

발간등록번호

11-1543000-000453-01

**장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효
김치의 항비만 효과 규명에 관한 연구**

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효김치의 항비만 효과 규명에 관한 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2013 년 12 월 19 일

동국대학교

연 구 진

연구기관명 : 동국대학교

연구책임자 : 김 호 준

책임연구원 : 김 호 준

연 구 원 : 김 은 정

연 구 원 : Subash

연 구 원 : 송 미 영

연 구 원 : 임 지 연

연 구 원 : 임 우 정

연 구 원 : 김 기 철

연 구 원 : 이 신 지

연 구 원 : 한 경 선

연 구 원 : 황 지 후

연 구 원 : 김 유 종

연구기관명 : 신라대학교

책임연구원 : 김 미 정

연 구 원 : 김 정 애

연 구 원 : 송 방 방

연 구 원 : 허 주 연

연 구 원 : 권 나 연

연 구 원 : 김 다 령

연 구 원 : 정 효 미

연 구 원 : 이 아 영

요 약 문

I. 제 목

장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효김치의 항비만 효과 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인체적용시험과 실험실 연구를 통해 발효 김치의 기능성과 우수성을 과학적으로 규명하고 한식 소비촉진을 유도함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 인체적용시험과 장내미생물 분석을 통해 우리나라 전통 발효식품의 대표인 김치의 비만 및 대사개선 효과를 검증
- DNA 마이크로어레이를 통해 발효 정도에 따른 김치의 유전자 발현 양상을 비교하고 비만 대사 마커 및 장내 미생물 군집 패턴의 변화와 연관 지어 그 기전을 규명

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 동국대학교 일산한방병원 IRB 통과
- 비발효 배추김치(생김치) 및 발효된 배추김치(발효김치)의 제조 및 공급 : 생김치와 발효김치의 제조 조건 및 제공 방법의 표준화와 김치 숙성 과정 모니터링.
- 피험자별 다이어트 플랜 수립 및 통제 : 유산균 섭취수준 파악을 위한 식품섭취빈도조사지(FFQ) 개발 및 수행. 10주간 식단 정기 모니터링 및 분석 통한 피험자 식사내용 관리
- 인체 적용 시험 수행 : 동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과 임상연구소에서 실시하였고 23명의 피험자가 8주간의 연구를 모두 마침.
- 김치의 체성분 및 혈압 개선효과 확인 : 임상시험 0주 및 8주에 있어 체성분 지표 및 혈압의 변화량을 살펴본 결과, 전체 피험자의(n=23) 허리둘레와 체지방률($p<0.01$), 총콜레스테롤($p=0.05$)과 고밀도지단백질($p<0.01$), 및 수축기와 이완기 혈압의($p<0.01$) 유의한 감소가 확인됨. 이 중 생김치군은(n=12) 허리둘레, 체지방률 및 수축기 혈압이 유의하게 감소하였고 발효김치군은(n=11) 이완기 혈압이 유의하게 감소함($p<0.05$).
- 장내미생물 양상 개선 효과 확인 : Firmicutes는 김치 섭취 8주 후 생김치군과 발효김치군에서 각각 10.9%, 14.23% 감소함. Bacteroidetes는 생김치와 발효김치군에서 각각 3.81%, 12.93% 증가함. 그 외 Acinobacteria, tenericutes, Proteobacteria는 2주간 휴약기 후에 증가하여 유지됨. 특히 Actinobacteria는 생김치 섭취 1주 후에 유의하게 증가함($p=0.022$). 가장 주목할 만한 변화는 Bifidobacterium의 비율로서, Bifidobacterium과 과 Firmicutes의 비가 생김치, 발효김치군에서 각각 0.23, 0.27에서 휴약기 후 각각 0.21, 1.20으로 변화됨.
- 비만 관련 유전자 발현 확인 : 발효김치군에서 생김치군보다 2배 이상으로 발현된 유전자는 모두 31개로 나타났으며 이 중 가장 주목할 만한 유전자는 CDC42와 CXCR1로서 비알콜성지방간, Helico bacter pylori감염에서의 epithelial cell signaling, pathogenic

Escherichia coli 감염, epithelial cells의 박테리아 침입 등과 관련이 있음. 또한 이 유전자들은 초점접착역(focal adhesion)과 세포의 tight junction과 관련이 있어 장내미생물 패턴에 영향을 미칠 수 있는 가능성으로 추론됨.

- 대사 마커, 장내미생물 패턴, 비만 유전자 발현의 통합적 분석을 통한 발효 김치의 비만 개선 입증 : 발효김치 복용 후의 유전자 발현은 CRP, insulin, body fat percentage 같은 대사 질환의 주요 지표와 관련이 있는 것으로 나타남.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 한식 세계화 정책 홍보물에 연구 성과 활용하여 발효 식품 적극 홍보
- 학교 급식 관련하여 발효 김치를 보다 적극적으로 활용
- 지방자치 단체에서 기능성 김치 개발 촉진
- 국민 모두가 잘 알고 있는 전통 발효 김치이기 때문에 언론 홍보 효과가 지대할 것으로 생각됨
- 관심을 많이 받고 있는 한식이자 한국을 대표하는 발효 식품이기 때문에 국내외에 좋은 기사감이 될 것으로 생각됨
- 초중고등 학생들에게 전통 식품의 장점을 과학적으로 입증해 보여 자국 음식문화에 대한 자긍심 고취 및 건강 증진
- 병원내 영양 상담에서 대사 질환에 대한 김치의 효과를 체계적으로 설명함으로써 관심 고취

SUMMARY

(영문요약문)

The trial was carried out in Dongguk University Hospital, Ilsan. Kimchi was provided from Hansung Kimchi factory (Gyeonggi-do, Korea) which produces Kimchi with standardized recipe and ingredients. Freshly-made fresh and fermented Kimchi were provided every week and stored in -1°C until subjects visited our hospital to get Kimchi every week.

Twenty-three subjects completed the 8 weeks study without any adverse effects.

After 8 weeks study, waist circumference, body fat percentage, cholesterol, HDL-cholesterol, blood pressure of 23 subjects were statistically significant decreased, compared to before study. In fresh Kimchi group, the difference(initial-final) of waist circumferences, body fat percentage and systolic blood pressure were statistically significant decreased, compared to fermented Kimchi group.

Gene expression changes after Kimchi intake : There were 31 significant probes in fermented Kimchi groups compared to fresh Kimchi group with two probes greater than 2 fold changes. Each group respectively had 31 significant probes in fermented Kimchi group and 18 significant probes in fresh Kimchi group. With these significant probes, we performed DAVID functional annotation clustering to find cognate functions. Significant probes from fermented kimchi group compared to fresh kimchi group were clustered into seven functionally related categories – six clusters within up-regulated genes and one cluster within down-regulated genes. The most notable genes from the fermented kimchi group were CDC42 and CXCR1 which are related to non-alcoholic fatty liver disease, epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection, pathogenic Escherichia coli infection and other bacterial invasion of epithelial cells. These genes are also related to focal adhesion and tight junction of the cells which can be inferred that gene expression of human can affect intestinal microbiota.

Changes of gut microbiota after Kimchi ingestion : The mean proportion of Firmicutes decreased by 10.9% (p value=0.308) in the Fresh group and decreased by 14.23% (p value=0.259) in the Fermented group after 8 weeks of study. On the other hand, Bacteroidetes increased by 3.81% (p value=0.729) and 12.93% (p value=0.330) in the Fresh and Fermented groups, respectively. Other phyla such as Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria increased after the 2 week of Kimchi wash-out period and then leveled off in both groups. Among these, Actinobacteria showed a significant increase after one week of fresh Kimchi consumption (p value=0.022). The most remarkable change after the kimchi consumption was the proportion of Bifidobacterium. The mean ratio of Bifidobacterium to Firmicutes was 0.23 in the Fresh group and 0.27 in the Fermented group after the wash-out period, but changed to 0.21 (p value=0.096) and 1.20 (p value=0.035) in the Fresh and Fermented groups, respectively, after the Kimchi consumption.

Correlation analysis : Correlations between human blood gene expression and gut microbiota were not significant, but gene expressions after fermented Kimchi intake was relevant to CRP, insulin and body fat percentage, which are the major indicators of metabolic diseases.

CONTENTS
(영 문 목 차)

I . Title	7
II . Purpose and Necessity	8
III . Contents	19
IV . Results	20
V . Application	67

1장. 제 목

장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효김치의 항비만 효과 규명

2장. 연구개발의 목적 및 필요성

1절. 연구목적

인체적용시험과 실험실 연구를 통해 발효 김치의 기능성과 우수성을 과학적으로 규명하고 한식 소비촉진을 유도함

2절. 연구의 필요성

1. 연구의 배경

가. 김치연구의 중요성

- 2009년 국민건강통계(보건복지부, 2010)에 따르면 다소비 식품조사에서 백미가 1위, 김치가 2위를 차지함으로써, 한국 사람이 섭취하는 대표적인 식품은 밥과 김치라고 할 수 있고, 그만큼 우리 식생활에서 김치의 중요도는 매우 높다고 할 수 있으며 매일 김치 섭취율은 5.7%를 나타냈고, 섭취량은 남자 96g/일, 여자 76g/일을 나타냄.
- 2006년 미국의 권위 있는 건강전문 월간지 'Health'가 세계 5대 건강식품을 발표하였는데, 그중 김치가 선정되어 스페인의 올리브유, 그리스의 요구르트, 일본의 낫또, 인도의 렌틸콩과 함께 그 우수성을 인정받았는데, 발효식품인 김치에는 비타민 A, B, C가 풍부하고 몸에 좋은 유산균이 풍부하며, 암세포 증식 억제가 이미 그 효능을 입증 받음.



Fig 1. The world's five most healthful foods recommended

- 국내 김치시장 규모는 약 2조6천억 원으로, 자가 생산김치와 시판용 김치비율이 6:4로 나타났는데 과거에는 김치를 주로 집에서 담아 먹었으나 최근 독신층과 노인, 맞벌이 가정이 증가함에 따라 김치제품 수요가 증대되었고, 이에 따라 김치가 점차 산업화되어 시판 김치를 이용하는 비율이 증대됨.
- 해외 김치시장의 수출은 주로 일본에 편중되어 있는데 이는 많은 일본인들에 의한 제품 선호도가 높고 김치의 건강 기능성에 대한 인식이 높아짐에 영향을 받은 것으로 생각되므로 김치 세계화를 위해서는 국가별 식문화가 잘 반영된 다양한 제품화 기술개발과 함께 김치의 알려진 다양한 기능성들이 임상시험을 통해 그 우수성이 규명되어야 함.

나. 김치의 항비만 효과

○ 김치가 갖는 항비만 효과는 세부적으로 어떤 비만유형 또는 증상에 유효하다고 밝혀지지는 않았으나, 얼마 전 김치가 어린이를 대상으로 한 아토피 치료효과가 우수하다는 연구결과가 있었고, 2009년에는 김치와 천일염의 항비만 효과에 대한 보고가 있었음. 그 외에도 많은 연구가 있었으나 대부분 김치를 식품으로 섭취해 얻게 되는 효과 보다는 김치 분리 유산균이나 발효에 의한 대사산물의 효과로 실제 우리가 일상에서 섭취하는 식품으로써의 효과에 대한 검증은 아직 미비한 실정임.

○ 기존 비만약물치료의 한계

- 비만 치료제 Reductil 및 Xenical은 장기 사용을 승인받았으나 부작용이 많음.
- Reductil은 혈압상승, 불면증, 구강건조, 현기증 등의 부작용이 빈번하며 심혈관질환, 고혈압 환자에게는 사용 못함.
- Xenical은 심한 복통, 신장결석, 심계항진 및 위장에 가스가 차는 증상과 함께 탈모 등의 부작용과 함께 지방섭취가 낮은 한국인에서는 그 효과가 뚜렷이 나타나지 않으며, 실제적인 장기사용에 대한 안전성이 확보되지 않음.

○ 김치의 효과

- 여러 실험실 연구와 임상연구에서 김치가 항비만 효과를 가지는 것으로 밝혀짐.
- 최근 문제가 되었던 사스와 조류독감에 김치의 예방효과가 알려지면서 국내뿐만 아니라 해외에서도 큰 관심을 보였는데 이는 발효된 김치에서 유래되는 물질이나 유산균에 의한 것으로, 김치 특유의 냄새 때문에 멀리하던 외국에서도 우리 전통발효식품에 대한 재조명이 이루어지고 있음.
- 이외에도 김치의 항산화성과 항노화성, 김치의 항돌연변이성 및 항암성, 김치의 항동맥경화성 및 기타 생리적 기능성 등에 대한 다양한 연구결과로 김치의 기능성이 확인됨.
- 하지만 한국을 대표하는 발효 식품 김치가 정작 장내에서 어떤 방식으로 장내미생물을 조정하며 어떤 식으로 비만 관련 유전자를 발현시키는지에 대해서는 전혀 연구가 이뤄지고 있지 않음.

다. 비만의 중요성과 시장성

- 국내에서도 식생활의 서구화 및 고콜레스테롤의 외식산업이 증가하면서 육류섭취가 증가하고 향상된 생활여건으로 운동량이나 노동량이 감소하여 비만환자가 급증함.
- 비만은 개인의 전반적인 건강상태, 현재 건강상태에 대한 인식, 신체기능의 척도 및 정서적 만족도 등을 저하시킬 뿐만 아니라 고혈압, 당뇨, 동맥경화, 심장병, 뇌졸중 등 각종 질병의 이환율을 높임. 나아가 비만은 한국인의 다양한 암 발생 위험성과 높은 관계를 가질 만큼 중요한 질환임.
- 미 기능성 식품시장의 규모는 2005년을 기준으로 41억 달러규모로 2000년과 비교해서 80% 이상 성장하였으며 이 중 가장 큰 성장을 보인 품목은 다이어트 품목으로 2000~2005년 사이에 95% 이상의 가파른 성장세를 나타냄 (KOTRA, 2006).
- 2005년 2월 미국 시장조사 전문기관인 '마켓데이터 엔터프라이즈(Market data Enterprise, Inc)' 가 발표한 '미국 체중감량 및 다이어트 시장(The U.S. Weight Loss & Diet Control Market)' 보고서에 따르면 미국인들의 비만도가 지속적으로 증가하고 있는 가운데 전체 인구에 25%에 달하는 미국인들이 현재 체중감량 시도 및 다이어트를 하고 있는 것으로 파악되고 있으며, 현재 이들의 수가 7천만명을 육박하고 있는 실정(비즈브레인, 2008).

라. 비만에서 장내미생물 연구의 중요성

- 비만과 대사증후군 연구에 장내 미생물 접근이 필요한 이유
 - 비만은 에너지 대사의 불균형이 지방 형태의 저장 에너지로 나타나게 되는 질환으로, 음식을 통한 칼로리 섭취와 운동을 통한 칼로리 소모를 위주로 하는 환경적인 요인, 또 이를 조정하는 유전자 조합 등의 선천적인 요인이 가장 중점적으로 연구되어 옴. 하지만, 에너지 섭취와 소모의 개인적 차이가 유전자에서만 기인되는지에 대한 논란이 지속되던 중 최근 장 속에 서식하는 특정 박테리아가 비만의 주범일지 모른다는 연구결과가 등장하여 관심을 모으고 있는데 2006년 Nature지에 실린 논문에서는 똥똥한 쥐와 사람은 특정한 박테리아를 많이 갖고 있는 한편 다른 종류의 박테리아는 적게 갖고 있는 것으로 밝혀졌음.
 - 이 연구에서 날씬한 쥐의 장에 특정 박테리아를 주입한 결과 체중이 두 배로 늘어났고 반면 사람에서 다이어트를 시켜 체중이 줄어들자 분변의 미생물 구성비가 달라지는 것을 관찰할 수 있었다고 밝혀 비만인들이 마른 사람에 비해 음식에서 더 많은 열량을 흡수하고, 지방세포로 저장을 촉진하는 장내 미생물을 더 많이 가지고 있다는 이론이 제시되고 있음.

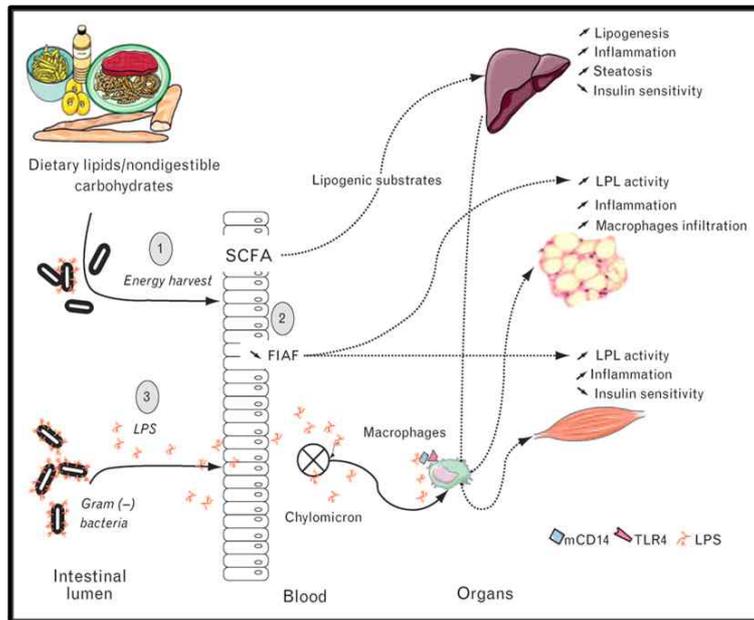


Fig 2. The proposed pathway of how intestinal microbiota influence on the obesity mechanism

- 식이조절과 운동요법이 현재까지 알려진 가장 효과적이고 검증된 비만의 관리법이기는 하지만 감량후 재증가율이 매우 높고 성과에 대한 개인차이가 크기 때문에 앞으로의 비만 치료에 대한 접근은 현재와는 완전히 다른 방법으로 접근해야 될지도 모른다는 공감대가 형성되고 있음.
- 장내 미생물을 이용한 에너지 대사 증진과 식욕조절을 하여 비만에 응용하려는 시도는 최근 비만 연구의 주요 주제중의 하나가 되어가고 있는데 다른 연구에서는 유전적으로 비만한 쥐들이 마른 쥐들에 비해 음식물로부터 에너지를 수확하는 능력이 뛰어나다는 것이 밝혀져 장내미생물로부터 기인한 비만의 경우는 그 원인균들이 비만의 바이오 마커로서, 또 치료의 목표로써 이용될 수 있음을 시사함.
- 그러므로 미생물 균총의 역할을 파악하고, 균형을 유지하는 것이 비만인 들의 에너지 균형을 통제할 수 있는 획기적인 방안이 될 수 있음. 미래의 비만 치료는 장내 미생물 균총을 조화롭게 조절하는 것이 중요할 것이며, 미생물 균총과 체중조절 사이의 관계를 밝혀 효과적인 비만 치료의 전략을 제시해야 할 것임.

○ 서구화된 식단으로 인해 비만과 대사증후군이 발생이 늘어나고 있음

- 복부비만이 대사증후군의 주된 원인인데 1998년, 2001년, 2005년, 2007년 실시된 국민건강 영양조사 결과를 비교한 결과 한국인의 대사성증후군 유병율은 24.9%(1998)에서 31.3%(2007)로 6.4%p 증가됨. 특히 2006년 미국의 대사성증후군 평균은 5%p 증가에 비해 한국인의 대사성증후군 증가 속도가 미국인과 비슷한 수준으로 나타남.
- 예전에 비해 증가한 육류 및 기름진 음식, 단음식 섭취(서구화된 식단)와 신체 활동 및 운동의 감소, 스트레스 증가가 복부 비만의 주요 원인. 그 외에도 인슐린 저항성, 체내 염증 반응, 대사조절 물질의 변화 등이 대사증후군의 주된 원인임.
- 대사성증후군의 유병율을 낮추기 위해 과다한 칼로리 섭취를 줄이고 현미나 잡곡밥·나물 야채가 풍부한 한식 위주의 식단으로 식사할 것을 많은 전문가가 지적하였으며 김치는 이러한 취지에 매우 적합한 음식임.



Fig 3. A press release pertaining westernized meal pattern and chronic diseases

마. 장내미생물 분석 방식

- 사람의 소화관(Gastrointestinal tract)은 1000종 이상의 서로 다른 종이 복잡하고 다양하게 분포된 ecosystem을 이루고 있는데 소화관에 존재하는 미생물은 주로 대장에서 서식하고 있으며, 분변 속의 미생물 분포는 대장에 존재하는 미생물 분포도와 유사하다고 알려져 있음. 장내 미생물 균총의 평형은 사람의 건강과 매우 밀접한 관계가 있음.
- 미생물 분석은 크게 culture method 및 uncultured method로 나누어짐. Culture method는 다양한 균 속에서 선택적으로 원하는 균을 자라게 할 수 있는 배지 조건을 선택하기가 어려울 뿐 아니라, 많은 시간과 인력이 필요하며 생균만 측정할 수 있기 때문에 정확성이 떨어짐. 순수배양을 통해 알려진 미생물 수는 자연계 전체 미생물의 1% 정도에 불과함. 즉 대부분의 미생물이 난배양성임. 이에 반해 uncultured method는 분자생물학적 기법을 이용한 것으로 DNA를 이용하여 보다 객관적이고 정확한 동정을 진행 할 수 있으며, total bacteria를 분석하는 특징을 가지고 있음.
- Unculture method에는 16s rDNA library, real time PCR, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), pyrosequencing 등이 포함됨. 16s rDNA library는 미생물 군집의 유전학적 다양성을 결정하고, 배양이 불가능한 미생물을 확인하기 위해 사용하는 기본적인 방법이지만, 분석하는 양이 많아질수록 시간과 비용이 많이 드는 단점을 지니고 있음. Real time PCR은 복합 미생물 군집에서 원하는 미생물을 짧은 시간에 분석할 수 있으며, 정확도와 민감도가 높은 장점을 가지고 있으나, 다양성은 확인하지는 못하는 단점을 지니

고 있음. DGGE는 복합 미생물 군집의 유전적 다양성을 직접적으로 규명 할 수 있고 전체적인 미생물 종의 수 그리고 양적 변화를 확인할 수 있지만 샘플 내에 분포도가 낮은 종이 검출되지 않을 가능성이 매우 높으며, band수가 너무 많으면 군집의 해석에 어려움이 있음. 또한, 결과의 데이터베이스화나 종(species)의 정보를 얻는 것이 불가능하며, 정량을 진행할 수 없는 단점을 지니고 있음.

