

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 80%;"> <p style="text-align: center;">주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">(15 포인트 고딕계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구</p> <p style="text-align: center; margin-top: 100px;">농 립 축 산 식 품 부</p> <p style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <p style="text-align: center;">11-1543000-000502-01</p> </div> <p style="text-align: center;">5cm ↓</p> <p style="text-align: center;">김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구 (Study of Kimchi Lactic Acid Bacteria on the Intestine Micro- flora of Antibiotics Treated Patient and Development of Clinical Testing and Research Model)</p> <p style="text-align: center; margin-top: 100px;">↑ 9cm ↓</p> <p style="text-align: center;">농 립 축 산 식 품 부(17포인트 명조계열)</p> <p style="text-align: center; margin-top: 100px;">↑ 4cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p>
--	--	---	--

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구에 관한 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2014년 7월 29일

연구기관명

세계김치연구소

전북대학교병원 기능성식품임상시험 지원센터

연 구 진

연구기관명 : 세계김치연구소

연구책임자 : 이 중 희

연 구 원 : 김 태 운

연 구 원 : 박 해 웅

연 구 원 : 최 학 중

연 구 원 : 장 자 영

연 구 원 : 박 성 희

연구기관명 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험 지원센터

책임연구원 : 채 수 완

책임연구원 : 이 승 옥

연 구 원 : 최 은 경

연 구 원 : 정 수 진

연 구 원 : 서 승 영

연 구 원 : 박 수 현

연 구 원 : 박 은 옥

연 구 원 : 김 두 겸

연 구 원 : 임 경 아

요 약 문

I. 제 목

김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

항생제 연관 설사의 치료를 위하여 metronidazol, vancomycin등의 항생제를 사용하고 있으나 내성균주의 출현으로 광범위한 사용은 제한적인 요인이 있다. 최근에 항생제에 잘 반응하지 않는 재발 항생제 연관 설사 환자의 경우, Fecal bacteriotherapy의 개념을 활용하여 건강한 성인의 변정제후 대장내시경을 통해 환자에게 주입하는 방법으로 임상에서 효과를 보이는 것으로 보고되고 있으나 변내 장내 미생물균총의 비균질성 및 다양성 그리고 병원성 균주로 인한 2차 감염의 우려가 있다.

최근의 연구결과에서는 probiotics를 이용한 항생제 연관 설사 치료 가능성이 대두 되었다. *Saccharomyces boulardii*를 항생제와 병합 투여할 경우 항생제로 인한 설사를 줄이고 재발을 방지하는데 효과가 있으며, *Lactobacillus rhamnosus*도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

Probiotics를 사용한 외국의 연구사례 불구하고 한국인의 장내 균총의 주유입원인 전통식품의 유익미생물을 이용한 연구사례는 전무한 실정이다. 따라서 가장 다양한 미생물을 함유한 식품인 김치에서 유래한 미생물로부터 항생제로 인한 파괴된 장내 균총 복원 및 연관설사 완화, 그리고 김치미생물의 장내 정착에 관한 연구가 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

김치미생물의 특성 분석 및 항생제 동물 모델을 이용한 장내 균총 변화 분석

- 김치미생물의 제제화 및 경구투여 안정성 연구
- 김치미생물의 유전자, 단백질 발현 분석
- 동물모델을 이용한 김치유산균의 장내 균총 개선효과 연구
- 동물모델을 이용한 김치유산균의 항생제로 인한 장내 균총 불균형 개선 효과 연구
- Metagenome 방법을 통한 장내 균총 변화량 분석 및 multivariate analysis

예비인체적용시험 프로토콜 개발 및 인체적용시험 설계

- 항생제 유래 설사의 김치미생물 투여를 통한 완화효과 검증을 위한 예비인체 실험모델 개발
- 김치미생물 투여 및 표준화된 인체적용시험 프로토콜 개발
- 인체적용시험을 통한 김치미생물의 장내 균총 개선효과 분석

IV. 연구개발결과

한국의 대표적 발효 음식인 김치로부터의 유익균주를 발굴하고 기능적 특성에 대한 과학적 근거를 제시하여 김치미생물을 사용한 복합제제를 개발하는 것은 김치유래의 건강 고부가가치 제품의 개발을 유도할 수 있다. 본 연구에서는 김치 유래의 미생물을 이용하여 항생제 투여 동물모델에서 장내 균총의 변화를 분석하였으며 위막성 장염 환자에 임상 실험을 통하여 김치미생물이 환자의 장내에 정착할 수 있음을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 김치미생물복합제를 이용한 치료보조제의 개발가능성을 보여주고 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

(1) 학술대회 발표 2건

2014. 한국미생물 생명공학회 포스터 및 구두발표

(2) 특허

출원번호: 10-2014-0086872, 락토바실러스플란타룸 W I K I M 1 8 및 이를 포함하는 조성물

(3) 논문

Jang JY, Lim HI, Park HW, Choi H-J, Kim T-W, Kang M, Lee J-H. 2014. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* wikim18, isolated from Korean kimchi. Genome Announc. 2(3):e00467-14. doi:10.1128/genomeA.00467-14.

SUMMARY

(영문요약문)

Fermented vegetables are among the oldest traditional food. They are made by fermentation of local vegetables and lactic acid bacteria (LAB), which have a key role in the fermentation stages. LAB itself is likewise used as probiotic additives because of its diverse useful aspect in human wellness.

Recent technological achievements make it potential for analyzing total bacterial complex without cultivation. A technology led an innovation in the monitoring of the bacterial population with an isolated DNA from environments as food or fecal sample. LAB has been employed for the fermentation and it plays a part in a major supplement for the bacteria. Kimchi is a representative fermented food in Korea. It contains diverse LAB including *Lactobacillus* sp, *Weissellia* sp, and *Leuconostoc* sp. The Intestinal bacterial population changes according to environmental stress, such as fermentation of food, limitation of nutritional supplement, and treatment of bactericidal materials. The correlation between LAB diet and affecting in intestinal bacteria community needs to be analyzed to understand the LAB behave in the intestine.

In this study, we monitored the intestinal bacterial community changes by metagenomic analysis approach and collecting the bacteria associated with LAB supplement.

LAB was isolated from kimchi and primary identified by 16S rRNA sequencing, previously. On this, acid tolerance and bile resistance of LAB were examined and *L. plantarum* and *L. citreum* strains showed relative viability while *L. lactis* and *L. sake* strains were defected in acid tolerance and biliary resistance at pH 4 and 0.3% bile salt for 2 hours at 37°C, respectively. Antibiotic resistance was tested by a diverse spectrum of antibiotics, including vancomycin (inhibits the cell wall synthesis), ciprofloxacin (inhibition of DNA gyrase), chloramphenicol (inhibition of protein synthesis), and tetracycline (aminoacyl-tRNA binding inhibition). The *L. plantarum* and *L. citreum* also showed the resistant vancomycin, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline at 10ug/ml concentration.

The bacteria is also tested in mouse model with antibiotics treatment and hospitalized patient who have CDAD (Clostridium difficile Associated Disease) positive symptoms. The results showed that supplements of LAB enhance the clearance of Clostridium sp. in animal model and LAB also increased in the human fecal among the CDAD patient.

Proteomic and metabolomic approaches indicated the difference in the bacterial growth. Carbohydrate metabolites are related to protein expressed at the late stage of growth, while DNA replication is related to protein expressed earlier stage of the growth. We also sequence the whole genome of *L. plantarum* wikim 18 which showed the antibiotics and acid tolerance feature among the tested LAB. The genome sequence was annotated using RAST genome annotation servers. The contigs of *L. plantarum* wikim 18 were annotated to have 336 subsystems, 3,316 coding sequences, and 66 RNAs.

RAST server identified the genes present in the test strain genome, but not in the reference genome. Among these genes were those encoding a GlpG protein, glyceraldehyde-3-phosphate ketol-isomerase, and inosose isomerase associated with sugar alcohol production. The draft genome sequence of *L. plantarum* described in this report will help the understanding the future in kimchi fermentation.

CONTENTS

(영 문 목 차)

I. Title

Study of Kimchi Lactic Acid Bacteria on the Intestine Microflora of Antibiotics Treated Patient and Development of Clinical Testing and Research Model

II. Purpose and necessity of project

III. Content of project

IV. Result of project

V. Reference

VI. Outcome of project and its uses

연구개발보고서 초록

과 제 명	김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구		
	Study of Kimchi Lactic Acid Bacteria on the Intestine Microflora of Antibiotics Treated Patient and Development of Clinical Testing and Research Model		
연 구 기 관	세계김치연구소	연 구 자	(소속) 세계김치연구소
참 여 기 관	전북대학교병원 기능성식품 임상시험 지원센터	책 임 자	(성명) 이 종 희
연 구 비	계	200,000 천원	총 연 구 기 간
			2013.07.30 ~ 2014.07.29(12개월)
참 여 연 구 원	16명 (연구책임자: 1명, 책임연구원: 2명, 연구원: 8명, 연구보조원 5명)		

○ 연구개발 목표 및 내용

최근 증가 하고 있는 항생제 사용으로 인하여 장내 균총의 파괴 및 불균형이 심화 되고 문제가 되므로 다양한 유용미생물의 보고인 김치로부터 유래한 김치미생물을 이용하여 항생제에 의한 균총 파괴 완화 및 김치미생물 섭취에 의한 장내 균총의 변화 양상을 분석하고자 한다.

○ 연구결과

(1) 김치미생물의 동결 건조 후 특성 분석

동결건조 직후에는 모든 균주가 10^8 cfu/g 이상의 생존수를 나타내었다. -20°C 에 보관하였을 때, 7일차 14일차 모두 4°C 보다 모든 균주의 생존율이 우수하였다. -20°C 에 보관하였을 경우 7일차에서 66%의 생존율을 보인 *L. brevis*와 20%의 생존율을 보인 *P. pentosaceus*를 제외한 대부분의 균주가 70% 이상의 생존율을 유지하였으며 *W. confusa*는 100%를 나타내었다. 4°C 7일차의 경우 *W. confusa*가 85%, *L. plantarum*, *L. citreum*, *L. sakei*가 70% 이상의 생존율을 보였으며, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides*가 60%대의 생존율을 나타내었다.

(2) 김치미생물의 항생제 특성 분석

그람양성균인 김치미생물의 항생제 저항성을 보기 위해 다양한 항생제로 MIC를 측정하였다. 실험의 결과, 10종의 김치미생물 모두 ketoconazole, fluconazole과 같은 세포막의 기능을 억제하는 azole계열 항생제에 10ug/ml 농도에서도 저항성을 가지는 것을 확인하였다. Ciprofloxacin의 경우 *L. mesenteroides*가 2.5ug/ml 농도에서 저항성을 보이는 것을 제외하고 나머지 9종의 김치미생물이 10ug/ml 농도에서 생존하였으며, Trimethoprim의 경우도 *L. fermentum* 균주만이 1.25ug/ml에서 저항성을 보였고, 나머지 9종의 김치미생물은 10ug/ml에서도 생존하였다. Vancomycin은 8종의 김치미생물에서 10ug/ml의 MIC를 나타내었고 *L. acidophilus*와 *L. lactis*가 1ug/ml 미만의 낮은 농도에서 생육이

저해되는 것을 확인하였다. *P. pentosaceus*은 항생제 11종에 대해 전반적으로 높은 저항성을 보였으며, *L. plantarum*도 moxifloxacin에 2.5ug/ml 농도의 MIC를 갖는 것을 제외하고는 10종의 항생제에 비교적 높은 저항성을 보이는 것을 알 수 있었다.

(3) 동물 모델을 이용한 항생제의 장내 균총 불균형 및 김치미생물 섭취에 의한 복원

항생제 처리 1주, 2주와 비교하여 항생제 처리 후 김치미생물을 처리 하였을 때 Bacteroidetes가 유의하게 증가하고, Firmicutes가 감소하는 것을 알 수 있었다. Clostridium은 Firmicutes에 속하는 genus로, Clostridium cluster 1에 속하는 *C. perfringens* 나 Clostridium cluster XI에 속하는 Clostridium difficile 경우 Gram-positive spore forming bacteria로 host intestine에 pathogenesis한 성격을 갖는다. 전반적으로 항생제 처리 그룹과 비교하여 항생제 처리 전 그룹, 항생제 처리 후 김치미생물을 처리하였을 때 Clostridium sp. 가 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 항생제 처리로 인하여 host에 negative effect를 줄 수 있는 미생물 균총이 증가하는 반면 김치미생물 처리로 인하여 그러한 미생물이 감소하는 결과를 얻었다.

(4) CDAD (위막성 장염) 환자의 김치미생물 섭취

동결 건조된 김치미생물 10종을 섭취하였을 때, 섭취 전과 비교하여 장내 미생물 균총의 변화를 분석을 이용하여 metagenomic analysis로 확인하였다. 환자에 따라 약간의 차이는 있었지만 장내에 존재하는 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Weissella의 비율이 증가하였다. 또한, 유해균 속(屬)으로 알려졌으며 인체에 장질환을 유발하는 Clostridium의 비율이 감소한 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, Salmonella의 장내 생존율도 감소하였다.

○ 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

(1) 학술대회 발표 2건

2014. 한국미생물 생명공학회 포스터 및 구두발표

(2) 특허

출원번호: 10-2014-0086872, 락토바실러스플란타룸 W I K I M 1 8 및 이를 포함하는 조성물

(3) 논문

Jang JY, Lim HI, Park HW, Choi H-J, Kim T-W, Kang M, Lee J-H. 2014. Draft genome sequence of Lactobacillus plantarum wikim18, isolated from Korean kimchi. Genome Announc. 2(3):e00467-14. doi:10.1128/genomeA.00467-14.

2. 성과활용 계획

특허 관련 기술 이전 및 김치미생물의 장내 균총 개선 효과에 대한 홍보

II. 연구개발의 목적 및 필요성

□ 연구개발대상의 국내외 연구 동향

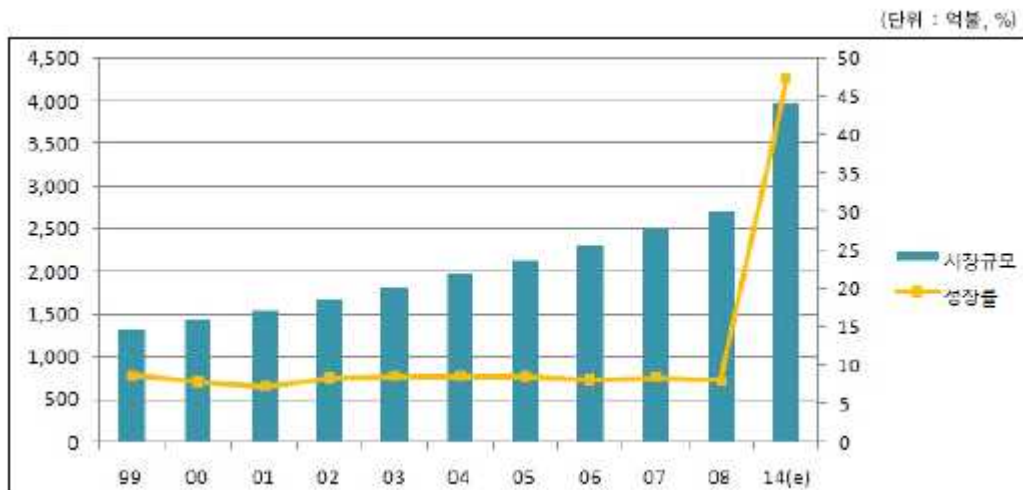
- 건강기능성 식품은 소비생활의 향상과 함께 시장이 급격히 증가 하고 있으며 특히 프로바이오틱스 관련 상품 시장은 급격한 성장이 진행되고 있다.
 - 프로바이오틱스의 기능은 주로 장내 미생물의 조절에 의해 수행되며 장관은 미생물총(microbiota)에 의한 복합적인 환경을 조성하며 이들 미생물은 숙주에 대하여 다양한 작용을 하게 된다. 특히 Lactobacillus와 Bifidobacterium이 우세할 때 숙주의 건강에 유리한 환경을 만든다. 신생아의 장내 미생물의 우점종과 건강상태에 대한 연구에서 많은 종류의 유산균이 절대적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다.
 - 우유에 pro(e)biotics의 첨가는 신생아의 장내미생물총을 변화시켜 면역력을 증가시켜 Th1 반응을 유도하며 알레르기 질환을 감소시키는 결과가 보고되었고 프로바이오틱스에 의한 면역력 증강 효과는 균주에 따라 차이가 있다. 균주에 따라 면역 활성화의 기전도 다르게 나타난다. 프로바이오틱스는 인체의약품 정장제와 유산균제제, 사료첨가제, 유산균 발효식품의 세 가지 제품형태로 판매되고 있다. 최근 프로바이오틱스는 항생물질과 항염증성 의약품으로 점점 더 관심이 고조되고 있지만 아직 그 작용기전에 대한 이해는 미흡하며 프로바이오틱 균주마다 독특한 특성이 있기 때문에 사용하는 목적과 질병의 예방 및 치료에 적합한 균주의 탐색이 필요하다.
 - 프로바이오틱 세균은 상피세포에 부착하여 병원균의 부착을 차단하는 항부착 효능이 있다. 항부착 효능은 동일 수용체나 뮤신(mucin)에 대하여 프로바이오틱과 병원균 사이에 경쟁을 초래한다.
- 식약처의 자료에 의하면 2010년 프로바이오틱스의 국내 시장 규모는 약 350억원대로 추정되고 있으며 건강기능식품 생산 및 수입실적에서 2007년 이후 10위권 내의 상위권의 시장을 형성하고 있다.
- 대부분 프로바이오틱스의 개발방향은 유산균 음료와 정장제를 개발하여 건강보조제로 사용하기 위하여 개발되고 있다. 국내외 유산균 개발의 주요 목적은 장내에 건강한 유산균을 단순히 주기적으로 공급하는 측면에서 면역 등의 부가 기능성을 가지고 있는 유산균을 선발하여 아토피환자 완화효과 등에 사용하고 있으며 미생물 유래의 기능성 물질인 GABA 생산균을 이용한 기능성 제품과 미생물 유래 피탄산 분해효소를 이용하여 미네랄킬레이트인 피탄산을 분해하여 미네랄의 인체 이용률을 증가 시키려는 방향으로 연구가 진행되고 있는 등 프로바이오틱스로부터 생성되는 항균물질을 식·의약품 또는 사료용으로 이용하는 기술 연구가

진행되고 있다.

◦ 본 연구는 김치유산균의 유산균을 이용하여 항생제 사용으로 인한 장내 균총의 불균형을 완화시키는 효과를 검증하는 연구로서, 현재 유산균으로 인한 장내 균총 변화 및 김치유산균을 이용한 연구가 진행된바가 없다. 기존의 유산균을 이용한 설사관련 연구에서도 유산균의 단순섭취에 의한 식중독 로타바이러스 감염억제 및 동물의 면역력 증강 사료개발 등 유산균 섭취에 의한 효과를 단순 분석하여 김치유산균 섭취가 장내 균총 개선 및 항생제의 영향으로 인한 장내 균총 불균형을 복원하는 효과에 대한 직접적 인과 관계에 관한 연구는 진행되지 않았다.

- 연구진은 김치식이를 통한 마우스분변의 미생물균총 변화 분석(선행연구결과 참조)를 통하여 김치미생물의 장내 균총 유익균 증가, 유해균 감소의 연구결과를 도출하였으며 특히 Clostridium sp.가 속한 Clostridia 미생물의 감소를 확인하였다. 이는 본 과제에서 달성하고자 하는 김치미생물 섭취에 의한 유해균 억제기작을 밝히는데 있어 중요한 상관관계가 있다고 사료된다.

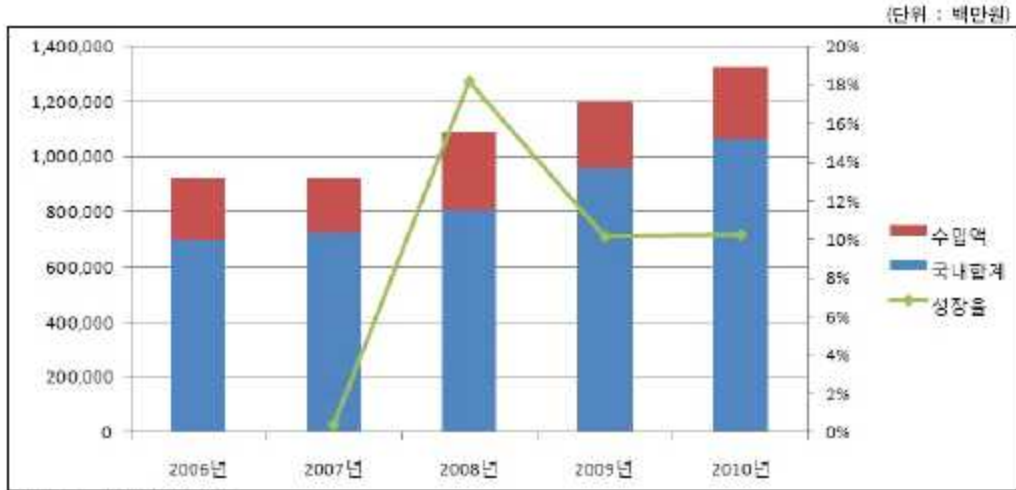
- 본 연구에서는 김치유산균의 섭취에 따른 설사의 완화 효과를 분석하고 메타제놈분석방법을 이용하여 동물 및 임상환자의 장내 미생물 변화를 분석하는 연구를 진행함으로써, 김치유산균 투여로 인한 장내 균총의 복원 등에 대한 직접적인 자료 분석을 통해 김치유산균의 항생제 연관 설사에서의 장내 정착을 확인하였다.



<연도별 세계 기능성 식품 시장 규모> (식품의약품안전평가원 2011)

건강에 대한 식생활의 변화 및 고령화로 인한 소비자의 관심증가로 인하여 기능성 식품에 대한 관심은 지속적으로 증가하고 있으며 이에 따라 성장 잠재력이 큰 시장으로 인식되고 있다. 식품의약품안전평가원의 2011년 보고서에 의하면 2008년 2,698억불의 시장을 형성한 세계

기능성 식품 시장은 2014년에는 3,973억불의 규모를 형성할 것으로 예상되어 약 47.3%의 폭발적 성장을 할 것으로 예상된다.



자료원 : 식품의약품안전청

<연도별 건강기능성식품 생산 및 수입실적> (식품의약품안전처)

국내 시장에서 건강기능성 관련 제품의 생산과 수입은 1조원대의 시장을 형성 하고 있으며 국내생산량이 증가하고 있는 추세를 보이고 있다.

건강기능성 제품의 판매에 있어서도 프로바이오틱스 제품은 2010년 약 348억의 시장 규모를 형성하고 있으며 전년대비 25%의 성장을 보이고 있으나, 그 효용과 가능성에 비해 비교적 적은 성장 규모를 보이고 있어 김치 유산균을 활용한 다양한 제품군의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

구분	총 판매액 (억원)					증가율 (*10^09,%)	
	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년		
총액	7,008	7,235	8,031	9,598	10,671	△20	
1	총합	2,469	3,284	4,184	4,995	5,817	△16
2	개별인정형	73	249	416	800	1,129	△41
3	비타민 및 무기질	636	604	531	761	991	△30
4	알로에	1,031	797	639	648	584	▽10
5	오메가-3지방산 함유유지	152	142	266	334	348	△4
6	인삼	364	348	413	364	341	▽6
7	프로바이오틱스	168	174	190	254	317	△25
8	가르시니아카뎀보지아추출물 ¹⁾	-	-	-	-	208	-
9	식이섬유	16	3	1	99	117	△18
10	프로폴리스추출물	53	64	49	100	97	▽3
11	기타품목	1,875	1,363	1,195	1,213	721	▽41

자료원 : 식품의약품안전청

1) 2010년 1월 1일부터 개별인정형 품목에서 고시형 품목으로 분류되었으며, 2008~2009년에는 개별인정형에 포함되어 있음.

<건강기능성 제품 판매실적> (식품의약품안전처)

□ 국내·외 인정·허가 현황

식품의약품안전처에서는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salioarius*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*를 유산균 증식 및 유해균 억제·배변활동 원활 등 장 기능 개선에 기능성을 가지는 프로바이오틱스로 인정하였다. (주)프로바이오 에서는 식약처에서 인정한 프로바이오틱스 균 중 8가지 균 (*L.acidophilus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*)을 혼합하여 만든 제제를 이용한 기능성 식품을 개별인증받아 제품화하여 판매하고 있다.

현재 장내균총 이상 (항생물질, 화학요법제 투여 등)에 의한 변비, 묽은 변, 복부 팽만감, 장내이상발효 증상의 회복 및 정상 효과에 따른 유산균 제제가 시판되고 있으며 식품의약품안전처에서는 *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei variety rhamnosus*의 동결건조 배양물 등 17여종의 성분을 인정하여 바이넥스, 일동제약, 한미약품 외 약 40여개 회사에서 제작되는 234개 품목이 허가 사용되고 있으나 장내 유해균주 억제 효과와 위막성 대장염 관련 효과를 나타내는 제품은 전무한 실정이다.

국외에서는 주로 유산균을 이용하여 영양보조제로써 probiotics 제품을 개발하여 판매하고 있고, 비피더스균을 이용한 제품이 가장 많으며 그 외 산코우 lifetech사의 *Bacillus coagulans*, 콤비사가 개발하여 사용하는 유산균인 *Enterococcus faecalis* 등이 제조되어 시판되고 있다. FAO/WHO 합동 프로바이오틱스 전문가위원회에서는 기능성과 안전성을 고려하여 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*를 사용하는 것을 권장하였다 (2001).

유럽에서는 네슬레, 바리오, 크리스찬 한센 등의 기업을 주축으로 프로바이오틱스 시장이 형성되어있으며, 유럽식품안전청(EFSA)에서 프로바이오틱스로 공시한 균주는 다음과 같다.

Micro-organisms in probiotic products

Lactobacilli	Bifidobacteria	other LAB	non-LAB
<i>L. acidophilus</i> (<i>L. casei</i>) <i>L. crispatus</i> <i>L. gallinarum</i> ^a <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> ^b <i>B. longum</i>	<i>Ent. faecalis</i> ^a <i>Ent. faecium</i> <i>Lactoc. lactis</i> ^c <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ^c <i>Ped. acidilactici</i> ^c <i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a <i>Strep. thermophilus</i>	<i>Bacillus cereus</i> ("toyoi") ^{a,d} <i>Escherichia coli</i> ("Nissle 1917") ^d <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{a,d} <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ("boulardii") ^d

^a in animal nutrition, ^b Synonymous with *B. animalis*, ^c unknown probiotic effects, ^d in pharmaceutical preparations

(출처 : 유럽식품안전청 홈페이지)

□ 국내 · 외 사용현황

연번	품목	회사명	성분명	효능·효과
1	비오플 250캡슐 등 22개	건일제약 등	사카로마이세스보올라르 디균	장내균총 이상(항생물질, 화학요법제 투여 등)에 의한 여러 증상의 개선: 정장, 변비, 묽은 변, 복부 팽만감, 장내이상발효
2	벤투룩스 30mg 캡슐 등 7개	동구제약 등	엔테로코쿠스페슘(스트렙 토코카스페시움)스트레인 세르넬레68균	장내균총 이상(항생물질, 화학요법제 투여 등)에 의한 여러 증상의 개선: 정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장내이상발효
3	비스칸정 등 23개	바이넥스 등	바실루스폴리퍼멘티쿠스 엔에스피균	정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장애이상발효
4	비스칸지캡셀 등 4개	바이넥스 등	바실루스폴리퍼멘티쿠스 엔에스피균, 클로스트리듐부티리쿰토 아균	정장, 변비, 묽은변, 복부팽만감, 장내이상발효
5	비스칸엔산 등 19개	바이넥스 등	바실루스리케니포르미스 균	급·만성 장염, 급·만성 설사, 급성 이질, 각종 원인에 기인한 장내 이상발효

6	비오티스큐정 등 2개	일동제약 등	락토바실루스 스포로게네스균, 바실루스 서브틸리스균	정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장내이상발효, 소화불량, 식욕감퇴(식욕부진), 과식, 체합, 소화촉진, 소화불량으로 인한 위부팽만감
7	비오비타과립	일동제약	락토바실루스스�포로게네스균, 클로스트리디움부티리쿰균, 바실루스서브틸리스균	식욕부진, 복부팽만감, 정장(특히 인공영양아의 정장), 장내이상발효, 묽은 변, 변비, 영양장애(이유기 유아 및 편식아)
8	더블락캡슐	일양약품	락토바실루스스�포로게네스균	소화불량, 식욕감퇴(식욕부진), 과식, 체합, 소화촉진, 소화불량으로 인한 위부팽만감, 정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장내이상발효
9	로페베론캡슐 등 44개	크라온제약 등	엔테로코쿠스(스트렙토코카스)페칼리스F-100균	설사, 복통을 수반하는 설사, 묽은 변, 식체, 토사
10	미야리산엔젤과립등 4개	한독 등	클로스트리듐부티리쿰미야이리II588균	정장, 묽은 변, 변비, 복부(배부분)팽만감
11	라시도필캡슐	한국팜비오	락토바실루스람노수스R0011균 락토바실루스아시도필루스 R0052균 혼합배양물	장내세균총이상의 회복 및 정상화
12	메디락디에스장용캡셀 등 14개	한미약품 등	바실루스서브틸리스균, 엔테로코쿠스(스트렙토코카스)페시움균 배양물	장내균총 이상(항생물질, 화학요법제 투여 등)에 의한 여러 증상의 개선: 정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장내이상발효
13	바이오답캡슐 등 3개	한올바이오파마 등	락토바실루스아시도필루스균, 바실루스메센테리쿠스토아균, 클로스트리디움부티리쿰토아균, 엔테로코쿠스(스트렙토코카스)페칼리스T-110균	정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장내이상발효

14	안티비오캡셀 300mg 등 38개	한화제약 등	락토바실루스아시도필루 스균	장내균총이상(항생물질, 화학요법 제투여등)에 의한 여러증상의 개선: 정장, 변비, 묽은변, 복부팽만감, 장내이상발효
15	람노스과립 등 3개	한화제약 등	락토바실루스 카제이 변종 람노수스의 동결건조 배양물	장내균총의 정상화에 의한 정장 및 설사증상의 개선
16	비오알정 등 3개	유니메드 제약 등	엔테로코쿠스(스트렙토코 카스)페칼리스비아이오4 알균	장내균총 이상(항생물질, 화학요법제 투여 등)에 의한 여러 증상의 개선: 정장, 변비, 묽은 변, 복부팽만감, 장내이상발효
17	원기에스정	비씨월드 제약	스트렙토코카스페칼리스 균	식욕부진, 영양장애, 정장, 묽은 변, 변비, 복부팽만감, 장내이상발효, 소화불량

(출처: 식품의약품안전처-유산균제제 허가현황)

- *L. acidophilus*의 경우 국내 여러 제약회사에서 인증받아 사용하고 있으며, 생균제로 한화제약의 안티비오 과립 300mg (http://m.hwpharm.com/product/product_view.asp?v_idx=7&ctgNO=01)은 성인에게 있어 제제 1 g 중 300 mg의 *L. acidophilus*를 포함하고 있으며 1회 1 g 하루 3회 복용토록 하고 있다.
- 듀오락골드는 *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* 등의 유산균을 1포 5 g당 3×10^8 의 균을 함유 하고 있으며 하루 3회 복용토록하고 있다.
- 암웨이의 인스타플로라7은 *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. lactis*, *L. plantarum* 등을 포함하고 있으며 하루 3회 1포씩 을 섭취하도록 하고 있으며 각각 1×10^8 이상의 균수를 가지고 있다.

-제 1세부과제-

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

□ 연구방법

김치미생물의 확보

본 연구에서 사용한 미생물 strain WIKIM18은 *Lactobacillus plantarum* (=KFCC 11588)에 속하는 novel strain으로 보여지며 세계김치연구소 김치에서 분리, 동정하였다. 그리고 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaceus*는 김치로부터 분리하여 사용하였다.

김치미생물의 동정

각각의 균주는 MRS broth에 배양 후 genomic DNA extraction kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel을 이용하여 확인하였으며, 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 추출된 genomic DNA를 template로 하여 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', forward), 1492R (5' - GGCTACCTTGTTACGACTT - 3', reverse) primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 denaturation 95°C 1min, annealing 45°C 1min, extension 72°C 1min 30sec로 30 cycle을 수행하였다. 얻어진 PCR product는 sequencing을 위해 purification Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 정제하였다. DNA 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 분리균주를 동정하여 각각의 미생물임을 확인하였다.

김치미생물의 대사물질 비교

김치미생물은 *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *W. confusa*를 선택하여 실험하였다. 세 균주를 각각 김치미생물에 적합한 배지인 MRS broth에 접종한 후 30°C에서 2시간, 4시간, 6시간, 8시간 배양하고 이 균액을 10000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그 후 상층액과 acetonitrile을 1:1(v/v)로 혼합하여 1분 동안 교반시켜 다시 13000rpm에 10분 동안 원심분리한다. 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담아 ESI-LC/MS-TOF로 분석하였다.

ESI-LC/MS-TOF분석은 AB SCIEX analyst 소프트웨어를 장착한 AB SCIEX TripleTOF® 5600+ 시스템 (AB SCIEX)을 사용하여 electro spray ionization mode (negative)에서 실시

하였다. 이동상은 10mM ammonium acetate를 포함하는 물과 10mM ammonium acetate를 포함하는 acetonitrile이었으며, ACQUITY UPLC BEH C18 Column (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm)으로 분석하였다. 75% acetonitrile(v/v)을 5분 동안 진행하여 0.4 ml/min의 유속으로 분리하였다. 결과 분석은 Markerview™ 소프트웨어를 사용하였다.

김치미생물의 탄소원 이용 조사

김치미생물의 탄소원 이용을 분석하기 위하여 BIOLOG Universal Growth Medium (BIOLOG, Hayward, USA) plate에 24시간 동안 배양하여 얻은 10종의 신선한 김치미생물 집락들을 cotton swab으로 채취하여 Inoculating Fluid 용액 속에 90~98% 현탁시킨 후 균 현탁액을 microplate (BIOLOG GENIII Microplate™)의 96 well에 100ul씩 분주하여 37°C에서 48시간 동안 각각 배양하였다. 배양된 MicroPlate의 결과는 MicroLog™ database software를 통해 확인하였다. 각 균주를 배양한 microplate 상에서 탄소원 이용 여부는 Biolog program 사용설명서에 따라 각 탄소원이 함유된 well의 변색유무를 확인하였다. 즉 탄소원이 들어있지 않은 대조구와 동일하게 변색되지 않은 well은 탄소원이 이용되지 않은 것으로 판명하고 보라색으로 변색된 well은 탄소원이 이용된 것으로 판명하였다.

