

## 바이오컨버전(Bioconversion)을 통해 제조된 마늘발효액으로 부터 면역강화 기능성 소재의 개발 및 제품화

주관기관 : (주)지앤에이치바이오

위탁개발기관 : 중앙대학교 산학협력단



# 연구개발과제의 목표 및 내용

## 연구개발과제의 단계별 목표 (p8)

### 1차년도

- 마늘발효 공정의 발효 기간에 따른 성분의 변화 분석
- 일반성분 분석 및 지표(기능)성분의 분리/분석
- **In vitro** 장관면역 기능성 평가 및 세포 분자기작 규명

### 2차년도

- 표준화 원료의 기준규격 설정
- 지표(기능)성분의 구조화학적 규명
- **In vivo** 장관면역 기능성 평가 및 체내 작용기전 규명
- 장관면역 기능성이 입증된 신규 고부가가치 제품 개발

## 연구개발과제의 내용 (p10)

### 위탁연구개발기관 개발 내용 및 방법

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형			
		in vitro	in vivo	Human	
면역조직	조직무게		○		
	조직학적 분석		○		
면역세포	백혈구 수 및 비율(총 백혈구, 중성구, 단구/대식세포, 자연살해세포)		○	○	
	림프구 수 및 아형비율		○	○	
	T 림프구 전사인자 발현	○	○	○	
항원인지	Major histocompatibility(MHC)	○	○	○	
	Toll-like receptor(TLR)	○	○	○	
면역세포활성	비장세포 증식능력	○	○		
	용혈판형성 세포수(plaque forming cell)	○	○	○	
	지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity, DTH)		○	○	
	대식세포 활성	탐식능력	○	○	○
		산화질소(nitric oxide, NO)	○	○	○
		Inducible nitric oxide synthase(iNOS)	○	○	○
		Cyclooxygenase-2(COX <sub>2</sub> )	○	○	○
		Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	○	○	○
		NF-κB	○	○	○
	MAPKs	○	○	○	
자연살해세포활성		○	○		
면역글로불린	IgA, IgG, IgM, IgD, IgE		○	○	
사이토카인	사이토카인 양, 단백질 발현, 유전자 발현	○	○	○	
보체	보체양		○	○	
	보체계 활성		○	○	

# 연구개발과제의 목표 및 내용

## 위탁연구개발기관 개발 내용 및 방법 (p11)

### 1차년도

#### ~~➤ In vitro 선천면역계 증진 기능성 평가 및 세포 내 작용기전 규명~~

- ~~↖ Balb/c 마우스 유래 복강 마크로파지 세포주의 배양 및 선천면역계 활성화 평가~~
- ~~↖ 탐식능, 산화질소(NO) 생성능, 면역증진 사이토카인 생성능(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) 측정~~
- ~~↖ Balb/c 마우스 유래 비장세포의 분리 및 적응면역계 활성화 평가~~
- ~~==~~

#### ~~➤ In vitro 장관면역계 증진 기능성 평가 및 세포 내 작용기전 규명~~

- ~~↖ C3H/HeN 마우스 유래 Peyer's patch 세포의 배양 및 장관면역계 활성화 평가~~
- ~~↖ Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식능 측정~~
- ~~↖ 면역증진 사이토카인 생성능(GM-CSF, IL-10, TGF- $\beta$  등) 측정~~
- ~~↖ 세포 내 분자기작 규명~~
- ~~↖ iNOS, COX-2 및 PGE2 생성능 평가~~
- ~~↖ NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호전달 기전 평가~~

### 2차년도

#### ~~➤ In vivo 장관면역 기능성 평가 및 체내 작용기전 규명~~

- ~~↖ 면역력이 저하된 실험동물에서 마늘발효액의 경구투여에 따른 면역 기능성 평가~~
- ~~↖ 마늘발효액의 체내 작용기전 규명~~
- ~~↖ H&E 및 IHC staining을 이용한 주요 조직 염색~~
- ~~↖ Real time RT-PCR을 이용한 림프구 전사인자 발현량 측정~~
- ~~↖ 혈액자동분석기를 이용한 총 백혈구, 과립구, 단핵구 및 림프구 수와 비율 측정~~
- ~~↖ 혈액으로부터 면역글로블린(sIgA 및 IgG) 함량 측정~~
- ~~↖ 마이크로바이옴 분석을 통한 장내균총과의 상관성 규명~~

