

RS-2021
-IP82102
8

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
기술사업화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004693-01

혈압조절에
도움을 줄
수 있는
신규한
유산균
포스트바이
오틱스
소재 개발

혈압조절에 도움을 줄 수 있는 신규한 유산균 포스트바이오틱스 소재 개발

2024.07.09.

2024

주관연구기관 / (주)노바락토
공동연구기관 / 한국식품연구원
동국대학교산학협력단
네오뉴트라(주)

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “혈압조절에 도움을 줄 수 있는 신규한 유산균 포스트바이오틱스 소재 개발”(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 09.

주관연구기관명 : (주)노바락토 (대표자) 황 용 진 (인)
공동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 백 형 희 (인)
공동연구기관명 : 동국대학교신학협력단장 (대표자) 이 경 (인)
공동연구기관명 : 네오뉴트라㈜ (대표자) 강 재 학 (인)

주관연구책임자 : 황 용 진 (인)
공동연구책임자 : 임 상 동 (인)
공동연구책임자 : 강 석 성 (인)
공동연구책임자 : 서 은 정 (인)

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명	기술사업화지원	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	-
내역사업명 (해당 시 작성)	공공기술 사업화 촉진(융복합)	연구개발과제번호	821028-03
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 LA0908 80%	2순위 소분류 LA0906 20%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 PA0201 60%	2순위 소분류 PA0102 40%
		3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	-		
연구개발과제명	혈압조절에 도움을 줄 수 있는 신규한 유산균 포스트바이오틱스 소재 개발		
전체 연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 30 (2년 9개월)		
총 연구개발비	총 977,000 천원 (정부지원연구개발비: 732,000 천원, 기관부담연구개발비 : 245,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)		
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]	기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준(3단계) 종료시점 목표(8단계)
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	-		
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)	-		
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p>[정량 목표]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특허 출원 1 건 / 제품 출시 3 건 / - 매출액 300 백만원 / 고용 창출 3 명 - 인력 양성 1 명 - SCI 논문 3 편 / 비 SCI 논문 1 편 <p>[정성 목표]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오컨버전 최적 배양조건 확립 및 안전성 검사 완료 - <i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 완료 - <i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압 조절 작용기작 규명 완료 - 혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화 및 안전성 입증 자료 확보 - 혈압 조절 기능성 균주 대량 생산 공정 확립 - 신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 써플리먼트 사업화 - 인체적용시험용 제품 개발 - 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료 - 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청 	
	전체 내용	<p>[연구 개발 부분]</p> <p>바이오컨버전 최적 배양조건 확립 및 안전성 검사</p> <ul style="list-style-type: none"> • 반응표면분석법(RSM)으로 최적 조건 설정 • 배양 조건 : 배지 농도, 온도, 시간, 살균, 건조 등 • 전장 유전체 분석으로 항생제 내성 및 독성 검사 <p><i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고혈압 동물모델을 이용한 혈압 저하 평가 <p>혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화 및 안전성 입증 자료 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> • 지표 물질 선정 및 분석방법 밸리데이션 완료 • 혈압 조절 기능성 소재의 규격 확정 • 혈압 조절 기능성 소재의 안전성 입증 자료 검토/확보 추진 <p><i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압 조절 작용기작 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구 : Endothelial nitric 	

		<p>oxide 생성, eNOS 발현, Akt 인산화, Rho/ROCK 발현 억제 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> • 균주 선발 및 대량 배양조건 확립 • 제형별 안정성 평가를 통한 최적 제형 개발 • 기능성 균주 및 포스트바이오틱스 대량생산 공정개발 • 인체적용시험용 제제 개발/생산, 프로토콜 개발 (IRB 승인) 및 인체적용시험 수행 <p>식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청</p> <ul style="list-style-type: none"> • 개별인정 신청용 자료 확보 : 표준화, 안전성, 기능성 • 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청 <p>[사업화 부문]</p> <p>신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 씨플리먼트 개발·판매</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈압 조절 기능성 소재 이용한 씨플리먼트 제형 개발 • 혈압 조절 씨플리먼트 제품 생산 및 판매 : 제품 출시 3 건, 매출액 3 억원 목표
	<p>목표</p>	<p>[연구 개발 부문]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오컨버전 최적 배양조건 확립 및 안전성 검사 완료 - <i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 개시 - 혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화 및 안전성 입증 자료 확보 - <i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압 조절 작용기작 규명 개시 - 인체적용시험용 제품 개발 - 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 개시 - 혈압 조절 기능성 균주 대량 생산 공정 확립 - SCI 논문 1편 - 비SCI 논문 1편 <p>[사업화 부문]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 씨플리먼트 사업화
<p>1단계</p>	<p>내용</p>	<p>[연구 개발 부문]</p> <p>바이오컨버전 최적 배양조건 확립 및 안전성 검사</p> <ul style="list-style-type: none"> • 반응표면분석법(RSM)으로 최적 조건 설정 • 배양 조건 : 배지 농도, 온도, 시간, 살균, 건조 등 • 전장 유전체 분석으로 항생제 내성 및 독성 검사 <p><i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 개시</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고혈압 동물모델을 이용한 혈압 저하 평가 <p>혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화 및 안전성 입증 자료 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> • 지표 물질 선정 및 분석방법 밸리데이션 완료 • 혈압 조절 기능성 소재의 규격 확정 • 혈압 조절 기능성 소재의 안전성 입증 자료 검토/확보 <p><i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압 조절 작용기작 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구 : Endothelial nitric oxide 생성, eNOS 발현 <p>혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 개시</p> <ul style="list-style-type: none"> • 균주 선발 및 대량 배양조건 확립 • 제형별 안정성 평가를 통한 최적 제형 개발 • 기능성 균주 및 포스트바이오틱스 대량생산 공정개발 • 인체적용시험용 제제 개발/생산, 프로토콜 개발 (IRB 승인)

			<p>및 인체적용시험 수행</p> <p>[사업화 부문]</p> <p>신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 씨플리먼트 개발·판매</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈압 조절 기능성 소재 이용한 씨플리먼트 제형 개발 • 혈압 조절 씨플리먼트 제품 생산 및 판매 : 제품 출시 1 건, 매출액 30 백만원 목표
	2단계	목표	<p>[연구 개발 부문]</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 완료 - <i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압 조절 작용기작 규명 완료 - 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료 - 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청 - SCI 논문 2편 <p>[사업화 부문]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 씨플리먼트 사업화 : 제품 출시 2 건, 매출액 2.7 억원 목표
		내용	<p>[연구 개발 부문]</p> <p><i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> • 장기 무게 분석 : 간, 신장, 췌장, 근육 • 혈액 분석 : 콜레스테롤, 지질, 단백질 발현 측정 <p><i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압 조절 작용기작 규명 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구 : Akt 인산화, Rho/ROCK 발현 억제, Ca²⁺ channel 활성화 연구 <p>혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료</p> <p>식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청</p> <ul style="list-style-type: none"> • 개별인정 신청용 자료 확보 : 표준화, 안전성, 기능성 • 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청 <p>[사업화 부문]</p> <p>신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 씨플리먼트 개발·판매</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈압 조절 씨플리먼트 제품 개발 및 판매 지속 : 제품 출시 2 건, 매출액 2.7 억원 달성

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> -혈압 조절 씨플리먼트 제형 개발 준비 및 시장조사 -혈압 조절 씨플리먼트 제품 생산 및 판매 준비 -지표 물질 선정 및 분석방법 밸리데이션 준비 -혈압 조절 기능성 소재의 안전성 입증을 위한 전장유전체 분석 완료 -지표 물질 선정 및 분석방법 밸리데이션 진행 -반응표면분석법(RSM)으로 최적 조건 설정 완료 -소재 전처리 조건 설정 -소재의 분획 : 한외여과 분자량별 ACE 억제능 평가 -식약처 인허가 신청시 필요자료에 기반한 기능성원료 검토 -선행연구자료 및 인체적용시험 관련 자료 수집, 선별 및 가이드 작성 -수집 자료 분석 및 프로토콜 작성 -인체적용시험 문서 개발 및 실시기관 선정 -혈압 조절 기능성 균주 대량 생산 공정 진행
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>연구개발성과의 활용 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구 개발에 대상 균주를 활용한 신규 혈압 조절 씨플리먼트 개발/출시 ○ 개별인정 취득 후 본격적인 혈압조절 건강기능식품 개발, 출시 ○ 혈압 조절 포스트바이오틱스 소재의 사업화
---------------------	---

	연구개발성과의 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> ○ 프로바이오틱스에 대비 아직 활성화되지 않은 차세대 포스트바이오틱스 개발로 시장 창출 ○ 프로바이오틱스 건강기능식품 시장 약 5000억원 (2020년 기준) 중 포스트바이오틱스 소재가 5% 차지할 경우, 약 250억원 이상의 매출 및 시장 창출을 형성할 것으로 예상 ○ 국내 출시 사례 부재한 혈압 조절 포스트바이오틱스 건강기능식품 개발을 위한 원천기술 확보 ○ 기능성 프로바이오틱스 종균의 수입대체 효과 ○ 국내 농축산식품 시장의 활성화 및 제품의 다양화 ○ 한국인의 만성 질환 개선을 통한 보건 향상으로 국민 생산성 증진
--	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	4	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)	건강기능식품	포스트바이오틱스	혈압 조절	고혈압	유산균							
영문핵심어 (5개 이내)	Health functional food	Post-biotics	Control of blood pressure	Hypertension	Lactic acid bacteria							

< 목 차 >

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

최종보고서				보안등급			
				일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]			
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		기술사업화	
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)		공공기술 사업화 촉진(융복합)	
공고번호		제 농축2021-41호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
				연구개발과제번호		821028-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 LA0908	80 %	2순위 소분류 LA0906	20 %	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품과학기술분류	1순위 소분류 PA0201	60 %	2순위 소분류 PA0102	40 %	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문		-			
		영문		-			
연구개발과제명		국문		혈압조절에 도움을 줄 수 있는 신규한 유산균 포스트바이오틱스 소재 개발			
		영문		Development of new lactic acid bacteria post-biotic materials that can help control blood pressure			
주관연구개발기관		기관명		(주)노바락토		사업자등록번호	
		주소		(우)34016 대전광역시 유성구 테크노3로 한신에스메카 632호		법인등록번호	
						476-88-01446	
						160111-0537592	
연구책임자		성명		황용진		직위	
		연락처		042-368-9731		대표이사	
		직장전화				휴대전화	
		전자우편				국가연구자번호	
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)			
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31 (1년 9개월)	
				2단계		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년 개월)	
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금	
		현금		현금		지방자치단체 기타()	
		현물		현물		합계	
						현금	
						현물	
						합계	
						연구개발비 외 지원금	
총계		732,000		8,900		236,100	
						740,900	
						236,100	
						977,000	
1단계		1년차		200,000		67,000	
						200,000	
						67,000	
						267,000	
		2년차		266,000		89,000	
						266,000	
						89,000	
						355,000	
2단계		1년차		266,000		8,900	
						80,100	
						274,900	
						80,100	
						355,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위	
		휴대전화				전자우편	
						비고	
						역할	
						기관유형	
공동연구개발기관		한국식품연구원		임상동		우수연구원	
		동국대학교		강석성		조교수	
		네오뉴트라(주)		서은정		차장	
위탁연구개발기관		네이처런스(주)		김미경		대표이사	
						공동	
						정부출연연	
						대학	
						공동	
						중소기업	
						위탁	
						중소기업	
연구개발담당자 실무담당자		성명		황용진		직위	
		연락처		042-368-9731		휴대전화	
						전자우편	
						국가연구자번호	
						대표이사	

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

2024년 02월 28일

연구책임자: 황 용 진 (인)

주관연구개발기관의 장: (주)노바락토 대표이사
 공동연구개발기관의 장: 한국식품연구원장
 공동연구개발기관의 장: 동국대학교산학협력단장
 공동연구개발기관의 장: 네오뉴트라(주) 대표이사

황용진 (직인)
 백형희 (직인)
 이 경 (직인)
 강제학 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

1. 연구개발과제의 개요

1) 사업화 추진배경 및 필요성

가) 산업의 특성

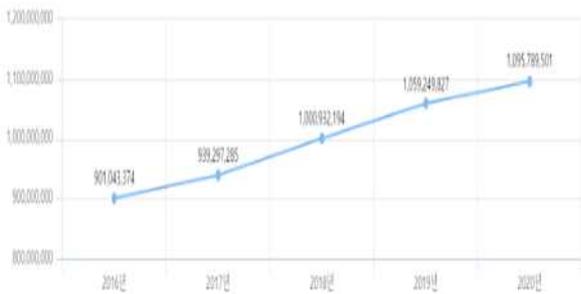
- 건강기능식품산업은 단순한 영양보충의 기능에서 벗어나 각종 질환의 예방·개선 등, 그 활용범위가 확대되고 있음. 고혈압은 만성 질환으로 유병률 및 재발율이 높아 지속적인 관리가 필요하므로 섭취가 용이한 건강기능식품 사용 시 효율적인 관리가 가능함,

나) 산업의 성장성

- 건강기능식품산업시장은 COVID시대의 도래와 함께 2020년 약 5조원으로 성장하고 있으며 연평균 6.6%의 꾸준한 성장성을 보이고 있으며, 각종 질환의 예방·개선·치료의 범위까지도 그 시장성을 확대하고자 하고 있으며, 특히 고혈압과 같은 만성 질환의 경우 유병률 및 재발율이 높고 지속적인 관리가 매우 필수적인 지표여야 하기 때문에 향후 만성질환 기능성의 건강기능식품 산업시장은 지속적으로 성장이 예상됨.

다) 경기변동의 특성

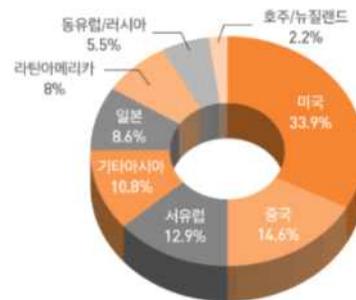
- 건강보조 기능 및 질환 개선, 예방에 도움을 줄 수 있는 천연의약품(natural medicine)으로서 역할이 강조되고 있으므로, 경기변동 민감도 낮음.



< 만 20세 이상 인구 고혈압 유병률 추이 >



<만 20세 이상 고혈압 인구 현황 요약>



<세계 건강기능식품 시장 규모>

<글로벌 건강기능식품 시장 지역별 점유율>

*출처: 한국식품과학회 대두가공이용분과 홈페이지(<http://www.soy.net.org/>); 리딩투자증권 리서치센터 홈페이지 (<http://www.leading.co.kr>); Korea Hypertension Fact sheet 2020; 건강보험심사평가원(2021)

<고혈압 유병률 추이 및 세계건강기능식품 시장 규모>

라) 경쟁요소

- 기존 혈압 조절 건강기능식품(저효능, 부작용) 대비 안전성 및 효능이 검증된 혈압 조절 기능성 포스트바이오틱스 제품을 개발함으로써 시장에서의 경쟁력 향상 및 비교우위를 선점할 수 있음.

마) 관련법령 또는 규제사항

- 건강기능식품의 안전성 제고를 위해 제조업 허가, 기능성 원료 및 기준규격, 품목제조 신고 등의 건강기능 식품에 관한 법률이 제정·시행되고 있음.

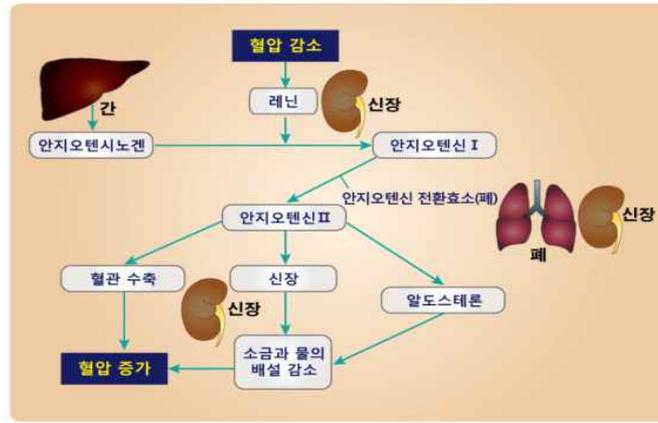
2) 사업화 대상 기술

가) 본 과제와 사업화대상기술의 연관성

- 주관기관의 사업화대상기술 이전 필요성
 - 최근 유산균 산업은 '낮은 생균수로 인한 효능 저하 및 독성으로 인한 부작용', '수입 균주의 무분별한 사용으로 인한 생산 단가 증가'와 생물다양성협약 관련 로열티 지급 문제' 등이 선결과제로 꼽히고 있음.
 - 사업화대상 기술인 「ACE(안지오텐신 전환 효소) 억제능이 있는 신규한 균주」 기술은 엔테로코커스(Enterococcus) 종과 락토바실러스(Lactobacillus) 종으로 구분되는 유산균을 사균화 처리 후 획득한 포스트바이오틱스 성분에 의해 ACE가 약 97% 억제되었으며, 그로 인한 혈압 조절 효과를 입증함.
 - 포스트바이오틱스는 유산균이 대사를 통해 배지조성 성분을 분해하여 기능성 대사산물을 포함하고 있으며 이를 사균화하여 안전하고 항생제와 병용해도 효능이 유지, 장기 보관 및 유통이 가능하고 제형에 다양한 제형화 및 여러 제품군에서의 활용이 가능하다는 우수성이 확인됨.
 - 이는 당사에서 추진하고자 하는 우수한 효능 및 부작용이 없는 포스트바이오틱스 제품 개발 계획에 부합하다고 판단되므로 사업화대상기술의 이전이 반드시 필요하다고 판단하여 사업화를 위해 한국식품연구원과 관련 핵심 특허기술이전을 2020년 3월 1일 이전받아 2020년 3월 18일 특허등록을 완료함.
- 대상기술의 적용가능분야(아이템, 제품)와 주관기관 주력 제품의 연관성
 - 주관기관인 노바락토는 포스트바이오틱스 제품군을 주력 상품으로 하여 사업을 수행 중이며 주력상품에 원재료로 사용되는 유산균의 경우, 최근 생균수 저하로 인한 낮은 효능 및 부작용 유발 등의 문제를 야기함.
 - 이에, 대상기술의 배양 후 사균화 처리 과정을 거친 기능성 포스트바이오틱스 소재를 이용함으로써 효능 및 부작용 문제를 해결할 수 있으며 現 프로바이오틱스 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 사료됨. 이에 따라 대상기술과의 연관성은 매우 높음.

나) 사업화대상기술의 개요

- 현대 성인병의 대표적인 질환인 고혈압은 대부분을 본태성 고혈압으로 레닌-안지오텐신-알도스테론(renin-angiotensin-aldosterone)계의 불균형으로 발생함.
- 안지오텐시노겐(angiotensinogen)이 레닌의 특이적 분해를 받아서 안지오텐신 I을 생성하고 이는 다시 안지오텐신 전환효소(ACE)에 의하여 혈관수축작용을 하는 안지오텐신 II를 생성함.
- ACE는 또한 혈관 이완작용을 가진 브레디키닌(bradykinin)을 분해하여 불활성화 시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 함.



*출처: 식품의약품안전평가원(2019), 건강기능식품기능성 평가 가이드 ‘혈압조절에 도움을 줄 수 있음’
 <레닌-안지오펜신-알도스테론계>

- 혈압의 상승에는 ACE의 관여가 크므로 혈압의 강하에는 ACE의 저해가 필수적임. 식품산업에서 유산균에 의한 우유발효로 생성된 ACE 억제물질은 기능성 소재로 그 활용 가치가 높음. 우유발효의 스타터(starter)인 유산균은 세포표면 단백질분해효소를 합성하고 유단백을 가수분해하며 배지에서 일부 펩타이드(peptide)를 방출할 수 있음.
- 펩타이드는 박테리아의 성장에 모두 사용되지 않기 때문에 다량의 펩타이드가 발효 중에 축적됨. 스타터로서 락토바실러스와 엔테로코커스로 발효된 일부 유제품은 동물실험에서 혈압 조절 활성이 입증된 바 있음.
- 국내에서는 한 유가공업체에서 혈압을 낮추는 발효유가 판매된 바 있으나, 주요 발효 균주는 수입에 의존하고 있는 실정으로 국내에서 개발된 유산균을 이용하여 제품을 만듦으로써 유산균의 수입 대체효과와 더 나아가 외국에 수출할 수 있는 국제경쟁력을 키울 수 있으리라 여겨짐.
- 본 사업화대상기술은 ACE 억제활성이 우수한 유산균(락토바실러스 종)을 원유에서 혈압 조절 활성이 있는 기능성원료로서 분리하고 선별하여 적합여부를 평가하기 위하여 신규한 균주의 생리적 특성 연구를 수행함.

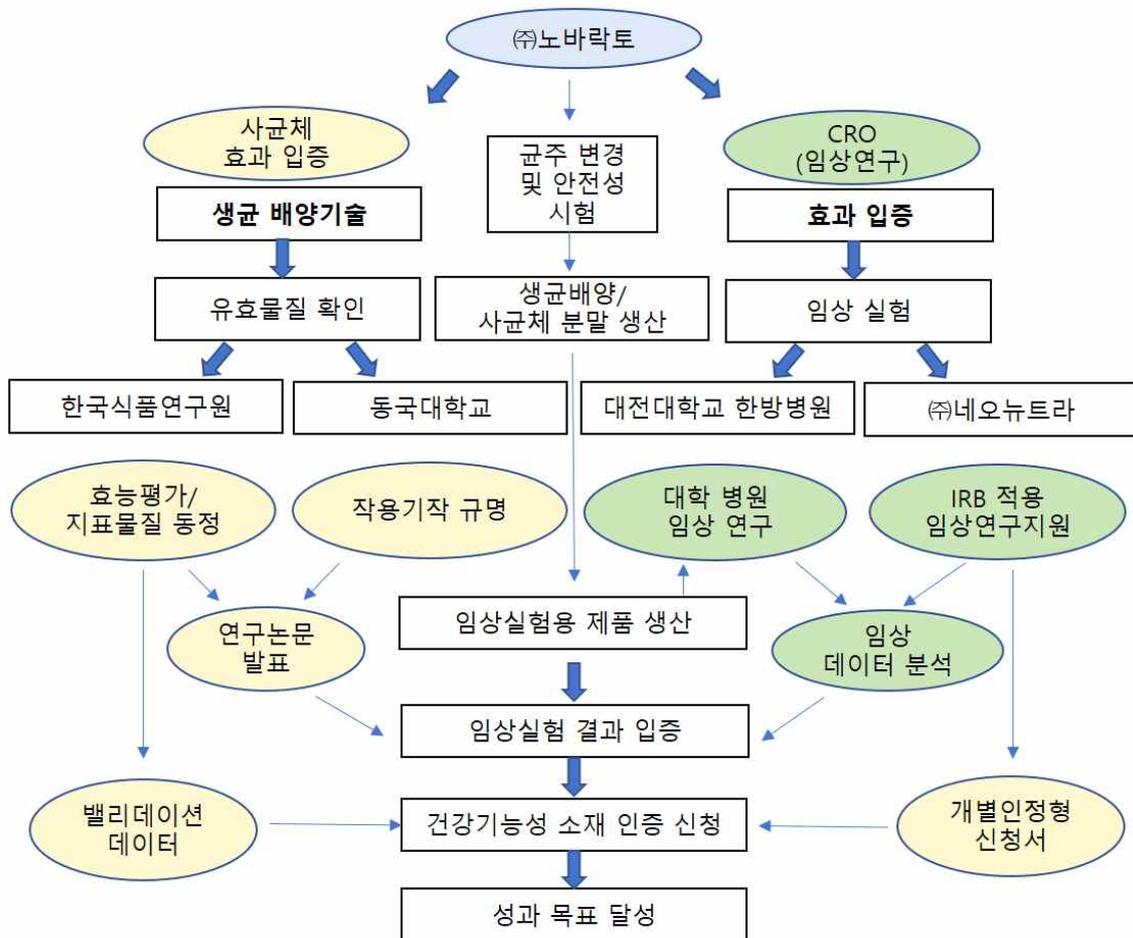
다) 사업화대상기술의 핵심경쟁요인

- 생균 수가 규격 기준으로 제시된 프로바이오틱스는 상온에서 급격한 균 감소, 고비용 냉장 유통, 가공·유통 중 부발효 발생 등의 단점이 있으며 또한, 프로바이오틱스의 부작용 및 무분별한 해외 균주의 수입으로 관련 산업 침체 및 저성장이 우려되는 상황임.
- 이에 반해 사업화대상기술의 혈압 조절 활성 발효유는 특정 미생물이 만들어낸 인체에 이로운 작용을 하는 대사산물(metabolite)로 구성된 포스트바이오틱스(postbiotics)제품으로 ▲프로바이오틱스를 사균화하여 포스트바이오틱스만을 추출하므로 안전함, ▲항생제와 병용해도 효능이 유지, ▲장기 보관 및 유통이 가능, ▲제형에 제한이 없어 섭취가 용이, ▲다양한 제형화 및 여러 제품군에서의 활용이 가능하다는 우수성이 확인됨.
- 당사는 제품 가공·생산 경제성 확보와 소비자가 안전하고 다양한 형태로 섭취·활용할 수 있도록, 국내 균주를 활용한 포스트바이오틱스를 이용한 혈압 조절 기능성 소재를 개발·판매하고자 함.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

해당 과제 계획 시 선발된 균주인 *Lactobacillus zeae* RMK354, *Enterococcus faecalis* RMB46으로 과제를 수행 중이었으나 해당 2개의 균주에 대해 식품의약품안전처 (이하 식약처)에서 두 균주가 고시형 균주가 아니라 안전성과 관련된 이슈를 제기하여 공동연구기관인 한국식품연구원과 협의하에 김치에서 분리한 *Lactiplantibacillus plantarum* K6, *Lactiplantibacillus plantarum* K79 2개의 균주를 선발함.

○ 연구개발 수행 체계



○ 참여기관별 수행내용 요약

수행기관	단계별	주요 수행 내용
주관기관 (노바락토)	1단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화 및 안전성 입증 자료 확보 - 혈압 조절 기능성 균주 변경 및 선정 - 혈압 조절 기능성 균주 전장유전체 분석 - 혈압 조절 기능성 소재의 규격 및 특성 확정 - 혈압 조절 기능성 소재의 안전성 입증 자료 확보 <ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 준비 및 추진 - 인체적용시험용 제재 생산 <ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압 조절 써플리먼트 사업화 추진 준비 - 혈압 조절 관련 시장 조사 및 사업화 방향성 수립 - 제형화의 정립 - 소재의 효능과 안전성 NEES 개선
	2단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료 - CRO와 협력하여 인체적용시험 모니터링 - 인체적용시험 완료 후 최종 결과 확정 <ul style="list-style-type: none"> ○ 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청 - 지표성분 정량분석 밸리데이션 레포트 작성 중 - 기능성 소재 인증 신청서 작성 중 <ul style="list-style-type: none"> ○ 다양한 제품화 및 판로개척을 통한 기능성 소재의 사업화 진행 - 연구동향 및 시장트렌드 파악 - 개별인정형 소재 신청 전 매출신장을 위한 제품화 진행
공동연구기관 (한식연)	1단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압조절 기능성 균주 분리·동정과 기능성 파악 및 특성조사 -바이오컨버전 최적 배양조건 확립 -바이오컨버전 산물에 대한 ACE 억제 활성 측정 -ACE 억제능 선발 균주의 특성 조사 -반응표면분석법(RSM)을 이용한 배양조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> ○ 소재의 혈압 조절 peptide 분리 -소재의 전처리 조건 설정 -소재의 분획 -소재의 peptide 분리 정제 -아미노산 배열 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ In vivo 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 개시 -고혈압 동물모델을 이용한 혈압 저하 평가
	2단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소재의 혈압 조절 peptide 분리 - 펩타이드 분리 방법 정립 - 펩타이드 단백질 구조 구명 <ul style="list-style-type: none"> ○ In vivo 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가 완료 - 일반증상 관찰 - 혈압 측정 - 혈액 분석 - 혈압 관련 바이오마커 확인 - 신장에서의 단백질 발현 확인
공동연구기관 (동국대학교)	1단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ In vitro 모델을 통한 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구 - Endothelial nitric oxide 생성 연구 - eNOS 발현 연구
	2단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ In vitro 모델을 통한 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구 - Akt 인산화 연구 - Rho/ROCK 발현 억제 연구 - Ca²⁺ channel 활성 연구
공동연구기관 (네오뉴트라(주))	1단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험 계획서 (프로토콜) IRB 승인 및 인체적용시험 개시
	2단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험 완료 및 건강기능식품 개별인정 신청 - 인체적용시험 IRB 승인 결과 보고서 - 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청
위탁연구기관 (네이처런스(주))	1단계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압 조절 기능성 소재 생산 공정 개발 - 5 L Jar fermenter를 이용한 시험생산 진행 - 생산공정 확립을 위한 시험생산 수행 ○ 인체적용시험용 제재 생산 - 300 L 발효조를 이용한 인체적용시험용 제재 생산

○ 혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화 및 안전성 입증 자료 확보

(1) 혈압 조절 기능성 균주의 전장유전체 분석

- 선발한 균주 모두 식약처 「건강기능식품의 기준 및 규격」 제 3. 개별 기준 및 규격(2-51 프로바이오틱스)에 고시된 균종 17종으로서(그림 1), 식경험도 있고 부작용 보고 등이 없는 *Lactiplantibacillus plantarum*이지만 새로운 기능성 원료로 개별인정형을 받기 위해서 안전성 평가와 관련하여 전장유전체 분석은 필수적으로 진행해야함.
- 또한 공동연구기관인 한국식품연구원과 네오뉴트라와의 협의 과정에서 선발된 균주의 전장유전체 분석을 먼저 선행해 해당 균주들의 유전자 구조의 규명과 함께 항생제 내성 및 독성 유전자 존재 유무를 확인하여 균주의 안전성을 검증하고 사용 가능 여부를 판단하는 것이 좋을 것으로 사료되어 본 과제 차년도 계획에 예정되어 있던 안전성 평가를 해당 연도로 앞당겨 진행함.

<ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Lactobacillus</i> : <i>L. acidophilus</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. gasser</i>, <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>, <i>L. helveticus</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>L. paracasei</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. reuteri</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. salivarius</i> ■ <i>Lactococcus</i> : <i>Lc. lactis</i> ■ <i>Streptococcus</i> : <i>S. thermophilus</i> ■ <i>Bifidobacterium</i> : <i>B. bifidum</i>, <i>B. breve</i>, <i>B. longum</i>, <i>B. animalis ssp. lactis</i> 	
※ 고시 제2021-65호(2021.7.29.), 시행일(2024.1.1.)	
	종류(학명)
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasser</i> , <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i>
<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
<i>Limosilactobacillus</i>	<i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i>
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>Ligilactobacillus</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. animalis ssp. lactis</i>

그림 1. 식품의약품안전처 프로바이오틱스 고시형 균주 17종

- 균주의 순수분리를 위해 MRS agar plate에 streaking 하여 얻어진 colony를 MRS broth에 접종하여 37℃에서 18~24시간 배양한 배양액을 centrifuge 하여 cell down 시켜 배지를 제외한 sample을 분석 기관에 보내 DNA prep부터 전장유전체 분석을 의뢰함. 전장유전체 분석은 ㈜씨제이바이오사이언스 (구 천랩) 에 의뢰하여 Pacbio sequencing 진행함.

- 분석된 전장유전체 결과, 즉 선발된 균주의 염기서열 정보를 가지고 16S rRNA 유전자뿐만 아니라 모든 세균의 core gene set에 속하는 *recA*, *rplC* 유전자를 이용하여 query와 유사한 종들을 분석함. 또한 다양한 분석 포털을 사용하여 항생제 내성 및 독성 유전자의 확인 및 분석을 진행함. 항생제 내성 유전자 및 독성 유전자는 천랩에서 제공하는 프로그램인 TrueBac에서 1차로 먼저 확인 후 항생제 내성 유전자는 CARD, 독성 유전자는 VFDB를 통해 이중으로 확인함.

(2) 혈압 조절 기능성 균주의 원료 표준화

- 해당 균주는 ACE 저해 활성을 통해 항고혈압 기능을 가짐. 젖산 균주에 의해 우유 발효 중 항고혈압 peptide를 생성하고 in vitro 상에서 낮은 ACE 억제활성 (IC50=1000 μM)을 보인 peptide β 169-175를 carboxypeptidase A로 가수분해시켜 본태성 고혈압 쥐 (SHR)에 경구투여 시켰을 때 뚜렷한 고혈압 감소를 보였다는 기존 연구결과를 기반으로 공동연구기관인 한국식품연구원에서 항고혈압 peptide 분리와 관련된 연구가 완료되면 해당 peptide를 지표 물질로 선정하기로 결정함. 본 연구기관은 항고혈압 peptide 이외 가능한 지표 물질을 검토하는 작업을 진행함.

-본 연구기관에서는 건강기능식품 개별인정형 원료의 표준화와 관련해 지표 물질 선정을 위해 해당 균주가 발효 결과물로 젖산을 주로 생성하는 젖산균주임을 감안하여 시간별 배양한 발효유를 가지고 유기산 분석 및 사균체 측정을 진행함.

-균주의 순수분리를 위해 MRS agar plate에 streaking 하여 얻어진 colony를 MRS broth에 접종하여 37℃에서 18~24시간 배양한 배양액을 centrifuge 하여 cell down 시켜 MRS broth 1 ml로 현탁하여 10% skim milk 배지에 접종함. 접종한 배지를 6시간, 12시간, 24시간 별로 정지 배양함.

-배양시간별 발효유 sample을 50 ml 씩 분석 기관에 보내 유기산 분석을 진행함. 유기산 분석은 식약처로부터 식품위생검사기관으로 지정받은 한국기능식품연구원(KHSI)에 의뢰하여 진행함. 한국기능식품연구원에서 유기산 분석을 건강기능식품공전 제 4. 건강기능식품 시험법, 3. 개별 성분별 시험법 3-36 구연산 시험방법에 근거하여 분석함.

-해당 균주를 최적 배양 조건에 따라 균주를 배양하여 사균화 및 분말화 공정을 시험 진행함. Skim milk 1 L에 선발 균주를 접종한 발효유를 80℃에서 20~25분간 증탕하여 사균화 함. 사균화 한 발효유를 한국화학연구원(KRICT)에 기술지도를 받아 spray dry 과정을 진행하여 분말화하고 현미경 측정을 진행함.

(3) 혈압 조절 기능성 소재의 규격 및 특성 확정

-식약처에서 고시한 건강기능식품의 기준 및 규격 적용 절차 및 적용해야 할 규격(그림 2)에 따라 기능성 소재의 기준 및 규격 확정을 위해 제조한 원료를 중금속(납, 카드뮴, 총비소 및 총수은; 3 Lot; Raw data 포함), 미생물(대장균군; 3 Lot; Raw data 포함), 잔류농약 5종 (BHC, DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin; 1 Lot; Raw data 포함), 영양성분(조단백질, 탄수화물, 조지방, 회분, 수분, 열량, 나트륨; 1 Lot), 성상 (3 Lot; Raw data 포함)에 대한 분석을 실시함.

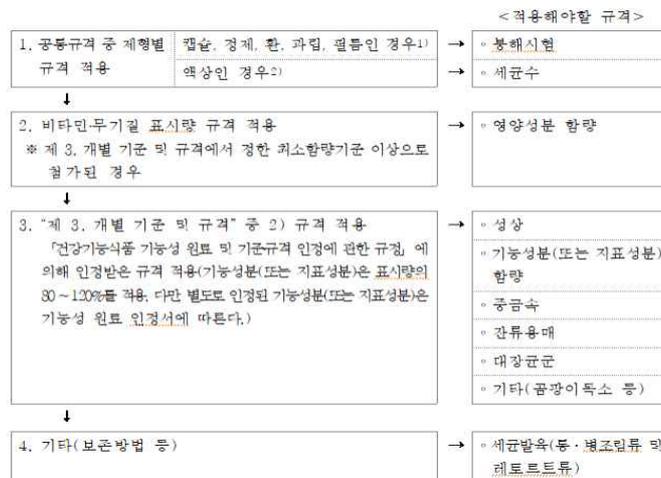


그림 2. 건강기능식품의 기준 및 규격 적용 절차

-아래의 표 1에서 나타난 바와 같이 식약처에서 지정한 식품 전문 시험·검사기관 중 건강기능식품 분야를 다루며 위에서 제시한 시험검사 항목을 모두 진행할 수 있는 기관을 선정하여 한국식품산업협회 부설 한국식품과학연구원을 통해 해당 분석들을 진행함.

표 1. 식품전문 시험·검사기관 지정 현황

연번	지정번호	기관명	업무범위	분야	시험검사항목	유효기간
1	제001호	한국식품산업협회 부설 한국식품과학연구원	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사), 표시검사, 품목제조가공검사, 식품안전관리인증검사	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사, 식품조사처리확인, 방사능	25.08.06
2	제026호	한국식품산업협회 부산지원	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사), 표시검사, 품목제조가공검사, 식품안전관리인증검사	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사	25.08.06
3	제035호	(주)한국분석기술연구원	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사), 표시검사, 식품안전관리인증검사	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사	25.08.06
4	제038호	(사)한국진강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사), 품목제조가공검사	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 방사능, 유전자변형식품, 식품조사처리확인	25.08.06
5	제042호	(주)코젠바이오텍	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품	유전자변형식품의 정성검사	25.08.06
6	제045호	한국에스지에스㈜	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사), 품목제조가공검사	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사, 방사능	25.08.06
7	제054호	(주)정피엔씨연구소	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품, 식품첨가물	유전자변형식품의 정성검사	25.06.19
8	제085호	(주)네오시스코리아	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품	방사능	22.10.15
9	제117호	하나원저력기술㈜ 환경영사능분석센터	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	방사능	23.03.09
10	제129호	방사능분석센터㈜	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	방사능	24.01.22
11	제133호	(주)핀어칼 CALS지정	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품, 식품첨가물	유전자변형식품의 확인검사	24.11.26
12	제146호	주식회사 알엠택	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품	방사능	23.08.30
13	제147호	(㈜)한국유료분석분석서비스	전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품, 식품첨가물, 기구 및 용기·포장	다이옥신	24.02.25
14	제148호	(사)KOTIT시험연구원	자가품질위탁검사, 전문 시험검사(수입검사, 검사명령검사, 수거검사)	식품, 건강기능식품, 식품첨가물	방사능	24.10.06

(4) 혈압 조절 기능성 소재의 안전성 입증 자료 확보

-과제 선정 당시 대상 기술에 적용하는 균주인 *Lactiplantibacillus plantarum*이 식약처 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」에 고시되어 있는 17종 균주 중 하나이며 식경험이 풍부하고 국내·외 문헌 등 독성 보고사례, 인정·유통 현황 중 부작용 사례 등이 없어 식약처에서 안전성에 관한 자료 중 기본 독성 시험 자료(단회투여독성시험, 90일 반복투여독성시험, 유전독성시험 중 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)를 필수로 요구하고 있지 않았음. 하지만 최근 식약처에서 유산균의 사균체와 관련하여 기본 독성 시험 자료를 요구하고 있는 추세임.

-따라서 당사는 식약처의 최근 요구사항에 최대한 맞춰 기본 독성 시험 자료를 준비코자 해당 기술에 적용 중인 *Lactiplantibacillus plantarum*이 식경험에 대한 자료가 풍부하며 제품화도 많이 이루어지고 있는 고시형 균주를 사용한 원료라는 것과 식용으로 일반 마트에서도 쉽게 구할 수 있는 탈지 분유로 배지를 사용했다는 것을 강조하여 비용과 시간이 가장 많이 소요되는 90일 반복투여독성시험을 제외한 나머지 시험 항목을 진행하여 안전성에 관한 자료를 갈음하는 것으로 추진하고자 함.

-식약처 고시 「의약품 등의 독성시험기준」에 따라 GLP 규정을 준수하는 기관들 중 당사의 현 상황에 맞춰 시험검사를 문의한 결과, 업체마다 필요로 하는 사항과 비용이 상이하였음. 비교했을 때 당사의 사정에 맞게 필요 항목만 진행 가능하며 비용적인 측면에서 가장 합리적이고 시험 의뢰 시 시험 과정을 실사로 확인할 수 있다는 장점을 고려하여 (주)바이오독스텍에 의뢰하는 것으로 결정함.

-1차년도에 개발된 대량 생산 공정에 의하여 위탁 기관인 네이처런스(주)에서 생산된 기능성 소재를 원료로 하여 시험검사 의뢰함.

○ 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 준비

(1) 인체적용시험용 제제 생산

-1차년도에 개발된 대량 생산 공정에 의하여 위탁 기관인 네이처런스(주)에서 인체적용시험용 제제 (이하 IP로 표기)를 생산함. IP 생산은 공동연구기관인 (주)네오뉴트라 (이하 CRO로 표기)의 「IP 생산 가이드」를 참고하여 생산함.

-4종의 균주는 MRS 액체배지를 사용하여 37 °C에서 24시간 동안 배양 후 70% 농도의 글리세롤과 혼합하여 -70 °C 동결보존하였고 5 L 발효평가 종균으로 사용하였음. 5 L 평가 후 선정된 균주는 (주)메디오젠사에서 종균 분말화 과정을 거쳐서 300 L 대량생산 개발공정의 종균으로 사용하였음.

-대량 생산공정 개발에 사용된 발효배지 조성은 다음과 같음. 종균 배양 단계에서는 BD사의 MRS 시약용 배지를 55.0 g/L의 농도로 액상 제조하여 사용하였고 대량생산 개발공정의 발효에는 표 2. 조성의 농도로 발효배지를 제조하여 사용하였음.

표 2. 대량생산 개발공정에 사용한 배지조성

배지 성분		대량생산 개발공정	발효배지 평가		시제품생산	비고
		균주평가 (5 L)	(5 L)		(300 L)	
발효 배지	Glucose		10.0	10.0	10.0	삼양사
	환원탈지분유	100.0	135.0	135.0	135.0	서울우유
MRS	Yeast extract			5.0		Difco
	Sodium acetate			5.0		삼전화학
	Dipotassium hydrogen phosphate			2.0		삼전화학
	Sodium citrate			2.0		삼전화학
	Magnesium sulfate			0.1		삼전화학
	Manganese sulfate			0.05		삼전화학
	Polysorbate 80			1.0		삼전화학

-5 L 발효 평가에 사용될 종균을 배양하기 위해 MRS 액체 배지를 250 ml pyrex bottle에 200 ml 넣고 121 °C에서 15분 동안 멸균하였음. 동결 보존된 균주를 1 ml 농도로 멸균된 MRS 액체배지에 접종하고 37 °C에서 18시간 동안 정치 배양한 후, 5 L 발효조의 종균으로 사용하였음.

-대량생산 개발공정에 사용될 균주 평가와 발효 배지 최적화를 위하여 5 L 발효기를 사용하여 평가하였음. 본 실험에 사용된 5 L 발효기는 pH 유지와 혐기적 배양을 위해 pH 조절기와 질소 공급 장치가 부착된 회분식 발효조 (Hanil R&D)를 사용하였음 (Fig. 3).

-표 3.의 조성에 따른 농도로 배지 성분을 첨가하고 2.5 L 부피로 발효 배지를 제조하여 균주 평가와 발효배지 최적화 평가를 수행하였음. 또한 배지 제조시 온도에 따른 환원탈지분유의 변성을 평가하기 위해서 멸균(121 °C, 15분)과 살균(90 °C, 5분) 방법으로 배지를 제조하여 평가하였음.

-5 L 발효 평가는 1차 배양된 종균을 25 ml 농도로 접종하고 37 °C에서 24시간 50 rpm의 속도 교반하며 배양하였음. 발효액의 pH를 6.0으로 조절할 경우, 25% 암모니아수를 사용하여 pH를 조절하였으며 혐기적인 조건을 유지하기 위해서 질소를 연속적으로 주입하였음.

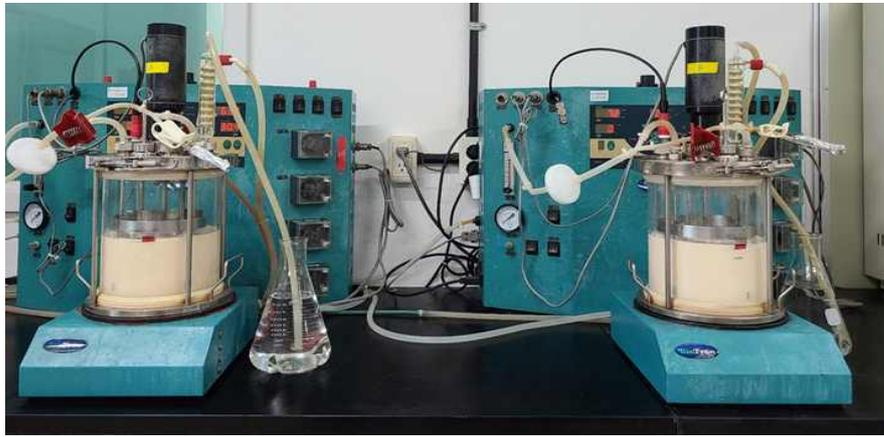


Fig. 3. Picture of 5 L Jar fermenter (Hanil R&D)

-본 실험에서는 균주 평가를 통하여 선정된 균주를 (주)메디오젠에 의뢰하여 분말화된 종균으로 제조하였고 이를 제공받아 300 L 발효의 종균으로 사용하였음. 150 g의 분말화된 종균을 1,350 ml의 발효 배지에 첨가하고 37 °C에서 90 rpm의 조건으로 1시간 현탁하여 활성화된 상태로 300 L 발효기에 접종하였음.

-대량 생산공정을 개발하기 위해서 KOBIOTECH사 (diameter, 53.5 cm; height, 145.6 cm; Korea Fermentor Co., Ltd., Incheon, Korea)와 CELLTECH사 (diameter, 54.0 cm; height, 143.0 cm; Celltech Co., Ltd., Chungcheongnam-do, Korea)의 300 L 회분식 발효조를 사용하였음(Fig. 4).

-본 배양기는 pH 유지를 위해서 pH 조절기와 디스크 터빈 타입의 교반봉을 장치하고 있고 혐기적 배양을 위해 질소 공급장치를 부착하였음. 135 g/L 환원탈지분유와 10.0 g/L의 포도당을 발효 배지로 사용하였고 300 L 발효조에 150 L 부피로 발효를 진행하였음. 발효 배지 성분인 환원탈지분유의 변성 및 최종 제품의 색도 유지를 위해서 멸균의 방법을 적용하지 않고 90 °C에서 5분간 배지를 살균하였음. (주)메디오젠에서 공급한 분말화 종균 현탁액 1,500 ml을 접종하고 37 °C에서 50 rpm의 속도로 교반하며 25~50 L/min 조건으로 질소를 주입하여 혐기적 발효를 진행하였음. 또한 사전 평가된 실험에서 배양 중 pH를 조절하지 않는 것이 혈압조절 효과가 우수하다는 결과에 따라 배양액의 pH는 조절하지 않았음.

-인체적용시험용 분말 생산 단계에서 300 L 배양은 총 2회 진행하였으며 최적화된 발효배지 조성을 적용하였고 혈압조절 효과가 있는 펩타이드의 생성이 가장 우수한 배양 종료 시점을 찾아 발효를 종료하였음. 또한 배양 종료 후, 발효액에 포함된 미생물의 살균 조건을 평가하였음. 살균이 종료된 시료는 사전에 평가된 분무건조법을 적용하여 분말화 공정을 진행하였음.



Fig. 4. Picture of 300 L fermenter. (A) KOBIO TECH, (B) CELL TECH

-300 L 배양 종료 후, 살균과 냉각이 완료된 시료를 이송용 용기(비닐 포장, 60 L 스텐 용기)에 나누어 담아 화인에프티로 이송하여 농축을 진행하였음. 농축 공정은 50 L/h의 처리용량을 가진 유진테크사의 농축기를 사용하였고 일반적인 식품을 농축하는 조건을 사용하여 진행하였음(Fig. 5). 농축방법은 시료를 교반이 가능한 2톤 크기의 농축 탱크에 넣고 680~700 mm/Hg의 진공조건에서 60 °C의 온도로 농축을 실시하였음. 농축이 완료가 되면 시료를 이송용기에 포장하여 분무건조기가 위치한 곳으로 이동하여 분무건조를 실시하였음.



Fig. 5. Picture of concentration system

-300 L 배양 종료 후, 살균과 냉각이 완료된 시료를 이송용 용기(비닐 포장, 60 L 스텐 용기)에 나누어 담아 가운팜으로 이송하여 동결건조를 진행하였음. 동결건조는 400 L 처리 용량을 가진 진진이앤씨사의 기기를 사용하였으며 일반적인 식품 건조에 사용하는 방법으로 진행하였음(Fig. 6).

-동결건조에 사용한 조건은 -30 °C의 건조 플레이트에 시료를 넣고 2~3일 동안 급속 냉동을 실시함. 시료의 냉동 상태를 확인 후, 진공펌프를 이용하여 시료가 포함된 건조 플레이트를 400 mm/Hg의 진공상태로 3일 이상 유지시킴. 시료에 포함된 수분이 모두 증발되면 시료의 온도가 30±2 °C로 상승하고 이를 확인 후 동결건조를 중지시킴. 동결건조가 완료되면 무균적인 조건에서 시료를 회수하였음.



Fig. 6. Picture of freeze dryer system

-배양 혹은 농축이 완료된 시료를 이송용 용기(비닐 포장, 60 L 스텐 용기)에 나누어 담아 화인에프티로 이송하여 분무건조를 진행하였음. 분무건조는 50 L/h의 처리용량을 지닌 노즐타입의 유진테크사 기기를 사용하였으며 일반적인 식품 건조에 사용하는 방법으로 진행하였음(Fig. 7). 분무건조에 사용한 조건은 200 ± 5 °C inlet temp.와 90 ± 5 °C outlet temp.를 적용하여 건조하였음.



Fig. 7. Picture of spray dryer system

-위와 같은 방법으로 4종의 유산균을 생산균주로 평가하였고 대량생산에 적합한 균주를 선정하였음. 그리고 선정된 균주를 이용하여 5 L 발효조에서 대량생산에 적합한 발효배지 및 최적 생산공정 평가를 진행하였고 300 L 발효조에서 대량생산 공정을 수행하였음. 300 L에서 대량 생산된 발효액을 사용하여 인체적용시험용 시제품의 분말화 공정 평가를 진행하였음.

-분말화 공정은 일반적인 식품소재의 분말화에 사용되는 분무건조 (Spray dryer) 방법과 동결건조 (freeze dryer) 방법을 적용하여 평가하였음. 실험 결과 동결건조 방법보다 건조시간이 빠르고

비교적 생산단가가 저렴한 분무건조법을 인체적용시험 시제품 제조방법으로 채택하였음 (Fig. 8.). 분무 건조법으로 생산된 건조 분말은 인체적용시험용 제재로 사용함.

-생산된 IP를 인체적용시험용 제제인 스틱 포 형태로 생산하기 위해 여러 업체 측에 문의한 결과 소량 생산 및 빠른 생산이 가능한 소분 포장 OEM 전문 업체인 스틱왕에서 진행하는 것으로 결정함.

-IP 포장 및 표기 사항에 대해서는 식약처의 「임상 시험용 의약품 표시기재 관리 방법 안내」, CRO의 「IP 생산 가이드」, 「IP 라벨링 가이드」를 참고하여 그림 9, 10과 같이 표기 사항을 기입한 라벨을 제작함.

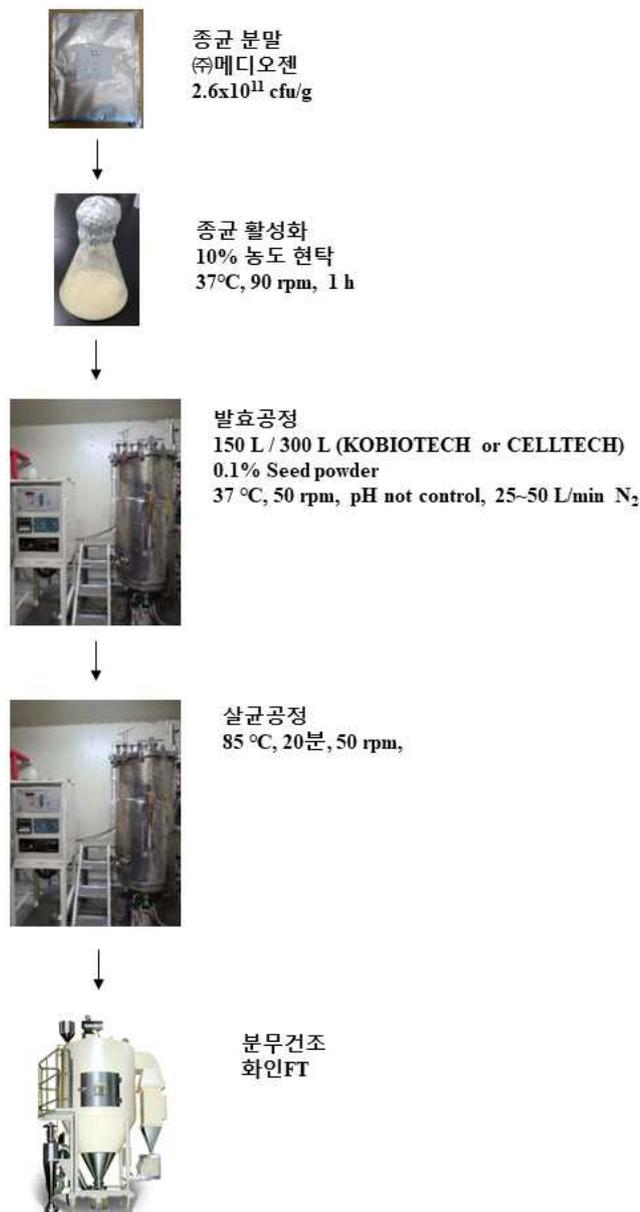


Fig. 8. Flow diagram of manufacturing of culture powder

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>임상시험용 "임상시험" 의 목적으로 사용할 수 없음</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 제품의 코드명: NVK79 또는 Placebo ■ 제조번호: 22631 또는 22632 ■ 고유코드번호: 01-R001-1 ■ 보관방법: 실온보관 ■ 사용기한: 2023.06.30 ■ 섭취방법: 1일 1회, 1회 1포 물과 함께 섭취 ■ 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오. ■ 임상시험용 의뢰자: (주)노바락로 </div>	<p style="text-align: center;">인체적용시험용</p> <ul style="list-style-type: none"> * 무작위배정번호: 01-R001 * 고유코드번호: 01-R001-1 * 인체적용시험계획서번호: NV_NVK79 * 제품의 코드명: NVK79 또는 Placebo * 제조번호: 22631 또는 22632 * 인체적용시험 계획 승인율 받은 자: (주)노바락로 대전광역시 유성구 태크노3로 65, 한신에스캐가 632호 042-368-9731 * 보관방법: 실온보관 * 사용(유효)기한: 2023년 6월 30일 * 섭취방법: 1일 1회, 1회 1포 물과 함께 섭취 <p style="text-align: center;">어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오. 본 제품은 "인체적용시험" 의 목적으로 사용할 수 없습니다.</p>
그림 9. IP 1차 라벨	그림 10. IP 2차 라벨

-1차 포장 라벨은 무작위 배정표에 따라 시험 식품과 대조 식품을 구별하여 날개마다 라벨을 부착함. 1차 라벨링이 완료된 후 「IP 라벨링 가이드」에 따라 1차 제공 (35포)과 2차 제공 (40포) 되는 양에 맞게 지퍼백에 담은 후 2차 라벨링을 진행함.

-이중눈가림을 위한 맹검봉투 제작을 위해 배정번호별로 해당 배정번호가 시험군 또는 대조군인지 표기하여 봉투에 봉인 후, 봉투 겉면에 해당 배정번호를 기재함.

-포장이 완료된 IP는 임상시험 기관에서 요청하는 IP 입고량에 따라 준비함. 준비된 IP를 일정한 온도에서 시험 기관까지 입고하기 위해 온도 트래킹을 할 수 있도록 이동식 일회용 온도기록계 (그림 11)를 준비함.