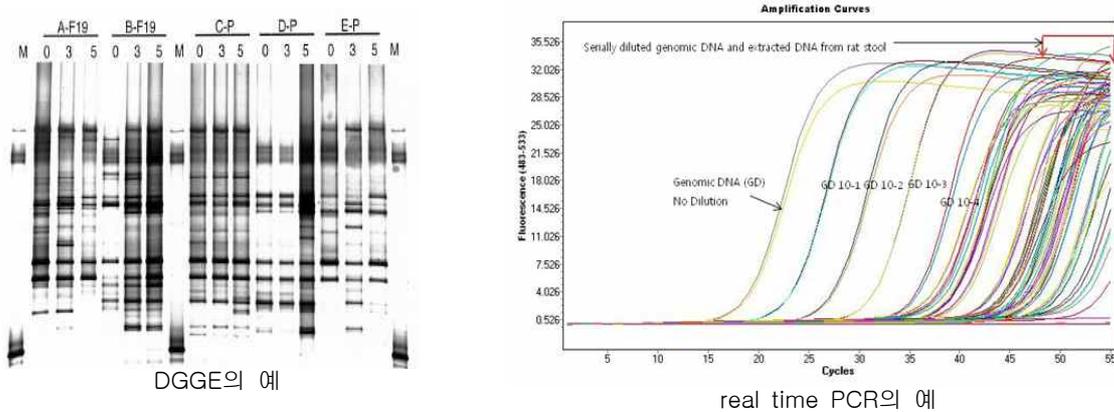


Fig 4. Examples of DGGE and real time PCR results

- 김치의 숙성도별 균총 변화와 장내 미생물에 미치는 영향
 - 김치의 발효 유산균은 숙성에 따라 변화함.
 - terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 분석을 김치유산균 연구에 적용하여, 15°C 및 4°C 발효 김치에 관여하는 유산균의 다양성과 역동성을 검토한 결과 두 발효온도에서 공통적으로 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lc. inhae*, *Lc. kimchii*, *Weissella koreensis*, *W. cibaria*, *Lactobacillus sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, 및 *Lb. brevis*의 존재가 예상되었고, *Lc. citreum*과 *Enterococcus faecalis*는 각각 15°C와 4°C에서 검출됨.
 - *W. koreensis*는 중기발효에 우점을 점하였고, *Lactobacillus* 속은 발효 후기의 우점종으로 나타났다. *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*는 발효 온도에 관계 없이 우점종을 형성하였지만, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*와 *Lb. brevis*의 생육은 저온에서 잘 일어나지 않았다. 몇 종의 *Leuconostoc* 속 유산균은 발효 후기까지 생장이 유지되었다. (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism 분석을 이용한 김치발효 관련 유산균 군집의 평가. 한국미생물생명공학회, 2008).
 - 대용량 유전체 분석방법을 이용해 김치 내 미생물 군집 및 메타지놈을 분석하여 시간의 경과에 따른 미생물 군집변화 특성을 규명한 결과, 류코노스톡, 락토바실러스, 웨이셀라가 우점종을 형성했음을 보여줌 (그림 5).

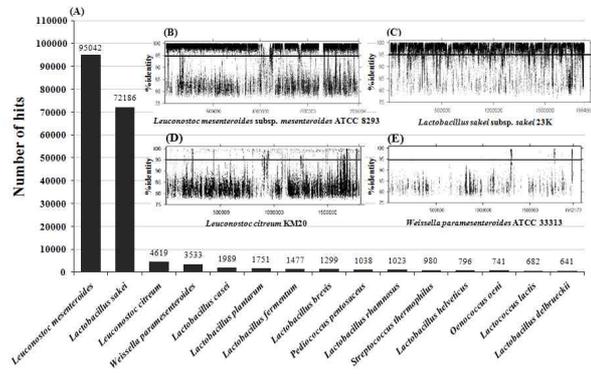
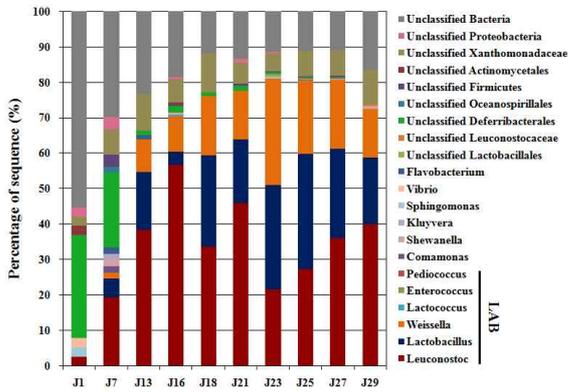


Fig 5. Kimchi lactic acid bacteria and changes of microorganism communities using metagenome analysis

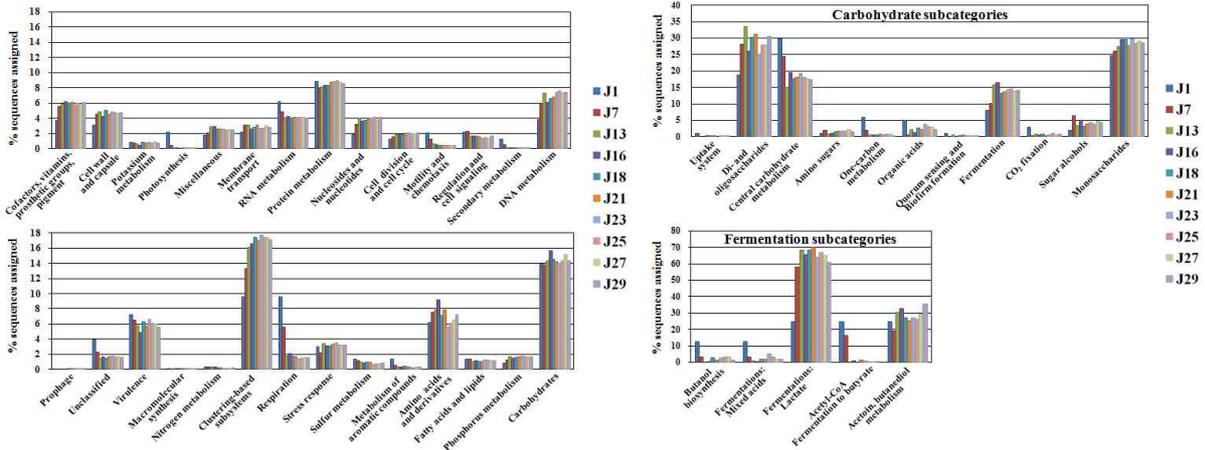


Fig 6. Gene functional analysis of microbial communities based on the Kimchi fermentation process

- 김치의 발효가 장내미생물에 영향을 미칠 것으로 사료됨.
- 김치 발효에 의한 장내병원균의 생육저해효과 (한국식품과학회지, 2002). 배추 및 갓김치를 제조할 때에 6종의 병원성 장내세균을 접종하여 관찰한 결과 pH의 저하에 따라 감소하고 사멸되었음. 특히 갓 즙액 및 allyl isothiocyanate는 병원균에 대해서 뚜렷한 생육저해효과를 나타내었으며 젖산균에 대한 효과는 미약하였음.

→ 김치는 발효식품으로 그 숙성도에 따라 미생물 군집이 변화하고 이러한 미생물들이 체내의 장내 미생물 조성에 영향을 미칠 것으로 사료됨.



Fig 7. A cartoon for the changes of intestinal microbial communities by Kimchi consumption

바. 비만과 관련된 유전자 및 마이크로 어레이를 통한 분석

- DNA microarray는 특정 DNA 염기서열을 초고속 (high-throughput)으로 분석할 수 있는 도구로서, 유전자 발현을 광범위하게 분석할 수 있으며, 최근 다양한 유전체의 염기 서열에 대한 정보가 확보되고, DNA 칩의 집적도를 높일 수 있는 기술이 개발됨에 따라 유전자 발현 분석 외에도 다양한 high throughput 분석에 응용되고 있음. 특정 식품-약물 처리에 의한 전사체 변화를 분석함으로써 식품-약물의 영향을 분석할 수 있는 실험들이 진행되고 있다. 이러한 DNA 마이크로어레이를 통해 현재 엄청난 양의 전사체에 대한 데이터들이 확보되고 있음.

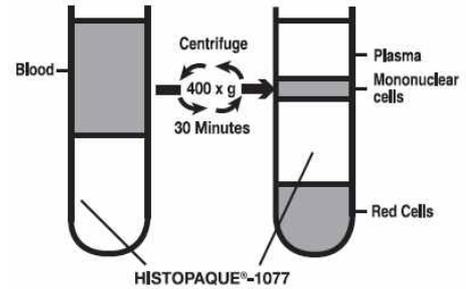


Fig 8. Analysis of PBMC using the ficoll gradients

- 본 연구에서 마이크로어레이를 통해 얻을 수 있는 결과는,

1. 김치 투여 전후 유전체 발현 패턴 확보

김치를 투여하기 전후 환자의 혈액 샘플을 확보하고 이를 이용하여 DNA 마이크로어레이 실험을 진행하여 발효김치와 생김치에 의해 변화되는 유전체 발현패턴을 확보함.

2. 김치에 의한 유전체 발현 패턴 분석

확보된 유전체 발현 패턴의 분석을 통해 김치의 생체 내 영향을 전사체 수준에서 분석함. 김치에 대한 반응이 높은 군과 낮은 군의 유전자 발현 패턴을 분석하여 고기능성 김치 개발에도 관여할 수 있음.

3. 영양유전체 데이터베이스 확보

다양한 분석도구를 이용하여 김치에 의해 변화하는 유전자 발현 패턴 분석 및 환자의 비만유형 변증과의 상관관계 등을 체계적으로 분석함으로써 김치에 대한 포괄적인 영양유전체 데이터베이스를 구축함.

2. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

- 한국의 김치는 세계 유수의 여러 음식과 비교하여도 뒤떨어지지 않는 전통 발효 식품의 일종임. 일본과 같은 외국의 경우 자국의 발효식품에 대한 연구가 오래전부터 수행되어 와 현재 그 품질이 굉장히 높은 수준에 있으나 한국의 경우 국내의 소비량은 매우 많지만 김치의 기능성 특히 비만 및 대사관련 효과는 크게 알려지지 않음.

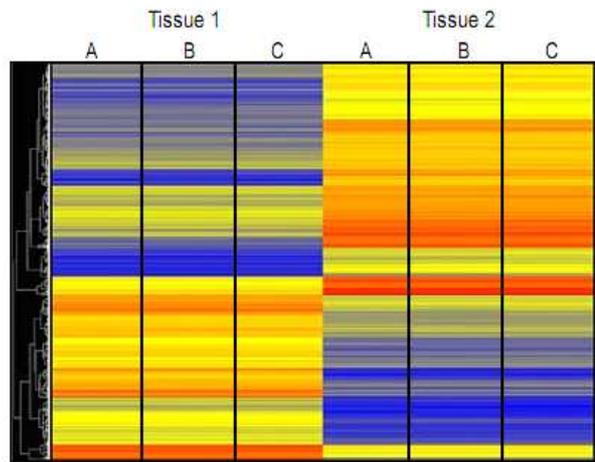


Fig 9. An illustrated clustering using the heatmap

- 또한 내국인들의 소비는 아직까진 많은 편이지만, 젊은 사람들의 기피현상이 꽤 크게 있는 편이며, 김치의 기능성이나 그 기전은 연구가 매우 부족함.
- 이러한 측면에서 이미 항비만 효과가 밝혀지고 있는 김치는 한층 심화된 연구가 필요하며 학문적으로 대사개선 효과의 기전이 밝혀진다면 대내외적 홍보로 인한 인지도 향상 및 국민 건강 향상에 크게 이바지 할 것으로 생각됨.

나. 경제·산업적 측면

- 국내 김치 시장규모는 2조 3천억원 정도이며, 해외 수출은 7천 7백만 달러 가량으로 추산됨 (자료 : 농림수산물부, 2009).
- 상기 시장규모로 보아 그 시장이 방대함을 알 수 있으나 해외로의 수출은 아직 만족스럽지 못한 상황인데, 보다 많은 학술적인 근거를 통한 적극적인 기능성 홍보가 최고의 홍보 전략으로 생각됨.
- 이러한 상황에서 발효 김치에 대한 기능성 연구와 그 기전 연구를 통해 과학적 근거를 확충하게 되면 대외적으로 한국식품에 대한 관심이 높아짐으로써 한식세계화에 크게 이바지 할 것으로 예상됨.

○ 국내 김치 시장 및 수출 현황

Table 1. Korea Kimchi market report by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

(단위 : 억원, 천톤)

구 분	2005	2006	2007	2008	2009	2010 (예상)
전체 김치시장(억원)	21,059	20,877	21,002	22,806	22,681	23,321
- 상품김치시장	8,300	8,608	9,560	10,741	10,767	11,239
. 가정용	2,101	2,018	2,179	2,253	2,194	2,495
. 업소용	6,199	6,590	7,381	8,488	8,573	8,745
- 가정(제조)시장	12,759	12,270	11,442	12,065	11,914	12,082
전체 김치시장(천톤)	1,374	1,277	1,265	1,315	1,276	1,238
- 상품김치시장	392	401	447	483	487	487
. 가정용	48	45	48	48	47	50
. 업소용	344	356	399	435	440	437
- 가정(제조)시장	981	876	817	832	489	750
상품화 김치 비중	29%	31%	35%	37%	38%	39%

<자료 : 관련업계, 식품저널 2010, 11월호>

Table 2. The current report of Korea's Kimchi export market size estimation.

(단위 : 천톤, 천달러)

구분	2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액
일본	32.4	96,911	29.7	86,428	22.8	62,637	23.5	66,120	23.5	75,052	24.4	77,672
미국	0.5	1,196	0.5	121,3	0.5	1,801	0.6	2,375	0.6	2,061	0.7	2,269
대만	0.4	968	0.7	147,0	0.7	1,625	0.8	1,872	0.8	1,962	0.9	1,951
홍콩	0.3	665	0.3	798	0.3	779	0.4	1,162	0.4	1,305	0.4	1,380
기타	1.2	2,986	0.8	3,055	1.3	3,486	1.2	3,780	1.6	4,915	2.1	6,164
합계	34.8	102,726	32.0	92,964	25.6	70,328	26.5	75,309	26.9	85,295	28.5	89,436

3장. 연구개발 내용 및 범위

- 인체적용시험과 장내미생물 분석을 이용한 배추김치의 비만 및 대사개선 효과를 검증
- DNA 마이크로어레이를 통해 발효 정도에 따른 배추김치의 유전자 발현 양상을 비교하고 비만 대사 마커 및 장내 미생물 군집 패턴의 변화와 연관 지어 그 기전을 규명

4장. 연구개발결과

1절. 주요성과

인체적용시험과 장내미생물 분석을 통하여 우리나라 전통 발효 식품인 배추김치의
비만과 대사 개선 효과를 검증하고 장내미생물과의 연관성을 규명

2절. 선행 연구 고찰을 통한 임상시험 설계

기 동물실험과 인체적용시험을 통해 김치의 항비만 효과가 밝혀짐.

하지만 상기 연구에서는 비만관련 혈액지표를 이용하여 김치의 항비만효과를 논의하는데 그치고 장내 미생물 및 유전체에 미치는 영향 등 기전에 대한 설명이 부족함. 본 연구에서는 이에 그 기전 파악을 위해 **발효 김치균과 생김치균으로 나누어 8주간 김치 투여 후 장내 미생물과 혈액 DNA 변화를 분석함**으로써 김치의 항비만기전을 알아보고자 함

- 김치에서 분리한 유산균 균주가 항비만 효능이 있는 아미노산 물질인 오르니틴(Ornithine)을 생산, 세포실험을 통해서 지방세포의 중성지방 생성을 억제하고, 지방산과 중성지방의 합성에 관여하는 단백질과 효소의 농도를 낮추는 항비만 효능이 있음(Experimental Biology 2010).

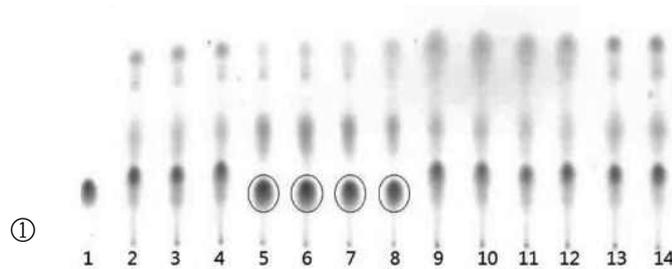


Fig 10. TLC analysis of lactic acid bacteria cultures for the ornithine production.

- 김치 보충제를 6주간 섭취한 결과, 비만 여중생 중 운동(EG군) 또는 김치 보충제(KG군)를 6주간 섭취한 군 및 운동과 김치 보충제 섭취를 병행한(EKG군)은 대조군에 비해 신체 조성 및 혈중 지질 농도가 유의하게 감소함. 체중, BMI 체지방 및 체지방율의 감소 정도는 EKG, EG 그리고 KG 순이었으며, 비만도를 낮추는 효과는 EKG, KG 그리고 EG순으로 나타남. 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 감소는 EKG, KG 그리고 EG 순으로 나타났으며, 중성지질 감소는 EKG, EG, 그리고 KG 순이었고, HDL-콜레스테롤 농도는 EKG와 EG 그룹이 KG와 CG에서 유의하게 증가함. 따라서 EKG군이 신체조성 및 혈중지질에 가장 현저하게 효과를 보이는 것으로 나타남 (Baek et al., 한국식품영양과학회지 2001;30(5): 906-912).
- 2011년 Nutrition Research 저널에 실린 김치의 항비만 효과 연구에서는 22명의 비만환자를 대상으로 8주간 발효 김치를 섭취한 군이 대조군에 비해 체지방 감소율이 뛰어 났으며 인슐린 민감도, 콜레스테롤 감소치도 우월해 대사증후군에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 밝혀짐(Kim, Eun Kyoung, et al. Nutrition Research 31(6), 2011:436-443).
- 따라서 본 연구에서는 1) 김치에 대한 장내 미생물과 혈액 DNA 변화를 분석하는 초회 탐색적 연구 2) 고 비용이 소모되는 파이로시퀀싱과 마이크로어레이를 수행하는 연구임을 감안하여 실험군 및 대조군 각 12명씩 배정함.

