

최 종 보 고 서

<p>기능성 전통발효식품 유래 발효 미생물 유전체 정보 활용 연구 인체 대사성 질환 예방 관련 식품소재 생산 균주 개발</p> <p>농림축산식품부</p>	<table border="1" data-bbox="614 492 877 577"><tr><td data-bbox="614 492 877 542">발간등록번호</td></tr><tr><td data-bbox="614 542 877 577">11-1543000-001031-01</td></tr></table> <p data-bbox="635 734 1380 974">기능성 전통발효식품 유래 발효 미생물 유전체정보를 활용한 인체 대사성 질환예방관련 식품소재 생산균주 개발</p> <p data-bbox="625 987 1396 1265">(Development of functional food material-producing strain using comparative genomic information of fermenting bacteria from functional traditional fermented foods)</p> <p data-bbox="895 1393 1118 1440">경희대학교</p> <p data-bbox="780 1693 1230 1742">농림축산식품부</p>	발간등록번호	11-1543000-001031-01
발간등록번호			
11-1543000-001031-01			

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 전통발효식품유래 발효미생물 유전체정보를 활용한 인체 대사성 질환예방관련 식품소재생산균주 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 11 월 16 일

주관연구기관명 : 경희대학교

주관연구책임자 : 이 주 훈

세부연구책임자 : 이 주 훈

연 구 원 : 안 민 주

연 구 원 : 이 세 희

연 구 원 : 육 경 진

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 전 체 옥

연 구 원 : 정 지 영

연 구 원 : 이 세 희

연 구 원 : 정 우 용

협동연구기관명 : (주) 천랩

협동연구책임자 : 전 윤 성

연 구 원 : 정 윤 영

연 구 원 : 김 대 성

연 구 원 : 박 주 영

연 구 원 : 윤 병 옥

# 요 약 문

## I. 제 목

- 기능성 전통발효식품유래 발효미생물 유전체정보를 활용한 인체 대사성 질환예방관련 식품 소재생산균주 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표		1				3	2	0	
	달성		4				4	3	1	
2차 년도	목표		2				3	4	1	
	달성		2				3	2	0	
3차 년도	목표	1	3				4	4	1	
	달성	0	6				3	6	0	
계	목표	1	6				10	10	2	
	달성	0	12				10	11	1	

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구 개발의 목적

- 가. 전통발효식품유래 전체 발효균총 정보수집 및 비교분석을 통한 기능성 발효미생물의 종류 및 조성 규명
- 나. 전통발효식품유래 발효미생물들의 기존 유전체정보를 바탕으로 최신 생물정보학기술을 활용하여 기능성유전자를 발굴 및 DB 구축
- 다. 전체 분석정보 및 발굴된 기능성유전자 중 인체 대사성 질환을 예방할 수 있는 식품소재 생산균주를 개발
- 라. 인체 대사성 질환 예방용 기능성 식품소재생산균주의 발효 최적화 및 기능성 평가

### 2. 연구개발의 필요성

- 가. 현재의 전통발효식품의 기능성 연구는 최종발효생산물질 자체에 대한 기존의 알려진 기능성을 검증하는 수준에서 이루어지고 있으며 그 원인분석이나 자세한 작용기작은 아직 과학적으로 밝혀져 있지 않은 것이 대부분임
- 나. 또한 최종발효생산물질 중 기능성 물질 및 다양한 발효미생물들의 발효 중 미생물간의 상호작용에 따른 기능성과 실험실에서 분리되지 않는 대다수 미생물들의 기능성에 대한 이해가 절대적으로 부족한 실정임
- 다. 따라서 다양한 건강기능성을 가진 전통발효식품유래 발효미생물들의 유전체학적 수준에서의 게놈 연구를 진행하여 이러한 유전체정보를 바탕으로 그 기능성에 대한 과학적 접근

을 통한 기능성유전체정보의 국제적 선점 및 대사성 질환예방에 기여할 수 있는 식품신소재의 개발이 필요함

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 인체 대사성 질환예방에 효과가 있는 것으로 알려진 전통발효식품유래 전체발효균총의 정보수집 및 비교분석을 통한 기능성 발효균주의 종류 및 조성 규명
  - 가. 유전체데이터베이스로부터 전통발효식품유래 전체발효균총의 정보수집
  - 나. 생물정보학기술을 활용하여 전체발효균총의 비교분석을 통한 주요 발효균주의 종류 규명
2. 전통발효식품유래 기능성 발효미생물들의 기존 유전체정보 및 생물정보학기술을 활용한 기능성유전자정보의 획득과 이를 바탕으로 한 DB 구축
  - 가. 유전체데이터베이스를 통한 기존의 기능성 발효균주 전체 염기서열을 획득
  - 나. 생물정보학기술을 활용하여 미생물대사과정을 분석하고 이를 바탕으로 기능성 유전자정보를 획득
  - 다. 획득된 건강기능성 유전자 및 대사성 질환예방관련 유전자정보를 바탕으로 DB 구축
3. 선별된 기능성 유전자정보를 활용하여 대사성 질환예방관련 식품소재생산균주의 개발
  - 가. 기능성 유전자정보를 활용하여 기존 발효미생물의 기능성 유전자 보유 검증 및 선발
  - 나. 선발된 발효미생물로부터 기존물질에 비하여 역가가 좋은 대사성 질환예방관련 식품소재의 생산 검증
  - 다. 기능성 관련 대사과정의 비교분석을 통한 식품소재의 생산과정에 관련된 대사과정 규명
4. 개발된 인체 대사성 질환예방용 기능성 식품소재생산균주의 발효 최적화 및 기능성 평가
  - 가. 선발된 발효미생물유래 혈전용해능 및 정장작용 등의 효과 검증을 위한 혈전용해능 평가 및 장내유해균저해를 통한 정장작용 평가 등을 통하여 기능성 평가
  - 나. 분석된 대사과정을 극대화할 수 있는 배양조건의 최적화 및 이를 통한 인체 대사성 질환관련 식품소재의 생산최적화
  - 다. 인체대사성 질환관련 식품소재생산균주를 활용 및 적용하여 전통발효식품의 기능성 증대 및 개선

#### V. 연구개발결과

##### 1. 제 1 세부과제

가. 인체 대사성 질환예방관련 전통발효식품의 균총 정보 분석

- (1) 전통방식으로 제조 및 발효된 전통발효식품 8종(메주, 포기김치, 묵은지, 백김치, 깍두기, 새우젓, 멸치젓 및 조개젓)을 수집었음
- (2) 수집된 샘플로부터 미생물학적 배양방법을 활용하여 총 1,589개의 균주를 분리 및 확보하였음

- (3) AP-PCR 및 DGGE 방법을 통하여 분석된 8가지 전통발효식품 내 발효균총을 비교한 결과 모든 전통발효식품으로부터 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Staphylococcus*가 우점종으로 관찰되었음

#### 나. 기능성 균주의 선별 및 기능성 유전자의 분자생물학적 탐색

- (1) 분리된 발효미생물들을 대상으로 박테리옌 생산능 평가를 실시한 결과 전체 1,589 발효균주 중 13개의 균주가 nisin 보다 뛰어난 미생물억제활성을 보였음
- (2) 선별된 균주들은 16S rRNA sequencing 방법으로 동정하였으며, 7종의 발효균주가 *B. subtilis*로 동정되었고 그 외에 *B. licheniformis*, *L. plantarum* 및 *B. bifidum* 으로 동정되었음
- (3) 혈전용해능 기능성 평가를 통하여 전체 1,589 발효균주 중 혈전용해능이 강한 균주 15종을 선별하였음
- (4) 16S rRNA sequencing 방법으로 동정한 결과 대부분 *Staphylococcus*였으며 그 외에 *B. subtilis*, *L. mesenteroides*, *P. acnes* 등으로 동정되었음

#### 다. 축적된 기능성 유전체정보를 활용한 인체 대사성 질환관련 기능성 식품소재생산균주의 개발

- (1) PCR 방법을 활용하여 선별된 균주 중 *B. subtilis* ZA400의 혈전용해능 유전자를 증폭한 뒤 대장균 발현시스템으로의 클로닝을 실시하였음
- (2) 대장균 발현시스템을 이용한 대량발현 후, stadard fibrin plate method를 통해 높은 혈전용해능을 확인하였음
- (3) 이 혈전용해 효소(BsfA)는 SDS-PAGE/Western blotting을 이용하여 28.7kDa 크기를 가진 효소임을 밝힘
- (4) 분리정제된 혈전 용해 효소는 온도(4~40°C), pH(6~10), Metal ion( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) 및 inhibitor(EDTA, SDS)에서 안정하였음
- (4) 또한 콩가루, 메주가루 배지에서는 20%의 높은 염농도까지 안정한 혈전용해능 활성이 나타남에 따라 비교적 염도가 높은 전통발효식품 내에서도 기능성을 유지할 수 있을 것으로 기대됨

#### 라. 인체 대사성 질환예방관련 식품소재생산균주를 활용한 전통발효식품 시제품 제조

- (1) 높은 혈전용해능을 가지는 기능성 미생물 *B. subtilis* ZA400, *Bifidobacterium bifidum* ZB193을 첨가하여 Lab-scale 수준에서 된장과 청국장을 제조하여 혈전용해 기능성을 확인하였음
- (2) 이후 한식장류 전문업체를 통해 찜장과 청국장을 Scale-up하여 시제품을 제작하였으며, 각각의 제품에서 비교적 안정적으로 유지되는 혈전용해 기능성을 확인하였음

## 2. 제 1 협동과제

가. 유전체 데이터베이스로부터 대사성 질환 예방효과 등 건강기능성이 있는 것으로 알려진 기존 전통발효미생물의 전체 염기서열을 확보함.

- 나. 전통발효식품으로부터 분리한 발효미생물의 Aflatoxin 생산 곰팡이(*A. flavus*)생장 억제능, proteinase, chitinase 및 hemolysis 활성의 역가분석을 통한 기능성 연구 수행 및 건강기능성 유전자 후보군의 선별을 수행함.
- 다. 전통 발효식품(된장, 젓갈)의 시기별 군집변화를 대용량 유전체 분석 기술 (pyrosequencing)을 이용하여 조사함으로써, 발효기간 중 주요하게 작용하는 유용 기능성 미생물 선정에 이용함.
- 라. 또한, 발효과정 중 대사체 분석을 통해 된장과 젓갈에 존재하는 인체 대사성 질환 예방 기능성 대사체의 규명을 진행함.
- 마. 상기 연구를 통해 선정한 젓갈류 우점종인 *Salimicrobium jeotgali* MJ3의 균주특성 및 유전체 분석을 통한 우수 기능성 유전자 발굴과 실제 발현 검증, 발현이 검증된 기능성 유전자들의 대사체 분석을 통한 인체 대사성 질환 예방 식품소재 생산 가능성을 검증함.
- 바. 된장으로부터 분리된 다수의 *Bacillus*의 기능성 평가를 통해 된장의 빠른 발효 유도과 병원성 세균, 진균의 억제 및 혈전을 분해할 수 있는 *Bacillus methylotrophicus* JJ-D34를 확보함.
- 사. 된장으로부터 분리된 *Bacillus methylotrophicus* JJ-D34의 유전체 분석을 통한 된장 내 고염환경 적응 및 인체대사성 질환예방 기능성 대사체 생성 기작 관련 유전자 정보를 확보함.
- 아. 신규 미생물 자원 확보 및 인체대사성 질환예방 기능성 균주 탐색을 위한 다수의 미생물 종을 분리하여 학계에 보고함.

### 3. 제 2 협동과제

- 가. 생물정보학 기술을 활용한 전통 발효식품 유래 기존 발효 미생물 유전체의 재해석
  - (1) 발효미생물 균주의 전유전체 데이터 재해석과 데이터베이스 구축을 위해 대상 발효미생물들을 주관기관의 연구 결과를 통해 결정함
  - (2) 주관연구기관의 1차년도 연구수행을 통해 Bacteriocin, Fibrinolysis의 기능성이 확인된 균주들의 taxonomic 정보를 획득
  - (3) 위 균주들 중 현재까지 NCBI (National Center of Biotechnology Information)의 database에 공개가 되어 있는 균주들을 다운받아 확보함
- 나. 재해석된 기존 발효미생물 유전체 정보를 바탕으로 한 발효미생물간의 비교유전체 분석
  - (1) Public 데이터베이스로부터 확보한 균주들의 분석을 위해 Average Nucleotide Identity (ANI) value를 이용한 genome tree를 그려 그들의 유사성 정도를 확인하였음
  - (2) genome tree를 그린 후 이들의 CDS들의 homology를 서로 비교한 후 이를 이용하여

전유전체의 차이점을 쉽게 볼 수 있는 Circos map을 그려 이들을 비교하였음

- (3) 비교 유전체 분석을 통해 분석한 각 균주들의 CDS 차이점을 유전체 비교 테이블로 만들어 이들을 차후 비교유전체 데이터로 쉽게 활용할 수 있도록 저장한 뒤 형식을 바꾸었음

#### 다. 비교유전체 분석 대상 균주들의 유전체 정보 DB 구축

- (1) 1차년도 연구 결과로 주관연구기관에서 관찰한 기능성 발효미생물들 균주들의 이미 알려진 전 유전체 결과를 확보하여 이들의 전유전체 분석 결과와 비교유전체를 분석한 결과를 모두 모아 SQL 데이터베이스 표 형태로 구축하여 앞으로 구축할 데이터베이스를 위한 작업을 진행함

#### 라. 발효미생물유래 확보된 기능성 유전자의 특성 및 대사분석을 위한 전사체/대사체 분석 결과의 DB 구축

- (1) 전유전체 데이터베이스 구축을 위해 식품별 동정된 균주들의 정보를 1 협동기관의 결과로부터 획득함
- (2) 동정 균주들 중 현재까지 NCBI (National Center of Biotechnology Information)의 database에 공개가 되어 있는 균주들을 다운 받아 확보하고 DB화함
- (3) NCBI로부터 확보한 균주들의 전유전체를 향상된 생물정보학적 기법을 이용하여 재분석하여 CLG file 형태로 데이터 추가 분석 가능 하도록 구축함

#### 마. DB화 된 분석 결과와 기존의 전사체/대사체 비교분석 및 그 결과의 DB화

- (1) 전사체/대사체 데이터베이스 구축을 위해 1협동기관으로부터 발효미생물 유래 데이터를 확보하였음
- (2) 전사체/대사체의 데이터베이스화를 위해 SQL table을 구축하였음

#### 바. 전통발효식품내 식품별 주요 발효 미생물 종류 및 구성을 파악하기 위한 기존 메타지노믹스 결과를 바탕으로 비교 분석

- (1) NCBI 에 공개되어 있는 전통 발효식품 관련 총 5개의 연구 문헌에 사용된 143개의 메타지노믹의 시퀀싱 데이터 확보
- (2) 확보된 전통 발효식품의 메타지노믹 시퀀싱 데이터를 분석하여 메타지노믹에 존재하는 미생물 군집 정보 획득
- (3) 데이터베이스에 통합 및 시각화 위해 미생물 군집 정보를 규격화

#### 사. 각 식품별 메타지노믹 데이터를 비교하여 주요 미생물 종류와 구성에 대한 데이터 축적 및 메타지노믹 DB 구축

- (1) 메타지노믹 데이터베이스를 구축하기 위해 제 1 협동 기관으로부터 멸치젓 52 샘플의 메타지노믹의 군집 분석 결과를 획득
- (2) NCBI 공개된 전통식품에 존재하는 메타지노믹의 구성 정보를 제 1 협동기관의 데이터와 함께 관계형 데이터베이스에 통합

아. 전통 발효식품 유래 기능성 식품 소재 생산 균주의 대사체/유전체 정보의 통합 및 DB 구축

- (1) NCBI SRA에 공개된 발효미생물 전사체의 NGS 시퀀싱 데이터 확보
- (2) 기능성 발효 미생물의 유전체, 전사체 및 발효 식품의 메타지놈 데이터를 얻을 수 있는 통합 데이터베이스를 구축
- (3) 통합된 데이터베이스를 기반으로 jQuery + JAVA/JSP+ dHTMLx+ MySQL 기반의 연구자용 홈페이지를 구축 (<http://www.korfermfood.com>)
- (4) 전통 발효 식품별, 발효 미생물별, 데이터베이스 및 연구 성과 및 관련 논문 등을 찾을 수 있는 페이지 구성 및 전통 발효식품에 관련된 유전체, 전사체 및 메타지놈의 연구 결과를 시각화 하고 다운로드 받을 수 있는 메뉴 구성
- (5) Biomarker 발굴 프로그램인 LefSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size)를 이용하여 두 종류의 서로 다른 전통 발효 식품의 메타지놈 구성을 비교 할 수 있는 기능을 구현하여 시각화한 결과를 제공

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구 성과

- 가. 논문 게재 12편 (SCI급 11편, 비 SCI급 1편)
- 나. 학술 발표 8건 (국외 1건, 국내 7건)
- 다. 유전자원 등록 10건 및 품종 등록 12건 (국외 6건, 국내 6건)
- 라. 홍보 실적 2건 및 수상 실적 2건
- 마. 시제품 생산 1건 및 DB 구축 1건

### 2. 성과활용 계획

가. 기술적 효과

- (1) 본 연구과제에서 활용되는 다양한 전통발효식품의 전체 균총 분석정보는 전통식품의 기능성 및 안전성에 대한 과학적 근거를 제시할 것임
- (2) 또한 다양한 전통발효식품에 존재하는 기능성 대사체에 대한 분석은 전통식품의 안전성뿐만 아니라 건강 기능성을 입증하는 토대가 될 것으로 생각됨
- (3) 또한 유전체학 및 생물정보학을 통한 중요발효미생물의 중요 기능성 유전자의 예측 및 발굴기술은 향후 국내 생물산업에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 기대됨
- (4) 그리고 본 연구과제에서 활용되는 유전체학 및 생물정보학적 기술은 향후 선진국과의 유전체연구 기술격차 및 관련 연구전문가의 양성에 기여할 것임.

나. 경제적 효과

- (1) 메타지놈믹스연구를 통한 전통발효식품의 전체발효미생물조성분석은 전통식품의 기능성



규명 및 안전성에 대한 과학적 정보를 제공하여 국제표준화에 이바지할 것이며 이는 전통 발효식품의 수출증대에도 이바지 할 것임

- (2) 전통발효식품유래 대사성 질환예방관련 우수발효미생물의 기능유전자의 DB구축은 다양한 기존 기능성 발효식품의 개선 및 새로운 기능성 발효식품의 개발을 가능케 할 것이며 이는 새로운 식품산업의 매출증대로 이어질 것으로 기대됨
- (3) 본 연구를 통하여 선발되는 기능성 유전자들의 정보는 미생물공학 및 유전체학적 방법을 통하여 대사성 질환예방 식품소재 및 치료보조제로서의 활용도가 높으므로 새로운 개념의 질환예방용 기능성 식품 개발 및 식품산업의 기술수준의 향상 및 매출증대가 예상됨.

#### 다. 국가 및 산업경쟁력 파급효과

- (1) 본 과제를 통하여 개발되는 인체 대사성 질환예방용 식품신소재의 전통발효식품으로의 적용은 기존 전통발효식품의 특정적 기능성을 크게 향상시켜서 차별화를 가져올 것으로 생각되며 전통발효식품의 우수성을 홍보하여 단순히 먹는 식품의 개념보다는 건강기능성 식품으로의 인식 변화를 가져올 것으로 예상됨
- (2) 또한, 기존의 우리나라 전통발효식품은 대부분 자연발효식품으로서 발효조절이 어렵거나 품질이 균일하지 않는 등 여러 가지 문제점이 있으므로, 고기능성의 소수 또는 단일 미생물자원을 미생물스타터로 사용함으로써 고품질의 전통발효식품의 생산이 가능할 것으로 예상됨
- (3) 그리고 본 과제를 통하여 국가적인 전통발효식품별 미생물 자원, 유전자원 및 생리활성물질에 대한 데이터베이스를 구축하고, 고기능성 바이오소재를 발굴할 수 있으며, 이러한 결과를 활용하여 전통식품별별 기능성 향상을 위한 최적 제조방법과 표준화기술을 김치, 장류, 전통술 등 해당 전통식품업체에 기술 이전하여 산업화가 가능하리라 예상됨.

## SUMMARY

### (영문요약문)

This study aims at the development of functional food material-producing strain using omics information of fermenting bacteria from Korean traditionally fermented foods for alleviation of human metabolic syndrome. To conduct this study, eight Korean traditionally fermented foods were collected and about 1,589 fermenting bacteria were isolated from them. AP-PCR/DGGE/16S rRNA sequencing were used for composition analysis of microbiota in the fermented foods. In addition, antibacterial and fibrinolytic activities were monitored in the isolated fermenting bacteria, showing that about 20% fermenting bacteria have these activities. Among them, *B. subtilis* ZA400 showed the highest fibrinolytic activity and this strain was selected for further molecular gene expression of a fibrinolytic enzyme (BsfA) and applied for development of a new type fermented food with high fibrinolytic activity. Furthermore, changes of fermenting microbiota in Korean traditionally fermented foods (jeotgal and meju/doenjang) during fermentation were monitored using metagenomics and metabolomics. Functional analysis of fermenting bacteria in jeotgal showed high growth inhibition activity against *A. flavus* producing aflatoxin. Among major fermenting bacteria in jeotgal and doenjang, *S. jeotgali* MJ3 and *B. methylotrophicus* YJ11-1-4 were studied to understand human metabolic syndrome-associated functions in omics level. From these studies, omics data were collected and the related database was constructed. For comparative analysis, fermenting bacteria and various microbiota information were collected and deposited into the DB. Based on the collected information of this study and previously reported omics information in the DB, comparative genomics and metagenomics were conducted and the results were also deposited into the DB. Finally, all the analyzed data are present in the DB and available to the public. The study results and the related DB would be useful for further application and development of various functional fermented foods.

## CONTENTS

Chapter I. Overview of research projects .....	12
Chapter II. Current research activities in domestic or foreign countries ....	17
Chapter III. Research activities and results .....	19
Chapter IV. Achievements and contribution to related area .....	155
Chapter V. Research outcomes and applications .....	159
Chapter VI. Foreign scientific informations collected during the study .....	165
Chapter VII. Current status of research facilities and equipments .....	165
Chapter VIII. Implementation of laboratory safety management .....	166
Chapter IX. References .....	168
<Appendix> Patent, paper and market analysis .....	171

## 목 차

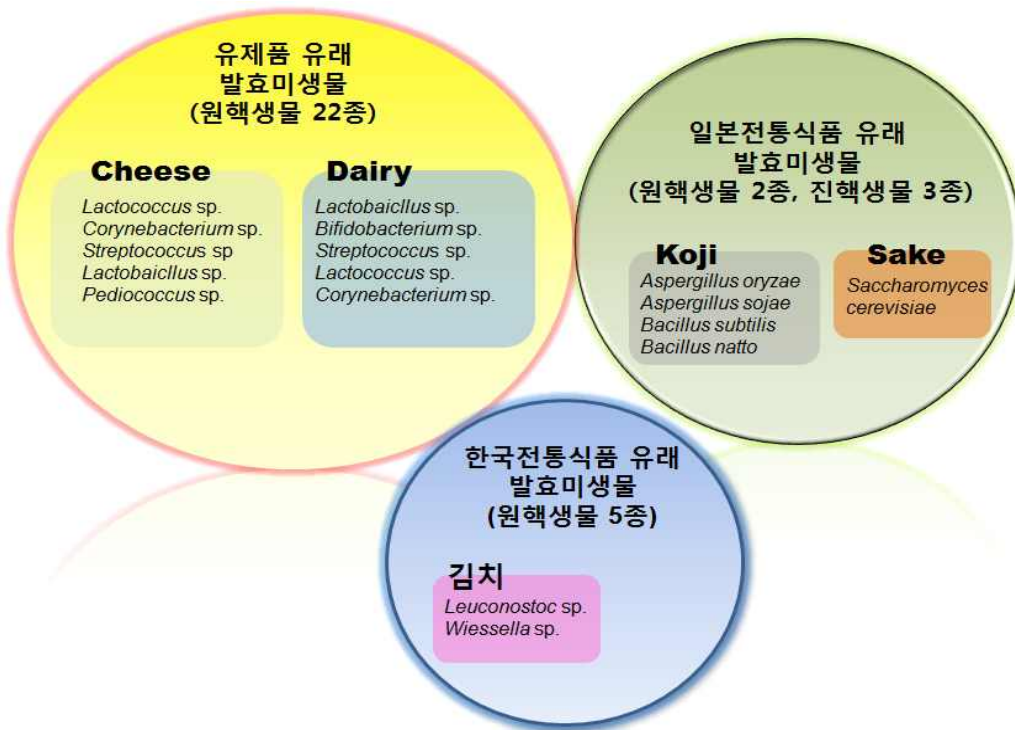
제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표 .....	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	19
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	155
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	159
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	165
제 7 장	연구시설·장비 현황 .....	165
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적 .....	166
제 9 장	참고문헌 .....	168
<첨부>	특허, 논문 및 시장분석 보고서 .....	171

# 제1장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제1절 연구과제의 배경

1. 21세기 식생활 및 경제여건의 발달로 웰빙 문화가 생활 전반에 자리 잡으면서 소비자들의 건강에 대한 관심이 지속적으로 높아짐에 따라 기능성 식품에 대한 수요가 크게 증가하고 있음. 특히 전통 발효식품의 경우 인공첨가물을 첨가되어있지 않고 미생물의 발효를 통해 여러 다양한 기능성 물질이 존재하는 것으로 알려지면서 이들 전통 발효식품 및 발효 미생물에 대한 관심이 높아지고 있음.
2. 서양의 경우 유제품을 발효하여 얻은 치즈 등의 발효식품이 발달하였으나 우리나라의 경우 서양과는 다른 발효 미생물과 발효 과정을 통하여 채소를 이용한 김치, 단백질이 많은 콩을 이용한 발효식품인 간장, 된장, 고추장 및 청국장등의 전통 식품이 발달하여 그 차별성이 있음.
3. 최근 장류와 김치에 대한 기능성이 알려지면서 국내외적인 관심이 높아짐에 따라 전통 발효 식품시장이 크게 증가하고 있음 그 예로서 2008년도 국내 전통 발효식품인 김치와 장류의 생산량은 각각 412.4천톤, 654천톤이었고 수출액은 각각 76,440천달러, 30,293천달러를 달성 하였음.
4. 현재 전통 발효식품의 기능성 및 우수성에 대해서는 세계적으로 많이 보고되고 있음. 그 예로서 국내 대표적인 전통 발효식품 중 하나인 김치의 경우 항암작용 (Cho et al. 2004), 심혈관질환과 관련된 콜레스테롤 저하 효능 (Kim et al. 2006)과 같은 기능성이 있다고 보고된 바 있음. 뿐만 아니라 대두 발효식품인 된장의 경우 항비만효과 (Kwak et al. 2012), 심혈관 질환의 원인인 혈전을 용해시키는 효능 (Jo et al. 2011), 항암효과 (Jung et al. 2006) 등이 있다고 알려져 있음. 하지만 이러한 국내 전통 발효 식품 유래 발효 미생물의 건강 기능성에 대한 유전체학적 수준에서의 연구는 아직 미비한 상태임.
5. 인간게놈프로젝트로 비롯된 최근의 미생물 유전체학 및 생물정보학의 발전으로 해외의 경우 이러한 발효식품의 기능성뿐만 아니라 발효에 관계된 미생물의 종류와 발효와 관계된 대사체에 대한 연구에 주목하여 유전체학 수준에서 활발하게 진행되고 있음
6. 일본의 경우 우리나라의 청국장과 비슷한 natto의 발효 미생물인 *Bacillus subtilis* natto에 대한 genome sequencing을 완료하였으며 유전체분석을 통하여 기능성 물질대사와 관련된 유전자에 대해 연구를 활발하게 진행 중에 있음 (Nishito et al. 2010). 또한 전통적인 콩 발효 곰팡이인 *Aspergillus oryzae*에 대한 genome sequencing (Machida et al. 2008)을 완료하였고 최근 Koji로부터 분리한 *Aspergillus sojae* NBRC4239 (Sato et al. 2011)의 염기서열분석을 완료하는 등 실제 산업에 이용하기 위한 발효미생물 연구가 지속적으로 이루어지고 있음.

7. 중국 또한 발효유에서 발견한 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Sun et al. 2011)와 기능성 물질인 poly- $\gamma$ -glutamic acid를 생산하는 발효 미생물인 *Bacillus amyloliquefaciens* LL3에 대한 genome sequencing을 완료하여(Geng et al. 2011) 발효 대사와 관련된 연구를 활발하게 진행하고 있음.
8. 발효 미생물에 대한 연구를 일찍 시작한 미국, 유럽 등의 여러 나라에서도 이미 발효 미생물에 대한 genome 연구를 진행하고 있으며 16 *Lactobacillus*, 2 *Leuconostoc*, 1 *Pediococcus*, 2 *Oenococcus*, 4 *Lactococcus*, 4 *Streptococcus*, 8 *Bifidobacterium* 균주에 대한 genome 분석을 진행 또는 완료하였을 뿐 아니라 최근에는 유산균간 상호 유전체 분석을 통해 유전체간 차이점에 대한 연구를 활발하게 진행하고 있음(Liu et al. 2005; Makarova et al. 2006)
9. 국내의 경우 누룩 등으로부터 유래된 복잡한 자연발효균주의 조성 및 유전체학적 연구의 경험부족으로 인하여 유전체연구를 통한 건강기능성 발효식품의 유전체연구 및 그 활용도가 선진국에 비하여 크게 뒤떨어져 있음.



전체염기서열분석이 완료된 발효 식품 유래 미생물 종류 현황(2011년,NCBI)

10. 국내 전통발효 식품 내 존재하는 미생물의 균총 분석은 다양한 방법을 통해 진행되어왔음. 김치의 경우 최근 김치 내에 존재하는 균총을 metagenomic 방법으로 분석하였고(Jung et al. 2011). 김치 유래 유산균에 대한 유전체 염기서열 분석과 함께 김치에 나오는 기능성 물질에 대한 연구도 많이 이루어져 있으나 이러한 기능성과 관련된 대사과정 분석에 관한 연구는 전무한 실정임
11. 된장의 경우 바이오 식품 소재 기반 기술개발사업(2003~20011)의 일환으로 콩 유래 전통

발효 식품의 기능성 및 대사물질에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있음. 2009년에는 DGGE 방법으로 균총을 분석한 연구결과가 보고된 바 있으며(Kim et al. 2009), Pyrosequencing을 이용한 균총 분석이 최근 이루어졌으나 (Nam et al. 2012) 국내 전통 된장에서 유래된 발효 미생물에 대한 전체 염기서열 분석은 전혀 이루어지지 않았음.

## 제2절 연구개발의 필요성

1. 현재의 전통발효식품의 기능성 연구는 최종발효생산물질 자체에 대한 기존의 알려진 기능성을 검증하는 수준에서 이루어지고 있으며 그 원인분석이나 자세한 작용기작은 아직 과학적으로 밝혀져 있지 않은 것이 대부분임
2. 또한 미생물연구기술의 발전에 따른 실험실내 선택배지를 통한 Culture-dependent method를 이용하여 분리가 가능한 일부 미생물에 대한 미생물학적 수준에서 제한된 기능성 규명이 진행되었고 이를 바탕으로 미생물의 기능성에 바탕을 둔 발효식품의 기능성을 평가하는 한계가 있음
3. 따라서 최종발효생산물질 중 기능성 물질 및 다양한 발효미생물들의 발효중 미생물간의 상호작용에 따른 기능성과 실험실에서 분리되지 않는 대다수 미생물들의 기능성에 대한 이해가 절대적으로 부족한 실정임
4. 이를 해결하기 위한 방안으로는 분자생물학 및 유전체학을 활용하여 Culture-independent method를 통한 전체발효균총에 대한 종류 및 조성을 분석해야하는 필요성이 제기됨
5. 이러한 전체발효균총의 조성분석은 전통발효식품의 안전성 확보 및 표준화에 반드시 수행되어야 하며 이러한 분석결과를 바탕으로 전통발효식품의 기능성에 관련된 발효미생물의 관련성에 대한 종류 및 조성에 대한 정보를 수집할 수 있음
6. 인간의 전체유전체분석 이래 획기적인 분자생물학 기술의 발전으로 인하여 유전체학 및 생물정보학의 비약적인 발전을 이루었고 이를 바탕으로 2000년대 이후 식품발효와 관련된 다양한 발효미생물들의 전체염기서열이 해독되었으나 기존의 부족한 정보분석력 및 데이터베이스에 수록된 부족한 정보량에 의하여 분석되지 않은 기능성 유전자들이 많이 존재하였으므로 이러한 기능성 유전자들을 새로이 발굴해내기 위해서는 기능성 발효미생물들의 기존 유전체를 재분석할 필요가 있음
7. 과거 10년전에 비해 수십배 이상 축적된 유전체정보 및 GenBank/GOLD 데이터베이스들을 바탕으로 기존의 기능성 발효미생물 유전체정보를 첨단생물정보학을 활용하여 새로이 재해석하여 기존에 분석되지 않았거나 분석되었더라도 미진한 기능성 유전자들을 발굴할 필요가 요구됨
8. 또한 이러한 기능성 유전자들에 대한 미생물대사과정에서 역할을 이해하기 위해서는 새로이 분석되는 기능성 유전체들의 전반적인 미생물대사과정을 분석하고 이를 바탕으로 기능성 유

전자들의 상호작용 및 역할을 이해하는 것이 필요함

9. 그리고 발효과정 중 선별된 기능성 유전자들이 실제로 발현되어서 기능성을 보이는지 검증하기 위하여 기능성 발효미생물의 전사체 및 대사체 연구도 동시에 진행되어야 함
10. 이번 연구를 통하여 얻게 되는 최신정보는 앞으로 다양한 전통발효식품의 기능성 연구에 유전체학적 수준에서의 최신정보를 제공해줄 것이며 또한 기능성 식품소재의 개발에 있어서도 이바지할 것으로 예상되어 반드시 수행되어야 함
11. 선별된 기능성 유전자들로부터 유래되는 기능성 식품신소재의 생산과정에 대한 이해 및 이를 바탕으로 한 식품신소재의 대량생산 및 생산최적화를 위해서는 반드시 식품신소재와 연관된 전반적인 metabolic pathway analysis가 수행되어야 하며 또한 분석된 대사과정을 바탕으로 배양조건 등의 최적화 연구가 동시에 진행되어야 함
12. 이렇게 규명된 건강 기능성 식품신소재는 실제로 전통발효식품에 적용하여 그 기능성을 극대화 할 수 있는지 실험적으로 검증되어야 식품산업에서 사용되어질 수 있으므로 반드시 실험적 규명이 요구됨
13. 따라서 다양한 건강기능성을 가진 전통발효식품유래 발효미생물들의 유전체학적 수준에서의 게놈연구를 진행하여 이러한 유전체정보를 바탕으로 그 기능성에 대한 과학적 접근을 통한 기능성유전체정보의 국제적 선점 및 대사성 질환예방에 기여할 수 있는 식품신소재의 개발이 필요함.
14. 2009년 선정된 “유전체 분석을 활용한 전통 발효식품의 기능성 표준화 연구” 연구과제는 전통발효식품내 발효중 균총의 변화를 메타지노믹스 기술을 사용하여 모니터링하고 또한 전통발효식품유래 주요 발효균주의 유전체정보를 밝히는데 목적이 있음. 따라서 이러한 연구를 통하여 축적되는 유전체정보를 기능성 식품에 활용하기 위해서는 전통발효식품유래 발효미생물의 기능성 유전자 발굴 및 이를 바탕으로 한 기능성 식품소재의 개발이 필요하며 전통발효식품의 기능성 강화에 기여할 수 있을 것으로 예상됨. 본 과제는 축적된 발효미생물들의 유전체정보를 활용하여 기능성 식품소재를 개발하고 이를 바탕으로 전통발효식품의 기능성을 향상시키는 것에 주안점을 두고 있으므로 기존의 과제와는 차별화되며 또한 그 후속 연구로서의 연계성을 가지므로 반드시 수행되어야 함



### 제3절 연구성과 목표 대비 실적

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 생산업 입신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표		1				3	2	0	
	달성		4				4	3	1	
2차 년도	목표		2				3	4	1	
	달성		2				3	2	0	
3차 년도	목표	1	3				4	4	1	
	달성	0	6				3	6	0	
계	목표	1	6				10	10	2	
	달성	0	12				10	11	1	

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내외 기술 현황

#### 1. 정책 및 제도 현황

- 가. 세계적으로 유전체 연구가 활발히 진행되고 있으며 주요 선진국은 유전체 연구 역량결집을 위한 전략적 정책 및 집중적 투자를 지원하고 있음
- 나. 미국의 경우 국립보건원 (NIH)와 에너지성(DOE)의 주관으로 Joint Genome Institute (JGI)에 많은 투자가 이루어지고 있음. JGI의 경우 2010년에는 153종류 2011년에는 171종류의 미생물의 전체염기서열분석을 완료하였고 메타지노믹스 분석의 경우 2011년에만 5백만달러를 투자하여 200여개의 관련 분석을 완료하였음. 또한 J. Craig Venter Institute에서 선발된 200여종 이상 발효균주의 전체염기서열연구가 진행 중에 있음
- 다. 일본의 경우 통산성, 과기청 등 10개 정부부처가 참여하여 유전체 연구를 지원하고 있으며 이화학연구소 (RIKEN)을 중심으로 연구를 수행 중에 있음. 국가기술평가원(National Institute of Technology and Evaluation, NITE)산하 생물공학부에서 26종의 미생물에 대한 전체염기서열분석을 이미 완료하였고 현재 *Lactobacillus homohiochii*, *Aspergillus awamori* 등 발효 균주를 포함하여 79종의 미생물에 대한 염기서열분석이 진행 중에 있음. 특히 유전체 분석결과의 활용도를 높이기 위한 유전체 데이터베이스 (Database of the Genome Analyzed at NITE, <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top>)를 운영하고 있으며 2012년에는 기능성 물질의 대사와 관련된 유전체에 대한 데이터베이스(Database of BioSynthesis clusters CURated and In Tegrated, DoBISCUIT)를 구축하였음. 최근 일본에서는 기초 유전체연구 뿐만 아니라 기능 유전체학 분야에 초점을 맞추어 연구를 진행 중에 있음.
- 라. 국내의 경우 교과부를 중심으로 유전체 연구 육성 및 기술개발 지원은 꾸준히 지원되고 있으나 최근 3년간 정체되는 추세임, 2008-2010년도 미생물 유전체 관련 연구개발사업에 투자액은 약 347억원임 (2011년 BT 기술동향보고서, 생명공학정책연구센터). 발효미생물의 경우 농업진흥청에서 바이오그린 21사업을 통하여 된장의 전체균종을 메타지노믹스기법을 활용하여 분석하고 있으며 김치균총은 농림부지원사업 및 21세기 프론티어사업으로 진행하였음. 또한 최근에는 국내젓갈류에 대한 균총분석도 진행중임. 그러나 이러한 기능성 전통 발효식품유래 기능성유전체정보의 활용을 통한 건강개선 기능성 식품으로의 적용은 미미한 실정임.

#### 2. 국내 기술 수준의 문제점 및 연구개발을 통한 기술수준 상승 기대치

- 가. 전통발효식품의 생물학적 기능성 평가수준은 선진국과 비교하여 기술적으로 크게 차이를

보이지 않으나, 유전체 염기서열분석기술, 관련연구 기자재 및 유전체정보의 처리능력, 그리고 유전체연구 전문가의 기술 및 경험적 해석능력은 선진국과 최소 5년 이상의 기술적 수준차이를 보임

나. 또한 이러한 건강기능성 유전체정보를 활용한 기능성 식품의 개발은 선진국과 비교하여 거의 전무한 실정임

다. 본 연구개발을 통하여 전통발효식품유래 발효미생물의 유전체정보 습득 및 분석능력 그리고 유전체 전문가의 정보해석능력 향상을 극대화하고 이를 통하여 선진국 유전체분석 기술 수준의 최소 90% 이상에 이르는 효과가 있을 것이며 또한 이러한 발효미생물의 유전체정보는 대사성 질환예방에 관련된 발효식품의 기능성을 유전자수준에서 연구하여 식품신소재를 개발할 수 있는 중요한 정보를 제시할 것으로 기대됨.

# 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제1절 제 1세부과제

### 1. 인체대사성 질환예방관련 전통발효식품의 균총 정보 분석

#### 가. 전통발효식품 (메주, 김치, 젓갈)로부터 샘플 수집

- 우리나라의 발효식품에는 김치, 장류(된장, 간장, 청국장, 고추장 등), 젓갈류가 대표적이며 발효의 매개가 되는 미생물을 통해 생산되는 다양한 건강 기능성 물질이 존재하는 것으로 알려져 있음
- 본 실험에서는 한국인들이 가장 많이 섭취하고 있으며 세계적으로 잘 알려져 있는 한국의 전통발효식품인 김치, 젓갈 및 여러 장류의 기본이 되는 메주에서 발효미생물을 분리하여 기능성을 탐색하고, 우수 균주를 선발하여 활용하는 것을 목표로 함
- 전통 발효식품의 샘플은 발효미생물의 분리를 위해서 조미료 또는 보존료를 첨가하지 않고 전통적인 방법으로 발효 및 제조하는 곳을 선정하여 구입 <표 1-1 및 그림 1-1>
- 메주의 경우 수분이 충분한 중심부에서 샘플을 채취하였으며, 김치의 경우 16℃에서 7일간 숙성한 후 추후 연구에 사용하였음

<표 1-1> 수집된 전통발효식품의 정보

전통발효식품	품목	구입처	구입시기	발효정도
메주	메주	적성시골된장 (경기도 파주)	2013년 2월 중순	발효완제품
김치류	포기김치	대도김치 (광주광역시 동구)	2012년 11월 중순	16℃에서 7일간 숙성 후 사용
	백김치			
	깍두기			발효완제품
	묵은지			
젓갈류	새우젓	경기상회 (인천광역시 소래포구)	2012년 10월 초순	발효완제품
	조개젓			
	멸치젓			



젓갈류 (경기상회)



메주 (적성시골된장)



김치류 (대도김치)

<그림 1-1> 전통발효식품 샘플 수집

## 나. 수집된 샘플로부터 주요발효미생물의 분리

### (1). 전통발효식품으로부터 발효미생물의 분리방법 연구

- 식품공전에 따르면 식품으로부터 미생물을 분리 및 정량하는 기준은 25 g의 식품을 225ml의 인산용액과 함께 plastic bag에 넣은 후 stomaching을 2분간 진행하고 연속희석법을 행하여 희석된 미생물 분리액을 한천배지에 도말하여 발효미생물들을 분리함
- 본 연구에서는 식품공전의 방법을 따랐으나 식품 특성상 파쇄에 따른 균체의 분리가 어려울뿐더러 본 연구는 미생물의 정량적인 분리가 목적이 아니라 정성적인 분리가 목적이므로 stomaching의 시간(10초, 30초, 1분, 2분, 5분, 10분)을 다양하게 실험해본 결과 30초가 식품의 파쇄잔유물이 적고 분리가 가장 용이하였음
- 또한 발효식품 내 균체의 효과적인 분리를 위해서 인산용액(1X PBS buffer, pH 7.8)과 0.1% peptone water를 비교실험해본 결과 차이가 극미하므로 본 연구에서는 0.1% peptone water를 사용함
- 따라서 발효균주의 분리를 위해서 25 g의 발효식품을 225 ml의 0.1% peptone water에 혼합한 후 stomaching 시간을 30초로 하여 그 상층액을 사용하여 발효균주를 분리하였음

### (2) 전통발효식품으로부터 발효미생물을 분리하기 위한 미생물배지 및 배양조건 연구

- 기존의 많은 연구를 통해 각 전통식품 별 분리된 균주정보를 수집하고 분석하여 본 실험에서의 균주 분리를 위한 배지 및 배양조건을 선별하였으며 최종 선택된 조건은 <표 1-2>와 같음

<표 1-2> 각 전통발효식품 유래 균주 분리를 위한 배양 조건의 선택

전통발효식품	배양 배지	배양 조건	참고문헌
김치 (백김치, 깍두기, 묵은지, 포기김치)	Nutrient MRS LB M17G	호기 혐기	김수영 외 5명, 2011, 한국식품과학회지, 43(4):446-452 정영기 외 4명, 1995, 한국생명과학회지, 5(4):203-210
젓갈 (새우젓, 멸치젓, 조개젓)	Nutrient MRS	호기 혐기	안지은 외 4명, 2012, 한국식품영양과학회지, 41(5):721-726 김민수 외 4명, 2009, 한국미생물학회지, 45(1):26-31
메주	Nutrient LB	호기 혐기	최경근 외 3명, 2003, 한국식품영양과학회지, 32(6):818-824 홍승범 외 6명, 2012, The Journal of Microbiology, 50(3):386-393

- 전통 발효 식품으로부터 미생물을 분리하기 위하여 살균된 Stomacher plastic bag에 0.1% peptone water 225 ml 과 sample 25 g을 배합하여 30초간 stomaching 실시하였음
- 파쇄된 식품성분을 침전시키기 위하여 15분간 상온에 방치하여 상층액을 얻고 그 상층액을 0.1% peptone water를 사용하여  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 의 연속배수로 희석하였음
- 각 희석액을 <표 1-2>의 조건을 참조하여 각 미생물배지별로 도말한 후 48시간동안 37도에서 배양조건별로 배양하였음
- 배양 후 형성된 개별적인 콜로니를 같은 액상미생물배지에 접종한 후 24시간동안 37도에서 배양함
- 액상배지에서 자란 발효미생물들의 stock culture를 제조하기 위하여 살균된 80% glycerol을 첨가하여 최종농도가 15%가 되도록 하였고 제조된 stock culture는 -80도에 보관함
- 각 발효식품별 분리된 발효균주의 수는 135개부터 258개까지 다양하였음
- 최종적으로 8종의 샘플에서 총 1,589개의 균주를 분리하였으며 샘플별 균주 현황은 <표 1-3>에서 나타낸 바와 같음

<표 1-3> 전통발효식품유래 발효미생물 분리 현황

전통발효식품	품목	발효균주수	식품별 균수	전체균수
메주	메주	185	185	1,589
김치류	포기김치	204	880	
	백김치	258		
	깍두기	250		
	묵은지	168		
젓갈류	새우젓	206	524	
	조개젓	183		
	멸치젓	135		

다. Culture-dependent 방법 (AP-PCR)을 활용한 전통발효식품내 발효균총 조성분석

(1) 전통발효식품유래 발효미생물의 Molecular fingerprinting 분석

- 전통발효식품으로부터 분리된 총 1,589 균주에 대하여 분자생물학적인 수준에서 균주의 다양성을 탐구하기 위해 Arbitrary-primed PCR (AP-PCR)을 수행하여 Molecular fingerprinting을 진행함
- 이는 culturable method를 바탕으로 하며 동정이 완료된 균주 이외의 모든 균주에 대해 분자생물학적으로 유사한 균주들을 그룹화하고 이들 중 대표적인 균주를 선발하여 추가 동정을 수행하여 각 전통발효식품별 균주 조성분석을 진행함

(2) DNA 추출 및 AP-PCR 수행을 통한 분자생물학적 수준에서 발효균주의 분류

- 전통발효식품으로부터 분리된 각 발효균주를 최적 액상배지에서 배양한 후 원심분리를 통해 cell을 수집함
- 수집된 발효균주의 cell을 molecular water를 이용하여 두 번 세척하여 배지성분을 제거하고 5%의 Chelex 100 resin solution으로 풀어줌
- 이후 10분간 가열하여 cell을 파쇄한 후 원심분리를 통하여 상층액을 확보하여 PCR 반응시 template DNA로 활용함
- 상층액 내 template DNA를 기존에 알려져 있는 universal primer인 P32 primer를 사용하여 AP-PCR을 수행하였으며 이 때 필요한 primer 와 PCR 반응조건 및 PCR mixture 조성에 대한 정보는 각각 <표 1-4>, <표 1-5> 및 <표 1-6>과 같음

<표 1-4> AP-PCR universal primer 정보

Primer	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Reference
P32	CAGCAGCCGCGGTAATWC	S.M. Cusick and D.J. O'Sullivan, 2000, Appl. Environ. Microbiol.

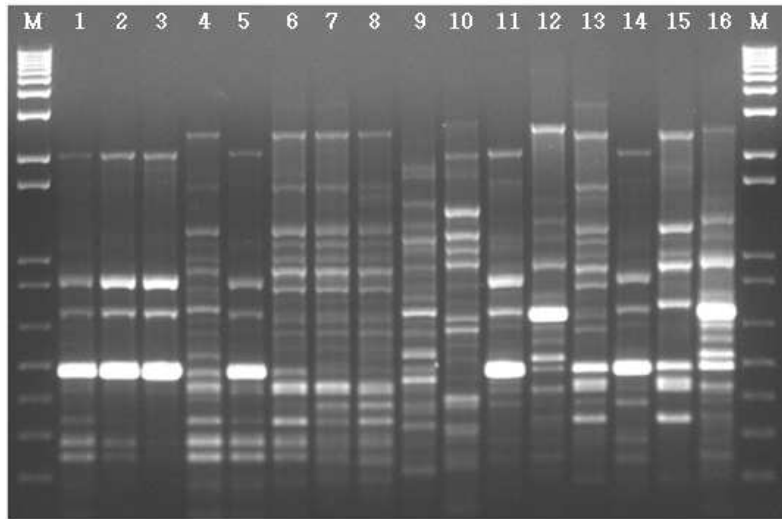
<sup>a</sup>, W(A/T)

<표 1-5> AP-PCR 반응조건

Step	Temperature (°C)	Duration time	Cycle number
Pre-denaturation	92	2 min	X 1
Denaturation	92	30 sec	X 40
Annealing	40	1 min	
Extension	68	1 min 30 sec	
Extra-extension	68	10 min	X 1

<표 1-6> AP-PCR mixture 조성

Mixture 조성	Volume ( $\mu$ l)
Molecular water(M.W.)	18
P32 primer (2 pmol/ul)	2.5
dNTP (10 mM)	0.5
10 $\times$ reaction buffer	2.5
<i>Taq</i> polymerase (5 U/ul)	0.5
Template DNA	1
Total	25

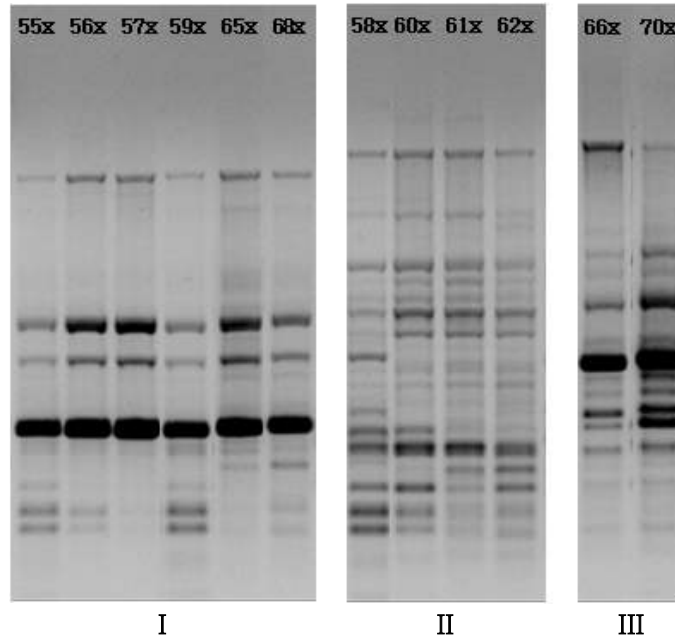


<그림 1-2> Arbitrary-primed PCR의 전기영동 결과

M: 1 kb plus DNA ladder	lane 1-16: selected strains		
1: 55x	5: 59x	9: 63x	13: 67x
2: 56x	6: 60x	10: 64x	14: 68x
3: 57x	7: 61x	11: 65x	15: 69x
4: 58x	8: 62x	12: 66x	16: 70x

- PCR을 통해서 증폭된 amplicon에 대한 전기영동 결과는 <그림 1-2>과 같으며 1,589 종의 수집된 전체 발효균주를 이 방법을 통해 finger-printing을 수행함
- 전기영동결과를 바탕으로 각 균주별 밴드 패턴을 분석하므로서 같은 밴드 패턴을 묶어 grouping을 진행하였으며 grouping에 대한 예시는 다음의 <그림 1-3>과 같음





<그림 1-3> AP-PCR의 전기영동 결과를 바탕으로 한 grouping 결과 예시  
 Group I, *W. cibaria*; Group II, *Lb. curvatus*; Group III, *Lb. plantarum*

- 그 결과 총 220개의 group으로 나뉘었으며 이 외에 어떠한 그룹에도 속하지 않는 패턴은 기타 group으로 분리함
- 전기영동결과를 바탕으로 그룹화 한 결과, 1,238 개의 bacterial strains 가 219개의 그룹으로 묶였으며 351개의 bacterial strains가 각각 다른 패턴을 나타내어 기타그룹으로 속해짐

### (3) Grouping 결과를 바탕으로 한 균주 동정

- AP-PCR을 통해 나뉘어진 각 그룹에서 대표적으로 2~3개의 샘플을 선발하였으며 선발된 균을 동정하기 위해 기존에 알려진 16S rRNA universal primer set를 활용하여 PCR로 증폭함 (예상크기 1,465 bp)
- 이 때 사용한 universal primer 및 PCR 반응조건과 mixture 구성에 대한 정보는 각각 <표 1-7>, <표 1-8> 및 <표 1-9>과 같음
- PCR을 통해서 증폭된 16S rRNA PCR product에 대한 전기영동 결과는 <그림 1-4>과 같으며 예상된 PCR product size인 1,465 bp를 얻었음
- PCR product는 gel extraction 방법으로 DNA를 정제하여 MacroGen에 sequencing을 의뢰함
- Sequence 결과는 천랩의 EzBioCloud 의 EzTaxon program을 이용하여 각각의 균주를 동정하였으며 이를 통해 각 전통발효식품 샘플 당 균주 조성을 분석하였음
- 각 전통발효식품별 균주 조성결과는 다음의 <표 1-10> 및 <그림 1-5>과 같음

<표 1-7> 16S rRNA universal primer 정보

Primer	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Reference
F1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Dorsch M and Stackebrandt E. 1992, J. Microbiol. Methods
R13	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	

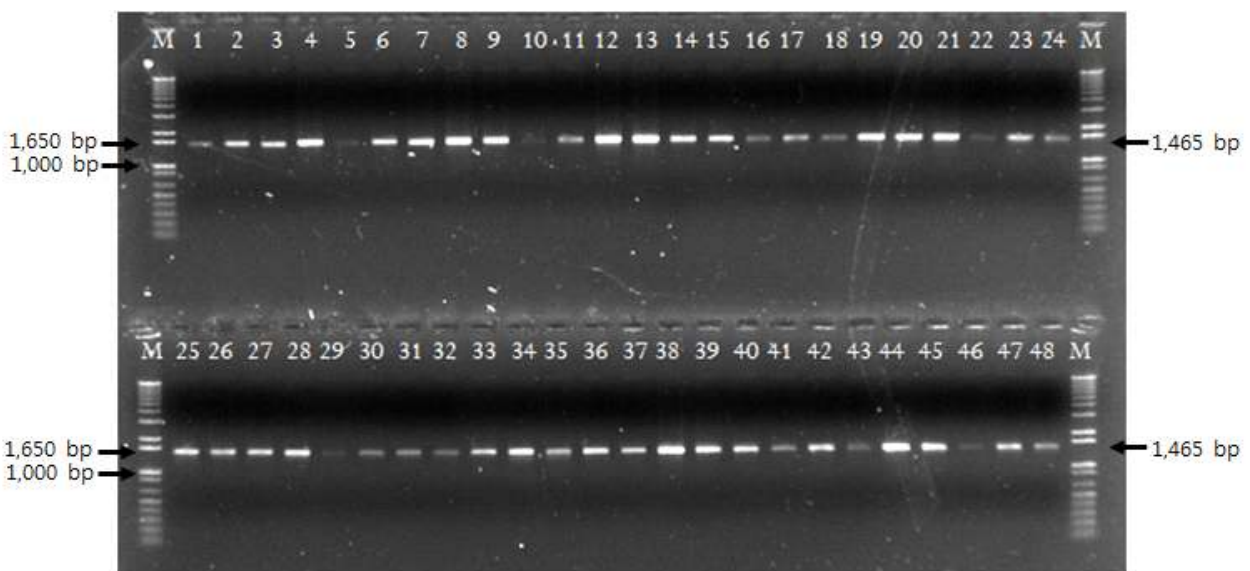
<sup>a</sup>, M(A/C), Y(C/T)

<표 1-8> 16S rRNA gene PCR 반응조건

Step	Temperature (°C)	Duration time	Cycle number
Pre-denaturation	94	3 min	X 1
Denaturation	94	30 sec	X 30
Annealing	57	30 sec	
Extension	72	1 min 30 sec	
Extra-extension	72	10 min	X 1

<표 1-9> 16S rRNA gene PCR mixture 조성

Mixture 조성	Volume (μl)
Molecular water	17.5
F1 primer (20 pmol)	0.5
R13 primer (20 pmol)	0.5
dNTP (2 mM each)	2.5
10× reaction buffer	2.5
<i>Taq</i> polymerase (5U/ul)	0.5
Template DNA	1
Total	25



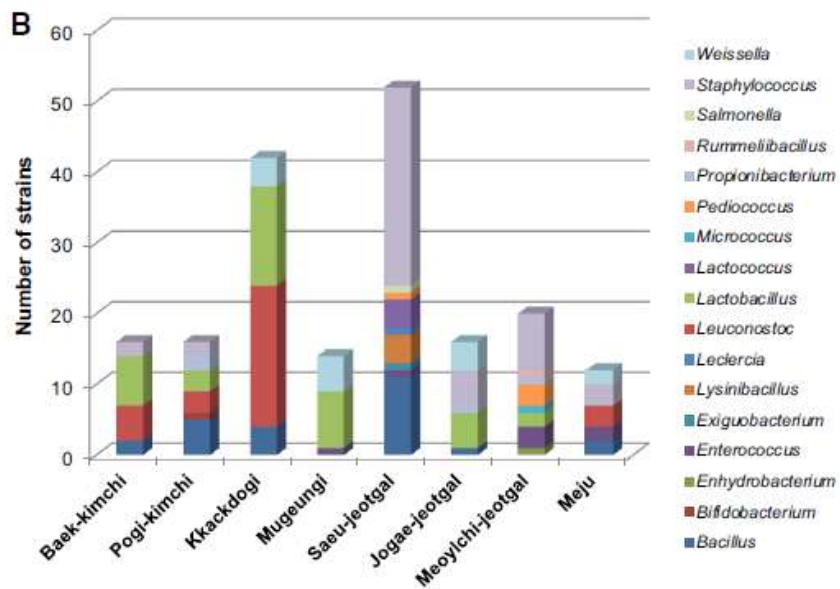
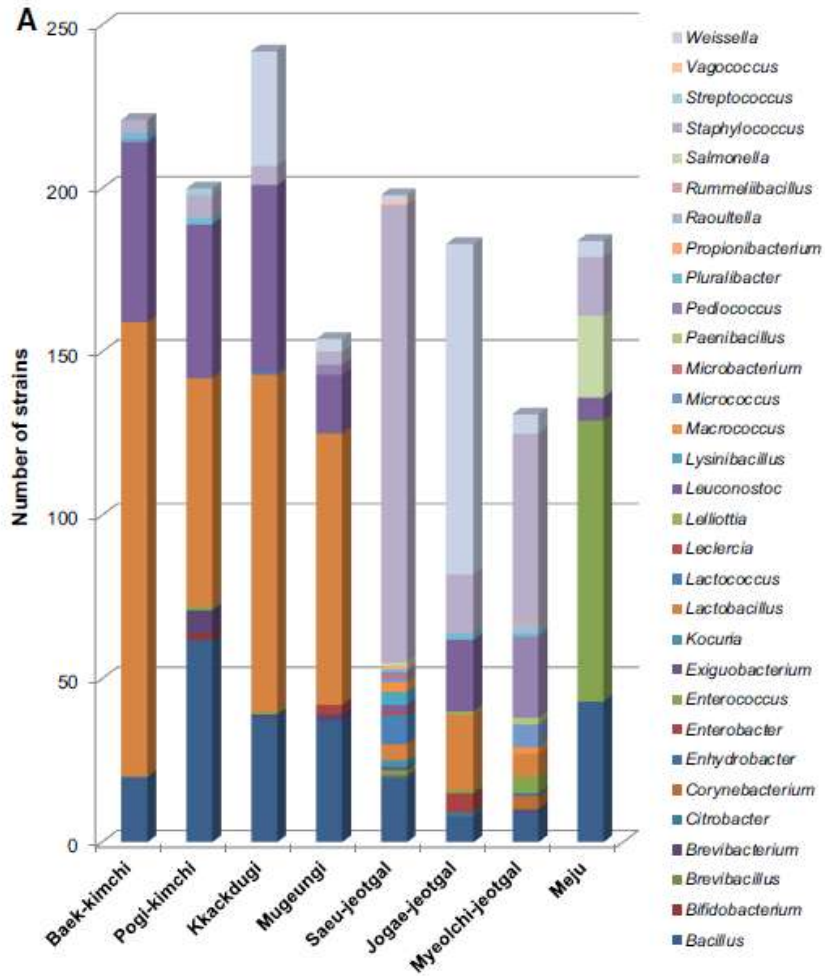
<그림 1-4> 분자생물학적 동정을 위한 16S rRNA PCR products의 전기영동 결과

M, 1 kb plus DNA ladder; 1, 2E; 2, 15E; 3, 19E; 4,121E; 5, 129E; 6, 135E; 7, MY62; 8, MY66; 9, MY68; 10, MY75; 11, 17C; 12, 25C; 13, 78C; 14, 153C; 15, 182C; 16, 183C; 17, 47X; 18, 50X; 19, 54X; 20, 100X; 21, 111X; 22, 156X; 23, 161X; 24, 162X; 25, 50W; 26, 115W; 27, 128W; 28, 158W; 29, 215W; 30, 224W; 31, 117S; 32, 118S; 33, 188S; 34, 193S; 35, 196S; 36, 58J; 37, 66J; 38, 73J; 39, 89J; 40, 179J; 41, 182J; 42, 183J; 43, 185J; 44, 108Z; 45, 188Z; 46, 196Z; 47, 197Z; 48, 198Z

<표 1-10> 전통발효식품별 균주 조성 분석 결과

Bacterium	Baek-kimchi	Pogi-kimchi	Kkakdugi	Mugeungi	Saeu-jeotgal	Jogae-jeotgal	Myeolchi-jeotgal	Meju
<i>Bacillus</i>	20	62	38	37	20	8	9	43
<i>Bifidobacterium</i>	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacillus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Brevibacterium</i>	-	7	1	2	-	-	1	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Corynebacterium</i>	-	-	-	-	-	-	4	-
<i>Enhydrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	3	-	6	-	-
<i>Enterococcus</i>	-	1	1	-	1	1	5	86
<i>Exiguobacterium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Kocuria</i>	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	139	70	103	83	5	23	7	-
<i>Lactococcus</i>	-	-	1	-	9	-	-	-
<i>Leclercia</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Lelliottia</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Leuconostoc</i>	55	47	57	18	2	22	-	7
<i>Lysinibacillus</i>	-	-	-	-	4	-	-	-
<i>Macrococcus</i>	-	-	-	-	3	-	2	-
<i>Micrococcus</i>	1	-	-	-	1	-	7	-
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Paenibacillus</i>	-	-	-	-	-	-	2	-
<i>Pediococcus</i>	-	-	-	3	1	-	25	-
<i>Pluralibacter</i>	2	2	-	-	1	2	1	-
<i>Propionibacterium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Raoultella</i>	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>Rummeliibacillus</i>	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	1	-	-	25
<i>Staphylococcus</i>	4	7	6	4	140	18	57	18
<i>Streptococcus</i>	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Weissella</i>	-	-	35	4	2	101	6	5
Unidentified	37	4	8	14	8	-	4	1
Total	258	204	250	168	206	183	135	185

\* Reference: SH Lee, MJ Ahn, JS Hong, and JH Lee. 2015. J Korean Soc Appl Bio Chem.



