

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001753-01

김치 발효 유산균을 통한 장내 미생물총 개선과 그로
인한 항비만 효과

(Modulation of the microbiome with a concomitant
anti-obesity effect by Kimchi originated probiotic
feeding)

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “김치 발효 유산균을 통한 장내 미생물총 개선과 그로 인한 항비만 효과에 관한 연구” 에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012년 12월 26일

한동대학교 산학협력단

연 구 진

연구기관명 : 한동대학교 산학협력단

연구책임자 : Wilhelm Holzapfel

책임연구원 : Wilhelm Hozapfel

책임연구원 : 신현길

책임연구원 : 현창기

연 구 원 : 지요셉

연 구 원 : 박소영

연 구 원 : 김한나

연 구 원 : 이지은

연 구 원 : 양재식

연 구 원 : 박현준

연 구 원 : 여소영

연 구 원 : 백보람

연 구 원 : 김선우

연 구 원 : 박근영

연 구 원 : 김보배

요 약 문

I. 제 목

김치 발효 유산균을 통한 장내 미생물총 개선과 그로 인한 항비만 효과

II. 연구개발의 목적 및 필요성

한식 세계화의 주역인 김치의 우수성을 과학적으로 입증함으로써 한식 문화의 위대함을 세계에 알리고자 한다. 임상실험을 통해 현상학적으로만 밝혀진 발효 김치의 체지방 감소 현상을 최신동향의 metagenomics와 분자 생물학을 이용하여 분석하였으며, 이번 연구를 통해 발효 김치의 핵심인 유산균이 비만으로 인해 유발된 소화기관 내 균총의 불균형을 건강한 균형 상태로 유도함으로써 체지방 축적을 감소시킨다는 것을 증명하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

2세부과제를 통해 외국인이 쉽게 즐길 수 있는 백김치로부터 잠재적 probiotics를 분리, 선별 및 동정하였고 소화기관의 척박한 환경에서 선택된 probiotic이 안전하게 제 역할을 할 수 있는지 생존율과 기능성 및 안전성을 확인하였다. 제 1세부과제에서는 10주 이상 고지방식이와 발효 김치 유산균을 쥐에게 섭취시킴으로서 김치 유산균이 소화기관 내 균총에 미치는 영향을 metagenomics 기법(DGGE, qRT-PCR)을 이용하여 분석하였다. 마지막으로 제 3세부과제를 통해 비만 유도 과정 중 유산균을 섭취한 그룹과 비교그룹의 신체적 변화를 mRNA level, signal protein level 등 여러 관점에서 Western blot, RT-PCR, ELISA 등을 이용하여 분석함으로써 발효 김치 유산균의 섭취에 따른 소화기관 내 균총 변화와 항비만 효과의 메커니즘을 설명하였다.

IV. 연구개발결과

시중에 판매되는 증가집 백김치, 농협 아릅찬 백김치, 그리고 지역의 한정식 식당에서 직접 담은 백김치 3종에서 총 38종의 미생물을 분리하였고, 카탈레

아제 테스트, BSH 테스트, Biogenic Amines 테스트, 항생제 내성 테스트, SSDP(Simulated stomach duodenum passage) 테스트 및 유전자 서열 분석을 통해 *L. plantarum* HSC4 와 *L. sakei* HSC7이 최종 선별되었다. 이 균주들은 위 3종의 백김치에서 분리된 균주들 중 기능성, 안정성 및 소화기관 내 생존률이 가장 높은 유용균으로 선택되었다. 이렇듯 기능성 및 안전성이 확보된 *L. plantarum* HSC4와 *L. sakei* HSC7을 C57BL6 쥐에 60% 고지방 식이와 함께 1×10^8 CFU의 농도로 매일 11주간 투여한 후 microbiota의 변화를 확인하였고, 비만 관련 유전인자 및 신호전달 단백질을 확인하였다. 그 결과 *L. plantarum* HSC4과 *L. sakei* HSC7 또는 이 둘을 섞은 그룹 모두에서 유의적 또는 뚜렷한 무게 감소가 확인 되었으며, 이는 정소지방, 내장 지방에서도 확인 할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

한국 식품문화의 상징이라 할 수 있는 김치와 세계적으로 가장 큰 문제가 되고 있는 비만의 관계성을 과학적으로 입증한다는 것은 한식 세계화 측면에 있어 매우 활용도가 높은 과학적 기반이 될 것이다. 발효 김치를 통한 체지방 감소 연구는 그 동안 잘 알려져 있던 한국인의 날씬한 체형과 맞물려 세계적인 홍보에 큰 시너지 효과를 창출할 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Purpose of this project is to achieve scientific background of anti-obesity effect of "baek kimchi" through microbiota modulating effect on host's gastrointestinal track through putative probiotic strains isolated from baek kimchi. It has been known by few different research papers that microorganisms related to kimchi fermentation has anti-obesity effect on animal model and humans through various pathways and mechanisms. In this project we have used microbiota concept that through putative probiotic strains isolated from baek kimchi can modulate host microbiota and it can bring back the balance of microbiota from dysbiosised microbiota caused by diet induced obesity. We have used metagenomics tools to analyse microbiota in mice model and molecular biology methods to monitor physiological impact on mice after feeding putative probiotics isolated from baek kimchi during their diet induced obesity intervention period. Whole project is divided into three different objectives and coordinators as follow. 1st project has goal to monitor microbiota modulation through baek kimchi isolated microorganisms, 2nd project has goal to isolate safe and functional putative probiotic strains from baek kimchi, and 3rd project has goal to analyse host anti-obesity related physiological impact after intervention. Once the project achieve its planned tasks, it will bring great impact on world wide scientific societies that Korean traditional fermented food "baek kimchi" is a good microbiota balancer and it has anti-obesity effect through microbiota modulation.

CONTENTS

(영 문 목 차)

I. Title

Modulation of the microbiome with a concomitant anti-obesity effect by
Kimchi originated probiotic feeding

II. Purpose and necessity of project

III. Content of project

IV. Result of project


V. Outcome of project and its uses

연구개발보고서 초록

과제명	김치 발효 유산균을 통한 장내 미생물총 개선과 그로인한 항비만 효과		
	Modulation of the microbiome with a concomitant anti-obesity effect by Kimchi originated probiotic feeding		
연구기관	한동대학교 산학협력단	연구자	한동대학교 산학협력단
참여기관		책임자	Wilhelm Holzapfel
연구비	계	총연구기간	2011.12.30~2012.12.29 (1년)
참여연구원	14명 (연구책임자: 3명, 연구보조원 11명)		

○ 연구개발 목표 및 내용

1 세부 과제	<p>김치 발효 유산균으로 인한 소화기관 내 균총의 변화 유도 및 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - RNA extraction을 통해 ribosomal RNA를 cDNA 로 만들어 metatranscriptomics로 분석함으로써 number base 뿐만 아니라 bacteria activity base quantification도 가능함 - DGGE를 통한 microbiota 분석 - RT-PCR을 통한 microbiota 분석
2 세부 과제	<p>백김치에서 유산균주 분리 선별 및 동정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 만든지 10, 15일 이상 pH3.8 이하 백김치에서 유산균을 분리한다. - 백김치는 농협 파머스 마켓 기준 가장 많이 소비되고 있는 중가집 백김치, 농협풍산김치 백김치, 그리고 일반 시중 재래시장에서 판매되는 백김치 총 3종에서 추출하여 총 6회 유산균을 분리한다. - 분리된 유산균은 아래의 과정을 거쳐 발효기간 별 종류별 유산균 databank를 구축한 후 최종 선별된다. - SSDP를 통한 내산성, 내담즙성 분석 - BSH, 항생제 실험을 통한 안정성 확보 - Biogenic Amines 생성 확인을 통한 안정성 확보
3 세부 과제	<p>소화기관 내 균총 변화 로 인한 physiological 변화 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 체지방, 비만 관련 유전인자, 신호전달 단백질 감소 - 혈중 leptin 감소, Lipoprotein lipase 증가 - 대장 내 Short Chain Fatty Acid 감소



유산균 분리 동정

- 10일 이상 발효된 백김치에서 유산균 분리(10개 이상)
- 내 산성, 내 담즙성 확인 (SSDP)
- 항생제 내성 확인
- Biogenic amine(BA) 생성 확인
- 가장 생존율이 높고 항생제 내성이 없으며, BA를 생성하지 않는 유산균 선별

세부과제 2

- DIO: Diet Induced Obesity
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- HFD: High Fat Diet
- DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- RT-PCR: Real Time PCR
- LPL: Lipoprotein lipase
- SCFA: Short Chain Fatty Acid
- 각 균주는 PBS에 1x10⁸ 농도로 suspend 하여 경구투여

백김치-선별균주 경구투여	PBS만 경구투여 Negative control	PBS만 경구투여 Negative control	LGG 경구투여 Positive control	Microbiota 분석 •Metatranscriptomics 분석 •DGGE •16S sequencing •RT-PCR • quantitative analysis of microbiota with primer and SYBR kit
DIO mouse	Normal Diet	DIO mouse	DIO mouse	
TEST (Kimchi Probiotic)	Control (only PBS)	Control (only PBS)	Control (LGG)	Faecal sample Ileum sample
In-Vivo				Physiology 분석 • mouse weight, organ weight • mRNA level analysis • RT-PCR • ACC, FAS, SCD-1, ChREBP, SREBPs, Fiaf, B-actin • Western Blot • ELISA (blood) • Leptin, LPL • Gas Chromatography (GC) • Large intestine content 내의 Short chain fatty acid 정량적 비교 • Acetate, Butyrate, Propionate
<ul style="list-style-type: none"> • Normal Diet - control group (8마리) • 나머지 24마리를 아래와 같이 3그룹으로. • HFD(60%)만 8주 섭취 후 마지막 4주간 아래 항목과 HFD(60%)을 함께 투여한다. <ul style="list-style-type: none"> • 선별된 균 • PBS • LGG (Positive control) • 4주간의 투여 후 (총 12주) <ul style="list-style-type: none"> • CO₂로 sacrifice 후 • sample deep freeze 				
세부과제 1				세부과제 3

Physiology 분석

- mouse weight, organ weight
- mRNA level analysis
- RT-PCR
- ACC, FAS, SCD-1, ChREBP, SREBPs, Fiaf, B-actin
- Western Blot
- ELISA (blood)
- Leptin, LPL
- Gas Chromatography (GC)
- Large intestine content 내의 Short chain fatty acid 정량적 비교
- Acetate, Butyrate, Propionate

세부과제 3

연구 내용	연구 범위
1 세부	<p>In-Vivo</p> <p>7주령 수컷 C57BL/6J mice (specific pathogen free)를 32마리 구입 후 아래와 같이 4그룹으로(그룹당 8마리) 나누어 23°C, 55±10% 습도, 12시간 light/dark cycle 의 환경에서 키운다.</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Normal Diet (10% fat) + (Phosphate buffered saline)PBS B. Hight Fat Diet (60% fat) +PBS C. Hight Fat Diet (60% fat) + 백김치 분리 균주 D. Hight Fat Diet (60% fat) + LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG) <p>모든 쥐는 첫 1주간 Adaptation 기간을 거친 후 8주간 식이만을 제공받는다. 9주부터 12주까지는 식이와 PBS 또는 균주를 같이 제공받으며, PBS는 총 30ul, 균주는 3×10^8 / day 농도로 30ul PBS에 suspend 하여 경구투여 한다. 물과 식이는 <i>ad-libitum</i> 방식으로 멸균상태로 제공한다.</p> <p>총 12주간 주 1회 간격으로 무게를 측정하며, 실험 마지막 날 CO₂ overdose로 희생하여 변, 소장, 대장, 간, 정소지방, 혈액을 적출한 후 무게를 측정하여 바로 -80°C 보관 후 추후 실험에 사용한다.</p> <p>Microbiota 분석</p> <p>실험 마지막 날 모아둔 모든 쥐의 변과 소장에서 전체 균 RNA를 extraction 한 후 Random Hexamer를 이용하여 Reverse Transcriptase PCR을 수행한다. 그 후 만들어진 cDNA에 GC clamp가 있는 Universal primer (v6-v8 region)를 사용하여 PCR 증폭을 한 후 DGGE (1.2% acrylamide gel; 35~60%)를 통해 전체 소화기관내 균총의 diversity를 확인한다. Gel 내의 band 의 위치차이를 통해 diversity 와 common band를 확인한 후 band를 elute 하여 sequencing을 맡긴다. 이를 통해 전체 DGGE band 에 해당하는 taxonomical map을 제작한 후 가장 지배적으로 존재하는 균주들에 해당하는 primer를 제작한다. (NCBI primer-BLAST 또는 Ribosomal Database Project의 Database를 활용한다) 제작한 primer와 SYBR green kit를 사용하여 Real-Time PCR로 해당 균총의 수를 측정한다. 이때 해당되는 균주들은 KCTC</p>