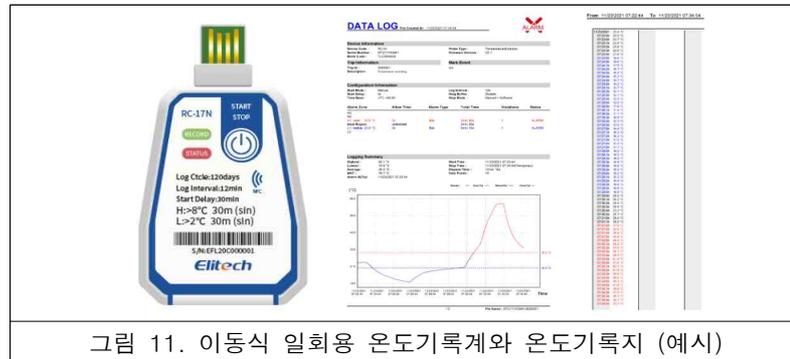


그림 11. 이동식 일회용 온도기록계와 온도기록지 (예시)

(2) 유산균수 분석

-배양액 시료에 포함된 유산균의 수를 분석하기 위해서 표준평판법을 사용하였음. 분석시료를 8.5 g/L의 농도로 제조된 멸균 생리 식염수에 단계별로 희석하여 MRS 고체배지에 도말하였음. 도말이 완료된 고체배지는 anaerobic pack(MITSUBISHI GAS CHEMICAL, Japan)이 포함된 용기에서 37 °C, 48시간 배양한 후 발생한 유산균의 집락을 계수하였음.

(3) 오염균 분석

-동결건조 및 분무건조된 최종 시제품의 오염도를 평가하기 위해서 건조필름법을 사용하였음. 시료를 8.5 g/L의 농도로 제조된 멸균 생리 식염수에 단계별로 희석하고 건조필름에 희석된 시료 1 ml을 분주하여 24~48시간 배양하였음. 일반세균의 오염 평가는 3M petrifilm aerobic count를 사용하였고 30 °C에서 배양하고 붉은색 집락의 오염균을 계수하였음.

-대장균 및 대장균군의 경우 3M petrifilm E.coli / coliform을 사용하였으며 37 °C에서 배양 후 푸른색 집락과 가스 발생 집락을 계수하였음. 진균의 오염 평가는 3M petrifilm Yeast and Mold를 사용하였으며 25 °C에서 7일 배양 후, 붉은색 집락을 계수하였음.

(3) 흡광도 및 배양 부산물 측정

-배양액의 미생물 균체의 성장을 측정하기 위해서 분광광도계를 사용하여 시료의 흡광도를 600 nm에서 측정하였고 UVIKON XS (Secoman, France) 모델을 사용하였음. 300 L 배양액에 포함된 포도당의 농도 및 미생물의 성장 부산물을 측정하기 위해서 Waters사의 HPLC 시스템을 사용하였음. 당 및 발효 부산물 측정은 Phenomenex사의 Rezex ROA organic acid H+ (150 × 7.8 mm) 컬럼과 SecurityGuard cartridges Carbo H (4 × 3.0 mm) 구성된 guard 컬럼을 사용하였음. 배양 종료액의 고형물 함량 및 건조 분말의 수분측정은 MX-50 모델(A&D)의 수분측정기를 사용하였으며 110 °C의 온도에서 측정을 진행하였음.

○ 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료

(1) CRO와 협력하여 인체적용시험 모니터링

-인체적용시험의 효율성을 높이기 위해 인체적용시험 과정과 데이터를 디지털로 전환하여 인체적용시험 수행에 필요한 톨과 수집된 데이터를 분석 및 제공하는 서비스 플랫폼인 cubeCDMS를 CRO에서 이용하고 있어 해당 플랫폼을 이용하는 것을 CRO에서 권유함.

-CRO에서 제시한 해당 플랫폼에 대한 검토를 진행한 결과 cubeCDMS는 정확한 eCRF(Case Report Form, 계획서에서 규정한 피험자와 시험물질에 관한 모든 정보를 기록하여 의뢰자에게 전달할 수 있도록 인쇄하거나 전자문서화한 서식) 데이터를 수집해 인체적용시험의 규모, 단계, 종류에 상관없이 진행상황을 실시간으로 확인하고 데이터를 관리할 수 있는 플랫폼인 것을 확인함. 또한 미국 식품의약국(FDA)의 21 CFR Part11을 준수해 데이터의 정확성·신뢰성·일관성 있게 수행할 수 있는 능력을 검증받았으며, FDA뿐 아니라 EMA(유럽), PMDA(일본) 규정도 준수하는 것을 확인함. 따라서 당사에서는 해당 플랫폼을 이용하여 CRO와 함께 인체적용시험 모니터링을 진행하는 것으로 결정함.

(2) 인체적용시험 완료 후 최종 결과 확정

-마지막 시험대상자의 인체적용시험이 완료된 후 맹검(Blinding)을 위해 만들어졌던 무작위배정번호를 공개하기 직전에 CRO와 블라인드 검토 회의(BRM, Blind Review Meeting)을 진행하여 분석대상군을 명확하게 정의하고 인체적용시험계획서에 위반한 자료에 대한 검토를 진행함.

-이는 이중맹검 해지 이전에 계획서 위반 또는 위배 내용을 확인하고 위반 정도에 따라 평가변수에 주는 영향력을 판단하여 분석군(PP set, FA set, Safety set)을 설정하고 문제가 있는 실험결과에 대한 조치를 취할 수 있는 기회임으로 분석대상군의 설정과 블라인드 검토를 신중하게 진행될 필요가 있음.

-따라서 당사는 블라인드 검토와 관련된 문헌들을 참고하였으며 CRO에서 전달한 BRM Agenda(BRM 진행 시 논의될 사항을 정리한 자료), Analysis Set Decision Table Before BRM(시험대상자별로 결과 등 자료를 정리하고 분류한 표), PD/PV list(시험 진행 중 발생한 PD/PV를 정리한 자료) 를 면밀히 살핀 후 BRM을 진행함.

-BRM에서 나온 결과를 바탕으로 분석군 설정이 결정되어 해당 내용을 토대로 통계분석을 진행하기 위해 인체적용시험 데이터를 Locking하는 것에 동의하여 CRO 측에서 통계분석을 진행함. CRO 측에서 완료한 통계분석 결과 초안을 전달받아 추가 분석에 대한 논의를 진행한 후 통계분석 결과를 확정하고 최종적으로 작성된 인체적용시험 결과 보고서를 검토 및 확정함.

○ 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청

(1) 개별인정 신청을 위한 자료 확보 : 표준화, 안전성, 기능성

-최근 식품의약품안전처에서 포스트바이오틱스 소재에 대하여 생균이 남아있지 않은 상태 (완전 사멸)인지 확인하기 때문에 최종 소재에 대한 유산균 수 분석 결과가 필요할 것으로 보인다라는 CRO 측의 의견에 따라 기능성 소재의 유산균 수 분석을 진행함. 유산균 수 분석은 식약처에서 지정한 공인시험기관의 성적서가 필요한 관계로 공인시험분석기관에 의뢰하여 진행함. 또한 식약처 공인시험방법에 따라 분석이 진행되었는지 확인하기 위해 Raw data를 함께 의뢰함.

○ 혈압 조절 써플리먼트 사업화 추진 준비

(1) 혈압 조절 관련 시장 조사 및 사업화 방향성 수립

-현재 혈압 조절 관련한 제품들은 식약처에 등록 된 기능성 원료인 코엔자임Q10을 가지고 제품들이 판매되고 있는 상황으로 종근당건강, 안국건강, 포뉴 등의 제약회사들의 제품군으로 대부분이 캡슐의 제형으로 물과 함께 섭취하여야 하는 제품들로 판매 되고 있음.(그림 12)



그림 12. 혈압 조절과 관련된 건강기능식품 판매 제품

-이런 제품들의 제형의 한계, 섭취의 한계를 극복하여 기존 시장에서의 소비자들의 불만과 새로운 제품에 대한 니즈를 소비자 조사를 통해 파악하여 내년에 획득할 항고혈압 써플리먼트를 가지고 다양한 제품을 출시하려고 함.

-유산균 제품에 대한 소비자 조사는 모바일 조사 링크를 통해 총 215명 대상으로 진행함. 30대 여성이 아닌 경우를 제외하고 최종 n=203을 결과 분석에 활용함(그림 13).

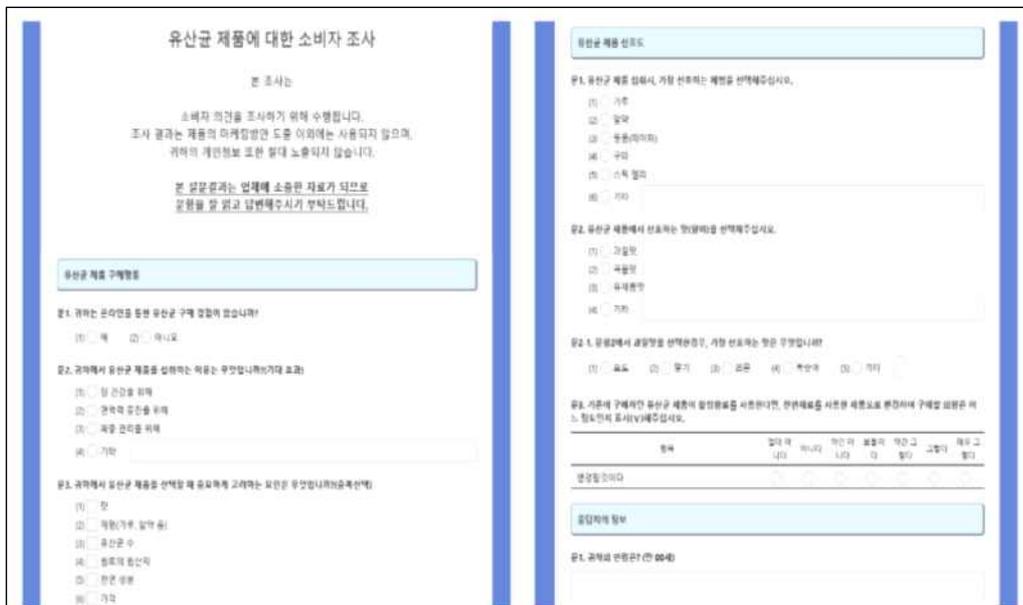


그림 13. 유산균 제품에 대한 소비자 조사 설문지 구성

표3. 건강기능식품 완제품 제형의 종류

제형	정의	특징
정제	일정한 형상으로 압축된 것	원형, 장방형 또는 강아지나 별모양과 같이 독특한 모양으로 제조 가능.
캡슐	연질 혹은 경질의 캡슐기체에 충전 또는 피포한 것	색소나 불투명화제로 다양한 색을 띠거나 불투명하게 제조 가능
환	구상(球狀)으로 만든 것	대부분 부피가 작아 복용이 용이하고 취급이나 휴대가 편리하여 냄새나 맛이 나빠 복용하기 어려운 건강기능식품의 제형으로 적당
과립	입자형태로 만든 것	응집된 분말을 재건조한 것으로 흡습성이 있어 유의
액상	유동성이 있는 액체	농축한 액상의 제형도 포함
분말	입자의 크기가 과립제품보다 작은 것	응집력이 있지만 비교적 약한 제품에 적용. 크기에 따라 입체, 분체, 미분체, 초미분체로 분류
페이스트	점성이 강한 유동성의 반 고상의 것	물을 가하지 않고 그대로 섭취할 수 있다는 장점 보유
시럽	점성이 약한 유동성의 반 액상의 것	불쾌한 맛이 있는 건강기능식품에 감미, 향미의 첨가를 통해 섭취를 용이 먹기 쉽게 만들어 줌
겔	액상에 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 있는 고체나 반고체 상태의 것	일정량의 액체를 큰 부피증가 없이 흡수 가능
젤리	액상에 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 없는 고체나 반고체 상태의 것	불쾌한 맛이 있는 건강기능식품을 섭취 용이하게 하여 어린이 제품과 여성들이 선호하는 건강기능식품에 많이 사용

(2) 다양한 제형화의 정립

-현재 항고혈압 관련한 제품들의 제형은 일정한 형태의 제품으로 구성되어있으며 이와 같이 다양한 형태의 많은 완제품 제형의 종류로 시장을 진출할 수있음.

-기존에 생산되고 있는 생균 제품 보다 효능 및 안전성이 우수한 혈압 조절 기능성 포스트바이오틱스 소재를 개발하고, 동물 및 인체적용시험을 통해 자사의 포스트바이오틱스의 효능을 검증. 국내 순수 분리균주에서 추출한 포스트바이오틱스와 기존 프로바이오틱스의 차별성을 홍보함과 동시에 국산 혈압 조절 기능성 포스트바이오틱스의 우수한 혈압 조절 활성 및 이를 포함한 다양한 기능성 포스트바이오틱스의 안전성 및 효능을 홍보하며 또한 가곡정성의 우수성을 통하여 단순한 기능성 식품의 제작 및 국한되어있는 제품의 범주를 넘어선 다양한 시장 진출이 가능함.

(3) 소재의 효능과 안정성의 NEEDS 개선

-기존 인류용 프로바이오틱스 기반의 세계 시장 규모는 2021년 \$456억(약54조원)에서 2022년 \$640억(약75조원) 규모로 성장할 것으로 전망됨.

-세계 프로바이오틱스 시장 : \$456억(2021) → \$640억(2022), 연평균 성장률 7.0%(마켓앤마켓)

-국내 프로바이오틱스 시장 : 6,444억원(2020년 건강기능식품 시장의 약 14%)

-프로바이오틱스의 성장세에도 불구하고, 효능에 대한 의구심과 부작용 등이 끊임없이 제기되고 있음.

-최근 국제학술지'셀(Cell)'에 발표된“프로바이오틱스의 효능과 안전성”에 대한 연구논문에 따르면 상용 프로바이오틱스 균이 보편적으로 모든 사람들에게 장 내에 잘 정착되는 것은 아니며, “항생제유입 시 소멸된 장내 세균이 다시 살아나야 하는데, 프로바이오틱스의 유입으로 인해 장내 미생물 간 경쟁이 치열해지면서 장내 세균 활동이 위축되어 마이크로바이옴이 회복되지 않는다”며 부작용을 우려된다 발표함.

(표)최근 5년간 건강기능식품 이상사례 신고 현황(제조업체별 및 품목별)						
연도	계	'16	'17	'18	'19	'20.7
건기식 제조업체별 이상사례 신고	4,042	655	834	818	1,133	602

(표)최근 5년간 건강기능식품 품목 별 이상사례 신고 현황(상위 10개 품목)						
연도	계	'16	'17	'18	'19	'20.7
영양보충식품	1,338	186	305	315	317	215
유산균(프로바이오틱스)	743	154	177	141	179	82
DHA/EPA 함유 유류지제품	368	58	64	79	80	87
프로폴리스 리코넨제품	261	8	4	56	113	80
가르시디아킴보지아추출물제품	240	42	39	35	104	20
출산제품	196	41	42	58	37	18
멜레시엄제품	144	20	27	33	41	23
쏘일메로알매추출물제품	140	19	23	29	37	32
녹차추출물제품	130	10	20	35	53	12
알로에정제	125	14	16	9	74	12

* 한 사람이 2개 이상의 제품을 섭취한 경우가 있어 신고건수 상미
 ** 이상사례 신고건수는 소비자의 주관적인 의견을 접수한 것으로, 과학적(의학적) 인과관계가 입증되지는 않았음

그림 14. 최근 5년간 건강기능식품 이상사례 신고 및 신고 현황
* 출처: 식품의약품안전처

○ 다양한 제품화 및 판로개척을 통한 기능성 소재의 사업화 진행

(1) 연구동향 및 시장트렌드 파악

-식품산업의 최신 연구동향과 시장트렌드 파악을 위해 제주도에서 열리는 한국식품과학회에 참가함. 학회의 다양한 세션 중 기능성 소재, 식품에 대한 연구동향 및 시장트렌드를 확인할 수 있는 세션에 참가함.

-2022년, 2023년 코엑스 푸드위크박람회에 참가하여 소비자들에게 생소한 포스트바이오틱스 소재의 인식을 제고하고, 기능성 소재에 대한 관심을 보이는 바이어를 만나 기능성 소재를 설명하고 시장에서의 기능성 포스트바이오틱스 소재에 대한 현황 및 시장에서 원하는 소재의 상업성의 정도를 파악함. 바이어와 소비자들에게 당사가 개발한 기능성 소재의 특징점을 소개할 수 있는 기능성 소재 팜플렛(그림 15.)와 같이 제작하여 제공함. 또한 다양한 유통채널 담당자들과의 마케팅 컨설팅을 진행하여 유통채널의 유형별 (대형마트, 온라인 쇼핑몰, 홈쇼핑, 소셜커머스 등) 로 기능성 소재의 마케팅 포인트를 확인하고 개발된 기능성 소재를 원료로 사용한 제품을 판매했을 시 적절한 유통채널을 확보함.

(2) 개별인정형 소재 신청 전 매출신장을 위한 제품화 진행

-개발된 소재의 기능성을 표시하고 기능성 소재를 원료로 사용한 건강기능식품을 제품화하기 위해서는 식약처 개별인정형 원료 등록 전에는 사용이 불가능하여 기능성 포스트바이오틱스 소재가 아닌 형태의 식품원료로의 제품화를 추진하고자 함.

그림 15. 열처리배양건조물 NVK79 팜플렛

○ 혈압조절 기능성 균주 분리·동정과 기능성 파악 및 특성조사

(1) 재료

(가) 분리 균주

-각 50가정에서 만든 김치에서 분리한 158 종의 균주를 대상으로 사용함.

(나) 탈지분유

-서울우유협동조합에서 제조한 단백질 35.0%, 유지방 1.0%, 탄수화물(유당) 52.5%, 회분 및 기타 8.5%, 수분 3.0%인 제품을 사용함.

(2) 방법

(가) 젖산균의 분리 및 수집

-각 가정별 김치를 수거하여 사용하였으며, peptone 희석액으로 총미생물이 $10^6 \sim 10^7$ cfu/ml 수준으로 희석하여 NaN₃를 첨가한 개선된 MRS배지(Table 1)에 0.1ml씩 평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하고 각 균락을 개선된 MRS배지에서 순수분리한 다음 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였음. 선발된 균주는 개선된 MRS배지에 3회 백금이로 도말한 후 호기배양하여 순수분리 하였고 여기서 얻어진 colony는 triptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 보관함.

(나) 바이오컨버전 산물에 대한 ACE 억제활성 측정

1) 정통법

가) Whey fraction 조제

-10% skim milk에 젖산균을 접종하여 배양해서 얻어진 커드를 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 whey fraction으로 사용함.

나) ACE 억제활성 측정법

-Cushman과 Cheung (1971)의 방법에 준하여 실시함. NaCl을 0.3M 함유한 0.1M sodium borate buffer(pH8.3)에 기질 Hip-His-Leu 2.5mM을 녹인액 50 μ l, ACE 50 μ l와 whey fraction 50 μ l를 혼합하였으며, 대조구는 whey fraction 대신 증류수 50 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1N HCl 250 μ l 첨가로 반응을 중지시켰음. 다시 여기에 ethylacetate 1.5ml를 가하여 15초간 교반한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상정액 1ml을 취하였음. 이 상정액을 121°C에서 30분간 가열하여 완전히 건조시킨 뒤 증류수 3ml을 가하여 용해시킨 다음 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 구함.

Table 1. Composition of Modified MRS agar

Component	gram/liter
Proteose Peptone #3	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	5.0
Lactose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Azide	0.25
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{(S - S.C)}{(C - C.C)} \times 100$$

S : 시료의 흡광도

S.C : 시료 대조구의 흡광도

C : blank의 흡광도

C.C : blank의 대조구 흡광도

2) 키트법

ACE Kit-WST(Dojindo molecular technologies, Inc. Japan)를 사용하여 실시하였다. 시료, 기질완충액, 효소 표준용액을 각 well에 넣고 60분간 배양한 다음 지시약 표준용액을 첨가하고 10분간 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정함.

(다) 선발균주 동정

-선발균주는 MRS 액체배지에서 2회 이상 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였음. 젖산균의 동정은 Hammes 등(2006)의 방법에 의하여 실시하였음. 순수 분리된 균주는 Gram 염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 성장, Catalase 생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스 생성, arginine으로부터 ammonia 생성을 측정하였으며, 현미경 관찰과 Lactobacillus 균은 API CH50, Streptococcus 균은 API Strep20(API bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 실험을 실시함.

-젖산균의 DNA sequence분석에는 universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였음. 증폭과정은 95°C, 15분을 한 후 95°C, 20초; 50°C, 40초; 72°C, 1분 30초를 30회 시행하였으며, 72°C, 5분으로 마무리 하였음. 서열 분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit (SolGent, Korea)로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)로 자동 분석하였음.

(라) ACE 억제능 선발 균주의 특성조사

1) 당 발효 특성

-Lactobacillus 균은 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 실험을 실시함.

2) 항생제 내성 시험

-항생제 내성 시험은 MRS 액체배지에 선발균주를 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone용액에 적정농도로 희석하였음. 각 항생제가 각 농도 별로 포함된 tryptic soy 액체배지에 105~106CFU/mL수준으로 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 성장 여부를 결정하였음. 항생제 내성 측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였음.

-항생제는 Sigma (USA)로부터 구매하여 사용하였음. 항생제는 Gentamicin, Kanamycin, Ampicillin, Tetracycline, Clindamycin, Erythromycin 및 Chloramphenicol을 시험에 사용하였음.

3) 효소활성 시험

-MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 동안 배양한 선발균주를 생리식염수로 희석하여 105~106CFU/mL수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit (API bioMerieux, Lyon, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰음. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C1

4), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, β -fucosidase 효소의 활성을 측정하였음.

4) 내담즙성 실험

-Gilliland와 Walker (1990)의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 선발균주 균주를 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였음. 37°C의 incubator에서 7시간까지 혐기배양하면서 시간 별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기배양하여 계수하였음.

5) 내산성 실험

-Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 선발균주(약 10⁹CFU/mL)를 1 mL씩 섞은 후 37°C에서 혐기 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였음.

6) 항균력 실험

-Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Listeria monocytogenes 및 Staphylococcus aureus는 한국식품연구원으로부터 분양 받았으며, 지시균의 증식배지로서 Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였음. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였음.

-선택배지로서 Escherichia coli는 EMB agar, Salmonella Typhimurium 은 Bismuth sulfite agar, Listeria monocytogenes는 Supplement(X123)가 함유된 Listeria Isolation Agar, Staphylococcus aureus는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였음. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였음.

*Inhibition (%) = (대조군의 균수 CFU/mL-혼합배양 후의 균수 CFU/mL)/대조군의 균수 CFU/mL

7) 장 부착능

-실험에 사용한 HT-29 세포는 한국세포주은행(seoul, Korea)을 통하여 구입하였고, Kim 등(2008)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 첨가된 RPMI 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂/95%air가 공급되는 조건의 항온기(incubator)에서 배양하였음.

-HT-29 세포를 배양하기 위하여 세포를 12 well plate의 각 well에 10⁶cells/well로 분주하고 2일에 한번씩 배지를 교체해 주며 실험 전날, 95%까지 세포가 찼을 때 serum free medium으로 교체하여 cell이 더 이상 차는 것을 막아주었음. 균주의 장내 정착능을 실험하기 위해 2차 계대배양한 균주 1 mL를 취해 12,000rpm에서 3분간 원심분리하고 serum free medium을 이용해 두 번 세척하였음. 세척한 균주를 RPMI 배지로 희석하여 O.D600nm이 0.5가 나오도록 맞춘 후 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring 하여 초기 균수를 측정하였음.

-OD값을 맞춘 균체 100mL를 well에 분주 한 후 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한 뒤 PBS를 이용해

붙지 않은 균을 5번 세척함. Trypsin-EDTA 1mL를 첨가하여 cell-bacteria를 떼어낸 후 0.1% peptone용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring하여 균수를 측정하였음.

8) D-lactate 생성

-시험균주를 37°C에서 24시간 배양한 후 상층액을 확보하여 D-lactate(Megazym 사) kit를 사용하여 실시하였음.

-다음의 공식에 따라 D-lactate 양을 측정함.

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D\text{-lactic acid}} \quad [g/L]$$

V = final volume [mL]
 MW = molecular weight of D-lactic acid [g/mol]
 ϵ = extinction coefficient of NADH at 340 nm
 = 6300 [$l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$]
 d = light path [cm]
 v = sample volume [mL]

9) 용혈활성

-유산균을 MRS(Difco) 액체배지에 1%(V/V) 접종하여 37°C에서 배양한 다음 5% 면양혈액 한천배지(MB cell, Seoul, Korea)에 희선도말하여 균주의 용혈타입을 확인함. 희선 도말된 배지는 37°C에서 48시간 동안 배양하였고, 배양이 끝난 다음 콜로니 주변에 용혈현상으로 인해 생성된 환의 형태를 확인함.

○ 혈압 조절 소재 확보를 위한 우유 유래 바이오컨버전 기술 최적화

(1) 반응표면분석법(RSM)을 이용한 배양조건의 최적화

(가) 재료 및 방법

1) 공시재료

-멸균된 MRS broth에 균주 1%를 접종하여 37°C, 18시간 동안 배양한 후, 6000 rpm, 15분간 원심분리하여 cell paste 형태로 회수함. 동결보호제로서 증류수를 첨가하여 10% skim milk를 제조한 후 110°C, 5분간 2회 간헐 멸균하여 사용함. 회수된 cell paste 15 g에 멸균된 10% skim milk 50 mL을 첨가하여 잘 섞고, -70°C deep freezer에 3시간 동결한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조시켜 powder 형태로 제조함. 이때의 제조된 stater에 들어있는 생균수는 K6은 7.3×10^{10} CFU/g, K79는 3.5×10^9 CFU/g이었음.

2) 방법

가) 조건설정

-조건설정은 배양조건을 최적화하기 위하여 독립변수(Xi)로 skim milk 농도(X1), starter첨가량(X2), 배양온도(X3), 배양시간(X4)을 설정하고 5단계로 부호화하여 27개 구간으로 설계하여 배양조건을 실시하였음. 종속변수(Yn)로는 ACE 억제율(Y1), pH(Y2)을 설정하였음. 통계처리는 MINITAB statistical software (Version 13, Minitab Inc., USA)를 사용하였음.

나) 배양조건의 최적화를 위한 반응표면실험법

-배양조건의 최적화를 위한 반응표면실험법은 중심합성계획(Central composite design, Box and Wilson, 1951)을 적용함. 독립변수로는 예비실험과 마찬가지로 skim milk 농도(X1), 배양온도(X2), 배양시간(X3), starter첨가량(X4)을 설정함. 독립변수의 중심값과 범위는 예비실험을 바탕으로 설정되었으며, -2, -1, 0, 1, 2의 5가지 수준으로 부호화하였고(Table 2), 이에 따른 실험조건은 Table 3과 같음. 종속변수로는 ACE 억제율(Y1), pH(Y2)을 설정하였음. 통계분석 결과를 바탕으로 반응표면 모델식을 구하고 반응표면 그래프(Response surface plots)는 Maple software (Version 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원으로 나타내었음.

Table 2. Independent values, their coded and actual values for optimization condition of fermented milk by starter

Independent variable	Symbol	Level				
		-2	-1	0	1	2
Skim milk con.(%)	X ₁	6	8	10	12	14
Incubation temp.(°C)	X ₂	32	34.5	37	39.5	42
Incubation time(h)	X ₃	8	12	16	20	24
Starter added amount(%)	X ₄	0.02	0.065	0.11	0.155	0.2

* 1.0% glucose was added to each Skim milk conc.

Table 3. RSM condition of starter

Run Order	Skim milk con.(%)	Incubation temp.(°C)	Incubation time(h)	Starter added amount(%)
1	8	34.5	12	0.065
2	12	34.5	12	0.065
3	8	39.5	12	0.065
4	12	39.5	12	0.065
5	8	34.5	20	0.065
6	12	34.5	20	0.065
7	8	39.5	20	0.065
8	12	39.5	20	0.065
9	8	34.5	12	0.155
10	12	34.5	12	0.155
11	8	39.5	12	0.155
12	12	39.5	12	0.155
13	8	34.5	20	0.155
14	12	34.5	20	0.155
15	8	39.5	20	0.155
16	12	39.5	20	0.155
17	6	37	16	0.11
18	14	37	16	0.11
19	10	32	16	0.11
20	10	42	16	0.11
21	10	37	8	0.11
22	10	37	24	0.11
23	10	37	16	0.02
24	10	37	16	0.2
25	10	37	16	0.11
26	10	37	16	0.11
27	10	37	16	0.11

다) pH 측정

-pH는 pH meter를 사용하여 측정하였음.

라) 유산균수 측정

-유산균수 측정은 발효액 1 mL를 십진희석법으로 희석하여 평판배양법으로 BCP 한천배지에 1 mL씩 분주하고, 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 노란색 콜로니를 계수하여 시료 1 g 당 CFU (colony forming unit)로 표시하였음.

○ 소재의 혈압 조절 peptide 분리

(1) 소재의 전처리 조건

(가) Lactobacillus plantarum K6

-반응표면분석법(RSM)에 의한 최적 조건인 11% skim milk를 90°C에서 5분간 살균하고 37°C로 냉각한 다음 동결건조된 균주 0.0268%를 접종하고 42°C로 14.8시간 배양한 다음 110°C에서 1분 살균하였음. 이때 상층액을 여과하여 시료로 사용하였음.

(나) Lactobacillus plantarum K79

-반응표면분석법(RSM)에 의한 최적 조건인 13.49% skim milk를 90°C에서 5분간 살균하고 37°C로 냉각한 다음 동결건조된 균주 0.0578%를 접종하고 33.4°C로 21.5시간 배양한 다음 110°C에서 1분 살균하였음. 이때 상층액을 여과하여 시료로 사용하였음.

(2) 소재의 분획

-시료를 cut-off 10,000 dalton의 membrane(YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치(Amicon Co)로 1,000 dalton 이하, 1,000-3,000 dalton, 3,000-5,000 dalton, 5,000-10000 dalton, 10,000 dalton 이상의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 peptide를 시료로 사용하였음.

(가) Superdex peptide column에 의한 gel permeation chromatography

-Superdex peptide column(10 x 30mm, Vt : 24ml)을 이용하여 분리정제함. 이때 용출액은 HPLC용 water와 0.1% Trifluoroacetic acid, 유속은 0.7 ml/min로 용출시켜 1ml씩 분취 하며, 215nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공 동결건조하였음.

(나) Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography

-Superdex peptide column으로 분획한 peptide를 Vydac column(10 x 250mm, Vt : 19.6ml)으로 분리정제하였음. 이때 용출액은 0.1%TFA in water를 A용매, 0.1% TFA in 50% acetonitrile(ACN)을 B용매로 하여 gradient 조건에서 분리하였음. 유속은 1.5 ml/min로 용출시켜 1ml씩 분취하며, 215nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압 농축한 후 진공 동결 건조하였음. 기기분석조건은 Table 3과 같음.

Table 3. Analysis Condition of chromatography

Condition	Gel chromatography	reverse-phase chromatography
Mobile phase	100% HPLC water + 0.1% Trifluoroacetic acid	50% HPLC water+ 50% Acetonitrile + 0.1% Trifluoroacetic acid
Column	Superdex peptide 10/300 GL	Vydac 218TP 5m C18
dimensions	10300-310 mm	10250 mm
Wavelength	215nm	
Flow rate	0.7 ml/min	1.5 ml/min
Sample volumn	1 mL	

(다) UPLC-Q-TOF MS 분석

-Vydac C18 column으로 분획된 peptide는 Waters Acquity UPLC-Q-TOF를 이용하여 분석하였음. 시료추출물은 Acquity UPLC BEH C18 column(2.1 mm×100 mm, 1.7µm; waters)에 주입하였으며 이동상은 0.1% formic acid를 함유하고 있는 물(A)과 0.1% formic acid를 함유하고 있는 acetonitrile(B)로 flow rate은 0.35 mL/min이며 분석시간은 12분이고 컬럼온도는 40°C이었음. 컬럼으로 통과하여 나온 eluents는 negative electrospray ionization(ESI) mode를 갖고있는 Q-TOF MS로 분석하였음.

-TOF MS data의 scan range는 50-1500 m/z, scan time은 0.2 s, capillary와 sampling cone voltages는 3 kV와 40 V, desolvation flow rate은 800 L/h, desolvation 온도는 400°C, source 온도는 100°C이었음. Leucine-enkephalin ([M+H]=556.2771)는 lock mass를 위한 reference compound로 사용되었으며 10 s 당 분석되었음. MS/MS spectra은 collision energy ramp(10-30 eV), m/z 50-1500 조건 하에서 얻음. M/Z, retention time, ion intensity를 포함하는 mass spectrometry data 프로세싱은 MakerLynx software(Waters)을 사용하여 진행하였음.

(라) GC/MS 분석

-유도체 된 시료 1 µL는 DB-5 column(30 m×0.25 mm id, 0.25 µm film thickness; J & W Scientific, USA)이 연결된 GC로 주입하여 분석을 진행하였음. Carrier gas로 사용된 helium은 1 mL/min 유속으로 흘러 보냈으며 injector 온도는 200°C로 유지하였음. 초기 oven 온도를 70°C로 2분간 유지시킨 후 10°C/min비율로 320°C까지 증가시키고 동일 온도에서 3분간 유지시켰음.

-GC column을 통해 분석되어 나오는 물질들은 electron impact(EI) ionization mode(70 eV)로 작동하는 Shimadzu GCMS-TQ 8030(Tokyo, Japan)로 분석하였음. Ion source와 interface 온도는 각각 230°C와 280°C였으며 GC column을 통해 분석되어 나오는 물질들은 full scan mode(m/z 45-550)로 모니터링되었으며 scan event time과 scan 속도는 각각 0.3 sec와 2,000 u/sec이었음. Detector voltage은 0.1 kV이고 threshold은 100를 사용하였음.

(마) HPLC 분석

-0.1% phosphoric acid가 포함된 3차 증류수를 용매로 사용하여 15분간 210 nm에서 유기산 분석을 진행하였음. 컬럼온도는 40°C이며 column은 YMC-Triart C18(150×30 mm id, S-3 µm, 12nm)을 사용하였음.

(바) Data processing

-UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 얻어진 LC-MS data의 collection, normalization, alignment는 UNIFI version 1.8.2 프로그램(Waters)을 이용하여 진행하였음. 모든 data는 표준물질을 이용하여 normalization하였음. 대사물질들은 UNIFI version 1.8.2.169(Waters), ChemSpider(www.chemspider.com), human metabolome databases(www.hmdb.ca), METLIN database(metlin.scripps.edu)을 사용하여 동정하였음.

(사) Statistical analysis

-SIMCA-P+version12.0.1(Umetrics,Umea,Sweden)는 UNIFI를 통해 프로세싱된 LC/MS data의 통계분석을 위해 사용되었음. 특히 Partial least squares discriminant analysis(PLS-DA)는 분석한 결과를 시각화하기 위하여 사용되었음. 분석된 PLS-DA를 평가하기 위하여 R2X, R2Y, Q2, permutation test를 사용하였으며 R2X와 R2Y는 goodness of fit measure, Q2Y는 predictive ability, permutation test는 PLS-DA를 교차검증하였음.

-또한, 대사물질의 relative abundances는 SPSS 17.0(SPSS Inc., Chicago, IL)의 one-way analysis of variance(ANOVA) with Duncan's test(p<0.05)를 이용하여 분석하였음.

(3) 주관기관에서의 분석의뢰

-시료를 cut-off 10,000 dalton의 membrane(YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치(Amicon Co)로 1,000 dalton 이하, 1,000-3,000 dalton, 3,000-5,000 dalton, 5,000-10000 dalton, 10,000 dalton 이상의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 peptide를 시료로 사용하였음.

(4) 주관기관에서의 분석의뢰

(가) 분석시료 명

- 1) 0.1464 g (Wheyprotein hydrolysate) / 1 mL (3차 증류수, 0.1% formic acid 3차 증류수)
- 2) Sample No. 1 (1차, Lot No.220603)
- 3) Sample No. 2 (2차, Lot No.220701)
- 4) Sample No. 3 (3차, Lot No.220805)

(나) 분석의뢰조건

- 1) 유효성을 보인 펩타이드 종류 및 HPLC 용출 peak
- 2) 펩타이드분리동정을위한 UPLC-MS 이온질량에의한 아미노산 서열 구명
- 3) 샘플 또는 펩타이드 분획 ACE 억제활성 수준

(다) 펩타이드 시료추출 HPLC 분리조건

- Chromtography: HPLC (Shimadzu)
- Analytical Column: XBridge@C18 3.5µm
- Elution Solvent: 0.1% formic acid, acetonitrile/ 0.1% Trifluoroacetic acid, acetonitrile
- Flow rate: 1 mL/min
- Inject volume: 20 µL
- Wavelength:220 nm
- Temperature: 40℃

Time	B solvent (0.1% TFA ACN)
0.01	0
5.00	0
20	50
30	50
31	100
32	0
37	0

(라) Whey protein hydrolysate Sample (0.1% formic acid DW) HLB Column 분획물 분리조건

- Conditioning - MeOH 200µl
- Equilibration - DW 200µl
- Add sample 200µl
- Washing - 5% MeOH 200µl
- Elution - add 10% MeOH 100µl
- Elution - add 20% MeOH 100µl
- Elution - add 30% MeOH 100µl
- Elution - add 40% MeOH 100µl
- Elution - add 50% MeOH 100µl



(마) ACE 억제활성 측정법

Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 준하여 실시하였음.

- Sample 100 μ L에 50 μ L 0.1-2M Na-borate buffer (pH 8.3, containing 300mM NaCl) 혼합
- 5mM Hip-His-Leu (substrate) 50 μ L혼합 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응
- ACE 효소액(0.2564 g (rabbit lung acetone powder)/20 mL buffer) 200 μ L 혼합
- 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응
- 1N HCl 200 μ L 가하여 반응 정지
- Ethyl acetate 2mL 가한 뒤 vortex mixing 실시
- 반응액중 hippuric acid 추출 상등액1 mL 회수
- 회수한 상등액 건조 후 1mL 1N NaCl에 용해
- UV 228 nm에서 흡광도측정

라. In vivo 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가

(1) 고혈압 동물모델(수컷 SHR 랫트)를 이용한 혈압 저하 평가

(가) 실험동물 및 사육환경

-시료를 cut-off 10,000 dalton의 membrane(YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치(Amicon Co)로 1,000 dalton 이하, 1,000-3,000 dalton, 3,000-5,000 dalton, 5,000-10000 dalton, 10,000 dalton 이상의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 peptide를 시료로 사용하였음.

(나) 시료 조제 및 투여

-탈지분유 13.5%와 포도당 1%를 혼합하고 90 $^{\circ}$ C에서 5분간 멸균한 후 37 $^{\circ}$ C로 냉각하였음. 이때 동결건조된 L. plantarum K79 균주를 1시간 동안 활성화시키고 접종한 다음, pH가 4.2에 도달할 때까지 37 $^{\circ}$ C에서 교반하면서 배양하였음. 배양물을 85 $^{\circ}$ C에서 20분간 교반하여 열처리하고, 50 $^{\circ}$ C 이하로 냉각한 후 분무건조하여 분말화하였음. 분말화된 원료를 현탁하여 시험에 사용하였음.

-사육기간 중 식이는 일반 고형사료(Samtako, Gyunggi, Korea)를 급여하며 순화기간이 끝난 실험동물은 혈압을 측정된 뒤 난괴법을 사용하여 군간 혈압의 평균값이 균일하도록 분리한 후 ear punch를 이용하여 개체식별 표시하였음. 실험군은 정상군(WKY): 증류수, 대조군(SHR): 증류수, 고처리군 (SHR): 5ml/kg/day, 중처리군 (SHR): 3.33ml/kg/day, 저처리군 (SHR): 1.65ml/kg/day, POS CON (양성 대조군, SHR): enalapril, 10mg/kg/day으로 각 군당 8마리씩 시험에 사용하였음. 이때 이 제제의 임상적용 경로인 경구투여 방법을 선택하여 각각의 시료를 위내로 직접 투여함.

-실험에는 5주령의 SHR(SLC, Japan) 수컷 랫드로 구성된 대조군과 Wistar-Kyoto 랫드(WKY)로 구성된 정상군을 포함하여 1주일의 순응 후 사용하였음. 실험동물에게는 AIN-93G 사료를 먹였으며, 적응기간 동안 여과된 식수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 매일 갈아주었음. 사육기간 온도는 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도는 50 \pm 5%, 소음은 휴대폰 60대 이하, 조명시간은 08:00~20:00(1일 12시간), 조도는 150~300 Lux, 환기는 시간당 10~12회였음. 본 실험은 동물실험윤리에 관한

규정을 준수하여 한국식품연구원(KFRI-M-22024)의 승인을 받아 수행되었음. 실험동물은 사육기간 동안 일반고형사료(한국 경기도 삼타코)를 먹었으며 순화기간 말기에 혈압을 측정하였고, 개인 식별이 표시되었음.

-실험군: 일반군(WKY): 증류수, 대조군(SHR): 증류수, 고처리군(SHR): 500mg/kg/일, 중처리군(SHR): 335mg/kg/일, 저 처리군(SHR): 170mg/kg/일, 양성 대조군(SHR): 에날라프릴, 10mg/kg/일. 실험에 사용된 각 그룹은 8마리의 동물로 구성되었음. 이때, 본 제제의 임상 적용경로인 경구투여법을 선택하여 각 시료를 각 실험동물의 위에 직접 투여하였음.

(다) 관찰 및 검사 항목

1) 일반증상 관찰

-시험 기간 중에 매일 오전 10~11시 사이에 1회 실시함. 관찰방법은 일반 임상증상의 여부 (anorexia, salivation, diarrhea, polyuria, vomiting, anuria, fecal change 등)에 따라 그 정도 등을 기록하였음.

2) 체중 측정

-모든 동물에 대하여 투여개시 전, 투여개시 후, 시험종료 시까지 매주 1회 측정하였음.

3) 사료 섭취량 측정

-사육 상자별로 당일 급여 및 급수 총량과 익일 잔량을 투여개시 후 4주간 매주 1회 측정하여 사료 섭취량을 군별로 1일 소비량을 표시하였음.

4) 장기중량 및 크기측정

-시험기간 중 폐사한 동물이나 시험 종료 후 모든 생존동물에 대하여 ether 마취 후 채혈하고 안락사 시킨 다음 육안적으로 모든 장기를 검사하였음. 모든 시험동물은 비장과 흉선을 포함하여 간장, 신장(좌우), 폐장, 심장, 고환(수컷:좌우) 등의 절대 장기 중량 및 체중에 대한 상대 장기 중량을 측정하였음.

5) 혈압측정

-렛트의 수축기압은 tail cuff blood pressure meter(INDIR, Model LE5002, Spain)로 측정하며, 측정 전에 렛트의 꼬리동맥의 맥박을 감지하기 위하여 32℃에서 30분간 유지하였음.

6) 혈액분석

-10주간의 실험 기간이 끝나면 모든 쥐의 혈액 샘플을 채취하여 즉시 멸균 튜브에 넣었음. 혈청은 4℃에서 15분간 2,000 x g으로 원심분리하여 수집하였음. 이후 혈청 시료의 총 콜레스테롤(TC), 중성지방(TG) 농도, 고밀도 지질단백질(HDL) 콜레스테롤, 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤을 GCCL(한국)을 통해 분석하였음.

7) 혈압과 관련된 바이오마커

-혈장 내 안지오텐시노겐 단백질 발현, 안지오텐신 II 단백질 및 레닌 단백질 함량은 각각 Rat Angiotensinogen ELISA 키트, Rat Angiotensin II ELISA 키트 및 Rat Renin ELISA 키트(Mybiosource, USA)를 사용하여 측정하였음.

8) 신장에서 단백질 발현

-Averill 등(2003)의 방법에 따라 신장 조직을 4% 포르말린에 48시간 동안 방치한 후 70% 에탄올로 옮기고, 신장 조직 블록이 파라핀에 묻히게 하였음. 5µm 섹션을 슬라이드로 옮기고 자일렌, 100% 에탄올, 95% 에탄올, 75% 에탄올 및 이중 증류수를 사용하여 순차적으로 세척하여 파라핀을 제거하였음.

-조직 절편을 3% 과산화수소에서 5분 동안 배양하고 PBS(pH 7.2)로 세척하고 건조시킨 다음

실온에서 1시간 동안 5% 일반 염소 혈청에서 배양하였음. 절편을 PBS로 세척하고 1% BSA에 항체를 1:25로 희석한 안지오텐신-1에 대한 친화성 정제 토끼 다클론 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양하였음. 안지오텐신-1 항체를 정제하고, 다음날 조직을 PBS로 세척하고 1% BSA에 1:400으로 희석된 비오틴화 항토끼 항체와 함께 4°C에서 3시간 동안 배양하였음.

-슬라이드를 PBS로 헹구고 건조시켰으며, 아비딘-비오틴 용액으로 면역세포화학적으로 반응시키고, 트리스 완충 식염수(0.05 mol/L, pH 7.6 ~ 7.7) 중 3,3'-디아미노벤지딘(Sigma Chemical Co)으로 갈색 염색하였음. PBS에서 반응을 중단하고 절편을 이중 증류수로 헹구고 헤마톡실린(Sigma)으로 대비염색하였음.

-조직 절편을 에탄올(70% 내지 100%)에서 탈수시킨 후 HistoClear(National Diagnostics)에서 탈수시켰음. 마지막으로, HistoMount를 사용하여 커버슬립 아래에 장착했음.

(라) 통계분석

-실험결과는 SPSS 버전 23(IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 실험군당 평균±표준편차(SD)로 표시하고, Duncan의 다중 범위 테스트를 사용하여 일원 분산 분석(ANOVA)을 수행하여 차이의 중요성을 분석하고 p<0.05 수준에서 검정하였음.

○ In vitro 모델을 통한 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구

-본 연구에서는 김치에서 분리한 선별된 균주인 *L. plantarum* K79가 postbiotics의 소재로써 혈압조절에 도움을 줄 수 있는지 알아보기 위해 *L. plantarum* K79를 배양하여 bacterial lysate (BL), heat-killed bacteria, peptidoglycan (PGN)을 추출함. 추가적으로 spray dried *L. plantarum* K79를 제공 받아 총 4가지의 소재로 혈압조절 기능을 평가함.

-HUVECs는 F-12K medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 medium)에 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% Penicillin/Streptomycin, 10 mg/mL Heparin 5 mL, 30 mg/mL Endothelial Cell Growth Supplement (ECGs) 500 μ L를 첨가하여 만든 complete F-12K medium에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양함.

- 가. 선별된 프로바이오틱스 균주의 사균 또는 배양체를 처리하여 endothelial nitric oxide 생성 확인
- (1)HUVECs를 96-well plate 각 well에 1x10⁵ cells/mL의 농도로 200 μ L seeding하고 5%
 - (2)medium 200 μ L을 완전히 제거 후 새로운 medium을 180 μ L 분주하고 유산균 사균 및 배양체 sample을 농도별로 20 μ L씩 처리하여 48 h incubation.
 - (3)Sample treatment 후에 세포 배양액을 취한 후 Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay kit (Cayman Chemical, Cat# 780051)을 이용하여 HUVEC으로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양을 측정.

나. Endothelial nitric oxide의 생성을 유도하는 PI3K/Akt-eNOS의 활성화와 vascular smooth muscle의 수축을 유발하는 ROCK2, MYPT1, PLC의 발현정도를 western blot 기법을 통해 확인

- (1)HUVECs 혹은 VSMCs를 100 ϕ dish에서 각 well에 1x10⁵ cells/mL의 농도로 12 mL seeding하고 5% CO₂, 37°C 조건에서 48 h 배양함.
- (2)약 80~90% confluent에서 medium 12 mL을 완전히 제거 후 새로운 medium을 10.8 mL 분주 하고 spray dried *L. plantarum* K79를 농도별로 1.2 mL씩 처리하여 2 h incubation.
- (3)세포 배양액을 제거하고 PBS 버퍼로 2번 wash 후 scraper로 cell을 긁어모아 protein lysis 버퍼를 처리하여 cell lysate를 원심분리를 통해 획득함.
- (4)Cell lysate는 BCA assay를 통해 농도를 측정함 다음, 5x sample buffer와 섞어 100°C에서 5 min동안 protein denaturation 시킴.
- (5)6% gel로 SDS-PAGE running (60 V, 30 min 이후 120 V, 1 h 20 min) 진행한 후 Ice에서 transfer (100 V, 1 h 30 min) 진행하여 PVDF membrane에 단백질을 전이시킴.

(6) 5% skim milk로 blocking (RT, 1 h 30 min)한 후 1차 항체와 반응시키고 (4°C, 15 h) 2차 항체와 추가 반응시킨(RT, 2 h) 다음 ECL chemiluminescence system으로 band의 발현정도를 분석함.

다. Vascular endothelial cell에서 Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증성 cytokine 및 chemokine의 억제 효과를 mRNA 수준에서 확인 (RT-PCR)

(1) HUVECs를 6-well plate 각 well에 1×10^5 cells/mL의 농도로 2 mL seeding하고 5% CO₂, 37°C 조건에서 48 h 배양함.

(2) 약 80~90% confluent에서 medium 2 mL을 완전히 제거 후 새로운 medium을 1.6 mL 분주하고 E. coli LPS 1 µg/mL와 spray dried L. plantarum K79를 농도별로 처리하여 24 h incubation.

(3) 세포 배양액을 제거하고 PBS 버퍼로 1번 wash 후 TRIzol을 처리함. 이후 순차적으로 Chloroform, Isopropanol, 75% ethanol을 처리하여 RNA를 추출함.

(4) Nanodrop을 통해 RNA의 양을 정량하고 random hexamer (pN6), MmLV reductase, dNTP를 이용하여 cycle 1 (90°C, 5 min), cycle 2 (37°C, 60 min)의 조건으로 cDNA를 합성함.

(5) SYBR Green Master mix와 target primer (IL-6, IL-8, GAPDH)를 이용하여 real-time PCR 후 $-\Delta\Delta Ct$ 법으로 target gene의 발현양을 정량함.

라. Vascular endothelial cell에서 Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증성 cytokine 및 chemokine의 억제 효과를 protein 수준에서 확인 (ELISA)

(1) HUVECs를 24-well plate 각 well에 1×10^5 cells/mL의 농도로 500 µL seeding하고 5% CO₂, 37°C 조건에서 48 h 배양함.

(2) 약 80~90% confluent에서 medium 500 µL를 완전히 제거 후 새로운 medium을 400 µL 분주하고 E. coli LPS 1 µg/mL와 spray dried L. plantarum K79를 농도별로 처리하여 24 h incubation.

(3) Cell culture plate를 centrifuge하여 세포 배양액을 얻음.

(4) 얻은 세포 배양액을 이용하여 각각 Human IL-6 ELISA kit (Cat# 430504; BioLegend)와 Human IL-8 ELISA kit (Cat# DY208; R&D systems)로 각 단백질의 secretion 수준을 정량함.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 기능성 균주의 분리·선발 및 선발 균주의 특성 조사

-김치 50종에서 채취하여 MRS 배지 조성 중 추가로 Bromocresol purple과 sodium azide를 첨가 한 플레이트에 도말한 후, 37℃에서 48시간 배양한 다음 노란색 콜로니 중 각기 다른 모양의 콜로니를 선발하고, 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 콜로니를 TSA에 37℃에서 18시간 배양하여 보관하였음. 이로부터 총 158종의 균주가 분리되었음. 이후 158종의 균주를 탈지유(skim milk)에 접종하여 발효능을 측정하였음. 탈지유를 살균하기 위해 10 % 제조한 후 심부 온도 80℃에서 1분간 살균된 10% 탈지유에 1%의 유산균을 접종한 후 37℃에서 18시간 및 24시간 후 응고 여부를 확인하였음. 그 결과, 김치 유래 158종 중 98종의 균주가 응고하여 발효능이 있는 것으로 나타났음.

-98종의 균주를 활용한 우유 발효물(바이오컨버전 산물)에 대한 ACE 억제능 평가(Table 1)를 통해 98종의 균주 중 12개 균주를 1차 선발하였음.

Table 1. Evaluation of ACE inhibition ability by strain

(Unit: %)

Strain	KIT Method	Method of Cushman & Cheung(1971)
<i>Enterococcus faecalis</i> B46(Patent)	84.1	88.3
<i>Lactobacillus zeae</i> K354(Patent)	86.8	60.0
K104	91.9	69.4
K106	91.0	77.2
K109	90.1	13.3
K108	91.6	78.3
K110	90.7	74.4
K111	91.6	60.6
K 6	91.3	85.0
K101	89.0	72.2
K79	91.3	80.0
K120	86.2	-
K118	91.9	55.6
K117	84.6	72.2

-2개의 특허등록 균주를 대조구로 Kit법과 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 통해 4개 균주를 선발하였고, Kit법으로 IC50을 측정한 결과(Table 2, Fig. 1) K79 균주가 200배 희석(희석농도 0.005)하여도 ACE 억제능이 59.3%로서 가장 높았음.

Table 2. IC50 evaluation of ACE inhibitory ability by strain

(Unit : ACE inhibition rate,%)

Strain	Sample dilution concentration (dilution factor)				
	0.04 (25 times)	0.02 (50 times)	0.01 (100 times)	0.005 (200 times)	0.0025 (400 times)
K106	92.4	82.0	71.9	44.7	10.1
K108	91.0	76.3	59.9	34.2	11.3
K6	89.5	73.1	63.0	30.9	12.7
K79	96.8	92.3	81.6	59.3	27.7

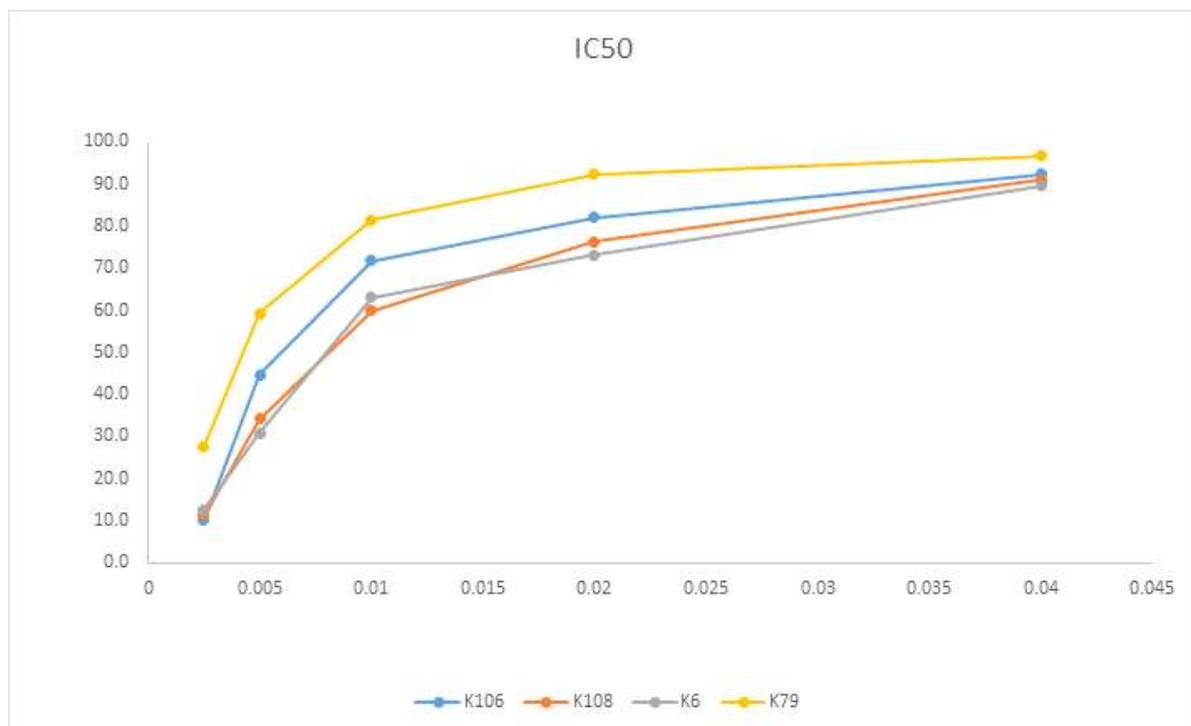


Fig. 1. IC50 evaluation of ACE inhibitory ability by strain

-바이오컨버전 산물에 대한 ACE 억제능 평가에서 선발된 젖산균 2 균주의 genus와 species를 결정하기 위하여 생화학적, 생리적 시험을 하였음(Table 3). 선발된 균주들은 공히 gram 양성을 나타내었고 현미경으로 관찰 시 2종은 rod 형태였고, 산소유무와 상관없이 잘 성장하였고, catalase와 운동성은 음성으로 나타났음. 또한, 두 균주가 15℃에서 성장하지 않았고, 45℃에서도 성장하지 않았음. 2종의 균주는 glucose와 arginine으로부터 각각 gas와 암모니아를 생성하지 않았음. 또한 두 균주에 대한 16S rRNA Sequencing 결과 공히 Lactobacillus plantarum으로 동정되었고 그 계통도는 Fig. 2와 Fig. 3과 같음.