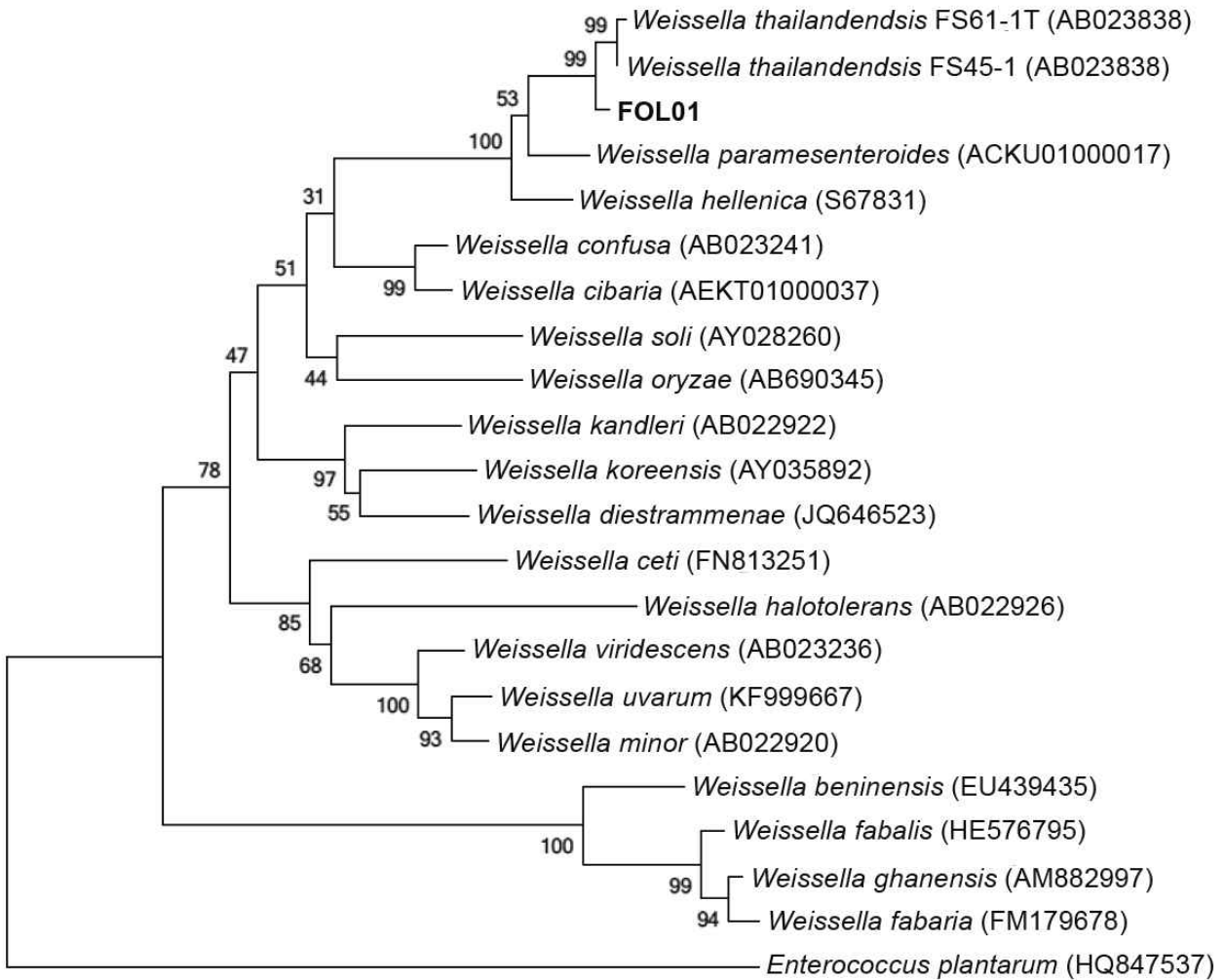
<그림 1-5> Culture-dependent 방법을 이용한 8종의 전통발효식품 내 미생물 균총 조성.  
 전체 1,589 균주의 균총 조성(a)과 그룹화 되지 않은 351개의 균주의 조성(b).

\* Reference: SH Lee, MJ Ahn, JS Hong, and JH Lee. 2015. J Korean Soc Appl Bio Chem.

- 8개의 전통발효식품 내 가장 우점하고 있는 것으로 밝혀진 균주는 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Staphylococcus*로 밝혀짐 <표1-10>.
- 김치류 (백김치, 포기김치, 깍두기, 묵은지)에서 가장 우점하고 있는 균주는 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*였으며, *Weissella*는 깍두기에서만 관찰되었음
- 젓갈류 (새우젓갈, 조개젓갈, 멸치젓갈)에는 *Staphylococcus*, *Bacillus*가 우점하고 있으나 젓갈의 종류에 따라 각각 서로 다른 우점종이 관찰되었음 (새우젓갈-*Lactococcus*, 조개젓갈-*Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, 멸치젓갈-*Pediococcus*, *Micrococcus*)
- 메주에는 *Enterococcus*, *Bacillus*에 속하는 균주들이 대부분 우점하고 있었으며, 그 외에 *Salmonella*, *Staphylococcus*에 속하는 균주들이 관찰되었음

#### (4) Grouping 결과를 바탕으로 한 신종균주 탐색

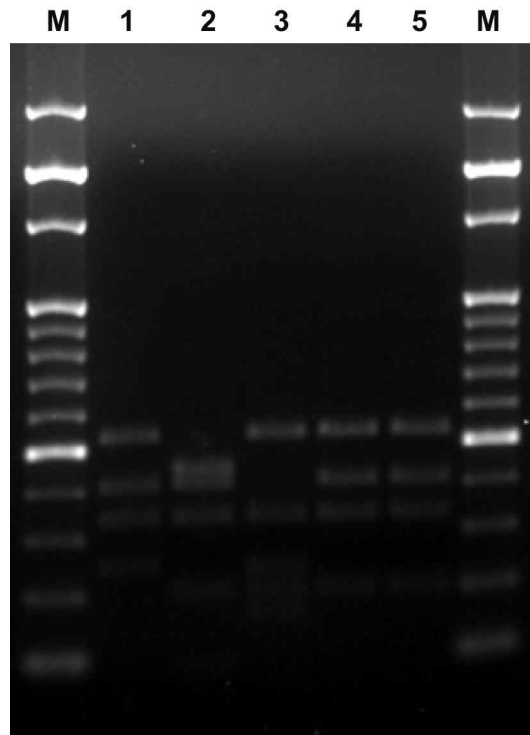
- 균주 조성을 분석하는 과정에서 NCBI BLAST 및 EzBioCloud EzTaxon에 구축된 데이터베이스를 이용하여 동정한 결과 중 100% 상동성을 보이지 않는 균주를 선발함
- NCBI BLAST 및 EzBioCloud EzTaxon의 데이터를 비교하여 후보균을 선발하였으며 두 데이터가 일치하지 않았을 때는 논문데이터를 바탕으로 한 자료인 EzTaxon의 데이터를 신뢰함
- 분석 결과를 종합하여 조개 젓갈로부터 분리된 균주 *Weissella* sp. 64C을 신종균주 후보로 선정하여 *W. jogaejeotgali* FOL01이라 명명하고 신종균주임을 확인하기 위한 추가 분석을 수행하였음
- 현재까지 보고된 19종의 *Weissella* species들의 16S rRNA gene sequence를 NCBI로부터 확보한 후, FOL01의 16S rRNA gene sequence와 비교한 결과 <그림 1-6>과 같이 *W. thailandensis*와 가장 가까우면서 *W. paramesenteroides* 및 *W. hellenica*와 한 그룹을 이루는 것을 확인하였음



0.01

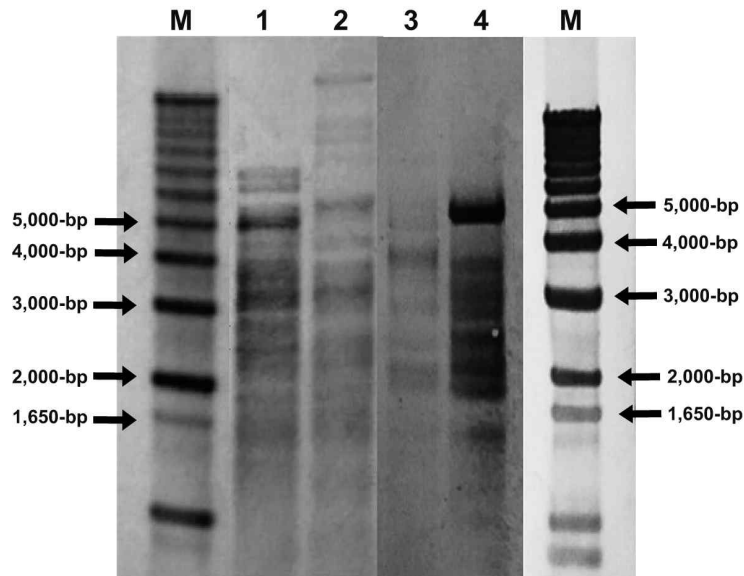
<그림 1-6> Neighbor-joining 방법을 이용한 FOL01과 서로 다른 *Weissella* species의 16S rRNA gene sequence의 계통학적 분석 결과.

- 이들과 서로 다른 균주임을 확인하기 위하여 16S rRNA gene의 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)을 수행하였음
- FOL01, *W. thailandensis*, *W. paramesenteroides*, *W. hellenica*의 16S rRNA gene을 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')로 각각 PCR한 후, *Hae*III과 *Hha*I으로 37°C에서 24시간동안 반응시킨 후 2% agarose gel에서 전기영동하여 패턴을 분석하였음
- 그 결과 <그림 1-7>과 같이 다른 균주들과는 전혀 다른 패턴을 보였으며, *W. thailandensis*와는 동일한 패턴을 나타내었지만 그 sequence를 확인한 결과, 1,335 nucleotide 중에서 25개의 nucleotide가 서로 다름을 확인하여 두 균주가 서로 다른 균주임을 확인하였음



<그림 1-7> FOL01과 비슷한 서로 다른 *Weissella*간의 ARDRA 분석 결과  
M, 100 bp DNA ladder marker (MGmed, Seoul, Korea); 1, *W. cibaria* LMG 17699<sup>T</sup>;  
2, *W. hellenica* ATCC 51523<sup>T</sup>; 3, *W. paramesenteroides* ATCC 33313<sup>T</sup>;  
4, *W. thailandensis* FS61-1<sup>T</sup>; 5, Strain FOL01.

- Southern blot을 이용한 Restriction enzyme profiling 분석을 위하여, 각각의 균주의 genomic DNA를 분리정제한 후 FOL01의 genomic DNA를 *Hae*III로 절단한 후 DIG hybridization을 통하여 probe로 제작한 뒤 다른 균주들의 genomic DNA와 hybridization 시킴
- 그 결과 <그림 1-8>에서처럼 FOL01의 RE profile이 서로 가깝게 나타난 다른 *Weissella*들과 차이가 있음을 확인하여 이 균주가 신종균주임을 확인하였음
- 생화학적 차이를 분석하기 위하여 API50 CHL kit 및 cellular fatty acid를 서로 비교한 결과는 다음 <표 1-11> 및 <표 1-12>와 같음
- <표 1-11>에서처럼 FOL01만 cellobiose, xylose을 분해할 수 있으며, galactose는 분해하지 못하는 것으로 보여져 다른 3종의 *Weissella*와 차이를 보였음
- 또한 melibiose, ribose, raffinose, esculin의 분해에 있어서도 다른 가까운 3종의 *Weissella*와 차이를 나타냄에 따라 신종균주임을 확인하였음
- 세포벽의 fatty acid 구성성분에 있어서 C<sub>17:0</sub> cyclo, C<sub>18:1</sub> *n*9*c*, and C<sub>19:0</sub> cyclo *n*8*c*의 성분이 *W. thailandensis* 및 *W. paramesenteroide*와 차이를 보임에 따라 FOL01이 이 2종의 *Weissella*와 서로 다른 species임을 확인하였음 <표 1-12>



<그림 1-8> FOL01과 비슷한 서로 다른 *Weissella*간의 RE profile 분석 결과  
M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1, strain FOL01; 2, *W. thailandensis* FS61-1<sup>T</sup>;  
3, *W. hellenica* ATCC 51523<sup>T</sup>; 4, *W. paramesenteroides* ATCC 33313<sup>T</sup>.

<표 1-11> FOL01과 서로 가까운 *Weissella*간의 API50 CHL, G+C 함량, 16rRNA sequence  
비교 분석 결과

1, FO101; 2, *W. thailandensis* FS61-1<sup>T</sup>; 3, *W. paramesenteroides* ATCC 33313<sup>T</sup>;  
4, *W. hellenica* ATCC 51523<sup>T</sup>

Characteristic	1	2	3	4
Acid from				
Arabinose	+	+	+	+
Cellobiose	+	-	-	-
Fructose	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	-
Raffinose	-	+	-	-
Ribose	-	+	+	-
Salicin	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Xylose	+	-	-	-
Hydrolysis of esculin	+	-	+	ND
NH <sub>3</sub> from arginine	-	-	-	-
Lactic acid configuration	D	D	D	D
G + C content (mol%)	39.6	41.2	40.4	39.4
DNA sequence identity of 16S rRNA gene*	100	99.39	98.50	92.74

\*ND, No data available



<표 1-12> FOL01과 서로 가까운 *Weissella*간의 cellular fatty acid 구성성분 비교 분석 결과  
 1, FOI01; 2, *W. thailandensis* FS61-1<sup>T</sup>; 3, *W. paramesenteroides* ATCC 33313<sup>T</sup>

Fatty acid	1	2	3
Straight-chain saturated			
C <sub>14:0</sub>	4.92	4.11	4.66
C <sub>16:0</sub>	30.91	32.52	29.25
C <sub>18:0</sub>	0.84	1.87	1.91
Branched saturated			
iso-C <sub>19:0</sub>	0.81	0.61	1.40
Unsaturated			
cyclo-C <sub>17:0</sub>	3.95	0.48	-
C <sub>18:1</sub> <i>i9c</i>	8.03	16.9	32.61
cyclo-C <sub>19:0</sub> <i>i8c</i>	20.6	12.26	-
Summed features			
3	5.93	4.37	2.45
7	22.02	23.42	24.35
8	2.61	3.40	3.38

\* -, Not detected

- 이러한 생화학적, 분자생물학적 비교분석을 통하여 FOL01이 *Weissella*의 새로운 species임을 확인하였으며 이에 따라 FOL01을 *W. jangaejoetgali* FOL01로 명명하여 KCCM 및 JCM에 기탁하였음 (KCCM 43128<sup>T</sup>=JCM 30580<sup>T</sup>)

**라. Culture-independent 방법 (DGGE)을 활용한 전통발효식품내 발효균총 조성분석**

**(1) 전통발효식품의 샘플 종류 및 DGGE 분석을 위한 분류**

- 김치류 3종 (포기김치, 백김치, 깍두기), 젓갈류 3종 (조개젓, 새우젓, 멸치젓) 및 메주 1종을 대상으로 발효균총의 조성분석을 DGGE 방법을 활용하여 분석함
- 김치류의 경우 건더기 부분과 국물 부분을 분류하여 각각 별도로 DGGE 분석을 수행함
- 전통발효식품의 샘플 종류 및 DGGE 분석을 위한 분류는 <표 1-13>과 같음

<표 1-13> 전통발효식품의 샘플 종류 및 DGGE 분석을 위한 샘플 분류

DGGE lane no.	Source	Sample	Sample 분류
1	김치류	포기김치	포기김치 건더기
2			포기김치 국물
3		깍두기	깍두기 건더기
4			깍두기 국물
5		백김치	백김치 건더기
6			백김치 국물
7	젓갈류	조개젓	조개젓
8		새우젓	새우젓
9		멸치젓	멸치젓
10	메주	메주	메주

(2) 전통발효식품으로부터 Total bacterial DNA 분리 및 정제

- 각 전통발효 식품 10 g에 멸균수 90 g을 첨가해준 후 230 rpm에서 30초 동안 Stomaching하여 균질화 한 후 상층액을 centrifuge를 이용하여 4°C, 4,300 rpm에서 15분 동안 원심분리함
- Bacterial DNA 추출을 위해, 얻어진 Pellet을 멸균수로 세척한 후, Solgent DNA Extract Kit를 사용하여 Total bacterial DNA를 분리정제함

(3) DGGE 분석을 위한 16S rRNA PCR 증폭

- DGGE 분석을 위해서는 16S rRNA gene을 증폭할 수 있는 16S rRNA universal primer가 필요하며 또한 GC clamp를 반드시 가지고 있어야 함
- 16S rRNA PCR 증폭을 위한 16S rRNA universal primer의 DNA sequence는 5'-GCCCGCGCGCGGCGGGCGGCGGGGGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' (gc338f forward primer) 및 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (518r reverse primer)이며 DGGE용 PCR 증폭 조건은 <표 1-14>와 같음
- 증폭된 PCR product는 QIAquick PCR purification kit를 이용하여 정제하였음

<표 1-14> DGGE를 위한 PCR 증폭 조건

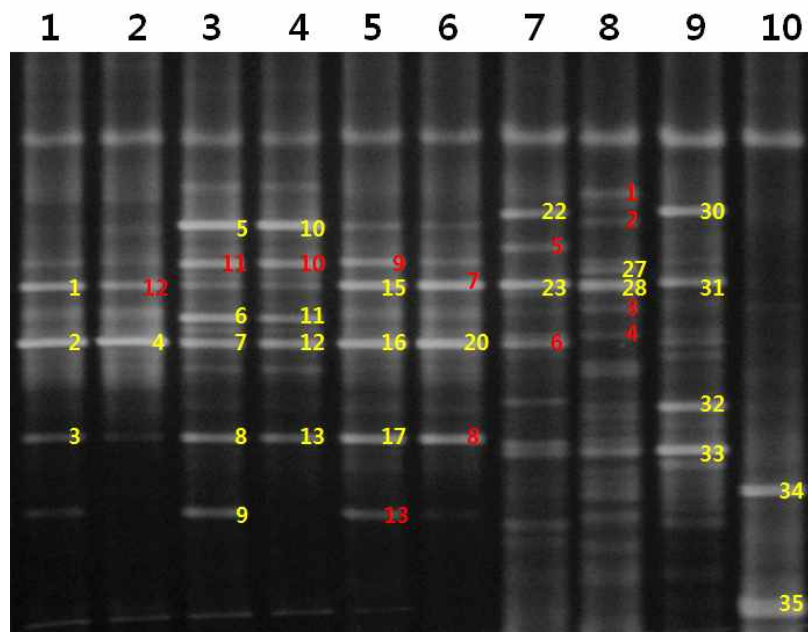
Step	Temperature	Time	Cycle
Pre-denaturation	95°C	5 min	X 1
Denaturation	95°C	1 min	X 30
Annealing	58°C	1 min	
Extension	72°C	2 min	
Extra extension	72°C	5 min	X 1

#### (4) DGGE gel 제조 및 DGGE 전기영동 수행

- DGGE 분석을 위한 PCR product은 7M urea를 함유한 40% (w/v) formamide를 사용하여 제조된 DGGE gel을 1X TAE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM EDTA (pH 8.0))를 사용하여 40 V에서 30분간 전기영동 (Dcode™ System Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 진행한 이후 60 V에서 15시간을 추가로 전기영동 함
- DGGE 분석결과는 <그림 1-6>과 같음
- <그림 1-6>에서 보는바와 같이 각 김치류내 발효식품의 건더기 및 국물간의 DGGE PCR band pattern의 비교분석을 통해서 발효균총 조성의 차이가 거의 없음을 알 수 있음
- 그러나 전통발효식품 샘플들 간의 DGGE PCR band pattern은 차이를 보여서 각 발효균총의 조성에 차이가 있음을 알 수 있음
- 각 PCR band들은 gel extraction을 통하여 증폭된 PCR product들을 정제하였음
- 이러한 PCR band들은 추가적인 PCR 증폭을 통하여 DNA sequencing을 위하여 필요한 충분한 DNA의 양을 확보하는데 사용됨

#### (5) 정제된 DGGE band들의 PCR 증폭 및 PCR product의 DNA sequencing 분석을 통한 발효균총의 동정

- DGGE gel로부터 gel extraction을 통하여 분리 정제된 각 DGGE band들은 재차 PCR 증폭을 통하여 DNA sequencing에 필요한 충분한 DNA를 확보함
- DGGE 전기영동 후 gel extraction을 위하여 선택된 각 band들은 <그림 1-9>와 같음



<그림 1-9> 전통발효식품의 발효균총 조성분석용 DNA sequencing을 위한 DGGE내 band 선정

- 1, 포기김치 건더기    2, 포기김치 국물    3, 깍두기 건더기    4, 깍두기 국물    5, 백김치 건더기  
 6, 백김치 국물    7, 조개젓    8, 새우젓    9, 멸치젓    10, 메주

- PCR 증폭을 위한 primer의 DNA sequence는 5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGG GCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' (338f forward primer) 및 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (518r reverse primer)이며 PCR 증폭 조건은 <표 1-15>와 같음

<표 1-15> 발효균총의 동정을 위한 PCR 증폭 조건

Step	Temperature	Time	Cycle
Predenaturation	95°C	5 min	X 1
Denatuartion	95°C	1 min	X 30
Annealing	62°C	1 min	
Extension	72°C	2 min	
Extra extension	72°C	5 min	X 1

- PCR 증폭된 PCR product들을 QIAquick PCR purification kit를 이용하여 정제하였음
- DNA sequencing은 (주)마크로젠에서 진행하였음
- DNA sequencing후 얻어진 DNA 염기서열을 BLASTN 프로그램을 이용하여 각 DGGE band들의 발효균주들을 동정하였음
- 동정된 결과는 아래 <표 1-16>과 같으며, 이러한 결과를 바탕으로 DGGE 분석을 통한 전통 발효식품유래 발효균총의 종류는 <표 1-17>과 같음

<표 1-16> DGGE 분석으로부터 얻어진 각 band들의 동정

Sample No.	Samples	Band No.	Identified strains	Homology(%)
1	포기김치 건더기	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KC865284(100)
		2	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	KC545936(100) KC787547(100)
		3	<i>Lactococcus lactis</i>	EF204360(100)
2	포기김치 국물	4	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	KC545936(100) KC787547(100)
3	깍두기 건더기	5	<i>Weisella confusa</i> <i>Weisella cibaria</i>	KC834396(100) KC456621(100)
		6	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Leuconostoc garlicum</i>	KC545933(100) JQ805713(100)
		7	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	KC545936(100) KC787547(100)
		8	<i>Lactococcus lactis</i>	KC545916(100)
		9	<i>Pachycladon cheesemaniae</i> <i>Camelina sativa</i>	JQ806762(100) GABL01033948(100)
4	깍두기 국물	10	<i>Weisella confusa</i> <i>Weisella cibaria</i>	KC834396(100) KC456621(100)
		11	<i>Leuconostoc lactis</i>	KC836716(100)
		12	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	KC545936(100) KC787547(100)
		13	<i>Lactococcus lactis</i>	EF204360(100)
		16	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	KC545936(100) KC787547(100)
5	백김치 건더기	17	<i>Lactococcus lactis</i>	KC545916(100)
6	백김치 국물	20	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	KC545936(100) KC787547(100)
7	조개젓	22	<i>Weisella paramesenteroides</i>	KC426952(100)
		23	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GU458344(100)
8	새우젓	27	<i>Staphylococcus equorum</i>	GQ169122(100)
		28	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KC836745(100)
9	멸치젓	30	<i>Weisella paramesenteroides</i>	KC426952(100)
		31	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KC836745(100)
		32	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	AP012046(100)
10	매주	34	<i>Bacillus licheniformis</i>	HQ290087(100)
		35	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i>	KC595863(99) DQ379997(99)
			<i>Bacillus safensis</i>	KC967072(99)

<표 1-17> DGGE 분석을 통한 전통발효식품유래 발효균총의 종류

순번	Species	발효식품종류
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	포기김치 건더기, 조개젓, 새우젓, 멸치젓
2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	포기김치 건더기, 포기김치 국물, 깍두기 건더기, 깍두기 국물, 백김치 건더기, 백김치 국물
3	<i>Lactococcus lactis</i>	포기김치 건더기, 포기김치 국물, 깍두기 건더기, 깍두기 국물, 백김치 건더기
4	<i>Lactobacillus sakei</i>	포기김치 건더기, 포기김치 국물, 깍두기 건더기, 깍두기 국물, 백김치 건더기, 백김치 국물
5	<i>Weissella confusa</i>	깍두기 건더기, 깍두기 국물
6	<i>Weissella cibaria</i>	깍두기 건더기, 깍두기 국물
7	<i>Weissella paramesenteroides</i>	조개젓, 멸치젓
8	<i>Leuconostoc garlicum</i>	깍두기 건더기
9	<i>Pachycladon cheesemanii</i>	깍두기 건더기
10	<i>Camelina sativa</i>	깍두기 건더기
11	<i>Staphylococcus equorum</i>	조개젓
12	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	멸치젓
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	메주
14	<i>Bacillus subtilis</i>	메주
15	<i>Bacillus pumilus</i>	메주
16	<i>Bacillus safensis</i>	메주

- DGGE 분석 결과 주요 발효 균주로서 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus*, *Weissella paramesenteroides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* species가 검출되었음
- 이러한 다섯 가지의 species는 전통발효식품 내 유용발효균주의 주요한 부분을 차지할 것으로 생각되어짐
- DGGE 분석결과 김치류에서 주로 발견되는 genus는 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*이 분리 및 동정되었음
- *Weissella* genus strain들은 주로 젓갈류 및 깍두기에서만 동정됨

**마. Culture-dependent 방법 및 culture-independent 방법을 통하여 관찰된 전통발효식품 내 발효균총의 비교**

- AP-PCR 및 DGGE를 통하여 분석된 8가지 전통발효식품 내 발효균총을 비교한 결과 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Staphylococcus*가 우점종으로 관찰되었음
- 깍두기 건더기 샘플에서는 *Pachycladon cheesemanii*, *Camelina sativa*가 관찰되었는데, 이는 Culture-independent한 방법 특성상 문제가 될 수 있는 식물의 chloroplast가 함께 분석된 것으로 보여짐
- *Weissella*의 경우 김치류 중에서는 오직 깍두기에서만 관찰되는 것으로 AP-PCR 및 DGGE 결과에서 밝혀졌으며, 이들의 대부분이 *W. confusa* 및 *W. cibaria*에 속하는 것을 알 수 있었음
- DGGE 결과, 3종류의 젓갈에서 *Leuconostoc*이 모두 관찰되어 AP-PCR에서 우점종으로

보여진 *Staphylococcus*, *Bacillus*와는 서로 다른 결과를 나타내었으며, 특히 멸치젓의 DGGE 분석 결과 *Tetragenococcus halophilus*가 우점종으로 새롭게 밝혀졌음

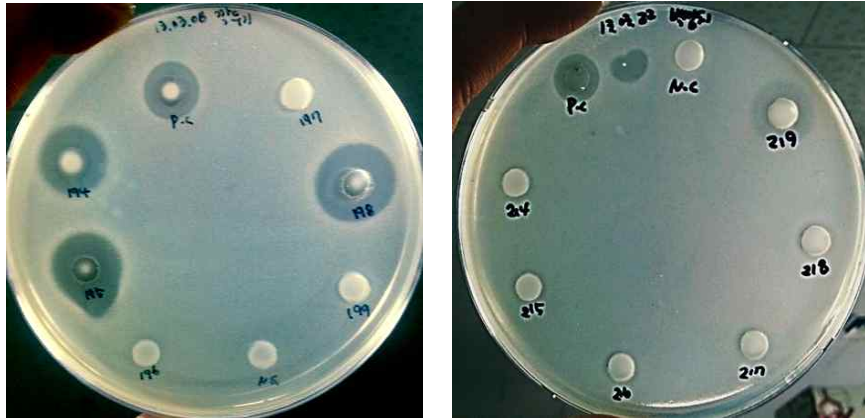
- *Tetragenococcus halophilus*의 경우 염도가 높은 (salt-rich) 배지에서 잘 자라는 균주 특성상 culturing에 사용한 배지의 한계에 의해 잘 분리되지 않아 AP-PCR 결과에서는 관찰되지 않았을 것으로 사료됨
- 메주 내 발효 균총의 AP-PCR 분석결과에서는 *Enterococcus*가 가장 우점하고 있으며, *Bacillus*가 두 번째로 우점하고 있는 것으로 관찰되었으나, DGGE 결과에서는 major하게 나타났던 band 2개 <그림1-9, band 34, 35> 모두 *Bacillus*에 속하는 균주로 분석되어 서로 다른 양상을 나타내었음

## 2. 균주 자원의 유전체정보를 바탕으로 한 기능성 균주의 선별 및 기능성 유전자의 분자생물학적 탐색

### 가. 전통발효식품 유래 박테리오신 유사물질 생산능을 가지는 기능성 우수 균주 선별

#### (1) 박테리오신 유사물질 생산능 평가

- 본 연구에서 분리한 1,589개의 전통 발효식품 유래 미생물 중 bacteriocin을 생산하는 유용 균주를 선별하기 위해 지표균주(*M. luteus*)를 이용한 standard well diffusion method를 활용하여 박테리오신 생산능을 측정하였음
- 각 균주가 성장하면서 만들어내는 다양한 유기산(젖산, 초산 등)에 의해 Indicator strain의 생장이 저해될 가능성을 방지하기 위해 100 mM의 PIPES buffer를 사용하였으며 이를 통해 배양액의 pH를 6.0~7.5로 유지시켜 배양 중 생성된 유기산에 의한 저해 가능성을 제거함
- 전통식품으로부터 분리된 각 미생물 배양 상층액 60 µl를 각각 well에 첨가하고 1시간동안 확산시킨 후 지표균주를 포함하는 0.5% 한천배지를 표면에 도포하여 37°C에서 5시간동안 배양하였음
- Positive control은 가장 잘 알려진 *Lactococcus lactis*에서 유래한 Nisin (Sigma, N5764, Jiangsu China)을 사용하여 발효균주들이 생산하는 박테리오신의 억제능과 비교함
- Standard well diffusion method를 통하여 준비된 한천배지를 배양 후 Bacteriocin으로 추정되는 물질에 의한 저해능을 확인한 결과예시는 <그림 1-10>와 같음

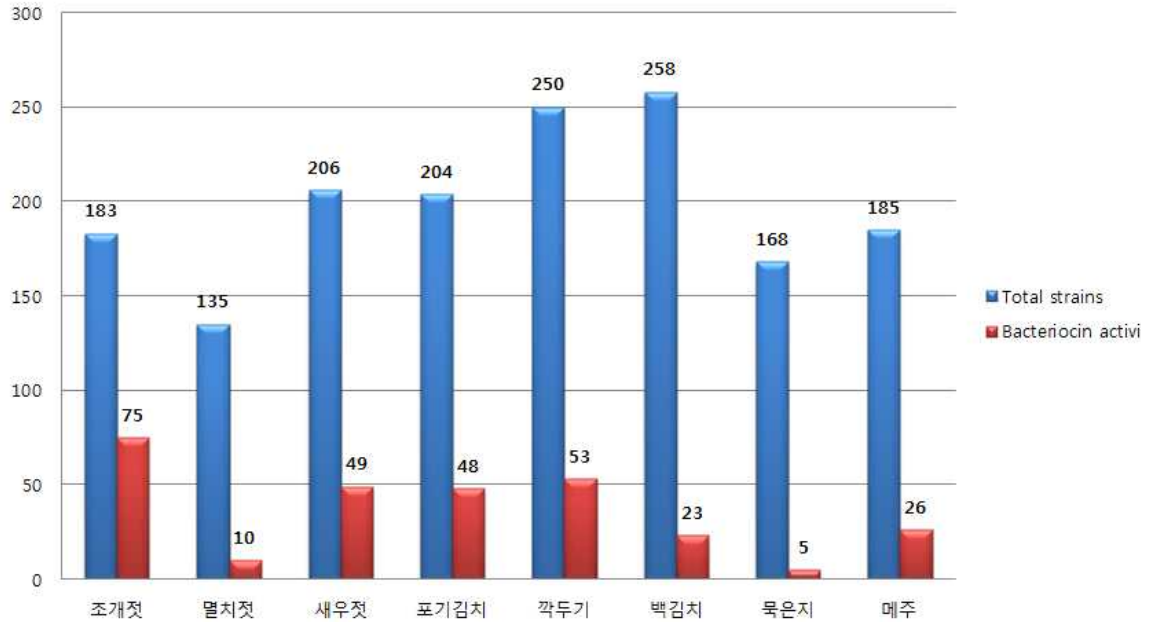


<그림 1-10> 지표균주(*M. luteus*)를 활용한 박테리오신 생산능 보유 발효균주의 확인 및 선발

(P.C.: positive control (nisin, 10 mg/mL); N.C.: molecular water)

- 위의 실험결과로부터 각두기유래 3균주 (194, 195, 198) 및 백김치유래 1균주 (219)가 선발됨
- 본 실험 결과를 바탕으로 전체 1,589 발효균주 중 18.2%에 해당하는 289종의 균주가 *M. luteus*에 대해 저해능을 가지는 bacteriocin-like compound를 생산하는 것을 확인함
- 각 전통식품별 bacteriocin-like compounds를 생산하는 균주의 비율 <그림 1-11>과 같음
- 본 연구의 목적은 기존에 잘 알려진 nisin 보다 미생물억제활성이 더 뛰어난 박테리오신을 생산하는 균주를 선발하는 것에 있으므로 nisin의 억제능과 비교를 통하여 우수 기능성 발효균주를 선발하였음.
- 항균활성을 가지는 것으로 확인 된 균주 중 Nisin 보다 더 높은 활성을 나타내는 균주 13종(ZA362, ZA372, ZA379, ZA394, ZA400, CB117, CB120, XA194, XA195, XA198, ZB204, WA219, WA241)을 우수 균주로 판단하여 최종적으로 선발하였음 <표1-18>
- <그림 1-11>의 실험결과에서 보듯이 조개젓유래 발효균주들이 박테리오신 생산능을 가장 많이 보유하고 있으며 새우젓, 포기김치, 각두기도 우수하였음
- Nisin 10mg/ml보다 활성이 우수한 발효균주는 총 13개의 균주가 최종 선발되었으며 묵은지에서 가장 많은 최종선발균주가 선발됨
- 따라서 최종선발균주가 많은 발효식품들과 박테리오신 생산능 보유균주가 많은 발효식품들과의 상관관계가 적었음





<그림 1-11> 전통식품 별 총 분리균주 및 항균 활성을 가지는 균주의 수

<표 1-18> 박테리옌 생산능 보유 균주 및 최종 선발된 균주

종류	박테리옌 생산능 보유 균주	최종 선택된 우수균주
조개젓	41% (75/183)	CB117, CB120
멸치젓	7.4% (10/135)	
새우젓	23.8% (49/206)	
포기김치	23.5% (48/204)	ZB204
깍두기	21.2% (53/250)	XA194, XA195, XA198
백김치	8.9% (23/258)	WA219, WA241
묵은지	3% (5/168)	ZA362, ZA372, ZA379, ZA394, ZA400
메주	14% (26/185)	
Total	18.2% (289/1,589)	

## (2) 박테리옌 유사물질 생산능 우수발효균주의 분자생물학적 동정

- 전통발효식품으로부터 분리된 각 발효균주를 최적액상배지에서 배양한 후 원심분리를 통해 cell을 수집함
- 선발된 발효균주의 cell을 molecular water를 이용하여 두 번 세척하여 배지성분을 제거하고 다시 200 ul의 새로운 molecular water에 cell을 풀어줌
- 세척된 cell을 Beadbeater를 이용하여 파쇄하고 spin down하여 상층액을 확보하여서 이를 DNA template로 활용함
- 기존에 알려져 있는 16S rRNA universal primer set을 활용하여 얻어진 상층액내 DNA template를 바탕으로 16S rRNA gene을 PCR로 증폭하고자 함 (예상크기 890 bp)
- 16S rRNA gene을 PCR로 증폭시키기 위해서 필요한 16S rRNA universal primer와 PCR

반응조건에 대한 정보는 각각 <표 1-19>, <표 1-20>와 같음

- PCR을 통해서 증폭된 16S rRNA PCR product는 890-bp의 사이즈를 가지며 이를 capillary sequencing 방법을 통하여 염기서열을 결정하고, BLASTN database와 비교하여 최종적으로 동정하였음

<표 1-19> 16S rRNA universal primer 정보

Primer	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Reference
16S-F	CAGCMGCCGCGGTAATWC	Lane et al. 1985. PNAS
16S-R	AGGCGCGGTGTGTRC	

<sup>a</sup>, M(A/C), R(A/G), W(A/T)

<표 1-20> PCR 반응조건

Step	Temperature (°C)	Duration time	Cycle number
Pre-denaturation	94	5 min	X 1
Denaturation	94	30 sec	X 30
Annealing	50	30 sec	
Extension	72	1 min	
Extra-extension	72	5 min	X 1

- 16S rRNA sequencing 방법을 통한 분자생물학적인 동정방법을 활용하여 최종선발된 13개의 발효균주를 모두 동정하였으며 그 결과는 <표 1-21>와 같음
- 7종의 발효균주가 *B. subtilis*로 동정되었으며 그 외에 *B. licheniformis*, *L. plantarum* 및 *B. bifidum*으로 동정되었음
- *B. bifidum* ZB204는 포기김치에서 분리되었으며 비피더스가 박테리오신을 생성한다는 것은 현재까지 단 1종의 보고밖에 없으므로 신종 박테리오신 생산능이 있는 유용균주로 향후 연구의 가치가 높을 것으로 판단됨 (참고문헌, Lee et al. 2008. BMC Genomics)
- 그 밖에 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. plantarum*은 기존에 박테리오신을 생산하는 균주로 알려져 있으므로 본 연구결과를 뒷받침할 것으로 생각됨

<표 1-21> 최종 선발된 균주의 16S rRNA 동정 결과

최종 선발 균주	동정 결과
WA219, WA241, ZA362, ZA372, ZA379, ZA394, ZA400	<i>Bacillus subtilis</i>
XA194, XA195, XA198	<i>B. licheniformis</i>
CB117, CB120	<i>Lactobacillus plantarum</i>
ZB204	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

### (3) 선발된 균주로부터 생산된 박테리오신 유사물질의 특성을 확인하기 위한 pH 및 열 안정성 평가

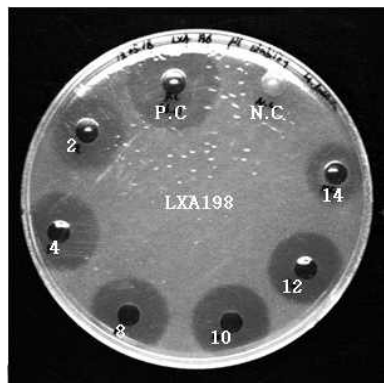
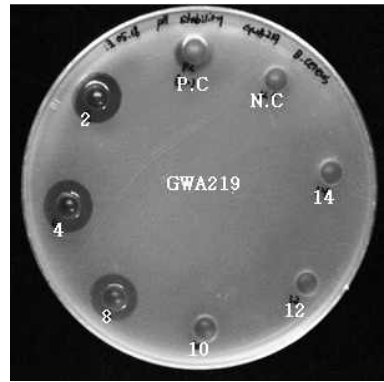
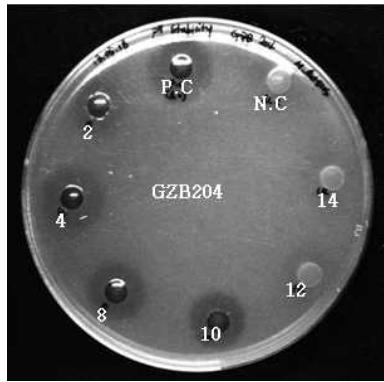
- 발효균주로부터 생산되는 박테리오신의 활용을 위해서는 다양한 식품의 조건이나

식품가공시 사용되는 열에 대한 내성이 필수적이므로 이러한 활용가능성을 확인하고자 pH 및 열에 대한 안정성 평가를 수행하였음

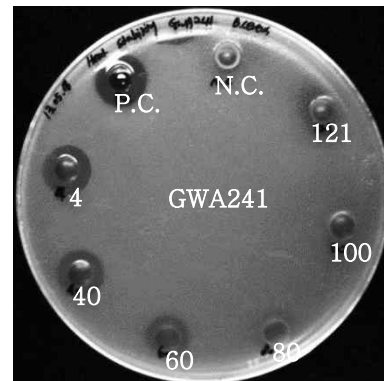
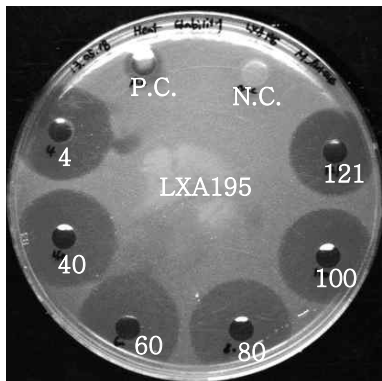
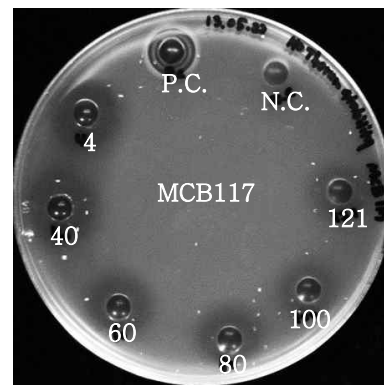
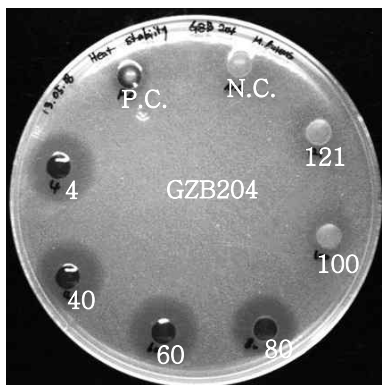
- 열 안정성은 배양액의 상층액을 취해 4°C, 40°C, 60°C, 80°C, 100°C, 121°C에서 15분간 반응하였음
- 충분히 식힌 후 standard well diffusion method를 통해 각 온도별 항균 활성 변화를 확인하였으며 positive control은 nisin (10 mg/ml)을 사용하였음
- pH 안정성은 PIPES buffer가 포함되지 않은 배지에서 배양한 후 상층액을 취해 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 2, 4, 8, 10, 12, 14로 변화 시켜 30분동안 상온에서 반응하였으며 1M PIPES buffer로 중화시켰음
- Standard well diffusion method를 통해 각 pH별 항균 활성 변화를 확인하였으며 positive control은 원래 배양액의 상층액 (pH 6)을 사용하였음
- 박테리옌 유사물질의 pH 및 열에 대한 안정성 평가 결과는 <표 1-22>와 같음
- 결과적으로 각 항균활성 물질은 대체적으로 내산성을 보이나 강염기조건에서는 항균 활성도가 다소 감소하였으며, 열에는 높은 안정성을 보였음. <그림 1-12> 및 <그림 1-13> 참조

<표 1-22> 선발된 균주로부터 유래한 박테리옌 유사물질의 pH 및 열 안정성

Sample	Stable pH range	Stable temperature range
XA194	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 2~12 (Stable)</li> <li>• pH 10 이상에서 활성을 잃기 시작함</li> </ul>	4~121°C
XA195		
XA198		
CB117	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 2~8 (Stable)</li> <li>• pH 10 이상에서 활성을 잃기 시작함</li> </ul>	4~100°C
CB120		
ZB204	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 2~10 (Stable)</li> <li>• pH 12 이상에서 활성을 잃기 시작함</li> </ul>	4~80°C
WA219	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 2~8 (Stable)</li> <li>• pH 10 이상에서 활성을 잃기 시작함</li> </ul>	4~80°C
WA241		
ZA362	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 2~8 (Stable)</li> <li>• pH 10 이상에서 활성을 잃기 시작함</li> </ul>	4~121°C
ZA372		
ZA379		
ZA394		
ZA400		



<그림 1-12> 최종선발된 발효균주유래 박테리오신 유사물질의 pH 안정성 비교



<그림 1-13> 최종선발된 발효균주유래 박테리오신 유사물질의 열 안정성 비교

(4) 다양한 식중독 균을 활용한 발효균주유래 박테리오신 유사물질의 Host range 평가

- 발효균주로부터 생산되는 박테리오신의 활용을 위해서는 pH 및 열에 대한 안정성에 더하여 다양한 미생물들을 저해하는 것이 중요하므로 이를 평가하고자 다양한 식중독균을 대상으로 host range analysis를 수행하였음
- 박테리오신의 host range 평가를 위한 식중독 지표균주는 각각 네 종류씩 그람음성균 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter sedlakii*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium) 및 그람양성균 (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*)를 선정함. <표 1-23> 참조
- Positive control로는 Gram negative에서 bovine lactoferrin (250 mg/ml), Gram positive에서 nisin (10 mg/ml)을 사용하였음
- Host range 평가는 Standard well diffusion method를 이용하여 측정되었으며 사용된 top agar는 균주별 최적 배지 조건을 고려하여 LB(*E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*), NA(*C. sedlakii*), BHI(*S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. faecalis*)를 사용하였음

<표 1-23> 박테리오신의 Host range 평가를 위한 지표균주 및 배양조건

Gram 염색	균주	배지
Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LB
	<i>E. coli</i> O157:H7	LB
	<i>Citrobacter sedlakii</i>	NA
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LB
Gram (+)	<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI
	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI

<표 1-24> Host range analysis 결과

Indicator strain		ZA 362	ZA 379, 394	ZA 372, 400	XA 194, 195, 198	ZB 204	WA 219	WA 241	CB 117, 120
		Group I			Group II				Group III
Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	CL
	<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	CL
	<i>Citrobacter sedlakii</i>	-	-	-	-	-	-	-	CL
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	I	I	I	-	-	-	-	CL
Gram (+)	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	I	C	I	I	I
	<i>Bacillus cereus</i>	I	-	C	C	-	-	CL	C
	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	I	I	I	I
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	I

\* CL, clear and large zone; C, clear zone; I, growth inhibition zone; -, no clear zone

- <표 1-24>에 보이는 것과 같이 host range 평가 결과, 세 가지 그룹으로 나눌 수 있었으며 Group I (ZA362, ZA372, ZA379, ZA394, ZA400)은 주로 *Salmonella*를 억제할 수 있고, Group II (XA194, XA195, XA198, ZB204, WA219, WA241)의 경우는 그람양성균만을 저해하는 특징이 있으며 Group III (CB117, CB120)의 경우는 특이적으로 그람음성균을 강하게 저해하는 특성을 보였음
- Group I의 경우 모든 균주가 *B. subtilis*에 속하며 그람음성균인 *Salmonella*를 저해하는 특징을 보여주어 일반적인 박테리오신이 그람양성균만을 저해하는 것과 차이를 보임
- Group II의 경우 그람양성균만 저해하는 경향을 보였는데 이는 일반적인 박테리오신의 저해능과 유사하며, 이 중 *B. licheniformis* (XA194, XA195, XA198) 및 *B. subtilis* (WA241)은 *B. cereus*에서 강한 활성을 보였음
- Group II에 속하는 *B. bifidum* ZB204는 그람양성균만 저해하며 그 중 *L. monocytogenes*에 대한 강한 저해를 보여주었음
- Group III의 경우 그람양성균 및 그람음성균을 모두 저해하나 특히 그람음성균에 대한 저해가 탁월하여 기존의 박테리오신과는 차별화되어짐 (참고문헌, H.S. Gong et al., Food Control 21:89 - 6, 2010)

**(5) 박테리오신 유사물질로부터 박테리오신의 활성을 위한 Proteolytic analysis 수행**

- Bacteriocin은 미생물에서 생산하는 항균활성을 가지는 펩타이드이므로 proteolytic enzyme에 의해 분해되어 그 활성을 잃게 되는 특징을 가지므로 이를 이용하여 박테리오신 활성을 할 수 있음
- 따라서 선발된 각 균주의 상층액에 proteolytic enzyme을 처리하여 활성도를 비교함으로써 그 물질이 bacterocin인지의 여부를 확인할 수 있음
- 본 실험에서는 proteolytic enzyme은 proteinase K, pronase E, pepsin, thermolysin, trypsin, α-chymotrypsin으로 총 6종이 사용되었으며 반응 조건은 <표 1-25>과 같음

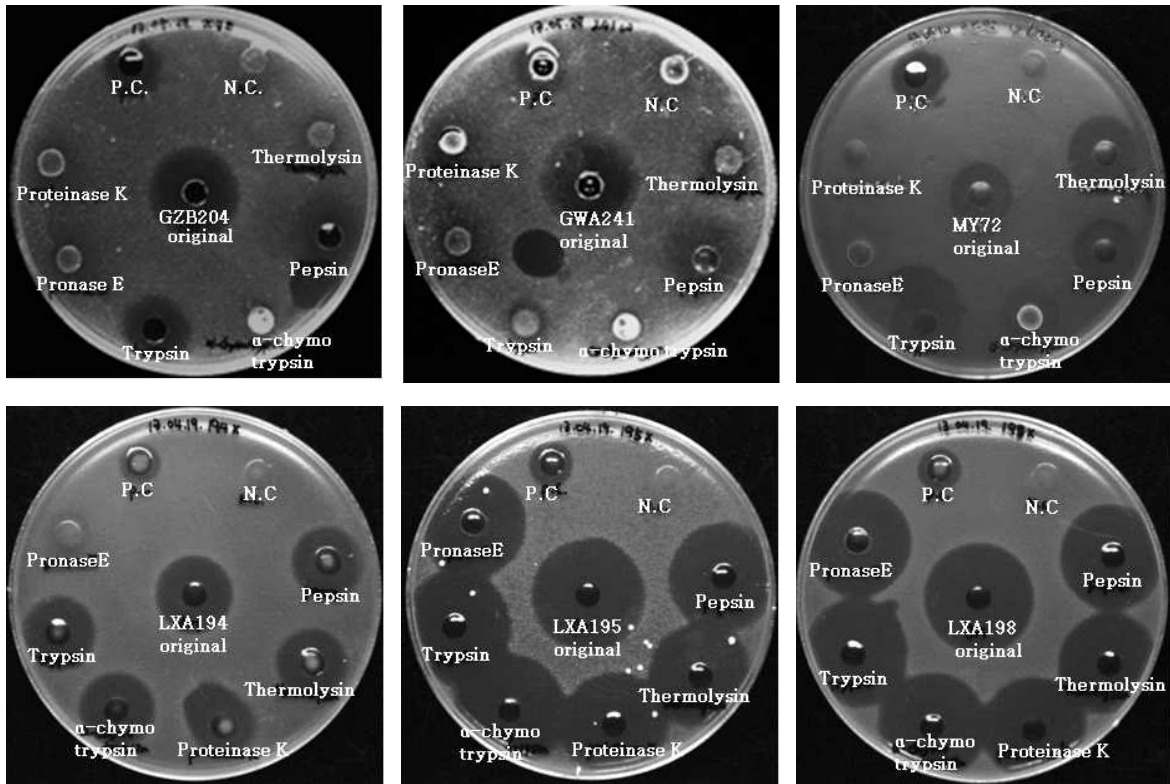
<표 1-25> Proteolytic analysis에 사용된 enzyme 및 반응 조건

Enzyme	Enzyme buffer	Incubation temperature(℃)	Working Units for 100µl samples (U)
Proteinase K	10mM Tris·HCl, pH 7.5	37	120
Pronase E	20mM Tris·HCl, pH 7.5		110
Pepsin	2mM Tris·HCl, pH 2.0		173
Thermolysin	10mM Tris·HCl, pH 7.2		120
Trypsin	10mM Tris·HCl, pH 7.6		95
α-chymotrypsin	80mM Tris·HCl, pH 7.8	25	102

- 효소는 26시간 동안 처리하였으며 반응시간 이후 10분간 끓여 단백질 분해효소의 활성을

제거하였음

- 효소에 의한 각 샘플의 항균 활성의 변화를 standard well diffusion method로 측정하였으며 그 결과는 <그림 1-14> 및 <표 1-26>와 같음
- Control로써는 단백질 분해효소를 처리하지 않은 원래의 배양 상층액을 이용하였음
- 본 실험을 통해 13종의 샘플 중 XA195, XA198은 모든 효소 반응 이후에도 항균 활성이 저해되지 않았으므로 bacteriocin이 아니라고 추정됨
- 이 밖에 11종의 샘플은 일부 효소에 의해 항균 활성이 저해되는 것으로 보아 펩타이드로 이루어진 bacteriocin이라고 판단됨
- 향후 본 연구를 통해서 선발된 발효균주들은 발효식품의 기능성을 높이기 위한 기능성 발효균주로 사용될 수 있을 것으로 생각됨



<그림 1-14> 박테리오신의 proteolysis이후 미생물 저해능 비교평가

<표 1-26> Proteolytic enzyme 처리 후 각 sample의 활성화도 변화

	Z A 36 2	Z A 37 2	Z A 37 9	Z A 39 4	ZA 400	WA 219	WA 241	XA 194	XA 195	XA 198	ZB2 04	CB1 17	CB1 20
Proteinase K	△	△	△	△	■	△	△	-	-	-	■	■	△
Pronase E	■	■	■	■	■	△	△	■	-	-	■	△	△
Trypsin	△	-	-	△	■	■	■	-	-	-	△	△	■
α-chymotrypsin	-	-	-	△	■	■	■	-	-	-	■	△	■
Thermolysin	-	-	-	△	-	■	■	-	-	-	■	■	△
Pepsin	△	-	△	△	△	△	△	-	-	-	■	-	△

■: no activity, △: reduced activity - : activity

## 나. 전통발효식품 유래 혈전용해능을 가지는 기능성 우수 균주 선발

### (1) 혈전의 형성과정 및 전통발효식품의 혈전용해능 연구 보고

혈액 내 존재하는 fibrinogen은 글로불린에 속하는 단백질로 혈액응고의 중심적 역할을 하는데, 효소 트롬빈과 반응하여 불용성인 fibrin이 되어 혈전을 일으킴

Plasmin은 혈액 중에 있는 단백질분해효소의 일종으로 fibrin으로 이루어진 혈전을 분해하거나 혈액응고를 저해함. 보통은 전구체인 Plasminogen으로 존재하며 plasminogen activator의 작용으로 plasmin이 됨

응고된 fibrin은 체내에 존재하는 plasmin에 의해 용해될 수 있으나 노화가 진행됨에 따라 plasmin activator의 양이 줄거나 plasmin 자체의 활성이 떨어지면서 제 기능을 하지 못하게 되면 혈전이 형성되어 뇌졸중, 치매, 당뇨 등과 같은 혈관계 질병을 유발하는 원인이 됨  
현재 일본의 발효식품인 natto에서 분리한 *Bacillus subtilis natto*가 생산하는 혈전용해 효소인 nattokinase를 가지고 기능성 식품으로서의 개발을 시도한 바 있으며, 우리나라의 전통 발효 음식에도 혈전용해작용이 보고 된 바 있음 (정영기 외 4명, 김치의 혈전용해작용, 생명과학회지, 1995, 5(4):203-210)

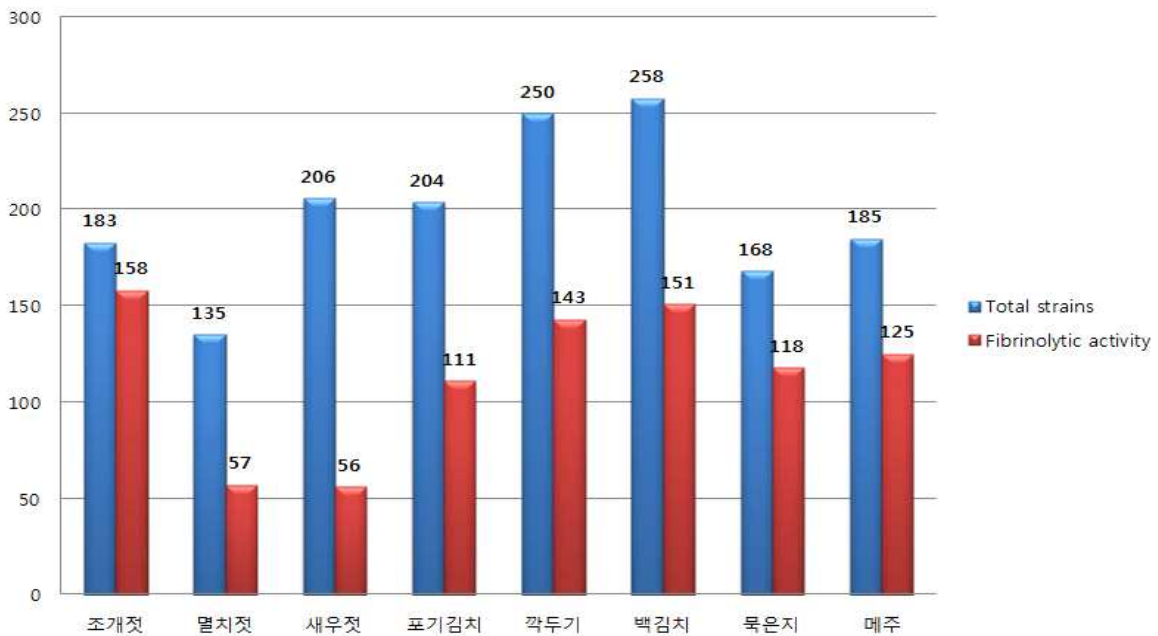
따라서 이번 연구에서는 fibrin plate method를 이용하여 한국의 전통발효식품 유래 균주들에서 이러한 혈전용해능을 가지는 발효균주를 선별하고 이들 중 우수한 균주를 선별하여 전통발효식품의 기능성을 증대시키는 우수발효균주로 활용하고자 함

