

11-1543
000-002
151-01

발간등록번호

11-1543000-002151-01

식품산업 활성화를 위한 산업융합을 위한 기반구축 연구 최종보고서

2018

농림축산식품부

고부가가치식품개발사업 R&D Report

식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구 최종보고서

2018. 1. 30.

주관연구기관/ 건국대학교 산학협력단
협동연구기관/ 한국식품연구원
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
가천대학교 산학협력단
(사)한국종균협회
(주)셀바이오텍
(주)충무발효
(주)아람
위탁연구기관/ 전북대학교 병원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반 구축연구”(개발기간 : 2014. 12. 17. ~ 2017. 12. 16.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 1. 30.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단	(대표자) 서정향 (인)
협동연구기관명 : 한국식품연구원	(대표자) 박용곤 (인)
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단	(대표자) 김철현 (인)
가천대학교 산학협력단	(대표자) 황보택근 (인)
(사)한국종균협회	(대표자) 김갑수 (인)
(주)셀바이오텍	(대표자) 정명준 (인)
(주)충무발효	(대표자) 양승준 (인)
(주)아람	(대표자) 박대철 (인)
위탁연구기관명 : 전북대학교 병원	(대표자) 강명재 (인)

주관연구책임자 : 백현동

협동연구책임자 : 임성일

강대경

박영서

김유진

김진웅

김재민

박대철

위탁연구책임자 : 채수완

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	314073-3	해당 단계 연구 기간	최종단계	단계 구분	3단계 / 3단계
연구 사업 명	단 위 사 업	고부가가치식품기술개발사업			
	사 업 명	(해당 없음)			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구			
연구 책임자	백현동 임성일 강대경 박영서	해당단계 참여 연구원 수	총: 60명 내부: 60명	해당단계 연구 개발 비	정부: 600,000천원 민간: 200,000천원 계: 800,000천원
	김유진 김진웅 김재민 박대철	총 연구기간 참여 연구원 수	총: 82명 내부: 82명	총 연구개발 비	정부: 2,000,000천원 민간: 670,000천원 계: 2,670,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	건국대학교 산학협력단 한국식품연구원 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 가천대학교 산학협력단 (사)한국중균협회			참여기업명: (주)셀바이오텍 (주)충무발효 (주)아람	
위탁 연구	연구기관명: 전북대학교 병원			연구책임자: 채수완	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 식품 산업용 균주 연구를 위한 농산물 매개물 및 자연 환경 유래 유용 미생물 확보, 스크리닝 툴의 개발과 가이드라인 구축 2. 식품 산업용 균주의 안전성 및 기능성 평가 시스템 구축 3. 식품 산업용 균주의 용도별 발효 적합성 평가 시스템 구축 4. 식품 산업용 균주 추적기술 개발 5. 식품 산업용 균주 데이터베이스 및 분양기반 구축 6. 식품 산업용 균주 고농도 배양 기술 확보 및 충격 조건 도구 구축 및 사업화 7. 전통발효식품용 종균의 생산 환경 및 제품 적합성 시스템 구축 사업화 8. 건강기능식품용 종균의 생산 환경 및 제품 적합성 검증 시스템 구축 및 사업화 				<p>보고서 면수 803쪽</p>	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> • 나고야 의정서에 따르면 유용한 동물, 식물, 미생물 등을 이용하여 제품을 생산하는 경우 원산지국과 그 이익을 공유하게 됨으로써 유용한 종균의 확보가 절실히함. • 본 과제에서는 한국 전통 발효식품에서 분리한 균주 수집 및 보존, 스크리닝 방법, 발효 적합성, 안전성, 기능성 관련 표준화된 방법을 통해 적합한 균주를 선별하였음. • 유전자 지문 분석을 통한 균주 추적 기술을 개발하였음. • 최적의 저장 방법을 이용해 분리 균주를 저장하고, 보존하면서 분양시스템을 구축하였음. • 선별된 유용균주를 이용해 배양공정을 거쳐 시제품을 생산하였음. 		
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> • 각 협동기관에서 받은 균주 6,087주에 대해 유제품, 건강기능식품, 전통발효식품 종균에 대한 후보 균주를 제공하기 위해 내산·내담즙성, 효소생산능, 정상세포에 대한 세포독성, 장 부착능, 항생제 저항성, protease 활성, amylase 활성 평가를 통해 기초 생리활성이 뛰어난 후보 균주 34주를 각 협동기관에 제공하였음. • 항당뇨 효과(<i>in vivo</i>를 이용한 내당능 개선 효능, 인슐린 저항성 분석), 항비만 효과(<i>ex vivo</i>를 이용한 지방축적 억제능, <i>in vivo</i>를 이용한 체지방 감소)가 뛰어난 <i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41, Ln4를 선별하였음. 또한 면역활성 효과(<i>in vivo</i>를 통한 Th1/Th2 균형 조절 또는 Th2 관련 사이토카인 억제능, 식품 알레르기 억제능)가 뛰어난 <i>L. brevis</i> G1을 선별하였음. • 발효적합성 평가를 통해 향산화 효과를 내는 펩타이드를 생산하는 요구르트용 종균인 <i>Lactococcus lactis</i> SL6, 알코올 생성능이 뛰어난 양조용 종균인 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SJ, TY-2, amylase 및 protease 활성이 뛰어난 전통발효식품용 종균인 <i>Aspergillus oryzae</i> CF1001를 선별하였음. • 전통발효식품 및 프로바이오틱스 제품에 존재하는 해당 균주에 대해 MLST 분석 및 개발한 유전자 지문의 디지털 코드 작성에 의해 균주를 추적할 수가 있음을 확인하였음. • 전통발효식품에서 분리한 균주에 대해 동결건조 앰플 및 초저온냉동고 동결 보존 방법을 통해 이중으로 보존하였으며, 각 협동기관에서 받은 연구결과 데이터를 홈페이지를 통해 제공함으로써 균주 분양시스템을 구축하였음. • 참여기업을 통해 유용성이 입증된 선별된 균주를 이용한 7개의 시제품 생산을 통해 높은 수익 및 다양한 부가 가치를 창출하였음. 		

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 균주 스크리닝 방법을 제시함으로써 추후 타 연구에 활용될 수 있음. • 균주 정보가 입력된 홈페이지를 통한 분양서비스에 의해 부가가치를 창출할 수 있음. • 산업적으로 활용 가능한 균주를 선별하여 제품화시켜 종균 관련 산업에 다양하게 활용될 수 있음. • 향후 종균에 관련된 수입 상당부분 대체함으로써 국내기업의 수익을 좀 더 증가시킬 수 있을 것으로 기대됨. 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>종균</p>	<p>프로바이오틱스</p>	<p>식품미생물</p>	<p>산업화</p>	<p>기반구축</p>

5. 영문 요약문

<SUMMARY>

		코드번호	D-02
Purpose & Contents	<ul style="list-style-type: none"> • According to the Nagoya Protocol, for production of commodities derived from useful animals, plants, and microorganisms, the benefits should be shared with the country of origin in a fair and equitable manner. • In the present study, the strains isolated from Korean traditional fermented foods were collected, preserved, and screened for their physiological properties, safety, functionality, and suitability for fermentation. • A novel strain-tracing technology based genetic fingerprint analysis was developed. • The strains were preserved using optimal storage methods and based on their properties, a strain distribution system has been desired on homepage, which is expected to lead to significant value addition. • By using selected strains, prototypes were made through fermentation system. 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> • Out of 6,087 strains obtained from each cooperative organization, 34 candidate strains with excellent physiological properties were provided to each cooperative organization after evaluation of their acid and bile salt tolerance, enzyme activity, cytotoxicity to normal cells, antibiotic resistance profile, and protease and amylase activities. • <i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41 and Ln4, having excellent anti-diabetic and anti-obesity effects, and <i>L. brevis</i> G1, having potent immuno-modulatory effect were selected after functionality and safety assessment. • <i>Lactococcus lactis</i> SL6, producing antioxidant peptides, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SJ and TY-2, a potent alcohol production activity, and <i>Aspergillus oryzae</i> CF1001, with high amylase and protease activities were selected through fermentation suitability assessment. • Using MLST analysis and genetic fingerprinting, a unique code was developed for the strains present in traditional fermented foods and probiotic products. • The strains isolated from traditional fermented foods were cryopreserved using freeze-dried ampoules and other suitable 		

	<p>cryopreservation methods.</p> <ul style="list-style-type: none"> • The results obtained were updated on the homepage to establish an efficient strain distribution system. • Using the most potent strains, the participating companies manufactured the goods post seven prototypes, which resulted in high profit and value addition. 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> • The study offers an efficient screening method for the strains, which can be utilized for further studies. • The strain distribution system on the homepage can lead to significant value addition. • The selected strains can be commercialized, and can be used by the starter industries. • It is expected that the domestic companies will be able to increase their profits by not relying on imports for starter. 				
Keywords	Starter	Probiotics	Food microorganism	Industrialization	Infra construction

6. 영문목차

< Contents >

1. Outline of R&D project	9
2. Current status of domestic and foreign technical development	42
3. The contents and results of the R&D	48
4. Achievements and contribution of the R&D	734
5. Application plan of the R&D	750
6. Information of abroad scientific technology for conducting project	751
7. Security grade of R&D	762
8. Current status research equipment registered on NTIS	763
9. Safety guideline of laboratory during performing R&D	764
10. Representative achievements of the R&D	768
11. The others	770
12. References	771

<Appendix> Self-evaluated sheet

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	42
3. 연구수행 내용 및 결과	48
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	734
5. 연구결과의 활용계획 등	750
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	751
7. 연구개발성과의 보안등급	762
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	763
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	764
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	768
11. 기타사항	770
12. 참고문헌	771

<별첨> 자체평가의견서

제 1장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1절 연구개발 목적

1. 국내 종균 개발의 필요성 및 잠재력

- 프로바이오틱스 종균 시장이 가장 큰 미국과 유럽의 경우 종균은행을 운영하는 등 균주 기술 개발이 보편화되어 있고, 국내에서도 일동제약의 경우 종균은행을 설립하는 등 프로바이오틱스 종균 관련 연구가 활발히 진행됨에 따라 국내 프로바이오틱스 종균 시장은 연간 10% 높은 성장률을 보이고 있다(산업뉴스, 2017년).
- 국내 발효 종균 시장은 대부분 외국산 제품에 의존하여 사용되고 있으며 된장, 고추장, 술, 식초와 같은 발효 종균의 수입을 대체할 국내 발효 종균을 찾는 것이 필요한 실정이다. 예를 들어, 막걸리의 경우 일제강점기에 들어온 백국균이나 수입 빵 효모를 사용하고 있다(대산농촌문화, 2017년).
- 그러므로 전통발효식품 유래 미생물로부터 유제품, 건강기능식품, 전통발효식품용 국내 종균을 찾고 개발하여 산업에 적용시킬 가능성이 무한하기 때문에 높은 잠재력을 지니고 있다.
- 본 연구의 목표는 국내 자연 유래 균주의 스크리닝, 생리활성의 평가 툴을 개발하고, 국내 자연 유래 균주를 개발한 툴에 적용하여 기존의 산업용 균주보다 우수한 산업용 균주를 제공하고, 활용하고자 한다. 또한 수입에 의존하던 종균을 국산화시키고, 국가별 식품 종균 자원화 경쟁에 대응뿐만 아니라 중장기 산업으로 육성하고자 하였다(Figure 1).



Figure 1. 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반 구축을 위한 연구 체계.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 생물자원에 관한 자원화 경쟁 및 식품 산업용 종균 사업의 필요성

- 2014년 나고야의정서 발효에 따라 생물자원의 이용, 응용 및 상업화 과정에서 발생하는 모든 이익은 상호합의조건(MAT, Mutually Agreed Terms)에 따라 자원을 제공하는 당사국에게 공정하고 평등하게 분배해야 한다. 따라서, 농생물자원 유래 소재의 확보를 위하여, 정책적, 기술적, 경제적 타당성을 가진 생물자원의 확보가 절실하다.
- 국내 식품산업의 다각화, 생명공학의 발달, 정부의 다양한 식품정책에 따라 발효식품의 관심이 높아짐에 따라 발효산업의 모체가 될 수 있는 발효미생물에 대한 중요성이 대두되고 있다.
- 국내 전통식품에서 분리한 발효미생물은 전 세계적으로 기능성, 경쟁에 있어서 무한한 가능성을 가짐으로 생물자원의 확보 및 그 이용을 위한 식품산업 활용 균주의 상용화를 위한 기반 기술이 절실한 시기이다.
- 우리나라의 식품시장의 원료의 다수는 수입에 의존하고 있으며, 특히 기능성 원료 수입 또한 꾸준히 이뤄지고 있다(Figure 2). 유제품 시장, 전통발효식품, 건강기능식품 시장에서도 대부분 수입 종균을 사용하고 있다.

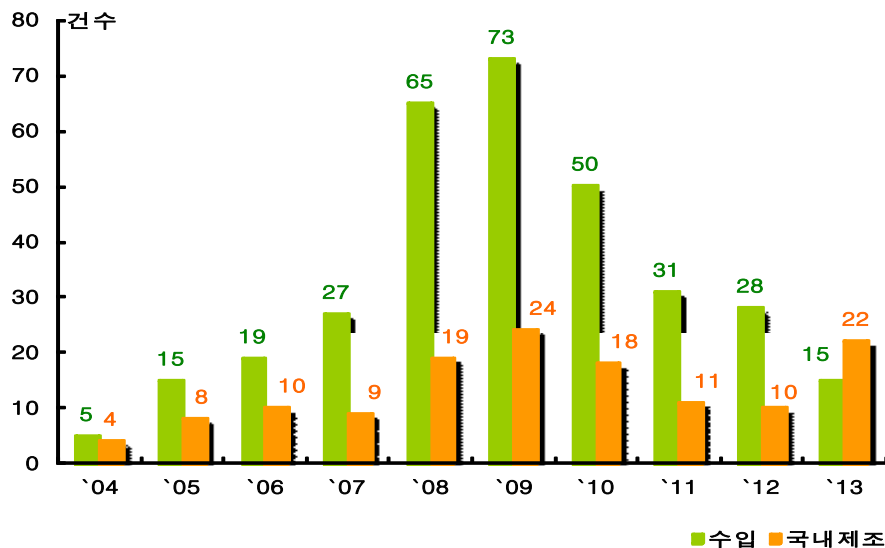


Figure 2. 기능성원료 수입 및 국내 제조.

(출처: 식품의약품안전처, 2014년)

- 또한, 기존의 전통발효식품으로부터 유용 미생물의 분리와 같은 연구는 많이 이뤄져 왔으나, 실험 방법의 다양성, 단순 기초 생리활성 연구에 치우쳐 효율적 상용화를 위한 통합적 연구가 필요함에 따라 표준균주의 도입, 객관적인 실험법, 비교 데이터 풀 구축이 부족한 실정이다. 따라서 본 연구과제에서는 이러한 모든 팀을 구성함으로써, 최종결과까지 달성할 수 있는 유기적인 협동연구 체계를 구축하였다.
- 정부의 식품산업에 대한 투자 증가와 대규모 식품 클러스터 조성에 및 식품 3대 전략의 하나로 전통식품의 상품화를 채택함에 따라 전통발효식품에 숨어있는 무한한 가능성의 식품미생물에 대한 중요성이 대두되고 있다.
- 세계 평균 배양 시장은 미생물의 종류와 지역에 따라 차이를 나타내며, 이들 시장은 2013년에서 2018년 사이에 5.6% 연평균 성장률(CAGR)을 나타내는 것으로 예측되어 진다(Markets and Markets, 2014년).

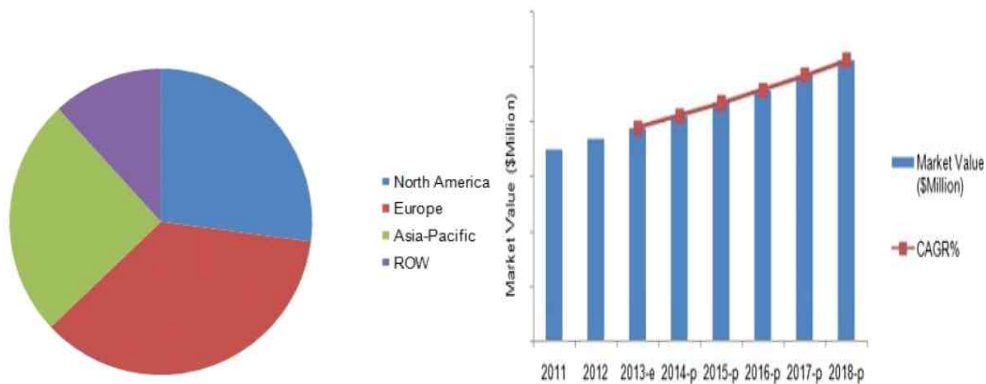


Figure 3. 평균 시장 규모. ROW, rest of the world; e, expected; p, projected.

(출처: Markets and Markets Analysis, 2014)

- 각종 발효미생물에 대한 기능적, 의학적 연구가 진행되고 있으며 미생물에 의해 발효된 식품에게서 새롭게 생성된 물질들에 대한 의학적인 기능 또한 많은 연구에 의해서 밝혀진 바가 많다.
- 간장, 된장: 항암효과, 노인성 치매 예방, 고혈압 예방, 간기능 회복
 - ✓ Jung *et al.* (2006) Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of Doenjang. *Nutrition* 22, 539-545.
 - ✓ Park *et al.* (2003) Antimutagenic effects of Doenjang(Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutat. Res.* 523 - 524, 43 - 53.
 - ✓ Park *et al.* (2000) Inhibitory effect of Doenjang(fermented Korean soypaste) extracts and linoleic acid on the growth of human cancer cell lines. *J. Food Sci. Nutr.* 5, 114 - 118.
 - ✓ Kim *et al.* (2014) Identification and quantification of antitumor thioproline and methylthioproline in Korean traditional foods by a liquid chromatography-atmospheri

- c pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 100, 58-63.
- ✓ Song *et al.* (2014) Anti-colitic effects of Kanjangs(fermented soy sauce and sesame sauce) in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Med. Food* 17, 1027-1035.
- 간장, 된장: 항암효과, 노인성 치매 예방, 고혈압 예방, 간기능 회복
 - ✓ Kwon *et al.* (2009) Kochujang, a Korean fermented red pepper plus soybean paste, improves glucose homeostasis in 90% pancreatectomized diabetic rats. *Nutrition* 25, 790-799.
 - ✓ Shin *et al.* (2012) Diterpene glycosides from Korean fermented red pepper paste (Gochujang) and their origin. *Food Chem.* 130, 1024-1030.
 - ✓ Cha *et al.* (2013) Kochujang, fermented soybean-based red pepper paste, decreases visceral fat and improves blood lipid profiles in overweight adults. *Nutr. Metab.* 10, 24.
 - 청국장: 항암효과, 면역 증강, 혈전 용해 효과, 간해독 기능, 비만 억제 효과
 - ✓ Kwak *et al.* (2007) Higher antioxidant properties of Chungkookjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. *Nutr. Res.* 27, 719-727.
 - ✓ Kwon *et al.* (2010) Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr. Res.* 30, 1-13.
 - ✓ Shon *et al.* (2007) Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of Chungkukjang. *J. Food Compos. Anal.* 20, 113-118.
 - 김치: 소화촉진, 면역 강화, 생체조절 기능, 항암, 항균, 항돌연변이 억제, 항산화 기능, 노화 억제
 - ✓ Kim *et al.* (2011) Fermented Kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. *Nutr. Res.* 31, 436-443.
 - ✓ Lee *et al.* (2014) Effect of baechu Kimchi added *Ecklonia cava* extracts on high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* 19, 170-177.
 - ✓ Lee *et al.* (2014) Immunomodulatory effects of Kimchi in chinese healthy college students: A randomized controlled trial. *Clin. Nutr. Res.* 3, 98-105.
 - ✓ Kim *et al.* (2014) Kimchi protects against azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colorectal carcinogenesis in mice. *J. Med. Food* 17, 833-841.
 - ✓ Yun *et al.* (2014) Kimchi methanol extract and the kimchi active compound, 3'-(4

'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid, downregulate CD36 in THP-1 macrophages stimulated by oxLDL. J. Med. Food 17, 886-893.

- 최근 생활 수준이 높아짐에 따라서 전통발효식품에 대한 관심이 증가하고 있으나, 전통발효식품 내의 미생물에 대한 연구는 주로 특정 미생물에 국한되어 있고 체계적인 연구가 부족한 실정이다.
- 식품산업에서 수입되는 미생물의 대체를 위한 국내 발효식품 유래 종균의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 실정이다.
- 식품산업에 종균의 적용을 위한 미생물 안전성 검사 및 관련 정보의 총체적인 제공을 위한 데이터베이스가 필요한 현실이다.
- 특히, 기능성 식품 분야 있어서의 시험관 수준에서의 평가 단계로 이뤄져 있는데, 본 연구에서는 *in vivo* 모델과 임상실험까지 수행되어짐에 따라 기존의 연구와 차별화되어 있으며, 이에 따르는 다양한 연구자료를 데이터베이스화할 수 있으며, 연구과제에서 개발된 유용 종균은 발효 스타터 및 기능성 소재로서 산업화/제품화 할 수 있다.
- 일본은 JSCC(Japan Society for Culture Collections)의 미생물자원센터를 운영하고 있으며, 미생물의 정보 교환과 미생물 분양 시스템이 구축되어 있다. 현재 24개 미생물 자원은행이 가입되어 있으며, Asahi, Meiji, Kyowa를 비롯한 19개의 식품, 화학, 약품 분야 기업과 연구소가 지원 회원으로 있다. On-line database 홈페이지(http://www.jscc-home.jp/jscc_strain_database.html)를 제작하여 운영 중이며, 8개의 핵심 기관(IFM, JCM, NBRC, NEKKEN, NIAS, NIES, NIRC, RIMD)의 균주 정보를 제공하고 있다(Figure 4).



Figure 4. 일본 미생물자원센터.

- 일본에서 전통발효식품에 사용되는 종균은 종균 제조업체에서 종균협회를 통해 각 개별 제조업체로 공급되는 것으로 파악되고 있다. 각 개별 업체의 제품의 특징과 기호도에 따라 적합한 종균을 주문 생산 또는 개별 주문에 의해 전문 종균업체가 생산하고 발효식품제조업체에서는 자체 균주생산은 하지 않고 최적의 종균을 공급받아 사용하고 있는 실태로 파악된다. 따라서 보다 전문적이고 안정된 종균을 다양하게 공급 받을 수 있는 분업화 전문화된 시스템을 구축하고 있다.
- 또한 종균협회에서는 보다 안정적이고 체계화된 발효식품 발전을 관리할 수 있는 이점이 있다. 그러나 현재 국내에서는 이러한 종균업체의 관리 및 활동이 거의 전무하고 전문 종균 제조업체의 수와 체계적이고 과학적인 종균 제조기술의 미비로 향후 이러한 발효식품 산업에 사용되는 상업용 전문 종균 제조업체의 기술 개발과 체계적인 지원이 절실한 실정이다.
- 우리나라의 경우, 기업체에서 이를 이용할 과학적 근거가 부족한 이유로, 다수 수입 자원에 의존하고 있으며, 최근 들어 자체 개발하여 사용한 사례들이 늘고 있음. (주)프로바이오틱스는 김치유래 식물성 유산균 Probio65가 함유된 2 in 1 유산균 제품 락토피 SP를 출시하였으며, (주)CJ에서는 김치에서 분리한 피부 유산균으로 *Lactobacillus plantarum* CJLP-133를 제품화하여 아토피 치료용 프로바이오틱스를 판매중이다. (주)바이오리듬에서도 김치유산균 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* 혼합균주를 이용한 제품이 시판되고 있다. (주)대상의 경우 장류 개발을 위해 전통장류에서 균을 스크리닝해서 장류 균주 100종류를 확보하고, 1997년부터 제품에 적용하고 있다.
- 자체개발 시스템에서의 문제점은 기능성의 인증 부분과 소요되는 시간과 노동력에 대한 비용이 크다는 점을 들 수 있다. 일본의 미생물자원센터에서처럼 균주의 분리와 특성까지 체계적으로 갖추어져야 할 필요성이 절실하다.

2. 국내 유제품 시장의 현황 및 문제점

- 경제의 발전과 유제품에 관한 국민 의식이 증가함에 따라 1인당 유제품 소비량이 점차 증가하고 있으며 발효유뿐만 아니라 치즈 시장의 규모도 증가하는 추세이다. 발효유의 경우, 2009년까지는 생산량이 감소 추세를 보이다 최근 건강 지향적인 트렌드에 따라 유산균이 풍부한 발효유에 대한 소비가 2009년 이후 크게 증가하고 있다(Table 1). 그러나, (주)한국야쿠르트, (주)파스퇴르, (주)남양유업, (주)매일유업, (주)서울우유협동조합, (주)빙그레, (주)해태, (주)롯데 등의 우리나라 주요 유가공 업체들은 종균으로 Chr. Hansen, Danisco, Marshall, Sodima, Sanofi 등의 국외 업체에서 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

Table 1. 1인당 유제품 소비량

(단위: kg)

		2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	
국내 소비량	총량(톤) ¹⁾	3,036,455	3,171,341	3,517,909	3,358,850	3,582,183	
	1인당 ²⁾	61.74	64.18	70.67	67.17	71.33	
1인당 소비량 ³⁾	시유	백색	28.25	27.56	26.88	28.1	27.72
		가공	6.35	5.65	5.57	5.6	5.8
	발효유	액상	5.34	7.44	7.83	8.77	8.96
		호상	3.6	2.62	2.55	2.26	2.33
	치즈	자연	1.05	1.3	1.47	1.5	1.66
		가공	0.4	0.49	0.53	0.48	0.48

(출처: 농림축산식품부)

¹⁾우유소비량 총량: 국내 원유 생산량+전기이월+수입-수출-재고

²⁾1인당 우유소비량: 국내 우유 소비총량/인구수

³⁾1인당 유제품별 소비량: 유제품별 소비량/인구수

- 그들 중 (주)한국야쿠르트의 경우, 1996년 한국인 장에서 분리한 한국형 비피더스 유산균 'HY8001'을 개발하며 발효유 종균을 국산화하는 데 성공하였다.

3. 전통발효식품 종균시장의 현황 및 문제점

- 전통발효식품에서 사용되는 종균으로는 김치, 된장, 고추장, 막걸리와 같은 주류가 대표적이다. 이 분야에서는 종균을 쓰는 경우와 재래식 방식의 두가지 형태이며, 주류 분야에서는 누룩 종균이 수입에서 차지하는 비중이 매우 높다.




전통발효식품(김치) 관련 종균	누룩 및 곰팡이 관련 종균	한국형 장류 미생물 관련 종균
<p>시장규모 22,777억원</p> <p>성장률: 6.1%</p> 	<p>시장규모: 18,873억원</p> <p>성장률: 6.1%</p> 	<p>시장규모: 82,175억원</p> <p>성장률: 6.1%</p> 

Figure 5. 전통발효식품의 종균 시장 규모.

(출처: bric.postech.ac.kr)

- 장류산업에서 기존의 수입 미생물은 단기간의 발효, 균일한 맛이라는 특징을 갖고 있으나, 이들에 대한 수입 비용, 맛의 특수성의 한계의 단점을 가지고 있다. 따라서 토

중 미생물 종균의 특성, 안전성, 기능성 등의 표준화를 이뤄진다면, 고부가가치 식품으로서의 전환을 통한 경제적 이익 재창출과 수입 미생물의 토종 발효미생물 전환에 따른 수입대체 효과도 기대할 수 있다.

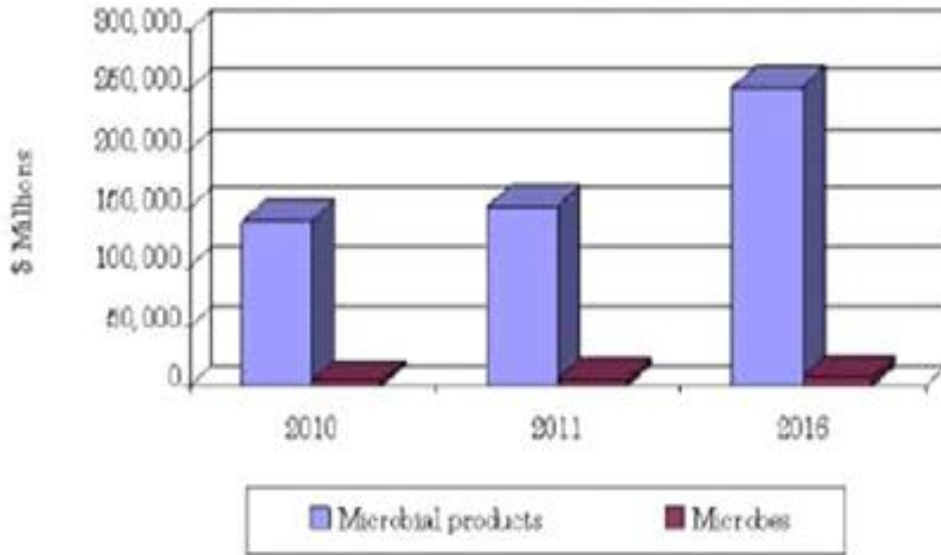


Figure 6. 세계 미생물 및 미생물 제품 시장의 동향.

(출처: 미생물 제품 시장-기술, 응용 및 세계 시장, BCC Research, 2011년)



Figure 7. 국내 농수축산업용 미생물 시장의 동향.

(출처: 미생물제제 산업화 동향 및 발전방향, (주)그린바이오, 2010년)

- 우리나라 전통발효식품 시장 또한 성장 추세이며 전통발효식품의 시장 규모는 약 3조 1천억원으로 전통식품 시장 4.4조원의 약 70%를 차지하고 있는데, 이 중에서 막걸

리, 장류 시장 등이 이를 선도하고 있다. 지난해부터 막걸리의 인기가 지속되고 있는 가운데 국내에서 생산되는 막걸리의 대부분이 일본에서 개발한 입국을 사용하고 있는 것으로 나타난다. 국내에서 생산되는 막걸리의 대부분이 ‘아스퍼질러스 가와치’라는 일본에서 개발한 입국을 사용하고 있다. 입국이 개발된 지 30년이 지나, 특허기간 만료로 로열티는 나가지 않고 있지만 기능성이 추가된 다양한 고품질 막걸리를 개발하기 위해서는 국내 자체 종균 개발이 시급하다.

- 현재 전국 700여개 양조장 중 누룩 등 미생물을 생산하는 국내 업체는 10여개에 불과하며 전통주의 원료가 되는 누룩 수입 규모는 연간 8만 7000달러에 달하는데 비해 국내 누룩 수출 실적은 1만 8000달러 정도로 대단히 미미하다(농림축산식품부 국정감사 자료. 2010.10.04.).
- 위에서 본 사례 외에도 전통발효식품 발효에 이용되는 종균이 대부분 수입 빵효모 등으로 막걸리 제조에 이용되며 대기업에서도 전통 장류발효에 사용되는 균주로 국적이 불분명한 수입종균(일본산 종균) 등이 사용되고 있는 것이 현실이다.
- 그 중에서도 가장 중요한 것이 전통발효식품의 기반이 되는 발효미생물 확보와 효율적 이용이다. 이를 위해 발효미생물 자원의 수집, 분류, 동정 및 종균화 사업과 보급을 통한 전통 발효식품산업의 과학화와 표준화를 이루는 것이 기존의 전통발효식품을 한 단계 더 발전시키는 지름길이다.
- 양조와 관련한 해외 종균협회는 일본, 중국, 미국, 프랑스 등에서 설립되어 있으며, 이들 기관에서 연구와, 종균의 판매까지 이뤄지고 있다.

Table 2. 양조 관련 해외 종균협회 및 종균 연구 사례

연구 수행 기관	연구개발의 내용	연구개발 성과의 활용 현황
일본양조협회	• 청주 효모의 기능을 개선하기 위한 연구	• 협회 6, 7, 9, 10, 11, 14, 15, KArg-9, KArg-901호, 601, 701, 901, 1001 등이 개발되어 시판되고 있음.
중국 안기 효모주식유한회사, 단보리효모공장 등	• 드라이 이스트 산업화 연구	• 주류 양조용 효모의 시장 30억 위안 돌파(2007.10.)
프랑스의 Lesaffre group	• 산업용 맥주효모의 개발 연구 • 원료를 달리한 산업용 증류주 효모의 개발 연구	• 산업용 맥주효모 saflager s-와 saflager w- 등 시판 중 • Home brewing을 위한 safbrew, safale, saflager s- 등 시판 중 • 위스키의 제조를 위한 safwhisky M-1, red star whiskey yeast 등 시판 • 사탕수수를 원료로 럼주 제조를 위한 safsorghum, SPI, SPM 등이 산

		업화
프랑스의 Chr. Hansen사	• 다양한 와인 제조에 적합한 와인 효모 연구	• 와인의 type에 따라 Merit, Harmony, Symphony, Rhythm, Melody, Noble 등의 효모들 시판
미국의 Vitamet	• 프로바이오틱스 효모의 개발 연구	• 현재 <i>S. boulardii</i> 균체를 이용한 캡슐이 개발되어 시판 중
네덜란드의 DSM	• 포도 원료에 따른 와인 효모 개발	• <i>S. cerevisiae</i> <i>Fermivin, collection cepage @ Syrah</i> (시라 와인 제조에 적합한 효모) 등 18종의 와인효모 시판
캐나다의 Lallemand 사	• 와인 제조에 적합한 와인효모의 개발	• 40여종의 와인효모를 시판 • 특수 목적 7종의 불활성화한 와인효모 시판
영국의 Brewing Research Foundation	• 맥주효모의 유전자 재조합	• 유전자 재조합효모를 이용한 맥주 생산 허가 신청 중
기타 와인효모 주요 종균 제조국	• 와인효모의 종균화	• 국가별 주요 회사는 러시아 21개, 우크라이나 20개, 벨라루스 9개, 폴란드 7개, 아르헨티나 5개 등의 와인효모 종균업체가 있음.

- 국내 종균 보유기관과 업체는 경북대학교 발효생물공학연구소, 농촌진흥청, 생명공학연구소, (주)충무발효 등으로 알려져 있으며, 주류업체 외의 기관에서는 산업화 과정에서 매우 미진한 실정이다.

Table 3. 국내 주요 종균 보유기관 및 업체 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용 현황
한국종균협회	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 환경으로부터 신규 미생물 자원 분리를 통한 다양성 연구 • 미생물 자원의 유전학적 분석 및 보존 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 균주의 보존기능 • 외국 균주의 확보 및 배포
경북대학교 발효생물공학연구소	<ul style="list-style-type: none"> • 전통주 효모 및 와인 효모의 다양성 연구 • 효모의 단포자 분리기술 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 현재 연구 단계에 있고 산업화 추진 예정

농촌진흥청	<ul style="list-style-type: none"> • 농업 환경으로부터 미생물 자원의 다양성 연구 • 농업 미생물 균주의 확보 및 보존 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 균주의 보존기능 • 외국 균주의 확보 및 배포
한국생명공학연구원	<ul style="list-style-type: none"> • 극한 미생물의 분리 및 동정 연구 • 발효 미생물 균주 확보 및 보존 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 균주의 보존 기능 • 외국 균주 확보 및 배포
(주)국순당, 배상면 주류연구소	<ul style="list-style-type: none"> • 전통주의 복원 및 발굴 • 전통주의 대규모 산업화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 백세주 등 약주의 상품화
(주)충무발효	<ul style="list-style-type: none"> • 전통 발효식품의 제조를 위한 우수 종균 개발 • 전통주 제조용 중국과 양조용 효모 제조 및 판매 	<ul style="list-style-type: none"> • 백국, 황국 및 황국균 중국 • 탁주용 정제효소

- 유용 발효 미생물 탐색 및 자원화, 전통 장류 식품 현대화 및 우리 술 복원사업과 산업화 연구를 추진하고 있다. 전통 발효식품 산업화를 위해서는 미생물, 효소, 발효제 등에 대한 기초 연구와 인프라 구축이 중요하다. 현재 대부분의 종균이 수입되고 있는 상황이므로 산업적 가치가 우수한 토착 발효미생물을 선별하여 종균화하는 사업이 더욱 중요하다.

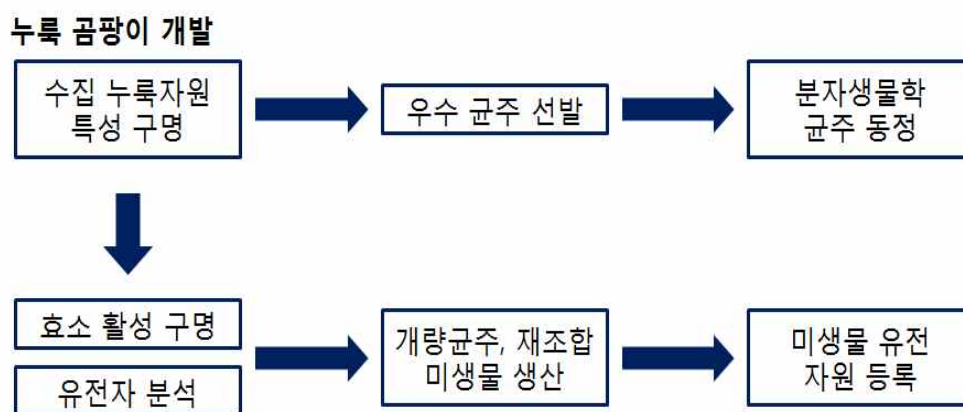


Figure 8. 전통발효 균주의 종균화 및 개발 방향.

4. 건강기능식품의 현황 및 문제점

- 식약처에 따르면 '13년 건강기능식품 총 생산액은 1조 4천820억원으로 '12년의 1조 4천91억원에 비해 5% 증가하였다. 수출은 754억원으로 '12년(584억원)보다 29% 늘어났고, 수입도 3천854억원으로 '12년(3천 532억원)보다 9% 증가하였다(메디파나뉴스, 2014. 08. 06.).
- '13년 국내 건강기능식품 시장규모(생산+수입-수출)는 '10년 1조 2천804억원, '11년 1조 6천855억원, '12년 1조 7천39억원에 이어 지속적인 성장세를 유지하였음. 수출은 754억원으로 '12년(584억원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3천854억원으로 '12년(3천532억원)보다 9% 증가하였다.
- 국내 건강기능식품 중 프로바이오틱스가 차지하는 비중이 5%(804억원)에 육박하였으며, 전년 대비 55% 증가하며 성장을 주도하였다.

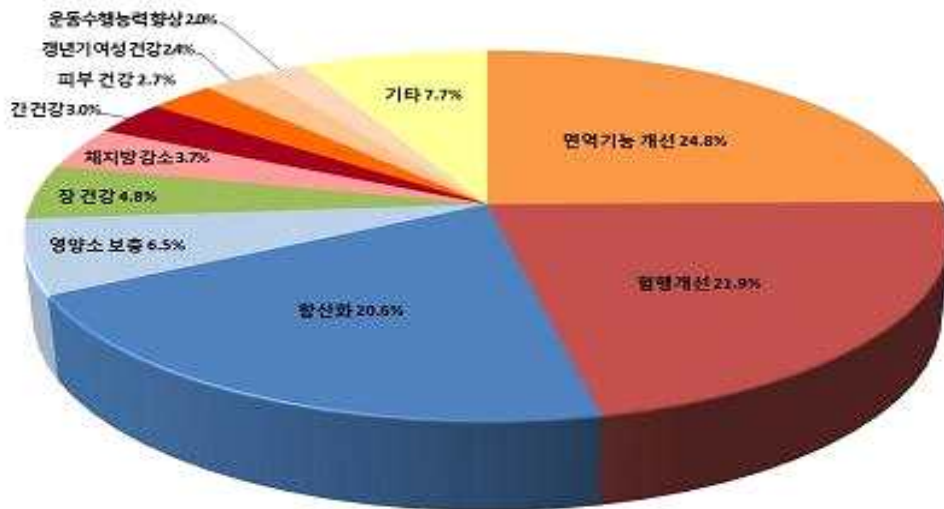


Figure 9. 기능성별 건강기능식품 2013년 생산 실적(점유율).

(출처: 프로바이오틱스. 백수오 건강기능식품 성장 주도)

- 프로바이오틱스의 국산화는 (주)셀바이오텍, (주)비피도, (주)프로바이오틱 등에 의해 이루어지고 있으며, 이 분야에서도 수입이 차지하는 비중이 더 큼. 최근 구강 냄새 제거, 장 건강으로 각광을 받고 있는 VSL#3의 경우, 미국 직배송으로 한달치 가격이 138,000원으로 고가에 해당하며, 이러한 제품을 국산 제품으로 대체한다면 고부가가치 산업으로 발전 가능성은 충분히 크다.



Figure 10. 직배송 수입되고 있는 프로바이오틱스 제품.

(출처: <http://www.vsl3.com/>)

- 소비자들의 건강 지향성에 힘입어 프로바이오틱 생균제는 앞으로도 더욱 각광을 받을 것으로 보인다. 향후 프로바이오틱스 시장을 주도하는 유산균 제품은 고기능성 및 다기능성 의약식품(medifoods)으로 발전할 전망이므로, 이에 부응하는 제품 제형 개발이 필요한 실정이다.
- 제조원가를 낮추기 위한 원재료의 개발, 고농도 배양법 개발, 동결건조 시 생균의 사멸률 최소화 및 유통 과정에서 생균 보호를 위한 부형제의 배합 기술이 발전이 이루어 져야 한다.
- 분말이나 타정 등 프로바이오틱스 제품 제조과정에서 마찰이나 혼합, 압력, 열 등 여러가지 공정 변수가 수반되는데 프로바이오틱스 사멸률 최소화를 위한 공정 조건 개발이 필요하다.
- 프로바이오틱을 포함한 건강기능식품의 효능 표시에 대한 보다 전향적인 정책으로 수입품과의 경쟁을 향상시키는 정책이 매우 절실하다.

5. 식품산업용 균주의 안전성 평가 시스템

- 유발효식품, 장류 등의 발효식품군은 국민 다소비 식품으로 발효식품의 발효과정 중 유해 물질이 생성 될 수 있으나, 국내의 경우 이에 따른 체계적인 연구가 부족한 실정이다.
- 주로 알콜음료, 김치류 및 발효유제품 등에서 발생될 수 있는 유해 물질인 ethyl carbamate(EC, urethane)는 쥐, 햄스터, 원숭이 등의 포유동물을 대상으로 진행된 실험에서 발암성이 입증되어 국제암연구센터(IARC)로부터 인간에게 암을 일으킬 수 있는 물질 Group 2A의 발암물질로 분류되어 있다(Agents classified by the IARC monographs, <http://monographs.iarc.fr/eng/classification/index.php>). 이에 캐나다, 미국, 체코, 독일 등 여러 국가에서 아래와 같이 EC에 대한 권장 규격을 제시하고 있으나 국내에는 권장 규격이 없으며, 잔류 분석기술이 확립되지 않은 실정이다.

Table 4. 국가별 주류 제품의 ethyl carbamate에 대한 권장 규격

Country	Ethyl carbamate concentration µg/L in legislation				
	Wine	Fortified wine	Distilled spirits	Sake	Fruit brandy
Canada	30	100	150	200	400
USA	15	60			
Czech Republic	30	100	150	200	400
France			150		1000
Germany					800

(출처: The EFSA Journal. 2007. 551, 1 - 44)

- 바이오제닉 아민 역시 발효식품에서 발생할 수 있는 유해 물질로서 발효에 관여하는 미생물들에 의한 유리 아미노산의 탈탄산화 반응에 의해 생성되는데, 바이오제닉 아민 중 histamine은 호흡곤란, 발열홍조, 발한, 심계항진, 두통 및 두드러기를 tyramine은 고혈압 및 편두통을 유발하는 것으로 알려져 있다(Trends Food Sci. Technol. 1995. 6, 341-346); Kor. J. Food. Sci. Technol. 2006. 39, 541-545). 이로 인해 미국 FDA는 수산물에서 histamine 50 mg/kg, tyramine 100 mg/kg, 총 바이오제닉 아민 1000 mg/kg을 수산식품의 잔류 허용 기준으로, EU에서는 histamine 100 mg/kg, 총 바이오제닉 아민 300 mg/kg을 수산식품의 잔류 허용 기준으로 제안하고 있으며, 바이오제닉 아민 생성에 관여하는 탈탄산효소 활성을 가지는 *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. 등의 균주가 발효식품에서 다수 분리됨에 따라 식품 전 분야에 걸친 바이오제닉 아민의 안전성 평가에 관한 연구가 진행 중임. 그러나 아직 국내에서는 바이오제닉 아민 관련 기준이 마련되어 있지 않다.

6. 식품산업용 균주의 기능성 평가 시스템

- 현재 식품산업용 균주 중 기능성을 인정받아 고시형 건강기능식품으로 이용가능 균주는 19종이다. 고시형 균주의 경우 주로 장 건강과 관련한 균주들로 다양한 기능성이 연구되고 발표되었으나, 건강기능식품으로 인정받고 있는 기능성은 ‘유익한 유산균 증식, 유해균 억제 또는 배변활동 원활’이라는 카테고리로 인정을 받고 있다. 개별인정형 건강기능식품으로 이용되고 있는 것은 균주는 2014년 10월 기준 11종이며, 장 건강 도움 1 건, 면역과민반응 4 건, 여성 질건강 1건, 알레르기 질환 1건, 고혈압 1 건, 혈행 개선 1건, 체지방 감소 1건, 노화 1 건으로 기능성 용도별로는 면역질환 개선 및 장 건강과 관련한 기능성 균주가 50% 이상의 점유율을 보였다. 균주 타입별로는 균은 10, 사균 1건으로 국내의 경우 생균 형태의 제품 등록이 90% 이상을 차지 있다(원료별 정보, <http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/>). 이는 ‘유익한 유산균 증식, 유해균 억제 또는 배변활동 원활’이라는 고전적인 probiotics의 health benefit의 개념이 점차 다양한 질환군으로 확대되고 있다는 것을 의미하므로, 이에 따른 질환별 적절한

기능성 평가법 구축이 필요하다고 생각된다.

- 장내미생물은 병원성 세균의 침입 억제, 장 표피세포의 손상 방지, 지방 축적 조절, 비타민 K 생산, 철분 흡수, 장 점가의 면역 증강 및 담즙산 대사 등 인체의 전반적인 대사 과정 및 생리작용에 직접적인 영향을 주고받고 있으며(Nature, 2007. 449, 804-810), 대사증후군, 장염, 대장암, 아토피, 알러지 등 인체의 다양한 범위의 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 이러한 장내 미생물의 형성은 식품의 섭취와 밀접한 관련이 있으며(ISME J. 2011. 5, 220-230), 특히 미생물을 공급원이 되는 발효식품과의 상관관계가 높을 것으로 생각된다. 따라서 식품산업용으로 이용하는 균주는 장내 미생물의 형성, 정착에 미치는 영향이 큰 환경적 요인으로 생각되므로, 식품산업용 미생물의 기능성 평가는 식품 산업용 균주의 용도 적합성을 설정하는데 꼭 필요한 과정일 것으로 생각된다.
- 국내의 경우 기능성 평가 식품의약품안전처 건강기능식품기준과에서 발간한 기능성 평가 가이드라인(건강기능식품기준과, 식품의약품안전처, 2012년), 기능성 평가 플랫폼 기능성평가 라이브러리(<http://hfplatform.kfri.re.kr/>)를 통해 기능성 평가를 위한 질 환별 바이오마커 설정이 이미 완료 되어있으며, 이를 바탕으로 기능성 평가 가이드라인을 제시하고 있으나, 탐색고자 하는 원료의 특성이 고려되어 있지 않다. 미생물의 경우 일반적인 기능성 원료와는 달리 생균, 사균, 추출물, 발효대사물 등 다양한 형태로 제공될 수 있으므로 각 원료 특징에 적합한 기능성 평가 시스템을 구축하는 것이 필요하다. 이에 본 과제를 통해 미생물의 제공 형태 및 용도에 따른 최적 기능성 평가 시스템을 구축하고자 한다.

7. 미생물 추적 시스템 개발 현황

- 미생물의 추적 시스템(tracking system)은 분자생물학적 기법을 사용한 유전자 지문 분석법(genetic fingerprinting)을 사용하여 개발할 수 있다.
- 현재까지 개발된 미생물 유전자 지문분석법은 자연계에서 미생물의 다양성을 연구하기 위한 분석 도구로 사용되고 있으며, 수질 등의 오염원을 파악하기 위한 미생물 오염원 추적(microbial source tracking, MST) 등에 사용되고 있다.

Table 5. 미생물 오염원 추적 방법의 분류

Library-dependent		Library-independent	
Culture-dependent		Culture-independent	
Phenotypic	Genotypic	Phenotypic or Genotypic	Genotypic
<ul style="list-style-type: none"> • Antibiotic resistance • Carbon utilization 	<ul style="list-style-type: none"> • Rep-PCR • PFGE • Ribotyping 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteriophage • Bacterial culture 	<ul style="list-style-type: none"> • Host-specific bacterial PCR • Host-specific viral PCR

			<ul style="list-style-type: none"> • Host-specific quantitative • PCR
--	--	--	---

- 또한 식중독 미생물 등의 병원성 미생물 판별이나, 항생제 내성 유전자 검출 (antibiotic resistance analysis, ARA), 유전자 재조합 미생물(genetically modified microorganism, GMM)의 검출 등에 이용되고 있다.
- 한편, 미생물의 염색체 DNA에 특정 염기서열을 암호로 지정하여 인위적으로 삽입 또는 치환하는 DNA cryptography 법이 일부 개발 중에 있으나 이는 미생물의 유전자를 변형시키는 유전자 변형 미생물이 되므로 식품 미생물에는 적용할 수 없는 단점이 있다.
- 현재까지 개발된 미생물 유전자 지문분석법은 다음과 같다.

Table 6. 미생물 유전자 지문분석법

분석법	분석 내용	장점	단점
Ribotyping	미생물의 16S rRNA 유전자를 제한효소로 절단한 후 생성된 DNA 단편의 패턴을 southern blot을 실시하여 분석함.	재현성이 높음.	방법이 복잡하고 비용이 많이 들며 실험자간에 방법이 상이함. 데이터베이스가 요구됨.
Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	미생물의 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 전기영동을 실시하여 DNA 단편의 패턴을 분석함.	미세한 유전적 차이도 구분하고 재현성이 높음.	분석시간이 장시간 요구되고 다량의 시료를 동시에 분석하기가 어려움. 데이터베이스가 요구됨.
PCR-denaturing-gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)	16S rRNA 유전자 또는 16S~23S rRNA intergenic spacer 구역을 PCR로 증폭시킨 후 증폭한 DNA의 변성 특성을 이용하여 denaturing-gradient gel 전기영동에 의한 DNA 밴드 패턴을 분석함.	Strain 특이성이 매우 높음.	실험자의 숙련도가 높아야 하고 다량의 시료를 동시에 분석하기가 어려움. 데이터베이스가 요구됨.
Repetitive DNA sequences (rep-PCR)	미생물 genomic DNA 상에 존재하는 반복 서열을 PCR로 증폭한 후 전기영동에 의해 DNA band 패턴을 분석함.	조작이 간편하고 신속함.	재현성이 높지 않고 데이터베이스가 요구됨.
Terminal restriction fragment	형광으로 말단 표지한 PCR amplicon을 제한효소로 절단하여 패턴을 분석함.	미생물 배양이 필요 없고 데이터베이스를 요구하지	고가의 장비가 요구되고 실험자의 숙련도가 요구됨.

length polymorphism analysis (T-RFLP)	없음.
---------------------------------------	-----

- DNA fingerprint의 경우 아직까지 광범위하게 채택되고 있는 표준화된 기술이 없으며, 실험실 간 혹은 실험실 내에서도 재현성 있는 결과를 얻기가 힘든 단점이 있다.
- 또한 분석 기술의 정밀성과 정확성도 실험 방법, 실험실, 실험 재료에 따라서 매우 차이가 나며, 실험 방법에 따라 결과를 얻기까지 장시간 소요되는 단점이 있다.

8. 오믹스(omics) 기반 기술의 중요성

- 유전체학, 단백질체학, 대사체학 등으로 대표되는 오믹스 분야는 최근 10여년동안 이를 지원하는 기기와 주변 기술의 발달로 생물학 분야의 중요한 기술로 발전해 왔다. 다양한 생명 현상을 개별 요인들의 독립적인 작용으로 설명하고자 하였던 기존의 연구 방식을 뛰어 넘어 상호 연관되어 있는 관계들을 종합적으로 이해하고자 하는 방향의 연구로 인간의 생명 현상을 이해하고자 하는 노력을 시작으로 점차 동·식물 그리고 미생물의 영역까지 다양한 생명체에 대해 적용되어 가고 있다.

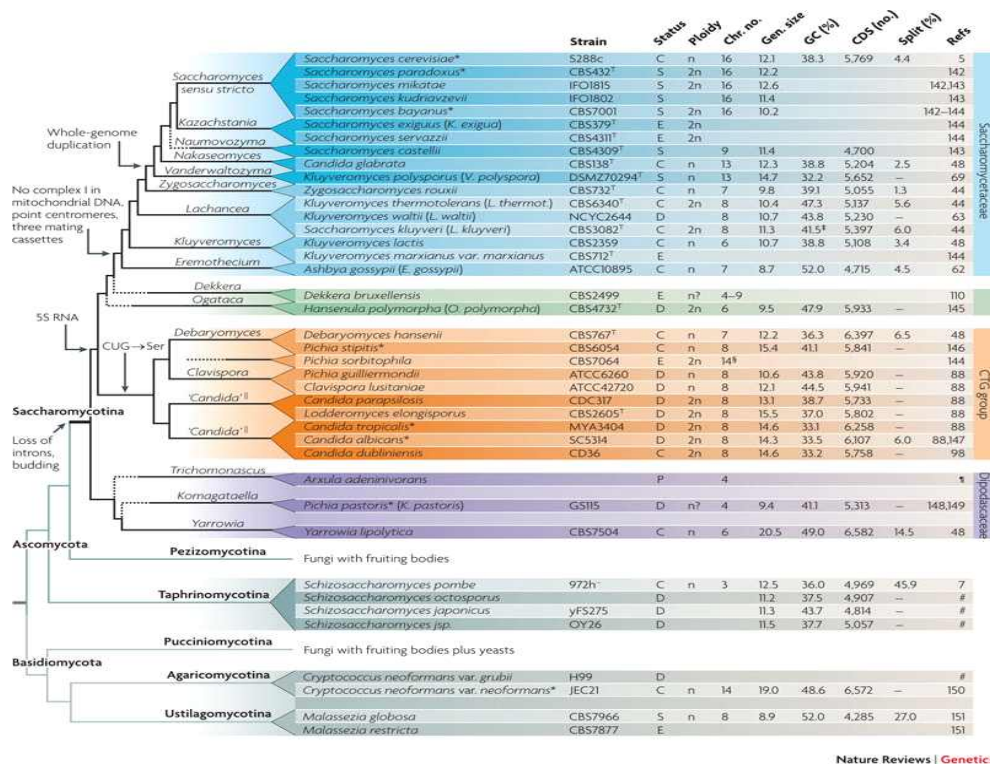
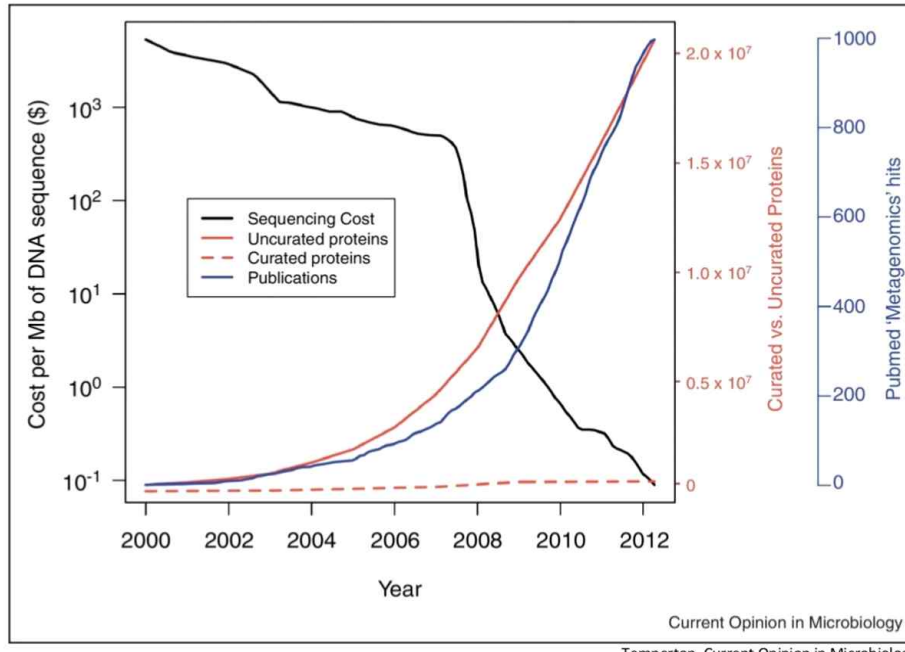


Figure 11. Full genome sequencing이 완료된 효모의 계통학적 분류.



Temperton, Current Opinion in Microbiology, 2012

Figure 12. Metagenomics 기술의 발전.

9. 오믹스 기술의 유산균 연구에의 적용

- 식품 미생물 중 가장 중요한 미생물군인 유산균은 분류학적으로 주로 *Firmicutes*에 속하는 *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp. 등의 3개 속(Genus)로 대표되는 광범위한 분류군에 속하는 미생물 군이다. 구균 및 간균 형태의 미호기성 균주로서 자유생활을 하는 Gram 양성 세균이며, 기질 수준에서의 인산화에 의해서만 에너지를 얻는 특징을 가지고 있다.
- 전통 식품의 지속적인 수요와 더불어 최근에는 기능성 식품에 대한 수요가 늘면서 새로운 각도에서 각광을 받고 있다. 현재 유산균 관련 제품이 가장 중요한 기능성 식품으로 간주되고 있어 유산균 관련 산업의 잠재력은 국내·외에서 매우 크다고 평가되고 있다.
- 유산균 유전체의 크기는 2.3~3.4 Mb 정도이며, 현재까지 *Bifidobacterium longum* NCC 2705, *Enterococcus faecalis* V583, *Lactobacillus plantarum* WFCS1, *Lactococcus lactis*를 대상으로 유전체 염기서열이 해독된 바 있고, 이 외에도 현재 11종(*B. longum* DJO10A, *Ec. faecium*, *Leuc. mesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gasseri*, *S. thermophilus*)에 대해 유전체 해독 연구가 진행되고 있다.

10. 오믹스 기술을 이용한 유산균 분리 분석기술

- 건강 기능성은 실험실 수준의 선전 효과를 넘어 임상학적 기능을 가지는 tailer-made type의 유산균 균주의 개발이 필요하다.
- 현재 NCBI genome site에 *Lactobacillus* sp. 37 종외 100종 이상의 유산균 전체 genome sequencing이 완결되어 발표되었고, 30종 이상의 유산균의 sequencing이 현재 진행 중이다.

1. Reference genome, Community selected : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842

The strain for this project is currently unknown.

Human Pathogen: no

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NC_008054.1	CR954253.1	1.87	49.7	1,529	27	95	2,184	533

Biological Properties

- Morphology
 - Gram : Positive
 - Shape : Bacilli
- Environment
 - OxygenReq : Facultative
 - TemperatureRange : Mesophilic
 - Habitat : Multiple

2. Calculated : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02

***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02.** This strain is isolated from traditional dairy products of minority nationalities in China and will be used for comparative analysis with other *Lactobacillus* species.

Human Pathogen: no

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NC_014727.1	CF002341.1	2.13	49.6	2,012	27	94	2,177	44
Plasm	unnamed	NC_014728.1	CF002342.1	0.006223	44.7	5	-	-	5	-

Figure 13. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*의 NCBI 정보.

Chromosomes [4] Scaffolds or contigs [5] BFA or Traces [3] No data [5]

Organism	BioProject	Assembly	Status	Chrs	Plasmids	Size (Mb)	GC%	Gene	Protein
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ND02	PRJNA63021, PRJNA49147	ASM16283v1	●	1	1	2.13	49.6	2,183	2,018
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	PRJNA161929, PRJNA16120	ASM19116v1	●	1	-	1.87	49.7	1,782	1,792
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	PRJNA59847, PRJNA16871	ASM5806v1	●	1	-	1.87	49.7	2,184	1,529
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-385	PRJNA67987, PRJNA403	ASM1440v1	●	1	-	1.86	49.7	2,039	1,715
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ZN7a-9	PRJNA171694	ASM138766v1	●	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNCM I-1619	PRJNA179899, PRJNA67981	ASM28471v1	●	-	-	1.8	49.9	1,957	1,893
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNCM I-1632	PRJNA179897, PRJNA67929	ASM28469v1	●	-	-	1.77	49.9	1,919	1,850
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> PB2003044-T3-4	PRJNA20571, PRJNA49819	ASM17937v1	●	-	-	1.98	49.9	1,981	1,909
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20072	PRJNA181640, PRJNA69001	ASM19216v1	●	-	-	1.88	49.8	2,084	2,006
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	PRJNA13817	-	○	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	PRJNA13881	-	○	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	PRJNA30317	-	○	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	PRJNA13317	-	○	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	PRJNA16115	-	○	-	-	-	-	-	-

Figure 14. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*의 whole genome sequencing 현황.

Lactobacillus delbrueckii

Feature counts are from RefSeq where it is available
[See Protein Details](#)

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ID02
The Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Education Ministry of P.R. China, Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, China
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ID02 Genome sequencing

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NC_014727.1	CP002341.1	2.13	49.8	2,012	27	94	2,177	44
Plasm	unnamed	NC_014728.1	CP002342.1	0.006223	44.7	6	-	-	6	-

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 2038
Chinese National HGC
Thermophilic starter culture for yogurt and Swiss and Italian-style cheeses

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene
Chr	-	NC_017459.1	CP000166.1	1.87	49.7	1,792	27	98	1,792

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC 11842
Genoscope
Unknown strain

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NC_008054.1	CR954263.1	1.87	49.7	1,529	27	95	2,184	533

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365
US DOE Joint Genome Institute (JGI), The Lactic Acid Bacteria Genome Consortium and Fossil Systems Inc.
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 RefSeq Genome

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NC_008029.1	CP000412.1	1.86	49.7	1,716	28	98	1	2,033	191

Lactobacillus delbrueckii ZN7a-9
University of Copenhagen
Lactobacillus delbrueckii ZN7a-9 Genome sequencing

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CNCM I-1519
Washington University, School of Medicine, Center for Genome Sciences and Systems Biology
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CNCM I-1519 Genome sequencing

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene
master WGS		NZ_AGHW000000000.1	AGHW000000000.1	1.8	49.9	1,693	3	61	1,957

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CNCM I-1632
Washington University, School of Medicine, Center for Genome Sciences and Systems Biology
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CNCM I-1632 Genome sequencing

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Gene
master WGS		NZ_AGFC000000000.1	AGFC000000000.1	1.77	49.9	1,850	3	66	1,919

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus PB2003/044-T3-4
J. Craig Venter Institute
Reference genome for Human Microbiome Project

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene
master WGS		NZ_AEAT000000000.1	AEAT000000000.1	1.98	49.9	1,909	4	65	3	1,981

Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis DSM 20072
Major College of Medicine
Reference genome for the Human Microbiome Project

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene
master WGS		NZ_AEXU000000000.1	AEXU000000000.1	1.88	49.9	2,005	3	71	4	2,054

Figure 15. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*의 genome annotation 정보.

11. 식품산업용 균주의 안전성 평가 시스템 구축의 필요성

- 미생물의 추적 시스템(tracking system)은 분자생물학적 기법을 사용한 유전자 지문 분석법(genetic fingerprinting)을 사용하여 개발할 수 있다.
- 현재까지 개발된 미생물 유전자 지문분석법은 자연계에서 미생물의 다양성을 연구하기 위한 분석 도구로 사용되고 있으며, 수질 등의 오염원을 파악하기 위한 미생물 오염원 추적(Microbial Source Tracking, MST) 등에 사용되고 있다.
- 또한 식중독 미생물 등의 병원성 미생물 판별이나, 유전자 재조합 미생물(Living Modified Organism, LMO)의 검출 등에 이용되고 있다.
- 따라서 국내에서도 식품산업 활용 종균의 국내·외 활용 및 수출 경쟁력 확보를 위하여 *in vitro*와 *in vivo*를 통한 안전성 신속 검증 시스템을 구축할 필요가 있으며, 이를 위해 수출 대상국의 국가별 식품 종균에 대한 규제를 파악하고 수출용 식품 종균에 대한 적용이 필요하다.

12. 균주 추적기술 개발 필요성

- 토양이나 과채류 등의 자연계 또는 식품으로부터 발효용 미생물을 분리 확보한 후 이들 균주들을 스타터로 이용하여 발효식품을 산업적으로 제조할 경우, 스타터 균주의 보존 관리가 매우 중요하다.
- 제품에 생균의 형태로 소비자에게 제공되는 발효식품의 경우에는 제품에 스타터 균주가 생존하므로 타 연구자가 이를 배양시켜 산업적으로 악용할 소지가 있다.
- 특히 산업적으로 유용한 특허균주의 경우에는 타 연구자 또는 타 기업이 제품에 존재하는 생균을 분리 배양하여 이를 스타터로 사용하여 제품을 생산할 가능성도 있다.
- 따라서 산업적으로 유용한 발효용 스타터 균주의 도용을 차단하기 위해서는 균주의 추적시스템 구축이 필수적이나 현재까지 산업용 발효균주의 추적을 위한 시스템 개발 연구는 이루어지지 않고 있다.
- 또한 국제적인 환경 보호 및 생물다양성 협약에 대처하기 위하여 미생물 자원의 지속적 이용 및 적극적 활용에 대한 국가적인 전략이 요구되며, 더불어 국내 기능성이 높은 전통발효균주의 타국가로의 무단 도용 예방 차원으로 본 과제의 발효균주 추적시스템 개발 연구가 시급하게 필요하다.

13. 고농도 배양 기술 현황 및 연구의 필요성

- 유산균의 배양은 일반적으로 회분식(batch) 배양과 연속식(continuous) 배양으로 나뉘어지는데, 기존의 산업에서는 회분식 배양법이 많이 사용되어져 왔고, 최근 들어서는 연속식 배양에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 두 가지 모두 높은 균체 농도를 얻는 데는 매우 제한적이다.
- 회분식 배양보다 연속식 배양이 고농도의 유산균체를 확보할 수는 있지만, 연속식은 stability가 문제가 된다(회분식에 비해 동결건조과정, 보관과정, 유통과정에서 사멸률이 높음).

Table 7. 배양방법에 따른 특징

배양방법	용도	특징
회분식 STR (Stirred Tank Reactor)	<ul style="list-style-type: none"> • 기질(substrate) 1회 투입. • 일정시간 후 배양완료. 	<ul style="list-style-type: none"> • 대부분의 미생물 배양에서 사용. • 1회성 생산.
회분유가식 (Fed batch-STR)	<ul style="list-style-type: none"> • 기질을 연속적으로 투입. • 생성물(product)의 제거 없이 일정시간 동안 배양. 	<ul style="list-style-type: none"> • 효소배양 등, 생성물의 농도를 높이는 배양. • 균체의 생육은 원할치 못함.
연속식 (Continuous Reactor)	<ul style="list-style-type: none"> • 기질을 연속적으로 투입. • 생성물을 연속적으로 제거. 	<ul style="list-style-type: none"> • 다량의 생성물을 얻을 수 있음. • 생성물에 의한 inhibition 해소.

- 유산균은 포도당 및 유당과 같은 당류를 대사시켜 젖산을 생성하고 다른 유기산 및 활성물질 등을 생성하여, 배양액 내의 수소이온 농도가 높아져 유산균의 대사 및 배양을 저해하는 현상을 보이게 된다.



Figure 16. 발효조.

- 유산균의 고농도 배양을 위해서 주로 사용하는 방법으로 과거에는 배지조성물(탈지분유, 효모추출물, 계면활성제, 인산염, 항산화제, 초산염)의 조절에 따른 배지최적화(특허출원: 제10-1997-027145호), 류코노스톡 균의 배양용 배지를 이용한 고농도 배양(특허출원: 제10-2012-0131607호)이 있다.
- 그밖에 유산균을 사균화 시키는 방법, 고정화시스템, 멤브레인의 설치와 같은 방법들이 진행되고 있으나 설비 시설의 까다로움 등의 이유로 실제적으로는 회분유가식 배양이 사용되어 지고 있다.
- 식품의약품안전처 및 국립축산검역원 기준에 적합한 균수의 확보가 중요하므로 고농도 배양기술의 표준화 또는 최적화 연구는 산업적·경제적 측면에서 볼 때 매우 절실한 실정이다.

제 3절 연구개발의 범위

1. 제 1세부과제: 건국대학교 산학협력단

가. 포괄적 연구 목표

- 식품 산업용 균주의 상용화를 위해 국내 유용 미생물 자원을 확보하고, 유제품, 전통 발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 스크리닝 틀을 개발하고 가이드라인을 구축하고자 하였다. 또한, 스크리닝한 균주의 생화학적 특성 및 기초생리활성을 평가하여 데이터베이스화하고, 식품 산업용 균주의 후보로 제공하고자 하였다.

나. 1차년도: [식품 산업용 균주 연구를 위한 유용 미생물 자원 확보 및 실험법의 국제 표준화]

- 기초생리활성 실험법의 정립 및 표준화 동량 조사
 - 기초생리활성 실험법과 관련한 최근 연구 동향 및 정보 수집
 - 기초생리활성 실험법과 관련한 국제 표준화 동향 조사
- 유제품, 전통발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 토종 균주의 수집 및 스크리닝 (2,000주)
 - 보유중인 토종 균주의 확보
(건국대, (사)한국중균협회, 한국식품연구원, 가천대 등 유용균주 및 상업용 균주)
 - 타깃 스크리닝법을 통한 균주의 스크리닝(2,000주)
- 분리균주, 상용균주, 표준균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화
 - 표준화된 실험법에 따라 분리균주, 상용균주, 표준균주의 생화학적 특성 분석
 - 분리균주, 상용균주, 표준균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 실험을 통한 기초생리활성 데이터 확보 및 관련 연구 자료를 확보하여 정리
- 기초생리활성 항목별 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 산업용 후보 균주 제공
 - 균주의 생화학적 특성 및 기초생리활성의 연구결과를 통계처리에 평가하고, 이들의 평가범위표 구축
 - 생화학적 특성 및 기초생리활성이 검증된 산업용 후보 균주를 확보하고, 이를 제2협동기관인 한국식품연구원과 균주의 관리 및 분양기반을 위해 제4협동기관인 (사)한국중균협회에 균주 및 연구결과를 제공

다. 2차년도: [식품 산업용 균주 연구를 위한 유용 미생물 자원 확보, 생화학적 특성 및 기초생리활성의 데이터베이스화]

- 유제품, 전통발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 토종 균주의 수집 및 스크리닝 (2,000주)

- 보유중인 토종 균주의 확보
(건국대, (사)한국종균협회, 한국식품연구원, 가천대 등 유용균주 및 상업용 균주)
- 타깃 스크리닝법을 통한 균주의 스크리닝(2,000주)
- 분리균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화
 - 표준화된 실험법에 따라 분리균주의 생화학적 특성 분석
 - 표준화된 실험법에 따라 분리균주의 기초생리활성 분석
 - 분리균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 실험을 통한 기초생리활성 데이터 확보 및 관련 연구 자료를 확보하여 정리
- 기초생리활성 항목별 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 산업용 후보 균주 제공
 - 균주의 생화학적 특성 및 기초생리활성의 연구결과를 통계처리에 평가하고, 이들의 평가범위표 구축
 - 생화학적 특성 및 기초생리활성이 검증된 산업용 후보 균주를 확보하고, 이를 제2협동기관인 한국식품연구원과 균주의 관리 및 분양기반을 위해 제4협동기관인 (사)한국종균협회에 균주 및 연구결과를 제공

라. 3차년도: [기초생리활성 실험 분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 검증된 식품 산업용 균주의 후보 수집]

- 유제품, 전통발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 토종 균주의 수집 및 스크리닝 (2,000주)
 - 보유중인 토종 균주의 확보
(건국대, (사)한국종균협회, 한국식품연구원, 가천대 등 유용균주 및 상업용 균주)
 - 타깃 스크리닝법을 통한 균주의 스크리닝(2,000주)
- 분리균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화
 - 표준화된 실험법에 따라 분리균주의 생화학적 특성 분석
 - 표준화된 실험법에 따라 분리균주의 기초생리활성 분석
 - 분리균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 실험을 통한 기초생리활성 데이터 확보 및 관련 연구 자료를 확보하여 정리
- 기초생리활성 항목별 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 산업용 후보 균주 제공
 - 균주의 생화학적 특성 및 기초생리활성의 연구결과를 통계처리에 평가하고, 이들의 평가범위표 구축
 - 생화학적 특성 및 기초생리활성이 검증된 산업용 후보 균주를 확보하고, 이를 제2협동기관인 한국식품연구원과 균주의 관리 및 분양기반을 위해 제4협동기관인 (사)한국종균협회에 균주 및 연구결과를 제공

2. 제 1협동과제: 한국식품연구원

가. 포괄적 연구 목표

- 국내 우수 종균의 상용화 및 수출 경쟁력 확보를 위해 *in vitro/in vivo* 상에서의 안전성과 임상연구를 통한 안전성 평가 시스템을 구축하고자 하였다. 또한 식품 산업용 균주 및 발효산물의 기능성 평가 시스템을 구축하고자 하였다.

나. 1차년도: [국내외 시장개척을 위한 식품 미생물 안전성 및 기능성 평가 시스템 확보를 위한 전략 수립]

- 잠재적 수출 대상국가의 국가별 식품 미생물에 대한 안전성 판단 기준/방법 현황 파악
- 식품 미생물용 균주의 통합 안전성 평가 시스템 구축 및 평가
 - 식품 미생물에서 생성되는 toxin 등 평가할 수 있는 *in vitro* 검증법의 표준화
 - 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 등 발효식품에서 잠재적 독성물질이 될 수 있는 물질에 대한 *in vitro* 평가 system의 표준화
 - Mouse 모델을 이용 신속하게 안전성을 평가할 수 있는 *in vivo* 검증법의 표준화
- 식품 미생물용 균주의 통합 기능성 평가 시스템 구축 및 평가
 - 식품산업용 균주 및 발효산물의 향당노, 간기능 개선, 항비만, 면역질환(아토피, 식품알레르기 등) 및 장 건강 증진 활성 평가를 위한 *in vitro/in vivo* 시스템 구축

다. 2차년도: [식품 산업용 균주의 통합 안전성 평가 및 분리균주의 기능성 평가]

- 식품 미생물용 균주의 통합 안전성 평가 시스템 구축 및 평가
 - 식품 미생물에서 생성되는 toxin 등 평가할 수 있는 *in vitro* 검증법의 표준화
 - 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 등 발효식품에서 잠재적 독성물질이 될 수 있는 물질에 대한 *in vitro* 평가 system의 표준화
 - Mouse 모델을 이용 신속하게 안전성을 평가할 수 있는 *in vivo* 검증법의 표준화
 - 산업체에서 간단하고 빠르게 검증할 수 있는 통합 안전성 검증 시스템 구축
- 식품 미생물용 균주의 통합 기능성 평가 시스템 구축 및 평가
 - 식품산업용 균주 및 발효산물의 향당노, 간기능 개선, 항비만, 면역질환(아토피, 식품알레르기 등) 및 장 건강 증진 활성 평가를 위한 *in vitro/in vivo* 시스템 구축
 - 기능성 평가 시스템을 기반한 식품산업용 균주의 기능성(향당노, 항비만, 간기능 개선, 식품알레르기 억제 활성)평가

라. 3차년도: [식품 산업용 균주의 안전성 및 기능성 평가]

- 식품 미생물용 균주의 통합 안전성 평가 시스템 구축 및 평가
 - 식품 미생물에서 생성되는 toxin 등 평가할 수 있는 *in vitro* 검증법의 표준화 및 기초 생리활성과 기능성이 우수한 식품산업용 종균의 안전성 평가
 - 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 등 발효식품에서 잠재적 독성물질이 될 수 있는 물질에 대한 *in vitro* 평가 system의 표준화 및 식품산업용 균주의 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 생성능 평가
 - Mouse 모델을 이용 식품산업용 균주의 안전성 평가
 - 산업체에서 간단하고 빠르게 검증할 수 있는 통합 안전성 검증 시스템 구축
- 식품 미생물용 균주의 통합 기능성 평가 시스템 구축 및 평가
 - 식품산업용 균주 및 발효산물의 항당뇨, 간기능 개선, 항비만, 면역질환(아토피, 식품알레르기 등) 및 장 건강 증진 활성 평가를 위한 *in vitro/in vivo* 시스템 구축
 - 기능성 평가 시스템을 기반한 식품산업용 균주의 기능성(항당뇨, 항비만, 간기능 개선, 식품알레르기 억제활성)평가
- 인체적용시험을 통한 식품 산업용 균주의 안전성 평가 시스템 구축(위탁-전북대학교병원)
 - EMBASE-Elsevier, Toxline-NLM, Pubmed-NLM, IBIDS-ODS를 이용한 선행연구조사
 - 식품산업용 균주의 안전성 평가 프로토콜 및 디자인 개발을 위한 인체적용시험 안전성 평가 시스템 구축

3. 제 2협동과제: 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

가. 포괄적 연구 목표

- 타 세부과제에서 예비 선발된 균주들의 발효특성을 식품유형(요구르트, 양조용 및 전통발효식품)에 따라 분석함으로써 식품별 발효에 적합한 균주를 선발하며, 실험결과 및 문헌조사를 바탕으로 발효 적합성 평가시스템을 구축함으로써 추후 균주 선발에 필요한 참고자료로써 이용하고자 하였다.

나. 1차년도: 발효특성 분석조건 확립 및 1차 선발된 균주들의 발효특성 분석

- 요구르트용 균주의 발효 적합성
 - 발효배지에서의 성장특성 분석
 - 발효배지에서의 pH 및 적정산도 변화 분석
 - 발효배지에서의 유기산 생성 패턴 분석
 - 발효배지에서의 저장 안정성 조사

- 알코올 발효용 균주의 발효 적합성
 - HPLC/MS를 이용한 발효시간별 알코올 생산능 조사
- 전통발효식품용 균주의 발효 적합성
 - 선발된 균주들의 효소(amylase, protease 등) 생산능 분석

다. 2차년도: 1, 2차 선발된 균주들의 발효특성 비교 분석

- 요구르트용 균주의 발효 적합성
 - 발효배지에서의 성장특성 분석
 - 발효배지에서의 pH 및 적정산도 변화 분석
 - 발효배지에서의 유기산 생성 패턴 분석
 - 발효배지에서의 저장 안정성 조사
- 알코올 발효용 균주의 발효 적합성
 - HPLC/MS를 이용한 발효시간별 알코올 생산능 조사
- 전통발효식품용 균주의 발효 적합성
 - 선발된 균주들의 효소(amylase, protease 등) 생산능 분석

라. 3차년도: 최종 선발된 균주들의 발효특성 비교 분석 및 발효 적합성 평가

- 요구르트용 균주의 발효 적합성
 - 발효배지에서의 성장특성 분석
 - 발효배지에서의 pH 및 적정산도 변화 분석
 - 발효배지에서의 유기산 생성 패턴 분석
 - 발효배지에서의 저장 안정성 조사
- 알코올 발효용 균주의 발효 적합성
 - HPLC/MS를 이용한 발효시간별 알코올 생산능 조사
 - GC/MS를 이용한 향미분석
- 전통발효식품용 균주의 발효 적합성
 - 선발된 균주들의 효소(amylase, protease 등) 생산능 분석
 - 균주 조합에 따른 성장 특성 및 효소 생산능 분석
- 용도별 선발된 균주의 실험결과와 문헌조사를 통한 발효적합성 평가시스템 구축

4. 제 3협동과제: 가천대학교 산학협력단

가. 포괄적 연구 목표

- 타 본 연구에서는 식품 산업용으로 개발되어진 유용 미생물의 안전관리를 위하여 식품 내 존재하는 특정 미생물의 효율적인 검출과 추적을 위한 기술을 개발하고, 본 연구과제에서 탐색 선정된 유용 미생물들의 유전자 지문을 데이터베이스화하였다.

나. 1차년도: [식품 산업용 균주의 genome 분석을 통한 유전자 표지 탐색]

- 유전자지문 분석법의 문헌 조사 및 장단점 비교 분석
 - 현재까지 개발된 유전자지문 분석법의 문헌 조사 및 각 분석방법별 장단점 비교 분석
- 식품 산업용 균주의 full genome 염기서열 수집
 - 식품 발효용 균주(유산균, 효모, 곰팡이, *Bacillus* spp. 등)의 full genome 염기서열 수집
- 식품 산업용 균주의 genome 분석을 통한 유전자 표지 탐색
 - 비교 유전체학(comparative genomics) 기법을 사용하여 수집된 genome 염기서열의 보존적 부위(conserved region), 가변 부위(variable region), 보존적 염기서열(conserved sequence), 반복서열(repeated sequence), 고유 염기서열(unique sequence) 등 유전자 표지(genetic marker) 탐색

다. 2차년도: [최적 미생물 추적 기술 선정 및 분리균주의 유전자 지문 데이터베이스 구축]

- 표준균주를 이용한 각종 유전자 지문 분석 및 최적 분석법의 선정
 - 유전자 지문 분석방법의 정확도와 편의성 및 경제성 등을 고려한 최적의 유전자 지문 분석방법 선정
 - 유전자 지문 분석법의 단독 혹은 병용 분석을 통한 최적 분석법 확립
- 분리균주의 유전자 지문 데이터베이스 구축
 - 본 과제로부터 확립된 최적 유전자 지문 분석법을 이용하여 모든 분리 균주의 유전자지문 채취 및 데이터베이스와 라이브러리 구축
 - 식품으로부터 균주를 분리하여 콜로니 형태로 확보한 후, 유전자 지문을 채취(culture dependent)
 - 아날로그 형태의 유전자 지문 데이터를 디지털화하는 암호화 작업의 기반 구축

라. 3차년도: [선정 균주를 이용하여 제조한 발효식품에서의 미생물 추적 평가]

- 시판 발효 식품에 존재하는 미생물의 유전자 지문 분석
- 특정 발효 균주를 이용한 발효 식품에서의 미생물 추적 기술 평가
 - 분리 균주 혹은 특정 발효 균주를 이용하여 발효 식품(유산균 발효유, 건강기능성 유산균제 등)을 제조한 후, 이로부터 본 과제에서 개발한 추적기술을 이용하여 표적 미생물 확인 및 효율 평가

5. 제 4협동과제: (사)한국종균협회

가. 포괄적 연구 목표

- 식품 산업용 유용미생물 자원 확보와 종균의 산업적 활용을 위한 장기적이며 안전한 보존을 수행하고, 미생물 자원관리를 위한 정보관리시스템(네트워크)을 구축하며, 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 효율적인 분양시스템의 구축 및 운영을 목표로 하였다.

나. 1차년도: [유용 균주에 대한 안전성, 발효특성, 기능 자료 홈페이지 구축]

- 산업용 유용 미생물 자원 확보 및 균주 제공
 - 다양한 발효 식품(장류, 젓갈류, 주류, 발효유제품 등)과 그의 원재료로부터 유용 미생물을 분리하여 균주를 제공
- 유용 균주에 관한 미생물 정보를 효율적으로 검색할 수 있도록 홈페이지의 구축
- 산업화 후보 종균의 분리, 분류 및 동정에 관한 다양한 정보(문헌, 이미지, 균주 정보 등)를 지원
- 산업체 등 민간에 활용 종균의 조회, 검색 서비스 제공

다. 2차년도: [웹 기반 DB의 활용 방안 및 연계]

- 기존 구축된 DB의 활용 방안 및 연계
 - KCCM 표준균주 DB의 format을 바탕으로 유용 균주의 DB 구축 및 각 기관의 raw data DB화
- 웹 기반 DB의 구축에 단어별 검색 엔진을 연동하여 인터넷 상에서 사용자가 간단히 유용 균주를 찾을 수 있는 기반 구축
- 타 연구기관의 균주 활용을 위한 DB의 연동화 구축

라. 3차년도: [유용 균주 보존, 관리 시스템 구축]

- 산업용 균주의 보존, 관리 시스템 구축
 - 균주의 장기 보존 및 분양을 위한 분양 시스템 구축
 - 유용 균주의 특성에 따라서 동결 건조, L-drying, 초저온 보존법 등의 보존 방법을 통하여 안정적인 균주 보존
 - 웹 기반 DB에 균주의 보존 방법, 보존 위치 및 재고 파악을 통합적으로 관리할 수 있는 균주 관리 시스템 구축
 - 유용 균주의 분양 신청 및 분양 과정 그리고 분양 후 사후 관리를 할 수 있는 관리시스템의 구축

- 보존 균주의 backup분을 주관 및 협동 기관에 이중으로 보존하여 안전하게 보존 관리
- 산업용 후보 종균 및 프로바이오틱스 등의 유전체 분석을 통한 고유성(identity)자료 확보
- 산업화 종균 후보 균주의 rRNA sequence 및 PCR-RFLP 등의 유전체 분석을 통하여 고유성 자료 확보
- 프로바이오틱스 기능성 관련 유전자의 유전체 분석 연구

6. 제 5협동과제: (주)셀바이오텍

가. 포괄적 연구 목표

- 식품 산업용 균주의 상용화를 위해 배지 및 배양 조건을 최적화, 유가식 배양을 통한 고농도 배양 기술을 확보하고 대량생산공정을 구축, 생산 프로세스 상의 충격(shock)을 조사와 검증 체계를 구축하며, 배양과정 중 발생할 수 있는 오염도 저하를 위한 생산 위생도 강화 시스템을 확립하고자 하였다. 또한 산업용 균주를 활용한 시제품을 생산하고 수출 전략을 수립하고자 하였다.

나. 1차년도: [고농도 배양 기술을 위한 배지 최적화 및 배양 조건 최적화]

- 회분식 배양조건에서 발효유 생산 균주 종균의 고농도 배양 기술
 - 탄소원의 영향: 균체 생산을 위한 최적 탄소원을 선정하기 위하여 다양한 탄소원 (glucose, lactose, sucrose 등)에 의한 영향 연구
 - 유기질소원의 영향: 균체에 대한 최적 질소원을 선정하기 위하여 다양한 질소원 (soytone, yeast extract, beef extract, proteose peptone 등)에 의한 영향 연구.
 - 무기염이온의 영향: 균체 생산에 대한 다양한 무기염 이온(Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} 등)의 영향 연구
 - 산업용 대량생산을 위한 저가배지 개발: 식품용 whey, soybean flour등을 이용한 저가형 천연 항균 소재 생산용 배지 개발

다. 2차년도: [후보 균주의 충격 조건 검증 및 생산 위생도 강화 시스템 연구]

- 생산 프로세스 상에서의 충격(shock) 조사 및 검증 체계 구축
 - 생산 프로세스 상에서의 충격으로, 유기산 생성, agitation, 당 농도 등에 따른 균수의 변화를 특정하여 충격을 조사하여 검증 체계를 구축
 - 상기 조건에 맞춰 통계프로그램에 의한 영향 결정 후 최적화
- 오염도 저하를 위한 생산 위생도 강화 시스템 연구
 - 파지 및 오염 잡균의 방지를 위해 control균으로 *Bacillus stearothermophilus*를 이용하여 유제품에서 살균 최적화

- 살균강도는 del factor(또는 sterilization criterion)로 나타냄
- 내부 온도에 따른 오염균의 균수에 따른 살균 온도 및 살균시간 결정시켜 위생도 강화 시스템 연구

라. 3차년도: [대량생산공정 구축 및 수출 전략 수립]

- 대량생산공정 적용 및 대량생산공정 구축
 - 첨가할 당 및 미네랄 성분의 결정: 첨가할 당으로 glucose, lactose, sucrose, 미네랄 성분의 조성 별로 첨가에 따른 영향 연구
 - 실험실 규모의 생산최적화를 통해 파일럿 단위에서 기술을 적용하여 조건을 검증하고, 이를 통해 대량생산공정을 구축
- 시제품 생산 및 수출 전략 수립
 - 제품화할 형태나 제형을 검토하여 부형제 첨가 등을 통한 시제품 생산
 - 국외 수출을 위한 발효유 종균 및 프로바이오틱스로서의 갖춰야 할 요건을 검토하여, 수출을 위한 제품의 특징과 규격화를 검토함으로써 수출 전략 수립

7. 제 6협동과제: (주)충무발효

가. 포괄적 연구 목표

- 본 연구를 통해서 얻은 국내 토착 미생물을 전통발효식품인 장류(된장, 간장 등), 양조용(탁주 및 전통주)의 종균으로 개발하기 위해, 생산 환경을 최적화 하고, 제품 적합성 검증 시스템으로 종균의 오염 방지 방안을 검토하고자 함. 또한 이러한 종균을 종균의 국산화 및 사업화시키고자 하였다.

나. 1차년도: [전통발효식품용 종균의 최적배지 개발]

- 곰팡이 종균생산용 최적배지의 개발
 - 액체 배지 상의 곰팡이 종균생산을 위한 탄소원으로 glucose, sucrose, starch 등을 이용하고, 질소원으로 peptone, tryptone, soy powder 등을 이용하여 배지 성분 및 배지 성분의 비율에 따라 최적화
- 효모 종균생산용 최적배지의 개발
 - 액체 배지 상의 효모 종균생산을 위한 탄소원으로 glucose, sucrose, starch 등을 이용하고, 질소원으로 peptone, tryptone, soy powder 등을 이용하여 배지 성분 및 배지 성분의 비율에 따라 최적화

다. 2차년도: [전통발효식품용 종균 생산방법의 최적화 시스템 개발]

- 곰팡이 종균생산용 고상발효공법의 최적화시스템 개발
 - 고체 배지 상의 탄소원으로 glucose, sucrose, starch 등을 이용하고, 질소원으로 peptone, tryptone, soy powder 등을 이용하여 배지 성분의 영향을 확인하고, 배지 성분의 비율에 따라 최적화
- 효모 종균생산용 분말화 기술 및 잡균 오염 방지법 개발
 - 효모 종균의 제품화를 위해 동결건조, 분무건조 등의 방법을 통해 분말화
 - 효모 종균의 분말화 방법에 따른 잡균 오염 유무를 확인하기 위해 미생물학적인 방법으로 PCA 및 오염 가능성이 있는 균주를 선별하여 선택배지를 이용하여 오염 정도를 검증하고, 이를 방제하는 방안 검토

라. 3차년도: [전통발효식품용 종균 시제품 개발]

- 전통발효식품용 종균 시제품 개발
 - 종균제품의 보관 활성 유지법 개발
 - 종균제품의 유통 최적 포장용기 및 방법의 개발
 - 종균 시제품 개발

8. 제 7협동과제: (주)아람

가. 포괄적 연구 목표

- 분말이나 타정 등 다양한 형태의 프로바이오틱스 제품 제조과정에서 마찰이나 혼합, 압력, 열등 여러 가지 공정 변수가 수반되는데 프로바이오틱스 사멸률 최소화 및 저장 안정성 향상을 위한 균주 선정, 제품 제조공정 및 부원료의 배합기술 개발하고 최종적으로 사업화하고자 하였다.

나. 1차년도: [건강기능식품용 균주를 위한 후보 균주의 상용화 생산 및 제품 적합성 검증]

- 후보 균주의 상용화 생산 환경 적합성 검증
 - 건강기능식품용 종균으로 효모, 유산균을 제품화하기 위해, 분말 타정 등 여러가지 제형별로 제조함. 제조과정에서 일어나는 다양한 공정변수를 마찰력, 압출력, 열 등의 조건을 설정하여 프로바이오틱스의 생존을 검토
- 후보 균주의 제품 적합성 검증
 - 저장기간을 냉장보관, 상온보관으로 나뉘 30일 단위로 제품의 생존율을 확인하고, 저장안정성 향상을 위한 신 공정 설계

다. 2차년도: [건강기능식품용 균주의 제품 적합성 및 제품을 위한 포물라 개발]

- 제품화를 위한 포물라 개발
 - 프로바이오틱스의 생존율을 향상시키면서 시너지 효능이 있는 올리고당의 종류에 따라 검토하여, 이를 부원료로 적용하여 완제품의 포물라 개발
 - 어린이, 성인, 노인 등이나 항산화, 대사질환 별 등의 특정 용도나 대상을 상대로 하여 적합한 형태의 포물라 개발

라. 3차년도: [건강기능식품용 균주의 시제품 개발]

- 포장 형태 및 포장 환경에 따른 저장안정성 검증
 - 스틱 및 타정 포장형태 및 포장재에 따른, 포장내 환경에 따른, 완제품 유통 및 저장 형태에 따른 생존율을 검토하고, 이를 통해 저장 안정성 확보
- 시제품 개발

제 2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1절 종균 관련 국내 연구 보고서

1. 발효식품용 종균 활용을 위한 효모와 세균의 선발 및 자원 풀 구축

(국립농업과학원, 2013.02.~2015.12., 농촌진흥청)

- 연구를 통해 다양한 발효식품(장류, 김치 등)에서 분리한 효모, 젖산균, 고초균 등을 수집하였으며 효모에 대해서는 양조적성 평가를 통해 다양한 발효음료 개발 가능성을 확인하고, 젖산균에 대해서는 유용효소 활성 및 유용물질 생성능 평가를 통해 균주의 활용성을 증대시키고, 고초균에 대해서는 효소 활성 평가를 통해 김치 맛 개선 및 식품을 높여주는 데 활용할 수가 있었다.
- 추가적인 연구를 통해 우수한 미생물자원의 데이터베이스를 구축하여 이의 활용성을 증대시키고, 확보한 미생물들은 국가의 고유한 생물자원이므로써 그 활용가치를 높일 예정이다.

제 2절 종균을 이용한 발효 및 기능성에 관련된 국내논문

- 종균과 관련된 논문으로는 다양한 종균(유산균, *Bacillus*, 효모, 곰팡이)을 이용한 항균, 항알러지, 항비만, 항산화 효과, 효소 활성, 종균 관련 식품의 적용에 관한 논문들이 게재되고 있다.

저자명	논문 제목	게재 학술지명	권 및 쪽수 (년도)
정원희 외 2명	영광 토종국에서 분리한 곰팡이의 amylase 활성	한국응용생명화학회지	30:250-257 (1987년)
강현미 외 1명	유산균이 생성하는 세포외 다당류의 기능성에 대한 고찰	한국유가공기술과학회지	17:101-108 (1999년)
전혜성 외 4명	유산균 투여가 마우스의 <i>Salmonella</i> 균 감염에 미치는 영향	한국낙농학회지	21:171-182 (1999년)
김은아 외 2명	유산균에 의한 <i>Escherichia coli</i> 와 <i>Salmonella</i> Typhimurium의 생육억제에 관한 연구	한국축산학회지	44:491-498 (2002년)
남윤주 외 2명	김치에서 분리한 <i>Lactobacillus plantarum</i> KM214 균주에 의한 인공치태 형성 억제효과	대한구강보건학회지	27:195-205 (2003년)
김중호 외 4명	전통 메주로부터 분리한 protease 생성 곰팡이로 제조된 된장의 품질 특성	한국응용생명화학회지	49:7-14 (2006년)
정석근 외 6명	유산균의 항알레르기 효과	한국유가공기술과학회지	25:21-25 (2007년)
이기선 외 3명	땅콩 알레르기 생쥐모델에서 항알레르기 효과가 있는 <i>Lactobacillus</i> 균주의 선별	대한소아알레르기호흡기학회지	17:260-270 (2007년)
이재준 외 4명	김치로부터 분리한 유산균 <i>Leuconostoc kimchii</i> GJ2가 고콜레스테롤식을 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향	한국식품저장유통학회지	17:760-768 (2008년)
조윤희 외 6명	Isoflavone 비배당화 및 항산화 활성을 지닌 <i>Lactobacillus plantarum</i> YS712의 선발	한국축산식품학회지	29:640-646 (2009년)
조윤희 외 1명	유산균의 항산화 활성 비교	한국유가공기술과학회지	28:31-39 (2010년)
구본성 외 5명	충청지역 누룩에서 양조용 우수 곰팡이의 탐색 및 특성	한국미생물·생명공학회지	34:373-378 (2010년)
최성현 외 3명	맥아에서 분리한 <i>Bacillus amyloquefacies</i> CNL-90이 생산하는 α -amylase와 protease의 특성	한국축산식품학회지	54:133-139 (2012년)
최우석 외 4명	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 파쇄물의 항산화 및 미백효과	한국미생물·생명공학회지	41:183-189 (2013년)

전현경 외 1명	된장에서 분리한 <i>Bacillus licheniformis</i> 의 β -galactosidase 생산성과 효소 특성	한국미생물·생명공학회지	42:339-346 (2014년)
양수진 외 5명	김치로부터 분리한 <i>Bacillus subtilis</i> KMKW4의 amylase 생산 및 효소활성	한국키티킨키토산학회지	19:21-28 (2014년)
백성열 외 4명	야생 효모 종류에 따른 알코올 발효 특성	한국미생물·생명공학회지	43:228-236 (2015년)
정상은 외 1명	시판 생막걸리에서 분리한 유산균의 프로바이오틱스 기능성 연구	한국식품과학회지	47:44-50 (2015년)
김태중 외 1명	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP2 균주의 <i>Helicobacter pylori</i> 억제효과	한국식품위생안전성학회지	30:372-375 (2015년)
최다혜 외 3명	누룩으로부터 맥아당 이용능과 에탄올 생산성이 우수한 효모의 분리와 특성	한국미생물·생명공학회지	44:34-39 (2016년)

제 3절 종균을 이용한 발효 및 기능성에 관련된 국내특허

- 종균과 관련된 특허로는 다양한 종균(유산균, *Bacillus*, 효모, 곰팡이)을 이용한 향균, 항바이러스, 콜레스테롤 저하, 항비만, 항산화 효과, 효소 활성, 종균 관련 식품의 적용에 관한 특허 출원 및 등록되고 있다.

출원인	제목	국가 및 출원/등록 구분	출원/등록번호 (일자)
오화균 외 2명	향균 및 항바이러스 효과를 가진 신규 유산균 및 이를 포함하는 조성물	대한민국 특허등록	제 10-0505910-0000호 (2008. 02. 25.)
신현길	혈중 콜레스테롤 농도 저하에 효과적인 유산균 및 이들의 혼합균주	대한민국 특허등록	제 10-0909586-0000호 (2009. 07. 21.)
김종무 외 6명	항비만 및 뇌기능개선 관련 생리활성 기능을 가지는 프로바이오틱 유산균 락토바실러스 플라타룸	대한민국 특허등록	제 10-1010914-0000호 (2011. 01. 19.)
장해춘 외 1명	메주로주터 분리된 바실러스 폴리퍼멘티쿠스 및 이를 포함하는 향진균 조성물	대한민국 특허등록	제 10-1024950-0000호 (2011. 03. 18.)
김정진 외 3명	아토피성 피부염 치료 및 또는 예방용 유산균 및 이를 함유하는 조성물	대한민국 특허등록	제 10-1094194-0000호 (2011. 12. 08.)
김동운 외 7명	면역 증강 유산균 및 이를 포함하는 유산균 제제	대한민국 특허등록	제 10-1201447-0000호 (2012. 11. 08.)
구본성 외 7명	효소 활성 및 향균 활성을 갖는 저염양 바실러스 아밀로큐파시엔스 B4-4 균주	대한민국 특허등록	제 10-1219592-0000호 (2013. 01. 02.)
곽중기 외 5명	누룩에서 분리한 아스퍼질러스 오리재 YA08 및 이를 이용한 발효주의 제조 방법	대한민국 특허등록	제 10-12861070-0000호 (2013. 07. 09.)
홍연 외 1명	된장으로부터 분리한 기능성 균주, 이를 이용한 기능성 된장의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 기능성 된장	대한민국 특허출원	제 10-2014-0009805호 (2014. 01. 27.)
안영태 외 4명	지방합성 억제 및 지방산화 촉진에 의한 체지방 감소 효능을 갖는 6종의 유산균 복합균주를 유효성분으로 함유하는 조성물	대한민국 특허등록	제 10-1428276-0000호 (2014. 07. 29.)

강남 외 3명	전통 메주에서 분리한 신규한 아스퍼질러스 오리재 CJ KY 균주와 이를 이용한 된장 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 된장	대한민국 특허등록	제 10-1455473-0000호 (2014. 10. 21.)
김동현 외 3명	노화 및 치매의 예방 및 또는 치료 활성을 갖는 유산균	대한민국 특허등록	제 10-1476236-0000호 (2014. 12. 18.)
최혜영 외 3명	김치에서 분리한 신규 유산균 균주 락토바실러스 플란타룸 DSR KF12 및 이를 포함하는 조성물	대한민국 특허출원	제 10-1495309-0000호 (2015. 02. 13.)
은영범	기능성 김치 유산균을 이용한 비만 억제 다이어트 효과	대한민국 특허출원	제 10-2015-0111282호 (2015. 08. 06.)
김성환 외 3명	인슐린 저항성 개선 효능을 갖는 7종의 유산균 복합균주를 유효성분으로 함유하는 조성물	대한민국 특허등록	제 10-1545551-0000호 (2015. 08. 12.)
한명주 외 1명	다양한 기능성을 가진 신규 유산균 및 이의 용도	대한민국 특허출원	제 10-2016-0114842호 (2016. 09. 07.)
강희윤 외 4명	향미증진 양조용 효모 사카로마이세스 세레비지에 및 이를 이용하여 제조한 발효주	대한민국 특허등록	제 10-1671669-0000호 (2016. 10. 26.)
한지숙 외 1명	알코올 저항성 효모 세포, 그의 제조 방법 및 그를 이용한 알코올 생산 방법	대한민국 특허등록	제 10-1700415-0000호 (2017. 01. 20.)
정수지 외 4명	장류의 유해 미생물에 대한 항균 활성 및 세포외 효소 분비능이 있고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통 장류 유래의 바실러스 서틸리스 SCM 688 균주 및 이의 용도	대한민국 특허등록	제 10-1734363-0000호 (2017. 05. 02.)
김미숙 외 3명	한국 전통 간장에서 분리된 신규 바실러스 균주 및 이를 함유하는 프로바이오틱스	대한민국 특허등록	제 10-1780770-0000호 (2017. 09. 15.)

제 4절 종균과 관련된 언론 보도

- 된장에서 분리한 유산균 균주를 이용해 동물에 투여하여 분석한 결과 대장염 질병 지수가 절반 수준으로 낮아졌고, 생균뿐만 아니라 균체 자체로도 효능을 보이기 때문에 다양한 방법으로 가공할 수 있어 프로바이오틱스 종균의 수입량을 대체할 수 있을 것이다(MBC뉴스, 2016년).
- 김치미생물 유전체연구팀은 김치유산균의 유전체를 분석해 표준유전체지도를 완성하고 발효특성, 기능성 및 안전성을 과학적으로 규명했으며 연구를 통해 김치발효종균으로 개발하고, 균주인 'DRC1506'에 대해 우리고유의 이름인 '류코노스톡 메센테로이데스 종가집김치아이'로 명명해 국제공인을 획득했으며 대상(주)에서 김치생산종균으로 산업적 생산에 적용해 표준화된 고품질 김치를 안정적으로 생산하고 있다(한국농어민신문, 2017년).
- 순창 발효미생물산업진흥원은 전통장류발효식품으로부터 독소 및 바이오제닉 아민 유전자가 있어 안전하고, 청국장보다 풍미를 높이고, 발효기능이 우수하며 혈전용해능력이 우수한 특징을 가지는 청국장 종균으로 활용가치가 높은 우수 균주 5종을 분리하였으며 산업적 측면에서는 현재 청국장 제조시 사용되는 벗집을 대체할 수 있는 장점과 식품의 안전성을 확보했다는 의미가 있으며 대사성질환 관련 기능성 청국장 생산도 가능할 것으로 보고 있다(국제뉴스, 2016년).

제 3장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 기초생리활성 실험법과 국제 표준화 동향 조사

1. 기초생리활성 실험법과 국제 표준화 동향 조사

가. 식품산업용 균주 관련 SCI급 논문 조사

(1) 내산·내담즙성 관련 실험법 표준화 조사

- 건강기능식품 및 유제품 종균에 대한 내산·내담즙성 관련 SCI급 논문의 분석결과는 다음과 같다(Table 1-1). 내산성의 경우 pH 2.5에 pepsin 3 mg/mL을 첨가한 후 3시간 배양, 내담즙성의 경우 pH 7에 oxgall 3 mg/mL을 첨가한 후 24시간 배양하는 것이 보편적이었다.
- 내산·내담즙성 관련 실험법 표준화는 내산성의 경우 pH 2.5, pepsin 3 mg/mL을 첨가한 후 3시간 배양으로, 내담즙성의 경우 pH 7에 oxgall 3 mg/mL을 첨가한 후 24시간 배양하는 실험방법으로 결정하였다.

Table 1-1. 내산·내담즙성 관련 SCI급 논문 분석

순번	년도 (년)	내산성	내담즙성	논문명	저널
1	2006	pH 2; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-4시간 반응	Probiotic potential of <i>Lactobacillus</i> strains isolated from dairy products	International Dairy Journal 16:79-94
2	2009	pH 2; 1 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	1-4 mg/mL bile salt; 0-3시간 반응	Comparative accounts of probiotic characteristics of <i>Bacillus</i> spp. isolated from food waste	Food Research International 42:505-510
3	2009	pH 2.5-4; 0-4시간 반응	1 mg/mL trypsin; 0-16시간 반응	<i>In vitro</i> comparison of probiotic properties of <i>Lactobacillus casei</i> Zhang, a potential new probiotic with selected probiotic strains	LWT-Food Science and Technology 42:1640-1646
4	2010	pH 2, 3; 0-3시간 반응	3, 10 mg/mL bile salt; 0-4	Screening lactic acid bacteria from swine	Anaerobe 16:321-326

			시간 반응	origins for multistrain probiotic functional properties	
5	2010	pH 2, 3; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	1, 5, 10 mg/mL oxgall; 0-12시간 반응	Probiotic properties of <i>Lactobacillus</i> strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage	Anaerobe 16:578-585
6	2010	pH 2.5; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	2.5 mg/mL bile salt; 0-3시간 반응	<i>In vitro</i> screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics	Anaerobe 16:493-500
7	2010	pH 2, 3, 4; 0-2시간 반응	5, 10, 20 mg/mL bile salt; 0-3시간 반응	Probiotic properties of folate producing <i>Streptococcus thermophilus</i> strains	Food Research International 43:103-110
8	2010	pH 1, 2, 3; 0-2시간 반응	10, 20, 30 mg/mL bile salt; 0-12시간 반응	Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic <i>Enterococcus faecium</i> KH24 strain under <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> conditions	International Journal of Food Microbiology 15:154-168
9	2010	pH 2, 2.5; 3.5 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	19 mg/mL bile salt과 trypsin; 0-24시간 반응	Screening of potential probiotic properties of <i>Lactobacillus fermentum</i> isolated from traditional dairy products	Food Control 21:695-701
10	2011	pH 2.5; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-24시간 반응	Protection activity of a novel probiotic strain of <i>Bacillus subtilis</i> against <i>Salmonella</i> Enteritidis infection	Research in Veterinary Science 93:74-81

11	2011	pH 3; 5 mg/mL pepsin; 0-1.5시간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-2.5시간 반응	Probiotic assessment of <i>Enterococcus faecalis</i> CP58 isolated from human gut	International Journal of Food Microbiology 145:390-394
12	2011	pH 3; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-3시간 반응	Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts	Anaerobe 17:97-105
13	2011	pH 2.5; 1,000 unit/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-3시간 반응	Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated <i>Lactobacillus</i> spp: Immune modulation and longevity	International Journal of Food Microbiology 148:80-86
14	2011	pH 2.5; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-3시간 반응	Characterization and <i>in vitro</i> properties of potentially probiotic <i>Bifidobacterium</i> strains isolated from breast milk	International Journal of Food Microbiology 149:28-36
15	2012	pH 3; 2 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	4.5 mg/mL bile salt; 0-8시간 반응	<i>In vitro</i> testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria	International Journal of Food Microbiology 153:216-222
16	2012	pH 3; 0-2시간 반응	5 mg/mL bile salt; 0-4시간 반응	<i>In vitro</i> evaluation of the probiotic potential of <i>Lactobacillus salivarius</i> SMXD51	Anaerobe 18:584-589
17	2012	pH 2, 3, 4; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-8시간 반응	<i>In vitro</i> analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics	Food Research International 14:619-625

				in goat's milk ice cream and yogurt	
18	2012	pH 2, 2.5, 3; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	1 mg/mL bile salt; 0-6시간 반응	<i>In vitro</i> evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin	Journal of Functional Foods 4:531-541
19	2012	pH 2.5; 0-3시간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-24시간 반응	Screening for cholesterol-lowering probiotic based on deoxycholic acid removal pathway and studying its functional mechanism	Anaerobe 18:516-522
20	2012	pH 3; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3, 5, 10 mg/mL oxgall; 0-24시간 반응	Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet	Journal of Dairy Science 95:1645-1654
21	2013	pH 2, 3; 3 mg/mL pepsin; 0-4시간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-6시간 반응	Evaluation of <i>Pediococcus pentosaceus</i> strains isolated from Idly batter for probiotic properties <i>in vitro</i>	Journal of Functional Foods 5:216-222
22	2013	pH 2.5; 0-3시간 반응	5 mg/mL bile salt; 0-4시간 반응	Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by <i>in vitro</i> tests	Food Microbiology 33:282-291
23	2013	pH 2, 3, 4; 0-4시간 반응	1, 2.5, 5, 10, 15 mg/mL bile salt; 0-4시간 반응	Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of <i>Enterococcus</i> strain LAB18s	Food Control 37:251-256
24	2013	pH 2, 2.5, 3;	2.5, 5, 7.5 mg	Probiotic properties of	Anaerobe

		0-2시간 반응	/mL oxgall; 0-2시간 반응	lactobacilli species isolated from children's feces	24:36-42
25	2014	pH 2.5; 0-4시간 반응	3 mg/mL oxgall; 0-4시간 반응	<i>In vitro</i> evaluation of the safety and probiotic properties of lactobacilli isolated from chicken and calves	Anaerobe 29:118-127
26	2014	pH 3; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL trypsin; 0-8시간 반응	Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity.	Food Control 35:65-72
27	2014	pH 3; 0-2.5시간 반응	3 mg/mL oxgall; 0-24시간 반응	Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetable and traditional Indian fermented food products	Food Bioscience 5:27-33
28	2014	pH 2; 3 mg/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-8시간 반응	Effect of dairy probiotic combinations on <i>in vitro</i> gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion	Journal of Functional Foods 8:18-25
29	2014	pH 1.8, 2.1, 3, 4.1, 5; 6 mg/mL pepsin; 0-1.5시간 반응	0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL bile salt; 0-24시간 반응	Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine	Food Microbiology 44:220-225
30	2014	pH 3; 0-3시간 반응	3 mg/mL oxgall; 0-4시간 반응	Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly	Anaerobe 28:29-36

				isolated vaginal <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> 36YL strains on cancer cells	
31	2014	pH 2, 3; 0-2 시간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-2시간 반응	Probiotic properties of <i>Pediococcus</i> strains isolated from jeotgals salted and fermented Korean sea-food	Anaerobe: 28:199-206
32	2014	pH 2, 4, 6; 0 -2시간 반응	1, 2, 5 mg/m L bile salt; 0 -24시간 반 응	Characterisation of <i>Lactobacillus</i> <i>gastricus</i> strains isolated from human milk	International Diary Journal 39:167-177
33	2014	pH 2.5; 0-3시 간 반응	3 mg/mL bile salt; 0-12시간 반응	Comparison of lactobacilli isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties	Journal of Functional Foods 12:294-302
34	2014	pH 2, 2.5, 3; 0-3시간 반응	2.5, 5, 7.5, 10 mg/mL bile s alt; 0-4시간 반응	Probiotic characteristics of <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> strains isolated from tulum cheese	Anaerobe 30:120-125
35	2015	pH 2, 3; 3 m g/mL pepsin; 0-3시간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-72시 간 반응	<i>In vitro</i> assessment of the probiotic potential of <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> KCC-24 isolated from Italian rye-grass forage	Anaerobe 32:90-97
36	2015	pH 2.5; 0-3시 간 반응	3 mg/mL ox gall; 0-3시간 반응	Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy	LWT-Food Science and Technology 60:690-697

			microbiota	
			Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain	LWT-Food Science and Technology
37	2015	pH 2.5; 3 mg /mL pepsin; 0-3시간 반응	5 mg/mL bile salt; 0-4시간 반응	DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment

(2) 효소 생산능 관련 실험법 표준화 조사

- 건강기능식품 및 유제품 종균에 대한 효소 생산능 관련 SCI급 논문 분석 결과는 다음과 같다(Table 1-2). 균체의 효소 생산능을 측정하기 위해 API zym kit를 이용한 색변화를 통해 유익효소 및 유해효소의 생산을 측정하였다.
- 효소 생산능 관련 표준화 실험법은 효소 생산능의 경우 API zym kit를 이용하여 4시간 배양한 후 Zym A, Zym B시약을 이용하여 측정하는 실험방법으로 결정하였다.

Table 1-2. 효소생산능 관련 SCI급 논문 분석

순번	년도 (년)	효소생산능	논문명	저널
1	1999	β -galactosidase, protease, aminopeptidase 활성 측정; ONPG, OPA, p-N A-L-amino acid derivative를 이용	Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Journal of Dairy Science 82:23-31
2	2003	Miller (1972)의 방법에 따라 β -galactosidase 활성 측정; o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 이용	Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance	Food Research International 36:895-904
3	2013	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	Potential probiotic properties of phytase-producing <i>Lactobacillus salivarius</i>	Annals of Microbiology 63:555-560

		FC113	
4	2013	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	Immunomodulatory and antigenotoxic properties of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KU801 Korean Journal of Microbiology and Biotechnology 41:249-252
5	2013	β -galactosidase 활성 측정; o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)를 이용	Production and optimization of β -galactosidase enzyme using probiotic Yeast spp Annals of Biological Research 4:62-67
6	2013	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	Potential probiotic properties of phytase-producing <i>Lactobacillus salivarius</i> FC113 Annals of Microbiology 63:555-560
7	2013	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	<i>In vitro</i> evaluation of the safety and probiotic properties of lactobacilli isolated from chicken and calves Anaerobe 29:118-127
8	2014	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	Probiotic properties of <i>Pediococcus</i> strains isolated from jeotgals salted and fermented Korean sea-food Anaerobe 28:119-206
9	2014	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	Probiotic potential of <i>Lactobacillus</i> strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters LWT-Food Science and Technology 58:130-134
10	2015	API zym kit를 이용하여 37°C에서 4시간 배양한 후 효소생산능을 측정	The prophylactic effect of probiotic <i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3 against cancer cells Journal of Functional Foods 14:513-518

(3) 세포독성 관련 실험법 표준화 조사

- 건강기능식품 및 유제품 종균에 대한 세포독성 관련 SCI급 논문 분석 결과는 다음과 같다(Table 1-3). 균체의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 이용하여 정상세포(MRC-5)에 대한 독성을 측정하였다.
- 세포독성 관련 실험법의 표준화는 MTT assay를 이용하여 정상세포에 대한 세포독성을 측정하는 실험방법으로 결정하였다.

Table 1-3. 세포독성 관련 SCI급 논문 분석

순번	년도 (년)	세포독성	논문명	저널
1	2001	MTT assay를 이용해 Vero, PBMC cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Anticancer and apoptosis-inducing activities of microbial metabolites	Electronic Journal of Biotechnology DOI: 10.2225/vol13-issue5-full-text-7
2	2013	MTT assay를 이용해 H NCF-PI 52(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate	Journal of Medical Microbiology 62:1065-1072
3	2014	MTT assay를 이용해 H UVEC cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	A newly isolated probiotic <i>Enterococcus faecalis</i> strain from vagina microbiota enhances apoptosis of human cancer cells	Journal of Applied Microbiology 117:498-508
4	2014	MTT assay를 이용해 H UVEC cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Anti-proliferative effects of <i>Enterococcus</i> strains isolated from fermented dairy products on different cancer cell lines	Journal of Functional Foods 11:363-374
5	2014	MTT assay를 이용해 H UVEC cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Probiotic potential and biotherapeutic effects	Anaerobe

		대한 세포독성을 측정	of newly isolated vaginal <i>Lactobacillus acidophilus</i> 36YL strain on cancer cells	28:29-36
6	2014	MTT assay를 이용해 H UVEC cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Different effects of two newly-isolated probiotic <i>Lactobacillus plantarum</i> 15HN and <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 44 Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines	Anaerobe 30:51-59
7	2015	MTT assay를 이용해 H UVEC cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota	LWT - Food Science and Technology 60:690-697
8	2015	MTT assay를 이용해 M RC-5 cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	The prophylactic effect of probiotic <i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3 against cancer cells	Journal of Functional Foods 14:513 - 518
9	2015	MTT assay를 이용해 M RC-5 cell(정상세포)에 대한 세포독성을 측정	Multifunctional effect of probiotic <i>Lactococcus lactis</i> KC24 isolated from kimchi	LWT-Food Science and Technology 64:1036-1041

(4) 장 부착능 관련 실험법 표준화 조사

- 건강기능식품 및 유제품 종균에 대한 장 부착능 관련 SCI급 논문 분석결과는 다음과 같다(Table 1-4). HT-29 cell 또는 Caco-2 cell를 이용하여 균을 부착시킨 후 세포를 떼어내어 장 부착능을 측정하였다.
- 장 부착능의 경우 HT-29 cell를 이용하여 균을 접종시켜 2시간 배양하여 부착시킨 뒤 1% Triton X-100을 이용하여 세포를 떼어낸 뒤 부착된 균수를 측정하는 실험방법으로 결정하였다.

Table 1-4. 장 부착능 관련 SCI급 논문 분석

순 번	년도 (년)	장 부착능	논문명	저널
1	2011	HT-29 cell에 균을 접종 시켜 2시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Antimicrobial activity against <i>Shigella</i> <i>sonnei</i> and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food	Microbiological Research 167:27-31
2	2011	HT-29 cell에 균을 접종 시켜 2시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated <i>Lactobacillus</i> spp.: Immune modulation and longevity	International Journal of Food Microbiology 148:80-86
3	2011	HT-29 cell에 균을 접종 시켜 1시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Characterization and <i>in vitro</i> properties of potentially probiotic <i>Bifidobacterium</i> strains isolated from breast-milk	International Journal of Food Microbiology 149:28-36
4	2012	Caco-2 cell에 균을 접종 시켜 3시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Probiotic assessment of <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> CP58 isolated from human gut	International Journal of Food Microbiology 145:390-394
5	2012	HT-29 cell에 균을 접종 시켜 1시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Screening for cholesterol-lowering probiotic based on deoxycholic acid removal pathway and studying its functional mechanisms <i>in vitro</i>	Anaerobe 18:516-522
6	2012	HT-29, Caco-2 cell에 균을 접종시켜 1시간 배 양시킨 뒤 장부착능 측정	<i>In vitro</i> testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria	International Journal of Food Microbiology 153:216-222
7	2013	HT-29 cell에 균을 접종	Screening of	Food Control

		시켜 1시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	30:563-568
8	2013	HT-29 cell에 균을 접종시켜 1시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Study of probiotic potential of four wild <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strains	Anaerobe 21:22-27
9	2014	HT-29 cell에 균을 접종시켜 2시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Probiotic potential of <i>Lactobacillus</i> strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters	LWT-Food Science and Technology 58:130-134
10	2014	HT-29 cell에 균 접종시켜 2시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three <i>Lactobacillus</i> strains	International Journal of Biological Macromolecules 65:110-114
11	2014	Caco-2 cell에 균 접종시켜 2시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	<i>In vitro</i> evaluation of the probiotic and functional potential of <i>Lactobacillus</i> strains isolated from fermented food and human intestine	Anaerobe 30:1-10
12	2014	HT-29 cell에 균 접종시켜 2시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Screening of indigenous oxalate degrading lactic acid bacteria from human faces and south indian fermented foods: Assesment of probiotic poential	The Scientific World Journal Article ID 648059
13	2014	Caco-2 cell에 균 접종시켜 1.5시간 배양시킨 뒤 장부착능 측정	Probiotic characteristics of <i>Lactobacillus fermentum</i> strains isolated from tulum cheese	Anaerobe 30:120-125

14	2015	HT-29 cell에 균 접종시켜 1시간 배양시킨 뒤 장 부착능 측정	A novel method for screening of potential probiotics for high adhesion capability	Journal of Dairy Science 98:4310-4317
15	2015	HT-29 cell에 균 접종시켜 1시간 배양시킨 뒤 장 부착능 측정	Comparison of lactobacilli isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties	Journal of Functional Foods 12:294-302
16	2015	HT-29 cell에 균 접종시켜 2시간 배양시킨 뒤 장 부착능 측정	Evaluation of probiotic properties of <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i> strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea	LWT - Food Science and Technology 63:437-444
17	2015	HT-29 cell에 균 접종시켜 2시간 배양시킨 뒤 장 부착능 측정	The prophylactic effect of probiotic <i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3 against cancer cells	Journal of Functional Foods 14:513-518

(5) Protease activity 관련 실험법 표준화 조사

- 전통발효식품 종균에 대한 protease 관련 SCI급 논문 분석결과는 다음과 같다(Table 1-5). 1% skim milk agar를 이용하여 양성인지 음성인지 확인한 후 protease 활성 실험을 통해 측정하였다.
- Protease activity 관련 실험법 표준화는 1% skim milk agar를 통해 활성 유/무를 판단한 후, 기질을 Folin-ciocalteu 반응을 이용한 protease 활성을 측정방법으로 결정하였다.

Table 1-5. Protease 활성 관련 SCI급 논문 분석

순번	년도 (년)	Protease 활성	논문명	저널
1	2009	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인	Comparative study of proteolytic activity of protease-producing bacteria isolated from thun nao	International Journal of Science and Technology 3:269-276
2	2011	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 Folin-ciocalteu반응을 이용	Production of protease by <i>Bacillus</i> sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties	Journal Biology Environment Science 5:95-103
3	2012	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 Folin-ciocalteu반응을 이용	Enzymatic activities of <i>Bacillus</i> species isolated from commercial samples of 'OGIRI' in western nigeria	Global Research Journal of Microbiology 2:96-102
4	2013	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인	Comparative study of proteolytic activity of protease-producing bacteria isolated from <i>thun nao</i>	Journal Biochemistry Technology 3:628-630
5	2013	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인	Production and optimization of extracellular alkaline proteases from <i>Bacillus</i> sp. isolated from marine soil	Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 4:1-8
6	2013	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 Folin-ciocalteu반응을 이용	Characterization of solvent stable extracellular protease from <i>Bacillus koreensis</i>	International Journal of Biological Macromolecules 56:162-168
7	2013	1% casein agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 Folin-ciocalteu	Screening and optimization of protease production	Journal of Genetic Engineering

		반응을 이용	from a halotolerant <i>Bacillus licheniformis</i> isolated from saltern sediments	and Biotechnology 11:47-52
8	2014	1% casein agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 bovine serum albumin을 이용한 lowry 방법 적용	Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic <i>Bacillus</i> sp	International Journal of Research in Engineering and Technology 3:435-443
9	2014	1% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 Folin-ciocalteu반응을 이용	Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil samples of district Kohat, Pakistan	Journal of Biomolecular Science 3:1-5
10	2015	2.8% skim milk agar를 이용하여 clear zone 유/무를 확인하고 Folin-ciocalteu반응을 이용	Determination of proteolytic activities of <i>Bacillus</i> species isolated from traditional fermented oil bean seed	British Microbiology Research Journal 6:277-285

(6) Amylase activity 관련 실험법 표준화 조사

- 전통발효식품 종균에 대한 amylase 관련 SCI급 논문 분석결과는 다음과 같다(Table 1-6). 1% starch agar에 요오드용액을 넣은 후 양성인지 음성인지 확인한 후 amylase 활성 실험을 통해 측정하였다.
- Amylase activity 관련 실험법 표준화는 1% starch agar에 요오드용액을 넣은 후 활성 유/무를 판단한 후 활성이 있는 균들에 한하여 환원당 DNS 법을 실험방법으로 결정하였다.

Table 1-6. Amylase 활성 관련 SCI급 논문 분석

순번	년도 (년)	Amylase 활성	논문명	저널
1	2010	0.5% starch agar에 요오드용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환	Characterization of thermostable α -amylase from thermophilic and	Research Journal of Biological

		원당 DNS법에 적용	alkaliphilic <i>Bacillus</i> sp. isolate DM-15	Sciences 5:118-124
2	2011	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원당 DNS법에 적용	A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from <i>Bacillus subtilis</i>	Advances in Applied Science Research 2:509-519
3	2012	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원당 DNS법에 적용	α -amylase assay of <i>Bacillus subtilis</i> KC3: Isolated from <i>Euphorbia hirta</i> rhizosphere	International Conference on Biological and Life science 40:12-16
4	2012	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원당 DNS법에 적용	Production of a thermostable α -amylase and its assay using <i>Bacillus licheniformis</i> isolated from Excavated land sites in ibadan, Nigeria	Bayero Journal of Pure and Applied Science 5:132-138
5	2012	0.1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원당 DNS법에 적용	Isolation and identification of a new <i>Bacillus</i> strain for amylase production	Research in Biotechnology 3:51-58
6	2013	0.1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원당 DNS법에 적용	Amylase production from bacteria isolated in the soil receiving kitchen wastes	International Journal of pharmaceutical and chemical sciences 7:283-287
7	2013	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 fuwa's colorimetric method를 적용	Isolation, optimization and characterization of α -amylase from <i>Bacillus alcalophilus</i>	International Journal of Science and Research 2:171-174
8	2013	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원당 DNS법에 적용	Molecular identification of amylase producing <i>Bacillus subtilis</i> and detection of optimal	Journal of Pharmacy Research 6:426-430

		conditions	
9	2014	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 환원 당 DNS법에 적용	Isolation, characterization and optimization of amylase producing microorganism from gastrointestinal tract of <i>Catla catla</i>
			International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology 3:17890-17899
10	2014	1% starch agar에 요오드 용액을 넣은 후 clear zone 유/무를 확인하고 요오드와 전분을 활용하여 활성 측정	Characterization of the ozone effect over an α -amylase from <i>Bacillus licheniformis</i>
			Biochemical Engineering Journal 85:119-124

제 2절 유제품, 전통발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 토종 균주의 수집 및 스크리닝 (6000주)

1. 토종균주의 확보

- 각 협동별(건국대학교, 한국식품연구원, 단국대학교, 가천대학교, (사)한국종균협회)로 전통발효식품 분리균주를 확보한 결과(Figure 1-1), 전통발효식품에서 6,087주를 확보하였다.
- 확보한 전통발효식품 분리균주 6,087주에 대해 1,2,3차년도동안 균주에 대한 스크리닝을 완료하였다.

균주번호	구분	코드명	미생물명	분리원	분리장소	분리시기	타기관보관번호	배양조성	배양온도(℃)	배양 pH	산소요구성
200001	Bacteria	FI10001	Lactobacillus parabuchneri	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200002	Bacteria	FI10002	Lactobacillus fermentum	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200003	Bacteria	FI10003	Lactobacillus parabuchneri	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200004	Bacteria	FI10004	Lactobacillus fermentum	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200005	Bacteria	FI10005	Lactobacillus fermentum	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200006	Bacteria	FI10006	Leuconostoc mesenteroides	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200007	Bacteria	FI10007	Lactobacillus parabuchneri	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200008	Bacteria	FI10008		배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200009	Bacteria	FI10009	Lactobacillus fermentum	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
200010	Bacteria	FI10010	Oenococcus oeni	배추김치	홍제동 재래시장	2007		MRS	37	7	F Anaerobe
중략											
206081	Bacteria	FI14277		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe
206082	Bacteria	FI14278		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe
206083	Bacteria	FI14279		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe
206084	Bacteria	FI14280		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe
206085	Bacteria	FI14281		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe
206086	Bacteria	FI14282		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe
206087	Bacteria	FI14283		배추김치		2017		MRS	37	7	F Anaerobe

Figure 1-1. 토종 균주의 확보 현황.

2. 유제품 및 건강기능식품의 경우 토종균주에 대한 내산성 스크리닝

- 유제품 및 건강기능식품에 사용되는 균주의 경우 체내 섭취시 장까지 도달하기 위해서 내산성과 내담즙성이 우수해야 한다. 균주의 경우 대부분 내산성이 내담즙성보다 취약하기 때문에 유제품 및 건강기능식품에 사용되는 균주에 대한 내산성 스크리닝을 실험하고자 하였다.
- 유제품 및 건강기능식품에 대한 내산성 스크리닝에 해당되는 균주들은 유산균, *Bacillus*, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)가 해당되며 전통발효식품 분리균주 6,087주 중 *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus aerius*, *Enterococcus* spp. 등은 스크리닝 단계에서 식품산업에 적합하지 않기 때문에 이러한 균주를 제외시킨 균주에 대해 내산성 스크리닝을 진행하였다.

- 유제품 및 건정기능식품에 대한 내산성 스크리닝 방법은 다음과 같다. 전통발효식품 분리균주들은 TSB, MRS, YM broth에 하루 전에 접종시킨 후 16시간 정도 37℃(효모의 경우 25℃)에서 배양시켰다. 유산균, *Bacillus*, 효모에 해당하는 pH 2.5, pH 7 broth(control)를 준비한 후 96 well plate에 균 배양액 100 μL와 pH 2.5 또는 pH 7에 해당하는 broth 100 μL를 섞은 후 37℃(효모의 경우 25℃)에서 24시간 배양을 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 630 nm에서 pH 7 배양액(control)과 pH 2.5 배양액의 흡광도를 비교하여 생존율을 측정하여 내산성을 지닌 균주를 스크리닝하였다.
- 내산성 스크리닝에 대한 생존율을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{Survial rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{2 \text{ h, pH } 2.5} - \text{OD}_{0 \text{ h, pH } 2.5}}{\text{OD}_{2 \text{ h, control}} - \text{OD}_{0 \text{ h, control}}} \times 100$$

- 생존율을 기준으로 유산균의 경우 70%, *Bacillus*의 경우 50%, 효모의 경우 80% 기준으로 정하여 해당하는 균주들은 추후 내산·내담즙성 실험을 진행하였다.
- 전통발효식품 유래 유산균 1,404주에 대한 내산성 스크리닝한 결과(Table 1-7), 생존율 70%기준으로 평가했을 때 유산균 566주가 내산성이 우수한 균으로 예상되었다.

Table 1-7. 유산균 1차 내산성 스크리닝 결과

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
Lb1	109.63	Ln2-2	107.92	A7	94.77
Lb2-1	67.11	Ln3-1	41.90	A8	0.00
Lb2-2	30.97	Ln3-2	7.15	B2	127.96
Lb3-1	58.42	Ln4	86.86	B3-1	27.00
Lb3-2	20.67	Ln5	112.44	B3-2-1	20.82
Lb41	71.27	A1	10.59	B3-2-2	15.61
Lb4-2	0.00	A2	130.00	B4	18.44
Lb5	71.43	A3	64.71	B5	0.00
Ln1	71.99	A4	95.04	B6	26.63
Ln2-1	72.20	A5	82.65	B7	65.90

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
B8	69.66	C204	25.37	SY45	30.82
B10	0.00	C205	118.32	F241	69.09
B11	29.14	C206	20.57	F242	55.07
B12-1	0.00	C208	39.07	F243	73.42
B12-2	1.66	C209	60.40	F342	112.61
B13	74.97	C210	50.22	F343	81.58
B13-1	48.27	C211	46.32	F344	35.90
B13-2	92.59	C212	59.64	F432	18.01
B15	84.43	C213	94.31	F542	13.72
B151	89.04	C214	128.70	F643	33.56
B15-2	28.66	C215	6.49	F1651	49.03
B341	103.45	C216	53.65	F1652	83.40
B431	0.00	C217	22.22	F1951	101.41
B1653	55.12	C218	45.24	F1953	77.40
B1654	50.36	C219	52.29	F1954	3.14
B3142	118.48	C220	82.90	F2251	44.94
B3353	0.00	D1	134.65	F3144	67.82
B3403	98.06	D2	111.74	F3352	103.44
B3473	2.08	D3-1	29.05	G1	80.25
C1	13.30	D4	117.95	G2-1	91.23
C2	29.02	D7	75.73	G2-2	98.80
C3	21.93	D8	7.23	G3	17.95
C4	20.70	D9	118.57	G4-1	85.71
C5	0.00	D10	115.10	G4-2	119.14
C6	56.76	D13	33.51	G7-1	24.27
C7	15.18	D14	44.73	G72	80.89
C8	76.09	D29	65.61	G11-1	79.48
C9	43.85	D30	64.19	G11-2	21.53
C10	91.41	D31	77.08	H9	3.64
C11	68.64	D38	0.36	H12	14.62
C12	111.11	D39	32.96	H14	19.88
C64	56.65	D40	31.40	H16	0.00
C66	57.98	SY31	79.04	H17	62.02
C67	95.42	SY32	14.98	H18	5.31
C68	10.34	SY33	101.79	H19	18.95
C70	76.24	SY34	35.82	H20	29.66
C71	48.00	SY35	36.59	H21	40.21
C73	98.36	SY41	28.79	H22	0.00
C201	25.14	SY43	61.38	H23	0.00
C203	43.16	SY44	46.50	H24	103.81

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
H25	77.19	KU15020	48.76	KU15077	19.51
H26	0.00	KU15021	102.88	KU15078	10.51
H28	24.42	KU15022	64.10	KU15082	70.18
H29	33.18	KU15023	58.97	KU15083	87.26
H30	41.98	KU15024	148.44	KU15084	54.23
H31	27.08	KU15030	51.48	KU15086	108.32
H32	16.87	KU15032	45.81	KU15087	108.60
H33	48.99	KU15033	35.32	KU15088	7.29
H34	67.19	KU15034	125.00	KU15090	50.93
H35	39.24	KU15035	96.93	KU15091	54.54
H36	25.00	KU15036	50.28	KU15092	47.00
H37	0.00	KU15037	58.04	KU15093	55.40
H39	51.02	KU15040	51.34	KU15094	9.43
H40	75.00	KU15042	11.14	KU15095	5.62
KC24	0.00	KU15043	7.09	KU15096	2.98
M1	64.63	KU15044	0.00	KU15097	25.89
M10	0.00	KU15046	33.95	KU15098	16.27
M20	0.00	KU15047	0.00	KU15099	86.32
M50	93.48	KU15048	20.78	KU15100	14.06
M52	110.81	KU15049	29.53	KU15101	30.04
M59	46.28	KU15050	51.86	KU15102	14.35
M60	46.52	KU15051	1.81	KU15103	32.98
M73	28.21	KU15053	63.69	KU15104	12.42
M74	102.82	KU15054	52.61	KU15105	73.36
KU15001	57.51	KU15055	70.29	KU15106	92.56
KU15002	13.56	KU15058	94.19	KU15107	19.43
KU15004	114.40	KU15059	54.90	KU15108	13.64
KU15005	82.16	KU15060	51.81	KU15110	44.12
KU15006	78.86	KU15061	22.24	KU15111	58.03
KU15007	42.16	KU15062	88.15	KU15112	7.79
KU15008	47.19	KU15063	56.40	KU15113	4.90
KU15009	148.39	KU15064	92.50	KU15114	0.00
KU15010	62.31	KU15065	97.59	KU15115	0.00
KU15011	3.89	KU15066	15.15	KU15116	50.33
KU15012	119.94	KU15070	0.00	KU15118	59.26
KU15013	98.21	KU15072	0.00	KU15119	54.67
KU15014	117.20	KU15073	27.10	KU15121	34.51
KU15016	9.80	KU15074	38.18	KU15122	80.78
KU15018	94.20	KU15075	7.14	KU15123	57.91
KU15019	98.16	KU15076	0.00	KU15124	52.47

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
KU15125	20.86	KU15184	0.00	SC18	47.97
KU15126	36.03	KU15185	5.93	SC19	38.88
KU15127	0.00	KU15186	2.96	SC20	44.00
KU15128	27.20	KU15187	4.17	SC21	7.91
KU15129	0.00	KU15190	4.43	SC22	23.82
KU15134	0.00	KU15192	30.63	SC23	67.99
KU15135	15.20	KU15193	0.00	SC24	27.81
KU15136	31.40	KU15196	55.31	SC25	73.27
KU15137	27.56	KU15197	116.33	SC26	46.52
KU15138	81.31	KU15199	0.00	SC27	58.90
KU15139	118.09	KU15200	0.00	SC28	105.49
KU15140	29.80	KU15201	0.00	SC29	61.97
KU15141	36.54	KU15202	0.00	SC30	2.72
KU15142	81.40	KU15203	83.01	SC32	65.17
KU15143	0.00	KU15204	0.00	SC52	1.41
KU15144	81.84	g42	0.00	SC53	81.86
KU15145	0.00	g43	61.04	SC59	25.29
KU15150	46.15	g73	69.68	SC60	0.00
KU15155	47.27	GS0015	124.81	SC61	124.94
KU15160	26.31	61517	142.73	SC63	41.62
KU15161	17.83	73911	33.62	SC64	86.81
KU15164	51.48	73918	59.25	SC65	15.42
KU15165	52.21	74401	10.09	Bro8	37.58
KU15166	61.47	SC1	8.16	Bro14	59.17
KU15167	44.40	SC2	20.55	Bro22	129.91
KU15168	28.68	SC3	20.11	S.Pum7	0.00
KU15169	19.94	SC4	45.32	S.Pum8	38.44
KU15170	6.02	SC5	18.43	S.Pum9	0.00
KU15171	60.43	SC6	21.31	S.Pum14	60.82
KU15172	18.59	SC7	18.90	S.Pum18	22.86
KU15173	0.00	SC8	37.89	S.Pum19	84.43
KU15174	49.06	SC9	34.13	S.Pum21	51.48
KU15175	45.29	SC10	24.78	S.Pum25	35.70
KU15177	102.92	SC11	46.54	Y-KC2	135.82
KU15178	14.29	SC12	77.65	Y-KC3	8.18
KU15179	34.69	SC13	17.65	Y-KC6	119.40
KU15180	50.83	SC14	71.28	Y-KC9	25.44
KU15181	0.00	SC15	40.85	Y-KC11	9.01
KU15182	3.32	SC16	13.31	Y-KC13	0.00
KU15183	26.92	SC17	29.32	Y-KC15	51.08

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
Y-KC19	92.58	ON-34A	9.40	SP-028	0.00
sal.cla3	6.68	ON-35A	42.77	SP-030	0.00
sal.cla5	67.39	ON-39A	16.39	SP-033	0.00
sal.cla6	106.41	ON-40A	23.14	SP-034	0.00
sal.cla7	29.70	ON-41A	46.49	SP-035	0.00
sal.cla8	48.90	ON-42A	2.33	SP-036	0.00
sal.cla9	77.50	ON-43A	59.28	SP-037	0.00
sal.cla10	63.21	ON-44A	0.00	SP-038	0.00
sal.cla11	34.93	ON-45A	0.00	SP-039	0.00
sal.cla22	67.31	ON-47A	0.00	SP-040	0.00
sal.cla23	112.79	ON-50A	0.00	SP-041	0.00
blue.Be3	110.83	ON-51A	0.00	SP-042	25.26
blue.Be13	10.93	ON-53A	0.00	SP-043	19.17
P.s8	67.68	ON-55A	38.75	SP-044	31.68
ma.KC20	29.23	ON-57A	46.18	TA-027	14.70
ON-184	103.00	ON-59A	0.00	TA-028	4.06
ON-188	0.00	ON-60A	0.00	TA-029	15.82
ON-192	42.92	ON-61A	24.06	TA-031	16.74
ON-193	0.00	ON-62A	35.68	TA-032	21.25
ON-194	0.00	ON-63A	50.90	TA-033	17.05
ON-207	0.00	ON-66A	15.46	TA-034	8.29
ON-208	0.00	ON-76A	0.00	TA-035	8.69
ON-237	13.81	ON-80A	0.00	TA-036	7.13
ON-241	0.00	ON-81A	0.00	TA-037	9.81
ON-242	6.39	ON-82A	0.00	TA-038	19.68
ON-250	114.15	ON-83A	0.00	TA-039	24.24
ON-255	9.85	ON-84A	0.00	TA-040	10.44
ON-262	59.34	ON-87A	0.00	TA-041	5.31
ON-263	18.45	ON-89A	0.00	TA-042	19.79
ON-266	20.94	ON-90A	0.00	TA-043	16.21
ON-269	32.15	ON-91A	0.00	TA-044	18.23
ON-272	21.08	ON-92A	0.00	TA-045	8.62
ON-295	21.83	ON-93A	0.00	TA-046	2.80
ON-303	23.46	SP-019	0.00	TA-047	0.00
ON-304	18.80	SP-020	0.00	TA-048	20.45
ON-25A	24.07	SP-021	0.00	RA035	12.94
ON-29A	0.00	SP-023	2.42	GO005	23.79
ON-30A	27.71	SP-024	0.00	GO008	0.00
ON-32A	27.48	SP-025	0.00	GO012	0.00
ON-33A	21.59	SP-026	0.00	GO026	18.35

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
CA-020	17.75	200038	49.12	200078	88.31
CA-022	0.00	200039	57.49	200079	41.88
CA-023	8.53	200040	45.68	200080	109.43
200001	20.87	200041	0.00	200081	89.06
200002	11.55	200042	32.41	200082	5.09
200003	36.29	200043	3.94	200083	70.74
200004	17.63	200044	32.53	200114	79.92
200005	53.08	200045	28.74	200115	37.45
200006	34.14	200046	117.11	200116	42.88
200007	16.21	200047	79.88	200117	57.14
200008	24.20	200048	39.21	200118	29.67
200009	45.60	200049	2.62	200119	56.22
200010	14.99	200050	30.72	200120	42.01
200011	94.72	200051	45.95	200121	83.38
200012	39.95	200052	0.00	200122	101.11
200013	10.85	200053	33.95	200123	104.43
200014	26.24	200054	96.08	200124	74.90
200015	38.33	200055	0.68	200125	2.33
200016	72.90	200056	0.00	200126	0.00
200017	57.67	200057	138.69	200127	86.80
200018	82.26	200058	0.00	200128	40.71
200019	91.25	200059	32.18	200129	47.90
200020	7.30	200060	89.97	200130	7.96
200021	0.00	200061	0.00	200131	116.36
200022	0.00	200062	10.79	200132	0.00
200023	0.00	200063	16.79	200133	89.22
200024	37.46	200064	39.36	200134	28.89
200025	22.08	200065	59.41	200135	0.00
200026	13.50	200066	47.74	200136	63.28
200027	0.00	200067	54.23	200137	47.84
200028	22.80	200068	0.00	200138	112.22
200029	14.56	200069	58.99	200139	4.60
200030	25.71	200070	102.71	200140	10.38
200031	36.49	200071	16.38	200141	5.96
200032	23.65	200072	161.18	200142	34.34
200033	32.74	200073	91.46	200143	42.73
200034	40.68	200074	37.63	200144	4.58
200035	33.33	200075	76.42	200145	5.59
200036	37.34	200076	60.27	200146	9.98
200037	79.29	200077	24.41	200147	46.11

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
200148	32.93	200188	304.00	200336	8.22
200149	24.01	200189	346.51	200343	14.50
200150	1.84	200190	616.13	200344	12.04
200151	6.41	200199	33.23	200346	5.83
200152	7.50	200200	46.69	200347	5.97
200153	21.90	200201	44.96	200353	13.82
200154	100.00	200202	16.67	200355	7.81
200155	47.06	200203	28.42	200356	30.86
200156	42.55	200204	36.25	200358	58.72
200157	38.17	200205	45.37	200359	62.50
200158	31.23	200206	0.00	200361	1.43
200159	41.30	200207	111.76	200362	18.51
200160	38.18	200208	0.00	200363	21.23
200161	26.23	200211	38.50	200369	42.26
200162	63.95	200212	20.36	200383	3.27
200163	61.00	200213	60.39	200384	2.82
200164	24.27	200214	48.64	200390	36.76
200165	0.00	200215	23.13	200400	1.44
200166	391.07	200246	18.81	200405	38.98
200167	267.03	200247	41.05	200406	75.71
200168	161.82	200248	0.00	200407	45.91
200169	227.78	200249	30.05	200408	43.91
200170	170.63	200250	82.96	200409	40.75
200171	214.91	200251	62.48	200410	36.40
200172	164.29	200252	62.92	200411	31.03
200173	213.39	200253	86.69	200412	26.63
200174	23.73	200254	41.02	200413	47.89
200175	138.92	200296	15.32	200414	54.52
200176	0.00	200297	25.70	200415	73.14
200177	425.00	200300	0.00	200416	52.64
200178	84.02	200303	46.89	200417	45.97
200179	402.27	200304	19.67	200418	43.16
200180	102.08	200305	0.00	200419	34.75
200181	28.92	200306	0.00	200420	42.05
200182	246.88	200307	14.22	200421	55.37
200183	125.97	200309	18.36	200422	56.91
200184	0.00	200326	5.65	200423	37.40
200185	217.20	200327	33.16	200424	50.39
200186	211.96	200328	42.44	200425	85.83
200187	546.67	200335	3.21	200426	87.39

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
200427	35.36	200644	56.81	200688	45.10
200428	72.61	200645	31.42	200689	0.00
200429	21.10	200646	25.70	200690	0.00
200430	24.79	200647	35.81	200691	102.31
200431	18.26	200648	62.60	200692	74.10
200432	15.52	200649	36.14	200693	70.67
200433	42.73	200650	135.33	200696	25.14
200434	53.39	200651	143.95	200699	73.05
200550	10.49	200652	0.00	200705	0.00
200551	13.33	200653	51.13	200792	69.89
200552	22.44	200654	30.48	200793	78.43
200553	27.82	200655	74.04	200794	85.46
200615	20.75	200656	121.08	200795	65.82
200616	0.00	200657	0.00	200796	66.97
200617	43.15	200658	58.27	200797	81.84
200618	129.85	200659	0.00	200798	78.71
200619	49.12	200660	0.00	200799	71.30
200620	38.68	200661	86.39	200800	180.82
200621	28.22	200662	46.61	200801	72.07
200622	18.58	200663	11.08	200802	25.42
200624	152.14	200664	12.94	200803	66.32
200625	46.54	200667	15.79	200804	45.24
200626	47.63	200668	13.66	200805	6.16
200627	30.37	200669	47.77	200806	61.04
200628	57.03	200670	0.00	200807	0.00
200629	52.23	200671	26.78	200808	28.92
200630	68.42	200673	0.00	200809	154.68
200631	71.46	200674	70.50	200810	99.34
200632	161.25	200675	151.02	200811	140.55
200633	96.76	200676	67.73	200812	7.30
200634	39.73	200677	31.08	200813	0.00
200635	36.57	200678	0.00	200814	0.00
200636	48.42	200679	10.83	200815	2.44
200637	66.67	200681	0.00	200816	0.00
200638	17.09	200682	94.55	200817	87.43
200639	6.33	200683	84.29	200818	13.73
200640	85.23	200684	72.37	200819	53.48
200641	21.37	200685	23.73	200820	60.36
200642	0.00	200686	18.40	200821	87.10
200643	0.00	200687	5.04	200822	55.56

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
200823	60.84	202255	76.94	202301	74.45
200824	12.07	202256	44.13	202302	103.52
200825	93.04	202257	62.01	202303	81.67
200826	56.31	202258	94.00	202304	60.20
200847	64.95	202259	80.40	202305	103.28
200848	68.00	202260	69.96	202306	90.02
200849	63.08	202261	84.96	202307	72.96
200850	46.09	202262	84.01	202308	109.02
200851	45.88	202263	84.80	202309	91.57
200852	82.33	202264	55.64	202310	82.18
200853	69.02	202265	83.34	202311	116.88
200854	102.40	202266	83.62	202312	98.06
200855	102.80	202267	50.46	202313	76.17
200856	105.68	202268	85.14	202314	73.32
202229	111.14	202269	80.36	202315	70.38
202230	103.49	202270	80.65	202316	73.87
202231	114.88	202271	35.06	202317	70.24
202232	113.84	202272	104.06	202318	62.40
202233	111.03	202273	51.04	202319	58.07
202234	118.00	202274	73.65	202320	57.83
202235	99.96	202275	79.21	202321	67.53
202236	54.13	202276	86.50	202322	76.02
202237	90.26	202277	53.18	202323	78.17
202238	88.77	202278	117.04	202324	79.37
202239	64.95	202279	47.00	202325	71.90
202240	65.49	202282	66.22	202326	88.02
202241	100.17	202284	12.09	202329	98.05
202242	88.95	202285	50.86	202330	84.06
202243	89.31	202289	31.36	202331	129.09
202244	92.89	202290	68.50	202332	108.52
202245	83.14	202291	65.15	202333	96.30
202246	88.99	202292	45.41	202334	105.07
202247	79.92	202293	35.57	202335	14.79
202248	105.87	202294	65.46	202336	90.71
202249	67.57	202295	70.24	202337	60.14
202250	60.90	202296	86.18	202346	16.64
202251	53.94	202297	96.66	202347	70.58
202252	86.35	202298	78.88	202348	68.67
202253	84.37	202299	93.91	202349	26.39
202254	70.64	202300	80.11	202350	75.03

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
202351	76.37	202394	113.90	202445	46.79
202352	44.01	202395	110.80	202446	112.87
202353	13.41	202396	155.50	202447	91.68
202354	86.88	202397	93.20	202448	58.71
202355	96.11	202398	70.40	202449	67.00
202356	89.08	202399	93.60	202450	90.29
202357	86.51	202400	96.20	202456	66.16
202358	81.36	202402	47.90	202457	50.15
202359	58.25	202403	77.80	202459	61.01
202360	87.86	202404	60.20	202461	61.21
202361	91.53	202405	92.50	202462	81.06
202362	85.86	202406	139.80	202467	65.99
202363	81.95	202407	95.60	202468	53.49
202364	83.82	202408	96.70	202469	20.19
202365	84.86	202409	60.30	202470	71.95
202366	85.44	202410	68.80	202472	51.56
202367	72.75	202411	82.60	202473	61.18
202368	83.68	202412	51.20	202477	73.08
202369	81.01	202413	265.90	202478	69.16
202370	78.08	202414	180.33	202479	55.19
202371	75.61	202415	47.92	202480	34.27
202372	65.86	202416	42.60	202481	75.51
202373	82.29	202417	16.50	202482	34.07
202374	53.40	202418	41.20	202483	40.33
202375	55.10	202419	14.60	202484	50.78
202376	85.52	202420	131.30	202485	41.04
202377	86.30	202421	149.70	202486	25.53
202378	74.60	202423	102.20	202487	95.42
202379	41.80	202425	123.90	202488	95.43
202383	93.10	202428	56.62	202489	64.83
202384	101.40	202429	73.88	202490	105.19
202385	97.50	202430	74.95	202491	68.26
202386	108.40	202431	43.61	202492	60.46
202387	109.20	202432	57.61	202493	47.41
202388	95.30	202433	36.66	202494	86.02
202389	103.70	202434	67.50	202495	158.55
202390	73.40	202436	52.10	202496	84.20
202391	78.20	202442	90.54	202497	60.09
202392	96.50	202443	89.29	202498	43.41
202393	149.50	202444	90.96	202499	35.37

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
202500	65.62	202553	81.97	202604	81.35
202501	44.62	202554	88.05	202605	72.80
202502	50.71	202555	88.37	202606	42.53
202503	12.77	202556	114.97	202607	80.52
202504	76.09	202557	149.48	202608	66.61
202505	65.19	202558	146.99	202609	64.41
202506	51.43	202559	143.16	202610	75.04
202507	70.82	202560	131.58	202611	83.18
202508	93.62	202565	22.06	202612	83.43
202511	246.68	202566	27.18	202613	85.43
202512	263.15	202567	34.82	202614	78.15
202513	184.14	202569	122.25	202615	107.01
202514	239.91	202570	62.60	202616	83.15
202515	263.56	202571	91.08	202617	154.31
202516	255.62	202576	81.77	202618	103.37
202517	225.29	202577	82.93	202619	113.64
202518	236.74	202578	82.34	202620	102.58
202519	42.68	202579	63.44	202621	82.87
202520	202.86	202580	80.73	202622	14.68
202521	215.15	202581	90.75	202774	49.68
202522	240.01	202582	77.47	202775	84.26
202523	245.53	202584	72.72	202776	175.2
202524	240.25	202585	111.52	202777	282.73
202525	53.28	202586	120.74	202778	51.32
202526	237.95	202587	54.62	202779	48.03
202527	239.21	202588	52.97	202780	47.86
202528	235.68	202589	47.94	202781	72.87
202531	76.28	202590	38.37	202782	69.48
202540	87.44	202591	27.72	202783	24.03
202541	86.09	202592	122.07	202784	30.35
202542	85.45	202593	80.52	202785	96.41
202543	87.55	202594	82.54	202786	62.41
202544	86.54	202595	104.94	202787	63.68
202545	87.45	202596	103.95	202788	46.91
202547	117.61	202597	101.94	202789	69.56
202548	90.51	202599	87.75	202790	66.51
202549	70.88	202600	79.28	202791	52.73
202550	90.06	202601	70.52	202792	88.34
202551	86.06	202602	81.56	202793	127.42
202552	85.59	202603	97.37	202794	109.17

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
202795	369.35	202984	86.89	203198	60.63
202796	69.29	202985	84.62	203199	96.43
202797	59.01	202986	86.62	203200	89.27
202798	67.97	202987	85.96	203321	40.22
202799	109.26	203039	105.64	203322	254.71
202800	80.77	203040	87.15	203323	85.6
202801	137.55	203041	107.12	203324	52.54
202802	75.2	203042	59.64	203325	51.22
202803	120.08	203043	91.49	203326	36.51
202804	117.3	203044	90.95	203327	58.91
202805	170.52	203045	89.3	203328	27.86
202806	40.5	203046	87.7	203329	26.25
202807	64.44	203047	87.63	203330	32.78
202808	113.97	203098	215.84	203331	77.93
202905	78.4	203099	202.28	203332	56.43
202906	82.8	203100	155.21	203333	67.31
202907	84.51	203101	184.51	203334	67.27
202908	78.91	203102	189.54	203335	47.96
202909	74.46	203103	199.32	203336	52.45
202910	86.13	203104	209.03	203337	41.98
202911	85.04	203105	205.15	203338	49.67
202912	82.66	203106	178.63	203339	42.42
202913	84.73	203107	168.02	203340	164.03
202914	84.09	203108	157.53	203437	34.5
202915	84.45	203109	115.42	203438	142.35
202916	103.62	203110	148.62	203439	156.76
202917	83.86	203111	138.36	203440	174.24
202918	104.85	203112	131.71	203441	170.94
202919	55.73	203113	119.77	203442	133.64
202920	88.4	203114	172.17	203443	132.32
202921	87.82	203115	153.25	203444	135.72
202922	85.93	203116	119.91	203445	173.22
202923	84.65	203117	106.92	203446	171.6
202924	84.33	203191	72.71	203447	146.11
202978	80.61	203192	66.31	203448	156.38
202979	84.69	203193	76.56	203449	128.52
202980	86.33	203194	97.69	203450	117.38
202981	80.29	203195	78.09	203451	129.87
202982	76.65	203196	77.14	203452	29.05
202983	87.93	203197	67.93	203469	121.96

(Table 1-7, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
203470	123.42	203589	126.14	203757	215.05
203471	130	203593	48.38	203758	184.95
203472	129.78	203594	70.65	203759	174.35
203473	116.08	203595	67.89	203760	276.69
203474	130.51	203742	84.26	203761	216.06
203475	22.06	203743	70.25	203886	88.51
203476	138.23	203744	80.86	203887	95.52
203477	123.98	203745	81.05	203888	98.46
203478	133.34	203746	77.7	203889	87.71
203479	122.33	203747	77.44	203890	89.92
203480	126.49	203748	66.41	203891	95.38
203578	82.62	203749	71.1	203892	91.88
203579	82.98	203750	76.89	203893	100.47
203580	82.1	203751	82.49	203894	73.63
203584	95.07	203752	148.66	203895	85.42
203585	118.13	203753	148.47	203896	154.96
203586	74.14	203754	188.3	203897	141.6
203588	119.86	203755	54.78	203898	151.33

- 전통발효식품 유래 *Bacillus* 314주에 대한 내산성 screening한 결과(Table 1-8), 생존률 50%기준으로 볼 때 *Bacillus* 12주가 내산성이 우수한 균으로 예상되었다.

Table 1-8. *Bacillus* 1차 내산성 스크리닝 결과

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
E1	1.45	E9	0.00	E20-1	8.99
E1-1	4.52	E9-1	15.54	E21-1	8.49
E2	1.02	E10	4.76	E22-1	2.28
E2-1	0.00	E10-1	1.61	E23	4.98
E3-1	6.62	E12	6.29	E24	6.24
E4	0.00	E12-1	27.83	E25	0.00
E4-1	0.00	E13	6.24	E27	0.00
E5	2.23	E13-1	4.46	E28	0.00
E5-1	22.13	E14	8.07	E29	9.72
E6	1.97	E14-1	19.09	E30	9.37
E6-1	8.66	E15	8.19	E31	18.45
E7	3.82	E15-1	10.03	E32	1.85
E7-1	0.85	E17-1	4.81	E33	3.81
E8	5.96	E18-1	6.38	E34	6.59
E8-1	3.95	E19-1	12.27	E35	0.63

(Table 1-8, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
E36	18.10	J46	0.26	KU15146	8.73
E38	6.13	J47	0.74	KU15157	0.00
E39	4.13	J48	3.95	KU15158	0.00
E40	3.46	N1	1.65	KU15162	6.76
E41	5.64	BK	72.00	KU15163	39.63
E43	1.54	JD	27.08	KU15188	10.29
E44	2.30	JK	58.33	KU15189	0.00
H38	3.64	MD	22.05	KU15191	0.00
I3	5.45	MK	19.99	KU15194	23.89
I5-1	5.95	MY2	27.89	KU15195	7.05
I21	3.35	VK	14.54	KU15198	0.00
I23	3.66	MJ	13.37	KU15205	22.73
I24	1.17	JS	0.00	JKI-1	20.54
I25	6.99	KU15015	2.17	JKI-2	2.76
I28	7.89	KU15017	2.27	JKI-3	50.00
I31	18.48	KU15025	3.13	JKI-4	47.35
I35	6.66	KU15026	10.90	JKI-5	17.32
I43	2.33	KU15027	7.36	JKI-6	18.80
I44	0.00	KU15028	0.00	JKI-7	0.87
I46	3.81	KU15029	5.73	JKI-8	0.75
I56	62.86	KU15038	0.00	JKI-9	4.23
I57	2.48	KU15039	4.18	JKI-11	30.90
I58	0.00	KU15045	0.07	JKI-13	0.00
I59	7.01	KU15052	4.68	JKI-14	3.59
I61	0.65	KU15056	7.35	JKI-15	9.11
I63	8.84	KU15057	18.94	JKI-17	1.47
I66	7.08	KU15067	0.00	JKI-18	6.71
I67	27.40	KU15068	0.00	JKI-19	5.61
I71	6.22	KU15069	0.00	JKI-22	0.55
I201	32.55	KU15071	0.00	JKI-24	0.00
I211	14.36	KU15079	5.45	JKI-25	14.42
I541	17.07	KU15080	15.24	JKI-28	6.39
I611	19.11	KU15081	5.54	JKI-29	1.94
I711	32.40	KU15085	108.32	JKI-30	0.79
I712	24.58	KU15089	74.25	JKI-33	3.18
J11	2.68	KU15109	0.00	JKI-34	19.31
J16	1.00	KU15130	0.99	JKI-36	0.49
J26	20.38	KU15131	0.15	JKI-37	2.72
J37	0.83	KU15132	0.00	JKI-38	0.00
J42	17.65	KU15133	0.00	JKI-39	8.15

(Table 1-8, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
JKI-40	6.53	JKI-178	6.18	200331	1.89
JKI-41	14.57	JKI-187	5.70	200332	3.37
JKI-42	0.00	JKI-199	1.90	200333	9.71
JKI-43	29.33	JKI-233	0.53	200334	2.65
JKI-44	4.28	JKI-236	0.00	200337	1.86
JKI-45	0.00	JKI-247	0.00	200338	19.77
JKI-46	0.00	JKI-263	2.19	200339	0.00
JKI-47	0.00	JKI-320	11.89	200340	12.56
JKI-48	0.77	JKI-366	4.04	200341	3.64
JKI-50	0.00	JKI-379	0.00	200342	7.37
JKI-51	38.10	JKI-418	8.47	200345	7.51
JKI-52	2.34	BT-10	2.50	200348	4.64
JKI-53	72.41	g4	41.62	200349	5.51
JKI-54	0.00	g7	0.00	200350	22.77
JKI-55	0.00	g8	14.67	200351	15.17
JKI-56	52.98	g10	3.38	200352	4.75
JKI-57	8.45	g12	4.14	200354	4.77
JKI-58	5.14	g13	14.51	200357	6.89
JKI-59	8.88	g15	5.84	200370	14.90
JKI-60	0.00	g17	25.38	200371	7.11
JKI-61	7.09	g21	19.06	200372	5.29
JKI-62	1.58	g30	19.95	200376	1.76
JKI-63	0.00	g65	0.00	200377	7.67
JKI-64	84.78	g66	2.91	200378	10.73
JKI-65	24.47	g68	14.87	200379	5.59
JKI-66	0.00	F3201	20.36	200381	6.51
JKI-67	0.00	F4042	1.32	200382	3.62
JKI-68	9.74	F4104	5.58	200385	9.30
JKI-69	1.65	F4163	3.44	200386	9.21
JKI-70	0.58	FA1028	0.00	200387	3.36
JKI-71	10.37	TPP6004	5.61	200388	2.96
JKI-72	3.25	TPP6023	7.86	200389	4.21
JKI-77	0.00	TPP6033	2.34	200391	2.92
JKI-95	0.00	200288	0.00	200392	3.18
JKI-97	0.72	200290	53.21	200393	5.79
JKI-142	7.67	200291	42.16	200394	8.18
JKI-148	2.93	200292	7.41	200395	8.98
JKI-157	18.62	200325	5.65	200396	0.99
JKI-160	0.00	200329	9.12	200397	11.20
JKI-177	1.35	200330	5.12	200398	8.03

(Table 1-8, 계속)

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
200399	8.58	200500	6.70	200556	18.32
200401	48.44	200501	2.28	200557	4.55
200402	4.92	200502	2.33	200558	4.60
200403	11.15	200503	3.20	200559	4.33
200404	5.63	200504	5.04	200560	75.82
200495	2.48	200505	11.34	200561	4.57
200496	2.31	200513	3.76	200562	1.82
200497	10.64	200514	15.53	200563	3.90
200498	12.46	200554	43.81	203098	215.84
200499	9.13	200555	4.75		

- 전통발효식품 유래 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 10주에 대한 내산성 screening한 결과(Table 1-9), 생존률 80%기준으로 볼 때 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 8주가 내산성이 우수한 균으로 예상되었다.

Table 1-9. 효모 1차 내산성 스크리닝 결과

Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)	Strain number	Survival rate(%)
200264	88.48	200278	84.07	200282	6.90
200266	106.32	200279	101.55	200284	91.71
200270	84.80	200280	87.72		
200274	64.20	200281	93.87		

3. 전통발효식품의 경우 토종균주에 대한 protease 및 amylase 스크리닝

- 현재 protease 및 amylase 효소 활성이 뛰어난 *Bacillus* 균주 및 곰팡이를 이용하여 전통발효식품인 된장, 간장, 메주 등에 다양하게 이용되고 있다.
- 전통발효식품에 사용되는 균주의 경우 protease 및 amylase 활성이 중요하며 protease 및 amylase 활성이 있는지를 확인하는 스크리닝 단계가 필요하다.
- Protease 활성 스크리닝 방법은 다음과 같다. Protease 활성 유/무를 확인하기 위해 *B. acillus* 균주를 broth에 하루 전 접종시킨 후 37°C에서 150 rpm으로 16시간 배양시킨 후 균 배양액을 백금으로 찍어 1% skim milk agar에 찍은 후 37°C에서 24시간 배양시킨 후 clear zone 유/무를 확인한 후 clear zone이 있는 균주의 경우 protease 활성 실험을 진행하였다.
- Amylase 활성 스크리닝 방법은 다음과 같다. Amylase 활성 유/무를 확인하기 위해 *B. acillus*를 TSB broth에 하루 전 접종시킨 후 37°C에서 150 rpm으로 16시간 배양시킨 후 균 배양액을 백금으로 찍어 1% starch agar에 찍은 후 48시간 배양시킨 후 clear zone 유/무를 확인한 후 clear zone이 있는 균주의 경우 amylase 활성 측정실험을 진행하였다.

- 전통발효식품 유래 *Bacillus* 314주에 대한 protease 스크리닝한 결과(Table 1-10), *Bacillus* 193주가 protease 활성이 양성을 나타냈기 때문에 protease 활성 측정 실험을 진행하였다.

Table 1-10. *Bacillus* 1차 protease 스크리닝 결과

Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone
E1	-	E25	+	I63	+
E1-1	-	E27	+	I66	-
E2	-	E28	+	I67	-
E2-1	-	E29	+	I71	-
E3-1	+	E30	++	I201	+
E4	+	E31	+	I211	-
E4-1	+	E32	+	I541	-
E5	+	E33	+	I611	+
E5-1	+	E34	+	I711	-
E6	+	E35	+	I712	++
E6-1	+	E36	-	J11	-
E7	+	E38	++	J16	++
E7-1	+	E39	+	J26	+
E8	-	E40	-	J37	+
E8-1	-	E41	+	J42	-
E9	-	E43	+	J46	+
E9-1	-	E44	+	J47	+
E10	+	H38	+	J48	+
E10-1	+	I3	-	N1	+
E12	-	I5-1	+	BK	+
E12-1	-	I21	-	JD	+
E13	+	I23	+	JK	+
E13-1	-	I24	-	MD	+
E14	-	I25	+	MK	+
E14-1	-	I28	+	MY2	-
E15	-	I31	-	VK	-
E15-1	+	I35	-	MJ	-
E17-1	-	I43	+	JS	-
E18-1	+	I44	-	KU15015	+
E19-1	+	I46	++	KU15017	-
E20-1	+	I56	+	KU15025	+++
E21-1	-	I57	+	KU15026	++
E22-1	+	I58	+	KU15027	++
E23	+	I59	+	KU15028	+
E24	+	I61	+	KU15029	+

-, no inhibition; +, 0-3 mm clear zone; ++, 3-5 mm clear zone; +++, > 5 mm clear zone.

(Table 1-10, 계속)

Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone
KU15038	-	JKI-9	+	JKI-61	+++
KU15039	-	JKI-11	-	JKI-62	-
KU15045	-	JKI-13	-	JKI-63	-
KU15052	-	JKI-14	-	JKI-64	+
KU15056	+	JKI-15	+	JKI-65	-
KU15057	-	JKI-17	-	JKI-66	-
KU15067	+	JKI-18	+	JKI-67	-
KU15068	-	JKI-19	-	JKI-68	+
KU15069	-	JKI-22	-	JKI-69	+++
KU15071	+	JKI-24	-	JKI-70	-
KU15079	+	JKI-25	-	JKI-71	+
KU15080	+	JKI-28	-	JKI-72	+
KU15081	-	JKI-29	-	JKI-77	+++
KU15085	-	JKI-30	-	JKI-95	-
KU15089	+	JKI-33	-	JKI-97	++
KU15109	+	JKI-34	+	JKI-142	+
KU15130	++	JKI-36	-	JKI-148	++
KU15131	++	JKI-37	-	JKI-157	-
KU15132	++	JKI-38	+	JKI-160	-
KU15133	+	JKI-39	+	JKI-177	++
KU15146	+	JKI-40	+	JKI-178	-
KU15157	+	JKI-41	-	JKI-187	-
KU15158	++	JKI-42	-	JKI-199	+
KU15162	+	JKI-43	++	JKI-233	+
KU15163	-	JKI-44	-	JKI-236	+
KU15188	+	JKI-45	-	JKI-247	+++
KU15189	-	JKI-46	++	JKI-263	-
KU15191	+	JKI-47	-	JKI-320	-
KU15194	+	JKI-48	++	JKI-366	+
KU15195	-	JKI-50	-	JKI-379	-
KU15198	+	JKI-51	+	JKI-418	-
KU15205	-	JKI-52	++	BT-10	-
JKI-1	-	JKI-53	-	g4	-
JKI-2	-	JKI-54	-	g7	+
JKI-3	-	JKI-55	-	g8	-
JKI-4	-	JKI-56	-	g10	+
JKI-5	-	JKI-57	-	g12	+
JKI-6	-	JKI-58	-	g13	-
JKI-7	-	JKI-59	-	g15	-
JKI-8	-	JKI-60	-	g17	-

-, no inhibition; +, 0-3 mm clear zone; ++, 3-5 mm clear zone; +++, > 5 mm clear zone.

(Table 1-10, 계속)

Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone
g21	+	200345	+	200399	+
g30	-	200348	+	200401	+
g65	-	200349	++	200402	+
g66	+	200350	+	200403	+
g68	+	200351	+	200404	+
F3201	+	200352	+++	200495	+
F4042	-	200354	++	200496	++
F4104	-	200357	+	200497	++
F4163	-	200370	-	200498	+
FA1028	-	200371	+	200499	++
TPP6004	-	200372	+	200500	+
TPP6023	-	200376	+	200501	+
TPP6033	-	200377	+	200502	+
200288	+++	200378	-	200503	+
200290	+	200379	+	200504	+
200291	+	200381	+	200505	+
200292	+	200382	+	200513	+
200325	++	200385	+	200514	+
200329	+	200386	+	200554	++
200330	+	200387	+	200555	+
200331	+	200388	+	200556	+
200332	+	200389	+	200557	+
200333	++	200391	+	200558	++
200334	+	200392	+	200559	+
200337	+	200393	-	200560	+
200338	++	200394	-	200561	+
200339	+	200395	+	200562	++
200340	+	200396	+	200563	++
200341	+	200397	+	203098	-
200342	+	200398	+		

-, no inhibition; +, 0-3 mm clear zone; ++, 3-5 mm clear zone; +++, > 5 mm clear zone.

- 전통발효식품 유래 *Bacillus* 314주에 대한 amylase 스크리닝한 결과(Table 1-11), *Bacillus* 112주가 amylase 활성이 양성을 나타냈기 때문에 amylase 활성 측정 실험을 진행하였다.

Table 1-11. *Bacillus* 1차 amylase 스크리닝 결과

Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone
E1	+	E25	+	I63	-
E1-1	+	E27	+	I66	-
E2	+	E28	-	I67	-
E2-1	+	E29	-	I71	-
E3-1	+	E30	+	I201	-
E4	+	E31	-	I211	-
E4-1	+	E32	+	I541	-
E5	+	E33	+	I611	-
E5-1	+	E34	+	I711	-
E6	-	E35	+	I712	-
E6-1	-	E36	+	J11	+
E7	-	E38	+++	J16	+
E7-1	-	E39	-	J26	-
E8	+	E40	-	J37	-
E8-1	+	E41	-	J42	-
E9	-	E43	+	J46	-
E9-1	-	E44	-	J47	-
E10	+	H38	-	J48	+
E10-1	+	I3	-	N1	-
E12	+	I5-1	-	BK	++
E12-1	+	I21	+	JD	-
E13	-	I23	-	JK	-
E13-1	+	I24	-	MD	-
E14	+	I25	-	MK	-
E14-1	-	I28	-	MY2	+
E15	-	I31	+	VK	-
E15-1	-	I35	+	MJ	-
E17-1	+	I43	++	JS	+
E18-1	+	I44	-	KU15015	++
E19-1	+	I46	-	KU15017	-
E20-1	-	I56	-	KU15025	+++
E21-1	-	I57	-	KU15026	+++
E22-1	-	I58	-	KU15027	+++
E23	-	I59	+	KU15028	++
E24	-	I61	-	KU15029	+

-, no inhibition; +, 0-3 mm clear zone; ++, 3-5 mm clear zone; +++, > 5 mm clear zone.

(Table 1-11, 계속)

Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone
KU15038	-	JKI-9	-	JKI-61	-
KU15039	-	JKI-11	-	JKI-62	-
KU15045	++	JKI-13	-	JKI-63	-
KU15052	+	JKI-14	-	JKI-64	-
KU15056	+	JKI-15	-	JKI-65	-
KU15057	-	JKI-17	-	JKI-66	+
KU15067	-	JKI-18	-	JKI-67	+
KU15068	-	JKI-19	-	JKI-68	-
KU15069	-	JKI-22	-	JKI-69	+
KU15071	-	JKI-24	-	JKI-70	+++
KU15079	-	JKI-25	-	JKI-71	-
KU15080	+	JKI-28	-	JKI-72	-
KU15081	-	JKI-29	-	JKI-77	-
KU15085	-	JKI-30	-	JKI-95	+
KU15089	+	JKI-33	++	JKI-97	-
KU15109	-	JKI-34	-	JKI-142	++
KU15130	+++	JKI-36	-	JKI-148	-
KU15131	+++	JKI-37	-	JKI-157	-
KU15132	+++	JKI-38	-	JKI-160	++
KU15133	-	JKI-39	-	JKI-177	-
KU15146	-	JKI-40	-	JKI-178	+++
KU15157	+	JKI-41	-	JKI-187	-
KU15158	+	JKI-42	-	JKI-199	++
KU15162	-	JKI-43	+	JKI-233	++
KU15163	-	JKI-44	-	JKI-236	-
KU15188	+	JKI-45	-	JKI-247	-
KU15189	-	JKI-46	-	JKI-263	-
KU15191	-	JKI-47	-	JKI-320	-
KU15194	-	JKI-48	-	JKI-366	++
KU15195	-	JKI-50	-	JKI-379	-
KU15198	-	JKI-51	+	JKI-418	-
KU15205	-	JKI-52	+	BT-10	-
JKI-1	-	JKI-53	+	g4	-
JKI-2	-	JKI-54	-	g7	+
JKI-3	-	JKI-55	-	g8	+
JKI-4	-	JKI-56	-	g10	++
JKI-5	-	JKI-57	-	g12	++
JKI-6	+	JKI-58	+++	g13	-
JKI-7	-	JKI-59	-	g15	-
JKI-8	-	JKI-60	-	g17	-

-, no inhibition; +, 0-3 mm clear zone; ++, 3-5 mm clear zone; +++, > 5 mm clear zone.

(Table 1-11, 계속)

Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone	Strain number	Clear zone
g21	-	200345	-	200399	-
g30	+	200348	+	200401	-
g65	+	200349	-	200402	+
g66	+	200350	+	200403	-
g68	-	200351	-	200404	-
F3201	-	200352	+++	200495	-
F4042	+++	200354	-	200496	-
F4104	-	200357	+	200497	-
F4163	-	200370	+	200498	+++
FA1028	-	200371	+	200499	-
TPP6004	-	200372	-	200500	-
TPP6023	-	200376	-	200501	+
TPP6033	-	200377	-	200502	-
200288	++	200378	+	200503	-
200290	-	200379	-	200504	+
200291	-	200381	-	200505	+++
200292	-	200382	-	200513	+
200325	-	200385	-	200514	+++
200329	+	200386	-	200554	-
200330	++	200387	-	200555	-
200331	++	200388	-	200556	-
200332	++	200389	-	200557	-
200333	-	200391	-	200558	-
200334	-	200392	-	200559	-
200337	++	200393	+	200560	-
200338	+++	200394	++	200561	-
200339	+	200395	+	200562	-
200340	+++	200396	-	200563	-
200341	-	200397	+	203098	-
200342	-	200398	+		

-, no inhibition; +, 0-3 mm clear zone; ++, 3-5 mm clear zone; +++, > 5 mm clear zone.

제 3절 분리균주, 상용균주, 표준균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화

1. 유제품 및 건강기능식품의 경우 내산·내담즙성, 효소생산능, 세포독성, 장부착능, 항생제 저항성, 항생제 저항성 측정

가. 내산·내담즙성 측정

- 내산성 스크리닝을 통해 얻은 전통발효식품 유래균주 586주(유산균 566주, *Bacillus* 12주, 효모 8주)에 대한 내산·내담즙성 측정 실험을 하였다.
- 내산성 실험은 균을 접종하여 16시간 배양시킨 후 3 mg/mL를 첨가한 pH 2.5 액체배지 9 mL에 균 배양액 1 mL를 접종시킨 후 접종균 수와 배양 3시간 뒤의 균수를 비교하여 생존률을 측정하였다.
- 내산성 실험에 대한 생존률을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Log } N_1(\text{CFU/mL})}{\text{Log } N_0(\text{CFU/mL})} \times 100$$

N_1 , Total viable count of strains after treatment by simulated gastrointestinal juices

N_0 , Total viable count of strains before treatment

- 내담즙성 실험은 균을 접종하여 16시간 배양시킨 후 3 mg/mL를 첨가한 pH 7 액체배지 9 mL에 균 배양액 1 mL를 접종시킨 후 접종균수와 배양 24시간 뒤의 균수를 비교하여 생존률을 측정하였다.
- 내담즙성 실험에 대한 생존률을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Log } N_1(\text{CFU/mL})}{\text{Log } N_0(\text{CFU/mL})} \times 100$$

N_1 , Total viable count of strains after treatment by bile salt

N_0 , Total viable count of strains before treatment

- 내산·내담즙성 측정결과 모두 80%이상 생존할 경우 우수균주로 지정하여 다음 단계인 효소 생산능을 측정하였다.
- 내산성 스크리닝 결과로 얻은 전통발효식품 분리균주 유산균 566주에 대한 내산·내담즙성 실험한 결과(Table 1-12), 내산·내담즙성 생존률 80%기준으로 볼 때 유산균 191주가 내산·내담즙성이 우수한 균으로 나타낸 다음 단계인 효소 생산능 실험을 진행하였다.

Table 1-12. 1차 내산성 스크리닝 우수 유산균의 내산·내담즙성

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
Lb1	99.09	110.40	SY33	0.00	-
Lb41	99.30	84.20	G1	99.30	106.85
Lb5	0.00	-	G72	99.93	86.46
Ln1	99.24	89.30	H40	87.77	101.01
Ln2-1	0.00	-	M1	0.00	-
Ln2-2	0.00	-	M50	95.48	97.90
Ln4	99.25	86.61	M52	93.69	96.82
Ln5	0.00	-	M74	96.39	97.72
A2	0.00	-	KU15004	0.00	-
A4	47.17	104.09	KU15005	0.00	-
A5	0.00	-	KU15006	102.16	105.26
A7	0.00	-	KU15009	0.00	-
B2	0.00	-	KU15012	0.00	-
B7	100.65	107.94	KU15013	0.00	-
B13	100.40	109.97	KU15014	0.00	-
B13-2	98.81	110.09	KU15018	47.48	67.21
B15	99.90	111.94	KU15019	0.00	-
B151	99.75	111.74	KU15021	0.00	-
B341	86.46	82.84	KU15024	0.00	-
B3142	67.54	74.78	KU15034	0.00	-
B3403	0.00	-	KU15035	0.00	-
C8	56.53	84.48	KU15055	0.00	-
C10	0.00	-	KU15058	98.89	106.13
C12	0.00	-	KU15062	0.00	-
C67	0.00	-	KU15064	0.00	-
C70	0.00	-	KU15065	38.15	96.29
C73	0.00	-	KU15082	0.00	-
C205	0.00	-	KU15083	0.00	-
C209	0.00	-	KU15085	50.89	107.97
C213	0.00	-	KU15086	0.00	-
C213	0.00	-	KU15087	0.00	-
C220	0.00	-	KU15089	40.12	87.35
D1	0.00	-	KU15099	64.34	101.89
D2	0.00	-	KU15105	96.92	107.31
D4	0.00	-	KU15106	0.00	-
D7	0.00	-	KU15122	97.99	78.19
D9	0.00	-	KU15138	0.00	-
D10	0.00	-	KU15139	97.95	78.44
D31	86.23	93.09	KU15142	0.00	-
SY31	0.00	-	KU15144	0.00	-

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
KU15177	0.00	-	200081	99.50	109.61
KU15197	0.00	-	200083	99.95	111.55
KU15203	0.00	-	200114	94.81	105.93
GS0015	0.00	-	200121	97.01	96.41
61517	56.68	105.96	200122	99.09	97.00
SC12	99.18	84.63	200123	97.68	95.89
SC14	100.16	95.28	200124	98.96	97.39
SC25	97.28	67.94	200127	98.51	94.08
SC28	98.11	91.17	200131	55.93	70.53
SC53	92.28	87.88	200133	77.73	97.90
SC61	101.96	90.24	200138	64.68	81.39
SC64	96.69	93.05	200154	72.38	98.39
SC65	100.38	76.63	200166	67.72	89.99
Bro22	33.63	81.22	200167	64.44	71.57
S.Pum19	92.57	93.05	200168	89.45	78.82
Y-KC2	0.00	-	200169	54.87	95.13
Y-KC6	50.39	84.41	200170	72.76	86.91
Y-KC19	0.00	-	200171	62.70	102.30
sal.cla6	0.00	-	200172	77.74	86.32
sal.cla9	0.00	-	200173	80.85	84.46
sal.cla23	73.84	89.31	200175	78.75	86.36
blue.Bel3	0.00	-	200177	74.74	92.84
ON-184	52.57	95.25	200178	0.00	-
ON-250	41.03	93.29	200179	0.00	-
200011	0.00	-	200180	0.00	-
200016	33.61	86.67	200182	68.81	112.60
200018	57.94	97.64	200183	0.00	-
200019	99.57	111.35	200185	0.00	-
200037	99.22	110.12	200186	0.00	-
200046	0.00	-	200187	0.00	-
200047	70.20	80.58	200188	0.00	-
200054	102.37	108.08	200189	0.00	-
200057	61.89	74.18	200190	0.00	-
200060	100.54	102.34	200207	0.00	-
200070	100.46	109.00	200250	94.11	86.70
200072	68.21	88.19	200253	98.39	50.00
200073	0.00	-	200299	0.06	97.03
200075	100.26	87.22	200358	105.68	118.93
200078	99.85	107.94	200359	104.51	114.55
200080	101.48	99.49	200406	0.00	-

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
200415	0.00	-	202231	58.87	108.04
200425	0.00	-	202232	57.64	105.77
200426	0.00	-	202233	58.12	104.71
200428	99.39	109.47	202234	59.70	107.79
200618	93.69	85.04	202235	68.11	102.31
200624	83.48	90.26	202237	84.57	93.37
200631	95.59	88.39	202238	91.72	101.38
200632	99.41	88.49	202241	46.87	84.71
200633	98.39	84.55	202242	93.54	97.96
200640	68.39	86.63	202243	0.00	-
200650	90.65	100.70	202244	96.35	110.29
200651	87.50	101.40	202245	92.24	101.11
200655	98.02	85.52	202246	99.27	90.62
200656	97.04	83.5	202247	85.61	90.05
200661	99.59	115.06	202248	0.00	-
200674	70.38	93.96	202252	98.01	61.48
200675	71.25	90.71	202253	91.45	94.77
200691	0.00	-	202254	54.55	86.98
200692	0.00	-	202255	56.82	92.92
200693	101.08	87.15	202258	53.67	105.53
200699	0.00	-	202259	73.90	99.36
200793	102.07	91.15	202261	96.79	64.53
200794	96.61	102.77	202262	97.00	70.62
200797	99.43	111.00	202263	96.92	72.40
200798	86.43	103.78	202265	100.39	95.44
200799	101.15	113.00	202266	96.83	64.40
200800	101.95	116.94	202268	99.88	98.99
200801	101.29	121.32	202269	101.84	94.42
200809	0.00	-	202270	98.41	95.10
200810	0.00	-	202272	0.00	-
200811	83.02	93.55	202274	0.00	-
200817	99.93	107.34	202275	0.00	-
200821	99.80	109.38	202276	0.00	-
200825	101.52	76.13	202278	93.34	72.19
200852	100.77	107.67	202295	99.01	93.33
200854	100.41	108.64	202296	98.64	76.03
200855	101.34	108.97	202297	100.37	71.97
200856	101.18	110.58	202298	101.92	92.14
202229	0.00	-	202299	102.91	74.21
202230	44.70	104.97	202300	100.89	75.88

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
202301	102.00	93.62	202365	0.00	-
202302	101.32	111.81	202366	0.00	-
202303	99.33	83.67	202367	0.00	-
202305	89.01	96.14	202368	0.00	-
202306	100.14	110.32	202369	102.07	87.57
202307	98.25	78.79	202370	0.00	-
202308	61.05	83.25	202371	0.00	-
202309	83.54	97.12	202376	0.00	-
202310	82.44	92.54	202377	0.00	-
202311	0.00	-	202378	0.00	-
202312	55.28	78.94	202383	0.00	-
202313	91.39	76.53	202384	57.55	106.85
202314	92.92	85.07	202385	0.00	-
202315	98.02	91.89	202386	0.00	-
202316	97.33	88.85	202387	0.00	-
202317	97.98	92.06	202388	93.48	93.27
202322	0.00	-	202389	100.12	85.12
202323	82.02	94.82	202390	98.06	114.17
202324	91.80	71.31	202391	98.37	110.36
202325	84.90	96.96	202392	99.81	88.35
202326	87.68	87.75	202393	0.00	-
202329	95.00	81.68	202394	0.00	-
202330	0.00	-	202395	0.00	-
202331	0.00	-	202396	0.00	-
202332	0.00	-	202397	99.09	77.88
202333	0.00	-	202398	99.88	110.13
202334	0.00	-	202399	99.50	109.56
202347	0.00	-	202400	99.73	77.77
202350	0.00	-	202403	0.00	-
202351	0.00	-	202405	0.00	-
202354	0.00	-	202406	0.00	-
202355	0.00	-	202407	88.82	98.62
202356	0.00	-	202408	98.66	104.90
202357	0.00	-	202411	0.00	-
202358	0.00	-	202413	0.00	-
202360	0.00	-	202414	0.00	-
202361	97.94	87.58	202420	0.00	-
202362	0.00	-	202421	0.00	-
202363	0.00	-	202423	0.00	-
202364	0.00	-	202425	77.21	109.83

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
202429	98.15	77.85	202540	97.40	89.20
202430	0.00	-	202541	98.70	97.45
202442	99.57	61.33	202542	100.80	104.17
202443	100.04	65.27	202543	97.95	110.72
202444	99.32	74.34	202544	100.48	100.02
202446	0.00	-	202545	100.84	96.60
202447	97.13	81.57	202547	89.47	99.31
202450	0.00	-	202548	87.02	100.26
202462	0.00	-	202549	89.27	89.29
202470	0.00	-	202550	91.81	100.88
202477	0.00	-	202551	101.11	81.35
202481	0.00	-	202552	102.08	80.47
202487	0.00	-	202553	93.87	99.01
202488	76.21	97.67	202554	100.94	83.97
202490	73.00	100.72	202555	99.58	99.44
202494	69.15	88.23	202556	92.51	98.31
202495	77.13	82.23	202557	97.87	77.14
202496	0.00	-	202558	99.19	87.76
202504	0.00	-	202559	99.75	84.42
202507	0.00	-	202560	96.03	75.04
202508	80.90	98.56	202569	41.80	96.84
202509	0.00	-	202571	98.99	100.78
202510	0.00	-	202576	84.13	100.62
202511	0.00	-	202577	103.29	126.05
202512	0.00	-	202578	100.74	114.82
202513	0.00	-	202580	99.34	113.06
202514	0.00	-	202581	100.43	115.23
202515	0.00	-	202582	100.46	109.86
202516	0.00	-	202584	0.00	-
202517	0.00	-	202585	0.00	-
202518	0.00	-	202586	46.97	98.14
202520	0.00	-	202592	0.00	-
202521	0.00	-	202593	0.00	-
202522	0.00	-	202594	0.00	-
202523	0.00	-	202595	100.00	111.36
202524	0.00	-	202596	83.84	97.30
202526	0.00	-	202597	83.27	96.09
202527	0.00	-	202599	100.81	105.75
202528	0.00	-	202600	92.53	102.98
202531	0.00	-	202601	86.80	97.61

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
202602	93.39	106.21	202911	101.92	53.27
202603	96.71	101.29	202912	100.19	53.27
202604	95.00	103.36	202913	100.00	60.06
202605	90.15	95.49	202914	106.51	54.27
202607	0.00	-	202915	0.00	-
202610	39.48	95.27	202916	38.56	101.28
202611	98.92	109.36	202917	0.00	-
202612	87.93	99.70	202918	0.00	-
202613	98.91	106.20	202920	0.00	-
202614	89.86	98.96	202921	0.00	-
202615	0.00	-	202922	0.00	-
202616	86.83	104.29	202923	0.00	-
202617	89.26	77.07	202924	0.00	-
202618	90.68	105.44	202978	0.00	-
202619	90.28	99.09	202979	0.00	-
202620	88.17	107.70	202980	0.00	-
202621	0.00	-	202981	0.00	-
202775	0.00	-	202982	0.00	-
202776	0.00	-	202983	0.00	-
202777	0.00	-	202984	0.00	-
202781	0.00	-	202985	0.00	-
202785	0.00	-	202986	0.00	-
202792	0.00	-	202987	0.00	-
202793	0.00	-	203038	0.00	-
202794	0.00	-	203039	0.00	-
202795	0.00	-	203040	0.00	-
202799	0.00	-	203041	0.00	-
202800	0.00	-	203043	0.00	-
202801	0.00	-	203044	0.00	-
202802	0.00	-	203045	0.00	-
202803	0.00	-	203046	0.00	-
202804	0.00	-	203047	0.00	-
202805	0.00	-	203099	0.00	-
202808	0.00	-	203100	0.00	-
202905	99.65	57.17	203101	0.00	-
202906	97.69	57.38	203102	0.00	-
202907	98.28	62.72	203103	0.00	-
202908	102.52	50.26	203104	0.00	-
202909	95.74	48.14	203105	0.00	-
202910	97.99	62.70	203106	0.00	-

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
203107	0.00	-	203473	99.37	96.32
203108	0.00	-	203474	95.03	96.32
203109	0.00	-	203476	94.76	82.34
203110	0.00	-	203477	94.28	101.03
203111	0.00	-	203478	99.66	86.04
203112	0.00	-	203479	81.62	102.27
203113	0.00	-	203480	98.25	71.11
203114	0.00	-	203578	101.02	116.27
203115	0.00	-	203579	100.78	117.81
203116	0.00	-	203580	102.14	116.79
203117	0.00	-	203584	0.00	-
203191	0.00	-	203585	0.00	-
203193	0.00	-	203586	100.67	112.82
203194	0.00	-	203588	0.00	-
203195	0.00	-	203589	0.00	-
203196	0.00	-	203594	41.45	101.79
203199	0.00	-	203742	0.00	-
203200	0.00	-	203743	0.00	-
203322	0.00	-	203744	0.00	-
203323	0.00	-	203745	0.00	-
203331	0.00	-	203746	0.00	-
203340	96.33	103.73	203747	0.00	-
203438	0.00	-	203749	0.00	-
203439	0.00	-	203750	0.00	-
203440	0.00	-	203751	0.00	-
203441	89.09	113.53	203752	0.00	-
203442	85.30	93.98	203753	0.00	-
203443	82.87	95.73	203754	0.00	-
203444	74.80	96.92	203757	0.00	-
203445	0.00	-	203758	0.00	-
203446	100.06	85.50	203759	0.00	-
203447	98.80	87.99	203760	0.00	-
203448	69.83	98.35	203761	0.00	-
203449	94.77	96.26	203886	98.78	106.14
203450	0.00	-	203887	94.99	102.05
203451	75.80	97.41	203888	97.31	105.08
203469	97.44	104.22	203889	91.64	98.87
203470	72.26	109.45	203890	92.20	93.89
203471	95.58	108.94	203891	95.90	97.18
203472	99.11	116.37	203892	94.91	97.6

(Table 1-12, 계속)

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
203893	96.49	101.69	203896	0.00	-
203894	95.64	98.62	203897	0.00	-
203895	94.36	93.64	203898	0.00	-

- 내산성 스크리닝 결과로 얻은 전통발효식품 분리균주 *Bacillus* 12주에 대한 내산·내담즙성 실험한 결과(Table 1-13), 내산·내담즙성 생존률 80%기준으로 볼 때 *Bacillus* 2주가 내산·내담즙성이 우수한 균으로 나타낸 다음 단계인 효소 생산능 실험을 진행하였다.