김치미생물의 내산성, 내담즙성 분석

산에 대한 김치미생물의 저항성을 측정하기 위해 HCl로 pH를 조절한 배지를 사용하였으며, 담즙에 대한 저항성 시험은 bile salt의 농도를 조절한 배지를 사용하였다. 30°C에서 20시간동안 MRS broth 배지에 배양한 균액을 각 조건배지에 접종(10^8 cfu/ml)하였다. 내산성 시험에 사용된 조건배지는 HCl로 pH를 2, 4로 맞춘 MRS broth 배지이며, 내담즙성 시험에 사용된 조건배지는 bile salt를 각각 0.3%, 1.0% 포함한 MRS broth 배지이다. 각 조건배지에 접종한 후 37°C에서 2시간 동안 배양하고 이 균액을 다시 MRS plate에 접종한 후 30°C에서 36시간 배양하여 증식유무를 관찰하고 순수한 MRS broth 배지에 배양한 균 집락의 개수와 비교하였다.

항생제에 대한 김치미생물의 Minimal inhibitory concentration (MIC) 측정

김치미생물을 대상으로 vancomycin, ciprofloxacin, erythroprim, ketoconazole, moxifloxacin, gentamicin, trimethoprim, minocycline, tobramycin, chloramphenicol, fluconazole (sigma)에 대한 감수성을 측정하였다. 항생제 농도는 최고 농도 10 µg/ml부터 2배 계열희석 하여 최소 농도가 0.01µg/ml이 되도록 하였다. 여기에 전 배양한 균액을 10^6 CFU/ml이 되도록 MRS broth 배지로 희석한 후 100µl씩 항생제에 접종하여 배양하고 균

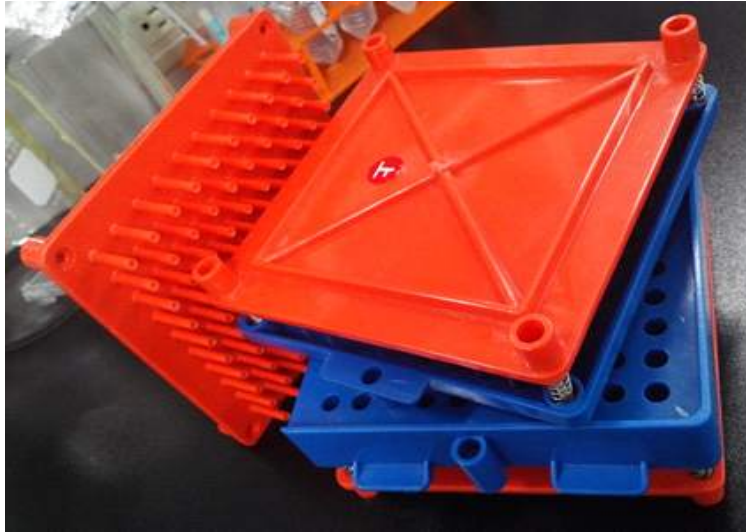
주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 항생제의 농도를 최소억제농도(MIC)로 결정하였다.

동결건조 김치미생물의 생존율 측정

세계김치연구소에서 특허 출원된 동결보호제로서 콩가루를 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법 (출원번호 10-2013-0087978)을 이용하여 김치미생물 제제화에 사용하였으며 식품첨가등급의 10% 탈지유, 10% 효모추출물, 20% 콩가루, 10% trehalose를 동결건조 보호제로 선정하고 0.9% 생리식염수를 대조구로 사용하여 동결보호 효과를 확인하였으며 콩가루를 동결보호제로 사용하였을 경우 가장 높은 생존율을 나타내는 것으로 특허출원되었으며 따라서 효과가 뛰어난 20% 콩가루수용액을 동결건조 보호제로 선정하였다. 김치미생물을 약 1.2×10^{10} cfu/ml의 농도로 30℃에서 배양하고 균액을 8000rpm에서 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 남은 균을 0.85%의 NaCl을 이용하여 세척하였다. 세척이 끝난 균은 20%의 콩가루수용액과 동일 부피로 혼합하여 2일의 기간 동안 동결 건조하였다. 동결건조 후 김치미생물의 생존율을 알아보기 위해 -20℃와 4℃에 각각의 김치미생물을 저장하고 7일, 14일 저장하였을 때 생존율을 측정하였다.

동결건조 후 김치미생물의 장내 생존율 측정

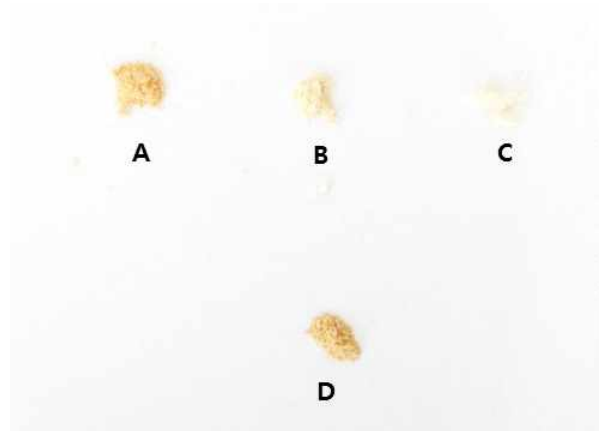
김치미생물을 약 1.2×10^{10} cfu/ml의 농도로 30℃에서 배양하고 균액을 8000rpm에서 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 남은 균을 0.85%의 NaCl을 이용하여 세척하였다. 세척이 끝난 균은 20%의 콩가루수용액과 동일 부피로 혼합하여 2일의 기간 동안 동결 건조하였다. 동결 건조된 균은 파쇄 하여 분말화 시킨 후 캡슐제조장치를 이용하여 약 300mg의 양이 캡슐에 포함되도록 포장하였다. 또한, 완성된 김치미생물복합제의 장내 생존 및 장내미생물 군총 변화 효과를 대조군 (placebo, 위약)과 비교·평가하고자 하여 색이 유사하며 식용 가능한 원료를 탐색하였다. 그 결과 10% 탈지분유 (skim milk)와 10% 콩가루수용액이 가장 적합하다고 판단되어 실험을 진행하였다.



캡슐제조장치



김치미생물복합제(캡슐)

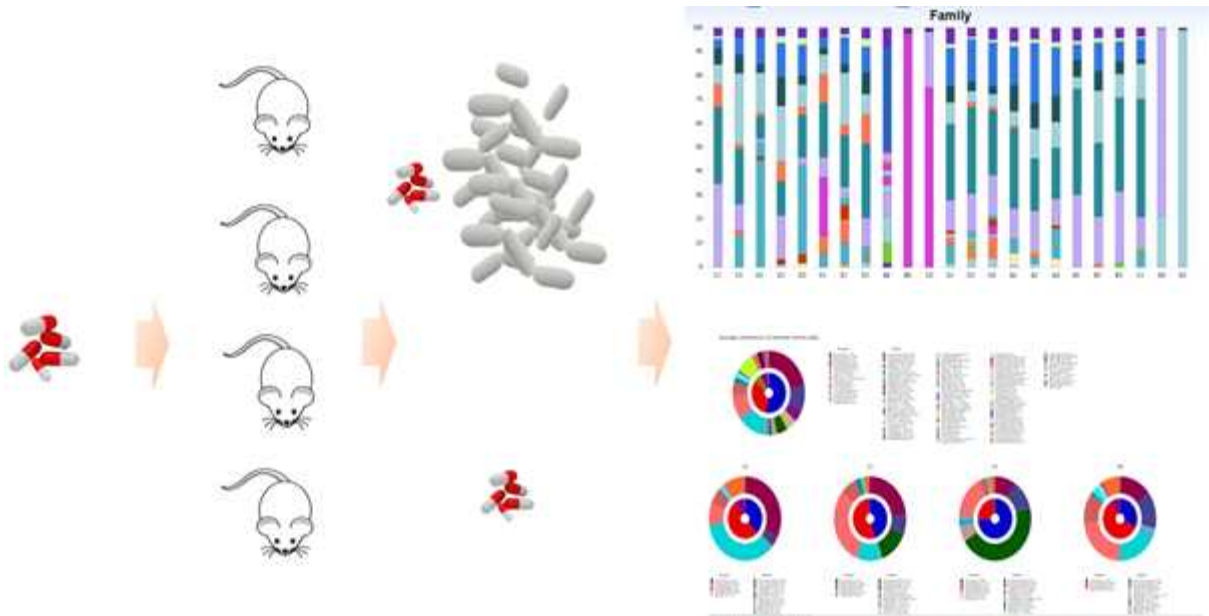


A: 콩가루10%+ Skim milk 10% 동결건조
 B: 콩가루5%+ Skim milk 5% 동결건조
 C: 콩가루1%+ Skim milk 1% 동결건조
 D: 콩가루20%+ 균체 pellet 동결건조

김치미생물복합제의 장내 균총 개선 효과

동물실험(Mouse)

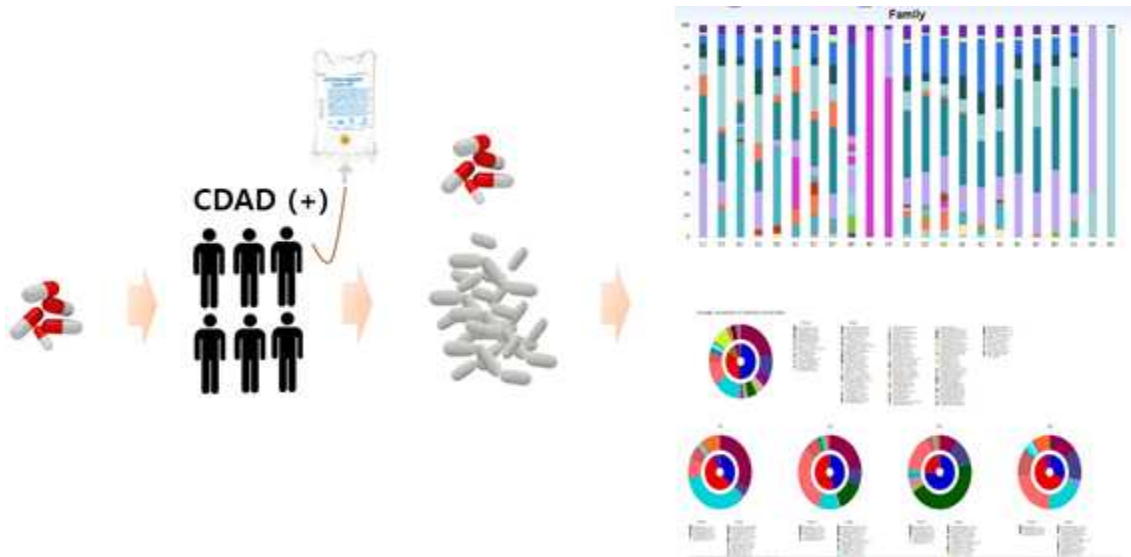
김치미생물의 장기능 개선 효과를 알아보기 위하여, 6주령 Balb/c mouse를 이용한 동물실험을 계획하였고 항생제는 널리 쓰이는 ciprofloxacin을 준비하였다. Ciprofloxacin은 200mg/kg으로 2주동안 경구투여하고, 김치미생물의 장기능 개선 효과를 확인하기 위해 항생제를 경구투여한 mouse에 10^8 cfu/ml의 동결건조된 김치미생물 10종을 1주 동안 경구투여한 후 매주 분변을 채취하여 장내 균총의 변화상을 metagenome 분석하였다. 실험은 증류수를 투여한 group, 증류수 후 김치미생물을 투여한 group, 항생제를 투여한 group, 항생제 후 김치미생물을 투여한 group 이렇게 총 4개의 group으로 나눠 실험을 진행하였다.



인체적용시험

탐색적 인체적용시험은 자원자에 한해 병력 및 약물투여력 조사, 신체검진, 진단검사의학 검사 등을 통하여 연구대상자를 선정하였다. 연구대상자는 전북대학교병원에서 김치미생물복합제를 섭취하기 전에 분변을 제공하고, 7일 분량의 김치미생물복합제를 제공 받아 섭취하며 항생제유발설사(CDI)에 대한 의학적 표준치료 (Vancomycin 1회 250mg, 1일 1,000mg 복용)를 병행한 다음 분변을 제공하였다.

확증적 인체적용시험은 자원자에 한하여 병력 및 약물투여력 조사, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 연구대상자로 적합한 자를 선정한다. 연구대상자는 첫 방문에 전북대학교병원에서 김치미생물복합제 섭취군 및 플라세보 섭취군에 각 10명씩 무작위배정된 후 정해진 검사를 받는다. 연구대상자는 7일 분량의 인체적용시험용제품 (김치미생물복합제, 위약)을 제공 받아 섭취하며 CDI에 대한 의학적 표준치료 (Vancomycin 1회 250mg, 1일 1,000mg 복용)를 병행한다. 연구대상자는 7일 후 전북대학교병원에서 정해진 검사를 받고 다시 7일 분량의 인체적용시험용제품을 제공받아 섭취하며 CDI에 대한 의학적 표준치료 (Vancomycin 1회 250mg, 1일 1,000mg 복용)를 병행한 다음 15일 차에 분변을 제공한다.



Barcode primer를 이용한 PCR 수행

분변샘플의 미생물의 다양성을 분석하기 위하여 각 분변샘플에서 metagenomic DNA를 추출하였고, 16S rRNA 유전자 중 가변영역인 V1~V3부분을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 제작하였다. 세균특이적 primer에 27F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')/518R (5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'), sequencing을 진행하는 각각의 역방향 primer에는 pyrosequencing을 수행하기 위한 adaptor A부분과 핵심 염기서열인 TCAG, 10개의 염기서열로 이루어진 각각의 barcode, linker를 붙이고, sequencing을 하지 않는 정방향 primer에는 adaptor B와 핵심 염기서열과 각각의 linker를 붙여 제작하였다 (표1, 2). 추출된 미생물의 전체 genomic를 주형으로 삼아 제작된 primer로 PCR을 수행하였다 (표3).

표1. Barcoded-PCR primer에 사용된 adaptor

이름	염기서열(5'-3')
Forward primer adaptor B	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG
Reverse primer adaptor A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG

표2. 32마리 마우스 분변샘플 barcoded pyrosequencing 분석에 사용된 barcode primers

Group	Sample ID	Barcode
Before	0_1_1	ACGAGTGCCT
	0_1_2	ACGCTCGACA
	0_2_1	AGACGCACTC
	0_2_2	AGCACTGTAG
	0_3_1	ATCAGACACG
	0_3_2	ATATCGCGAG
	0_4_1	CGTGTCTCTA
	0_4_2	CTCGCGTGTC

AB1W	1_1_1	TCTCTATGCG
	1_1_2	TGATACGTCT
	1_2_1	CATAGTAGTG
	1_2_2	CGAGAGATAC
	1_3_1	ATACGACGTA
	1_3_2	TCACGTACTA
	1_4_1	CGTCTAGTAC
	1_4_2	TCTACGTAGC
AB2W	2_1_1	TGTACTACTC
	2_1_2	ACGACTACAG
	2_2_1	CGTAGACTAG
	2_2_2	TACGAGTATG
	2_3_1	TACTCTCGTG
	2_3_2	TAGAGACGAG
	2_4_1	TCGTGCTCG
	2_4_2	ACATACGCGT
AB2W+ P	3_1_1	ACGCGAGTAT
	3_1_2	ACTACTATGT
	3_2_1	ACTGTACAGT
	3_2_2	AGACTATACT
	3_3_1	AGCGTCGTCT
	3_3_2	AGTACGCTAT
	3_4_1	ATAGAGTACT
	3_4_2	CACGCTACGT

표3. PCR master mix 및 PCR 프로그램 조건

Master mix		PCR program			
Reagent	1 Amplicon	Step	°C	Min	Cycle
Forward Primer (10μM)	1 μℓ	Initial denaturation	94	3	1
Reverse Primer (10μM)	1 μℓ	Denaturation	94	15(sec)	25~35
dNTP mix (10mM each)	0.5 μℓ	Annealing	55~65	45(sec)	
Faststart 10X Buffer #2	2.5 μℓ	Extention	72	1	
Faststart HiFi Polymerase (5U/μℓ)	0.25 μℓ	Final Extention	72	8	
Molecular Biology Grade Water	18.75 μℓ	Hold	4	∞	
Total	24 μℓ				

Roche 454 GS-FLX plus를 이용한 차세대 염기서열 분석

Sequencing은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며 전체적인 분석방법은 다음과 같다.

(1) Microreactor형성

Library ssDNA를 DNA Capture beads (library의 A adapter와 결합할 수 있는 상보적인 primer가 존재하여 library와 결합이 가능) 섞어준다. DNA가 결합된 capture bead와 emulsion oil을 shaker를 이용하여 섞어준다.

(2) Emulsion PCR

Microreactor가 형성되면 PCR reagent와 반응하여 각각의 microreactor내부에서 clonal amplification이 일어나고 amplified DNA를 얻는다.

(3) PicoTiterPlate packaing

Sequencing이 일어나는 PicoTiter Plate에 Micro-reactor를 넣어준다. Picotiter Pllate (454 Life Sciences, 직경 44um pore를 가지고 있음) micro-reactor가 pore에 하나씩 들어가게 된다. 적정농도의 Micro-reactor를 plate에 흘려주고 centrifugation을 통해 deposit 시킨다. 그 후 pore의 공간을 채우기 위해 packing beads를 넣고 sequencing을 하기 위한 enzyme beads를 마지막으로 넣고 centrifugation을 통해 packing 완료한다.

(4) Pyrosequencing

Genome Sequencer FLX plus (454 Life Sciences)을 사용하여 sequencing을 진행하였다. 100만 개의 PicoTiter pore마다 pyrosequencing의 원리를 이용한 연속적인 sequencing이 이루어진다.

Bacterial 16s rRNA gene sequences와 community comparison 비교분석

장내 미생물상 변화 분석을 위해 아래와 같은 bioinformatic tool을 이용하였다.

[CD-HIT-OTU (operational taxonomic unit)]

: Preprocessing (length, quality, homopolymer error, chimera 등의 noise 제거)

: Clustering - 97%(Species) / 94%(Genus) / 90%(Family)의 cutoff로 OTU 생성하였다.

(Li,etal.,2012)

[Mothur] (Schloss,etal.,2009)

: 통계분석 - Shannon, Simpson index / Rarefaction Curve / Phylogenetic tree

Shannon-Weaver diversity index (Shannon, 1948)

Simpson index (Simpson, 1949)

[Silva database] (Quast,etal.,2013)

: Taxonomic assignment 를 위한 reference database로 이용하였다.

[BLAST] (Altschul,etal.,1990)

: Reference DB와의 상동성 비교를 위해 이용하였다.

[Needleman] (Needleman & Wunsch, 1970)

: Refernce DB와의 상동성 비교를 위해 이용하였다.

[MG-RAST]

: Community comparision 비교분석 목적으로 Principle Coordinate Analysis (PCoA)와 heatmap visualization 하기 위해 사용되었다.

동물실험 후 mouse 혈액의 cytokine 발현 분석

6주령 Balb/c mouse를 이용하여 항생제로 널리 쓰이는 ciprofloxacin을 200 mg/kg으로 2주 동안 경구투여하였다. 항생제를 경구투여한 mouse에 10^8 cfu/ml의 김치미생물 pool을 1주 동안 경구투여 한 후 혈중 cytokine의 변화를 보기 위해 항생제 투여 전·후 및 김치미생물 투여 후로 나눠 채혈하였다. 혈액은 3000rpm에서 원심분리하여 혈청을 준비하였다. 혈청 내 cytokine 분석은 mouse ELISA Kit (ENZO life science, USA)를 사용하여 제조사의 설명에 준하여 실시하였다.

먼저, 혈청의 경우에는 100 : 1의 비율로 세척액(1×)과 희석하였다. Standard도 같이 희석을 한 후 실험 플레이트에 100μL씩을 각각 분주 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어 well당 세척액 400μL씩 4회 반복 세척하였고, antibody 용액을 모든 well에 100μL씩 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 세척한 다음 conjugate 용액을 모든 well에 100 μL씩 분주하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 세척액으로 well당 400μL씩 세척하는 과정을 다시 4회 반복하고, substrate 용액을 모든 well에 100μL씩 분주한 후 30분간 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 플레이트에 반응정지액을 well당 100μL씩 넣고 잘 혼합하여

색이 변하도록 한 후 대조액과 standard, 그리고 각 시료의 흡광도를 파장 450nm에서 측정하였다.

Group	IL-6 level(pg/ml)			SD(pg/ml)		
	0 weeks	2weeks	3weeks	0 weeks	2weeks	3weeks
DW	14.0321	14.0315	14.0318	0.0009	0.0009	0.0005
DW+LAB	14.0322	14.0316	14.0318	0.0007	0.0015	0.0002
Drug	14.0329	14.0319	14.0320	0.0012	0.0003	0.0005
Drug+LAB	14.0324	14.0322	14.0321	0.0003	0.0002	0.0004

Group	TNF- α level(pg/ml)			SD(pg/ml)		
	0 week	2week	3week	0 week	2week	3week
DW	1.4468	1.4468	1.4468	0.0000	0.0001	0.0001
DW+LAB	1.4468	1.4468	1.4469	0.0001	0.0000	0.0001
Drug	1.4468	1.4468	1.4469	0.0000	0.0000	0.0002
Drug+LAB	1.4468	1.4467	1.4468	0.0001	0.0000	0.0000

Group	IL-2 level(pg/ml)			SD(pg/ml)		
	0 weeks	2weeks	3weeks	0 weeks	2weeks	3weeks
DW	13.7241	13.7241	13.7241	0.0001	0.0002	0.0003
DW+LAB	13.7242	13.7242	13.7241	0.0002	0.0002	0.0002
Drug	13.7244	13.7241	13.7246	0.0004	0.0002	0.0004
Drug+LAB	13.7246	13.7240	13.7242	0.0005	0.0002	0.0004

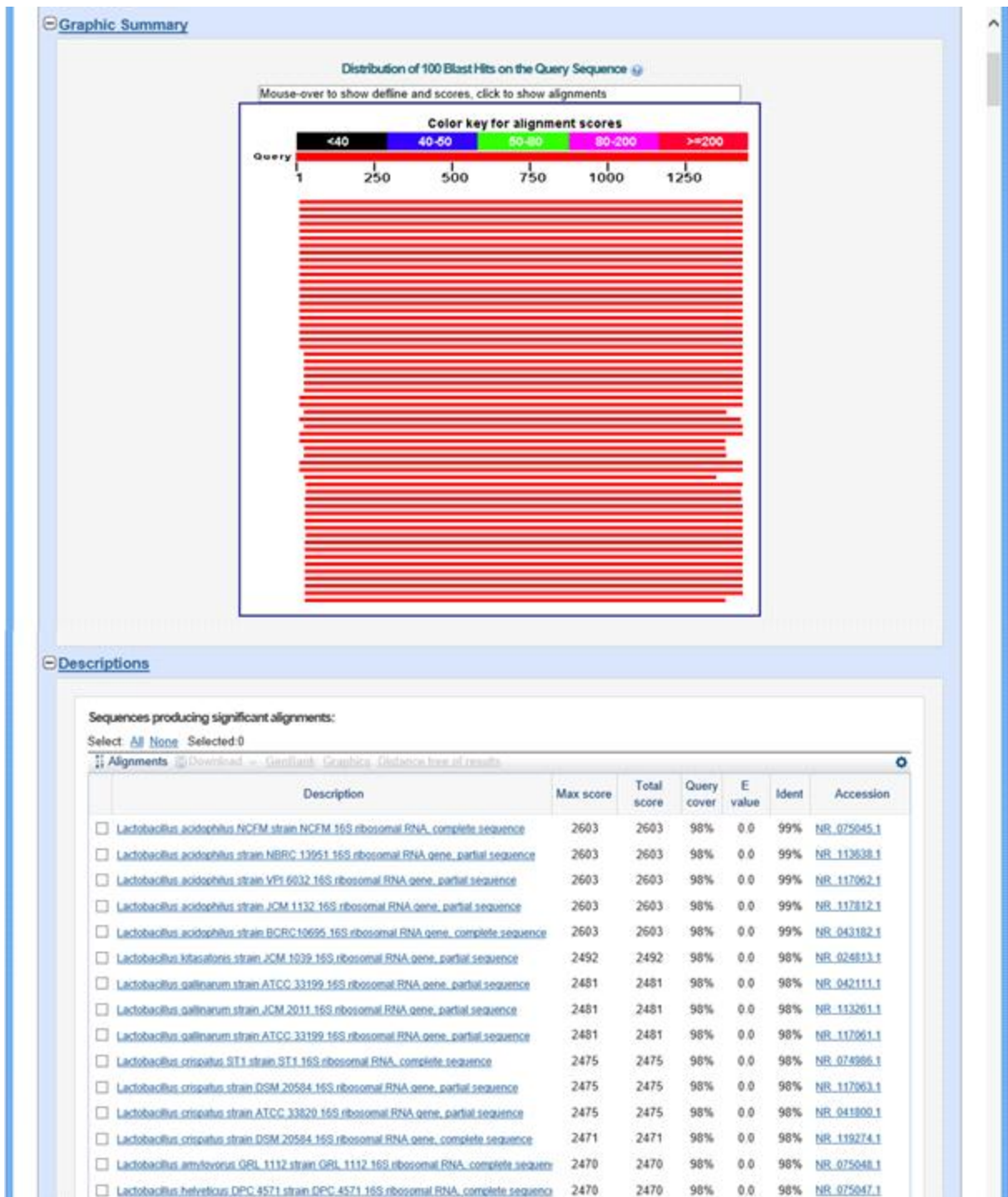
Group	IL-4 level(pg/ml)			SD(pg/ml)		
	0 weeks	2weeks	3weeks	0 weeks	2weeks	3weeks
DW	23.7172	23.7194	23.7168	0.0006	0.0012	0.0008
DW+LAB	23.7178	23.7182	23.7190	0.0031	0.0014	0.0013
Drug	23.7240	23.7164	23.7190	0.0018	0.0014	0.0012
Drug+LAB	23.7237	23.7165	23.7201	0.0022	0.0014	0.0015

Group	IL-10 level(pg/ml)			SD(pg/ml)		
	0 weeks	2weeks	3weeks	0 weeks	2weeks	3weeks
DW	9.0587	9.0587	9.0589	0.0003	0.0002	0.0003
DW+LAB	9.0586	9.0586	9.0589	0.0002	0.0002	0.0001
Drug	9.0587	9.0589	9.0591	0.0003	0.0002	0.0003
Drug+LAB	9.0587	9.0590	9.0593	0.0002	0.0001	0.0002

IV. 연구개발결과

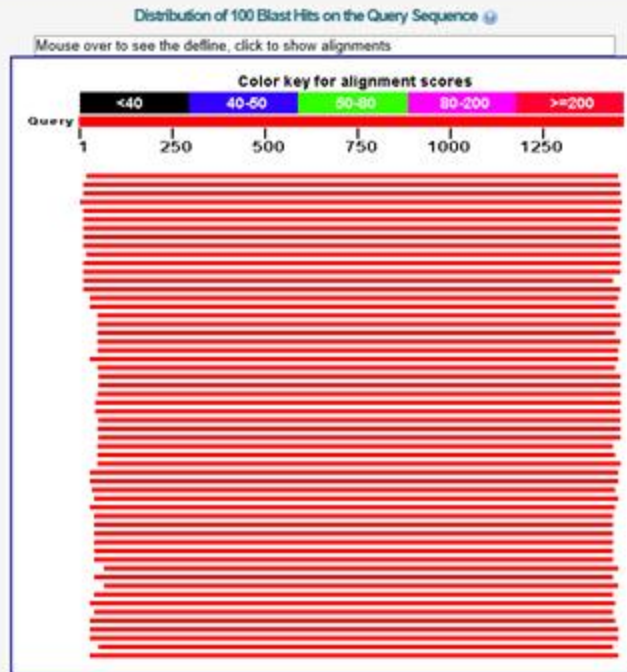
□ 연구결과

김치미생물 10종 16S sequencing 결과



*Lactobacillus acidophilus*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

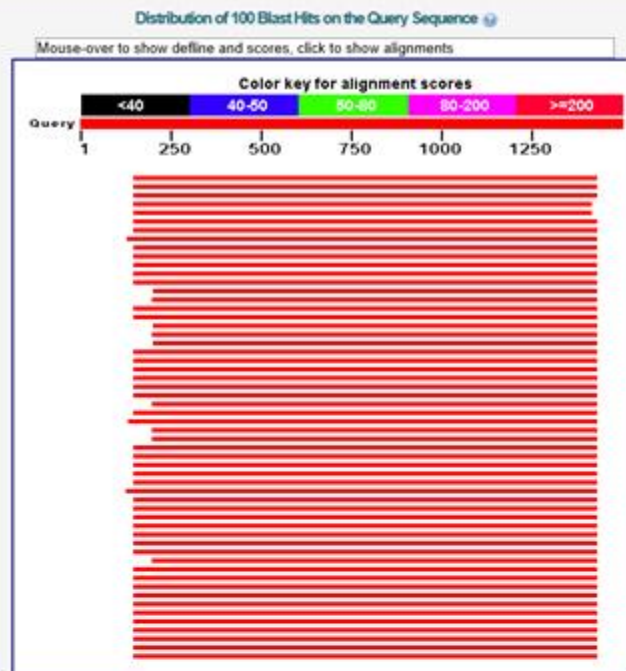
Select All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lactobacillus brevis strain ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2614	2614	97%	0.0	99%	NR_116238.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus brevis ATCC 367 strain ATCC 367 16S ribosomal RNA, complete sequence	2610	2610	98%	0.0	99%	NR_075024.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus brevis strain ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2601	2601	98%	0.0	99%	NR_044704.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus yoncinensis strain THK-V8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	98%	NR_109452.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus hammesii strain TMW 1 1236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2494	2494	98%	0.0	98%	NR_042243.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus senmazukeni strain NBRC 103853 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2488	2488	98%	0.0	98%	NR_114251.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus koreensis strain DCY 50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2468	2468	98%	0.0	98%	NR_116854.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus spicheri strain LTH 5753 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	98%	0.0	98%	NR_025579.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus parabrevis strain LMG 11984 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2453	2453	98%	0.0	97%	NR_042456.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus senmazukeni strain L13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2447	2447	97%	0.0	98%	NR_041584.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus acidifarinae strain R-19065 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2405	2405	98%	0.0	97%	NR_042242.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus zymae strain R-18615 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2401	2401	98%	0.0	97%	NR_042241.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus namurensis strain R-27965 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2361	2361	97%	0.0	97%	NR_042514.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus paucivorans strain TMW 1 1424 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2316	2316	98%	0.0	96%	NR_116943.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus oryzae strain SG263 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2200	2200	96%	0.0	95%	NR_114339.1

*Lactobacillus brevis*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

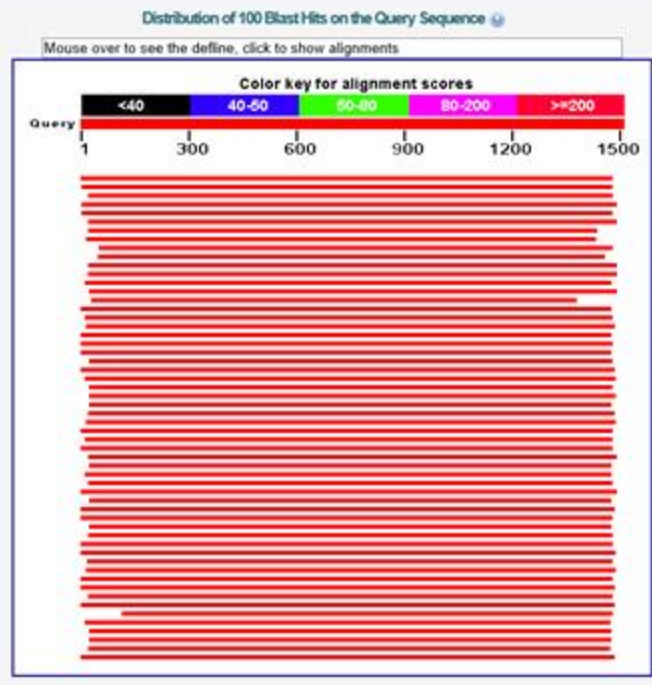
Select: All None Selected: 0

Alignments Download - GenBank Graphics Distance list of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain CIP 102990 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2222	2222	85%	0.0	98%	NR_104927.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2218	2218	85%	0.0	98%	NR_113335.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum JFO 3956 strain JFO 3956 16S ribosomal RNA, complete sequence	2217	2217	85%	0.0	98%	NR_075003.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain NCDO 1750 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2028	2028	84%	0.0	95%	NR_118928.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus ingluviel strain KR3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1989	1989	84%	0.0	95%	NR_028810.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus equigenosii strain NRIC 0697 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1969	1969	85%	0.0	95%	NR_041566.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus gassicus strain Kx156A7 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1960	1960	85%	0.0	95%	NR_029084.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus mucosae strain S32 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1945	1945	86%	0.0	94%	NR_024994.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus atvi strain R54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1927	1927	85%	0.0	94%	NR_118032.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus reuteri strain NBRC 15892 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1871	1871	85%	0.0	93%	NR_112820.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus reuteri strain DSM 20016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	85%	0.0	93%	NR_119069.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus reuteri strain DSM 20016 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1857	1857	85%	0.0	93%	NR_075035.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus colocolonis strain DSM 14060 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1855	1855	85%	0.0	93%	NR_042436.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus secaliphilus strain TMY 1.1309 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1851	1851	81%	0.0	94%	NR_042523.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus frumenti strain TMY 1.666 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1832	1832	81%	0.0	94%	NR_025371.1

*Lactobacillus fermentum*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

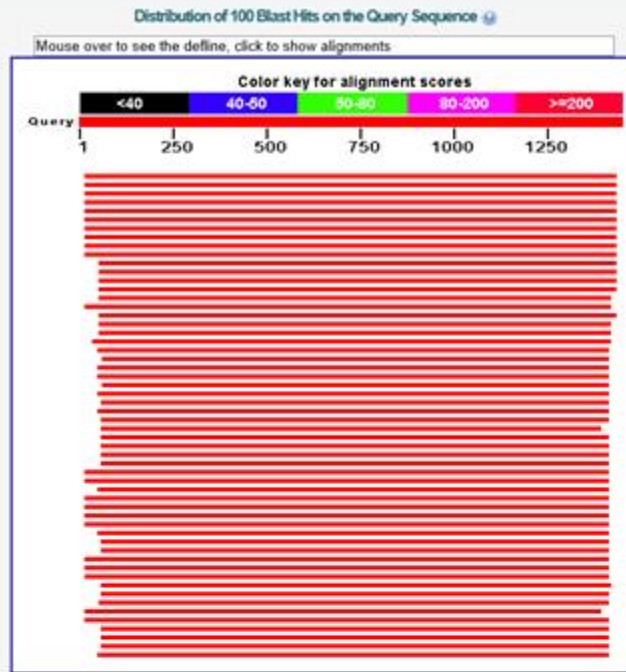
Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus sakei subsp. sakei strain 23K 16S ribosomal RNA, complete sequence	2687	2687	97%	0.0	99%	NR_075942.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus sakei subsp. sakei strain DSM 20017 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	2675	2675	97%	0.0	99%	NR_042443.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus sakei subsp. sakei strain NBRC 15893 16S ribosomal RNA gene, partial sequo	2662	2662	96%	0.0	99%	NR_113821.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus curvatus strain DSM 20019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	98%	0.0	99%	NR_042437.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus graminis strain Q90 (1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	2623	97%	0.0	99%	NR_042438.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus curvatus strain NBRC 15884 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	97%	0.0	99%	NR_113334.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus sakei subsp. sakei strain DSM 20017 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	2584	2584	93%	0.0	99%	NR_115172.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus sakei subsp. carnosus strain CCUG 31331 16S ribosomal RNA gene, partial se	2566	2566	93%	0.0	99%	NR_104208.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus graminis strain LMG 9825 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2512	2512	94%	0.0	99%	NR_114916.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus curvatus strain LMG 9198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2499	2499	93%	0.0	99%	NR_114915.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fuchuensis strain DSM10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2490	2490	97%	0.0	97%	NR_112753.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fuchuensis strain LMG 21669 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2483	2483	97%	0.0	97%	NR_104975.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus nodensis strain 1248-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2218	2218	96%	0.0	94%	NR_041629.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus obofermentans strain AMKR18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2204	2204	96%	0.0	94%	NR_043148.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fuchuensis strain JCM 11249 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2193	2193	89%	0.0	96%	NR_112157.1