### (2) 전통발효식품유래 발효균주의 혈전용해능 평가

- 20 unit의 thrombin 100  $\mu$ l를 petri dish에 spotting한 후 0.3% fibrinogen 10 ml 을 조심스럽게 부은 후 거품이 생기지 않게 섞어 30 min 동안 상온에서 반응시킴
- 생성된 fibrin plate에 6 mm paper disc를 올린 후, PIPES buffer에 의해 pH가 조정된 배양 상층액 sample 15  $\mu$ l을 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킴



- positive control은 0.02 unit plasmin, negative control은 molecular water 사용
- 반응 후 fibrin의 분해정도에 따라 혈전용해능의 유무를 판단
- 8종의 전통발효식품으로부터 분리된 1,589개의 발효균주에 대하여 혈전용해능을 평가해본 결과는 <그림 1-15>와 <표 1-27>과 같음
- 전체 발효균주 중 919 균주가 혈전용해능을 보여 <표 1-27>와 같이 총 57.8%의 발효균주가 혈전용해능을 가지고 있는 것으로 파악되었음
- 일반적으로 혈전용해능이 우수한 것으로 알려진 메주 (67.6%)의 경우보다는 본 연구에서는 조개젓(86.3%)유래 발효균주의 혈전용해능이 훨씬 보편적이며 강한 것으로 보여졌음
- 최종선발된 혈전용해능 우수발효균주는 대부분 조개젓 및 포기김치에서 분리되었음



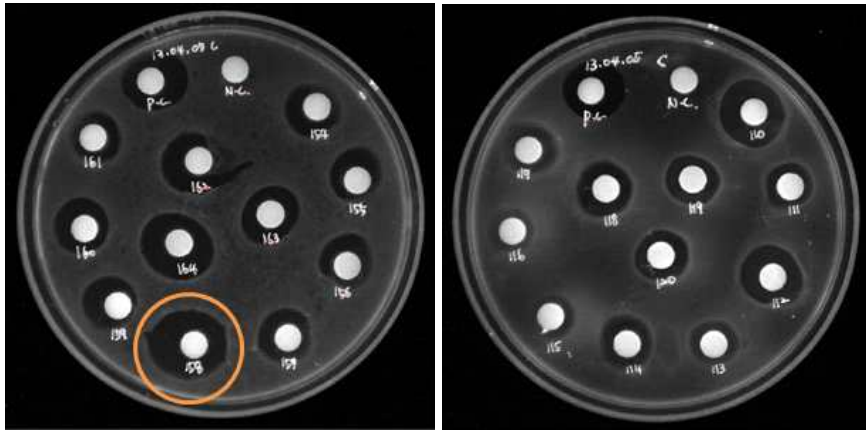
<그림 1-15> 전통식품 별 총 분리균주 및 혈전용해능을 가지는 균주의 수

<표 1-27> 전통발효식품유래 발효균주의 혈전용해능 평가 결과

sample	혈전용해 활성균주	최종 선택된 우수균주
조개젓	86.3% (158/183)	CA082, CB110, CB125, CB126, CB158
멸치젓	42.2% (57/135)	EB133
새우젓	27.2% (56/206)	SA175, SB179
포기김치	54.4% (111/204)	ZA003, ZA007, ZA024, ZB140, ZB193
깍두기	57.2% (143/250)	
백김치	58.5% (151/258)	
묵은지	70.2% (118/168)	ZA400
메주	67.6% (125/185)	JA085
Total		57.8% (919/1589)

(3) 혈전용해능 우수발효균주의 분자생물학적 동정

- 혈전용해능을 보이는 919 균주 중 <그림 1-16>과 같이 활성이 Positive control (0.02 unit plasmin)보다 강한 균주를 15종 <표 1-28> 선발하여 동정하였음
- 이 15종의 균주들을 대상으로 혈전용해능 기능성 유전자를 탐색하여 가장 우수한 인체 대사성 질환관련 기능성 식품소재생산균주를 개발하고자 함



<그림 1-16> 혈전용해능을 가지는 우수 균주 선발

<표 1-28> 최종선발된 혈전용해능 우수발효균주의 분자생물학적 동정

Selected bacteria	Identification result
ZA007, SA175	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
ZB140	<i>Lactobacillus curvatus</i>
CB110	<i>Propionibacterium acnes</i>
JA085	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
ZA003	<i>Staphylococcus hominis</i>
EB133, SA179	<i>Staphylococcus warneri</i>
CB158	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ZA400	<i>Bacillus subtilis</i>
ZA024	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZB193	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
CA082, CB125, CB126	<i>Weissella paramesenteroides</i>

다. 축적된 기능성 유전체정보를 활용한 인체 대사성 질환관련 기능성 식품소재생산균주의 개발

(1) 축적된 기능성 유전체 정보를 활용한 기능성발효미생물의 기능성 유전자 증폭

- 동정된 균주 들 중 full genome sequencing이 완료된 표준 균주로는 *Leuconostoc mesenteroides* J18, *Lactobacillus curvatus* CRL705, *Propionibacterium acnes* HL096PA1, *Bacillus subtilis* LSSE-22 , *Bacillus licheniformis* NH1, *Bifidobacterium bifidum* BGN4 등 이었음

- 위의 bacterial full genome sequence에서 serine protease enzyme의 CDS gene sequence를 NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)를 통해 확보함
- 확보한 혈전용해 기능성 유전자를 바탕으로 해당 유전자의 CDS gene에서 종결코돈을 제외하고 양 끝에 특정 제한효소 (*XhoI*, *BamHI*, 또는, *HindIII*) 자리를 같도록 <표 1-29> 같은 primer set을 제작하였음

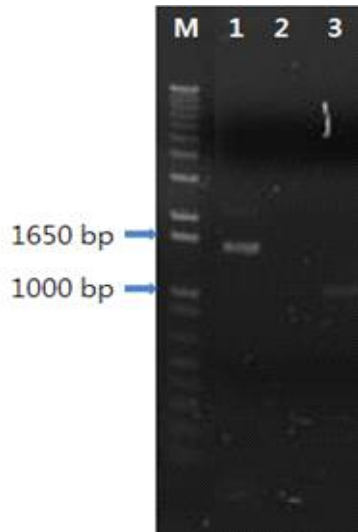
<표 1-29> 혈전용해 기능성 유전자 증폭을 위한 primer set

No.	Sequence (5' to 3')	PCR product size (bp)	Target bacterium
1	F : GGATCCGATGAATCAGAATTCAGGATTAATG R : CTCGAGTTTTGCTGCTGTTGTACTATCTG	1,249	<i>Lac. curvatus</i>
2	F : GGATCCGATGATGTATAACGATGACGC R : CTCGAGGTTCAACATATAGCCGCTATTC	1,627	<i>Leu. mesenteroides</i>
3	F : AAGCTTATGGTACAACCAGCATTAACAA R : CTCGAGGCTTGCTAATTTCTGTGTTAATTT	1,149	<i>Leu. mesenteroides</i>
4	F : AAGCTTATGGCACTACGCCGTACG R : CTCGAGGGCCGATTTTGCAGCC	1,482	<i>P. acnes</i>
5	F : GGATCCGATGGCGCACATCCTCGA R : CTCGAGGGCGCACTGCAACGTCC	1,204	<i>P. acnes</i>
6	F : GGATCCGGTGAAGGCCGGATGCG R : CTCGAGCTAGGCGGCTGTTCCG	1,654	<i>B. bifidum</i>
7	F : GGATCCGATGAGAAGCAAAAATTGTGGAT R : CTCGAGTTGTGCAGCTG	1,156	<i>B. subtilis</i>

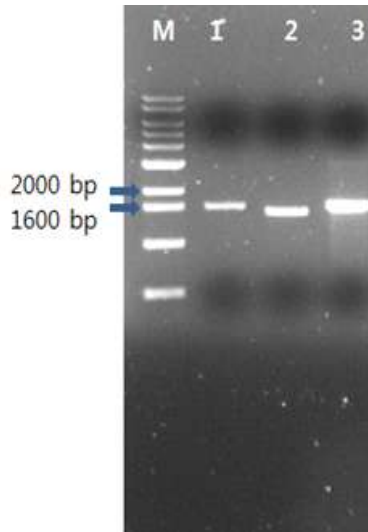
- 새로 제작된 fibrinolytic enzyme 유전자를 targeting하는 각각의 primer set을 이용하여 PCR 증폭을 하고 이를 통하여 해당 유전자 DNA을 얻고자 하였음
- 각 해당 박테리아의 total DNA를 얻기 위하여 배양된 균체를 bead-beating 방법 (30초간)을 활용하였고 얻어진 각 박테리아의 total DNA를 PCR DNA template로 활용함
- <표 1-28>의 PCR 증폭 조건으로 PCR 증폭시 error를 없애기 위하여 *pfu* 계열의 polymerase를 이용하여 PCR을 진행하여 혈전용해 기능성 유전자를 증폭하였으며, <그림 1-17>과 같이 PCR 증폭 산물을 얻음

<표 1-30> 혈전용해능 기능성 유전자 증폭을 위한 PCR 조건

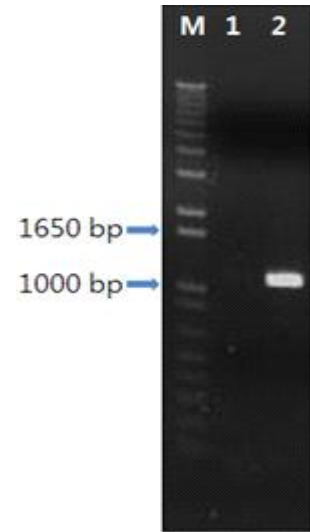
Step	Temperature	Time	Cycle
Pre-denaturation	94°C	3 min	X 1
Denaturation	94°C	15 sec	X 25
Annealing	57°C	40-100 sec	
Extension	68°C	80 sec	
Extra extension	68°C	5 min	X 1



M : 1 kb plus DNA ladder  
 1 : *B. bifidum* ZB193  
 (1,954 bp)  
 2 : *Lac. curvatus* ZB140  
 (1,249 bp)  
 3 : *P. acnes* CB110  
 (1,204 bp)



M : 1 kb DNA ladder  
 1 : *Leu. mesenteroides* ZA007  
 (1,627 bp)  
 2 : *P. acnes* CB110  
 (1,482 bp)  
 3 : *Leu. mesenteroides* SA175  
 (1,627 bp)



M : 1 kb plus DNA ladder  
 1 : Negative control  
 2 : *B. subtilis* ZA400  
 (1,156 bp)

<그림 1-17> 혈전 용해 유전자 PCR의 전기영동 결과

- 얻어진 PCR product들은 agarose gel extraction 방법을 활용하여 각각 정제하여 클로닝의 insert DNA로 사용함

(2) 증폭된 기능성 유전자의 대장균 발현시스템으로의 클로닝

(가) pGEM-T Easy vector로의 클로닝을 통한 혈전용해 기능성 유전자 염기서열 확인

- 앞서 Fibrinolytic enzyme 유전자를 증폭하기 위하여 사용된 *Pfu* DNA polymerase는 T-vector에 클로닝하기 위한 A-tailing을 만들지 않기 때문에 추가적으로 A-tailing 반응을 진행하였음.
- PCR 및 agarose gel extraction을 통하여 대량 증폭후 정제된 혈전용해 기능성 유전자를 <표 1-31>와 mixture로 72°C에서 20 분간 반응하여 A-tailing하였음
- A-tailing이 끝난 혈전용해 기능성 유전자는 gel extraction kit를 통해 다시 정제함

<표 1-31> A - tailing mixture 조성

Mixture 조성	Volume ( $\mu\text{l}$ )
PCR product	27.5
Taq polymerase	0.5
dATP	8
10X buffer	4
Total	40

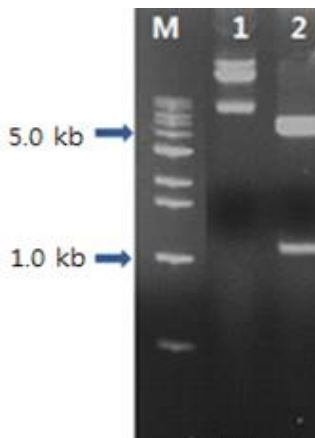
- A - tailing 후 정제가 끝난 혈전용해능 기능성 유전자를 pGEM-T easy vector에 클로닝하기 위하여 정제된 기능성유전자 3.5  $\mu\text{l}$ 와 pGEM - T Easy vector 1  $\mu\text{l}$ , 2X Quick ligase buffer 5  $\mu\text{l}$ , Quick ligase 0.5  $\mu\text{l}$ 를 섞은 후 상온에서 5분간 반응함
- 5분간 반응 후 ice에서 1 - 2분간 넣어둔 혈전용해능 기능성 유전자 5  $\mu\text{l}$ 를 ice 상에서 녹여놓은 *E. coli* DH5a에 넣어 준 후 30분간 방치함
- 혈전용해능 기능성 유전자를 넣어 준 *E. coli* DH5a를 42°C에서 1분 30초간 heat shock을 준 후 ice에서 5분간 식혀줌
- 이 후 LB broth 800  $\mu\text{l}$ 를 넣어 준 후 37°C에서 1시간 배양함
- 배양이 완료 된 균주는 50  $\mu\text{g/ml}$  의 Ampicillin LB agar plate에 50  $\mu\text{l}$ 의 X-gal (20 mg/ml)을 먼저 spreading 완료 후 배양액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 두 plate spreading 하였으며 남은 800  $\mu\text{l}$ 를 100  $\mu\text{l}$ 로 농축하여 최종 spreading 완료하여 37°C에서 12시간 배양함
- 배양이 완료된 Ampicillin LB agar plate/X-gal에서 흰색 colony만을 선별하여 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin이 포함된 LB broth에 접종하여 37°C에서 12시간 배양함
- 배양이 완료 된 후 Axygen plasmid mini-prep kit를 이용하여 plasmid를 분리, 정제한 후 pGEM - T Easy Vector의 universal primer (Forward : T7 5'-AATACGACTCACTATAG-3', Reverse : SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')를 이용하여 DNA sequencing함으로써 PCR error가 없음을 확인하였음
- 분리 및 정제된 plasmid들은 *Bam*HI/*Xho*I 또는 *Hind*III/*Xho*I으로 double digestion하여 insert DNA 삽입을 정확하게 확인한 후 이후 과정을 진행하였음

(나) 정제된 fibrinolytic enzyme 유전자의 pET26b(+) Vector로의 클로닝 및 *E. coli* BL21(DE3)pLysS system을 통한 혈전용해 효소의 대량 발현

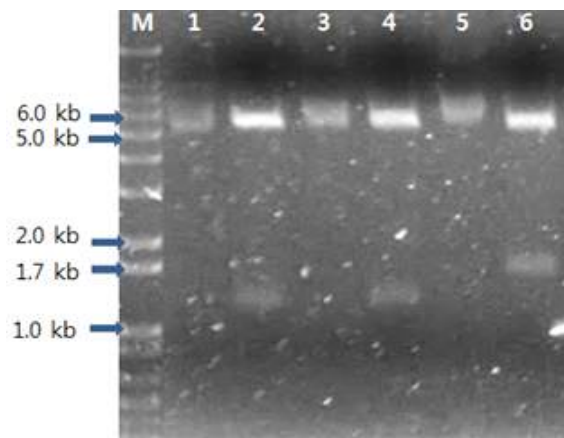
- *E. coli*로의 외래 유전자 삽입 system은 기능성 단백질의 대량 발현을 위해 현재 가장 많이 사용되어지고 있으나, 대량 배양 시 기능성 단백질이 inclusion body를 형성하여 activity가 없거나, 세포 내에 단백질이 생성되어 sonication 등의 과정을 거쳐야 하는 문제점이 있음
- 이러한 문제점을 해결하기 위하여 셀 내부에 생성된 외래 기능성 단백질을 생성과 동시에 셀 밖으로 배출하는 secretion system을 사용하기로 함
- 이를 위하여 pET26b(+) vector는 *pe*IB secretion 유전자를 가지고 있어 클로닝된 유전자의

발현 직후 외부로 secretion할 수 있도록 도와줌

- pGEM-T Easy vector에 클로닝 된 insert DNA (fibrinolytic enzyme)를 *Bam*HI과 *Xho*I 또는 *Hind*III와 *Xho*I을 통해 Double digestion하고 agarose gel extraction kit를 사용하여 충분한 양의 정제된 insert DNA (*Hind*III/*Xho*I 또는 *Bam*HI/*Xho*I -digested)를 확보함
- 확보된 insert DNA를 pET26b(+) vector에 Quick ligase kit를 이용하여 multiple cloning site (MCS) 내 *Hind*III 및 *Xho*I site로 cloning 후 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 transformation을 진행하였고 kanamycin을 포함한 agar plate에서 선발하여 plasmid 분리정제를 진행하였음
- 분리정제된 plasmid를 확인하기 위하여 *Bam*HI 및 *Xho*I 또는 *Hind*III 및 *Xho*I으로 double digestion을 하고 agarose gel electrophoresis한 결과 <그림 1-18>와 같음



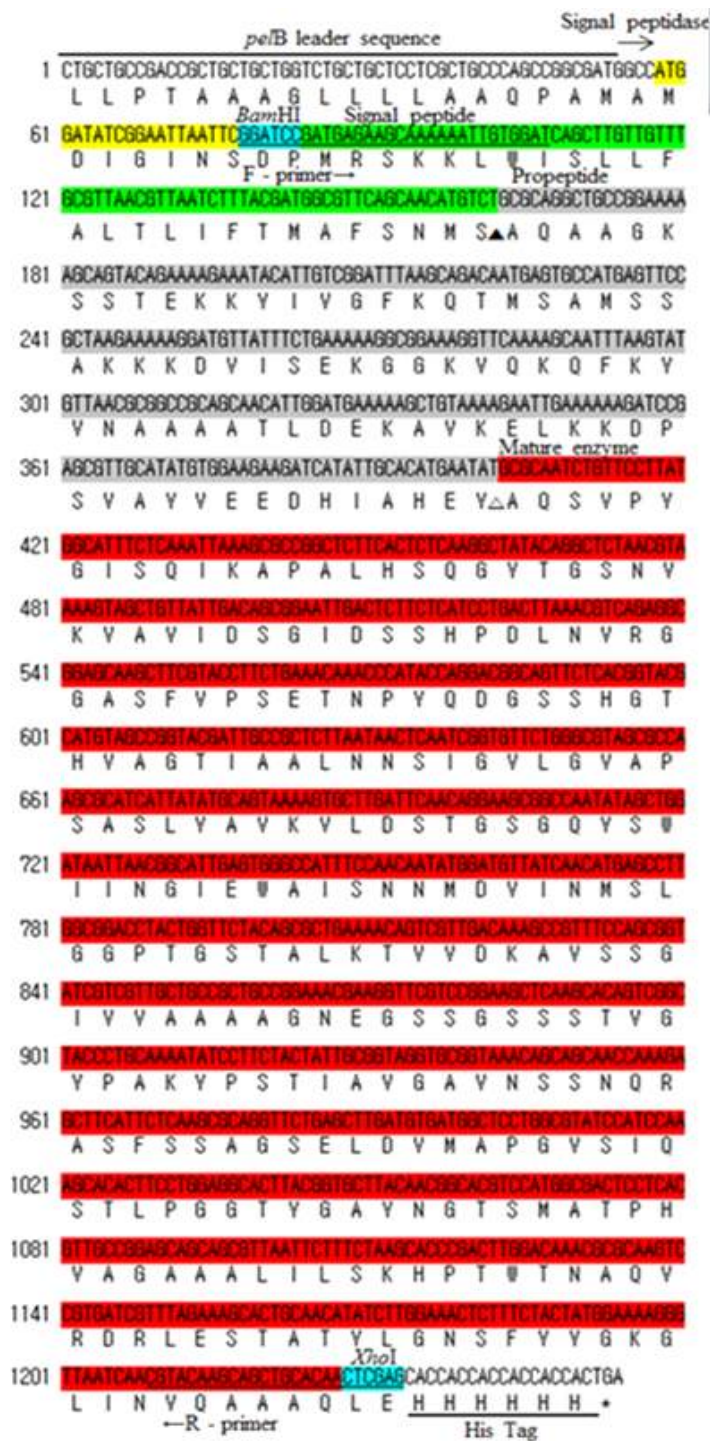
M : 1 kb DNA ladder  
 1 : Transformant ZA400 (no cut)  
 2 : Transformant1 ZA400  
 (*Bam*HI, *Xho*I - 1,156 bp)



M : 1 kb plus DNA ladder  
 1 : Transformant SA175 (no cut)  
 2 : Transformant SA175  
 (*Bam*HI, *Xho*I - 1,627 bp)  
 3 : Transformant ZA007 (no cut)  
 4 : Transformant ZA007  
 (*Bam*HI, *Xho*I - 1,627 bp)  
 5 : Transformant ZB140(no cut)  
 6 : Transformant ZB140  
 (*Hind*III, *Xho*I - 1,249 bp)

<그림 1-18> pET26b(+) Vector로의 혈전용해능 기능성 유전자 클로닝 전기영동 확인

- 클로닝이 완료되어 전기영동으로 확인한 transformant는 pET26b(+) vector의 universal primer (Forward : T7 promoter 5' - TAATACGACTCACTATAGGG ' 3', Reverse : T7 Terminator 5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3')를 이용하여 최종 클로닝 product의 sequence를 확인함
- 최종 클로닝 product sequence 확인을 통해 frameshift의 여부를 확인하였으며 그 결과 중 *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme gene (*bsf4*) 클로닝 결과는 <그림 1-19>와 같음

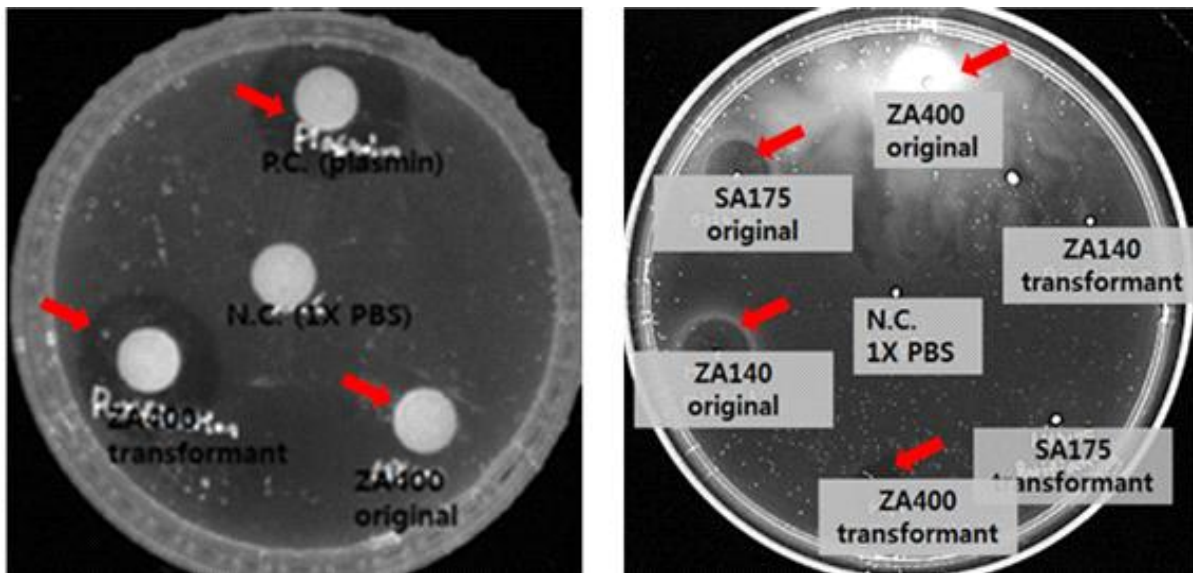


Yellow : Signal peptidase  
 Blue : Restriction enzyme  
 Green : Signal peptide  
 Gray : Propeptide  
 Red : Mature enzyme

<그림 1-19> *Bacillus subtilis* 의 fibrinolytic enzyme 유전자 (*bsfA*) 클로닝 염기서열 분석결과

- Insert DNA의 염기서열 분석결과 frameshift가 일어나지 않고 올바르게 insert DNA가 삽입된 최종 pET26b(+)-*bsfA* vector가 선발되었으며 이를 포함하는 *E. coli* BL31(DE3)pLysS transformant는 80% glycerol과 섞어 저장균주 (최종농도 15%)로 제작함

- 대량발현을 위해 5 ml LB (50 ug/ml kanamycin 함유) 배지에 혈전용해 기능성 유전자가 도입된 대장균 저장균주를 접종하여 37°C에서 12시간 배양하여 seed culture를 제작함
- 신선한 LB 배지 100 ml (50 ug/ml kanamycin 함유)에 seed culture를 1/100 접종하여 subculture를 진행함
- Subculture의 O.D.<sub>600nm</sub>이 0.6이 될 때까지 37°C에서 배양 후 IPTG를 최종 농도 1 mM이 되도록 넣어 준 후 20°C에서 24시간 발현함
- 발현된 fibrinolytic enzyme은 standard fibrin plate method를 통해 <그림 1-20>과 같이 혈전용해능을 확인함



<그림 1-20> 대량발현된 혈전용해 효소의 혈전용해능 확인

- Standard fibrin plate method를 활용한 fibrin lysis test 실험 결과, *Leu. mesenteroides* SA175와 *Lac. curvatus* ZA140은 원 균주에서는 활성을 보였으나 cloning 및 IPTG induction을 통한 활성측정에서는 활성을 보이지 않아, 각 insert DNA들이 fibrinolytic enzyme이 아님을 확인함 <그림 1-20>
- 그러나 포기김치유래 *B. subtilis* ZA400은 원 균주 및 대량발현시스템을 통하여 얻어진 물질 모두 활성을 보여 insert DNA에 들어있는 유전자가 fibrinolytic enzyme 유전자임을 확인하였음. 따라서 추후 연구에서는 이 유전자를 바탕으로 진행되었음.

### (3) 발현된 기능성 식품소재의 분리정제 및 생산검증

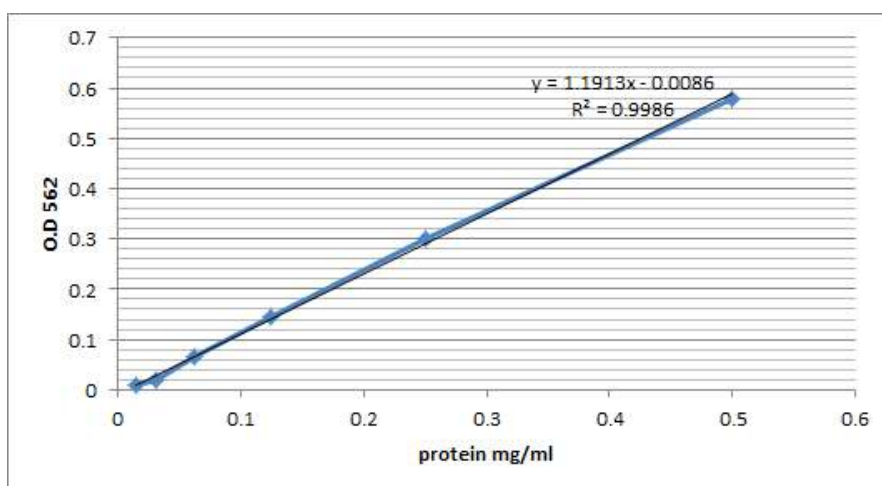
#### (가) 대량발현 된 혈전용해 효소를 Ni-NTA column을 이용한 정제

- 혈전용해 효소의 대량 발현을 위해 사용된 pET26b(+) vector에는 His-Tag이 coding되어 있기 때문에 외래 유전자의 발현시 이 His-Tag을 이용하여 정제할 수 있음. 또한



fibrinolytic enzyme인 BsfA는 IPTG induction에 의하여 상층액으로 분리되므로 본 연구에서는 이러한 His-Tag과 결합하는 Ni-NTA column을 이용하여 상층액내 혈전용해 효소를 순수 정제함

- 대량 발현된 혈전용해 기능성 효소를 얻기 위해 먼저 대량발현한 배양액을 4℃, 3,600 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 상등액만을 분리하여 얻어냄
- 분리한 배양상층액은 membrane (12 - 14 kDa)과 Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)을 이용하여 1/10으로 농축을 진행함
- 농축이 완료된 배양 상층액의 정제를 위해 1X PBS buffer에 Imidazole을 10 mM, 25 mM, 300 mM이 되도록 용해하여 Equilibration buffer, Wash buffer, Elution buffer를 제작함
- Equilibration buffer를 Ni-NTA column 용량의 5배를 흘려보내 column을 equilibrium 한 후 농축 샘플과 equilibration buffer을 1:1로 섞어 column에 천천히 흘려보냄
- column 용량의 10배의 wash buffer을 천천히 흘려보내 column과 binding 하지 않은 배지성분과 다른 protein들을 제거함
- column 용량의 5배의 elution buffer을 천천히 흘려보내 His-tag이 되어있는 혈전용해 효소를 정제하여 <그림 1-21> 및 <표 1-32>와 같이 standard fibrin plate method를 통해 혈전용해능을 확인함
- Total protein은 BSA kit와 UV spectrophotometer를 이용하였으며, total protein 계산방법은 다음과 같음
- 먼저 농도를 알고 있는 albumin을 serial dilution하여 BSA kit와 UV spectrophotometer를 이용하여 O.D.<sub>540 nm</sub> 에서 <그림 1-18>과 같이 흡광도를 측정함



<그림 1-21> Albumin standard curve

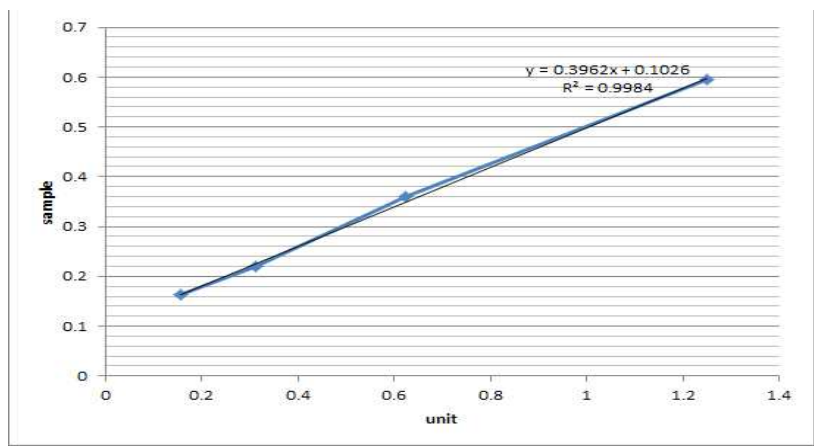
- 준비된 sample을 BSA kit와 UV spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정한 후 <표 1-30>에서 얻어진 standard curve에 흡광도를 넣어 protein양을 구한 후 각 sample의 total

volume를 곱하여 total protein양을 <표 1-33>와 같이 계산함

<표 1-33> 대량발현 sample의 total protein 정량 결과

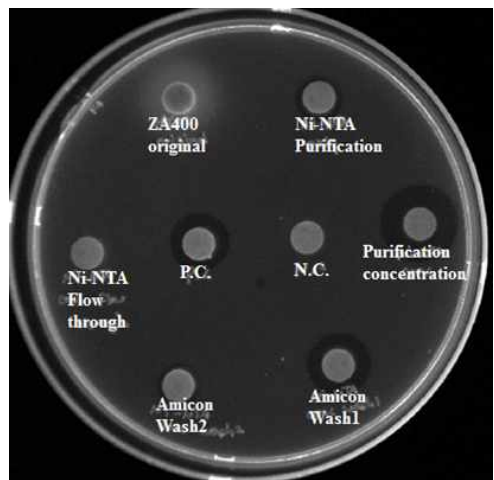
Sample	O.D.	Protein (mg/ml)	Total protein
ZA400 supernatant	0.85	0.721	720.7 mg
ZA400 conc.	6.67	5.606	280.3 mg
column purification	0.128	0.115	0.115 mg
purification conc.	0.62	0.528	0.2112 mg

- Activity 측정은 5 unit의 plasmin을 serial dilution하여 standard fibrin plate method test를 실시하여 standard curve를 <그림 1-22>와 같이 측정함



<그림 1-22> Plasmin standard curve 정량 결과

- 이 후 대량발현 sample의 activity를 측정하기 위하여 <그림 1-22>과 같이 standard fibrin plate method를 통해 각 sample이 lysis한 fibrin의 양을 측정하여 plasmin standard curve에 대입하여 각 sample의 activity를 <표 1-34>과 같이 계산함



<그림 1-22> 대량 발현한 혈전용해 효소를 His-tag/Ni-NTA를 이용하여 정제한 후

혈전용해능 평가

ZA400 original, *B. subtilis* ZA400 original supernatant; Ni-NTA Purification, 대량발현 후 Ni-NTA column 정제; Ni-NTA Flow through, Ni-NTA column 정제 시 얻어진 flow through; Purification concentration, 대량발현 후 Ni-NTA column 정제하여 Amicon 농축; Amicon Wash1, 농축에 사용된 Amicon을 1차 wash한 용액; Amcicon Wash2, Amicon을 2차 wash한 용액; P.C., 0.02 unit plasmin; N.C., 1X PBS buffer

<표 1-34> 대량발현 sample의 activity 측정 결과

Sample	Lysis of fibrin (g)	activity (unit)
ZA400 supernatant	0.0806	0.05
ZA400 conc.	0.1599	0.14
column purification	0.1246	0.06
purification conc.	0.3157	0.54

- <표 1-33> 및 <표 1-34>의 결과값을 바탕으로 대량 발현 한 혈전용해 효소의 specific activity를 <표 1-35>와 같이 계산함

<표 1-35> 대량 발현한 혈전용해 효소의 혈전용해능

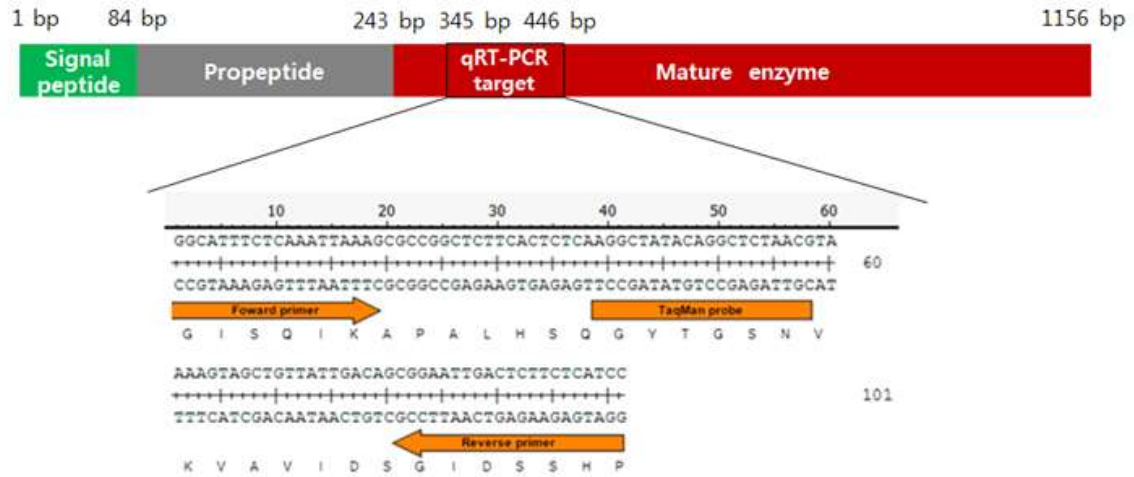
Sample	Total protein (mg)	Total activity (U)	specific activity (U/mg)	Fold (x-fold)	Recovery(%)
ZA400 supernatant	5,240	92.73	0.02	1.00	100.00%
ZA400 conc.	1,434	21.69	0.02	1.00	27.37%
column purification	19.5	8.33	0.43	21.50	0.37%
purification conc.	1.2	5.38	4.48	224.00	0.02%

(나) Quantitative Real-Time PCR을 통한 실제 혈전용해능 유전자의 mRNA 발현 수준 확인

- 유전자의 발현 정도를 알아보기 위한 방법으로는 mRNA가 cDNA로 전사되는 양을 측정하는 Quantitative Real-Time PCR이 널리 사용되고 있음
- 본 연구에서는 Quantitative Real-Time PCR을 위하여 probe 양 끝에 형광물질과 quancher가 결합되어 있는 TaqMan probe를 제작하여 실험을 진행함
- 각 primer와 probe는 GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design site를 이용하였으며 PCR 증폭 size는 100-150 bp, primer Tm 값은 55°C-60°C, probe Tm은 65°C-70°C가 되도록 조건을 지정하여 제작함
- PCR이 진행되는 유전자의 크기는 101 bp가 되도록 진행하였으며 혈전용해 효소를 코딩하고 있는 유전자의 일부분을 바탕으로 primer와 probe를 <표 1-36> 및 <그림 1-24>과 같이 제작하였음

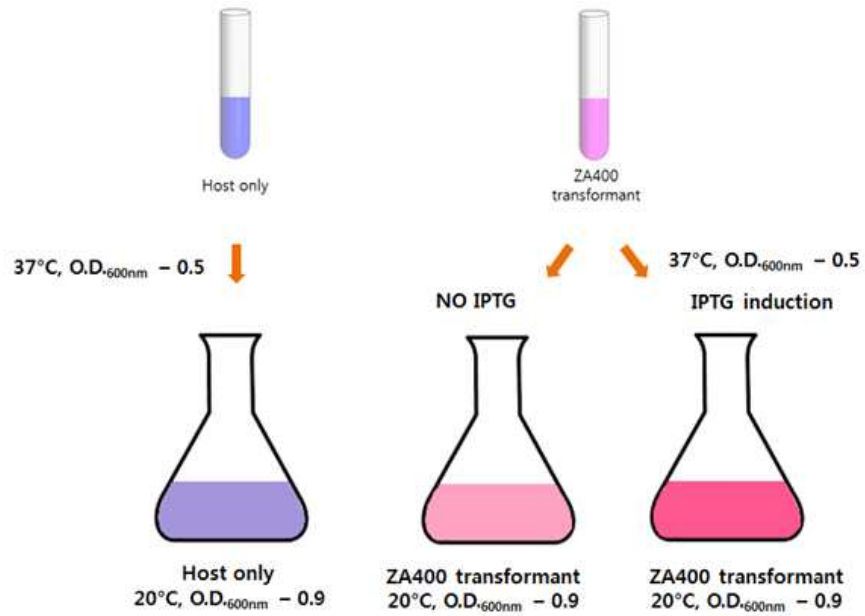
<표 1-36> qRT-PCR primer 및 probe 정보

Primer	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>
qRT-F	GGCATTCTCAAATTAAG
qRT-R	GGATGAGAAGAGTCAATTCCG
probe	AGGCTATACAGGCTCTAACG

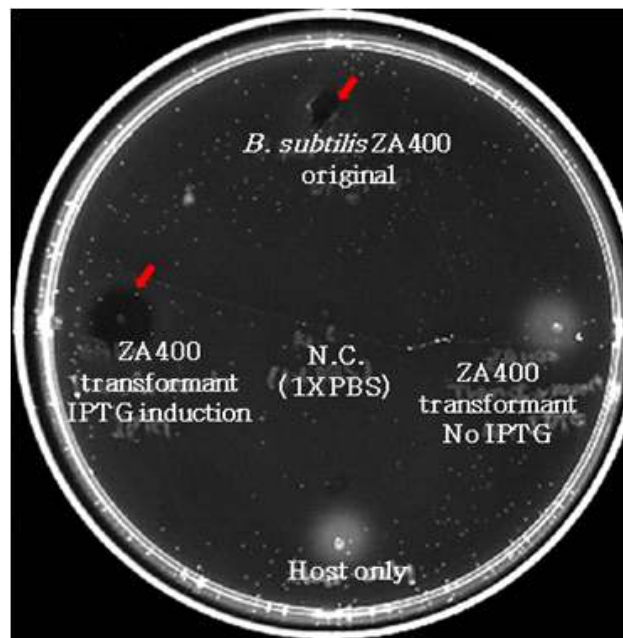


<그림 1-24> Quantitative Real-Time PCR을 위한 primer 및 probe 제작

- *B. subtilis* ZA400 original 균주의 DNA를 추출하여 RT-PCR을 위하여 제작한 primer로 PCR을 통해 혈전용해 기능성 유전자를 증폭한 뒤 Extraction하여 DNA농도를 정량하였으며, serial dilution하였음
- RNA isolation을 위하여 ZA400 original 저장균주를 5 ml의 LB배지에 접종하였으며, *E. coli* transformant는 50 ug/ml의 kanamycin이 포함된 5 ml의 LB에 접종하여 37°C에서 12시간 배양하여 seed culture를 제작함
- 제작된 seed culture는 새로운 100 ml LB배지 세 개에 original 1개, transformant 2개를 1/100접종하여 37°C에서 O.D.<sub>600nm</sub>이 0.5가 될 때까지 subculture진행하였으며, 이후 transformant는 IPTG를 최종 1 mM이 되도록 induction하고 하나는 induction하지 않은 다음 20°C에서 O.D.<sub>600nm</sub>이 0.9가 될 때까지 발현 하였으며, original은 O.D.<sub>600nm</sub>이 0.9가 될 때까지 37°C에서 발현하였으며 <그림 1-25>, 준비된 sample은 standard fibrin plate method test로 확인하였음 <그림 1-26>



<그림 1-25> Total RNA isolation을 위한 sample 준비 방법



<그림 1-26> Total RNA isolation을 위해 준비한 sample의 standard fibrin plate method test 결과

- 발현이 완료된 후, Ambion사의 RiboPure Bacteria kit를 이용하여 발현 배양액 3 ml로부터 total RNA isolation을 진행하여 <표 1-37>과 같이 RNA를 isolation함

<표 1-37> Total isolation 결과 및 quality

Sample	RNA (ng)	Ratio
<i>B. subtilis</i> ZA400 original	24.065	1.953
Host only	153.53	1.899
No IPTG	88.86	1.917
IPTG induction	187.40	1.998

- *B. subtilis* ZA400 original DNA는  $3.012 \times 10^{-2}$  -  $3.012 \times 10^{-8}$ 으로 serial dilution 하여 standard curve product로 사용하였으며, qRT-PCR을 2반복 하여 standard curve를 구함
- Standard curve를 구하기 위한 RT-PCR mixture와 조건은 <표 1-38> 및 <표 1-39>와 같으며, 이때 조성에서 PrimeScript RT enzyme는 제외함

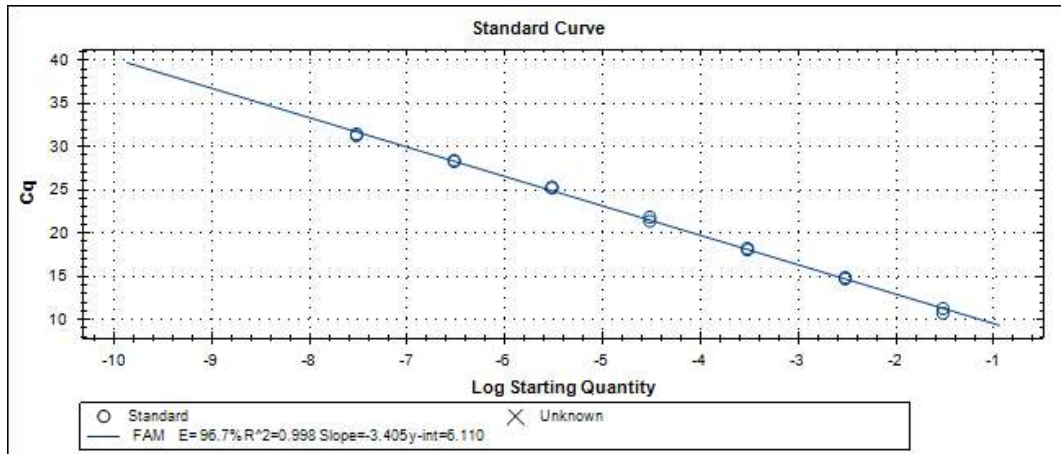
<표 1-38> qRT-PCR mixture 조성

Mixture 조성	Volume ( $\mu\ell$ )	Final concentration
Premix Ex Taq (2X Probe qPCR)	12.5	1 X
qRT-F primer (10 pmol)	0.75	0.3 pmol
qRT-R primer (10 pmol)	0.75	0.3 pmol
TaqMan probe (10 pmol)	0.75	0.3 pmol
DNA (RNA)	5	20 - 0.625 ng
(PrimeScript RT enzyme)	(0.625)	-
Molecular water	4.75(4.125)	-
40X ROX dye	0.5	1 X
Total	25	-

<표 1-39> qRT-PCR 반응 조건

Step	Temperature	Time	Cycle
Transcription	48°C	15 min	X 1
Pre-denaturation	95°C	30 sec	X 1
Denaturation	95°C	5 sec	X 40
Annealing	57.5°C	33 sec	

- 그 결과 얻어진 standard curve는 <그림 1-27>과 같음



<그림 1-27> *bsfA* 유전자의 Standard curve

- <그림 1-25>과 같은 방법으로 얻어진 *B. subtilis* ZA400, Host only, ZA400 transformant NO IPTG, ZA400 transformant IPTG sample에서 isolation한 RNA는 <표 1-38>의 mixture 조성으로 <표 1-39>의 반응 조건으로 진행하였으며 그 결과는 <표 1-40>, <표 1-41> 및 <그림 1-28>과 같음

<표 1-40> 혈전용해 기능성 유전자의 qRT-PCR 결과

Sample	Total RNA (ng)	cDNA (ng)	Adjusted cDNA (ng)	average	stdev*	error
<i>B. subtilis</i> ZA400original	20	0.00038	0.000376	0.00070	0.00018	0.00007
	10	0.00031	0.000616			
	5	0.00021	0.000827			
	2.5	0.00009	0.000699			
	1.25	0.00005	0.000864			
	0.625	0.00002	0.000794			
Host only	20	0	0.000000	0.00000	0.00000	0.00000
	10	0.00000	0.000000			
	5	0.00000	0.000000			
	2.5	0.00000	0.000000			
	1.25	0.00000	0.000000			
	0.625	0.00000	0.000000			
No IPTG	20	0.00002	0.000025	0.00004	0.00001	0.00000
	10	0.00002	0.000034			
	5	0.00001	0.000041			
	2.5	0.00001	0.000047			
	1.25	0.00000	0.000046			
	0.625	0.00000	0.000054			
IPTG induction	20	0.11428	0.114278	0.09271	0.01216	0.00497
	10	0.04083	0.081662			
	5	0.02338	0.093512			
	2.5	0.01006	0.080504			
	1.25	0.00575	0.092061			
	0.625	0.00294	0.094229			

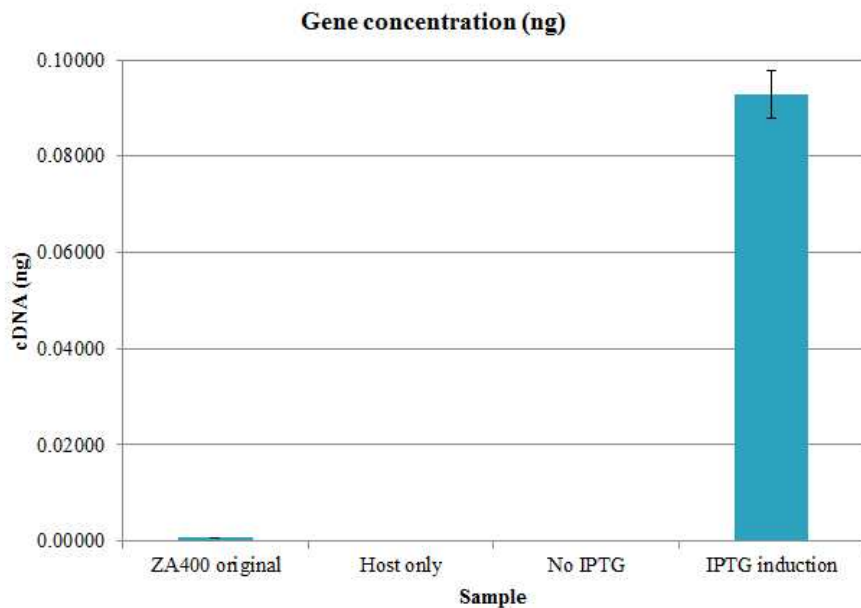
\*Stdev; standard deviation

- Adjusted cDNA의 경우 20 ng의 total RNA를 기준으로 희석된 배수를 곱하여 보정된 값이며, 이 보정 값을 바탕으로 평균값 및 standard deviation 그리고 standard error를 구함
- Standard error를 구하는 계산식은 각각의 표준편차를 각 실험의 반복 횟수 (6)의 양의 제곱근으로 나누어 계산함

<표 1-41> 혈전용해 기능성 유전자의 발현 결과

Sample	cDNA (ng)	Stdev*	Standard error
<i>B. subtilis</i> ZA400 original	0.00070	0.00018	0.00007
Host only	0.00000	0.00000	0.00000
No IPTG	0.00004	0.00001	0.00000
IPTG induction	0.09271	0.01216	0.00497

\*Stdev; standard deviation



<그림 1-28> qRT-PCR을 통한 혈전용해 기능성 유전자 발현정도 비교

- qRT-PCR 결과 혈전용해 기능성 유전자의 발현 정도는 <표 1-40>, <표 1-41> 및 <그림 1-28>와 같이 *E. coli*에 transformation하여 overexpression한 sample에서의 발현정도가 *B. subtilis* ZA400 original에 비해 약 132배 가량 높게 발현되었음을 확인 할 수 있었음

#### (4) SDS-PAGE/Western blotting을 이용한 대량발현을 통해 생산된 혈전용해 효소 확인

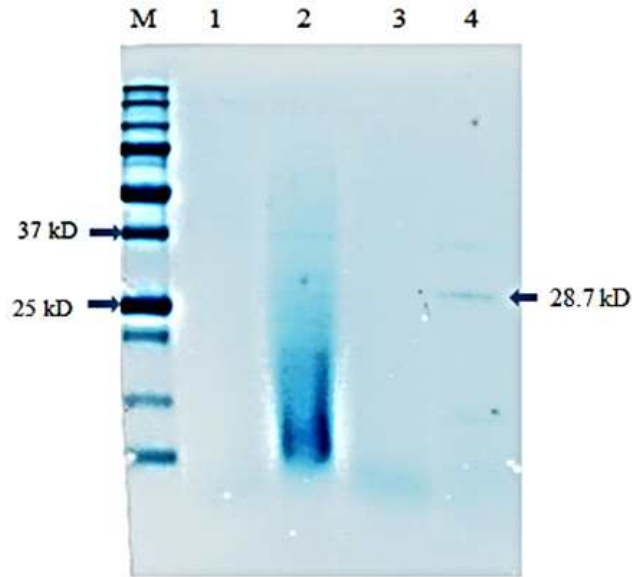
##### (가) SDS-PAGE 분석을 통한 정제된 혈전용해 효소 확인

- 혈전용해 효소 생산 유전자가 삽입되지 않은 *E. coli* BL21(DE3)pLysS만을 발현한 sample과 ZA400 original 발현 sample, IPTG로 induction하지 않은 혈전용해 효소 생산 유전자 삽입



*E. coli* BL21(DE3)pLysS, IPTG induction 후 Ni-NTA column을 통해 정제 하여 Amicon (10kDa)으로 농축한 혈전용해 효소를 <그림 1-29>와 같이 SDS-PAGE로 확인함

- SDS-PAGE 결과 IPTG로 induction 후 정제 및 농축한 혈전용해 효소를 loading 한 부분에서 28.7 kDa 크기의 밴드가 확인되었음

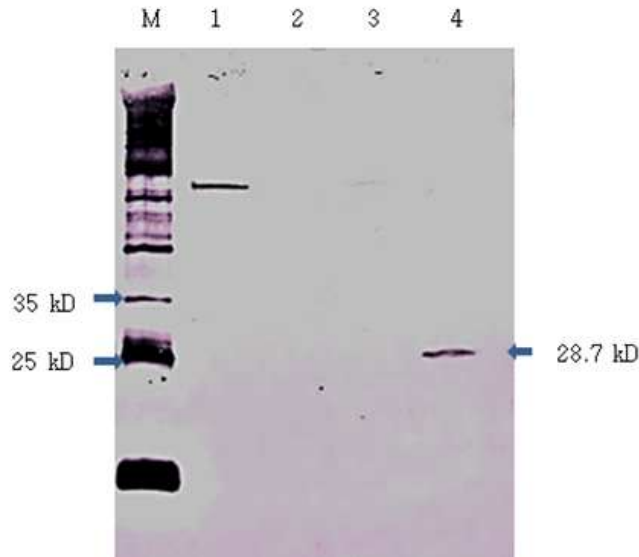


<그림 1-29> SDS-PAGE를 통한 혈전용해 효소의 확인

M, Precision Plus Dual Color Standards marker (Bio Rad); 1, *E. coli* BL21(DE3)pLysS; 2, ZA400 original; 3, No IPTG; 4, Purification, concentration

**(나) Anti His-Tag antibody를 이용하여 발현, 정제된 혈전용해 효소를 최종 확인**

- *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformant에서 발현되는 혈전용해 효소의 경우 효소의 끝에 His-tag이 함께 발현됨
- 이를 이용하여 western blot를 통해 혈전용해 효소의 올바른 발현을 확인하기 위하여 Anti His-tag antibody를 이용하여 western blot를 진행함
- SDS-PAGE와 똑같은 sample을 가지고 western blot을 시행한 결과 <그림 1-30>과 같은 결과를 보였음
- Western blot결과 SDS-PAGE 결과와 같이 IPTG induction 후 정제, 농축한 sample lane에서 28.7 kDa의 밴드를 확인할 수 있었음
- 본래는 4번 lane에서만 밴드가 보여야 하지만 host 균주만 발현한 1번 lane에서도 큰 사이즈에서 밴드가 보임
- 위의 밴드는 Histidine이 다량 포함된 protein이 밀집되어 있어 unspecific binding가 일어난 것으로 추측됨



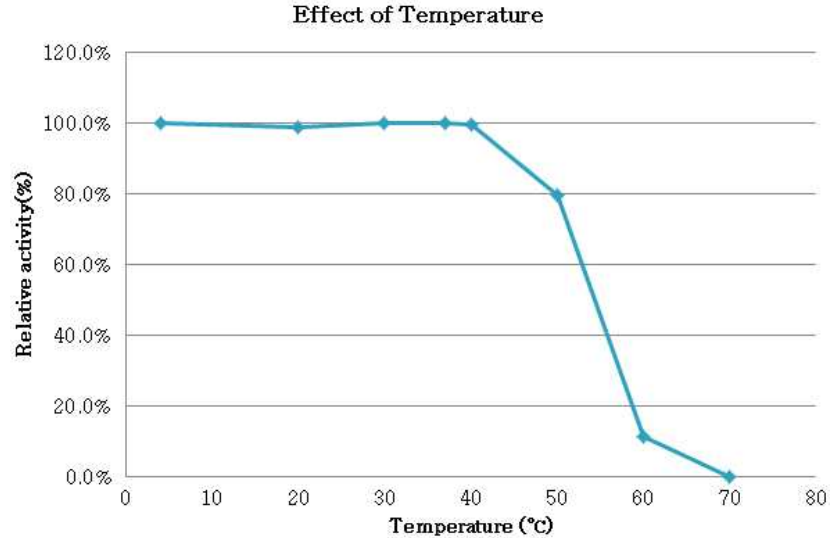
<그림 1-30> Western blot를 이용한 혈전용해능 효소의 확인

M, Trail Mix™ Western Markers (Novagen); 1, *E. coli* BL21(DE3)pLysS;  
2, ZA400 original; 3, No IPTG; 4, Purified BsfA

#### (다) 온도, pH 및 ion 등에 의한 혈전용해효소의 안정성 평가

##### ① 온도에 의한 효소 안정성 평가

- 단백질로 이루어진 효소는 열에 의해 3차 구조가 변화하여 그 활성을 잃을 수 있으며, 일반적으로 기질에 대한 특이성을 가지고 있고 상온 및 체온 정도의 온도에서 활성이 가장 최적화 되어 있음
- 이러한 사실을 바탕으로 발현한 혈전용해 기능성 효소의 열에 의한 안정성을 확인하기 위하여 4, 20, 30, 37, 40, 50, 60 및 70°C에서 30분 간 반응 후 ice에서 5분 간 식힌 후 standard fibrin plate method를 통해 비교한 활성변화는 <그림 1-31>과 같음
- 이 때, negative control로는 1X PBS buffer를 이용하였음



<그림 1-31> 온도에 의한 혈전용해 기능성 효소의 활성 변화 그래프

- 실험 결과 혈전용해 기능성 효소의 경우 40°C까지 안정하였으며, 이후 활성을 잃기 시작하여 50°C부터 급격하게 그 활성을 잃었고 70°C가 되면 활성이 완전히 사라짐을 확인함
- 30~37°C에서 활성이 가장 최적화 되어있으므로 사람의 체온인 36.5°C에서도 최적 활성을 나타낼 것으로 추측되며 추후 인체에 적용도 가능할 것으로 생각됨

② pH에 의한 효소 안정성 평가

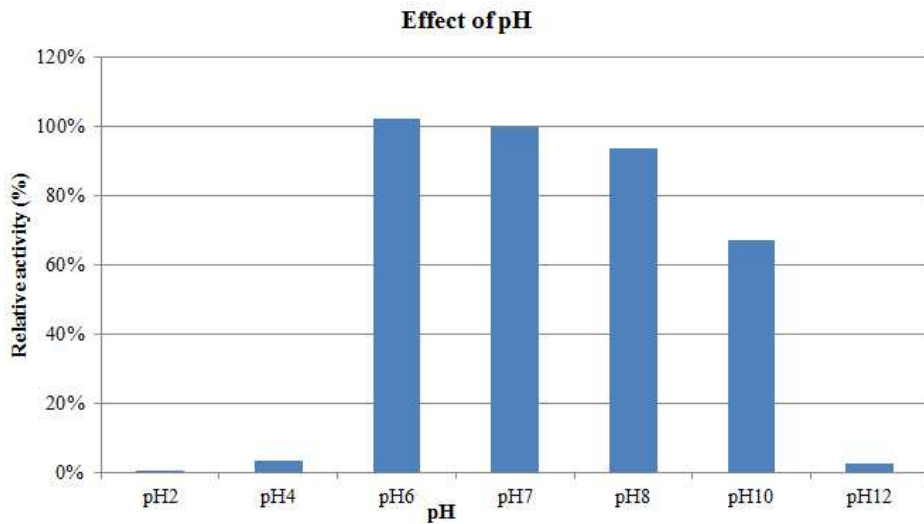
- 혈전용해 기능성 효소가 낮은 pH 및 높은 pH 환경하 에서 얼마나 안정적인지 평가하기 위하여 pH 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12에서 효소 안정성을 비교하였음
- 각 pH를 맞추기 위한 buffer의 종류는 다음 <표 1-42>과 같음

<표 1-42> pH에 의한 효소 안정성 평가에 사용된 Buffer 종류

pH	Buffer
2, 4	50 mM glycine-HCl buffer
6, 7	50 mM sodium acetate-acetic acid buffer
8	50 mM Tris-HCl buffer
10, 12	50 mM glycine-NaOH buffer

- 각 pH range buffer와 혈전용해 기능성 효소를 섞은 후 37°C에서 1시간동안 pH stress를 준 후 Amicon과 PBS buffer를 이용하여 buffer change를 하여 pH 7까지 중화시킨 후 standard fibrin plate method를 통해 활성을 확인하였음
- 그 결과 <그림 1-32>처럼 강산 및 강염기 조건인 pH 2, 4, 12 에서는 효소가 활성을 잃는 것으로 확인되었지만 pH 6~10에서는 비교적 안정한 활성을 보이는 것으로 확인되었음