3절. 연구계획서의 IRB 승인 및 임상시험 수행

1. 동국대학교일산한방병원 임상연구심위원회 연구프로토콜 승인

Table 3. The research proposal submitted to the IRB of Dongkuk University Medical Center and notification of review approval

연구제목	국문	장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효김치의 항비만 효과 규명				
	영문	Mechanistic study of anti-obesity effect of fermented Kimchi using gut microbiota analysis and microarray				
분류	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 의료행위 <input type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자검사 <input type="checkbox"/> 조직 및 검체연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 행동과학 <input type="checkbox"/> 교육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(식품에 대한 연구)					
연구 단계	<input type="checkbox"/> 1상 <input type="checkbox"/> 2상 <input type="checkbox"/> 3상 <input type="checkbox"/> 4상 <input checked="" type="checkbox"/> 학술연구 <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 기타()					
연구 목적	<input checked="" type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 국내허가용 <input type="checkbox"/> 해외허가용(국가명:)					
식약청의 연구계획서 승인대상연구		<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오				
피험자 수	전체	24명	국내	24명	본원	24명
피험자 군	<input checked="" type="checkbox"/> 환자 <input type="checkbox"/> 건강인 <input type="checkbox"/> 기타					
	<input type="checkbox"/> 취약한 피험자	<input type="checkbox"/> 의사능력이 결여된 자(장애인 포함) <input type="checkbox"/> 임산부 <input type="checkbox"/> 신생아 <input type="checkbox"/> 미성년자 <input type="checkbox"/> 연구기관, 연구자, 의뢰자의 피고용인 (예. 연구원, 의과대학생, 군인 등) <input type="checkbox"/> 수감자, 시설에 수용된 자 <input type="checkbox"/> 기타()				
	<input type="checkbox"/> 취약한 피험자가 포함되는 경우, 이들을 보호할 방안이 계획서에 기술됨					
피험자에 대한 지원	<input type="checkbox"/> 연구 의약품 혹은 의료기기 <input checked="" type="checkbox"/> 교통비 <input type="checkbox"/> 참여보상비 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 기타()					
피험자동의 취득	<input checked="" type="checkbox"/> 서면동의 <input type="checkbox"/> 서면동의 불필요(사유서 첨부) ※ 피험자 서면동의 취득 불필요 사유서 참조					
연구목적	1. 김치섭취가 비만 개선 및 대사 개선효과가 있는지 확인 2. 김치섭취가 장내미생물을 어떻게 변화 시키는지 확인 3. 김치섭취가 비만 관련 유전자 발현을 어떻게 변화 시키는지 확인					
연구의 과학적 근거	EunKyoung Kim et al. Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. Nutrition Research 31 (2011) 436 - 443					
연구 설계 개요	Randomized, 2 Limbed, Parallel-Group, Controlled clinical Study					

시험군 (의약품/기기 등)	발효 김치 (발효정도를 pH 4.6, 산도 0.5%에 맞추, 약 10일 전후)	
대조군 (의약품/기기 등)	<input type="checkbox"/> 해당 없음 <input type="checkbox"/> 위약 : (위약에 대한 상세 설명)	익지 않은 생김치
대상질환명	비만환자 (체질량지수 25 kg/m ² 이상)	
선정기준	1. 체질량지수 25kg/m ² 이상의 비만환자 중 만 30세 이상 60세 이하의 여성 2. 본 인체적용시험에 자의로 참여를 결정하고 서면 동의한 자 3. 신뢰할 수 있으며 향후 8주 동안 본 시험에 기꺼이 협조하고, 제한 사항을 준수할 자	
제외기준	1. 지난 3달간 10% 이상의 몸무게 변동이 있던 자 2. 김치나 김치 부재료에 알러지가 있는 자. 3. 섭취 및 대사 관련 질환이나 관련된 수술 경험이 있는 자(EX) Crohn's dis. 위장관계 수술 경력, 간과 신장의 심각한 기능장애(ALT, AST ≥ 정상 상한치의 2.5배) (Cr > 2.0mg/dl), 또는 만성신부전질환의 병력이 있는 환자 4. 갑상선 기능 저하증, 쿠싱 증후군 등 체중에 영향을 미칠 수 있는 내분비질환 환자 5. 심질환(심부전, 협심증, 심근경색)이 있는 환자 6. 악성종양 또는 폐질환이 있는 환자 7. 담석증 환자 8. 협우각 녹내장 (Narrow angle glaucoma)이 있는 환자 9. 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 환자 10. 섬망, 혼돈 등의 정신적 장애가 있거나 인체적용시험 수행 및 평가에 영향을 미칠만한 정신과적 질환이 있는 자 11. 체중감량을 위해 외과적 수술을 받은 경험이 있는 환자: 위성형술 등 12. 신경성 식욕부진 혹은 신경성 식욕항진 등의 기본 취식기능 이상환자 및 병력이 있는 환자 13. 최근 3개월 이내에 식욕 억제제, 완하제(처방없이) 또는 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬, 암페타민, 싸이프로헵타딘, 페노디아진 또는 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 등과 같이 체중에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있는 환자 14. 중추신경계용약, 또는 중추성 체중감량제를 투여받고 있는 환자 15. 절제 등과 같은 해부학적 변화가 있어, 신체측정평가가 곤란한 환자 16. 호르몬제 및 SSRI 복용자 및 임신부 및 임신가능성 있는 자 17. 최근 1개월 사이 항생제나 생균제(프로바이오틱스)를 섭취한 경우 18. 최근 1개월 이내에 다른 시험약을 복용한 경험이 있는 환자 19. 최근 3개월 이내 금연을 시작하였으나, 흡연과 금연에 대해 불규칙한 습관을 가지고 있는 자 20. 그 외 연구자 평가상 본 인체적용시험에 참여하기에 적절하지 않은 경우 21. 조절되지 않는 고혈압, 당뇨와 김치 흡수에 장애를 일으키는 위염 및 위궤양이 있는 환자	
피험자 모집 및 등록 절차	원내 원외 광고를 통해 피험자를 모집하고 환자 방문 후 연구 전반에 걸쳐 환자 설명을 수행. 본인의 자발적 의지에 의해 인체적용시험 피험자 동의서에 서명한 피험자는 인체적용연구계획서에 따라 스크리닝을 위한 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 선정기준 및 제외기준을 검토하여 인체적용시험에 적합하다고 판단이 되면 Visit 2에서 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정. Visit 2에서 각 피험자에게 고유한 피험자 번호를 배정.	

스크리닝방법	선정기준 및 제외기준에 따라 적합성 여부 스크리닝을 수행함	
동의취득절차	<p>설명하는 한의사 : 김호준, 이신지, 김형구 동의/찬성을 제공자 : 환자 설명과 동의 획득간의 시간 간격 : 72시간 이내 피험자에게 가해지는 부당한 영향을 최소화할 방안 : IRB 심의된 환자 동의서를 바탕으로 한 설명 설명 의사가 사용하는 언어/피험자가 이해하는 언어 : 한국어 피험자에게 제공할 정보의 내용 : 환자 동의서</p>	
대상 질환의 표준치료방법	<p>생활 습관을 개선하여 식사량을 줄이고 운동량을 증가시키는 것과 더불어 운동요법이 필요. 식이 요법은 칼로리 섭취를 줄이는 것이 가장 중요한데, 평소에 섭취하던 열량보다 500~1000kcal 정도를 덜 섭취하도록 권장함. 이러한 생활 습관 개선 이외에도 약물을 통해 비만을 치료하기도 함. 비만 치료에 사용되는 약물의 종류는 크게 식욕억제제와 지방의 흡수를 저해하는 약으로 나눌 수 있고, 장기간 사용이 허가된 약물은 시부트라민(sibutramine)과 오르리스타트(orlistat) 두 가지가 있음. 시부트라민은 식욕억제제의 일종으로 1년 동안 복용할 경우 평균적으로 약 5~9%의 체중을 줄여주나 약으로 인해 두통, 구갈(심한 갈증), 불면증 및 변비 등의 부작용이 발생할 수 있고, 혈압과 맥박수가 다소 증가할 수 있기 때문에 주기적으로 혈압과 맥박수를 체크해야 함</p> <p>오르리스타트는 지방분해효소의 억제제로 체내에서 지방이 소화되지 못하도록 하는 약으로 섭취한 지방의 약 30%는 소화 및 흡수되지 않고 그대로 몸 밖으로 배출. 부작용으로 대변이 자주 마렵거나 지방변 등이 나타날 수 있지만 이러한 증상은 환자 스스로가 섭취하는 지방의 양을 조절함으로써 완화될 수 있음. 수술은 심한 비만 (BMI \geq 40 Kg/m²)인 환자에서 시행을 권장함</p>	
위험/이익평가	연구의 잠재적 위험 :	본 연구는 평소에도 자주 복용하는 김치를 발효여부에 따라 발효 김치와 생김치로 나누어 섭취하는 연구로 최소한의 위험에 해당하는 연구임.
	연구의 잠재적 이익 :	기존 연구를 바탕으로 비만에 대한 김치의 항비만 효과를 기대하고 시행하는 연구로 환자의 증상 완화와 병세 호전에 기여
	위험/이익 분석 결과 :	환자의 증세 호전을 위한 치료법으로 위험/이익을 종합적으로 평가할 때 이 정도의 위험은 이익과 비교하여 적절하다고 판단됨.
연구방법	총 10주간 10회 방문하여 선정 및 김치 배부 및 검사를 통해 변화를 확인함	
유효성평가항목	1차 평가 변수: 체중의 차이 2차 평가 변수: 신체계측(허리둘레, BMI), 체성분(체지방량, 근육량), 혈압, 혈청지질 (Total cholesterol, Triglyceride, HDL LDL cholesterol), 혈당, 인슐린, HOMA, 장내미생물균총 차이, 염증수치(CRP), Microarray 통한 유전자발현변화	
통계분석방법	자료의 통계분석은 SAS 프로그램(SAS/STAT, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용함. 혈액 지표, 혈압, 혈당 및 체성분 자료는 임상시험 개시점과 종료점에 두 군간 independent t-test 를 실시하고 개인별 8주차 측정치와 0주차 측정치의 전후 비교를 위하여 paired t-test를 실시함. 아울러 전체 대상자에 대하여 paired t-test 를 통하여 임상 지표의 전후 비교를 실시함	

임상연구심의위원회 심의결과통보서

주소 : (410-773) 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 전화 : 031-961-9003 전송 : 031-961-9009 담당자 : 오은경

수신	연구책임자	한방재활의학과 김호준		
	연구의뢰자	농림수산식품기술기획평가원		
과제번호	2013-01			
연구제목	장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효김치의 항비만 효과 규명			
심의종류	<input type="checkbox"/> 심의면제 <input checked="" type="checkbox"/> 신규과제심의 <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 지적사항담변심의 <input type="checkbox"/> 지속심의 <input type="checkbox"/> 조기종료/계획취소심의 <input type="checkbox"/> 종료보고심의 <input type="checkbox"/> 결과보고심의 <input type="checkbox"/> 이의신청심의 <input type="checkbox"/> 이상반응심의 <input type="checkbox"/> 계획변경심의 <input type="checkbox"/> UP심의 <input type="checkbox"/> 기타심의			
회의 종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의			
회의 차수	91차	심의 일자	2013.02.06.	
참석자명단	이명중, 한창호, 임지연, 김재은, 대엽스님, 정승현, 이승덕, 최동준, 배효상, 오은경			
연구 종류	<input type="checkbox"/> 유전자검사 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자치료 <input type="checkbox"/> 유전자은행 <input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 생물학적제제 <input type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 관찰연구 <input type="checkbox"/> 의무기록이용연구 <input type="checkbox"/> 검체이용연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 () <input checked="" type="checkbox"/> 연구용 <input type="checkbox"/> 국내 허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외 허가용 (국가명 :) <input type="checkbox"/> 제1상 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input checked="" type="checkbox"/> 학술연구 <input type="checkbox"/> 생동성시험 <input type="checkbox"/> 기타			
	심의목록			
	임상연구과제신청서 및 관련첨부자료			
	심의내용 주요 논의사항 요약 : 본 연구는 본원에 2013년 IRB 승인일 이후부터 2013년 12월 19일까지 체질량지수 25kg/m ² 이상의 비만환자 중 만 30세 이상 60세이하의 여성을 대상으로 비만개선 및 대사 개선효과 확인, 장내미생물 변화 확인, 비만 관련 유전자 발현 확인을 목적으로 하는 연구임. 임상연구계획서, CRF의 지적사항이 시정되어 승인함.			
지속심의 주기	1년	승인유효기간	2014.02.05.	
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지 또는 보류 이상반응보고 심의결과의 승인은 임상연구지속을 의미합니다.			

- * 귀하가 신청하신 심의 안건에 대하여 본 임상연구심의위원회의 심의결과를 위와 같이 알려드립니다.
- * 연구책임자는 IRB심의결과에 이의가 있는 경우 IRB통보일로부터 2주 이내에 서면으로 이의 사유를 기록하여 이의를 제기할 수 있습니다. 단, 동일 사안에 대하여 2회 연속으로 신청할 수는 없습니다.
- * 본 임상연구심의위원회는 KGCP 및 ICH-GCP 규정을 준수하며 생명윤리및안전에관한법률 등 관련 법규를 준수합니다.
- * 임상시험 문서보관에 관한 사항은 관련 법률 및 규정에 따르며, 비용 등 관련절차는 담당자와 상의하시기 바랍니다.
- * 품목허가 대상 과제인 경우 종료보고일로부터 매 6개월마다 품목허가 관련사항을 보고하여 주시기 바라며, 1년 이상 품목허가 관련 보고가 지연되는 경우, 본원 종료보고일을 품목허가일로 간주하여 보관기한이 산정 적용됨을 알려드립니다.

동국대학교일산한방병원 임상연구심의위원회 (직인)



IRB SOP ver2.0_20120619

2. 인체 적용 시험 수행

- 기관: 동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과
- 실시 체계

Table 4. The progress chart for clinical trial with Kimchi administration to obesity patients.

내용	Screening		기간								
	-2		0	1	2	3	4	5	6	7	8
주 (weeks)	1	·	2	3	4	5	6	7	8	9	10
방문 차수	X										
전화 선별	X										
서면동의서	X										
인구학적조사, 흡연, 운동, 임신여부 조사											
과거력투약력조사	X										
피험자 교육	X →										
신체계측			X	X	X	X	X	X	X	X	X
혈액검사	X										X
체성분 검사	X		X				X				X
투약 변화 확인	X →										
피험자 선정 · 제외		X									
무작위 배정			X								
활력 징후	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
2) 분변용기배부	X		X							X	
3) 분변획득			X	X							X
발효김치/ 생김치 배포			X	X	X	X	X	X	X	X	
부작용 이상반응기록	X →										

○ 피험자 모집 및 시험 수행

- 23명의 피험자가 8주간의 연구를 모두 마침. 1명은 개인적인 이유로 연구를 중단함.
- 연구전반을 거쳐 특별한 부작용은 보고되지 않음.
- 연구 개시 전 기저치(성별 비만도 및 혈액검사 등)는 발효김치군과 생김치군 간 통계적인 차이는 없었음.

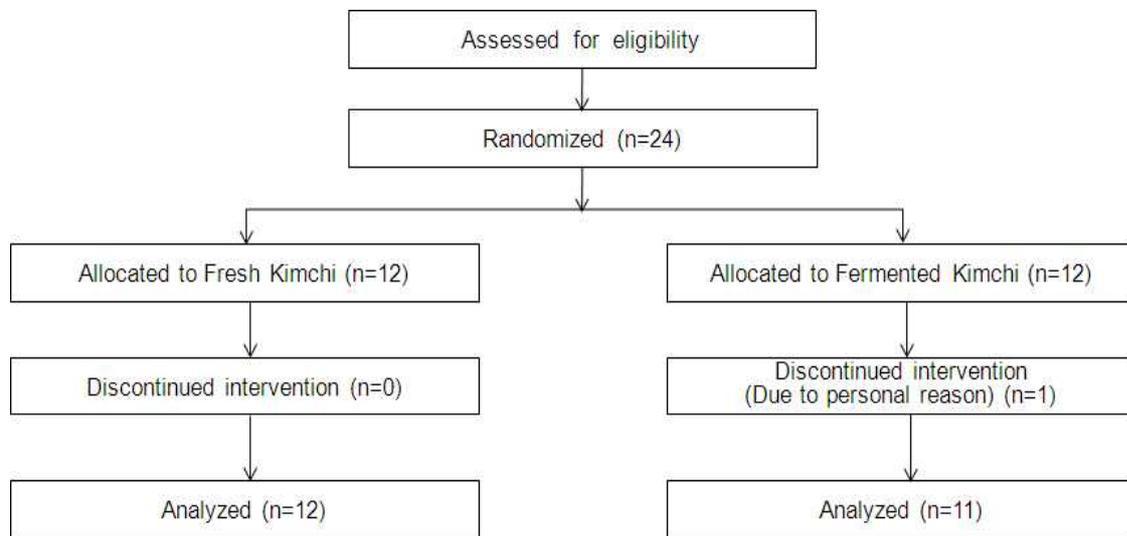


Fig 11. The Flow chart of clinical trial with kimchi administration

4절. 생김치 및 발효김치 제조 조건 확립

1. 방법

○ 김치 숙성 과정 모니터링

- 피험자에게 제공될 김치의 발효과정을 모니터링하여 최적의 숙성 상태에서 제공함을 보장하기 위하여 김치의 pH, 산도, 환원당 및 젖산균 수를 정기적으로 측정함.
- 이화학 실험에 사용할 김치와 피험자에게 제공될 김치의 보관을 구분하고 시료의 출입 시 공기 유입을 최소화함.
- pH 및 산도 측정 : 숙성 기간별 김치의 pH는 김치를 마쇄한 후 여과한 김치즙액을 pH meter (Metrohm, USA))를 사용하여 실온에서 측정. 산도는 김치즙액을 10 mL을 취하여 AOAC방법으로 측정하는데, pH 8.1이 되도록 0.1N NaOH로 적정하여 적정 값은 Lactic acid로 환산하고 함량 %로 나타냄(Sigma Aldrich, MO, USA).
- 젖산균수 측정: 평판계수법 (plate count technique)을 이용하여 젖산균(Lactobacillus sp., Leuconostoc sp.)의 수를 측정함. 즉, 시료액 1 mL를 멸균한 증류수로 단계적으로 101~108까지 희석한 후 희석액 1 mL씩을 멸균한 Lactobacillus sp. 선택 배지와 Leuconostoc sp. 선택 배지에 넣고 혼합한 후 petri dish에 평판을 만들어(BD Difco, Maryland, USA) Lactobacillus sp.는 30°C에서 3일간, Leuconostoc sp.는 20°C에서 5일간 각각 배양하여 colony의 개수를 측정하였다(Lab house, Seoul, Korea). Lactobacillus sp. 선택 배지는 Pediococcus의 생육을 억제하기 위하여 젖산균 분리에 주로 쓰이는 MRS agar 배지에 acetic acid와 sodium acetate를 첨가한 modified LBS agar medium (m-LBS medium)을 사용하였으며 Leuconostoc sp. 배지는 phenylethyl alcohol sucrose agar medium (PES medium)를 사용함.

○ 김치 시료 제조 및 제공 방법의 표준화

- 김치시료는 김치 제조 시설로서 식약청 HACCP 인증을 받은 한성식품(경기도, 한국)에서 제조한 후 생김치 또는 발효김치 상태로 피험자에게 제공함.
- 김치 재료는 모두 국산으로 제한하였고 제조 레시피는 Table 4에 나타난 바와 같음.
- 임상 시험에 제공된 김치는 제조 전 기간에 걸쳐 연구진이 품질 모니터링을 실시하였으며 발효김치의 기준은 pH 4.6 ± 0.1 , 산도 $0.5 \pm 0.1\%$ 로 정의하였음.
- 김치 시료의 보관온도 및 보관 기간에 따른 김치의 품질 변화를 예측하기 위하여 김치 냉장고와 일반 냉장고의 보관 온도인 -1°C 와 4°C 에서 각각 김치의 산도, pH, 총젖산균수의 변화를 살펴본 결과, 발효김치는 보관 온도에 따른 산도와 pH가 보관 기간이 경과하더라도 크게 변하지 않았으나 생김치는 4°C 에서 보관할 경우 4일이 경과한 후부터 pH의 급격한 감소가 나타났음. 산도도 마찬가지로 생김치의 경우 4°C 에서 보관 4일이 경과한 시점부터 증가폭이 커지는 것으로 나타났음. 총젖산균수는 생김치 발효김치 모두 제조 후 3일까지는 변화량이 완만하였으나 4일째부터 증가폭이 상승하였음.
- -1°C 에 보관할 경우 생김치 발효김치 모두 제조 후 10일이 경과하여도 pH와 산도의 변화가 미미하였으며 특히 4일까지는 발효의 지연이 가능할 것으로 판단되었기에 본 임상시험에서는 김치 시료라는 특성으로 인하여 김치 냉장고를 보유하고 있는 사람에 한해 피험자를 모집하였

으며 김치 냉장고의 사용방법을 교육함으로써 피험자가 시료를 보관하는 동안 생길 수 있는 시료의 품질 열화를 최소화하고자 노력하였음.

- 표준레시피에 따라 일정한 시각에 제조한 김치는 익일에 배송전문업체에 의해 운송되어 피험자에게 전달하였음. 생김치는 냉장 탑차 및 보냉주머니와 아이스팩을 이용하여 격일로 배송하였고 발효김치는 동일한 방법으로 주 1회 배송하였으며 반드시 -1에 보관하였다가 먹도록 시료 제공시마다 피험자를 교육하였음.
- 피험자에게 제공된 모든 김치 시료는 배송 시점부터 -1℃에서 1주간 보관하면서 위에서 언급한 방법에 따라 산도, pH 및 총젓산균수를 측정하면서 발효 정도를 엄격하게 모니터링하였음. 요약하면, 제시된 재료 및 레시피에 따라 전일 오후 4-5시경에 제조 완료된 배추김치는 60g씩 개별 포장하여 생김치로 제공될 것은 -1℃에 보관하였다가 익일 아침 일찍 냉장탑차로 개인 피험자의 가정으로 배송 전달하였음. 발효김치는 제조 후 24시간 실온에서 숙성시킨 후 냉장고로 옮겨 14-15일 동안 발효를 진행하면서 pH와 산도를 주기적으로 모니터링하였으며 pH 4.6±0.1, 산도 0.5±0.1%에서 발효를 중지하여 살얼음이 얼 정도의 온도에 보관한 후 익일 아침 냉장탑차로 병원으로 배송하여 피험자에게 전달하였음.