	<p>(없을 경우 ATCC) 를 통해 type strain을 구입한 후 Standard Curve를 만들어 변과 소장에 존재하는 균주의 absolute number를 측정한다.</p>
<p>2 세부</p>	<p>백김치로부터 유산균의 분리 및 선별 동정</p> <p>백김치에서 유산균주 분리 선별 및 동정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 만든지 10, 15일 이상 pH3.8이하의 백김치에서 유산균을 분리한다. - 백김치는 농협 파머스 마켓 기준 가장 많이 소비되고 있는 “중가집 백김치“, “농협풍산김치 백김치“, 그리고 일반 시중 재래시장에서 판매되는 백김치 총 3종에서 추출하여 총 6회 유산균을 분리한다. - 분리된 유산균은 아래의 과정을 거쳐 발효기간 별 종류별 유산균 databank를 구축한 후 최종 선별된다. <p>고압 멸균된 백에 Peptone water 90ml을 넣고, sample 10g를 Peptone water 에 풀어준다.</p> <p>1ml을 분주하여 9ml의 peptone water에 10 배수로 dilution하여(10⁻⁶, ⁻⁷, ⁻⁸, ⁻⁹) MRS agar plate에 3 반복하여 도말한다. 그 후 37℃ incubator에서 48시간 이상 키운다.</p> <p>MRS agar plate에 자란 균을 colony 별로 색깔, 크기, 투명도 등 고려해서 분리하고, 각 colony들을 MRS broth에 단일 균주로 접종 후(37℃ incubator) 1일 후 다시 agar plate에 striking 하여 single colony를 확인한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> -유산균은 catalase negative, gram positive 인 미생물이다. 따라서 유산균을 선별하기 위해 MRS Agar에서 자란 균 중 catalase test와 gram염색을 통해 유산균을 확인한다. -Catalase test: 0.3% H2O2를 준비한 후 colony에 접종한 뒤, 기포가 발생하지 않는 colony를 선택한다. -Gram staining: 빨간색이 아닌 청보라색 으로 나타나는 균을 선택한다. <p>분리 선별된 백김치 유산균 확보</p> <p>선별된 균주를 5ml의 MRS broth에 50ul로 접종하여 37℃에 16~18시간 배양 증식시킨 후 8000 x g, 10min 원심 분리하여 균체를</p>

언어 MRS broth 와 glycerol이 5:1 비율로 섞여 있는 freezing media에 충분히 Vortex 하여 cryo tube에 넣어 -80℃에 보관한다. 냉동된 균주는 이 후 미생물 database 구축의 일환으로 장기 보관한다.

내산성과 내담즙성 테스트(SSDP)

유산균은 음식물과 함께 섭취하였을 때 강한 위산을 분비하는 위에서 1시간 정도 머무른 후, 십이지장에서는 담즙을 분비하여 고농도의 담즙에서 2시간 정도 통과한 후 장으로 이동하게 된다. 유산균이 이런 극심한 환경에서 살아남아 장으로 들어갈 수 있어야 장에 달라붙어 숙주에게 좋은 영양을 끼치게 되어 probiotics로서의 역할을 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 인체(위와 십이지장)환경과 비슷한 조건으로 설정된 SSDP (Simulated stomach duodenum passage) 방법으로 유산균의 내산성 내담즙성 실험을 수행하여 가장 많이 살아남은 균주를 1차 선별한다.

- ① 유산균을 18시간동안 MRS broth에서 배양시킨다.
- ② 1ml 의 유산균 액을 e-tube에 담아 원심분리한 후, PBS로 2번 씻어준다.
- ③ PBS를 제거한 후, 침전된 유산균을 pH3 MRS broth 10ml에 suspend 한 후, vortexing한다.
- ④ 그 중 1ml을 취해 10fold 로 10⁻⁹희석하여 Agar plate count method로 initial point의 유산균 수를 계수한다.
- ⑤ 나머지 9ml은 37℃에서 한 시간 배양 후, 4ml의 oxgall solution을 넣어준 후 17ml의 Synthetic duodenum juice 섞어 준다.
- ⑥ 37℃, 2시간 배양 후 10fold 로 10⁻⁹희석하여 Agar plate count method로 살아남은 유산균의 수를 계수한다.
- ⑦ 처음 접종된 유산균의 수와 3시간 후 살아남아있는 유산균의 수를 비교하여 percentage(%) 로 나타낸다.

항생제 내성 테스트

- ① 항생제(Erythromycin, Gentamycin, Ampicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin, Ciprofloxacin, Penicillin G)을

	<p>2배 희석법으로 0.025~64μg/ml의 농도로 넣은 MRS agar plate를 만든다.</p> <p>② 18시간 배양한 유산균을 10⁵ /spot이 되도록 plate에 접종한다.</p> <p>③ 24~48시간 37$^{\circ}$C incubator에서 배양 후, 최소저해농도(MIC)를 측정한다.</p> <p>Biogenic amine(BA)생성 테스트</p> <p>아미노산 전구체((L-Tyrosine disodium salt, L-Histidine monohydrochloride monohydrate, L-Ornithine monohydrochloride, L-Lysine monohydrochloride)를 0.1%첨가한 MRS broth를 만든다. 18시간 배양한 유산균을 1%접종한 뒤 5~10번 교대 배양하여, decarboxylase 효소를 활성화시킨다. Sara Bover-Cid and Wilhelm Holzapfel. (1999)에 의해 고안된 decarboxylase media에 효소 활성화된 균을 도말한다. 37$^{\circ}$C에서 24~48시간 배양 후 보라색으로 변함을 통하여 BA생성 균을 판별한다.</p> <p>decarboxylase media속에 있는 bromocresol purple은 pH 5.2에서 노란색을 띄지만 pH 6.8로 올라갈수록 보라색으로 변한다. 따라서 BA 생성으로 인해 pH가 올라갈 때 보라색으로 변하는 것을 이용하여 BA생성을 확인할 수 있다.</p> <p>유산균 동정(16S rDNA sequence)</p> <p>최종적으로 SSDP, 항생제내성, BA test 후 선별된 균주는 16S rDNA sequencing을 통하여 그 taxonomical species를 분별한다.</p>
3 세부	<p>Real time RT-PCR & Western blot & ELISA</p> <ul style="list-style-type: none"> - Total RNA 추출 및 정제, cDNA 합성 후, SYBR green master mix와 ABI 7500 fast machine을 사용하여 real time RT-PCR 실시 - 실험실의 standard protocol을 따라 비만 관련 효소들을 특정 antibody를 사용하여 western blot으로 확인 - Mouse leptin & LPL ELISA kit를 사용하여 혈중 leptin 과 LPL 농도 비교

○ 연구결과

1. 백김치에서 유산균 분리 및 동정 (2세부)

시중에서 판매중인 종가집 백김치와 농협 아릅찬 백김치, 그리고 본 연구팀이 임의로 지정한 백김치(한동한정식 식당에서 담군 백김치)에서 4차례에 걸쳐 pH를 측정하여 최적의 발효상태를 확인 한 후 유산균을 분리하기 위해 속적으로 희석한 샘플을 MRS배지에 도말 한 후 각 콜로니를 취하여 MRS 배지에 단독으로 순수배양 하였을 때 자라는 균만을 선별하였다(그림 1).



그림 1. 유산균을 분리한 시료 왼쪽부터 종가집, 농협 아릅찬, 한동 한정식 백김치.

유산균은 카탈라아제가 없다는 특징을 가지기 때문에 유산균만을 선택하기 위해 카탈라아제 테스트를 통하여 카탈라아제 반응 음성인 균만을 선별하였다 (그림 2). 선별된 균들을 16s rDNA 유전자 염기 서열 분석 후, NCBI의 BLAST를 통해 strain 이름을 부여하였다(표 1).



그림 2. 카탈라아제 테스트 결과, 4A1 이 catalase 양성으로 나와 후보균에서 제외 되었다. (N.C. = negative control)

2. 분리된 유산균의 안정성 및 기능성 검사 (2세부)

2-1. 담즙산염 탈포합활성 테스트 (BSH, Bile salt dehydrogenase)

담즙산을 분해하여 체내 콜레스테롤 소비 증가에 따른 혈중 콜레스테롤 저하 가능성이 있는 균주를 선별하였다 (그림 3, 표 1). 이러한 담즙산 분해능은 콜레스테롤 저하 뿐 아니라 균의 장내 생존 여부에 중요한 요소가 된다 (Holzapfel et al., 1998).

2-2. Biogenic amine(BA)생성 테스트

다량 생성시 면역 과민반응을 유발할 수 있는 biogenic amines를 생성하는 지 확인하였다. Biogenic amines를 생성하지 않는 균주를 선별함으로 섭취시 안전성을 고려하였다(그림 3, 표1).

2-3. 항생제내성 테스트

유산균의 항생제 내성 유전자가 유해한 균에게 horizontal gene transfer를 통해 전달 될 수 있는 위험을 방지하기 위하여 항생제 내성 유전자를 가지지 않은 균주만을 최종적으로 선별하였다 (그림 3, 표1).

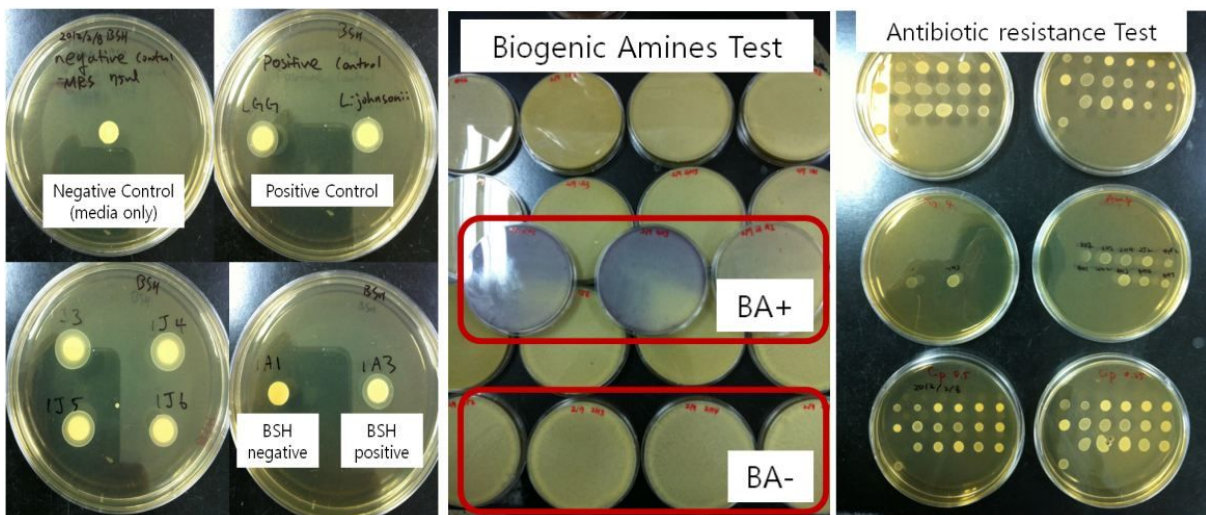


그림 3. 순서대로 BSH Test, Biogenic Amines 항생제 내성 실험 결과의 일부.