Table 1-13. 1차 내산성 스크리닝 우수 *Bacillus*의 내산·내담즙성

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
I56	51.74	113.74	JKI-53	0.00	-
BK	47.32	109.81	JKI-56	60.55	100.91
JK	0.00	-	JKI-64	46.42	86.84
KU15085	50.89	107.97	200290	101.79	161.08
KU15089	40.12	87.35	200560	0.00	-
JKI-3	0.00	-	203098	99.92	107.00

- 내산성 스크리닝 결과로 얻은 전통발효식품 분리균주 효모 8주에 대한 내산·내담즙성 실험한 결과(Table 1-14), 내산·내담즙성 생존률 80%기준으로 볼 때 효모 8주가 내산·내담즙성이 우수한 균으로 나타낸 다음 단계인 효소 생산능 실험을 진행하였다.

Table 1-14. 1차 내산성 스크리닝 우수 효모의 내산·내담즙성

Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)	Strain number	Acid tolerance (%)	Bile salt tolerance (%)
200264	95.56	111.83	200279	106.56	81.77
200266	99.45	99.45	200280	89.57	108.45
200270	99.31	115.23	200281	96.57	117.46
200278	98.34	114.78	200284	97.39	117.44

나. 효소 생산능 측정

- 내산·내담즙성 실험에서 80%이상 생존률을 보인 전통발효식품 분리균주 201주(유산균 191주, *Bacillus* 2주, 효모 8주에 대해 유해 효소를 생산하는지 확인하기 위해 API zym kit를 이용한 효소 생산능을 측정하였다.
- 효소 생산능 실험방법은 다음과 같다. 효소 생산능 실험방법은 하루 전 미리 균을 접종시켜 16시간 배양시킨 후 원심분리기를 이용하여 균 상등액을 제거한 후 균체를 수집한 후 10⁶ cfu/mL로 희석한 후 API zym kit에 65 µL씩 접종시킨 후 37°C에서 4시간 반응시킨 후 Zym A, Zym B 시약을 순서대로 떨어뜨린 뒤 10분간 반응시킨 후 색깔변화를 통해 균이 유해효소를 생산하는지를 확인하였다.
- 내산·내담즙성 우수균주인 유산균 191주에 대해 효소 생산능을 측정한 결과(Table 1-15), 유산균 155주가 유해효소인 β-glucuronidase(β-GU)를 생성하지 않았기 때문에 정상세포에 대한 세포독성을 진행하였다.

Table 1-15. 내산·내담즙성 우수 유산균의 효소 생산능

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α-CT
Lb1	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0
Lb41	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
Ln1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
Ln4	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
B7	0	0	1	1	0	4	3	0	0	0
B13	0	0	1	0	0	4	3	1	0	0
B13-2	0	0	1	1	0	4	3	1	0	0
B15	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
B151	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
B341	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
D31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G1	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
G72	0	0	0	1	0	4	3	0	0	0
H40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M50	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0
M52	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0
M74	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
KU15006	0	0	1	1	0	4	3	0	0	0
KU15058	0	0	2	0	0	5	3	0	0	0
KU15105	0	0	1	1	0	4	3	0	0	0
SC12	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
SC14	0	0	0	0	1	4	3	0	0	0
SC28	0	0	0	0	1	4	3	0	0	0
SC53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α-CT, α-Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
Lb1	1	0	4	1	1	4	0	0	0	0
Lb41	1	1	0	5	0	0	5	0	0	0
Ln1	1	1	0	5	0	0	4	0	0	0
Ln4	1	1	0	4	0	0	3	0	0	0
B7	1	1	0	4	1	1	5	0	0	0
B13	1	1	1	4	2	2	5	0	0	0
B13-2	1	1	1	4	2	1	5	0	0	0
B15	1	1	1	4	1	2	5	0	0	0
B151	1	1	1	3	0	1	5	0	0	0
B341	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0
D31	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G1	2	1	0	4	0	4	5	0	0	0
G72	1	2	0	0	0	1	4	3	0	0
H40	1	2	0	0	0	3	4	0	0	0
M50	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
M52	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
M74	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
KU15006	1	2	0	4	0	1	5	0	0	0
KU15058	1	1	2	4	1	3	5	0	0	0
KU15105	1	1	0	4	1	0	4	0	0	0
SC12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
SC14	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
SC28	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
SC53	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
SC61	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
SC64	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
S.Pum19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
200019	0	0	1	0	0	4	3	0	0	0
200037	0	0	1	1	0	4	3	1	0	0
200054	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0
200060	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
200070	0	0	1	1	0	4	3	0	0	0
200075	0	0	0	1	0	3	2	0	0	0
200078	0	0	1	0	0	3	2	0	0	0
200080	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0
200081	0	0	2	1	0	4	3	0	0	0
200083	0	0	1	0	0	4	3	0	0	0
200114	0	0	1	0	0	4	3	0	0	0
200121	0	0	0	0	0	5	3	0	0	0
200122	0	0	0	0	1	5	3	0	0	0
200123	0	0	0	0	0	5	3	0	0	0
200124	0	0	0	0	0	5	3	0	0	0
200127	0	0	0	0	0	5	3	0	0	0
200173	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
200250	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
200358	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
200359	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
200428	0	0	1	1	0	4	3	0	0	0
200618	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
200624	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200631	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
200632	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
200633	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200650	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
200651	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
200655	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200656	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
200661	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
200682	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200683	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200693	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
200793	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
200794	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
200797	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
SC61	1	1	0	0	0	1	2	2	0	0
SC64	0	1	0	0	0	1	2	1	0	0
S.Pum19	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0
200019	1	1	1	4	0	1	3	0	0	0
200037	2	1	3	4	2	2	5	0	0	0
200054	1	1	0	2	0	1	3	0	0	0
200060	1	1	4	5	0	1	0	0	0	0
200070	1	1	2	3	1	3	4	0	0	0
200075	1	1	0	5	0	1	4	1	0	0
200078	2	1	0	1	0	1	2	0	0	0
200080	1	1	1	3	0	0	4	0	0	0
200081	2	1	3	4	3	3	5	0	0	0
200083	1	1	1	3	1	1	4	0	0	0
200114	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
200121	1	1	0	3	0	0	1	3	0	0
200122	1	1	0	4	0	0	2	3	0	0
200123	1	1	0	3	0	0	1	2	0	0
200124	1	1	0	3	0	0	1	2	0	0
200127	1	1	0	3	0	0	1	2	0	0
200173	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200250	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0
200358	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
200359	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
200428	1	1	1	3	0	1	2	0	0	0
200618	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
200624	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200631	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0
200632	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0
200633	1	1	0	2	0	0	2	0	0	0
200650	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
200651	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
200655	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
200656	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0
200661	0	1	0	3	0	2	2	2	0	0
200682	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200683	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200693	0	1	0	4	0	2	3	3	0	0
200793	0	1	0	4	0	0	1	2	0	0
200794	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
200797	0	1	1	5	1	1	2	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
200798	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
200799	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0
200800	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0
200801	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0
200811	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
200817	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
200821	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
200825	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
200852	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
200854	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
200855	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
200856	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
202237	0	0	2	1	0	3	0	0	0	0
202238	0	0	2	2	0	3	0	0	0	0
202242	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0
202244	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0
202245	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0
202246	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
202247	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
202253	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
202265	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0
202268	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0
202269	0	0	0	0	1	4	2	0	0	0
202270	0	0	0	0	1	5	2	0	0	0
202295	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0
202298	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
202301	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
202302	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
202303	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
202305	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
202306	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
202309	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
202310	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
202314	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
202315	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0
202316	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0
202317	0	0	0	0	2	5	4	0	0	0
202323	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202326	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
200798	0	1	0	2	1	1	1	0	0	0
200799	1	1	2	3	2	0	0	0	0	0
200800	0	0	2	4	1	1	0	0	0	0
200801	1	1	2	4	2	1	0	0	0	0
200811	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200817	0	1	1	3	1	0	2	0	0	0
200821	0	1	1	3	1	0	2	0	0	0
200825	0	1	1	3	1	0	2	0	0	0
200852	1	1	2	3	1	1	2	0	0	0
200854	0	1	1	3	1	0	2	0	0	0
200855	0	1	1	3	1	0	2	0	0	0
200856	0	1	2	3	1	1	2	0	0	0
202237	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202238	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
202242	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202244	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202245	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202246	1	2	0	0	0	3	0	0	0	0
202247	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202253	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202265	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0
202268	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0
202269	0	2	0	1	0	0	1	2	0	0
202270	0	2	0	1	0	0	1	2	0	0
202295	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
202298	0	1	0	2	0	0	2	2	0	0
202301	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202302	1	1	1	2	0	1	2	0	0	0
202303	1	1	0	2	0	0	4	3	0	0
202305	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202306	4	1	1	3	0	1	3	0	0	0
202309	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202310	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202314	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
202315	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202316	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
202317	1	3	0	0	0	0	2	3	0	0
202323	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
202325	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
202326	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
202329	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
202361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202369	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202388	0	0	0	0	1	4	3	1	0	0
202389	0	0	0	0	1	4	3	2	0	0
202390	0	0	1	0	1	4	3	0	0	0
202391	0	0	0	0	1	4	3	0	0	0
202392	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0
202398	0	0	2	1	0	4	2	0	0	0
202399	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
202407	0	0	1	1	0	4	3	0	0	0
202408	0	0	1	1	0	4	4	2	0	0
202447	0	0	0	1	0	2	2	1	0	0
202508	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0
202540	0	0	0	0	0	3	1	1	0	1
202541	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0
202542	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
202543	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
202544	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
202545	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
202547	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
202548	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
202549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202550	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
202551	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
202552	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
202553	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
202554	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
202555	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0
202556	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
202558	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
202559	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
202571	0	0	1	0	0	3	2	0	0	0
202576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202577	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
202578	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
202580	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
202581	0	0	1	0	1	2	3	1	0	0
202582	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
202595	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, \geq 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
202329	4	1	0	0	0	0	0	1	0	0
202361	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
202369	1	2	3	0	0	2	0	0	2	0
202388	2	2	0	3	0	0	4	3	0	0
202389	1	2	1	5	0	2	4	3	0	0
202390	2	2	3	5	2	3	4	0	0	0
202391	2	1	2	4	2	3	4	0	0	0
202392	1	1	0	5	0	1	4	3	0	0
202398	1	1	2	3	1	1	4	0	0	0
202399	1	1	0	4	0	1	5	0	0	0
202407	1	1	2	3	0	3	3	0	0	0
202408	2	1	2	4	0	4	3	0	0	0
202447	0	1	0	2	0	0	2	3	0	0
202508	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
202540	1	2	0	1	0	3	4	4	0	1
202541	1	2	0	1	0	3	4	3	0	1
202542	1	1	2	3	0	3	0	0	0	0
202543	0	1	1	2	0	3	0	0	0	0
202544	0	1	3	3	0	4	0	0	0	0
202545	0	2	0	1	0	1	3	1	0	0
202547	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202548	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202549	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202550	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202551	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202552	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202553	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202554	1	1	0	2	0	0	1	2	0	0
202555	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
202556	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202558	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202559	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202571	1	1	1	2	1	1	2	0	0	0
202576	0	1	1	1	0	1	2	0	0	0
202577	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0
202578	0	1	0	2	1	0	2	0	0	0
202580	0	1	0	2	1	0	2	0	0	0
202581	0	1	0	3	1	1	3	0	0	0
202582	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0
202595	1	1	3	5	1	0	0	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
202596	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0
202597	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0
202599	0	0	2	1	0	4	3	0	0	0
202600	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0
202601	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
202602	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202603	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
202604	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
202605	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0
202611	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
202612	0	0	2	1	0	4	3	0	0	0
202613	0	0	2	1	0	4	3	0	0	0
202614	0	0	2	1	0	4	3	0	0	0
202616	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
202618	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
202619	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
202620	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
203340	0	5	1	0	0	3	1	0	0	0
203441	0	2	1	0	0	3	0	0	0	0
203442	0	2	1	1	0	3	0	0	0	0
203443	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0
203446	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0
203447	0	2	1	1	0	3	0	0	0	0
203449	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
203469	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
203471	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0
203472	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0
203473	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0
203474	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
203476	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
203477	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
203478	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
203479	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0
203578	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
203579	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
203580	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
203586	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
203886	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0
203887	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0
203888	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
202596	1	1	3	5	1	0	0	0	0	0
202597	1	1	3	5	1	0	0	0	0	0
202599	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
202600	1	1	0	0	0	2	1	0	0	0
202601	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
202602	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
202603	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
202604	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
202605	0	2	0	0	0	3	2	1	0	0
202611	1	1	2	5	1	0	1	0	0	0
202612	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0
202613	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0
202614	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0
202616	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0
202618	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
202619	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
202620	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
203340	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203441	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203442	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0
203443	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0
203446	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203447	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0
203449	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203469	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203471	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203472	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203473	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203474	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203476	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203477	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203478	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203479	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
203578	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203579	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203580	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203586	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0
203886	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203887	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203888	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
203889	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0
203890	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
203891	0	0	3	1	0	2	0	0	0	0
203892	0	0	3	1	0	2	0	0	0	0
203893	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0
203894	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0
203895	0	0	3	1	0	2	0	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-15, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
203889	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203890	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203891	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
203892	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
203893	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203894	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
203895	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

- 내산·내담즙성 우수균주인 *Bacillus* 2주에 대해 효소 생산능을 측정한 결과(Table 1-16), *Bacillus* 2주가 유해효소인 β -glucuronidase(β -GU)를 생성하지 않았기 때문에 정상세포에 대한 세포독성을 진행하였다.

Table 1-16. 내산·내담즙성 우수 *Bacillus*의 효소 생산능

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
200290	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0
203098	0	0	1	0	0	3	2	0	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-16, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
200290	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
203098	2	1	0	4	0	1	3	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

- 내산·내담즙성 우수균주인 효모 8주에 대해 효소 생산능을 측정한 결과(Table 1-17), 효모 8주가 유해효소인 β -glucuronidase(β -GU)를 생성하기 않았기 때문에 정상세포에 대한 세포독성을 진행하였다.

Table 1-17. 내산·내담즙성 우수 효모의 효소 생산능

Strain number	Enzyme activity									
	C	ALP	ES	ESL	LIP	LAS	VAS	CAS	TR	α -CT
200264	0	0	2	1	0	1	0	1	0	0
200266	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
200270	0	0	2	1	0	3	1	1	0	0
200278	0	0	2	1	0	3	1	1	0	0
200279	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
200280	0	0	2	1	0	3	1	1	1	0
200281	0	0	2	1	0	3	0	1	0	1
200284	0	0	2	1	0	3	0	1	0	0

C, Control; ALP, Alkaline phosphate; ES, Esterase; ESL, Esterase lipase; LIP, Lipase; LAS, Leucine arylamidase; VAS, Valine arylamidase, CAS, Cystine arylamidase, TR, Trypsin; α -CT, α -Chymotrypsin.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-17, 계속)

Strain number	Enzyme activity									
	ACP	NABP	α -GAL	β -GAL	β -GU	α -GL	β -GL	NAG	α -Man	α -Fuc
200264	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200266	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200270	3	1	0	0	0	3	0	0	0	0
200278	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0
200279	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
200280	4	1	0	0	0	3	0	0	0	0
200281	3	1	0	0	0	4	0	0	0	0
200284	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0

ACP, Acid phosphate; NABP, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; α -GAL, α -Galactosidase; β -GAL, β -Galactosidase; β -GU, β -Glucuronidase; α -GL, α -Glucosidase; GL, β -Glucosidase; NAG, N-Acetyl- β -glucosaminidase; α -Man, α -Mannosidase, α -Fuc; α -Fucosidase.

0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, ≥ 40 nmol.

다. 정상세포에 대한 세포독성 측정

- 효소 생산능 실험에서 유해효소인 β -glucuronidase를 생성하지 않는 전통발효식품 분리균주 165주(유산균 155주, *Bacillus* 2주, 효모 8주)에 대해 정상세포(MRC-5)에 대한 세포독성을 측정하였다.
- 정상세포에 대한 세포독성 실험방법은 정상세포(MRC-5)를 2×10^5 cell/well을 96 well plate에 깔아놓은 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양시킨 후 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 10분)를 이용하여 균체를 회수한 후 항생제 첨가하지 않은 MEM배지를 넣어 희석시킨 후 미리 배양시킨 MRC-5에 접종시킨 후 37°C, 5% CO₂에서 44시간 배양시켰음. 배양상등액을 제거한 후 PBS buffer로 3번 씻어준 후 MTT 처리한 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양시킨 후 MTT시약을 제거한 후 DMSO 50 μ L를 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다.
- 정상세포에 대한 세포독성을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(1 - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

- 정상세포에 대한 세포독성을 20%이하 기준으로 하여 측정하였다.
- 유해효소를 생성하지 않는 유산균 155주에 대해 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과(Table 1-18), 유산균 35주가 정상세포에 대한 세포독성이 나타내지 않는 것으로 나타났다.

Table 1-18. 내산·내담즙성 우수 유산균의 정상세포에 대한 세포독성

Strain number	Cytotoxicity(%)	Strain number	Cytotoxicity(%)
Lb41	17.19	SC61	13.91
Ln1	30.47	SC64	33.06
Ln4	3.91	S.Pum19	0.00
B151	9.38	200019	0.00
B341	30.47	200054	17.42
D31	51.14	200060	0.00
G1	0.44	200075	35.48
G72	0.00	200078	25.47
H40	14.38	200080	0.00
M50	73.68	200114	21.29
M52	71.49	200121	44.10
M74	64.91	200122	75.78
KU15006	7.87	200123	54.66
SC12	43.84	200124	37.58
SC14	68.49	200127	69.57
SC28	17.81	200173	0.00
SC53	40.32	200250	43.15

(Table 1-18, 계속)

Strain number	Cytotoxicity(%)	Strain number	Cytotoxicity(%)
200358	91.53	202317	78.66
200359	91.53	202323	93.31
200428	64.11	202325	58.16
200618	65.11	202326	90.59
200624	79.69	202329	84.70
200631	69.47	202361	5.44
200632	68.42	202369	11.30
200633	59.47	202388	82.64
200650	0.00	202389	66.94
200651	92.34	202392	59.50
200655	0.00	202399	7.60
200656	0.00	202407	88.84
200661	2.87	202408	18.60
200682	94.64	202447	28.05
200683	74.83	202508	91.74
200693	0.00	202540	27.42
200793	0.00	202541	0.00
200794	23.84	202542	0.00
200811	60.26	202543	0.00
202237	92.47	202544	57.03
202238	93.91	202545	54.05
202242	93.19	202547	88.80
202244	92.11	202548	88.42
202245	89.96	202549	83.88
202246	0.00	202550	88.36
202247	97.15	202551	78.21
202253	98.69	202552	88.36
202265	97.84	202553	85.61
202268	56.66	202554	76.14
202269	77.58	202555	78.79
202270	77.26	202556	87.50
202295	21.55	202558	91.92
202298	24.70	202559	90.81
202301	72.80	202576	90.81
202302	13.24	202599	47.12
202303	19.94	202600	93.27
202305	79.00	202601	90.06
202306	31.56	202602	81.09
202309	94.13	202603	87.50
202310	92.17	202604	90.06
202314	78.13	202605	97.76
202315	82.70	202612	95.27
202316	74.86	202613	92.65

(Table 1-18, 계속)

Strain number	Cytotoxicity(%)	Strain number	Cytotoxicity(%)
202614	96.39	203477	89.06
202616	66.87	203478	89.36
202618	97.76	203479	81.16
202619	97.01	203578	0.00
202620	98.13	203579	0.00
203340	91.19	203580	0.00
203441	91.40	203586	0.00
203442	95.81	203886	69.86
203443	92.98	203887	71.46
203446	90.99	203888	65.87
203447	92.77	203889	65.75
203449	95.58	203890	85.39
203469	89.76	203891	81.62
203471	88.15	203892	74.43
203472	66.47	203893	63.24
203473	46.34	203894	67.12
203474	87.23	203895	65.41
203476	88.75		

- 유해효소를 생성하지 않는 *Bacillus* 2주에 대해 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과(Table 1-19), *Bacillus* 1주가 정상세포에 대한 세포독성이 나타내지 않는 것으로 나타났다.

Table 1-19. 내산·내담즙성 우수 *Bacillus*의 정상세포에 대한 세포독성

Strain number	Cytotoxicity(%)	Strain number	Cytotoxicity(%)
200290	39.76	203098	18.60

- 유해효소를 생성하지 않는 효모 8주에 대해 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과 (Table 1-20), 효모 5주가 정상세포에 대한 세포독성이 나타내지 않는 것으로 나타났다.

Table 1-20. 내산·내담즙성 우수 효모의 정상세포에 대한 세포독성

Strain number	Cytotoxicity(%)	Strain number	Cytotoxicity(%)
200264	46.83	200279	68.67
200266	46.83	200280	0.00
200270	0.00	200281	0.79
200278	0.00	200284	8.73

라. 장 부착능 측정

- 세포독성 실험에서 정상세포(MRC-5)에 대해 세포독성을 나타내지 않는 전통발효식품 분리균주 41주(유산균 35주, *Bacillus* 1주, 효모 5주)에 대해 대장암세포(HT-29)를 이용한 장 부착능을 측정하였다.
- 장 부착능 실험방법은 대장암세포(HT-29)를 1×10^5 cell/well을 24 well plate에 깔아놓은 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양시킨 후 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 10분)를 이용하여 균체를 회수한 후 항생제 첨가하지 않은 RPMI배지를 넣어 희석시킨 후 미리 배양시킨 대장암세포(HT-29)에 접종시킨 후 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양시켰다. 배양상등액을 제거한 후 PBS buffer로 3번 씻어준 후 1% Triton X-100 용액을 이용하여 10분간 처리한 뒤 상등액을 담아 희석하여 도말하여 부착 균수를 측정한 후 부착전 균수와 부착균수를 비교하여 장 부착능을 측정하였다.
- 장 부착능을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{Cell adhesion (\%)} = \frac{V_1}{V_0} \times 100$$

V₀, initial viable bacterial count tested; V₁, viable bacterial count obtained from the HT-29 cells after 2 h.

- 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 유산균 35주에 대해 장 부착능을 측정한 결과(Table 1-21), 1% 기준으로 볼 때 유산균 33주가 장 부착능이 우수한 것으로 나타났다으므로 유산균 33주에 대해 항생제 저항성 실험을 진행하였다.

Table 1-21. 내산·내담즙성 우수 유산균의 장 부착능

Strain number	Cell adhesion(%)	Strain number	Cell adhesion(%)
Lb41	7.50	200650	2.20
Ln4	7.64	200655	15.77
B151	2.43	200656	10.68
G1	2.62	200661	13.24
G72	8.70	200693	2.21
H40	2.86	200793	13.68
KU15006	16.01	202246	0.13
SC28	28.28	202302	10.71
SC61	11.52	202303	6.07
S.Pum19	2.83	202361	1.29
200019	1.41	202369	2.09
200054	1.67	202399	12.37
200060	1.15	202408	0.08
200080	3.42	202541	4.49
200173	2.02	202542	1.41

(Table 1-21, 계속)

Strain number	Cell adhesion(%)	Strain number	Cell adhesion(%)
202543	1.41	203580	24.09
203578	7.47	203586	26.63
203579	16.4		

- 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 *Bacillus* 1주에 대해 장 부착능을 측정한 결과(Table 1-22), 1% 기준으로 볼 때 *Bacillus* 1주가 장 부착능이 우수한 것으로 나타났으므로 *Bacillus* 1주에 대해 항생제 저항성 실험을 진행하였다.

Table 1-22. 내산·내담즙성 우수 *Bacillus* 균주의 장 부착능

Strain number	Cell adhesion(%)
203098	2.42

- 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 효모 5주에 대해 장 부착능을 측정한 결과(Table 1-23), 1% 기준으로 볼 때 효모 5주가 장 부착능이 우수한 것으로 나타났으므로 효모 5주에 대해 항생제 저항성 실험을 진행하였다.

Table 1-23. 내산·내담즙성 우수 효모의 장 부착능

Strain number	Cell adhesion(%)	Strain number	Cell adhesion(%)
200270	5.34	200281	20.9
200278	8.93	200284	16.38
200280	8.30		

마. 항생제 저항성 측정

- 장 부착능 실험에서 장 부착능이 우수한 전통발효식품 분리균주 19주(유산균 33주, *Bacillus* 1주, 효모 5주)에 대해 paper disc을 이용한 항생제 저항성을 측정하였다.
- 항생제 저항성 실험방법은 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 15분)를 이용하여 균체를 회수한 후 10^5 CFU/mL로 희석한 후 고체배지에 도말을 한다. 그 위에 미리 멸균시킨 paper disc를 올려놓은 뒤 Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI)기준에 사용되는 항생제를 이용하여 50 μ L씩 접종시킨 후 37°C에서 24 시간 배양시킨 후 Inhibition zone의 크기에 따라 항생제 저항성 정도를 판별하여 측정하였다.
- 항생제 저항성 정도를 판별하는 기준은 다음과 같다(Figure 1-2).

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
A	Ampicillin	10 µg	≥17	14-16	≤13	≤8	16	≥32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See comment (2).
B	Piperacillin	100 µg	≥21	18-20	≤17	≤16	32-64	≥128	
O	Mecillinam	10 µg	≥15	12-14	≤11	≤8	16	≥32	(5) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only.
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
B	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥18	14-17	≤13	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12-14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18-20	≤17	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4	
B	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20	15-19	≤14	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
(6) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., first- and second-generation cephalosporins and cephamycins may appear active <i>in vitro</i> , but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.									
(7) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised interpretive criteria for cephalosporins (cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftazoxime, and ceftiofur) and aztreonam were first published in January 2010 (M100-S20) and are listed in this table. Cefazolin interpretive criteria were revised again in June 2010 and are listed below. Cefepime and cefturoxime (parenteral) were also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required for the dosages indicated below. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (ie, it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins from susceptible to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in Table 2A Supplemental Table 1.									
Note that interpretive criteria for drugs with limited availability in many countries (eg, moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone) were not evaluated. If considering use of these drugs for <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , or <i>Proteus</i> spp., ESBL testing should be performed (see Table 2A Supplemental Table 1). If isolates test ESBL positive, the results for moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone should be reported as resistant.									
(8) <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , and <i>Serratia</i> may develop resistance during prolonged therapy with third-generation cephalosporins as a result of derepression of AmpC β-lactamase. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.									
A	Cefazolin	30 µg	≥23	20-22	≤19	≤2	4	≥8	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h. See comment (7).
U	Cephalothin	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	(10) Cephalothin interpretive criteria can be used only to predict results to the oral agents, cefadroxil, cefprozime, cephalexin, and loracarbef. Older data that suggest that cephalothin results could predict susceptibility to some other cephalosporins may still be correct, but there are no recent data to confirm this.

Figure 1-2. 장내 미생물에 대한 항생제 저항성 기준(CLSI, 2014).

- 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 유산균 33주에 대해 항생제 저항성을 측정한 결과(Table 1-24), 관련논문에 따르면 장 내 균주의 경우 특이적인 항생제 내성 패턴이 없으면 장 내 미생물에 대해 항생제 저항인자를 전달할 가능성이 낮다. 이에 따라 gentamycin, kanamycin, streptomycin, ciprofloxacin에 대해 본래 내성을 지니는 것이 일반적인 특징이기 때문에 이에 관련된 항생제 내성에 대해서 문제가 되지 않는 유산균 28주에 대해 다음단계인 항산화 실험을 진행하였다.

Table 1-24. 내산·내담즙성 우수 유산균의 항생제 저항성

Strain number	Ampicillin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Tetracycline	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Doxycycline
Lb41	S	R	R	R	S	R	S	S
Ln4	S	R	R	R	S	R	S	S
B151	S	R	R	R	S	R	S	S
G1	S	S	R	R	S	R	S	S
G72	S	S	R	R	S	R	S	S
H40	S	R	R	R	S	R	S	S
KU15006	S	R	R	R	S	R	S	S

S: susceptible, R: resistant.

(Table 1-24, 계속)

Strain number	Ampicillin	Gentamycin	Kanamycin	Streptomycin	Tetracycline	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Doxycycline
SC28	S	R	R	R	S	R	S	S
SC61	S	S	R	R	S	R	S	S
S.Pum19	S	R	R	R	S	R	S	S
200019	S	R	R	R	S	R	S	S
200054	S	R	R	R	S	R	S	S
200060	S	R	R	R	S	R	S	S
200080	S	R	R	R	S	R	S	S
200173	S	R	R	R	S	R	S	S
200650	S	R	R	R	S	R	S	S
200655	S	R	R	R	S	R	S	S
200656	S	R	R	R	S	R	S	S
200661	S	R	R	R	S	R	S	S
200693	S	R	R	R	S	R	S	S
200793	S	I	R	R	S	R	S	S
202302	S	S	R	R	S	R	S	S
202303	S	R	R	R	S	R	S	S
202361	S	R	R	R	S	R	S	S
202369	S	R	R	R	S	R	S	S
202399	S	R	R	R	S	R	S	S
202541	S	I	R	I	S	R	S	S
202542	S	I	R	I	I	R	S	S
202543	S	R	R	R	S	R	S	S
203578	R	R	R	R	I	R	I	R
203579	R	R	R	R	R	R	I	R
203580	R	R	R	R	R	R	I	R
203586	R	R	R	R	I	R	I	R

S: susceptible, R: resistant.

- 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 *Bacillus* 1주에 대해 항생제 저항성을 측정 한 결과(Table 1-25), 항생제 내성에 대해서 문제가 되지 않는 *Bacillus* 1주에 대해 다음단계인 항산화 실험을 진행하였다.

Table 1-25. 내산·내담즙성 우수 *Bacillus*의 항생제 저항성

Strain number	Ampicillin	Gentamycin	Kanamycin	Streptomycin	Tetracycline	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Doxycycline
203098	S	S	R	R	S	R	S	S

S: susceptible, R: resistant.

- 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 효모 5주에 대해 항생제 저항성을 측정한 결과(Table 1-26), 항생제 내성에 대해서 문제가 되지 않는 효모 5주에 대해 다음단계인 항산화 실험을 진행하였다.

Table 1-26. 내산·내담즙성 우수 효모의 항생제 저항성

Strain number	Ampicillin	Gentamycin	Kanamycin	Streptomycin	Tetracycline	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Doxycycline
200270	R	R	R	R	I	R	I	R
200278	R	R	R	R	I	R	I	R
200280	R	R	R	R	I	R	R	R
200281	R	R	R	R	I	R	I	R
200284	R	R	R	R	I	R	I	R

S: susceptible, R: resistant.

바. 항산화 측정

- 항생제 저항성 실험에서 안전성이 검증된 전통발효식품 분리균주 34주(유산균 28주, *Bacillus* 1주, 효모 5주)에 대해 DPPH 용액을 이용한 항산화 효과를 측정하였다.
- 항산화 실험방법은 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 15분)를 이용하여 균체를 회수한 후 DPBS로 희석한 후 0.4 mM DPPH 용액 150 µL와 희석한 균액 150 µL를 섞어준 후 암실에서 37°C에서 30분 배양시킨다. 배양액을 원심분리기(12,000 rpm, 15분)를 이용하여 상등액을 분리한 후 96 well plate에 200 µL씩 옮긴 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 항산화 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

A_c, Absorbance of control ; A_s, Absorbance of sample.

- 유산균 28주에 대해 항산화 효과를 측정한 결과(Table 1-27), 0.08~40.64%까지 다양한 항산화 효과가 나타났다.

Table 1-27. 내산·내담즙성 우수 유산균의 항산화 효과

Strain number	Antioxidant activity(%)	Strain number	Antioxidant activity(%)
Lb41	38.09	G1	18.42
Ln4	40.64	G72	21.08
B151	17.00	H40	13.43

(Table 1-27, 계속)

Strain number	Antioxidant activity(%)	Strain number	Antioxidant activity(%)
KU15006	8.04	200656	4.25
SC28	28.28	200661	9.15
SC61	11.52	200693	17.05
S.Pum19	2.83	200793	11.26
200019	8.09	202302	25.13
200054	6.29	202303	0.00
200060	28.37	202361	1.71
200080	17.9	202369	0.08
200173	9.59	202399	17.42
200650	5.61	202541	11.39
200655	9.85	202543	18.40

- *Bacillus* 1주에 대해 항산화 효과를 측정한 결과(Table 1-28), 20.87% 항산화 효과가 나타났다.

Table 1-28. 내산·내담즙성 우수 *Bacillus*의 항산화 효과

Strain number	Antioxidant activity(%)
203098	20.87

- 효모 5주에 대해 항산화 효과를 측정한 결과(Table 1-29), 2.54~21.64%까지 다양한 항산화 효과가 나타났다.

Table 1-29. 내산·내담즙성 우수 효모의 항산화 효과

Strain number	Antioxidant activity(%)	Strain number	Antioxidant activity(%)
200270	2.54	200281	9.3
200278	9.64	200284	21.64
200280	12.39		

2. 전통발효식품의 경우 protease 및 amylase 활성 측정

가. Protease 활성 측정

- Protease 활성 스크리닝을 통해 얻은 활성이 있는 *Bacillus* 193주에 대해서 protease 활성 양 측정 실험을 하였다.
- Protease 활성 양 측정 실험방법은 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 15분)를 이용하여 상등액을 회수한 후 상등액을 15 mL conical tube에 1 mL를 담은 후 0.6%casein 용액을 1 mL를 넣은 후 water bath에 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.4

M trichloroacetic acid를 2 mL씩 넣은 후 water bath에 37°C에서 25분간 담가 반응을 정지시킨다. syringe filter를 이용해 여과시킨 후 0.4 M sodium carbonate용액을 5 mL 넣은 후 3배 희석한 포린시액을 1 mL 넣은 후 20분간 반응시킨 후 흡광도 660 nm에서 측정하였다.

- 전통발효식품 유래 *Bacillus* 194주에 대한 protease 활성 측정 결과(Table 1-30), protease 활성 양이 266.22~710.72 Unit로 다양하게 나타났다.

Table 1-30. *Bacillus* 균주의 protease 활성

Strain number	Protease unit(U)	Strain number	Protease unit(U)	Strain number	Protease unit(U)
E3-1	528.22	I5-1	417.25	KU15071	437.64
E4	471.48	I23	416.41	KU15079	464.09
E4-1	479.83	I25	402.23	KU15080	425.71
E5	490.91	I28	377.91	KU15089	538.59
E5-1	547.77	I43	409.98	KU15109	479.11
E6	478.40	I46	347.87	KU15130	483.52
E6-1	473.27	I56	412.24	KU15131	476.01
E7	525.24	I57	451.81	KU15132	478.75
E7-1	514.87	I58	425.59	KU15133	455.39
E10	503.19	I59	358.24	KU15146	448.36
E10-1	501.28	I61	438.70	KU15157	458.97
E13	522.26	I63	500.09	KU15158	466.24
E15-1	469.69	I201	345.73	KU15162	520.83
E18-1	532.27	I611	343.34	KU15188	529.77
E19-1	520.59	I712	321.41	KU15191	514.99
E20-1	514.16	J16	475.89	KU15194	520.59
E22-1	507.12	J26	489.96	KU15198	537.64
E23	521.67	J37	473.51	JKI-9	560.52
E24	500.69	J46	483.76	JKI-15	465.16
E25	509.51	J47	487.81	JKI-18	492.46
E27	552.90	J48	470.29	JKI-34	481.73
E28	516.90	N1	480.90	JKI-38	525.24
E29	507.12	BK	266.22	JKI-39	569.70
E30	572.21	JD	372.67	JKI-40	505.10
E31	577.57	JK	351.45	JKI-43	408.43
E32	593.42	MD	374.57	JKI-46	449.43
E33	575.66	MK	355.50	JKI-48	433.70
E34	574.35	KU15015	457.30	JKI-51	398.41
E35	632.16	KU15025	539.31	JKI-52	429.17
E38	710.72	KU15026	486.98	JKI-61	506.17
E39	601.53	KU15027	494.49	JKI-64	433.34
E41	482.81	KU15028	400.08	JKI-68	432.86
E43	479.35	KU15029	399.84	JKI-69	512.37
E44	487.22	KU15056	408.07	JKI-71	429.52
H38	433.46	KU15067	436.91	JKI-72	438.70

(Table 1-30, 계속)

Strain number	Protease unit(U)	Strain number	Protease unit(U)	Strain number	Protease unit(U)
JKI-77	437.39	200339	435.96	200399	481.02
JKI-97	456.22	200340	551.58	200401	422.13
JKI-142	445.74	200341	534.90	200402	429.76
JKI-148	449.79	200342	517.85	200403	447.28
JKI-177	432.98	200345	525.96	200404	478.75
JKI-199	397.82	200348	490.20	200495	369.33
JKI-233	441.56	200349	429.40	200496	470.77
JKI-236	486.50	200350	452.89	200497	417.25
JKI-247	459.09	200351	488.65	200498	380.53
JKI-366	458.97	200352	471.72	200499	406.04
g7	445.74	200354	562.31	200500	417.48
g10	453.84	200357	505.34	200501	428.45
g12	450.50	200371	429.52	200502	409.62
g21	451.34	200372	492.34	200503	421.06
g66	601.41	200376	476.97	200504	454.32
g68	591.52	200377	439.66	200505	457.77
F3201	442.87	200379	444.07	200513	478.04
200288	463.97	200381	435.36	200514	453.60
200290	403.90	200382	434.29	200554	594.14
200291	423.21	200385	456.70	200555	618.46
200292	452.89	200386	501.28	200556	557.90
200325	485.43	200387	456.94	200557	607.37
200329	489.96	200388	523.81	200558	595.69
200330	526.67	200389	555.88	200559	570.54
200331	513.32	200391	533.11	200560	511.65
200332	519.04	200392	540.62	200561	626.80
200333	502.47	200395	439.42	200562	640.87
200334	539.19	200396	430.24	200563	675.91
200337	560.05	200397	447.64		
200338	524.76	200398	431.91		

나. Amylase 활성 측정

- Amylase 활성 스크리닝을 통해 얻은 활성이 있는 *Bacillus* 112주에 대해서 amylase 활성 양 측정 실험을 하였다.
- Amylase 활성 측정 실험방법은 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 15분)를 이용하여 상등액을 회수한 후 상등액을 15 mL conical tube에 1 mL를 담은 후 water bath에 25°C에서 3분간 반응시킨 1% soluble starch 용액을 1 mL를 넣는다. water bath에 25°C에서 3분간 반응시킨 후 DNS시약 1 mL를 넣고, 끓는 물에 15분간 담가놓음. 얼음에 10분간 냉각시킨 후 증류수 9 mL를 넣은 후 흡광도 540 nm에서 측정하였다.
- 전통발효식품 유래 *Bacillus* 112주에 대한 amylase 활성 측정 결과(Table 1-31), *Bacil*

Ius 112주가 amylase 활성 양이 0.00~3.00 Unit로 다양하게 나타났다.

Table 1-31. *Bacillus* 균주의 amylase 활성

Strain number	Amylase unit(U)	Strain number	Amylase unit(U)	Strain number	Amylase unit(U)
E1	1.02	BK	0.94	g7	0.32
E1-1	0.97	MY2	0.99	g8	0.36
E2	1.31	JS	0.79	g10	0.43
E2-1	1.41	KU15015	0.77	g12	0.18
E3-1	1.33	KU15025	0.79	g30	0.22
E4	1.14	KU15026	1.00	g65	0.22
E4-1	1.26	KU15027	1.03	g66	0.16
E5	1.35	KU15028	0.66	F4042	0.89
E5-1	1.46	KU15029	0.83	200288	1.23
E8	1.39	KU15045	0.74	200329	1.55
E8-1	1.15	KU15052	0.68	200330	1.86
E10	1.21	KU15056	0.43	200331	1.67
E10-1	1.07	KU15080	0.96	200332	1.24
E12	1.83	KU15089	1.04	200337	1.74
E12-1	1.41	KU15130	0.82	200338	1.02
E13-1	1.59	KU15131	0.58	200339	1.22
E14	1.95	KU15132	0.53	200340	1.45
E17-1	1.45	KU15157	0.74	200348	1.6
E18-1	1.59	KU15158	0.52	200350	1.01
E19-1	1.33	KU15188	0.46	200352	1.59
E25	1.34	JKI-6	0.67	200357	1.86
E27	1.68	JKI-33	0.82	200370	1.03
E30	1.42	JKI-43	1.44	200371	0.86
E32	1.26	JKI-51	0.88	200378	1.12
E33	2.06	JKI-52	1.20	200393	2.31
E34	1.50	JKI-53	0.85	200394	2.22
E35	1.44	JKI-58	1.31	200395	1.95
E36	1.27	JKI-66	1.90	200397	2.32
E38	3.00	JKI-67	1.07	200398	2.53
E43	1.49	JKI-69	1.09	200402	1.81
I21	0.67	JKI-70	1.44	200498	0.7
I31	0.97	JKI-95	0.00	200501	0.95
I35	1.10	JKI-142	0.00	200504	1.46
I43	1.02	JKI-160	0.00	200505	0.71
I59	0.72	JKI-178	0.00	200513	1.26
J11	2.17	JKI-199	0.00	200514	0.64
J16	1.30	JKI-233	0.41		
J48	1.47	JKI-366	0.58		

3. 16s rRNA 염기서열 분석을 통한 균주 동정

가. 산업용 후보 균주에 대한 16s rRNA 염기서열 분석

- 전통발효식품 분리균주 중 기초생리활성 스크리닝 단계를 통해 우수한 균주로 확인된 34주(유산균 28주, *Bacillus* 1주, 효모 5주)에 대한 16s rRNA 염기서열을 통한 산업용 후보 균주 동정(Table 1-32)은 다음과 같이 동정되었다.

Table 1-32. 산업용 후보 균주에 16s rRNA 염기서열 분석을 통한 동정 결과

산업화 후보 균주	16s rRNA 염기서열 분석 결과	Identity(%)
Lb41	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	99
Ln4	<i>Lactobacillus plantarum</i> Ln4	99
B151	<i>Lactobacillus brevis</i> B151	99
G1	<i>Lactobacillus brevis</i> G1	99
G72	<i>Lactobacillus plantarum</i> G72	99
H40	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> H40	99
KU15006	<i>Lactobacillus brevis</i> KU15006	99
SC28	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC28	99
SC61	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> SC61	99
S.Pum19	<i>Leuconostoc citreum</i> S.Pum19	99
200019	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200019	99
200054	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200054	99
200060	<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 200060	99
200080	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200080	99
200173	<i>Lactobacillus curvatus</i> KCCM 200173	99
200270	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200270	99
200278	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200278	99
200280	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200280	99
200281	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200281	99
200284	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200284	99
200650	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200650	99
200655	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200655	99
200656	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200656	99
200661	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200661	99
200693	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200693	99
200793	<i>Lactobacillus buchneri</i> KCCM 200793	99
202302	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202302	99
202303	<i>Lactobacillus plantaru</i> KCCM 202303	99
202361	<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202361	99
202369	<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202369	99
202399	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202399	99
202541	<i>Lactobacillus perolens</i> KCCM 202541	99
202543	<i>Lactobacillus hilgardii</i> KCCM 202543	99
203098	<i>Bacillus coagulans</i> KCCM 203098	99

4. 표준균주 및 상용균주에 대한 프로바이오틱스 특성 및 효소 생산능 측정

가. 유제품 및 건강기능식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 내산·내담즙성

- 생물자원센터(KCTC)에서 제공받은 표준균주인 *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* KCTC 3108, *L. casei* KCTC 3109, *L. brevis* KCTC 3498(유산균 4주)와 회사에서 제공받은 상용균주인 *Lactobacillus plantarum* KCTC 10782BP, *L. rhamnosus* KCTC 12202BP, *L. reuteri* KCTC 12397BP, *L. casei* KCTC 12398BP, *L. paracasei* KCTC 12451BP(유산균 5주) 총 유산균 9주에 대해 내산·내담즙성 측정실험을 하였다.
- 유제품 및 건강기능식품에 사용되고 있는 표준균주 및 상용균주 9주에 대한 내산·내담즙성을 실험한 결과(Table 1-33), 내산·내담즙성이 80%이상 넘는 생존률을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1-33. 표준균주 및 상용균주에 대한 내산·내담즙성

Strain number	Acid tolerance(%)	Bile salt tolerance(%)
<i>L. rhamnosus</i> GG	99.47	100.27
<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	93.20	97.63
<i>L. casei</i> KCTC 3109	83.70	88.77
<i>L. brevis</i> KCTC 3498	94.48	100.77
<i>L. plantarum</i> KCTC 10782BP	98.26	68.80
<i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP	98.83	100.84
<i>L. reuteri</i> KCTC 12397BP	100.50	97.78
<i>L. casei</i> KCTC 12398BP	98.33	97.58
<i>L. paracasei</i> KCTC 12451BP	98.68	100.11

나. 유제품 및 건강기능식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 효소 생산능

- 표준균주 및 상용균주 9주에 대한 효소 생산능을 실험한 결과(Table 1-34), 유해효소인 β -glucuronidase를 모두 생성하지 않았기 때문에 안전한 것으로 확인되었다.

Table 1-34. 표준균주 및 상용균주에 대한 효소 생산능

Enzyme activity	Strain number		
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 3109
Control	0	0	0
Alkaline phosphate	0	0	0
Esterase	2	0	3
Esterase lipase	1	0	2
Lipase	0	0	0
Leucine arylamidase	3	0	3
Valine arylamidase	3	0	4
Cystine arylamidase	0	0	0
Trypsin	0	0	0
α -Chymotrypsin	0	0	0
Acid phosphate	1	1	1
Naphthol-AS-BI-p hosphohydrolase	2	2	2
α -Galactosidase	0	0	0
β -Galactosidase	1	0	3
β -Glucuronidase	0	0	0
α -Glucosidase	0	0	0
β -Glucosidase	1	0	2
N-Acetyl- β -glucos aminidase	0	0	0
α -Mannosidase	0	0	0
α -Fucosidase	0	0	0

0, 0 nmol 1, 5 nmol 2, 10 nmol 3, 20 nmol 4, 30 nmol 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-34, 계속)

Enzyme activity	Strain number		
	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
	KCTC 3498	KCTC 10782BP	KCTC 12202BP
Control	0	0	0
Alkaline phosphate	0	0	1
Esterase	0	0	1
Esterase lipase	0	0	1
Lipase	0	0	0
Leucine arylamidase	3	3	4
Valine arylamidase	2	2	4
Cystine arylamidase	0	0	2
Trypsin	0	0	0
α -Chymotrypsin	0	0	0
Acid phosphate	1	1	2
Naphthol-AS-BI-p hosphohydrolase	2	1	3
α -Galactosidase	0	0	0
β -Galactosidase	4	5	3
β -Glucuronidase	0	0	0
α -Glucosidase	1	0	0
β -Glucosidase	3	4	4
N-Acetyl- β -glucos aminidase	0	1	0
α -Mannosidase	0	0	0
α -Fucosidase	0	0	0

0, 0 nmol 1, 5 nmol 2, 10 nmol 3, 20 nmol 4, 30 nmol 5, ≥ 40 nmol.

(Table 1-34, 계속)

Enzyme activity	Strain number		
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>
	KCTC 12397BP	KCTC 12398BP	KCTC 12451BP
Control	0	0	0
Alkaline phosphate	0	1	0
Esterase	1	2	1
Esterase lipase	0	1	1
Lipase	0	0	0
Leucine arylamidase	2	4	4
Valine arylamidase	0	4	5
Cystine arylamidase	0	1	0
Trypsin	0	0	0
α -Chymotrypsin	0	0	0
Acid phosphate	1	2	0
Naphthol-AS-BI-p hosphohydrolase	1	3	1
α -Galactosidase	0	1	0
β -Galactosidase	5	2	1
β -Glucuronidase	0	0	0
α -Glucosidase	1	2	2
β -Glucosidase	0	4	0
N-Acetyl- β -glucos aminidase	0	1	0
α -Mannosidase	0	0	0
α -Fucosidase	0	0	0

0, 0 nmol 1, 5 nmol 2, 10 nmol 3, 20 nmol 4, 30 nmol 5, ≥ 40 nmol.

다. 유제품 및 건강기능식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 장 부착능

- 표준균주 및 상용균주 9주에 대한 장 부착능을 실험한 결과(Table 1-35), 0.04~8.61%의 장 부착능력을 갖는 것으로 확인되었다.

Table 1-35. 표준균주 및 상용균주에 대한 장 부착능

Strain number	Cell adhesion(%)
<i>L. rhamnosus</i> GG	2.48
<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	2.22
<i>L. casei</i> KCTC 3109	1.56
<i>L. brevis</i> KCTC 3498	0.72
<i>L. plantarum</i> KCTC 10782BP	8.61
<i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP	0.04

(Table 1-35, 계속)

Strain number	Cell adhesion(%)
<i>L. reuteri</i> KCTC 12397BP	2.46
<i>L. casei</i> KCTC 12398BP	1.48
<i>L. paracasei</i> KCTC 12451BP	6.57

라. 유제품 및 건강기능식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 항생제 저항성

- 표준균주 및 상용균주 9주에 대한 항생제 저항성을 실험한 결과(Table 1-36), gentamycin, kanamycin, streptomycin, ciprofloxacin에 대해 다른 균주에게 항생제 인자를 전달할 가능성이 없는 본래 지니고 있는 항생제 내성을 갖는 것으로 확인되었다.

Table 1-36. 내산·내담즙성 우수 유산균의 항생제 저항성

Strain number	Ampicillin	Gentamycin	Kanamycin	Streptomycin
<i>L. rhamnosus</i> GG	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	S	R	R	R
<i>L. casei</i> KCTC 3109	S	R	R	R
<i>L. brevis</i> KCTC 3498	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> KCTC 10782BP	S	R	R	R
<i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP	S	R	R	R
<i>L. reuteri</i> KCTC 12397BP	S	R	R	R
<i>L. casei</i> KCTC 12398BP	S	R	R	R
<i>L. paracasei</i> KCTC 12451BP	S	R	R	R

S: susceptible, R: resistant.

(Table 1-36, 계속)

Strain number	Tetracycline	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Doxycycline
<i>L. rhamnosus</i> GG	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	S	R	S	S
<i>L. casei</i> KCTC 3109	S	R	S	S
<i>L. brevis</i> KCTC 3498	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> KCTC 10782BP	R	R	S	S
<i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP	S	R	S	S
<i>L. reuteri</i> KCTC 12397BP	S	R	S	S
<i>L. casei</i> KCTC 12398BP	S	R	S	S
<i>L. paracasei</i> KCTC 12451BP	I	R	I	S

S: susceptible, R: resistant.

마. 유제품 및 건강기능식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 항산화 효과

- 표준균주 및 상용균주 9주에 대한 DPPH radical 소거능에 관한 항산화 효과를 실험한 결과(Table 1-37), 9.71~34.88%의 항산화 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

Table 1-37. 표준균주 및 상용균주에 대한 항산화 효과

Strain number	Antioxidant activity(%)
<i>L. rhamnosus</i> GG	19.76
<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	11.33
<i>L. casei</i> KCTC 3109	9.71
<i>L. brevis</i> KCTC 3498	24.45
<i>L. plantarum</i> KCTC 10782BP	31.02
<i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP	32.03
<i>L. reuteri</i> KCTC 12397BP	24.16
<i>L. casei</i> KCTC 12398BP	34.88
<i>L. paracasei</i> KCTC 12451BP	21.45

바. 전통발효식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 protease 활성 측정

- 회사에서 제공받은 *Aspergillus oryzae* CF1001, *A. sojae* CF1002, *A. oryzae* CF1003, *A. luchuensis* CF1005에 대한 protease 활성을 측정하였다.
- 전통발효식품에 사용되고 있는 곰팡이 4주에 대해 protease 활성 여부를 측정한 결과 (Table 1-38), *A. luchuensis* CF1005이 protease 활성이 있는 것으로 나타났다.

Table 1-38. 표준균주 및 상용균주에 대한 protease 활성 여부

Strain number	Clear zone
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1001	-
<i>Aspergillus sojae</i> CF1002	-
<i>Aseprgilus oryzae</i> CF1003	-
<i>Aseprgilus luchuensis</i> CF1005	++

-, No inhibition ; +, 1-2 mm clear zone ; ++, 2-5 mm clear zone ; +++, > 5 mm clear zone.

사. 전통발효식품 관련 표준균주 및 상용균주에 대한 amylase 활성 측정

- 회사에서 제공받은 *A. oryzae* CF1001, *A. sojae* CF1002, *A. oryzae* CF1003, *A. luchuensis* CF1005에 대한 amylase 활성을 측정하였다.
- 전통발효식품에 사용되고 있는 곰팡이 4주에 대해 amylase 활성 여부를 측정한 결과 (Table 1-39), *A. oryzae* CF1003, *A. luchuensis* CF1005이 amylase 활성이 있는 것으로 나타났다.

Table 1-39. 표준균주 및 상용균주에 대한 amylase 활성 여부

Strain number	Clear zone
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1001	-
<i>Aspergillus sojae</i> CF1002	-
<i>Aseprgilus oryzae</i> CF1003	+++
<i>Aseprgilus luchuensis</i> CF1005	+++

-, No inhibition ; +, 1-2 mm clear zone ; ++, 2-5 mm clear zone ; +++, > 5 mm clear zone.

제 4절 기초생리활성 항목별 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 산업용 후보 균주 제공

1. 균주의 생화학적 특성 및 기초 생리활성 연구결과에 대한 통계 처리 및 평가 범위표 확보

가. 균주의 대한 평가범위표

- 유제품 및 건강기능식품에 관련된 전통발효식품 분리균주의 평가 범위표는 다음과 같다(Table 1-40).

Table 1-40. 유제품 및 건강기능식품에 관련된 전통발효식품 분리균주 평가 범위표

실험단계	평가범위
내산성 스크리닝 측정	유산균의 경우 70%, <i>Bacillus</i> 균주의 경우 50%, 효모의 경우 80%이상인 경우 → 내산·내담즙성 실험을 진행
내산·내담즙성 측정	모든 균주의 경우 내산성 및 내담즙성이 80%이상인 경우 → 효소생산능 실험을 진행
효소 생산능 측정	모든 균주의 경우 유해효소인 β -glucuronidase를 생산하지 않는 경우 → 세포독성 실험을 진행
세포독성 측정	모든 균주의 경우 세포독성이 20%이하일 경우 → 장 부착능 실험을 진행
장 부착능 측정	모든 균주의 경우 장 부착능이 1%이상일 경우 → 항생제 저항성을 진행
항생제 저항성 측정	모든 균주의 경우 특이적인 항생제 내성이 나타나지 않을 경우 → 산업용 후보균주로 입증되며 다양한 기능성 실험을 진행

- 전통발효식품에 관련된 전통발효식품 분리균주의 평가 범위표는 다음과 같다(Table 1-41).

Table 1-41. 전통발효식품에 관련된 전통발효식품 분리균주 평가 범위표

실험단계	평가범위
Protease 스크리닝 측정	<i>Bacillus</i> 및 곰팡이의 경우 1% skim milk를 이용하여 활성 여부를 측정 → 활성이 나타나는 경우 protease 활성 양을 측정
Amylase 스크리닝 측정	<i>Bacillus</i> 및 곰팡이의 경우 1% starch agar를 이용하여 활성 여부를 측정 → 활성이 나타나는 경우 amylase 활성 양을 측정

나. 검증된 산업용 후보 균주 확보 및 제공

- 현재 산업용 후보 균주들은 기초생리활성 특성에 대해서는 앞에 제시된 평가범위표 (Table 1-40, Table 1-41)기준을 통과한 균주들이다. 또한 이들 균주를 통과한 균주들은 총 34주(유산균 28주, *Bacillus* 1주, 효모 5주)이다.
- 산업용 후보 균주들은 기초생리활성 측면에서 표준균주 및 상용균주만큼 우수한 것으로 나타났으며 각 협동에게 제공하였다.
- 산업용 후보 균주 제공 현황은 현재 한국식품연구원에 27주(유산균 22주, 효모 5주), 단국대학교에 27주(유산균 22주, 효모 5주), 가천대학교에 16주(유산균 16주), (주)셀바이오텍 3주(유산균 3주), (주)아람 2주(유산균 2주)를 제공하였다(Table 1-42).

Table 1-42. 산업용 후보 균주 확보 및 제공현황

산업용 후보 균주	한국식품연구원	단국대학교	가천대학교	(주)셀바이오텍	(주)아람
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus plantarum</i> Ln4	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus brevis</i> B151	○	○	○		
<i>Lactobacillus brevis</i> G1	○	○	○	○	○

(Table 1-42, 계속)

산업용 후보 균주	한국식품연구원	단국대학교	가천대학교	(주)셀마이오틱	(주)아람
<i>Lactobacillus plantarum</i> G72	○	○			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> H40		○			
<i>Lactobacillus brevis</i> KU15006		○	○		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC28	○	○			
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> SC61		○			
<i>Leuconostoc citreum</i> S.Pum19	○	○			
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200019	○	○	○		
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200054	○	○	○		
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 200060	○	○			
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200080	○	○	○		
<i>Lactobacillus curvatus</i> KCCM 200173					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200270	○	○			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200278	○	○			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200280	○	○			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200281	○	○			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200284	○	○			
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200650	○	○	○		
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200655	○	○	○		

(Table 1-42, 계속)

산업용 후보 균주	한국식품연구원	단국대학교	가천대학교	(주)셀바이오텍	(주)아람
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200656	○	○	○		
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200661	○	○	○		
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200693	○	○	○		
<i>Lactobacillus buchneri</i> KCCM 200793	○	○	○		
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202302	○	○	○		
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 202303	○	○	○		
<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202361	○				
<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202369	○				
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202399	○				
<i>Lactobacillus perolens</i> KCCM 202541					
<i>Lactobacillus hilgardii</i> KCCM 202543					
<i>Bacillus coagulans</i> KCCM 203098					

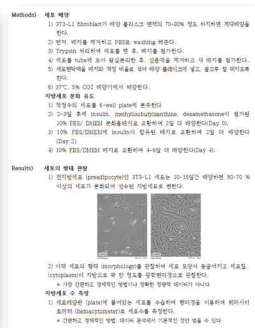
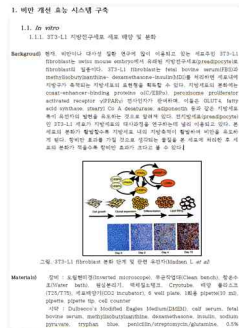
제 5절 식품 산업용 균주의 안전성 및 기능성 평가시스템 구축

1. 식품산업용 균주의 기능성 평가시스템 구축 및 평가

- 기능성 평가시스템 구축 및 평가와 관련한 1협동기관의 연구목표 및 내용은 1,2년차에 국내·외 기능성 평가 가이드라인과 연구문헌 분석을 통해 기능성 평가시스템을 제공하고, 이를 바탕으로 2,3년차에는 주관기관에서 제공하는 기초생리활성 우수 균주의 기능성을 구명하여 최종적으로 식품 산업용으로 사용 가능한 기능성 우수 균주를 제시하는 것이다.
- 이에 국내·외 기능성 평가 관련 지침, 국내·외 연구논문 분석을 통해 항비만, 항당뇨, 간기능 개선, 면역과민반응 억제활성 및 장 건강 개선 활성 평가와 관련한 기능성 평가법을 1,2차년도에 구축하였으며, 시스템 구축 보고서의 내용이 방대하여 이에 대한 내용은 [식품산업용 균주의 기능성 평가시스템 구축] 별첨 보고서(약 200 페이지 분량)로 제출하였다.
- 2,3차년도에는 주관기관에서 6,000 균주를 대상으로 기초생리활성 평가를 실시하여 선별한 우수종균 22종에 대한 기능성(항비만, 항당뇨, 항알레르기 및 간기능성 개선 활성)을 구축한 *in vitro/in vivo* 기능성 평가법을 바탕으로 분석하였다. 이를 통해 최종적으로 항비만 및 항당뇨 활성이 뛰어난 *Lactobacillus plantarum* Ln4와 *Lactobacillus plantarum* Lb41와 식품알레르기 억제활성을 가지는 *Lactobacillus brevis* G1 균주를 기능성 우수 균주로 제시하였다.

가. 식품산업용 균주의 기능성 평가시스템 구축

- 식품산업용 균주의 기능성 평가시스템을 구축하기 위해 다양한 가이드라인, 검색엔진, 연구문헌 분석하여 미생물 시료 전처리법, 기능성 평가법은 아래의 예시와 같이 프로토콜화 하였다.



기능성 평가시스템 구축을 위한 문헌조사 기능성 평가법 프로토콜화 예시

- 항비만 활성 평가법 20건, 항당뇨 활성 평가법 21건, 간기능 개선 활성 평가법 23건, 면역과민반응 억제활성 평가법 10건 및 장 건강 개선 활성 평가법 10건 등 총 84건의 평가법을 프로토콜화 하였으며, 미생물의 기능성을 평가한 연구문헌 분석을 통해 미생물 시료 생산법, 전처리법, 적정처리 농도 등에 대한 정보를 제시하는 [식품산업용 균주의 기능성 평가시스템 구축] 보고서를 작성하였으며, 내용이 방대하여 최종보고서 외 별첨 보고서(약 200 페이지 분량)로 제출하였다.

나. 식품산업용 균주의 기능성 평가

(1) 기능성 우수 후보 종균의 시료 전처리

(가) 균주 배양

- 주관기관으로부터 기초생리활성 및 프로바이오틱스 특성이 높은 균주 22종을(1차년도 11종, 2차년도 11종) 제공받았다. 22종 균주를 MRS 배지를 이용하여 37°C, pH 6.5 조건에서 4 L 규모로 18시간 호기진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리(5,000 g, 10분) 한 후 pellet과 배양상등액을 따로 취하여 동결건조 및 분말화 함으로써 생균 및 배양상등액 샘플을 준비하였고, 생균을 121°C에서 15분간 열처리하여 사균 샘플을 준비하였다. 균주의 목록 및 전처리 방법에 따른 수율과 생균 농도는 아래와 같다.

Table 2-1. 기초생리활성 및 프로바이오틱스 특성이 높은 균주 22종 수율 및 생산농도

No	균주명	수율(%)		균농도 (CFU/mg)	
		균체	수율		
1차년도 선별 균주	1	<i>Lactobacillus brevis</i> B151	균체	0.17	2.8×10^8
	2	<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 200060	균체	0.25	2.2×10^8
	3	<i>Lactobacillus plantarum</i> G72	균체	0.2	1.5×10^7
	4	<i>Lactobacillus plantarum</i> Ln4	균체	0.25	1.5×10^5
	5	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	균체	0.25	1.2×10^8
	6	<i>Lactobacillus brevis</i> G1	균체	0.13	5.0×10^8
	7	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200080	균체	0.18	7.0×10^8
	8	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200054	균체	0.27	9.0×10^9
	9	<i>Leuconostoc citreum</i> S.Pum19	균체	0.26	8.3×10^4
	10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC28	균체	0.18	4.4×10^8
	11	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200019	균체	0.26	2.3×10^8
2차년도 선별 균주	1	<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202361	균체	0.18	7.8×10^6
	2	<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202369	균체	0.20	3.5×10^8
	3	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200655	균체	0.22	6.6×10^4
	4	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200656	균체	0.13	2.4×10^6
	5	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200693	균체	0.24	1.5×10^6
	6	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200650	균체	0.25	5.0×10^8
	7	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 202303	균체	0.20	7.0×10^7
	8	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200661	균체	0.18	1.3×10^8
	9	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202302	균체	0.16	1.1×10^8
	10	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202399	균체	0.15	1.4×10^7
	11	<i>Lactobacillus buchneri</i> KCCM 200793	균체	0.22	6.8×10^7
총 균주	22종 (1차년도 11종, 2차년도 11종)				

(나) 시료의 재현탁

① 생균 및 사균

- 동결 건조하여 분말화한 생균 및 사균 시료는 기능성 평가에 사용하는 동물세포의 배지에 $10^{5\sim 8}$ CFU/mL 농도로 현탁 하였으며, 최종 농도가 seeding하는 동물세포의 농도의 1~10배가 되도록 처리하였다.

② 배양상등액

- 배양 상등액 분말은 기능성 평가에 사용하는 동물세포의 배지에 1 mg/mL 농도로 용해한 후 최종 농도가 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 처리하였다.

(2) 항비만활성 평가

(가) *In vitro* 항비만 활성 평가

① 지방세포 분화 측정

- 구축한 식품산업용 균주의 기능성 평가시스템에 기반하여 주관기관에서 제공한 1차년도 11 균주와 2차년도 11 균주의 총 22종 균주에 대해 실험법의 특성을 고려하여 생균, 사균 또는 배양상등액 상태에서의 항비만 활성을 평가하였다.
- 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하도록 유도하고 분화 유도를 억제하는 능력을 1차년도에 선별한 11종의 식품산업용 종균이 가지고 있는지 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 플레이트에 부착 후 각각 11종에 대한 사균과 대사체 시료를 처리함과 동시에 dexamethasone, methylisobutylxanthine(IBMx), insulin을 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 그 후에 Oil Red O staining을 통하여 지방세포를 염색하고 정량화하여 지방세포로의 분화 억제능을 확인하였다. 이 실험법의 경우에는 배지 오염 등의 문제로 인하여 생균 시료로는 실험을 진행하지 않고, 사균과 대사체만 효능평가에 사용하였다.
- 사균 처리에 의하여 지방세포 분화를 억제하는 효능을 확인한 결과, 분화시키지 않은 그룹(ND; non-differentiated) 대비 분화시킨 경우(C; control) 2.5배 이상 유도가 되었으며 이러한 지방세포 축적이 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10번 균주(사균, 100 $\mu\text{g/mL}$) 처리에 의하여 억제되는 것을 확인하였다(Figure 2-1).

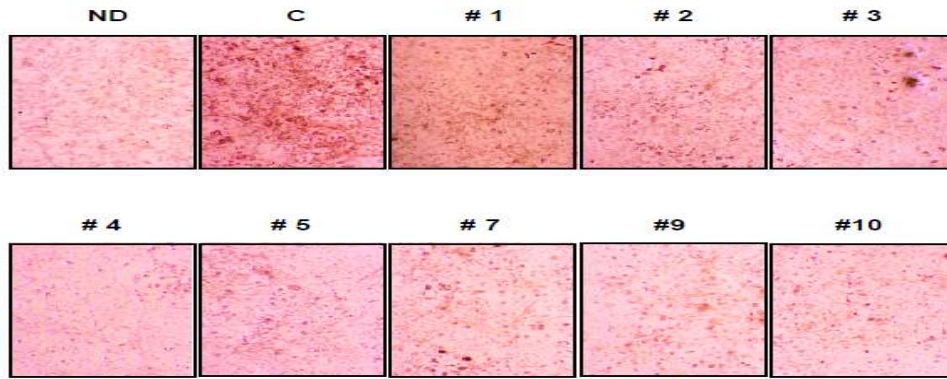
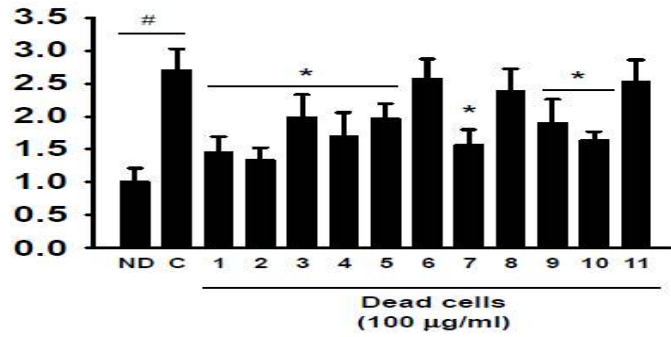


Figure 2-1. The inhibitory effect of dead cells on adipocyte differentiation induced by MDI treatment in 3T3-L1 cells. Lipid content were measured by Oil Red O staining. #, $p < 0.05$ vs. ND; *, $p < 0.05$ vs. C; y-axis, fold of ND.

- 대사체 처리에 의하여 지방세포 분화를 억제하는 효능을 확인한 결과, 분화시키지 않은 그룹(ND; non-differentiated) 대비 분화시킨 경우(C; control) 5배 이상 유도가 되었으며 이러한 지방세포 축적이 1, 2, 3, 5, 6, 9번 균주(사균, 100 µg/mL) 처리에 의하여 억제되는 것을 확인하였다(Figure 2-2).

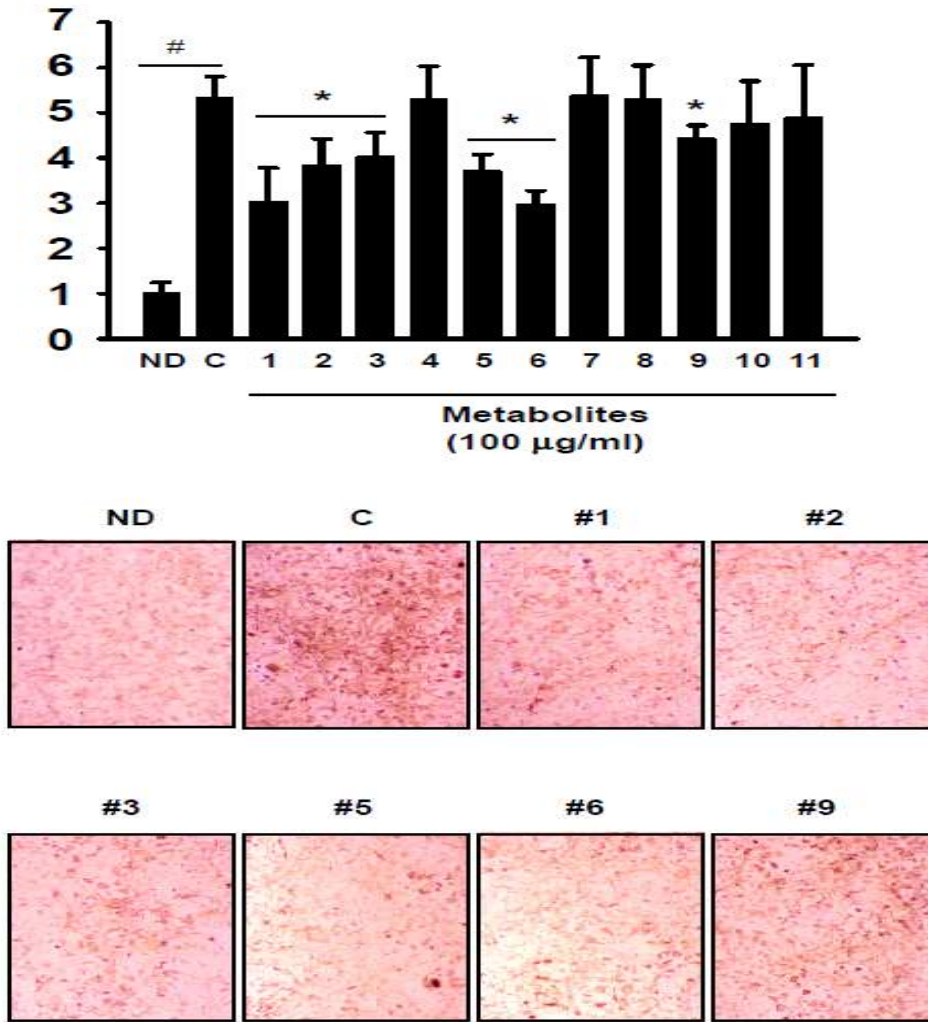


Figure 2-2. The inhibitory effect of metabolites on adipocyte differentiation induced by MDI treatment in 3T3-L1 cells. Lipid content were measured by Oil Red O staining. #, $p < 0.05$ vs. ND; *, $p < 0.05$ vs. C; y-axis, fold of ND.

- 2차년도 결과에 따라 주관기관에서 새롭게 선정된 11개 신규 균주에 대하여 추가적으로 지방전구세포 분화 억제능을 확인하였다. 균주의 종류는 아래의 Table 2-1와 같으며 그 결과는 Figure 2-3에 그래프로 나타내었다. 그 결과, 2차년도에 선별된 11종 균주를 사균형태로 20, 100 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 결과 지방전구세포의 분화를 유의적으로 억제하는 효능이 확인되지 않았다.

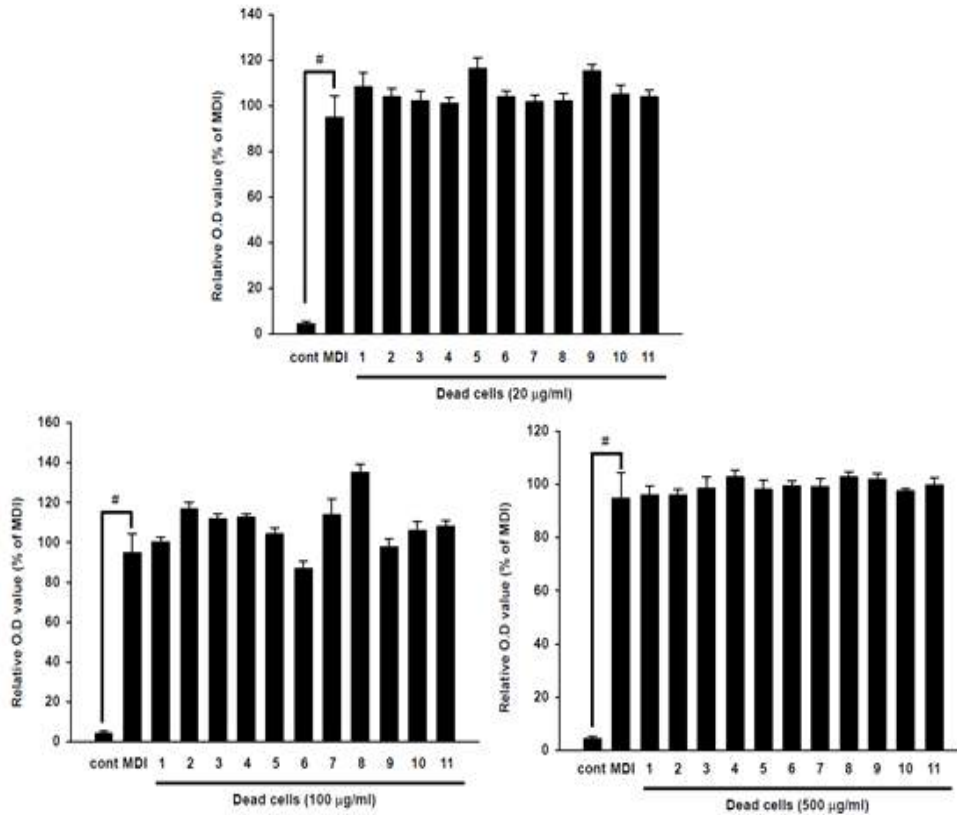


Figure 2-3. The effect of dead cells on adipocyte differentiation induced by MDI treatment in 3T3-L1 cells. Lipid content were measured by Oil Red O staining. #, $p < 0.05$ vs. cont; y-axis, % of MDI.

② 지방분해효능 측정

- 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 이후, 주관기관으로부터 제공받은 1차년도 선별 균주 11종의 사균과 대사체를 처리하여 지방을 분해하는 효능을 확인하기 위하여 중성지방이 분해되어 나타나는 glycerol 방출 정도를 측정하였다. Glycerol release를 측정하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 우선 지방전구세포를 지방세포로 완전 분화시키기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 플레이트에 부착 후 100% confluency가 될 때까지 배양하였다. 그 후에 dexamethasone, methylisobutylxanthine (IBMX), insulin을 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 지방세포로 분화가 대부분 된 것을 확인한 이후(현미경 관찰 시 육안으로 세포 내에 지방구가 가득 찬 것을 확인한 후) 24시간에서 48시간동안 11종의 균주에 대한 각각의 사균 및 대사체 시료를 처리하였다. 배양 후 배지에서 분비된 glycerol 양을 free glycerol 정량법을 통하여 정량하였다.

- Glycerol standard solution(0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015826 mM) 농도로 설정하고, 각각 시료 처리구의 배지를 따서 3반복으로 gree glycerol reagent(Sigma)와 반응시켰다. 15분간 37°C에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도 측정하여 아래의 식에 대비하여 glycerol 양을 정량하였다. 단, 이 실험법의 경우에도 배지 오염 등의 문제로 인하여 생균 시료로는 실험을 진행하지 않고, 사균과 대사체만 효능평가에 사용하였다.

$$\frac{A_{\text{시료처리균}} - A_{\text{시료blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}} \times \text{standard농도}$$

- 사균 처리에 의한 지방분해(glycerol release) 정도를 측정한 결과는 아래의 Figure 2-4에 있으며, 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11번 군주에서 유의적 차이가 나타나는 것을 확인했다. 특히 1번과 5, 8, 9번 군주의 활성이 매우 뛰어나함을 확인하였다.
- 대사체 처리에 의한 지방분해(glycerol release) 정도를 측정한 결과(Figure 2-5) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11번 군주에서 유의적 차이가 나타나는 것을 확인하였다.

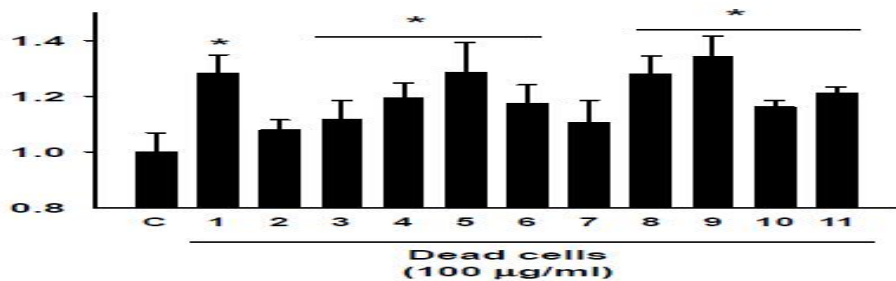


Figure 2-4. The effect of dead cells on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. *, $p < 0.05$ vs. C; y-axis, fold of C.

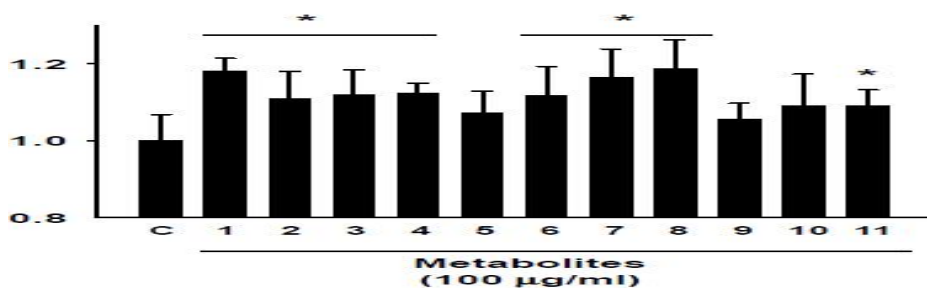


Figure 2-5. The effect of metabolites on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. *, $p < 0.05$ vs. C; y-axis, fold of C.

- 2차년도 생리활성 및 프로바이오틱스 결과에 따라 주관기관에서 새롭게 선정된 11개 신규 균주에 대하여 추가적으로 지방전구세포 분화 억제능을 확인하였다. 균주의 종류는 위의 Table 2-1와 같으며 그 결과는 Figure 2-6에 그래프로 나타내었다.
- Figure 2-6에서 확인할 수 있듯이 2차년도 추가 선별 균주에 대해서는 지방분해 촉진능이 농도 의존적으로 나오는 균주를 확인하지 못하였다.

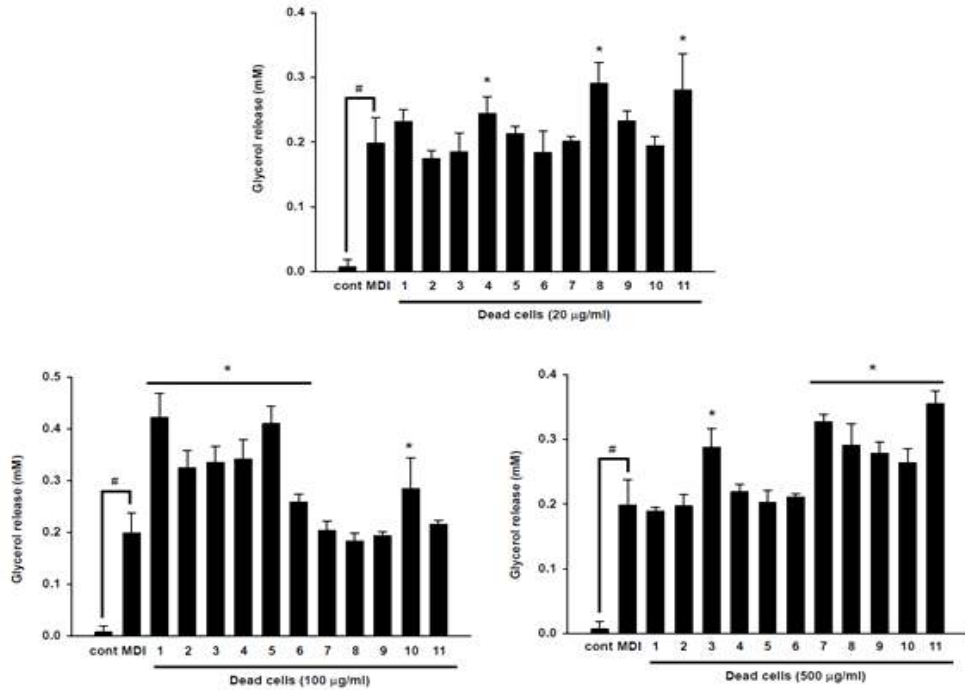


Figure 2-6. The effect of dead cells on glycerol release in 3T3-L1 cells. #, $p < 0.05$ vs. cont; y-axis, glycerol content (mM).

- 3T3-L1 지방세포 분화능 억제와 지방분해능 측정을 항비만 *in vitro* 효능평가 결과를 정리한 결과 2차년도 선별 균주에서는 항비만 활성을 확인할 수 없었고, 1차년도 선별 균주인 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9번 균주가 항비만 효능을 가지는 것으로 확인되었다. 이들 중 매우 우수한 효능을 보인 1, 4, 5, 9번 균주에 대하여 본격적인 항비만 효능 검증을 위한 동물실험(*in vivo*)을 수행하였다.

(나) *In vivo* 항비만 활성 평가

① 고지방식이 섭취 마우스 모델

㉠ 실험 방법

- *In vitro*에서 우수한 항비만 효능을 보인 1번(GK1; *Lactobacillus brevis* B151), 4번(GK4; *Lactobacillus plantarum* Ln4), 5번(GK5; *Lactobacillus plantarum* Lb41), 9번(GK9; *Leuconostoc citreum* S.Pum19) 균주에 대한 *in vivo* 항비만 효능 검증을 위하여 고지방식이를 먹여 비만을 유도하는 마우스 모델을 선택하여 수행하였다. 마우스는 항비만/항당뇨 모델에서 가장 널리 사용되는 C57BL/6J strain 12주령 이상의 마우스를 활용하였으며 1주 이상의 적응기간을 가진 이후에 고지방식이와 생균 경구투여를 시작하였다. 4종류의 균주 모두 생균을 경구투여(5×10^8 /mice/day in DW)하였고, 고지방식이는 vegetable shortening과 corn oil을 기반으로 하는 54.4% kcal from fat diet를 총 5주간 자율식으로 급여함과 동시에 매주 몸무게와 식이섭취량을 측정하였다.

㉡ 결과 서술

- 5주간의 몸무게 투여 변화는 Figure 2-7와 같으며 5주째의 그룹별 무게는 Figure 2-8에 나타내었다.
- 측정 1주일 이후부터 바로 고지방식이 그룹(HFD)는 정상식이그룹(ND) 대비 유의적인 무게 증가를 나타내었으며($p=0.002$ vs. ND), 시료 경구투여 그룹 중 GK4($p=0.044$ vs. HFD)와 GK5($p=0.029$ vs. HFD) 또한 HFD에 대비하여 유의적인 무게 감소가 나타나는 것을 확인하였으며 이러한 경향성은 실험이 진행된 5주간 지속적으로 나타남을 확인하였다.

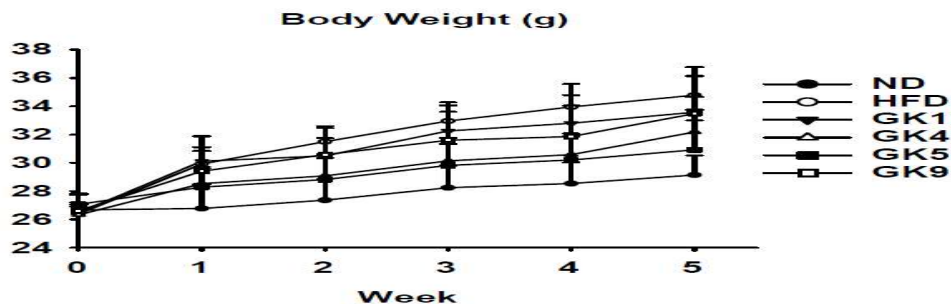


Figure 2-7. The effect of strains (live cells) on body weight gain induced by High-fat diet in C57BL/6J mice. ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

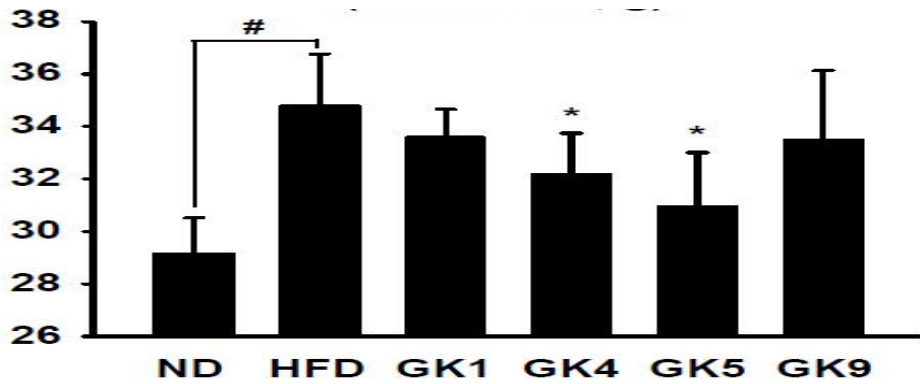


Figure 2-8. The inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* Ln4 and Lb41 on body weigh gain induced by High-fat diet for 5 weeks in C57BL/6J mice. #, $p < 0.05$ vs N D; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

- 최종 5주차 무게에서 확인할 수 있듯이, GK1(*Lactobacillus brevis* B151)과 GK9(*Leuconostoc citreum* S.Pum19) 균주의 *in vivo* 항비만 효능이 없는 것과는 다르게 GK4(*Lactobacillus plantarum* Ln4)와 GK5(*Lactobacillus plantarum* Lb41) 투여시에는 유의적으로 무게 증가가 감소하는 결과를 확인하였다. 이러한 두 균주의 항비만 효능이식이섭취량(food intake, energy intake) 변화에 의한 것이 아닌지를 판별하기 위하여 그룹별로 평균 food intake 결과를 기반으로 energy intake를 계산하여 Figure 2-9에 표시하였다.

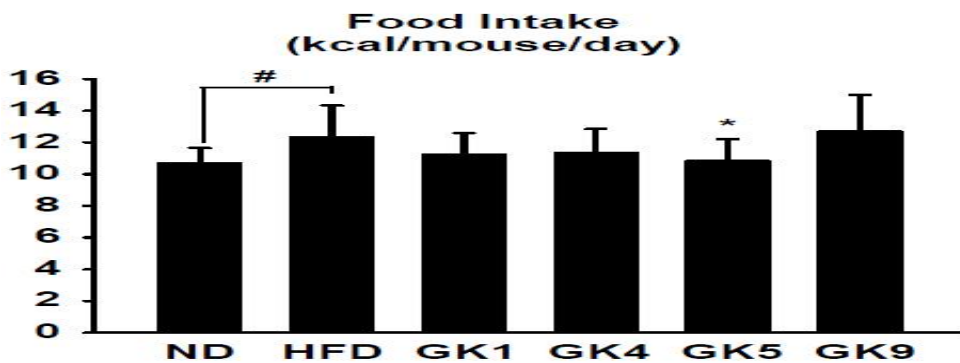


Figure 2-9. The suppressive effect of *Lactobacillus plantarum* L b41 on food intake in C57BL/6J mice. #, $p < 0.05$ vs ND; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HF D, high-fat diet group.

- 고지방식이 먹인 마우스의 food intake는 2.52 g으로 정상식이 3.44 g의 food intake(g)와 유의적 차이를 보이며 감소하였으나 칼로리로 계산시에는 ND에 대비하여 HF 그룹이 유의적으로 높은 칼로리를 섭취하는 것을 확인하였다. 그러나 GK5를 먹인 그룹에서는 이러한 energy intake 증가가 나타나지 않음을 확인함으로써, GK5가 식욕을 조절하는 효능이 있음을 간접적으로 확인하였다. GK4의 경우에는 식이섭취량에 있어서 유의적인 차이가 나타나지 않았음에도 불구하고 최종적인 phenotype에서는 무게 감소가 유의적으로 나타났으므로 식이섭취량 변화에 의한 무게 감소가 아닌 다른 기작에 의한 항비만 효능임을 확인할 수 있었다. 따라서 차후 생리학적인 항비만 효능의 기작 규명을 위해서는 식이섭취량에는 영향이 없이 무게 및 지방조직 감소 효능을 보이는 GK4(Ln4)에 대하여 분석을 진행하였다.

② 비만 유도 마우스에서 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 측정

㉠ 실험 방법 및 결과

- 식이의 과도한 섭취와 에너지 대사의 불균형으로 인하여 나타나는 비만은 혈중의 지질 대사 이상을 동반하고 이러한 이상지질혈증(dyslipidemia)는 비만이 대사성 질환으로 진행되는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 이상지질혈증은 혈중 총콜레스테롤, 중성지방, low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C)이 증가하거나 high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C)이 감소한 상태를 이른다. 따라서 비만과 대사성질환의 간접 마커로서 활용하기 위하여 고지방식으로 유도되는 비만 마우스 모델에서 혈장(plasma) 또는 혈청(serum)을 분리하여 이의 콜레스테롤과 중성지방을 측정하였다.
- 혈중 지질 분석을 위하여 마우스 혈장(plasma)을 분리하였다. 정상식이와 고지방식이, GK4를 매일 경구투여한 마우스를 15시간 이상 공복을 유지하도록 fasting 시켜준 후에 미정맥으로부터 피를 뽑아 얼음에 보관하고, 이를 10,000 rpm, 4°C에서 5분간 centrifuge하여 상등액을 취하고 -80°C에서 보관하였다.
- 혈중 콜레스테롤 분석은 총콜레스테롤 측정이 가능한 이동형 소형 기기가 보편화되어 있어 비교적 측정이 간단하고 빠르나, 본 연구에서는 HDL, LDL/VLDL 콜레스테롤 측정을 위해서 assay kit를 활용하였다. HDL와 LDL/VLDL을 분리하기 위해서 precipitation buffer를 넣고 centrifuge 후 상등액은 HDL, 침전물은 LDL/VLDL 파트로 분리하였다. 침전된 LDL/VLDL 파트는 다시 버퍼로 녹여준다. Total cholesterol과 free cholesterol의 standard를 준비하여 standard curve를 그리고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 Total, HDL, LDL/VLDL fraction서 각각 cholesterol을 측정하였다.
- 혈중 중성지방 측정을 위하여 free glycerol reagent와 triglyceride reagent를 활용하였다. Free glycerol reagent와 triglyceride reagent를 37°C로 맞추고 시료 처리군과 blank, standard를 각각 10 µL씩 96-well plate에 넣어 200 µL의 free glycerol reagent와 15분간 반응시킨다. 그 이후에 triglyceride reagent 50 µL씩 넣은 후 10~15분간 추가 반응시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- 혈중 지질분석 결과(Table 2-2), 고지방식이 투여에 의하여 유의적으로 증가하는 중성지방(total triglyceride)이 Ln4 투여에 의하여 control 수준까지 감소하는 결과를 확인하였다. 콜레스테롤의 경우, 고지방식이에 의하여 HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol이 유의적으로 고지방식이 투여 그룹에서 증가하였으나, Ln4 투여군과의 차이를 확인하지 못하였다. 이 결과를 통하여 Ln4 투여가 혈중중성지방 개선에 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 타 연구에서 *Lactobacillus plantarum* K21을 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에 8주간 섭취시켰을 때 혈액 내 중성지방이 약 32% 감소(음성대조군 대비)하여 정상군과 수준으로 회복되는 것으로 보고되었다(Evidence-based complementary and alternative medicine. Article ID391767, 2015). 본 연구를 통해 선별한 균주 Ln4을 섭취했을 경우 혈액내 중성지방 수치가 약 26% 감소(음성대조군 대비)하는 것으로 나타났으나 이 또한 정상대조군과 동일한 수준으로 회복된 것이다. 게다가 본 연구에서 프로바이오틱스(균주)의 섭취기간이 3주나 짧은 것을 감안하면 섭취기간 증가시 오히려 더 높은 효과를 기대할 수도 있을 것으로 사료된다.

Table 2-2. The effects of Ln4 administration on plasma triglyceride and cholesterol contents in HFD-induced obese mice

(mg/dL)	Control (ND)	HFD	Ln4
Total triglyceride	158.2±18.3 ^a	203.9±33.3 ^b	150.8±35.0 ^a
HDL-cholesterol	49.2±12.1 ^a	79.5±5.4 ^b	74.2±6.0 ^b
LDL-cholesterol	21.0±4.2 ^a	29.6±3.6 ^b	30.5±4.6 ^b

Mean±SD. Means with different superscript letters in each column are significantly different, $p < 0.05$ (ANOVA, Duncan test).

③ 비만 유도 마우스에서 조직 분리 및 분석

㉠ 실험 방법 및 결과

- 고지방식이를 통하여 비만을 유도한 마우스 모델에서 GK4와 GK5의 항비만 효능에 대하여 추가적으로 조직 별 무게 증감을 확인하였다. 5주차 무게 측정 이후 18시간 이상의 공복(fasting)을 유도한 이후에 마우스를 희생하여 각각 백색 내장지방(white adipose tissue)인 부고환지방과 갈색지방(brown adipose tissue), 심장(heart), 간(liver) 등을 분리하여 무게를 측정하였다(Figure 2-10). 백색지방과 간은 비만과 당뇨에 있어서 중요한 biomarker로 사용되는 조직이므로 무게 측정 이후에는 차후 분석을 위하여 -80℃에 보관하였다.

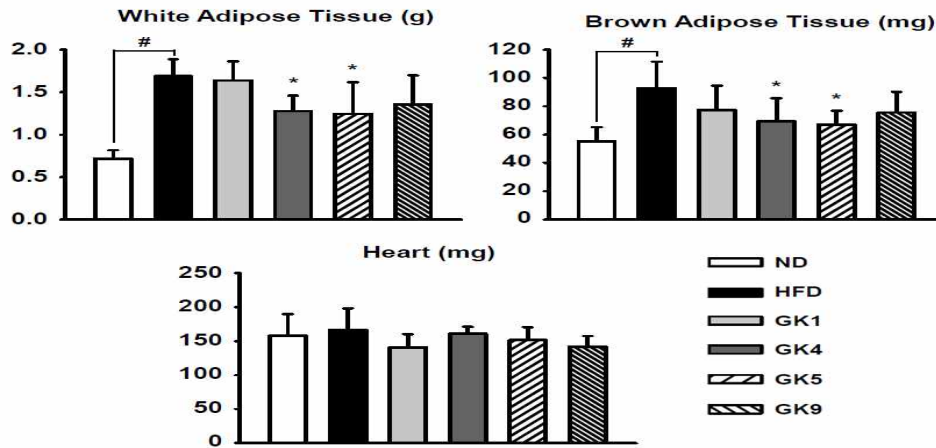


Figure 2-10. The organ weight from mice. #, $p < 0.05$ vs ND; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

- 조직별 무게를 확인한 결과, 심장 무게에는 유의적 차이가 나타나지 않았음에도 백색 지방과 갈색지방 모두 GK4와 GK5 투여 그룹에서 유의적인 감소 효능을 나타내었다. 이를 통하여 GK4와 GK5 투여시 지방 축적이 감소함을 확인할 수 있다.

④ 비만 유도 마우스에서 분리한 조직 분석-아디포카인(adipokine)

㉠ 실험 방법 및 결과

- 아디포카인(adipokine)은 지방세포 유래 호르몬으로 대표적으로 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin) 등을 포괄하는 물질이다. 이는 비만과 더불어 이와 연계된 다양한 질환인 당뇨, 염증, 동맥경화 및 심혈관계 질환에의 예방 및 진단 마커로서 사용되고 있다. 전반적인 아디포카인 분석을 위하여 고지방식이와 Ln4 투여 그룹으로부터 분리한 백색지방조직 300 mg을 사용하였다(Proteome Profiler adipokine antibody array, R&D systems). 300 mg의 백색지방을 lysis시킨 이후 단백질 500 μ g을 정량하여 adipokine mixture와 반응시키고 이를 다시 아디포카인 안티바디가 plating된 membrane에 반응시켜 이의 발광정도를 측정하였다. Chemi-doc을 통하여 이미지화한 데이터는 image J를 통하여 수치화하여 정량하였다. 38종류의 다양한 adipokine의 발현정도를 정량한 결과(Figure 2-11), IGF-1, IGFBP, CRP, FGF 등의 아디포카인들이 유의적인 차이를 나타내는 것을 확인하였다.

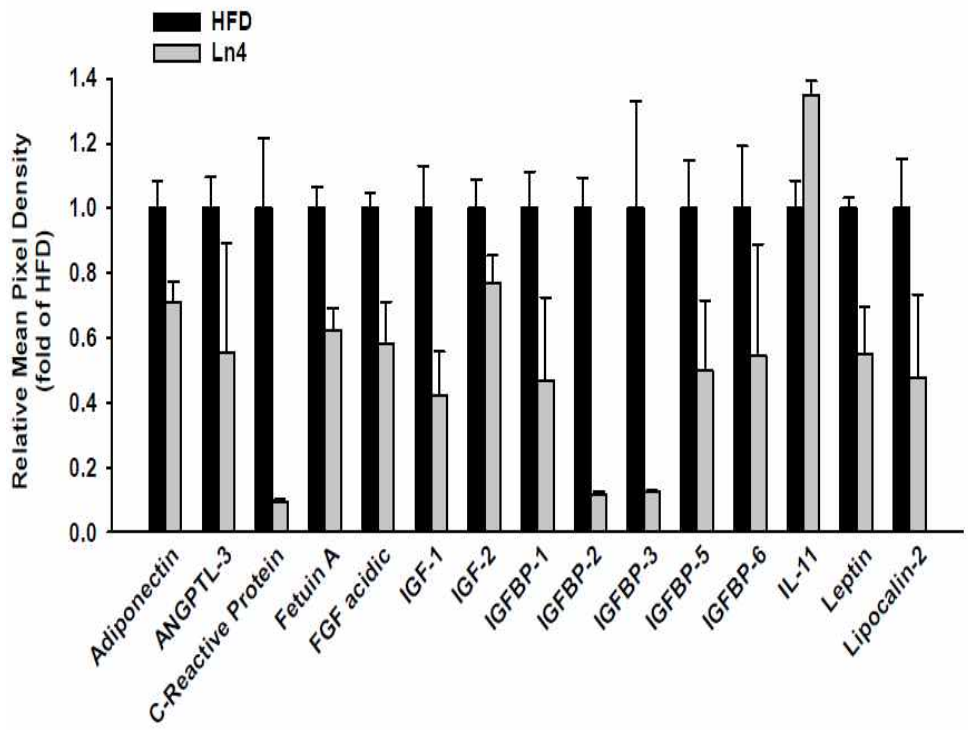
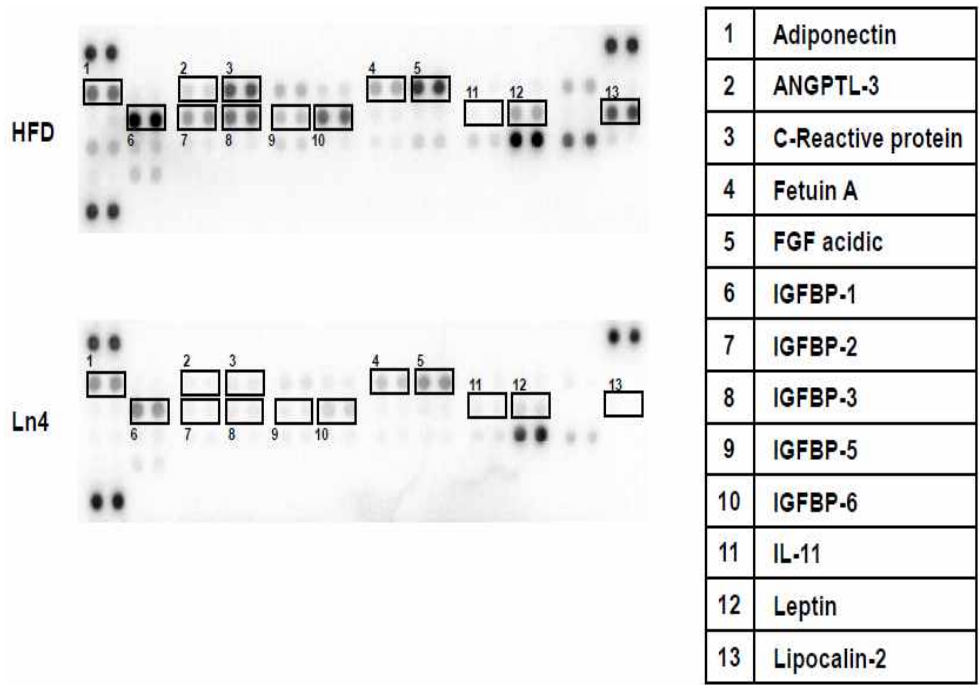


Figure 2-11. Protein array analysis of white adipose tissues from HFD-fed and Ln4 administrated mice. HFD, high-fat diet group.

(3) 항당뇨활성 평가

(가) *In vitro* 항당뇨 활성 평가

① 당 체내 흡수 억제능 측정

㉠ 실험 방법 및 결과

- 당뇨는 대표적으로 혈당의 상승과 인슐린의 과분비, 그로 인한 인슐린 분비 기관인 췌장의 beta cells injury에 의한 것으로 1차적으로 혈당 상승 조절은 항당뇨의 중요한 전략 중 하나이다. α -Glucosidase 저해제는 효소에 경쟁적인 저해작용을 통하여 탄수화물의 소화를 억제하는 작용을 하며, 이러한 α -glucosidase 저해제를 섭취하였을 때 혈당 조절과 인슐린 레벨의 조절이 정상화되는 임상 결과도 보고된 바 있다. 따라서 주관기관에서 제공된 종균 시료(생균, 사균, 대사체)의 α -glucosidase에 대한 저해 활성을 측정하여 시료의 항당뇨 효능을 *in vitro*로 확인하였다.
- 상용화된 α -glucosidase activity 측정 kit를 활용하여 *in vitro*에서 직접적으로 α -glucosidase 활성 억제능을 확인하기 위하여 1 mg의 α -glucosidase를 200 mg의 BSA가 녹여진 100 mL phosphate 버퍼에 녹이고 표준물질로 *p*-Nitrophenol standard solution(0-100 nmol/well)을 준비한다. 10 μ L의 시료와 490 μ L의 phosphate 버퍼와 250 μ L의 5 mM substrate solution과 섞어서 37°C에서 5분간 반응시킨 후 250 μ L의 α -Glucosidase(0.15 unit/mL)를 넣은 후 다시 15분간 반응시켰다. 그 후에 200 mM의 Na_2CO_3 2 mL을 넣어 반응을 정지시키고 400 nm에서 *p*-nitrophenol의 흡광도를 측정하여 glucosidase substrate의 α -glucosidase에 의한 *p*-nitrophenol 생성능을 측정한다. 이를 통하여 간접적으로 glucosidase 저해 활성을 측정할 수 있다. 저해될수록, 즉 α -Glucosidase 활성이 낮게 나타날수록 탄수화물 분해가 낮아지고 따라서 항비만 효능이 있는 것으로 볼 수 있으며, 본 실험에서는 α -glucosidase 자체의 활성을 0%로 두고, *p*-nitrophenol가 생성되지 않은 negative control을 100%로 설정하여 저해 효능을 %로 표시하여 나타내었다.

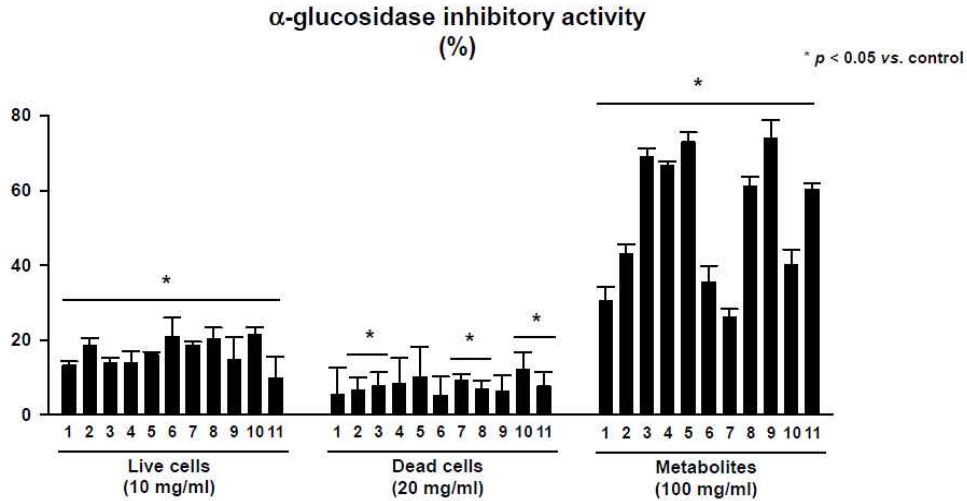


Figure 2-12. The inhibitory effect of strains(live cells, dead cells, and metabolites) treatment on α -glucosidase activity.

- Figure 2-12에 나타난 결과에 의하면, 대부분의 시료에서 α -glucosidase 저해 효능이 나타났으며, 사균에 대비하여 생균이 낮은 농도임에도 불구하고 전반적으로 높은 효능을 나타내었다. 대사체의 경우 가장 높은 농도로 처리하였기 때문에 저해 효능이 상대적으로 매우 높은 것을 확인하였으며 특히 3, 4, 5, 9번 균주의 효능이 뛰어난 것을 확인하였다. 이렇게 전반적으로 모두 효능을 나타낸 이유는 아마도 α -glucosidase inhibitor로 기존에 알려진 물질들은 다당체로 세포 내에 다량 함유되어 있기 때문이며, active한 효소 자체를 사용하는 *in vitro* 실험의 특성 상 전반적으로 효과가 잘 나올 수 있으므로 이를 반영하여 추가적인 항당뇨 효능 평가가 필요하다고 판단하였다.

② 당 흡수능 측정

㉠ 실험 방법 및 결과

- 체내 혈류로 유입된 당은 인슐린 분비시 빠르게 체내 기관(지방, 근육, 심장 등)으로 흡수가 되어야 정상적인 혈당을 유지할 수 있다. 따라서 지방세포나 근육세포 내로의 당 흡수능을 촉진시키는 효능을 평가함으로써 *in vitro*에서의 항당뇨 효능을 확인할 수 있다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방세포에 주관기관에서 제공한 11종 균주의 사균과 대사체 시료를 처리 시 지방세포 내로의 당 흡수 정도를 형광물질이 표지된 당, 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglucose(2-NBDG)을 활용하여 당 흡수능을 측정하였다.

- 먼저 지방전구세포를 지방세포로 분화시키기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 플레이트에 부착 후 100% confluency가 될 때까지 배양한다. 그 후에 dexamethasone, methylisobutylxanthine(IBMx), insulin을 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 지방세포로 분화가 대부분 된 것을 확인한 이후(현미경 관찰 시 육안으로 세포 내에 지방구가 가득 찬 것을 확인한 후) 5시간 이상을 저농도의 glucose만 함유한 DMEM으로 교체하여 배양하여 체내 glucose 농도를 낮춘 후, 각각 사균 및 대사체 시료를 처리하거나 positive control로 insulin을 처리하여 glucose uptake(당 흡수)를 유도한다. 이때 저농도 glucose를 함유한 배지에 형광으로 표지된 glucose 유사체인 2-NBDG를 넣고 4시간 이상 배양하여 2-NBDG가 세포내로 들어가게끔 유도하고 이후에 washing 작업을 통하여 남은 형광물질을 제거하였다. 일정시간 배양 이후에 세포를 lysis시켜 세포 내의 형광정도를 $\lambda_{ex} = 466 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 587 \text{ nm}$ 에서 측정하여 정량하였다.
- 사균(100 $\mu\text{g/mL}$) 처리시 지방세포에서의 당 흡수능을 확인한 결과는 Figure 2-13과 같으며, positive control인 인슐린 처리 시 당 흡수능이 대략 2배정도 상승하며, 특히 1번과 9번 균주 처리시 인슐린 없이도 높은 당 흡수능을 나타내었다.
- 대사체(100 $\mu\text{g/mL}$) 처리시 지방세포에서의 당 흡수능을 확인한 결과는 Figure 2-14과 같으며, 특히 4번과 5번 균주의 대사체 처리시 인슐린 없이도 유의적으로 높은 당 흡수능을 나타내었다.

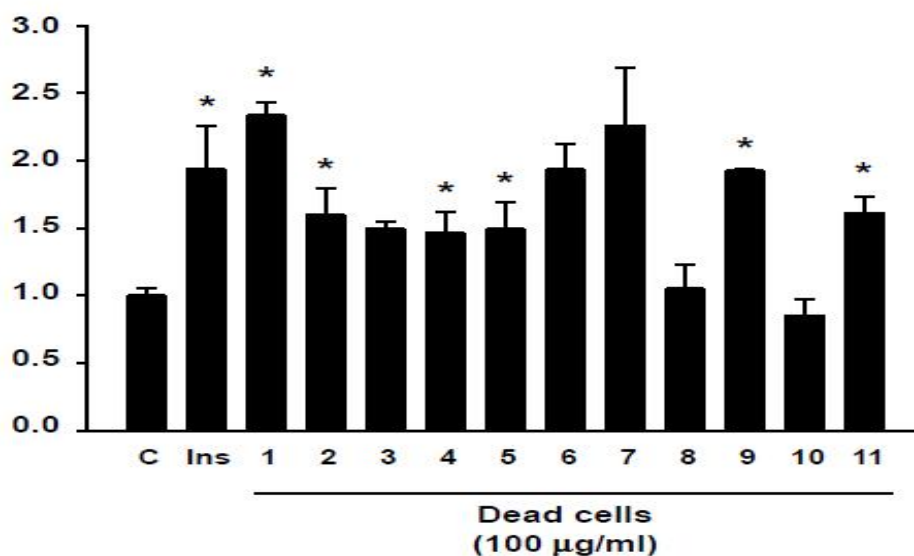


Figure 2-13. The stimulation of glucose uptake by strains(dead cells) treatment in 3T3-L1 adipocytes. *, $p < 0.05$ vs. C; C, control; Ins, insulin treated group as a positive control.

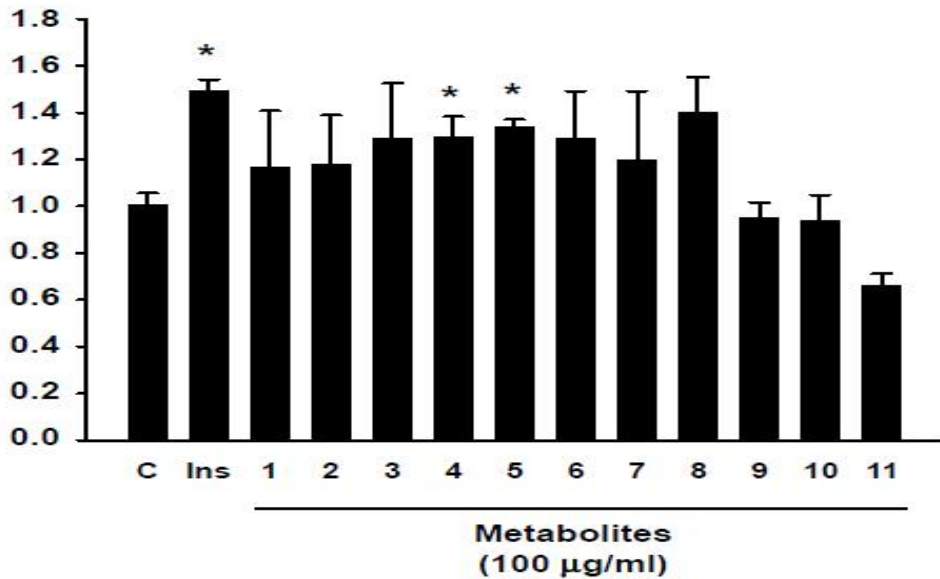


Figure 2-14. The stimulation of glucose uptake by metabolites treatment in 3T3-L1 adipocytes. *, $p < 0.05$ vs. C; C, control; Ins, insulin treated group as a positive control.

- α -Glucosidase 저해능과 3T3-L1 지방세포에서의 당 흡수능 결과를 기반으로 전반적인 항당뇨 *in vitro* 효능평가 결과를 정리하여 1, 4, 5, 9번 균주를 항당뇨 효능을 가질 것으로 보이는 우선적인 균주로 선정하였고, *in vivo* 항당뇨 효능 검증을 위한 동물실험을 수행하였다. 특히 1, 4, 5, 9번 균주의 경우에는 항비만 *in vitro* 평가에서도 유의적인 효능이 나타났다(Figure 2-15).

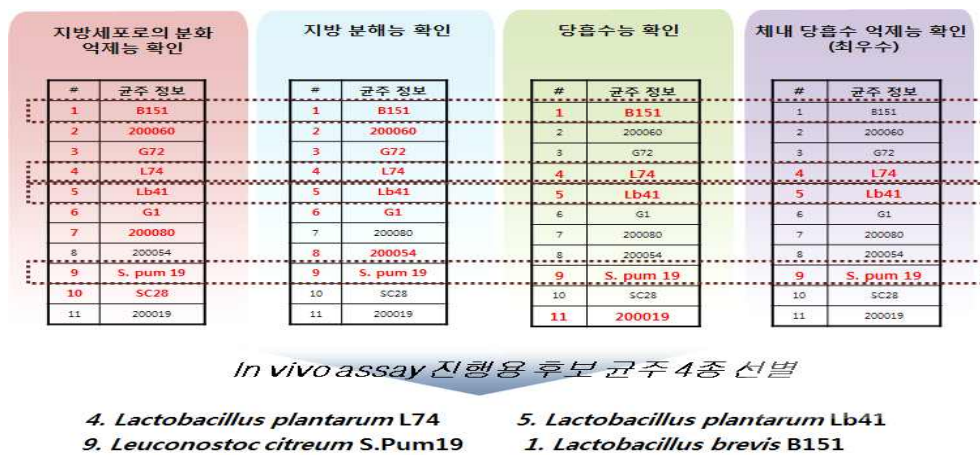


Figure 2-15. Summary of strains showing anti-obesity and anti-diabetic effect *in vitro* assay.

(나) *In vivo* 항당뇨 활성 평가

① 고지방식이 섭취 당뇨 유발 마우스 모델

㉠ 실험 방법

- *In vitro*에서 우수한 항당뇨 효능을 보인 1번(GK1; *Lactobacillus brevis* B151), 4번(GK4; *Lactobacillus plantarum* Ln4), 5번(GK5; *Lactobacillus plantarum* Lb41), 9번(GK9; *Leuconostoc citreum* S.Pum19) 균주에 대한 *in vivo* 항당뇨 효능 검증을 위하여 고지방식이를 먹여 인슐린 저항성을 유도하는 마우스 모델을 선택하여 수행하였다. 마우스는 비만/당뇨모델에서 널리 사용되는 C57BL/6J strain을 사용하였으며 12주령 이상의 마우스를 활용하였다. 1주 이상의 적응기간을 거친 이후 랜덤으로 그룹을 나누고 각각 정상식이, 고지방식이, 고지방식이에 더불어 4종류의 균주를 경구투여하는 총 6개의 그룹으로 진행하였다. 4종류의 균주 모두 생균을 매일 경구투여(5×10^8 /mice/day in DW)하였고, 고지방식이는 vegetable shortening과 corn oil을 기반으로 하는 54.4% kcal from fat diet를 총 5주간 자율식으로 급여하였다. 당뇨모델의 경우 비만모델과 큰 연관성을 보이기 때문에 매주 food intake과 더불어 body weight를 측정하였으며, 각각 4주와 5주차에 이르러서 항당뇨 효능평가를 위한 oral glucose tolerance test, insulin tolerance test, HOMA-IR 측정을 진행하였다.

㉡ 결과

- 당뇨모델의 경우, 비만모델(고지방식이 투여)과 큰 연관성을 보이기 때문에 일반적으로 고지방식이 투여 중 무게 측정이 이루어지며 5주간의 무게 변화는 Figure 2-16에 나타내었다.
- 결과에서 볼 수 있듯이 고지방식이 투여에 의하여 정상식이 투여 대비 무게 상승이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 GK4, GK5 투여시에 유의적으로 무게 증가가 감소하는 결과를 확인하였다.

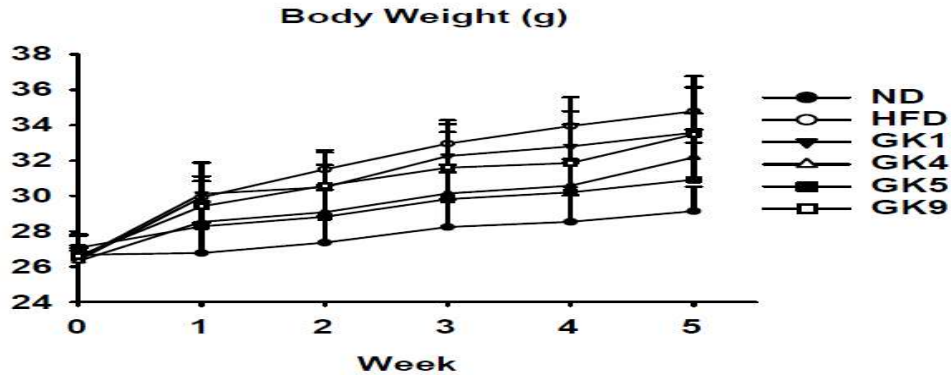


Figure 2-16. The effect of strains(live cells) on body weight gain induced by High-fat diet in C57BL/6J mice. ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

② 내당능(glucose tolerance test, GTT) 확인

㉠ 실험 방법 및 결과

- 항당뇨 효능을 *in vivo*로 확인하기 위하여 마우스는 비만/당뇨모델에서 널리 사용되는 C57BL/6J strain을 사용하였으며 12주령 이상의 마우스를 활용하였다. 1주 이상의 적응기간을 거친 이후 랜덤으로 그룹을 나누고, 각각 정상식이, 고지방식이, 고지방식이와 더불어 4종류의 균주를 경구투여하는 총 6개의 그룹으로 진행하였다. 4종류의 균주 모두 생균을 매일 경구투여(5×10^8 /mice/day in DW)하였고, 고지방식은 vegetable shortening과 corn oil을 기반으로 하는 54.4% kcal from fat diet를 총 5주간 저열식으로 급여하였다. 고지방식이 투여와 함께 1번(GK1; *Lactobacillus brevis* B151), 4번(GK4; *Lactobacillus plantarum* Ln4), 5번(GK5; *Lactobacillus plantarum* Lb41), 9번(GK9; *Leuconostoc citreum* S.Pum19) 균주를 경구투여로 매일 투여 하고, 4주 후 oral glucose tolerance test(OGTT)를 통하여 내당능을 확인하였다. OGTT 수행을 위하여 15시간 이상의 공복을 유지한 이후에 케이지 교체를 통하여 추가적인 음식 공급을 중단하고 물만 접근 가능하도록 세팅하였다. 15시간 이상 fasting 후 다음날 오전에 0시간대의 혈당을 측정 한 이후 경구투여를 통하여 glucose solution을 1 g/kg의 농도로 투여하고, 각각 15, 30, 60, 90, 120분 후에 혈당을 측정하여 curve 형태의 그래프로 그리고 그의 AUC를 구하여 정량하였다. 정상식이 그룹에서는 glucose 투여시 혈당 증가가 나타나나 이에 반응하여 체내의 인슐린 분비가 증가, 이로 인한 혈당의 정상화가 진행되게 되나, 고지방식이의 경우에는 glucose 투여에 의한 혈당 증가가 급속한 가속세로 나타나며 30분 이후로 나타나는 혈당 감소가 나타나지 않거나 둔화되어 나타나는 것을 확인할 수 있으며 이는 혈당을 정상적으로 유지하고자 하는 내당능에 문제가 생긴 것을 의미한다.

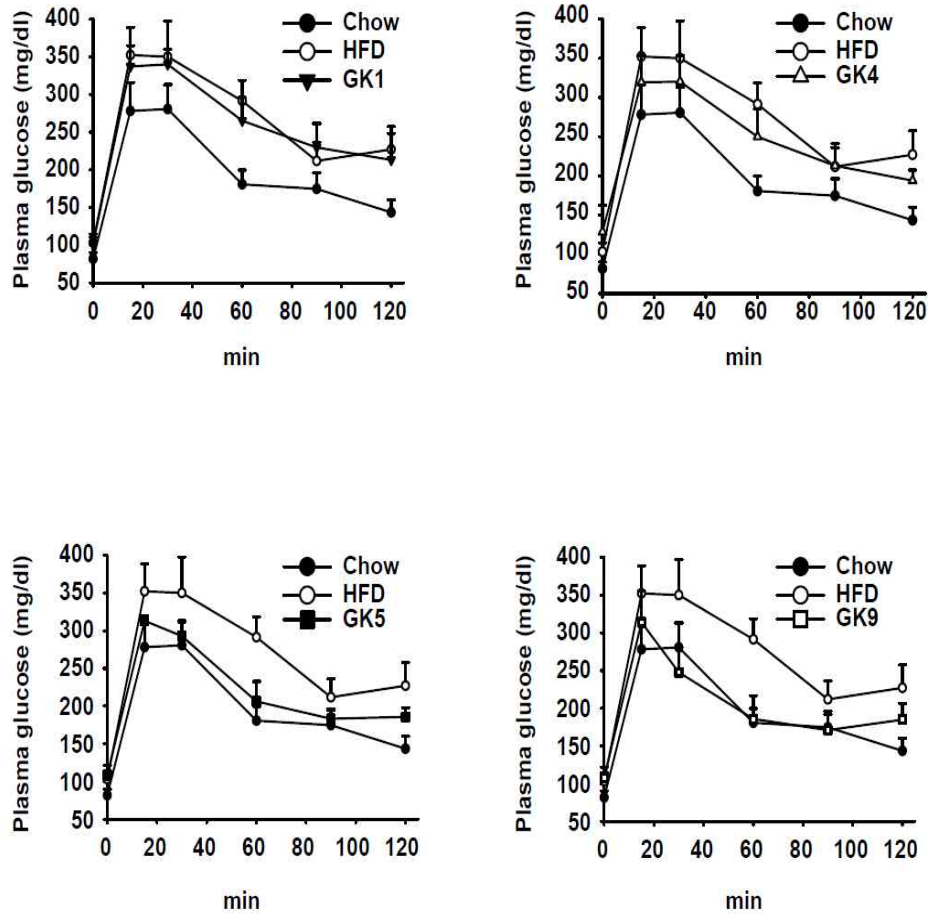


Figure 2-17. Blood glucose concentration during an oral glucose tolerance test(OGTT) in C57BL/6J mice treated live cells. Chow, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

- OGTT 수행 결과(Figure 2-17), 정상식을 먹은 그룹(ND)은 glucose 투여 후 빠른 속도로 정상혈당을 회복하였으나 고지방식을 먹은 그룹(HFD)은 유의적으로 더디게 회복되는 것을 확인하였다. GK4와 GK5, GK9를 경구투여한 그룹의 경우에는 이러한 둔화된 회복세가 개선되어 빠르게 혈당이 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. Curve를 정량한 AUC값은 아래 Figure 2-18에 표시하였다. Figure 2-18에서 볼 수 있듯이 GK9이 수치상으로 가장 뛰어난 내당능 개선 효능을 보임을 확인하였으며 GK4와 GK5도 유의적인 개선 효능을 보임을 확인하였다. 이 결과를 통하여 GK4와 GK5에서 항비만, 항당뇨 효능이 있음을 간접적으로 확인하였으며 특이적으로 GK9은 비만에는 영향이 없이 내당능 개선 효능이 뛰어난을 확인하였다.

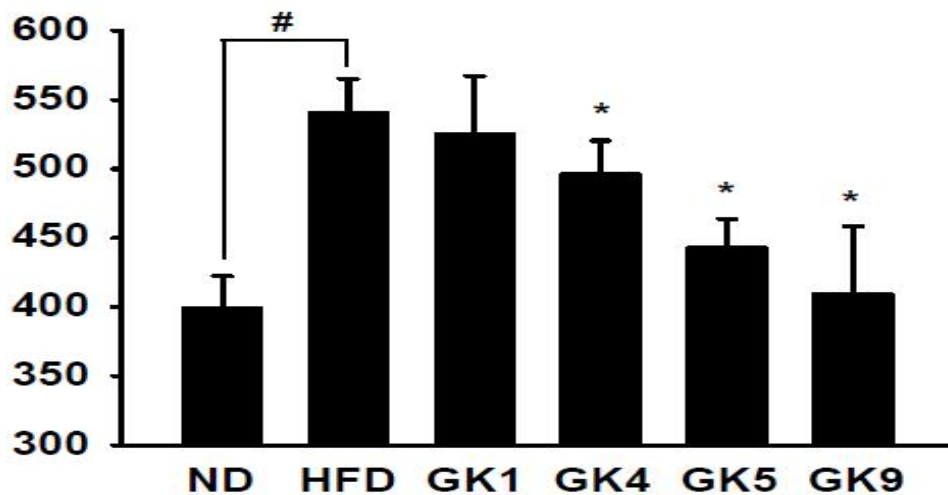


Figure 2-18. Calculated area under curve of the OGTT in C57BL/6J mice treated live cells. #, $p < 0.05$ vs ND; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

③ 인슐린 내성능 (insulin tolerance test, ITT) 확인

㉔ 실험 방법 및 결과

- 항당뇨 효능을 *in vivo*로 확인하기 위하여 마우스는 비만/당뇨모델에서 널리 사용되는 C57BL/6J strain을 사용하였으며 12주령 이상의 마우스를 활용하였다. 1주 이상의 적응기간을 거친 이후 랜덤으로 그룹을 나누고 각각 정상식이, 고지방식이, 고지방식이와 더불어 4종류의 균주를 경구투여하는 총 6개의 그룹으로 진행하였다. 4종류의 균주 모두 생균을 매일 경구투여(5×10^8 /mice/day in DW)하였고, 고지방식은 vegetable shortening과 corn oil을 기반으로 하는 54.4% kcal from fat diet를 총 5주간 자율식으로 급여하였다. 고지방식이 투여와 함께 1번(GK1; *Lactobacillus brevis* B151), 4번(GK4; *Lactobacillus plantarum* Ln4), 5번(GK5; *Lactobacillus plantarum* Lb41), 9번(GK9; *Leuconostoc citreum* S.Pum19) 균주를 경구투여로 매일 투여 하고 4주 후 insulin tolerance test(ITT)를 통하여 인슐린 내성능을 확인하였다. ITT 수행을 위하여 5시간 이상의 공복을 유지한 이후에 복강투여를 통하여 insulin solution을 0.75 U/kg의 농도로 투여한 이후에 0, 15, 30, 60, 90, 120분 후에 각각 혈당을 측정하여 curve 형태의 그래프로 그리고 그의 AUC를 구하여 정량하였다. 인슐린 투여 후 정상식이 투여 그룹의 마우스 혈당은 인슐린에 반응하여 감소하나 고지방식이의 경우에는 이러한 감소세가 둔화되어 나타나며 이를 통하여 인슐린 저항성이 어느 정도 진행되고 있음을 짐작할 수 있다.

- 생균 투여 시 인슐린 투여에 의한 혈당 감소가 나타나는 것은 인슐린 시그널이 정상적으로 잘 작동하는 것을 의미하므로 인슐린 내성능 개선에의 의미가 있다. 실험 도중 저혈당 쇼크로 인한 마우스 사망을 방지하기 위하여 혈당 40 mg/dL 이하의 경우에는 실험을 중단하고 포도당을 투여한 이후, 결과 값에서는 배제하였다.
- ITT 수행 결과, 4종류 균주 투여에 의한 각각의 혈당 curve는 Figure 2-19과 같으며 계산된 AUC(area under curve)값은 Figure 2-20과 같다. 고지방식이 투여에 의하여 증가한 AUC값이 GK4, GK9 투여 시 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 반면 내당능 개선 효능을 보였던 GK5의 경우에는 glucose 투여 60분 이후에 혈당이 다시 증가하여 고지방식사와의 AUC값 자체의 유의성을 확인하지 못하였다. 이 결과를 통하여 GK4와 GK9 투여시 인슐린 내성능 개선 효능이 있음을 확인하였으며 결과적으로 두 균주 투여 시에 항당뇨 효능이 있음을 확인하였다.

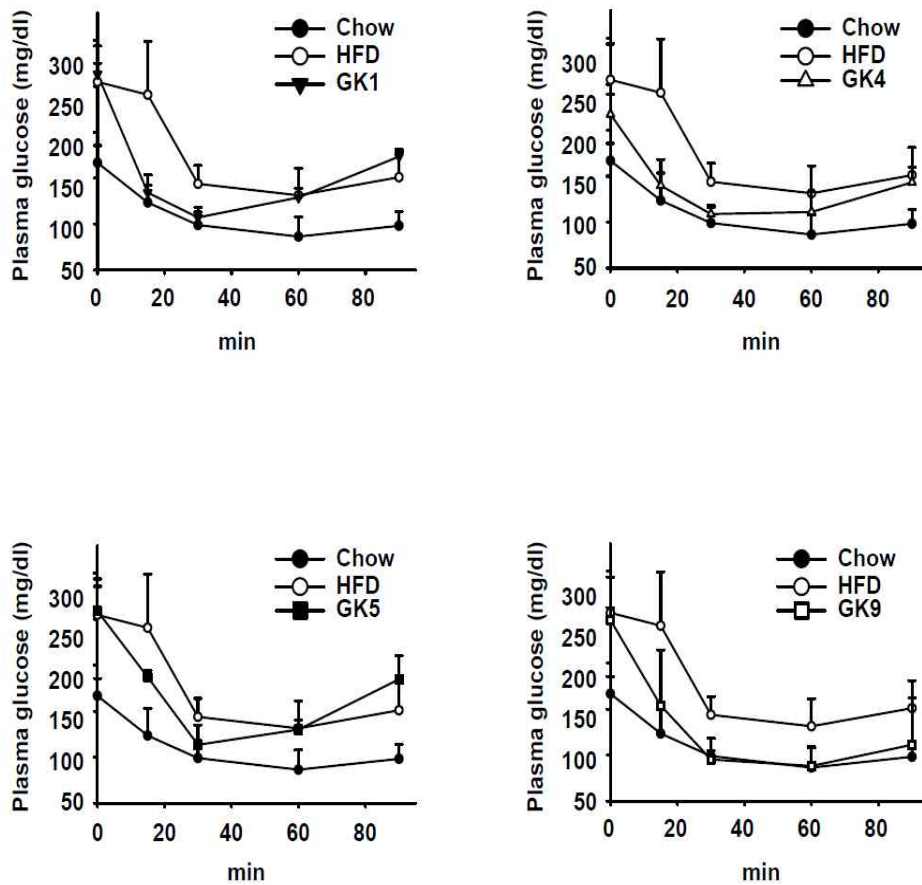


Figure 2-19. Blood glucose concentration during an insulin tolerance test(ITT) in C57BL/6J mice treated live cells. Chow, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

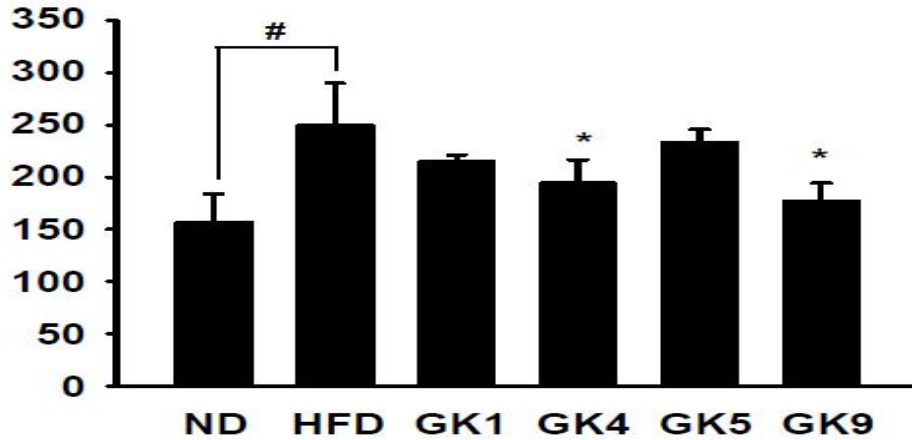


Figure 2-20. Calculated area under curve of the ITT in C57BL/6J mice treated live cells. #, $p < 0.05$ vs ND; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

④ 인슐린 저항성 수치(HOMA-IR) 확인

㉞ 실험 방법 및 결과

- 항당뇨 효능을 *in vivo*로 확인하기 위하여 앞서 진행한 OGTT와 ITT외에도 HOMA-IR index 계산을 위하여 공복혈당과 인슐린 혈중 농도를 측정하는 실험을 진행하였다. 마우스는 비만/당뇨모델에서 널리 사용되는 C57BL/6J strain을 사용하였으며 12주령 이상의 마우스를 활용하였다. 1주 이상의 적응기간을 거친 이후 랜덤으로 그룹을 나누고 각각 정상식이, 고지방식이, 고지방식이와 더불어 4종류의 균주를 경구투여하는 총 6개의 그룹으로 진행하였다. 4종류의 균주 모두 생균을 매일 경구투여(5×10^8 /mice/day in DW) 하였고 고지방식은 vegetable shortening과 corn oil을 기반으로 하는 54.4% kcal from fat diet를 총 5주간 자율식으로 급여하였다. 앞선 실험과 동일하게 고지방식과 동시에 1번(GK1; *Lactobacillus brevis* B151), 4번(GK4; *Lactobacillus plantarum* Ln4), 5번(GK5; *Lactobacillus plantarum* Lb41), 9번(GK9; *Leuconostoc citreum* S.Pum19) 균주를 경구투여하였다. 4주 후 공복혈당과 인슐린 분비량을 측정하고 이를 계산하여 인슐린 저항성 수치 중 하나인 HOMA-IR을 아래의 계산식을 통하여 확인하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Fasting glucose (mM)} \times \text{Fasting insulin (mU/L)}}{22.5}$$

$$= \frac{\text{Fasting glucose (mg/dl)} \times \text{Fasting insulin (mU/L)}}{405}$$

- HOMA-IR 분석을 위하여 공복혈당과 인슐린 농도를 측정하였다. 이를 위하여 정상식이와 고지방식이, GK4를 매일 경구투여한 마우스를 15시간 이상 공복을 유지하도록 fasting 시켜준 후에 미정맥으로부터 피를 뽑아 얼음에 보관하고 이를 10,000 rpm, 4°C에서 5분간 centrifuge하여 상등액을 취하고, -80°C에서 보관하여 plasma를 분리하였다. 공복혈당은 미정맥으로부터 뽑은 피를 활용하여 그 즉시 측정하여 수치화하고, insulin은 ELISA kit(ALPCO)를 통하여 측정하였다. 수행결과 공복혈당과 인슐린 농도, HOMA-IR값은 각각 Table 2-3와 Figure 2-21에 표시하였다.
- 공복혈당과 인슐린 농도를 측정한 결과(Table 2-3), 고지방식이 투여 시 정상식이 투여 그룹 대비하여 혈당과 인슐린 농도가 크게 증가하는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 체내 당대사 이상이 나타나고 있음을 의미하며 Ln4 투여시에는 이러한 비정상적인 상태가 유의적으로 완화되는 것을 확인하였다. Figure 2-21의 결과와 같이 HOMA-IR index의 경우에도 고지방식이 투여시에는 정상 수치 대비 3배 이상의 증가가 나타났으나 GK4, GK5, GK9 투여시에는 유의적으로 감소하여 인슐린 저항성이 개선됨을 간접적으로 확인할 수 있었다. 타 연구에서는 당뇨에 사용되는 의약품인 metformin과 *Bifidobacterium animalis* ssp. *laticis* B420을 병용 섭취시켰을 때 HOMA-IR이 약 37% 감소한 것으로 보고되었다(Diabetology & metabolic syndrome 7:75, 2015). 본 연구에서는 GK9 투여시 대조군 대비 HOMA-IR이 약 39% 감소하는 것으로 나타나 더 뛰어난 인슐린 저항성 개선 능력이 있음을 보였다. 반면, GK1에서는 HOMA-IR뿐만 아니라 무게 증가, OGTT, ITT에서도 모두 유의적인 결과를 얻지 못하였는데, 이는 *in vitro*와는 달리 *in vivo*에서는 GK4와 GK5의 효능이 뛰어난 것을 의미한다.

Table 2-3. The effects of Ln4 administration on fasting plasma glucose and insulin levels in HFD-induced obese mice

	Control(ND)	HFD	Ln4
Fasting glucose (mg/dL)	155±30.8 ^a	227±22.9 ^c	199±8.6 ^b
Fasting insulin (μU/mL)	18.8±6.4 ^a	36.3±6.4 ^b	28.4±7.6 ^b

Mean±SD. Means with different superscript letters in each column are significantly different, $p < 0.05$ (ANOVA, Duncan test).

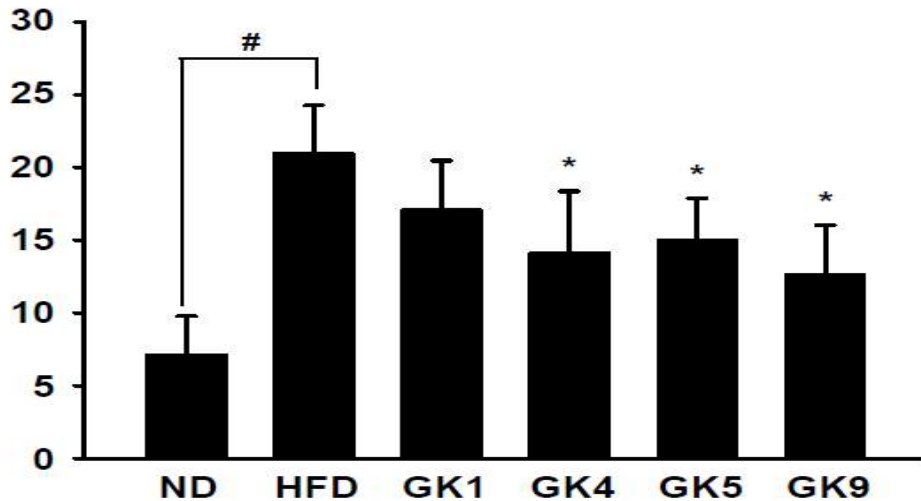


Figure 2-21. Calculated HOMA-IR index in C57BL/6J mice treated live cells fed High-fat diet for 4 weeks. #, $p < 0.05$ vs ND; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

⑤ 당뇨 유도 마우스에서 조직 분리 및 분석

㉞ 실험 방법 및 결과

- 고지방식이를 통하여 당뇨를 유도한 마우스 모델에서 GK4와 GK5, GK9 경구투여에 의한 간 무게의 증감을 확인하였다. 간은 혈당 조절에 중요한 생체기관으로 당을 생성하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 고지방식에 의한 지방간 생성은 당뇨에 있어서 악영향을 끼치는 중요한 지표 중 하나로 취급한다. 간의 지방축적을 간접적으로 확인하기 위하여 마우스로부터 간을 분리하여 무게를 측정하고, 색을 통하여 병변 진행 정도를 확인하였다. 5주차 무게 측정 이후 18시간 이상의 공복(fasting)을 유도한 이후에 마우스를 희생하여 각각 심장(heart), 간(liver) 등을 분리하여 무게를 측정하고 차후 분석을 위하여 -80°C 에 보관하였다. 그 결과, 심장의 경우에는 유의적 차이가 없음에도 불구하고, 간 무게는 GK4, GK5, GK9 투여에 의해 유의적인 감소 형태를 보였다(Figure 2-22).

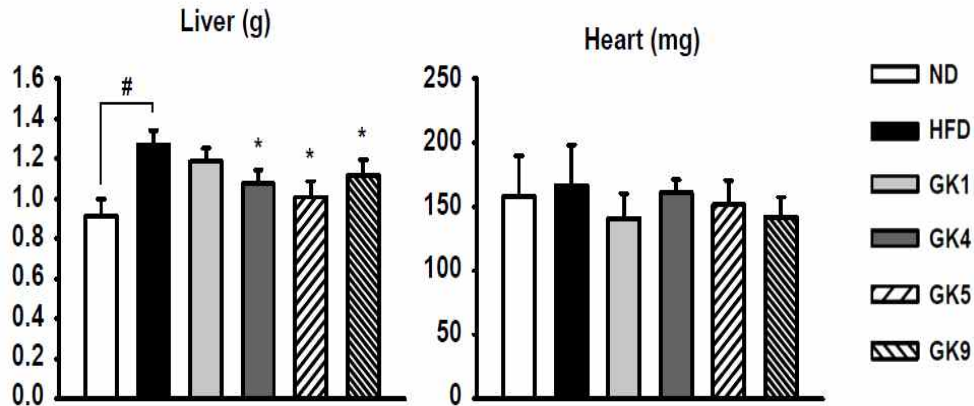


Figure 2-22. The effect of strains(live cells) treatment on liver and heart weight in C57BL/6J mice fed High-fat diet for 5 weeks. #, $p < 0.05$ vs ND; *, $p < 0.05$ vs. HFD; ND, normal diet group; HFD, high-fat diet group.

⑦ 마우스로부터 분리한 조직 분석-insulin signaling 탐색

㉠ 실험 방법

- 비만으로 인하여 유도되는 제 2형 당뇨병의 진행에 있어서 가장 중요한 단계는 인슐린 저항성(insulin resistance) 상태라고 할 수 있다. 인슐린 저항성은 인슐린 감수성의 저하, 인슐린 민감성의 감소 등으로도 표현되는데, 체내 고혈당이나 고지혈, 고염증 등의 만성스트레스 반응에 의하여 인슐린이 분비가 되어도 그 signaling이 제대로 작동하지 않아서 인슐린이 과분비되게 되고, 이로 인한 베타세포의 과부하가 결국 췌장에서의 인슐린 분비가 멈추게 되는 당뇨병으로 진행이 되는 비셔스 사이클(vicious cycle)을 유발한다. 인슐린 저항성 여부를 판단하는 다양한 방법이 *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*로 제시가 되고 있으나 대부분 비용적, 시간적 측면에서 접근이 용이하지 않다. 실험적 방법에서, insulin signaling으로 알려진 대표 biomarker를 확인함으로써 인슐린 저항성 여부를 확인할 수 있으며, 대표적으로 AMPK signaling과 Akt, IRS signaling 등이 있다. 본 연구에서는 내당능과 인슐린 내성능, HOMA-IR 수치상 유의적으로 효능을 보인 Ln4에 대하여 Ln4를 투여한 마우스로부터 분리한 간에서의 insulin signaling 관련 protein의 mRNA 레벨을 확인하였다. 관련 signaling으로는 PPAR γ , ACC1, AMPK, IRS2, Akt2와 같은 insulin signaling과 CD36, LPL, LDLR, FAS 등과 같은 lipid metabolism관련 signaling이 포함되어 있다. 이들 단백질의 mRNA 레벨을 확인하기 위하여 마우스로 분리한 간을 300 mg 이상 준비하고, Qiagen RNA extraction kit와 homogenizer를 활용하여 RNA를 추출한 이후 cDNA 합성을 통하여 mRNA 샘플을 준비하였다.

- 그 이후 각각의 gene에 맞는 primer를 활용하여 SYBR green polymerase mixture를 활용하여 real-time quantitative PCR을 수행하였다. Ct값을 기준으로 gene expression을 측정하고 이를 그래프 또는 이미지화 하여 색으로 도식화하였다.

㉞ 실험 결과

- Ln4 투여 시, IRS/Akt/AMPK와 같은 insulin signaling이 고지방식이에 의하여 나타나는 인슐린 저항성을 회복시키는 것을 확인할 수 있었으며, CD36과 같이 lipid metabolism에 관여하는 단백질도 조절하는 것을 확인하였다. 특히 Ln4 투여에 의한 insulin signaling의 변화는 이에 의한 인슐린 저항성과 항당뇨 효능을 보였던 *in vivo* 결과와도 매치되는 것으로 간 내의 인슐린 저항성 개선에 의하여 전반적인 항당뇨 개선 효능을 보이는 것을 간접적으로 확인하였다.

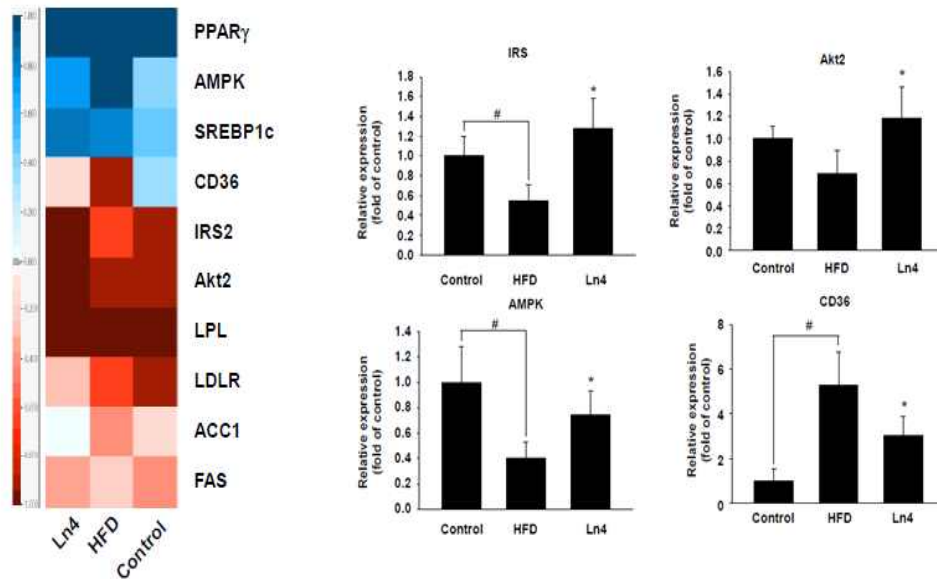


Figure 2-23. The levels of gene expression involving insulin signaling in liver from HFD-fed and Ln4 administrated mice.

- 따라서 위와 같은 Ln4와 Lb41의 항비만, 항당뇨 효능을 바탕으로 4건의 특허출원과 1건의 SCI급 저널에의 논문 투고, 1건의 비SCI급 논문 투고를 완료하였다.

(4) 면역과민반응 억제활성 평가

(가) *In vitro* 면역과민반응 억제활성 평가

① Th1/Th2 균형조절 활성 평가

- 면역한 마우스의 비장세포와 장간막림프절세포를 이용한 *in vitro* 실험계를 이용하여 주관기관에서 제공한 22종 균주(1차년도 11종, 2차년도 11종, Table 2-1)에 대한 면역과민 억제활성 평가하였다. 구체적인 실험법은 다음과 같다. 6주령된 암컷 BALB/c mouse에 1주 간격으로 2차례 알레르겐을 복강면역하여 알레르기를 유발하였다. 알레르겐은 OVA(20 µg)와 alum(2 mg)의 혼합액을 30분간 섞어준 다음 한 마리당 100 µL씩 복강 주사하였다(n= 5). 면역 1주후 마우스를 경추탈골시키고, 무균상태에서 비장과 장간막림프절 세포를 적출한 다음, 1 mL의 기본배지(RPMI1640+2ME+항생제+10% FBS)가 있는 petri dish에서 마쇄하여 단세포화 시킨 뒤 5 mL의 기본배지로 2회 세척하고, 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상정액 제거 후 1 mL의 RBC lysing buffer를 첨가하여 3분간 아이스 위에서 반응시킨 뒤 10 mL의 기본배지 첨가 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리를 2회 실시하였다. 상정액 제거 후 기본배지를 넣어 현탁하고, 96 well plate에 5×10^6 cells/mL의 농도로 비장세포 및 OVA 100 µg/mL 그리고 생균/사균은 $5 \times 10^7 \sim 8$ CFU 농도로, 배양상등액은 10~100 µg 농도로 처리하였다. WST를 측정을 통해 해당 농도에서 생균/사균 및 배양상등액이 비장세포 및 장간막림프절세포에 대한 세포독성이 없음을 확인한 후 실험을 진행하였다. 37°C CO₂ incubator에서 72시간 배양 후, ELISA kit를 사용하여 배양상등액의 IL-4과 IFN-γ를 측정하였다.

② 1차년도 선별 균주에 대한 Th1/Th2 균형조절 활성 평가

- 알레르기와 같은 면역과민반응은 여러 요인에 의해 발생할 수 있으나, Th1과 Th2 면역반응의 불균형으로 인해 발생하게 하게 된다. 따라서 Th2 면역반응으로 치우쳐진 면역반응을 Th1 면역반응 증진, Th2 면역반응 억제를 통해 조절함으로써 알레르기 질환을 예방 개선할 수 있다. 이에 기초생리활성 우수 균주 11종의 면역과민반응 개선 활성을 평가하기 위해 이들 균주와 Th2 면역반응을 유도한 세포를 공동배양한 후 대표적인 Th1 사이토카인인 IFN-γ 생성능과 Th2 사이토카인인 IL-4 억제활성을 평가하여 실험결과 장간막림프절세포를 이용한 실험계(Table 2-7, 2-8, 2-9)보다는 비장세포를 이용한 실험계(Table 2-4, 2-5, 2-6)에서 사이토카인 분비 패턴이 뚜렷하게 나타나 균주 선별은 비장세포 시험결과 위주로 진행하였다.
- 비장세포에 생균/사균 및 배양상등액을 처리한 후 대표적인 Th2 사이토카인인 IL-4와 대표적인 Th1 사이토카인인 IFN-γ 분비량을 측정한 결과, 전반적으로 배양상등액(Table 2-6) 처리 시보다는 생균 및 사균에서 높은 IL-4 억제 활성 및 IFN-γ 증가활성을 보여 screening을 위한 실험에는 생균 또는 사균을 이용하는 것이 선별에 용이할 것으로 판단된다. 실험에 사용한 1차년도 11종 균주는 대부분 IL-4 활성을 보였는데, 이는 11종

균주가 주관기관에서 이미 다양한 지표로 1차 생리활성 평가를 진행하여 선별한 균주이기 때문인 것으로 판단된다.

- 비장세포에 생균을 처리한 후 IL-4와 IFN- γ 분비량을 측정된 결과(Table 2-4), IFN- γ /IL-4 비율이 50 이상으로 Th1/Th2 면역조절 활성이 있을 것을 판단되는 균주는 B151, G1, 200080, 200054, S.Pum19, SC28, 200019 균주였으며, 이 중 B151, 200054, 200019 균주의 경우 IL-4 억제활성이 매우 높아 Th2 면역반응을 특이적으로 억제할 가능성도 있는 것으로 판단된다. 이외에 G72 균주의 경우 Th1 및 Th2 면역반응을 모두 억제하여 면역 과민반응을 조절할 가능성이 있는 균주로 판단된다.

Table 2-4. 생균처리에 의한 비장세포배양액의 사이토카인 패턴

Sample	처리농도	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
PBS	1:1	70.75 \pm 8.68	916.39 \pm 142.88	12.95
	1:10	70.75 \pm 8.68	916.39 \pm 142.88	12.95
B151	1:1	13.16\pm1.02	1998.12\pm63.88	151.85
	1:10	9.96\pm0.87	1063.05\pm198.59	106.71
200060	1:1	10.39 \pm 0.92	460.12 \pm 166.44	44.27
	1:10	6.63 \pm 0.42	44.31 \pm 4.86	6.68
G72	1:1	8.91\pm0.40	53.38\pm8.64	5.99
	1:10	13.24\pm0.66	52.17\pm11.18	3.94
Ln4	1:1	11.02 \pm 1.86	405.19 \pm 138.26	36.78
	1:10	11.83 \pm 3.87	40.93 \pm 2.80	3.46
PBS	1:1	126.44 \pm 1.36	1450.27 \pm 71.58	11.47
	1:10	126.44 \pm 1.36	1450.27 \pm 71.58	11.47
Lb41	1:1	25.02 \pm 2.07	909.92 \pm 66.33	36.37
	1:10	13.95 \pm 5.50	50.75 \pm 5.22	3.64
G1	1:1	33.17\pm0.91	1836.77\pm69.42	55.37
	1:10	19.16\pm1.11	1013.31\pm97.40	52.88
200080	1:1	32.07\pm2.56	1907.81\pm32.67	59.48
	1:10	11.56\pm0.72	587.79\pm155.96	50.85
200054	1:1	49.38\pm3.36	1900.13\pm28.08	38.48
	1:10	37.98\pm3.89	1927.96\pm20.37	50.76
PBS	1:1	131.28 \pm 8.15	1967.87 \pm 115.62	14.99
	1:10	131.28 \pm 8.15	1967.87 \pm 115.62	14.99
S.Pum19	1:1	2.35\pm0.61	185.69\pm31.91	78.98
	1:10	2.73\pm1.79	156.31\pm44.23	57.21
SC28	1:1	29.42\pm1.93	2112.95\pm46.37	71.83
	1:10	15.74\pm1.00	629.31\pm231.51	39.97
200019	1:1	52.63\pm10.15	2246.36\pm67.18	42.68
	1:10	8.18\pm0.63	1865.77\pm6.52	228.13

- 비장세포에 사균을 처리한 후 IL-4와 IFN- γ 분비량을 측정된 결과(Table 2-5), IFN- γ /IL-4 비율이 50 이상으로 Th1/Th2 면역조절 활성이 있을 것을 판단되는 균주는 B151, G1, 200080, S.Pum19, SC28, 200019 균주로 200054을 제외하고는 생균 처리시 활성을 보인 균주와 동일하였다.

Table 2-5. 사균처리에 의한 비장세포배양액의 사이토카인 패턴

Sample	처리농도	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
PBS	1:1	70.75±8.68	916.39±142.88	12.95
	1:10	70.75±8.68	916.39±142.88	12.95
B151	1:1	19.30±1.60	1983.21±48.41	102.75
	1:10	14.81±2.36	930.76±222.28	62.83
200060	1:1	25.19±2.27	1283.71±228.34	50.96
	1:10	16.85±2.22	339.64±38.57	20.16
G72	1:1	18.52±1.61	1139.10±298.90	61.51
	1:10	20.01±1.90	41.90±6.55	2.09
Ln4	1:1	25.11±1.93	1052.05±101.21	41.90
	1:10	15.37±0.94	182.14±58.68	11.85
PBS	1:1	126.44±1.36	1450.27±71.58	11.47
	1:10	126.44±1.36	1450.27±71.58	11.47
Lb41	1:1	37.56±6.95	1620.92±92.40	43.15
	1:10	18.65±8.37	547.02±260.63	29.33
G1	1:1	49.78±4.47	1937.50±41.44	38.92
	1:10	32.63±2.38	1760.23±33.34	53.95
200080	1:1	45.51±7.30	1968.40±43.10	43.25
	1:10	28.57±3.81	1868.65±39.37	65.40
200054	1:1	88.65±1.38	1803.54±57.66	20.34
	1:10	64.79±3.65	1922.83±19.14	29.68
PBS	1:1	131.28±8.15	1967.87±115.62	14.99
	1:10	131.28±8.15	1967.87±115.62	14.99
S.Pum19	1:1	13.64±1.47	598.31±61.18	43.87
	1:10	26.86±2.33	2066.79±14.81	76.96
SC28	1:1	29.49±0.46	2209.33±66.40	74.91
	1:10	25.21±5.02	1614.28±153.79	64.02
200019	1:1	51.14±3.16	2349.95±32.96	45.95
	1:10	30.02±7.71	2337.05±30.18	77.86

- 비장세포에 배양상등액을 처리한 후 IL-4와 IFN- γ 분비량을 측정된 결과(Table 2-6), 사균과 생균처리 보다는 전반적으로 활성이 낮은 것을 확인할 수 있었고, IFN- γ /IL-4 비율이 50 이상으로 Th1/Th2 면역조절 활성이 있을 것을 판단되는 균주는 B151, G72 균주였다.

Table 2-6. 배양상등액에 의한 비장세포배양액의 사이토카인 패턴

Sample	처리농도	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
PBS	10 μ g	70.75 \pm 8.68	916.39 \pm 142.88	12.95
	100 μ g	70.75 \pm 8.68	916.39 \pm 142.88	12.95
B151	10 μ g	55.51\pm8.23	1742.62\pm136.20	31.39
	100 μ g	25.05\pm2.26	1954.57\pm42.15	78.01
200060	10 μ g	61.85 \pm 4.08	934.21 \pm 167.67	15.10
	100 μ g	55.90 \pm 3.78	635.50 \pm 75.96	11.37
G72	10 μ g	48.85\pm3.61	1687.69\pm128.17	34.55
	100 μ g	22.86\pm3.00	1794.90\pm132.27	78.52
Ln4	10 μ g	53.68 \pm 7.86	809.17 \pm 379.11	15.07
	100 μ g	33.52 \pm 1.82	1185.21 \pm 95.08	35.35
PBS	10 μ g	126.44 \pm 1.36	1450.27 \pm 71.58	11.47
	100 μ g	126.44 \pm 1.36	1450.27 \pm 71.58	11.47
Lb41	10 μ g	109.71 \pm 2.19	1403.88 \pm 210.23	12.80
	100 μ g	73.84 \pm 4.30	729.15 \pm 127.26	9.87
G1	10 μ g	89.71 \pm 13.95	1790.48 \pm 42.42	19.96
	100 μ g	56.52 \pm 6.80	1863.69 \pm 23.87	32.97
200080	10 μ g	81.88 \pm 4.28	1684.46 \pm 73.86	20.57
	100 μ g	39.34 \pm 8.47	1833.19 \pm 1.77	46.60
200054	10 μ g	95.67 \pm 13.48	1855.58 \pm 63.03	19.40
	100 μ g	59.07 \pm 7.10	1940.31 \pm 42.79	32.85
PBS	10 μ g	131.28 \pm 8.15	1967.87 \pm 115.62	14.99
	100 μ g	131.28 \pm 8.15	1967.87 \pm 115.62	14.99
S.Pum19	10 μ g	96.73 \pm 11.58	1893.23 \pm 50.46	19.57
	100 μ g	62.05 \pm 2.42	1901.72 \pm 48.73	30.65
SC28	10 μ g	117.05 \pm 17.92	2057.74 \pm 47.85	17.58
	100 μ g	65.50 \pm 4.69	1929.36 \pm 14.47	29.46
200019	10 μ g	135.58 \pm 15.19	2125.41 \pm 71.20	15.68
	100 μ g	75.40 \pm 10.05	2160.59 \pm 84.24	28.65

- 장간막립프절 유래 면역세포에 생균, 사균 및 배양상등액을 처리한 후 IL-4와 IFN- γ 분비량을 측정된 결과, 생균처리시는 B151, G1, 200080, 200054, SC28, 200019 균주에서 (Table 2-7), 사균처리시 B151, 200080, S.Pum19, SC28, 200019 균주(Table 2-8)에서, 배양상등액 처리시(Table 2-9)에는 G1, S.Pum19, SC28 균주에서 높은 IFN- γ /IL-4 비율을 보였다.

Table 2-7. 생균에 의한 장간막림프절세포의 사이토카인 패턴

Sample	처리농도	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
PBS	1:1	48.46 \pm 2.83	482.36 \pm 178.04	9.95
	1:10	48.46 \pm 2.83	482.36 \pm 178.04	9.95
B151	1:1	40.06 \pm 1.24	1646.88 \pm 80.23	41.11
	1:10	40.77 \pm 2.44	517.76 \pm 136.70	12.70
200060	1:1	39.28 \pm 0.58	69.76 \pm 16.55	1.78
	1:10	35.86 \pm 1.30	45.81 \pm 5.31	1.28
G72	1:1	42.43 \pm 1.10	53.10 \pm 4.83	1.25
	1:10	34.98 \pm 0.70	77.38 \pm 13.37	2.21
Ln4	1:1	34.54 \pm 0.36	95.19 \pm 7.00	2.76
	1:10	34.42 \pm 0.57	41.29 \pm 3.25	1.20
PBS	1:1	33.70 \pm 0.44	315.00 \pm 2.34	9.35
	1:10	33.70 \pm 0.44	315.00 \pm 2.34	9.35
Lb41	1:1	9.06 \pm 1.11	287.58 \pm 89.00	31.76
	1:10	9.74 \pm 0.31	40.15 \pm 2.34	4.12
G1	1:1	17.01\pm2.63	1214.54\pm59.38	71.39
	1:10	10.51\pm0.82	163.65\pm14.81	15.56
200080	1:1	20.05\pm1.21	1332.19\pm54.99	66.44
	1:10	6.33\pm0.68	79.40\pm19.99	12.54
200054	1:1	24.56\pm5.15	869.29\pm203.31	35.40
	1:10	20.93\pm1.23	1192.08\pm135.19	56.97
PBS	1:1	114.36 \pm 19.56	1691.73 \pm 145.56	14.79
	1:10	114.36 \pm 19.56	1691.73 \pm 145.56	14.79
S.Pum19	1:1	4.02 \pm 0.91	101.21 \pm 21.36	25.19
	1:10	7.58 \pm 1.22	36.64 \pm 4.50	4.84
SC28	1:1	21.55\pm4.28	1510.44\pm203.35	70.10
	1:10	16.98\pm1.94	182.13\pm46.84	10.72
200019	1:1	33.55\pm7.46	1876.54\pm139.57	55.93
	1:10	7.26\pm2.90	428.28\pm108.36	58.98

Table 2-8. 사균에 의한 장간막림프절세포의 사이토카인 패턴

Sample	처리농도	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
PBS	1:1	48.46 \pm 2.83	482.36 \pm 178.04	9.95
	1:10	48.46 \pm 2.83	482.36 \pm 178.04	9.95
B151	1:1	52.97\pm15.06	1620.36\pm175.03	30.59
	1:10	49.35\pm2.83	723.21\pm107.00	14.65
200060	1:1	39.14 \pm 3.29	283.39 \pm 118.75	7.24
	1:10	47.85 \pm 3.98	221.93 \pm 60.64	4.64
G72	1:1	35.02 \pm 0.07	564.88 \pm 85.41	16.13
	1:10	37.80 \pm 1.11	43.10 \pm 6.58	1.14
Ln4	1:1	45.43 \pm 10.37	896.88 \pm 99.38	19.74
	1:10	43.98 \pm 0.89	188.52 \pm 75.38	4.29
PBS	1:1	33.70 \pm 0.44	315.00 \pm 2.34	9.35
	1:10	33.70 \pm 0.44	315.00 \pm 2.34	9.35
Lb41	1:1	21.18 \pm 0.96	1149.00 \pm 148.80	54.26
	1:10	8.13 \pm 1.50	137.67 \pm 36.36	16.93
G1	1:1	33.56 \pm 2.01	1277.75 \pm 128.35	38.07
	1:10	17.69 \pm 1.56	840.65 \pm 87.12	47.53
200080	1:1	30.34\pm2.15	1191.08\pm130.45	39.26
	1:10	21.22\pm5.37	1169.33\pm188.62	55.11
200054	1:1	29.82 \pm 4.35	516.79 \pm 175.02	17.33
	1:10	26.19 \pm 1.16	1041.92 \pm 189.73	39.78
PBS	1:1	114.36 \pm 19.56	1691.73 \pm 145.56	14.79
	1:10	114.36 \pm 19.56	1691.73 \pm 145.56	14.79
S.Pum19	1:1	7.51\pm1.43	183.59\pm90.82	24.44
	1:10	25.95\pm1.69	1631.13\pm52.28	62.85
SC28	1:1	38.07\pm3.97	2044.92\pm45.94	53.72
	1:10	20.17\pm3.47	879.85\pm114.96	43.62
200019	1:1	66.27\pm11.09	2162.03\pm75.50	32.62
	1:10	53.96\pm15.94	2150.28\pm61.72	39.85

Table 2-9. 배양상등액에 의한 장간막림프절세포의 사이토카인 패턴

Sample	처리농도	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
PBS	10 μ g	48.46 \pm 2.83	482.36 \pm 178.04	9.95
	100 μ g	48.46 \pm 2.83	482.36 \pm 178.04	9.95
B151	10 μ g	44.56 \pm 1.65	662.50 \pm 161.25	14.87
	100 μ g	44.44 \pm 1.77	1640.07 \pm 74.51	36.90
200060	10 μ g	44.33 \pm 3.04	191.05 \pm 121.44	4.31
	100 μ g	46.52 \pm 3.00	312.36 \pm 121.83	6.71
G72	10 μ g	43.22 \pm 0.81	528.33 \pm 152.87	12.23
	100 μ g	44.15 \pm 0.50	1116.50 \pm 85.58	25.29
Ln4	10 μ g	42.89 \pm 1.20	170.64 \pm 17.05	3.98
	100 μ g	43.92 \pm 0.67	210.81 \pm 134.58	4.80
PBS	10 μ g	33.70 \pm 0.44	315.00 \pm 2.34	9.35
	100 μ g	33.70 \pm 0.44	315.00 \pm 2.34	9.35
Lb41	10 μ g	31.08 \pm 2.37	233.35 \pm 33.84	7.51
	100 μ g	25.57 \pm 5.71	268.38 \pm 187.96	10.50
G1	10 μ g	28.81\pm4.12	407.19\pm127.29	14.14
	100 μ g	16.86\pm2.21	924.25\pm68.40	54.82
200080	10 μ g	30.01 \pm 3.22	592.83 \pm 70.49	19.75
	100 μ g	19.63 \pm 0.82	920.63 \pm 320.83	46.91
200054	10 μ g	37.51 \pm 2.30	728.81 \pm 319.23	19.43
	100 μ g	26.96 \pm 5.39	1175.10 \pm 58.68	43.58
PBS	10 μ g	114.36 \pm 19.56	1691.73 \pm 145.56	14.79
	100 μ g	114.36 \pm 19.56	1691.73 \pm 145.56	14.79
S.Pum19	10 μ g	52.27\pm4.84	1675.90\pm108.47	32.06
	100 μ g	33.71\pm5.13	1802.69\pm76.53	53.47
SC28	10 μ g	47.57\pm5.94	1895.38\pm108.65	39.84
	100 μ g	34.01\pm3.11	1913.36\pm132.77	56.27
200019	10 μ g	56.40 \pm 4.83	1797.85 \pm 101.87	31.88
	100 μ g	46.47 \pm 15.35	1696.28 \pm 106.87	36.50

- 이상의 결과를 종합해 볼 때, Th1/Th2 면역반응 조절 또는 Th2 면역반응 억제를 통해 면역과민반응을 억제할 가능성이 있는 균주는 **B151, G72, G1, 200080, 200054, S.Pum19, SC28, 200019** 균주로 판단되며 특히, **G1, 200080, S.Pum19, SC28, 200019** 균주는 생균, 사균 및 배양상등액 모두에서 활성을 보였다. 이들 균주에 대해서는 OVA를 이용하여 유도한 식품알레르기 동물모델을 이용하여 활성 확인실험을 진행하였다.

㉔ 2차년도 선별 균주에 대한 Th1/Th2 균형조절 활성 평가

- 1차년도 실험결과를 참고할 때 장간막림프절유래 면역세포를 이용하는 것보다는 비장세포를 이용하는 것인 사이토카인 분비 패턴이 더 뚜렷하게 확인되었기에 2차년도 11종 균주에 대해서는 비장세포를 이용하여 IL-4와 IFN- γ 분비 패턴을 확인함으로써 Th1/Th2 균형조절 활성을 평가하였다.
- 비장세포에 2차년도 선별 생균을 처리한 후 IL-4와 IFN- γ 분비량을 측정된 결과이다(Table 2-10). 2차년도 선별 균주는 대부분이 *Lactobacillus plantarum*이기 때문에 단순히 IFN- γ /IL-4 ratio만을 고려하여 동물실험에 적용한 균주를 찾을 경우, *Lactobacillus plantarum* 균주만 선별될 우려가 있다. *In vitro* 실험 결과와 *In vivo* 실험 결과가 항상 일치하는 것은 아니므로 같은 종의 균주를 선택하는 것보다는 다양한 종을 확인하는 것이 균주 활용 측면에서 좋을 거라 판단하고 동일한 종중에서 IFN- γ /IL-4 ratio가 높은 균주를 선별하였다. 그 결과 *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KCCM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793 균주를 Th1/Th2 균형조절 활성이 높은 균주로 선택하였다.

Table 2-10. 2차년도 선별 생균에 의한 비장세포의 사이토카인 분비 패턴

Live cells	5×10^6			5×10^7		
	IL-4	IFN- γ	IFN/ IL-4 ratio	IL-4	IFN- γ	IFN- γ / IL-4 ratio
PBS	37.21±2.92	1473.42±397.19	39.59	37.21±2.92	1473.42±397.19	39.59
369	23.45±2.39	861.00±183.99	36.72	20.51±2.94	168.79±92.17	8.23
650	23.99±1.73	2031.42±64.95	84.67	20.90±2.23	518.18±194.85	24.79
655	21.46±1.05	212.33±88.93	9.89	21.17±0.81	114.09±77.45	5.39
656	21.72±1.21	1799.58±80.58	82.84	22.15±1.73	900.06±88.30	40.64
661	20.35±0.21	196.24±77.04	9.64	20.71±0.36	107.36±73.88	5.18
693	21.77±1.04	1796.30±142.87	82.50	20.33±1.15	475.97±213.80	23.42
PBS	81.95±3.83	542.93±70.89	6.63	81.95±3.83	542.93±70.89	6.63
302	32.56±2.32	804.96±184.88	24.72	20.13±1.74	89.37±13.36	4.44
303	20.69±1.75	81.96±15.69	3.96	20.46±1.62	73.46±11.41	3.59
361	27.53±8.93	914.72±199.95	33.22	27.17±5.03	928.48±120.37	34.17
399	22.14±2.14	988.52±161.79	44.64	27.23±4.28	153.41±9.13	5.63
793	37.53±13.84	846.56±149.84	22.55	20.55±1.33	238.33±49.83	11.60

- 비장세포에 2차년도에 선별된 사균을 처리한 후 IL-4와 IFN- γ 분비량을 측정된 결과(Table 2-11), 생균과 유사한 패턴을 보였는데, *L. plantarum* 균주의 경우 생균과는 조금 다른 패턴을 보였다. 그러나 동물실험에서는 사균의 형태가 아닌 생균을 투여할 예정이기 때문에 생균 결과를 우선적으로 반영하여 2차년도 선별 균주 중 *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KCCM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793 균주를 식품알레르기 모델에 적용하여 활성평가를 진행하였다.

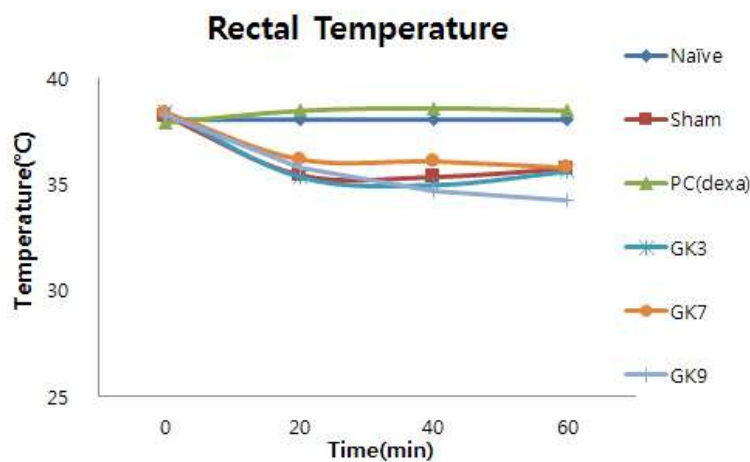
Table 2-11. 2차년도 선별 생균에 의한 비장세포의 사이토카인 분비 패턴

Dead cells	5×10 ⁶			5×10 ⁷		
	IL-4	IFN- γ	IFN/ IL-4 ratio	IL-4	IFN- γ	IFN- γ / IL-4 ratio
PBS	37.21±2.92	1473.42±397.19	39.59	37.21±2.92	1473.42±397.19	39.59
369	30.24±6.43	1787.30±157.09	59.09	22.21±1.22	1925.24±413.02	27.19
650	32.92±6.17	2077.15±252.64	63.09	25.21±1.41	2220.76±166.69	88.11
655	22.67±3.44	1756.48±64.13	77.49	21.11±2.42	170.85±114.94	8.09
656	23.71±2.71	2237.09±66.25	94.36	21.71±2.00	1369.36±184.97	63.08
661	22.95±0.18	1819.91±131.40	79.30	20.28±1.08	1193.82±54.60	9.56
693	29.27±3.15	2144.73±73.28	73.28	22.75±2.25	2242.18±46.18	98.55
PBS	81.95±3.83	542.93±70.89	6.63	81.95±3.83	542.93±70.89	6.63
302	44.12±5.70	789.78±171.26	17.90	28.71±5.94	604.00±229.05	21.04
303	23.20±3.72	1050.39±18.82	45.27	27.63±2.16	67.72±2.33	2.45
361	52.45±12.98	671.09±227.07	12.80	27.70±3.79	956.04±162.83	34.51
399	35.41±5.22	1000.22±33.91	28.25	36.36±12.16	1032.00±9.13	28.38
793	31.80±2.10	894.24±199.95	28.12	83.09±12.11	313.02±79.51	11.60

(나) 식품알레르기 모델을 이용한 면역과민반응 억제활성 평가

㉔ 1차년도 선별 균주에 대한 Th1/Th2 균형조절 활성 평가

- *In vitro* test를 통해 선별한 면역과민반응 억제활성 균주의 기능성을 *in vivo*에서 확인하기 위해 다음과 같이 OVA 유도 식품알레르기 모델을 이용하였다. BALB/C Mouse 5주령 암컷을 구입하여 일주일간 순화시킨 후 OVA 20 μg 과 Alum 2 mg으로 복강 주사하여 1차 면역하고, 14일 뒤 동일한 방법으로 2차 면역을 실시하였다. 2차 면역 14일 후부터 5×10^8 CFU/day 농도로 균주를 매일 경구 투여하였고, 3일 간격으로 OVA 50 mg을 균주와 함께 경구 투여하여 식품알레르기를 유발시켰다. 식품알레르기 유발 지표로써 아나필락시스 및 설사반응, 그리고 직장온도의 변화를 측정하였고, OVA와 균주를 경구 투여한 후 20분 간격으로 60분간 관찰하였다. 식품알레르기의 스코어는 알레르기의 지표로써 아나필락시스 및 설사 반응을 정도에 따라 1~3점까지 점수화하였으며, 객관적인 지표로 직장온도를 기록하였다. 마지막 challenge를 한 후에는 채혈을 통해 혈청 total IgE, ova-specific IgE를 분석하였으며, 비장세포와 림프노드의 배양을 통해 다양한 cytokine의 분비유형을 확인하였다.
- G72, 200080, S.Pum 19 균주를 면역한 마우스에 경구 투여하며 식품알레르기 증상완화 활성을 분석한 결과, 3 균주 모두 *in vitro* 결과와는 달리 식품알레르기 증상 억제 활성을 보이지 않았으며(Figure 2-24), 알레르기 증상 발현 밀접한 관련이 있는 면역글로블린인 IgE 및 OVA-specific IgE의 생성에서 활성을 보이지 않았다(Figure 2-25). 또한 비장세포와 장간막림프절의 측정된 사이토카인 분비패턴에서도 대표적인 Th2 사이토카인은 IL-4의 생산을 억제하거나 Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 생산을 증가시키는 활성은 관찰되지 않았다(Figure 2-26, 2-27).



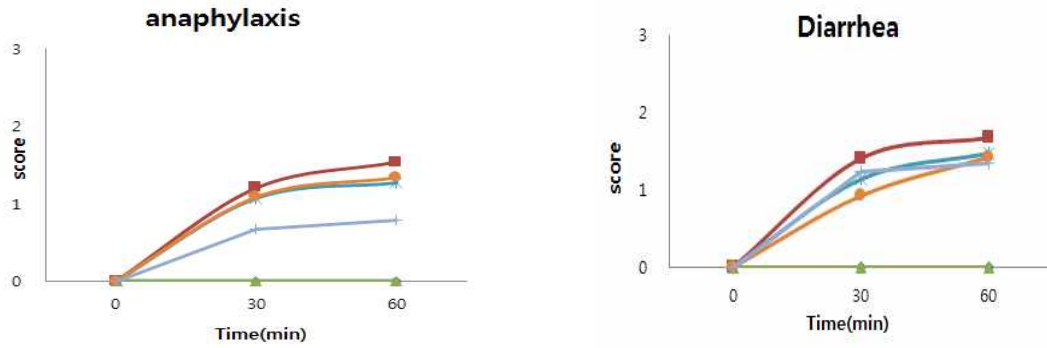


Figure 2-24. GK3(*Lactobacillus plantarum* G72), GK7(*Lactobacillus brevis* KCCM 200080), GK9(*Leuconostoc citreum* S.Pum 19) 균주 경구 투여에 따른 식품알레르기 증상 완화 효과.

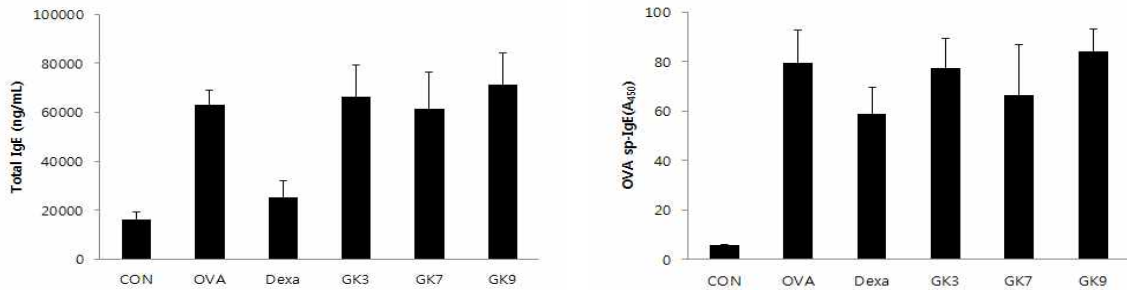


Figure 2-25. GK3(*Lactobacillus plantarum* G72), GK7(*Lactobacillus brevis* KCCM 200080), GK9(*Leuconostoc citreum* S.Pum 19) 균주 경구투여에 따른 Total IgE 및 OVA 특이 IgE 생성능.

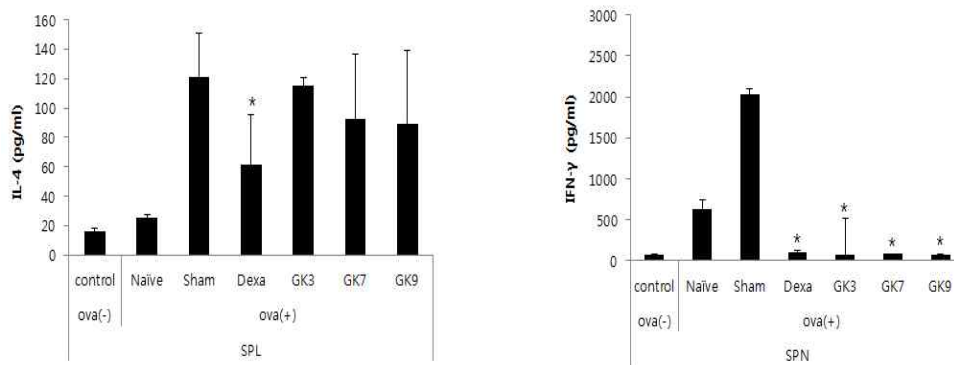


Figure 2-26. GK3(*Lactobacillus plantarum* G72), GK7(*Lactobacillus brevis* KCCM 200080), GK9(*Leuconostoc citreum* S.Pum 19) 균주 경구투여에 따른 비장세포에서의 cytokine 분비패턴. *, $p < 0.05$ sham 군 대비.

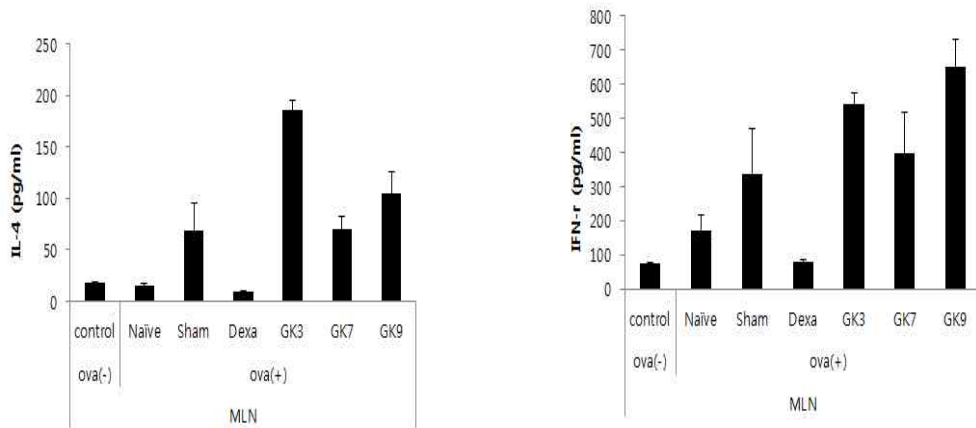
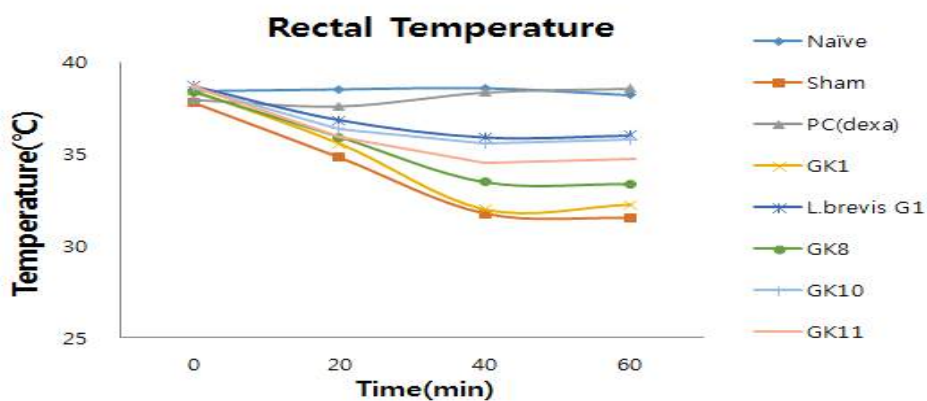


Figure 2-27. GK3(*Lactobacillus plantarum* G72), GK7(*Lactobacillus brevis* KCCM 200080), GK9(*Leuconostoc citreum* S.Pum 19) 균주 경구투여에 따른 장간막림프절에서의 cytokine 분비패턴. *, $p < 0.05$ sham 군 대비.

- B151, G1, 200054, SC28, 200019 균주를 면역한 마우스에 경구 투여하며 식품알레르기 증상 완화 활성을 분석한 결과 B151 및 200054 균주 투여 시에는 식품알레르기 유발 시 대표적인 증상인 직장온도 감소, 아나필락시스반응, 설사반응의 완화활성이 관찰되지 않았으나, G1, SC2810 및 200019 균주 투여 시에는 직장온도 감소 증상($N > \text{Dexa} > G1 = \text{SC}28 > 200019 > 200054 > B151 > S$), 아나필락시스반응($N = \text{dexa} < \text{SC}28 < G1 < 200019 < 200054 < B151 < S$), 설사반응($N = \text{dexa} < \text{SC}28 < G1 < 200019 < S < 200054 < B151$)이 완화되어 식품알레르기 억제 활성을 확인할 수 있었다(Figure 2-28).



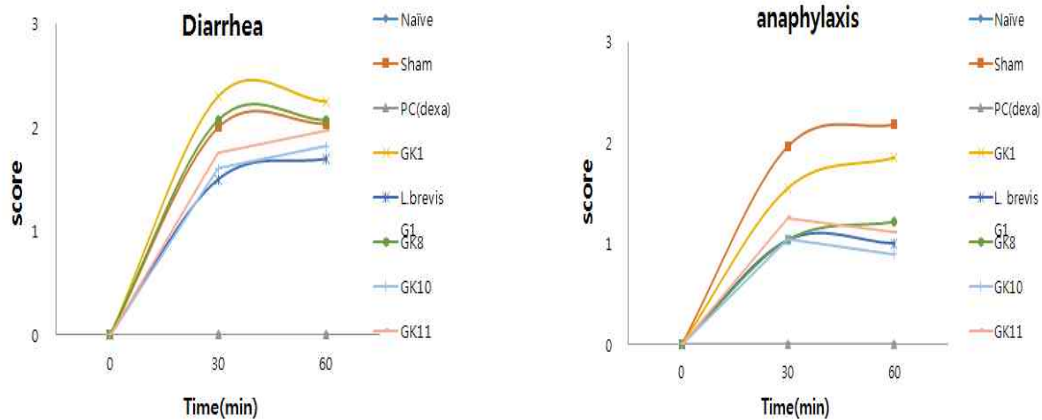


Figure 2-28. GK1(*Lactobacillus brevis* B151), GK6(*Lactobacillus brevis* G1), GK8(*Lactobacillus brevis* KCCM 200054), GK10(*Pediococcus pentosaceus* SC28), GK11(*Lactobacillus brevis* KCCM 200019) 균주 경구투여에 따른 식품 알레르기 증상 완화 효과.

- 증상완화효과가 있었던 G1, SC28 및 200019 균주의 비장세포배양액에서의 사이토카인 분비 패턴을 확인한 결과(Figure 2-29), 알레르기 증상발현과 관련 있는 Th2 사이토카인인 IL-4, 5, 10이 모두 감소한 것으로 나타났다. 그러나 이와 동시에 Th1 사이토카인이 증가한 균주는 G1 균주였다. 장간막림프절 유래 면역세포 배양액에서의 사이토카인 분비 패턴은 비장세포배양액에서와는 다른 패턴은 보였는데(Figure 2-30), 식품 알레르기 증상완화를 보였던 SC28과 200019 균주에서는 Th2 사이토카인의 감소가 관찰되지 않았고 G1 균주에서만 Th2 사이토카인의 감소 및 Th1 사이토카인의 증가가 관찰되었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, SC28 및 200019 균주의 식품알레르기 억제활성은 전신면역조절에 의한 것으로 판단되며, G1 균주의 활성의 국소 및 전신면역 모두에 작용하여 Th1/Th2 면역반응 균형조절을 통해 나타나는 것으로 판단된다.
- 염증성 장질환, 알레르기성 질환 등 면역관련질환 개선에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 세계적인 프로바이오틱스 제품인 VSL3# (8종 혼합 균주; *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) 역시 Th1/Th2 면역반응 균형조절 활성이 있는 것으로 알려져 있는데, S T(shrim tropomyosin)로 유도한 식품알레르기 모델에서 Th2 cytokine인 IL-4의 생성을 sham군 대비 약 43% 억제하는 것으로 보고된 바 있다(Allergy 66(4):499-508, 2010). 본 연구를 통해 선별한 G1균주의 경우 OVA로 유도한 식품알레르기 모델에서 IL-4를 sham군 대비 약 40-60% 가량 억제하는 것으로 나타나 비록 알레르기 유도 모델에서 차이가 있기는 하지만 세계적인 프로바이오틱스 제품과 유사한 수준의 Th2 면역반응 억제활성을 보임을 확인 할 수 있었다.
- 따라서 1차년도 선별 균주 중 가장 활성이 뛰어난 균주는 *Lactobacillus brevis* G1 임을 확인할 수 있었으며 추가적인 분석을 통해 *Lactobacillus brevis* G1 투여군에서는 IgE의 생성량도 감소됨을 확인 할 수 있었다(Figure 2-32).

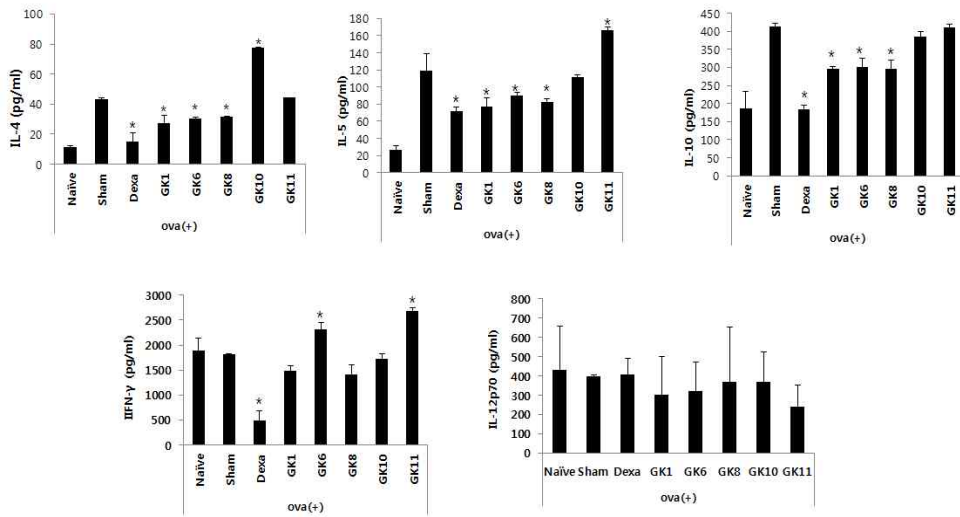


Figure 2-29. GK1(*Lactobacillus brevis* B151), GK6(*Lactobacillus brevis* G1), GK8(*Lactobacillus brevis* KCCM 200054), GK10(*Pediococcus pentosaceus* SC28), GK11(*Lactobacillus brevis* KCCM 200019) 균주 경구투여에 따른 비장세포에서의 cytokine 분비패턴. *, $p < 0.05$ sham 군 대비.

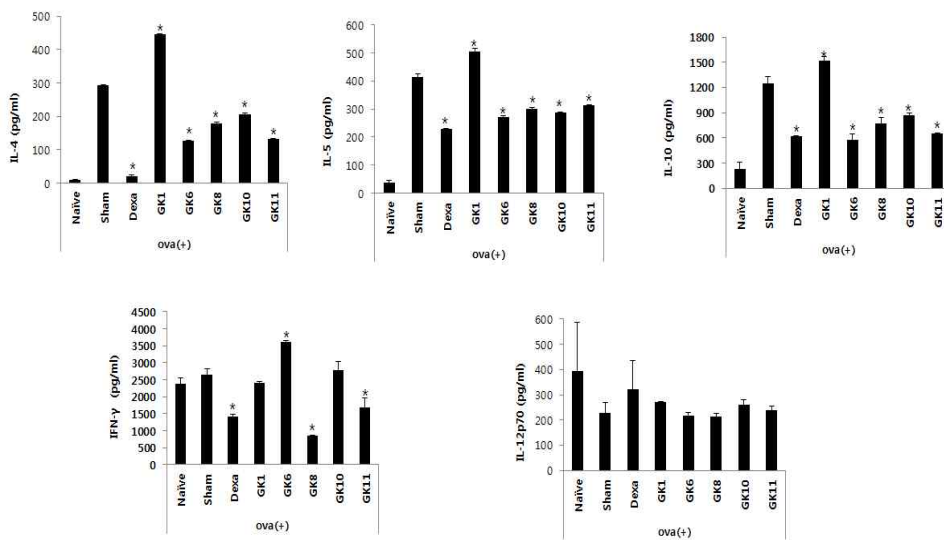


Figure 2-30. GK1(*Lactobacillus brevis* B151), GK6(*Lactobacillus brevis* G1), GK8(*Lactobacillus brevis* KCCM 200054), GK10(*Pediococcus pentosaceus* SC28), GK11(*Lactobacillus brevis* KCCM 200019) 균주 경구투여에 따른 장간막림프절에서의 cytokine 분비패턴. *, $p < 0.05$ sham 군 대비.