*Lactobacillus sakei*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

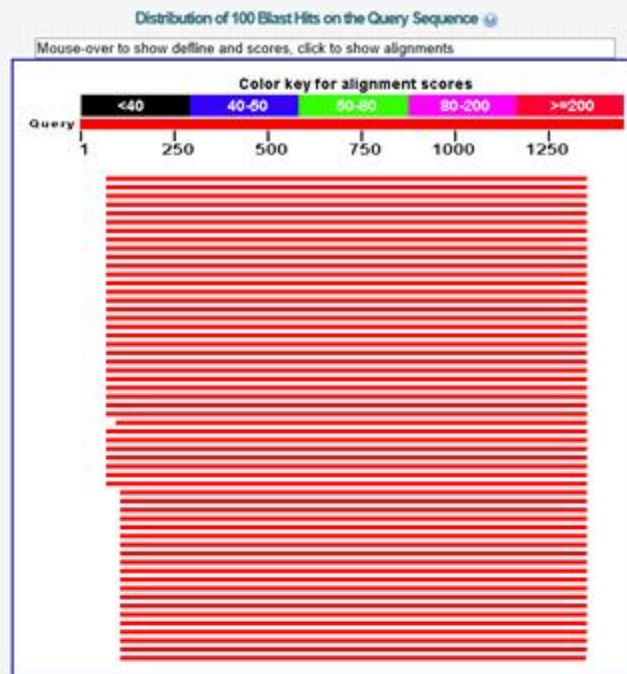
Select All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tips of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. lactis strain IL1403 16S ribosomal RNA, complete sequence	2571	2571	97%	0.0	99%	NR_103918.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. lactis strain NBRC 100933 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2571	2571	97%	0.0	99%	NR_113960.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. lactis strain NCDO 604 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2571	2571	97%	0.0	99%	NR_040955.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. horidiae strain NBRC 100931 16S ribosomal RNA gene, partial se	2560	2560	97%	0.0	99%	NR_113958.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. horidiae strain NCDO 2181 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2560	2560	97%	0.0	99%	NR_040956.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. fructae strain L105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	97%	0.0	99%	NR_116443.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11 strain SK11 16S ribosomal RNA, complete sequenc	2521	2521	97%	0.0	99%	NR_074949.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. cremoris strain NBRC 100976 16S ribosomal RNA gene, partial se	2521	2521	97%	0.0	99%	NR_113925.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lactis subsp. cremoris strain NCDO 607 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2521	2521	97%	0.0	99%	NR_040954.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus lateanensis strain 0905C15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2483	2483	97%	0.0	98%	NR_114327.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus flahisensis strain NJ 317 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2119	2119	95%	0.0	95%	NR_152882.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus garvieae ATCC 49156 strain ATCC 49156 16S ribosomal RNA, complete sequ	2063	2063	95%	0.0	94%	NR_102968.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain JCM 10343 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2063	2063	95%	0.0	94%	NR_113268.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus garvieae strain NIZO2415T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2063	2063	95%	0.0	94%	NR_104722.1
<input type="checkbox"/> Lactococcus chuangensis strain CAU 28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2019	2019	94%	0.0	94%	NR_044357.1

*Lactococcus lactis*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

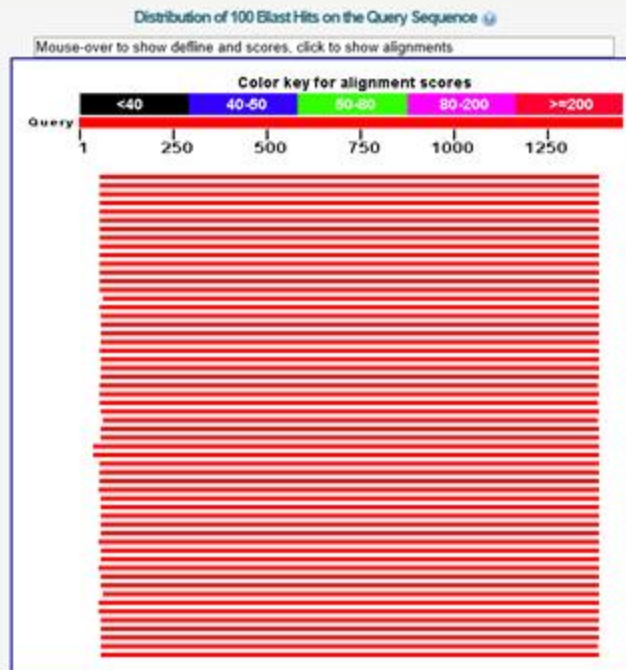
Select All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance lists of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc citreum KM20 strain KM20 16S ribosomal RNA, complete sequence	2316	2316	88%	0.0	99%	NR_074694.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc citreum strain ATCC 49370 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2316	2316	88%	0.0	99%	NR_041727.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc holzapfeli strain BFE 7000 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2305	2305	88%	0.0	99%	NR_042620.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc lactis strain JCM 6123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2250	2250	88%	0.0	98%	NR_113255.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc lactis strain KCTC 3528 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2250	2250	88%	0.0	98%	NR_040823.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc palmee strain TMW 2 694 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2239	2239	88%	0.0	98%	NR_042695.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc kimchi strain IMSNU 11154 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2211	2211	88%	0.0	98%	NR_075014.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc kimchi strain JH25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2206	2206	88%	0.0	98%	NR_025034.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc gasiconitatum strain TB 1-10 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2200	2200	88%	0.0	98%	NR_074997.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc gasiconitatum strain TB1-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2200	2200	88%	0.0	98%	NR_028777.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc carnosum strain NRIC 1722 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2194	2194	88%	0.0	98%	NR_040811.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc gelidum JB7 strain JB7 16S ribosomal RNA, complete sequence	2189	2189	88%	0.0	98%	NR_102984.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc carnosum JB16 strain JB16 16S ribosomal RNA, complete sequence	2189	2189	88%	0.0	98%	NR_102781.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc sp. C2 strain C2 16S ribosomal RNA, complete sequence	2189	2189	88%	0.0	98%	NR_075017.1
<input type="checkbox"/>	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain ATCC 8293 16S ribosomal RNA g	2189	2189	88%	0.0	98%	NR_074957.1

*Leuconostoc citreum*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

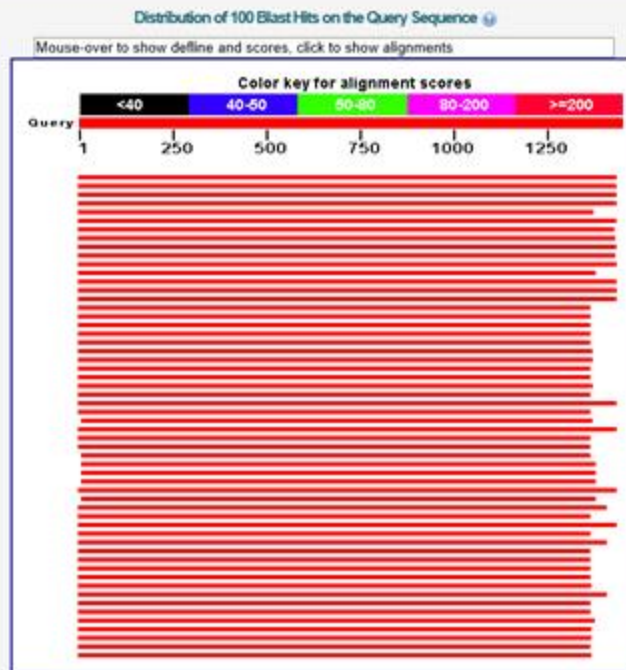
Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance box of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain ATCC 8293 16S ribosomal RNA ge	2460	2460	91%	0.0	100%	NR_074957.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. deuteranicum strain NBRC 100495 16S ribosomal RNA ge	2460	2460	91%	0.0	100%	NR_113911.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. deuteranicum strain JCM 9700 16S ribosomal RNA gene	2460	2460	91%	0.0	100%	NR_113254.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain JCM 6124 16S ribosomal RNA gene	2460	2460	91%	0.0	100%	NR_113251.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. deuteranicum strain NCFB 529 16S ribosomal RNA gene	2460	2460	91%	0.0	100%	NR_040817.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain ATCC 8293 16S ribosomal RNA ge	2455	2455	91%	0.0	99%	NR_118557.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris strain NCFB 543 16S ribosomal RNA gene _par	2455	2455	91%	0.0	99%	NR_040818.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides subsp. suozonicum strain LMG 8159 16S ribosomal RNA gene _p	2449	2449	91%	0.0	99%	NR_109003.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc pseudomesenteroides strain LMG 11482 16S ribosomal RNA gene _partial sequ	2433	2433	91%	0.0	99%	NR_109004.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc pseudomesenteroides strain NRIC 1777 16S ribosomal RNA gene _partial sequ	2433	2433	91%	0.0	99%	NR_040814.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc oetidum JB7 strain JB7 16S ribosomal RNA _complete sequence	2333	2333	91%	0.0	98%	NR_102984.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc gasicomitatum strain TB 1-10 16S ribosomal RNA gene _complete sequence	2333	2333	91%	0.0	98%	NR_074997.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc gasicomitatum strain TB1-10 16S ribosomal RNA gene _partial sequence	2333	2333	91%	0.0	98%	NR_028777.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc sp. C2 strain C2 16S ribosomal RNA _complete sequence	2327	2327	91%	0.0	98%	NR_075017.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc pseudomesenteroides strain NCDO 768 16S ribosomal RNA gene _partial sequ	2327	2327	91%	0.0	98%	NR_119222.1

*Leuconostoc mesenteroides*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

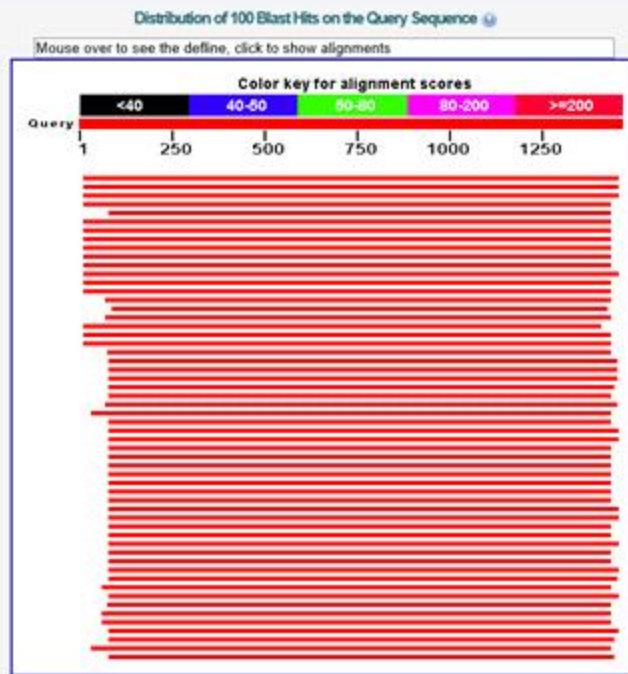
Select All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Database Use of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pedococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745 16S ribosomal RNA, complete sequence	2617	2617	99%	0.0	99%	NR_075052.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus pentosaceus strain DSM 20336 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2601	2601	99%	0.0	99%	NR_042058.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus stilesii strain FAIR E 180 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2488	2488	99%	0.0	98%	NR_042401.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus acidilactici strain DSM 20284 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2462	2462	99%	0.0	98%	NR_042057.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus argentinicus strain CRL 776 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2396	2396	94%	0.0	98%	NR_042823.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus clausenii strain ATCC BAA-344 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2386	2386	99%	0.0	97%	NR_075029.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus loki strain NGRi 0510Q 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2368	2368	98%	0.0	97%	NR_041640.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus clausenii strain P06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2366	2366	98%	0.0	97%	NR_042232.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus parvulus strain NBRC 100673 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2294	2294	99%	0.0	96%	NR_112922.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus parvulus strain S-182 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2287	2287	98%	0.0	96%	NR_029136.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus ethanolicus strain Z-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	99%	0.0	95%	NR_043291.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus collicola strain Z-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2259	2259	95%	0.0	96%	NR_043290.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus inopatus strain DSM 20285 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2242	2242	99%	0.0	95%	NR_025388.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus dammosus strain DSM 20331 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2237	2237	99%	0.0	95%	NR_042087.1
<input type="checkbox"/>	Pedococcus dammosus strain JCM5886 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2180	2180	99%	0.0	94%	NR_115654.1

*Pedococcus pentosaceus*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

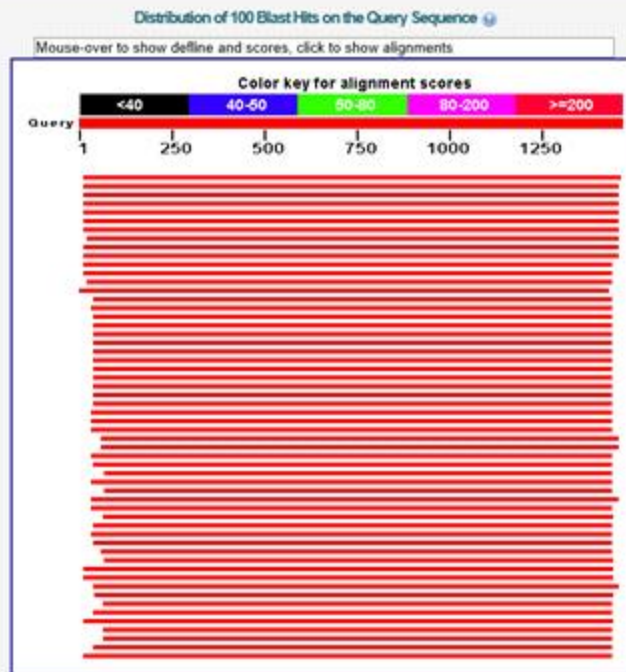
Select All None Selected:0

Alignments Download Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Weissella confusa strain JCM 1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	2623	98%	0.0	99%	NR_113258.1
<input type="checkbox"/> Weissella confusa strain JCM 1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	2623	98%	0.0	99%	NR_040816.1
<input type="checkbox"/> Weissella cibaria strain II-159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	98%	0.0	99%	NR_036924.1
<input type="checkbox"/> Weissella vindosensis strain NRIC 1536 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2357	2357	96%	0.0	97%	NR_040013.1
<input type="checkbox"/> Weissella oryzae strain SG25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2331	2331	92%	0.0	98%	NR_114312.1
<input type="checkbox"/> Weissella hellenica strain NRRC 15553 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2329	2329	96%	0.0	96%	NR_113775.1
<input type="checkbox"/> Weissella paramesenteroides 16S ribosomal RNA, complete sequence	2329	2329	96%	0.0	96%	NR_044759.1
<input type="checkbox"/> Weissella paramesenteroides strain NRIC 1542 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2322	2322	96%	0.0	96%	NR_040815.1
<input type="checkbox"/> Weissella minor strain NRIC 1625 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2307	2307	96%	0.0	96%	NR_040809.1
<input type="checkbox"/> Weissella diestramenae strain QRY33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2289	2289	96%	0.0	96%	NR_118386.1
<input type="checkbox"/> Weissella soli strain M268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2289	2289	96%	0.0	96%	NR_025642.1
<input type="checkbox"/> Weissella ceti strain 1139-1A-09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2285	2285	98%	0.0	95%	NR_117039.1
<input type="checkbox"/> Weissella koreensis KACC 15510 strain KACC 15510 16S ribosomal RNA, complete sequen	2268	2268	96%	0.0	95%	NR_075058.1
<input type="checkbox"/> Weissella koreensis strain S-5623 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2263	2263	96%	0.0	95%	NR_029041.1
<input type="checkbox"/> Weissella kandleri strain NRIC 1628 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2254	2254	92%	0.0	97%	NR_112087.1

*Weissella confusa*의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	2623	98%	0.0	99%	NR_117813.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1 16S ribosomal RNA, complete sequence	2614	2614	98%	0.0	99%	NR_075041.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum strain CIP 103151 16S ribosomal RNA gene, parti	2614	2614	98%	0.0	99%	NR_104573.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2614	2614	98%	0.0	99%	NR_042394.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus perfovensis strain 124-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2614	2614	98%	0.0	99%	NR_029133.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2610	2610	98%	0.0	99%	NR_113338.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2608	2608	98%	0.0	99%	NR_115605.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	97%	0.0	99%	NR_112690.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus paraplantarum strain DSM 10957 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	98%	0.0	99%	NR_025447.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis strain DKO 22 16S ribosomal RNA gene, par	2575	2575	98%	0.0	99%	NR_042254.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fabifermentans strain DSM 21115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	97%	0.0	99%	NR_113339.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus fabifermentans strain LMG 24284 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	97%	0.0	99%	NR_042676.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus stanfangensis strain 3.1.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2523	2523	96%	0.0	99%	NR_109000.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus yonoiensis strain THK-Y8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2233	2233	97%	0.0	95%	NR_109452.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus odoratiboi strain YIT 11304 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2228	2228	95%	0.0	96%	NR_112739.1

Lactobacillus plantarum WIKIM18의 16S rRNA sequencing 후 NCBI 분석 결과

김치미생물의 선정

김치미생물은 세계김치연구소에서 가정 제조 김치로부터 수집한 균주를 사용하였으며 이전의 연구를 통하여 김치 분리 및 연구 보고된 균주를 사용하였으며 김치의 metagenome 연구를 통해 보고된 *Lactococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* 속 미생물이 포함되어 김치 속의 다양한 미생물이 연구에 반영되도록 선정 하였다 (Hong et al, 2013; Jung et al, 2011; Nam et al, 2009; Park et al, 2009).

김치미생물의 탄소원 이용 조사

미생물은 이용하는 탄소원의 범위가 다양하며, 균의 종류에 따라 이용할 수 있는 활성이 다르다고 보고되어 있다 (CH, 2004). 김치미생물도 예외는 아니며, 이미 여러 연구에서 김치미생물 종류마다 이용하는 탄소원이 다르다는 것이 밝혀졌다. 기존 연구에 따르면 *L.citreum*과 같은 경우 glucose, fructose, maltose를 탄소원으로 이용했을 때는 탄소원을 첨가하지 않았을 때 보다 높은 생육을 보였지만 lactose와 galactose는 성장이 거의 이루어지지 않았다 (WK, 2010). 또, 김치로부터 분리, 동정한 5종의 김치미생물에 대해 API test를 실시한 결과 glucose, fructose, maltose는 모두 이용할 수 있는 반면 lactose는 이용하지 못한다는 연구 결과도 있다 (WK, 2010).

따라서, 본 연구에 사용된 10종의 김치미생물에 대하여 약 40개의 탄소원 이용을 확인한 결과 10균주 모두 α-D-Glucose와 D-Fructose를 잘 이용하였고 그 외 38개의 탄소원은 균마다 다른 이용성을 보이는 것을 확인하였다. *L.citreum*이 galactose를 이용하지 않는다는 점은 기존의 연구와 동일하며, *L. acidophilus*와 *L. mesenteroides*도 galactose를 이용하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 또한 알려져 있듯이 lactose는 *L.lactis*와 *L.fermentum*을 제외하고는 탄소원으로 사용하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

표. BIOLOG system을 이용한 김치미생물 10종의 탄소원 분석

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dextrin	+	+	++	++	+	+	++	++	+	++
D-Maltose	++	-	+	++	++	++	++	++	-	++
D-Trehalose	++	-	+	++	++	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	++	+	+	+	++	-	-	++	-	++
Gentiobiose	+	+	++	+	++	-	-	++	-	++
Sucrose	++	++	+	++	++	++	-	-	-	-
D-Turanose	+	-	++	++	-	+	-	-	-	+
Stachyose	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

D-Raffinose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
α -D-Lactose	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
D-Melibiose	++	-	+	-	+	+	+	-	-	-
β -Methyl-D-glucoside	-	++	++	+	-	-	-	++	-	+
N-Acetyl-D-glucosamine	++	-	++	++	++	-	++	++	+	++
N-Acetyl- β -D-mannosamine	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-galactosamine	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-
N-Acetylneuraminic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -D-Glucose	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++
D-Mannose	++	-	+	++	++	-	-	++	+	++
D-Fructose	++	+	++	++	++	++	+	++	+	++
D-Galactose	+	-	++	-	+	+	+	++	-	++
D-Fucose	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
myo-Inositol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose-6-PO4	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
D-Fructose-6-PO4	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Glucuronic acid	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Lactic acid	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Citric acid	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
α -Keto-glutaric acid	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
D-Malic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Malic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bromo-Succinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoacetic acid	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Propionic acid	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Acetic acid	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Formic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Strains: 1, *Lactobacillus plantarum* WIKIM18; 2, *Lactobacillus acidophilus*; 3, *Lactococcus lactis*; 4, *Leuconostoc citreum*; 5, *Pediococcus pentosaceus*; 6, *Lactobacillus fermentum*; 7, *Lactobacillus brevis*; 8, *Weissella confusa*; 9, *Leuconostoc mesenteroides*; 10, *Lactobacillus sakei*. Symbols: +, positive; -, negative.

김치미생물의 대사물질 비교

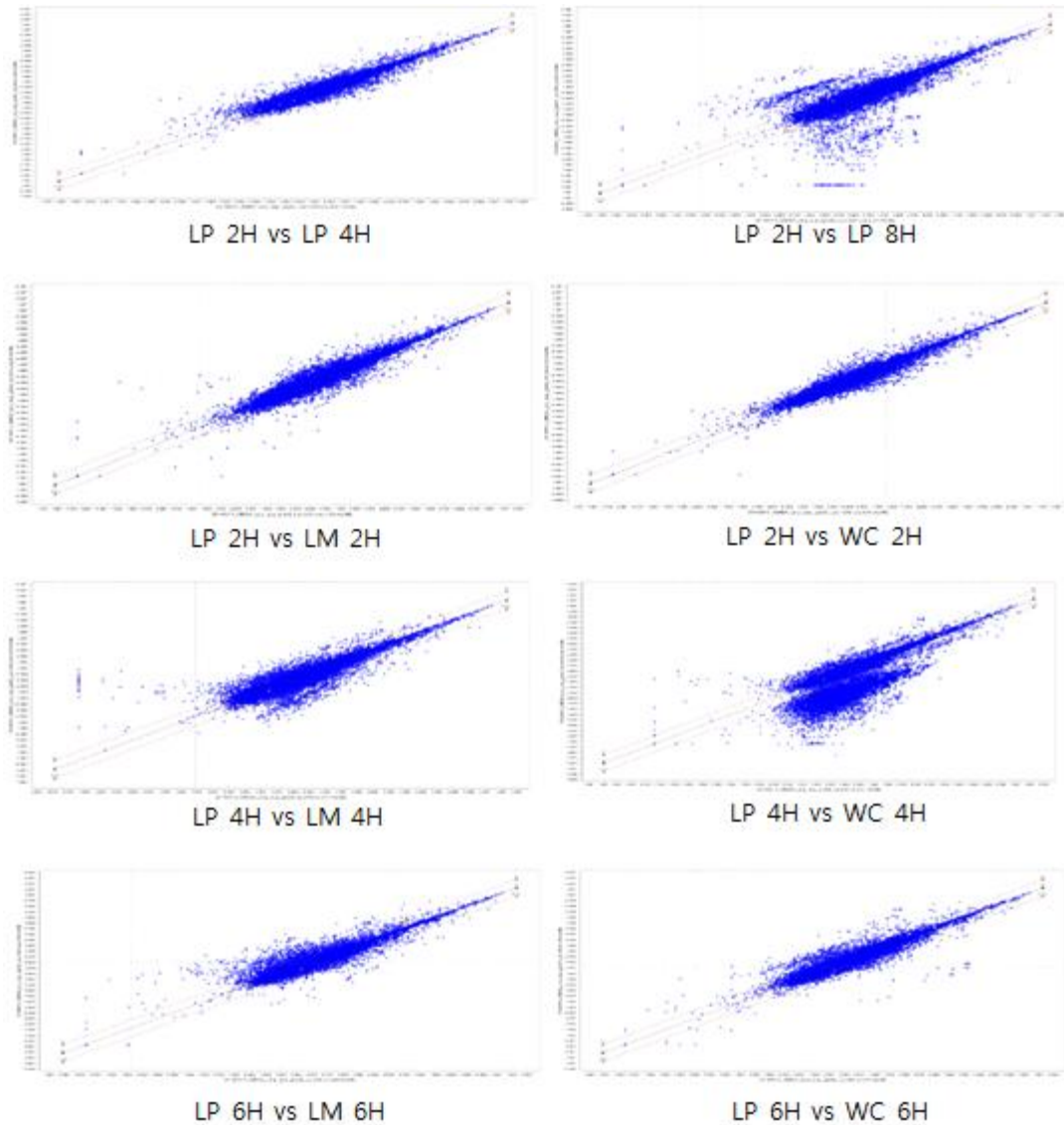


그림. *L. plantarum*(LP) vs *L. mesenteroides*(LM) vs *W. confusa*(WC) 간의 대사물질 비교

본 연구에 사용된 김치미생물 중 대표적으로 알려진 3가지 균주로 대사물질을 비교하였다. ESI-LC/MS-TOF를 이용한 분석 결과, 균 간의 대사물질이 차이를 보였을 뿐만 아니라 배양 시간에 따른 비교도 가능하였다. *L. plantarum*의 경우, 2시간 배양액을 4시간 배양액과 비교했을 때보다 8시간 배양액과 비교했을 때 대사물질이 매우 큰 차이를 보였다. 세 균주를 각각 4시간 배양하여 대사물질을 분석했을 때는 *L. plantarum*과 *W. confusa*의 대사물질의 차이가 더 큰 것으로 나타났다. PCA 분석 결과는 마찬가지로 *L. plantarum*과 *L. mesenteroides*의 초기 대사물질이 상당수 겹치는 것으로 나타났으며, *W. confusa*는 배양 내내 다른 두 균주와 다른 대사물질을 생산하는 것을 알 수 있었다.

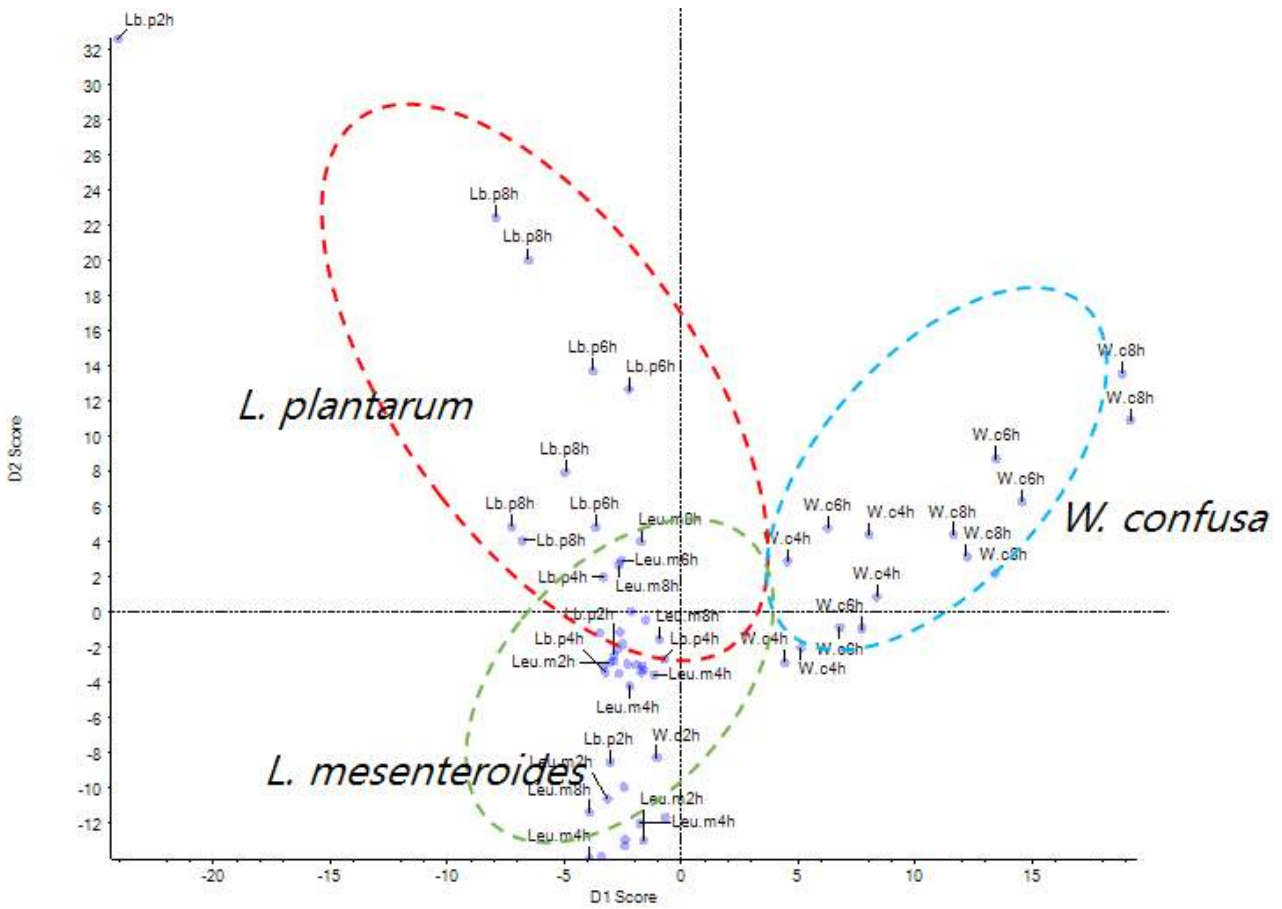


그림. *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *W. confusa*의 대사물질 PCA 분석

김치미생물의 내산성, 내담즙성 분석

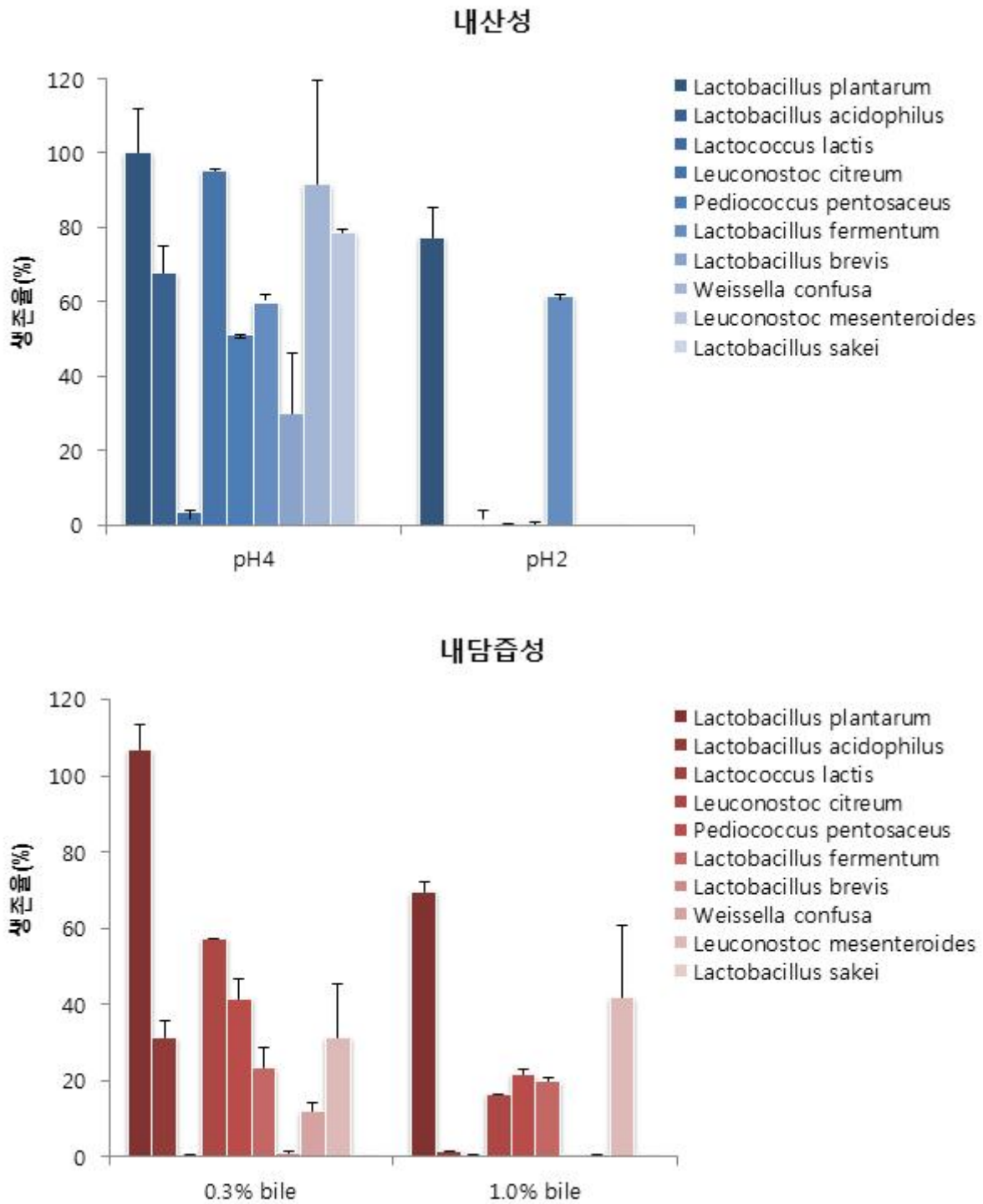


그림. 내산성·내담즙성 실험을 통한 김치미생물의 생존율 확인

현재 유산균은 probiotics라는 체내 유익균으로 알려져 있으며, 장내 미생물 균총의 유지 및 면역 증강작용, 혈중 콜레스테롤의 감소, 항암작용 등의 효과와 변비의 완화, 유아 설사의 방지, 항생제 유래 설사의 완화 등의 치료적인 효과가 주목받고 있다 (Gill, 2003). 구강을 통해

섭취한 많은 수의 유산균이 사람의 소화기관을 통과하여 대장까지 이동하고, 인체에 유리한 작용을 하기 위해서는 여러 소화기관의 소화효소들의 작용에 대한 저항성을 가지고 있어야 한다 (Chow & Weimer, 1999). 따라서 균주의 내산성 및 내담즙성에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 캡슐제조에 이용한 김치미생물이 소화액 중 위액과 담즙산에 저항성이 있는지의 여부를 알아보기 위해 HCl과 bile salt를 이용하여 pH를 조절한 MRS broth 배지에서 내산성 시험과 내담즙성 시험을 수행하였다.