표 1. 분리된 유산균주들의 phenotype 결과

#	김치 pH	이름	CFU/ml	MRS 성장	catalase 테스트	strain 명	B S H	B A	항생제
1	3.8	1J1	6.3×10^8	-	-				
2		1J2	7×10^7	-	-				
3		1J3	6×10^7	+	-	<i>Lactobacillus plantarum</i> HSC4	+	-	-
4		1J4	5×10^7	+	-	<i>L. plantarum</i> HSC4	+	-	-

5		1J5	4×10^7	+	-	<i>L. plantarum</i> HSC5	+	-	-
6		1J6	3×10^7	+	-	<i>L. plantarum</i> HSC5	+	-	-
7		1J7	1×10^7	-	-				
8		1J8	8×10^7	-	-				
9	3.92	2J1	1.1×10^7	-	-				
10		2J2	4×10^6	+	-	<i>L. sakei</i> HSC8	+	-	Am
11		2J3	3×10^6	-	-				
12		2J4	3×10^6	-	-				
13		2J5	2×10^6	-	-				
14	3.95	3J1	4×10^7	-	-				
15	3.89	4J1	1×10^8	-	-				
16		4J2	1×10^8	-	-				
17		4J3	1×10^8	-	-				
18	5.54	1A1	1.3×10^6	+	-	<i>Leuconostoc citrium</i> HSC1	-		
19		1A2	9×10^5	-	-				
20		1A3	2×10^5	+	-	<i>Leu., Mesenteroides</i> HSC2	+	-	Gm
21	3.9	3A1	3×10^7	-	-				
22	3.86	4A1	2×10^8	+	+				
23		4A2	1×10^8	+	-	<i>L. brevis</i> HSC10	+	+	
24	3.94	1H1	4.2×10^8	-	-				
25		1H2	3×10^7	-	-				
26		1H3	1×10^7	-	-				
27		1H4	1×10^7	+	-	<i>L. plantarum</i> HSC3	+	-	-
28	3.98	2H1	2.6×10^7	-	-				
29		2H2	1.7×10^7	+	-	<i>L. sakei</i> HSC7	+	-	Am
30		2H3	4×10^6	+	-	<i>L. sakei</i> HSC7	+	-	Am
31		2H4	3×10^6	+	-	<i>L. sakei</i> HSC7	+	-	Am
32		2H5	3×10^6	-	-				
33	3.9	4H1	1.1×10^8	+	-	<i>L. brevis</i> HSC11	+	+	
34		4H2	4×10^8	+	-	<i>L. plantarum</i> HSC6	+	-	-
35		4H3	3×10^8	+	-	<i>L. brevis</i> HSC12	+	+	
36		4H4	1×10^7	+	-	<i>L. sakei</i> HSC13	+	-	-
37		4H5	1×10^7	+	-	<i>L. sakei</i> HSC14	+	-	-
38		4H6	1×10^7	+	-	<i>L. sakei</i> HSC9	+	-	-

3. 장까지 살아가 미생물총 개선 가능성이 있는 유산균의 최종선별

최종적으로 MRS 배지에서 생장이 가능하고 카탈라아제 음성이며 담즙산 분해능이 있고, biogenic amines를 생성하지 않으며 항생제에 내성이 없는 유산균으로 선별된 6개의 strain과 대조균으로써 LGG균을 SSDP(Simulated stomach duodenum passage)방법으로 내산성 및 내담즙성 테스트를 거쳐서 실제로 위액과 담즙을 통과하여 장까지 생존할 가능성이 높은 균을 선별하였다.

SSDP 테스트는 두 차례에 걸쳐 시행되었으며 첫 번째와 두 번째의 시행에서 각각 pH2.4와 pH3.0 의 MRS에서 배양 후 담즙산을 처리하였다 (그림 4, 표 2). 1차 시기의 SSDP테스트에서는 *L. plantarum*의 3가지 strain을 제외한 모든 strain이 측정이 불가능한 범위의 생존률을 보여주었다.

표 2. SSDP test 결과

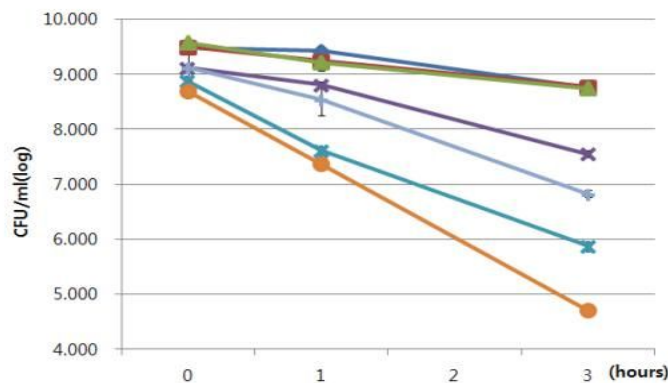
이름	strain명	1차시기(pH2.4) 생존률 (%)	2차시기(pH3.0) 생존률 (%)
1J3	<i>L. plantarum</i> HSC4	8.7×10^{-5}	19.206
1J6	<i>L. plantarum</i> HSC5	1.2×10^{-5}	14.473
2J2	<i>L. sakei</i> HSC8	$< 1 \times 10^{-5}$	0.091
1A3	<i>Leu. meseteroides</i> HSC2	$< 1 \times 10^{-5}$	0.004
1H4	<i>L. plantarum</i> HSC3	1.7×10^{-5}	18.709
4H2	<i>L. plantarum</i> HSC6	$< 1 \times 10^{-5}$	2.769
4H4	<i>L. sakei</i> HSC7	$< 1 \times 10^{-5}$	0.101
4H6	<i>L. sakei</i> HSC9	$< 1 \times 10^{-5}$	0.010
LGG	<i>L. rhamnosus</i> GG	$< 1 \times 10^{-5}$	0.447

그리하여 2차시기의 SSDP테스트의 결과에 따라 생존률이 가장 높은 *L. plantarum* HSC4와 *L. plantarum*외의 종(species) 중에서 가장 높은 생존률을 보인 *L. sakei* HSC7을 동물실험에 가장 적합한 유산균주로 선택하였다.

4. 백김치에서 분리한 기능성 유산균주를 이용한 동물실험 (1세부)

기능성 및 안전성이 확보된 *L. plantarum* HSC4와 *L. sakei* HSC7을 C57BL/6 쥐에 60% 고지방 식이와 함께 1×10^8 CFU/day 로 20ul의 PBS에 섞어서 11주간(4주 고지방식이만 투여 후 7주간 고지방 식이와 김치 분리 유용균 함께 투여함) 투여하였다. 이와 함께 유용균 (probiotic)으로 알려진 *L. rhamnosus* GG 균주를 미생물 대조군으로 사용하였고, 음성대조군으로 PBS(carrier)만을 먹였다.

프로바이오틱스를 이용하여 숙주의 장내 균총을 변화시켜 항비만 효과를 유도할 수 있다는 것은 여러 과학자로부터 제시된 학설로서 특정 질병군마다 장내 균총



	0	pH 3.0에서 1시간	담즙첨가 후2시간
L. plantarum HSC3	9.491	9.423	8.763
L. plantarum HSC4	9.498	9.242	8.777
L. plantarum HSC5	9.579	9.213	8.739
L. plantarum HSC6	9.113	8.814	7.554
L. sakei HSC7	8.872	7.612	5.875
L. sakei HSC9	8.695	7.369	4.702
LGG	9.123	8.541	6.824

그림 4. SSDP 2차시기 (pH3.0에서 1시간 배양 후 담즙과 이자액 첨가하여 2시간 더 배양) 결과. 표의 숫자는 plate counting method로 확인한 균의 CFU/ml

에 차이가 있다는 점에 착안하여 실험이 진행되고 있다. 하지만 본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 프로바이오틱스를 투여한 후 변하는 장내 균총은 대부분 소장 부분에 국한되어 있어 임상실험에서 그 결과를 확인하는데 큰 어려움이 있다. Willem M de Vos 그룹에서 2007년 future medicine 에 게재한 논문에서 (Booijink et al., 2007) 서술한 바와 같이 사람의 소화기관은 총 7m 에 달하며 소장은 위장과 대장 사이에 위치하고 있으며, 그 안의 균총은 사람의 에너지 대사에 매우 중요한 역할을 하지만 표본추출 및 혐기성 조건을 맞추기 어려워 분석에 어려움을 겪고 있다. Jeffrey I. Gordon 그룹에서 2005년 PNAS에 발표한 논문을 인용하자면 (Ley et al., 2005) 마우스 모델의 맹장의 균총을 분석 한 결과 비만 그룹(ob/ob)과 정상 그룹(wild type)간의 장내균총은 비만인 사람과 정상군의 장내 균총 차이와 문 단위에서 유사한 모습을 찾을 수 있었으며 (super kingdom level) 이는 *Bacteroidetes* 문의 감소 그리고 *Firmicutes* / *Bacteroidetes* 문의 증가와 같이 마우스를 사용한 비만 실험에서도 비만인 사람의 장내균총에서와 비슷한 결과가 확인됨을 발표하였다. 2009년 Jeffrey I. Gordon 그룹은 사람의 장내 균총을 무균 쥐의 소화기관에 이식하는 실험을 발표하였고 쥐의 장내균총이 변을 제공한 사람의 장내 균총과 매우 유사해지는 결과를 발표하였다(Turnbaugh et al., 2009). 하지만 아직 쥐에게 먹인 프로바이오틱스가 사람에게서 똑같은 결과를 보일 것이라는 결론은 가정으로 남아있으며 추후 추가적인 실험을 통해 쥐에게서 효과를 보인 해당 균주들이 임상실험에서 동일한 효과가 나타나는지 확인할 필요가 있다. 또 쥐에게 투여한 특정 유산균 종이 해당 모든 종을 대표하는 결과가 아닐 것으로 생각한다(해당 연구에서는 *Lactobacillus plantarum* 과 *L. sakei*). 많은 연구에서 유산균주의 계통 특이적인 효과를 확인한 결과가 발표되고 있으며 (strain specific effect) 아직까지 특정 유산균 종과 비만과의 관계에 대해 고찰 된 연구 결과는 없는 것으로 사려 된다. 2013년 HMP 그룹에서 Nature에 발표한 내용을 인용하자면