Table 4. Ingredients of Kimchi

Ingredients of kimchi	(g)
Salted cabbage	67.2
Red pepper powder	4
Red pepper	0.1
Shredded radish	14.4
Garlic	2.9
Ginger	0.1
Onion	0.3
Sugar	1.1
Extract of sea tangle	0.3
Pickled shrimp	1.6
Pickled anchovy sause	1.1
Pickled anchovy sause	0.9
Glutinous rice porridge	2.3
Pear	1.4
Leaf mustard	1.4
Leak	0.7
Starch syrup	0.1
Sun dried salt	0.1

2. 결과

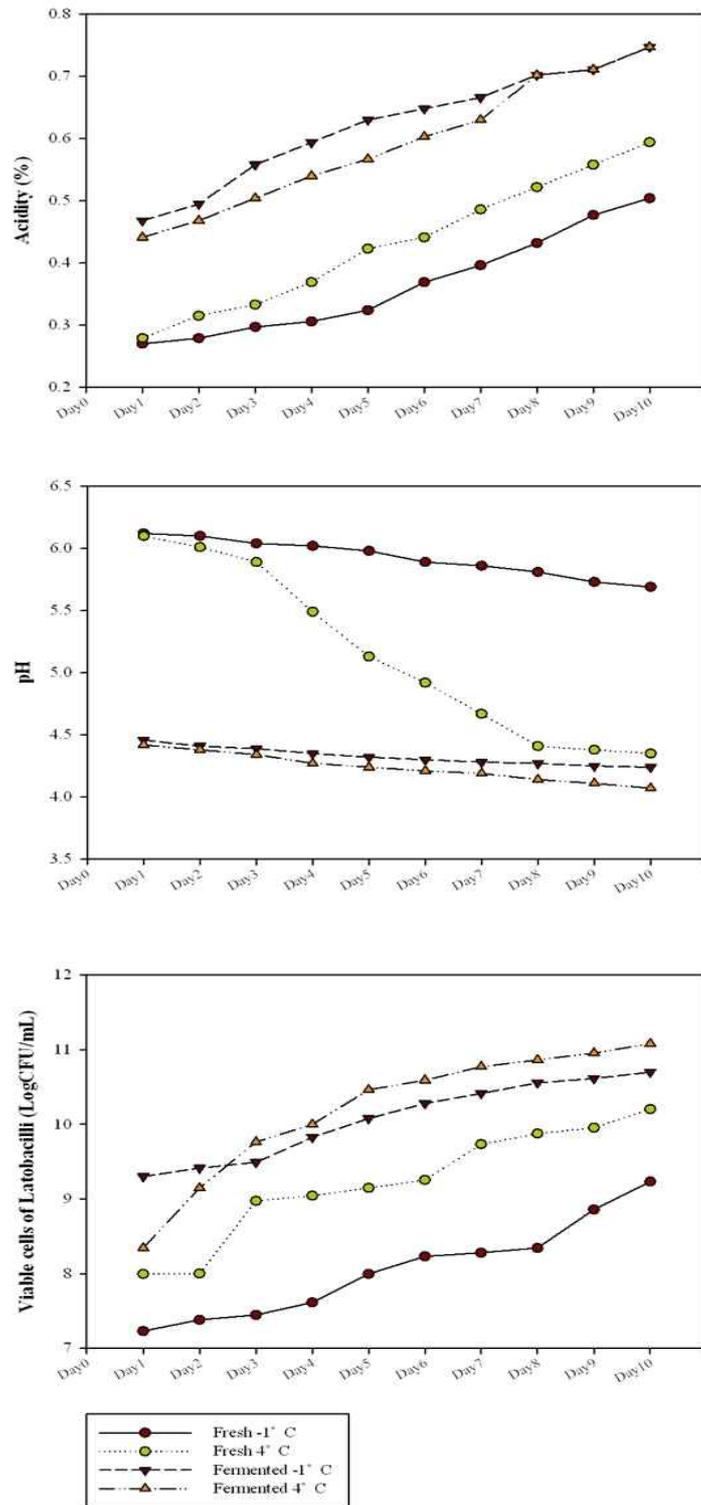


Fig 10. Kimchi quality control

5절. 피험자별 다이어트 플랜 수립 및 통제

1. 방법

○ 피험자의 식단 모니터링

- 본 연구에서는 김치의 제조방법 표준화를 통하여 임상시험기간 동안 제공한 김치의 발효도, 분량, 섭취 시기 등을 엄격하게 관리함.
- 자유롭게 일상생활을 하는 피험자의 식사내용을 10주간 완전 통제하는 것은 대상자의 동의 획득 및 예산 지원 측면에서 불가하므로 피험자들이 평상시 식사패턴을 유지하도록 허용하되 제공한 김치 외의 김치 섭취 및 유산균 제제의 사용을 제한하기 위하여 식사내용의 정기적 모니터링을 실시함.
- 식사내용 수집방법 표준화를 위하여 동일한 임상간호사가 전 대상자를 개별적으로 심층 면담하여 식사력 및 식품 섭취 관련 자료를 수집함. 평상시 섭취량을 반영하기 위하여 임상시험 기간이 진행되는 10주 동안 총 10회 면담하였으며 주중과 주말의 적절한 조합을 위하여 요일에 상관없이 주중 7일, 주말 3일에 해당하는 식품섭취 자료를 수집하여 분석한 후 평균치를 분석에 활용함. 식품섭취 자료는 CAN-Pro 4.0(한국영양학회(사), 서울, 한국)을 이용하여 에너지 및 각종 영양소 수준에서 분석함.
- 식사내용의 통제를 위하여 계획된 스마트폰, PC 또는 디지털카메라를 이용한 식사 내용의 촬영, 전송 및 분석 결과의 전송 등은 피험자들의 협조 부족으로 인하여 시행하지 못함.
- 임상 시험 개시 전 피험자의 일반적인 생활양식에 대하여 개별 면접 조사한 결과 모든 대상자가 중등도 이하의 신체 활동을 하는 것으로 나타났으므로 임상 시험 참여 기간 중 평상시 수준의 신체 활동을 유지해 줄 것을 요구함.

○ 피험자의 유산균 섭취 수준 파악을 위한 식품섭취빈도조사지(LFFQ) 개발

- 피험자가 평상시 섭취하는 유산균 함량의 추정을 위하여 유산균이 함유된 발효식품 20가지로 구성된 간이유산균섭취빈도조사지를 개발(LFFQ)함. LFFQ 항목 선정은 식품공전과 학술 논문 등을 참고하여 각 식품의 1 g 또는 1 mL에 포함된 평균적인 유산균 함량을 참고함.
- 개발된 유산균섭취빈도조사지는 Table 5와 같으며 호상요구르트, 액상 요구르트 등 유제품, 배추김치, 깍두기 등 김치류, 된장, 고추장 등 장류, 장아찌 등 19가지 식품과 유산균 제제인 프로바이오틱스를 포함하여 총 20개 항목으로 구성하고 섭취 빈도는 9점 척도법(거의 안먹음~1일 3회)을 이용함.
- 각 항목의 1회 분량은 한국인영양섭취기준에서 제시한 성인 1회 분량(한국영양학회), 국민건강영양조사보고서(질병관리본부), 식품교환표(대한영양사협회) 등 최근에 발표된 관련 논문에 수록된 내용을 참고하여 식품 또는 음식의 1회 분량을 결정함. 섭취빈도와 1회 분량에 포함된 유산균 함량을 곱하여 평균 1일 유산균 섭취량을 추정함.

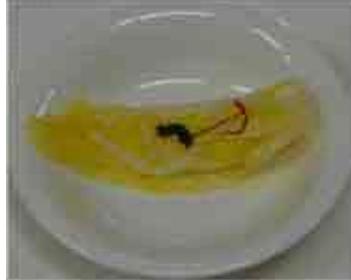
유산균 섭취 빈도 조사지

다음은 귀하께서 평소 섭취하는 유산균 양을 대략적으로 조사하기 위한 섭취빈도조사지입니다. 제시한 각 항목을 최근 1년 동안 얼마나 섭취하셨는지 답해 주십시오. (1회 평균 섭취량 및 지난 1년간 평균 섭취 빈도)

식품명	섭취빈도 (회)	1회 평균 섭취량				거의 안 먹음	1개월		1주			1일		
							1	2~3	1	2~4	5~6	1	2	3
 1.농후발효유(호상)	1개(110g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2										
 2.농후발효유(액상)	1병(200g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2										
 3.유산균 음료	1병(150g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2										
 4.요구르트 아이스크림	1컵(100g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2										

	1포(2g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
5. 프로바이오틱스(유산균제)													
식품명 / 섭취빈도 (회)	1회 평균 섭취량				거의 안 먹음	1개월		1주			1일		
						1	2~3	1	2~4	5~6	1	2	3
	1큰술가락(18g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
6. 고추장													
	1큰술가락(18g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
7. 된장													
	1컵-밥공기(200g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
8. 막걸리													
	1숟가락(20g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
9. 자연치즈(모짜렐라치즈)													

 10.젓갈(오징어, 창란 등)	1순가락(18g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
식품명 / 섭취빈도 (회)	1회 평균 섭취량				거의 안 먹음	1개월		1주			1일		
						1	2~3	1	2~4	5~6	1	2	3
 11.배추김치	12쪽(40g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
 12.부추김치	20줄(25g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
 13.파김치	6쪽(25g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									
 14.깍두기	7~88조각(40g)				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2									

	1/2공기(60g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
15. 동치미	① 1/2 ② 1 ③ 1 1/2 ④ 2									
식품명 / 섭취빈도 (회)	1회 평균 섭취량	거의 안 먹음	1개월		1주			1일		
			1	2~3	1	2~4	5~6	1	2	3
	1/2공기(60g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
16. 나박김치	① 1/2 ② 1 ③ 1 1/2 ④ 2									
	4~5잎(40g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
17. 백김치	① 1/2 ② 1 ③ 1 1/2 ④ 2									
	1/2공기(60g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
18. 열무물김치	① 1/2 ② 1 ③ 1 1/2 ④ 2									
	1병(200g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19. 혼합과채음료	① 1/2 ② 1 ③ 1 1/2 ④ 2									

	10~11조각(50g)													
	① 1/2	② 1	③ 1 1/2	④ 2	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	

20.오이피클

○ 통계방법

자료의 통계분석은 SAS 프로그램(SAS/STAT, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하였으며 평균과 표준편차를 이용하여 데이터를 기술함. 24시간 회상법을 이용하여 수집한 주중 7일과 주말 3일에 대한 식사섭취 자료는 영양소분석 프로그램인 CAN-Pro 4.0(한국영양학회, 서울, 한국)을 이용하여 에너지 및 영양소로 환산한 후 전체 대상자 및 생김치군과 발효김치군의 1일 평균 에너지 및 영양소 섭취량의 평균과 표준편차를 제시함. 유산균섭취빈도조사지의 내용은 문헌에서 제시한 평균 유산균 함량을 참고하여 1회분량에 대한 유산균 함량을 계산한 후 개인별 20가지 식품을 통하여 섭취한 1일 평균 유산균 함량을 각각 구한 후 t-test를 이용하여 군간 비교함.

2. 결과

○ 에너지 및 영양소 섭취 실태

- 10주간 매주 1회 식사내용의 모니터링 결과 제공한 김치 외의 김치를 섭취하거나 유산균 제제 등을 이용한 피험자는 확인되지 않았음.
- 표준화된 24시간 회상법을 이용하여 피험자의 주중 7일과 주말 3일의 식품 섭취 내용을 분석한 결과 에너지의 평균 섭취량은 1958.90 kcal 로 나타남. 생김치군과 발효김치군의 평균 에너지 섭취량은 각각 1883.14 kcal 및 2041 kcal로서 군간 유의성은 나타나지 않았음. 총 지질의 섭취량은 군 간 차이가 없음에도 불구하고 포화지방산과 단일불포화지방산, 트랜스지방산의 섭취량이 발효김치군에서 유의하게 높게 나타났음. 그 외 단백질, 총 지질, 고도불포화지방산, 콜레스테롤 섭취량은 군간 유의성이 없었음 (Table 6).
- 식사를 통한 비타민 섭취량을 살펴보면 지용성 비타민인 비타민 A와 K는 발효김치군이 생김치 군에 비하여 유의하게 높았으며 수용성 비타민은 판토텐산을 제외하고는 유의적인 차이를 보이지 않았음 (Table 6).
- 식사를 통한 무기질 섭취량을 살펴보면, 칼슘은 발효김치군과 생김치군이 각각 715.57 mg, 493.33 mg을 섭취하였으며 유의적인 차이를 나타내었음. 그 외 나트륨, 염소, 요오드 섭취량 또한 발효김치군이 생김치군에 비하여 유의하게 높게 나타난 반면 불소 섭취량은 생김치 군이 발효김치군에 비하여 유의하게 높았음 (Table 8).

Table 6. Comparison of energy and macro nutrient intake between fresh and fermented Kimchi groups

Variables	Total (n=23)	Fresh Kimchi (n=12)	Fermented Kimchi (n=11)	P value ¹⁾
Energy	1958.90 ± 628.90	1883.14 ± 735.41	2041.56 ± 510.68	0.2609
Carbohydrates	282.52 ± 92.29	260.25 ± 115.77	306.81 ± 52.43	0.0185
Fiber	27.70 ± 13.44	25.20 ± 12.55	30.43 ± 14.44	0.6492
Protein	82.72 ± 32.20	81.37 ± 32.13	84.19 ± 33.78	0.8661
Lipid	59.33 ± 23.35	59.37 ± 23.88	59.29 ± 23.93	0.9879
SFA	9.58 ± 4.69	7.86 ± 2.27	11.45 ± 5.94	0.0039
MUFA	12.21 ± 5.40	10.57 ± 3.21	14.00 ± 6.79	0.0212
PUFA	9.32 ± 4.78	8.55 ± 3.64	10.16 ± 5.85	0.1352
n-6 PUFA	8.22 ± 4.45	7.64 ± 3.27	8.86 ± 5.56	0.0963
n-3 PUFA	1.09 ± 0.61	1.06 ± 0.54	1.13 ± 0.71	0.36.5
TFA	29.86 ± 14.30	26.99 ± 8.72	32.98 ± 18.59	0.0199
Cholesterol	396.77 ± 160.06	374.52 ± 137.16	421.05 ± 185.54	0.3359
Water	985.14 ± 296.30	979.71 ± 291.24	991.06 ± 315.86	0.7898

1) Independent t-test was performed.

Table 7. Comparison of vitamins intake between fresh and fermented Kimchi groups

Variables	Total (n=23)	Fresh Kimchi (n=12)	Fermented Kimchi (n=11)	P value ¹⁾
Vitamin A	162.14 ± 109.96	133.12 ± 68.12	193.81 ± 139.23	0.0273
Vitamin D	3.16 ± 1.34	2.83 ± 1.13	3.52 ± 1.51	0.3627
Vitamin E	19.57 ± 9.50	19.12 ± 8.86	20.05 ± 10.57	0.5692
Vitamin K	289.58 ± 160.69	258.36 ± 93.15	323.63 ± 211.70	0.0121
Vitamin C	144.52 ± 51.60	139.02 ± 46.49	150.52 ± 58.36	0.1666
Vitamin B1	1.47 ± 0.57	1.43 ± 0.65	1.51 ± 0.50	0.4312
Vitamin B2	1.54 ± 0.68	1.49 ± 0.70	1.59 ± 0.68	0.9293
Niacin	18.53 ± 7.67	18.15 ± 6.83	18.96 ± 8.81	0.4177
Vitamin B6	2.01 ± 0.75	1.95 ± 0.86	2.07 ± 0.65	0.3965
Folate	597.26 ± 216.03	562.67 ± 210.25	635.00 ± 225.93	0.8122
Vitamin B12	11.62 ± 7.23	10.30 ± 5.26	13.06 ± 8.97	0.0940
Pantothenic acid	4.50 ± 1.44	4.44 ± 1.88	4.57 ± 0.83	0.0156
Biotin	16.85 ± 4.81	15.94 ± 4.57	17.85 ± 5.07	0.7355

1) Independent t-test was performed.

Table 8. Comparison of minerals intake between fresh and fermented Kimchi groups

Variables	Total (n=23)	Fresh Kimchi (n=12)	Fermented Kimchi (n=11)	P value ¹⁾
Calcium	599.62 ± 321.97	493.33 ± 181.93	715.57 ± 404.11	0.0145
Phosphorus	1222.67 ± 505.23	1167.52 ± 544.61	1282.82 ± 477.15	0.6843
Sodium	4497.82 ± 1850.38	4063.70 ± 1028.67	4971.41 ± 2428.12	0.0089
Chloride	426.94 ± 271.58	421.78 ± 182.05	432.56 ± 354.60	0.0337
Potassium	3435.60 ± 1577.03	3158.14 ± 1204.35	3738.28 ± 1919.06	0.1421
Magnesium	100.30 ± 39.09	101.32 ± 33.43	99.20 ± 46.15	0.3051
Iron	18.16 ± 6.88	17.23 ± 6.78	19.18 ± 7.16	0.8530
Zinc	11.50 ± 4.40	11.17 ± 4.33	11.86 ± 4.66	0.8061
Copper	1.35 ± 0.55	1.33 ± 0.63	1.36 ± 0.49	0.4152
Fluoride	36.44 ± 48.23	47.23 ± 64.87	24.66 ± 14.04	0.0001
Manganese	4.06 ± 1.85	3.70 ± 2.02	4.45 ± 1.65	0.5307
Iodine	572.45 ± 1476.09	304.94 ± 372.42	864.28 ± 2112.18	0.0001
Serine	103.66 ± 38.54	102.06 ± 41.80	105.41 ± 36.59	0.6820

1) Independent t-test was performed.

- 식사를 통한 아미노산의 섭취량은 군간 유의적인 차이가 비교적 높았음. 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파르틱산, 라이신, 메티오닌, 히스티딘, 트립토판, 타우린은 발효김치군이 생김치군에 비하여 유의하게 높게 섭취하였음 (Table 9).

Table 9. Comparison of amino acids intake between fresh and fermented Kimchi groups

Variables	Total (n=23)	Fresh Kimchi (n=12)	Fermented Kimchi (n=11)	P value ¹⁾
Glycine	2393.97 ± 1209.90	2167.56 ± 713.58	2640.97 ± 1591.14	0.0141
Alanine	3134.56 ± 1438.68	2816.94 ± 887.85	3481.05 ± 1852.93	0.0234
Serine	2248.12 ± 988.33	1962.97 ± 624.49	2559.19 ± 1231.24	0.0355
Proline	3393.01 ± 1115.07	3044.41 ± 765.54	3773.30 ± 1336.36	0.0813
Valine	2936.92 ± 1392.50	2661.97 ± 998.13	3236.88 ± 1726.37	0.0862
Threonine	2137.72 ± 1103.10	1892.79 ± 672.39	2404.93 ± 1424.50	0.0209
Cysteine	575.60 ± 227.99	514.37 ± 197.55	642.39 ± 249.03	0.4584
Isoleucine	2532.45 ± 1176.96	2316.31 ± 860.60	2768.24 ± 1454.50	0.0997
Leucine	4350.96 ± 2081.76	3926.84 ± 1467.56	4813.63 ± 2591.10	0.0755
Glutamic acid	8689.80 ± 3344.68	7775.70 ± 2359.61	9686.99 ± 4048.47	0.0907
Aspartic acid	4748.55 ± 2266.45	4198.49 ± 1412.54	5348.61 ± 2889.12	0.0272
Lysine	3122.22 ± 1787.36	2784.68 ± 1024.31	3490.44 ± 2363.96	0.0107
Methionine	1278.61 ± 637.76	1156.06 ± 415.99	1412.27 ± 816.58	0.0366
Histidine	1833.54 ± 886.51	1670.78 ± 530.92	2011.10 ± 1162.96	0.0162
Phenylalanine	2432.41 ± 1081.33	2192.07 ± 809.21	2694.60 ± 1306.58	0.1315
Arginine	3724.14 ± 1527.72	3446.22 ± 1310.86	4027.32 ± 1746.61	0.3602
Tyrosine	1806.17 ± 780.40	1620.87 ± 578.03	2008.31 ± 941.36	0.1250
Tryptophan	589.54 ± 297.68	495.72 ± 137.42	691.89 ± 389.99	0.0019
Taurine	38.90 ± 129.12	55.11 ± 174.68	21.20 ± 49.55	0.0004
Sulfuric amino acid	1854.21 ± 854.56	1670.46 ± 609.88	2054.67 ± 1054.85	0.0862
Aromatic amino acid	4238.57 ± 1858.55	3812.94 ± 1382.54	4702.91 ± 2245.46	0.1270

1) Independent t-test was performed.

- 유산균빈도섭취조사지를 통하여 평상 시 섭취하는 유산균의 양을 추정한 결과, 생김치군과 발효김치군의 유산균 섭취량은 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (Table 10).

Table 10. Comparison of estimated daily amount of LAB based on LAB consumption frequency questionnaire between fresh and fermented Kimchi groups

Variable	Total (n=23)	Fresh Kimchi (n=12)	Fermented Kimchi (n=11)	P value ¹⁾
LAB ($\times 10^{12}$)	9.15 \pm 10.87	7.38 \pm 5.27	11.07 \pm 14.88	0.4510

LAB: estimated daily amount of lactic acid bacteria via 20 selected lactic acid bacteria-rich food consumption frequencies. 1) Independent t-test was performed.

6절. 김치의 체성분 및 대사 마커 개선 효과 확인

1. 방법

○ 체성분 및 대사마커 측정

- 체중은 검진용 가운을 입은 채로 0.1kg단위까지 전자체중계로 측정함. (G-tech, Uijeongbu, Korea). 키는 동일한 체중 측정과 같은 기기로 0.5cm 단위까지 측정함.
- 복부둘레는 동일한 측정자에 의해 WHO 방법에 의거하여 직립자세에서 최하위 늑골하부와 골반 장골능과의 중간부위 (전상장골극 3cm 상부) 둘레를 측정함.
- 체성분 검사는 오전 공복에 Inbody 3.0(InBody 3.0, Biospace, Seoul, Korea)으로 측정함.
- 활력징후의 측정
- 혈압은 10분 이상 안정을 취한 후 자동 혈압계로 앉은 상태에서 방문 시마다 측정한다. 매 회 안정시간을 두고 총 3회 측정하여 평균값을 취함.
- 측정횟수: 체성분검사와 BMI는 최초 방문 및 4주, 8주에 총 3회 측정. 체중, 복부둘레, 혈압, 맥박은 매회 방문 시 측정함.
- 혈액검사는 초회 방문 시와 최종 방문에 12시간 공복 후 채혈하여 실시함.
- Cobas 8000 modular analyzer(Roche, Brandford, CT, USA)를 이용하여 AST/ALT, Total cholesterol, Triglyceride, HDL cholesterol, FBS, CRP, CBC를 검사함.
- 초회 방문 시 임신선별검사로 Urine HCG를 수행함.