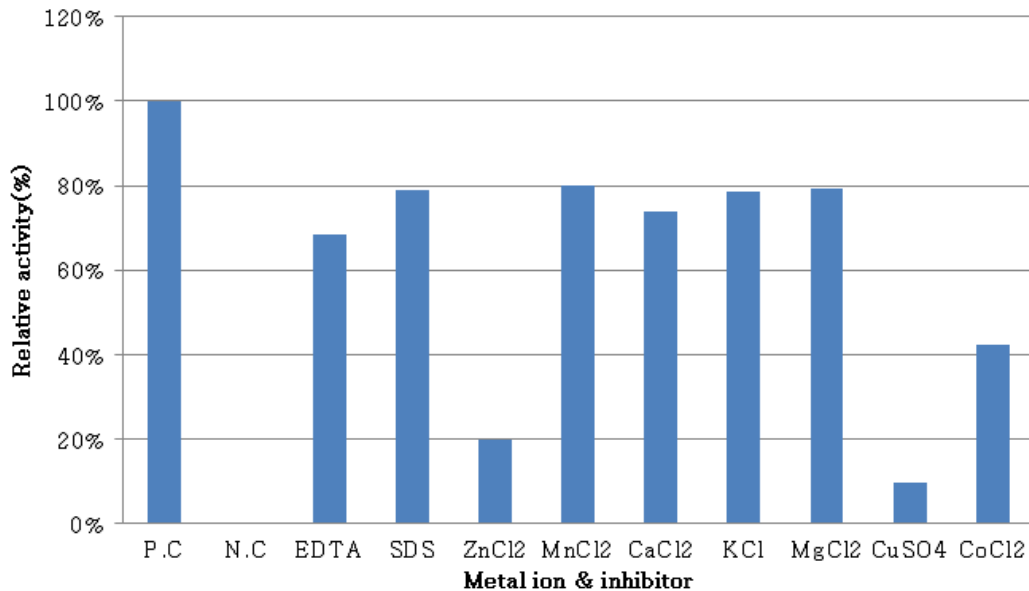
- pH 10에서는 60% 이상의 활성을 유지하였으며, pH 6, 7, 8에서는 약 90% 이상의 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었음



<그림 1-32> pH에 의한 혈전용해 기능성 효소의 활성 변화

### ③ Metal ion 및 inhibitor에 의한 안정성 평가

- 금속 이온은 효소와 결합하여 효소의 반응성을 높여주는 cofactor의 역할을 하거나 효소의 반응을 억제하는 inhibitor의 역할을 하는 경우가 있음
- 본 실험을 통해 얻어진 혈전용해 효소의 활성에 금속이온과 inhibitor가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 실험을 진행함
- 정제, 농축을 통해 얻은 혈전용해 효소에 최종 농도가 금속이온의 경우 5 mM이 되도록, inhibitor의 경우 1 mM이 되도록  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , SDS, EDTA를 넣어 준 후 37°C에서 1시간 반응시킨 후 standard fibrin plate method 실험을 통하여 activity를 비교한 결과 <그림 1-33>과 같음
- Inhibitor의 일종인 EDTA 와 SDS에 의해서는 60% 이상 활성이 유지됨을 보였음
- 금속 이온에서는  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ 에 의해 활성이 거의 저해되며 다른 금속 이온인  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 에서는 활성이 60%이상 유지되며  $\text{Co}^{2+}$ 의 경우 활성이 절반정도 유지됨을 보임



<그림 1-33> 금속 이온 및 inhibitor에 의한 혈전용해 효소 활성 변화 그래프

### 3. 인체 대사성 질환예방관련 식품소재생산균주를 활용한 전통발효식품 시제품 제조

#### 가. 기능성 발효미생물들을 활용한 최적화된 발효조건에서 전통발효식품 제조 및 평가

##### (1) Lab-scale에서 기능성 발효 미생물을 적용한 된장의 제조 및 혈전용해능 평가

###### (가) 된장 제조

- 실제 산업화하기 전, lab-scale에서 혈전용해능의 기능성을 가진 다양한 발효 미생물을 적용하여 된장을 제조하고, 혈전용해능이 발현되는지 확인하고자 함
- 소금물에 침지해 둔 메주를 장가르기로 된장과 간장으로 분리하고 분리된 된장에 혈전용해기능성을 가진 미생물을 (1) *B. subtilis* ZA400 (2) *B. subtilis* ZA400+*Bifidobacterium bifidum* ZB193 (3) *B. subtilis* ZA400+*Enterococcus faecium* JB138의 조합으로 하여 균주 당 각각  $10^8$  CFU/g 이 되도록 접종하고 상온의 항아리에서 발효를 진행하였음 <그림 1-34>
- 위의 세 균주는 우수한 혈전용해능을 가졌으며 ZA400과 ZB193은 박테리오신 생성능력을 가지고 있음. 특히 ZA400 균주는 된장에서 식중독 유발 독소 생성균으로 문제되고 있는 *Bacillus cereus*에 대해 강한 저해능력을 보이므로 추후 *B. cereus*의 저감화로 장류의 안정성을 높일 수 있을 거라 기대됨
- 첨가된 *B. subtilis* ZA400는 특성상 anaerobic 상태에서 잘 자라지 못함. 따라서 된장 안의 혐기적인 조건에서도 생육이 가능한 *B. bifidum* ZB193과 *E. faecium* JB138를 첨가해 줌으로서 혈전용해 시너지 효과를 얻고자 함
- 첨가된 균주의 혈전용해능 비교평가를 위하여 같은 방법으로 제조하되 기능성 균주를 따로

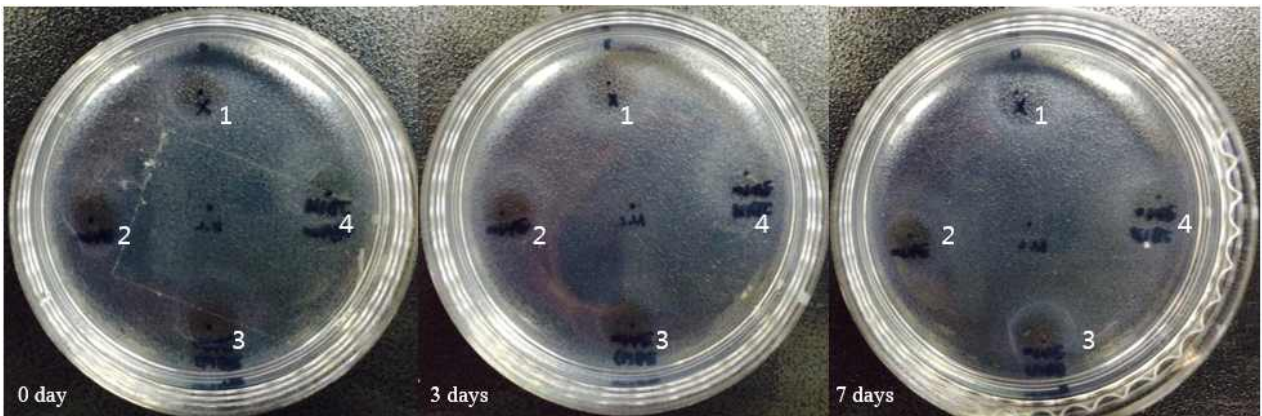
접종하지 않고 발효한 된장(No inoculation)을 control로 하였음



<그림 1-34> Lab-scale에서 제조한 된장

(나) 제조된 된장의 혈전용해능 평가

- 된장 제조 후 발효과정에서 0, 3, 7일에 각각 샘플링하여 standard fibrin plate method test를 통해 <그림 1-35>과 같이 혈전용해능을 확인함



<그림 1-35> 제조된 된장에서의 혈전용해능 평가

(1, No inoculation; 2, *B. subtilis* ZA400; 3, *B. subtilis* ZA400+*Bifidobacterium bifidum* ZB193; 4, *B. subtilis* ZA400+*Enterococcus faecium* JB138)

- 혈전용해능 평가 결과 균을 접종하지 않은 샘플보다 균을 첨가해준 샘플에서 혈전용해능이 더 크게 나타났으며 특히 *B. subtilis* ZA400+*Bifidobacterium bifidum* ZB193의 조합의 경우가 시너지 효과로 activity가 더 커지는 것을 알 수 있음
- 하지만 *B. subtilis* ZA400+*Enterococcus faecium* JB138의 조합의 경우, 오히려 activity가 떨어짐을 확인
- 추후에 산업체와의 시제품 제작 시 위와 같은 실험결과를 토대로 *B. subtilis* ZA400+*Bifidobacterium bifidum* ZB193를 적용한 전통식품에서 보다 큰 혈전용해능을 기대할 수 있을거라 생각되어짐

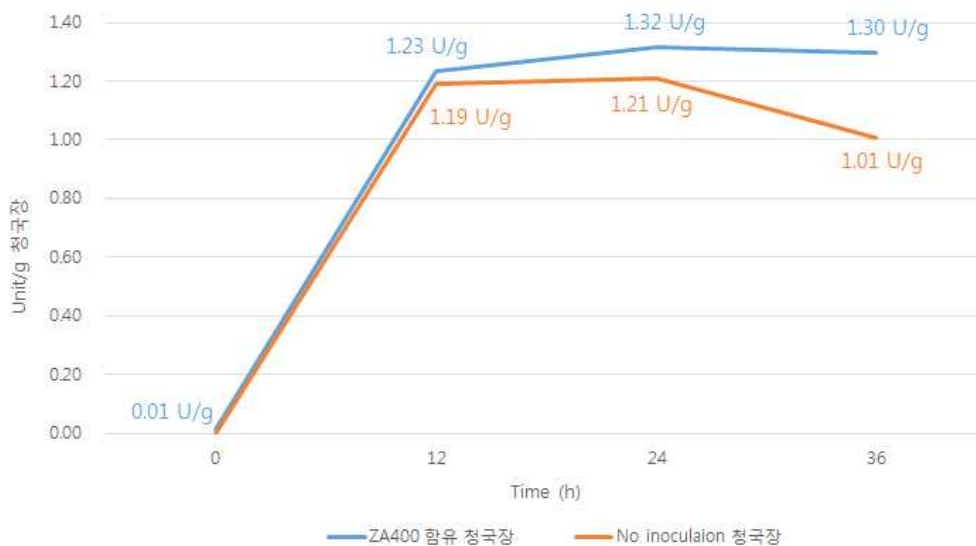
(2) Lab-scale에서 *B. subtilis* ZA400을 적용한 청국장 제조 및 혈전용해능 평가

(가) 청국장 제조

- 청국장은 삶은 콩을 발효시켜 *Bacillus subtilis*가 생기도록 만든 장류로서 발효기간이 약 2일로 짧은 기일 내 섭취할 수 있는 전통발효식품임
- 청국장은 날로 먹기도 하므로 열에 의한 효소의 불활성화를 막을 수 있을 거라 기대할 수 있음
- 실제 산업화하기 전 lab-scale에서 *B. subtilis* ZA400 original 균주를 접종하여 청국장을 제조하고, 혈전용해능이 발현되는지 확인하고자 함
- 20시간 이상 불린 콩을 5시간 이상 삶은 후 식힌 다음 하나는 균을 접종하지 않았고 나머지 하나는 *B. subtilis* ZA400을  $10^8$  CFU/g 이 되도록 접종하였음. 콩 위에 짚을 넣어 준 후 면보를 덮어 40°C incubator에서 36시간 동안 발효를 진행함

(나) 제조된 청국장의 혈전용해능 평가

- 청국장 제조 후 0시간, 12시간, 24시간, 36시간마다 1g씩 샘플링하여 9 ml의 1X PBS buffer에 풀어준 후, 상층액(20 ul)을 이용하여 standard fibrin plate method test를 실시하였음
- Fibrin plate 상에서 육안상으로는 용해된 fibrin의 차이를 정확하게 판단할 수 없어서 각 샘플에 의해 용해된 fibrin의 무게를 잰 후 positive control(0.02U plasmin)이 용해한 fibrin의 무게로 환산하여 혈전용해능을 unit/g (청국장샘플)으로 나타내었음 <그림 1-36>



<그림 1-36> 제조된 청국장에서의 혈전용해능 평가

- 그 결과, ZA400을 첨가하지 않은 청국장에 비하여 ZA400을 첨가한 청국장에서 더 높은 혈전용해능이 확인되었음
- 또한 36시간 동안 ZA400을 첨가하지 않은 청국장에 비하여 혈전용해능이 ZA400을 첨가한

청국장에서 혈전용해능이 비교적 안정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었음

### (3) 한식장류 전문업체를 통한 기능성 발효 미생물을 적용한 찜장 시제품 제조 및 혈전용해능 평가

#### (가) 업체 선정

- Lab scale에서 확인한 혈전용해능 결과를 바탕으로 산업체와 연계하여 기능성 전통발효식품의 scale-up 제조를 하고자 함
- 업체선정 시 공장에서 대량생산하지 않고 가공식품이 아닌 수가공식 전통적인 방법으로 제조하는 곳을 우선으로 하였으며 100% 국내산 콩 및 천일염과 같은 부재료들을 사용하는 업체를 고려함
- 본 실험에서는 한식전통장류 전문업체들 가운데서 균 첨가와 샘플링이 용이하며(가까운 거리) 농림수산식품부 전통식품 품질 인증을 받은 경기도 남양주시에 위치한 ‘㈜이삭뜯뜯안에 된장’을 선정하였음



<그림 1-37> 선정 한 한식정통장류 전문업체

#### (나) 찜장 제조

- ‘뜯안에 된장’의 주력생산제품인 찜장은 재래식 한식 된장의 또 다른 이름으로서 일반



한식된장과 차별성을 지니고 있음

- 일반 한식된장의 경우 식염수에 메주를 담가 일정기간 숙성시키는 과정을 거침으로서 염도를 조절 할 수 없어 짠 맛이 강하다는 단점이 있음
- 이에 비해 ‘뜰안에 된장’ 찜장은 간장을 우려내지 않은 메주를 잘 분쇄하여 자체 1차 발효를 시킨 후 보리밥과 고추씨가루, 천일염과 함께 잘 반죽해서 항아리에 6개월~1년 정도 자연 숙성을 시킨 재래식 한식 된장으로서 간장을 빼지 않아 영양소가 풍부하고 별도의 숙성과정으로 더 깊은 감칠맛을 내며 염도가 낮다는 장점이 있음
- 본 실험에서는 이러한 찜장을 선택하여 시제품 제작을 진행하였음
- 찜장의 제조과정은 <그림 1-38>과 같음

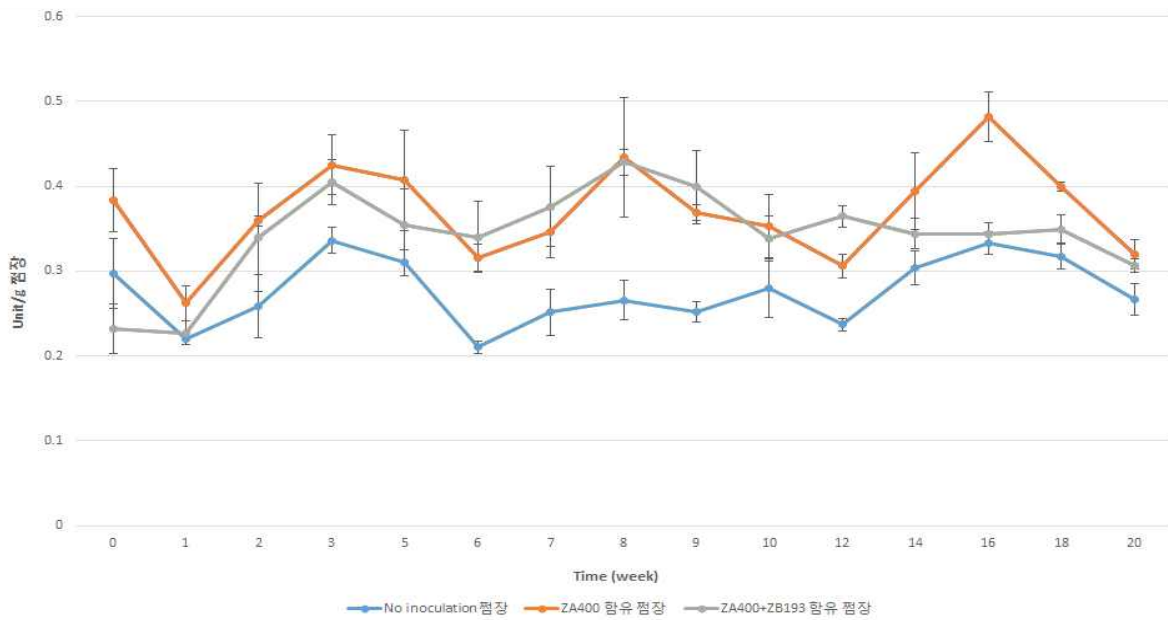


<그림 1-38> 찜장 제조

- 모든 재료가 배합된 찜장에 혈전용해기능성을 가진 미생물을 (1) *B. subtilis* ZA400 (2) *B. subtilis* ZA400+*Bifidobacterium bifidum* ZB193의 조합으로 하여 찜장 6kg에 균주 당 각각  $10^8$  CFU/g 이 되도록 제조해 항아리에서 발효를 진행하였음
- Lab-scale에서 된장 제조에 사용된 혈전용해능을 보이는 또 다른 균주 *Enterococcus faecium* JB138은 혈전용해능 평가에서 활성이 희미했을 뿐 더러 대한민국 식품의약품안전처(KFDA)에서 probiotics로 인정하는 균주 목록에서 삭제되어 찜장 scale-up 제조에 적용하지 않았음
- 첨가된 균주의 혈전용해능 비교평가를 위하여 같은 방법으로 제조하되 기능성 균주를 따로 접종하지 않고 발효한 찜장(No inoculation)을 control로 하였음
- 찜장 제조 후 발효 초기에는 일주일마다, 후반에는 2주 마다 sampling을 하고 20주까지의 모니터링을 거쳐 찜장의 혈전용해능력과 *B. subtilis*의 생균수 확인, Real-time을 통한 찜장 속의 혈전용해능 유전자 확인 실험을 실시하여 균을 첨가한 찜장의 기능성을 알아보하고자 함

(다) 제조된 찜장의 혈전용해능 평가

- 찜장 제조 후 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 weeks의 샘플을 1g씩 샘플링하여 9ml의 1X PBS buffer에 풀어준 후, 상층액(20 ul)을 이용하여 standard fibrin plate method test를 실시하였음
- 각 샘플에 의해 용해된 fibrin의 무게를 잰 후 positive control (0.02U plasmin)이 용해된 fibrin의 무게로 환산하여 혈전용해능을 unit/g(찜장샘플)으로 나타내었음 <그림 1-39>



<그림 1-39> 제조된 찜장에서의 혈전용해능 평가

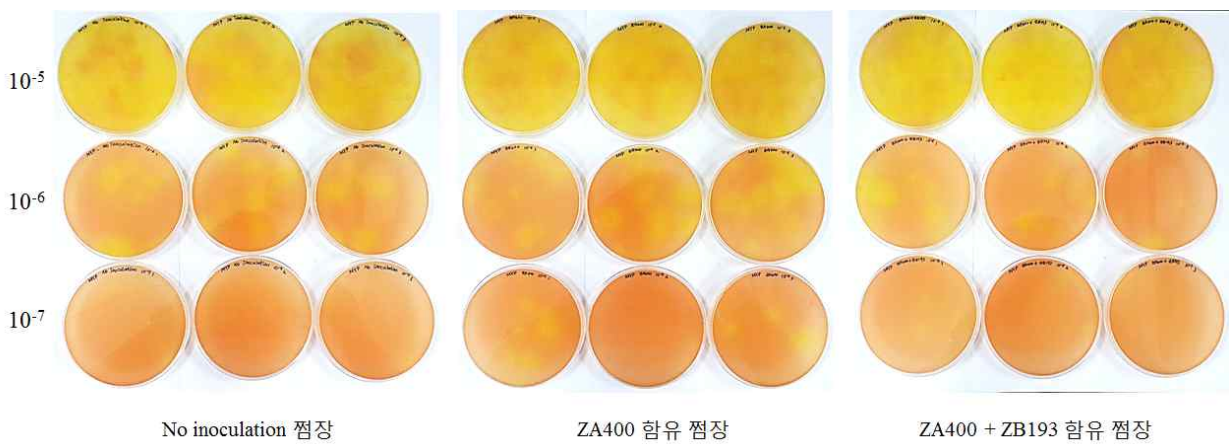
- 실험 결과 균을 접종하지 않은 찜장보다 균을 첨가해준 찜장의 fibrinolytic activity가 더 높은 것을 확인할 수 있음
- 균을 접종한 두 가지 샘플<sup>(1)Only ZA400, (2)ZA400+ZB193</sup> 간에는 큰 차이를 보이지 않았으며 전체적으로 높은 혈전용해능 활성을 보임

(라) 찜장의 발효기간에 따른 *B. subtilis* 수 변화

- 찜장의 발효기간 중 *B. subtilis*의 생균수 변화를 확인하기 위하여 6주부터 viable cell count를 실시함
- *B. subtilis* selective media로 사용한 MYP agar에는 지시약으로 phenol red가 들어 있어 mannitol salt 발효 여부에 따라 배지의 색상이 달라지므로 mannitol salt의 발효가 가능한 *B. subtilis*에 의해 배지가 노랗게 변하여 선택적인 counting을 할 수 있음. 또한 *B. subtilis*에게는 배지 내에 들어있는 Egg-yolk의 성분인 Lecithin을 분해할 수 있는 능력이 없어 colony 주변에

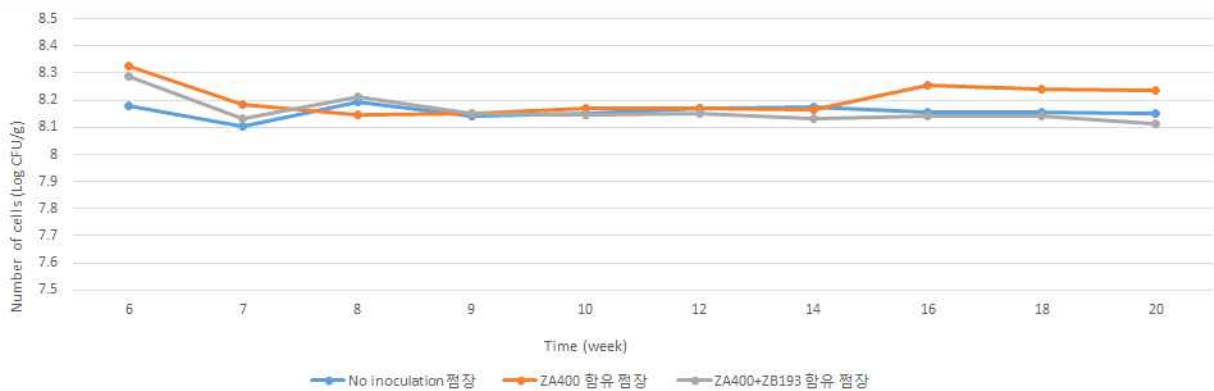
불투명한 환을 생성하지 않음

- 또한 MYP 배지에는 항생제 Polymyxin B의 첨가로 그람음성균만 선택적으로 죽일 수 있는 특징을 가짐
- MYP 배지는 Mannitol salt agar에 Egg yolk와 Polymyxin B를 첨가하여 제조하였으며 petri-dish에 20 ml 씩 분주하여 사용하였음
- stomacher bag에 0.1% peptone water 22.5 ml과 찜장 2.5 g을 배합하며 1분동안 stomaching을 실시하고 파쇄된 찜장 성분을 침전시킨 후 상층액을 얻었음
- 상층액은 0.1% peptone water를 사용하여 serial dilution 한 후  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ 의 희석액을 MYP agar에 도말한 뒤 24시간 동안 37도에서 배양하였음
- 그 후 viable cell count를 실시하여 CFU(colony forming unit)을 측정하였음 <그림 1-40>



No inoculation	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	ZA400	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	ZA400+ZB193	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
1	180	15	1	1	266	36	2	1	221	21	7
2	206	21	3	2	255	32	6	2	211	33	2
3	185	17	1	3	263	27	4	3	227	31	2
<b><math>1.78 \times 10^8</math> CFU/g</b>			<b><math>3.26 \times 10^8</math> CFU/g</b>				<b><math>2.9 \times 10^8</math> CFU/g</b>				

<그림 1-40> Selective media MYP agar를 사용한 viable cell count 예시



<그림 1-41> 찜장의 *B. subtilis* 수 변화

- 발효기간 동안 찜장의 *B. subtilis* 균수에 있어서 발효초기와 20주 후의 샘플 간에는 큰 차이가 없었음
- 다만 발효 후반기 때에는 ZA400을 첨가한 찜장 샘플에서 *B. subtilis*의 균수가 증가하는 모습을 관찰할 수 있음
- 발효기간 중에 찜장의 *B. subtilis*의 수는 모두  $10^8$  CFU/g 수준으로 나타났으며, 이를 통해 찜장 안의 *B. subtilis*의 수가  $10^8$  CFU로 유지되고 있음을 알 수 있음 <그림 1-41>

**(마) Real-time PCR을 통한 찜장안에서의 혈전용해능 유전자의 정량화 및 비교**

- Real-time PCR은 샘플 안에서 원하는 DNA의 존재 유무 확인과 정량화를 위한 방법으로 널리 사용되고 있음
- 따라서 우리는 Real-time PCR 실험을 통해 찜장 안에서의 혈전용해능 유전자 DNA양을 비교해봄으로써 샘플 간에 잠재적인 혈전용해효소발현능력과 더불어 발효 기간에 따른 ZA400의 생존율을 확인하였음
- *B. subtilis* ZA400 original DNA는  $1.46 \times 10^{-2} \sim 1.46 \times 10^{-8}$  으로 serial dilution 하여 standard curve product로 사용하였으며, 3반복 하여 standard curve를 구함 <그림 1-42>
- 찜장은 0.1% peptone water에 푼 후 원심분리(2000 rpm, 5 min)하여 찜장 불순물을 제거한 뒤 상층액만을 가지고 iNtRON사의 G-spin™ Genomic DNA extraction kit를 사용하여 DNA를 얻어냄
- 실험에 쓰인 primer와 probe 정보는 <표 1-36>, <그림 1-24> 참고
- Real-time PCR mixture와 조건은 <표 1-43> 및 <표 1-44>와 같음
- DNA extraction efficiency에 따른 차이를 막기 위해 실험에 쓰인 각각의 DNA들은 total DNA를 200 ng/ul으로 맞추어 실험진행

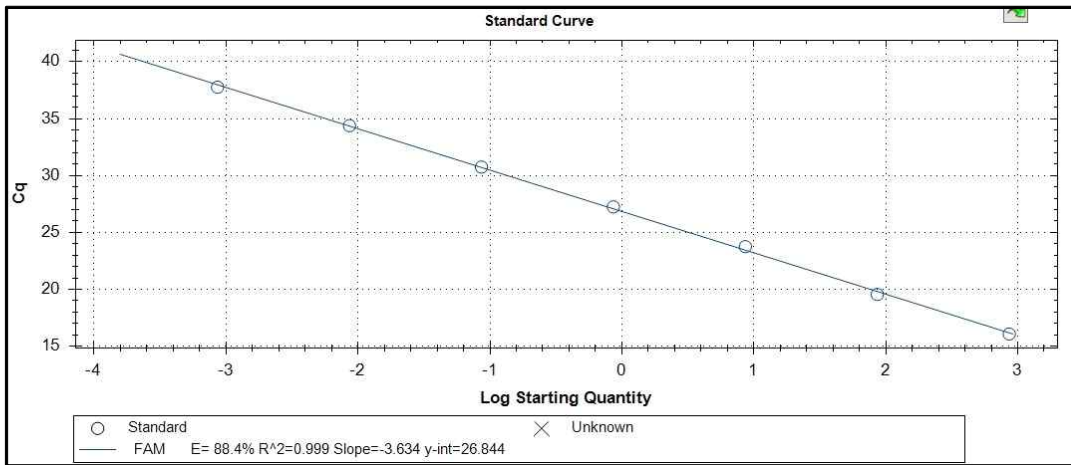
<표 1-43> Real-time PCR mixture 조성

Mixture 조성	Volume ( $\mu\ell$ )	Final concentration
Premix Ex Taq (2X Probe qPCR)	12.5	1 X
Forward primer (10 pmol)	0.75	0.3 pmol
Rreverse primer (10 pmol)	0.75	0.3 pmol
TaqMan probe (10 pmol)	0.75	0.3 pmol
DNA	-	200 ng
Molecular water	-	-
50X ROX dye I	0.5	1 X
Total	25	-

<표 1-44> Real-time PCR 반응 조건

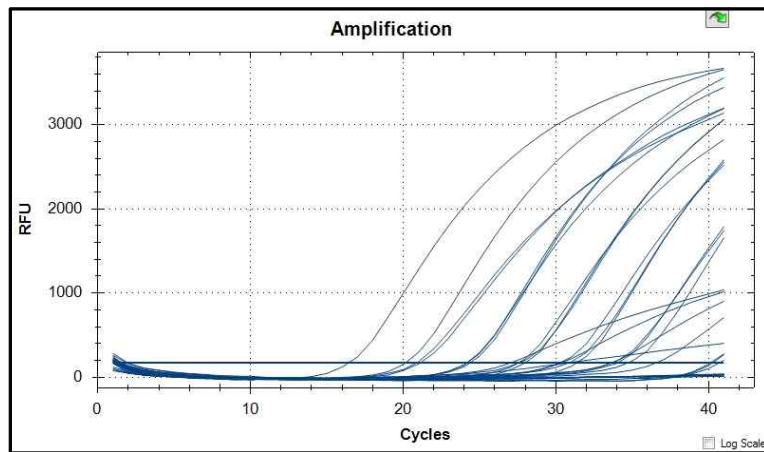
Step	Temperature	Time	Cycle
Pre-denaturation	95°C	30 sec	X 1
Denaturation	95°C	5 sec	X 40
Annealing & Extension	57.5°C	33 sec	

- 그 결과 얻어진 Real-time PCR의 Amplification graph는 <그림 1-43> 과 같음



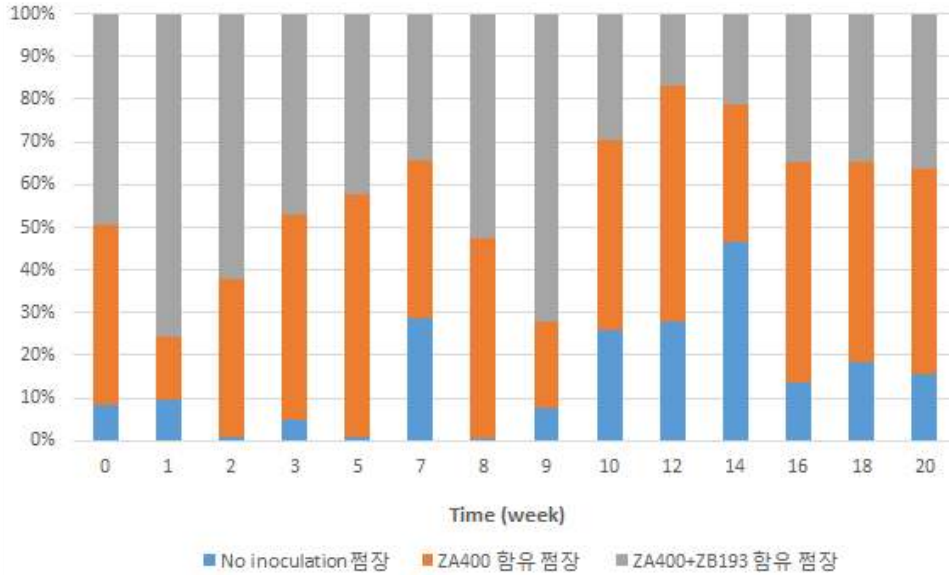
<그림 1-42> 혈전용해능 유전자의 standard curve 예시

\*standard curve의 한 예로서 해당 그림은 째장 1주차의 data임



<그림 1-43> \*Real-time PCR의 amplification graph 예시

\*amplification graph의 한 예로서 해당 그림은 째장 1주차의 data임



<그림 1-44> Real-time PCR을 통한 찜장의 혈전용해 유전자의 상대적 정량화

- 그 결과 균을 첨가해준 찜장이 기존 찜장보다 혈전용해 유전자 DNA 양이 1/3, 많게는 절반 가까이 월등히 많음. 여기는 ZA400 유래 혈전용해 유전자가 큰 역할을 했을 것임
- 따라서 ZA400이 찜장 전체 균총에서 우수하게 자리 잡고 있음을 알 수 있음

**(바) 제조된 찜장의 관능 평가**

- 20주의 발효가 끝난 No inoculation 찜장과 ZA400을 함유한 찜장의 관능특성을 비교해봄
- 색, 향미, 맛, 식감(texture)에 대해서 경희대학교 대학원생 및 학부생 10 명의 패널을 선정하여 단일 맹검 시험법(Single blind test)을 실시함
- 단일 맹검 시험법에 의한 각 항목에 대한 찜장의 선호도는 다음 <표 1-45>와 같음

<표 1-45> ZA400 균 첨가에 따른 찜장에 대한 단일 맹검 시험법 결과

단일 맹검 시험법		선호도		
샘플명	검사항목	ZA400 함유 찜장 (A)	No inoculation 찜장 (B)	A군과 B군의 차이가 없다
찜장	색	1	8	1
	향미	3	2	5
	맛	5	2	3
	식감	2	4	4
	기타	· A,B군 모두 전체적으로 짠 맛이 큼 (2명) · B군은 종이 씹는 것 같은 식감임 (1명)		

- 관능 평가 결과 향미, 맛에 대한 선호도는 균을 첨가해준 찜장에서 높게 나타남
- 색 항목에서는 균을 넣어준 찜장보다는 기존 찜장인 No inoculation 찜장에서 선호도가 높은 것을 알 수 있음. <그림 1-45>처럼 기존의 미접종 찜장에 비하여 ZA400을 접종한 찜장의 색이 훨씬 진한 것을 알 수 있음. 된장과는 다른 이러한 어두운 색이 비선택의 원인으로 작용하게 되었음
- 그러나 <그림 1-45>의 2년 이상 발효된 찜장의 색은 이보다 훨씬 더 어두운 것을 알 수 있음. 이처럼 찜장은 발효가 오래될수록 색이 진해지고 맛이 깊어지는 특성이 있는데, ZA400을 접종한 찜장의 경우 인위적으로 발효균주(*B. subtilis* ZA400)을 더 많이 넣어준 것이므로 발효가 더 빠르게 촉진되어 미접종 찜장에 비해 더 어두운 색이 된 것으로 보여짐
- 이러한 문제는 ZA400을 첨가한 찜장을 제조한 후에 저온에서 숙성시키는 등의 방법을 통하여 ZA400에 의한 발효속도를 조절함으로써 충분히 극복이 가능할 것으로 예상됨



<그림 1-45> 각 찜장 샘플의 색 관찰

#### (4) 한식장류 전문업체를 통한 기능성 발효 미생물을 적용한 청국장 시제품 제조 및 혈전용해능 평가

##### (가) 청국장 제조

- Lab-scale에서의 제조시 높은 fibrinolytic activity를 보인 청국장 또한 ‘뜰안에 된장’을 통해 시제품을 제작하여 혈전용해능이 발현되는지 확인하고자 함
- 제조과정은 다음과 같음 <그림 1-46>



<그림 1-46> 청국장 제조

- 청국장 sample 하나는 *B. subtilis* ZA400을 10<sup>8</sup> CFU/g 이 되도록 접종하였으며 첨가된 균주의 혈전용해능 비교평가를 위하여 균을 접종하지 않은 것을 control(No inoculation)로 하여 각각 5kg의 청국장을 제조함
- 발효 전과 시제품 완료 후 sampling을 하여 혈전용해능이 발현되는지 확인하고자 함

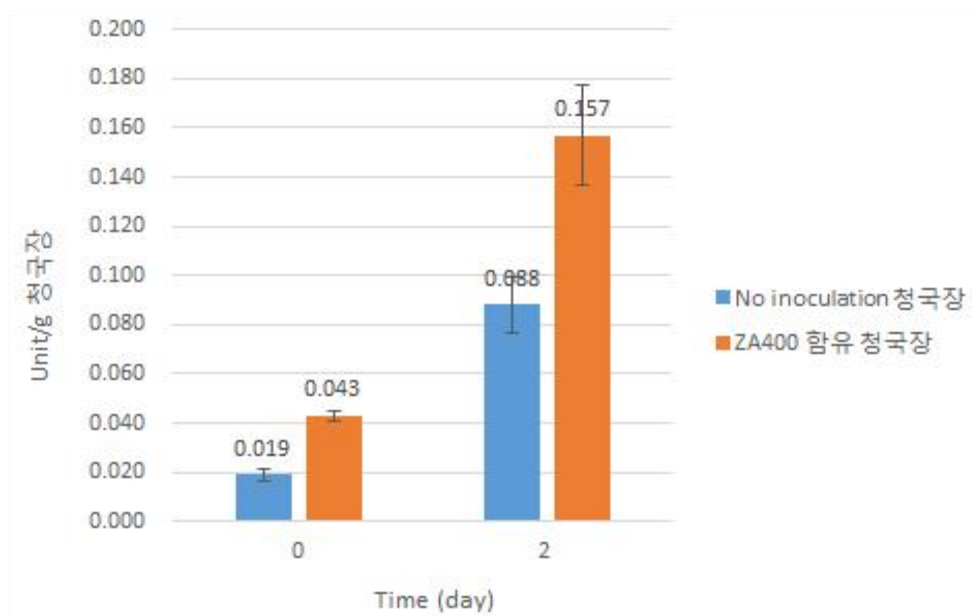
#### (나) 제조된 청국장의 혈전용해능 평가

- 청국장 제조 후 0 day, 2 days의 샘플을 1g씩 샘플링하여 9ml의 1X PBS buffer에 풀어준 후, 상층액(20 ul)을 이용하여 standard fibrin plate method test를 실시하였음 <그림 1-47>
- 또한 각 샘플에 의해 용해된 fibrin의 무게를 잰 후 positive control (0.02U plasmin)이 용해된 fibrin의 무게로 환산하여 혈전용해능을 unit/g(청국장샘플)으로 나타내었음 <그림 1-48>





<그림 1-47> 제조된 청국장에서의 fibrin plate method를 통한 혈전 용해능 평가  
 N.C, 1X PBS; P.C, 0.02U plasmin; 1, No inoculation 청국장 0일차; 2, No inoculation 청국장 2일차; 3, ZA400 함유 청국장 0일차; 4, ZA400 함유 청국장 2일차



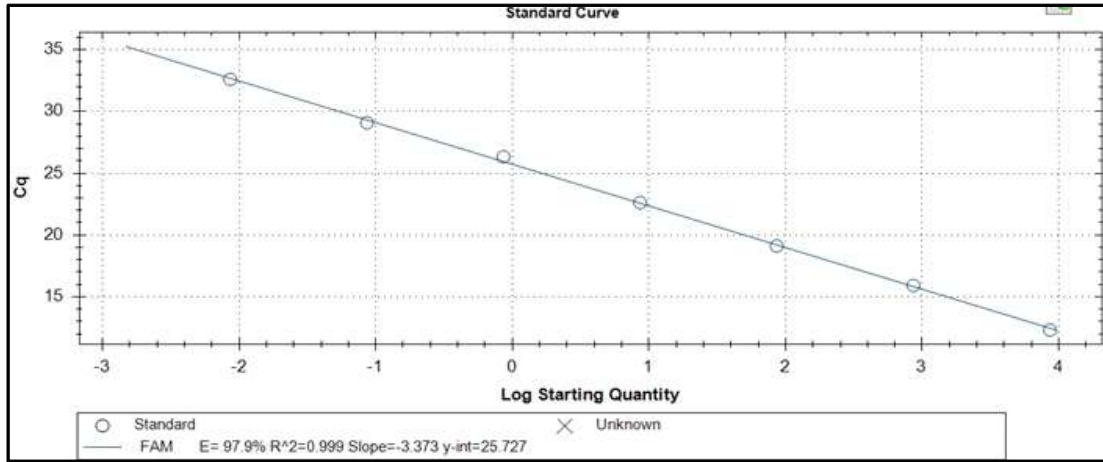
<그림 1-48> 제조된 청국장에서의 혈전용해능 평가

- 실험 결과, ZA400을 첨가하지 않은 청국장에 비하여 ZA400을 첨가한 청국장에서 월등히 강한 혈전용해능이 확인되었음

**(다) Real-time PCR을 통한 청국장 내에서의 혈전용해능 유전자 정량화 및 비교**

- 청국장은 QIAGEN사의 QIAamp DNA Stool Mini kit를 이용하여 DNA를 extraction 함
- primer, probe, PCR mixture 및 조건은 짬장과 같음

- 그 결과 얻어진 standard curve는 <그림 1-49> 와 같음



<그림 1-49> 혈전용해능 유전자의 standard curve

- 0일차 No inoculation, 0일차 Added ZA400, 2일차 No inoculation, 2일차 Added ZA400 청국장 sample에서 isolation 한 DNA에 대한 Real-time PCR 결과는 <그림 1-50>과 같음



<그림 1-50> Real-time을 통한 청국장의 혈전용해 유전자의 정량화 및 비교

- Real-time 결과 ZA400을 넣고 2일간 발효한 청국장에서의 혈전용해능 유전자 DNA의 양이 훨씬 많아진 것을 알 수 있음. 이는 청국장 내에서의 혈전용해 유전자를 가지고 있는 ZA400의 생존은 물론, 높은 성장 가능성이 있는 것으로 여겨짐

- 종합적인 결과 ‘(주)이삭뜯 뜰안에 된장’ 산업체 하에 발효 진행한 청국장에서 *B. subtilis* ZA400의 생존과 높은 성장률을 확인하였으며, 이로 인하여 강한 혈전용해능을 나타내었음. 추후에 이 청국장은 높은 혈전용해 효과를 보이는 경제성 있는 기능성 전통발효 식품으로 성장될 것이라 생각되어짐

**(라) 제조된 청국장의 관능 평가**

- 2일의 발효가 끝난 No inoculation 청국장과 ZA400을 함유한 청국장의 관능특성을 비교해봄
- 색, 향미, 맛, 식감(texture)에 대해서 경희대학교 대학원생 및 학부생 10 명의 패널을 선정하여 단일 맹검 시험법(Single blind test)을 실시함
- 단일 맹검 시험법에 의한 각 항목에 대한 청국장의 선호도는 다음 <표 1-46>와 같음

<표 1-46> ZA400 균 첨가에 따른 찜장에 대한 단일 맹검 시험법 결과

단일 맹검 시험법		선호도		
샘플명	검사항목	ZA400 함유 청국장 (A)	No inoculation 청국장 (B)	A군과 B군의 차이가 없다
청국장	색	4	5	1
	향미	4	2	4
	맛	4	4	2
	식감	1	2	7
	기타	· A군에서 감칠맛이 좀 더 느껴짐 (1명) · B군의 식감이 좀 더 단단한 느낌 (1명) · B군의 경우 끝에서 쓴맛이 났음 (2명)		

- ZA400 균을 넣어준 청국장의 선호도가 약 2.1배 정도 높게 분석된 것으로 보아 향후 기능성 청국장 제조에 균을 적용하였을 때 관능적 거부감 없이 소비자들에게 긍정적인 결과를 보일 것으로 기대됨

**나. 혈전용해 기능성 전통발효식품 시제품 제조**

**(1) 찜장 시제품 제조**

- 20주 동안의 발효가 끝난 찜장(ZA400 함유 찜장, ZA400+ZB193 함유 찜장)은 각각 350g, 500g, 1kg으로 나누어 시제품을 제작하였음 <그림 1-51>



<그림 1-51> 찜장 시제품 사진

(2) 청국장 시제품 제조

- 2일 동안의 발효가 끝난 청국장(ZA400 함유 청국장)은 각각 200g, 1kg으로 나누어 시제품을 제작하였음 <그림 1-52>



<그림 1-52> 청국장 시제품 사진

(3) 제조된 시제품의 기대효과

- 본 연구를 통하여 제조된 찜장 및 청국장의 경우 혈전용해 가능성을 가진 기능성 식품으로서 전통발효식품산업의 발전에 이바지할 것으로 예상됨
- 특히 청국장의 경우 제조 및 발효 기간이 짧고, 제조된 시제품의 혈전용해 가능성이 기존의 것보다 약 2배 가량 높게 측정됨에 따라 기능성 식품으로서 효과가 훨씬 더 우수하게

작용할 수 있을 것으로 기대됨

- 그러나 실제 이 제품을 섭취한 후의 장내 균총 변화에 대한 영향 및 체내에서 실제로 어느 정도의 혈전용해 가능성이 발휘되는지 등의 연구가 깊이 있게 이루어져야 할 것이며, 이러한 결과를 통하여 전통 발효 식품의 안전성 확보 및 차별화 등을 가져올 수 있을 것임

## 제2절 제 1협동과제

### 1. 미생물 군집 및 대사체 분석을 위한 전통발효식품의 선정

- 제 1세부과제에서 수행한 김치류, 젓갈류, 메주 등 8가지 전통발효식품 내 미생물 군집의 AP-PCR 및 DGGE 분석결과를 바탕으로 특정한 전통발효식품을 선정하여 발효기간 중 미생물 군집의 변화 및 대사체 분석을 통한 유용 발효 미생물을 선정, 분리 및 동정하고자 하였음
- 제 1세부과제에서는 발효가 완료된 전통발효식품에 대한 미생물 군집 및 기능성 발효 미생물 분리 연구를 진행하였으므로 제 1협동과제에서는 발효가 진행되는 동안의 미생물 군집의 변화 및 그에 따른 대사체 분석을 연구하였음
- 한국의 대표적인 발효식품인 김치에 관한 균총 및 기능성에 관한 연구는 다양한 측면에서 활발하게 진행되어왔으나, 그에 비하여 젓갈류 및 메주, 된장에 관한 연구는 다소 미흡한 부분이 있기 때문에 제 1협동과제에는 젓갈과 메주 내 미생물 군집 및 대사체 분석을 진행하고자 하였음
- 특히 DGGE 결과 상 다른 전통발효 식품에 비하여 젓갈에 매우 다양한 미생물 군집이 형성되어 있는 것으로 분석되어 젓갈의 미생물 군집 변화 및 대사체 연구에서 다양한 유용 발효 미생물을 분리할 수 있을 것으로 기대됨

### 2. 젓갈 내 미생물 군집 및 대사체 정보 분석

#### 가. 젓갈 시료 선정 및 중점사항

- 본 연구에서는 한국 전통 발효식품인 젓갈 내 발효기간별 미생물 군집 및 대사체 변화를 조사하고, 젓갈발효 기간 중 미생물변화에 따른 대사체 변화를 통계학적 방법을 사용하여 각각 적으로 상관관계를 조사함으로써 유용미생물을 선정하고자 하였음
- 선정된 유용미생물은 분리 및 동정하고자 하였고, 다음 연구에 필요한 기능성 유전체 정보 획득을 위한 기반연구를 수행하고자 하였음

#### 나. 젓갈 제조 방법

- 멸치액젓은 포항, 여수, 그리고 남해의 미조항에서 멸치를 직접 구매하여 실험실내에서 제조 하였음

- 각 지역에서 구매한 멸치는 지역별로 크기가 각기 다르며, 작은 크기의 멸치(Small, 6-8cm, 포항멸치), 중간 크기의 멸치(Midium, 8-12cm, 여수멸치), 가장 큰 크기의 멸치(Large, 12-16cm, 남해멸치)로 구분되었음
- 멸치젓의 염 농도가 25%가 되도록 소금과 멸치의 건조중량을 고려해 전라남도 신안의 천일염을 10 kg 의 멸치에 3.2 kg의 소금을 첨가하였으며, 멸치와 천일염을 골고루 섞어서 3회 반복 실험을 위해 3개의 플라스틱 용기에 각각 담은 후, 소금물을 소금과 섞인 멸치가 잠기도록 플라스틱 용기에 첨가하였음 <그림 2-1.A>
- 제조된 멸치젓은 25℃에서 발효하면서 멸치젓국을 취하여 발효미생물 분리에 사용하였음
- 새우젓도 멸치젓과 함께 발효 미생물 분리를 위하여 제조하였음
- 새우젓의 새우는 인천의 소래포구에서 직접 구매하였고, 새우젓은 실험실내에서 제조하였음.
- 새우젓의 염 농도는 25%가 되도록 제조하였으며, 이 때 새우에 첨가하는 소금은 전라남도 신안의 천일염을 첨가하였고, 첨가하는 소금의 양은 3 kg의 새우에 소금과 새우의 건조중량을 고려한 양인 800 g을 첨가하여 제조하였음
- 새우와 천일염을 골고루 섞어 3회 반복 실험을 위해 3개의 플라스틱 용기에 각각 담은 후, 소금물을 소금과 섞은 새우가 잠기도록 플라스틱 용기에 <그림 2-1.B>와 같이 첨가하였음.
- 제조된 새우젓의 염도는 염도계로 확인하였고, 15℃에서 발효하면서 새우젓국을 취하여 발효 미생물 분리를 위해 사용하였음



<그림 2-1> 발효미생물 분리를 위해 제조된 멸치젓(A), 새우젓(B)

#### 다. 멸치 젓갈의 발효기간에 따른 미생물 군집변화

##### (1) 발효시기별 pH 및 세균수 변화 측정

- 위에서 제조한 멸치젓에 사용된 멸치는 지역별로 크기가 달랐으며, 작은 크기의 멸치(Small, 6-8cm, 포항멸치), 중간 크기의 멸치(Midium, 8-12cm, 여수멸치), 가장 큰 크기의 멸치(Large, 12-16cm, 남해멸치)로 구분되었음 <그림 2-2>



<그림 2-2> 발효 미생물 분리를 위해 제조된 세 종류의 멸치액젓

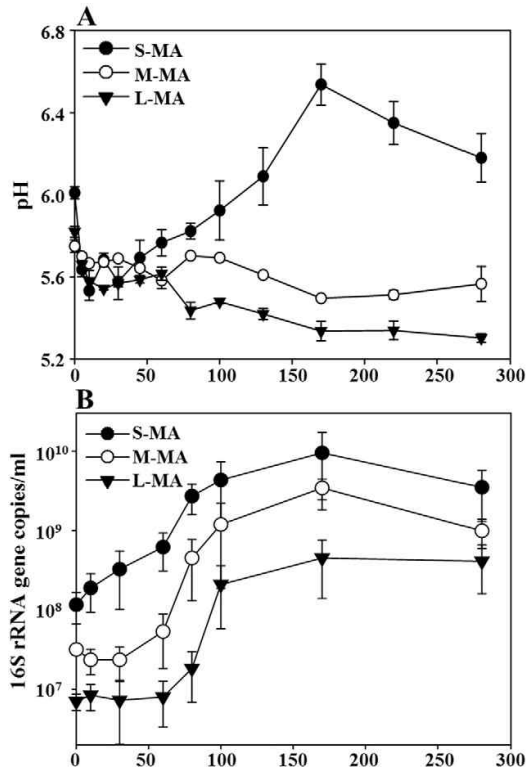
- 각 멸치의 종류별로 수분, 단백질, 탄수화물, 회분 분석을 실시한 결과, 각 성분들 중에서도 지방의 함량이 멸치의 크기가 커질수록 높아지는 것을 확인할 수 있었음 <표 2-1>

<표 2-1> 세가지 멸치액젓 제조를 위해 사용한 Small, Midium, Large 멸치의 특성분석

Anchovies (fishing time)	Range of length (cm)	Range of weight (g)	Average content $\pm$ SD <sup>a</sup>				
			Moisture	Total proteins	Total carbohydrate	Lipids	Ash
Small (Aug. 2011)	5-8	2-5	74.9 $\pm$ 0.3	18.9 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2
Medium (Aug. 2011)	8-10	5-10	72.3 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2
Large (Jan. 2012)	10-13	10-16	72.3 $\pm$ 0.4	17.6 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup> The contents were measured in triplicate and SD represents standard deviation.