균의 분류학적 위치는 해당 균의 역할을 명확하게 구분하지 못하며 분류학적으로 다른 많은 종류의 균이 그 역할을 함께 공유하기 때문에 전체 유전자의 일부분인 16s rRNA를 이용하여 분류된 하나의 분류학적 기준으로 해당 유산균주가 전체 소화기관내에 있는 1000종에 달하는 다른 종류의 균총과 완전히 별개의 역할을 한다고 고려하기 어렵다(The Human Microbiome Project Consortium, 2013). 그 보다는 균끼리의 cross-feeding 또는 여타 균의 생장에 관여하는 환경적 요인을 제공하기 때문에 이러한 항비만 효과가 나타난 것으로 고려하는 것이 더 바람직하다고 사려 된다. *Lactobacillus plantarum* HSC4 와 *Lactobacillus sakei* HSC7은 백김치에서 가장 많은 수로 분리되었다는 점과 각종 in-vitro 실험을 통해 그 안전성과 기능성이 입증되었으며, SSDP 실험을 통해 여타 백김치에서 분리된 유산균주보다 더 많은 수가 위장간 환경을 통과하여 소화기관에 정착할 수 있는 가능성이 확인 되어 선택된 백김치를 대표하는 후보균주라고 가정할 수 있다. 앞으로 추가적인 실험을 통해 다양한 유산균 종이 나타내는 항비만 효과와 생체 지표를 비교 분석하여 한국 전통식품에서 분리된 유산균 종이 가지는 특성을 기록할 필요가 있다고 생각 된다. 임상실험을 통해 유산균주를 사람에게 먹인 후 장내균총의 변화와 항비만 효과를 서술한 논문은 찾을 수 없지만 유산균 종이 사람의 항비만 효과에 미치는 영향에 대해 간접적으로 기술한 연구 결과로는 2009년 Yolanda Sanz 그룹이 obesity journal에 게재한 연구를 예로 들 수 있다(Santacruz et al., 2009). 이 연구 결과를 보면 13~15세 사이의 과체중 청소년들을 대상으로 체중감량 프로그램을 실시한 결과 체중 감소를 보인 모든 그룹의 장내균총에서 유의적으로 유산균의 수가 증가하였으며, 또한 이 중에서도 4kg 이상의 체중 감소를 보인 (고체중감소군) 에서도 유산균주의 수가 체중 감소 프로그램 실행 전보다 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 이렇듯 아직 그 메커니즘에 대한 이해가 부족하지만 유산균주가 숙주의 장내 균총 중에서 체중의 감소와 연결된 에너지 대사 경로의 일부분에 관여하는 바가 있을 것으로 추측 된다. 항 비만 효과가 지질 대사 과정 중 어떤 경로와 관련이 있는지는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각되며 Soares et al., 2005에서 기술 한 바와 같이 젖산의 증가가 부수되었는지는 추후 연구를 통해 확인할 필요가 있다고 생각된다. 본 연구에서 확인된 짧은 사슬 지방산의 증가가 유산균주의 섭취와 관련되어 있다는 근거는 추가적인 메타트랜스크립토믹스 연구를 통해 확인 할 수 있을 것으로 추측 된다. 대표적인 짧은 사슬 지방산인 아세트산, 부티르산의 혐기성 발효 생산에 관여하는 유전자인 butyryl coA transferase(BCoAT)와 formyltetrahydrofolate synthetase(FTHFS)의 발현양을 추가

적으로 확인 할 필요가 있다고 생각된다(Cho et al., 2012). 식이섬유 함유량이 적은 고지방 식이군에서 유산균을 투여했을 때 대조군에 비해 유의적으로 짧은 사슬 지방산이 증가 한 것은 식이에 포함된 식이섬유만의 효과라고 볼 수 없다고 고려 된다.

L. plantarum HSC4과 *L. sakei* HSC7 또는 이 둘을 섞어서 투여한 그룹 모두에서 유의적 또는 현저한 무게 차이가 확인 되었으며(그림 5), 이러한 무게 감소는 정 소지방 및 내장 지방에서도 확인 할 수 있었다(그림 6).

또한 CT촬영을 통한 지방 분포와 총 지방량을 비교에서 유산균을 투여한 모든 그룹에서 피하지방과 내장지방이 모두 감소하였음을 다시 한 번 확인하였다. CT 촬영은 Siemens사의 Inveon micro PET-CT를 사용하여 촬영하였으며(그림 7, 8), Inveon software를 사용하여 내장지방과 피하지방 볼륨(mm³)을 자동으로 계산하였다(그림 9, 표3). CT 사진상 Mix 그룹의 지방량이 비교적으로 많은 것으로 계산 되었지만 이는 CT 기기의 오작동으로 측정 날짜가 2주 연기 되었고, 그 기간 동안 Mix 그룹의 체중이 급격하게 증가함으로 초래되었다.

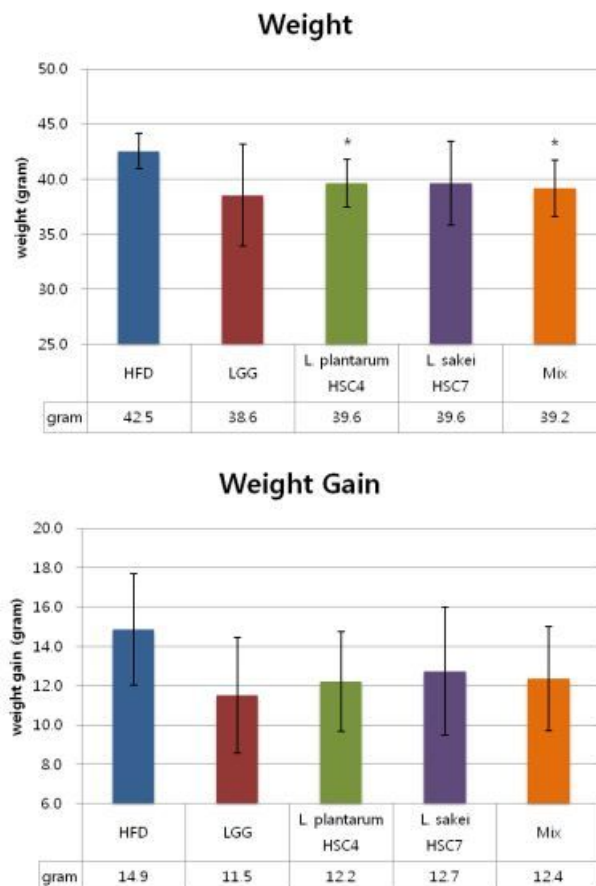
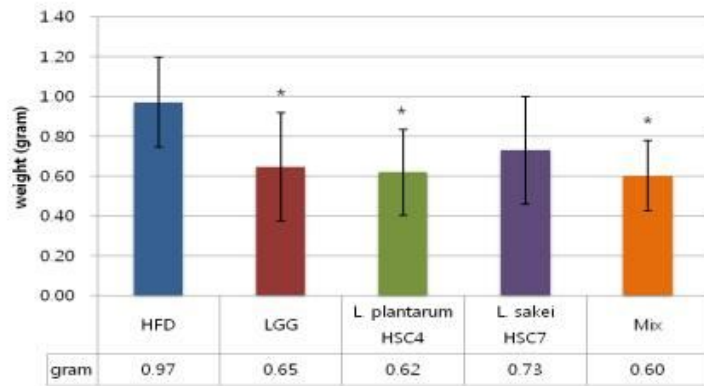
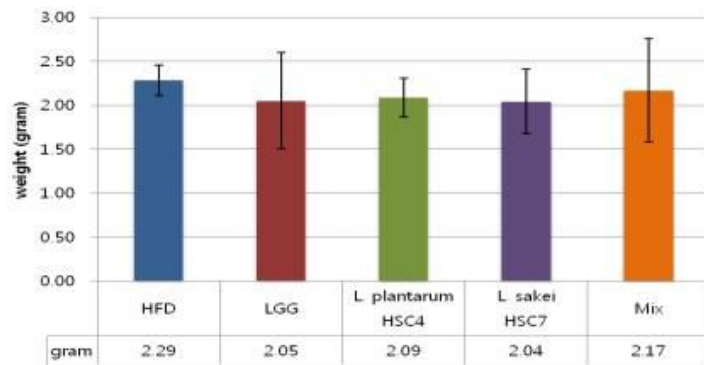


그림 5. 최종 쥐의 무게 및 증가량. 모든 그룹은 고지방식이(60%)와 함께 HFD:PBS; LGG:*L. rhamnosus* GG; 시험군:*L. plantarum* HSC4, *L. sakei* HSC7 또는 그 둘을 혼합한 Mix 형태로 총 4+7주간 투여하였다. 통계치(parametric t test)는 HFD그룹과 비교함. *=P<0.05; **=P<0.01.

Mesenteric Adipose Tissue (MAT)



Epididymal Adipose Tissue (EAT)



MAT + EAT

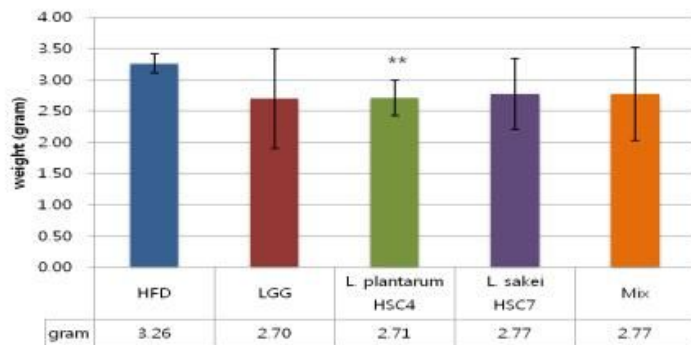


그림 6. 최종 쥐의 지방량. 모든 그룹은 고지방식이(60%)와 함께 HFD:PBS; LGG:*L. rhamnosus* GG; 시험군:*L. plantarum* HSC4, *L. sakei* HSC7 또는 그 둘을 혼합한 Mix 형태로 총 4+7주간 투여하였다. 통계치(parametric t test)는 HFD그룹과 비교함. *=P<0.05; **=P<0.01.

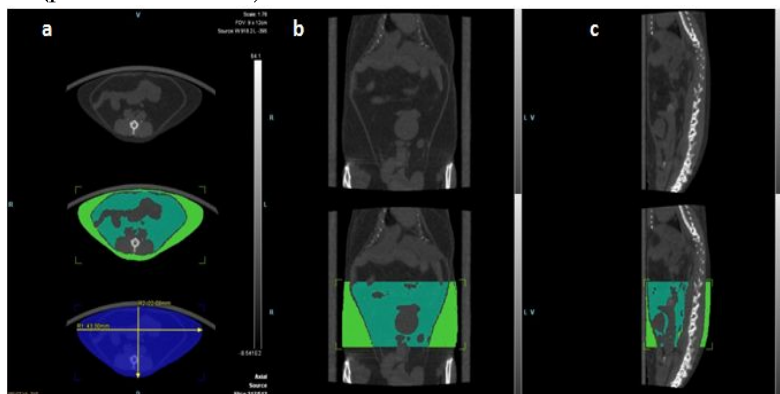


그림 7. 고지방식이와 PBS를 투여한 대조군의 CT촬영 사진. 안쪽 녹색부분이 내장지방, 바깥쪽

연두색 부분이 피하지방이다. 쥐의 횡단면(a) 몸통의 전면(b) 및 측면(c)의 단면 사진. Inveon 프로그램을 이용하여 각 위치의 횡 단면 사진에서 빛의 투과율에 따라 구분된 지방 영역을 전면과 측면으로 적분하여 내장지방과 피하지방의 면적을 3차원 volume(mm³)으로 계산하였다.

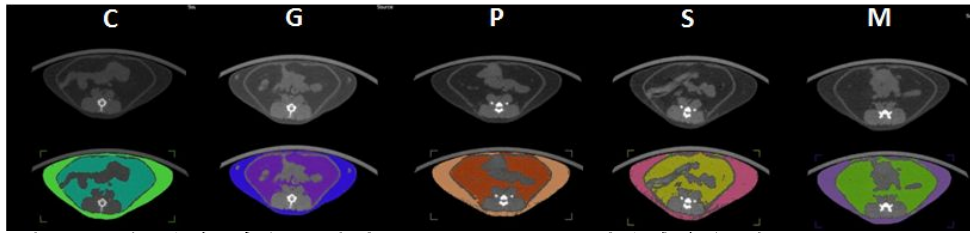


그림 8. 각 그룹별 쥐의 횡단면 사진. 모든 그룹은 고지방식이와 함께 C: PBS; G: *L. rhamnosus* GG; P: *L. plantarum* HSC4; S: *L. sakei* HSC7; M: *L. plantarum* HSC4 + *L. sakei* HSC7.