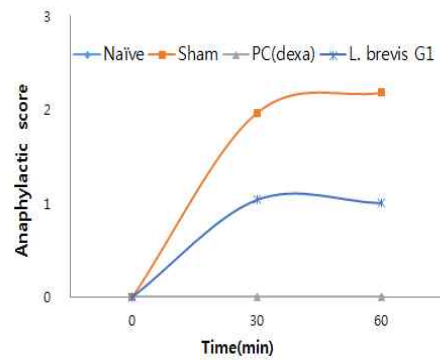
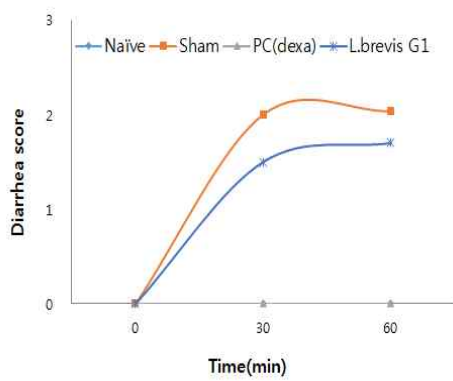
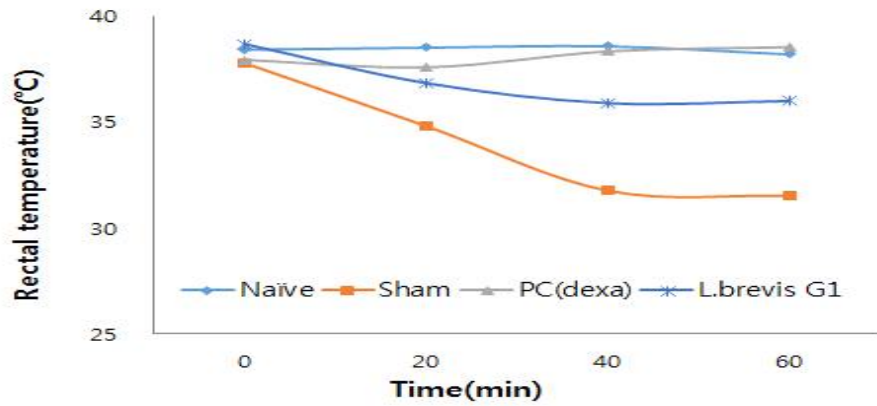


Figure 2-31. *Lactobacillus brevis* G1 균주 경구투여에 따른 식품 알레르기 증상 완화 효과.

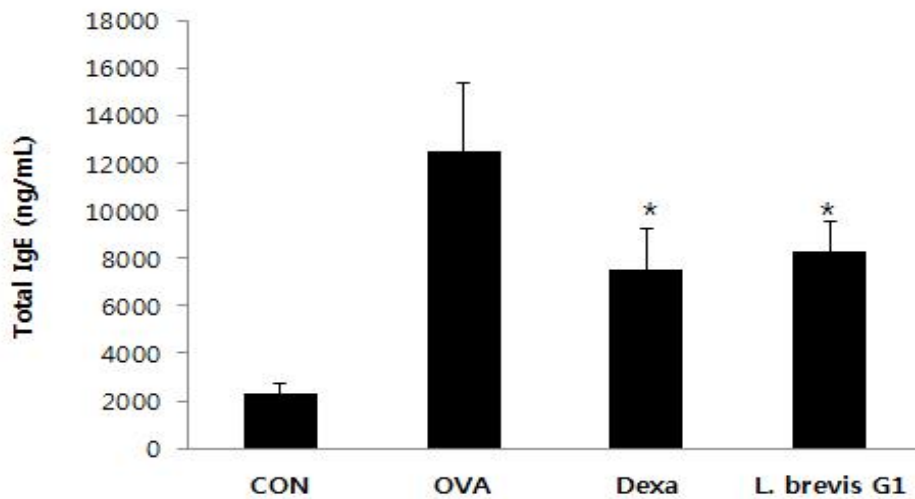


Figure 2-32. *Lactobacillus brevis* G1 균주 경구투여에 따른 식품 알레르기 증상 완화 효과. 균주 경구투여에 따른 Total IgE 생성능 *, $p < 0.05$ Sham군 대비.

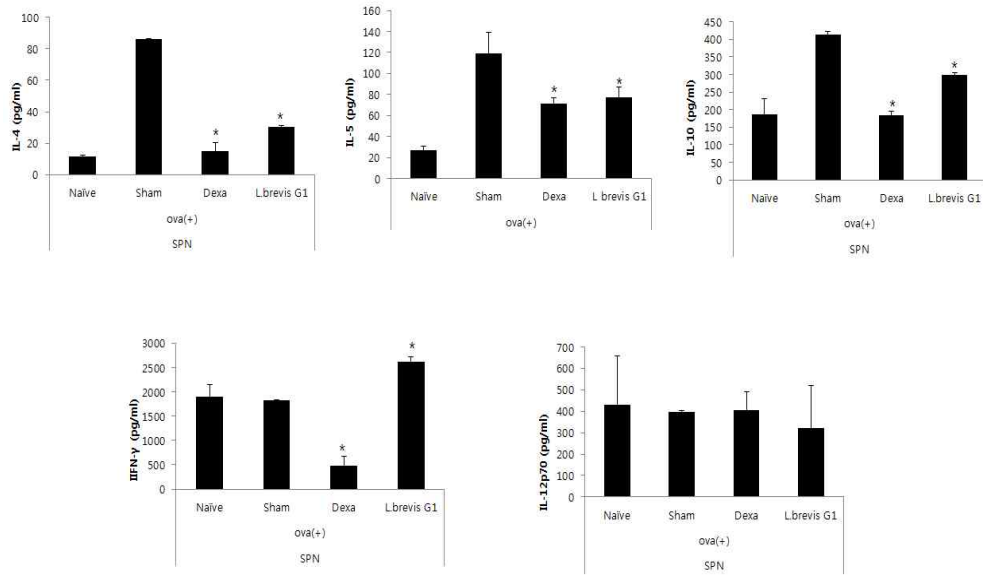


Figure 2-33. *Lactobacillus brevis* G1 균주 경구투여에 따른 비장세포에서의 cytokine 분비패턴. *, $p < 0.05$ sham 군 대비.

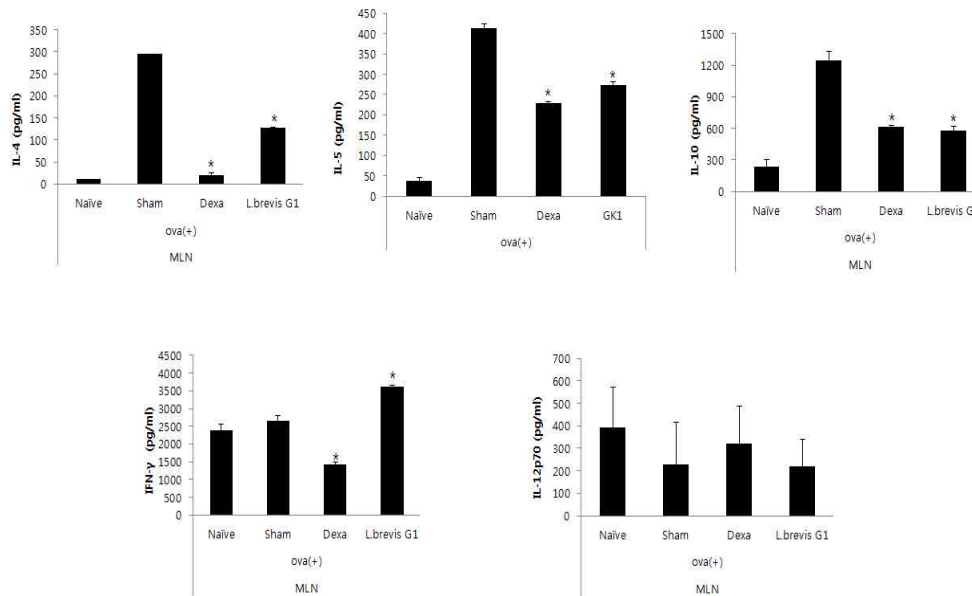


Figure 2-34. *Lactobacillus brevis* G1 균주 경구투여에 따른 장간막림프절에서의 cytokine 분비패턴. *, $p < 0.05$ sham 군 대비.

㉔ 2차년도 선별 균주에 대한 Th1/Th2 균형조절 활성 평가

- *In vitro* test를 통해 선별한 면역과민반응 억제활성 균주의 기능성을 *in vivo*에서 확인하기 위해 다음과 같이 OVA 유도 식품알레르기 모델을 이용하였다. BALB/C Mouse 5주령 암컷을 구입하여 일주일간 순화시킨 후 OVA 20 μ g과 Alum 2 mg으로 복강 주사하여 1차 면역하고, 14일 뒤 동일한 방법으로 2차 면역을 실시하였다. 2차 면역 14일 후부터 5×10^8 CFU/day 농도로 균주를 매일 경구 투여하였고, 3일 간격으로 OVA 50 mg을 균주와 함께 경구 투여하여 식품알레르기를 유발시켰다. 식품알레르기 유발 지표로써 아나필락시스 및 설사반응, 그리고 직장온도의 변화를 측정하였고, OVA와 균주를 경구 투여한 후 20분 간격으로 60분간 관찰하였다. 식품알레르기의 스코어는 알레르기의 지표로써 아나필락시스 및 설사 반응을 정도에 따라 1~3점까지 점수화하였으며, 객관적인 지표로 직장온도를 기록하였다. 마지막 challenge를 한 후에는 채혈을 통해 혈청 total IgE, ova-specific IgE를 분석하였으며, 비장세포와 림프노드의 배양을 통해 다양한 cytokine의 분비유형을 확인하였다.
- 실험 결과 *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KCCM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793 균주는 식품알레르기의 대표적인 증상인 직장온도 저하, 설사 및 아나필락시스 반응을 개선하지 못하는 것으로 확인되었고(Figure 2-35), 식품알레르기 증상을 유발하는 주요 원인인 IgE 및 OVA specific IgE 생성량 측정 결과에서도 4종 균주 투여에 따른 유의적인 감소활성은 나타나지 않았다(Figure 2-36). 또한 해부 후 회수한 비장세포 및 장간막리프질 유래 면역 세포의 배양상등액에서도 식품알레르기의 유발과 병변 진행에 밀접한 관련이 있는 Th2 사이토카인 지표의 감소나 Th1 사이토카인의 증가가 관찰되지 않았다(Figure 2-37, 2-38). *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793의 경우 IL-5, IL-10 등의 일부 Th2 사이토카인이 감소하기는 하였으나, 그 정도가 미미하고 식품알레르기 증상에서는 오히려 악화되는 패턴을 보였고, IFN- γ 역시 감소한 것으로 미루어 볼 때 전반적인 면역억제가 있었건 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 2차년도에 선별된 기초생리활성 우수 균주 중에서는 식품알레르기 억제활성 균주는 확인할 수 없었으며, 1,2차년도에 선별한 모든 균주 중 *Lactobacillus brevis* G1의 활성이 가장 뛰어남을 확인할 수 있었다. 이에 기초생리활성 및 식품알레르기 억제활성이 있는 *Lactobacillus brevis* G1에 대해서는 기술이전이 진행되었다.

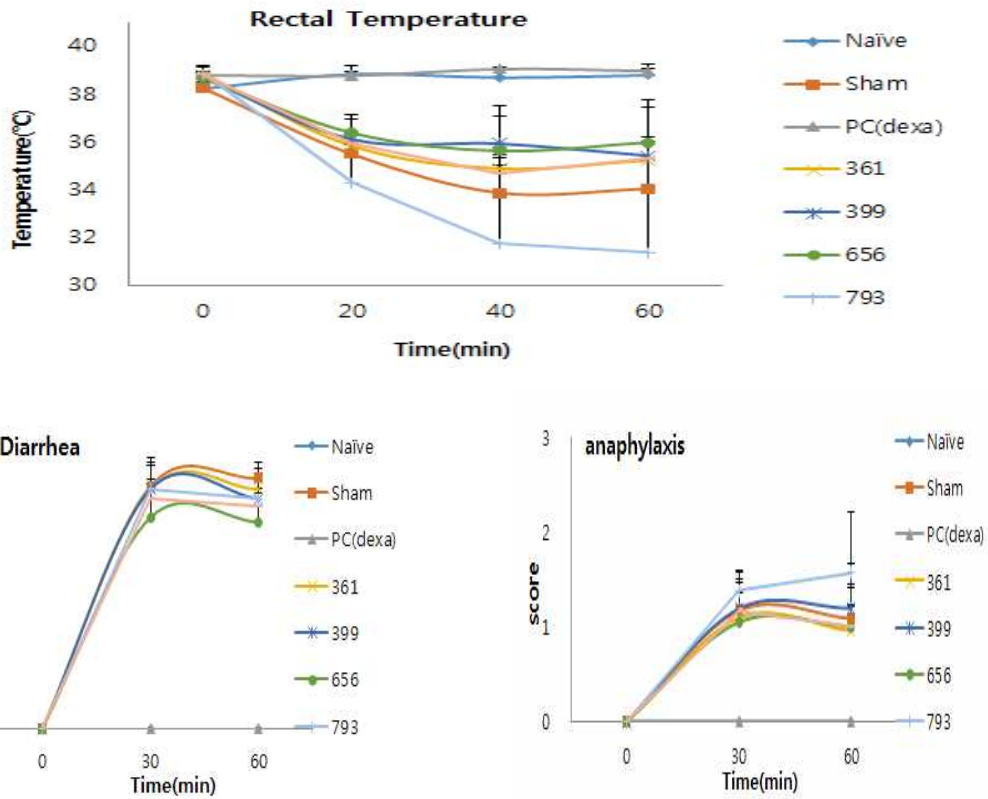


Figure 2-35. *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KCCM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793 균주 경구투여에 따른 식품알레르기 증상 완화 효과.

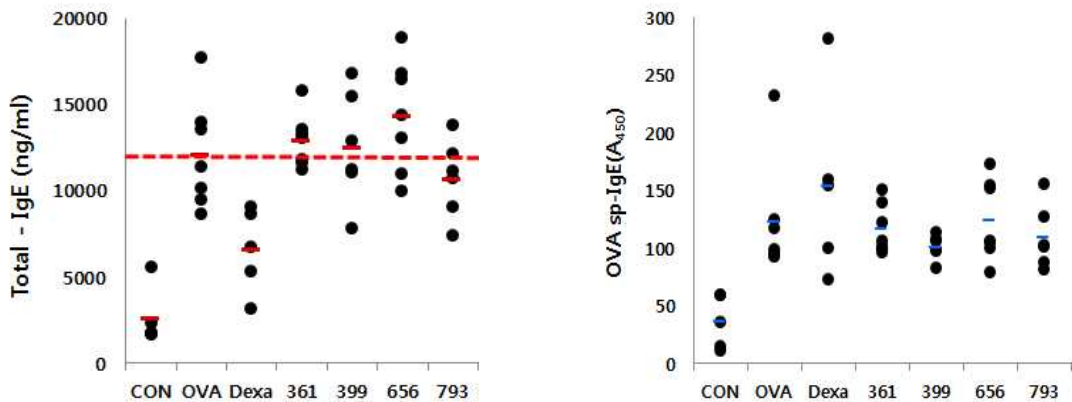


Figure 2-36. *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KCCM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793 균주 경구투여에 따른 Total IgE 및 OVA sp specific IgE 생성능 *, $p < 0.05$ Sham군 대비.

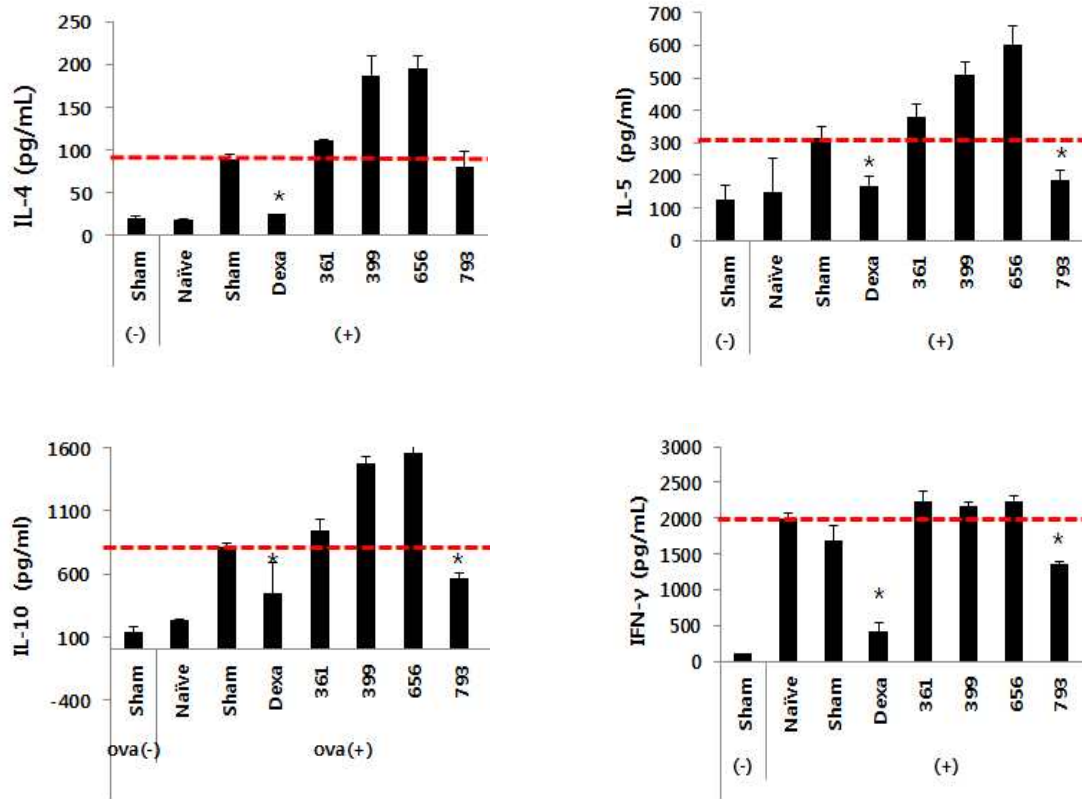


Figure 2-37. *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KC CM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchneri* KCCM 200793 균주 경구투여에 따른 비장세포에서의 사이토카인 분비 패턴 분석*, $p < 0.05$ Sham군 대비.

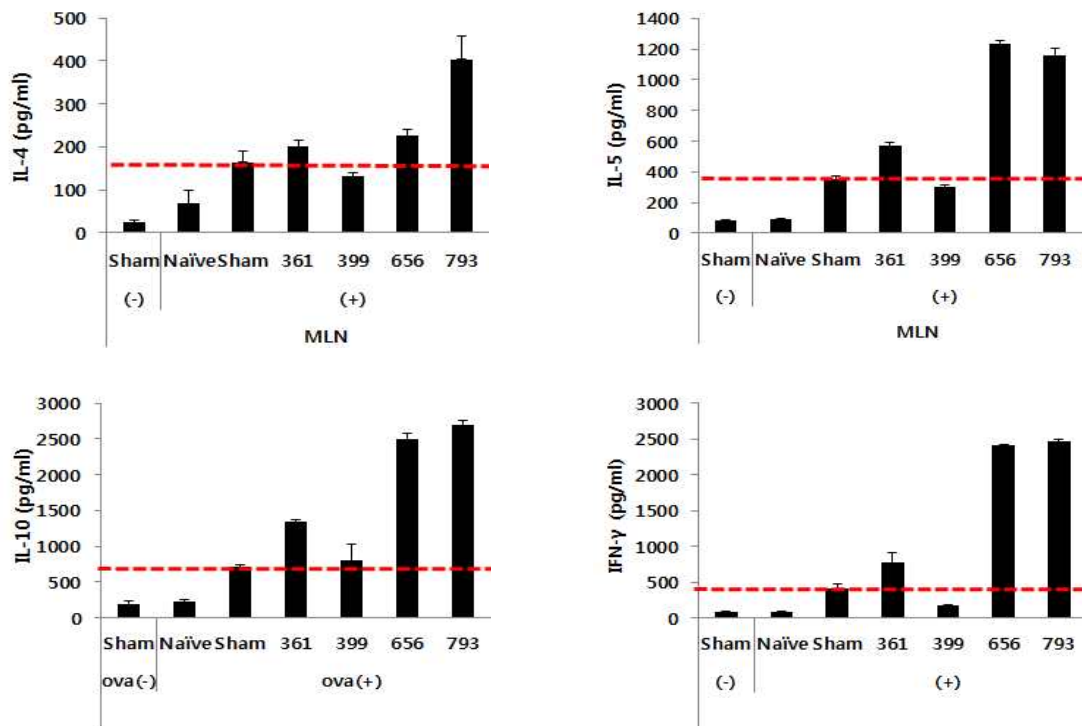


Figure 2-38. *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Leuconostoc lactis* KCCM 202361, *Lactobacillus brevis* KCCM 202399, *Lactobacillus buchnri* KCCM 200793 균주 경구투여에 따른 장간막림프절에서의 사이토카인 분비 패턴 분석*, $p < 0.05$ Sham군 대비.

(5) 간기능 개선 활성 평가

(가) *In vitro* 간기능 개선 활성 평가

① AST(GOT) 효소활성

㉠ 실험 방법

- AST(Aspartate aminotransferase)는 GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase)라고도 하며, 특히 간에 많이 분포하는 것으로 알려져 급성간염과 심근경색 등의 질병상태에서 상승하는 것으로 알려져 있다. 주관기관에서 제공한 11종의 균주 각각의 생균(viable strain)과 사균(killed strain), 배양상등액(culture supernatant)에 대한 HepG2 세포에서의 GOT assay를 시험하였다. HepG2 세포를 24 well plate에 2.0×10^5 cells/well 세포 수로 분주하여 24시간 배양 후, FBS가 무첨가된 MEM 배지로 바꿔 4시간동안 배양한다. 농도별 후보물질을 처리하여 1시간 뒤, 독성을 유도하기 위해 Ethanol(100 mM)를 세포에 처리한다. 24시간 후 AST kit를 사용하여 하여 AST level을 측정한다.

- Glutamate를 standard로 사용하며, glutamic oxaloacetic transaminase activity assay kit(abcam, USA)을 이용하여 450 nm에서 10분과 60분 뒤, 반응 값의 차이로 그 값을 구하였다. 생균과 사균의 경우 특별한 세포독성이 없는 경우 샘플의 보유한 최고 CFU 보다 최저 1,000배 희석된 농도까지 실험하였으며, 배양 상등액은 100~200 µg농도로 실험하였다.

㉠ 실험 결과

- 배양상등액에서 음성대조군 대비 40% 이상의 GOT 활성감소를 가진 샘플은 총 6종(culture sup. No. 2, 3, 4, 5, 6, 7)으로 확인되었으며(Figure 2-40), 사균은 그 보다 적은 5종(killed stain No. 2, 3, 4, 5, 11)에서 활성감소가 확인되었다. 생균에서는 3종(viable stain No. 1, 3, 4)에서 활성감소가 나타났다(Figure 2-39). 세 가지 균주 타입 중 생균을 사용하여 실험할 경우 세포독성이 높았으며, 사균의 경우 생균보다 세포의 생존율이 높았으나, No. 9 사균체에서만 높은 세포독성이 관찰되었다(Figure 2-41). 11종 대부분의 배양상등액이 세포실험에는 안전하고 효과적인 것으로 관찰되었으나, 이는 균체배양액 이외의 성분들이 섞여있어 비특이적인 반응일 수도 있음을 감안해야한다.

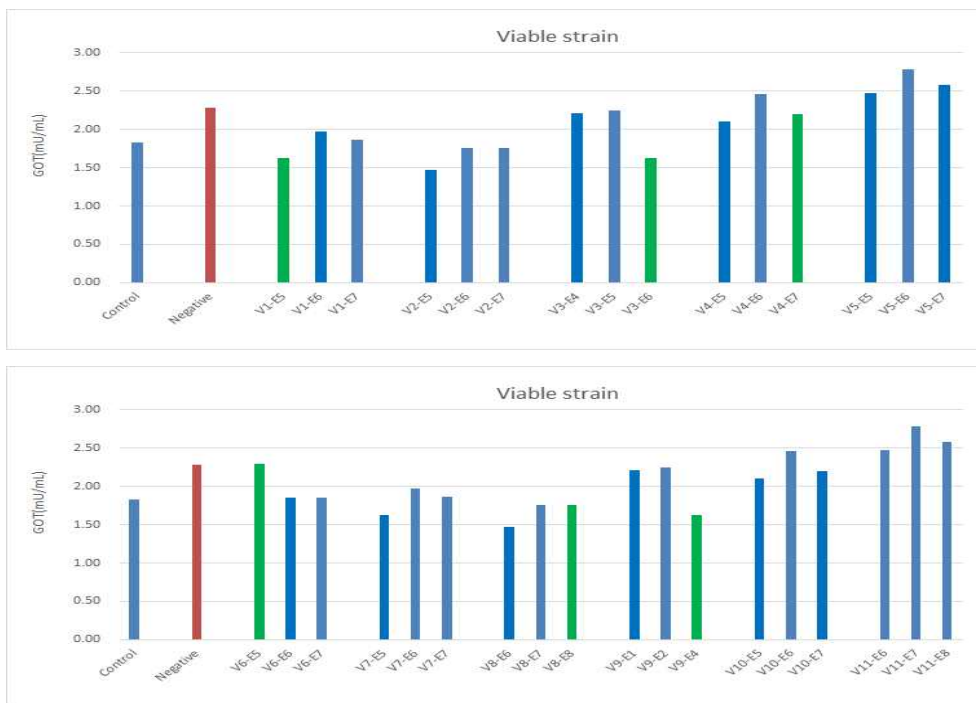


Figure 2-39. 주관기관 제공 11종(생균)에 대한 HepG2 세포에서의 GOT 활성 결과(*in vitro*) Control: HepG2 cells, Negative: Hep G2 cells+EtOH, V1-E5: HepG2 cells+EtOH+viable strain No.1 10⁵ CFU.

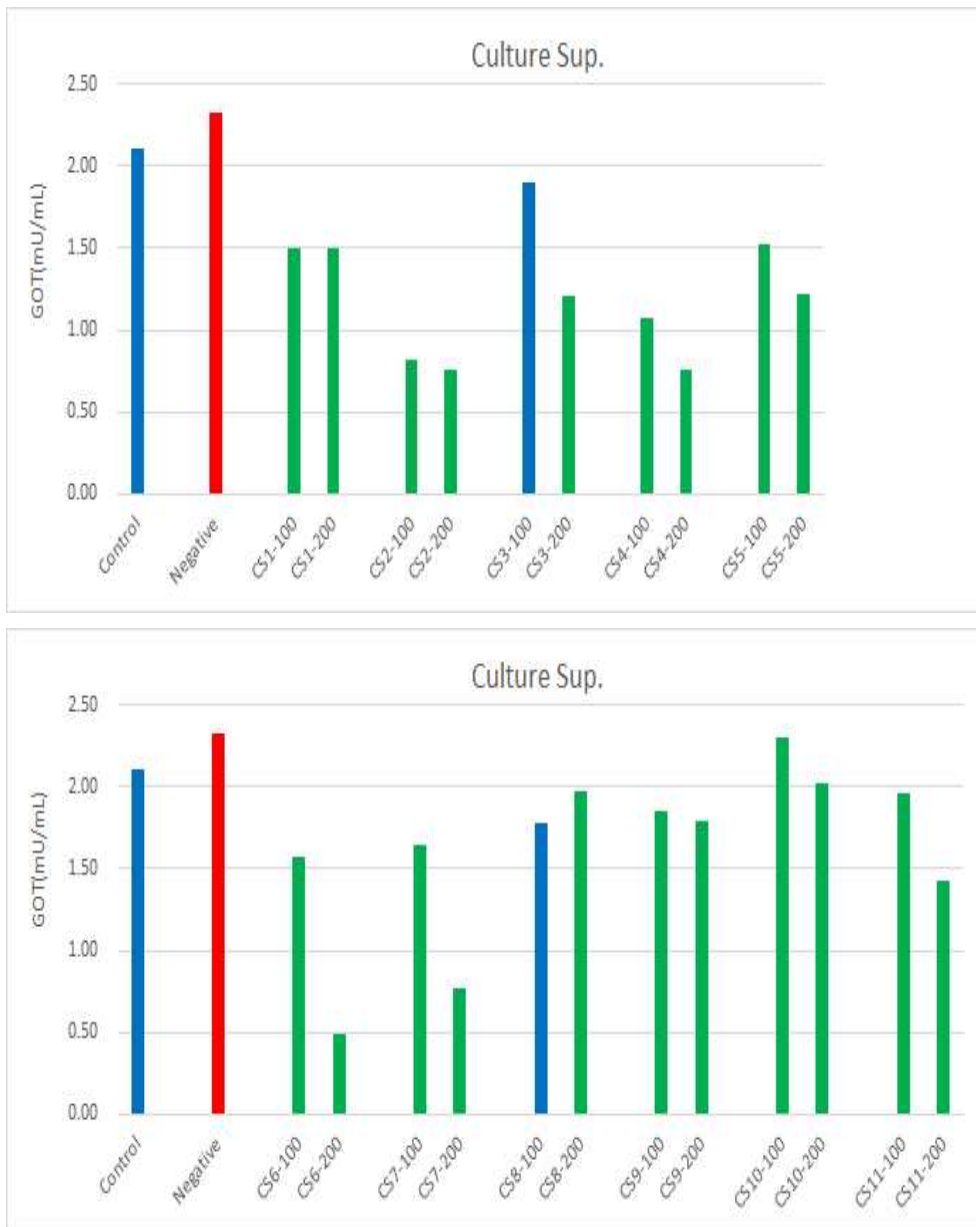


Figure 2-40. 주관기관 제공 11종(배양상등액)에 대한 HepG2 세포에서의 GOT 활성결과(*in vitro*) Control: HepG2 cells, Negative: HepG2 cells+EtOH, CS1-100: HepG2 cells+EtOH+culture supernatant No.1 100 μ g.

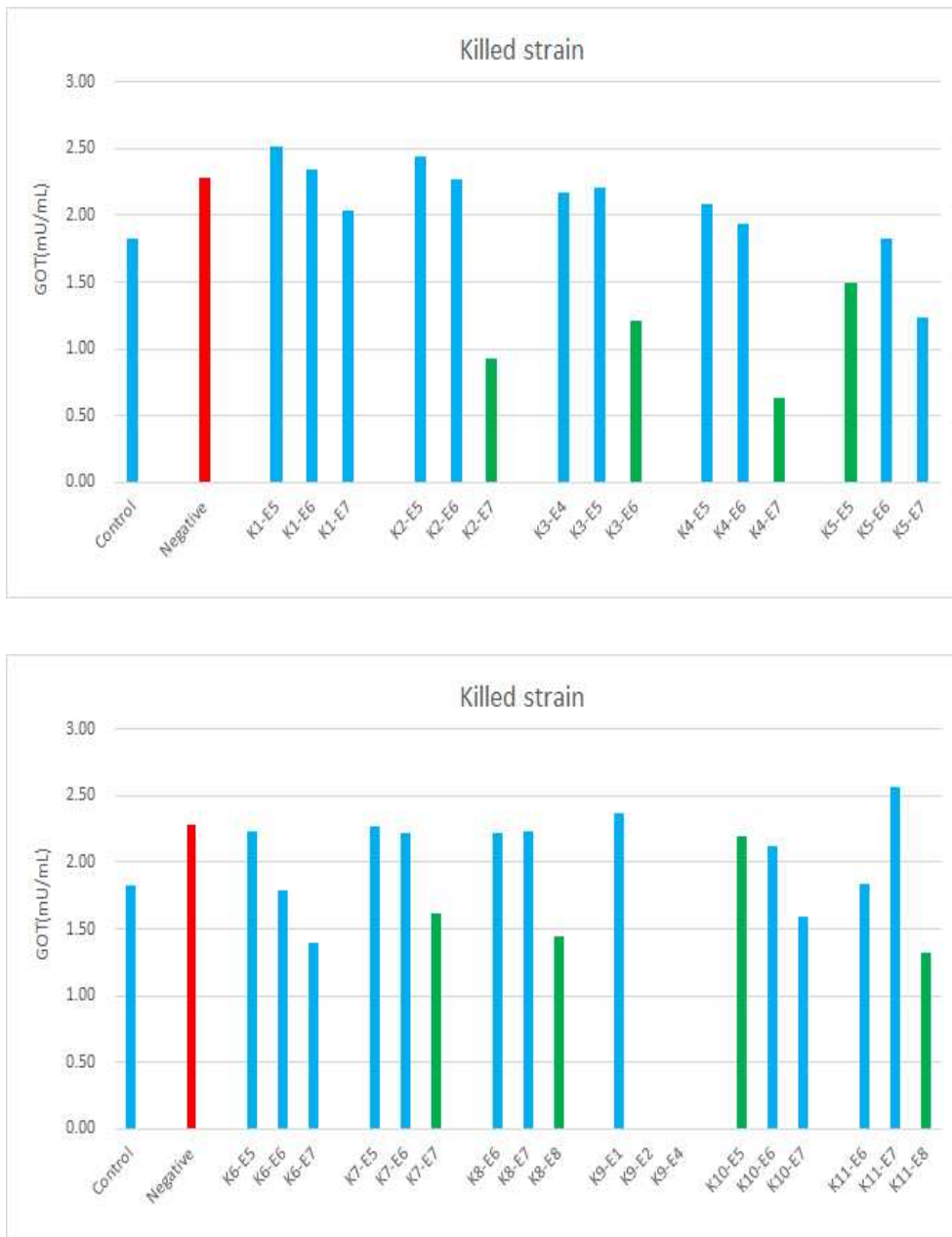


Figure 2-41. 주관기관 제공 11종(사균)에 대한 HepG2 세포에서의 GOT 활성 결과(*in vitro*) Control: HepG2 cells, Negative: Hep G2 cells+EtOH, K1-E5: HepG2 cells+EtOH+killed strain No.1 10^5 CFU.

② TBARS(MDA) 함량측정

㉠ 실험 방법

- 간에서 독성물질이 대사되는 과정에서 생성된 산소라디칼에 의해 지질이 산화되어 누적되면 간기능을 저해시킨다. 간 조직내 MDA(malondialdehyde)의 농도가 높을수록 간기능이 저하된다는 의미이다. HepG2 세포를 24 well plate에 2.0×10^5 cells/well 세포 수로 분주하여 24시간 배양 후, FBS가 무첨가된 MEM 배지로 바꿔 4시간 동안 배양한다. 농도별 후보물질을 처리하여 1시간 뒤, 독성을 유도하기 위해 ethanol(100 mM)를 세포에 처리한다. 12시간 배양 후, 배양액을 제거하고 PBS에 현탁시켜 균질화시킨 뒤 TBARS(지질과산화물)함량을 측정하였다. MDA(Malondialdehyde)를 standard로 사용하며, Oxitek TBARS assay kit(Enzo life science, USA)를 이용하여 532 nm에서 지질과산화물을 측정하였다. 20% TCA에서 thiobarbituric acid와 liver homogenate 용액을 반응시켜 측정한다.

㉡ 실험 결과

- Negative(에탄올 독성군)대비 TBARS의 함량이 일정량(30%)이상 감소하는 것을 확인하였다. 생균실험에서 총 7종(viable strain No. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11)(Figure 2-42), 배양 상등액 5종(culture sup. No. 1, 4, 6, 7, 8)(Figure 2-43)과 사균 4종(killed strain No. 1, 5, 7, 8)에서 TBARS의 감소가 확인되었다(Figure 2-44).
- GOT 활성(40% 이상 활성 감소)과 TBARS 함량 측정(30% 이상 함량 감소)결과를 수치만을 고려하여 종합적인 결론을 내린다면 생균, 사균, 배양상등액 모든 샘플구획에서 가장 높은 활성을 나타낸 strain No. 4과 No. 5, 2종이 활성 균주라 할 수 있다.

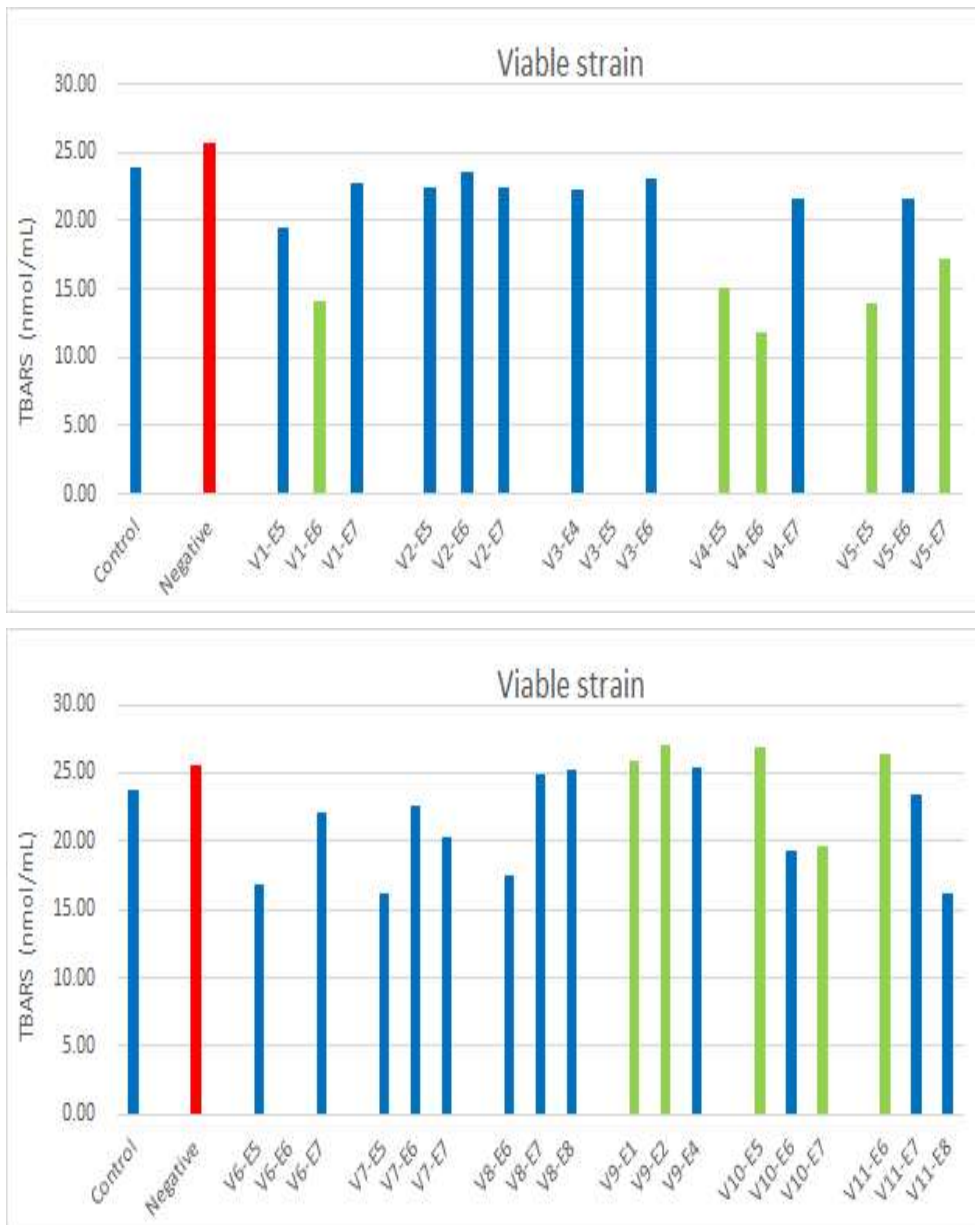


Figure 2-42. 주관기관 제공 11종(생균)에 대한 HepG2 세포에서의 TBARS(MDA) 함량측정 결과(*in vitro*) Control: HepG2 cells, Negative: HepG2 cells+EtOH, V1-E5: HepG2 cells+EtOH+viable strain No.1 10^5 CFU.

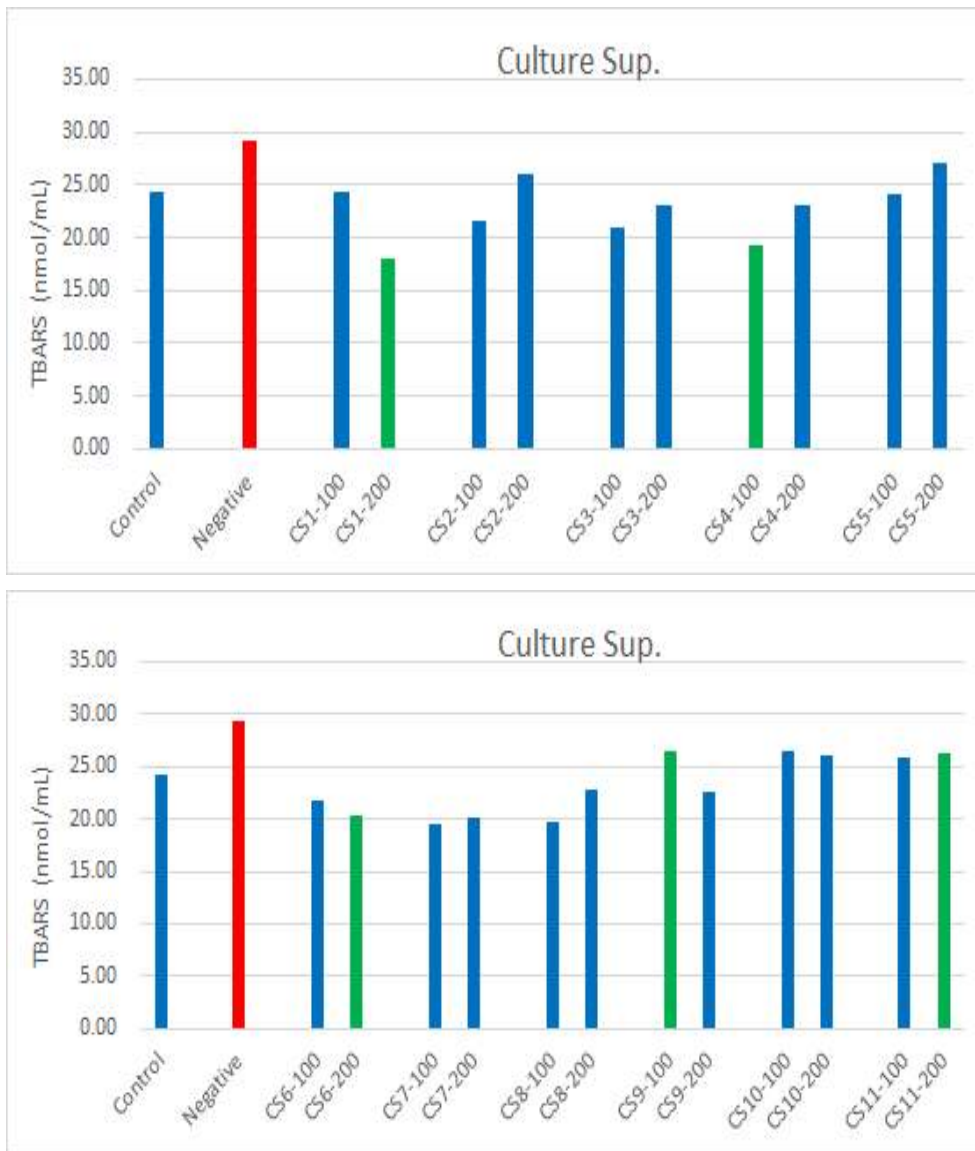


Figure 2-43. 주판기관 제공 11종(생균)에 대한 HepG2 세포에서의 TBARS(MDA) 함량측정 결과(*in vitro*) Control: HepG2 cells, Negative: HepG2 cells+EtOH, CS1-100: HepG2 cells+EtOH+culture supernatant No.1 100 μ g.

- 앞서 언급된 2종 균주에 대한 실험결과만을 종합해 보면 GOT 활성을 감소시킨 것은 맞지만 그 값이 샘플의 농도 의존적이지 않아 명확한 활성을 가진다고 보기는 어려웠다. 그리고 MDA 함량은 동물실험시 간 조직에서 직접 측정하므로 전 단계인 세포 실험 결과를 주요하게 관찰하는데, 본 실험에서 가장 높은 활성을 나타낸 생균(viable strain) 타입은 HepG2 cells을 이용한 세포실험에서 세포독성을 보였다. 만약 동물실험에서 샘플의 활성과 독성이 동시에 나타날 경우 결과해석에 부정적인 영향을 끼칠 수 있을 것으로 예상되었다.

- 따라서 본 활성평가에서는 명확한 간기능 개선의 활성을 나타내는 샘플의 부재와 생균의 세포독성으로 인해 동물실험을 진행하지 않기로 하였다.

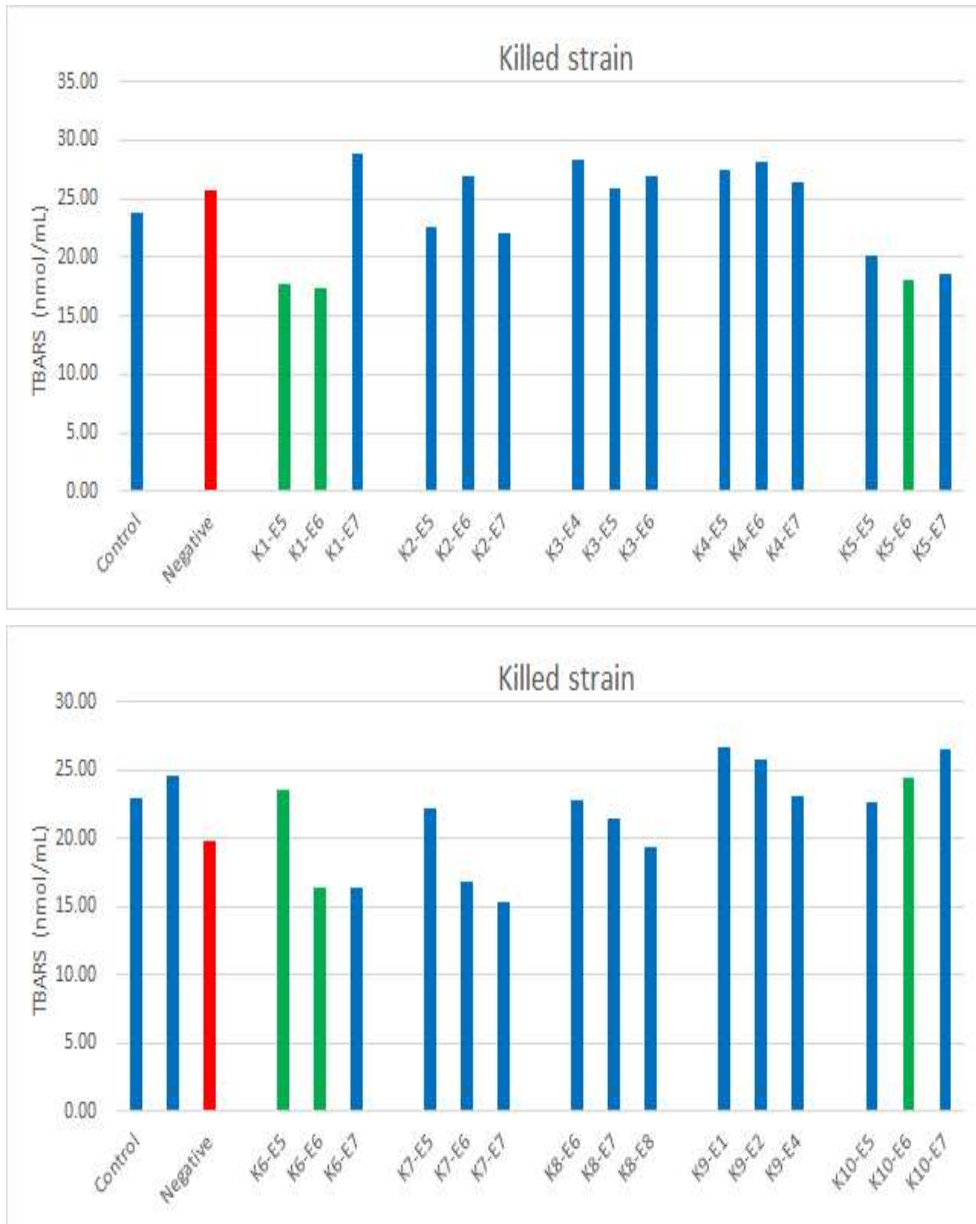


Figure 2-44. 주관기관 제공 11종(생균)에 대한 HepG2 세포에서의 TBARS(MDA) 함량측정 결과(*in vitro*) Control: HepG2 cells, Negative: HepG2 cells+EtOH, K1-E5: HepG2 cells+EtOH +killed strain No.1 10^5 CFU.

2. 식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축 및 평가

- 식품원료, 식품첨가물 및 건강기능식품 등 식품분야에 사용되는 미생물의 안전성 평가와 관련한 국내·외 판단 기준, 식품산업용 미생물 인정현황, 법령과 규정, 안전성 확보를 위해 필요한 제출 자료와 그 범위 및 절차, 제출항목에 대한 실험법 등의 정보를 바탕으로 식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축하였으며, 이에 대한 내용은 [식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축] 별첨 보고서(117 페이지 분량)로 제출하였다. 식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축과 관련한 내용 중 본 협동의 위탁연구기관인 전북대학교병원에서 수행한 인체적용시험과 관련한 내용은 본 보고서에 기술하였다.
- 구축한 안전성 평가시스템을 바탕으로 주관기관 및 타 협동기관에서 제공한 식품산업용 균주에 대한 비의도적 유해물질(바이오제닉 아민, 에틸 카바메이트)물질 생산능을 평가하여 발효식품용 중균으로서의 안전성을 확인하였다.
- 기초생리활성 및 기능성 평가를 통해 기능성 우수 중균으로 확인된 *Lactobacillus plantarum* Ln4에 대해서는 안전성 평가시스템을 통해 구축한 평가법을 이용하여 안전성 평가를 실시하였으며, *Lactobacillus plantarum* Ln4가 식품에 사용하기 적합한 안전성을 보유하고 있음을 확인하였다.

가. 식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축

- 식품원료, 식품첨가물 및 건강기능식품 등 식품분야에 사용되는 미생물의 안전성 평가와 관련한 국내·외 판단 기준, 식품산업용 미생물 인정현황, 법령과 규정, 안전성 확보를 위해 필요한 제출 자료와 그 범위 및 절차, 제출항목에 대한 실험법에 대한 정보를 식품의약품안전처, EFSA, FDA, 한국보건의료원 등 관련 기관에서 발행하는 법규, 가이드라인 및 연구보고서를 바탕으로 조사하였고, 실험법에 대한 구체적인 방법은 논문을 참고하였다. 이를 통해 식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축하였으며, 이에 대한 내용은 [식품산업용 균주의 안전성 평가시스템 구축] 별첨 보고서(117 페이지 분량)로 제출하였다.



안전성 평가법 구축 예시

나. 식품산업용 균주의 비의도적 유해물질 생산능 평가

- 식품산업용 균주의 안전성 평가와 관련하여 식약처에서 비의도적 유해물질로 지정하고 관리하고 있는 바이오제닉 아민(Biogenic amine, 이하 BA)과 에틸 카바메이트(ethyl carbamate, 이하 EC) 생산능 평가를 위한 실험법을 제시하였으며, 주관기관에서 1,2차 screening을 통해 확보한 우수활성 균주와 협동기관에서 보유한 종균에 대한 BA 및 EC 생산능을 측정하여 식품산업용 종균으로서의 안전성을 제시하였다.

(1) 발효식품내의 biogenic amine(BA) 규제 현황 및 BA 평가시스템 구축

(가) BA의 특성

- BA는 단백질이 많은 식품에 있는 아미노산이 미생물의 효소에 의해 아미노산 탈탄산 작용, 알데히드와 케톤의 아미노화, 아미노기 전이반응에 의해 생성되는 질소 유독 화합물이다. 미생물이나 동식물의 대사과정에서 합성되는데, 저분자량이며 살아있는 세포의 핵산작용의 조절, 단백질 합성 및 세포막의 안정성에 중요한 역할을 한다.
- 대표적인 BA의 종류는 다음과 같다. 푸트레신(putrescine)의 전구체는 오르니틴이고, 저혈압을 일으키며 맥박을 느리게 하며, 팔다리 마비를 일으킨다. 또한 히스타민 등 다른 아민들의 독성을 증가시키는 역할을 하기도 한다. 세포의 성장과 증식에 관여하며, 세포에 필수불가결한 구성성분이다.
- 카다베린(cadaverine)은 라이신(lysine)으로부터 형성되며 푸트레신처럼 저혈압 및 맥박을 느리게 할 수 있으며, 팔다리 마비를 일으킨다. 또한 히스타민 등 다른 아민들의 독성을 증가시킨다. 세포 성장 및 증식에 관여한다.
- 스퍼미딘(spermidine)은 아르기닌으로부터 생성되며, 다른 아민들의 독성을 증가시키는 역할을 한다. 세포 성장과 증식에 필수적이다.
- 스퍼민(spermine)도 스퍼미딘과 마찬가지로 아르기닌으로부터 형성되며 다른 아민들의 독성을 증가시키고, 세포 성장과 증식에 필수적이다.
- 히스타민(histamine)의 전구체는 히스티딘이다. 히스타민은 아드레날린과 노르아드레날린을 유리시킨다. 자궁 및 소장, 기도 등의 평활근을 자극하며, 감각 신경과 운동신경을 자극하는 역할을 하기도 한다. 또한, 위산분비 조절에 관여한다. 신경체계와 혈압조절에 관여하여 인체 대사에 중요한 역할을 한다. 알레르기 반응에서도 중요한 역할을 한다. 히스타민은 고등어, 꽁치, 정어리, 참치 등을 비위생적으로 보관하여 부패할 때 생성되는 것으로 알려져 있다. 히스타민은 신경계나 혈관계에 악영향을 주어 히스타민 중독을 야기하기도 한다.
- 트립토판의 분해에 의해서 형성되는 트립타민(tryptamine)은 멜라토닌의 전구체의 역할을 하기도 하고 항우울 효과가 있기도 하다. 혈압상승을 일으킨다.

- 베타-페닐에틸아민(β -phenylethylamine)의 전구체는 페닐알라닌이다. 약리작용으로는 교감신경계에서 노르아드레날린을 방출하는 역할을 하고, 혈압상승 및 편두통을 야기하기도 한다.
- 티라민(tyramine)은 타이로신(tyrosine)에서 생성되며 말초혈관 수축 및 심장박출량 증가에 중요한 역할을 한다. 또한 호흡 증가, 혈당수치 증가, 교감신경계에서 노르아드레날린 방출을 일으키기도 한다. 편두통을 야기한다. 신경계나 혈관계에 영향을 주어 티라민 중독을 일으키기도 한다.
- 세로토닌(serotonin)의 전구체는 히드록시트립토판(hydroxytryptophane)이다. 세로토닌은 중요한 신경전달물질로 알려져 있고, 혈관 수축에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- 노르아드레날린(noradrenaline)은 티로신으로부터 생성되며 신경전달물질로 알려져 있다. 심장이 한번 수축할 때마다 뿜어내는 혈액의 양인 심장박출량이 증가하고, 혈압을 상승시키는 역할을 한다.
- 도파민(dopamine)은 티로신을 전구체로 하는 신경전달물질로 내인성 노르에피네프린 방출에 중요한 역할을 하고, 혈압상승을 일으킨다.
- 아그마틴(armatine)은 아르기닌으로부터 형성되는 바이오제닉 아민으로 NO(nitric oxide)의 생성을 억제하고, 펩티드 호르몬 유리를 촉진시키는 기능을 한다. 히스타민의 산화를 억제하여 인체에 히스타민 독성을 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- BA 중 푸트레신, 카다베린, 스퍼민, 스퍼민, 히스타민, 트립타민, 베타-페닐에틸아민, 티라민, 세로토닌, 노르아드레날린, 도파민, 아그마틴은 식품의 신선도와 부패의 척도로서도 중요한 역할을 한다.

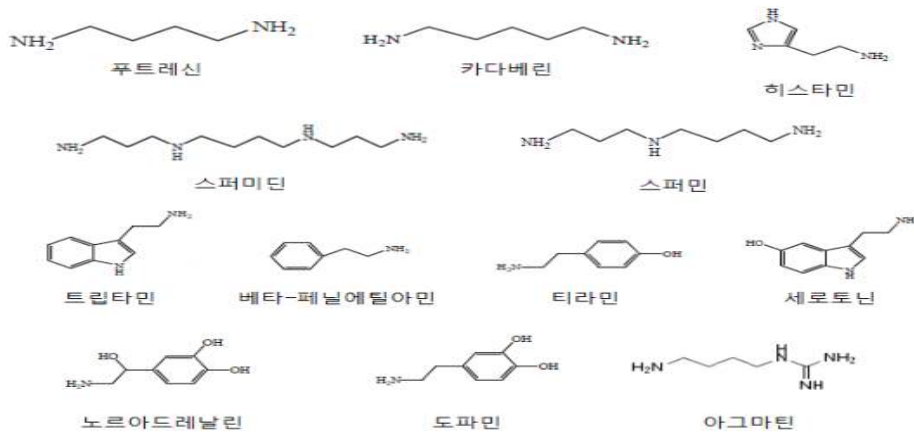


Figure 2-45. 대표적 BA의 구조(출처: 식약처, 2016).

(나) BA의 규제 현황

- 대부분의 나라에서는 어류 및 어류발효제품에 대한 히스타민과 티라민의 함량만을 규제하고 있다.

- 국내의 경우 발효식품에 대한 규제가 없이, BA를 ‘식품 중 비의도적 유해물질’로 지정하고, 발효식품 등을 대상으로 지속적인 모니터링 및 저감화 사업 실시하였으나, 최근 다랑어류에 한하여 히스타민을 200 mg/kg 이하로 제한하기로 하였다(고시일 2015. 02. 03.). 2005년 식품의약품안전처에서 실시한 모니터링 결과 멸치통조림과 마른멸치에서 히스타민 농도가 각각 131.8 mg/kg과 13.8 mg/kg이 검출되었으며, 2007년에는 멸치에서 최고 70.1 mg/kg과 고등어 통조림에서 16.5 mg/kg의 히스타민이 검출되었다. 2009년에는 히스타민 모니터링에서 시판 콩치와 과메기에서 33~124 mg/kg, 삼치에서 최고 45.5 mg/kg의 히스타민이 검출되었다.
- 미국의 FDA는 참치와 마히마히 또는 그와 관련된 어종에서 500 mg/kg 이하로 기준을 설정해 놓고 있다. 검사하고자 하는 생선에서 히스타민이 균일하게 존재하지 않을 것임으로 50 mg/kg을 결함수준(defect action level: DAL)로 정하고 이 함량이 한곳에서 넘으면 다른 곳에서도 500 mg/kg를 초과할 가능성이 높은 것으로 보고 있다.
- 유럽에서는 히스타민의 경우 고등어과, 청어과, 멸치과 및 민새기과 어종을 대상으로 9개의 검체를 채취하여 평균을 내었을 때 그 평균이 100 mg/kg을 초과하지 말아야 하고, 모든 검체는 200 mg/kg을 초과하지 않도록 규제하고 있다.
- 뉴질랜드는 어류 및 어류관련제품에서 히스타민의 양이 200 mg/kg 이하로 규정하고 있다.
- 캐나다의 경우는 엔초비, 발효된 생선소스 및 페이스트에서 히스타민의 농도를 200 mg/kg 이하로 규정하고 있으며, 다른 생선제품이나 생선자체에 대해서는 100 mg/kg 이하로 규정하고 있다.
- 일본에서는 식물 발효 식품과 관련하여 히스타민 및 티라민의 불검출을 원칙으로 하고 있다.

Table 2-12. 바이오제닉 아민에 대한 국제 규격

Country	Regulation	Notification date
South Korea	Histamine: 200 mg/kg 이하(다랑어류에 한함)	식품공전 (고시일 2015. 02. 03)
Japan	Histamine, tyramine: 불검출(식물발효 식품)	일본 건강영양식품협회(2003)
EU	Histamine: the mean value must not exceed 100 ppm, no sample may have a value exceeding 200 ppm (<i>Scombridae</i> and <i>Clupeidae</i>)	Official Journal of the European Communities (91/493/EEC, 1991. 07. 22.)
Canada	Histamine 20 mg/100 g(anchovies, fermented fish sauces & pastes), 10 mg/100 g(in other fish and fish products)	Health Canada (Date Modified: 2012. 06. 28)
USA	Histamine: 500 ppm(Tuna, mahi-mahi, and related fish), 50 ppm(DAL)	FDA(2011. 04.)

- 국내에서는 대표적인 발효식품들에서 바이오제닉 아민의 검출이 되어 이슈화 되었다. 2005년 식품의약품안전청은 한 해 동안 유통 중인 김치, 장류, 젓갈류 등의 전통발효 식품의 BA 함유량을 분석한 결과, 1.3~1127.6 mg/kg이 검출되었다고 2007년 2월 13일 발표했다. 구체적으로는 재래식 된장이 260.1~952.0 mg/kg, 간장 13.8~229.8 mg/kg, 멸치액젓 352.5~1127.6 mg/kg, 배추김치 3.4~142.3 mg/kg 등 BA를 함유하는 것으로 나타났다. 전통발효식품내의 BA양을 줄이려면 저온발효 및 보관 유통을 권고하고 있는 실정이다.
- 2009년에는 유럽에 수출되는 대상 청정원의 멸치액젓 제품에 히스타민 기준치 이상 검출돼 부적합 처리를 받았다. 유럽의 히스타민 기준이 검체당 200 mg/kg 이하인데 해당 제품의 경우 무려 602.7 mg/kg 검출돼 부적합 처리를 받았다. 이 제품은 비슷한 시기에 까나리액젓에서도 히스타민 546.7 mg/kg이 검출돼 부적합 처리를 받은 것으로 알려져 있다.
- BA가 발효방법의 개선을 통해 변화할 수 있다고 하나 대표적인 식품이고, 국민들이 많이 섭취하고 있는 식품이 발효식품이므로 국민 건강을 위해서 정확한 기준 및 규격을 정하고, 중소기업체들에게도 적용 가능한 BA 평가방법을 구축하는 것이 국민에게 안전한 식품을 제공하는 것이 장기적으로 필요하다고 할 수 있다.
- 단백질이나 유리아미노산을 함유하고 있는 식품은 미생물이나 식품 내 생화학적 활성이 BA에 큰 역할을 하므로 종균개발 단계에서 BA 생산능을 검증할 필요가 있으며, 배지상에서 생산된 BA와 실제 제품에서 생산되는 BA 함량간의 상관성 연구가 필요하다.

(다) BA 평가시스템 구축

① BA를 생산하는 decarboxylase gene을 이용하여 검출하는 방법

- BA를 생산하는 미생물을 선별하는 방법으로 실시간 유전자 증폭 정량분석 기술(real-time polymerase chain reaction method)을 적용하여 미생물의 특정 유전자를 증폭하여 선별한다. 이러한 유전자증폭기술 기반의 검출기술은 HPLC 등에 비해 많은 양의 시료를 신속하게 분석할 수 있는 장점이 있다. 하지만 BA의 양을 직접적으로 알 수 있는 방법이 아니므로, 균주 선별에는 용이하나, 식품의 BA 함량을 모니터링하기에는 부적합하다.
- Decarboxylase gene을 검출하는 방법은 다음과 같다. ① 선발미생물의 균체를 취하고 멸균된 생리 식염수에 균체를 2회 세척한 후, DNeasy tissue kit을 사용하여 DNA를 추출한다. ② PCR 증폭에 사용할 primer는 histidine decarboxylase(hdc)와 tyrosine decarboxylase(tdc) gene을 이용하며 primer는 다음과 같다.

Table 2-13. Histidine decarboxylase(hdc)와 tyrosine decarboxylase(tdc) gene의 PCR 증폭을 위한 프라이머

Gene	Primer	Sequence(5' to 3')	TM(°C)
hdc	HDC3-F HDC4-R	GAT GGT ATT GTT TCK TAT GA CAA ACA CCA GCA TCT TC	48
tdc	TD2-F TD5-R	CAA ATG GAA GAA GAA GTA GG ACA TAG TCA ACC ATR TTG AA	48

- PCR 반응은 95°C에서 5분(initial denaturation), 95°C에서 45초(denaturation), hdc gene과 tdc gene 검출을 위한 annealing 온도는 각각 52°C와 48°C에서 45초, 72°C에서 2분(extension)을 35 cycles 실시한다. ③ Positive control의 경우 탈탄산효소 활성이 빠른 시간에 양성반응을 나타내는 균주를 선발하여 비교하고, negative control은 배양에 사용한 배지를 이용한다. ④ PCR product는 2% agarose gel상에서 전기영동을 수행하여 DNA band를 확인한다.

② Decarboxylase 효소의 활성을 측정하는 방법

- Biogenic amine은 아미노산의 decarboxylation에 의해 생성되므로, 미생물의 decarboxylase 효소의 활성을 측정하는 것으로 BA생성 유무를 확인 할 수 있다. 이러한 탈탄산효소 활성측정은 Bover-cid와 Holzapfel의 방법을 바탕으로 측정 가능하다. ① 미생물을 decarboxylase medium(0.5% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% meat extract, 0.25% sodium chloride, 0.05% glucose, 0.1% Tween 80, 0.02% MgSO₄, 0.005% MnSO₄, 0.004% FeSO₄, 0.2% ammonium citrate, 0.001% thiamine, 0.2% K₂PO₄, 0.01% CaCO₃, 0.005% pyridoxal-5-phosphate, 0.4% amino acid(L-lysine, L-histidine, L-ornithine, L-tyrosine, L-arginine), 0.006% bromocresol purple, pH 5.3)집중하여 37°C에서 배양한다. ② 배양시간 24시간에서 72시간까지 12시간 간격으로 배지색깔의 변화를 관찰하여 노란색으로 변하면 음성, 보라색으로 변하면 양성으로 표시한다. ③ 이때의 색을 관찰하여 biogenic amine의 생성 여부를 판별한다.

③ HPLC를 이용한 분석법

- HPLC 분석을 위해서는 전통적으로 dansylchloride를 적용한 유도체화 방법이 많이 사용되었다. dansylchloride를 이용하여 HPLC로 BA를 분석하는 방법은 다음과 같다.
- ① 우선 고체시료와 액체시료에 대해 0.1 M HCl을 처리하여 아민류가 잘 추출되도록 homogenization을 실시한다. ② 원심분리를 통하여 침전물을 제거한 상등액을 취하여 내부 표준물질과 dansylchloride를 넣어 유도체화 한다. ③ 수용성이 높은 BA들이 dansyl기로 유도체화될 경우 지용성으로 화학적 특성이 바뀌게 되어 용매인 diethylether를 통하여 분액할 때 유도체화된 바이오제닉 아민들이 분리정제 되게 된다. ④ 정제된

시료는 C₁₈ 역상칼럼이 장착된 UPLC를 통하여 50% acetonitrile과 순수한 acetonitrile을 사용한 gradient 조건에서 13분간 running시켜 10가지 BA(agmatin, tryptamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, serotonin, tyramine, spermidine, spermine)의 크로마토그램 피크를 확인할 수 있게 한다. ⑤ 내부 표준물질로는 1,7-diaminoheptane을 사용할 수 있고, agmatine을 제외한 나머지 바이오제닉 아민은 UV 흡광을 통하여 225 nm에서 정량 분석한다. ⑥ Agmatine 정량분석용 형광 검출기를 이용하여 excitation 325 nm와 emission 525 nm로 설정하여 정량한다.

- 이 방법으로 분석 가능한 BA 중에서 putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, phenylethylamine만이 유해성과 관련된 것으로 보고되었으며, 나머지 바이오제닉 아민들은 유해성과 관련한 결과가 보고된 바가 없다.
- HPLC 분석법에 앞서, LB broth등으로 발효한 경우 전처리 방법은 다음과 같다. ① 24시간 배양한 배양액을(9,950×g)의 속도로 4℃에서 15분간 원심분리한다. ② 상등액을 취하여 0.2 μm 구멍의 크기의 필터를 이용하여 여과 후, 동결건조한다. ③ 동결건조된 샘플은 10배 농축된 농도로 증류수에 녹여준다. 농축된 샘플 2 mL에 5% 트리클로로아세트산-0.4 M 과염소산 10 mL과 0.2 mg의 1,7-디아미노헵탄을 내부표준물질로 첨가하여 준다. ④ 샘플을 vortex를 이용하여 10분간 잘 섞어준 후, 염화벤조일을 이용하여 추출한다. ⑤ 유도체된 잔여물을 50% 메탄올에 용해하여, 이 샘플을 HPLC에 주입하여 분석한다.

④ ELISA를 이용한 histamine 신속 검출방법

- 히스타민의 신속 검출을 위해 ELISA를 쓰는 방법도 현재 개발되어 있다. 이는 히스타민 특이 항체를 이용하는 ELISA 방법이다. ELISA kit에서 histamine 정량을 위해 항체에 고정화된 peroxidase와 발색기질간의 효소반응을 이용한다. 분석할 발효식품에 따라 pH 등 고려하여야 할 것이 있지만, 대략적인 방법은 다음과 같다. ① 시료 5 g을 물 25 mL과 혼합한 후 30분간 인큐베이션하고 BA를 추출한 후, 3,000×g에서 10분동안 원심분리한다. ② 원심분리과정에서 고형분을 침전시키고, 상등액을 회수한다. ③ 1차 추출 후 남은 고형분에 20 mL의 물을 추가로 넣어 혼합한 후 2차 추출을 동일한 방법으로 진행한다. ④ 1,2차 추출액을 합친 후, 3000×g에서 10분 동안 다시 원심분리한 후에 상등액을 취해 90 μm 필터 페이퍼로 필터링을 실시한다. ⑤ 이렇게 해서 얻어진 시료를 kit을 이용하여 측정한다.

(라) 주관 및 협동기관 제공 균주의 biogenic amine 생산능력 평가

- 상기 구축한 방법 중 decarboxylase 효소활성 측정법과 HPLC 및 GC/MS분석법을 이용하여 주관기관 기초생리활성 우수 균주와 협동기관에서 종균으로 사용하고 있는 균주를 제공받아 BA 생산능을 평가하였다.
- 실험법을 종합한 결과, 주관기관에서 제공한 22종 기초생리활성이 높은 균주 중 10종 균주(*Lactobacillus brevis* B151, *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus fermentum* K

CCM 200060, *Lactobacillus brevis* KCCM 200080, *Lactobacillus brevis* KCCM 200054, *Pediococcus pentosaceus* SC28, *Lactobacillus brevis* KCCM 200019, *Leuconostoc lactis* KCCM 202369, *Lactobacillus brevis* KCCM 202302 및 *Lactobacillus brevis* KCCM 202399)는 BA 생산 가능성이 있으므로 BA가 생성되기 쉬운 발효식품용 종균으로는 적합하지 않은 것으로 파악된다.

- 한편 협동기관에서 제공 발효식품 제조용 종균 4종은(*Aspergillus oryzae* 159-1, *Aspergillus oryzae* CF1001, *Aspergillus oryzae* 75-2, *Aspergillus luchuensis* CF1005)은 BA가 생성되지 않는 것으로 판단되어 발효식품 제조에 적합한 종균임을 확인할 수 있었다.

① 주관기관 및 협동기관 제공 우수 균주 목록

Table 2-14. 기초생리활성 및 프로바이오틱스 특성이 높은 균주 23종 수율 및 생산농도

No		균주명
주관기관 제공균주	1차년도 선별균주	1 <i>Lactobacillus brevis</i> B151
		2 <i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 200060
		3 <i>Lactobacillus plantarum</i> G72
		4 <i>Lactobacillus plantarum</i> Ln4
		5 <i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41
		6 <i>Lactobacillus brevis</i> G1
		7 <i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200080
		8 <i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200054
		9 <i>Leuconostoc citreum</i> S.Pum19
		10 <i>Pediococcus pentosaceus</i> SC28
		11 <i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200019
	2차년도 선별균주	1 <i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202302
		2 <i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202399
		3 <i>Lactobacillus buchneri</i> KCCM 200793
		4 <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 202303
		5 <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200650
		6 <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200655
		7 <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200656
		8 <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200661
		9 <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200693
		10 <i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202361
		11 <i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202369
충무발효 제공균주	1 <i>Aspergillus oryzae</i> 159-1	
	2 <i>Asoergukkys ozyzae</i> CF1001	
	3 <i>Aspergillus Luchensis</i> CF1005	
	4 <i>Aspergillus oryzae</i> 175-2	

② Decarboxylase 효소 활성 측정법을 통한 생리활성 우수 균주의 BA 생산능 평가

- 상기 biogenic amine(BA)를 생성하는 균주를 스크리닝 하는 방법으로, BA는 아미노산의 decarboxylation에 의해 생성되므로, 미생물의 decarboxylase 효소의 활성을 측정하는 것으로 BA생성 유무를 확인할 수 있다. 이러한 탈탄산효소 활성 측정은 Bover-oid와 Holzapfel의 방법을 바탕으로 측정하였다. 사용한 균주는 주관기관에서 제공한 22종 균주이며, 충무발효에서 제공한 5종 곰팡이의 경우 decarboxylase 효소활성 측정법을 통해서 생산능 평가가 어렵기 때문에 GC/MS분석을 통한 생산능 평가만 진행하였다. 미생물을 MRS agar plate 활성화 시킨 후, 5 mL MRS broth에 계대 배양하여 overnight으로 배양하였다. 배양액 200 μ L를 decarboxylase medium(0.5% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% meat extract, 0.25% sodium chloride, 0.05% glucose, 0.1% Tween 80, 0.02% $MgSO_4$, 0.005% $MnSO_4$, 0.004% $FeSO_4$, 0.2% ammonium citrate, 0.001% thiamine, 0.2% K_2PO_4 , 0.01% $CaCO_3$, 0.005% pyridoxal-5-phosphate, 0.4% amino acid(L-lysine, L-histidine, L-ornithine, L-tyrosine, L-arginine), 0.006% bromocresol purple, pH 5.3)에 agar diffusion 방법으로 접종하여 37 $^{\circ}C$ 에서 배양하였다. 배양시간 24시간에서 72시간까지 12시간 간격으로 배지색깔의 변화를 관찰하여 노란색으로 변하면 음성, 보라색으로 변하면 양성으로 표시하였다.
- 실험결과, 관찰 72시간까지 아래와 같은 결과를 보였는데, 접종한 배지의 색이 변하지 않으면 음성으로 BA 미생균주로 판단하였고, 보라색으로 변하면 decarboxylase 효소의 활성을 가진 균주로 BA 생성 균주로 판별하였다.
- 1차년도 균주 중에서는 1, 2, 6, 7, 8, 9 및 11번 균주에서 BA를 생성함을 확인할 수 있었다. 생성 BA종류별로 살펴보면 L-ornithine(putrescine 전구체)을 첨가한 decarboxylase medium에서 1번으로 표시된 *Lactobacillus brevis* B151과 6번 *Lactobacillus brevis* G1 균주에서 약한 효소 활성 결과를 확인할 수 있었다. L-arginine(spermidine 전구체)가 첨가된 decarboxylase medium에서는 2번으로 표시된 *Lactobacillus fermentum* KCCM 200060, 7번 *Lactobacillus brevis* KCCM 200080, 8번 *Lactobacillus brevis* KCCM 200054, 10번 *Pediococcus pentosaceus* SC28, 11번 *Lactobacillus brevis* KCCM 200019 균주들에서 양성 결과를 확인하였으며, 2번과 11번의 균주 활성보다 7, 8, 9번 균주의 decarboxylase 효소의 활성이 강함을 확인할 수 있었다. L-lysine(cadaverine 전구체), L-histidine(histamine 전구체), L-tyrosine(tyramine 전구체), 첨가된 decarboxylase medium에서는 효소활성이 없음을 확인하였다.
- 따라서 1차년도 균주 중 *Lactobacillus brevis* B151, *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus fermentum* KCCM 200060, *Lactobacillus brevis* KCCM 200080, *Lactobacillus brevis* KCCM 200054, *Pediococcus pentosaceus* SC28, 및 *Lactobacillus brevis* KCCM 200019 균주는 BA 생성 가능성이 높은 균주로 판단되었다.
- 2차년도 균주 중에서는 2번과 11번 균주에서 BA가 생성됨을 확인할 수 있었는데, L-ornithine을 첨가한 decarboxylase medium에서는 사진에 11번으로 표시된 *Leuconostoc lactis* KCCM 202369 균주에서 효소활성 결과를 확인할 수 있었고, L-tyrosine과 L-arginine가 첨가된 decarboxylase medium에서는 2번으로 표시된 *Lactobacillus*

brevis KCCM 202399 균주에서 양성의 결과를 확인 할 수 있었다. L-lysine, L-histidine, 첨가된 decarboxylase medium에서는 효소활성이 없음을 확인하였다. 따라서 2차년도 선별 균주 중에는 *Leuconostoc lactis* KCCM, 202369 *Lactobacillus brevis* KCCM 202399 균주가 BA 생성 가능성이 높은 균주로 생각된다.

- 이상의 균주에 대해서는 HPLC 및 GC/MS분석을 통하여 BA 생성능을 한 번 더 확인하였다.

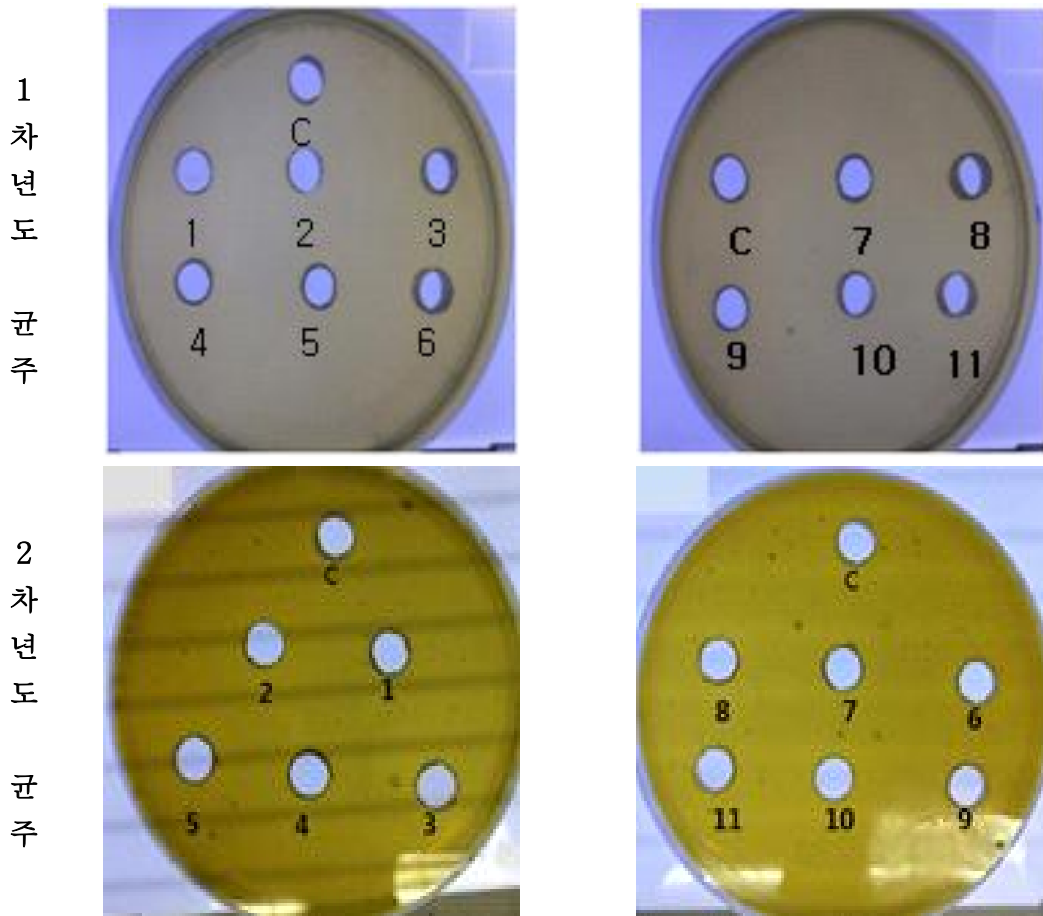
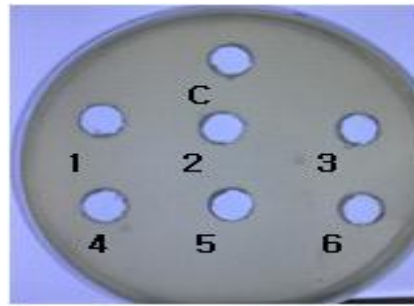
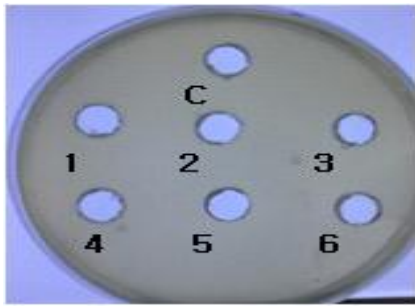


Figure 2-46. 주관기관 제공 생리활성 우수 균주의 cadaverine 생산능 확인.

1 차
년 도
균 주



2 차
년 도
균 주

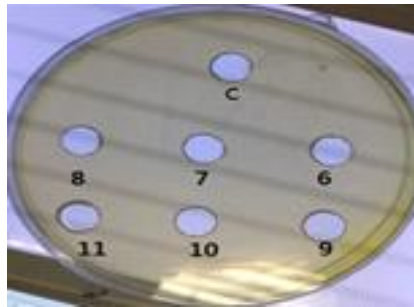
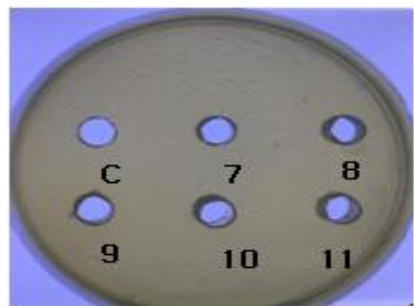
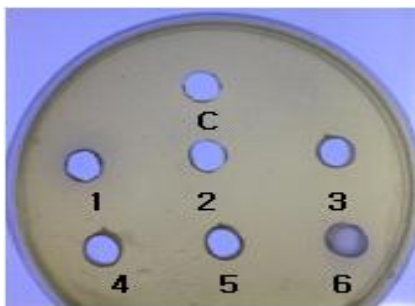


Figure 2-47. 주관기관 제공 생리활성 우수 균주의 histamine 생산능 확인.

1 차
년 도
균 주



2 차
년 도
균 주

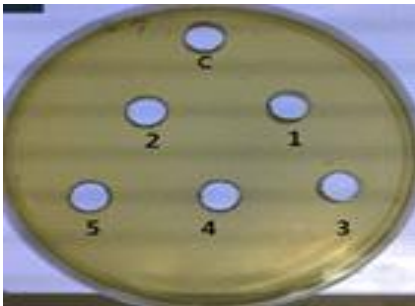


Figure 2-48. 주관기관 제공 생리활성 우수 균주의 putrescine 생산능 확인.

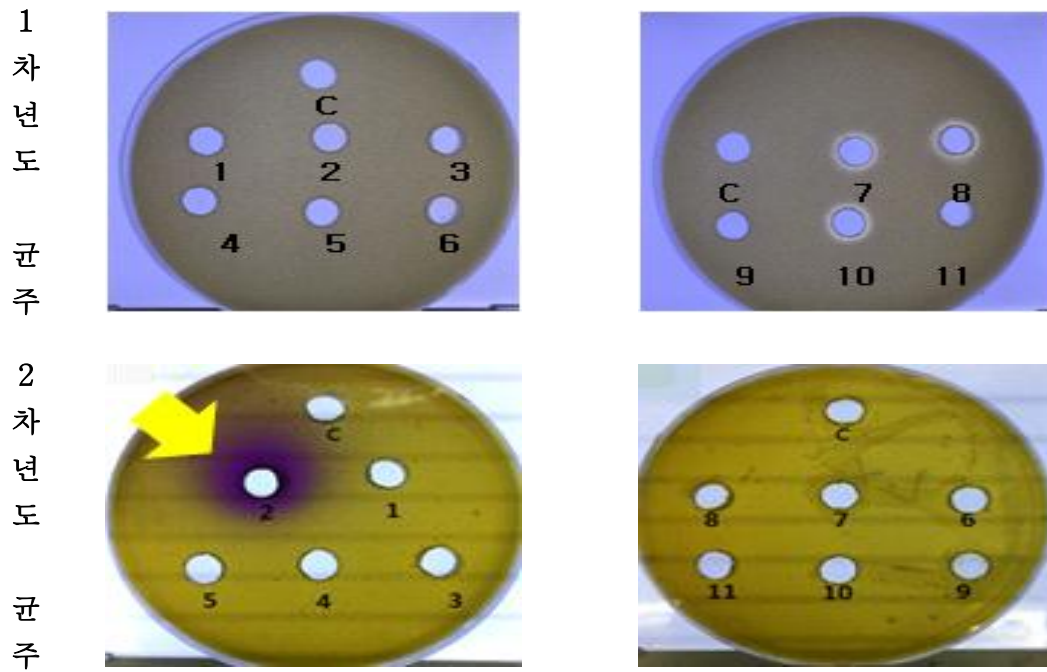


Figure 2-49. 주관기관 제공 생리활성 우수 균주의 tyrosine 생산능 확인.

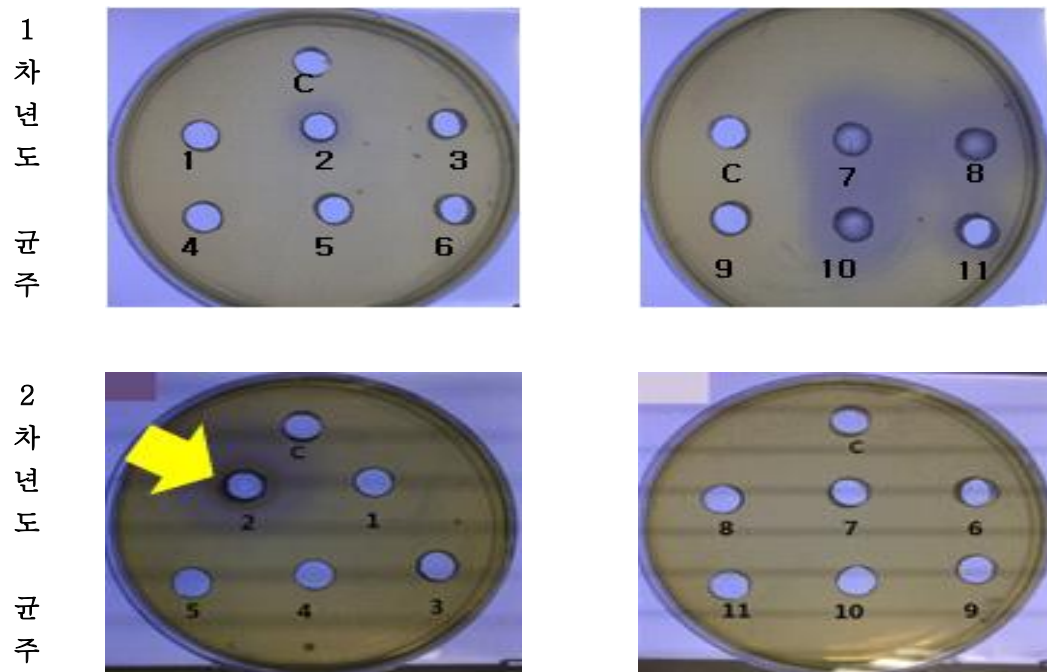


Figure 2-50. 주관기관 제공 생리활성 우수 균주의 spermine/spermidine 생산능 확인.

③ HPLC 및 GC/MS분석을 통한 생리활성 우수 균주의 BA 생산능 평가

- 1차년도에 선별한 균주를 대상으로 decarboxylase 효소의 활성 측정을 통한 실험에서 *Lactobacillus brevis* B151, *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus fermentum* KCCM 200060, *Lactobacillus brevis* KCCM 200080, *Lactobacillus brevis* KCCM 200054, *Pediococcus pentosaceus* SC28, 및 *Lactobacillus brevis* KCCM 200019 균주가 BA 생성 가능성이 높은 균주임이 확인되었으므로, 이들의 BA 생성능을 HPLC분석을 통해 판별하였다.
- HPLC분석을 위해 spermine, phenylethylamine, methylamine, putrecine, histamine, tyramine에 대한 표준품 분석 수행하였다.

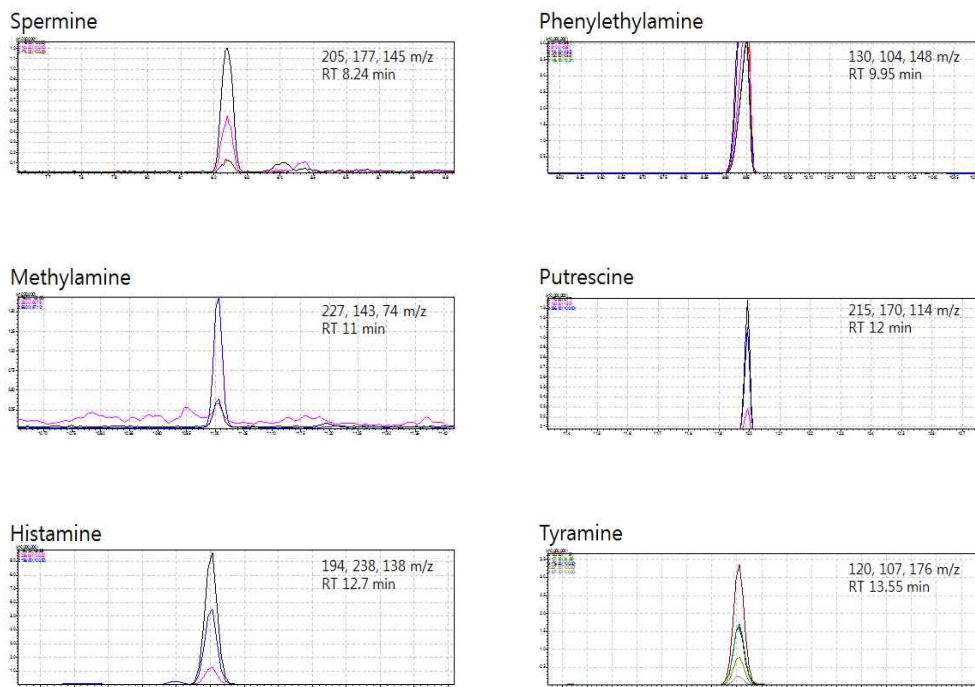


Figure 2-51. Spermine, phenylethylamine, methylamine, putrecine, histamine, tyramine 표준품 분석 결과.

- 표준품 분석 결과를 바탕으로 *Lactobacillus brevis* B151(GK1), *Lactobacillus brevis* G1(GK6), *Lactobacillus fermentum* KCCM 200060(GK2), *Lactobacillus brevis* KCCM 200080(GK7), *Lactobacillus brevis* KCCM 200054(GK8), *Pediococcus pentosaceus* SC28(GK10), 및 *Lactobacillus brevis* KCCM 200019(GK11)의 spermine, phenylethylamine, methylamine, putrescine, histamine 및 tyramine 분석 유무를 평가한 결과, Table 2-15와 Figure 2-52~58에서 제시한 바와 같이 decarboxylase 활성 측정법에 서 BA를 생성하는 것으로 확인된 7종 균주 모두(Figure 2-46~50)에서 BA가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

Table 2-15. HPLC를 이용한 주관기관 제공 1차년도 기초생리활성 우수 종균의 바이오제닉 아민 생성능 평가

균주 종류	생성 바이오제닉 아민
<i>Lactobacillus brevis</i> B151(GK1)	Histamine, methylamine, putrescine, spermine, phenylethylamine
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 200060(GK2)	Methylamine, spermine, phenylethylamine
<i>Lactobacillus brevis</i> G1(GK6)	Methylamine, spermine, phenylethylamine, histamine
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200080(GK7)	Tyramine, methylamine, spermine, phenylethylamine
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200054(GK8)	Tyramine, methylamine, spermine, phenylethylamine
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC28(GK10)	Methylamine, spermine
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200019(GK11)	Tyramine, methylamine, spermine, phenylethylamine

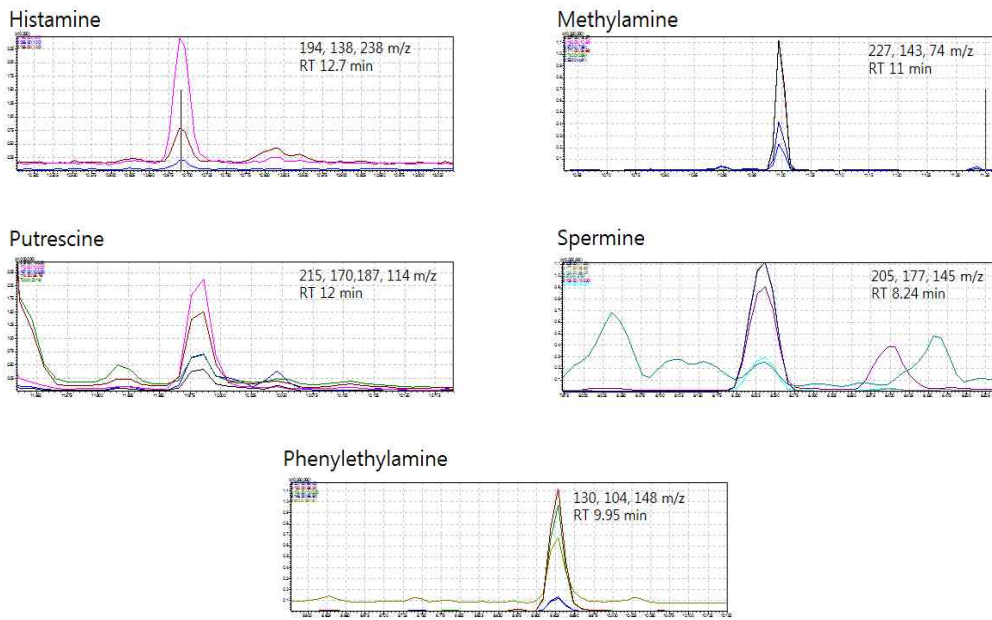


Figure 2-52. *Lactobacillus brevis* B151(GK1)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

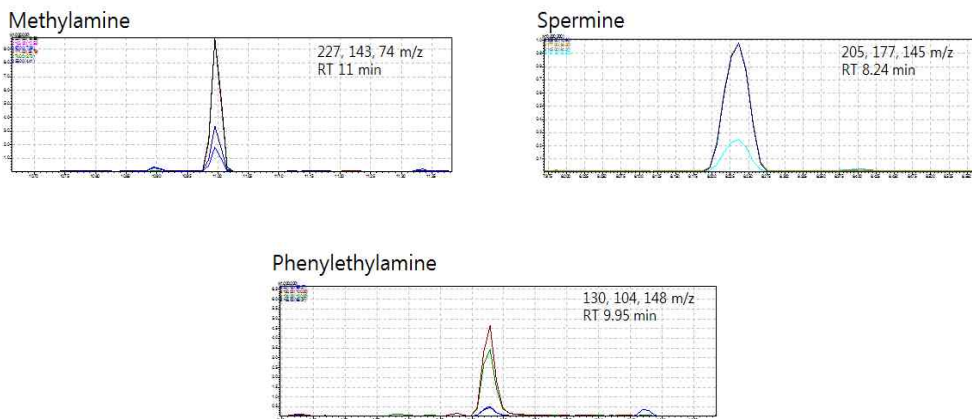


Figure 2-53. *Lactobacillus fermentum* KCCM 200060(GK2)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

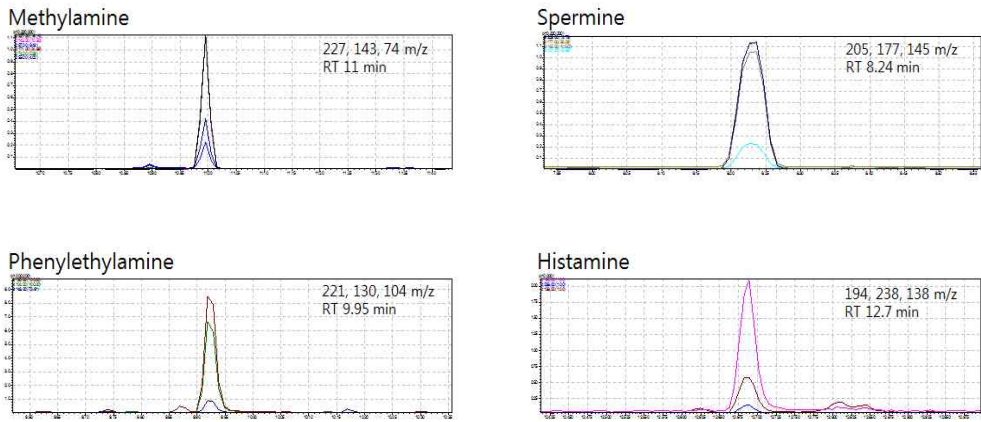


Figure 2-54. *Lactobacillus brevis* G1(GK6)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

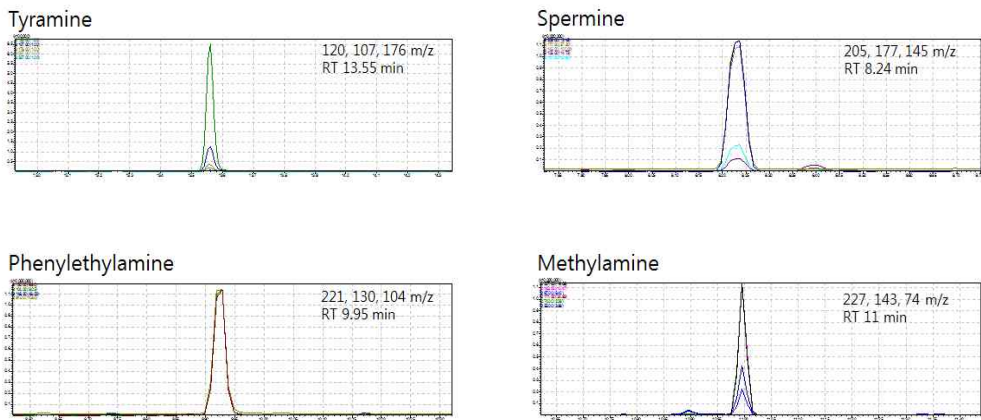


Figure 2-55. *Lactobacillus brevis* KCCM 200080(GK7)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

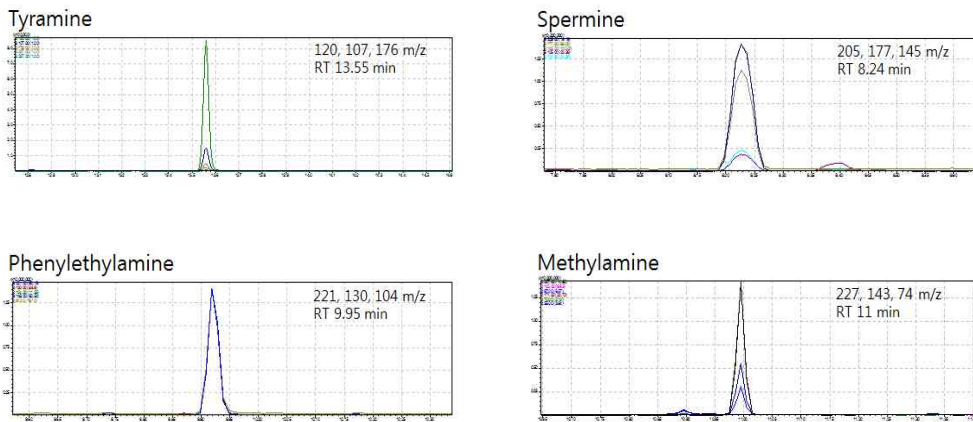


Figure 2-56. *Lactobacillus brevis* KCCM 200054(GK8)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

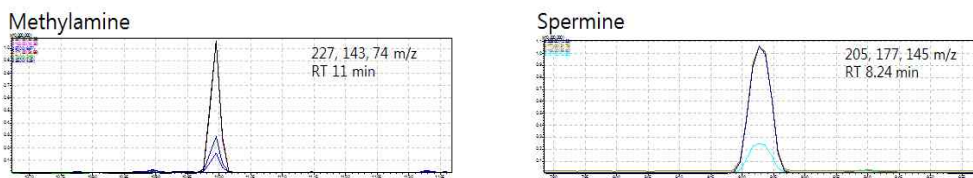


Figure 2-57. *Pediococcus pentosaceus* SC28(GK10)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

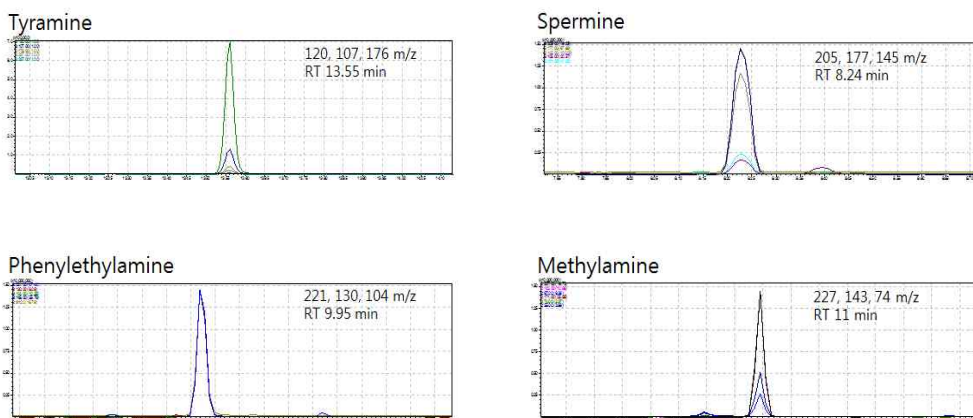


Figure 2-58. *Lactobacillus brevis* KCCM 200019(GK11)의 바이오제닉 아민 생성능 측정 결과.

- 주관기관에서 제공한 2차년도에 선별한 균주와 협동기관 충무발효에서 제공한 곰팡이를 대상으로 GC/MS분석을 실시하였다.
- 바이오제닉 아민 분석을 위한 시료 전처리는 다음과 같이 수행하였다. Sample 2 mL에 toluene 2 mL을 넣어 섞어준 후 0.5 M phosphate buffer(pH 12) 1 mL과 유도체 시약 IBCF(isobutyl chloroformate) 25 µL을 넣어 vortexing하여 잘 섞어준 후 10분 동안 shaking시키고, 3,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 아민 중 tyramine은 toluene 총 600 µL을 따내어 speed vac으로 건조 후 toluene 70 µL로 다시 녹여 GC/MS로 분석하였다. 나머지 아민들은 원심분리 되어진 toluene 상층액을 1.2 mL 따내고 alkaline MeOH 1.2 mL 첨가 후 5분간 shaking 한 다음 5 M NaOH 3.6 mL을 넣어 섞어준 후 5분 동안 shaking한 후 3,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 toluene층을 800 µL를 따내어 speed vac으로 건조 후 다시 toluene 100 µL로 녹여준 후 GC/MS로 분석하였다. 본 분석에 사용된 표준물질은 histamine, tryptamine, cadaverine, putrescine, phenethylamine, isopentylamine, tyramine 7종이며, 표준물질도 동일한 방법으로 분석하였다.

Table 2-16. 주관기관 및 협동기관 제공 균주의 바이오제닉 아민 생성능 분석을 위한 GC/MS 분석 조건

분석장비	<ul style="list-style-type: none"> • GC-20010 Plus, GCMS-TQ 8030(Shimazu, Tokyo, Japan)
GC조건	<ul style="list-style-type: none"> • Inject volume: 1 µL • Column: DB-5 column(30 mm×0.25 mm id, 0.25 um film thickness; J &W Scientific, Santa Clara, CA., U.S.A) • Column oven temp: 100°C • Injection temp: 230°C • Column flow: 0.87 mL/min • Carrier gas: Helium • Analyzed method: 100°C for 1 min, increased to 160°C at 10°C/min, increased to 280°C at 25°C/min, and then held at 280°C for 12 min.
MS조건	<ul style="list-style-type: none"> • MRM mode • Ion source temp: 230°C • Interface temp: 280°C • Detector voltage: 0.1 kV • Event time 0.03 s, 15 ev

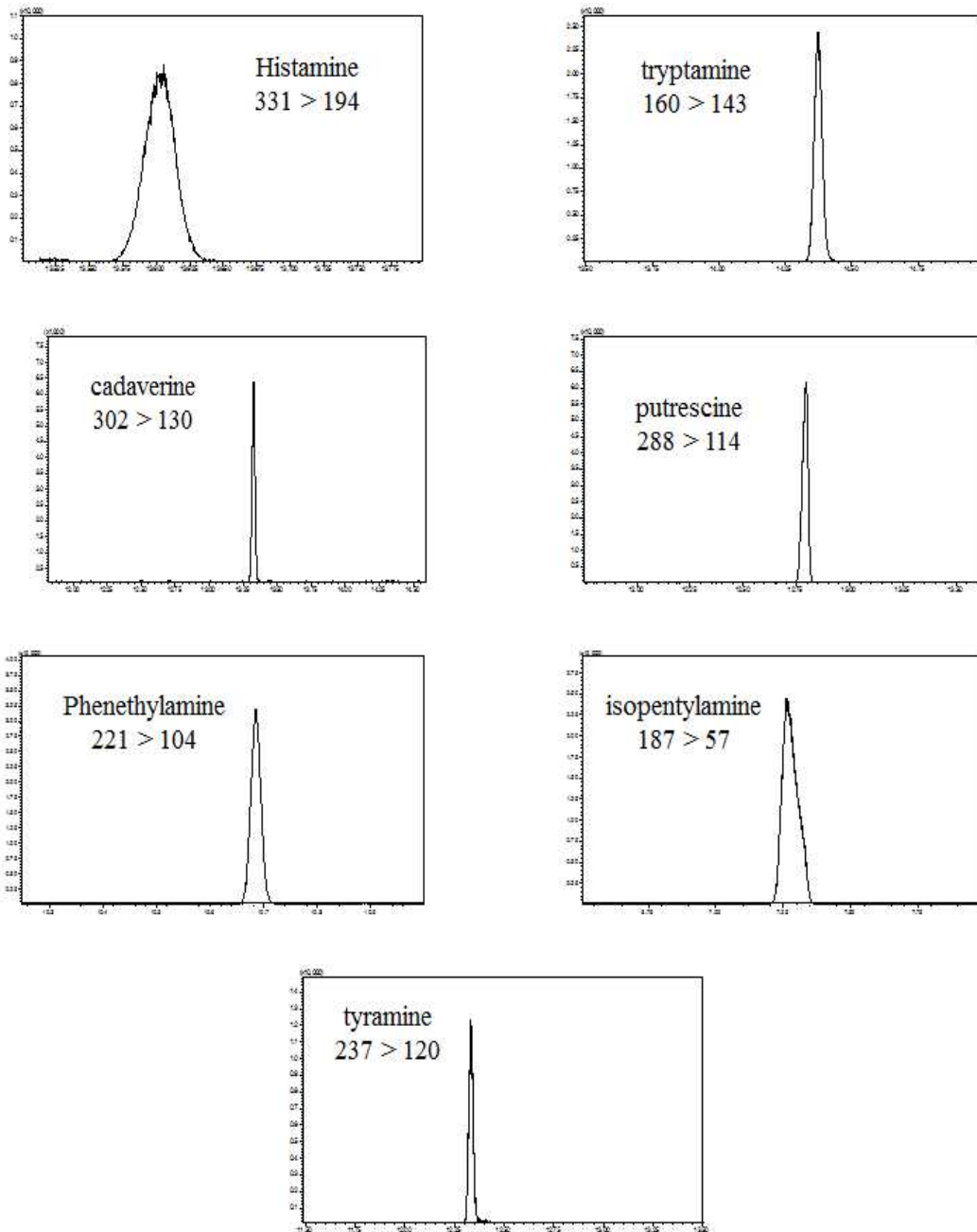


Figure 2-59. Spermine, phenylethylamine, methylamine, putrescine, histamine, tyramine 표준품 분석 결과.

- GC/MS분석을 통해 2차년도에 주관기관에서 제공한 11종 기초생리활성이 높은 균주 중 *Leuconostoc lactis* KCCM 202369는 tryptamine, phenylethylamine 및 tyramine을 *Lactobacillus brevis* KCCM 202302는 histamine, putresine 및 cadaverine을 *Lactobacillus brevis* KCCM 202399는 phenylethylamine과 tyramine을 과량 생성함을 확인하였다. 따라서 이들 균주는 발효식품용 종균으로는 적합하지 않은 것으로 파악된다.
- 한편 협동기관인 충무발효에서 제공한 발효식품 제조용 종균 4종에 대한 바이오제닉 아민 생성능을 분석한 결과, *Aspergillus oryzae* 159-1, *Aspergillus oryzae* CF1001, *Aspergillus oryzae* 75-2는 균주를 접종하지 않은 PDB 배지에서 검출된 BA보다 적은 양의 BA가 검출되어 이들 균주는 BA를 생성하지 않는 안전한 균주로 종균으로 이용하기 적합함을 확인하였다. *Aspergillus luchuensis* CF1005의 경우 histamine, phenylethylamine, tyramine, putresine, isopentylamine, cadaverine은 검출되지 않았으나, tryptamine이 균주를 접종하지 않은 PDB 배지에서 검출된 함량인 2.879보다 약간 높은 3.138 µg/mL이 검출되었다. 하지만 매우 소량 검출된 것으로 *Aspergillus luchuensis* CF1005 역시 발효식품용 종균으로 사용하기에 무리가 없는 것으로 판단된다.

Table 2-17. 주관기관 및 협동기관 제공 균주의 바이오제닉 아민 생성능 측정결과

Strain	Histamine (ng/mL)	Tryptamine (ng/mL)	Phenylethylamine (ng/mL)	Tyramine (ng/mL)	Putresine (ng/mL)	Isopentylamine (ng/mL)	Cadaverine (ng/mL)
<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202369	0.910	82.616	199.610	9.983	0.614	0.429	0.832
<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 202361	6.600	16.927	106.831	10.017	0.185	0.336	0.193
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200656	1.221	37.339	116.797	11.982	0.140	0.332	0.148
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200693	0.484	22.410	81.090	10.508	0.120	0.302	0.091
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM	0.212	18.834	118.324	10.559	0.082	0.385	0.060

200650							
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 202303	0.513	15.421	86.266	10.339	0.119	0.283	0.082
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200655	0.248	20.310	90.262	17.267	0.099	0.302	0.064
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200661	1.319	31.271	99.068	10.881	0.136	0.289	0.144
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202302	110.319	45.720	172.646	9.678	358.233	00.587	75.371
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202399	2.371	45.923	1973.220	242.790	0.518	00.549	0.702
<i>Lactobacillus buchnri</i> KCCM 200793	0.211	14.618	93.191	9.441	0.084	0.307	0.059
MRS	7.510	54.952	171.161	9.509	1.065	0.368	1.598
<i>Aspergillus oryzae</i> 159-1	0.000	0.000	9.736	5.246	0.067	0.062	0.025
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1001	0.000	0.000	8.712	5.415	0.035	0.050	0.021
<i>Aspergillus luchuensis</i> CF1005	0.000	3.138	9.158	9.455	0.066	0.055	0.024
<i>Aspergillus oryzae</i> 75-2	0.000	0.290	9.361	7.168	0.058	0.057	0.027
PDB	0.000	2.876	9.619	11.123	0.047	0.060	0.030

(2) 주류의 에틸 카바메이트(ethyl carbamate, 이하 EC) 규제 현황 및 EC 평가시스템 구축

(가) EC의 특성

- EC는 와인, 맥주, 위스키, 과일주, 리큐류와 같은 주류 및 빵, 요구르트, 빵 등의 발효 식품에서 자연적 혹은 저장 숙성과정에서 발생하는 물질이다. 이는 임상이나 실험동물에서 마취제로 사용되기도 하며, 가공식품의 생산 및 저장시 식품 내에 존재하는 hydrocyanic acid, urea, 에탄올 등이 EC의 전구체가 될 수 있다.
- EC는 미국에서 상용적으로 생산되어 왔으며, antineoplastic agent와 다른 의약용으로 사용되어왔는데 1943년에 EC의 발암성이 동물실험으로 입증되었으며 그 사용이 중단되었다. 1970년대 초기 식품 및 주류의 EC 함유가 확인되었다. 1980년대 중반에 주류에 광범위하게 함유되어 있는 EC가 확인되었다. EC의 발암성이 확인된 이후에 미국 FDA에서 의약용 용도로의 사용이 제한되었다. 2007년 IARC에 의해서 Group 2A carcinogen으로 격상되었다. EC는 작은 양을 사용하여 실험동물에서 마취제로 쓰이고 있는데, 실험동물에서의 유전독성 및 여러 세포에 대한 발암성이 확인되어 인체에도 발암가능물질로 보고되고 있다. 이로 인해서 유럽연합을 비롯한 선진국들에서 EC의 인체 위해성에 대한 연구를 수행하고 있다.
- 2005년에 개최된 제 64차 JECFA 회의에서 EC가 rat와 mouse에서 유전독성물질 및 다장기 발암물질로 평가되었다. BMDL(bench mark dose, level: 유해영향 발생이 일정 비율 나타날 것으로 예측되는 통계적 산출용량)을 0.3~0.5 mg/kg·bw/day로 설정하였다. 알코올음료를 제외한 식품에서의 노출량은 미미하여 고농도로 검출되는 알코올음료에서는 EC 저감화를 추진하여 식품 중 노출을 최소화할 것을 권고 하고 있다. EC의 체내 대사과정은 세 가지로 요약될 수 있다. 에스터라아제와 같은 효소와 반응에 의해 에탄올, 이산화탄소, 암모니아와 같은 생성물이 형성되는 가수분해 과정, cytochrome p450에 의해 대사되어, N-hydroxycarbamate, a-hydroxy ethyl carbamate, vinyl carbamate와 같은 산물을 만드는 수화 및 산화 과정으로 나뉜다. 이중에 vinyl carbamate는 산화되어 vinyl carbamate epoxide를 형성하는데 이것이 유전자나 단백질과 반응하여 EC 발암성의 원인이 되는 것으로 추정되고 있다.

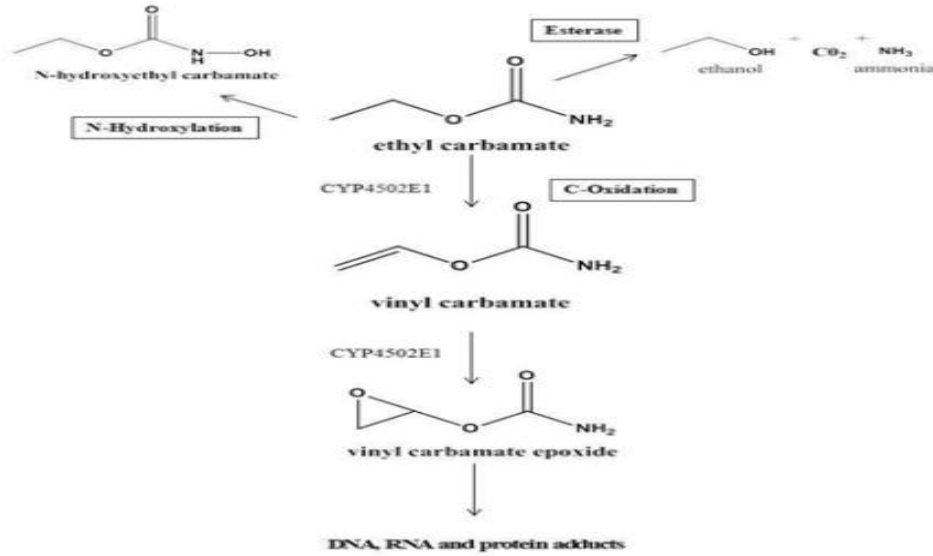


Figure 2-60. EC의 체내 대사과정(출처: The EFSA Journal 551:1-44, 2007).

(나) 주류 내 EC 국내·외 규제 현황

- 국제적 규제의 시초는 1986년 캐나다 정부에서 유통 중인 주류에서 EC 함량을 조사한 결과 핵과(자두, 복숭아, 체리 등)를 원료로 한 과실주에서 EC가 높게 검출됨을 언론에 발표하면서이다. 이로서 캐나다는 현재 여러 선진국 중에 EC에 대한 규제가 가장 강력한 국가가 되었다. 캐나다 정부의 경우는 와인 내 EC의 규제농도를 30 ppb로 규정하고 있으며, fortified wine은 100 ppb, 증류주는 150 ppb로 각각 규제하고 있다. 또한, 사케에서는 200 ppb 과일브랜디에서는 400 ppb로 규제하고 있다.
- 유럽은 EFSA를 중심으로 해서 EC의 분석법 개발 및 모니터링 그리고 발암성과 관련된 독성평가등을 지속적으로 진행하여 왔다. 유럽연합의 경우 통일된 EC 규제농도가 있는 것이 아닌 개개의 국가가 EC 규제농도를 가지고 있다. 체코의 경우 캐나다의 규제농도와 매우 유사하고, 프랑스는 증류주 150 ppb, 과일브랜디를 1000 ppb로 규제하고 있다. 독일은 과일브랜디의 경우만 800 ppb로 규제하고 있다. EU의 경우 과일브랜디 중 stone fruit spirit과 stone fruit marc spirit에 한해서는 1000 ppb 이하로 EC를 규제하고 있다.
- 미국은 1997년 FDA에서 포도주 제조시 EC 저감화를 위해 예방매뉴얼을 만들어 양조업자들이 자발적으로 참여하도록 권고하였고, 수입품의 경우에도 이 기준을 준수하도록 하고 있다.

- 국내의 경우는 모 언론의 수입 포도주에 상당량의 EC가 함유되어 있다는 보도에 의해서 식품의약품안전청에 의해 서둘러 허용기준을 정하였고, 2008년 1월 31일 포도주 30 ppb 이하로 규격기준을 만들 것을 입안예고(제 2008-25호)했으나 현재까지 시행되지는 않았다. 이는 EC가 유통 및 보관 중에 온도변화에 따라 달라질 수 있고, 이 허용기준을 모든 발효식품에 확대할 경우 한국식품의 특징인 발효식품 전반에 대한 불신을 소비자에게 가져다 줄 수 있다는 문제 제기에 의한 것으로 사료된다.

Table 2-18. 주류 내 EC 국외 규제 현황(식약처, 2011)

Country	Ethyl carbamate maximum levels(ppb)				
	Wine	Fortified wine	Distilled spirits	Sake	Fruit brandy
Canada/Czech Republic	30	100	150	200	400
Germany					800
Brazil			150		
EU					1000
France			150		1000
USA	15	60			

- EC의 발암가능성은 비록 실험동물에서 확인된 것으로 제한되어 있지만, 선진국을 중심으로 이에 대한 모니터링이 지속되고 있으며, 이에 대한 규제도 구축되어 있기 때문에 유럽이나 북미 지역 등의 수출 상품에 대해서는 EC의 제한이 필요할 것으로 사료된다.
- EC가 유통이나 보관 중의 관리방법에 의해서 함유량이 변화할 수 있다고 하나 국민 건강을 위해서 정확한 기준 및 규격을 정하여 국민에게 안전한 식품을 제공하는 것이 장기적으로 필요하다고 할 수 있다.
- 대표적인 전통식품이 발효식품이므로 지속적인 모니터링을 통해서 관리할 필요가 있고, 이를 통해 국민들이 안심하고 먹을 수 있는 환경을 조성할 필요가 있다.
- 주류의 경우 균주의 EC 생성능이 해당 주류의 EC 함유량과 매우 밀접한 관계를 가지고 있고, EC의 저감화를 위해서 균주 자체의 EC 생성능 억제가 자체가 중요하므로 균주의 EC 생산능을 평가하는 것이 중요하다.
- 발효식품에서 사용되는 균주에서도 균주의 EC 생산능력을 평가하여 EC가 저감화되어 있는 균주를 사용하는 것이 복잡한 식품 매트릭스에서 샘플을 준비하여 분석하는 것보다 효율적일 수 있고, 한꺼번에 여러 균주를 테스트 할 수 있는 이점도 있다.

(다) EC 평가시스템 구축

① 주류 제조용 효모의 EC 평가시스템 구축

- 주류 내 EC 함유량은 효모의 EC 생산능력이 중요한 원인이고 이는 효모가 생산해내는 알코올과 urea가 오랜 시간 높은 온도를 유지했을 때 생성되는 것으로 알려져 있으므로 효모의 urea 생성능과 EC의 생성능의 상관관계를 파악하는 것이 중요할 것으로 사료된다. 또한, EC의 측정을 위해서는 주류의 EC 함유량을 측정한다고 해도 복잡한 샘플준비과정을 요구되고, GC-MS라는 고가의 전문인력을 필요로 하는 장비가 필요하기 때문에 간단한 평가방법이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 효모 균주의 EC 생산능력을 평가하기 위하여 GC-MS를 이용하여 EC를 평가하는 방법을 구축하고 더불어 효모의 urea 생산능력이 배지 내 EC의 생성과 어떻게 연관되는지를 파악하여 EC 저감화 주류 제조용 효모 선별에 활용 가능한 urea 생산능 측정을 통한 간접적인 EC 측정법을 제시하였다.

② Urea 평가시스템 구축

- 균주의 EC 생성능을 측정하기 위해 배지조성은 제한배지인 yeast synthetic media(glucose 180 g/L, arginine 1 g/L)를 사용하였다. 사용 균주는 한국식품연구원 보유 21개의 효모 균주와 lab strain인 BY 4742 strain을 사용하였다.
- 제한 배지(SCD 180 g/L)에 1% 아르기닌을 첨가하여 30℃, 100 rpm에서 26시간동안 발효를 진행하였다.
- Urea의 lab strain인 BY4742와 주류산업용 효모 21종에 대하여 배지 내의 urea양을 측정하였다.
- 첨가된 urease와 배지 내 urea의 반응에 의해 pH가 변화하는 colorimetric assay를 통해 효모에 의해 생성된 urea양 측정하였다.
- 측정결과 urea의 양이 두드러지는 균주가 5, 11, 18번인 것으로 확인되었으며, 그 이외의 균주는 0.05 mM/100 mL 이하인 것으로 확인되었다.

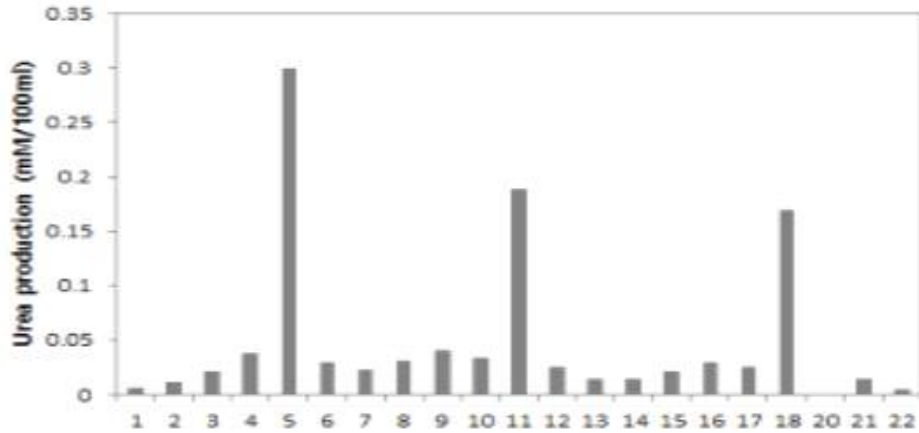


Figure 2-61. 보유효모(yeast strains 1, BY4742; 2-22, industrial strain)의 urea 생성능.

Table 2-19. EC 평가를 위해 사용된 한국식품연구원 보유 주류 생산용 효모

KFRI No.	균주 수집 지역
Y64-5	해미
Y89-1-3	합천
Y89-3-1	합천
Y89-5-1	합천
Y91-4	합천
Y98-2	계룡
Y98-5	계룡
Y99-7	안동
Y111-5	안동
Y113-8	하동
Y-APP-6	산청
Y-APP-11	산청
Y-H4-2	산청
Y157-1	예산
Y183-2	곡성
Y193-5	안성
Y228-1	성주
Y268-3	예산
Y277-10	태안
Y282-1	안면도 남면
Y-H1-1	산청
BY4742	Lab strain

③ EC 평가시스템 구축

- 제한 배지에서 EC를 평가할 수 있도록 EC 측정용 sample prep. 방법을 구축하였다.
- EC와 internal control인 BC(butyl carbamate, 400 ng/mL로 고정)를 통해서 standard curve를 작성하였다. 이때 사용한 EC의 양은 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 ppb를 사용하였다.
- GC-MS의 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 값을 구함. LOC=0.015 ppm, LOQ=0.0044 ppm (n=7, avg. of slope=1.628, stdev. of intercept=0.007)
- EC가 저장 과정에서 발생하는 것이므로 urea 측정 발효과정과 동일한 과정으로 중비된 시료 20 mL을 71°C에서 20일 동안 저장하였다. EC는 저장일수가 늘어날수록 늘어날 것이지만 종균을 파악하기에 너무 긴 시간을 사용할 수 없으므로 20일로 기간을 제한하였다.
- 20일 동안 저장한 시료를 5 mL을 중성화 시키고 internal control인 BC를 400 ng/mL 첨가하고 여기에 40 mL 물을 넣고, chemelut 컬럼에 가한 후 dichloromethane을 80 mL로 정제하였다. 정제한 용액을 0.2 mL로 농축한 후 GC-MS로 측정하였다.

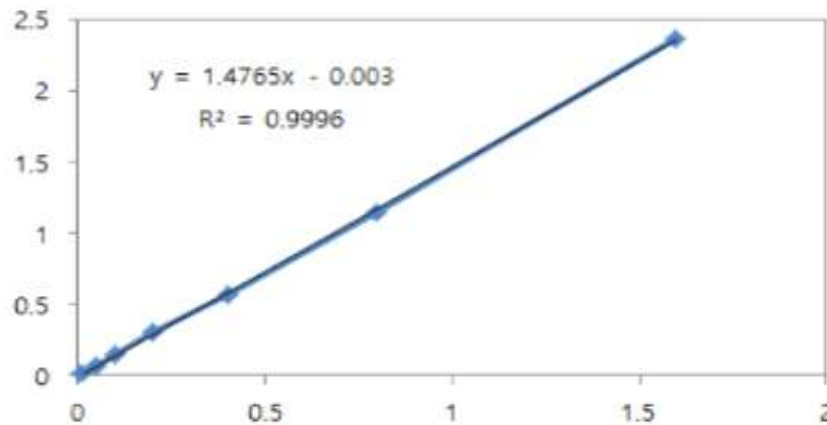


Figure 2-62. The standard curve to calculate amount of EC in the medium. We calculated EC concentration in the media based on the equation in the box.

④ 산업화 균주의 EC 평가

- Urea를 측정했던 22개 균주의 주류 발효과정에서의 EC 생성량을 측정하였다.
- BY 균주를 비롯하여 대부분의 균주들이 검출한계 이하로 EC가 생성되는 것으로 파악되었다.

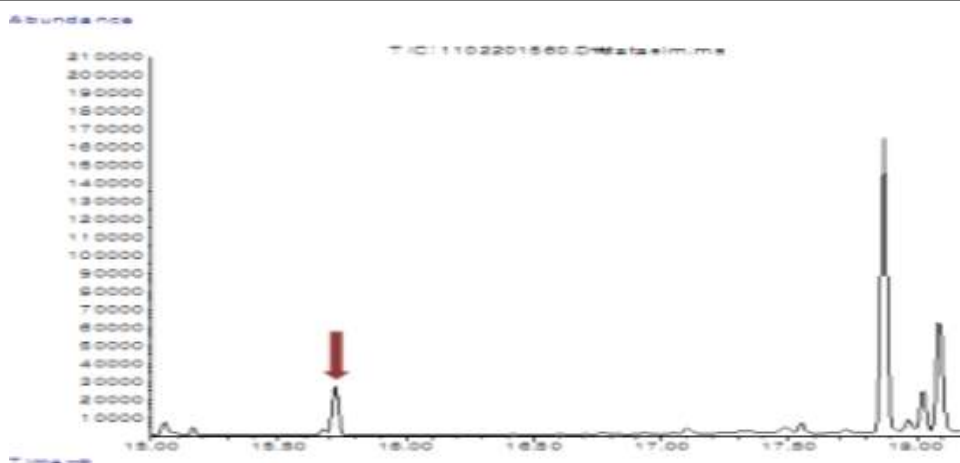


Figure 2-63. The GC-MS spectrum displaying the EC production in the medium(the strain 18). The peak corresponding to the EC production was indicated by the red arrow.

Table 2-20. EC concentrations in the media of the industrial yeast strains

Strain number	Strain name	Urea concentration (mM/100 mL)	EC concentration(ppb)
1	BY4742	0.006	N.D. ^a
2	H1-1	0.012	N.D.
3	H4-2	0.021	N.D.
4	APP-6	0.038	N.D.
5	APP-11	0.300	30.72
6	Y 54-5	0.029	N.D.
7	Y 89-1-3	0.023	N.D.
8	Y 89-3-1	0.031	N.D.
9	Y 89-5-1	0.041	N.D.
10	Y 91-4	0.034	N.D.
11	Y 98-2	0.189	31.74
12	Y 98-5	0.025	N.D.
13	Y 99-7	0.014	N.D.
14	Y 111-5	0.014	N.D.
15	Y 113-8	0.021	N.D.
16	Y 157-1	0.030	N.D.
17	Y 228-1	0.025	N.D.
18	Y 262-6	0.169	34.55
19	Y 268-3	0.000	N.D.

20	Y 277-10	0.014	N.D.
21	Y 282-1	0.004	N.D.

^aN.D. = Not detected(less than LOQ)

- EC가 검출한계 이상으로 생성된 균주들은 모두 30 ppb 이상 EC가 생성되는 것으로 파악되었고, 이 균주의 urea 생성량은 0.219±0.058 mM/100 mL로 나머지 균주들의 urea 생성량 (0.021±0.011 mM/100 mL)과 현저한 차이를 보이므로 EC의 생성량과 urea 생성량이 매우 밀접한 연관성이 있다고 볼 수 있다.
- 이러한 연관성을 이용하여 상대적으로 고가의 장비(GC-MS)를 이용하고, 숙련된 기술을 요하는 EC분석보다, kit 등을 사용하여 비색법으로 간단하게 분석할 수 있는 urea 검출을 통해서 EC 생성 균주를 파악하는 것이 가능하며, 주류생산 중소기업에서 EC 생성을 제한하기 위해서 urea 생성량이 0.1 mM/100 mL 이하의 균주만을 선별하여 종균으로 사용하는 것이 가능할 것이라고 판단된다.

다. 최종 선별 기능성 우수 균주 *Lactobacillus plantarum* Ln4에 대한 안전성 평가

- 연구기간동안 6,000주 미생물을 대상으로 주관기관과 협동연구기관에서 실시한 생화학적 특성, 기초생리활성 및 기능성 시험 결과를 바탕으로 최종 우수 균주인 *Lactobacillus plantarum* Ln4를 확보하였고, 이에 *L. plantarum* Ln4의 안전성 확인하기 위해 젤라틴 액화, 용혈성, indol/urea 생성능, 바이오제닉 아민 생성능, 유해효소 생산능, 항생제 내성, 마우스를 이용한 단회경구투여 독성평가를 실시하였다.
- 상기 항목에 대한 실험결과, *L. plantarum* Ln4은 젤라틴 액화 음성, 용혈성 음성, 인돌, 요소 및 바이오제닉 아민들의 유해물질을 생성하지 않으며, β-glucuronidase 등의 유해효소를 생성하지 않았다, 또한 마우스를 이용한 급성경구독성 실험에서도 경구투여에 따른 독성징후가 관찰되지 않아 식품산업용 균주로 적합한 안전한 균주임을 확인 할 수 있었다.

(1) 젤라틴 액화 실험

- 용혈성 실험을 위해 *L. plantarum* Ln4는 MRS 고체배지에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화 상태로 준비하였다. MRS 배지에 젤라틴을 첨가하여 제조한 배지에 *L. plantarum* Ln4를 접종한 후 37°C에서 48시간 배양한 뒤 젤라틴 영양 배지를 4°C에서 4시간 방치한 후 배지의 응고 여부를 확인하였다.
- 시험결과 *L. plantarum* Ln4를 접종한 배지에서는 액화반응이 확인되지 않았다(Table 2-21).

(2) 용혈성 실험

- 용혈성 실험을 위해 *L. plantarum* Ln4는 MRS 고체배지에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화 상태로 준비하고 sheep blood agar plate(아산제약)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 뒤 집락주변에 나타난 α, β 및 γ 용혈성 패턴을 확인하였다.
- 실험결과 *L. plantarum* Ln4는 γ 패턴을 보여 용혈활성이 없는 안전한 균주임을 확인할 수 있었다(Table 2-21).

(3) Indol/urea 생성능

- Indol/urea 생성능은 알아보기 위해 MB cells에서 indole/urea test kit를 구매하여 실험을 진행하였고, 결과 비교를 위해 positive control로 *E. coli* KCCM 41300을 사용하였다. *L. plantarum* Ln4 균주는 MRS 고체 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화 상태로 준비하고, sterile loop로 colony 중 2~3개를 취해 Urea/ Indole test mixture에 풀어준 뒤 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후에는 Kovac's-Reagent 시약을 처리하여 색 변화를 관찰하고 인돌(indole) 및 요소(urea) 생성 여부를 확인하였다.
- 실험결과 *L. plantarum* Ln4는 indol 및 urea 등의 유해물질을 생성하지 않는 것으로 확인되었다(Table 2-21).

Table 2-21. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 안전성 평가 결과

	<i>E. coli</i>	<i>L. plantarum</i> Ln4
젤라틴 액화 반응		음성
용혈성 검사		음성
Indole	양성	음성
Urea	음성	음성

(4) 바이오제닉 아민 생성능

- *L. plantarum* Ln4의 바이오제닉 아민 생성능은 decarboxylase 활성측정법을 이용하여 cadaverine, histamine, putrescine, tyrosine, spermine, spermidine 생성능을 측정하였다. 실험결과 해당 바이오제닉 아민이 생성되는 않는 것으로 나타나 식품용 종균으로 사용하기 적합한 균주임을 확인할 수 있었다(Figure 2-46~50의 1차년도 균주 4번 disc 결과 참고)

(5) 유해효소 생산능

- 미생물이 생산할 수 있는 유해 효소인 β -glucuronidase 생산능은 API zym kit를 이용하여 측정하였으며, 본 실험은 주관기관에서 실시하였다. 실험결과 *L. plantarum* Ln4는 대장암을 유발할 수 있는 유해효소인 β -glucuronidase를 생성하지 않는 것으로 확인되었다(Table 1-15, Ln4 결과 참고).

(6) 항생제 내성 측정

- *L. plantarum* Ln4의 항생제 내성 실험은 디스크 확산법으로 측정하였다. 미리 접종시킨 균액을 원심분리기(12,000 rpm, 15분)를 이용하여 균체를 회수한 후 10^5 CFU/mL로 희석한 후 고체배지에 도말을 하였다. 그 위에 미리 멸균시킨 paper disc를 올려놓은 뒤 Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI)기준에 사용되는 항생제를 이용하여 50 μ L씩 접종시킨 후 37°C에서 24시간 배양시킨 후 Inhibition zone의 크기에 따라 항생제 저항성 정도를 판별하여 측정하였다. 실험결과 *L. plantarum* Ln4는 유산균에서 일반적으로 내성을 보이는 gentamycin, kanamycine, streptomycin, ciprofloxacin을 제외한 항생제에 대해서는 저항성을 보이지 않아 식품산업용으로 사용이 적합함을 확인한 수 있었다(Table 1-24 Ln4 결과참고).

(7) 마우스를 이용한 단회투여독성시험

(가) 실험방법 및 결과

- *L. plantarum* Ln4의 단회독성평가를 위해 Orientbio Inc.에서 6주령 ICR계 마우스를 암수 각각 5마리 구입하였다. 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울(CP3202 S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반 증상을 관찰하여 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였고 입고 및 순화종료 후의 체중을 기록하였다. 순화종료 후 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군 분리한 후 온도 25.0°C, 상대습도 45.7~60.2%, 명암주기(조명시간) 12시간 조건에서 마우스를 사육하였으며, 음용수와 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)는 자유섭취시켰다.
- *L. plantarum* Ln4의 최종적용예정경로는 경구이기 때문에 투여경로는 경구로 선택하였다. 개체별 투여액량은 절식 후(투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였으며, 경구투여용 존테를 부착한 일회용 주사기(1 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제 투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 4시간 이상 음수는 자유섭취시키면서 절식시키고, 투여 후 약 2시간에 사료를 급여하였다.

- 투여농도는 *L. plantarum* Ln4 생균으로 0, 1×10^9 , 1×10^{10} 및 5×10^{10} CFU/day 농도로 단회 투여하였으며, 투여 후 14일간 치사 및 이상반응 발생 여부를 관찰하였으며, 14일 이후에는 해부 후 장기이상관찰, 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 수행하였다.
- *L. plantarum* Ln4 투여당일(0일)에 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였으며, 체중은 투여당일(투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14일(부검일)에 측정하였다. 관찰기간 종료 후 부검하였으며, 혈액을 취하여 혈액학적 및 혈액생화학적 검사를 수행하였다.
- 혈액학적 검사를 위해 부검 전 약 4시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 후대정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 0.2 mL을 EDTA 함유 tube에 넣은 후, 혈구 분석기(ProCyte DX, IDEXX, U.S.A.)로 적혈구수(total erythrocyte count, RBC), 혈색소량(hemoglobin, HGB), 헤마토크리트치(hematocrit, HCT), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구헤모글로빈량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수(platelet count, PLT), 백혈구수(total leukocyte count, WBC)를 측정하였다.
- 혈액생화학적 검사를 위해 채혈한 혈액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 혈액생화학 분석기(7180, HITACHI, Japan)로 알라닌 아미노기전이효소(alanine aminotransferase, ALT), 아스파테이트 아미노기전이효소(aspartate aminotransferase, AST), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP), 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌(creatinine, Crea), 총 단백질(total protein, TP), 알부민(albumin, Alb), A/G ratio, 총콜레스테롤(total cholesterol, T-Chol), 트리글리세라이드(triglycerides, TG), 혈당(glucose, Glu)을 측정하였다.
- *L. plantarum* Ln4 생균으로 0, 1×10^9 , 1×10^{10} 및 5×10^{10} CFU/day 농도투여한 후 14일 동안 관찰한 결과, 모든 실험군에서 사망한 쥐는 관찰되지 않아 LD50은 5×10^{10} CFU/day을 선회하는 것으로 추정하였다(Table 2-22~23). 치사량뿐만 아니라 행동이상에서도 *L. plantarum* Ln4 투여 직후부터 6시간 이내는 물론 관찰이 진행된 14일 동안 대조군과 구별되는 시험물질 투여와 관련된 어떠한 이상소견(보행 장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등)도 관찰되지 않았으며, 체중 변화, 사료 및 음용수 섭취량도 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 2-24~27). 또한 부검 후 적출한 장기에서 무게변화나 육안관찰상의 이상이 발견되는 장기는 없었다(Table 2-28~29). 부검일 안와정맥을 통해 혈액을 취한 후 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HCT), 평균적혈구용적량(MCV), 평균 혈구 헤모글로빈량(MCH), 평균 헤모글로빈농도(MCHC), 혈소판수(PLT)를 측정하였다. 대조군과 *L. plantarum* Ln4 투여군의 평균값과 표준편차로 결과를 비교한 결과(Table 2-30~33), 모든 실험군에서 *L. plantarum* Ln4 투여에 따른 변화가 관찰되지 않았다.

- 또한 동일한 방법으로 채취한 혈액의 생화학적 분석결과(Table 2-30~31) *L. plantarum* Ln4를 투여한 모든 실험군과 대조군에서 정상범위를 나타내었으며, 실험구간에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다.

Table 2-22. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(수컷, N=5)의 치사율

Group (CFU/hea d/day)	Day after treatment														LD ₅₀ (CFU/he ad/day)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
0	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	>5×10 ¹⁰
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1×10 ⁹	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1×10 ¹⁰	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
5×10 ¹⁰	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Table 2-23. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(암컷, N=5)의 치사율

Group (CFU/hea d/day)	Day after treatment														LD ₅₀ (CFU/head /day)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
0	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	>5×10 ¹⁰
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1×10 ⁹	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1×10 ¹⁰	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
5×10 ¹⁰	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	0/	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Table 2-24. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(수컷, N=5)의 이상반응 관찰결과

Group (CFU/ head/d ay)	No of anim als	Clinic al sign	Hour(Day 0) after dosing					Day after dosing																	
			0.5	1	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
0	5	NOA *	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1×10 ⁹	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1×10 ¹⁰	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5×10 ¹⁰	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

*NOA : No Observable Abnormality

Table 2-25. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(암컷, N=5)의 이상반응 관찰결과

Group (CFU/ head/d ay)	No of anim als	Clinic al sign	Hour(Day 0) after dosing					Day after dosing																	
			0.5	1	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
0	5	NOA *	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1×10 ⁹	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1×10 ¹⁰	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5×10 ¹⁰	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

*NOA : No Observable Abnormality

Table 2-26. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(수컷, N=5)의 체중 변화

Group (CFU/head/day)	Day after treatment		
	0	7	14
0	26.32±1.95	34.13±2.83	38.26±3.76
1×10 ⁹	25.40±1.70	33.76±1.08	36.92±1.84
1×10 ¹⁰	26.00±2.08	33.15±2.34	36.50±2.83
5×10 ¹⁰	25.45±2.43	32.14±3.06	35.54±3.16

Table 2-27. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(암컷, N=5)의 체중 변화

Group (CFU/head/day)	Day after treatment		
	0	7	14
0	24.26±1.74	28.89±2.36	32.98±3.18
1×10 ⁹	24.62±1.76	27.56±1.44	30.28±1.99
1×10 ¹⁰	23.31±1.50	27.04±0.67	29.75±1.12
5×10 ¹⁰	24.51±1.92	27.12±0.96	30.84±1.97

Table 2-28. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(수컷, N=5)의 장기중량 변화

Group (CFU/head/day)	Organ weight (g/head), 절대중량				Organ weight (g/100 g), 상대중량			
	Spleen (g)	Kidney (g)	Liver (g)	Small intestine (g)	Spleen (g)	Kidney (g)	Liver (g)	Small intestine (g)
0	0.110±	0.603±	1.937±	1.652±	0.289±	1.580±	5.052±	4.309±
	0.019	0.059	0.271	0.216	0.042	0.127	0.308	0.243
1×10 ⁹	0.121±	0.642±	1.925±	1.722±	0.330±	1.740±	5.219±	4.676±
	0.017	0.048	0.085	0.188	0.051	0.115	0.166	0.585
1×10 ¹⁰	0.120±	0.608±	1.866±	1.776±	0.328±	1.667±	5.101±	4.847±
	0.014	0.049	0.180	0.278	0.031	0.093	0.158	0.415
5×10 ¹⁰	0.115±	0.547±	1.723±	1.584±	0.321±	1.540±	4.835±	4.463±
	0.024	0.064	0.225	0.148	0.046	0.129	0.299	0.286

Table 2-29. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여에 따른 ICR계 마우스(암컷, N=5)의 장기중량 변화

Group (CFU/head/day)	Organ weight (g/head), 절대중량				Organ weight (g/100 g), 상대중량			
	Spleen (g)	Kidney (g)	Liver (g)	Small intestine (g)	Spleen (g)	Kidney (g)	Liver (g)	Small intestine (g)
0	0.158±	0.383±	1.703±	1.747±	0.473±	1.165±	5.156±	5.292±
	0.046	0.040	0.291	0.288	0.100	0.106	0.651	0.599
1×10 ⁹	0.132±	0.360±	1.503±	1.649±	0.432±	1.191±	4.950±	5.462±
	0.039	0.029	0.207	0.069	0.112	0.092	0.454	0.385
1×10 ¹⁰	0.129±	0.348±	1.460±	1.594±	0.432±	1.172±	4.904±	5.352±
	0.022	0.023	0.116	0.124	0.061	0.095	0.291	0.295
5×10 ¹⁰	0.134±	0.374±	1.463±	1.631±	0.431±	1.216±	4.740±	5.277±
	0.040	0.028	0.137	0.233	0.125	0.103	0.242	0.590

Table 2-30. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여독성에 따른 ICR계 마우스(수컷)의 혈액 생화학적 분석

Group (CFU/head/day)	A/G ratio	Albumin (g/dL)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	T.chol (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Protein total (g/dL)	Triglyceride (mg/dL)
0	2.5 ±0.2	4.0 ±0.2	122.7± 20.0	48.8 ±8.2	123.0 ±18.7	15.3 ±1.4	142.0 ±24.3	< 0.17	177.5 ±23.4	5.5 ±0.1	209.2 ±56.1
1×10 ⁹	2.9 ±0.2	3.8 ±0.4	134.90 ±25.7	39.4 ±8.3	115.7 ±20.0	15.0 ±0.8	145.1 ±11.5	< 0.17	166.40 ±7.8	5.5 ±0.2	229.6 ±24.5
1×10 ¹⁰	3.2 ±0.3	4.0 ±0.2	116.20 ±20.4	38.8 ±7.0	93.6 ±14.1	14.9 ±1.8	137.4 ±10.5	< 0.17	162.70 ±16.1	5.3 ±0.2	235.0 ±73.5
5×10 ¹⁰	2.8 ±0.4	4.1 ±0.3	131.1 ±37.9	32.3 ±7.6	108.6 ±26.6	14.7 ±3.2	145.3 ±37.1	< 0.17	165.9 ±10.6	5.5 ±0.2	196.9 ±33.5

Table 2-31. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여독성에 따른 ICR계 마우스(암컷, N=5)의 혈액 생화학적 분석

Group (CFU/head/day)	A/G ratio	Albumin (g/dL)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	T.chol (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Protein total (g/dL)	Triglyceride (mg/dL)
0	2.1 ±0.1	3.8 ±0.1	117.0 ±29.5	51.1 ±27.0	108.6 ±26.6	18.2 ±3.8	191.9 ±27.6	< 0.17	171.1 ±13.9	5.7 ±0.2	190.0 ±29.6
1×10 ⁹	2.1 ±0.1	3.7 ±0.1	99.0 ±58.1	61.8 ±12.1	111.3 ±17.7	16.1 ±2.4	183.2 ±42.3	< 0.17	184.5 ±24.0	5.4 ±0.2	219.0 ±29.5
1×10 ¹⁰	2.0 ±0.2	3.5 ±0.1	112.8 ±9.5	47.4 ±13.5	107.4 ±29.1	16.7 ±1.2	190.1 ±20.9	< 0.17	181.8 ±21.5	5.3 ±0.2	223.0 ±39.8
5×10 ¹⁰	2.2 ±0.3	3.6 ±0.1	131.1 ±37.9	68.2 ±19.0	114.6 ±27.8	14.7 ±2.3	201.8 ±35.0	< 0.17	187.0 ±29.9	5.3 ±0.1	214.1 ±58.2

Table 2-32. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여독성에 따른 ICR계 마우스 (수컷)의 혈액학적 분석

Group (CFU/head/day)	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT(%)	RBC index			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)
				MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC (g/dL)		
0	8.26 \pm 0.2	13.26 \pm 0	42.64 \pm 0.3	15.30 \pm 0.5	29.70 \pm 0.6	29.7 \pm 0.69	794 \pm 43	1.91 \pm 0.16
1×10^9	8.31 \pm 0.3	13.26 \pm 0	41.94 \pm 1.4	15.10 \pm 0.4	30.10 \pm 0.4	30.10 \pm 0.49	829 \pm 83	2.11 \pm 0.34
1×10^{10}	8.10 \pm 0.5	12.96 \pm 0	40.94 \pm 1.4	15.10 \pm 0.1	30.20 \pm 0.5	30.20 \pm 0.59	797 \pm 102	2.18 \pm 0.58
5×10^{10}	8.04 \pm 0.5	12.86 \pm 0	41.54 \pm 3.4	15.10 \pm 0.0	29.40 \pm 0.2	29.40 \pm 0.29	756 \pm 102	1.67 \pm 0.54

Table 2-33. *Lactobacillus plantarum* Ln4의 단회투여독성에 따른 ICR계 마우스 (암컷)의 혈액학적 분석

Group (CFU/head/day)	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT(%)	RBC index			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)
				MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC (g/dL)		
0	8.08 \pm 0.43	13.46 \pm 0	42.84 \pm 2.7	50.81 \pm 1.2	29.70 \pm 0.6	29.90 \pm 0.89	771 \pm 190	3.06 \pm 1.5
1×10^9	8.19 \pm 0.09	13.36 \pm 0	42.64 \pm 1.4	49.81 \pm 0.6	30.10 \pm 0.4	30.00 \pm 0.99	765 \pm 15	2.81 \pm 0.36
1×10^{10}	8.40 \pm 0.19	13.66 \pm 0	43.14 \pm 1.2	49.13 \pm 1.2	30.20 \pm 0.5	30.10 \pm 0.59	749 \pm 123	2.26 \pm 0.65
5×10^{10}	8.18 \pm 0.23	13.26 \pm 0	42.14 \pm 1.5	15.10 \pm 0.0	49.41 \pm 0.7	30.00 \pm 0.49	761 \pm 76	1.96 \pm 0.66

라. 식품산업용 균주의 인체적용시험을 통한 식품산업용 균주의 안전성 평가법 구축

- 식품산업용 미생물, 특히 사용된 경험이 없는 미생물 소재의 경우 안전성을 평가하기 위한 최종 단계는 인체적용시험을 통한 안전성 평가라 할 수 있다. 인체적용시험을 통해 안전성 평가만을 진행할 수 있으나, 보통은 미생물의 기능성과 안전성을 동시에 연구하는 경우가 많다. 인체적용시험은 일반적인 시험관 시험이나 전임상 시험과는 달리 사람을 대상으로 한 연구이기 때문에 연구수행 전, 후 IRB 심의를 받아야 하며, 실험디자인, CRF 구축, 피험자 모집, 이상반응에 대한 대응방법, 각종 동의서 작성 등 처음 인체적용시험을 접하는 연구자나 개발자가 모든 절차를 이해하기에는 어려움이 있다. 이에 인체적용시험에 대한 개요와 인체적용시험을 통해 안전성을 평가하기 위한 일반적인 절차 및 기본적으로 실시하는 안전성 지표 항목에 대해 조사하였다.

(1) 식품산업용 균주의 인체적용시험

(가) 임상시험의 정의

- 임상시험용 의약품의 안전성과 유효성을 증명할 목적으로, 해당 약물의 약동·약력·약리·임상적 효과를 확인하고 이상반응을 조사하기 위하여 사람을 대상으로 실시하는 시험 또는 연구를 말한다.

(나) 식품 원료의 인체적용시험

- 식품 원료의 안전성과 기능성을 증명하기 위하여 사람을 대상으로 시험하는 연구를 “인체적용시험”이라고 한다(건강기능식품의 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 제2조 제1항 제7호). 일반적으로 인체적용시험의 대다수는 건강기능식품의 소재가 되는 기능성원료의 기능성 및 안전성을 검증하기 위해 수행된다.

(다) 인체적용시험의 기본 원칙

- 인체적용시험은 아래와 같은 원칙에 의거해 수행되어야 하므로 인체적용시험이 수행되기 전에 시험원료의 안전성이 사전에 충분히 확보되어야 한다.
- 인체적용시험은 헬싱키 선언에 근거한 윤리규정에 따라 수행되어야 한다.
- 인체적용시험으로부터 예측되는 위험과 불편사항에 대한 충분한 고려를 통해 인체적용시험 실시를 결정하여야 한다.
- 연구대상자의 권리, 안전, 복지는 우선 검토의 대상으로 과학과 사회의 이익보다 중요하다.
- 인체적용시험에 사용되는 시험식품에 대한 정보는 실시하고자 하는 인체적용시험을 충분히 뒷받침해야 한다.

- 인체적용시험은 과학적으로 타당하여야 하며, 계획서는 명확하고 상세히 기술되어야 한다.
- 인체적용시험은 인체적용시험 심사위원회(기관생명윤리위원회)에서 승인한 시험계획서에 따라 실시하여야 한다.
- 인체적용시험 수행에 참여하는 모든 사람들은 각자의 업무 수행을 위한 적절한 교육, 훈련을 받고, 경험을 갖고 있어야 한다.
- 인체적용시험 참여 전에 모든 연구대상자로부터 자발적인 참가 동의를 받아야 한다.
- 모든 인체적용시험 관련 정보는 정확한 보고, 해석, 확인이 가능하도록 기록, 처리, 보존되어야 한다.
- 연구대상자의 신원에 대한 모든 기록은 비밀보장이 되도록 관련규정에 따라 취급하여야 한다.
- 인체적용시험에 사용되는 시험식품은 표준화되어야 하고, 승인된 인체적용시험 계획에 따라 사용되어야 한다.
- 인체적용시험은 신뢰성을 보증할 수 있는 절차에 따라 실시되어야 한다.

(라) 인체적용시험의 절차

① 계획

㉠ 인체적용시험 계획

• 연구디자인 설계

- 인체적용시험의 “gold standard”는 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조군 설정 연구(RCT; Randomized Controlled Trial)이다.
- 인체적용시험의 설계에는 평행설계(Parallel Design)와 교차설계(Cross-Over Design)가 있으며, 연구의 특성(타겟 기능성) 및 시험제품의 유형에 따라 시험디자인을 결정한다.

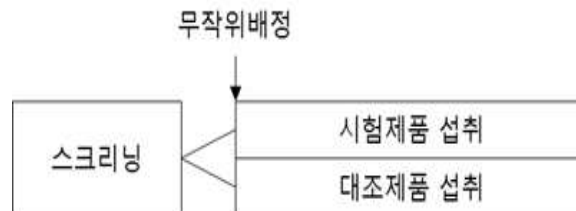


Figure 2-64. 평행설계.

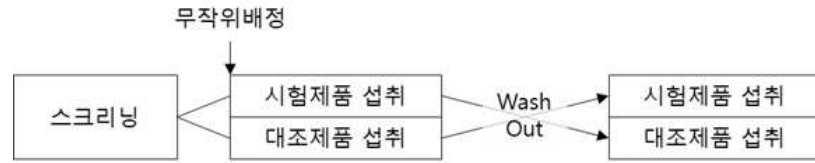


Figure 2-65. 교차설계.

- 평가항목 선정
 - 유효성 평가항목: 시험용제품의 유효성을 입증할 수 있는 객관적·과학적인 평가항목을 선정한다.
 - 안전성 평가항목: 시험용제품에 대한 폭로정도와 유해사례 및 실험실적 검사 등의 안전성 평가항목을 선정한다.

㉞ 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

- 인체적용시험계획서(PRT; Protocol) 개발
 - 해당 인체적용시험의 배경이나 근거를 제공하기 위해 인체적용시험의 목적·연구방법론·통계학적 측면·관련 조직 등이 기술된 문서인 인체적용시험계획서를 개발한다.
- 증례기록서(CRF; Case Report Form) 개발
 - 인체적용시험에 참여하는 개개 연구대상자 별로 계획서에 규정된 정보를 기록하여 의뢰자에게 전달할 수 있도록 증례기록서를 개발한다.

㉟ 임상시험심사위원회 심의 및 승인

- 임상시험심사위원회(IRB; Institutional Review Board)
 - 계획서 또는 변경계획서, 연구대상자로부터 서면동의를 얻기 위해 사용하는 방법이나 제공되는 정보를 검토하고 지속적으로 이를 확인함으로써 인체적용시험에 참여하는 연구대상자의 권리·안전·복지를 보호하기 위해 시험기관 내에 독립적으로 설치한 상설위원회를 말한다.
- 심의 서류
 - 인체적용시험(변경)계획서, 연구대상자 서면동의서 서식, 연구대상자에게 제공되는 서면정보(연구대상자 설명서 포함), 인체적용시험자료집, 안전성 정보, 연구대상자에게 제공되는 보상에 대한 정보, 시험책임자의 최근 이력 또는 기타 경력에 관한 문서, 표준작업지침서 등
- IRB 심의 및 승인
 - IRB는 시험책임자가 제출한 인체적용시험과 관련된 사항을 심사위원회 표준작업지침서에 규정한 기간 내에 검토하고, 인체적용시험의 명칭, 검토한 문서, 날짜 및 의견(승인 또는 시정승인, 보완, 반려, 승인된 인체적용시험의 중지 또는 보류)을 통보한다.

㉠ 인체적용시험용제품(IP; Investigational Product) 준비

- 시험용제품
 - 시험제품: 인체적용시험을 통해 기능성 및 안전성을 검증하고자 하는 제품
 - 대조제품: 시험제품과 비교할 목적으로 사용하는 위약(플라세보) 또는 개발 중이거나 시판 중인 제품
- RB 승인 후 시험기관에 시험용제품을 입고하여 인체적용시험 개시 준비를 완료한다.

② 수행

㉡ 연구대상자 모집 및 등록

- 자의로 참여를 결정하고 서면 동의한 자를 대상으로 스크리닝을 시행하여 계획서에 명시된 선정기준에 해당하는 자를 연구대상자로 등록한다.

㉢ 인체적용시험 수행

- 선정된 연구대상자를 대상으로 인체적용시험을 수행하여 시험용제품의 유효성 및 안전성을 평가한다.

㉣ 증례기록서(CRF; Case Report Form) 수집

- 인체적용시험 기간 동안 수집된 연구대상자의 연구 관련 정보를 CRF에 기재한다.

㉤ 자료입력

- 인체적용시험 결과의 통계 및 결과분석을 위해 수집된 정보를 dataset에 입력한다.

③ 종료

㉥ 통계분석

- 적절한 통계분석 방법을 사용하여 유효성 및 안전성 평가항목에 대한 통계분석을 실시한다.

㉦ 결과보고

- 인체적용시험에서 얻은 결과를 임상적·통계적 측면에서 통합하여 결과보고서(CSR; Clinical Trial/Study Report)를 작성한다.



Figure 2-66. 인체적용시험 절차.

(2) 인체적용시험을 통한 새로운 식품원료의 안전성 평가

(가) 인체적용시험에서의 안전성 평가

- 안전성 평가는 인체적용시험에 참여하여 한번 이상 시험용제품을 투여 받은 연구대상을 대상으로, 시험용제품에 대한 폭로정도와 유해사례, 중대한 유해사례 및 실험실적 검사에 대한 평가를 시행하여야 한다. 연구자는 인체적용시험 기간 동안 발생하는 모든 유해사례에 대해 의뢰자에게 보고를 하여야 한다. 만약 유해사례가 심각하고 예상되지 못한 것이라면 24시간 이내 의뢰자에게 보고하고, IRB에도 알려야한다.

(나) 안전성 평가항목

① 이상반응

- 시험자는 인체적용시험 중 발생한 모든 이상반응을 기록하여야 한다. 이상반응은 시험자가 관찰하거나, 연구대상자가 보고한 증상 및 증후에 대한 용어를 기록한다. 인체적용시험 도중 나타나는 중대한 이상반응은 시험제품과의 관련성에 관계없이 의뢰자에게 보고하여야 한다.

㉔ 이상반응(Adverse Event, AE)

- 시험용제품을 투여한 연구대상자에게 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 증후

(sign, 실험실적 검사 결과의 이상 등 포함), 증상(symptom) 또는 질병을 말하며, 해당 시험용제품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

㉔ 이상약물반응(Adverse Drug Reaction, ADR)

- 시험용제품의 임의 용량에서 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 반응으로서 시험용제품과의 인과관계를 부정할 수 없는 경우를 말한다.

㉕ 중대한 이상반응·이상약물반응(Serious AE · ADR)

- 시험용제품의 임의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음 어느 하나에 해당하는 경우를 말한다.
 - 사망하거나 생명에 대한 위험이 발생한 경우
 - 입원할 필요가 있거나 입원 기간을 연장할 필요가 있는 경우
 - 영구적이거나 중대한 장애 및 기능 저하를 가져온 경우
 - 태아에게 기형 또는 이상이 발생한 경우

㉖ 예상하지 못한 이상약물반응(Unexpected Adverse Drug Reaction)

- 인체적용시험자자료집 또는 시험용제품의 첨부문서 등 이용 가능한 의약품관련 정보에 비추어 이상약물반응의 양상이나 위해의 정도에서 차이가 나는 것을 말한다.

② 실험실적 검사

- 중요한 실험실적 검사 결과를 각 투여군 별로 요약하며, 다기관 공동연구의 경우에는 각 검사항목에 대한 기관 별 정상치를 참조하여 정상범위를 벗어나는 정도를 비교할 수 있다.
- 만일 비정상적인 실험실적 검사 결과가 중대한 유해사례 또는 기타 중요한 유해사례의 범주에 해당된다면 이에 준해서 정보를 제시하여야 하고, 연구대상자 개인별 검사 자료를 제공해야 한다.

㉑ 간기능 검사

- 총 단백질(Total protein): 80종이상의 단백질 성분의 총화로써 전체적인 영양상태를 평가하고, 병적 증가나 감소를 평가하는 검사이다.
 - 증가: 탈수, 고감마글로불린혈증
 - 감소: 영양불량, 합성장애(심한 간질환), 신증후군, 발열, 염증, 악성종양, 만성질환, 갑상선기능항진증, 수액투여
- 알부민(Albumin): 총 단백질의 60%정도가 알부민이며, 주로 간에서 합성된다. 간의

단백 합성기능을 평가할 수 있으며, 최근 한 달 이내의 영양 상태를 반영한다.

- 증가: 탈수, 간염 회복기
- 감소: 영양불량, 흡수장애, 간질환, 임신, 갑상선기능항진증, 종양, 감염, 신증후군, 수액 투여
- 총 빌리루빈(Total bilirubin): 적혈구가 파괴되면서 유리된 헴(heme)으로부터 합성되며 간의 분비기능을 파악할 수 있다.
 - 증가: 선천성황달질환, 담도계질환, 간질환, 용혈성빈혈, 악성빈혈, 혈중
 - 감소: 임상적 의의 없음
- 알칼리포스파타제(ALP; Alkaline phosphatase): 여러 조직에 분포하는 효소로서 주로 골질환 및 간담도계질환시 증가할 수 있다.
 - 증가: 부갑상선기능항진증, 골질환, 갑상선기능항진증, 간담도계질환, 악성종양, 임신, 소아
 - 감소: 비타민 D 과다섭취, 갑상선기능저하증, 영양불량, 갱년기여성(호르몬 치료 시)
- 감마지티피(Gamma GT: Gamma-glutamyl transferase): 주로 간에서 유래하는 효소이며, 간질환시 ALP와 비슷하게 변화하므로 ALP 증가시 그 기원이 간인지 뼈인지를 감별하는데 유용한 검사이다.
 - 증가: 담도폐색, 급성간염, 만성활동성간염, 간경화, 지방간, 췌장염, 알코올과다섭취, 알코올성 간장애, 비만
 - 감소: 임상적 의의 없음
- 혈청지오티(AST; Aspartate aminotransferase, GOT; Glutamic oxaloacetic transaminase): 간기능을 평가하는 기초검사항목으로서 알코올성 간장애나 만성 간질환에서 주로 증가한다.
 - 증가: 간질환, 근질환, 심부전, 간독성약물 복용, 심근경색, 췌장염, 급성순환부전, 용혈성 빈혈
 - 감소: 임상적 의의 없음
- 혈청지피티(ALT; Alanine transaminase, GPT; Glutamate-pyruvate transaminase): 간기능을 평가하는 기초검사항목으로서 급성 간염 시 주로 증가한다.
 - 증가: 간질환, 심근경색, 지방간, 비만
 - 감소: 임상적 의의 없음

㉔ 당뇨 검사

- 공복혈당(fasting glucose): 당뇨 질환의 진단 및 치료 효과를 반영하는 검사이다.
 - 증가: 당뇨, 쿠싱병, 스트레스, 췌장염, 두개뇌질환, 약물(스테로이드, 알코올)
 - 감소: 췌장질환, 간질환, 뇌하수체기능저하, 갑상선기능저하증, 에디슨병, 인슐린치료, 경구혈당강하제 복용, 알코올중독증
- 당화혈색소검사(HbA1c): 당뇨환자 혈당치의 장기간 조절여부를 판단하기 위한 검사로서, 최근 2~3개월 동안의 혈중 평균 당 농도를 반영한다.
 - 증가: 당뇨병, 만성신부전, 알코올중독증, 고중성지방혈증

- 감소: 임신, 출혈, 용혈성빈혈

㉔ 신장기능 및 전해질 검사

- 혈중요소질소(BUN; Blood urea nitrogen): 단백질의 주요 최종분해산물로서 간에서 요소회로에 의해 생성되어 신장으로 배출된다.
 - 증가: 신기능장애, 심부전, 탈수, 장출혈, 심근경색, 폐쇄성요로병증
 - 감소: 중증간질환, 임신, 영양불량, 신증후군, 저단백식이
- 크레아티닌(Creatinine): BUN보다 신질환에 더 특이적이고 예민한 검사로 신장 기능의 평가를 위한 기초검사이다.
 - 증가: 신기능장애, 폐쇄성요로병증, 근질환
 - 감소: 임상적 의의 없음, 임신
- 무기인(P; Phosphorus): 골형성, 세포막형성, 에너지 저장과 교환에 관여한다.
 - 증가: 신부전, Vit D 중독, 특발성부갑상선기능저하증, 이차성부갑상선기능항진증, 갑상선기능항진증, 에디슨병, 골질환
 - 감소: 구루병, 원발성부갑상선기능항진증, Vit D 결핍, 이뇨제 복용, 칼륨 감소, 투석, 통풍, 영양불량, 구토, 설사, 알코올중독증, 당뇨
- 칼슘(Ca; Calcium): 골형성, 혈액응고 및 신경근육 전달에 관여한다. Ca항상성 조절에 관여하는 장기로는 소장, 신장, 뼈 등이 있으며, 호르몬으로는 부갑상선호르몬, 비타민 D3, 칼시토닌 등이 있다.
 - 증가: 부갑상선기능항진증, Vit D 중독, 신부전, 갑상선기능항진증, 급성 골다공증, 악성종양
 - 감소: 부갑상선기능저하증, 췌장염, 기아, 이뇨제복용, 수액 투여
- 나트륨(Na; Sodium): 세포외액의 주요 양이온으로 체액량과 삼투압 조절에 중요한 역할을 한다. 전해질 불균형 여부 판정 및 산염기 평형상태의 평가 시 이용할 수 있다.
 - 증가: 탈수, 당뇨병, 요붕증, 원발성알도스테론증, 쿠싱병
 - 감소: 구토, 설사, 세뇨관성 산증, 에디슨병
- 칼륨(K; Potassium): 전해질 불균형 여부 판정 및 산염기 평형상태의 평가 시 이용할 수 있다.
 - 증가: 신부전, 에디슨병, 소염제 복용
 - 감소: 설사, 구토, 쿠싱병, 세뇨관성 산증, 갑상선기능항진증, 이뇨제 복용
- 클로라이드(Cl; Chloride): 전해질 불균형 여부 판정 및 산염기 평형상태의 평가 시 이용할 수 있다.
 - 증가: 탈수, 설사, 세뇨관성 산증, 만성신장염
 - 감소: 구토, 급성신부전, 이뇨제 복용
- 요산(Uric acid): 퓨린(Purine)대사의 주요산물로 대부분 간에서 크산틴산화효소(Xanthine oxidase)에 의해 생성된다. 핵산 대사의 평가를 위한 기초검사이다.
 - 증가: 통풍, 무증상고요산혈증, 신부전, 악성종양 고단백식이, 알코올중독증, 이뇨제

복용

- 감소: 세뇨관재흡수장애(건강인), 임신, 수술직후

㉠ 혈중지질 검사

- 총콜레스테롤(Total cholesterol): 고지혈증 진단의 선별검사이며, 동맥경화와 관련이 있고, 영양상태를 반영한다.
 - 증가: 고지혈증, 담도폐색, 갑상선기능저하증, 신증후군, 만성췌장염, 당뇨, 임신
 - 감소: 중증간질환, 갑상선기능항진증, 영양불량, 만성빈혈, 감염, 염증
- 고밀도지단백(HDL cholesterol; High density lipoprotein cholesterol): 동맥경화와 관련이 있고, 여러 고지혈증을 진단하는데 도움이 되는 검사이다.
 - 증가: 심한 운동, 알코올중독증, 인슐린 치료, 경구피임약 복용
 - 감소: 스트레스, 기아, 비만, 운동부족, 흡연, 당뇨, 갑상선기능 이상
- 저밀도지단백(LDL cholesterol; Low density lipoprotein cholesterol): 동맥경화의 위험도 측정 및 치료 여부를 결정하는 검사이다.
 - 증가: 고지혈증, 당뇨, 갑상선기능저하증, 신증후군, 만성신부전, 임신
 - 감소: 경구피임약복용, 무베타지단백혈증
- 중성지방(Triglyceride): 지질대사를 평가하는 기초검사이다.
 - 증가: 가족성 고지단백혈증, 당뇨병, 동맥경화, 통풍, 췌장염
 - 감소: 영양불량, 최근 체중감소, 심한 운동, 간경변

㉡ 일반혈액검사

- 적혈구수(RBC count; Red blood cells count): 적혈구수의 측정은 빈혈 또는 적혈구 증가증의 유무와 그 정도를 파악하는 것이다. 적혈구는 조혈장애, 출혈, 혈구파괴 등에 의해 감소하고, 골수의 적혈구계 과형성, 심한 설사로 인한 탈수 등에 의한 체액상실 시 증가한다.
 - 증가: 진성다혈구증, 탈수, 쇼크, 부신부전증, 심폐질환
 - 감소: 각종 빈혈, 골수기능부전, 출혈
- 혈색소(Hb; Hemoglobin): 조직으로 산소를 운반하는 역할을 담당하므로 감소할 경우 각 장기조직은 산소 결핍으로 여러 가지 증상이 나타날 수 있다. 일반적으로 빈혈의 지표로 사용한다.
 - 증가: 적혈구 증가증
 - 감소: 빈혈, 혈액질환
- 백혈구수(WBC; White blood cells count)
 - 증가: 급성감염증, 염증성질환, 급성출혈, 조직 괴사, 혈액질환
 - 감소: 바이러스감염, 중증감염, 약물복용, 재생불량성빈혈, 악성빈혈
- 혈소판(Platelet)
 - 증가: 만성염증성질환, 감염성질환, 수술직후, 종양, 혈액질환

- 감소: 감염성질환, 간경변, 특발성혈소판감소증, 각종 혈액질환

㉞ 기타 혈액검사

- 크레아틴키나제(CK; Creatine kinase): 골격근, 심근, 뇌 및 평활근에 고농도로 존재하는 효소로서 기타 조직 및 장기에는 거의 존재하지 않는다.
 - 증가: 근질환, 심장질환, 알코올중독증, 갑상선기능저하증, 중추신경계질환
 - 감소: 임상적 의의 없음
- 젖산탈수소효소(LD; Lactate dehydrogenase): 대부분의 장기에 분포하므로, 장기 손상의 비특이적인 지표이다.
 - 증가: 혈액질환, 심장질환, 간질환, 악성종양, 근질환, 신장질환, 운동 후
 - 감소: 임상적 의의 없음
- 아밀라아제(Amylase): 전분이나 글리코겐같은 다당류를 가수분해하는 효소로 췌장과 타액선에서 주로 분비된다. 췌장질환의 진단이나 경과관찰에 유용한 검사이다.
 - 증가: 췌장질환, 타액선질환, 간·담도질환, 소화성궤양 천공, 급성알코올중독증
 - 감소: 임상적 의의 없음
- 적혈구침강속도(ESR; Erythrocyte sedimentation rate): 시간에 따른 적혈구의 침강속도를 측정하는 것으로, 염증이나 종양 등에 의한 조직파괴 또는 혈장단백이상을 반영하는 비특이적인 검사이다.
 - 증가: 감염성질환, 만성염증성질환, 빈혈, 고지혈증, 종양
 - 감소: 적혈구증가증, 겸상적혈구빈혈, 구상적혈구증

(다) 병용약물

- 인체적용시험 기간 동안 허용된, 그리고 허용 또는 금지 병행 요법과 관련된 병용 약제 및 시술을 인체적용시험계획서에 기술한다. 연구대상자가 인체적용시험 기간 동안 복용한 모든 병용약물에 대해 상세히 기록하며, 시험용제품과의 인과관계를 분석한다.

(라) 활력징후 · 심전도 · 신체검사

- 활력징후(체온, 맥박, 혈압 등)·심전도·기타 신체검사 등의 분석은 경향성을 조사하기 위하여 수행된다.

(마) 유해사례 발생 시 보고 절차

① 유해사례의 확인

- 유해사례 발생 확인은 인체적용시험계획서에 제시된 일정을 따르되 필요한 경우 매

방문 시나 신체검진 시에 유해사례를 질문하거나 연구대상자의 자발적인 보고 혹은 연구대상자의 가족 및 의료 제공자로부터의 보고, 검사결과 등을 통하여 시행한다.

② 유해사례의 인과성 평가

- 시험용제품과의 관련성(노출정도, 시간적 순서, 개연성, 투여중단, 재투여)을 조사하여 시험용제품 투여 중단 여부를 결정한다. 식품의약품안전처와 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서 사용하고 있는 의약품과의 인과관계 평가기준은 다음과 같다.

㉠ 확실함(certain): 의약품 등의 투여·사용과의 전후관계가 타당하고 다른 의약품이나 화학물질 또는 수반하는 질환으로 설명되지 아니하며, 투여중단 시 해당 유해사례가 소실되고, 재투여시 약물학적 또는 현상학적으로 결정적인 반응이 나타나는 경우

㉡ 상당히 확실함(probable·likely): 의약품 등의 투여·사용과의 시간적 관계가 합당하고 다른 의약품이나 화학물질 또는 수반하는 질환에 의한 것으로 보이지 아니하며, 그 의약품등의 투여중단 시 임상적으로 합당한 반응을 보이는 경우(재투여 정보 없음)

㉢ 가능함(possible): 의약품 등의 투여·사용과의 시간적 관계가 합당하나 다른 의약품이나 화학물질 또는 수반하는 질환에 의한 것으로도 설명되며, 그 의약품등의 투여중단에 관한 정보가 부족하거나 불명확한 경우

㉣ 가능성 적음(unlikely): 의약품 등의 투여·사용과 인과관계가 있을 것 같지 않은 일시적 사례이고, 다른 의약품이나 화학물질 또는 잠재된 질환에 의한 것으로도 타당한 설명이 가능한 경우

㉤ 평가 곤란(conditional·unclassified): 적절한 평가를 위해 더 많은 자료가 필요하거나 추가 자료를 검토 중인 경우

㉥ 평가 불가(unassessable·unclassifiable): 정보가 불충분하거나 상충되어 판단할 수 없고 이를 보완하거나 확인할 수 없는 경우

③ 유해사례의 치료

- 신체검진을 통하여 연구대상자를 임상적으로 평가하고 실험실적 검사 및 진단적 검사를 실시하며 필요 시 다른 과와 협진한다. 인체적용시험계획서에 준하여 또는 표준적인 치료를 시행하고, 유해사례가 안정되거나 소실될 때까지 추적 관찰한다.

④ 유해사례의 기록

- 연구대상자에게 발생한 유해사례와 발생일, 소실일, 연관성, 최대강도, 시행된 치료, 실험실적 검사 및 진단적 검사, 병용 약물, 시험용제품의 용량 조절 등에 관한 사항을 기록한다.

(바) 중대한 유해사례 보고

- 중대하고 예상하지 못한 모든 유해반응은 신속히 보고하여야 한다. 이때 주의할 것은 심함(severe)과 중대함(serious)은 동의어가 아니라는 것이다. 그 의미의 혼동이나 오해를 방지하기 위하여 다음과 같이 설명된다. 심함이라 함은 경증, 중등증, 또는 중증 등 특정한 반응의 강도를 설명하기 위하여 종종 사용된다. 그러나 심한 두통처럼 이 반응 자체는 의학적 중요도가 비교적 경미할 수 있다. 중대함은 심함과는 다른 뜻으로 유해사례의 결과 또는 취해진 조치가 보통 환자의 생명이나 기능을 위협하는 사건과 관련이 있다.
- 시험책임자는 계획서나 인체적용시험자료집 등에서 즉시 보고하지 않아도 된다고 명기한 것을 제외한 모든 중대한 유해사례를 즉시 의뢰자에게 알려야 하고, 계획서에 기술한 기일 내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가보고를 하여야 한다. 시험책임자는 안전성 평가에 매우 중요하다고 계획서에서 명시된 유해사례나 실험실적 검사치의 이상 등에 대하여 계획서에서 정한 기간 및 보고방법에 따라 의뢰자에게 보고하여야 한다.
- 의뢰자는 기타 관련된 시험자, 심사위원회 등에게 중대하고 예상하지 못한 모든 유해반응에 대해, 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 7일 이내, 상세한 정보를 최초 보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고해야 한다. 추가적인 안전성 정보는 해당 유해반응이 종결(해당 유해반응의 소실 또는 추적조사의 불가능)될 때까지 주기적으로 보고해야 한다. 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 유해반응의 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 15일 이내 보고해야 한다.

(사) 안전성 평가 결과의 제시

- 안전성과 관련된 자료는 크게 세 가지 차원에서 고려되어야 한다. 첫째, 시험제품(군) 및 대조제품(군)의 투여용량, 투여기간, 연구대상자 수 등과 같은 폭로의 정도에 따른 분석, 둘째, 흔하게 발생할 수 있는 유해사례, 실험실적 검사치의 변동 등을 투여군 별이나 기타 이들의 발생에 영향을 미칠 수 있는 변수별로 나누어 분석하는 것, 마지막으로, 중대한 유해사례(serious adverse event)나 기타 중요한 유해사례(other significant adverse event)의 발생에 대한 자료를 따로 제시하는 것이다.
- 인체적용시험 중에 발생한 유해사례를 전체적으로 표나 그림의 형태로 제시하고 또 이에 대하여 간단하게 서술하여야 한다. 이때 유해사례는 투여군 별로 나누어 제시하여야 한다. 안전성 자료의 분석에는 연구에 참여하여 최소한 한번 이상의 시험용제품을 투여 받은 연구대상자를 대상으로 하는 것이 일반적이다. 특별한 이유가 없는 한, 인체적용시험 시작 이후에 발생한 유해사례는 해당 약물과의 인과관계에 상관없이 모두 제시하여야 한다.
- 중대한 유해사례와 기타 중요한 유해사례 등의 발생에 대해서는 보다 자세한 기술이 필요하다. 특히 사망의 경우에는, 사망이 발생했을 당시의 상황을 재현할 수 있을 정

도로 상세한 정보가 제공되어야 한다. ‘기타 중요한 유해사례’는 혈액학적 및 기타 실험실적 검사치의 이상 또는 기타 유해사례 등으로 인하여 시험용제품의 일시적 또는 영구적 투여중단, 용량의 감량 또는 기타 중요한 병용치료와 같은 적절한 조치를 요하는 경우를 의미한다. 만일 비정상적인 실험실 검사결과가 중대한 유해사례 또는 기타 중요한 유해사례의 범주에 해당된다면, 이에 준해서 정보를 제시하여야 한다.

- 이상의 자료에 근거하여 안전성에 대한 최종적인 결론을 내려야 하며, 특히 사망이나 기타 중대한 유해사례의 발생과 이에 대처한 조치내용 및 용량의 조절 등에 대하여 중점적으로 기술하여야 한다.

제 6절 요구르트용 균주의 발효 적합성 평가

1. 요구르트 균주의 성장특성

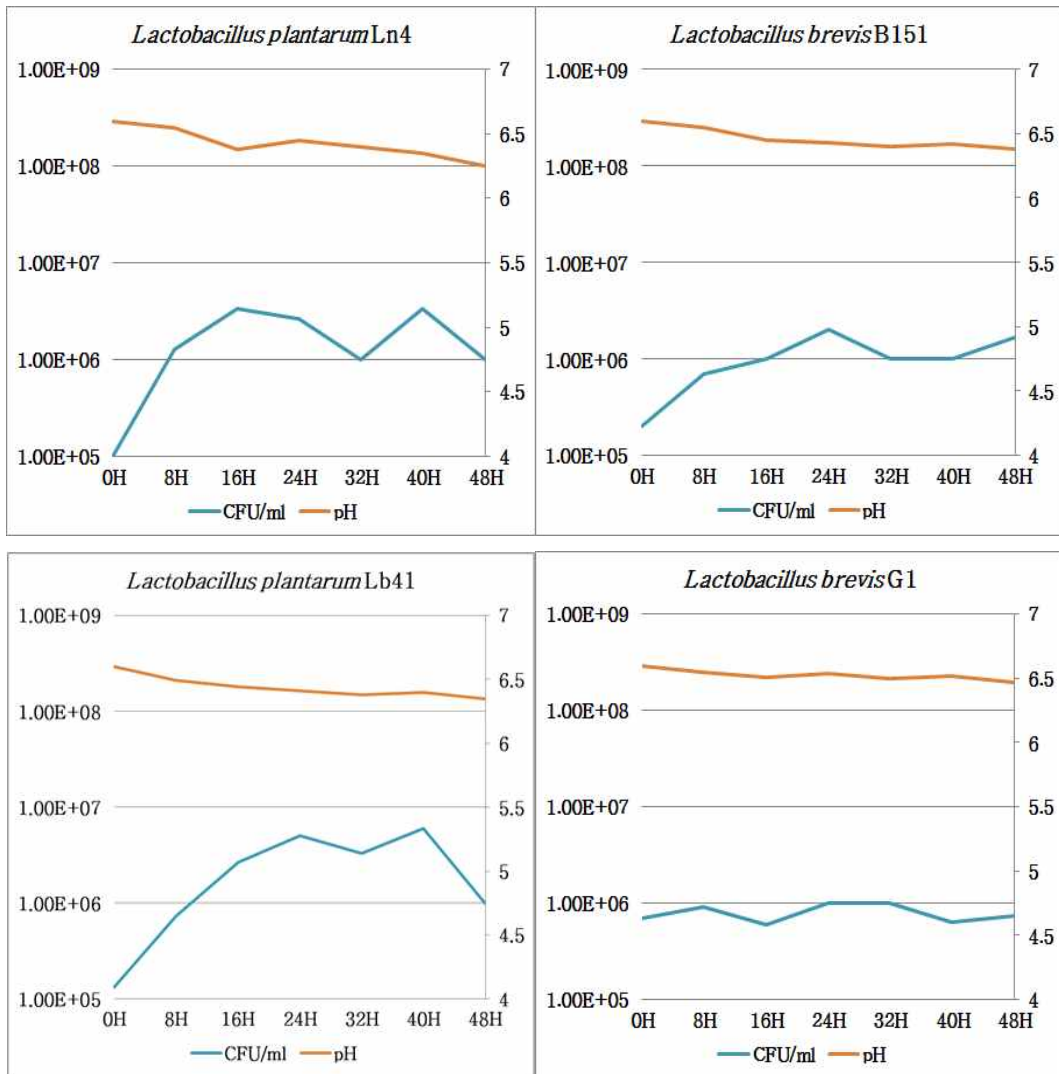
가. 실험방법

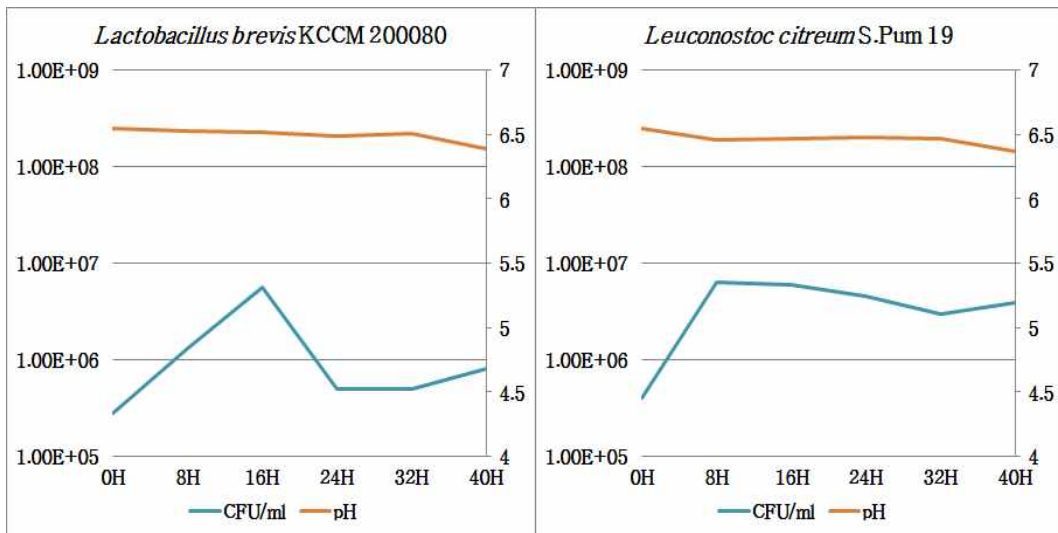
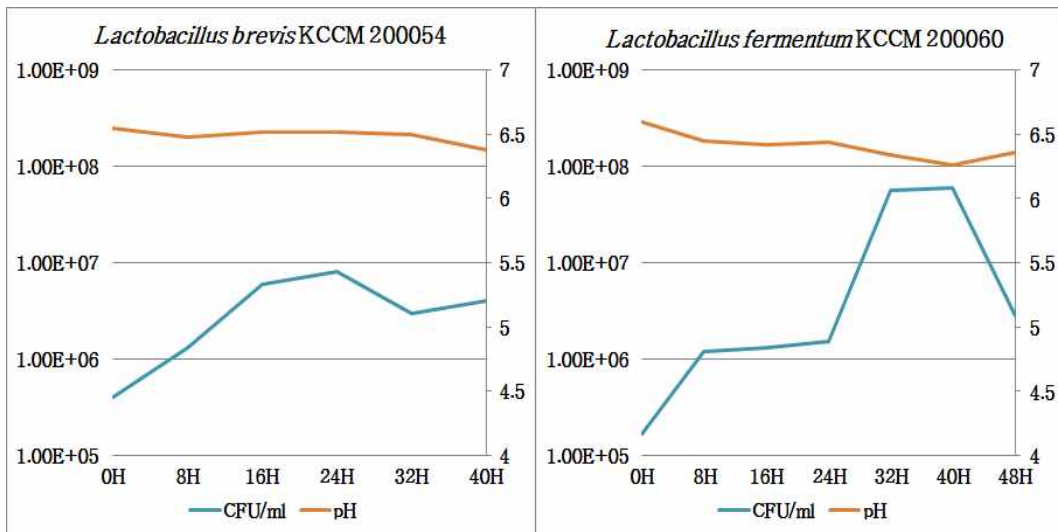
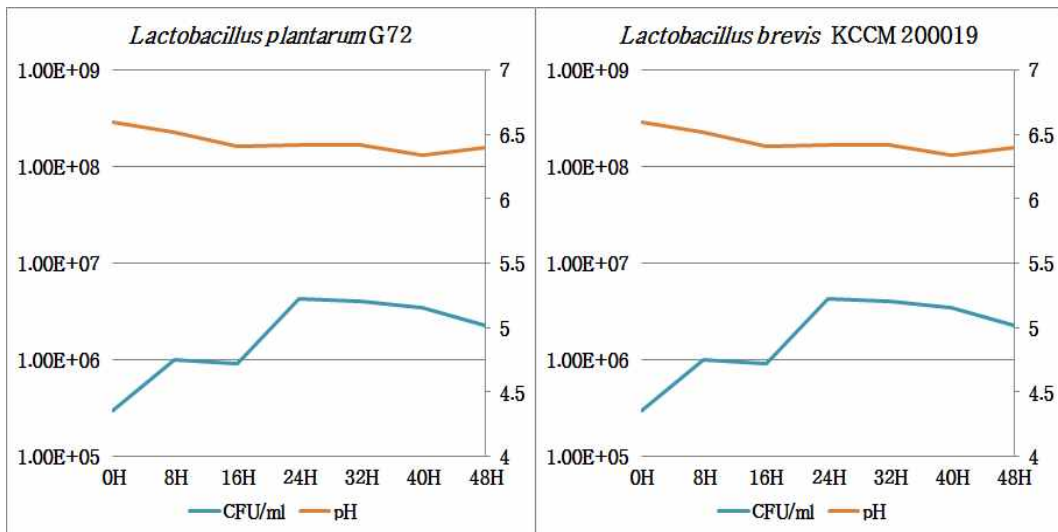
- 내산성/내담즙성, 효소분비능, 세포독성 및 장부착능을 기준으로 선발된 균주를 분양받아 사용하였다. 분양받은 균주의 de Man, Rogosa & Sharpe(MRS, Difco, USA) 액체배지에서 활성을 유지하며 진행하였다.
- 성장특성은 문헌조사 결과 주로 skim milk(10%, w/v) 배지에 접종하여 37°C에서 배양하는 것으로 확인되었다. 본 과제 실험은 skim milk 배지에 접종 후, 37°C에서 48시간까지 정지 배양하여 진행하였다. 이후 8시간 간격으로 취한 시료를 vortexing하여 균질화 후에 0.85% 생리식염수를 이용하여 십진법으로 희석하였다. 시료를 MRS 평판배지에 분주하고 도말 후, 37°C에서 48시간동안 배양하여 형성된 colony를 수를 기준으로 성장곡선을 측정하였다. 동시에 pH 값 또한 균질화 과정을 거친 시료를 pH meter(Thermo, USA)를 이용하여 측정하였다.