- 멸치액젓 제조부터 제조 후 280일간 주기적인 간격으로 멸치액젓 시료채취와 동시에 pH를 측정하여 발효패턴을 관찰하였음 <그림 2-3>
- 측정결과 발효초기에는 세 가지 멸치액젓 모두 pH 5.5-5.7 정도로 모두 비슷하게 나타나지만, 발효 후기로 갈수록 작은 크기의 멸치로 만든 멸치액젓 (S-MA)은 약 pH 6.5까지 꾸준히 증가하다가 발효후반에 급격하게 감소하는 경향을 확인할 수 있었음
- 하지만 나머지 두 종류의 멸치액젓(M-MA, L-MA)은 시간의 경과와 상관없이 pH 5.3-5.6 정도로 꾸준히 유지되는 것을 확인할 수 있었음
- 초기의 멸치액젓 세균의 수는 멸치크기의 반비례하여 확인되었음
- 발효 기간 중 미생물의 변화는 멸치의 크기가 작을수록 멸치액젓에서의 세균의 풍부도가 높은 경향을 확인할 수 있었고 특이한 점은 작은 멸치로 만든 멸치액젓은 발효초반부터 세균의 수가 증가한 반면 M-MA, L-MA에서는 발효초기에는 변화가 없다가 발효 중기에서야 세균의 수가 증가하는 경향을 확인할 수 있었음
- 작은 크기의 멸치액젓 (S-MA)에서 가장 세균의 수가 많을 때는 170일  $9.5 \times 10^9$  이지만, 중간크기의 멸치액젓 (M-MA)와 큰 크기의 멸치액젓 (L-MA)는 각각  $3.4 \times 10^9$ 와  $4.5 \times 10^8$ 인 것을 확인할 수 있었음



<그림 2-3> 크기가 다른 멸치로 제조한 멸치액젓의 발효기간 중 pH와 세균 수의 변화

(2) 발효시기별 멸치 젓갈 내 기능성 발효미생물의 군집 변화

- 멸치액젓 시료를 bead beating 방법을 사용하는 FastDNA Spin Kit for Soil(MP-Bio)를 사용하여 멸치 크기별로 제조된 세 종류의 멸치액젓에서 시기별로 시료를 채취하여 각 시료에서 전체 genomic DNA를 추출하였으며, 추출한 DNA는 0.7% (w/v) agarose gel electrophoresis를 통하여 추출여부를 확인하였음
- 멸치액젓 시료내의 전체 미생물의 다양성을 분석하기 위하여 16S rRNA 유전자 중 초 가변 영역인 V1-V3부분을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 (27F-518R)를 제작하여 추출된 DNA를 증폭하였음 <표 2-2>

<표 2.2> 바코드-PCR 프라이머에 사용된 어댑터와 바코드 염기서열 목록

시료	바코드 염기서열 (5'-3')
S0	ATGCTGAG
S5	TACAGCAG
S10	ATGCAGAC
S20	AGATCGCT
S30	CATGTAGC
S45	ATCGTGTG
S60	CTACACAG
S80	TAGCTACG
S100	TCGAGTAG



S130	TGACTCTG
S170	ACACTGTG
S220	ATGCAGAC
S280	ACACTGTG
M0	ATGTGTCTAG
M5	ATGTACGATG
M10	ATCGTCTGTG
M20	ATCGTAGCAG
M30	ATCACGTGCG
M45	AGTCTGACTG
M60	TGAGTGACGC
M80	TGAGTGACGC
M100	TCTGTCTCGC
M130	TCGCAGACAC
M170	TATCTGTACGC
M220	TCGCTAGTGTA
M280	CACACGATAG
L0	ACTACACGC
L5	ACTCGTATC
L10	TGACTCGAC
L20	CTGTCTACG
L30	CAGTCTCGA
L45	AGTCACTAG
L60	CAGACAGAT
L80	ACGACAGTA
L100	AGCTCACTG
L130	ATACGTACG
L170	CGTGTACTG
L220	CAGTCTCGA
L280	CACTATGTG
어댑터 염기서열	
A 어댑터	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
B 어댑터	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG

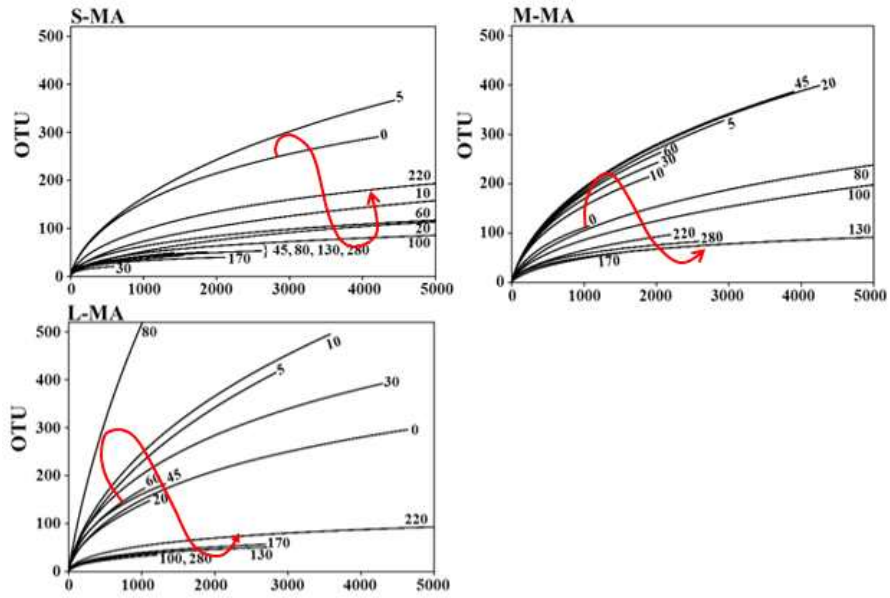
- 각 시료별 정제된 PCR 증폭 산물은 동일한 양으로 하나의 샘플로 합쳐서 파이로시퀀싱을 의뢰하였으며, 그 결과 총 159,701개의 염기서열 read를 얻었고, QC (Quality control)를 통해 그 중에서 quality score 값이 낮거나, read의 길이가 짧거나, 세균에 비 특이적인 read를 제거하고 마지막으로 chimera sequence 들을 제거한 결과 130,727개의 read를 얻을 수 있었음
- 이러한 결과를 RDP pyrosequencing pipeline를 이용하여 97% similarity 수준에서 분류 조작상 단위 (Operational Taxonomic Unit, OTU)를 계산한 후 희박곡선 (rarefaction curve) 과 다양성 지수인 Shannon-Weaver 지수와 Chao1과 균등도를 계산하였음 <표 2-3> <그림 2-4>

<표 2-3> 멸치액젓 시료별에서의 바코드-파이로씨퀀싱 데이터 요약 및 미생물 다양성분석

Subject	Days	Total reads	High quality reads	Average read length	OTU*	Shannon-Weaver*	Chao1*	Evenness*
S-MA	0	5525	4220	464	291	3.7	434	0.66
	5	5512	4444	462	367	3.7	581	0.63
	10	7430	6258	465	174	2.4	278	0.47
	20	6999	5709	471	119	2.2	146	0.46
	30	681	595	475	21	1.6	32	0.53
	45	2185	1867	476	51	2.1	58	0.54
	60	6571	5372	474	120	2.5	164	0.52
	80	1976	1554	474	44	1.9	75	0.51
	100	6193	5253	474	87	2.2	116	0.49
	130	3026	2616	469	53	2.2	66	0.56
	170	2460	2117	467	40	2	45	0.54
	220	9663	8758	448	231	2.8	307	0.52
280	1494	1417	454	49	1.6	63	0.41	
M-MA	0	1161	1073	467	115	2.9	187	0.61
	5	3413	2933	442	328	3.5	573	0.61
	10	1903	1898	441	214	3.4	352	0.63
	20	4819	4258	440	399	3.6	624	0.61
	30	2254	2028	441	244	3.5	427	0.63
	45	4496	3900	442	387	3.8	644	0.64
	60	6116	2063	446	264	3.7	508	0.67
	80	6529	6228	459	262	2.6	411	0.47
	100	8803	8791	463	255	2.1	376	0.39
	130	5722	5713	463	95	2.1	113	0.45
	170	1701	1696	481	64	1.3	103	0.32
	220	2214	2204	478	97	2	151	0.43
280	2606	2594	467	83	2	120	0.46	
L-MA	0	6589	4646	465	296	3.6	419	0.64
	5	4769	2842	459	415	4.3	756	0.71
	10	5708	3583	461	495	4.6	903	0.74
	20	1458	1114	464	148	3.5	329	0.71
	30	6452	4299	455	392	4.5	556	0.75
	45	1973	1328	458	183	4	295	0.76
	60	1522	1047	461	174	4	296	0.77
	80	4600	3116	457	1050	6.2	2233	0.89
	100	1454	1141	479	40	1.2	61	0.31
	130	3421	2713	481	51	1.4	68	0.35
	170	2821	2699	462	57	1.7	70	0.43
	220	6204	5425	463	95	2.1	118	0.46
280	1278	1215	463	35	1.6	53	0.45	

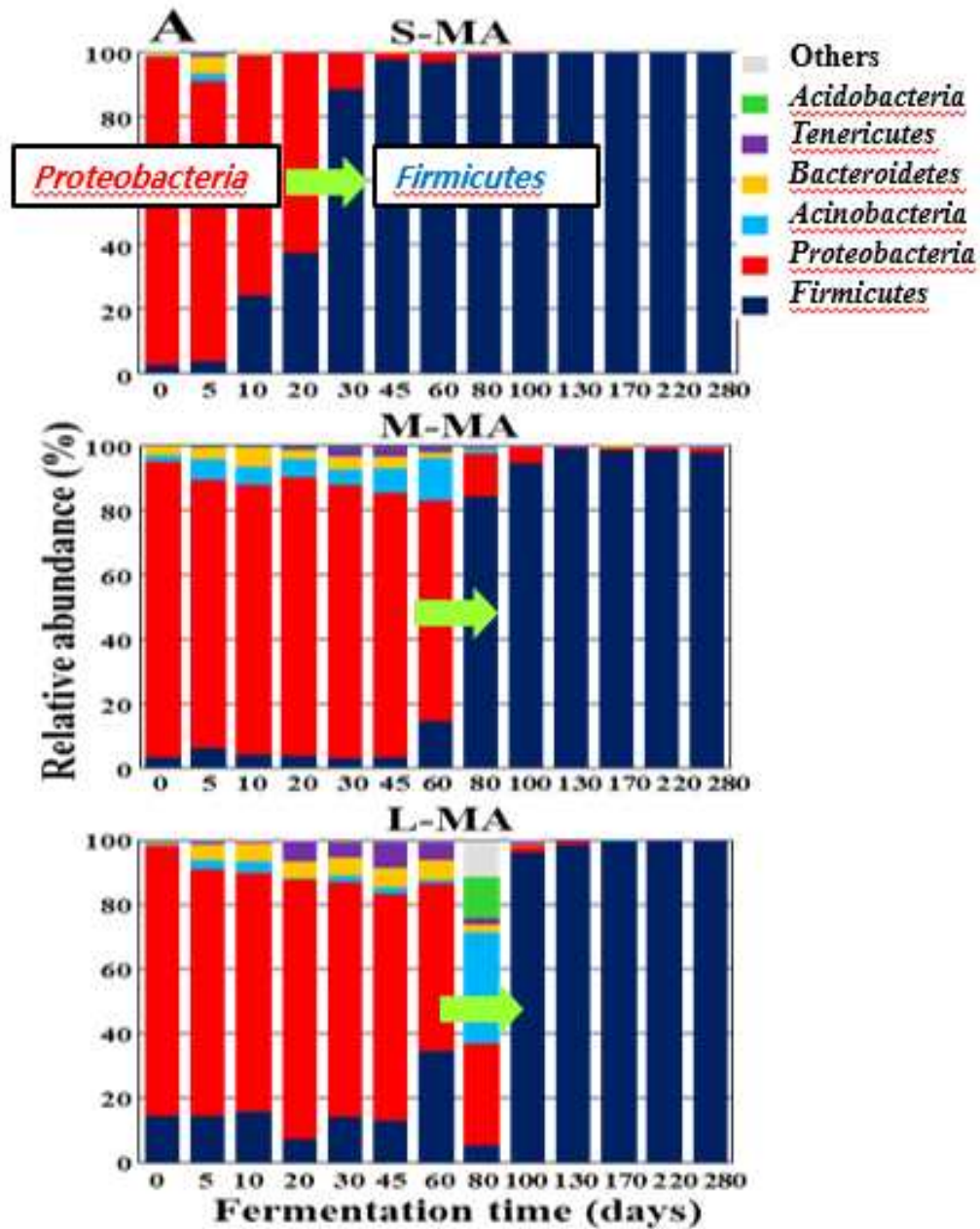
\*축약: OTUs, operational taxonomic units

- 회박곡선 분석결과, 미생물의 다양성은 세 종류의 멸치액젓 모두 발효 초기에 증가하지만 발효 후반에는 점차 단순해지는 것이 확인되었음
- 시료별 미생물 다양성이 단순해지는 시기는 S-MA는 발효초기인 5일부터, M-MA는 45일부터 그리고, L-MA는 80일부터로 확인 되었고, 이를 통해 멸치의 크기가 커질수록 미생물의 다양성이 증가하지 않는 시기가 늦어지는 것을 확인할 수 있었음



<그림 2-4> 발효기간에 따른 멸치액젓의 미생물 희박곡선 (rarefaction curve) 변화  
작은 멸치 액젓 (S-MA), 중간 멸치 액젓 (M-MA), 큰 멸치 액젓 (L-MA)

- 각 시료별 미생물 군집분석은 RDP naïve Bayesian rRNA Classifier를 이용하여 분석하였음
- 분석결과 문 (Phylum)수준에서는 발효초기 *Proteobacteria*가 우점하고 있었으나, 발효 후반에는 세 종류의 멸치액젓 모두 *Firmicutes*로 미생물 군집이 대체되는 것을 확인할 수 있었음

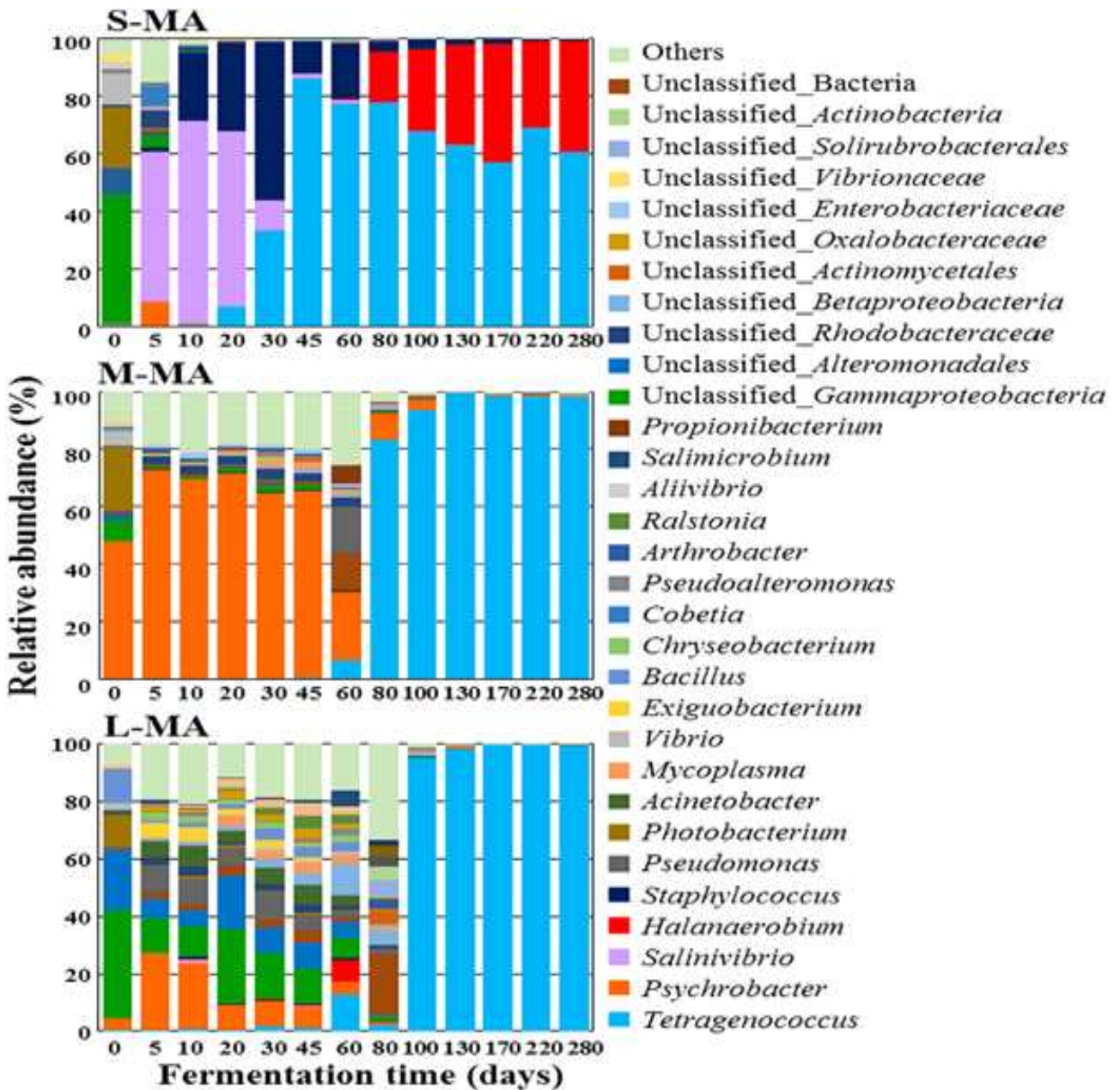


<그림 2-5> 발효기간에 따른 멸치액젓의 미생물 군집변화 (phylum 수준)  
 작은 멸치 액젓 (S-MA), 중간 멸치 액젓 (M-MA), 큰 멸치 액젓 (L-MA)

- 미생물 군집이 *Firmicutes*로 대체되는 속도는 작은 멸치로 제조한 멸치액젓일수록 빨라지는 것을 확인할 수 있었음 <그림2-5>
- 마찬가지로 발효초기의 속(genus) 수준에서의 미생물 군집의 천이 또한 멸치의 종류에 따라서 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었음
- S-MA는 발효 초기에는 멸치에서 유래하였을 것이라 생각되는 *Vibrio*, *Photobacterium*이 나타나지만, 발효 5일 이후부터 중반까지는 *Salinivibrio*와 *Staphylococcus*가 우점하였고, M-MA는 발효 초기에 역시 멸치에서 유래하였을 것이라 생각되는 *Photobacterium*이 나타

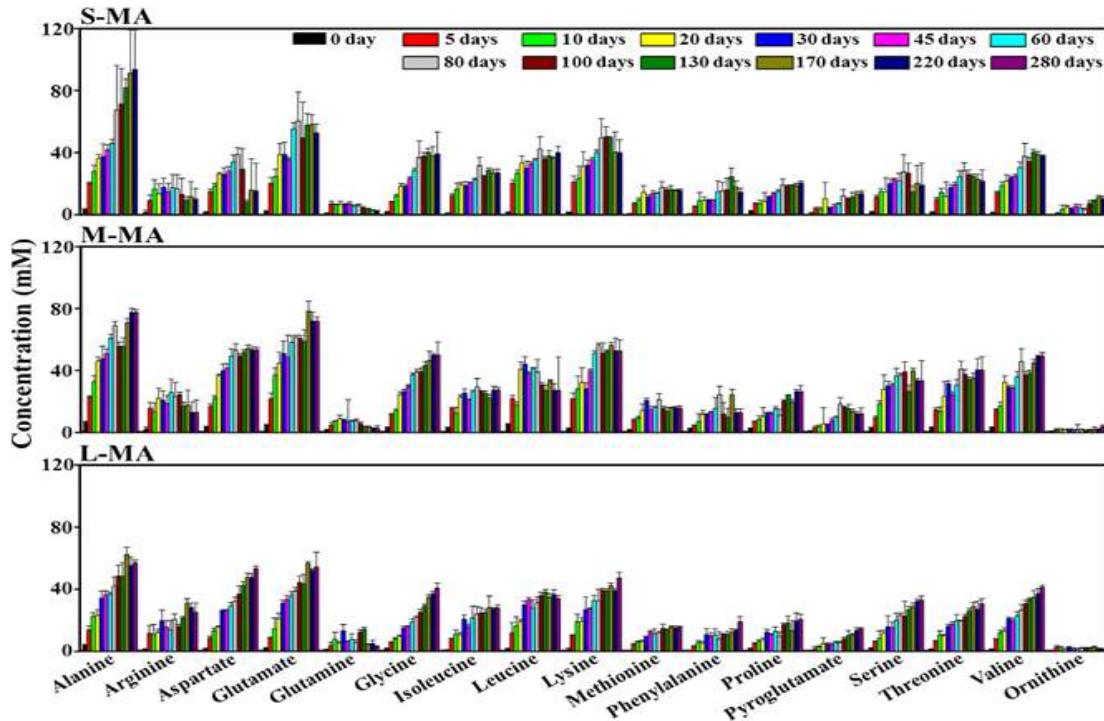
나며, 발효 초기부터 중반까지는 *Psychrobacter*가 우점하였음

- 그리고 L-MA는 발효 초기부터 중반까지 *Psychrobacter*, *Pseudomonas*이외의 다양한 미생물들이 등장하지만 우점 하는 미생물은 나타나지 않았음
- 하지만 발효 중기가 지나면 모든 멸치액젓은 멸치의 종류와 상관없이 *Tetragenococcus*에 의해서 우점 되는 것을 확인할 수 있었고, 예외적으로 S-MA는 *Tetragenococcus*이외에도 부패에 관여하고 있을 것이라 생각되는 *Halanaerobium*이 함께 등장하는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-6>



<그림 2-6> 발효기간에 따른 멸치액젓의 미생물 군집변화 (genus 수준)  
작은 멸치 액젓 (S-MA), 중간 멸치 액젓 (M-MA), 큰 멸치 액젓 (L-MA)

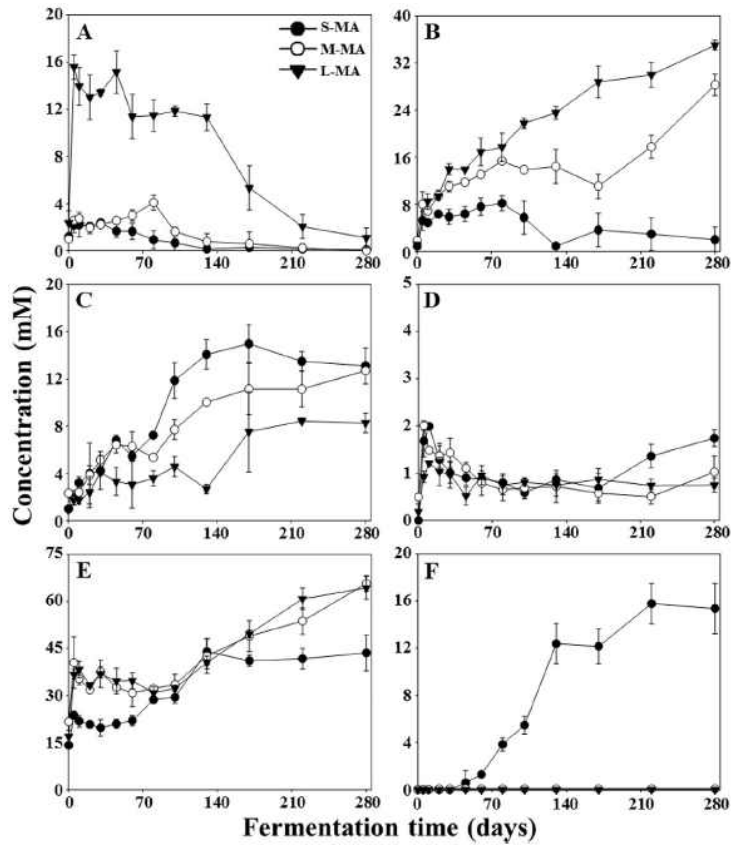




<그림 2-8> 발효기간에 따른 멸치액젓의 아미노산 변화

작은 멸치 액젓 (S-MA), 중간 멸치 액젓 (M-MA), 큰 멸치 액젓 (L-MA)

- 멸치젓 내에 존재하는 glucose, glycerol, acetate, butyrate, lactate, putrescine과 같은 대사체도  $^1\text{H-NMR}$ 을 통하여 분석하였음 <그림 2-9>
- 멸치의 glycogen에서 유래하였을 것이라 생각되는 glucose는 L-MA에서 발효초기에 다른 두 종류의 멸치액젓에 비해서 대조적으로 상당히 풍부하게 존재하고 있는 것으로 확인되지만, 발효 초기 이후에 계속해서 감소하는 것을 확인할 수 있었음
- 멸치의 지방에서 유래하였을 것이라 생각되는 glycerol은, glucose와는 대조적으로 시간에 따라 계속해서 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 멸치의 크기가 클수록 더 빨리 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- Acetate의 함량은 멸치의 크기가 작을수록 빨리 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, butyrate함량은 세 종류의 멸치젓 모두 발효 기간에 따라서 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었음
- Lactate는 세 가지 멸치젓에서의 가장 많이 생성되므로 주요 유기산임을 확인할 수 있었고, 시간에 따라서 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 바이오제닉 아민 중 하나인 putrescine은 오직 S-MA에서만 시간에 따라서 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- Histamine, tyramine, cadaverine과 같은 멸치액젓에서 생산된다고 이미 알려져 있는 바이오제닉 아민은 확인되지 않았음

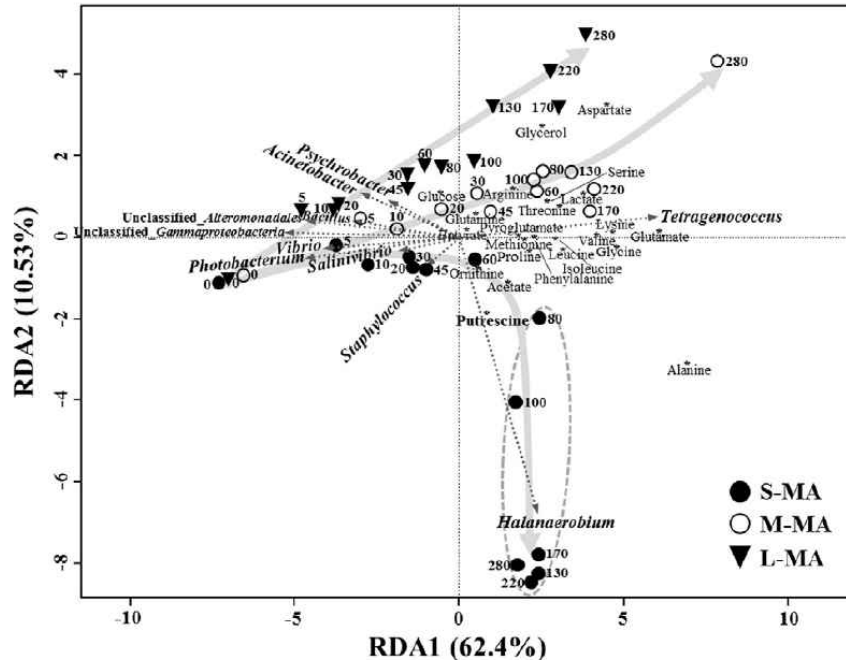


<그림 2-9> 발효기간에 따른 멸치액젓의 주요 유기 성분

[glucose (A) glycerol (B), acetate (C), butyrate (D), lactate (E), and putrescine (F)] 변화  
작은 멸치 액젓 (S), 중간 멸치 액젓 (M), 큰 멸치 액젓 (L)

- 이와 함께 RDA (Redundancy analysis, 중복성분석) 통계분석을 통해 멸치액젓 대사체 변화양상과, 이에 따른 community와의 상관성에 함께 분석하였음 <그림 2-10>
- M-MA와 L-MA는 발효 후반에 *Tetragenococcus*가 발효에 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있었으며, 다양한 아미노산 성분들이 주성분으로 나타나는 것을 확인할 수 있었음
- 특히 감칠맛을 내는 아미노산인 aspartate와 glutamate가 두 멸치액젓의 발효 후반에 다량 검출되었음
- 하지만 이와는 반대로 S-MA는 *Tetragenococcus*보다는 *Halanaerobium*이 발효에 더욱 영향을 끼치는 것으로 확인되었음





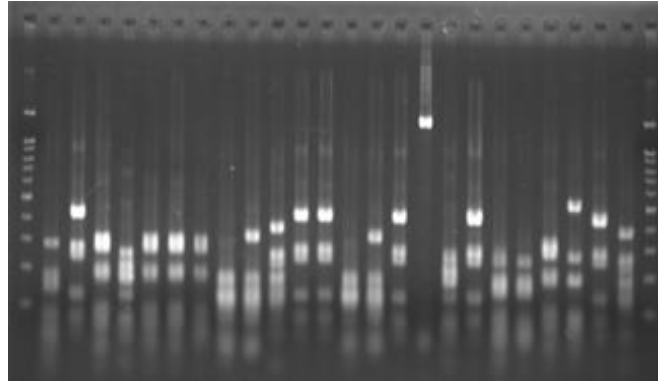
<그림 2-10> 멸치액젓 발효기간에 따른 대사체 변화와 세균 군집간의 상관관계 분석  
작은 멸치 액젓 (S-MA), 중간 멸치 액젓 (M-MA), 큰 멸치 액젓( L-MA)

### 3. 젓갈 유래 유용 발효미생물의 분리, 동정 및 기능성 탐색

#### 가. 멸치젓갈 유래 기능성 발효미생물 탐색

##### (1) 멸치 젓갈로부터 발효 균주 분리

- 제조된 젓갈로부터 미생물을 분리하기 위해 젓국에서 채취한 시료를 PBS (phosphate buffered saline) buffer를 이용하여 희석하고, NaCl로 염도를 조절(0%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%)한 Marine agar 배지에 도말하여 배양하였음
- 미생물 분리 시 중복을 최소화 하기위해 콜로니 모양 및 색깔로 구분하여 콜로니를 선택하고, 순수 미생물(single colony)을 분리 하였음
- 분리한 미생물의 중복성을 배제하기 위하여 미생물의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후, ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, 증폭된 rDNA 제한 분석)를 실시하였음 <그림 2-11>



<그림 2-11> ARDRA 분석에 의한 미생물 중복성 배제

## (2) 분리된 멸치젓갈 유래 발효 균주의 동정

- ARDRA 분석결과 유일한 패턴을 보이는 미생물들을 선별하여 PCR을 통해 증폭된 16S rRNA 유전자를 F1 primer만 이용하여 16S rRNA 유전자 서열을 부분적으로 분석하였으며, 이렇게 얻어진 16S rRNA 유전자 서열을 GenBank에서 BLAST program을 이용하여 16S rRNA 유전자의 상동성을 분석하였음
- 그 결과 약 100여종의 미생물이 분리 되었고, 이 중 ARDRA와 16S rRNA 유전자 서열을 분석 통해 약 10여종이 신종 후보균으로 분리 되었으며, 신종 후보균으로 분류된 미생물의 경우 16S rRNA 유전자를 증폭한 후 TOPO TA cloning kit (Invitrogen)을 이용하여 *E. coli*에 형질 전환 한 후 얻어진 colony의 Plasmid에 삽입된 16S rRNA 유전자 서열을 분석 하였음
- 이렇게 얻어진 16S rRNA 서열을 이용하여 GenBank에서 BLAST program을 이용한 유연 관계가 있는 미생물을 검색하였고, 그 결과를 바탕으로 분자계통학적인 분석을 실시하였으며 그 결과는 <표 2-4>과 같음

<표 2-4> 멸치 젓갈에서 분리한 미생물을 바탕으로 한 분자계통학적 분석

Sample Name	Closest strain	Identity(%)
M1	<i>Nocardiopsis litoralis</i>	99.8
M2	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>	99.6
M3	<i>S. salexigens</i>	98.9
M8	<i>Chromohalobacter canadensis</i>	99.1
M9	<i>Halomonas sinaiensis</i>	98.6
M22	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	99.5
M24	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	99.3
NM1	<i>Phychrobactera limentarius</i>	98.11
NM2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99.88
NM3	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.4
NM4	<i>Salinisphaera orenii</i>	96.47
NM6	<i>Ocianobacillus picturae</i>	99.89
NM8	<i>Ocianobacillus picturae</i>	99.87
NM9	<i>Virgibacillus soli</i>	94.19
NM10	<i>Psychrobactera limentarium</i>	98.35
NM13	<i>Bacillus anthracis</i>	99.87
NM14	<i>Lentibacillus juripiscarium</i>	94.32
JT-1	<i>Vibrio azureus</i>	99.02
JT-3	<i>Vibrio hepataius</i>	99.24
JT-4	<i>Photobacterium jeanii</i>	98.92
JT-5	<i>Vibrio azureus</i>	99.13
JT-6	<i>Vibrio alfacensis</i>	100
JT-8	<i>Vibrio atypicus</i>	99.58
JT-9	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	99.79
JT-10	<i>Vibrio owensii</i>	99.21
JT-11	<i>Vibrio campbellii</i>	99.9
JT19	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
SJ7	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	99.89
SJ9	<i>Vibrio azureus</i>	99.23
S4	<i>Vibrio azureus</i>	98.56
S8	<i>Vibrio azureus</i>	98.38
S10	<i>Vibrio communis</i>	99.46







(3) 분리된 멸치젓갈 유래 발효 균주의 기능성 및 기능성 유전자 후보군의 선별

(가) Aflatoxin 생산 곰팡이(*Aspergillus flavus*)의 생장을 억제하는 미생물 탐색 및 기능성 연구

- 식품에서 곰팡이류인 *A. flavus*는 ‘aflatoxin’이라는 독성대사물질을 생성하여 사람에게 간독성, 돌연변이성을 일으킬 가능성이 있기 때문에 식품의 안정적인 생산에 제한요인이 될 수 있음
- 특히 ‘aflatoxin’은 국제 암 연구소에서도 발암물질로 분류할 정도로 위험도가 크기 때문에 이를 방지하기 위한 여러 가지 방법 중, 효과적이면서 식품에서 사용할 수 있을 정도로

안전하며, 자연 친화적인 생물학적 억제 방법을 마련하기 위해 식품(젓갈)에서 분리한 미생물을 이용한 *A. flavus* 억제 연구를 수행하고자 하였음

- *A. flavus*의 성장을 억제하는 미생물을 탐색하기 위한 Inhibition zone 실험을 실시하기 위하여 *A. flavus*와 후보미생물을 배양하기 위한 배지는 각기 다른 두 종류의 평판배지를 사용하였음
- *A. flavus*는 전용배지인 PDA (potato dextrose agar) 배지에 2% NaCl을 첨가하여 *A. flavus*뿐만 아니라 젓갈에서 분리한 호염성 후보미생물 역시 모두 성장할 수 있게 하였으며, 다른 하나는 호염성 미생물 전용배지인 Marine agar배지를 사용하여 역시 미생물과 *A. flavus*가 모두 성장 할 수 있도록 하였음
- 각각의 평판배지에 한쪽에는 젓갈에서 분리된 미생물을 35 mm의 길이로 획선 도말하여 각각 접종하고, 50 mm 떨어진 반대쪽에는 PDA 평판배지에서 미리 배양한 *A. flavus*를 지름 6.5 mm 코르크 보러를 사용하여 균사가 배양되어있는 배지를 떼어서 접종하였음
- 접종 후 25°C 에서 5일간 배양하면서 길항균으로부터 *A. flavus*의 균사생장 억제거리를 측정하였음
- 실험 결과 <그림 2-12>과 같이 젓갈에서 분리된 후보미생물 중에 *A. flavus*의 성장을 가장 많이 억제한 균은 총 두 균주로, *Bacillus* sp. MJ41와 *Bacillus* sp. My9 균주가 대략 20-30%의 *A. flavus* 균사 생장 억제를 보이는 것을 확인하였음

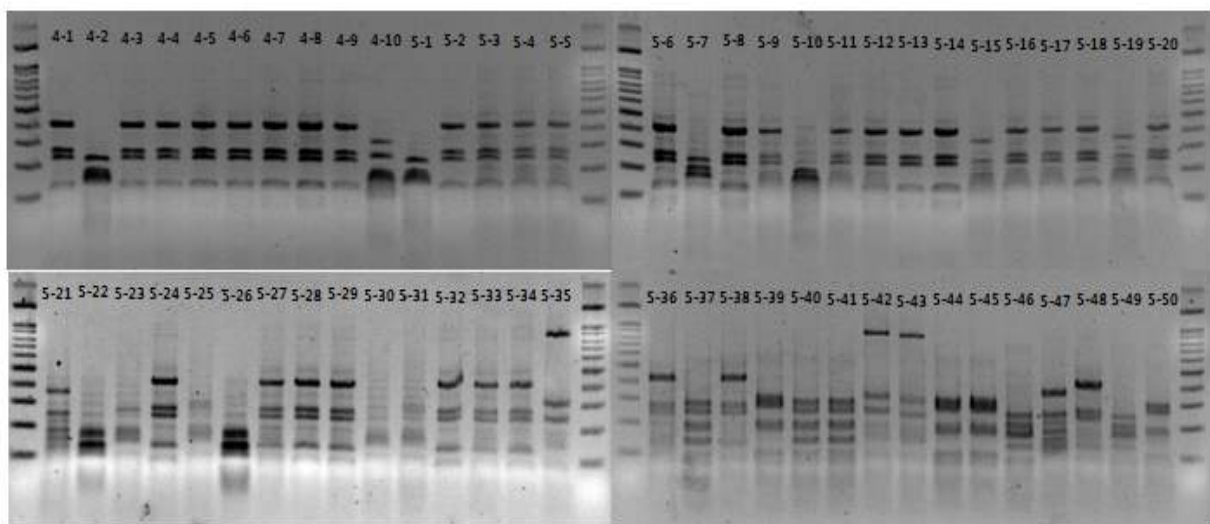
	<i>Bacillus</i> sp. MJ41	<i>Bacillus</i> sp. My9	Control
PDA (Potato dextrose agar)+ 2% NaCl	 4.2 cm 19.2% inhibition	 3.6 cm 30.8% inhibition	 5.2 cm
MA (Marine agar)	 3 cm 25% inhibition	 3.2 cm 20% inhibition	 4 cm

<그림 2-12> 멸치 젓갈 유래 미생물의 *A. flavus* 생장 억제확인

## 나. 새우젓갈 유래 기능성 발효미생물 탐색

### (1) 새우 젓갈로부터 발효 균주 분리 및 동정

- 한국 전통 염장 발효식품인 젓갈의 경우, 젓갈 제조에 사용되는 원재료(멸치, 새우 등) 및 미생물의 protease 작용에 의해 젓갈 숙성이 일어나는 것으로 알려져 있음
- 그러나 현재까지 젓갈과 같은 극 고염환경(25-30%)에서의 protease 작용이 있는 미생물에 대한 분리 및 특성 분석과 관련한 보고는 많이 이루어져 있지 않으며, 특히, 젓갈 스타터로 사용될 미생물 균주의 경우, 빠른 젓갈 숙성을 유도하여 생산량의 증가를 가능케 해야 하는 이유로 미생물의 고염환경에서의 높은 protease 활성은 필수적임
- 따라서 본 연구를 통해, 실제 젓갈에서 다양한 미생물을 분리하고 고염에서의 protease 활성을 나타내는 미생물을 분리하고자 연구를 진행하였음
- 부가적으로, 새우와 같은 갑각류의 구성 성분인 키틴(chitin)을 분해하는 미생물을 관찰해 보고자 하였음
- 새우젓으로부터 미생물을 분리하기 위해 젓국에서 채취한 시료를 PBS(phosphate buffered saline) buffer에 연속 희석하여 염도(0%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%)를 각기 달리한 Marine agar 배지에 도말하였음
- 콜로니를 형태학적 특성(색, 모양)에 따라 선택하고 1회 계대배양을 통해 순수 분리한 후 분리된 미생물은<그림 2-13>와 같이 16S rRNA 유전자-ARDRA 분석을 수행하여 중복성을 줄이고, 16S rRNA 유전자 서열 sequencing을 통해 얻어진 16S rRNA 유전자 서열은 ez-taxon 및 NCBI-BLAST program을 이용하여 기존 데이터베이스와의 비교를 통해<표 2-5>와 같이 상동성(similarity 및 identity)을 분석하였음



<그림 2-13> 16S rRNA gene-ARDRA fingerprinting 패턴 분석

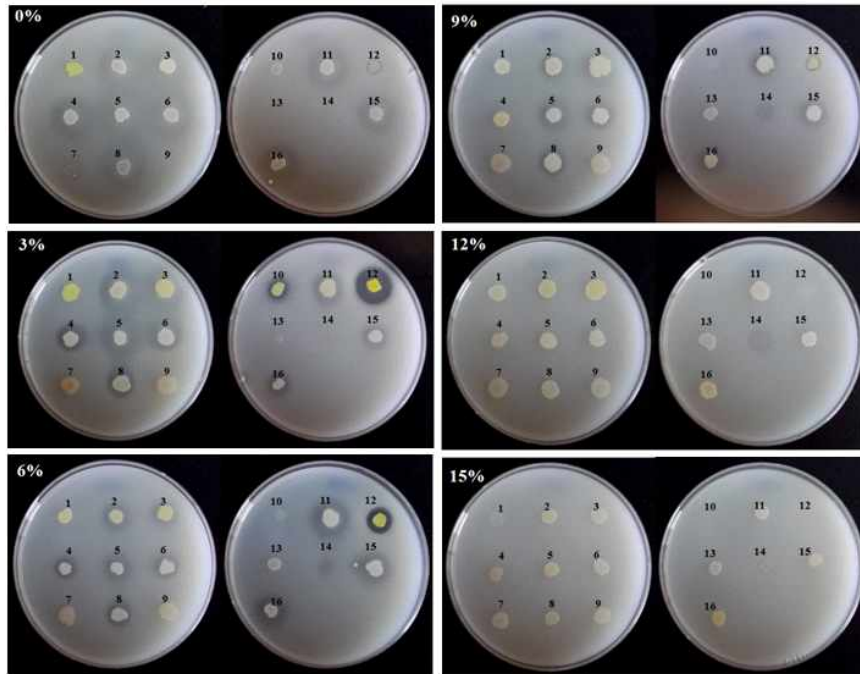
<표 2-5> 새우 젓갈로부터 순수 분리된 균주 목록

Query	Hit	NCBI accession NO.	Diff/Total nt	Similarity (%)
4-1	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i> RP29(T)	AF527483	0/893	100
4-2	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925(T)	Y16263	0/896	100
4-10	<i>Halomonas stenophila</i> N12(T)	HM242216	40/879	95.449
5-3	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i> RP29(T)	AF527483	0/839	100
5-10	<i>Halomonas jeotgali</i> KCTC 22487(T)	EU909458	26/894	97.092
5-15	<i>Tetragenococcus muriaticus</i> X-1(T)	D88824	2/689	99.689
5-22	<i>Halomonas salina</i> F8-11(T)	AJ295145	15/895	98.324
5-23	<i>Micrococcus yunannensis</i> YIM65004(T)	FJ214335	2/871	99.770
5-30	<i>Shigella sonnei</i> GTC 781(T)	AB273732	6/688	99.128
5-35	<i>Marinilactibacillus piezotolerans</i> LT20(T)	AY485792	42/708	94.068
5-37	<i>Alkalkbacillus halophilus</i> YIM012(T)	DQ359731	2/926	99.784
5-39	<i>S. salexigens</i> 29CMI(T)	FR714935	3/926	99.676
5-46	<i>Salinicoccus salsiraiiae</i> RH-1(T)	DQ333949	0/951	100

(2) 분리된 새우젓갈 유래 발효 균주의 기능성 및 기능성 유전자 후보균의 선별

(가) 단백질 분해능 실험(Protease activity test)

- 다양한 염도(0-15%)의 Marine agar 배지에 1% skim milk를 첨가하여 배지를 제조하였고, 배지 위에 후보균을 배양한 배양액을 spotting하여 2-3일 배양 후 clear zone 생성여부에 따라 젓갈에서 분리된 미생물들의 고염조건에서의 단백질 분해능을 관찰하고자 하였음
- 그 결과, 염 농도가 높아질수록 성장과 동시에 protease 활성을 지닌 균주를 <그림 2-14>과 같이 관찰하지 못하였음
- 하지만 본 연구는 단 한 종류의 발효식품(젓갈)에서 분리한 미생물을 대상으로 한 실험이기 때문에 차후 다양한 발효식품에서 미생물을 분리하여 고염에서 활성을 나타내는 미생물에 대한 탐색이 필요할 것으로 보임



<그림 2-14> 분리된 미생물의 Protease activity test

- 1, *Kocuria palustris*; 2, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 3, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 4, *Halomonas* sp.; 5, *Halomonas* sp.; 6, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 7, *Tetragenococcus muriaticus*; 8, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 9, *Halomonas* sp.; 10, *Micrococcus yunnanensis*; 11, *Marinilactibacillus piezotolerans*; 12, *Shigella sonnei*; 13, *Alkalibacillus halophilus*; 14, *S. salexigens*; 15, *Salinicoccus salsiraiiae*; 16, *Tetragenococcus halohpilus*

#### (나) 키틴 분해능 실험(Chitinase activity test)

- 1% colloidal chitin (w/v)을 첨가한 marine agar 배지에 분리 미생물의 배양액을 spotting하여 3일간 배양 후, clear zone 생성여부에 따라 키틴 분해능을 관찰하고자 하였음.
- 그 결과 <그림 2-15>와 같이 chitin을 분해하는 미생물 역시 관찰하지 못하였음 이 역시 다양한 발효식품에서 미생물을 분리하여 키틴 분해 활성을 나타내는 미생물에 대한 탐색이 필요할 것으로 보임.



<그림 2-15> 키틴 분해 활성 확인결과

1, *Kocuria palustris*; 2, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 3, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 4, *Halomonas* sp.; 5, *Halomonas* sp.; 6, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 7, *Tetragenococcus muriaticus*; 8, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*; 9, *Halomonas* sp.; 10, *Micrococcus yunnanensis*; 11, *Marinilactibacillus piezotolerans*; 12, *Shigella sonnei*; 13, *Alkalibacillus halophilus*; 14, *S. salexigens*; 15, *Salinicoccus salsiraiae*; 16, *Tetragenococcus halohpilus*

#### (다) 용혈반응 활성 실험(Hemolysis activity test)

- 새우젓 내 미생물 균집 중, *Vibrio*, *Enterovibrio*, *Photobacterium*, *Allivibrio* 등 pathogenicity가 존재할 수 있는 미생물이 존재한다고 보고 (Jung et al., 2013)됨을 토대로 본 연구를 통해 젓갈에 존재하는 병원가능성 균주를 순수 분리하고, 실제로 병원성을 지니고 있는지에 대한 확인을 하고자 했으며, 이와 함께 젓갈에서 병원 가능성 미생물의 억제 및 천이 조절에 관한 방법에 대해서 고찰해 보고자 하였음

#### ① 새우 젓갈 내 병원 가능성 미생물의 분리

- 제조한 새우젓으로부터 병원가능성 균주를 분리하기 위해 젓국을 일부 채취하고 PBS (phosphate buffered saline) buffer에 연속 희석하여 TCBS (thiosulfate citrate bile sucrose) agar 배지에 도말하여 30℃에서 2-3일 간 배양하였음
- 배양 후 형태학적 특성에 따라 콜로니를 취하고 1회 계대배양을 통해 순수 분리하였음
- 순수 분리한 균주는 16S rRNA 유전자 서열을 분석하여 ez-taxon 및 NCBI-BLAST program을 통해 기존 데이터베이스와의 상동성 분석을 통해 어떠한 미생물인지 분석하였음
- 그 결과 <표 2-6>과 같이 11개의 *Vibrio* strain, 3개의 *Photobacterium* strain, 그리고 1개의 *Enterococcus* strain을 분리 하였으며, 이 외에도 *Salinicoccus*, *Pseudoalteromonas*,



*Exiguobacterium*, *Planococcus* 등 다양한 균주를 분리 및 확보할 수 있었음 <표 2-7>

- 용혈반응 활성 실험(Hemolysis activity test)은 기존에 병원가능성 균주로 잘 알려진 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Enterococcus* 속에 포함되는 균주만을 수행하였음

<표 2-6> TCBS 선택 배지를 통해 순수 분리된 병원가능성 균주

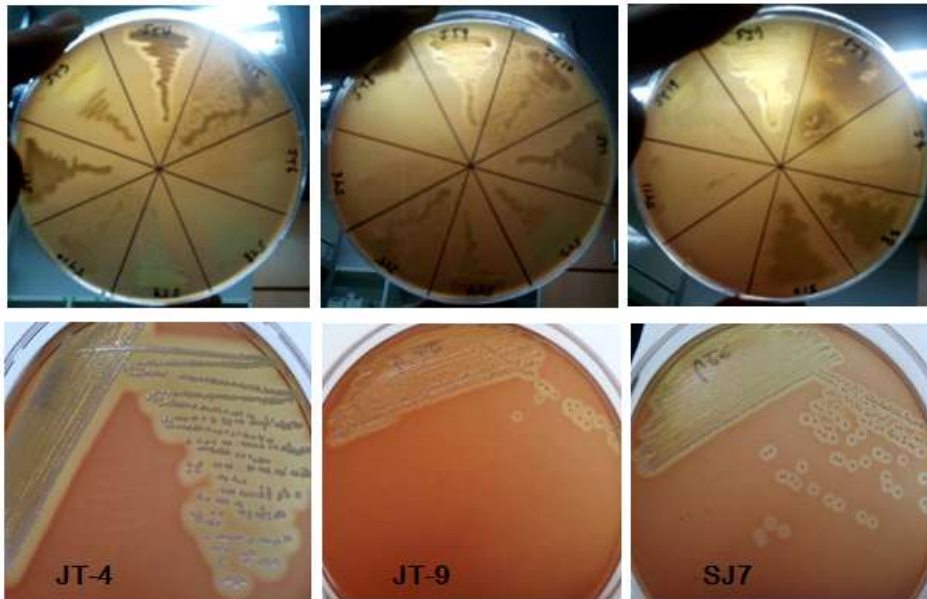
No.	Species	Strain (T)	Accession	Similarity (%)	nt/Diff.
JT-1	<i>Vibrio azureus</i>	LC2-005	AB428897	99.02	9/918
JT-3	<i>Vibrio hepataius</i>	LMG20362	AJ345063	99.24	7/923
JT-4	<i>photobacterium jeanii</i>	R-40508	GU65209	98.92	10/922
JT-5	<i>Vibrio azureus</i>	LC2-005	AB428897	99.13	8/915
JT-6	<i>Vibrio alfacensis</i>	CAIM 1831	JF16656	100	0/989
JT-8	<i>Vibrio atypicus</i>	HHS02	FJ009624	99.58	4/954
JT-9	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	NCIMB 2058	X78105	99.79	2/942
JT-10	<i>Vibrio owensii</i>	DY05	GU18180	99.21	8/1008
JT-11	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920	X74692	99.9	1/964
JT-19	<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803	AB012212	100	0/785
SJ-7	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	NCIMB 2058	X78105	99.89	1/923
SJ-9	<i>Vibrio azureus</i>	LC2-005(T)	AB428897	99.23	7/908
S4	<i>Vibrio azureus</i>	LC2-005(T)	AB428897	98.56	13/905
S8	<i>Vibrio azureus</i>	LC2-005(T)	AB428897	98.38	14/862
S10	<i>Vibrio communis</i>	R-40496	GU078672	99.45	5/934

<표 2-7> *Vibrio*, *Photobacterium*, *Enterococcus* 이외 분리된 다양한 균주

No.	Species	Strain(T)	Accession	Similarity (%)	nt/Diff.
JT11	<i>Salinicoccus salsiraiae</i>	RH-1	DQ333949	99.9	1/978
JT13	<i>Exiguobacterium marinum</i>	TF-80	AY594266	99.66	3/895
JT14	<i>Salinicoccus salsiraiae</i>	RH-1	DQ333949	100	0/794
JT15	<i>Joetgalicoccus halotolerans</i>	TKJ-101	AY028925	99.55	4/891
JT17	<i>Exiguobacterium marinum</i>	TF-80	AY594266	99.64	3/830
JT20	<i>Salinicoccus salsiraiae</i>	RH-1	DQ333949	99.66	3/895
JT21	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	GIFU 12498	D88211	100	0/726
SJ4	<i>Exiguobacterium profundum</i>	10C(T)	AY818050	99.78	2/892
SJ6	<i>Vagococcus fluvialis</i>	CCUG32704(T)	Y18098	98.96	9/863
SJ10	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	DSM20345(T)	AJ421446	100	0/810
SJ11	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	IFO12173	D87677	99.79	2/932
SJ13	<i>Psychrobacter celer</i>	SW-238(T)	AY842259	98.79	12/990
S2	<i>Pseudoalteromonas undina</i>	NCIMB2128(T)	X82140	99.11	8/897
S3	<i>Planococcus maritimus</i>	TF-9(T)	AF500007	98.15	17/918
S5	<i>Psychrobacter marincola</i>	KMN277(T)	AJ309941	99.25	7/928
S13	<i>Planococcus rifietoensis</i>	M8(T)	AJ493659	99.89	1/929

② 용혈반응 활성 실험(Hemolysis activity test)

- 병원성의 여부를 판단하기 위한 한 가지 요인인 용혈반응에 대한 활성도를 측정하기 위하여, 먼저 1% sheep blood를 첨가한 marine agar 배지를 제조하고, 분리된 후보 미생물을 배양하여 투명한 형성 여부에 대해 관찰하였음
- 그 결과 <그림 2-16>와 같이 *Vbrio*에 속하는 균주들은 용혈반응 활성이 나타나지 않았으나, *Photobacterium*에 속하는 3개의 균주에서 활성을 확인할 수 있었음. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*의 경우, 바다환경에서 서식하는 다양한 어류뿐만 아니라 양식어류에 궤양 및 출혈을 일으키는 원인균으로 알려져 있는데, 인간에 있어서도 감염의 원인이 될 수 있음고 보고 (Amable et al., 2011)된 것과 일치하는 결과라고 할 수 있었음
- 결과적으로 병원성 미생물이 젓갈에 존재할 수 있기 때문에 이 미생물 군집을 억제하거나 천이를 조절하는 방안에 대한 연구가 필요할 것이며, 특히 젓갈 종균 개발에 있어서 고려해야 할 사항이라 사료되어짐



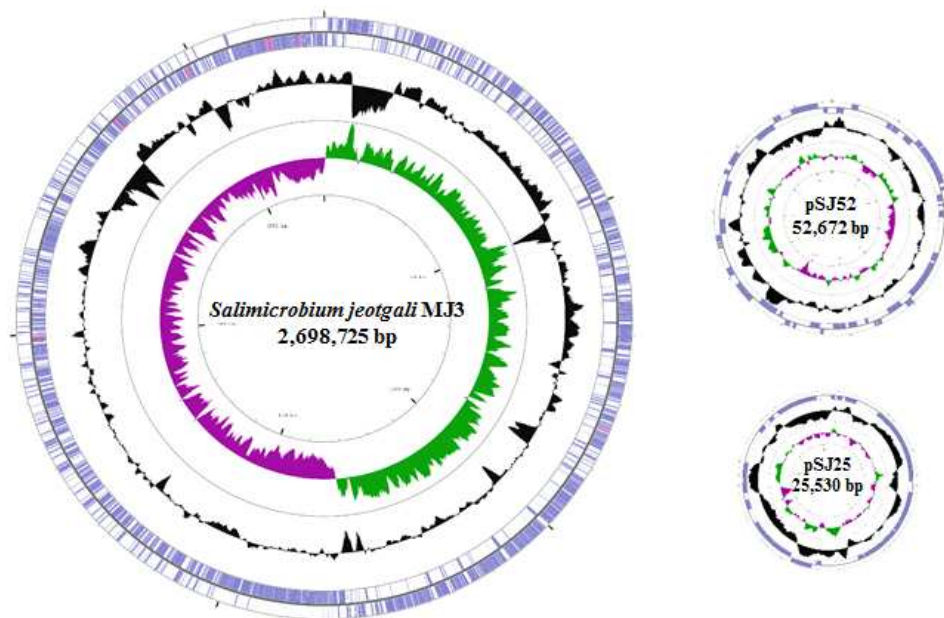
<그림 2-16> 새우 젓갈에서 분리한 *Photobacterium* strain들의 용혈활성 확인 결과

#### 4. 젓갈 내 유용 발효미생물인 *Salimicrobium jeotgali* MJ3의 기능성 탐색

##### 가. 젓갈에서 분리된 *S. jeotgali* MJ3의 유전체 분석

- 식품의 발효에 가장 중요하게 기여하고 있을 것이라 여겨지는 발효미생물의 전체 유전체 연구는 한국에서는 이미 김치발효에 관여한 주요한 미생물들의 유전체 연구는 이루어진 바 있음
- 하지만 아직까지 이러한 연구는 김치에 한정되어 있으며 또 다른 한국 전통 발효식품인 젓갈 발효에 있어서는 구체적으로 이루어진 바 없음
- 또한 이러한 젓갈은 발효의 메커니즘이 명확하게 규명되지도 않은 실정이므로 젓갈발효에

- 있어서 가장 많이 우점하면서 가장 크게 기여하고 있을 것이라 추측되는 미생물중 한 종의 전체 유전체를 분석하여 이에 대한 정보를 얻고자 하였음
- 이를 통하여 젓갈발효의 메카니즘을 알 수 있게 될 뿐만 아니라 더 나아가서는 균주 병원성의 확인, 독성물질의 생산, 아민생성의 억제와 같은 식품안정성과 연관된 사항도 파악할 수 있으며, 추후에 인체 대사성 질환 예방관련 유전자도 확인하는 것에 의의를 두고 있음
  - *Salimicrobium* 속의 미생물은 새우젓과 멸치젓의 정상발효기간 동안 두 젓갈 모두에서 가장 우점하는 것을 Barcode pyrosequencing이라는 비 배양학적 방법으로 미생물의 군집을 연구한 사전연구를 통해 알 수 있었음
  - 여기서 말하는 정상발효기간이란 발효가 덜되어서 젓갈의 원재료에서 유래한 병원성 미생물이 우점하거나, 발효가 너무 진행되어서 부패가 진행된 상태가 아니라 발효 중기에 젓갈이 가장 아미노산을 많이 생성하여 섭취하기에 안전하며 맛과 향이 좋은 기간을 의미함
  - 본 연구에서 분리한 *S. jeotgali* MJ3은 멸치젓에서 유래하였고, 본 균주로부터 DNA를 추출하여 전체염기서열 분석을 진행하였음
  - 전체염기서열 분석 결과를 통하여 젓갈 발효 식품 안에서의 다양한 생존전략 및 대사 경로에 대한 정보를 얻을 수 있었으며, 추가적으로 실질적 대사체에 대한 분석을 시행하였음
  - 멸치젓에서 유래한 *S. jeotgali* MJ3 균주로부터 DNA를 추출하여 두 가지 염기서열 분석방법인 Illumina (Solex)와 PacBio방법을 융합하여 염기서열분석을 진행하였음
  - 전체 염기 서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 그린 결과 <그림 2-17>과 같이 1개의 chromosome와 2개의 플라스미드가 있는 것으로 밝혀짐



<그림 2-17> *S. jeotgali* MJ3의 지놈 유전자 지도

- 전체 염기서열의 구체적인 특징들은 <표 2-8>에 정리하였음
- *S. jeotgali* MJ3의 유전자는 2,698,725 bp 크기의 chromosome, 52,672, 25,530 bp의 플라스미

- 드를 가지고 있었으며, 각각에 포함되어있는 C+G함량은 각각 46.5, 38.5, 42.0mol% 임
- 이들의 지놈에 존재하는 전체 유전자의 수는 2,862개로 이중 93%인 2,681개의 유전자가 단백질로 발현되어 세포 내에서 작용하는 것을 확인할 수 있었음
  - 또한 라이보솜을 이루는 rRNA 오페론은 7개로 단백질 합성이 효율적으로 일어날 것으로 예상됨

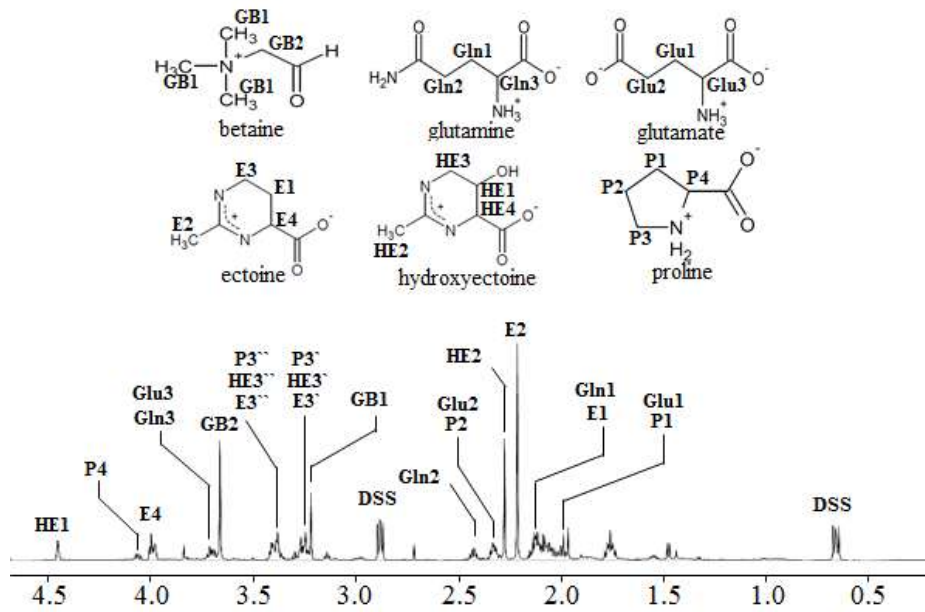
<표 2-8> 전체 지놈 서열을 바탕으로 한 유전자의 특징

Characteristic	Chromosome	pSJ52	pSJ25
Size (bp)	2,698,725	52,672	25,530
G+C content (%)	46.5	38.5	42.0
Total genes	2,783	59	20
DNA coding density (%)	88.3	72.4	77.9
Protein coding sequences	2,681	58	20
Proteins assigned to COG (%)	1,975 (73.7)	13 (22.4)	7 (35.0)
rRNA operons	7	-	-
tRNA genes (diversity)	69 (33)	1 (1)	-
Genomic islands	15	1	1
Confirmed CRISPRs (questionable)□	1 (1)	-	-

#### 나. 젓갈에서 분리된 *S. jeotgali* MJ3의 대사체 분석

##### (1) <sup>1</sup>H-NMR을 이용한 compatible solutes 분석

- 멸치젓에서 분리된 *S. jeotgali* MJ3은 고염환경으로부터 가해지는 삼투스트레스로부터 세포를 보호하기 위해 세포내에 ‘compatible solute’를 축적하게 됨
- 이러한 세포 내에서 생산되어 축적되는 compatible solutes의 종류를 탐색하기 위하여 대사체 분석을 실시하였음
- Compatible solute를 분석하기 위해 10%(w/v)의 NaCl이 포함되어 있는 marine broth배지에서 *S. jeotgali* MJ3를 약 O.D<sub>600nm</sub>=0.8 까지 배양한 뒤, 원심분리를 통하여 배양액에서 세포만을 분리하여 파쇄 하였음
- 이렇게 얻어진 세포 추출액을 600-MHz <sup>1</sup>H-NMR을 이용하여 검출하였음. 검출 결과 <그림 2-18>과 같은 스펙트럼을 보였으며, 주요하게 glycine-betaine, glutamate, glutamine, proline, ectoine, 그리고 hydroxyectoine이 검출되었음
- 이들 대사체들은 고 염의 환경 내에서 세포에 축적되는 것으로 추측되며, 고 염 환경에서 세포 내에서 이루어지는 생합성과 축적 양상을 파악하고자 하였음



<그림 2-18> 600-MHz 1H-NMR로 검출한 스펙트럼

(2) 전체 염기서열을 바탕으로 한 compatible solutes 생합성 유전자 분석

- 전체염기서열 분석을 통해 확보한 *S. jeotgali* MJ3의 전체 염기 서열을 바탕으로 예상 되는 compatible solutes의 생합성에 참여하는 효소 생성 유전자들의 존재 및 그 구성을 확인하였 음 <그림 2-19>



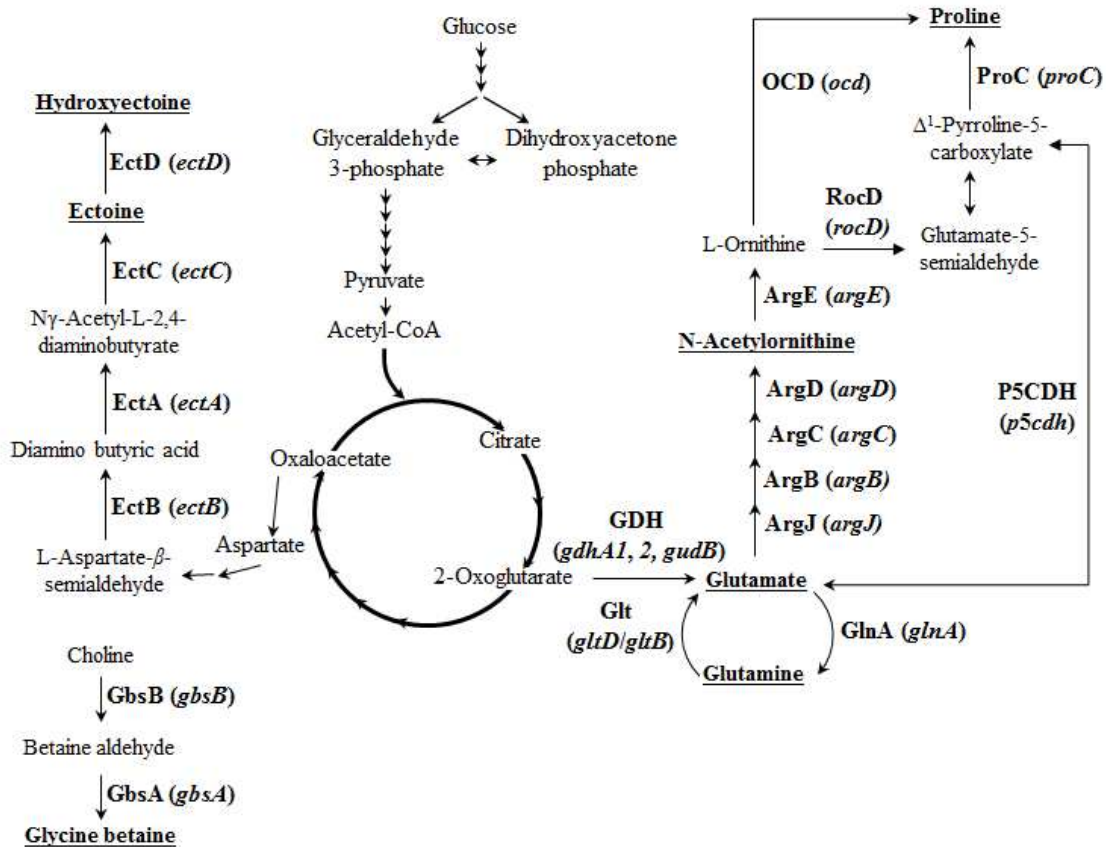
<그림 2-19> 주요 compatible solute들을 생합성하는 유전자의 구성

- 그 결과 고염 환경에서 축적되는 대사체들의 생합성 경로가 존재함을 확인 하였으며, 이들 대사체를 생합성 하는 경로에 참여하는 효소 유전자들의 이름과 길이, 유전자상의 위치, 그리고 유전자의 발현에 대한 방향성 정보를 찾을 수 있었음 <표 2-9>
- 600-MHz <sup>1</sup>H-NMR의 검출 결과와 *S. jeotgali* MJ3의 전체 염기 서열 정보를 바탕으로 높은 농도의 NaCl이 포함되어 있는 환경에서 생존하기 위한 compatible solutes의 축적 경향과, 그 생합성 경로에 참여하는 효소의 생성 유전자들의 발현 경향을 파악하기 위한 분석을 수행하였음
- Compatible solutes의 생합성 효소 생성 유전자들의 지놈에서의 구성을 조사하였을 때, glycine betaine, glutamate, glutamine, ectoine, 그리고 ornithine의 생합성 유전자가 오픈론의 구성을 이루어 더욱 높은 효율의 compatible solutes의 생성이 가능할 것으로 예상됨

<표 2-9> 주요 compatible solutes 생합성 유전자

Product name	Gene name	Locus tag	Length (bp)	Direction
<b>Betaine</b>				
Betaine aldehyde dehydrogenase	<i>gbsA</i>	AAV35_002775	1471	+
Choline dehydrogenase	<i>gbsB</i>	AAV35_002780	1686	+
DNA-binding transcriptional regulator, GbsR	<i>gbsR</i>	AAV35_002785	546	+
<b>Glutamate</b>				
Glutamate dehydrogenase	<i>gdhA</i>	AAV35_002805	1383	-
Glutamate dehydrogenase	<i>gudB</i>	AAV35_006040	1263	+
Glutamate dehydrogenase	<i>gdhA</i>	AAV35_010370	1383	-
Glutamate synthase small subunit	<i>gltD</i>	AAV35_009610	1488	-
Glutamate synthase large subunit	<i>gltB</i>	AAV35_009615	4643	-
<b>Glutamine</b>				
Glutamine synthase	<i>glnA</i>	AAV35_006710	1332	-
DNA-binding transcriptional regulator, MerR family	<i>glnR</i>	AAV35_006715	405	-
<b>Ectoine</b>				
Diaminobutyric acid aminotransferase	<i>ectB</i>	AAV35_008025	507	+
L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase	<i>ectA</i>	AAV35_008030	1280	+
Ectoine synthase	<i>ectC</i>	AAV35_008035	393	+
Ectoine hydroxylase	<i>ectD</i>	AAV35_000930	933	-
<b>Proline</b>				
Acetylornithine aminotransferase	<i>argD</i>	AAV35_009590	1188	-
Acetylglutamate kinase	<i>argB</i>	AAV35_009595	789	-
Arginine biosynthesis bifunctional protein	<i>argJ</i>	AAV35_009600	1218	-
N-acetyl-γ-glutamyl phosphate reductase	<i>argC</i>	AAV35_009605	1035	-
Acetylornithine deacetylase	<i>argE</i>	AAV35_001345	1362	+
Ornithine cyclodeaminase	<i>ocd</i>	AAV35_007870	948	-
Ornithine aminotransferase	<i>rocD</i>	AAV35_009335	1196	+
Pyroline-5-carboxylate reductase	<i>proC</i>	AAV35_009790	810	-
1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	<i>p5cdh</i>	AAV35_010445	1548	-

- 위의 유전자 정보를 바탕으로 <그림 2-20>와 같이 대사회로를 그릴 수 있었음
- 이와 같은 대사회로는 어떠한 물질이 어떻게 변화하는지와, 각 단계에 작용하는 효소의 이름과, 해당 효소를 생성하는 유전자의 이름 정보를 알 수 있었음
- 대사 회로를 통하여 고 염 환경에서 세포내에 축적되는 물질간의 관계에 대하여 정보를 얻을 수 있었고, 이들 정보를 바탕으로 고 염 환경 내에서 compatible solutes의 생합성 효소들이 *S. jeotgali* MJ3 세포 내에서 실질적으로 발현되는 경향을 파악하고자 추가적 실험을 진행하였음



<그림 2-20> *S. jeotgali* MJ3가 갖는 compatible solutes의 대사경로

### (3) 젓갈 유래 *S. jeotgali* MJ3에서 생산되는 compatible solutes의 산업적 활용가능성

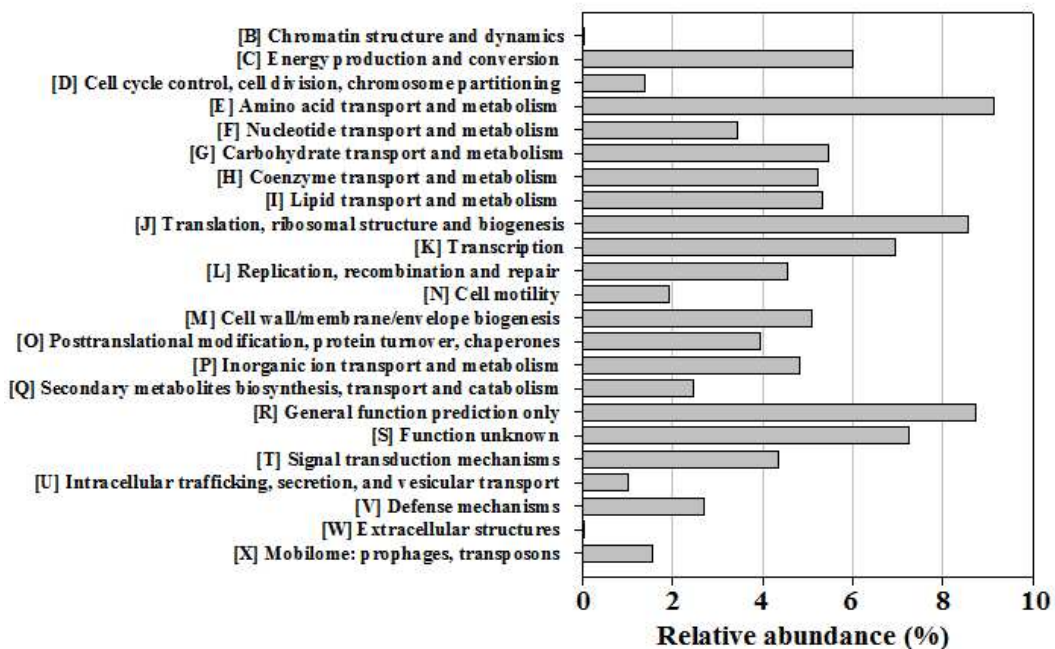
- *S. jeotgali* MJ3가 고염환경에서 생존하기 위해서 만드는 Ectoine, proline Glycine-betaine, Glutamate와 같은 compatible solutes는 산업적으로 활용가능성이 매우 높음
- Compatible solutes는 현재에도 많은 질병에 치료제로 이용되며, 계속적으로 연구가 이루어지고 있는 분야임
- *S. jeotgali* MJ3가 월등히 높은 농도로 축적하는 ectoine의 경우 small molecule chaperones (SMCs)으로써, 단백질의 misfolding 또는 aggregation으로부터 유발될 수 있는 알츠하이머나, 마카도 조셉 병의 예방 물질로 연구되고 있음(Kanapathipillai et al. 2005, Furusho et al.