## 성능지표 및 측정방법 (연구개발계획서 p21)


평가 항목	단위	전체 항목에서 차지하는 비중(%)	세계최고수준 보유국/보유기업	최종 개발목표	연구개발 목표치	목표 설정 근거
			성능수준	성능수준	1단계	
지표성분 시험법 개발 /검증	부	15	검증된 시험법을 통해 80~120% 범위의 지표성분 기준규격 설정 (식품의약품안전처)	지표성분 후보군 확인	지표성분 2종 이상 확보	식품의약품안전처
선천면역계 증진 효력 입증	건	15	통계학적인 유의수준에서의 차이(p<0.05)	0	대조군 대비 30% 이상 증진 입증 1건	식품의약품안전처
1. 장관면역계 증진 효력 입증	건	15	통계학적인 유의수준에서의 차이(p<0.05)	0	대조군 대비 30% 이상 증진 입증 1건	식품의약품안전처
발효공정 최적화 및 표준화	건	15	지표(기능)성분이 일정하게 함유된 표준화된 발효제품 제조공정도 및 COA 제작	발효공정 최적화 및 표준화 1건	발효공정 최적화 및 표준화	제조공정도 및 COA 제작
마늘발효물 제품 개발	건	15	건강기능식품 제품 개발	0	신규 제품 개발 1건	제품화 구현
동물 조직 및 혈액 유효성 평가	건	25	대조군 대비 15% 이상 면역활성 증가	15% 이상	17% 이상 증가	제품 유효성 확보





순번	평가항목(성능지표)	평가방법	평가환경
1	지표성분 시험법	건강기능식품 시험법 밸리데이션 가이드라인에 따라 밸리데이션(특이성, 직선성, 정확도, 정밀도, 정량한계)을 수행하고, 이 시험법을 이용하여 마늘발효물에 존재하는 지표성분(알리신 및 polysaccharide)의 함량을 정확히 도출하여 µg/g으로 계산 (외부 기관(연구소) 의뢰)	외부 기관 의뢰 (기능성 연구원 및 대학)
2	선천면역계 증진 효력 입증	Balb/c 마우스(시험군 및 대조군 각 8마리 이상/동물시험 IRB 승인 필수)에서 유래한 마크로파지 및 비장 세포에 마늘발효물의 처리로 인한 면역증진 사이토카인 생성량을 대조군 대비 상대활성(%)으로 계산함 (외부 기관(학교) 의뢰)	공동연구개발기관 자체평가 후 외부기관 연구원 입회 평가
3	1. 장관면역계 증진 효력 입증	C3H/HeN 마우스(시험군 및 대조군 각 8마리 이상/동물시험 IRB 승인 필수)에서 유래한 Peyer's patch 세포에 마늘발효물의 처리로 인한 면역증진 사이토카인 생성량을 대조군 대비 상대활성(%)으로 계산함 (외부 기관(학교) 의뢰)	공동연구개발기관 자체평가 후 외부기관 연구원 입회 평가
4	발효공정 최적화 및 표준화	지표(기능)성분 시험법을 통해 단계별 성분함량이 자세하게 기재된 표준화된 발효공정에 대한 제조공정도를 제작하고 원료에 대한 시험성적서 제작	주관기관 자체평가 후 외부기관 연구원 입회 평가
5	마늘발효물 제품 개발	마늘발효 원료 신규 소재를 개발하고 식약처에 품목제조보고서를 신청	식약처 품목제조보고
6	동물 조직 및 혈액 유효성 평가	마우스(시험군 및 대조군 각 8마리/동물시험 IRB 승인 필수)에 대하여 혈액검사 및 면역관련 조직(흉선, 림프절 등) 관찰을 통한 면역활성증진(면역 관련 세포분화 증가)확인, 국내저명학술지(KCI급) 논문 게재	공동연구개발기관 자체평가 후 외부기관 연구원 입회 평가