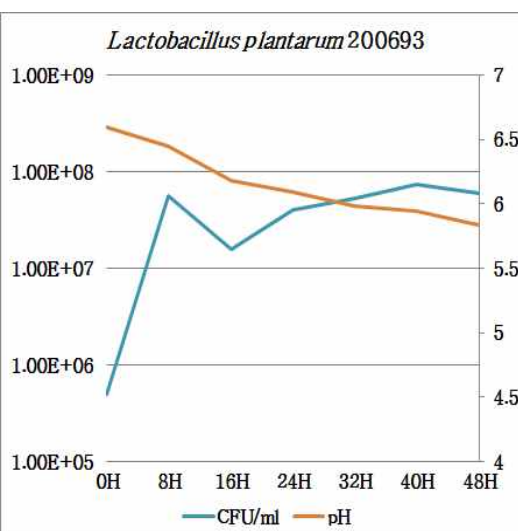
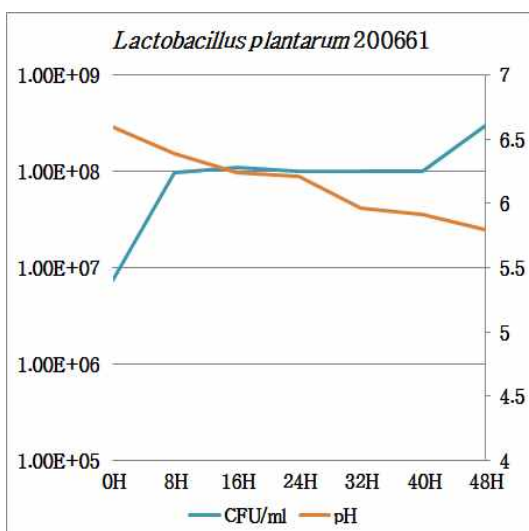
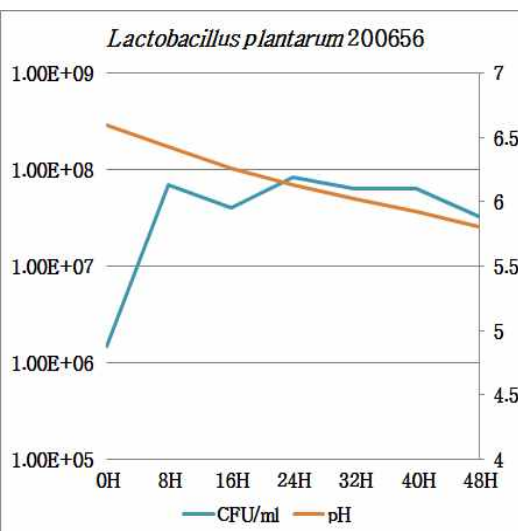
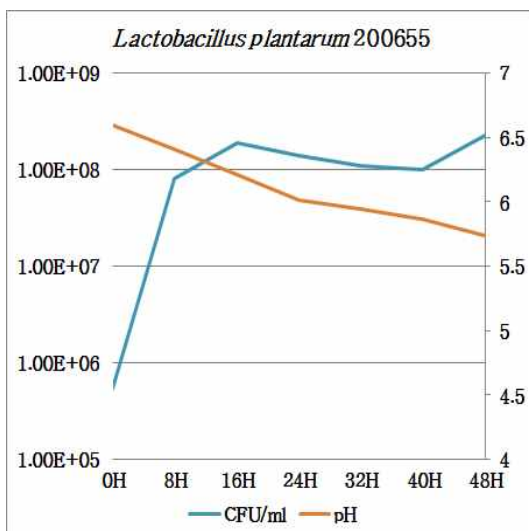
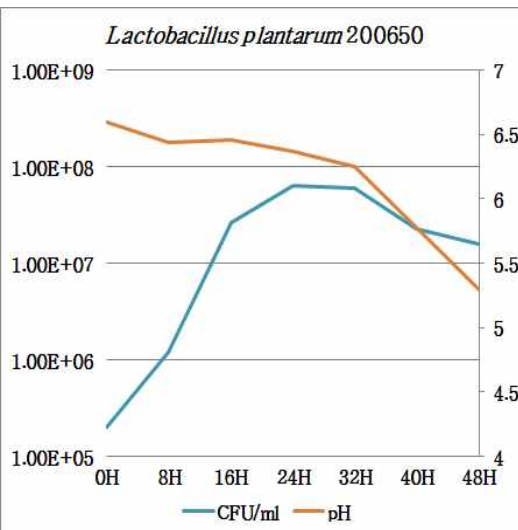
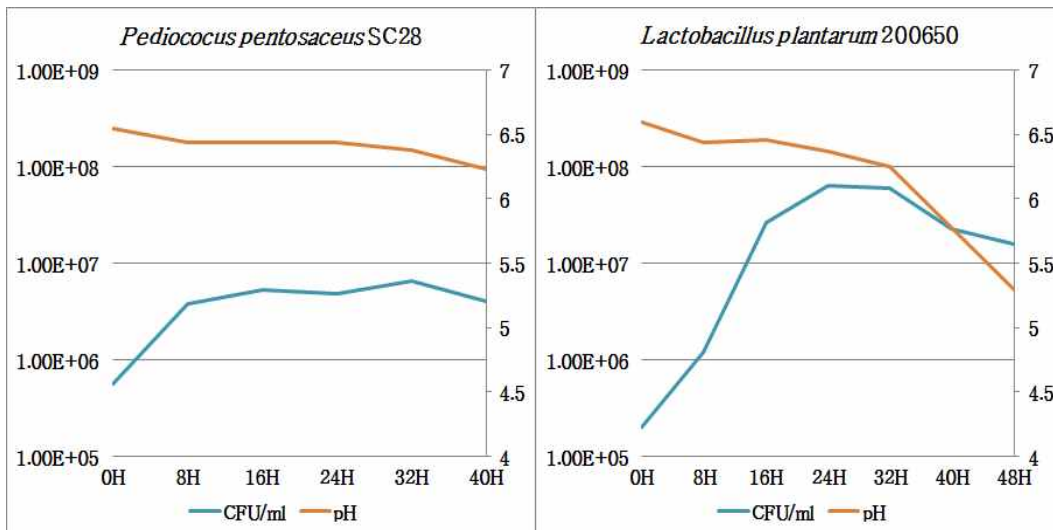
나. 연구결과 및 결론

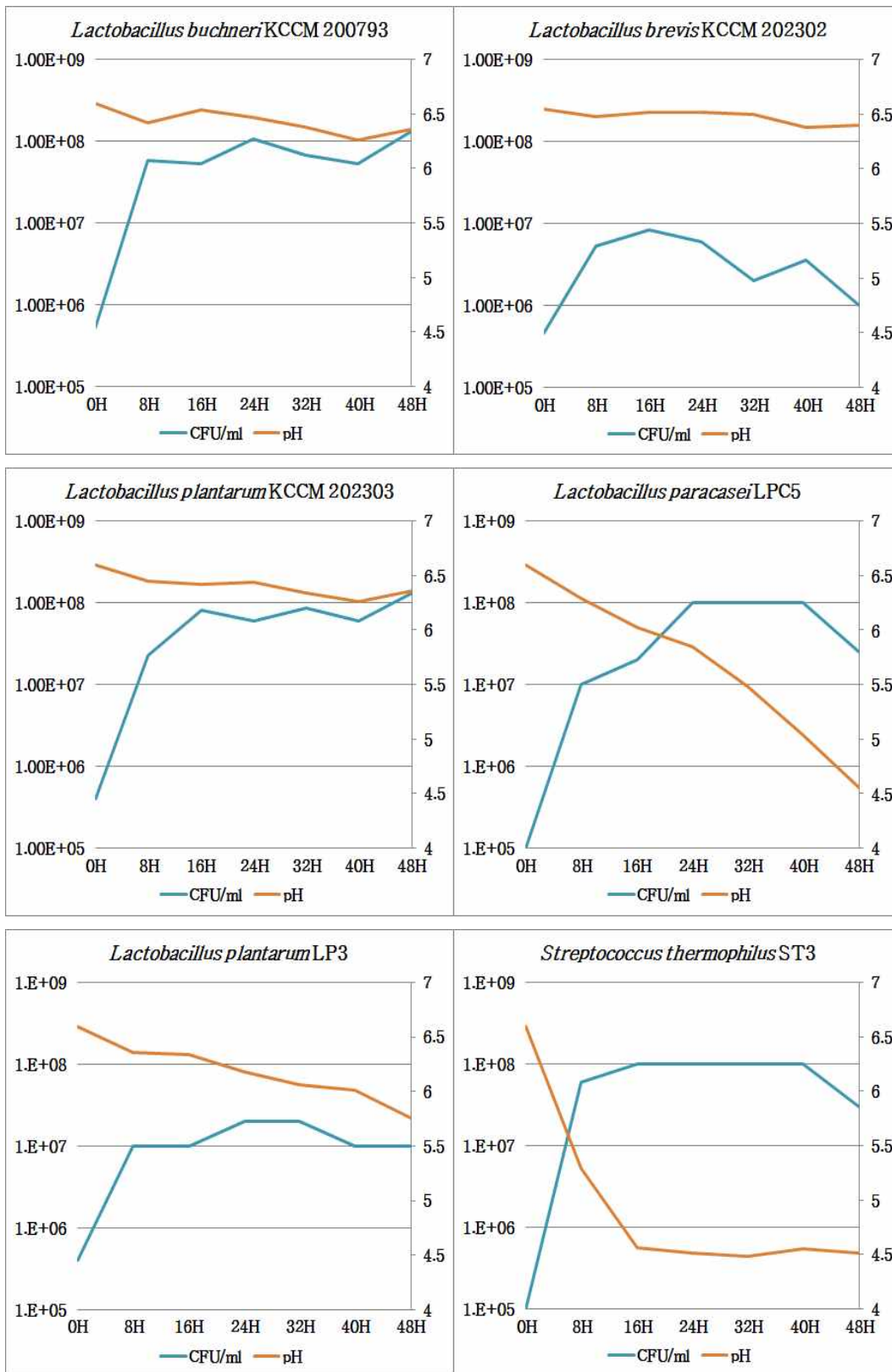
- Figure 3-1와 같이 선발된 32종의 균주를 요구르트의 기본배지라고 할 수 있는 10% (w/v) skim milk 배지에서의 배양했을 경우, 균주 별 최종균수는 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL 수준이었다. *Lactobacillus* 속 중에서는 *Lactobacillus paracasei* LPC5, *Lactobacillus acidophilus* LA1, *Lactobacillus rhamnosus* LR5, *Lactobacillus casei* LC5, *Lactobacillus plantarum* KCCM 200655, *Lactobacillus plantarum* KCCM 200661, *Lactobacillus buchneri* KCCM 200793, *Lactobacillus plantarum* KCCM 202303 균주의 최종균수가 호상 및 드링크 요구르트의 기준인 10^8 CFU/mL 이상을 나타내었으므로 요구르트용 종균으로서 이용 가능할 것으로 판단되었다. 이 외에도 *Streptococcus thermophilus* ST3, *Lactococcus lactis* SL6 균주들의 최종균수가 10^8 CFU/mL 이상을 나타내었다. 그 중에서도 *S. thermophilus* ST3, *L. lactis* SL6 및 *L. casei* LC5 균주는 배양 16시간 만에 10^8 CFU/mL 수준에 도달하였으며, 특히 *L. casei* LC5 균주는 5.0×10^8 CFU/mL 수준에 도달하였다. 한편, *Bifidobacteria* 균주 3종(BL3, BF3, BG7) 모두 10^7 초반 또는 중반 CFU/mL 수준에 머물렀으나, BG7 균주의 경우에는 배양시간을 연장할 경우에 최종균수가 증가할 것으로 예측되었다. 호상 및 드링크 요구르트의 최소균수 기준(10^8 CFU/mL 이상)을 고려할 때, 최종균수가 10^8 CFU/mL 이하의 성장을 나타내는 균주들은 요구르트 발효용 종균으로 적합하지 않을 것으로 판단되었다.

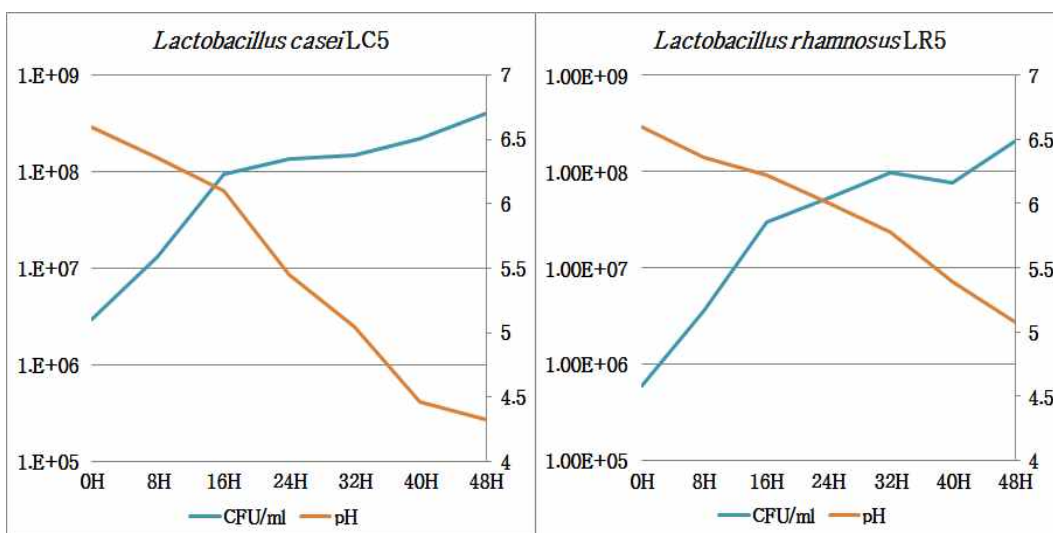
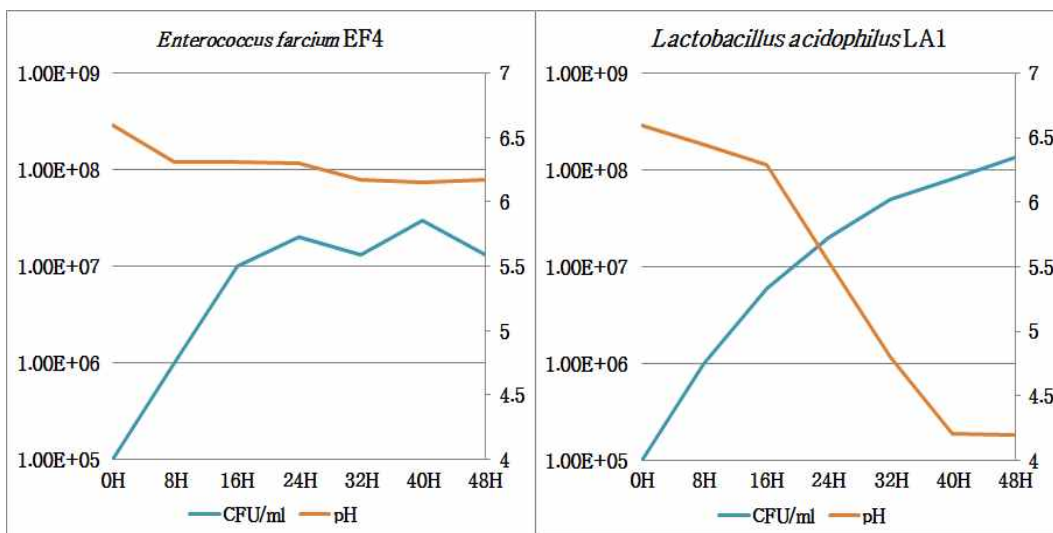
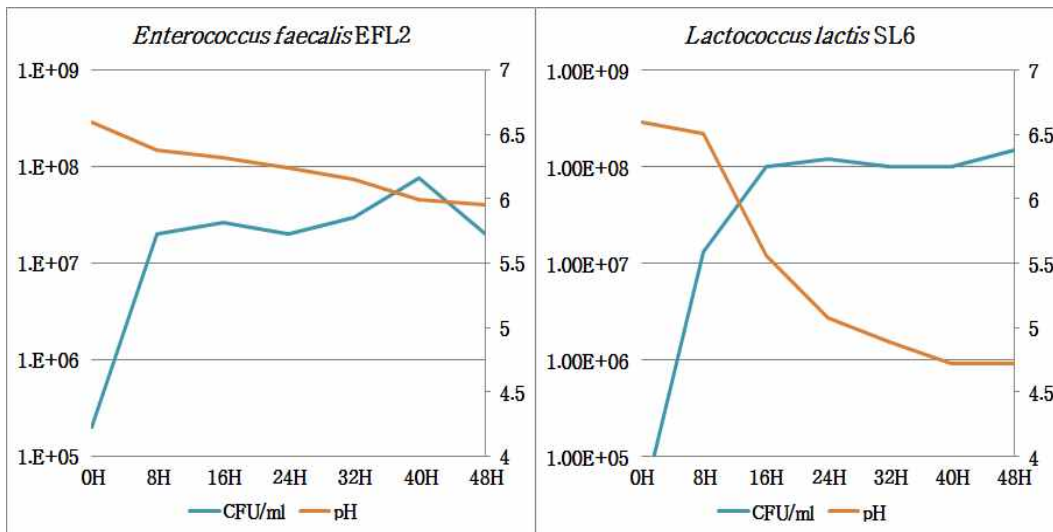
- 그럼에도 불구하고, 다른 probiotic 특성이 매우 우수한 균주의 경우에는, 요구르트 발효율이 아니라 별도의 배지에서 배양한 후에 요구르트에 첨가하는 방법도 고려될 수 있을 것으로 사료되었다. pH를 시간대 별로 측정된 결과, 균수 증가와 반비례하는 경향을 보였다. 이는 10^8 CFU/mL 이상의 균수를 나타낸 균주들의 배양액 pH는 48시간 후에 대부분 4.0~4.5사이였으며, 이는 호상 및 드링크 요구르트의 배양종료 pH와 유사한 수치로 확인되었다.
- 연구 결과, 건강기능식품 및 유제품용 종균으로서 발효적합성 기준 충족한 균주는 타협동기관의 고농도배양 및 배지최적화 연구단계로 넘어가 제품화 후보균주로서 가치가 있을 것으로 사료된다.











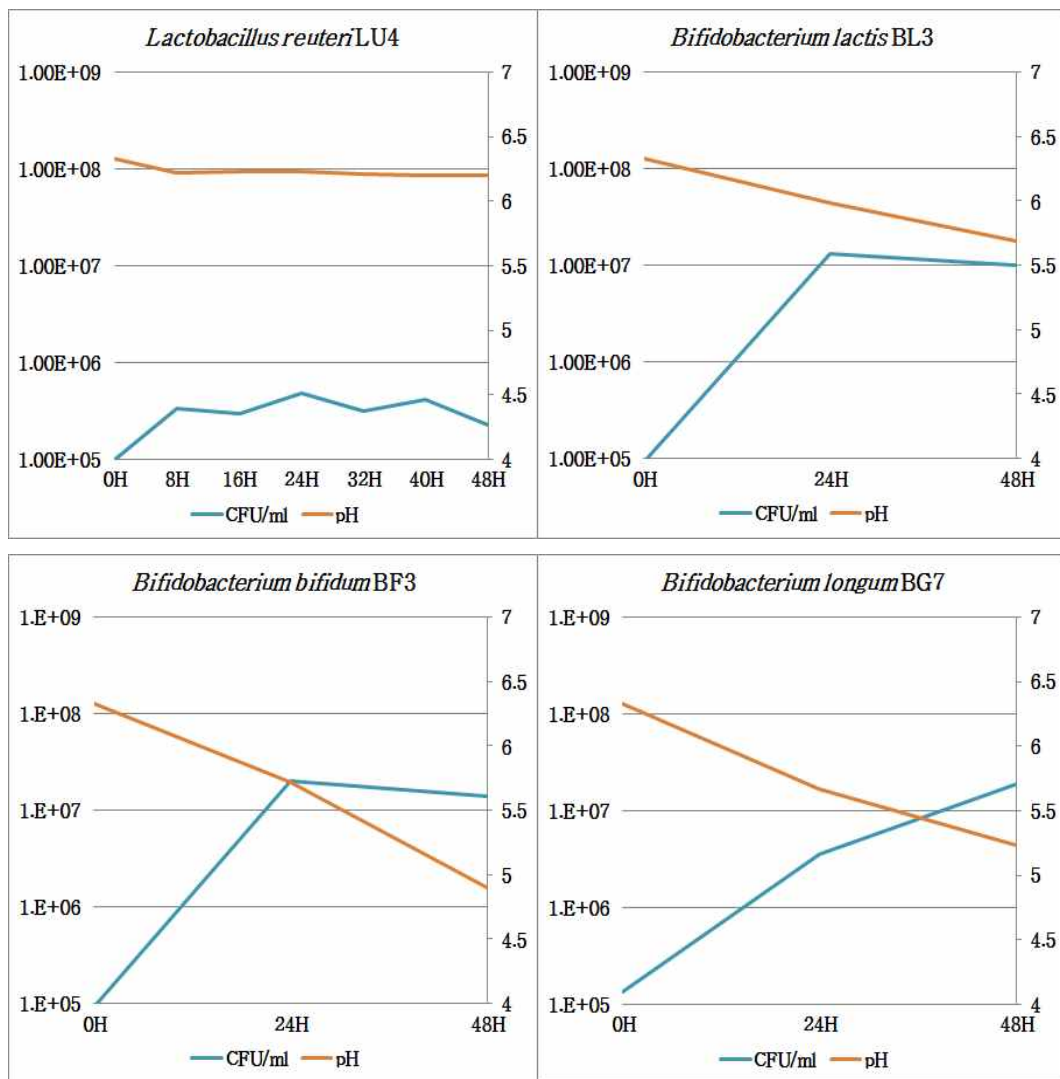


Figure 3-1. Changes in the growth and pH of the selected lactic acid bacterial strains during incubation in skim milk medium at 37°C.

2. 유기산 패턴 및 적정산도 평가

가. 실험방법

- 1차 선발된 유산균들을 skim milk(10%) 배지에서 37°C에서 48시간까지 정치배양하였다. 배양 48시간에서 시료를 vortexing하여 균질화 과정을 거친 후에 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)하였다. 이 후 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과 후에 유기산 생성 패턴을 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 통해서 분석하였다. 적정산도는 배양이 종료된 시료를 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.3이 될 때까지 중화하여 적정하였다. 이후 아래의 계산식에 따라 환산계수가 0.009인 젖산 함량(%)으로 나타내었다.

$$\text{Lactic acid (\%)} = \frac{0.009 \times \text{ml of } N \text{ NaOH} \times F}{\text{Sample (ml)}} \times 100$$

F= factor of 0.1 N, NaOH= 1.0

- HPLC 실험조건은 다음과 같다.
 - Detector: RI detector and UV detector(210 nm)
 - Solvent: 0.01 N H₂SO₄ 사용, 0.5 mL/min
 - Column 종류: Bio-Rad HP-87H column(ion exchange 방식)
 - Column 온도: 40°C

나. 연구결과 및 결론

- 건강기능식품 및 유제품 종균용으로 선발된 균주들을 skim milk(10%, w/v)배지에서 48시간 배양 후 HPLC를 이용하여 상등액의 유기산(lactic acid, citric acid, formic acid, acetic acid)을 분석하였다. 분석결과(Table 3-1) 성장특성 실험에서 충분한 생장능을 보이며, 발효특성을 보인 균주(*Lactobacillus lactis* SL6, *Lactobacillus rhamnosus* LR5, *Lactobacillus casei* LC5, *Lactobacillus acidophilus* LA1, *Lactobacillus paracasei* LPC5, *Streptococcus thermophilus* ST3, *Bifidobacterium bifidum* BF3, *Bifidobacterium longum* BG7)이 0.4~0.8%의 유기산 총량이 검출되었으며, 발효 특성을 보이지 않은 균주에서는 0.4% 이하의 유기산 총량이 검출되었다. 특히 발효특성을 보인 균주에서 생성된 유기산 패턴은 lactic acid가 주로 생성됨이 확인되었다. 이는 발효유 제조시 lactic acid 함량이 급격하게 증가한다는 보고와 일치하는 결과를 보이며, 요구르트용 종균으로서 이용 가능할 것으로 판단되었다.

- 적정산도(titratable acidity)는 시중 발효유에서 0.9~1.4% 알려져 있다. 분석 결과(Table 3-1), 발효특성을 보인 균주(*Lactobacillus lactis* SL6, *Lactobacillus rhamnosus* LR5, *Lactobacillus casei* LC5, *Lactobacillus acidophilus* LA1, *Lactobacillus paracasei* LPC5, *Streptococcus thermophilus* ST3, *Bifidobacterium bifidum* BF3, *Bifidobacterium longum* BG7)의 적정산도가 0.45~0.83%로 확인되었다. 이는 요구르트 발효용 기준으로 적합하지 않을 것으로 판단되었다. 그러나 성장특성이 우수하기 때문에, 적정산도 기준에 달하는 균주와 혼합 배양하거나 고농도배양 및 배지최적화 연구가 다음 단계에서 필요할 것으로 사료된다.

Table 3-1. Profiles of organic acids and titratable acidity generated by lactic acid bacteria during incubation at skim milk medium

Strain	Organic acid content (%)				Titratable acidity (%)
	Lactic acid	Citric acid	Formic acid	Acetic acid	
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	-	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus plantarum</i> Ln4	-	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus plantarum</i> B151	-	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus brevis</i> G1	-	-	-	-	0.210
<i>Lactobacillus plantarum</i> G72	-	-	-	-	0.220
<i>Lactobacillus lactis</i> SL6	0.590	-	-	-	0.640
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR5	0.420	-	-	-	0.550
<i>Lactobacillus reuteri</i> LU4	0.038	-	-	-	0.150
<i>Lactobacillus casei</i> LC5	0.840	-	0.040	0.150	0.850
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA1	0.830	-	-	-	0.830
<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC5	0.730	-	0.080	-	0.670
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP3	0.150	-	-	-	0.280
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST3	0.800	-	-	-	0.780
<i>Enterococcus faecalis</i> EFL2	0.071	-	-	-	0.250
<i>Enterococcus faecium</i> EF4	0.020	-	-	-	0.250
<i>Bifidobacterium lactis</i> BL3	0.013	-	-	0.100	0.190
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BF3	0.220	0.400	-	0.290	0.450
<i>Bifidobacterium longum</i> BG7	0.130	0.340	-	0.130	0.550
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC28	0.060	-	-	-	0.350
<i>Leuconostoc sitreum</i> S.Pum 19	0.030	-	-	-	0.250
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200019	-	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200054	-	-	-	-	0.200

<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 200060	-	-	-	-	0.450
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 200080	-	-	-	-	0.450
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200650	0.010	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200655	0.100	-	-	-	0.200
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200656	0.020	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200661	0.120	-	-	-	0.250
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 200693	0.130	-	-	-	0.250
<i>Lactobacillus buchneri</i> KCCM 200793	0.050	-	-	-	0.190
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 202302	-	-	-	-	0.150
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 202303	0.020	-	-	-	0.195

3. 저장 안정성

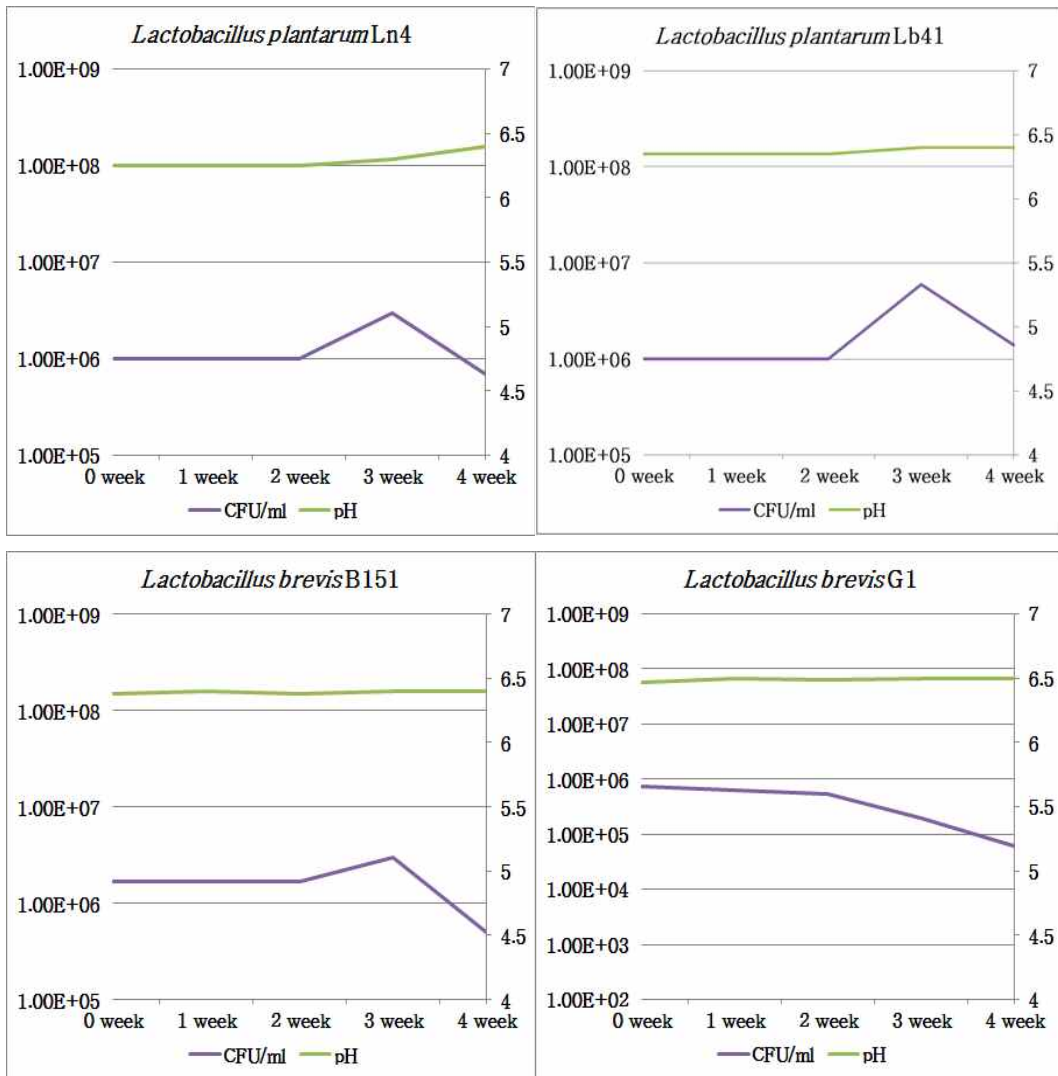
가. 실험방법

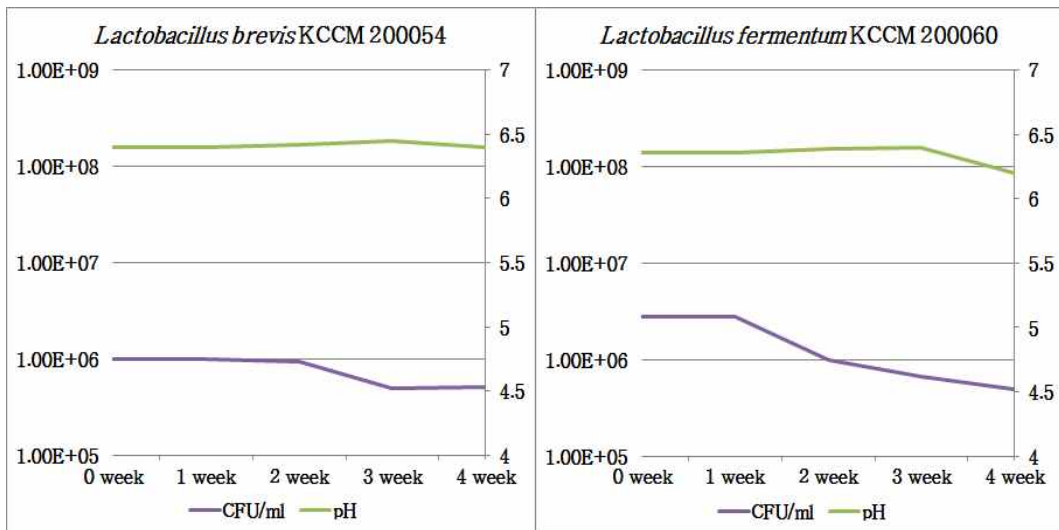
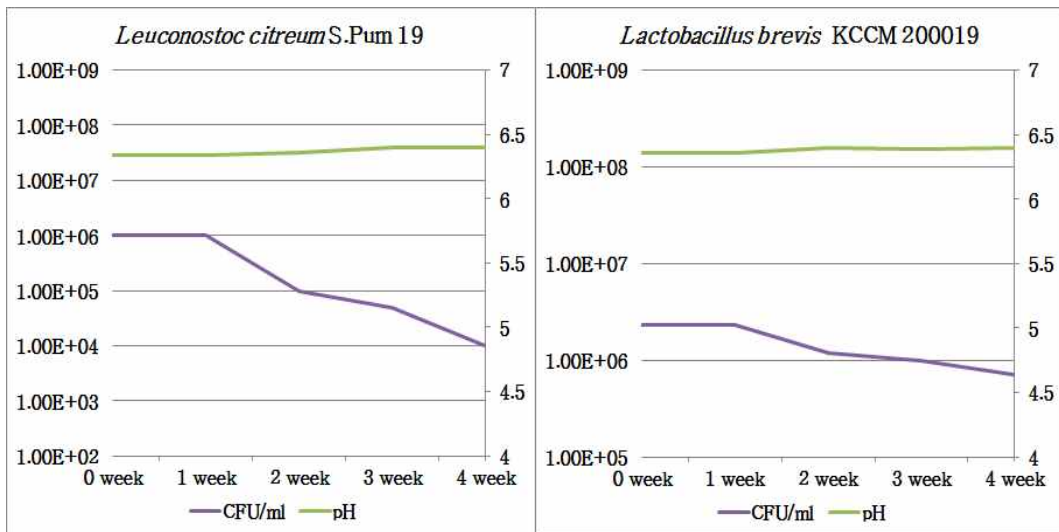
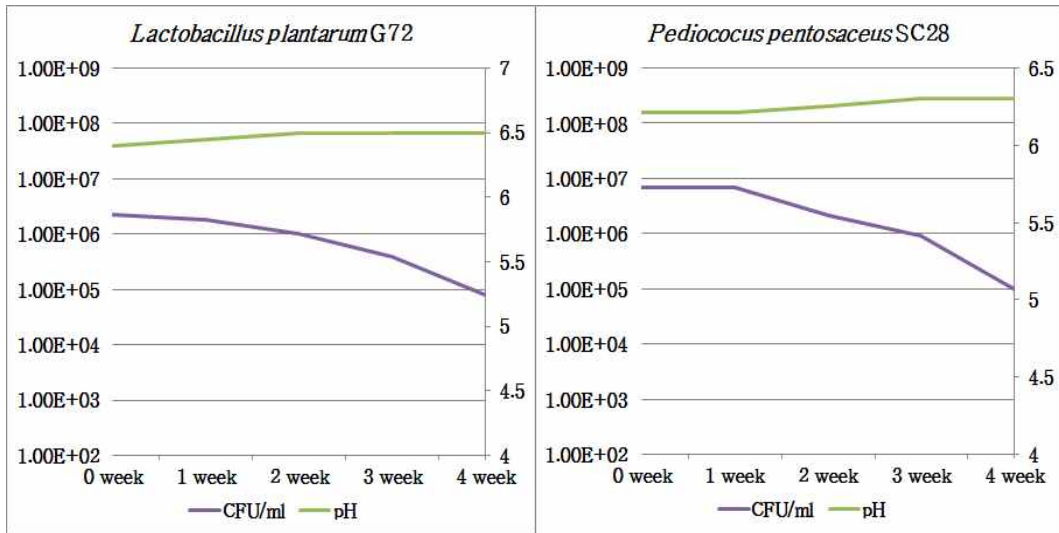
- 생장특성 실험과 마찬가지로 타 협동기관에서 선발된 균주를 skim milk(10%,w/v) 배지에 0.1% 접종하여 37°C에서 48시간까지 정치배양한 후에, 균질화를 거쳐 1 mL씩 소분하여 4°C에서 저장하였다. 1주 간격으로 시료를 vortexing하여 균질화 후에 0.85% 생리식염수를 이용하여 십진법으로 희석하였으며, MRS 평판배지에 도말하였다. 37°C에서 48시간동안 배양한 후, 형성된 colony를 계수하여 4주차까지 균주 별 저장 안정성을 측정하였다.

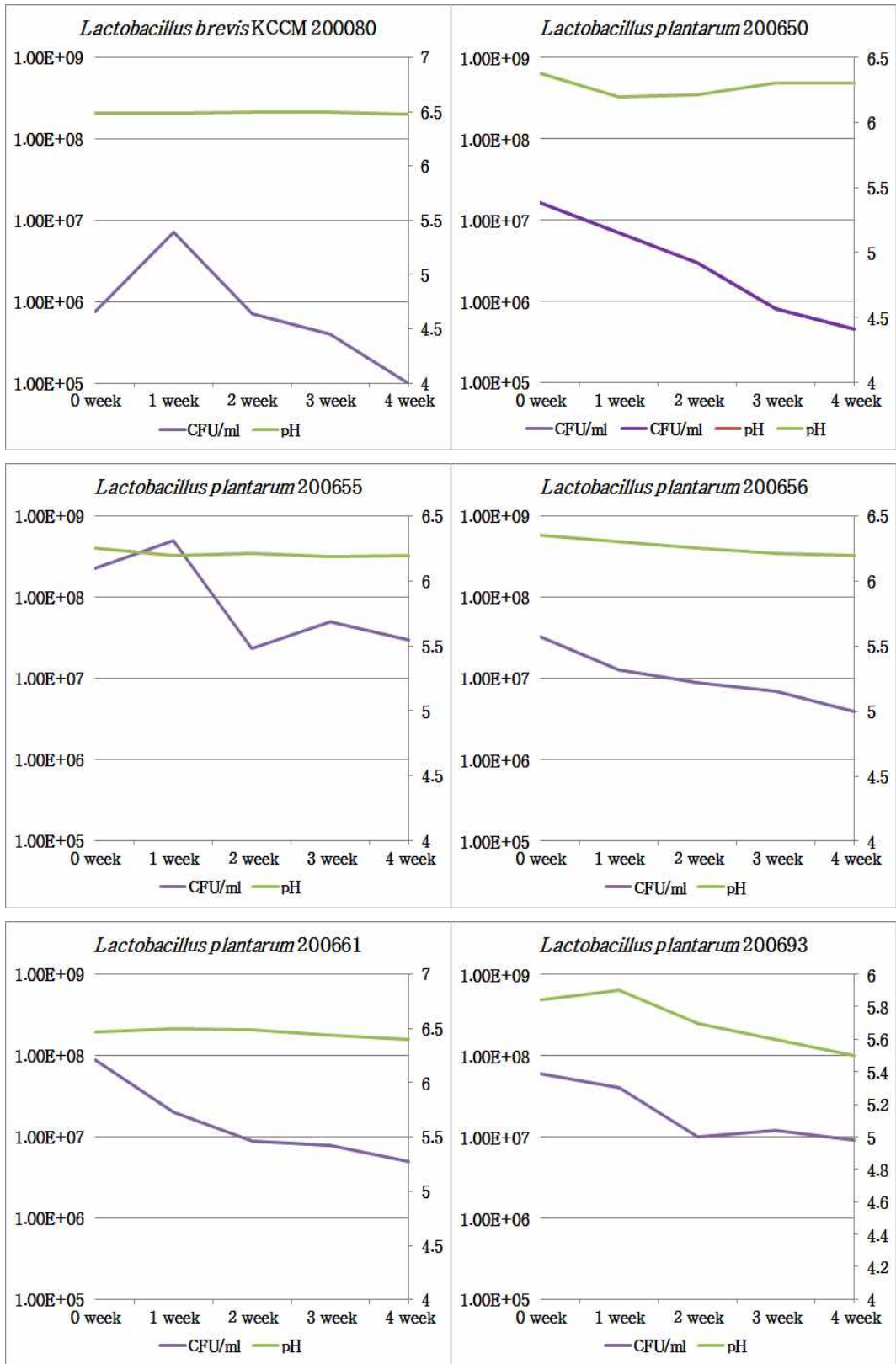
나. 연구결과 및 결론

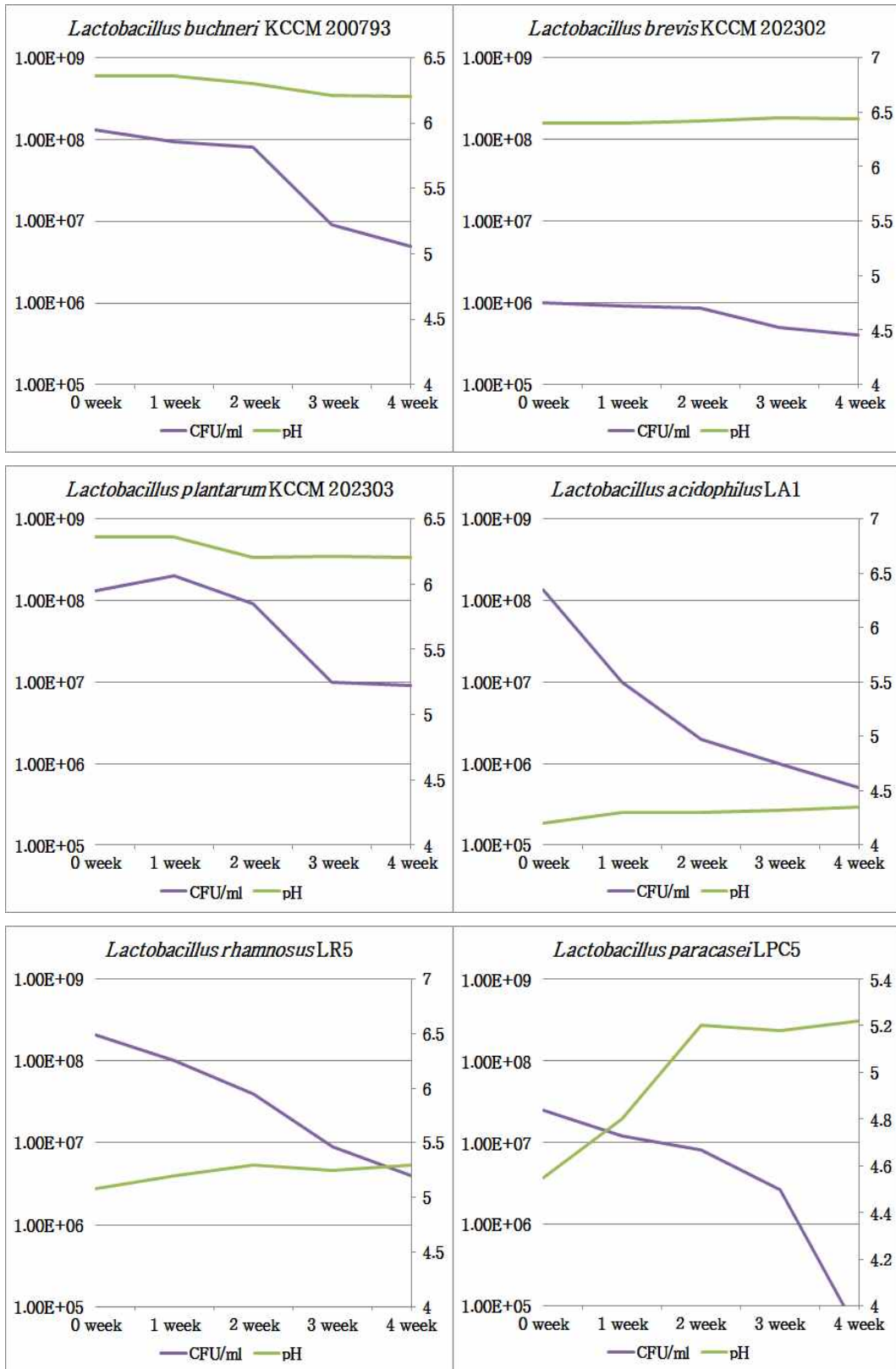
- 실험결과 균주에 따라 저장안정성에 큰 차이를 보였는데, *Lactobacillus paracasei* LP C5는 저장 3주까지 점진적인 감소 추세를 나타내었다(1/10로 감소), 3주 이후부터 급격히 감소하였다. *Lactobacillus acidophilus* LA1는 저장기간 중에 지속적으로 감소하여, 저장 3주 후에는 초기균수의 1% 수준으로 감소하였다. *Lactobacillus rhamnosus* LR5은 저장기간 중에 지속적으로 감소하여, 저장 3주 후에는 초기균수의 10% 이하로 감소하였다. *Lactobacillus casei* LC5는 저장 1주까지는 균수에 큰 변화가 없었으나, 2주경부터 점진적으로 감소하였다. *Streptococcus thermophilus* ST3는 저장 초기부터 큰 폭으로 감소하여 1주 후에는 초기균수의 1% 이하로 감소하였다. *Lactococcus lactis* SL6는 저장 4주 동안 균수변화가 거의 없었으며, 가장 높은 저장안정성을 나타내었다.

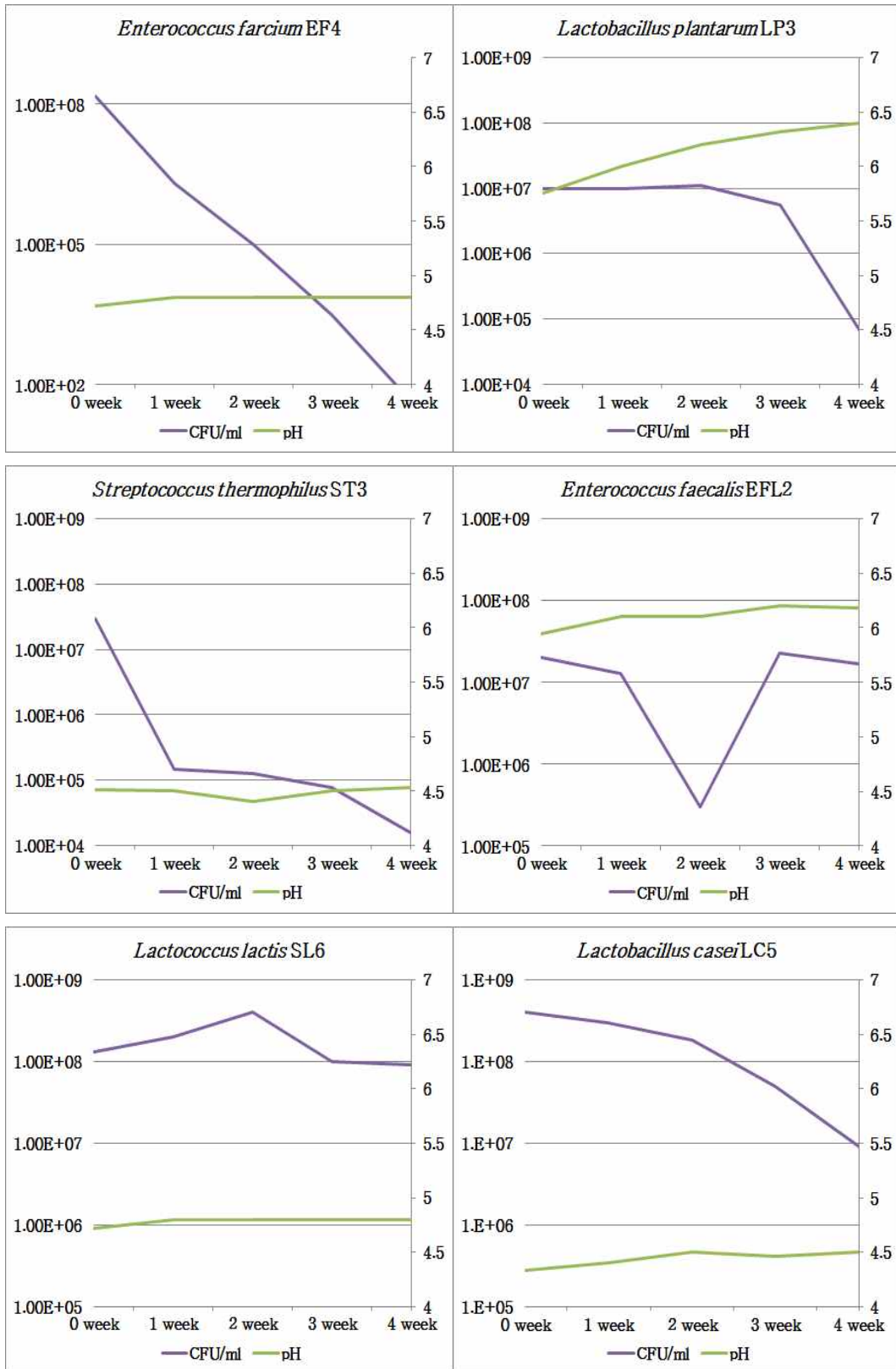
- 이외에도 *Lactobacillus plantarum* KCCM 200656, *Lactobacillus plantarum* KCCM 200693, *Lactobacillus plantarum* KCCM 202303, *Lactobacillus brevis* KCCM 200054, *Lactobacillus fermentum* KCCM 200060의 경우 균수(CFU/mL)은 낮으나 1/10 이하의 감소율을 보이며 저장안정성을 보였다. 식품공전에서 농후 발효유 최종균수가 10^8 CFU/mL 이상임을 고시하고 있으며, 이는 성장특성과 마찬가지로 발효유 제조시 발효적합성 기준으로서 사용가능하다고 사료된다. 따라서 상기 저장안정성이 우수한 균주는 이용한 건강기능식품 및 유제품용 제품화 후보로서 가치가 있을 것으로 사료된다.











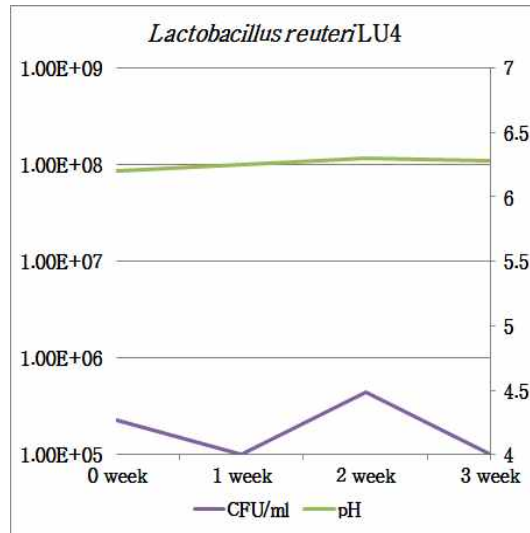


Figure 3-2. Storage stability of lactic acid bacteria at 4°C after incubation for 48 h at skim milk medium.

4. 기능성물질 탐색

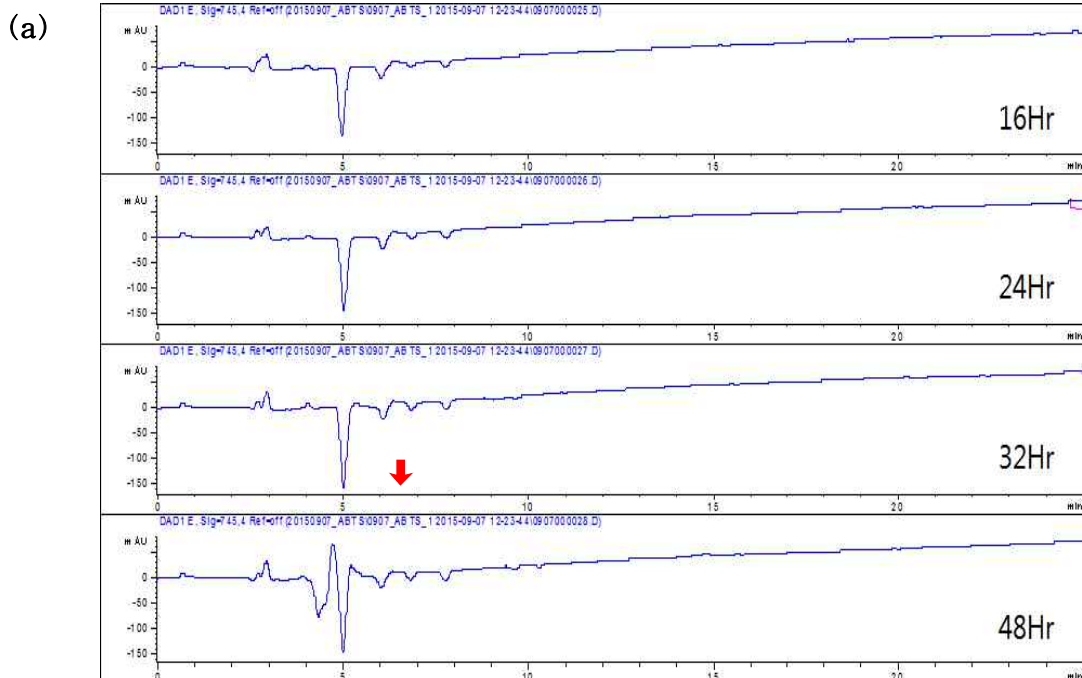
가. 실험방법

- 선발되어 분양받은 균주들 중에서 ABTS free radical scavenging assay를 통해 항산화능이 있는 것으로 확인된 균주의 발효액으로부터 항산화 물질을 정제하고 동정을 실시하였다. 각 균주를 50 mL skim milk(10%, w/v)배지에 0.1% 접종하여 37°C에서 48시간까지 정치 배양하여 시료를 준비하였다. 사전 조사결과 작은 분자량의 항산화 펩타이드로 예상되었기 때문에(결과 미제시), 배양상등액을 황산암모늄 침전법을 이용하여 분자량이 큰 단백질을 침전시켰다. 이후 원심분리(10,000×g, 20 min, 4°C)하여 상등액 샘플을 HPLC/MS/MS방법으로 항산화 펩타이드를 확인하였다.
- 샘플 중에서 *Lactobacillus casei* LC5, *Lactococcus lactis* SL6 2개의 항산화 펩타이드 후보균을 얻었다(Table 3-2). 최종적으로 *Lactobacillus casei* LC5, *Lactococcus lactis* SL6 상등액에서 각각 3개, 2개의 펩타이드를 합성하였으며(Table 3-3), ABTS/DPPH free radical scavenging assay를 통해 합성 펩타이드의 항산화능을 확인하였다.

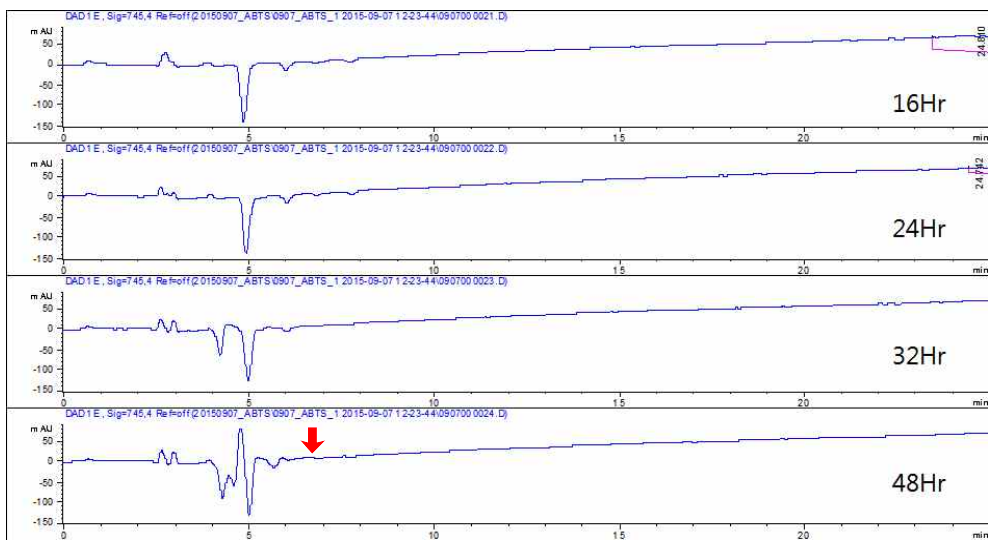
나. 연구결과 및 결론

- 건강기능식품용 및 유제품 종균용 균주의 추가적인 기능성을 확인하기 위해 문헌조사결과 많은 논문에서 균주의 항산화능에 대한 연구가 진행됨을 알 수 있었다. 따라서 균주의 배양상등액에서 ABTS free radical scavenging assay로 항산화능 유무를 확인하였다.

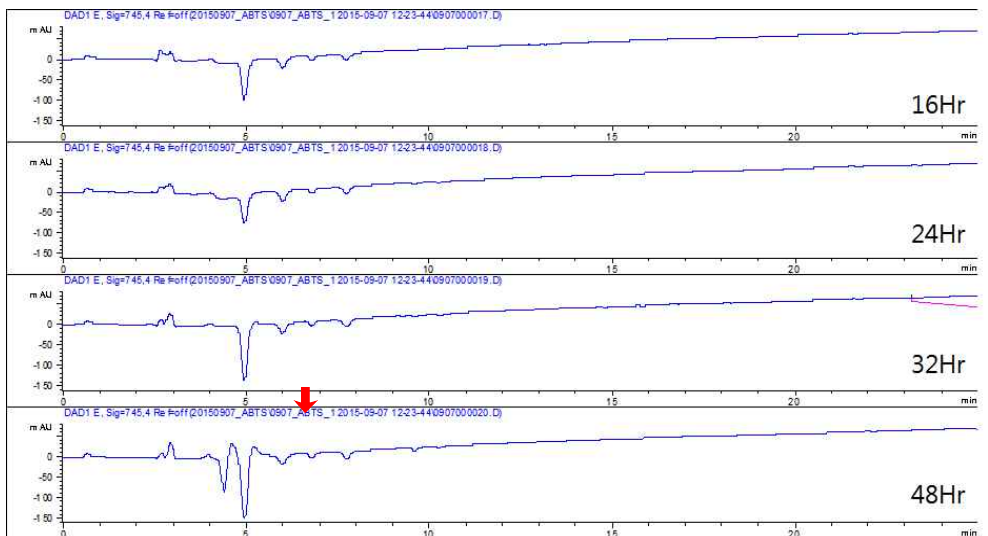
- 연구 결과, 붉은색 화살표 위치의 크로마토그램(Figure 3-3)에서 보는 바와 같이, 음의 값으로 흡광도 변화가 발생하면 항산화능이 있는 것으로 판단하게 된다. 선발된 균주 배양액을 분석한 결과, *L. casei* LC5, *L. acidophilus* LA1, *L. paracasei* LPC5, *L. rhamnosus* LR5 및 *L. lactis* SL6 균주의 배양액에서 5분대에서 항산화능이 있는 것으로 나타났으며, *L. acidophilus* LA1, *L. paracasei* LPC5, *L. lactis* SL6 균주는 4분 20초대에도 항산화능 피크를 나타내었다. LC/MSMS 분석결과 다양한 크기의 펩타이드가 확인되었으며(Table 3-2), 이중 4개의 항산화 펩타이드 후보를 선별하여 합성하였다(Table 3-3). 합성 펩타이드의 항산화능을 측정한 결과, 5개의 펩타이드 모두 DPPH assay에서는 6~7.5%의 항산화능을 보였으며, ABTS assay에서는 *L. lactis* SL6 유래의 5번 펩타이드에서만 상대적으로 강한 항산화능 활성을 보였다(data not shown). 항산화능 활성이 강하게 나타난 펩타이드(FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW)의 항산화능을 대표적인 항산화 표준품인 trolox의 IC50 값($15.37 \pm 0.52 \mu\text{M}$)과 비교하여 $28.25 \pm 0.96 \mu\text{M}$ 나타냈다 (Table 3-4). 또한 항산화능 펩타이드의 아미노산 sequence를 BLAST 검색한 결과, α_{s1} -casein 유래의 펩타이드로 확인되었다(Figure 3-4). 한편, 배양시간이 길어질수록 항산화능은 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 탈지분유에 포함되어 있는 우유단백질이 유산균 배양 중에 분해되면서 생성되는 펩타이드의 일부가 항산화능을 나타내는 것으로 추정된다. 건강기능식품 및 유제품 중군으로서 항산화능과 같은 추가 기능성을 가지는 균주들은 연구개발 추진 계획상 산업화 연구 단계에서 주요 고려사항이 될 수 있을 것으로 사료된다.



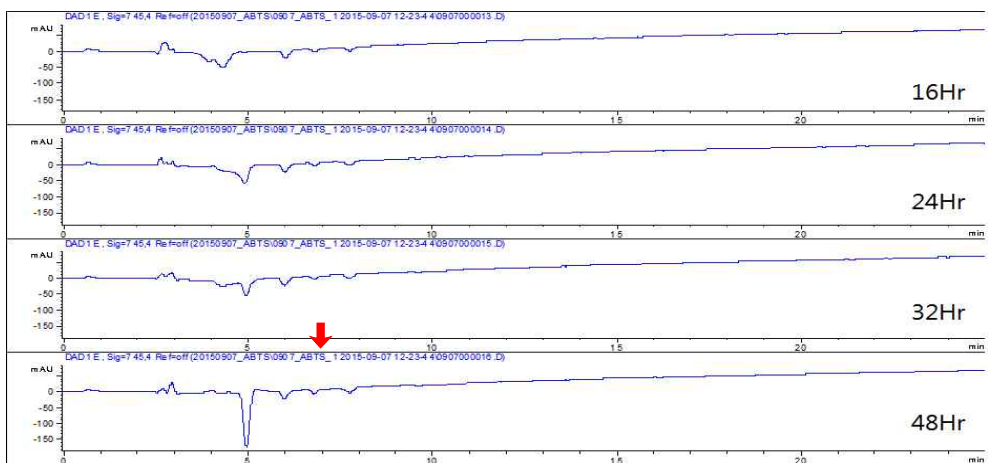
(b)



(c)



(d)



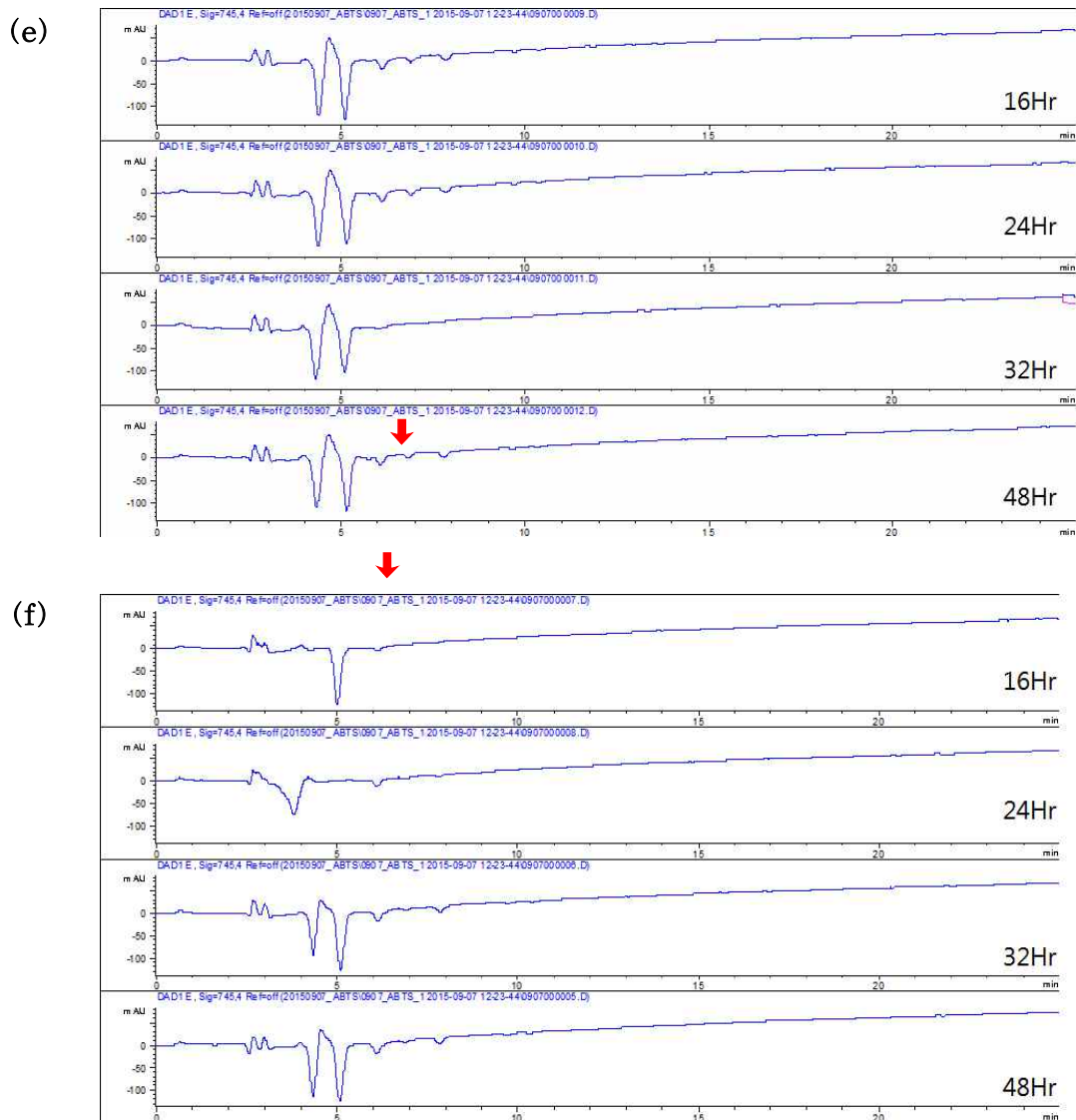


Figure 3-3. HPLC chromatogram describing the antioxidant activity of the culture supernatant. (a) *Lactobacillus casei* LC5; (b) *Lactobacillus acidophilus* LA1; (c) *Lactobacillus paracasei* LPC5; (d) *Lactobacillus rhamnosus* LR5; (e) *Streptococcus thermophilus* ST3; (f) *Lactococcus lactis* SL6.

Table 3-2. Casein-derived peptides identified by liquid chromatography electrospray ionization time-of-flight tandem mass spectrometry in the <3 kDa fraction of the 48 h fermentates obtained from fermentation of skim milk by *Lactococcus lactis* SL6, *Lactobacillus casei* LC5

Sequence	Conf	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	z
APSFSDIPNPIGSEN	99	1543.7153	772.8649	1543.7155	2
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMP	99	2334.0708	779.0309	2334.0686	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMP	99	2334.0708	779.0309	2334.0686	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2405	878.7541	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2633.2402	878.7540	2633.2319	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2617.2439	873.4219	2617.2371	3
APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2617.2439	873.4219	2617.2371	3
IPNPIGSENSEKTTMP	99	1729.8229	865.9187	1729.8192	2
IPNPIGSENSEKTTMP	99	1713.8229	857.9187	1713.8243	2
IPNPIGSENSEKTTMPLW	<1	2028.9075	1015.4610	2028.9827	2
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2028.9075	1015.4610	2028.9827	2
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2028.9874	1015.5010	2028.9827	2
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2028.9841	677.3353	2028.9827	3
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2028.9874	1015.5010	2028.9827	2
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2028.9841	677.3353	2028.9827	3
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2012.9895	1007.5020	2012.9877	2
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2028.9882	677.3367	2028.9827	3
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2012.9928	672.0049	2012.9877	3
IPNPIGSENSEKTTMPLW	99	2012.9928	672.0049	2012.9877	3

m/z= mass to charge ratio, where z= number of positively charged ions.

Table 3-3. List of antioxidant synthetic peptides

No.	Strains	Sequence	M.W.
1	<i>Lactobacillus casei</i> LC5	TQTPVVVPPFLQPEVM	1782.15
2	<i>Lactobacillus casei</i> LC5	MHQPHQPLPPTVM	1512.83
3	<i>Lactobacillus casei</i> LC5	IPNPIGSENSEKTTMP	1714.93
4	<i>Lactococcus lactis</i> SL6	ASPSFSDIPNPIGSENSEKTTMP	2319.65
5	<i>Lactococcus lactis</i> SL6	FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	2363.76

Table 3-4. List of antioxidant synthetic peptides

Synthetic peptide sequence	Radical scavenging activity ¹⁾	
	ABTS ²⁾	DPPH ³⁾
FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	70.83±1.15%	89.73±1.19%

¹⁾Each observation is mean of triplicates of each batch. Results are expressed as mean of scores ± standard error of mean.

²⁾ABTS radical scavenging was tested at 5 µM.

³⁾DPPH radical scavenging was tested at 50 µM.

α_{s1} -casein : MKLLIILTCLV AVALARPKHP IKHQGLPQEV LNENLLRFFV APFPEVFGKE
 KVNELSKDI GSESTEDQAM EDIKQMEAES ISSSEEIVPN SVEQKHIQKE
 HIQKE
 DVPSERYLGY LEQLRLKKY KVPQLEIVPN SAEERLHSMK EGIHAQQKEP
 DVPSER¹⁾
 MIGVNQELAY FYPELFRQFY QLDAYPSGAW YYVPLGTQYT DAPSFSDIPN
 FSDIPN
 PIGSENSEKT TEMPLW
 PIGSENSEKT TEMPLW

1) : Gupta et al., 2010. Identification of antioxidant peptides in cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 300. *Milchwissenschaft*.

Figure 3-4. BLAST search result of the peptide(FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW).

5. 연구개발성과

가. 논문게재 성과

- Sang Hoon Kim, Ji Yoon Lee, Marilen P. Balolong, Jin-Eung Kim Hyun-Dong Paik and Dae-Kyung Kang. Identification and Characterization of a Novel Antioxidant peptide from Bovine Skim Milk Fermented by *Lactococcus lactis* SL6. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. 37(3): 402-409(2017).

나. 특허성과

- 특허명: 락토코커스 락티스 SL6에 의해 발효된 소 탈지유로부터 분리하여 동정한 신규 항산화능 보유 펩타이드(Novel antioxidant peptide separated and identified from bovine skim milk fermented by *Lactococcus lactis* SL6), 출원연도: 2017 출원인: 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단, (주)셀바이오텍 출원번호: 10-2017-0087592.

제 7절 양조용 균주의 발효 적합성 평가

1. 양조용 균주의 알코올 생산능 분석

가. 액체배지에서의 알코올(에탄올) 생산능 분석

(1) 실험방법

- 제공받은(*Saccharomyces cerevisiae* SJ, *Saccharomyces cerevisiae* TY-2, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200270, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200278, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200280, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200281, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200284) 7종과 비교균주로서 본 연구실에 보관중인 균주 2종(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7964)를 사용하였다. 배지의 경우, 실험용 배지인 YPD, YPD+glucose broth(BD, France), 산업용 배지(충무발효 제공) 및 양조용 맥아즙 배지(wort; 보리맥아추출물, England)를 사용하였다. 산업용 배지(GYA medium)의 조성은 Table 3-5에서 보는 바와 같다.

Table 3-5. Composition of GYA medium

Component	Content
Glucose	20 g/L
Yeast extract	20 g/L
Ammonium sulfate	2 g/L
Magnesium sulfate	2 g/L
Calcium phosphate tribasic	1 g/L
pH	6

- 멸균된 배지(YPD, YPD+glucose, GYA) 100 mL에 균주를 접종하고 30°C에서 12시간 동안 진탕배양(180 rpm) 후, 실험 종료까지 정지배양으로 진행하였다. 이후 일정시간 간격으로 시료를 채취한 후에, 시료를 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C) 하였다. 맥아즙 배지를 이용한 실험에서는 상기 방법과 마찬가지로 100 mL 맥아즙 배지(wort; 보리맥아추출물, England)에 균주를 접종하고 30°C에서 12시간 동안 진탕배양(180 rpm) 후, 실험 종료까지 정지배양으로 진행하였다. 상등액을 0.45 µm syringe filter를 사용하여 이물질 제거한 후에 알코올 함량을 HPLC방법으로 분석하였으며, HPLC 실험조건은 다음과 같다.

- Detector: RI detector and UV detector(210 nm)
- Solvent: 0.01 N H₂SO₄ 사용, 0.5 mL/min
- Column 종류: Bio-Rad HP-87H column(ion exchange 방식)
- Column 온도: 40℃

(2) 연구결과 및 결론

- 산업용 배지(GYA broth)에서의 에탄올 생산패턴을 관찰한 결과, 배양 24시간만에 알코올 생산 최대치를 나타내었으며, 1.0~1.1%수준이었다. Table 3-6와 같이 실험용 배지(YPD broth)에서의 알코올 생산량을 조사한 결과, 배양 48시간 후의 알코올 생산량은 0.49~0.66%수준이었지만, YPD+10%(w/v) glucose배지에서는 약 4.44~6.35% 수준의 알코올 함량이 확인되었다. 당 첨가배지에서 4.44~6.35% 수준의 알코올 함량이 확인되었지만, 산업용 배지에서 시중 전통발효주(막걸리)의 알코올 함량인 6~8% 수준에 도달하지 못한 것으로 확인되었다(Table 3-6). 그러나 비교적 짧은 배양시간(48시간)과 실험용 배지에서만 적정 알코올 함량을 보였기 때문에 실제 양조용 배지에서의 발효 후 알코올 함량 측정이 요구되었다. 실험결과 Figure 3-5에서 보이는 것처럼 배양 5일에서 10일 사이에 알코올 함량 최대치를 확인하였다.
- 논문을 통한 문헌조사결과 효모의 알코올 생성능은 7% 수준인 것으로 확인되었다. 알코올 함량은 *Saccharomyces cerevisiae* SJ, *Saccharomyces cerevisiae* TY-2, 산업용 균주가 각각 5.5%, 5.7%로 시중 막걸리 알코올 함량에 근접한 결과를 보였다. 타 협동기관에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200270, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200278, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200280, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200281, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200284 균주는 최종 5% 수준으로 알코올 함량이 확인되었다. 반면에 비교균주로 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7964 균주의 경우 1% 수준의 알코올 함량을 보이며 다양한 배지에서 불안정한 알코올 생성능을 보였다. 실험결과 양조용으로 선발된 효모는 전통발효주 후보균주로서 알코올 생성능을 보였으며, 이에 연구개발 추진체계에 따라 제품화 단계에서 이용 가능할 것으로 사료된다.

Table 3-6. Ethanol production by yeast strains on YPD, YPD+glucose and GYA broth during incubation at 30°C in 72 h

Strain	Ethanol production(%)		
	YPD	YPD+ 10% glucose	GYA broth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SJ	0.50	5.00	0.97
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TY-2	0.49	4.96	1.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7913	0.49	4.44	0.94
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7964	0.49	4.80	1.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200270	0.48	6.35	0.90
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200278	0.51	6.40	0.80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200280	0.52	6.25	0.79
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200281	0.44	6.35	0.85
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 200284	0.35	6.28	0.83

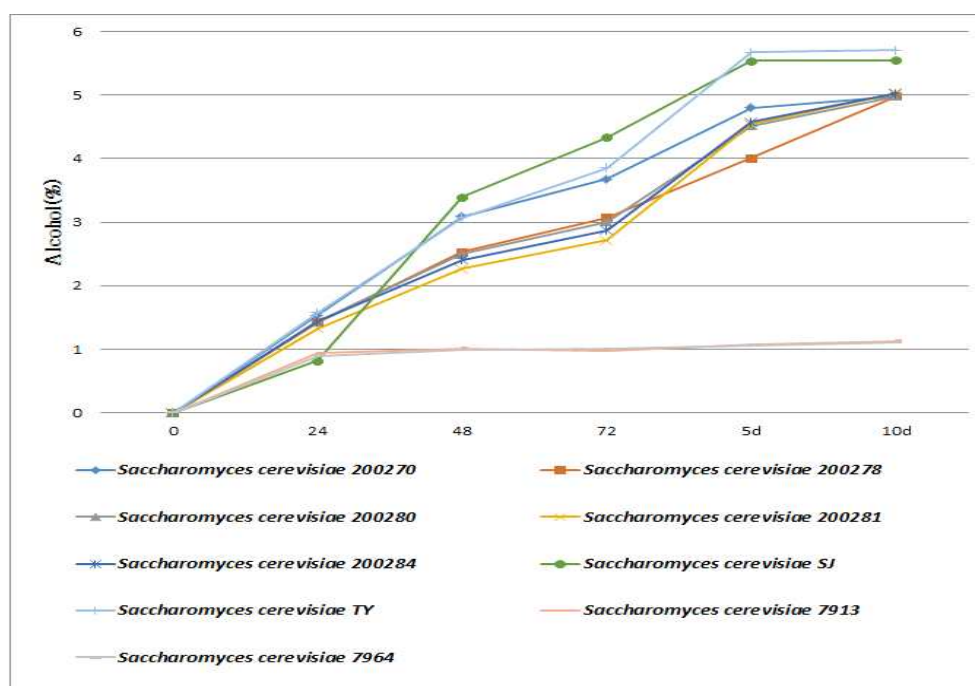


Figure 3-5. Ethanol production by yeast strains on wort medium.

2. 양조용 균주의 향미분석

가. 실험방법

- 알코올 생성능 실험과 마찬가지로 제공받은(*Saccharomyces cerevisiae* SJ, *Saccharomyces cerevisiae* TY-2, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200270, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200278, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200280, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200281, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200284) 7종과 비교균주로서 본 연구실에 보관중인 균주 2종(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7964)를 실험용 배지(YPD broth)에서 활성을 유지한 효모를 양조용 맥아즙 배지(wort; 보리맥아추출물, England) 100 mL에 접종하고 30°C에서 10일간 정치배양 하였다. 이후 gas chromatography 분석을 실시하였다.
- 시료 전처리: solid phase microextraction(SPME)
 - Sample: 10 mL(20 mL headspace vial)
 - SPME fiber: PDMS/DVB/CAR
 - Equilibrium: 40°C, 30 min
 - Adsorption: 40°C, 30 min
 - Desorption: 200°C, 1 min
- Gas chromatography 조건
 - Column: Polyethylene glycol(PEG) column - Carrier gas: helium
 - Flow rate: 1.0 mL/min - Injection port: splitless mode, 200°C
 - Temp. program: initial 40°C for 5 min, increase to 200°C at 5°C/min, hold for 20 min
 - Ion Source Temp. 250°C
 - Interface Temp. 240°C
 - MS Scan range: 10~600 m/z

나. 연구결과 및 결론

- 맥아즙 배지에 분양받은 균주(*Saccharomyces cerevisiae* SJ, *Saccharomyces cerevisiae* TY-2, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200270, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200278, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200280, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200281, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200284)와 비교용 균주(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7964)를 접종하여 배양한 시료의 향미성분을 분석결과 Figure 3-6에서 Figure 3-14까지처럼 확인되었다.

- 향미성분으로는 ethyl alcohol이 가장 많은 peak area를 차지하는 것으로 확인되었다. Ethyl alcohol 다음으로 isoamyl alcohol, ethyl acetate, isobutyl alcohol, isoamyl acetate의 순으로 함량이 높은 편이었으며 n-amyl alcohol과 ester류, aldehyde류 등은 낮은 농도로 검출되었다. Ester류 중에서는 ethyl acetate가 5~6분대에서 검출되었는데, 이는 강한 과일향을 나타내는 것으로 알려져 있다. 향미성분 GC/MS 결과 중 다수를 차지하는 n-amyl alcohol류는 일반적으로 시료 내 함량이 높으면 맥주의 향미 품질이 향상되는 것으로도 알려져 있다. 그러나 문헌조사와 일치하는 향미성분이 분석되었더라도 단일 향미성분만으로는 관능적인 평가가 어려우며, 실제 전통발효주를 이용하여 관능평가와 양의 상관관계를 분석해야 할 것으로 사료된다.
- 또한, 문헌조사결과에서 막걸리의 향미성분과 관능평가와 상관분석에 관한 연구논문에 의하면(Kim *et al.*, 2017), 관능평가와 양의 상관관계를 가지는 성분으로서 ester류 중에서는 ethyl lactate와 ethyl palmitate(복분자향, 배향, 달콤한향), ethyl myristate(구수한 향, 누룩향)이 주로 검출되었으며, 고급알코올 중에서는 isobutanol(복분자향, 배향, 달콤한향)이 관능성과 상관관계가 높은 것으로 분석되었다.
- 지방산 중에서는 caproic acid(달콤한향, 배향) 및 furfural(복분자향)이 관능성과 양의 상관관계를 가지는 것으로 분석되었다. 따라서, 전통발효주의 중요한 향미성분으로서 isoamyl alcohol, isobutanol(isobutyl alcohol) ethyl lactate, ethyl palmitate, ethyl myristate, caproic acid 및 furfural 등의 존재 유무가 중요할 것으로 사료된다.

Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.290	937650	0.39	Acetaldehyde
2	4.474	964905	0.41	1-Propen-2-ol, acetate
3	4.684	230626	0.10	Ethyl formate
4	5.988	11935773	5.03	Ethyl Acetate
5	6.658	114369	0.05	Butanal, 2-methyl-
6	6.801	274254	0.12	Butanal, 3-methyl-
7	7.403	124152768	52.27	Ethanol
8	11.527	3149417	1.33	1-Propanol
9	14.029	23681779	9.97	1-Propanol, 2-methyl-
10	15.689	957596	0.40	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
11	16.790	157914	0.07	1-Butanol
12	21.097	66752874	28.11	1-Butanol, 3-methyl-
13	25.321	97959	0.04	Acetoin
14	26.976	65390	0.03	1-Pentanol, 4-methyl-
15	31.941	116223	0.05	Octanoic acid, ethyl ester
16	32.160	980567	0.41	Acetic acid
17	35.990	90182	0.04	Propanoic acid, 2-methyl-
18	38.268	233939	0.10	Decanoic acid, ethyl ester
19	38.662	44174	0.02	2-Furanmethanol
20	38.895	105323	0.04	Butanoic acid, 3-methyl-
21	42.983	130968	0.06	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
22	43.334	106202	0.04	Hexanoic acid
23	43.505	319663	0.13	Dodecanoic acid, ethyl ester
24	45.131	1904167	0.80	Phenylethyl Alcohol
		237504682	100.00	

Figure 3-6. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* SJ.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.287	72522	0.07	Acetaldehyde
2	4.470	813810	0.77	Acetone
3	4.668	89863	0.08	Ethyl formate
4	5.980	3131476	2.95	Ethyl Acetate
5	6.654	92119	0.09	Butanal, 2-methyl-
6	6.802	205538	0.19	Butanal, 3-methyl-
7	7.390	58302682	54.99	Ethanol
8	11.527	1468369	1.38	1-Propanol
9	14.028	14264303	13.45	1-Propanol, 2-methyl-
10	15.684	326828	0.31	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
11	21.087	24045685	22.68	1-Butanol, 3-methyl-
12	32.161	1304211	1.23	Acetic acid
13	35.991	125163	0.12	Propanoic acid, 2-methyl-
14	38.271	65219	0.06	Decanoic acid, ethyl ester
15	38.669	93337	0.09	2-Furanmethanol
16	38.899	98914	0.09	Butanoic acid, 3-methyl-
17	43.506	99889	0.09	Eicosanoic acid, ethyl ester
18	45.135	1432736	1.35	Phenylethyl Alcohol
		106032664	100.00	

Figure 3-7. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* TY-2.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.292	660240	0.26	Acetaldehyde
2	4.484	635272	0.25	Acetone
3	4.691	301937	0.12	Ethyl formate
4	5.996	12295295	4.77	Ethyl Acetate
5	6.668	168504	0.07	Butanal, 2-methyl-
6	6.807	227153	0.09	Butanal, 3-methyl-
7	7.412	125733020	48.81	Ethanol
8	7.720	492835	0.19	1,3-Dioxane, 4-methyl-
9	8.238	68435	0.03	Propanoic acid, ethyl ester
10	11.536	2775266	1.08	1-Propanol
11	14.038	19810728	7.69	1-Propanol, 2-methyl-
12	15.696	771214	0.30	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
13	16.804	184385	0.07	1-Butanol
14	21.122	87385444	33.92	1-Butanol, 3-methyl-
15	22.876	70061	0.03	Hexanoic acid, ethyl ester
16	25.331	134826	0.05	Acetoin
17	26.999	85764	0.03	1-Pentanol, 4-methyl-
18	27.552	81933	0.03	1-Pentanol, 3-methyl-
19	31.944	43533	0.02	Octanoic acid, ethyl ester
20	32.162	2252081	0.87	Acetic acid
21	36.000	137100	0.05	Propanoic acid, 2-methyl-
22	38.277	61918	0.02	Decanoic acid, ethyl ester
23	38.678	96277	0.04	2-Furanmethanol
24	38.923	119807	0.05	Butanoic acid, 2-methyl-
25	40.296	74795	0.03	1-Propanol, 3-(methylthio)-
26	45.139	2922737	1.13	Phenylethyl Alcohol
		257590560	100.00	

Figure 3-8. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.294	1065300	0.47	Acetaldehyde
2	4.480	623429	0.27	1-Propen-2-ol, acetate
3	4.686	276142	0.12	Ethyl formate
4	5.990	14588987	6.41	Ethyl Acetate
5	6.665	77643	0.03	Butanal, 2-methyl-
6	6.806	150550	0.07	Butanal, 3-methyl-
7	7.403	111057685	48.80	Ethanol
8	7.710	472791	0.21	1,3-Dioxane, 2,4-dimethyl-
9	8.239	186885	0.08	Propanoic acid, ethyl ester
10	10.460	119989	0.05	Isobutyl acetate
11	11.527	2724308	1.20	1-Propanol
12	14.028	17262328	7.59	1-Propanol, 2-methyl-
13	15.685	1228440	0.54	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
14	16.790	171220	0.08	1-Butanol
15	21.103	72527143	31.87	1-Butanol, 3-methyl-
16	22.863	117529	0.05	Hexanoic acid, ethyl ester
17	25.324	619333	0.27	Acetoin
18	26.983	97690	0.04	1-Pentanol, 4-methyl-
19	27.556	68012	0.03	1-Hexanol
20	31.934	152544	0.07	Octanoic acid, ethyl ester
21	32.156	1354892	0.60	Acetic acid
22	35.982	117577	0.05	Propanoic acid, 2-methyl-

Figure 3-9. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7964.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.289	302773	0.11	Acetaldehyde
2	4.478	455452	0.17	Acetone
3	4.684	185976	0.07	Ethyl formate
4	5.987	13746616	5.10	Ethyl Acetate
5	6.663	115124	0.04	Butanal, 2-methyl-
6	6.807	234309	0.09	Butanal, 3-methyl-
7	7.402	123006121	45.63	Ethanol
8	8.230	81744	0.03	Propanoic acid, ethyl ester
9	10.454	75064	0.03	Isobutyl acetate
10	11.526	4482966	1.66	1-Propanol
11	14.028	19468370	7.22	1-Propanol, 2-methyl-
12	15.686	1085220	0.40	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
13	16.780	201472	0.07	1-Butanol
14	21.112	98886254	36.68	1-Butanol, 3-methyl-
15	22.873	201838	0.07	Hexanoic acid, ethyl ester
16	26.987	89469	0.03	1-Pentanol, 4-methyl-
17	27.544	112545	0.04	1-Hexanol
18	29.574	108874	0.04	1-Propanol, 3-ethoxy-
19	31.933	197961	0.07	Octanoic acid, ethyl ester
20	32.154	1863264	0.69	Acetic acid
21	35.989	152894	0.06	Propanoic acid, 2-methyl-
22	38.268	369816	0.14	Decanoic acid, ethyl ester
23	38.663	106534	0.04	3-Furanmethanol
24	38.899	118694	0.04	Butanoic acid, 3-methyl-
25	42.977	93292	0.03	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
26	43.507	282310	0.10	Dodecanoic acid, ethyl ester
27	45.132	3546516	1.32	Phenylethyl Alcohol
		269571468	100.00	

Figure 3-10. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200270.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.298	184949	0.07	Acetaldehyde
2	4.486	515113	0.21	Acetone
3	4.690	167161	0.07	Ethyl formate
4	5.997	11975690	4.79	Ethyl Acetate
5	6.665	79923	0.03	Butanal, 2-methyl-
6	6.812	179538	0.07	Butanal, 3-methyl-
7	7.409	113510758	45.43	Ethanol
8	8.233	77593	0.03	Propanoic acid, ethyl ester
9	11.532	3132381	1.25	1-Propanol
10	14.033	19892425	7.96	1-Propanol, 2-methyl-
11	15.688	1073155	0.43	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
12	16.787	213493	0.09	1-Butanol
13	21.114	95407237	38.18	1-Butanol, 3-methyl-
14	22.866	242310	0.10	Hexanoic acid, ethyl ester
15	26.991	73699	0.03	1-Pentanol, 4-methyl-
16	27.554	90430	0.04	1-Hexanol
17	31.936	268673	0.11	Octanoic acid, ethyl ester
18	32.155	1954502	0.78	Acetic acid
19	35.989	136110	0.05	Propanoic acid, 2-methyl-
20	38.268	461292	0.18	Decanoic acid, ethyl ester
21	38.668	100163	0.04	2-Furanmethanol
22	38.903	129509	0.05	Pentanoic acid, 3-methyl-

Figure 3-11. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200278.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.298	111266	0.04	Acetaldehyde
2	4.485	525017	0.20	Acetone
3	4.691	165851	0.06	Ethyl formate
4	5.995	15802461	5.88	Ethyl Acetate
5	6.667	91659	0.03	Butanal, 2-methyl-
6	6.805	170456	0.06	Butanal, 3-methyl-
7	7.406	114671717	42.68	Ethanol
8	8.239	84066	0.03	Propanoic acid, ethyl ester
9	11.530	4481630	1.67	1-Propanol
10	14.031	20952998	7.80	1-Propanol, 2-methyl-
11	15.687	1233282	0.46	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
12	16.784	210283	0.08	1-Butanol
13	21.115	104425789	38.87	1-Butanol, 3-methyl-
14	22.864	196118	0.07	Hexanoic acid, ethyl ester
15	26.983	89167	0.03	1-Pentanol, 4-methyl-
16	27.547	115264	0.04	1-Hexanol
17	29.578	86207	0.03	1-Propanol, 3-ethoxy-
18	31.937	168678	0.06	Octanoic acid, ethyl ester
19	32.157	1446925	0.54	Acetic acid
20	35.985	112525	0.04	Propanoic acid, 2-methyl-
21	38.267	293837	0.11	Decanoic acid, ethyl ester
22	38.665	95848	0.04	2-Furanmethanol
23	38.914	101616	0.04	Butanoic acid, 2-methyl-
24	42.980	78664	0.03	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
25	43.329	68879	0.03	Hexanoic acid
26	43.506	214651	0.08	Undecanoic acid, ethyl ester
27	45.132	2658157	0.99	Phenylethyl Alcohol
		268653011	100.00	

Figure 3-12. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200280.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.289	126655	0.05	Acetaldehyde
2	4.475	545893	0.20	Acetone
3	4.677	161730	0.06	Ethyl formate
4	5.984	15438567	5.64	Ethyl Acetate
5	6.656	113412	0.04	Butanal, 2-methyl-
6	6.805	228727	0.08	Butanal, 3-methyl-
7	7.399	117731629	43.03	Ethanol
8	8.237	102400	0.04	Propanoic acid, ethyl ester
9	11.524	4643508	1.70	1-Propanol
10	14.026	19632366	7.18	1-Propanol, 2-methyl-
11	15.682	1376891	0.50	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
12	16.785	217391	0.08	1-Butanol
13	21.111	106262710	38.84	1-Butanol, 3-methyl-
14	22.868	178738	0.07	Hexanoic acid, ethyl ester
15	26.982	104492	0.04	1-Pentanol, 4-methyl-
16	27.545	147587	0.05	1-Hexanol
17	29.575	133694	0.05	1-Propanol, 3-ethoxy-
18	31.933	154044	0.06	Octanoic acid, ethyl ester
19	32.152	1971871	0.72	Acetic acid
20	35.982	116805	0.04	Propanoic acid, 2-methyl-
21	38.268	231502	0.08	Decanoic acid, ethyl ester
22	38.660	96459	0.04	2-Furanmethanol
23	38.899	124772	0.05	Pentanoic acid, 3-methyl-
24	42.979	105327	0.04	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
25	43.508	125889	0.05	Dodecanoic acid, ethyl ester
26	45.130	3547393	1.30	Phenylethyl Alcohol
		273620452	100.00	

Figure 3-13. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200281.

Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	3.298	184733	0.07	Acetaldehyde
2	4.487	537856	0.21	Acetone
3	4.691	191087	0.07	Ethyl formate
4	5.997	14258682	5.45	Ethyl Acetate
5	6.677	150727	0.06	Butanal, 2-methyl-
6	6.816	211137	0.08	Butanal, 3-methyl-
7	7.408	116806957	44.66	Ethanol
8	8.250	77953	0.03	Propanoic acid, ethyl ester
9	11.531	4188435	1.60	1-Propanol
10	14.031	19887396	7.60	1-Propanol, 2-methyl-
11	15.690	1177883	0.45	1-Butanol, 3-methyl-, acetate
12	16.786	200862	0.08	1-Butanol
13	21.111	96396491	36.86	1-Butanol, 3-methyl-
14	22.861	196594	0.08	Hexanoic acid, ethyl ester
15	26.979	99153	0.04	1-Pentanol, 4-methyl-
16	27.548	106114	0.04	1-Hexanol
17	29.570	117620	0.04	1-Propanol, 3-ethoxy-
18	31.933	206923	0.08	Octanoic acid, ethyl ester
19	32.152	2190212	0.84	Acetic acid
20	35.993	136569	0.05	Propanoic acid, 2-methyl-
21	38.268	314058	0.12	Decanoic acid, ethyl ester
22	38.662	94747	0.04	2-Furanmethanol
23	38.892	125470	0.05	Butanoic acid, 3-methyl-
24	42.976	89277	0.03	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
25	43.330	75607	0.03	Hexanoic acid
26	43.507	203676	0.08	Dodecanoic acid, ethyl ester
27	45.130	3317250	1.27	Phenylethyl Alcohol
		261543469	100.00	

Figure 3-14. Volatile compounds in fermented alcohol beverage by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 200284.

제 8절 전통발효식품용 균주의 발효 적합성 평가

1. 전통발효식품용 균주의 amylase 활성 및 효소 생산능 분석

가. 실험방법

- 본 실험에서는 타 기관(충무발효)에서 분양받은 균주(*Aspergillus oryzae* CF1001, *Aspergillus sojae* CF1002, *Aspergillus oryzae* CF1003, *Aspergillus luchuensis* CF1005, *Aspergillus oryzae* KACC 94210)와 자체 보유 균주(*Aspergillus oryzae* KCTC 6291, *Aspergillus oryzae* KCTC 46199)을 사용하였다(Table 3-8). 배지의 경우, 균주의 활성유지 및 1차 효소활성 분석에는 potato dextrose broth(BD, France) 배지를 사용하였다. 추가적으로 산업용 배지(SBA broth)를 사용하였다.

Table 3-7. Composition of SBA medium

Component	Content
Soluble starch	5 g/L
Sucrose	10 g/L
Beef extract	2 g/L
Ammonium sulfate	2 g/L

- 멸균된 배지 100 mL에 균주를 접종한 후에 30°C에서 72시간 동안 진탕배양(180 rpm) 하였다. 배양액을 회수한 후에, 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)하였다. 0.45 μm syringe filter를 사용하여 이물질을 제거한 후에 여과된 시료를 조효소액으로 사용하였다. Amylase 효소능 측정은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 환원당 정량법을 이용하여 효소반응산물의 환원력을 이용하여 측정하였다. 효소의 역가는 1분당 1 mg의 maltose를 생산하는 효소의 양을 1단위(unit)로 정의하였다.
- 실제 고체배양(solid-state fermentation)에서의 효소능을 평가하기 위해 *Aspergillus oryzae* CF1001와 *Aspergillus oryzae* M385 균주를 사용하여 고체배양시 일정 간격으로 수집하여 효소능을 측정하였다. 측정방법은 액체배양과 마찬가지로 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다.

나. 연구결과 및 결론

- 효소능 분석결과(Table 3-8), 실험용 배지인 potato dextrose broth에서 균주가 분비하는 amylase 역가는 산업용 후보균주의 경우, 12.8~55.15 U/mL 수준이었으며, 자체 보유 균주들은 상대적으로 낮은 1.25~2.23 U/mL 수준이었다. *Aspergillus oryzae* CF1001, *Aspergillus oryzae* CF1002, *Aspergillus oryzae* CF1003 균주가 50 U/mL 이상으로 기존 보고된 *Aspergillus oryzae*의 amylase 효소능(수십 unit)에 근접한 것으로 판단되었다. 한편, 산업용 배지인 SBA 배지에서 배양한 경우, 산업용 후보균주는 8.65~50.99 U/mL정도로 역가의 편차가 크게 나타났으며, 비교균주들은 1.11~2.45 U/mL 상대적으로 낮은 역가를 나타내었다. 본 실험에서는 균주의 액상배양을 통해 효소능을 확인하였으나 기존의 연구결과에 의하면 곰팡이의 amylase 역가는 고체배양에서 10² unit 이상으로 높은 것으로 보고되었다. 따라서 (주)충무발효를 통해 고체배양된 시료를 이용하여 효소능을 확인하였다.

Table 3-8. Amylase activity of *Aspergillus* spp. on potato dextrose broth and SBA broth after incubation at 30°C for 72 h

Strain	Amylase activity(U/mL)	
	PDA broth	SBA broth
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1001	55.15±2.35	50.99±2.99
<i>Aspergillus sojae</i> CF1002	53.89±1.15	41.45±2.01
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1003	54.29±3.22	52.30±2.58
<i>Aspergillus luchuensis</i> CF1005	12.8±1.02	8.65±1.34
<i>Aspergillus oryzae</i> KACC 94210	16.02±1.34	10.58±1.76
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC 6291	2.23±0.11	2.45±0.24
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC 46199	1.25±0.17	1.11±0.09

- 효소능 분석결과(Figure 3-15), *Aspergillus oryzae* CF1001 균주가 분비하는 amylase 역가는 배양 초반(32시간대)에서 110 U/g 수준이었으며, 이후 배양시간이 지남에 따라 낮아지는 경향을 보였다. 반면에 *Aspergillus oryzae* M385 균주의 경우 amylase 역가는 배양 초반부터 종료 시점까지 120 U/g 수준을 유지함을 보였다. *Aspergillus oryzae* CF1001과 *Aspergillus oryzae* M385을 혼합하여 배양한 시료의 경우 단독 균주보다 안정적으로 120 U/g 수준을 유지함을 보였다. 이 결과는 곰팡이의 amylase 역가가 고체배양 시에 10² unit 이상으로 보고되는 경향과 일치하며, *Aspergillus oryzae* CF1001 균주처럼 효소능이 시간 별로 안정적이지 않은 균주는 다른 균주와의 혼합으로 이를 극복 가능할 것으로 사료된다.

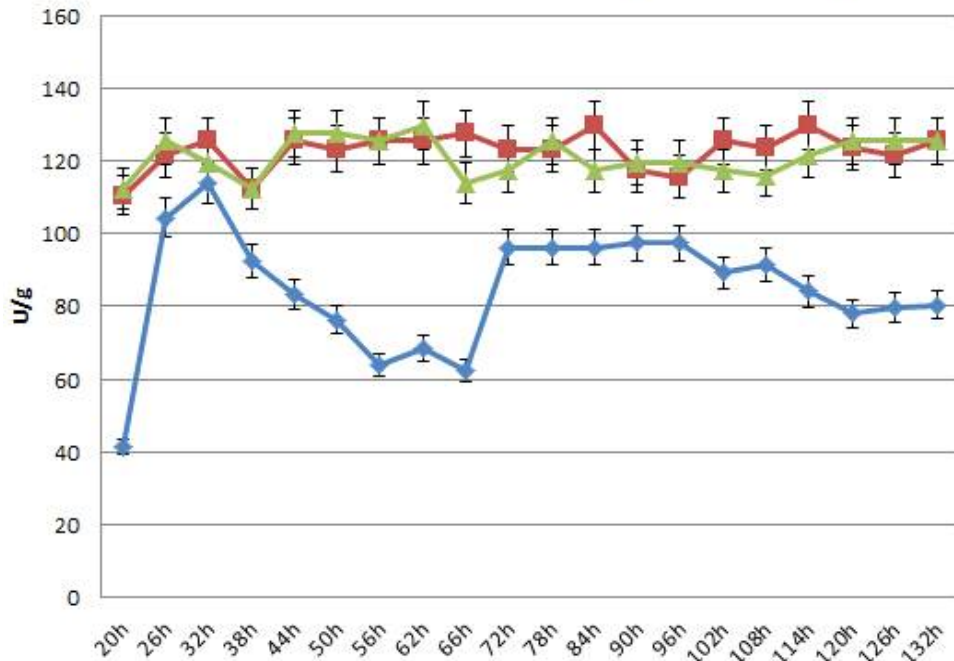


Figure 3-15. Amylase activity of *Aspergillus* spp. on solid-state fermentation. ◆: *Aspergillus oryzae* CF1001, ■: *Aspergillus oryzae* M385, ▲: *Aspergillus oryzae* CF1001+*Aspergillus oryzae* M385.

2. 전통발효식품용 균주의 protease 활성 및 효소 생산능 분석

가. 실험방법

- Amylase 활성 실험과 마찬가지로 타 기관(충무발효)에서 분양받은 균주(*Aspergillus oryzae* CF1001, *Aspergillus sojae* CF1002, *Aspergillus oryzae* CF1003, *Aspergillus luchuensis* CF1005, *Aspergillus oryzae* KACC 94210)와 자체 보유 균주(*Aspergillus oryzae* KCTC 6291, *Aspergillus oryzae* KCTC 46199)를 사용하였다(Table 3-11). 배지의 경우, 실험용 배지인 potato dextrose broth(BD, France) 및 산업용 배지(SBA broth, Table 3-4)를 사용하였다. 멸균된 배지 100 mL에 균주를 접종한 후에 30°C에서 72시간 동안 진탕배양(180 rpm)하였다. 배양액을 회수한 후에, 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C) 하였다. 0.45 μm syringe filter를 사용하여 이물질을 제거한 후에 여과된 시료를 조효소액으로 사용하였다. 0.6% casein 용액을 기질로 사용하였으며, 여과된 조효소액과 혼합하여 37°C에서 10분간 반응하였다.

- 이후 TCA(trichloroacetic acid) 용액 2 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰으며, folin 시약으로 발색시킨 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease의 역가는 1분당 tyrosine 1 µg을 유리시키는 양을 1단위(unit)로 산출하였다.
- Amylase와 마찬가지로 고체배양(solid-state fermentation)에서의 효소능을 평가하기 위해 *Aspergillus oryzae* CF1001와 *Aspergillus oryzae* M385 균주의 배양시간 별 시료에 대한 효소능을 측정하였다. 측정방법은 액체배양과 마찬가지로 DNS 환원당정량법으로 측정하였다.

나. 결과 및 결론

- 실험용 배지인 potato dextrose broth에서의 protease 역가를 측정한 결과(Table 3-9), 대부분의 균주들이 0.10~0.13 U/mL 수준의 역가를 나타내었으며, *Aspergillus oryzae* CF1001 균주는 다른 균주들보다 2배 이상의 역가(0.28 U/mL)를 나타내었다. 한편, SBA 배지에서의 protease 역가를 측정한 결과, 대부분의 균주들이 potato dextrose broth에서보다 상대적으로 높은 역가(0.28~0.35 U/mL)를 나타내었다. 하지만, potato dextrose broth에서 가장 높은 역가를 나타내었던 *Aspergillus oryzae* CF1001 균주는 SBA 배지에서도 비슷한 수준의 역가를 나타내었다. 본 실험에서는 균주의 액상 배양을 통해 효소능을 확인하였으나 기존의 연구결과에 의하면 곰팡이의 protease 역가는 고체배양에서 10^2 unit 이상으로 높은 것으로 보고되었다. 따라서 (주)충무발효를 통해 고체배양된 시료를 이용하여 효소능을 확인하였다(Figure 3-16).

Table 3-9. Protease activity of *Aspergillus* spp. on Potato Dextrose Broth and SBA broth after incubation at 30°C for 72 h

Strain	Protease activity(U/mL)	
	PDA broth	SBA broth
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1001	10.24±0.98	9.42±1.02
<i>Aspergillus sojae</i> CF1002	12.31±1.06	5.31±0.72
<i>Aspergillus oryzae</i> CF1003	50.66±2.33	35.43±1.53
<i>Aspergillus luchuensis</i> CF1005	47.27±2.76	24.16±1.88
<i>Aspergillus oryzae</i> KACC 93215	11.24±2.47	7.65±1.31
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC 6291	1.31±0.84	2.71±0.61
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC 46199	0.24±0.56	3.49±0.78

- 효소능 분석결과(Figure 3-16), *Aspergillus oryzae* CF1001 균주가 분비하는 amylase 역가는 100시간대에서 최고 수준이었으며(500 U/mL 이상), 최소 400 U/mL을 유지하였다. 반면에 *Aspergillus oryzae* M385와 *Aspergillus oryzae* CF1001, *Aspergillus oryzae* M385 혼합 배양한 시료의 경우 300~400 U/mL 수준을 유지함을 보였다. 이 결과는 곰팡이의 protease 역가가 고체배양시에 10^2 unit 이상으로 보고되는 경향과 일치하며, 전통발효식품용 균주로서 사용가능할 것으로 사료된다.

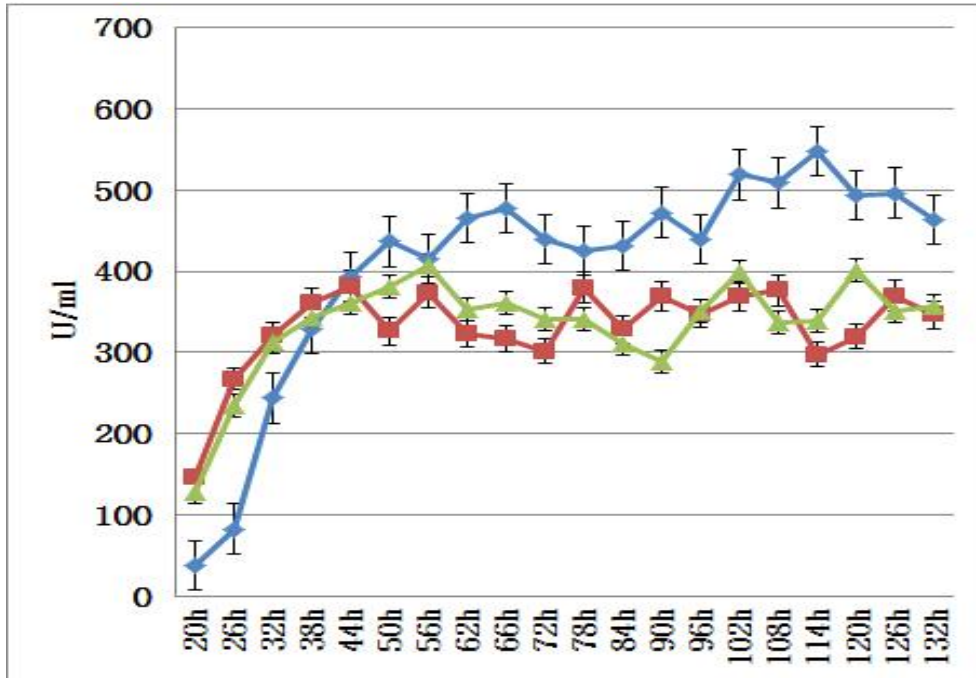


Figure 3-16. Protease activity of *Aspergillus* spp. on solid-state fermentation. ◆: *Aspergillus oryzae* CF1001, ■: *Aspergillus oryzae* M385, ▲: *Aspergillus oryzae* CF1001+*Aspergillus oryzae* M385.

3. 연구개발성과

가. 기술이전 성과

- 기술실시 계약명: 곰팡이균 고상발효 적합성 분석
- 기술실시기업: (주)충무발효
- 기술이전금액: 220만원(VAT 포함)

제 9절 식품 산업용 균주의 genome 분석을 통한 유전자 표시 탐색 및 표준균주를 이용한 각종 유전자 지문 분석 및 최적 분석법의 선정

1. 유전자 지문 분석법의 문헌 조사 및 각 분석방법별 장단점 비교분석

- 미생물의 추적 시스템(tracking system)은 분자생물학적 기법을 사용한 유전자 지문 분석법(genetic fingerprinting)을 사용하여 개발할 수 있다.
- 현재까지 개발된 미생물 유전자 지문 분석법은 자연계에서 미생물의 다양성을 연구하기 위한 분석 도구로 사용되고 있으며, 수질 등의 오염원을 파악하기 위한 미생물 오염원 추적(microbial source tracking, MST) 등에 사용되고 있다.
- 미생물 오염원 추적기술(MST)은 각 숙주 동물에 따른 생태학적 적응에 의하여 존재하는 지표미생물은 유전적 생리적으로 특이하기 때문에, 이러한 특성을 기반으로 종 기반 유전형 동정방법들(species-based genotypic methods) 중 유전자 DNA 지문(DNA fingerprinting)법 등을 이용하여 ecotype을 결정하는 연구방법이다.
- 예를 들면 대장균을 항생제 저항성, rep-PCR DNA fingerprinting 등의 분석을 기초로 하여 동정하고 그 각기 다른 오염원의 출처를 확인하는 것이 미생물 오염원 추적 기술(MST)이다.
- 현재까지 발표된 미생물 오염원 추적기술 관련 논문은 rep-PCR, restriction fragment length polymorphism(RFLP) 등과 같은 유전자형(genotyping)방법과 항생제 내성의 여부, serotype, 또는 특정 효소의 유무에 따른 표현형(phenotyping)방법의 2가지로 나눌 수 있다.
- 이러한 미생물의 유전자형과 표현형의 분석방법은 다시 library의 사용여부에 따라 library dependent 또는 library independent로 세분화 할 수 있는데, library dependent 방법은 특정 감염성 폐기물의 오염원에 존재하는 지표미생물의 library를 구축하여, 환경매체에서 발견되는 샘플과 library에 존재하는 미생물을 비교하여 오염원을 추적하는 기술이다(Table 4-1).

Table 4-1. Types of microbial source tracking

Library-dependent		Library-independent	
Culture-dependent		Culture-independent	
Phenotypic	Genotypic	Phenotypic or Genotypic	Genotypic
<ul style="list-style-type: none"> • Antibiotic resistance • Carbon utilization 	<ul style="list-style-type: none"> • Rep-PCR • PFGE • Ribotyping 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteriophage • Bacterial culture 	<ul style="list-style-type: none"> • Host-specific bacterial PCR • Host-specific viral PCR • Host-specific quantitative PCR

- 또한 미생물 오염원 추적기술은 식중독 미생물 등의 병원성 미생물 판별이나, 항생제 내성 유전자 검출(antibiotic resistance analysis, ARA), 유전자 재조합 미생물 (genetically modified microorganism, GMM)의 검출 등에 이용되고 있다.
- 한편, 미생물의 염색체 DNA에 특정 염기서열을 암호로 지정하여 인위적으로 삽입 또는 치환하는 DNA cryptography법이 일부 개발 중에 있으나 이는 미생물의 유전자를 변형시키는 유전자 변형 미생물에 해당되므로 식품 미생물에는 적용할 수 없는 문제점이 있다.
- 미생물들의 감염, 분류, 계통학의 관계성을 조사하기 위하여 다양한 유전체 적용 DNA fingerprinting 방법이 사용되어 왔다(Sadowsky and Hur, 1998).
- 그 중, 박테리아의 유전체 연구에서 repetitive extragenic palindromic sequence가 발견된 이후(Stern *et al.*, 1984), 다양한 활용 방법 중 DNA hybridization과 rep-PCR DNA fingerprinting 방법은 다양한 병원성 미생물들 즉, 효모(Panchal *et al.*, 1987; Scherer and Stevens, 1987), mycoplasmas(Ruland *et al.*, 1990), 곰팡이(Koch *et al.*, 1991), 바이러스(Buchman *et al.*, 1978; Christensen *et al.*, 1987), 박테리아(Rademaker *et al.*, 1998; Versalovic *et al.*, 1998)의 감염, 분류학적 분석에 성공적으로 활용되어 왔다.
- 현재까지 박테리아를 strain수준으로 동정 또는 분류하기 위한 분자 수준의 typing 기술이 여러 가지 개발되어 왔는데, 이러한 기술들 중에서 가장 강력한 기술은 유전자 지문 분석법(DNA fingerprinting) 기술로서, 여기에는 절단 빈도가 낮은 제한효소를 이용한 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA(RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP), multilocus sequence typing(MLST) 등이 있다.
- 이러한 기술들은 발효식품이나 인간 장내에서 분리된 유산균이나 *Bifidobacteria*를 종 이하의 수준에서 typing하는 데 광범위하게 사용되어 왔는데(McCartney, 2002), 기본적으로 종 간 또는 균주 간 DNA의 다형화를 검출하는 것에 기초를 두고 있으며, 각각의 기술들은 분류 범위, 재현성, 해석의 용이성, 표준화 정도가 서로 다르다.

- 유전자 지문 분석법(DNA fingerprinting)은 아직까지 광범위하게 채택되고 있는 표준화된 기술이 없으며, 실험실 간 혹은 실험실 내에서도 재현성 있는 결과를 얻기가 힘든 단점이 있다.
- 또한 분석 기술의 정밀성과 정확성도 실험 방법, 실험실, 실험 재료에 따라서 매우 차이가 나며, 실험 방법에 따라 결과를 얻기까지 장시간 소요되는 단점이 있다.
- 현재 유산균과 특히 probiotics 균주들을 대상으로 하는 DNA fingerprinting 기술은 아래와 같다.

가. Ribotyping

- Ribotyping은 박테리아의 16S와 23S rRNA transcription unit 사이에 존재하는 intergenic space region은 변이가 심하여도 생존 가능하여 다양한 크기의 다형화(polymorphism)를 나타내는 현상을 이용한 것으로 다양한 박테리아들의 typing에 적용되고 있다(Kostman *et al.*, 1992)(Figure 4-1).
- Ribotyping은 리보솜 RNA(rRNA)를 probe로 해서 제한효소 처리한 염색체 DNA와 혼성화함으로써 그 절단 단편의 다형성을 해석하는 방법으로 DNA의 표적부위는 16S 또는 23S rRNA를 coding하는 영역이 사용되고 있다.
- Ribotyping은 모든 생물체에 적용이 가능하며, 안정적이며 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있는 것이 특징으로, 유전자의 변화를 비교, 연구할 목적에도 사용되고 있다.
- 그러나 방법의 단계가 많고 장시간 소요되는 단점이 있으며, 또한 얻어진 밴드가 서로 접근해 있다면 다수 검체의 비교가 곤란하게 되므로 사용할 제한효소 선택이 해석 결과를 좌우하게 되는 단점이 있다.

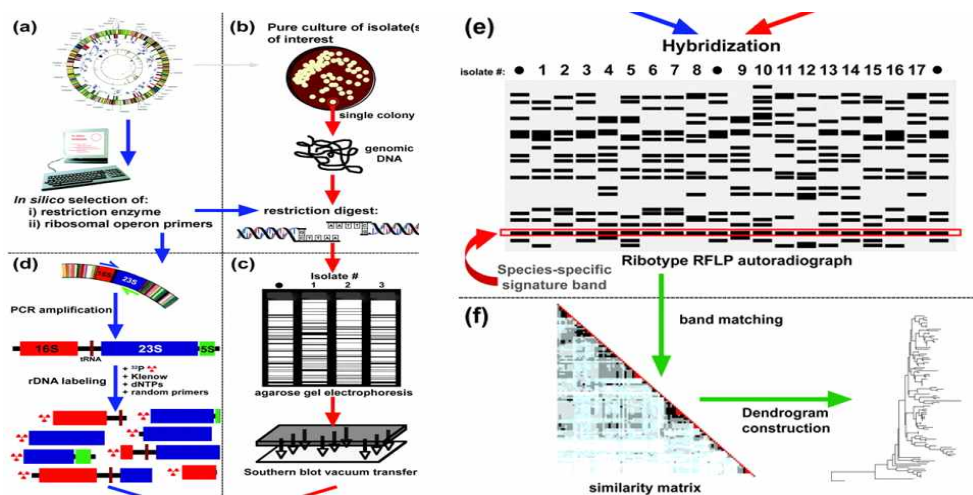


Figure 4-1. Schematic diagram of principles in ribotyping(출처: Bouchet *et al.*, Clin. Microbiol. Rev. 21: 262-273, 2008).

나. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

- 세균 DNA의 제한효소 절편 다형화(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 분석은 세균의 염색체 DNA를 절단 빈도가 낮은 제한효소로 절단하여 소수의 비교적 크기가 큰 DNA 단편을 제조하고, 이 단편들을 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 이용하여 크기별로 분리하는 기술이다.
- PFGE는 특정의 제한효소 처리된 DNA를 전기영동시켜 전기 과장을 다각도에서 전달하여 절단된 DNA 분절의 형태학적 양상을 비교하는 것으로, 일반적인 전기영동에서는 분리할 수 없었던 분자량이 매우 큰 DNA 단편(40~1,000 kb)을 분리해 낼 수 있으며, 여러 조건에 따라 다양한 DNA 분절 형태를 관찰할 수 있다(Figure 4-2).

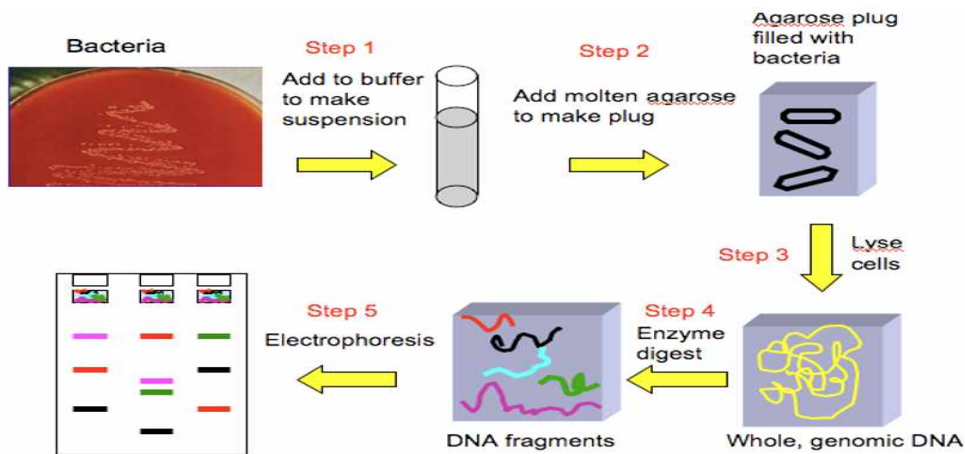


Figure 4-2. Schematic diagram of principles in pulsed-field gel electrophoresis(출처: <http://www.foodsafetynews.com/2009/08/genetic-testing-1/#.Wm597ahl-Uk>).

- PFGE는 우수한 감별력과 재현성을 가지고 다양한 역학 자료와 높은 유전적 상관관계를 제시함으로써 여러 molecular typing 방식 중 gold standard로 인식되고 있다(Olson, 1989).
- 특히 이 기법은 전기영동에 의한 band pattern을 분석함으로써 특정 식중독균에 의한 식중독 발생이 서로 다른 유래의 식품 분리주 간 유전적 상관성을 확인하여 오염원을 파악하는 기초 자료로 활용되어 왔다.
- 최근 PFGE법을 활용하여 식품 내 다양한 미생물을 검출하는 연구가 이루어지고 있는데, Praakle-Amin *et al.*(2007)은 Estonia에서 시판되는 가금육에서 *Campylobacter* 검출 조건을 확립하였다고 발표하였고 프랑스 및 페루에서도 동일한 방법을 이용하여 치즈 및 야채에서 각각 *Staphylococcus aureus* 및 *Escherichia coli* O157:H7을 검출한 바 있다(Keroanton *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2007).

- PFGE는 다양한 미생물 혈청형의 DNA fingerprint에서 가장 훌륭한 marker로서 분자역학적 형별분석에 가장 신뢰성이 있으며 감별력과 재현성이 높은 유전형별 방법임이 인정되고 있다(Hudson *et al.*, 2000).
- PFGE는 균주 간 유전적 상관성을 쉽게 알 수 있고 실험실 간에 재현성이 우수한 반면, 실험에 소요되는 시간이 3~5일로 많은 시간이 소요되고 노동 집약적이며, 동일 band가 동일한 DNA 단편인지 확신할 수 없는 문제점이 있다.
- 또한 band들이 명확히 구분되지 않고 gel로부터 DNA의 추출이 어려우며 데이터분석이 시험자의 경험에 의해 다양한 견해를 보일 수 있어 실험결과가 실험자에 따라 다르게 나올 수 있기 때문에 고도로 숙련된 기술이 필요하고 실험절차 및 시료를 표준화하기 위한 많은 노력들이 필요하다.
- 생성된 DNA fingerprint는 사용되는 제한효소의 특이성과 염색체 DNA의 염기서열에 의해 결정되기 때문에 특정 세균 종이나 균주의 특성이 될 수 있으며, PFGE에 의한 fingerprint는 염색체 전체를 포함하고 있기 때문에 특정 균주의 DNA 상에서의 결실, 삽입, 재배열 등과 같은 특이한 변화를 검출할 수 있다.
- 그러나 제한효소로 인식되는 특정 염기서열에 대한 차이를 나타낸 것으로 유전자 전체의 염기배열을 비교하는 것은 아니다.
- PFGE는 *Bifidobacterium longum*이나 *B. animalis*(Roy *et al.*, 1996), *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*(Tynkkynen *et al.*, 1999), *L. acidophilus* complex(Roy *et al.*, 2000), *L. helveticus*(Lortal *et al.*, 1997)와 *L. johnsonii*(Ventura and Zink, 2002) 등과 같은 중요한 probiotics 균주 사이에서 균주를 분별할 수 있는 특성이 매우 높으나 일부 균주는 이 방법으로 typing이 되지 않고 있다.

다. PCR-denaturing-gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE)

- PCR-DGGE법은 원래 의학 분야에서 돌연변이 유전자의 검출을 위하여 사용되어 오던 방법이였으나, Muyzeoxr *et al.*(1993)이 처음으로 16S rRNA 유전자의 V3 region(16S rRNA 유전자 가운데 미생물 종에 따라 가장 변이가 심한 부분)을 대상으로 미생물 생태 분야에 적용하였다.
- PCR-DGGE 분석법은 5'말단에 GC-clamp(약 40개 정도의 G와 C로 구성된 DNA 단편)를 붙여 놓은 primer를 사용하여 미생물 군집에서 추출한 염색체 DNA로부터 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭시킨 후, 증폭된 PCR 산물을 urea나 formamide와 같은 DNA 변성제의 농도 구배가 존재하는 gel상에서 전기영동을 한다.
- 증폭된 16S rRNA 유전자는 군집 내의 박테리아 종에 따른 염기서열의 차이에 의해 단일가닥(한쪽 끝은 GC-clamp로 인해 묶여진 상태)으로 변성되는 정도가 달라지고, 이에 따라 gel상에서의 이동거리가 달라지는 점을 이용한 방법이다(Figure 4-3).

- 즉, 미생물의 16S RNA 유전자 가닥 간의 염기서열 차이로 인해 발생하는 고유한 Tm 값의 차이를 이용하여 서로 다른 미생물의 16S RNA 유전자를 이중 가닥을 단일가닥으로 풀어주는 변성제가 연속되는 농도 차이로 함유된 DNA 전기영동 gel상에서 분리하고 관찰하는 방법이다(Muyzer *et al.*, 1993).
- 결국 gel상의 특정 위치에서 특정 16S rRNA 유전자 염기서열을 가진 DNA가 band 형태로 나타나게 되는데, 샘플 내에 미생물의 개체수가 다양할수록 band의 수는 늘어나게 되고 동일한 염기서열의 DNA가 많을수록 나타나는 band의 선명도는 증가하게 된다.
- PCR-DGGE법은 많은 샘플에서의 전체적인 미생물 종의 수 그리고 양적 변화를 하나의 gel 상에서 관찰할 수 있다는 장점이 있으며, 중요도가 높은 band의 경우에는 band로부터 직접 DNA를 회수한 후, sequencing을 통해 종을 확인할 수 있기 때문에 cloning 분석법에 비해 시간, 노력 및 비용을 최소화할 수 있다.
- 그러나 gel의 제작과 최적 농도 구배의 범위를 설정하는 과정이 번거롭고, 샘플 내에 분포도가 낮은 종의 경우에는 증폭 산물이 적어 검출되지 않을 수 있으며, band의 수가 너무 많이 발생하는 경우에는 군집의 변화를 해석하는데 어려움이 따르는 단점이 있다.
- 더욱이 비교해야 할 샘플의 수가 많은 경우, 여러 장의 gel을 사용하여 전기영동을 실시해야 하며, 샘플의 조합을 달리하여 군집을 비교하고자 할 경우에는 추가적으로 전기영동을 실시해야 한다는 문제점이 있다(Kim *et al.*, 2010).
- PCR-DGGE법을 이용하여 다양한 식품에 존재하는 미생물이 검출되었다는 보고가 많이 있는데, Hu *et al.*(2009)은 PCR-DGGE법을 이용하여 진공 포장된 햄에 있는 *Leuconostoc* 종, *Lactobacillus* 종 등을 검출한 바 있고, Han *et al.*(2010) 역시 같은 방법을 이용하여 축산가공품에서 다양한 *Lactobacillus* 종을 검출한 바 있다.
- 또한 Handshur *et al.*(2005)은 PCR-DGGE를 이용하여 가공 중인 샐러드에서 *Pseudomonas* 종, *Acinetobacter* 종 등 다양한 미생물을 검출한 바 있으며, Vero *et al.*(2006)은 식초에서 *Acetobacter* 종 등의 검출 조건을 확립하여 발표하였다.
- 이 방법은 높은 효율로 많은 시료를 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있어서 일반적으로 미생물 다양성 연구에 많이 쓰이는 분자생물학적 기술로서 토양(Wang *et al.*, 2004)뿐만 아니라, 하천(Araya *et al.*, 2003), 곤충(Reeson *et al.*, 2003), 식물(Boon *et al.*, 2002), 음식(Ercolini, 2004)에 이르기까지 다양한 환경 시료로부터의 미생물 분석에 적용되고 있다.
- 그러나, DGGE 법에 의한 미생물 다양성 연구는 원 시료로부터의 DNA 추출방법, PCR 증폭 및 분석 방법에 의해 많은 영향을 받는다고 알려져 있으며, 단일 종의 군주 추적을 위한 유전자 지문 분석법으로는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다.

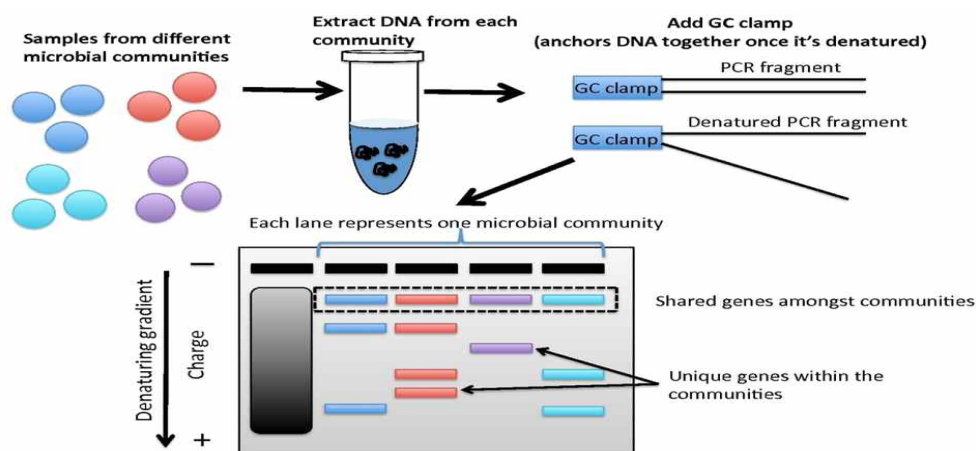


Figure 4-3. Schematic diagram of principles in PCR-denaturing-gradient gel electrophoresis(출처: https://en.wikipedia.org/wiki/Community_fingerprinting).

라. Terminal restriction fragment length polymorphism(t-RFLP)

- T-RFLP은 DNA 시료에서 16S rRNA나 18S rRNA 유전자 정보를 PCR로 증폭하여 확보한 후 제한효소 처리를 통해 해당 미생물 군집의 fingerprint를 획득하는 방법으로서(Marsh, 1999), RFLP법을 Liu *et al.*이 개량한 기법으로, 시료로부터 PCR을 통해 증폭된 미생물 DNA 염기서열의 차이를 빠르게 비교할 수 있으며, 많은 양의 시료를 한 번에 분석할 수 있는 장점이 있다(Dunbar *et al.*, 2001).
- 이 방법에서는 말단을 형광물질로 표지한 primer를 이용하여 16S rRNA나 18S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후, PCR 산물을 제한 효소로 절단하고, 생성된 단편들 가운데에서 형광 표지된 DNA 절편들은 변성제를 함유하지 않은 polyacrylamide gel를 사용하여 전기영동하거나 capillary 전기영동을 수행하여 형광을 검출함으로써 군집 내 미생물 종 다양성을 반영하는 peak(또는 band) 프로파일로 나타나게 된다(Figure 4-4).
- 이론적으로 형광 표지된 DNA 절편의 길이에 따라 나타나는 각 peak는 특정 미생물 종을 의미하며, 각 peak의 면적은 그 미생물 종의 상대적인 분포비를 나타내므로 PCR-DGGE와 유사하게 정성적 그리고 정량적으로 사용할 수 있다.
- 또한, 전기영동을 수행할 때 DNA의 size marker를 사용하여 형광 표지된 DNA 절편들의 길이를 측정할 수 있으며, 사용한 primer 및 제한효소의 종류에 근거하여 데이터베이스에서 각 단편의 길이에 해당하는 박테리아의 종을 찾아낼 수도 있다.
- 그러나 이론적으로는 하나의 미생물 종은 특정한 길이의 형광 표지 절편 하나만을 생성하지만, 서로 다른 미생물이라 하더라도 같은 길이에서 같은 제한효소 사이트를 가질 경우에는 여러 종이 똑같은 길이의 형광 표시 절편을 생성할 수도 있기 때문에 이러한 경우에는 데이터베이스로부터 미생물 종을 결정하기 어렵다.

- T-RFLP법은 서로 다른 미생물 군집의 종 다양성을 비교하거나 한 미생물 군집 내의 변화를 모니터링할 때 유용한 방법으로서, 샘플의 조합을 달리하여 군집을 해석하고자 할 때에도 추가적인 실험 없이 기존의 peak 프로파일 데이터를 비교함으로써 간단히 수행할 수 있으며, 존재량이 적은 미생물 종까지 검출해 낼 수 있는 장점이 있다(Kim *et al.*, 2009).
- 그러나 peak의 베이스라인이 안정되지 못 할 경우, peak가 아닌 것까지 모두 peak로 간주해 버림으로써 미생물 종 다양성을 과다하게 평가하는 오류를 범할 수 있으며, 사용한 primer와 제한효소의 종류에 따라 군집해석 결과가 달라질 수 있다.
- 따라서 t-RFLP법은 복잡한 군집구조를 가지는 시료의 해석에는 적합하지 않으며, 종 다양성이 크지 않은 미생물 군집의 해석에 적용하는 것이 바람직하다.
- 그 동안 농업 및 환경분야에서는 이와 같은 방법을 이용한 미생물 분석법이 알려져 있었지만(Kim *et al.*, 2009) 식품분야에는 많이 적용되지는 않았으나, 2000년대 후반부터 t-RFLP법을 이용하여 멸치, 육류 및 참치 통조림에서 다양한 종류의 미생물 검출 조건 확립 사례가 보고되고 있다(Hsieh *et al.*, 2007; Rea *et al.*, 2009).

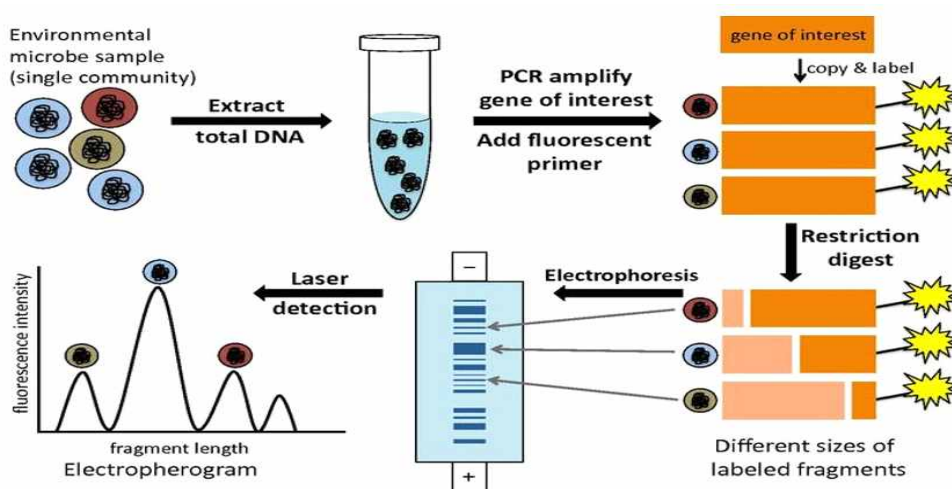


Figure 4-4. Schematic diagram of principles in terminal restriction fragment length polymorphism(출처: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/c/c5/Step-by-step_procedure_of_using_T-RFLP_analysis_in_microbiology.pdf).

마. Repetitive sequence-based PCR(rep-PCR)

- 원핵세포 유전체 내에는 단백질을 발현하지 못하는 non-coding 지역에 대부분 500 bp 이하의 비교적 짧은 단편이 반복적으로 존재하고 있는데 이는 종의 특성에 따라 strain간에도 반복되는 단편의 횟수에 차이를 보이고 있다.

- rep-PCR 분석방법은 이러한 세균의 염색체에 존재하는 interspersed repetitive DNA sequence 구간을 PCR을 통해 증폭함으로써 strain 수준까지 구별할 수 있는 fingerprinting pattern을 얻을 수 있는 검사법이며, 높은 재현성을 보인다고 알려져 있다(Koeuth *et al.*, 1995; Louws *et al.*, 1994)(Figure 4-5).
- 특히, 나타나는 유전자 지문이 균주에 따라 서로 다른 bar code 형태를 보임으로써 세균 중, 아종 및 균주 수준까지도 구별이 가능하여 세균의 신속한 분류 및 동정 이외에도 역학적인 연구에도 널리 사용되고 있다(Lupski and Weinstock, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 1993).
- 현재 널리 사용되고 있는 반복 염기서열에 기초한 유전자 지문법(rep-PCR genomic fingerprinting)은 반복 염기서열의 종류에 따라 Gram 음성 장내 세균에 존재하는 35~40 bp의 REP(repetitive extragenic palindrome), 124~127 bp의 ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus) 및 *Streptococcus pneumoniae* 에서 처음 발견되어 Gram 양성 세균의 분류에 이용되고 있는 154 bp의 BOX motif 등의 3종류로 구성되어 있다(Hulton *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1991).
- 최근에는 rep-PCR법을 이용한 자동화 분석방법이 개발되었는데 최종결과를 얻는데 소요되는 시간이 4시간 이내로 매우 짧으며 자동화된 결과의 분석으로 실험자 간의 오차가 적고 data를 저장 및 분석이 용이하며, 무엇보다도 가장 큰 장점은 높은 재현성을 보여준다는 장점이 있다(Healy *et al.*, 2005).
- Repetitive extragenic palindromic PCR(REP-PCR)은 bacteria의 extragenic sequence 중 계속 반복되는 palindromic sequence에 대한 complement sequence를 primer로 하여 PCR을 수행한 후 다양한 크기의 product pattern을 비교하는 기술로, bacteria와 같이 비교적 DNA의 변형이 많은 종의 경우에는 종뿐만 아니라 strain이 다를 경우에도 대부분 extragenic palindromic sequence의 위치가 다르므로 미생물의 분류 동정과 유연관계 분석에 사용 가능하다.
- REP sequence들은 5 bp의 유동적인 loop 구조를 포함한 38 bp palindromic unit들로 이루어져 있다(Higgins *et al.*, 1982).
- Higgins *et al.*(1982)에 의하여 REP sequence들이 최초로 발견된 이래, REP-PCR기술은 다양한 세균 균주들을 동정하기 위하여 신속하고 효과적인 genotyping 방법으로 이용되어져 왔다.
- REP-PCR은 다른 역학조사 방법들과 병행하여 *Salmonella enterica* serovar(Beyer *et al.*, 1998), *Shigella* species(Navia *et al.*, 1999), *Clostridium botulinum*(Hyytia *et al.*, 1999), *Proteus* species(Serwecinska *et al.*, 1998), *Streptococcus milleri* species(Clarridge *et al.*, 1999), *Lactobacillus hilgardii*와 *Lactobacillus brevis*(Sohier *et al.*, 1999), *Staphylococcus aureus* strains(van der Zee *et al.*, 1999), *Listeria monocytogenes* 균주들(Jersek *et al.*, 1999) 그리고 *Bacillus* 균주들(Hermann *et al.*, 1998)과 같은 다양한 종류의 세균 분리 균주들을 동정하는데 효율적으로 이용되어지고 있다.

- 특히 lactobacilli와 bifidobacteria 등과 같은 probiotics 균주들에서도 (GTG)₅, REP1R-I, REP2R-I 등과 같은 marker를 이용하여 typing할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Gevers *et al.*, 2001; Krizova *et al.*, 2008; Tafvizi and Ebrahimi, 2015).
- ERIC sequence들은 126 bp element들로서 중앙에 보존된 palindromic 구조를 가지고 있는데(Hulton *et al.*, 1991), Gram 음성 장내세균들뿐만 아니라 많은 계통분류체계상 서로 연관이 없는 다양한 문(phyla)들에 속하는 세균들에서도 보존되어 발견되고 있다(de Bruijn, 1992).
- 이에 따라 ERIC과 REP sequence들을 이용하여 장내세균들을 중심으로 한 대표적 식중독 세균들의 신속하고 정확한 검출·동정 기술들이 개발되어져 왔다.
- ERIC sequence의 몇몇 특성은 REP sequence와 유사한데, 두 종류 sequence 모두 염색체 상에서 non-coding 부위에 위치하고, 염색체상의 위치는 종(species)마다 각기 다르며, 두 종류 모두 전사 방향과 비교하여 방향성(orientation)에 있어서 같은 방향 혹은 반대방향에 관계없이 염색체 상에 위치할 수 있다.
- ERIC sequence와 REP sequence 모두 보존된 inverted repeat구조(잠정적 stem-loop 구조)를 포함하고 있다.
- 그러나 ERIC sequence와 REP sequence들 사이에 몇 개의 서로 다른 점들도 존재하는데, REP sequence들(33 bp)은 ERIC sequence들(126 bp)에 비해서 매우 짧고, 동일한 염색체 위치상에서 다양한 REP sequence들이 종종 발견되지만, ERIC sequence들은 한 가지 종류 만이 존재하는 것으로 확인되며, *E. coli* 내에서 염색체 당 추산되는 REP sequence들의 숫자는 ERIC sequence들의 숫자보다 10배정도 더 많은 것으로 알려져 있다.
- 현재 ERIC-PCR 기술은 공생균인 *Rhizobium*(de Bruijn, 1992), 식물병원균인 *Xanthomonas campestris*(Louws *et al.*, 1994), 그리고 인간 병원성균인 *S. pneumoniae*과 *Mycobacterium tuberculosis*(Sechi *et al.*, 1998)와 같은 Gram양성 및 Gram음성 분리균주들을 동정하는데 널리 이용되고 있다.
- BOX element들은 자연계의 기본 구성단위이고, 차별적으로 보존된 subsequence들로 구성되어 있으며, Gram양성균인 *Streptococcus pneumoniae*으로부터 분리된 최초의 산재된 반복성 element이다(Martin *et al.*, 1992).
- BOX element에는 boxA(59 bp), boxB(45 bp) 그리고 boxC(50 bp)라고 불리는 세 개의 다른 subunit들이 발견되는데(Martin *et al.*, 1992), 단지 boxA와 유사한 subunit sequence들 만이 다양한 여러 세균들 사이에서 높은 정도로 보존된 것으로 밝혀졌다.
- BoxB와 boxC subunit들과 유사한 sequence들은 오직 *S. pneumoniae*에서 만 발견되었고, boxA subunit은 *S. pneumoniae*에서는 많은 copy수로 분산되어 존재하지만, *Streptococcus pyogenes*와 *Streptococcus agalactiae*와 같은 다른 streptococci 미생물들에는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.

- 그러나 *E. coli*나 *Salmonella Typhimurium*과 같은 전혀 계통분류학적으로 무관한 Gram 음성균은 그들의 각각의 genome에 여러 copy수의 boxA와 같은 sub-sequence 들을 가지고 있는 것으로 확인되었다.
- BOX DNA element들은 세균 strain의 동정을 위하여 PCR-based DNA fingerprinting에 거의 사용되지 않는데, 그 이유는 이러한 BOX DNA element가 Gram 양성균인 *S. pneumoniae*의 계놈 상에서 만 발견됐다는 한계 때문이다(Martin *et al.*, 1992).

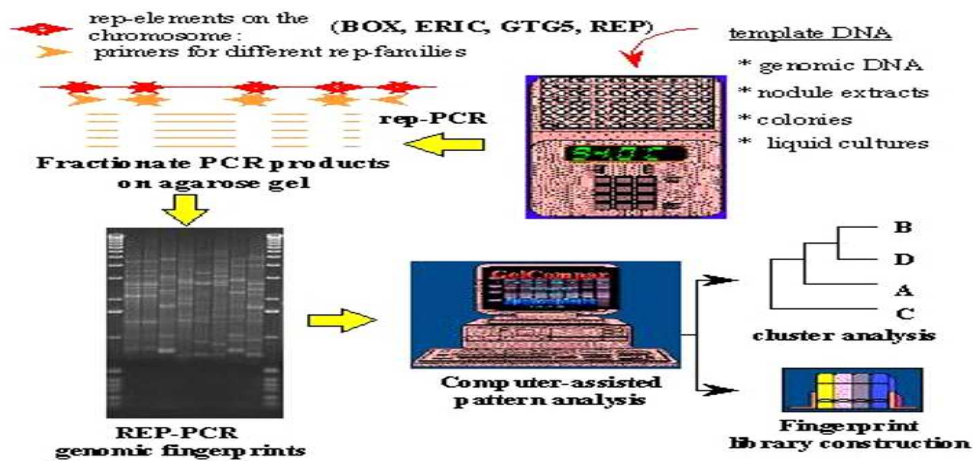


Figure 4-5. Schematic diagram of principles in repetitive sequence-based PCR(출처: https://www.staff.uni-marburg.de/~werner/rhizobial_diversity.htm).

바. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)

- DNA의 임의적인 부분을 증폭하는 RAPD는 유산균주와 bifidobacteria 균주의 genetic typing을 위한 신속하고 감도가 높으며 경제적인 분석 방법으로 알려져 있다.
- PCR을 기반으로 한 이 기술은 한 개체의 염색체 내의 미지 영역에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 일련의 염기서열에 결합할 수 있는 임의적인 primer를 사용하는데, 만약에 결합부위가 DNA 단편의 증폭이 가능할 정도로 간격이 있고 방향성이 맞으면 특정 균주에 특이적인 fingerprint pattern이 형성되는 것을 이용한다(O'Sullivan, 1999)(Figure 4-6).
- RAPD profiling은 *Bifidobacterium* 균주 간(Vincent *et al.*, 1998), *L. acidophilus* group에 속하는 균주들을 서로 구별하는 데 사용되어 왔는데(Gancheva *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2000; Torriani *et al.*, 1999; Tynkynen *et al.*, 1999), 몇몇 인자들이 RAPD fingerprint의 재현성과 구별성에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있고, 이러한 인자에는 primer의 결합 온도, DNA template의 순도와 농도, primer 조합 등이 있다.

- 유전자 다형분석인 RAPD방법은 실험조작이 간편하여 쉽게 DNA 다형성을 관찰할 수 있으며, 단 하나의 DNA절편까지도 증폭되어 밴드로 나타날 수 있을 정도로 그 감응도가 높기 때문에 소량의 DNA 만을 사용하여도 수행이 가능하여 종 및 품종의 분자생물학적 분류 및 집단간 다양성 연구에 널리 이용되고 있다(William *et al.*, 1993).
- 또한 이 방법은 대상 생물의 자세한 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 특정 유전자 부분의 증폭 및 증폭된 DNA절편을 비교함으로써 쉽게 종간 혹은 개체간의 유전적 유사도를 구할 수 있으나 primer의 길이가 상대적으로 짧아서 비 특이적인 결합을 너무 쉽게 하기 때문에 반응 조건에 따라 결과가 달라지는 등 재현성이 낮은 단점이 있다(Kim *et al.*, 2003).
- 뿐만 아니라, 이 분석법을 이용하여 식품 내 잔존하는 미생물 검출하는 것으로도 이용되고 있는데, Haryani *et al.*(2007)은 RAPD 분석법을 이용하여 말레이시아에서 판매하는 길거리 식품에서 *Klebsiella pneumonia*를 분리하였다고 발표한 바 있으며, 최근 국내에서 같은 방법으로 청국장 내에서 *Bacillus* 종을 검출하는 조건을 확립하였다고 보고한 바 있다(Kwon *et al.*, 2007).

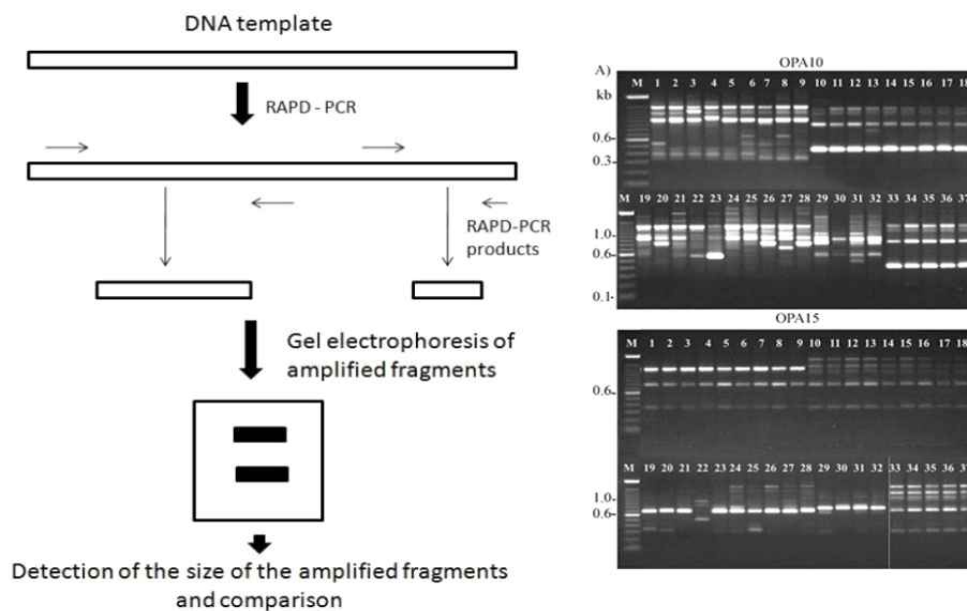


Figure 4-6. Schematic diagram of principles in randomly amplified polymorphic DNA(출처: Arif *et al.*, Int. J. Mol. Sci. 11: 2079-2096, 2010).

사. Amplified fragment length polymorphism(AFLP)

- AFLP는 인식부위가 많지 않은 제한효소로 절단된 DNA의 단편들에 adaptor(임의로 합성한 DNA조각)을 붙인 다음, 표식 부위의 DNA 염기서열을 바탕으로 작성한 primer를 PCR primer로 사용하여 특정 제한효소 단편을 증폭시켜 그 산물에서 얻어지는 band 차이의 유무를 비교하는 기술로서(Vos *et al.*, 1995), RAPD에서와 같이 재현성 여부가 문제점으로 되어 있다(Figure 4-7).
- AFLP의 장점으로서는 RAPD보다 고감도의 PCR 산물을 얻을 수 있고 여러 개의 유전자를 동시에 동정하는 것이 가능하며, 다형성이 드문 계통에 적용할 수 있을 뿐만 아니라 양 말단의 DNA 염기서열을 알지 못하는 제한 효소 단편을 증폭시킬 수 있다는 점 등이 있으나 재현성이 낮고 분석이 복잡하다는 단점이 있다.
- 현재는 임상연구에서 주로 사용되고 있으나 *L. acidophilus* group이나 *L. johnsonii* 분리군주 등을 typing하는 데 응용한 보고도 있다(Gancheva *et al.*, 1999; Ventura and Zink, 2002).

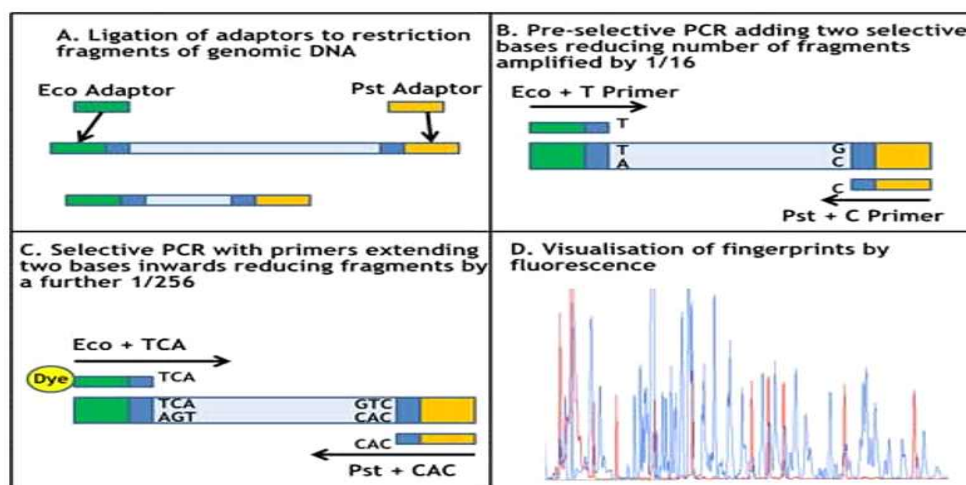


Figure 4-7. Schematic diagram of principles in amplified fragment length polymorphism(출처: <http://www.brainkart.com/article/Amplified-Fragment-Length-Polymorphism-AMP-FLP-14716/>).

아. Multilocus sequence typing(MLST)

- 최근 각 균종의 계통발생이나 유행균주들의 유래를 추적하기 위해 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)나 PCR 등의 band-based typing방법의 단점을 보완할 수 있는 multilocus sequence typing(MLST)방법이 고안되어 사용되고 있다(Gevers *et al.*, 2005; Stackebrandt *et al.*, 2002).

- MLST방법은 염색체 DNA에서 약 6~8개의 housekeeping 유전자의 염기서열을 결정하고 MLST database에 입력한 후 allelic profile들을 조합하여 sequence type(ST)을 결정하는 방법이다(Homan *et al.*, 2002)(Figure 4-8).
- MLST의 marker로 사용될 수 있는 유전자의 조건은 다음과 같다.
 - ✓ Marker로 사용할 유전자는 유전체의 염기서열이 완전히 밝혀진 미생물의 염색체에 전반에 골고루 분포되어야 한다(Makarova *et al.*, 2006).
 - ✓ 코딩하는 단백질의 기능이 잘 보존되고 특성이 규명되어 있어야 한다.
 - ✓ 모든 균주에 최소 1 kb 이상의 크기의 단일 사본으로 존재하여야 한다.
- MLST 결과는 분리균들의 ST나 clonal complex(CC)를 확인할 수 있기 때문에 실험자와 실험실간의 오차없이 동일 균종들의 역학적 기원 및 진화적 배경들을 추정할 수 있는 방법으로 재현성은 매우 우수하나 각 특정 유전자의 염기서열 분석 방법에 의해 종에 제한이 있는 단점이 있다(Coffey *et al.*, 2006; Madslie *et al.*, 2012; Maiden *et al.*, 1998).

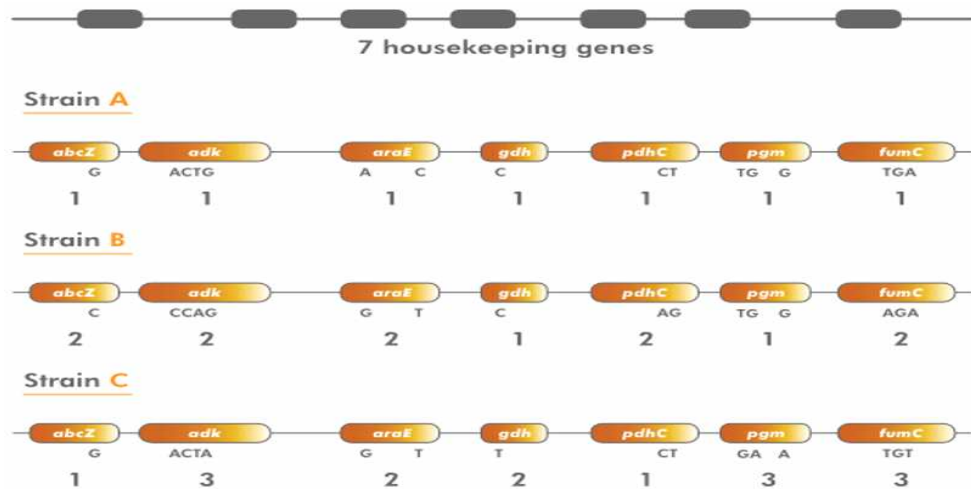


Figure 4-8. Schematic diagram of principles in multilocus sequence typing(출처: <http://www.applied-maths.com/applications/mlst>).

- 이성과 같이 미생물의 strain을 구별하여 추적할 수 있는 방법으로 유전학적 특성을 이용한 ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), PCR-denaturing-gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE), terminal restriction fragment length polymorphism analysis(t-RFLP), repetitive sequence-based PCR(rep-PCR), randomly amplified polymorphic DNA(RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP), multilocus sequence typing(MLST) 등이 있지만 Table 4-2에 정리한 것과 같이 ribotyping, PFGE, PCR-DGGE, t-RFLP 등은 재현성은 높지만 고가의 장비와 많은 분석 시간이 요구되고 분석과정이 복잡하여 고도의 숙련도가 필요하기 때문에 일반 실험실에서는 분석이 어려운 단점이 있다.

- 반면에 rep-PCR, RAPD, AFLP 등은 조작이 비교적 간단하고 신속하지만 재현성이 낮은 단점이 있다.
- 한편, 가장 최근에 개발된 DNA fingerprinting 방법인 multilocus sequence typing (MLST)의 경우에는 분석 방법이 비교적 간단하고 재현성이 높아 실험자 또는 실험실 간 오차가 발생하지 않는 장점이 있다.
- 따라서 본 연구에서는 여러 유전자 지문 분석 방법 중에서 multilocus sequence typing (MLST)이 정확도와 편의성이 다른 분석 방법 중에서 가장 우수하며, 경제성 면에서도 상대적으로 좋은 것으로 판단되었기에 본 연구를 위한 유전자 지문 분석 방법으로 선정하여 향후 실험에 적용하였다.

Table 4-2. Characteristics of genetic fingerprinting methods for microorganisms

분석법	분석 내용	장점	단점
Ribotyping	미생물의 16S 또는 23S rRNA 유전자를 제한효소로 절단한 후 생성된 DNA 단편의 패턴을 Southern blot을 실시하여 분석함.	재현성이 높음.	방법이 복잡하고 비용이 많이 들며 실험자 간에 방법이 상이하고 데이터베이스가 요구됨.
Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	미생물의 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 전기영동을 실시하여 DNA 단편의 패턴을 분석함.	미세한 유전적 차이도 구분하고 재현성이 높음.	분석시간이 장시간 요구되고 다량의 시료를 동시에 분석하기가 어려우며 데이터베이스가 요구됨.
PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)	16S rRNA 유전자 또는 16S~23S rRNA intergenic spacer 구역을 PCR로 증폭시킨 후 증폭한 DNA의 변성 특성을 이용하여 denaturing-gradient gel 전기영동에 의한 DNA 밴드 패턴을 분석함.	Strain 특이성이 매우 높음.	실험자의 숙련도가 높아야 하고 다량의 시료를 동시에 분석하기가 어려우며 데이터베이스가 요구됨.
Terminal restriction fragment length polymorphism analysis (T-RFLP)	형광으로 말단 표지한 PCR amplicon을 제한효소로 절단하여 패턴을 분석함.	미생물 배양이 필요 없고 데이터베이스를 요구하지 않음.	고가의 장비가 요구되고 실험자의 숙련도가 요구됨.
Repetitive	미생물 genomic DNA 상에 존재하는	조작이	재현성이 높지 않고

DNA sequences (rep-PCR)	반복 서열을 PCR로 증폭한 후 전기영동에 의해 DNA band 패턴을 분석함.	간편하고 신속함.	적용 가능한 균주가 많지 않고 데이터베이스가 요구됨.
Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)	임의의 primer를 사용하여 genomic DNA 상의 특정 부위를 증폭한 후 전기영동에 의해 DNA band 패턴을 분석함.	소량의 DNA로부터 결과를 얻을 수 있고 조작이 간편함.	재현성이 낮음.
Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	제한효소로 절단한 DNA 단편에 adaptor를 붙인 후 PCR primer를 사용하여 특정 제한효소 단편의 증폭 산물의 크기를 분석함.	RAPD보다 고감도의 PCR 산물을 얻을 수 있음.	재현성이 낮고 분석과정이 복잡함.
Multilocus sequence typing (MLST)	염색체 DNA에서 약 6~8개의 housekeeping 유전자의 염기서열을 결정하고 MLST database에 입력한 후 allelic profile들을 조합하여 sequence type(ST)을 결정하여 분석함.	재현성이 우수하고 분석방법이 비교적 간단함.	분석 가능한 종에 제한이 있음.

2. 식품 발효용 균주(유산균, 효모, 곰팡이, *Bacillus* spp. 등)의 full genome 염기서열 수집

가. Full genome 염기서열 수집을 위한 균주 선정

- 본 연구는 식품 발효용 균주를 이용하는 것이고, 이를 위해서는 안전성이 입증되어 식품으로 사용할 수 있는 균주를 이용하는 것이 필수 조건이다.
- 따라서 미국, 유럽연합 및 우리나라에서 식품 사용이 가능하도록 허가된 미생물의 종류를 국가 별로 조사하였다.

(1) 미국 FDA의 GRAS균주

- 미국에서 식품첨가물은 연방식품의약품화장품법(Federal Food, Drug and Cosmetic Act, FFDC)에 따라 규제되고 있는데, FFDC 201(s) 및 409 조항에 따르면 식품첨가물은 식품의 특성에 영향을 미칠 수 있는 성분으로 의도적으로 첨가한 물질로 정의하고 있으며, 신규 물질의 식품사용을 위해서는 FDA의 사전승인(premarket approval)을 받아야 한다.
- GRAS(generally recognized as safe)는 미국 FDA(Food and Drug Administration)가 오랜 사용이력 및 전문가들의 평가를 통하여 일반적으로 안전하다고 판단되는 식품

첨가물을 관리하는 규격(status)이다. 따라서 GRAS로 인정된 식품첨가물의 사용에는 사전승인을 면제하고 있다.

- FFDCA에 의해 GRAS시스템이 시행되기 시작한 1958년 이전부터 사용한 물질에 대해서는 사전승인(prior sanction)물질로 간주해 안전성 평가 없이 GRAS로 인정되었지만, 현재는 안전성에 대한 과학적 근거 자료에 대한 전문가들의 심사를 통하여 인정되고 있다.
- 미생물 및 미생물에서 유래한 성분을 식품에 첨가하려는 경우, 식품첨가물과 동일한 절차를 거쳐 GRAS로 승인되는데, GRAS규격은 식품에 첨가하는 원료 자체에 대한 안전성을 제공하는 것이 아닌, 특정용도에서의 안전성을 의미한다. 따라서 항상 용도를 지정해야 한다.
- GRAS notification program은 식품원료의 안전성을 증명하는 과정으로, GRAS로 인증된 식품원료는 GRAS notice inventory에 등재되어 FDA homepage (<http://www.fda.gov>)에 공개되고 있다.
- 1997년 이전에는 GRAS인증의 심사가 FDA 및 제조업체의 안전성 평가 전문가들에 의해서 진행되었지만, 오랜 기간에 걸쳐 진행되는 단점을 보완하기 위해, 1997년 이후에는 생산자 또는 판매자가 GRAS여부를 판단한다.
- 현재 미국 FDA가 공시하고 있는 38종의 GRAS균주는 Table 4-3과 같다.
- FDA에 심사를 청구하면 독성, 영양, 분자생물학 분야 전문가 패널의 안전성 검증을 통해 GRAS규격을 획득하는데, 다만 1958년 이전에 안전하게 사용되었다는 역사적 사용 근거가 있는 물질에 대해서는 사전승인 물질로 인정해 위해성이 없는 물질로 간주하고 있다.

Table 4-3. GRAS microorganisms list

GRN No.	Strain
378	<i>Bacillus coagulans</i>
240	<i>Bacillus coagulans</i> LA-1
399	<i>Bacillus coagulans</i> strain GBI-30, 6086 spores
560	<i>Bacillus licheniformis</i>
561	<i>Bacillus pumilus</i>
562	<i>Bacillus subtilis</i>
457	<i>Bacteriodes xylanisolvens</i> strain DSM23964
377	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Bf-6
445	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> strains HN019, Bi-07, B1-04, B420
453	<i>Bifidobacterium breve</i> M-16V
49	<i>Bifidobacterium lactis</i> strain Bb12
268	<i>Bifidobacterium longum</i> strain BB536
159	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain CB1
171	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
502	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14
357	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM

463	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain NP28
463	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain NP51
378	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
429	<i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota
231	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> strain GG
531	<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT5716
171	<i>Lactobacillus lactis</i>
378	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
378	<i>Lactobacillus plantarum</i>
254	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain DSM17938
440	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain NCIMB30242
288	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain HN001
378	<i>Lactobacillus sakei</i>
463	<i>Lactobacillus</i> subsp. <i>lactis</i> strain NP7
171	<i>Pediococcus acidilactici</i>
463	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain NP3
415	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ET-3 culture, heat-killed (powder)
240	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>
350	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain P1Y0
378	<i>Streptococcus thermophilus</i>
49	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain Th4

(FDA Gras Notice Inventory, as of 2015.04.05.)

(2) 유럽의 QPS시스템

- European Food Safety Authority(EFSA)는 EU의 Scientific Committee on Animal Nutrition(SCAN), Scientific Committee on Food(SCF), Scientific Committee on Plants(SCP)의 전문가 그룹을 2002년과 2003년에 소집하여 식품이나 사료에 사용될 미생물의 안전성 평가를 위한 qualified presumption of safety(QPS) 개념을 제안하였다(EFSA, 2004; Leuschner *et al.*, 2010).
- QPS는 특정 용도로 식품에 첨가하는 미생물의 균주 수준(strain level)에서의 안전성을 의미하는 미국의 GRAS와는 달리, 미생물 단위의 일반적인 안전성을 정의하기 때문에, QPS 시스템을 통하여 안전하다고 평가된 미생물 단위(종 또는 속)은 사용 용도를 제한하지 않고 있다.
- QPS에 의해 안전성이 확보된 미생물 단위는 QPS list에 등록되고, 이 목록은 매년 업데이트되며(<http://www.efsa.eu.int/>), QPS list에 등록된 미생물 단위는 일반적인 안전성이 입증되었기 때문에 개별적인 안전성 평가가 필요 없고, 균주 수준에서의 특이적 안전성 문제가 없다면 식품에 사용 가능하지만, 반면에 등록되지 않은 미생물 단위에 대해서는 평가가 필요한 모든 안전성이 검증되어야 한다.

- EFSA의 과학위원회는 2005년 식품에 첨가하는 미생물의 안전성 평가에 QPS를 적용하도록 제안하였고(EFSA, 2005), 2007년에는 bifidobacteria, 유산균, *Bacillus* 속 및 일부 효모에 대한 안전성을 검토하여 QPS list를 작성하였다(EFSA, 2007).
- 2008년부터는 EFSA의 Biological Hazards(BIOHAZ)패널이 안전성을 검토하여 QPS list를 업데이트하고 있는 바(Bourdichon *et al.*, 2012, EFSA, 2008; EFSA, 2009), Table 4-4에 2017년에 업데이트된 83종의 QPS 미생물목록을 정리하였다.

Table 4-4. The 2017 updated list of QPS status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA Scientific Panels and Units

Gram-Positive Non-Sporulating Bacteria		
Species	Qualifications	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	
<i>Carnobacterium divergens</i>		
<i>Corynebacterium glutamicum**</i>		QPS only applies when the species is used for amino acid production
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus gasserii</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
***	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>		
<i>Microbacterium imperiale</i>		QPS only applies when the species is used for

			enzyme production
<i>Oenococcus oeni</i>			
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>			
Bacillus			
Species			Qualifications
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	Absence of toxigenic activity
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>			
Gram-Negative Bacteria			
Species			Qualifications
<i>Gluconobacter oxydans</i>			QPS only applies when the species is used for vitamin production
Yeasts			
Species			Qualifications
<i>Candida cylindracea</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production
<i>Debaryomyces hansenii</i>			
<i>Hanseniaspora uvarum</i>			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		QPS only applies when the species is used for enzyme production
<i>Komagataella pastoris</i>			
<i>Lindnera jadinii</i>			
<i>Ogataea angusta</i>			
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (imperfect form)			

(3) 우리나라 식품의약품안전처 고시 식품원재료로 사용 가능한 미생물

- 우리나라는 식품의약품안전처(MFDS)가 식품원재료로 사용 가능한 균주 68종을 고시하고 있고 정기적으로 업데이트하고 있는 바, 이들 균주 목록을 Table 4-5에 나타내었다.
- 식품원재료로 사용 가능한 균주 68종은 안전성이 확보된 것으로 판단하기 때문에 우리나라에서는 별도의 안전성 시험을 실시하지 않고 식품에 사용할 수 있는 균주이므로, 본 연구에서는 여러 발효 미생물 중에서 Table 4-5에 기술되어 있는 식품의약품안전처 고시 식품원재료로 사용 가능한 미생물 균주를 우선 대상으로 하고, 미국 FDA의 GRAS미생물과 EU의 QPS시스템에 등재되어 있는 미생물을 참고하여 최종 연구 대상 미생물 수 종을 선정한 후 이들 균주들을 대상으로 유전체 분석과 균주 추적 기술을 개발하고자 하였다.

Table 4-5. Microorganisms which can be used as food materials listed by MFDS and their complete genome sequences

Microorganisms	Reference strain	NCBI RefSeq	GenBank assembly	Sequencing level	Genome size (Mb)	No. of genes	
<i>Aspergillus</i>							
<i>A. kawachii</i>	IFO 4308	n.a*	GCA_00023983 5.2	Scaffold	37.11	11,472	
<i>A. niger</i>	SH2	n.a	GCA_00063304 5.1	Scaffold	34.60	-	
	ATCC 1015	n.a	GCA_00023039 5.2	Contig	34.85	10,947	
	HBR18	n.a	GCA_00053034 5.1	Contig	32.84	-	
<i>A. oryzae</i>	3.042	n.a	GCA_00026978 5.2	Contig	36.58	11,639	
	AS 3.951	n.a	GCA_00027840 5.1	Contig	36.33	-	
	AS 3.863	n.a	GCA_00027842 5.1	Contig	36.41	-	
	RIB326	n.a	GCA_00032090 5.1	Contig	35.43	-	
	HBR9	n.a	GCA_00053105 5.1	Contig	35.28	-	
	100-8	n.a	GCA_00069188 5.1	Contig	36.77	11,188	
	RIB40	n.a	n.a	GCA_00096524	Contig	37.06	-
				5.1			

<i>A. shirousamii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. usamii</i>	-	-	-	-	-	-
Bacillus						
<i>B. amyloliquefaciens</i>	DSM 7	NC_01455	GCA_00019673	Complete	3.98	4,043
		1.1	5.1			
	FZB42	NC_00972	GCA_00001578	Complete	3.92	3,807
		5.1	5.1			
	TA208	NC_01718	GCA_00019551	Complete	3.94	3,990
		8.1	5.1			
	LL3	NC_01719	GCA_00020427	Complete	4.00	4,058
		0.1	5.1			
	XH7	NC_01719	GCA_00022164	Complete	3.94	3,996
		1.1	5.1			
	IT-45	NC_02027	GCA_00024285	Complete	3.94	3,844
		2.1	5.2			
	Y2	NC_01791	GCA_00026238	Complete	4.24	4,163
		2.1	5.1			
	CAU B946	NC_01678	GCA_00028369	Complete	4.02	3,945
		4.1	5.1			
	YAU	NC_01706	GCA_00028439	Complete	4.24	4,167
	B9601-Y2	1.1	5.1			
	AS43.3	NC_01984	GCA_00031947	Complete	3.96	3,860
		2.1	5.1			
	UCMB5036	NC_02041	GCA_00034187	Complete	3.91	3,857
		0.1	5.1			
	UCMB-5033	NC_02207	GCA_00045556	Complete	4.07	4,057
		5.1	5.1			
	UCMB5113	NC_02208	GCA_00045558	Complete	3.89	3,836
		1.1	5.1			
	NAU-B3	NC_02253	GCA_00049337	Complete	4.20	4,110
		0.1	5.1			
	CC178	NC_02265	GCA_00049483	Complete	3.92	3,804
		3.1	5.1			
	LFB112	NC_02307	GCA_00050826	Complete	3.94	3,811
		3.1	5.1			
	TrigoCor144	NZ_CP00	GCA_00058306	Complete	3.96	3,828
	8	7244.1	5.1			
	SQR9	NZ_CP00	GCA_00068572	Complete	4.12	3,980
		6890.1	5.1			
	L-H15	NZ_CP01	GCA_00083300	Complete	3.91	3,778
		0556.1	5.1			
	KHG19	NZ_CP00	GCA_00083514	Complete	3.95	3,828
		7242.1	5.1			
	L-S60	NZ_CP01	GCA_00097348	Complete	3.90	3,783
		1278.1	5.1			
	NJN6	NZ_CP00	GCA_00097358	Complete	4.05	3,937
		7165.1	5.1			
	DC-12	NZ_AMQ	GCA_00033080	Scaffold	4.02	4,005

	I00000000.	5.1			
	1				
	NZ_BBL	GCA_00074770			
CMW1	H0000000	5.1	Scaffold	3.91	3,913
	0.1				
	NZ_JUDU	GCA_00081757			
TF28	00000000.	5.1	Scaffold	3.99	3,798
	1				
	NZ_AMP	GCA_00029961			
M27	K0000000	5.1	Contig	3.86	3,869
	0.1				
	-	GCA_00040892			
SPZ1	-	5.1	Contig	4.13	4,082
	-	GCA_00041083			
ATCC12321	-	5.1	Contig	4.14	4,083
	NZ_AVQ	GCA_00046565			
EGD-AQ14	H0000000	5.1	Contig	4.22	4,372
	0.1				
	NZ_AWQ	GCA_00046901			
UASWS	Y0000000	5.1	Contig	3.94	4,053
BA1					
	0.1				
	NZ_JCOC	GCA_00055914			
EBL11	00000000.	5.1	Contig	3.93	3,777
	1				
	NZ_JFBZ	GCA_00061256			
AH159-1	00000000.	5.1	Contig	3.99	4,020
	1				
	NZ_JME	GCA_00069628			
B1895	G0000000	5.1	Contig	4.11	4,046
	0.1				
	NZ_JOKF	GCA_00073205			
W2	00000000.	5.1	Contig	4.00	3,925
	1				
	NZ_JQNZ	GCA_00075004			
X1	00000000.	5.1	Contig	3.92	3,774
	1				
	NZ_AUW	GCA_00078467			
HB-26	K0000000	5.1	Contig	3.99	3,895
	0.1				
	-	GCA_00079861			
JJC33M	-	5.1	Contig	3.96	-
	NZ_JXAT	GCA_00081527			
LPL-K103	00000000.	5.1	Contig	3.87	3,770
	1				
AP183	NZ_JXA	GCA_00087587	Contig	3.99	3,809

		M0000000	5.1			
		0.1 NZ_JYGH				
	GR4-5	00000000.	GCA_00093488	Contig	4.11	4,057
		1	5.1			
	12B	NZ_JZDI0	GCA_00094711	Contig	7.60	8,229
		0000000.1	5.1			
<i>B. coagulans</i>	36D1	NC_01602	GCA_00016919	Complete	3.55	3,434
		3.1	5.2			
	2-6	NC_01563	GCA_00021783	Complete	3.07	3,070
		4.1	5.1			
	ATCC 7050	NZ_CP00	GCA_00083290	Complete	3.37	3,388
		9709.1	5.1			
	HM-08	NZ_CP01	GCA_00087654	Complete	3.62	3,552
		0525.1	5.1			
	XZL4	NZ_AFW	GCA_00022315	Scaffold	2.87	2,926
		M0000000	5.1			
		0.1 NZ_AXV				
	CSIL1	W0000000	GCA_00048260	Scaffold	3.47	3,453
			5.1			
		0.1 NZ_ALA				
	DSM 1	S00000000	GCA_00029061	Contig	3.02	3,156
			5.1			
		1 NZ_ANA				
	XZL9	P00000000	GCA_00033391	Contig	3.42	3,488
			5.1			
		1 NZ_ANA				
	H-1	Q0000000	GCA_00033393	Contig	2.86	2,959
			5.1			
		0.1 NZ_ATU				
	ATCC 7050	M0000000	GCA_00042020	Contig	2.95	3,033
			5.1			
		0.1 NZ_JPSK				
	GBI-30, 6086	00000000.	GCA_00075628	Contig	3.46	3,377
			5.1			
		1 NZ_JSVI0				
	P38	0000000.1	GCA_00077365	Contig	3.37	3,365
			5.1			
<i>B. polyfermenticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	168	NC_00096	GCA_00000904	Complete	4.22	4,421
		4.3	5.1			
	TU-B-10	NC_01604	GCA_00022746	Complete	4.21	4,307
		7.1	5.1			
	W23	NC_01447	GCA_00014656	Complete	4.03	4,140
		9.1	5.1			
	BSn5	NC_01497	GCA_00018674	Complete	4.09	4,242

BEST195	6.1 NC_01719	5.1 GCA_00020979	Complete	4.11	4,392
RO-NN-1	6.2 NC_01719	5.2 GCA_00022748	Complete	4.01	3,982
QB928	5.1 NC_01852	5.1 GCA_00029376	Complete	4.15	4,349
BSP1	0.1 NC_01989	5.1 GCA_00032139	Complete	4.04	4,165
XF-1	6.1 NC_02024	5.1 GCA_00033873	Complete	4.06	4,042
6051-HGW	4.1 NC_02050	5.1 GCA_00034474	Complete	4.22	4,246
BAB-1	7.1 NC_02083	5.1 GCA_00034979	Complete	4.02	3,996
PY79	2.1 NC_02289	5.1 GCA_00049748	Complete	4.03	4,031
BEST7003	8.1 NZ_AP01	5.1 GCA_00052304	Complete	4.04	4,045
JAG174	2496.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00069946	Complete	4.19	4,424
AG1839	7800.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00069952	Complete	4.19	4,427
OH 131.1	8698.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00070670	Complete	4.04	4,178
ATCC 13952	7409.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00077212	Complete	3.88	3,930
ATCC 19217	9748.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00077216	Complete	3.96	3,769
Bs-916	9749.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00077220	Complete	3.98	3,849
SG6	9611.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00078283	Complete	4.08	4,221
168	9796.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00078927	Complete	4.22	4,248
PS832	0052.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00078929	Complete	4.22	4,243
NRS 231	0053.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00081680	Complete	4.03	4,137
3NA	0434.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00082706	Complete	4.20	4,413
BS49	0314.1 NZ_LN64	5.1 GCA_00095361	Complete	4.25	4,469
T30	9259.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00095902	Complete	4.03	4,138
KCTC 1028	1051.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00097192	Complete	4.22	4,434
HJ5	1115.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00097360	Complete	4.01	4,115

B-1	7173.1 NZ_CP00	5.1 GCA_00076951	Chromos ome	3.94	3,794
168	9684.1 NZ_ABQ K0000000	5.1 GCA_00015532	Chromos ome	4.21	4,436
JH642	0.1 NZ_ABQ M0000000	5.1 GCA_00015535	Chromos ome	4.19	4,422
SMY	0.1 NZ_ABQ N0000000	5.1 GCA_00015537	Chromos ome	4.21	4,439
NCIB 3610	0.1 NZ_ABQ L00000000	5.1 GCA_00018608	Chromos ome	4.29	4,548
AUSI98	.1 NZ_AFSF 00000000.	5.1 GCA_00024529	Scaffold	4.35	4,674
BST	1 NZ_JMN A0000000	5.1 GCA_00074321	Scaffold	4.04	4,107
PCI 246	0.1 NZ_JMTJ 00000000.	5.1 GCA_00074323	Scaffold	4.15	4,196
ATCC 6633	1 NZ_ADG S00000000	5.1 GCA_00017759	Contig	3.98	4,112
gtP20b	.1 NZ_AEH M0000000	5.2 GCA_00018376	Contig	4.21	4,272
SC-8	0.1 NZ_AGF W0000000	5.2 GCA_00023075	Contig	4.14	4,297
DV1-B-1	0.1 NZ_AFS G0000000	5.2 GCA_00024503	Contig	3.97	4,140
KCTC 13429	0.1 NZ_AMX N0000000	5.1 GCA_00033264	Contig	4.34	4,509
S1-4	0.1 NZ_ANIP 00000000.	5.1 GCA_00034029	Contig	4.45	4,829
MB73/2	1 NZ_AOT Y0000000	5.1 GCA_00034177	Contig	4.17	4,507

PS216	0.1 NZ_AQG R0000000	GCA_00038598	5.1	Contig	4.31	4,620
Hal1	0.1 NZ_AMC A0000000	GCA_00040958	5.1	Contig	3.98	4,013
MP9	0.1 NZ_APM W0000000	GCA_00049734	5.1	Contig	3.95	4,214
MP11	0.1 NZ_APM X0000000	GCA_00049736	5.1	Contig	3.93	4,458
PTS-394	0.1 NZ_AWX G0000000	GCA_00050700	5.1	Contig	4.01	4,100
GB03	0.1 NZ_AYTJ 00000000.	GCA_00050812	5.1	Contig	3.85	3,748
B7-s	1 NZ_AZNI 00000000.	GCA_00052091	5.1	Contig	5.31	5,389
QH-1	1 NZ_AZQS 00000000.	GCA_00058288	5.1	Contig	4.03	4,189
KATMIRA1 933	1 NZ_JMEF 00000000.	GCA_00069118	5.1	Contig	4.26	4,342
E72	1 NZ_JNCN 00000000.	GCA_00069661	5.1	Contig	4.17	4,410
168	1 NZ_JNC M0000000	GCA_00069663	5.1	Contig	4.17	4,411
E1	0.1 NZ_CAU C0000000	GCA_00072412	5.1	Contig	4.11	4,396
GXA-28	0.1 NZ_JPNZ 00000000.	GCA_00073511	5.1	Contig	4.26	4,299
D7XPN1	1 -	GCA_00073801	5.1	Contig	4.08	4,021
NDmed	NZ_JPV W0000000	GCA_00074047	5.1	Contig	4.06	4,043

NDfood	0.1 NZ_JPVX 00000000.	GCA_00074048	Contig	4.06	4,050
	1 NZ_JPYY 00000000.	GCA_00074071	Contig	3.95	3,821
Miyagi-4	1 NZ_BALZ 00000000.	GCA_00074764	Contig	4.08	4,432
B4067	1 NZ_JSXS 00000000.	GCA_00082849	Contig	4.31	4,855
B4072	1 NZ_JXHO 00000000.	GCA_00083059	Contig	4.02	4,334
B4069	1 NZ_JXHL 00000000.	GCA_00083060	Contig	4.02	4,326
B4068	1 NZ_JXHK 00000000.	GCA_00083063	Contig	3.96	4,235
B4146	1 NZ_JXHR 00000000.	GCA_00083064	Contig	4.18	4,467
B4070	1 NZ_JXH M0000000	GCA_00083067	Contig	4.20	4,546
B4071	0.1 NZ_JXHN 00000000.	GCA_00083069	Contig	4.13	4,442
B4073	1 NZ_JXHP 00000000.	GCA_00083071	Contig	4.05	4,344
B4145	1 NZ_JXHQ 00000000.	GCA_00083073	Contig	4.32	4,706
B4143	1 NZ_JXLQ 00000000.	GCA_00083219	Contig	4.10	4,376
HM-66	1 NZ_JXBC 00000000.	GCA_00087826	Contig	4.36	5,029
RFWG1A3	1 NZ_AJHL	GCA_00093181	Contig	4.06	4,203

		00000000.	5.1			
		1				
		NZ_AJH				
RFWG1A4	M0000000	GCA_00093182	5.1	Contig	4.00	4,131
		0.1				
		NZ_AJHN				
RFWG4C10	00000000.	GCA_00093183	5.1	Contig	3.98	4,094
		1				
		NZ_AJHO				
RFWG5B15	00000000.	GCA_00093184	5.1	Contig	4.01	4,140
		1				
		NZ_JYFL				
2014-3557	00000000.	GCA_00093416	5.1	Contig	4.18	4,313
		1				
		-				
C3	-	GCA_00095287	5.1	Contig	4.18	4,396
		-				
GRSW1-B1	-	-	5.1	Contig	-	-
		NC_01994				
BEST7613		GCA_00032874	5.1	Complete	7.59	7,430
		8.1	5.1			
<i>Bifidobacterium</i>						
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	NC_00861	GCA_00001042	Complete	2.09	1,721
		8.1	5.1			
		22L				
		NZ_CP00	GCA_00073788	Complete	2.20	1,798
		7443.1	5.1			
		BBMN23				
		NZ_CP01	GCA_00081799	Complete	2.17	1,812
		0437.1	5.1			
		L2-32				
		D0000000	GCA_00015408	Scaffold	2.39	2,499
		0.2	5.1			
		NZ_JNK				
DSM 20087	M0000000	GCA_00070286	5.1	Contig	2.05	1,680
		0.1	5.1			
		NZ_JRNZ				
IVS-1	00000000.	GCA_00082986	5.1	Contig	2.26	1,952
		1				
<i>B. animalis</i> *	RH	NZ_CP00	GCA_00069589	Complete	1.93	1,606
		7755.1	5.1			
		ATCC 25527				
		NC_01783	GCA_00026071	Complete	1.93	1,583
		4.1	5.1			
		A6				
		NZ_CP01	GCA_00081704	Complete	1.96	1,623
		0433.1	5.1			
		LMG 10508				
		NZ_JGY	GCA_00074148	Contig	1.92	1,602
		M0000000	5.1			
		0.1				
<i>B. animalis</i> subsp.	AD011	NC_01183	GCA_00002142	Complete	1.93	1,615

<i>lactis</i>		5.1	5.1			
	BI-04	NC_01281	GCA_00002270	Complete	1.94	1,608
		4.1	5.1			
	DSM 10140	NC_01281	GCA_00002296	Complete	1.94	1,607
		5.1	5.1			
	BB-12	NC_01721	GCA_00002524	Complete	1.94	1,611
		4.1	5.1			
	V9	NC_01721	GCA_00009276	Complete	1.94	1,610
		7.1	5.1			
	CNCM	NC_01721	GCA_00022088	Complete	1.94	1,611
		5.1	5.1			
	I-2494	NC_01721	GCA_00022496	Complete	1.94	1,608
		6.2	5.2			
	B420	NC_01786	GCA_00027732	Complete	1.94	1,610
		6.1	5.1			
	Bi-07	NC_01786	GCA_00027734	Complete	1.94	1,608
		7.1	5.1			
	BI12	NC_02159	GCA_00041421	Complete	1.94	1,608
		3.1	5.1			
	ATCC 27673	NC_02252	GCA_00047194	Complete	1.96	1,624
		3.1	5.1			
	KLDS2.0603	NZ_CP00	GCA_00081620	Complete	1.95	1,610
		7522.1	5.1			
	BF052	NZ_CP00	GCA_00081805	Complete	1.94	1,608
		9045.1	5.1			
		NZ_AHG	GCA_00024076			
	BS 01	W0000000	5.1	Scaffold	1.93	1,628
		0.1				
		NZ_ABO	GCA_00017253			
	HN019	T0000000	5.1	Contig	1.92	1,632
		0.1				
		NZ_CBW	GCA_00061270			
	CECT 8145	X0000000	5.1	Contig	1.96	1,678
		00.1				
<i>B. bifidum</i> *	PRL2010	NC_01463	GCA_00016590	Complete	2.21	1,791
		8.1	5.1			
	S17	NC_01461	GCA_00016496	Complete	2.19	1,819
		6.1	5.1			
	BGN4	NC_01799	GCA_00026509	Complete	2.22	1,832
		9.1	5.1			
		NZ_ABQ	GCA_00015539			
	NCIMB	P00000000	5.1	Scaffold	2.20	1,844
	41171	.1				
		NZ_AWS	GCA_00046652			
	ATCC 29521	W0000000	5.1	Scaffold	2.20	2,166
		0.1				

	NCIMB 41171	NZ_AKC A0000000	GCA_00027352	Contig	2.22	1,860
		0.1 NZ_AMP	5.1			
	LMG 13195	L00000000	GCA_00029959	Contig	2.28	1,966
		.1 NZ_AMP	5.1			
	IPLA 20015	M0000000	GCA_00030021	Contig	2.14	2,219
		0.1 NZ_JGYO	5.1			
	LMG 11041	00000000.	GCA_00074108	Contig	2.21	1,820
		1 NZ_JDU	5.1			
	DSM 20456	M0000000	GCA_00077148	Contig	2.20	1,848
		0.1				
<i>B. breve</i> *	UCC2003	NC_02051	GCA_00022013	Complete	2.42	2,049
		7.1	5.1			
	ACS-071-V	NC_01721	GCA_00021386	Complete	2.33	1,956
	-Sch8b	8.1	5.1			
	12L	NZ_CP00	GCA_00056895	Complete	2.24	1,883
		6711.1	5.1			
	JCM 7017	NZ_CP00	GCA_00056897	Complete	2.29	1,916
		6712.1	5.1			
	JCM 7019	NZ_CP00	GCA_00056901	Complete	2.36	2,045
		6713.1	5.1			
	NCFB 2258	NZ_CP00	GCA_00056903	Complete	2.32	1,946
		6714.1	5.1			
	689b	NZ_CP00	GCA_00056905	Complete	2.33	1,970
		6715.1	5.1			
	S27	NZ_CP00	GCA_00056907	Complete	2.29	1,926
		6716.1	5.1			
		NZ_ACC	GCA_00015801			
	DSM 20213	G0000000	5.1	Scaffold	2.33	2,323
		0.2 NZ_ATC				
	HPH0326	B0000000	GCA_00041143	Scaffold	2.50	2,199
		0.1 NZ_AWS	5.1			
	JCP7499	X0000000	GCA_00046654	Scaffold	2.37	2,337
		0.1 NZ_AFX	5.1			
	DPC 6330	X0000000	GCA_00022617	Contig	2.39	2,086
		0.1 NZ_AFV	5.2			
	CECT 7263	V0000000	GCA_00024775	Contig	2.31	1,868
		0.1 V0000000	5.2			

		0.1 NZ_AWU	GCA_00056887			
31L	F00000000		5.1	Contig	2.27	1,814
		.1 NZ_AWU	GCA_00056889			
2L	G00000000		5.1	Contig	2.24	1,784
		0.1 NZ_JDUD	GCA_00074112			
LMG 13208	00000000.		5.1	Contig	2.26	1,977
		1 NZ_JDUD	GCA_00077130			
DSM 20213	00000000.		5.1	Contig	2.26	1,955
<hr/>						
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>		1 NC_01159	GCA_00002042	Complete	2.83	2,594
ATCC 15697		3.1	5.1			
		NC_01505	GCA_00019657	Complete	2.41	2,052
157F		2.1	5.1			
		NC_01721	GCA_00026996	Complete	2.83	2,592
JCM 1222		9.1	5.1			
		NZ_ABQ	GCA_00015541			
CCUG 52486	Q00000000		5.1	Complete	2.48	2,131
		0.1 NZ_JDTT	GCA_00077110			
DSM 20088	00000000.		5.1	Scaffold	2.78	2,602
		1 NZ_CCW	GCA_00082500			
BIC12061227	N00000000		5.1	Contig	2.79	2,624
87		0.1 NZ_CCW	GCA_00082502			
BIC13072924	O00000000		5.1	Contig	2.88	2,679
62		0.1 NZ_CCW	GCA_00082504			
BIC14011112	P00000000		5.1	Contig	2.79	2,625
50		.1 NZ_CCW	GCA_00082506			
BIC14012126	S00000000		5.1	Contig	2.79	2,616
21a		.1 NZ_CCW	GCA_00082508			
BIC14012126	Q00000000		5.1	Contig	2.82	2,640
21b		0.1 NZ_CCW	GCA_00082510			
BIB14012429	U00000000		5.1	Contig	2.79	2,609
51		0.1 NZ_CCW	GCA_00082512			
BIB14012728	R00000000		5.1	Contig	2.79	2,617
45a						

	BIB14012728	0.1 NZ_CCW T0000000	GCA_00082514	Contig	2.79	2,607
	45b		5.1			
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> *	JDM301	0.1 NC_01416	GCA_00009232	Complete	2.48	2,062
	BBMN68	9.1 NC_01465	GCA_00016631	Complete	2.27	1,873
	JCM 1217	6.1 NC_01506	GCA_00019655	Complete	2.39	2,001
	KACC 91563	7.1 NC_01722	GCA_00021945	Complete	2.40	1,987
	GT15	1.1 NZ_CP00	GCA_00077248	Complete	2.34	1,947
	F8	6741.1 NC_02100	GCA_00021075	Complete	2.38	1,999
	ATCC 55813	8.1 NZ_ACHI 00000000.	GCA_00000313	Scaffold	2.40	2,171
	CMCC P0001	1 NZ_APV E00000000	GCA_00041059	Scaffold	2.42	2,042
	2-2B	1 NZ_AJTJ 00000000.	GCA_00026120	Contig	2.63	2,502
	35B	1 NZ_AJTI 00000000.	GCA_00026122	Contig	2.51	2,328
	1-6B	1 NZ_AJTF 00000000.	GCA_00026124	Contig	2.69	2,521
	44B	1 NZ_AJT M0000000	GCA_00026126	Contig	2.56	2,349
	EK5	0.1 NZ_JNW C0000000	GCA_00073002	Contig	2.23	1,807
	17-1B	0.1 NZ_JNVZ 00000000.	GCA_00073003	Contig	2.47	1,997
	72B	1 NZ_JNW A0000000	GCA_00073004	Contig	2.37	1,987
	7-1B	0.1 NZ_JNVY 00000000.	GCA_00073005	Contig	2.41	1,953

	1-5B	1 NZ_JNVX 00000000.	GCA_00073010 5.1	Contig	2.37	1,933
	EK13	1 NZ_JNW D0000000	GCA_00073013 5.1	Contig	2.47	2,063
	LMG 13197	0.1 NZ_JGYZ 00000000.	GCA_00074124 5.1	Contig	2.38	1,995
	VMKB44	1 -	GCA_00078617 5.1	Contig	2.50	2,175
<i>B. pseudolongum</i>	LMG 11571	NZ_JGZH 00000000.	GCA_00074132 5.1	Contig	1.90	1,570
	PV8-2	1 NZ_CP00 7457.1	GCA_00080047 5.1	Complete	2.04	1,709
	AGR2145	NZ_ATW W0000000	GCA_00042136 5.1	Contig	1.99	1,668
	DSM 20092	0.1 NZ_JHW N0000000	GCA_00068759 5.1	Contig	1.91	1,623
	LMG 11569	0.1 NZ_JGZG 00000000.	GCA_00074129 5.1	Contig	1.94	1,646
	DSM 20092	1 NZ_JDTV 00000000.	GCA_00077114 5.1	Contig	1.92	1,610
	DSM 20099	1 NZ_JDTZ 00000000.	GCA_00077122 5.1	Contig	1.90	1,597
<i>Cyberlindnera</i>						
<i>C. jadinii</i>	NBRC 0988	-	GCA_00032838 5.1	Chromosome	14.28	-
<i>Clostridium</i>						
<i>C. butyricum</i> Miyairi	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces</i>						
<i>K. lactis</i> *	NRRL Y-1140	6 Chr.	GCA_00000251 5.1	Complete	10.73	5,412
<i>Lactobacillus</i>						
<i>L. acidophilus</i> *	NCFM 30SC La-14	NC_00681 4.3 NC_01521 4.1 NC_02118	GCA_00001198 5.1 GCA_00019154 5.1 GCA_00038967	Complete Complete Complete	1.99 2.10 1.99	1,927 2,102 1,951

		1.2	5.2				
	FSI4	NZ_CP01	GCA_00093462	Complete	1.99	1,950	
		0432.1	5.1				
		NZ_ACH	GCA_00015971				
	ATCC 4796	N0000000	5.1	Scaffold	2.02	2,084	
		0.1					
		NZ_CBLQ	GCA_00046970				
	CIP 76.13	00000000	5.1	Scaffold	1.95	2,025	
		.1					
		NZ_CBLS	GCA_00046974				
	DSM 9126	00000000	5.1	Scaffold	1.99	2,029	
		.1					
		NZ_CBLR	GCA_00046976				
	CIRM-BIA	00000000	5.1	Scaffold	2.00	2,044	
	445						
		.1					
		NZ_CBLT	GCA_00044282				
	DSM 20242	00000000	5.1	Contig	2.05	2,093	
		.1					
		NZ_CBLP	GCA_00044286				
	CIRM-BIA	00000000	5.1	Contig	1.99	2,035	
	442						
		.1					
		NZ_AYU	GCA_00049779				
	CFH	B0000000	5.1	Contig	1.97	1,988	
		0.1					
		NZ_AYU	GCA_00049781				
	CFH	A0000000	5.1	Contig	1.25	1,550	
		0.1					
		NZ_BAL	GCA_00061516				
	JCM 1132	R0000000	5.1	Contig	1.95	1,922	
		0.1					
		NZ_JRUT	GCA_00078639				
	ATCC 4356	00000000.	5.1	Contig	1.96	1,933	
		1					
	VKMV-2020	-	GCA_00070873	Contig	0.01	-	
	D		5.1				
		NC_00849	GCA_00001446				
<i>L. brevis</i>	ATCC 367			Complete	2.34	2,308	
		7.1	5.1				
		NC_02081	GCA_00035962				
	KB290			Complete	2.59	2,587	
		9.1	5.1				
	BSO 464	-	GCA_00080797	Chromosome	2.72	2,708	
			5.1				
		NZ_ACG	GCA_00015917				
	ATCC	G0000000	5.1	Scaffold	3.14	3,106	
	27305						
		0.1					
	ATCC 14869	NZ_AWV	GCA_00046936	Scaffold	2.47	2,687	

		K0000000					
		0.1	5.1				
15f		NZ_JXCD	GCA_00087590	Scaffold	2.44	2,393	
		00000000.	5.1				
		1					
EW		NZ_AUT	GCA_00047467	Contig	2.89	2,924	
		D0000000	5.1				
		0.1					
AG48		NZ_JAGR	GCA_00052675	Contig	2.60	2,604	
		00000000.	5.1				
		1					
WK12		NZ_BBO	GCA_00078445	Contig	2.60	2,667	
		W0000000	5.1				
		0.1					
DmCS_003		NZ_JOKA	GCA_00081472	Contig	2.86	2,854	
		00000000.	5.1				
		1					
TMW 1.465		NZ_JXUG	GCA_00083339	Contig	2.54	2,495	
		00000000.	5.1				
		1					
TMW 1.313		NZ_JXUF	GCA_00083340	Contig	2.74	2,876	
		00000000.	5.1				
		1					
TMW 1.6		NZ_JXUE	GCA_00083341	Contig	2.52	2,423	
		00000000.	5.1				
		1					
<i>L. casei</i> *	ATCC 334	NC_00852	GCA_00001452	Complete	2.92	2,922	
		6.1	5.1				
	Zhang	NZ_CP00	GCA_00001924	Complete	2.90	2,759	
		1084.1	5.3				
	BL23	NC_01099	GCA_00002648	Complete	3.08	3,057	
		9.1	5.1				
	BD-II	NC_01747	GCA_00019476	Complete	3.13	3,112	
		4.1	5.1				
	LC2W	NC_01747	GCA_00019478	Complete	3.08	3,044	
		3.1	5.1				
	12A	NZ_CP00	GCA_00030956	Complete	2.91	2,799	
		6690.1	5.2				
	W56	NC_01864	GCA_00031803	Complete	3.13	3,131	
		1.1	5.1				
	LOCK919	NC_02172	GCA_00041851	Complete	3.14	3,065	
		1.1	5.1				
	ATCC 393	NZ_AP01	GCA_00082905	Complete	2.95	2,856	
		2544.1	5.1				
	LcY	NZ_ARN	GCA_00038809	Chromos	3.14	3,190	