내산성 시험의 결과 pH4 에서는 *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. citreum*, *P. pentosaceus*, *L. fermentum*, *W. confusa*, *L. sakei* 등이 50% 이상의 생존율을 나타내었으며, *L. plantarum*의 경우 100%의 생존율을 나타내었다. pH2 에서는 *L. plantarum*은 77%, *L. fermentum*의 경우는 61% 이상의 생존율을 나타내었지만, 나머지의 균들은 1% 미만의 생존율을 나타내었고, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. sakei* 균주는 생존하지 않았다.

내담즙성 시험의 결과 0.3% bile salt에서 *L. plantarum*은 100%의 생존율을 나타내었고, *L. citreum*이 57%, *P. pentosaceus*가 41%, *L. citreum*이 31%의 생존율을 나타내었다. *L. lactis*와 *L. sakei*는 1% 미만의 생존율을 나타내었다. 1% bile salt 조건에서는 *L. plantarum*은 69%, *L. mesenteroides*는 41%의 생존율을 나타내었다. *L. citreum*이 16%, *P. pentosaceus*가 21%, *L. fermentum*이 19%의 생존율을 나타내었고, *L. acidophilus*가 1.5%의 생존율을 나타내었으며, 나머지는 1% 미만으로 생존하였다.

항생제에 대한 김치미생물의 Minimal inhibitory concentration (MIC) 측정

표. 김치로부터 분리한 김치미생물 10종의 Minimal inhibitory concentration.

Strain	MIC(ug/ml)										
	VAN	CIP	ERY	KET	MOX	GEN	TRI	MIN	TOB	CHL	FLU
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.625	10	0.312	10	1.25	5	10	1.25	10	2.5	10
<i>Lactococcus lactis</i>	0.01	10	0.15	10	0.625	0.078	10	0.312	0.15	5	10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10	10	0.625	10	2.5	5	10	1.25	10	10	10
<i>Leuconostoc citreum</i>	10	10	0.625	10	0.625	5	10	0.312	10	10	10
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10	10	0.625	10	>10	5	10	1.25	10	5	10
<i>Lactobacillus fermentum</i>	10	10	0.15	10	2.5	2.5	1.25	0.312	10	1.25	10
<i>Lactobacillus brevis</i>	10	10	1.25	10	1.25	2.5	10	1.25	5	5	10

<i>Weissella confusa</i>	10	10	1.25	10	1.25	5	10	0.625	5	5	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	10	2.5	1.25	10	0.625	2.5	10	0.312	5	5	10
<i>Lactobacillus sakei</i>	10	10	0.625	10	0.625	5	10	0.625	10	5	10

VAN, vancomycin; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythroprim; KET, ketoconazole; MOX, moxifloxacin; GEN, gentamicin; TRI, trimethoprim; MIN, minocycline; TOB, tobramycin; CHL, chloramphenicol; FLU, fluconazole.

외부로부터 유입된 전염성 병원균 또는 식중독 세균에 의한 설사, 과음과 항생제 복용 후의 설사, 스트레스에 의한 과민성 설사 등이 발생했을 때, 흔히 정상적인 세균총의 균형이 무너지고 대장균, 포도상 구균, 연쇄상 구균 및 유해세균 등이 이상증식하여 장 상피세포를 자극하고 염증을 유발하기 쉽다. 본 연구에서는 이러한 장내 균총 불균형의 경우, 김치미생물 섭취에 의한 정상 균총 개선효과를 확인하고자 하였으며, 치료 목적으로 섭취된 항생제에 의해 김치미생물이 사멸될 경우에 생체 내에서의 기능성이 낮아질 수 있는데, 이런 결과를 예방하기 위해 김치미생물이 항생제에 대한 내성을 가지고 있는 지 확인하고자 하였다.

Vancomycin은 대표적인 glycopeptide계 항생제로서 1956년 *Amycolatopsis orientalis*에서 추출되었다 (McCormick, *etal.*, 1955). 그람양성균의 세포벽 합성에는 UDP-N-acetylmuramyl (MurNAc)-pentapeptide 전구체가 필요하다. 이러한 전구체는 세포질 안에서 UDP-MurNAc-tripeptide의 carboxyl 말단부에 D-ala-D-ala의 dipeptide가 ligase에 의해 연결되어 완성되며 지방 운반체에 의해 세포막 바깥으로 운반되어 UDP-N-acetylglucosamine과 함께 세포벽을 합성한다. Vancomycin을 비롯한 여러 glycopeptide계 항생제들은 이 전구물질의 말단부인 D-ala-D-ala 부분과 수소 결합하여 중합작용을 막고 UDP-N-acetylglucosamine과 격자구조 형성을 막아 정상적인 세포벽 형성이 이루어지는 것을 막는다 (Reynolds, 1989, Ghuysen & Hackenbeck, 1994).

Ciprofloxacin은 fluoroquinolone계 항생제로서 그람양성균 및 그람음성균에 대하여 광범위한 항균효과를 가진 약물이다 (Campoli-Richards, *etal.*, 1988, Koestner, 1989). Ciprofloxacin은 경구투여시 신속히 흡수되어 70%내외의 높은 생체이용률을 나타내며 경구투여량의 약 30~40%가 대사되지 않은 채 뇨중으로 배설됨이 보고되었다. 또한 혈중 단백결합률이 20~40%로 비교적 낮으며 분포용적이 커서 좋은 치료효과를 나타낸다 (Hoffken, *etal.*, 1985, Drusano, *etal.*, 1986).

항진균제로 널리 알려져 있는 azole계열의 항생제는 세포막에서 ergosterol의 합성을 억제한다. 진균의 세포막에서 lanosterol을 ergosterol로 변환시키는 효소의 작용을 억제하여

ergosterol이 고갈되고 14 α -methylated sterol이 축적되게 한다. 이에 따라 세포막에서의 영양 수송 및 chitin의 합성이 방해되어 성장이 저하된다 (Sheehan, *etal.*, 1999). Azole계열의 물질들은 공통적으로 5각형의 azole 고리를 가지고 있으며 고리 내 N의 개수에 따라 3개일 경우 triazole, 2개일 경우 imidazole로 분류된다. Imidazole계열 화합물로는 대표적으로 ketoconazole, clotrimazole 등이 있으며, triazole은 fluconazole, itraconazole 등이 알려져 있다 (S., 2009, Gye, *etal.*, 2014).

그람양성균인 김치미생물의 항생제 저항성을 보기 위해 11가지의 항생제로 MIC를 측정하였다. 실험의 결과, 10종의 김치미생물 모두 ketoconazole, fluconazole과 같은 세포막의 기능을 억제하는 azole계열 항생제에 10ug/ml 농도에서도 저항성을 가지는 것을 확인하였다. Ciprofloxacin의 경우 *L.mesenteroides*가 2.5ug/ml 농도에서 저항성을 보이는 것을 제외하고 나머지 9종의 김치미생물이 10ug/ml 농도에서 생존하였으며, Trimethoprim의 경우도 *L.fermentum* 균주만이 1.25ug/ml에서 저항성을 보였고, 나머지 9종의 김치미생물은 10ug/ml에서도 생존하였다. Vancomycin은 8종의 김치미생물에서 10ug/ml의 MIC를 나타내었고 *L.acidophilus*와 *L.lactis*가 1ug/ml 미만의 낮은 농도에서 생육이 저해되는 것을 확인하였다. *P.pentosaceus*은 항생제 11종에 대해 전반적으로 높은 저항성을 보였으며, *L.plantarum*도 moxifloxacin에 2.5ug/ml 농도의 MIC를 갖는 것을 제외하고는 10종의 항생제에 비교적 높은 저항성을 보이는 것을 알 수 있었다.

동결건조 김치미생물의 생존율 측정

미생물의 장기보존을 위한 방법 중 동결건조는 미생물의 균체를 냉동 건조시킴으로 저장하는 방법이며 (Heckly, 1978), 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다 (Morich, 1973). 동결건조는 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등에서 장점을 가지지만 건조 과정에서 균체의 손상을 억제하고 생존율을 최대한 높일 수 있는 방법으로 동결건조보호제 (cryoprotectant)가 요구된다. 위 실험에서는 세계김치연구소의 연구결과에 따라 동결건조 보호제로 20% 콩가루 수용액을 선택하여 김치미생물과 혼합하고 동결건조 하였다.

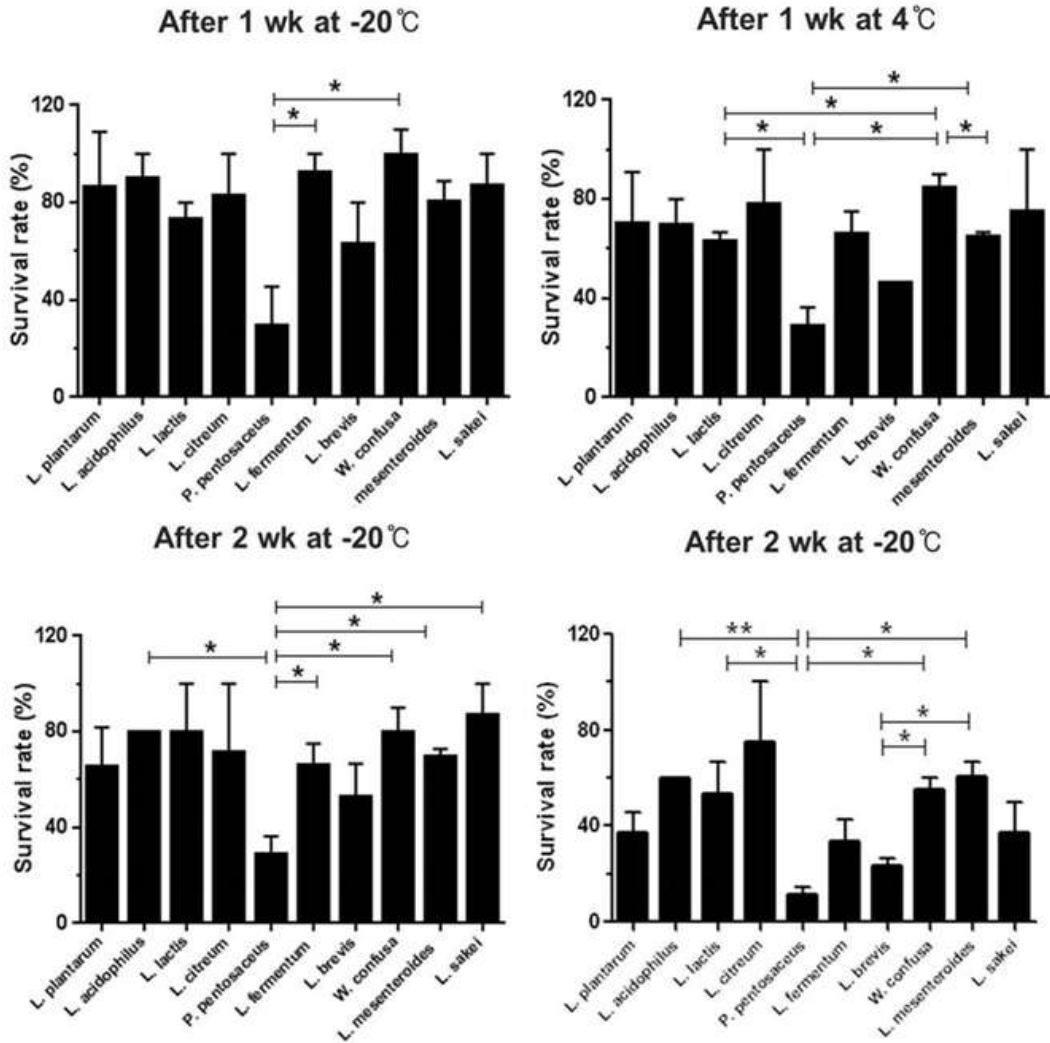


그림. 동결건조 후 김치미생물 10종의 온도와 기간에 따른 생존율 비교

동결건조 후 김치미생물의 저장성을 확인하기 위해 -20°C, 4°C에 7일, 14일 저장하였을 때 생존율을 측정하였다. 실험의 결과 동결건조 직후에는 모든 균주가 10^8 cfu/g이상의 생균 수를 나타내었다. -20°C에 보관하였을 때, 7일차 14일차 모두 4°C 보다 모든 균주의 생존율이 우수하였다. -20°C에 보관하였을 경우 7일차에서 66%의 생존율을 보인 *L. brevis*와 20%의 생존율을 보인 *P. pentosaceus*를 제외한 대부분의 균주가 70% 이상의 생존율을 유지하였으며 *W. confusa*는 100%를 나타내었다. 4°C 7일차의 경우 *W. confusa*가 85%, *L. plantarum*, *L. citreum*, *L. sakei*가 70% 이상의 생존율을 보였으며, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides*가 60%대의 생존율을 나타내었다. *L. brevis*는 46%의 다소 낮은 생존율을 나타내었다. 특히 *P. pentosaceus*는 -20°C와 4°C 모두 7일차에서 30% 미만으로 생존율이 감소하였으며, 4°C 14일차 에서는 11%의 생존율을 보였다. 14일차의 경우 -20°C 에서는 대부분의 균주가 7일차보다 비슷하거나 약간 감소하는 수준의 차이를 보였다. 4°C의 경우도 모든 균주가 생존율이 감소하였으며, *L. sakei*는 4°C 7일차에 75%였던 생존율이 14일

차에 37.5%로 큰 폭 감소하였다. 위 실험의 결과 각 균마다의 차이는 있으나, 동결건조 된 김치미생물의 보관은 -20℃에서 2주의 저장기간을 두는 것이 안전한 것으로 보인다.

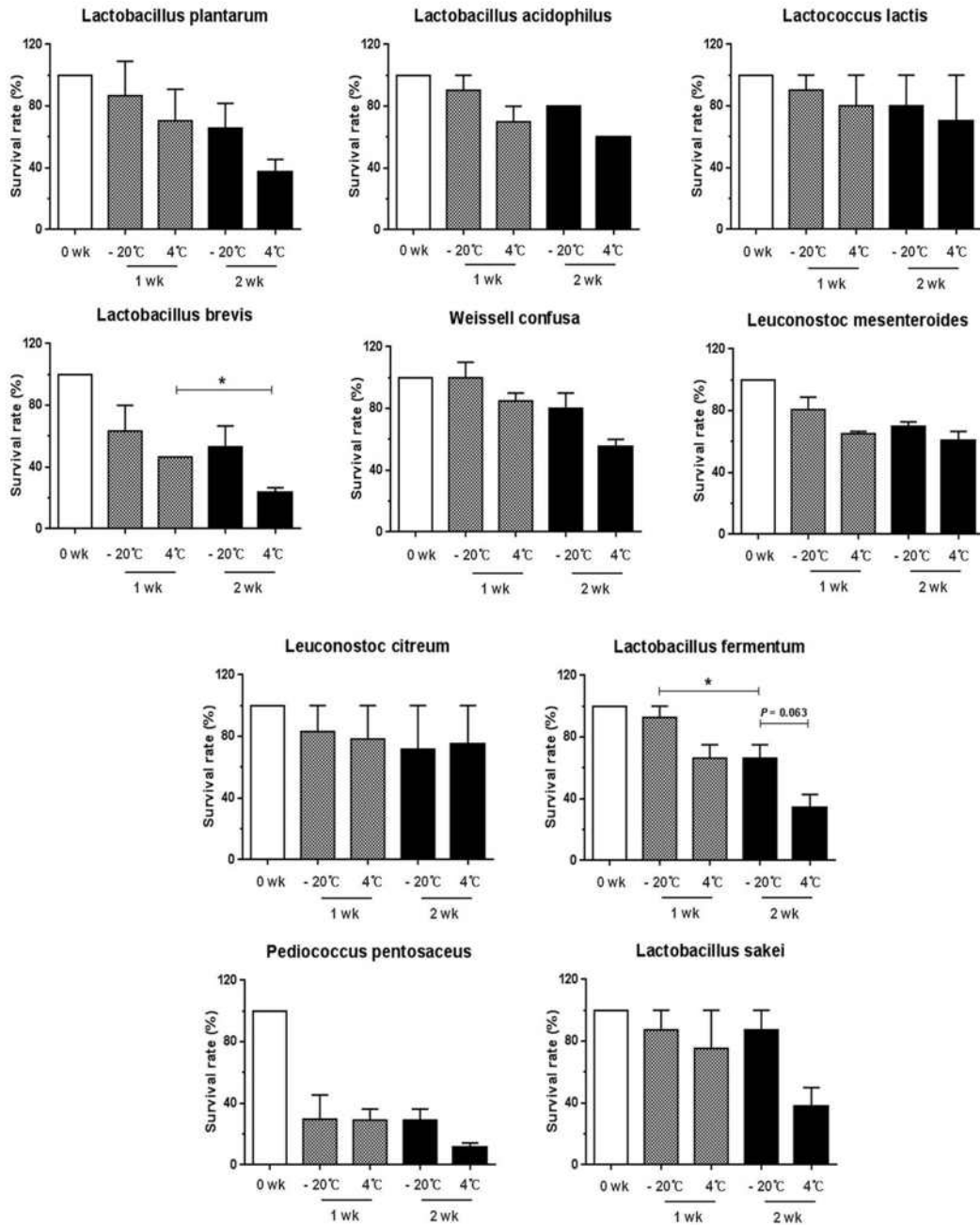


그림. 동결건조 후 김치미생물 10종의 온도와 기간에 따른 생존율 비교

항생제 처리로 불균형된 마우스 장내미생물 군총에 김치미생물 제제 미치는 영향

인간의 장내에는 10-100조에 가까운 microorganism이 존재하며 1000개 이상의 다른 bacterial species로 구성 되어져 있다 (Dethlefsen, *etal.*, 2008). 이러한 장내미생물은 host metabolism과 에너지 조절 뿐만 아니라 염증 활성화에 영향을 미친다 (Backhed, *etal.*, 2004, Ley, *etal.*, 2005, Turnbaugh, *etal.*, 2006, Jumpertz, *etal.*, 2011, Kim, *e tal.*, 2013). 대부분

정상상태에서 장내미생물은 그들의 host와 좋은 관계를 유지하고 있지만, 다른 환경적인 요인에 의하여 host-microbe사이에 균형이 무너질 수 있다 (dysbiosis). 이러한 dysbiosis는 Clostridium difficile infection(CDI) or inflammatory bowel disease (IBD) 와 같은 pathological condition을 만들어 host로부터 inflammation, mucosal tissue damage를 일으킬 수 있다 (Jacobs, 1994, McFarland, 1998, Tamboli, *etal.*, 2004, Lepage, *etal.*, 2008). Intestinal dysbiosis와 microbial stability를 무너뜨리는 요인으로서는 항생제, 정신적-신체적 stress, 식이, 위생 등을 들 수 있다 (Hawrelak & Myers, 2004, Bernstein & Shanahan, 2008). 특히 antibiotic therapy에 의해 무너지는 microbiota balance는 vaginal candidiasis, Clostridium difficile colitis와 같은 질병을 유래한다 (Crogan & Evans, 2007, Sobel, 2007).

	Sample	#Reads	Total bases	Avg.read length
Before	0-1-1	10,415	4,723,524	453.531
	0-1-2	10,350	4,728,938	456.903
	0-2-1	9,378	4,283,023	456.710
	0-2-2	9,731	4,445,529	456.842
	0-3-1	8,395	3,850,894	458.713
	0-3-2	8,277	3,771,071	455.609
	0-4-1	8,902	4,048,961	454.838
	0-4-2	10,607	4,835,469	455.876
AB1W	1-1-1	11,086	5,092,985	459.407
	1-1-2	10,327	4,736,385	458.641
	1-2-1	6,997	3,173,395	453.537
	1-2-2	4,947	2,059,601	416.334
	1-3-1	8,599	3,986,501	463.601
	1-3-2	9,491	4,398,457	463.435
	1-4-1	9,242	4,246,378	459.466
	1-4-2	10,079	4,709,977	467.306
AB2W	2-1-1	9,637	4,511,109	468.104
	2-1-2	9,648	4,420,262	458.154
	2-2-1	10,461	4,817,142	460.486
	2-2-2	9,251	4,308,516	465.736
	2-3-1	9,971	4,516,259	452.940
	2-3-2	7,542	3,503,927	464.589
	2-4-1	10,649	4,937,821	463.689
	2-4-2	10,426	4,746,537	455.260
AB2W+P	3-1-1	10,837	4,919,850	453.987
	3-1-2	10,378	4,741,589	456.889
	3-2-1	9,482	4,343,544	458.084
	3-2-2	9,857	4,534,543	460.033
	3-3-1	9,667	4,427,400	457.992
	3-3-2	9,933	4,575,263	460.613
	3-4-1	8,359	3,875,160	463.592
	3-4-2	10,461	4,836,464	462.333
		303,382	139,106,474	458.519

그림. Sample specific barcode에 따른 sequence sorting

표. 각 반복샘플에서 장내미생물 군총의 alpha-diversity 분석

Sample ID	Observed_OTUs	Chao1	Equitability	Shannon	Phylogenetic	Simpson
Before	0-1-1	218	0.85	6.6	14	0.98
	0-1-2	211	0.83	6.4	13	0.97
	0-2-1	203	0.82	6.3	12	0.96
	0-2-2	224	0.85	6.6	14	0.98
	0-3-1	221	0.88	6.9	13	0.98
	0-3-2	202	0.85	6.5	13	0.98
	0-4-1	219	0.87	6.7	13	0.98
	0-4-2	187	0.8	6.1	12	0.96
AB1W	1-1-1	216	0.87	6.7	14	0.98
	1-1-2	215	0.88	6.8	13	0.98
	1-2-1	202	0.84	6.5	11	0.97
	1-3-1	193	0.79	6	12	0.95
	1-3-2	125	0.67	4.7	6	0.88
	1-4-1	142	0.76	5.4	8	0.94
	1-4-2	149	0.75	5.4	8	0.94
	2-1-1	220	0.86	6.7	14	0.98
AB2W	2-1-2	258	0.9	7.2	14	0.99
	2-2-1	213	0.9	7	13	0.99
	2-2-2	218	0.85	6.6	13	0.97
	2-3-1	78	0.6	3.8	6	0.83
	2-3-2	101	0.68	4.6	5	0.88
	2-4-1	121	0.73	5	7	0.92
	2-4-2	121	0.73	5.1	6	0.93
	3-1-1	212	0.85	6.6	13	0.98
AB2W+P	3-1-2	239	0.87	6.9	15	0.98
	3-2-1	200	0.84	6.4	14	0.97
	3-2-2	203	0.81	6.2	12	0.95
	3-3-1	191	0.79	6	11	0.95
	3-3-2	75	0.64	4	5	0.85
	3-4-1	81	0.73	4.7	5	0.92
	3-4-2	107	0.71	4.8	7	0.92

97% similarity 수준에서 분류조작상 단위(Operational Taxonomic Unit OTU)를 계산

QIIME software를 이용하여 species diversity 측정

Alpha-diversity 분석을 하기 위하여 454-pyrosequencing으로부터 얻은 16S rRNA V1-3 sequence (OTU level)를 사용하였다.

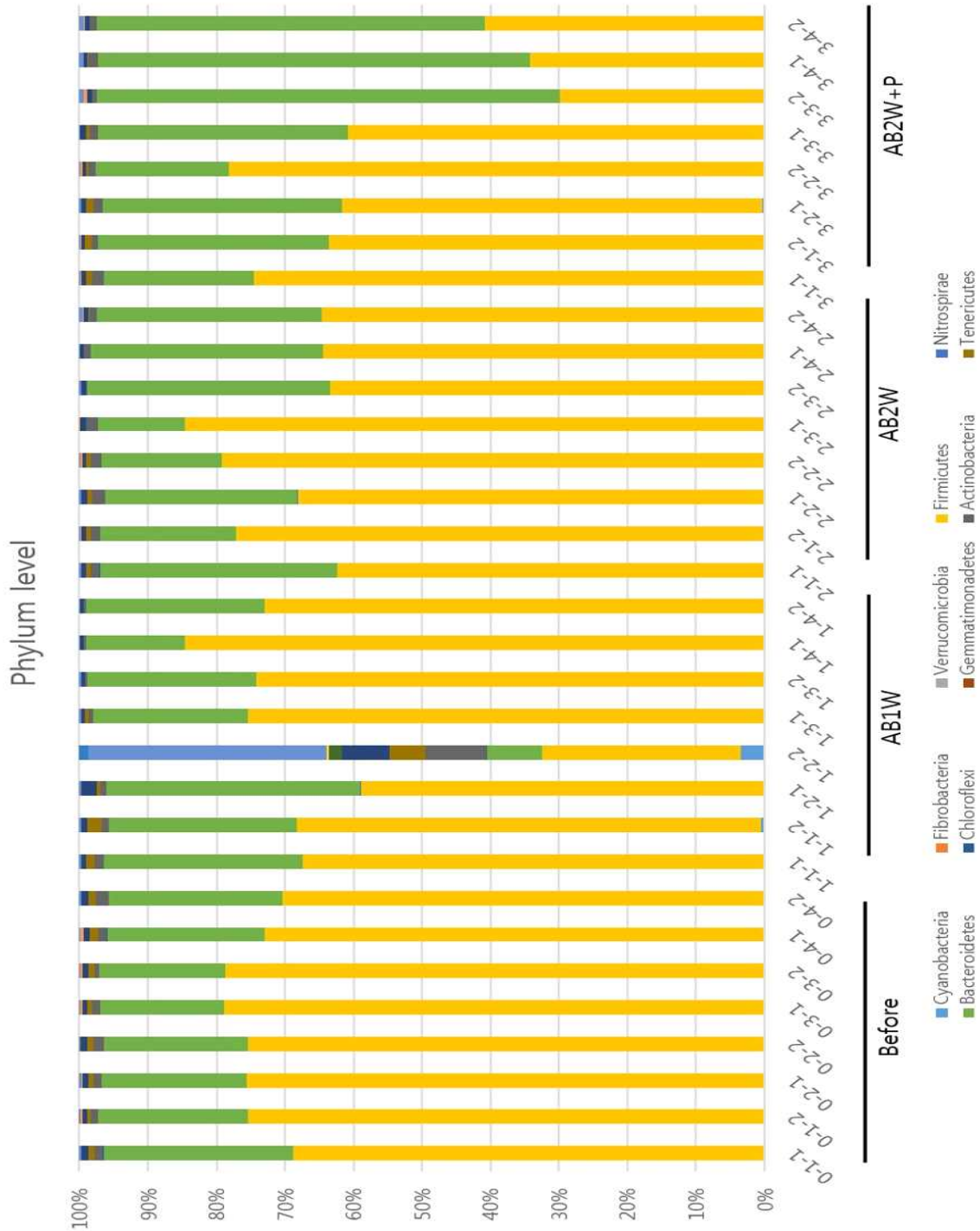


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Phylum 수준에서의 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)

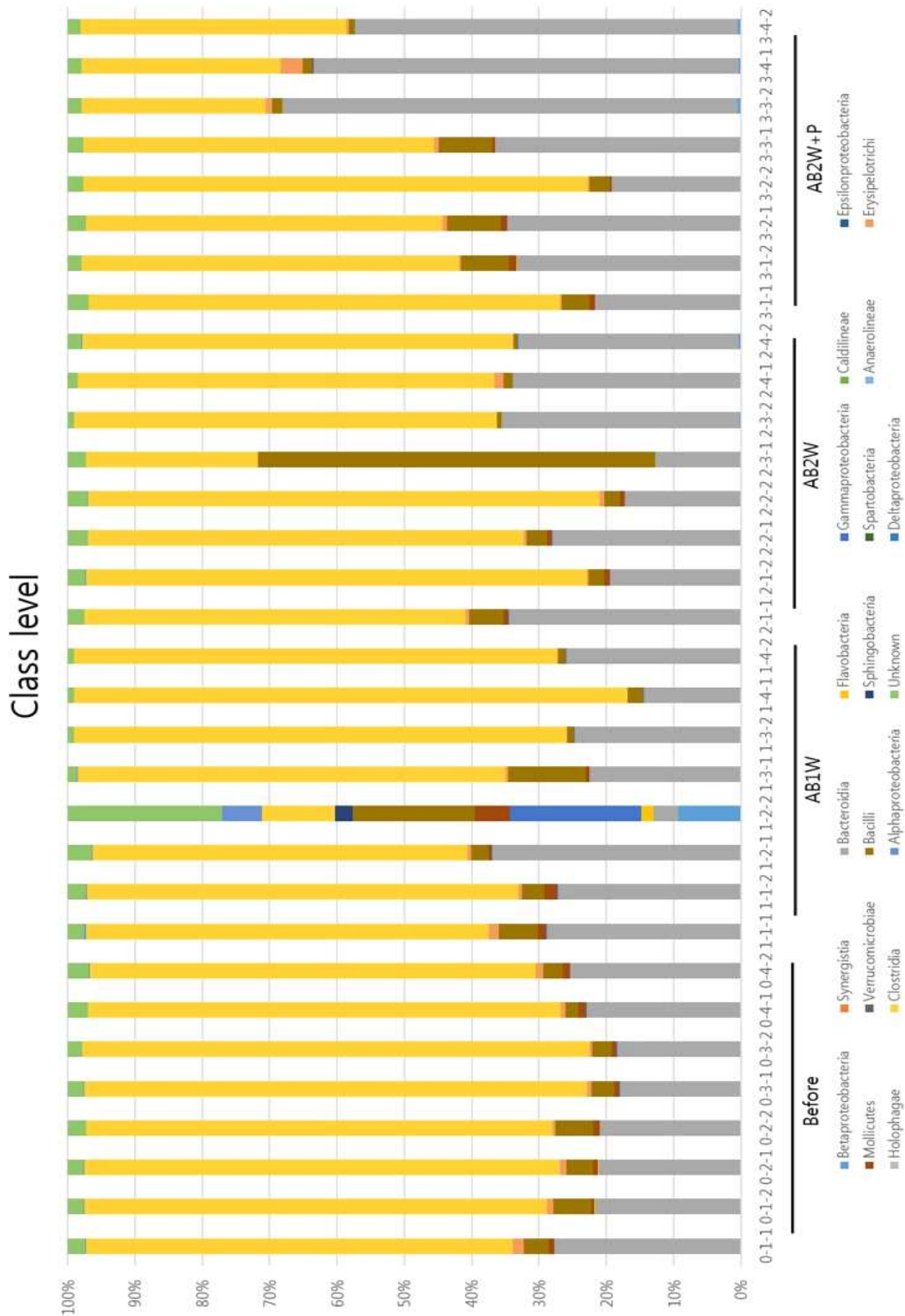


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Class 수준에서의 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)

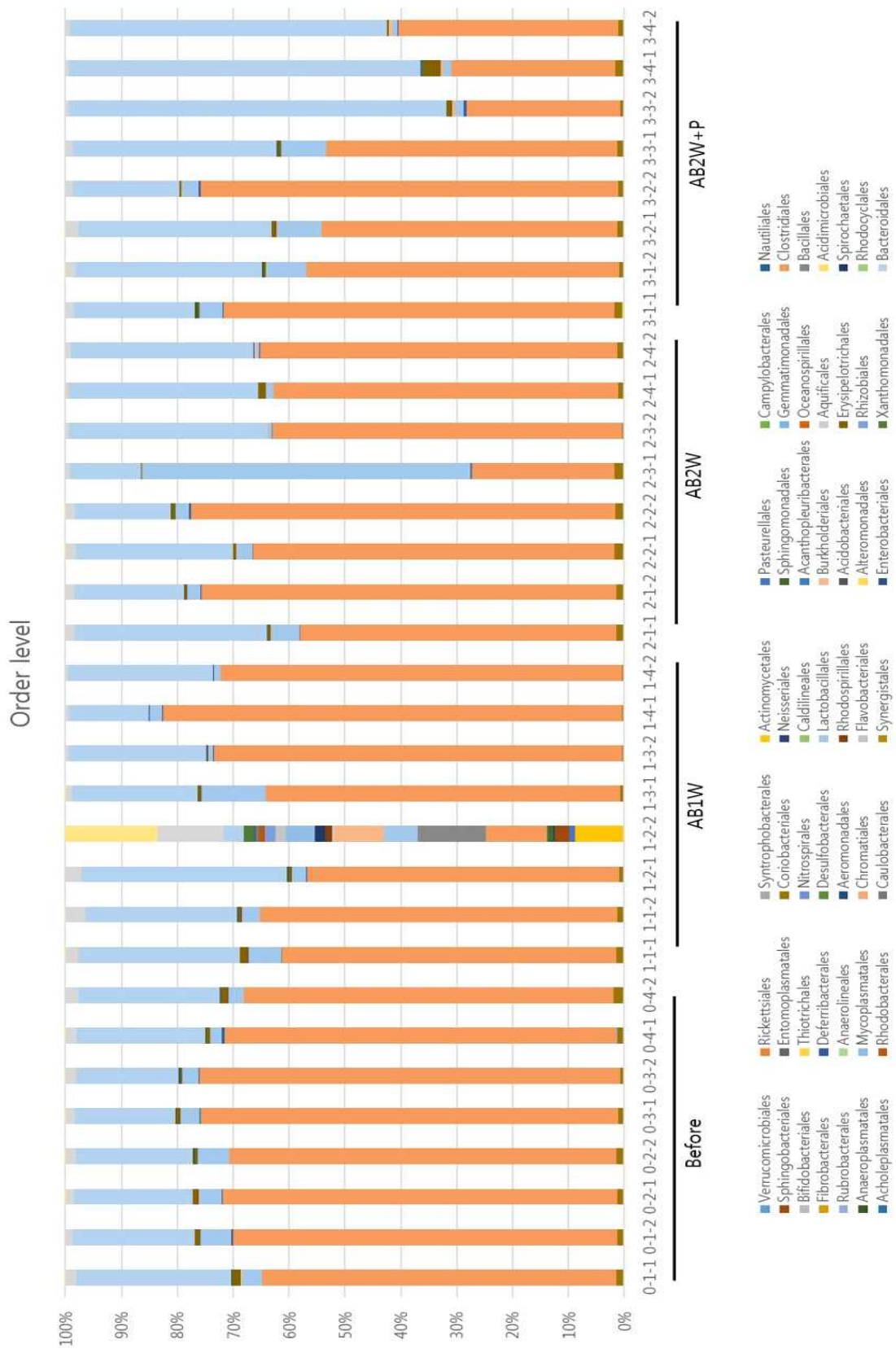


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Order 수준에서의 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)

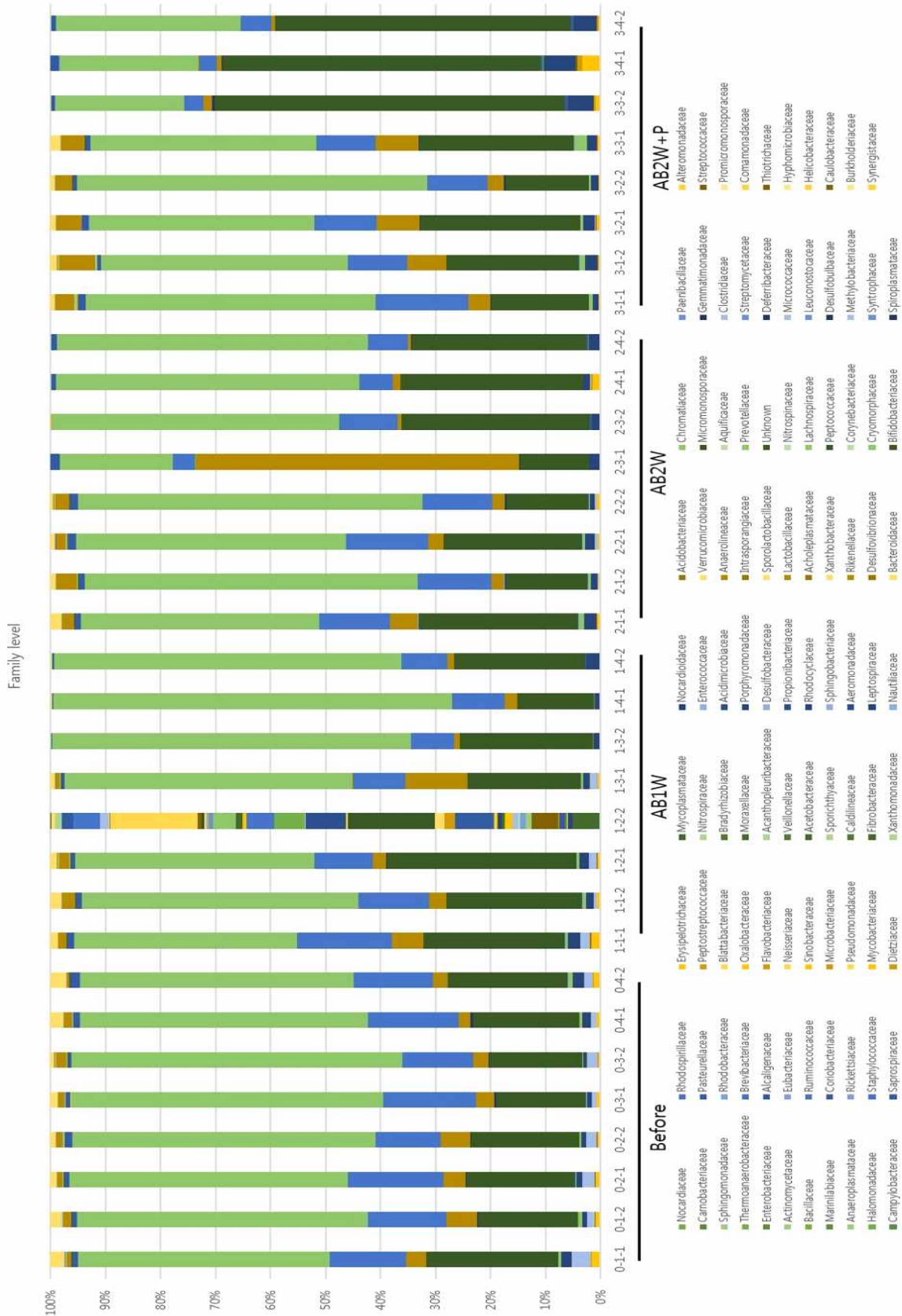


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Family 수준에서의 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)



그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Genus 수준에서의 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)

마우스 분변샘플의 pyrosequencing 자료 분석 결과 평균 각 샘플에서 9,481 ($\pm 1,266$) reads가 sorting 된 것을 확인 할 수 있었다. QIIME 프로그램을 이용하여 길이 낮거나, 길이가 짧거나, 세균에 비 특이적인 reads 제거, chimera sequence를 제거하였다. 이러한 결과를 가지고 97% similarity 수준에서 분류조작상 단위 (Operational Taxonomic Unit, OTU)를 계산한 후 다양성 지수인 Shannon-Weaver 지수와 Chao1과 균등도를 나타내었다.