# 연구개발 결과

## 외부기관 연구원 입회 평가 보고서

외부 전문가 입회 평가 보고서		
과제명 / 과제번호	바이오컨버전(Bioconversion)을 통해 제조된 마늘 발효액으로부터 면역강화 기능성 소재의 개발 및 제품화 /S3284778	
평가 의뢰자	소속	중앙대학교 생명공학대학 식품영양학과
	소재지	경기도 안성시 서동대로 4726 중앙대학교 안성캠퍼스 904 관 9316 호
	시험 책임자	김 훈
	시험자	중앙대학교 김훈, 문성권
	시험물질/제조원	마늘발효물(Aglio)/지앤에이치바이오
	평가일자	2023년 5월 31일
평가장소	<ul style="list-style-type: none"> <li>중앙대학교 안성캠퍼스 904 관 211, 212 호 (CK-II 특성화 동물실험센터, 동물실험실)</li> <li>중앙대학교 안성캠퍼스 904 관 9202 호 (세포배양실)</li> </ul>	
외부 평가자	소속	호서대학교 임상병리학과
	소재지	충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 20
	평가 책임자	황다현
	평가항목	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험군 및 대조군 8 마리 이상 여부 확인</li> <li>동물실험 IRB 승인 필수 확인</li> <li>선천면역계 증진 효력 입증</li> <li>장관면역계 증진 효력 입증</li> <li>동물 조직 및 혈액 유효성 평가</li> </ul>
보고서 제출일	2023년 6월 23일	

제 출 문	
<p>본 외부평가위원회는 중앙대학교 안성캠퍼스에서 진행하는 중소벤처기업부 창업성장기술개발사업(전략형)의 "바이오컨버전 (Bioconversion)을 통해 제조된 마늘발효액으로부터 면역강화 기능성 소재의 개발 및 제품화(S3284778)" 과제의 성능지표 입회평가를 성실히 수행하였으며 다음과 같이 입회평가 결과를 보고합니다.</p>	
2023. 08. 23	
외부입회위원 : 호서대학교 임상병리학과 교수 황다현 	

입회평가 보고서	
1. 시험 물질 평가	
	
건조시료	경구투여용 용해시료
2. 시험 장소 평가	
가) 중앙대학교 CK-II 특성화 실험동물센터	
	
외부평가위원 실험동물센터 입구 진입	사육현황 확인 (군당 8마리 이상 여부)

## 장관면역계 증진 논문 (Molecular Nutritional & Food Research, JIF 4.5, 76.0%)

### RESEARCH ARTICLE

Molecular Nutrition  
Food Research  
www.mnfjournal.com

### Garlic Bioconverted by *Bacillus subtilis* Stimulates the Intestinal Immune System and Modulates Gut Microbiota Composition

Genevieve Tonog, Hyunjun Yu, Sung-Kwon Moon, Sanghyun Lee, Hyeleen Jeong, Kwang Bin Kim, and Hoon Kim\*

**Scope:** This study evaluates the potential of bioconverted garlic ferments (BGFs) to stimulate the intestinal immune system and modulate cecal microbiota composition.

**Methods and results:** In vitro, BGF significantly enhances Peyer's patch (PP)-mediated bone marrow cell proliferation and increases the production of Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), Interleukin (IL)-6, and IgA but not IL-4, IL-5, and IgE. Oral administration of BGF to C3H/HeN mice for 4 weeks significantly increases the GM-CSF (42.1–45.8 pg mL<sup>-1</sup>) and IFN- $\gamma$  (6.5–12.1 pg mL<sup>-1</sup>) levels in PP cells. BGF also significantly elevates the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ , 165.0–236.3 pg mg<sup>-1</sup>), GM-CSF (2.4–3.0 ng mg<sup>-1</sup>), and IFN- $\gamma$  (1.5–3.2 ng mg<sup>-1</sup>) in the small intestinal fluid, and TNF- $\alpha$  (2.2–3.1 pg mL<sup>-1</sup>) and IFN- $\gamma$  (10.3–0.21.5 pg mL<sup>-1</sup>) in the mouse serum. Cecal microbial analysis reveals that BGF increases Bacteroidota and Verrucomicrobiota and decreases Actinobacteria and Bacillota at the phylum level in mice. At the genus level, BGF significantly increases the abundance of *Fusimonas* (250 mg kg<sup>-1</sup> BW<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), *Bacteroides* (125 and 250 mg kg<sup>-1</sup> BW<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), and *Akkermansia* (125 mg kg<sup>-1</sup> BW<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) and decreases that of *Bifidobacterium* (62.5 and 250 mg kg<sup>-1</sup> BW<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) and *Limosilactobacillus* (125 and 250 mg kg<sup>-1</sup> BW<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>).