	V0000000	5.1	ome		
	0.2				
LcA	NZ_CM00	GCA_00040058	Chromos	3.13	3,177
	1861.1	5.1	ome		
	NZ_AZOE	GCA_00051082			
A2-362	00000000.	5.1	Scaffold	3.19	3,215
	1				
	NZ_AFY	GCA_00030958			
42025	K0000000	5.1	Contig	3.22	3,241
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030960			
32G	L00000000	5.1	Contig	3.01	3,094
	.1				
	NZ_AFY	GCA_00030962			
A2-362	M0000000	5.1	Contig	3.36	3,398
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030964			
CRF28	N0000000	5.1	Contig	3.04	3,044
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030966			
M36	O0000000	5.1	Contig	3.15	3,126
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030968			
T71499	P00000000	5.1	Contig	3.00	2,915
	.1				
	NZ_AFY	GCA_00030970			
UCD174	Q0000000	5.1	Contig	3.07	3,153
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030972			
UW1	R0000000	5.1	Contig	2.87	2,964
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030974			
UW4	S00000000	5.1	Contig	2.76	2,808
	.1				
	NZ_AFY	GCA_00030976			
Lc-10	T0000000	5.1	Contig	2.95	2,888
	0.1				
	NZ_AFY	GCA_00030978			
Lpc-37	U0000000	5.1	Contig	3.08	2,967
	0.1				
	NZ_AQV	GCA_00037614			
UW4	S00000000	5.1	Contig	2.63	2,591
	.1				
12A	NZ_AWZ	GCA_00047234	Contig	2.93	3,037

		Q0000000	5.1			
		0.1 NZ_AUY				
5b		M0000000	GCA_00047461	Contig	3.02	3,043
		0.1 NZ_BALS				
JCM 1134		00000000.	GCA_00061520	Contig	2.78	2,717
		1	5.1			
Lbs2		-	GCA_00073629	Contig	3.27	2,892
			5.3			
		NZ_JXNV				
KL1-Liu		00000000.	GCA_00082714	Contig	2.85	2,777
		1	5.1			
<i>L. caucasicus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. crispatus</i>	ST1	NC_01410	GCA_00009176	Chromosome	2.04	2,015
		6.1 NZ_ACK				
JV-V01		R0000000	GCA_00016051	Scaffold	2.22	2,278
		0.1 NZ_ACO				
MV-1A-US		G0000000	GCA_00016191	Scaffold	2.25	2,483
		0.2 NZ_ACP				
125-2-CHN		V0000000	GCA_00016225	Scaffold	2.31	2,153
		0.1 NZ_ACQ				
MV-3A-US		C0000000	GCA_00016231	Scaffold	2.44	2,393
		0.1 NZ_ADM				
CTV-05		L0000000	GCA_00016588	Scaffold	2.36	2,352
		.1 NZ_ADD				
SJ-3C-US		T0000000	GCA_00017697	Scaffold	2.17	2,261
		0.1 NZ_AGZF				
FB049-03		00000000.	GCA_00030111	Scaffold	2.46	2,509
		1 NZ_AGZ				
FB077-07		G0000000	GCA_00030113	Scaffold	2.70	2,716
		0.1 NZ_ADG				
214-1		R0000000	GCA_00017757	Contig	2.07	2,221
		0.1 NZ_AVF				
2029			GCA_00046688	Contig	2.19	2,651

		H0000000					
		0.2	5.2				
		NZ_AXL					
	EM-LC1	M0000000	GCA_00049706	Contig	1.83	1,791	
		0.1	5.1				
		NZ_AGB					
<i>L. curvatus</i>	CRL 705	U0000000	GCA_00023570	Contig	1.84	1,918	
		0.1	5.2				
		NZ_JTJV					
	NRIC0822	00000000.	GCA_00080535	Contig	1.94	2,058	
		0.1	5.1				
		1					
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842	NC_00805	GCA_00005606	Complete	1.87	1,938	
		4.1	5.1				
	ATCC	NC_00852	GCA_00001440	Complete	1.86	1,930	
	BAA-365	9.1	5.1				
	ND02	NC_01472	GCA_00018283	Complete	2.13	2,125	
		7.1	5.1				
	2038	NC_01746	GCA_00019116	Complete	1.87	1,926	
		9.1	5.1				
	PB2003/044-	NZ_AEA					
	T3-4	T0000000	GCA_00017937	Contig	1.98	1,981	
		0.1	5.1				
	CNCM	NZ_AGF					
	I-1632	O0000000	GCA_00028469	Contig	1.77	1,919	
		0.1	5.1				
	CNCM	NZ_AGH					
	I-1519	W0000000	GCA_00028471	Contig	1.80	1,957	
		0.1	5.1				
	-	NZ_CCE					
		T0000000	GCA_00075163	Contig	1.85	2,275	
		0.1	5.1				
	-	NZ_CCE					
		U0000000	GCA_00075189	Contig	1.82	2,228	
		0.1	5.1				
	CRL871	-	GCA_00093480	Contig	2.06	2,313	
		0.1	5.1				
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	JCM 1012	NZ_BALP	GCA_00061509	Contig	1.73	1,765	
		00000000.	5.1				
		1					
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20072	NZ_AEX	GCA_00019216	Scaffold	2.07	2,084	
		U0000000	5.1				
		0.1					
		NZ_ATB					
	CRL581	Q0000000	GCA_00040967	Scaffold	2.14	1,992	
		0.1	5.1				

		NZ_CCDS	GCA_00075123	Contig	2.05	2,173
-		00000000.	5.1			
		1				
		NZ_CCD	GCA_00075127	Contig	2.09	2,066
-		U0000000	5.1			
		0.1				
		NZ_CCD	GCA_00075165	Contig	1.91	2,147
-		T0000000	5.1			
		0.1				
		NZ_CCD	GCA_00075169	Contig	2.11	2,161
-		V0000000	5.2			
		0.1				
<i>L. fermentum</i> *	IFO 3956	NC_01061	GCA_00001014	Complete	2.10	2,100
		0.1	5.1			
	CECT 5716	NC_01746	GCA_00021051	Complete	2.10	2,104
		5.1	5.1			
	F-6	NC_02123	GCA_00039716	Complete	2.06	2,044
		5.1	5.1			
		NZ_ACGI	GCA_00015921	Scaffold	1.87	1,929
ATCC 14931	00000000.		5.1			
		1				
		NZ_ACQ	GCA_00016239	Scaffold	2.03	1,948
28-3-CHN	G0000000		5.1			
		0.1				
		NZ_ASX	GCA_00041700	Scaffold	1.97	1,922
FTDC8312	U0000000		5.1			
		0.1				
		NZ_AYH	GCA_00049643	Scaffold	2.01	2,028
NB-22	A0000000		5.1			
		0.1				
		NZ_LAIK	GCA_00096683	Scaffold	2.20	2,062
LfQi6	00000000.		5.1			
		1				
		NZ_AVC	GCA_00046678	Contig	2.54	2,553
3872	T0000000		5.2			
		0.2				
		NZ_AWX	GCA_00047226	Contig	1.82	1,852
Lf1	S00000000		5.1			
		.1				
		NZ_AVA	GCA_00047751	Contig	2.57	2,546
MTCC 8711	B0000000		5.1			
		0.1				
<i>L. gasseri</i>	ATCC 33323	NC_00853	GCA_00001442	Complete	1.89	1,869
		0.1	5.1			
	130918	NZ_CP00	GCA_00081488	Complete	1.96	1,902

		6809.1	5.1				
		NZ_ACG	GCA_00014364				
JV-V03	O0000000		5.1	Scaffold	2.01	2,036	
		0.2					
		NZ_ABW	GCA_00015593				
MV-22	H0000000		5.2	Scaffold	1.93	1,910	
		0.2					
		NZ_ADD	GCA_00017699				
SJ-9E-US	U0000000		5.2	Scaffold	1.78	1,730	
		0.1					
		NZ_ADD	GCA_00017703				
SV-16A-US	Y0000000		5.2	Scaffold	2.00	2,013	
		0.1					
		NZ_ASR	GCA_00040634				
K7	G0000000		5.2	Scaffold	1.99	1,945	
		0.2					
		NZ_ACO	GCA_00017505				
202-4	Z0000000		5.1	Contig	1.82	1,821	
		.1					
		NZ_ADF	GCA_00017741				
224-1	T0000000		5.1	Contig	2.01	2,354	
		0.1					
		NZ_AKF	GCA_00028313				
CECT 5714	Q0000000		5.1	Contig	1.91	1,843	
		0.1					
		NZ_AUU	GCA_00043991				
2016	E0000000		5.1	Contig	1.88	1,875	
		.1					
		NZ_BAL	GCA_00061512				
JCM 1131	Q0000000		5.1	Contig	1.82	1,773	
		0.1					
<i>L. helveticus</i> *	CNRZ32	NC_02174	GCA_00042216	Complete	2.23	2,279	
		4.1	5.1				
	DPC 4571	NC_01008	GCA_00001538	Complete	2.08	2,093	
		0.1	5.1				
	R0052	NC_01852	GCA_00016577	Complete	2.13	2,151	
		8.1	5.3				
	H10	NC_01746	GCA_00018951	Complete	2.17	2,188	
		7.1	5.1				
	H9	NZ_CP00	GCA_00052571	Complete	1.87	1,902	
		2427.1	5.1				
	KLDS1.8701	-	GCA_00096101	Complete	2.11	2,164	
			5.1				
	DSM 20075	NZ_ACL	GCA_00016085	Scaffold	2.02	2,129	
		M0000000	5.1				

	CIRM-BIA 103	0.1 NZ_CBU M0000000	GCA_00049333 5.1	Scaffold	2.01	2,377
	CIRM-BIA 951	00.1 NZ_CBU K0000000	GCA_00049345 5.1	Scaffold	1.90	2,248
	CIRM-BIA 104	00.1 NZ_CBUL 000000000	GCA_00049355 5.1	Scaffold	2.07	2,427
	CIRM-BIA 953	.1 NZ_CBU H0000000	GCA_00049351 5.1	Contig	2.39	2,796
	CIRM-BIA 101	00.1 NZ_CBU N0000000	GCA_00049357 5.1	Contig	2.07	2,408
	M3	00.1 NZ_JRTS 00000000.	GCA_00076545 5.1	Contig	1.86	1,951
	ATCC 10386	1 NZ_JRQG 00000000.	GCA_00076546 5.1	Contig	1.87	1,972
	MTCC 5463	1 -	GCA_00019535 5.2	Contig	2.05	2,307
<i>L. johnsonii</i>	NCC 533	NC_00536	GCA_00000806 5.1	Complete	1.99	1,907
	FI9785	2.1 NC_01350	GCA_00009140 5.1	Complete	1.79	1,742
	DPC 6026	4.1 NC_01747	GCA_00020498 5.1	Complete	1.97	1,883
	N6.2	7.1 NC_02290	GCA_00049867 5.1	Complete	1.89	1,771
	ATCC 33200	9.1 NZ_ACG R0000000	GCA_00015935 5.1	Scaffold	1.78	1,896
	pf01	0.1 NZ_AFQJ 00000000.	GCA_00021947 5.2	Contig	1.88	1,889
<i>L. kefiranofaciens</i> subsp.	DSM 5016	1 NZ_BAM G0000000	GCA_00061568 5.1	Contig	2.25	2,230
<i>kefiranofaciens</i> <i>L. kefiranofaciens</i> subsp.	-	0.1 -	-	-	-	-
<i>kefirgranum</i> <i>L. kefiri</i>	-	-	-	-	-	-

<i>L. leichmannii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i> *	362.5014	NZ_CP00	GCA_00015551	Complete	3.03	2,956
		7122.1	5.2			
	N1115	NZ_CP00	GCA_00058266	Complete	3.06	3,042
		7122.1	5.1			
	JCM 8130	NZ_AP01	GCA_00082903	Complete	3.02	2,961
		2541.1	5.1			
		NZ_ACG	GCA_00015949			
	ATCC 25302	Y0000000	GCA_00015949	Scaffold	2.99	3,103
		0.1	5.1			
		NZ_ANK	GCA_00040981			
	Lpp230	Y0000000	GCA_00040981	Contig	2.89	2,693
		0.1	5.1			
		NZ_ANK	GCA_00040983			
	Lpl7	V0000000	GCA_00040983	Contig	3.09	2,966
		0.1	5.1			
		NZ_ANK	GCA_00040985			
	Lpp122	W0000000	GCA_00040985	Contig	2.92	2,736
		0.1	5.1			
		NZ_ANM	GCA_00040987			
	Lpp46	J00000000	GCA_00040987	Contig	2.93	2,832
		.1	5.1			
		NZ_ANM	GCA_00040989			
	Lpp226	N0000000	GCA_00040989	Contig	3.01	2,951
		0.1	5.1			
		NZ_ANM	GCA_00040993			
	Lpp120	K0000000	GCA_00040993	Contig	2.80	2,704
		0.1	5.1			
		NZ_ANM	GCA_00040995			
	Lpp223	L00000000	GCA_00040995	Contig	3.05	3,028
		.1	5.1			
		-	GCA_00040997			
	Lpp123	-	GCA_00040997	Contig	2.82	3,314
			5.1			
		NZ_ANK	GCA_00040999			
	Lpp228	A0000000	GCA_00040999	Contig	2.94	2,970
		0.1	5.1			
		NZ_ANK	GCA_00041001			
	Lpp221	F00000000	GCA_00041001	Contig	3.04	3,066
		.1	5.1			
		NZ_ANKJ	GCA_00041003			
	Lpp49	00000000.	GCA_00041003	Contig	2.92	2,905
			5.1			
		1	GCA_00041005			
	Lpp227	NZ_ANK	GCA_00041005	Contig	2.91	3,072
		K0000000	5.1			

CNCM I-4648	0.1 NZ_ANK L00000000	GCA_00041007 5.1	Contig	2.83	3,244
CNCM I-2877	.1 NZ_ANL E00000000	GCA_00041009 5.1	Contig	2.97	3,112
Lpp48	.1 -	GCA_00041011 5.1	Contig	2.81	3,262
Lpp17	NZ_ANM H0000000	GCA_00041013 5.1	Contig	2.95	2,863
Lpp22	0.1 NZ_ANM I00000000.	GCA_00041015 5.1	Contig	2.75	2,653
Lpp225	1 NZ_ANM M0000000	GCA_00041017 5.1	Contig	3.09	2,989
Lpp219	0.1 NZ_ANJS 00000000.	GCA_00041019 5.1	Contig	3.06	3,065
Lpp229	1 NZ_ANJT 00000000.	GCA_00041021 5.1	Contig	2.95	3,008
Lpp74	1 NZ_ANJU 00000000.	GCA_00041023 5.1	Contig	3.03	3,012
Lpp7	1 NZ_ANJV 00000000.	GCA_00041025 5.1	Contig	2.84	2,973
CNCM I-4270	1 NZ_ANJX 00000000.	GCA_00041027 5.1	Contig	2.99	3,075
Lpp189	1 NZ_ANJY 00000000.	GCA_00041029 5.1	Contig	2.92	3,017
Lpp14	1 NZ_ANJZ 00000000.	GCA_00041031 5.1	Contig	2.88	3,032
Lpl14	1 NZ_ANK B0000000	GCA_00041033 5.1	Contig	3.01	2,986
Lpp126	0.1 -	GCA_00041035 5.1	Contig	2.70	3,437
Lpp71	-	GCA_00041037	Contig	2.68	2,978

	Lpp41	-	5.1 GCA_00041039	Contig	2.71	3,063
	Lpp37	NZ_ANK G0000000	5.1 GCA_00041041	Contig	2.98	3,125
	CNCM I-4649	0.1 NZ_ANK H0000000	5.1 GCA_00041043	Contig	2.98	3,197
	Lpp43	0.1 NZ_ANKI 00000000.	5.1 GCA_00041045	Contig	3.12	3,147
	Lpp125	1 NZ_ANK M0000000	5.1 GCA_00041047	Contig	3.01	3,099
	Lpp70	0.1 NZ_ANL F00000000	5.1 GCA_00041049	Contig	2.72	2,834
	COM0101	.1 NZ_BAG T0000000	5.1 GCA_00050884	Contig	3.00	3,038
	DSM 20207	0.1 NZ_JYBD 00000000.	5.1 GCA_00094948	Contig	3.02	2,986
	NRIC1981	1 NZ_BAY O0000000	5.1 GCA_00095848	Contig	3.19	2,778
	NRIC1917	0.1 NZ_BAY N0000000	5.1 GCA_00095850	Contig	2.96	2,715
	NRIC0644	0.1 NZ_BAY M0000000	5.1 GCA_00095852	Contig	3.29	2,773
<i>L. paraplantarum</i>	L-ZS9	0.1 NZ_JPEB 00000000.	5.1 GCA_00075814	Scaffold	3.12	2,818
<i>L. pentosus</i>	KCA1	1 NZ_AKA O0000000	5.1 GCA_00027144	Chromosome	3.43	3,045
<i>L. perolens</i>	-	0.1 -	5.1 -	-	-	-
<i>L. plantarum</i> *	WCFS1	NC_00456	GCA_00020385	Complete	3.35	3,174
	JDM1	7.2 NC_01298	5.3 GCA_00002308	Complete	3.20	2,967
	ST-III	4.1 NC_01455	5.1 GCA_00014881	Complete	3.31	3,068

ZJ316	4.1 NC_02022	5.2 GCA_00033811	Complete	3.30	3,115
plantarum	9.1 NZ_CP00	5.2 GCA_00039248	Complete	3.25	3,089
	5942.1 NC_02151	5.2 GCA_00041220	Complete	3.36	3,157
16	4.1 NZ_CP01	5.1 GCA_00093142	Complete	3/28	3,062
CMPG5300	0528.1 -	5.1 GCA_00076295	Chromos	3.51	3,209
		5.1	ome		
ATCC 14917	NZ_ACG Z00000000	GCA_00014374	Scaffold	3.21	3,223
	.2 NZ_APH	GCA_00034751	Scaffold	3.11	2,997
UCMA 3037	P00000000	5.1	Scaffold	3.11	2,997
	.1 NZ_JPSU	GCA_00076428	Scaffold	3.31	3,073
FMNP01	00000000.	5.1	Scaffold	3.31	3,073
	1 NZ_JZSB	GCA_00096647	Scaffold	3.35	3,204
NL42	00000000.	5.1	Scaffold	3.35	3,204
	1 NZ_AGRI	GCA_00024773	Contig	3.21	3,007
NC8	00000000.	5.2	Contig	3.21	3,007
	1 NZ_ASJE	GCA_00041079	Contig	3.25	3,165
IPLA88	00000000.	5.1	Contig	3.25	3,165
	1 NZ_AVA	GCA_00046307	Contig	3.42	3,135
EGD-AQ4	Q0000000	5.1	Contig	3.42	3,135
	0.1 NZ_AVFI	GCA_00046684	Contig	3.18	3,327
2165	00000000.	5.1	Contig	3.18	3,327
	1 NZ_AVAI	GCA_00046911	Contig	3.32	3,241
AY01	00000000.	5.1	Contig	3.32	3,241
	1 NZ_AXD	GCA_00047393	Contig	2.93	2,740
LP91	Q0000000	5.1	Contig	2.93	2,740
	0.1 NZ_AUT	GCA_00047469	Contig	3.48	3,484
WJL	E00000000	5.1	Contig	3.48	3,484
	.1 NZ_AYT	GCA_00050704	Contig	3.32	3,205
4_3					

		U0000000				
		0.1	5.1			
WHE 92	-	GCA_00060414	Contig	2.93	2,868	
		5.1				
19L3	NZ_AWT	GCA_00060436	Contig	3.29	3,216	
	S00000000	5.1				
JCM 1149	.1	GCA_00061532	Contig	3.21	3,011	
	NZ_BAL	5.1				
	V0000000	5.1				
wikim18	0.1	GCA_00064875	Contig	3.35	3,246	
	NZ_JMEL	5.1				
	00000000.	5.1				
AG30	1	GCA_00068749	Contig	3.44	3,250	
	NZ_JHW	5.1				
	A0000000	5.1				
Lp90	0.1	GCA_00073185	Contig	3.32	3,273	
	NZ_JIBX0	5.1				
	0000000.1	5.1				
DmCS_001	NZ_JOJT	GCA_00074389	Contig	3.19	3,137	
	00000000.	5.1				
	1	5.1				
90sk	NZ_JXAX	GCA_00083053	Contig	3.37	3,194	
	00000000.	5.1				
	1	5.1				
CIP104448	NZ_JSU	GCA_00095619	Contig	3.24	3,063	
	W0000000	5.1				
	0.1	5.1				
2025	-	GCA_00046690	Contig	3.07	3,776	
		5.1				
<i>L. reuteri</i> *	DSM 20016	NC_00951 GCA_00001682	Complete	2.00	2,020	
		3.1	5.1			
JCM 1112		NC_01060 GCA_00001000	Complete	2.04	2,050	
		9.1	5.1			
SD2112		NC_01569 GCA_00015945	Complete	2.32	2,322	
		7.1	5.2			
I5007		NC_02149 GCA_00041099	Complete	2.09	2,056	
		4.1	5.1			
TD1		NC_02187 GCA_00043927	Complete	2.15	2,013	
		2.1	5.1			
CF48-3A	NZ_ACH	GCA_00015961	Scaffold	2.11	2,223	
	G0000000	5.1				
	0.1	5.1				
MM2-3	NZ_ACL	GCA_00016071	Scaffold	2.02	2,105	
	B0000000	5.1				
	0.1	5.1				

	NZ_CAC	GCA_00023645	Scaffold	2.02	2,004	
ATCC 53608S00000000	5.1					
	.2					
	NZ_ACG	GCA_00015947	Contig	2.07	2,226	
MM4-1A	X0000000	5.2				
	0.2					
	NZ_AAPZ	GCA_00016825	Contig	2.31	2,269	
100-23	00000000.	5.1				
	2					
	NZ_AEA	GCA_00017943	Contig	2.02	1,971	
mLc3	W0000000	5.1				
	0.1					
	NZ_AEA	GCA_00017945	Contig	2.12	2,079	
lpuph	X0000000	5.1				
	0.1					
	NZ_JOSX	GCA_00071255	Contig	2.07	1,992	
LTH2584	00000000.	5.1				
	1					
	NZ_JOS	GCA_00071256	Contig	1.94	1,835	
TMW1.656	W0000000	5.1				
	0.1					
	NZ_JOKX	GCA_00072253	Contig	2.03	1,935	
TMW1.112	00000000.	5.1				
	1					
	NZ_JOOG	GCA_00075818	Contig	1.98	1,853	
LTH5448	00000000.	5.1				
	1					
<i>L. rhamnosus</i> *	GG (ATCC NC_01319	GCA_00002650	Complete	3.01	2,820	
	53103)	8.1				
		5.1				
ATCC 53103	NC_01748	GCA_00001104	Complete	3.01	2,817	
	2.1	5.1				
	Lc 705	NC_01319	GCA_00002652	Complete	3.03	2,827
	9.1	5.1				
ATCC 8530	NC_01749	GCA_00023375	Complete	2.96	2,741	
	1.1	5.1				
LOCK900	NC_02172	GCA_00041847	Complete	2.88	2,689	
	3.1	5.1				
LOCK908	NC_02172	GCA_00041849	Complete	2.99	2,770	
	5.1	5.1				
	NZ_ACIZ	GCA_00016017	Scaffold	3.16	3,209	
LMS2-1	00000000.	5.1				
	1					
	NZ_AFY	GCA_00022623	Scaffold	2.86	2,684	
CASL	D0000000	5.1				
	0.1					

ATCC 21052	NZ_AFZY 00000000.	GCA_00023586	Scaffold	2.88	3,063
	1	5.1			
HN001	NZ_ABW J00000000	GCA_00017325	Contig	2.91	2,912
	.1	5.2			
MTCC 5462	-	GCA_00019537	Contig	2.52	3,308
		5.2			
R0011	NZ_AGK C0000000	GCA_00023578	Contig	2.90	2,782
	0.1	5.2			
LRHMDP2	NZ_AMQ W0000000	GCA_00031194	Contig	2.91	2,965
	0.1	5.1			
LRHMDP3	NZ_AMQ X0000000	GCA_00031196	Contig	2.91	2,983
	0.1	5.1			
CRL1505	NZ_ATBI 00000000.	GCA_00041436	Contig	3.42	3,273
	1	5.1			
LR231	NZ_AZHJ 00000000.	GCA_00050840	Contig	2.59	2,461
	1	5.1			
JCM 1136	NZ_BAL T0000000	GCA_00061524	Contig	2.93	2,741
	0.1	5.1			
51B	NZ_JMSI 00000000.	GCA_00069998	Contig	2.95	2,757
	1	5.1			
E800	NZ_JDR W0000000	GCA_00071249	Contig	3.03	2,891
	0.1	5.1			
PEL5	NZ_JDFQ 00000000.	GCA_00071250	Contig	2.90	2,729
	1	5.1			
PEL6	NZ_JDFR 00000000.	GCA_00071251	Contig	2.88	2,720
	1	5.1			
K32	NZ_JNNV 00000000.	GCA_00073525	Contig	3.02	2,767
	1	5.1			
24	NZ_JPZB 00000000.	GCA_00074307	Contig	2.92	2,756
	1	5.1			

	L34	NZ_AYT R0000000	GCA_00078437	Contig	2.94	2,769
		0.1	5.1			
	L35	NZ_AYT P00000000	GCA_00078439	Contig	2.94	2,771
		.1	5.1			
	L31	NZ_AYT Q0000000	GCA_00078440	Contig	2.83	2,670
		0.1	5.1			
	116	-	GCA_00080104	Contig	2.97	2,797
			5.1			
	308	NZ_JWH C0000000	GCA_00081448	Contig	3.04	2,891
		0.1	5.1			
	CLS17	NZ_JYCS 00000000.	GCA_00093203	Contig	2.89	2,744
		1	5.1			
	2166	-	GCA_00046686	Contig	3.02	3,205
			5.2			
<i>L. sakei</i>	23K	NC_00757	GCA_00002606	Complete	1.88	1,891
		6.1	5.1			
	LS25	NZ_ASTI 00000000.	GCA_00047862	Contig	2.04	2,046
		1	5.1			
	JCM 1157	NZ_BAL W0000000	GCA_00061536	Contig	1.91	1,926
		0.1	5.1			
	wikim 22	NZ_JRFY 00000000.	GCA_00075562	Contig	2.19	2,147
		1	5.1			
<i>L. salivarius*</i>	UCC118	NC_00792	GCA_00000892	Complete	2.13	2,182
		9.1	5.1			
	CECT 5713	NC_01748	GCA_00014343	Complete	2.14	2,189
		1.1	5.1			
	JCM1046	NZ_CP00	GCA_00075836	Complete	2.32	2,310
		7646.1	5.1			
	ATCC 11741	NZ_ACG T0000000	GCA_00015939	Scaffold	2.02	2,046
		0.1	5.1			
	SMXD51	NZ_AICL 00000000.	GCA_00026033	Scaffold	1.97	1,954
		1	5.1			
	ACS-116-V -Col5a	NZ_AEB A0000000	GCA_00017947	Contig	2.04	2,184
		0.1	5.1			

	NIAS840	NZ_AFM N0000000	GCA_00021546 5.2	Contig	2.05	1,996
	GJ-24	0.1 NZ_AFOI 00000000.	GCA_00021773 5.2	Contig	2.00	1,962
	cp400	1 NZ_CBV R0000000	GCA_00052938 5.1	Contig	2.16	2,132
		00.1				
<i>Lactococcus</i>						
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> *						
	MG1363	NC_00900	GCA_00000942 4.1 5.1	Complete	2.53	2,594
	SK11	NC_00852	GCA_00001454 7.1 5.1	Complete	2.60	2,685
	NZ9000	NC_01794	GCA_00014320 9.1 5.1	Complete	2.53	2,590
	A76	NC_01749	GCA_00023647 2.1 5.1	Complete	2.58	2,682
	UC509.9	NC_01943	GCA_00031268 5.1 5.1	Complete	2.46	2,493
	KW2	NC_02236	GCA_00046895 9.1 5.1	Complete	2.43	2,342
	TIFN5	NZ_ATB C0000000	GCA_00044782 5.1	Contig	2.54	2,601
	TIFN6	0.1 -	GCA_00044784 5.1	Contig	2.59	2,728
	TIFN1	NZ_ASX F00000000	GCA_00044788 5.1	Contig	2.68	2,976
	TIFN3	.1 NZ_ATB E00000000	GCA_00044792 5.1	Contig	2.73	3,112
	TIFN7	.1 NZ_ATB A0000000	GCA_00044796 5.1	Contig	2.63	2,870
	HP	0.1 NZ_JAUH 00000000.	GCA_00053481 5.1	Contig	2.27	2,374
	GE214	1 NZ_AZSI 00000000.	GCA_00073163 5.1	Contig	2.80	2,832
	A17	1 NZ_JQIC0 0000000.1	GCA_00080543 5.1	Contig	2.68	2,500
	Mast36	NZ_JZUI0	GCA_00096947	Contig	2.61	2,653

		0000000.1	5.1			
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	IL1403	NC_00266	GCA_00000686	Complete	2.37	2,406
		2.1	5.1			
	KF147	NC_01365	GCA_00002504	Complete	2.64	2,597
		6.1	5.1			
	CV56	NC_01748	GCA_00019270	Complete	2.52	2,538
		6.1	5.1			
	IO-1	NC_02045	GCA_00034457	Complete	2.42	2,340
		0.1	5.1			
NCDO 2118		NZ_CP00	GCA_00047825	Complete	2.59	2,548
		9054.1	5.2			
	KLDS	NC_02259	GCA_00047937	Complete	2.60	2,651
	4.0325	3.1	5.2			
	S0	NZ_CP01	GCA_00080737	Complete	2.49	2,490
		0050.1	5.1			
		NZ_CBUJ	GCA_00049335			
Dephy 1		000000000		Scaffold	2.60	2,744
		.1	5.1			
		NZ_AGH	GCA_00028473			
CNCM		X0000000		Contig	2.51	2,630
I-1631			5.1			
		0.1				
		NZ_APA	GCA_00034896			
YF11		V0000000		Contig	2.53	2,473
			5.1			
		0.1				
		NZ_CBLU	GCA_00044284			
A12		000000000		Contig	2.70	2,895
			5.1			
		.1				
		NZ_ATB	GCA_00044790			
TIFN2		F00000000		Contig	2.51	2,665
			5.1			
		.1				
		NZ_ATB	GCA_00044798			
TIFN4		D00000000		Contig	2.55	2,736
			5.1			
		0.1				
		NZ_AXZ	GCA_00048897			
LD61		K00000000		Contig	2.60	2,751
			5.1			
		0.1				
		NZ_BAL	GCA_00061540			
JCM 5805		X00000000		Contig	2.53	2,566
			5.1			
		0.1				
		NZ_JNLP	GCA_00070314			
511		00000000.		Contig	2.48	2,498
			5.1			
		1				
		NZ_JNCC	GCA_00072186			
GL2		00000000.		Contig	2.60	2,683
			5.1			
		1				

		NZ_JRKY	GCA_00076156			
CECT 4433	00000000.	1	5.1	Contig	2.58	2,643
1AA59	-		GCA_00078675	Contig	2.58	2,682
			5.1			
		NZ_BBSI	GCA_00083597			
JCM 5805	00000000.	1	5.1	Contig	2.55	3,174
<i>Leuconostoc</i>						
<i>L. citreum</i>	KM20	NC_01047	GCA_00002640	Complete	1.90	1,903
		1.1	5.1			
		NZ_CAG	GCA_00023989			
LBAE C10	E00000000	.1	5.2	Contig	1.93	2,024
		NZ_CAG	GCA_00023991			
LBAE C11	F00000000	.1	5.2	Contig	1.97	2,089
		NZ_CAG	GCA_00023993			
LBAE E16	G00000000	0.1	5.2	Contig	1.80	1,908
		NZ_CCN	GCA_00082096			
-	G00000000	0.1	5.1	Contig	1.71	1,795
		NZ_CCN	GCA_00082098			
-	H00000000	0.1	5.1	Contig	1.75	1,831
<i>L. kimchii</i>	IMSNU	NC_01413	GCA_00009250	Complete	2.00	2,023
	11154	6.1	5.1			
<i>L. mesenteroides</i>	ATCC 8293	NC_00853	GCA_00001444	Complete	2.08	2,066
		1.1	5.1			
	J18	NC_01680	GCA_00023482	Complete	2.02	1,982
		5.1	5.1			
	KFRI-MG	NZ_CP00	GCA_00051295	Complete	1.90	1,883
		0574.1	5.1			
		NZ_ACK	GCA_00016059			
ATCC 19254	V00000000	.1	5.1	Scaffold	1.74	1,903
		NZ_ATA	GCA_00044794			
TIFN8	Z00000000	.1	5.1	Contig	1.71	1,742
		NZ_JAUJ	GCA_00068648			
T26	00000000.	1	5.1	Contig	1.83	1,956
		NZ_JRGZ	GCA_00075635			
P45	00000000.	1	5.1	Contig	1.87	1,800

	Wikim17	1 NZ_BBP K0000000	GCA_00078773	Contig	1.86	1,843
		0.1	5.1			
<i>Pediococcus</i>						
<i>P. acidilactici</i>	DSM 20284	NZ_AEE G0000000	GCA_00014632	Scaffold	1.94	1,943
		0.1	5.1			
	7_4	NZ_ACX B0000000	GCA_00016309	Scaffold	2.02	1,953
		0.1	5.1			
	D3	NZ_AQG T0000000	GCA_00038026	Scaffold	1.96	1,976
		0.1	5.1			
	MA18/5M	NZ_AGK B0000000	GCA_00023580	Contig	1.99	1,943
		0.1	5.2			
	AGR20	NZ_JAGU 00000000.	GCA_00052681	Contig	1.92	1,890
		0.1	5.1			
<i>P. pentosaceus</i>	ATCC 25745	1 NC_00852	GCA_00001450	Complete	1.83	1,797
		5.1	5.1			
	SL4	NC_02278	GCA_00049626	Complete	1.79	1,776
		0.1	5.1			
	IE-3	NZ_CAH U0000000	GCA_00028587	Contig	1.80	1,762
		0.1	5.1			
	CGMCC 7049	NZ_JDV W0000000	GCA_00070863	Contig	1.75	1,754
		0.1	5.1			
<i>Propionibacterium</i>						
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	DSM 20271	NZ_CP01 0341.1	GCA_00094084	Complete	2.65	2,325
		0.1	5.1			
	ITG P20	NZ_CCBE 000000000	GCA_00072354	Scaffold	2.59	2,385
		.1	5.1			
	-	-	GCA_00094523	Scaffold	2.57	2,268
		0.1	5.1			
<i>P. jensenii</i>	DSM 20535	NZ_AUD D0000000	GCA_00042528	Scaffold	3.03	2,728
		0.1	5.1			
<i>Rhizopus</i>						
<i>R. oligosporous</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>						

<i>S. pastorianus</i> *	CBS 1513	-	GCA_00058659 5.1	Contig	19.37	-
	Weihenstephan 34/70	-	GCA_00018211 5.1	Contig	22.38	-
	CCY48 - 91	-	GCA_00028789 5.1	Contig	24.21	-
	Weihenstephan 34/70	-	GCA_00058653 5.1	Contig	22.96	-
	CBS 1483	-	GCA_00080546 5.1	Contig	21.92	-
<i>S. cerevisiae</i>	S288c	16 Chr.	GCA_00014604 5.2	Complete	12.16	6,352
	YJM993	-	GCA_00066243 5.1	Chromosome	12.50	6,961
	YJM195	-	GCA_00097558 5.1	Chromosome	12.79	7,079
	YJM244	-	GCA_00097561 5.1	Chromosome	12.99	7,376
	YJM1078	-	GCA_00097564 5.1	Chromosome	11.86	6,153
	YJM1083	-	GCA_00097567 5.1	Chromosome	12.51	6,756
	YJM1129	-	GCA_00097570 5.1	Chromosome	13.09	7,642
	YJM189	-	GCA_00097573 5.1	Chromosome	12.27	6,564
	YJM193	-	GCA_00097576 5.1	Chromosome	13.06	7,498
	YJM248	-	GCA_00097579 5.1	Chromosome	12.07	6,357
	YJM270	-	GCA_00097582 5.1	Chromosome	12.37	6,844
	YJM271	-	GCA_00097585 5.1	Chromosome	13.53	8,054
	YJM320	-	GCA_00097588 5.1	Chromosome	13.52	8,021
	YJM326	-	GCA_00097591 5.1	Chromosome	12.43	6,658
	YJM428	-	GCA_00097594 5.1	Chromosome	12.33	6,533
	YJM450	-	GCA_00097597 5.1	Chromosome	12.42	6,712
	YJM451	-	GCA_00097600 5.1	Chromosome	12.36	6,632
	YJM453	-	GCA_00097603 5.1	Chromosome	12.68	7,121
	YJM456	-	GCA_00097606 5.1	Chromosome	12.40	6,574

YJM470	-	5.1 ome GCA_00097609 Chromos	12.60	6,927
YJM541	-	5.1 ome GCA_00097612 Chromos	13.00	7,389
YJM554	-	5.1 ome GCA_00097615 Chromos	13.05	7,409
YJM555	-	5.1 ome GCA_00097618 Chromos	13.37	7,802
YJM627	-	5.1 ome GCA_00097621 Chromos	12.63	6,936
YJM681	-	5.1 ome GCA_00097624 Chromos	12.33	6,584
YJM682	-	5.1 ome GCA_00097627 Chromos	12.38	6,628
YJM683	-	5.1 ome GCA_00097630 Chromos	12.54	6,815
YJM689	-	5.1 ome GCA_00097633 Chromos	12.30	6,576
YJM693	-	5.1 ome GCA_00097636 Chromos	13.16	7,541
YJM969	-	5.1 ome GCA_00097639 Chromos	12.32	6,768
YJM972	-	5.1 ome GCA_00097642 Chromos	12.97	7,492
YJM975	-	5.1 ome GCA_00097645 Chromos	12.24	6,608
YJM978	-	5.1 ome GCA_00097648 Chromos	12.48	6,963
YJM981	-	5.1 ome GCA_00097651 Chromos	12.92	7,462
YJM984	-	5.1 ome GCA_00097654 Chromos	13.09	7,602
YJM987	-	5.1 ome GCA_00097657 Chromos	12.95	7,532
YJM990	-	5.1 ome GCA_00097660 Chromos	12.45	6,794
YJM996	-	5.1 ome GCA_00097666 Chromos	12.71	7,258
YJM1133	-	5.1 ome GCA_00097669 Chromos	12.43	6,607
YJM1190	-	5.1 ome GCA_00097672 Chromos	12.94	7,380
YJM1199	-	5.1 ome GCA_00097675 Chromos	12.36	6,662
YJM1202	-	5.1 ome GCA_00097678 Chromos	12.57	6,785
YJM1208	-	5.1 ome GCA_00097681 Chromos	13.10	7,446

YJM1242	-	5.1 ome GCA_00097684 Chromos	12.18	6,542
YJM1244	-	5.1 ome GCA_00097687 Chromos	12.73	7,136
YJM1248	-	5.1 ome GCA_00097690 Chromos	12.61	6,848
YJM1250	-	5.1 ome GCA_00097693 Chromos	12.35	6,525
YJM1252	-	5.1 ome GCA_00097696 Chromos	12.66	7,020
YJM1273	-	5.1 ome GCA_00097699 Chromos	12.61	6,904
YJM1304	-	5.1 ome GCA_00097702 Chromos	12.42	6,661
YJM1307	-	5.1 ome GCA_00097705 Chromos	13.08	7,510
YJM1311	-	5.1 ome GCA_00097708 Chromos	12.58	6,880
YJM1326	-	5.1 ome GCA_00097711 Chromos	12.44	6,661
YJM1332	-	5.1 ome GCA_00097714 Chromos	12.30	6,711
YJM1336	-	5.1 ome GCA_00097717 Chromos	12.86	7,322
YJM1338	-	5.1 ome GCA_00097720 Chromos	12.28	6,543
YJM1341	-	5.1 ome GCA_00097723 Chromos	12.51	6,931
YJM1342	-	5.1 ome GCA_00097726 Chromos	12.69	6,912
YJM1355	-	5.1 ome GCA_00097729 Chromos	12.90	7,180
YJM1356	-	5.1 ome GCA_00097732 Chromos	12.60	7,038
YJM1381	-	5.1 ome GCA_00097735 Chromos	12.46	6,806
YJM1383	-	5.1 ome GCA_00097738 Chromos	12.63	6,885
YJM1385	-	5.1 ome GCA_00097741 Chromos	13.02	7,280
YJM1386	-	5.1 ome GCA_00097744 Chromos	12.64	6,875
YJM1387	-	5.1 ome GCA_00097747 Chromos	12.77	7,218
YJM1388	-	5.1 ome GCA_00097750 Chromos	12.54	6,935
YJM1389	-	5.1 ome GCA_00097753 Chromos	12.28	6,591

YJM1399	-	5.1 ome GCA_00097756 Chromos	12.42	6,488
YJM1400	-	5.1 ome GCA_00097759 Chromos	12.42	6,623
YJM1401	-	5.1 ome GCA_00097762 Chromos	12.24	6,386
YJM1402	-	5.1 ome GCA_00097765 Chromos	12.62	6,924
YJM1415	-	5.1 ome GCA_00097768 Chromos	12.87	7,422
YJM1417	-	5.1 ome GCA_00097771 Chromos	12.72	7,208
YJM1418	-	5.1 ome GCA_00097774 Chromos	12.51	6,772
YJM1419	-	5.1 ome GCA_00097777 Chromos	13.61	8,081
YJM1433	-	5.1 ome GCA_00097780 Chromos	12.57	6,920
YJM1434	-	5.1 ome GCA_00097783 Chromos	12.59	6,865
YJM1439	-	5.1 ome GCA_00097786 Chromos	12.96	7,351
YJM1443	-	5.1 ome GCA_00097789 Chromos	12.26	6,397
YJM1444	-	5.1 ome GCA_00097792 Chromos	12.43	6,581
YJM1447	-	5.1 ome GCA_00097795 Chromos	12.12	6,302
YJM1450	-	5.1 ome GCA_00097798 Chromos	13.05	7,373
YJM1460	-	5.1 ome GCA_00097801 Chromos	12.79	7,166
YJM1463	-	5.1 ome GCA_00097804 Chromos	13.44	7,961
YJM1477	-	5.1 ome GCA_00097807 Chromos	12.19	6,607
YJM1478	-	5.1 ome GCA_00097810 Chromos	12.68	6,997
YJM1479	-	5.1 ome GCA_00097813 Chromos	12.48	6,709
YJM1526	-	5.1 ome GCA_00097816 Chromos	12.54	6,862
YJM1527	-	5.1 ome GCA_00097819 Chromos	12.80	7,112
YJM1549	-	5.1 ome GCA_00097822 Chromos	13.26	7,739
YJM1573	-	5.1 ome GCA_00097825 Chromos	12.30	6,531

			5.1	ome		
YJM1574	-		GCA_00097828	Chromos	12.47	6,738
			5.1	ome		
YJM1592	-		GCA_00097831	Chromos	12.38	6,742
			5.1	ome		
YJM1615	-		GCA_00097834	Chromos	12.65	6,940
			5.1	ome		
Sigma1278b	-		GCA_00015148	Chromos	11.95	-
			5.1	ome		
AWRI796	-		GCA_00019019	Chromos	11.74	5,153
			5.1	ome		
Vin13	-		GCA_00019021	Chromos	11.67	5,122
			5.1	ome		
VL3	-		GCA_00019023	Chromos	11.66	5,128
			5.1	ome		
FostersB	-		GCA_00019025	Chromos	11.51	5,068
			5.1	ome		
CEN.PK113-	-		GCA_00026988	Chromos	12.00	5,444
			5.1	ome		
7D	-		GCA_00026988	Chromos	12.00	5,444
<i>S. fragilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces</i>						
			GCA_00000294	Chromos		
<i>S. pombe</i>	972h	3 Chr.			12.59	6,991
			5.2	ome		
<i>Streptococcus</i>						
<i>S. diacetylactis</i>	-	-	-	-	-	-
			NC_01576	GCA_00025333		
<i>S. salivarius</i>	CCHSS3		0.1	5.1	Complete	2.22
			NC_01759	GCA_00025331	Complete	2.21
	JIM8777		5.1	5.1	Complete	2.21
			NC_01759	GCA_00030533	Complete	2.18
	57.I		4.1	5.1	Complete	2.18
			NZ_CP00	GCA_00078551	Complete	2.19
	NCTC 8618		9913.1	5.1	Complete	2.19
			NZ_ACL	GCA_00017471	Contig	2.13
	SK126		O0000000	5.1	Contig	2.13
			0.1	5.1	Contig	2.13
			NZ_AGB	GCA_00022538	Contig	2.33
	M18		V0000000	5.2	Contig	2.33
			0.1	5.2	Contig	2.33
			NZ_AJF	GCA_00025758	Contig	2.05
	PS4		W0000000	5.1	Contig	2.05
			0.1	5.1	Contig	2.05
			NZ_ALIF	GCA_00028629	Contig	2.43
	K12		00000000.	5.1	Contig	2.43
			1	5.1	Contig	2.43
			NZ_JJMT	GCA_00071444	Contig	2.34
	NU10		00000000.	5.1	Contig	2.34

	YU10	1 NZ_JJMS 00000000.	GCA_00071445 5.1	Contig	2.35	2,165
	UC3162	1 NZ_JYOY 00000000.	GCA_00096326 5.1	Contig	2.16	2,035
	KB005	1 NZ_JYOX 00000000.	GCA_00096333 5.1	Contig	2.29	2,153
<i>S. thermophilus</i> *	LMG 18311	1 NC_00644	GCA_00001182 8.1 5.1	Complete	1.80	1,893
	M17PTZA49	6 CM002372	GCA_00052126 5.1	Chromos ome	2.07	2,287
	CNRZ1066	1 NC_00644	GCA_00001184 5.1	Complete	1.80	1,903
	LMD-9	9.1 NC_00853	GCA_00001448 5.1	Complete	1.86	1,967
	ND03	2.1 NC_01756	GCA_00018287 5.1	Complete	1.83	1,934
	JIM 8232	3.1 NC_01758	GCA_00025339 5.1	Complete	1.93	2,011
	MN-ZLW-02	1.1 NC_01792	GCA_00026267 5.1	Complete	1.85	1,937
	ASCC 1275	7.1 NZ_CP00	GCA_00069888 5.1	Complete	1.85	1,942
	SMQ-301	6819.1 NZ_CP01	GCA_00097166 5.1	Chromos ome	1.86	1,956
	TH1435	1217.1 -	GCA_00052128 5.1	Chromos ome	1.75	1,862
	TH1436	-	GCA_00052130 5.1	Chromos ome	1.78	1,919
	MTH17CL39	-	GCA_00052132 5.1	Chromos ome	1.83	2,019
	TH982	6 -	GCA_00057206 5.1	Chromos ome	1.79	2,006
	TH1477	-	GCA_00057209 5.1	Chromos ome	1.89	2,037
	1F8CT	-	GCA_00083659 5.1	Chromos ome	1.75	1,944
	TH985	-	GCA_00083667 5.1	Chromos ome	1.84	2,013
	CNCM I-1630	NZ_AGF N0000000	GCA_00028467 5.1	Contig	1.62	1,937
	MTCC 5461	0.1 NZ_ALIL	GCA_00033549	Contig	1.62	1,805

		00000000.	5.1			
		1 NZ_ALIK				
MTCC 5460		00000000.	5.1	GCA_00033551	Contig	1.61 1,764
		1 NZ_AWV				
DGCC7710		Z00000000	5.1	GCA_00050056	Contig	1.80 1,887
		.1				
<i>Tetragenococcus</i>						
<i>T. halophilus</i>	NBRC 12172	NC_01605	2.1	GCA_00028361	Complete	2.56 2,535
<i>Weissella</i>						
<i>W. confusa</i>	LBAE C39-2	NZ_CAG H0000000	0.1	GCA_00023995	Contig	2.28 2,237
<i>W. koreensis</i>	KACC15510	NC_01575	9.1	GCA_00021980	Complete	1.44 1,396
	KCTC 3621	NZ_AKG G0000000	5.1	GCA_00027764	Contig	1.73 1,750
<i>W. paramesenteroides</i>	ATCC 33313	NZ_ACK U0000000	0.1	GCA_00016057	Scaffold	1.96 2,020
<i>Zygosaccharomyces</i>						
<i>Z. rouxii</i> *	CBS 732	7 Chr.	5.1	GCA_00002636	Chromosome	9.76 5,332

Probiotics strain listed by MFDS.

**The Reference Sequence(RefSeq) database of NCBI provides a comprehensive standard dataset that represents sequence information for a species. RefSeq sequences are derived from GenBank records but differ in that each RefSeq is a synthesis of information, not an archived unit of primary research data.

*n.a: not available, ***-: not determined.

나. 식품의약품안전처 고시 식품원재료로 사용 가능한 미생물의 full genome 염기서열

- Table 4-5에는 현재까지 미국 국립보건원이 운영하고 있는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Genome database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genomes-maps/>)를 이용하여 식품의약품안전처(MFDS) 고시 식품원재료로 사용 가능한 균주 68종에 대한 full genome sequence를 분석하여 그 결과를 정리하였으며, 이들 68종에 대한 full genome sequence 분석 결과를 요약하여 sequencing level에 따른 full genome sequencing 현황은 Table 4-6에 정리하였다.

Table 4-6. Genome sequencing status of microorganisms which can be used as food materials listed by MFDS

Microorganisms	No. of genome sequence d	Sequencing level			
		Complete	Chromosome	Scaffold	Contig
		e	e		
<i>Aspergillus</i> (5)					
<i>A. kawachii</i>	1	-	-	1	-
<i>A. niger</i>	4	-	-	1	3
<i>A. oryzae</i>	7	-	-	-	7
<i>A. shirousamii</i>	0	-	-	-	-
<i>A. usamii</i>	0	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> (4)					
<i>B. amyloliquefaciens</i>	41	22	-	3	16
<i>B. coagulans</i>	11	4	-	1	6
<i>B. polyfermenticus</i>	0	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	78	28	5	3	42
<i>Bifidobacterium</i> (8)					
<i>B. adolescentis</i>	6	3	1	-	2
<i>B. animalis</i> *	4	3	-	-	1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	15	13	-	1	2
<i>B. bifidum</i> *	10	3	-	2	5
<i>B. breve</i> *	17	8	-	3	6
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	13	4	-	1	8
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> *	20	6	-	2	12
<i>B. Pseudolongum</i>	7	1	-	-	6
<i>Cyberlindnera</i> (1)					
<i>C. jadinii</i>	1	-	1	-	-
<i>Clostridium</i> (1)					
<i>C. butyricum</i> Miyairi	0	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces</i> (1)					
<i>K. lactis</i> *	1	1	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> (26)					
<i>L. acidophilus</i> *	15	4	-	4	7
<i>L. brevis</i>	13	2	1	3	7
<i>L. casei</i> *	19	9	1	1	17
<i>L. caucasicus</i>	0	-	-	-	-
<i>L. crispatus</i>	14	-	1	8	5
<i>L. curvatus</i>	2	-	-	-	2
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10	4	-	-	6
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	1	-	-	-	1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	6	-	-	2	4
<i>L. fermentum</i> *	11	3	-	5	3
<i>L. gasseri</i>	12	2	-	5	5
<i>L. helveticus</i> *	15	6	-	4	5
<i>L. johnsonii</i>	6	4	-	1	1
<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> subsp. <i>kefirano</i> <i>faciens</i>	1	-	-	-	1
<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	0	-	-	-	-
<i>L. kefir</i>	0	-	-	-	-

<i>L. leichmannii</i>	0	-	-	-	-
<i>L. paracasei*</i>	43	3	-	1	39
<i>L. paraplantarum</i>	1	-	-	1	-
<i>L. pentosus</i>	1	-	1	-	-
<i>L. perolens</i>	0	-	-	-	-
<i>L. plantarum*</i>		7	1	4	18
<i>L. reuteri*</i>	16	5	-	3	8
<i>L. rhamnosus*</i>	30	6	-	3	21
<i>L. sakei</i>	4	1	-	-	3
<i>L. salivarius*</i>	9	3	-	2	4
<i>Lactococcus</i> (2)					
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris*</i>	15	6	-	-	9
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis*</i>	20	7	-	1	12
<i>Leuconostoc</i> (3)					
<i>L. citreum</i>	6	1	-	-	5
<i>L. kimchi</i>	1	1	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	9	3	-	1	4
<i>Pediococcus</i> (2)					
<i>P. acidilactici</i>	5	-	-	3	2
<i>P. pentosaceus</i>	4	2	-	-	2
<i>Propionibacterium</i> (2)					
<i>P. freudenreichii</i> subsp.					
<i>freudenreichii</i>	3	1	-	2	-
<i>P. jensenii</i>	1	-	-	1	-
<i>Rhizopus</i> (1)					
<i>R. oligosporous</i>	0	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> (3)					
<i>S. pastorianus*</i>	5	-	-	-	5
<i>S. cerevisiae</i>	100	1	99	-	-
<i>S. fragilis</i>	0	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces</i> (1)					
<i>S. pombe</i>	1	-	1	-	--
<i>Streptococcus</i> (3)					
<i>S. diacetylactis</i>	0	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i>	12	4	-	-	8
<i>S. thermophilus*</i>	20	7	9	-	4
<i>Tetragenococcus</i> (1)					
<i>T. halophilus</i>	1	1	-	-	-
<i>Weissella</i> (3)					
<i>W. confuse</i>	1	-	-	-	1
<i>W. koreensis</i>	2	1	-	-	1
<i>W. paramesenteroides</i>	1	-	-	1	-
<i>Zygosaccharomyces</i> (1)					
<i>Z. rouxii*</i>	1	-	1	-	-

- 68종 균주에 대한 full genome sequence 분석 결과 Table 4-6에 정리한 바와 같이 fungi인 *Aspergillus* sp.는 식품의약품안전처에 고시된 5종(species)중에서 *A. shirousamii*와 *A. usami*는 genome sequencing이 이루어지지 않았고, *A. kawachii*, *A. niger*, *A. oryzae*는 genome sequencing이 완료되었으나, sequencing이 scaffold 또는 contig level에서 만 이루어져 있는 상황이다.

- 4종의 *Bacillus* sp. 중에서는 *B. polyfermenticus*를 제외하고는 complete level에서 full genome sequencing이 완료되었다.
- *Bifidobacterium* sp.는 8종 모두 complete level에서 full genome sequencing이 완료되었으며, *Lactobacillus* sp.는 식품의약품안전처에 고시된 26종 중에서 *L. caucasicus*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *L. kefiri*, *L. leichmannii*, *L. perolens* 등은 genome sequencing이 이루어지지 않았으나, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. gasserii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* 등의 주요 식품산업용 발효 균주들에 대해서는 complete level의 full genome sequencing이 완료된 상태이다.
- 한편, *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Weissella* sp.는 식품의약품안전처에 고시된 종들에 대해서는 모두 full genome sequencing이 완료되었다.
- 대표적인 효모 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*는 100 strains에 대한 full genome sequencing이 완료되었고, 이 중에서 99개의 genome이 chromosome level에서 sequencing이 이루어졌다.

3. 식품 산업용 균주의 genome 분석을 통한 유전자 표지 탐색

가. Multilocus sequence typing 분석을 위한 유전자 표지 탐색

(1) Sequence type과 target gene에 대한 데이터베이스 구축

- 본 연구에서는 균주 추적을 위한 DNA fingerprinting 분석 방법으로 multilocus sequence typing(MLST)을 선정하였기에, 식품의약품안전처가 고시한 식품원재료로 사용 가능한 균주 68종에 대하여 기존에 분석된 MLST의 sequence type과 target 유전자를 조사하여 이에 대한 데이터베이스를 구축하여 Table 4-7에 정리하였다.

Table 4-7. Sequence type and target gene for MLST analysis of microorganisms listed by MFDS

Microorganisms	Sequence type	Target gene	Reference
<i>Aspergillus</i>			
<i>A. kawachii</i>	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-	-
<i>A. shirousamii</i>	-	-	-
<i>A. usamii</i>	-	-	-
<i>Bacillus</i>			
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	-
<i>B. coagulans</i>	-	-	-
<i>B. polyfermenticus</i>	-	-	-

<i>B. subtilis</i>	155	<i>glpF, ilvD, pta, purH, pycA, rpoD, tpiA</i>	PubMLST, 2015
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>B. adolescentis</i>	-	-	-
<i>B. animalis</i> *		<i>clpC, fusA, gyrB, lles, purF, rplB, rpoB</i>	Delétoile <i>et al.</i> , 2010
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>clpC, fusA, gyrB, lles, purF, rplB, rpoB</i>	Delétoile <i>et al.</i> , 2010
<i>B. bifidum</i> *	27	<i>clpC, fusA, gyrB, lles, purF, rplB, rpoB</i>	Delétoile <i>et al.</i> , 2010
<i>B. breve</i> *	25	<i>clpC, fusA, gyrB, lles, purF, rplB, rpoB</i>	Delétoile <i>et al.</i> , 2010
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>		<i>clpC, fusA, gyrB, lles, purF, rplB, rpoB</i>	Delétoile <i>et al.</i> , 2010
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> *	41	<i>clpC, fusA, gyrB, lles, purF, rplB, rpoB</i>	Delétoile <i>et al.</i> , 2010
<i>B. pseudolongum</i>	-	-	-
<i>Cyberlindnera</i>			
<i>C. jadinii</i>	-	-	-
<i>Clostridium</i>			
<i>C. butyricum</i> Miyairi	-	-	-
<i>Kluyveromyces</i>			
<i>K. lactis</i> *	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. acidophilus</i> *	2	<i>fusA, gpmA, gyrA, gyrB, lepA, pyrG, recA</i>	Ramachandran <i>et al.</i> , 2013
<i>L. brevis</i>	-	-	-
<i>L. casei</i> *	40	<i>fusA, ileS, lepA, leuS, pyrG, recA, recG</i>	PubMLST, 2015
<i>L. caucasicus</i>	-	-	-
<i>L. crispatus</i>	10	<i>fusA, gpmA, gyrA, gyrB, lepA, pyrG, recA</i>	Ramachandran <i>et al.</i> , 2013
<i>L. curvatus</i>	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	34	<i>fusA, gyrB, hsp60, ileS, pyrG, recA, recG</i>	Tanigawa and Watanabe, 2011
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	34	<i>fusA, gyrB, hsp60, ileS, pyrG, recA, recG</i>	Tanigawa and Watanabe, 2011
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	34	<i>fusA, gyrB, hsp60, ileS, pyrG, recA, recG</i>	Tanigawa and Watanabe, 2011
<i>L. fermentum</i> *	-	-	-
<i>L. gasseri</i>	8	<i>fusA, gpmA, gyrA, gyrB, lepA, pyrG, recA, clpX, dnaA, dnaK, groEL,</i>	Ramachandran <i>et al.</i> , 2013
<i>L. helveticus</i> *	108	<i>murC, murE, pepN, pepX, pyrG, recA, uvrC</i>	Sun <i>et al.</i> , 2015
<i>L. johnsonii</i>	5	<i>fusA, gpmA, gyrA, gyrB,</i>	Ramachandran <i>et al.</i> ,

<i>L. kefiranofaciens</i> subsp.		<i>lepA, pyrG, recA</i>	2013
<i>kefiranofaciens</i>	-	-	-
<i>L. kefiranofaciens</i> subsp.	-	-	-
<i>kefirgranum</i>	-	-	-
<i>L. kefiri</i>	-	-	-
<i>L. leichmannii</i>	-	-	-
<i>L. paracasei</i> *	14	<i>fusA, ileS, lepA, leuS, pyrG,</i> <i>recA and recG</i>	Parolo <i>et al.</i> , 2011
<i>L. paraplantarum</i>	-	-	-
<i>L. pentosus</i>	-	-	-
<i>L. perolens</i>	-	-	-
<i>L. plantarum</i> *	16	<i>pgm, ddl, gyrB, purK1, gdh, mutS,</i>	Siezen <i>et al.</i> , 2011 de las Rivas <i>et al.</i> , 2006
<i>L. reuteri</i> *	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> *	-	-	-
<i>L. sakei</i>	116	<i>pepV, recA, glpF, tuf, dnaK, hemN, ldhL, rpoB, parB, pstB, rpsB, pheS,</i>	Chaillou <i>et al.</i> , 2013
<i>L. salivarius</i> *	25	<i>ftsQ, nrdB, rpoA</i>	Ratis <i>et al.</i> , 2011
Lactococcus			
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> *	na	<i>atpA, rpoA, pheS, bcaT, pepN, pepX</i>	Fernandez <i>et al.</i> , 2011
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	70	<i>atpA, rpoA, pheS, bcaT, pepN, pepX</i>	Fernandez <i>et al.</i> , 2011
Leuconostoc			
<i>L. citreum</i>	-	-	-
<i>L. kimchii</i>	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-
Pediococcus			
<i>P. acidilactici</i>	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	17	<i>gyrB, pyc, pgm, leuS, glnA, dalR, pgI</i>	PubMLST, 2015
Propionibacterium			
<i>P. freudenreichii</i> subsp.	-	-	-
<i>freudenreichii</i>	-	-	-
<i>P. jensenii</i>	-	-	-
Rhizopus			
<i>R. oligosporous</i>	-	-	-
Saccharomyces			
<i>S. pastorianus</i> *	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	13	<i>acc1, vps13, gln4, adp1, rpn2, ala1</i>	Muñoz <i>et al.</i> , 2009

	40	<i>atfI, met4, rpn2, nup116, ste50, ybl081w, IntAY</i>	Ayoub <i>et al.</i> , 2006
<i>S. fragilis</i>	-	-	-
Schizosaccharomyces			
<i>S. pombe</i>	-	-	-
Streptococcus			
<i>S. diacetylactis</i>	-	-	-
<i>S. salivarius</i>	26	<i>glcK, ddlA, pepO, ilvC, thrS, pyrE, dnaE, sodA, tkt</i>	Delorme <i>et al.</i> , 2007
<i>S. thermophilus</i> *	21	<i>glcK, ddlA, pepO, ilvC, thrS, tkt, pyrE, dnaE</i>	Delorme <i>et al.</i> , 2010
Tetragenococcus			
<i>T. halophilus</i>	-	-	-
Weissella			
<i>W. confusa</i>	-	-	-
<i>W. koreensis</i>	-	-	-
<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-
Zygosaccharomyces			
<i>Z. rouxii</i> *	-	-	-

(2) 각 균주에 대한 MLST allelic profiles

- 식품의약품안전처가 고시한 식품원재료로 사용 가능한 균주 68종에 대하여 현재까지 보고된 MLST allelic profiles을 조사하여 다음과 같이 분석하였다.
- *Bacillus subtilis*의 MLST primer, sequence type, polymorphic site analysis는 각각 Table 4-8, 4-9와 Figure 4-9에 나타내었다. *Bacillus subtilis*의 MLST를 위한 target gene은 *glpF* 등 총 7개를 사용하였으며, 각각의 유전자에 대한 allele은 63개에서 97개로 분포되어 있었다. 이로부터 *Bacillus subtilis*의 sequence type은 155개로 분석되어져 있다.

Table 4-8. MLST primers for *Bacillus subtilis*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>glpF</i>	<i>glpF_F</i>	Glycerol uptake	_1)	78	384
	<i>glpF_R</i>	facilitator protein			
<i>ilvD</i>	<i>ilvD_F</i>	Dihydroxy-acid	-	88	471
	<i>ilvD_R</i>	dehydratase			
<i>pta</i>	<i>pta_F</i>	Phosphotransacetyla	-	88	414
	<i>pta_R</i>	se			
<i>purH</i>	<i>purH_F</i>	Purine biosynthesis	-	97	399
	<i>purH_R</i>	protein			

<i>pycA</i>	pycA_F	Pyruvate	-	82	399
	pycA_R	carboxylase			
<i>rpoD</i>	rpoD_F	RNA polymerase	-	63	384
	rpoD_R	sigma factor			
<i>tpiA</i>	tpiA_F	Triosephosphate	-	68	420
	tpiA_R	isomerase			

¹⁾Not open to public.

(PubMLST, 2015)

Table 4-9. Sequence type of MLST for *Bacillus subtilis*

Sequence type	<i>glpF</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>pycA</i>	<i>rpoD</i>	<i>tpiA</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	1	5	2	1	1	1
3	3	3	2	3	2	1	1
4	3	2	2	6	4	3	4
5	1	2	2	6	4	1	4
6	3	2	2	5	4	1	3
7	9	4	6	7	5	4	5
8	5	5	8	8	6	5	7
9	4	1	4	4	3	1	2
10	4	1	20	23	3	1	2
11	3	18	2	24	20	1	1
12	6	6	9	9	7	6	8
13	7	7	10	10	8	7	9
14	9	4	21	7	5	4	5
15	19	19	8	25	21	5	21
16	13	11	12	15	13	12	13
17	13	11	12	15	14	12	13
18	13	11	13	16	13	11	12
19	11	10	12	14	11	10	12
20	12	12	14	17	12	10	12
21	8	8	7	11	9	8	6
22	20	20	7	26	22	8	23
23	21	21	7	27	22	8	24
24	10	9	11	12	10	9	10
25	23	23	23	29	24	9	10
26	22	22	22	28	23	21	22
27	15	14	16	18	16	15	14
28	16	14	17	19	16	16	14
29	17	16	18	20	17	14	16
30	18	17	19	21	18	17	17
31	18	17	19	21	19	17	18
32	14	13	15	13	15	13	11
33	18	17	34	21	19	17	17
34	18	30	19	21	19	24	17
35	1	1	1	1	1	4	1
36	26	24	32	37	25	23	25
37	17	16	31	20	27	14	16

38	18	17	19	21	19	24	17
39	14	25	27	34	15	13	27
40	27	28	30	36	30	2	28
41	28	27	29	34	28	2	26
42	29	26	28	33	29	2	29
43	9	1	1	1	1	1	1
44	1	1	5	38	26	1	1
45	30	15	3	22	32	18	30
46	31	29	33	35	31	22	15
47	36	1	36	43	33	1	33
48	1	1	38	4	1	1	1
49	37	35	39	44	34	1	34
50	38	36	40	45	35	25	35
51	39	37	41	10	36	26	36
52	40	38	42	46	37	27	37
53	17	16	18	20	38	14	16
54	33	14	16	47	16	28	16
55	41	39	43	48	39	29	38
56	1	1	44	49	40	1	1
57	50	53	57	60	53	37	46
58	28	27	29	30	28	2	26
59	24	40	26	32	41	19	19
60	29	41	45	50	42	30	39
61	34	42	46	51	43	31	28
62	43	43	47	52	15	32	28
63	14	13	29	53	44	33	40
64	14	13	48	13	45	13	28
65	44	44	49	13	46	34	28
66	45	45	46	51	47	31	32
67	46	46	50	54	48	20	41
68	47	49	52	57	49	19	43
69	48	50	53	58	50	31	44
70	14	13	47	33	15	35	28
71	29	51	54	50	51	30	45
72	1	48	55	56	34	1	1
73	42	47	51	55	4	1	42
74	49	52	56	59	52	36	3
75	51	54	58	61	54	38	47
76	17	16	18	20	27	14	16
77	17	55	18	20	17	39	16
78	17	16	18	20	38	39	16
79	4	56	59	62	55	40	3
80	52	57	1	63	56	1	33
81	3	48	60	64	2	41	1
82	3	48	2	65	34	41	3
83	53	58	55	38	57	1	48
84	1	1	55	66	1	1	1
85	1	1	1	1	58	1	1
86	1	31	35	40	56	3	49

87	1	1	55	66	26	1	1
88	54	57	61	67	56	1	1
89	55	6	9	9	7	6	8
90	9	59	6	68	5	42	50
91	34	33	62	39	60	31	32
92	56	60	29	53	44	43	29
93	35	44	63	13	15	13	51
94	29	61	54	50	61	30	52
95	29	62	54	50	59	30	53
96	57	42	64	69	50	44	44
97	18	63	19	21	18	17	17
98	58	22	65	70	23	45	54
99	29	62	45	50	59	30	52
100	3	1	36	43	26	1	1
101	62	66	67	74	63	46	55
102	59	64	66	71	34	1	1
103	1	57	43	72	40	1	1
104	36	1	5	1	62	1	56
105	3	64	44	66	2	3	3
106	63	24	68	76	68	49	59
107	3	48	2	66	34	1	3
108	61	65	55	73	4	1	63
109	60	68	65	75	66	53	58
110	68	33	74	80	49	54	32
111	64	13	70	34	64	50	60
112	14	13	69	33	15	51	62
113	17	16	18	20	27	39	16
114	17	16	18	77	27	14	16
115	14	69	71	33	29	13	28
116	33	16	18	20	17	14	16
117	24	40	24	30	41	19	19
118	65	70	67	78	65	52	61
119	66	14	16	19	16	16	14
120	67	67	72	79	69	47	57
121	67	67	73	79	70	48	57
122	25	46	25	31	67	20	20
123	3	31	35	40	56	3	4
124	54	71	75	81	71	1	1
125	61	72	76	82	34	55	64
126	33	83	17	47	16	16	14
127	69	83	16	47	72	16	14
128	75	64	35	83	79	56	1
129	71	76	79	84	75	57	66
130	1	1	35	85	56	3	4
131	1	1	35	86	56	1	49
132	35	44	63	13	15	34	26
133	29	77	80	34	44	2	28
134	72	78	81	87	76	58	67
135	29	79	54	88	42	30	53

136	14	80	29	90	44	43	29
137	14	13	48	13	45	19	28
138	43	40	47	52	15	32	28
139	29	41	54	89	51	31	68
140	34	33	82	51	77	31	32
141	29	44	29	34	44	59	28
142	3	48	83	91	34	60	3
143	73	81	84	92	78	36	3
144	74	82	85	93	78	36	3
145	59	48	55	56	34	1	1
146	9	73	6	68	5	61	5
147	9	59	6	7	5	61	5
148	35	44	29	94	45	13	28
149	14	84	47	13	80	13	28
150	9	85	6	7	5	61	5
151	77	87	87	96	81	62	44
152	78	88	88	97	82	46	65
153	33	75	16	47	74	16	14
154	78	88	88	97	82	63	65
155	15	74	78	47	73	16	14

glpF



ilvD



rpoD



tpiA



Figure 4-9. Polymorphic site analysis of MLST for *Bacillus subtilis*.

- *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. paracasei*의 MLST primer는 Table 4-10부터 4-17에 각각 정리하였다.

Table 4-10. MLST primers for *Bifidobacterium animalis*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>clpC</i>	ClpC-uni	ATP-dependent Clp	GAGTACCGCAAGTACATCG	3	600
	ClpC-rev	protease	AG		
		ATP-binding protein	CATCCTCATCGTCGAACAG		

			GAAC ATCGGCATCATGGCYCACA		
<i>fusA</i>	fusAB3 fusAB4	Protein elongation factor EF-2	TYGAT CCAGCATCGGCTGMACRCCC	2	666
			TT AGCTGCACGCBGGCGGCAAG		
<i>gyrB</i>	gyrBB3 gyrBB4	DNA gyrase, subunit B	TTCG GTTGCCGAGCTTGGTCTTG	3	627
			GTCTG ATCCCGCGYTACCAGACSAT		
<i>Iles</i>	ileSB3 ileSB4	Isoleucyl-tRNA synthase	G CGGTGTCGACGTAGTCGGC	4	489
			G CATTCGAACTCCGACACCG		
<i>purF</i>	PurF-uni PurF-rev	Amidophosphoribosyl transferase	A GTGGGGTAGTCGCCGTTG GGACAAGGACGGCRTSCCSG	3	591
			CCAA ACGACCRCCGTGCGGGTGR	2	357
<i>rplB</i>	rplBB3 rplBB4	50S Ribosomal protein L2	TCGAC GGCGAGCTGATCCAGAACC		
			A		
<i>rpoB</i>	rpoBB3 rpoBB4	RNA polymerase β subunit	GCATCCTCGTAGTTGTASC	1	501
			C		

(Delétoile *et al.*, 2010)

Table 4-11. MLST primers for *Bifidobacterium bifidum*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
		ATP-dependent	GAGTACCGCAAGTACATCGA		
<i>clpC</i>	ClpC-uni ClpC-rev	Clp protease ATP-binding protein	G CATCCTCATCGTCGAACAGG AAC ATCGGCATCATGGCYCACAT	8	600
			YGAT CCAGCATCGGCTGMACRCCC	16	666
			TT AGCTGCACGCBGGCGGCAAG		
<i>gyrB</i>	gyrBB3 gyrBB4	DNA gyrase, subunit B	TTCG GTTGCCGAGCTTGGTCTTGG	10	627
			TCTG ATCCCGCGYTACCAGACSAT		
<i>Iles</i>	ileSB3 ileSB4	Isoleucyl-tRNA synthase	G	13	489

<i>purF</i>	PurF-uni	Amidophosphoribosyltransferase	CGGTGTCGACGTAGTCGGCG CATTTCGAACTCCGACACCGA	13	591
	PurF-rev		GTGGGGTAGTCGCCGTTG GGACAAGGACGGCRTSCCSG		
<i>rplB</i>	rplBB3	50S Ribosomal protein L2	CCAA	3	357
	rplBB4		ACGACCRCGGTGCGGGTGRT		
<i>rpoB</i>	rpoBB3	RNA polymerase β subunit	CGAC GGCGAGCTGATCCAGAACCA	11	501
	rpoBB4		GCATCCTCGTAGTTGTASCC		

(Delétoile *et al.*, 2010)

Table 4-12. MLST primers for *Bifidobacterium breve*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>clpC</i>	ClpC-uni	ATP-dependent ClpC protease	GAGTACCGCAAGTACATCG AG	6	600
	ClpC-rev	ATP-binding protein	CATCCTCATCGTCGAACAGG AAC ATCGGCATCATGGCYCACAT		
<i>fusA</i>	fusAB3	Protein elongation factor EF-2	YGAT	8	666
	fusAB4		CCAGCATCGGCTGMACRCCC TT AGCTGCACGCBGGCGGCAAG		
<i>gyrB</i>	gyrBB3	DNA gyrase, subunit B	TTCG	8	627
	gyrBB4		GTTGCCGAGCTTGGTCTTGG TCTG ATCCCGCGYTACCAGACSAT		
<i>Iles</i>	ileSB3	Isoleucyl-tRNA synthase	G	15	489
	ileSB4		CGGTGTCGACGTAGTCGGCG CATTTCGAACTCCGACACCGA		
<i>purF</i>	PurF-uni	Amidophosphoribosyltransferase	CGGTGTCGACGTAGTCGGCG CATTTCGAACTCCGACACCGA	10	591
	PurF-rev		GTGGGGTAGTCGCCGTTG GGACAAGGACGGCRTSCCSG		
<i>rplB</i>	rplBB3	50S Ribosomal protein L2	CCAA	3	357
	rplBB4		ACGACCRCGGTGCGGGTGRT		
<i>rpoB</i>	rpoBB3	RNA polymerase β subunit	CGAC GGCGAGCTGATCCAGAACCA	7	501
	rpoBB4		GCATCCTCGTAGTTGTASCC		

(Delétoile *et al.*, 2010)

Table 4-13. MLST primers for *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>clpC</i>	ClpC-uni	ATP-dependent	GAGTACCGCAAGTACATCG	9	600

		Clp protease	AG		
	ClpC-rev	ATP-binding protein	CATCCTCATCGTCGAACAG GAAC ATCGGCATCATGGCYCACA		
<i>fusA</i>	fusAB3	Protein elongation factor EF-2	TYGAT	9	666
	fusAB4		CCAGCATCGGCTGMACRCCC TT AGCTGCACGCBGGCGGCAAG		
<i>gyrB</i>	gyrBB3	DNA gyrase, subunit B	TTCG	21	627
	gyrBB4		GTTGCCGAGCTTGGTCTTG GTCTG ATCCCGCGYTACCAGACSAT		
<i>Iles</i>	ileSB3	Isoleucyl-tRNA synthase	G	16	489
	ileSB4		CGGTGTCGACGTAGTCGGC G CATTCGAACTCCGACACCG		
<i>purF</i>	PurF-uni	Amidophosphoribosyltransferase	A	9	591
	PurF-rev		GTGGGGTAGTCGCCGTTG GGACAAGGACGGCRTSCCSG		
<i>rplB</i>	rplBB3	50S Ribosomal protein L2	CCAA	10	357
	rplBB4		ACGACCRCGTCGCGGTGR TCGAC GGCGAGCTGATCCAGAACC		
<i>rpoB</i>	rpoBB3	RNA polymerase β A		16	501
	rpoBB4	subunit	GCATCCTCGTAGTTGTASC C		

(Delétoile *et al.*, 2010)

Table 4-14. MLST primers for *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
		ATP-dependent	GAGTACCGCAAGTACATCG		
<i>clpC</i>	ClpC-uni	Clp protease	AG	4	600
	ClpC-rev	ATP-binding protein	CATCCTCATCGTCGAACAGG AAC ATCGGCATCATGGCYCACAT		
<i>fusA</i>	fusAB3	Protein elongation factor EF-2	YGAT	3	666
	fusAB4		CCAGCATCGGCTGMACRCCC TT AGCTGCACGCBGGCGGCAAG		
<i>gyrB</i>	gyrBB3	DNA gyrase, subunit B	TTCG	3	627
	gyrBB4		GTTGCCGAGCTTGGTCTTGG		

<i>Iles</i>	ileSB3	Isoleucyl-tRNA synthase	TCTG ATCCCGCGYTACCAGACSAT G	3	489
	ileSB4		CGGTGTCGACGTAGTCGGCG		
<i>purF</i>	PurF-uni	Amidophosphoribosyltransferase	CATTCGAACTCCGACACCGA	3	591
	PurF-rev		GTGGGGTAGTCGCCGTTG GGACAAGGACGGCRTSCCSG		
<i>rplB</i>	rplBB3	50S Ribosomal protein L2	CCAA	3	357
	rplBB4		ACGACCRCCGTGCGGGTGRT		
<i>rpoB</i>	rpoBB3	RNA polymerase β subunit	CGAC GGCGAGCTGATCCAGAACCA	3	501
	rpoBB4		GCATCCTCGTAGTTGTASCC		

(Delétoile *et al.*, 2010)

Table 4-15. MLST primers for *Lactobacillus delbrueckii*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>fusA</i>	fusA-F	Protein elongation factor EF-2	TGCGTGTCTTGGACGGTG CC	12	474
	fusA-R		TGCCTTCCTTGTCGTGGG		
<i>gyrB</i>	gyrB-F	DNA gyrase, subunit B	CG AAGCTGGGCAACTCCGAC GC	16	380
	gyrB-R		CATCGGCCGCATGTAGCG		
<i>hsp60</i>	hsp-F	Heat-shock protein 60	GT ACTGTTTTGACCCAGGCC ATCG	17	515
	hsp-R		AACAGCAACMACGTTGA		
<i>ileS</i>	ileS-F	Isoleucyl-tRNA synthase	AGG GCCTGGTCCACACCGCTT CC	17	496
	ileS-R		ACCCCGCTCCAGGATGAC		
<i>pyrG</i>	pyrG-F	CTP synthase	CC TGCGGGCAGCCAAGGAAC TG	18	392
	pyrG-R		CCGAAACCGCCTGGCACG		
<i>recA</i>	recA-F	Recombinase A	AT CTCACTGGCACTGGACGC GG	17	412
	recA-R		CTTCAGGGCCCGACCACC		
<i>recG</i>	recG-F	ATP-dependent DNA helicase	TG GGAAATTCGCCGGCCAGC	22	490
	recG-R		CT		

TGACCAGCAGATGCAGCG
CC

(Tanigawa *et al.*, 2011)

Table 4-16. MLST primers for *Lactobacillus helveticus*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>dnaA</i>	dnaA-1	DNA-directed DNA replication initiator protein	TTAGCCGTAGCGGACAG	5	850
	dnaA-2		ATTTGCGACGACTTCTT		
<i>pyrG</i>	pyrG-1	CTP synthase	CGCAGTATCGGTATTCA	13	714
	pyrG-2		AAGACCTAAACGCAAAG		
<i>groE</i>	groEL-1	60 kDa chaperonin	ACATCTTGCCATTACTTC	8	698
	<i>L</i> groEL-2		TACTGAGCCATCTTTACC AAGAGCAACGATGAACAA		
<i>murC</i>	murC-1	UDP-N-acetylmuramate-1-alanine ligase	GT	13	560
	murC-2		AACTTAGAGCCAGTGGTT GA GCAGTGCACAAGTCCTCT		
<i>pepX</i>	pepX-1	x-Prolyl-dipeptidyl aminopeptidase	TAC	13	520
	pepX-2		TTGACGAAAATCTCTCTG		
<i>dnaK</i>	dnaK-1	Chaperone protein dnaK	ACTC ATCAACTCGTATCCCTG	10	780
	dnaK-2		AGCTTAACTGCCAAATC		
<i>uvrC</i>	uvrC-1	Excision endonuclease subunit UvrC ATP-dependent	CAAAGACGGAGGCTATT	15	631
	uvrC-2		CGTTCTAACTGGGACTG		
<i>clpX</i>	clpX-1	protease ATP-binding subunit ClpX	CAAGCGAATTAGTCAGA	16	612
	clpX-2		TCAGGTATCATCCCAA		
<i>recA</i>	recA-1	Recombinase A	ATTGGTGTTGGCGGCTAT	10	745
	recA-2		CGATCCGATCACTCTTGT		
<i>murE</i>	murE-1	UDP-N-acetylmuramoyl-1-alanyl-d-glutamyl-1-lysine ligase	CGAATGAACACCCTAAC	7	681
	murE-2		CCTCGGCAATACTCTTA		
<i>pepN</i>	pepN-1	Aminopeptidase N	TGGTTCGGTGACTTGGT	8	789
	pepN-2		TTGCTTGCCTTCTGCTA		

(Sun *et al.*, 2015)

Table 4-17. MLST primers for *Lactobacillus paracasei*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>fusA</i>	fusA-F	Protein elongation factor EF-2	- ¹⁾	9	663
	fusA-R				
<i>ileS</i>	ileS-F	Isoleucyl-tRNA synthase	-	12	360

<i>lepA</i>	ileS-R lepA-F	GTP-binding protein	-	13	549
<i>leuS</i>	lepA-R leuS-F	Leucyl-tRNA synthetase	-	14	642
<i>pyrG</i>	leuS-R pyrG-F	CTP synthase	-	4	345
<i>recA</i>	pyrG-R recA-F	Recombinase A	-	6	315
<i>recG</i>	recA-R recG-F	ATP-dependent DNA helicase	-	10	342

¹⁾Not open to public. (Parolo *et al.*, 2011)

- *Lactobacillus plantarum*의 MLST primer와 polymorphic site analysis는 각각 Table 4-18과 Figure 4-10에 정리하였다.

Table 4-18. MLST primers for *Lactobacillus plantarum*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>pgm</i>	PGM1-LP PGM2	Phosphoglucomutase	CTTGCGGCCAACCCAGAA AC CCGTAGGATTCTTCAAAA CC	3	558
			AACATGATGTTTCGAAGC		
<i>ddl</i>	DDL1-LP DDL2-LP	D-Alanine-D-alanine ligase	G GTTAGTAAAACCAGGTA ACG	5	677
<i>gyrB</i>	GYRB1-L P GYRB2-L P	DNA gyrase, B subunit	GTGGTCTTCACGGGGTCG TTCGACAATGAACAACAC	7	704
<i>purK</i> <i>1</i>	PURK1 PURK2	Phosphoribosylamino imidazolecarboxylase, ATPase subunit	TGACCTACGAGTTTGAA AAC GGTGACATGACCCATCTT GCG	8	525
			CCTTACAAGGGCGGCTTA		
<i>gdh</i>	GDH1 GDH2	Glutamate dehydrogenase	CG ACGCCACCAGCATTGGCA GC	10	414
			AAGTACGTTCTCATCCCA		
<i>mutS</i>	MUT1 MUT2	DNA mismatch repair protein	TATG ATAACGCACACCCCGCAG GTC	8	594

(de las Rivas *et al.*, 2006)

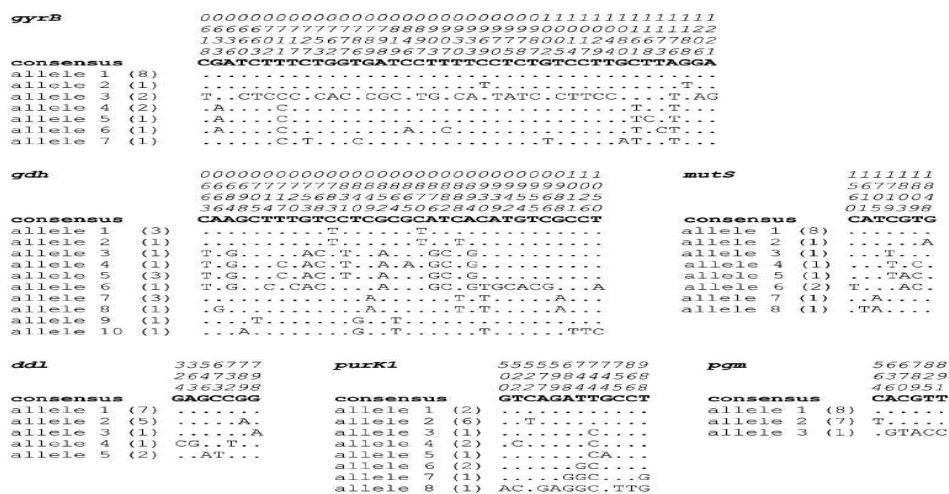


Figure 4-10. Polymorphic site analysis of MLST for *Lactobacillus plantarum*.

• *Lactobacillus sakei*의 MLST primer는 Table 4-19에 정리하였고, *L. salivarius*의 MLST primer와 sequence type은 각각 Table 4-20과 4-21에 나타내었다.

Table 4-19. MLST primers for *Lactobacillus sakei*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>pepV</i>	pepV-F	Xaa-His	- ¹⁾	8	540
	pepV-R	dipeptidase			
<i>recA</i>	recA-F	Recombinase A	-	13	399
	recA-R				
<i>glpF</i>	glpF-F	Glycerol uptake	-	12	399
	glpF-R	facilitator protein			
<i>Tuf</i>	Tuf-F	Elongation factor	-	9	330
	Tuf-R	Tu			
<i>dnaK</i>	dnaK-F	Chaperone protein	-	21	519
	dnaK-R	dnaK			
<i>hemN</i>	hemN-F	Coproporphyrinoge	-	21	369
	hemN-R	n III oxidase			
<i>ldhL</i>	ldhL-F	L-lactate	-	9	441
	ldhL-R	dehydrogenase			
<i>rpoB</i>	rpoB_primer F	RNA polymerase	-	12	369
	rpoB_primer R	β subunit			

¹⁾Not open to public.

Table 4-20. MLST primers for *Lactobacillus salivarius*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
		Phosphate transport,	GGCATTAGAAACAAGGGATTT		
<i>pstB</i>	pstB-F	ATP-binding protein	G	16	731
	pstB-R		AGTTCACCTATCCAAAGTTTC		
		SSU ribosomal protein S2P	CTG		
<i>rpsB</i>	rpsB-F		ACGTCGTTGGAACCCTAAGA	12	786
	rpsB-R		CGCCTTCTACAACCTCAACG		
		Phenylalanyl-tRNA synthetase α chain	GGTCCAATCACTGAAGTTTAA		
<i>pheS</i>	pheS-F		CG	19	864
	pheS-R		TCTGGTCCTAAACCGAATGC		
			GATAAGCATATGCATATGCGC		
		Cell division protein	CCACT		
<i>ftsQ</i>	ftsQ-F		AAAGCCATGAGAGTAATGAA	17	821
	ftsQ-R		GAA		
		Ribonucleoside-diphosphate reductase β chain	AGGCTACGTGGGAAAACTT		
<i>nrdB</i>	nrdB-F		CCATTACCAACTTGGGAGAA	13	734
	nrdB-R				
		RNA polymerase α chain	CCAAGATCTGCCAATTTAGCC		
<i>rpoA</i>	rpoA-F		CGCTTGAACGTGGTTATGGT	10	816
	rpoA-R		TTCGATTCCATTTTCACTTGC		
		Chromosome partitioning protein	CGATACACAAGAAAAGGTTCA	17	795
<i>parB</i>	parB-F		AGA		
	parB-R				

(Raftis *et al.*, 2011)

Table 4-21. Sequence type of MLST for *Lactobacillus salivarius*

ST	<i>ftsQ</i>	<i>nrdB</i>	<i>parB</i>	<i>pheS</i>	<i>pstB</i>	<i>rpoA</i>	<i>rspB</i>
ST-1	1	1	1	1	1	1	1
ST-1	1	1	1	1	1	1	1
ST-1	1	1	1	1	1	1	1
ST-2	2	2	2	2	2	2	2
ST-2	2	2	2	2	2	2	2
ST-2	2	2	2	2	2	2	2
ST-3	3	3	3	3	3	3	3
ST-4	4	3	3	4	4	4	4
ST-5	4	2	3	5	3	3	5
ST-6	5	4	4	6	5	5	6
ST-6	5	4	4	6	5	5	6
ST-6	5	4	4	6	5	5	6
ST-7	6	5	5	7	6	6	7
ST-8	7	1	6	1	2	1	1
ST-9	1	1	1	1	2	1	1
ST-10	5	6	7	8	3	5	2

ST-11	8	7	8	9	7	1	4
ST-12	2	2	9	2	2	2	2
ST-13	8	7	9	9	2	7	4
ST-13	8	7	9	9	2	7	4
ST-13		8	7	9	9	2	7
ST-14	9	8	10	10	8	1	8
ST-15	10	9	11	11	9	6	9
ST-16	8	3	8	12	2	5	10
ST-17	8	7	8	13	2	1	4

(Raftis *et al.*, 2011)

- 또한 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*의 MLST primer는 Table 4-22와 4-23에 정리하였다.

Table 4-22. MLST primers for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>bcaT</i>	bcaT_F	Branched-chain- amino-acid aminotransferase	AATTTAGACTGGGAAAATTTA	21	978
	bcaT_R		GG		
<i>glyA</i>	glyA_F	Serine hydroxymethyl transferase	CAACATCACCAAACCTGAATG	25	1134
	glyA_R		ATGATTTTTGATAAAGAAGAT		
<i>pdp</i>	pdp_F	Pyrimidine-nucleo- side phosphorylase	CTTCAACTTCTTTAAATCCTCT	26	1210
	pdp_R		ATGGTTGATCTCATTCAAAG		
<i>pepXP</i>	pepXP_F	X-prolyl-dipeptid- yl aminopeptidase	GGCTTATGGTGCTGCTACTACT	22	1224
	pepXP_R		CACACTTTCAATAGGAATAAT		
<i>pgk</i>	pgk_F	Phosphoglycerate kinase	TGGCAAAATTGACTGTAAAAG	22	1191
	pgk_R		A		
<i>recN</i>	recN_F	ATPase involved in DNA repair	TTTTTCAGTCAAAGCTGCAAGTC	26	863
	recN_R		TTGTCTGAATCAATGGTCAAAT		
			GG TCCATATAAAGCTCAGAAAGT TCG		

(Fernandez *et al.*, 2011)

Table 4-23. MLST primers for *Leuconostoc mesenteroides*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>dnaA</i>	dnaA_primer F	Chromosomal replication initiator	CGAAGCAAAGCCTACC ACT	6	621

	dnaA_primer R	protein dnaA	AAGCCATCAGATTCAG ACAA ATTACGCCAAATGAAG		
<i>pyrG</i>	pyrG_primerF pyrG_primerR	CTP synthase	TCG CAAGCAAATGCCTAAG AAA ATATTGAAGCCGACGA	6	676
<i>rpoB</i>	rpoB_primerF rpoB_primerR	RNA polymerase β subunit	GGTT TTCCCTTGTTTCCATG ACG GTGCTGTCGCATCTCG	8	597
<i>groE</i> <i>L</i>	groEL_primer F groEL_primer R pheS	Chaperonin GroEL	TGT GCGGCAATCATGTCTA CCC ATCAACAGTTATTGGC	6	451
<i>pheS</i>	_primerF pheS _primerR	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit α	AGAA TACCTCCACAGATGGC TCA GTAACGGACCACAAGG	10	545
<i>murC</i>	murC_primer F murC_primer R	UDPN-acetyl muramate-1-alanine ligase	TAG GCATTAGTCGGAATTT CTC ACGATGAAATGGTGGG	8	524
<i>pepN</i>	pepN_primerF pepN_primer R	Lysyl-aminopeptidase, aminopeptidase N	ATG TCACTACACGCTTACT GGAT GTAACGGACCACAAGG	9	580
<i>uvrC</i>	uvrC_primerF uvrC_primerR	Excinuclease ABC subunit C	TAG GCATTAGTCGGAATTT CTC ACGATGAAATGGTGGG	11	615
<i>murE</i>	murE_primer F murE_primer R	UDPN-acetylmuramoyl alanyl-d-glutamate-1- lysine ligase	ATG TCACTACACGCTTACT GGAT	8	619

(Zhang *et al.*, 2015)

- 한편 *Pediococcus pentosaceus*의 MLST primer, sequence type과 polymorphic site analysis는 Table 4-24, 4-25와 Figure 4-11에 각각 정리하였다. *P. pentosaceus*의 MLST 분석을 위한 target gene은 gyr유전자 등 총 7개를 사용하고 있으며, 각각의 유전자들의 allele는 5~10개로 분포되어 있다. 현재까지 *P. pentosaceus*의 sequence type은 17개로 알려져 있다.

Table 4-24. MLST primers for *Pediococcus pentosaceus*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>gyr</i>	gyrB_F gyrB_R	Gyrase B	AGGGTGATTCTGCCGGT	6	462
			GG ACCTTGTCACCCATCAA		
<i>pyc</i>	pyc_F pyc_R	Pyruvate carboxylase	CAT AACAAATTGCGGGCTAAA	9	603
			ATG GGCGCAGGTTGGTATAC		
<i>pgm</i>	pgm_F pgm_R	Phosphoglucomutase	TGT TTACGAAGAAAATGGCG	8	321
			AC AATTTCAAAACATCCGC		
<i>leuS</i>	leuS_F leuS_R	Leucyl-tRNA synthetase	TTT GGGTGGAACGGTAGTTG	10	522
			CTA GCGAGAGAAGACCCAGT		
<i>gln</i>	glnA_F glnA_R	Glutamine synthetase	CAC AATCAATGGTTCAGGGA	5	495
			TGC TTGACGGTAAGAAGCCC		
<i>dal</i>	dalR_F dalR_R	Glycyl-tRNA synthetase	ATTC TGTCGAACCTGGCTAATG	10	570
			CTG CATGTAATGTTCGCGAA		
<i>pgi</i>	pgi_F pgi_R	Glucose-6-Phosphate isomerase	TGG ATCGGTGACCGTGACTION	9	417
			CTC ATCAAATTGCGACGACC		
			TTC		

(PubMLST, 2015)

Table 4-25. Sequence type of MLST for *Pediococcus pentosaceus*

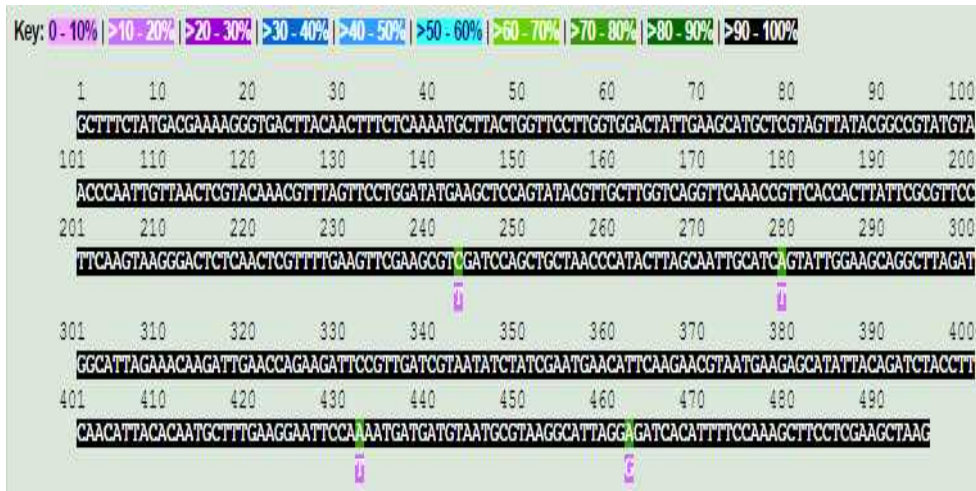
Sequence type	<i>gyrB</i>	<i>pyc</i>	<i>pgm</i>	<i>leuS</i>	<i>glnA</i>	<i>dalR</i>	<i>pgi</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	1	1	2	1
3	2	3	3	2	2	3	2
4	1	4	4	3	1	4	3
5	1	4	4	3	2	4	3

6	1	5	5	4	1	2	1
7	3	6	2	5	2	5	4
8	4	7	2	6	2	6	5
9	1	8	6	7	2	7	6
10	5	7	2	6	3	6	5
11	3	6	2	1	4	5	7
12	1	2	7	8	1	8	8
13	4	4	2	6	5	9	9
14	1	5	8	4	2	10	8
15	6	6	2	9	1	2	2
16	6	9	2	10	2	2	8
17	6	5	5	4	1	2	1

dalR



glnA



gyrB



leuS



pgl



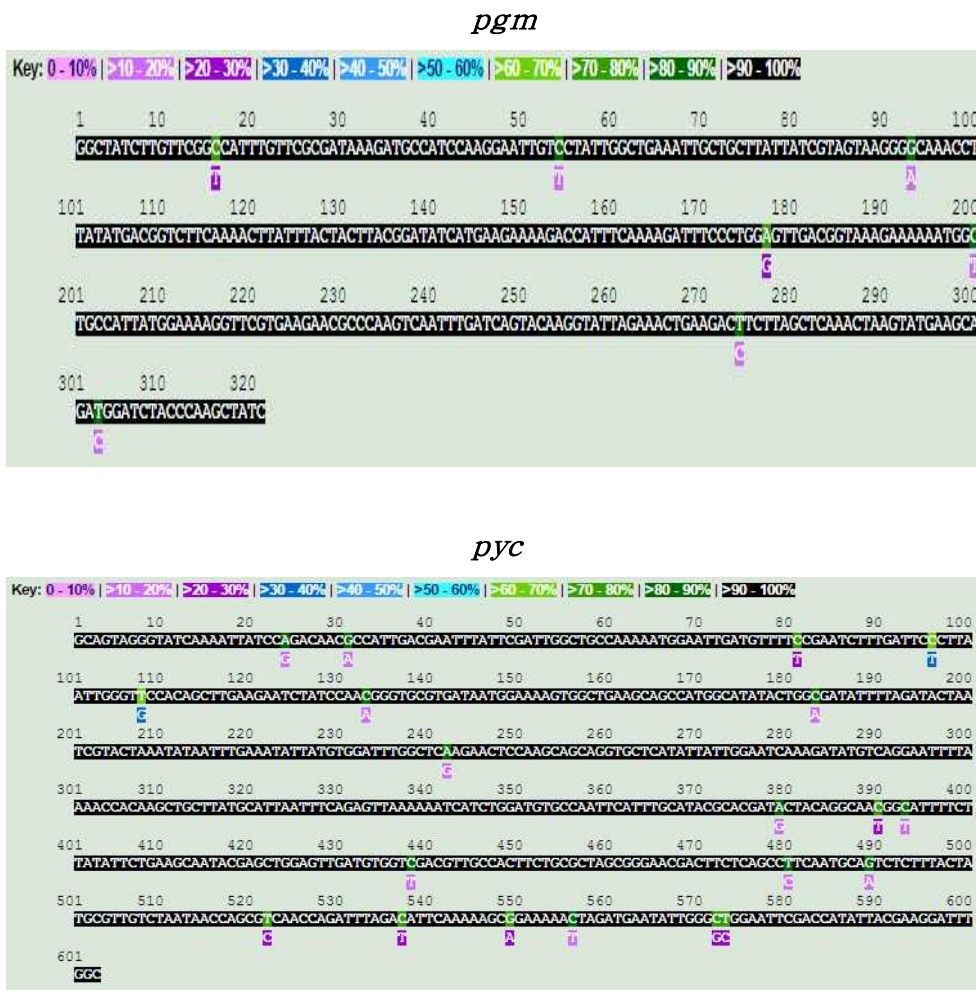


Figure 4-11. Polymorphic site analysis of MLST for *Pediococcus pentosaceus*.

- *Saccharomyces cerevisiae*의 MLST primer는 Table 4-26과 4-27에 정리하였고, *Streptococcus salivarius*와 *S. thermophilus*의 MLST primer는 Table 4-28과 4-29에 각각 나타내었다.

Table 4-26. MLST primers for *Saccharomyces cerevisiae*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>acc1</i>	acc1_F	Acetyl-CoA	GCAAGAGAAATTTTGATTC	2	492
	acc1_R	carboxylase	AAGG TTCATCAACATCATCTAAA		
<i>gln4</i>	gln4_F	Glutamine-tRNA	TG GAGATTGTCAAGAATAAAA	5	489

	gln4_R	ligase	AGGT GTCTCTCTCATCCTTTGGAC C GAGCCTTCTATGAATGATT		
<i>adp1</i>	adp1_F adp1_R	Putative ATP-dependent permease	TG TTGATCGACGAACCCGATT AT TTTATGCACGCTGGTACTA C	1	585
<i>rpn2</i>	rpn2_F rpn2_R	Proteasome regulatory particle base subunit RPN2	GAGACCCATACCTAATGCA G AGAAGAATTGTTGCTGTTA	3	450
<i>ala1</i>	ala1_F ala1_R	Alanine--tRNA ligase	CTG ATTACCTTTACCACCAGCCT T	7	552

Table 4-27. Another MLST primers for *Saccharomyces cerevisiae*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
	YOR377W_ F	Alcohol	CAGATTGCCGCTCACAA C		
<i>atfl</i>	YOR377W_ R	O-acetyltransferase	AAATGCTTGGTGCCAGG A	11	401
	YNL103W_ F		CGAGGATAAGCCGAGCA A		
<i>met4</i>	YNL103W_ R	Met4p	GCGCATCCACTCCATTG T	10	395
	YIL075C_F YIL075C_R	Proteasome regulatory particle base subunit RPN2	CGGCCGTCAAGAGTTAG C TATCATGGCAGCCTGAC	8	397
	YMR047C_ F	FG-nucleoporin	G AAGCAACTGTCACCAAC ACG		
<i>nup11</i>	YMR047C_ R	NUP116	CTTCCCCATCGTTCTTT GAG	10	501
	YCL032W_ F		CATCTGCGAAATTGCA AGAA		
<i>ste50</i>	YCL032W_ R	Ste50p	ATCCCCATAGCAAATGA CCA	10	503
	YBL081W_ F	Hypothetical protein	TACCGCAGTTTGAAGCT CCT	10	501
<i>ybl081</i>	YBL081W_ w		GGAGAACTGCGTCTGGT		

R	TGT			
	TCGCAGAATTAGGGAG			
IntAY	AAGT		18	600
*	ACTTCCCGACAGCAGAT			
	TC			

*Intergenic locus between ORFs APPI and YPT53 (YNL094W and YNL093W).

Table 4-28. Another MLST primers for *Streptococcus salivarius*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
			GATCAGGTCACGATGTT		
<i>ilvC</i>	ilvC-up	Ketol-acid reductoisomerase	AT	14	492
	ilvC-dn		GGTGCATATCCAGCTTC		
<i>ddlA</i>	ddlA-up	D-alanine D-alanine ligase	AGT TCAAGTGTGGCTATGGA	24	459
	ddlA-dn		GTAGATGGCTCCATCCT		
<i>glcK</i>	glcK-up	glucose kinase	C TGGGCAGAACTCAAGA	13	470
	glcK-dn		AACACCACCACCGATAA		
<i>pyrE</i>	pyrE-up	Orotate phosphoribosyltransferase	C GTCCGTCTGCAGTGATG	20	519
	pyrE-dn		T CGCTTTACGGAGGAACA		
<i>thrS</i>	thrS-up	Threonyl-tRNA synthetase	T ATCACTGAAGATGGAAG	17	497
	thrS-dn		C CCAAGTTTACGGTGGTC		
<i>dnaE</i>	dnaE-up	DNA polymerase III	A GGACTGGGAGCCTGGGA	19	480
	dnaE-dn		T ACTCCCTGCAGCAGACC		
<i>pepO</i>	pepOup	endopeptidase	C AACTCTACCACCCTTAT	19	460
	pepOdn		GA GGTTTGTTCCACTTGCT		
			CCAG		

Table 4-29. Another MLST primers for *Streptococcus thermophilus*

Gene	Primers	Protein	Sequence(5' → 3')	Alleles	Standard length(bp)
<i>ddlA</i>	ddlA-F	D-alanine D-alanine ligase	-1)	3	459
	ddlA-R				
<i>thrS</i>	thrS-F	Threonyl-tRNA	-	5	497

	thrS-R	synthetase Orotate			
<i>pyrE</i>	pyrE-F pyrE-R	phosphoribosyltransf erase	-	13	519
<i>dnaE</i>	dnaE-F dnaE-R	DNA polymerase III	-	5	480
<i>glcK</i>	glcK-F glcK-R	Glucokinase	-	7	470
<i>pepO</i>	pepOF pepOR	Endopeptidase	-	6	460
<i>ilvC</i>	ilvC-F ilvC-R	Ketol-acid reductoisomerase	-	2	492
<i>tkt</i>	tkt-F tkt-R	Transketolase	-	11	527

¹⁾Not open to public

(3) *P. pentosaceus*를 모델 균주로 한 MLST 분석의 유용성 평가

- 본 연구과제는 건국대학교를 주관기관으로 하여 총 8개 기관이 참여하여 식품산업에 사용될 수 있는 우수 종균을 탐색하고 기능성과 발효능을 분석하여 우수 종균을 확보하고 이를 상용화하는 데 있다.
- 이를 위하여 각 참여기관에서는 다양한 분리원으로부터 종균으로 사용할 수 있는 균주를 분리, 탐색하여 그 특성들을 데이터베이스화하고 있으며, 분리된 균주들의 내산성, 내담즙성 등의 생리적 특성, protease 및 amylase 생산능 등의 발효특성, 향산화능, 향암, 항염증 등의 기능성 등을 분석하여 상용화 종균으로 사용할 수 있는 후보 균주 18주를 1차로 선정하였다.
- 선정된 균주는 유산균주 13주, 효모 5주로서 이를 Table 4-30에 정리하였다.
- 이들 균주 중에서 *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *S. cerevisiae*에 대한 MLST 분석은 타 연구자에 의해 이루어진 바 있으나, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. citreum*, *L. mesenteroides* 균주에 대한 MLST 분석은 전혀 연구된 바 없다.
- 따라서 본 연구에서는 기존에 MLST 분석이 이루어진 *P. pentosaceus*를 모델 균주로 하여 MLST 분석의 유용성을 평가하였다.

Table 4-30. Candidate strains selected for the fermentation starters

Microorganisms	Strain
<i>Lactobacillus brevis</i>	B151
<i>Lactobacillus brevis</i>	G1
<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 200019
<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 200054
<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 200080

<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	KCCM 200173
<i>Lactobacillus fermentum</i>	KCCM 200060
<i>Lactobacillus plantarum</i>	G72
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lb41
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ln4
<i>Leuconostoc citreum</i>	S.Pum19
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	H40
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC28
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 200270
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 200278
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 200280
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 200281
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 200284

- 특정 균주를 대상으로 MLST와 같은 유전자 지문 분석을 하기 위해서는 유전자 지문의 데이터베이스가 필요하고 이를 위해서는 일정 수준 이상의 미생물 strain 수가 요구되기 때문에 본 연구팀에서는 다양한 분리원으로부터 유산균주를 분리하여 16S ribosomal DNA 유전자의 염기서열을 분석하고 이로부터 phylogenetic tree를 작성하여 종 수준의 동정을 수행하였다.
- 그 결과 Table 4-31에 나타낸 바와 같이 총 414주의 유산균주를 분리 동정 확보하였다.

Table 4-31. Identification of lactic acid bacteria strains

No.	Identification	Strain	Source
1	<i>Enterobacter asburiae</i>	CB 001	Chinese cabbage
2	<i>Enterobacter asburiae</i>	CB 002	Chinese cabbage
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	GO 003	Green onion
4	<i>Enterobacter kobei</i>	BK 012	Kimchi
5	<i>Enterobacter kobei</i>	CK3 019	Kimchi
6	<i>Enterobacter ludwigii</i>	CK1 005	Kimchi
7	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GO 001	Green onion
8	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	BK 008	Kimchi
9	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	CK1 011	Kimchi
10	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	CK3 018	Kimchi
11	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	DC1 004	Dongchimi
12	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	DC1 005	Dongchimi
13	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	DC1 009	Dongchimi
14	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	GOK 007	Kimchi
15	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	GOK 008	Kimchi
16	<i>Enterococcus faecalis</i>	EFK2	Kimchi
17	<i>Enterococcus faecalis</i>	JG004	Jeotgal
18	<i>Enterococcus faecium</i>	EFK1	Kimchi

19	<i>Enterococcus faecium</i>	EFK2	Kimchi
20	<i>Enterococcus faecium</i>	EFR2	Radish
21	<i>Enterococcus faecium</i>	EFK3	Kimchi
22	<i>Enterococcus faecium</i>	EFG15	Grape
23	<i>Enterococcus faecium</i>	AKC3	Kimchi
24	<i>Enterococcus faecium</i>	AKC4	Kimchi
25	<i>Enterococcus faecium</i>	CKJ1	Cheonggukjang
26	<i>Enterococcus faecium</i>	CKJ2	Cheonggukjang
27	<i>Enterococcus faecium</i>	CKJ8	Cheonggukjang
28	<i>Enterococcus faecium</i>	EFD1	Doenjang
29	<i>Enterococcus faecium</i>	EFD2	Doenjang
30	<i>Enterococcus faecium</i>	ERK2	Radich kimchi
31	<i>Enterococcus faecium</i>	JAC1	Cheonggukjang
32	<i>Enterococcus faecium</i>	JAC2	Cheonggukjang
33	<i>Enterococcus faecium</i>	MS1	Doenjang
34	<i>Enterococcus faecium</i>	MS2	Doenjang
35	<i>Enterococcus faecium</i>	NJG1-2	Salted small octopus
36	<i>Enterococcus faecium</i>	ON-70A	Onion
37	<i>Enterococcus faecium</i>	ON-75A	Onion
38	<i>Enterococcus faecium</i>	PR1-4	unidentified
39	<i>Enterococcus faecium</i>	PR1-5	unidentified
40	<i>Enterococcus faecium</i>	PR7-12	unidentified
41	<i>Enterococcus faecium</i>	PR9-1	unidentified
42	<i>Enterococcus faecium</i>	PR9-2	unidentified
43	<i>Enterococcus faecium</i>	PS1-11	unidentified
44	<i>Enterococcus faecium</i>	PS1-12	unidentified
45	<i>Enterococcus faecium</i>	PS6-7	unidentified
46	<i>Enterococcus faecium</i>	PS7-5	unidentified
47	<i>Enterococcus faecium</i>	PS8-2	unidentified
48	<i>Enterococcus faecium</i>	RPL01	Gochujang
49	<i>Enterococcus faecium</i>	RPL02	Gochujang
50	<i>Enterococcus faecium</i>	SC54	Pickled persimmon
51	<i>Enterococcus faecium</i>	SC56	Pickled persimmon
52	<i>Enterococcus faecium</i>	SC57	Pickled persimmon
53	<i>Enterococcus faecium</i>	SC58	Pickled persimmon
54	<i>Enterococcus faecium</i>	SC62	Pickled burdock
55	<i>Enterococcus faecium</i>	SC66	Pickled deodeok
56	<i>Enterococcus faecium</i>	SC67	Pickled deodeok
57	<i>Enterococcus faecium</i>	SC68	Pickled deodeok
58	<i>Enterococcus faecium</i>	SC69	Pickled deodeok
59	<i>Enterococcus faecium</i>	SC70	Pickled deodeok
60	<i>Enterococcus faecium</i>	SC71	Pickled deodeok
61	<i>Enterococcus faecium</i>	SC72	Pickled deodeok
62	<i>Enterococcus faecium</i>	SC73	Pickled deodeok
63	<i>Enterococcus faecium</i>	SC74	Pickled deodeok
64	<i>Enterococcus faecium</i>	SC75	Pickled deodeok
65	<i>Enterococcus faecium</i>	SC76	Pickled deodeok
66	<i>Enterococcus faecium</i>	SC77	Pickled deodeok

67	<i>Enterococcus faecium</i>	SC78	Pickled deodeok
68	<i>Lactobacillus casei</i>	GOM	Ragwort
69	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	CCK	Kimchi
70	<i>Lactobacillus brevis</i>	LBK1	Kimchi
71	<i>Lactobacillus brevis</i>	LBK10	Kimchi
72	<i>Lactobacillus brevis</i>	LBK14	Kimchi
73	<i>Lactobacillus curvatus</i>	BK3, CMC 39	Kimchi
74	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DC2 001	Dongchimi
75	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DC2 003	Dongchimi
76	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DC2 009	Dongchimi
77	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DC2 012	Dongchimi
78	<i>Lactobacillus curvatus</i>	PS7-1	unidentified
79	<i>Lactobacillus curvatus</i>	SPR7	Salted pollack roe
80	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	sal.cla3	Salted clam
81	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK1	Kimchi
82	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	SC59	Pickled burdock
83	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	SC61	Pickled burdock
84	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	SC63	Pickled burdock
85	<i>Lactobacillus pentosus</i>	SC48	Salted oyster
86	<i>Lactobacillus pentosus</i>	SC60	Pickled burdock
87	<i>Lactobacillus pentosus</i>	SC64	Pickled burdock
88	<i>Lactobacillus pentosus</i>	SC65	Pickled burdock
89	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LPK2	Kimchi
90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LPK4	Kimchi
91	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KLP1	Kimchi
92	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KLP3	Kimchi
93	<i>Lactobacillus plantarum</i>	SC25	Salted small octopus
94	<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF1	Jeotgal
95	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSR1	Radish
96	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK1	Radish kimchi
97	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK2	Kimchi
98	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK2-2	Kimchi
99	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSR2	Radish
100	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSR2-2	Radish
101	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSRK2	Radish kimchi
102	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK3	Kimchi
103	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK3-2	Kimchi
104	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK7	Kimchi
105	<i>Lactobacillus sakei</i>	blue.Be13	Black bean
106	<i>Lactobacillus sakei</i>	blue.Be3	Black bean
107	<i>Lactobacillus sakei</i>	CRJ1	Changnanjeot
108	<i>Lactobacillus sakei</i>	CRJ2	Changnanjeot
109	<i>Lactobacillus sakei</i>	JSL2	Doenjang
110	<i>Lactobacillus sakei</i>	LSK2-3	Kimchi
111	<i>Lactobacillus sakei</i>	ma.KC20	Kimchi
112	<i>Lactobacillus sakei</i>	PR-009	Dongchimi
113	<i>Lactobacillus sakei</i>	PS2-14	unidentified
114	<i>Lactobacillus sakei</i>	PS2-2	unidentified
115	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla10	Salted clam

116	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla11	Salted clam
117	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla17	Salted clam
118	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla22	Salted clam
119	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla23	Salted clam
120	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla6	Salted clam
121	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla7	Salted clam
122	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla8	Salted clam
123	<i>Lactobacillus sakei</i>	sal.cla9	Salted clam
124	<i>Lactobacillus sakei</i>	SJK8	Kimchi
125	<i>Lactobacillus sakei</i>	SPR14	Salted pollack roe
126	<i>Lactobacillus sakei</i>	SPR2	Salted pollack roe
127	<i>Lactobacillus sakei</i>	SPR3	Salted pollack roe
128	<i>Lactobacillus sakei</i>	SQ1-1	Salted squid
129	<i>Lactobacillus sakei</i>	SQ2-1	Salted squid
130	<i>Lactobacillus sakei</i>	SQ2-2	Salted squid
131	<i>Lactobacillus sakei</i>	Y-KC11	Kimchi
132	<i>Lactobacillus sakei</i>	Y-KC13	Kimchi
133	<i>Lactobacillus sakei</i>	Y-KC15	Kimchi
134	<i>Lactobacillus sakei</i>	Y-KC4	Kimchi
135	<i>Lactobacillus sakei</i>	Y-KC9	Kimchi
136	<i>Lactococcus lactis</i>	LLM1	Mushroom
137	<i>Lactococcus lactis</i>	LLM2	Mushroom
138	<i>Lactococcus lactis</i>	LLP3	Pumpkin
139	<i>Lactococcus lactis</i>	LLG13	Grape
140	<i>Lactococcus lactis</i>	LLP20	Green pepper
141	<i>Lactococcus lactis</i>	LLR33	Radish
142	<i>Lactococcus lactis</i>	LLC43	Chinese cabbage
143	<i>Lactococcus lactis</i>	Bro17	Broccoli
144	<i>Lactococcus lactis</i>	GP-002	Green pepper
145	<i>Lactococcus lactis</i>	SJ	Salted shirimp
146	<i>Leuconostoc citreum</i>	LCK1	Kimchi
147	<i>Leuconostoc citreum</i>	LCK1-2	Kimchi
148	<i>Leuconostoc citreum</i>	LCK2	Kimchi
149	<i>Leuconostoc citreum</i>	CMK2	Kimchi
150	<i>Leuconostoc citreum</i>	NJ1	Small octopus
151	<i>Leuconostoc citreum</i>	NJG3-1	Salted small octopus
152	<i>Leuconostoc citreum</i>	OJ1	Salted oyster
153	<i>Leuconostoc citreum</i>	S.Pum19	Sweet pumpkin
154	<i>Leuconostoc citreum</i>	SC53	Salted small octopus
155	<i>Leuconostoc citreum</i>	SF4	Jeotgal
156	<i>Leuconostoc citreum</i>	Y-KC19	Kimchi
157	<i>Leuconostoc citreum</i>	Y-KC2	Kimchi
158	<i>Leuconostoc citreum</i>	Y-KC3	Kimchi
159	<i>Leuconostoc fallax</i>	LFD5	Doenjang
160	<i>Leuconostoc fallax</i>	LRK1	Radich kimchi
161	<i>Leuconostoc lactis</i>	LLR1	Radish
162	<i>Leuconostoc lactis</i>	LLR2	Radish
163	<i>Leuconostoc lactis</i>	C3	Radish
164	<i>Leuconostoc lactis</i>	S.Pum21	Sweet pumpkin

165	<i>Leuconostoc lactis</i>	SBC001	Chives
166	<i>Leuconostoc lactis</i>	SBC005	Chives
167	<i>Leuconostoc lactis</i>	URDP002	Dried persimmon
168	<i>Leuconostoc lactis</i>	S-Per.s12	Persimmon
169	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMK2	Kimchi
170	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMR3	Radish
171	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMR5	Radish
172	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMR6	Radish
173	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMK2-2-1	Kimchi
174	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMK2-2-2	Kimchi
175	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMK2-1	Kimchi
176	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMK2-2	Kimchi
177	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1-1 BK	Kimchi
178	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1-2 BK	Kimchi
179	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2-1 BK	Kimchi
180	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2-2 BK	Kimchi
181	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 12	Kimchi
182	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 14	Kimchi
183	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 24	Kimchi
184	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 25	Kimchi
185	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 29	Kimchi
186	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 31	Kimchi
187	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 36	Kimchi
188	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BK3, CMC 38	Kimchi
189	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GKC1	Kimchi
190	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GKC2	Kimchi
191	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	JAM1	Kimchi
192	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	K1	Kimchi
193	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMK6	Kimchi
194	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MSJ1	Salted clam
195	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NJG3-2	Salted small octopus
196	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NMK2	Radish kimchi
197	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	RA-042	Radish
198	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	SFJ1	Jeotgal
199	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	SJK1	Kimchi
200	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	YKC2	Kimchi
201	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	YKC8	Kimchi
202	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	YLB8	Doenjang
203	<i>Leuconostoc citreum</i>	P.s8	Pear
204	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	sal.cla5	Salted clam
205	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Y-KC6	Kimchi
206	<i>Pediococcus lolii</i>	PS6-6	unidentified
207	<i>Pediococcus lolii</i>	PS9-13	unidentified
208	<i>Pediococcus lolii</i>	PS9-14	unidentified
209	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPK1	Kimchi
210	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPK1-2	Kimchi
211	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPK6	Kimchi
212	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPD7	Doenjang
213	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPK7	Kimchi

214	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PP7	Pumpkin
215	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPT16	Tangerine
216	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PPG31	Green pepper
217	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GO-005	Green onion
218	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GO-008	Green onion
219	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GO-012	Green onion
220	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GO-026	Green onion
221	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GP-001	Green pepper
222	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KW-001	Kiwi
223	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KW-003	Kiwi
224	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-184	Onion
225	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-188	Onion
226	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-192	Onion
227	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-193	Onion
228	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-194	Onion
229	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-207	Onion
230	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-208	Onion
231	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-237	Onion
232	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-241	Onion
233	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-242	Onion
234	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-250	Onion
235	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-255	Onion
236	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-25A	Onion
237	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-262	Onion
238	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-263	Onion
239	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-266	Onion
240	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-269	Onion
241	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-272	Onion
242	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-295	Onion
243	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-29A	Onion
244	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-303	Onion
245	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-304	Onion
246	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-30A	Onion
247	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-32A	Onion
248	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-33A	Onion
249	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-34A	Onion
250	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-35A	Onion
251	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-39A	Onion
252	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-40A	Onion
253	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-41A	Onion
254	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-42A	Onion
255	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-43A	Onion
256	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-44A	Onion
257	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-45A	Onion
258	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-47A	Onion
259	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-50A	Onion
260	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-51A	Onion
261	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-53A	Onion
262	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-55A	Onion

263	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-57A	Onion
264	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-59A	Onion
265	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-60A	Onion
266	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-61A	Onion
267	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-62A	Onion
268	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-63A	Onion
269	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-66A	Onion
270	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-76A	Onion
271	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-80A	Onion
272	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-81A	Onion
273	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-82A	Onion
274	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-83A	Onion
275	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-84A	Onion
276	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-87A	Onion
277	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-89A	Onion
278	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-90A	Onion
279	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-91A	Onion
280	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-92A	Onion
281	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ON-93A	Onion
282	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PC-001	Peach
283	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PC-003	Peach
284	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PCK1	Cucumber kimchi
285	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PCK2	Cucumber kimchi
286	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PE-001	Pear
287	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PR-005	Dongchimi
288	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PR3	Radish
289	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PRK1	Radich kimchi
290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PRK2	Radich kimchi
291	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PS10-4	unidentified
292	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PS8-1	unidentified
293	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RA-035	Radish
294	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-001	Red pepper
295	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-002	Red pepper
296	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-003	Red pepper
297	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-005	Red pepper
298	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-006	Red pepper
299	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-007	Red pepper
300	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-008	Red pepper
301	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-009	Red pepper
302	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-010	Red pepper
303	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-013	Red pepper
304	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-014	Red pepper
305	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RP-015	Red pepper
306	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC1	Salted small octopus
307	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC10	Salted small octopus
308	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC11	Salted small octopus
309	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC12	Salted small octopus
310	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC13	Salted small octopus
311	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC14	Salted small octopus

312	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC15	Salted small octopus
313	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC16	Salted small octopus
314	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC17	Salted small octopus
315	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC18	Salted small octopus
316	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC19	Salted small octopus
317	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC2	Salted small octopus
318	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC20	Salted small octopus
319	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC21	Salted small octopus
320	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC22	Salted small octopus
321	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC24	Salted small octopus
322	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC26	Salted small octopus
323	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC27	Salted small octopus
324	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC28	Salted small octopus
325	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC29	Salted small octopus
326	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC3	Salted small octopus
327	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC30	Salted small octopus
328	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC4	Salted small octopus
329	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC5	Salted small octopus
330	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC6	Salted small octopus
331	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC7	Salted small octopus
332	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC8	Salted small octopus
333	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SC9	Salted small octopus
334	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SFJ3	Jeotgal
335	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-019	Sweet potato
336	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-020	Sweet potato
337	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-021	Sweet potato
338	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-023	Sweet potato
339	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-024	Sweet potato
340	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-025	Sweet potato
341	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-026	Sweet potato
342	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-028	Sweet potato
343	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-030	Sweet potato
344	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-033	Sweet potato
345	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-034	Sweet potato
346	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-035	Sweet potato
347	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-036	Sweet potato
348	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-037	Sweet potato
349	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-038	Sweet potato
350	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-039	Sweet potato
351	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-040	Sweet potato
352	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-041	Sweet potato
353	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-042	Sweet potato
354	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-043	Sweet potato
355	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SP-044	Sweet potato
356	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-027	Tangerine
357	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-028	Tangerine
358	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-029	Tangerine
359	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-031	Tangerine
360	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-032	Tangerine

361	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-033	Tangerine
362	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-034	Tangerine
363	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-035	Tangerine
364	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-036	Tangerine
365	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-037	Tangerine
366	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-038	Tangerine
367	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-039	Tangerine
368	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-040	Tangerine
369	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-041	Tangerine
370	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-042	Tangerine
371	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-043	Tangerine
372	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-044	Tangerine
373	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-045	Tangerine
374	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-046	Tangerine
375	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-047	Tangerine
376	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TA-048	Tangerine
377	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	LR 006	Lotus root
378	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LR 007	Lotus root
379	<i>Staphylococcus warneri</i>	ON-197	Onion
380	<i>Staphylococcus warneri</i>	PG-001	Pomegranate
381	<i>Weissella cibaria</i>	BN-001	Banana
382	<i>Weissella cibaria</i>	Bro22	Broccoli
383	<i>Weissella cibaria</i>	Bro8	Broccoli
384	<i>Weissella cibaria</i>	S.Pum14	Sweet pumpkin
385	<i>Weissella cibaria</i>	S.Pum18	Sweet pumpkin
386	<i>Weissella cibaria</i>	S.Pum8	Sweet pumpkin
387	<i>Weissella cibaria</i>	S.Pum9	Sweet pumpkin
388	<i>Weissella cibaria</i>	SJK2	Kimchi
389	<i>Weissella cibaria</i>	SP-003	Sweet pumpkin
390	<i>Weissella cibaria</i>	SULK	Kimchi
391	<i>Weissella cibaria</i>	WK4	Kimchi
392	<i>Weissella confusa</i>	NJG2-2	Salted small octopus
393	<i>Weissella confusa</i>	WCK1	Kimchi
394	<i>Weissella kimchii</i>	BK	Kimchi
395	<i>Weissella kimchii</i>	Bro14	Broccoli
396	<i>Weissella kimchii</i>	GK3	Kimchi
397	<i>Weissella kimchii</i>	JAM3	Radish kimchi
398	<i>Weissella kimchii</i>	KL-001	Chives
399	<i>Weissella kimchii</i>	NJG2-1	Salted small octopus
400	<i>Weissella kimchii</i>	NMK3	Kimchi
401	<i>Weissella kimchii</i>	PA-001	Parsley
402	<i>Weissella kimchii</i>	PA-002	Parsley
403	<i>Weissella kimchii</i>	PR-002	Dongchimi
404	<i>Weissella kimchii</i>	S.Pum25	Sweet pumpkin
405	<i>Weissella kimchii</i>	S.Pum7	Sweet pumpkin
406	<i>Weissella kimchii</i>	SC23	Salted small octopus
407	<i>Weissella kimchii</i>	SC32	Salted scallop
408	<i>Weissella kimchii</i>	SC52	Salted oyster
409	<i>Weissella kimchii</i>	SQ3-1	Salted squid

410	<i>Weissella kimchii</i>	WK3	Radish
411	<i>Weissella kimchii</i>	WKR4	Radish
412	<i>Weissella kimchii</i>	WM-007	Watermelon
413	<i>Weissella kimchii</i>	WM-011	Watermelon
414	<i>Weissella kimchii</i>	WM-012	Watermelon

- *P. pentosaceus*를 이용한 MLST 분석의 유용성 평가를 위하여 본 연구팀에서 분리한 *P. pentosaceus* strain으로부터 genomic DNA를 다음과 같이 분리하였다.
- Lactobacilli MRS 액체배지(Difco, MI, USA)에 단일 집락을 접종하여 37°C에서 16시간 정치배양하였다. 배양액 3 mL을 13,200 rpm에서 1분 간 원심분리하여 균체를 수확하고, 상등액을 제거하였다. 이후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였고, 균체에 1 mL의 TEN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)을 첨가하여 현탁하고, 원심분리하여 배지성분을 제거하였다. SET 완충용액(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA) 500 µL를 첨가하여 현탁하고, 50 µL의 lysozyme(60 mg/mL in TEN buffer, w/v)과 3 µL의 RNase A용액을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이 반응 용액에 25 µL의 SDS(25%, w/v)와 20 µL의 proteinase K를 첨가하여 조심스럽게 혼합하고, 37°C에서 30분 간 반응시켰다. 반응 종료 후, GC binding buffer 400 µL를 첨가하여 60°C에서 10분 간 반응시키고, 200 µL의 iso-propanol(Sigma-Aldrich, MO, USA)을 첨가하여 조심스럽게 혼합하였다. 반응액을 column tube에 옮겨서 원심분리를 통하여 DNA를 column에 부착시키고, 500 µL의 washing buffer 1과 washing buffer 2를 순차적으로 첨가하여 순수하게 DNA를 부착시킨 후, 50 µL의 멸균 3차 증류수로 DNA를 용출시켰다.
- *P. pentosaceus*의 MLST primer는 Table 4-24에 나타난 7종류(*gyr*, *pyc*, *pgm*, *leuS*, *gln*, *dal*, *pgi*)를 사용하였으며, MLST 분석을 위한 PCR 조건은 다음과 같았다.
- 분리 균주의 MLST 분석을 위한 PCR은 상기 조건으로 분리된 genomic DNA를 template DNA로 사용하였고, Table 4-24의 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR은 AccuPrep[®] PreMix(Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였고, My Cycler(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰으며, PCR 조건은 94°C에서 2분, 1 cycle; 95°C에서 20초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초, 35 cycle; 72°C에서 7분 간 반응시켰다. PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 수행하였다. 분석된 염기서열의 homology 분석은 Bioedit program(Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)을 이용하였고, 염기서열의 상동성은 Clustal X(<http://www.clustal.org/clustal2>)와 Mega 5 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)에 의해 phylogenetic tree를 작성하였다.

- 분리된 균주의 genomic DNA와 PCR 산물을 확인하기 위하여 agarose gel 전기영동을 진행하였다. Genomic DNA는 0.8%(w/v), PCR 산물은 1.2%(w/v)의 agarose gel 을 제작하여 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액으로 염색하였다. 제작된 agarose gel 에 DNA를 분주하고, 100 V의 정전압으로 각각 40분, 90분 간 전기영동을 수행하였다. UV-filter가 장착된 gel document system(BIO-RAD)을 이용하여 사진촬영을 진행하였다.
- *P. pentosaceus*의 MLST 분석을 위한 agarose gel 전기영동 결과는 Figure 4-12에 나타내었고, 12개의 strain을 이용하였다. 12개의 strain은 총 6개의 식품에서 분리된 균주로서 양파에서 분리된 ON-82A, ON-188, 파에서 분리된 GO-005, GO-008, 젓갈에서 분리된 SC27, SC12, 고추에서 분리된 RP-008, RP-003, 굴에서 분리된 TA-027, TA-035, 고구마에서 분리된 SP-019, SP-026을 MLST 분석에 사용하였다.

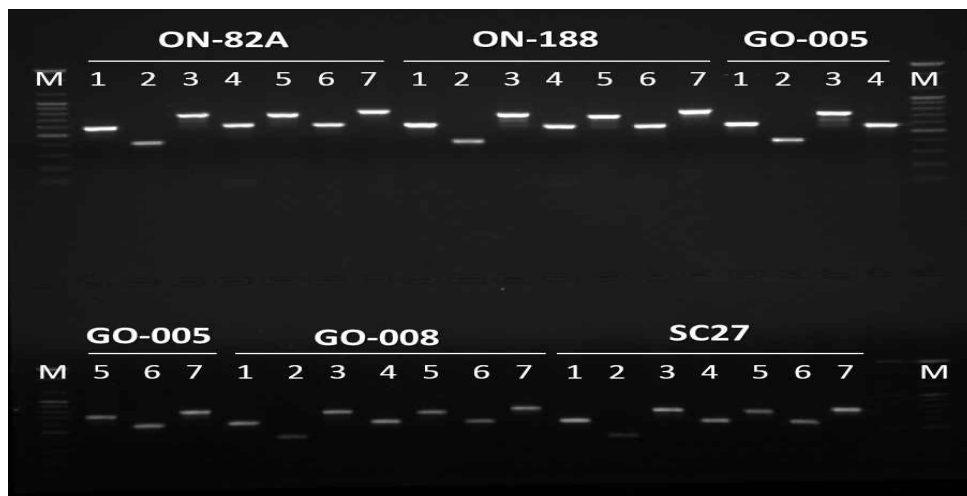




Figure 4-12. Agarose gel electrophoresis of MLST for *P. pentosaceus* strains. M, 100 bp DNA ladder; 1, *Pgi*; 2, *Pgm*; 3, *Pyc*; 4, *GyrB*; 5, *DalR*; 6, *GlnA*; 7, *LeuS*.

- 12개의 strain 중 ON-82A, ON-188, GO-005, GO-008, RP-003, RP-008을 선정하여 target gene에 대하여 sequence를 분석한 결과를 Figure 4-13과 Table 4-32와 같이 나타낼 수 있었다. Figure 4-13에 나타낸 바와 같이 MLST primer에 따른 sequence tree로서 유사한 sequence pattern을 지니고 있는 것과 가깝게 관찰되었다.
- 분석된 6 균주 모두는 *dalR* 유전자는 5번 allele, *glnA* 유전자는 4번 allele, *gyrB* 유전자는 3번 allele, *leuS* 유전자는 5번 allele, *pgi* 유전자는 4번 allele, *pyc* 유전자는 6번 allele를 동일하게 지니고 있었으나, *pgm* 유전자의 경우에는 ON-188 균주의 경우 6번 allele을 지니고 있고 다른 균주들은 2번 allele을 지니고 있었는데 이를 이용하여 sequence type을 결정한 결과 기존의 sequence type과 일치하지 않는 새로운 sequence type으로 확인되었다. 따라서 ON-188 균주의 sequence type을 18번으로, 나머지 균주들의 sequence type을 19번으로 지정하였다.
- 본 결과로 MLST 분석법은 매우 간단하고 신속한 방법으로 미생물 분류 및 추적을 위한 유용한 유전자 지문법인 것으로 확인되었으며, *P. pentosaceus*의 경우 6균주를 대상으로 MLST 분석을 한 결과 지금까지 알려져 있던 17개의 sequence type 이외에 추가로 2개의 sequence type이 밝혀진 바, 보다 많은 균주를 대상으로 MLST 분석을 할 경우 아직까지 밝혀져 있지 않은 sequence type을 확인할 수 있을 것으로 판단되었다.

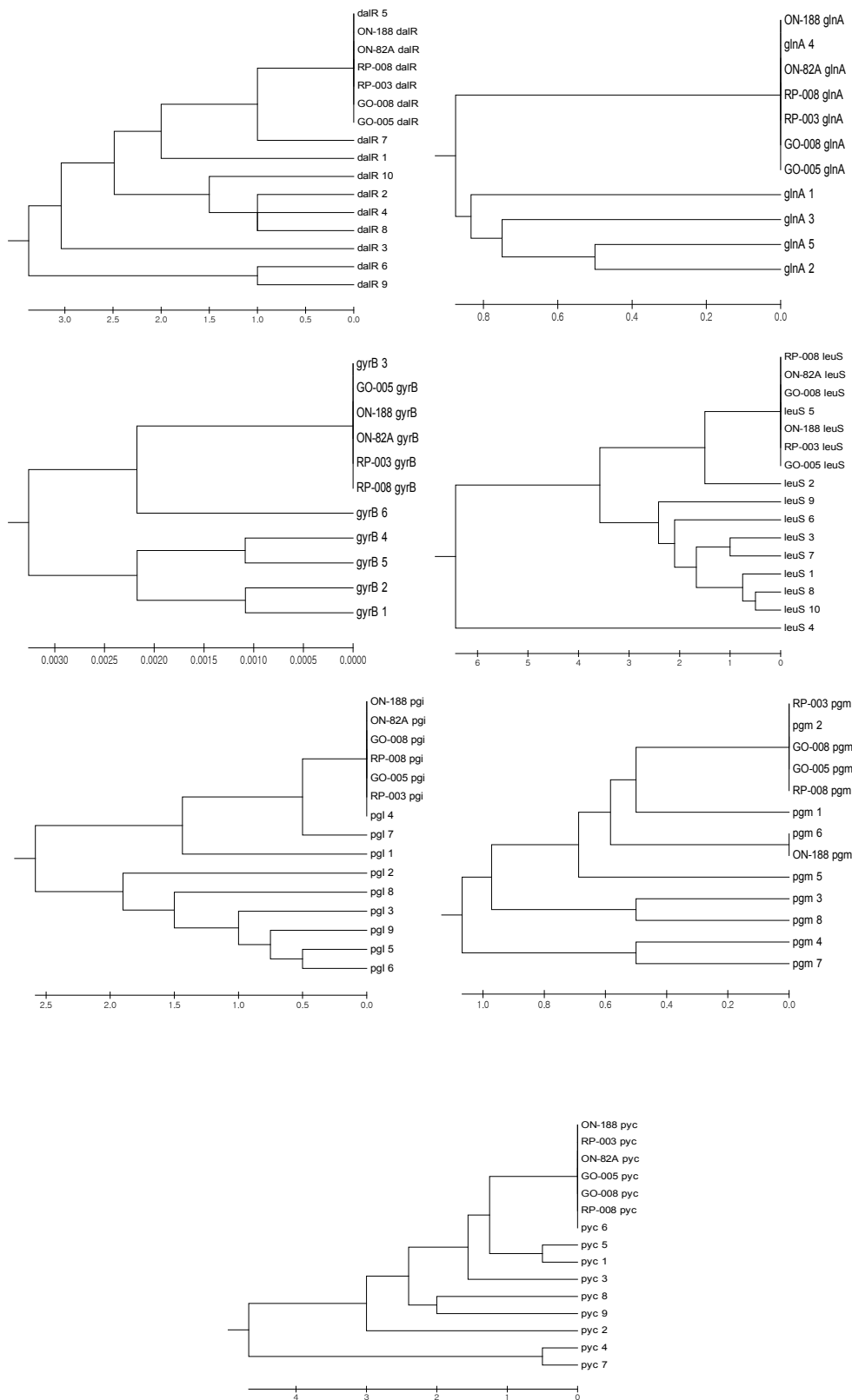


Figure 4-13. UPGMA dendrograms for 6 *P. pentosaceus* isolates sequenced for MLST.

Table 4-32. Sequence types of MLST for *P. pentosaceus* strains

Strain	<i>dalR</i>	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>leuS</i>	<i>pgi</i>	<i>pgm</i>	<i>pyc</i>	ST
ON-188	5	4	3	5	4	6	6	18
ON-82	5	4	3	5	4	2	6	19
A								
SP-008	5	4	3	5	4	2	6	19
SP-003	5	4	3	5	4	2	6	19
GO-008	5	4	3	5	4	2	6	19
GO-005	5	4	3	5	4	2	6	19

나. Comparative genomics 기법을 이용한 유전자 표지 탐색

- 본 연구과제를 통하여 선정된 식품 발효를 위한 상용화 종균으로 사용할 수 있는 후보 균주 18주 중에서 *L. brevis*, *L. fermentum*, *Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides* 균주에 대한 MLST 분석은 전혀 연구된 바 없다.
- 따라서 이들 균주들 중에서 발효식품의 starter로 많이 사용되고 있는 *L. brevis*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*의 MLST 분석 방법을 개발하고자하며, 이를 위해 본 연구에서 MLST 분석의 모델 균주로 선정한 *P. pentosaceus*와 *L. brevis*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*의 유전체를 분석하였다.

(1) *Pediococcus pentosaceus*의 유전체 분석

- *P. pentosaceus*는 현재까지 총 4주의 genome에 대한 염기서열이 분석되었는데, 이 중 에서 *P. pentosaceus* ATCC 25745와 *P. pentosaceus* SL4는 complete level로 염기서열 결정이 완료되었으며, *P. pentosaceus* IE-3와 CGMCC는 contig level에서 염기서열이 결정되어 있다(Table 4-33).
- 따라서 complete level에서 염기서열 결정이 완료된 *P. pentosaceus* ATCC 25745와 *P. pentosaceus* SL4의 유전체를 분석하였다.

Table 4-33. Genome assembly and annotation report for *P. pentosaceus*

Pediococcus pentosaceus

Levels: All Complete [2] Contig [2] Download table

Organism/Name	Strain	CladeID	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%	Replicons	WGS	Scaffolds	Gene	Protein	Release Date	Modify Date	FTP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	ATCC 25745	20085	SAMN02598525	PRJNA388	GCA_00014505.1	●	1.83239	37.40	chromosome:NC_008525.1 CP009422.1	-	-	1795	1707	2006/10/13	2015/07/30	◆◆
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SL4	SL4	20085	SAMN02603952	PRJNA222573	GCA_009496265.1	●	1.78914	37.30	chromosome:NC_022780.1 CP006854.1	-	-	1774	1673	2013/11/08	2015/08/15	◆◆
<i>Pediococcus pentosaceus</i> IE-3	IE-3	20085	SIAMEA227526	PRJEA80991	GCA_000265875.1	○	1.80238	37.20	-	CAHU01	91	1765	1675	2012/03/26	2015/08/13	◆◆
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CGMCC 7049	CGMCC 7049	20085	SAMN02639794	PRJNA224116	GCA_000708635.1	○	1.75195	37.30	-	JDVW01	8	1755	1656	2014/06/16	2015/08/16	◆◆

Items 1 - 4 of 4 << First < Prev Page 1 of 1 Next > Last >>

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1109)

- 각 균주들의 full genome sequence는 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)에서 GenBank 파일형식으로 확보하였으며, *P. pentosaceus*의 genome을 blast atlas로 분석한 결과는 Figure 4-14에 나타내었다.
- *P. pentosaceus* ATCC 25745의 genome은 총 1,832,387 bp로 이루어져 있고 GC%는 37.4%이며 1,795개의 유전자를 보유하고 있으며, 1,707종류의 단백질을 코딩하고 있다.
- *P. pentosaceus* ATCC SL4의 genome은 총 1,789,138 bp로 이루어져 있고 GC%는 37.3%이며 1,774개의 유전자를 지니고 있으며, 1,673 종류의 단백질을 코딩하고 있다.
- Pan genome은 특정 분류군에 속하는 각각의 개체가 지니고 있는 유전자를 모두 합한 전체 유전자를 의미하고(Figure 4-15), core genome은 특정 분류군에 속하는 모든 개체가 공통적으로 지니고 있는 유전자의 개수를 의미하는 것으로 *P. pentosaceus*의 core genome의 분석 결과는 Figure 4-16에 나타내었는데 core genome은 총 1,211개로 분석되었다.

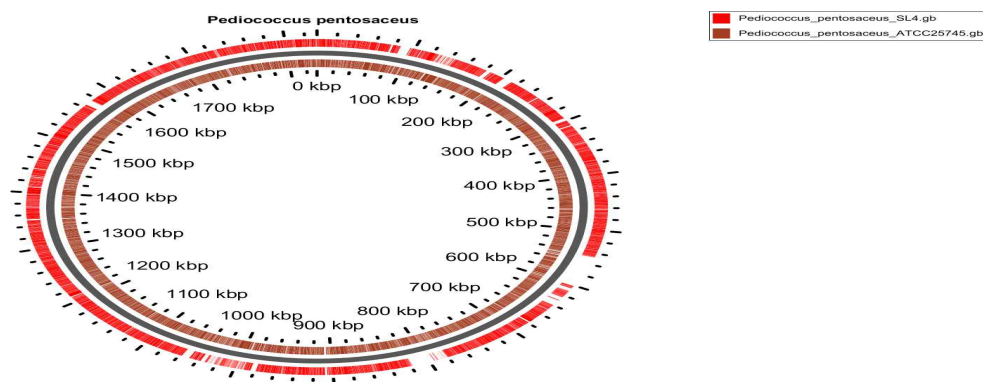


Figure 4-14. Comparison of genome sequences of *P. pentosaceus* strains.

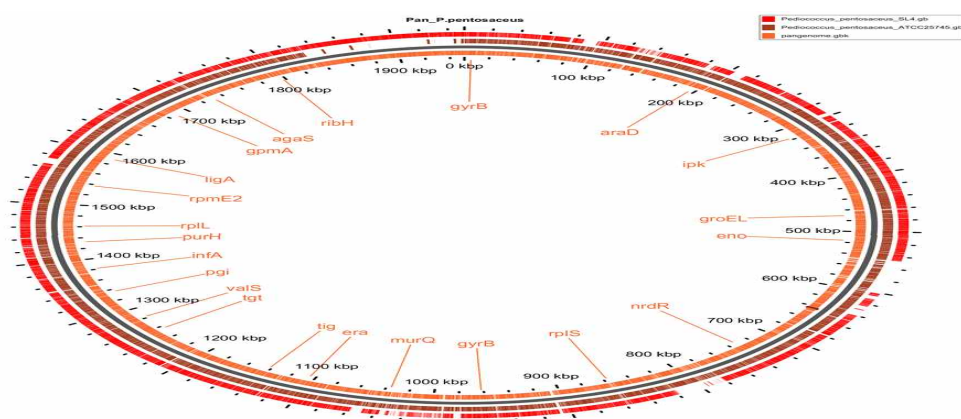


Figure 4-15. Pan genome analysis of *P. pentosaceus* strains.

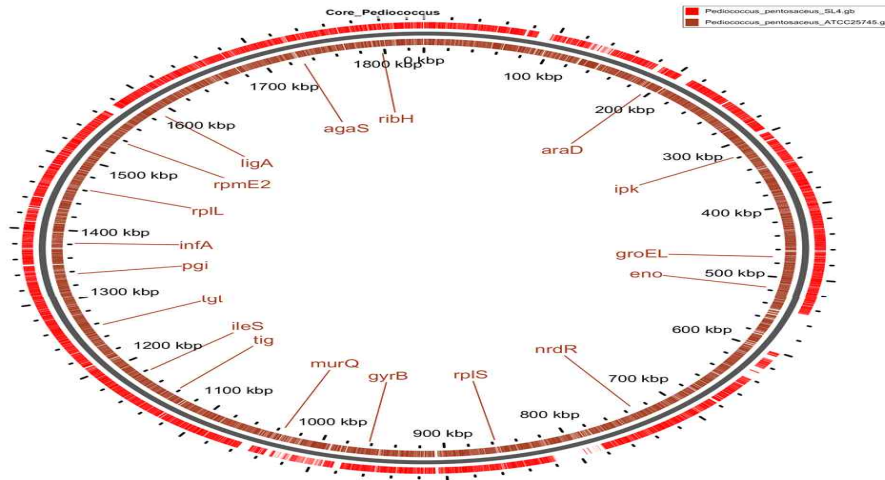


Figure 4-16. Core genome analysis of *P. pentosaceus* ATCC 25745 and *P. pentosaceus* SL4.

(2) *Lactobacillus brevis*의 유전체 분석

- *Lactobacillus brevis*는 현재까지 총 14주의 genome에 대한 염기서열이 분석되었는데, 이중에서 *L. brevis* ATCC 367과 *L. brevis* KB290은 complete level로 염기서열 결정이 완료되었고, *L. brevis* BSO464는 chromosome level로 염기서열이 결정되었으며, 나머지 11주는 scaffold 또는 contig level에서 염기서열이 결정되어 있다(Table 4-34).

Table 4-34. Genome assembly and annotation report for *Lactobacillus brevis*

Organism/Name	Strain	CladeID	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%	Replicons	WGS	Scaffolds	Gene	Protein	Release Date	Modify Date	FTP
Lactobacillus brevis ATCC 367	ATCC 367	20992	SAMN02598532	PRJNA484	GCA_000114485.1	●	2.34023	46.04	chromosome:NC_008497.1;CP000416.1 plasmid:1:NC_008498.1;CP000417.1 plasmid:2:NC_008499.1;CP000418.1	-	-	2305	2174	2006/10/13	2015/06/17	◆◆
Lactobacillus brevis KB290	KB290	20992	-	PRJDA64681	GCA_000358625.1	●	2.58788	45.57	chromosome:NC_020819.1;JAP012167.1 plasmid:phB299-1:NC_020820.1;JAP012168.1 plasmid:phB299-2:NC_020821.1;JAP012169.1 Show at 10 replicons	-	-	2581	2458	2013/03/29	2015/06/14	◆◆
Lactobacillus brevis BSO 464	BSO 464	20992	SAMN03273225	PRJNA203086	GCA_000807075.1	●	2.7232	45.46	chromosome:CP005577.1 plasmid:pl747-1:CP005578.1 plasmid:pl747-2:CP005579.1 Show at 9 replicons	-	9	2788	2606	2014/12/29	2014/12/29	◆
Lactobacillus brevis subsp. gravesensis ATCC 27395	ATCC 27395	20089	SAMN00001468	PRJNA31481	GCA_000159175.1	●	3.14466	40.20	-	ACGG01	106	2869	2721	2009/02/12	2015/06/12	◆◆
Lactobacillus brevis ATCC 14869 = DSM 20054	ATCC 14869	20992	SAMN02436750	PRJNA30325	GCA_000469365.1	●	2.47395	45.90	-	AU1NG1	86	2494	2291	2013/09/18	2015/06/19	◆◆
Lactobacillus brevis IF5	IF5	20992	SAMN03247579	PRJNA224116	GCA_000875905.1	●	2.43543	45.90	-	JXCDB1	99	3378	2256	2015/02/13	2015/06/19	◆◆
Lactobacillus brevis EV	EV	20992	SAMN02470900	PRJNA224116	GCA_000474675.1	●	2.8851	45.30	-	AUTDB1	38	2689	2768	2013/10/18	2015/06/15	◆◆
Lactobacillus brevis AG48	AG48	20992	SAMN02564891	PRJNA224116	GCA_000526755.1	●	2.59989	45.70	-	JAGRB1	9	2606	2424	2014/01/14	2015/06/15	◆◆
Lactobacillus brevis VR12	VR12	20992	SAMN00021033	PRJNA224116	GCA_000784855.1	●	2.60195	45.40	-	BBOWD1	110	2636	2486	2014/11/12	2015/06/18	◆◆
Lactobacillus brevis DmS_3003	DmS_3003	20992	SAMN02649420	PRJNA224116	GCA_000814725.1	●	2.86422	45.40	-	JOKG1	103	3548	2758	2015/01/05	2015/06/17	◆◆
Lactobacillus brevis TMW 1.445	TMW 1.445	20992	SAMN03144672	PRJNA224116	GCA_000833395.1	●	2.54065	46.00	-	JXUG1	33	2447	2104	2015/02/06	2015/06/19	◆◆
Lactobacillus brevis TMW 1.6	TMW 1.6	20992	SAMN03144670	PRJNA224116	GCA_000833415.1	●	2.52032	46.00	-	JXUE1	46	2432	2318	2015/02/06	2015/06/19	◆◆
Lactobacillus brevis 471	471	20992	SAMN03470252	PRJNA224116	GCA_001010995.1	●	2.62156	45.50	-	LBHR1	138	2663	2449	2015/05/20	2015/06/20	◆◆
Lactobacillus brevis TMW 1.313	TMW 1.313	20992	SAMN03144671	PRJNA264952	GCA_000833405.1 many frameshifted proteins	●	2.73529	45.50	-	JXUF1	11	2876	2811	2015/02/06	2015/02/06	◆◆

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1110>)

- 따라서 complete level과 chromosome level에서 염기서열 결정이 완료된 *L. brevis* ATCC 367, *L. brevis* KB290과 *L. brevis* BSO464의 유전체를 분석하였으며, Blast atlas로 분석한 결과는 Figure 4-17에 나타내었다.

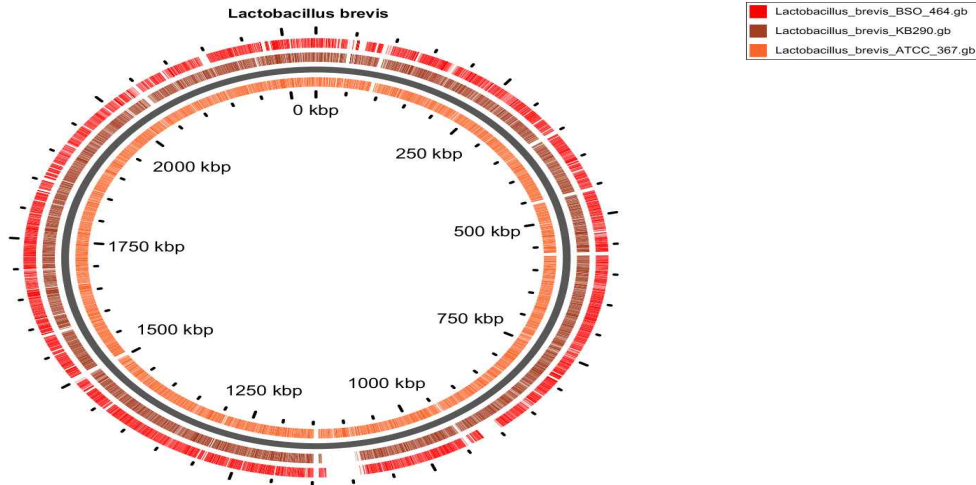


Figure 4-17. Comparison of genome sequences of *L. brevis* strains.

- *L. brevis* ATCC 367의 genome은 2,291,220 bp로 구성되어 있고, 2,305개의 유전자를 지니고 있으며 2,174개의 단백질을 coding하고 있는 반면, *L. brevis* KB290의 genome은 2,395,134 bp로 구성되어 있고, 2,581개의 유전자를 지니고 있으며 2,458개의 단백질을 coding하고 있다.
- 한편, *L. brevis* BSO464의 genome은 2,503,991 bp로 구성되어 있고 2,708개의 유전자를 지니고 있으며 2,606개의 단백질을 coding하고 있다.
- *L. brevis* ATCC 367, *L. brevis* KB290, *L. brevis* BSO464의 pan genome과 core genome을 분석한 결과를 Figure 4-18부터 4-21에 나타내었는데, 분석 program의 특성 상 2개의 genome 간의 분석만 가능하였다.
- Comparative genomics platform인 EDGAR program(Blom *et al.*, 2009)을 이용하여 pan genome과 core genome을 분석을 실시하였는데, *L. brevis* ATCC 367과 *L. brevis* KB290의 pan genome은 2,533개, core genome은 2,006개가 존재하는 것으로 분석되었다.

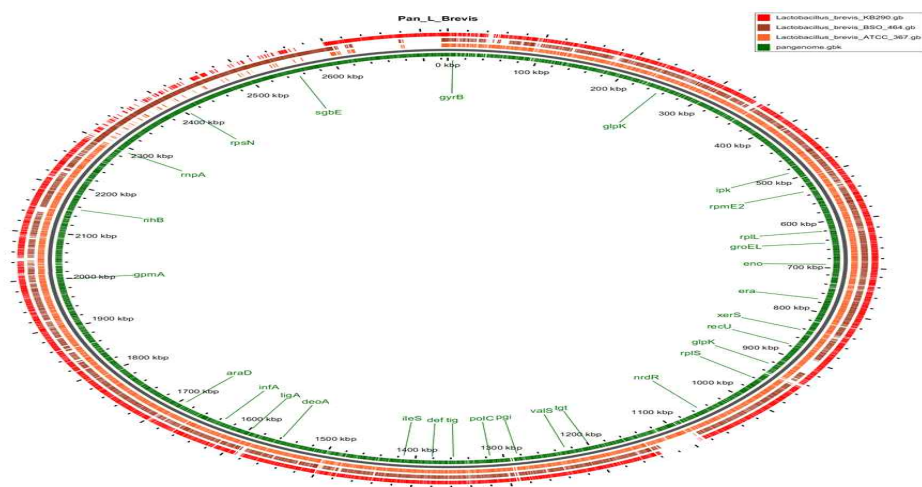


Figure 4-18. Pan genome analysis of *L. brevis* strains.

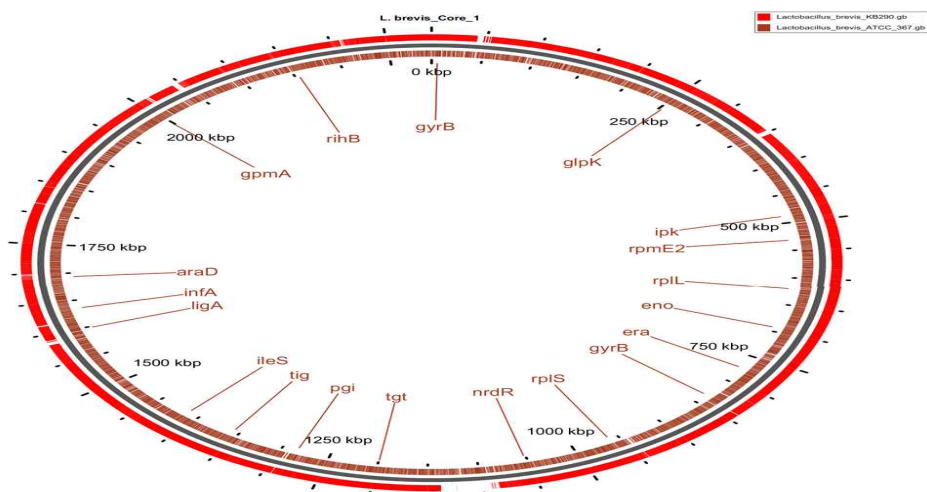


Figure 4-19. Core genome analysis of *L. brevis* ATCC 367 and *L. brevis* KB290.

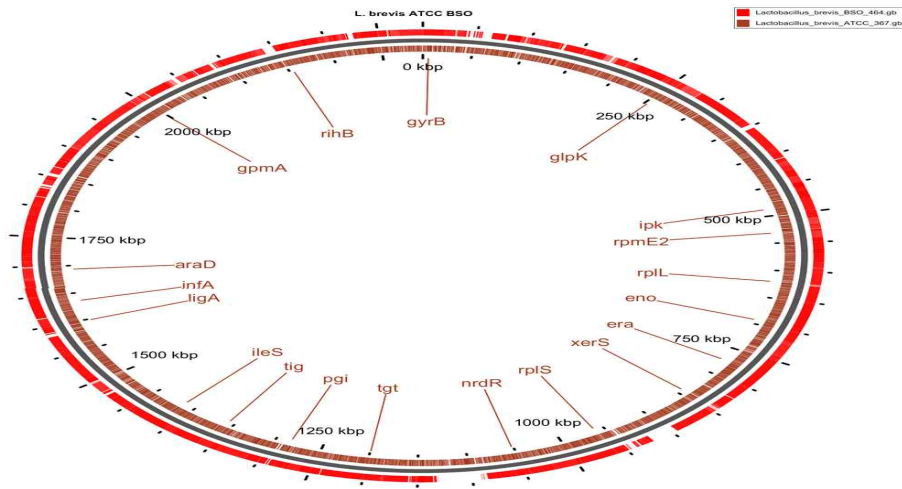


Figure 4-20. Core genome analysis of *L. brevis* ATCC 367 and *L. brevis* BSO464.

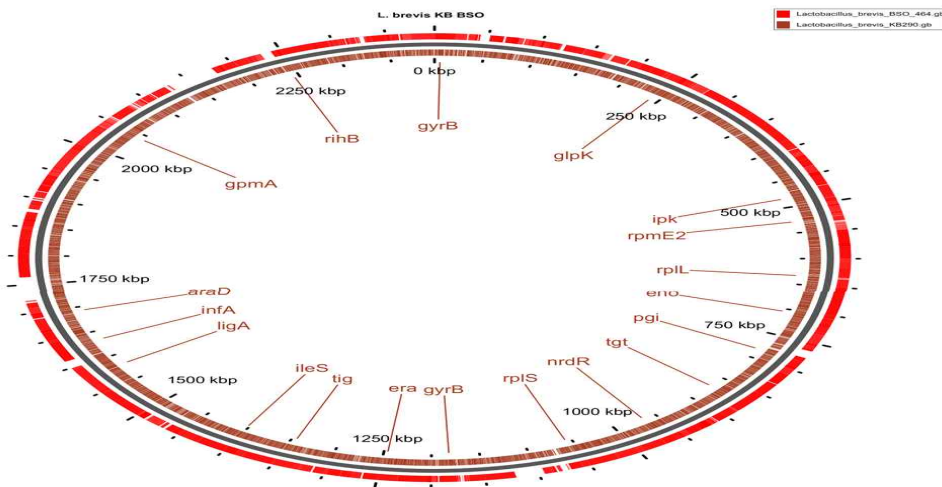


Figure 4-21. Core genome analysis of *L. brevis* KB290 and *L. brevis* BSO464.

- 그러나 Figure 4-22에 나타낸 바와 같이, comparative genomics platform인 MicroScope program(Vieira *et al.*, 2011)을 이용하여 pan genome과 core genome을 분석을 실시하였는데, *L. brevis* ATCC 14869, *L. brevis* ATCC 367과 *L. brevis* KB290의 pan genome은 3,358개, core genome은 1,867개가 존재하는 것으로 분석되었다.

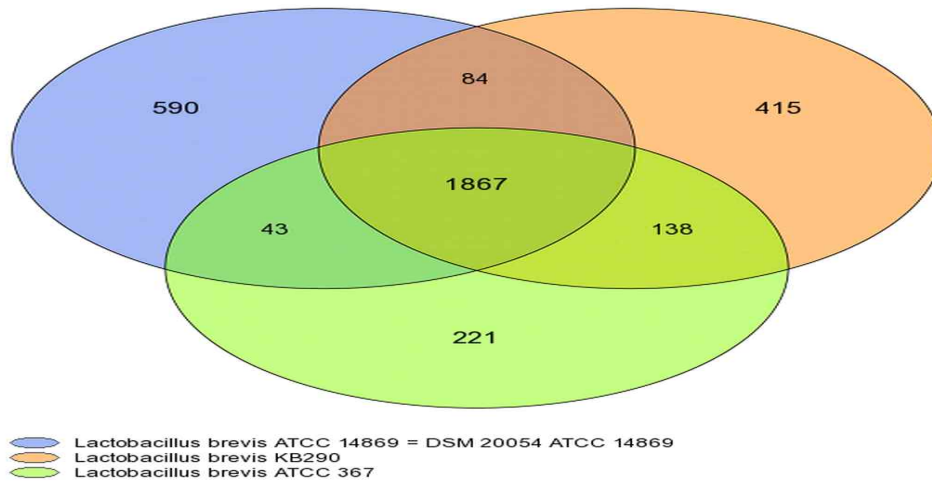


Figure 4-22. Venn diagram of *L. brevis* genome.

- 이와 같은 core genome 분석 결과와 기존의 타 연구자들이 *Lactobacillus* sp.의 MLST 분석에 사용한 target gene을 고려하여 *L. brevis*의 MLST 분석에 사용될 target gene으로 fusA(elongation factor G), gpmA(phosphoglyceromutase), gyrB(gyrase subunit B), leuS(leucyl-tRNA synthetase), pyrG(CTP synthase), recA(recombinase A), rpoB(RNA polymerase beta subunit)등 7개를 선정하였다.

(3) *Leuconostoc mesenteroides*의 유전체 분석

- *Leuconostoc mesenteroides*는 현재까지 총 12주의 genome에 대한 염기서열이 분석되었는데, 이중에서 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293과 *Leu. mesenteroides* J18, *Leu. mesenteroides* KFRI-MG, *Leu. mesenteroides* DSM 20484는 complete level로 염기서열 결정이 완료되었고, 나머지 8주는 scaffold 또는 contig level에서 염기서열이 결정되어 있다(Table 4-35).

Table 4-35. Genome assembly and annotation report of *Leu. mesenteroides*

Organism/Name	Strain	CladeID	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%	Replicons	WGS	Scaffolds	Gene	Protein	Release Date	Modify Date	FTP		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	ATCC 8293	20552	SAMN02588482	PRJNA3315	GCA_000914445.1	●	2.07576	37.66	chromosome:HC_085531.1/ICP000414.1 plasmid:pLE001.HC_204846.ICP000415.1	-	-	2061	1948	2006/10/13	2015/07/20	◆◆		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18	J18	20552	SAMN02903136	PRJNA84337	GCA_000234825.2	●	2.01664	37.68	chromosome:HC_016005.2/ICP003101.2 plasmid:pLE02.HC_016020.2/ICP003103.2 Show all 5 replicons	-	-	1980	1863	2011/11/10	2015/08/21	◆◆		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI-MG	KFRI-MG	20552	SAMN02641626	PRJNA224116	GCA_000512055.1	●	1.88641	37.73	chromosome:HZ_CP000574.1/ICP000574.1	-	-	1884	1781	2014/01/03	2015/08/15	◆◆		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>delectansum</i> DSM 20484	DSM 20484	20552	SAMN03105774	PRJNA224116	GCA_001047695.1	●	1.85473	38.04	chromosome:HZ_CP012009.1/ICP012009.1 plasmid:pGM00484.HC_CP012010.1/ICP012010.1	-	-	1876	1699	2015/07/08	2015/08/21	◆◆		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254	ATCC 19254	20552	SAMN00139187	PRJNA34629	GCA_000160595.1	●	1.73507	38.50	-	-	-	ACRV01	29	1677	1470	2008/04/22	2015/08/12	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> TIF18	TIF18	20552	SAMN02472108	PRJNA175676	GCA_000447045.1	●	1.71099	38.20	-	-	-	ATAZ01	173	1794	1263	2013/08/19	2015/08/16	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> T26	T26	20552	SAMN02767914	PRJNA224116	GCA_000806485.1	●	1.83247	38.40	-	-	-	JAUJ01	123	1692	1630	2014/05/06	2015/08/16	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P45	P45	20552	SAMN03032191	PRJNA224116	GCA_000750305.1	●	1.87419	37.50	-	-	-	JRGZ01	6	1837	1716	2014/09/19	2015/08/16	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Wk(m)17	Wk(m)17	20552	SAMN00022975	PRJNA224116	GCA_000787735.1	●	1.85932	37.60	-	-	-	BBPK01	41	1826	1725	2014/11/19	2015/08/16	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>delectansum</i> LRE15	LRE15	20552	SAMN03463642	PRJNA224116	GCA_001184265.1	●	2.00792	37.60	-	-	-	LAVH01	83	2041	1880	2015/07/21	2015/08/13	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> LRE16	LRE16	20552	SAMN03463665	PRJNA224116	GCA_001184265.1	●	2.03069	37.50	-	-	-	LAVU01	85	2088	1921	2015/07/21	2015/08/13	◆◆
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> LBT16	LBT16	20552	SAMN03463677	PRJNA224116	GCA_001184265.1	●	1.90636	37.80	-	-	-	LAVV01	65	1929	1701	2015/07/21	2015/08/13	◆◆

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1078>)

- 따라서 complete level에서 염기서열 결정이 완료된 *Leu. mesenteroides* ATCC 8293 과 *Leu. mesenteroides* J18, *Leu. mesenteroides* KFRI-NG, *Leu. mesenteroides* DSM 20484의 유전체를 분석하였다(Figure 4-23).
- *Leu. mesenteroides* ATCC 8293의 genome은 2,038,396 bp로 구성되어 있고, 2,061개의 유전자를 지니고 있으며 1,948개의 단백질을 coding하고 있는 반면, *Leu. mesenteroides* J18의 genome은 1,900,120 bp로 구성되어 있고, 1,980개의 유전자를 지니며 1,863개의 단백질을 coding하고 있다.
- 또한 *Leu. mesenteroides* KFRI-MG의 genome은 1,896,413 bp로 구성되어 있고, 1,884개의 유전자를 지니고 있으며 1,781개의 단백질을 coding하고 있는 반면, *Leu. mesenteroides* DSM 20484의 genome은 1,818,633 bp로 구성되어 있고, 1,876개의 유전자를 지니며 1,699개의 단백질을 coding하고 있다.
- 상기 4균주에 대하여 pan genome과 core genome에 대하여 분석한 결과를 Figure 4-23부터 4-30에 도식화하였다. *Leu. mesenteroides* ATCC 8293과 *Leu. mesenteroides* J18의 genome을 EDGAR program(ver.1.3)을 이용하여 pan genome과 core genome을 분석한 결과 pan genome은 1,833개, core genome은 1,698개가 존재하는 것으로 분석되었다.

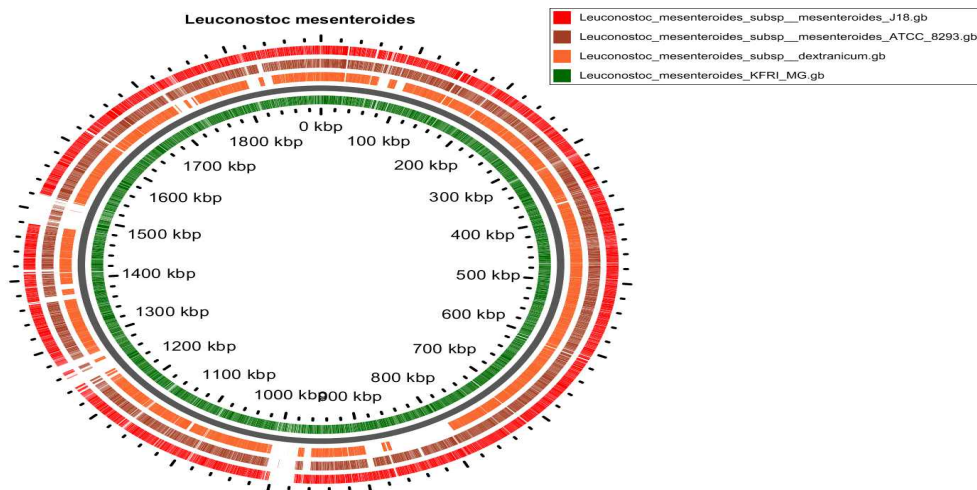


Figure 4-23. Genome analysis of *Leu. mesenteroides* strains.

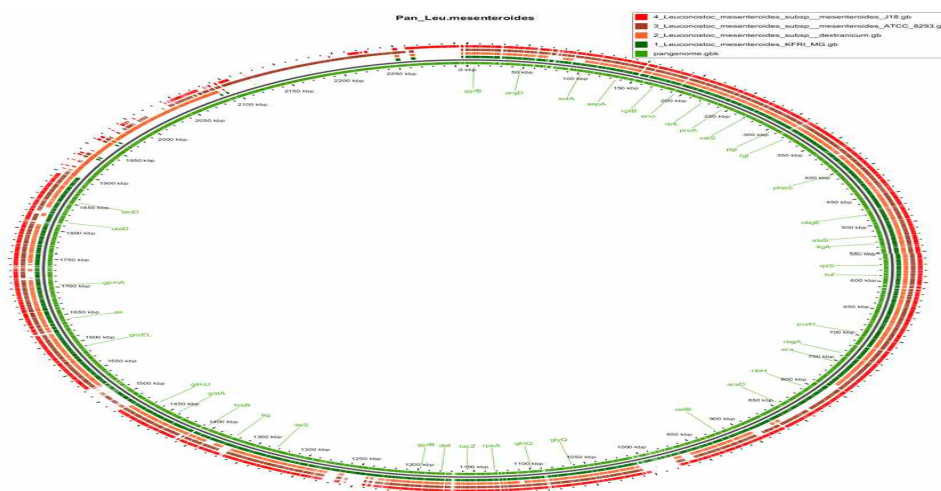


Figure 4-24. Pangenome analysis of *Leu. mesenteroides* strains.

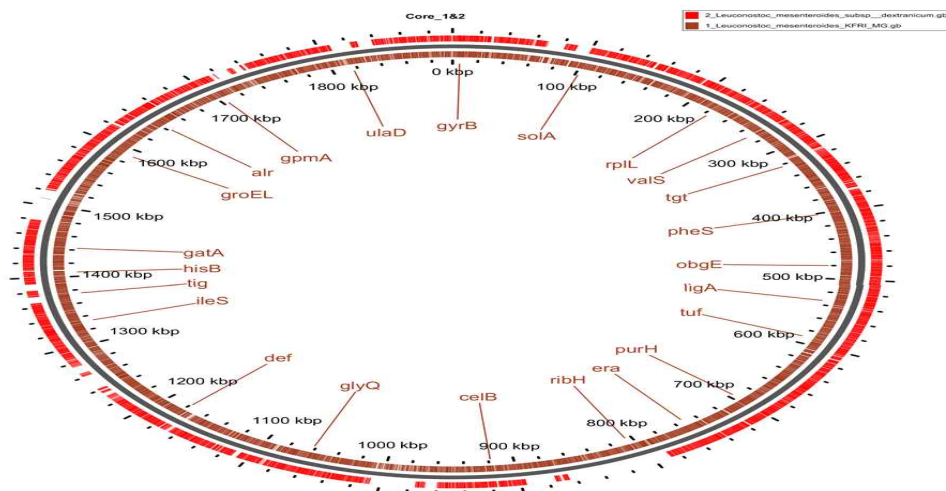


Figure 4-25. Core genome analysis of *Leu. mesenteroides* KFRI-MG and *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM 20484.

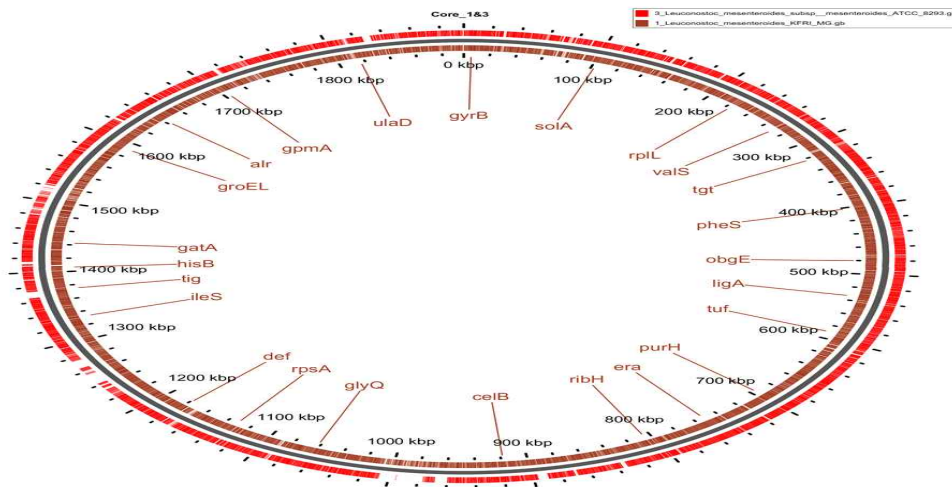


Figure 4-26. Core genome analysis of *Leu. mesenteroides* KFRI-MG and *Leu. mesenteroides* subsp. *meseteroides* ATCC 8293.

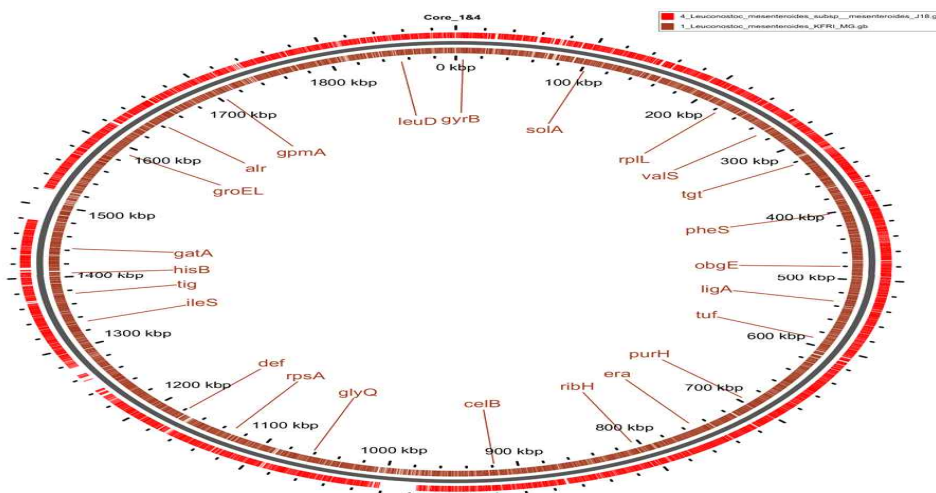


Figure 4-27. Core genome analysis of *Leu. mesenteroides* KFRI-MG and *Leu. mesenteroides* subsp. *meseteroides* J18.

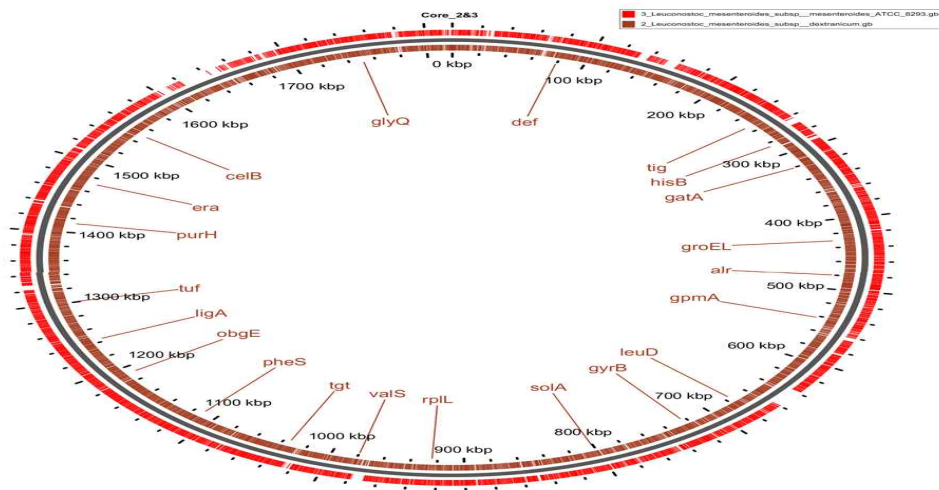


Figure 4-28. Core genome analysis of *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM 20484 and *Leu. mesenteroides* subsp. *meseteroides* ATCC 8293.

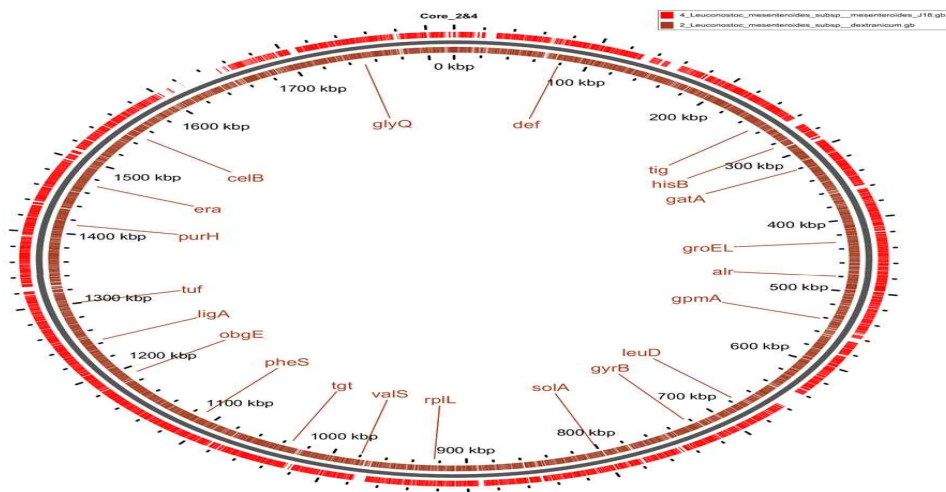


Figure 4-29. Core genome analysis of *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM 20484 and *Leu. mesenteroides* subsp. *meseteroides* J18.

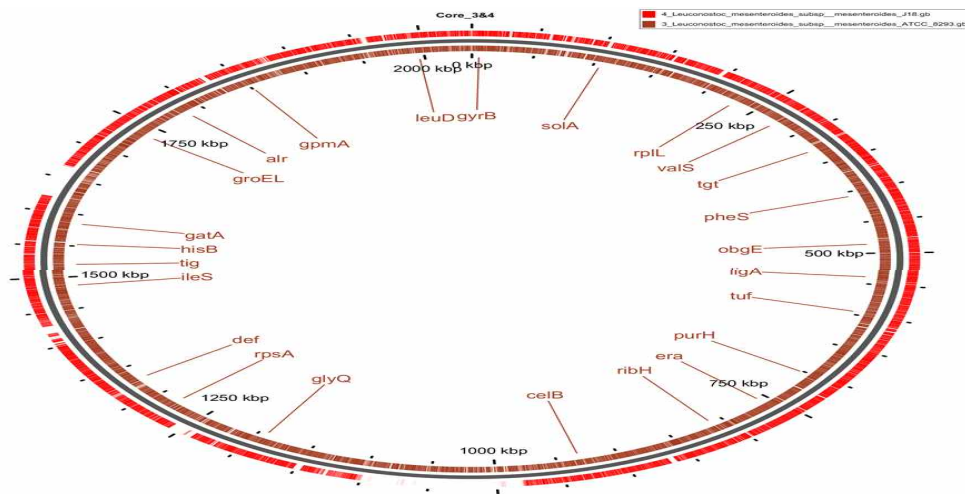


Figure 4-30. Core genome analysis of *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 and *Leu. mesenteroides* subsp. *meseteroides* J18.

- 그러나 Figure 4-31에 나타난 바와 같이, comparative genomics platform인 microScope program(Vieira *et al.*, 2011)을 이용하여 pan genome과 core genome을 분석을 실시하였는데, *Leu. mesenteroides* ATCC 8293과 *Leu. mesenteroides* J18의 pan genome은 2,217개, core genome은 1,712개가 존재하는 것으로 분석되었다.

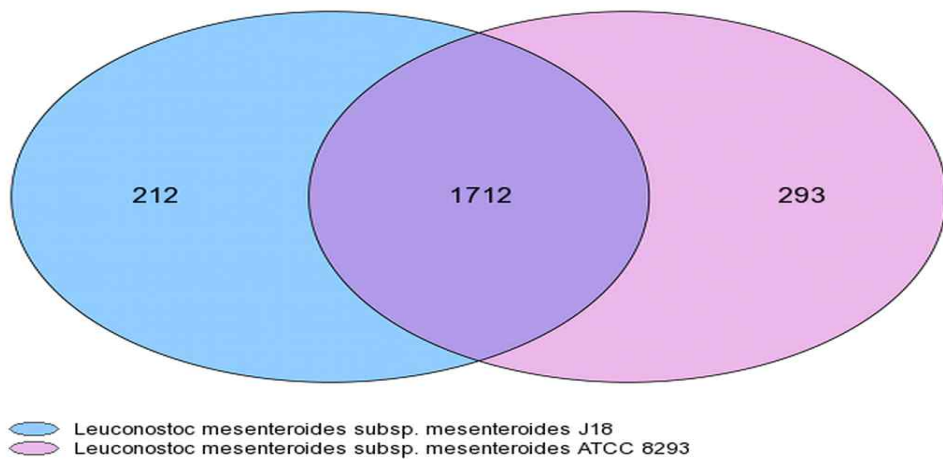


Figure 4-31. Venn diagram of *Leu. mesenteroides* genome.

- 이와 같은 core genome 분석 결과와 기존의 타 연구자들이 *Leuconostoc* sp.의 MLST 분석에 사용한 target gene을 고려하여 *Leu. mesenteroides*의 MLST 분석에 사용될 target gene으로 *L. brevis*의 경우와 동일하게 fusA(elongation factor G), gpmA(phosphoglyceromutase), gyrB(gyrase subunit B), leuS(leucyl-tRNA synthetase), pyrG(CTP synthase), recA(recombinase A), rpoB(RNA polymerase beta subunit) 등 7개를 선정하였다.

(4) *Leuconostoc citerum*의 유전체 분석

- *Leu. citreum*의 MLST 분석에 사용된 target gene을 선정하기 위하여 *Leu. citreum*의 core genome을 분석하고자 하였으나 현재까지 *Leu. citreum*의 full genome sequence가 완료된 균주는 *Leu. citreum* KM20(assembly no: GCA_000026405.1) 1균주만이 존재하여 core genome 분석이 불가능하였다.

다. MLST 분석을 위한 target gene 분석

(1) *Pediococcus pentosaceus*의 target gene 분석

- *P. pentosaceus*의 MLST 분석을 위한 target gene은 *gyr*(gyrase B), *pyc*(pyruvate carboxylase), *pgm*(phosphoglucomutase), *leuS*(leucyl-tRNA synthetase), *gln*(glutamine synthetase), *dal*(glycyl-tRNA synthetase), *pgi*(glucose-6-phosphate isomerase) 유전자를 사용하였는데, 이 유전자들이 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속을 포함하는 Lactobacillaceae과에 속하는 균주들에서 synteny를 나타내는지를 SyntTax program(Oberto, 2013)을 이용하여 분석하였고 그 결과를 Figure 4-32부터 4-38에 나타내었다.
- Synteny는 서로 다른 2개의 생물종 genome을 분석할 때 한 쪽 생물종의 염색체 상의 특정 영역에 존재하는 유전자에 대한 상동 유전자가 다른 쪽 생물종의 특정 염색체의 일부 영역에 존재하는 상태를 말하는 것으로 특정 유전자의 염색체 상에서의 보존성을 나타낸다.
- SyntTax program의 데이터베이스에는 Lactobacillaceae과에 속하는 균주가 총 69종이 존재하므로 이들 69종에 대하여 각 유전자의 synteny를 조사하였다.
- Target gene이 Lactobacillaceae과에서 synteny를 나타내는 보여주는 데이터는 양이 방대하기 때문에 각 유전자 별로 synteny output의 일부만을 캡처하여 제시하였는데, synteny 분석 결과 target gene으로 선택한 7개 유전자 모두 synteny를 지니고 있어 MLST 분석을 위한 target gene으로 적합한 것으로 확인되었다.

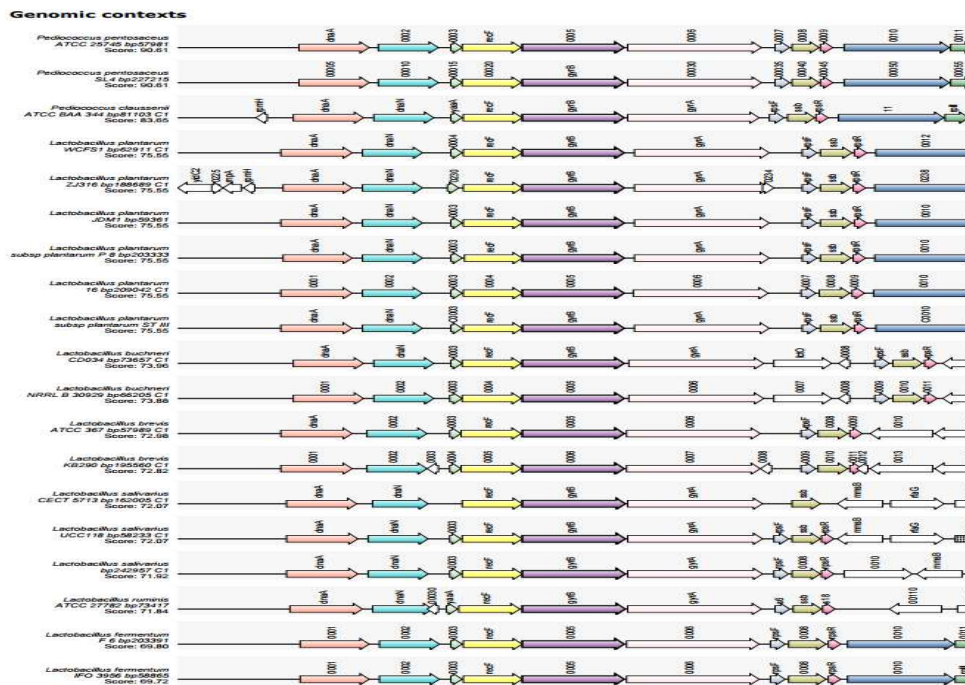


Figure 4-32. Synteny of *gyrB* (gyrase B) gene of *P. pentosaceus* spp.

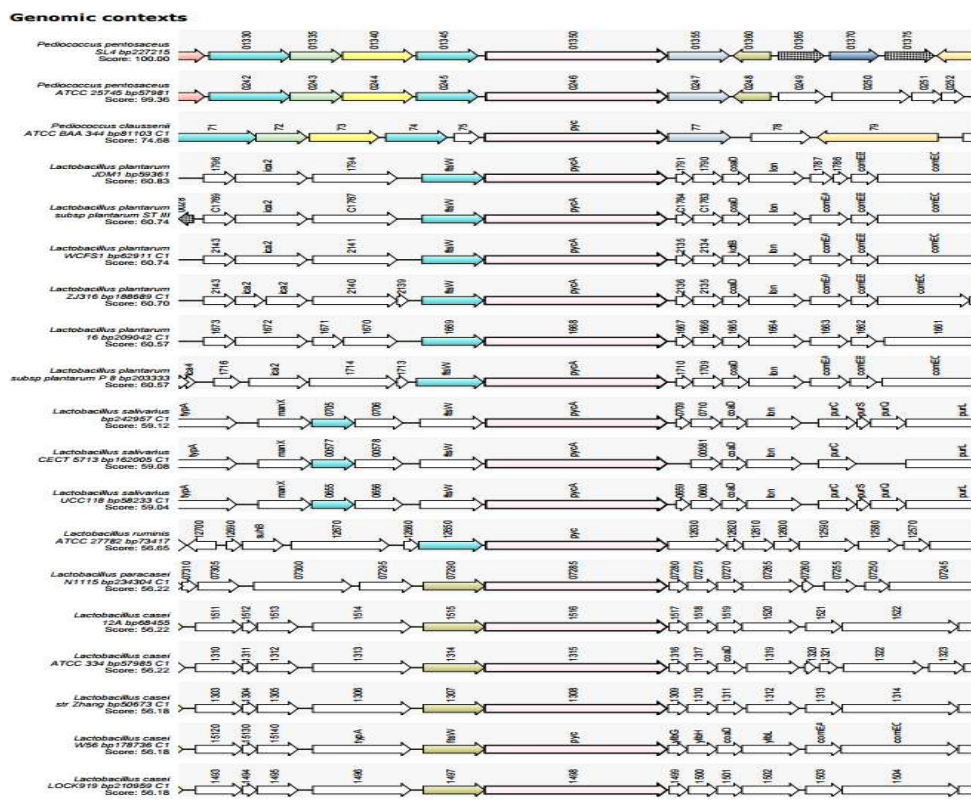


Figure 4-33. Synteny of *pyc* (pyruvate carboxylase) gene of *P. pentosaceus* spp.

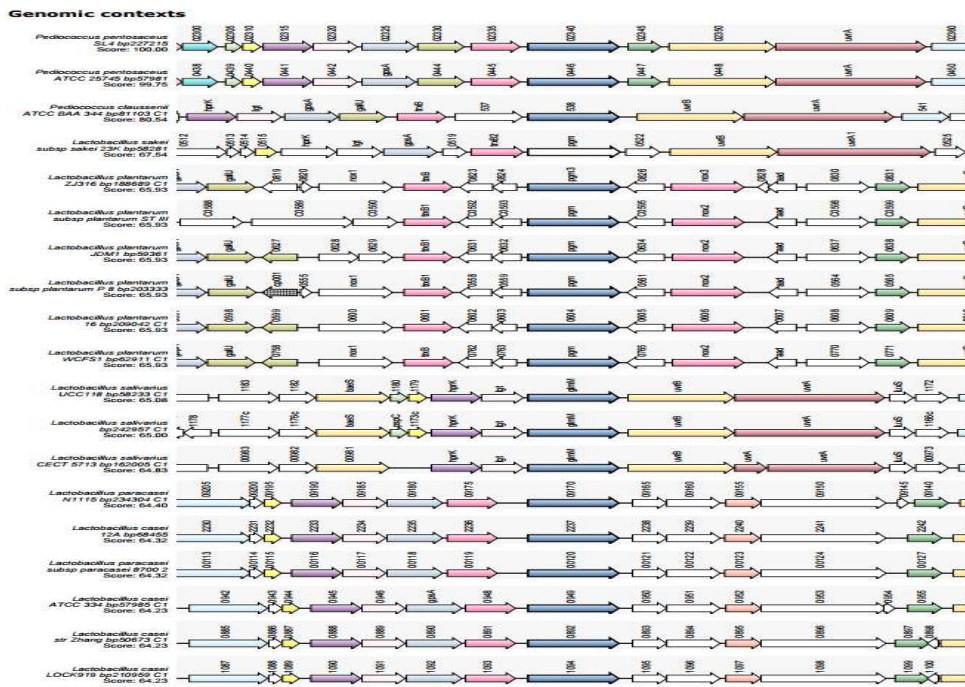


Figure 4-34. Synteny of *pgm*(phosphoglucumutase) gene of *P. pentosaceus* spp.

