가능성 확인 • HP7 균주의 배양 및 분말 최적화 연구로 미네랄 함량 증대에 따른 안정성 증대 확인 및 보호제와 부형제 적용에 따른 안정성 증대 확인 • 균주의 산업화를 위한 plant scale의 scale-up 연구를 진행하여 타정, 캡슐, 츄어블, 이중제형 등 다양한 제형을 통해 산업화 가능성 확인 • 균주 라인테스트 및 예비저장성 진행 후 규격 이상 없음 확인 	100%
<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품 카테고리 구축 전략을 통한 신제품 개발 및 출시 (4세부) 	<ul style="list-style-type: none"> • 특허 자사균주인 HY7715, HY8002, HP7를 이용한 신제품 개발 • 유산균 HY7715, HY8002, HP7 3종을 배합하여 제품의 1일 섭취량은 2g, 2포 섭취 및 5억 보증으로 설계함 	100%
<ul style="list-style-type: none"> ○ 한국인 정상인 분변 모집 50예 (5세부) 	<ul style="list-style-type: none"> • 306예 모집 • 한국인 정상인 분변의 퇴행성 질환 분석 활용 <ul style="list-style-type: none"> - 정신건강의학과와의 협동 연구로 정신질환자 59명의 분변 분석 	600%
<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험 2건 (5세부) 	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 1건 (4세부 (에치와이(주)) 소재) 종료 /1건 (주관/1세부 (엠테라파마(주)) 소재) 진행 중 • 각 인체적용시험에서 복용 전후 분변 수집 <ul style="list-style-type: none"> - 복용 전후 분변 32명에서 63예 수집 (4세부 (에치와이(주)) 소재 인체적용시험) - 복용 전후 분변 10예 수집 (주관/1세부 (엠테라파마(주)) 소재 인체적용시험) 	70%
<ul style="list-style-type: none"> ○ 인지기능 천연물소재의 프리바이오틱스 활성 평가 (6세부) 	<ul style="list-style-type: none"> • NK112와 천연물소재 병용 (MT104) 시, 시너지 효능 확인 <ul style="list-style-type: none"> - Y-maze, NOR, TST 에서 불안 및 기억력 개선 효과 확인 - Myeloperoxidase 활성 억제 효과 확인 	100%

	- 대장 및 해마 조직에서 IL-6 억제 효과 확인 - 대장 조직의 p-p65의 활성화 유도 효과 확인	
○ 우울·불안 동물모델 구축 및 후보소재의 활성 평가 (6세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 대장균 K1 유도 우울/불안 동물모델 구축 • 우울/인지능 손상 질환 동물모델의 장내 microbiota 분석 • 후보 유산균 소재 NK112, NK109는 정신신경질환 개선 효능 확인 • TNBS 유도 인지능손상 마우스에서 BDNF 발현 유도 LR (NK210), LL (NK209), BL (NK219)의 인지능 개선 효능 확인 	100%
○ 장내미생물 이식 gnotobiotte 및 conventional 동물 제작 및 플랫폼 구축 (6세부)	<ul style="list-style-type: none"> • SPF 마우스와 GM 마우스에 장내세균이식 정신질환 동물 모델 구축 - 정신질환환자 기원 장내세균 Escherichia coli K1은 SPF, GM마우스에서 인지기능 손상등의 정신질환을 유발 확인 	100%
○ 한국인 장내미생물 분포 분석 (5세부 협력 연구) (6세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 연령 증가에 따라 α-diversity와 β-diversity가 증가 • 연령 증가에 따라 Actinobacteria, Bifidobacteriales/Proteobacteria비율 감소 • 인지능손상건강인과 건강인과의 장내마이크로바이오타와의 상관성 확인 	100%

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 인지기능개선 인체적용시험 진행 지연으로 인한 개별인정형 원료 신청 목표 미달
 - COVID-19 팬데믹 등으로 인체적용시험이 4차년도 2분기부터 시작
 - COVID-19 유행으로 인체적용시험기관 연구진의 감염과 환자 내원이 어려워져 대상자 모집에 어려움

2) 자체 보완활동

- 다기관 인체적용시험으로의 전환
 - 주관연구기관인 엠테라파마는 기존 경희대병원 1개 기관에서 진행되던 인체적용시험의 보다 빠른 진행을 위하여, 자체 연구비로 CRO (네오뉴트라(주)) 선정 및 2개 기관 (전북대학교병원, 고려대학교 안암병원)을 인체적용시험기관으로 추가하여 올해 말까지 인체적용시험 완료를 목표로 진행중임
- 인지기능개선 개별인정형 원료 신청 준비
 - 인체적용시험 완료와 동시에 식약처에 개별인정형 원료 신청을 빠른 속도로 진행할 수 있도록 나머지 모든 구비자료들을 전문 CRO (네오뉴트라) 컨설팅과 함께 진행중임

3) 연구개발 과정의 성실성

- 다기관 임상시험은 인체적용시험에서 비용의 증가로 대부분의 회사가 수행하기 어려움
 - 주관연구기관 엠테라파마는 병원 비용 추가 1.5억원 이상을 투자하고 CRO 비용도 투자하면서 적극적으로 임상시험에서 좋은 결과를 도출하기 위하여 연구자와 협력하여 총력을 다하고 있음
 - RFP에서 식약처 기능성 획득에 관한 내용이 없음에도 엠테라파마에서는 국책과제 연구비 대비 의미 있는 결과를 도출하기 위하여 식약처 기능성 획득을 목표로 연구를 진행함
 - 5세부 연구책임자인 임성빈 교수도 경희대학교병원 신경과에서 인체적용시험이 완료될 수 있도록 노력할 예정이며, 타 기관 인체적용시험의 모니터링도 CRO와 함께 수행중임
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 식품 및 미생물 자원을 활용한 제품개발을 통해 유용자원의 활용도 및 부가가치 증대 기대
 - 장내균총과 인지감퇴와의 상관성 연구를 통해 관련 산업 기술 발전에 기여
 - 체계화된 장내균총과 인지능력 개선 상관 연구를 통해 장내균총 조절 제품 개발 원천 기술 확보 및 국가 기술력 증대 도모
 - 대사체학을 적용한 신경정신질환별 인지기능 개선 소재의 효능 예측 및 알고리즘 구축을 통한 핵심기술 확보
 - 고기능성 원료의 재배, 연구개발, 제품생산, 유통 관련 분야의 중소기업 활성화 및 매출 증가에 따른 연계산업의 일자리 창출에 기여
 - 생애주기별 신경정신질환을 예방 및 인지능력을 증진 제품 개발을 통한 인지 장애 관련 의료비 절감 효과 기대
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	11	
	비SCIE	0	
	계	11	
국내논문	SCIE	0	
	비SCIE	0	
	계	0	
특허출원	국내	4	
	국외	1	
	계	5	
특허등록	국내	3	
	국외	1	
	계	4	
인력양성	학사	1	
	석사	4	
	박사	1	
	계	6	
사업화	상품출시	4	
	기술이전	3	
	공정개발	0	
제품개발	시제품개발	4	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 별첨1. 자체평가의견서
	2) 별첨2. 연구성과 활용계획서
	3) 첨부1. 평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서
	4) 첨부3. 최종보고서 관련 제출 문서 양식
	5) 첨부4. 최종보고서 배포결과
2.	1)
	2)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업 ‘프로바이오틱스 기반 생애주기별 인지능력 개선 제품 개발’ 과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(전문기관: 농림식품기술기획평가원)에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.