**Conclusion:** This study provides the first evidence of BGF's ability to modulate the intestinal immune system and gut microbiota, supporting its potential as a novel functional material to enhance gut immunity.

#### 1. Introduction

Intestinal immune system, an integral component of the mucosa-associated lymphoid tissue, is crucial as the first line of

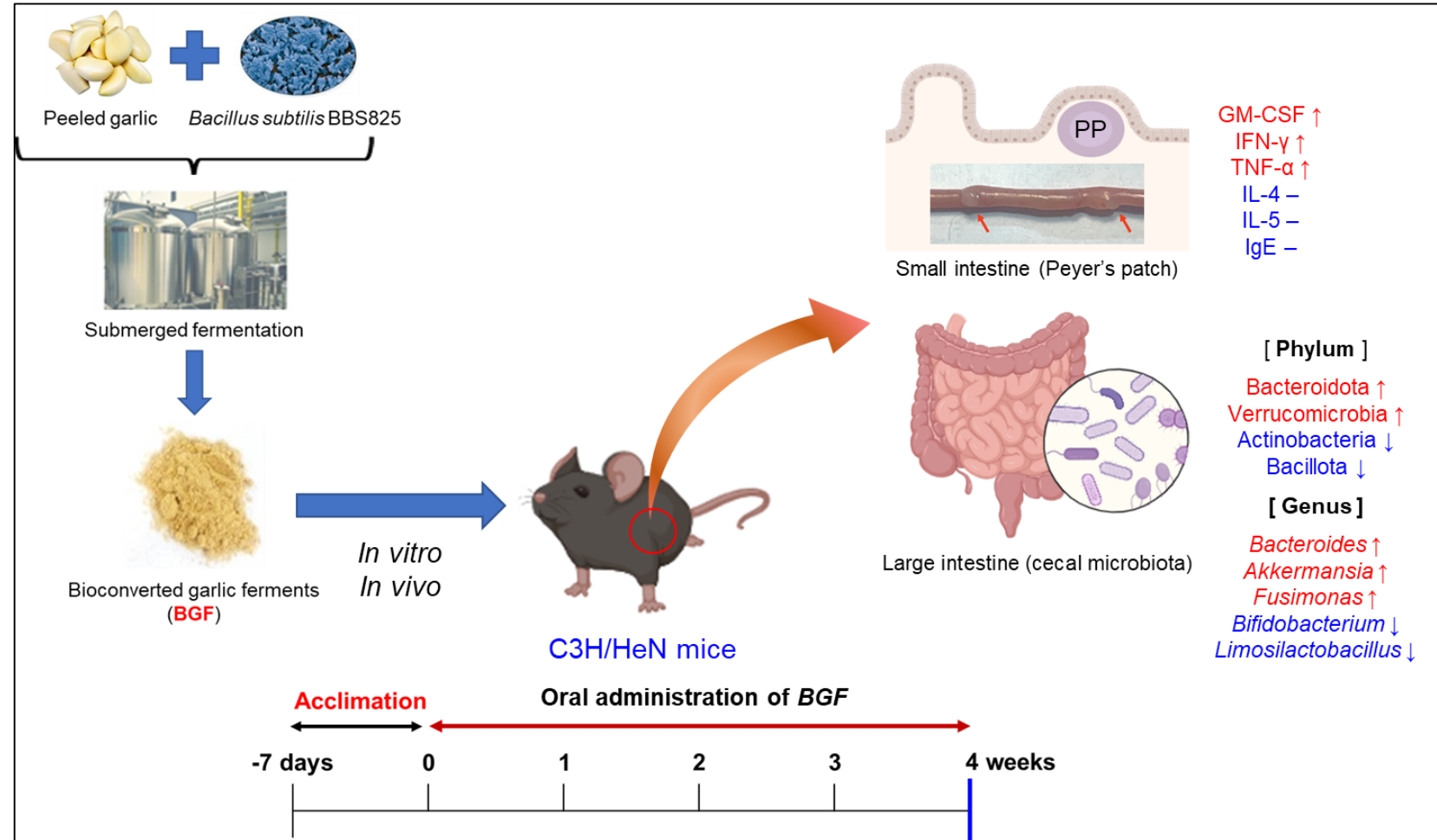
defense in humans.<sup>[1]</sup> However, daily exposure to complex microbial environments affects the intestinal immune system. The intestine is the largest immune organ in the body comprising anatomically defined segments with distinct physiological and immunological components. It consists of dispersed innate and adaptive effector cells and organized lymphoid tissues, such as Peyer's patches (PPs).<sup>[2]</sup> PPs are primarily located in the jejunum and ileum and have a specialized follicular epithelium of microfold cells (M cells) that transport antigens from the lumen to immune cells, such as dendritic cells, in tissues.<sup>[3]</sup> These immune cells circulate throughout the body through the mesenteric lymph nodes and stimulate both local mucosal immune activity and the circulating immune system upon activation.<sup>[1]</sup> As 70%–80% of immune cells are present in the gut, the complex interplay among the intestinal epithelial layers, immune system, and gut microbiome has been extensively explored.<sup>[4]</sup> Gut epithelium plays a crucial role in protecting the host from infections; it consists of a layer of mucus that serves as a barrier against pathogenic invasion.<sup>[5]</sup> Gut microbiota synthesizes vitamins, breaks down proteins and complex carbohydrates, and generates various metabolic products, including short-chain fatty acids (SCFAs), which mediate the interactions between immune cells and the gut epithelium.<sup>[6]</sup> In addition to the local mucosal immune responses in the gut, the gut