2. 결과

- 임상 시험 개시점과 8주 후에 측정한 비만 관련 신체계측치, 생화학적 검사치 및 혈압의 개인 별 차이값(8주차 값 - 0주차 값)이 유의하게 달라졌는지 알아본 결과, 발효김치군은 이완기 혈압이 유의하게 감소하였고 생김치군은 허리둘레 및 체지방율이 유의하게 감소하였으며 수축기 혈압 또한 유의하게 감소하였음. 그 외 지표들은 유의한 감소 또는 증가가 나타나지 않았음 (Table 11).
- 생김치, 발효김치 구분없이 김치를 8주간 섭취한 모든 피험자에 대하여 임상마커의 전후비교를 한 결과 허리둘레 및 체지방율이 유의하게 감소하였고 ($p < 0.01$)(Table 12). 혈중 지질 성분은 총콜레스테롤($p = 0.05$)과 고밀도지단백질($p < 0.01$) 수준이 유의하게 감소함. 또한 수축기 및 이완기 혈압의 유의한 감소가 확인됨 ($p < 0.01$). 이와 같은 결과로 볼 때, 발효김치가 생김치에 비하여 항비만 효과가 유의하게 높을 것이라는 본 연구의 가설은 입증되지 못하였으나 김치 자체의 항비만 효과는 어느 정도 확인된 것으로 사료됨.

Table 11. Comparison of difference of the initial and final figures for selected anthropometric, clinical, and blood pressure variables between fresh and fermented Kimchi groups

Variables	Total (n=23)	Fresh Kimchi (n=12)		Fermented Kimchi (n=11)			p-value*	
	Mean±SD	Mean±SD	t	p	Mean±SD	t		p
Body weight (kg)	-0.43 ± 1.41	-0.44 ± 1.56	-0.98	0.3481	-0.41 ± 1.30	-1.04	0.3221	0.9571
Waist circumference (cm)	-1.74 ± 2.94	-1.56 ± 1.94	-2.78	0.0181	-1.95 ± 3.84	-1.68	0.1235	0.7676
BMI (kg/m ²)	-0.20 ± 0.54	-0.20 ± 0.59	-1.22	0.2468	-0.18 ± 0.52	-1.17	0.2708	0.9102
Body fat percentage (%)	-1.63 ± 2.63	-1.85 ± 2.82	-2.27	0.0442	-1.39 ± 2.52	-1.83	0.0971	0.6860
FBS (mg/dL)	-0.09 ± 4.91	-0.75 ± 5.71	-0.46	0.6578	0.64 ± 4.01	0.53	0.6099	0.5113
TG (mg/dL)*	8.41 ± 46.45	19.09 ± 59.04	1.54	0.1519	-2.27 ± 28.18	-0.27	0.7945	0.2967
Cholesterol (mg/dL)	-9.35 ± 21.65	-8.75 ± 25.24	-1.20	0.2550	-10.00 ± 18.15	-1.83	0.0977	0.8937
HDL-cholesterol (mg/dL)	-4.30 ± 6.76	-3.83 ± 7.94	-1.67	0.1227	-4.82 ± 5.53	-2.89	0.0161	0.7357
Insulin, fasting (mg/dL)	0.25 ± 3.75	-0.92 ± 3.06	-1.04	0.3224	1.52 ± 4.14	1.22	0.2501	0.1209
CRP (mg/dL)	0.03 ± 0.16	0.01 ± 0.02	1.27	0.2308	0.06 ± 0.23	0.90	0.3892	0.4619
Systolic BP (mmHg)	-7.23 ± 11.60	-7.54 ± 11.15	-2.44	0.0326	-6.91 ± 12.57	-1.82	0.0982	0.9040
Diastolic BP (mmHg)	-5.82 ± 7.98	-3.55 ± 6.50	-2.04	0.0656	-8.10 ± 8.95	-3.00	0.0134	0.1799
Pulse rate (bpm)*	-0.95 ± 5.90	1.27 ± 5.95	0.71	0.4944	0.64 ± 6.12	0.34	0.7373	0.8072

* TG 및 pulse rate는 이상치로 나타난 피험자(id=R01-22 및 id=R01-11)를 제외한 나머지 관측치만 분석에 이용함.

** p-values for the group differences by independent t-test between fresh and fermented kimchi groups

Table 12. Comparison of difference of the initial and final figures for selected anthropometric, clinical, and blood pressure variables of total subjects.

Variables	Mean ± SD (n=23)	t-value	p-value
Body weight (kg)	-0.43 ± 1.41	-1.45	0.1616
Waist circumference (cm)	-1.74 ± 2.94	-2.85	0.0093
BMI (kg/m ²)	-0.20 ± 0.54	-1.72	0.0986
Body fat percentage (%)	-1.63 ± 2.63	-2.97	0.0070
FBS (mg/dL)	-0.09 ± 4.91	-0.08	0.9330
TG (mg/dL)*	8.41 ± 46.45	0.85	0.4054
Cholesterol (mg/dL)	-9.35 ± 21.65	-2.07	0.0503
HDL-cholesterol (mg/dL)	-4.30 ± 6.76	-3.05	0.0058
Insulin, fasting (mg/dL)	0.25 ± 3.75	0.32	0.7502
CRP(mg/dL)	0.03 ± 0.16	1.05	0.3061
Systolic BP (mmHg)	-7.22 ± 11.33	-3.06	0.0058
Diastolic BP (mmHg)	-5.78 ± 7.80	-3.56	0.0018
Pulse rate (bpm)*	0.95 ± 5.90	0.76	0.4564

*TG 및 Pulse rate 는 각각 이상치로 나타난 관측자인 id=R01-22 및 id=R01-11을 제외한 나머지 관측치만 분석에 이용함.

** p-values for the group differences by independent t-test between fresh and fermented kimchi groups

7절. 장내미생물 양상 개선 효과 확인

1. 방법

○ 채변 : 피험자로부터 김치 복용 전에 1회, 김치 복용 1주일 후, 종료 후 1회로 총 3회에 걸쳐 분변을 제출 받음. 특히 전화 예약 시 주소를 받아 미리 분변 채취통을 보내 첫 내원시 채취된 분변을 갖고 오도록 함.

○ 분변 DNA 추출

- 분변을 제출받는 즉시 -80℃에 저장함.
- DNA 추출은 QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) 를 사용함.
- 샘플당 약 200mg의 분변을 DNA 추출을 위해 사용하는데, proteinase K를 분변 샘플에 처리하고 SL buffer를 이용하여 녹인후 동결화된 분변을 60도에서 10분간 처리후 5분간 12,000 rpm으로 원심분리함.
- 그 결과로 나온 상등액을 incubation하고 원심분리 하며 마지막으로 bound DNA를 컬럼에서 elution buffer를 이용하여 녹여 분리하고 원심분리함. 녹여 분리한 DNA의 순도는 spectrophotometer 을 이용하여 A260/A280에서 측정함.
- Real time PCR로 비만환자에서 비만정도 및 체중 감량 정도에 따른 firmicutes 와 bacteroidetes 간의 변화 관찰 혹은 bifidus, lactobacillus 등의 유익균 속(genus) 수종 및 clostridium, shigella 등 유해균 속 (genus)을 선정하여 섭취 전후 비교.
- qPCR에 의한 정량분석과 더불어 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 통해 체질에 따른 한약재의 복용이 장내 세균총에 미치는 영향을 정성적으로 분석함.

○ Pyrosequencing

- 각 군당 피험자 10명의 분변 총 60 샘플을 시료로 사용하여 ChunLab (Seoul, Korea)에서 진행함.
- C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 16S rRNA 유전자의 표적 지역을 증폭함(V1-V3 of variable region으로 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 purification함).
- PicoGreendsDNA Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 농도를 측정하였고 이로부터 몰수를 계산함. Roche/454 GS Junior system을 이용하여 기술 매뉴얼에 따라 동일한 몰비로 증폭산물(amplicons)이 시퀀싱됨.
- pyrosequencer 분석에서, 각 샘플의 시퀀스는 unique barcodes에 따라 sort됨.
- 시퀀스 중, low quality(평균 quality scores가 25 미만 이거나 read길이가 300bp미만인 경우)의 read는 제외함. Primer 시퀀스는 pairwise alignment와 HMMER 3.0 package (HHMI Janelia farm research, Ashburn, VA, USA)로 trim됨. Trim된 시퀀스를 이용하여 균의 각 분류군별 지정은 Taxonomic identification은 EzTaxon-e server를 이용하여 BLASTN의 top5 결과 중 일치도가 가장 높은 시퀀스의 분류군으로 지정됨.
- 가능한 chimera sequences은 UCHIME을 이용하여 제거하였으며, 각 샘플의 read number는 random subsampling으로 normalized하였음. 그리고 diversity indice는 Mothur program을 이용하여 계산함.

2. 결과

○ 장내 미생물 문(phyla)의 분포

- 16S rRNA-based pyrosequencing을 이용하여 분변샘플 분석 결과 397,981 valid read와 24,895OTU를 획득함.
- 각 그룹의 phylum(문)의 분포는 아래 그림과 같음 (Table 11).

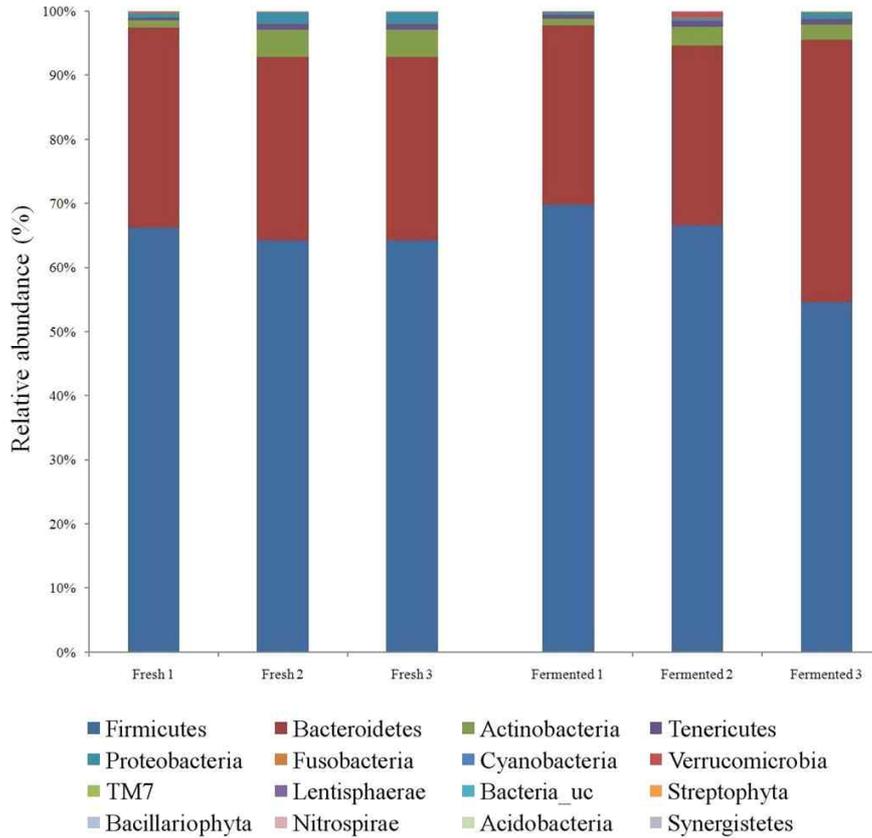


Fig 11. Average composition of phylums

- Firmicutes phylum의 상대량이 모든 군에서 가장 높게 나타났으며 그 뒤를 이어 Bacteroidetes 와 Actinobacteria가 각 2,3위를 차지함. 발효 김치군의 Bacteroidetes 상대량이 연구기간 동안 점차 증가하는 경향성을 보이나, 개인별 수치의 차가 커 Bacteroidetes /Firmicutes 비율의 변화는 통계적으로 유의하게 못함 (Table 11).
- 발효김치를 복용한 군에서 Bacteroidetes는 1주일 후 100.1%, 8주 후 146.1% 증가하고 Firmicutes는 각 95.4% 78.2%로 감소한 것으로 나타남. 이에 비해 생김치를 복용한 군에서는 복용 1주일후 Firmicutes가 96.9%로 감소한 상태로 이후에도 유지됨. Bacteroidetes 는 91.8%로 감소하는 앞과 비슷한 경향을 보이고 비슷한 비율로 유지됨.
- Actinobacteria, Tenericutes, Proteobacteria같은 phylums(문)의 경우 연구 후 두 군 모두에서 증가하는 것으로 나타남. 이 중 Actinobacteria의 경우 생김치 복용 1주일후에 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타남(p value=0.22).

○ 장내 미생물 속(genera)의 분포

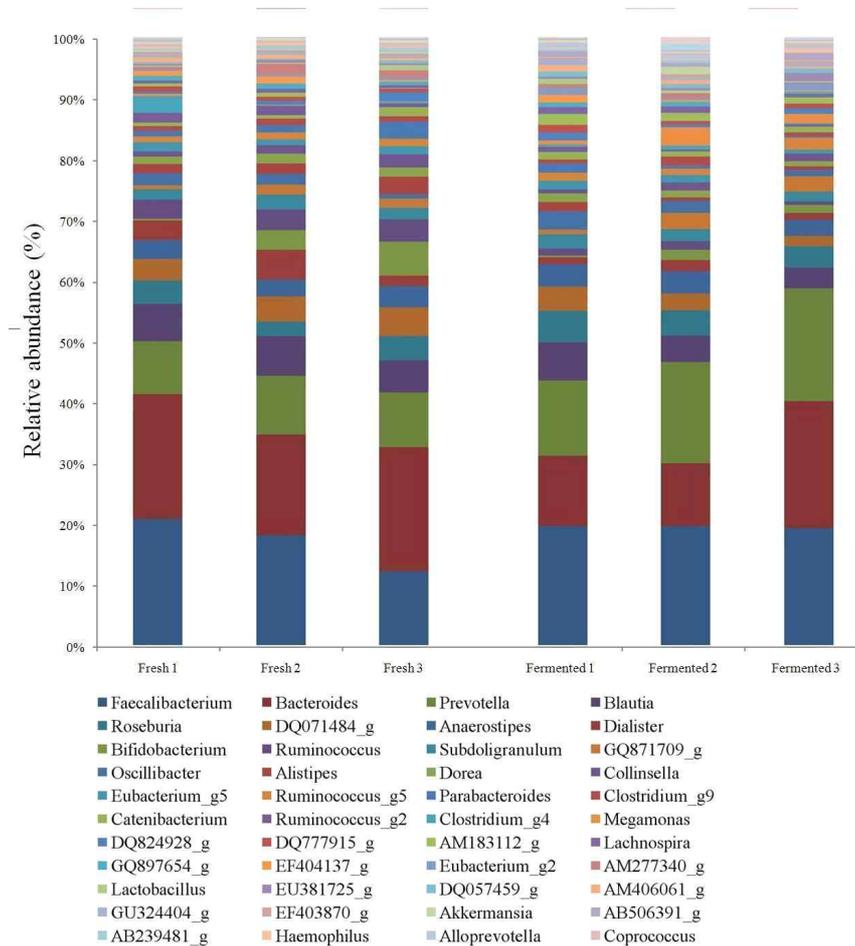


Fig 12 . Average composition of genera

- genus(속) 레벨에서, Faecalibacterium, Prevotella, Bacteroides가 두 군 모두에서 우세하게 나타남.
- 발효김치군에서는 Prevotella, Bacteroides의 community composition가 눈에 띄는 변화를 보임. 발효김치군에서 Prevotella, Bacteroides는 인체적용 시험 후 각 153, 186% 증가한 것으로 나타남. 이에 비해 생김치군에서는 104% and 99%로 비슷하게 나타남.
- 이와 반대로 Roseburia의 비율은 발효 김치군에서 68%로 떨어진 반면, 생김치군에서는 103%로 약간 증가한 것으로 나타남.
- Faecalibacterium는 생김치군에서는 60%로 떨어진 반면 발효김치군에서는 비슷하게 유지됨.
- 김치복용후 가장 눈에 띄게 변화한 것은 Bifidobacterium의 비율임. Bifidobacterium의 상대량은 미량이나 발효김치군에서는 449%까지, 생김치군에서는 점차 2259%까지 증가하였음. 이는 초기량에 비해 유의하게 증가한 수치임.

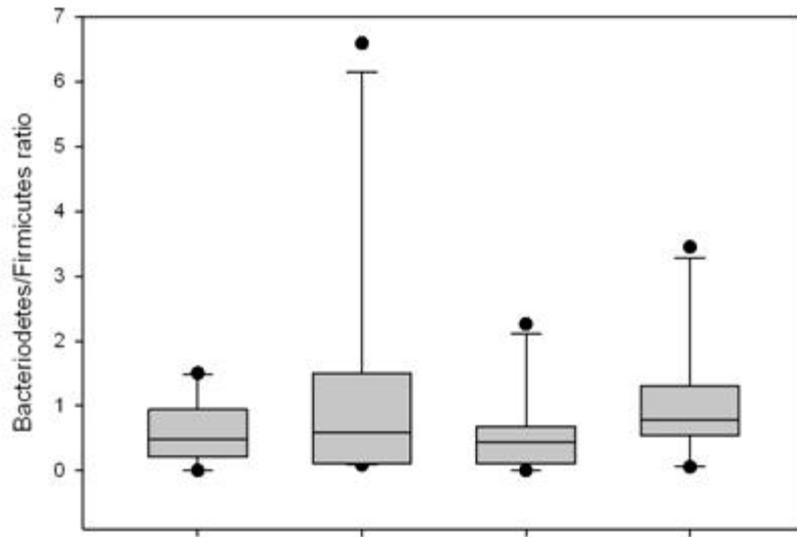


Fig 13. Bacteroidetes/Firmicutes ratio

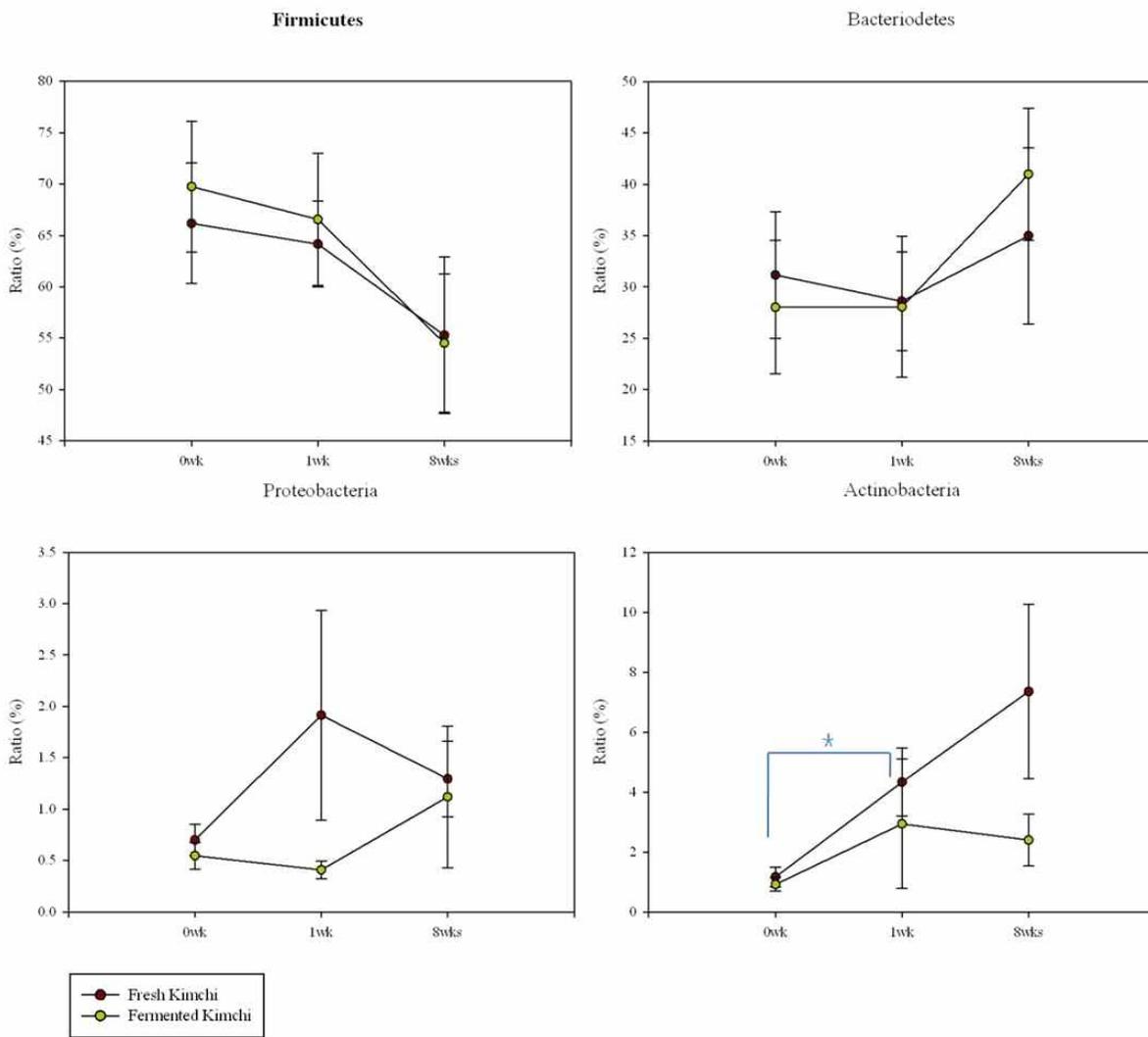


Fig 14. Alterations of intestinal microbiota after the kimchi intake : phylum level