2005)

- 또한, 사람의 염증유발 사이토카인의 억제물질인 hsp70 and hsp70B'의 유발을 촉진시키는 것이 밝혀졌으며, 미세입자로부터 유래되는 폐의 염증반응을 억제하는 기능을 하는 것도 밝혀짐(Buommino et al. 2005, Sydlik et al. 2009)
- *S. jeotgali* MJ3의 compatible solutes중 하나인 glycine betaine은 선천성 아미노산 대사이상으로 나타나는 질병인 호모시스틴요증을 치료하는 치료제로 이용하는 것이 연구되고 있음
- 또한 간경변 초반 간에 지방질의 침식을 예방하는 치료적 효과를 가진 것으로 알려져 있음
- 추가적으로 *S. jeotgali* MJ3과 비교하여 연구하였던 *Halobacillus halophilus*에서 발견된 trans-4-hydroxy-L-proline은 *Halobacillus halophilus*가 가진 주요 compatible solutes로서 소염제인 antiphlogistic의 중요한 전구체로 사용되기도 하며, 카바뎀계 항생제와 안지오텐신을 변형시키는 효소의 저해제로서 사용되기도 함(Shibata et al., 2004, Remuzon et al., 1996)

**다. 유전체/대사체 비교분석을 통하여 선별된 기능성 유전자 후보군의 생물정보학적 단백질 기능성 분석**

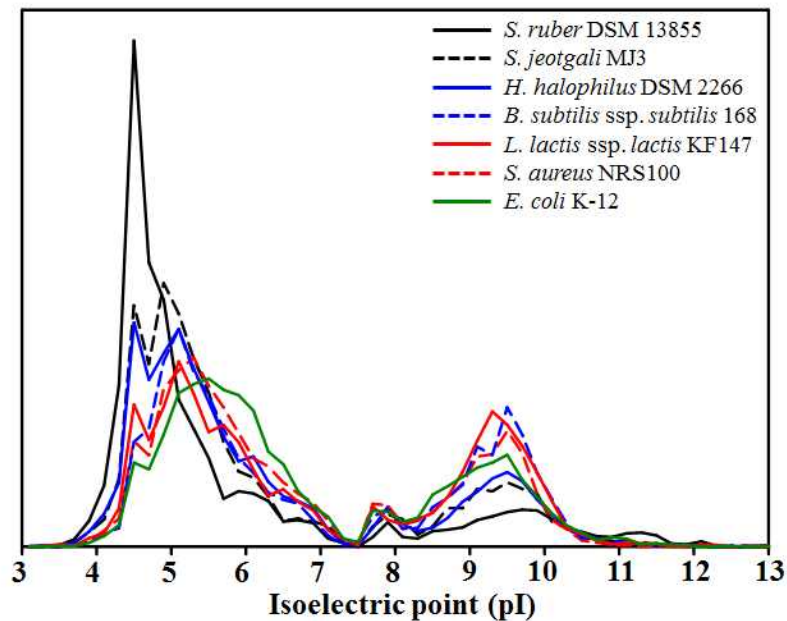
- 지놈으로부터 생성되는 유전자 중 기능을 가진 COG (Clusters of Orthologous Groups)로 확정되는 유전자는 전체 유전자의 73.7%로 존재하였음
- 이들을 각 기능별 카테고리 분류하면 아미노산의 수송과 대사에 관련된 유전자들이 가장 높은 비율을 차지하며, 번역과 리보솜의 구조 및 생합성에 관여하는 유전자 역시 높은 비율로 가지고 있었음 <그림 2-21>



<그림 2-21> *S. jeotgali* MJ3의 COG분석 결과



- *S. jeotgali* MJ3의 전체 염기 서열 정보를 이용하여 예상되는 전체 단백질의 구성, 그리고 고 염 환경 생존에 필수적인 이온 및 대사체의 세포 막 내 통로의 구성 정보를 확인 할 수 있었음
- *S. jeotgali* MJ3가 가지고 있는 전체 단백질의 특징을 살펴보면, 이 균주가 고 염 환경 내에 생존에 중요한 특징 중 하나임
- <그림 2-22>의 그래프에서 나타나듯이 *S. jeotgali* MJ3의 예상 되는 전체 단백질의 등전점 (pI) 값은 4와 5.5 사이에 매우 높은 비율로 분포하고 있음을 알 수 있음
- 이러한 경향은 초고염 환경에서 생존하는 *Salinibacter ruber*에 비하여 산성의 등전점을 가진 예상 단백질의 비율이 적게 나타나며, 나머지 균주들과 비교하였을 때, 산성의 등전점을 가진 예상 단백질의 비율이 훨씬 높게 나타나는 것을 알 수 있음
- 이는 *S. jeotgali* MJ3가 *Salinibacter ruber*를 제외한 나머지 균주들에 비하여 더욱 높은 염 도 환경에서도 그 생존이 가능 할 것으로 예상되는 결과임



<그림 2-22> 등전점(pI)값을 0.2 간격으로 예상되는 ORF들의 분포를 나타낸 그래프

- 전체 유전자 정보를 통해서 *S. jeotgali* MJ3의 고 염 환경에서 가해지는 삼투 스트레스로부터, 세포 내의 삼투압의 항상성을 유지하기 하여 발현하는 양이온의 통로 및 compatible solutes와, 그 전구체의 통로를 <표 2-10>과 같이 확인할 수 있었음

<표 2-10> *S. jeogali* MJ3의 삼투 스트레스 저항성 유전자

COG gene	Product	Local tag	Length
NhaC-type	NhaC-type Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters	AAV35_002930	1473 bp

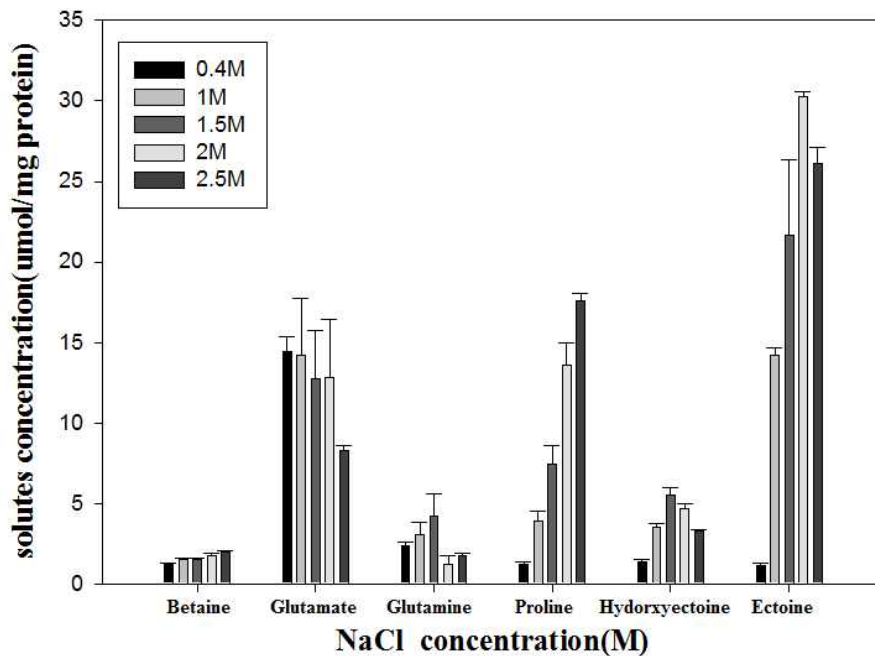
	NhaC-type Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters	AAV35_003785	1545 bp
	NhaC-type Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters	AAV35_009660	1395 bp
	NhaC-type Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters	AAV35_010185	1305 bp
<b>NhaP-type</b>	NhaP-type Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters	AAV35_001300	1185 bp
	NhaP-type Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters	AAV35_001905	1857 bp
<b>TrkA</b>	K <sup>+</sup> transport systems, NAD-binding component	AAV35_007730	669 bp
	K <sup>+</sup> transport systems, NAD-binding component	AAV35_011240	666 bp
<b>TrkH</b>	Trk-type K <sup>+</sup> transport systems, membrane components	AAV35_011245	1314 bp
<b>NatA</b>	ABC-type Na <sup>+</sup> efflux pump, ATPase component	AAV35_000545	939 bp
	ABC-type Na <sup>+</sup> efflux pump, ATPase component	AAV35_009550	897 bp
<b>NatB</b>	ABC-type Na <sup>+</sup> efflux pump, permease component	AAV35_000550	1245 bp
	ABC-type Na <sup>+</sup> efflux pump, permease component	AAV35_009545	1230 bp
<b>Mrp antiporter</b>	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpA subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_005285	447 bp
	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpB subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_006670	2328 bp
	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpC subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_005280	339 bp
	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpD subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_005275	1485 bp
	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpE subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_005270	477 bp
	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpF subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_005265	312 bp
	multisubunit sodium/proton antiporter, MrpG subunit (TC 2.A.63.1)	AAV35_005260	360 bp
<b>PutP</b>	Na <sup>+</sup> /proline symporter	AAV35_000730	1410
	Na <sup>+</sup> /proline symporter	AAV35_010620	1512
<b>GltS</b>	Na <sup>+</sup> /glutamate symporter	AAV35_000975	1425
<b>OpuAA</b>	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, ATPase component	AAV35_009510	1203
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, ATPase component	AAV35_011025	1152
<b>OpuAB</b>	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, permease component	AAV35_001100	1557
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, permease component	AAV35_002870	1509
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, permease component	AAV35_006605	1527
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, permease component	AAV35_007675	1533
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, permease component	AAV35_009505	852
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, permease component	AAV35_010415	1497

<b>OpuAC</b>	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, periplasmic components	AAV35_008865	909
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, periplasmic components	AAV35_009500	942
	ABC-type glycine betaine/L-proline transport system, periplasmic components	AAV35_011015	882
<b>OpuBA</b>	choline ABC transport system, ATP-binding component	AAV35_006610	1029 bp
<b>OpuBB</b>	choline ABC transport system, permease component	AAV35_011020	648 bp
<b>BetT</b>	choline transporter	AAV35_008300	1515 bp
	choline transporter	AAV35_010155	1632 bp
	choline transporter	AAV35_010770	1536 bp
<b>BCCT-type</b>	Choline-glycine betaine transporter	AAV35_010410	1527 bp

- 고염 환경 하에 가해지는 삼투 압력에 대한 세포 내 항상성을 유지하기 위해서는 세포 내로 계속하여 유입되는 고 농도의  $\text{Na}^+$  유출, 일시적으로 세포 내의 삼투 압력을 유지하기 위한  $\text{K}^+$  이온의 유입에 대한 조절이 필요하게 되는데 *S. jeotgali* MJ3에는 이들을 위하여 많은 수의 통로(transport)가 존재하고 있음이 밝혀짐
- 먼저, 환경 내 높은 농도로 존재하여 세포 내로 끊임없이 유입되는  $\text{Na}^+$ 를 세포 바깥으로 내보내기 위하여 4개의 NhaC-type, 2개의 NhaP-type의  $\text{Na}^+$  조절통로가 존재하며 추가적으로 ATP 에너지를 소모하며  $\text{Na}^+$ 를 세포 바깥으로 내보내는 ABC-type  $\text{Na}^+$  펌프 2세트가 확인 되었음
- 그리고 다수의 단백질들이 모여서 하나의 작용을 하게 되는 멀티 서브유닛  $\text{Na}^+$  통로를 한 세트 가짐으로, 총 9개의  $\text{Na}^+$ 조절 통로를 가지고 세포 내로 유입되는 고농도의  $\text{Na}^+$ 를 세포 바깥으로 내보내게 됨
- 또한, 고염환경 내에서 박테리아가 삼투압력을 일정하게 유지하기 위하여  $\text{K}^+$ 를 세포 내에 축적하게 되는데, *S. jeotgali* MJ3에는 trk 시스템의  $\text{K}^+$  조절통로를 이루는 유전자가 세 개 존재함을 알 수가 있었음
- *S. jeotgali* MJ3가 가지고 있는 이온 조절 통로를 이용하여 세포 내 이온의 항상성을 유지하여 고 염 환경에서 생존 가능 한 것으로 이해됨
- 세포 내 이온의 항상성 조절 외에도 이차적인 고 염 환경 생존 반응으로 세포 내부에 compatible solutes라 하는 삼투 압력 유지를 위한 대사체를 유지하게 되는데, *S. jeotgali* MJ3에는 이러한 compatible solutes와 그 전구체를 세포 내부로 유입시키는 조절 통로를 다 수 가짐으로 이들 대사체의 세포 내 축적을 용이 하게 함
- 세포 내부로 compatible solutes를 유입시켜 세포 내부로 축적하는 것은 세포 내부에서 생합 성하는 것 보다 더욱 효율적임이 밝혀졌으며, *S. jeotgali* MJ3는 여러 가지 compatible solutes의 통로를 통해 효율적으로 compatible solutes를 축적하여 고염환경에서 적응하는 것으로 예상됨

라. *S. jeotgali* MJ3의 세포 내 대사체의 생성과 이에 작용하는 기능성 유전자의 발현에 대한 상관성 규명

- 이들 대사체의 세포 내부 축적의 실제 경향을 파악하기 위하여 0.4 M, 1 M, 1.5 M, 2 M, 2.5 M 의 각기 다른 농도의 염이 포함 되어 있는 marine broth배지에서 배양된 *S. jeotgali* MJ3의 세포로부터 축적된 6개의 compatible solutes의 양을 <그림 2-23>과 같이 파악하였음. 이들의 정량을 위해서는 screening에 이용하였던 600MHz <sup>1</sup>H-NMR과 HPLC를 이용하였음
- <그림 2-23>에서 *S. jeotgali* MJ3의 세포 내에 축적된 compatible solutes는 여러 형태의 경향성을 가지며 NaCl의 농도에 따라서 변화하는 것을 확인하였음
- 이를 통해 NaCl농도에 따라 두드러진 증가를 나타낸 proline과 ectoine이 *S. jeotgali* MJ3의 주요 compatible solutes임을 확인하였음
- Ectoine의 경우 다른 대사체들에 비해 세포 내 축적량이 높은 것을 통해 *S. jeotgali* MJ3가 ectoine생산 박테리아로의 산업적 이용 가능성이 있음을 시사함

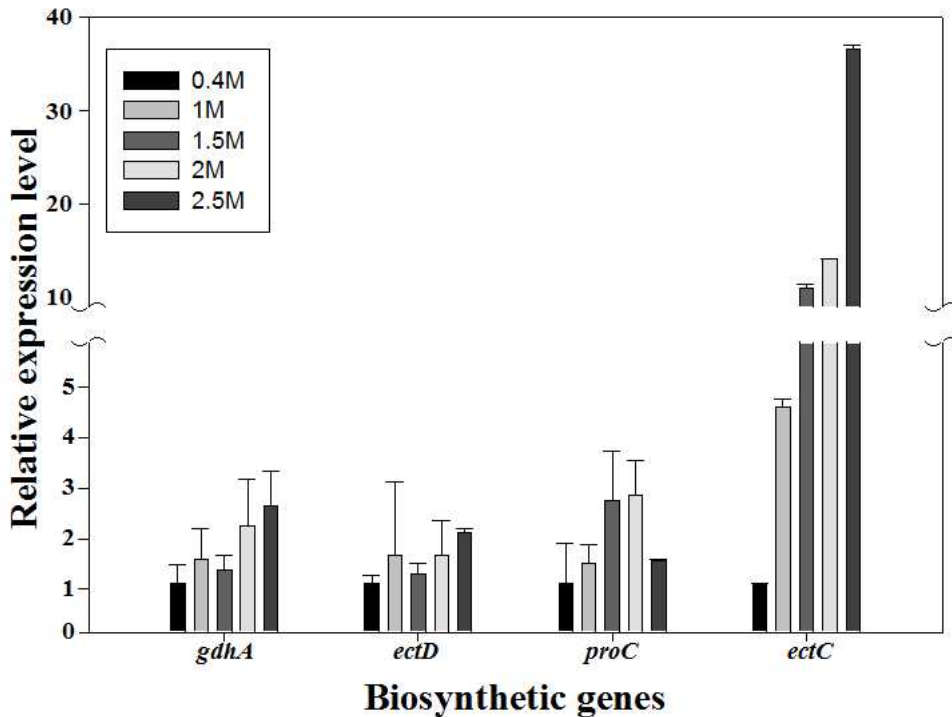


<그림 2-23> NaCl 농도에 따른 *S. jeotgali* MJ3의 세포 내 compatible solutes 축적량의 변화

- 추가적으로 각 compatible solutes의 축적량과 생합성 효소의 발현량을 비교하기 위하여 qRT-PCR (quantitative reverse-transcritase PCR)를 시행하여 NaCl 농도에 따른 생합성 효소의 발현 경향을 파악하였음 <그림 2-24>
- 각 NaCl농도별 compatible solutes 생합성 효소 생성 유전자의 발현량을 조사한 결과 ectoine을 생합성하는 ectABC 오페론의 발현량이 염분의 농도에 따라서 급격히 증가하는

것을 확인하였음

- 이는 앞의 compatible solutes의 축적량 중 ectoine의 축적량이 다른 대사체에 비하여 월등히 높았던 이유를 설명해 줄 수 있는 근거가 됨
- 또한 ectoine의 생합성 효소와 같이 고 염 환경에서 기능을 갖는 단백질 등이 기능성 단백질로 산업적 이용이 가능할 것으로 예상됨



<그림 2-24> NaCl 농도에 따른 compatible solutes 생합성 유전자의 발현량 변화

## 5. 메주 내 미생물 군집 및 대사체 분석

### 가. 메주 시료 선정 및 중점사항

- 본 연구에서는 한국 전통 발효식품인 된장, 고추장, 간장 제조의 주재료가 되는 메주의 발효 기간별 대사체 변화를 확인 하고자 하였음
- 발효기간 중 메주 외부와 내부의 환경은 수분함유량, 산소 농도 그리고 미생물 군집이 다른 것으로 알려져 있기 때문에 외부와 내부의 대사체를 각각 구분하여 조사하였음

### (2) 메주 제조 방법

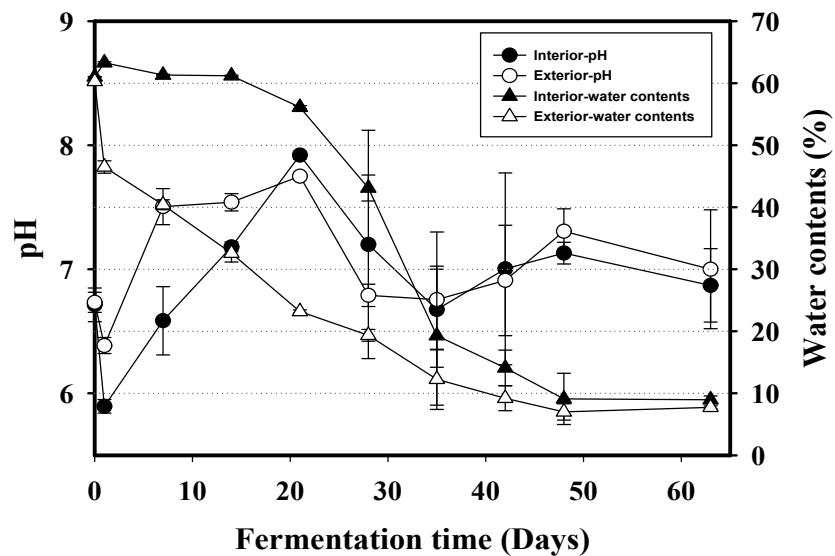
- 실험에서 사용된 메주는 240 kg의 말린 노란콩을 실온에서 물에 하루 동안 불린 후, 고압 수증기를 120°C 에서 2시간 처리하여 삶고, 40°C에서 식힌 뒤, 충분히 으깨어 19 × 15 × 8 크기의 벽돌 모양으로 성형을 하였음
- 이 과정을 통해 총 200개의 메주를 제조하고, 40°C에서 20시간동안 건조한 뒤 목제선반 위로

운반 하여 20일간 발효를 진행하고, 그 뒤 벗짚을 포개어 썬어 42일간 발효를 진행하며, 이 기간 동안 주기적으로 메주를 쪼개어 외부와 내부 부분을 각각 채취하여 실험에 이용하였음

#### 다. 된장 제조 전 메주의 특성 변화

##### (1) 메주 외부 및 내부의 수분함유량, pH 변화 측정

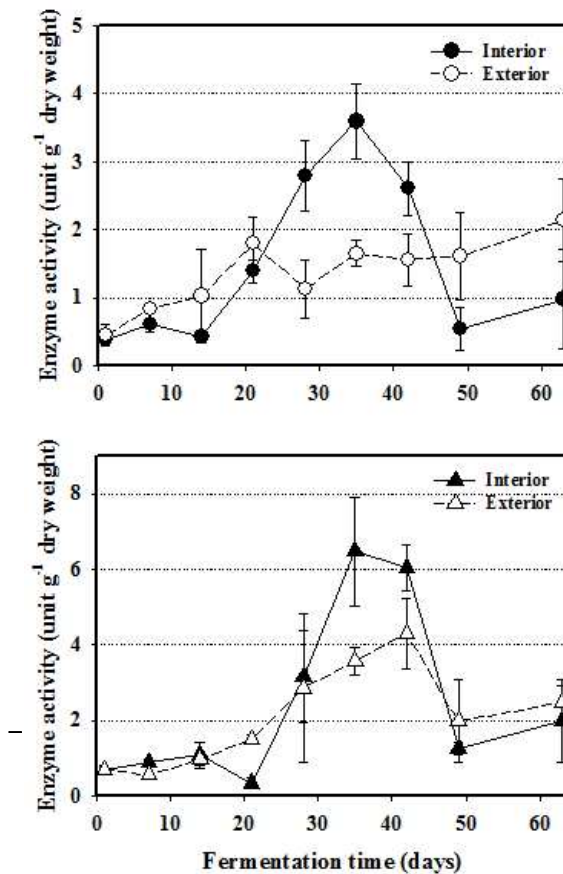
- 메주는 바깥 부분 2 cm를 외부, 그 안쪽 부분을 내부로 구분하여 시료를 채취하였고, 채취된 시료는 분쇄하여 균질화한 후 수분함량, pH 측정 및 대사체 분석에 이용하였음
- 메주 외부와 내부의 수분 함유량을 측정한 결과 메주 내부의 수분 함유량은 외부에 비해 발효기간 동안 높게 측정이 되었음
- 수분함유량은 발효과정에 작용하는 미생물의 활성에 영향을 미치는 중요한 요인으로써 작용하기 때문에, 메주 내부의 낮은 산소함량과 높은 수분 함유량에 의해 발효 미생물들의 활성이 높게 나타날 것으로 예상됨
- 발효 후반의 수분 함유량은 메주 외부, 내부와 관계없이 감소하는 것을 확인하였는데, 이는 메주 내부의 미생물 활성에 좀 더 많은 영향을 끼칠 것으로 예상됨
- 두 영역 모두 초기의 pH는 6.8이었지만, 40°C에서 20분간 건조하는 단계에서 외부는 6.3, 내부는 5.9로 떨어졌다. 메주 외부와 내부의 pH 는 발효의 초기 단계를 제외하고 모든 발효 과정에서 거의 유사한 것을 확인할 수 있었는데, 외부와 내부 모두 발효 21일까지 pH 8.0까지 증가하고, 21일 이후에 pH 7.0까지 감소하는 것을 확인하였음 <그림 2-25>



<그림 2-25> 메주 발효시기에 따른 메주 내부와 외부의 pH, 수분함유량의 변화

##### (2) 메주 외부 및 내부의 단백질 가수분해 효소와 α-amylase 활성 변화 측정

- 메주 외부와 내부의 발효기간별 단백질 가수분해 효소와  $\alpha$ -amylase 활성 변화를 측정하였음<그림 2-26>
- 단백질 가수분해 효소 활성도는 casein을 기질로 첨가하여 분당 tyrosine을 생산하는 양을 통해 측정하였음
- $\alpha$ -amylase 활성도는 전분-요오드 분석법에 따라 전분을 기질로 첨가하여 30분 배양 한 후 분해된 전분의 양을 요오드를 첨가함으로써 색의 변화를 통해 확인하였고, 변화하는 색은 580 nm microplate reader를 이용해 측정하였음
- 초기 발효 기간(1-21일) 동안, 단백질 분해 효소 활성이 외부와 내부 각각 1.8, 1.4 unit  $g^{-1}$  dry weight으로 증가하였고, 그 이후에 외부의 활성이 상대적으로 일정하게 유지 된 것에 비해 내부의 활성은 35일까지 급격히 감소하다 그 이후에 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 초기 발효 기간 동안 내부의 단백질 분해 효소 활성이 외부에 비해 높은 것은 21일 이후 내부의 총 아미노산 농도가 외부에 비해 급격히 증가하는 것과 밀접하게 연관되어 있음을 예상할 수 있었음<그림 8.3.C>
- 발효 과정 동안 메주 외부와 내부의  $\alpha$ -amylase 활성의 변화 패턴은 단백질 분해 효소의 활성 변화 패턴과 거의 유사하게 나타남

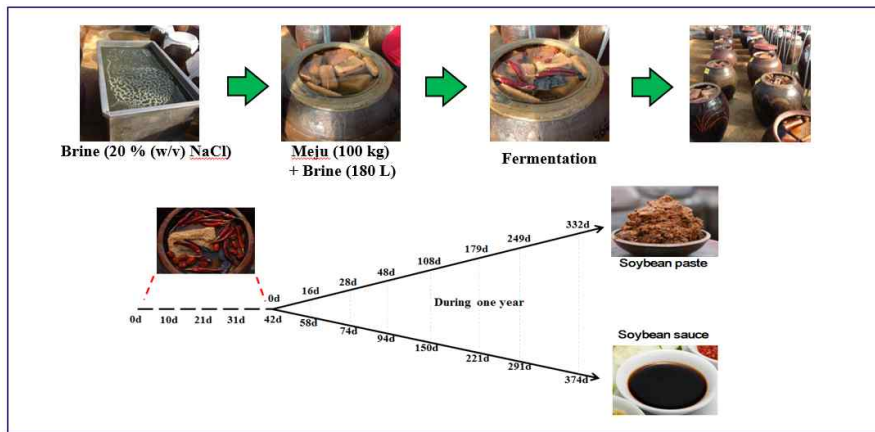


<그림 2-26> 메주 외부와 내부의 발효기간별 중성 단백질 가수 분해 효소와

라. 된장 제조 후 발효기간에 따른 미생물 군집 변화

(1) 발효시기별 균총, pH 변화 측정

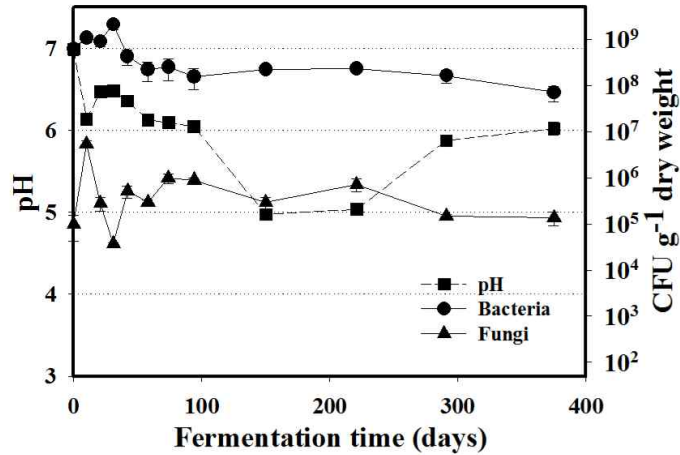
- 실험에서 사용된 된장은 약 100 kg의 메주와 180 L의 소금물(20% NaCl (w/v))을 혼합 후 42일간 상온에서 보관한 뒤, 소금물(간장)을 메주로부터 분리하고 남은 메주는 으깨어 된장 제조를 위해 332일 간 발효를 진행하였음 <그림 2-27>



<그림 2-27> 미생물 군집, 대사체 분석 및 기능성 균주를 분리하기 위한 된장 제조 과정

- 발효기간 중 pH, 미생물 생균수 및 군집분석을 위해 시료채취를 수행하였음
- pH 분석 결과, 발효초기에는 pH 7.0을 나타냈고 발효가 진행됨에 따라 pH 5.0까지 감소하였으나 230일 이후에는 다시 증가하는 경향을 보였다
- 된장발효기간 중 세균의 수는 초기  $10^9$ /g에서 발효가 진행됨에 따라  $10^8$ /g로 약간 감소하였고, 곰팡이 수는  $10^5$ - $10^6$ /g으로 세균에 비해 적은 수로 존재하며 발효기간 중 큰 변화 없이 유지하는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-28>
- 이러한 미생물 생균수 분석을 통해 된장의 발효는 곰팡이보다 세균의 영향을 많이 받는다는 것을 확인할 수 있었음

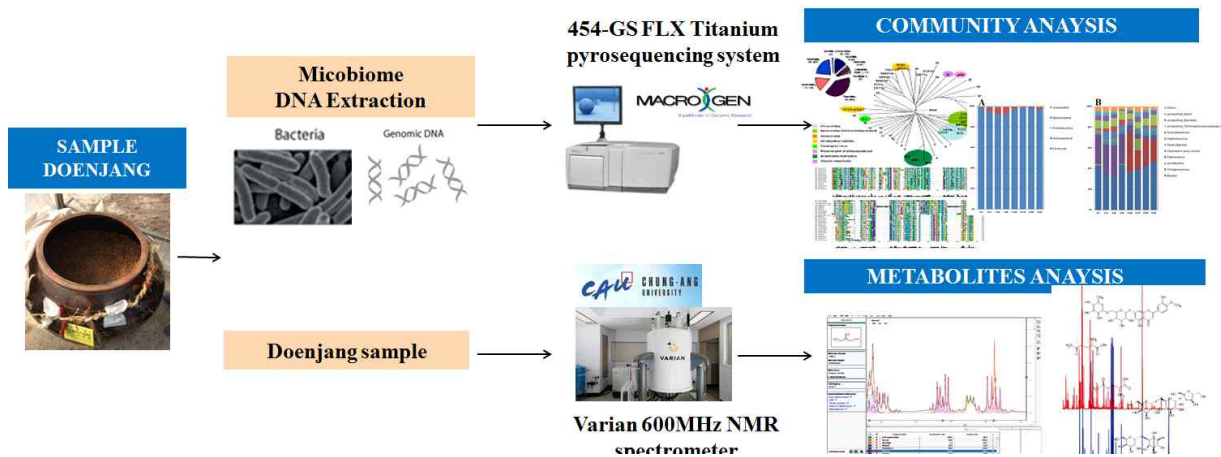




<그림 2-28> 된장 발효시기 별 세균 및 곰팡이 수, pH의 변화 패턴

(2) 발효시기별 된장 내 기능성 발효미생물의 군집 변화

- 시기별로 채취된 된장시료로부터 genomic DNA의 추출을 위해 FastDNA SPIN Kit for Soil (MPBio, USA)를 사용하였고, 추출한 DNA는 0.7% (w/v) agarose 전기영동을 통하여 추출 여부를 확인하였음
- 그리고 된장시료내의 전체 세균의 다양성을 분석하기 위하여 추출된 DNA를 주형으로 세균 16S rRNA 유전자의 V1-V3 부분을 시료마다 각각 다른 바코드 염기서열을 적용한 27F-518R barcoded primers를 사용하여 증폭하였고 <표 2-11>, PCR purification kit (Solgent, Korea)를 이용해 PCR산물을 정제한 후 동일한 농도로 하나의 시료로 합쳐 454-GS FLX titanium (Roche)를 이용하여 high-throughput pyrosequencing을 수행하였음 <그림 2-29>

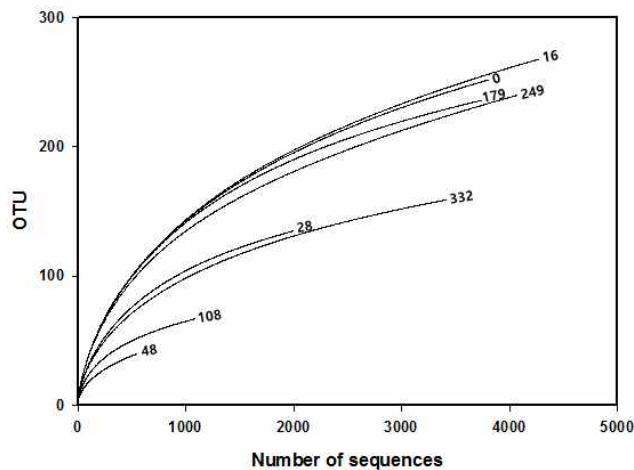


<그림 2-29> 된장 발효시기별 군집 및 대사체 분석과정

<표 2-11> 바코드-PCR 프라이머에 사용된 어댑터와 바코드 염기서열 목록

발효시기(day)	바코드 염기서열 (5'-3')
0	ATGCTGAG
16	TACAGCAG
28	ATGCAGAC
48	AGATCGCT
108	CATGTAGC
179	ATCGTGTG
249	CTACACAG
332	TAGCTACG
어댑터 염기서열 (5'-3')	
A 어댑터	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
B 어댑터	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG

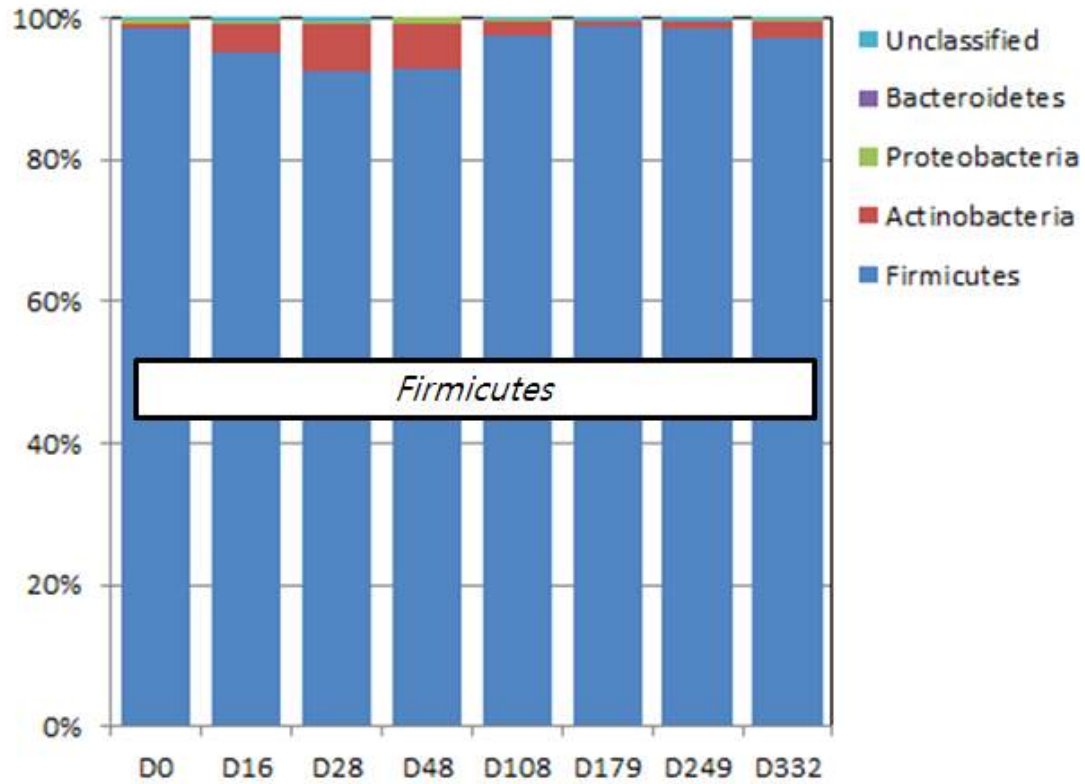
- Pyrosequencing 결과 총 43,432개의 염기서열 read를 총 발효시기 별 8개 시료로부터 얻었고, QC (Quality control)을 수행하여 그 중에서 quality score 값이 낮거나, read 길이가 짧거나, 세균에 비 특이적인 read를 제거하고 마지막으로 chimera sequence들을 제거한 결과 최종적으로 23,031개의 read를 얻을 수 있었음
- 이러한 결과를 RDP pyrosequencing pipeline(<http://pyro.cme.msu.edu/>)를 이용하여 97% 염기서열 유사도 기준으로 분류 조작상 단위(Operational Taxonomic Unit, OTU)를 계산한 후, 희박곡선 (rarefaction curve)분석을 통해 발효시기별 샘플 내 alpha-diversity를 분석한 결과, 발효초기에는 비교적 높은 다양성을 나타내지만 48일 까지 다양성이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 그 이후부터 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 그러나 249일 이후에는 다시 다양성이 감소하는 것을 관찰할 수 있었음 <그림 2-30>



<그림 2-30> 된장 발효시기 별 채취한 시료에서의 희박곡선 (Rarefaction curve)

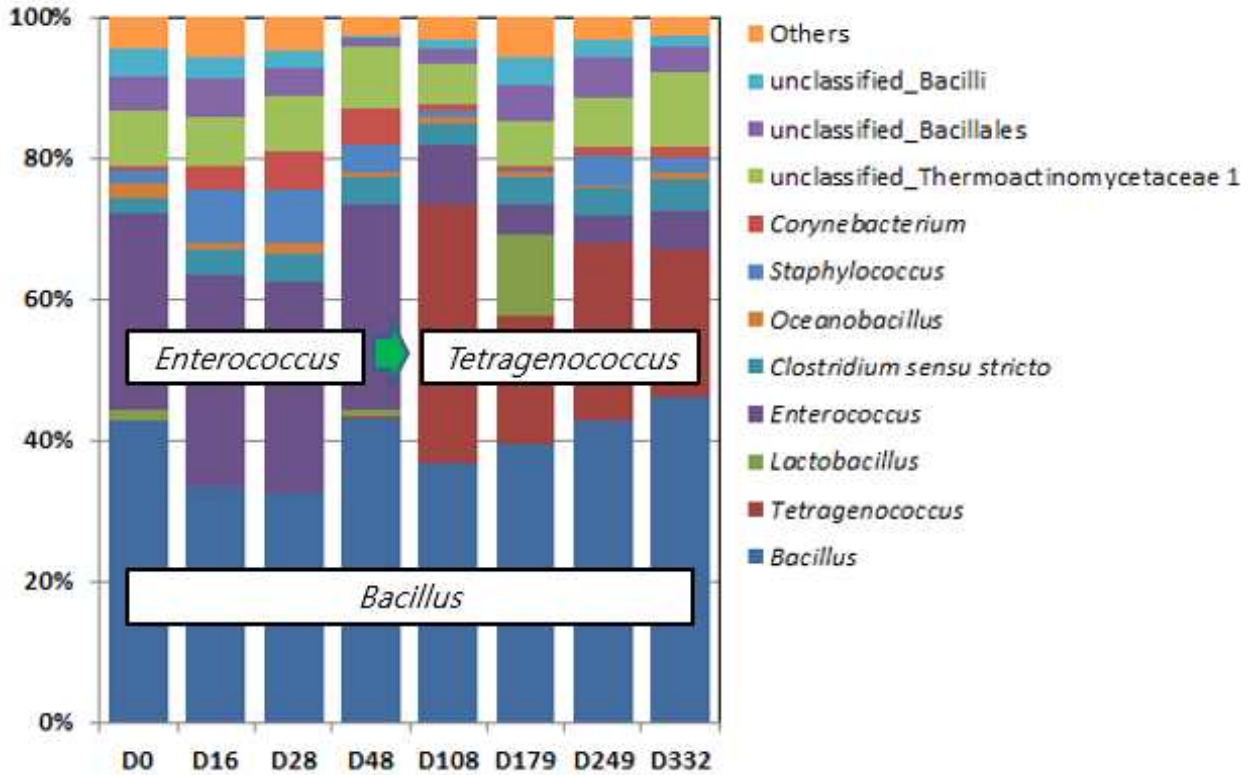
- 각 시료별 미생물 군집분석은 RDP naïve Bayesian rRNA Classifier를 이용하여 분석하였

음. 분석결과 문 (Phylum)수준에서는 *Firmicute* 가 발효초반부터 발효가 끝날 때까지 모두 우점하는 것을 확인할 수 있었으며, *Actinobacteria* 가 발효초반에 조금 증가하다 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-31>



<그림 2-31> 발효시기 별 된장 시료에서의 미생물 군집분석 (phylum 수준)

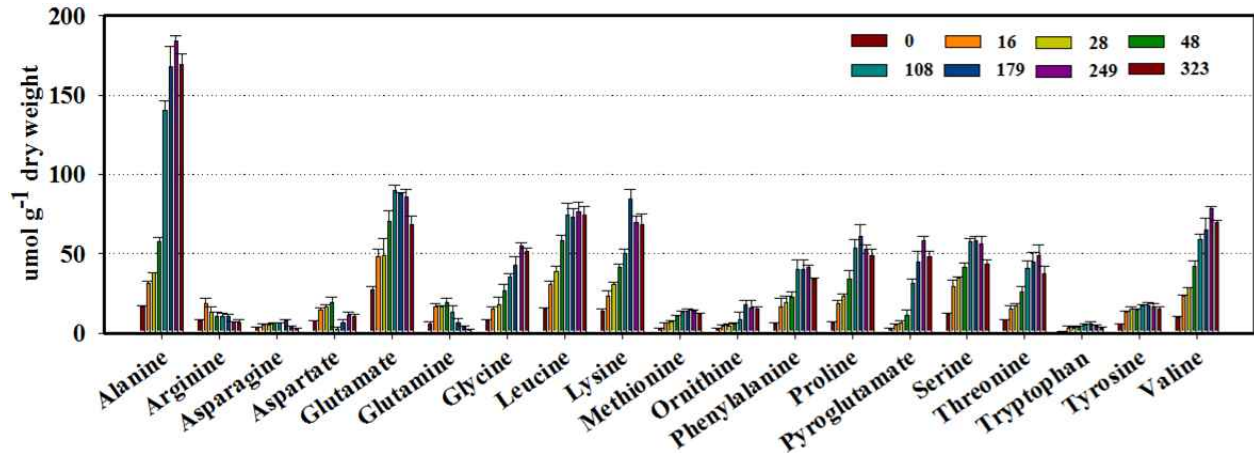
- 속 (genus) 수준에서의 미생물 군집의 천이를 관찰했을 때 *Bacillus* 속이 전체 발효기간 동안 우점하는 것을 확인할 수 있었고, 특이적으로 발효초반부터 48일까지 *Bacillus* 와 비슷한 비율로 우점하던 *Enterococcus* 가 48일을 기점으로 급격히 감소하고, *Tetragenococcus* 우점도가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-32>



<그림 2-32> 발효시기별 된장 시료 내 미생물 군집분석 (genus 수준)

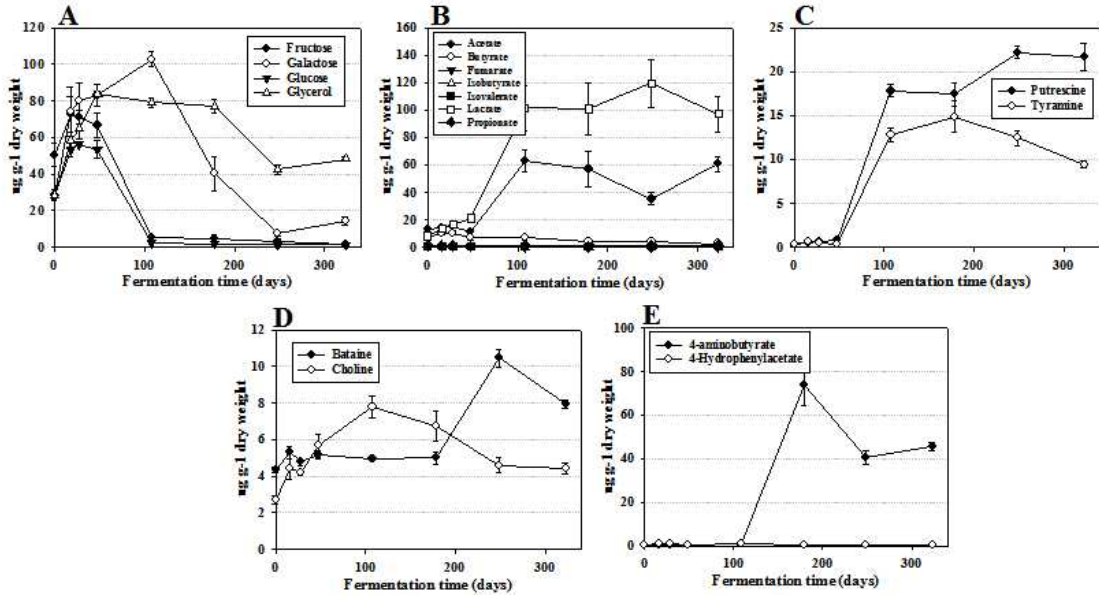
마. 발효시기별 된장 내 대사체 변화 및 미생물 군집과의 상관관계 통계적 분석

- 된장 발효 기간중의 대사체 변화를 proton NMR 분석을 이용해 얻은 NMR 스펙트럼에 대해 ChenomX 프로그램을 사용하여 각 대사체 별 annotation 및 농도측정을 수행하였음 <그림 2-33>
- 그 결과 된장 내 존재하는 아미노산 중 alanine, glutamate, glycine, leucine, lysine, valine이 주요 아미노산이라는 것을 확인할 수 있었으며, 대부분이 *Enterococcus* 우점도가 감소하고 *Tetragenococcus*의 우점도가 증가하는 시점인 48일 이후에 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 이러한 아미노산은 된장 맛을 결정하는데 중요한 요인이 되는데 lysine, alanine, glycine은 된장의 단맛, leucine은 쓴맛, glutamate의 경우 감칠맛의 요인이 됨 (Namgung et al., 2010). 이로 미루어 보았을 때 *Tetragenococcus*는 된장의 맛을 결정하는 중요한 미생물로 판단됨



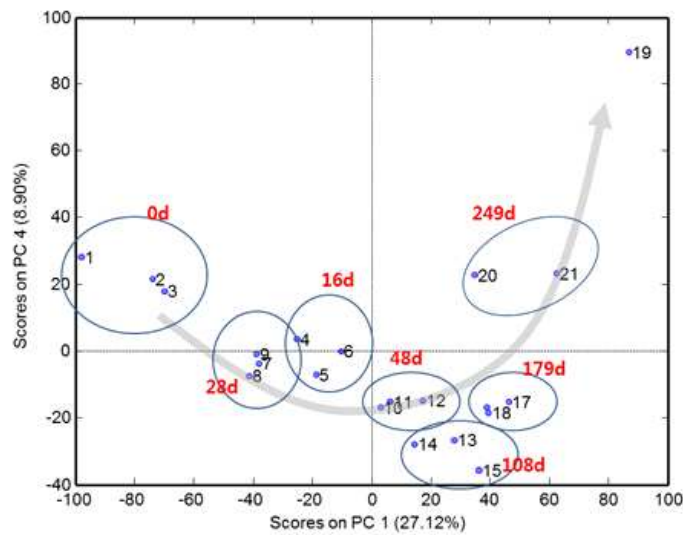
<그림 2-33> 발효시기 별 된장 시료에서의 주요 아미노산 함량 변화 분석

- 된장의 주요 탄소원으로는 glucose, fructose, galactose, glycerol이 관찰되었음
- 4가지 탄소원 모두 발효초기 10일까지 증가하다가 42일까지 일정한 농도를 유지하였음
- 발효 42일 이후 fructose 및 glucose가 빠르게 감소하였고, 108일 이후엔 galactose, 그리고 179일 이후엔 glycerol이 순차적으로 감소하였음
- 주요 탄소원들이 감소함에 따라 lactate 및 acetate는 증가하였는데 이들은 fructose 및 glucose가 감소하는 42일 이후에 빠르게 증가하였고 fructose, glucose가 완전히 소모된 시기에서는 증가 없이 발효기간 내내 일정하였음
- 4-aminobutyrate 즉 GABA로 잘 알려진 아미노산의 경우 108일 이후로 급격히 증가하였음. GABA는 신경전달물질로서 역할을 하는 것으로 알려진 아미노산으로서 뇌에서 포도당 분해를 촉진하고 뇌의 기능을 활발하게 하는 역할을 하며 뇌혈관장애에도 사용되어짐
- lactate, acetate, 4-aminobutyrate 모두 *Tetragenococcus*가 우점하고 있는 시기에 증가하는 것으로 보아 *Tetragenococcus*가 이들의 생성에 연관이 있을 것으로 보임
- 이외에도 butyrate, fumarate, isobutyrate, isovalerate, propionate 역시 관찰되었으나 매우 미량으로 큰 변동없이 존재하였음 <그림 2-34>



<그림 2-34> 발효시기 별 된장 시료에서의 주요 유기성분의 함량 변화

- 이와 함께 발효시기별 3반복으로 측정된 대사체 정보를 이용하여 주성분분석 (principal component analysis, PCA)를 실시한 결과 3반복 결과가 시기별로 명확히 구분되는 것을 확인할 수 있었으며, PC 1을 기준으로 발효가 진행됨에 따라 변화하는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-35>



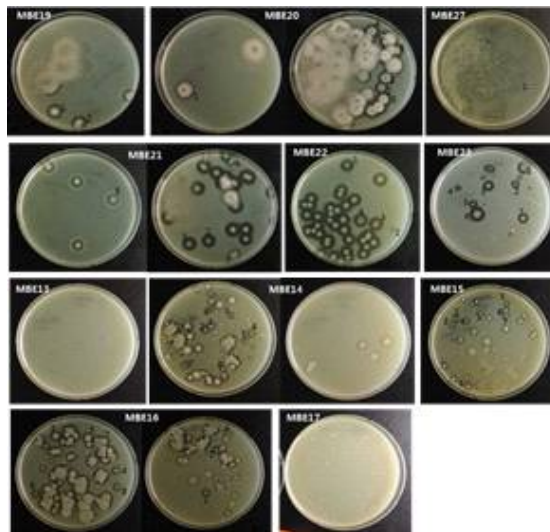
<그림 2-35> 주성분 분석 (PCA)를 통한 대사체 변화양상과 발효시기의 상관성 분석

## 6. 된장 내 유용 기능성 미생물 분리 및 기능성 평가

- 된장 내 pyrosequencing을 통한 미생물 군집 분석을 통해 *Bacillus*가 된장 내 우점 하는 주요 미생물임을 알게 됨
- 이 결과를 토대로 된장에서 *Bacillus*를 분리하여 인체 대사성 질환예방 및 된장 발효에 영향

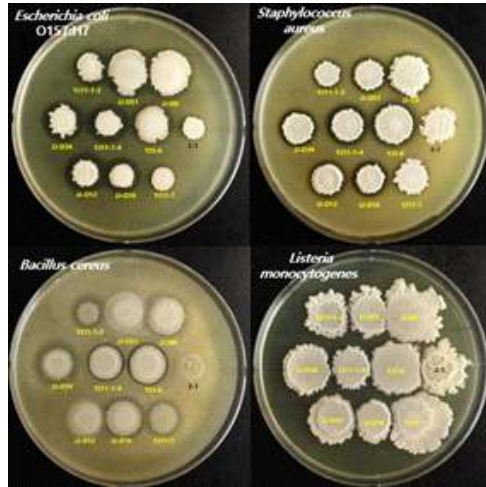
을 미치는 기능성 평가를 진행함

- 첫번째 평가할 기능성으로 protease activity (단백질 분해력)를 측정하였으며, 이는 된장의 주 성분인 콩의 빠른 분해를 촉진함으로, 된장의 빠른 발효를 유도하는 부분에 있어 필수적인 기능성임
- Protease activity를 측정하기 위하여 된장을 PBS buffer에 희석하고, 1% skim milk를 첨가한 tryptic soy agar (TSA) 배지에 도말하여 배양함으로 생성되는 clear zone의 크기를 측정함으로써 높은 protease activity를 지닌 균주를 다수 선별함 <그림 2-36>



<그림 2-36> 된장에서 분리한 *Bacillus*의 protease activity(단백질 분해력) test

- Protease activity test를 통해 1차로 선별된 *Bacillus* 균주들을 대상으로 병원성 미생물 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 균주에 대한 항균 활성능을 측정하여 2차로 우수 기능성 *Bacillus* 9균주를 선별함 <그림 2-37>
- 이러한 병원성 미생물의 억제능을 보유한 기능성 미생물들은 된장환경 내에서 성장할 수 있는 병원성 미생물로부터 기인할 수 있는 다양한 질병을 예방할 수 있음



<그림 2-37> 1차 선별한 *Bacillus*의 antimicrobial activity (항균활성) test

-높은 활성의 단백질 분해능과 항균 활성을 지닌 선정된 9개의 균주를 대상으로 16S rRNA 염기서열을 분석하여 동정을 진행함 <표 2-12>

<표 2-12> 선정된 9개의 균주의 16S rRNA 염기서열 분석 및 동정결과

Isolates	Closest relative	Sequence homology (%)
JJ-D16	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1415)
JJ-D34	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.86 (2/1405)
YJ11-1-2	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1416)
YJ11-7	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1416)
JJ-D8	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1410)
JJ-D51	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1414)
YJ11-1-4	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.86 (2/1415)
JJ-D12	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1416)
YJ3-6	<i>Baillus methylotrophicus</i> CBMB205(T)	99.93 (1/1415)

-동정한 9개의 균주를 대상으로 추가 기능성 test를 진행 함. fibrinolytic activity (혈전 용해능) 여부를 확인하기 위해 Cell-free 상등액으로 투명화의 존재 여부를 관찰한 결과, 9균주 모두 혈전 용해능을 확인할 수 있었음 <그림 2-38>. 이로써 뇌졸중, 치매, 당뇨 등과 같은 혈관계 질병을 유발하는 원인이 되는 혈전을 용해 할 수 있는 기능성을 확인할 수 있었음





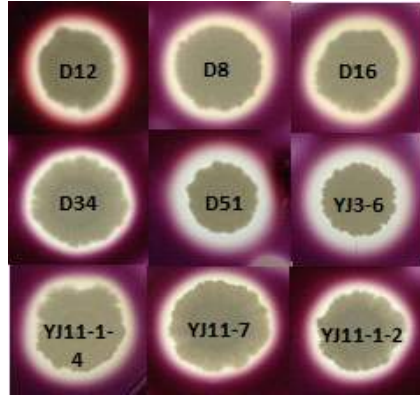
<그림 2-38> 선별된 9균주의 fibrinolytic activity (혈전 용해능) test

-콩 껍질의 주성분인 셀룰로오스를 분해하는 능력 (Cellulose-degrading activity) 여부를 확인하기 위하여 1% CMC 고체 배지에서 배양한 colony 주위에 1% congo red 지시약을 사용해 투명환의 존재 여부를 관찰한 결과, 선별된 9주의 균주 모두 셀룰로오스 분해능이 존재하는 것을 확인함 <그림 2-39>.