G. Tonog, S.-K. Moon, H. Kim  
Department of Food and Nutrition  
Chung-Ang University  
Anseong 17546, South Korea  
E-mail: saphhead1106@hanmail.net

H. Yu  
Department of Integrated Biomedical and Life Science  
Korea University  
Seoul 02841, South Korea  
S. Lee  
Department of Plant Science and Technology  
Chung-Ang University  
Anseong 17546, South Korea  
H. Jeong, K. B. Kim  
C&H Bio Co., Ltd.  
Goyang 23038, South Korea

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mnfr.202400504>

DOI: 10.1002/mnfr.202400504



## 선천면역계 증진 논문 (Food & Function, JIF 5.1, 81.2%)

### ARTICLE

#### Immunostimulatory effects of *Bacillus subtilis*-fermented garlic (Aglio): An in-depth *in vitro* and *in vivo* analysis

Received 00th January 20xx,  
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

Hyunjun Yu,<sup>a\*</sup> Genevieve Tonog,<sup>a,b</sup> Sung-Kwon Moon,<sup>b</sup> Sanghyun Lee,<sup>c</sup> Hyeleen Jeong,<sup>d</sup> Hae Soung Kim,<sup>d</sup> Kwang Bin Kim,<sup>d</sup> Hyung Joo Suh,<sup>a</sup> Hoon Kim,<sup>a,b</sup>

**Abstract:** This study evaluated the immunostimulatory potential of garlic fermented with *Bacillus subtilis* (Aglio) and identified the underlying mechanisms using *in vitro* and *in vivo* models. Aglio significantly enhanced macrophage activity, with increased TNF- $\alpha$  (9.3–46.6 fold), MCP-1 (5.3–41.4 fold), IL-6 (2.1–32.1 fold), and IL-12 (1.1–5.5 fold) secretion compared to those of the standard garlic extract. This macrophage-stimulatory activity was associated with MAPK (ERK, JNK, and p38) and NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  and p65) signaling pathway activation. Aglio significantly increased splenocyte proliferation (1.8–2.9 fold) and TNF- $\alpha$  (32.5–96.6 fold), IFN- $\gamma$  (26.6–362.3 fold), GM-CSF (2.1–3.9 fold), and IL-6 (10.3–11.6 fold) secretion. Gene expression analysis revealed Th1-related T-Bet upregulation and Th2- and Th17-related GATA3 and FOXP3 downregulation, indicating a Th1-mediated splenocyte activation mechanism. Oral administration of Aglio (125 and 250 mg/kg) to BALB/c mice increased splenocyte proliferation (2.1–3.3 fold) and elevated splenic cytokine (TNF- $\alpha$ , 1.9–2.7 fold; GM-CSF, 2.2–2.3 fold; IL-6, 1.9 fold) and antibody (IgA, 1.4–1.8 fold; IgG, 1.0–1.7 fold) levels. Aglio administration also increased serum TNF- $\alpha$  (2.1–3.3 fold), IL-6 (1.0–1.1 fold), and IgG (1.6–1.9 fold) levels. Nutrient analysis indicated that Aglio lacked detectable carbohydrates and had negligible protein and polyphenol contents compared to standard garlic extract, suggesting complete biotransformation during fermentation. These findings demonstrate Aglio-mediated immune activation, highlighting its potential as a functional food or nutraceutical agent for immune enhancement.