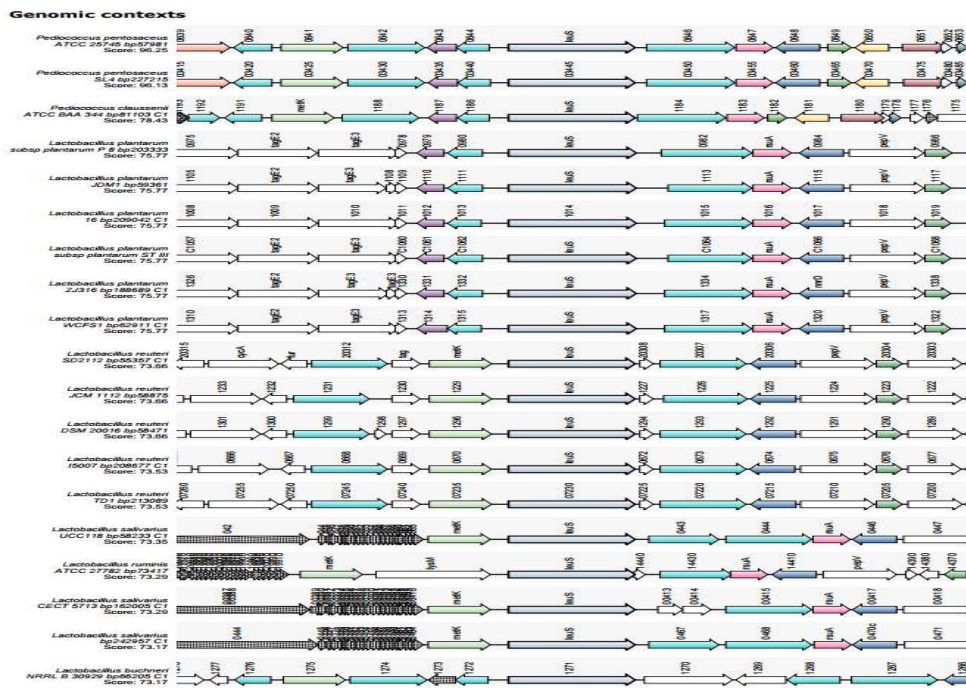


Figure 4-35. Synteny of *leuS*(leucyl-tRNA synthetase) gene of *P. pentosaceus* spp.

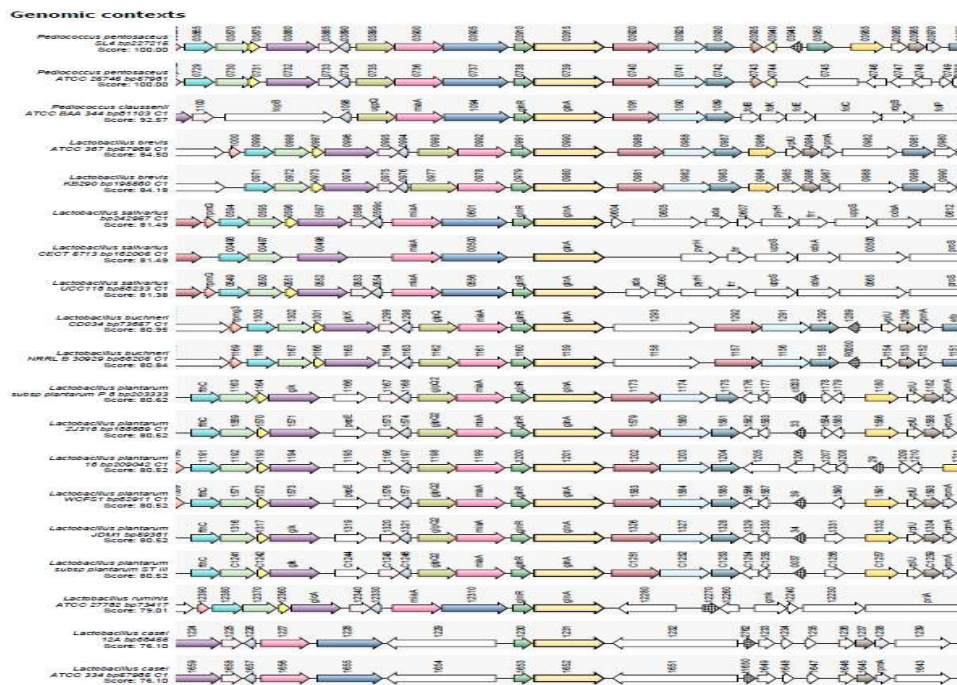


Figure 4-36. Synteny of *gln*(glutamine synthetase) gene of *P. pentosaceus* spp.

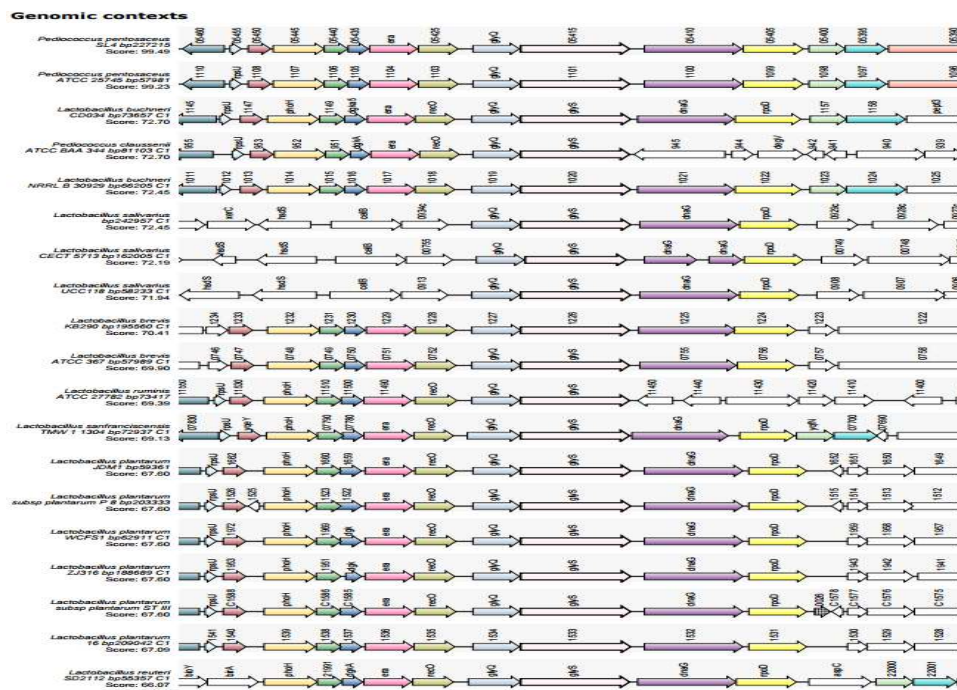


Figure 4-37. Synteny of *dal*(glycyl-tRNA synthetase) gene of *P. pentosaceus* spp.

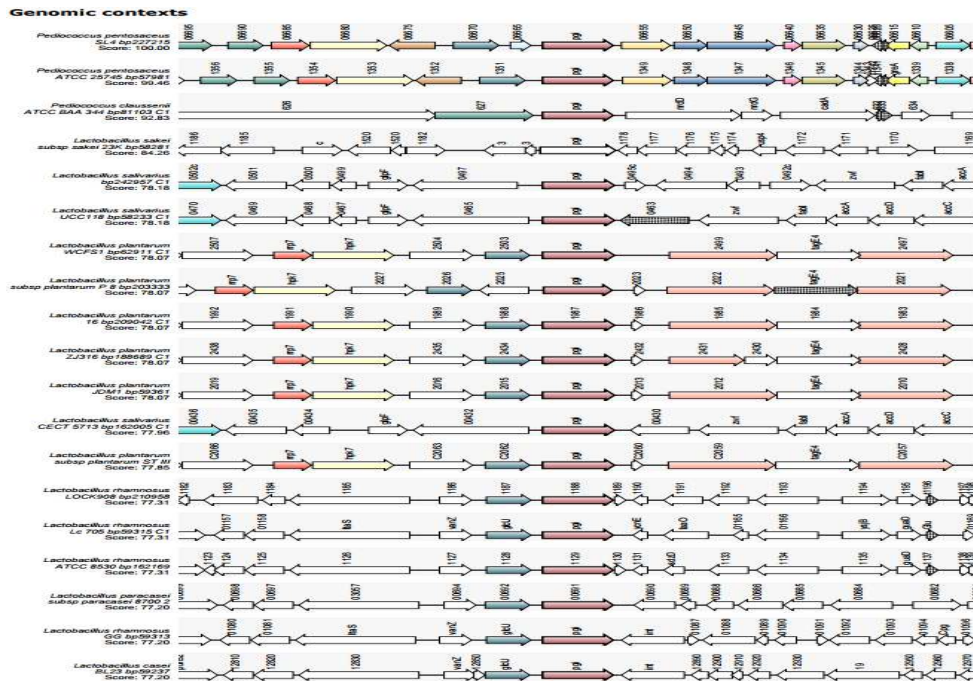


Figure 4-38. Synteny of *pgi*(glucose-6-phosphate isomerase) gene of *P. pentosaceus* spp.

(2) *Lactobacillus brevis*의 target gene 분석

- *L. brevis*의 MLST 분석에 사용될 target gene으로 *fusA*(elongation factor G), *gpmA*(phosphoglyceromutase), *gyrB*(gyrase subunit B), *leuS*(leucyl-tRNA synthetase), *pyrG*(CTP synthase), *recA*(recombinase A), *rpoB*(RNA polymerase beta subunit) 유전자를 선정한 바, 이들 유전자의 synteny를 Figure 4-39부터 4-45 과 같이 확인함으로써 선정한 유전자들이 target gene으로서의 유용성을 검토하였다.
- SyntTax program의 데이터베이스에 존재하는 Lactobacillaceae과에 속하는 균주 69 종에 대하여 각 유전자의 synteny를 조사하였는데, target gene이 Lactobacillaceae과에서 synteny를 나타내는 보여주는 데이터는 양이 방대하기 때문에 각 유전자 별로 synteny output의 일부만을 캡처하여 제시하였다.
- Synteny 분석 결과 target gene으로 선택한 7개 유전자 모두 synteny를 지니고 있어 MLST 분석을 위한 target gene으로 적합한 것으로 확인되었다.

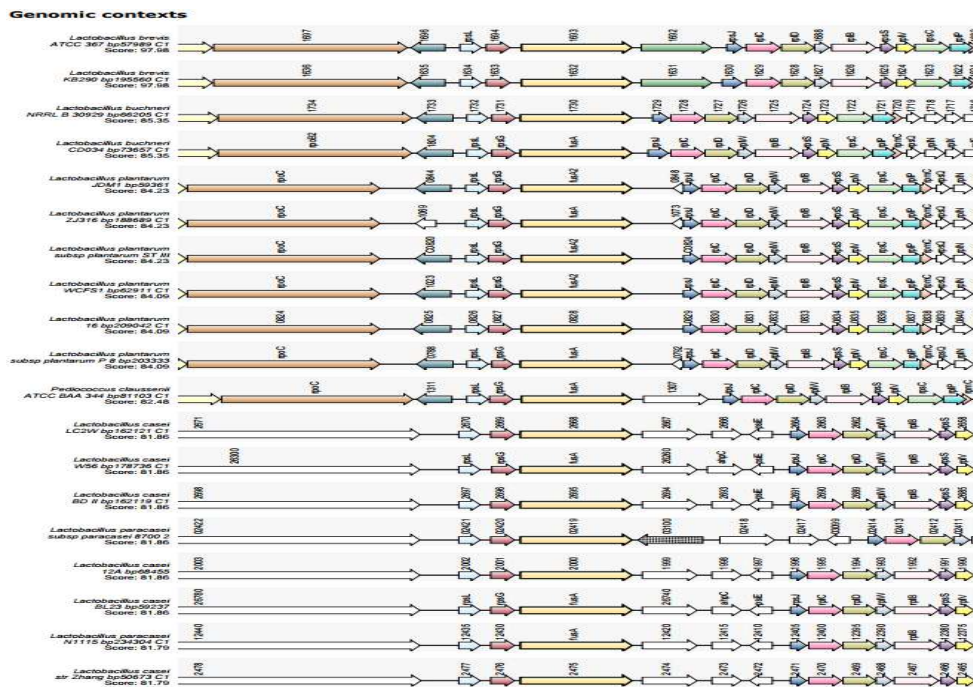


Figure 4-39. Synteny of *fusA*(elongation factor G) gene of *L. brevis* spp.



Figure 4-40. Synteny of *gpmA*(phosphoglyceromutase) gene of *L. brevis* spp.

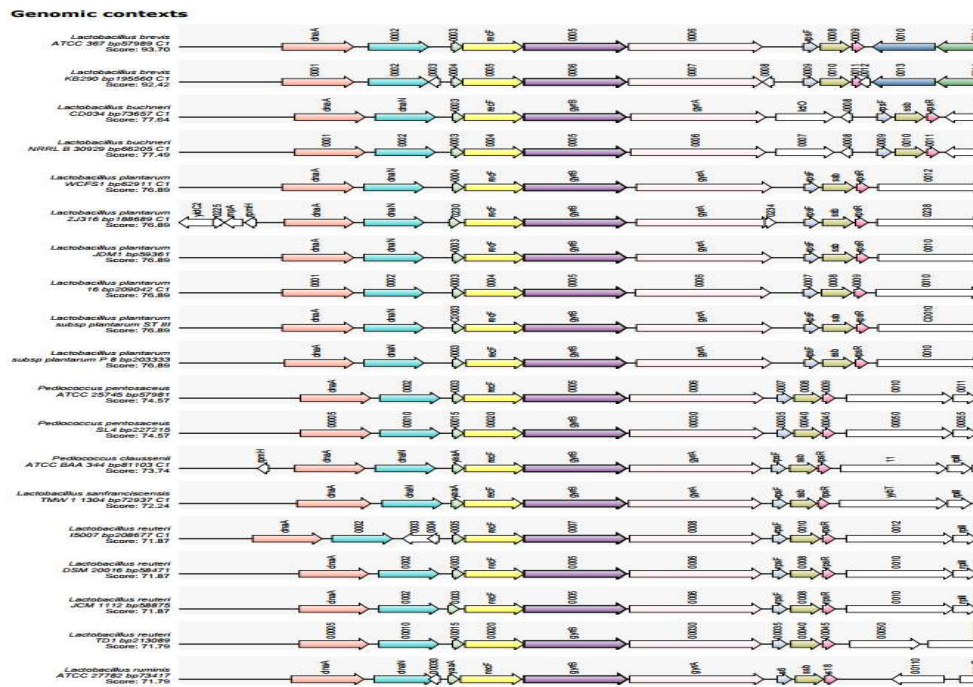


Figure 4-41. Synteny of *gyrB*(gyrase subunit B) gene of *L. brevis* spp.

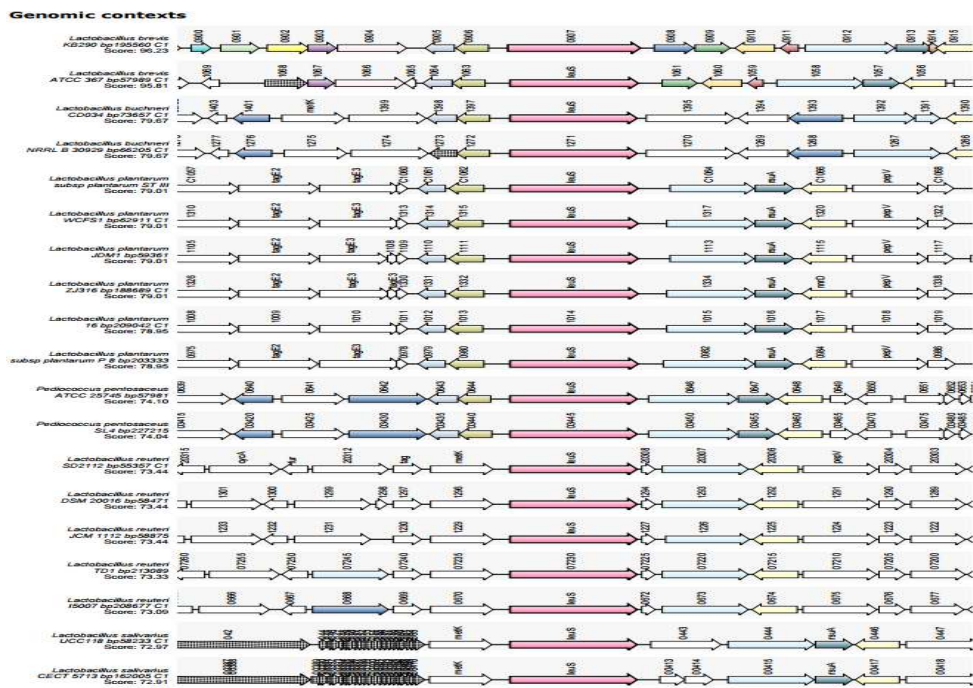


Figure 4-42. Synteny of *leuS*(leucyl-tRNA synthetase) gene of *L. brevis* spp.

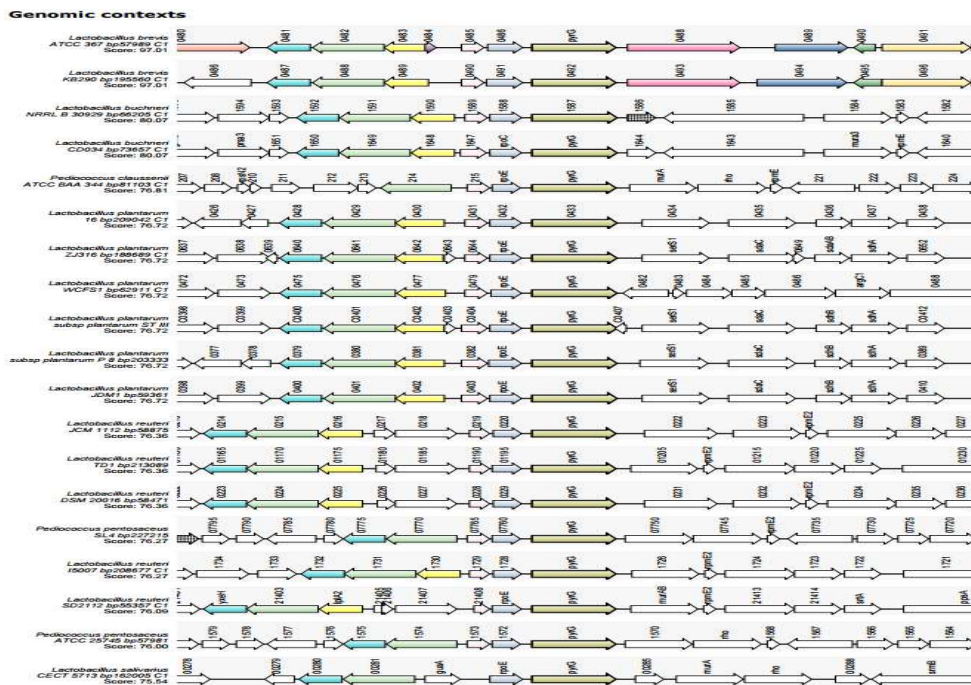


Figure 4-43. Synteny of *pyrG*(CTP synthase) gene of *L. brevis* spp.

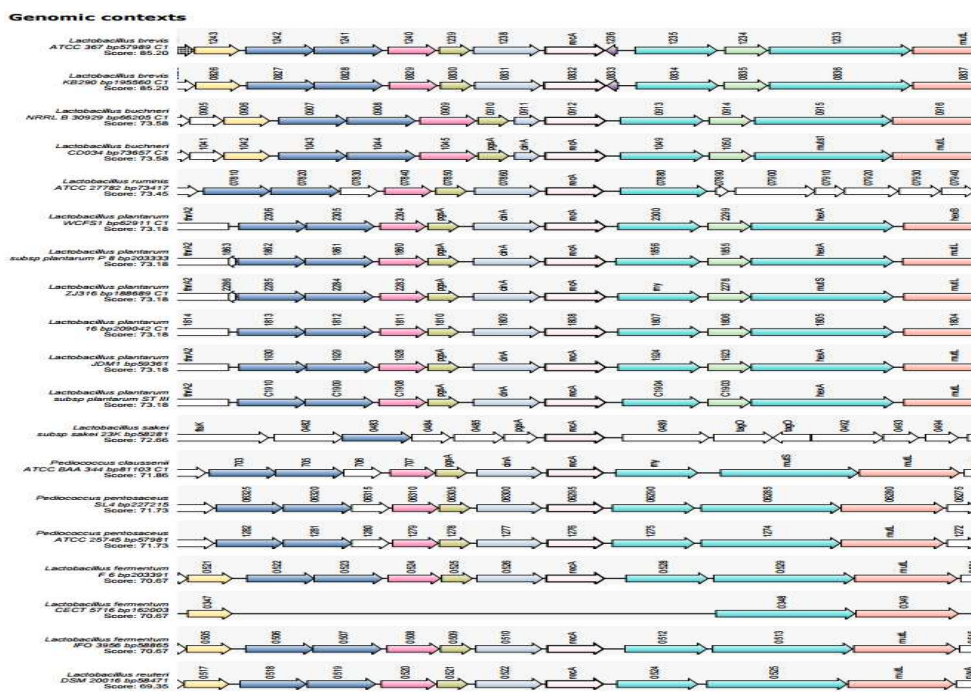


Figure 4-44. Synteny of *recA*(recombinase A) gene of *L. brevis* spp.

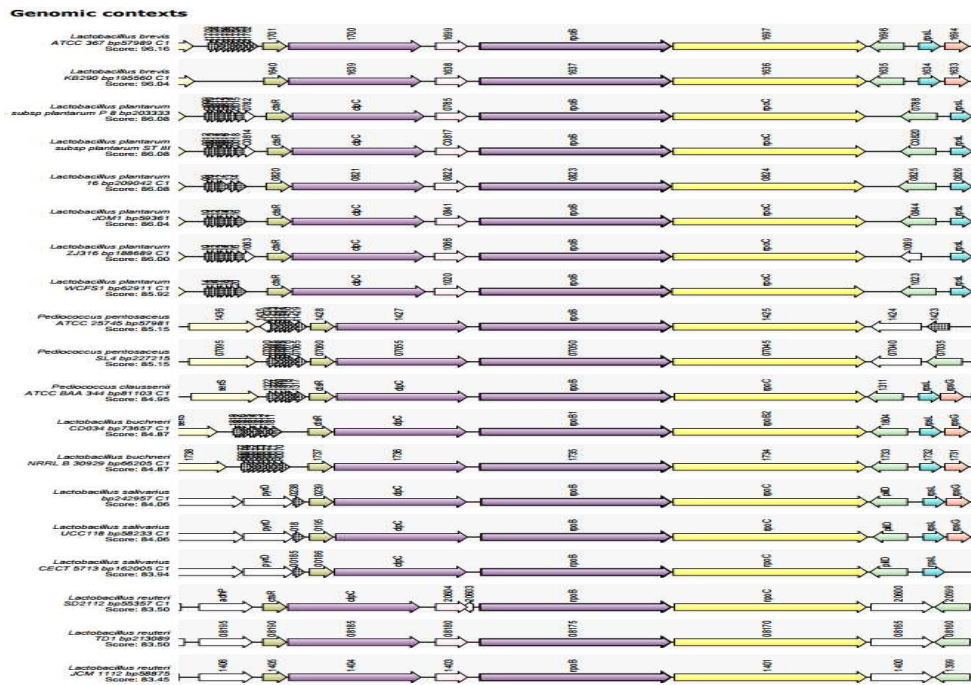


Figure 4-45. Synteny of *rpoB*(RNA polymerase beta subunit) gene of *L. brevis* spp.

(3) *Leuconostoc mesenteroides*의 target gene 분석

- *Leu. mesenteroides*의 MLST 분석에 사용될 target gene으로 *L. brevis*의 경우와 동일하게 *fusA*(elongation factor G), *gpmA*(phosphoglyceromutase), *gyrB*(gyrase subunit B), *leuS*(leucyl-tRNA synthetase), *pyrG*(CTP synthase), *recA*(recombinase A), *rpoB*(RNA polymerase beta subunit) 유전자를 선정하되, 이들 유전자의 synteny를 Figure 4-46부터 4-52과 같이 확인함으로써 선정된 유전자들이 target gene으로서의 유용성을 검토하였다.
- Synteny 분석 결과 target gene으로 선택한 7개 유전자 모두 synteny를 지니고 있어 MLST 분석을 위한 target gene으로 적합한 것으로 확인되었다.

Genomic contexts

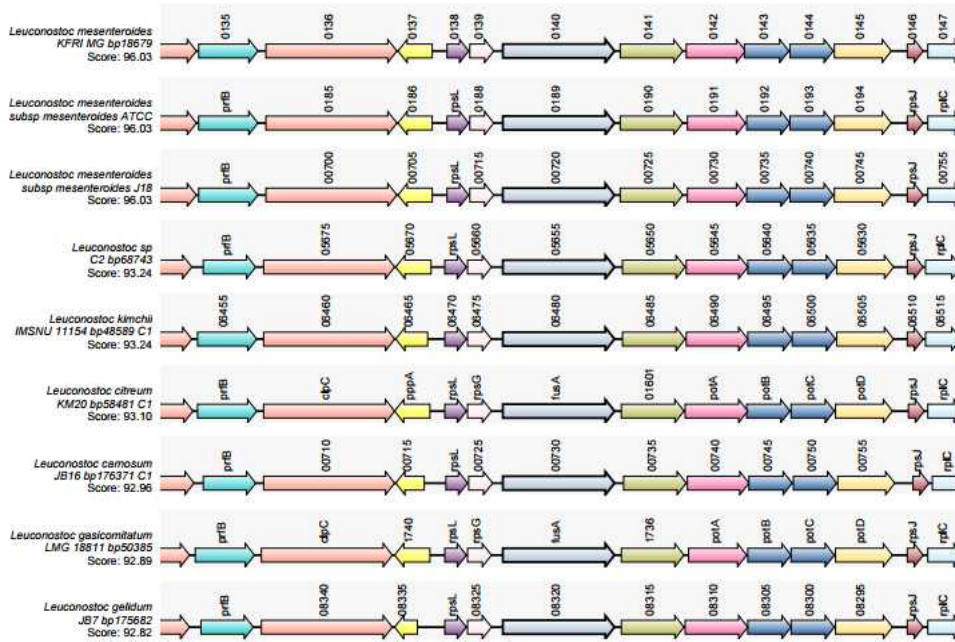


Figure 4-46. Synteny of *fusA*(elongation factor G) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

Genomic contexts

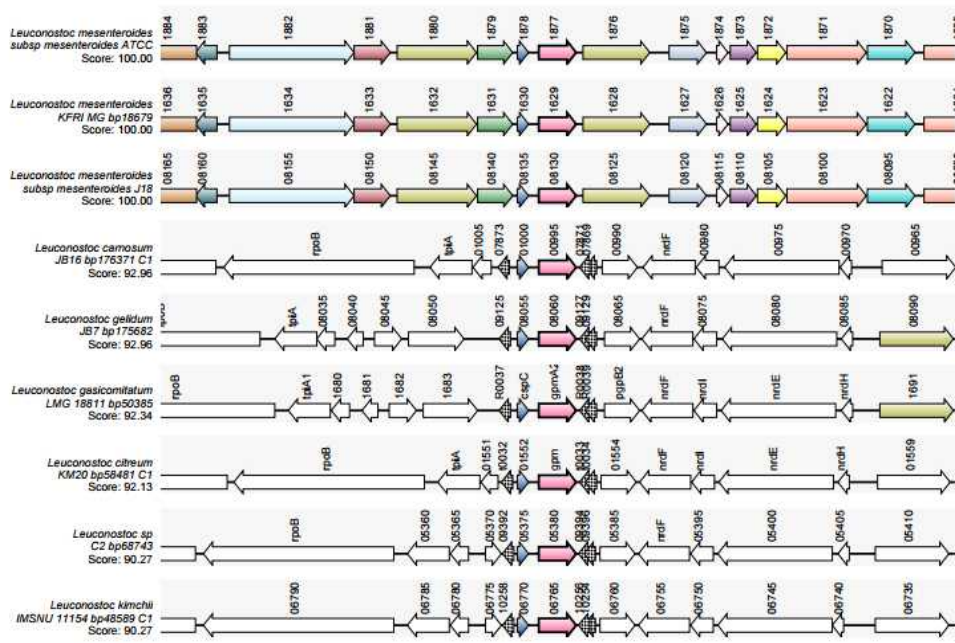


Figure 4-47. Synteny of *gpmA*(phosphoglyceromutase) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

Genomic contexts

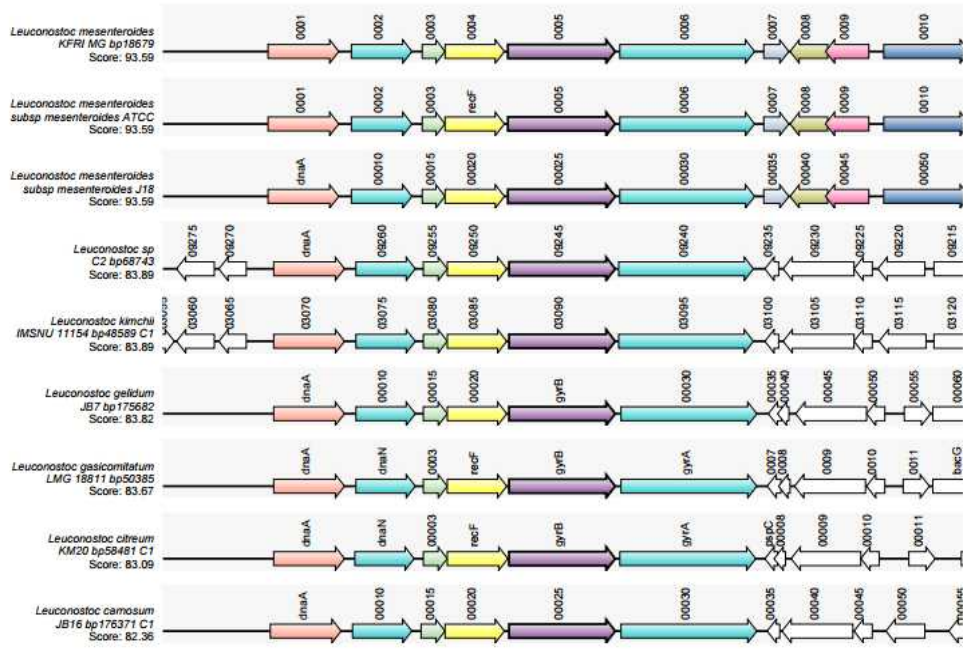


Figure 4-48. Synteny of *gyrB*(gyrase subunit B) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

Genomic contexts

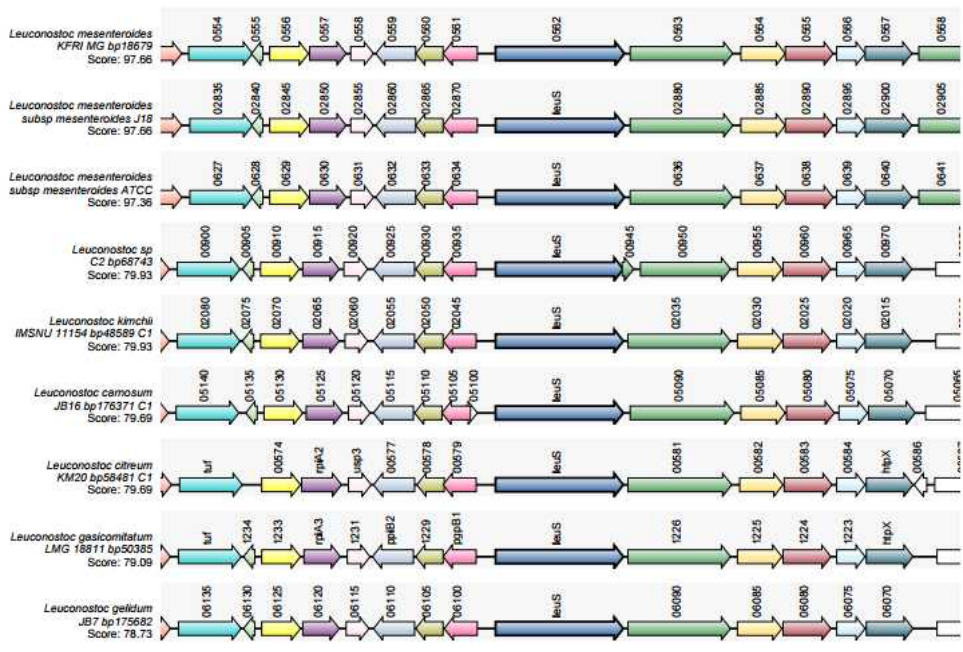


Figure 4-49. Synteny of *leuS*(leucyl-tRNA synthetase) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

Genomic contexts

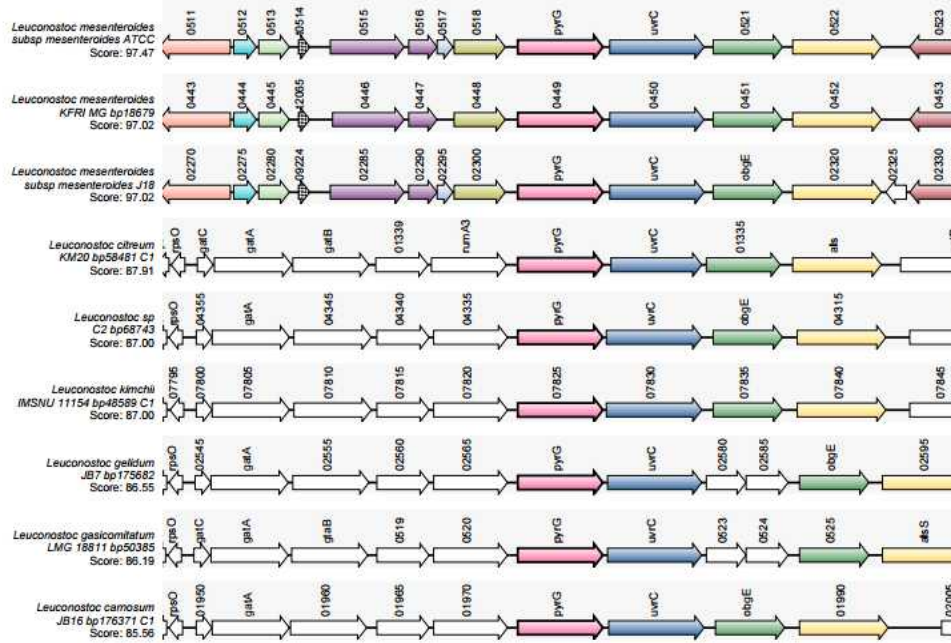


Figure 4-50. Synteny of *pyrG*(CTP synthase) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

Genomic contexts

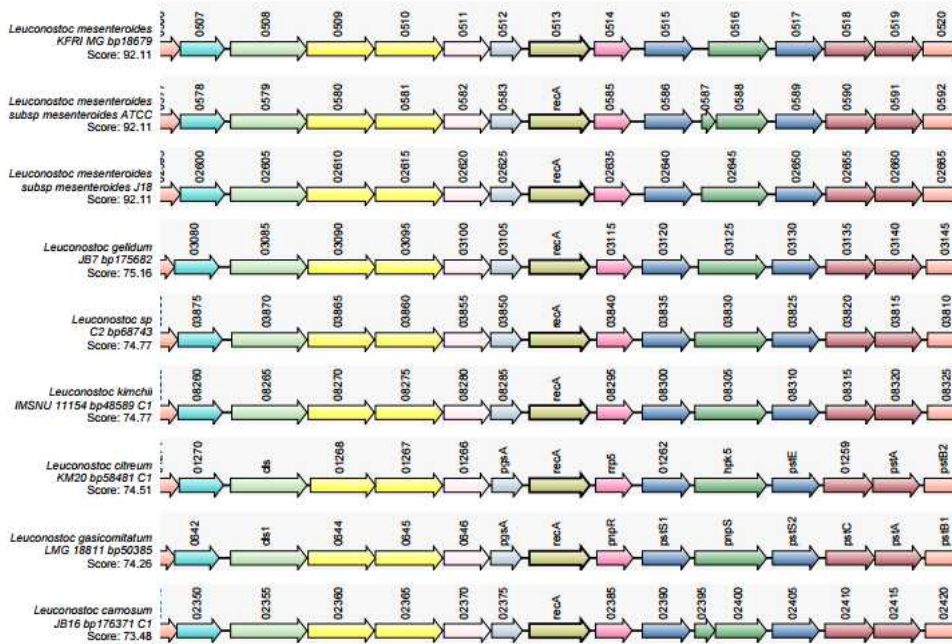


Figure 4-51. Synteny of *recA*(recombinase A) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

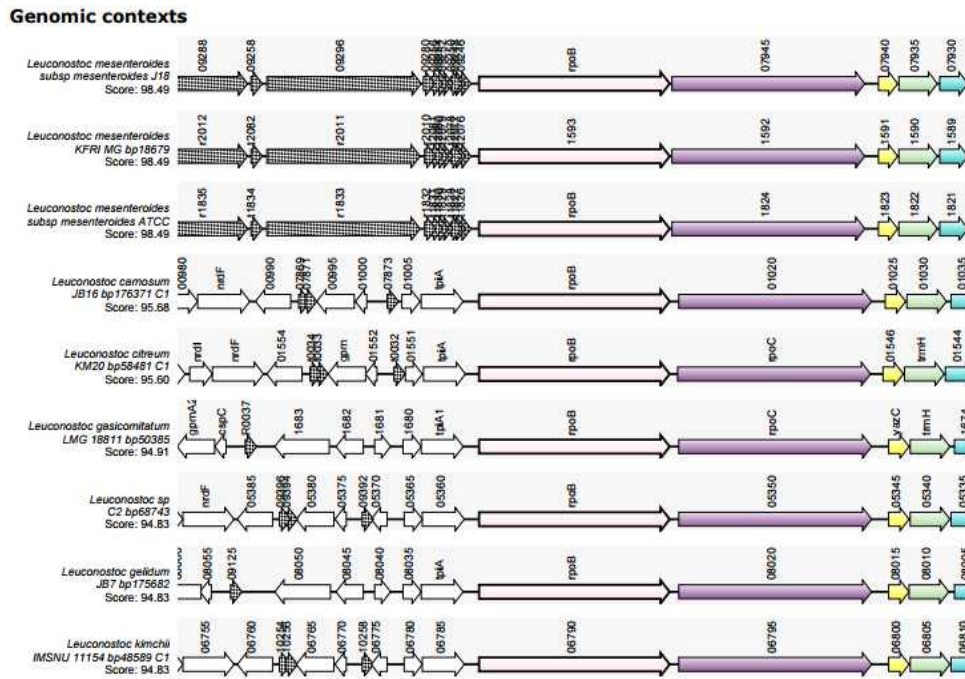


Figure 4-52. Synteny of *rpoB*(RNA polymerase beta subunit) gene of *Leu. mesenteroides* spp.

(4) *Leuconostoc citreum*의 target gene 분석

- *Leu. citreum*의 MLST 분석에 사용된 target gene을 선정하기 위하여 *Leu. citreum*의 core genome을 분석하고자 하였으나 현재까지 *Leu. citreum*의 full genome sequence가 완료된 균주는 *Leu. citreum* KM20(assembly no: GCA_000026405.1) 1균주만이 존재하여 core genome 분석이 불가능하였다. 이에 core genome 분석을 통한 target gene 선정에 대한 차선택책으로서 다른 유산균주들의 housekeeping 유전자들 중에서 MLST의 target 유전자로 많이 사용되는 유전자들을 후보 유전자로 하여 본 균주의 MLST 분석에 사용할 target 유전자를 *atpA*(ATP synthase subunit alpha), *dnaA*(chromosomal replication initiation protein), *dnaK*(chaperone hsp70), *gyrB*(gyrase subunit B), *pheS*(phenylalanine tRNA synthetase), *pyrG*(CTP synthase), *rpoA*(RNA polymerase) 유전자 등 총 7개 유전자를 선정하였다.
- 선정된 유전자들이 *Leuconostoc* 속을 포함하는 Leuconostocaceae과에 속하는 균주들에서 synteny를 나타내는지를 SyntTax program(Oberto, 2013)을 이용하여 분석하였고 그 결과를 Figure 4-53부터 4-59에 나타내었다.
- SyntTax program의 데이터베이스에는 Leuconostocaceae과에 속하는 균주가 총 19균주가 존재하므로 이들 19주에 대하여 각 유전자의 synteny를 조사하였다.

- Target gene이 Leuconostocaceae과에서 synteny를 나타내는 보여주는 데이터는 양이 방대하기 때문에 각 유전자 별로 synteny output의 일부 만을 캡처하여 제시하였는데, synteny 분석 결과 target gene으로 선택한 7개 유전자 모두 높은 synteny를 지니고 있어 MLST 분석을 위한 target gene으로 적합한 것으로 확인되었다.
- 각 유전자의 특정 부위를 증폭한 PCR 산물의 크기는 *pheS* 유전자가 286 bp로 가장 작았고 *dnaK* 유전자가 1,647 bp로 가장 컸다.



Figure 4-53. Synteny of *atpA* gene of *Leu. citreum*.

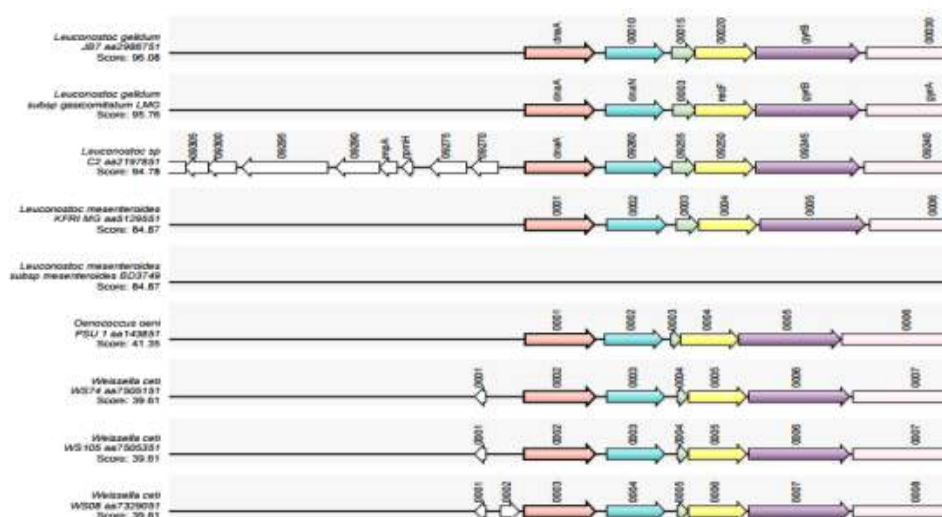


Figure 4-54. Synteny of *dnaA* gene of *Leu. citreum*.

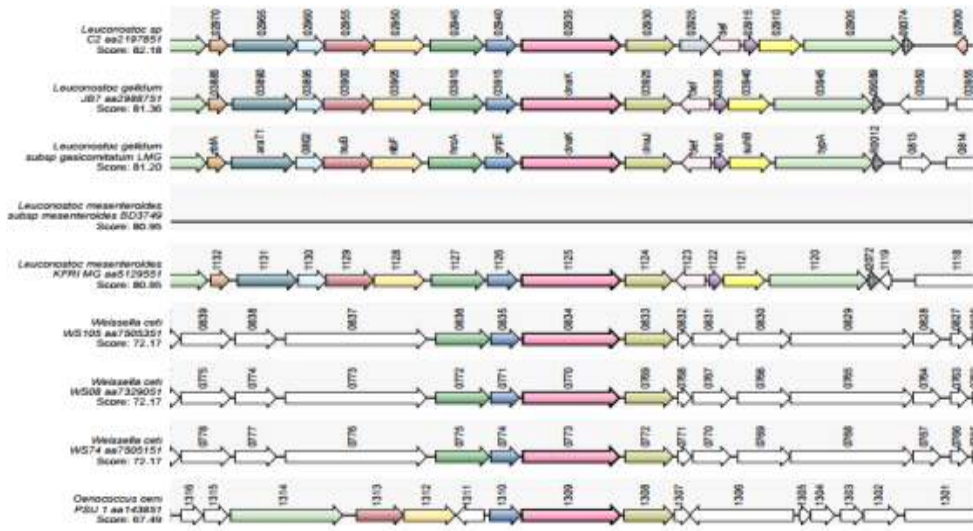


Figure 4-55. Synteny of *dnaK* gene of *Leu. citreum*.

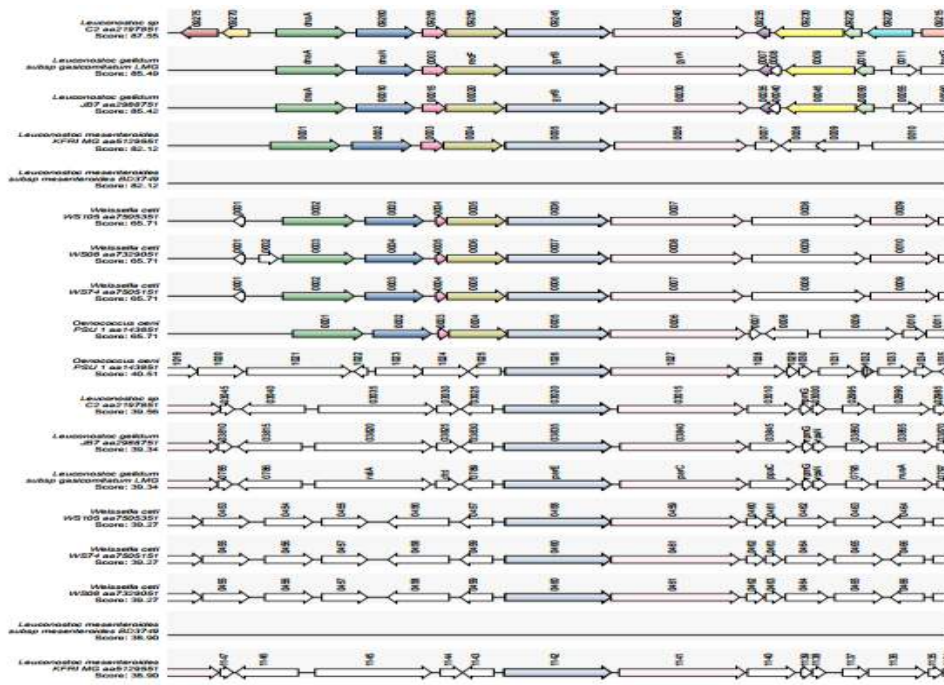


Figure 4-56. Synteny of *gyrB* gene of *Leu. citreum*.

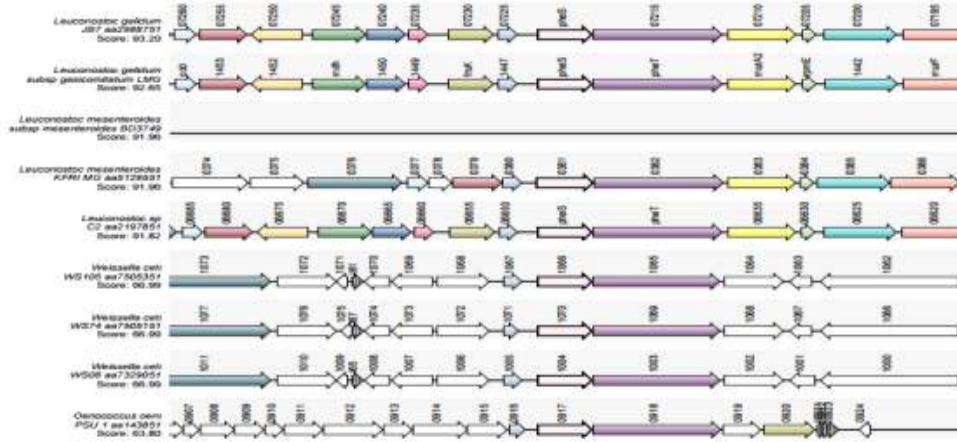


Figure 4-57. Synteny of *pheS* gene of *Leu. citreum*.

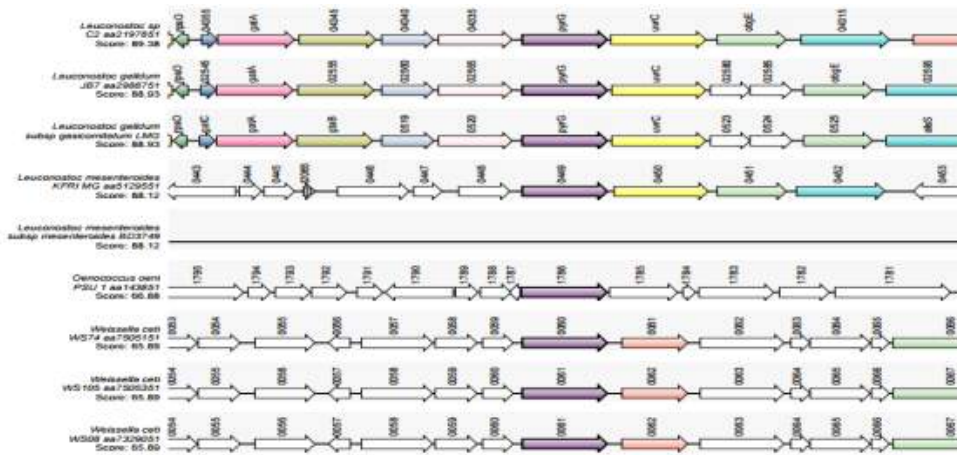


Figure 4-58. Synteny of *pyrG* gene of *Leu. citreum*.

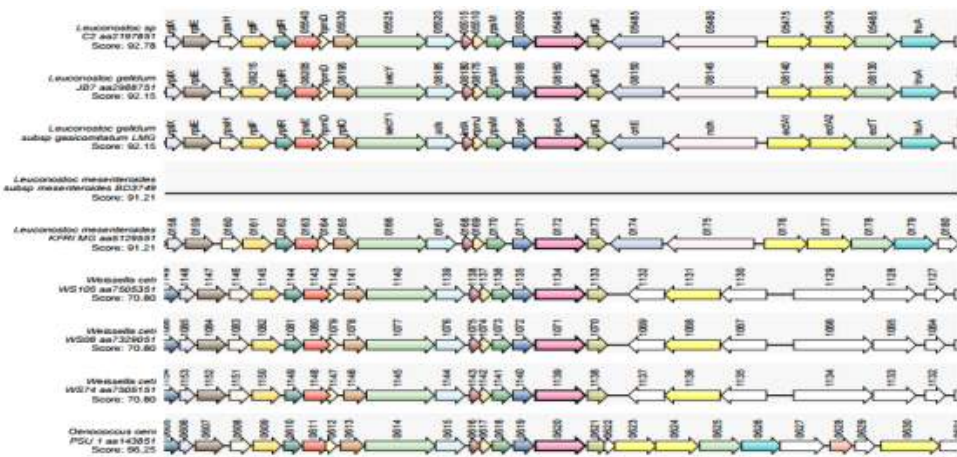


Figure 4-59. Synteny of *rpoA* gene of *Leu. citreum*.

라. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석

- RAPD 분석법은 random primer를 이용하여 genome 상의 임의의 특정 지역을 증폭 시키고, 같은 종 내에서의 strain의 차이에 따른 다형성을 관찰할 수 있으며, 비교적 분석기간이 빠르고, 경제적인 분석 방법이다(Kim *et al.*, 2000).
- 따라서 본 연구에서 최적의 유전자 지문 분석법으로 선정된 MLST 분석법을 보완 또는 병용할 분석방법 중의 하나로 RAPD 분석법을 선정하여 모델 균주인 *P. pentosaceus*와 *L. brevis*, *Leu. mesenteroides*를 이용하여 RAPD 분석법을 개발하고자 하였다.

(1) *Pediococcus pentosaceus*의 RAPD 분석

- *P. pentosaceus*의 RAPD 분석은 다양한 분리원에서 분리한 26주를 이용하여 수행하였다(Table 4-36).

Table 4-36. *P. pentosaceus* strains for RAPD-PCR analysis

No.	Strain	Source	No.	Strain	Source
2	PP7	Pumpkin	17	PCK1	Cucumber kimchi
3	PR3	Kimchi	18	ON-188	Onion
4	PE-001	Pear	19	PPK1	Kimchi
5	KC 007	Kimchi	20	PC-001	Peach
6	GP-001	Green pepper	21	SP-044	Sweet potato
7	KW-001	Kiwi	22	PPD7	Doenjang
8	PR-005	Dongchimi	23	PRK1	Radish kimchi
9	RP-001	Red pepper	24	GO-005	Green onion
10	PPK1-2	Radish kimchi Salted small	25	ON-82A	Onion
11	SC1	octopus	26	PPK6	Kimchi
12	RA-035	Radish	27	SFJ3	Jeotgal
13	GO-008	Green onion	28	RP-008	Red pepper
14	PPT16	Tangerine	29	RP-003	Red pepper

- RAPD 분석을 위한 PCR은 상기 조건으로 분리된 genomic DNA를 template DNA로 사용하였고, primer 239(CTGGCGACTG)를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR은 AccuPrep[®] PreMix를 사용하여 최종 부피가 20 μ L가 되도록 하였고, My Cycler로 반응시켰으며, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분, 1 cycle; 94 $^{\circ}$ C에서 2분, 39 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분, 2 cycle; 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 39 $^{\circ}$ C에서 15초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 35 cycle을 반응시켰다.

- RAPD-PCR이 완료된 후, 1.2% agarose gel 전기영동으로 100 V에서 40분 간 수행 후, UV filter가 장착된 Gel Doc 시스템을 이용하여 촬영한 후 Quantity One software(BIO-RAD)를 이용하여 산술평균을 사용한 unweighted pair group method(UPGMA)를 기초로 하여 phylogenetic tree를 작성하였다.
- *P. pentosaceus*의 RAPD-PCR 분석 결과는 Figure 4-60에 나타내었는데 대부분의 균주에서 4개 이상의 band를 관찰할 수 있었고, 최대 8개의 band를 관찰할 수 있었다.
- 본 연구에서 사용한 *P. pentosaceus* 균주들의 RAPD band pattern은 dendrogram 상에서 6개의 cluster로 나눌 수 있다.
- 14번 균주와 29번, 25번 균주는 각각 cluster 1, 2, 4에 속해 있고, 28, 26번 균주는 cluster 3에 속해 있었다. 또한 cluster 5는 7, 13, 5, 6, 2, 22, 24, 21, 20, 18번 균주가 속해 있었고, cluster 6에는 12, 8, 23, 17, 27, 19, 4, 3, 9, 11, 10번 균주가 속해 있었다.
- 분석 결과 균주들의 분리원과 grouping과는 특별한 상관관계는 없는 것으로 나타났다.
- MLST 분석을 수행하였을 경우, 18번 균주인 ON-188는 sequence type 18번에 속해 있었고, 나머지 13, 24, 25, 18, 29번 균주인 GO-008, GO-005, ON-82A, RP-008, RP-003은 sequence type 19번에 속해 있었다.
- 본 실험 결과 동일한 MLST sequence type에 속해 있는 균주들이 RAPD 상에서는 다른 cluster에 속해 있어 MLST 분석보다는 RAPD 분석이보다 세분화된 결과를 나타내었으나, RAPD 분석의 낮은 재현성 때문에 MLST 분석 결과와의 상관성을 추가적으로 연구해야할 필요성이 있다.

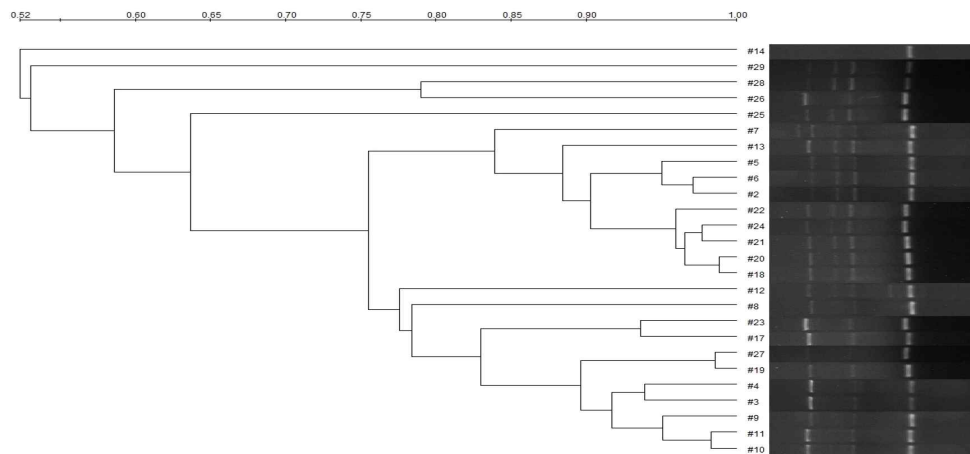


Figure 4-60. Dendrogram derived from cluster analysis(UPGMA) showing relationship among 26 strains of *P. pentosaceus* spp.

(2) *Lactobacillus brevis*의 RAPD 분석

- *L. brevis*에 대한 RAPD 분석은 상기 *P. pentosaceus* 분석 방법과 동일하게 수행하였으며, 김치, 조개젓갈, 장아찌에서 분리된 13주를 이용하였다(Table 4-37).

Table 4-37. *L. brevis* strains for RAPD-PCR analysis

No.	Strain	Source	No.	Strain	Source
2	B15	Kimchi	9	B7	Kimchi
3	FI10019	Salted clam	10	G1	Kimchi
4	FI10080	Kimchi	11	KU15006	Kimchi
5	B151	Kimchi	12	LBK1	Kimchi
6	B13	Kimchi	13	LBK10	Kimchi
7	FI10054	Jangajji	14	LBK14	Kimchi
8	B13-2	Kimchi			

- Figure 4-61에 나타낸 바와 같이 RAPD 결과에서 총 5개의 group을 확인할 수 있었다. Group 1에는 3번 균주, group 2에는 2번 균주가 속해 있었고, group 3에는 9, 5번 균주가 속해 있었다. 또한 group 4에는 10, 7, 8번 균주가 속해 있었고, group 5에는 11, 8, 13, 12, 14, 4번 균주가 속해 있었다.
- Group 1에 속해 있는 3번 균주의 경우 조개젓갈에서 분리된 균주로서, 대부분 김치에서 분리된 다른 균주와는 상이한 pattern을 나타내었다.
- 향후 MLST 분석이 이루어질 경우, 본 실험결과와 비교 분석하여 MLST 분석과 RAPD 분석의 상호 연관성을 규명할 예정이다.

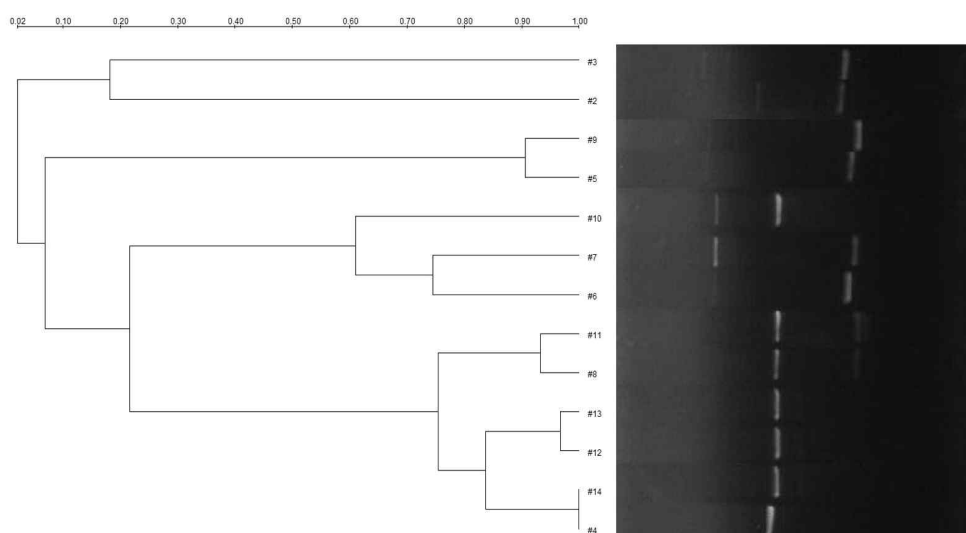


Figure 4-61. Dendrogram derived from cluster analysis(UPGMA) showing relationship among 13 strains of *L. brevis* spp.

(3) *Leuconostoc mesenteroides*의 RAPD 분석

- *Leu. mesenteroides*에 대한 RAPD 분석 역시 상기 *P. pentosaceus* 분석 방법과 동일하게 수행하였으며, 분리원이 다양한 총 25주의 *Leu. mesenteroides*를 이용하여 RAPD를 수행한 결과는 Figure 4-62에 나타난 바와 같으며, 균주들의 분리원은 Table 4-38에 나타내었다.

Table 4-38. *Leu. mesenteroides* strains for RAPD-PCR analysis

No.	Strain	Source	No.	Strain	Source
2	200006	KCCM	17	RA-042	Radish
3	JAM1	Radish kimchi	18	ON-179	Onion
4	MSJ1	Salted clam	19	sal.cla5	Salted clam
5	NMK	Radish Kimchi	20	YKC2	Kimchi
6	YLB8	Doenjang	21	BK3, CMC38	Kimchi
7	GKC1	Kimchi	22	BK3, CMC12	Kimchi
8	2-1 BK	Kimchi	23	SFJ1	Jeotgal
9	LMK2	Kimchi	24	Y-KC6	Kimchi
10	LMK2-1	Kimchi	25	BK3, CMC38	Kimchi
11	NJG3-2	Salted small octopus	26	1-1 BK	Kimchi
12	K1	Kimchi	27	LMR5	Radish
13	LMK2-2-1	Kimchi	28	SJK1	Kimchi
16	LMR3	Radish			

- 상기 *P. pentosaceus*와 *L. brevis*의 결과와는 달리 *Leu. mesenteroides*의 균주들은 상당히 다른 RAPD band pattern을 나타내었는데 총 4 group으로 나눌 수 있었다.
- Group 1에는 김치에서 분리된 12번 균주 만이 속해 있었고, group 2는 역시 김치에서 분리한 24번 균주 만 존재하였다.
- Group 3에는 22, 13, 19, 23, 5, 25, 11, 21, 16번 균주 등 총 9균주가 속해 있었고, group 4에는 2, 27, 9, 3, 26, 10, 8, 28, 4, 7, 20, 18, 17, 5 등 14균주가 속해 있었다.
- 균주들의 분리원과 grouping과는 상관관계가 없는 것으로 나타나 분리원에 따라 균주들이 한 group에 속하지는 않는 것으로 확인되었다.

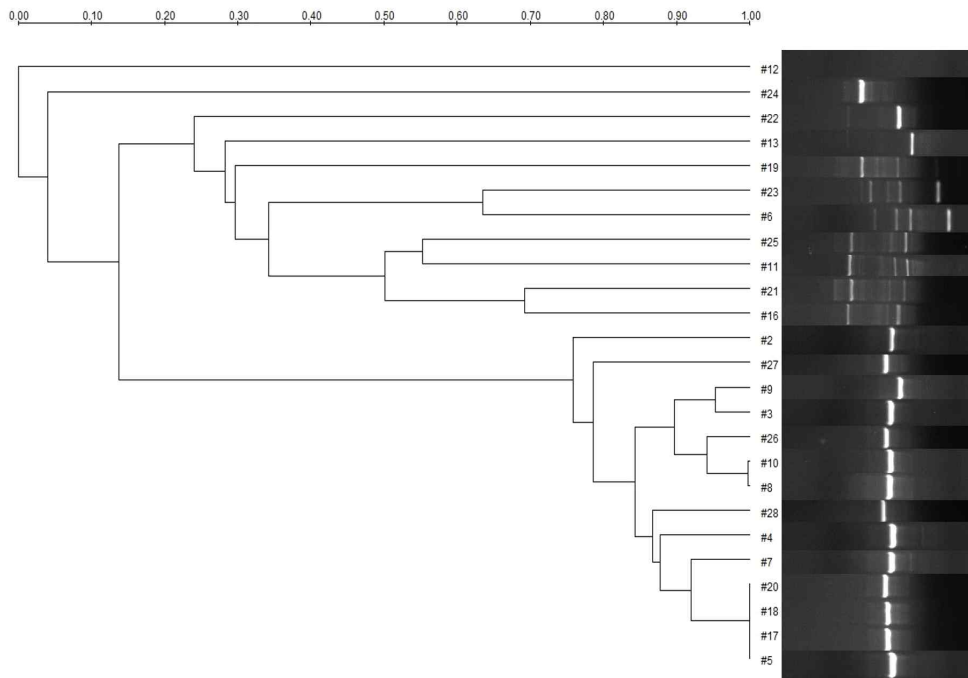


Figure 4-62. Dendrogram derived from cluster analysis(UPGMA) showing relationship among 25 strains of *Leu. mesenteroides* spp.

제 10절 최적 미생물 추적 기술 선정 및 분리 균주의 유전자 지문 데이터베이스 구축

1. 유전자 지문 분석법의 단독 또는 병용 분석을 통한 최적 분석법 확립

- 본 연구과제는 건국대학교를 주관기관으로 하여 총 8개 기관이 참여하여 식품산업에 사용될 수 있는 우수 종균을 탐색하고 기능성과 발효능을 분석하여 우수 종균을 확보하고 이를 상용화하는 데 있고, 이를 위하여 각 참여 기관에서는 다양한 분리원으로부터 종균으로 사용할 수 있는 균주를 분리, 탐색하여 그 특성들을 데이터베이스화하고 있으며, 분리된 균주들의 내산성, 내담즙성 등의 생리적 특성, protease 및 amylase 생산능 등의 발효특성, 향산화능, 항암, 항염증 등의 기능성 등을 재분석하여 상용화 종균으로 사용할 수 있는 총 31주(유산균 26주, 효모 5주)의 후보 균주를 선정하였다.
- 이들 균주 중에서 유산균주 중 *L. delbruekii*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *S. cerevisiae*에 대한 MLST 분석은 타 연구자에 의해 이루어진 바 있으나, *L. brevis*, *Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides* 균주에 대한 MLST 분석은 전혀 연구된 바 없다.
- 따라서 MLST 분석 연구가 이루어지지 않은 균주들 중에서 식품산업에서 발효스타터로 중요하게 사용되는 균주들인 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *Leu. citreum*을 선정하여 MLST를 이용한 유전자 지문 분석법을 개발하고자 하였으며, 이와 더불어 유전자 지문 분석법 중에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 RAPD 분석법과 rep-PCR 분석법을 추가로 사용하여 상기 선정된 3개 균주에 대한 유전자 지문 분석을 수행함으로써 3가지 유전자 지문 분석법의 단독 또는 병용 분석을 통한 최적분석법을 확립하고자 하였다.
- 특정 균주를 대상으로 MLST와 같은 유전자 지문 분석을 하기 위해서는 유전자 지문의 데이터베이스가 필요하고 이를 위해서는 일정 수준 이상의 미생물 균주 수가 요구되기 때문에 본 연구팀에서는 본 연구과제를 통하여 상용화 종균으로 사용할 수 있는 후보균주 31주 중에서 *L. brevis* 10균주, *Leu. citreum* 1균주를 선정하여 연구에 사용하였고, 또한 다양한 분리원으로부터 유산균주를 분리하여 16S ribosomal DNA 유전자의 염기서열을 분석하고 이로부터 phylogenetic tree를 작성하여 종 수준의 동정을 수행함으로써 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *Leu. citreum*으로 동정된 균주를 선별하여 연구에 사용하였다.
- 선정된 균주인 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *Leu. citreum*은 서울, 경기지역에서 수집한 발효식품과 야채 및 과일로부터 분리하여 다음과 같이 동정하였다.

가. 균주의 분리 및 동정

(1) 유산균주 분리

- 연구에 사용할 유산균주를 분리하기 위하여 시료 1 g을 멸균생리식염수(3 M, MN, USA) 9 mL에 현탁한 후, $10^1 \sim 10^5$ 까지 십진 희석하여 BCP plate count agar 배지 (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 50 μ L씩 도말하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 단일 집락 주변 노란색 환이 생성된 집락을 1차 선별하였고, 선별된 집락은 lactobacilli MRS broth(Difco, NJ, USA)에 접종하여 멸균된 20%의 글리세린을 첨가하여 -80°C에서 동결 보존하여 사용하였다.

(2) 균주 동정

- Lactobacilli MRS 액체배지(Difco, MI, USA)에 분리된 유산균주의 단일 집락을 접종하여 37°C에서 16시간 정치 배양하였다. 배양액 3 mL을 13,200 rpm에서 1분 간 원심 분리하여 균체를 수확하고, 상등액을 제거하였다. 이후 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였고 균체에 1 mL의 TEN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)을 첨가하여 현탁하고, 원심분리하여 배지성분을 제거하였다. SET 완충용액(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA) 500 μ L를 첨가하여 현탁하고, 50 μ L의 lysozyme(60 mg/mL in TEN buffer, w/v)과 3 μ L의 RNase A용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응 용액에 25 μ L의 SDS(25%, w/v)와 20 μ L의 proteinase K를 첨가하여 조심스럽게 혼합하고, 37°C에서 30분 간 반응시켰다. 반응 종료 후, GC binding buffer 400 μ L를 첨가하여 60°C에서 10분 간 반응시키고, 200 μ L의 iso-propanol(Sigma-Aldrich, MO, USA)을 첨가하여 조심스럽게 혼합하였다. 반응액을 column tube에 옮겨서 원심분리를 통하여 DNA를 column에 부착시키고, 500 μ L의 washing buffer 1과 washing buffer 2를 순차적으로 첨가하여 순수하게 DNA를 부착시킨 후, 50 μ L의 멸균 3차 증류수로 DNA를 용출시켰다.
- 분리된 유산균 균주의 16S ribosomal gene의 DNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 균주의 genomic DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용해 분리한 후 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정에 사용하는 universal primer인 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel PCR clean-up system(Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 마크로젠(Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLAST 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 Clustal X와 Mega 5 program을 이용하여 비교분석하였다.

- 최종 선정된 유산균의 특성은 최종 선발균주의 colony를 취하여 Gram-stain, 3% KOH test, 운동성, catalase test, 당 분해로 인한 gas 생성 유무를 확인하였다. 생화학적 특성은 API CHL 50 kit를 사용하여 분석하였고, 최종 선발된 균주의 colony를 API medium에 현탁하여 이를 kit의 strip에 접종한 후 37°C에서 24시간, 48시간 배양한 후 medium의 색상 변화를 비교분석하여 당 분해 유무에 따른 생화학적 성질을 확인하였다.
- 본 연구에서 선정한 상용화 후보균주와 함께 상기 방법으로 분리 동정된 유산균주 중에서 본 연구에 적용할 균주로서 *Leu. mesenteroides* 37주, *L. brevis* 13주, *Leu. citreum* 14주를 최종 선정하였으며, 이를 Table 4-39~4-41에 정리하였다.

Table 4-39. *Leu. mesenteroides* strains isolated from different sources

Strain No.	Area/locality	Source	Isolator
KCCP 11083	Seongnam	Salted clam	Gachon University
KCCP 11204	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11253	Seongnam	Salted fish	Gachon University
KCCP 11259	Seongnam	Soybean Paste	Gachon University
KCCP 11260	Seongnam	Onion	Gachon University
KCCP 11392	Seongnam	Salted small octopus	Gachon University
KCCP 11416	Seongnam	Young Radish	Gachon University
KCCP 11426	Seongnam	Young Radish	Gachon University
KCCP 11427	Seongnam	Young Radish	Gachon University
KCCP 11460	Seongnam	Salted Clam	Gachon University
KCCP 11078	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11251	Seongnam	Chinese cabbage kimchi	Gachon University
KCCP 11289	Seongnam	Chinese cabbage kimchi	KCCM
KCCP 11323	Seongnam	Young Radish	Gachon University
KCCP 11357	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11358	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11359	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11360	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11361	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11362	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11363	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11364	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11386	Seongnam	Radish	Gachon University
KCCP 11396	Seongnam	Radish kimchi	Gachon University
KCCP 11434	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11435	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11436	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11437	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11438	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11439	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11440	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11441	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11443	Seongnam	Chinese cabbage kimchi	Gachon University
KCCP 11461	Seongnam	Chinese cabbage kimchi	Gachon University

KCCP 11463	Seongnam	Radish kimchi	Gachon University
KCCP 11464	Anseong	Kimchi	Gachon University
KCCP 11465	Anseong	Kimchi	Gachon University

Table 4-40. *L. brevis* strains isolated from different sources

Strain No.	Area/locality	Source	Isolator
200019	Seoul	Salted clam	KCCM
B13	Seoul	Kimchi	Konkuk University
B154	Seoul	Kimchi	Konkuk University
B7	Seoul	Kimchi	Konkuk University
200054	Seoul	Pickled vegetable	KCCM
B13-2	Seoul	Kimchi	Konkuk University
200080	Seoul	Mustard kimchi	KCCM
B15	Seoul	Kimchi	Konkuk University
G1	Seoul	Kimchi	Konkuk University
KU15006	Incheon	Turnip kimchi	Konkuk University
KCCP 11348	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11350	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11351	Seongnam	Kimchi	Gachon University

Table 4-41. *Leu. citreum* strains isolated from different sources

Strain No.	Area/locality	Source	Isolator
KCCP 11001	Seongnam	Sweet pumpkin	Gachon University
KCCP 11037	Sunchang	Salted small octopus	Gachon University
KCCP 11076	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11077	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11082	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11093	Seongnam	Pear	Gachon University
KCCP 11382	Seongnam	Salted small octopus	Gachon University
KCCP 11388	Seongnam	Young reddish kimchi	Gachon University
KCCP 11391	Seongnam	Salted small octopus	Gachon University
KCCP 11413	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11414	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11422	Seongnam	Kimchi	Gachon University
KCCP 11432	Seongnam	Salted oyster	Gachon University
KCCP 11447	Seongnam	Salted fish	Gachon University

나. Multilocus sequence typing(MLST) 분석법 개발

- MLST 분석법은 염색체 DNA에서 약 6~8개의 housekeeping 유전자의 염기서열을 결정하고 MLST database에 입력한 후 allelic profile들을 조합하여 sequence type(ST)을 결정하는 방법이다(Homan *et al.*, 2002).

- MLST 결과는 분리균들의 ST나 clonal complex(CC)를 확인할 수 있기 때문에 실험자와 실험실간의 오차 없이 동일 균종들의 역학적 기원 및 진화적 배경들을 추정할 수 있는 방법으로 재현성은 매우 우수한 장점이 있는 반면에, 각 특정 유전자의 염기서열 분석 방법에 의해 종에 제한이 있는 단점이 있다(Coffey *et al.*, 2006; Madslie *et al.*, 2012).

(1) *Leu. mesenteroides*의 MLST

(가) MLST target gene 선정과 PCR을 이용한 분리

- *Leu. mesenteroides*의 MLST 분석에 사용된 target gene은 core genome 분석 (<https://server.gview.ca>)과 Dan *et al.*(2014), Tanigawa *et al.*(2011)의 연구를 참고하여 Table 4-42와 같이 *atpA*(ATP synthase subunit alpha), *gyrB*(gyrase subunit B), *groEL*(molecular chaperone groEL), *pheS*(phenylalanine tRNA synthetase), *pyrG*(CTP synthase), *rpoA*(RNA polymerase), *uvrC*(exinuclease Uvr ABC, endonuclease subunit) 유전자 등 총 7개 유전자를 선정하였으며, 유전자의 염기서열은 NCBI database에서 확보하였다.
- 각 유전자의 특정 부위를 PCR로 증폭한 결과 PCR 산물의 크기는 *pyrG* 유전자가 437 bp로 가장 작았고 *uvrC*가 1,508 bp로 가장 컸다(Table 4-42).

Table 4-42. Target genes and PCR primers for MLST analysis of *Leu. mesenteroides*

Gene	Protein	PCR primer	Amplicon size(bp)
<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	F-5'-CTTACGGCATGGCCC-3' R-5'-CAACATTGGTGCTGGT-3'	530
<i>gyrB</i>	Gyrase subunit B	F-5'-TTGGTGCTTCTGTTGTT-3' R-5'-CATCCCCAAAGCCAG-3'	1,100
<i>groEL</i>	Molecular chaperone groEL	F-5'-CCTGGCATAACCACCTTGTG-3' R-5'-AAAATATGGGCGCTAAGCTTG T-3'	1,414
<i>pheS</i>	Phenylalanine tRNA synthetase	F-5'-ATTGAAGATCTTACGGC-3' R-5'-TCAACATAGCAAATCG-3'	960
<i>pyrG</i>	CTP synthase	F-5'-AGCAACGTTCTCTGGTG-3' R-5'-CTGTAGCACAATTACGTTC-3'	437
<i>rpoA</i>	RNA polymerase	F-5'-TTTGAAAAGCCAAATATTCAT -3' R-5'-GTTACGCACTTTCATCAT-3'	860
<i>uvrC</i>	Exinuclease Uvr ABC,	F-5'-TACAACACAACATATCG-3' R-5'-CAAGAGTAACTATCTGA-3'	1,508

endonuclease

subunit

- 따라서 이들 target 유전자를 cloning하기 위한 primer를 NCBI의 Primer-Blast program을 이용하여 위치와 서열을 디자인하여 Table 4-42와 같이 설계하였으며, 이를 위한 genomic DNA의 분리와 PCR 조건은 다음과 같았다.
- *Leu. mesenteroides* 균주로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 lactobacilli MRS 액체배지(Difco, MI, USA)에 단일 집락을 접종하여 37°C에서 16시간 정치배양하였다. 배양액 3 mL을 13,200 rpm에서 1분 간 원심분리하여 균체를 수확하고, 상등액을 제거하였다. 이후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였다.
- PCR은 AccuPrep[®] PreMix(Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 forward primer와 reverse primer를 각각 1 µL씩 첨가하고, 2 µL의 증류수를 첨가한 후 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였고, My Cyclor(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰다. 기본적인 PCR 반응은 pre-denaturation을 95°C에서 2분 실시한 후, denaturation step을 94°C에서 20초, annealing step은 각 유전자 별 특정 온도(*atpA*, 51°C; *groEL*, 60°C; *gyrB*, 49.2°C; *pheS*, 46.3°C; *pyrG*, 53.7°C; *rpoA*, 50.5°C; *uvrC*, 58.3°C)에서 30초, extension step은 72°C에서 30초로 하여 35 cycle을 실시한 후, post-extension을 72°C에서 7분 실시하였다.
- 분리된 균주의 genomic DNA와 PCR 산물을 확인하기 위하여 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액이 첨가된 agarose gel 전기영동을 수행하였는데, genomic DNA는 0.8%(w/v), PCR 산물은 1.2%(w/v)의 agarose gel을 이용하여 100 V의 정전압으로 수행하였다. 전기영동 후 agarose gel은 UV-filter가 장착된 gel document system(BIO-RAD)을 이용하여 사진촬영을 진행하였다.
- PCR 산물의 정제는 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system Kit(Promega, USA)를 이용하여 정제하였다. Kit 내의 membrane binding solution을 PCR 산물과 동량으로 첨가하여 binding column tube에 옮겨 원심분리(13,000 rpm, 1분)를 진행하였다. 원심분리 후, membrane을 빠져나온 용액을 제거하고, washing buffer 500 µL를 다시 분주하여 원심분리를 진행하여 membrane을 두 번 세척한 다음, 비어있는 column을 다시 한 번 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 washing buffer 내에 존재하는 에탄올을 제거하였다. Column을 새로운 tube에 옮겨 멸균 증류수로 PCR 산물을 용출하여 염기서열 분석에 이용하였다.
- 정제된 PCR 산물은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 Clustal X와 Mega 5 program을 이용하여 비교분석하였다.

- PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 이용하여 수행하였다. 결정된 염기서열은 Bioedit Sequence Alignment Editor ver. 7.2.5 program(Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분석하였고, 염기서열의 alignment는 Clustal X(<http://www.clustal.org/clustal2>)와 Mega 5 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 수행하였다.

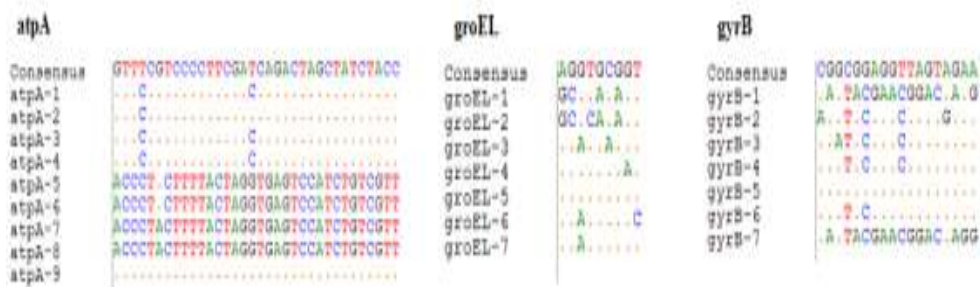
(나) MLST sequence type 분석

- MLST 분석을 위한 target 유전자의 GC content와 polymorphism data는 DNA sequence polymorphism 5.10(DnaSP) program을 이용하여 계산 및 작성하였으며, nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율은 SNAP program(www.hiv.lanl.gov)(Korber, 2000)을 이용하여 계산하였다.
- MLST 분석법은 target 유전자의 염기서열 분석을 통해 분석 대상의 균주들에 대한 single nucleotide polymorphism에 기반을 둔 분석법이므로 본 연구에 사용된 37주의 *Leu. mesenteroides*가 지니고 있는 7가지 target 유전자의 single nucleotide polymorphism을 Bionumerics(Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium) software program을 이용하여 분석함으로써 allelic profile을 작성하였으며, 이로부터 각 균주의 sequence type(ST)을 결정하였다.
- 각각의 sequence type에 대한 진화적 상관관계는 Bionumerics program을 이용하여 조사하였으며, sequence type 간의 상관관계는 S.T.A.R.T. 2 ver. 0.9.0를 이용하여 UPGMA 법에 의해 phylogenetic tree를 작성하여 분석하였다. 또한 split decomposition 분석은 splits tree software(version 4.14)(Huson and Bryant, 2006)를 이용하여 각 균주 별 7개의 target 유전자에 대한 split tree를 작성하였으며, bionumerics software를 이용하여 분석하였다.
- 본 연구에서 선정한 37주의 *Leu. mesenteroides* 중에서 2균주는 7개의 target 유전자 중 일부 유전자에 대한 분리 또는 염기서열 결정이 성공적으로 이루어지지 않아 최종 35균주를 대상으로 MLST 분석을 수행하였다.
- 그 결과 각각의 target 유전자에 대한 polymorphic site, GC content, nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율을 분석하여 Table 4-43에 나타내었다. Polymorphic site는 *groEL* 유전자가 9개로 가장 적었고, *pheS* 유전자가 282개로 가장 많은 것으로 나타났다. 이 결과는 *Leu. mesenteroides* 중에서 일부 균주들은 상당한 대립유전자들의 변이가 있음을 나타내는 것으로, *pheS* 유전자의 polymorphic site가 많은 이유는 No. 11078 균주가 지니는 *pheS* 유전자가 다수의 polymorphic site를 지니고 있기 때문이다.
- 각 target 유전자의 여러 allele을 구성하는 polymorphic nucleotide site의 염기서열을 Figure 4-63에 나타내었다.

- 7종류 target 유전자의 GC content는 *pyrG* 유전자가 37.2%로 가장 낮았고, *rpoA* 유전자가 43.4%로 가장 높았다. Makarova *et al.*(2006)의 연구에 의하면 *Leu. mesenteroides*의 전체 유전체의 GC content는 37.7%로 보고되었다.
- Nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율인 dN/dS 값은 특정 유전자의 염기서열의 진화 속도를 측정할 수 있는 척도이다. Nonsynonymous substitution은 nonsynonymous site당 발생하는 nonsynonymous substitution의 숫자이고, synonymous substitution은 synonymous site당 발생하는 synonymous substitution의 숫자이다. Synonymous substitution은 선택 압력하에서 기능적 변화가 없는 중성적 진화이기 때문에 dN/dS 값은 진화의 background 속도에 대한 적응 진화의 속도를 나타낸다. 따라서 dN/dS 값은 개체의 진화에 대한 선택 압력을 나타내는 것을 의미하는 것으로 dN/dS 값이 1보다 클 경우 nonsynonymous substitution이 synonymous substitution보다 빠르다는 것을 의미하며, dN/dS 값이 1보다 작을 경우에는 단백질의 기능에 영향을 주는 substitution이 제거됨을 의미한다. 따라서 dN/dS 값이 클수록 적응 변이가 발생되고 빠른 속도로 진행된다는 것을 의미한다.
- 조사한 7종류 유전자에 대한 dN/dS 값은 *gyrB* 유전자는 0.0718로 가장 작았고, *uvrC*는 1.8643으로 가장 컸다. 7개의 유전자 중 3개의 유전자(*groEL*, *pyrG*, *uvrC*)의 dN/dS 값은 1보다 큰 것으로 나타나 선택 압력이 높은 것으로 나타났다.

Table 4-43. Allelic variation in seven target genes of *Leu. mesenteroides*

Locus	Polymorphic sites	GC content (mol%)	dN/dS
<i>atpA</i>	34	42.5	0.2143
<i>groEL</i>	9	42.0	1.1039
<i>gyrB</i>	18	38.7	0.0718
<i>pheS</i>	282	40.1	0.6334
<i>pyrG</i>	48	37.2	1.5332
<i>rpoA</i>	27	43.4	0.0752
<i>uvrC</i>	23	39.1	1.8643



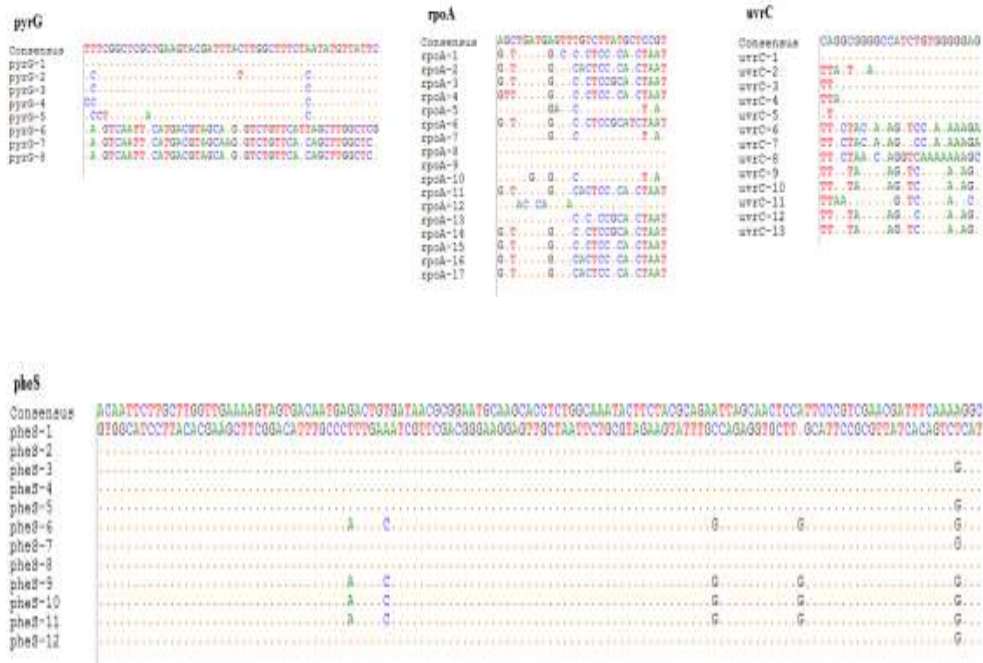


Figure 4-63. Polymorphic nucleotide sites(SNPs) in *Leu. mesenteroides* MLST target genes. Only the variable sites are shown with respect to the putative consensus sequence.

- 조사한 35균주들의 sequence type을 결정한 결과, Table 4-44과 같이 27개의 sequence type이 존재함을 알 수 있었다. 35균주 중에서 No. 11204, 11251, 11357, 11359, 11396 등 5균주가 ST-3를 지니고 있었고, No. 11289, 11360, 11362, 11364, 11389 등 5균주는 ST-5를 지니고 있었으며, 나머지 균주들은 각각 고유의 sequence type을 지니고 있었다. Sequence type에 대한 phylogenetic 분석을 수행하여 sequence type 간의 유전적 상관성을 조사하여 Figure 4-64에 나타내었다.

Table 4-44. Sequence types(ST) and allelic profile of *Leu. mesenteroides*

ST	<i>atpA</i>	<i>groEL</i>	<i>gyrB</i>	<i>pheS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rpoA</i>	<i>uvrC</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	1	1	2	2	2	2
3	1	2	1	3	3	3	3
4	1	1	1	4	4	4	4
5	3	2	1	3	3	3	3
6	1	2	1	3	5	3	3
7	1	2	1	5	3	3	5
8	4	2	1	3	3	3	3
9	5	3	2	6	6	5	6
10	3	1	1	7	3	6	3
11	1	1	1	3	3	3	3
12	6	4	3	8	7	2	2
13	3	2	1	4	3	3	3
14	6	5	4	9	8	7	7

15	7	6	5	6	8	8	8
16	8	7	6	10	8	9	9
17	8	7	6	6	8	8	10
18	6	4	3	11	7	10	11
19	2	4	3	8	2	11	2
20	5	5	4	11	8	7	12
21	7	7	6	6	8	12	13
22	1	2	1	3	3	13	3
23	3	2	1	12	3	3	3
24	3	1	1	3	3	14	3
25	3	1	1	4	3	15	4
26	2	1	7	4	2	16	2
27	9	1	7	4	2	17	2

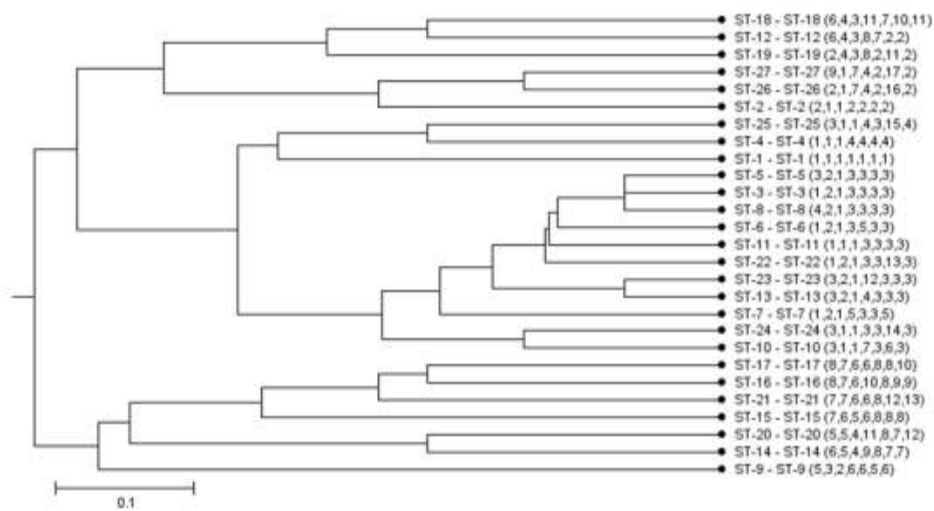


Figure 4-64. UPGMA dendrogram showing the genetic relationship between 27 STs belonging to *Leu. mesenteroides* via MLST typing.

- Target 유전자 내부의 재조합 정도를 측정하기 위하여 각 유전자에 대한 split decomposition 분석을 실시하여 Figure 4-65에 나타내었다. 조사한 7개의 유전자 중에서 *pheS* 유전자만이 parallelogram 모양의 구조를 지니고 있었는데, 이는 *pheS* 유전자 내부에서 재조합이 일어났음을 의미한다. Meslier *et al.*(2012)의 연구에 따르면 *Leuconostoc* spp.에서는 bacteriophage, genomic island, transposable element 등과 같은 mobile element들이 유전체 내에 발견되어 유전자 재조합이 빈번히 일어남을 보고한 바 있다.

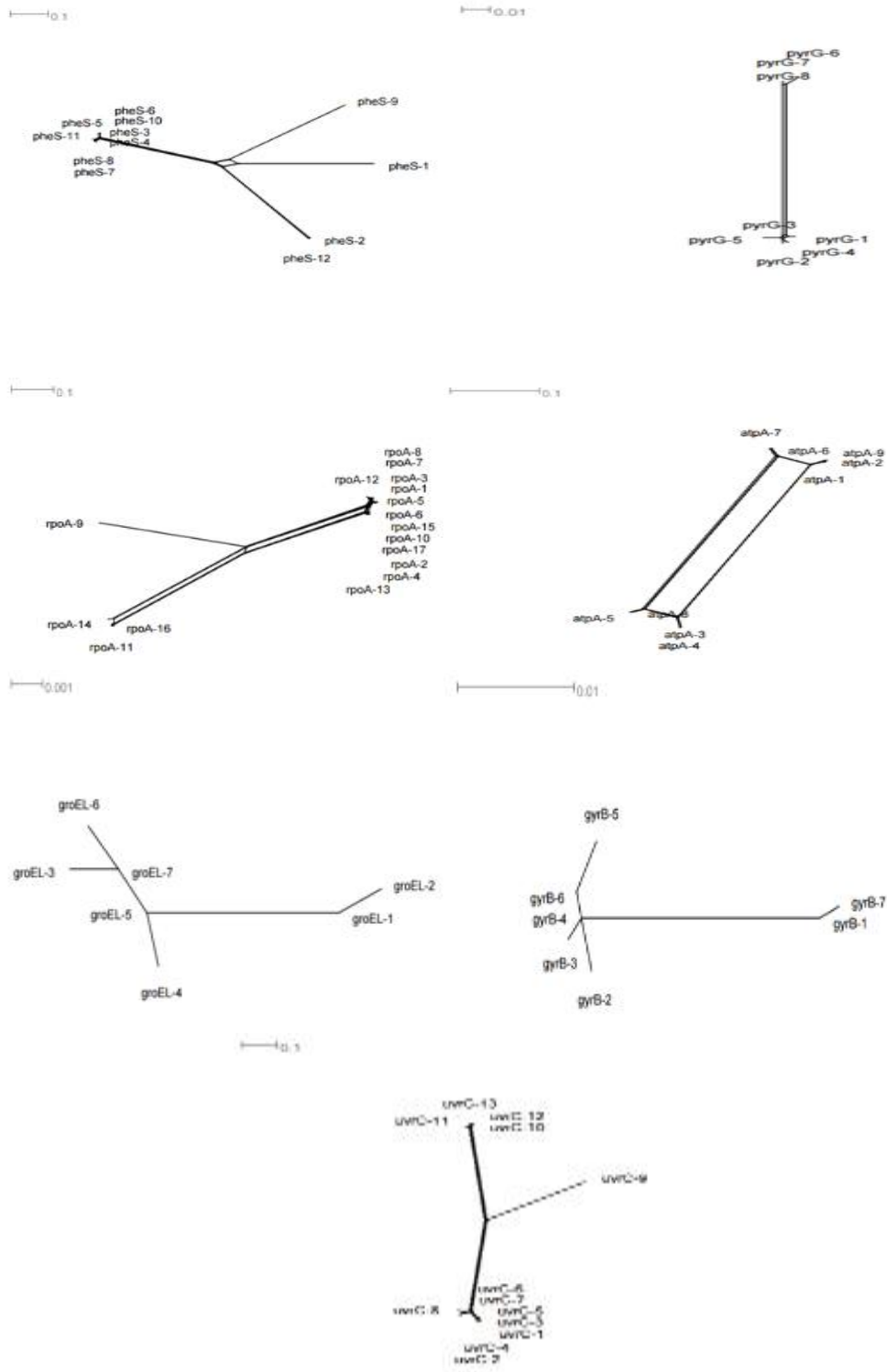


Figure 4-65. Split-decomposition analysis of 7 individual alleles for multilocus sequence typing (MLST) loci (*pheS*, *pyrG*, *rpoA*, *atpA*, *groEL*, *gyrB*, and *uvrC*) of 35 *Leu. mesenteroides* strains.

- 한편, De Las *et al.*(2004)에 따르면 parallelogram 모양의 구조가 *O. oeni*의 *ddl*, *pgm*, *recP*의 split 그래프에서 나타난바 있다. *pheS* 유전자 이외의 나머지 여섯 유전자의 split tree decomposition은 tree 유사구조를 나타내었는데, 이는 유전자 내 재조합이 일어나지 않음을 의미하는 것이다. 반면에, 7 유전자의 concatenated 염기서열은 전형적인 network 유사구조를 나타내었으며, 2개의 주요 그룹으로 나눌 수 있었다 (Figure 4-66).

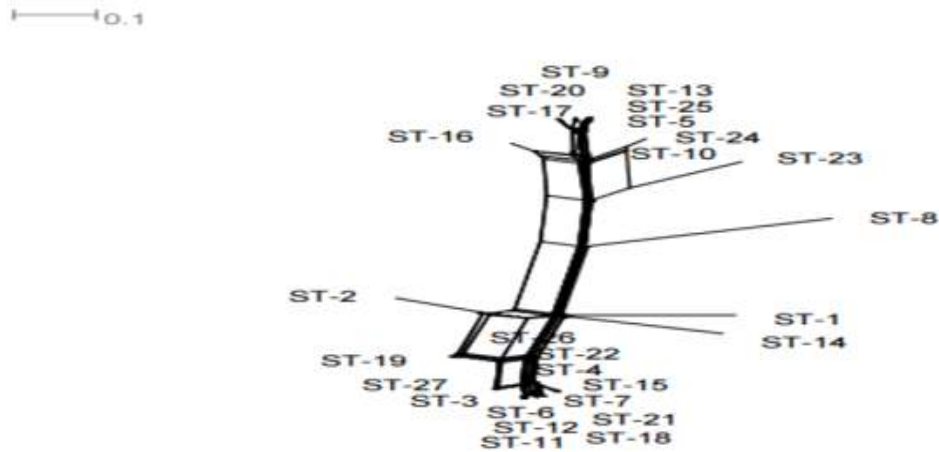


Figure 4-66. Combined split decomposition analysis of alleles of 7 sequence type(ST) loci(*pheS*, *pyrG*, *rpoA*, *atpA*, *groEL*, and *gyrB*) of 35 *Leu. mesenteroides* strains.

- 각 균주와 sequence type 간의 유전적 유사성을 비교하기 위하여, minimum spanning tree(MST)(Dan *et al.*, 2014)를 작성하여 Figure 4-67에 나타내었다. 각각의 원은 특정 sequence type을 의미하며, 원의 크기는 같은 sequence type을 지니는 균주의 개수를 의미한다. 또한 원을 연결시키는 선의 길이는 균주들의 profile에 대한 유전적 유사성을 나타낸다.

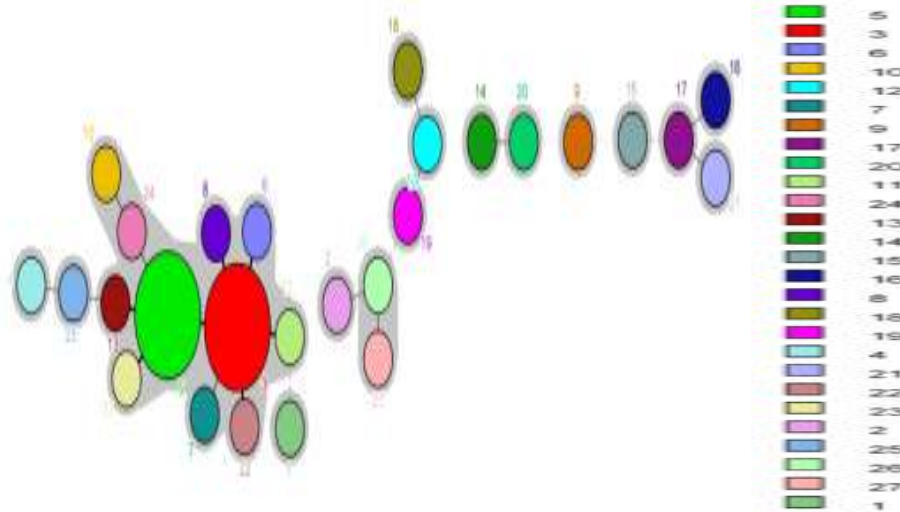


Figure 4-67. Minimum-spanning tree analysis of the 35 *Leu. mesenteroides* strains. Each circle corresponds to a sequence type(ST) and the circle size denotes the number of strains sharing the same ST.

(2) *L. brevis*의 MLST

(가) MLST target gene 선정과 PCR을 이용한 분리

- *L. brevis*의 MLST 분석에 사용된 target gene은 core genome 분석 (<https://server.gview.ca>)과 Dan *et al.*(2014), Tanigawa *et al.*(2011)의 연구를 참고하여 Table 4-45과 같이 *dnaK*(chaperone hsp70), *gyrB*(gyrase subunit B), *groEL*(molecular chaperone groEL), *pheS*(phenylalanine tRNA synthetase), *recA*(recombinase A), *rpoA*(RNA polymerase), *rpoB*(RNA polymerase beta subunit) 유전자 등 총 7개 유전자를 선정하였으며, 이들 유전자의 synteny는 1차년도에 분석을 이미 완료하여 선정한 유전자들이 target gene으로서 유용한 것임을 확인한 바 있다. 유전자의 염기서열은 NCBI database에서 확보하였다.
- 각 유전자의 특정 부위를 증폭한 PCR 산물의 크기는 *rpoB* 유전자가 314 bp로 가장 작았고 *dnaK*가 1,637 bp로 가장 컸다.

Table 4-45. Target genes and PCR primers for MLST analysis of *L. brevis*

Gene	Protein	PCR primer	Amplicon size(bp)
<i>dnaK</i>	Chaperone hsp70	F-5'-TCGTCGTCGTTAACTTCGTG -3' R-5'-CACATGGGTGAAGCTGGCTA-3'	1,637

<i>gyrB</i>	Gyrase subunit B	F-5'-AAGGCGTCAAGATTACCCTAAC -3' R-5'-TTCATTTTTTCATGATGTCTGGGC -3'	815
<i>groEL</i>	Molecular chaperone groEL	F-5'-GGATTGAAAAGGCGACTGG-3' R-5'-TCATCAGCGATGATTAAGAGT- 3'	400
<i>pheS</i>	Phenylalanine tRNA synthetase	F-5'-CAAGGAAATTTTGATGCGGA-3' R-5'-GTTACAACCCTTTCCACCAC-3'	340
<i>recA</i>	Recombinase A	F-5'-CACTTGACGTTGCCT-3' R-5'-CCGTGCCATCTTTAATCT-3'	570
<i>rpoA</i>	RNA polymerase	F - - - - 5 ' - - AGCTGTTACCAGCATTCAAA-3' R-5'-GCTCTTCGATGGTCATCTC-3' F-5'-GATACCGGTGAAATTATTGCC-	626
<i>rpoB</i>	RNA polymerase beta subunit	3' R-5'-TCAATATCATCAGTGTTACCAA -3'	314

- 따라서 이들 target 유전자를 cloning하기 위한 primer를 NCBI의 Primer-Blast program을 이용하여 위치와 서열을 디자인하여 Table 4-45와 같이 설계하였으며, 이를 위한 genomic DNA의 분리와 PCR 조건은 다음과 같았다.
- *L. brevis* 균주로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 lactobacilli MRS 액체배지 (Difco, MI, USA)에 단일 집락을 접종하여 37°C에서 16시간 정치 배양하였다. 배양액 3 mL을 13,200 rpm에서 1분 간 원심분리하여 균체를 수확하고, 상등액을 제거하였다. 이후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였다.
- PCR은 AccuPrep[®] PreMix(Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 forward primer와 reverse primer를 각각 1 µL씩 첨가하고, 2 µL의 증류수를 첨가한 후 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였고, My Cycloer(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰다. 기본적인 PCR 반응은 pre-denaturation을 95°C에서 2분 실시한 후, denaturation step을 94°C에서 20초, annealing step은 각 유전자 별 특정 온도(*dnaK*, 60.5°C; *groEL*, 57.4°C; *gyrB*, 60.3°C; *pheS*, 57.3°C; *recA*, 49.8°C; *rpoA*, 56.8°C; *rpoB*, 57.0°C)에서 30초, extension step은 72°C에서 30초로 하여 35 cycle을 실시한 후, post-extension을 72°C에서 7분 실시하였다.
- 분리된 균주의 genomic DNA와 PCR 산물을 확인하기 위하여 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액이 첨가된 agarose gel 전기영동을 수행하였는데, genomic DNA는 0.8%(w/v), PCR 산물은 1.2%(w/v)의 agarose gel을 이용하여 100 V의 정전압으로 수행하였다.

- 전기영동 후 agarose gel은 UV-filter가 장착된 gel document system(BIO-RAD)을 이용하여 사진촬영을 진행하였다.
- PCR 산물의 정제는 Wizard SV Gel과 PCR Clean-Up system Kit(Promega, USA)를 이용하여 정제하였다. Kit 내의 membrane binding solution을 PCR 산물과 동량으로 첨가하여 binding column tube에 옮겨 원심분리(13,000 rpm, 1분)를 진행하였다. 원심분리 후, membrane을 빠져나온 용액을 제거하고, washing buffer 500 μ L를 다시 분주하여 원심분리를 진행하여 membrane을 두 번 세척한 다음, 비어있는 column을 다시 한 번 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 washing buffer 내에 존재하는 에탄올을 제거하였다. Column을 새로운 tube에 옮겨 멸균 증류수로 PCR 산물을 용출하여 염기서열 분석에 이용하였다.
- 정제된 PCR 산물은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 Clustal X와 Mega 5 program을 이용하여 비교분석하였다.
- PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 이용하여 수행하였다. 결정된 염기서열은 Bioedit Sequence Alignment Editor ver. 7.2.5. program(Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분석하였고, 염기서열의 alignment는 Clustal X(<http://www.clustal.org/clustal2>)와 Mega 5 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 수행하였다.

(나) MLST sequence type 분석

- MLST 분석을 위한 target 유전자의 GC content와 polymorphism data는 DNA sequence polymorphism 5.10(DnaSP) program을 이용하여 계산 및 작성하였으며, nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율은 SNAP program(www.hiv.lanl.gov)(Korber B., 2000)을 이용하여 계산하였다.
- MLST 분석법은 target 유전자의 염기서열 분석을 통해 분석 대상의 균주들에 대한 single nucleotide polymorphism에 기반을 둔 분석법이므로 본 연구에 사용된 13주의 *L. brevis*가 지니고 있는 7가지 target 유전자의 single nucleotide polymorphism을 Bionumerics(Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium) software program을 이용하여 분석함으로써 allelic profile을 작성하였으며, 이로부터 각 균주의 sequence type(ST)을 결정하였다.

- 각각의 sequence type에 대한 진화적 상관관계는 Bionumerics program을 이용하여 조사하였으며, sequence type 간의 상관관계는 S.T.A.R.T. 2 ver. 0.9.0를 이용하여 UPGMA법에 의해 phylogenetic tree를 작성하여 분석하였다. 또한 split decomposition 분석은 Splits tree software(version 4.14)(Huson and Bryant, 2006)를 이용하여 각 균주별 7개의 target 유전자에 대한 split tree를 작성하였으며, Bionumerics software를 이용하여 분석하였다.
- 본 연구에서 선정된 13주의 *L. brevis*의 target 유전자에 대한 polymorphic site, GC content, nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율을 분석하여 Table 4-46에 나타내었다. Polymorphic site는 *groEL* 유전자가 0개로 가장 적었고, *recA* 유전자가 17개로 가장 많은 것으로 나타났다. 이 결과로 *L. brevis*의 polymorphic site의 변화는 *Leu. mesenteroides*와 비교해서 높지 않음을 알 수 있었고 *groEL* 유전자는 SNP가 없는 것으로 나타났다.

Table 4-46. Allelic variation in seven target genes of *L. brevis*

Locus	Polymorphic sites	GC content (mol%)	dN/dS
<i>dnaK</i>	10	44.5	2.490
<i>groEL</i>	0	42.9	0
<i>gyrB</i>	16	48.3	0.2253
<i>pheS</i>	9	46.7	0.8248
<i>recA</i>	17	50.2	1.3617
<i>rpoA</i>	10	45.7	0.7596
<i>rpoB</i>	3	42.2	0.1345

- 각 target 유전자의 여러 allele을 구성하는 polymorphic nucleotide site의 염기서열을 Figure 4-68에 나타내었다.
- 7종류 target 유전자의 GC content는 *rpoB* 유전자가 42.2%로 가장 낮았고, *recA* 유전자가 50.2%로 가장 높았다. 7개 target 유전자의 평균 GC content는 45.78%로 *Leu. mesenteroides*나 *Leu. citreum*보다 높은 것으로 나타났다.
- 조사한 7종류 유전자에 대한 dN/dS 값은 *groEL* 유전자는 0으로 가장 작았고, *dnaK* 유전자는 2.490으로 가장 컸다. 7개의 유전자 중 5개의 유전자(*groEL*, *gyrB*, *pheS*, *rpoA*, *rpoB*)의 dN/dS 값은 1보다 낮은 것으로 나타나 선택 압력이 낮은 것으로 나타났다.

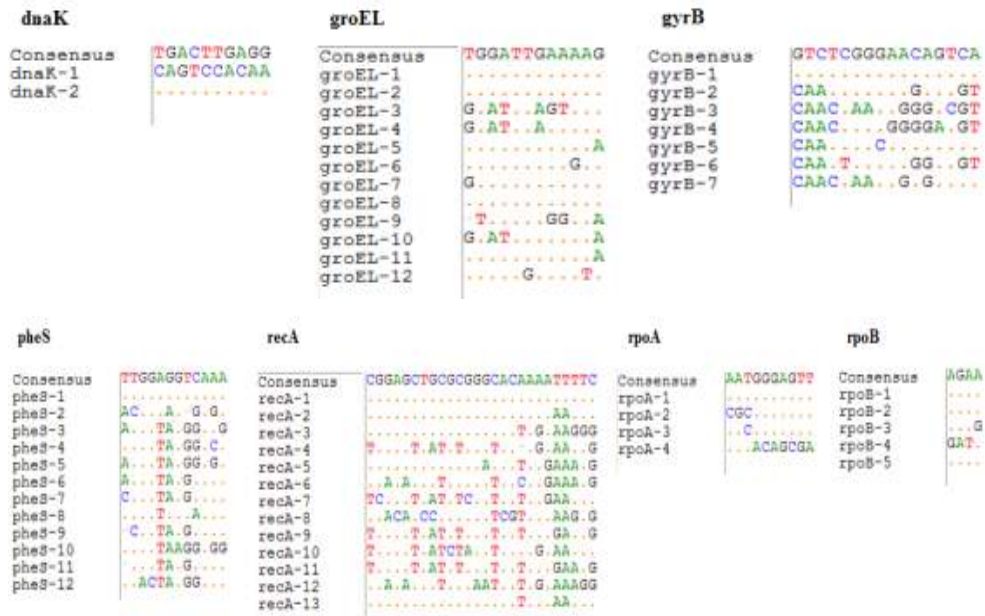


Figure 4-68. Polymorphic nucleotide sites(SNPs) in *L. brevis* MLST target genes. Only the variable sites are shown with respect to the putative consensus sequence.

- 조사한 13균주들의 sequence type을 결정한 결과, Table 4-47과 같이 13균주 모두 각각의 sequence type을 지니고 있어 총 13개의 sequence type이 존재함을 알 수 있었다. Sequence type에 대한 phylogenetic 분석을 수행하여 sequence type 간의 유전적 상관성을 조사하여 Figure 4-69에 나타내었다.

Table 4-47. Sequence types(ST) and allelic profile of *L. brevis*

ST	<i>dnaK</i>	<i>groEL</i>	<i>gyrB</i>	<i>p6heS</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2	1	2
3	1	2	2	3	3	1	1
4	1	3	2	4	4	2	1
5	2	4	2	5	5	1	1
6	1	5	3	5	6	3	3
7	1	6	2	6	7	4	1
8	1	7	4	7	8	3	4
9	1	8	5	8	9	1	1
10	1	9	2	9	10	1	5
11	1	10	2	10	11	1	1
12	2	11	6	11	12	1	1
13	1	12	7	12	13	1	1

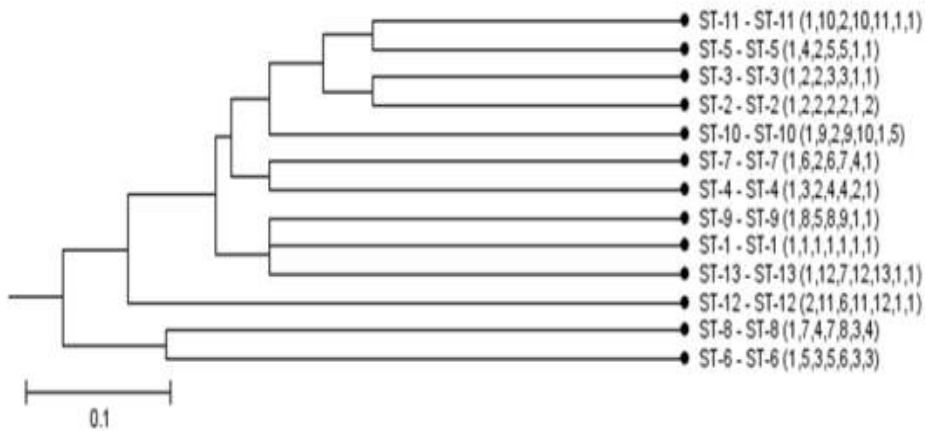
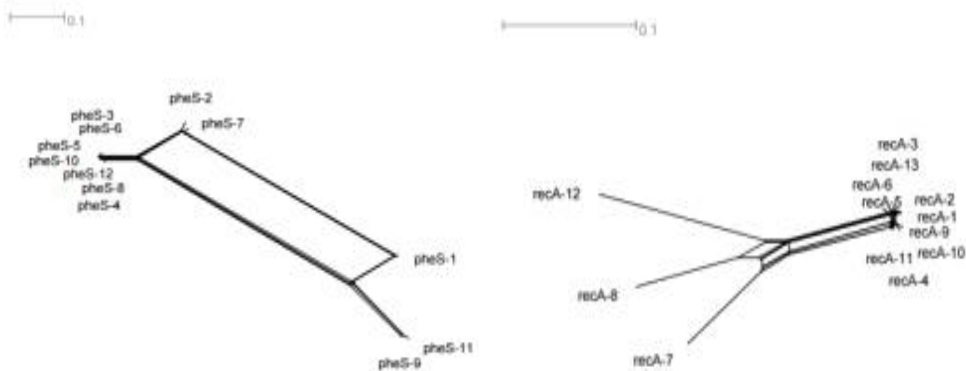


Figure 4-69. UPGMA dendrogram showing the genetic relationship between 13 STs belonging to *L. brevis* via MLST typing.

- Target 유전자 내부의 재조합 정도를 측정하기 위하여 각 유전자에 대한 split decomposition 분석을 실시하여 Figure 4-70에 나타내었다. 조사한 7개의 유전자 중에서 *recA*, *rpoB*, *gyrB* 유전자들이 parallelogram 모양의 구조를 지니고 있어 유전자 내부에서 재조합이 일어났음을 알 수 있었다. *groEL*, *pheS*, *recA*, *rpoA* 유전자들의 split tree decomposition은 tree 유사구조를 나타내어, 유전자내 재조합이 일어나지 않음을 확인하였다. 반면에, 7 유전자의 concatenated 염기서열은 전형적인 network 유사구조를 나타내었다(Figure 4-71).



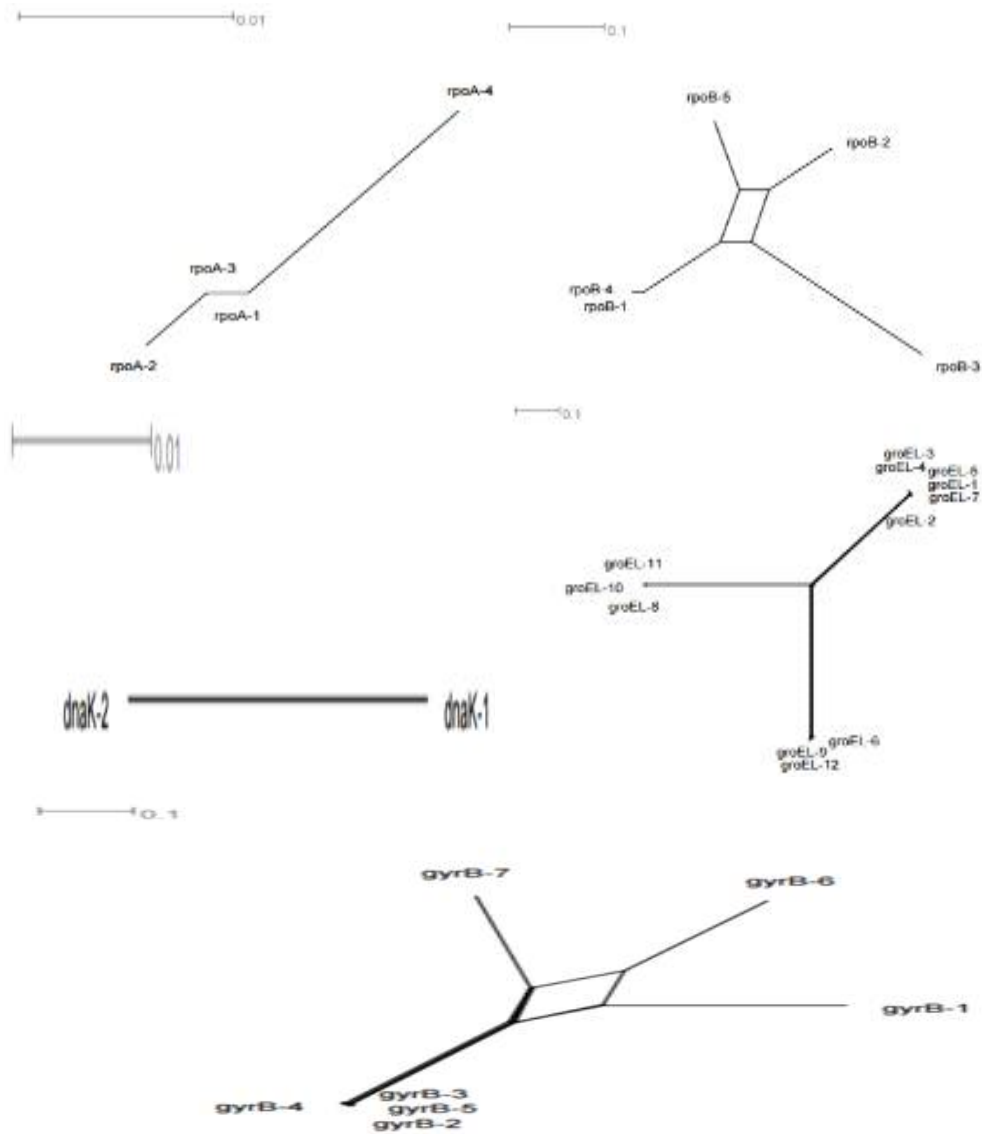


Figure 4-70. Split-decomposition analysis of 7 individual alleles for multilocus sequence typing (MLST) loci (*dnaK*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, and *rpoB*) of 13 *L. brevis* strains.

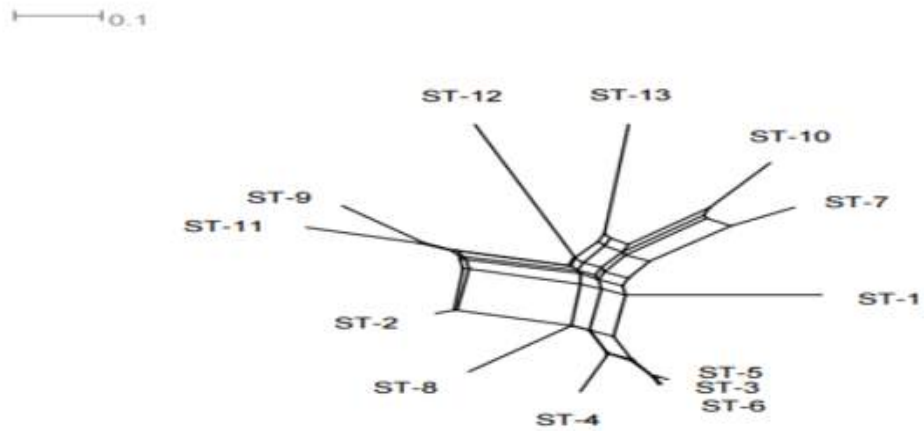


Figure 4-71. Combined split decomposition analysis of alleles of 7 sequence type(ST) loci(*dnaK*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, and *rpoB*) of 13 *L. brevis* strains.

- 각 균주와 sequence type 간의 유전적 유사성을 비교하기 위하여, minimum spanning tree(MST)(Dan *et al.*, 2014)를 작성하여 Figure 4-72에 나타내었다.

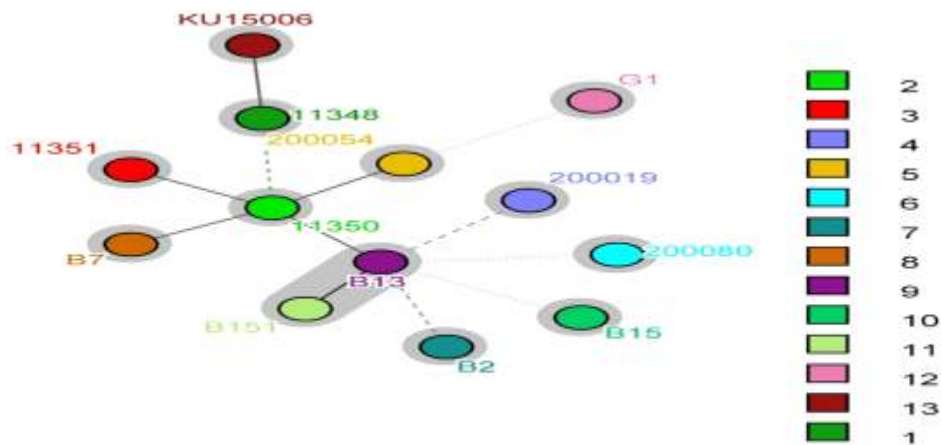


Figure 4-72. Minimum-spanning tree analysis of the 13 *L. brevis* strains.

(3) *Leu. citreum*의 MLST

(가) MLST target gene 선정과 PCR을 이용한 분리

- *Leu. citreum*의 MLST 분석에 사용된 target gene은 *atpA*(ATP synthase subunit alpha), *dnaA*(chromosomal replication initiation protein), *dnaK*(chaperone hsp70), *gyrB*(gyrase subunit B), *pheS*(phenylalanine tRNA synthetase), *pyrG*(CTP synthase), *rpoA*(RNA polymerase) 유전자 등 총 7개 유전자를 선정하였다.
- 따라서 이들 target 유전자를 cloning하기 위한 primer를 NCBI의 Primer-Blast program을 이용하여 위치와 서열을 디자인하여 Table 4-48과 같이 설계하였으며, 이를 위한 genomic DNA의 분리와 PCR 조건은 다음과 같았다.

Table 4-48. Target genes and PCR primers for MLST analysis of *Leu. citreum*

Gene	Protein	PCR primer	Amplicon size(bp)
<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	F-5'-GTTTTTCGAGCCATTACAA-3' R-5'-GTGATTGAGATAACGTTTG-3'	590
<i>dnaA</i>	Chromosomal replication initiation protein	F-5'-CCAATTACAAAAGAGGAACTA-3' R-5'-TTATCTTGTTGGTTGCGTG-3'	1,261
<i>dnaK</i>	Chaperone hsp70	F-5'-GAAGGTGGCGAACCAAAAA-3' R-5'-AGCCAATGCTTCTGTCTTAG-3'	1,647
<i>gyrB</i>	Gyrase subunit B	F-5'-ATAAAGTCTCTGGTGGATT-3' R-5'-TGGTAGGATAGCTTGTGTTA-3'	1,022
<i>pheS</i>	Phenylalanine tRNA synthetase	F-5'-CACAACTTCACCTGT-3' R-5'-ACGTCTACTTCAACTG-3'	286
<i>pyrG</i>	CTP synthase	F-5'-ACCGTGGCTTAAAATTGGC-3' R-5'-TCACTGCCAAGATCTGATTTCAT-3'	415
<i>rpoA</i>	RNA polymerase	F-5'-CGTTGTTGAAGATGTCACAC-3' R-5'-GCCAACACGCCGATAG-3'	291

- *Leu. citreum* 균주로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 lactobacilli MRS 액체배지(Difco, MI, USA)에 단일 집락을 접종하여 37°C에서 16시간 정치 배양하였다. 배양액 3 mL을 13,200 rpm에서 1분 간 원심분리하여 균체를 수확하고, 상등액을 제거하였다. 이후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였다.
- PCR은 AccuPrep[®] PreMix(Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 forward primer와 reverse primer를 각각 1 µL씩 첨가하고, 2 µL의 증류수를 첨가한 후 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였고, My Cyclor(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰다.

- 기본적인 PCR 반응은 pre-denaturation을 95°C에서 2분 실시한 후, denaturation step을 94°C에서 20초, annealing step은 각 유전자 별 특정 온도(*atpA*, 51.1°C; *dnaA*, 54.2°C; *dnaK*, 56.8°C; *gyrB*, 54.6°C; *pheS*, 46.6°C; *pyrG*, 58.0°C; *rpoA*, 56.0°C)에서 30초, extension step은 72°C에서 30초로 하여 35 cycle을 실시한 후, post-extension을 72°C에서 7분 실시하였다.
- 분리된 균주의 genomic DNA와 PCR 산물을 확인하기 위하여 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액이 첨가된 agarose gel 전기영동을 수행하였는데, genomic DNA는 0.8%(w/v), PCR 산물은 1.2%(w/v)의 agarose gel을 이용하여 100 V의 정전압으로 수행하였다. 전기영동 후 agarose gel은 UV-filter가 장착된 gel document system(BIO-RAD)을 이용하여 사진촬영을 진행하였다.
- PCR 산물의 정제는 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system Kit(Promega, USA)를 이용하여 정제하였다. Kit 내의 membrane binding solution을 PCR 산물과 동량으로 첨가하여 binding column tube에 옮겨 원심분리(13,000 rpm, 1분)를 진행하였다. 원심분리 후, membrane을 빠져나온 용액을 제거하고, washing buffer 500 µL를 다시 분주하여 원심분리를 진행하여 membrane을 두 번 세척한 다음, 비어있는 column을 다시 한 번 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 washing buffer 내에 존재하는 에탄올을 제거하였다. Column을 새로운 tube에 옮겨 멸균 증류수로 PCR 산물을 용출하여 염기서열 분석에 이용하였다.
- 정제된 PCR 산물은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLAST 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 Clustal X와 Mega 5 program을 이용하여 비교분석하였다.
- PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 이용하여 수행하였다. 결정된 염기서열은 Bioedit Sequence Alignment Editor ver. 7.2.5 .program(Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분석하였고, 염기서열의 alignment는 Clustal X(<http://www.clustal.org/clustal2>)와 Mega 5 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 수행하였다.

(나) MLST sequence type 분석

- MLST 분석을 위한 target 유전자의 GC content와 polymorphism data는 DNA sequence polymorphism 5.10(DnaSP) program을 이용하여 계산 및 작성하였으며, nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율은 SNAP program(www.hiv.lanl.gov)(Korber, 2000)을 이용하여 계산하였다.

- MLST 분석법은 target 유전자의 염기서열 분석을 통해 분석 대상의 균주들에 대한 single nucleotide polymorphism에 기반을 둔 분석법이므로 본 연구에 사용된 37주의 *Leu. citreum*이 지니고 있는 7가지 target 유전자의 single nucleotide polymorphism을 Bionumerics(Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium) software program을 이용하여 분석함으로써 allelic profile을 작성하였으며, 이로부터 각 균주의 sequence type(ST)을 결정하였다.
- 각각의 sequence type에 대한 진화적 상관관계는 Bionumerics program을 이용하여 조사하였으며, sequence type 간의 상관관계는 S.T.A.R.T. 2 ver. 0.9.0를 이용하여 UPGMA법에 의해 phylogenetic tree를 작성하여 분석하였다. 또한 split decomposition 분석은 Splits tree software(version 4.14)(Huson and Bryant, 2006)를 이용하여 각 균주별 7개의 target 유전자에 대한 split tree를 작성하였으며, Bionumerics software를 이용하여 분석하였다.
- 본 연구에서 선정한 14주의 *Leu. citreum*이 지니고 있는 7개의 target 유전자에 대한 polymorphic site, GC content, nonsynonymous substitution과 synonymous substitution과의 비율을 분석하여 Table 4-49에 나타내었다.
- Polymorphic site는 *rpoA* 유전자가 2개로 가장 적었고, *pyrG* 유전자가 194개로 가장 많은 것으로 나타났으며, *gyrB* 유전자가 173개로 두 번째로 많은 것으로 나타났다. 이 결과는 *Leu. citreum* 중에서 일부 균주들은 상당한 대립유전자들의 변이가 있음을 나타내는 것으로, *pheS* 유전자와 *gyrB* 유전자의 polymorphic site가 많은 이유는 No. 11001 균주가 지니는 *pheS* 유전자와 *gyrB* 유전자가 다수의 polymorphic site를 지니고 있기 때문이다.

Table 4-49. Allelic variation in seven target genes of *Leu. citreum*

Locus	Polymorphic sites	GC% content	dN/dS
<i>atpA</i>	7	41.2	0
<i>dnaA</i>	12	38.6	1.0000
<i>dnaK</i>	26	41.9	1.5000
<i>gyrB</i>	173	41.6	0.7900
<i>pheS</i>	5	42.3	0.3874
<i>pyrG</i>	194	39.4	0.6202
<i>rpoA</i>	2	43.5	0.2460

- 각 target 유전자의 여러 allele을 구성하는 polymorphic nucleotide site의 염기서열을 Figure 4-73에 나타내었다.
- 7종류 target 유전자의 GC content는 *dnaA* 유전자가 38.6%로 가장 낮았고, *rpoA* 유전자가 43.5%로 가장 높았다. *Leu. citreum*의 전체 유전체의 GC content는 41.21%로 보고되어 있다.

- 조사한 7종류 유전자에 대한 dN/dS 값은 *rpoA* 유전자는 0.2460으로 가장 작았고, *dnaK*는 1.5000으로 가장 컸다. 7개의 유전자 중 5개의 유전자(*atpA*, *gyrB*, *pheS*, *pyrG*, *rpoA*)의 dN/dS 값은 1보다 작았고, 2개의 유전자(*dnaA*, *dnaK*)의 dN/dS 값은 1과 같거나 큰 것으로 선택 압력이 높은 것으로 나타났다.

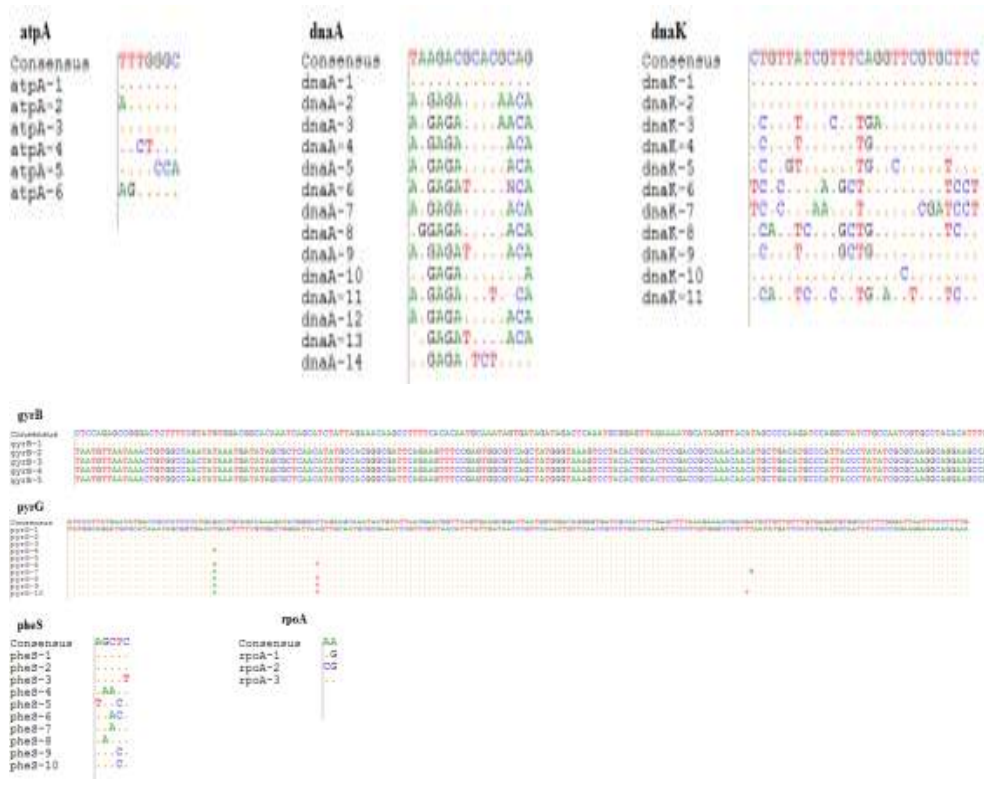


Figure 4-73. Polymorphic nucleotide sites(SNPs) in *Leu. citreum* MLST target genes. Only the variable sites are shown with respect to the putative consensus sequence.

- 조사한 14균주들의 sequence type을 결정한 결과, Table 4-50과 같이 각각의 균주들이 고유한 sequence type을 지니고 있어 총 14개의 sequence type이 존재함을 알 수 있었다.

Table 4-50. Sequence types(ST) and allelic profile of *Leu. citreum*

ST	<i>atpA</i>	<i>dnaA</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>pheS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rpoA</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	1
3	1	3	3	3	3	3	1
4	1	4	3	2	4	4	1

5	3	5	4	2	5	5	1
6	1	6	5	4	6	6	1
7	4	7	6	2	7	7	1
8	5	8	7	3	8	8	1
9	1	9	8	3	9	9	1
10	2	10	9	2	2	2	2
11	2	11	2	5	4	4	1
12	1	12	10	2	10	10	3
13	1	13	11	3	5	5	1
14	6	14	3	3	2	2	1

- Sequence type에 대한 phylogenetic 분석을 수행하여 sequence type 간의 유전적 상관성을 조사하여 Figure 4-74에 나타내었다.

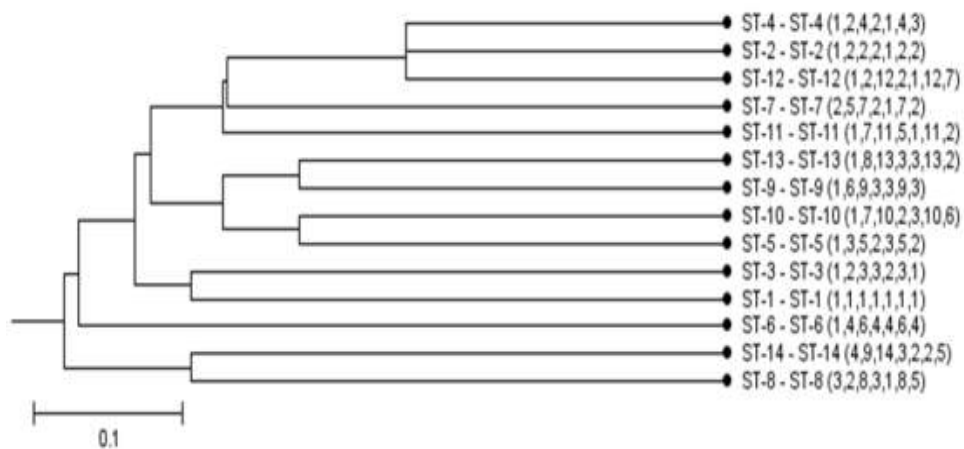


Figure 4-74. UPGMA dendrogram showing the genetic relationship between 14 STs belonging to *Leu. citreum* via MLST typing.

- Target 유전자 내부의 재조합 정도를 측정하기 위하여 각 유전자에 대한 split decomposition 분석을 실시하여 Figure 4-75에 나타내었다. 조사한 7개의 유전자 중에서 *dnaK* 유전자만이 parallelogram 모양의 구조를 지니고 있어 유전자 내부에서 재조합이 일어났음을 알 수 있었다. *dnaK* 유전자 이외의 나머지 여섯 유전자의 split tree decomposition은 tree 유사구조를 나타내어 유전자내 재조합이 일어나지 않음이 확인되었다. 반면에, 7 유전자의 concatenated 염기서열은 전형적인 network 유사구조를 나타내었으며, 2개의 주요 그룹으로 나눌 수 있었다(Figure 4-76).

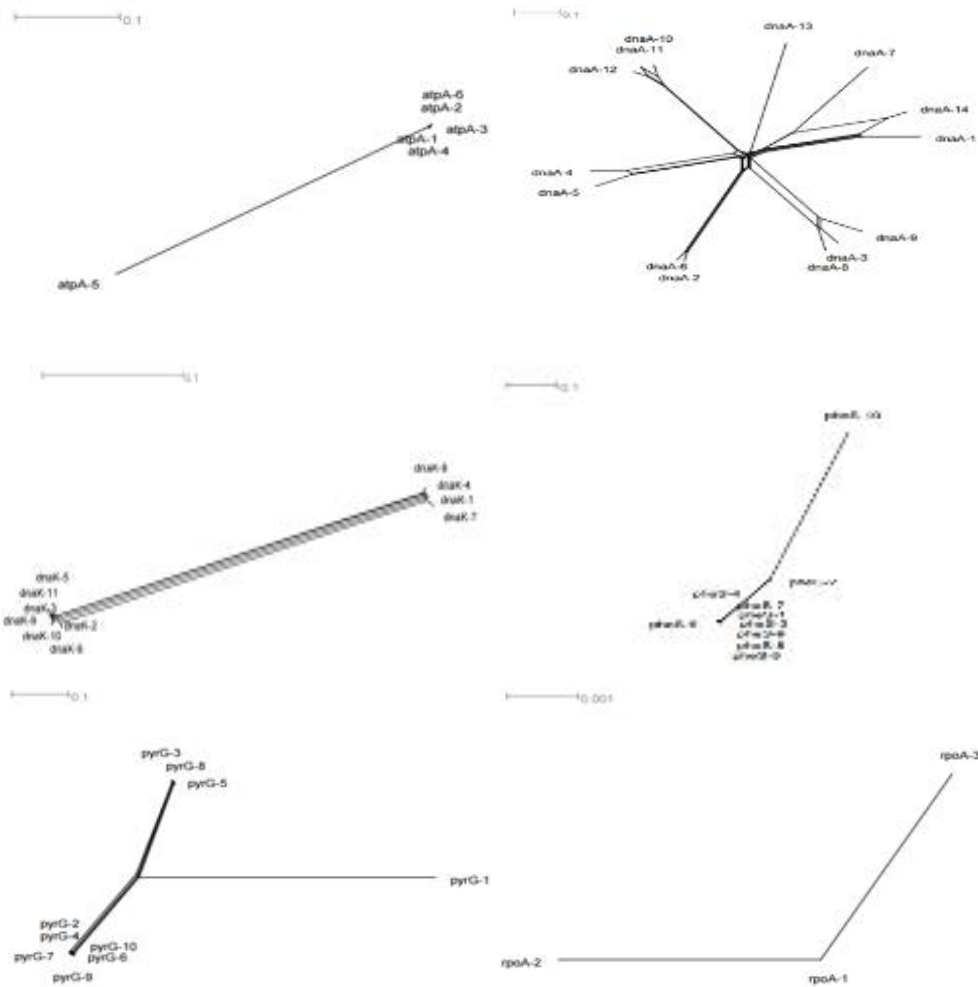


Figure 4-75. Split-decomposition analysis of 7 individual alleles for Multilocus sequence typing (MLST) loci (*atpA*, *dnaK*, *dnaA*, *pheS*, *pyrG*, *rpoA*, and *gyrB*) of 14 *Leu. citreum* strains.

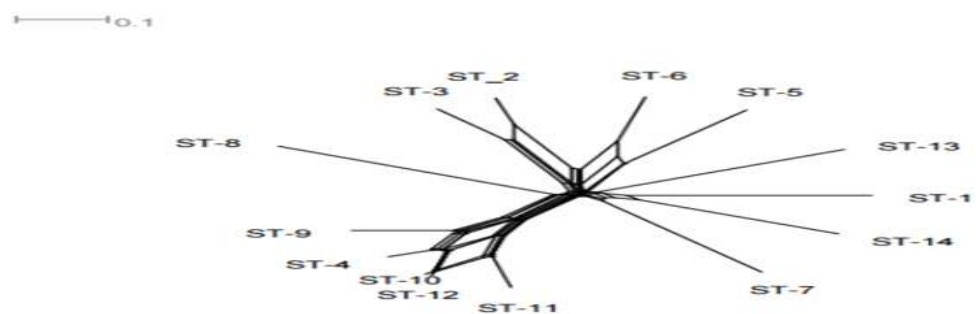


Figure 4-76. Combined split decomposition analysis of alleles of 7 sequence type (ST) loci (*atpA*, *dnaK*, *dnaA*, *pheS*, *pyrG*, *rpoA*, and *gyrB*) of 14 *Leu. citreum* strains.

- 각 균주와 sequence type 간의 유전적 유사성을 비교하기 위하여, minimum spanning tree(MST)(Dan *et al.*, 2014)를 작성하여 Figure 4-77에 나타내었다.

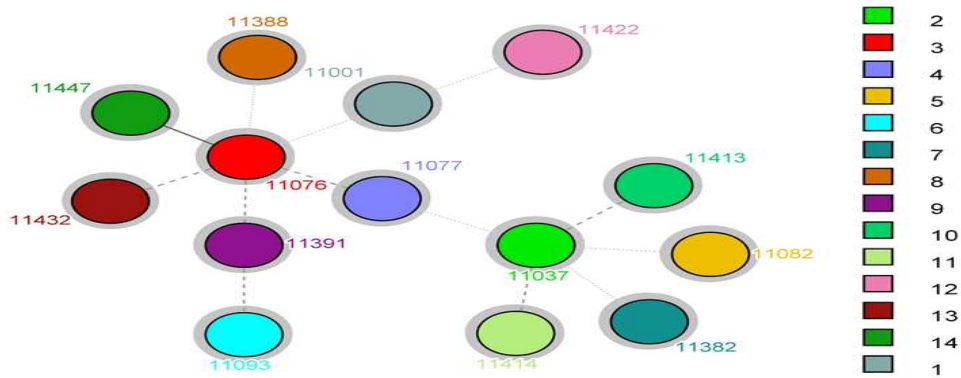


Figure 4-77. Minimum-spanning tree analysis of the 14 *Leu. citreum* strains.

다. Repetitive sequence-based PCR(rep-PCR) 분석

- 원핵세포 유전체 내에는 단백질을 발현하지 못하는 non-coding 지역에 대부분 500 bp 이하의 비교적 짧은 단편이 반복적으로 존재하고 있는데 이는 종의 특성에 따라 strain 간에도 반복되는 단편의 횟수에 차이를 보이고 있다.
- rep-PCR 분석방법은 이러한 세균의 염색체에 존재하는 interspersed repetitive DNA sequence 구간을 PCR을 통해 증폭함으로써 strain 수준까지 구별할 수 있는 fingerprinting pattern을 얻을 수 있는 검사법이며, 높은 재현성을 보인다고 알려져 있다(Koeuth *et al.*, 1995; Louws *et al.*, 1994).
- 특히, 나타나는 유전자 지문이 균주에 따라 서로 다른 barcode 형태를 보임으로써 세균 종, 아종 및 균주 수준까지도 구별이 가능하여 세균의 신속한 분류 및 동정 이외에도 역학적인 연구에도 널리 사용되고 있다(Lupski and Weinstock, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 1993).
- 현재 널리 사용되고 있는 반복 염기서열에 기초한 유전자 지문법(rep-PCR genomic fingerprinting)은 반복 염기서열의 종류에 따라 Gram 음성 장내 세균에 존재하는 35~40 bp의 REP(repetitive extragenic palindrome), 124~127 bp의 ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus) 및 *Streptococcus pneumoniae* 에서 처음 발견되어 Gram 양성 세균의 분류에 이용되고 있는 154 bp의 BOX motif 등의 3종류로 구성되어 있다(Hulton *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1991).

- Repetitive extragenic palindromic PCR(REP-PCR)은 bacteria의 extragenic sequence 중 계속 반복되는 palindromic sequence에 대한 complement sequence를 primer로 하여 PCR을 수행한 후 다양한 크기의 product pattern을 비교하는 기술로, bacteria와 같이 비교적 DNA의 변형이 많은 종의 경우에는 종뿐만 아니라 strain이 다를 경우에도 대부분 extragenic palindromic sequence의 위치가 다르므로 미생물의 분류 동정과 유연관계 분석에 사용 가능하다.
- REP sequence들은 5 bp의 유동적인 loop 구조를 포함한 38 bp palindromic unit들로 이루어져 있다(Higgins *et al.*, 1982).
- 특히 lactobacilli와 bifidobacteria 등과 같은 probiotics 균주들에서도 (GTG)₅, REP1R-I, REP2R-I 등과 같은 marker를 이용하여 typing할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Gevers *et al.*, 2001; Krizova *et al.*, 2008; Tafvizi and Ebrahimi, 2015).
- ERIC sequence들은 126 bp element들로서 중앙에 보존된 palindromic 구조를 가지고 있는데(Hulton *et al.*, 1991), Gram 음성 장내세균들뿐만 아니라 많은 계통분류체계상 서로 연관이 없는 다양한 문(phyla)들에 속하는 세균들에서도 보존되어 발견되고 있다(De Bruijn, 1992).
- ERIC sequence의 몇몇 특성은 REP sequence와 유사한데, 두 종류 sequence 모두 염색체 상에서 non-coding 부위에 위치하고, 염색체상의 위치는 종(species)마다 각기 다르며, 두 종류 모두 전사 방향과 비교하여 방향성(orientation)에 있어서 같은 방향 혹은 반대방향에 관계없이 염색체 상에 위치할 수 있다.
- ERIC sequence와 REP sequence 모두 보존된 inverted repeat구조(잠정적 stem-loop 구조)를 포함하고 있다.
- 그러나 ERIC sequence와 REP sequence들 사이에 몇 개의 서로 다른 점들도 존재하는데, REP sequence들(33 bp)은 ERIC sequence들(126 bp)에 비해서 매우 짧고, 동일한 염색체 위치상에서 다양한 REP sequence들이 종종 발견되지만, ERIC sequence들은 한 가지 종류만이 존재하는 것으로 확인되며, *E. coli* 내에서 염색체 당 추산되는 REP sequence들의 숫자는 ERIC sequence들의 숫자보다 10배정도 더 많은 것으로 알려져 있다.
- BOX element들은 자연계의 기본 구성단위이고, 차별적으로 보존된 subsequence들로 구성되어 있으며, Gram 양성균인 *S. pneumoniae*으로부터 분리된 최초의 산재된 반복성 element이다(Martin *et al.*, 1992).
- BOX element에는 boxA(59 bp), boxB(45 bp) 그리고 boxC(50 bp)라고 불리는 세 개의 다른 subunit들이 발견되는데(Martin *et al.*, 1992), 단지 boxA와 유사한 subunit sequence들만이 다양한 여러 세균들 사이에서 높은 정도로 보존된 것으로 밝혀졌다.
- BoxB와 boxC subunit들과 유사한 sequence들은 오직 *S. pneumoniae*에서만 발견되었고, boxA subunit은 *S. pneumoniae*에서는 많은 copy수로 분산되어 존재하지만, *S. pyogenes*와 *S. agalactiae*와 같은 다른 streptococci 미생물들에는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.

- 그러나 *E. coli*나 *Salmonella* Typhimurium과 같은 전혀 계통분류학적으로 무관한 Gram음성균은 그들의 각각의 genome에 여러 copy수의 boxA와 같은 sub-sequence 들을 가지고 있는 것으로 확인되었다.
- BOX DNA element들은 세균 strain의 동정을 위하여 PCR-based DNA fingerprinting에 거의 사용되지 않는데, 그 이유는 이러한 BOX DNA element가 Gram양성균인 *S. pneumoniae*의 계놈 상에서 만 발견됐다는 한계 때문이다(Martin *et al.*, 1992).
- 본 연구에서 사용된 유산균주의 분석을 위한 genomic DNA는 상기 MLST 분석법에 서 사용한 genomic DNA 분리방법을 이용하여 분리하여 사용하였다. Rep-PCR에 사용된 primer는 REP1R-I, REP2-I, ERIC1R, ERIC2, (GTG)₅를 이용하여 분석하였고, PCR은 AccuPrep[®] PreMix(Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 forward primer와 reverse primer를 각각 1 μL씩 첨가하고, 2 μL의 증류수를 첨가한 후 최종 부피가 20 μL가 되도록 하였고, My Cyclor(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰다. Primer의 염기서열은 Table 4-51에 나타내었고 REP-PCR, ERIC-PCR, (GTG)₅-PCR의 반응조건은 Table 4-52~4-54과 같았다.

Table 4-51. Primers used for 3 types of rep-PCR

PCR	Primer	Sequence
REP-PCR	REPIR-I	5'- NNNNCGNCGNCATCNGGC-3'
	REP2-1	5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3'
ERIC-PCR	ERICF	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA-3'
	ERIC-1R	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
(GTG) ₅ -PCR	(GTG) ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

Table 4-52. PCR condition for REP-PCR

Temperature(°C)	Time(sec)	Cycle number
95	420	1
95	60	
41	60	35
65	180	
65	960	1

Table 4-53. PCR condition for ERIC-PCR

Temperature (°C)	Time(min)	Cycle number
94	180	1
94	30	
52	90	35
68	480	
68	480	1

Table 4-54. PCR condition for (GTG)₅-PCR

Temperature(℃)	Time(min)	Cycle number
94	420	1
95	120	
36	120	4
72	120	
95	60	
50	60	30
72	60	
72	300	1

- PCR 산물을 확인하기 위하여 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액이 첨가된 agarose gel 전기영동을 수행하였는데, 1.5%(w/v)의 agarose gel(Seakem, Lonza, USA)을 이용하여 1×TAE 완충용액에서 70 V의 정전압으로 4℃에서 6시간동안 수행하였다. 전기영동 후 agarose gel은 UV-filter가 장착된 gel document system(BIO-RAD Gel Doc XR+)을 이용하여 사진촬영을 진행하였다. Agarose gel상의 PCR band는 NYSYS software package를 이용하여 unweighted pair group method with arithmetic mean(UPGMA) clustering 방법으로 dendrogram을 작성하여 분석하였다.

(1) *Leu. mesenteroides*의 rep-PCR

(가) REP-PCR

- 37주의 *Leu. mesenteroides*의 REP-PCR 수행 결과 생성된 band들은 Figure 4-78과 같이 100~3,000 bp의 크기를 지니고 있었는데, 균주에 따라 최대 26개의 서로 다른 크기를 지니는 band가 생성되었다. 300 bp 크기의 band는 No. 11260, 11392, 11416을 제외한 모든 균주에서 생성되었고, 1,300 bp 크기의 band는 No. 11259 균주를 제외한 모든 균주에서 발견되었다. 37주의 *Leu. mesenteroides*의 REP-PCR 분석에서 총 296개의 band가 생성되었으며, 배추김치에서 분리된 No. 11289 균주가 13개 band가 생성되어 가장 많은 band가 생성되었고, 무에서 분리된 No. 11426 균주에서는 3개의 band 만이 생성되었다. No. 1435, 11436, 11437, 11438, 11440, 11441 균주들은 유사한 REP-PCR band pattern을 나타내었다.

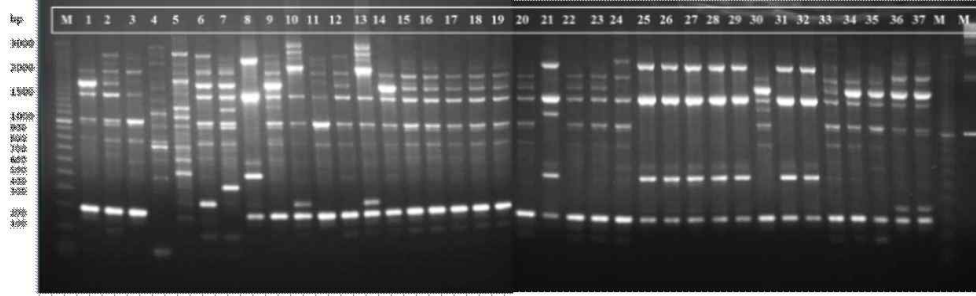


Figure 4-78. REP-PCR profile of 37 isolates *Leu. mesenteroides* isolates studies based on REP primer on 1.5% agarose gel. M, 100 bp marker; 1, 11083; 2, 11204; 3, 11253; 4, 11259; 5, 11260; 6, 11392; 7, 11416; 8, 11426; 9, 11427; 10, 11460; 11, 11078; 12, 11251; 13, 11289; 14, 11323; 15, 11357; 16, 11358; 17, 11359; 18, 11360; 19, 11361; 20, 11362; 21, 11363; 22, 11364; 23, 11386; 24, 11396; 25, 11434; 26, 11435; 27, 11436; 28, 11437; 29, 11438; 30, 11439; 31, 11440; 32, 11441; 33, 11443; 34, 11461; 35, 11463; 36, 11464; 37, 11465; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- REP-PCR 결과 생성된 각 균주들의 band들을 UPGMA법으로 dendrogram을 작성한 결과 Figure 4-79에 나타낸 바와 같이 4개의 group으로 분류할 수 있었다. Group I에는 26균주(11083, 11253, 11078, 11204, 11251, 11323, 11357, 11358, 11359, 11360, 11361, 11362, 11386, 11364, 11396, 11392, 11427, 11416, 11460, 11289, 11439, 11443, 11461, 11463, 11464, 11465)가 속해 있었는데, 이들은 조개젓, 생선젓갈, 김치, 무, 배추김치, 열무, 열무김치, 낙지젓갈 등 8종류의 분리원으로부터 분리된 균주들이다. Group II와 IV에는 각각 된장에서 분리된 No. 11260 균주와 No. 11259 균주만이 속해 있었고, Group III에는 무에서 분리된 No. 11426 균주와 김치에서 분리된 No. 11363, 11434, 11435, 11436, 11437, 11438, 11440, 11441 균주들이 속해 있었다.

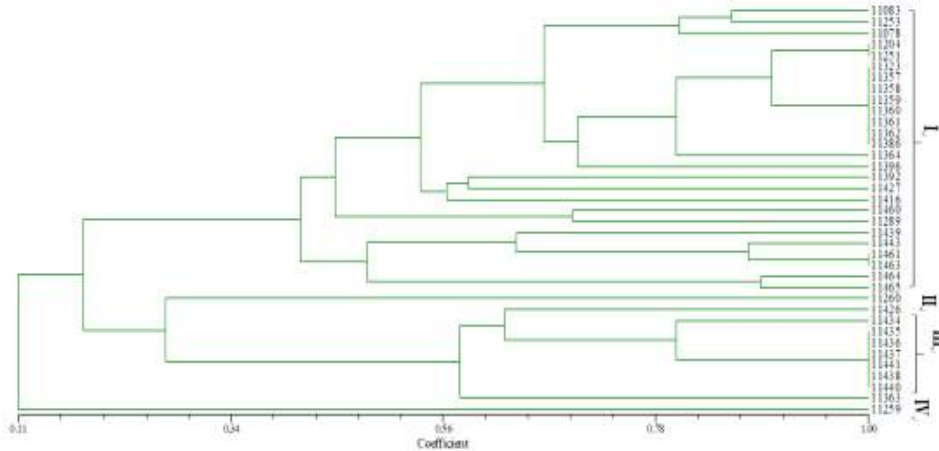


Figure 4-79. UPGMA dendrogram of 37 *Leu. mesenteroides* isolates based on REP marker by NTSYS software. 11083, salted clam; 11204, radish; 11253, salted fish; 11259, soyabean paste; 11260, onion; 11392, salted small octopus; 11416, young radish; 11426, young radish; 11427, young radish; 11460, salted clam; 11078, kimchi; 11251, chinese cabbage kimchi; 11289, chinese cabbage kimchi; 11323, young radish; 11357, kimchi; 11358, kimchi; 11359, kimchi; 11360, kimchi; 11361, kimchi; 11362, kimchi; 11363, kimchi; 11364, kimchi; 11386, kimchi; 11396, radish kimchi; 11434, kimchi; 11435, kimchi; 11436, kimchi; 11437, kimchi; 11438, kimchi; 11439, kimchi; 11440, kimchi; 11441, kimchi; 11443, chinese cabbage kimchi; 11461, chinese cabbage kimchi; 11463, radish kimchi; 11464, kimchi; 11465, kimchi.

(나) ERIC-PCR

- 37주의 *Leu. mesenteroides*의 REP-PCR 결과 200 bp부터 2,500 bp까지 다양한 크기를 지니는 총 22종류의 band가 생성되었으며, 37균주에서 생성된 band는 총 154개로 확인되었다(Figure 4-80). 양파에서 분리한 No. 11260 균주에서는 12개의 band가 생성되어 가장 많은 band를 생성하였으며, 김치에서 분리한 No. 11439 균주에서는 단 1개의 band가 생성되었다. 한편, 김치에서 분리한 No. 11357, 11359, 11360, 11361, 11362 균주는 유사한 band profile을 지니고 있었다.

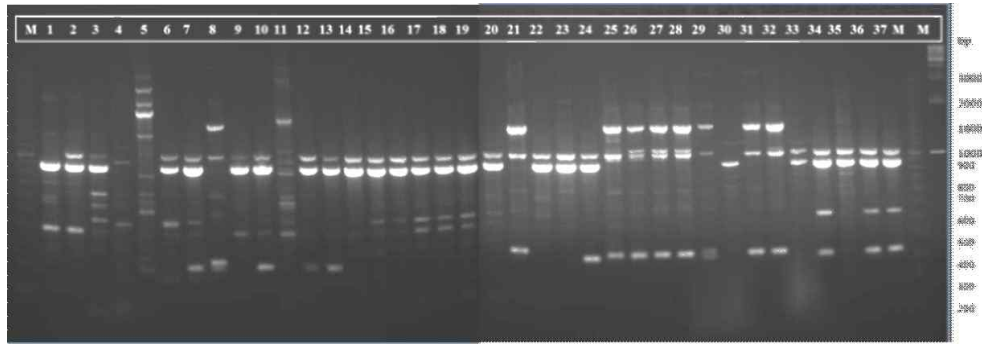


Figure 4-80. REP-PCR profile of 37 isolates *Leu. mesenteroides* isolates studies based on ERIC primer on 1.5% agarose gel. M, 100 bp maker; 1, 11083; 2, 11204; 3, 11253; 4, 11259; 5, 11260; 6, 11392; 7, 11416; 8, 11426; 9, 11427; 10, 11460; 11, 11078; 12, 11251; 13, 11289; 14, 11323; 15, 11357; 16, 11358; 17, 11359; 18, 11360; 19, 11361; 20, 11362; 21, 11363; 22, 11364; 23, 11386; 24, 11396; 25, 11434; 26, 11435; 27, 11436; 28, 11437; 29, 11438; 30, 11439; 31, 11440; 32, 11441; 33, 11443; 34, 11461; 35, 11463; 36, 11464; 37, 11465; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- NTSYS PC와 Jacquard 방법에 의해 dendrogram을 작성한 결과 4개의 group으로 분류할 수 있었다(Figure 4-81). Group I에는 No. 11083, 11078, 11204, 11427, 11323, 11460, 11251, 11289, 11392, 11416, 11253, 11357, 11359, 11360, 11361, 11362, 11358, 11461, 11465, 11464, 11396, 11364, 11386, 11443, 11463, 11439 등 10종류의 분리원(조개젓, 열무, 김치, 배추김치, 생선젓갈, 낙지젓갈, 무김치, 무)에서 분리된 26균주가 포함되어 있었다. 이 결과는 REP-PCR 결과와 유사하였다. Group II에는 열무에서 분리한 No. 11426 균주와 김치에서 분리한 No. 11438, 11440, 11435, 11436, 11437, 11441, 11363이 포함되어 있었다. Group III과 IV에는 각각 양파에서 분리한 No. 11260과 된장에서 분리한 No. 11259 만이 속해 있었다.

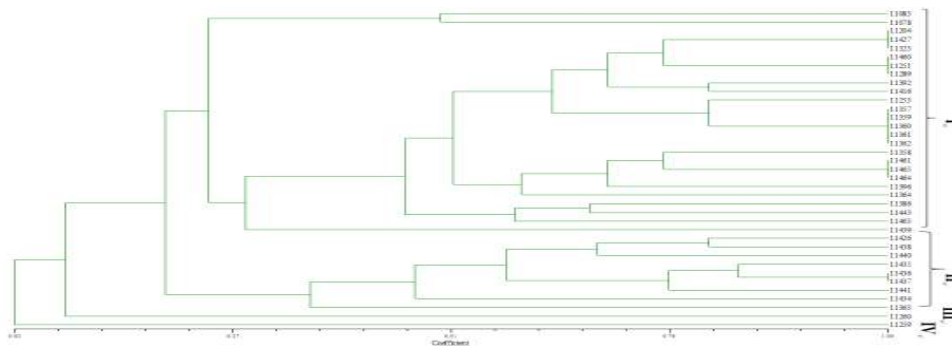


Figure 4-81. UPGMA dendrogram of 37 *Leu. mesenteroides* isolates based on ERIC marker by NTSYS software. 11083, salted clam; 11204, radish; 11253, salted fish; 11259, soyabean paste; 11260, onion; 11392, salted small octopus; 11416, young radish; 11426, young radish; 11427, young radish; 11460, salted clam; 11078, kimchi; 11251, chinese cabbage kimchi; 11289, chinese cabbage kimchi; 11323, young radish; 11357, kimchi; 11358, kimchi; 11359, kimchi; 11360, kimchi; 11361, kimchi; 11362, kimchi; 11363, kimchi; 11364, kimchi; 11386, kimchi; 11396, radish kimchi; 11434, kimchi; 11435, kimchi; 11436, kimchi; 11437, kimchi; 11438, kimchi; 11439, kimchi; 11440, kimchi; 11441, kimchi; 11443, chinese cabbage kimchi; 11461, chinese cabbage kimchi; 11463, radish kimchi; 11464, kimchi; 11465, kimchi.

(다) (GTG)₅-PCR

- 37주의 *Leu. mesenteroides* 균주의 (GTG)₅-PCR 수행결과 200~1,650 bp 크기를 지닌 24종류의 band가 생성되었다(Figure 4-82). 37균주에서 총 268 band가 생성되었는데, 각각 된장, 양파, 낙지젓갈에서 분리된 No. 11259, 11260, 11392 균주에서는 10개의 band가 형성되어 가장 많은 band를 형성하였으며, 김치에서 분리한 No. 11426은 2개의 band 만이 형성되었다. 분석한 37균주 중에서 No. 11259, 11438, 11439 균주에서 만 200 bp 크기의 band가 생성되었고, 된장에서 분리한 No. 11259와 김치에서 분리한 No. 11363, 11464, 11465 균주를 제외한 모든 균주에서 400 bp 크기의 band가 관찰되었다. No. 11259 균주에서는 1,650 bp와 1,500 bp 크기의 band가 생성되었고, No. 11260과 11392에서는 각각 1,600 bp와 1,500 bp가 관찰되었다. 열무 유래의 No. 11426, 11427, 11323, 조개젓 유래의 11460, 배추김치 유래의 11251, 11289, 김치 유래의 11357, 11358, 11359, 11360, 11361, 무김치 유래의 11363은 유사한 band pattern을 나타내었다.

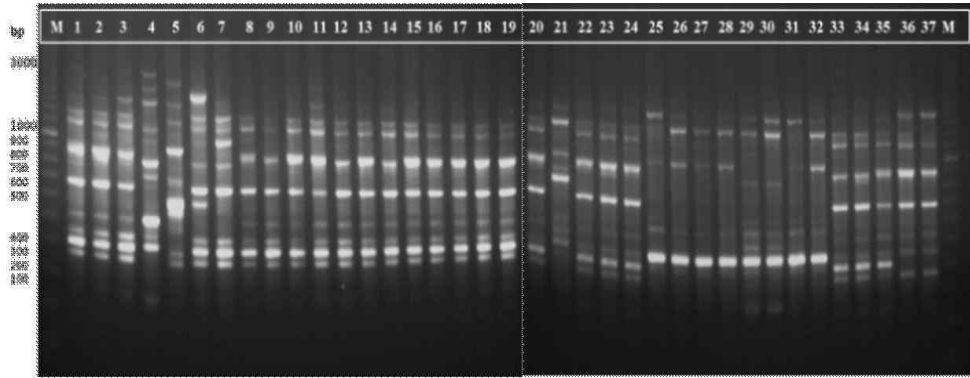


Figure 4-82. REP-PCR profile of 37 isolates *Leu. mesenteroides* isolates studies based on (GTG)₅ primer on 1.5% agarose gel. M, 100 bp maker; 1, 11083; 2, 11204; 3, 11253; 4, 11259; 5, 11260; 6, 11392; 7, 11416; 8, 11426; 9, 11427; 10, 11460; 11, 11078; 12, 11251; 13, 11289; 14, 11323; 15, 11357; 16, 11358; 17, 11359; 18, 11360; 19, 11361; 20, 11362; 21, 11363; 22, 11364; 23, 11386; 24, 11396; 25, 11434; 26, 11435; 27, 11436; 28, 11437; 29, 11438; 30, 11439; 31, 11440; 32, 11441; 33, 11443; 34, 11461; 35, 11463; 36, 11464; 37, 11465; M, 100 bp marker.

- Dendrogram 분석 결과, *Leu. mesenteroides* 37균주는 5개의 group으로 분류할 수 있었는데, 가장 큰 group인 group I에는 열무, 무김치, 배추김치, 조개젓, 김치, 낙지젓갈, 무, 조개젓갈 등 8종류의 분리원에서 유래한 No. 11083, 11426, 11427, 11460, 11463, 11251, 11289, 11323, 11357, 11358, 11359, 11360, 11361, 11204, 11253, 11078, 11364, 11396, 11386, 11443, 11461, 11464, 11465, 11392, 11416 등 25균주가 속해 있었다(Figure 4-83). Group II에는 11362, 11435, 11437, 11436이 속해있었고, group III에는 11434, 11440, 11441, 11438, 11439이 속해 있었는데, 모두 김치에서 유래된 균주들이었다. Group IV에는 된장에서 분리한 11259 균주와 김치에서 분리한 11363 균주가 포함되어 있었고, group V에는 양파에서 분리한 11260 균주만이 속해 있었다. 이 결과로부터 된장에서 분리한 11259와 양파에서 분리한 11260은 REP-, ERIC-, (GTG)₅-PCR 등 3가지 rep-PCR profile에서 서로 다른 group에 속해 있었다. 그러나 대부분의 균주들은 분리원이 동일할 경우, 3가지 rep-PCR profile에서 같은 group에 속해있음을 알 수 있었다.

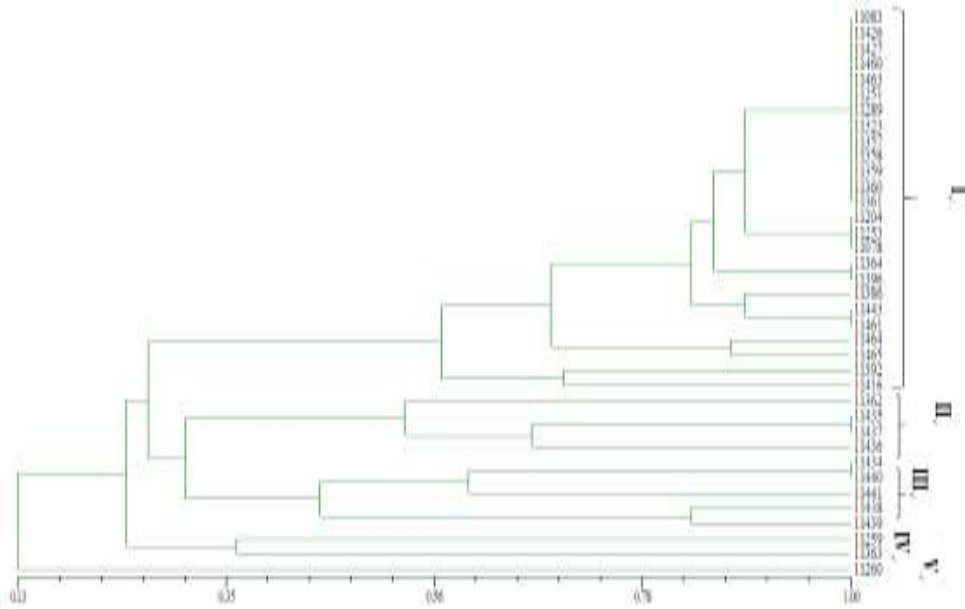


Figure 4-83. UPGMA dendrogram of 37 *Leu. mesenteroides* isolates based on (GTG)₅ marker by NTSYS software. 11083, salted clam; 11204, radish; 11253, salted fish; 11259, soyabean paste; 11260, onion; 11392, salted small octopus; 11416, young radish; 11426, young radish; 11427, young radish; 11460, salted clam; 11078, kimchi; 11251, chinese cabbage kimchi; 11289, chinese cabbage kimchi; 11323, young radish; 11357, kimchi; 11358, kimchi; 11359, kimchi; 11360, kimchi; 11361, kimchi; 11362, kimchi; 11363, kimchi; 11364, kimchi; 11386, kimchi; 11396, radish kimchi; 11434, kimchi; 11435, kimchi; 11436, kimchi; 11437, kimchi; 11438, kimchi; 11439, kimchi; 11440, kimchi; 11441, kimchi; 11443, chinese cabbage kimchi; 11461, chinese cabbage kimchi; 11463, radish kimchi; 11464, kimchi; 11465, kimchi.

(2) *L. brevis*의 rep-PCR

(가) REP-PCR

- 13주의 *L. brevis*의 REP-PCR 수행결과, 150~5,000 bp 크기를 지니는 24종류의 band를 확인하였다(Figure 4-84). 13균주에서 총 194 band가 생성되었고, 순무김치에서 분리한 KU15006은 17개의 band가 생성되어 가장 많았으며, 김치와 갓김치에서 각각 분리된 B151과 No. 200080은 13개의 band가 형성되어 가장 적은 band 수를 나타내었다. 1,300 bp 크기의 band는 B7 균주에서, 1,600과 2,000 bp 크기의 band는 B151 균주에서, 2,100 bp 크기의 band는 B13 균주에서, 2,200 bp 크기의 band는 G1 균주에서 만 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 1,000 bp 크기의 band와 1,100 bp 크기의 band는 김치에서 분리된 B151 균주를 제외한 모든 균주에서 존재하지 않았으며, 3,000 bp 크기의 band는 순무김치에서 분리된 KU15006균주에서 만 생성되었다.

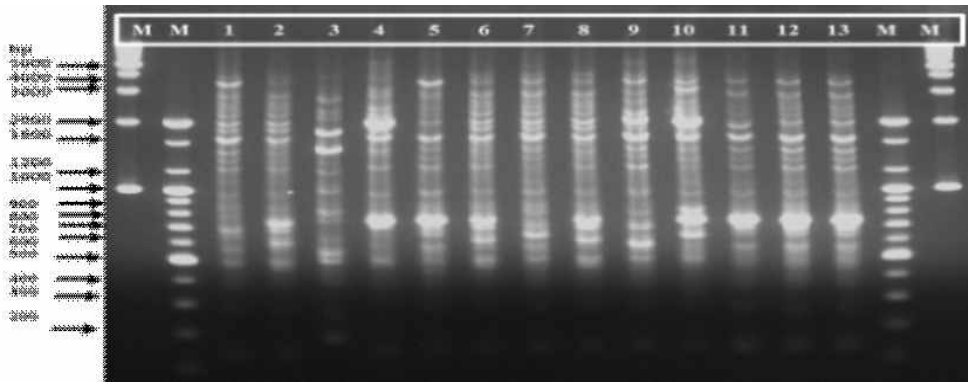


Figure 4-84. REP-PCR profiling of *L. brevis*. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 1, 200019; 2, B151; 3, B13; 4, B7; 5, 200054; 6, 13-2; 7, 200080; 8, B15; 9, G1; 10, KU15006; 11, 11348; 12, 11350; 13, 11351; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- 13주의 *L. brevis* 균주에 대한 REP-PCR profile에 대한 dendrogram을 작성한 결과, Figure 4-85와 같이 가장 큰 group인 group I은 김치에서 분리한 6균주(B13, B13-2, B15, 11350, 11351, 11348)와 조개젓, 장아찌, 갓김치, 순무김치에서 각각 분리한 200019, 200054, 200080, KU15006 균주가 속해 있었다. Group II, III, IV는 김치에서 분리한 B7, G1, B151 균주가 각각 속해 있었다.

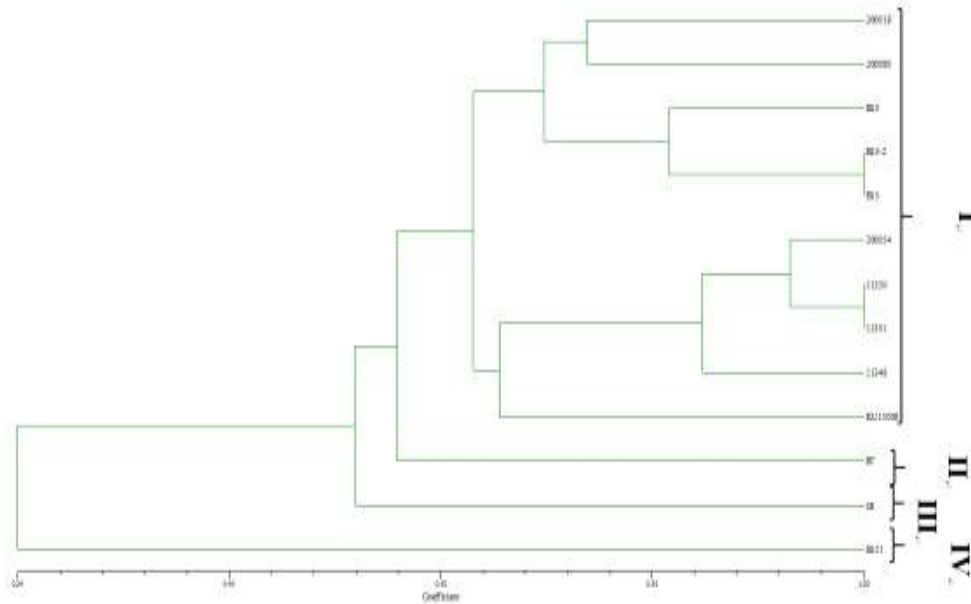


Figure 4-85. REP-PCR profiling of 13 strains of *L. brevis*. 200019, salted clam; 200080, mustard kimchi; B13, kimchi; B13-2, kimchi; B15, kimchi; 200054, pickled vegetable; 11350, kimchi, 11351, kimchi, 11348, kimchi; KU15006, turnip kimchi; B7, kimchi; G1, kimchi; B151, kimchi.

(나) ERIC-PCR

- 13주의 *L. brevis*의 ERIC-PCR 수행결과, 200 bp부터 7,500 bp의 크기를 지니는 36종류의 band가 확인되었고, 13균주에서 총 130 band가 생성되었는데, 순무김치에서 분리된 KU15006 균주는 14개의 band가 생성되어 가장 많았고, 조개젓에서 분리된 No. 200019 균주에서는 2개의 band 만이 관찰되었다. 530 bp의 크기를 지니는 band는 김치에서 분리된 B151 균주를 제외한 모든 균주에서 관찰되었고, 1,100 bp를 지니는 band는 조개젓과 김치에서 각각 분리된 No. 200019 균주와 B151 균주를 제외한 모든 균주에서 관찰되었다. 2,700 bp 크기의 band와 3,100 bp 크기의 band는 No. 11350 균주와 No. 200054 균주에서 만 각각 관찰되었다(Figure 4-86).

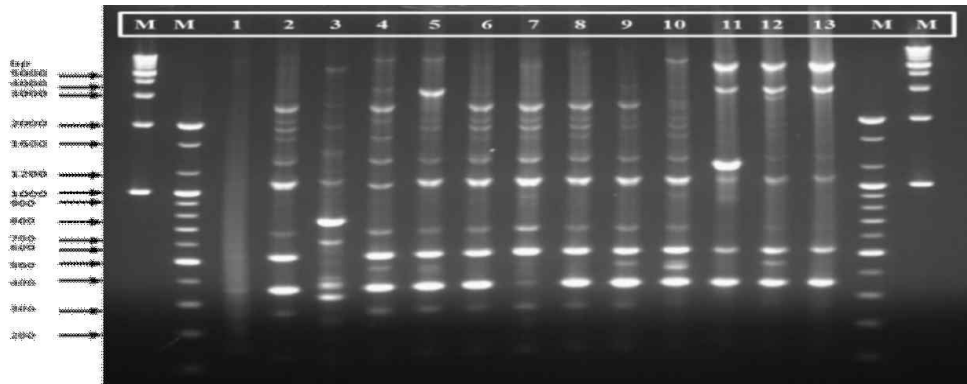


Figure 4-86. ERIC-PCR profiling of *L. brevis*. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 1, 200019; 2, B151; 3, B13; 4, B7; 5, 200054; 6, B13-2; 7, 200080; 8, B15; 9, G1; 10, KU15006; 11, 11348; 12, 11350; 13, 11351; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- ERIC-PCR profile을 UPGMA법을 사용하여 dendrogram을 작성한 결과, Figure 4-87에서와 같이 group I은 No. 200019, 11348, 11350, 11351, B13, B7, 200054, B13-2, G1, B15, 200080, KU15006 균주 등 총 12균주가 속해 있었는데, No. 200019, 200054, 200080, KU15006 균주는 각각 조개젓, 장아찌, 갓김치, 순무김치에서 분리되었고, 나머지 균주들은 김치에서 분리되었다. Group II에는 김치에서 분리한 B151 균주만이 속해 있었다.

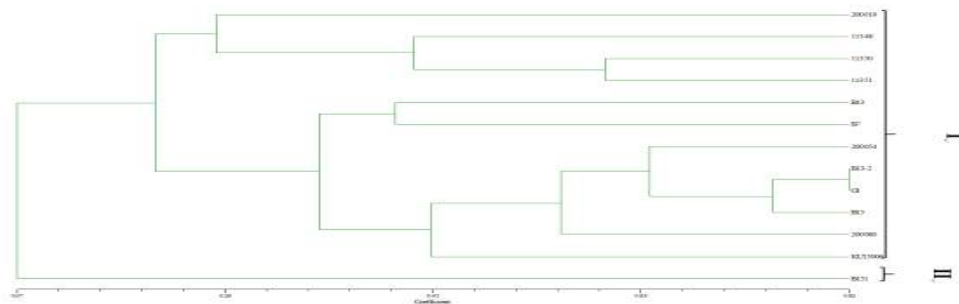


Figure 4-87. ERIC-PCR profiling of 13 strains of *L. brevis*. 200019, salted clam; 11348, kimchi; 11350, kimchi; 11351, kimchi; B13, kimchi; B7, kimchi; 200054, pickled vegetable; B13-2, kimchi; G1, kimchi; B15, kimchi; 200080, mustard kimchi; KU15006, turnip kimchi; B151, kimchi.

(다) (GTG)₅-PCR

- 13종류의 *L. brevis* 균주의 (GTG)₅-PCR 결과, 250~2,000 bp 크기를 지니는 band들이 19개 형성되었다(Figure 4-88). 13균주에서 총 105개의 band가 생성되었으며, 김치에서 분리한 B7, 11350, 11351과 장아찌에서 분리한 No. 200054 균주는 band의 숫자가 9개로 가장 많았으며, 조개젓에서 분리한 No. 200019 균주는 band의 숫자가 6개로 가장 적었다. 1,000 bp와 1,300 bp의 크기를 지니는 band는 김치로부터 분리된 B151 균주를 제외한 모든 균주에서 관찰되었으며, 19종류의 band 중에서 6개의 band는 13 균주 중에서 단 한 균주에서 만 관찰되었다. 350, 650, 750, 850 bp의 크기를 지니는 band는 김치에서 분리한 B151에서 만 관찰되었고, 1,600, 2,000 bp 크기를 지니는 band는 김치에서 분리한 G1, B7 균주에서 만 관찰되었다.

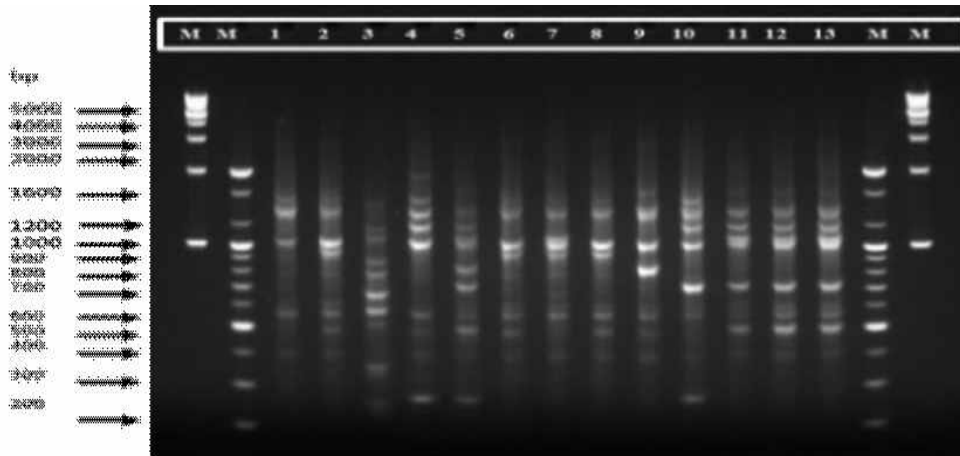


Figure 4-88. (GTG)₅-PCR profiling of *L. brevis*. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 1, 200019; 2, B151; 3, B13; 4, B7; 5, 200054; 6, B13-2; 7, 200080; 8, B15; 9, G1; 10, KU15006; 11, 11348; 12, 11350; 13, 11351; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- (GTG)₅-PCR DNA profile을 dendrogram으로 분석한 결과, Figure 4-89와 같이 5개의 group으로 나눌 수 있었으며, group I에는 No. 200019, B13, B13-2, B15, 200080 등 5개의 균주가 속해있었으며, group IV에는 No. 200054, 11348, 11350, 11351, KU15006 균주가 포함되어 있었다. 이들 균주들은 대부분 김치에서 분리된 균주들이었다. Group II, III, V는 김치에서 분리한 G1, B7, B151 균주가 각각 포함되어 있었다.

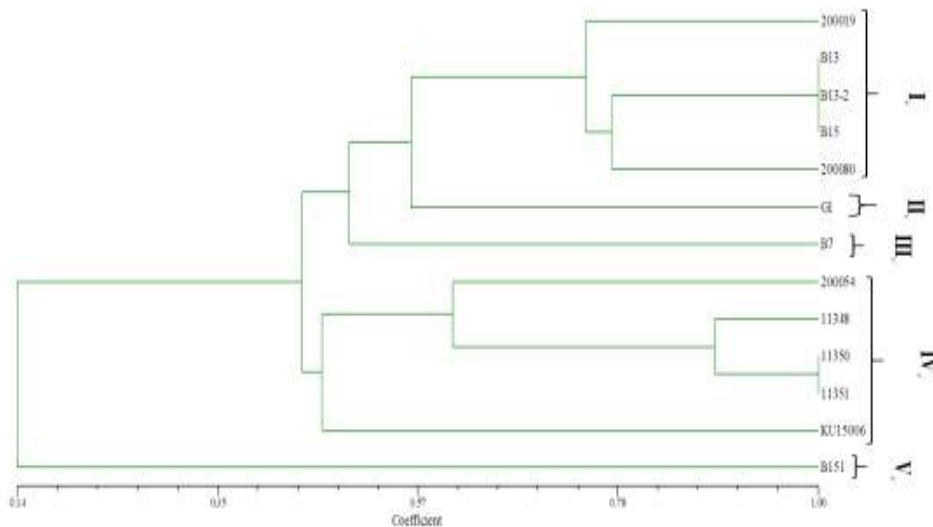


Figure 4-89. (GTG)₅-PCR profiling of 13 strains of *L. brevis*. 200019, salted clam; B13, kimchi; B13-2, kimchi; B15, kimchi; 200080, mustard kimchi; G1, kimchi; B7, kimchi; 200054, pickled vegetable; 11348, kimchi; 11350, kimchi; 11351, kimchi; KU15006, turnip kimchi; B151, kimchi.

(3) *Leu. citreum*의 rep-PCR

(가) REP-PCR

- *Leu. citreum* 14균주에 대한 REP-PCR을 수행한 결과, 300~6,000 bp 크기를 지닌 31종류의 band를 확인하였으며, 14균주에서 총 191 band가 생성되었다(Figure 4-90). 김치에서 분리한 No. 11082 균주는 17개의 band를 지니고 있어 가장 많았고, 단호박에서 분리한 No. 11001은 가장 적은 10개의 band를 생성하였다. 820 bp 크기의 band는 낙지젓에서 분리한 No. 11037을 제외한 모든 균주에서 발견되었다. 단호박에서 분리한 No. 11001 균주는 다른 균주들과는 매우 상이한 band pattern을 보여주었다. 300, 1,050 bp 크기를 지니는 band는 모든 균주에서 관찰되었으며, 380, 590, 1,200 bp 크기의 band는 단호박에서 분리한 No. 11001을 제외한 모든 균주에서 발견되었다. 500, 580 bp 크기의 band는 굴젓에서 분리한 No. 11432에서 만 발견되었으며, 1,000, 1,400, 2,200, 5,000 bp 크기의 band는 No. 11001 균주에서 만 관찰되었다. 또한 900, 1,600, 2,100 bp 크기의 band는 김치에서 분리된 No. 11422, 11082 균주와 낙지젓같이 분리된 No. 11382 균주에서 각각 생성되었다.

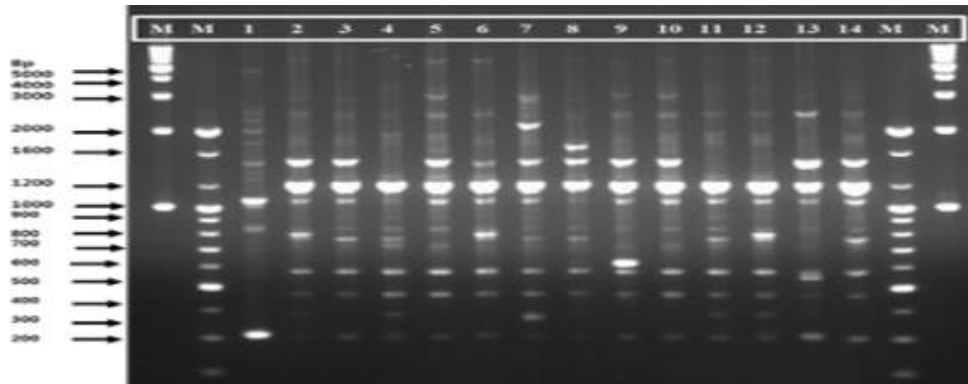


Figure 4-90. REP-PCR profiling of 14 strains of *Leu. citreum*. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 1, 11001; 2, 11037; 3, 11076; 4, 11077; 5, 11082; 6, 11093; 7, 11382; 8, 11388; 9, 11391; 10, 11413; 11, 11414; 12, 11422; 13, 11432; 14, 11447; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- REP-PCR profile을 dendrogram을 작성하여 분석한 결과, Figure 4-91과 같이 가장 큰 group인 group II는 낙지젓, 김치, 생선젓갈, 배, 낙지젓에서 각각 분리한 No. 11037, 11076, 11447, 11093, 11382 균주가 속해 있었다. 김치에서 분리한 No. 11077, 11414, 11422 균주는 group III에 속해있었으며, group I과 group V에는 단호박에서 분리한 No. 11001 균주와 열무김치에서 분리한 No. 11388 균주가 각각 속해 있었다. Group IV에는 No. 11082, 11391, 11413, 11432 균주가 속해 있는 것으로 확인되었다.

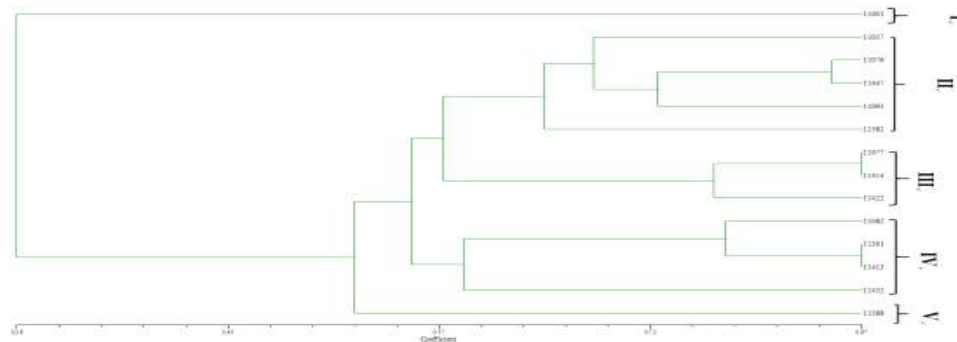


Figure 4-91. REP-PCR profiling of 14 strains of *Leu. citreum*. 11001, sweet pumpkin; 11037, salted small octopus; 11076, kimchi; 11077, kimchi; 11082, kimchi; 11093, pear; 11382, salted small octopus; 11388, young radish kimchi; 11391, salted small octopus; 11413, kimchi; 11414, kimchi; 11422, kimchi; 11432, salted oyster; 11447, salted fish.

(나) ERIC-PCR

- ERIC-PCR 결과, *Leu. citreum* 14균주는 150~6,000 bp 크기의 서로 다른 25개의 band를 생성하였으며, 14균주에서 모두 110개의 band가 형성되었다. 단호박 유래의 No. 11001 균주는 13개의 band를 지니고 있어 가장 많았으며, 김치에서 분리한 No. 11414와 11422 균주는 5개의 band를 지니고 있어 가장 적었다(Figure 4-92). 이 결과는 REP-PCR profile에서 No. 11001 균주가 가장 적은 band 수를 가진 것과는 상반된 결과이다. 900, 1,000 bp 크기의 band는 굴젓과 단호박에서 각각 분리한 No. 11432 균주와 11001 균주를 제외한 모든 균주에서 발견되었다. 1,200, 2,900, 5,000, 6,000 bp 크기의 band는 No. 11001 균주에서 만 발견된 반면, 4,500 bp는 김치 유래의 No. 11076 균주에서 만 존재하였다. 한편, 1,800, 2,100 bp 크기의 band는 낙지젓과 배에서 각각 분리한 No. 11037, 11093 균주에서 만 관찰되었다.

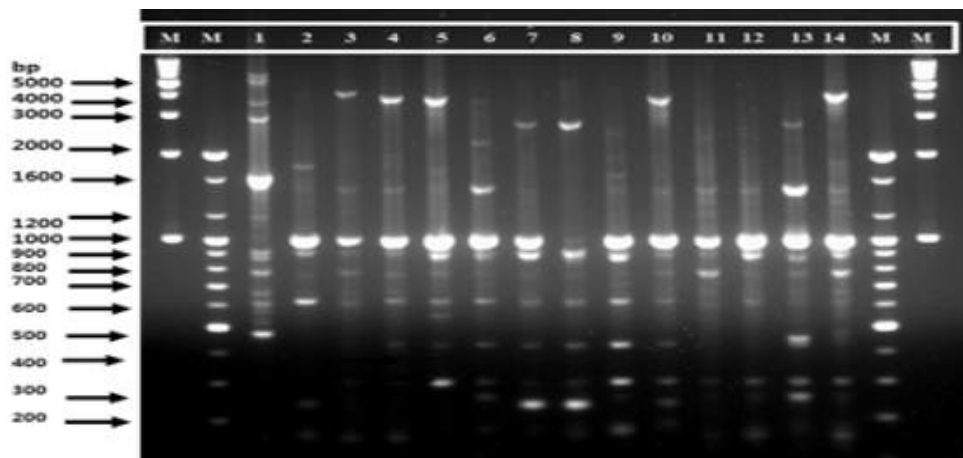


Figure 4-92. ERIC-PCR profiling of 14 strains of *Leu. citreum*. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 1, 11001; 2, 11037; 3, 11076; 4, 11077; 5, 11082; 6, 11093; 7, 11382; 8, 11388; 9, 11391; 10, 11413; 11, 11414; 12, 11422; 13, 11432; 14, 11447; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- ERIC-PCR profile을 dendrogram으로 분석한 결과, 가장 큰 group인 group II는 No. 11037, 11422, 11076, 11077, 11082, 11413, 11447, 11414 균주가 속해 있었는데, 이 중 No. 11037은 낙지젓에서, No. 11447은 생선젓갈에서 분리되었고, 나머지 균주들은 김치에서 분리되었다. Group III에는 배에서 분리된 No. 11093과 열무김치에서 분리된 No. 11388, 그리고 낙지젓에서 분리된 No. 11382, 11391 균주가 속해 있었다. Group I 과 IV는 단호박에서 분리한 No. 11001과 열무김치에서 분리한 No. 11432 만이 각각 속해 있었다(Figure 4-93).