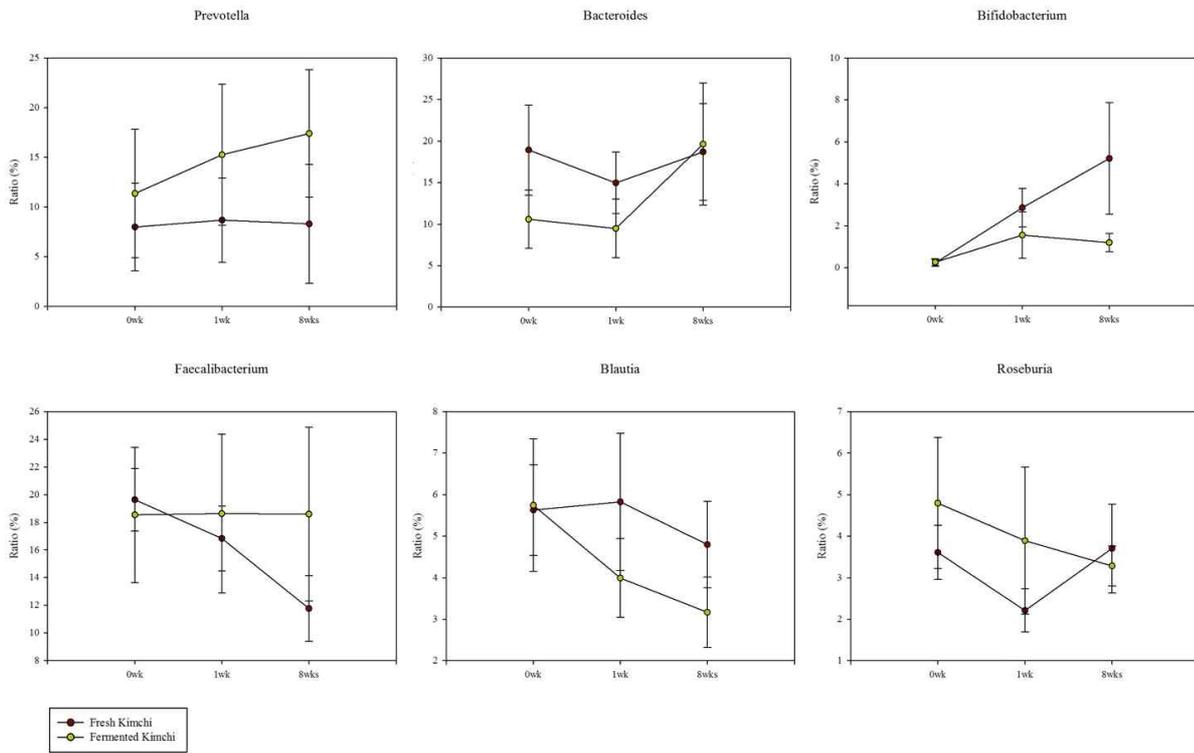


Fig 15. Alterations of intestinal microbiota after the kimchi intake : genus level

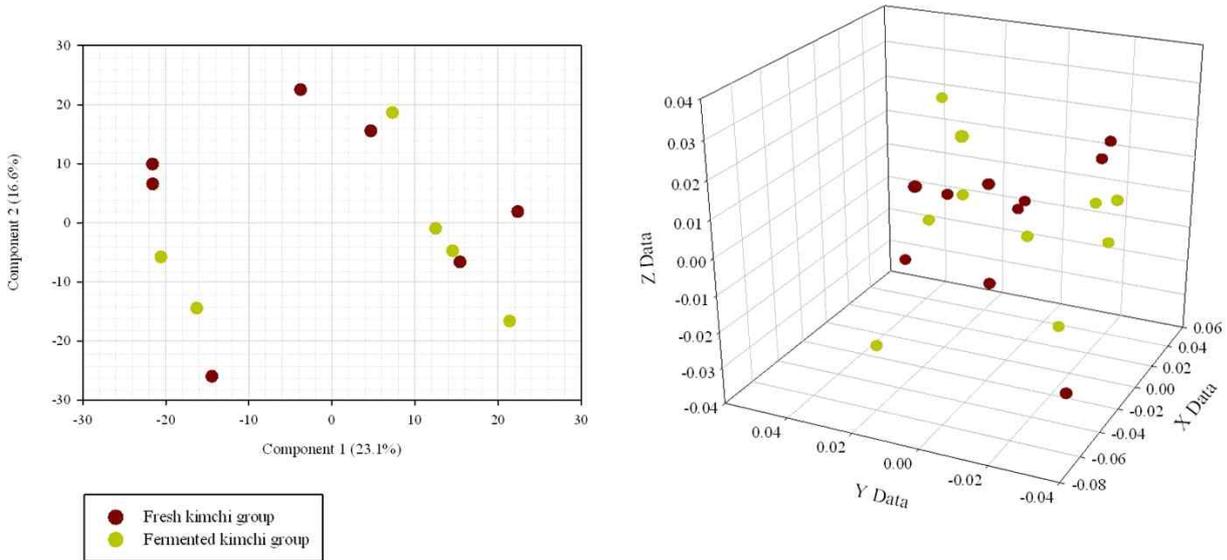


Fig 16. Comparison between microarray analysis of host blood RNA and pyrosequencing analysis of gut microbioa. a) Microarray analysis shown in MDS plot. b) Pyrosequencing analysis shown in PCO chart

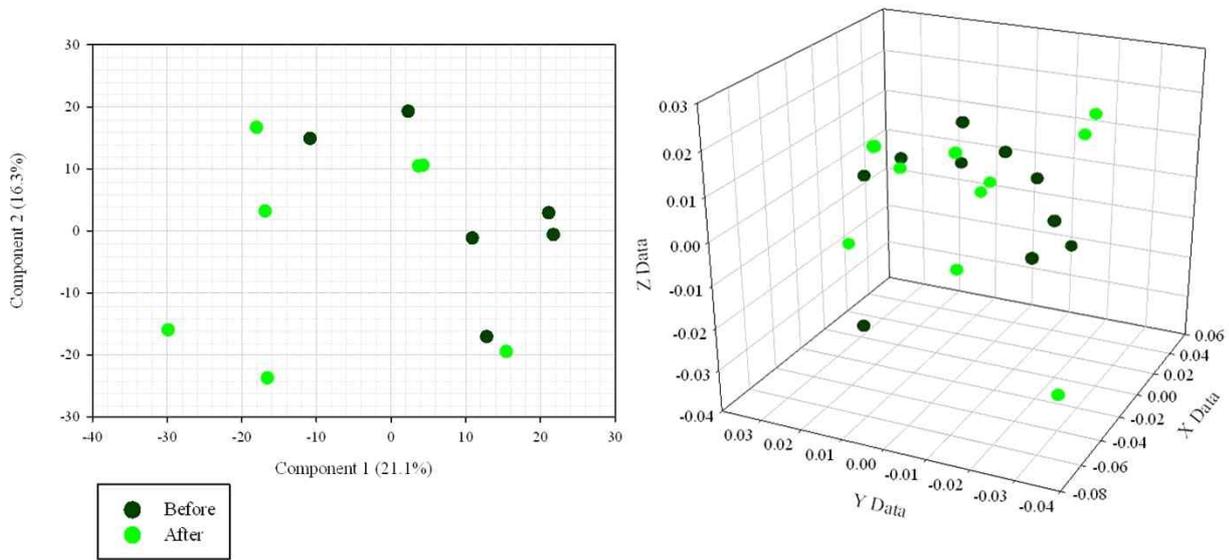


Fig 17. Comparison between microarray analysis of host blood RNA and pyrosequencing analysis of gut microbioa. a) Microarray analysis shown in MDS plot. b) Pyrosequencing analysis shown in PCO chart

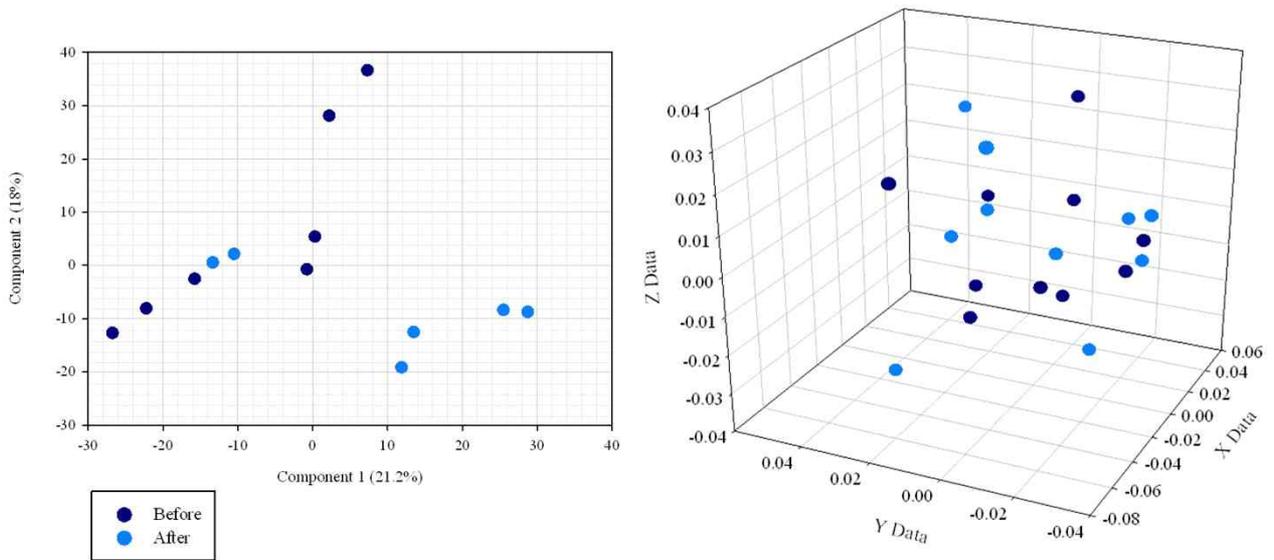


Fig 18. Comparison between microarray analysis of host blood RNA and pyrosequencing analysis of gut microbioa. a) Microarray analysis shown in MDS plot. b) Pyrosequencing analysis shown in PCO chart

8절. 마이크로어레이를 통한 비만 관련 유전자 발현 확인

1. 방법

○ 혈액 DNA 마이크로어레이 수행

- 인체 적용 시험 전후로 피험자의 혈액 샘플을 PAX geneTM Blood RNA tube에 채집하였음. 이를 기술매뉴얼의 프로토콜에 따라 PAXgeneTM Blood RNA kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 정제하였으며 -80°C에 저장함.
- Microarray는 마크로젠에서 시행되었으며 각 군당 9명의 피험자의 샘플이 microarray study에 사용됨.
- quality control을 위해 RNA 정제 및 integrity는 denaturing gel electrophoresis, OD 260/280 ratio로 evaluation 되었음. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)를 이용하여 분석함.
- 36개 샘플 중, 10개의 샘플은 RNA 부족으로 분석에서 배제됨. 26개의 샘플이 다음 단계로 진입하여, biotinylated cRNA를 산출하기 위하여 Ambion Illumina RNA amplification kit (Ambion, Austin, USA)를 이용하여 기술공정서에 따라 total RNA를 증폭하고 정제하여 정제됨. 550 ng의 total RNA를 T7 oligo(dT) primer를 이용하여 cDNA로 역전사시킴.
- Second-strand cDNA를 합성하여, biotin-NTP로 in vitro transcription labeling을 시행함. 정제 후, ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, USA)를 이용하여 cRNA를 측정함.
- 라벨링된 cRNA 750ng 샘플을 매뉴얼(Illumina, Inc., San Diego, USA)에 따라 58°C, 16-18시간동안 Human HT12 expression v.4 bead 어레이에 hybridize함. 어레이 signal의 Detection은 bead array 매뉴얼에 따라 Amershamfluorolink streptavidin-Cy3 (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK)를 이용하여 수행함.
- 어레이는 기술매뉴얼에 따라 Illumina bead array Reader confocal scanner를 이용하여 스캔함.
- Raw 데이터는 제공받은 Illumina Genome Studio v2011.1 (Gene Expression Module v1.9.0) 소프트웨어를 이용하여 추출함.
- Probes signal value는 quantile method로 logarithm과 normalized하여 변환하여 사용함. False discovery rate (FDR)는 Benjamini-Hochberg algorithm을 이용하여 p값을 조정하여 컨트롤함.
- Functional Annotation 분석에 DAVID Bioinformatics Resources를 이용하여 유의하게 증가 또는 감소된 probe lists를 골라냄.
- 유전자의 생리학적 분자학적 기능을 분류하고 pathway 분석을 위해 PANTHER version 8.1(5)과 KEGG Mapper v1.6(6)를 이용함.
- 발현이 바뀐 유전자의 데이터 분석 및 시각화는 R 2.15.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL: www.r-project.org)를 사용함.
- 박스 플롯을 이용하여 각 sample의 normalized signal에 대한 최대, 최소, percentile 값의 분포를 나타냄.

- 각 샘플의 분포를 한 눈에 알아보기 위하여 density plot을 그림.

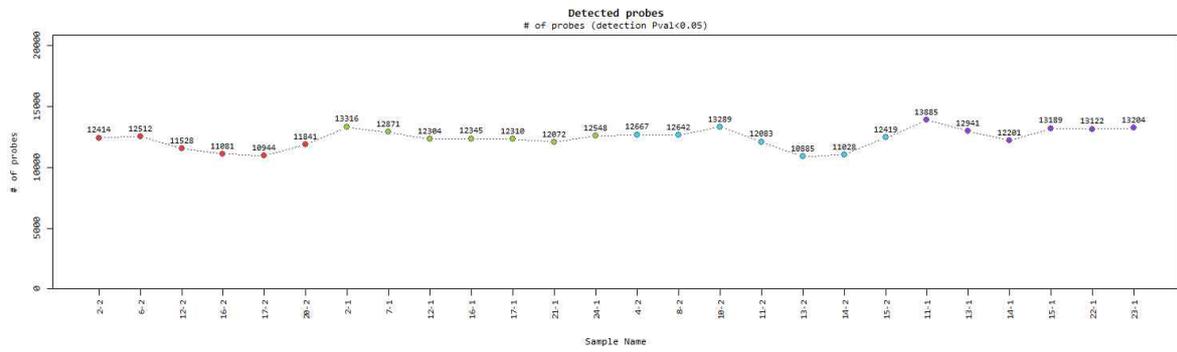


Fig 19. Detected probes by microarray analysis

①

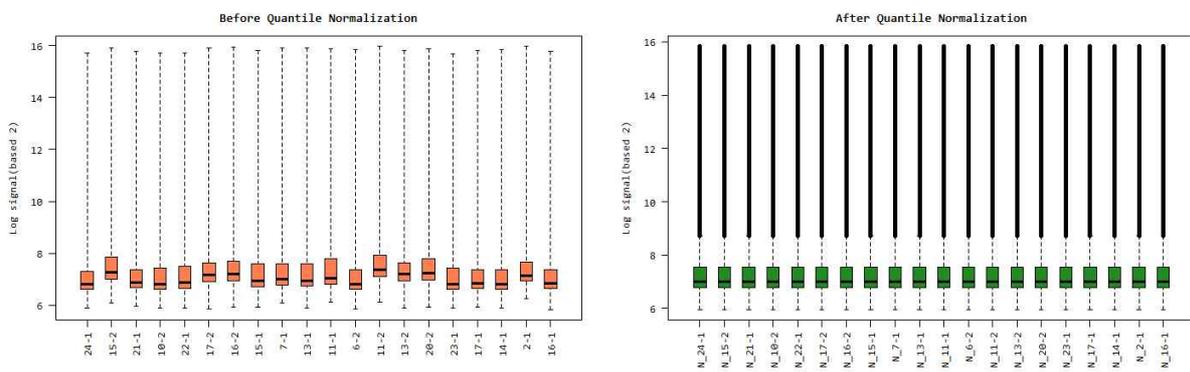


Fig 20. Box plot

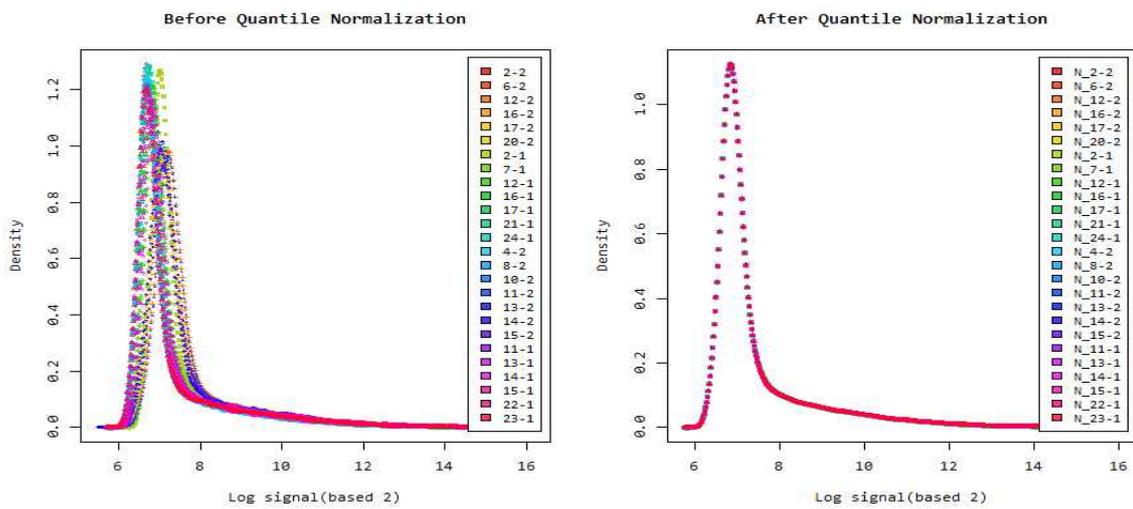


Fig 21. Density plot

- quantitative real-time PCR을 이용한 유전자 발현의 확인
- microarray data를 평가하기 위해 18개 유전자에 대해 quantitative real-time PCR 수행함.
 - 대사와 관련된 7개의 유전자를 선택하여 primer를 제작함. 유전자 선별은 현저한 fold change를 나타낸 것 중, 대사증후군과 비만에 그 역할이 알려진 것으로 함. Primer의 디자인 및 합성은 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에서 수행함.
 - 선별된 유전자와 그 시퀀스는 기술공정서에 따라 AccuPower RT Premix(BioneerInc, Daejun, Korea)를 사용하여 total RNA0.5ng로 cDNA를 합성함 (Fig 22).
 - Real-time quantitative PCR은 Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 Light Cycler 480(Roche, Basel, Switzerland)에서 수행함.