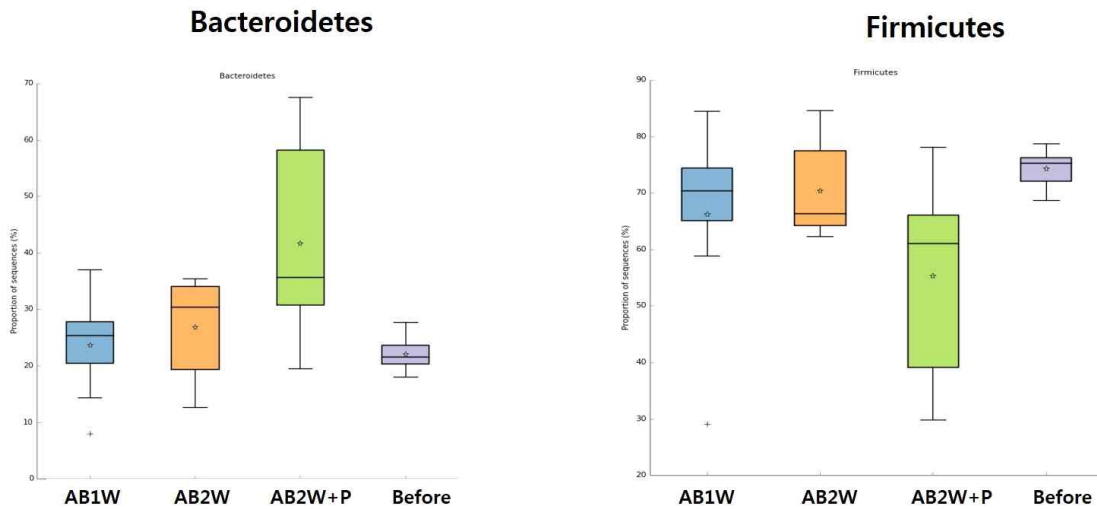


그림. Mouse 분변의 metagenome 분석을 통한 Firmicutes와 Bacteroidetes 변화 확인. 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)

최근의 연구 결과에서도 신생아 등에 있어 항생제의 사용이 에너지 대사에 영향을 미쳐 비만을 유도한다는 보고가 있으며 (Cho et al, 2012), 본 연구에서는 김치미생물 투여군에서 미생물 균총의 변화를 확인 하였다.

장내 미생물을 8 bacterial phyla로 구성하고 마우스와 인간의 장내에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 phyla는 Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria 이다 (Ley, *etal.*, 2005). 대부분 dietary factor에 가장 많은 영향을 받으며, phylum level에서 변화와 질병과 상관관계가 있다는 연구가 보고된 바 있다 (비만한 개체에서 Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio가 높다는 연구 결과가 있음 (Turnbaugh,*etal.*,2009)).

항생제 처리 1주, 2주와 비교하여 항생제 처리 후 김치미생물을 처리 하였을 때 Bacteroidetes가 유의하게 증가하고, Firmicutes가 감소하는 것을 알 수 있었다.

Clostridium sp.

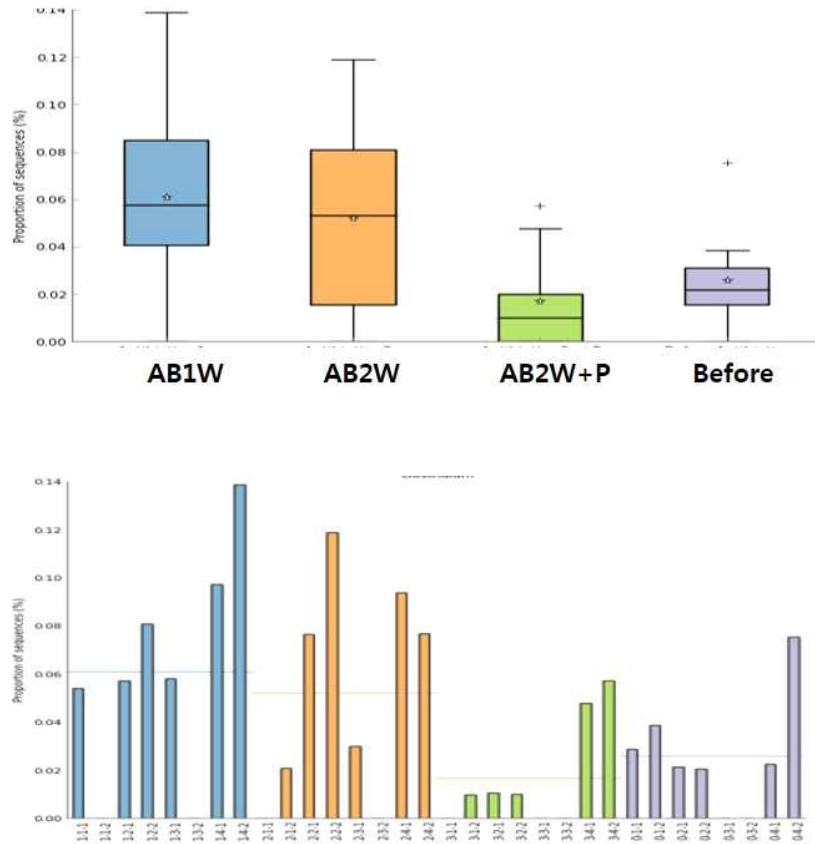


그림. Mouse 분변의 metagenome 분석을 통한 *Clostridium* sp. 변화 확인

*Clostridium*은 Firmicutes에 속하는 genus로, *Clostridium* cluster 1에 속하는 *C. perfringens* 나 *Clostridium* cluster XI에 속하는 *Clostridium difficile* 경우 Gram-positive spore forming bacteria로 host intestine에 pathogenesis한 성격을 갖는다. 전반적으로 항생제 처리 그룹과 비교하여 항생제 처리 전 그룹, 항생제 처리 후 김치미생물을 처리하였을 때 *Clostridium* sp. 가 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 항생제 처리로 인하여 host에 negative effect를 줄 수 있는 미생물 군총이 증가하는 반면 김치미생물 처리로 인하여 그러한 미생물이 감소한다는 것을 알 수 있다.

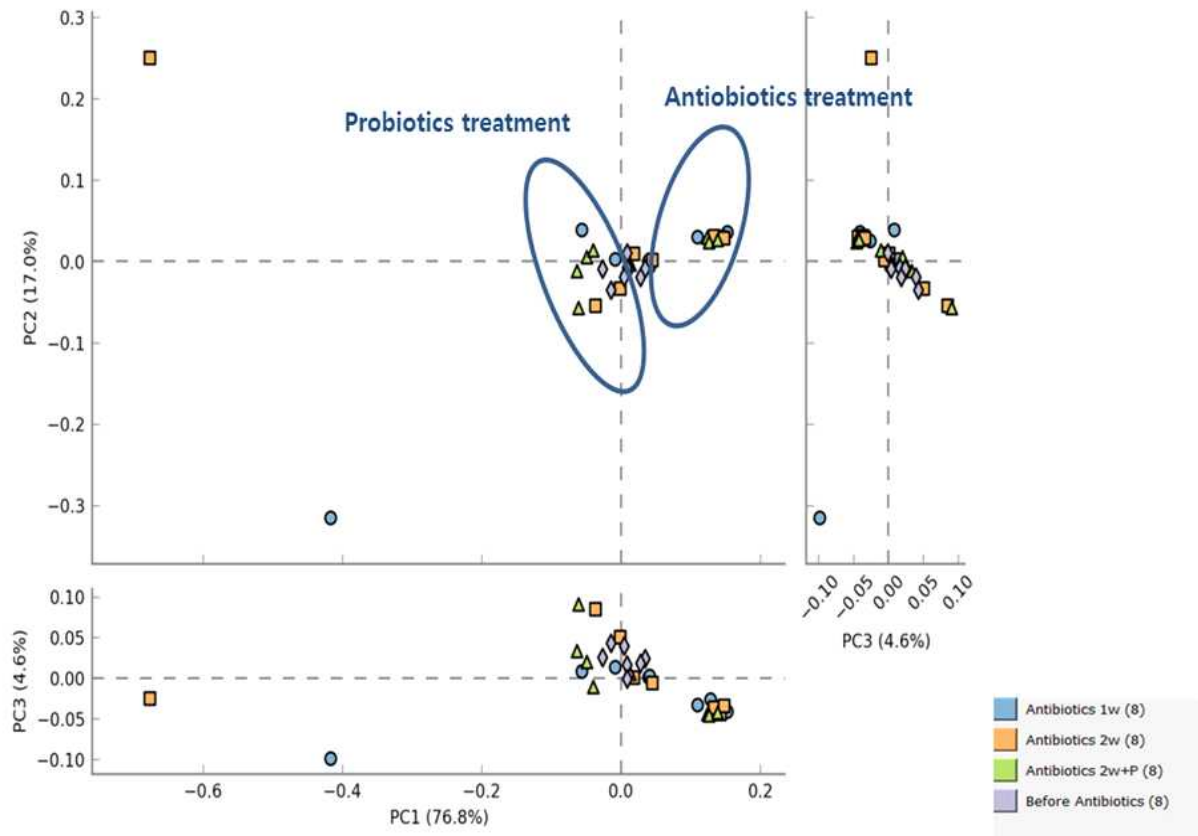


그림. 항생제 투여 전 그룹 (Before), 항생제 투여 1주 그룹 (AB1W), 항생제 투여 2주 그룹 (AB2W), 항생제 투여 2주 후 김치미생물 투여 그룹 (AB2W+P)에서 Cluster analysis. 장내 미생물 군총은 principal coordinates analysis (PCoA)를 사용하여 clustering 하였다. Plotted principal coordinates의 percentage variation이 각 축에 표시되었다. 각 spot은 각 분변 샘플을 나타내며 마우스 각 그룹은 다른 색으로 표시 되었다.

Pyrosequencing 결과에서 나온 데이터를 바탕으로 각 장내미생물 군집의 clustering을 비교하기 위하여 좌표분석 (principal coordinate analysis)을 시행하였다. 항생제 투여에 따라 미생물 community가 clustering되는 것을 확인할 수 있었고, 김치미생물 (Probiotics) 처리에 따라 clustering 되는 것을 볼 수 있었다.

항생제 처리로 인한 체내 장내미생물 군총 불균형에 김치미생물이 미치는 영향

클로스트리디움 디피실 장염(*Clostridium difficile* Infection, CDI)이란 항생제를 투여받는 환자의 장에 정상 세균총의 구성이 변화하면서 *C. difficile* 균이 증식하고, 동시에 독소를 분비하여 발생하는 항생제 관련 설사병이다. 특히 fluoroquinolone, clindamycin, carbapenems, cephalosporine, penicillins와 같은 항생제를 투여하는 환자에서 자주 발생한다 (Schulster & Chinn, 2003). 항생제 연관 설사의 치료를 위하여 metronidazol, vancomycin등의 항생제를

사용하고 있으며 내성균주의 출현으로 광범위한 사용은 제한적이다. 항생제에 잘 반응하지 않는 재발 항생제 연관 설사 환자의 경우 건강한 성인의 변정제후 대장내시경을 통해 환자에게 주입하는 방법 (fecal bacteriotherapy)을 사용하고 있으며 임상에서 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 하지만 분변 내에 장내 미생물 군총의 비 균질성 및 다양성 그리고 병원성 균주로 인한 2차 감염의 우려가 있는 것으로 사료되었다. 최근의 연구결과에서는 probiotics를 이용한 항생제 연관 설사 치료 가능성이 제시 되었으며, *Saccharomyces boulardii*를 항생제와 병합 투여할 경우 항생제로 인한 설사를 줄이고 재발을 방지하는데 효과가 있고 *Lactobacillus rhamnosus*에서도 효과가 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 설사환자에 7일 분량의 김치미생물복합제를 제공, 항생제유발설사(CDI)에 대한 의학적 표준치료 (Vancomycin 1회 250mg, 1일 1,000mg 복용)를 병행하게 한 다음 454-pyrosequencing을 이용하여 장내균총 불균형 개선 효과를 보고자 하였다.

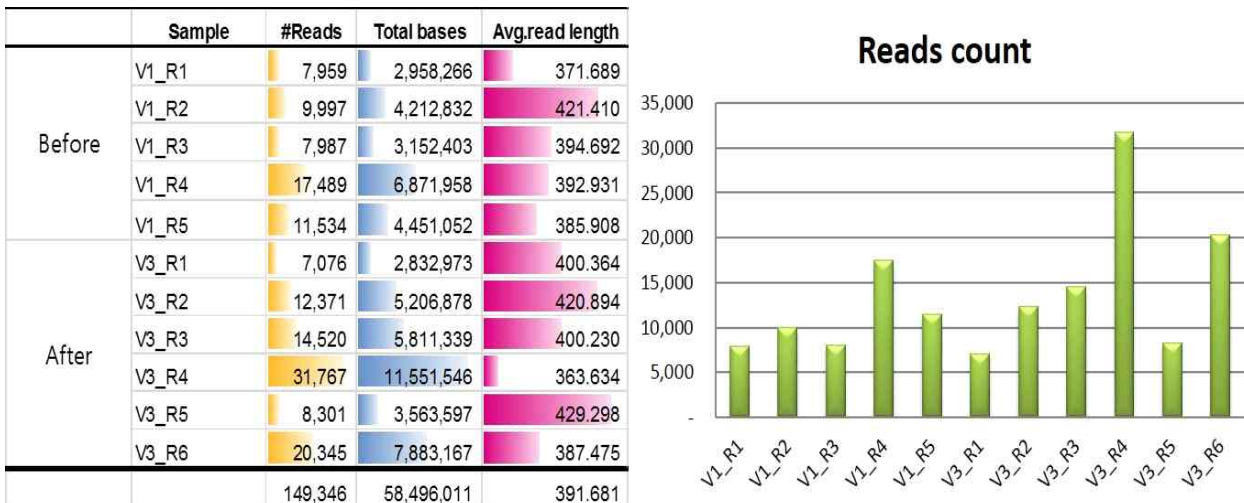


그림. Sample specific barcode에 따른 sequence sorting

표. 각 분변샘플에서 장내미생물 군총의 alpha-diversity 분석

	Sample	Number of reads	Observed OTUs	Shannon	Simpson
Before	V1_R1	2985	24	1.7	0.27
	V1_R2	4086	17	1.6	0.28
	V1_R3	4466	19	1.1	0.44
	V1_R4	8506	28	1.2	0.38
	V1_R5	4778	19	0.9	0.59
After	V3_R1	3574	15	0.8	0.50
	V3_R2	5530	22	0.9	0.62
	V3_R3	8477	13	1.0	0.44
	V3_R4	15764	19	1.2	0.34
	V3_R5	4126	32	2.1	0.18
	V3_R6	9177	19	1.2	0.42

97% similarity 수준에서 분류조작상 단위(Operational Taxonomic Unit OTU)를 계산
 Mothur software를 이용하여 species diversity (shannon, simpson) 측정

Alpha-diversity 분석을 하기 위하여 454-pyrosequencing으로부터 얻은 16S rRNA V1-3 sequence (OTU level)를 사용하였다. 투여 전 (Before), LAB+ vancomycin 투여 후 (After).

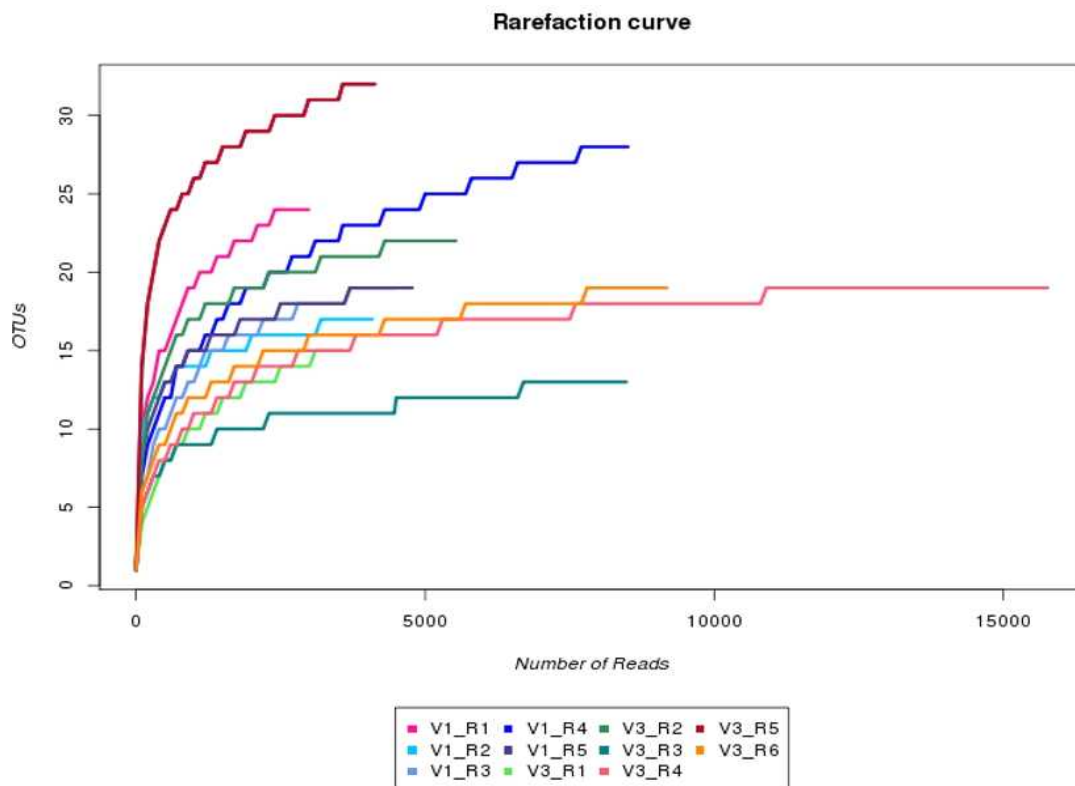


그림. 그룹별 분변샘플에서의 희박곡선 (rarefraction curve). 투여 전 (Before), 김치미생물 + vancomycin 투여 후 (After).

인체 분변 샘플의 pyrosequencing 자료 분석 결과 평균 각 샘플에서 13,577 ($\pm 7,377$) reads가 sorting 된 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 가지고 조작상 단위 (Operational Taxonomic Unit, OTU)를 picking 후 희박곡선 (rarefaction curve)과 다양성 지수인 Shannon 지수와 Chao1과 균등도를 나타내었다. PCA와 phylogenetic tree 분석결과 각 그룹의 명확한 clustering은 확인할 수 없었으나, 투여 전 샘플의 microbial community가 가깝게 묶이는 경향성을 보이고 있었다.

PCA

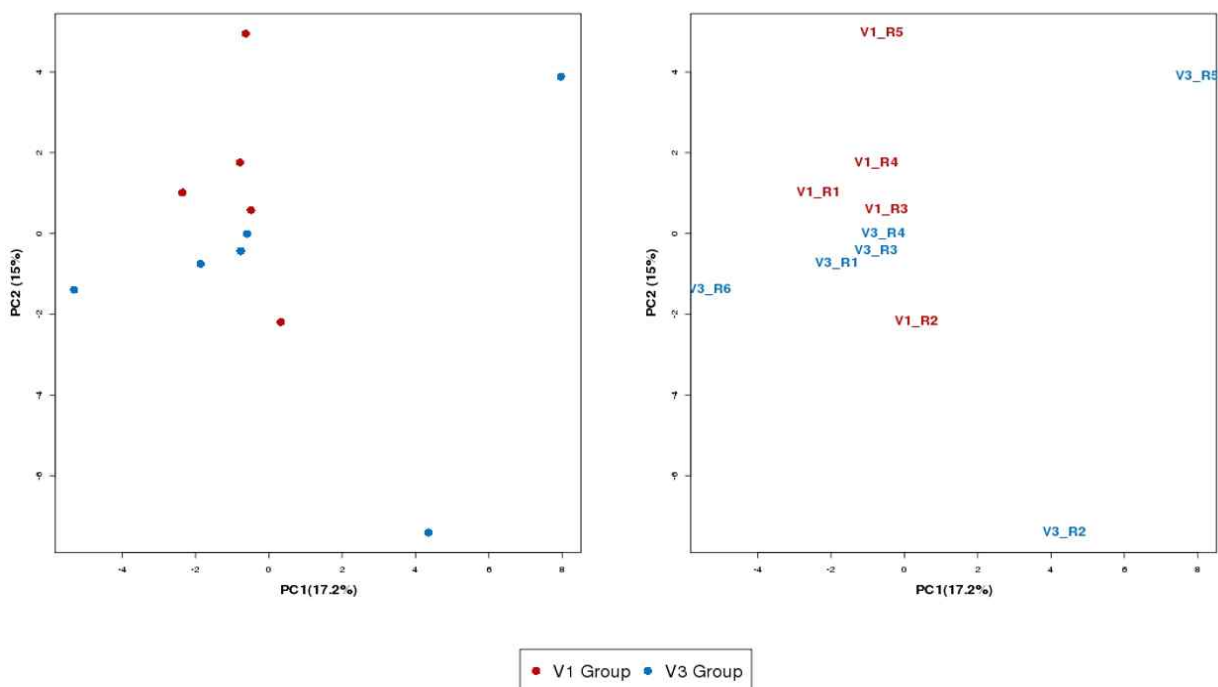


그림. 투여 전(V1), 김치미생물+ vancomycin 투여 후(V3)에서 Cluster analysis. 장내미생물 균총은 principal coordinates analysis (PCoA)를 사용하여 clustering 하였다. 각 spot은 각 분변 샘플을 나타내며 마우스 각 그룹은 다른 색으로 표시 되었다.

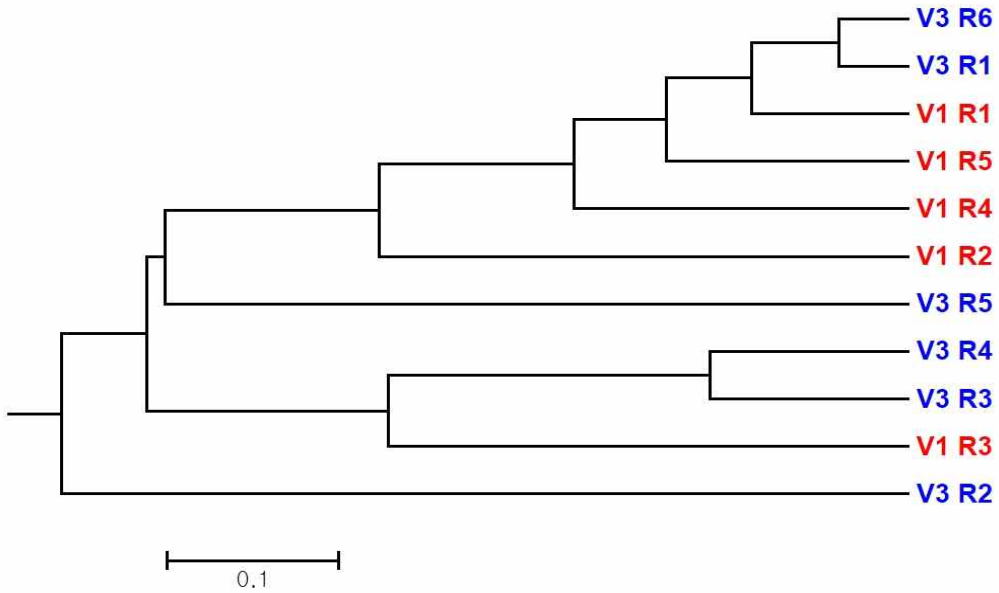


그림. 분변샘플에서 phylogenetic tree (using thetacy calculator) 분석. 투여 전(V1), 김치미생물+ vancomycin 투여 후(V3)

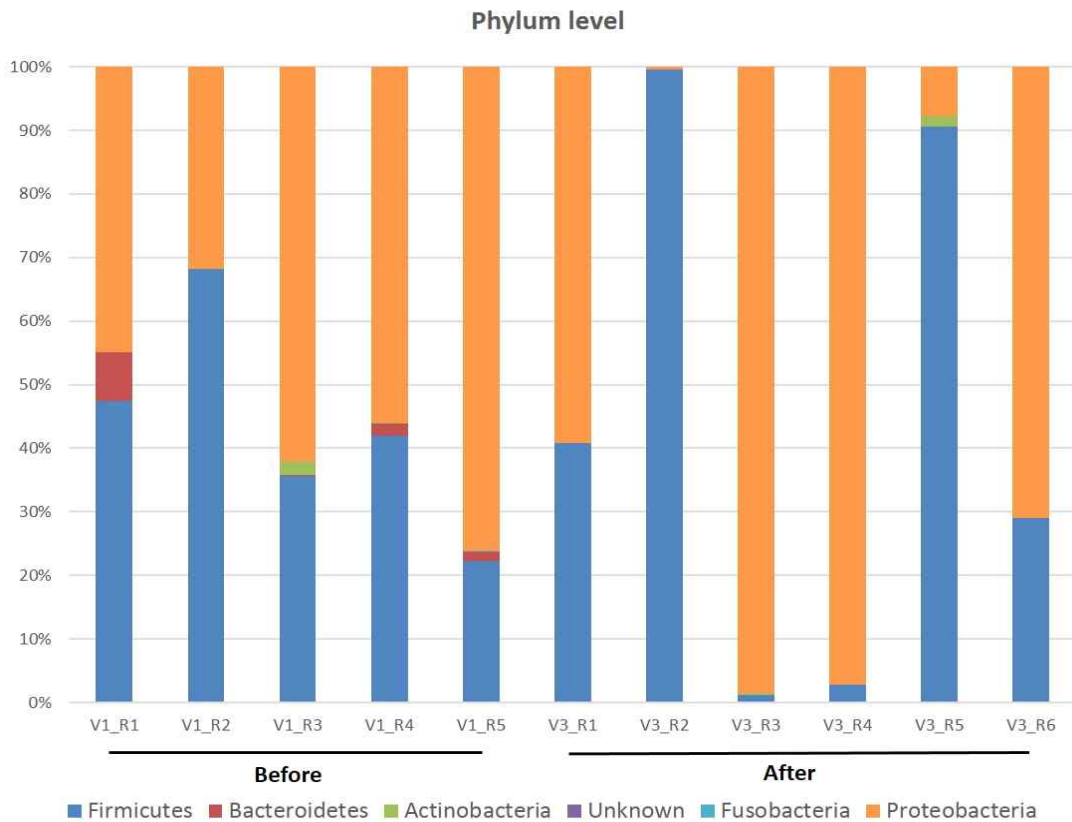


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Phylum 수준에서의 투여 전 (Before), 김치미생물+ vancomycin 투여 후 (After)

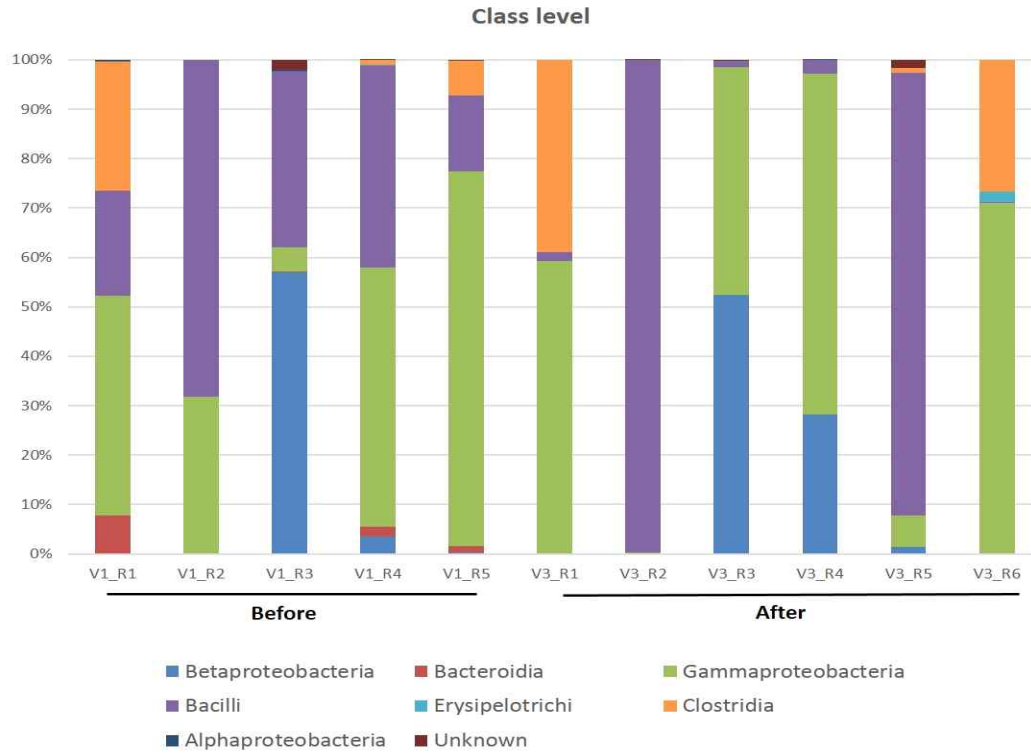


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Class 수준에서의 투여 전 (Before), 김치미생물+ vancomycin 투여 후 (After)

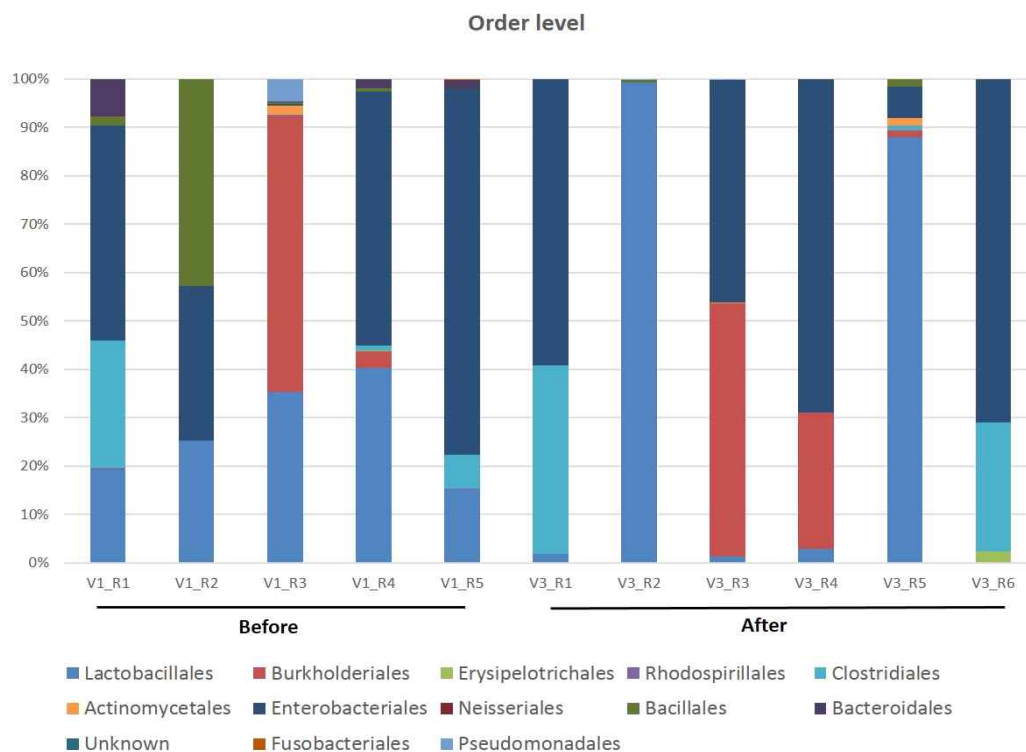


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Order 수준에서의 투여 전(Before), 김치미생물+ vancomycin 투여 후 (After)

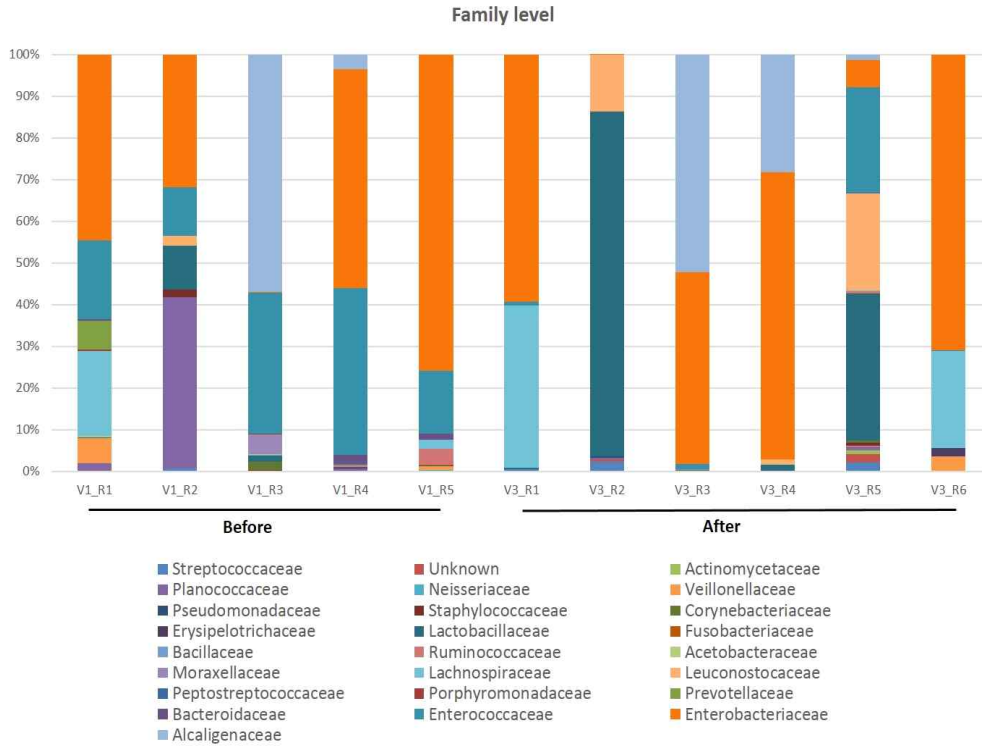


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분. Family 수준에서의 투여 전 (Before), 김치미생물+ vancomycin 투여 후 (After)

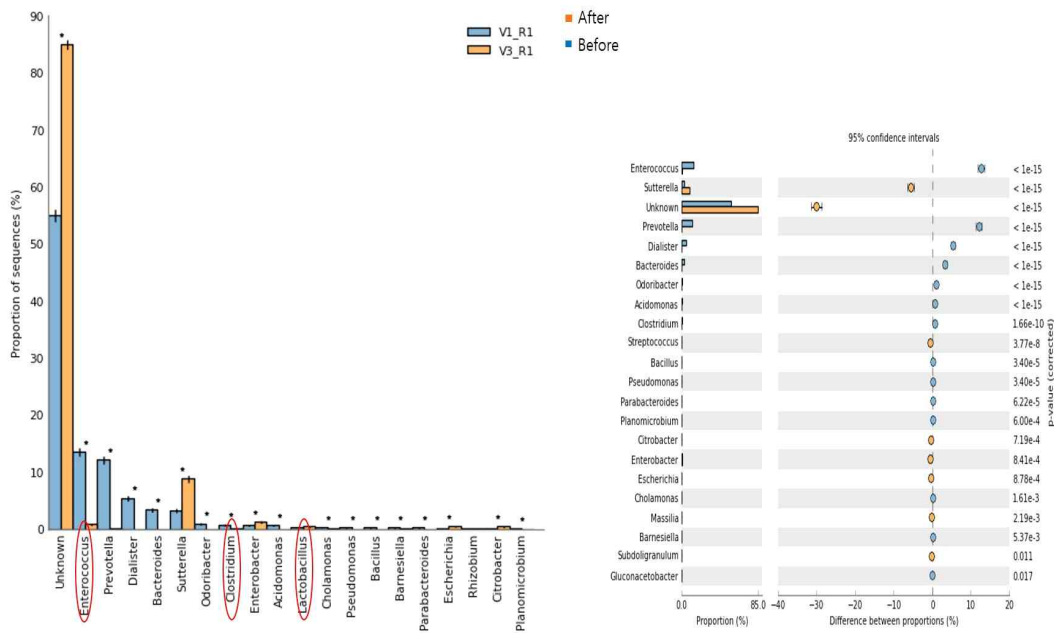


그림. Genus 수준에서 relative abundance (%) 비교. 투여 전 (Before), 김치미생물 + vancomycin 투여 후 (After)

동결 건조된 김치미생물 10종을 섭취하였을 때, 섭취 전과 비교하여 장내 미생물 균총의 변화를 분변을 이용하여 metagenomic analysis로 확인하였다. 환자에 따라 약간의 차이는 있었지만 장내에 존재하는 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Weissella의 비율이 증가하

였다. 또한, 유해균 속(屬)으로 알려졌으며 인체에 장질환을 유발하는 Clostridium의 비율이 감소한 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, Salmonella의 장내 생존율도 감소하였다.