Table 3. Biochemical and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from milk and kimchi

Strains	K6	K79
Gram stain	+	+
Cell morphology	rod	rod
Spore formation	-	-
Motility	-	-
Aerobic growth	+	+
Anaerobic growth	+	+
Catalase	-	-
Growth at 15°C	-	-
Growth at 45°C	-	-
Gas from glucose	-	-
Ammonia from arginine	-	-

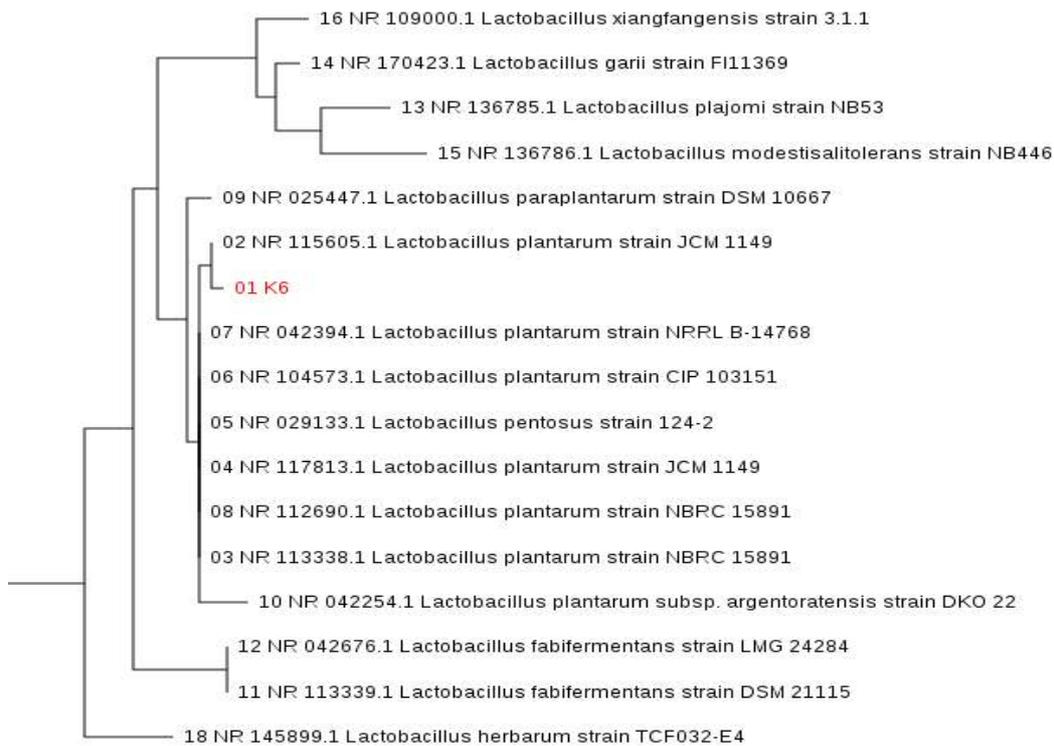


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Lactobacillus plantarum* K6

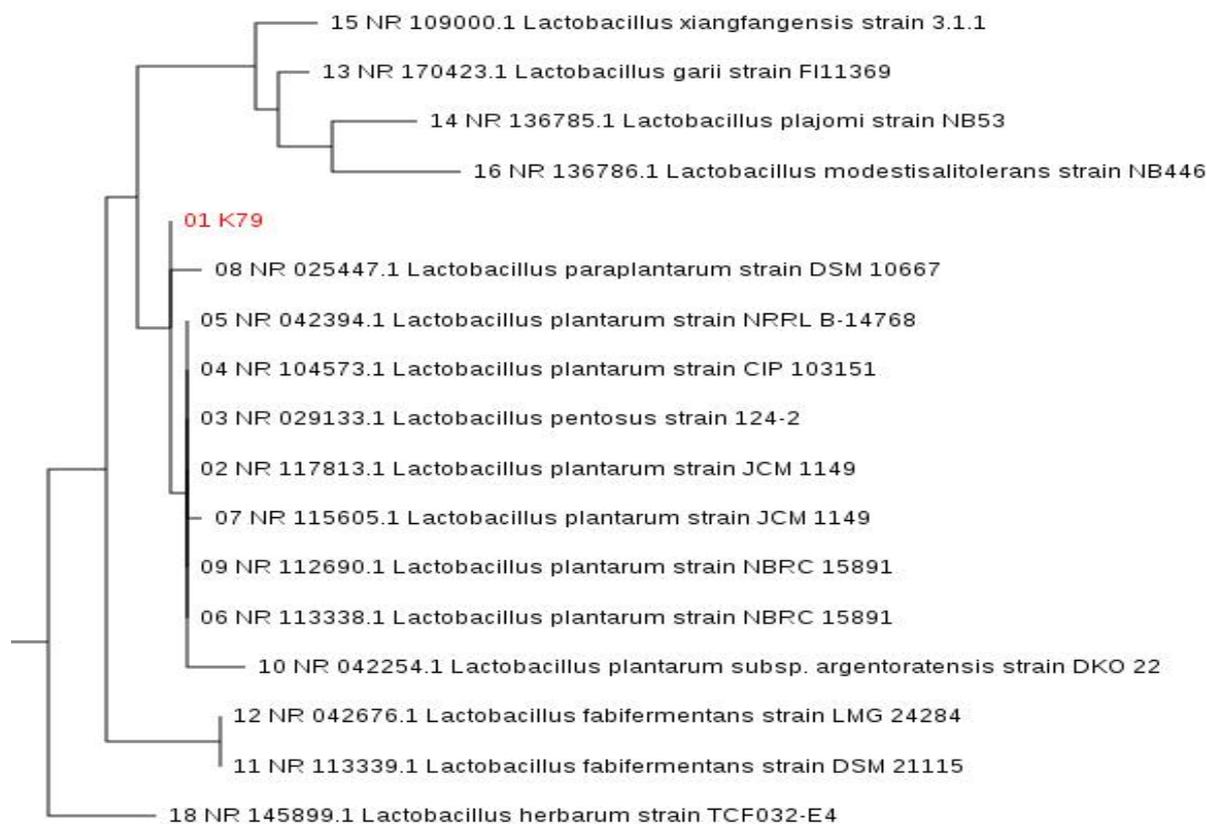


Fig. 3. Phylogenetic tree of *Lactobacillus plantarum* K79

-당 발효 시험은 API 50 CHL kit(BioMereux, France)를 이용하여 실시하였음(Table 4). API 50 CHL 49종의 당 중 *L. plantarum* K6 균주는 23종, *L. plantarum* K79 균주는 25종을 이용하였음.

Table 4. Sugar fermentation in *L. plantarum* K6 and *L. plantarum* K79

No.	Strains	<i>L. plantarum</i> K6	<i>L. plantarum</i> K79
0	Control	-	-
1	Glycerol	-	-
2	Erythritol	-	-
3	D-Arabinose	-	-
4	L-Arabinose	+	+
5	D-Ribose	+	+
6	D-Xylose	+	+
7	L-Xylose	-	-
8	D-Adonitol	-	-
9	Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-
10	D-Galactose	+	+
11	D-Glucose	+	+
12	D-Fructose	+	+

13	D-Mannose	+	+
14	L-Sorbose	-	-
15	L-Rhamnose	-	-
16	Dulcitol	-	-
17	Inositol	-	-
18	D-Mannitol	+	+
19	D-Sorbitol	+	+
20	Methyl- α D-Mannopyranoside	+	+
21	Methyl- α D-Glucopyranoside	-	-
22	N-AcetylGlucosamine	\pm	+
23	Amygdalin	+	+
24	Arbutin	+	+
25	Esculin ferric citrate	+	-
26	Salicin	+	+
27	D-Celiobiose	+	+
28	D-Maltose	+	+
29	D-Lactose	+	+
30	D-Melibiose	+	+
31	D-Saccharose	+	+
32	D-Trehalose	+	+
33	Inulin	-	-
34	D-Melezitose	+	+
35	D-Raffinose	+	+
36	Amidon(starch)	-	-
37	Glycogen	-	-
38	Xylitol	-	-
39	Gentiobiose	\pm	+
40	D-Turanose	+	+
41	D-Lyxose	-	-
42	D-Tagatose	-	-
43	D-Fucose	-	-
44	L-Fucose	-	-
45	D-Arabitol	-	-

46	L-Arabitol	-	-
47	Potassium Gluconate	±	+
48	Potassium 2-KetoGluconate	±	-
49	Potassium 5-KetoGluconate	-	-

-항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 생장여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 그 결과는 Table 5에서 보는 바와 같음. Clindamycin과 Erythromycin에 대해 감수성이 높은 반면 Kanamycin에 대해 내성이 높은 것으로 나타났음.

Table 5. Antibiotics susceptibility of *Lactobacillus plantarum* K79

Antimicrobial agents	MIC (ug/mL)	cut-off value (ug/mL)
Gentamycin	8	16
Kanamycin	64	64
Ampicillin	1	2
Tetracycline	16	32
Clindamycin	0.25	2
Erythromycin	0.25	1
Chloramphenicol	8	8

-2종의 유산균의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 Table 6에서 보는 바와 같음. *L. plantarum* K79는 이당류인 유당을 포도당과 갈락토스로 분해하는 갈락토시다제의 활성이 5로서 매우 높았음. 특히, 유산균 2종 모두 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 효소활성이 없는 것으로 나타나 안전성을 확인하였음.

Table 6. Enzyme activity of *Lactobacillus plantarum* K79

Enzyme	<i>Lactobacillus plantarum</i> K6	<i>Lactobacillus plantarum</i> K79
Alkaline phosphatase	0	0
Esterase(C4)	0	0
Esterase Lipase(C8)	0	0
Lipase(C14)	0	0
Leucine arylamidase	3	4
Valine arylamidase	2	3
Cystinearylamidase	0	2
Trypsin	0	0
α -chymotrypsin	0	0
Acid phosphatase	1	1

Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	1	2
α -galactosidase	0	0
β -galactosidase	3	5
β -glucuronidase	0	0
α -glucosidase	0	1
β -glucosidase	2	3
N-acetyl- β -glucosaminidase	1	3
α -mannosidase	0	0
α -fucosidase	0	0

*: A value ranging from 0 to 2 is assigned to the standard color: zero represents a negative; 5 represents a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength: 1 corresponds to the liberation of 5nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles, and 5 to 40 nanomoles or more.

-담즙내성시험은 Gilliland & Walker(1990)의 방법에 따라 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었음. Fig. 4에서 보는 바와 같이 담즙 첨가시 7시간 배양 후 약 0.5 log 값이 감소함에 따라 약간 억제력을 받기는 하나 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났음.

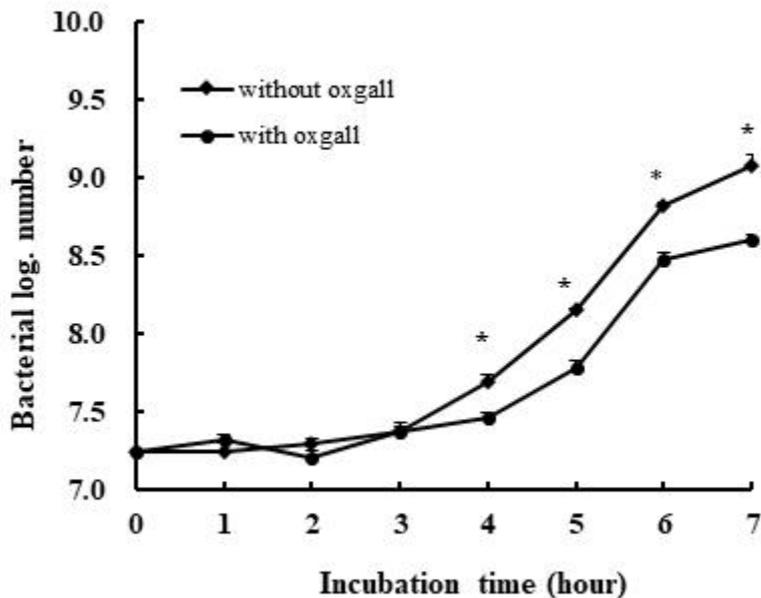


Fig. 4. Growth of *Lactobacillus plantarum* K79 in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with/without 0.3% oxgall. All values are within the mean \pm standard deviation of the three replicates; * p <0.05, * p <0.01 and * p <0.001 between with ox gall and without oxgall (t-test)

-내산성 시험은 Clark 등(1993)의 방법에 따라 측정한 결과는 Fig. 5에 나타내었음. Fig. 5에서 보는 바와 같이 대조구 pH인 6.4에 비해 강산인 pH 2에서조차도 거의 영향이 없음에 따라 내산성이 있음을 보였음.

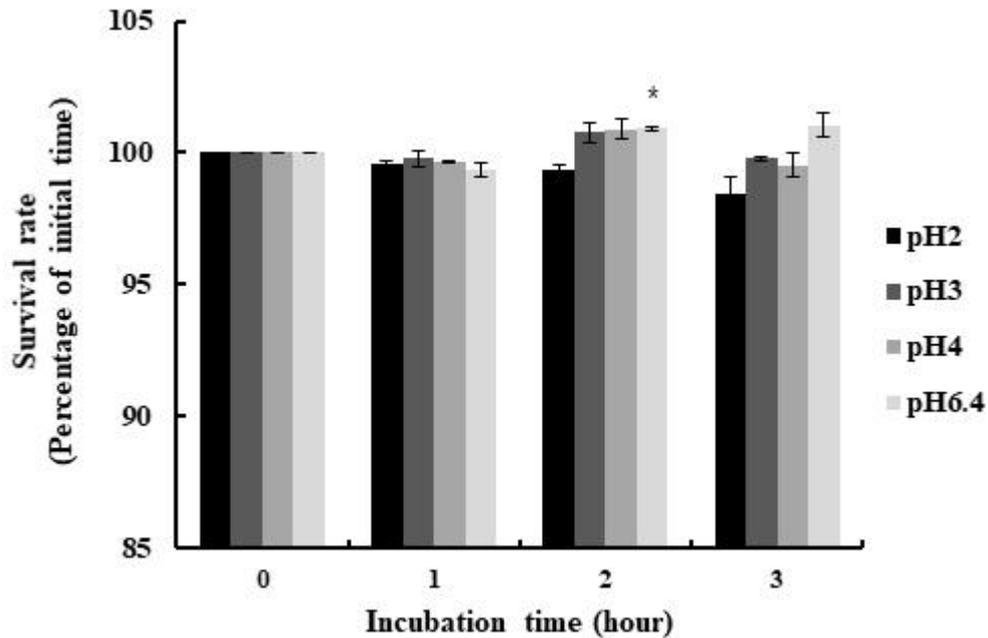


Fig. 5. Survival of *Lactobacillus plantarum* K79 after three hours in HCl solution (pH 2.0, 3.0, 4.0 and 6.4). All values are within the mean \pm standard deviation of the three replicates; * $p < 0.05$ compared with initial time (t-test)

-항균력 시험은 Gilliland & Speck(1977)의 방법에 따라 측정한 결과는 Table 7에 나타내었음.

Table 7. Inhibition of food poisoning bacteria *L. plantarum* K79 in MRS medium(*)

Food poisoning bacteria	Growth				inhibition rate(%)
	Food poisoning bacteria ^a		<i>L. plantarum</i> K79 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	$1.14 \pm 0.32 \times 10^7$	6.25	$5.50 \pm 1.27 \times 10^6$	4.96	51.75%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	$4.72 \pm 0.4 \times 10^5$	6.25	$2.94 \pm 0.01 \times 10^5$	4.83	37.71%
<i>Listeria monocytogenes</i>	$8.4 \pm 0.85 \times 10^6$	6.23	$5.60 \pm 0.14 \times 10^6$	4.89	33.33%
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4.6 \pm 1.13 \times 10^6$	6.24	$3.65 \pm 0.64 \times 10^6$	4.91	20.65%

* Initial numbers of *L. plantarum* K79 : $1.64 \pm 0.16 \times 10^6$ CFU/ml

a Measured after 6 hours of incubation at 37°C

-상기 표 7에서 보는 바와 같이, *L. plantarum* K79가 *Escherichia coli*에 대해 51.75%의 억제력을 보였고, *Salmonella Typhimurium*과 *Listeria monocytogenes*에 대해 각각 37.71%와 33.33%의 억제력을 보였음. *Staphylococcus aureus*에 대해 20.65%로 가장 낮은 억제력을 보였음.

-장부착능 시험은 Kim 등(2018)의 방법에 따라 측정한 결과는 Fig. 6에 나타내었음. Fig. 6에서 보는 바와 같이 대조구인 *Lactobacillus rhamnosus* LGG에 비해 유의성 있게 장부착능을 보였음.

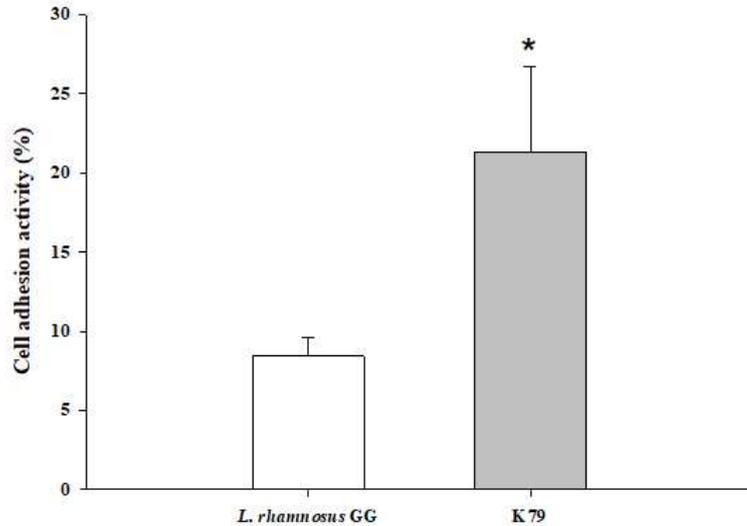


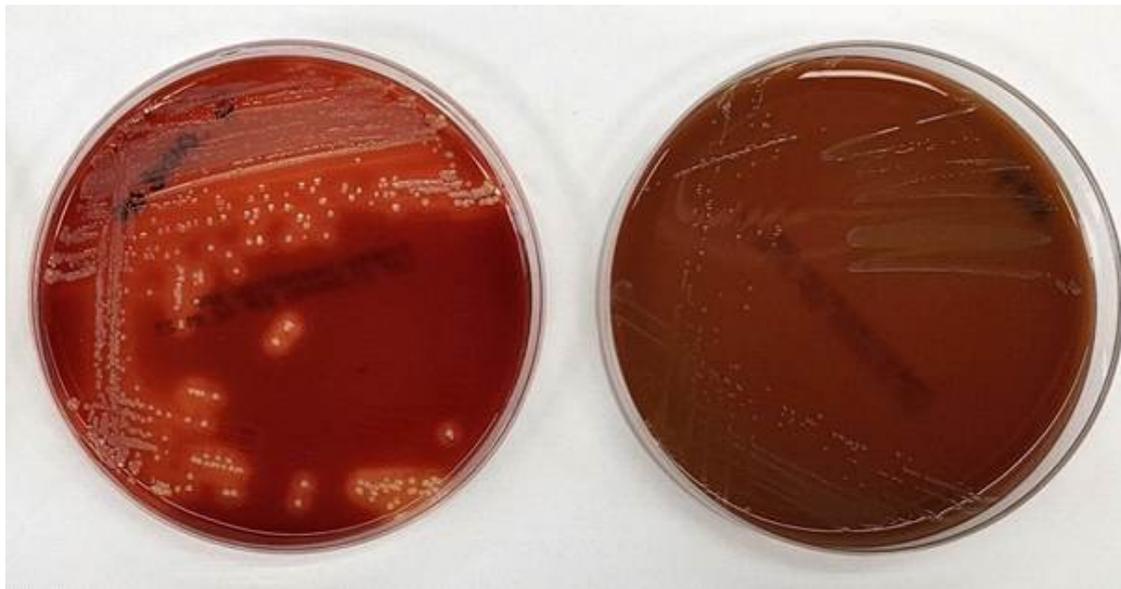
Fig. 6. Adhesion ability of *Lactobacillus plantarum* K79 to HT-29 cell. All values are within the mean \pm standard deviation of the three replicates. * $p < 0.05$ compared with control strain (t-test)

-D-lactate 생성여부를 확인하기 위하여 Megazyme 사의 Kit를 사용하여 분석한 결과(Table 8) D-Lactic acid가 평균 0.408 g/L 생성하는 것으로 나타남에 따라 신생아, 어린아이, Short bowel syndrome 환자에게 위험할 수 있으므로 섭취시 주의사항 등에 관련 문구를 명시하여야 함.

Table 8. D-Lactate Production of *L. plantarum* K79

Sample	D-Lactate (g/L)
1	0.404
2	0.401
3	0.420

-균주가 용혈활성을 가지고 있으면 숙주의 적혈구를 파괴시키므로 이를 확인하여 안전성을 평가하는데 필수적임. 용혈성 시험은 Donohue와 Sminen(1996)의 방법에 따라 측정한 결과는 Fig. 7에 나타내었음. Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 대조구인 *Staphylococcus aureus* 는 용혈활성이 있으나 *L. plantarum* K79는 용혈현상이 없는 γ 형으로 확인되었음. 이에 프로바이오틱스로 섭취하였을 시 인체에 유해성을 나타낼 수 있는 적혈구 용혈에 대한 안전성이 확인되었음.



Staphylococcus aureus

Lactiplantibacillus plantarum K79

Fig. 7. Hemolysis ability of *L. plantarum* K79

가. 반응표면분석법(RSM)을 이용한 *L. plantarum* K6 균주 배양조건의 최적화

-모두 27개의 구간에서 실험이 행해졌으며, 각각의 구간에 따른 종속변수(Y1, Y2)를 Table 9에 나타내었음. 이때 ACE 억제율(Y1)은 조건별 발효원액에서 100배 희석하여 나타낸 값임. skim milk 농도(X1)는 11%, 배양 온도(X2)는 42°C, 배양시간(X3)은 14.7746시간, 스타터 첨가량(X4)은 0.0268% 일 때 최적 ACE 억제능과 pH를 보이는 것으로 나타났으며 예상되는 ACE 억제능은 85%, pH는 5.2 이었음.

Table 9. Central composite design and responses of dependent variables for fermented milk by *Lactiplantibacillus plantarum* K6 to independent variables

Run Order	Independent variables				Response	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	-1	-1	69.2	5.59
2	1	-1	-1	-1	78.9	5.73
3	-1	1	-1	-1	75.4	4.96
4	1	1	-1	-1	82.5	5.20
5	-1	-1	1	-1	78.5	4.12
6	1	-1	1	-1	85.2	4.53
7	-1	1	1	-1	78.0	4.07
8	1	1	1	-1	83.0	4.38
9	-1	-1	-1	1	46.4	5.21
10	1	-1	-1	1	62.0	5.37
11	-1	1	-1	1	69.8	4.73
12	1	1	-1	1	51.8	4.93
13	-1	-1	1	1	59.9	4.01

14	1	-1	1	1	73.3	4.17
15	-1	1	1	1	66.1	3.90
16	1	1	1	1	76.0	4.16
17	-2	0	0	0	56.7	4.06
18	2	0	0	0	74.8	4.51
19	0	-2	0	0	66.2	4.66
20	0	2	0	0	65.9	4.82
21	0	0	-2	0	49.4	6.07
22	0	0	2	0	76.3	3.93
23	0	0	0	-2	84.2	4.86
24	0	0	0	2	71.4	4.14
25	0	0	0	0	69.4	4.32
26	0	0	0	0	72.8	4.32
27	0	0	0	0	71.3	4.32

X₁: Skim milk conc.(%), X₂: temperature(°C), X₃: incubation time(h), X₄: starter conc.(%)

Y₁: ACE inhibitory activity(%), Y₂: pH

-배양조건을 최적화하기 위하여 4가지 독립변수들의 조합에 대한 종속변수의 반응 값을 Table 10에 나타내었음. 그 결과 Y1은 X2를 제외한 대부분의 일차항에서 유의수준(p-value)이 0.05보다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타난 반면 교차항은 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났음. Y2는 모든 일차항에서 유의수준(p-value)이 0.05보다 낮게 나와 통계적으로 유의성이 나타났고, 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타났으며, 교차항은 X2X2, X3X3 및 X2X3이 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났음.

Table 10. Estimated effects and coefficients for ACE inhibitory activity and pH (coded units) about fermented milk by *Lactiplantibacillus plantarum* K79

	Y ₁		Y ₂	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
intercept	85.6667	0.000	5.14667	0.000
X ₁	3.5792	0.026	0.06167	0.200
X ₂	-0.7542	0.601	-0.02000	0.668
X ₃	6.8292	0.000	-0.44417	0.000
X ₄	0.3542	0.805	-0.06583	0.173

X ₁ X ₁	-1.0823	0.482	-0.01896	0.701
X ₂ X ₂	-1.2823	0.407	-0.07521	0.145
X ₃ X ₃	-5.0948	0.005	0.08979	0.087
X ₄ X ₄	0.3302	0.828	-0.00646	0.896
X ₁ X ₂	0.4313	0.806	0.00000	1.000
X ₁ X ₃	-0.4062	0.817	0.01875	0.742
X ₁ X ₄	-0.4937	0.779	0.01250	0.826
X ₂ X ₃	-1.4313	0.422	0.12250	0.048
X ₂ X ₄	-0.8938	0.613	0.06125	0.293
X ₃ X ₄	0.2687	0.879	-0.01500	0.792

X1: Skim milk conc.(%), X2: temperature(°C), X3: incubation time(h), X4: starter conc.(%)
 Y1: ACE inhibitory activity(%), Y2: pH

-상기에서 얻어진 결과를 바탕으로 구한 반응식은 Table 11과 같음. 실험 결과 얻어진 data를 Minitab software를 이용하여 반응표면분석한 결과를 바탕으로 적합한 2차 다항식의 모델을 구하였다. 각각의 독립변수에 대한 각각의 식은 아래 모델식과 같으며, 종속변수인 Y1과 Y2의 결정계수(R²)는 각각 0.791과 0.905로 나타났으며, p-value=공히 0.000으로 나타났음.

Table 11. Response surface model for making condition

Responses	Quadratic polynomial model	R ²	p-value
Y ₁	$Y_1 = 85.6667 + 3.5792X_1 - 0.7542X_2 + 6.8292X_3 + 0.3542X_4 + 0.4313X_1X_2 - 0.4062X_1X_3 - 0.4937X_1X_4 - 1.4313X_2X_3 - 0.8938X_2X_4 + 0.2687X_3X_4 - 1.0823X_1^2 - 1.2823X_2^2 - 5.0948X_3^2 + 0.3302X_4^2$	0.791	0.000
Y ₂	$Y_2 = 5.14667 + 0.06167X_1 - 0.02000X_2 - 0.44417X_3 - 0.06583X_4 + 0.00000X_1X_2 + 0.01875X_1X_3 + 0.01250X_1X_4 + 0.12250X_2X_3 + 0.06125X_2X_4 - 0.01500X_3X_4 - 0.01896X_1^2 - 0.07521X_2^2 + 0.08979X_3^2 - 0.00646X_4^2$	0.905	0.000

X1: Skim milk conc.(%), X2: temperature(°C), X3: incubation time(h), X4: starter conc.(%)
 Y1: ACE inhibitory activity(%), Y2: pH

-Table 12는 ACE inhibitory activity(%)에 대한 ANOVA (Analysis of variance) 결과를 나타내었음. Linear는 유의수준이 0.003으로써 매우 유의성이 높게 나타났으며, Regression과 Square는 각각 0.024와 0.043으로 유의성이 있는 반면, 2-way interactions는 0.971로 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났음.

Table 12. Analysis of variance for ACE inhibitory activity(Y_1) about fermented milk by *Lactiplantibacillus plantarum* K79

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y_1	Regression	14	2152.78	153.770	3.24	0.024
	Linear	4	1443.41	360.853	7.61	0.003
	Square	4	653.14	163.286	3.44	0.043
	Interaction	6	56.23	9.371	0.20	0.971
	Residual error	12	568.97	47.414	-	-
	Lack of fit	10	563.85	56.385	22.00	0.044
	Pure error	2	5.13	2.563	-	-
	Total	26	2721.76	-	-	-

DF, Degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, Mean square ($MS=SS/DF$). Y_1 : ACE inhibitory activity(%)

-Table 13은 pH에 대한 ANOVA (Analysis of variance) 결과임. Regression과 Linear는 각각 유의수준이 0.000으로써 매우 유의성이 높게 나타났으나 Square와 2-way interactions는 각각 0.122와 0.443으로 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났음.

Table 13. Analysis of variance for pH(Y_2) about fermented milk by *Lactiplantibacillus plantarum* K79

Response	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y_1	Regression	14	5.70276	0.40734	8.21	0.000
	Linear	4	4.93970	1.23493	24.89	0.000
	Square	4	0.45121	0.11280	2.27	0.122
	Interaction	6	0.31185	0.05198	1.05	0.443
	Residual error	12	0.59540	0.04962	-	-
	Lack of fit	10	0.59533	0.05953	1786.00	0.001
	Pure error	2	0.00007	0.00003	-	-
	Total	26	6.29816	-	-	-

DF, Degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, Mean square ($MS=SS/DF$). Y_2 : pH

-반응표면분석 결과 나타난 최적 조건에서의 coded 값과 uncoded 값을 Table 14에 나타내었음. 최적 조건일 때의 code 값은 $X_1=13.49$, $X_2=33.4$, $X_3=21.5013$ 그리고 $X_4=0.0578$ 로 나타났음. 즉 skim milk 농도(X_1)는 13.49%, 배양 온도(X_2)는 33.4°C, 배양시간(X_3)은 21.5013시간, 스타터 첨가량(X_4)은 0.0578%일 때 최적 ACE 억제능과 pH를 보이는 것으로 나타났음. 이 때 예상되는 ACE 억제능은 86.69%, pH는 4.6 이었으며, 실험값은 ACE 억제능은 85.5%, pH는 4.58 이었음(Table 15).

Table 14. Optimal conditions of ACE inhibitory activity and pH about fermented milk by *Lactiplantibacillus plantarum* K79

Dependent		Independent variables	Critical value (uncoded)	Predicted value	Stationary point
Y ₁ (ACE inhibitory activity(%))		X ₁	10.0	90.0000	Target
		X ₂	37.0		
		X ₃	17.8304		
		X ₄	0.200		
Y ₂ (pH)		X ₁	6.0000	4.6	Target
		X ₂	32.0017		
		X ₃	14.1670		
		X ₄	0.200		
Multiple response optimization	Y ₁ , Y ₂	X ₁	13.4931	-	-
		X ₂	33.4057		
		X ₃	21.5013		
		X ₄	0.0578		

Table 15. Predicted results of verification under optimized conditions of fermented milk by *Lactiplantibacillus plantarum* K79

Dependent	Predicted value	Experimental value
Y ₁	86.7 %	85.5 %
Y ₂	4.60	4.58

-독립변수(X_1 , X_2 , X_3 , X_4)가 종속변수(Y_1 , Y_2)에 미치는 영향을 Maple software(Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었음(Fig. 8).

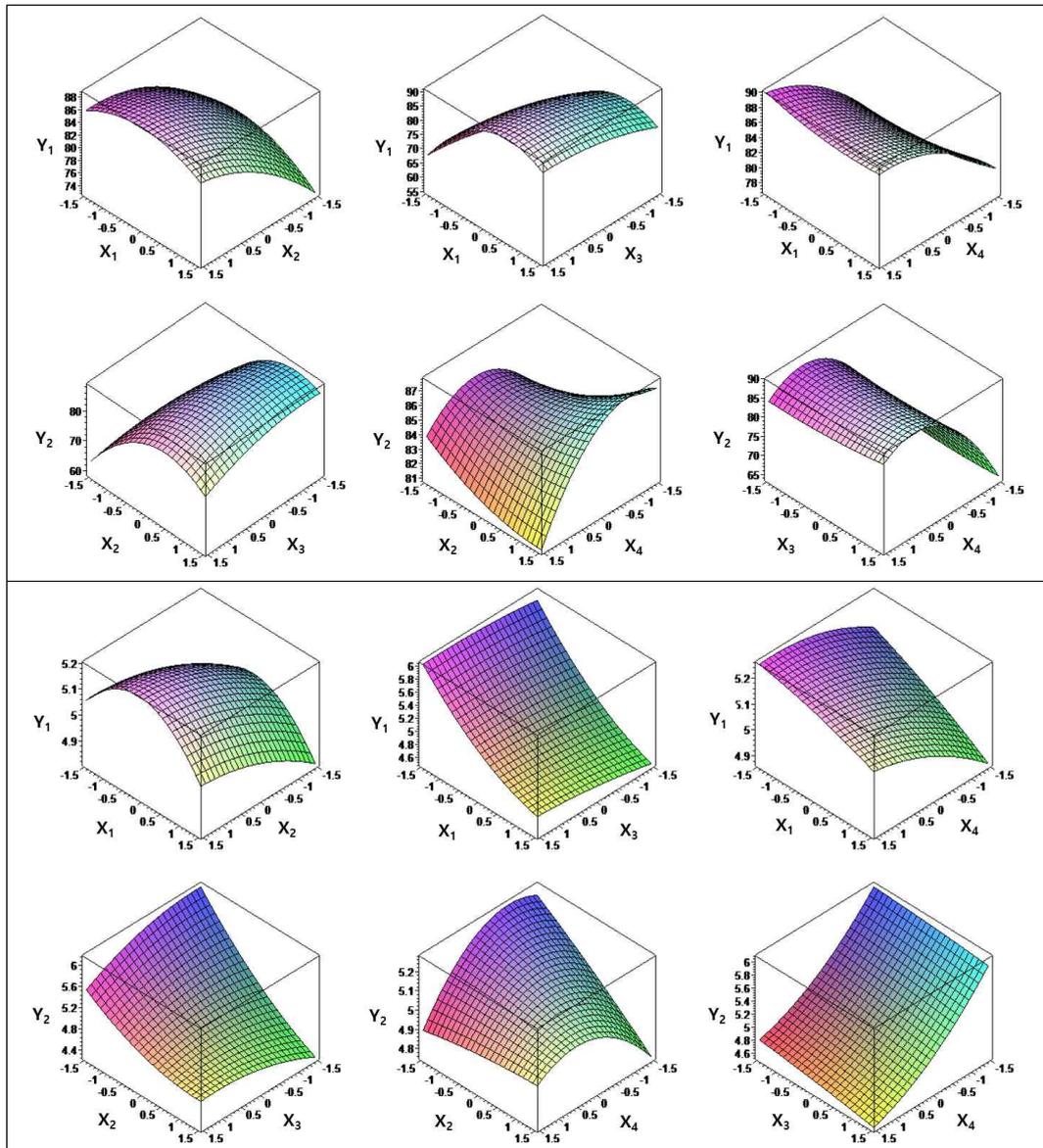


Fig. 8. Response surface plots for the effect of independent variables on dependent (ACE inhibitory activity and pH) in *Lactiplantibacillus plantarum* K79
 X_1 : Skim milk conc.(%), X_2 : temperature($^{\circ}\text{C}$), X_3 : incubation time(h), X_4 : starter conc.(%)
 Y_1 : ACE inhibitory activity(%), Y_2 : pH

-상기 최적조건인 탈지유 13.5%를 90℃에서 5분 살균한 다음 *L. plantarum* K79 0.0578%를 첨가하고 33.4℃에서 21.5시간 배양한 배양액과 열처리 후(110℃에서 1분 살균), 분무건조분말 및 분말을 13.5%로 환원한 액으로 구분하여 ACE 억제능을 분석한 결과는 다음 Table 16, Fig. 9와 같음.

Table 16. Effect on ACE inhibition ability by process step

(Unit : ACE inhibition rate, %)

Process step	Sample dilution concentration (dilution factor)			
	20 times	40 times	80 times	100 times
After incubation	89.39	82.01	62.85	55.01
After heat treatment	87.05	74.00	46.06	46.20
After spray drying	93.00	93.56	90.69	91.00
Reconstituted milk(TS 13.5%)	86.37	74.58	50.25	44.38



Fig. 9. Effect on ACE inhibition ability by process step

-열처리 전과 후에는는 약간 열처리 단계에서 ACE 억제능이 약간 감소하는 경향을 보인 반면 열처리 후 단계와 분무건조 후 동일한 농도로 환원하였을 때 ACE 억제능이 거의 큰 차이를 보이지 않았음.

○ 혈압 조절 기능성 균주의 안전성 입증 자료 확보

-㈜씨제이바이오사이언스에서 전장유전체 분석한 결과를 EZ BioCloud라는 데이터 분석 포털을 이용하여 확인한 결과 *L. plantarum* K6는 Genome size 3,439,990 bp, *L. plantarum* K79는 Genome size 3,224,464 bp의 염기서열을 확인할 수 있었음. (그림 1~4).

About Strain		About Genome	
Taxon name	Lactobacillus plantarum	Status	No. of CDSs
Strain name	K6	Q.C. passed	3,195
Original label	Lactobacillus plantarum K6	Sequencing depth of coverage	Mean of CDS length (s.d.)
		344.0x	899.1 (648.9)
		Assembly type	Median of CDS length (bp)
		COMPLETE	777
		No. of contigs	Mean length of intergenic region (s.d.)
		6	183.1 (212.8)
		Genome size (bp)	No. of rRNA genes
		3,439,990	16
		N50 (bp)	No. of tRNA genes
		3,281,897	73

그림 1. *Lactiplantibacillus plantarum* K6 균주의 전장유전체 분석 결과

About Strain		About Genome	
Taxon name	Lactobacillus plantarum	Status	No. of CDSs
Strain name	K79	Q.C. passed	3,066
Original label	Lactobacillus plantarum K79	Sequencing depth of coverage	Mean of CDS length (s.d.) (bp)
		469.0x	881.3 (622.4)
		Assembly type	Median of CDS length (bp)
		COMPLETE	766.5
		No. of contigs	Mean length of intergenic region (s.d.)
		5	176.2 (200.3)
		Genome size (bp)	No. of rRNA genes
		3,224,464	16
		N50 (bp)	No. of tRNA genes
		3,095,634	69
		GC content	
		44.6%	

그림 2. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 균주의 전장유전체 분석 결과

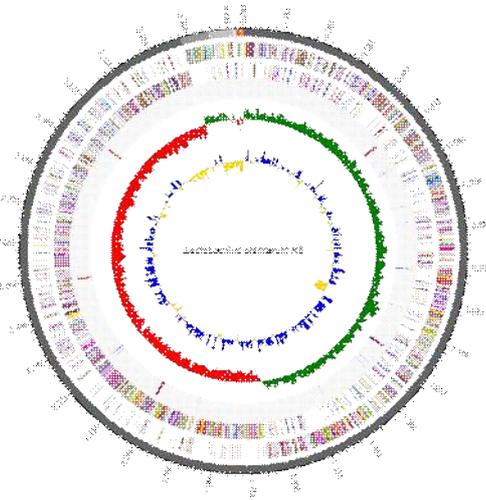


그림 3. *L. plantarum* K6 균주의 유전체 지도

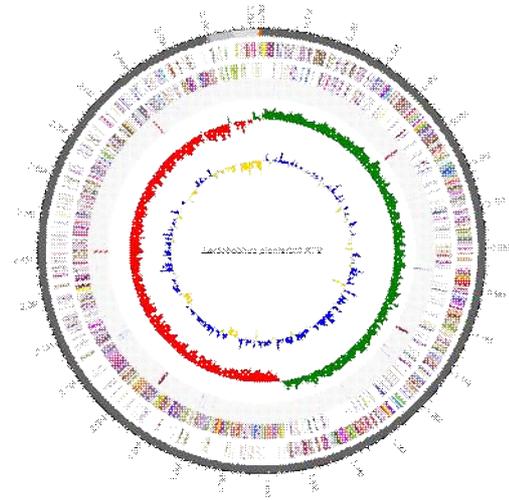


그림 4. *L. plantarum* K79 균주의 유전체 지도

-선발 균주의 전장유전체 염기서열을 가지고 종 수준으로 분석한 결과 두 균주 모두 *Lactiplantibacillus plantarum* (이전 학명 *Lactobacillus plantarum*) 으로 동정됨. (표 1~2)

표 1. *Lactiplantibacillus plantarum* K6 균주의 동정 분석 결과

No.	Hit taxon	ANI (%)	ANI coverage (%)	16S (%)	recA (%)	rplC (%)	Taxonomy
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	99.54	94.5	99.87	99.91	100	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus;Lactobacillus plantarum
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenterotensis</i>	95.64	85.1	99.87	93.26	99.68	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus;Lactobacillus plantarum

표 2. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 균주의 동정 분석 결과

No.	Hit taxon	ANI (%)	ANI coverage (%)	16S (%)	recA (%)	rplC (%)	Taxonomy
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	98.99	90.4	99.93	99.91	100	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus;Lactobacillus plantarum
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenterotensis</i>	95.64	86.4	99.93	93.26	99.68	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus;Lactobacillus plantarum

-선발 균주의 전장유전체 염기서열을 가지고 항생제 내성 및 독성 유전자를 분석하고 확인한 결과 두 균주 모두 항생제 내성 유전자는 존재하지 않았고 독성 유전자는 Truebac에서는 확인되었으나 NCBI BLAST로 이중 확인한 결과 독성 유전자 또한 존재하지 않는 것으로 판단됨. (그림 5~8, 표 3~4)

Summary						
Filename	Date (UTC)	RGI Criteria	# Perfect Hits	# Strict Hits	# Loose Hits	Download
Lactobacillus_plantarum_K6_contigs	December 21, 2021 07:29:16	Perfect, Strict, complete genes only	0	0	0	Download

Results								
RGI Criteria	ARO Term	SNP	Detection Criteria	AMR Gene Family	Drug Class	Resistance Mechanism	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
No data available in table								

그림 5. CARD 상에서 분석한 *Lactiplantibacillus plantarum* K6의 항생제 내성 유전자 결과

Antibiotic resistance gene(s)	
No known antibiotic resistant genes were detected.	
Showing 0 to 0 of 0 entries	

그림 6. Truebac 상에서 분석한 *Lactiplantibacillus plantarum* K6의 항생제 내성 유전자 결과

Summary						
Filename	Date (UTC)	RGI Criteria	# Perfect Hits	# Strict Hits	# Loose Hits	Download
Lactobacillus_plantarum_K79_contigs	December 21, 2021 07:47:41	Perfect, Strict, complete genes only	0	0	0	Download

Results								
RGI Criteria	ARO Term	SNP	Detection Criteria	AMR Gene Family	Drug Class	Resistance Mechanism	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
No data available in table								

그림 7. CARD 상에서 분석한 *Lactiplantibacillus plantarum* K79의 항생제 내성 유전자 결과

Antibiotic resistance gene(s)	
No known antibiotic resistant genes were detected.	
Showing 0 to 0 of 0 entries	

그림 8. Truebac 상에서 분석한 *Lactiplantibacillus plantarum* K79의 항생제 내성 유전자 결과

표 3. Truebac 상에서 분석된 *Lactiplantibacillus plantarum* K6의 독성 유전자 결과

Index	Ref ID	Location	Gene	E-value	% Identity	% Coverage
1	VFG002162	3132788...3133762	<i>Bsh</i>	8.390e-128	71.9	90.56
2	VFG000964	671748...672668	<i>hasC</i>	4.690e-118	71.81	87.19
3	VFG000077	709076...709666	<i>clpP</i>	2.140e-69	70.54	94.59

*cut-off value: identity 70%, coverage 60%

표 4. Truebac 상에서 분석된 *Lactiplantibacillus plantarum* K79의 독성 유전자 결과

Index	Ref ID	Location	Gene	E-value	% Identity	% Coverage
1	VFG000964	605159..606079	<i>hasC</i>	1.340e-118	72	87.19
2	VFG000077	634136..634726	<i>clpP</i>	5.030e-71	70.71	94.59

*cut-off value: identity 70%, coverage 60%

-독성 유전자 부분에서 두 개의 포털에서 분석 결과가 다른 이유는 Truebac에서는 분석되는 결과에 특정한 cut-off 값을 제시하지 않고 있고 전장유전체 분석 알고리즘이나 분석 tool에 따라 결과가 상이하게 나타날 수 있기 때문에 분석자의 견해에 따라 같은 결과에서 다른 분석 결과를 도출할 수 있어 이중적으로 확인해보는 것이 중요함. 본 기관에서는 해당 독성 유전자와 관련하여 삼중으로 확인한 결과 두 균주 내에 독성 유전자는 존재하지 않는 것으로 판단함. (그림 9~10)

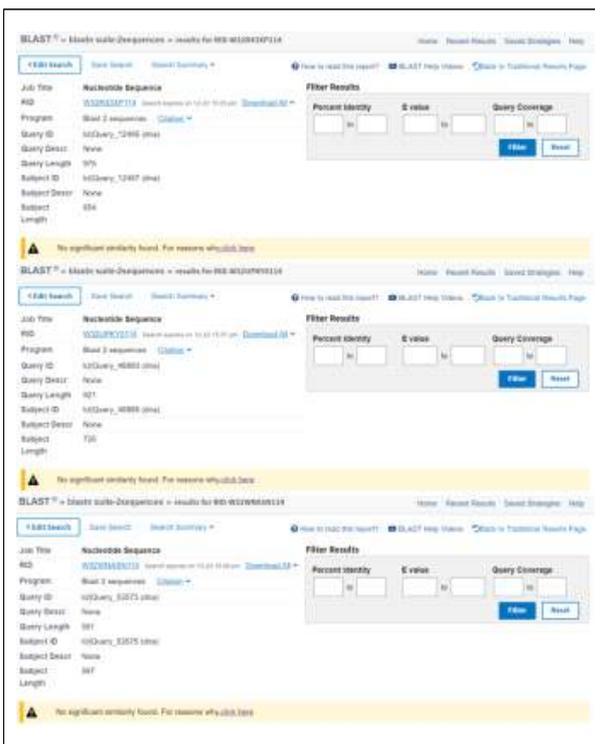


그림 9. NCBI BLAST로 *L. plantarum* K6의 독성유전자 이중확인한 결과

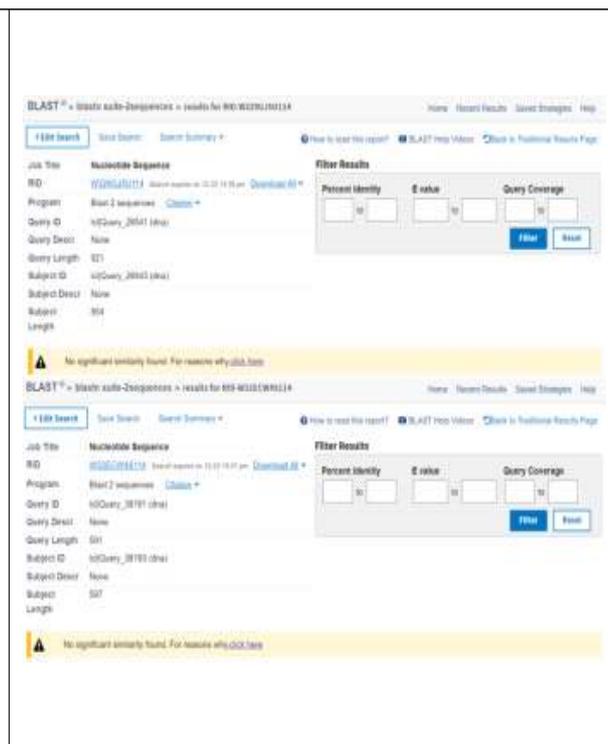


그림 10. NCBI BLAST로 *L. plantarum* K79의 독성유전자 이중확인한 결과

○ 인체적용시험용 제재 생산을 위한 대량 생산공정 개발 및 생산

- 5 L 발효조를 이용한 균주평가

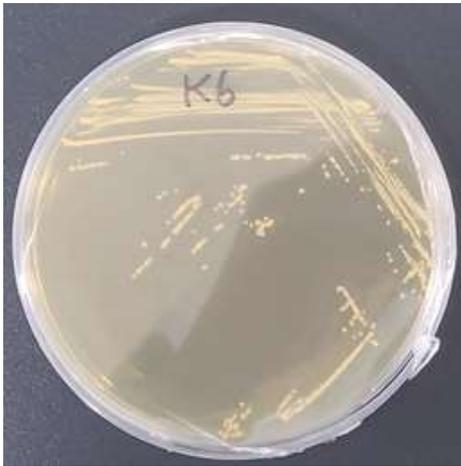
- 사전평가 진행 후, 선정된 4종의 균주를 제공 받아 5 L 회분식 발효조를 사용하여 균주의 생장을 평가하였음. *L. zeae* RMK354, *E. faecalis* RMB46, *L. plantarum* K6 및 *L. plantarum* K79 등 4종의 균주를 2회에 걸쳐 평가를 진행하였음(Fig. 11).
- 본 실험에서는 공동연구개발기관의 선행연구에서 확립된 100.0 g/L 농도의 환원탈지분유가 첨가된 배지를 사용하였고 1% 농도의 종균을 접종 후, 37 °C에서 24시간동안 혐기적으로 배양하였음. 1차 배양에서는 *L. zeae* RMK354와 *E. faecalis* RMB46 균주를 동일한 발효조건에서 평가하였음.
- 5 L 발효에 사용한 종균은 MRS 배지에서 37 °C에서 24시간 혐기적 배양하였고 발효된 종균수를 평가한 결과 *L. zeae* RMK354는 1.98×10^9 cfu/ml이고 *E. faecalis* RMB46는 1.28×10^9 cfu/ml로 측정되었음. 유사한 수의 두 종균을 접종하고 5 L 발효를 진행한 결과 *L. zeae* RMK354는 초기 O.D. 24.7에서 종료 O.D. 28.4로 3.7 증가하였으며 생균수의 경우 2.7×10^7 cfu/ml에서 1.1×10^9 cfu/ml로 증가하였음. *E. faecalis* RMB46는 초기 O.D. 21.1에서 종료 O.D. 7.6로 13.5 감소하였으며 생균수의 경우 3.0×10^7 cfu/ml에서 1.2×10^{10} cfu/ml 증가하였음(Fig. 12).
- 각 발효액의 초기 높은 O.D.는 배지에 첨가되는 환원탈지분유가 물에 녹지 않는 특성으로 인해서 모두 높았지만 *E. faecalis* RMB46는 성장과 동시에 환원탈지분유를 분해하여 종료액의 O.D.가 감소하였음. 발효 종료액의 생균수는 *E. faecalis* RMB46 균주가 *L. zeae* RMK354 균주보다 약 10배 우수한 성장량을 보여주었음.
- 2차 배양에서는 *L. plantarum* K6 및 *L. plantarum* K79 균주를 동일한 발효 조건에서 평가하였음. 5 L 발효에 사용한 종균은 MRS 배지에서 37 °C에서 24시간 혐기적 발효를 하였고 발효된 종균수를 평가한 결과 *L. plantarum* K6는 3.3×10^9 cfu/ml이고 *L. plantarum* K79 는 2.4×10^9 cfu/ml로 측정되었음. 유사한 수의 두 종균을 접종하고 5 L 발효를 진행한 결과 *L. plantarum* K6는 초기 O.D. 26.9에서 종료 O.D. 30.5로 3.6 증가하였으며 생균수의 경우 2.1×10^7 cfu/ml에서 1.5×10^8 cfu/ml로 증가하였음. *L. plantarum* K79는 초기 O.D. 24.4에서 종료 O.D. 27.4로 3.0 증가하였으며 생균수의 경우 1.7×10^7 cfu/ml에서 5.8×10^7 cfu/ml로 소폭 증가하였음(Fig. 13).
- 4 종류의 유산균을 비교 분석한 결과 *E. faecalis* RMB46가 비교적 우수한 성장곡선을 보여주었지만 전장유전체의 분석결과와 식품으로 사용이 어려워 *L. plantarum* K79를 대량생산 개발공정에 사용하기로 하였음.



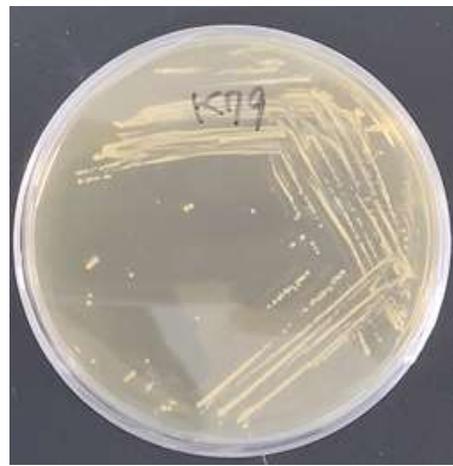
L. zaea RMK354



E. faecalis RMB46



L. plantarum K6



L. plantarum K79

Fig. 11. Picture of strains used for optimal culture conditions

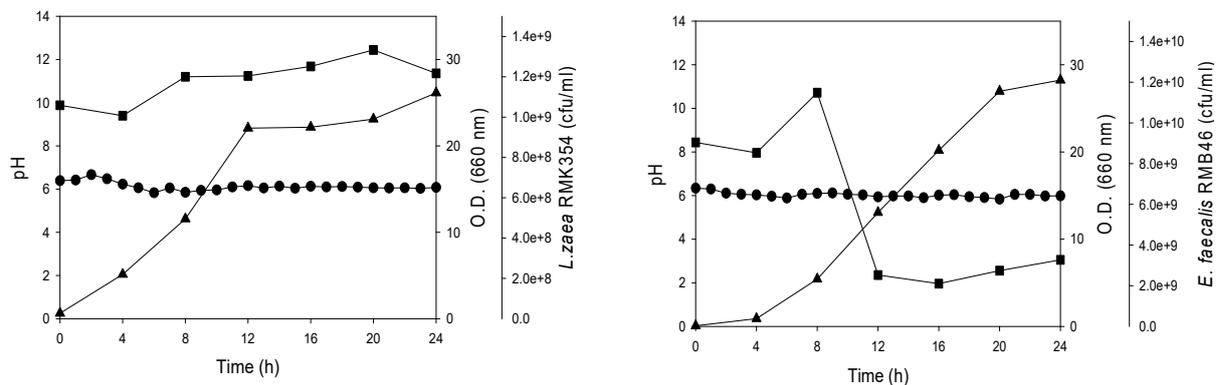


Fig 12. Time profiles of concentrations of pH, O.D. and cell number. Jar fermentation was carried out by *L. zaea* RMK354 and *E. faecalis* RMB46 in 5 L jar fermenter. (●) pH profile, (■) : O.D. profile, (▲) : Cell number

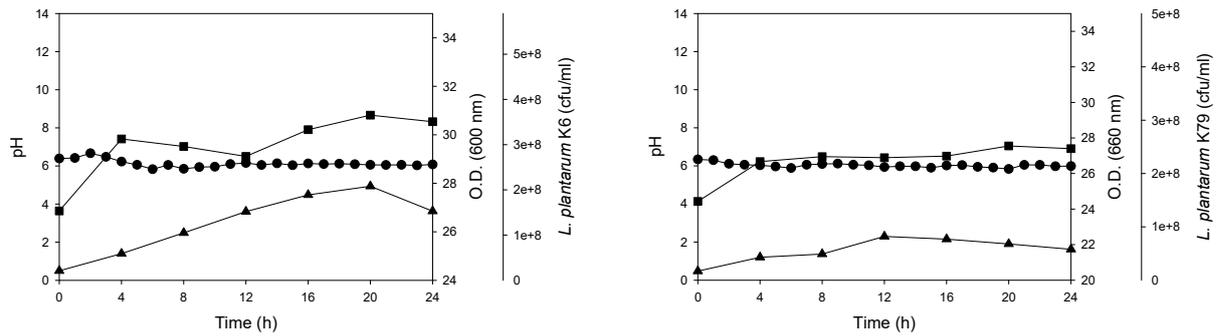


Fig 13. Time profiles of concentrations of pH, O.D. and cell number. Jar fermentation was carried out by *L. plantarum* K6 and *L. plantarum* K79 in 5 L jar fermenter. (●) pH profile, (■) : O.D. profile, (▲) : Cell number

- 5 L 발효조를 이용한 발효 배지선정

·균주 평가에서 선정된 *L. plantarum* K79 균주를 이용하여 대량생산 개발공정에 사용될 발효배지를 평가하였음. 본 실험에 사용된 발효배지는 표 1.의 구성과 동일한 농도로 제조하였고 121 °C, 1.5 기압의 조건에서 15분간 멸균하여 제조하였음.