표 3. CT 촬영 후 inveon software를 통해 계산된 지방 볼륨.

volume (mm ³)	Total Fat	Total Fat / Total volume	Subcutaneous Fat	Subcu. Fat / total volume	Visceral Fat	Visceral Fat / Total volume
LFD	3525.5	39.9%	1362.8	15.4%	2162.7	24.5%
HFD	8888.8	67.3%	3723.8	28.2%	5165	39.1%
LGG	7457.2	57.9%	2962.9	23.0%	4494.3	34.9%
<i>L. plantarum</i> HSC4	7200.3	58.9%	2825.9	23.1%	4374.4	35.8%
<i>L. sakei</i> HSC7	7275.8	56.2%	3092.9	23.9%	4182.9	32.3%
Mix	8484.6	62.5%	3633.2	26.7%	4851.4	35.7%

Calculated fat volume

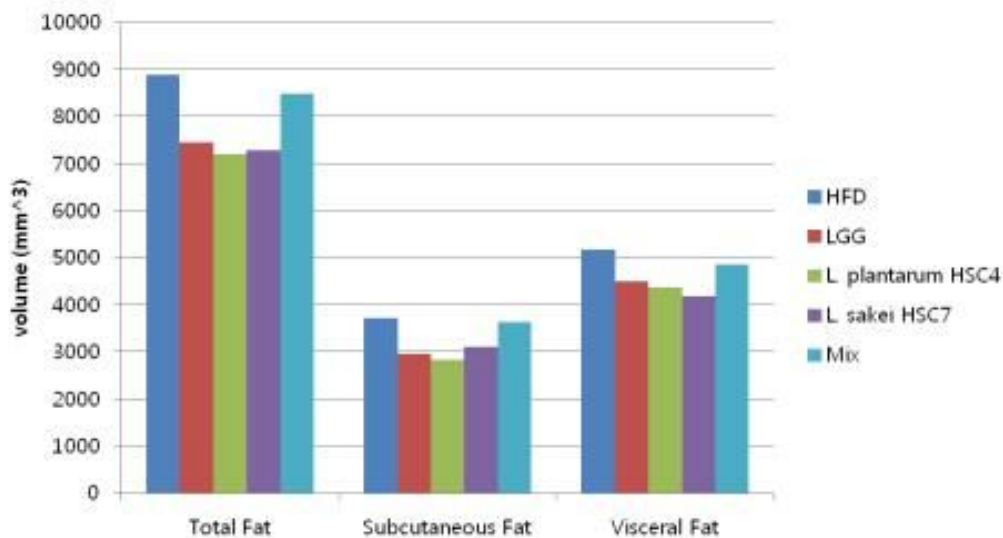


그림 9. CT 촬영 후 inveon software를 통해 계산된 지방 볼륨.

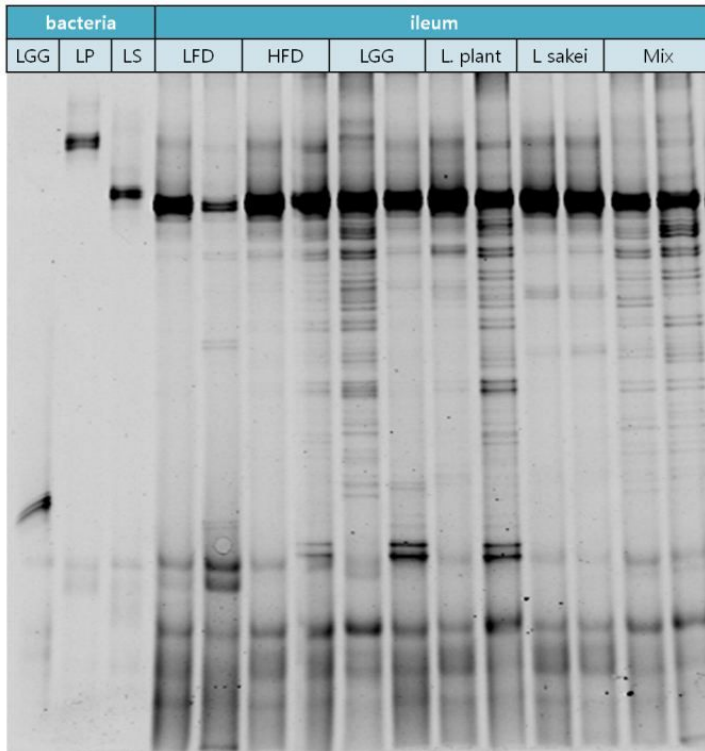
5. 백김치에서 분리한 유산균을 먹인 쥐의 장내 미생물총 변화 조사(1세부)

5-1 DGGE를 통한 장내균총 분석

동물실험 시 취한 변 샘플과 실험 종료 후 쥐를 희생하여 취한 소장(ileum)에서

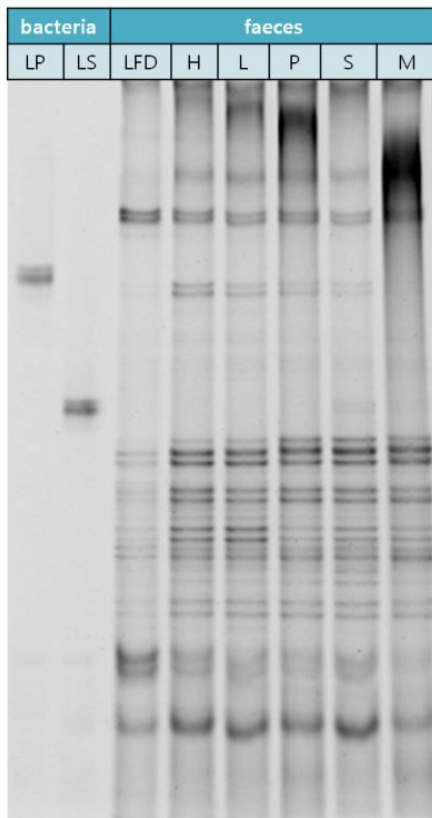
박테리아의 ribosomal RNA를 추출하여 DGGE를 이용해 장내 미생물총의 변화를 확인하였다. 균질화된 각 샘플 내 박테리아의 세포벽을 beadbeating을 이용하여 파쇄한 후에 RNA를 추출하여 박테리아 mRNA를 포함한 전체 RNA를 얻고 이로부터 제작된 cDNA에 GC clamp가 달린 universal bacterial primer로 PCR한 증폭산물을 DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)로 확인 하였다. 농도 구배가 연속적으로 이루어져있는 DGGE gel상에서 서로 다른 염기서열의 DNA fragment는 각기 다른 위치 즉 다른 Urea 농도에 검출 된다. 미생물의 genomic DNA가 아닌 ribosomal RNA를 통한 장내 균총 분석은 1998년 Zoetendal et al., 의 논문에서 기술된 바와 같이 장내 균총 중에서도 활동성이 있는 균을 중심으로 분석이 가능하며 더 유의적이고 객체별로 연관성이 높은 장내 균총의 분석이 가능하다고 알려져 있다.

고지방식이를 섭취한 대조군 그룹과 유산균을 먹인 그룹을 비교하였을 때 유산균을 먹인 그룹에서 소장 내 미생물총의 다양성이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 장내 균총의 다양성 증가는 건강의 중요한 인자로서 the human microbiome project consortium에서 2012년에 nature에 게재한 논문에서 밝힌바와 같이 건강한 사람의 장은 그렇지 않은 사람에 비해 미생물의 다양성이 높고 이는 여러 환경적 또는 항생제와 같은 외부의 간섭에 더 안정적으로 대처가 가능하며 항상성 유지에 도움이 된다고 알려져 있다. 소장내 미생물의 다양성 증가에 반해 변 샘플에서의 미생물총을 확인하였을 때 대조군과 실험군 간에 큰 변화가 없는 것을 확인하였다(그림 10,11). 이는 유산균 섭취는 대장보다는 소장에서 더 큰 활성을 갖는다는 것을 의미하며 현재 많은 장내 균총 연구가 샘플 표본 채취의 용의성 때문에 변에서 확인되고 있지만 전통 발효 식품 섭취를 통한 장내균총 변화를 확인하기 위해서는 소장에 더 집중해야 함을 확인시켜주는 결과이다.



LGG: *L. rhamnosus* GG
LP: *L. plantarum* HSC4
LS: *L. sakei* HSC7
LFD: low fat diet
HFD: high fat diet + PBS
LGG high fat diet + LGG
L.plant: high fat diet + LP
L.sakei: high fat diet + LS
Mix: mixture of LP and LS

그림 10. 각 그룹 간 소장 내 미생물총 비교. 소장에서 추출한 박테리아 유전자와 함께 각 그룹에 투여한 유산균에서 추출한 유전자도 같이 DGGE하여 그 band를 비교하였다.



LP: *L. plantarum* HSC4
LS: *L. sakei* HSC7
LFD: low fat diet
H: high fat diet + PBS
L: high fat diet + LGG
p: high fat diet + LP
S: high fat diet + LS
M: mixture of LP and LS

그림 11. 각 그룹 간 변 샘플 내의 미생물총 비교. 변 샘플에서 추출한 박테리아 유전자와 함께 각 그룹에 투여한 유산균에서 추출한 유전자도 같이 DGGE하여 그 band를 비교하였다.

5-2 Quantitative Real Time PCR 을 이용한 장내균총 분석

DGGE를 통해 균총의 다양성을 확인할 수 있지만 균주의 수는 계측하기 어렵다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 qRT-PCR을 이용하여 비만의 지표가 되는 미생물 그룹을 상대정량으로 확인하였다. Ji et al.,의 논문과 위의 DGGE에서 확인한 바와 같이 유산균의 섭취는 소장 내 microbiota의 변화 유발에 더 유의적이므로 소장내 균총의 수를 qRT-PCR로 정량하였다(그림 12).

소장내 총균수는 백김치에서 분리한 유산균 섭취시 약간 감소하는 경향을 보였다. *Firmicutes* 또는 *Bacteroidetes* 와 체중감소의 상관 관계를 규명하기를 어려워 보였다. Ley et al., 이 2005년 PNAS 논문에서 설명한 비만의 microbiota 척도로 알려진 *Firmicutes* / *Bacteroidetes* ratio를 계산하여 유의성이 가장 뚜렷한 내장지방량과 비교해 본 결과 장내 균총과 내장 지방의 상관관계를 유추할 수 있었다. (그림 13).

또한 Ji et al., 의 논문에서 비만과 관계가 있다고 알려진 *Clostridium* cluster XIVab 와 체중 증가량 또는 내장지방의 상관 관계를 분석하였다 (그림 14).