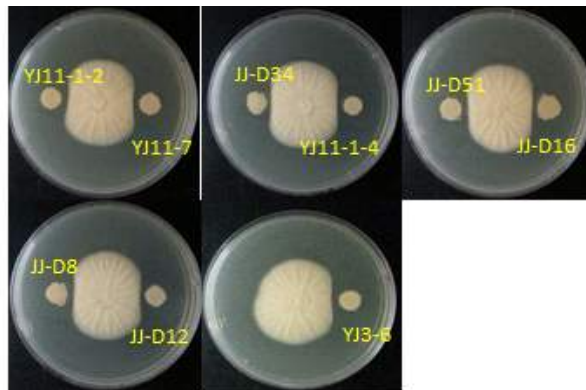
<그림 2-39> 선별된 9균주의 cellulose-degrading activity (섬유소 분해능) test

-전분질 분해능 (amylase activity)을 확인하기 위하여 Gram's Iodine 지시약을 1% soluble starch 고체 배지에서 배양한 colony 주변에 뿌려 투명환의 존재 여부를 관찰한 결과, 선별된 균주 모두 전분질 분해능을 나타내는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-40>



<그림 2-40> 선별된 9균주의 amylase activity (전분 분해능) test

-Antifungal activity (항진균 활성)을 위한 곰팡이는 *Aspergillus flavus* subsp. *flavus* KACC 41809를 사용하였음. *Aspergillus flavus* subsp. *flavus* 의 성장을 저해하는 정도를 측정한 결과, 선별된 균주 모두 항진균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었음 <그림 2-41>. 이로써 강한 간 장애를 일으킬 뿐만 아니라 대단히 강한 발암물질인 ‘aflatoxin’을 생성함으로써 식품의 안정적인 생산에 제한요인이 될 수 있는 *A. flavus*를 억제 할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었음



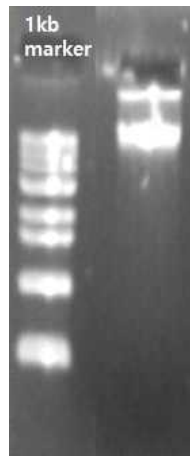
<그림 2-41> 선별된 9균주의 antifungal activity (항진균 활성) test

-기능성 평가 결과 후보균주 중 모든 평가에서 높은 활성을 보인 JJ-D34를 최종적으로 우수 발효 미생물로 선정함

## 7. 된장 내 유용 발효미생물인 *Bacillus methylotrophicus* JJ-D34의 기능성 탐색

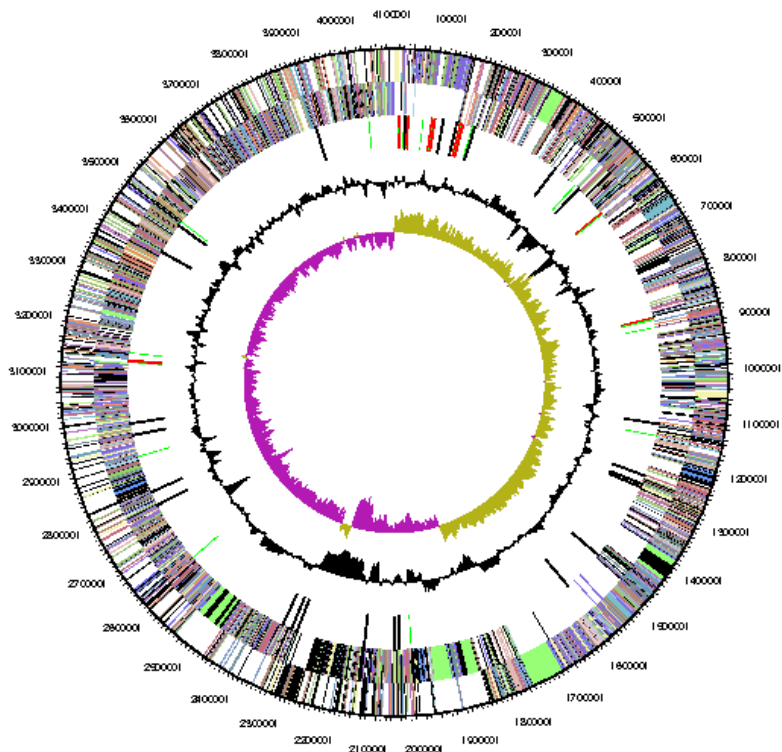
### 가. 된장에서 분리된 *B. methylotrophicus* JJ-D34의 유전체 분석

- 위의 발효시기에 따른 된장 시료 내 미생물 군집 분석 결과 *Bacillus* 속의 미생물이 전체 된장 발효기간 동안 우점하여 된장 발효에 중요한 미생물임을 확인 할 수 있었음
- 그에 따라 장내에서 생존할 수 있는 능력과 면역반응조절기능을 변화하고 통제하는 능력을 지닌 균주로 알려진 *B. methylotrophicus* (Sim et al., 2015)를 통해 유용 발효 기능성 유전자를 탐색하고자 하였음
- 대상 균주로는 된장에서 분리한 *B. methylotrophicus* strain JJ-D34를 선정하여 전체 유전체 분석을 진행하였음



<그림 2-42> *B. methylotrophicus* JJ-D34 의 전체 유전체 분석을 위한 DNA 추출 전기영동 결과

- Genomic DNA를 phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 추출한 후 <그림 2-42>, 염기서열 분석방법인 PacBio 방법을 이용하여 전체염기서열분석을 진행하였음
- 전체 염기 서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 그린 결과 <그림 2-43>와 같이 1개의 chromosome이 있는 것으로 밝혀졌고 plasmid는 없는 것으로 나타남



<그림 2-43> *B. methylotrophicus* JJ-D34의 지놈 유전자 지도

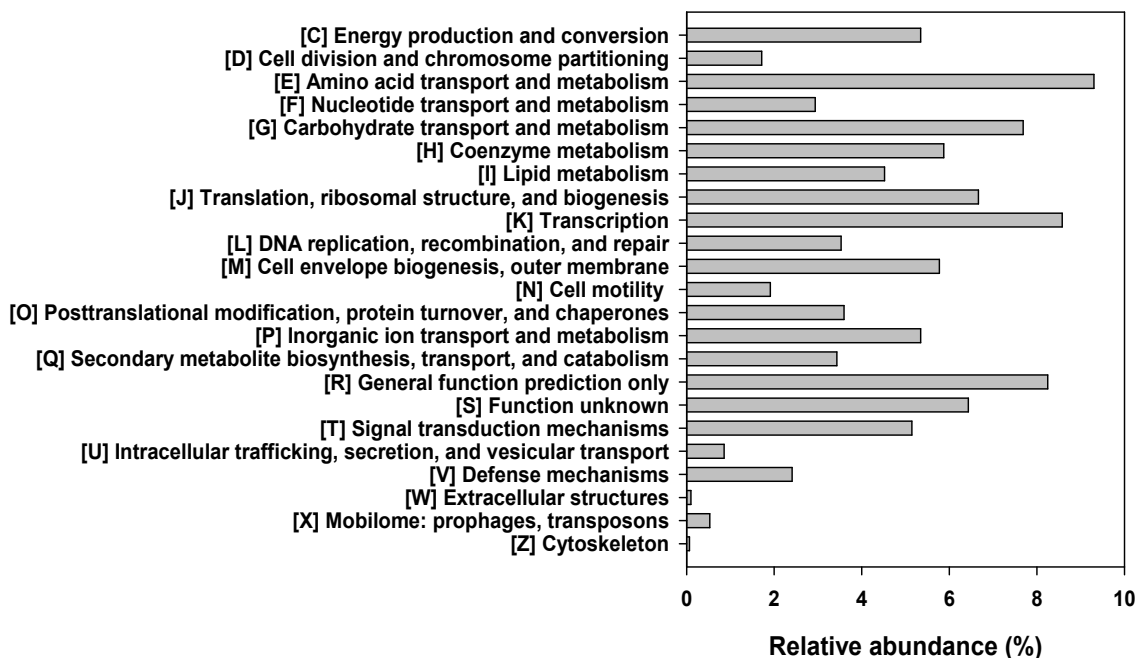
- 전체 염기서열의 구체적인 특징들은 <표 2-13>에 정리하였음
- JJ-D34 균주는 4,105,955개의 염기서열로 이루어진 하나의 크로모솜을 가지며 G+C 함량은 46.24% 임
- 지놈에 존재하는 총 유전자의 개수는 4,120개이고 그 중 3,982개의 유전자가 단백질을 코딩하여 세포 내에서 작용하는 것을 확인할 수 있었음

<표 2-13> *B. methylotrophicus* JJ-D34 의 유전자 특징

Characteristic	Value for: JJ-D34
Size (bp)	4,105,995
GC content (%)	46.24
Total no. of genes	4,120
No. of protein coding sequences	3,982
No. of proteins with function prediction	3,231
DNA coding density (%)	96.65
Protein assigned to COG (%)	2742 (65.55)
Average gene length (bp)	996.59
No. of rRNA operons	9
Total no. of tRNA genes	86

#### 나. 된장 유래 *B. methylotrophicus* JJ-D34의 기능성 유전자 탐색

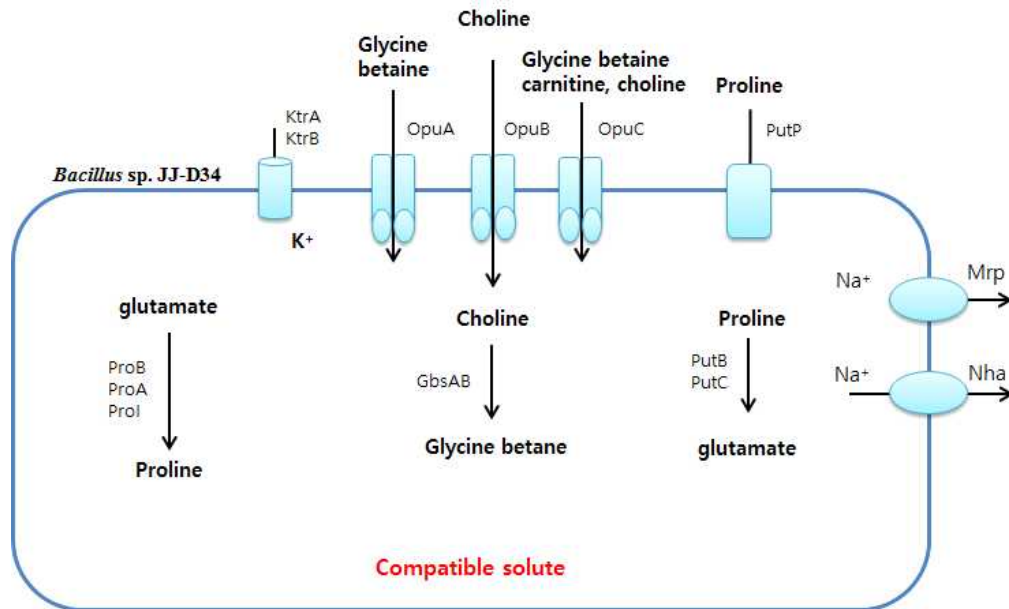
- 지놈으로부터 생성되는 유전자 중 기능을 가진 COG(Clusters of Orthologous Groups)로 확정되는 유전자는 전체 유전자의 65.55%로 존재하였음
- 이들을 각 기능별 카테고리 분류하면 아미노산의 수송과 대사에 관련된 유전자들이 가장 높은 비율을 차지하며, 전사와 탄수화물 수송 및 대사에 관련된 유전자 역시 높은 비율을 차지하고 있었음 <그림 2-44>



<그림 2-44> *B. methylotrophicus* JJ-D34의 지놈 특징과 COG분석 결과

- 전체 유전자 정보를 통해서 *B. methylotrophicus* JJ-D34의 된장 환경과 같은 고 염 환경에서 가해지는 삼투 스트레스로부터, 세포 내의 삼투압의 항상성을 유지하기 하여

발현하는 양이온의 통로 및 compatible solutes와, 그 전구체의 통로를 <그림 2-45>과 같이 확인할 수 있었음



<그림 2-45> *B. methylotrophicus* JJ-D34가 갖는 compatible solutes 축적경로

- 된장이라는 고염 환경 하에 가해지는 삼투 압력에 대한 세포 내 항상성을 유지하기 위해서 *B. methylotrophicus* JJ-D34는 세포 내로 계속해서 유입되는 고 농도의 Na<sup>+</sup>이온을 유출을 하는 통로를 코딩하는 유전자를 가지며, K<sup>+</sup>를 세포 내에 축적하기 위해 K<sup>+</sup> 이온의 유입을 조절하는 통로를 코딩하는 유전자도 함께 존재하는 것이 확인되었음
- *B. methylotrophicus* JJ-D34 는 이러한 이온 조절 통로를 이용하여 세포 내 이온의 항상성을 유지하여 된장 내 고 염 환경에서 생존 가능 한 것으로 이해됨
- 그 외에 세포 내부에 compatible solutes를 축적하기 위한 유전자가 다량 발견되었는데, 이러한 compatible solutes와 그 전구체를 세포 내부로 유입시키는 조절 통로를 다수 코딩함으로 이들 대사체의 세포 내 축적을 용이 하게 하는 것으로 보임
- *B. methylotrophicus* JJ-D34가 고염환경에서 생존하기 위해서 만드는 proline Glycine-betaine, Glutamate와 같은 compatible solutes는 위의 ‘*S. jeotgali* MJ3에서 생산되는 compatible solutes의 산업적 활용가능성 탐색’에서 언급한대로 산업적으로 활용가능성이 매우 높음
- *B. methylotrophicus* JJ-D34가 glycine betaine을 세포 내에 축적하기 위한 유전자를 지님을 확인함으로써 이를 아미노산 대사질환인 ‘호모시스틴요증’의 치료와 간경변 초반 간에 지방질의 침식을 예방하는 치료적 효과에 활용할 수 있음을 알게 되었음

### 제3절 제 2협동과제

#### 1. 최신 데이터베이스 및 향상된 생물정보학 기술을 활용한 전통발효식품유래 기존 발효미생물 유전체의 재해석

- 발효미생물 균주의 전유전체 데이터 재해석과 데이터 베이스 구축을 위해 대상 발효미생물들을 주관기관의 연구 결과를 통해 결정함
- 주관연구기관의 연구수행을 통해 Bacteriocin, Fibrinolysis의 기능성이 확인 된 균주들의 taxonomic 정보를 얻었으며 <표 3-1> 및 <표 3-2>와 같음

<표 3-1> Putative Bacteriocin produing strains

Sample	Strain
WA219, WA241, ZA362, ZA372, ZA379, ZA394, ZA400	<i>Bacillus subtilis</i>
XA194, XA195, XA198	<i>Bacillus licheniformis</i>
CB117, CB120	<i>Lactobacillus plantanum</i>
ZB204	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

<표 3-2> Putative Fibrionlysis enzyme producing strains

Sample	Strain
ZA7, SA175	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
CB110	<i>Propionicbacterium acnes</i>
CA82, CB125, CB126	<i>Weissella paramesenteroides</i>
ZA3	<i>Staphylococcus hominis</i>
JA85	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
EB133, SA179	<i>Staphylococcus warneri</i>
CB158	<i>Staphylococcus epiderimidis</i>
ZA24	<i>Bacillus licheniforminis</i>
ZA400	<i>Bacillus subtilis</i>
ZB140	<i>Lactobacillus curvatus</i>

- 이들 균주들 중 현재까지 NCBI (National Center of Biotechnology Information)의 database에 공개가 되어 있는 균주들을 다운 받아 확보함
- 실제 NCBI 데이터베이스에서 genome을 다운받아 확보할 수 있는 균주들은 아래의 <표 3-3>과 같음

<표 3-3> NCBI 데이터베이스로부터 다운 받아 분석할 수 있는 전유전체 수

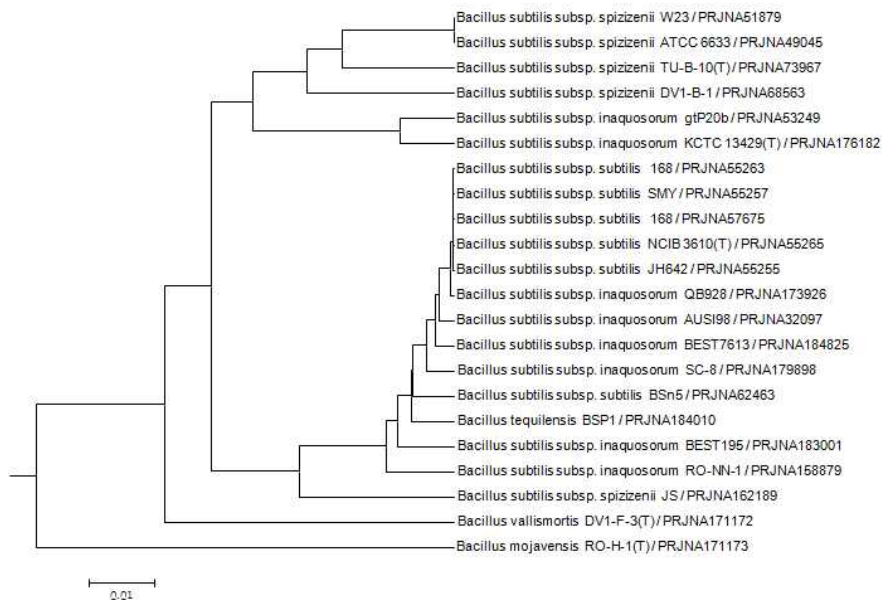
Species	Number of available genome sequence
<i>Bacillus subtilis</i>	18
<i>Bacillus licheniformis</i>	6
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2

## 2. 재해석된 기존 발효미생물 유전체정보를 바탕으로 한 발효미생물간의 비교유전체 (Comparative genomics) 분석

- Public 데이터베이스로부터 확보한 균주들의 분석을 위해 Average Nucleotide identity (ANI) value를 이용한 genome tree를 그려 그들의 유사성 정도를 확인하였음
- genome tree를 그린 후 이들의 CDS들의 homolgy를 서로 비교한 후 이를 이용하여 전유전체의 차이점을 쉽게 볼 수 있는 circos map을 그려 이들을 비교하였음.
- 비교 유전체 분석을 통해 분석한 각 균주들의 CDS 차이점을 유전체 비교 테이블로 만들어 이들을 차후 비교유전체 데이터로 쉽게 활용할 수 있도록 저장한 뒤 형식을 바꾸었음

### 가. *Bacillus subtilis* 균주

- *B. subtilis* 균주의 경우 putative bacteriocin과 putative fibrinolysis enzyme을 만드는 균주로 주관기관에서 분리되었음
- 기능성을 가지는 발효미생물로 판단되어 이들의 전유전체 데이터를 NCBI에서 확보하였다. 총 18개의 전유전체 정보가 등록되어 있어 이들을 이용한 genome tree는 <그림 3-1>과 같음



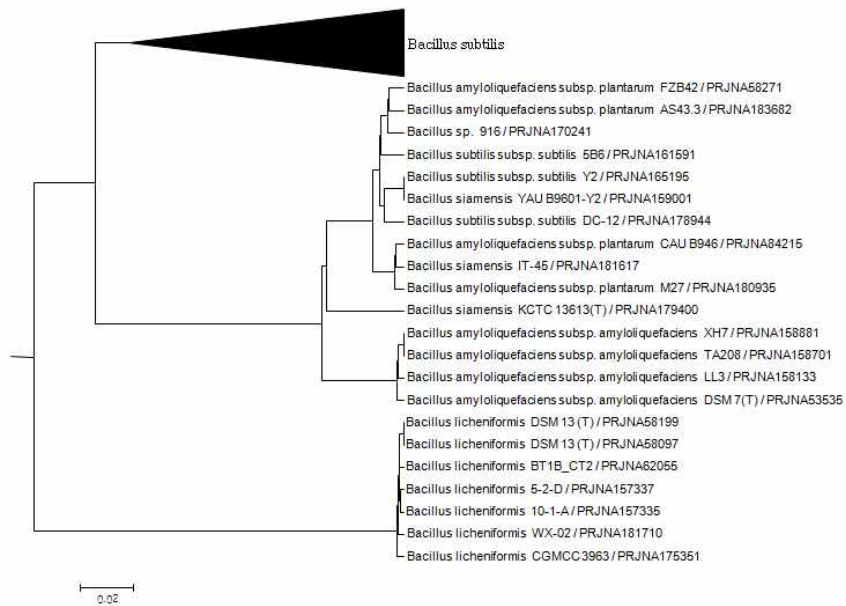
<그림 3-1> *Bacillus subtilis*의 genome tree



- *B. subtilis*의 경우 많은 subsp.가 보고되어 이들의 전유전체가 이용가능하며 이들 중 기능성을 가지는 발효미생물을 선별한다면 더 많은 분석이 가능함

나. *Bacillus licheniformis*

- *B. licheniformis*균주의 경우에도 putative bacteriocin과 putative fibrinolysis enzyme을 생성하는 균주로 분석이 되었음
- 현재 총 6개의 전유전체 정보가 NCBI에 공개되어 있으며 이들을 이용한 genome tree는 <그림 3-2>와 같음



<그림 3-2> *Bacillus licheniformis*의 genome tree

- *B. licheniformis*의 경우 전유전체가 *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis*의 전유전체와 유사하나 다르게 묶인다는 것을 확인 할 수 있으며, 이 균주들이 가진 CDS들의 homology를 이용하여 비교유전체를 위한 circos map은 <그림 3-3>과 같음

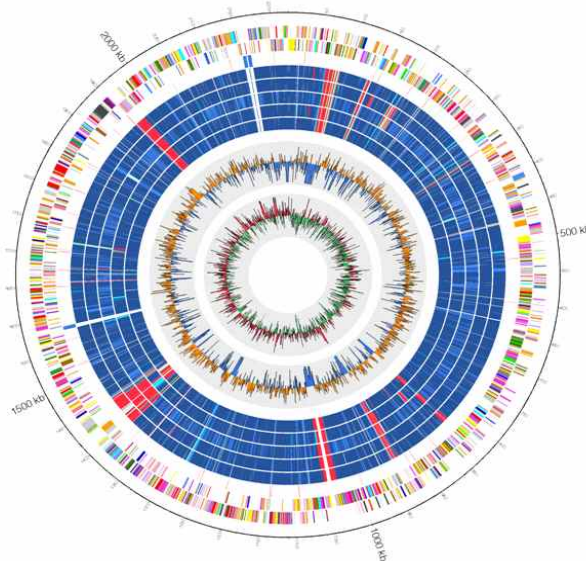


다. *Bifidobacterium bifidum*

- *B. bifidum*의 균주는 putative bacteriocin을 형성하는 균주로 관찰이 되었으며 NCBI로부터 6개의 전유전체 데이터를 확보하여 이들을 이용하여 비교유전체 분석을 진행함
- 전유전체의 homology search를 통한 genome tree는 <그림 3-5>와 같음



<그림 3-5> *B. bifidum*의 genome tree



<그림 3-6> *B. bifidum*의 circos map

( 바깥쪽 원부터 *B. bifidum* BGN4, PRL2010, S17, IPLA 20015, LMG 13195, NCIMB 41171균주들의 비교 결과로 안쪽원은 GC skew이고 바깥쪽 원은 ORF를 나타냄 )

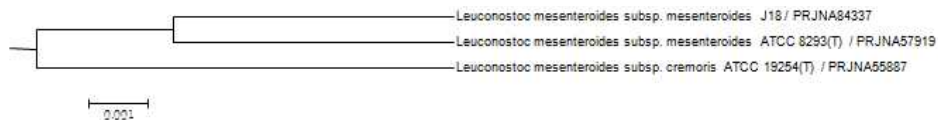
- 이들 균주들의 비교 표는 <그림 3-7>과 같음

feature name	Contig	Position	Length	Strand	reference feature name	PRJNA167888 Bifidobacterium bifidum Bifid	PRJNA5983 Bifidobacterium bifidum PRJ2019	PRJNA5545 Bifidobacterium bifidum S17	PRJNA180937 Bifidobacterium bifidum IPA_200615	PRJNA180936 Bifidobacterium bifidum IMG_11195	PRJNA5223 Bifidobacterium bifidum NCMB_41271	SSD function	subCategory
BBNG_00001	NZ_CP0990229.1	1,509	509	+	null	(1) 8056_8618	(1) 98863_99200	(1) 121612_121794	(1) 121612_121794	(1) 121612_121794	(1) 121612_121794		
BBNG_00002	NZ_CP0990229.1	696,1963	1163	-	null								
BBNG_00003	NZ_CP0990229.1	2331,3872	342	-	null								
BBNG_00004	NZ_CP0990229.1	2394,3179	186	+	null								
BBNG_00005	NZ_CP0990229.1	3038,3269	186	-	null								
BBNG_00006	NZ_CP0990229.1	3323,5481	2079	+	null								
BBNG_00007	NZ_CP0990229.1	3885,4119	235	-	null								
BBNG_00008	NZ_CP0990229.1	4279,8528	318	+	null								
BBNG_00009	NZ_CP0990229.1	4515,8920	451	-	null								
BBNG_00010	NZ_CP0990229.1	4946,7289	346	-	null								
BBNG_00011	NZ_CP0990229.1	7495,7920	450	-	null								
BBNG_00012	NZ_CP0990229.1	8219,10692	2484	+	null								
BBNG_00013	NZ_CP0990229.1	11451,11812	275	-	null								
BBNG_00014	NZ_CP0990229.1	13445,12624	765	+	null								
BBNG_00015	NZ_CP0990229.1	13733,13318	626	+	null								
BBNG_00016	NZ_CP0990229.1	13586,14887	1302	+	null								
BBNG_00017	NZ_CP0990229.1	15012,15487	476	-	null								
BBNG_00018	NZ_CP0990229.1	15930,16318	739	+	null								
BBNG_00019	NZ_CP0990229.1	16492,17644	1153	+	null								
BBNG_00020	NZ_CP0990229.1	17645,18284	640	-	null								
BBNG_00021	NZ_CP0990229.1	18512,20569	2058	-	null								
BBNG_00022	NZ_CP0990229.1	20072,21181	399	-	null								
BBNG_00023	NZ_CP0990229.1	21552,23018	1467	-	null								
BBNG_00024	NZ_CP0990229.1	23015,24493	1479	-	null								
BBNG_00025	NZ_CP0990229.1	24495,26148	1653	-	null								
BBNG_00026	NZ_CP0990229.1	26155,26697	543	-	null								
BBNG_00027	NZ_CP0990229.1	26728,27426	702	-	null								
BBNG_00028	NZ_CP0990229.1	27666,30137	2472	-	null								
BBNG_00029	NZ_CP0990229.1	30493,33247	2755	+	null								
BBNG_00030	NZ_CP0990229.1	33248,35571	2323	+	null								
BBNG_00031	NZ_CP0990229.1	35582,36803	1221	-	null								
BBNG_00032	NZ_CP0990229.1	36872,37810	939	+	null								
BBNG_00033	NZ_CP0990229.1	38074,38829	756	+	null								
BBNG_00034	NZ_CP0990229.1	38881,39403	523	+	null								
BBNG_00035	NZ_CP0990229.1	39510,40514	1005	+	null								
BBNG_00036	NZ_CP0990229.1	40519,41019	501	-	null								
BBNG_00037	NZ_CP0990229.1	41668,46395	3527	-	null								
BBNG_00038	NZ_CP0990229.1	44351,45200	850	-	null								
BBNG_00039	NZ_CP0990229.1	45212,45654	443	-	null								
BBNG_00040	NZ_CP0990229.1	45688,46008	321	-	null								

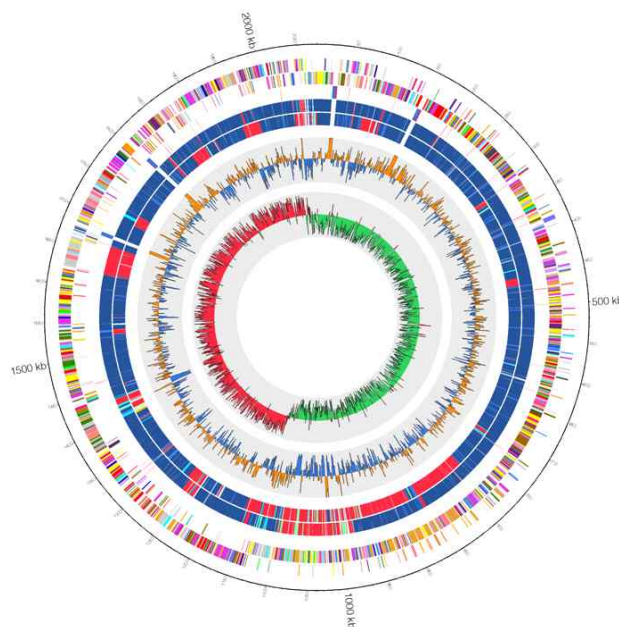
<그림 3-7> *B. bifidum*의 비교유전체 분석 표

라. *Leuconostoc mesenteroides*

- *L. mesenteroides* 균주의 경우 putative fibrinolysis enzyme을 생성한다고 발견되었음
- 총 3개의 전유전체 데이터를 NCBI로부터 확보하였으며 이들을 이용한 genome tree는 <그림 3-8>과 같음



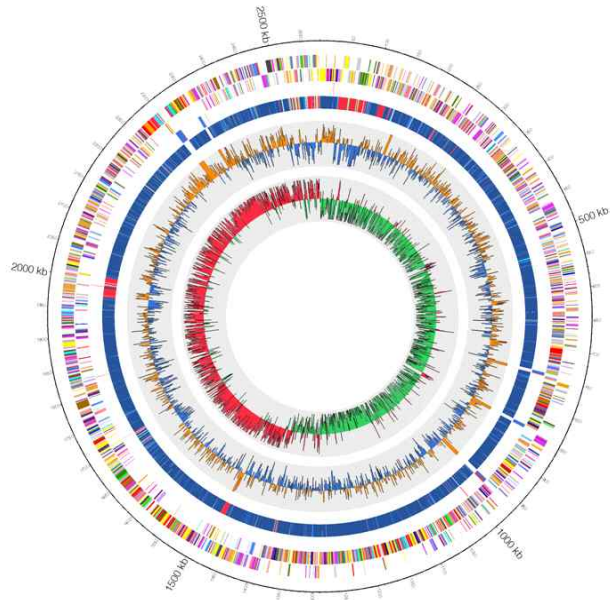
<그림 3-8> *L. mesenteroides*의 genome tree



<그림 3-9> *L. mesenteroides*의 circos map

( 바깥쪽 원부터 *L. mesenteroides* J18, ATCC 19254를 나타내며 안쪽원은 GC skew이고





<그림 3-12> *S. saprophyticus*의 circus map  
*S. saprophyticus* ATCC 15305를 기준으로 map을 그림

feature name	Contig	Position	Length	Strand	reference feature name	PRUNA5411 Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305	PRUNA180053 Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus KACC 16462	SEED function	subcategory	category	COG function	COG id	COG category	gene	CDD	product	annotation source
SSP0001	NC_007350.1	509,1876	1368	+	null	01_0001_0001	01_0001_0001				ATPase involved in DNA replication initiation	CO00593	L	DnaA	30933	chromosome replication initiator DnaA	
SSP0002	NC_007350.1	2124,3254	1131	+	null	01_0001_0004	01_0001_0004				DNA polymerase sliding clamp subunit (DNA homology)	CO00592	L	DnaN	30937	DNA polymerase III subunit beta	
SSP0003	NC_007350.1	3815,4039	225	=	null	01_0001_0004	01_0001_0004				Uncharacterized conserved protein	CO02501	S		12575	hypothetical protein	
SSP0004	NC_007350.1	4036,5151	1116	-	null	01_0001_0004	01_0001_0004				Recombinational DNA repair ATPase (RecF pathway)	CO01195	L	RecF	11388	recombination protein F	
SSP0005	NC_007350.1	5173,7098	1926	+	null	01_0001_0006	01_0001_0006				Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topoisomerase IV), B subunit	CO00187	L	SyrB	80536	DNA gyrase subunit B	
SSP0006	NC_007350.1	7134,3827	2694	+	null	01_0001_0006	01_0001_0006				Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topoisomerase IV), A subunit	CO00188	L	SyrA	80537	DNA gyrase subunit A	
SSP0007	NC_007350.1	9889,10701	813	-	null	01_0001_0007	01_0001_0007				Predicted sugar kinase	CO00063	G		10412	hypothetical protein	
SSP0008	NC_007350.1	11098,12397	1500	+	null	01_0001_0007	01_0001_0007				histidine ammonia-lyase	CO02980	E	HuorI	32805	histidine ammonia-lyase	
SSP0009	NC_007350.1	12503,14412	1284	+	null	01_0001_0007	01_0001_0007				Sarcosine synthase	CO00172	J	InfC	10521	sarcosine synthase	
SSP0010	NC_007350.1	14528,15229	702	+	null	01_0001_0007	01_0001_0007				Predicted branched-chain amino acid permease (salicylic acid resistance)	CO01296	E	AuC	15487	branched-chain amino acid permease	
SSP0011	NC_007350.1	15226,15553	330	-	null	01_0001_0007	01_0001_0007				Predicted membrane protein	CO04392	S	CO04392	34099	hypothetical protein	
SSP0012	NC_007350.1	15827,16798	969	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				homoserine acetyltransferase	CO02021	E	MEF2	12204	homoserine-o-acetyltransferase	
SSP0013	NC_007350.1	17076,17987	912	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Predicted membrane protein	CO04241	S	CO04241	33964	hypothetical protein	
SSP0014	NC_007350.1	18002,19969	1968	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Predicted signaling protein consisting of a modified GDEF domain and a Dlx1 domain	CO03887	T	CO03887	33676	hypothetical protein	
SSP0015	NC_007350.1	19966,20412	447	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Ribosomal protein L9	CO00959	J	RefI	80708	S15 ribosomal protein L9	
SSP0016	NC_007350.1	20443,21882	1410	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Replicative DNA helicase	CO00305	L	DnaB	30683	replicative DNA helicase	
SSP0017	NC_007350.1	22148,23421	1284	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Adenylosuccinate synthase	CO00104	F	PurR	30463	adenylosuccinate synthetase	
SSP0018	NC_007350.1	23521,24722	1212	-	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Glyoxyl transferase, related to UDP-glucuronosyltransferase	CO01819	SC	CO01819	32004	glyoxyltransferase	
SSP0019	NC_007350.1	25365,25823	459	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Transcriptional regulator	CO01946	F	MarR	32031	transcriptional regulator	
SSP0020	NC_007350.1	26277,27683	1407	+	null	01_0001_0008	01_0001_0008				Arabinose efflux permease	CO02816	G	AraE	32643	major facilitator superfamily permease	
SSP0021	NC_007350.1	29100,28801	702	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	CO00745	TK	OmpR	31033	response regulator	
SSP0022	NC_007350.1	28814,30646	1833	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Signal transduction histidine kinase	CO08302	T	VicK	34607	two-component sensor histidine kinase	
SSP0023	NC_007350.1	30636,31976	1341	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Uncharacterized protein conserved in bacteria	CO04863	S	CO04863	34472	hypothetical protein	
SSP0024	NC_007350.1	31977,32759	783	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Uncharacterized protein conserved in bacteria	CO04853	S	CO04853	34462	hypothetical protein	
SSP0025	NC_007350.1	33192,33983	792	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily 1	CO01235	R	DhpP	31420	metal-dependent hydrolase	
SSP0026	NC_007350.1	34583,35061	480	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Uncharacterized conserved protein	CO01576	S	CO01576	31764	hypothetical protein	
SSP0027	NC_007350.1	35138,36919	1752	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				DNA modification methylase	CO00863	L	CO00863	31203	DNA modification methylase	
SSP0028	NC_007350.1	36942,37721	780	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Predicted DNA modification methylase	CO01041	L	CO01041	31243	modification methylase	
SSP0029	NC_007350.1	37734,38797	1044	+	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Protein involved in initiation of plasmid replication	CO08527	L	CO08527	36086	replication protein RepA	
SSP0030	NC_007350.1	38849,39395	515	-	null	01_0001_0009	01_0001_0009				Uncharacterized protein conserved in bacteria	CO04833	S	CO04833	34053	hypothetical protein	

<그림 3-13> *S. saprophyticus*의 비교 유전체 테이블

### 3. 비교 유전체 분석을 한 균주들의 DB구축을 위한 테이블 구축

- 주관연구기관에서 관찰한 기능성 발효미생물들 균주들의 이미 알려진 전 유전체 결과를 확보하여 이들의 전유전체 분석 결과와 비교유전체를 분석한 결과를 모두 모아 SQL 데이터베이스 표 형태로 구축하여 앞으로 구축할 데이터베이스를 위한 작업을 진행함
- 본 SQL 데이터베이스 표를 차후년도에 더욱 확장되어 데이터베이스를 위한 작업에 사용될 예정임

acc	ncbi_name	ctg_list	genome_size	gc_content	n_contigs	n_cds	n_features	n_rna	n_rRNA	NCBI
PRJNA180053	Bifidobacterium bifidum PRJ_2010	NC_014638.1	2214656	62.666436683...	1	1706	3600	52	9	-1
PRJNA179944	Bacillus amyloqueliciens subsp. amyloqueliciens DC-12	NZ_AMQ10100...	4011743	46.077827019...	45	4069	8352	66	3	-1
PRJNA162189	Bacillus sp. J5	NC_017743.1	4125456	43.926763527...	1	4239	8720	86	30	-1
PRJNA51209	Bacillus subtilis subsp. spizizenii str. W23	NC_014479.1	4027676	43.806659417...	1	4062	8412	77	24	-1
PRJNA58411	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305	NC_007250.1	2577999	33.185939402...	3	2514	5183	60	20	-1
PRJNA180926	Bifidobacterium bifidum UMG 13195	NZ_AMPL01000...	2283145	62.566810255...	164	1910	4132	55	1	-1
PRJNA55257	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SHY	NZ_ABQ90100...	4214371	43.513121159...	9	4283	8863	85	31	-1
PRJNA183001	Bacillus subtilis subsp. natto BEST195	NC_017196.1	4097429	43.579441235...	2	4381	9030	93	30	-1
PRJNA165195	Bacillus amyloqueliciens Y2	NC_017912.1	4238624	45.854314985...	1	4238	8707	85	29	-1
PRJNA179967	Bacillus subtilis subsp. spizizenii TU-8-10	NC_016047.1	4207222	43.423477919...	1	4297	8895	92	30	-1
PRJNA179968	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-9	NZ_ASP160100...	4138918	43.464957723...	17	4244	8616	46	7	-1
PRJNA118879	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. ROHN-1	NC_017195.1	4019486	43.866555553...	1	4128	8555	86	30	-1
PRJNA173926	Bacillus subtilis Q9528	NC_018520.1	4146829	43.607311486...	1	4034	8402	86	30	-1
PRJNA49045	Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC 6633	NZ_ADO50100...	3978576	43.824549285...	37	4038	8290	71	3	-1
PRJNA184825	Bacillus subtilis BEST7613	NC_019948.1	7585470	45.727186318...	1	7270	14868	130	30	-1
PRJNA55255	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. JH642	NZ_ABQ40100...	4187320	43.494773494...	9	4263	8821	86	32	-1
PRJNA181710	Bacillus licheniformis WX-02	NZ_JH636050...	4270204	46.059768099...	2	4313	8816	72	21	-1
PRJNA180927	Bifidobacterium bifidum BFLA 20015	NZ_AMPM0100...	2138334	62.474777912...	571	2165	5026	52	2	-1
PRJNA512055	Bacillus sp. BT18_CT2	NZ_ABO101000...	4292794	43.514985333...	84	4422	9214	87	36	-1
PRJNA62055	Bacillus sp. BT18_CT2	NZ_ACVC0100...	4341820	45.73241951...	49	4429	9105	85	11	-1
PRJNA167988	Bifidobacterium bifidum BQ44	NC_017999.1	2223664	62.648223832...	1	1834	3800	52	9	-1
PRJNA58097	Bacillus licheniformis DPH 13 = ATCC 14580	NC_006270.3	4222597	46.194391745...	1	4173	8620	72	21	-1
PRJNA84337	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides 318	NC_016805.1	2016420	37.654989570...	6	1837	4061	71	12	-1
PRJNA55283	Bifidobacterium bifidum HCPMB 41171	NZ_D5990229...	2202895	62.816410604...	9	1852	3841	52	-1	-1
PRJNA59545	Bifidobacterium bifidum 517	NC_014616.1	2186882	62.758438725...	1	1783	3700	53	9	-1
PRJNA181191	Bacillus sp. S96	NZ_A37101000...	3899657	46.644179218...	1	3898	8039	86	30	-1
PRJNA179719	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293	NC_008331.1	2073783	37.606066676...	2	2055	4243	71	12	-1
PRJNA57675	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 158	NC_000964.3	4215606	43.514408130...	1	4176	8946	86	30	-1
PRJNA55887	Leuconostoc mesenteroides subsp. oemoris ATCC 19254	NZ_ADOV01000...	1638511	37.903132783...	126	1847	3942	48	3	-1
PRJNA176282	Bacillus subtilis subsp. inaquosorum KCTC 13429	NZ_AMNO0100...	4342440	43.688648636...	24	4431	9043	70	4	-1
PRJNA62463	Bacillus subtilis B5r5	NC_014976.1	4093599	43.847308932...	1	4145	8336	83	30	-1
PRJNA180053	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus KACC 16562	NZ_AH8301000...	2619936	33.060845761...	58	2407	5175	65	5	-1

<그림 3-14> 이미 알려진 전유전체 정보들을 확보하여 분석한 뒤 분석 결과들을 SQL 데이터베이스형식으로 만들어 놓은 파일

#### 4. 발효미생물유래 확보된 기능성 유전자의 특성 및 대사분석을 위한 전사체/대사체 분석 결과의 DB 구축

- 전유전체 데이터베이스 구축을 위해 식품별 동정된 균주들의 정보를 1 협동기관의 결과로부터 획득함 <표 3-4>

<표 3-4> 식품별 동정된 발효 미생물 종류

Food	Identified species
Beakkimchi	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Beakkimchi	<i>Lactobacillus sakei</i>
Beakkimchi	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Beakkimchi	<i>Lactobacillus brevis</i>
Beakkimchi	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Beakkimchi	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Beakkimchi	<i>Bacillus altitudinis</i>
Beakkimchi	<i>Bacillus subtilis</i>
Beakkimchi	<i>Bacillus megaterium</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bacillus subtilis</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bacillus altitudinis</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bacillus pumilus</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bacillus safensis</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bacillus licheniformis</i>
Pogi-Kimchi	<i>Brevibacterium halotolerans</i>
Pogi-Kimchi	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Pogi-Kimchi	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Pogi-Kimchi	<i>Staphylococcus hominis</i>
Pogi-Kimchi	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Pogi-Kimchi	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Pogi-Kimchi	<i>Lactobacillus sakei</i>
Pogi-Kimchi	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>
Pogi-Kimchi	<i>Propionibacterium acnes</i>
Pogi-Kimchi	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus aerius</i>
Kkadugi	<i>Bacillus altitudinis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus cereus</i>
Kkadugi	<i>Bacillus niabensis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus subtilis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus safensis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus licheniformis</i>
Kkadugi	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
Kkadugi	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>
Kkadugi	<i>Leuconostoc lactis</i>
Kkadugi	<i>Leuconostoc garlicum</i>
Kkadugi	<i>Leuconostoc citreum</i>
Kkadugi	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Kkadugi	<i>Lactobacillus sakei</i>
Kkadugi	<i>Weissella cibaria</i>
Kkadugi	<i>Weissella confusa</i>
Kkadugi	<i>Weissella paramesenteroides</i>
Meju	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Meju	<i>Bacillus cereus</i>
Meju	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Meju	<i>Bacillus pumilus</i>
Meju	<i>Enterococcus faecium</i>
Meju	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Pickled anchovy	<i>Brevibacterium permense</i>
Pickled anchovy	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
Pickled anchovy	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Pickled anchovy	<i>Staphylococcus warneri</i>
Pickled anchovy	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
Pickled anchovy	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Pickled anchovy	<i>Rummelibacillus stabekisii</i>
Pickled shrimp	<i>Bacillus altitudinis</i>
Pickled shrimp	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Pickled shrimp	<i>Bacillus firmus</i>
Pickled shrimp	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>
Pickled shrimp	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Pickled shrimp	<i>Staphylococcus equorum</i>
Pickled shrimp	<i>Staphylococcus warneri</i>
Pickled shrimp	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Pickled shrimp	<i>Lactococcus lactis</i>
Pickled shrimp	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>
Pickled clam	<i>Enterococcus faecium</i>
Pickled clam	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Pickled clam	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>



Pickled clam	<i>Weissella pthailandensis</i>
Pickled clam	<i>Weissella paramesenteriodes</i>

- 동정 균주들 중 현재까지 NCBI (National Center of Biotechnology Information)의 database에 공개가 되어 있는 균주들을 다운 받아 확보하고 DB화 하였다.
- DB 구축을 위해 다운 받은 전유전체의 수를 <표 3-5>와 같이 요약함

<표 3-5> NCBI로부터 다운 받아 DB 구축에 사용할 수 있는 전유전체 수

Species	Available numbers of genome in NCBI
<i>Bacillus aerius</i>	0
<i>Bacillus altitudinis</i>	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	20
<i>Bacillus cereus</i>	147
<i>Bacillus firmus</i>	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	8
<i>Bacillus megaterium</i>	5
<i>Bacillus niabensis</i>	0
<i>Bacillus pumilus</i>	6
<i>Bacillus safensis</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	32
<i>Bacillus thuringiensis</i>	33
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	1
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	7
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	0
<i>Brevibacterium permense</i>	0
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	251
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	5
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	17
<i>Lactobacillus sakei</i>	2
<i>Lactococcus lactis</i>	24
<i>Leuconostoc citreum</i>	4
<i>Leuconostoc garlicum</i>	0
<i>Leuconostoc lactis</i>	24
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	86
<i>Rummelibacillus stabekisii</i>	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	83
<i>Staphylococcus equorum</i>	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2
<i>Staphylococcus hominis</i>	4
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2
<i>Staphylococcus wagneri</i>	0
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	8
<i>Weissella cibaria</i>	1

<i>Weissella confusa</i>	1
<i>Weissella paramesenteroides</i>	1
<i>Weissella thailandensis</i>	0

- 확보한 전유전체 데이터들의 DB 구축함 (<http://tff.chunlab.com>)
- NCBI로부터 확보한 균주들의 전유전체를 향상된 생물정보학적 기법을 이용하여 재분석하여 <그림 3-15>과 같이 CLG file 형태로 데이터 추가 분석 가능하도록 구축하였다.

Strain list isolated from Traditional Fermented Foods

Project ID	Status	Tasks	SZ Genome Name	Strain	NCBI original name	Genome Size	GC+C	Contigs	CDS	Taxonomy
PRJNA196467	Assembly	CLG	Bacillus amyloquelificans subsp. plantarum DSM 5211	5211	Bacillus subtilis 5211	4,124,697	46	79	0	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus amyloquelificans; Bacillus amyloquelificans subsp. plantarum
PRJNA48371	Complete	CLG	Bacillus megaterium DSM 339	DSM 339	Bacillus megaterium DSM 339	5,997,447	38.1	0	5,200	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus megaterium
PRJNA200003	Assembly	CLG	Bacillus megaterium	NC2	Bacillus megaterium NC2	5,323,779	37.8	149	5,541	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus megaterium
PRJNA15582	Complete	CLG	Bacillus megaterium	QM 81551	Bacillus megaterium QM 81551	5,523,192	37.9	8	5,612	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus megaterium
PRJNA159841	Complete	CLG	Bacillus megaterium	W94-002	Bacillus megaterium W94-002	5,075,293	38.2	4	5,272	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus megaterium
PRJNA200475	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. neopastorianus	g9729	Bacillus subtilis g9729	4,265,967	44	88	4,122	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. neopastorianus
PRJNA181347	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. neopastorianus	KCTC 12429T	Bacillus subtilis subsp. neopastorianus KCTC 12429	4,242,448	43.7	24	4,421	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. neopastorianus
PRJNA49045	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	ATCC 46123	Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC 46123	5,878,576	43.8	37	4,838	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. spizizenii
PRJNA200793	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	DV1 8-1	Bacillus subtilis subsp. spizizenii DV1 8-1	5,974,551	43.6	20	3,915	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. spizizenii
PRJNA72987	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	TU 8-10T	Bacillus subtilis subsp. spizizenii TU 8-10	4,207,222	43.8	0	4,207	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. spizizenii
PRJNA181879	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	W23	Bacillus subtilis subsp. spizizenii str. W23	4,027,076	43.9	0	4,062	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. spizizenii
PRJNA452363	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	4,214,147	43.1	5	4,279	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA43875	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	4,215,406	43.1	0	4,176	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA193706	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	6051-HGV	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 6051-HGV	4,215,610	43.1	0	4,188	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA200792	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	ALC296	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. ALC296	4,353,151	43.5	123	4,463	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA195463	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	848-1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 848-1	4,021,994	43.9	0	4,021	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA181001	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	882T185	Bacillus subtilis subsp. natto 882T185	4,092,428	43.6	0	4,261	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA42463	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	850-5	Bacillus subtilis 850-5	4,092,599	43.8	0	4,145	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA184010	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	BSP1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BSP1	4,043,754	43.9	0	3,847	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA35235	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	3M42	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 3M42	4,187,415	43.1	8	4,263	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA190660	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	HE732	Bacillus subtilis HE732	4,170,857	43.4	33	4,427	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA181001	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	NC2B 3610T	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. NC2B 3610	4,262,894	43.4	84	0	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA201108	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	PS116	Bacillus subtilis PS116	4,207,186	43.8	146	4,402	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA172926	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	Q6928	Bacillus subtilis Q6928	4,146,839	43.6	0	4,024	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA158879	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	RO-NV-1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. RO-NV-1	4,011,949	43.9	0	4,101	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA199882	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	S1-4	Bacillus subtilis S1-4	4,454,030	43.1	104	4,681	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis
PRJNA129998	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	SC-8	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8	4,138,818	43.1	17	4,294	Bacteria; Firmicutes; Bacili; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis; Bacillus subtilis subsp. subtilis

CLG files can be opened by CLGenomics program which can be downloaded through this.

CLG file을 다운 받을 수 있게 구축

<그림 3-15> 전유전체 데이터들의 DB화

- CLG file을 사용자가 다운 받을 수 있도록 구축하였음
- 또한 식품별로 동정된 균주들을 각각 열람할 수 있도록 <그림 3-16>와 같이 구축하였으며 식품별 전유전체 정보와 결과를 다운 받을 수 있도록 구축하였음

식품별로 따로 분석할 수 있도록 구성

TFF.chunlab.com Strain list isolated from Traditional Fermented Foods

Strain list isolated from Traditional Fermented Foods

Beakkimchi Pog-kanchi Kkakdugi Jeju Pickled anchovy Pickled shrimp Pickled dani

Beakkimchi

Project ID	Status	Tasks	EZGenome Name	Strain	NCBI original name
PRJNA196467	Assembly	CLG	Bacillus amyloqueliciens subsp. plantaris	SPZ1	Bacillus subtilis SPZ1
PRJNA48371	Complete	CLG	Bacillus megaterium	DSM 319	Bacillus megaterium DSM 319
PRJNA200005	Assembly	CLG	Bacillus megaterium	NCT-2	Bacillus megaterium NCT-2
PRJNA15862	Complete	CLG	Bacillus megaterium	QM B1551	Bacillus megaterium QM B1551
PRJNA159841	Complete	CLG	Bacillus megaterium	WSH-002	Bacillus megaterium WSH-002
PRJNA200473	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. inaquosorum	gIP20b	Bacillus subtilis gIP20b
PRJNA187347	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. inaquosorum	KCTC 13429(T)	Bacillus subtilis subsp. inaquosorum KCTC 13429
PRJNA49045	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	ATCC 6633	Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC 6633
PRJNA200783	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	DV1-B-1	Bacillus subtilis subsp. spizizenii DV1-B-1
PRJNA73967	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	TU-B-10(T)	Bacillus subtilis subsp. spizizenii TU-B-10
PRJNA51879	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	W23	Bacillus subtilis subsp. spizizenii str. W23
PRJNA55263	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168
PRJNA57675	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168
PRJNA193706	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	6051+HGW	Bacillus subtilis subsp. subtilis 6051+HGW
PRJNA200782	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	AUS198	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. AUS198
PRJNA195461	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	BAB-1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BAB-1
PRJNA183001	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	BEST195	Bacillus subtilis subsp. netto BEST195
PRJNA62463	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	BSn5	Bacillus subtilis BSn5
PRJNA184010	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	BSP1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BSP1
PRJNA55255	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	JH642	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. JH642
PRJNA190660	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	MB73/2	Bacillus subtilis MB73/2
PRJNA55265	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	NCIB 3610(T)	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. NCIB 3610
PRJNA201316	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	PS216	Bacillus subtilis PS216
PRJNA173926	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	QB928	Bacillus subtilis QB928
PRJNA158879	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	RO-NN-1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. RO-NN-1
PRJNA199882	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	S1-4	Bacillus subtilis S1-4
PRJNA179898	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	SC-8	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8

<그림 3-16> 식품별로 찾아볼 수 있는 메뉴의 구성

- 구축된 DB는 클릭시 각 식품별 전유전체 DB가 확인 가능함
- 각 유전체의 CLG file은 <그림 3-17>과 같이 CLgenomics 프로그램을 이용하여 추가 분석이 가능하도록 구축하였음

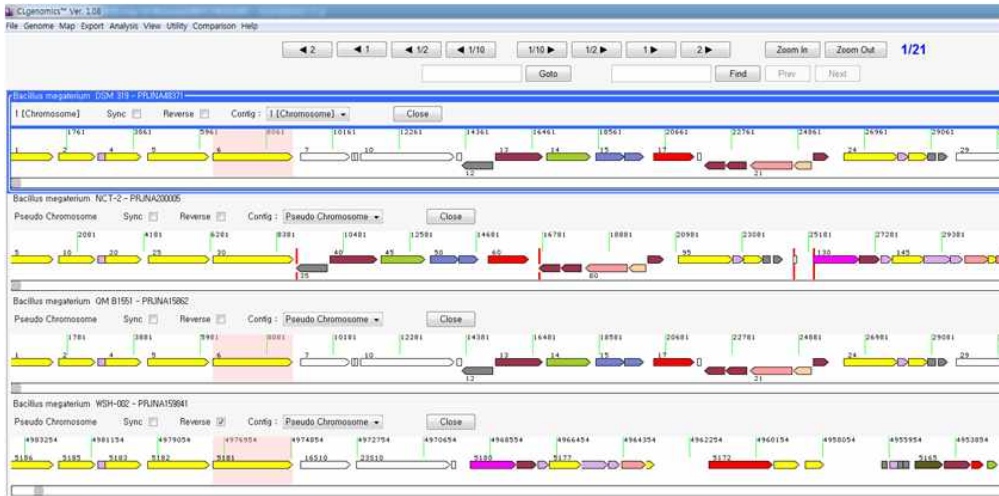
PRJNA190660	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	DSM 1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. DSM 1
PRJNA55255	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	JH642	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. JH642
PRJNA190660	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	MB73/2	Bacillus subtilis MB73/2
PRJNA55265	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	NCIB 3610(T)	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. NCIB 3610
PRJNA201316	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	PS216	Bacillus subtilis PS216
PRJNA173926	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	QB928	Bacillus subtilis QB928
PRJNA158879	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	RO-NN-1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. RO-NN-1
PRJNA199882	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	S1-4	Bacillus subtilis S1-4
PRJNA179898	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	SC-8	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8

CLG files can be opened by CLgenomics™ program which can be downloaded through this.

CLG file을 열 수 있는 CLgenomics 프로그램 link

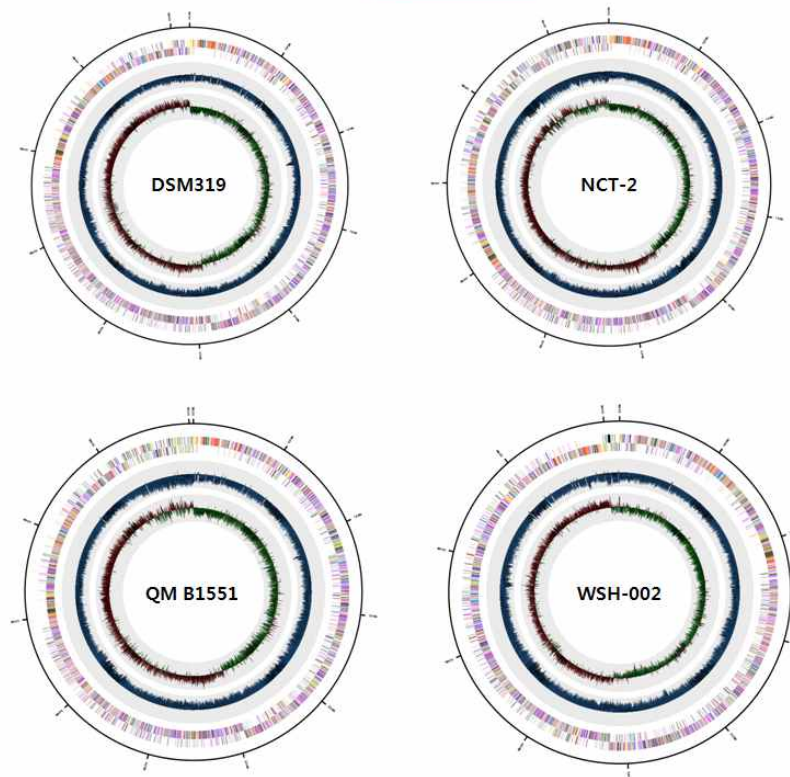
<그림 3-17> CLgenomics 소프트웨어를 다운 받을 수 있도록 구성된 모습

- CLgenomics 프로그램을 이용하여 gene contents 비교 <그림 3-18>, genome map비교 <그림 3-19>, Average nucleotide identity (ANI) 비교 및 <그림 3-20>과 같이 Mummer 분석이 가능하도록 구성하였다.