·제조된 발효 배지에 1% 농도의 종균을 접종하고 *L. plantarum* K79 균주의 생장에 따른 pH 유지를 위하여 5.0 N NaOH를 사용하여 pH 6.0으로 유지하였음. 또한 50 rpm의 속도로 교반을 실시하며 37 °C에서 24시간동안 혐기적으로 배양하였음.

·5 L 배양에 사용된 종균은 MRS 배지에서 37°C 조건으로 18시간 혐기적 배양을 하였고 배양된 종균을 평가한 결과 O.D. 3.49, 1.3 X 10⁹ cfu/ml의 균체수가 존재하는 것으로 측정되었음. 발효기 A의 경우, 혈압조절에 도움을 주는 펩타이드 생산에 기질로 작용하는 135.0 g/L의 환원탈지분유와 10.0 g/L의 포도당이 발효 배지로 사용되었음. 발효기 B의 경우, *L. plantarum* K79 균주의 성장을 촉진시키기 위해서 발효기 A에 사용한 배지에 유산균 배양에 사용하는 배지성분을 추가로 첨가하여 발효하였음.

·5 L 발효액 제조 후, 성상을 관찰한 결과 멸균(121°C, 1.5 기압)으로 인하여 발효기 A, B 모두 갈변화가 진행이 되었으며 첨가한 환원탈지분유에 포함된 카제인단백질의 변성으로 인해 침전이 관찰되었음. 발효를 진행한 결과 발효기 A는 배양 0 시간에 8.2 X 10⁶ cfu/ml에서 종료시 8.7 X 10⁷ cfu/ml의 유산균수가 측정되었음. 발효 종료액에 포함된 포도당의 함량을 측정한 결과 6.6 g/L 잔존하였고 환원탈지분유에 포함된 락토오즈의 경우 64.8 g/L가 측정되었음(Fig 14).

·발효기 A에 사용한 배지 조성의 경우, *L. plantarum* K79 균주의 생장이 저조하였고 포도당 이용성도 낮았음. 발효기 B는 배양 0 시간 1.1 X 10⁷ cfu/ml에서 종료시 1.7 X 10⁹ cfu/ml의 *L. plantarum* K79 균수가 측정되었음. 발효 종료액에 포함된 포도당의 함량을 측정한 결과 0 g/L로 넣어준 포도당을 모두 소진하였고 환원탈지분유에 포함된 락토오즈의 경우 57.9 g/L가 측정되었음 (Fig 15).

·*L. plantarum* K79 균주의 최적 생장에 적합한 발효 배지의 성분은 135.0 g/L의 환원탈지분유와 10.0 g/L의 포도당 기본배지에 유산균 생장에 사용하는 배지성분을 추가로 첨가한 발효기 B 배지로 나타났음. 하지만 발효 종료액을 주관기관에 전달하여 ACE 저해활성

분석을 실시한 결과 발효기 A의 배지를 적용한 발효액이 우수하게 나타났음. 따라서 발효기 A에 사용된 135.0 g/L 환원탈지분유와 10.0 g/L의 포도당이 첨가된 배지를 대량생산 개발공정에 적용하기로 하고 *L. plantarum* K79 균주의 증식을 위해 발효공정의 최적화를 수행하였음.

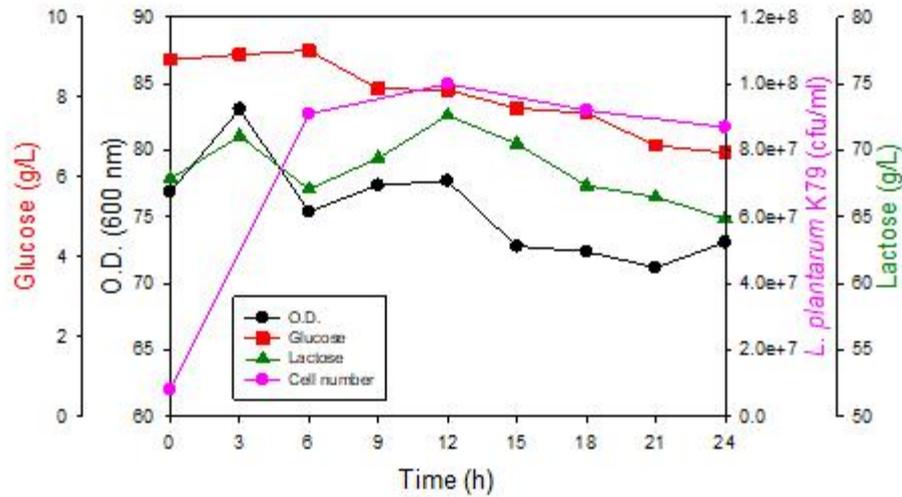


Fig 14. Time profiles of concentrations of O.D., glucose, lactose and cell number. The fermentation was carried out in a 5 L fermenter. (●) O.D., (■) Glucose, (▲) Lactose, (●) Cell number

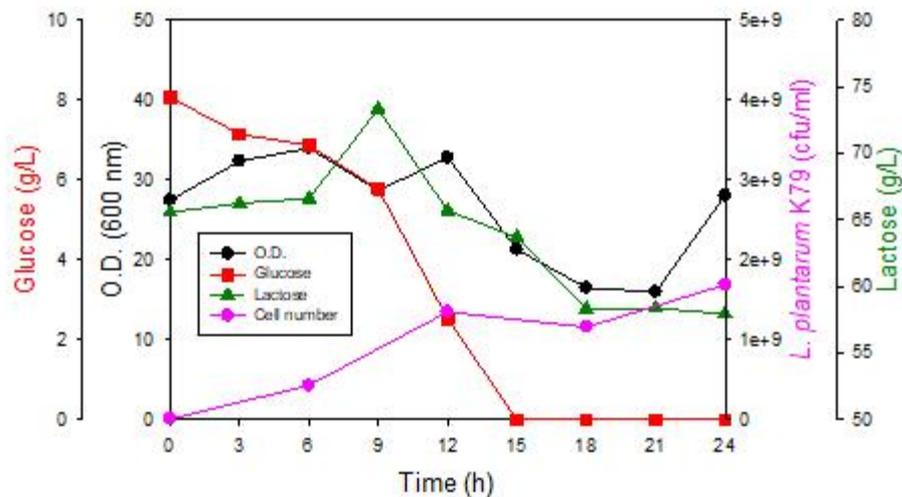


Fig 15. Time profiles of concentrations of O.D., glucose, lactose and cell number. The fermentation was carried out in a 5 L fermenter. (●) O.D., (■) Glucose, (▲) Lactose, (●) Cell number

- 5 L 발효조를 이용한 발효공정 확립

· 5 L 발효기를 이용한 발효배지 평가에서 *L. plantarum* K79 균주의 생장은 저조하였지만 ACE 효소의 저해 효과가 우수한 135.0 g/L 환원탈지분유와 10.0 g/L 포도당 조성의 발효배지를 선정하였음. 하지만 선정된 발효배지를 대량생산 공정에 적용하기 위해서는 *L. plantarum* K79 균주의 저조한 성장과 시제품 분말의 상품성을 높이기 위한 발효액 색도의 개선이 필요하였음.

· 따라서 본 실험에서는 *L. plantarum* K79 균주의 저조한 성장과 분말화 시료의 색도를 개선하기 위해서 배양 공정의 최적화를 진행하였음. 본 실험에 사용한 배지는 기존에 선정된 135.0 g/L의 환원탈지분유와 10.0 g/L의 포도당 조성의 배지를 사용하였음. 발효배지 제조시 멸균으로 인한 배지 성분의 변성을 방지하기 위해서 멸균(121 °C, 15분) 공정을 적용하지 않고 90°C에서 5분간

살균 공정을 적용하였음. 제조된 발효 배지에 1% 농도의 종균을 접종하고 50 rpm의 속도로 교반을 실시하며 37 °C에서 혐기적으로 배양하였음. 또한 발효시간을 33시간동안 적용하여 균체 생장을 평가하였으며 최적의 발효 종료시점을 선정하였음.

·5 L 발효를 수행한 결과 배양 0 시간에 7.8 X 10⁶ cfu/ml에서 종료시 3.2 X 10⁸ cfu/ml의 유산균수가 측정되었음. 또한 발효 종료액에 포함된 포도당의 함량을 측정한 결과 1.3 g/L 잔존하였고 환원탈지분유에 포함된 락토오스의 경우 65.78 g/L가 측정되었음 (Fig.16). 발효액의 pH도 초기 6.1에서 발효 종료시 4.4까지 감소가 확인되었음.

·발효 종료액의 *L. plantarum* K79 균체수, 잔존 포도당 및 pH 감소 패턴등으로 판단할 때 동일한 배지 조성을 사용한 이전 실험보다 생장이 증가함을 확인하였음. 이는 발효 배지 제조시 살균 공정(90°C, 5분)을 적용하여 발효배지의 변성이 감소하여 균체가 효율적으로 성장했을 것으로 판단이 되어짐. 또한 살균 공정 적용과 pH 조절제를 사용하지 않아서 발효 종료액의 색도 변화도 관찰되지 않았고 이로인해 분말 건조시 상품성이 증가할 것으로 판단이 됨.

·생산된 발효액을 ACE 효소 저해활성을 분석하였고 발효 18시간 이후부터 ACE 효소 활성 저해율이 증가하지 않고 유지되는 경향이 나타났음. 따라서 *L. plantarum* K79 균주의 발효 종료시간은 18시간 내외가 적절하다고 판단되어짐.

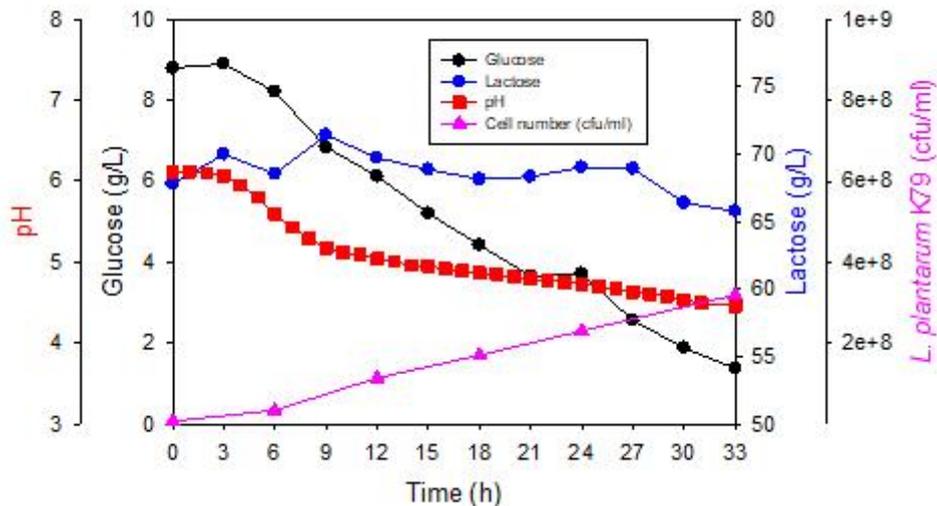


Fig 16. Time profiles of concentrations of pH, glucose, lactose and cell number. The fermentation was carried out in a 5 L fermenter. (■) pH, (●) Glucose., (◆) Lactose, (▲) Cell number

- 300 L 발효조를 이용한 대량생산 조건평가

·5 L 발효조에서 선정된 결과를 바탕으로 하여 300 L 발효조를 이용한 대량생산 공정조건을 평가하였음. 본 실험에 사용한 종균은 (주)메디오젠에 의뢰하여 생산한 분말화 종균을 사용하였고 종균에 포함된 *L. plantarum* K79 균체수 2.6X10¹¹ cfu/g로 측정되었음. 150 g의 분말화 종균을 1,350 ml의 생리식염수에 넣고 현탁하여 300 L 발효기에 접종하였고 300 L 발효조에서 150 L 용량으로 배양하여 분말화 공정평가를 진행하였음.

·135.0 g/L 농도의 환원탈지분유와 10.0 g/L 포도당을 첨가한 배지를 300 L 배양 배지로 사용하였으며 혐기적인 조건을 유지하기 위해서 25~50 L/min 조건으로 질소를 주입하였음. 5 L 사전 발효 결과 pH는 조절하지 않았으며 50 rpm의 속도로 교반을 실시하며 37 °C에서 18시간 배양하였음.

·300 L 배양 결과 배양 0시간의 유산균수는 2.6X10⁸ cfu/ml 나타내었고 배양 종료액의

유산균수는 3.92×10^8 cfu/ml 나타났음. 발효액의 포도당 함량을 측정한 결과 배양 0 시간에 9.9 g/L에서 발효 종료시 4.6 g/L로 측정되었고 발효액의 pH도 초기 6.3에서 발효 종료시 5.0까지 감소가 확인되었음 (Fig 17). 300 L 발효액의 균체수 및 포도당 이용성 등으로 판단한 결과 *L. plantarum* K79 균주의 생장이 저조함이 관찰되었음.

pH 및 Lactic acid의 농도로 판단하여볼 때 저조한 *L. plantarum* K79 균주의 생장은 2차 대사산물에 의한 성장 저해라기보다는 300 L 발효기에 접종한 종균이 활성화 되지 않았다고 판단되었음. 기존 배양에서 사용한 종균의 경우, 1차 및 2차의 액상 배양의 공정으로 인해 충분히 활성화된 상태로 300 L 발효기에 접종되었음.

본 실험의 경우, 분말화된 종균의 활성화 과정을 없이 접종하였기 때문에 300 L에서 원활한 균체 증식의 과정이 이루어지지 않았다고 판단됨. 따라서 향후 시제품 생산 발효에서는 분말화된 종균의 활성화 과정이 필요하다는 결론을 도출하였음. 그리고 300 L 배양 후 발생한 배양액 이용하여 분말화 평가를 실시하였음. 배양 종료 후, 배양액에 존재하는 유산균을 살균하기 위해서 85 °C에서 15분의 조건으로 열처리를 실시하였음.

살균이 완료된 배양액은 50 °C 이하로 냉각하고 분말화 공정평가를 위해서 멸균된 포장용기로 포장하여 화인FT로 이송하였음. 살균된 발효액을 분석한 결과 8.0×10^5 cfu/ml의 *L. plantarum* K79 균주가 검출되어 살균 공정의 개선도 필요하다고 판단되었음. 분말화 공정은 1차년도에서 평가하여 선정한 분무건조공정으로 진행하였고 발효 배지의 환원탈지분유의 함량 증가로 인해서 농축공정없이 분말화 공정을 진행하였음. 분말화 공정은 분말화 공정 전문업체인 화인FT에서 실시하였고 식품건조에 사용되는 일반적인 조건으로 진행하였음.

분말 시료를 평가한 결과에서도 20 cfu/g의 *L. plantarum* K79 균주가 검출되었고 생산 수율은 56.0%로 측정되었음. 본 실험의 결과를 바탕으로 300 L 종균의 활성화 공정과 발효액의 살균 공정을 개선하여 인체적용시험용 건조 분말을 생산하였음.

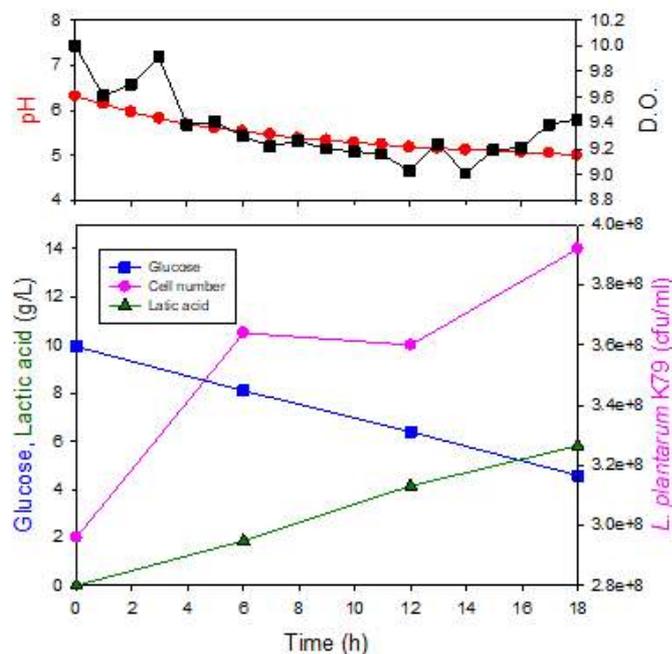


Fig 17. Time profiles of concentrations of pH, O.D., lactic acid, glucose and cell number. The fermentation was carried out in a 300 L fermenter. (●) pH., (■) D.O., (▲) Lactic acid, (■) Glucose, (●) Cell number

- 300 L 발효조를 이용한 인체적용시험용 소재 발효

·300 L 발효조를 이용한 사전 발효에서 나타난 문제점을 개선하여 인체적용시험에 사용될 건조분말을 생산하였음. 300 L 사전 발효에는 분말화된 종균이 활성화되지 않아 *L. plantarum* K79 균주의 생장이 저조하였음. 또한 발효 종료 후, 생산 균주의 완벽한 살균이 이루어지지 않아 생산된 분말에서 *L. plantarum* K79 균주가 검출되었음. 따라서 시제품 생산을 위한 본 발효에서는 종균의 활성화 공정과 살균 공정을 개선하여 발효를 진행하였음. 또한 본 발효에서는 pH를 조절하지 않기 때문에 *L. plantarum* K79 균주의 생장이 저해되는 pH에 도달하면 발효를 종료하도록 하였음.

·본 실험에는 *L. plantarum* K79 균주가 2.6×10^{11} cfu/g의 농도로 함유된 분말화 종균을 사용하였음. 분말화된 종균의 활성화 위해서 150 g의 분말화 종균을 1,350 ml의 발효배지(135.0g/L 환원탈지분유, 10.0 g/L 포도당)에 현탁하고 37°C에서 90 rpm 조건으로 1시간 배양하였음. 그 후, 활성화된 종균 1,500 ml을 발효기에 접종하였고 300 L 발효조에서 150 L 용량으로 배양하여 분말화된 시제품 생산을 진행하였음.

·인체적용시험용 소재는 135.0 g/L 농도의 환원탈지분유와 10.0 g/L 포도당을 첨가한 배지를 300 L 발효 배지로 사용하였으며 혐기적인 조건을 유지하기 위해서 25~50 L/min 조건으로 질소를 주입하였음. 발효기의 pH는 조절하지 않았으며 50 rpm의 속도로 교반을 실시하며 37 °C에서 배양하였음. 또한 발효 12시간 이후 pH가 4.0~4.5 범위에 도달하면 발효를 종료하였음. 발효는 12.5시간에 종료하였으며 그때 pH는 4.2로 측정되었음.

·발효 결과 배양 0시간의 유산균수는 1.1×10^8 cfu/ml 나타내었고 발효 종료액의 *L. plantarum* K79 균체 수는 9.2×10^8 cfu/ml 나타났음. 발효액의 포도당 함량을 측정된 결과 배양 0 시간에 10.3 g/L에서 발효 종료시 0 g/L로 측정되었음 (Fig 18). 분말화 종균의 활성화 공정을 적용하여 첨가한 포도당의 모두 소진되었고 *L. plantarum* K79 균주의 생장이 증가됨을 확인하였음. 또한 발효 종료 시점을 명확히 선정하여 발효 시간을 단축에 따른 생산단가 감소도 기대할 수 있었음.

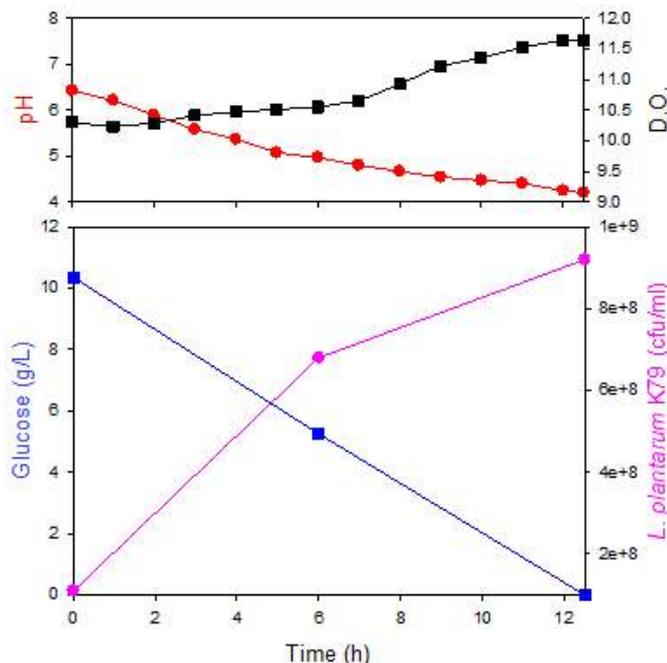


Fig 18. Time profiles of concentrations of pH, O.D., glucose and cell number. The fermentation was carried out in a 300 L fermenter. (●) pH., (■) D.O., (■) Glucose, (●) Cell number

- 분말화 공정의 비교 평가

·인체적용시험용 시제품 생산을 위해서 *L. plantarum* K79 균주 발효액의 분말화 조건을 평가하였음. 본 실험에는 KOBIOTECH사와 CELLTECH사의 발효기를 사용하여 300 L 발효를 진행하였음. 300 L 발효 종료 후, 발효액에 존재하는 *L. plantarum* K79 균주를 살균하기 위해서 85 °C에서 10분의 조건으로 열처리를 실시하였음. 열처리된 발효액에서 *L. plantarum* K79 균주는 측정되지 않았으며 열처리 후 발효액의 색도도 갈변화가 진행되지 않았음. 살균이 완료된 발효액은 50 °C 이하로 냉각하였고 KOBIOTECH사의 발효조로 생산된 배양액은 분무건조법(spray dry) 평가를 위해서 멸균된 포장용기로 포장하여 화인FT로 이송하였고 CELLTECH사의 발효조로 생산된 배양액은 동결건조법(freeze dry) 평가를 위해서 멸균된 포장용기로 포장하여 가온팜으로 이송하였음.

·분무건조 공정평가를 위해서 사용한 배양 종료액은 11.53%의 고형물을 함유하고 있었으며 1차 평가에서 분무건조 공정 중 기벽 부착 현상을 방지하기 위해 농축공정을 실시하였음. 149.3 kg의 배양액을 사용하여 60 °C에서 약 2시간 농축을 진행하여 50.1 kg 부피까지 농축을 진행하였음. 농축 완료액은 27.8%의 고형물 함유량을 나타내었으며 건조 분말로 13.94 kg로 환산되었음. 농축 완료액은 노즐 타입의 분무건조기로 분무 건조를 진행하였으며 10.0 kg의 분말 시료를 회수하였음. 약 28.3%의 분말 시료의 손실이 발생하였지만 농축 공정을 추가하여 1차 분무건조 공정에 발생한 대부분의 분말 시료가 기벽에 부착하는 현상을 방지할 수 있었음. 또한 시료 처리량이 증가하면 기벽에 부착되는 손실량의 비율이 낮아질 것으로 판단되어짐.

·동결 건조 공정평가를 위해서 사용한 배양 종료액은 11.90%의 고형물을 함유하고 있었으며 145.7 kg을 식품용 동결건조기에서 사용하여 처리하였음. 살균 종료액을 -30 °C의 온도에서 24 시간동안 동결한 후 48 시간동안 건조를 진행하였음. 건조 후 17.9 kg의 건조분말을 회수하였고 103.5%의 회수율을 보여주었음.

·분무건조와 동결건조 공정을 진행한 후, 얻어진 분말의 성상을 비교한 결과 농축공정이 포함되었음에도 불구하고 두가지 분말의 색도는 유사하였음. 하지만 분무건조 시료는 분말의 입도가 균일하게 유지되어진 반면 동결건조 시료는 재분쇄의 과정을 거쳐야 할 정도로 거칠게 건조되었음. 분무건조 방법을 적용하면 기벽에 부착되는 시료로 인해 동결건조법 보다 회수율은 낮지만 전반적인 시료의 성상은 우수하게 나타났고 처리량이 늘어나면 손실량이 비례적으로 줄어 들 것으로 판단됨. 또한 분무건조 방법이 대용량의 시료를 처리하는 공정에 적합하고 생산단가도 저렴하여 인체적용시험 시제품 제조에 분무건조기를 이용한 건조공정에 적합할 것으로 판단됨 (Fig. 19).



(A)



(B)

Fig. 19. Powder sample of Freeze dry (A) and Spray dry (B)

- 대량생산 공정 확립

· 위와 같은 결과를 토대로 혈압조절 기능성 소재의 대량생산공정을 확립하였으며 해당 공정을 공정도로 제작하여 개별인정형 신청 시 필요한 서류로 사용함 (그림 20).

- 인체적용시험용 소재 생산

· 인체적용시험용 건조 분말은 300 L에서 발효된 발효액을 사용하여 제조하였음. 발효가 종료된 발효액에 잔존하는 *L. plantarum* K79 균주의 완전한 살균을 위하여 열처리 공정을 실시하였음. 사전 평가에서 적용된 살균 조건(85℃, 15분)에서는 유산균 군체가 완전히 살균되지 않아서 85℃에서 20분간 살균 조건을 변경하여 실시하였음. 변경된 살균조건에는 *L. plantarum* K79 균주가 모두 살균됨을 확인하였음. 그 후 살균이 완료된 배양액은 50 ℃ 이하로 냉각하고 인체적용시험용 건조 분말을 생산하기 위해서 멸균된 포장용기로 포장하여 확인FT로 이송하였음.

· 분말화 제조 공정은 일반적으로 식품 제조에 많이 적용되며 대량 생산이 가능하고 생산단가가 저렴한 장점이 있는 분무건조법을 적용하였음. 인체적용시험용 건조분말 생산과정에서는 농축 공정을 적용하지 않았음. 이는 발효배지의 환원탈지분유의 함량이 증가하여 분무건조 공정시 건조 분말의 기벽 부착현상이 발생하지 않았고 농축공정으로 인해 2차 오염 및 시제품의 색도에 영향을 미칠 가능성이 있기 때문임.

· 300 L 발효기를 사용하여 150 L 발효액을 생산한 결과 16.5 kg의 건조분말은 생산하였으며 생산 수율은 77.1%로 측정되었음 (표 5). 생산된 건조 분말은 품질 분석을 위한 소량의 시료(표 6)를 제외하고 인체적용시험용 시제품 제작을 위해서 사용함 (그림 21).

제조공정도 NVK79 열처리배양건조물

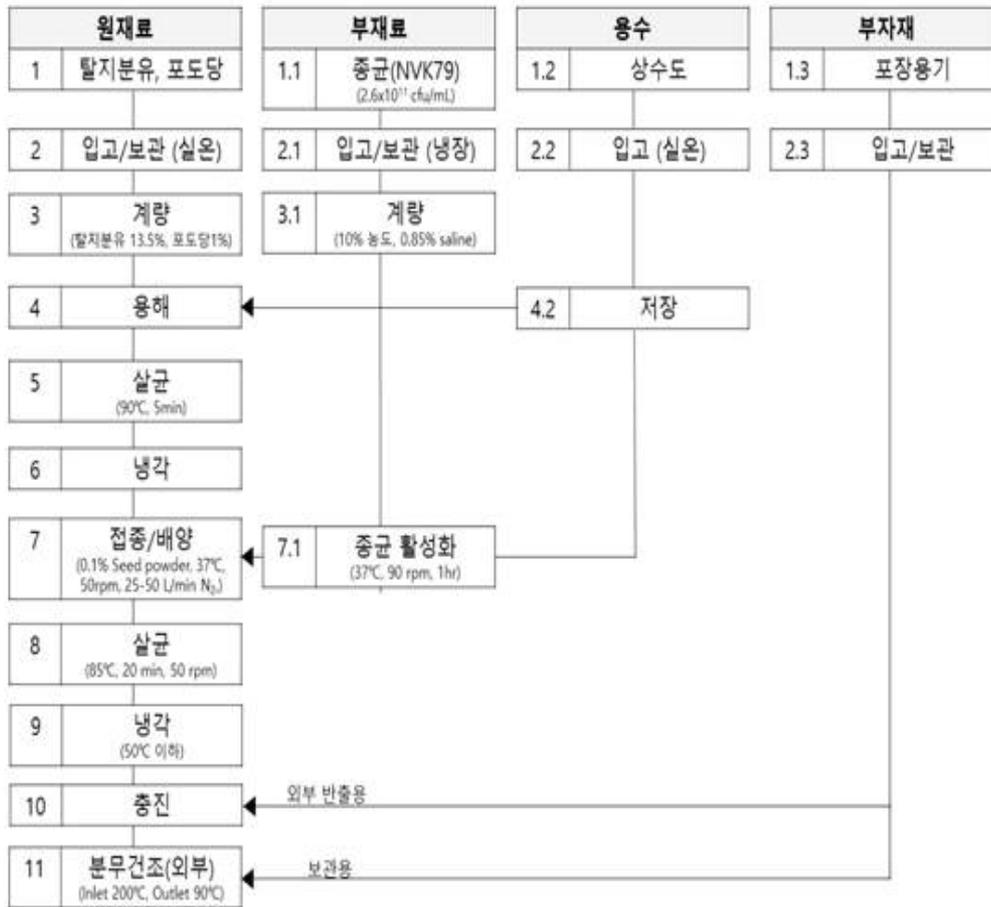


그림 20. 기능성 포스트바이오틱스 소재의 대량생산 공정도

표 5. 인체적용시험용 건조분말 생산결과

생산공정	생산량 (kg)	수율(%)	비고
발효종료액	21.39	100	150 L, 14.26% (S.M.)
살균종료액	92.90	92.9	140 L, 14.19% (S.M.)
건조분말	16.50	77.1	

표 6. 인체적용시험용 건조분말 분석결과

항목	기준규격	시험결과
성상	이미.이취가 없는 미백색 분말	적합
수분	8.0% 이하	4.5
대장균군	음성	음성
일반세균수	10 ³ cfu/g 이하	N.D.



그림 21. 인체적용시험용 건조 분말

○ 혈압 조절 기능성 균주 원료 표준화

-균주 접종 발효유의 분말화 및 사균체 측정과 관련하여 균주가 배지에서 발효되면서 생성된 대사산물이 분산되지 않아 부유물 또는 가라앉는 물질이 혼재하고 고형분 함량이 높아 건조 후 고형분이 뭉치고 내벽에 부착되는 현상이 나타나 고형분의 함량을 조정하거나 식용 계면활성제를 사용하여 분산시킨 후 homogenizer로 균질화 하는 작업이 필요할 것으로 보인다는 결과를 한국화학연구원으로부터 전달 받음.

-이러한 이유로 인해 선발 균주의 발효유에서 사균체 수를 지표 물질 선정하는 것은 어려울 것으로 판단함.

-균주 접종 발효유의 유기산 분석 결과 젖산을 중심으로 *L. plantarum* K6는 표 7~9에서 보는 바와 같이 6시간 배양 발효유에서 4.18 mg/g, 12시간 배양 발효유에서 7.45 mg/g, 24시간 배양 발효유에서 8.67 mg/g 검출되었음.

표 7. *L. plantarum* K6 접종 후 6시간 배양한 발효유의 유기산 검출량

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
젖산(mg/g)	4.18 mg/g	김란영
구연산(mg/g)	0.93 mg/g	김란영
게미산(mg/g)	0.91 mg/g	김란영
호박산(mg/g)	불검출	김란영
사과산(mg/g)	불검출	김란영
주석산(mg/g)	0.28 mg/g	김란영
옥살산(mg/g)	0.03 mg/g	김란영
초산(mg/g)	0.66 mg/g	김란영

표 8. *L. plantarum* K6 접종 후 12시간 배양한 발효유의 유기산 검출량

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
젖산(mg/g)	7.45 mg/g	김란영
구연산(mg/g)	0.84 mg/g	김란영
개미산(mg/g)	0.91 mg/g	김란영
호박산(mg/g)	불검출	김란영
사과산(mg/g)	불검출	김란영
주석산(mg/g)	0.25 mg/g	김란영
옥살산(mg/g)	0.02 mg/g	김란영
초산(mg/g)	0.81 mg/g	김란영

표 9. *L. plantarum* K6 접종 후 24시간 배양한 발효유의 유기산 검출량

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
젖산(mg/g)	8.67 mg/g	김란영
구연산(mg/g)	0.87 mg/g	김란영
개미산(mg/g)	0.90 mg/g	김란영
호박산(mg/g)	불검출	김란영
사과산(mg/g)	불검출	김란영
주석산(mg/g)	0.23 mg/g	김란영
옥살산(mg/g)	0.02 mg/g	김란영
초산(mg/g)	0.86 mg/g	김란영

-*L. plantarum* K79는 표 10~12에서 보는 바와 같이 6시간 배양 발효유에서 불검출, 12시간 배양 발효유에서 불검출, 24시간 배양 발효유에서 4.13 mg/g 검출된 것을 확인할 수 있었음.

표 10. *L. plantarum* K79 접종 후 6시간 배양한 발효유의 유기산 검출량

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
젖산(mg/g)	불검출	김란영
구연산(mg/g)	1.71 mg/g	김란영
개미산(mg/g)	0.85 mg/g	김란영
호박산(mg/g)	불검출	김란영
사과산(mg/g)	불검출	김란영
주석산(mg/g)	0.29 mg/g	김란영
옥살산(mg/g)	0.05 mg/g	김란영
초산(mg/g)	불검출	김란영

표 11. *L. plantarum* K79 접종 후 12시간 배양한 발효유의 유기산 검출량

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
젖산(mg/g)	불검출	김란영
구연산(mg/g)	1.64 mg/g	김란영
개미산(mg/g)	0.85 mg/g	김란영
호박산(mg/g)	불검출	김란영
사과산(mg/g)	불검출	김란영
주석산(mg/g)	0.26 mg/g	김란영
옥살산(mg/g)	0.05 mg/g	김란영
초산(mg/g)	불검출	김란영

표 12. *L. plantarum* K79 접종 후 24시간 배양한 발효유의 유기산 검출량

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
젖산(mg/g)	4.13 mg/g	김란영
구연산(mg/g)	1.59 mg/g	김란영
개미산(mg/g)	0.85 mg/g	김란영
호박산(mg/g)	불검출	김란영
사과산(mg/g)	불검출	김란영
주석산(mg/g)	0.30 mg/g	김란영
옥살산(mg/g)	0.04 mg/g	김란영
초산(mg/g)	0.22 mg/g	김란영

-표 13에서 보는 바와 같이 젖산을 제외한 다른 유기산들은 배양시간이 증가함에 따라 검출되는 양이 증가하지 않았지만 젖산에서는 배양시간이 증가함에 따라 젖산의 검출량 또한 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었음.

-해당 결과를 보았을 때 젖산을 지표물질 후보군으로 설정하여 개별인정형 등록을 준비할 수 있을 것으로 사료됨. 추가적으로 한국식품연구원에서 수행하는 항고혈압 peptide 분리 및 정제, 아미노산의 배열의 분석이 완료된 후 젖산 검출량에 따라 해당 peptide도 유의적으로 증가하는지 파악할 필요가 있을 것으로 사료됨.

표 13. *L. plantarum* K6, K79 시간별 배양 발효유의 유기산 분석 결과

시험항목 (mg/g)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K6			<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79		
	6시간	12시간	24시간	6시간	12시간	24시간
젖산	4.18	7.45	8.67	-	-	4.13
구연산	0.93	0.84	0.87	1.71	1.64	1.59
개미산	0.91	0.91	0.90	0.85	0.85	0.85
호박산	-	-	-	-	-	-
사과산	-	-	-	-	-	-
주석산	0.28	0.25	0.23	0.29	0.26	0.30
옥살산	0.03	0.02	0.02	0.05	0.05	0.04
초산	0.66	0.81	0.86	-	-	0.22

-로 표시된 부분: 불검출

-식약처 고시 시험법으로 한국식품과학연구원에서 진행한 혈압 조절 기능성 소재인 *L. plantarum* K79 열처리배양건조물의 규격 및 특성 시험의 결과는 다음과 같음.

-성상과 관련하여 “고유의 향미가 있고, 이미·이취가 없는 미색의 분말로 시험을 의뢰하여 적합 판정을 받았으며 중금속 5가지 항목과 관련하여 납 (0.03 mg/kg), 카드뮴 (불검출), 총비소 (0.01 mg/kg), 총수은 (불검출)로 납과 총비소에서 검출이 되었으나 이는 식약처 권장 기준 규격 이하(납: 1.0 이하, 비소: 1.0 이하)로 유해하지 않은 수준으로 판단됨. 잔류농약 5가지 항목과 관련하여 모두 불검출 판정을 받았으며 대장균군과 관련하여 음성 판정을 받음. 영양 성분은 나트륨이 414.70 mg/100 g, 수분 4.07 %, 탄수화물 55.06 %, 회분 7.32 %, 조단백질 32.34 %, 조지방 0.71 %으로 분석되었으며 기능성 소재의 열량은 100g 당 357.99 kcal로 분석되었음.

-식약처에서 건강기능식품 기능성 원료 신청 시 규격 및 특성 시험과 관련하여 Raw data를 포함한 공인시험성적서를 요구하고 있어 위 결과에 대한 Raw data를 시험성적서와 함께 분석기관으로부터 받음.(그림 22)

-중금속 분석 3 Lot, 대장균군 3 Lot, 잔류농약 1 Lot, 영양성분 1 Lot, 성상 3 Lot에 대한 분석을 완료하여 *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물의 규격 및 특성을 확정하고 원료에 대한 안전성을 검증함.

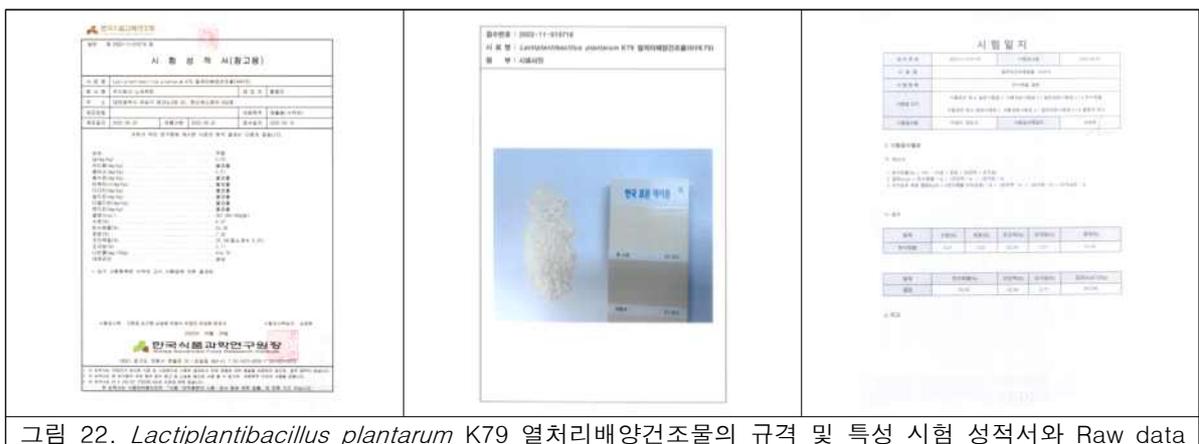


그림 22. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물의 규격 및 특성 시험 성적서와 Raw data

○ 혈압 조절 기능성 소재의 안전성 입증 자료 확보

가. 단회독성투여시험

-*Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK79)을 Sprague-Dawley 계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였음.

-암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았음. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 본 시험의 조건 하에서 *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK79)을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 이상으로 판단됨. (그림 23)

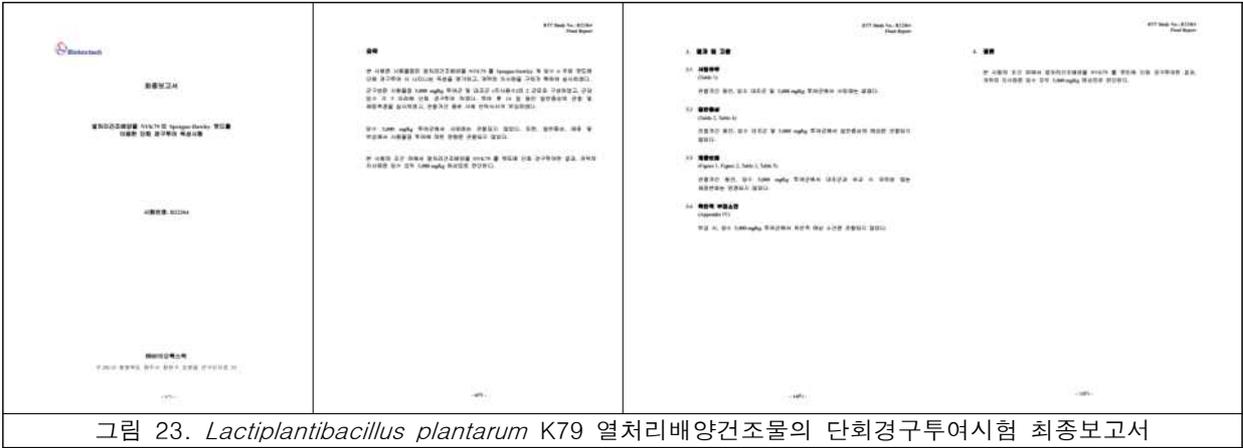


그림 23. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리 배양건조물의 단회경구투여시험 최종보고서

나. 복귀돌연변이시험

- *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리 배양건조물 (NVK79)의 유전자 돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균 (WP2uvrA 균주)을 이용하여 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 각각 검토하였음.

- 본 시험의 용량을 설정하기 위하여 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고 용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 용량 설정 시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았음.

- 본 시험의 결과, 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이 콜로니 수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았음. 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이 콜로니 수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였음. 이상의 결과로부터, 본 시험 조건 하에서 *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리 배양건조물 (NVK79)의 유전자 돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단됨. (그림 24)

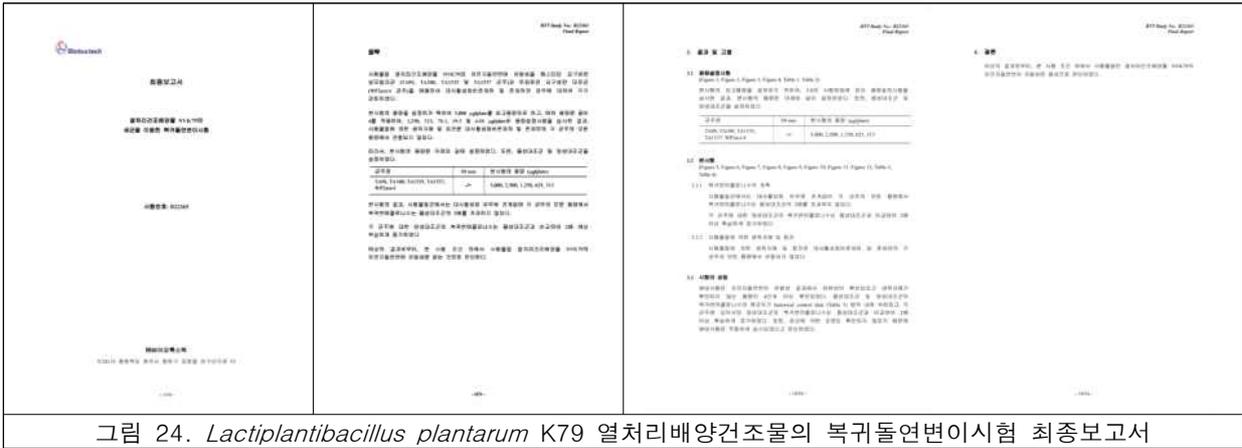


그림 24. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리 배양건조물의 복귀돌연변이시험 최종보고서

다. 염색체 이상 시험

- *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리 배양건조물 (NVK79)의 염색체 이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토하였음.

- 단시간 처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속 처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현 빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았음. 각 처리 계열에 대한 양성대조군에서는 구조 이상을 가진 세포의 출현 빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었음 ($p < 0.01$)

-음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있었음. 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었음. 또한, 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열증기상이 300개 이상 관찰되었으며, 판독 가능한 용량이 3단계 이상 확보되었음. 그리고, 음성대조군 내의 세포증식 기주가 충족되었고, 세가지 실험 조건 중 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에서 양성을 나타내지 않아 세 조건을 모두 수행하였음. 또한, 용량설정시험을 수행하여 최고농도를 설정하였기 때문에 최고농도를 선정하기 위한 기준도 적합하여 해당 시험을 적절한 시험 조건 하에서 실시된 것이 확인되었음. 이상의 결과로부터, 본 시험 조건 하에서 *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK79)의 염색체이상을 유발성은 음성으로 판단하였음. (그림 25)

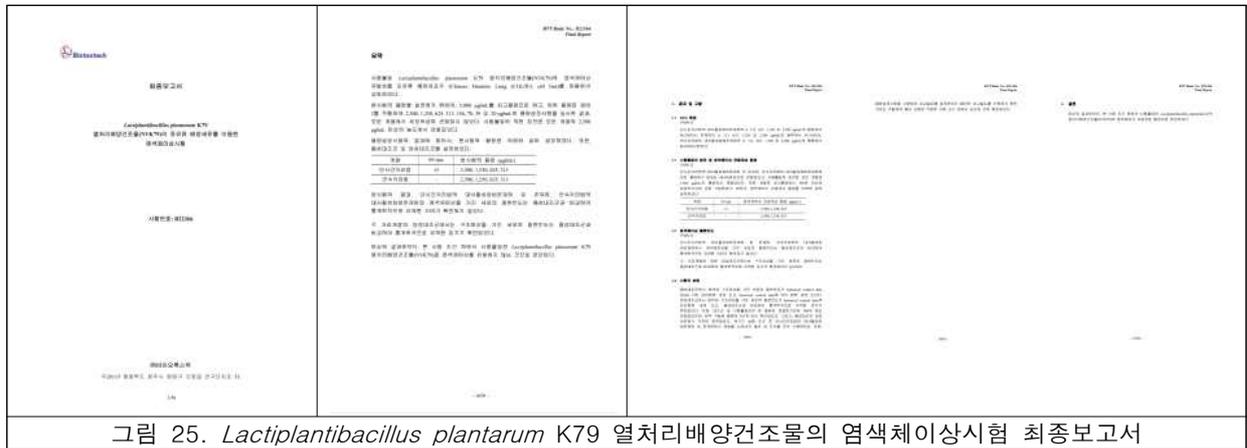


그림 25. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물의 염색체이상시험 최종보고서

라. 소핵시험

-*Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK79)의 랫드 골수세포에 대한 소핵 유발 유무를 평가하기 위하여 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 총 2회 경구투여하여 검토하였음.

-*Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK79)의 랫드를 이용한 경구투여 독성시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B22364P1)의 결과, 5,000 mg/kg 암수 투여군에서 사망이 관찰되지 않았기 때문에, 본 시험의 최고용량을 5,000 mg/kg 으로 설정하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500 및 1,250 mg/kg 의 시험물질군을 설정하였음. 또한, 본 시험에서는 소핵 유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였음.

-본 시험의 결과, 시험물질군의 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구 (MNPC, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았음. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았음.

-양성대조군의 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었음. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았음. 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK79)의 랫드 골수세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단됨. (그림 26)

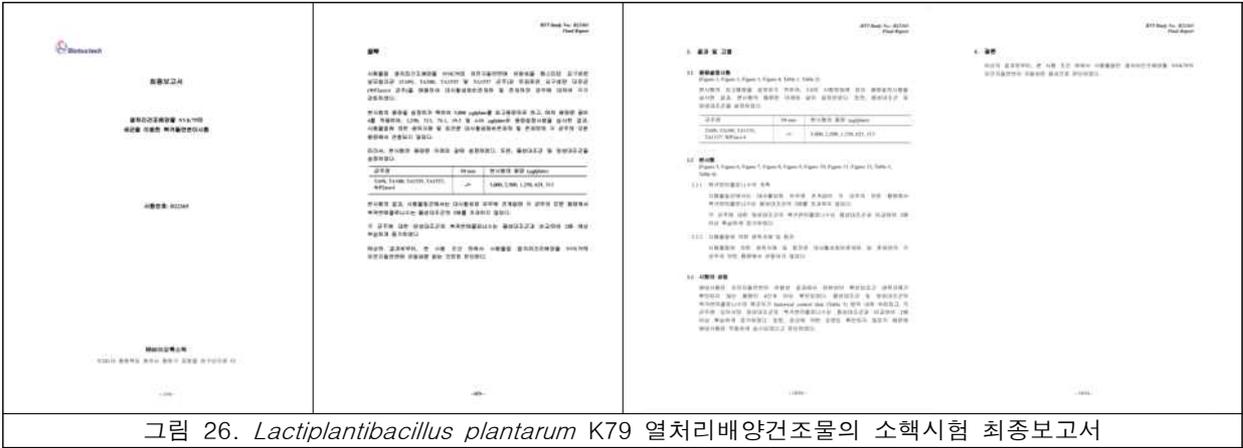


그림 26. *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물의 소핵시험 최종보고서

-위와 같은 결과를 토대로 혈압 조절 기능성 소재인 *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물 (NVK_79)에서 독성은 없는 것으로 보여지며 사람에게 대한 위해성과 유해성은 없을 것으로 사료됨.

마. 유산균 수 분석

-포스트바이오틱스 소재의 완전 사멸 상태를 증명하기 위해 최종 소재에 대한 유산균 수 분석을 식약처 공인시험분석기관인 (주)한국유로핀즈에 맡겨 진행함. 유산균 수 분석 결과 그림 27과 같이 당사가 생산한 기능성 포스트바이오틱스 소재의 유산균 수는 0 cfu/g으로 단 하나도 관찰되지 않았음. 따라서 당사가 위탁연구기관과 확정된 기능성 포스트바이오틱스 소재의 생산 공정이 제대로 설정되었다는 것도 확인할 수 있었음.



페이지 번호
AR-24-HX-001725

시험성적서



성적서 발행일 15-Jan-2024

성적서 번호: AR-24-HX-001725

주식회사 노베팜코
대전광역시 유성구 테크노3로 65
632호(관동동, 한신에스이타워)

시험 번호:	EUKR01-00039530 / 984-2024-01000798
검체명:	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79 열처리배양건조물(NVK79)
제조일자:	2024-08-05
발주일:	09-Jan-2024
용량:	100g
시험의뢰목적:	치중량

Test Result(s):

100088	유산균수 분석방법: 식물의 기준 및 유역	결과	Unit	기준
	유산균수	0	cfu/g	

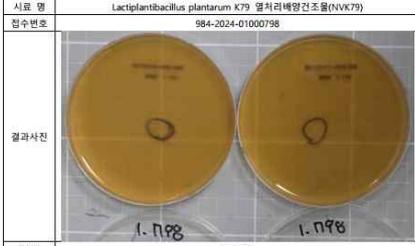
서명: *Jungsoo Lim*
Jungsoo Lim
Technical Manager

비고:
* 본 시험은 Eurofins group내부의 위탁 시험 결과입니다.
* 본 시험은 Eurofins group내부의 위탁 시험 결과입니다.
* 본 시험성적서는 의뢰자가 제시한 시료에 대한 결과입니다. 위 시험결과를 시험한 항목에만 관련됩니다. 이 시험성적서는 시험소의 시험 용량이 일부 부족을 알립니다.
* 이 보고서에 첨부된 확인서 필요하신 경우 EurofinsKoreaAnyangASM@eurofins.com으로 요청 바랍니다.
* 본 시험은 과학적 유효성을 가진 분석서비스 및 기타 목적이 적용 됩니다. Eurofins Korea Analytic Service Co., Ltd.

END OF REPORT

유산균수 결과 Raw Data

1. 의뢰 업체 : 노베팜코
2. 의뢰 일자 : 2024. 01. 09.
3. 분석 기간 : 2024. 01. 10. ~ 2024. 01. 15.
4. 의뢰 시료 : *Lactiplantibacillus plantarum* K79 열처리배양건조물(NVK79) 3개
5. 접수 번호 : 984-2024-01000798, 984-2024-01000799, 984-2024-01000800
6. 분석 방법 : 식물의 기준 및 규격, 제8 일반시험법, 4.미생물시험법, 4.9 유산균수
7. 분석 결과 및 사진

시료 명	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79 열처리배양건조물(NVK79)
접수번호	984-2024-01000798
결과사진	
결과	0 cfu/g

Eurofins Korea Analytic Service Co., Ltd.
13, Sanbon-ro 101beon-gil, Gunpo-si, Gyeonggi-do, Korea
Phone: 82-31-361-7777 Fax: 82-31-361-7799
www.eurofins.co.kr

* 본 성적서 ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련된 성적서임을 밝힙니다.

그림 27. 기능성 포스트바이오틱스 소재의 유산균 수 분석 결과

○ 소재의 혈압조절 peptide 분리

-발효탈지유를 cut-off 1 kDa, 3 kDa, 5 kDa 10 kDa 그리고 30 kDa membrane으로 분획하고 분자량 분포도를 분석하였으며, 그 결과는 Table 1과 Table 2과 같음. membrane으로 분획한 결과, *Lactobacillus plantarum* K6에 의해 발효된 탈지유 분획물 중 1 kDa 이하가 77.98%로서 대부분을 차지하였고 그 다음으로 1-3 kDa이 10.64%를 차지하였음. 또한 *Lactobacillus plantarum* K79에 의해 발효된 분획물 중 1 kDa 이하가 83.33%로서 대부분을 차지하였고 그 다음으로 1-3 kDa이 13.69%를 차지하였음. 따라서 두 균주에 의한 발효탈지유 분획물 모두 대부분이 분자량 1000 이하로 나타났음.

Table 1. Recovery rates of skim milk1) hydrolysate fermented by *Lactobacillus plantarum* K6 after ultra filtration using vacuum-drying or moisture analysis

Membrane	vacuum-drying (%)	moisture analysis (%)
whole	100	100
More than 30,000 Da	7.06	7.10
10,000 - 30,000 Da	0.98	1.40
5,000 - 10,000 Da	1.76	2.59
3,000 - 5,000 Da	1.58	1.91
1,000 - 3,000 Da	10.64	11.91
1,000 Da or less	77.98	75.09

주) fermented skim milk : 0.0268% of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* K6 strain was inoculated into 11% skim milk containing 1% glucose and then cultured at 42°C for 14.8 hours.

Table 2. Recovery rates of skim milk1) hydrolysate fermented by *Lactobacillus plantarum* K79 after ultra filtration using vacuum-drying or moisture analysis

Membrane	vacuum-drying (%)	moisture analysis (%)
whole	100	100
More than 30,000 Da	1.74	1.54
10,000 - 30,000 Da	0.50	0.57
5,000 - 10,000 Da	0.55	0.64
3,000 - 5,000 Da	0.19	0.10
1,000 - 3,000 Da	13.69	15.52
1,000 Da or less	83.33	81.63

주) fermented skim milk : 0.0578% of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* K79 strain was inoculated into 13.49% skim milk containing 1% glucose and then cultured at 33.4°C for 21.5 hours.