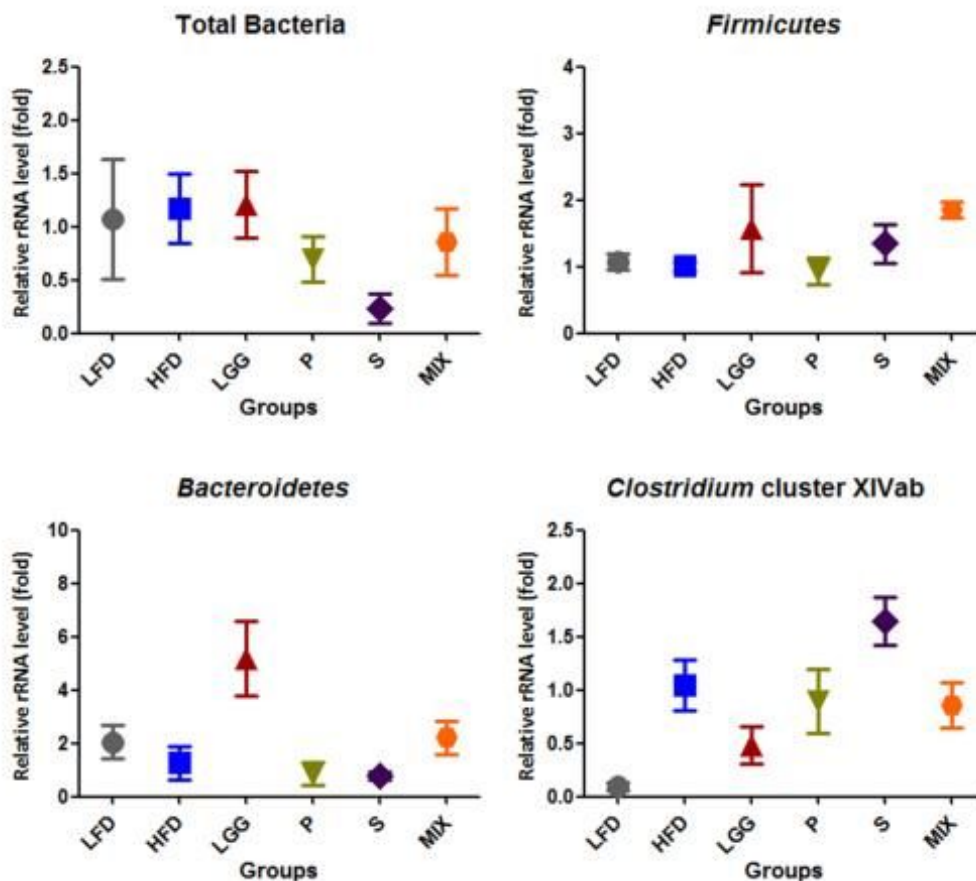
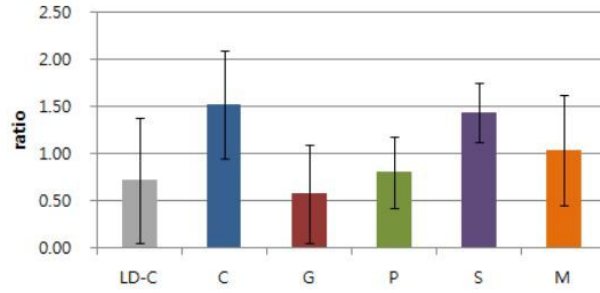


그림 12. qRT-PCR을 통해 확인한 장내 균총의 수. Firmicutes, Bacteroidetes, Clostridium cluster XIVab는 total bacteria의 CT 값을 housekeeping으로 사용하여 delta delta CT 방법을 이용하여 상대 정량 하였다.

Firmicutes / Bacteroidetes



Firmicutes/Bacteroidetes : Mesenteric Adipose Tissue

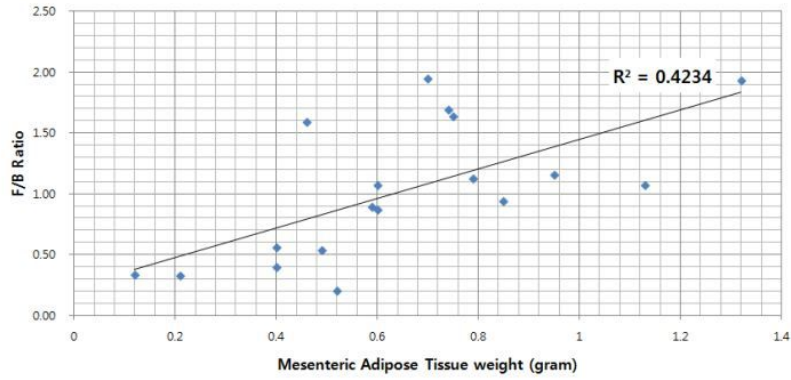
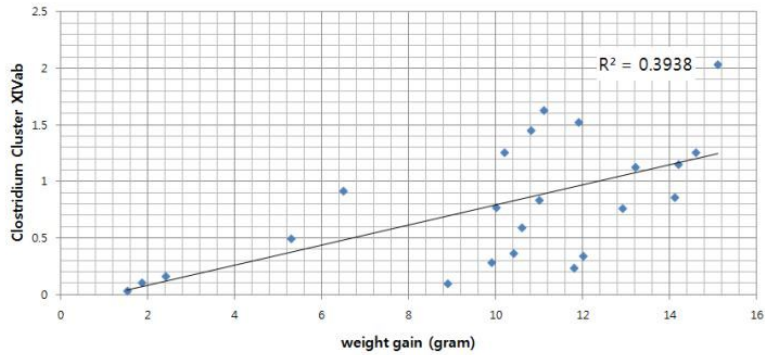


그림 13. Firmicutes / Bacteroidetes ratio와 MAT의 관계.

Weight gain : Clostridium XIV



Mesenteric Adipose Tissue : Clostridium XIV

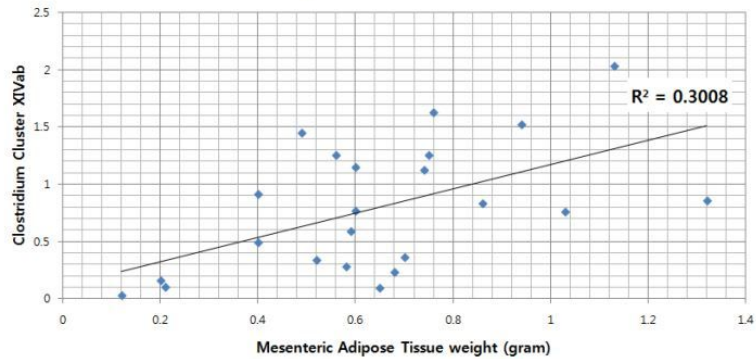


그림 14. Clostridium cluster XIVab 그룹과 내장 지방 또는 체중증가량의 상관 관계..

위 그래프에서 보는 바와 같이 쥐의 체중 증가량 또는 내장 지방량의 증가는 장내 균총 중에서도 특이적으로 *Clostridium* cluster XIVab 그룹과 상관관계가 있는 것으로 확인되었다.

6. 백김치 유래 유산균을 먹인 쥐의 생체 지표 변화 조사(1세부)

유산균을 먹인 그룹과 대조군간의 무게와 지방량 차이에 대하여 좀 더 조사해 보기 위하여 추가 실험을 진행하였다.

6-1. 혈액 내 생체지표

혈액분석기를 통하여 대사관련, 간기능 등(표 4.)을 확인한 결과 대사관련 인자들의 유의적인 감소가 확인되었다. 중성지방의 수치에는 유의적인 변화가 없었지만 김치유래 유산균을 먹인 그룹의 혈청에서 감소하는 경향을 보였으며 혈중 콜레스테롤 농도 및 혈당 수치는 백김치 분리 유산균을 먹인 그룹에서 유의적으로 감소하였다. 특히 대표 유용균으로 전 세계에서 널리 시판되는 LGG균보다 김치 유래 유산균을 투여하였을 때 더욱 큰 효과를 확인 할 수 있었다(그림 15).

표 4. 혈액분석기를 통해 확인한 생체 지표 결과.

a. 대사관련 지표

	mg/dL	Glucose	TG	Cholesterol	HDL	LDL
LFD		103.3 ± 20.8	103.3 ± 46.2	113.3 ± 5.8	23.3 ± 20.8	6.7 ± 5.8
HFD		237.5 ± 9.6	105.0 ± 12.9	202.5 ± 23.6	50.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
LGG		200.0 ± 49.7	107.5 ± 29.9	165.0 ± 34.2	47.5 ± 5.0	5.0 ± 5.8
<i>L. plantarum</i> HSC4		187.5 ± 23.6	87.5 ± 17.1	162.5 ± 15.0	45.0 ± 5.8	5.0 ± 5.8
<i>L. sakei</i> HSC7		157.5 ± 18.9	85.0 ± 23.8	152.5 ± 27.5	45.0 ± 5.8	7.5 ± 5.0
Mix		177.5 ± 22.2	92.5 ± 9.6	152.5 ± 29.9	45.0 ± 5.8	2.5 ± 5.0

b. 간기능 관련 지표

	U/L	Total Protein	ALT	AST
LFD		5.7 ± 0.6	53.3 ± 20.8	643.3 ± 55.1
HFD		6.0 ± 0.0	97.5 ± 72.7	595.0 ± 557.2
LGG		6.0 ± 0.0	90.0 ± 69.8	757.5 ± 716.4
<i>L. plantarum</i> HSC4		5.5 ± 0.6	55.0 ± 57.4	360.0 ± 447.6
<i>L. sakei</i> HSC7		6.0 ± 0.0	97.5 ± 67.0	665.0 ± 629.8
Mix		5.5 ± 0.6	40.0 ± 14.1	230.0 ± 178.3

c. 그 외

	Uric Acid (mg/dL)	LDH (U/L)	Creatine kinase (g/L)
LFD	3.3 ± 3.1	1835.0 ± 987.8	30733.3 ± 20464.1
HFD	5.0 ± 1.8	1594.8 ± 1529.8	27025.0 ± 30437.1
LGG	4.8 ± 1.5	2073.8 ± 1708.1	33647.5 ± 37433.3
<i>L. plantarum</i> HSC4	3.3 ± 0.5	1575.3 ± 1558.1	16825.0 ± 30698.2
<i>L. sakei</i> HSC7	3.8 ± 1.0	1563.0 ± 877.9	32087.5 ± 35628.9
Mix	3.8 ± 0.5	469.8 ± 272.2	5300.0 ± 6563.3

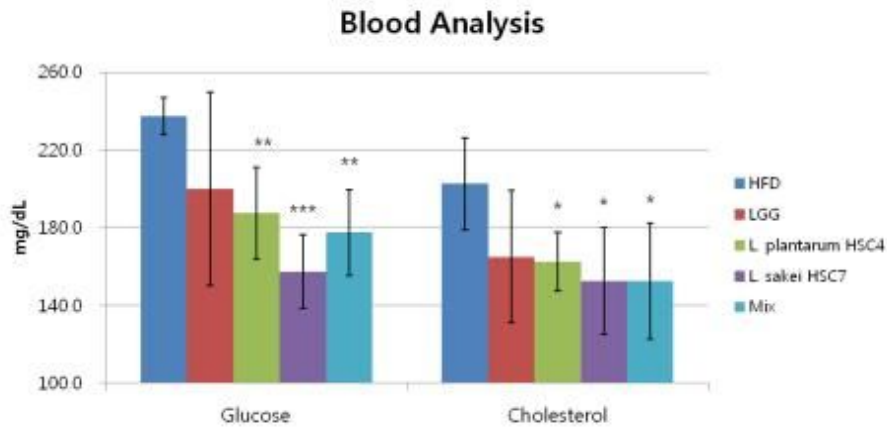


그림 15. 혈액 분석기를 통한 혈중 혈당 및 콜레스테롤량 측정 결과.

7. 유산균 섭취가 변에서의 Short Chain Fatty Acid에 미치는 영향 (1세부)

다음으로 비만 또는 건강상의 지표가 될 수 있는 짧은사슬지방산(SCFA)의 변화를 Gas Chromatography를 이용하여 쥐의 변에서 확인하였다(그림 16). Schwartz et al., 2009의 연구에 의하면 비만 환자의 대장내 SCFA의 양은 일반인에 비해 유의적으로 높았다. 하지만 Conterno et al., 2011 에 의하면 대장내 SCFA의 증가가 비만 환자들에서 나타나는 현상이기는 하지만 다른 한편으로는 SCFA는 장세포의 성장 발육인자임과 동시에 신진대사 조절인자 이기 때문에 SCFA 와 비만, 신진대사 조절에 대한 추가적인 연구가 필요함을 피력하고 있다. SCFA 중에서도 가장 중요한 지방산은 acetic, propionic, butyric acid 이고 이중 butyric acid는 대장내 점액질 생성 및 대장세포 성장인자에 관여하며, acetic acid는 acetyl-coA와 fatty acid synthase(FAS)를 통한 드노보 리피드 생성 및 간에서의 콜레스테롤 생성에 관여하며, propionic acid 의 증가는 리피드 생성을 저하시키는 걸로 알려져 있다. 특히 Favier et al., 1995의 논문을 인용하자면 acetic acid와 propionic acid의 비율이 신진대사 과정에서 지방 및 콜레스테롤 합성에 아주 중추적인 역할을 한다고 기술하였다. 본 연구진의 실험에서 확인된 acetic acid와 propionic acid 의 비율을 계산한 결과 (그림 17) 고지방식이만을 섭취한 대조군에 비해 비율이 유의적으로 증가한 것을 확인하였고, 이는 Favier et al.,의 논문에서 확인한 바와 같이 혈중 콜레스테롤의 저하와 지방 생성을 저하시켰을 것이라 예상한다.