#### Introduction

Garlic (*Allium sativum* L.) has traditionally been used as a seasoning in oriental cuisine and various other dishes. Garlic has multiple physiological and pharmacological functions in addition to its use in traditional medicine to treat typhus, dysentery, cholera, and influenza.<sup>1</sup> These include cardioprotective,<sup>2</sup> anticancer,<sup>3</sup> common cold-relief,<sup>4</sup> antibacterial,<sup>5</sup> anti-inflammatory,<sup>6</sup> hepatoprotective,<sup>7</sup> and immunomodulatory<sup>8</sup> effects. Garlic contains over 200 chemical compounds, including organosulfur compounds, allicin, ajoene, diallyl polysulfides, vinylthiols, and S-allylcysteine.<sup>9</sup>

Recent advances in microbial food fermentation have focused on transforming chemical constituents from raw materials into biologically active metabolites.<sup>10</sup> These bioactive metabolites produced during microbial fermentation have been used as potential

ingredients in nutraceuticals and functional food formulations.<sup>11</sup> Fermented food products have particularly been receiving increased interest because of their promising health benefits, including protection against infectious agents, immunomodulatory effects, anti-allergenic properties, anti-obesity, antioxidant, and anti-anxiety effects.<sup>12,13</sup> Furthermore, fermented foods containing probiotic bacteria can enhance the immune function.<sup>14</sup> Therefore, identifying natural products with novel prospects with the aim to develop potent and safe immune-enhancing ingredients, referred to as functional foods,<sup>15</sup> has attracted considerable attention. Consuming specific functional foods can boost immune system activity by stimulating T cells, B cells, macrophages, and natural killer cells and triggering cytokines, chemokines, and antibody production.<sup>16</sup>

Garlic fermentation enhances the levels of reducing sugars, amino acids, and antioxidant compounds, making fermented garlic a promising functional food.<sup>17</sup> Fermented garlic has better health-enhancing properties than normal garlic because of the increased S-allyl cysteine,<sup>18</sup> organosulfur compound, polyphenol, and volatile compound content.<sup>19,20</sup> Furthermore, fermented garlic has various health effects, such as lowering blood pressure<sup>21</sup> and anti-fatty liver,<sup>22</sup> anti-obesity,<sup>23</sup> and antithrombotic<sup>24</sup> activities. Several studies have investigated the immunostimulatory effects of fermented garlic. One study focused on the immunomodulating effects of garlic fermentation using *Bacillus subtilis*.<sup>25</sup> The standard methods for fermenting garlic include the application of high temperatures (40–90 °C) under high humidity (60–90%) for 10–90 days<sup>26</sup> and using lactic

<sup>a</sup> Department of Integrated Biomedical and Life Science, Korea University, Seoul 02841, South Korea. E-mail: ahstmsj77@korea.ac.kr, suh1960@korea.ac.kr