-수율을 감안하여 1 kDa이하와 1-3 kDa 분획물의 ACE 억제활성을 측정한 결과는 Table 3, Fig. 1과 같음. 10mg/ml 농도에서 5배, 10배, 20배, 40배, 80배, 160배, 640배로 희석하여 IC50을 측정하였을 때 *Lactobacillus plantarum* K6 균주에 의해 발효된 탈지유 분획물 중 1 kDa이하는 2.5 mg/ml, 1-3 kDa은 0.6 mg/ml, *Lactobacillus plantarum* K79 균주에 의해

발효된 탈지유 분획물 중 1 kDa이하는 1.1 mg/ml, 1-3 kDa은 0.8 mg/ml로 나타났음. 1 kDa이하에 비해 1-3 kDa이 ACE억제활성이 높게 나왔으나 1 kDa이하는 염을 제거하게 되면 ACE 억제활성이 더 높아질 것으로 예상되고 또한 수율이 6-7배 함량이 높아 1 kDa이하를 선정하여 peptide를 분리하는 것이 좋을 듯하며, *Lactobacillus plantarum* K6보다 K79 균주에 의해 발효된 탈지유 분획물을 선정하는 것이 효과적으로 보였음.

Table 3. ACE inhibitory activity(IC50) of skim milk1) hydrolysate fermented

(Unit : %)

Sample dilution factor(Times)	5	10	20	40	80	160	320	640
Sample dilution concentration	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	0.003125	0.001563
K6, 1 kDa	44.91	31.92	12.46	10.19	4.02	4.34	1.75	-1.27
K6, 1-3 kDa	86.05	67.81	47.60	29.48	17.97	9.99	4.09	3.35
K79, 1 kDa	71.80	49.72	30.76	17.22	11.12	5.82	5.88	1.53
K79, 1-3 kDa	80.31	60.20	37.47	21.99	13.66	7.18	0.48	-5.55

1)concentration 10mg/ml

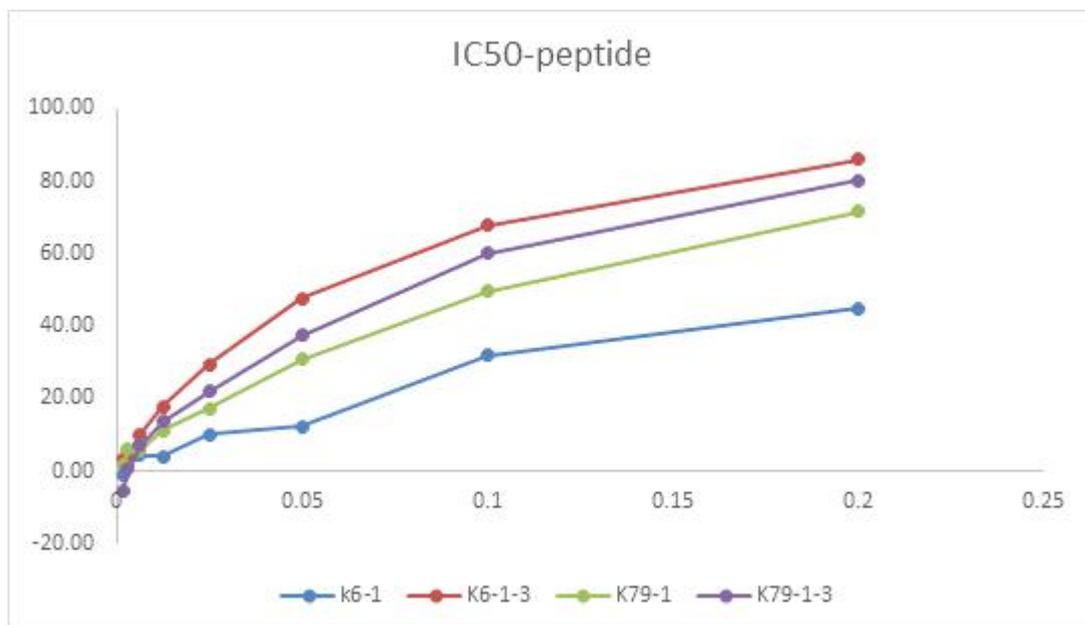


Fig. 1. ACE inhibitory activity(IC50) of skim milk hydrolysate fermented

-*Lactobacillus plantarum* K79에 의한 발효물의 peptide를 Superdex peptide column, Vydac column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같음. Superdex peptide column으로 fraction 별로 분획하여 9개의 획분(Fig. 2, Table 4)을 얻었음.

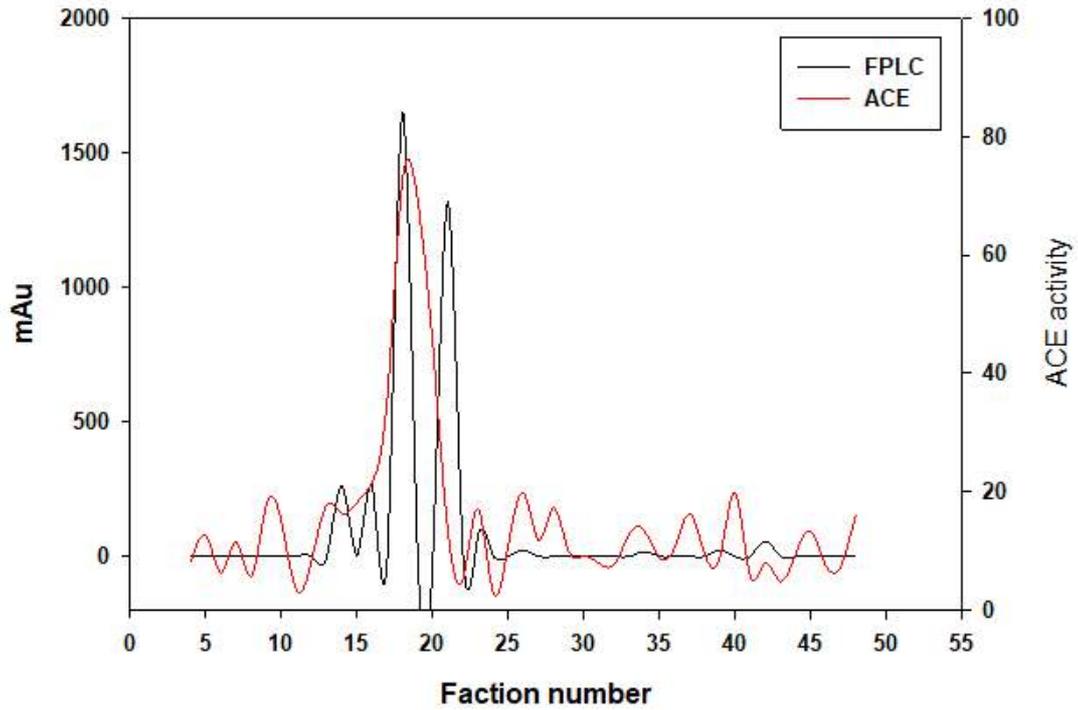


Fig. 2. Gel chromatogram of fermented milk peptide on Superdex peptide column

Table 4. Purification of ACE inhibitory peptide by Superdex peptide column from fermented milk peptide

Retention time	Peak height	ACE activity
14.98	263.7004	16.176
16.1	264.408	21.7317
18.41	1652.497	72.8815
21.18	1315.879	13.3488
23.37	85.211	17.1582
26.45	21.393	19.7932
34.26	16.844	13.3799
39.17	22.299	8.952
42.46	55.239	7.9957

-이들 획분을 ACE 억제 활성을 측정한 결과 3번째 획분(18, 19 peak)이 72.88%(80배 희석한 값)로서 가장 높은 활성을 보였음. 이때 Superdex peptide column 3번째 분획에서 얻어진 획분을 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 펩타이드를 분석한 결과는 다음 Fig. 3~ Fig. 6과 같으며, 8개의 펩타이드가 동정되었음.

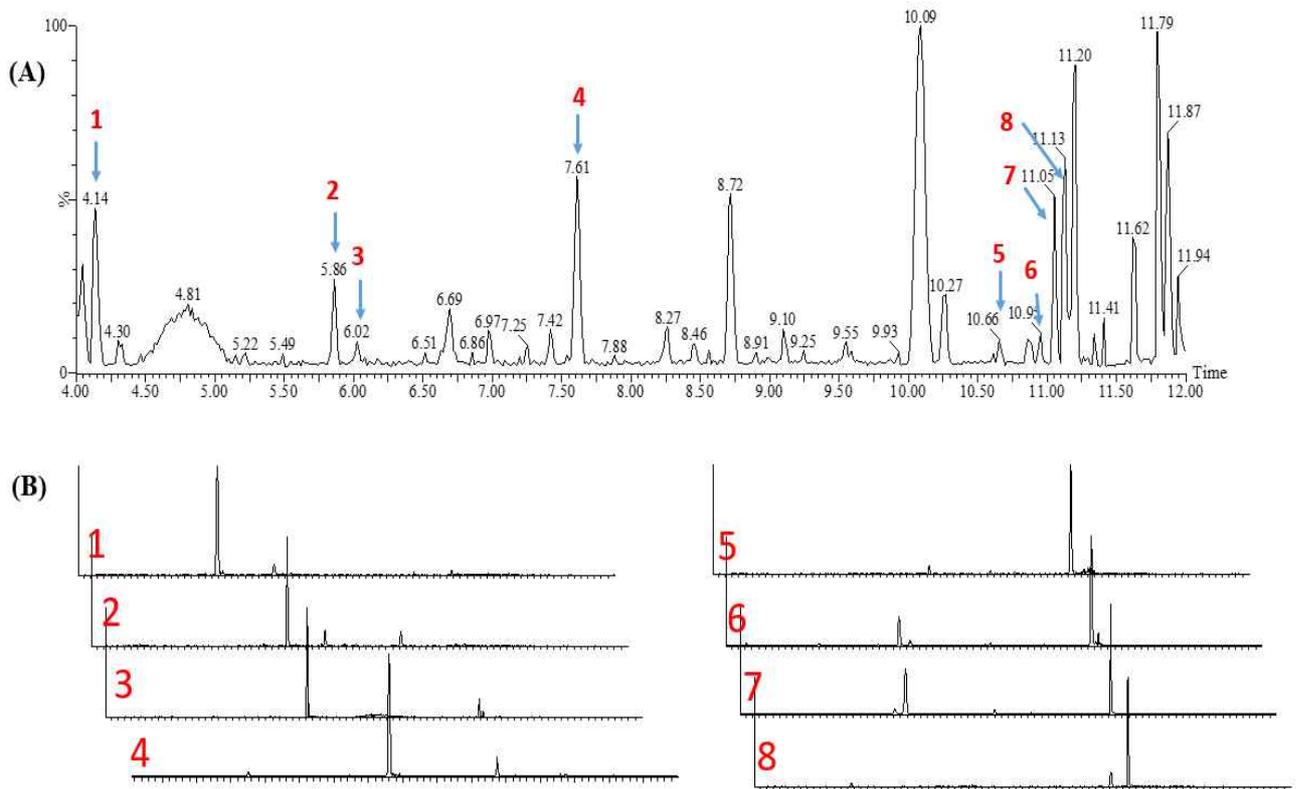


Fig. 3. Representative UPLC-Q-TOF MS chromatogram of the collected fraction (A3) analyzed using HPLC (A) and peptide peaks (B).

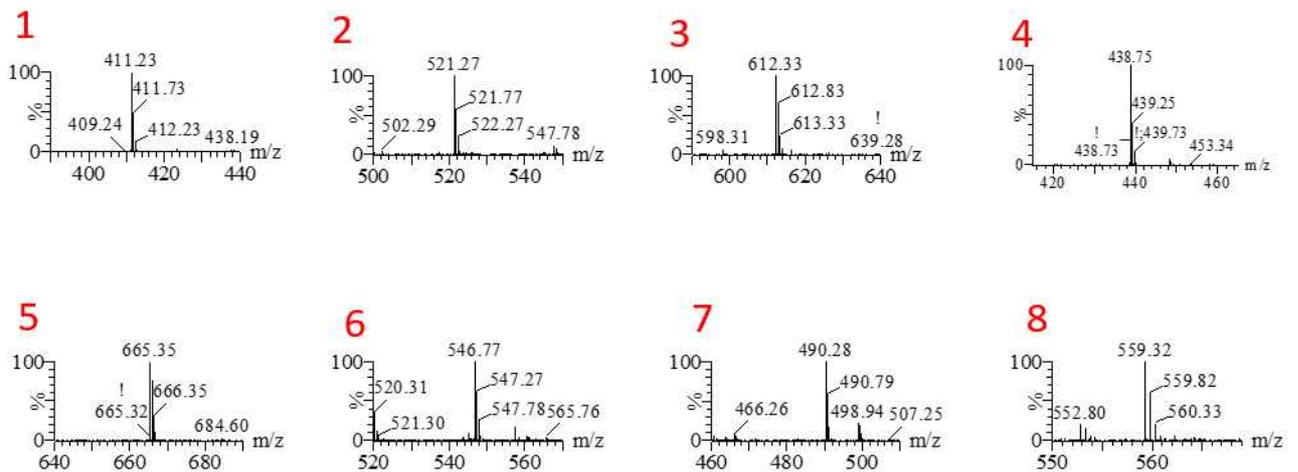


Fig. 4. MS spectra of peptide peaks analyzed using UPLC-Q-TOF MS.

	72.08	173.13	301.19	400.26	501.30	588.34	689.38	760.42	859.49
a	---	0.00	-0.00	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02	---
b	100.08	201.12	329.18	428.25	529.30	616.33	717.38	788.42	887.48
	---	-0.00	0.00	0.00	-0.00	0.01	0.01	-0.00	---

	Val	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Thr	Ala	Val
	86	86	100	100	100	100	100	100	100
y	905.49	806.43	705.38	577.32	478.25	377.20	290.17	189.12	118.09
	---	---	-0.00	-0.01	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
z	888.46	789.40	688.35	560.29	461.22	360.17	273.14	172.09	101.06
	---	-0.01	---	-0.01	---	---	---	---	-0.01

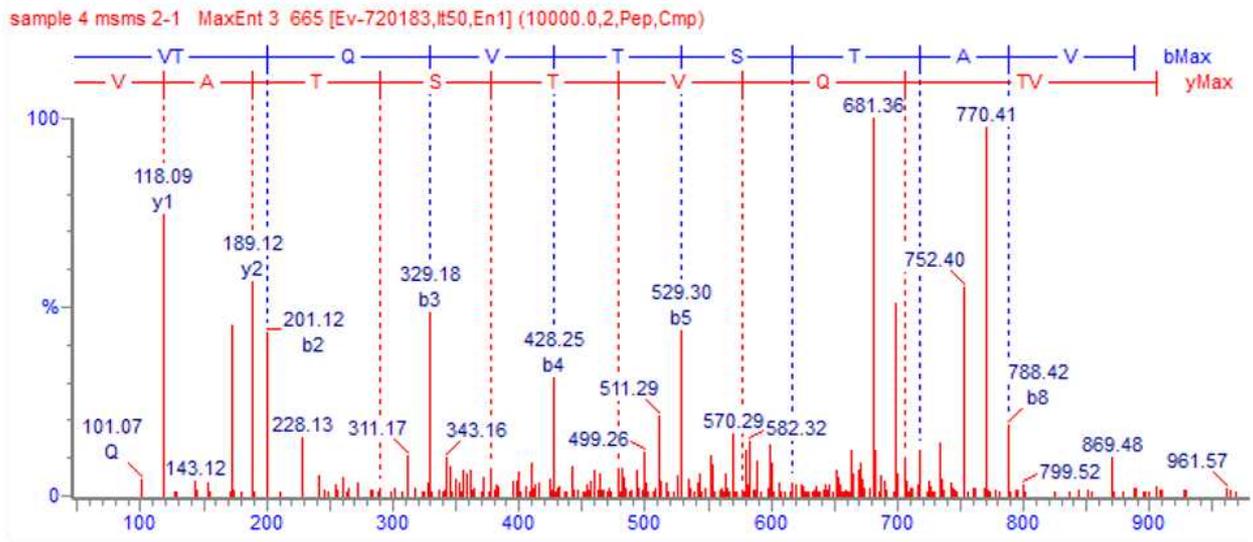


Fig. 5. De novo sequencing of casein-derived peptides analyzed using UPLC-Q-TOF MS.

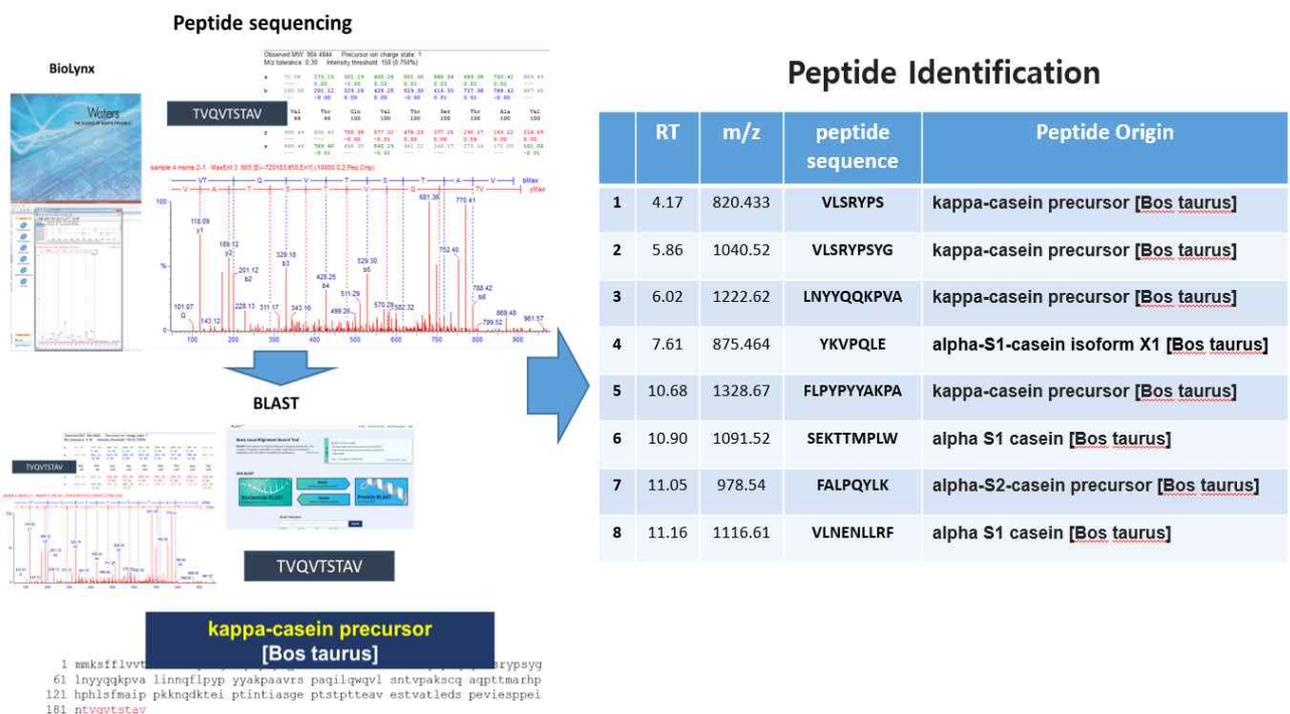


Fig. 6. Identification of casein-derived peptides analyzed using UPLC-Q-TOF MS

-HPLC에 의해 postbiotic sample의 획분(Fig. 7)과 획분별 ACE 억제활성(Fig. 8, 9)을 보면 IX 획분이 가장 높은 ACE 억제활성을 보였음.

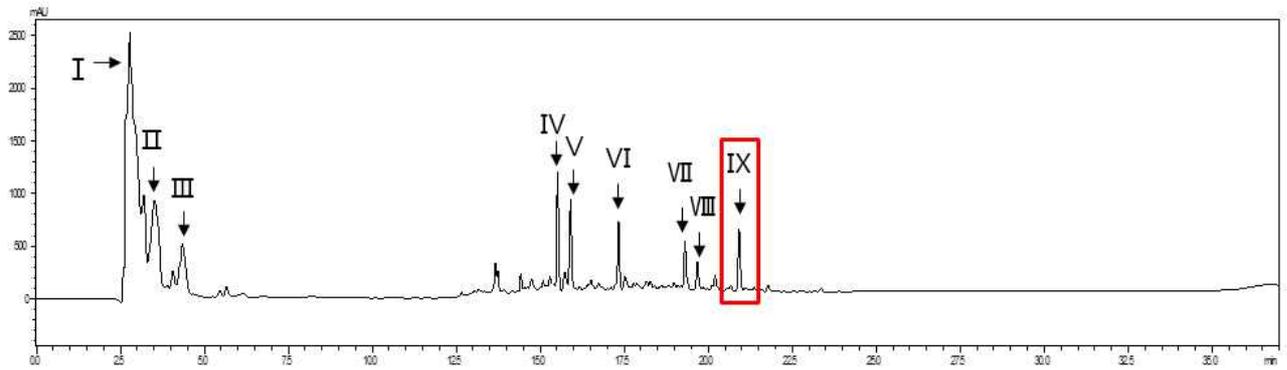


Fig. 7. Elution file of peptides from the water-soluble fraction of a postbiotic sample by HPLC

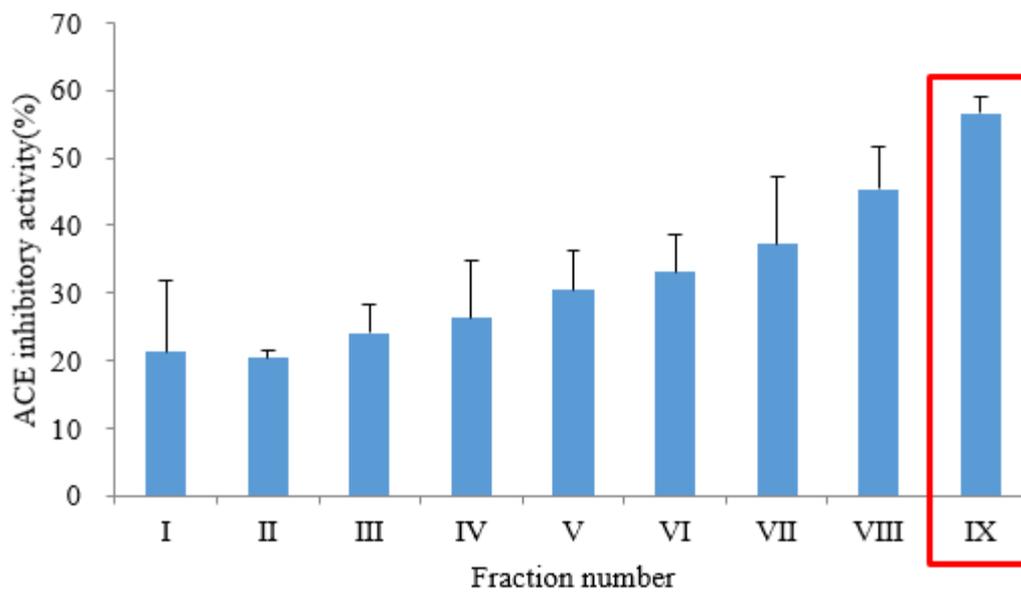


Fig. 8. ACE inhibitory activity of peptides from the water-soluble fraction of a postbiotic sample by HPLC

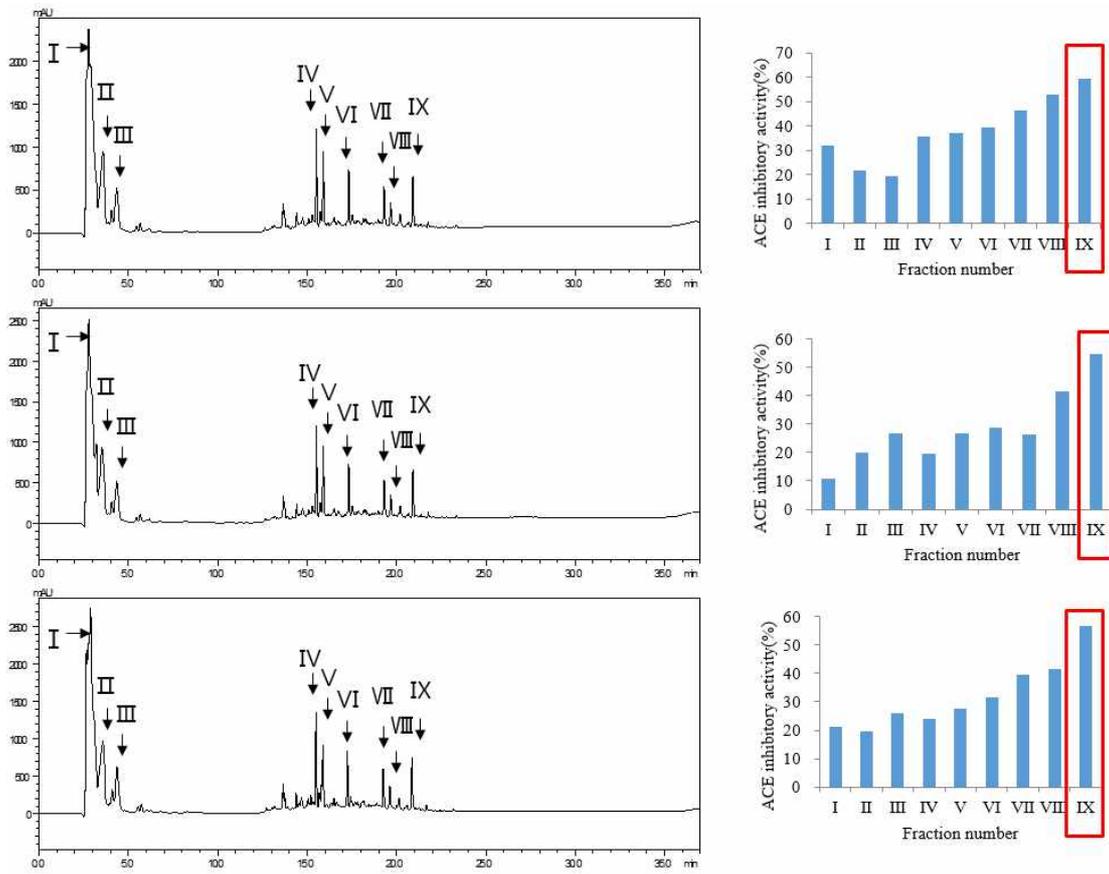
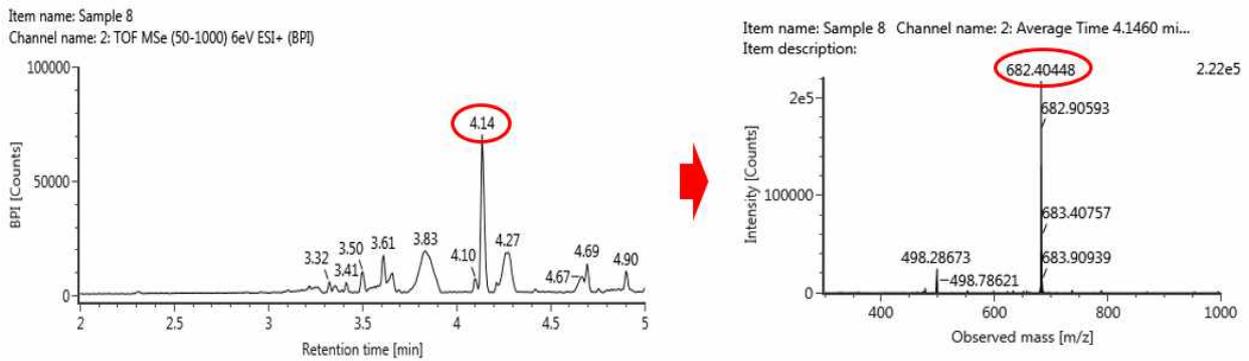
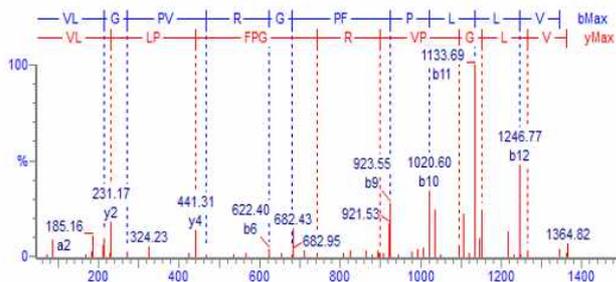


Fig. 9. Elution file of peptides from the water-soluble fraction of three postbiotic samples

-펩타이드 분리 동정을 위한 UPLC-MS 이온질량에 의한 아미노산 서열 구명한 결과(Fig. 10) β -casein 1197-1209 (13-peptides)로서 아미노산 서열이 VLGPVRGPFPIIV으로 나타났음.



분회물 IX (Identification of the target peptide)



beta-casein isoform X1

VLGPVRGPFPIIV

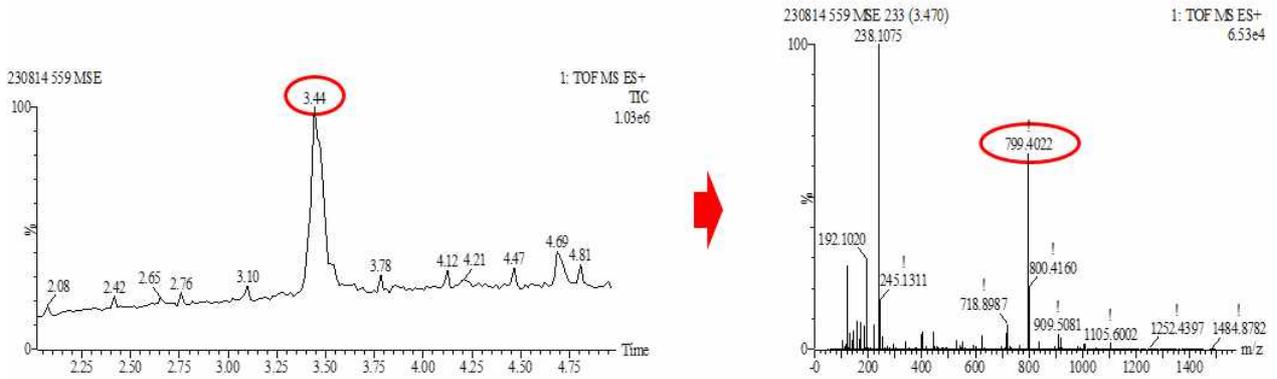
```

mpltntiykqp qngqiihsap pelliivlyfgk kelramkvli laclvalala releelnvpg
eiveslsesse esitrinkki ekfgseeqqq tedelqdkih pfaqtqslvy pfpppipnsl
pqnippltqt pvvppflqp evmgvskvke amapkhkemp fpkypvepft esqslitdv
enlhlpilil qswmhghpqp lpptvmfppq svlslsqskv lpvpqkavpy pqrmpiqaf
llyqepvlgp vrgpfpfiivs lnlltvlfnf

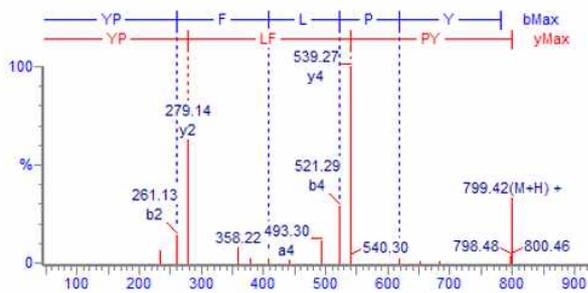
```

Fig. 10. Isolation and ion-mass chromatogram of a target peptide IX by UPLC-MS

-결과분획물 VIII를 UPLC-MS 이온질량에 의해 동정한 결과(Fig. 11) Vacuolar protein sorting-associated peptide (6 peptides)로서 아미노산 서열이 YPFLPY로 나타났음.



분획물 VIII (Identification of the target peptide)



vacuolar protein sorting-associated protein

YPFLPY

fhshphmvp lhhslng sdravlted ofvesetvms crigevdvff
ddvciedllw qvlivieslr vcddvneapf vevhvngvvl svavrglvev
snvffnsfyp iinlvlpfl pyrrallhra pllaaqlpp iaftgptpt
phdfavnvdt wpfreatird lvvhlpatr ksqalvleig kqvvtfthkan
dasvplqgfi crncacgell rlvwsdqkdd dfwhnptfqc

Fig. 11. Isolation and ion-mass chromatogram of a target peptide VIII by UPLC-MS

-Whey protein hydrolysate Sample의 HLB Column 분획물의 크로마토그램(Fig. 12)과 ACE 억제활성은 Fig. 13와 같으며, 40% MeOH로 용출할 때 ACE 억제활성이 가장 높은 것으로 나타났음.

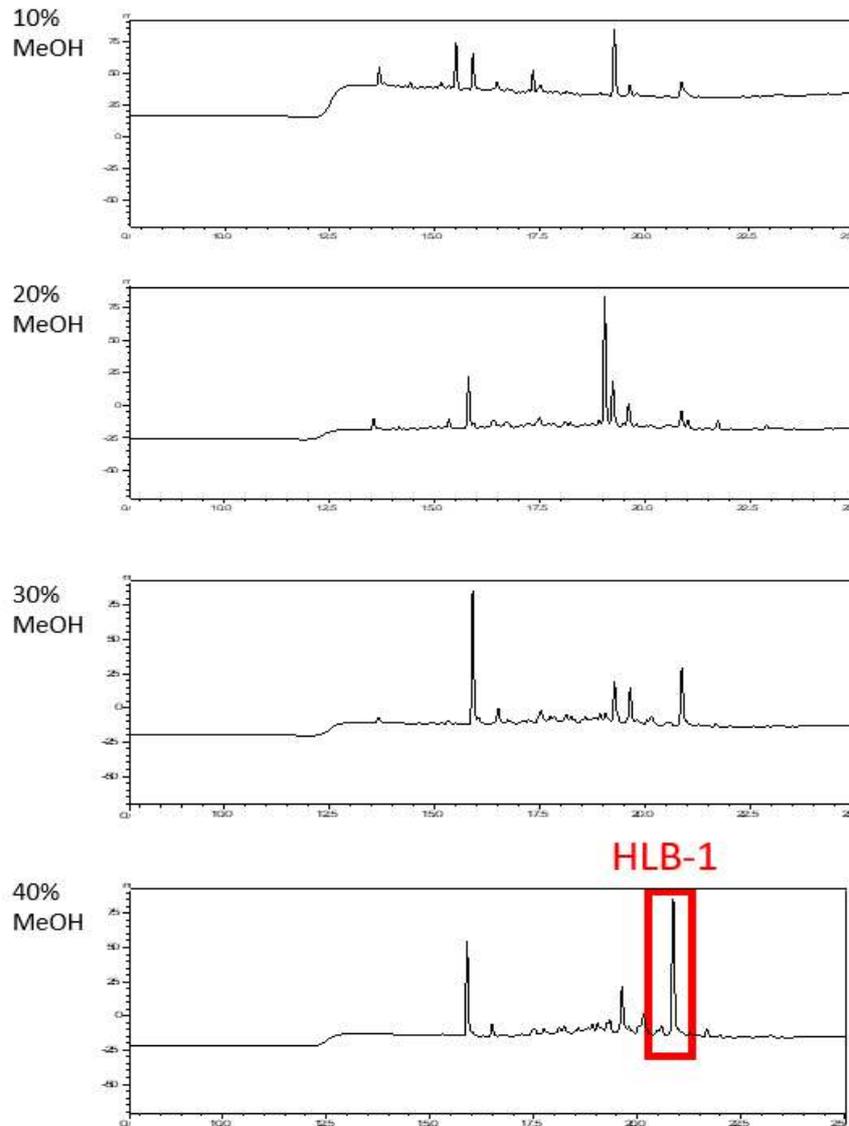


Fig. 12. Chromatogram of a water-soluble peptide fraction by HLB column eluted with a solvent

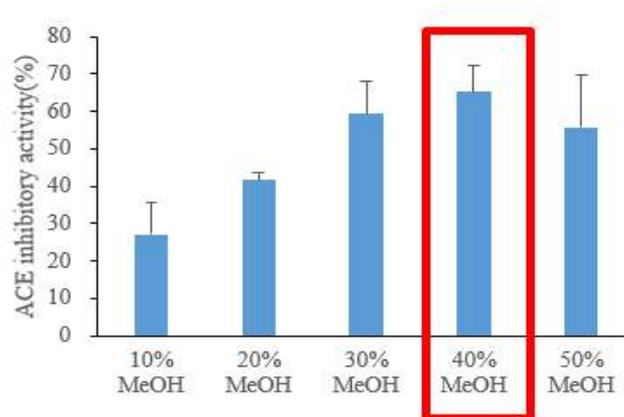
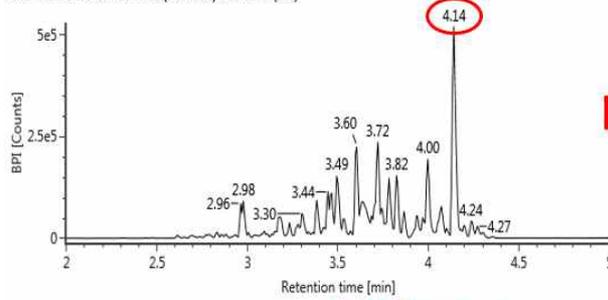


Fig. 13. ACE- activity of water-soluble peptide fractionated by HLB column eluted with a solvent

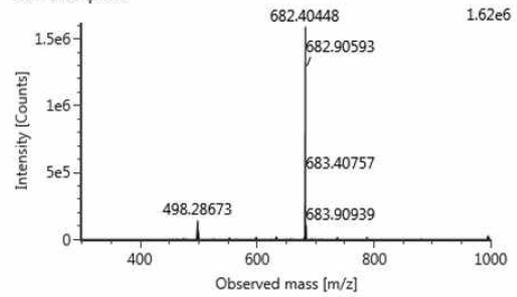
-HPLC 분획물과 UPLC-MS 분획물이 동일물질인지 여부를 확인한 결과 Fig. 14에서 보는 바와 같이 같은 물질로 확인되었음.

UPLC-MS
HLB Column 40%MEOH **분획물 IX**

Item name: Sample 7
Channel name: 2: TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ (BPI)

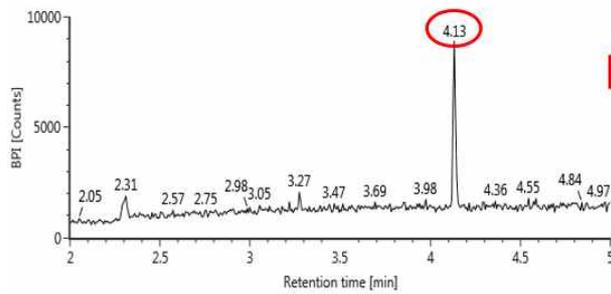


Item name: Sample 7 Channel name: 2: Average Time 4.1400 mi...
Item description:



분획물 HLB-1

Item name: Sample 6
Channel name: 2: TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ (BPI)



Item name: Sample 6 Channel name: 2: Average Time 4.1368 mi...
Item description:

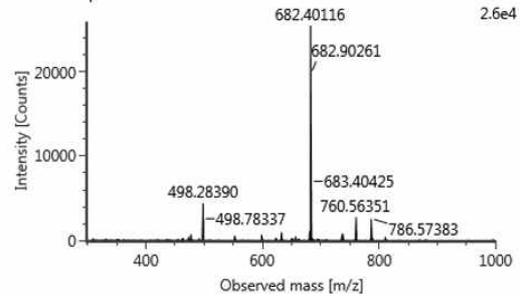
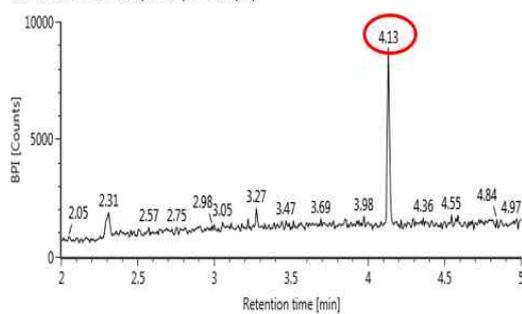


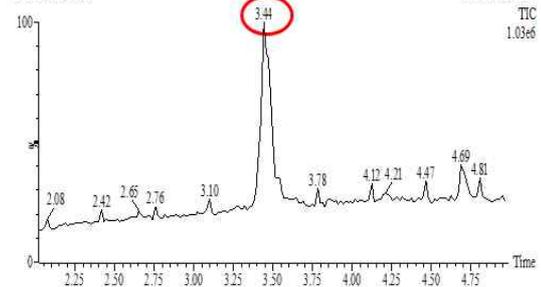
Fig. 14. Proof for Identity of water-soluble peptide fractions obtained from HPLC and UPLC-MS

-ACE 억제활성 펩타이드(분획물 4.13과 분획물 3.44)는 Fig. 15에서 보는 바와 같이 동결건조 중에 용매와 함께 유실되는 것을 발견하였음.

Item name: Sample 6
Channel name: 2: TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ (BPI)



230814 539 MISE



After Drying

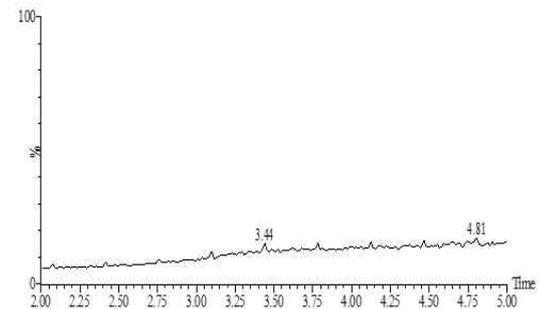
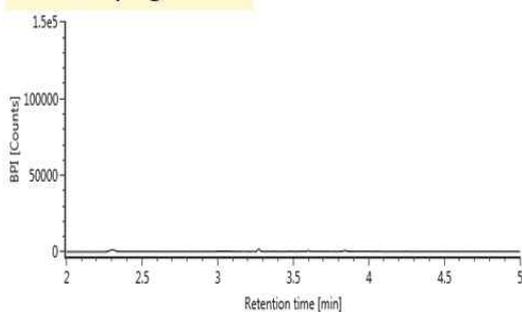


Fig. 15. The target peptides (Fraction 4.13 and Fraction 3.44) disappeared with the solvent during freeze-drying

○ In vivo 모델을 통한 혈압 저하 효능 평가

-실험 기간에 따른 체중 변화(Fig. 1, Table 2)를 보면 동일 기간 내에 정상군(WKY)으로써 식염수를 먹인 군과 고혈압쥐인 SHR 군간에 유의적인 차이를 보였음. 이는 WKY가 출생 시 SHR과 유사한 체중을 가졌으나 시간이 지남에 따라 그 체중이 SHR보다 커진다는 Gattone(1986)의 보고와 일치하는 것으로 나타났음. 그러나 실험군의 평균 체중은 처리군과 대조군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 *L. plantarum* K79 젖산균에 의해 발효된 발효물이 랫트의 체중 변화에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었음.

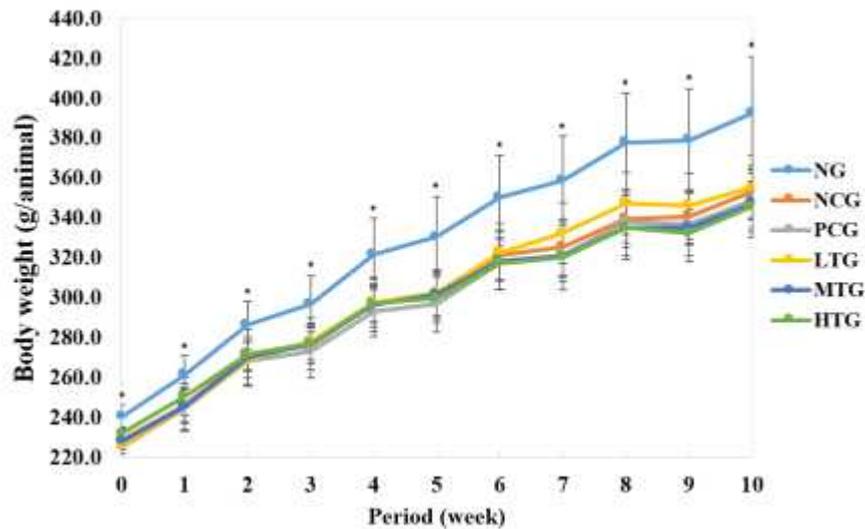


Fig. 1. Change in body weight of SHR fed with experimental diet (g/rat) for 10 week All values are the mean±SD (n=8). a-c In the same column are significantly different(p<0.05). NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR); WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats

Table 2. Body weight change of SHR Rat fed experimental diets(g/rat)

Weeks Group	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NG	239.00 ±6.19 ^a	261.26 ±9.59 ^a	286.29 ±12.04 a	296.91 ±14.09 a	321.75 ±17.90 a	330.55 ±19.89 a	350.03 ±21.22 a	358.68 ±22.35 a	377.59 ±24.81 a	378.86 ±25.80 a	392.62 ±28.12 a
NCG	228.32 ±6.59 ^b	246.06 ±7.94 ^b	271.16 ±7.48 ^b	276.03 ±9.02 ^b	296.94 ±9.04 ^b	301.38 ±11.51 b	321.33 ±12.37 b	325.35 ±14.17 b	339.45 ±14.65 b	340.57 ±13.34 b	353.09 ±13.30 b
PCG	224.92 ±9.11 ^b	244.28 ±10.65 b	268.24 ±12.07 b	273.17 ±13.45 b	292.87 ±12.33 b	296.65 ±13.97 b	317.1 ±8.65 ^b	321.12 ±11.08 b	337.88 ±10.39 b	336.73 ±10.29 b	348.62 ±13.96 b
LTG	225.50 ±6.71 ^b	244.67 ±7.65 ^b	268.48 ±8.93 ^b	277.92 ±9.35 ^b	297.42 ±12.07 b	302.24 ±11.20 b	322.43 ±14.28 b	332.44 ±15.30 b	347.18 ±15.65 b	346.02 ±16.48 b	355.22 ±16.11 b
MTG	227.62 ±7.66 ^b	245.06 ±11.95 b	269.94 ±14.30 b	276.71 ±13.00 b	296.57 ±13.66 b	301.65 ±12.14 b	318.34 ±14.59 b	320.75 ±17.06 b	335.14 ±16.19 b	334.91 ±17.14 b	346.96 ±16.94 b
HTG	231.91 ±8.18 ^b	250.45 ±9.76 ^b	271.62 ±8.80 ^b	277.04 ±8.47 ^b	297.14 ±9.75 ^b	299.55 ±12.21 b	317.28 ±12.95 b	320.23 ±12.33 b	335.04 ±13.74 b	332.36 ±11.36 b	345.67 ±12.83 b

All values are the mean±SD (n=8).

a-c In the same column are significantly different(p<0.05).

NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR); WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats Mean±Std(n=8)

-실험 기간에 따른 랫트의 사료섭취 변화를 보면 Fig. 2과 Table 3와 같음. 식이군 간의 체중과 체중 변화량의 유의차가 인정되지 않은 것은 전체 열량 소비량에 차이가 없는 경우에는 체중에 영향을 미치지 않는다는 연구(Kent 등, 1989; Kim 등, 1989)와 유사한 것으로 처리군과 대조군 간의 식이 섭취량에서는 다소의 차이를 보였으나, 유의할 만한 변화가 나타나지 않아 Lactobacillus plantarum K79 젖산균 함유 발효유는 랫트의 증체와는 상관이 없는 것으로 나타났음. 다만 7주 급여시 저처리군이 정상군 및 고처리군에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났음.



Fig. 2. Feed intake change of SHR Rat fed experimental diets(g/rat)

Table 3. Change of feed intake in SHR fed with experimental diets(g/rat) for 10 weeks

Group	Weeks	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NG		38.8±2.5 ^{NSa}	36.5±2.3 ^{NSa}	36.4±2.4 ^{NSa}	37.3±2.9 ^{NSa}	38.4±1.9 ^{NSa}	38.2±2.3 ^{NSa}	38.5±2.0 ^{Ba}	38.9±2.1 ^{NSa}	38.3±2.3 ^{NSa}	39.0±3.5 ^{NSa}
NCG		39.0±1.2 ^{abc}	38.6±1.0 ^{abc}	37.5±1.1 ^c	38.0±0.8 ^{bc}	39.6±1.3 ^{ab}	40.1±2.0 ^a	40.7±1.7 ^{ABa}	38.8±1.1 ^{abc}	40.6±1.2 ^a	39.3±0.9 ^{abc}
PCG		40.2±1.4 ^a	37.0±1.8 ^b	38.0±1.6 ^{ab}	37.7±1.0 ^{ab}	38.9±1.7 ^{ab}	38.7±1.1 ^{ab}	39.9±1.9 ^{ABab}	39.1±2.2 ^{ab}	40.1±2.2 ^a	39.0±2.1 ^{ab}
LTG		40.7±1.9 ^{ab}	38.6±2.5 ^b	37.6±2.5 ^b	38.2±1.8 ^b	38.7±1.9 ^b	40.3±2.2 ^{ab}	42.8±2.9 ^{Aa}	39.6±2.1 ^{ab}	40.8±1.9 ^{ab}	39.0±1.8 ^b
MTG		39.6±2.1 ^a	38.6±2.2 ^a	37.6±1.6 ^a	38.2±0.7 ^a	38.2±0.9 ^a	38.5±1.4 ^a	39.2±1.7 ^{Ba}	38.3±2.5 ^a	39.5±2.8 ^a	39.4±2.6 ^a
HTG		40.2±1.4 ^a	37.5±0.8 ^b	37.5±0.9 ^b	38.1±1.6 ^{ab}	38.3±1.0 ^{ab}	38.0±1.4 ^b	37.9±1.0 ^{Bb}	37.8±1.5 ^b	38.8±0.7 ^{ab}	38.1±2.3 ^{ab}

All values are the mean±SD(n=4).

NS Values in the column are not significantly different (p<0.05).

A-B In the same column are significantly different (p<0.05).

a-c In the same row are significantly different(p<0.05).

SHR, spontaneously hypertensive rats; NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR); WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR,

-실험 기간에 따른 혈압의 변화를 측정한 결과 10주까지는 정상군, 양성대조군, 처리군 및 음성대조군 순으로 유의성이 있었고, 처리군과 음성 대조군 간을 비교하였을 때는 처리군이 6주까지 혈압이 낮아지는 경향을 보였지만 유의성이 없는 것으로 나타났음. 그러나 8주 후에는 NCG(230.8±7.3mmHg)보다 HTG(209.9±13.3mmHg)에서 혈압이 더 유의하게 낮아졌음. Ishiguro 등(2012)은 정제 고구마 단백질 가수분해물을 SHR에 경구 투여한 후 수축기 혈압(SBP)과 확장기 혈압(DBP)이 각각 30mmHg 및 20mmHg 이상 감소했다고 보고하였음. Tsai 등(2006)은 유산균을 첨가한 발효 두유를 8주간 경구 투여하였을 때 SHR의 SBP가 19mmHg 감소하였다고 하였는데 이러한 결과는 본 연구에서 얻은 결과와 유사하였음. Yuan 등(2022) 및 Alshuniaber 등 (2021)에 따르면 쥐의 이러한 혈압 강하는 염증과 관련이 있으며 레닌-안지오텐신 시스템의 ACE 활성을 억제함으로써 얻을 수 있다고 하였음.

Table 4. Changes in the systolic blood pressure of rats for 10 weeks

(Unit : mmHg)

Group	Weeks	0	2	4	6	8	10
NG		138.0±16.9 ^a	143.3±12.7 ^a	144.1± 9.2 ^a	143.0±9.7 ^a	153.0±10.0 ^a	152.0±6.1 ^a
NCG		179.8±16.9 ^b	203.6±6.7 ^d	214.0±10.8 ^c	222.5±6.4 ^c	230.8±7.3 ^d	240.6±4.0 ^d
PCG		179.8±19.0 ^b	174.8±11.9 ^b	184.0±20.6 ^b	181.0±13.1 ^b	183.1±23.5 ^b	187.6±12.8 ^b
LTG		181.0± 9.0 ^b	190.1±18.2 ^c	204.0±13.5 ^c	212.3±11.1 ^c	214.6±16.0 ^{cd}	230.0±13.4 ^{cd}
MTG		183.5±17.3 ^b	193.5±7.3 ^{cd}	203.6±12.1 ^c	216.3±9.6 ^c	216.8±8.8 ^{cd}	227.0±15.5 ^{cd}
HTG		182.9±13.1 ^b	192.8±10.1 ^{cd}	211.3±8.3 ^c	212.5±11.3 ^c	209.9±13.3 ^c	222.7±10.1 ^c

All values are the mean±SD(n=8).

a-cthe same column are significantly different(p<0.05).

NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR)

WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats

-발효물 투여 후 10주에 안락사 시킨 SHR rat의 각 장기의 무게를 보면 간에서 양성 대조군이 정상군에 비해 유의하게 무게가 많았으며, 신장은 정상군이 다른 군에 비해 유의하게 무게가 적었음. 폐는 모든 군들이 유의성이 없었으며, 심장은 음성대조군 및 처리군이 양성대조군과 정상군에 비해 유의하게 무게가 높았음. 정상군은 다른 장기에서 타 군에 비해 무게가 적었으나 특이하게 고환에서 유의하게 무게가 많았음. 이는 심장, 신장 및 간의 무게가 SHR보다 WKY에서 더 낮다는 Walter 및 Hamet(1986)의 보고와 일치하였음.

Table 5. Organ weight in rat after 10 weeks(g/rat)

Group	Liver	Kidneys	Lungs	Heart	Testes
NG	11.80±1.13 ^b	2.37±0.17 ^b	1.36±0.14 ^a	1.07±0.09 ^c	3.27±0.21 ^a
NCG	13.03±0.29 ^{ab}	2.58±0.08 ^a	1.52±0.20 ^a	1.39±0.04 ^a	2.93±0.13 ^b
PCG ¹⁾	13.15±0.59 ^a	2.58±0.08 ^a	1.39±0.11 ^a	1.26±0.04 ^b	2.96±0.09 ^b
LTG ¹⁾	12.97±1.10 ^{ab}	2.59±0.15 ^a	1.43±0.08 ^a	1.40±0.08 ^a	2.90±0.15 ^b
MTG ¹⁾	12.34±1.02 ^{ab}	2.56±0.16 ^a	1.55±0.23 ^a	1.35±0.06 ^a	2.84±0.09 ^b
HTG ¹⁾	12.43±0.86 ^{ab}	2.54±0.13 ^a	1.38±0.09 ^a	1.37±0.05 ^a	2.89±0.18 ^b

All values are the mean±SD(n=8).

a-c the same column are significantly different(p<0.05).

NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR)

WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats

-혈중 지질은 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 모두 정상군이 고혈압 쥐군에 비해 유의하게 높았고, 중성지방은 정상군에서 유의하게 낮았음(Table 6). 이는 SHR 그룹이 WKY 그룹보다 TC 및 HDL-C 수준이 낮다는 것을 관찰한 Cho 등(2018).의 보고와 일치하였음. 혈압쥐군 중 총콜레스테롤과 LDL콜레스테롤은 중용량 투여군에서 약간 높았으나 HDL콜레스테롤과 중성지방은 미미한 수준이었음.

Table 6. Blood serum levels in rats after 10 weeks

Group	TC(mg/dL)	HDL(mg/dL)	LDL(mg/dL)	TG(mg/dL)
NG	144.4±4.8 ^a	101.5±7.8 ^a	22.8±2.1 ^a	54.9±12.2 ^b
NCG	90.8±5.1 ^{bc}	59.5±3.8 ^b	13.0±0.5 ^c	119.4±19.1 ^a
PCG	88.1±5.6 ^c	59.1±4.4 ^b	12.9±1.8 ^c	122.0±15.6 ^a
LTG	89.9±5.5 ^{bc}	60.1±4.2 ^b	12.9±0.6 ^c	134.1±25.1 ^a
MTG	94.1±4.3 ^b	60.9±4.1 ^b	15.0±2.7 ^b	104.8±47.3 ^a
HTG	88.1±5.7 ^c	58.4±4.7 ^b	13.4±1.3 ^{bc}	105.5±24.3 ^a

All values are the mean±SD(n=8).

a-c In the same column are significantly different(p<0.05).