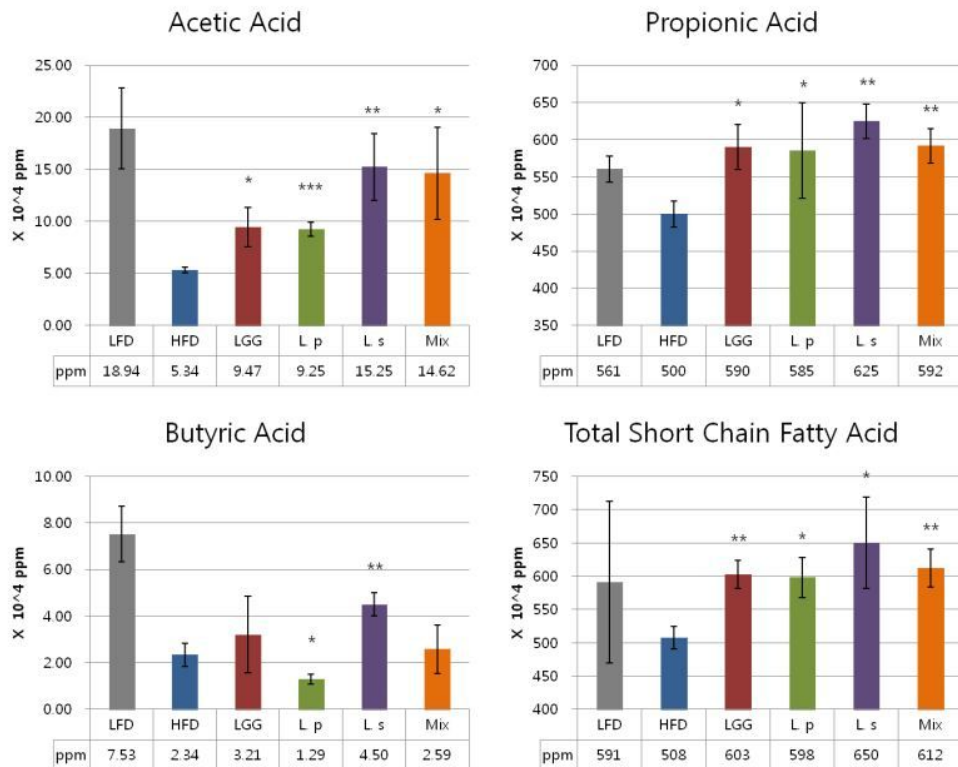


그림 16. 변에서 GC를 통해 확인한 SCFA의 양. 유의성은 parametric t test를 이용해 HFD 과의 비교수치로 계산되었다. *=p<0.05; **=p<0.01

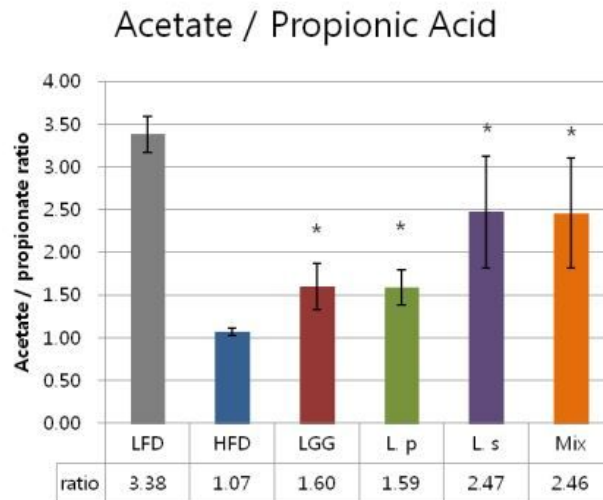


그림 17. Acetic acid / propionic acid 의 비율. 유의성은 parametric t test를 이용해 HFD 과의 비교수치로 계산되었다. *=p<0.05; **=p<0.01

또한 소장내 균총의 변화와 변에서의 SCFA의 변화의 상관관계를 분석하기 위하여 장내 균총의 상대적 정량값과 SCFA의 절대치를 비교 분석한 결과 Acetate와 Propionate 의 비율이 소장내 Firmicutes의 관계성이 확인되었다. 또한 혈중 glucose 농도와 Acetate / propionate 비율을 비교분석한 결과 매우 유의적인 상관관계가 확인되었다(그림 18).

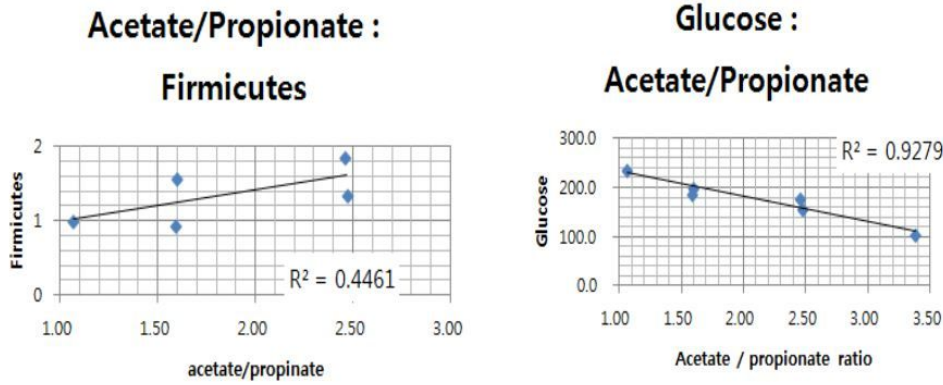


그림 18. 순서대로 Acetate / propionate 와 Firmicutes, glucose와의 관계 그래프.

8. 유산균 투여에 따른 신진 대사 관련 인자 변화 관찰 (3세부)

8-1 유산균 투여가 간과 지방조직에서 지방 합성과 지방산 산화 관련 유전자 발현에 미치는 영향

선별한 균주를 투여한 쥐에서 일어난 체중 감소 효과의 메커니즘을 파악하기 위해 간과 내장 지방조직에서 지방대사와 관련된 유전자들의 발현량을 real time PCR 분석을 통해 비교하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* GG와 *L. plantarum* HSC4, 그리고 *L. plantarum* HSC4와 *L. sakei* HSC7를 섞어서 투여한 쥐의 간에서는 지방산 산화와 관련된 유전자들인 Acyl-CoA oxidase(ACOX), Carnitine palmitoyltransferase 1(CPT1), Peroxisome proliferator-activated receptor alpha(PPAR- α)의 발현이 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이와 더불어 *L. rhamnosus* GG와 *L. plantarum* HSC4을 투여한 그룹에서는 지방산 합성과 관련된 유전자들인 Acetyl-CoA carboxylase(ACC), Fatty acid synthase(FAS), Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) 의 발현도 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나, *L. sakei* HSC7를 투여한 그룹과 *L. plantarum* HSC4와 *L. sakei* HSC7를 섞어서 투여한 그룹에서는 차이를 나타내지 않았다.

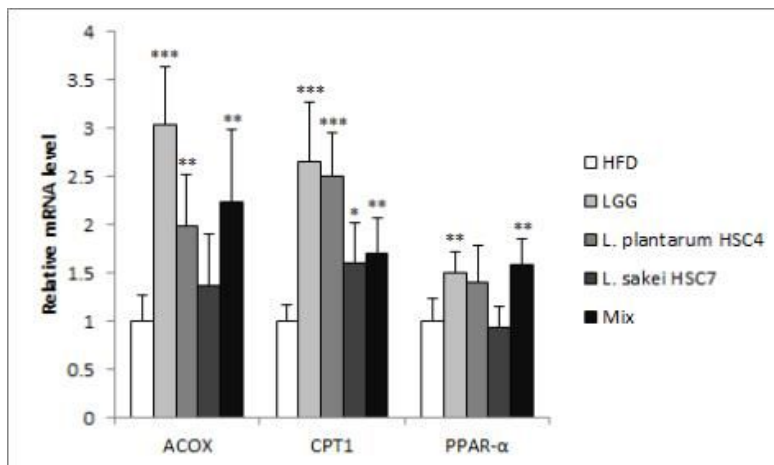


그림 19. 고지방 식이 급여 마우스에서 유산균 투여에 의한 간에서의 지방산 산화 관련 유전자

들의 발현 변화. 선별한 균주를 12주차 투여 후 쥐를 희생하여 채취한 간으로부터 Tri-reagent를 이용해 total RNA를 추출하고 Realtime RT-PCR 분석을 통해 유전자 발현을 확인하였다. HFD; high-fat diet only, PBS; phosphate-buffered saline, LGG; *L. rhamnosus* GG, Mix; *L. plantarum* HSC4 +*L. sakei* HSC7. HFD 그룹과 비교하여 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (n=6)

내장 지방조직에서는 지방산 산화와 관련하여 *L. plantarum* HSC4를 투여한 그룹에서 PPAR- α 의 유의적인 증가를 확인하였다. 지방산 합성과 관련하여서는 *L. rhamnosus* GG를 투여한 그룹과 *L. sakei* HSC7를 투여한 그룹에서 FAS의 발현이 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였다. 반면 예상과 달리 *L. plantarum* HSC4와 *L. sakei* HSC7를 섞어서 투여한 그룹에서 FAS의 발현이 유의적으로 증가함을 관찰하였다.

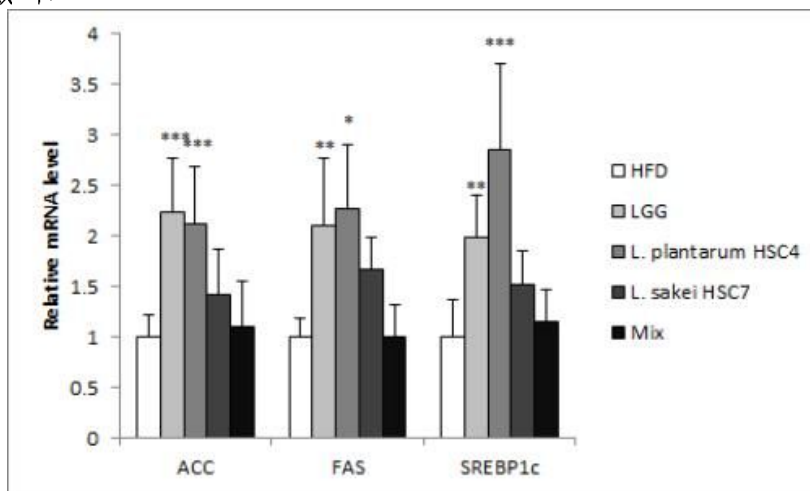


그림 20. 고지방 식이 급여 마우스에서 유산균 투여에 의한 간에서의 지방산 합성 관련된 유전자들의 발현 변화. 선별한 균주를 12주차 투여 후 쥐를 희생하여 채취한 간으로부터 Tri-reagent를 이용해 total RNA를 추출하고 Realtime RT-PCR 분석을 통해 유전자 발현을 확인하였다. HFD; high-fat diet only, PBS; phosphate-buffered saline, LGG; *L. rhamnosus* GG, Mix; *L. plantarum* HSC4 +*L. sakei* HSC7. HFD 그룹과 비교하여 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (n=6)