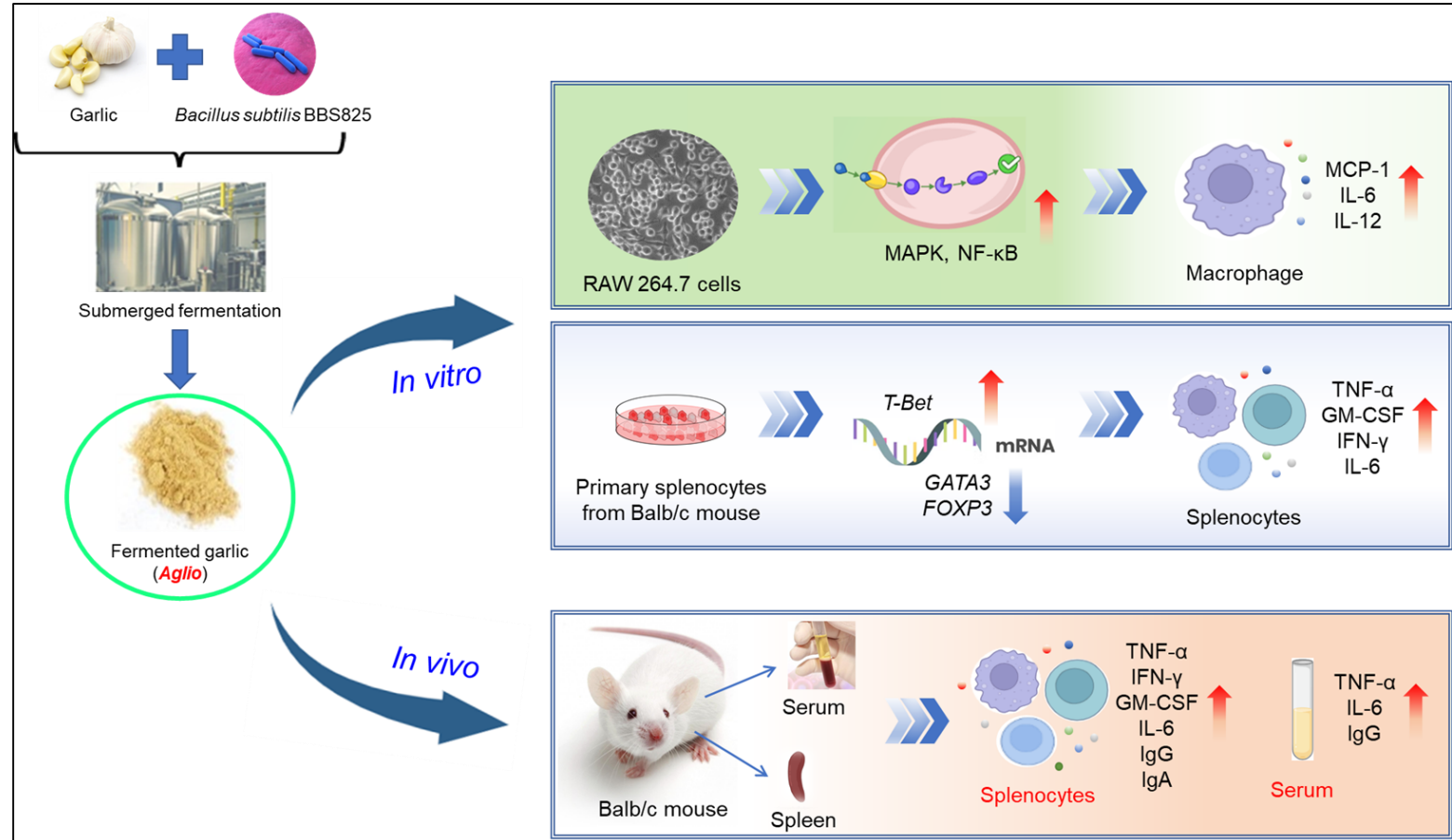
<sup>b</sup> Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong 17546, South Korea. E-mail: genzie01@cau.ac.kr, sumoon66@cau.ac.kr, saphead1106@hanmail.net

<sup>c</sup> Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, South Korea. E-mail: slee@cau.ac.kr

<sup>d</sup> G&H Bio Co., Ltd., Goyang 23038, South Korea. E-mail: gnbio@naver.com, hichen@naver.com, kkb419@naver.com

<sup>†</sup> Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>

\* The authors contributed equally to this work.