TC, Total cholesterol; HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein; TG, Triglyceride; NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR); WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats

-잘 알려진 바와 같이 Ang II는 체계적으로 생성됨. RAS의 기질인 AGT(Angiotensinogen)는 간에서 방출되고 순환계에서 분해되어 신장의 근위 사구체 장치에서 분비되는 레닌에 의해 Ang I을 형성함. 그러면 혈관 확장제 I(Ang I)이 쉽게 활성화되고 Ang II는 주로 폐순환 내 내피 세포 표면에서 높은 수준으로 발현되는 안지오텐신 전환 효소(ACE)에 의해 발생함. 이들 바이오마커의 농도가 증가하면 혈압 증가에 영향을 미침(Ichihara et al., 2004; Yim and Yu, 2008). Table 7은 10주 후 쥐의 혈장 내 혈압 관련 바이오마커의 변화를 나타내었음. NG, PCG, HTG는 NCG에 비해 안지오텐시노겐 단백질 발현이 현저히 낮은 것을 확인하였음. 안지오텐신-II는

NCG에 비해 NG, PCG, 처리군에서 유의하게 낮은 발현을 보였음. 또한 Renin은 NCG에 비해 NG에서 가장 적게 발현되었고 PCG와 HTG가 그 뒤를 이었음. 따라서 혈압 관련 바이오마커 단백질 발현을 유의하게 억제함으로써 치료군의 혈압을 낮추는 효과가 있었던 것으로 판단됨.

Table 7. Change of blood pressure-related biomarkers in the blood plasma of rats after 10 weeks

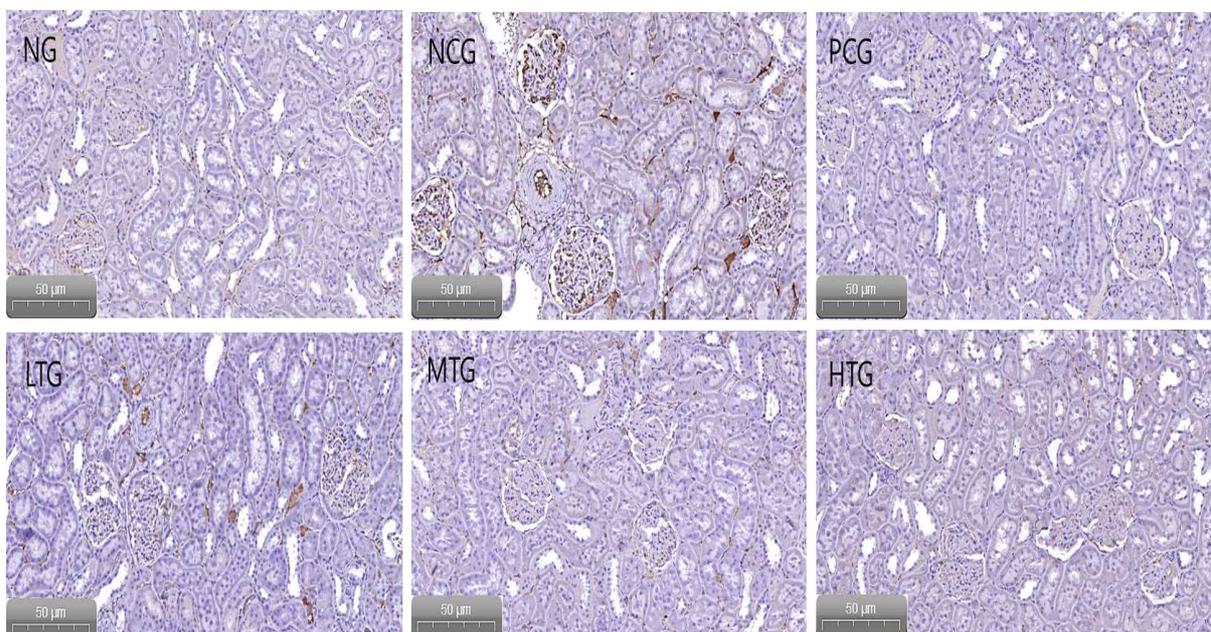
Biomarker Group	Angiotensinogen(ng/mL)	Angiotensin-II(pg/mL)	Renin(pg/mL)
NG	18.3±1.7 ^a	5.8±1.5 ^a	153.6±23.7 ^a
NCG	28.1±2.3 ^c	13.4±1.0 ^c	204.8±15.5 ^d
PCG	21.6±1.9 ^{ab}	8.4±1.9 ^b	175.2±12.0 ^b
LTG	24.6±3.8 ^{bc}	10.0±0.7 ^b	194.7±18.0 ^{cd}
MTG	23.9±3.3 ^{bc}	9.1±1.7 ^b	180.4±11.5 ^{bc}
HTG	21.7±1.7 ^{ab}	8.7±1.7 ^b	177.5±11.4 ^b

All values are the mean±SD(n=8).

a-c In the same column are significantly different(p<0.05).

NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR); WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats

-신장에서서의 Angiotensin-I 단백질 발현 중 인간 안지오텐신은 간, 심장, 혈관벽, 뇌, 신장 등 다양한 기관의 조직과 지방 조직에서 발현됨. 모든 장기 시스템에는 레닌-안지오텐신 시스템(RAS)의 특정 구성요소가 있지만 신장에는 RAS의 모든 구성요소가 있으며 세뇨관 및 간질 네트워크의 구획화 및 세포내 축적도 나타남(Kobori 등. 2007). Fig. 3은 면역조직화학을 이용하여 안지오텐신-I의 발현을 확인한 실험 결과임. 신장내 사구체를 살펴보면, 종류수만 먹인 고혈압 쥐, 즉 NCG에서 안지오텐신-I의 단백질 발현이 정상 쥐, PCG, 투여군에 비해 육안으로 관찰 가능한 수준으로 증가한 것으로 나타났음. 따라서, 투여군에서 안지오텐신-I의 단백질 발현 억제가 관찰됨으로써 항고혈압 효과가 있음이 확인되었음.



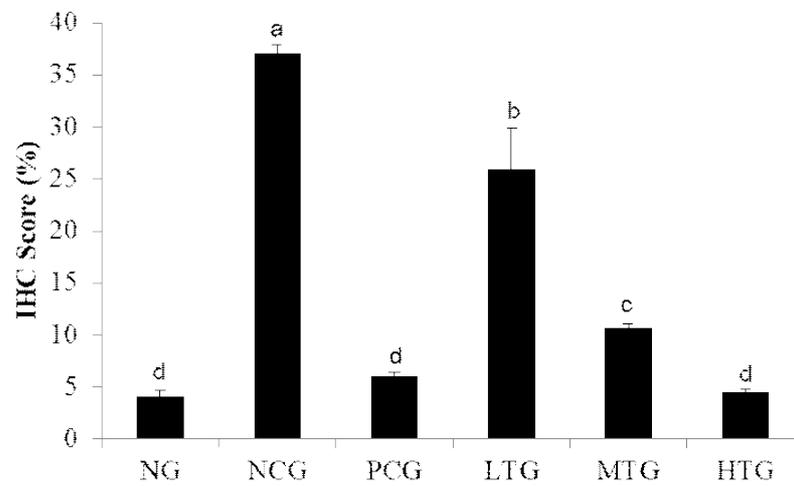


Fig. 3. Experiment to confirm the expression of angiotensin-1 protein staining in rat kidneys. Data are expressed as mean \pm SD, a-d In the same column are significantly different ($p < 0.05$). Tissue sections were selected for the measurement of staining areas using ImageJ (bar=50 μ m). NG, Normal group (WKY) with distilled water; NCG, Negative control group (SHR) with distilled water; PCG, Positive control group (SHR) with Enalapril; LTG, Low treatment group (SHR); MTG, Medium treatment group (SHR); HTG, High treatment group (SHR); IHC, immunohistochemistry; WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats.

○ In vitro 모델을 통한 혈관이완/수축 관련 신호전달기전 연구

-*L. plantarum* K79의 BL, heat-killed bacteria, PGN sample을 각각 처리할 수 있는 최고 농도(BL의 경우 10 µg/mL, heat-killed bacteria의 경우 109 CFU/mL, PGN의 경우 100 µg/mL)로 HUVECs에 처리하여 NO의 생성을 측정함. 추가적으로 spray dried *L. plantarum* K79를 10 mg/mL의 농도로 처리한 후 48 h 뒤에 NO의 생성을 kit로 측정함.

-그림 1(A)을 보면 *L. plantarum* K79의 BL, PGN 처리 군에서는 아무것도 처리하지 않은 NT 군에 비해 유의적인 NO의 생성이 관찰되지 않았지만, heat-killed bacteria와 spray dried *L. plantarum* K79 처리 군의 경우 NO의 생성이 각각 약 4, 8 µM로 증가하는 경향을 보임.

-추가적으로 spray dried *L. plantarum* K79를 농도별로 처리하였고 그림 2(A and B)를 보면 sample 처리 농도가 2.5, 5, 10 mg/mL로 증가함에 따라 NO의 생성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있고 처리 시간이 24 h에서 48 h으로 늘어남에 따라 NO의 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있음.

-결론적으로 본 NO 측정 실험의 경우 우선적으로 아무것도 처리하지 않은 NT 군에 비해 heat-killed bacteria와 spray dried *L. plantarum* K79 (LpK79) 처리 군에서 NO가 유의적으로 증가하는 것을 확인함.

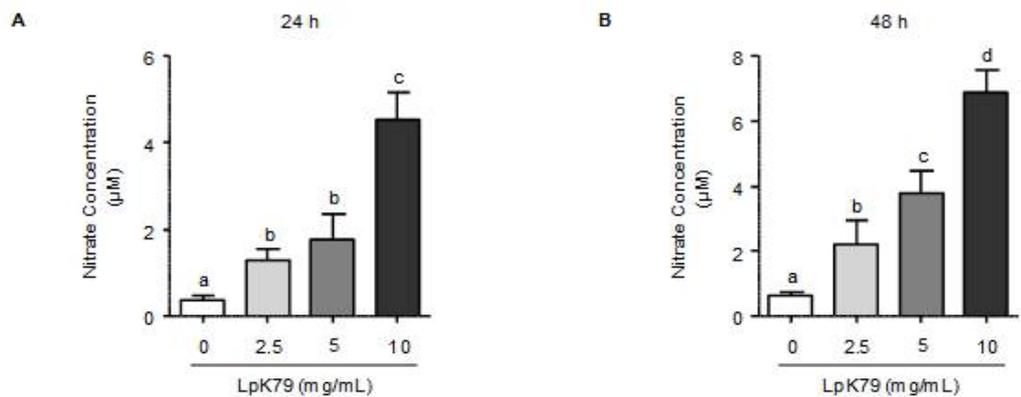


그림 1. HUVEC에서 각각의 *L. plantarum* K79 postbiotics 단독처리에 의한 NO 생성 결과 (Fluorometric assay)

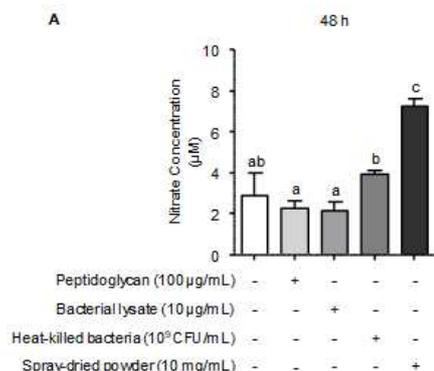


그림 2. HUVEC에서 농도별 spray dried *L. plantarum* K79 (LpK79) 단독처리에 의한 NO 생성 결과 (Fluorometric assay)

-Endothelial nitric oxide의 생성을 유도하는 eNOS와 그 상위 인자인 PI3K/Akt의 발현 정도를 western blot을 통해 확인하기 위해 HUVECs에 LpK79를 농도별로 2.5, 5, 10 mg/mL 처리한 후 PI3K/Akt/eNOS 각 인자의 활성화 form인 phospho-form의 발현량을 western blot을 통해 측정함.

- 그림 3을 보면 HUVECs에 LpK79를 농도별로 처리하였을 때, p-eNOS의 발현이 sample에 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있음.
- 추가적으로 eNOS의 상위 조절 인자인 PI3K와 Akt의 경우도 아무것도 처리하지 않은 NT군에 비해 LpK79를 처리하였을 때, phospho-form의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있음.
- 본 실험결과는 LpK79가 HUVECs에서 PI3K/Akt 경로를 통해 eNOS를 활성화하여 NO를 생성한다는 것을 시사함.

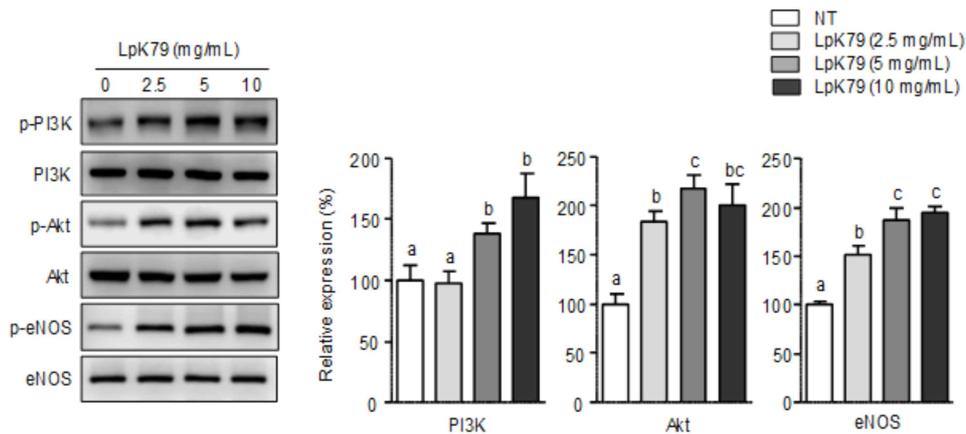


그림 3. HUVECs에서 각각의 LpK79 단독처리에 의한 PI3K/Akt-eNOS의 phospho-form 발현 정도 확인 결과 (Western blot)

- Vascular smooth muscle의 수축을 유도하는 ROCK2와 MYPT1의 발현 정도와 Ca²⁺ channel을 활성화시키는 PLC의 발현 정도를 western blot을 통해 확인하기 위해 VSMCs에 LpK79를 농도별로 2.5, 5, 10 mg/mL 처리한 후 ROCK2의 발현 정도와 MYPT1 및 PLC γ 의 활성화 form인 phospho-form의 발현 정도를 western blot을 통해 측정함.

- 그림 4를 보면 VSMCs에 LpK79를 농도별로 처리하였을 때, ROCK2와 MYPT1의 발현이 sample에 유의적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있음.
- 추가적으로 p-PLC γ 경우도 아무것도 처리하지 않은 NT군에 비해 LpK79를 처리하였을 때, phospho-form의 발현이 sample에 농도의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있음.

- 본 실험결과는 LpK79가 VSMCs에서 직접적으로 근육 수축인자인 ROCK2, MYPT1의 활성화를 억제함으로써 근육의 이완을 유도한다는 것을 알 수 있음. 또한 LpK79가 Ca²⁺ channel을 활성화시키는 PLC의 활성화를 억제함으로써, 세포 내에서 근육 수축을 유도하는 Ca²⁺의 농도를 감소시켜 근육의 이완을 촉진한다는 것을 확인함.

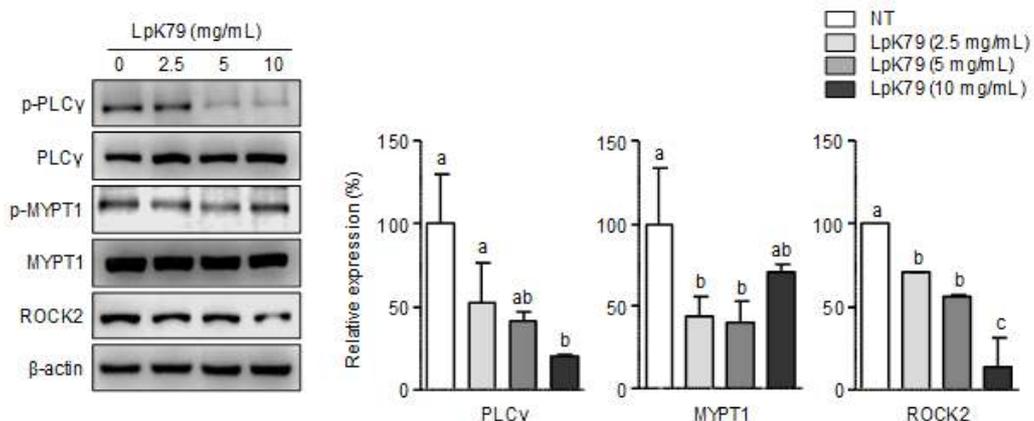


그림 4. VSMCs에서 LpK79 단독처리에 의한 ROCK2/MYPT1/PLC γ 의 발현 정도 확인결과 (Western blot)

-E. coli lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증 반응에서 IL-6와 IL-8의 발현 억제 정도를 mRNA 및 protein 수준에서 확인하기 위해 HUVECs에 LPS 1 µg/mL와 LpK79를 최고 처리농도인 10 mg/mL 처리한 후 IL-6, IL-8의 발현정도를 mRNA 수준에서 RT-PCR로 확인하고, protein 수준에서 ELISA로 확인함.

-그림 5(A and B)를 보면 IL-6의 경우 LPS 처리군에서 발현양이 증가하였다가 LpK79 처리군에서 감소하는 경향이 보였지만 효과가 미미하여 유의적인 차이는 없었음. 하지만 IL-8의 경우 LPS 처리 시 발현양이 증가하였다가 LpK79 처리 시 유의적으로 발현양이 감소하는 것을 확인함.

-실질적인 IL-6 및 IL-8의 secretion 정도를 확인하기 위한 ELISA 결과 그림 6(A and B)를 보면 IL-6, IL-8에서 모두 LPS 처리시 secretion levels이 크게 증가하였다가 LpK79 처리 시에는 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있음.

-본 실험 결과 LpK79는 LPS로 유도된 HUVECs에서 염증 반응을 어느정도 억제하는 것을 확인하였고, 위의 실험결과와 종합하여 보면 in vitro 수준에서 LpK79는 염증 혹은 endothelial cell dysfunction로 유도된 고혈압을 억제하는 효과적인 소재가 될 잠재성이 있다고 판단됨.

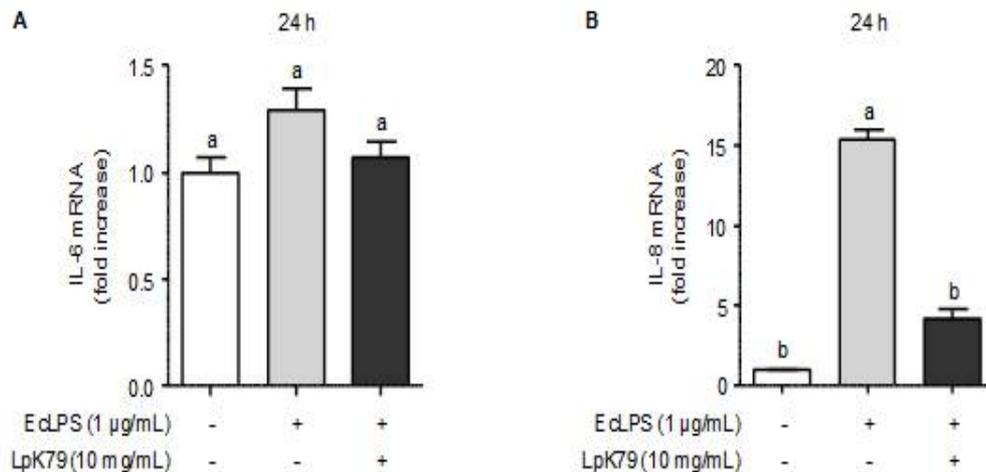


그림 5. HUVECs에서 LPS로 유도된 IL-6 및 IL-8 mRNA 수준에서의 발현 억제 효과 (RT-PCR)

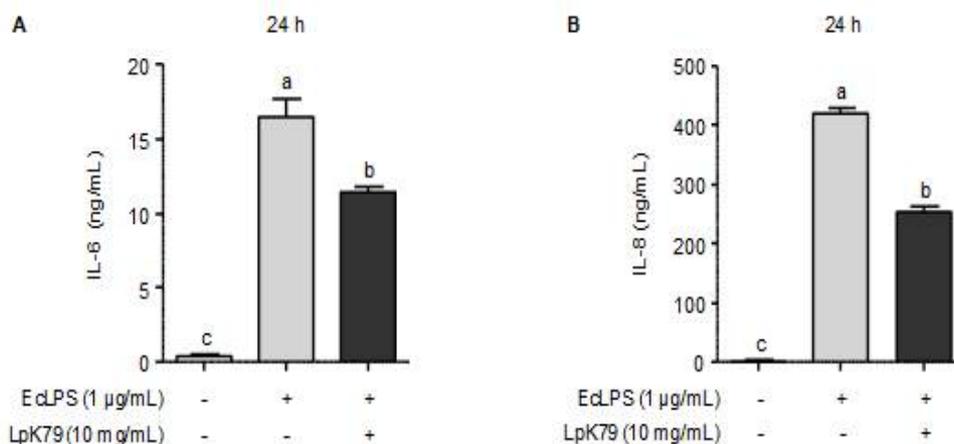


그림 6. HUVECs에서 LPS로 유도된 IL-6 및 IL-8의 secretion 억제 효과 (ELISA)

○ 인체적용시험용 진행

-인체적용시험과 관련해 시험기관은 대전대학교 대전한방병원, 분석기관은 (주)GCCL으로 결정하여 그림 1~2과 같이 인체적용시험 위탁연구계약을 완료함.



그림 1. 대전대학교 대전한방병원 연구용역 계약서



그림 2. (주)GCCL 업무위탁계약서

-1차년도에 개발된 대량 생산 공정에 의하여 위탁 기관인 네이처런스(주)에서 인체적용시험용 제제 (이하 IP로 표기)를 그림 3과 같이 생산 후 인체적용시험 1일 섭취량인 1.6 g 씩 PE 재질 포장지에 소분 포장하여 스틱 포 형태로 생산함. 생산된 스틱 포에 무작위 배정표를 토대로 그림 4와 같이 대조식품과 시험식품에 1차 라벨링을 완료함.

-1차 라벨 작업이 완료된 스틱 포를 지퍼백에 1차 35포, 2차 40포씩 포장한 후 그림 5과 같이 2차 라벨 작업을 진행하여 전체 IP 라벨링 작업을 완료함. 2차 라벨 작업까지 완료된 IP를 시험기관의 약국에서 요청하는 수량대로 그림 6와 같이 준비하여 당사에서 시험기관까지 향온 (24.5 °C~24.7 °C)에서 입고 진행함. (그림 7)

-이중맹검봉투는 총 120개를 제작하여 인체적용시험 개시모임 때 해당 인체적용시험의 담당 코디네이터 측에 전달 완료함. (그림 8)



그림 3. 인체적용시험용 제제



그림 4. IP 1차 포장 완료 샘플



그림 5. IP 2차 포장 완료 샘플

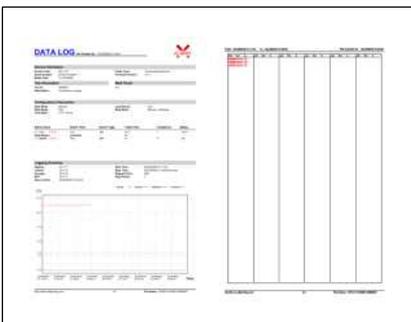


그림 6. IP 1차 입고분 온도 트래킹 정보



그림 7. IP 1차 입고



그림 8. 이중맹검봉투 (눈가림봉투)

가. 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발

(1) 식약처 인허가 신청 시 필요자료에 기반한 기능성원료 검토 및 인체적용시험 가이드

<p>기능성원료 검토</p>	<p>IP(시험식품) 생산/라벨링 가이드</p>
-----------------	----------------------------

(2) 선행연구자료 및 인체적용시험 관련 자료 수집 및 선별

Ref. No.	Reference
No.01	건강기능식품 기능성 평가 가이드 '혈압조절에 도움을 줄 수 있음' 편, 2019.06, 식품의약품안전처
No.02	홍경표(2001). 협심증의 약물치료. 대한내과학회지: 제60권 제6호.
No.03	일차 의료용 근거기반 고혈압 임상진료지침. 2019. 대한의학회, 질병관리본부.
No.04	이해영. (2013). 항혈전제의 1 차 예방 및 2 차 예방 효과. 대한내과학회지, 85(1), 15-21.
No.05	Berta, E., Lengyel, I., Halmi, S., Zrínyi, M., Erdei, A., Harangi, M., ... & Bodor, M. (2019). Hypertension in thyroid disorders. Frontiers in endocrinology, 10, 482.
No.06	혈압강화에 미치는 오가피열매추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
CRIS.01	황철나무-미숙과복분자추출혼합물의 혈압에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험[KCT0004300]
CRIS.02	고혈압 전단계 성인에서 더덕추출물이 혈압, 혈중지질 및 산화적 스트레스에 미치는 효과[KCT0003735]
CRIS.03	두릅추출분말의 혈압 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험[KCT0002713]
CRIS.04	혈압강화에 미치는 복분자추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험[KCT0001946]

(3) 수집 자료 분석 및 프로토콜 초안 작성

시험목적	유산균 포스트바이오틱스가 혈압에 미치는 유효성 및 안전성 평가를 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
시험디자인	무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
시험대상	고혈압 전단계에 해당되는 자
시험대상자 수	100명(시험군:대조군 = 1:1)

섭취기간	8주
선정기준	<p>1) 만 19세 이상, 만 75세 이하의 남녀</p> <div data-bbox="373 282 1353 405" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> • 만 19세 이상, 만 75세 이하^(CRIS.01) • 만 19세 이상, 만 70세 이하^(CRIS.04) • 만 19세 이상, 만 65세 이하^(CRIS.02, CRIS.03) </div> <p>2) 최근 3개월 이내에 고혈압으로 치료받은 기왕력이 없는 안정 시 수축기 혈압이 120~139 mmHg 또는 이완기 혈압이 80~89 mmHg인 자^(CRIS.01, CRIS.03)</p> <div data-bbox="373 535 1353 954" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> • 방문1과 방문2 당시 기준 혈압은 최소 2분 이상 간격으로 2회 이상 측정하여 평균 좌위 수축기 혈압(sitSBP)이 120~139 mmHg 또는 평균 좌위 이완기 혈압(sit DBP)이 80~89 mmHg인 고혈압 전단계에 해당되는 자^(No.06, CRIS.04) • 고혈압 전단계(수축기 혈압: 120~139 mmHg 또는 확장기 혈압: 80~89 mmHg) 대상자^(CRIS.02) • 혈압이 정상(수축기 혈압: 120 mmHg 미만, 이완기 혈압: 80 mmHg 미만), 주의(수축기 혈압: 120~129 mmHg, 이완기 혈압: 80 mmHg 미만), 고혈압 전단계(수축기 혈압: 130~139 mmHg 또는 이완기 혈압: 80~89 mmHg)에 속하며 약물을 복용하지 않는 자^(No.01) </div> <p>3) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서 (Informed Consent Form)에 서명한 자</p>
제외기준	<p>1) 중증의 면역계, 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 정신성, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자</p> <div data-bbox="373 1184 1353 1350" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> • 임상적으로 유의한 다음의 중증 질환이 있는 자(심부전, 심근경색, 뇌혈관 질환, 동맥경화, 당뇨병, 갑상선 질환, 위궤양, 위출혈, 감염성 질환, 전신성 염증질환, 급성염증, 악성종양, 신장질환, 신기능 이상, 간질환, 조절이 안되는 고혈압, 크론씨병 등)^(CRIS.01) </div> <p>2) 수축기 혈압 150 mmHg 또는 이완기 혈압 95 mmHg 이상인 사람</p> <div data-bbox="373 1429 1353 1536" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> • 수축기 혈압 160 mmHg 또는 이완기 혈압 100 mmHg 이상인 자^(CRIS.01) • 의학적 치료를 필요로 하는 고혈압 질환을 가지고 있는 자^(CRIS.02) </div> <p>3) 혈압에 영향을 미칠 수 있는 약물(스테로이드제제, 갑상선 호르몬제제, 경구피임약, 중추 신경 억제제 혹은 흥분제, 질산염제, 면역억제제, 은행염엑스 제제 등)을 3개월 이상 지속적으로 투여한 자</p> <div data-bbox="373 1693 1353 2154" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> • 혈압에 영향을 미칠 수 있는 약물(스테로이드제제, 갑상선 호르몬제제, 경구피임약, 중추 신경 억제제 혹은 흥분제, 협심증 치료제, 면역억제제 등)을 3개월 이상 지속적으로 투여한 자^(CRIS.04) • 6개월 이내 혈압에 영향을 주는 약 복용(호르몬치료, 저혈당제, 체중조절제)^(No.01) • 약물 중, 혈액희석제제는 항응고제와 같은 것으로 확인하였으며, 일반적으로 폐성 고혈압(Pulmonary HTN)의 혈액 응고를 예방하기 위해서 사용되는 것으로 확인됨. 아스피린 같은 경우 일차예방은 출혈의 위험에 비해 심혈관 질환의 예방효과가 클 것으로 판단되는 만성신장질환, 당뇨병, 표적장기 손상 및 주요 위험요인이 3개 이상 동반된, 심혈관질환의 위험이 높은 고혈압 환자들에서는 사용을 고려해 볼 수 있으나 저위험군이나 중등도 위험군에 </div>

	<p>서는 사용을 권고하지 않는다는 점을 고혈압 임상진료지침을 통해 확인하였음.^(No.03) 하지만 논문 확인 결과, 일반적으로 두 개 이상의 심혈관 위험인자를 가지고 있는 환자가 대상이 될 것이며 고혈압 환자의 경우 수축기 혈압이 150 mmHg 미만으로 조절된 이후에 순차적으로 사용해야 한다^(No.04)는 것으로 확인되어, 항응고제 추가여부에 대해서 논의가 필요할 것으로 사료됨.</p> <p>4) 방문1 기준 3개월 이내에 고혈압제제를 복용한 자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3개월 이내에 혈압강하제를 복용한 자^(CRIS.03) • 최근 3개월 이내에 고혈압약을 복용한 자^(CRIS.01) • 현재 혈압약을 복용하고 있는 자^(CRIS.02) • 혈압강하제 복용^(No.01) <p>5) 방문1 기준 2주 이내에 혈압 조절 또는 흉삼 등 혈행 개선을 목적으로 하는 건강기능식품을 지속적으로 섭취한 자^(No.06)</p> <p>6) 알코올 또는 약물남용의 병력이 있는 자^(No.06, CRIS.01, CRIS.02, CRIS.04)</p> <p>7) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상)^(No.06, CRIS.04)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 당뇨약 복용자^(CRIS.02) <p>8) TSH가 0.1 µIU/mL 이하이거나, 10 µIU/mL 이상인 자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 조절되지 않는 갑상선 질환자^(No.06) • 갑상샘 자극 호르몬 ≥ 10 mIU/L^(No.01) → 갑상선기능이상, 갑상선기능저하 또는 항진증이 고혈압의 위험을 증가시킬 수 있음.^(No.05) <p>9) Creatinine이 실시기관 정상 상한치의 2배 이상인 자</p> <p>10) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 실시기관 정상 상한치의 3배 이상인 자</p> <p>11) 임신 중이거나 수유부 또는 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자</p> <p>12) 방문1 기준 3개월 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>13) 본 인체적용시험용 식품 성분에 민감하거나 알레르기가 있는 자</p> <p>14) 기타 사유로 시험자가 부적합하다고 판단하는 자</p>
<p>유효성 평가 변수</p>	<p>1) 1차 유효성 평가 변수^(No.06)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 혈압(수축기 혈압, 이완기 혈압, 평균동맥압) <p>2) 2차 유효성 평가 변수^(No.06)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 수축기 목표혈압(sitSBP <120 mmHg)에 도달한 대상자의 비율 ○ 이완기 목표혈압(sitDBP <80 mmHg)에 도달한 대상자의 비율 ○ 레닌-안지오텐신계(Renin, ACE, Aldosterone) ○ 염증(Homocysteine, hs-CRP) ○ 섬유소용해(PAI-1) <ul style="list-style-type: none"> • 수축기혈압, 이완기혈압, 평균동맥압, 평균맥압, ACE, Renin, hs-CRP, 알도스테론^(CRIS.01) • 수축기혈압, 이완기혈압, 평균동맥압, 평균맥압, Renin, hs-CRP, Aldosterone, Ntirc oxide^(CRIS.03) • → Aldosterone이 공통적으로 들어가는 것이 확인되어 추가했습니다.

<그 외 가이드에서 제시한 바이오마커>

구분	바이오마커		
혈압	24시간 활동 혈압		
	혈압변동성		
레닌-안지오텐신계	안지오텐시노겐		
	안지오텐신 I		
	안지오텐신 II		
염증	인터루킨-6(IL-6)		
	TNF-alpha		
	NF-kB		
혈관 이완	NADPH oxidase(활성, 단백질, mRNA 발현)		
심장 기능	좌심실비대(LVH)		
	B형 나트륨이뇨펩타이드(BNP)		
	N-terminal proatrial natriuretic peptide (NT-proBNP)		
	심박(동)수		
	맥박수		
	심전도(ECG)		
	심장 초음파		
신장 기능	소변 알부민-크레아티닌 비(UACR)		
	사구체여과율(GFR)		
	이뇨작용	소변량	
		Lipschitz value	
		Na+Cl	
		Na:K ratio	
		Cl:(Na+K) ratio	

안전성 평가
변수

- 1) 이상반응
- 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)
- 3) 활력징후(맥박), 신체계측(체중)
- 4) 심전도검사

시험진행
일정표

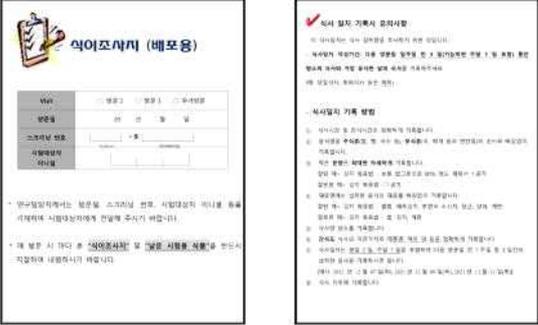
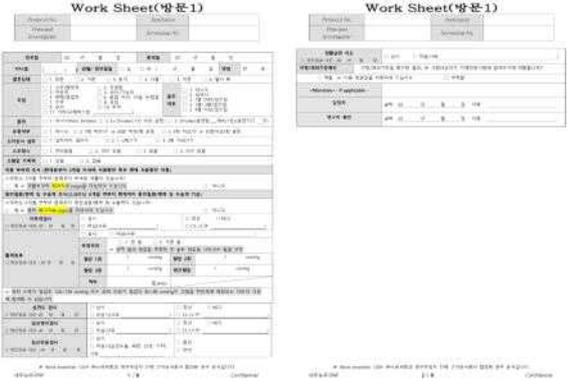
Period	Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit	1	2	3	4
Week	-2	0	4	8
Window period(day) ²⁾			±7	±5
서면동의서	√			
인구학적 조사 ³⁾	√			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾	√	√		
생활습관 조사 ⁵⁾				
생활습관 지도 ⁵⁾	√			√
신체검진	√		√	√
활력징후(맥박) 측정	√		√	√
신체계측 ⁶⁾	신장	√		
	체중	√	√	√
임상병리검사 ⁷⁾	√			√
임신반응검사 ⁷⁾	√			
심전도검사 ⁸⁾	√			√
유효성 평가	혈압 ⁹⁾	√	√	√
	레닌-안지오텐신계 ¹⁰⁾	√		√
	염증 ¹⁰⁾	√		√

	섭유소용해 ¹⁰⁾	√			√
	식사지도 및 식이조사 ¹¹⁾		√	√	√
	대상자 적합성 평가	√	√		
	무작위배정		√		
	인체적용시험용 식품 처방		√	√	
	이상반응 확인			√	√
	순응도 확인 ¹²⁾			√	√
	병용약물 및 병용요법 변화 확인			√	√
	자가평가 설문				√

- 1) 방문1의 방문일로부터 2주 이내에 방문2가 시행될 수 있도록 한다. 방문1과 방문 2는 동일한 날에 실시할 수 있다. 방문1의 일부 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위배정 전까지 실시할 수 있다.
- 2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.
- 3) 방문1에 인체적용시험 대상자의 성별, 생년월일, 연령, 결혼상태, 직업, 고혈압 가족력을 조사한다.
- 4) 방문1 기준 3개월 이내의 외과적 수술력 및 병력, 약물투여력을 조사한다.
- 5) 인체적용시험 기간 동안 대상자들이 방문 전날 및 당일에 음주, 심한 운동 등 평소와 다른 식사와 활동을 하지 않도록 인체적용시험 코디네이터는 정규방문(방문 1, 2, 3) 및 유선상으로 방문4 전날까지 교육하며, 방문1, 4에 음주여부, 흡연여부, 운동여부, 고지방식 섭취여부(한 끼 식사로 고지방식을 섭취하는 횟수), 스트레스 자각 정도를 조사한다.
- 6) 신장, 체중은 0.1 cm, 0.1 kg 단위까지 반올림하여 기록한다.
- 7) 인체적용시험 대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 방문1 기준 4주 이내의 검사 결과가 있다면 적용 가능하며(임신반응검사 제외), 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대하여 재검사를 실시할 수 있다.
 - 혈액학적검사: RBC, WBC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet
 - 혈액화학적검사: AST(GOT), ALT(GPT), Total Cholesterol, Glucose, Total Protein, BUN, Creatinine, Uric Acid, Ca
 - 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, RBC(Erythrocyte), Urobilinogen, Nitrite, WBC(Leukocyte)
 - 임신반응검사: Urine HCG(※ 가임기 여성만 해당)
- 8) 방문1 기준 3개월 내 검사 결과가 있을 시, 적용 가능하다.
- 9) 방문1과 방문2에서 측정된 혈압수치로 시험대상자 적합성 평가를 시행한다. 수축기 및 이완기 혈압은 10분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 전자혈압계를 사용하여 측정한다.
 - 가능한 동일 시간대에 방문하여 동일한 팔에 혈압을 측정한다. 혈압은 최소 2분 이상 간격을 두고 적어도 2번 이상 측정하되, 처음은 양팔에서 측정하고 수치가 더 높은 쪽 팔에서 재측정 한다. 만약 처음과 재측정 한 혈압의 수치가 5 mmHg 이상 차이가 난다면, 추가로 혈압을 측정하여 재측정한 두 혈압의 평균을 기록하여야 한다.
 - 활력징후 측정시기가 채혈시기와 일치할 경우, 가급적 활력징후를 먼저 측정한 후 채혈을 하도록 한다. 불가피하게 활력징후를 채혈 후 실시할 경우, 5분

	<p>이상의 간격을 두고 활력징후를 측정하도록 한다.</p> <p>10) 분석을 위해 Serum 00 mL를 채취하여 냉동 보관(-70 °C 이하) 후 외부분석기관에서 분석하며, 분석 완료 후 검체는 폐기한다.</p> <p>11) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험 대상자에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.</p> <p>12) 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 확인하여 관리약사 및 인체적용시험 코디네이터가 점검, 기록한다('인체적용시험용 식품 처방 날~다음방문 전날' 섭취).</p>
<p>비용금지</p>	<p>[비용금지 약물(또는 식품)]</p> <p>1) 고혈압제제: Thiazide계 이뇨제, 안지오텐신 전환효소 억제제, 안지오텐신II 수용체 차단제, 베타 차단제, 칼슘 채널 차단제 등</p> <p>2) 혈압에 영향을 미칠 수 있는 약물: 스테로이드제제, 갑상선 호르몬제제, 경구 피임약, 중추 신경 억제제 혹은 흥분제, 질산염제, 면역억제제, 은행엽엑스 제제 등</p> <p>3) 흡삼 등 혈행 개선 목적 및 혈압에 영향을 미치는 건강기능식품</p>

(4) 인체적용시험 문서 개발

	
<p>식이조사지</p>	<p>Work Sheet</p>

(5) 인체적용시험 실시기관 선정

- (가) 시험(연구)자가 인체적용시험에 관한 규정을 준수하고, 과학적·윤리적인 기준을 가지고 인체적용시험 계획서에 따라 연구를 수행할 수 있는지를 평가하며, 시험기관의 인체적용시험 진행에 필요한 세부 항목들을 확인 및 점검
- (나) 선정 기관: 대전대학교 대전한방병원(한방내과 유효룡 교수)

나. 인체적용시험 계획서(프로토콜) 최종화

- (1) 시험식품의 정보, 내외부 전문가 검토의견을 반영하여 프로토콜 최종화
- (2) 프로토콜 요약

인체적용시험 제목	NVK79가 혈압에 미치는 유효성 및 안전성 평가를 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험														
인체적용시험 의뢰자	(주)노바락토														
인체적용시험 책임자	류호룡 교수														
인체적용시험 실시기관	대전대학교 대전한방병원 한방내과														
인체적용시험 기간	기관생명윤리위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월 (단, 시험대상자 등록속도에 따라 변경될 수 있음)														
인체적용시험 대상	고혈압 전단계에 해당되는 자														
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 고혈압 전단계에 해당되는 자를 대상으로 NVK79(Lactiplantibacillus plantarum K79 열처리배양건조물)를 섭취시켰을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 혈압 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.														
인체적용시험 시험 단계 및 디자인	단 계: 기타(건강기능식품) 디자인: 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조														
인체적용시험용 식품	시험식품: NVK79(Lactiplantibacillus plantarum K79 열처리배양건조물) 대조식품: Placebo														
인체적용시험용 식품 섭취 방법	시험식품(NVK79): 1일 1회, 1회 1포 물과 함께 섭취 (Lactiplantibacillus plantarum K79 열처리배양건조물로써 1.6 g/day) 대조식품(Placebo): 시험식품과 동일한 방법으로 섭취														
인체적용시험용 식품 섭취 기간	8주														
인체적용시험 방법	인체적용시험 동의서에 자의로 서명한 인체적용시험 대상자를 대상으로, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 한다. 배정된 인체적용시험 대상자는 8주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.														
인체적용시험 대상자 수	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군 (NVK79)</th> <th>대조군 (Placebo)</th> <th>총 인체적용시험 대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수 (PP Set)</td> <td>37</td> <td>37</td> <td>74</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(25 %) 고려 레수</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>				시험군 (NVK79)	대조군 (Placebo)	총 인체적용시험 대상자 수	최종 평가 레수 (PP Set)	37	37	74	Drop-out(25 %) 고려 레수	50	50	100
	시험군 (NVK79)	대조군 (Placebo)	총 인체적용시험 대상자 수												
최종 평가 레수 (PP Set)	37	37	74												
Drop-out(25 %) 고려 레수	50	50	100												
선정기준	1) 만 19세 이상, 만 75세 이하의 남녀 2) 수축기 혈압이 120~139 mmHg 또는 이완기 혈압이 80~89 mmHg인 자 3) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험 참여에 동의하고, 서면 동의서(Informed Consent Form)를 작성한 자														
제외기준	1) 중증의 면역계, 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 정신성, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자 (단, 시험대상자의 상태를 고려하여 시험자의 판단에 따라 시험 참여 가능) 2) 수축기 혈압 160 mmHg 또는 이완기 혈압 100 mmHg 이상인 자 3) 혈압에 영향을 미칠 수 있는 약물(스테로이드제제, 갑상선 호르몬제제, 경														

	<p>구피임약, 중추 신경 억제제 혹은 흥분제, 질산염제, 면역억제제, 은행엽엑스 제제 등)을 3개월 이상 지속적으로 투여한 자</p> <p>4) 방문1 기준 3개월 이내에 고혈압제제를 투여한 자</p> <p>5) 방문1 기준2주 이내에 혈압 조절 또는 홍삼 등 혈행 개선을 목적으로 하는 건강기능식품을 지속적으로섭취한 자</p> <p>6) 방문1 기준2주 이내에 항생제, 성장제를 투여한 자</p> <p>7) 방문1 기준2주 이내에 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 포스트바이오틱스, 지속적으로(주 4회 이상) 유산균 제품을 투여 또는 섭취한 자</p> <p>8) 알코올 또는 약물남용의 병력이 있는 자</p> <p>9) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상)</p> <p>10) TSH가 0.1 μU/mL 이하이거나, 10 μU/mL 이상인 자 또는 갑상선 질환자</p> <p>11) Creatinine이 실시기관 정상 상한치의 2배 이상인 자</p> <p>12) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 실시기관 정상 상한치의 3배 이상인 자</p> <p>13) 방문1 기준 3개월 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>14) 임신 중이거나 수유부 또는 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자</p> <p>15) 본 인체적용시험용 식품 성분에 민감하거나 알레르기가 있는 자</p> <p>16) 기타 사유로 시험자가 부적합하다고 판단하는 자</p>
<p>유효성 평가 변수</p>	<p>1) 1차 유효성 평가 변수</p> <ul style="list-style-type: none"> - 혈압(수축기 혈압, 이완기 혈압, 평균동맥압) <p>2) 2차 유효성 평가 변수</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수축기 목표혈압(sitSBP < 120 mmHg)에 도달한 대상자의 비율 - 이완기 목표혈압(sitDBP < 80 mmHg)에 도달한 대상자의 비율 - 레닌-안지오텐신계 지표(Renin, ACE, Aldosterone) - 염증 지표(Homocysteine, hs-CRP) - 섬유소용해 억제제(PAI-1)
<p>안전성 평가 변수</p>	<p>1) 이상반응</p> <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p> <p>3) 활력징후(맥박), 신체계측(체중)</p> <p>4) 심전도검사</p>
<p>통계분석</p>	<p>1. 유효성 평가 변수</p> <p>1) 1차 유효성 평가 변수</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1차 유효성 평가 변수인 혈압의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 인구학적 및 생활습관 조사에서 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있고 임상적으로 유의한 경우 해당 기저특성을 공변량으로 하는 ANCOVA를 실시할 수 있다. <p>2) 2차 유효성 평가 변수</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2차 유효성 평가 변수인 레닌-안지오텐신계 지표, 염증 지표, 섬유소용해 억제제의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시

다. IRB 초기심의 신청 및 승인 획득

- (1) 인체적용시험용 문서 및 IRB 심의 신청을 위한 서류를 제작 후 프로토콜과 함께 인체적용시험 실시기관(대전대학교 대전한방병원) IRB에 제출하여 승인 획득
- (2) 제출자료

<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 계획서 • 연구대상자 설명문 및 동의서 • 인체적용시험자 자료집 • 증례기록서 • 책임연구자 및 참여연구자 최근 이력 • 책임연구자 및 참여연구자 임상연구윤리 교육 수료증 • 연구자서약서 • 이해상충보고서 • 피해보상에 대한 규약 • 생활습관조사지 • 식이조사지(방문2, 배포용) • 자가평가설문지 • 모집공고안 • 연구비 소요내역서 • 진료검사비세부내역서
--

(3) 주요 인체적용시험용 문서

<p>증례기록서 (Case Report Form)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 각각의 대상자 별로 인체적용시험 계획서에서 요구한 정보를 기록하여 인체적용시험 의뢰자에게 전달할 목적으로 개발된 문서
<p>인체적용시험 대상자 동의서 (Informed Consent Form)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 대상자가 인체적용시험 참여 유무를 결정하기 전에 대상자 설명서를 통하여 인체적용시험과 관련된 모든 정보를 제공받고, 대상자 본인이 자발적으로 인체적용시험에 참여함을 확인하는 서명 및 서명일자가 포함된 문서
<p>인체적용시험 대상자 모집 공고문</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 대상자가 합리적인 참여 결정을 위해 필요한 정보(인체적용시험의 명칭, 목적, 방법, 대상자 자격 및 선정기준, 의뢰자와 책임자의 성명·주소·연락처 및 예측 가능한 부작용에 관한 사항 등)를 이해하기 쉽고 정확하게 전달하도록 작성된 문서
<p>인체적용시험 피해 보상 규약</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 대상자가 인체적용시험 참여로 인한 손상(인체적용시험 계획서에 따라 섭취한 인체적용시험용 식품 또는 인체적용시험 계획서에 따라 행해진 의학적 치료 과정 또는 개입으로 인한 손상)이 발생하였을 경우, 그 보상에 대한 사항을 규정하는 문서
<p>증례기록서</p>	<p>대상자 동의/설명서</p>
<p>대상자 모집 공고안</p>	<p>피해 보상 규약</p>

Protocol No. NV_NVK79 Investigator's Brochure version 1.0 (Date 2022.07.14)

인체적용 시험자 자료집 (Investigator's Brochure)

기능성분명명 Lat(β)-bacteriophage K79 말티지박테리오파지(NVK79)	Version 1.0 NV_NVK79 인체적용시험 계획서 번호 인체적용시험 의뢰자 KIN-NA79
---	--

Version Date: 2022년 7월 14일

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험자 자료집에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험 계획서, 인체적용시험 승인서, 기관생명윤리위원회(IRB), 식약처의 승인서 등을 통해 제공된 것으로 IRB, 생명윤리위원회 승인 사항에 대한 책임은 연구 책임자에게 있습니다.

CONFIDENTIAL

인체적용시험자자료집

[서식11] 생활습관 조사지
Protocol No. NV_NVK79
시험계획서 번호: NV_NVK79 (Date: 2022.07.14)

생활습관 조사지

1. 연구 목적: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

2. 목적: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

3. 대상: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

4. 설문지 작성 방법: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

생활습관조사지

[서식12] 자가평가 설문지
Protocol No. NV_NVK79
시험계획서 번호: NV_NVK79 (Date: 2022.07.14)

자가평가 설문지

1. 연구 목적: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

2. 목적: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

3. 대상: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

4. 설문지 작성 방법: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

자가평가설문지

[서식13] 식이조사지(배포용)
Protocol No. NV_NVK79
시험계획서 번호: NV_NVK79 (Date: 2022.07.14)

식이조사지(배포용)

1. 연구 목적: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

2. 목적: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

3. 대상: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

4. 설문지 작성 방법: 본 설문지는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

식이조사지

(4) IRB 신청서 및 승인 통보서

[서식11] 연구계획 초기심의신청서
[서식11] Version No. 5.1(2020.03)
대진대학 | 대전원방병원
기관생명윤리위원회

연구계획 초기심의신청서

1. 연구 목적: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

2. 목적: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

3. 대상: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

4. 설문지 작성 방법: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

IRB 신청서

[서식12] IRB 심의결과 통보서
[서식12] Version No. 5.1(2020.03)
대진대학 | 대전원방병원
기관생명윤리위원회

IRB 심의결과 통보서

1. 연구 목적: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

2. 목적: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

3. 대상: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

4. 설문지 작성 방법: 본 연구는 연구 목적을 달성하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험을 위한 연구 목적을 달성하기 위한 설문지입니다.