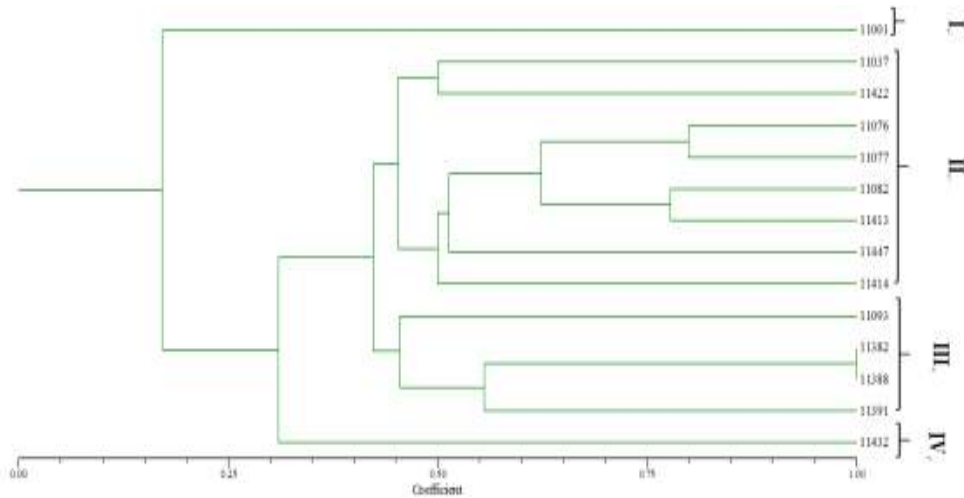


Figure 4-93. ERIC-PCR profiling of 14 strains of *Leu. citreum*. 11001, sweet pumpkin; 11037, salted small octopus; 11076, kimchi; 11077, kimchi; 11082, kimchi; 11093, pear; 11382, salted small octopus; 11388, young radish kimchi; 11391, salted small octopus; 11413, kimchi; 11414, kimchi; 11422, kimchi; 11432, salted oyster; 11447, salted fish.

(다) (GTG)₅-PCR

- *Leu. citreum* 14균주의 (GTG)₅-PCR 수행결과, 200~1,700 bp 크기를 지니는 20종류의 DNA가 형성되었으며, 14균주에서 총 167개의 band를 확인하였다(Figure 4-94). 김치와 열무김치에서 각각 분리된 No. 11082, 11388 균주는 15개의 band를 지니고 있었으며, 김치에서 분리한 No. 11422 균주는 9개의 band를 지니고 있어 가장 적었다. 20종류의 band 중에서 450, 700, 1,300 bp 크기의 band는 모든 균주에서 관찰되었다. 200, 600, 1,100 bp 크기의 band는 단호박에서 분리한 No. 11001 균주를 제외한 모든 균주에서 관찰되었으며, 900 bp 크기의 band는 굴젓에서 분리한 No. 11432 균주에서만 관찰되지 않았다. 또한 200, 280 bp 크기의 band는 각각 No. 11001, 11082에서 만 발견되었다.

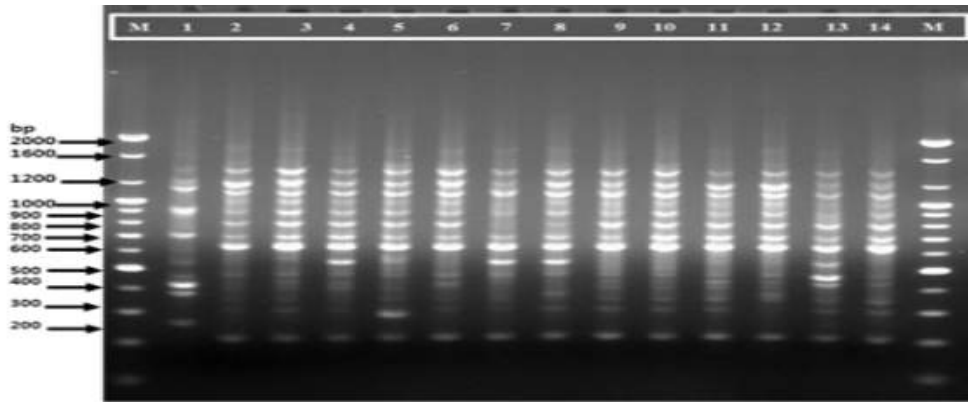


Figure 4-94. (GTG)₅-PCR profiling of 14 strains of *Leu. citreum*. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 1, 11001; 2, 11037; 3, 11076; 4, 11077; 5, 11082; 6, 11093; 7, 11382; 8, 11388; 9, 11391; 10, 11413; 11, 11414; 12, 11422; 13, 11432; 14, 11447; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker 1kb.

- (GTG)₅-PCR profile에 대하여 dendrogram을 작성하여 분석한 결과, 14개의 균주를 5개의 group으로 분류할 수 있었으며, 가장 큰 group인 group II에는 김치에서 분리된 No. 11076, 11077, 11082, 11388, 11413, 낙지젓에서 분리한 No. 11037, 11391, 배에서 분리한 No. 11093, 생선젓갈에서 분리한 No. 11447 등 9균주가 속해 있었다. Group V에는 김치에서 분리한 No. 11414와 11422 균주 만이 속해있었고, group I, III, IV에는 단호박, 열무김치, 낙지젓갈에서 각각 분리한 No. 11001, 11432, 11382 균주가 속해 있었다(Figure 4-95).

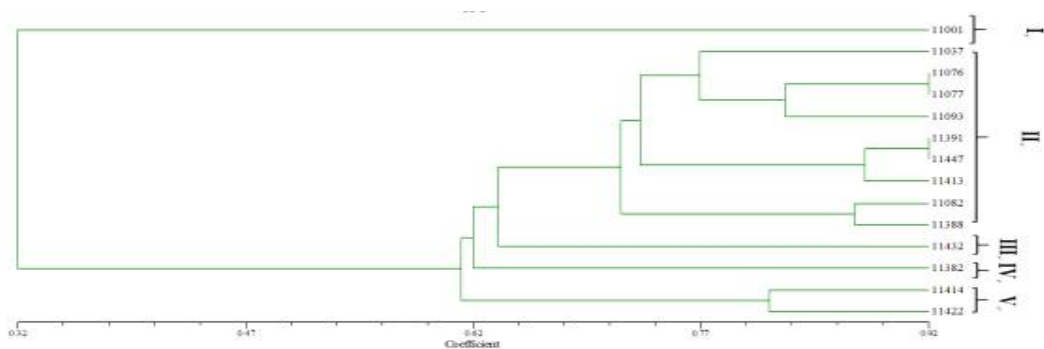


Figure 4-95. (GTG)₅-PCR profiling of 14 strains of *Leu. citreum*. 11001, sweet pumpkin; 11037, salted small octopus; 11076, kimchi; 11077, kimchi; 11082, kimchi; 11093, pear; 11382, salted small octopus; 11388, young radish kimchi; 11391, salted small octopus; 11413, kimchi; 11414, kimchi; 11422, kimchi; 11432, salted oyster; 11447, salted fish.

라. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석

- DNA의 임의적인 부분을 증폭하는 RAPD는 유산균주의 genetic typing을 위한 신속하고 감도가 높으며 경제적인 분석 방법으로 알려져 있다.
- PCR을 기반으로 한 이 기술은 한 개체의 염색체 내의 미지 영역에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 일련의 염기서열에 결합할 수 있는 임의적인 primer를 사용하는 데, 만약에 결합부위가 DNA 단편의 증폭이 가능할 정도로 간격이 있고 방향성이 맞으면 특정 균주에 특이적인 fingerprint pattern이 형성되는 것을 이용한다(O'Sullivan, 1999).
- 유전자 다형분석인 RAPD 방법은 실험조작이 간편하여 쉽게 DNA 다형성을 관찰할 수 있으며, 단 하나의 DNA 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타날 수 있을 정도로 그 감응도가 높기 때문에 소량의 DNA 만을 사용하여도 수행이 가능하여 종 및 품종의 분자생물학적 분류 및 집단간 다양성 연구에 널리 이용되고 있다(William *et al.*, 1993).
- 또한 이 방법은 대상 생물의 자세한 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 특정 유전자 부분의 증폭 및 증폭된 DNA 절편을 비교함으로써 쉽게 종간 혹은 개체간의 유전적 유사도를 구할 수 있으나 primer의 길이가 상대적으로 짧아서 비 특이적인 결합을 너무 쉽게 하기 때문에 반응 조건에 따라 결과가 달라지는 등 재현성이 낮은 단점이 있다(Kim *et al.*, 2003).

(1) *Leu. mesenteroides*의 RAPD

(가) 239 primer를 이용한 RAPD 분석

- 239 primer를 이용하여 *Leu. mesenteroides* 37균주를 RAPD 분석한 결과, 14종류의 profile을 얻을 수 있었다(Figure 4-96). 그 결과, 많은 균주들이 공통된 band를 지니고 있었으며, band 들은 300~4,000 bp의 크기를 지니고 있었다. 총 7개의 major band가 관찰되었으며, 그 크기는 350, 600, 700, 1,000, 1,600, 2,000, 3,000 bp였다. No. 11436 균주는 가장 많은 band를 나타내었으며, No. 11083, 11204, 11427, 11460, 11251, 11289, 11323, 11357, 11358, 11359, 11360, 11361, 11362, 11364, 11386, 11439, 11443, 11461, 11463, 11464, 11465 균주는 1,100 bp 크기의 major band를 가지고 있었다. No. 11426 균주는 350 bp 크기의 단일 band를 지니고 있었다. Moschetti *et al.*(2000)은 *Leu. mesenteroides*의 RAPD profiling을 보고한 바 있다.

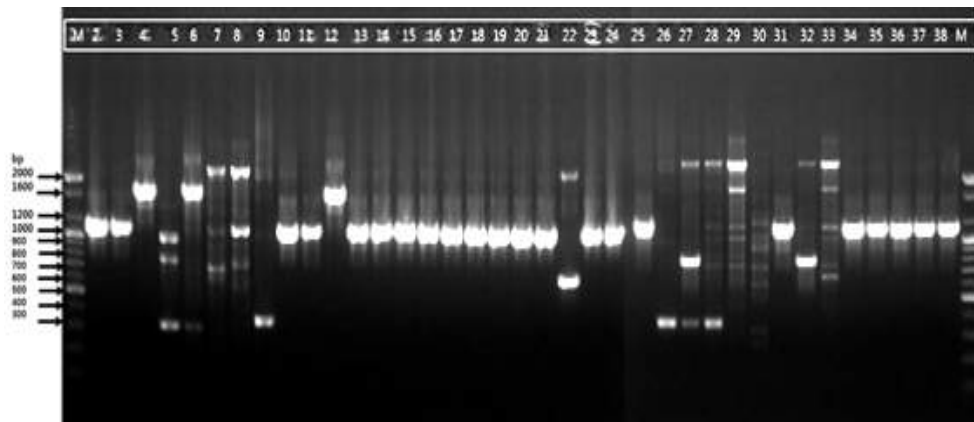


Figure 4-96. RAPD profiling of 37 *Leu. mesenteroides* using 239 primer. M, 100 bp maker; 2, 11083; 3, 11204; 4, 11253; 5, 11259; 6, 11260; 7, 11392; 8, 11416; 9, 11426; 10, 11427; 11, 11460; 12, 11078; 13, 11251; 14, 11289; 15, 11323; 16, 11357; 17, 11358; 18, 11359; 19, 11360; 20, 11361; 21, 11362; 22, 11363; 23, 11364; 24, 11386; 25, 11396; 26, 11438; 27, 11434; 28, 11435; 29, 11436; 30, 11437; 31, 11439; 32, 11440; 33, 11441; 34, 11443; 35, 11461; 36, 11463; 37, 11464; 38, 11465; M, 100 bp maker.

- RAPD profile을 dendrogram을 작성하여 분석한 결과, 37균주는 7 group으로 분류할 수 있었는데, 가장 큰 group인 group VII에는 20균주가 속해 있었고, group V에는 7균주가 속해 있었다. Group I과 VI은 한 균 만이 속해있었고, group II, III, IV는 각각 3, 3, 2균주가 속해 있었다(Figure 4-97).

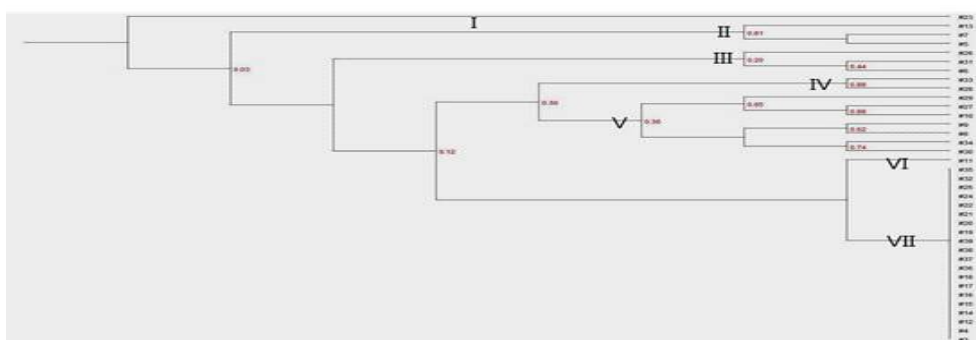


Figure 4-97. Dendrogram generated after cluster analysis of the RAPD 239 primer of the *Leu. mesenteroides* strains isolated from various food products and vegetables using UPGMA method by Quantity1 software.

(나) KAY3 primer를 이용한 RAPD 분석

- KAY3 primer를 이용하여 *Leu. mesenteroides* 37균주를 RAPD 분석한 결과, 가장 작은 크기의 band는 500 bp였고, 가장 큰 크기의 band는 2,500 bp였다(Figure 4-98). No. 11392 균주는 가장 많은 band를 지니고 있었고, No. 11078 균주는 500 bp 크기의 단일 band를 지니고 있었다. 18 균주는 2,500 bp 크기의 band와 1,600 bp 크기의 band를 공통적으로 지니고 있었으며, No. 11358 균주는 1,600 bp 크기의 단일 band만을 지니고 있었다.

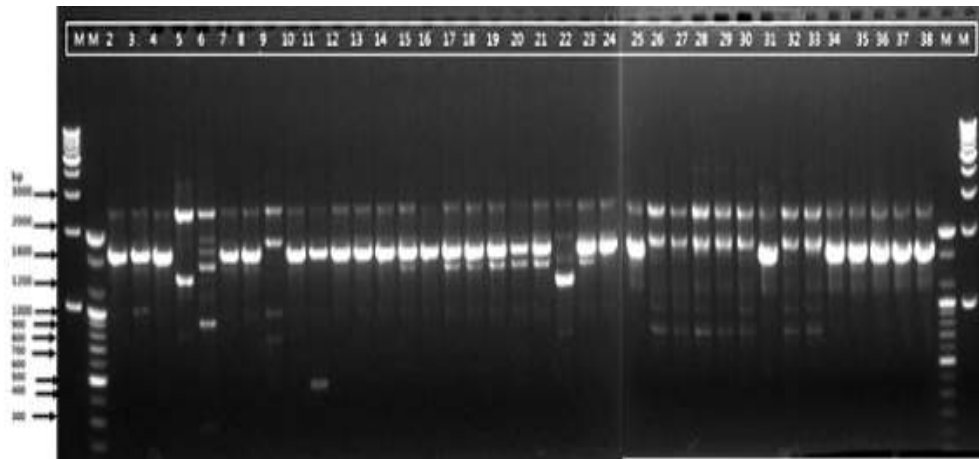


Figure 4-98. RAPD profiling of 37 *Leu. mesenteroides* using KAY3 primer. M, 1 kb marker; M, 100 bp maker; 2, 11083; 3, 11204; 4, 11253; 5, 11259; 6, 11260; 7, 11392; 8, 11416; 9, 11426; 10, 11427; 11, 11460; 12, 11078; 13, 11251; 14, 11289; 15, 11323; 16, 11357; 17, 11358; 18, 11359; 19, 11360; 20, 11361; 21, 11362; 22, 11363; 23, 11364; 24, 11386; 25, 11396; 26, 11438; 27, 11434; 28, 11435; 29, 11436; 30, 11437; 31, 11439; 32, 11440; 33, 11441; 34, 11443; 35, 11461; 36, 11463; 37, 11464; 38, 11465; M, 100 bp maker; M, 1 kb marker.

- Dendrogram 분석 결과, 239 primer를 이용한 RAPD에서는 37균주가 7 group으로 분류될 수 있었는데, 가장 큰 group인 group VII은 21균주를 포함하고 있었으며, group III에는 8균주가 속해 있었다. Group II와 V는 각각 1균주씩 만을 포함하고 있었으며, Group I, IV, VI에는 각각 2균주씩을 포함하고 있었다(Figure 4-99).

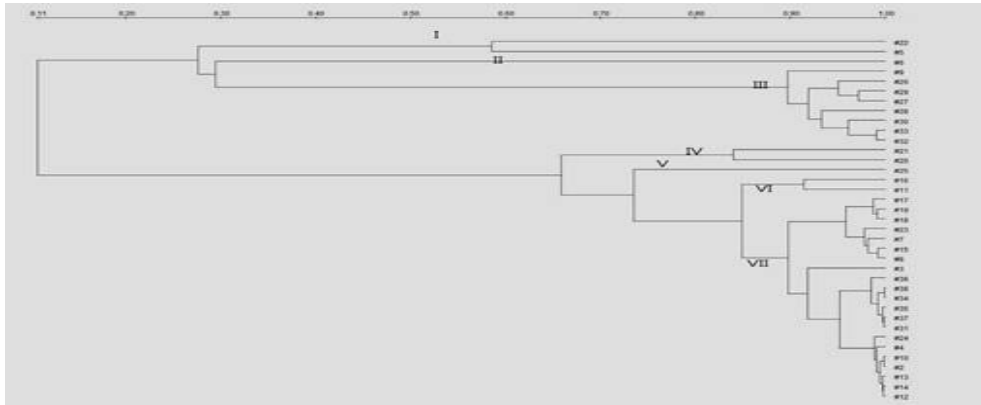


Figure 4-99. Dendrogram generated after cluster analysis of the RAPD KAY3 primer of the *Leu. mesenteroides* strains isolated from various food products and vegetables using UPGMA method by Quantity1 software.

(2) *L. brevis*의 RAPD

(가) 239 primer를 이용한 RAPD 분석

- 239 primer를 이용하여 *L. brevis* 13균주를 RAPD 분석한 결과, 8개의 profile을 얻을 수 있었으며, 가장 작은 band는 500 bp였고, 가장 큰 band는 4,000 bp였다. B151 균주는 다른 균주들과 비교하였을 경우, band의 intensity가 가장 약하였다. Major band로는 500, 550, 1,250, 2,500 bp 크기의 4개의 band가 관찰되었으며, KU15006 균주는 500 bp 크기의 단일 band만을 지니고 있었다. B-15 균주는 가장 많은 band pattern을 지니고 있음을 관찰하였다(Figure 4-100).

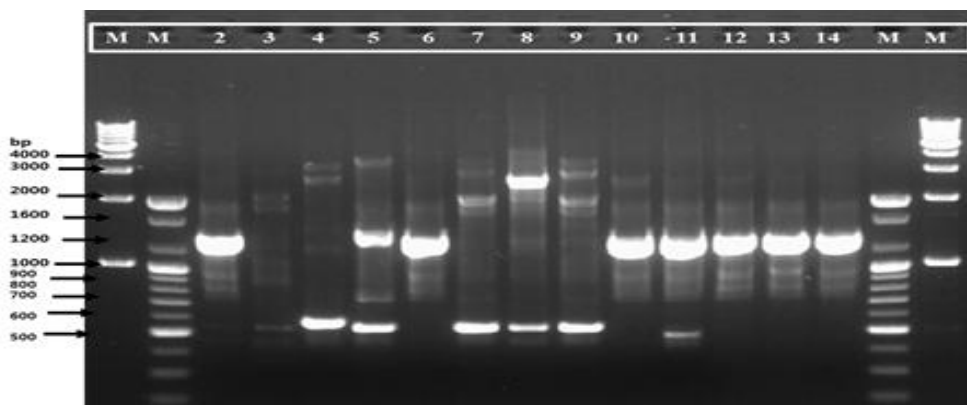


Figure 4-100. RAPD profiling of *L. brevis* using 239 primer. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 2, 200019; 3, B151; 4, B13; 5, B7; 6, 200054; 7, B13-2; 8, 200080; 9, B15; 10, G1; 11, KU15006; 12, 11348; 13, 11350; 14, 11351; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- Dendrogram 분석 결과, 분석된 13개의 균주는 6개의 group으로 분류될 수 있었으며, 가장 큰 group인 group VI에는 7개의 균주가 속해 있었다. Group V는 두 개의 균주가 속해있었으며, 나머지 group I, II, III, IV에는 각각 1균주씩만 속해 있었다. Group I부터 V에 속하는 균주들은 서로 다른 band pattern을 보여주었다(Figure 4-101).

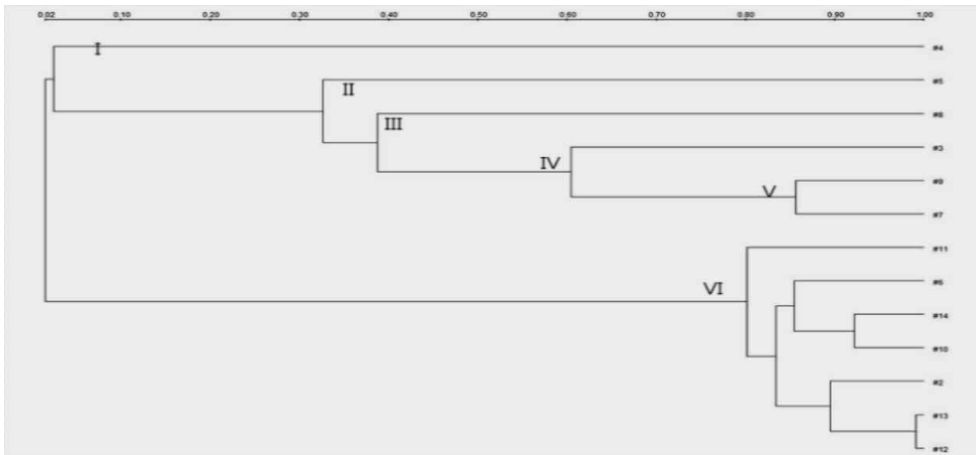


Figure 4-101. Dendrogram generated after cluster analysis of the RAPD 239 primer of the *L. brevis* strains isolated from various food products and vegetables using UPGMA method by Quantity1 software.

(나) KAY3 primer를 이용한 RAPD 분석

- KAY3 primer를 이용한 RAPD 분석 결과, 13균주는 8종류의 RAPD profile을 나타내었으며, 이 중 B-15 균주가 가장 많은 band pattern을 보여주었다(Figure 4-102). 이 결과는 239 primer를 이용하였을 때와 동일함을 확인할 수 있었다. 가장 큰 band는 4,000 bp였으며, 가장 작은 band는 600 bp로 확인되었다. 주요 band의 크기는 500, 600, 900, 1,200, 2,000, 2,500 bp의 크기를 나타내었다. No. 200019, 200054, 200080, G1 균주는 서로 유사한 band pattern을 나타내었다.

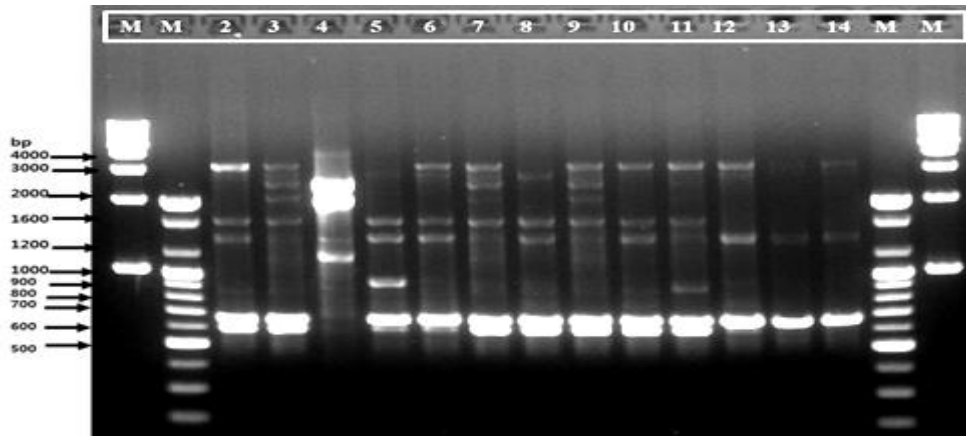


Figure 4-102. RAPD profiling of *L. brevis* using KAY3 primer. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 2, 200019; 3, B151; 4, B13; 5, B7; 6, 200054; 7, B13-2; 8, 200080; 9, B15; 10, G1; 11, KU15006; 12, 11348; 13, 11350; 14, 11351; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- Dendrogram 분석 결과, 13균주는 6개의 group으로 분류할 수 있었으며, 2개의 주요 group인 group VI과 III에는 각각 B-13-2, B151, B15, G1, KU15006 균주와 No. 200054, 11348, 11350, 11351 균주 등 5균주씩 속해 있었다. 한편, group I, II, IV, V 에는 각각 1균씩 만이 속해 있었다(Figure 4-103).

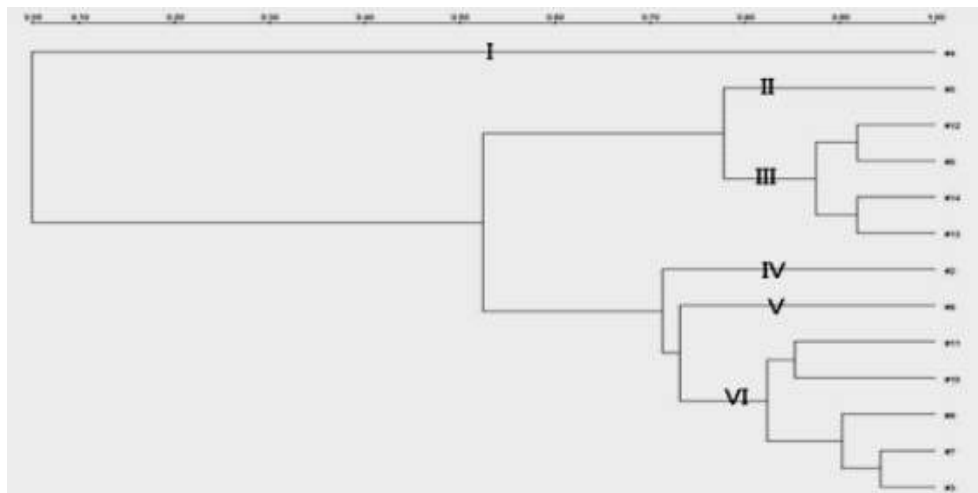


Figure 4-103. Dendrogram generated after cluster analysis of the KAY3 primer of the *L. brevis* strains isolated from various food products and vegetables using UPGMA method by Quantity1 software.

(3) *Leu. citreum*의 RAPD

(가) 239 primer를 이용한 RAPD 분석

- 239 primer를 이용하여 RAPD profile을 분석한 결과 7종류의 각기 다른 profile을 관찰할 수 있었고, 각 profile에는 7개의 major band가 존재하였는데, 그 크기는 200, 350, 480, 600, 1,000, 1,200, 1,600, 1,800 bp였다. 1,800 bp 크기의 band는 No. 11001 균주에만 존재하였고, 500, 600 bp 크기의 band는 각각 No. 11093, 11388에서 발견되었다. 350 bp 크기의 band는 No. 11432에서 만 major band로 관찰되었고, 200 bp 크기의 band는 NO. 11076과 11447 균주에서 만 관찰되었다(Figure 4-104).

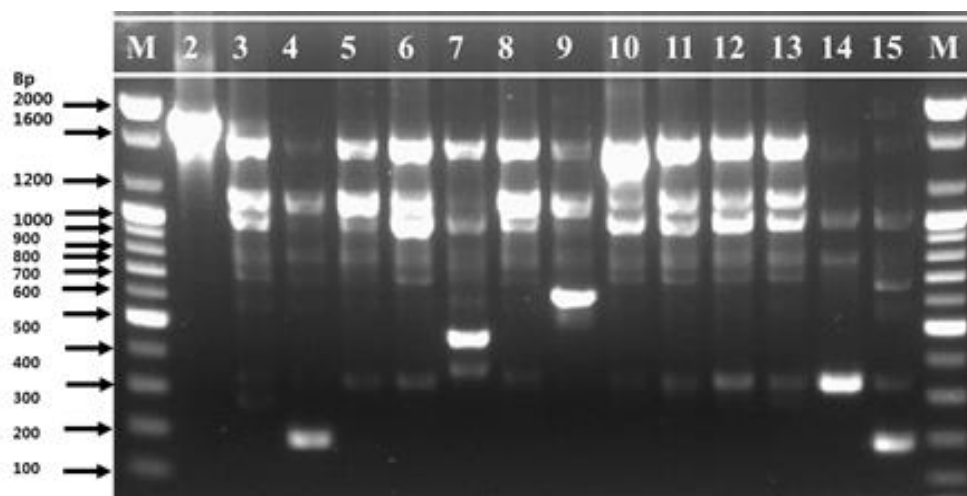


Figure 4-104. RAPD profiling of 14 strains of *Leu. citreum* using 239 primer. M, 100 bp marker; 2, 11001; 3, 11037; 4, 11076; 5, 11077; 6, 11082; 7, 11093; 8, 11382; 9, 11388; 10, 11391; 11, 11413; 12, 11414; 13, 11422; 14, 11432; 15, 11447; M, 100 bp marker.

- Dendrogram 분석 결과, 14균주는 7 group으로 분류할 수 있었으며, 가장 큰 group인 group VII에는 7균주가 속해 있었다. Group V에는 2균주 만이 속해 있었으며, 나머지 group I, II, III, IV, VI에는 각각 한 균주 만이 속해 있었다(Figure 4-105).

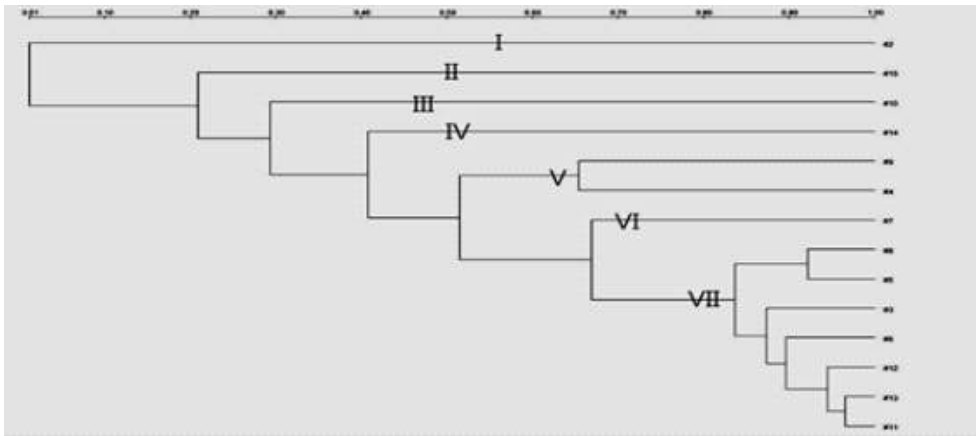


Figure 4-105. Dendrogram generated after cluster analysis of the RAPD 239 primer of the *Leu. citreum* strains isolated from various food products and vegetables using UPGMA method by Quantity1 software.

(나) KAY3 primer를 이용한 RAPD 분석

- KAY3 primer를 이용하여 RAPD profile을 분석한 결과, 총 7개의 profile을 확인할 수 있었고, 각 profile에는 7개의 major band가 확인되었는데, 그 크기는 500, 600, 1,000, 1,600, 2,000, 2,500 bp였다. No. 11432 균주는 가장 큰 band인 4,000 bp의 band가 관찰되었고, No. 11388 균주는 유일하게 500 bp의 band가 확인되었다(Figure 4-106).

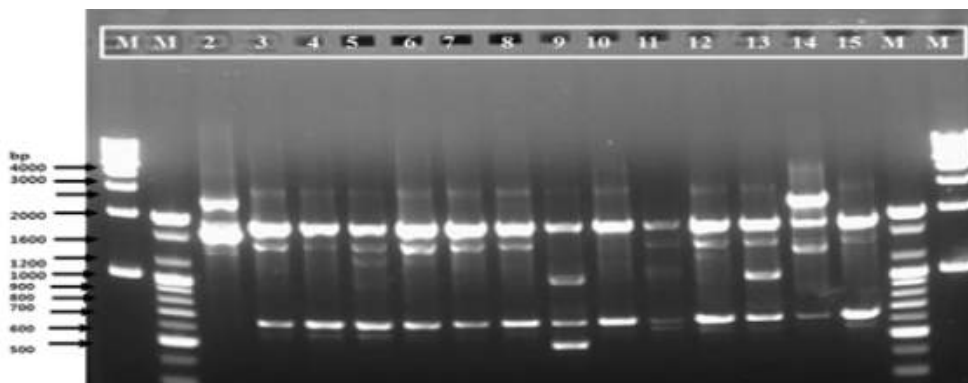


Figure 4-106. RAPD profiling of 14 strains of *Leu. citreum* using KAY3 primer. M, 1 kb marker; M, 100 bp marker; 2, 11001; 3, 11037; 4, 11076; 5, 11077; 6, 11082; 7, 11093; 8, 11382; 9, 11388; 10, 11391; 11, 11413; 12, 11414; 13, 11422; 14, 11432; 15, 11447; M, 100 bp marker; M, 1 kb marker.

- Dendrogram 분석 결과, 14균주는 4개의 group으로 분류할 수 있었으며, 이 중 group IV에는 10개의 균주가 속해 있었다. Group I은 두 개의 균주 만이 속해 있었고, 나머지 group II와 III에는 각각 1개의 균주 만이 속해 있었다(Figure 4-107).

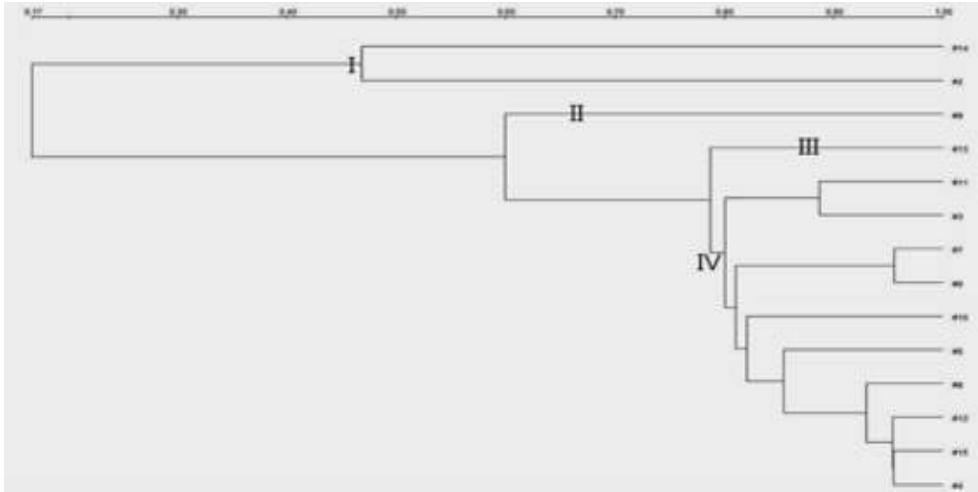


Figure 4-107. Dendrogram generated after cluster analysis of the RAPD KAY3 primer of the *Leu. citreum* strains isolated from various food products and vegetables using UPGMA method by Quantity1 software.

마. Culture-dependent DNA profiling

- 유산균 등의 식품발효용 균주들을 스타터로 이용하여 발효식품을 산업적으로 제조할 경우, 스타터 균주의 보존 관리가 매우 중요하다.
- 특히 제품에 생균의 형태로 소비자에게 제공되는 발효식품의 경우에는 제품에 스타터 균주가 생존하므로 타 연구자가 이를 배양시켜 산업적으로 악용할 소지가 있으며, 산업적으로 유용한 특허균주의 경우에는 타 연구자 또는 타 기업이 제품에 존재하는 생균을 분리 배양하여 이를 스타터로 사용하여 제품을 생산할 가능성도 있다.
- 따라서 산업적으로 유용한 발효용 스타터 균주의 도용을 차단하기 위해서는 균주의 추적시스템 구축이 필수적이다. 이에 본 연구에서는 대표적인 발효균주인 유산균주의 유전자 지문 채취를 위한 최적의 분석법을 개발하였으며, 이 분석법의 현장 적용 가능성을 연구하였다.
- 이를 위하여 우선적으로 대표적인 고상 발효식품인 김치와 액상 발효식품인 요구르트에 본 연구에서 사용한 유산균주인 *Leu. mesenteroides*를 접종한 후 김치와 요구르트에 존재하는 미생물들의 유전자 지문을 채취 분석함으로써 접종한 *Leu. mesenteroides* 균주의 존재 여부를 확인할 수 있는지 조사하였다.

- 37주의 *Leu. mesenteroides* 중에서 배추김치에서 분리된 No. 11251과 11289 두 균주를 선정하여 MRS 배지를 이용하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후, 시중 마트에서 구입한 김치와 플레인 요구르트에 각각 10%(v/w), 5%(v/v)을 접종하였다.
- 접종된 시료를 잘 혼합한 다음, 일정량을 취하여 십진희석법에 의해 10⁴까지 희석한 후 MRS agar 배지에 도말하여 배양한 후 형성된 colony 중 10개를 취하여 genomic DNA를 분리하였다.

(1) RAPD 분석

(가) 김치에 존재하는 유산균주의 RAPD 분석

- 상기 기술된 RAPD 분석법에 의하여 239 primer와 KAY3 primer를 이용하여 김치와 요구르트에서 각각 10개씩 분리된 colony의 RAPD profile을 분석한 결과, *Leu. mesenteroides* No. 11251 균주를 접종한 김치에서는 10개 균주 중에서 8균주의 genomic DNA가 분리되었다. 이를 template DNA로 하여 239 primer를 이용하여 RAPD를 수행한 결과 Figure 4-108에 나타낸 바와 같이 8균주 중에서 5균주(K3, K4, K5, K6, K8)가 No. 11251 균주와 동일한 RAPD profile을 지니고 있었다. 한편 KAY3 primer를 이용하여 RAPD를 수행하였을 경우에는 Figure 4-109와 같이 8균주 중에서 4균주(K3, K4, K6, K8) No. 11251 균주와 동일한 RAPD profile을 지니고 있었다.



Figure 4-108. RAPD profiles with 239 primer for 8 colonies of No. 11251 *Leu. mesenteroides* obtained from the kimchi culture.

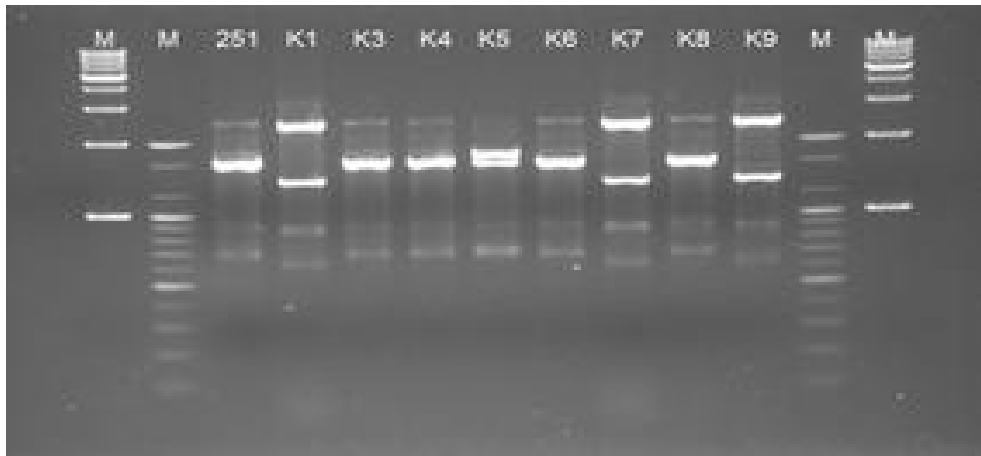


Figure 4-109. RAPD profiles with KAY3 primer for 8 colonies of No. 11251 *Leu. mesenteroides* obtained from the kimchi culture.

- 한편 *Leu. mesenteroides* No. 11289 균주를 접종한 김치에서 분리한 10개 균주에 대한 RAPD 분석을 KAY3 primer를 이용하여 수행한 결과 Figure 4-110에 나타난 바와 같이 10 균주 중에서 4균주(K1, K4, K6, K8)가 *Leu. mesenteroides* No. 11289 균주와 동일한 RAPD profile을 나타내었다.
- 이 결과로부터 대표적인 고상 발효식품인 김치에 특정 유산균주가 존재할 경우 김치 시료로부터 해당 유산균주에 대한 RAPD 분석이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

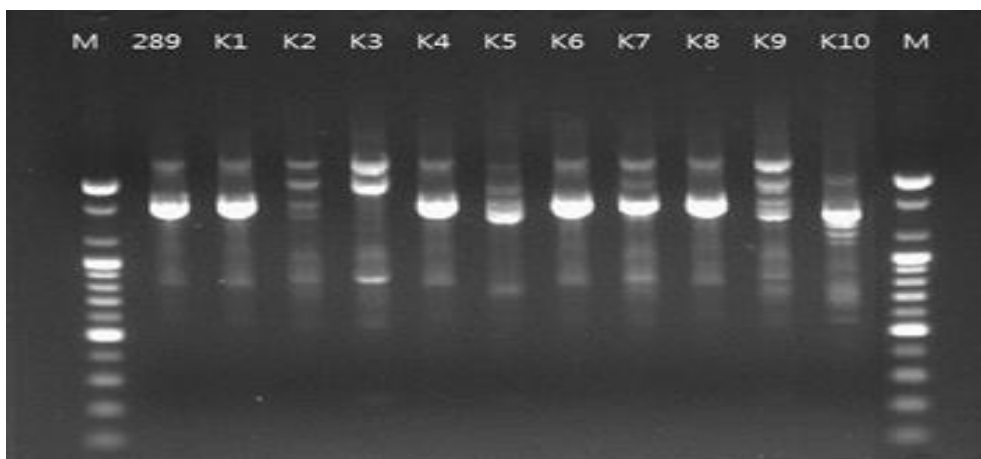


Figure 4-110. RAPD profiles with KAY3 primer for 10 colonies of No. 11289 *Leu. mesenteroides* obtained from the kimchi culture.

(나) 요구르트에 존재하는 유산균주의 RAPD 분석

- 김치의 경우와 동일한 방법으로 상기 기술된 RAPD 분석법에 의하여 KAY3 primer를 이용하여 요구르트에서 각각 10개씩 분리된 colony의 RAPD profile을 분석한 결과, *Leu. mesenteroides* No. 11251 균주를 접종한 김치에서는 10개 균주 중에서 7균주(Y3, Y4, Y6, Y7, Y8, Y9, Y10)가 No. 11251 균주와 동일한 RAPD profile을 지니고 있었다(Figure 4-111). 한편 *Leu. mesenteroides* No. 11289 균주를 접종하였을 경우에는 Figure 4-112과 같이 10균주 중에서 3균주(Y4, Y6, Y9)가 No. 11251 균주와 동일한 RAPD profile을 지니고 있었다.

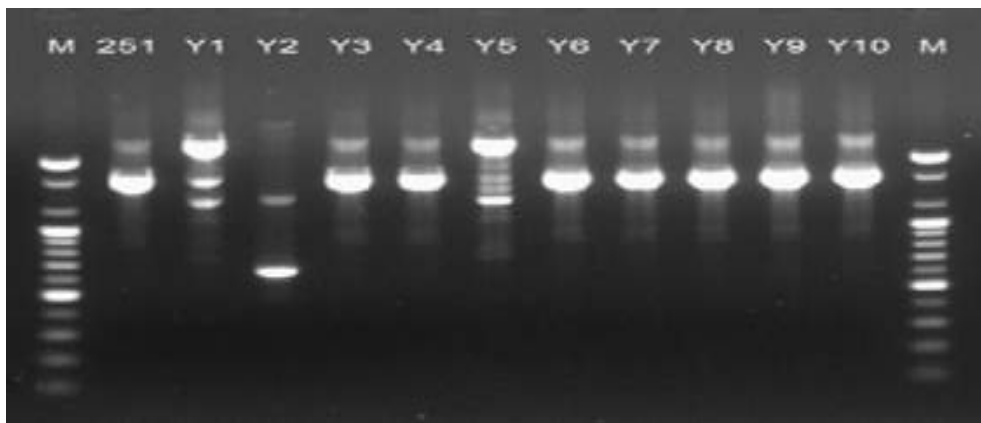


Figure 4-111. RAPD profiles with KAY3 primer for 10 colonies of No. 11251 *Leu. mesenteroides* obtained from the yogurt culture.

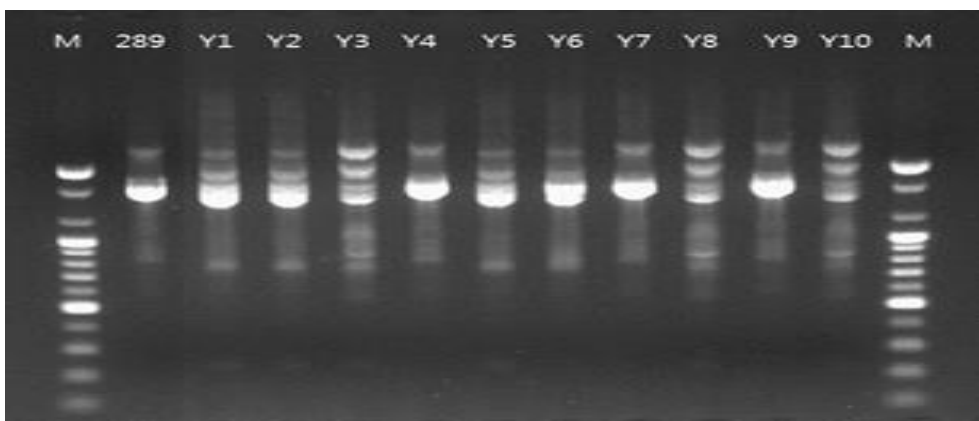


Figure 4-112. RAPD profiles with KAY3 primer for 10 colonies of No. 11289 *Leu. mesenteroides* obtained from the yogurt culture.

- 이 결과로부터 대표적인 액상 발효식품인 요구르트에 특정 유산균주가 존재할 경우 요구르트 시료로부터 해당 유산균주에 대한 RAPD의 효율적 분석이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.
- 본 연구에서 10^9 CFU/g의 유산균을 지니는 김치와 요구르트에 10^9 CFU/mL의 유산균 배양액을 10%(v/w) 접종한 직후 colony를 생성시켜 RAPD 분석을 실시하였으므로, 분석한 10균주 중에서 확률적으로 10%인 1균주 정도가 접종한 유산균주와 동일한 RAPD profile을 지니고 있을 것으로 예상하였으나 30~80%의 균주가 접종한 유산균주와 동일한 RAPD profile을 나타내었는데 이는 김치와 요구르트에 이미 존재하는 유산균주들의 RAPD profile이 접종한 유산균주와 동일한 RAPD profile을 지니고 있기 때문인 것으로 해석된다. 따라서 이들 균주에 대한 유전자 지문 분석을 rep-PCR로 추가 분석하였다.

(2) rep-PCR 분석

(가) 김치에 존재하는 유산균주의 rep-PCR 분석

- KAY3 primer를 이용한 RAPD 분석 결과 김치에 접종한 *Leu. mesenteroides* No. 11251 균주와 동일한 RAPD profile을 나타내는 4균주(K3, K4, K6, K8)에 대하여 REP primer, ERIC primer, (GTG)₅ primer를 이용하여 rep-PCR profile을 분석하였다.
- 그 결과 REP primer를 이용한 rep-PCR profile에서는 3균주(K4, K6, K8)가 *Leu. mesenteroides* No. 11251 균주와 동일한 rep-PCR profile을 나타내었고(Figure 4-113), (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR에서는 K3, K4, K6 균주가 동일한 rep-PCR profile을 나타내었으며(Figure 4-114), ERIC primer를 이용한 rep-PCR profile은 K3, K6, K8 균주가 동일한 profile을 나타내었다(Figure 4-115).
- 분석한 4균주 중에서 K6 균주만이 REP primer, ERIC primer, (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR에서 모두 *Leu. mesenteroides* No. 11251 균주와 동일한 rep-PCR profile을 나타내었기 때문에 본 연구에서 분석한 김치에서 분리한 10개 균주 중에서 K6 균주가 접종한 *Leu. mesenteroides* No. 11251 균주인 것으로 판단되었다.
- 이상의 결과로부터 주요 고상 발효식품인 김치나 액상 발효식품인 요구르트로부터 유산균주를 분리하여 culture-dependent한 방법으로 유전자 분석을 수행할 경우 정확한 DNA profiling이 가능하다는 것이 확인되었다.

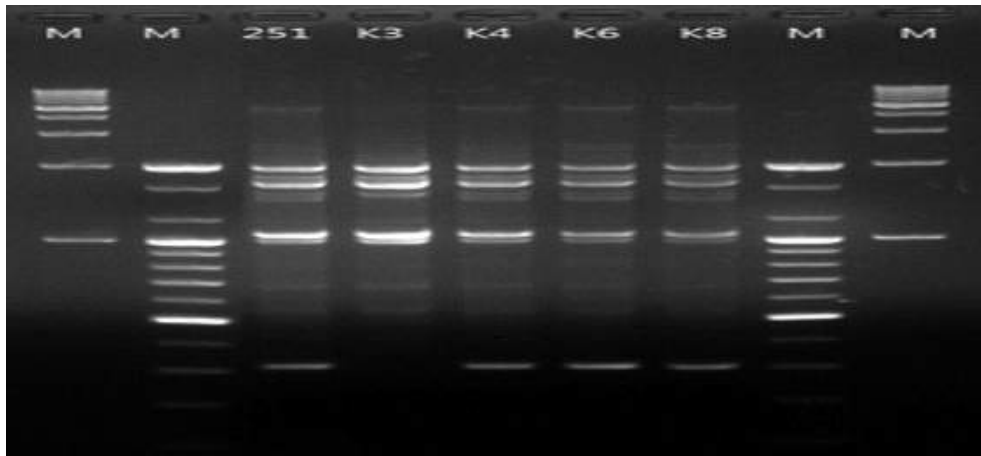


Figure 4-113. rep-PCR profiles with REP primer for 4 colonies of No. 11251 *Leu. mesenteroides* selected on the RAPD band pattern from the kimchi culture.

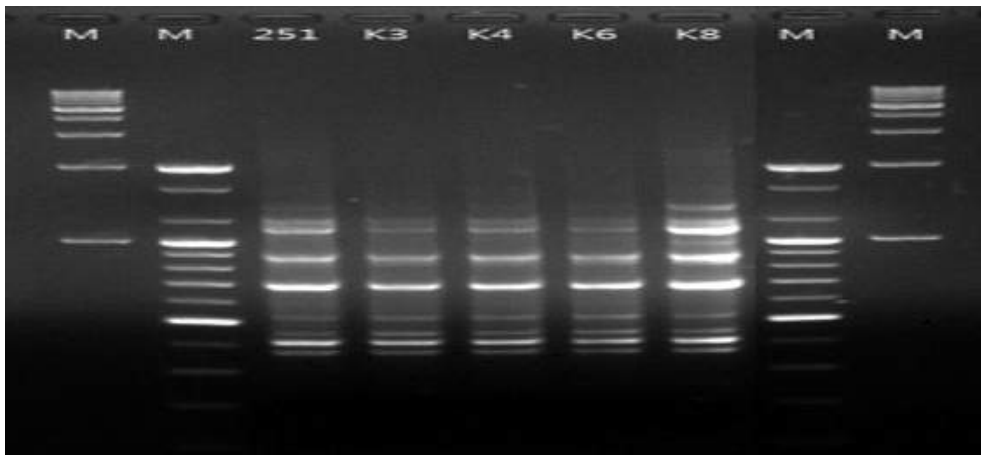


Figure 4-114. rep-PCR profiles with (GTG)₅ primer for 4 colonies of No. 11251 *Leu. mesenteroides* selected on the RAPD band pattern from the kimchi culture.

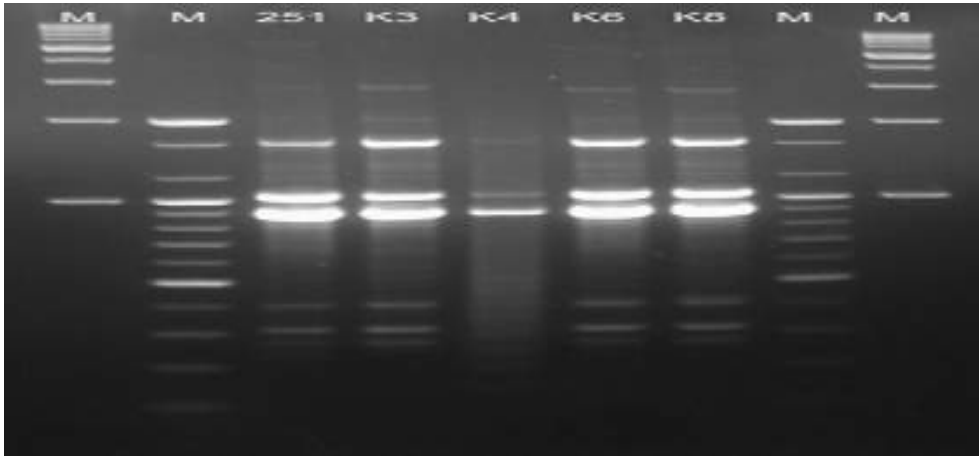


Figure 4-115. rep-PCR profiles with ERIC primer for 4 colonies of No. 11251 *Leu. mesenteroides* selected on the RAPD band pattern from the kimchi culture.

2. 분리 균주의 유전자 지문 데이터베이스 구축

가. 유전자 지문 데이터의 암호화 작업

- 본 연구에서 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *Leu. citreum* 등 3종의 유산균주에 대한 최적의 유전자 지문 분석법을 개발하기 위하여 MLST, RAPD, rep-PCR 분석법을 이용하여 3종 유산균주의 유전자 지문 분석을 실시한 결과 MLST 분석법이 최적의 분석법인 것으로 확인되었다.
- *L. brevis* 14주와 *Leu. citreum* 15주 각 균주는 고유의 MLST sequence type을 지니고 있어 MLST 분석에 의한 sequence type만으로 개별 균주를 확인할 수 있었으나 *Leu. mesenteroides*의 경우 일부 균주들의 MLST sequence type이 동일하여 MLST 분석법만으로는 균주 식별이 불가하였기 때문에 rep-PCR 또는 RAPD 분석법을 병용하여 분석하는 것이 필요한 것으로 확인되었다.
- MLST의 경우 유전자 분석 결과는 sequence type이라는 숫자의 형태로 표시되어 디지털 형식으로 데이터베이스화할 수 있지만, rep-PCR이나 RAPD의 경우에는 유전자 지문이 agarose gel상에 아날로그 형식의 band의 형태로 나타나고, 이 band pattern을 dendrogram으로 분석하여 분석 대상 균주들을 band pattern의 유사성에 따라 grouping할 수 있다.
- 따라서 rep-PCR이나 RAPD 분석 결과인 band pattern을 이용하여 각각의 균주들에 group number를 부여할 수 있지만 일반적으로 하나의 group에 여러 균주가 존재하기 때문에 특정 균주에 고유한 디지털 형식의 유전자 지문을 부여할 수 없는 문제점이 있다.

- 이에 본 연구에서는 rep-PCR과 RAPD 분석에 의해 얻어진 agarose gel 전기영동상의 특정 크기를 지니는 DNA band의 존재 여부를 이용하여 아날로그 형식의 유전자 지문을 숫자로 표현하여 디지털화 하고자 하였다.
- 즉 3가지 primer(REP, ERIC, (GTG)₅)를 각각 이용하여 rep-PCR을 수행한 다음 이로부터 얻어진 PCR 산물을 agarose gel에 전기영동하여 얻어진 결과에서 특정 크기를 지닌 band의 존재 유무에 따라 이진법을 이용하여 디지털 code를 작성하였다 (McDaniel and Pillai, 2002). 즉, 특정 위치에 band가 존재할 경우를 '1', 존재하지 않을 경우를 '0'으로 하여 각 band의 크기에 따라 digital code를 부여하였고 DNA band의 크기가 큰 band부터 작은 band순으로 나열하여 Table 4-55부터 4-63에 나타내었다.

Table 4-55. Digital data of *Leu. mesenteroides* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.																		
	11 08 3	11 20 4	11 25 3	11 25 9	11 26 0	11 39 2	11 41 6	11 42 6	11 42 7	11 46 0	11 07 8	11 25 1	11 28 9	11 32 3	11 35 7	11 35 8	11 35 9	11 36 0	11 36 1
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2,200	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2,100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,800	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1,600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1,400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,150	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,050	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
490	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
300	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
200	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(bp)	36 2	36 3	36 4	38 6	39 6	43 4	43 5	43 6	43 7	43 8	43 9	44 0	44 1	44 3	46 1	46 3	46 4	46 5
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
1,800	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1,700	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1,500	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1,300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,150	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1,100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
950	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
800	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
500	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
250	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
200	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-56. Digital data of *Leu. mesenteroides* in the form of binary number(1, 0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.																		
	11 08 3	11 20 4	11 25 3	11 25 9	11 26 0	11 39 2	11 41 6	11 42 6	11 42 7	11 46 0	11 07 8	11 25 1	11 28 9	11 32 3	11 35 7	11 35 8	11 35 9	11 36 0	11 36 1
2,500	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,700	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,220	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
850	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

650	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
530	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Band size (bp)	Strain No.																	
	11 36	11 36	11 36	11 38	11 39	11 43	11 43	11 43	11 43	11 43	11 43	11 44	11 44	11 44	11 46	11 46	11 46	11 46
	2	3	4	6	6	4	5	6	7	8	9	0	1	3	1	3	4	5
2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
1,220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,020	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
700	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1

Table 4-57. Digital data of *Leu. mesenteroides* in the form of binary number(1, 0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

	Strain No.																		
Band size (bp)	11 08	11 20	11 25	11 25	11 26	11 39	11 41	11 42	11 42	11 46	11 07	11 25	11 28	11 32	11 35	11 35	11 35	11 36	11 36
	3	4	3	9	0	2	6	6	7	0	8	1	9	3	7	8	9	0	1
1,650	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,550	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,150	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,050	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
720	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
420	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
200	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.																	
	11 36 2	11 36 3	11 36 4	11 38 6	11 39 6	11 43 4	11 43 5	11 43 6	11 43 7	11 43 8	11 43 9	11 44 0	11 44 1	11 44 3	11 46 1	11 46 3	11 46 4	11 46 5
1,650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
1,200	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
1,150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1,050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
900	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
800	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
750	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
720	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
450	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
420	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
400	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
380	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-58. Digital data of *L. brevis* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.												
	200 0 19	B13	B15 1	B7	200 0 54	B13 -2	200 080	B15	G1	KU 150 06	113 48	113 50	113 51
5,000	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
3,200	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
3,100	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2,800	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
2,700	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2,200	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
2,100	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1,600	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,500	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1,100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
800	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
700	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
690	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
680	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
600	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
400	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-59. Digital data of *L. brevis* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.												
	200 019	B13	B15 1	B7	200 0 54	B13 -2	200 0 80	B15	G1	KU 150 06	113 48	113 50	113 51
7,500	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7,000	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6,000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
3,100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2,700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2,600	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2,500	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
2,300	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,100	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2,000	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1,900	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1,800	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1,700	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1,600	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1,500	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1,300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
1,200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1,150	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
900	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
880	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
800	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
700	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
650	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
530	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
430	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
380	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
350	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0

Table 4-60. Digital data of *L. brevis* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.												
	200 0 19	B13	B15 1	B7	200 0 54	B13 -2	200 0 80	B15	G1	KU 150 06	113 48	113 50	113 51
2,000	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1,500	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
1,400	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
1,050	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1
1,000	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
850	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0

750	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
650	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
500	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
400	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
350	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0

Table 4-61. Digital data of *Leu. citreum* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.													
	110 01	110 37	110 76	110 77	110 82	110 93	113 82	113 88	113 91	114 13	114 14	114 22	114 32	114 47
6,000	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
5,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,100	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
3,000	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
2,900	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,700	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2,500	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
2,200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1
1,700	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
1,400	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,250	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,200	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,100	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1,050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
820	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
750	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
700	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
590	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
490	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Table 4-62. Digital data of *Leu. citreum* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.													
	110 01	110 37	110 76	110 77	110 82	110 93	113 82	113 88	113 91	114 13	114 14	114 22	114 32	114 47
6,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,500	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,000	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
3,500	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2,900	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,800	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
2,100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,800	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,500	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
1,200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
850	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
780	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
630	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
550	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
420	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
300	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
250	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
150	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

Table 4-63. Digital data of *Leu. citreum* in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.													
	110 01	110 37	110 76	110 77	110 82	110 93	113 82	113 88	113 91	114 13	114 14	114 22	114 32	114 47
1,700	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1,300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
1,150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1,100	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
800	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
380	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
300	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
280	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

- RAPD 분석의 경우에도 rep-PCR과 동일한 방법을 이용하여 RAPD 분석 결과 얻어진 PCR 산물인 band들을 특정 위치에서의 band 존재 여부로 이진법화하여 디지털 code를 부여하여 Table 4-64부터 4-69에 나타내었다.

Table 4-64. Digital data of *Leu. mesenteroides* in the form of binary number(1, 0) for the RAPD fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.																		
	11 08 3	11 20 4	11 25 3	11 25 9	11 26 0	11 39 2	11 41 6	11 42 6	11 42 7	11 46 0	11 07 8	11 25 1	11 28 9	11 32 3	11 35 7	11 35 8	11 35 9	11 36 0	11 36 1
3,000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.																	
	11 36 2	11 36 3	11 36 4	11 38 6	11 39 6	11 43 4	11 43 5	11 43 6	11 43 7	11 43 8	11 43 9	11 44 0	11 44 1	11 44 3	11 46 1	11 46 3	11 46 4	11 46 5
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
600	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-65. Digital data of *Leu. mesenteroides* in the form of binary number(1,0) for the RAPD fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.																		
	11 08 3	11 20 4	11 25 3	11 25 9	11 26 0	11 39 2	11 41 6	11 42 6	11 42 7	11 46 0	11 07 8	11 25 1	11 28 9	11 32 3	11 35 7	11 35 8	11 35 9	11 36 0	11 36 1
2,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
2,000	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,500	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
1,250	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.																		
	11 36 2	11 36 3	11 36 4	11 38 6	11 39 6	11 43 4	11 43 5	11 43 6	11 43 7	11 43 8	11 43 9	11 44 0	11 44 1	11 44 3	11 46 1	11 46 3	11 46 4	11 46 5	
2,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,500	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,250	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-66. Digital data of *L. brevis* in the form of binary number(1,0) for the RAPD fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.												
	20 00 19	B13	B15 1	B7	200 0 54	B13 -2	200 0 80	B15	G1	KU 150 06	113 48	113 50	113 51
3,500	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2,800	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
2,700	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2,500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2,000	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
1,800	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
1,250	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
950	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
700	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Table 4-67. Digital data of *L. brevis* in the form of binary number(1,0) for the RAPD fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.												
	2000	B13	B15	B7	2000	B13	2000	B15	G1	KU	113	113	113
	019		1		054	-2	080			15006	48	50	51
4,000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,000	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
2,500	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1,400	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
1,200	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0

Table 4-68. Digital data of *Leu. citreum* in the form of binary number(1,0) for the RAPD fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.													
	11001	11037	11076	11077	11082	11093	11382	11388	11391	11413	11414	11422	11432	11447
2,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,500	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
1,400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1,200	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1,000	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
800	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
700	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
680	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-69. Digital data of *Leu. citreum* in the form of binary number(1,0) for the RAPD fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.													
	11001	11037	11076	11077	11082	11093	11382	11388	11391	11413	11414	11422	11432	11447
4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2,800	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
2,500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2,000	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1,600	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1,500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1,000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
600	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

나. 최적 유전자 지문 분석법을 이용한 유전자 지문 데이터베이스 구축

- 본 연구에 사용한 37주의 *Leu. mesenteroides*, 13주의 *L. brevis*, 14주의 *Leu. citreum*의 유전자 지문은 MLST 분석의 sequence type, REP primer, ERIC primer, (GTG)₅ primer 등 총 3종류의 primer를 이용한 rep-PCR 분석, 234 primer, KAY3 primer 등 총 2종류의 primer를 이용한 RAPD 분석을 통해 각 균주 당 총 6종류의 유전자 지문을 확보하였으며, rep-PCR과 RAPD 분석의 경우에는 gel상의 band pattern을 이전법으로 디지털화함으로써 본 연구에서 분석한 모든 유전자 지문을 디지털화하였다.
- 본 연구에서 사용된 37주의 *Leu. mesenteroides*, 13주의 *L. brevis*, 14주의 *Leu. citreum*에 대한 유전자 지문을 데이터베이스화하기 위하여 디지털화한 6종류의 유전자 지문을 통합하여 code화하였으며, 이를 이용하여 bar code를 제작함으로써 유산균에 대한 유전자 지문 데이터베이스를 구축하였다.
- 디지털화된 유전자 지문의 code화는 Figure 4-116에 나타난 바와 같이 총 6개의 유전자 지문 code, 즉 MLST, REP primer를 이용한 rep-PCR, ERIC primer를 이용한 rep-PCR, (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR, 239 primer를 이용한 RAPD, KAY3 primer를 이용한 RAPD로 구성하였다.
- 각 유전자 지문 code는 유전자 지문의 종류를 영문자로 표시하여 MLST는 ‘M’, REP primer를 이용한 rep-PCR은 ‘R’, ERIC primer를 이용한 rep-PCR은 ‘E’, (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR은 ‘G’, 239 primer를 이용한 RAPD는 ‘T’, KAY3 primer를 이용한 RAPD는 ‘K’로 표시하였다.
- 각 영문자 뒤에는 2자리 숫자를 부여하였으며, 이는 MLST의 경우에는 sequence type, rep-PCR과 RAPD의 경우에는 agarose gel상에 존재하는 band의 수, 즉 Table 4-55부터 4-69에 나타난 각 균주별 디지털 데이터에서의 ‘1’의 개수를 의미한다.
- 예를 들어 Table 4-70에서 *Leu. mesenteroides* No. 11083의 경우 MLST의 sequence type이 2이므로 이에 해당하는 code는 ‘M02’이 되고, REP primer를 이용한 rep-PCR의 band 수는 7개이므로 이에 대한 code는 ‘R07’이 되며, ERIC primer를 이용한 rep-PCR의 band 수는 4개이므로 code는 ‘E04’이고, (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR의 band 수는 8개이므로 code는 ‘G08’이고, 239 primer와 KAY3 primer를 이용한 RAPD의 code는 각각 ‘T01’, ‘K02’가 된다. 이를 통합하면 완성된 code는 ‘M02R07E04G08T01K02’가 된다.

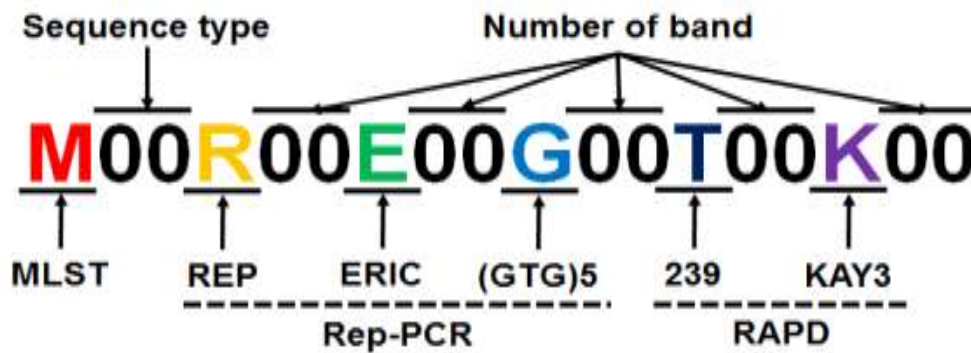


Figure 4-116. Scheme of digital code of integrated DNA fingerprints.

- *L. brevis*와 *Leu. citreum*의 경우 본 연구에서 분석한 MLST sequence type은 모든 균주가 고유의 sequence type을 지니고 있어, rep-PCR이나 RAPD 분석이 필요 없이 MLST 분석만으로도 균주 확인이 가능하나, *Leu. mesenteroides*의 경우에는 분석한 37균주 중에서 No. 11259와 No. 11260은 염기서열 분석이 정확하지 않아 sequence type을 부여하지 못하였고, No. 11204, 11251, 11357, 11359, 11396 등 5 균주는 sequence type이 3으로 동일한 sequence type을 지니고 있었고, No. 11289, 11360, 11362, 11364, 11386 등 5균주는 sequence type이 5로 역시 동일한 sequence type을 지니고 있어, MLST 분석만으로는 균주를 구별할 수 없는 것으로 확인되었다.
- 따라서 *Leu. mesenteroides*의 경우에는 MLST이외에 rep-PCR과 RAPD를 병행하여 유전자 지문을 분석해야 하여, 이럴 경우 *Leu. mesenteroide*의 모든 균주는 고유의 유전자 지문 code를 지니고 있는 것으로 확인되었다.
- 동일한 sequence type 3을 지니고 있는 No. 11204, 11251, 11357, 11359, 11396 등 5 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 alignment한 결과, No. 11359를 제외한 4균주는 동일한 염기서열을 지니고 있었고, No. 11359는 다른 균주들의 염기서열과 비교하여 조사된 1,312 bp 중 4 bp가 일치하지 않는 것으로 나타났다(Figure 4-117). 이는 No. 11359를 제외한 4균주는 일부 분리원이 동일하기 때문에 동일한 균주일 가능성이 있다고 판단된다.
- 동일한 sequence type 5를 지니고 있는 No. 11289, 11360, 11362, 11364, 11386 등 5 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 alignment한 결과 모든 균주의 염기서열이 동일한 것으로 나타났다. 이 결과는 동일한 16S rRNA 유전자의 염기서열이 동일할 경우 MLST sequence type이 동일하다는 것을 보여준다.
- Digital code화 된 유전자 지문은 Table 4-70부터 4-72에 나타낸 바와 같이 bar code로 변환하여 데이터베이스에 리스트화하여 데이터베이스 구축을 완성하였다.
- Bar code는 웹사이트(<http://www.terryburton.co.uk/barcodewriter/generator/>)의 bar code 생성 프로그램을 이용하여 제작하였으며, barcode의 형식은 'Code 128'을 이용하였다.

- 본 연구 결과, 유산균주의 DNA fingerprint를 이용한 균주 확인은 MLST 분석에 의해 일차적으로 가능하며, 만약 MLST 분석에 의해 확인이 가능하지 않을 경우에는 본 연구에서 개발한 유전자 지문의 디지털 코드 작성에 의해 정확하게 확인할 수 있다는 것을 보여 주었다.

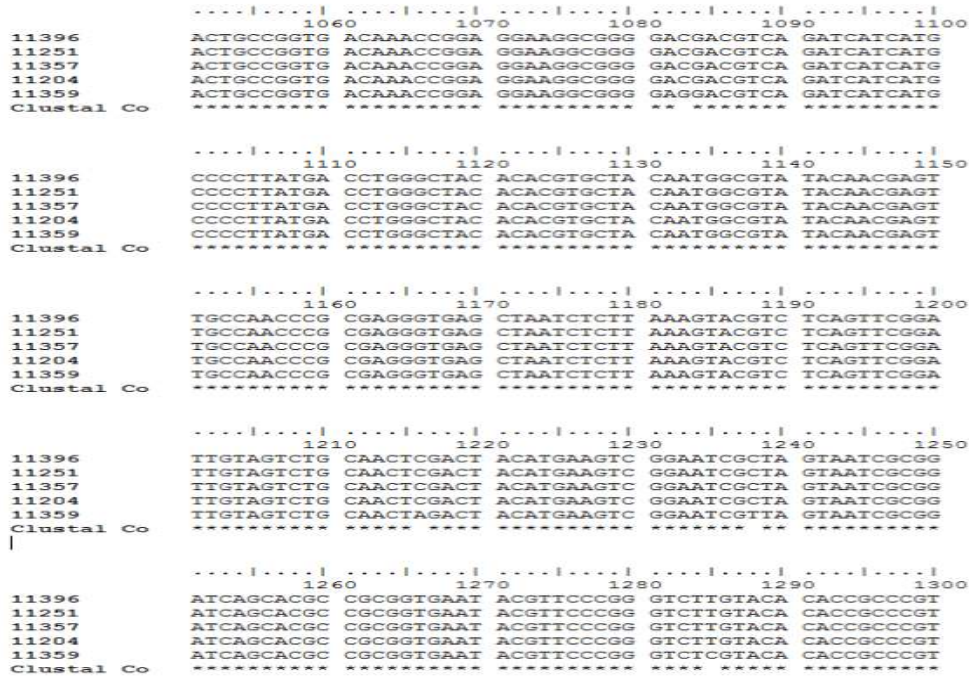




Figure 4-117. Alignment of nucleotide sequence of 16S rRNA gene of *Leu. mesenteroides* strains which share same sequence type of MLST.

Table 4-70. Database of DNA fingerprints for *Leu. mesenteroides*

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital barcode
		Rep-PCR		RAPD-PCR			
		REP	ERIC	(GT) ₅	239	KAY 3	
11083	2	7	4	8	1	2	
11204	3	9	3	9	1	2	

11253 4 6 5 9 1 2



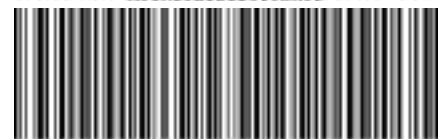
11259* - 8 2 10 3 2



11260* - 10 12 10 2 5



11392 10 10 4 9 2 2



11416 11 10 5 8 4 2



11426 12 3 5 8 3 2



11427 13 9 3 8 2 2



11460 23 10 4 8 2 2



11078 1 7 8 9 1 2



11251 3 9 4 8 1 2



11289 5 12 4 8 1 2



11323 6 10 3 8 1 4



11357 3 10 4 8 1 1



11358 7 10 3 8 1 4



11359 3 10 4 8 1 4



11360 5 10 4 8 1 4



11361 8 10 4 8 1 4



11362 5 10 4 5 1 4



11363 9 6 3 9 2 4



11364 5 10 4 7 1 4



11386 5 10 3 8 1 2



11396 3 9 3 7 1 2



11434 14 4 7 3 2 3



11435 15 5 6 3 3 3



11436 16 5 5 2 3 3



11437 17 5 5 3 4 3



11438 18 5 4 6 3 3



11439 19 9 1 5 1 2



11440 20 5 3 3 2 3



11441 21 5 4 5 2 3



11443 22 8 2 9 1 2



11461 24 7 4 9 1 2



11463 25 7 3 8 1 2



11464 26 8 4 8 1 2



11465 27 9 4 7 1 2



* Sequences were not obtained in good quality, therefore, these two strains were removed from MLST analysis.

Table 4-71. Database of DNA fingerprints for *L. brevis*

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital barcode
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) ₅	239	KAY3	
200019	4	15	2	6	2	4	
B13	9	15	14	8	2	4	
B151	11	13	10	8	3	6	
B7	8	15	11	9	4	3	
200054	5	14	12	9	3	4	
B13-2	7	16	10	8	4	5	
200080	6	13	11	8	3	4	
B15	10	16	11	8	5	4	
G1	12	15	10	8	2	5	
KU1500 6	13	17	14	7	2	4	

11348	1	15	9	8	2	3
11350	2	15	10	9	2	2
11351	3	15	6	9	1	3

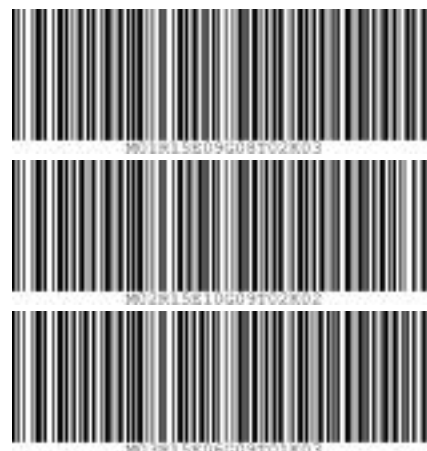









Table 4-72. Database of DNA fingerprints for *Leu. citreum*

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital barcode
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) ₅	239	KAY3	
11001	1	10	13	10	2	3	
11037	2	14	7	10	6	3	
11076	3	12	9	12	3	4	
11077	4	13	9	13	5	3	
11082	5	17	8	15	6	4	
11093	6	13	9	14	6	4	
11382	7	16	7	10	4	4	

11388 8 13 7 15 4 4



11391 9 14 7 13 3 3



11413 10 14 8 11 7 3



11414 11 15 5 11 6 4



11422 12 16 5 9 6 5



11432 13 12 9 12 4 6



11447 14 12 7 12 4 4



제 11절 선정 균주를 이용하여 제조한 발효식품에서의 미생물 추적 평가

1. 시판 발효식품에 존재하는 미생물 유전자 지문 분석

가. 개발한 유전자 지문 분석법을 이용한 유전자 지문 채취

- 본 연구에서 개발한 최적의 유전자 지문 분석법은 RAPD, Rep-PCR, MLST 분석법을 조합하여 특정 미생물의 유전자 지문을 디지털 코드화 하는 것이며, 코드화된 유전자 지문은 특정 미생물 고유의 DNA profiling을 나타낸다. 따라서 본 연구에서 개발한 유전자 지문 분석법이 실제로 발효식품에 적용 가능한지를 검증하기 위하여 대표적인 고상 발효식품인 김치와 액상 발효식품인 요구르트에 존재하는 미생물들의 유전자 지문을 분석하고, 동시에 본 연구에서 사용한 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*을 김치와 요구르트에 각각 접종한 후 김치와 요구르트로부터 해당 유산균의 유전자 지문을 분석함으로써 본 연구에서 개발한 유전자 지문법의 유효성을 검증하고자 하였다.

(1) 유산균주의 분리 및 genomic DNA 분리정제

- 유전자 지문 채취를 위한 발효 식품은 한국야쿠르트사의 메치니코프 발효유 또는 덴마크 드링킹 요구르트와 가정에서 제조된 김치를 이용하였다. 메치니코프 발효유에는 코카서스 유산균, *S. thermophilus*, *B. longum*, *L. casei*, *L. acidophilus*가 함유되어 있었다.
- 발효유에는 MRS broth에 배양된 *Leu. mesenteroides* 11251, *L. brevis* B151, *L. plantarum* Lb41^K을 각각 10%(v/v)으로 접종하였고, PBS에 십진 희석하여 10⁶까지 희석한 후 MRS agar 배지에 도말하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 형성된 colony 중 무작위로 30개를 취하여 genomic DNA를 분리하였다.
- 김치에는 MRS broth에 배양된 *Leu. mesenteroides* 11251과 *L. brevis* B151을 각각 10%(v/w)로 접종하였고, 접종 후 3 g의 김치를 취하여 25 mL의 멸균생리식염수를 첨가하여 십진희석법으로 10⁶까지 희석한 후 MRS agar 배지에 도말하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 형성된 colony 중 무작위로 30개를 취하여 genomic DNA를 분리하였다.

(2) 유전자 지문 채취를 위한 PCR 수행 및 PCR 산물의 염기서열 결정

- 유전자 지문 채취를 위하여 본 연구에서 선정된 방법인 RAPD-PCR은 239와 KAY3 프라이머를 동일하게 사용하였고, Rep-PCR 분석을 위하여 REP, ERIC, (GTG)₅ 프라이머를 사용하였다. MLST 분석에는 *Leu. mesenteroides* 11251의 추적에는 *atpA*, *gyrB*, *groEL*, *pheS*, *pyrG*, *rpoA*, *uvrC* 유전자를 증폭하여 분석하였고, *L. brevis* B151의 추적에는 *dnaK*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* 유전자를 분석하였으며, *L. plantarum* Lb41의 추적을 위하여 *ddl*, *gdh*, *gyrB*, *mutS*, *pgm*, *Purk1*, *tkt4* 유전자를 분석하였다.
- PCR 반응 조건은 Table 4-73와 같다.

Table 4-73. PCR conditions used for the amplification of various genes and fingerprinting methods of the target colonies

Primer	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	No. of cycles	Post extension	Product storage
16S rRNA	94°C/2 min	94°C/30 sec	50°C/1 min	72°C/1 min	35	72°C/7 min	
RAPD	94°C/4 min	94°C/2 min	39°C/2 min	72°C/2 min	2	72°C/7 min	4°C/∞
		95°C/15 sec	39°C/15 sec	72°C/20 sec	35	72°C/7 min	
REP	95°C/7 min	95°C/1 min	41°C/1 min	65°C/3 min	35	65°C/16 min	
(GTG) ₅	95°C/7 min	95°C/2 min	36°C/2 min	72°C/2 min	4	72°C/5 min	4°C/∞
		95°C/1 min	50°C/1 min	72°C/1 min	30	72°C/5 min	
ERIC	94°C/3 min	94°C/30 sec	52°C/1.5 min	68°C/8 min	35	68°C/8 min	
MLST	94°C/2 min	95°C/20 sec	*(Av.Tm+1) °C/ 30 sec	72°C/30 sec	35	72°C/7 min	

나. 주요 발효식품에 존재하는 유산균의 유전자 지문 분석

(1) 발효유 내에 존재하는 유산균의 유전자 지문 분석

(가) 발효유에서 선별한 유산균의 동정

- 발효유에 *Leu. mesenteroides* 11251, *L. brevis* B151, *L. plantarum* Lb41^K를 각각 접종하여 무작위로 선별한 각 30개의 균주에 해당하는 결과는 Table 4-74에 나타내었다.
- *Leu. mesenteroides* 11251을 접종한 덴마크 드링킹 발효유에서 무작위로 선별한 30개의 균주 중 22개의 균주는 *S. thermophilus*로 동정되었고, 7개의 균주가 *Leu. mesenteroides*로 동정되었다(Y3, 7, 10, 14, 15, 16, 27). 또한 1개의 균주는 *L. plantarum*으로 확인되었다.
- *L. brevis* B151을 접종한 메치니코프 발효유에서 무작위로 선별한 30개의 균주 중 21개의 균주가 *S. thermophilus*로, 9개의 균주가 *L. brevis*로 동정되었다(YB2, 4, 9, 15, 18, 21, 23, 25, 30).
- *L. plantarum* Lb41^K를 접종한 메치니코프 발효유에서 무작위로 선별한 30개의 균주 중 5개의 균주가 *L. plantarum*으로 동정되었고(YP5, 6, 9, 15, 29), 나머지 25개의 균주가 *S. thermophilus*로 동정되었다.

Table 4-74. 16S rRNA gene sequencing results for *Leu. mesenteroides*(11251), *L. brevis*(B151), and *L. plantarum*(Lb41^K) strains inoculated in Yoghurt

Colony ID	BLAST result	Colony ID	BLAST result	Colony ID	BLAST result
Y1	<i>S. thermophilus</i>	YB1	<i>S. thermophilus</i>	YP1	<i>S. thermophilus</i>
Y2	<i>S. thermophilus</i>	YB2	<i>L. brevis</i>	YP2	<i>S. thermophilus</i>
Y3	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB3	<i>S. thermophilus</i>	YP3	<i>S. thermophilus</i>
Y4	<i>S. thermophilus</i>	YB4	<i>L. brevis</i>	YP4	<i>S. thermophilus</i>
Y5	<i>S. thermophilus</i>	YB5	<i>S. thermophilus</i>	YP5	<i>L. plantarum</i>
Y6	<i>L. plantarum</i>	YB6	<i>S. thermophilus</i>	YP6	<i>L. plantarum</i>
Y7	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB7	<i>S. thermophilus</i>	YP7	<i>S. thermophilus</i>
Y8	<i>S. thermophilus</i>	YB8	<i>S. thermophilus</i>	YP8	<i>S. thermophilus</i>
Y9	<i>S. thermophilus</i>	YB9	<i>L. brevis</i>	YP9	<i>L. plantarum</i>
Y10	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB10	<i>S. thermophilus</i>	YP10	<i>S. thermophilus</i>
Y11	<i>S. thermophilus</i>	YB11	<i>S. thermophilus</i>	YP11	<i>S. thermophilus</i>
Y12	<i>S. thermophilus</i>	YB12	<i>S. thermophilus</i>	YP12	<i>S. thermophilus</i>
Y13	<i>S. thermophilus</i>	YB13	<i>S. thermophilus</i>	YP13	<i>S. thermophilus</i>
Y14	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB14	<i>S. thermophilus</i>	YP14	<i>S. thermophilus</i>
Y15	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB15	<i>L. brevis</i>	YP15	<i>L. plantarum</i>
Y16	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB16	<i>S. thermophilus</i>	YP16	<i>S. thermophilus</i>
Y17	<i>S. thermophilus</i>	YB17	<i>S. thermophilus</i>	YP17	<i>S. thermophilus</i>
Y18	<i>S. thermophilus</i>	YB18	<i>L. brevis</i>	YP18	<i>S. thermophilus</i>

Y19	<i>S. thermophilus</i>	YB19	<i>S. thermophilus</i>	YP19	<i>S. thermophilus</i>
Y20	<i>S. thermophilus</i>	YB20	<i>S. thermophilus</i>	YP20	<i>S. thermophilus</i>
Y21	<i>S. thermophilus</i>	YB21	<i>L. brevis</i>	YP21	<i>S. thermophilus</i>
Y22	<i>S. thermophilus</i>	YB22	<i>S. thermophilus</i>	YP22	<i>S. thermophilus</i>
Y23	<i>S. thermophilus</i>	YB23	<i>L. brevis</i>	YP23	<i>S. thermophilus</i>
Y24	<i>S. thermophilus</i>	YB24	<i>S. thermophilus</i>	YP24	<i>S. thermophilus</i>
Y25	<i>S. thermophilus</i>	YB25	<i>L. brevis</i>	YP25	<i>S. thermophilus</i>
Y26	<i>S. thermophilus</i>	YB26	<i>S. thermophilus</i>	YP26	<i>S. thermophilus</i>
Y27	<i>Leu. mesenteroides</i>	YB27	<i>S. thermophilus</i>	YP27	<i>S. thermophilus</i>
Y28	<i>S. thermophilus</i>	YB28	<i>S. thermophilus</i>	YP28	<i>S. thermophilus</i>
Y29	<i>S. thermophilus</i>	YB29	<i>S. thermophilus</i>	YP29	<i>L. plantarum</i>
Y30	<i>S. thermophilus</i>	YB30	<i>L. brevis</i>	YP30	<i>S. thermophilus</i>

(나) 선별된 유산균의 RAPD-PCR 결과

- 선별된 유산균의 유전자 지문을 분석하기 위하여 RAPD-PCR을 수행하였다. Figure 4-118A는 *Leu. mesenteroides* 11251를 접종한 결과(Y1-Y30)를 나타내었고, Figure 4-118B는 *L. brevis* B151를 접종한 결과(YB1-YB30), Figure 4-118C는 *L. plantarum* Lb41^K을 접종한 결과(YP1-YP30)를 나타내었다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- *Leu. mesenteroides* 11251을 접종한 발효유에서 선별한 균주의 RAPD-PCR 결과에서 Figure 4-118AA에는 primer 239를 이용하였는데 1,100 bp에서 주요 band가 나타났으며, *Leu. mesenteroides* 11251과 동일하게 모든 균주에 있어서 나타나는 band로 확인되었다. 그러나 primer KAY3를 이용한 결과에서는 단지 7개의 균주가 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 band 양상을 보였고, 주요 band는 1,600 bp부근에서 나타났다(Figure 4-118AB).
- 두 가지 primer를 사용하였을 경우, 분리된 *Leu. mesenteroides*는 *Leu. mesenteroides* 11251과 유사한 band 패턴을 나타내었는데, 이는 덴마크 드링킹 발효유에서 분리된 7개의 *Leu. mesenteroides*가 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 균주인 가능성이 높은 것임을 나타낸다. 또한 *Leu. mesenteroides*는 상업적 요구르트에 많이 이용되지 않는 균주로서, 이는 16S rRNA 염기서열 결과에서 나타난 *Leu. mesenteroides*가 본 연구에서 접종한 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 균주일 가능성이 높은 것으로 확인되었다.
- *L. plantarum*으로 동정된 Y6 균주의 경우 primer 239를 이용하여 RAPD-PCR로 분석하였을 때, *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 band 양상을 나타내었는데, 이는 두 균주에 대하여 primer가 binding하는 장소가 유사하여 이와 같은 결과를 나타낸 것으로 판단되었다.

② *L. brevis* B151

- *L. brevis* B151을 접종한 발효유에서 선별한 균주의 RAPD-PCR결과에서 Figure 4-118BC에는 primer 239로, Figure 4-119BD에는 primer KAY3로 분석한 결과를 나타내었다. 총 9개의 균주가 *L. brevis* B151과 같은 band 양상을 나타내었고, 660~1,200 bp 사이에 band가 나타난 것을 확인할 수 있었다.
- *B. longum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*를 함유한 발효유에서는 *S. thermophilus*를 제외한 나머지 3가지 균주를 16S rRNA 유전자 분석 결과에서는 검출되지 않았는데, 이는 본 연구가 통성혐기적 배양 조건으로 진행되었기 때문이라고 사료되었다. 또한 *L. acidophilus*의 경우 무작위적인 선별 시 선택되지 않은 colony일 것이라 판단되었다.
- *L. brevis*는 본 연구에서 이용한 발효유에는 첨가되지 않은 유산균으로서, 16S rRNA 유전자의 분석 결과에서 나타난 9개의 *L. brevis*는 *L. brevis* B151로 동정할 수 있었다.

③ *L. plantarum* Lb41^K

- *L. plantarum* Lb41^K을 접종하여 RAPD-PCR로 분석한 결과는 Figure 4-118CE와 Figure 4-119CF에 나타내었다. 16S rRNA 동정결과는 총 5개의 균주가 *L. plantarum*으로 동정되었는데, 이와 유사한 경향으로 primer 239를 이용하였을 때 3,000 bp의 band가 동일하게 나타남을 확인할 수 있었고, primer KAY3를 이용하여 분석하였을 때, 2,000과 2,500 bp 두 개의 주요 band가 나타났다.
- *L. brevis*의 결과와 유사하게, *L. plantarum*은 발효유에 함유되어 있는 유산균주가 아니기 때문에 분리된 *L. plantarum*은 본 연구에서 접종한 *L. plantarum* Lb41^K 균주로 확인되었다.

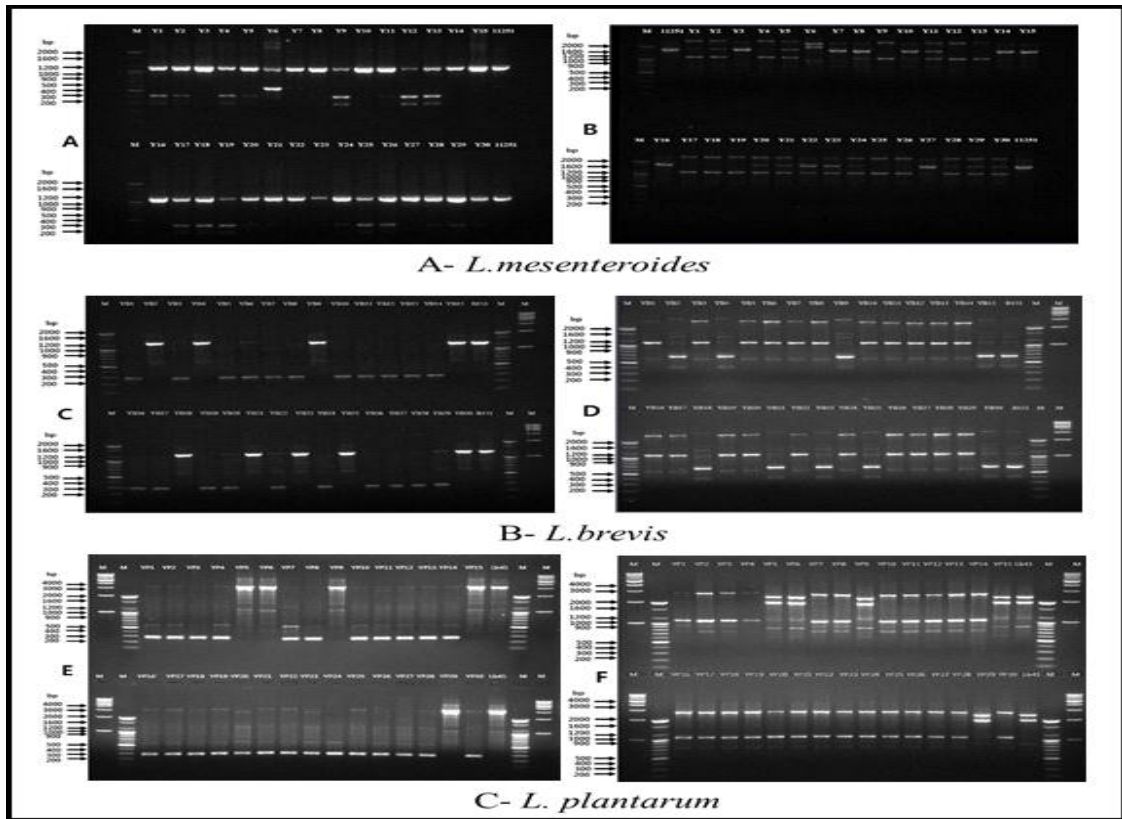


Figure 4-118. RAPD-PCR analysis of 30 colonies picked from yoghurt inoculated with *Leu. mesenteroides* 11251 using 239 primer (A) and KAY3 primer (B), lane: 1, 100 bp ladder; 2, *Leu. mesenteroides* 11251; 3-17, Y1-Y15; (lower half of the gel) 18, 100 bp ladder; 19-33, Y16-Y30; 34, *Leu. mesenteroides* 11251. From yoghurt inoculated with *L. brevis* B151 using 239 primer (C) and KAY3 primer (D), lane: 1, 100 bp ladder; 2-16, YB1-YB15; 17, *L. brevis* B151; 18, 100 bp ladder; 19, 1 kb ladder; (lower half of the gel) 20, 100 bp ladder; 21-35, YB16-YB30; 36, *L. brevis* B151, 37, 100 bp ladder, 38, 1 kb ladder. From yoghurt inoculated with *L. plantarum* Lb41^K using 239 primer (E) and KAY3 primer (F), lane: 1, 1kb ladder; 2, 100 bp ladder; 3-17, YP1-YP15; 18, *L. plantarum* Lb41^K; 19, 100 bp ladder; 20, 1 kb ladder; (lower half of the gel) 21, 1 kb ladder; 22, 100 bp ladder; 23-37, YP16-YP30; 38, *L. plantarum* Lb41^K; 39, 100 bp ladder; 40, 1 kb ladder.

(다) 선별된 유산균의 Rep-PCR 결과

- 선별된 유산균의 유전자 지문을 분석하기 위하여 Rep-PCR을 수행하였다. Figure 4-119A는 *Leu. mesenteroides* 11251를 접종한 결과(Y1-Y30)를 나타내었고, Figure 4-119B는 *L. brevis* B151를 접종한 결과(YB1-YB30), Figure 4-119C는 *L. plantarum* Lb41^K을 접종한 결과(YP1-YP30)를 나타내었다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- RAPD-PCR 결과와 유사하게 rep-PCR 결과 또한 분리된 *Leu. mesenteroides*의 band 패턴이 *Leu. mesenteroides* 11251의 band패턴과 동일함을 확인할 수 있었다. (GTG)₅, REP, ERIC의 결과는 Figure 4-120Aa, b, c에 각각 나타내었고, *Leu. mesenteroides*로 동정된 7개의 균주는 세 가지 rep-PCR 결과에서 각각 band 패턴이 동일하였다.
- 세 가지의 primer 중, (GTG)₅ primer를 이용하여 지문분석을 하였을 때, 430, 700, 900, 1,150, 1,200 bp에 band가 확인되었고(Figure 4-120Aa), REP primer를 이용하였을 때는 350, 1,050, 1,500, 1,610, 2,000, 2,500 bp에서 band가 나타났다(Figure 4-120Ab).
- ERIC primer를 이용하였을 때는, *Leu. mesenteroides*로 동정된 균주와 *Leu. mesenteroides* 11251균주에서 900, 1,050 bp부근의 band가 동일하게 나타났다(Figure 4-120Ac). 상기 결과에서 확인하였을 때, *Leu. mesenteroides*로 동정된 분리 균주는 본 연구에서 접종한 *Leu. mesenteroides* 11251로 확인할 수 있었다.

② *L. brevis* B151

- 발효유에 *L. brevis* B151을 접종하여 RAPD-PCR에서 9개의 균주가 *L. brevis* B151과 같았고, rep-PCR 결과에서도 동일하게 나타났다.
- Figure 4-119Ba에 나타낸 바와 같이 (GTG)₅ primer 이용하여 분석한 결과 1,000, 1,100, 1,500 bp에 주요 band가 검출되었고, *L. brevis* B151과 비교하였을 때, *L. brevis*로 동정된 9개의 균주의 band 양상이 동일하였다.
- REP-PCR 결과에서는 1,600과 2,000 bp에서 band가 나타났고, (GTG)₅-PCR의 결과와 동일하게 *L. brevis* B151과 9개의 균주에서 유전자 지문이 일치하였다(Figure 4-119Bb).
- Primer ERIC을 이용한 결과는 Figure 4-119Bc에 나타내었는데, 9개의 균주에 있어 350, 500, 1,200, 2,000, 2,200 bp에 나타나는 band 양상이 *L. brevis* B151과 유사한 것이 확인되었다.

③ *L. plantarum* Lb41^K

- RAPD-PCR 결과를 기반으로 *L. plantarum* Lb41^K을 접종하여 선별된 균주 중 5개의 균주가 *L. plantarum*으로 동정되었는데, rep-PCR 결과도 동일한 양상을 나타내었다 (Figure 4-119C).
- Figure 4-119Ca에는 (GTG)₅-PCR 결과를 나타내었는데, 350, 700, 800, 1,000, 1,100, 1,200 bp에 *L. plantarum* Lb41^K와 동일한 유전자 지문이 5개의 균주에서도 동일하게 확인되었다.
- REP-PCR 결과를 바탕으로, 5개의 균주에서 1,000, 1,200, 1,500, 1,700, 2,100, 4,000 bp에서 유전자 지문을 나타내었고, *L. plantarum* Lb41^K와 동일한 유전자 지문이 검출되었다(Figure 4-119Cb).
- Figure 4-119Cc에는 ERIC-PCR 결과를 나타내었고, 5개의 균주에서 380, 1,700, 2,800 bp에 3개의 유전자 지문이 검출되었고, *L. plantarum* Lb41^K의 유전자 지문에서도 동일한 양상을 나타내었다.

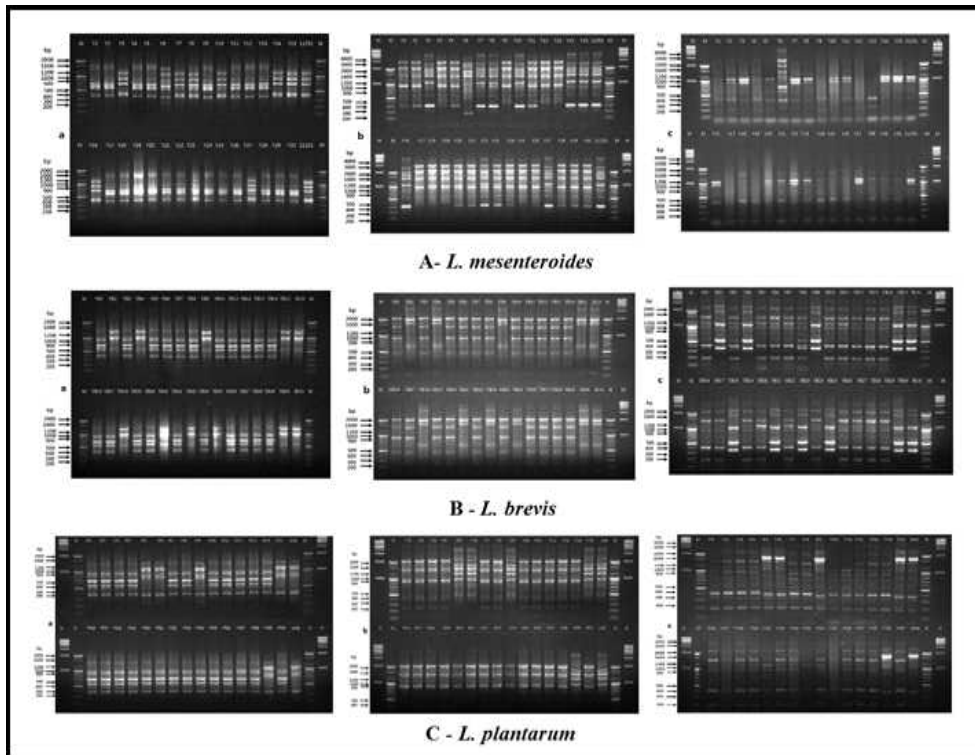


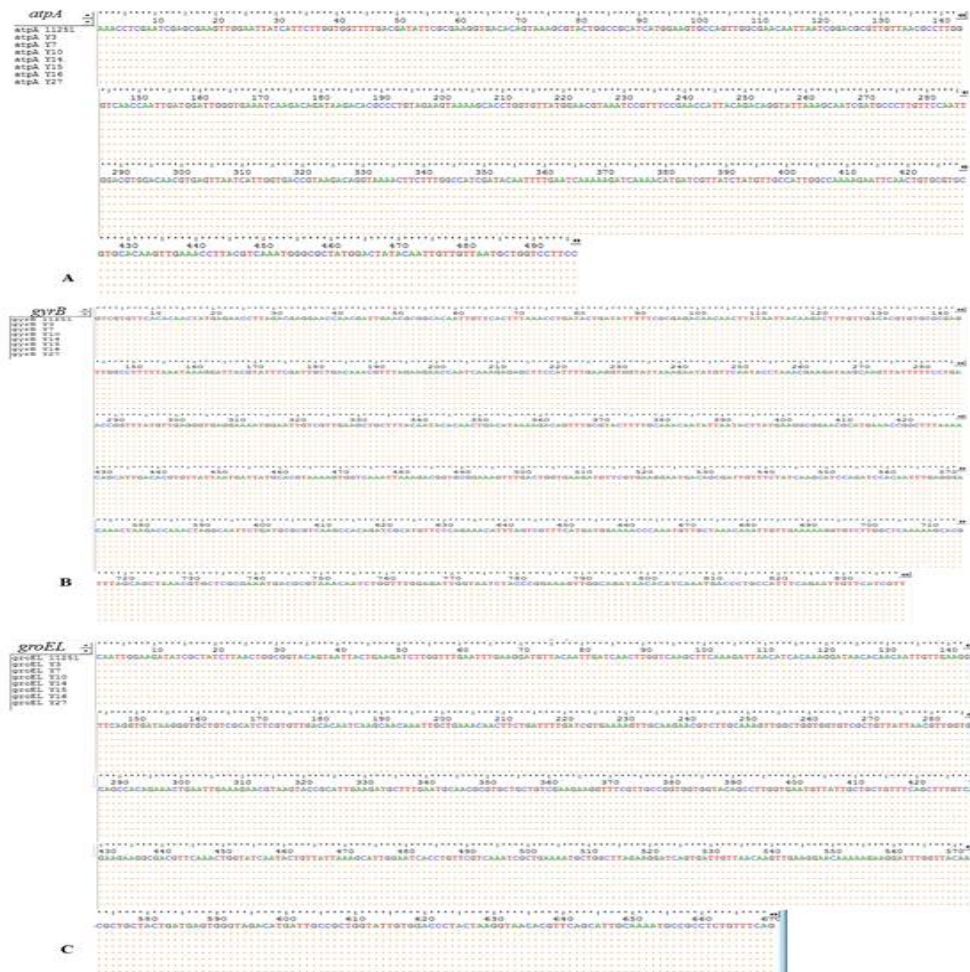
Figure 4-119. Rep-PCR analysis of 30 colonies picked from yoghurt inoculated with *Leu. mesenteroides* 11251 using (GTG)₅ primer (Aa), REP primer (Ab) and ERIC primer (Ac), lane: 1, 100 bp ladder; 2-31, Y1-Y30; 32, *Leu. mesenteroides* 11251; 33, 100 bp ladder; 34, 1 kb ladder. From yoghurt inoculated with *L. brevis* B151 using (GTG)₅ primer (Ba), REP primer (Bb) and ERIC primer (Bc), lane: 1, 100 bp ladder; 2-31, YB1-YB30; 32, *L. brevis* B151; 33, 100 bp ladder; 34, 1 kb ladder. From yoghurt inoculated with *L. plantarum* Lb41^K using (GTG)₅ primer (Ca), REP primer (Cb) and ERIC primer (Cc), lane: 1, 1 kb ladder; 2, 100 bp ladder; 3-32, YP1-YP30; 33, *L. plantarum* Lb41^K; 34, 100 bp ladder; 35, 1 kb ladder.

(라) 선별된 유산균의 MLST 분석 결과

- MLST 분석을 위하여 발효유에 *Leu. mesenteroides* 11251, *L. brevis* B151, *L. plantarum* Lb41^K을 접종하여 선별된 유산균주 중 7개의 *Leu. mesenteroides*, 9개의 *L. brevis*, 5개의 *L. plantarum*으로 동정된 균주를 이용하여 MLST 분석하였다.
- 선별된 유산균주의 염기서열에서 reference strain인 *Leu. mesenteroides* 11251, *L. brevis* B151, *L. plantarum* Lb41^K을 기준으로 SNP를 탐색하였다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- *Leu. mesenteroides*를 위한 housekeeping 유전자는 *atpA*, *gyrB*, *groEL*, *pheS*, *pyrG*, *rpoA*, *uvrC*를 이용하였다. 7개의 *Leu. mesenteroides*로 균주와 *Leu. mesenteroides* 11251의 housekeeping 유전자를 비교한 결과 SNP는 검출되지 않았다 (Figure 4-120A~G).



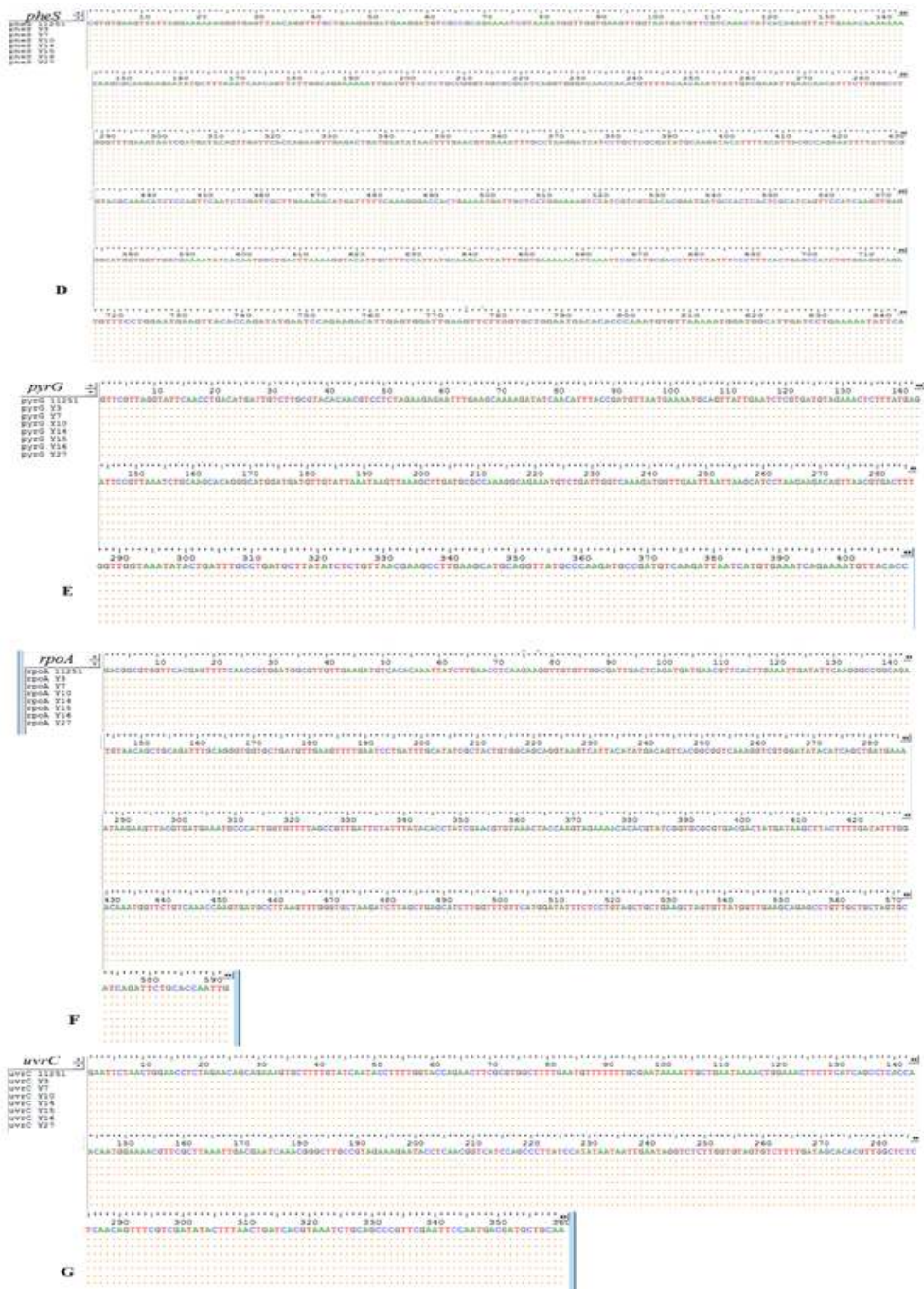
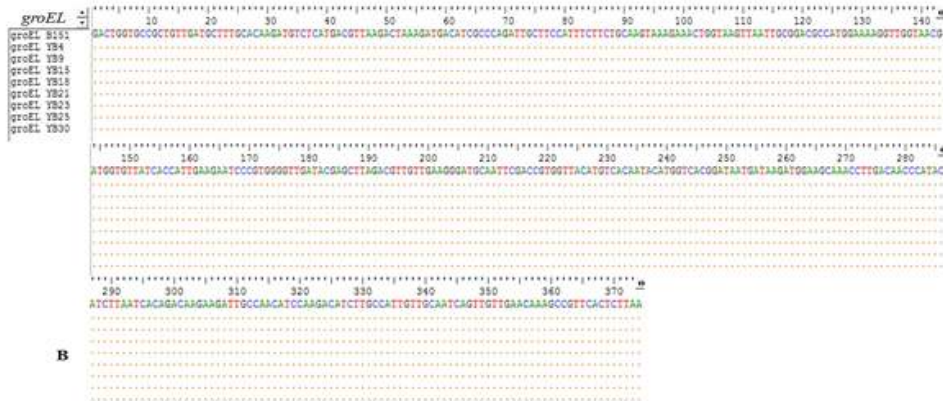


Figure 4-120. Comparative gene sequence analysis- *atpA* (A), *gyrB* (B), *groEL* (C), *pheS* (D), *pyrG* (E), *rpoA* (F), and *uvrC* (G) of 7 colonies isolated from yoghurt inoculated with reference strain 11251(*Leu. mesenteroides*).

② *L. brevis* B151

- Figure 4-121A~G에는 *L. brevis*에 해당하는 균주에 대한 MLST 결과를 나타내었다. *L. brevis*의 housekeeping 유전자는 *dnaK*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*를 이용하여 분석하였다.
- 9개의 *L. brevis*는 reference 균주인 *L. brevis* B151과 모든 염기서열이 일치하였고, housekeeping 유전자 내에 SNP는 존재하지 않았다.



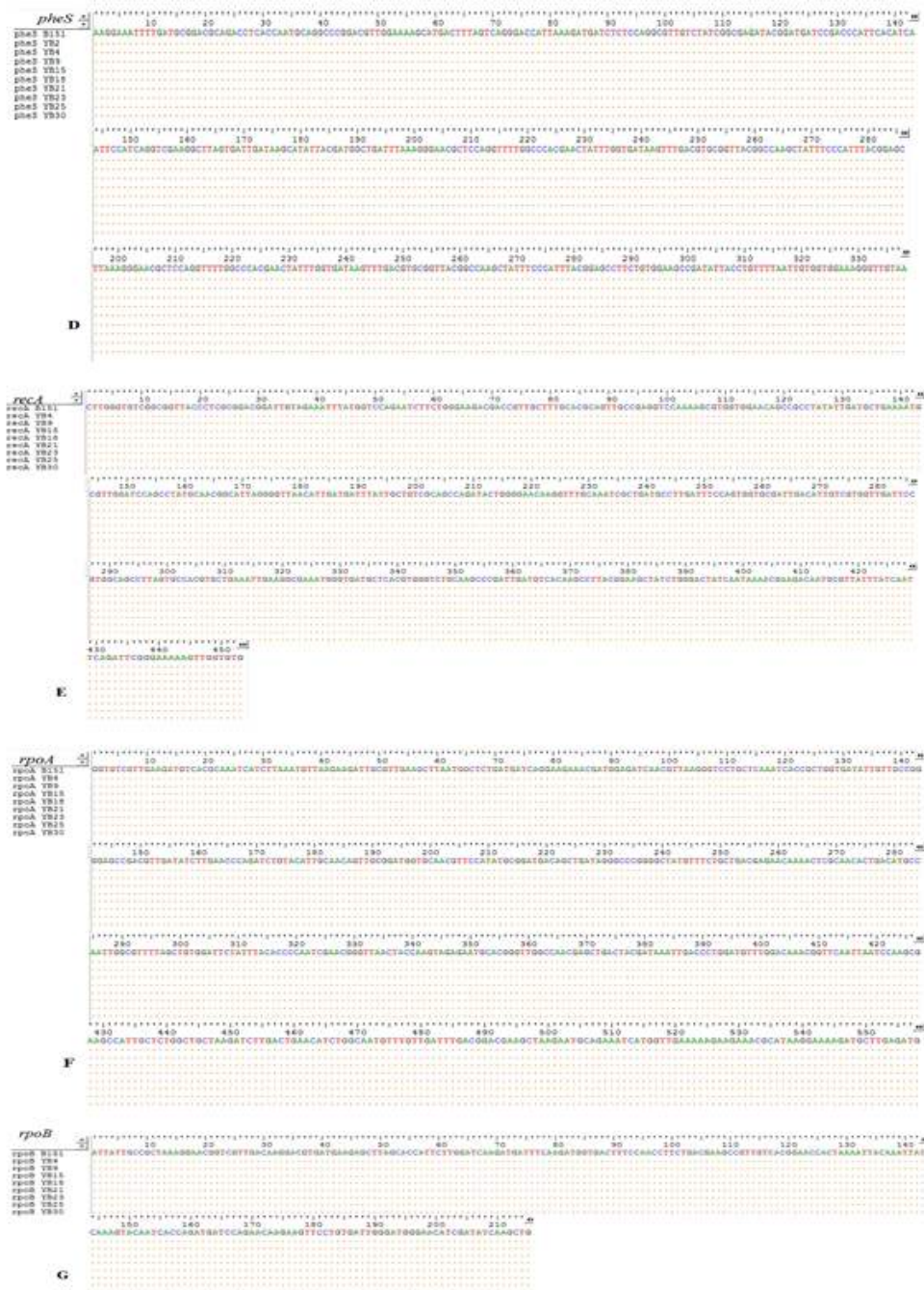


Figure 4-121. Comparative gene sequence analysis- *dnaK* (A), *groEL* (B), *gyrB* (C), *pheS* (D), *recA* (E), *rpoA* (F), and *rpoB* (G) of 9 colonies isolated from yoghurt inoculated with reference strain B151(*L. brevis*).

③ *L. plantarum* Lb41^K

- *L. plantarum*의 MLST 결과도 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*와 동일하게 나타났다 (Figure 4-122A-G). *L. plantarum*에 이용된 housekeeping 유전자는 *ddl*, *gdh*, *gyrB*, *mutS*, *pgm*, *purK1*, *tkf4*를 분석에 사용하였다.
- 5개의 균주는 *L. plantarum* Lb41^K와 동일한 염기서열을 지니고 있었고, SNP는 검출되지 않았다.
- 결과적으로 발효유에 *Leu. mesenteroides* 11251을 접종하여 선별된 Y3, Y7, Y10, Y14, Y15, Y16, Y27 균주와 *L. brevis* B151을 접종하여 선별된 YB2, YB4, YB9, YB15, YB18, YB21, YB23, YB25 균주, *L. plantarum* Lb41^K를 접종하여 선별된 YP5, YP6, YP9, YP15, YP29 균주는 각각 접종해준 reference 균주와 RAPD-PCR, rep-PCR, MLST 분석에서 동일한 유전자 지문을 나타내었다.

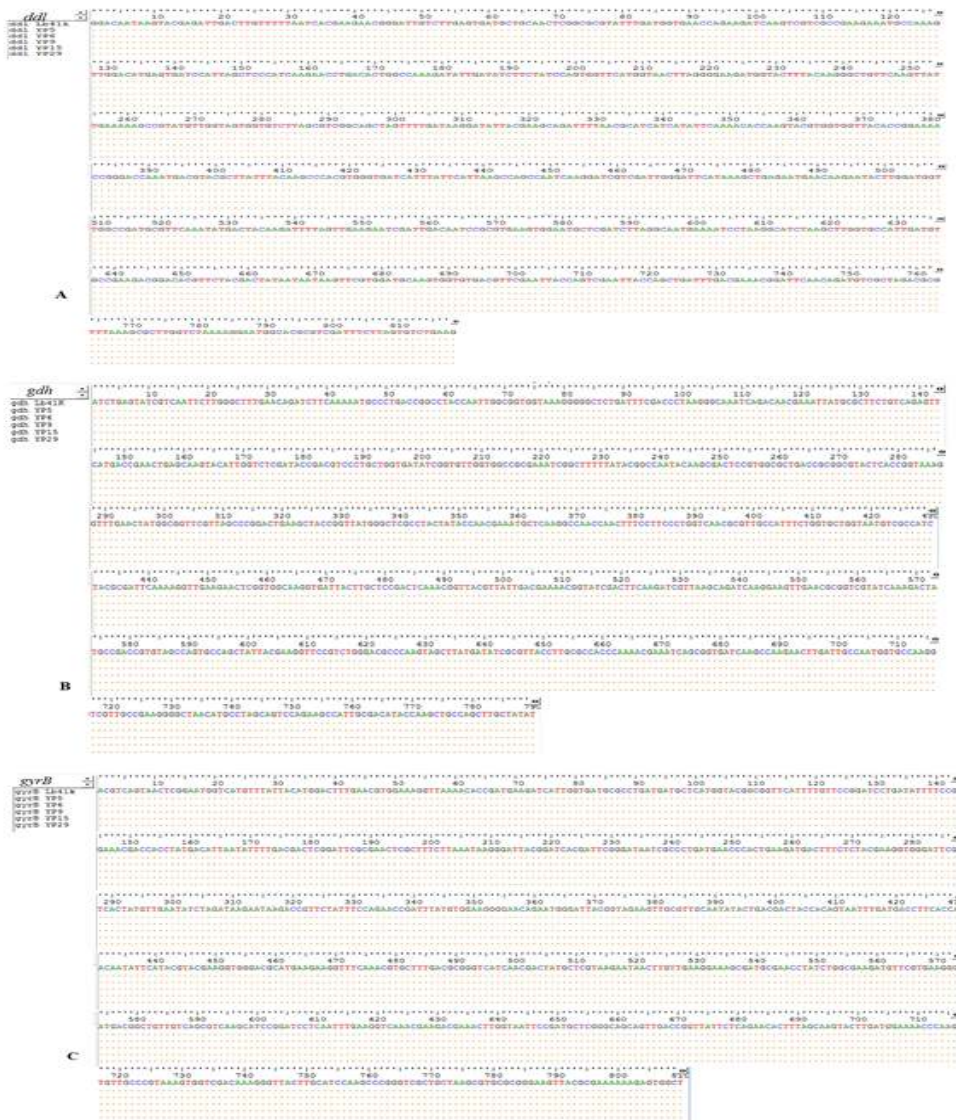






Figure 4-122. Comparative gene sequence analysis- *ddl* (A), *gdh* (B), *gyrB* (C), *mutS* (D), *pgm* (E), *purK1* (F) and *tkt4* (G) of 5 colonies isolated from yoghurt inoculated with reference strain Lb41^K(*L. plantarum*).

(2) 김치 내에 존재하는 유산균의 유전자 지문 분석

(가) 김치에서 선별한 유산균의 동정

- 김치에 *Leu. mesenteroides* 11251, *L. brevis* B151을 접종하여 무작위로 선별한 각 30개의 균주에 해당하는 결과는 Table 4-75에 나타내었다.
- *Leu. mesenteroides* 11251을 접종한 김치에서 무작위로 선별한 30개의 균주 중 15개의 균주는 *Leu. mesenteroides*로 동정되었고(KM 1, 2, 5, 6, 7, 14, 15, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29), 14개의 균주가 *L. sakei*로 동정되었다. 또한 1개의 균주는 *L. curvatus*로 밝혀졌다.
- *L. brevis* B151을 접종한 발효유에서 무작위로 선별한 30개의 균주 중 28개의 균주가 *L. plantarum*으로, 2개의 균주가 *L. brevis*로 동정되었다(KB 5, 17).

Table 4-75. 16S rRNA gene sequencing results for *Leu. mesenteroides*(11251), *L. brevis* (B151) inoculated in kimchi

Colony ID	BLAST result	Colony ID	BLAST result
KM1	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB1	<i>L. plantarum</i>
KM2	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB2	<i>L. plantarum</i>
KM3	<i>L. sakei</i>	KB3	<i>L. plantarum</i>
KM4	<i>L. sakei</i>	KB4	<i>L. plantarum</i>
KM5	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB5	<i>L. brevis</i>

KM6	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB6	<i>L. plantarum</i>
KM7	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB7	<i>L. plantarum</i>
KM8	<i>L. sakei</i>	KB8	<i>L. plantarum</i>
KM9	<i>L. sakei</i>	KB9	<i>L. plantarum</i>
KM10	<i>L. sakei</i>	KB10	<i>L. plantarum</i>
KM11	<i>L. curvatus</i>	KB11	<i>L. plantarum</i>
KM12	<i>L. sakei</i>	KB12	<i>L. plantarum</i>
KM13	<i>L. sakei</i>	KB13	<i>L. plantarum</i>
KM14	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB14	<i>L. plantarum</i>
KM15	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB15	<i>L. plantarum</i>
KM16	<i>L. sakei</i>	KB16	<i>L. plantarum</i>
KM17	<i>L. sakei</i>	KB17	<i>L. brevis</i>
KM18	<i>L. sakei</i>	KB18	<i>L. plantarum</i>
KM19	<i>L. sakei</i>	KB19	<i>L. plantarum</i>
KM20	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB20	<i>L. plantarum</i>
KM21	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB21	<i>L. plantarum</i>
KM22	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB22	<i>L. plantarum</i>
KM23	<i>L. sakei</i>	KB23	<i>L. plantarum</i>
KM24	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB24	<i>L. plantarum</i>
KM25	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB25	<i>L. plantarum</i>
KM26	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB26	<i>L. plantarum</i>
KM27	<i>L. sakei</i>	KB27	<i>L. plantarum</i>
KM28	<i>L. sakei</i>	KB28	<i>L. plantarum</i>
KM29	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB29	<i>L. plantarum</i>
KM30	<i>Leu. mesenteroides</i>	KB30	<i>L. plantarum</i>

(나) 선별된 유산균의 RAPD-PCR 결과

- 선별된 유산균의 유전자 지문을 분석하기 위하여 RAPD-PCR을 수행하였다. Figure 4-123A는 *Leu. mesenteroides* 11251를 접종한 결과(KM1-KM30)를 나타내었고, Figure 4-123B는 *L. brevis* B151를 접종한 결과(KB1-KB30)를 나타내었다.

① *Leu. mesenteroides* 1125

- *Leu. mesenteroides* 11251을 김치에 접종하여 무작위로 선별하여 집락의 DNA로부터 RAPD-PCR 지문 분석을 수행한 결과, primer 239를 이용하였을 때 *Leu. mesenteroides*로 동정된 15균주에서 1,100 bp에 주요 band가 나타났으며 이는 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 band 양상을 보였다(Figure 4-123Aa).
- Primer KAY3를 이용하여 RAPD-PCR 분석 결과는 Figure 4-123Ab에 나타내었고, 주요 band는 1,600 bp에서 관찰되었고, 2개의 band가 함께 나타나는 양상을 보였다.

② *L. brevis* B151

- *L. brevis* B151을 김치에 접종하여 무작위로 30균주를 선별하였을 때, 단지 2균주 만 *L. brevis*로 동정되었다(KB5, KB17). RAPD-PCR 결과에서도 primer 239와 KAY3를 이용하여 분석한 결과, 2균주는 *L. brevis* B151과 같은 유전자 지문을 나타내었다 (Figure 4-123B).
- Figure 4-124Bc에 KB5와 KB17균주는 *L. brevis* B151은 primer 239를 이용하였을 때 1,200 bp에서 주요 band가 나타난 것이 일치하였고, primer KAY3를 이용하였을 때 주요 band는 ~660 bp에서 나타났다.

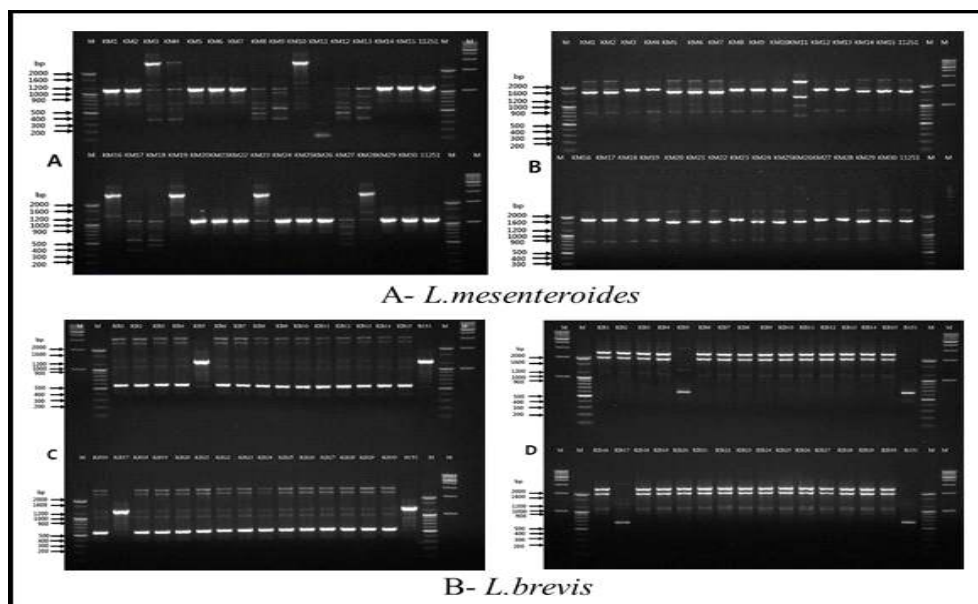


Figure 4-123. RAPD-PCR analysis of 30 colonies picked from Kimchi inoculated with *Leu. mesenteroides* 11251 using 239 primer (A) and KAY3 primer (B), lane: 1, 1 kb ladder; 2, 100 bp ladder; 3-17, KM1-KM15; 18, *Leu. mesenteroides* 11251; 19, 100 bp ladder; 20, 1 kb ladder; (lower half of the gel) 21, 1 kb ladder; 22, 100 bp ladder; 23-37, KM16-KM30; 38, *Leu. mesenteroides* 11251; 39, 100 bp ladder; 40, 1 kb ladder. From kimchi inoculated with *L. brevis* B151 using 239 primer (C) and KAY3 primer (D), lane: 1, 1 kb ladder; 2, 100 bp ladder; 3-17, KB1-KB15; 18, *L. brevis* B151; 19, 100 bp ladder; 20, 1 kb ladder; (lower half of the gel) 21, 1 kb ladder; 22, 100 bp ladder; 23-37, KB16-KB30; 38, *L. brevis* B151; 39, 100 bp ladder; 40, 1 kb ladder.

(다) 선별된 유산균의 Rep-PCR 결과

- 선별된 유산균의 유전자 지문을 분석하기 위하여 Rep-PCR을 수행하였다. Figure 4-124A는 *Leu. mesenteroides* 11251를 접종하여 30개의 균주를 선별하여 분석한 결과(KM1-KM30)를 나타내었고, Figure 4-124B는 *L. brevis* B151를 접종하여 30개의 균주를 선별하여 분석한 결과(KB1-KB30)를 나타내었다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR 분석 결과는 Figure 4-124Aa에 나타내었다. 선별된 30개의 균주 중 15개의 균주가 동일한 band 양상을 보였고, 이는 430~1,200 bp에서 band를 확인할 수 있었다. 이러한 양상은 발효유에 *Leu. mesenteroides* 11251를 접종하여 선별된 *Leu. mesenteroides*의 (GTG)₅-PCR 결과와 동일하였다.
- Figure 4-124Ab에는 REP primer를 이용한 분석 결과를 나타내었는데, *Leu. mesenteroides*로 동정된 15개의 균주 중 KM24 균주를 제외하고 300~5,000 bp에서 유전자 지문 양상이 동일하였다. KM24 균주의 경우 1,200과 1,500 bp 부근에 두 개의 구별되는 band가 나타났다.
- ERIC primer를 이용한 결과는 REP primer 결과와 유사한 것으로 나타났다(Figure 4-124Ac). KM24를 제외한 14개의 균주와 *Leu. mesenteroides* 11251 균주는 900과 1,050 bp에 band 양상이 동일하게 확인되었다. 반면에 KM24 균주의 경우 1,600 bp에 band가 더 나타난 것으로 보아, KM24 균주를 제외하고 김치에 접종한 *Leu. mesenteroides* 11251과 나머지 14균주는 동일한 종임이 확인할 수 있었다.

② *L. brevis* B151

- 김치에 *L. brevis* B151를 접종하여 30균주를 선별하였을 때, 단 2개의 균주 만이 *L. brevis*로 동정되었고, 2균주는 (GTG)₅, REP, ERIC-PCR 분석에서 *L. brevis* B151과 동일한 유전자 지문을 나타내었다.
- 이들의 (GTG)₅ primer를 이용한 rep-PCR 분석 결과는 Figure 4-124Ba에 나타내었는데, 1,000, 1,100, 1,500 bp에 검출된 band가 나타났고, 2균주와 *L. brevis* B151의 유전자 지문이 동일한 것을 확인할 수 있었다.
- REP primer로 분석하였을 때, 1,600과 2,000 bp에 주요 band가 나타남이 확인되었고, (GTG)₅ primer의 결과와 마찬가지로 2균주와 *L. brevis* B151의 유전자 지문이 동일하였다(Figure 4-124Bb).
- Figure 4-124Bc에 ERIC primer를 이용한 결과를 나타내었다. 2균주의 유전자 지문은 350, 500, 1,200, 2,000, 2,200 bp에 검출되었고, *L. brevis* B151의 유전자 지문이 동일하였다.

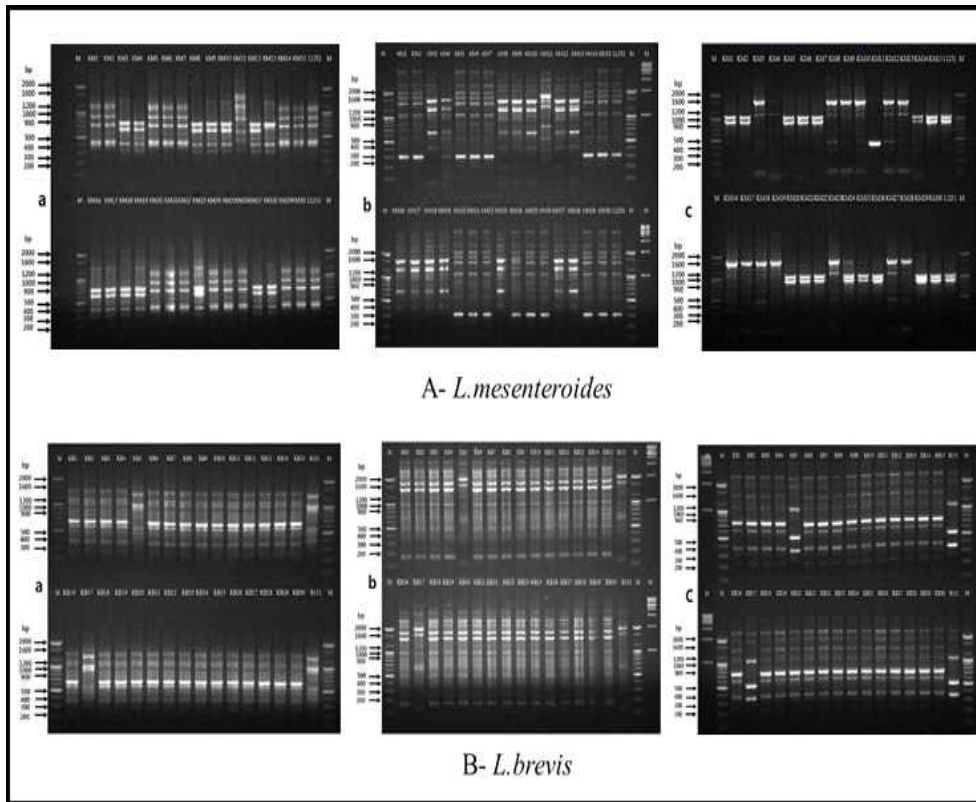


Figure 4-124. Rep-PCR analysis of 30 colonies picked from kimchi inoculated with *Leu. mesenteroides* 11251 using (GTG)₅ primer (Aa), REP primer (Ab) and ERIC primer (Ac), lane: 1, 100 bp ladder; 2-31, KM1-KM30; 32, *Leu. mesenteroides* 11251; 33, 100 bp ladder; 34, 1 kb ladder. From kimchi inoculated with *L. brevis* B151 using (GTG)₅ primer (Ba), REP primer (Bb) and ERIC primer (Bc), lane: 1, 1 kb ladder; 2, 100 bp ladder; 3-32, KB1-KB30; 33, *L. brevis* B151; 34, 100 bp ladder.

(라) 선별된 유산균의 MLST 분석 결과

- 선별된 유산균의 유전자 지문을 분석의 유용성을 더하기 위하여 7개의 housekeeping 유전자를 이용하여 MLST 분석을 수행하였다. MLST 분석을 위하여 김치에 *Leu. mesenteroides* 11251과 *L. brevis* B151을 접종하여 선별된 유산균주 중 15개의 *Leu. mesenteroides*와 2개의 *L. brevis*로 동정된 균주를 이용하여 MLST 분석하였다.
- 선별된 유산균주의 염기서열에서 reference strain인 *Leu. mesenteroides* 11251와 *L. brevis* B151을 기준으로 SNP를 탐색하였다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- *Leu. mesenteroides*로 동정된 15균주를 MLST 분석하였을 때 결과는 Figure 4-125에 나타내었다. 7개의 housekeeping 유전자 중에 *atpA*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *uvrC* 유전자에서 SNP를 확인할 수 있었고, 나머지 두 가지 유전자인 *pyrG*, *rpoA*는 *Leu. mesenteroides* 11251과 15균주는 SNP가 나타나지 않았다.
- 따라서 16S rRNA 유전자 염기서열의 결과와 RAPD, rep-PCR(REP, ERIC primer에서 KM24 제외)결과에서 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 유전자 지문을 나타내었으나, 5개의 housekeeping 유전자에서 다른 결과를 나타낸 것으로 확인되었다.
- 유전자의 염기서열을 비교하였을 때도, 14개의 균주는 적어도 하나의 유전자에서 SNP를 지니고 있었다. SNP가 존재하는 유전자 염기서열에 기반하여, 15개의 균주 중 14개 균주는 김치에 이미 존재하던 *Leu. mesenteroides*로 확인되었고, 단지 KM22 균주 만이 7개의 유전자에서 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 염기서열을 지닌 것으로 확인되어 본 연구에서 집중한 균주로 결정할 수 있었다.
- 김치에 집중한 *Leu. mesenteroides* 11251의 유전자 지문을 추적할 때, MLST 분석이 가장 효과적이라고 판단되는 바이다. 선별된 30개의 균주 중 *Leu. mesenteroides*로 동정된 15개의 균주가 모두 집중해준 *Leu. mesenteroides* 11251로 추정할 수 있었다.
- 김치에서 30개의 균주를 분리할 때 상당히 많은 양의 유산균주가 검출되었는데, 이는 많은 유산균주의 좋은 분리원으로서 *Leu. mesenteroides* 뿐만 아니라 *Leu. citreum* 등이 김치 발효의 중간 단계에서 많이 생성된다고 보고되어 있다(Chang *et al.*, 2010).
- 초기에 분리된 유산균주가 모두 16S rRNA 유전자 분석 결과에 기반하여 *Leu. mesenteroides* 11251이라 추정하였으나, MLST 분석을 통하여 KM22 균주 만이 *Leu. mesenteroides* 11251과 SNP를 갖지 않는 유일한 균주임이 밝혀졌다.
- 16S rRNA 유전자 염기서열은 유산균의 동정과 계통학적 분석을 위한 좋은 방법이나, 계통발생학적으로 밀접하게 관련된 종이나 그의 아종일 경우 아주 밀접한 관계를 갖고 있을 때는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 있어서 불완전한 방법이라고 보고되었다(Fox *et al.*, 1992; Temmerman *et al.*, 2004). 따라서 16S rRNA로 분석한 결과는 100%의 신뢰성을 갖지는 않는다(Björkroth *et al.*, 2002).
- RAPD나 rep-PCR과 같은 유전자 지문 분석법은 16S rRNA 염기서열 분석과 유사한 판별력을 지니고, 다수의 미생물의 식별에 적합한 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 방법은 실험실간의 비교가 어렵고, 재현성이 떨어진다. 본 연구에서 김치의 *Leu. mesenteroides* 11251을 추적할 때 확인할 수 있듯이 이 방법은 유전자의 염기서열 비교에 있어 판별력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.



pheS



pyg





A		B		C		D		G	
atpA 11251	T	groEL 11251	AGAAAGCGAAAG	gyrB 11251	CGAGAGT	pheS 11251	ATGA	uvrC 11251	ATACGG
atpA KM1	.	groEL KM1	gyrB KM1	pheS KM1	GATT	uvrC KM1	GACGA.
atpA KM2	.	groEL KM2	gyrB KM2	pheS KM2	uvrC KM2	TACGA.
atpA KM5	.	groEL KM5	GTT.....	gyrB KM5	pheS KM5	uvrC KM5	GA.....
atpA KM6	.	groEL KM6	GTT.....	gyrB KM6	A.....	pheS KM6	uvrC KM6	CA.....
atpA KM7	.	groEL KM7	gyrB KM7	pheS KM7	uvrC KM7	G..GA.
atpA KM14	.	groEL KM14	gyrB KM14	pheS KM14	uvrC KM14	CA.....
atpA KM15	A	groEL KM15	..TT.....	gyrB KM15	pheS KM15	Ga..	uvrC KM15	GA.....
atpA KM20	.	groEL KM20G.GT	gyrB KM20A	pheS KM20	uvrC KM20
atpA KM21	.	groEL KM21G..T	gyrB KM21	pheS KM21	uvrC KM21	..CGC.
atpA KM22	.	groEL KM22	gyrB KM22	pheS KM22	uvrC KM22
atpA KM24	.	groEL KM24	G..GTTT.G	gyrB KM24	..CGAGA.	pheS KM24	uvrC KM24	..ACGA.
atpA KM25	.	groEL KM25	gyrB KM25	pheS KM25	uvrC KM25	GACGT.
atpA KM26	.	groEL KM26G.	gyrB KM26	pheS KM26	uvrC KM26	GACG.
atpA KM29	.	groEL KM29G.	gyrB KM29	pheS KM29	uvrC KM29	GAGGAC
atpA KM30	.	groEL KM30G.	gyrB KM30	pheS KM30	uvrC KM30	GA.....

Out of 7 housekeeping loci, *atpA*, *groEL*, *gyrB*, *pheS* and *uvrC* have represented SNP's in 14 selected colonies out of 15 and the gene sequences for *pyrG* (E) and *rpoA* (F) was found identical for the 15 colonies of *L. mesenteroides*.

Figure 4-125. Comparative gene sequence analysis—*atpA* (A), *gyrB* (B), *groEL* (C), *pheS* (D), *pyrG* (E), *rpoA* (F), and *uvrC* (G) of 15 colonies isolated from kimchi inoculated with reference strain 11251(*Leu. mesenteroides*) (H) representing variations in 5 gene sequences.

② *L. brevis* B151

- *L. brevis*로 동정된 2균주를 MLST 분석하였을 때 결과는 Figure 4-126에 나타내었다. 2개의 균주는 housekeeping 유전자(*dnaK*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*)에서 SNP를 나타내지 않았다.
- KB5와 KB17은 *L. brevis* B151과 염기서열이 완전하게 일치하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 김치에 접종한 *L. brevis* B151과 같은 균주라고 판단하였다.
- 또한 KB5와 KB17을 제외하고, 28균주가 모두 *L. plantarum*으로 동정된 것으로 보아, 김치의 숙성 단계에서 *L. plantarum*이 가장 두드러진 종이라 추측할 수 있었다.
- 발효유와 김치를 이용한 유산균의 추적 방법으로 이용된 4가지 방법에서 염기서열 기반의 추적기술인 MLST 기법이 다른 16S rRNA 유전자 염기서열 분석, RAPD-PCR, rep-PCR 기술보다 신뢰성 있는 결과를 보여주었다.

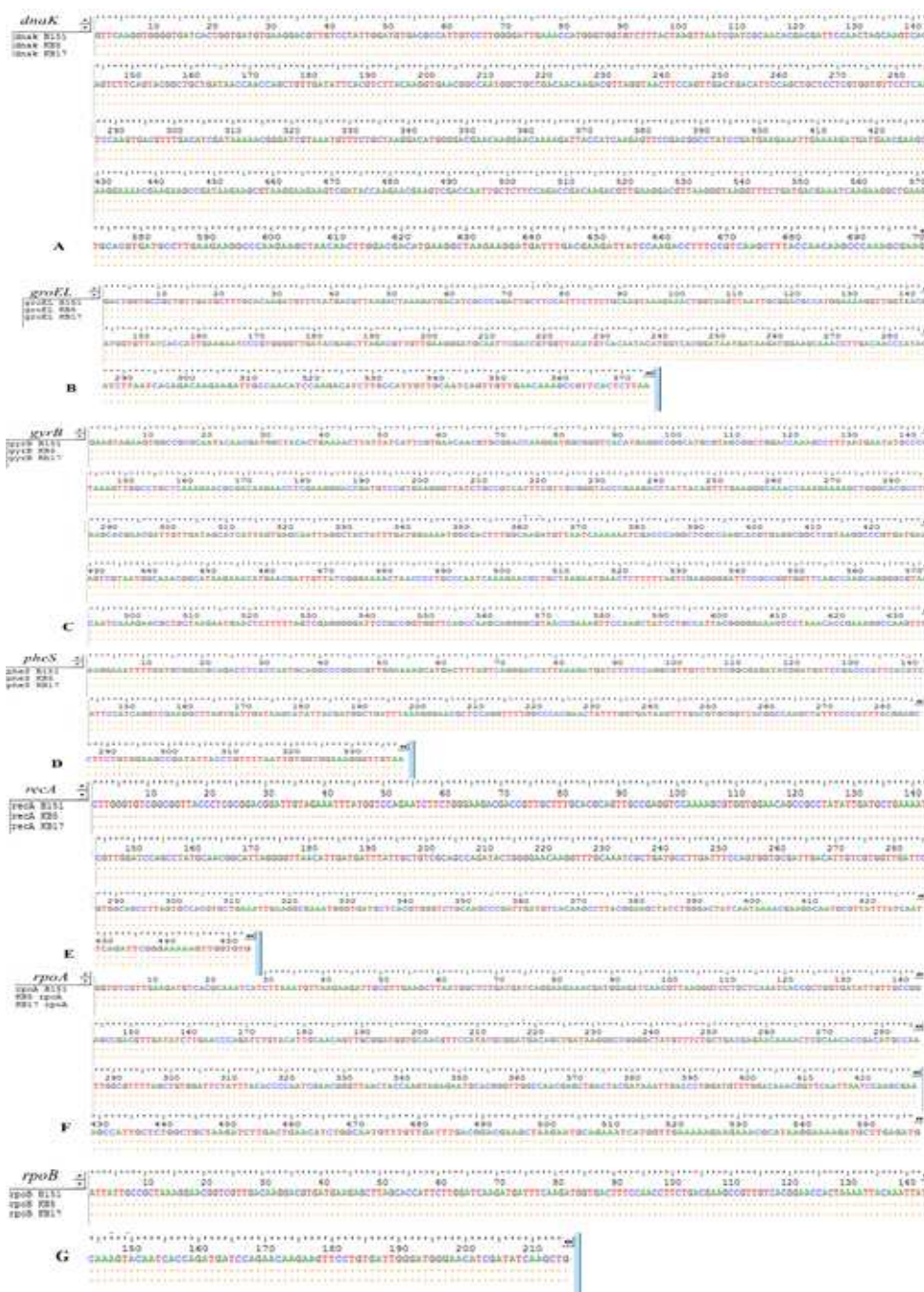


Figure 4-126. Comparative gene sequence analysis- *dnaK* (A), *groEL* (B), *gyrB* (C), *pheS* (D), *recA* (E), *rpoA* (F), and *rpoB* (G) of 2 colonies isolated from inoculated kimchi with reference strain B151(*L. brevis*).

(3) 확보된 유산균 유전자 지문 데이터베이스 분석

- 본 연구에서 확보된 유산균의 유전자 지문 분석법으로 MLST 분석법이 최적의 분석법인 것으로 재차 확인되었다. 또한 발효유나 김치에 접종한 *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*에 해당하는 균주 추적에는 종전의 RAPD, rep-PCR, MLST sequence type을 이용한 유전자 암호화가 요구되었다.

(가) 발효유에서 확보된 유산균의 유전자 지문 데이터베이스 구축

- 발효유에서 확보된 유산균의 유전자 지문 데이터베이스 구축을 위하여 RAPD-PCR 분석은 239와 KAY3 primer를 이용하였고, rep-PCR 유전자 지문의 분석은 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용하였다. 발효유에 접종하였던 균주는 *Leu. mesenteroides* 11251, *L. brevis* B151, *L. plantarum* Lb41^K이고, 각 30개의 균주를 확보하여 나타내었다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- *Leu. mesenteroides* 11251을 접종했던 발효유에서 분리된 30개의 균주를 239와 KAY3 primer를 이용하여 RAPD-PCR로 유전자 지문을 분석한 결과는 각각 Table 4-76과 4-77에 나타내었다. 또한 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용한 유전자 지문 분석 및 암호화 결과는 각각 Table 4-78, 4-79, 4-80에 나타내었다.
- Y3, 7, 10, 14, 15, 16, 27 균주는 같은 band 양상을 나타내어 암호화되었고, 30개의 균주 중 *L. plantarum*으로 동정된 Y6 균주는 다른 균주와는 다른 유전자 지문을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 나머지 *S. thermophilus*로 동정된 22개의 균주의 유전자 지문 분석에서 각 유전자 지문이 유사하였다.

Table 4-76. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) from inoculated yoghurt in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.															
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16
3,000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
520	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
300	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0

size (bp)	Y 16	Y 17	Y 18	Y 19	Y 20	Y 21	Y 22	Y 23	Y 24	Y 25	Y 26	Y 27	Y 28	Y 29	Y 30	11 25 1
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
300	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

Table 4-77. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.															11 25 1
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y 10	Y 11	Y 12	Y 13	Y 14	Y 15	
2,600	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
2,500	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
2,000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
1,200	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															11 25 1
	Y 16	Y 17	Y 18	Y 19	Y 20	Y 21	Y 22	Y 23	Y 24	Y 25	Y 26	Y 27	Y 28	Y 29	Y 30	
2,600	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
2,500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1,200	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

Table 4-78. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.															11 25 1
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y 10	Y 11	Y 12	Y 13	Y 14	Y 15	
5,000	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
3,500	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
3,000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
1,400	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0

1,210	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
1,200	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
1,000	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
900	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
850	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
700	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
490	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
400	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
300	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
210	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
150	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															11 25 1
	Y 16	Y 17	Y 18	Y 19	Y 20	Y 21	Y 22	Y 23	Y 24	Y 25	Y 26	Y 27	Y 28	Y 29	Y 30	
5,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
3,500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
1,400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,210	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,200	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
900	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
850	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
490	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
300	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-79. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.															11 25 1
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	
5,000	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
3,500	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
3,000	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
2,600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
2,100	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,800	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
1,550	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
1,200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
400	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
350	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
300	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
190	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															11 25 1
	Y16	Y17	Y18	Y19	Y20	Y21	Y22	Y23	Y24	Y25	Y26	Y27	Y28	Y29	Y30	
5,000	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
3,500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
3,000	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
2,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
2,100	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,800	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
400	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
350	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
190	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

Table 4-80. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.															
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	11 25 1
1,500	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
1,300	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,200	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
1,100	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1,000	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
950	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
900	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
800	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
700	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
600	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
550	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
420	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
400	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
380	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
350	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															
	Y16	Y17	Y18	Y19	Y20	Y21	Y22	Y23	Y24	Y25	Y26	Y27	Y28	Y29	Y30	11 25 1
1,500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,300	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
800	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
700	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
600	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
550	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
420	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
400	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
380	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
350	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

② *L. brevis* B151

- *L. brevis* B151을 접종한 발효유에서 분리된 30개의 균주에 해당하는 결과는 *Leu. mesenteroides*와 유사하게 나타났다. 239와 KAY3 primer를 이용하여 RAPD-PCR로 유전자 지문을 분석한 결과는 각각 Table 4-81과 4-82에 나타내었다. 또한 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용한 유전자 지문 분석 및 암호화 결과는 각각 Table 4-83, 4-84, 4-85에 나타내었다.
- 확보된 유산균 중 YB2, 4, 9, 15, 18, 21, 23, 25, 30에 해당하는 균주는 *L. brevis* B151과 같은 유전자 지문 양상을 보였고, 나머지 21개의 균주 또한 같은 유전자 지문이 확보되었다.

Table 4-81. Digital data of *L. brevis* inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.															B151
	Y B1	Y B2	Y B3	Y B4	Y B5	Y B6	Y B7	Y B8	Y B9	Y B10	Y B11	Y B12	Y B13	Y B14	Y B15	
1,800	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0

Band size (bp)	Strain No.															B151
	Y B16	Y B17	Y B18	Y B19	Y B20	Y B21	Y B22	Y B23	Y B24	Y B25	Y B26	Y B27	Y B28	Y B29	Y B30	
1,800	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0

Table 4-82. Digital data of *L. brevis* inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.															B151
	Y B1	Y B2	Y B3	Y B4	Y B5	Y B6	Y B7	Y B8	Y B9	Y B10	Y B11	Y B12	Y B13	Y B14	Y B15	
3,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,600	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,400	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
600	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
400	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	Strain No.															
Band size (bp)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B151
3,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,600	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1,400	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
600	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
400	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1

Table 4-83. Digital data of *L. brevis* inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

	Strain No.															
Band size (bp)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B151
5,000	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
4,500	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
3,800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,100	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,200	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,100	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,600	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
700	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
500	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
450	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
400	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
300	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
250	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	Strain No.															
Band size	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	B1

(bp)	B 16	B 17	B 18	B 19	B 20	B 21	B 22	B 23	B 24	B 25	B 26	B 27	B 28	B 29	B 30	51
5,000	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
4,500	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
3,800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,100	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
2,200	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
2,100	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
1,600	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
700	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
500	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
450	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
400	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
300	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
250	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1

Table 4-84. Digital data of *L. brevis* inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.															B1 51
	Y B1	Y B2	Y B3	Y B4	Y B5	Y B6	Y B7	Y B8	Y B9	Y B 10	Y B 11	Y B 12	Y B 13	Y B 14	Y B 15	
5,000	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
4,000	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
2,100	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,000	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,900	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,500	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,400	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
700	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
650	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
400	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
350	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

300	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
200	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
120	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
Band size (bp)	Strain No.															
	Y B 16	Y B 17	Y B 18	Y B 19	Y B 20	Y B 21	Y B 22	Y B 23	Y B 24	Y B 25	Y B 26	Y B 27	Y B 28	Y B 29	Y B 30	B1 51
5,000	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
4,000	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
2,100	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
2,000	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
1,900	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1,500	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1,400	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
700	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
650	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
400	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
350	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
300	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
200	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
120	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0

Table 4-85. Digital data of *L. brevis* inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.															
	Y B1	Y B2	Y B3	Y B4	Y B5	Y B6	Y B7	Y B8	Y B9	Y B10	Y B11	Y B12	Y B13	Y B14	Y B15	B1 51
2,100	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
2,000	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
400	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
390	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
Band size (bp)	Strain No.															
	Y B 16	Y B 17	Y B 18	Y B 19	Y B 20	Y B 21	Y B 22	Y B 23	Y B 24	Y B 25	Y B 26	Y B 27	Y B 28	Y B 29	Y B 30	B1 51
2,100	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0

2,000	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
1,600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
400	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
390	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0

③ *L. plantarum* Lb41^K

- 상기 두 균주와 유사하게도 *L. plantarum*s Lb41^K를 접종한 발효유에서 분리된 30개의 균주에 해당하는 유전자 지문이 유사하게 나타났다. 239와 KAY3 primer를 이용하여 RAPD-PCR로 유전자 지문을 분석한 결과는 각각 Table 4-86과 4-87에 나타내었다. 또한 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용한 유전자 지문 분석 및 암호화 결과는 각각 Table 4-88, 4-89, 4-90에 나타내었다.
- 확보된 유산균 중 16S rRNA 유전자 염기서열의 결과로 5개의 균주(YP5, 6, 9, 15, 29)가 *L. plantarum*s Lb41^K와 동일하게 유전자 지문이 암호화되었고, 반면에 *S. thermophilus*로 동정된 균주 등도 동일한 유전자 지문이 나타났다.

Table 4-86. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^K) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb41 ^K
	YP 1	YP 2	YP 3	YP 4	YP 5	YP 6	YP 7	YP 8	YP 9	YP 10	YP 11	YP 12	YP 13	YP 14	YP 15	
6,000	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
3,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,300	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,500	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,100	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,000	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
550	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
290	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0

Band size (bp)	Strain No.															Lb41 ^K
	YP 16	YP 17	YP 18	YP 19	YP 20	YP 21	YP 22	YP 23	YP 24	YP 25	YP 26	YP 27	YP 28	YP 29	YP 30	
6,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
3,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

1,100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0

Table 4-87. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^K) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	YP 1	YP 2	YP 3	YP 4	YP 5	YP 6	YP 7	YP 8	YP 9	YP 10	YP 11	YP 12	YP 13	YP 14	YP 15	
2,900	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
2,400	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,000	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,200	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,100	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
950	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
900	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
750	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	YP 16	YP 17	YP 18	YP 19	YP 20	YP 21	YP 22	YP 23	YP 24	YP 25	YP 26	YP 27	YP 28	YP 29	YP 30	
2,900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
2,400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0

Table 4-88. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^K) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	YP 1	YP 2	YP 3	YP 4	YP 5	YP 6	YP 7	YP 8	YP 9	YP 10	YP 11	YP 12	YP 13	YP 14	YP 15	
5,000	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
4,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,900	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
2,700	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,200	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,000	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,700	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,600	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,210	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,200	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
690	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
600	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
550	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
500	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
250	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 k
	YP 16	YP 17	YP 18	YP 19	YP 20	YP 21	YP 22	YP 23	YP 24	YP 25	YP 26	YP 27	YP 28	YP 29	YP 30	
5,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
4,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
2,700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
2,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
690	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0

Table 4-89. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^K)inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	Y P1	Y P2	Y P3	Y P4	Y P5	Y P6	Y P7	Y P8	Y P9	Y P10	Y P11	Y P12	Y P13	Y P14	Y P15	
4,500	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
3,500	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
2,500	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2,100	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,800	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,590	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,500	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,400	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,200	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
850	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
750	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
550	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
400	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
380	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
320	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
230	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	Y P16	Y P17	Y P18	Y P19	Y P20	Y P21	Y P22	Y P23	Y P24	Y P25	Y P26	Y P27	Y P28	Y P29	Y P30	
4,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
3,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
2,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,590	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

200 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

Table 4-90. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^K) inoculated in yoghurt in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	YP 1	YP 2	YP 3	YP 4	YP 5	YP 6	YP 7	YP 8	YP 9	YP 10	YP 11	YP 12	YP 13	YP 14	YP 15	
2,000	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,600	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
1,400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,100	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1,050	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
950	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
900	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
850	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
790	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
700	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
550	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
220	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^K
	YP 16	YP 17	YP 18	YP 19	YP 20	YP 21	YP 22	YP 23	YP 24	YP 25	YP 26	YP 27	YP 28	YP 29	YP 30	
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1,400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1,050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

- 본 연구에서 발효유에서 확보된 유산균의 RAPD, rep-PCR, MLST sequence type 결과를 통하여 Table 4-91부터 4-93에 Y1-Y30(*Leu. mesenteroides*), YB1-YB30(*L. brevis*), YP1-YP30(*L. plantarum*)에 해당하는 digital code를 완성하였다.

Table 4-91. Digital database of DNA fingerprints for 30 colonies(Y1-Y30) inoculated in yoghurt with *Leu. mesenteroides*(11251) strain

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital bar code
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) ₅	239	KAY3	
Y1	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y2	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y3	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y4	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y5	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y6	0	12	11	9	4	2	M00R12E11G09T04K02
Y7	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y8	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y9	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y10	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y11	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y12	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y13	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y14	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y15	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y16	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y17	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y18	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y19	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y20	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y21	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y22	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y23	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y24	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y25	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y26	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y27	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
Y28	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y29	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03
Y30	0	12	12	9	3	3	M00R12E12G09T03K03

Table 4-92. Digital database of DNA fingerprints for 30 colonies(YB1-YB30) inoculated in yoghurt with *L. brevis*(B151) strain

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital bar code
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) ₅	239	KAY3	
YB1	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB2	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB3	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB4	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06

YB5	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB6	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB7	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB8	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB9	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB10	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB11	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB12	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB13	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB14	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB15	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB16	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB17	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB18	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB19	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB20	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB21	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB22	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB23	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB24	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB25	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
YB26	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB27	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB28	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB29	00	16	10	9	3	3	M00R16E10G09T03K03
YB30	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06

Table 4-93. Digital database of DNA fingerprints for 30 colonies(YP1-YP30) inoculated in yoghurt with *L. plantarum*(Lb41) strain

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital barcode
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) 5	239	KAY3	
YP1	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP2	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP3	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP4	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP5	15	13	12	7	6	4	MR1513E12G07T06K04
YP6	15	13	12	7	6	4	MR1513E12G07T06K04
YP7	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP8	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP9	15	13	12	7	6	4	MR1513E12G07T06K04
YP10	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP11	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP12	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP13	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP14	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP15	15	13	12	7	6	4	MR1513E12G07T06K04

YP16	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP17	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP18	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP19	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP20	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP21	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP22	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP23	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP24	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP25	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP26	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP27	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP28	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04
YP29	15	13	12	7	6	4	MR1513E12G07T06K04
YP30	0	17	9	8	3	4	M00R17E09G08T03K04

(나) 김치에서 확보된 유산균의 유전자 지문 데이터베이스 구축

- 발효유에서 확보된 유산균의 유전자 지문 데이터베이스 구축을 위하여 RAPD-PCR 분석은 239와 KAY3 primer를 이용하였고, rep-PCR 유전자 지문의 분석은 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용하였다. 발효유에 접종하였던 균주는 *Leu. mesenteroides* 11251과 *L. brevis* B151이고, 각 30개의 균주를 확보하여 나타내었다.

① *Leu. mesenteroides* 11251

- *Leu. mesenteroides* 11251을 접종했던 김치에서 분리된 30개의 균주를 239와 KAY3 primer를 이용하여 RAPD-PCR로 유전자 지문을 분석한 결과는 각각 Table 4-94과 95에 나타내었다. 또한 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용한 유전자 지문 분석 및 압화 결과는 각각 Table 4-96, 4-97, 4-98에 나타내었다.
- 확보된 30개의 균주 중 KM1, 2, 5, 6, 7, 14, 15, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 30에 해당하는 균주는 *Leu. mesenteroides* 11251과 동일한 유전자 지문을 나타내었으나, KM24 균주는 일부 primer에서 다양한 유전자 지문 양상을 보였다.
- *L. curvatus*로 동정된 KM11의 유전자 지문도 예상과 같게 유전자 지문의 양상이 다른 균주들과 다른 것을 확인할 수 있었다.
- 독특하게도 14개의 균주가 *L. sakei*로 동정되었으나 RAPD-PCR에서 239 primer를 사용하였을 때 유전자 지문이 다르게 나타났다. 예를 들면, KM3, 4, 10, 16, 19, 23, 28이 하나의 그룹으로, KM8, 12, 18이 두 번째 그룹, KM9, 17이 세 번째 그룹, KM13, 27이 네 번째 그룹으로 나뉘었다. *L. sakei* 균주를 증폭시킨 다른 primer도 유사한 결과를 나타내었고, 이는 특정 부위에 약한 증폭을 나타낸 것으로 판단할 수 있었다.

Table 4-94. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.															
	K M 1	K M 2	K M 3	K M 4	K M 5	K M 6	K M 7	K M 8	K M 9	K M 10	K M 11	K M 12	K M 13	K M 14	K M 15	11 25 1
4,000	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2,800	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1,250	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1,200	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1,100	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1,000	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
700	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
600	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
490	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
390	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															
	K M 16	K M 17	K M 18	K M 19	K M 20	K M 21	K M 22	K M 23	K M 24	K M 25	K M 26	K M 27	K M 28	K M 29	K M 30	11 25 1
4,000	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
2,800	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1,250	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1,200	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1,100	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1,000	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
700	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
600	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
490	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
390	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-95. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.															
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	11
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	25
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	1
2,500	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
1,800	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,600	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1,400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
850	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	11
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	25
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1
2,500	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
1,800	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,600	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
1,400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
850	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-96. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.															
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	11
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	25
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	1
5,000	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
4,000	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
3,000	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1,800	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,200	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
900	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
850	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
710	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0

600	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
400	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
300	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	Strain No.															
Band size (bp)	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	11
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	25
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1
5,000	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
4,000	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
3,000	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
2,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
850	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
710	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
600	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
300	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Table 4-97. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

	Strain No.															
Band size (bp)	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	11
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	25
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	1
2,500	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
2,200	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,900	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,600	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,400	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,100	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
490	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
400	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
350	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
200	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1

100	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
Band size (bp)	Strain No.															
	K M 16	K M 17	K M 18	K M 19	K M 20	K M 21	K M 22	K M 23	K M 24	K M 25	K M 26	K M 27	K M 28	K M 29	K M 30	11 25 1
2,500	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
2,200	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,900	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,400	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,100	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
490	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
400	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
350	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
200	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
100	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0

Table 4-98. Digital data of *Leu. mesenteroides*(11251) inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.															
	K M 1	K M 2	K M 3	K M 4	K M 5	K M 6	K M 7	K M 8	K M 9	K M 10	K M 11	K M 12	K M 13	K M 14	K M 15	11 25 1
2,300	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,300	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1,200	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
1,100	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
900	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
750	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
700	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
600	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
550	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
500	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
380	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
300	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
Band size (bp)	Strain No.															
	K M 16	K M 17	K M 18	K M 19	K M 20	K M 21	K M 22	K M 23	K M 24	K M 25	K M 26	K M 27	K M 28	K M 29	K M 30	11 25 1

2,300	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1,200	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
1,100	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
700	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
600	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
550	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
500	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
300	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0

② *L. brevis* B151

- *L. brevis* B151을 접종했던 김치에서 분리된 30개의 균주를 239와 KAY3 primer를 이용하여 RAPD-PCR로 유전자 지문을 분석한 결과는 각각 Table 4-99와 4-100에 나타내었다. 또한 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용한 유전자 지문 분석 및 암호화 결과는 각각 Table 4-101, 4-102, 4-103에 나타내었다.
- 확보된 30 균주 중 KB5와 KB17은 *L. brevis* B151과 완전하게 일치하는 유전자 지문을 나타내었고, 나머지 28개의 균주들도 유사한 유전자 지문의 양상을 보였다.

Table 4-99. Digital data of *L. brevis* inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.															
	K B1	K B2	K B3	K B4	K B5	K B6	K B7	K B8	K B9	K B10	K B11	K B12	K B13	K B14	K B15	B1 51
3,000	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2,500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,800	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,200	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,100	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															
	K B1	K B1	K B1	K B1	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B3	B1 51
3,000	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2,500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,800	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,200	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,100	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
3,000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
2,500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1,800	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1,400	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1,200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1,100	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-100. Digital data of *L. brevis* inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.															B151	
	KB 1	KB 2	KB 3	KB 4	KB 5	KB 6	KB 7	KB 8	KB 9	KB 10	KB 11	KB 12	KB 13	KB 14	KB 15		
3000	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2000	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Band size (bp)	Strain No.															B151	
	KB 16	KB 17	KB 18	KB 19	KB 20	KB 21	KB 22	KB 23	KB 24	KB 25	KB 26	KB 27	KB 28	KB 29	KB 30		
3000	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1600	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Table 4-101. Digital data of *L. brevis* inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the Rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.															B151
	K B1	K B2	K B3	K B4	K B5	K B6	K B7	K B8	K B9	K B1 0	K B1 1	K B1 2	K B1 3	K B1 4	K B1 5	
3,800	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3,100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2,500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2,200	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1,300	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,200	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,000	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
900	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
800	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
750	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
700	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
650	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
180	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
150	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Strain No.																
Band size (bp)	K B1	K B1	K B1	K B1	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B2	K B3	B1 51
	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
3,800	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3,100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2,500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2,200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,800	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,300	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
900	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
800	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
700	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
650	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
180	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
150	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Table 4-102. Digital data of *L. brevis* inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the Rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Strain No.																
Band size (bp)	K B1	K B2	K B3	K B4	K B5	K B6	K B7	K B8	K B9	K B1 0	K B1 1	K B1 2	K B1 3	K B1 4	K B1 5	B1 51
	5,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2,100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2,000	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

1,900	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
650	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
550	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
500	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
220	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Band size (bp)	Strain No.															
	K B1 6	K B1 7	K B1 8	K B1 9	K B2 0	K B2 1	K B2 2	K B2 3	K B2 4	K B2 5	K B2 6	K B2 7	K B2 8	K B2 9	K B3 0	B1 51
5,000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2,100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2,000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,900	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,200	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
650	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
600	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
550	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
500	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
400	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
220	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Table 4-103. Digital data of *L. brevis* inoculated in kimchi in the form of binary number(1,0) for the Rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.															
	K B1	K B2	K B3	K B4	K B5	K B6	K B7	K B8	K B9	K B1 0	K B1 1	K B1 2	K B1 3	K B1 4	K B1 5	B1 51
1,600	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,050	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,000	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
900	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

750	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
650	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
350	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Strain No.																
Band size (bp)	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	B1
	B1	B1	B1	B1	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B3	51
	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
1,600	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,050	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1,000	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
900	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
650	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
350	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

- 본 연구에서 발효유에서 확보된 유산균의 RAPD, rep-PCR, MLST sequence type 결과를 통하여 Table 4-104, 4-105에 KM1-KM30(*Leu. mesenteroides*)과 KB1-KB30(*L. brevis*)에 해당하는 digital code를 완성하였다.
- KM22의 경우 *Leu. mesenteroides* 11251과 완전하게 일치하였고, 나머지 *Leu. mesenteroides*로 동정된 14개의 균주는 일치하지 않았다. MLST 분석에서 7개의 housekeeping 유전자에서 14개의 균주는 *rpoA*와 *pyrG*에서 SNP가 존재하였으나, KM22만 *Leu. mesenteroides* 11251와 비교하여 SNP가 존재하지 않았다.
- 뿐만 아니라, KM2, 7, 14, 25 균주들은 7개의 housekeeping 유전자 중 6개는 동일하였으나 *uvrC* 유전자의 염기서열이 상이하였기 때문에 이들 4균주는 *Leu. mesenteroides* 11251 균주가 아닌 것으로 확인되었다.
- 또한 KB5와 KB17은 완전히 같은 digital code가 생성되어 같은 균주라고 판단할 수 있었다.

Table 4-104. Digital database of DNA fingerprints for 30 colonies(KM1-KM30) inoculated in kimchi with *Leu. mesenteroides*(11251) strain

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital bar code
		Rep-PCR		RAPD-PCR			
		REP	ERIC	(GTG) 5	239	KAY3	
KM1	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM2	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02

KM3	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM4	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM5	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM6	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM7	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM8	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM9	0	12	10	8	5	2	M00R12E10G08T05K02
KM10	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM11	0	10	3	9	2	4	M00R10E03G09T02K04
KM12	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM13	0	12	10	8	5	2	M00R12E10G08T05K02
KM14	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM15	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM16	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM17	0	12	10	8	5	2	M00R12E10G08T05K02
KM18	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM19	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM20	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM21	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM22	3	9	4	8	1	2	M03R09E04G08T01K02
KM23	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM24	0	11	5	8	1	2	M00R11E05G08T01K02
KM25	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM26	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM27	0	12	10	8	5	2	M00R12E10G08T05K02
KM28	0	12	10	8	7	2	M00R12E10G08T07K02
KM29	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02
KM30	0	9	4	8	1	2	M00R09E04G08T01K02

Table 4-105. Digital database of DNA fingerprints for 30 colonies(KB1-KB30) inoculated in kimchi with *L. brevis*(B151) strain

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital bar code
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) 5	239	KAY3	
KB1	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB2	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB3	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB4	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB5	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
KB6	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB7	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB8	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB9	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB10	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB11	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB12	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB13	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB14	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03

KB15	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB16	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB17	11	13	10	8	3	6	M11R13E10G08T03K06
KB18	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB19	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB20	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB21	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB22	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB23	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB24	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB25	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB26	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB27	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB28	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB29	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03
KB30	00	13	11	9	6	3	M00R13E11G09T06K03

2. 개발한 프로바이오틱스 균주를 이용하여 제조한 프로바이오틱스 제품에서의 미생물 추적 기술 평가

가. 프로바이오틱스 분말 내에 존재하는 유산균 유전자 지문 분석

- 본 연구과제에서 기능성이 높아 산업적으로 활용성이 높은 것으로 선정된 균주들 중에서 *L. plantarum* Lb41^P 균주는 프로바이오틱스로서의 기능성이 확인되었다 따라서 본 연구과제의 협동기관이자 참여기업인 (주)아람에서는 상기 균주를 이용하여 프로바이오틱스 분말 제품을 개발하여 시제품을 제조하였는데 개발한 프로바이오틱스 분말에는 *L. plantarum*(Lb41^P), *B. longum*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*가 함유되어 있다. 이에 본 연구에서는 (주)아람에서 개발한 프로바이오틱스 제품 내에 존재하는 *L. plantarum* Lb41^P 균주의 유전자 지문을 분석함으로써 본 연구에서 개발한 유전자 지문 분석법의 균주 추적 효능을 검증하였다.

(1) 프로바이오틱스 분말 제품에서 분리한 유산균의 동정

- 상기 연구방법과 동일하게 프로바이오틱스 분말을 멸균생리식염수에 현탁하여 MRS agar 배지에서 나타난 집락을 무작위로 30개를 선별하여 PP1-PP30으로 나타내었다.
- Table 4-106에 나타낸 바와 같이 30개의 집락 중 PP4, 7, 13, 14, 16, 22, 25 균주가 *L. plantarum*으로 동정되었다. 나머지 균주는 *S. thermophilus*와 *L. acidophilus*로 동정되었다. 완전하게 혐기적 배양을 진행하지 않았기 때문에 *B. longum*은 나타나지 않은 것으로 판단된다.

Table 4-106. 16S rRNA gene sequencing results for *L. plantarum*(Lb41^P) identified from probiotics powder

Colony ID	BLAST result	Colony ID	BLAST result
PP1	<i>S. thermophilus</i>	PP16	<i>L. plantarum</i>
PP2	<i>S. thermophilus</i>	PP17	<i>S. thermophilus</i>
PP3	<i>S. thermophilus</i>	PP18	<i>L. acidophilus</i>
PP4	<i>L. plantarum</i>	PP19	<i>S. thermophilus</i>
PP5	<i>S. thermophilus</i>	PP20	<i>S. thermophilus</i>
PP6	<i>S. thermophilus</i>	PP21	<i>S. thermophilus</i>
PP7	<i>L. plantarum</i>	PP22	<i>L. plantarum</i>
PP8	-	PP23	<i>L. acidophilus</i>
PP9	<i>L. acidophilus</i>	PP24	<i>S. thermophilus</i>
PP10	<i>L. acidophilus</i>	PP25	<i>L. plantarum</i>
PP11	<i>L. acidophilus</i>	PP26	<i>L. acidophilus</i>
PP12	<i>L. acidophilus</i>	PP27	<i>L. acidophilus</i>
PP13	<i>L. plantarum</i>	PP28	<i>S. thermophilus</i>
PP14	<i>L. plantarum</i>	PP29	<i>L. acidophilus</i>
PP15	<i>S. thermophilus</i>	PP30	<i>S. thermophilus</i>

(2) 분리 유산균의 RAPD 분석

- 프로바이오틱스 분말 제품으로부터 분리된 유산균의 유전자 지문을 분석하기 위하여 RAPD-PCR을 수행하였다. Figure 4-127A는 primer 239를 이용하여 분석한 결과이고, Figure 4-127B는 primer KAY3를 이용하여 분석한 결과이다.
- *L. plantarum*으로 동정된 7개의 균주의 band 양상은 서로 유사하였다. Primer 239를 이용한 균주의 band는 700~3,000 bp에 나타났고, primer KAY3로 증폭시킨 균주의 band는 900~2,500 bp에서 나타났다.

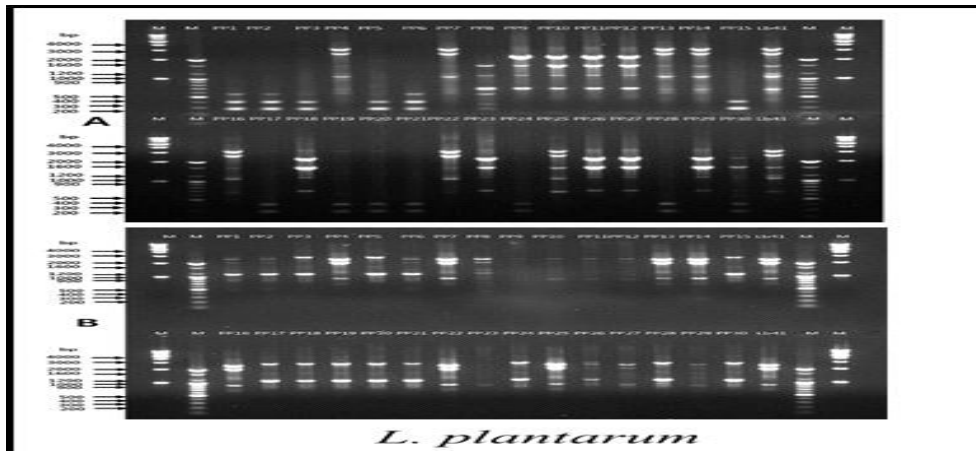


Figure 4-127. RAPD-PCR analysis of 30 colonies picked from probiotics powder using 239 primer (A) and KAY3 primer (B), lane: 1, 1 kb ladder; 2, 100 bp ladder; 3-17, PP1-PP15; 18, *L. plantarum* Lb41^P; 19, 100 bp ladder; 20, 1 kb ladder; (lower half of the gel) 21, 1 kb ladder; 22, 100 bp ladder; 23-37, PP16-PP30; 38, *L. plantarum* Lb41^P; 39, 100 bp ladder; 40, 1 kb ladder.

(3) 분리 유산균의 rep-PCR 분석

- 프로바이오틱스 분말 제품으로부터 분리된 유산균의 rep-PCR 분석을 수행한 결과 Figure 4-128에 나타내었다. Figure 4-128A는 (GTG)₅ primer, Figure 4-128B는 REP, Figure 11C는 ERIC primer를 이용한 결과이다.
- RAPD-PCR의 결과와 마찬가지로 (GTG)₅ primer를 이용하였을 때, 7개의 균주는 350-2,500 bp의 band 양상을 보였고, 이는 *L. plantarum* Lb41^P와 유사하였으며, REP 과 ERIC primer를 사용하였을 때, 각각 200~5,000 bp, 230~5,000 bp에서 band 양상이 나타나 *L. plantarum* Lb41^P와 동일한 균주로 예상되었다.

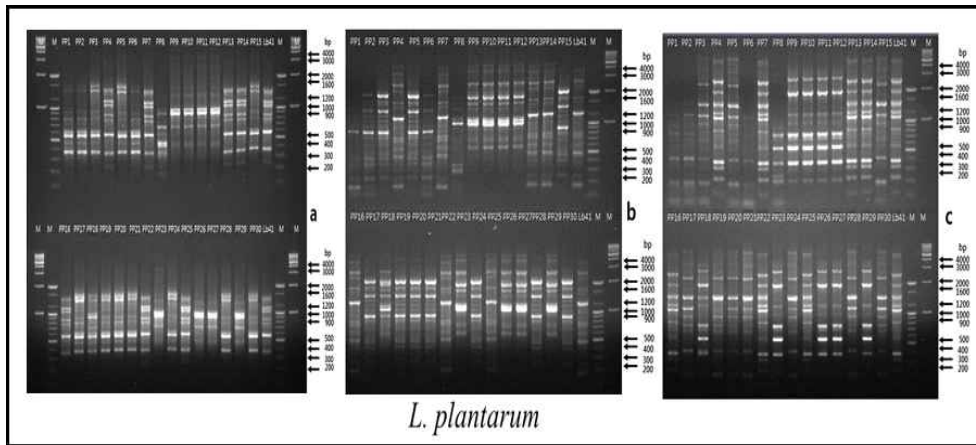


Figure 4-128. Rep-PCR analysis of 30 colonies picked from probiotics powder using (GTG)₅ primer (a), REP primer (b) and ERIC primer (c), lane: 1, 100 bp ladder; 2-31, PP1-PP30; 32, *L. plantarum* Lb41^P; 33, 100 bp ladder.

(4) 분리 유산균의 MLST 분석

- 분리 유산균의 7개의 housekeeping 유전자를 이용하여 MLST sequence type을 분석한 결과(Figure 4-129). *L. plantarum*으로 동정된 7개의 균주는 모두 *L. plantarum* Lb41^P와 비교하였을 때 SNP가 존재하지 않아 동일한 MLST sequence type을 지니는 것으로 확인되었다.

ddl

ORF 1018
ORF 1019
ORF 1020
ORF 1021
ORF 1022
ORF 1023

100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510

520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930

940 950 960 970 980 990 1000

A

gdh

ORF 1018
ORF 1019
ORF 1020
ORF 1021
ORF 1022
ORF 1023

100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510

520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930

940 950 960 970 980 990 1000

B

gyrB

ORF 1018
ORF 1019
ORF 1020
ORF 1021
ORF 1022
ORF 1023

100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510

520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930

940 950 960 970 980 990 1000

C

mutS

mutS 1619
mutS 204
mutS 597
mutS PP3
mutS PP5
mutS PP20
mutS PP25

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140
 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290
 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430
 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570
 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710
 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850
 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990

D

ppm

ppm 1619
ppm PP4
ppm PP7
ppm PP8
ppm PP14
ppm PP16
ppm PP23

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140
 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280
 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420
 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560
 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
 990

E

ppmK1

ppmK1 1619
ppmK1 PP4
ppmK1 PP7
ppmK1 PP8
ppmK1 PP14
ppmK1 PP16
ppmK1 PP23

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140
 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280
 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420
 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560
 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
 990

F



Figure 4-129. Comparative gene sequence analysis- *ddl* (A), *gdh* (B), *gyrB* (C), *mutS* (D), *pgm* (E), *purK1* (F) and *tkt4* (G) of 7 colonies isolated from probiotic powder inoculated with reference strain Lb41^P(*L. plantarum*).

나. 프로바이오틱스 분말 내에 존재하는 유산균 유전자 지문의 디지털코드화와 데이터베이스 구축

- 프로바이오틱스 분말로부터 분리한 30주의 유산균주를 RAPD로 유전자 지문을 분석한 결과는 각각 Table 4-107과 4-108에 나타내었다. 또한 REP, ERIC, (GTG)₅ primer를 이용한 유전자 지문 분석 및 암호화 결과는 각각 Table 4-109, 4-110, 4-111에 나타내었다. 2종류의 primer로 수행한 RAPD 분석, REP, ERIC, (GTG)₅ 등 3종류의 primer로 수행한 rep-PCR 분석, MLST 분석 등 총 6종류의 유전자 분석법을 조합하여 작성한 유산균주 30주에 대한 유전자 지문 데이터베이스는 Table 4-112에 정리하였다.
- 분석한 30균주 중 PP4, 7, 13, 14, 16, 22, 25 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *L. plantarum*으로 확인되었으며, RAPD, rep-PCR, MLST 분석 결과를 이용하여 작성한 유전자 지문이 *L. plantarum* Lb41^P와 동일한 것으로 확인되었다.

Table 4-107. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^P) from probiotics powder in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using 239 primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 _P
	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	PP 5	PP 6	PP 7	PP 8	PP 9	PP 10	PP 11	PP 12	PP 13	PP 14	PP 15	
3,000	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
2,600	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
2,200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1,600	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1,100	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1,050	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
700	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
550	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
400	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
380	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
300	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 _P
	PP 16	PP 17	PP 18	PP 19	PP 20	PP 21	PP 22	PP 23	PP 24	PP 25	PP 26	PP 27	PP 28	PP 29	PP 30	
3,000	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
2,600	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
2,200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,600	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
1,100	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,050	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
700	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
550	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
400	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0

Table 4-108. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^P) from probiotics powder in the form of binary number(1,0) for the RAPD-PCR fingerprint using KAY3 primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 _P
	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	PP 5	PP 6	PP 7	PP 8	PP 9	PP 10	PP 11	PP 12	PP 13	PP 14	PP 15	
2,800	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2,500	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2,000	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1,200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
900	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1

Band	Strain No.														
------	------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

size (bp)	PP 16	PP 17	PP 18	PP 19	PP 20	PP 21	PP 22	PP 23	PP 24	PP 25	PP 26	PP 27	PP 28	PP 29	PP 30	Lb 41 _F
2,800	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2,500	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
2,000	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
1,200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,100	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
900	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1

Table 4-109. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^F) from probiotics powder in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using REP primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 _F
	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	PP 5	PP 6	PP 7	PP 8	PP 9	PP 10	PP 11	PP 12	PP 13	PP 14	PP 15	
4,000	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
3,500	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
2,500	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
2,100	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
2,000	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1,800	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1,700	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
1,600	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
1,580	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1,500	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1,400	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1,210	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1,200	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1,050	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1,000	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
900	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
800	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
710	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
600	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
580	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
500	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
450	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
400	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
390	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
320	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
300	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
250	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
180	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
105	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															Lb
	PP 16	PP 17	PP 18	PP 19	PP 20	PP 21	PP 22	PP 23	PP 24	PP 25	PP 26	PP 27	PP 28	PP 29	PP 30	

4,000	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
3,500	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
2,500	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
2,100	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
2,000	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1,800	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1,700	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
1,600	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1,580	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,500	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
1,400	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,210	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1,200	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
1,050	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,000	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
900	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
800	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
710	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
600	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
580	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
500	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
450	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
400	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
390	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
180	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-110. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^P) from probiotics powder in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using ERIC primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^P
	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	PP 5	PP 6	PP 7	PP 8	PP 9	PP 10	PP 11	PP 12	PP 13	PP 14	PP 15	
6,000	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5,000	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
4,500	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3,500	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3,100	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2,700	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
2,400	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
2,200	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1,900	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
1,500	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

1,200	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
1,100	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1,050	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
950	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
800	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
750	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
720	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
650	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
550	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
510	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
390	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
310	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
220	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
210	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
190	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	Strain No.															
Band size (bp)	PP 16	PP 17	PP 18	PP 19	PP 20	PP 21	PP 22	PP 23	PP 24	PP 25	PP 26	PP 27	PP 28	PP 29	PP 30	Lb 41 P
6,000	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
5,000	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
4,500	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
3,500	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
3,100	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2,700	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
2,400	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
2,200	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1,900	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
1,500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
1,200	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
1,100	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1,050	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
950	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
800	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
750	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
720	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
650	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
550	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
510	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
390	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
310	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
220	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

120 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1

Table 4-111. Digital data of *L. plantarum*(Lb41^P) from probiotics powder in the form of binary number(1,0) for the rep-PCR fingerprint using (GTG)₅ primer

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^P
	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	PP 5	PP 6	PP 7	PP 8	PP 9	PP 10	PP 11	PP 12	PP 13	PP 14	PP 15	
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1,600	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1,400	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1,300	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1,100	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
1,050	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
950	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
900	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
850	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
800	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
790	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
600	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
650	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
580	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
480	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
450	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
370	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
310	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
240	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
150	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Band size (bp)	Strain No.															Lb 41 ^P
	PP 16	PP 17	PP 18	PP 19	PP 20	PP 21	PP 22	PP 23	PP 24	PP 25	PP 26	PP 27	PP 28	PP 29	PP 30	
3,000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,600	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1,500	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,400	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
1,300	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1,100	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1,050	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1,000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
950	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
900	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
850	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
800	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
790	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1

700	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
600	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
580	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
480	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
450	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
370	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4-112. Digital database of DNA fingerprints for 30 colonies(PP1-PP30) isolated from commercial probiotics powder.

Strain No.	MLST (Sequence type)	Number of band					Digital bar code
		Rep-PCR			RAPD-PCR		
		REP	ERIC	(GTG) ₅	239	KAY3	
PP1	00	10	4	8	3	3	M00R10E04G08T03K03
PP2	00	10	4	8	3	3	M00R10E04G08T03K03
PP3	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP4	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP5	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP6	00	10	4	8	3	3	M00R10E04G08T03K03
PP7	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP8	00	8	7	8	6	3	M00R08E07G08T06K03
PP9	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP10	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP11	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP12	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP13	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP14	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP15	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP16	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP17	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP18	00	10	7	9	4	2	M00R10E07G09T04K02
PP19	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP20	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP21	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP22	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP23	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP24	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP25	16	13	12	8	5	3	M16R13E12G08T05K03
PP26	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP27	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP28	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02
PP29	00	10	9	8	4	3	M00R10E09G08T04K03
PP30	00	13	13	8	3	2	M00R13E13G08T03K02

3. 결론

- 유산균 등의 식품발효용 균주들을 스타터로 이용하여 발효식품을 산업적으로 제조할 경우, 스타터 균주의 보존 관리가 매우 중요하다.
- 특히 제품에 생균의 형태로 소비자에게 제공되는 발효식품의 경우에는 제품에 스타터 균주가 생존하므로 타 연구자가 이를 배양시켜 산업적으로 악용할 소지가 있으며, 산업적으로 유용한 특허균주의 경우에는 타 연구자 또는 타 기업이 제품에 존재하는 생균을 분리 배양하여 이를 스타터로 사용하여 제품을 생산할 가능성도 있다.
- 따라서 산업적으로 유용한 발효용 스타터 균주의 도용을 차단하기 위해서는 균주의 추적시스템 구축이 필수적이나 현재까지 정확도가 높은 균주 추적시스템은 개발되지 않은 상황이다.
- 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석은 중 수준의 동정은 매우 정확하나 균주(strain) 수준에서의 동정은 불가하며, full genome sequencing에 의한 균주 확인은 균주의 계대 배양 시 세포분열에 의해 세대가 지나갈 경우 돌연변이에 의해 염기서열이 100% 일치하지 않게 됨에 따라 균주 확인에 어려움이 따른다. 또한 균주의 염색체 DNA에 특정 염기서열을 삽입하는 일종의 유전적 마킹법인 DNA cryptography 기법은 해당 균주를 정확하게 확인할 수 있는 방법이지만, 본 연구에서 사용한 유산균과 같은 GRAS 균주에는 적용할 수 없는 기법이다.
- 본 연구에서는 산업적으로 이용성이 높은 3종의 유산균주에 대한 pan genome 분석, core genome 분석 및 snyteny 분석을 통하여 돌연변이의 영향을 거의 받지 않는 housekeeping 유전자 7개를 발굴하여 MLST 분석을 위한 target 유전자로 선정하였으며, 이를 이용하여 MLST 분석을 위한 sequence type을 결정하였다.
- 한편, MLST 분석법 이외에 RAPD와 rep-PCR 분석법을 추가하여 6개의 유전자 분석법을 조합한 후 분석 결과를 디지털코드화 함으로써 정확하고 효율적인 유전자 지문을 개발하였다.
- 본 연구 결과, 유산균주의 DNA fingerprint를 이용한 균주 확인은 MLST 분석에 의해 일차적으로 가능하며, 만약 MLST 분석에 의해 확인이 가능하지 않을 경우에는 본 연구에서 개발한 유전자 지문의 디지털 코드 작성에 의해 정확하게 확인할 수 있다는 것을 보여 주었다.
- 또한 김치와 발효유 등 대표적인 발효식품에 존재하는 유산균주들의 유전자 지문 분석과 프로바이오틱스 제품을 제조한 후 제품 내에 존재하는 균주의 유전자 지문 분석을 수행하여 해당 균주를 추적함으로써 본 연구에서 개발한 유전자 지문 분석법은 식품 종균 개발 현장에서 적용 가능함을 검증하였다.
- 본 연구 결과는 현재까지 개발된 균주 추적기술 또는 도용방지기술 중에서 DNA cryptography 기법을 제외하고는 가장 정확도와 효율이 높은 것으로 판단되며, 따라서 상업적으로 개발된 특허균주들에 본 개발기술을 적용한다면 해당 균주의 도용 또는 오용을 방지할 수 있을 것으로 기대한다.

제 12절 유용 균주에 대한 안전성, 발효특성, 기능 자료 홈페이지 구축

1. 산업용 유용 미생물 자원 확보 및 균주 제공

가. 다양한 발효 식품으로부터 미생물 분리

(1) 발효 식품 유래 미생물 자원 수집

- 국내의 가정집, 채래시장 등에서 김치, 장아찌, 젓갈류를 수집하여 미생물을 분리하였다. 세균은 nutrient agar에서 30°C 호기 배양, 효모는 chloramphenicol이 첨가된 YM agar에서 26°C 호기 배양, 유산균은 lactobacilli MRS agar에서 37°C 혐기 배양하였다.
- 식중독 균인 *Bacillus cereus*에 대한 저해 활성, 생물전환능을 확인하기 위한 β -glucosidase 생산 및 protease 생산능이 있는 미생물을 1차적으로 선별하여, 1차년도에 세균 12주, 효모 62주, 유산균 77주 총 151주를 수집하였다.

나. 토종 미생물 자원을 수집하여 안전하게 보존

(1) 국내 순수 분리 미생물 자원 확보

- 각 협동 기관으로부터 미생물 자원을 기탁받아 국내 순수 분리 미생물 자원을 수집하였다. 국내 다양한 발효 식품인 장류(된장, 고추장), 젓갈류(오징어젓, 새우젓, 낙지젓, 창란젓, 어리굴젓, 명란젓, 밴댕이젓, 게장 등), 김치류(배추김치, 총각무김치, 열무김치, 갯김치, 파김치, 깍두기, 동치미, 토마토김치, 오이소박이 등), 장아찌류(감장아찌, 우엉장아찌, 더덕장아찌, 오이장아찌 등)와 그의 원재료인 배추, 무, 부추, 양파, 고추, 메주 등의 식재료로부터 분리된 미생물과 국내 다양한 환경(유아분변, 돼지초유 등)에서 분리한 토착 미생물을 수집하여 1차년도 총 2,128주를 확보하였다.