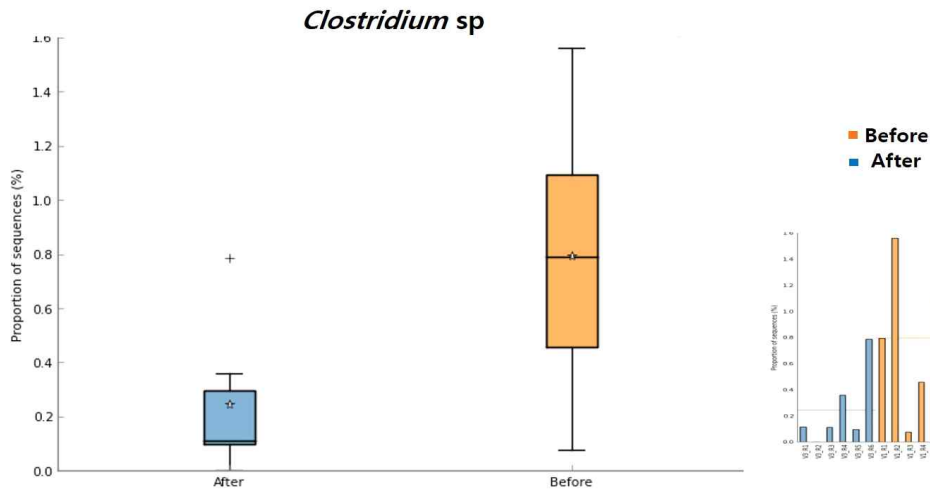


그림. Clostridium sp. relative abundance (%) 비교. 투여 전 (Before), 김치미생물 + vancomycin 투여 후 (After)

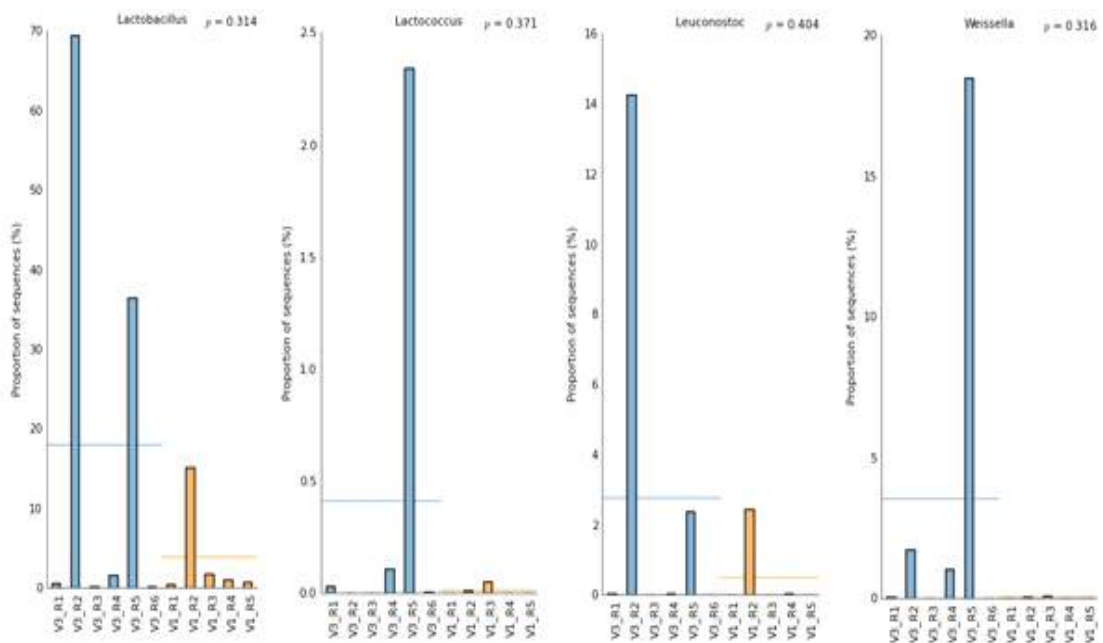


그림. Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Weissella relative abundance (%) 비교. 투여 전(V1), 김치미생물+ vancomycin 투여 후(V3)

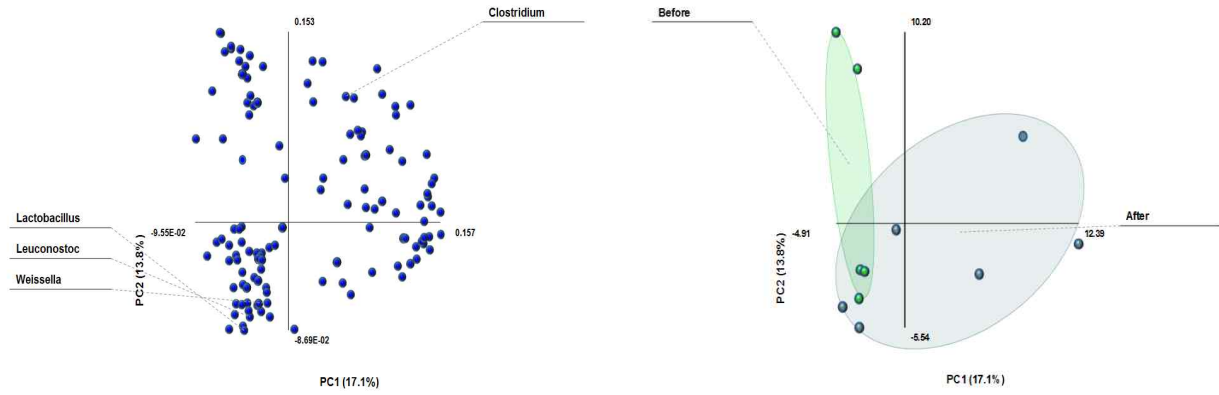


그림. 김치미생물복합제가 인체 장내미생물 불균형에 미치는 영향

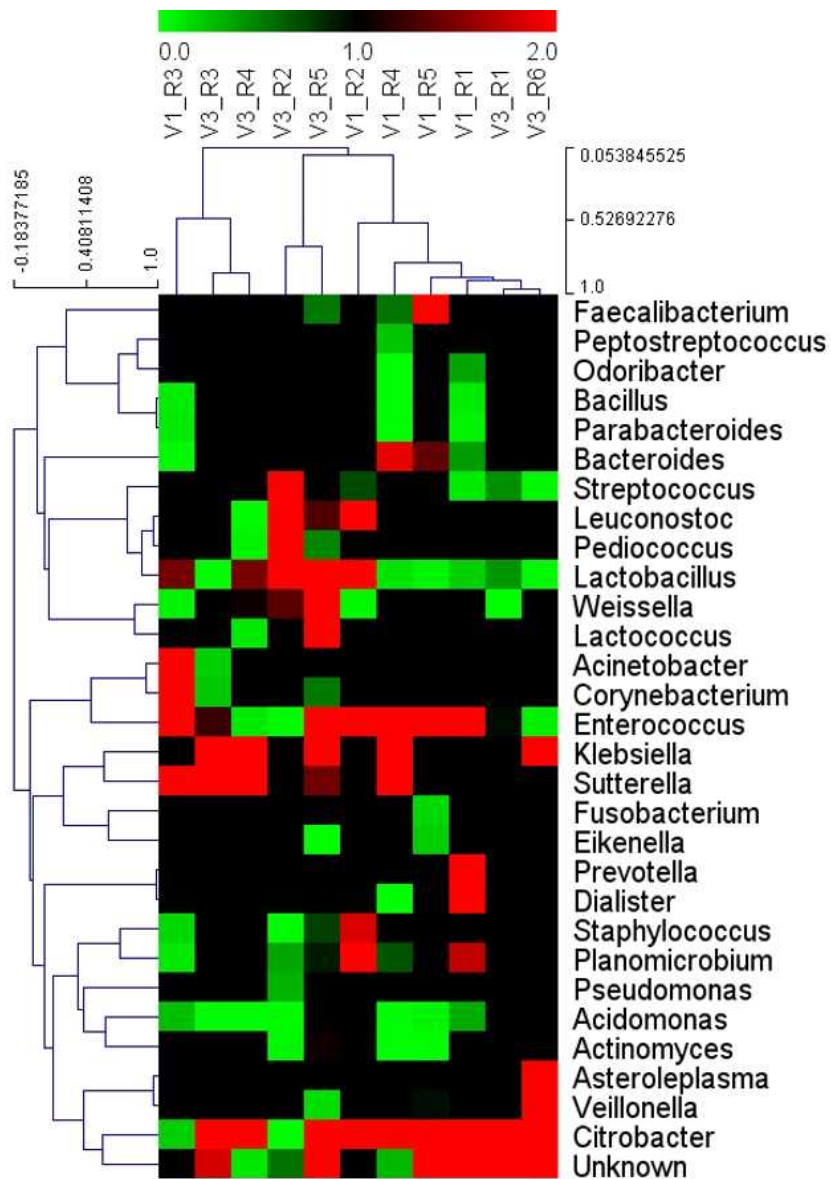


그림. Heat map 분석. Genus 수준에서의 투여 전 (Before), 김치미생물+ vancomycin 투여 후 (After)

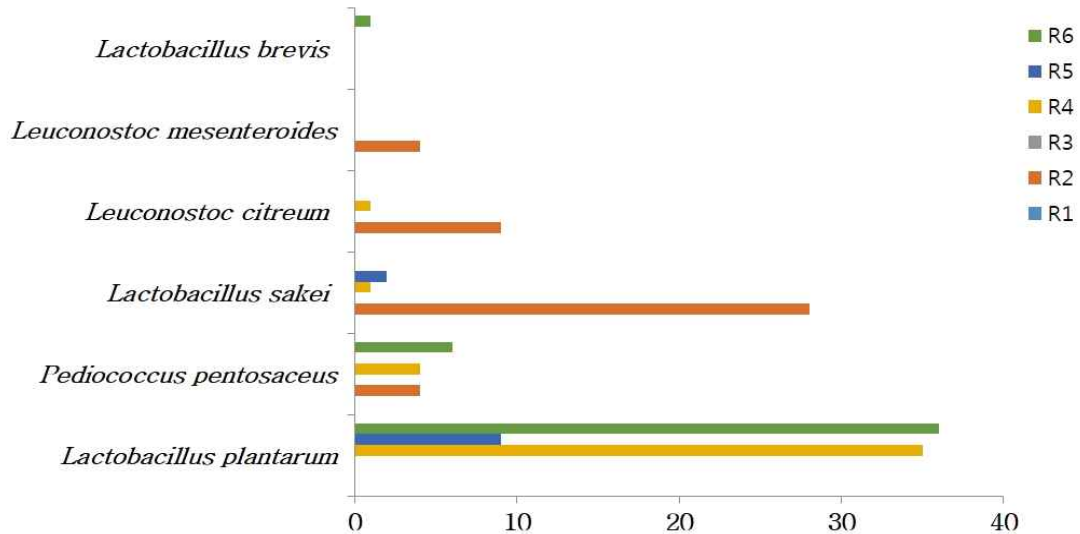


그림. 인체분변에서 분리한 김치미생물의 16S rRNA sequencing 결과

김치미생물복합제 섭취 후, 장내에 정착하여 생존하는 생균수를 측정하기 위해 인체분변 10mg을 0.85% NaCl에 풀어 MRS plate에 도말하였다. 총 6명의 환자로부터 얻은 분변으로 도말 후 30℃에서 18시간정도 배양한 다음, 얻은 균 집락을 1ml MRS broth에 접종하여 30℃에서 16시간 배양하였다. 이와 같이 단일 균주를 분변마다 각각 50개씩 분리하여 마이크로젠에 16S rRNA sequencing을 의뢰하였다. Metagenomic analysis가 생균뿐만 아니라 사균까지 분석한다는 점에서 투여한 김치미생물의 생존을 확인하기 어렵다. 따라서 직접 분리 배양하여 동정하였는데, 제제에 포함된 김치미생물이 확인되었으며 이는 투여한 김치미생물이 장내에서 정착하여 분변에서 검출된 것으로 생각된다.

김치미생물복합제 섭취군 및 플라세보 섭취군에서 장내미생물 균총 비교 분석

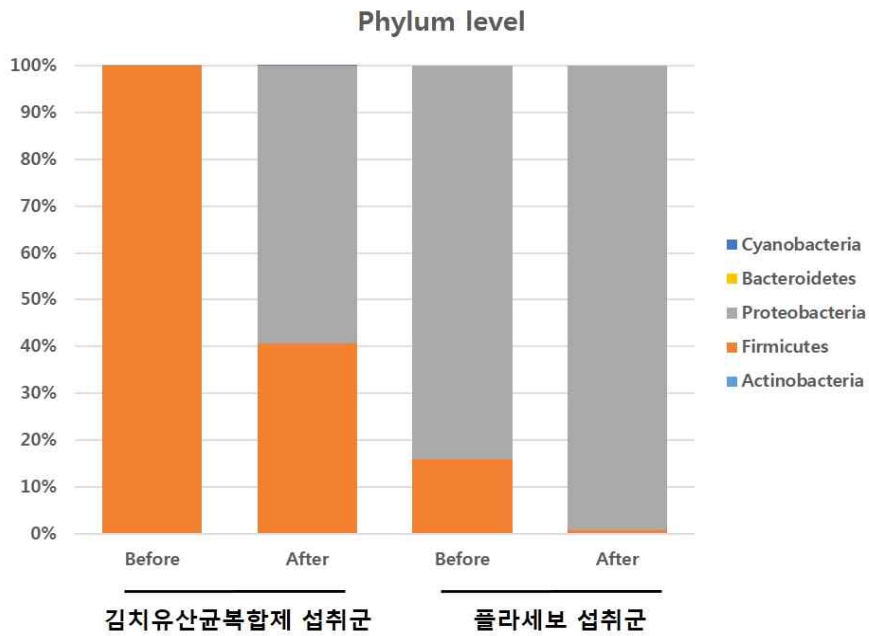


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분 (phylum 수준). 투여 전 (Before), 투여 후 (After)

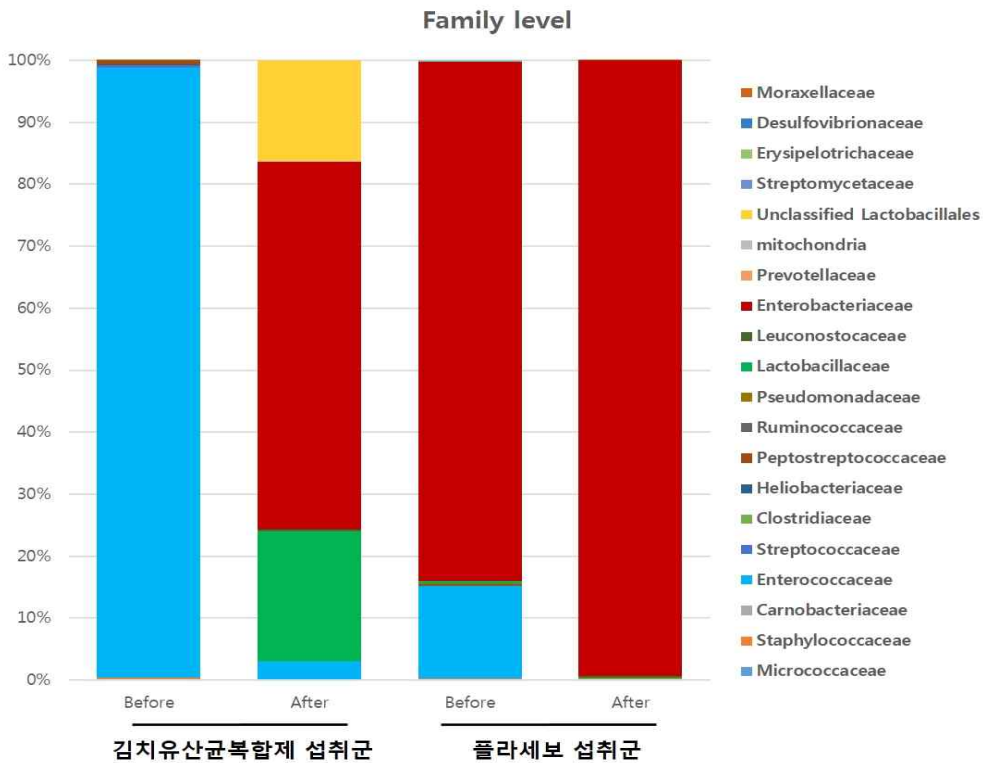


그림. 각 분변샘플에서의 미생물 분류학적 구분 (family 수준). 투여 전 (Before), 투여 후 (After)

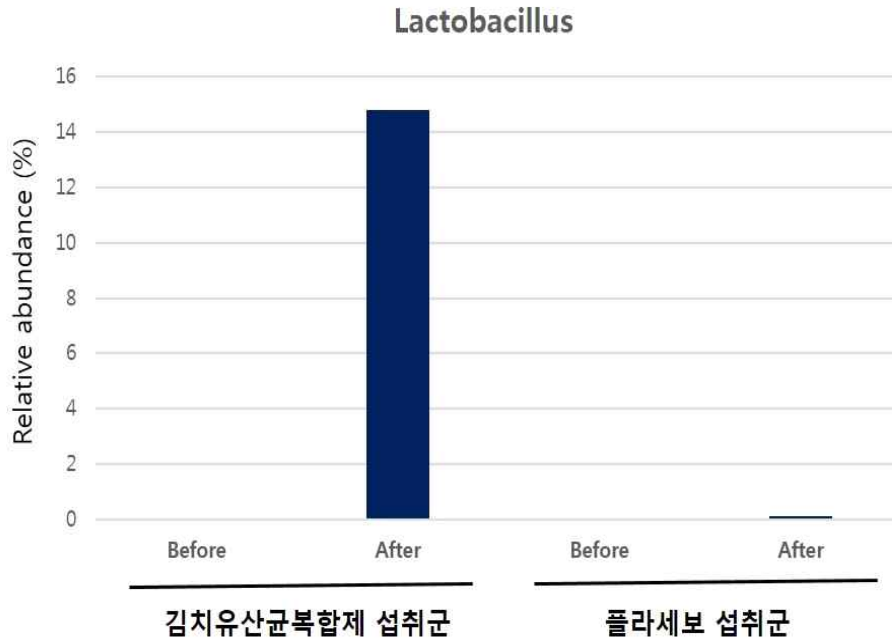
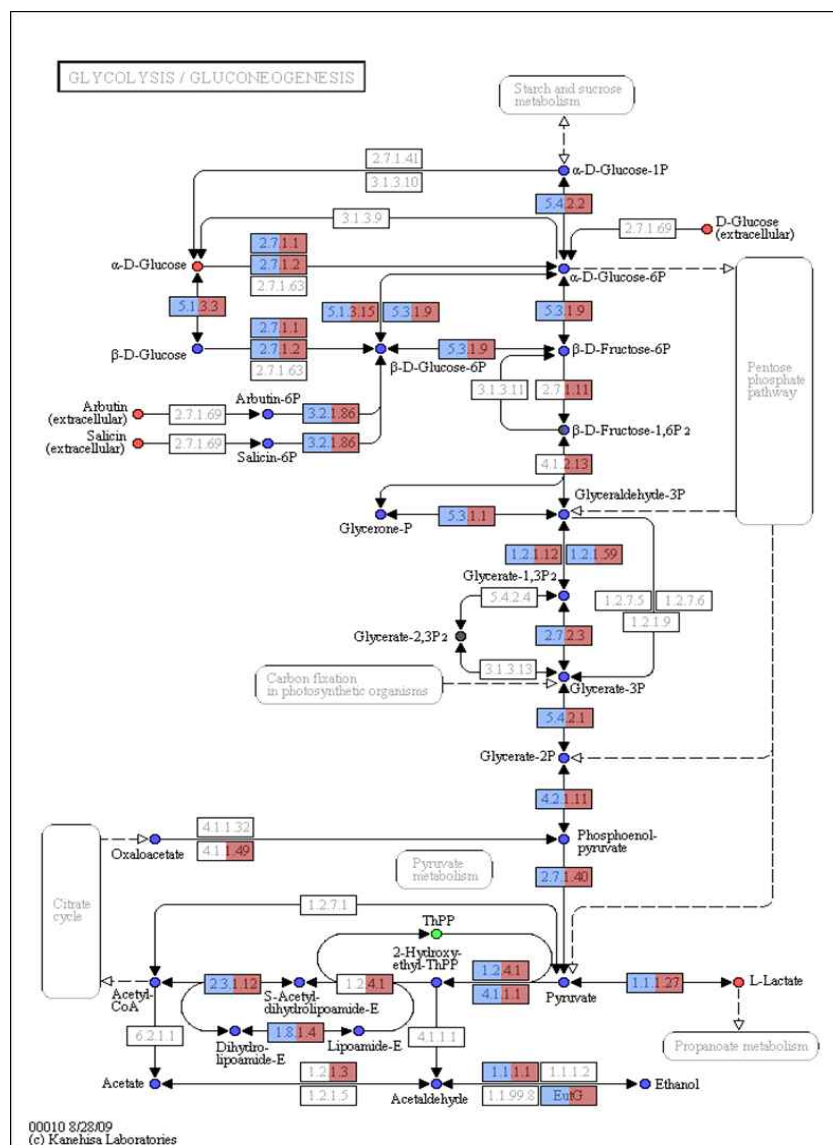


그림. Lactobacillus, relative abundance (%) 비교. 투여 전 (Before), 투여 후 (After)

김치미생물복합제 섭취군과 플라세보 섭취군, 각 두 그룹에서 섭취 전과 후 모두 metagenomic analysis를 실행하였다. 플라세보 섭취군에서는 섭취 전과 후에서 Proteobacteria와 Firmicutes가 대부분의 비율을 차지하고 있었으며 특히 유해균을 많이 포함하고 있는 Proteobacteria가 높게 차지하고 있었다. Lactobacillus는 김치미생물복합제를 섭취함에 따라 장내에 14%로 높은 비율을 차지하고 있는 반면에 플라세보 섭취군 경우 투여 전후에서 낮게 detection 되었다.

Lactobacillus plantarum wikim18과 *Leuconostoc mesenteroides* wikim19의 metabolite pathway 비교분석

KEGG map	Distinct ECs	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Carbon fixation in photosynthetic organisms	25	10 (40.0 %)			11 (44.0 %)		
Citrate cycle (TCA cycle)	22	2 (9.1 %)			8 (36.4 %)		
Glycolysis / Gluconeogenesis	41	15 (36.6 %)			21 (51.2 %)		
Pentose phosphate pathway	37	14 (37.8 %)			17 (45.9 %)		
Propanoate metabolism	47	5 (10.6 %)			6 (12.8 %)		
Pyruvate metabolism	64	12 (18.8 %)			21 (32.8 %)		
Starch and sucrose metabolism	71	17 (23.9 %)			20 (28.2 %)		



Presence ▲▼	Category ▼	Subcategory ▼	Subsystem ▲▼	Role ▲▼	Organism A ▲▼	SS active A all ▼	Organism B ▲▼	SS active B all ▼
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Alanine biosynthesis	Alanine racemase (EC 5.1.1.1)	figl6666666.57837.peq.374 , figl6666666.57837.peq.1748 , figl6666666.57837.peq.1859	yes	figl6666666.67708.peq.2520	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Alanine biosynthesis	Branched-chain amino acid aminotransferase (EC 2.6.1.42)	figl6666666.57837.peq.1273	yes	figl6666666.67708.peq.2353	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Alanine biosynthesis	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7), SufS subfamily	figl6666666.57837.peq.1955	yes	figl6666666.67708.peq.876	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine Biosynthesis	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	figl6666666.57837.peq.734	yes	figl6666666.67708.peq.2363	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Serine Biosynthesis	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	figl6666666.57837.peq.396 , figl6666666.57837.peq.453 , figl6666666.57837.peq.917 , figl6666666.57837.peq.1189 , figl6666666.57837.peq.1412	yes	figl6666666.67708.peq.2559 , figl6666666.67708.peq.3270	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Serine Biosynthesis	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	figl6666666.57837.peq.1413	yes	figl6666666.67708.peq.2558	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Serine Biosynthesis	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	figl6666666.57837.peq.734	yes	figl6666666.67708.peq.2363	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Alanine biosynthesis	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7)	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.1539 , figl6666666.67708.peq.2405	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine and Serine Utilization	D-serine dehydratase (EC 4.3.1.18)	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.3283	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine and Serine Utilization	D-serine/D-alanine/glycine transporter	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.120 , figl6666666.67708.peq.1353 , figl6666666.67708.peq.1968 , figl6666666.67708.peq.3055	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine and Serine Utilization	Glycine cleavage system H protein	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.2924	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine and Serine Utilization	L-serine dehydratase, alpha subunit (EC 4.3.1.17)	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.2713	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine and Serine Utilization	L-serine dehydratase, beta subunit (EC 4.3.1.17)	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.2712	yes
B	Amino Acids and Derivatives	Alanine, serine, and glycine	Glycine and Serine Utilization	Serine transporter	<input type="button" value="find"/>	no	figl6666666.67708.peq.2449 , figl6666666.67708.peq.2711	yes
A and B	Amino Acids and Derivatives	Arginine; urea cycle, polyamines	Arginine Biosynthesis -- gjo	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	figl6666666.57837.peq.38	yes	figl6666666.67708.peq.2513	yes

그림. *Lactobacillus plantarum wikim18*과 *Leuconostoc mesenteroides wikim19*의 metabolite pathway 비교분석

김치 발효과정에 김치 유래 미생물이 분자 생물학적으로 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여 *Lactobacillus plantarum wikim18*과 *Leuconostoc mesenteroides wikim19*의 당대사 관련 pathway를 비교해 보았다. Carbon, fixation (in photosynthetic organism), citrate cycle, glycolysis/gluconeogenesis, pentose phosphate pathway, propanoate metabolism, pyruvate metabolism, starch/sucrose metabolism 관련 부분 두 균주 모두에서 보여졌으며 이 *L. plantarum wikim18*에서 더 높게 관찰되었다.

계획서번호	CTCF2_2013_WiKim
인체적용시험품명	김치유산균복합제

인체적용시험결과보고서

항생제유발설사(*Clostridium difficile* infection, CDI) 환자에서
김치유산균복합제 투여 후 장내미생물 변화 및 CDI 치료에 대한 유효성과
안전성을 평가하기 위한 인체적용시험

2014년 07월 02일

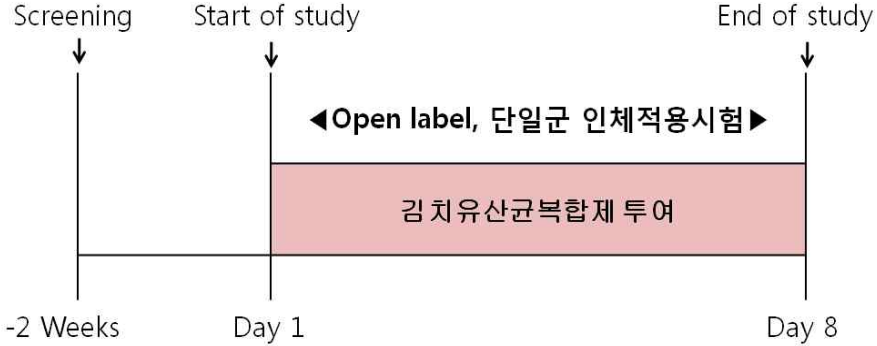
본 인체적용시험은 총 10명의 피험자를 대상으로 하는 공개, 단일군 연구이다. 피험자는 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 자의적 서면동의서를 작성한 후 신체검진, 진단검사의학 검사 등을 포함한 스크리닝 검사를 받았으며 스크리닝 방문일로부터 2주 이내에 1차 방문하여 선정 및 제외기준을 재검토 받고 인체적용시험에 등록되었다. 피험자는 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 시험용제품을 하루 2회씩 매일 복용하면서 8일째에 인체적용시험계획서에 명시한 검사 등을 수행하며 8일 동안 인체적용시험에 참여하였다.