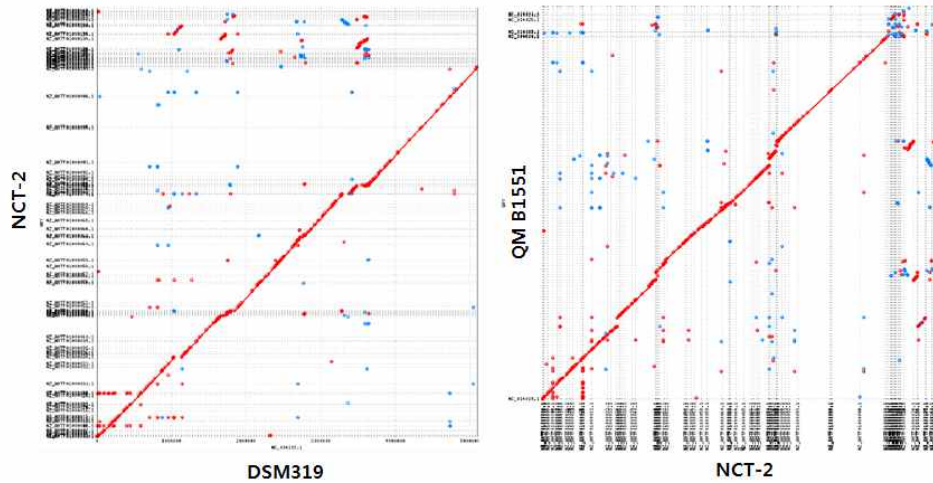
<그림 3-18> CLgenomics 프로그램을 이용하여 전유전체 분석 모습

**Bacillus megaterium**



<그림 3-19> CLgenomics 프로그램을 이용하여 genome map 비교 모습

## Bacillus megaterium



<그림 3-20> CLgenomics 프로그램을 이용하여 Mummer 분석하는 모습

### 5. DB화 된 분석결과와 기존의 전사체/대사체 비교분석 및 그 결과의 DB화

- 전사체/대사체 데이터베이스 구축을 위해 1협동기관으로부터 발효미생물 유래 데이터를 확보하였음
- 전사체/대사체의 데이터베이스화를 위해 <그림 3-21>과 같이 SQL table을 구축하였음

acc	ncbi_name	tbl_seq	genome_size	gc_content	n_contigs	n_cds	n_features	n_rna	n_rna	nt5
PRJNA180053	Bifidobacterium bifidum PRJ12010	NC_014638.1	2214606	62.666496683...	1	1706	3605	52	9	-1
PRJNA179944	Bifidobacterium bifidum subsp. amyloqueliciens DC-12	NZ_AMQ01000...	4011743	46.077827019...	45	4069	8352	66	5	-1
PRJNA162189	Bacillus sp. JS	NC_017743.1	4027406	43.926783527...	1	4239	8720	86	30	-1
PRJNA51879	Bacillus subtilis subsp. spizizeni str. W23	NC_014479.1	4027676	43.800667417...	1	4062	8412	77	24	-1
PRJNA58411	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305	NC_007350.1...	2577899	33.185939402...	3	2514	5193	60	20	-1
PRJNA180936	Bifidobacterium bifidum IMG 13195	NZ_AMPL01000...	2383145	62.966810253...	364	1910	4132	55	1	-1
PRJNA53257	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SMR	NZ_ABP01000...	4214371	43.513121199...	9	4283	8663	85	31	-1
PRJNA183001	Bacillus subtilis subsp. natto BEST195	NC_017196.1...	4097429	43.579441235...	2	4381	9030	93	30	-1
PRJNA165295	Bacillus amyloqueliciens Y2	NC_017912.1	4238624	45.854314985...	1	4238	8707	85	29	-1
PRJNA173967	Bacillus subtilis subsp. spizizeni TU-8-10	NC_016047.1	4207222	43.823477819...	1	4297	8895	92	30	-1
PRJNA179898	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8	NC_0138818	4138818	43.464507723...	17	4244	8616	46	7	-1
PRJNA188879	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. RO-AN-1	NC_017195.1	4011949	43.866570553...	1	4128	8505	86	30	-1
PRJNA173926	Bacillus subtilis Q9928	NC_018520.1	4146829	43.607211496...	1	4034	8402	86	30	-1
PRJNA190495	Bacillus subtilis subsp. spizizeni ATCC 6633	NZ_ACP01000...	3978576	43.842492859...	37	4038	8290	71	3	-1
PRJNA184825	Bacillus subtilis BEC77613	NC_019948.1	7585470	45.727386318...	1	7270	14068	120	30	-1
PRJNA55255	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 3464Z	NZ_ABDQ01000...	4187329	43.494773494...	9	4063	8821	86	32	-1
PRJNA181710	Bacillus licheniformis WJ-02	NZ_34836050...	4270204	46.029768099...	2	4315	8816	72	21	-1
PRJNA180937	Bifidobacterium bifidum JPLA 20015	NZ_AMP040100...	2138134	62.674773912...	571	2165	5026	52	2	-1
PRJNA51265	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. NCIB 3610	NZ_ABRQ01000...	4282784	43.354985333...	84	4422	9214	87	30	-1
PRJNA62055	Bacillus sp. BT_IB_C72	NZ_ACV001000...	4341829	45.735241991...	49	4429	9105	85	11	-1
PRJNA167968	Bifidobacterium bifidum B504	NC_017999.1	2225664	63.514402383...	1	1824	3650	52	9	-1
PRJNA58207	Bacillus licheniformis DSM 13 = ATCC 14580	NC_006276.3	4222597	46.194391245...	1	4173	8620	72	21	-1
PRJNA484337	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides 318	NC_016808.1...	2016426	37.654909570...	6	1837	4061	71	12	-1
PRJNA55283	Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171	NZ_D6990229...	2202695	62.816410664...	9	1852	3841	52	-1	-1
PRJNA59545	Bifidobacterium bifidum 517	NC_014616.1	2186883	62.758438726...	1	1783	3700	53	9	-1
PRJNA161991	Bacillus sp. 566	NZ_AZT01000...	3899657	46.644179218...	1	3898	8039	86	30	-1
PRJNA57919	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8291	NC_008331.1...	2079763	37.668066676...	2	2005	4243	71	12	-1
PRJNA17675	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. JB5	NC_000964.3	4225664	43.514402383...	1	4126	8846	86	30	-1
PRJNA55887	Leuconostoc mesenteroides subsp. clemensi ATCC 39254	NZ_ADX01000...	1638511	37.903132293...	126	1847	3942	48	3	-1
PRJNA176382	Bacillus subtilis subsp. inaquosorum K1C3 13429	NZ_AMO040100...	4342448	43.686648636...	24	4431	9043	70	4	-1
PRJNA62463	Bacillus subtilis B5n5	NC_014976.1	4093399	43.847308922...	1	4145	8536	83	30	-1
PRJNA180053	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus KACC 16562	NZ_AK9301000...	2619936	33.060845761...	58	2407	5175	65	5	-1

<그림 3-21> 전사체/대사체 데이터베이스화를 위한 SQL table 구축 모습

### 6. 전통발효식품내 식품별 주요 발효 미생물 종류 및 구성을 파악하기 위한 기존 메타지노믹스 결과를 바탕으로 비교 분석

- National Center for Biotechnology Information (NCBI) 에 공개되어 있는 전통 발효식품 관련 총 5개의 연구 문헌에 사용된 143개의 메타지노믹의 시퀀싱 데이터 확보 <표 3-6>

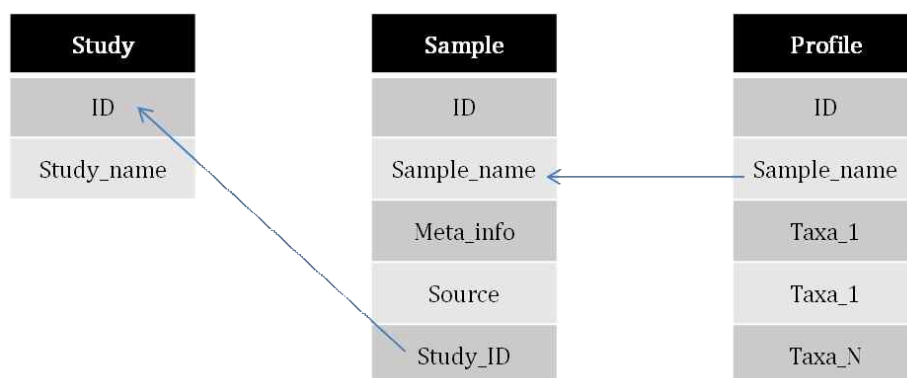
<표 3-6> 공개된 전통 발효식품 연구에서 획득한 데이터 종류

전통 발효 식품 종류	샘플 개수
배추김치	82
열무김치	40
동치미	2
김장김치	1
메주	18

- 확보된 전통 발효식품의 메타지놈 시퀀싱 데이터를 분석하여 메타지놈에 존재하는 미생물 군집 정보 획득
- 데이터베이스에 통합 및 시각화 위해 미생물 군집 정보를 규격화

### 7. 각 식품별 메타지놈 데이터를 비교하여 주요 미생물 종류와 구성에 대한 데이터 추적 및 메타지놈 DB 구축

- 메타지놈 데이터베이스를 구축하기 위한 관계형 데이터베이스 테이블 구조를 <그림 3-22> 과 같이 구성 함



<그림 3-22> 데이터베이스 테이블 구조 모식도

- 데이터베이스 관리 프로그램인 MySQL 서버를 설치 후 데이터베이스 생성
- 메타지놈 데이터베이스를 구축하기 위해 제 1 협동 기관으로부터 멸치젓 52 샘플의 메타지놈의 군집 분석 결과를 획득
- NCBI 공개된 전통식품에 존재하는 메타지놈의 구성 정보를 제 1 협동기관의 데이터와 함께 <그림 3-23>와 같이 관계형 데이터베이스에 통합

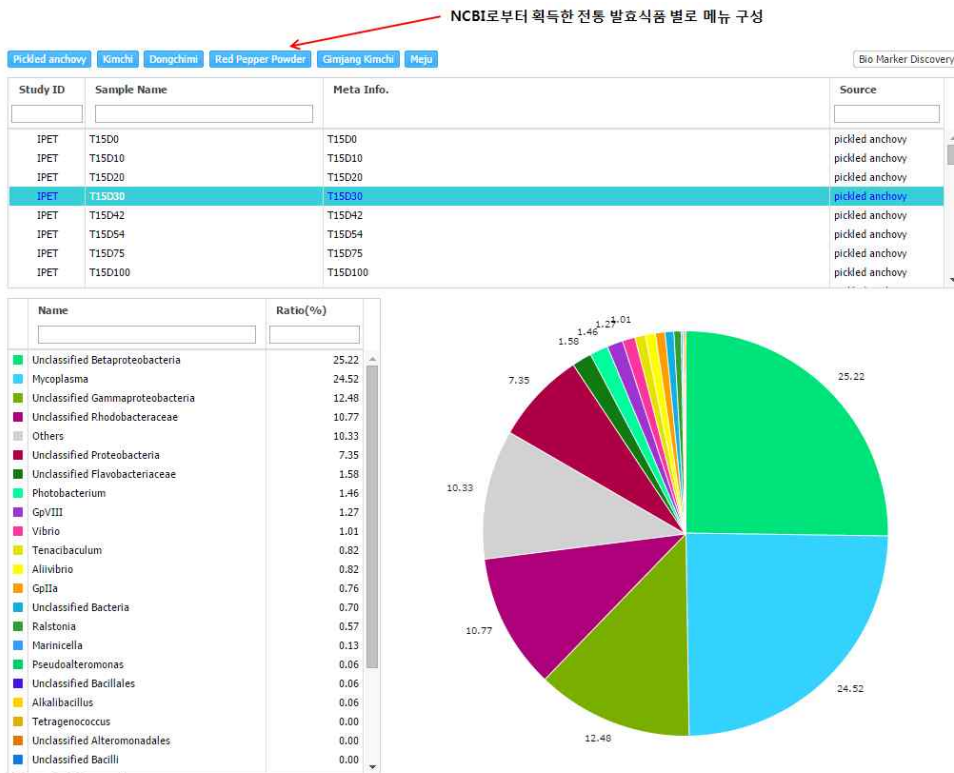
데이터베이스: IPET    테이블: tbl\_metagenome\_sample

IPET.tbl\_metagenome\_sample: 194 행 (출)

id	sample_name	meta_info	source	study_id
147	K9-6	K9-6	Kimchi	2
148	K9-7	K9-7	Kimchi	2
149	K9-8	K9-8	Kimchi	2
150	K9-9	K9-9	Kimchi	2
151	K1-1.1	K1-1	Kimchi	2
152	K2-1.1	K2-1	Kimchi	2
153	K2-2.1	K2-2	Kimchi	2
154	K2-3.1	K2-3	Kimchi	2
155	K2-4.1	K2-4	Kimchi	2
156	K2-5.1	K2-5	Kimchi	2
157	K2-6.1	K2-6	Kimchi	2
158	K2-7.1	K2-7	Kimchi	2
159	K2-9.1	K2-9	Kimchi	2
160	K5-1.1	K5-1	Kimchi	2
161	K5-10.1	K5-10	Kimchi	2
162	K5-2.1	K5-2	Kimchi	2
163	K5-3.1	K5-3	Kimchi	2
164	K5-5.1	K5-5	Kimchi	2
165	K5-9.1	K5-9	Kimchi	2
166	K6-1.1	K6-1	Kimchi	2
167	K6-2.1	K6-2	Kimchi	2
168	K6-3.1	K6-3	Kimchi	2
169	K6-5.1	K6-5	Kimchi	2
170	K7-1.1	K7-1	Kimchi	2
171	K8-4.1	K8-4	Kimchi	2
172	K9-10.1	K9-10	Kimchi	2
173	red_pepper_powder	red_peppe...	red_pepper_powder	3
174	dongchimi_04	dongchimi_04	dongchimi	4
175	dongchimi_90	dongchimi_90	dongchimi	4
176	gmsjang_kimchi	gmsjang_ki...	Gmsjang_Kimchi	5
177	ex_1	ex_1	Meju	6
178	ex_14	ex_14	Meju	6
179	ex_21	ex_21	Meju	6
180	ex_28	ex_28	Meju	6
181	ex_35	ex_35	Meju	6
182	ex_42	ex_42	Meju	6
183	ex_49	ex_49	Meju	6
184	ex_53	ex_53	Meju	6
185	ex_7	ex_7	Meju	6
186	in_1	in_1	Meju	6
187	in_14	in_14	Meju	6
188	in_21	in_21	Meju	6
189	in_28	in_28	Meju	6
190	in_35	in_35	Meju	6
191	in_42	in_42	Meju	6
192	in_49	in_49	Meju	6

<그림 3-23> 제 1 협동기관의 미생물 균집 데이터와 공개된 발효식품의 균집 데이터를 관계형 데이터베이스 형태로 통합

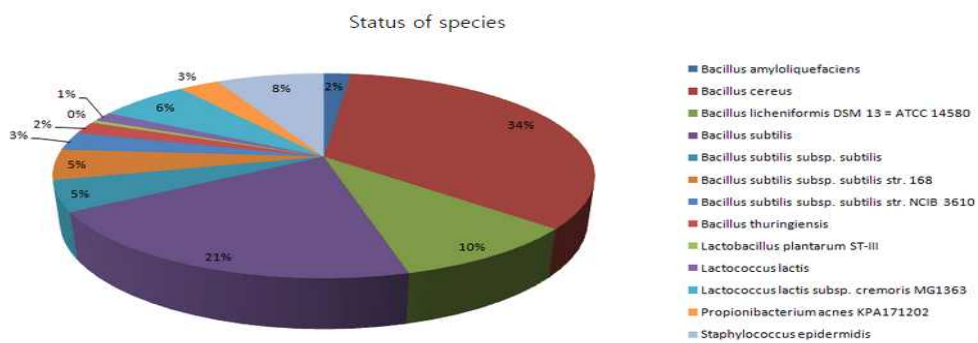
- 획득한 전통발효식품 메타지놈 분석 결과로부터 주요 미생물의 종류와 구성에 대한 데이터 베이스 구축 및 웹페이지를 통한 시각화 구현 <그림 3-24>



<그림 3-24> 전통 발효식품에 존재하는 미생물 군집의 웹(Web)을 통한 시각화

### 8. 전통 발효식품 유래 기능성 식품 소재 생산 균주의 대사체 및 유전체 정보의 통합 및 DB 구축

- NCBI SRA에 공개된 발효 미생물 전사체의 NGS 시퀀싱 데이터 371건 획득 <그림 3-25>



<그림 3-25> NCBI에서 획득한 공개된 발효 미생물의 전사체 연구 데이터베이스 현황

- 기능성 발효 미생물의 유전체, 전사체 및 발효 식품의 메타지놈 데이터를 얻을 수 있는 통합 데이터베이스를 구축



- 통합된 데이터베이스를 기반으로 jQuery +JAVA/JSP+dHTMLx+MySQL 기반의 연구자용 홈페이지를 <그림 3-26>와 같이 구축 <http://www.korfermfood.com>



<그림 3-26> 전통 발효 식품 연구자용 홈페이지 <http://www.korfermfood.com> 구축

- 로그인 페이지 등 기본적인 웹페이지 기능을 구성하였으며, 전통 발효 식품별, 발효 미생물별, 데이터베이스 및 연구 성과 및 관련 논문 등을 찾을 수 있는 페이지를 구성 <그림 3-26>
- 전통 발효식품에 관련된 유전체, 전사체 및 메타지놈의 연구 결과를 시각화 하고 다운로드 받을 수 있는 메뉴 구성 <그림 3-27>

Strain list isolated from Traditional Fermented Foods

Beakimchi Poggi-kimchi Kkakdugi Meju Pickled anchovy Pickled shrimp Pickled clam

Project ID	Status	Tasks	EZGenome Name	Strain	NCBI original name	Genome Size	%G
PRJNA199813	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	12142587	Staphylococcus epidermidis 12142587	2,556,074	
PRJNA180001	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	14.1.R1.5E	Staphylococcus epidermidis 14.1.R1.5E	2,555,725	
PRJNA209042	Complete	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantaru	16	Lactobacillus plantarum 16	3,361,015	
PRJNA55263	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	4,214,547	
PRJNA57675	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	4,215,606	
PRJNA220353	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantaru	2025	Lactobacillus plantarum 2025	3,068,696	
PRJNA220352	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantaru	2165	Lactobacillus plantarum 2165	3,179,972	
PRJNA58281	Complete	CLG	Lactobacillus sakei subsp. sakei	23K	Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K	1,894,661	
PRJNA203329	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	36-1	Staphylococcus epidermidis 36-1	2,714,638	
PRJNA203331	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	41tr	Staphylococcus epidermidis 41tr	2,685,457	
PRJNA231819	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantaru	4_3	Lactobacillus plantarum 4_3	3,320,363	
PRJNA203330	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	528m	Staphylococcus epidermidis 528m	2,687,516	
PRJNA193706	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	6051-HGW	Bacillus subtilis subsp. subtilis 6051-HGW	4,215,610	
PRJNA210480	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	APO27	Staphylococcus epidermidis APO27	2,576,963	
PRJNA210481	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	APO35	Staphylococcus epidermidis APO35	2,556,994	
PRJNA57961	Complete	CLG	Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	2,564,615	
PRJNA221267	Assembly	CLG	Lactobacillus brevis	ATCC 14869(T)	Lactobacillus brevis ATCC 14869 = DSM 20054	2,473,047	
PRJNA55521	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantaru	ATCC 14917(T)	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum ATCC 14917	3,212,261	
PRJNA55887	Assembly	CLG	Leuconostoc mesenteroides subsp. crem	ATCC 19254(T)	Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris ATCC 19254	1,735,074	
PRJNA55493	Assembly	CLG	Lactobacillus hilgardii	ATCC 27305	Lactobacillus brevis subsp. gravesensis ATCC 27305	3,144,656	
PRJNA57989	Complete	CLG	Lactobacillus brevis	ATCC 367	Lactobacillus brevis ATCC 367	2,340,228	
PRJNA49045	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	ATCC 6633	Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC 6633	3,978,576	
PRJNA57919	Complete	CLG	Leuconostoc mesenteroides subsp. mes	ATCC 8293(T)	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 829	2,075,763	
PRJNA180900	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	AU12-03	Staphylococcus epidermidis AU12-03	2,406,624	
PRJNA200782	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	AUS198	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. AUS198	4,353,151	
PRJNA221255	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantaru	AY01	Lactobacillus plantarum AY01	3,315,973	
PRJNA58461	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	84B-1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 84B-1	4,071,644	

<그림 3-27> 발효미생물의 유전체, 메타지놈 및 전사체 연구 결과를 다운 받을 수 있도록 구성함

- Biomarker 발굴 프로그램인 LefSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) 를 이용하여 두 종류의 서로 다른 전통 발효 식품의 메타지놈 구성을 비교 할 수 있는 기능을 구현하여 <그림 3-28>과 같은 시각화 결과를 제공



<그림 3-28> 김치와 메주를 비교한 결과를 시각화한 예시

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012- 2013)	(제 1세부) 전통발효식품유래 발효미생물 균주 및 기능성 유전자 자원 확보	○전통발효식품 (매주, 김치, 젓갈류)으로부터 샘플 수집	100	○전통방식으로 제조 및 발효된 전통발효식품 8종(매주, 포기김치, 묵은지, 백김치, 깍두기, 새우젓, 멸치젓 및 조개젓)을 수집
		○수집된 샘플로부터 주 요발효미생물의 분리 및 분자생물학적 동정	100	○전통발효식품 8종으로부터 미생물학적 배양방법을 활용하여 1,589개의 균주 확보 ○수집된 주요발효미생물 중 기능성 균주로 선발된 주요 발효미생물들을 16S rRNA sequencing으로 동정함
		○균주 자원으로부터 재 해석된 유전체정보를 바탕으로 기능성 유전 자의 분자생물학적 탐 색 및 보유균주 선별	100	○분리된 발효미생물들을 대상으로 박테리옌 생산능 및 혈전용해능의 평가 및 보유균주 선발 ○ 선발된 균주를 대상으로 PCR을 통한 혈전용해능 유전자의 확보 및 보유균주 선별
	(제 1협동) 발효미생물유래 기존유전체의 비 교분석을 통한 대 사성 질환예방관 련 기능성 유전자 대량 발굴	○GenBank 등 유전체 데이터베이스로부터 대 사성 질환 예방효과 등 건강기능성이 있는 것 으로 알려진 기존 전통 발효미생물의 전체 염 기서열 확보	100	○전통발효식품유래 유용발효미생물의 종류 선정 및 유전체 정보 수집 ○수집된 전통발효식품유래 발효균주의 유전체정보를 생물정보학적인 분석방법을 토대로 분석
		○전통발효식품으로부터 분리한 발효미생물의 기능성 연구 및 건강기 능성 유전자 후보군의 선별	100	○Aflatoxin 생산 곰팡이( <i>A. flavus</i> )의 생장을 억제하는 미생물 탐색 및 기능성 연구 ○젓갈 분리 균주의 Proteinase, chitinase 및 hemolysis 역가분석
		○발효 미생물 유전체 정 보의 분석을 통해 우수 한 기능성 유전자 발굴	100	○발효식품에서 분리된 발효미생물의 유전체 연구를 통한 기능성 유전자 탐색 ○젓갈류 우점종인 <i>S. sp. MJ3</i> 의 균주특성 및 유전체 분석을 통한 기능성 유전자 탐색
	(제 2협동) 기존 발효미생물 유전체의 재해석 결과에 대한 DB 구축	○최신 데이터베이스 및 향상된 생물정보학 기 술을 활용한 전통 발효 식품유래 기존 발효 미 생물 유전체의 재해석	100	○세부연구로부터 선발된 전통발효식품유래 발효균주의 동정정보 분석 ○세부연구에서 동정된 균주와 동일한 species내에서 GenBank로부터 활용한 가능한 발효미생물 유전체 정보 획득 및

				분석
		○재해석된 기존 발효 미생물 유전체정보를 바탕으로 한 발효 미생물 간의 비교유전체 분석	100	○GenBank로부터 얻은 5가지 종류의 발효균주 유전체 정보를 바탕으로 비교분석 및 phylogenetic analysis 수행 ○비교유전체분석을 통한 발효균주들의 core gene 탐색
		○기존 발효 미생물 유전체 정보 및 비교 분석 결과의 DB 구축	100	○분석결과를 바탕으로 SQL을 이용한 DB구축을 위한 테이블구축
2차 년도 (2013- 2014)	(제 1세부) 대장균 발현 시스템을 활용한 기능성 유전자 유래 대사질환 예방 관련 식품 소재 특성 규명 및 기능성 평가	○확보된 기능성 유전자 보유 발효 미생물로부터 PCR 방법을 활용한 기능성 유전자 증폭	100	○선발 균주의 혈전용해능 유전자 증폭 ○pGEM - T Easy vector로의 클로닝을 통한 혈전용해능 유전자의 염기서열 확인
		○증폭된 기능성 유전자의 대장균 발현시스템으로의 클로닝	100	○혈전용해능 유전자의 pET26b(+) vector 로의 클로닝 ○대량발현 최적 균주인 <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS로의 transformation 수행
		○발현된 기능성 식품소재의 분리정제 및 생산 검증	100	○Ni-NTA column을 이용한 대량발현 혈전용해 효소의 정제 ○Quantitative Real Time PCR을 통한 실제 혈전용해능 유전자의 발현 수준 확인 ○SDS-PAGE/Western blotting을 이용한 대량발현을 통해 생산된 혈전용해 효소 확인
		○분리정제된 기능성 식품소재의 혈전용해능 기능성 평가	100	○분리 정제된 혈전 용해 효소를 Standard fibrin plate method 방법을 이용한 혈전용해능 평가
	(제 1협동) 대사성 질환예방 기능성 유전자관련 전사체/대사체 비교분석	○선별된 기능성 유전자들의 전사체 분석을 통하여 선별된 유전자의 실제 발현여부 및 발현 패턴 검증	100	○ <sup>1</sup> H-NMR을 이용하여 고염 환경에서의 균주 내 기능성 물질인 compatible solute 생합성 유전자의 발현여부 및 발현패턴 검증
		○발현이 검증된 기능성 유전자들의 대사체 분석을 통한 식품소재 생산 검증	100	○젓갈 유래미생물 ( <i>S. sp.MJ3</i> )에서 생산되는 compatible solutes의 산업적 활용가능성 탐색
		○전사체/대사체 비교분석을 통하여 선별된 건강기능성 유전자 후보군의 생물정보학적 단백질 기능성 분석	100	○Pyrosequencing 및 <sup>1</sup> H-NMR 분석을 활용한 대사체 단백질 동정과 기능성 유전자 단백질의 기능성 및 대사과정 규명 ○젓갈발효기간중 미생물 군집변화와 대사체 변화패턴의 통계학적 분석
	(제 2협동)	○ 발효미생물유래 확보	100	○제1세부 연구결과를 바탕으로

	기능성 유전자의 특성 및 대사분석을 위한 전사체/대사체의 DB 구축	된 기능성 유전자의 특성 및 대사분석을 위한 전사체/대사체 분석 결과의 DB 구축		기존 발효미생물의 유전체 정보 DB화 ○제1협동의 연구 결과를 바탕으로 생물정보학적 분석 결과를 DB화
		○발효미생물유래 기존의 전사체/대사체 분석자료를 활용한 비교분석 및 분석결과 DB구축	100	○DB화 된 분석결과와 기존의 전사체/대사체 비교분석 및 그 결과의 DB화
3차년도 (2014-2015)	(제 1세부) 기능성 식품소재 생산균주의 발효 조건 최적화 및 전통발효식품에의 응용	○대량 발현을 통해 생산된 혈전용해효소의 식품소재로 활용을 위한 안정성 평가	100	○온도(4℃~70℃)에 따른 혈전용해효소의 열 안정성 평가 ○pH(2~12)에 의한 혈전용해효소 안정성 평가 ○Metal ion 및 inhibitor에 의한 안정성 평가
		○선별된 기능성 식품소재 생산균주의 발효조건 최적화를 통한 식품소재 생산의 극대화	100	○배양 조건의 최적화 (배지 종류, 배양 온도, 배양 시간) ○된장으로 적용을 위하여 콩가루 및 메주가루 배지 상에서 선별된 기능성 균주의 내염성 평가
		○기능성을 가진 발효미생물들을 활용한 전통 발효식품(된장) 제조 및 평가	100	○Lab-scale 수준에서 제조한 된장과 청국장에서 혈전용해 효과 확인
		○제조된 된장과 기존 된장과의 기능성 및 품질 비교평가	100	○한식장류 전문업체를 통한 찜장의 Scale-up 제조와 평가(standard fibrin plate method, viable cell count, Real-time PCR) ○한식장류 전문업체를 통한 청국장의 Scale-up 제조와 평가 (standard fibrin plate method, Real-time PCR)
	(제 1협동) 전통발효식품유래 발효균총의 규명 및 비교분석	○전통발효식품의 식품별 메타지노믹스 분석을 통한 발효미생물 조성 규명	100	○대용량 유전체 분석 기술(pyrosequencing)을 활용한 발효시기 별 멸치젓과 된장의 발효미생물의 군집 조성 확인 및 유용 기능성 미생물 선별
		○전통발효식품유래 기능성 균주 후보균의 대사체 분석, 발효균주간의 상호작용 및 기능성 탐색을 통한 주요 기능성 발효미생물 정보 확보	100	○된장으로부터 분리된 <i>Bacillus methylotrophicus</i> YJ11-1-4의 유전체 분석을 통한 된장 내 고염환경 적응 및 인체대사성 질환예방 기능성 대사체 생성기작 관련 유전자 정보 확보
		○전통발효식품유래 기능성 식품소재생산균주를 이용한 발효식품의 제	100	○멸치젓 유래 기능성 식품소재생산 균주인

		조 및 유전체, 대사체 분석을 통한 식품소재 생산 검증		<i>Salimicrobium jeotgali</i> MJ3의 세포 내 여러 유용 대사체의 생성과 이를 암호화하는 기능성 유전자의 발현에 대한 상관성 분석을 통한 식품소재 생산성 검증
(제 2협동)		○전통 발효식품 내 존재하는 메타지놈 및 대사체 분석 결과를 비교 분석하기 위한 데이터베이스 구축	100	○NCBI에 공개된 전통식품 관련 문헌을 참고하여 김치 및 메주 등의 시퀀싱 데이터 확보 및 처리 ○제 1협동기관으로 부터 획득한 연구 결과 및 기존에 발표된 발효 식품에 존재하는 미생물 군집 구성 정보 DB화 ○데이터베이스를 운용하기 위한 관계형 데이터베이스 서버 구축 ○전통 발효식품 메타지놈 데이터베이스 구축을 위한 테이블 구조 설계 ○NCBI에 공개된 발효 미생물의 전사체 연구 획득 및 DB화
		○전통 발효식품 내 존재하는 유전체, 전사체 및 메타지놈 데이터베이스를 기반으로 연구자용 홈페이지 구축	100	○전통 발효식품 홈페이지 도메인 확보 : <a href="http://www.korfoodferm.com">http://www.korfoodferm.com</a> ○전체 홈페이지의 UX 설계 ○jQuery+Java/JSP+MySQL+dHTMLx 기반의 웹 서버 구축 ○로그인 기능 구현 ○전통 발효식품 및 대표적인 발효 미생물 별 별도 페이지 구현 ○전통 발효식품 내 존재하는 메타지놈 및 발효미생물의 유전체, 전사체 별 별도 페이지 구현 ○16S rRNA 기반의 메타지놈의 구성에 대한 시각화 기능 구현 ○발효 식품별 미생물 구성 차이를 비교할 수 있는 기능 구현

## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구개발의 성과

#### 1. 논문 게재 및 발표

##### 가. 논문 게재 (SCI급-11편, 비SCI급-1편)

- (1) 박명렬, 이세희, 안민주, 구혜진, 이주훈. 2013. 포기김치에서 분리한 *Bacillus subtilis* ML01 유래 박테리오신 유사 물질의 특성 분석. 생명자원과학연구원 연구논문집. 32: 66-73.
- (2) EJ Choi, SH Lee, JY Jung, and CO Jeon. 2013. *Brevibacterium jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. Int J Syst Evol Microbiol. 63(Pt9): 3430-3436.
- (3) SH Jeong, JH Lee, JY Jung, SH Lee, MS Park, and CO Jeon. 2013. *Halomonas cibimaris* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. A Van Leeuw J Microb. 103(3): 503-512.
- (4) SH Jeong, SH Lee, JY Jung, EJ Choi, and CO Jeon, 2013. Microbial succession and metabolite changes during long-term storage of kimchi. J Food Sci. 78(5): M763-M76.
- (5) HJ Lee, SH Lee, SS Lee, JS Lee. 2014. *Ramlibacter solisilvae* sp. nov., isolated from forest soil, and emended description of the genus *Ramlibacter*. Int J Syst Evol Microbiol. 64: 1317-132.
- (6) JY Jung, SH Lee, and CO Jeon. 2014. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. Int J Syst Evol Microbiol. 185: 112-120.
- (7) LO Naysim, SH Lee, HM Jin, JY Jung, P Schumann, and CO Jeon. 2015. *Garicola koreensis* gen. nov., nov. isolated from saeu-jeot: traditional Korean fermented shrimp. Int J Syst Evol Microbiol. 65: 1015.
- (8) SH Lee, MJ Ahn, JS Hong, and JH Lee. 2015. Diversity and community analysis of fermenting bacteria isolated from eight major Korean fermented foods using arbitrary-primed PCR and 16S rRNA gene sequencing. J Korean Soc Appl Biol Chem. 58(3): 453-461.
- (9) HJ Ku, MS Park, and JH Lee. 2015. Characterization of a minimal pKW2124 replicon from *Weissella cibaria* KLC140 and its application for the construction of the *Weissella* expression vector pKUCm1. Fronti Microbiol. 6(35): 1-10.
- (10) SH Lee, JY Jung, and CO Jeon. 2015. Bacterial community dynamics and metabolite changes in myeolchi-aekjeot, a Korean traditional fermented fish sauce, during



fermentation. Int J Food Microbiol. **203**: 15-22.

- (11) SH Lee, HJ Ku, MJ Ahn, JS Hong, SH Lee, H SHin, KC Lee, JS Lee, S Ryu, CO Jeon, and JH Lee. 2015. Isolation of *Weissella jogaejeotgali* sp. nov. from Jogaejeotgal, a Traditional Korean Fermented Seafood. Int J Food Microbiol. (Epub ahead of print)
- (12) MJ Ahn, HJ Ku, SH Lee, and JH Lee. 2015. Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme BsfA from *Bacillus subtilis* ZA400 in Kimchi Reveals Its Pertinence to the Thrombosis Treatment. J Microbiol Biotechnol. (Epub ahead of print)

#### 나. 학술발표 (국외-2건, 국내-7건)

- (1) JH Lee, MJ Ahn, and SH Lee. Prevalence and Diversity of Bacteriocin-like Antimicrobial Compounds from Korean Traditional Fermented Foods. 2014 ASM General Meeting
- (2) MJ Ahn, SH Lee, and JH Lee. Diversity and Prevalence of Bacteriocin-like Compounds from Korean Traditional Fermented Foods. 2013년도 한국미생물생명공학회 정기학술대회
- (3) MJ Ahn, SH Lee, and JH Lee. Gene Expression and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* ZA400 in Korean Traditionally Fermented Kimchi. 2014 한국 미생물 생명공학회 정기학술대회
- (4) SH Lee, MJ Ahn, and JH Lee. Diversity and Prevalence of Bacteriocin-like Compounds from Korean Traditional Fermented Foods. 2014 한국 미생물 생명공학회 정기학술대회
- (5) MJ Ahn, SH Lee, and JH Lee. Gene Expression and Characterization of Novel Fibrinolytic Enzymes from Selected Bacteria in Korean Traditionally Fermented Foods. 2014 한국 식품과학회 정기학술대회
- (6) SH Lee, MJ Ahn, and JH Lee. Isolation and Identification of a novel *Weissella* species, *W. jogaejeotgalis* FOL01 from Korean Traditionally Fermented Jogaejeotgal. 2014 한국 식품과학회 정기학술대회
- (7) SH Lee, JY Jung, and CO Jeon. Changes of bacterial communities in myeolchi-jeot, fermented anchovy, during fermentation. 2014 한국미생물학회연합 국제학술대회
- (8) JY Jung, SH Lee, WY Jung, CO Jeon. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. 15th International Symposium on Microbial Ecology

## 2. 지식재산권 및 홍보실적

### 가. 유전자원 등록 (10건)

- (1) *Brevibacterium* sp. SJ5-8 16S rRNA gene, partial sequence. 2012. (JX152779)
- (2) *Halomonas* sp. 10-C-3 16S rRNA gene, partial sequence. 2013. (GQ232738)

- (3) *Halomonas* sp. 30-C-3 16S rRNA gene, partial sequence. 2013. (GQ232739)
- (4) Changes in microbial communities and metabolites during fermentation of gimjang kimchi. Bacterial metagenome sequence database. 2013. (SRA059491)
- (5) *Ramlibacter solisilvae* sp. 5-10<sup>T</sup> 16S rRNA gene, partial sequence. 2014. (KC569791)
- (6) Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju. Bacterial metagenome sequence database. 2014. (SRP039098)
- (7) *Weissella jogaejeotgali* sp. nov. 16S rRNA gene, partial sequence. 2014. (SRA059491)
- (8) *Garicola koreensis* sp. SJ5-4<sup>T</sup> 16S rRNA gene, partial sequence. 2015. (JX152781)
- (9) Bacterial community dynamics and metabolite changes in myeolchi-aekjeot. Bacterial metagenome sequence database. 2015. (SRX755990)
- (10) *Weissella jogaejeotgali* sp. nov. Phenylalanyl-tRNA synthetase (pheS) gene, partial sequence. 2015. (KR822109)

#### 나. 품종등록 (국외-6건, 국내-6건)

- (1) *Brevibacterium jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. 2013. (일본, JCM 18571)
- (2) *Brevibacterium jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. 2013. (대한민국, KACC 16911)
- (3) *Halomonas cibimaris* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. 2013. (일본, JCM 16914)
- (4) *Halomonas cibimaris* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. 2013. (대한민국, KACC 14932)
- (5) *Ramlibacter solisilvae* sp. nov., isolated from forest soil. 2014. (일본, JCM 19319)
- (6) *Ramlibacter solisilvae* sp. nov., isolated from forest soil. 2014. (대한민국, KACC 17567)
- (7) *Garicola koreensis* gen. nov., nov. isolated from saeu-jeot: traditional Korean fermented shrimp. 2015. (일본, JCM 18572)
- (8) *Garicola koreensis* gen. nov., nov. isolated from saeu-jeot: traditional Korean fermented shrimp. 2015. (독일, DSM 28238)
- (9) *Garicola koreensis* gen. nov., nov. isolated from saeu-jeot: traditional Korean fermented shrimp. 2015. (대한민국, KACC 16909)
- (10) 박테리오파지를 생산하는 신종 발효균주 *Bacillus subtilis* FOL01. 2014. (대한민국, KACC 91954P)
- (11) *Weissella jogaejeotgali* sp. nov., isolated jogaejeotgal, a traditional Korean Fermented Seafood. 2015. (일본, JCM 30580)
- (12) 조개젓갈유래 신종 발효균주 *Weissella jogaejeotgali* FOL01. 2014 (대한민국, KCCM

다. 홍보실적 (2건)

- (1) 전체옥. 2014년 7월. 전통 발효식품의 기능성 향상 및 표준화를 위한 데이터베이스 구축. e-생물산업(ISSN 1598-8384). 27권 4호.
- (2) 전체옥. 2014년 11월. 실험실 진화기법을 이용한 전통 발효식품용 종균 개발 및 산업적 활용. e-생물산업(ISSN 1598-8384). 27권 6호.

라. 수상실적 (2건)

- (1) 이세희, 2013 한국미생물생명공학회 정기학술대회 우수 포스터 발표상 수상
- (2) 안민주. 2014 한국식품과학회 정기학술대회 우수 포스터 발표상 수상

3. 시제품 및 DB 구축·활용 실적

가. 국내 된장, 찜장, 보리간장, 청국장 등 전문업체인 “뜰안에 된장”과 함께 확보된 기능 유용미생물자원 중 혈전용해능 및 박테리오신 활성이 우수하게 평가된 *Bacillus subtilis* ZA400을 이용하여 찜장 및 생청국장 시제품을 제작하였음



나. 발효미생물유래 확보된 기능성 유전자의 특성 및 대사분석을 위한 전사체/대사체 분석 결과의 DB를 구축하였음. (<http://tff.chunlab.com>)

TFF.chunlab.com | Strain list isolated from Traditional Fermented Foods

**Strain list isolated from Traditional Fermented Foods**

Beakkimchi | Pogi-kimchi | Kkalddugi | Meju | Pickled anchovy | Pickled shrimp | Pickled clam

**Beakkimchi**

Project ID	Status	Tasks	EZGenome Name	Strain	NCBI original name	Genome Size	%G+C	Contigs	CDS	Taxonomy
PRJNA199813	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	12142587	Staphylococcus epidermidis 12142587	2,556,074	31.9	81	2,342	Bacteria; Firm
PRJNA180001	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	14.1.R1.5E	Staphylococcus epidermidis 14.1.R1.5E	2,555,725	32.2	131	2,521	Bacteria; Firm
PRJNA209042	Complete	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum	16	Lactobacillus plantarum 16	3,361,015	44.3	11	3,088	Bacteria; Firm
PRJNA55263	Assembly	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	4,214,547	43.5	5	4,279	Bacteria; Firm
PRJNA57675	Complete	CLG	Bacillus subtilis subsp. subtilis	168	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	4,215,606	43.5	1	4,175	Bacteria; Firm
PRJNA220353	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum	2025	Lactobacillus plantarum 2025	3,068,696	44.7	595	3,533	Bacteria; Firm
PRJNA220352	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum	2165	Lactobacillus plantarum 2165	3,179,972	44.5	192	3,108	Bacteria; Firm
PRJNA58281	Complete	CLG	Lactobacillus sakei subsp. sakei	23K	Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K	1,884,661	41.3	1	1,871	Bacteria; Firm
PRJNA203329	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	36-1	Staphylococcus epidermidis 36-1	2,714,638	31.8	447	2,642	Bacteria; Firm
PRJNA203331	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	41tr	Staphylococcus epidermidis 41tr	2,685,457	31.7	100	2,502	Bacteria; Firm
PRJNA231819	Assembly	CLG	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum	4_3	Lactobacillus plantarum 4_3	3,320,363	44.3	105	3,150	Bacteria; Firm
PRJNA203330	Assembly	CLG	Staphylococcus epidermidis	528m	Staphylococcus epidermidis 528m	2,687,516	31.7	117	2,502	Bacteria; Firm

#### 4. 사업화 (기술이전) 실적

- 현재 시제품을 함께 생산한 (주)뜰안에 된장과 기술이전에 관한 사항을 협의 중에 있음
- (주)뜰안에 된장에 자체적인 균주 배양 설비가 없기 때문에 균주 생산 및 보관에 대한 사항을 중점적으로 논의하고 있음
- 균주 생산 설비를 (주)뜰안에 된장에서 자체적으로 구축할 것인지 아니면 시제품 생산 때처럼 균주를 제공받아서 제품 제조만 (주)뜰안에 된장에서 진행할 것인지가 결정 되는대로 빠른 시일 내 기술이전이 가능할 것임

## 제2절 성과활용 계획

### 1. 기술적 효과

- 가. 본 연구과제에서 활용되는 다양한 전통발효식품의 전체 균총 분석정보는 전통식품의 기능성 및 안전성에 대한 과학적 근거를 제시할 것임
- 나. 또한 유전체학 및 생물정보학을 통한 중요발효미생물의 중요 기능성 유전자의 예측 및 발굴기술은 향후 국내 생물산업에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 기대됨
- 다. 그리고 본 연구과제에서 활용되는 유전체학 및 생물정보학적 기술은 향후 선진국과의 유전체연구 기술격차 및 관련 연구전문가의 양성에 기여할 것임.

### 2. 경제적 효과

- 가. 메타지노믹스연구를 통한 전통발효식품의 전체발효미생물조성분석은 전통식품의 기능성 규명 및 안전성에 대한 과학적 정보를 제공하여 국제표준화에 이바지할 것이며 이는 전통발효식품의 수출증대에도 이바지 할 것임
- 나. 전통발효식품유래 대사성 질환예방관련 우수발효미생물의 기능유전자의 DB구축은 다양한 기존 기능성 발효식품의 개선 및 새로운 기능성 발효식품의 개발을 가능케 할 것이며 이는 새로운 식품산업의 매출증대로 이어질 것으로 기대됨
- 다. 본 연구를 통하여 선발되는 기능성 유전자들의 정보는 미생물공학 및 유전체학적 방법을 통하여 대사성 질환예방 식품소재 및 치료보조제로서의 활용도가 높으므로 새로운 개념의 질환예방용 기능성 식품 개발 및 식품산업의 기술수준의 향상 및 매출증대가 예상됨.

### 3. 국가 및 산업경쟁력 파급효과

- 가. 본 과제를 통하여 개발되는 인체 대사성 질환예방용 식품신소재의 전통발효식품으로의 적용은 기존 전통발효식품의 특정적 기능성을 크게 향상시켜서 차별화를 가져올 것으로 생각되며 전통발효식품의 우수성을 홍보하여 단순히 먹는 식품의 개념보다는 건강기능성 식품으로의 인식 변화를 가져올 것으로 예상됨
- 나. 또한, 기존의 우리나라 전통발효식품은 대부분 자연발효식품으로서 발효조절이 어렵거나

품질이 균일하지 않는 등 여러 가지 문제점이 있으므로, 고기능성의 소수 또는 단일 미생물자원을 미생물스타터로 사용함으로써 고품질의 전통발효식품의 생산이 가능할 것으로 예상됨

다. 그리고 본 과제를 통하여 국가적인 전통발효식품별 미생물 자원, 유전자원 및 생리활성물질에 대한 데이터베이스를 구축하고, 고기능성 바이오소재를 발굴할 수 있으며, 이러한 결과를 활용하여 전통식품별별 기능성 향상을 위한 최적 제조방법과 표준화기술을 김치, 장류, 전통술 등 해당 전통식품업체에 기술 이전하여 산업화가 가능하리라 예상됨.

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준			
	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	200,000	300,000	500,000	1,000,000
경제적 파급효과	200,000	300,000	500,000	1,000,000
부가가치 창출액	100,000	200,000	200,000	500,000
합 계	500,000	800,000	1,200,000	2,500,000

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

## **제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보**

- 해당 없음

## **제7장 연구시설·장비 현황**

- 해당 없음

# 제8장 연구실 안전관리 이행실적

## 제1절 연구활동종사자 안전교육 실시

### 1. 안전교육 실시방법

- 가. 사이버안전교육 : 연구실안전관리시스템에서 제공하는 사이버안전교육
- 나. 자체안전교육 : 연구실험실에서 자체적으로 실시하는 교육으로 실시 후 안전교육일지를 연구안전관리 시스템에 등록해야 함

### 2. 교육 대상

- 가. 대학, 연구기관 등에서 과학기술분야 연구개발활동에 종사하는 연구원/대학생/대학원생 및 연구보조원 등

### 3. 안전교육·훈련의 시간 및 교육인정기간

#### 가. 안전교육 시간

교육과정	교육대상	교육시간
정기 교육·훈련	연구활동 종사자	반기별 6시간 이상
신규채용 등에 따른 교육·훈련	신규채용 된 연구활동 종사자(계약직 포함)	8시간 이상
	대학·연구기관 등에서 채용된 자 외의 자로서 신규로 연구개발활동에 참여하는 연구활동종사자(대학생·대학원생 등)	2시간 이상
특별안전 교육	중대 연구실사고 발생 및 연구내용 변경 등의 경우 연구주체의 창이 필요하다고 인정하는 연구활동 종사자	2시간 이상

- 나. 교육인정기간 : 이수증의 유효기간 동안 (유효기간 지나면 안전교육 재 이수)  
전반기 3월~8월, 후반기 9월~2월

### 4. 교육인정 요건 제시

- 가. 정기 교육·훈련은 사이버안전교육과 자체안전교육을 병행할 수 있으며, 총 교육시간이 반기별 6시간 이상이어야 함
- 나. 신규채용 등에 따른 교육·훈련은 자체안전교육 또는 집체식 교육으로 병행할 수 있음
- 다. 특별안전 교육·훈련은 자체안전교육 또는 집체식 교육으로 병행할 수 있음

### 5. 사이버안전교육절차



## 제2절 실험실 안전 점검 실시

### 1. 일상점검

- 가. 전 연구개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검
- 나. 실시자 : 연구활동종사자
- 다. 내용 : 실험실별 특성에 맞는 점검표 작성 후 점검 실시

### 2. 정기점검

- 가. 실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검실시하고, 그 결과 4,5등급 연구(실험실)에 대한 사용제한 조치

등급	연구실 안전환경 상태
1	연구실 안전환경에 문제가 없고 안전성이 유지된 상태
2	연구실 안전환경 및 연구시설에 결함이 일부 발견되었으나, 안전에 크게 영향을 미치지 않으며 개선이 필요한 상태
3	연구실 안전환경 또는 연구시설에 결함이 발견되어 안전환경 개선이 필요한 상태
4	연구실 안전환경 또는 연구시설에 결함이 심하게 발생하여 사용에 제한을 가하여야 하는 상태
5	연구실 안전환경 또는 연구시설의 심각한 결함이 발생하여 안전상 사고발생위험이 커서 즉시 사용을 금지하고 개선해야 하는 상태

- 다. 점검 기관: 안전환경기술원 (외부기관)
- 라. 항목 : 가스, 화공, 소방, 전기, 기계, 산업위생 등 6개 항목
  - (1) 일상점검표 작성
  - (2) 소화기 제자리 위치 등 사용가능 여부
  - (3) MSDS 비치
  - (4) 실험실 위생상태
  - (5) 보호구함 정비
  - (6) 각 연구(실험)실별 인원 파악 및 안전교육 이수증 확인
  - (7) 각 연구(실험)실별 정/부 표시 (출입구 상단에 부착)

## 제3절 실험실 안전사고 대응 및 예방

1. 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완, 사고 대응 훈련 실시 : 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼에 따라 사고전과, 조치하며 실험실 안전사고 대응훈련을 실시하여 유사사고 발생 시 대응능력 향상
2. 실험실 사고사례 전과 : 실험실 안전사고에 대한 경각심을 높이고 유사사고 예방하기 위해 국·내외 대학과 연구기관에서 발생하는 사고를 수집하여 학내 대학원생 및 연구원 등 연구활동종사자에게 이메일을 통해 전과
3. 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포



## 제9장 참고문헌

Ahn et al, Isolation and Characterization of a Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* B16 from Kimchi, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2012, 41(5):721-726.

Amable et al., The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Hemolysins Damselysin and HlyA Are Encoded within a New Virulence Plasmid, 2011, 79(11): 4617-4627.

Buommino et al., Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. Cell stress & chaperones, 2005, 10(3):197.

Cho et al., In vitro anticancer effects of active compounds from Chinese cabbage kimchi. J. Korean Assoc. Cancer Prev., 2004, 9:98 - 103.

Choi et al., Isolation, Identification and Growth Characteristics of Main Strain Related to Meju Fermentation, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2003, 32(6):808-824.

Cole et al., Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis, Nucleic Acids Res, 2014, 50:D633-D642.

Dorsch M., Stackebrandt E., Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA, J. Microbiol. Methods, 1992, 16(4):271-279.

Furusho et al., Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado - Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Neurobiology of disease, 2005, 20(1): 170-178.

Geng et al., Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3, which exhibits glutamic acid-independent production of poly- $\gamma$ -glutamic acid. J. Bacteriol., 2011, 193(13):3393-3394.

Gong et al., Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China, Food Control, 2010, 21(1):89-96.

Hong et al., Zygomycota Associated with Traditional Meju, a Fermented Soybean Starting Material for Soy Sauce and Soybean Paste, Journal of Microbiology, 2012, 50(3):386-393.

Jeong et al., Fibrinolysis of Fermented Kimchi, Korean J. Life Science, 1995, 5(4):203-210.

Jo et al., Purification and characterization of a major fibrinolytic enzyme from *Bacillus*

*amyloliquefaciens* MJ5-41 isolated from *Meju*. J. Microbiol. Biotechnol., 2011, 21(11):1166–1173.

Jung et al., Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77(7):2264–2274.

Jung et al., Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean, Int J Food Microbiol, 2014, 185:112–120.

Jung et al., Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood, Food Microbiol, 2013, 34:360–368.

Jung et al., Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of *Doenjang*. Nutrition, 2006, 22(5):539–545.

Kim et al., Analysis of microbial communities in *doenjang*, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol., 2009, 131(2–3):265–271.

Kim et al., Analysis of Prokaryote Communities in Korean Traditional Fermented Food, Jeotgal, Using Culture-Dependent Method and Isolation of a Novel Strain, The Korean Journal of Microbiology, 2009, 3(26–31):6.

Kim et al., Biochemical and Molecular Identification of Antibacterial Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., 2011, 43(4):446–452.

Kim MJ and Kim GR, In vitro evaluation of cholesterol reduction by lactic acid bacteria extracted from kimchi. Korean J. Culinary Res., 2006, 12:259 - 268.

Kwak et al., Doenjang, A fermented soybean paste, decreased visceral fat accumulation and adipocyte size in rats fed with high fat diet more effectively than nonfermented soybeans. J. Med. Food., 2012, 15(1):1–9.

Lane et al., Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6955–6959.

Lee et al., Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using barcoded pyrosequencing and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy, Appl Environ Microbiol, 2012, 78:5983–5993.

Liu et al., Genome update: lactic acid bacteria genome sequencing is booming. Microbiology, 2005, 151:3811–3814.

- Machida et al., Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. DNA Res., 2008, 15(4):173-183.
- Makarova et al., Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci., 2006, 103(42):15611-15616.
- Namgung et al., Metabolite profiling of doenjang, fermented soybean paste, during fermentation, Science of Food and Agriculture, 2010, 90(11):1926-1935.
- Nam et al., Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. Int. J. Food Microbiol., 2012, 155(1-2):36-42.
- Nishito et al., Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis natto* from very short read data. BMC Genomics, 2010, 16(11):243.
- Remuzon et al., Trans-4-hydroxy-L-proline, a useful and versatile chiral starting block, Tetrahedron, 1996, 52:13803-13835.
- Rhee et al., Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. Microb. Cell Fact., 2011, 30:10.
- Sato et al., Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239. DNA Res., 2011, 18(3):165-176.
- Shibata et al., Synthesis of optically-active 3-mercaptopyrrolidine derivatives, synthetic intermediates of carbapenem rs-533 and its isomer, Heterocycles, 1986, 24:1331-1346.
- S.M. Cusick et al., Use of a Single, Triplicate Arbitrarily Primed-PCR Procedure for Molecular Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(5):2227-2231.
- Sun et al, Complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ND02. J. Bacteriol., 2011, 193(13):3426-3427.

<첨부>

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

<b>신청과제명</b>	기능성 전통발효식품유래 발효미생물 유전체정보를 활용한 인체 대사성 질환예방관련 식품소재생산균주 개발		
<b>주관연구책임자</b>	<b>이 주 훈</b>	<b>주관기관</b>	경희대학교

### 1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청 팀		
전통발효식품유래 신규 미생물유전정보 확보 기술	일본	80%	80%	100%	연구신청팀은 전통식품에서만 10여 종 (전체 환경에서는 100여 종) 이상의 신규 미생물유전정보를 기 확보 및 국제학계 보고함
메타지노믹스 분석을 활용한 다양한 균총 분석 기술	미국	80%	80%	95%	NGS 시퀀싱법 등 최첨단 대용량 염기서열 분석법을 통한 전통식품 내 미생물 균집 분석 연구 경험 보유 및 국제학계 보고함
기능성 생물소재 발굴 및 분석 기술	일본	80%	80%	95%	연구신청팀이 천연물, 전통식품 등으로부터 기능성 바이오 소재 탐색 연구를 다년간 수행해 왔으며 특허와 분석 기술 보유
전통발효식품유래 기능성 식품소재 생산기술	일본	40%	20%	80%	본 연구팀에서는 정부정책과제로 국가연구사업의 일환으로 김치의 품질균일화를 위하여 미생물제제를 개발한 경험을 가지고 있음(특허 보유)
대용량 유전자 정보 분석 및 DB화 기술	미국	70%	70%	90%	본 연구팀의 구성원(전체욱교수, 이주훈교수)은 각각 미생물 genome 염기서열 분석 및 가공에 많은 경험과 노하우를 가지고 있음

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

## 2. 특허분석

### 가. 특허분석 범위

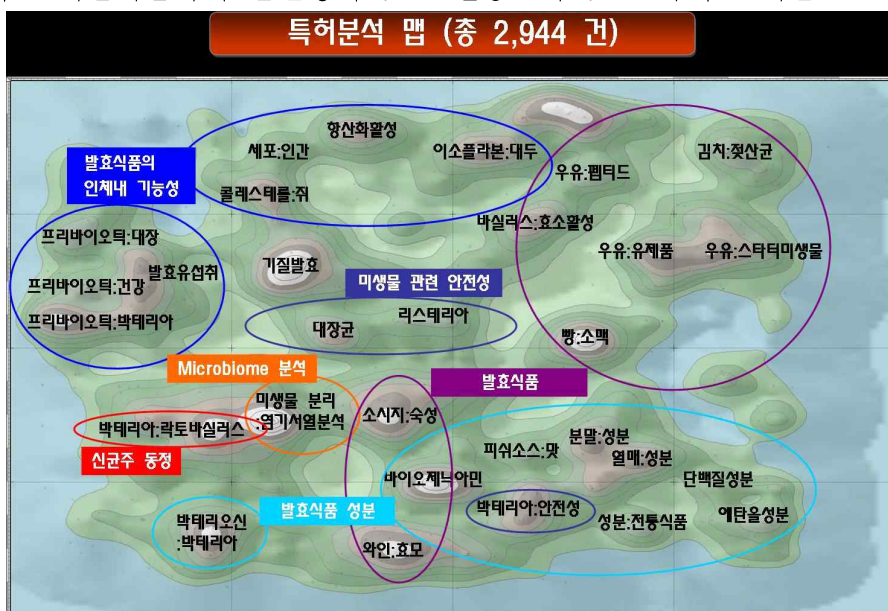
(예시)

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 30년간
검색범위	제목 및 초록

### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	fermented food	fermented food, lactic acid bacteria
검색건수	2,944	123
유효특허건수	2,199	
핵심특허 및 관련성	특허명	Fibrinolytic metalloprotease and composition comprising the same
	보유국	Korea
	등록년도	2011
	관련성(%)	80
	유사점	대사성 질환예방관련 기능성 유전자
	차이점	해양미생물로부터 분리

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석



### 3. 논문분석

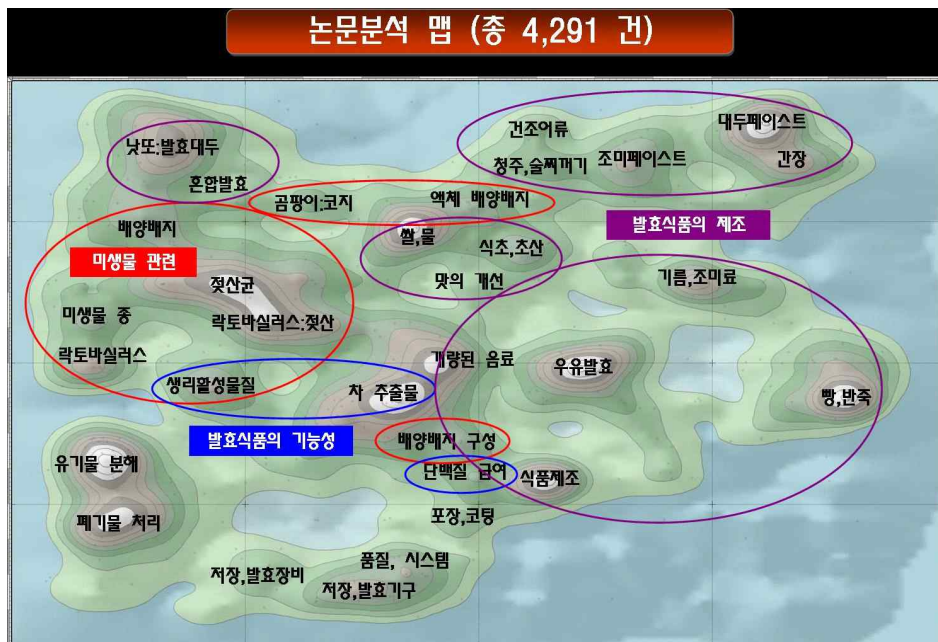
#### 가. 논문분석 범위

(예시)

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), Scopus DB(www.scopus.com)
검색기간	최근 30년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	fermented food, lactic acid bacteria	fermented food, metagenomics
검색건수	4,291	62
유효논문건수	2,648	62
핵심논문 및 관련성	논문명	Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food
	학술지명	Applied and Environmental Microbiology
	저자	Jung 외 7인
	게재년도	2011
	관련성(%)	90
	유사점	메타지노믹스기법을 이용한 전통 발효식품 (김치) 내 발효미생물의 조성분석
	차이점	김치내 유산균 위주의 분석



## 4. 제품 및 시장 분석

### 가. 생산 및 시장현황

#### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- ① 김치류 : 2008년 현재 김치류의 생산능력은 총 890.3천톤이고 생산량은 412.4천톤이며 총 생산액으로는 6,574억원에 이르는 것으로 보고되었다. 또한 2008년 기준 김치의 출하현황은 총 출하량 366.5천톤 (생산량의 88.9%)이고 출하액은 6,357억원 (생산액의 96.7%)이었다. 그리고 총 수출량은 21천톤이며 수출액은 76,440천달러에 이르렀다. (식품의약품안전청, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2008년)
- ② 장류 : 국내에서 소요되는 장류는 다양하며 고추장, 간장, 된장, 청국장, 그리고 춘장 등이 포함된다. 2008년 기준 총 생산능력은 1,139.7천톤이고 생산량은 654천톤에 이르며 총생산액은 6,811억원이었다. 또한 2008년 기준 장류의 출하현황은 총 출하량 588.6천톤 (생산량의 85.4%), 출하액은 8,900억원 (생산액의 130.7%)이었으며 총 수출량은 19.2천톤, 수출액은 30,293천달러이었다. (식품의약품안전청, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2008년)
- ③ 젓갈류 : 2008년 현재 가장 많이 생산되는 젓갈은 새우젓과 멸치젓이며, 총 젓갈제품의 생산능력은 343천톤, 생산량은 654천톤이며 생산액은 2,248억원이었다 (전남발전연구원, 전남발전연구원정책제안, 2010).

#### 2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- ① 포도주 : 세계 포도주 소비는 매년 2억 6,600만 명 씩 증가하고 있으며 포도주 판매로 인한 매출액은 2005년 1,070억 달러를 기록하였다. 2005년부터 2010년까지 매출액은 9.4% 성장한 1,170억 달러에 달할 것으로 예측된다. (농수산물유통공사, 2005년)
- ② 치즈 : 치즈를 주로 생산하는 나라인 유럽 및 미국은 전 세계 생산량의 약 90%를 차지하며 치즈의 총 생산량은 13,617천톤에 달한다. (농수산물유통공사, 2005년)

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.