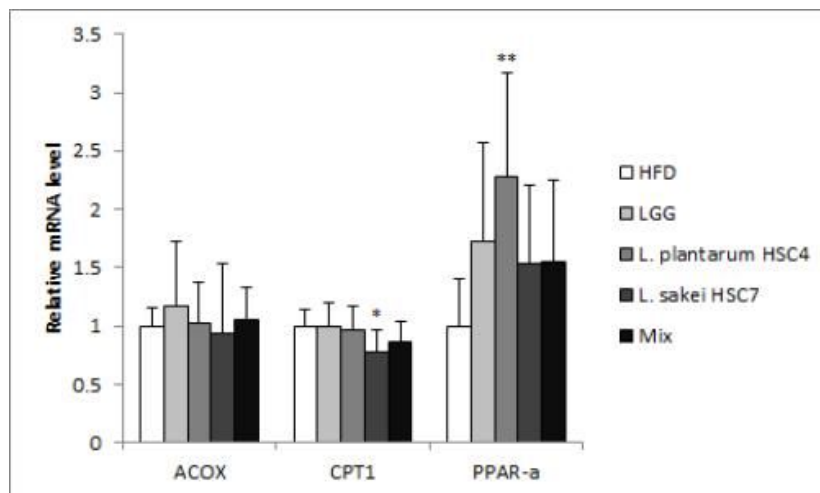


그림 21. 고지방 식이 급여 마우스에서 유산균 투여에 의한 내장 지방에서의 지방산 산화 관련된 유전자들의 발현 변화. 선별한 균주를 12주차 투여 후 쥐를 희생하여 채취한 내장 지방으로부터

Tri-reagent를 이용해 total RNA를 추출하고 Realtime RT-PCR 분석을 통해 유전자 발현을 확인하였다. HFD; high-fat diet only, PBS; phosphate-buffered saline, LGG; *L. rhamnosus* GG, Mix; *L. plantarum* HSC4 +*L. sakei* HSC7. HFD 그룹과 비교하여 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (n=6)

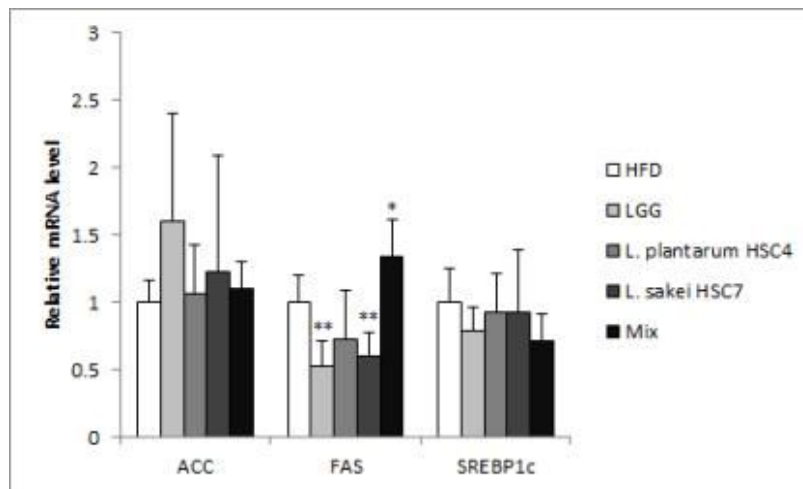


그림 22. 고지방 식이 급여 마우스에서 유산균 투여에 의한 내장 지방에서의 지방산 합성 관련된 유전자들의 발현 변화. 선별한 균주를 12주차 투여 후 쥐를 희생하여 채취한 내장 지방으로부터 Tri-reagent를 이용해 total RNA를 추출하고 Realtime RT-PCR 분석을 통해 유전자 발현을 확인하였다. HFD; high-fat diet only, PBS; phosphate-buffered saline, LGG; *L. rhamnosus* GG, Mix; *L. plantarum* HSC4 +*L. sakei* HSC7. HFD 그룹과 비교하여 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (n=6)

8-2 유산균 투여가 혈청내 leptin과 adiponectin 수치에 미치는 영향

유산균 투여에 의한 간과 내장 지방에서의 지방 대사 관련 유전자 발현 변화를 설명하기 위해 지방 조직에서 분비되는 adipokine의 변화를 관찰하였다. Leptin은 지방조직에서 분비되어 식욕을 억제하고 에너지 대사를 촉진시키는 기능을 갖는 adipokine이다. 지방조직의 크기가 증가함에 따라 leptin의 분비도 증가하지만 비만한 사람은 leptin에 대한 저항성이 생겨 혈중 leptin의 수치는 높게 유지되고, 이 때문에 비만의 marker로서 활용된다. 에너지 대사를 촉진시키는 또 다른 adipokine인 adiponectin은 에너지 대사를 조절하는 중추적인 기능을 하는 AMPK를 활성화시켜 지방의 산화를 촉진시키는데, leptin과 반대로 비만도가 증가함에 따라 혈중 수치가 감소한다. 이들 adiponectin의 수치를 ELISA를 측정하여 비만도의 확인과 유산균 투여에 의한 체중감소의 메커니즘을 파악하고자 하였다. Leptin의 경우 *L. plantarum* HSC를 투여한 그룹과 *L. plantarum* HSC4와 *L. sakei* HSC7를 섞어서 투여한 그룹에서 대조군에 비해 유의적인 감소를 확인할 수 있었다. Adiponectin의 경우 *L. rhamnosus* GG를 투여하 그룹과 *L. plantarum* HSC4를 투여한 그룹에서 유의적으로 증가하였다.

결론적으로 유산균의 투여는 혈청 내 adiponectin의 수치를 증가시키는데, 간에서 일어나는 지방산 산화 관련 유전자의 발현 증가와 내장 지방에서 지방산 합성 관련 유전자의 발현 감소는 adiponectin에 의해 활성화되는 AMPK의 작용에 의한 것으로 추정되며 이를 통해 유산균 투여에 의한 체중 감소 효과를 설명할 수 있겠다.

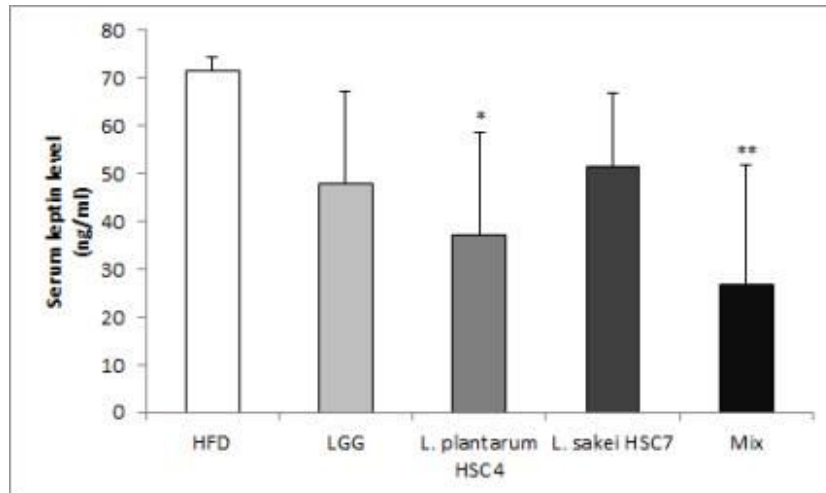


그림 23 쥐의 혈청에서 leptin 수치의 비교. 선별한 균주를 12주차 투여 후 심장 채혈하여 분리한 혈청을 mouse leptin ELISA kit를 이용해 혈청 내 leptin 수치를 분석하였다. HFD 그룹과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 모든 그룹은 고지방식이와 함께 HFD: PBS; LGG: *L. rhamnosus* GG; *L. plantarum* HSC4; *L. sakei* HSC7; Mix: *L. plantarum* HSC4 + *L. sakei* HSC7. $n=4$

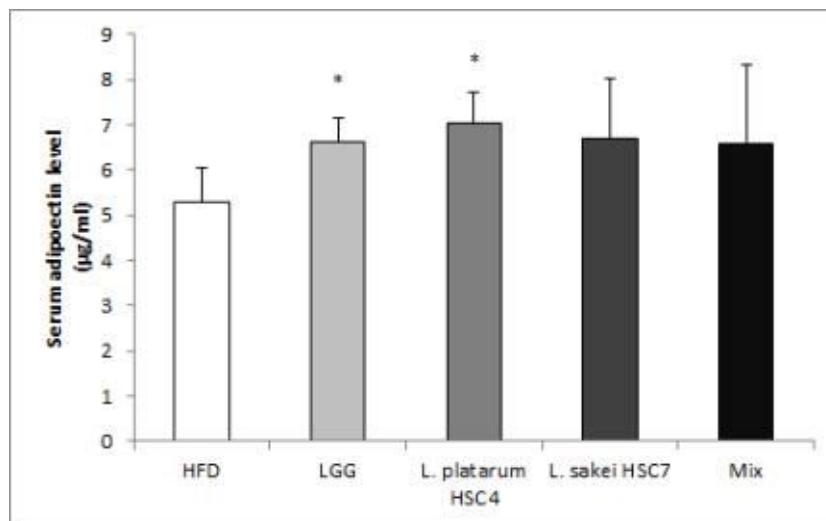


그림 24 쥐의 혈청에서 adiponectin 수치의 비교. 선별한 균주를 12주차 투여 후 심장 채혈하여 분리한 혈청을 mouse adiponectin ELISA kit를 사용하여 혈청 내 adiponectin 수치를 분석하였다. HFD 그룹과 비교하여 * $p < 0.05$ 모든 그룹은 고지방식이와 함께 HFD: PBS; LGG: *L. rhamnosus* GG; *L. plantarum* HSC4; *L. sakei* HSC7; Mix: *L. plantarum* HSC4 + *L. sakei* HSC7. $n=4$

○ 참고문헌

- Booijink, C.C.G.M., Zoetendal, E.G., Kleerebezem, M. and de vos W.M. 2007. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol* 2(3): 285-295.
- Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methe, B.A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z. et al., 2012. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 488: 621-626.
- Conterno L, Fava F, Viola R and Tuohy KM. 2011 Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease? *Genes Nutr* 6:241-260.
- Favier ML, Moundras C, Demigne C and Remesy C. 1995 Fermentable carbohydrates exert a more potent cholesterol-lowering effect than cholestyramine. *Biochim Biophys Acta* 2:115-21.
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Veld JHJH. 1998 Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41:85-101.
- Ji YS, Kim HS, Park HJ, Lee JE, Yeo SY et al., 2012 Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. *Beneficial Microbes* 3:13-22.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P.J., Lozupone, C.A., Knight, R.D. and Gordon J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 11070 - 11075.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
- Rajilic-Stojanovic M., Smidt, H. and de Vos, W.M., 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology* 9: 2125-2136.
- Samuel, B.S. and Gordon, J.I., 2006 A humanized gnotobiotic mouse model of host archaeal-bacterial mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 10011-10016.
- Santacruz, A., Marcos, A., Warnberg, J., Marti, A., Matillas, M.M., Campoy, C., Moreno, L.A. et al., 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 17: 1906-1915.

- Schowiartz A, Taras D, Shafer K, Beijer S, Bos N A, Donus C and Hardt P D., 2009 Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Epidemiology* 18:190-196.
- Soares, A.F., Guichardant, M., Cozzone, D., Bernoud-Hubac, N., Bouzaiou-Tiali, N., Legarde, M. and Geloën, A. 2005. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 38(7): 882-889.
- The Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486: 207-214.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. and Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3: 213-223.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knigh, R. and Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480-484.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith J.J., Rey F.E., Knight, R. and Gordon J.I. 2009. The effect of Diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 11;1(6).
- Zoetendal et al., 1998. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* Oct: 3854-3859

○ 연구성과 및 성과활용 계획

한국 식품문화의 상징이라 할 수 있는 김치와 세계적으로 가장 큰 문제가 되고 있는 비만의 관계성을 과학적으로 입증한다는 것은 한식 세계화 측면에 있어 매우 활용도가 높은 과학적 기반이 될 것이다. 발효 김치를 통한 체지방 감소 연구는 그 동안 잘 알려져 있던 한국인의 날씬한 체형과 맞물려 세계적인 홍보에 큰 시너지 효과를 창출할 것이다.

주 의

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