인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

- 인체적용시험제목 : 항생제유발설사(*Clostridium difficile* infection, CDI) 환자에
서 김치유산균복합제 투여 후 장내미생물 변화 및 CDI 치료에
대한 유효성과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험
- 단계 : 인체적용시험
- 인체적용시험실시기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
- 시험책임자 : 전북대학교병원 소화기내과
이 승 옥, MD, PhD
- 공동연구책임자 : 전북대학교 의학전문대학원 약리학교실
채 수 완, MD, PhD
전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
최 은 경, MD
전북대학교병원 소화기내과
서 승 영, MD
- 시험담당자 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
소병옥, 정수진, 정수영, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 임지
희, 장윤진, 김순영, 김예리, 윤주량, 박혜림, 이소영, 서현영,
노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선이, 정혜연,
Renu yadav
- 의뢰자 : 전북대학교병원 소화기내과
조재삼, 송필훈
- 인체적용시험용제품명 : 한국식품연구원 부설 세계김치연구소
시험제품 - 김치유산균복합제
- 시험방법 : 본 인체적용시험은 총 10명의 피험자를 대상으로 하는 공개,
단일군 연구이다. 피험자는 전북대학교병원 기능성식품임상
시험지원센터에 방문하여 자의적 서면동의서를 작성한 후
신체검진, 진단검사의학 검사 등을 포함한 스크리닝 검사를
받았으며 스크리닝 방문일로부터 2주 이내에 1차 방문하여
선정 및 제외기준을 재검토 받고 인체적용시험에 등록되었다.
피험자는 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후
시험용제품을 하루 2회씩 매일 복용하면서 CDI에 대한
의학적 표준치료(Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg
복용)를 병행하고, 8일째에 인체적용시험계획서에 명시한
검사 등을 수행하며 8일 동안 인체적용시험에 참여하였다.
- 인체적용시험계획서번호 : CTCF2_2013_WiKim
- 인체적용시험 시작일 : 2013. 11. 28 (최초 피험자 등록일)
- 결과보고서 작성일 : 2013. 07. 02

요 약 (Synopsis)

인체적용시험계획서 번호	CTCF2_2013_WiKim
인체적용시험제목	항생제유발설사(Clostridium difficile infection, CDI) 환자에서 김치유산균 복합제 투여 후 장내미생물 변화 및 CDI 치료에 대한 유효성과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험
목적	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 목적 CDI 환자에게 투여한 김치유산균복합제의 장내 생존 및 장내미생물 군총 변화를 평가한다 • 2차 목적 김치유산균복합제 투여 후 CDI 치료 효과 및 안전성을 평가한다.
연구책임자	전북대학교병원 소화기내과 이승욱 MD, PhD
공동연구책임자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채 수 완, MD, PhD 전북대학교병원 소화기내과 서승영 MD 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최은경 MD
시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 소병옥, 정수진, 정수영, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 임지희, 장운진, 김순영, 김예리, 윤주량, 박혜림, 박미현, 이소영, 서현영, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선이, 정혜연, Renu yadav 전북대학교병원 소화기내과 조재삼, 송필훈
선정기준	<p>1) 만 20 ~ 90세의 성인 남녀</p> <p>2) 스크리닝 검사 전 8주 이내에 항생제 투여 과거력이 있으며 CDI 진단기준을 만족하는 자</p> <p>※ CDI 진단기준 : 하루 3회 이상 무른 변 또는 설사가 있으며, 다음 기준 중 한 가지 이상을 만족할 때</p> <p>① 대변검사서서 C.difficile 또는 toxin 양성인 경우</p> <p>② 대장 또는 직장내시경 또는 조직검사서서 위막성장염의 소견이 있는 경우</p> <p>3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p>
제외기준	<p>약물, 알코올, 시험용제품 또는 성분에 임상적으로 유의한 과민반응 병력이 있는 자</p> <p>경구 투약 및 섭취가 불가능한 자</p> <p>생명을 위협할 만한 복합합병증(장 파열 및 폐쇄)이 동반된 자</p> <p>저혈압, 의식불명, 쇼크상태인 자</p> <p>스크리닝 검사 전 14일 이내에 Vancomycin 이 투여된 자</p> <p>Vancomycin 치료에 실패하였던 CDI기왕력이 있는 자</p> <p>C. difficile 이외 감염성 원인에 의한 설사가 입증된 자</p> <p>- Salmonella, Shilgella, and Campylobacter species, etc</p>

	<p>- Virus, ova and parasites, etc</p> <p>스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 수유부, 임신부 또는 시험기간 중에 임신계획이 있는 자 진단검사의학 검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자</p>
<p>피험자 수</p>	<p>총 10 명</p>
<p>시험방법</p>	 <p>본 인체적용시험은 총 10명의 피험자를 대상으로 하는 공개, 단일군 연구이다. 피험자는 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 자의적 서면동의서를 작성한 후 신체검진, 진단검사의학 검사 등을 포함한 스크리닝 검사를 받았으며 스크리닝 방문일로부터 2주 이내에 1차 방문하여 선정 및 제외기준을 재검토 받고 인체적용시험에 등록되었다. 피험자는 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 시험용제품을 하루 2회씩 매일 복용하면서 CDI에 대한 의학적 표준치료(Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg 복용)를 병행하고, 8일째에 인체적용시험계획서에 명시한 검사 등을 수행하며 8일 동안 인체적용시험에 참여하였다.</p>
<p>섭취방법</p>	<p>• 김치유산균 - 1일 2회, 1회 1캡슐 (107CFU/일), 미지근한 물 또는 찬물과 함께 복용</p>
<p>평가기준 및 방법</p>	<p>▶ 유효성 평가 1차 유효성 평가 김치유산균 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화 2차 유효성 평가 ※ CDI 치료의 결과(치료 성공, 치료 실패) ■ 치료 성공: 다음 항목을 모두 만족할 경우 A. Day 7 까지 설사 호전(2회/day이하) B. Day 8 에 시행한 toxin assay에서 음성 반응(negative result) ■ 치료 실패: 다음의 항목 중 하나 이상 만족하는 경우 A. Day 8 에 하루 3회 이상 설사 지속 B. Day 8 에 시행한 toxin assay에서 양성 반응(positive result) ▶ 안전성 평가 - 자 · 타각 증상 등 이상반응 모니터링 - 신체검진 - 진단검사의학 검사 - 활력징후</p>

<p>통계분석</p>	<p>인구학적 정보는 피험자 등록 이후 피험자 등록 정보를 확인하기 위하여 기술통계학적 분석을 한다.</p> <p>안전성 평가는 활력징후, 진단검사의학검사 결과, 이상반응 발생 등에 따라서 평가한다. 활력징후, 진단검사의학검사 결과 등에 대해서는 paired t-test 등을 이용하여 검정한다. 이상반응의 발생 양상은 기술통계학적 분석을 한다.</p> <p>유효성 평가항목의 변화는 섭취 전·후 차이를 비교하기 위하여 paired t-test, linear mixed model, Chi-square test 또는 Fisher's exact test 등으로 검정한다.</p>
<p>결론</p>	<p>본 인체적용시험은 CDI 환자에서 CDI에 대한 의학적 표준치료에 병행한 김치유산균복합제 섭취가 장내미생물변화 및 항생제유발설사 치료에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 8일 간 공개, 단일군 연구이다.</p> <p>본 인체적용시험은 총 8명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 피험자 적합성 평가를 통해 총 8명이 적격 피험자로 선정되었다. 선정된 피험자는 8일간 본 인체적용시험에 참여하였으며, 중도탈락자가 없이 총 8명의 피험자가 시험계획서(프로토콜)에 명시한 바에 따라 정상적으로 인체적용시험을 종료하였다.</p> <p>시험자는 모든 피험자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, CDI에 대한 의학적 표준치료(Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg 복용)를 병행하면서 김치유산균복합제 섭취 전과 섭취 7일 후 김치유산균 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화, stool toxin, 항생제유발설사 증상에 대한 임상양상 평가 등의 유효성 평가 및 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다.</p> <p>김치유산균 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화를 분석한 결과, 김치유산균 복합제 섭취 7일 후, 섭취 전에 비해 장내에 존재하는 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc 및 Weissella 종의 비율이 증가하였으며, 인체에 장질환을 유발하는 유해균인 Clostridium과 Salmonella 종의 비율이 감소하였다.</p> <p>피험자의 분변을 통해 김치유산균복합제의 장내 생존 여부 확인 결과, 시험용제품인 김치유산균복합제에 포함된 김치유산균의 존재가 확인되었다. 김치유산균복합제를 통해 섭취한 김치유산균이 장내에서 정착하여 분변에서 검출된 것으로 판단하였다.</p> <p>Stool toxin 변화를 비교한 결과, 김치유산균복합제 섭취 전 stool toxin 양성인 피험자 (N=3) 중 섭취 7일 후 음성으로 변화한 피험자가 2명, 섭취 전 stool toxin 음성 (N=4), 섭취 7일 후에도 음성으로 결과에 변화가 없는 피험자는 4명이었다. 변화가 있는 피험자와 변화가 없는 피험자 빈도수 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었지만($P>0.05$), stool toxin 양성인 피험자 (N=3) 중 섭취 7일 후 대변 채취 및 stool toxin assay 가 가능했던 2명의 피험자 모두 섭취 전 stool toxin 양성에서 섭취 후 stool toxin 음성으로 변화하였다.</p> <p>항생제유발설사에 대한 임상양상 평가 결과, 8명 피험자 중 모든 피험자의 설사횟수가 하루 2회 이하로 감소하였고, 김치유산균복합제 섭취 전 stool toxin assay 에서 양성반응에서 보였던 2명의 피험자는 섭취 7일 후 음성반응으로 변화하여 모든 피험자에서 항생제유발설사 치료 성공을 확인하였</p>

다.

안전성 평가를 위해 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 피험자 8명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 8명의 피험자 중 7명의 피험자에서 총 7건의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였으며, 인체적용시험용제품 섭취와 인과관계가 없다고 판단하였다. 진단검사의학 검사 및 활력징후에서도 통계적으로, 그리고 임상적으로 의미 있는 변화가 없었다($P>0.05$).

요약하면, 본 인체적용시험을 통해 항생제유발설사 (Clostridium difficile infection, CDI) 를 가진 피험자가 CDI 에 대한 의학적 표준치료에 병행하여 김치유산균복합제를 섭취할 때 모든 피험자가 CDI 치료에 성공하였고, 섭취한 김치유산균이 장내 생존하며, 인체에 유익한 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc 및 Weissella 종의 비율이 증가하고, 유해균인 Clostridium과 Salmonella 종의 비율이 감소함을 확인하였다. 따라서 김치유산균복합제 섭취가 인체에 안전하면서 의학적 치료 목적에 의한 항생제 사용에서 나타날 수 있는 장내 균총 불균형을 예방하거나 개선할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

1. 약어 및 용어의 정의

AE	Adverse Event
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	L-Alanine aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance
AST	L-Aspartate aminotransferase
BMI	Body mass index
BUN	Blood urea nitrogen
CDI	<i>Clostridium difficile</i> infection
ESR	Erythrocyte sedimentation rate
GCP	Good Clinical Practice
GGT	gamma-glutamyltranspeptidase
HDL	High-density lipoprotein
hs-CRP	High sensitivity C-reactive protein
ICH	International Conference on Harmonisation
IRB	Institutional review board
ITT	Intention-to-treatment
LDL	Low-density lipoprotein cholesterol
PP	Per-protocol PR
RBC	Red Blood Cell
RM-ANOVA	Repeated measure analysis of variance
SOP	Standard of performance
WBC	White Blood Cell

2. 윤리적 고려

(1) 인체적용시험실시기관에서의 인체적용시험계획서 심의

인체적용시험계획서는 피험자의 안전을 충분히 고려하여 작성되었으며, 전북대학교병원 기능성식품인체시험윤리위원회(Institutional Review Board, IRB)가 심의하여 인체적용시험 수행을 결정하였다.

전북대학교병원 기능성식품인체시험윤리위원회 최초 승인 일자

:2013년 11월 18일

(2) 피험자 동의

피험자에게 인체적용시험의 목적, 내용, 기능성식품의 효과 및 이상반응에 대하여 사전에 충분히 설명한 후, 피험자의 자발적 서면동의를 받아 인체적용시험을 진행하였다.

3. 시험자 및 기타시험참여자

(1) 시험책임자

전북대학교병원 소화기내과 이 승 옥 MD, PhD

(2) 공동연구책임자

전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채 수 완, MD, PhD

전북대학교병원 소화기내과 서 승 영 MD

전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최 은 경 MD

(3) 시험담당자

전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터

소병옥, 정수진, 정수영, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 임지희, 장윤진, 김순영, 김예리, 윤주량, 박혜림, 박미현, 이소영, 서현영, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선이, 정혜연, Renu yadav

전북대학교병원 소화기내과

조재삼, 송필훈

(4) 의뢰자

한국식품연구원 부설 세계김치연구소 이종희

광주광역시 남구 김치로 86 세계김치연구소

4. 서론

유산균이 장내 균총을 개선시킨다는 여러 연구 결과가 보고되고 있으며, 한국 식품의약품안전처에서는 *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.gasseri*, *L.delbrueckii spp. Bulgaricus*, *L.heloticus*, *L.fermentum*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus*, *L.salioarius*, *Lc. lactis*, *E.faecium*, *E.faecalis*, *S.thermophilus*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.longum*, *B.animalis ssp. lactis*를 유산균 증식 및 유해균 억제, 배변활동 원활 등 장 기능 개선 가능성을 가지는 프로바이오틱스로 인정하였다. 그러나 한국인들이 전통적으로 섭취해 온, 유산균의 보고라고 알려진 김치에서 유래한 미생물을 사용한 연구는 전무한 실정이다.

연구자들은 김치유산균의 기능성 구명을 위해 선행연구에서 한국 전통식품인 김치에서 많이 분리된다고 보고된 10종의 유산균을 세계김치연구소에서 직접 분리 동정하여 확보한 후 배양하고 동결건조하여 캡슐 제제화 하였다.

김치미생물복합체에 포함된 10종 유산균은 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella confuse*, *Pediococcus pentosaceus* 으로 구성되며, 이들 모두 식품의약품안전처 식품원재료 데이터베이스에 ‘식용 가능’으로 분류된 GRAS (generally recognized as safe) 유산균으로서 김치의 발효과정에 신맛과 감칠맛을 내는데 중요한 역할을 하며, 김치 이외 여러 발효 식품에 사용되어 온 미생물들이다 (Otgonbayar, et al., 2011, Shin, et al., 2008, Lee, et al., 2005).

이들 미생물 중 *Lactobacillus plantarum*은 식품의약품안전처에서 고시한 probiotics 유산균으로 *Asparagillus* 속의 곰팡이에 대해 항진균 활성 (yang & Chang, 2008), *Lactobacillus acidophilus*는 체내 콜레스테롤 강하효과 (Y. T. Ahn, et al., 2004), *Lactobacillus brevis*는 김치뿐만 아니라 피클, 사워크라우트 등 여러 발효식품에서 발견되는 유산균으로 내산성을 가지며, 장에서 면역활성 증진 (Lee, et al., 1998, Yakabe, et al., 2013), *Lactobacillus sakei*는 박테리오신을 생산하는 균으로 *Listeria monocytogenes*에 항균 활성, GABA 등 생리활성물질 생산 (Ahn, et al., 2012), *Lactobacillus lactis*는 유제품 발효에 주로 이용되는 유산균으로 박테리오신 생산 및 항균활성(Yu & Oh, 2011), *Leuconostoc mesenteroides*는 박테리오신을 생성하며 항균 활성 및 만니톨 생성능 (Kim, et al., 1998), *Lactobacillus fermentum*은 항산화 활성, *Leuconostoc citreum*은 박테리오신을 생성하며 만니톨을 생성능 (Kim, et al., 2011), *Pediococcus pentosaceus*는 위액과 담즙산에 대해 내성을 가지며, 또한 *Listeria monocytogenes* 및 *Shigella sonnei*를 포함하는 식중독 병원균에 대해 항균활성(Shin, et al., 2012, Kim, et al., 2011) 등의 효과를 가지고 있다고

보고되고 있다. 이 중 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum* 4종은 식품의약품안전처 건강기능식품 기준에서 프로바이오틱스 원료로 공시된 균주이다 (Korea Food and Drug Administration, 2012).

김치식이를 통한 마우스 분변의 미생물상 변화를 세계김치연구소에서 연구한 결과 비만관련 미생물인 *fermicutes*(페르미쿠테스)문 세균은 김치 섭취에 따라 감소하는 효과를, *bacteroidetes*(박테로이데테스)문 세균은 그 수가 증가하였다. 또한 *lactobacillaceae* (*lactobacillus* 과) 미생물은 김치 섭취에 의해 증가, *Clostridium difficile*가 포함된 *Clostridia* 강미생물이 유의적으로 감소하는 결과를 얻어 김치유래 미생물의 장내균총 변화에 긍정적 효과를 보여주었다.

본 연구에서는 한국김치 유산균을 이용하여 인체 장내 균총 개선 효과를 검증하고자 하며, 이를 위해 항생제유발설사(*Clostridium difficile* infection, CDI) 환자에서 CDI에 대한 의학적 표준치료(Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg 복용)를 병행하면서 7일간 김치유산균 10^7 CFU/day투여한 후 장내미생물 변화 및 CDI 치료에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 탐색적 인체적용시험을 계획하였다.

5. 인체적용시험의 목적

- 1차 목적: CDI 환자에게 투여한 김치유산균복합제의 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화를 평가한다
- 2차 목적: 김치유산균복합제 투여 후 CDI 치료효과 및 안전성을 평가한다.

6. 인체적용시험계획

6.1. 인체적용시험 방법

본 인체적용시험은 총 10 명의 피험자를 대상으로 하는 공개, 단일군 연구이다. 피험자는 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 자의적 서면동의서를 작성한 후 신체검진, 진단검사의학 검사 등을 포함한 스크리닝 검사를 받았으며 스크리닝 방문일로부터 2주 이내에 1차 방문하여 선정 및 제외기준을 재검토 받고 인체적용시험에 등록되었다. 피험자는 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 시험용제품을 하루 2회씩 매일 복용하면서 CDI에 대한 의학적 표준치료(Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg 복용)를 병행하면서 8일째에 인체적용시험계획서에 명시한 검사 등을 수행하며 8일 동안 인체적용시험에 참여하였다.

6.2. 검사방법 및 대조제품의 선정

6.2.1. 피험자 동의서 (Informed Consent Document, ICD)

연구자는 인체적용시험 전반에 걸쳐 피험자가 가질 수 있는 질문에 대해 성실히 답변하였다. 또한 피험자의 인체적용시험 참여 지속 의사에중요할 수 있는 새로운 정보가 입수되는 대로 적절한 시한 내에 이를 공유하고 피험자가 인체적용시험 참여로 인한 위험 및 이익을 이해하는지 확인하였다. ICD 가 새로운 정보에 따라 갱신되는 경우 연구자는 갱신된 ICD 를 사용하여 피험자의 인체적용시험 참여 지속 의사를 다시 한 번 확인하였다. ICD 는 피험자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 쉬운 용어를 사용하여 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익을 피험자에게 설명하기 위해 사용되었으며, 피험자가 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익에 대해 만족 할 만큼 이해하고 인체적용시험에 참여하고자 하는지 문서화하기 위해 사용되었다.

연구자는 각 피험자가 제출한 피험자 동의서를 확인하였다. 여기에는 모든 인체적용시험계획서 상의 절차수행 및 시험제품의 처방 이전에 적절한 서명 및 날짜가 기재되어야 하는 점이 포함되었다.

6.2.2. 스크리닝 번호 및 피험자 번호 부여

인체적용시험에 참여하고자 서면동의한 자원자에게 스크리닝 번호를 부여하였다. 스크리닝 번호는 S01 로 시작하며, 뒤 숫자 두 자리로 구성되며, 동의서를 받은 순서대로 부여하였다.

피험자 번호 부여방법은 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 피험자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였고, 1 차 방문 시 최종통과되면 통과 된 순서대로 무작위배정하여 피험자 번호를 부여하였다. 피험자 번호는 R01 로 시작하며, 뒤 숫자 두 자리로 일정한 규칙을 갖는다. 피험자 번호 숫자부분의 의미는 다음과 같다. 첫 번째와 두 번째 숫자는 참여한 피험자의 순서를 나타냈다. 각 피험자에게 부여된 피험자 번호는 인체적용시험이 끝날 때까지 피험자를 인식하는 피험자식별코드(subject identification code)로 사용되었다.

6.2.3. 인구학적 정보

피험자의 신분증을 통하여 성명, 성별, 생년월일, 연령 등 인구학적 정보를 확인하였다. 연령은 만 나이로 기록하였으며 피험자에게 음주, 흡연력을 조사하였다.

6.2.4. 병력 및 약물 투여력 조사

피험자가 동의서에 서명한 시점에서 과거 3 년 이내 병력을 확인하였고, 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다. 인체적용시험기간 동안 질환이 처음으

로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주하고 기록하였다. 또한 모든 병용약물의 일반명, 용량, 용법, 투여기간 등을 상세히 기록하였다.

6.2.5. 활력징후

활력징후는 좌위 혈압, 맥박수 항목을 측정하였다. 혈압은 피험자의 팔이 심장의 높이에 위치하도록 하여 측정하였으며, 단위는 mmHg 이고 정수로 표기하였다. 급격한 체위변동 없이 5 분 이상 좌위 자세를 유지한 상태에서 혈압, 맥박수를 측정하였다.

활력징후 측정시기가 채혈시기와 일치할 경우, 가급적 활력징후를 먼저 측정한 후 채혈을 하도록 하였다. 불가피하게 채혈 후 활력징후를 측정할 경우, 가급적 5 분 이상 시간 간격을 두고 활력징후를 측정하였다.

6.2.6. 신체계측

신장은 단위를 cm 로 하였으며, 스크리닝 방문 시의 측정값으로 연구 종료 시까지 기재하였으며, 소수점 첫 째 자리에서 반올림하여 정수로 표기하였다. 체중은 단위를 kg 으로 하였으며, 소수점 첫째 자리까지 표기하였다(단, 소수점 둘째 자리까지 나오는 기계일 경우, 둘째 자리에서 반올림하여 첫째 자리까지 표기하였다).

6.2.7. 진단검사의학 검사

진단검사의학 검사는 12 시간 이상 공복상태에서 채혈하여 측정하는 것을 원칙으로 하되, 시험책임자의 판단에 따라 달리 시행하였으며, 검사 항목은 다음과 같다:

진단검사의학 검사 항목

- 혈액학적 검사
: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets, hs-CRP
- 혈액생화학적 검사
: Na, K, Cl, Total bilirubin, ALP, AST, ALT, γ -GTP, total protein, albumin, BUN, creatinine, glucose, total cholesterol, ESR
- 뇨 검사
: Specific gravity, pH, nitrite, protein, ketone, glucose, bilirubin, urobilinogen, microscopy(RBC, WBC)

6.2.8. Metagenomic analysis.

분변에 존재하는 미생물의 분포를 NGS(차세대염기서열분석법)을 이용하여

확인하는 방법이다.

본편에서 MG kit을 이용하여 gDNA를 추출한 뒤 bacteria동정에 사용되는 16S region의 V1~V3에 해당하는 primer를 디자인하여 PCR하였다. PCR product는 Roche GS-FLX amplicon library kit을 이용하여 library를 제작하였고 emPCR을 진행한 후 Roche GS-FLX를 이용하여 Sequencing하였다. Sequencing이 완료되면 silvar database를 이용하여 blast하고 taxonomic assignment와 OTU분석을 통해 샘플 내에 존재하는 미생물의 분포를 확인하였다. 본편 샘플은 채취 후 -70도에 보관하여 위탁기관에 전달하고 이를 분석 후 폐기하였다.

6.2.9. 임상양상 평가

CDI 치료의 결과를 치료 또는 치료실패로 평가하였다.

- **치료 성공:** 다음 항목을 모두 만족 할 경우
 - ① Day 7까지 설사 호전(2회/day 이하)
 - ② Day 8 에 시행한 toxin assay 에서 음성 반응(negative result)

- **치료 실패:** 다음의 항목 중 하나 이상 만족하는 경우
 - ① Day 8 에 하루 3회 이상 설사 지속
 - ② Day 8 에 시행한 toxin assay 에서 양성 반응(positive result)

6.2.10. Stool toxin assay

환자의 분변을 이용하여 RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B EIA(Enzyme Immunoassay) test를 시행, 치료 유무를 평가하였다. 분변 샘플 은 분석 종료 후 폐기하였다.

6.2.11. 이상반응 모니터링

이상반응에 대한 정보는 수시로 피험자에게 자발적인 보고를 하도록 하였으며, 그 외에 투약기간 동안 전화 방문과 정기 방문 시 시험담당자의 면담 및 문진 등 진료를 통하여 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상 반응의 정도 및 결과, 시험제품/플라세보제품과 관련하여 취해진 조치 및 시험 제품/플라세보제품의 인과관계, 시험제품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료여부 및 내용 등이 포함되었다.

6.2.12. 선정기준/ 제외기준 확인(피험자 적합성 평가)

스크리닝 방문 시에 수행한, 피험자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약품 투여력 조사, 이학적 검사소견, 심전도, 기타 검사결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 합당하는 피험자 선정이 이루어졌는지 평가하여 기록하였다.

6.2.13. 시험용제품 처방

선정기준/제외기준에 합당한 피험자에게 1 차 방문 시(1일) 시험용제품을 처방하였다. 이 때 피험자는 시험용제품 최초 섭취가 이루어졌으며, 섭취시작 후 7일에 피험자가 방문하여 시험용제품 반납하도록 하였다.

6.2.14. 반납제품 회수 및 순응도 확인

반납제품 회수 및 시험용제품의 섭취 순응도는 종료방문 시 피험자가 지참하고 온 시험용제품의 잔량을 관리영양사가 점검하였다. 섭취하고 남은 잔량은 반드시 약국에 반납하였고 수불장부를 기록하였다. 각 방문 별 순응도는 100%를 초과할 수 없으며, 초과할 경우 100%로 간주하였다. 각 방문 별로 순응도를 계산하여 전체 순응도 평균치가 70% 이상 만족하지 못할 경우 분석에서 제외하였다. 순응도는 정수로 표기하였다.

$$\text{제품순응도(\%)} = \frac{\text{실제 복용한 제품 수}}{\text{복용하여야 할 제품 수}} \times 100$$

6.3. 피험자의 선정

6.3.1. 선정기준

모든 피험자는 다음 기준을 만족하여 인체적용시험에 참여하였다.

- 1) 만 20 ~ 90 세의 성인 남녀
- 2) 스크리닝 검사 전 8 주 이내에 항생제 투여 과거력이 있으며 CDI 진단기준을 만족하는 자

※ CDI 진단기준

: 하루 3 회 이상 무른 변 또는 설사가 있으며, 다음 기준 중 한 가지 이상을 만족할 때

- ① 대변검사에서 C.difficile 또는 toxin 양성인 경우
- ② 대장 또는 직장내시경 또는 조직검사서 위막성장염의 소견이 있는 경우
- 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

6.3.2. 제외기준

피험자들이 다음 기준 중 어느 하나라도 해당될 경우 인체적용시험의 참여에서 배제되었다. 그러나, 위반 내용이 경미할 경우, 시험책임자의 판단 하에 허용하였다.

- 1) 약물, 알코올, 시험용제품 또는 성분에 임상적으로 유의한 과민반응 병력이 있는 자
- 2) 경구 투약 및 섭취가 불가능한 자
- 3) 생명을 위협할 만한 복부합병증(장 과열 및 폐쇄)이 동반된 자
- 4) 저혈압, 의식불명, 쇼크상태인 자
- 5) 스크리닝 검사 전 14 일 이내에 Vancomycin 이 투여된 자
- 6) Vancomycin 치료에 실패하였던 CDI 기왕력이 있는 자
- 7) *C. difficile* 이외 감염성 원인에 의한 설사가 입증된 자
 - *Salminella*, *Shilgella*, and *Campylobacter* species, etc
 - Virus, ova and parasites, etc
- 8) 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자
- 9) 수유부, 임신부 또는 시험기간 중에 임신계획이 있는 자
- 10) 진단검사의학 검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

6.4. 인체적용시험용 제품

6.4.1. 섭취방법

1 차 방문 시점에서 피험자 번호가 부여되고 이후에 시험기간 7 일 동안 매일 복용하였다.

- 김치유산균: 1 일 2 회, 1 회 1 캡슐 (10^7 CFU/일), 미지근한 물 또는 찬물과 함께 복용

6.4.2. 인체적용시험용 제품선정

- 김치유산균

-성상 및 제형: 김치유래 유산균 10 종을 함유하는 동결건조분말을 캡슐에 밀봉하여 제조

-저장방법: 냉동보관

지표성분명	구조	함량
<i>Lactobacillus plantarum</i>	그람양성, 혐기성 간균	10 ⁷ CFU
<i>Lactobacillus lactis</i>	그람양성, 통성혐기성 간균	10 ⁷ CFU
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	그람양성, 호기성 간균	10 ⁷ CFU
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	그람양성, 통성혐기성균, 액체 배지에서는 구균, 고체배지에서는 간균	10 ⁷ CFU
<i>Leuconostoc citreum</i>	그람양성, 통성혐기성균, 액체 배지에서는 구균, 고체배지에서는 간균	10 ⁷ CFU
<i>Weissella confuse</i>	그람양성 통성혐기성균	10 ⁷ CFU
<i>Lactonacillus fermentum</i>	그람양성, 혐기성 간균	10 ⁷ CFU
<i>Lactobacillus brevis</i>	그람양성, 호기성 간균	10 ⁷ CFU
<i>Lactobacillus sakei</i>	그람양성, 혐기성 간균	10 ⁷ CFU
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	그람양성, 혐기성 구균	10 ⁷ CFU
콩가루	-	30 mg

6.4.3. 과거 병력 및 병용 투여

1) 과거 병력

피험자가 동의서에 서명한 시점에서, 문진 시 3년 이내에 가지고 있는 과거 병력을 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다.

시험기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주되고 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하였다.

2) 병용가능 약물

- CDI 진단을 받은 피험자에게 CDI에 대한 의학적 표준치료를 위하여 Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg 복용을 병행한다.

- 피험자가 시험에 참여하기 2 주 이전부터 복용하고 있던 약물 중 본 시험의 결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 병용약물(제품)은 연구책임자의 판단 하에 허용하였다.
- 기타 질환 또는 이상반응의 치료를 목적으로 일과성으로 사용되는 약제는 담당 의사와 상의를 통하여 병용 투여하였다.
- 연구책임자의 판단 없이 임의로 투약한 약물이 시험의 유효성 평가에 영향을 줄 수 있다고 예상되는 경우 이 피험자는 탈락하였다. 투여한 모든 제품 및 투여사유는 반드시 증례기록서에 기재하였고 연구책임자가 서명하였다.

3) 병용금지 약물

다음에 열거하는 약물은 시험기간 동안 병용투여를 금지하도록 하였다.

- 결과에 영향을 미칠 수 있는 식품: 발효유제품(특히 요구르트)
- 배변활동 개선 건강기능식품(대두올리고당, 라피노스, 목이버섯, 분말한천, 이소말토올리고당, 자일로올리고당, 커피만노올리고당분말, 프락토올리고당, 프로바이오틱스 등)
- 기타 연구자가 인정하지 않는 제제나 제품

피험자의 다른 의학적 증상 치료를 담당하는 의사의 판단에 따라 인체적용시험 기간 중 피험자의 치료를 위해 병용금지 약물의 사용이 필요한 경우에 해당 피험자는 즉시 인체적용시험을 중단하였으며, 증례기록서의 마지막 페이지에 관련내용을 자세히 기록하였다.

6.4.4. 인체적용시험 순응도

시험제품의 섭취상황에 대하여 종료방문 시 피험자에게 섭취 후 남은 시험제품을 지참하고 방문하도록 지도하여 피험자가 지참하고 온 시험제품의 잔여량을 반납 받고 순응도를 확인하였다. 피험자가 지참하고 온 잔여량은 반드시 약국에 반납하여 수불장부를 기록 하였다.

6.5. 유효성 및 안전성 관련 변수

6.5.1. 유효성 평가 변수

- 1 차 유효성 평가변수

김치유산균 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화

- 2 차 유효성 평가변수

※ CDI 치료의 결과(치료 성공, 치료 실패)

■ **치료 성공:** 다음 항목을 모두 만족할 경우

A. day 7 까지 설사 호전(2 회/day 이하)

B. day 8 에 시행한 toxin assay 에서 음성 반응(negative result)

■ **치료 실패:** 다음의 항목 중 하나 이상 만족하는 경우

A. Day 8 에 하루 3 회 이상 설사 지속

B. Day 8 에 시행한 toxin assay 에서 양성 반응(positive result)

6.5.2. 안전성 평가 변수

자·타각 증상 등 이상반응 모니터링, 진단검사의학 검사, 활력징후, 심전도 인체적용시험 기간 중 시험제품 관련 이상반응을 경험한 피험자의 비율을 요약 제시하였다.

▶ 자·타각 증상 등 이상반응

1) 이상반응의 중증도 (Severity) 평가

1 = 경증 (Mild)	피험자가 거의 느끼지 못할 정도로 정상적인 일상생활(기능)을 저해하지 않는 정도. 대부분 치료가 필요하지 않는 정도
2 = 중등도 (Moderate)	피험자가 불편감을 느낄 수 있으며, 정상적인 일상생활(기능)을 저해하는 정도. 피험자가 시험을 계속할 수는 있으나 치료가 필요할 수도 있는 정도
3 = 중증 (Severe)	피험자가 매우 불편하여 일상생활(기능)이 불가능하고, 시험의 지속적인 참여가 불가능한 정도. 치료나 입원이 필요할 수 있는 정도

2) 이상반응의 인과관계(relationship) 평가

관련 없음 (Not related)	시험제품 사용과 관련되지 않은 이상반응 -피험자가 시험제품을 섭취하지 않은 경우 -시험제품 섭취와 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당하지 않은 경우 -이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우
확실치 않음 (Doubtful)	이상반응에 대한 다른 대체설명이 더 가능성이 큰 경우, 예를 들어 병용약물, 동반질환 또는

	<p>시간적으로 볼 때 인과관계의 가능성이 적은 이상반응</p> <ul style="list-style-type: none"> -이상반응에 대해 보다 가능성 있는 원인이 있는 경우 -섭취중단 결과(실시한 경우)가 음성이거나 모호한 경우 -재 섭취 결과(실시한 경우)가 음성이거나 모호한 경우
<p>관련이 있을 가능성이 있음 (Possible)</p>	<p>시험제품 사용이 원인이 될 수 있는 이상반응. 예를 들어 병용약물, 동반질환에 의한 것인지 확실하지 않음. 시간적으로도 타당성이 있으며, 따라서 인과관계를 배제할 수 없는 경우.</p> <ul style="list-style-type: none"> -시험제품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 -시험제품 섭취와 이상반응 발현 간의 시간적 순서가 타당한 경우 -이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 시험제품에서 기인한다고 판단되는 경우 -섭취중단(실시한 경우)으로 이상반응이 소실된 경우
<p>가능성이 높음 (Probably)</p>	<p>시험제품 사용이 원인이 될 수 있는 이상반응. 시간적 연관성도 설득력이 있음 (섭취 중단으로 확인됨). 예를 들어 병용약물, 동반질환에 의한 가능성이 적은 경우.</p> <ul style="list-style-type: none"> -시험제품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 -시험제품 섭취와 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당한 경우 -이상반응이 다른 원인보다 시험제품 섭취에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우 -섭취중단(실시한 경우)으로 이상반응이 소실된 경우
<p>매우 가능성이 높음 (Very likely)</p>	<p>시험제품의 기여 가능성이 있는 이상반응으로 명시된 이상반응으로, 다른 대체 설명에 의해서 합리적으로 설명될 수 없는 경우로서, 시간에 따른 관련성이 매우 설득력이 있는 경우 (섭취 중단과 재 섭취로 확인됨).</p> <ul style="list-style-type: none"> -시험제품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 -시험제품 섭취와 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당한 경우 -이상반응이 다른 어떤 이유보다 시험제품 섭취에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우

	<ul style="list-style-type: none"> -섭취중단(실시한 경우)으로 이상반응이 소실된 경우 -재 섭취결과(실시한 경우)가 양성인 경우 -이상반응이 시험제품 또는 동일계열의 제품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우
--	---

3) 이상반응과 관련하여 취해진 조치 (Action Taken)

0=취해진 조치 없음	No action taken
1=시험제품의 일시적 섭취 중단	Study product temporarily interrupted
2=시험제품의 섭취 중단	Study product permanently discontinued
3=치료약물 병용 섭취	Concomitant medication taken
4=비약물치료	Non-drug therapy given
5=입원/입원 기간의 연장	Hospitalization/Prolonged hospitalization

- 연구책임자는 시험 시작일로부터 시험 종료 후 30일 이내까지 발생한 이상반응을 보고한다. 중대한 이상반응의 기준을 만족시키는 이상반응은 “중대한 이상반응보고서 양식”을 사용하여 보고하였다. 피험자가 시험을 완료 (추적관찰 포함)한 후 30일 이내에 연구자에게 자발적으로 보고하는 중대한 이상반응도 위와 같이 보고하였다.
- 이상반응 기록: 이상반응의 심각성, 발현 정도 또는 투여제품과의 연관성과 관계없이 모든 이상반응은 근거문서와 증례기록서에 의학적 용어로 기록되었다. 징후 및 증상이 일반적인 병인에서 기인할 때 가능한 경우 이에 대한 진단이 실시되었다. 연구자는 증례기록서에 이상반응과 시험제품 투여 사이의 관련성에 관한 소견을 기록하였다. 이상반응 관리를 위해 요구되는 모든 측정 방법들은 의뢰자의 지시사항에 따라 근거문서에 기록되었다.
- 연구책임자/담당자의 책무: 시험 중 발생한 모든 중대한 이상반응은 연구책임자/담당자에 의해서 인지된 후 24 시간 이내에 해당 의뢰자의 연락 담당자에게 보고하였다. 중대한 이상반응은 중대한 이상반응 보고서 양식을 통해 의뢰자 (필요한 경우 IRB)에게 전달되며, 이는 연구담당자에

의해 서명된다. 중대한 이상반응의 첫 보고는 이메일, 팩스나 전화로 하였으며, 전화 보고 이후 중대한 이상반응에 대한 보고는 당일 근무일 이내에 연구담당자에 의해서 중대한 이상반응 보고서 양식을 작성/완료하여 전송하였다.