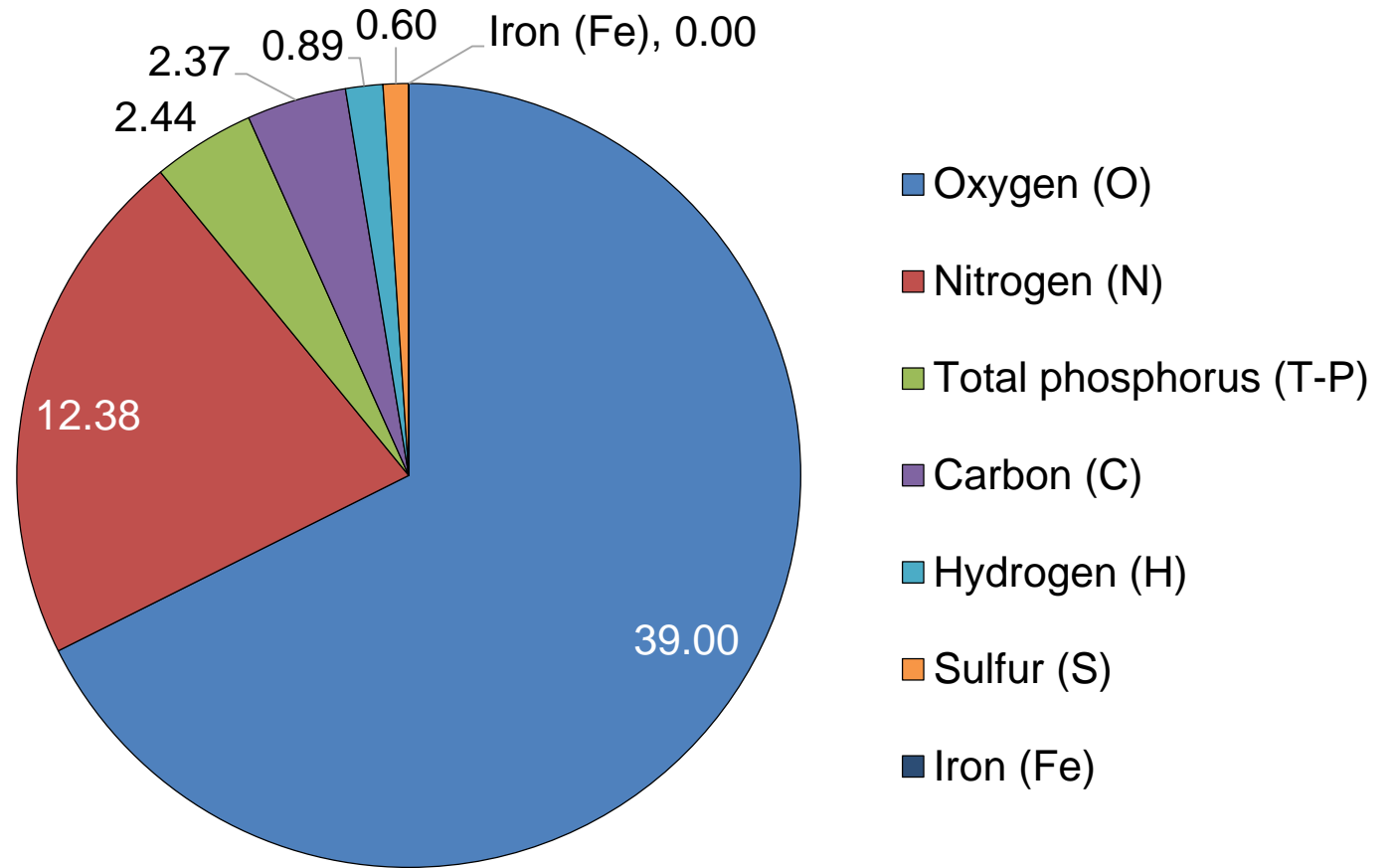
<https://mail.daum.net/top/SENT/7000000000Fzvwyy/>

# 연구개발 결과

## 원소분석 결과 (Element analysis)

### General composition

Composition	Contents (mg/g)	
	Garlic extract	Aglio
Neutral sugar	579.2 ± 13.5	n.d.
Acidic sugar	31.3 ± 4.5	n.d.
Amino sugar	60.7 ± 0.4	n.d.
Protein	3.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1
Polyphenol	6.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Sum	681.7	2.6





감사합니다!

Q&A