Selected genes		Primer sequences	Annealing temperature (°C)
CYP2D6	F	5'- CAG CAC TTC AGC TTC TCG GT -3'	53
	R	5'- GGA TGG GGT CAC CAG GAA AG -3'	
RPL9	F	5'- TGA TTC AGC AAG CCA CAA CAG -3'	52
	R	5'- AGC CTG CTG AAC AGT TCC TT -3'	
SNX25	F	5'- TAA CCA AAT GCT GCT TGC CC -3'	53
	R	5'- AGA GGG GGC ATA GGT GTA GG -3'	
GMPR	F	5'- GAG TGG AAG CGT CCA AAC CT -3'	50
	R	5'- GAG GAC ACA GCA TTC CAC CA -3'	
FECH	F	5'- ACC TCA AGT TCA ACC GCA GA -3'	51
	R	5'- GTT TCA GGG CCT CCC ATG TT -3'	
CES1	F	5'- AAG CAG GAG TTT GGC TGG TT -3'	51
	R	5'- TTC TGG TCC AGT TGC CCT TC -3'	
KIR2DL4	F	5'- GAG CCCAGA GCG TTA TCT CC -3'	53
	R	5'- AAG CTG GGT TTG AGA CAG GG -3'	

Fig 22. Primer list for qPCR analysis

2. 결과

○ 김치 섭취후 유전자 변화

- 마이크로어레이 분석의 46,323 프로브 중 유의한 프로브를 찾기 위해, Benjamini-Hochberg algorithm 방법으로 False Discovery Rate (FDR)를 교정하여 p값이 0.05미만인 133 프로브 중 발효김치vs생김치, 발효김치전후, 생김치 전후로 쌍비교하여 1.5 배 이상 변화된 것을 필터링함.
- 발효김치군에서 생김치군보다 유의한 수준인 2배 이상으로 발현변이를 나타낸 프로브가 31개 있었음. 각각 발효김치는 31개, 생김치는 18개의 프로브에서 유의한 변화를 나타냄

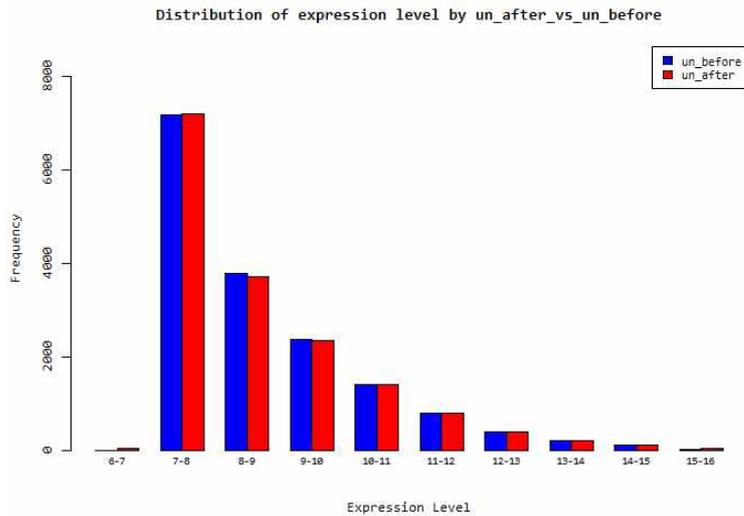


Fig 23. DNA expressions after 8 weeks of fresh kimchi consumptions

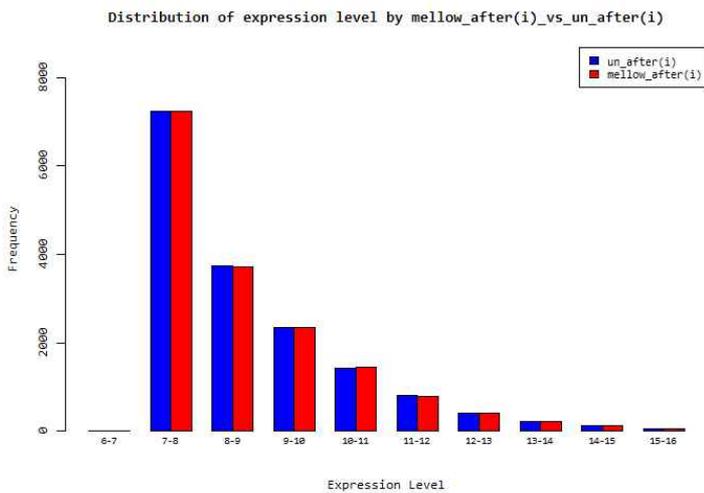


Fig 24. Comparison of the DNA expressions after 8 weeks of fresh and fermented kimchi consumptions

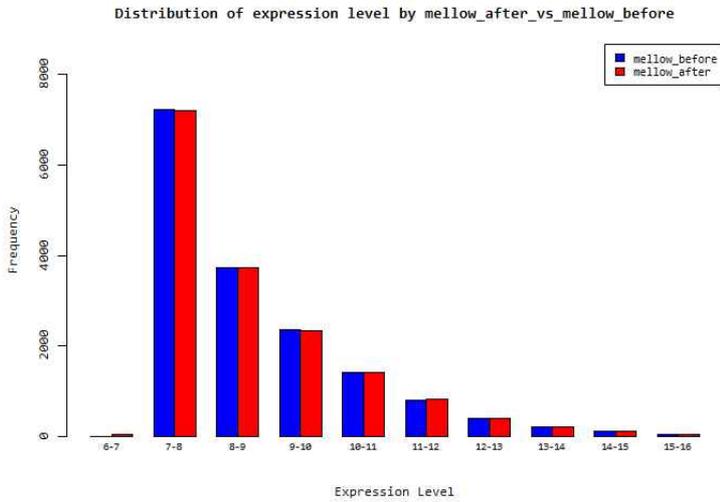
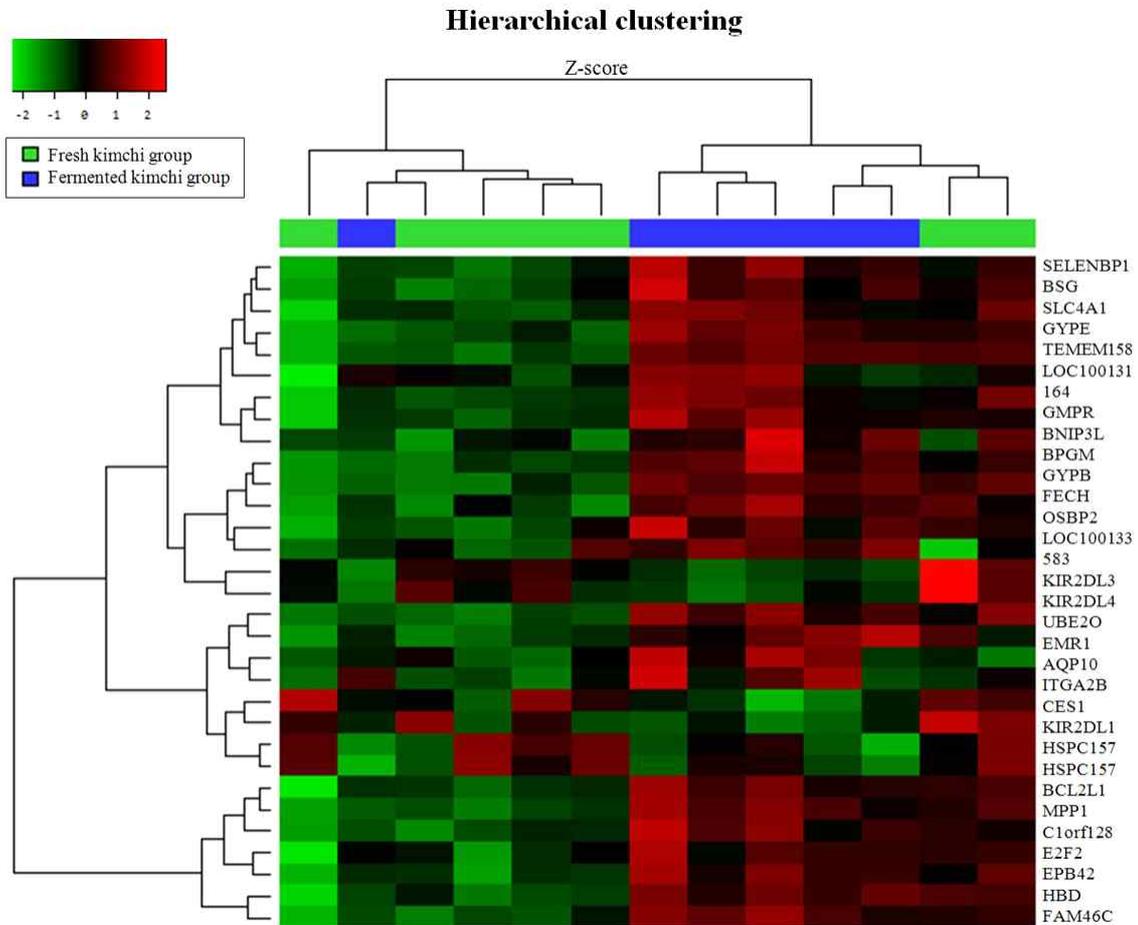


Fig 25. DNA expressions after 8 weeks of fermented kimchi consumptions

○ Hierarchical 클러스터링을 이용한 유전자발현 패턴 분석



② Fig 26. Hierarchical clustering of microarray data after kimchi administration
 - 생김치 및 발효김치 복용 후 혈액의 RNAs에서 유전자발현 경향이 구분됨. 또한 각 군의 전 후 변화에서도 다른 클러스터링을 형성한 것으로 볼 때 생김치와 발효김치 섭취 후 유전자 발현의 변화가 나타났음을 확인함.

○ Quantitative PCR을 이용한 유전자발현 패턴 확인

- 인체의 대사 변화(metabolic changes)에 영향을 미치는 작용이 있는 것으로 알려진 7개의 유전자를 이용한 Quantitative PCR 분석으로 밸리테이션 수행함.
- qPCR의 측정결과는 마이크로 어레이의 fold-change와 부합하였으며 sensitizations 또한 유사한 경향성을 나타냄 (Fig 27).

○ 반응 유전자의 기능분석(Functional analysis of the responsive genes)

- 유의한 변화를 보인 probes를 대상으로 관련한 기능을 찾기 위하여 DAVID functional annotation 클러스터링을 수행함 (Fig 28).
- 생김치군에 비해 발효김치군에서 유의한 프로브는 7개의 기능적 관련 카테고리 묶임. 이중 여섯 클러스터는 과발현이고 하나는 저발현임. 이중 발효김치의 복용 전후로 현저한 변화를 보인 클러스터는 하나로 발효김치에서 과발현(up-regulated)되는 것으로 나타남.
하지만 생김치군의 18개의 유의한 프로브와 발효김치군의 저발현된 프로브에서도 기능적인 클러스터는 찾을 수 없음.
- Fisher's exact test로 p값이 0.05이상인 유전자 그룹을 골라낸 결과, 2개의 기능적 그룹만이 높은 ES(enrichment scores)값을 가짐.

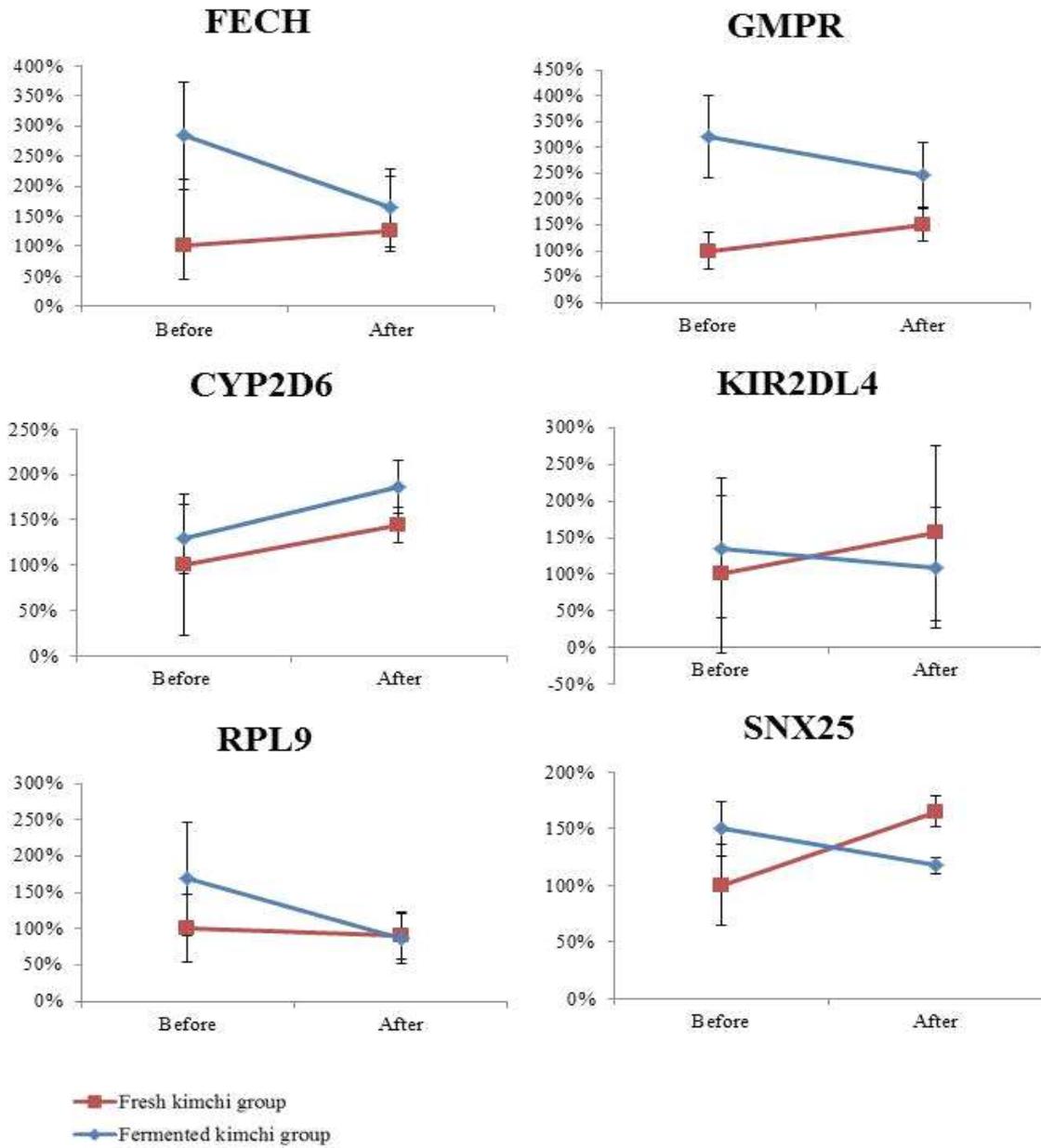


Fig 27. Quantitative PCR analysis

		Number of genes	Clusters	Enrichment scores	Normal p-value	Genes	Biological process
Significantly differentially expressed genes of fermented kimchi group compared to fresh kimchi group	Up-regulated genes	25	Cluster 1	1.163	0.0068	MPP1, EPB42, SLC4A1	Cellular component morphogenesis, protein modification process, ion transport, signaltransduction, synaptic transmission, neurotransmitter secretion, protein amino acid phosphorylation, asymmetric protein localization
	Down-regulated genes	6	Cluster 2	1.072	0.0051	GYPB, BSG, OSBP2, FECH, GYPE, MPP1, EPB42, TMEM158, SELENBP1, LOC100133583, BCL2L1, AQP10, EMR1, BNIP3L, SLC4A1, ITGA2B	Lipid transport, lipid metabolic process, cholesterol metabolic process, immune system process, immune response, defense response to bacterium, protein modification process, gamete generation, cell cycle, hemopoiesis, cellular component morphogenesis, synaptic vesicle exocytosis, intracellular protein transport, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, cell adhesion, protein amino acid phosphorylation, neurotransmitter secretion
Pre-post comparative approach of fermented kimchi group	Up-regulated genes	15	-	-	-		
	Down-regulated genes	16	Cluster1	2.866	0.0019	RPL17, RPL23, RPL9, RSL24D1, ACTR6	Natural killer cell activation, response to stimulus, immune system process, neurological system process, vitamin metabolic process, lipid metabolic process, response to toxin, cell-cell signaling, ectoderm development
Pre-post comparative approach of fresh kimchi group	Up-regulated genes	14	-	-	-		
	Down-regulated genes	4	-	-	-		

Fig 28. DAVID annotation clustering

- PANTHER classification system을 이용한 유전자 조절기전의 경로 탐색
- 김치의 섭취와 관련한 조절 기전(regulatory pathway)를 밝히기 위해 유의한 probes들을 PANTHER classification system(이미 알려진 기전의 유전자의 biological process를 시각화함)을 이용하여 분석함.
- 생김치군 대비 발효김치군에서 상대적으로 발현이 증가한 유전자는 여러 기전과 관련이 있는 것으로 나타남.
- 관련 pathway는 cell cycle, glycolysis, heme biosynthesis, blood coagulation, apoptosis signaling pathway, integrin signaling pathway, Parkinson disease, p53 pathway, p53 pathway feedback loops 2와 관련되며 이러한 기전들은 서로 비슷한 비율을 나타냄.
- 발효김치군의 과발현 유전자에서 chemokine과 cytokine 매개의 inflammation의 signaling pathway와 TGF-beta signaling pathway가 서로 높은 연관성을 나타냄. 생김치군과 발효김치의 저발현 그룹에서는 기전이 나타나지 않음.

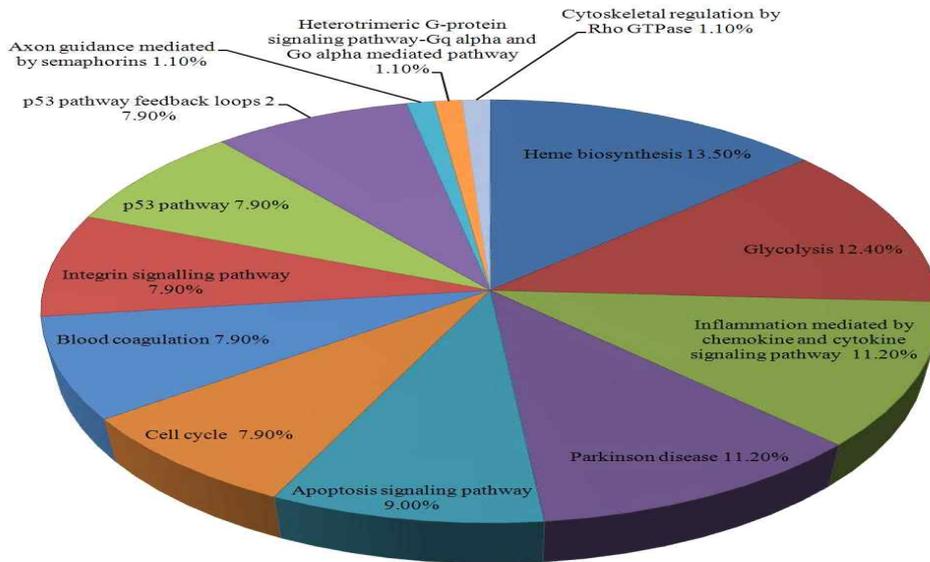
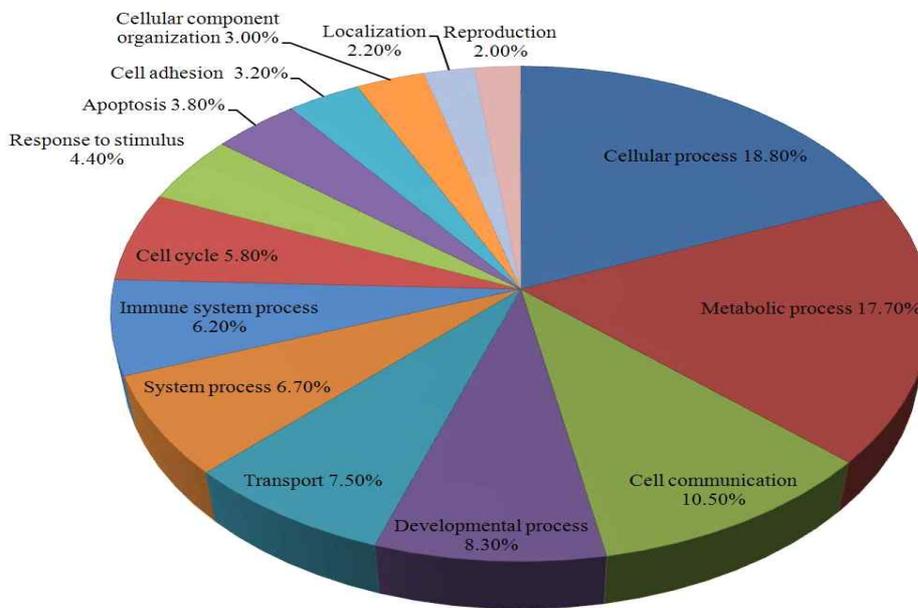


Fig 29. Pathway analysis by PANTHER software



③

Fig 30. Biological process analysis by PANTHER software

- KEGG Mapper를 이용하여 흥미로운 유전자의 pathways를 확인함. 발효김치균의 유의한 유전자는 cell cycle, metabolic pathways(purine metabolism, glycolysis, porphyrin, chlorophyll metabolism, drug metabolism)과 관련이 있었음.
- 발효김치균의 가장 주목할 만한 유전자는 CDC42와 CXCR1임. 이들은 비알콜성지방간, Helico bacter pylori감염에서의 epithelial cell signaling, pathogenic Escherichia coli 감염, epithelial cells의 박테리아 침입 등과 관련이 있음. 또한 이 유전자들은 초점접착역

(focal adhesion)과 세포의 tight junction과 관련이 있어 장내미생물에 영향을 미칠수 있는 유전자의 발현과의 연관성을 추론할 수 있음.

- 발효김치군의 BPGM, GMPR, CES1, FECH는 metabolic pathways와 높은 연관성을 가짐. CYP2D6는 두 군 모두에서 유의성있게 증가한 유일한 유전자로 cytochrome P450의 metabolism과 관련이 깊음.

9절. 대사 마커, 장내미생물 패턴, 비만 유전자 발현의 통합적 분석을 통한 발효 김치의 비만 개선 효과 확인

1. 방법

○ 유전자 변화 양상이 큰 개체의 임의 선정

- 유전자 발현과 장내 미생물의 변화 분포를 비교한 결과 특별한 변화를 찾을 수 없었음. 이에 본 연구팀은 각 그룹에서 인체 적용시험 이후 유전자 변화가 뚜렷한 세 개체를 각각 선정하였음 (Fig 31, 32).

○ Heatmap을 이용한 혈액 유전자 및 장내 미생물 변화의 상관관계 탐색

- 임상수치와 분변 미생물의 변화와 혈액내 유전자 발현 변화의 상관관계를 구하기 위해 Pearson's correlation test를 이용함. 모든 통계분석은 SPSS version 18 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용함.

- 혈액내 유전자 발현변화와 장내 미생물 변화의 상관관계 분석 결과의 도식화를 위해 PermutMatrix Version 1.0.3 EN (PermutMatrix, Montpellier, France)의 correlation data heatmaps을 사용함.

2. 결과

○ 선택된 세 피험자의 장내미생물 변화양상

- 그룹별 장내 미생물 변화양상을 살펴보면 군 간 차이가 더욱 뚜렷함 (Fig 33).

○ 혈액의 유전자 발현과 장내 미생물의 상관관계는 대체로 유의하지 않은 것으로 나타남.

○ 발효김치 복용후의 유전자 발현은 CRP, insulin, body fat percentage 같은 대사 질환의 주요 지표와 관련이 있는 것으로 나타남.