승인 통보서

라. 인체적용시험 개시

(1) 개시모임 실시

- (가) 일자 및 장소: 2022.09.14(수) / 대전대학교 대전한방병원 임상시험센터 5층 IRB 회의실
- (나) 참석자: 실시기관(대전한방병원 류호룡 교수 등 6명), Sponsor(주노바락토 황용진 대표이사 등 3명), CRO(네오뉴트라주) 서은정 CRM 등 3명)
- (다) 개시모임 주요 수행 업무

- ① 인체적용시험 계획서의 전반적 검토(선정/제외기준, 시험진행 절차, 시험식품 섭취, 무작위 배정 및 맹검법, 1차 유효성 평가변수 및 기타 자세한 사항들) 및 설명, 논의, 준수사항(GCP설명)
- ② 시험 관련 문서 및 물품 등 필요한 자료 제공
- ③ 영상진단의학실 검사(임상병리실) 및 특수 컴퓨터 프로그램과 같은 전문적인 절차에 대한 지침 검토
- ④ Protocol, ICF, CRF, 복용일지 등에 대한 모든 질문사항 및 의문점들에 대한 논의
- ⑤ IRB승인 및 변경 사항 문서화
- ⑥ 시험 담당자의 역할과 책임 명시
- ⑦ 향후 모니터링 SDV업무계획 소개 및 근거문서(Source Document)정의(모니터링 방문 간격, 모니터링 방문 시 CRC준비사항 등)
- ⑧ 이상반응 및 중대한 이상반응 등에 대한 보고 및 보고 절차
- ⑨ 의뢰자에게 관련 연구에 관한 최신 정보를 제공
- ⑩ 시험기관 내에서의 절차 및 이슈사항
- ⑪ 연구문서의 종류, 보관 및 사용방법 등에 대한 소개(동의서, 시험대상자 로그, 워크시트, 증례기록서, 수불대장, 처방전, 온도기록지 등의 작성법)
- ⑫ 시험에 사용되는 식품의 수불 일지 확인
- ⑬ 모든 연구 관련 교육 후의 교육기록 문서화
- ⑭ 시험 실시 전 확보되어야 할 기본 문서들 확인, Investigator Site File(ISF) 검토(기록의 보관) 및 ISF보관 기본문서 설명
- ⑮ 연구자파일 및 약국파일 업데이트(추후 발송되는 뉴스레터 와 IRB 관련 변경 및 승인사항, Material 인수증 등)

(2) 개시모임 발표자료 및 보고서

--	--	--

마. 인체적용시험 수행

(1). 프로토콜 일정에 따라 실시기관 대상자 등록 및 검사 진행

Period		Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	4	8
Window period(day) ²⁾				±7	±5
서면 동의서		√			
인구학적 조사 ³⁾		√			
생활습관 조사 ⁴⁾		√			√
생활습관 지도 ⁴⁾		√	√	√	
병력 및 약물투여력 ⁵⁾		√	√		
맥박		√		√	√
신체검진		√		√	√
신체계측 ⁶⁾	신장	√			
	체중	√		√	√
임상병리검사 ⁷⁾		√			√
임신반응검사 ⁷⁾		√			
심전도검사 ⁸⁾		√			√
유효성 평가	혈압 ⁹⁾	√		√	√
	레닌-안지오텐신계 지표 ¹⁰⁾	√			√
	염증 지표 ¹⁰⁾	√			√
	섬유소용해 억제제 ¹⁰⁾	√			√
식사지도 및 식이조사 ¹¹⁾			√	√	√
인체적용시험 대상자 적합성 평가		√	√		
무작위배정			√		
인체적용시험용 식품 처방			√	√	
이상반응 확인				√	√
순응도 확인 ¹²⁾				√	√
병용약물 및 병용요법 변화 확인				√	√
자가평가 설문					√
<p>1) 방문1 이후 2주일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 방문1과 방문2는 동일한 날에 실시할 수 있다. 방문1의 일부 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위배정 전까지 실시할 수 있다.</p> <p>2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.</p> <p>3) 방문1에 성별, 생년월일, 연령, 결혼상태, 직업, 고혈압 가족력을 조사한다.</p> <p>4) 인체적용시험 기간 동안 대상자들이 방문 전날 및 당일에 음주, 심한 운동 등 평소와 다른 식사와 활동을 하지 않도록 인체적용시험 코디네이터는 정규방문(방문1, 2, 3) 및 유선상으로 방문 4 전날까지 교육하며, 방문1, 4에 음주여부, 흡연여부, 운동여부, 고지방식 섭취여부(한끼 식사로 고지방식을 섭취하는 횟수), 스트레스 자각 정도를 조사한다.</p> <p>5) 방문1 기준 3개월 이내의 외과적 수술력 및 병력, 약물투여력을 조사한다.</p> <p>6) 신장, 체중은 0.1 cm, 0.1 kg 단위까지 반올림하여 기록한다.</p> <p>7) 인체적용시험 대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 방문 1 기준 4주 이내의 검사 결과가 있다면 적용 가능하며(임신반응검사 제외), 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대하여 재검사를 실시할 수 있다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈액학적검사: RBC, WBC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet • 혈액화학적검사: AST(GOT), ALT(GPT), Total Cholesterol, Glucose, Total Protein, BUN, 					

<p>Creatinine, Uric Acid, Ca</p> <ul style="list-style-type: none"> • 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, RBC(Erythrocyte), Urobilinogen, Nitrite, WBC(Leukocyte) • 임신반응검사: Urine HCG(※ 가임기 여성만 해당) • 갑상선호르몬검사: TSH(방문1에서만 실시) <p>8) 방문1의 심전도 검사는 방문1 기준 3개월 내 검사 결과가 있을 시, 적용 가능하다.</p> <p>9) 수축기 및 이완기 혈압은 10분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 가능한 동일한 시간대에 측정하며, 동일한 전자혈압계를 사용하여 측정한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 방문1에서는 양팔 혈압을 측정하고 수치가 더 높은 쪽 팔에서 혈압을 재측정하고, 이후 동일한 팔에서 혈압을 측정한다. 2분 간격으로 2회 측정 후 측정한 두 번의 측정값의 평균을 내고, 만약 2회 측정치의 값이 5 mmHg 이상 차이가 나면 추가로 측정하여 평균을 계산한다. 최종 두 번의 측정값을 증례기록서에 기록하여 그 두 값의 평균값이 수집되도록 한다. • 혈압 측정시기가 채혈시기와 일치할 경우, 가급적 혈압을 먼저 측정한 후 채혈을 하도록 한다. 불가피하게 채혈 후 혈압을 측정할 경우, 5분 이상의 간격을 두고 혈압을 측정하도록 한다. <p>10) 분석을 위해 혈액 약 14 mL를 채취하여 냉동보관 후 외부분석기관에서 분석하며, 분석 완료 후 검체는 폐기한다. 단, 염증지표 중 hs-CRP는 실시기관에서 분석한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 레닌-안지오텐신계 지표: Renin, ACE, Aldosterone • 염증 지표: Homocysteine, hs-CRP • 섬유소용해 억제제: PAI-1 <p>11) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험 대상자에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.</p> <p>12) 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 확인하여 관리약사 및 인체적용시험 코디네이터가 점검, 기록한다('인체적용시험용 식품 처방 날~다음 방문 전날' 섭취).</p>
--

(2) 인체적용시험 관찰 항목 및 임상검사 항목

인체적용시험 대상자 동의 및 인구학적 조사	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험에 들어가기 전, 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 인체적용시험 대상자에게 상세히 설명하였고, 인체적용시험 대상자에게 서면 동의를 받았다. 서면 동의는 인체적용시험 대상자가 자의로 서명하여야 하였다. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사하였다. • 방문1에 실시하는 인구학적 조사의 기록사항은 인체적용시험 대상자 성별, 생년월일, 연령, 결혼상태, 직업, 고혈압 가족력이었다.
생활습관 조사 및 지도	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 기간 동안 대상자들이 방문 전날 및 당일에 음주, 심한 운동 등 평소와 다른 식사와 활동을 하지 않도록 인체적용시험 코디네이터는 정규방문(방문1, 2, 3) 및 유선상으로 방문4 전날까지 교육하였으며, 방문1, 4에 음주여부, 흡연여부, 운동여부, 고지방식 섭취여부(한끼 식사로 고지방식을 섭취하는 횟수), 스트레스 자각 정도를 조사하였다.
병력 및 약물투여력, 병용약물 및 병용요법 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1, 2에 문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사하였다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 방문1을 기준으로 3개월 이내의 병력을 상세히 조사하였다. 과거력 및 현병력에 대하여 방문일 기준 유병 여부, 질환명/수술명, 시작일, 방문 당시 지속여부를 기재하였다. 약물투여력은 방문1을 기준으로 3개월 이내의 선행약물을 모두 확인하였다. • 인체적용시험용 식품 섭취 이후 방문3과 방문4에서 병용약물 및 병용

	<p>요법을 확인하였다.</p>
신체검진	<ul style="list-style-type: none"> 방문1, 3, 4에서 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 인체적용시험 대상자의 임상적 상태를 근거로 신체검진을 실시하였다.
신체계측(신장, 체중)	<ul style="list-style-type: none"> 방문1에 신장, 체중을 측정하였고, 방문3, 4에 체중을 측정하였다. 신장은 0.1 cm, 체중은 0.1 kg 단위까지 반올림하여 측정하였다.
임상병리검사/임신반응검사	<ul style="list-style-type: none"> 방문1, 4에서 임상병리검사를 실시하여 인체적용시험 대상자의 전신적인 건강상태를 평가하였다. 인체적용시험 대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사하였다. 방문1 기준 4주 이내의 검사 결과가 있다면 적용 가능하였으며(임신반응검사 제외), 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대하여 재검사를 실시할 수 있었다. <ul style="list-style-type: none"> - 혈액학적검사: RBC, WBC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Hemoglobin, Hematocrit, Platelet - 혈액화학적검사: AST(GOT), ALT(GPT), Total Cholesterol, Glucose, Total Protein, BUN, Creatinine, Uric Acid, Ca - 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, RBC(Erythrocyte), Urobilinogen, Nitrite, WBC(Leukocyte) - 임신반응검사: Urine HCG(※ 가임기 여성만 해당) - 갑상선호르몬검사: TSH(방문1에서만 실시) 가임 여성의 경우 무작위배정을 받기 전에 소변 임신반응검사 결과 음성 판정을 받아야 하였다. 검사 결과 음성 판정이 나오지 않을 경우(임신을 의미) 본 인체적용시험에서 배제되었다. 단, 비가임 여성*은 임신반응검사를 시행하지 않았다. <p>{*비가임 여성: 불임시술(기록된 자궁절제술, 양난소절제술 혹은 수정란이 난관을 통과하지 못하게 하는 수술)을 받은 여성 혹은 폐경 여성(최소 2년 동안 생리가 없는 경우)}</p> 임상적으로 의미가 있는 비정상 임상병리검사 결과는 시험자가 인체적용시험 대상자의 증례기록서(CRF)에 소견을 기재하였고, 시험자가 필요하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하여야 하였다. 비정상적 임상병리검사 결과로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 인체적용시험 대상자의 근거문서, 증례기록서(CRF)에 진단 또는 의학적 상태를 기록하여야 하였다.
심전도검사	<ul style="list-style-type: none"> 방문1, 4에 실시하였으며, 방문1의 심전도검사는 방문1 기준으로 3개월 이내 검사 결과가 있을 시 대체가 가능하였다.
활력징후(맥박), 혈압	<ul style="list-style-type: none"> 맥박, 혈압은 인체적용시험 대상자를 10분 이상 안정시킨 후 가능한 동일한 시간대에 측정하였다. 맥박, 혈압은 방문1, 3, 4에 동일한 전자혈압계를 사용하여 수축기/이완기 혈압을 측정하였고, 평균동맥압은 계산식을 통해 구하였다. <ul style="list-style-type: none"> - 대상자를 의자에 앉게 하고 상완위를 심장과 같은 높이로 하여 혈압계 커프의 하부가 팔꿈치 안팎으로 2 cm 상부에 오도록 한 후 측정하였다. - 방문1에서는 양팔 혈압을 측정하였고 수치가 더 높은 쪽 팔에서 혈압을 재측정하였고, 이후 동일한 팔에서 혈압을 측정하였다. 2분 간격으로 2회 측정 후 측정된 두 번의 측정값의 평균을 내고, 만약 2회 측정치의 값이 5 mmHg 이상 차이가 나면 추가로 측정하여 평균을 계산하였다. 최종 두 번의 측정값을 증례기록서에 기록하여 그 두 값의

	<p>평균값이 수집되도록 하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활력징후 측정시기가 채혈시기와 일치할 경우, 가급적 활력징후를 먼저 측정한 후 채혈을 하도록 하였다. 불가피하게 활력징후를 채혈 후 실시할 경우, 5분 이상의 간격을 두고 활력징후를 측정하도록 하였다. - 평균동맥압 = 이완기 혈압 + 1/3(수축기 혈압 - 이완기 혈압) - 수축기 혈압(sitSBP)이 120 mmHg 미만, 이완기 혈압(sitDBP)이 80 mmHg 미만에 도달한 경우 목표혈압에 도달한 것으로 정의하였고, 방문2, 3, 4에서 목표혈압에 도달한 대상자의 비율을 구하였다.
<p>레닌-안지오텐신계 지표</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 레닌-안지오텐신계(Renin-Angiotensin System, RAS)는 혈관 수축과 신장에서 나트륨의 재흡수를 통하여 혈압과 체액의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. RAS는 레닌 분비를 시작으로 안지오텐신(Angiotensin) II로 전환되어 작용을 나타내는 특이한 내분비계이다. 조직 내 RAS는 순환 내 RAS를 보조하여 Angiotensin II 작용의 균형과 항상성을 보다 장기적으로 유지하며 과다 발현되면 병태 생리적 상태를 초래한다. 또한, RAS의 차단이 혈압저하 뿐만 아니라 심혈관계질환에서 표적장기 손상을 방지함이 알려졌다. • 방문1, 4에 Renin, ACE, Aldosterone를 측정하였으며, 검체는 냉동보관 후 외부분석기관에서 분석하였으며, 분석 후 폐기하였다.
<p>염증 지표</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 염증 지표 중 하나인 호모시스테인(Homocysteine)은 혈압 등 심혈관계질환의 위험인자와 연관성이 있다. 이는 증가된 호모시스테인이 혈관 내피세포에 직접적인 독성을 주며, 혈소판응집을 증가시키고, 다른 한편으로 산화 LDL 콜레스테롤과의 상호 작용에 의한 것으로 알려져 있다. • hs-CRP는 혈액에 있는 급성병기단백질(Acute-Phase Protein)의 일종으로 염증, 감염, 조직상해 시에 간에서 생성되며 또한 관상동맥의 심근세포와 병든 혈관에서도 생성된다. CRP는 염증반응에서 중요한 역할을 하는데, 혈관내피세포를 활성화시켜 점착분자(Adhesion Molecules)와 사이토카인이 생성되게 하며, IL-6 분비를 촉진하고, 혈관내피세포에서 NO Synthase의 생성과 활성을 감소시킨다. hs-CRP 농도는 정상혈압을 가진 사람에서 미래 고혈압을 예견할 수 있는 지표이며, 고혈압 환자에서 미래 심혈관질환 발생을 예견할 수 있는 독립적인 바이오마커이다. • 방문1, 4에 Homocysteine, hs-CRP를 측정하였으며, Homocysteine 분석을 위해 검체는 냉동보관 후 외부분석기관에서 분석하였으며, 분석 후 폐기하였다.
<p>섬유소용해 억제제</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 섬유소용해 억제제인 플라즈미노겐 활성화인자 억제제-1(Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1)와 섬유소용해인자인 조직 플라즈미노겐 활성화인자(Tissue Plasminogen Activator, tPA)의 작용이 중요한데, tPA는 당단백질(Glycoprotein) 중 하나로 주로 혈관내피세포(Vascular Endothelial Cells)에서 분비가 되는데 섬유소용해를 상향조절(Up-Regulation)하여서 혈액응고 용해(Clot Dissolution)를 활성화하기 때문에 혈관계질환의 발생을 낮춘다. PAI-1은 고혈압과 관련이 깊다. 고혈압을 가지고 있는 환자의 경우 그 수준이 증가한다고 알려져 있는 PAI-1은 활성화된 혹은 손상된 내피세포 및 평활근세포에서 증가된다. • 방문1, 4에 PAI-1를 측정하였으며, 검체는 냉동보관 후 외부분석기관에서 분석하였으며, 분석 후 폐기하였다.

식사지도 및 식이조사	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 대상자로 적합하다고 판정될 경우, 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험 대상자에게 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 신체활동량, 식이섭취량을 유지하도록 권고하였다. • 방문2에서는 인체적용시험 대상자의 평상시 식이조사를 위해 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 기록하였다. • 인체적용시험 기간 동안의 인체적용시험 대상자의 평상시 식이를 조사하기 위해 방문2, 3에 인체적용시험 대상자에게 식이조사지를 배부하였다. 인체적용시험 대상자는 식이조사지에 다음 방문일전 최근 일주일 중 3일 동안(가능한 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 식사를 기록하도록 하였다. 방문3, 4에 인체적용시험 코디네이터는 인체적용시험 대상자의 식이조사지를 확인하였다. • 인체적용시험 기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 Can pro program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석하였다.
선정/제외기준 확인(인체적용시험 대상자 적합성 평가)	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1, 2에 이루어진 인체적용시험 대상자 동의여부와 인구학적 조사, 생활습관 조사 및 지도, 병력 및 약물투여력 조사, 맥박 측정, 신체검진, 신체계측(신장, 체중), 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당), 심전도검사, 혈압 측정 결과를 종합하여 선정/제외기준에 적합한 인체적용시험 대상자인지를 평가하였다.
무작위배정 및 섭취	<ul style="list-style-type: none"> • 방문2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 인체적용시험 대상자를 시험군 또는 대조군으로 무작위배정 하였고, 무작위배정번호에 따라 인체적용시험용 식품을 배부하여 섭취하도록 하였다. 섭취 방법은 인체적용시험용 식품을 받은 날로부터 섭취하도록 하였으며, 다음 방문일 전날까지 섭취하도록 지도하였다.
이상사례 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 이상사례에 대한 정보는 인체적용시험 기간 동안의 각 방문에서 인체적용시험 대상자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색하였다. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 인체적용시험 대상자가 자발적으로 보고하거나 신체검진, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인할 수 있었다. 이상사례 조사에는 발현일 및 소실일, 이상사례의 정도 및 결과, 인체적용시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계, 이상사례에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함되었다.
순응도 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험용 식품의 섭취상황에 대하여 방문2, 3에 인체적용시험용 식품 처방 후 관리약사 또는 인체적용시험 코디네이터가 기록하였고, 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 확인하여 관리약사 또는 인체적용시험 코디네이터가 점검, 기록하였다. '인체적용시험용 식품 처방 날~다음 방문 전날' 섭취를 원칙으로 하였으며, 순응도 확인 시 섭취 순응도(%)는 반올림하여 소수점 1자리까지 표기하였다. $\text{섭취 순응도}(\%) = (\text{실제 섭취한 식품 수} / \text{섭취해야 하는 식품 수}) \times 100$
자가평가 설문	<ul style="list-style-type: none"> • 방문4에 모든 검사 및 평가를 완료한 인체적용시험 대상자에게 본 인체적용시험에 대한 자가평가 설문을 실시하였다.

(3) 대상자 방문별 관찰 검사 방법

1차 방문 (Screening visit, Week -2)	<p>본 인체적용시험에 참여하고자 하는 인체적용시험 대상자가 인체적용시험에 대한 설명을 들은 후 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> ① 서면 동의서 ② 스크리닝 번호 부여 </div>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> ③ 인구학적 조사 ④ 생활습관 조사 및 지도 ⑤ 병력 및 약물투여력 ⑥ 맥박 ⑦ 신체검진 ⑧ 신체계측(신장, 체중) ⑨ 1차 적합성 평가 ⑩ 임상병리검사 ⑪ 임신반응검사(가임기 여성만 실시) ⑫ 심전도검사 ⑬ 혈압 ⑭ 유효성 평가 관련 혈액검사(레닌-안지오텐신계 지표, 염증 지표, 섬유소용해 억제제) ⑮ 다음 방문일 지정
<p style="text-align: center;">2차 방문 (Randomization visit, Week 0)</p>	<p>이 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 병력 및 약물투여력 변화 확인 ② 생활습관 지도 ③ 최종 적합성 평가 ④ 무작위배정 ⑤ 식이조사지 배부 및 작성 방법 교육, 24시간 식이조사 및 식사지도 ⑥ 인체적용시험용 식품 섭취 방법 교육 및 배부 ⑦ 다음 방문일 지정
<p style="text-align: center;">3차 방문 (Interim visit, Week 4)</p>	<p>이 방문은 2차 방문일 이후 28일(±7) 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상사례 확인 ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 생활습관 지도 ④ 맥박 ⑤ 신체검진 ⑥ 신체계측(체중) ⑦ 혈압 ⑧ 식사지도 및 식이조사 ⑨ 식이조사지 배부 및 작성 방법 교육 ⑩ 섭취 순응도 확인 ⑪ 인체적용시험용 식품 섭취 방법 교육 및 배부 ⑫ 다음 방문일 지정
<p style="text-align: center;">4차 방문 (Closing visit, Week 8)</p>	<p>이 방문은 2차 방문일 이후 56일(±5) 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상사례 확인 ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 생활습관 조사 ④ 맥박 ⑤ 신체검진 ⑥ 신체계측(체중) ⑦ 임상병리검사

	⑧ 심전도검사 ⑨ 혈압 ⑩ 유효성 평가 관련 혈액검사(레닌-안지오텐신계 지표, 염증 지표, 섬유소용해 억제제) ⑪ 식이조사 ⑫ 섭취 순응도 확인 ⑬ 자가평가 설문
--	---

(4) 인체적용시험 대상자 등록 및 진행 결과

(가) 인체적용시험 목표 대상자에 대한 대상자 등록을 완료하였으며, 선별된 대상자에 대한 무작위배정, 시험식품 또는 대조식품의 분출 및 섭취, 검사를 완료하였음.

(나) 인체적용시험 대상자 등록 결과 표

Site Name	Planned Enrollment	Screened	S/F	Randomized(%)	Dropped	Completed
대전대학교 대전한방병원	100	117	16	101(101.00%)	8	93
FPE(First Patient Enrollment)	2022.11.22					
LPO(Last Patient Out)	2023.07.31					

(5) 연구 상황 보고서(Monthly Report) 작성

(가)인체적용시험 관련자(의뢰기관, 실시기관 시험책임자 등)들의 상호 정보 공유를 위한 연구 상황 보고서 작성

The image displays four screenshots of clinical trial reports. The first screenshot shows 'Enrollment Data' with a table and a line graph. The second screenshot shows 'Study Start-Up' with various tables and text. The third screenshot shows 'Visit Tracker' with a table. The fourth screenshot shows 'Adverse Event Reporting/Tracking' with a table.

(6) 인체적용시험 모니터링

(가) 인체적용시험 시험 대상자의 권리와 복지를 보호하기 위한 인체적용시험 모니터링 실시

(나) 모니터링 주요 내용

- 시험책임자가 시험기간 동안 안전하고 적절하게 인체적용시험을 수행할 자격이 있고 자원을 확보하고 있는지 여부 확인
- 인체적용시험에 사용되는 시험식품에 대한 다음 사항의 확인
 - 저장조건의 적절성, 섭취기간의 준수 여부 및 이들 시험식품이 인체적용시험을 실시하기에 충분한지의 여부
 - 선정기준을 만족하는 대상자에게만 시험계획서에 명시된 섭취기간, 섭취방법대로 사용되고 있는지의 여부
 - 대상자가 인체적용시험에 사용되는 시험식품의 적절한 섭취·보관·반납에 관한 정보를 제공받는지의 여부
 - 실시기관에서 인체적용시험에 사용되는 시험식품의 인수 또는 섭취, 의뢰자로의 회수 등이

적절히 관리되고 문서화되는지의 여부

- 시험자가 승인된 시험계획서 또는 시험변경계획서를 준수하고 있는지 여부 확인
- 대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 동의서가 얻어졌는지의 여부 확인
- 시험자가 인체적용시험을 적절히 실시하고 이 기준에서 정한 사항을 준수하기 위하여 필요한 최신의 인체적용시험자 자료집 및 문서, 인체적용시험에 사용되는 시험식품을 포함한 그 밖의 공급품을 수령하였는지의 여부 확인
- 시험자가 인체적용시험의 제반 사항을 충분히 숙지하고 있는지의 여부 확인
- 시험자가 특정한 인체적용시험 관련 기능을 시험계획서 및 의뢰자와 실시기관의 장 또는 시험책임자와 합의한 문서에 따라 수행하고 있으며, 권한이 없는 자에게 이러한 기능이 위임되지 않았다는 사실의 확인
- 시험책임자가 선정기준에 적합한 대상자만을 인체적용시험에 참여시키고 있는지의 여부 확인
- 대상자 모집 현황에 대한 보고
- 근거문서 및 그 밖의 인체적용시험 관련 기록이 정확하고 완전하며 최신 사항이 반영되도록 유지되고 있는지의 여부 확인
- 시험책임자가 인체적용시험에 필요한 모든 보고서, 통지서, 신청서 등을 적절히 제공하고 있으며, 이러한 문서들을 통해 해당 인체적용시험을 확인할 수 있고 또한 그 기록이 정확하고 적절하며, 읽기 쉽고, 날짜가 기재되어 있는지 여부 확인
- 증례기록서상의 기재 내용, 근거문서 및 그 밖의 인체적용시험 관련 문서의 정확성과 완전성에 대한 검토와 이들의 상호대조로부터 서로 일치하는지의 여부 및 다음 각 사항에 대한 확인
 - 인체적용시험 계획서에서 요구한 자료가 증례기록서에 정확히 기재되었거나 보고되고 있으며, 근거문서와 일치하는지 여부
 - 섭취기간이나 섭취방법 등의 변동사항이 각 대상자별로 적절히 문서화되고 있는지의 여부
 - 대상자가 지키지 못한 방문검사, 실시하지 않은 실험실 검사 또는 임상 검사 등에 대하여 증례기록서상에 사실대로 명확하게 기재되었거나 보고되고 있는지의 여부
 - 인체적용시험으로부터 대상자가 탈락하거나 탈퇴한 모든 사실이 증례기록서 상에 기재되었거나 보고되고 그 이유가 설명되었는지의 여부
 - 증례기록서의 기재오류, 누락사항과 판독하기 어려운 부분에 대하여 시험책임자에게 알리고, 이러한 사항에 대한 정정·첨가·삭제 등이 적절하게 이루어졌는지, 날짜와 그 사유(필요한 경우)가 기재되어 있는지, 시험책임자 또는 시험책임자를 대신하여 증례기록서상의 기재사항에 대한 변경권한을 가진 시험담당자가 서명을 하였는지 등의 확인
 - 모든 이상반응이 인체적용시험 계획서, 심사위원회, 의뢰자 및 관련규정에 명시된 기간 내에 적절하게 보고되었는지의 여부 확인
 - 시험책임자가 기본문서를 보존하고 있는지의 여부 확인
 - 인체적용시험 계획서, 표준작업지침서에서 정한 사항을 준수하지 않은 것에 대해 시험책임자에게 알리고, 이러한 미 준수 사항이 재발되지 않도록 하는 적절한 조치

(다) 모니터링 실시 내역

실시기관	회차	모니터링일자
대전대학교 대전한방병원	1	2022.12.15
	2	2023.01.20
	3,4	2023.02.01,02
	5,6	2023.02.23,24
	7,8	2023.03.27,28
	9,10	2023.04.10,11
	11,12	2023.05.15,16
	13,14	2023.06.26,27
	15,16	2023.07.10,11
	17,18	2023.08.07,08

(라) KGCP 규정에 의거한 모니터링 보고서 작성

- 모니터링을 실시한 날짜 및 장소
- 모니터링원의 이름 및 시험자 또는 접촉한 사람의 이름
- 모니터링원이 확인한 사항의 요약
- 임상적으로 의미있는 발견 또는 사건
- 인체적용시험 계획서, 의뢰자 표준작업지침서, 실시기관 표준작업지침서 및 이 기준을 위반한 사항 또는 인체적용시험의 문제점
- 결론
- 인체적용시험 계획서, 의뢰자 표준작업지침서, 실시기관 표준작업지침서 및 이 기준을 위반한 사항이 재발되지 않도록 조치한 사항 및 조치가 필요한 사항

(마) 보고서 작성

CR-034_2019V3.0
Effective Date: 2022.05.05

Site Monitoring Visit #17, #18 Report

Investigator: NIA, NACS
Sponsor: [Blank]
Protocol Investigator: [Blank]
Sponsor's Representative: [Blank]
Sponsor's Representative Title: [Blank]
Sponsor's Representative Name: [Blank]
Sponsor's Representative Address: [Blank]
Sponsor's Representative Phone: [Blank]
Sponsor's Representative Email: [Blank]
Sponsor's Representative Fax: [Blank]
Sponsor's Representative Website: [Blank]
Sponsor's Representative Other: [Blank]

Subject Recruitment Status

Enrollment	Completed	Withdrawn	Discontinued	Completed
107	99	0	0	99
107	99	0	0	99

Investigator

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

Monitoring Visit Checklist

Investigator: [Blank] Check: [Blank]
Sponsor: [Blank] Check: [Blank]

CR-034_2019V3.0
Effective Date: 2022.05.05

Site Monitoring Visit #17, #18 Report

Investigator

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

Investigation Product

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

Investigation Product

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

Investigation Product

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

Investigation Product

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

Investigation Product

Investigator Name: [Blank]
Investigator Title: [Blank]
Investigator Address: [Blank]
Investigator Phone: [Blank]
Investigator Email: [Blank]
Investigator Fax: [Blank]
Investigator Website: [Blank]
Investigator Other: [Blank]

○ 혈압 조절 효능 평가 인체적용시험 완료

-CRO와 함께 인체적용시험 데이터 수집, 분석 서비스 플랫폼 cubeCDMS에서 모니터링을 진행함. (그림 1) 등록된 대상자들의 이상징후나 IP를 수령해 간 후 시험기관에 재방문 시 혈압의 변화를 실시간으로 확인하여 인체적용시험 진행 중에 문제가 발생하지 않는지 결과는 유의하게 변화하고 있는지 체크함.

-CRO와 진행한 BRM 진행에 앞서 인체적용시험 계획서의 내용을 숙지하고 참석하였으며 관련한 평가변수에 대한 의미를 이해하고 참석함. 주요한 이상반응 등에 대해 미리 내부적으로 문헌 고찰을 진행하였으며 시험대상자가 인체적용시험 계획서를 위반하면 무조건적으로 분석군에서 제외시키지 않고 평가변수에 얼마나 영향을 주는지 고려해보고 분석대상군 선정 또는 제외시킴.

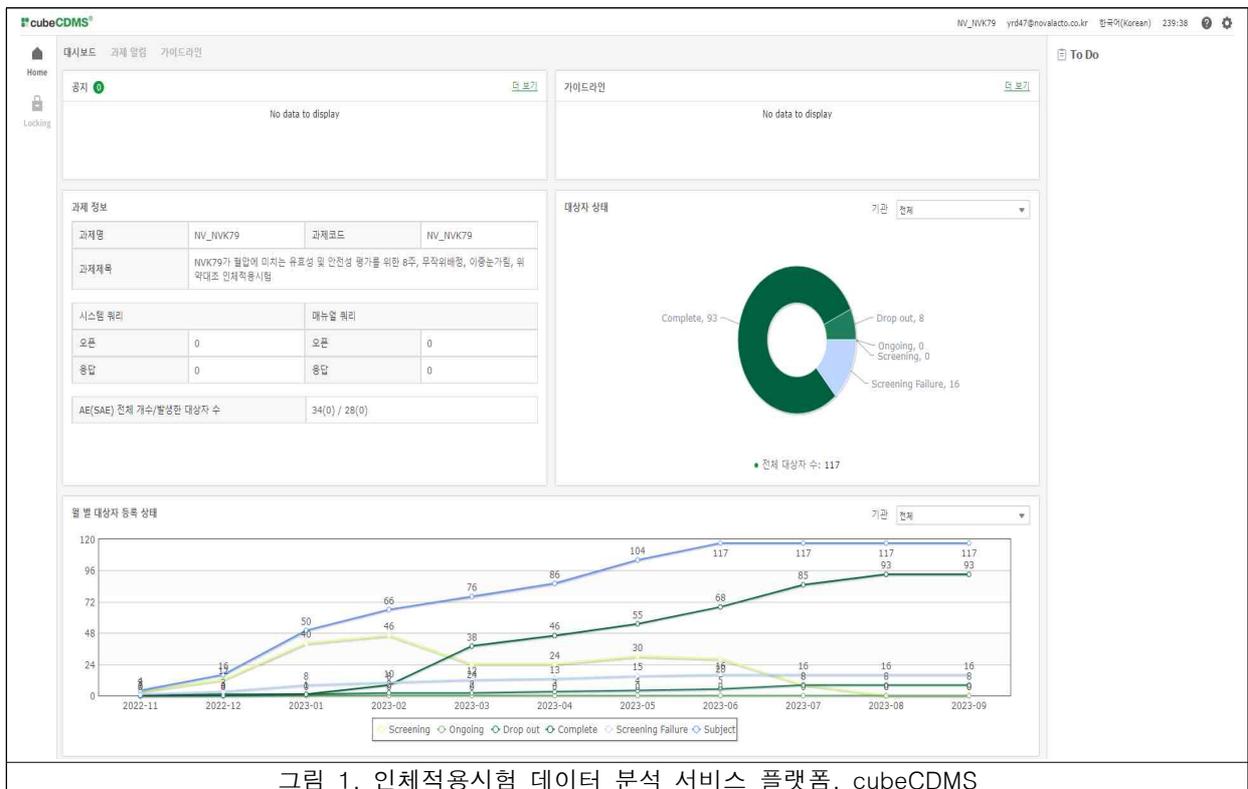


그림 1. 인체적용시험 데이터 분석 서비스 플랫폼, cubeCDMS

가. 인체적용시험 종료

- (1) 마지막 등록된 대상자가 마지막 방문을 끝내고, 모든 데이터가 수집되어 모니터링이 완료된 시점 이후 종료 방문(Close Out Visit)을 시행하여 인체적용시험을 종료
- (2) 종료 방문 시 인체적용시험 중 발생한 문제점이 최종 해결이 되었는지, 관련 기록이 남아있는지, 시험 관련 중요서류들(증례기록서, 연구자 파일, 무작위 배정봉투 등) 점검, 인체적용시험용 식품 등을 점검

나 인체적용시험 DM(Data Management)

- (1) DMP(Data Management Plan) 수립
 - (가) 인체적용시험의 완성도를 높이고 질 높은 데이터를 제공하기 위해 시행되는 일련의 Data Management 과정을 계획하여 문서화

(나) DMP 구성

- Signature Page
- Modification List
- Abbreviation
- Protocol Summary
- Project Team Members and Their Roles
- Data Flow
- Data Management System
- Data Validation
- Medical Coding
- Database Quality Check(DBQC)
- Database Locking/Unlocking
- Management of Clinical Study data (Transfer, backup 등)
- Archiving

(다) DMP

The image shows three pages from a Data Management Plan (DMP) for protocol NV_NWK79. The first page is the title page, the second is the table of contents, and the third is the project team members and their roles section.

Page 1: Title Page

Protocol No. NV_NWK79
 Protocol Title: NVK79가 폐암에 미치는 유효성 및 안전성 평가를 위한 2중, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체 적용시험

Sponsor: (주)비바리온
 CRD: 비오노브이비
 DMP Version: 1.0
 Version Date: 2022-09-26

Page 2: Table of Contents

PERSONNEL HISTORY & MODIFICATION LIST: 2
 ABBREVIATION: 6
 1. INTRODUCTION: 7
 1.1. PURPOSE: 7
 1.2. SCOPE: 7
 1.3. PROTOCOL SUMMARY: 7
 1.4. OTHERS: 8
 2. PROJECT TEAM MEMBERS AND THEIR ROLES: 9
 3. PROCESS: 12
 3.1. DATA MANAGEMENT PROCEDURES: 12
 3.2. TRAINING: 12
 4. EDC DEVELOPMENT: 13
 4.1. CRF DESIGN: 13
 4.2. DATA VALIDATION SPECIFICATIONS(VS): 13
 4.3. USER ACCEPTANCE TEST(UAT): 13
 5. USER ACCEPTANCE TEST(UAT): 14
 5.1. PURPOSE: 14
 5.2. SCOPE: 14
 6. EDC RELEASE: 15
 7. USER MANAGEMENT: 15
 8. DATA VALIDATION: 16
 8.1. USER IDENTIFICATION/RECOGNITION: 16
 8.2. MEDICAL CODING: 17
 8.3. REPORT AND MANAGEMENT OF NEW CRF DATA: 18
 8.4. EXCESSIVE DATA: 18
 8.5. SAS RECONCILIATION: 19
 8.6. SAS RECONCILIATION: 19
 9. PD LIST: 19
 10. DATABASE LOCKING: 19

Page 3: Project Team Members and Their Roles

Role	Responsibility
Sponsor	<ul style="list-style-type: none"> Review Approval of DMP Review Approval of Case Report Form (CRF) Approval Form Review Approval of DB Specification Review Approval of CRF Approval of User Acceptance Test (UAT) Review Approval of User Acceptance Test (UAT) Report Review Approval of EDC Release Approval Form Review Approval of SAS Reconciliation Report Review Approval of Database Locking Approval Form Review Approval of Database Locking and Releasing Approval Form Review Approval of Clinical Data Transfer Report
Data Management Director (DMO)	<ul style="list-style-type: none"> Review of DMP Review of Case Report Form (CRF) Approval Form Review of DB Specification Review of CRF Review of User Acceptance Test (UAT) Report Review of EDC Release Approval Form Approval of a CRF Design Approval of Medical Coding Report Approval of SAS Reconciliation Report Review of External Data Specification Approval of External Data Reconciliation Report Review of Database Locking Approval Form Review of Database Locking and Releasing Approval Form
Data Management Manager (DMM)	<ul style="list-style-type: none"> Review of DMP Review of DB Specification Review of CRF Review of User Acceptance Test (UAT) Report Review of EDC Release Approval Form

(2). DVS(Data Validation Specification)

- (가) 쿼리(Query;질의)항목: CRF로 수집해야 하는 자료 중 계획서·CRF 작성 지침에 위반되거나 수집되어야 할 자료의 누락 또는 수집된 자료 간의 일치하지 않는 항목 등
- (나) DVS란 쿼리항목을 사전정의 및 목록화하는 과정으로서, Data의 무결성을 최대화하고, 높은 수준의 Data Quality를 이끌어내기 위함.
- (다) 첫 Data가 입력되기 전 개발하여야하며, Protocol 및 CRF 등을 검토하여 수정, 추가, 삭제 및 확인되어야 할 validation 항목을 정의함.
- (라) Missing Values, Range Checks, Logical Inconsistencies, Protocol Violations 및 적절하지 못한 데이터의 확인 작업들을 포함함.
- (마) DVS의 수정 및 변경: Protocol/CRF 변경 또는 예상하지 못했던 상황이 발생하여 DVS 변경이 필요한 경우 DVS는 필요시점마다 변경 될 수 있으며, 해당 변경에 대한 변경 목록(Modification List)을 작성하여 유지·보관함.
- (바) DVS Test: 작성된 DVS의 정확성을 확인하기 위해 DVS Test를 수행하며, Dummy Data(질의가 각 항목별에 해당하는 자료가 입력되었을 때는 검출되고, 그렇지 않은 자료가 입력되었을 때는 검출되지 않음을 확인하기 위하여 임의로 만드는 자료)를 작성 및 DVS에 적용하여 제대로 실행되는지 검증함. Dummy Data와 출력된 결과와의 불일치를 발견할 경우 이를 해결하여 Retest를 시행하고, Discrepancy가 없을 때까지 반복

(사) UAT(User Acceptance Test): EDC real site를 개시하기 전 EDC System의 기능 및 Data Validation 조건들의 오류가 발생하지 않는 지 확인하기 위하여 실시하며, UAT과정에서 Sponsor 검토 의견에 따른 쿼리 조건 추가 및 삭제 등을 진행함.

(아) DVS

The image shows a 'Data Validation Specification' document for protocol NW_NW79. It includes a table for 'DVS Ver.' with version 2.1 dated 2023-08-14. A 'DVS Version History & Modification List' table shows changes to the 'DVS' version. The document also contains several data validation tables with columns for 'DVS ID', 'DVS Name', 'DVS Description', 'DVS Type', 'DVS Status', 'DVS Date', 'DVS User', 'DVS Action', 'DVS Reason', and 'DVS Comment'.

(3) Query Management

(가) 발생한 System Query, Manual Query에 대한 해결 및 관리

(4) Medical Coding

(가) 인체적용시험 과정에서 수집된 이상반응, 병력, 약물에 대한 자료를 표준용어체계를 이용하여 일괄된 용어로 선택함으로써 자료저장, 검색, 분석, 표현을 용이하게 할 뿐만 아니라 자료의 활용도를 높이고, 신속하고 정확한 정보교환을 가능케 함.

(나) Coding Dictionary

이상반응, 동반질환 및 병력, 수술력	MedDRA ver .26.0	- 의학정보의 분류를 지원하기 위해 설계된 새로운 국제적 의학 용어사전으로 ICH에 의해 개발되고 MedDRA MSSO의 의해 관리됨
약물투여력(선행약물)	WHO drug reference 2021(ATC code)	- 작용기관 및 계통에 따라 약물의 화학적, 약학적, 치료적 특성에 따라 서로 다른 그룹으로 분류되는 약물 분류코드이며 WHO부작용 모니터링 센터에서 ATC시스템에 제정, 개정 관리 개발됨.

(다) Medical Coding Report

The image shows a 'Medical Coding Report' document. It includes a 'Medical Coding List' table with columns for 'DVS ID', 'DVS Name', 'DVS Description', 'DVS Type', 'DVS Status', 'DVS Date', 'DVS User', 'DVS Action', 'DVS Reason', and 'DVS Comment'. Below the table is a signature table with columns for 'Name', 'Role', 'Signature', and 'Date'.

(5) Database Locking

- (가) DB Locking(잠금)은 Data Management 업무의 완료단계로서, Data Cleaning을 확인하고 사전에 정해진 절차에 따라 데이터베이스를 잠그는 과정을 의미함.
- (나) 수행목적: 관련자들의 접근 권한을 제한하여 분석이 가능한 자료로 생성하고, 완료된 자료를 저장, 보관하며, 인체적용시험 자료의 결과도출, 분석, 제출과정의 데이터 무결성(Data Integrity)을 확보하기 위함.
- (다) DB Locking 이후에 통계 분석을 위한 분석군을 정하는 업무가 진행되기에 반드시 입력된 자료에 대한 완전무결함을 검증한 뒤에 DB Locking을 실시함.

다. 인체적용시험 통계분석

(1) SAP(Statistical Analysis Plan) 작성

- (가) 인체적용시험 계획서에 기술된 평가변수들에 대한 통계 분석의 주요한 특성 및 방법을 보다 기술적이고 상세하게 포함
- (나) SAP의 구성

- Signature Page
- Modification List
- Abbreviation
- Protocol Summary
- Project Team Members and Their Roles
- 시험진행 일정표
- 시험의 목적
- 무작위배정
- 목표한 시험대상자 수 및 산정 근거
- 평가 변수
- 통계분석 방법
- Table

(다) SAP

The image displays four pages from a Statistical Analysis Plan (SAP) document. The first page is the title page, the second is the table of contents, the third is the statistical methods section, and the fourth is the table of primary endpoints.

(2) 통계분석 실시 및 통계분석 보고서(SAR, Statistical Analysis Report) 작성

- (가) 프로토콜 및 SAP에 의거하여 인체적용시험의 유효성 및 안전성을 분석함.
- (나) 유효성 평가 변수 분석 방법

1차 유효성 평가 변수	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 유효성 평가 변수인 혈압의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석함
--------------	--

	<p>였고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> 인구학적 및 생활습관 조사에서 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있고 임상적으로 유의한 경우 해당 기저특성을 공변량으로 하는 ANCOVA 실시
2차 유효성 평가 변수	<ul style="list-style-type: none"> 2차 유효성 평가 변수인 레닌-안지오텐신계 지표, 염증 지표, 섬유소용해 억제제의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음. 수축기 목표혈압 및 이완기 목표혈압에 도달한 대상자의 비율에 대하여 섭취 군간 비율(%)을 제시하였고, 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 통해 섭취 군간 비율 차이를 비교 인구학적 및 생활습관 조사에서 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있고 임상적으로 유의한 경우 해당 기저특성을 공변량으로 하는 ANCOVA 실시

(다) 안전성 평가 변수 분석 방법

이상사례	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상사례(Treatment-Emergent Adverse Events, TEAEs)는 MedDRA version.26.0에 따라 Coding 하였으며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상사례를 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가 각 군간 이상사례가 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였음.
임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사)	<ul style="list-style-type: none"> 혈액학적 및 혈액화학적 검사치에 대하여 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였음.
활력징후(맥박), 신체계측(체중)	<ul style="list-style-type: none"> 활력징후(맥박), 신체계측(체중) 검사치에 대하여 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가
심전도검사	<ul style="list-style-type: none"> 심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였음.

(라)분석에 포함될 시험 대상자 군의 선정

Safety Set	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 인체적용시험 대상자로 총 101명(시험군 50명, 대조군 51명)이 분석에 포함
FA Set	<ul style="list-style-type: none"> 계획서에 기술하였던대로 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고, 주요 선정/제외기준 위반에 해당되지 않는 인체적용시험 대상자로 방문2 이후 중도탈락되어 유효성 평가 미실시 4명(시험군 1명, 대조군 3명)이 제외됨에 따라 총 97명(시험군 49명, 대조군 48명)이 FA Set에 포함
PP Set	<ul style="list-style-type: none"> FA Set 분석에 포함된 인체적용시험 대상자 중에서 인체적용시험을 종료하고,

인체적용시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항이 없는 인체적용시험 대상자로 방문3 이후 중도탈락된 4명(시험군 1명, 대조군 3명), 분석군 판정을 통해 병용금지 약물 복용 5명(시험군 1명, 대조군 4명), 방문허용일 4일 이상 위반 5명(시험군1명, 대조군 4명), 1차 또는 2차 순응도 70 % 미만 6명(시험군 4명, 대조군 2명), 이 제외됨에 따라 총 77명(시험군 42명, 대조군 35명)이 PP Set에 포함

(마) 통계분석 보고서

The image shows a Statistical Analysis Report and its Table of Contents. The report includes protocol details (Protocol No. NV_NK076, Title: NOV076기 혈압에 미치는 유류산 및 안전성 평가를 위한 3상, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험), sponsor (신노비테코), and SAR version (2023.11.21). The Table of Contents lists sections such as Signature Page, SAR Version History, Abbreviations, and various tables and figures related to the study design and results.

(바)유효성 평가 결과

수축기 혈압 변화량	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 2.73±6.00 mmHg 감소하였고 (p=0.0053), 대조군은 2.89±9.76 mmHg 감소하였으므로(p=0.0893) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. FA Set 분석 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
이완기 혈압 변화량	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 2.61±6.11 mmHg 감소하였고 (p=0.0085), 대조군은 3.26±7.44 mmHg 감소하였으므로(p=0.0141) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. FA Set 분석 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
평균 동맥압 변화량	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 2.65±5.34 torr 감소하였고 (p=0.0025), 대조군은 3.13±7.08 torr 감소하였으므로(p=0.0131) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. FA Set 분석 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
수축기 목표혈압(sitSBP < 120 mmHg)에 도달한 대상자의 비율	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군에서 13명(30.95 %), 대조군에서 10명(28.57 %)의 대상자가 수축기 목표혈압에 도달하였으므로 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. FA Set 분석 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
이완기 목표혈압(sitDBP < 80 mmHg)에 도달한 대상자의 비율	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군에서 28명(66.67 %), 대조군에서 21명(60.00 %)의 대상자가 이완기 목표혈압에 도달하였으므로 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. FA Set 분석 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
Renin 변화량	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 0.27±0.85 ng/mL/hr 감소하였고 (p=0.0488), 대조군은 0.20±1.32 ng/mL/hr 감소하였으므로(p=0.0793) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. FA Set 분석 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
ACE 변화량	<ul style="list-style-type: none"> PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 0.28±7.30 U/L 감소하였고 (p=0.1621), 대조군은 1.12±5.04 U/L 감소하였으므로(p=0.1983) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

	<ul style="list-style-type: none"> • FA Set 분석 결과, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
Aldosterone 변화량	<ul style="list-style-type: none"> • PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 1.09 ± 7.01 ng/dL 증가하였고($p=0.5714$), 대조군은 1.18 ± 9.65 ng/dL 증가하였으므로($p=0.2202$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. • FA Set 분석 결과, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
Homocysteine 변화량	<ul style="list-style-type: none"> • PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 0.04 ± 1.94 μmol/L 증가하였고($p=0.8810$), 대조군은 0.27 ± 1.15 μmol/L 증가하였으므로($p=0.1796$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. • FA Set 분석 결과, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
hs-CRP 변화량	<ul style="list-style-type: none"> • PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 0.48 ± 5.27 mg/L 증가하였고($p=0.1452$), 대조군은 0.69 ± 7.15 mg/L 증가하였으므로($p=0.1626$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. • FA Set 분석 결과, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
PAI-1 변화량	<ul style="list-style-type: none"> • PP Set 분석 결과, 섭취 8주 후 시험군은 0.46 ± 16.49 ng/mL 감소하였고($p=0.8635$), 대조군은 0.69 ± 9.34 ng/mL 증가하였으나($p=0.6642$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. • FA Set 분석 결과, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(사) 안전성 평가 결과

이상사례	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군에서는 총 14명(28.00 %)의 인체적용시험 대상자에게서 18건의 이상사례가 있었고, 대조군에서는 총 14명(27.45 %)의 인체적용시험 대상자에게서 16건의 이상사례가 있었으며, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. • 시험군은 총 18건의 이상사례가 발생하였으며, 주된 이상사례는 감염 및 기생충 감염이었음. 대조군은 총 16건의 이상사례가 발생하였으며, 주된 이상사례는 각종 위장관 장애였음. • 이상사례의 증상정도 조사 결과, 시험군은 경도(Mild) 16건, 대조군은 경도(Mild) 9건이었음. • 이상사례와 인체적용시험용 식품과의 관련성 조사 결과, 시험군은 관련이 없다고 생각됨(Probably not related) 1건, 명확히 관련이 없음(Definitely not related) 17건, 대조군은 관련이 있을 가능성이 있음(Possibly related) 2건, 관련이 없다고 생각됨(Probably not related) 3건, 명확히 관련이 없음(Definitely not related) 10건, 불명(Unknown) 1건으로 조사되었음. • 이 중 중대한 이상사례는 발생하지 않았으며, 이상사례로 인한 중도탈락자 또한 없었음. • 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상사례는 대조군에서 3건 발생하였으며, 각종 위장관 장애와 피부 및 피하 조직 장애였음. 이 중 Abdominal discomfort는 관련 조치없이 완전치유 되었고, Constipation은 관련 조치없이 치유되었음. Urticaria는 인체적용시험 종료일까지 소실되지 않았음.
임상병리검사	<ul style="list-style-type: none"> • 임상병리검사(혈액학적검사/혈액화학적검사, 뇨검사)는 방문1과 방문4에서 시행되었음. • 혈액화학적검사 중 Ca 항목에서 섭취 8주 후 시험군은 0.05 ± 0.33 mg/dL 감소하였고($p=0.3234$), 대조군은 0.20 ± 0.37 mg/dL 감소하여($p=0.0007$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($p=0.0373^{(T)}$). 시험군, 대조군에서 정상범위를 벗어난 대상자가 있었으나 시험자에 의해 임상적 의미가 있다고 판단된 대상자는 없었으며, 이외 혈액학적검사/혈액화학적검사 항목에서

	<p>섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 뇨검사의 모든 항목에서 시험군, 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
<p>활력징후 신체계측 심전도검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 활력징후(맥박), 신체계측(체중)에서 섭취 4주, 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. • 심전도검사에서 섭취 8주 후 시험군, 대조군 모두 정상이었음.

라. 인체적용시험 결과보고서 작성 및 결과보고 IRB 승인

(1) 인체적용시험 결과보고서(Clinical Study Report) 작성

(가) 인체적용시험 종료 결과 및 통계분석에 따른 결과를 근거로 결과보고서 작성

(나) 유효성 및 안전성 평가자료에 근거하여 해당 식품의 유용성을 유익성-위험성 차원에서 최종적으로 평가하며, 기준 자료에 비추어 임상적으로 어떤 의미를 갖는지 고찰

(다) 결과보고서

<p>인체적용시험 결과보고서</p> <p>NVK79가 미치는 유효성 및 안전성 평가를 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험</p> <p>인체적용시험 번호: NVK79 인체적용시험 코드: NVK79(plantibacillus) (human K79) (표준시험코드) 인체적용시험 제목: NVK79의 유효성 및 안전성 평가 인체적용시험 목적: NVK79의 유효성 및 안전성 평가 인체적용시험 기간: 2022.01.15 ~ 2022.11.15 인체적용시험 종료 일자: 2022.11.15</p> <p>본 인체적용시험은 국제 임상시험관리기준(GCP)에 따라 수행되었습니다. 본 보고서는 포함된 모든 정보에 대해 정확하고 시인 가능한 자료를 제공합니다.</p>	<p>목 차</p> <p>1. 연구 목적 및 배경 11 1.1. 연구 목적 11 1.2. 연구 배경 11 1.3. 연구 의의 11 1.4. 연구 범위 11 2. 인체적용시험 개요 12 2.1. 인체적용시험 목적 12 2.2. 인체적용시험 설계 12 2.3. 인체적용시험 실험군 12 2.4. 인체적용시험 평가항목 12 2.5. 인체적용시험 평가항목 12 3. 인체적용시험 실행 13 3.1. 인체적용시험 실행 13 3.2. 인체적용시험 실행 13 3.3. 인체적용시험 실행 13 3.4. 인체적용시험 실행 13 3.5. 인체적용시험 실행 13 4. 인체적용시험 결과 14 4.1. 인체적용시험 결과 14 4.2. 인체적용시험 결과 14 4.3. 인체적용시험 결과 14 4.4. 인체적용시험 결과 14 4.5. 인체적용시험 결과 14 5. 인체적용시험 결론 15 5.1. 인체적용시험 결론 15 5.2. 인체적용시험 결론 15 5.3. 인체적용시험 결론 15 5.4. 인체적용시험 결론 15 5.5. 인체적용시험 결론 15</p>	<p>목 차</p> <p>6.1. 인체적용시험 결과 16 6.2. 인체적용시험 결과 16 6.3. 인체적용시험 결과 16 6.4. 인체적용시험 결과 16 6.5. 인체적용시험 결과 16 6.6. 인체적용시험 결과 16 6.7. 인체적용시험 결과 16 6.8. 인체적용시험 결과 16 6.9. 인체적용시험 결과 16 6.10. 인체적용시험 결과 16 6.11. 인체적용시험 결과 16 6.12. 인체적용시험 결과 16 6.13. 인체적용시험 결과 16 6.14. 인체적용시험 결과 16 6.15. 인체적용시험 결과 16 6.16. 인체적용시험 결과 16 6.17. 인체적용시험 결과 16 6.18. 인체적용시험 결과 16 6.19. 인체적용시험 결과 16 6.20. 인체적용시험 결과 16 6.21. 인체적용시험 결과 16 6.22. 인체적용시험 결과 16 6.23. 인체적용시험 결과 16 6.24. 인체적용시험 결과 16 6.25. 인체적용시험 결과 16 6.26. 인체적용시험 결과 16 6.27. 인체적용시험 결과 16 6.28. 인체적용시험 결과 16 6.29. 인체적용시험 결과 16 6.30. 인체적용시험 결과 16 6.31. 인체적용시험 결과 16 6.32. 인체적용시험 결과 16 6.33. 인체적용시험 결과 16 6.34. 인체적용시험 결과 16 6.35. 인체적용시험 결과 16 6.36. 인체적용시험 결과 16 6.37. 인체적용시험 결과 16 6.38. 인체적용시험 결과 16 6.39. 인체적용시험 결과 16 6.40. 인체적용시험 결과 16 6.41. 인체적용시험 결과 16 6.42. 인체적용시험 결과 16 6.43. 인체적용시험 결과 16 6.44. 인체적용시험 결과 16 6.45. 인체적용시험 결과 16 6.46. 인체적용시험 결과 16 6.47. 인체적용시험 결과 16 6.48. 인체적용시험 결과 16 6.49. 인체적용시험 결과 16 6.50. 인체적용시험 결과 16 6.51. 인체적용시험 결과 16 6.52. 인체적용시험 결과 16 6.53. 인체적용시험 결과 16 6.54. 인체적용시험 결과 16 6.55. 인체적용시험 결과 16 6.56. 인체적용시험 결과 16 6.57. 인체적용시험 결과 16 6.58. 인체적용시험 결과 16 6.59. 인체적용시험 결과 16 6.60. 인체적용시험 결과 16 6.61. 인체적용시험 결과 16 6.62. 인체적용시험 결과 16 6.63. 인체적용시험 결과 16 6.64. 인체적용시험 결과 16 6.65. 인체적용시험 결과 16 6.66. 인체적용시험 결과 16 6.67. 인체적용시험 결과 16 6.68. 인체적용시험 결과 16 6.69. 인체적용시험 결과 16 6.70. 인체적용시험 결과 16 6.71. 인체적용시험 결과 16 6.72. 인체적용시험 결과 16 6.73. 인체적용시험 결과 16 6.74. 인체적용시험 결과 16 6.75. 인체적용시험 결과 16 6.76. 인체적용시험 결과 16 6.77. 인체적용시험 결과 16 6.78. 인체적용시험 결과 16 6.79. 인체적용시험 결과 16 6.80. 인체적용시험 결과 16 6.81. 인체적용시험 결과 16 6.82. 인체적용시험 결과 16 6.83. 인체적용시험 결과 16 6.84. 인체적용시험 결과 16 6.85. 인체적용시험 결과 16 6.86. 인체적용시험 결과 16 6.87. 인체적용시험 결과 16 6.88. 인체적용시험 결과 16 6.89. 인체적용시험 결과 16 6.90. 인체적용시험 결과 16 6.91. 인체적용시험 결과 16 6.92. 인체적용시험 결과 16 6.93. 인체적용시험 결과 16 6.94. 인체적용시험 결과 16 6.95. 인체적용시험 결과 16 6.96. 인체적용시험 결과 16 6.97. 인체적용시험 결과 16 6.98. 인체적용시험 결과 16 6.99. 인체적용시험 결과 16 6.100. 인체적용시험 결과 16</p>	<p>목 차</p> <p>6.101. 인체적용시험 결과 16 6.102. 인체적용시험 결과 16 6.103. 인체적용시험 결과 16 6.104. 인체적용시험 결과 16 6.105. 인체적용시험 결과 16 6.106. 인체적용시험 결과 16 6.107. 인체적용시험 결과 16 6.108. 인체적용시험 결과 16 6.109. 인체적용시험 결과 16 6.110. 인체적용시험 결과 16 6.111. 인체적용시험 결과 16 6.112. 인체적용시험 결과 16 6.113. 인체적용시험 결과 16 6.114. 인체적용시험 결과 16 6.115. 인체적용시험 결과 16 6.116. 인체적용시험 결과 16 6.117. 인체적용시험 결과 16 6.118. 인체적용시험 결과 16 6.119. 인체적용시험 결과 16 6.120. 인체적용시험 결과 16 6.121. 인체적용시험 결과 16 6.122. 인체적용시험 결과 16 6.123. 인체적용시험 결과 16 6.124. 인체적용시험 결과 16 6.125. 인체적용시험 결과 16 6.126. 인체적용시험 결과 16 6.127. 인체적용시험 결과 16 6.128. 인체적용시험 결과 16 6.129. 인체적용시험 결과 16 6.130. 인체적용시험 결과 16 6.131. 인체적용시험 결과 16 6.132. 인체적용시험 결과 16 6.133. 인체적용시험 결과 16 6.134. 인체적용시험 결과 16 6.135. 인체적용시험 결과 16 6.136. 인체적용시험 결과 16 6.137. 인체적용시험 결과 16 6.138. 인체적용시험 결과 16 6.139. 인체적용시험 결과 16 6.140. 인체적용시험 결과 16 6.141. 인체적용시험 결과 16 6.142. 인체적용시험 결과 16 6.143. 인체적용시험 결과 16 6.144. 인체적용시험 결과 16 6.145. 인체적용시험 결과 16 6.146. 인체적용시험 결과 16 6.147. 인체적용시험 결과 16 6.148. 인체적용시험 결과 16 6.149. 인체적용시험 결과 16 6.150. 인체적용시험 결과 16</p>
---	--	---	---

(라) 인체적용시험 결론

- 본 인체적용시험에서는 고혈압 전단계에 해당되는 자를 대상으로 NVK79(Lactiplantibacillus plantarum K79 열처리배양건조물)의 8주 섭취가 혈압에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하고자 하였음.
- 섭취 8주 후 통계적으로 유의한 차이를 보이는 항목은 없었으나 수축기 및 이완기 목표혈압 도달대상자 비율이 대조군 대비 시험군에서 높은 경향을 보였으며, Renin 및 PAI-1 항목에서 대조군 대비 시험군에서 개선되는 경향이 확인되었음. 따라서 NVK79의 혈압에 대한 효과를 예측할 수 있었으나 이에 대해서는 각 시험식품의 섭취 용량, 섭취 기간, 대상자 수 확대 등을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨.
- 인체적용시험 기간동안 안전성 평가를 위해 시행된 이상반응 평가에서 시험군은 18건, 대조군은 16건의 이상반응이 발생하였음. 이 중 중대한 이상반응은 발생하지 않았으며, 이상반응으로 인한 중도탈락자 또한 없었음.
- 안전성 평가항목 중 혈액화학적검사의 Ca 항목에서 섭취 8주 후 시험군과 대조군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나 시험자에 의해 임상적 의미가 있다고 판단된 대상자는 없었음.
- 이외의 혈액화학적검사, 혈액화학적검사, 활력징후(맥박), 신체계측(체중) 항목에서 섭취 후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 뇨검사 및 심전도검사 결과 섭취 전후 시험군, 대조군 모두 정상이었음.
- 결론적으로 유효성 평가 변수의 경향성 및 안전성 평가 결과에 NVK79(Lactiplantibacillus plantarum K79 열처리배양건조물)의 섭취는 인체에 안전하며 혈압 개선에 효과가 있을 것으로 예측됨.