6.6. 자료의 질 보증

인체적용시험 자료의 정확성 및 신뢰성을 보증하기 위한 조치로는 적합한 자격요건을 가진 인체적용시험자와 시험기관을 선정하여 인체적용시험이 실시되기 이전에 인체적용시험자 및 담당자에 의한 인체적용시험계획서의 검토, 인체적용시험 의뢰자에 의한 주기적인 시험기관 모니터링 방문, 검사실로부터 얻은 인체적용시험 자료들을 인체적용시험 의뢰자에게 자료파일로 전송하는 일등이 포함되었다. 혈액, 혈청 및 소변 샘플의 수집, 준비와 운송에 대한 서면으로 된 지시사항이 제공되었다. 인체적용시험 시작 전에 증례기록서 완성지침이 제공되고, 인체적용시험 담당자들 사이에서 검토되었다. 인체적용시험 의뢰자는 시험기관 방문 동안, 그리고 증례기록서가 의뢰자에게 회수된 후에 증례기록서의 정확성과 완결성을 검토되었다. 내용이 일치하지 않을 때에는 인체적용 시험자 또는 담당자와 함께 적절한 방법으로 해결하였다. 자료는 인체적용시험 데이터베이스로 보내져 정확성을 확인 받았다.

6.7. 인체적용시험 계획서의 통계적 분석방법 및 피험자 수

6.7.1. 통계적 분석방법

본 인체적용시험의 피험자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety군, ITT(intention-to-treat)군과 PP(per protocol)군으로 분석하였다.

- Safety군은 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용제품을 섭취한 피험자를 대상으로 분석하였다.
- ITT군은 인체적용시험용제품 섭취 후, 최소한 1회 이상 주 평가변수에 대한 측정이 이루어진 피험자를 대상으로 하였다.
- PP군은 ITT군에 포함되는 피험자 중 인체적용시험 계획서에 따라 인체적용시험을 완료한 피험자를 대상으로 분석하였다.
- 유효성 평가에 대한 자료는 PP군을 주 분석대상으로 하였다. 안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 분석하여 본 시험제품에 대한 안전성을 평가하였다.

1) 유효성 분석

유효성 평가항목의 변화는 섭취 전·후 차이를 비교하기 위하여 paired t-test, linear mixed model, Chi-square test 또는 Fisher's exact test

등으로 검정하였다. 시험책임자의 판단에 따라 비정상적으로 높은 수치에 대해서는 분석대상에서 제외시켰다.

2) 안전성 분석

안전성 평가에 대한 일차적 집단은 적어도 1 회 이상의 인체적용시험용제품을 섭취한 모든 피험자들이다.

- 이상반응

인체적용시험 기간 동안 보고된 모든 이상반응을 도표화한 후 이상반응의 발생률을 구하였다.

- 진단검사의학 검사, 활력징후, 심전도

진단검사의학 검사, 활력징후, 심전도 자료는 검사 유형별로 요약하였다. 계획된 시점의 각 분석 대상 검사 자료에 대해서는 기술 통계량이 제시되었으며, 기초 평가일 결과로부터의 변화 정도가 제시되었다.

6.7.2. 피험자 수

1) 피험자 수

총 피험자 수는 10 명으로 하였다.

2) 피험자 수 산정 근거

본 인체적용시험의 목적은 항생제 투여 합병증으로 인한 항생제유발설사(CDI) 환자에서 김치유산균복합제 투여가 장내미생물 변화 및 CDI 치료에 미치는 영향을 알아보기 위한 탐색적 인체적용시험이다. 이는 전형적인 통계적 가설 검정을 위한 시험과는 성격이 다르며, 어떤 수식에 의한 근거보다는 그 목적을 충족시키는 한도 내에서 경험적으로 요구되는 최소한의 피험자 수로 진행하는 것이 바람직하다. 따라서 본 인체적용시험 피험자 수를 10 명으로 설정하였다.

6.8. 인체적용시험 수행 및 분석방법의 변경

인체적용시험 수행 중 몇몇 항목에 대하여 최초 승인된 계획서로부터 변경사항이 있었다. 그러나 인체적용시험 전체 일정에 영향을 줄 정도의 중대한 사항은 없었다.

7. 피험자

본 인체적용시험의 목표 피험자 수는 총 10명으로, 총 8명의 자원자가 스크리닝 검사를 받았다. 자원자는 서면동의서를 작성한 후 피험자 적합성 평가를 받았으며 그 결과 8명의 피험자가 적격 피험자로 선정되었고 중도탈락자는 없었다. 총 8명의 피험자가 시험계획서에 명시된 바에 따라 정상적으로 시험을 수행 완료하였다(figure 1).

본 인체적용시험은 확증적 인체적용시험의 시험용제품 설정을 위한 탐색적 연구로서, 목표 피험자 수 10명이 모두 등록되기 전에 확증적 인체적용시험용제품 설정을 완료하여 총 8명의 피험자를 인체적용시험 수행 완료 시킨 후에 조기종료 하였다.

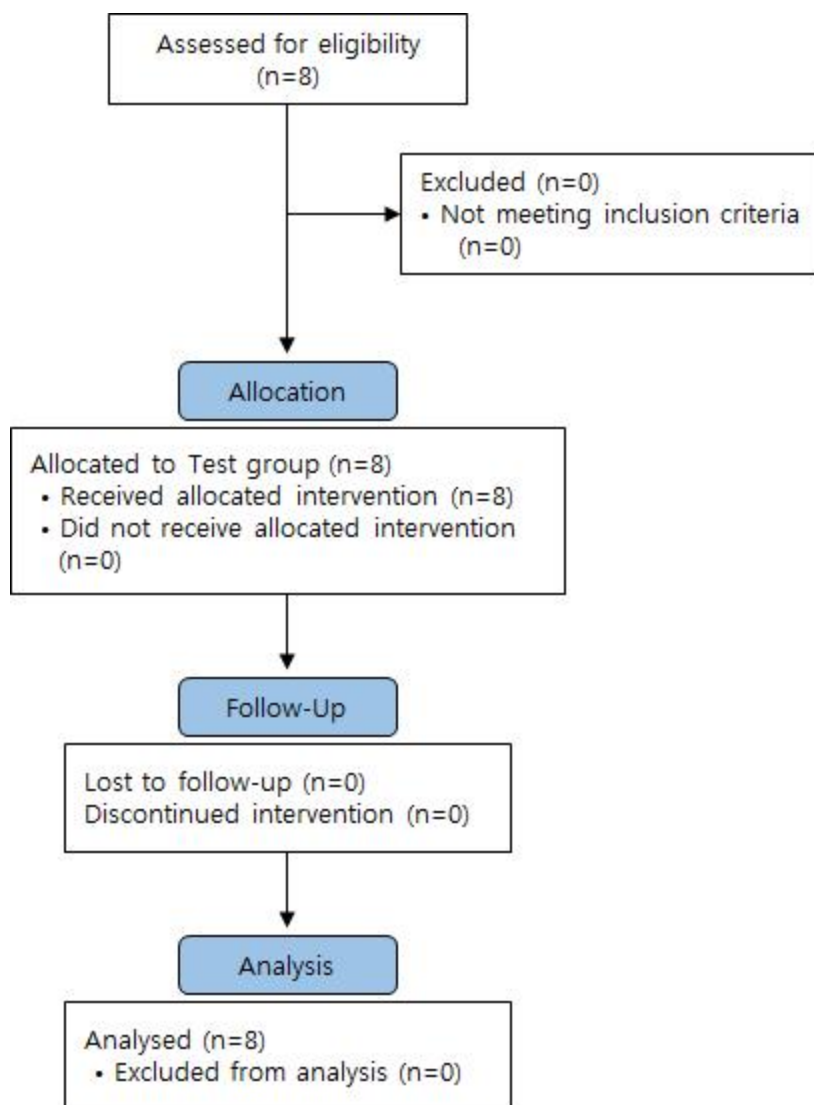


Figure 1. 피험자 참여 실태

8. 피험자의 인구학적 정보

본 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 복용한 피험자, 즉 Safety군 8명을 대상으로 인구학적 정보를 분석하였으며, 자세한 인구학적 정보를 table 1에 요약하였다.

스크리닝 당시 전체 피험자 8명의 평균 연령은 76.6±9.7세이고, 평균 신장은 158.3±9.7cm, 평균 체중은 61.1±8.2kg, 평균 체질량지수(BMI)는 24.3±1.5kg/m²로 모두 비음주자, 비흡연자였다. 스크리닝 당시 전체 피험자의 수축기혈압은 125.1±11.3 mmHg, 이완기혈압 73.0±12.4 mmHg, 맥박수는 분당 84.9±16.2회였다(table 1).

Table1. 인구학적 정보

		전체(n=8)
나이 (세)		76.6±9.7
성별(남/여)		3/5
신장 (cm)		158.3±9.7
체중 (kg)		61.1±8.2
BMI(kg/m ²)		24.3±1.5
	수축기혈압(mmHg)	125.1±11.3
활력징후	이완기혈압(mmHg)	73.0±12.4
	맥박수(회/분)	84.9±16.2

Values are presented as mean±SD.

9. 순응도

인체적용시험용제품의 투여상황에 대하여 매 방문마다 피험자가 지참하고 온 인체적용시험용제품의 잔여량을 반납 받고 순응도를 확인하였다. 평가방법은 아래와 같으며, 순응도가 70% 미만일 경우 탈락처리 하였다.

$$\text{섭취한 제품 수} = \text{처방한 총 제품 수} - \text{반납한 제품 수}$$

$$\text{섭취순응도}(\%) = \frac{\text{섭취한 제품 수}(C)}{\text{섭취해야 할 제품 수}(B)} \times 100$$

본 연구기간 중 처방한 제품 수는 14 캡슐이고, 모든 피험자가 인체적용시험기간(7일) 동안 처방한 제품을 모두 복용하여 제품 순응도(Compliance)는 100%이며, 순응도 미달로 탈락한 피험자는 없었다.

10. 유효성 평가

10.1. 유효성 평가 분석 결과

10.1.1. Metagenomic analysis.

Metagenomic analysis 분변에 존재하는 미생물의 분포를 NGS(차세대염기서열분석법)을 이용하여 세계김치연구소에서 확인하였다.

김치유산균복합제 섭취 7일 후, 섭취 전에 비해 장내에 존재하는 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Weissella의 비율이 증가하였으며, 인체에 장질환을 유발하는 유해균인 Clostridium, Salmonella의 비율이 감소한 것을 확인하였다(figure 2).

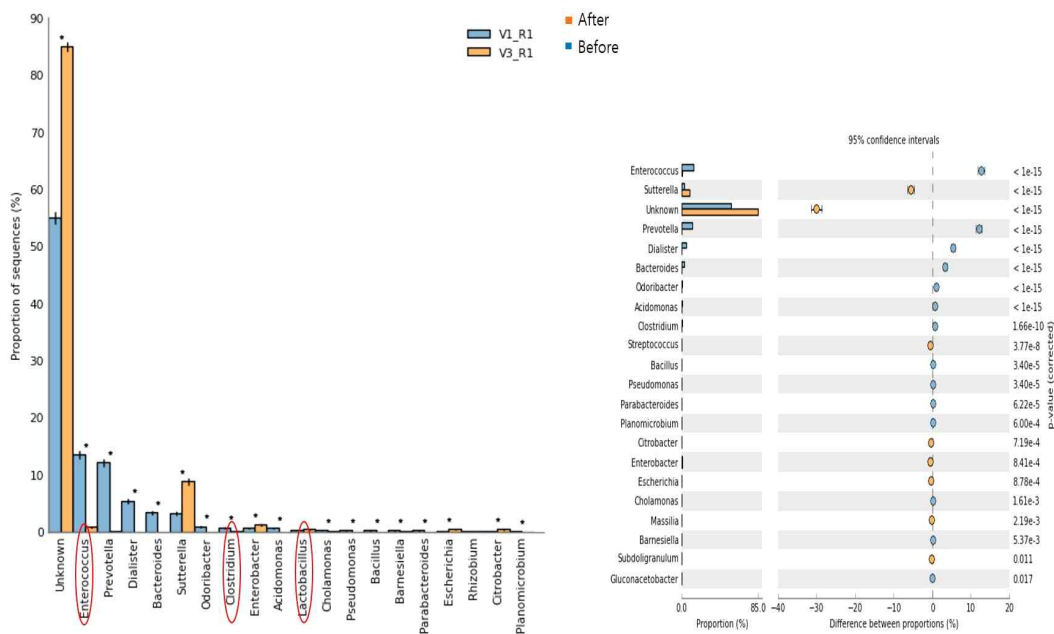


Figure 2. 장내 미생물 균총 변화

피험자의 분변을 통해 김치유산균복합제의 장내 생존 여부 확인 결과, 김치유산균복합제에 포함된 김치유산균이 확인되었으며 이는 피험자들이 섭취한 김치유산균이 장내에서 정착하여 분변에서 검출 된 것으로 생각된다(figure 3).

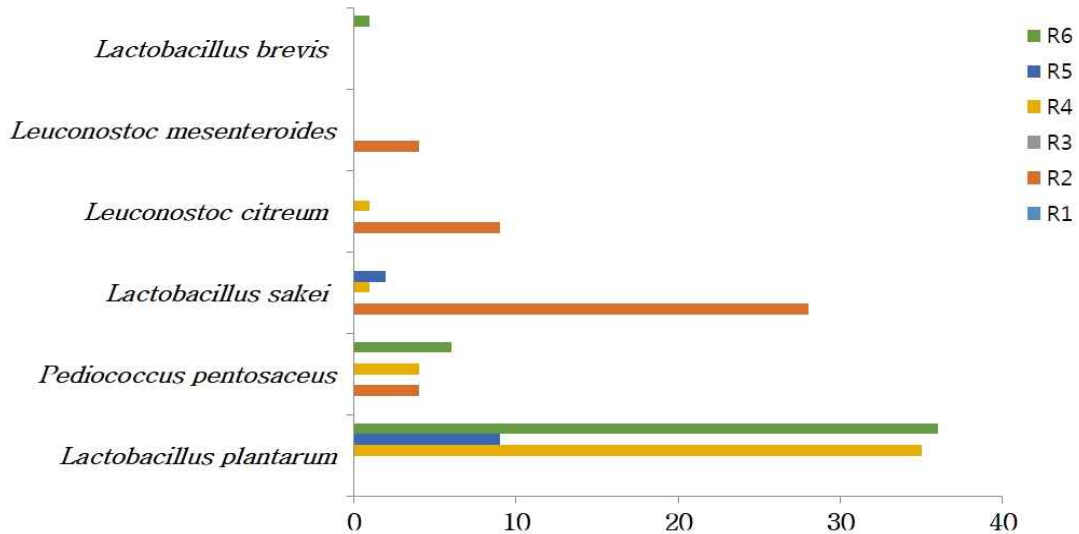


Figure 3. 김치유산균의 장내 생존 확인

10.1.2. 유효성 평가 결과: Stool toxin

Stool toxin은 환자의 분변을 사용하여 RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B EIA(Enzyme Immunoassay) test를 시행하고, 치료 유무를 평가하였다. 총 8명의 피험자 중 2명의 피험자가 3차 방문일에 분변 채취를 하지 못하여 분석에서 제외하였다.

섭취 전 · 섭취 7일 후 stool toxin 변화를 비교한 결과, 김치유산균복합제 섭취 전 양성에서, 섭취 7일 후 음성으로 변화한 피험자가 2명, 변화가 없는 피험자는 4명이었으며, 변화가 있는 피험자와 변화가 없는 피험자 빈도수 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$)(table 2-3).

Table 2. 시험제품 섭취 7일 후 Stool toxin 변화

	스크리닝 (Baseline, N=8)	3차 방문(N=6)		P - value ¹⁾
		음성	양성	
김치유산균복합제 (n=8)	음성 (N=5)	4	0	0.091
	양성(N=3)	2	0	

¹⁾ McNemar test

Table3. 피험자 별 시험제품 섭취 7일 후 Stool toxin 변화

	스크리닝	2차방문	P - value ¹⁾
	(섭취 전)	(섭취 7일 후)	
R01	음성	음성	0.091
R02	양성	음성	
R03	음성	음성	
R04	음성	음성	
R05	음성	음성	
R06	음성	-	
R07	양성	음성	
R08	양성	-	

¹⁾ McNemar test

10.1.3. 유효성 평가 결과: 항생제유발설사 치료에 대한 임상 양상 평가 결과

항생제유발설사 치료에 대한 임상 양상 평가는 섭취 후 7일까지 설사가 하루 2회 이하이거나, stool toxin assay 에서 음성 반응을 보인 경우를 치료 성공으로 평가하였다.

섭취 전 · 섭취 7일 후 항생제유발설사에 대한 임상양상 평가 결과, 8명 피험자 중 8명 전체 피험자의 설사횟수가 하루 2회 이하로 감소하였고, 2명의 피험자가 stool toxin assay 에서 김치유산균복합제 섭취 전 양성반응에서 섭취 7일 후 음성 반응으로 변화하여 모든 피험자에서 항생제유발설사의 치료 성공을 확인하였다.

10.1.4. 추가분석: 신체계측 지표

체중과 체질량지수로 이루어진 신체계측지표를 스크리닝 방문과 2차방문에 측정하였으며, 분석 결과를 Table14 에 요약하였다.

섭취 전 · 섭취 7일 후 신체계측지표 항목 중 통계적으로 유의한 변화가 있는 항목은 없었다($P>0.05$).

Table 14. 섭취 전 · 섭취 7일 후 신체계측 변화

	김치유산균복합제(n=8)		P-value ¹⁾
	스크리닝	2차방문	
	(섭취 전)	(섭취 7일 후)	
몸무게(Kg)	61.1±8.2	61.4±8.2	0.772
BMI(Kg/m ²)	24.3±1.5	24.4±0.9	0.816

Values are presented as mean ± SD

¹⁾ Analyzed by Paired t-test,

11. 안전성 평가

본 인체적용시험은 김치유산균복합제를 섭취하였을 때, 체내 변화를 살펴보는 것을 목적으로 하였다. 안전성 평가는 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 피험자 8명을 대상으로 분석하였다.

11.1. 자·타각 증상 등 이상반응

이상반응 발생률에 대한 결과를 Table15에 요약하였다.

본 연구기간 동안 전체 피험자 8명 중 7명에서 7건의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였다. 경도 또는 중등도 이상반응 내용은 허혈성 대장염 1건, 발열 2건, 복통 1건, 감기 1건, 혈당상승 1건, 혈변 1건이었다. 이상의 증상 및 징후는 CDI 질환 자연 경과 중에 나타날 수 있는 것으로써 시험용제품 섭취와 인과관계가 없는 것으로 판단하였다.

Table 15. 이상반응 발생 여부

전체 (n=8)	
이상반응 발생 N (%)	7(87.5%)

Values are presented as number (percentage).

11.2. 진단검사의학 검사

혈액학 검사와 혈액생화학 검사, 소변 검사로 이루어진 진단검사의학 검사를 스크리닝 방문과 2차방문에 실시하였으며, 분석 결과를 Table16 에 요약하였다.

진단검사의학 검사 항목 측정치에서 시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 7일 후 ALT, Total cholesterol, hs-CRP 항목이 통계적으로 유의하게 변화하였으나($P=0.013$, $P=0.031$, $P=0.031$), 참고치 범위 내에서 일어난 임상적 의미가 없는 변화라고 판단하였다. 그 외 다른 항목에서는 통계적으로 유의한 변화가 없었다($P>0.05$).

Table 16. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 7일 후 진단검사의학 검사 결과

항목	스크리닝 (섭취 전)	2차방문 (섭취 7일 후)	P-value
WBC (4.8~10.8×10 ³ /μL)	12.0±8.0	9.3±4.6	0.281
RBC (남: 4.7~6.1×10 ³ ,여: 4.2~5.4×10 ³ /μL)	3.6±0.7	3.7±0.7	0.472
Hemoglobin (남: 13~18, 여: 12~16g/dL)	11.2±2.0	11.4±2.0	0.508
Hematocrit (남: 42~52, 여: 37~47%)	33.0±6.1	34.0±5.9	0.363
Platelet (130~450×10 ³ /μL)	240.6±88.1	278.3±130.6	0.168
ESR(~20mm/hr)	21.4±17.1	28.3±16.0	0.429
Na (135~150 mmol/L)	138.5±6.8	134.8±3.8	0.563
K (3.5~5.5 mmol/L)	3.5±0.8	4.0±0.7	0.254
Cl (91~110 mmol/L)	106.6±12.2	100.9±4.5	0.254
ALP (45~129IU/L)	94.9±39.5	89.3±21.4	0.930
GGT (남: 12~73, 여: 8~48IU/L)	37.8±35.3	37.5±24.3	0.970
AST (12~33IU/L)	26.3±14.7	32.8±13.8	0.111
ALT (5~35IU/L)	15.4±8.5	22.3±6.5	0.013
Total bilirubin (0.2~1.2mg/dL)	0.8±0.6	0.7±0.2	0.226
Total protein (6.7~8.3g/dL)	5.6±0.7	6.1±0.8	0.051
Albumin (3.5~5.3g/dL)	3.1±0.5	3.3±0.6	0.108
BUN (8~23mg/dL)	22.1±24.1	19.8±21.7	0.491
Creatinine (0.7~1.7mg/dL)	2.0±4.0	1.8±3.2	>0.999
Total cholesterol (~200mg/dL)	96.6±39.9	126.9±44.4	0.031
Glucose (74~106mg/dL)	131.3±83.4	139.3±56.6	0.438
hs-CRP (50~200IU/L)	110.1±77.3	46.3±65.6	0.031
SG (1.005~1.030)	1.0±0.0	1.0±0.0	0.098
pH (4.5~9.0)	6.0±0.4	6.1±0.6	0.875

Values are presented as mean ± SD

¹⁾ Analyzed by Paired t-test or Wilcoxon signed-rank test

11.3. 활력징후

매 방문마다 피험자들의 활력징후(수축기혈압, 이완기혈압, 맥박수)를 측정하였으며, 분석 결과를 Table17 에 요약하였다.

김치유산균복합제 섭취에 따른 활력징후를 평가한 결과, 섭취 전에 비해 섭취 7일 후 임상적으로 이상 소견을 보이는 수치는 없었다($P>0.05$)

Table 17. 방문 별 활력징후 측정 결과

	김치유산균복합제 (n=8)		P-value ¹⁾
	1차방문 (섭취 전)	2차방문 (섭취 7일 후)	
수축기혈압(mmHg)	123.1±11.4	113.1±8.6	0.085
이완기혈압(mmHg)	72.1±12.4	77.1±16.1	0.494
맥박수(회/분)	81.9±14.7	83.9±21.1	0.773

Values are presented as mean ± SD

¹⁾ Analyzed by Paired t-test or Wilcoxon signed-rank test

12. 결론 및 고찰

본 인체적용시험은 CDI 환자에서 CDI에 대한 의학적 표준치료에 병행한 김치유산균복합제 섭취가 장내미생물변화 및 항생제유발설사 치료에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 8일간 공개, 단일군 연구이다.

본 인체적용시험은 총 8명의 자원자가 서면동의를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 피험자 적합성 평가를 통해 총 8명이 적격 피험자로 선정되었다. 선정된 피험자는 8일간 본 인체적용시험에 참여하였으며, 중도탈락자가 없이 총 8명의 피험자가 시험계획서(프로토콜)에 명시한 바에 따라 정상적으로 인체적용시험을 종료하였다.

시험자는 모든 피험자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, CDI에 대한 의학적 표준치료(Vancomycin 1회 250 mg, 1일 1,000 mg 복용)를 병행하면서 김치유산균복합제 섭취 전과 섭취 7일 후 김치유산균 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화, stool toxin, 항생제유발설사 증상에 대한 임상양상 평가 등의 유효성 평가 및 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다.

김치유산균 장내 생존 및 장내미생물 균총 변화를 분석한 결과, 김치유산균복합제 섭취 7일 후, 섭취 전에 비해 장내에 존재하는 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc 및 Weissella 종의 비율이 증가하였으며, 인체에 장질환을 유발하는 유해균인 Clostridium과 Salmonella 종의 비율이 감소하였다.

피험자의 분변을 통해 김치유산균복합제의 장내 생존 여부 확인 결과, 시험용제품인 김치유산균복합제에 포함된 김치유산균의 존재가 확인되었다. 김치유산균복합제를 통해 섭취한 김치유산균이 장내에서 정착하여 분변에서 검출된 것으로 판단하였다.

Stool toxin 변화를 비교한 결과, 김치유산균복합제 섭취 전 stool toxin 양성인 피험자 (N=3) 중 섭취 7일 후 음성으로 변화한 피험자가 2명, 섭취 전 stool toxin 음성 (N=4), 섭취 7일 후에도 음성으로 결과에 변화가 없는 피험자는 4명이었다. 변화가 있는 피험자와 변화가 없는 피험자 빈도수 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었지만($P>0.05$), stool toxin 양성인 피험자(N=3) 중 섭취 7일 후 대변 채취 및 stool toxin assay 가 가능했던 2명의 피험자 모두 섭취 전 stool toxin 양성에서 섭취 후 stool toxin 음성으로 변화하였다.

항생제유발설사에 대한 임상양상 평가 결과, 8명 피험자 중 모든 피험자의 설사횟수가 하루 2회 이하로 감소하였고, 김치유산균복합제 섭취 전 stool toxin assay 에서 양성반응에서 보였던 2명의 피험자는 섭취 7일 후 음성 반응으로 변화하여 모든 피험자에서 항생제유발설사 치료 성공을 확인하였다.

안전성 평가를 위해 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 피험자 8명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨 검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 8명의 피험자 중 7명의 피험자에서 총 7건의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였으며, 인체적용시험용제품 섭취와 인과관계가 없다고 판단하였다. 진단검사의학 검사 및 활력징후에서도 통계적으로, 그리고 임상적으로 의미 있는 변화가 없었다($P>0.05$).

요약하면, 본 인체적용시험을 통해 항생제유발설사 (Clostridium difficile infection, CDI) 를 가진 피험자가 CDI 에 대한 의학적 표준치료에 병행하여 김치유산균복합제를 섭취할 때 모든 피험자가 CDI 치료에 성공하였고, 섭취한 김치유산균이 장내 생존하며, 인체에 유익한 Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc 및 Weissella 종의 비율이 증가하고, 유해균인 Clostridium과 Salmonella 종의 비율이 감소함을 확인하였다. 따라서 김치유산균복합제 섭취가 인체에 안전하면서 의학적 치료 목적에 의한 항생제 사용에서 나타날 수 있는 장내 균총 불균형을 예방하거나 개선할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

V. 참고문헌

-제 1세부과제-

(2001) FAO/WHO, Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

Backhed F, Ding H, Wang T, et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15718-15723.

Bernstein CN & Shanahan F (2008) Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 57: 1185-1191.

Campoli-Richards DM, Monk JP, Price A, Benfield P, Todd PA & Ward A (1988) Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 35: 373-447.

CH K (2004) Food microbiology Yu Han Publisher, Seoul, Korea. p 60-61.61.

Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methe BA, Zavadil J, Li K, Gao Z, Mahana D, Raju K, Teitler I, Li H, Alekseyenko AV, Blaser MJ (2012) Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 488: 621-626

Chow L & Weimer B (1999) Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolated from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 82: 23-31.

Crogan NL & Evans BC (2007) *Clostridium difficile*: an emerging epidemic in nursing homes. *Geriatr Nurs* 28: 161-164.

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML & Relman DA (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 6: e280.

Drusano GL, Standiford HC, Plaisance K, Forrest A, Leslie J & Caldwell J (1986) Absolute oral bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 30:

444-446.

Ghuysen IJ-M & Hackenbeck R (1994) Bacterial cell wall. Elsevier Science B.V., Amsterdam. Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit, p39-55. Van Heijenoort J.

Gill HS (2003) Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 755-773.

Gye MC, Park CJ, Park YA & Ok SS (2014) Effects of Azole Fungicide on Amphibian: Review. *Korean J. Environ. Biol.* 1 -15.

Hawrelak JA & Myers SP (2004) The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 9: 180-197.

Heckly RJ (1978) Preservation of microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 24: 1-53.

Hoffken G, Lode H, Prinzing C, Borner K & Koeppe P (1985) Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and parenteral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 375-379.

Hong Y, Yang HS, Chang HC, Kim HY (2013) Comparison of bacterial community changes in fermenting kimchi at two different temperatures using a denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of microbiology and biotechnology* 23: 76-84

Jacobs NF, Jr. (1994) Antibiotic-induced diarrhea and pseudomembranous colitis. *Postgrad Med* 95: 111-114, 117-120.

Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO (2011) Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and environmental microbiology* 77: 2264-2274

Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI & Krakoff J (2011) Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 94: 58-65.

Kim MS, Hwang SS, Park EJ & Bae JW (2013) Strict vegetarian diet improves the risk

factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environ Microbiol Rep* 5: 765–775.

Koestner JA (1989) Ciprofloxacin: a new fluoroquinolone. *Am J Med Sci* 297: 128–131.

Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ŋgando T, Dore J & Leclerc M (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 57: 424–425.

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD & Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11070–11075.

Li W, Fu L, Niu B, Wu S & Wooley J (2012) Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief Bioinform* 13: 656–668.

McCormick MH, McGuire JM, Pittenger GE, Pittenger RC & Stark WM (1955) Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiot Annu* 3: 606–611.

McFarland LV (1998) Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis* 16: 292–307.

Morich T (1973) Lactic acid bacteria in animal industry. *Japanese J. Wootech. Sci.* 44(11), 535–553.

Nam YD, Chang HW, Kim KH, Roh SW, Bae JW (2009) Metatranscriptome analysis of lactic acid bacteria during kimchi fermentation with genome-probing microarrays. *International journal of food microbiology* 130: 140–146

Needleman SB & Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 48: 443–453.

Park EJ, Chang HW, Kim KH, Nam YD, Roh SW, Bae JW (2009) Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast

populations in kimchi. *Journal of microbiology* 47: 682–685

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590–596.

Reynolds PE (1989) Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 943–950.

S. S (2009) Antiviral agents. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. *Basic and clinical pharmacology*. 11th ed. New York: McGraw-Hill. pp. 845–875.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537–7541.

Sehulster L & Chinn RY (2003) Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 52: 1–42.

Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 379–423 and 623–656.

Sheehan DJ, Hitchcock CA & Sibley CM (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 40–79.

Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.

Sobel JD (2007) Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369: 1961–1971.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P & Colombel JF (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53: 1–4.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER & Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027–1031.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, et al. (2009) A core gut microbiome in

obese and lean twins. Nature 457: 480-484.

WK J (2010) A study on the strain identification and culture optimization for onion fermentation. MS Thesis. KonKuk University, Seoul, Korea.

-제 2 세부과제-

Ahn JE, Kim JK, Lee HF, Eom HJ & Han NS (2012) Isolation and Characterization of a Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* B16 from Kimchi. J. Korean soc Food sci Nutr 41: 721-726.

Kim OM, Kim MK, Lee KR & Kim SD (1998) Selective Antimicrobial Effects of Spice Extracts Against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Kimchi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biothchnol. 26: 373-378.

Kim SY, Kim JD, Son JS, Lee SK, Park KJ & Park MS (2011) Biochemical and Molecular Identification of Antibacterial Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 446-452.

Korea Food and Drug Administration (2012) Health Functional Food Code. Chungcheongbuk-do. 55-56.

Lee J, Hwang KT, Heo MS, Lee JH & Park KY (2005) Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from Kimchi to oxidative stress. J Med Food 8: 299-304.

Lee KS, Shin YS & Lee CH (1998) Acid Tolerance of *Lactobacillus brevis* Isolated from Kimchi. J. Food sci, Technol 30: 1399-1403.

Otgonbayar GE, Eom HJ, Kim BS, Ko JH & Han NS (2011) Mannitol production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P isolated from Kimchi. J Microbiol Biotechnol 21: 968-971.

Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Lee YG, Jeong YK & Joo WH (2012) Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* BCNU 9070. Journal of life Science 22: 1194-1200.

Shin MS, Han SK, Ryu JS, Kim KS & Lee WK (2008) Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated

from Kimchi. J Appl Microbiol 105: 331-339.

Y. T. Ahn, Lim KS, Baek YJ, Lim JH & Kim HU (2004) Deconjugation of Bile Salts by *Lactobacillus acidophilus*. J. Korean Dairy Technol. Sci. 22: 13-15.

Yakabe T, Shimohata T & Takahashi A (2013) *Lactobacillus brevis* KB290 enhances IL-8 secretion by *Vibrio parahaemolyticus*-infected Caco-2 cells. J Microbiol Biotechnol 23: 118-124.

yang EJ & Chang HC (2008) Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Kimchi. Kor. J. Microbiol. Biothchnol 36: 376-284.

Yu JJ & Oh SH (2011) γ -Aminobutyric Acid Production and Glutamate Decarboxylase Activity of *Lactobacillus sakei* OPK2-59 Isolated from Kimchi. The Korean Journal of Microbiology. The Korean Journal of Microbiology 47: 316-322

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

(1) 학술대회 발표 2건

2014. 한국미생물 생명공학회 포스터 및 구두발표

(2) 특허

출원번호: 10-2014-0086872, 락토바실러스플란타룸 W I K I M 1 8 및 이를 포함하는 조성물

(3) 논문

Jang JY, Lim HI, Park HW, Choi H-J, Kim T-W, Kang M, Lee J-H. 2014. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* wikim18, isolated from Korean kimchi. Genome Announc. 2(3):e00467-14. doi:10.1128/genomeA.00467-14.

2. 성과활용 계획

본 연구를 통하여 김치미생물이 항생제에 의하여 불균형화된 장내균총의 개선 효과가 있다는 것을 동물 실험을 통하여 확인하였으며, 위막성 대장염 (CDAD) 환자에 있어서도 장내에 정착한다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 기존의 유산균제제이외에 환자를 대상으로 하는 제품 개발 가능성을 보이고 있으며 기술 이전을 통하여 고부가 제품 개발이 가능할 것이다.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 한식세계화 용역연구사업 (김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 한식 세계화 용역연구사업(김치섭취에 의한 장내 유산균이 항생제 투여환자의 장내 미생물증식 안정화에 미치는 영향 연구)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.