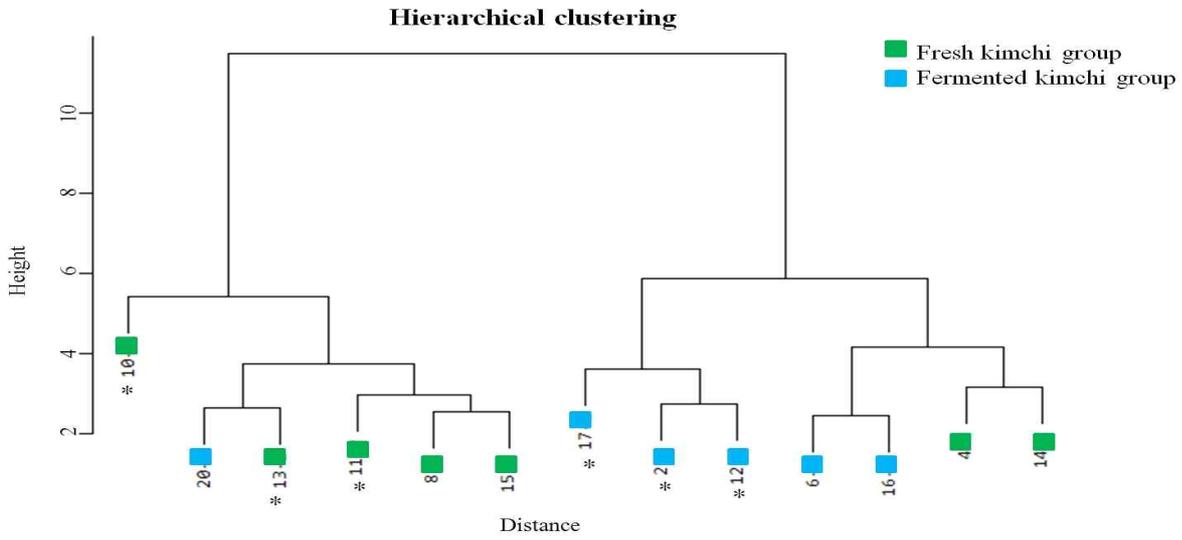
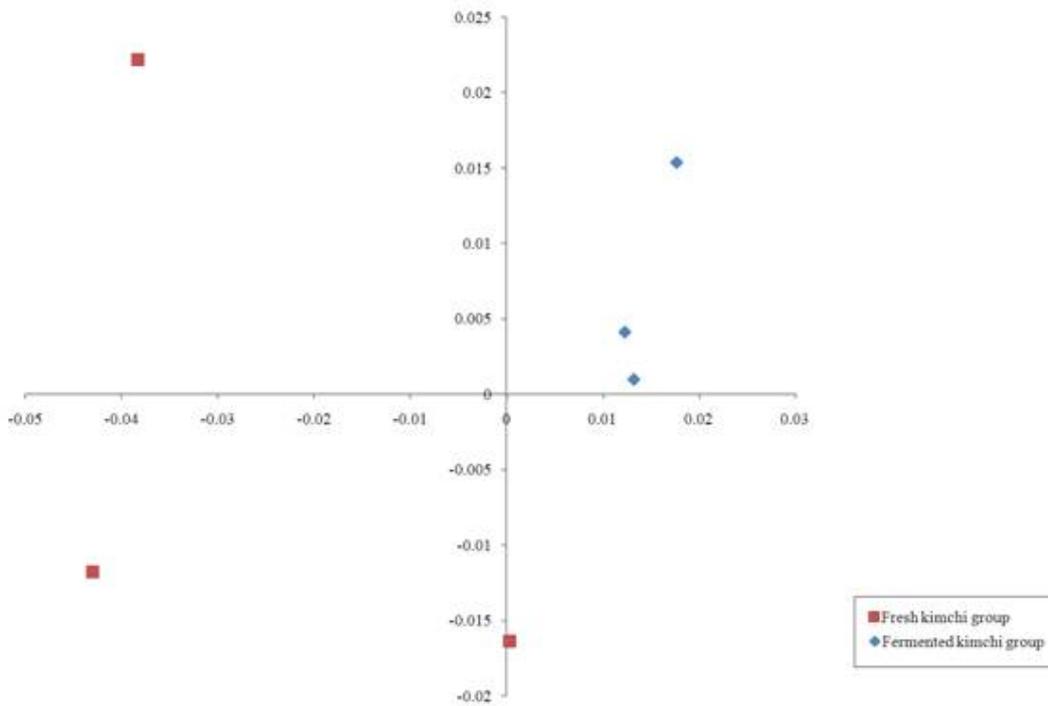
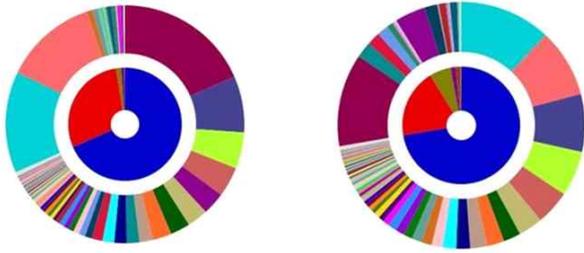


Fig 31. Hierarchical clustering for the genes of three selected subjects in each groups on the basis of having prominent gene expression changes after the study
 ④



⑤
 Fig 32. PCO chart with selected subjects from each groups

a) Average composition of three selected communities of fresh kimchi group



b) Average composition of three selected communities of fermented kimchi group

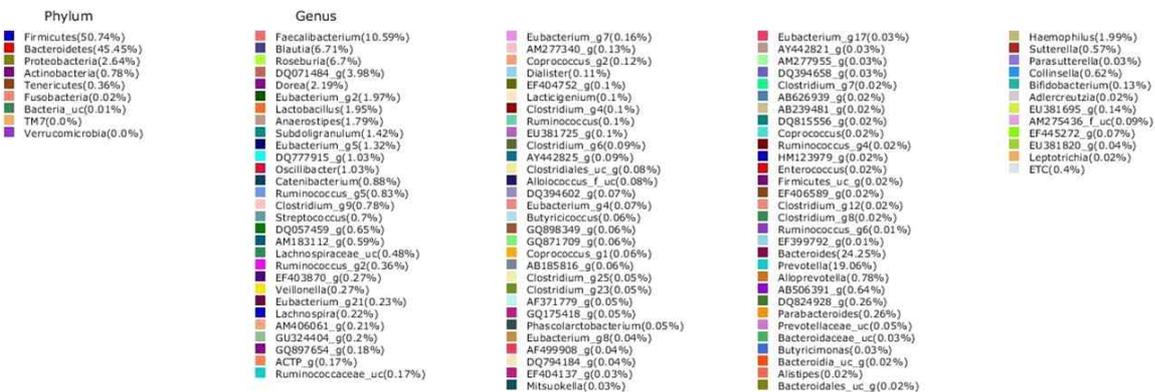


Fig 33. Average composition of three selected communities : inner pie indicates phylum and outer pie indicates genus level

○ 생김치 대비 발효김치군에서 유의하게 증가한 유전자들과 장내미생물, 임상 마커들의 상관관계 (Fig 34).

발효김치에서 유의하게 증가한 유전자는 염증수치의 감소에 유의성있는 상관관계를 보임
발효김치에서 증가한 유전자들은 체지방량, 중성지방, BMI, 체중과는 음의 상관관계를 보임.

이들 유전자는 혈중인슐린 농도를 유의성있게 증가시키는 상관관계를 보임.

발효김치에서 증가한 유전자는 Proteobacteria의 증가와, Tenericutes의 감소와 관련성이 있음.

○ 생김치 섭취 후 변화한 유전자들과 장내미생물, 임상 마커들의 상관관계 (Fig 35).

생김치 섭취 후 유의성있게 증가한 유전자는 체지방량, 복부둘레와 양의 상관관계를, BMI, 공복 시혈당, 중성지방, 혈중인슐린농도, CRP와는 음의 상관관계를 나타냄.

생김치 섭취 후 유의성있게 감소한 유전자는 수축기, 이완기 혈압, 맥박수, 혈중 HDL 농도와 음의 상관관계를 보이는 반면, BMI, 체중, 공복시혈당과는 양의 상관관계를 보임.

○ 발효김치 섭취 후 변화한 유전자들과 장내미생물, 임상 마커들의 상관관계 (Fig 35). 발효김치 섭취 후 유의성있는 변화를 나타낸 유전자들은 중성지방, HDL, 인슐린농도와 양의 상관관계를 보이는 반면, 수축기와 이완기 혈압, 복부둘레, 맥박수와는 음의 상관관계를 보임. 이들 유전자들은 Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria와는 양의 상관관계, Bacteroidetes와는 음의상관관계를 보임

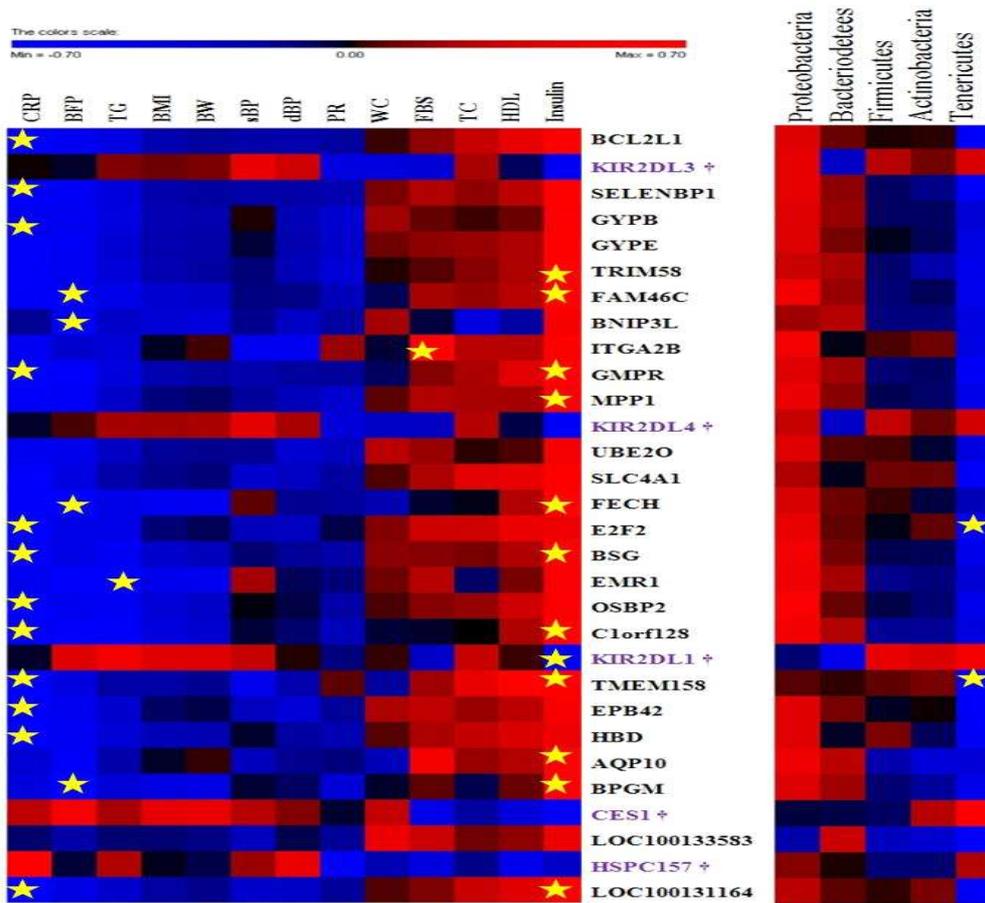


Fig 34. The correlations of blood associated genes - which remarkably up-regulated in the Fermented group relative to the Fresh group after Kimchi consumptions - with intestinal microbiota, and clinical parameters.; ★: $p < 0.05$. * : up-regulated genes; † : down-regulated genes

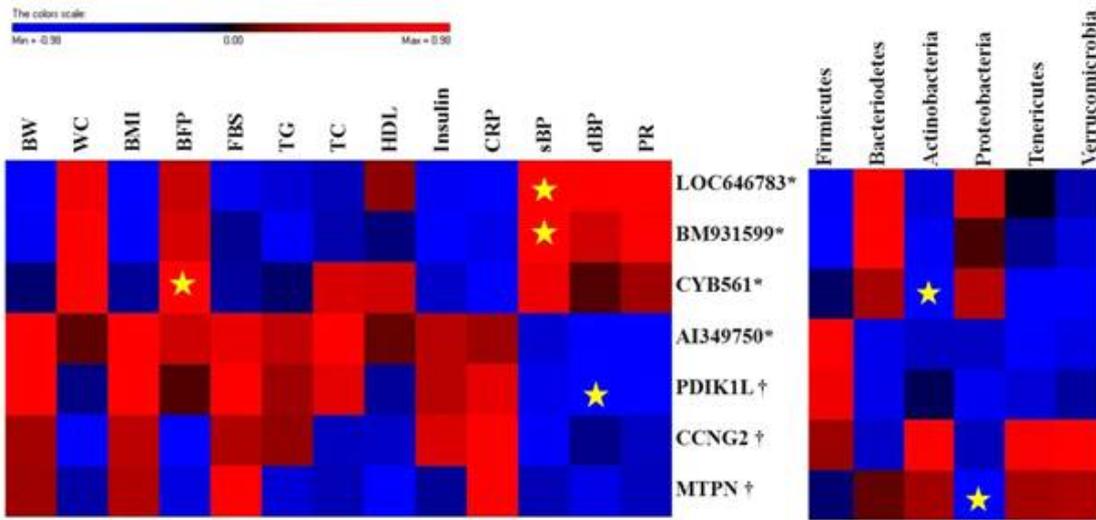


Fig 35. The correlations of blood associated genes which remarkably up-regulated after Kimchi consumptions with intestinal microbiota, and clinical parameters in the Fresh group; ★: $p < 0.05$. * : up-regulated genes; † : down-regulated genes

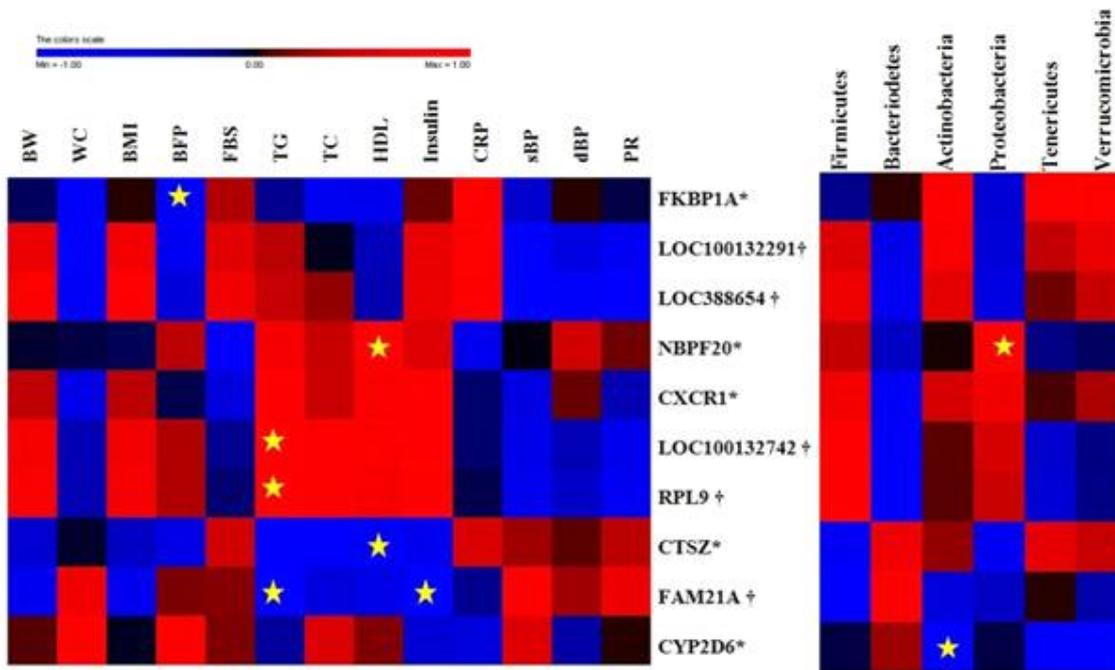


Fig 36. The correlations of blood associated genes which remarkably up-regulated after Kimchi consumptions with intestinal microbiota, and clinical parameters in the Fermented group. ★: $p < 0.05$. * : up-regulated genes; † : down-regulated genes

5장. 연구성과 및 성과활용 계획

1절. 주요연구성과

인체적용시험과 장내미생물 분석을 통하여 우리나라 전통 발효 식품인 배추김치의 비만과 대사 개선 효과를 검증하고 장내미생물과의 연관성을 규명

2절. 성과활용계획

- 한식 세계화 정책 홍보물에 연구 성과 활용하여 발효 식품 적극 홍보
- 학교 급식 관련하여 발효 김치를 보다 적극적으로 활용
- 지방자치 단체에서 기능성 김치 개발 촉진
- 국민 모두가 잘 알고 있는 전통 발효 김치이기 때문에 언론 홍보 효과가 지대할 것으로 생각됨
- 관심을 많이 받고 있는 한식이자 한국을 대표하는 발효 식품이기 때문에 국내외에 좋은 기사감이 될 것으로 생각됨
- 초중고등 학생들에게 전통 식품의 장점을 과학적으로 입증해 보여 자국 음식문화에 대한 자긍심 고취 및 건강 증진
- 병원내 영양 상담에서 대사 질환에 대한 김치의 효과를 체계적으로 설명함으로써 관심 고취

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 장내미생물 분석과 마이크로어레이를 통한 발효김치의 항비만 효과 규명 (영문) Mechanistic study of anti-obesity effect of fermented Kimchi using gut microbiota analysis and microarray		
연 구 기 관	동국대학교	연	(소속) 동국대학교
참 여 기 관	신라대학교	책	(성명) 김 호 준
연 구 비	계	130,000(천원)	총 연 구 기 간
참 여 연 구 원	19 명 (연구책임자: 1명, 책임연구원: 2(1)명, 연구원: 5 명, 연구보조원12 명)		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>연구목적 인체적용시험과 실험실 연구를 통해 발효 김치의 기능성과 우수성을 과학적으로 규명하고 한식 소비촉진을 유도함</p> <p>연구내용 - 인체적용시험과 장내미생물 분석을 통해 우리나라 전통 발효식품의 대표인 김치의 비만 및 대사개선 효과를 검증 - DNA 마이크로어레이를 통해 발효 정도에 따른 김치의 유전자 발현 양상을 비교하고 비만 대사 마커 및 장내 미생물 군집 패턴의 변화와 연관지어 그 기전을 규명</p> <p>○ 연구결과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 동국대학교 일산한방병원 IRB 통과 2. 비발효 배추김치(생김치) 및 발효된 배추김치(발효김치)의 제조 및 공급 : 생김치와 발효김치의 제조 조건 및 제공 방법의 표준화와 김치 숙성 과정 모니터링. 3. 피험자별 다이어트 플랜 수립 및 통제 : 유산균 섭취수준 파악을 위한 식품섭취빈도조사지(FFQ) 개발 및 수행. 10주간 식단 정기 모니터링 및 분석 통한 피험자 식사내용 관리. 4. 인체 적용 시험 수행 : 동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과 임상연구소에서 실시하였고 23명의 피험자가 8주간의 연구를 모두 마침. 5. 김치의 체성분 및 혈압 개선효과 확인 : 임상시험 0주 및 8주에 있어 체성분 지표 및 혈압의 변화량을 살펴본 결과, 전체 피험자의(n=23) 허리둘레와 체지방률(p<0.01), 총콜레스테롤(p=0.05)과 고밀도지단백질(p <0.01), 및 수축기와 이완기 혈압의(p<0.01) 유의한 감소가 확인됨. 이 중 생김치군은(n=12) 허리둘레, 체지방률 및 수축기 혈압이 유의하게 감소하였고 발효김치군은(n=11) 이완기 혈압이 유의하게 감소함(p<0.05). 			

6. 장내미생물 양상 개선 효과 확인 : Firmicutes는 김치 섭취 8주 후 생김치군과 발효김치군에서 각각 10.9%, 14.23% 감소함. Bacteroidetes는 생김치와 발효김치군에서 각각 3.81%, 12.93% 증가함. 그 외 Acinobacteria, tenericutes, Proteobacteria는 2주간 휴약기 후에 증가하여 유지됨. 특히 Actinobacteria는 생김치 섭취 1주 후에 유의하게 증가함(p=0.022). 가장 주목할 만한 변화는 Bifidobacterium의 비율로서, Bifidobacterium과 과 Firmicutes의 비가 생김치, 발효김치군에서 각각 0.23, 0.27에서 휴약기 후 각각 0.21, 1.20으로 변화됨.

7. 비만 관련 유전자 발현 확인 : 발효김치군에서 생김치군보다 2배 이상으로 발현된 유전자는 모두 31개로 나타났으며 이 중 가장 주목할 만한 유전자는 CDC42와 CXCR1로서 비알콜성지방간, Helico bacter pylori감염에서의 epithelial cell signaling, pathogenic Escherichia coli 감염, epithelial cells의 박테리아 침입 등과 관련이 있음. 또한 이 유전자들은 초점접착역(focal adhesion)과 세포의 tight junction과 관련이 있어 장내미생물 패턴에 영향을 미칠 수 있는 가능성으로 추론됨.

8. 대사 마커, 장내미생물 패턴, 비만 유전자 발현의 통합적 분석을 통한 발효 김치의 비만 개선 입증 : 발효김치 복용 후의 유전자 발현은 CRP, insulin, body fat percentage 같은 대사 질환의 주요 지표와 관련이 있는 것으로 나타남.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 한식 세계화 정책 홍보물에 연구 성과 활용하여 발효 식품 적극 홍보
- 학교 급식 관련하여 발효 김치를 보다 적극적으로 활용
- 지방자치 단체에서 기능성 김치 개발 촉진
- 국민 모두가 잘 알고 있는 전통 발효 김치이기 때문에 언론 홍보 효과가 지대할 것으로 생각됨
- 관심을 많이 받고 있는 한식이자 한국을 대표하는 발효 식품이기 때문에 국내외에 좋은 기사감이 될 것으로 생각됨
- 초중고등 학생들에게 전통 식품의 장점을 과학적으로 입증해 보여 자국 음식문화에 대한 자긍심 고취 및 건강 증진
- 병원내 영양 상담에서 대사 질환에 대한 김치의 효과를 체계적으로 설명함으로써 관심 고취

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 한식세계화사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 한식 세계화사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.