(2) 결과보고 IRB 승인

(가) 완료된 결과보고서를 IRB에 제출하여 최종 승인 획득

(나) IRB 신청서 및 승인 통보서

신청서	승인 통보서

○ 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청

(1) 신청서 작성 및 가이드 진행

(가) 식약처 신청 시 필요자료를 기반으로 한 자료 검토 및 가이드 진행

신청자료	검토사항
<p>기원, 개발경위, 국내/외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료</p>	<ol style="list-style-type: none"> 기원 및 개발경위 <ul style="list-style-type: none"> 언제, 어느 나라에서, 어떤 경위로 개발되었는지, 천연물을 원재료로 사용한 경우에는 그 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등이 구체적으로 기재되었는지 검토 국내외 인정·허가 현황 <ul style="list-style-type: none"> 국내외 및 국제기구에서의 인정·허가 상황, 사용 기준·규격 등의 관련 내용이 정확히 기재되었는지 확인 (국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC) 등 국제기구에서 검토 중인 경우에는 안전성 평가 상황 및 사용기준, 규격 등에 관한 자료를 첨부) 국내외 사용현황 <ul style="list-style-type: none"> 국내외에서 식품 등으로 사용실적이 있는 경우에는 사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실태 등에 관한 자료 첨부
<p>제조방법 및 그에 관한 자료</p>	<ol style="list-style-type: none"> 제조 온도, 시간, 압력 등 단위공정별 구체적인 제조방법 제조공정에 사용된 용매, 효소, 미생물 등 안전성·기능성 평가와 관련된 제조방법 및 제조국가 등 주요 제조단계별(추출, 여과, 농축 등) 기능(또는 지표)성분의 함량 및 수율 변화에 대한 상세한 자료 두 가지 이상의 원재료를 혼합한 경우 각 원재료의 명칭, 배합비 및 안정성관련 자료
<p>원료의 특성에 관한 자료</p>	<ol style="list-style-type: none"> 해당 원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등에 관한 자료 해당 원료의 표준화를 확인하기 위한 기능성분(또는 지표성분)에 관한 자료 육안으로 다른 원재료와 구별하기 곤란한 원재료가 존재할 경우 이를 구분할 수 있는 성상, 지표성분 등의 자료

<p>기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</p>	<p>① 기능성분(또는 지표성분)의 규격 ② 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법 ③ 국내·외 시험·검사기관에서 시험분석한 시험성적서</p>
<p>유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</p>	<p>① 유해물질의 규격 ② 유해물질의 시험방법 ③ 국내외 시험·검사기관에서 시험 분석한 시험성적서</p>
<p>안전성에 관한 자료</p>	<p>① 원료를 제안된 방법에 따라 섭취하였을 때 해당 원료가 인체에 위해가 없음을 확인할 수 있는 과학적 근거 자료(섭취 근거 자료, 해당 원료 또는 성분에 대한 안전성 정보 자료, 섭취량평가자료, 인체적용시험자료(중재시험, 역학조사 등), 독성시험자료 등) ② 안전성 자료의 요건 검토 ✓ 섭취 근거 자료의 경우 당해 원료가 안전하다고 판단할 수 있는 역사적 사용 기록 뿐 아니라 제조방법, 용도, 섭취량 등이 기술된 과학적 자료인지 검토 ✓ 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료가 국내외 학술지에 게재되거나 게재증명서를 받은 것, 국내외 정부 보고서 또는 국제기구 보고서, 관련 데이터베이스 검색결과로 나타나는지 검토 ✓ 섭취량 평가 자료는 다양한 과학적 자료(섭취실태조사자료, 통계자료 등)를 사용하여 작성되었는지 검토(특정 대상군을 섭취대상으로 하는 경우에는 해당 섭취대상에 대한 섭취량 평가 자료가 있는지) ✓ 안전성과 관련된 인체적용시험자료 ✓ 독성시험자료의 경우 우수실험실운영규정(Good Laboratory Practice, GLP)에 따라 운영된 기관이 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)에서 정하고 있는 독성시험 방법(OECD Test Guideline)에 준하여 시험한 보고서</p>
<p>기능성 내용 및 그에 관한 자료</p>	<p>① 기능성 내용 ② 기능성에 관한 자료로 사용할 인체적용시험, 동물시험, 시험관시험 자료 등 확인 ③ 기능성 자료의 요건 검토 ✓ 동물시험 및 시험관시험은 과학기술논문인용색인(Science Citation Index(Expanded), SCI(E) 포함)이나 한국학술지인용색인(Korea Citation Index, KCI)과 동등 이상의 학술지에 게재된 것(게재증명서 포함)인지 확인 ✓ 인체적용시험의 경우 IRB 승인된 인체적용시험계획서 및 최종보고서</p>
<p>섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</p>	<p>① 안전성 및 기능성 자료를 근거로 원료의 안전성이 보장되고 기능성이 나타나는 일일 섭취량 또는 그 범위가 적절히 설정되었는지 검토(특정 대상군을 섭취대상으로 하는 경우에는 해당 섭취대상에 대하여 설정) ② 기능성 자료를 근거로 하여 해당 원료의 기능성이 가장 효과적으로 나타나는 섭취방법이 기재되었는지 검토 ③ 해당 원료의 과다섭취에 따른 부작용, 신청 기능성과 관련된 식품 또는 복용중인 의약품 성분과의 상호작용, 취약집단(임산부, 수유부, 어린이, 노약자 등) 등을 고려하여 섭취 시 주의사항이 기재되었는지 검토</p>

(나) 검토의견서

9회 검토의견서		9회 검토의견서		10회 검토의견서		10회 검토의견서	
<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>	<p>1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)</p> <p>2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)</p> <p>3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)</p> <p>4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)</p> <p>5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)</p>

(다) 신청서 작성

가능성 원료 인정 신청을 위한
제출 자료

구분	내용	제출여부	비고
1. 최종용 설계명: IPFC-024 (비밀번호: 02020505)	...	제출	...
2. 최종용 설계명: IPFC-025 (비밀번호: 02020505)	...	제출	...
3. 최종용 설계명: IPFC-026 (비밀번호: 02020505)	...	제출	...
4. 최종용 설계명: IPFC-027 (비밀번호: 02020505)	...	제출	...
5. 최종용 설계명: IPFC-028 (비밀번호: 02020505)	...	제출	...

(2) 개별인정형 등록을 위한 향후 추진 계획

인체적용시험에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으면 인체적용시험에서 가능성 원료의 효과를 입증할 수 없어 개별인정형 신청을 위한 사전검토 등록 시 반려되는 경우가 있어 인체적용시험에서의 결과를 보완하는 작업이 필요함. 또한 사전검토 등록을 진행하여 반려되는 사항이 생기면 2년 안에 보완을 완료하여 재검토를 요청해야하는데 이 기간을 지나면 기존에 진행되었던 안전성 평가, 유효성 평가 등 모든 항목에서 재 진행하여 다시 신청을 해야하기 때문에 기업 측에서 시간과 비용적으로 많은 부담으로 이어질 수 있음.

따라서 사전검토 등록 전 시간이 오래 소요되는 인체적용시험 결과와 같은 부분에서 확실한 결과를 확보하는 것이 매우 중요함. 또한 식약처에서 가능성 원료에 대한 규정을 계속적으로 변경하고 있어 변경되는 사항에 대해서도 맞춰 준비하는 것이 필요하기 때문에 주관연구기관에서는 CRO와의 주기적인 미팅을 통해 가능성 원료의 개별인정형 원료 신청을 위한 필요서류를 반려 사항이 나오더라도 이를 최소한으로 나올 수 있도록 준비하고자하며 관련 학회의 주기적인 참석을 통해 식약처의 인정 심사 동향 파악을 하고자 함.

(가) 인체적용시험 재진행

- 섭취 8주 후 통계적으로 유의한 차이를 보이는 항목은 없었으나 수축기 및 이완기 목표혈압

도달대상자 비율이 대조군 대비 시험군에서 높은 경향을 보였으며, Renin 및 PAI-1 항목에서 대조군 대비 시험군에서 개선되는 경향이 확인되었음. 따라서 NVK79의 혈압에 대한 효과를 예측할 수 있었으나 이에 대해서는 각 시험식품의 섭취 용량, 섭취 기간, 대상자 수 확대 등을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되어 공동연구개발기관인 한국식품연구원에서 수행하고 있는 식품기능성평가지원 사업을 통해 인체적용시험을 재진행코자 함.

- 기존에 진행했던 인체적용시험에서 섭취량이 기능성 원료로서 1.6g을 섭취하는 것으로 설계하여 진행되었지만 통계치에 도달하는 유의한 결과를 확인할 수 없었음. 그러나 1.6g 이상의 섭취량을 증가시켜 진행하는 것은 소비자들로 하여금 섭취량을 증가시켜 섭취에 부담을 주며 기능성 원료에 대한 사업성이 떨어짐. 1.6g으로 섭취한 결과에서 목표혈압도달대상자 비율이 대조군 대비 더 높았던 경향과 여러 항목에서 개선되는 경향이 확인되었으므로 따라서 섭취기간을 8주보다 더 길게 설계한다면 유의한 결과를 보일 것으로 예상되며 대조군의 재설정 등을 통해 인체적용시험을 다시 진행하고자 함.

(나) 원료의 개선

- 해당 기능성 원료의 유효성을 나타내는 대사산물로서의 분리 정제를 통해 일일 섭취량을 낮추는 작업을 할 수도 있지만 해당 대사산물이 펩타이드이기 때문에 기존에 혈압조절 기능을 인정받은 원료들(가쓰오부시울리고펩타이드, 정어리펩타이드 SP100N, 연어 펩타이드 등)과 차별성이 떨어짐. 오히려 유산균의 사균체를 포함한 포스트바이오틱스 소재로 개발되었을 때 소비자들에게 더 친근하게 접근할 수 있을 것으로 보임.
- 유산균 시장에서 국내보다 5~10년 더 앞서있는 일본에서는 2010년 중반부터 생균 상태인 프로바이오틱스보다 포스트바이오틱스 시장으로 옮겨가 관련 연구와 제품 개발에 투자해왔음. 최근 국내에서도 1 제약회사에서 포스트바이오틱스 소재로 개별인정형 원료 등록을 2건 받은 바 있지만 일본과 비교했을 때 포스트바이오틱스의 연구와 제품 개발은 아주 미흡한 상태임. 따라서 해외 유산균 시장 트렌드에 맞춰 진보성 또한 갖춘 원료 개발이라 생각됨.
- 또한 사균체를 포함한 포스트바이오틱스 소재로서 기능성 원료를 개발하게 되면 혈압조절 기능성뿐만 아니라 장 기능 개선 등 추가적인 기능성 인정에도 해당 원료를 사용할 수 있을 것으로 사료되었으며 유효성분의 분리, 정제 작업이 생산공정에 추가된다면 원료의 단가 상승을 가져와 이는 소비자들에게 가격적으로 부담을 줄 수 있어 현 시점에서 분리 정제를 진행하지 않는 것이 추후 사업화에 더 유리할 것으로 판단하였음.
- 하지만 유효성분의 분리, 정제 농축을 통해 제약 소재로서의 개발도 가능성 있기 때문에 해당 소재의 지속적인 연구를 통해 소재의 다양한 활용 가능성을 파악하기 위해 노력하고자 함.

(다) 개별인정형 신청 현황 확인을 위한 모니터링 방안

- 해당 연구개발과제는 종료 후에도 제품화 및 매출액, 수출액에 대한 사업화 지표가 계획되어 있기 때문에 전문기관 측으로 사업화 지표 결과를 지속적으로 보고할 예정이므로 개별인정형 신청 현황에 대하여도 함께 보고하여 전문기관에서 확인할 수 있도록 진행할 예정임.

○ 신규 매출 창출을 위한 혈압 조절 써플리먼트 사업화

가. 항고혈압 관련 시장 조사 및 추후 사업화 방향성 수립

-소비자 조사 결과 응답자의 거주지는 서울(37.0%), 경기(22.7%), 전북(10.3%) 순으로 많았음. 응답자의 75.4%는 가족과 함께 거주하며, 이 중 부부와 자녀가 함께 거주하는 비율이 32.0%로 가장 높음. 가정 월 총소득은 40.4%가 300만원에서 599만원 구간이 가장 높은 비중을 차지함. (그림 1)

-소비자 조사 중 유산균 제품 구매활동과 관련하여 응답자의 93.6%인 190명이 온라인을 통한 유산균 제품 구매 경험이 있음. 유산균을 섭취하는 이유에 대해 '장 건강을 위해(68.5%)'라고 답한 응답이 가장 많았고, '면역력 증진을 위해(27.6%)'가 뒤를 이어 많았음. 유산균 제품 구매 시 중요하게 생각하는 요인으로는 유산균 수(23.0%), 가격(16.8%), 맛(15.1%) 등의 순으로 나타남. (중복)이 중 가장 중요하게 고려하는 요인은 '유산균 수'로 나타남. 기타 효과, 후기 등의 의견이 있었음. (그림 2)

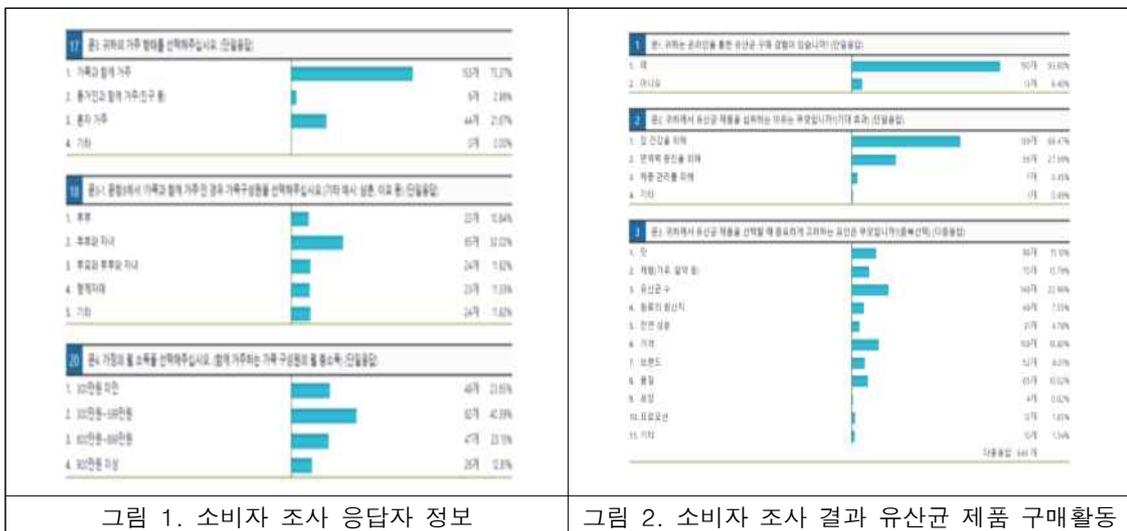


그림 2. 소비자 조사 결과 유산균 제품 구매활동

-위와 같은 소비자 조사 결과 유산균의 대부분 구입 중 여성들을 타겟으로 하여 소비를 하는 부분을 선점하여 향후 써플리먼트 제품생산에 있어 제품의 컨셉 및 방향성에 대해 준비함.

나. 다양한 산업군으로의 사업화 방향성 향상

-1인 가구 증가, 고령화, 코로나19로 인한 재택근무 일상화 등 사회 환경 변화에 따라 반려동물을 기르는 가구 수가 늘고 있음. 특히, 반려동물을 사람처럼 대하는 '펫 휴머니제이션' 문화가 확산되면서, 펫푸드¹⁾가 고급화되고 있으며, 반려동물의 종류, 건강 및 영양 관리를 고려한 기능성 사료의 특허출원이 늘고 있음.

-국내 반려견의 수는 '10년 기준 461만 마리에서 '19년 598만 마리로 약 1.3배 증가하였으며, 같은 기간 반려묘는 63만 마리에서 258만 마리로 약 4배 증가하였다. 2019년 기준 반려동물을 키우는 반려인 가구는 전체 가구의 26.4%인 591만 가구로 추정되고 있으며 2022년 현재까지 꾸준히 증가하고 있음.

-반려동물 연관산업은 꾸준히 성장하고 있으며 '17년 2조 3천억원에서 '27년까지 연평균 10%씩 성장하여 6조원에 도달할 것이라고 예측되고 있으며 이마저 보수적인 추정치라고 생각될 정도로 꾸준히 성장하고 있음. 그 중 반려동물을 인간으로 대하는 '펫 휴머니제이션(Pet Humanization)'현상으로 반려동물을 위한 지출과 투자를 아끼지 않는 소비 형태가 늘어나며

펫푸드의 고급화와 프리미엄화가 일어나고 있으며 이를 통해 펫푸드 시장 규모 또한 꾸준하게 성장하고 있으며 2023년 1조 시장까지 성장할 것으로 예상됨.



출처: 한국농촌경제연구원

반려동물 연관산업 규모 전망
(출처 : 한국농촌경제연구원)



국내 펫푸드 시장 규모
(출처 : 유로모니터)

-소비자들이 펫푸드 구입 시 가장 고려하는 부분은 반려동물의 기호에 맞는지, 즉 반려동물이 편식하지 않고 잘 섭취하는지가 가장 큰 니즈로 파악되고 있음. 인간과 마찬가지로 반려동물에게 약을 먹이거나 좋은 기능성 펫푸드를 먹이기 힘들어 비싸게 구입하여도 반려동물이 먹지 않는 부분에서 문제가 발생함.

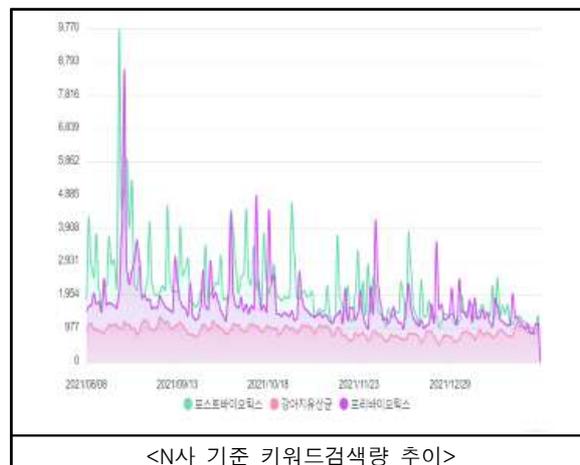
다. 펫푸드 써플리먼트 사업화 추진

-인류에게는 물론이고 반려동물에게도 안전성과 제조과정의 어려움이 있는 기존소재보다, 사업성이 우수한 신소재 포스트바이오틱스를 개발.

-마이크로바이옴의 중요성이 커지고 시장규모(2021년 글로벌기준 930억\$)이 성장하는 시점에서 안전성과 가공적성이 용이한 포스트바이오틱스 소재를 통해 사업화를 진행하여 반려동물 펫푸드 시장에 진입하고자 함.

-국내 펫푸드 시장의 35% 이상을 수입산이 차지하고 있고 해마다 증가율을 보이고 있으나 국산 제품의 수출은 수입액의 25%에 불과하여 무역수지 적자 현상이 심각한 상황임. 가공적성이 뛰어난 소재를 개발하여 반려동물이 먹기 편한 제품을 개발한다면 수입산 제품의 의존도를 줄여주고 나아가 해외시장에 진출하여 수출을 일으켜 무역수지 적자 현상의 해결에 도움을 줄 수 있음.

-반려동물 시장에서 반려동물이 섭취하기 쉬운 제품에 대한 사회적 Needs 다양한 제형화, 가공적성의 용이성을 통한 다양한 제품군으로 출시되길 원하는 소비자의 Needs 증가.



-기존 반려동물 시장에서 프로바이오틱스의 경우 생균 상태로 반려동물의 위산과 담즙을 견디지 못하고 장까지 도달하지 못하는 경우가 발생하고 있으며 이런 문제점 해결을 위한 새로운 포스트바이오틱스 제품 시장 확대 될 것임.

-생균의 반려동물 장까지 도달률에 대한 불확실성을 제거할 수 있고 사업적으로 가공적성과 유통비용이 우수한 포스트바이오틱스 중심의 반려동물 맞춤형 시장으로 시장이 재편될 것임.

-그림1.과 같이 2022년 10월 기준, N사 기준 포스트바이오틱스가 검색량 추이도가 전체적으로 높은 검색량을 보임.

※ 포스트바이오틱스 제품은 유산균이 활동한 그 결과물(대사물질)을 사균형태로 가공하여 장내 환경에 직접 투여함으로써 장내 환경을 획기적으로 **향상시켜 면역력을 강화**시킬 수 있음 또한 열에 강하고 위산,담즙에도 강하기에 **반려동물용의 제품화**에도 적합한 소재임.

-포스트바이오틱스는 효소·펩타이드 등 특정 미생물이 만들어내는 인체와 반려동물에 이로운 작용을 하는 대사산물(metabolite)로 구성된 제품으로 ▲프로바이오틱스를 사균화해 포스트바이오틱스만을 추출, 사용하기에 안전하고, ▲항생제와 병행·사용해도 효능이 유지되며, ▲열에 강하고 위산,담즙에 강하며, ▲장기간 보관 및 유통이 가능하며, ▲제형에 제한이 없어 섭취가 용이한 다양한 제형화 및 다양한 반려동물 제품군에서의 활용이 가능하다는 우수성이 확인됨.

-대부분의 프로바이오틱스 제품의 원천균주, 펫푸드 시장의 35%이상 제품이 수입에 의존하고 있으나, 당사에서 개발하고자 하는 포스트바이오틱스 소재는 국내 원유에서 순수분리한 신규균주으로써 균주의 국산화를 통하여 경쟁력확보가 가능해짐. 이에 더불어 국내 내수시장 활성화에도 도움을 줄 수 있음.

라. 보조사료제/미생물제 써플리먼트 제품화 실시

-이에, 당사는 특정 미생물이 만들어내는 유기산, 박테리오신, 효소, 아미노산, 펩타이드 등의 인체에 이로운 작용을 하는 대사산물(metabolite)로 구성된 '포스트바이오틱스'를 사균화하여 사용하기에 안전하고, 항생제와 병행·사용해도 효능이 유지되며, 장기간 보관 및 유통이 가능한 소재를 제작하고자 하며, 이를 통해 장내 환경 개선을 통한 혈압조절 면역력 증진 제품을 개발, 시장에 제공하고자 함.

-또한, 사균화의 장점을 살려 여러 형태의 제형화로 소재를 개발할 수 있기 때문에 반려동물 시장이 성장하고 반려동물에게도 사람과 같은 건강을 제공하고자 하는 Needs를 반영하여 반려동물용 기능성 포스트바이오틱스 소재 맞춤형 기술을 개발하고자 함.

< (주)노바락토 경쟁사 현황 >

구분		브리지데일	데이스포	툼린	로알캐닌
반려동물 펫푸드 제품	제품명	 페토메디 프로바이오틱스 얼티밋	 데이스포 에이치시리즈 반려견 종합 영양제 250g	 툼린 뉴트리칼 독 비타민 미네랄 강아지 영양제	 로알캐닌 에듀
	단가	38,000원 (60캡슐 기준)	16,850원 (250g 기준)	10,000원 (120.5g 기준)	31,690원 (50g 기준)
비고		<ul style="list-style-type: none"> • 자사몰 판매 • 오픈마켓 판매 • 원산지: 한국 	<ul style="list-style-type: none"> • 오픈마켓 판매 • 펫푸드 추천제품 • 원산지: 미국 	<ul style="list-style-type: none"> • 오픈마켓 판매 • 펫푸드 추천제품 • 원산지: 미국 	<ul style="list-style-type: none"> • 오픈마켓 판매 • 자사몰 판매 • 원산지: 미국

-현재 펫푸드 플랫폼을 통한 추천제품들은 대부분 수입에 의존한 제품들이며 국산 제품들은 대부분 수입에 의존하고 있음. 이를 통해 펫푸드는 인지도, 신뢰도 부분에서 아직까지 국산 제품에 비하여 수입산(대부분 미국산) 제품들이 경쟁력을 가져가고 있음.

-당사는 포스트바이오틱스 소재개발을 통해 다양한 제형화를 가능하게 하여 반려동물의 펫푸드 섭취 부분에서 기존의 제품들 대비 차별화 되는 강점을 가져가고자 하고 있으며 ‘펫 휴머니제이션’시대에 맞게 반려동물이 쉽게 섭취 가능한 맛있는 펫푸드의 제품화를 계획하여 국산 제품의 비중을 높이려 함.

< (주)노바락토 반려동물 제품화 현황 >

구분		노바락토
반려동물 펫푸드 제품	제품명	  노바락토 콜샷골드
	단가	30,000원 (30포 기준)

-2022년 연구개발로 인한 소재표준화를 통해 써플리먼트 개발, 생산 이후에 소비자가 만족할수 있는 가공적성의 제품군들을 출시하여 매출성장을 일으킴. 그에 따른 가장 빠르고 시장성이 좋은 품목인 반려동물용 제품을 출시함.

-제조사 선바이오와 연구개발을 통하여 락토바실러스 플란타럼을 주성분으로 하는 보조사료를 개발하여 반려동물용 제품으로 출시하여 제조를 하였으며, 위 제품에 성분사항에 자사가 연구개발하여 소재개발을 한 열처리배양물을 넣어 반려동물에게 있어 장내환경개선 및 혈압조절, 면역력 증진을 도울 수 있는 제품으로 만들었으며 국내유산균으로 만들어진 제품으로 출시(22.11)하여 시장에 진출함.

	<p>프리미엄 반려동물 유산균 콜샷골드 [FOR DOG & CAT]</p> <p>제품명 노바락토 콜샷골드 성분등록번호 제CCBQ80018호 사료의 종류 보조사료 / 미성숙제 사료의 평칭 락토바실러스 플란타럼 사료의 형태 가루 사료의 용도 반려동물용, 양육능가짐 등록성분명 Lactobacillus plantarum - 1.0X10¹⁰ cfu/g 이상 사용원료 락토바실러스 키제이, 락토바실러스 프란체티, 락티오코커스 에스도락티사이 락토오스, 프락토올리고당, 락티올유, 베타인, 트로판올, 열처리배양건조물NVK79 내용량 40g (한 포장 2g, 30일분) 내포장재질 폴리프로필렌(PP) 섭취량 및 섭취방법 사료와 함께 하루 1포씩 급여하십시오. 제조국 한국 유통권역판매범 (주)노바락토 / 대전광역시 유성구 태극로3로 74, 1016호 제조업 선바이오(주) / 충청남도 천안시 서북구 성안동 물금3길 36 고객센터 042-368-9730 한울 및 고향장소 구입시 및 판매점 제조일자 도면하단표기 유통기한 제조일로부터 12개월</p> <p>유효성분 락토바실러스 플란타럼(1.0 × 10¹⁰ cfu/g 이상) 락티오코커스 에스도락티사이(1.0 × 10¹⁰ cfu/g 이상) 프락토올리고당(Bifidus factor), 락토오스, 락티올유, 베타인, C, 면역증강물질, 열처리배양건조물 등 함유 면역강화, 혈압 조절 등 다양한 물질 함유</p> <p>제조일자: 2022. 11. 10</p>
<p>노바락토 콜샷골드</p>	

마. 판매 목표 및 사업화 계획

-사업 초기단계에서는 포스트바이오틱스라는 차세대 소재에 대한 이해도를 고객에게 전달하기 위해 기술개발능력, 한국식품연구원의 기술이전, 국내 원천기술 보유와 같은 자사의 장점을 필두로 새로운 시장에 진입하고 온라인, 라디오, TV, 신문들의 매체들을 통하여 마케팅 홍보(신규 고객확보와 제품홍보)를 진행할 예정임.

-사업초기 매출은 제품출시(22.11) 후 약 300만원정도의 매출이 일어났으며, 제품의 고도화에 따라 지속적 채널들을 확대할것으로 기대됨.

-2024년 5월 미국수출화를 시작으로 미국내 유통채널확보를 이루었으며, 지속적으로 제품개발을 통하여 미국내 뿐만이 아닌 글로벌화를 성공시키고자함.

-주 거래 고객으로는 B2B업체(반려동물카페, 병원, 커뮤니티) 및 개인을 대상으로 판매계획을 수립함.



푸드위크 참가 및 해외 전시회 참가



사. 다양한 제품화 및 판로개척을 통한 기능성 소재의 사업화 진행

-한국식품연구원 식품기술대상에서 장려상을 수상하게 되어 한국식품연구원 패밀리기업 부스에 참여하여 소비자들과 바이어들을 대상으로 기능성 포스트바이오틱스 소재에 대한 홍보 진행함 (그림 3). 서울우유, 광동제약, 주식회사 빅솔, (주)로니웰 등 다양한 관계 업종의 담당자들을 상대로 소재를 안내함.



그림 3. 22년, 23년 코엑스 푸드위크 참가 관련 모습

-다양한 유통판매채널의 담당자들과 마케팅 컨설팅을 진행한 결과 대형마트(롯데마트)는 고객층이 요구하는 제품이 10,000원대 제품을 요구하며 개별인정형 소재를 적용한 고가의 건강기능식품은 가격대가 높아 마트 판매에 대한 어려움이 있음. 브랜드가 약하면 제품의 패키지에서 고객들의 이목을 끌 수 있는 제품 기획이 필요하며 대형마트 고객들은 제품의 구매에 있어서 소재나 원료에 대한 관심이 낮아 온라인 대비 가격이 낮게 제공되어야 하며 소비자들의 이목을 집중시킬 수 있는 요소가 반드시 필요하다는 피드백을 받음. 온라인 채널(쿠팡)에서는 기존에 판매되고 있는 프로바이오틱스 기준으로 가격대를 잡을 수 있는 가격 경쟁력이 있어야함. 스틱포 형태로 제작하게 될 시에는 과포화 된 스틱포 시장에서는 제품의 소구를 확실히 잡아들여가야하며 유산균 수나 기능성을 강조하여 제품을 어필하는 것이 중요하다는 피드백이 있었음. (그림 4)

-기능성 포스트바이오틱스 소재의 개별인정형 원료 등록 전 매출 신장을 위해 기능성 포스트바이오틱스의 원재료임 기능성 균주 *Lactiplantibacillus plantarum* K79가 식약처 고시형 균주기 때문에 안전성, 기능성, 표준화 된 자료가 필요없이 프로바이오틱스 원료로 바로 사용할 수 있는 이점과 기능성 포스트바이오틱스 소재를 생산하기 위해 기존에 (주)메디오젠에서 위탁하여 종균 형태로 생산하고 있던 상황을 적극적으로 활용하여 (주)메디오젠 영업부 담당자와 논의한 후 해당 기능성 균주를 프로바이오틱스/건강기능식품원료로 생산하는 것으로 결정함. 또한 포스트바이오틱스 소재로서의 활용도 놓치지 않기 위해 대구에 소재한 발효 전문 기업인 (주)KMF에 방문하여 공정 논의 후 기타가공품의 형태로 소재를 생산함. (그림 5~6)

-당사에서 판매하고 있는 기존 제품을 리뉴얼하면서 위와 같이 생산된 원료를 추가하여 개발하는 작업을 진행했으며 당해 상반기에 제품으로 출시될 예정임.



그림 4. 유통판매채널 담당자와 진행한 마케팅 컨설팅

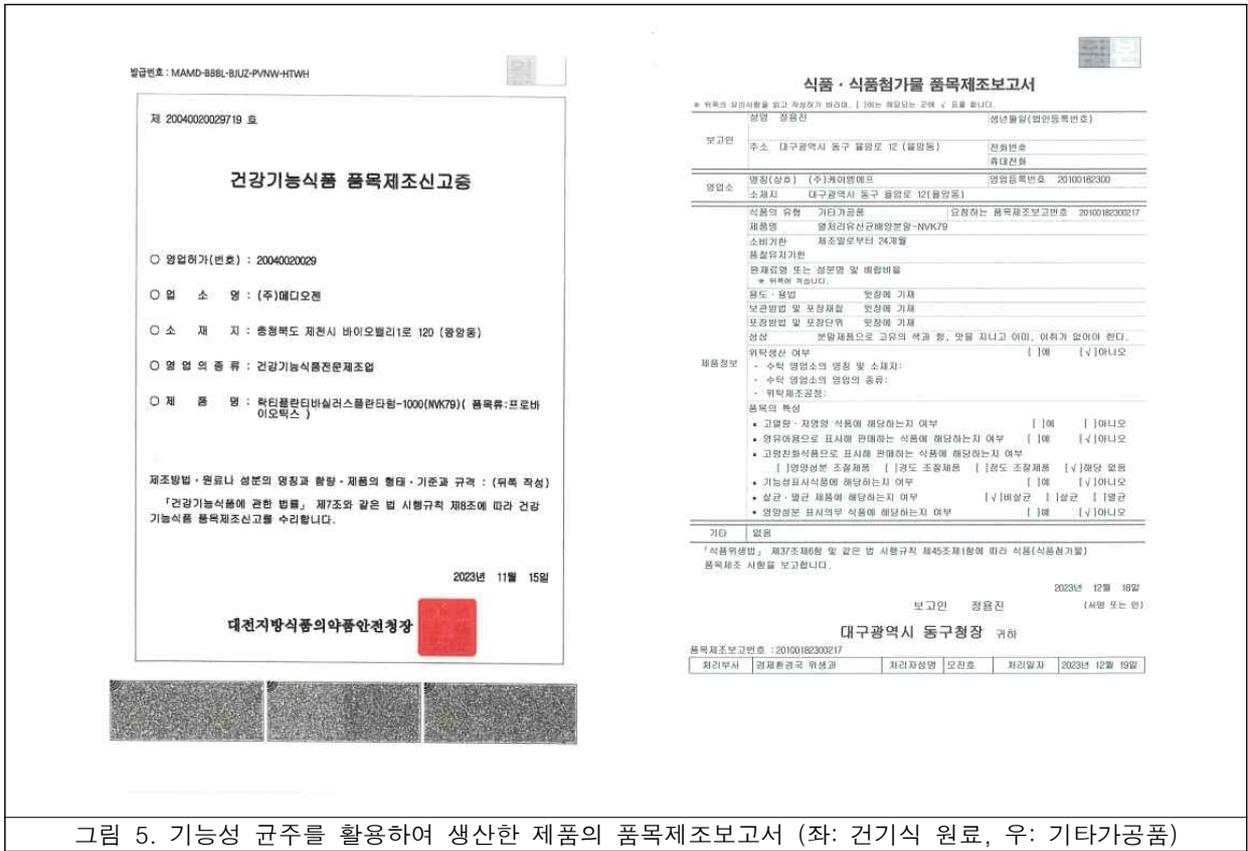


그림 5. 기능성 균주를 활용하여 생산한 제품의 품목제조보고서 (좌: 건기식 원료, 우: 기타가공품)

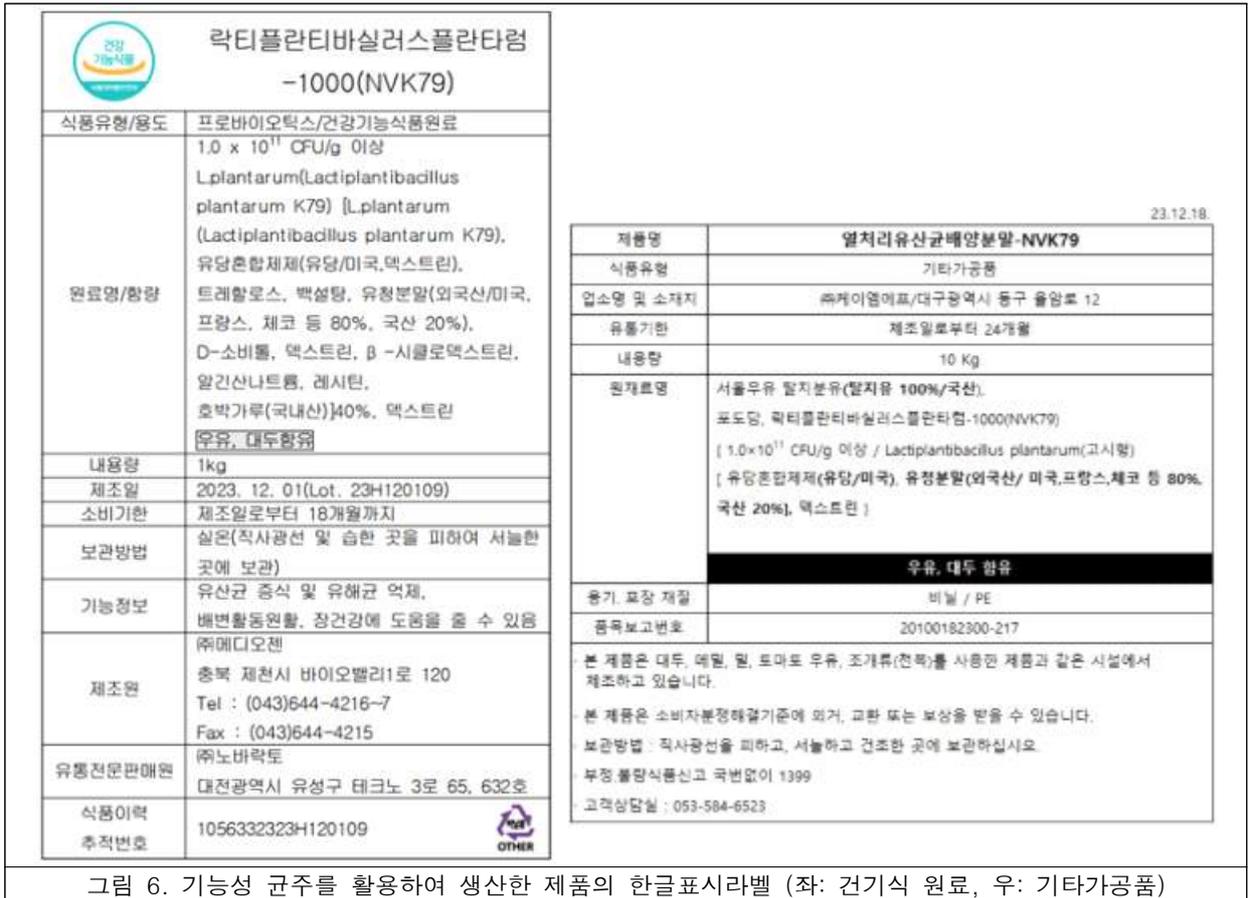


그림 6. 기능성 균주를 활용하여 생산한 제품의 한글표시라벨 (좌: 건기식 원료, 우: 기타가공품)

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2021~2022)	2단계 (2023~2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	생명자원	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	1	0(1)	1	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	제품화	목표(단계별)	1	2	3	15
		실적(누적)	1	2(3)	3	
	매출액	목표(단계별)	30,000	270,000	300,000	15
		실적(누적)	33,250	131,563(164,813)	164,813	
	고용창출	목표(단계별)	2	1	3	15
		실적(누적)	5	2(7)	7	
	인력양성	목표(단계별)	1	0	1	
		실적(누적)	0	1	1	
계		목표(단계별)			5	
		실적(누적)	6		6	

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)		단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고 성능수준	연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
						1단계(21~22)	2단계(23~23)	
1	유효성 평가 (ACE저 해능)	%	40 %	N.A. (포스트바이오틱스)	N.A. (포스트바이오틱스)	80 % 이상	-	이전 기술 개발보고서
2	동물 모델 유효성 평가 (혈압)	(mmHg)	40 %	대조군 대비 10% 감소	대조군 대비 5% 감소	-	수축기 혈압 대조군 대비 10% 감소	이전 기술 개발보고서
3	동물 모델 유효성 평가 (angiotensinogen 발현)	(pmol/mL)	20 %	대조군 대비 10% 감소	대조군 대비 5% 감소	-	angiotensinogen 발현량 대조군 대비 10% 감소	이전 기술 개발보고서

(2) 평가방법 및 평가환경

순번	평가항목 (성능지표)	평가방법	평가환경
1	유효성 평가 (ACE저해능)	효소 억제능 시험법 (한국식품연구원의 이전 기술 개발보고서 내 평가 방법)	
2	동물 모델 유효성 평가 (혈압)	혈압 측정법 (대한약전)	
3	동물 모델 유효성 평가 (angiotensinogen 발현)	ELISA 기법	

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Optimization of skim milk fermentation conditions by response surface methodology to improve ACE inhibitory activity using <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79	한국낙농식품응용생물학회지	박유경	3	대한민국	한국낙농식품응용생물학회	비 SCIE	2022. 9. 30	2733-4562	100
2	Inhibitory Effect of Genomic DNA Extracted from <i>Pediococcus acidilactici</i> on <i>Porphyromonas gingivalis</i> Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses	Food Science of Animal Resources	최영현	43	대한민국	한국축산식품학회	SCIE	2023.1.1	2636-0772	50%
3	Antihypertensive Effect of Milk Fermented by <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79 on Spontaneously Hypertensive Rats	한국축산식품학회지	임상동	1	대한민국	한국축산식품학회	SCIE	2024.1.1	2636-0772	100%
4	Regulatory Effect of Spray-Dried <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79 on the Activation of Vasodilatory Factors and Inflammatory Responses	Food Science of Animal Resources	김기환	44	대한민국	한국축산식품학회	SCIE	2024.1.1.	2636-0772	100%

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국유산균프로바이오틱스학회 학술대회	박유경, 홍상필, 임상동*	2021. 11. 26	세종대학교 대양시 컨벤션센터	한국
2	한국낙농식품응용생물학회 학술대회	박유경, 홍상필, 임상동*	2022. 6. 24	여수 디오션 리조트	한국
3	한국낙농식품응용생물학회 학술대회	홍상필, 임상동*	2023. 7. 6	국립축산과학원	한국

기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K79	KACC 81222BP	국립농업과학원	2022

[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	ACE 억제 활성을 갖는 신규한 락티플란티바실 러스 플란타럼 K79 균 주, 이를 이용한 우유 발효물의 제조방법, 이 에 따른 우유 발효물 및 이를 유효성분으로 포함 하는 고혈압의 예방 또 는 개선용 식품 조성물	대한민국	한국식품 연구원 (주)노바 락토	22. 11. 03	10-2022 -014542 6				60% 40%		

○ 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

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
1	300백만원	-	-	300백만원	투자유치

□ 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	혈압조절에 도움을 줄 수 있는 신규한 유산균 포스트바이오틱스 소재 개발	포스트바이오틱스 소재분말의 제품화를 통해 상품을 개발하여 제품화.	㈜노바락토	33,250	-	2022	5년
							131,563	-	2023	5년

* 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)		
혈압조절에 도움을 줄 수 있는 신규한 유산균 포스트바이오틱스 소재 개발	2022	33,250		33,250	세금계산서
	2023	131,563		131,563	세금계산서
합계		164,813		164,813	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		매출발생			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		164,813	1,200,000	2,000,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
국내			0.1	5	10
국외			-	1	3
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	추후 소재개발을 통한 B2B/B2C판매계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출	-	-	-	
			100,000	300,000	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	기술사업화	(주)노바락토	4	2	6
2	기술사업화	네오뉴트라(주)	-	24	24
합계			4	26	30

□ 고용 효과

고용 효과	구분	고용 효과(명)	
		개발 전	개발 후
	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	5
		생산인력	2

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
1	바이오산업 생태계 활성화를 위한 비즈니스 전주기 지원사업	2021	시험분석 비용지원	10,000
2	바이오 연구데이터 검증 지원사업	2022	시험분석 비용 지원	33,390
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	전문인력	2021			1			1		1				
2	전문인력	2023		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

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	포스터 발표상	여송Young Scientist Award	Optimization of the skim milk fermentation conditions for controlling blood pressure effect using <i>Lactobacillus plantarum</i> K6 by response surface methodology	박유경, 홍상필, 임상동	2021.11.26	한국유산균프로바이오틱스학회

[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)

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

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 혈압 조절 씨플리먼트 사업화 준비	○ 항고혈압 관련 시장 조사 및 사업화 방향성 수립을 완료함. ○ 포스트바이오틱스 소재 분말의 시제품화를 통해 반려동물용 제품 및 프로바이오틱스 원료, 기타가공품을 개발하는데 접목하여 제품화를 이루어냄.	○ 100
○ 혈압 조절 기능성 균주 원료 표 준화	○ 성상, 중금속, 잔류농약, 영양 성분, 열량 분석을 통해 기능성 소재의 규격 및 특성을 확정함.	○ 100
○ 혈압 조절 기능성 균주 안전성 입증 자료 검토/확보 추진	○ 전장유전체 분석을 완료하고 항생제 내성 유전자 및 독성 유전자가 존재하지 않음을 파악 완료함. ○ 단회독성투여시험, 유전체독성시험을 진행하여 기능성 소재의 독성이 없는 것을 파악 완료함. ○ 유산균수 분석을 통해 최종 소재인 열처리배양건조물의 완전 사멸화를 확인하여 생균이 존재하지 않음을 입증함.	○ 100
○ 대량생산 공정 확립 및 시제품·인체적용시험제품용 소재 생산	○ 유산균 4종 평가 (5 L) 완료 ○ 대량생산 배지 및 생산공정 최적화 완료 (5 L,	○ 100

	<p>300 L)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 분말화 공정평가 완료 (멸균, 농축, spray dry, Freeze dry) ○ 인체적용시험용 시제품 생산 완료 	
○ 혈압 조절 효능 평가 인체적용 시험 추진 및 개시	○ 공동연구기관 및 위탁연구기관과의 협업으로 인체적용시험용 소재 생산을 완료하고 인체적용시험기관과의 연구위탁계약을 완료하였으며 인체적용시험 개시를 완료함.	○ 100
○ 인체적용시험 계획서(프로토콜) IRB 승인 및 인체적용시험 개시	○ 프로토콜 IRB 승인 획득 및 인체적용시험 완료	○ 100
○ 인체적용시험 IRB 승인 결과 보고서	○ 인체적용시험 결과보고 IRB 승인 획득	○ 100
○ 바이오컨버전 최적 배양 조건 확립	○ skim milk 농도(X_1)는 13.49%, 배양 온도(X_2)는 33.4℃, 배양시간(X_3)은 21.5013시간, 스타터 첨가량(X_4)은 0.0578%일 때 최적 ACE 억제능과 pH를 보이는 것으로 나타났다. 이 때 예상되는 ACE 억제능은 86.69%, pH는 4.6 이었으며, 실험값은 ACE 억제능은 85.5%, pH는 4.58 이었음.	○ 100
○ 소재의 항고혈압 peptide 분리	○ <i>Lactobacillus plantarum</i> K79에 의해 발효된 분획물 중 1 kDa이하가 83.33%로서 대부분을 차지하였다. 발효물의 peptide를 Superdex peptide column, Vydac column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제하였으며 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 펩타이드를 동정하였음.	○ 100
○ <i>In vivo</i> 모델을 이용한 혈압 저하 효능 평가	○ 실험동물은 대조군으로 생후 5주령인 SHR(SLC사, 일본) 수컷 랫트와 정상군으로 Wistar-Kyoto rat를 실험군은 정상군(WKY): 증류수, 대조군(SHR): 증류수, 고처리군 (SHR): 5ml/kg/day, 중처리군 (SHR): 3.33ml/kg/day, 저처리군 (SHR): 1.65ml/kg/day, POS CON (양성 대조군, SHR): enalapril, 10mg/kg으로 각 군당 8마리씩 10주간 실험에 사용하여 혈압 저하 효능 평가를 완료하였음.	○ 100
○ <i>In vitro</i> 모델을 이용한 혈압이완/수축 관련 신호전달기전연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ Endothelial nitric oxide 생성 규명 ○ eNOS 발현 조절 규명 ○ Akt 인산화 조절 규명 ○ Rho/ROCK 발현 억제 규명 	○ 100
○ 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정 신청	○ 신청서 작성 및 식약처 신청(예정)	○ 90

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 주관연구개발기관의 사업화 매출액 목표(3억원)중 1억 7천만원 가량의 매출이 발생하여 목표 금액에 미달함. 이는 소재의 제품화에 소요되는 기간이 계획보다 지연되면서 실제적으로 사업화 할 수 있는 기한이 줄어들게 되어 사업화 매출에 대한 부분을 달성하기 어려워짐.
 - 성공적인 개별인정형 등록을 위해 지표성분에 대한 밸리데이션 리포트의 보완이 필요하다는 내외부 검토 의견에 따라 밸리데이션리포트를 수정중에 있음.
-

2) 자체 보완활동

- 마케팅 전략 개선, 가격 전략 변경, 신규 시장 탐색 등과 같은 여러 가지 전략을 고려하여 상황에 맞게 적용하여 매출을 증가시키기 위한 작업을 진행 중에 있음.
 - 표준물질 peptide를 합성하여 논문 투고를 위한 데이터를 확보하는 과정을 진행하면서 밸리데이션리포트를 보완하는 데이터를 함께 확보하기 위해 진행 중에 있음.
 - 해당 지표성분에 관련한 밸리데이션리포트 보완이 완료되는 즉시 개별인정형 신청을 진행할 예정이며 밸리데이션리포트 보완기간동안 식약처의 상황에 맞게 진행될 수 있도록 꾸준히 방문 상담 및 온라인 상담을 진행하기 위한 계획도 수립 중임.
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 건강기능식품 개별인정형과 관련된 평가 가이드라인이 식약처에서 수시로 보완되고 있으며 해마다 식약처 법령내 가이드라인에 따라 개별인정형 원료 등록을 위한 요구되는 자료의 수준이 달라질 수도 있어 CRO와 꾸준히 논의하여 개별인정형 신청을 위한 준비를 진행함.
 - 과제 계획서 상에 목표로 설정되어 있지 않았던 기능성 소재의 독성시험평가 또한 위와 같은 이유로 진행하게 된 것으로 고시형 균주를 사용하지만 사균체에 대해 식약처에서 새로운 원료로 접근하고 있어 독성시험평가에 대한 요구가 있을 수도 있다는 CRO의 의견을 반영하여 성공적인 개별인정형 원료 등록을 위해 독성시험평가를 진행함. 해당 독성시험평가는 비용절감을 위하여 분석비 지원사업을 신청하여 해당 지원사업을 통해 진행하였음.
 - 제품화에 대한 매출에 대한 노력으로 제품에 대한 인허가 전단계에서 기능성 균주가 고시형 균주라는 사실을 활용해 프로바이오틱스 원료로 제품화를 이루어냈으며 열처리배양건조물을 사전에 다양한 제품에 원료로 사용하기 위해 기타가공품의 형태로 제품화 완료함. 또한 B2C/B2B채널확보를 위한 업체 섭렵 및 제품의 특징점들을 홍보하여 판매를 이루어내었으며, 추후 건강기능식품,식품 또는 식품첨가물 등과 같은 다양한 제품군의 원료로 활용하여 제품매출을 확장시키고자 제품화중에 있음.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

관련 산업분야의 현황

- 건강기능식품산업은 COVID시대의 도래와 함께 2020년에는 약 5조원으로 성장하였으며, 연평균 6.6%의 꾸준한 성장성을 보이고 있음. 또한 최근에는 각종 질환의 예방 개선 치료의 범위까지도 그 시장성이 확대되고 있음.
- 한국건강기능식품협회에서 발표한 '2022년 건강기능식품 산업 실태조사' 보고서에 따르면 기능성 원료별 시장 규모에서 프로바이오틱스는 홍삼에 이어 두 번째로 높은 것으로 나타남.
- 그 중 고혈압은 만성질환 중 하나로 사망에 미치는 위험인자 중 가장 기여도가 높고, 뇌졸중 환자의 가장 중요한 원인으로 알려져 있으며, 각종 성인병과 심혈관계질환과의 연관성도 확인된 바 있음. 이러한 만성 질환의 경우 유병율과 재발율이 높아 지속적인 관리가 필수적으로 필요함.
- 고혈압은 의약품으로 조절이 가능하다고 알려져 있지만 다양한 부작용이 제기되고 있으며, 약물 치료만 하는 경우 환자의 70%가 목표 혈압에 도달하기 못하는 등의 문제점이 있음. 고혈압은 약물 치료만 하는 경우보다 비약물치료의 병행으로 더욱 호전될 수 있음.
- 고혈압은 의약품으로 조절이 가능하다고 알려져 있지만 다양한 부작용이 제기되고 있으며, 약물 치료만 하는 경우 환자의 70%가 목표 혈압에 도달하기 못하는 등의 문제점이 있음. 고혈압은 약물 치료만 하는 경우보다 비약물치료의 병행으로 더욱 호전될 수 있음.

해당 산업화 진행 시 기여도

- 각종 질환 및 환자발생률이 증가하면서 건강기능식품 산업이 계속적으로 성장하고 있음. 개발 중인 제품의 경우 프로바이오틱스의 개념을 확장시킨 포스트바이오틱스로서의 개발이 요구되며 아직 국내에서의 특허나 기술개발이 미비한 혈압조절 유산균의 개발로 해당 산업에 대한 우위와 지속적인 성장이 예측됨.
- 국내에서 기능성을 가진 유산균은 프로바이오틱스로서 가장 많이 개발되었지만 인체 흡수율, 기능성 극대화, 효능 활성화 등에 이유로 프리바이오틱스의 섭취가 대두되었고, 유산균과 먹이가 결합된 형태인 신바이오틱스의 개발 등 활발한 연구가 진행됨. 포스트바이오틱스의 경우 유산균의 사균체와 대사산물을 포함한 물질로 이루어져있으며, 위장기능이 약한 어린이나 노인의 식이 제품 및 건기식 섭취 시에 더 높은 흡수율과 적은 부작용, 항생제와의 병행에서도 효능유지, 제형 제한 없이 섭취가 용이하여 각광받고 있음. 또한 미생물 대사 시 자연적으로 생성된 여러 기능적 화합물을 안전하게 섭취할 수 있어 프로바이오틱스보다 더 큰 이점을 갖음.
- 국내에서 포스트바이오틱스에 대한 많은 기술개발은 진행되지 않고 있으며, 포스트바이오틱스 실험 가이드라인에 대한 기초 실험법도 미비함. 따라서 본 프로젝트의 포스트바이오틱스에 대한 연구를 통하여 새로운 제품군에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.
- 질병에 대한 프로바이오틱스의 연구는 꾸준히 진행되고 있으며, 면역, 항비만에 대한 연구와 개별인정형 원료 등록 사례가 많으나 포스트바이오틱스로 제품화한 경우는 2건으로 그 중 개별인정형 원료를 획득한 경우는 일동제약에서 면역관련 유산균원료로 등록된 '지큐랩' 으로 1건이 유일함. 향후 혈압조절 포스트바이오틱스 개발로 유산균에서 파생된 건강기능식품산업에서 계속적 성장 및 소재 개발이 진행될 수 있을 것으로 기대됨.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서 3) 성과관련 증빙자료
2.	1) 2)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.