(2) 국내 순수 분리 미생물 자원의 안전 보존

- 각 세부, 협동 기관으로부터 기탁 받은 총 2,128주를 안전하게 보존하기 위하여 다음과 같은 방법으로 보존하였다.
- 각 미생물 자원은 생균 형태로 배양하여 활성이 높은 상태에서 멸균된 10% skim milk를 보존제로 하여, 미생물과 보존제를 혼합하여 유리 앰플에 분주한 후 -70°C에서 예비 동결 후, -50°C에서 20 mmHg이하의 진공 하에 동결건조 하였다. 동결건조한 앰플은 진공 상태에서 밀봉하여 보안 유지 하에 안전하게 보존하였다.



Figure 5-1. 국내 순수 분리 미생물 자원의 동결건조기 및 보관용 앰플.

- 활성 상태의 생균을 멸균된 20% glycerol을 보존제로 하여, 미생물과 보존제를 혼합하여 cryo vial에 분주한 후 -70°C 초저온냉동고에 동결 보존하였다.

다. 미생물 자원의 스크리닝 툴 제공

(1) 식품 산업용 유용 균주 선별을 위한 스크리닝 툴 제공

- 각 세부, 협동 기관으로부터 기탁 받은 국내 순수 분리 미생물 자원 총 2,128주를 활성 상태의 생균으로 1차년도 식품 산업용 후보 균주 선별을 위한 스크리닝 툴에 제공하였다.

2. 유용 균주에 관한 미생물 정보를 효율적으로 검색할 수 있는 홈페이지 구축

가. 홈페이지 운영 개요

(1) 홈페이지 운영 소프트웨어 구성

- 서버는 홈페이지 데이터(html, 이미지, php 파일 등)을 저장하는 컴퓨터를 말한다. 24시간 구동되어 있으며, 전 세계 어디에서든 접속할 수 있도록 인터넷 회선이 연결된 곳에 설치된 컴퓨터이다. 서버는 24시간 동작해야하기 때문에 안정성에 우선되어 설계되어있다.
- 이 서버 컴퓨터에 운영체계를 설치해야 서버가 돌아가는데 이 운영체계를 LINUX를 근간으로 하였다. Linux server는 1989년 Linus Torvalds가 Unix를 기반으로 개발한 공개용 오퍼레이팅시스템(OS)로, 인터넷을 통해 프로그램 소스 코드를 완전 무료로 공개하여 사용자가 원하는 대로 특정 기능을 추가할 수 있도록 하여 안정성과 확장성을 검증받아 현재까지 서버 구성으로 전 세계에서 가장 많이 사용되고 있으며, 클라우드 컴퓨팅의 지배적인 플랫폼으로 사용되고 있으며, 새로운 어플리케이션이나 서비스, 빅데이터 분야에 많이 사용되고 있다.

- Web server는 apache를 사용하였다. Apache Web Server는 1995년 처음 발표된 월드 와이드웹 서버용 소프트웨어로, 웹에서 홈페이지 주소를 입력하면, apache 서비스가 받아서 서버에 있는 홈페이지 데이터를 사용자에게 보내주는 역할을 한다.
- 데이터베이스 관리 시스템(DBMS)은 LINUX의 MySQL을 사용하였다. MySQL 데이터베이스 서버는 세계에서 가장 널리 사용되는 오픈소스 데이터베이스로, 빠른 성능과 쉬운 사용자 구성을 가능하게 해준다.
- 홈페이지를 구성하는 프로그래밍 언어로는 텍스트, 특히 html의 처리에 강점을 가지고 있는 PHP(Hypertext Preprocessor)를 사용하였으며, 개체 기반의 스크립트 프로그래밍 언어로는 JavaScript를 사용하였다.

(2) 홈페이지 운영 개발툴

- 홈페이지 운영을 위한 개발툴로는 사용자가 입력한 것을 처리하는 프로그램을 작성하는데 쓰이는 PHPEd를 사용하였으며, 게시판과 같은 화면을 구성할 때 사용자가 게시판에 입력하면, 데이터베이스에 기록하고, 이 내용을 화면에 리스트로 보여주는 등의 기능을 한다.
- 홈페이지의 이미지 제작, 편집 기능을 갖춘 이미지 편집 프로그램으로는 Adobe Photo shop을 사용하였으며, 이미지를 화면에 알맞게 배치하고 html로 변환하는데 사용되는 웹개발 응용 프로그램으로는 Dream weaver를 사용하였다.

나. 홈페이지 화면 설계 및 구축

(1) 홈페이지 디자인 컨셉

- 편안하고 일반적인 디자인: 홈페이지 사용자가 손쉽게 원하는 정보를 찾을 수 있도록 익숙하고 일반적인 디자인과 배치로 구성하였다. ① 가장 위쪽에 로그인과 회원가입을 배치, ② 쉽게 메뉴를 찾을 수 있도록 구성, ③ 다양한 컨텐츠와 미생물 검색을 쉽게 할 수 있도록 구성하였다.



Figure 5-2. 홈페이지 첫 화면(HOME).

- 편리한 네비게이션: 원하는 메뉴와 전체 사이트 맵을 쉽게 볼 수 있도록 마우스를 올려놓으면 전체 메뉴가 나오도록 구성하였다.



Figure 5-3. 홈페이지 메뉴 활성화 화면.

- 자료실: 서식이나 자료를 다운로드 받을 수 있도록 구성하였다.



Figure 5-4. 홈페이지 자료실 화면.

(2) 홈페이지 중요 화면 설계

- 사업(설립)목적 화면: 사업(연구) 목적을 소개할 수 있도록 화면을 구성하였다.



Figure 5-5. 홈페이지 사업(설립)목적 화면.

- 분양절차 안내 화면: 분양절차 및 방법에 대하여 안내할 수 있도록 화면을 구성하였다.



Figure 5-6. 홈페이지 분양절차 안내 화면.

- 공지사항 화면: 고객센터 내 공지사항을 게시할 수 있도록 화면을 구성하였다.



Figure 5-7. 홈페이지 공지사항 화면.

- 회원가입 화면: 분양 등의 서비스를 이용하기 위해서 회원가입 할 때 회원 정보를 입력하기 위한 화면으로 구성하였다.



Figure 5-8. 홈페이지 회원가입 화면.

(3) 홈페이지 중요 프로그램 설계

- 회원 개인정보 암호화: 회원 정보의 중요성에 기인하여 강력한 암호화 기법인 sha256, rijndael-256를 결합하여 비밀번호, 전화번호, 휴대폰 번호, 주소를 암호화하여 DB에 저장하였다.

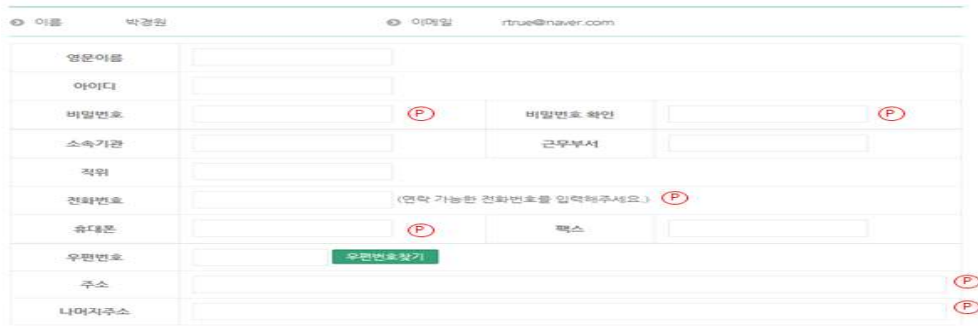


Figure 5-9. 홈페이지 회원가입 화면 중 회원 정보의 암호화 부분(Ⓟ표시).

- 사용자 모드 메뉴 구성: 사업소개, 미생물 DB 현황, 미생물 검색/분양, 미생물 기탁, 회원시스템, 고객센터(알림)를 메뉴화하여 사용자가 홈페이지에서 사업 내용을 파악하거나 미생물의 분양 신청, 기탁 신청 방법을 쉽게 안내받을 수 있도록 하였으며, 미생물의 보유 정도 및 미생물의 정보를 검색/열람할 수 있도록 하였다. 또한, 사용자에게 필요한 서식이나 자료 등을 다운로드 받을 수 있도록 고객센터를 포함하여 구성하였다.

나. 수집된 raw data의 데이터베이스화

- 유용 미생물 자원의 정보를 수집하여 excel 파일로 입력하여 raw data를 데이터베이스로 변환하였다.



Figure 5-12. 데이터베이스 내 미생물 정보 구성.

다. 웹기반 데이터베이스 구축

- 식품 산업용 유용 균주 데이터베이스의 중요 구성

한글데이터명	이름	이름	페이지	2
데이터명	TEL_MICROBE	버전	Ver 1.0	
이름	박경광	날짜	2015.8.6	
필드명	타입	길이	설명	비고
MEMBER	VARCHAR	20	미생물번호	
MNAME	VARCHAR	200	미생물명	
IGND	VARCHAR	50	구분	
CODE	VARCHAR	50	코드명	
SOURCE	VARCHAR	100	분리원	
LOCAL	VARCHAR	200	분리지역	
MRS	VARCHAR	50	배양정보	
TEMP	VARCHAR	100	배양온도	
METHOD	VARCHAR	50	보존방법	
SLIST	VARCHAR	50	영양서열	
SPEC1	TEXT		주요 균주 특성	
SPEC2	TEXT		산업적 유용 특성	
THESIS	LONGTEXT		발표논문	
PATENT	LONGTEXT		특허	
ONUMBER	VARCHAR	100	타기관번호	
STATUS	INT	2	상태	1-정상,0-BLOCK

Figure 5-13. 데이터베이스 내 미생물 정보 테이블창.

4. 산업체 등 민간에 산업화 활용 종균의 조회, 검색 서비스 제공

가. 식품 산업용 유용 미생물에 대한 홈페이지 검색 세분화

(1) 미생물 번호, 미생물, 용도 및 특성으로 미생물 검색 세분화

- 미생물에 대한 검색을 세분화하여 미생물 번호, 미생물명, 용도 및 특성으로 구분하여 화면을 별도로 구성하여 검색 예를 보여줌으로써 산업체 등 민간 사용자가 미생물을 손쉽게 검색할 수 있도록 구성하였다. ① 미생물 번호로 검색 ② 미생물명으로 검색 ③ 용도 및 특성으로 검색으로 구성하였다.



Figure 5-14. 홈페이지 미생물 검색 화면.

나. 유용 미생물에 대한 홈페이지 검색 화면 구성

(1) 미생물 정보 조회 화면

- 식품 산업용 미생물 정보를 데이터베이스화 하였으며, 산업화에 활용 가능한 미생물에 대한 정보를 홈페이지를 통해서 찾아볼 수 있으며, 검색한 미생물 정보는 한 화면에 담아 사용자가 원하는 정보를 한 눈에 쉽게 볼 수 있도록 구성하였다.

미생물 정보

미생물명	Lactobacillus parabuchneri
미생물번호	200001
구분	Bacteria
코드명	PI10001
분리원	백송김치
분리지역	서울시 서대문구 용계동 재래시장, 2007
매양정보	MRS
배양온도(°C)	37
보존방법	Freeze drying & Cryopreservation
영기시험	
주요 균주 특성	
산업적 유용 특성	
발표논문	
특이	
타기관번호	

Figure 5-15. 홈페이지 미생물 정보 조회 화면.

제 13절 웹기반 DB의 활용 방안 및 연계

1. 식품 산업용 균주의 확보 및 안전 보존

가. 식품 산업용 유용 미생물 자원의 수집 및 확보

(1) 식품 유래 토종 미생물 분리

- 산업용 유용 미생물 자원을 확보하기 위하여 국내 서울특별시, 인천광역시, 충청남도, 전라북도 지역의 가정집, 재래시장 등에서 김치, 장아찌, 장류를 수집하여 미생물을 분리하였다. 일반 세균은 nutrient agar에서 30℃, 2일 호기 배양, 효모는 chloramphenicol이 첨가된 YM agar에서 26℃, 3일 호기 배양, 유산균은 lactobacilli MRS agar에서 37℃, 3일 혐기 배양하였다.
- 배양된 미생물은 순수 분리하여 2차년도 세균 625주, 효모 28주, 유산균 545주를 수집하였다.

(2) 유용 균주 선별 스크리닝 툴 제공을 위한 1차 선별

- 국내 발효 식품에서 분리한 미생물 중에서 유용 균주 선별을 위한 스크리닝 툴 제공을 위하여 분리 균주에 대한 내산성을 확인하였고, 내담즙성을 병행 확인하였다. 내산성 생존률 70%이상을 나타내는 분리 미생물을 스크리닝 툴에 제공하였다.
- 내산성 확인을 위한 실험 방법은 다음과 같다. MRS broth에 분리 미생물을 16시간 이상 배양시킨 후 균 배양액 100 µL를 96 well plate에 2가지 조건(pH 7.0, pH 2.5)을 지닌 MRS broth 100 µL에 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. Microplate reader를 이용하여 흡광도 630 nm에서 pH 7.0 배양액과 pH 2.5 배양액의 흡광도를 비교하여 생존률을 측정하였다.
- 내산성 확인 실험에 대한 생존률을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{생존률 측정식 (\%)} = \frac{\text{OD}_{24 \text{ h, pH } 2.5}}{\text{OD}_{24 \text{ h, pH } 7.0}} \times 100$$

- 내담즙성 확인을 위한 실험 방법은 다음과 같다. MRS broth에 분리 미생물을 16시간 이상 배양시킨 후 균 배양액 100 µL를 96 well plate에 2가지 조건(MRS broth, MRS broth+0.3% oxgall)을 지닌 MRS broth 100 µL에 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. Microplate reader를 이용하여 흡광도 630 nm에서 흡광도를 비교하여 생존률을 측정하였다.
- 내담즙성 확인 실험에 대한 생존률을 측정하는 식은 다음과 같다.

$$\text{생존률 측정식 (\%)} = \frac{\text{OD}_{24 \text{ h, MRS} + 0.3\% \text{ oxgall}}}{\text{OD}_{24 \text{ h, MRS}}} \times 100$$

- 내산성, 내담즙성 확인 실험 결과(Table 5-1), 생존률 70%이상인 균주 291주를 2차년도 유용 균주 선별을 위한 스크리닝 틀에 제공하였다.

Table 5-1. 스크리닝 틀 제공을 위한 내산성, 내담즙성 1차 선별

	< 25 %	< 50 %	< 70%	≥ 70 %
내산성 확인 균주 수	8	29	68	291
내담즙성 확인 균주 수	22	28	149	197

나. 식품 산업용 유용 미생물 자원의 안전 보존

(1) 식품 산업용 미생물 자원 확보

- 각 세부, 협동 기관으로부터 국내에서 순수 분리한 미생물 자원을 기탁받아 미생물을 수집하였다. 식품 유래 분리 미생물들로, 주로 배추김치, 물김치, 열무김치, 깍두기, 백김치, 갓김치, 파김치, 총각김치, 부추김치, 고들빼기김치, 쉼박지, 오이소박이 등의 다양한 김치류로부터 분리한 미생물이며, 국내 전통 발효 식품인 장류(청국장, 간장, 된장, 고추장), 젓갈류(새우젓, 조개젓, 오징어젓, 게장 등), 절임류(동치미, 오이지), 장아찌류(깻잎장아찌), 그 외 양파와 같은 식재료, 식혜, 식초, 누룩으로부터 분리한 미생물을 수집하여 2차년도에 총 2,020주를 확보하였다.

(2) 식품 산업용 미생물 자원의 안전 보존

- 2차년도에 각 세부, 협동 기관으로부터 기탁받아 수집한 국내 순수 분리 미생물 자원 2,020주를 장기적으로 안전하게 보존하기 위하여 동결건조 앰플 보존과 초저온냉동고 동결 보존 방법으로 이중으로 보존하였다.
- 동결건조 앰플 보존 방법은 다음과 같다. 미생물 자원은 각 미생물에 맞는 고체 증균 배지에 배양하여 활성이 높은 상태로 만들었다. 유산균은 MRS agar에서 37℃, 2~3일 배양, 일반 세균은 nutrient agar나 tryptic soy agar에서 30℃, 2일 배양, 효모는 YM agar에서 26℃, 2~3일 배양하였다. 동결건조보존제로 멸균된 10% skim milk를 사용하였으며, 미생물과 보존제를 현탁하여 멸균된 유리 앰플에 분주 후 면전으로 앰플을 막은 후 -70℃에 예비 동결하였다. -50℃에서 20 mmHg 이하의 진공 하에 15~24시간 동결건조하였고, 동결건조한 앰플은 진공 상태에서 화염 밀봉하였다. 제작된 동결건조 앰플은 보안 유지 하에 부여된 번호 순서대로 앰플 장에 안전하게 보존하였다.



Figure 5-16. 식품 산업용 미생물 자원 동결건조 과정(좌: 동결건조기, 우: 앰플 성형틀).

- 초저온냉동고 동결 보존 방법은 다음과 같다. 동결건조 앰플 보존 방법과 같이 미생물 자원은 고체 증균 배지에 배양하고, 동결보존제로 멸균된 20% glycerol(v/v)을 사용하였다. 미생물과 보존제를 현탁하여 멸균된 cryo vial에 분주한 후 부여된 번호 순서대로 cryo vial box에 넣어 -70°C 초저온냉동고에 이중으로 보존하였다.



Figure 5-17. 식품 산업용 균주의 안전 보존(좌: 동결건조 앰플, 우: 초저온냉동고 동결 보존).

2. 웹기반 DB의 관리자 페이지 구축

가. 웹기반 DB 관리자 페이지 운영 개요

(1) 웹기반 DB 구축 체계

- 유용 미생물 데이터베이스를 구축하기 위하여 미생물의 정보를 저장하기 위한 웹서버를 만들고, 사용자가 접근하여 서비스를 이용할 수 있는 사용자 모드의 웹사이트인 식품산업미생물은행 홈페이지를 구축하였고, 관리자가 접근하여 미생물의 정보 관리, 회원 관리 등의 서비스를 관리할 수 있는 관리자 페이지를 구성하였다.



Figure 5-18. 웹기반 DB 구성(홈페이지, 관리자 페이지 메뉴 구성).

- 사용자 모드 홈페이지 메뉴 구성: 사업소개, 미생물 DB 현황, 미생물 검색/분양, 미생물 기탁, 회원시스템, 고객센터(알림)를 메뉴화하여 사용자가 홈페이지에서 미생물의 정보를 검색/열람할 수 있으며, 미생물의 분양 신청 및 기탁 신청 방법 등을 안내받을 수 있도록 하였다. 사용자에게 필요한 서식이나 자료 등을 자료실에서 다운로드 받을 수 있으며, 관련 기관 사이트를 링크하여 타기관 미생물 정보를 검색할 수 있도록 구성하였다.
- 관리자 모드 관리자 페이지 메뉴 구성: 홈페이지에 게재될 공지사항, 팝업창, 자료실 등을 관리할 수 있으며, 회원관리, 미생물 정보 관리를 할 수 있도록 하였다. 미생물의 등록, 정보 입력, 추가, 수정, 삭제, 검색 등의 기능을 포함하여 구성하였다.

(2) 식품산업미생물은행 홈페이지 개선

- 식품산업미생물은행 홈페이지 도메인 결정: 1차년도 구축한 유용 균주에 대한 안전성, 발효특성, 기능 자료 홈페이지인 식품산업미생물은행 사용자 모드 홈페이지의 도메인을 Korea Food Industry Microorganisms Center의 약자로 한 kfimc로 하여 <http://kfimc.net>으로 정하였다.



Figure 5-19. 식품산업미생물은행 홈페이지 첫 화면.

(3) 관리자 페이지 소프트웨어 구성

- 서버는 다양한 형태의 데이터를 전체적으로 저장 및 관리하는 컴퓨터이다. 일반 컴퓨터와는 다르게 장시간 구동 시에도 기계적인 무리가 없어 상시 가동되어야 하는 서비스에 알맞으며, 대용량의 데이터를 빠르게 처리할 수 있어 빅데이터의 관리에도 알맞다. 서버를 효과적으로 운용하기 위해서는 이에 알맞은 운영체제가 필요한데, 크게 Windows 기반의 서버 운영체제와 Linux 기반의 운영체제가 있다. Linux는 오픈베이스 운영체제로서 운영용도에 맞게 설정이 용이하며, 유연성이 우수하며, 강력한 보안체계를 가지고 있어 외부요인에 의한 데이터베이스의 손실을 방지하기에 매우 강력한 운영체제이다. 또한 직관적인 명령어 체계를 가지고 있어 숙련된 운영자가 다루기에 강력한 tool이 된다. Linux는 오픈베이스 운영체제인 만큼 우분투, 레드햇 등 다양한 버전이 존재하며 버전마다 고유의 장점들이 있어, 사용 용도에 맞게 선택할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 여러 이유를 바탕으로 Linux system을 근간하여 서버를 구성하였다.

- 웹서버는 apache를 사용하였다. 웹서버 역시 상기의 운영체제와 마찬가지로 여러 tool 이 존재하나 여러 기관에서 오랫동안 사용되어 그 기능과 안정성이 입증된 Apache를 선택하였다. Apache는 현재까지 꾸준히 패치파일을 개선해 제공하고 있으며, 개선시마다 최고 수준의 성능을 발휘하기 때문에 월드와이드웹 서버용 소프트웨어로 가장 많이 사용되고 있다. 오픈소스 라이선스에 따라 무료로 배포되어 원하는 사람들이 자유롭게 사용할 수 있으며, Linux 또는 윈도우 등을 비롯해 거의 모든 운영체제와 시스템에서 운용이 가능하다.
- 대규모의 데이터베이스를 효과적으로 관리하기 위하여 DBM system은 Linux의 MySQL을 선택하였다. MySQL은 개방 소스의 관계형 데이터베이스 관리 시스템으로 매우 빠르고, 유연성이 높으며, 사용하기 쉬운 특징이 있다. 다중 사용자, 다중 스레드를 지원하고 많은 프로그래밍언어를 위한 응용프로그램 인터페이스(API)를 제공하고 있다. 다양한 운영체제에서 사용할 수 있으나 Linux와 호환성이 매우 높다.
- 관리자 페이지를 효과적으로 구축하기 위하여 홈페이지 구성 프로그래밍 언어는 PHP (Hypertext Preprocessor)를 사용하였다. PHP는 하이퍼텍스트 생성 언어(HTML)에 포함되어 동작하는 스크립팅 언어로서 별도의 실행 파일을 만들 필요 없이 HTML 문서 안에 직접 포함시켜 사용가능하다는 장점이 있다. 또한 C언어, 자바, 펄 언어 등에서 많은 문장 형식을 준용하고 있어 동적인 웹문서를 빠르게 쉽게 작성할 수 있다. 또한 PHP 이외 개체 기반의 스크립트 프로그래밍 언어는 수년간 널리 사용되어 온 Javascript를 사용하여 호환성 등의 안정성을 증가시켰다.

(4) 관리자 페이지 운영 개발 툴

- 관리자 페이지 작성 및 관리를 위한 운영 개발 툴로는 상기의 PHP를 기반으로 하는 PHPED를 사용하였다. PHPED는 서버와 클라이언트 간의 상호작용을 수월하게 하며 이러한 장점을 바탕으로 양방향 개체 등의 구축에 용이하다. 이를 이용한 게시판의 경우 관리자가 글을 작성할 수 있는 에디터 툴을 제공하고, 이로부터 입력된 내용을 체계화하여 서버 데이터베이스에 저장하며, 이를 형식화하여 실제 사용자가 확인할 수 있도록 리스트 도식화를 하게 해주는 일련의 작업을 쉽게 구현할 수 있다.
- 관리자 페이지의 구축에 이용되는 대부분의 이미지는 널리 사용되고 있는 Adobe사의 photoshop을 이용하고 있으며, Dream weaver 프로그램을 사용하여 이미지, 각종 메뉴 등의 배치를 html로 원활하게 전환시켰다.

나. 관리자 페이지 화면 설계 및 구축

(1) 관리자 페이지 디자인 컨셉

- 사용하기 쉬운 디자인: 웹사이트 관리자가 사용하기 쉽도록 콘텐츠를 배치하고, 일반적으로 많이 쓰는 디자인을 사용하여 관리자가 쉽게 적응하도록 구성하였다. ① 가장 위쪽에 로그아웃, 홈 연결을 배치, ② 손쉽게 메뉴를 찾을 수 있도록 구성, ③ 관리자의 콘텐츠 영역을 오른쪽 영역으로 구성하여 쉽게 접근 가능하도록 배치하였다.



Figure 5-20. 관리자 페이지 메인 화면(미생물 정보관리 창).

- 편리한 네비게이션: 전체 메뉴를 모든 페이지의 왼쪽에 항상 배치하여 원하는 메뉴에 바로 접근 가능하도록 구성하였다.

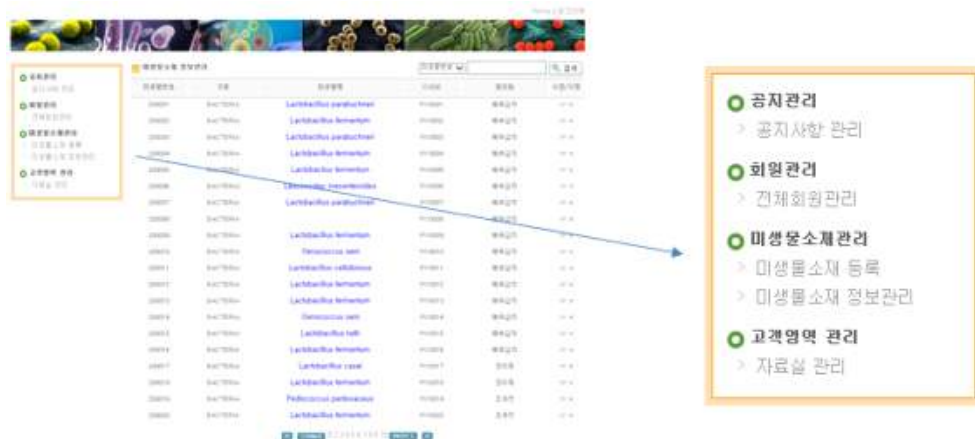


Figure 5-21. 관리자 페이지 메뉴 화면.

(2) 관리자 페이지 중요 프로그램 설계

- 관리자 페이지 화면 보안을 위해 외부에서 노출이 안된 별도 URL 사용: 사용자 모드의 홈페이지에 노출이 전혀 없는 URL을 사용하여 외부에서는 관리자 페이지 여부를 확인할 수 없도록 하였다.



Figure 5-22. 관리자 페이지 로그인 화면.

- 관리자 로그인/비밀번호 암호화: 관리자 로그인 암호의 중요성에 기인하여 강력한 암호화 기법인 sha256, rijndael-256를 결합하여 암호화하였다.
- 회원 관리 및 회원 내역 관리: 홈페이지에서 회원 가입한 회원들의 정보를 관리할 수 있도록 구성하였다. 회원 관리창에서는 가입된 회원 리스트를 열람할 수 있으며, 회원의 이름, 아이디, 소속기관으로 관리자가 검색할 수 있도록 하였고, 회원 개인의 내역을 수정, 삭제할 수 있도록 하였다.

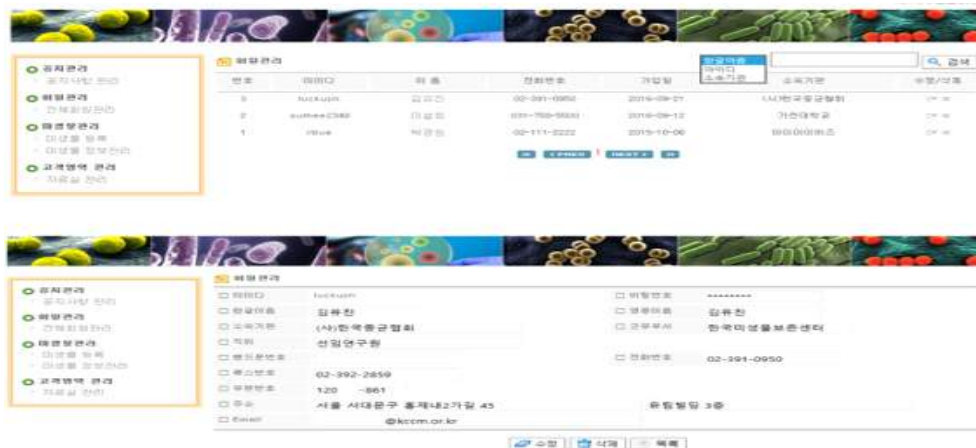


Figure 5-23. 회원 관리 및 회원 내역 관리 화면.

- 미생물 정보관리: 미생물 정보를 상시 등록/관리 할 수 있도록 구성하였다. ① 미생물 번호/미생물명/코드/분리원으로 검색 지원, ② 등록된 미생물에 대해서 수정 및 삭제 기능 지원, ③ 등록된 미생물에 대한 자세한 내역 보기 기능이 지원되도록 하였다.

등록번호	군명	학명	분리원	생물분류	수정/삭제
000021	BACTERIA	Lactobacillus parabuchneri		F110021	생물분류
000022	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110022	생물분류
000023	BACTERIA	Lactobacillus parabuchneri		F110023	생물분류
000024	BACTERIA	Lactobacillus maltonii		F110024	생물분류
000025	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110025	생물분류
000026	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110026	생물분류
000027	BACTERIA	Lactobacillus acidophilus		F110027	생물분류
000028	BACTERIA	Lactobacillus kefir		F110028	생물분류
000029	BACTERIA	Lactobacillus maltonii		F110029	생물분류
000030	BACTERIA	Demococcus oeni		F110030	생물분류
000031	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110031	생물분류
000032	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110032	생물분류
000033	BACTERIA	Demococcus oeni		F110033	생물분류
000034	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110034	생물분류
000035	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110035	생물분류
000036	BACTERIA	Lactobacillus parabuchneri		F110036	생물분류
000037	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110037	생물분류
000038	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110038	생물분류
000039	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110039	생물분류
000040	BACTERIA	Lactobacillus fermentum		F110040	생물분류

Figure 5-24. 관리자 페이지 미생물 정보관리 화면.

- 미생물 등록: 미생물 정보를 상시 등록할 수 있도록 구성하였다. 신규 수집한 미생물을 등록하고 그 미생물의 정보를 입력할 수 있도록 하였다.
- 균주의 생화학적 특성 및 기초 생리활성 연구결과에 대한 통계 처리 및 평가범위표 확보
 - ✓ 1차 미생물 등록 화면: 데이터베이스 내 미생물 정보 구성에 따라 미생물 분류, 분리원 정보, 배양 및 보존 정보, 특성 정보를 입력할 수 있도록 하였다.
 - ✓ 2차 미생물 등록 화면: 배지조성 및 염기서열 입력창을 짧은 텍스트 입력에서 1,500자 이상의 긴 텍스트 입력창으로 입력 방식 변경함. 주요 균주 특성을 기존의 일차원적인 글자 나열 방식에서 균주 특성을 한눈에 볼 수 있도록 표로 구성하여 데이터 배열 방식을 변경하였다.

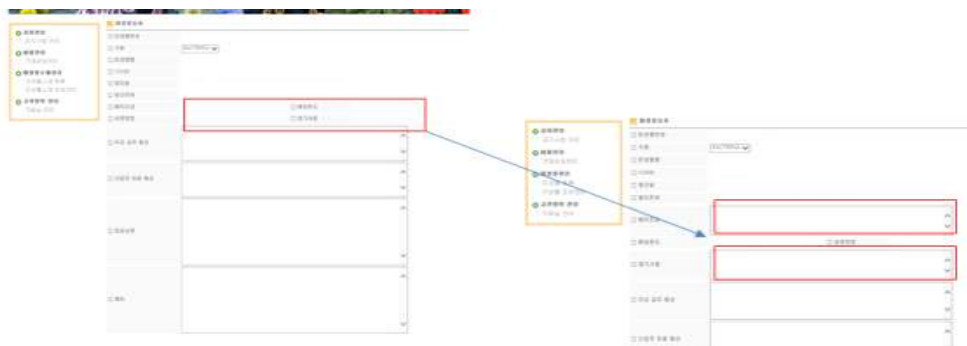


Figure 5-25. 관리자 페이지 미생물 등록 화면(배지조성, 염기서열 입력 방식 변경).

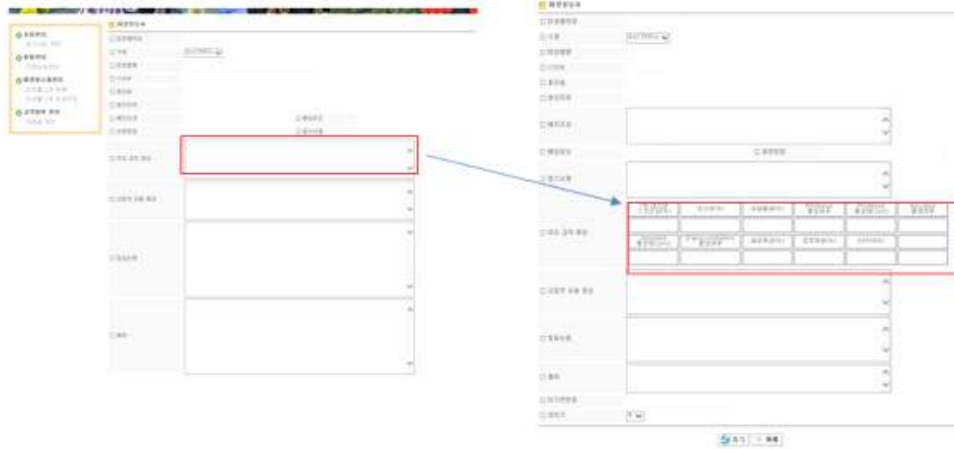


Figure 5-26. 관리자 페이지 미생물 등록 화면(주요 균주 특성 배열 방식 변경).

- 주요 균주 특성 배열 방식 변경: 내산성, 내담즙성, protease, amylase, β -glucuronidase, 세포독성, 장부착능, DPPH 분석 결과를 표 형태로 구성하여 excel 파일로 입력하였다. raw data를 데이터베이스로 변환하여 표 형태의 표현 방식으로 변경하였고, 사용자 모드의 홈페이지에서도 미생물 정보 조회 시에 표 형태로 표현되도록 구현하였다.

구분	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	균주명	1차 내산성	2차 내산성	내산성(%)	내담즙성(%)	Protease 활성(μg)	Amylase 활성(μg)	Amylase 활성(μg)	β-glucuronidase 활성(μg)	세포독성(%)	장부착능(%)	DPPH(%)
2	200001			20.87								
3	200002			15.55								
4	200003			36.29								
5	200004			17.83								
6	200005			53.09								
7	200006			34.14								
8	200007			16.25								
9	200008			24.05								
10	200009			45.80								
11	200010			14.99								
12	200011			94.72	0.00							
13	200012			39.95								
14	200013			92.25								
15	200014			26.24								
16	200015			35.13								
17	200016			72.90	83.81	96.67						
18	200017			57.87								
19	200018			82.26	57.84	97.84						
20	200019			95.25	90.57	111.35						
21	200020			7.30						0.00	1.41	0.09
22	200021			0.00								
23	200022			0.00								
24	200023			0.00								
25	200024			37.46								
26	200025			22.06								
27	200026			13.50								
28	200027			0.00								
29	200028			22.80								
30	200029			14.56								
31	200030			25.71								
32	200031			36.49								

Figure 5-27. 주요 균주 특성 excel 파일 입력창.

미생물 정보

미생물명	Lactobacillus fermentum																								
미생물번호	200018																								
구분	BACTERIA																								
과/과명	FIT0018																								
분리원	강아지																								
분리장기	축적용-강아지상																								
배양조건	MRS																								
배양온도(℃)	37																								
보존방법	Freeze drying & Cryopreservation																								
별기사항																									
주요 균주 특성	<table border="1"> <tr><td>1차 1중산성 스코리닝(%)</td><td>1중산성(%)</td><td>1중산성(%)</td><td>Protease 활성여부</td><td>Protease 활성영(Unit)</td><td>Amylase 활성여부</td></tr> <tr><td>82.26</td><td>57.94</td><td>97.64</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Amylase 활성영(Unit)</td><td>Polysaccharidase 활성여부</td><td>세정제(%)</td><td>장부(%)</td><td>DPPH(%)</td><td></td></tr> <tr><td></td><td>-</td><td>0.00</td><td>1.41</td><td>8.09</td><td></td></tr> </table>	1차 1중산성 스코리닝(%)	1중산성(%)	1중산성(%)	Protease 활성여부	Protease 활성영(Unit)	Amylase 활성여부	82.26	57.94	97.64				Amylase 활성영(Unit)	Polysaccharidase 활성여부	세정제(%)	장부(%)	DPPH(%)			-	0.00	1.41	8.09	
1차 1중산성 스코리닝(%)	1중산성(%)	1중산성(%)	Protease 활성여부	Protease 활성영(Unit)	Amylase 활성여부																				
82.26	57.94	97.64																							
Amylase 활성영(Unit)	Polysaccharidase 활성여부	세정제(%)	장부(%)	DPPH(%)																					
	-	0.00	1.41	8.09																					
산염기 균형 특성																									
발효능																									
특이																									
대기번호																									

Figure 5-28. 홈페이지 미생물 정보 조회 화면(변경 후).

- 고객영역 관리: 사용자가 필요한 서식이나 자료를 다운로드받아 사용할 수 있도록 자료실을 구성하여 파일을 첨부할 수 있도록 하였다. 자료실 내 파일을 추가 등록 및 삭제 할 수 있으며, 등록된 자료 중에서 제목, 내용으로 관리자가 쉽게 검색할 수 있도록 구성하였다.



Figure 5-29. 관리자 페이지 자료실 관리 화면.

3. 웹기반 DB 인덱싱을 통한 사용자 편의 강화 검색 기반 구축

가. 식품 산업용 유용 미생물에 대한 DB 검색 기능

(1) 인덱싱을 통한 단어 별 검색 지원

- 단어 별 검색은 모든 검색엔진에서 지원하고 있는 형태로 현재 가장 널리 사용되는 검색 방식이다. 단어 별 검색을 이용하면 빠른 시간 내에 정보 검색을 할 수 있는 것이 가장 큰 장점이며, 초보자들도 쉽게 이용할 수 있다. 단어 별 검색은 사용자가 찾고자 하는 정보의 단어를 입력하여 검색엔진이 그 단어에 대하여 만족하는 검색 내용을 보여주는 형식으로, 사용자가 찾고자 하는 정보에 대한 키워드만 알면 쉽게 찾을 수 있다.
- 인덱싱은 빠른 탐색을 위하여 연관 데이터를 작성해두는 기법으로, 웹기반 DB 데이터를 인덱싱 처리하여 단어 별 검색 엔진을 구동하여 빠른 검색이 가능하도록 하였다. 웹기반 DB에서 미생물번호, 미생물명, 분리원, 특성에 대해서 인덱싱을 자체 처리하였다. 사용자가 찾고자 하는 단어를 입력하면 검색 엔진 프로그램은 사용자의 검색 키워드를 가지고 DB에 검색 조건을 넘기도록 되어 있고, DB에서는 인덱싱된 데이터를 중심으로 해당되는 키워드를 비교 검색하여 출력하는 방식으로 기능을 한다.
- 웹기반 DB 사용자 모드 홈페이지에서 지원하는 미생물 검색은 미생물 번호, 미생물명, 용도 및 특성 검색으로 구성되어 있다. 미생물명 검색의 경우에는 미생물의 학명(Scientific name) 중에서 속(Genus)명 또는 종(species)명 만 입력하여 검색해도 그 단어를 포함하는 모든 미생물의 목록이 조회되도록 하였으며, 용도 및 특성 검색의 경우에는 미생물의 특성과 관련된 키워드를 입력하면 해당 키워드가 포함된 모든 미생물의 목록이 조회 가능하도록 설계하였다.

4. 타 연구기관의 균주 활용을 위한 DB의 연동화 구축

가. 식품 유관기관의 DB 연계 방안 모색

(1) 식품 유관기관 미생물 검색 웹사이트 링크

- 식품산업미생물은행 홈페이지에 식품 유관기관 미생물 검색 사이트를 연결하여 타 연구기관의 균주를 함께 검색하고, 균주 정보를 열람할 수 있도록 하였다. 홈페이지 우측에 배너를 추가하여 배너를 클릭하면 해당기관의 미생물 검색 웹사이트로 연결되도록 하였다.

- 한국미생물보존센터 미생물 검색 사이트(<http://www.kccm.or.kr>), 한국식품연구원 발효식품 미생물 검색 사이트(<http://www.kfri.net>), 식품의약품안전처 식품안전정보포털 사이트(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/main.html>)를 해당 기관의 로고를 사용하여 홈페이지 우측에 배너를 추가하고, 해당 사이트를 홈페이지에 연결하였다. 사용자가 식품산업미생물은행 홈페이지에서 미생물을 검색하는 동시에 필요시에 언제든지 타 기관의 미생물을 검색할 수 있도록 모든 화면의 우측에 배너를 추가하여 연결될 수 있도록 하였다.



Figure 5-30. 식품산업미생물은행 홈페이지 미생물 검색 화면(우측 배너).

- 한국미생물보존센터 홈페이지와 한국식품연구원 발효식품 미생물 홈페이지에도 식품산업미생물은행 홈페이지를 링크하여 식품 산업용 유용 균주 검색을 연계하여 할 수 있도록 설계하였다.



Figure 5-31. 한국미생물보존센터 홈페이지 화면(우측 배너).



Figure 5-32. 한국식품연구원 발효식품 미생물 검색 홈페이지 화면(우측 배너).



Figure 5-33. 식품의약품안전처 식품안전정보포털 식품원료목록 검색 화면.

제 14절 유용 균주 보존, 관리 시스템 구축

1. 유용 균주의 특성에 따라서 동결건조, L-drying, 초저온 보존법 등의 보존 방법을 통하여 안정적인 균주 보존

가. 식품 산업용 유용 균주의 수집 및 확보

(1) 식품 유래 토종 균주의 분리

- 식품 산업용 유용 균주를 수집하기 위하여 국내 가정집, 재래시장 등에서 김치류와 장류를 수집하여 미생물을 분리하였다. 시료로 사용된 김치류에는 배추김치, 사과김치, 무김치, 열무김치, 갓김치, 고들빼기 김치, 고춧잎 김치, 겉절이, 동치미, 무생채, 오이소박이 등이 있으며, 장류에는 재래식 된장, 표고 된장, 청국장, 저염 청국장 등이 있다.
- 미생물은 순수 분리하여 일반 세균 218주, 효모 10주, 유산균 1,711주를 분리하였다. 식품 유래 토종 균주는 3년 연구 기간 동안 일반 세균 855주, 효모 100주, 유산균 2,333주를 신규로 분리하여 총 3,288주를 수집하였다.

(2) 유용 균주 선별 스크리닝 툴 제공

- 국내 가정집 및 재래시장 등에서 수집한 발효 식품에서 분리한 유용 균주 중에서 선별 스크리닝 툴 제공을 위하여 분리 균주에 대한 내산성, 내담즙성을 확인하였다. 내산성 생존률 70%이상인 181주를 스크리닝 툴에 제공하였다. 내산성 생존률 70%이상인 균주는 2차년도 제공한 291주를 포함하여 총 472주를 제공하였고, 1차년도에 제공한 2,128주를 포함하여 3년 연구 기간 동안 총 2,600주를 유용 균주 선별 스크리닝 툴에 제공하였다.

(3) 식품 산업용 유용 균주의 보유 현황

- 1차년도 2,128주, 2차년도 2,020주, 3차년도 1,939주를 확보하여 총 6,087주(세균 5,888주, 효모 199주)를 보존하였다.



Figure 5-34. 식품 산업용 유용 균주 보존.

- 주관 기관 및 협동 기관으로부터 국내에서 순수 분리한 토종 미생물 자원을 기탁받았으며, 건국대학교 477주, 한국식품연구원 745주, 단국대학교 69주, 가천대학교 454주, (사)한국중균협회 4,342주 제공한 것을 보유하고 있다. 본 연구 사업으로 총 6,087주를 확보하였다.

Table 5-2. 식품 산업용 유용 균주 확보 균주수

	확보 균주수
건국대학교	477
한국식품연구원	745
단국대학교	69
가천대학교	454
(사)한국중균협회	4,342
총 계	6,087

나. 유용 균주의 특성에 따른 보존 방법 및 유용 균주의 안정적 보존

(1) 유용 균주 보존의 목적

- 균주 보존은 균주의 사멸 방지, 본래 형질 유지, 보존 기간의 연장, 균주의 반복 재생, 오염 방지, 조작의 용이 등의 목적이 있다.
- 식품 산업용 균주를 확보하여 오염을 방지하고, 장기간 반복 재생하여 사용할 수 있도록 분리된 균주의 안정적 보존이 중요하다. 균주가 갖는 유용한 형질을 그대로 유지하며, 동시에 생존력을 장기간 유지할 수 있어야 하며, 산업체와 같은 민간 사업장에 분양하기 위해서 이동 및 사용이 용이한 형태로 보존되어야 한다.

(2) 유용 균주 보존 방법

- 유용 균주를 보존하기 위한 방법 중에서 초저온냉동고 동결 보존법은 동해 방지제(동결보존제)를 첨가하여 $-70\sim 80^{\circ}\text{C}$ 에 보존하는 방법으로, 보존제로는 보통 5~20% glycerol, 2.5~10% DMSO 등을 사용한다.
- 동결건조 앰플 보존법은 동해 방지제(보존제)를 첨가하여 동결건조 후 밀봉하는 방법으로, 보존제로는 10% skim milk, soluble starch, arabic gum, gelatin, polysaccharide 등이 사용된다. 동결건조 조건은 온도 -50°C , 압력 30 mm Torr. 이하이며, 미생물보존기관에서 주로 사용하는 일반적인 보존 방법이다.
- 동결건조 앰플 제작 과정은 미생물 배양, 동결건조 보존제 분주, 균주 현탁, 멸균 앰플 준비, 현탁된 균주 앰플 분주, 예비 동결, 동결건조, 앰플 성형, 진공 및 밀봉의 순으로 이루어진다.



Figure 5-35. 동결건조 앰플 제작 과정.

- L-drying 앰플 보존법은 예비 동결에 의한 초기 동결 장애 미생물에 이용 가능하며, 동결과정 없이 liquid 상태에서 바로 건조하는 방법이다.
- L-drying 앰플 제작 과정은 미생물 배양, L-drying medium 분주, 균주 현탁, 멸균 앰플 준비, 현탁된 균체 앰플 분주, 진공 건조, 앰플 성형, 진공 및 밀봉의 순으로 이루어진다.

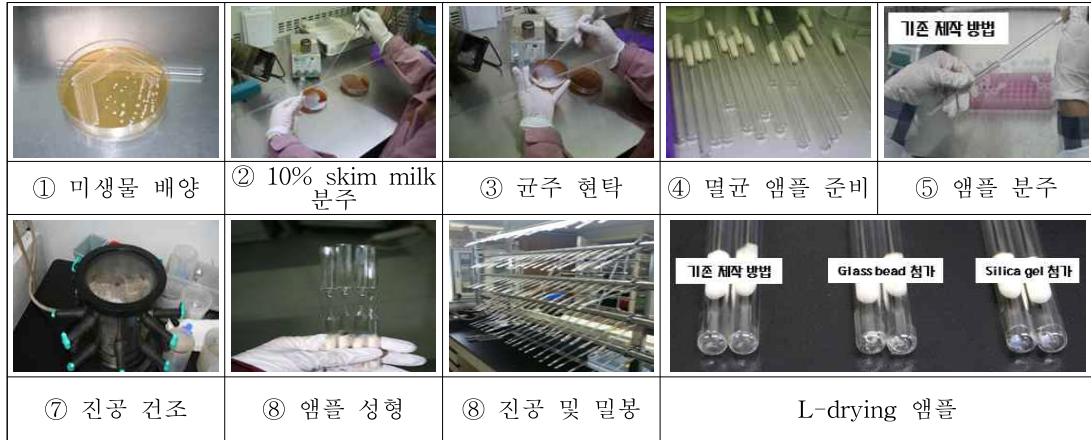


Figure 5-36. L-drying 앰플 제작 과정.

(3) 유용 균주의 보존 방법에 따른 생존력 확인 실험

- 유용 균주의 보존 방법에 따른 생존력을 확인하기 위하여 실험균주 KCCM 32820 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820, *Lactobacillus delbrueckii* KCCM 35463, *Lactobacillus plantarum* KCCM 200440를 대상으로 동결건조법, L-drying법, glass bead 첨가 L-drying법, silicagel 첨가 L-drying법으로 동일 균주에 대하여 4가지 방법으로 앰플을 제작한 후 앰플을 깨서 생균수를 측정하여 보존 방법에 따른 생존력을 비교하였다.
- L-drying법은 보존제만 첨가하여 진공 건조하였고, 같은 L-drying법에 glass bead와 silicagel을 첨가한 실험균을 추가하여 bead를 이용한 균주 현탁액의 부착 면적 증가 효과를 확인하였다.
- *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820는 *Lactobacillus acidophilus* 종의 type strain으로, 10% skim milk를 보존제로 하여 동결건조 하였을 때 생존력이 좋지 않아 L-drying법으로 앰플을 제작하고 있는 균종이다. 보존 방법을 달리하여 생존력을 확인한 결과, glass bead를 첨가하여 L-drying법으로 앰플을 제작하였을 때 생존력이 가장 높았다.

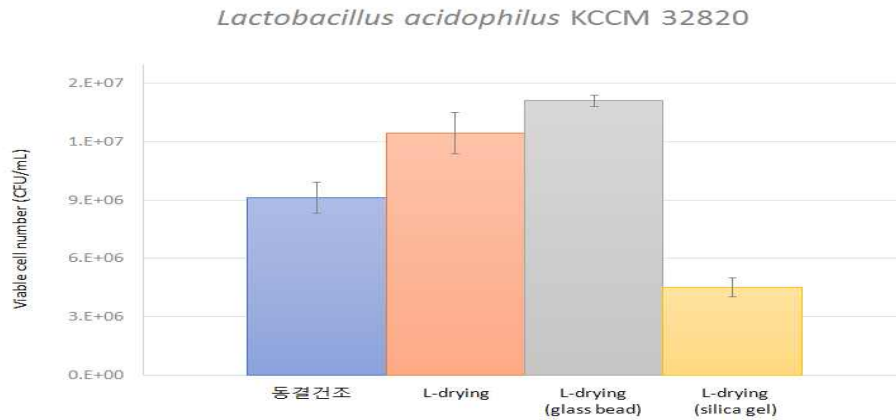


Figure 5-37. *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 보존 방법에 따른 생존력.

- *Lactobacillus delbrueckii* KCCM 35463는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 종의 type strain으로, 배양과 복원이 쉽지 않아 L-drying법으로 앰플을 제작하고 있는 균종이다. 보존 방법을 달리하여 생존력을 확인한 결과, 보존 방법에 따른 큰 영향은 없는 것으로 확인되었다.

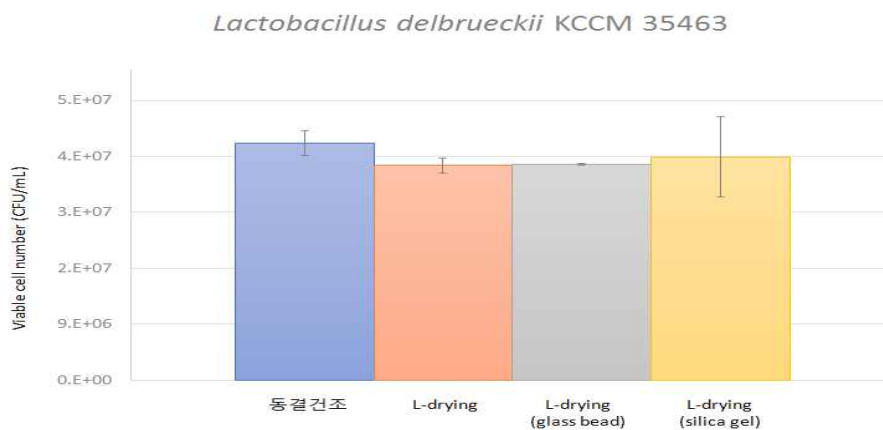


Figure 5-38. *Lactobacillus delbrueckii* KCCM 35463 보존 방법에 따른 생존력.

- *Lactobacillus plantarum* KCCM 200440은 유용 균주로 선발된 균주로, *Lactobacillus plantarum* 종은 다른 종에 비하여 배양 및 보존이 용이한 균종이다. 보존 방법을 달리하여 생존력을 확인한 결과, 동결건조법으로 제작한 앰플의 생존력이 가장 우수하였고, L-drying법으로 제작한 앰플도 생존력이 모두 10^7 CFU/mL 이상을 나타내었다.

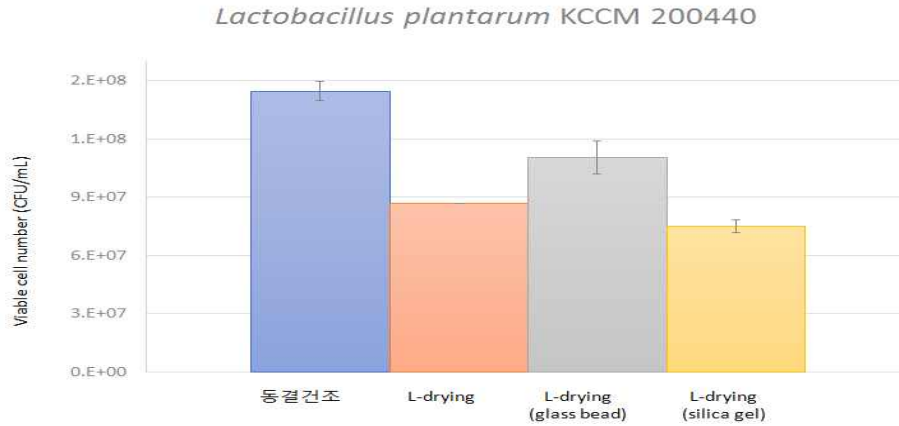


Figure 5-39. *Lactobacillus plantarum* KCCM 200440 보존 방법에 따른 생존력.

- 균주에 따른 보존 방법을 달리하여 생존력을 비교한 결과, 균종에 따라서 보존 방법에 따른 생존력에 차이가 생길 수 있으며, 이에 따라 균주의 종류와 특성을 고려하여 보존 방법을 선택해야함을 확인하였다.
- 현재 균주의 안정적인 보존을 위한 보존 방법은 동결건조법, L-drying법을 기본으로 하여 확립한 상태이며, 식품 산업용 유용 균주는 초저온냉동보존법과 동결건조법을 기본으로 보존하고 있다. 동결건조법으로 제작한 앰플을 생존시험하여 생존 상태가 양호하지 않을 경우에는 L-drying법으로 앰플을 제작하여 보존하고 있으며, 균주의 배양 속도가 느리거나 colony 크기가 작은 균주의 경우에는 L-drying법으로 보존하고 있다.

2. 균주의 장기 보존 및 분양을 위한 분양시스템 구축

가. 식품 산업용 유용 균주 분양 개요

(1) 식품 산업용 유용 균주 분양 절차

- 사용자가 홈페이지에서 미생물을 검색하고, 필요로 하는 미생물을 신청하기 위하여 홈페이지에서 온라인으로 신청하거나, 분양신청서를 작성하여 팩스나 이메일로 오프라인 분양 신청을 할 수 있다.
- 분양 신청이 접수되면 관리자가 분양 적절성, 분양 형태, 재고 등을 파악하여 분양 비용을 청구한다. 분양 비용이 납부되면, 사용자에게 미생물을 우편으로 발송한다. 경우에 따라서는 사용자가 직접 수령할 수 있다.

- 분양 후 사용자가 균주에 의문이 있을 때는 균주 이의 신청을 할 수 있고, 이의 신청이 접수되면 이의 신청 사유에 따라 실험 또는 배양 확인 등을 수행하여 재분양 또는 분석 결과 등을 통보한다. 분양 후 연구 및 실험을 통하여 얻게 된 미생물 활용/연구 결과는 데이터 파일 형태로 관리자에게 보고한다.



Figure 5-40. 식품 산업용 미생물 분양 절차.

(2) 분양 신청 방법

- 온라인 신청: 식품산업미생물은행 홈페이지 회원 가입 > 홈페이지 로그인 > 미생물 검색 > 미생물 신청 > 신청 내역 확인 > 분양신청
- 오프라인 신청: 식품산업미생물은행 홈페이지 > 고객센터 > 자료실 > 분양신청서 양식 다운로드 > 분양신청서 작성 > Fax 또는 E-mail 신청

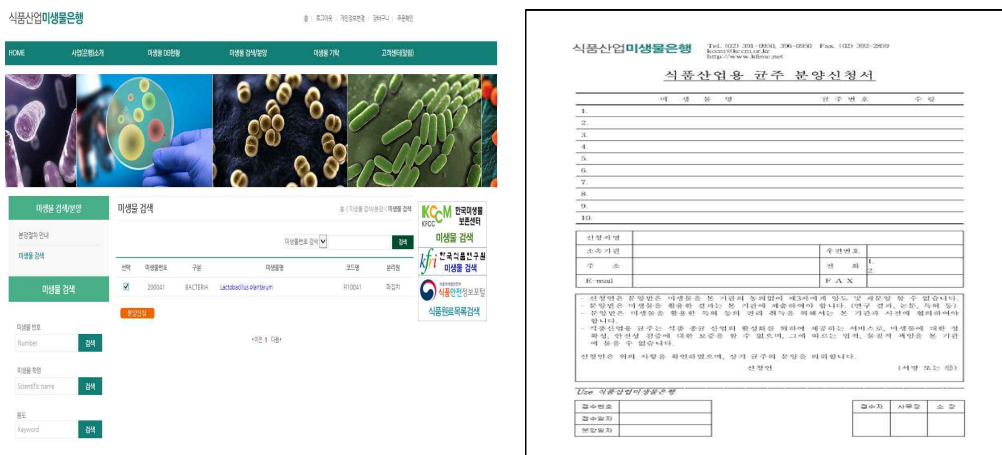


Figure 5-41. 분양 신청 방법(좌: 온라인 분양 신청 화면, 우: 오프라인 분양신청서 양식).

(3) 분양 형태

- 미생물 분양은 기본적으로 동결건조 된 앰플 형태로 발송한다. 신청자의 요청에 따라 활성화된 생균의 형태로도 분양 가능하며, 생균 분양시에는 배양 수수료 20%가 추가 청구된다.
- 앰플 제작이 어려운 균주의 경우는 glycerol stock vial 형태로 분양하거나 활성화 하여 생균 형태로 분양할 수 있다. 신청자의 별도 요청에 의한 경우가 아니고, 불가피하게 배양하여 분양되는 경우에는 배양 수수료가 추가되지 않는다.

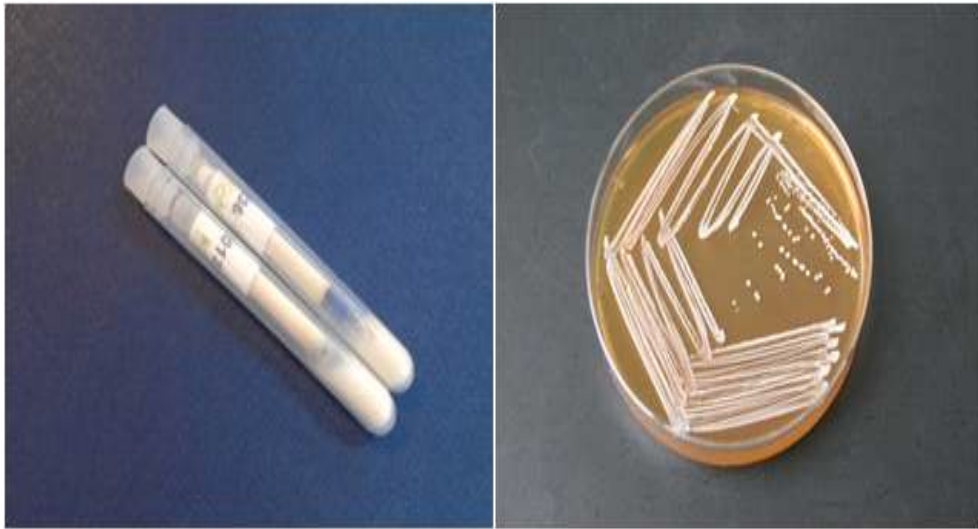


Figure 5-42. 식품 산업용 균주 분양 형태(좌: 앰플, 우: 생균).

나. 분양 시스템을 위한 화면 설계 및 구축

(1) 분양 시스템을 위한 사용자 홈페이지 기능

- 미생물 선택 및 분양 신청: 홈페이지의 한 페이지 내에서 사용자가 미생물을 빠르게 검색하고, 필요로 하는 미생물을 바로 선택하여 분양 신청하거나 한꺼번에 모두 신청할 수 있도록 구성하였다. ① 미생물 검색(번호, 학명, keyword)을 위한 검색바, ② 체크 박스를 구성하여 신청하고자 하는 미생물을 각각 클릭하여 필요로 하는 미생물을 선택 가능, ③ 선택한 상태에서 분양 신청 버튼을 통해 일괄 신청이 가능하도록 하였으며, 클릭하면 신청 다음 단계로 이동하도록 배치하였다.

미생물 검색

홈 > 미생물 검색/분양 > 미생물 검색

미생물번호 검색 1

선택	미생물번호	구분	미생물명	코드명	분리원
<input checked="" type="checkbox"/> 2	200010	BACTERIA	Oenococcus oeni	FI10010	배추김치
<input type="checkbox"/>	200011	BACTERIA	Lactobacillus cellobiosus	FI10011	배추김치
<input type="checkbox"/>	200012	BACTERIA	Lactobacillus fermentum	FI10012	배추김치
<input type="checkbox"/>	200013	BACTERIA	Lactobacillus fermentum	FI10013	배추김치
<input type="checkbox"/>	200014	BACTERIA	Oenococcus oeni	FI10014	배추김치
<input type="checkbox"/>	200015	BACTERIA	Lactobacillus kefir	FI10015	배추김치
<input type="checkbox"/>	200016	BACTERIA	Lactobacillus fermentum	FI10016	배추김치
<input type="checkbox"/>	200017	BACTERIA	Lactobacillus casei	FI10017	장아찌

3

Figure 5-43. 식품산업미생물은행 홈페이지 온라인 분양신청 화면.

- 장바구니(카트): 장바구니 시스템을 활용하여 사용자가 선택 내역을 확인할 수 있도록 하였으며, ① 선택한 미생물에 대한 수량 조정 및 삭제 기능 배치, ② 체크 박스를 구성하여 최종 선택한 미생물만 주문 가능, ③ 배송 방법, 세금계산서 발행 여부, 기타 요청사항 칸을 배치하여 배송 정보를 확인하고 신청완료 할 수 있도록 구성하였다.

장바구니 홈 > 장바구니

◆ 주문상품 확인

선택	미생물번호	구분	미생물명	합계금액	수량	삭제
<input checked="" type="checkbox"/> 2	200001	BACTERIA	Lactobacillus parabuchneri	55,000원	1 <input type="button" value="수량"/> 1 <input type="button" value="수량"/> 1 <input type="button" value="삭제"/>	<input type="button" value="삭제"/>
<input type="checkbox"/>	200002	BACTERIA	Lactobacillus fermentum	55,000원	1 <input type="button" value="수량"/> <input type="button" value="수량"/>	<input type="button" value="삭제"/>
합계				110,000원	2	

◆ 배송정보 확인

3 미생물시료명 우편배송 직접수령

세금계산서발행여부 발행 미발행

기타요청사항

Figure 5-44. 홈페이지 장바구니 화면.

- 주문확인 (주문내역): 전체 주문 내역과 주문리스트에서 각각의 주문 상세 내역을 확인할 수 있도록 구성하였다. ① 홈페이지 상단에 주문확인 메뉴 배치, ② 미생물 전체 주문리스트 확인 가능, ③ 원하는 주문리스트를 클릭하면 각 상세 주문 내역이 확인 가능하도록 구성하였다.

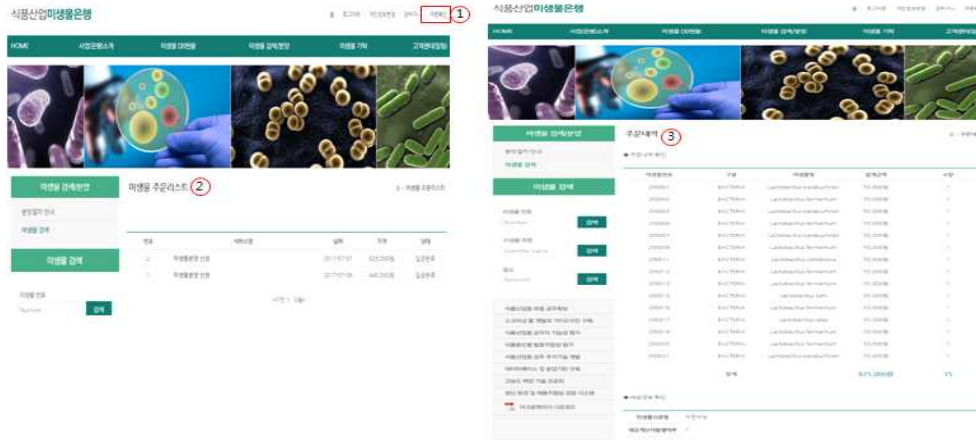


Figure 5-45. 홈페이지 주문리스트 및 주문내역 확인 화면.

3. 웹 DB에 균주의 보존 방법, 보존 위치 및 재고 파악을 통합적으로 관리할 수 있는 균주 관리 시스템 구축

가. 식품 산업용 유용 균주의 보존 관리 시스템 구축

(1) 식품 산업용 유용 균주의 보존 관리 구성

- 기존 구축한 웹기반 DB에 보존 방법, 보존 위치, 보존 수량 등의 정보를 포함한 데이터베이스로 개선하였다. 보존 방법은 freeze drying, L-drying, cryopreservation 등의 입력 항목 중에서 선택할 수 있으며, 보존 위치는 앰플장(1), 앰플장(2), 앰플장(3), 초저온냉동고(1), 초저온냉동고(2)의 입력 항목 중에서 선택하여 입력할 수 있다. 보존 수량은 숫자로 입력하도록 구성하였다.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
ACCUM 번호	구분	교과명	학명	분리원	분리일자	분리사기	배양조건	배양온도(°C)	배양시간(시간)	산소요구성	보존방법	가장자	보존 위치	양분 수량	
160	110110	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
161	200109	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
170	200170	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
171	200171	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
172	200172	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
173	200173	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
174	200174	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
175	200175	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
176	200176	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
177	200177	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
178	200178	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
179	200179	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
180	200180	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
181	200181	Bacteria	Lactobacillus fermentum	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	L-drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
182	200182	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
183	200183	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
184	200184	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
185	200185	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
186	200186	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
187	200187	Bacteria	Lactobacillus helveticus	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
188	200188	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
189	200189	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
190	200190	Bacteria	Lactobacillus delbrueckii	격질	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	
191	200191	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying	KCCM	앰플장(1)	10	
192	200192	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
193	200193	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
194	200194	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
195	200195	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
196	200196	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
197	200197	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
198	200198	Yeast	Kluyveromyces fragilis	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	YM	26	7	O Aerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
199	200199	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
200	200200	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
201	200201	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
202	200202	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
203	200203	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
204	200204	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
205	200205	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
206	200206	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
207	200207	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
208	200208	Bacteria	Lactobacillus parabutchneri	백운 김지	저온 소액 용사제	2014	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(2)	10	
209	200209	Bacteria	Neisseria meningitidis (Difco)	이인경김희	저온 소액 용사제	2015	NA-TSA	30	7	O Aerobic	Cryopreservation	KCCM	초저온냉동고(1)	10	
210	200210	Bacteria	Bifidobacterium bifidum	이인경김희	저온 소액 용사제	2015	NA-TSA	30	7	O Anaerobic	Cryopreservation	KCCM	초저온냉동고(1)	10	
211	200211	Bacteria	Lactobacillus sakei	이인경김희	저온 소액 용사제	2015	MRS	37	7	F Anaerobic	Cryopreservation	KCCM	초저온냉동고(1)	10	
212	200212	Bacteria	Lactobacillus sakei	이인경김희	저온 소액 용사제	2015	MRS	37	7	F Anaerobic	Freeze drying & Cryopreservation	KCCM	앰플장(1)	10	

Figure 5-46. 데이터베이스 균주 정보 입력창.

(2) 식품 산업용 균주 보존 관리자 지정

- 균주 보존 관리자를 지정하여 지정 관리자만 균주의 보존 정보를 파악할 수 있도록 하였다. 여러 명의 관리자가 보존 정보를 관리할 경우, 보존 수량 파악 시에 차이가 발생할 수 있고, 보존 정보의 변경 시에 착오가 생길 수 있어 보존 관리자를 지정하고, 지정 관리자만 정보를 입력하고 파악할 수 있도록 하였다.

4. 유용 균주의 분양 신청, 분양 과정, 분양 후 관리를 할 수 있는 관리 시스템의 구축

가. 유용 균주 분양 관리 시스템 화면 설계 및 구축

(1) 분양 시스템을 위한 관리자 홈페이지 기능

- 사용자가 홈페이지에서 분양 신청하면 관리자 페이지에서 분양 신청 내역을 한 눈에 볼 수 있도록 목록을 표시하여 구성하였다. 관리자 페이지 좌측 메뉴에서 미생물 분양 신청 목록을 클릭하면 전체 분양 신청 목록을 표기한다. ① 신청자 이름으로 검색 가능, ② 신청 목록에 대한 이전, 이후 목록 제공, ③ 신청한 내역에 대해서 자세한 내역 보기를 제공하도록 구성하였다.

번호	아이디	이름	소속기관	신청일	결제여부	계산서발행여부	수정/삭제
10	rtue	박경원	아이아이비즈1	2017-12-13	미결제	N	③ ≡ X
9	kej507	고은진	엘틱스바이오	2017-07-28	결제완료	Y	≡ X
7	luckujin	김유진	(사)한국중균협회	2017-07-07	결제완료	Y	≡ X
6	luckujin	김유진	(사)한국중균협회	2017-07-06	결제완료	N	≡ X
5	byunoh	변옥희	한국중균협회	2017-07-04	미결제	N	≡ X
4	byunoh	변옥희	한국중균협회	2017-07-04	미결제	Y	≡ X
2	rtue	박경원	아이아이비즈1	2017-06-27	미결제	Y	≡ X

Figure 5-47. 관리자 페이지 전체 분양 신청 목록 화면.

- 각 신청 목록을 클릭하면 사용자가 신청한 상세 주문 내역을 확인할 수 있도록 구성하였으며, 결제사항, 결제서류 발송 여부 등을 표시하거나 입력할 수 있도록 하였다. ① 신청자 기본정보 표시, ② 신청한 미생물 목록 표시, ③ 결제사항, 견적서 발송 여부와 배송방법 등 표시하였으며, ④ 수정, 삭제, 인쇄 기능을 추가하여 신청 수량을 수정할 수 있으며, 각 항목에 대하여 취소하거나 전체 항목을 삭제할 수 있고, 신청 내역을 인쇄할 수 있도록 하였다.

- 홈페이지의 자료실에서 식품산업용 균주 활용보고서 양식을 다운로드 받을 수 있도록 하였으며, 사용자가 작성하여 데이터는 파일 형태로 첨부하여 이메일로 제출하도록 하였다. 이를 받아서 관리자는 관리자 페이지를 통해 데이터베이스의 해당 부분에 입력하여 홈페이지에서 미생물 정보로 조회되도록 하였다.

식품산업미생물은행 TEL: (02) 391-8959, 396-8959 FAX: (02) 392-2859
 http://www.kfribk.net

식품산업용 균주 활용보고서

<p>1. 균주 활용 정보</p> <p>- 원기사항, 균주의 사진, 기타 신청 데이터는 파일 형태로 첨부 제출해주시시오. - 발효량, 배양, 특이 정보 등도 기재 후 파일 형태로 첨부 제출해주시시오. * 제출해주시는 자료는 본 균주의 활용, 교역은 허용하지만 원본 데이터베이스에 입력하여 변경할 권리로 추가할 것이며, 다른 사용자에게 송출된 권리로 제공받지 않습니다.</p> <p>2. 균주의 배양에 관련된 특성 정보</p> <p>3. 균주의 기능성에 관련된 특성 정보 (기능 및 용도)</p> <p>4. 균주의 안전성에 관련된 특성 정보</p>	<p>5. 발효 논문</p> <p>6. 특이 용량 등재 관련된 정보</p> <p>7. 기타 특성 정보 및 참고 사항</p> <p>8. 작성자</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>작성지명</td> <td></td> </tr> <tr> <td>소속기관</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mail</td> <td></td> </tr> </table> <p><small>Use: 식품산업미생물은행</small></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>접수번호</td> <td></td> <td>접수일자</td> <td></td> </tr> <tr> <td>접수일자</td> <td></td> <td>접수인</td> <td>사무인</td> </tr> </table>	작성지명		소속기관		E-mail		접수번호		접수일자		접수일자		접수인	사무인
작성지명															
소속기관															
E-mail															
접수번호		접수일자													
접수일자		접수인	사무인												

Figure 5-50. 식품산업용 균주 활용보고서 양식.

(2) 균주 이의 신청

- 분양받은 미생물이 파손, 오염 등으로 인해 활성화가 되지 않을 경우를 포함하여 균주에 문제가 있다고 판단되는 경우에는 균주 이의 신청을 할 수 있다. 이의 신청 사유를 기재하여 균주 이의 신청을 하면, 활성화하여 재분양하거나 실험을 통해 확인 후 분석 결과 통보 또는 환불 등의 조치를 할 수 있도록 하였다.

5. 보존 균주의 백업본을 주관 및 협동 기관에 이중으로 보존하여 안전하게 보존 관리

가. 유용 균주 이중 보존의 필요성

(1) 유용 균주 이중 보존의 필요성 제시

- 식품 산업용 유용 균주는 국내 식품 종균 산업의 활성화, 식품 산업용 종균의 민간 보급을 위하여 안전하게 보존 관리되어야 한다. 하지만, 화재, 자연재해, 전쟁 등과 같은 재난 발생 시에 유용 균주의 소실, 훼손 등의 문제가 발생할 수 있어, 이를 대비한 유용 균주의 이중 보존이 필요한 실정이다.

- 유용 균주를 이중으로 중복 보존하였을 때, 이중 보존한 한 기관에 문제가 발생하여 유용 균주가 복원되지 않을 경우, 나머지 기관에 보존된 균주를 복원하여 재보존하고, 종균으로 다시 활용할 수 있는 이점이 있다.

(2) 균주 이중 보존의 국내외 현황

- 국내 생물자원은 복제본의 중복 보존을 통해 주 보관 균주의 문제 발생 시에 중복 보존된 균주를 복원하는 방법으로 비상시를 대비하고 있다. 중복 보존은 기관 사정에 따라 분산 보존, 통합 보존 등의 방법을 사용하여 이중으로 안전하게 보존 관리하고 있다.
- 국내 특허생물자원 기탁기관은 특허청고시 2013-28호 제3조 제4항에 의거하여 주보관 시설과 적어도 10 m 이상 떨어진 다른 건물 또는 다른 층에 별도의 자체 백업시설을 구축하고 있다. 특허생물자원은 2013년 국가특허미생물 통합보존소를 지정하여 국내 4개 특허기탁기관의 복제본을 통합하여 중복 보존하고 있다.
- 미국 NRRL의 경우, 본시설과 약 300마일(482 km) 떨어진 곳에 백업시설을 설치하여 운영하고 있으며, 비상시를 대비하여 모든 생물자원과 정보를 중복 보존하고 있다. 일본은 2011년 발생한 대지진으로 인해 NPMD의 경우, 백업시설에 건물 파손, 실험시설 파손 등의 상당한 피해를 입었다. 이후 생물자원의 안전한 보존을 위하여 비상시를 대비한 전력 누수 최소화, 비축 연료 증대와 같은 방안을 강화하여 수립하였다.
- 일본의 피해 사례와 같이 지진 등 비상 상황에 효과적으로 대처하기 위해서는 주보관 시설과 비교적 멀리 백업시설을 갖추고, 유용 균주를 안전하게 이중 보존해야 한다.

나. 유용 균주의 안전한 이중 보존

(1) 유용 균주의 이중 보존 형태 및 방법

- 이중 보존을 위해서는 보존 형태가 중요하다. 동결보존 형태로 이중 보존을 하기 위해서는 동결보존을 위한 초저온냉동고 또는 액체질소탱크와 같은 보존 시설이 이중으로 필요하다. 동결보존 시설 비용과 소모되는 전력 또는 액체질소 유지 관리 비용이 다중으로 들기 때문에 시설 유지 비용에 대한 부담이 크다. 또한 이중 보존을 위하여 균주의 이동이 불가피한데, 이동하기에도 간편하고, 보존 시에 공간을 많이 차지하지 않는 형태로 고려해야 한다.
- 보존 관리 비용, 이동, 보존 공간 문제 등을 고려하여 이중 보존을 위한 형태로 동결 건조 앰플을 선택하였다. 동결건조 앰플은 별도의 시설 없이 상온에서 보관할 수 있으며, 이동시에도 별도의 운송 방법이나 수단이 필요하지 않은 이점이 있다. 동결건조 앰플은 유리 앰플의 특성상 파손의 위험이 있기 때문에 파손에 대한 대비를 충분히 할 경우에는 보관상 어려운 문제는 없다. 앰플의 파손을 방지하기 위하여 각각의 앰플을 플라스틱 포장재에 넣고, 다시 비닐 파우치에 포장하여 이동하고, 보존하였다.



Figure 5-51. 유용 균주의 이중 보존 형태.

(2) 유용 균주의 주관 기관 이중 보존

- 산업화 후보 종균으로 선발된 유용 균주의 동결건조 앰플은 파손에 대비하여 안전하게 포장하여, 주관 기관인 건국대학교 내의 생물공학실험실에 중복으로 이중 보존하였다.

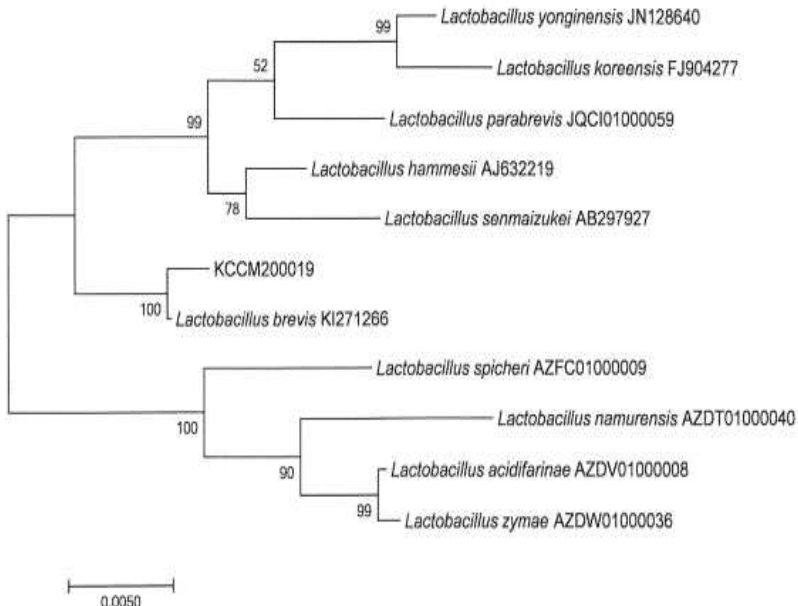
6. 산업화 후보 종균의 유전체 분석을 통한 고유성 자료 확보

가. 산업화 후보 종균의 고유성 자료 확보

(1) 16S(18S) rRNA sequence 확보 및 sequence 등록

- 산업화 후보 종균은 genomic DNA를 추출하여 세균은 16S rRNA, 효모는 18S rRNA 염기서열을 분석하여 phylogenetic tree를 통해 계통도를 분석하였다. 확보한 rRNA sequence는 NCBI GenBank에 등록하였다.
- 확보한 산업화 후보 종균의 고유성을 나타낼 수 있는 자료들을 취합하여 strain number, source, sequence, phylogenetic tree, GenBank accession number를 표로 나타내었다(Table 5-3).

Table 5-3. 산업화 후보 종균 24주의 고유성 자료

KCCM # 200019	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus brevis</i></p>	<p>CGTGAGTGCGGCATGCTATACATGCAGTCGAACGAGCTCCGTTGAATGACGTGCTTGCCTGACTGATTT CAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAAGCAGGGGATA ACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGAAAGGTGGC TTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGCCACCAAGA CGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCC TACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAG TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAA GGGTTGACGGTATTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG TGGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGCGGAAGGCGGCTGTC TAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTA AGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGC CAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAG TTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGG CTAAGCTAATCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT CACACCATGAGAGTTTGAACACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAGCCGCTAA</p>
<p>분리원 조개젓</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank # MF992221</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200054	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus brevis</i></p>	<p>ACCAAGCGGCTGCTAGTACATGCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCCTGACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAAGCAGGGGATAA CACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGAAAGGTGGCTT CGGCTATCACTTCTGGATGATCCCAGCGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGCCACCAAGACG ATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGT GAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAG GGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAA GCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTGTCT AGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCC ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTA AGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGC CAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCT GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAG TTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAACGAGTTGCGAAGTCTGTGAGG CTAAGCTAATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCCTGTACACACCGCCCGT CACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAGCCGTGCTAATA GGGAATCACGCTT</p>
<p>분리원 장아찌</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank # MF992222</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM #	Sequence
200060	CGGTAAGGCGGATCTGCTATACATGCAGTCGAACGCGTGTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGAC CTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAG CGGGGGACAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTGCGATGAACAACGCTTA AAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAAATGG CCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGG CCCATACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAAC ACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAG TAACTGTTACATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGT CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAG AGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAG GCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> CTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGAGC TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGAC ATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTG CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCTTGTACTAGTTGCC AGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAAGTGCAGGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAACGAGTCCGGA CTCGGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA CGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAC ACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACTATTAGGAGCCA GCCGCGCTAATGGTGGATCACCT
균주명	
분리원	Phylogenetic tree
물김치	
Gene Bank # MF992223	<p>Phylogenetic tree showing relationships between KCCM200060 and other <i>Lactobacillus</i> species. The tree is rooted with <i>Lactobacillus reuteri</i> AP007281 as the outgroup. Bootstrap values are shown at the nodes: 59, 71, 99, 71, 99, 100, 99. A scale bar of 0.0050 is provided at the bottom left.</p> <ul style="list-style-type: none">KCCM200060<i>Lactobacillus fermentum</i> AJ575812<i>Lactobacillus gorillae</i> AB904716<i>Lactobacillus gastricus</i> AZFN01000048<i>Lactobacillus equigenerosi</i> AZGC01000017<i>Lactobacillus mucosae</i> AF126738<i>Lactobacillus ingluviei</i> AZFK01000041<i>Lactobacillus alvi</i> HQ718585<i>Lactobacillus secaliphilus</i> JQBW01000001<i>Lactobacillus reuteri</i> AP007281

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200080	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus brevis</i></p>	<p>GGCCGGGCGGCATGCTATACATGCAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCCTGACTGATTC AACAAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCAGAAGCAGGGGATAA CACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGAATTTTGTGAAAGGTGGC TTCGGCTACTTCTGGATGATCCCGCGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGCCACCAAGA CGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCC TACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAG TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTGAGAGTAACTGTTCAA GGGTTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG TGGAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTC TAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGTAACGCATTA AGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGC CAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAG TTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGG CTAAGCTAATCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGT CACACCATGAGAGTTTGAACACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAGCCGTCTAAGGT GACAGAGTTATGG</p>
<p>분리원</p> <p>갓김치</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank #</p> <p>MF992224</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200173	Sequence
균주명 <i>Lactobacillus curvatus</i>	GACGTGGCGGCTGCTATACATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTAGATTGAAGAAGCTTGCTTCTGAT TGATAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGA TAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAGCACCGCATGGTGCAAGGTTGAAAGATG GTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACAA GACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTG AGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTAATTTGATAGTAACTGATCA GGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT GGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGT CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGATTAGATACCTGGTAGTC CATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCACTGCCGAGCTAACGCATT AAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTG ACCACTTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT CGTGTGTCGATGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTACTACTAGTTGCCAGCATTTA GTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCA TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCCGCGAG GTTTAGCTAATCTCTAAAACATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG AATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCG TCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAAGTAACCTTCGGGAGCCAGCCGTCTAATG GTGACAGAGATGG
분리원 계장	Phylogenetic tree
Gene Bank # MF992225	<p>Phylogenetic tree showing relationships between KCCM200173 and other <i>Lactobacillus</i> species. The tree is rooted with <i>Lactobacillus saniviri</i> (JQCE01000025) and <i>Lactobacillus brantae</i> (AYZQ01000010). Bootstrap values are shown at the nodes: 92, 99, 100, 99, 100, 100, 61, 96. A scale bar of 0.0050 is provided at the bottom left.</p>

(Table 5-3, 계속)

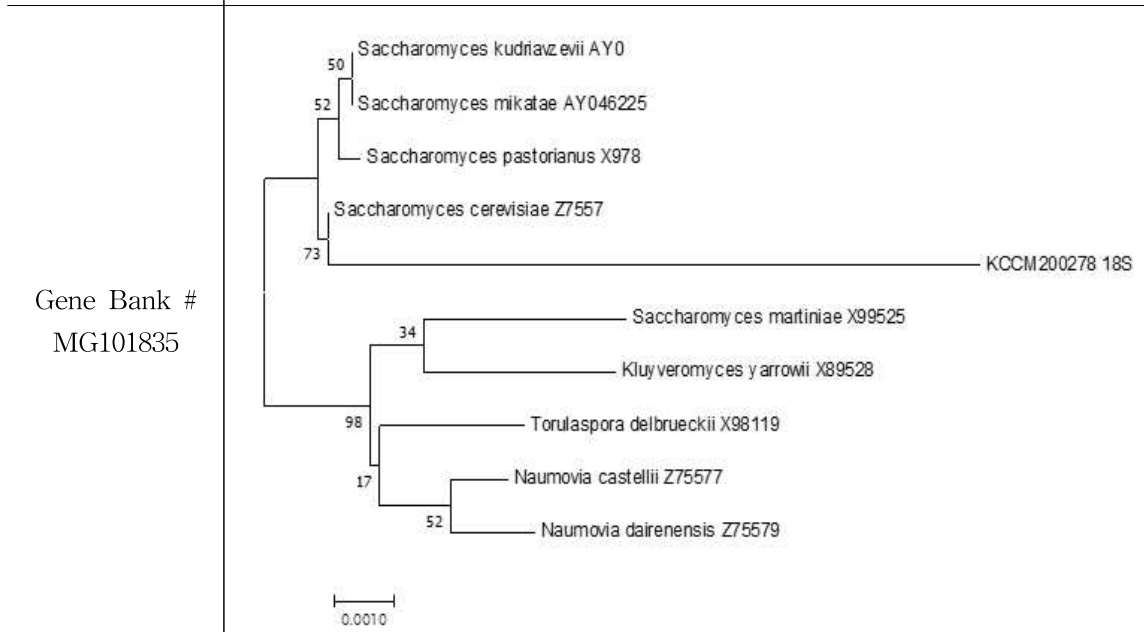
KCCM # 200270	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>AGGTTCTGCATGTCTAGTATAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATCG TTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGTATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAT CTCGACCCCTTGGGAAGAGATGTATTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCTTTGATGATTCA TAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCATCAACTT TCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATCCGG AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAAATACCCAATC CTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAAATTGGAATG AGTACAATGTAAATACCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTTGGGCC GGTTGGCCGGTCCGATTTTTTCGTGACTGGATTTCCAACGGGGCCTTCTCTGGCTAACCTTGA GTCCTTGTGGCTCTTGGCGAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCGTA TTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGAC CATCGTAATGATTAATAGGACGGTTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGCAGAGGTGAAATCTTGG ATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTTATTAATCAAGAACGAAAGT TAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCTGAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGG GTGGTGTTTTTTAAATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTGGGTTCTGGGGGAG TATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG GCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAG AGCTCTTCTTGATTTTGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTT AATTGCGATAACGAACGAGACCTAACCTACTAAATAGTGGTGTAGCATTGCTGTTATCCACTT CTTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTA GACGTTCTGGGCCGACGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTCAACCTTGGCCGAGAGGTC TTGGTAATCTTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTTCAACGAGGA ATTCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTATTACGTCCTGCCCTTGTACACACCGCCCGT CGTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTCAGGATCTGCTTAGAGAAGGGGGCAACTCCAT CTCAGAGCGGAGAATTGGACAACTAGTCATACCGATCCC</p>
<p>분리원</p> <p>오이장아찌</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank #</p> <p>MG101834</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200278	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>GGATCTTCATGTCTAGTATAAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCG TTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGTATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAT CTCGACCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCTTTGATGATTCA TAATAACTTTTGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTT TCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGGAATAAGGGTTTCGATCCGG AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGCAAATTACCCAATC CTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAAATTGGAATG AGTACAATGTAAATACCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTTGGGCC GGTTGGCCGGTCCGATTTTTCTGTACTGGATTTCCAACGGGGCCTTCTCTGGCTAACCTTGA GTCCTTGTGGCTTTGGCGAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCGTA TTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGAC CATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTG GATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAA AGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGA TCGGGTGGTGTTTTTTTAATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGTTCTGGG GGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGC CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGA TTGAGAGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTC TGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTAACCTACTAAATAGTGGTGTAGCATTGCTGGTTATC CACTTCTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGGCAATAACAGGTCTGTGATGC CCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTCTAACCTTGGCCGAG AGGTCTTGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTCAAC GAGGAATCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACCCG CCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATCTGCTTAGAGAAGGGGGCAAC TCCATCTCAGAGCGGAGAATTTGGACAAACACGGTCATTAGGAATAAGCTAAAACCGCGTTTT</p>

분리원
오이장아찌

Phylogenetic tree



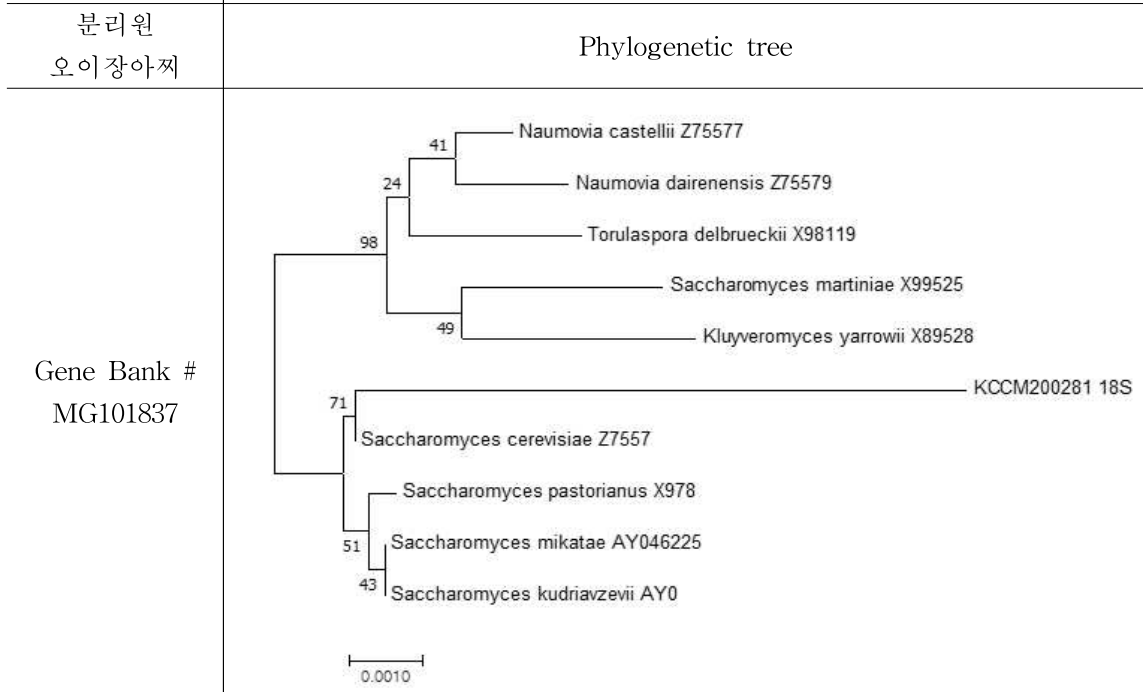
(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200280	Sequence
<p>관주명</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>AGGTTCTGCATGTCTAGTATAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCG TTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGTATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAAT CTCGACCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCTTTGATGATTCA TAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCTATCAACTT TCGATGGTAGGATAGTGGCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGG AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCCGCAAATACCCAATC CTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCATTGCGGTCTTGAATTGGAATG AGTACAATGTAAATACCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCC GGTTGGCCGGTCCGATTTTTTCGTGACTGGATTTCCAACGGGGCCTTTCCTCTGGCTAACCTTGA GTCCTTGTGGCTCTTGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCGTA TTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGAC CATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGG ATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTTCAATCAAGAACGAAAGT TAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGG GTGGTGTTTTTTAATGACCCACTCGGCACCTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTGGGGGGAG TATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG GCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAG AGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTGTCTGCTT AATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGGTGTAGCATTGCTGGTTATCCACTT CTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTA GACGTTCTGGGCCGACGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTCTAACCTTGGCCGAGAGGTC TTGTAATCTTGTGAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGA ATTCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTGATTACGTCCTGCCCTTGTACACACCGCCCGT CGTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATCTGCTTAGAGAAGGGGGCAACTCCAT CTCAGAGCGGAGAATTTGGACAACTTGGTCATTAGAGAACTAAAGTCGTAATGG</p>
<p>분리원</p> <p>오이장아찌</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank #</p> <p>MG101836</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM #	Sequence
200281	AGGTCCTCATGTCTAGTATAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT TTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGTATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATC TCGACCCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCTTTGATGATTCAT AATAACTTTTGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCAATCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT CGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGA GAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAAATACCCAATCC TAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAAATGGAATGA GTACAATGTAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TCCGACTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCCCG GTTGGCCGGTCCGATTTTTTCGTGACTGGATTTCCAACGGGGCCTTCTCTTGGCTAACCTTGAGT CCTTGTGGCTCTTGGCGAACAGGACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCGTATT GCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACC ATCGTAATGATTAATAGGGACGGTGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGGA TTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT AGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGG GTGGTGTTTTTTAATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAG TATGGTGCGAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG GCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAG AGCTCTTCTGATTTTGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTT AATTGCGATAACGAACGAGACCTAACCTACTAAATAGTGGTGTAGCATTGCTGGTTATCCACTT CTTAGAGGGACTATCGTTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGGCAATAACAGTCTGTGATGCCCTTA GACGTTCTGGGCCGACGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTCTAACCTTGGCCGAGAGGTC TTGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGA ATTCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGT CGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATCTGCTTAGAGAAGGGGGCAACTCCAT CTCAGAGCGGAGAATTTGGACAAACTTGGTCATTAGAGAACAAAAGTAGAAACCGC

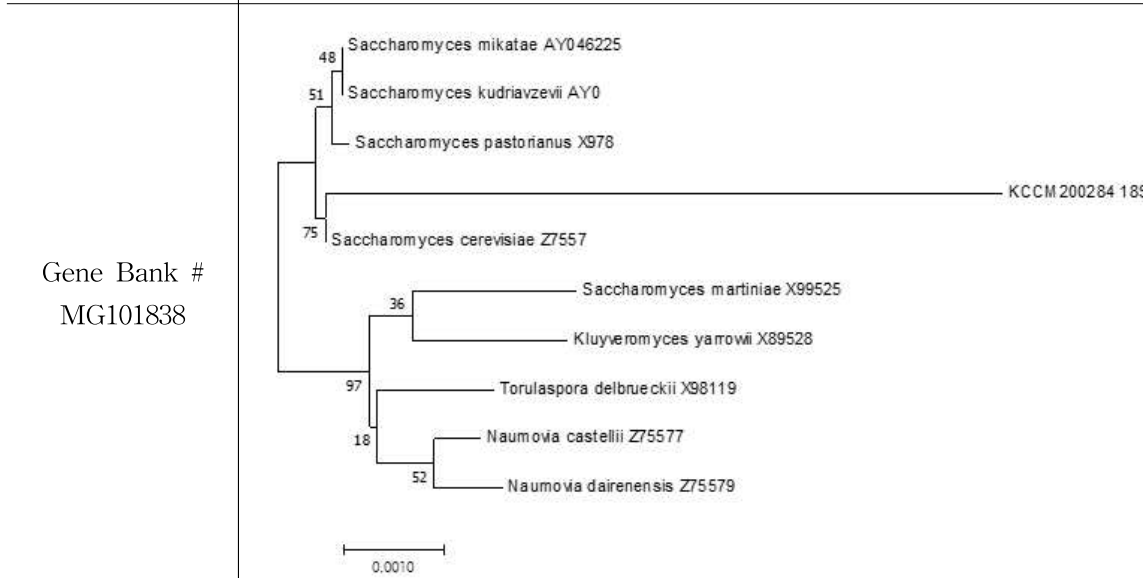
균주명
Saccharomyces cerevisiae



(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200284	Sequence
균주명 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AGTTCCTGCATGTCTAGTATAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATC GTTTATTTGATAGTTCCCTTACTACATGGTATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAA ATCTCGACCCTTTGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCTTTGATGA TTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATC AACTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGAT TCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAC CCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAA TGGAATGAGTACAATGTAATACCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG CCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAA CTTTGGGCCCGGTTGGCCGGTCCGATTTTTTCGTGTACTGGATTTCCAACGGGGCCTTTCTTCTG GCTAACCTTGAGTCCTTGTGGCTCTTGGCGAACCCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGGTC AAAGCAGGCGTATTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTG TTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAG AGGTGAAATTCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTCATT AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACT ATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTTAATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAG TCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTTCGAAGGCTGAAACTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAC CACCAGGAGTGGAGCCTGCGGATTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAC AATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTAACCTACTAAATAGTGGTG CTAGCATTGCTGGTTATCCACTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTAGAGGC AATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAG CGAGTCAACCTTGACCGAGAGGTCTTGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGC ATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTGATTAC GTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGCTAGTACCGATAGAAAGGCTTAGAGAGGCCTCAG GATCTGCTTAGAGAAGGGGGCACTCCATCTCAGAGCGGAGAATTGGACAAACCTGGTCATTAG ACGAACAAAAATTAGTTTTTG

분리원 오이장아찌	Phylogenetic tree
--------------	-------------------



(Table 5-3, 계속)

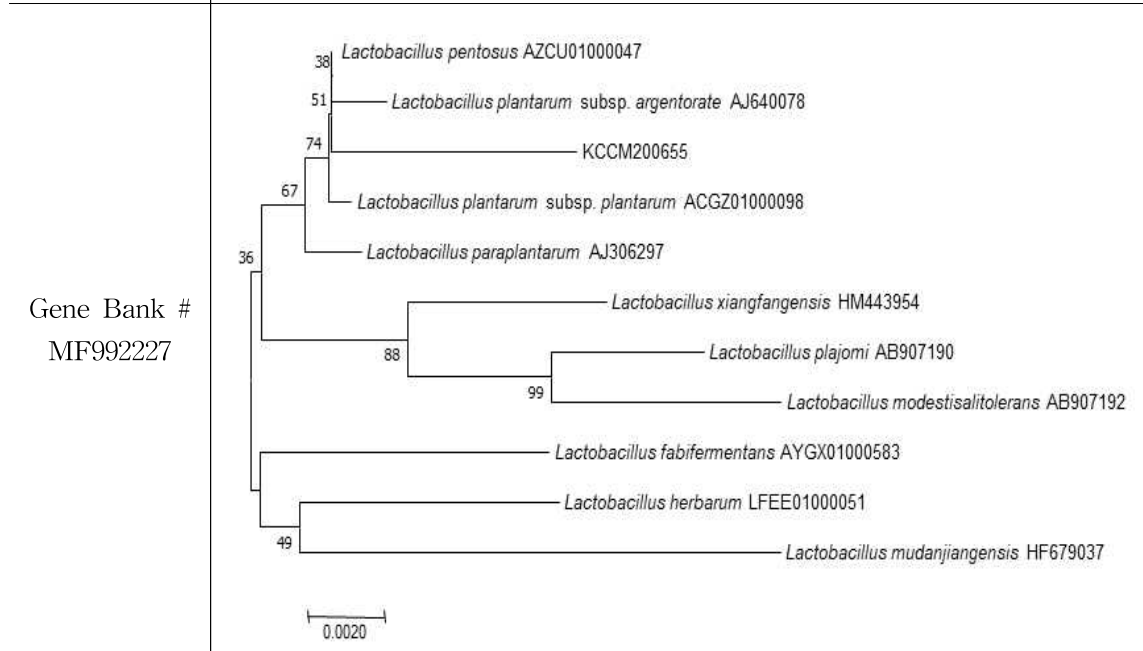
KCCM # 200650	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p>	<p>CGGGCGCGTGCCATACATGCAGTTCGAACGAACCTCCTGGTTATTTGATTTGGTGCTTGCATTCATG ATTTACATTTTGAGTTGAGTTGGCGAACCTTGGTGAGTAACACGTTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGG GGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCAGGTCCGAGCTTGAAAG ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCAC CATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTG TTCAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATG TGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGTAGTGCAGAAGAGGACA GTGGAACCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCT GTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGGAGGGTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGCTAACGC ATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTGAAAGTACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATACTA TGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAG CTCGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT AGTTGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAG AGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG AATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACCCGCCCG TCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAAGTCGGTGGGGTACCTTTAGGAACCAGCCGCTAAGTG ACAGAGT</p>
<p>분리원</p> <p>동치미</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank # MF992226</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200655	Sequence
균주명 <i>Lactobacillus plantarum</i>	GCCATGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTTCGAACGAACTTCTGGTTATTTGATTGGTGCTTGCCATCA TGATTTTACATTTGAGTTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGG GGATAACACCTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAA GATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCA CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA AACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACT GTTACAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGA CAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG CTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTCTGCAGCTAACG CATTAAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCA GCTCGTGCAGTGTGAGTGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGCACTCTGGTGTAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGA GAGTAAGCTAATCTTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCG GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACGCCCC GTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACTTTTAGGAACCAGCCGCGCTAAG TGGACAGAGTTCGT

분리원
토마토김치

Phylogenetic tree



(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200656	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p>	<p>CGGGCGGGCGTGCCTATACATGCAGTCCGAACGAACTCCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGAT TTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAA CACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCT TCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTACCATGGC AATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTGAG GTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAA GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT GGTCTGTAACGACGCTGAGGCTGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTA AGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATACTATGC AAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAA TTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGA GTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGT CACACCATGAGAAGTTTGTACACCCAAAAGTCGGTGAAGTACCTTTGGAACCAAGCCGCTAAGCTG ACAGAGT</p>
<p>분리원</p> <p>토마토김치</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank #</p> <p>MF99228</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200661	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p>	<p>GCAATGGCTAGCGCCAAGTATGCAGTTCGAACGAACTCTGGTATTGATGTGGTGCTTGCATCATGAT TTACATTTGAGTGAGTGGGCAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAA CACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCT TCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGC AATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTGAG GTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAA GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCT GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTCTGCAGCTAACGCATTA AGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGC AAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAG TTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGA GTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGCT CACACCATGAGAAGTTTGTAACAACCCAAAAAGTCCGGTGGGGTAAACCTATTAGGAACCAGCCGCG CTAATAGATGTCAGAGTTCCG</p>
<p>분리원</p> <p>토마토김치</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank # MF992229</p>	<p>KCCM200661 16S</p> <p>57 L. plantarum subsp. argentorate</p> <p>64 Lactobacillus pentosus</p> <p>95 L. plantarum subsp. plantarum</p> <p>83 Lactobacillus paraplantarum</p> <p>Lactobacillus fabifermentans</p> <p>68 Lactobacillus xiangfangensis</p> <p>57 Lactobacillus modestisalitoler</p> <p>94 Lactobacillus plajomi</p> <p>Lactobacillus mudanjiangensis</p> <p>Lactobacillus odoratitofui</p> <p>Lactobacillus koreensis</p> <p>0.0050</p>

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 200693	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p>	<p>GGGGAGGGCCGGCGTGCCTATACTTGCAGTTGCAACGAACCTCCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATC ATGATTTACATTTTGGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGG GGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTAAA GATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCA CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACT GTTCAGGTATTGACGGTATTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGA CAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGGAAGAACCCAGTGGCGAAGCGCG CTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGCTAACG CATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC GCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGA GAGTAAGCTAATCTTTAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCG GAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC GTCACACCATGAGGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCGCCGCTAA GGTGGACAGAGTGGA</p>
<p>분리원</p> <p>오이김치</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank # MF992230</p>	<p>KCCM200693 16S</p> <p>66 — L plantarum subsp. argenteorata</p> <p>73 — Lactobacillus pentosus</p> <p>97 — L plantarum subsp. plantarum</p> <p>67 — Lactobacillus paraplanarum</p> <p>92 — Lactobacillus fabifermentans</p> <p>72 — Lactobacillus xiangfangensis</p> <p>98 — Lactobacillus modestisalitoler</p> <p>98 — Lactobacillus plajomi</p> <p>100 — Lactobacillus mudanjiangensis</p> <p>100 — Lactobacillus koreensis</p> <p>100 — Lactobacillus odoratitofui</p> <p>0.0050</p>

(Table 5-3, 계속)

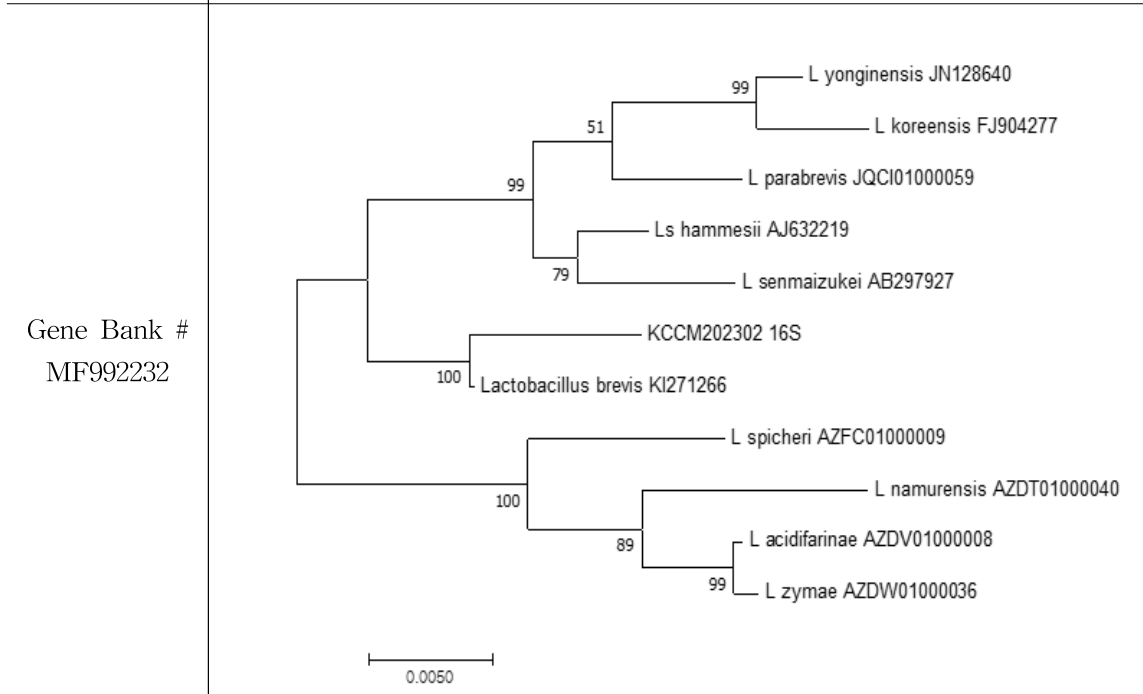
KCCM # 200793	Sequence
<p>균주명</p> <p><i>Lactobacillus</i> <i>buchneri</i></p>	<p>GCAGTGGGCGGCATGCTATACATGCAGTGAACCGCTCTCCGTTGATGATTTTAGGTGCTTGCACTT GAAAGATTTAACATTGAGACGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTGAAGT AGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCAAACACCTGGTTTTGGTTTAA AAGACGGCTTCGGCTGTCACTTTAGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCC TACCAAGGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGC CGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCAGAGTAA CTGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTCTG ATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG ACAGTGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG GCTGTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTG GTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAA CGCATAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATC TTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGTTGTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTGGCCAGC ATTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAT CATCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAACC GCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA AGTTGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAACA CCGCCCGTACACCATGAGAAGTTTGTAAACAACCAAAGCCGGTGAAGGTAACCTTCGGGGACC AGCCGTCTAAGTGACAGAGTTGG</p>
<p>분리원</p> <p>김치</p>	<p>Phylogenetic tree</p>
<p>Gene Bank # MF992231</p>	

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 202302	Sequence
관주명 <i>Lactobacillus brevis</i>	CCGGGCGGCTGCCTATACTTGCAGTTCGAACGAAGCTTCCGTTTGAATGACGTTGCTTGCAGTAT TTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAAGTAAACACGTGGGGAATCTGCCAGAAGCAGGGGA GAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGAAAGGTG GCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGCGTATTAGTTAGTTGGTGAAGTAAAGGCCACCAA GACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTG AGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTC AAGGGTTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTG AAAGCCTTCGGCTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT GGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGT CTAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTC CATGCCGTAACGATGAGTGAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTA AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTCTGC CAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTC GTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTATTATCAGTTGCCAGCATTGAG TTGGGCACTCTGGTGAAGTACGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGG CTAAGCTAATCTTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGA ATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGT CACACCATAGAGTTTGTACACCCAAAAGCCGGTAGATACCTTCGGGAGTCAGCCGTCTAAGTATGATCA G

분리원
갯잎

Phylogenetic tree



(Table 5-3, 계속)

KCCM # 202303	Sequence
균주명 <i>Lactobacillus plantarum</i>	GGGACTGGCGGCTGCCTATACTGCAGTTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATTATGA TTTACATTTTGAGTTGAGTGGCGAACTTGGTGGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGG ATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTAAAAGAT GGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTACCA TGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTT CAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGT GAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGGTGCAGAAAGAGGACA GTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGCGCGCT GTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCA TTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTAT GCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAA GTTGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGA GTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT CACACCATGAGAGTTTGAACCCATAAGTCGGTGAGTACCTTTGGAACCAGCCGCGAAGGTGGA CAGATTCG
분리원 깻잎	Phylogenetic tree
Gene Bank # MF992233	<p>Lactobacillus pentosus AZCU010</p> <p>Lactobacillus plantarum subsp. argenterate AJ640078</p> <p>KCCM202303</p> <p>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum ACGZ0100098</p> <p>Lactobacillus paraplantarum AJ306297</p> <p>Lactobacillus fabifermentans AYGX01000583</p> <p>Lactobacillus herbarum LFEE010</p> <p>Lactobacillus mudanjiangensis HF679037</p> <p>Lactobacillus xiangfangensis HM443954</p> <p>Lactobacillus plajomi AB907190</p> <p>Lactobacillus modestisalitolerans AB907192</p> <p>0.0010</p>

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 202361	Sequence
균주명 <i>Leuconostoc lactis</i>	GAGGGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAACGCGCAGCGAAAGGTGCTTGACCTTTCAAGCGAG TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGCCTCAAGCTGGGGATAACATTTGAAACAGAT GCTAATACCGAATAAACTTAGTATCGCATGATACAAAGTTGAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAGAG ATGGGTCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGA GTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTA GGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTAGGG TCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTCTAGTTCGACGGTACCATA CCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCGGAGCGTTATCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTC CGGAATGGCATTGAAACTGGTAACTTGAGTGTGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCCGT GGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAACGACGTTG AGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAAT ACTAGGTGTTAGGAGTTTCCGCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTATTCCGCCTGGGGAG TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTCTAGAGATAGAAGT GTTCTCTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGCGAGA CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC TACACACGTGCTACAATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACC CGGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAG TACGTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTGACTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA TCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACC GCCGTACACCATGGGAGTTTGT AATGCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTATGGAGGGAGCCGTCTAAGGCAGACAGATTCTTG
분리원 배추김치	Phylogenetic tree
Gene Bank # MF992234	<p>68 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> HM443957 43 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ACKV01000113 94 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> CP000414 99 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> AB023246 <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> AEOQ01000906 <i>Leuconostoc miyukkimchii</i> HQ263024 100 — KCCM202361 <i>Leuconostoc lactis</i> AEOR01001150 73 — <i>Leuconostoc palmae</i> AM940225 48 — <i>Leuconostoc holzapfelii</i> AM600682 95 — <i>Leuconostoc citreum</i> AF111948</p> <p>0.002</p>

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 202369	Sequence
균주명 <i>Leuconostoc lactis</i>	GAATTGGCGGGCGTGCTATACATGCAAGTGAACGCGCAGCGAAAGGTGCTTGACCTTTCAAGCG AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAACACAG ATGCTAATACCGAATAAACTTAGTATCGCATGATACAAAGTTGAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAG AGATGGGTCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCC GAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAG TAGGGAATCTTCCACAATGGGGGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTAG GGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTCTAGTTGCACGGTACCA TACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCGGGAGCGTTATCC GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAA CTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGTGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGC GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAACACTGACG TTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATG AATACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTATTCCGCCTGGG GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTCTAGAGATAG AAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGC GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCT GGGCTACACACGTGTACAATGGCGTATAACAAGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTT AAAGTACGTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTGACTGCACGAAGTCGGAATCGTAGTAATCG CGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG TTTGTAAATGCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTATGGAGGAGCCGTCTAAGCAGACAGATATTG
분리원 동치미	Phylogenetic tree
Gene Bank # MF992235	<p>69 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> HM443957 37 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ACKV01000113 94 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> CP000414 99 — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> AB023246 <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> AEQQ01000906 <i>Leuconostoc miyukkimchii</i> HQ263024 100 — KCCM202369 <i>Leuconostoc lactis</i> AEOR01001150 73 — <i>Leuconostoc palmae</i> AM940225 48 — <i>Leuconostoc holzapfelii</i> AM600682 95 — <i>Leuconostoc citreum</i> AF111948</p> <p>0.002</p>

(Table 5-3, 계속)

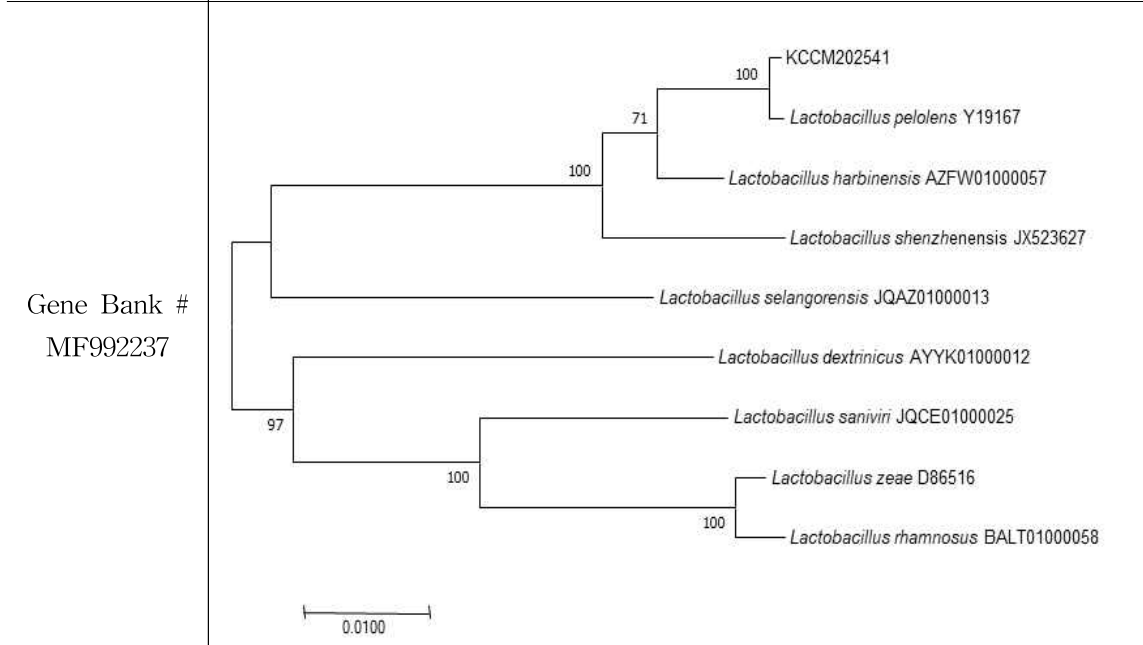
KCCM # 202399	Sequence
관주명 <i>Lactobacillus brevis</i>	TGAAGGGCGCATGCCTATACATGCAAGTTCGAACGAGCTTCCGTTTGAATGACGTGCTTGCCTGAT TTCCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTTGGTGAAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAAGCAGGGG ATAA CACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGAAAGGT GGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGCGTATTAGTTAGTTGGTGAAGTAAAGGCCACCA AGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA CTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCG TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGT TCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTAAGTCTGATG TGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACA GTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGCGGCT GTCTAGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGC ATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTC TGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG CTCGTGTGTCGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGATT AGTTGGCACTCTGGTGAAGTGCCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGA GGCTAAGCTAATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTG GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCC GTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAAGATAACCTTCGGGAGTCAGCCGTCTAAG GGTGATCT
분리원 충각김치	Phylogenetic tree
Gene Bank # MF992236	<p>Phylogenetic tree showing relationships between various <i>Lactobacillus</i> species. The tree is rooted on the left and branches out to the right. Species listed include <i>Lactobacillus yonginensis</i> JN128640, <i>Lactobacillus koreensis</i> FJ904277, <i>Lactobacillus parabrevis</i> JQCI01000059, <i>Lactobacillus hammesii</i> AJ632219, <i>Lactobacillus senmaizukei</i> AB297927, KCCM202399, <i>Lactobacillus brevis</i> KI271266, <i>Lactobacillus spicheri</i> AZFC01000009, <i>Lactobacillus namurensis</i> AZDT01000040, <i>Lactobacillus acidifarinae</i> AZDV01000008, and <i>Lactobacillus zymae</i> AZDW01000036. A scale bar at the bottom indicates 0.0020 substitutions per site.</p>

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 202541	Sequence
균주명 <i>Lactobacillus perolens</i>	CGGGAGGGCGGGTGCTATACATGCAGTCGAACGAGGTTTGATCAGTTTGCGGTGGTGCTTGCATCAC CAATTACCGATTAAACCGAGTGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTCAGCAGGG GATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGTATAACCACGGAGACCCGATGGTCTCCGGGTAAAAG ATGGCGCAAGCTATCACTGAGGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCCAGTTGGTGGGGTAATGGCCTA CCAAAGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA AACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG CGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTATTGAAGAAGAAGCTGTGTGAGAGTAACT GCTCATGCAGTGACGGTATCAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGA TGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTGAGTGCAGAAGAGGA GAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG CTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAAGTGTGGGGGTTTCGCCCTCAGTCTGCAGTAACG CATAAGTATTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTT CTGCCAAGCTGAGAGATCAGCCGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC AGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGATTAGTTGCCAGCA TTCAGTTGGGCACTCTAGTCAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATC ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGGTGGTACAACGAGCAGCGAGACCG CGAGGTCAAGCGAATCTCTAAAACCATCCTCAGTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAA GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC CGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACCCCAAAGCCGGTAGGACAACCGCAAGGAGTCAGCCGT CTAAGGTGGACAACCGATCGGG

분리원 식초

Phylogenetic tree



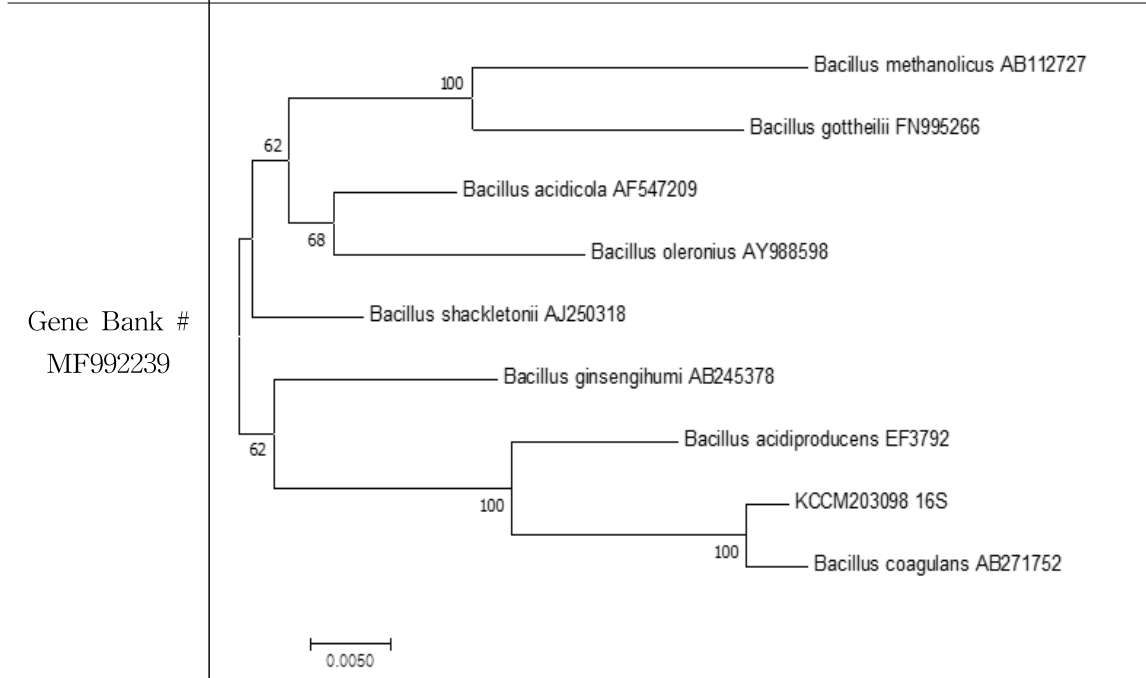
(Table 5-3, 계속)

KCCM # 202543	Sequence
균주명 <i>Lactobacillus hilgardii</i>	TTTCCCTGGTTAGCGTCAGAGTATGATCGTGGATCGCGACTTCGGTCAATAGAAATTCGAGTGCTTG CATTAACTGATTTGACATTAAGACGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCCGA AGCGGGGGATAACATTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAACAAAAACCACATGGTTTTTGT TAAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTGGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG GCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAA CGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTTGTTGGAGAAGAACGGGTGTCAGA GTAACCTGTTGACATCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAG GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTGCAGA AGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGA AGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCA GCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTG ACATCTTCTGCTAACCTAAGAGATTAGCGTTCCCTTCGGGACGGAATGACAGGTGGTGCATGGTT GTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTCAGTTG CCAGCATTTAGTTGGCACTCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTGC AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTAC ACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGAACACCCGAAGCCGGTGAGGTAACCTAAAGTCGTGACA AAAGTTGCCGTGAAATGCACCGTTGGC
분리원 식초	Phylogenetic tree
Gene Bank # MF992238	<p>Phylogenetic tree showing relationships between <i>Lactobacillus</i> strains. The tree is rooted on the left and branches to the right. Bootstrap values are indicated at the nodes: 70, 76, 73, 72, 34, 90, and 100. The strains included are <i>Lactobacillus kefir</i> (AJ621553), <i>Lactobacillus parabuchneri</i> (BCVT01000078), <i>Lactobacillus parakefiri</i> (AY026750), <i>Lactobacillus rapi</i> (AZEI0100003), <i>Lactobacillus kisonensis</i> (AB366388), <i>Lactobacillus diolivorans</i> (AZEY01000081), <i>Lactobacillus parafarraginis</i> (AZFZ01000113), <i>Lactobacillus farraginis</i> (BAKI01000097), KCCM202543, and <i>Lactobacillus hilgardii</i> (ACGP01000200). A scale bar at the bottom indicates 0.0020 substitutions per site.</p>

(Table 5-3, 계속)

KCCM # 203098	Sequence
균주명 <i>Bacillus coagulans</i>	GCTAATACATGCAAGTCGTGCGGACCTTTTAAAAGCTTGCTTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTG AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACGCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT AGTTTTTTCCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTTTGCTGTCACCTACAGATGGGCCGCG GCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAACCT CTGTTGCCGGGAAGAACAAGTGCCGTTGCAACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGCCAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATT GGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGGCGCTCAACCGCAAGCG GTCATTGGAACTGGGAGGCTTGTAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATGTGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCG CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA GTGTTAGAGGGTTCCGCCCTTGTAGTGTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGACATCCTCTGACCTCCCTGGAGACAGGGCCTTCCC CTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGTTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGC CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA CACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCAGAAAACCA TTCCAGTTCGATTGACAGGCTGCAACCCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAAC ACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTACGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGG

분리원 고추장	Phylogenetic tree
------------	-------------------



나. 산업화 후보 종균의 RAPD법을 이용한 유전체 분석

(1) 산업화 후보 종균의 RAPD분석 조건

- 산업화 후보 종균 중에서 *Lactobacillus plantarum* 균주를 대상으로 random primer를 사용하여 유전체 DNA를 증폭함으로써 실험 균주 간의 유전적 유사도를 예측할 수 있는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 분석을 수행하였다.
- 표준 균주 2주, 산업화 후보 종균 10주를 포함하여 총 12주에 대하여 분석하였다. RAPD분석을 위한 방법은 다음과 같다. 실험 균주에서 추출한 genomic DNA를 template DNA로 하여, primer 239(CTGGCGACTG), primer A-1(CAGGCCCTTC)을 제작하여 사용하였고, 최종 부피가 50 μ L가 되도록 하여 RAPD-PCR을 수행하였다. BIO-RAD T100 Thermal Cycler를 사용하여, 다음의 조건으로 PCR 반응시켰다. 초기 변성을 위해 94°C에서 2분 간 반응한 후, 변성 단계에서 94°C로 2분, 결합 단계에서 36°C로 1분, 신장 단계에서 72°C에서 2분, 40회 반복하였고, 후기 신장 단계에서 72°C로 5분 간 반응시켰다. PCR 생성물은 0.8% agarose gel로 전기영동 한 후, Gel Doc XR System을 이용하여 UV상에서 gel image를 촬영하여 Quantity One software를 이용하여 UPGA (unweighted pair group method)를 기초로 하여 실험균주 간의 유사도에 따라 grouping하여 분석하였다.

(2) A-1 primer를 이용한 RAPD분석

- A-1 primer를 이용하여 표준 균주 KCCM 12116, KCCM 11322, 산업화 후보 종균 10주를 포함하여 12주의 *Lactobacillus plantarum* 균주를 대상으로 RAPD band pattern을 분석한 결과, 증폭된 DNA 단편의 크기는 0.2 kb와 2.0 kb 사이에서 나타났고, 실험 균주마다 3개에서 8개까지 다양한 band pattern을 나타내었다.

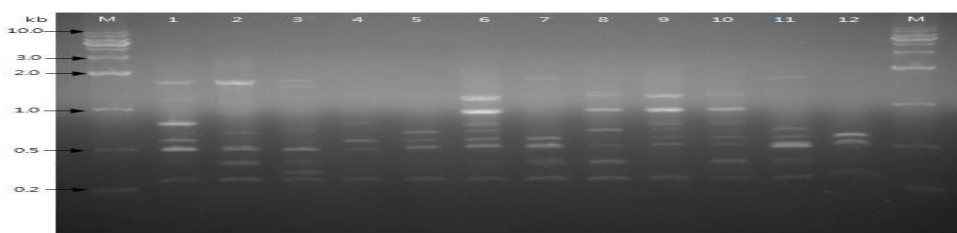


Figure 5-52. RAPD banding patterns of 12 strains using A-1 primer. Lane M, 1.0kb marker; 1, *Lactobacillus plantarum* KCCM 12116; 2, KCCM 11322; 3, 200440; 4, 200448; 5, 200573; 6, 200650; 7, 200655; 8, 200656; 9, 200661; 10, 200693; 11, 202303; 12, 201055; M, 1.0 kb marker.

- A-1 primer를 이용한 RAPD band pattern을 dendrogram으로 나타내어 분석한 결과, 200655, 201055, 200573 균주가 속한 Group A, 202303, KCCM 11322 균주가 속한 Group B, 200440, KCCM 12166, 200656, 200693, 200661, 200650 균주가 속한 Group C로 분류할 수 있었다.

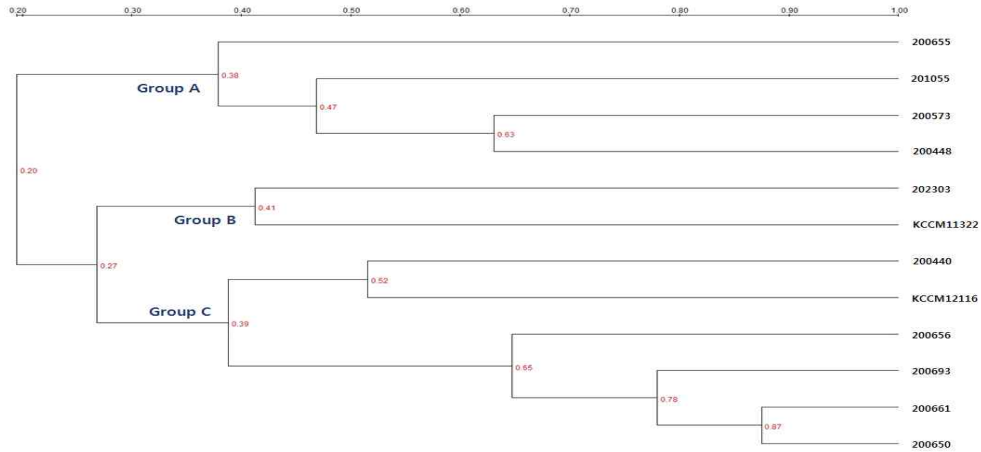


Figure 5-53. Dendrogram depicting the genetic relationship among 12 strains using RAPD A-1 primer by UPGMA method of cluster analysis.

(3) 239 primer를 이용한 RAPD분석

- 239 primer를 이용하여 12주의 *Lactobacillus plantarum* 균주를 대상으로 RAPD band pattern을 분석한 결과, 증폭된 DNA 단편의 크기는 0.3 kb와 4.0 kb 사이에서 나타났고, 실험 균주마다 4개에서 11개까지 다양한 band pattern을 나타내었다.

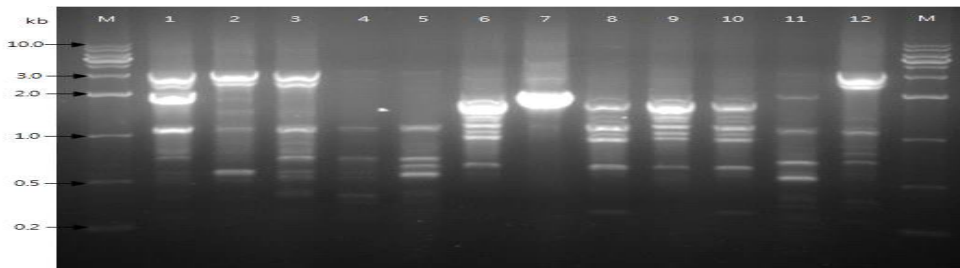


Figure 5-54. RAPD banding patterns of 12 strains using 239 primer. Lane M, 1.0kb marker; 1, *Lactobacillus plantarum* KCCM 12116; 2, KCCM 11322; 3, 200440; 4, 200448; 5, 200573; 6, 200650; 7, 200655; 8, 200656; 9, 200661; 10, 200693; 11, 201055; 12, 202303; M, 1.0 kb marker.

- 239 primer를 이용한 RAPD band pattern을 dendrogram으로 나타내어 분석한 결과, 200655, KCCM 12116 균주가 속한 Group A, 202303, 200440, KCCM 11322 균주가 속한 Group B, 201055, 200573, 200448 균주가 속한 Group C, 200693, 200656, 200661, 200650 균주가 속한 Group D로 분류할 수 있었다.

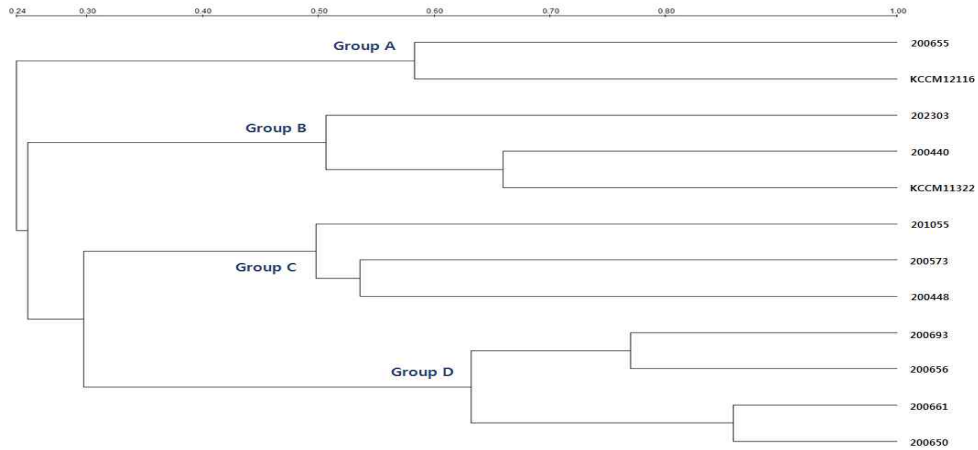


Figure 5-55. Dendrogram depicting the genetic relationship among 12 strains using RAPD 239 primer by UPGMA method of cluster analysis.

- 산업용 후보 균주의 RAPD분석을 통해서 strain 특이성에 의한 특이적인 fingerprinting pattern을 확인할 수 있었으며, 같은 균 종 내에서 유전적으로 서로 다른 특성을 갖고 있음을 예상해볼 수 있었다. 사용된 primer에 따라 분류되는 group에 차이가 나타나긴 했지만, 2개의 primer를 이용하여 분석하였을 때, 공통적으로 201055, 200573, 200448 균주 간, 202303과 표준 균주 KCCM 11322 균주 간, 200693, 200656, 200661, 200650 균주 간의 유전적 유사도가 비교적 높음을 확인할 수 있었다.
- 산업용 후보 균주의 유전체 분석을 통한 유전적 pattern 분석 데이터를 확보할 수 있었으며, 이를 토대로 균주의 고유성을 증명할 수 있는 타당성이 있는 근거 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

제 15절 식품 산업용 균주 고농도 배양(10^{10} CFU/mL 이상) 기술 확보 및 충격(Shock) 조건 검증 도구 구축 및 종군 사업화

1. 고농도 배양 기술을 위한 배지 최적화 및 배양 조건 최적화

- 현재 사용 중인 산업용 균주를 기준으로 최적배지 조성 및 배양 조건을 확립하였으며, 1차적으로 flask 배양 수준에서 적정 배지원을 선별하고 각 선별된 배지원에 대한 최적화 과정을 수행하였다.
- 1차적 flask 배양의 배지 조성 최적화 과정이후에 5 L Jar-Fermenter를 이용하여 최적배지조건에서의 배양 조건에 따른 배양 최적화를 수행하였다.
- 1단계 flask 배양과정과 2단계 5 L Jar-Fermenter 과정을 통해 최적배지와 배양 조건 최적화를 수행한 이후 마지막 단계인 생산 현장 스케일에 따른 배양 최적화를 수행하며, 생산스케일의 저가 배지를 사용하여 생산성을 기존대비 동일하거나 더 향상시키기 위한 저가 배지 최적화 및 생산스케일 배양 최적화를 수행하였다.

가. 균주 배양 최적화 실험을 위한 균주 리스트

- *Lactobacillus acidophilus* LA1
- *Lactobacillus fermentum* LF1
- *Lactobacillus rhamnosus* LR1
- *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* BL3
- *Bifidobacterium longum* BG7

나. 분리균주에 대한 배양 최적화 과정

- 1단계: Flask 배양을 이용한 배지 최적화 단계
인자선정: 탄소원, 질소원, 무기이온 등
영양배지 조성 검토
- 2단계: Jar-Fermenter를 이용한 배양조건 최적화 단계
배양조건 검토: 온도, pH
배지 최적화
저가 배지 원료를 이용한 배양성 평가
- 3단계: 대형 발효조(1,000 L)를 이용한 배양조건 최적화 단계

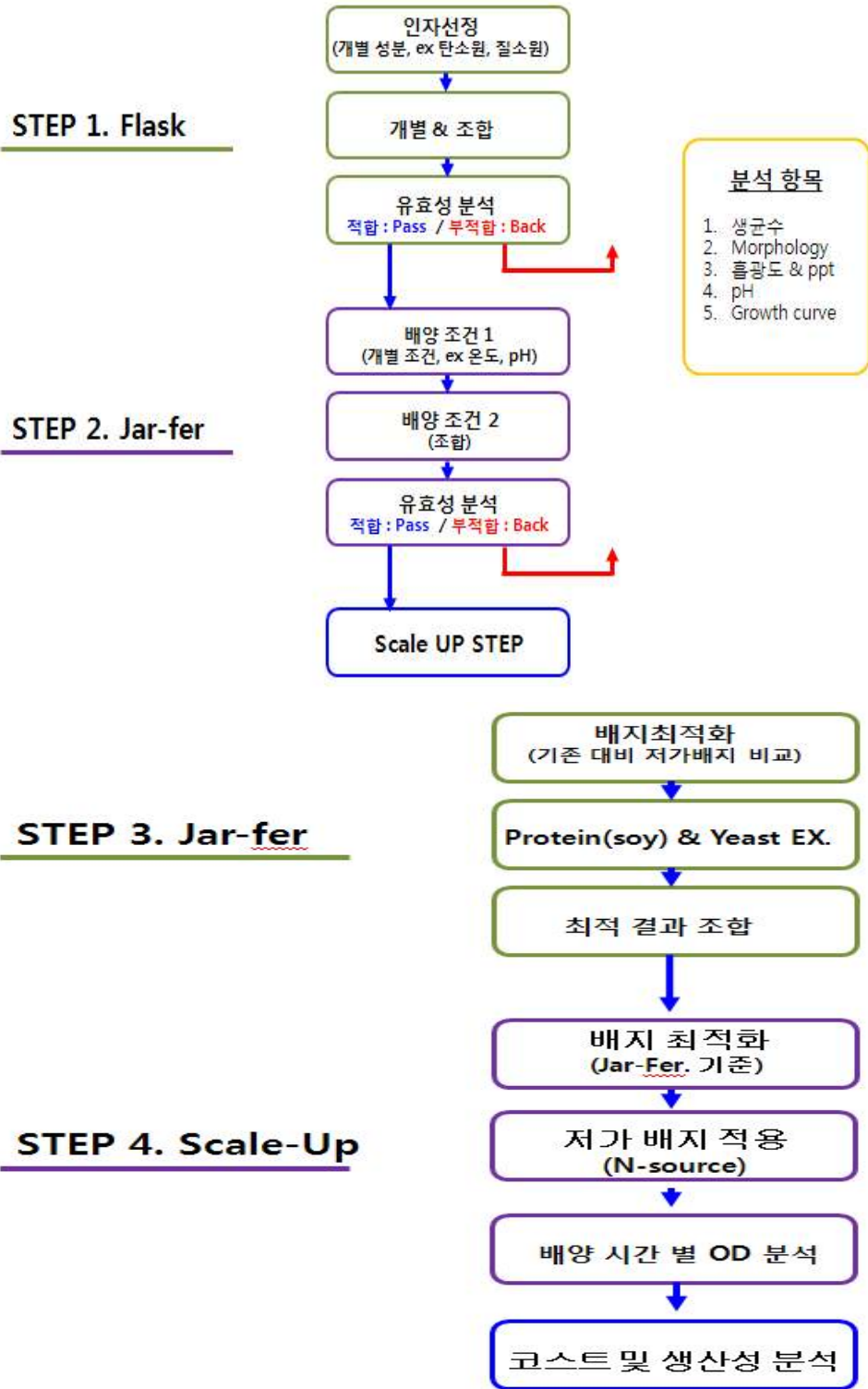


Figure 6-1. 선별균주에 대한 배지 및 배양 최적화 및 생산수준의 저가배지를 이용한 경제성 확보를 위한 단계별 최적화 과정 요약.

2. Flask 배양 수준에서의 배지원 선별 및 최적화

가. 균주별 탄소원의 영향 조사

(1) *L. acidophilus* LA1

(가) 당 동정 실시

Table 6-1. API 키트를 이용한 당 이용성

No	Carbohydrates	Utilized	No	Carbohydrates	Utilized
0	Control	-	25	Esculine	-
1	Glycerol	-	26	Salicine	-
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	-
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	-	29	Lactose	-
5	Ribose	-	30	Melibiose	-
6	D-Xylose	-	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	-
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β-Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	-
11	D-Glucose	+	36	Amidon	-
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	-
13	D-Mannose	-	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	β-Gentiobiose	-
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	-	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	α-Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α-Methyl-D-glucoside	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	+	47	Gluconate	-
23	Amygdaline	-	48	2-Ceto-gluconate	-
24	Arbutine	-	49	5-Ceto-gluconate	-

(나) 당 이용성

- 당 이용성 검사에서 주로 사용하는 당에 대한 개별 배양성 검사를 실시하였으며, ‘fructose’를 적용한 배지조성에서 생균수가 1.6×10^9 CFU/mL으로 가장 좋은 생균수를 보였으며, 현미경으로 morphology를 관찰한 결과 양호한 모양을 보였다.

구분	배양균수 (cfu/ml)	Morphology
Glucose	2.26E+08	
Fructose	1.64E+09	
Maltose	1.36E+09	
Sucrose	1.08E+09	

Figure 6-2. 당 배지 별 배양균수와 morphology.

(2) *L. fermentum* LF1

(가) 당 동정 실시

Table 6-2. API 키트를 이용한 당 이용성

No	Carbohydrates	Utilized	No	Carbohydrates	Utilized
0	Control	-	25	Esculine	-
1	Glycerol	-	26	Salicine	-
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	-
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	Lactose	-
5	Ribose	+	30	Melibiose	-
6	D-Xylose	+	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	-
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β -Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	-	35	D-Raffinose	-
11	D-Glucose	+	36	Amidon	-
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	-
13	D-Mannose	-	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	β -Gentiobiose	-
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	-	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	α -Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α -Methyl-D-glucoside	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	-	47	Gluconate	+
23	Amygdaline	-	48	2-Ceto-gluconate	-
24	Arbutine	-	49	5-Ceto-gluconate	+

(나) 당 이용성

- 당 이용성 검사에서 주로 사용하는 당에 대한 개별 배양성 검사를 실시하였으며, 'glucose'를 적용한 배지조성에서 생균수가 2.2×10^9 CFU/mL으로 가장 좋은 생균수를 보였으며, 현미경으로 morphology를 관찰한 결과 양호한 모양을 보였다.

구분	배양균수 (cfu/ml)	Morphology
Glucose	2.26E+09	
Fructose	1.64E+09	
Maltose	1.36E+09	
Sucrose	1.28E+09	

Figure 6-3. 당 배지 별 배양균수와 morphology.

(3) *L. rhamnosus* LR1

(가) 당 동정 실시

Table 6-3. API 키트를 이용한 당 이용성

No	Carbohydrates	Utilized	No	Carbohydrates	Utilized
0	Control	-	25	Esculine	+
1	Glycerol	+	26	Salicine	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	+	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	-	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	-
6	D-Xylose	-	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	+
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β -Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	+
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	-
11	D-Glucose	+	36	Amidon	-
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	-
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	+	39	β -Gentiobiose	+
15	Rhamnose	+	40	D-Turanose	-

16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatose	+
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	+	44	L-Fucose	+
20	α-Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α-Methyl-D-glucoside	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	+	47	Gluconate	+
23	Amygdaline	+	48	2-Ceto-gluconate	-
24	Arbutine	+	49	5-Ceto-gluconate	-

(나) 당 이용성

- 당 이용성 검사에서 주로 사용하는 당에 대한 개별 배양성 검사를 실시하였으며, 'glucose'를 적용한 배지조성에서 생균수가 2.5×10^9 CFU/mL으로 가장 좋은 생균수를 보였으며, 현미경으로 morphology를 관찰한 결과 양호한 모양을 보였다.


구분	배양균수 (cfu/ml)	Morphology
Glucose	2.54E+09	
Fructose	1.21E+09	
Maltose	1.516E+09	
Sucrose	1.14E+09	

Figure 6-4. 당 배지 별 배양균수와 morphology.

(4) *B. animalis* spp. *lactis* BL3

(가) 당 동정 실시

Table 6-4. API 키트를 이용한 당 이용성

No	Carbohydrates	Utilized	No	Carbohydrates	Utilized
0	Control	-	25	Esculine	-
1	Glycerol	-	26	Salicine	-
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	-
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	-	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	+

6	D-Xylose	-	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	-
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β-Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	-	35	D-Raffinose	+
11	D-Glucose	+	36	Amidon	-
12	D-Fructose	-	37	Glycogene	-
13	D-Mannose	-	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	β-Gentiobiose	+
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	α-Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α-Methyl-D-glucoside	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	-	47	Gluconate	-
23	Amygdaline	+	48	2-Ceto-gluconate	-
24	Arbutine	-	49	5-Ceto-gluconate	-

(나) 당 이용성

- 당 이용성 검사에서 주로 사용하는 당에 대한 개별 배양성 검사를 실시하였으며, 'glucose'를 적용한 배지조성에서 생균수가 2.3×10^9 CFU/mL으로 가장 좋은 생균수를 보였으며, 현미경으로 morphology를 관찰한 결과 양호한 모양을 보였다.

구분	배양균수 (cfu/ml)	Morphology
Glucose	2.25E+09	
Maltose	1.15E+09	
Lactose	1.33E+09	
Sucrose	8.52E+08	

Figure 6-5. 당 배지 별 배양균수와 morphology.

(5) *B. longum* BG7

(가) 당 동정 실시

Table 6-5. API 키트를 이용한 당 이용성

No	Carbohydrates	Utilized	No	Carbohydrates	Utilized
0	Control	-	25	Esculine	+
1	Glycerol	-	26	Salicine	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	+
6	D-Xylose	+	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	-
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β -Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	+
11	D-Glucose	+	36	Amidon	-
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	-
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	β -Gentiobiose	-
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	w
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	+	44	L-Fucose	-
20	α -Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α -Methyl-D-glucoside	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	-	47	Gluconate	-
23	Amygdaline	-	48	2-Ceto-gluconate	-
24	Arbutine	+	49	5-Ceto-gluconate	w

(나) 당 이용성

- 당 이용성 검사에서 주로 사용하는 당에 대한 개별 배양성 검사를 실시하였으며, ‘glucose’를 적용한 배지조성에서 생균수가 2.4×10^9 CFU/mL으로 가장 좋은 생균수를 보였으며, 현미경으로 morphology를 관찰한 결과 양호한 모양을 보였다.

구분	배양균수 (cfu/ml)	Morphology
Glucose	2.37E+09	
Maltose	1.01E+09	
Lactose	1.21E+09	
Sucrose	1.31E+09	

Figure 6-6. 당 배지 별 배양균수와 morphology.

나. 균주 별 유기질소원의 영향

(1) 균주 별 단백질원 이용성 조사

(가) *L. acidophilus* LA1

구분	Skim milk	Soy peptone	Isolated Soy Protein	Casein peptone
배양균수 (cfu/ml)	8.29E+08	1.36E+09	1.08E+09	1.75E+08
Morphology				

Figure 6-7. 단백질 배지 별 배양균수와 morphology.

(나) *L. fermentum* LF1

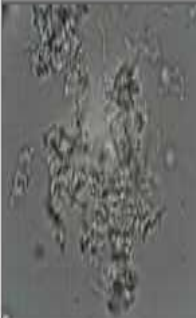



구분	Skim milk	Soy peptone	Isolated Soy Protein	Casein peptone
배양균수 (cfu/ml)	3.35E+08	1.52E+09	8.79E+08	2.02E+08
Morphology				

Figure 6-8. 단백질 배지 별 배양균수와 morphology.

(다) *L. rhamnosus* LR5





구분	Skim milk	Soy peptone	Isolated Soy Protein	Casein peptone
배양균수 (cfu/ml)	1.02E+09	2.41E+09	1.54E+09	5.84E+08
Morphology				

Figure 6-9. 단백질 배지 별 배양균수와 morphology.

(라) *B. animalis* spp. *lactis* BL3

구분	Skim milk	Soy peptone	Isolated Soy Protein	Casein peptone
배양균수 (cfu/ml)	1.22E+09	1.02E+09	2.15E+09	2.22E+09
Morphology				

Figure 6-10. 단백질 배지 별 배양균수와 morphology.

(마) *B. longum* BG7

구분	Skim milk	Soy peptone	Isolated Soy Protein	Casein peptone
배양균수 (cfu/ml)	1.54E+09	2.59E+09	1.09E+09	1.94E+09
Morphology				

Figure 6-11. 단백질 배지 별 배양균수와 morphology.

다. 무기이온의 영향(Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} 등)

(1) 균주 별 무기이온 영향성 조사

(가) *L. acidophilus* LA1





구분	Vitamin E	L-cystein	Citric acid	NaCl
배양균수 (cfu/ml)	1.03E+09	1.11E+09	1.05E+09	8.33E+08
Morphology				

Figure 6-12. 무기이온 배지 별 배양균수와 morphology.

(나) *L. fermentum* LF1





구분	NaCl	$MnSO_4$	$MgSO_4$	$CaCl_2$
배양균수 (cfu/ml)	1.25E+08	8.5E+08	1.11E+08	1.07E+08
Morphology				

Figure 6-13. 무기이온 배지 별 배양균수와 morphology.

(다) *L. rhamnosus* LR5

구분	Vitamin E	L-Cystein	Citric acid	Na Cl
배양균수 (cfu/ml)	2.11E+09	2.09E+09	2.34E+09	1.94E+09
Morphology				

Figure 6-14. 무기이온 배지 별 배양균수와 morphology.

(라) *B. animalis* spp. *lactis* BL3





구분	Na Cl	ZnSO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂
배양균수 (cfu/ml)	1.25E+06	3.25E+06	3.11E+08	8.25E+08
Morphology				

Figure 6-15. 무기이온 배지 별 배양균수와 morphology.

(마) *B. longum* BG7



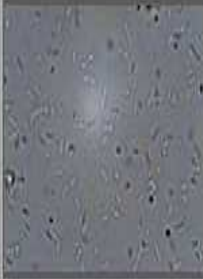

구분	NaCl	ZnSO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂
배양균수 (cfu/ml)	1.34E+09	3.25E+08	1.22E+09	1.35E+09
Morphology				

Figure 6-16. 무기이온 배지 별 배양균수와 morphology.

3. Jar-Fermenter 수준에서의 배양 조건 최적화

- Flask 배양에서 얻은 최적의 배지 조성을 이용하여 Jar-Fermenter에서 최적의 배양 조건을 구하는 실험을 진행하였다.
- 배양 최적화 조건으로는 온도, pH를 선정하여 최적화하였다.

가. 최적의 온도 조건 확인

(1) *L. acidophilus* LA1

Table 6-6. 온도 별 배양성 확인

Culture Time (hr)	32°C	37°C	42°C
0	1.12E+06	1.10E+06	1.13E+06
2	1.08E+06	1.43E+06	1.33E+06
4	1.43E+06	1.21E+07	8.57E+06
6	1.54E+06	5.63E+07	1.28E+07
8	1.65E+06	3.78E+08	3.63E+07
10	3.67E+06	1.21E+09	2.43E+08
12	1.26E+07	1.63E+09	7.41E+08
14	1.35E+08	2.09E+09	1.44E+09
16	2.83E+08	2.83E+09	1.50E+09
18	3.50E+08	3.35E+09	1.58E+09
20	3.34E+08	3.18E+09	1.36E+09

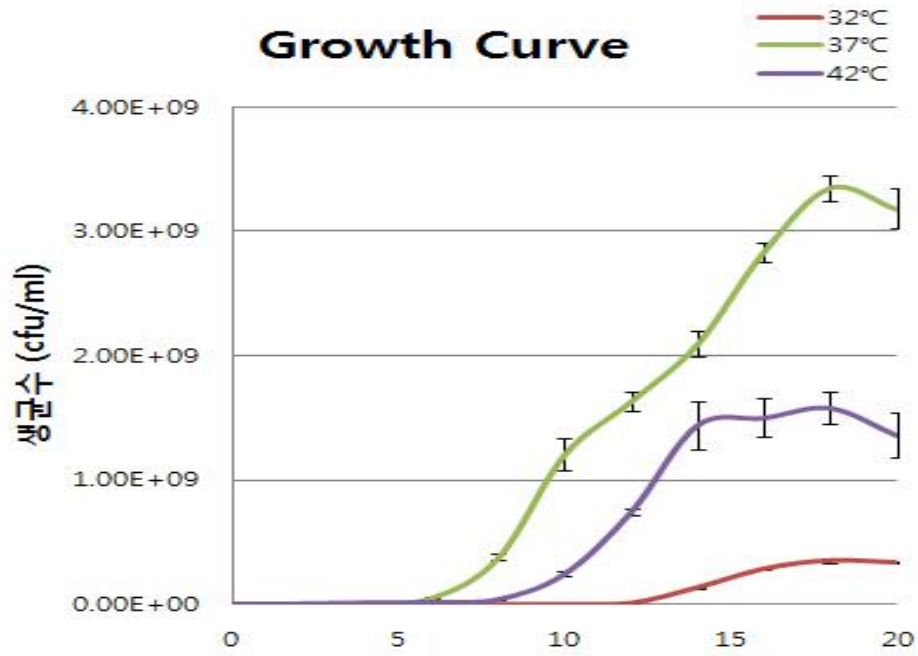


Figure 6-17. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(2) *L. fermentum* LF1

Table 6-7. 온도별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	32°C	37°C	42°C
0	1.72E+06	1.65E+06	2.12E+06
2	1.95E+06	2.52E+06	3.27E+06
4	2.20E+06	1.52E+07	1.63E+07
6	5.20E+06	3.53E+07	3.48E+07
8	8.59E+06	5.37E+07	8.76E+07
10	1.56E+07	9.71E+07	1.56E+09
12	3.73E+07	1.32E+09	2.64E+09
14	1.49E+08	2.29E+09	3.45E+09
16	4.52E+08	3.27E+09	3.54E+09
18	7.52E+08	2.95E+09	3.20E+09
20	8.48E+08	2.64E+09	3.14E+09

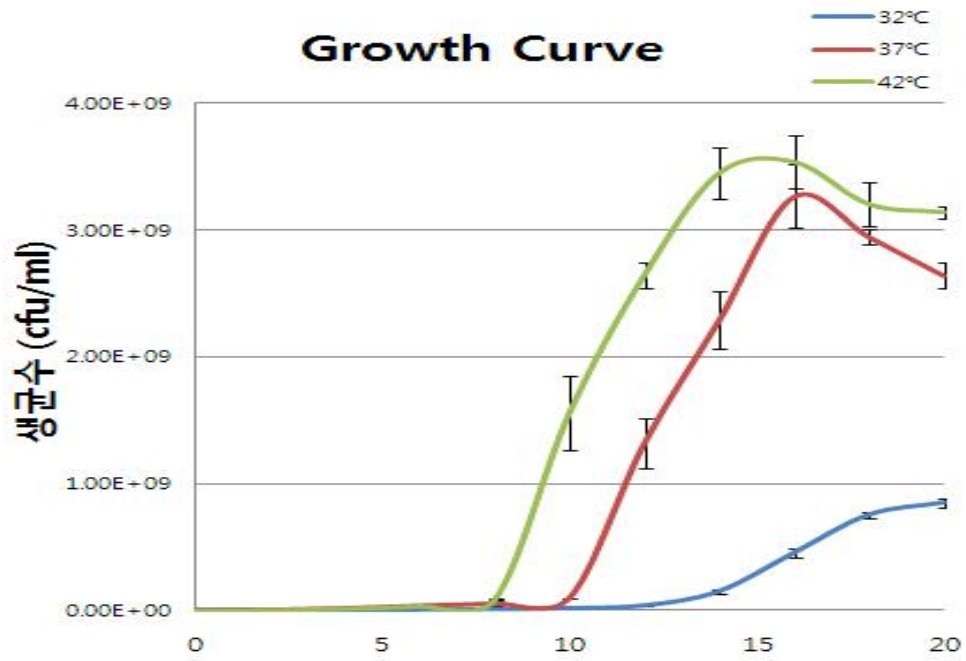


Figure 6-18. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(3) *L. rhamnosus* LR5

Table 6-8. 온도 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	32°C	37°C	42°C
0	1.13E+07	1.37E+07	1.25E+07
2	1.33E+07	1.46E+07	1.31E+07
4	1.18E+07	1.81E+07	4.71E+07
6	1.64E+07	2.36E+08	1.54E+08
8	1.77E+07	9.64E+08	5.18E+08
10	3.63E+07	2.18E+09	1.11E+09
12	5.31E+07	4.40E+09	2.48E+09
14	8.33E+07	6.32E+09	3.79E+09
16	1.56E+08	7.61E+09	4.23E+09
18	2.59E+08	7.65E+09	4.65E+09
20	4.66E+08	7.47E+09	4.72E+09

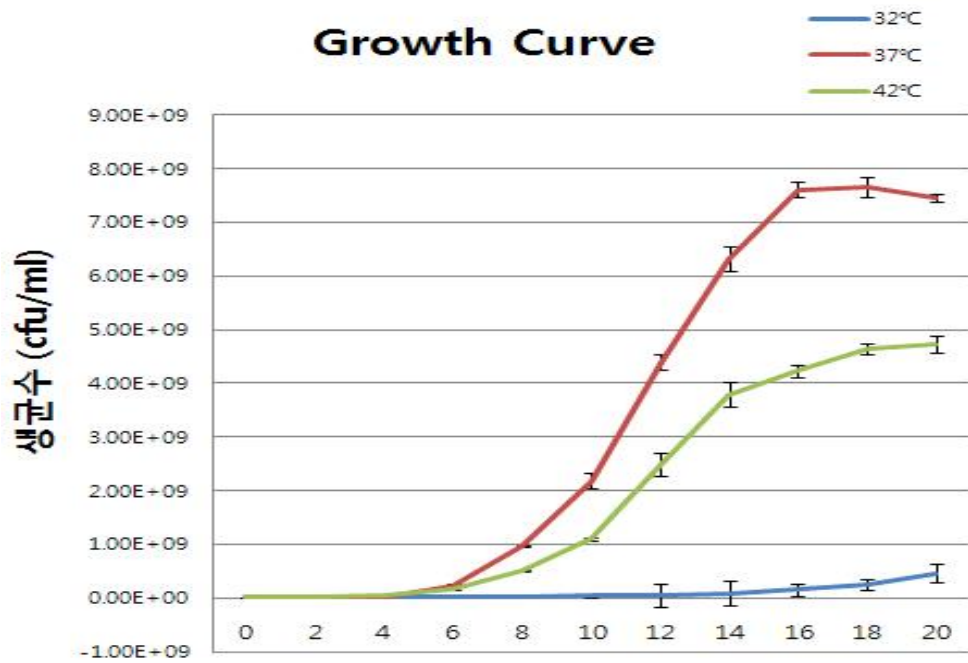


Figure 6-19. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(4) *B. animalis* spp. *lactis* BL3

Table 6-9. 온도 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	32°C	37°C	42°C
0	1.50E+06	2.47E+06	1.53E+06
2	1.64E+06	2.41E+06	1.84E+06
4	1.68E+06	3.42E+06	2.38E+06
6	1.71E+06	4.44E+07	3.73E+06
8	3.34E+06	7.70E+07	5.37E+06
10	4.49E+06	9.68E+07	7.24E+06
12	8.33E+06	1.29E+09	1.12E+07
14	1.38E+07	5.41E+09	3.58E+07
16	5.74E+07	5.70E+09	1.23E+08
18	1.36E+08	5.54E+09	3.27E+08
20	8.85E+08	5.64E+09	4.49E+08

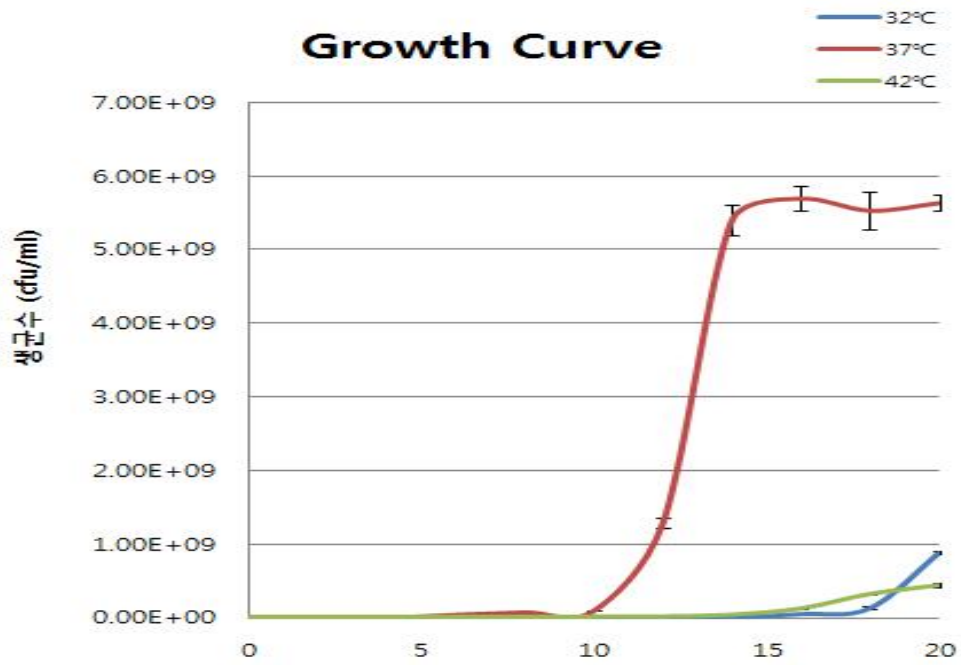


Figure 6-20. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(5) *B. longum* BG7

Table 6-10. 온도 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	32°C	37°C	42°C
0	1.54E+07	1.81E+07	1.35E+07
2	1.76E+07	1.79E+07	1.57E+07
4	1.97E+07	5.37E+07	3.46E+07
6	1.94E+07	4.79E+08	6.55E+08
8	4.35E+07	2.49E+09	2.86E+09
10	4.78E+07	4.46E+09	3.55E+09
12	9.33E+07	6.42E+09	3.45E+09
14	1.44E+08	6.51E+09	3.65E+09
16	3.70E+08	6.69E+09	2.64E+09
18	5.65E+08	6.37E+09	2.70E+09
20	7.73E+08	6.67E+09	2.70E+09

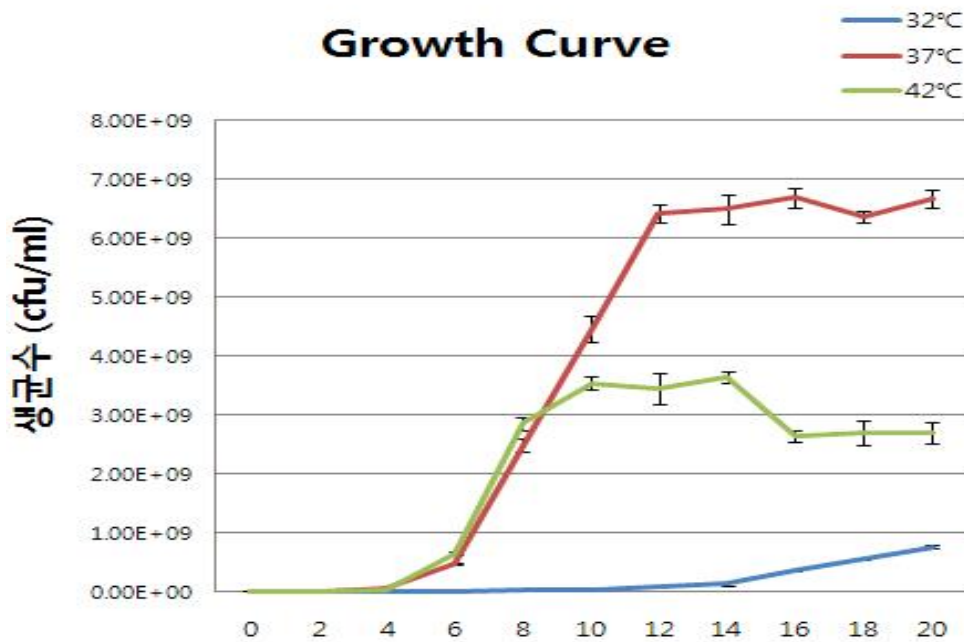


Figure 6-21. 각 온도 조건 별 성장곡선.

나. 최적의 pH 조건 확인

(1) *L. acidophilus* LA1

Table 6-11. pH 별 배양성 확인

Culture Time (hr)	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5
0	1.37E+06	1.23E+06	1.22E+06
2	1.57E+06	1.38E+06	1.52E+06
4	1.41E+07	1.43E+07	1.39E+07
6	4.86E+07	3.68E+07	3.34E+07
8	3.78E+08	2.36E+08	2.33E+08
10	1.15E+09	8.68E+08	4.53E+08
12	1.65E+09	1.37E+09	6.53E+08
14	2.50E+09	1.47E+09	7.43E+08
16	3.25E+09	1.92E+09	8.23E+08
18	3.52E+09	2.36E+09	1.08E+09
20	3.36E+09	2.50E+09	1.22E+09

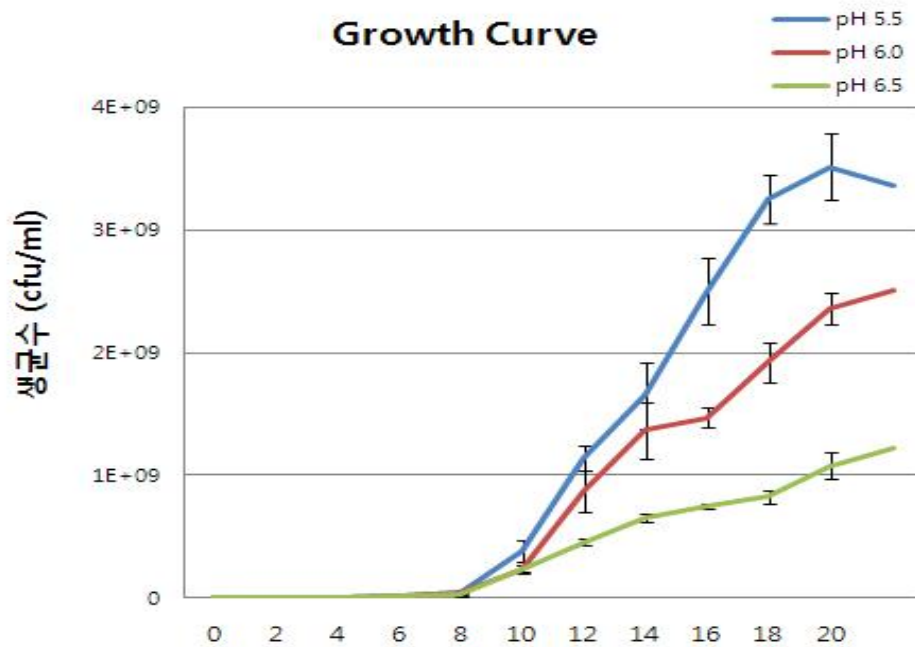


Figure 6-22. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(2) *L. fermentum* LF1

Table 6-12. pH 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5
0	1.54E+06	1.33E+06	1.65E+06
2	3.26E+06	3.26E+06	1.94E+06
4	1.37E+07	1.37E+07	3.38E+06
6	3.33E+07	2.84E+07	4.52E+06
8	7.52E+07	6.77E+07	8.44E+07
10	1.54E+09	1.36E+09	1.22E+08
12	2.64E+09	1.93E+09	3.38E+08
14	3.50E+09	2.65E+09	7.32E+08
16	3.53E+09	2.71E+09	1.26E+09
18	3.53E+09	2.74E+09	1.41E+09
20	3.51E+09	2.64E+09	1.54E+09

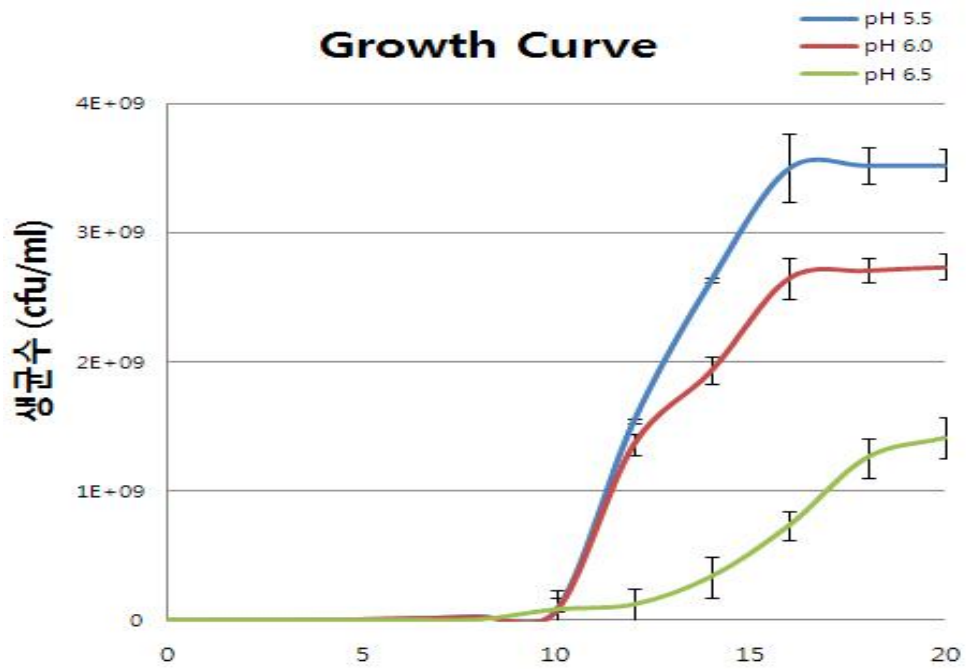


Figure 6-23. 각 온도 조건 별 성장곡선

(3) *Lactobacillus rhamnosus* LR5

Table 6-13. pH 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	pH 5.5	pH 6	pH 6.5
0	1.28E+07	1.34E+07	1.56E+07
2	1.58E+07	1.50E+07	1.48E+07
4	1.42E+07	1.84E+07	1.84E+07
6	4.31E+07	2.55E+08	5.67E+07
8	8.37E+07	8.32E+08	2.61E+08
10	2.64E+08	2.56E+09	8.45E+08
12	7.95E+08	4.21E+09	1.58E+09
14	1.24E+09	5.76E+09	2.27E+09
16	2.62E+09	7.26E+09	3.54E+09
18	3.57E+09	7.47E+09	3.56E+09
20	3.39E+09	7.49E+09	3.62E+09

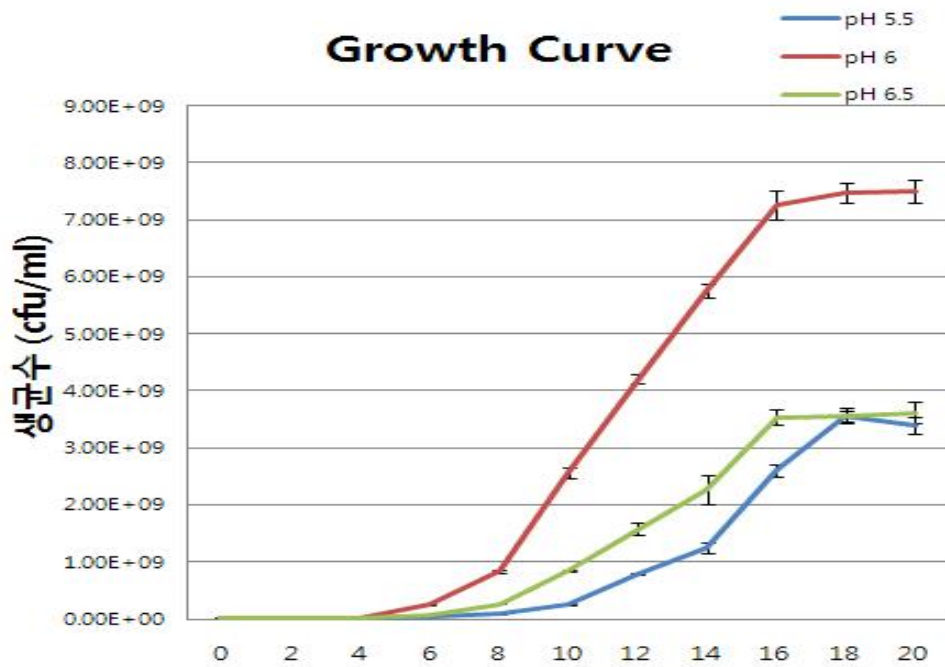


Figure 6-24. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(4) *B. animalis* spp. *lactis* BL3

Table 6-14. pH 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	pH 5.5	pH 6	pH 6.5
0	2.21E+06	1.42E+06	1.76E+06
2	2.13E+06	1.88E+06	1.89E+06
4	3.64E+06	2.71E+06	3.56E+06
6	4.39E+07	3.59E+07	8.57E+06
8	6.72E+07	5.55E+07	1.68E+07
10	1.16E+08	1.17E+08	6.38E+07
12	5.23E+08	5.46E+08	1.41E+08
14	3.61E+09	3.49E+09	5.60E+08
16	5.73E+09	5.55E+09	1.12E+09
18	5.71E+09	5.65E+09	2.64E+09
20	5.46E+09	5.33E+09	3.42E+09

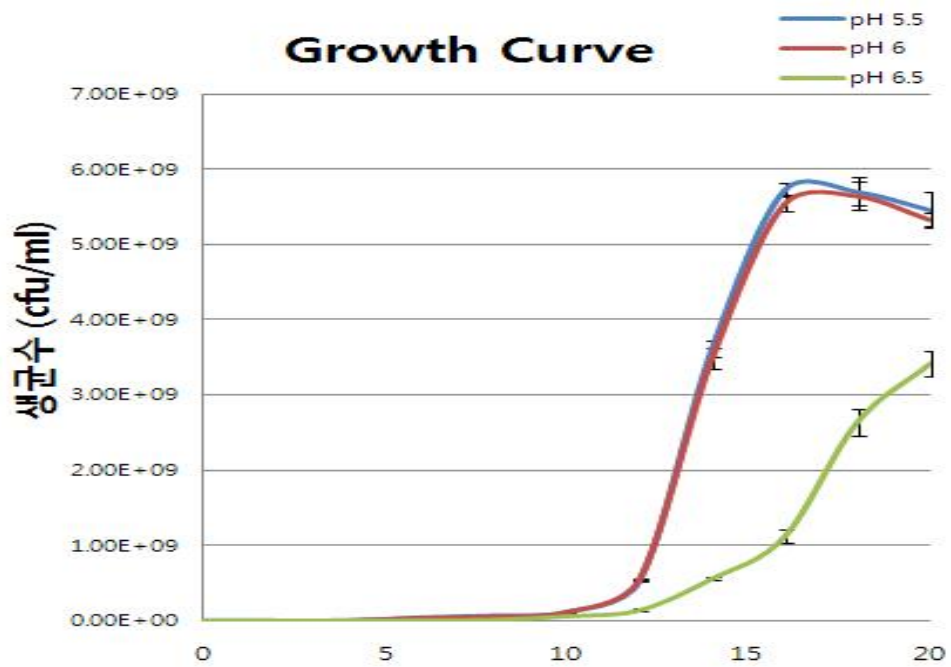


Figure 6-25. 각 온도 조건 별 성장곡선.

(5) *B. longum* BG7

Table 6-15. pH 별 배양성 확인

Culture Time (Hr)	pH 5.5	pH 6	pH 6.5
0	1.52E+07	1.54E+07	1.55E+07
2	1.55E+07	1.62E+07	1.63E+07
4	5.46E+07	5.72E+07	5.96E+07
6	4.70E+08	4.69E+08	4.88E+08
8	2.98E+09	2.69E+09	1.52E+09
10	4.58E+09	4.69E+09	2.48E+09
12	6.54E+09	6.48E+09	3.57E+09
14	6.52E+09	6.61E+09	3.58E+09
16	6.59E+09	6.63E+09	3.72E+09
18	6.56E+09	6.46E+09	3.83E+09
20	6.76E+09	6.67E+09	3.88E+09

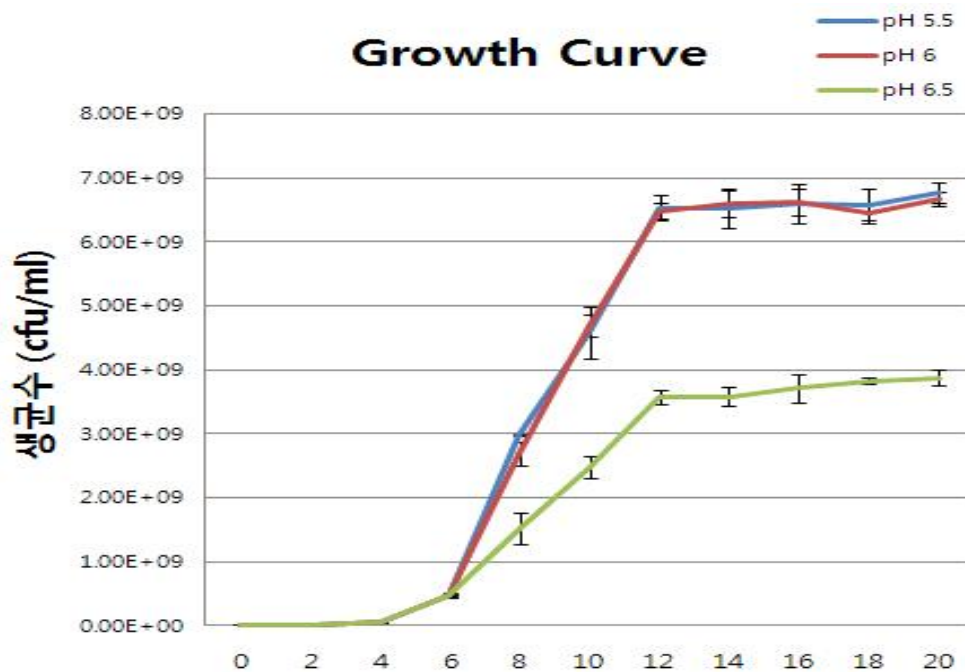


Figure 6-26. 각 온도 조건 별 성장곡선

4. 산업용 대량생산을 위한 저가배지 개발 및 배양 조건 최적화

가. Jar-Fermenter 배양 수준에서의 배지원 선별 및 최적화

(1) N-Source의 저가 배지 적용을 위한 배지 조성 개발

- 플라스크 배양실험에서 여러 당 종류 별 이용성과 N-source에 대한 배지 최적화 실험 및 배양조건 최적화 실험을 하였으며, 이를 바탕으로 대량 생산 시스템(1,000 L 이상)에서의 경제성을 고려한 저가 배지 최적화 실험을 수행하였다.

(가) *L. acidophilus* LA1

① Protein & peptone 조합의 최적화

- N-Source로써 protein 배지인 ISP(Isolate Soybean Protein)와 peptone 배지인 soy peptone을 이용하여 각각의 농도 별 조합을 만들어 가장 최적의 배양성을 보이는 배지 조성을 확립하였다. 기존의 peptone 배지는 protein 배지 대비 가격 원가가 높은 편이며, 경제성을 확보하기 위하여 저가 배지인 protein 배지류인 ISP를 혼합하여 최적의 배양성을 확보하고자 하였다.

- 배지 조성에서 ‘기준’이라 함은 생산현장에서 생산 배지로써 사용되는 양을 기준으로 그 절반 수준과 없이 “0%”로 3가지 조성 조합을 만들어 최적 배지원을 선정하였다.

Table 6-16 고가배지와 저가배지의 조합으로 얻은 배지 최적화

계획			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	기준 1/2	기준
B: peptone (고가)	B0	0%	제외1	1	2
	B1	기준 1/2	3	4	5
	B2	기준	6	7	제외2

- 7가지 배지 조성 조합을 만들어 배양성 테스트를 진행하였다.

Table 6-17. 7가지 조합 배지 별 배양 생균수 비교

결과			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	×1	×2
B: peptone (고가)	B0	0%	제외 (불필요)	9.7×10^8 (탈락1)	2.0×10^9 (1순위)
	B1	×1	8.2×10^8 (탈락1)	1.9×10^9 (2순위)	1.9×10^9 (탈락2)
	B2	×2	1.7×10^9 (3순위)	1.8×10^9 (탈락2)	제외 (경제성X)

- 7가지 배지 조성 조합으로 각각 배양 후 생균수 분석을 하여 가장 높은 생균수를 나타내는 배지조성을 1순위부터 3순위까지 3개의 후보균을 도출하였다.
- 순위 선정 기준으로는 배양성(생균수)과 경제성을 종합하여 순위 선정을 하였다.

② Yeast extract 저가 배지의 최적화

- 유산균 배양 시 배지의 N-source로써 yeast extract의 유무에 배양성에 많은 차이를 보이며 yeast extract는 N-source로써 들어갈 때 향상된 배양성을 보인다.
- 그러므로, 필수 불가결한 배지원으로 yeast extract는 생산원가의 상승 요인으로 작용하며, yeast extract에 대한 저가 배지를 적용하고 최적화함으로써 생산 경제성 확보를 가능하게 할 수 있다.
- 이번 실험에서는 flask 배양에서 최적화된 배지 조성에 yeast extract를 혼합하여 사용하되, 3개 회사 제품을 각각 적용하였으며, 각 회사의 제품은 단가측면에서 “고가”, “중가”, “저가”로 구분하였으며, 고가 원료 대비 저가는 약 1/2의 단가 차이를 보인다.

- 각 회사 제품의 yeast extract를 사용함에 최적의 결과를 얻기 위하여, 각 제품 별 enzyme 처리 방법을 별도로 처리한 후 동일 배양 조건에 대한 배양성 결과를 비교 관찰 하였다.

Table 6-18. Yeast extract의 제조사 별(단가 별) 배양성 비교 결과

배양시간 (h)	실험 조건		
	1	2	3
	A社(고가)	B社(중가)	C社(저가)
0	1.1×10^6	1.2×10^6	1.3×10^6
2	1.3×10^6	1.5×10^6	1.7×10^6
4	1.3×10^7	3.2×10^6	1.5×10^7
6	3.7×10^7	4.5×10^6	5.4×10^7
8	1.9×10^8	1.2×10^7	2.3×10^8
10	4.4×10^8	3.6×10^8	8.1×10^8
12	8.4×10^8	4.3×10^8	1.4×10^9
14	1.5×10^9	5.7×10^8	2.1×10^9
16	1.8×10^9	5.5×10^8	2.8×10^9
18	1.9×10^9	5.5×10^8	3.5×10^9
20	1.9×10^9	5.3×10^8	3.5×10^9

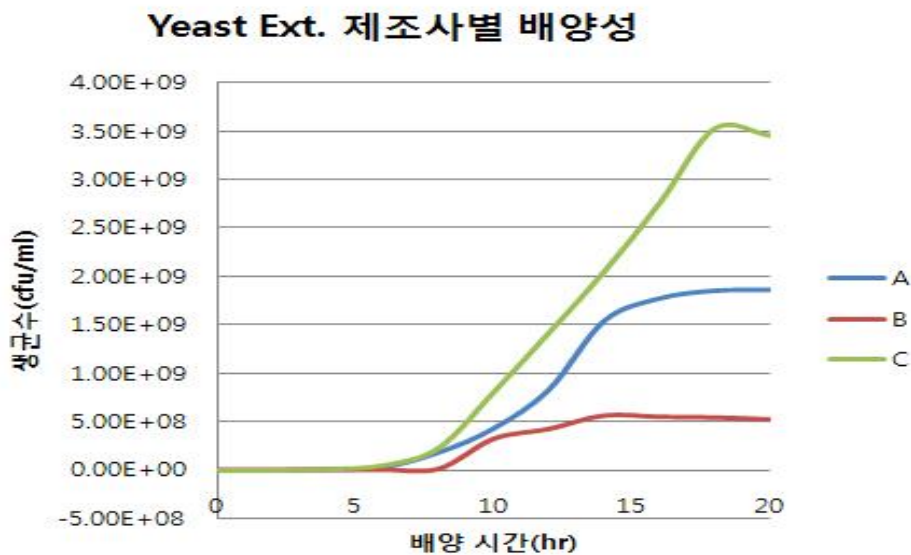


Figure 6-27. Yeast extract의 제조사 원료 별 성장곡선 비교.

③ 배양성 비교 결과

- C사 원료를 적용하여 배양한 생균수가 가장 높게 나왔으며, 증가되어 수준 실험 및 교차 사용 실험은 제외하였다.

④ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화 검증

- N-source인 protein(ISP), peptone(Soy), yeast extract의 조합으로 저가 배지의 최적화 배지를 제조하였다.
- 생산현장의 스케일로 scale-up 하여 3회 배양결과에 대한 validation을 진행하였다.

Table 6-19. 고가배지와 저가배지의 조합으로 얻은 배지 최적화

실험 횟수	발효액량	건조량	분석 결과		생산성	절감율(%)
			발효	건조		
Control	1,000 L	8.3	2.5×10^9	2.3×10^{11}	100%	-
1	1,000 L	8.5	3.3×10^9	3.1×10^{11}	138%	54%
2		8.3	3.4×10^9	3.3×10^{11}	140%	55%
3		8.7	3.4×10^9	3.2×10^{11}	144%	56%
평균		8.5	3.4×10^9	3.2×10^{11}	141%	55%

⑤ 저가 원료를 사용한 최적화 배양의 validation 결과

- N-source 배지 조성: A2(ISP)+Yeast extract(C사) 조합 배지 적용
- 기존대비 결과: 생산성 약 40% 향상, 원가 55% 절감

(나) *L. fermentum* LF1

① Protein & peptone 조합의 최적화

- N-source로써 protein 배지인 ISP(Isolate Soybean Protein)와 peptone배지인 soy peptone을 이용하여 각각의 농도 별 조합을 만들어 가장 최적의 배양성을 보이는 배지 조성을 확립하였다. 기존의 peptone 배지는 protein 배지 대비 가격원가가 높은 편이며, 경제성을 확보하기 위하여 저가 배지인 protein 배지류인 ISP를 혼합하여 최적의 배양성을 확보하고자 하였다. 배지 조성에서 ‘기존’이라 함은 생산현장에서 생산 배지로서 사용되는 양을 기준으로 그 절반 수준과 없이 “0%”로 3가지 조성 조합을 만들어 최적 배지원을 선정하였다.

Table 6-20. 고가배지와 저가배지의 조합으로 얻은 배지 최적화

계획			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	기존 1/2	기존
B: peptone (고가)	B0	0%	제외	1	2
	B1	기존 1/2	3	4	5
	B2	기존	6	7	제외

- 7가지 배지 조성 조합을 만들어 배양성 테스트를 진행하였다.

Table 6-21. 7가지 조합 배지 별 배양 생균수 비교

결과			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	×1	×2
B: peptone (고가)	B0	0%	제외 (불필요)	8.3×10^8 (탈락1)	2.8×10^9 (2순위)
	B1	×1	1.2×10^9 (탈락1)	2.9×10^9 (3순위)	2.7×10^9 (탈락2)
	B2	×2	3.4×10^9 (1순위)	2.7×10^9 (탈락2)	제외 (경제성X)

- 7가지 배지 조성 조합으로 각각 배양 후 생균수 분석을 하여 가장 높은 생균수를 나타내는 배지조성을 1순위부터 3순위까지 3개의 후보군을 도출하였다.
- 순위 선정 기준으로는 배양성(생균수)과 경제성을 종합하여 순위 선정을 하였다.
- Yeast extract 저가 배지의 최적화

Table 6-22. Yeast extract의 제조사 별(단가 별) 배양성 비교 결과

배양시간 (h)	실험 조건		
	1	2	3
	A社(고가)	B社(중가)	C社(저가)
0	1.4×10^6	1.1×10^6	1.2×10^6
2	3.4×10^6	3.3×10^6	3.5×10^6
4	1.4×10^7	1.5×10^7	1.8×10^7
6	7.3×10^8	6.2×10^8	8.2×10^8
8	1.6×10^9	1.3×10^9	2.1×10^9
10	2.8×10^9	2.1×10^9	3.1×10^9

12	3.3×10^9	2.5×10^9	3.9×10^9
14	3.4×10^9	2.3×10^9	3.7×10^9
16	3.3×10^9	2.3×10^9	3.4×10^9
18	3.3×10^9	2.2×10^9	3.5×10^9
20	3.2×10^9	1.9×10^9	3.4×10^9

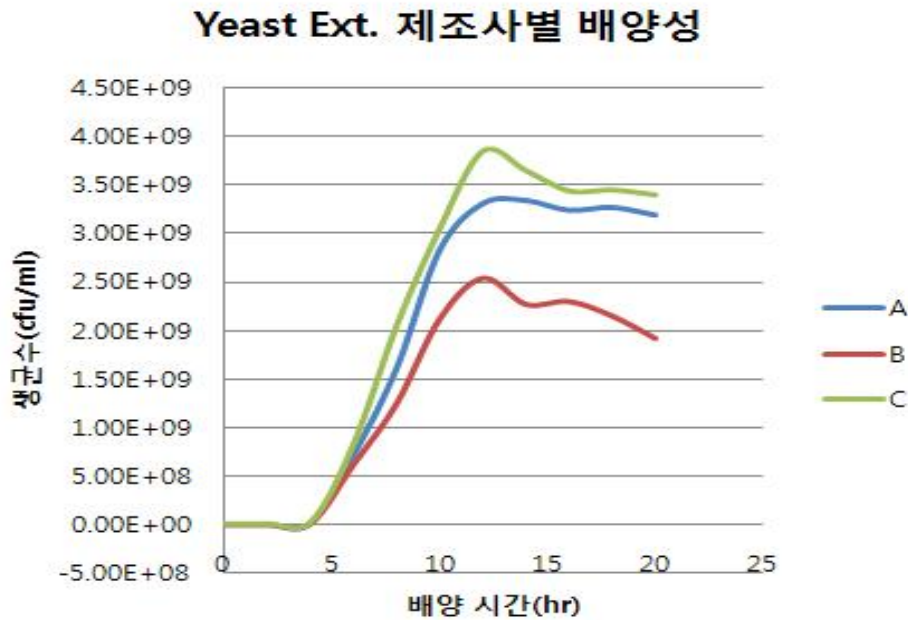


Figure 6-28. Yeast extract의 제조사 원료 별 성장곡선 비교.

- 배양성 비교 결과: C사 원료와 A사 원료를 적용하여 배양한 배지조성의 생균수가 높게 나왔으며, B사의 원료는 배양성이 저조하여 비교 대상에 제외하였다.
- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 수준 별 비교): 2인자 4수준 실험계획. A사 원료와 C사 원료를 4가지 농도 수준으로 '2인자 4수준' 배지 조성을 만들어 배양성을 비교하였다.

Table 6-23. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성표(2인자 4수준)

계획			A: A社(고가)			
			A0 0수준	A1 1수준	A2 2수준	A3 3수준
B: C社 (저가)	B0	0수준	제외1	1	2 Control	3
	B1	1수준	4	5	6	7
	B2	2수준	8	9	10	제외2
	B3	3수준	11	12	제외2	제외2

Table 6-24. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성으로 배양한 생균수 결과(2인자 4수준)

결과			A: A社(고가)			
			A0	A1	A2	A3
			0수준	1수준	2수준	3수준
B: C社 (저가)	B0	0수준	제외1	1.5×10 ⁹ (탈락1)	2.4×10 ⁹ (탈락1)	3.4×10 ⁹ (Control, 4위)
	B1	1수준	2.0×10 ⁹ (탈락1)	2.2×10 ⁹ (탈락1)	3.3×10 ⁹ (3순위)	3.4×10 ⁹ (탈락2)
	B2	2수준	2.6×10 ⁹ (탈락1)	3.4×10 ⁹ (2순위)	3.52×10 ⁹ (탈락2)	제외2
	B3	3수준	3.7×10 ⁹ (1순위)	3.5×10 ⁹ (탈락2)	제외2	제외2

- Yeast extract 조합 실험(A社, C社 수준 별 비교): 2인자 4수준 배지 조성 조합으로 각각 배양하여 생균수를 측정하여 1순위부터 3순위 까지 후보군 순위를 도출하였다.
- 4순위는 1부터 3순위까지의 비교군으로 적용하였다.

② 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화

Table 6-25. Yeast extract 조합의 3개 후보군배양 배지 조성으로 대량 배양한 생균수 결과(2인자 4수준)

실험 No.	Yeast extract (상대비율)		발효액량	건조량	분석 결과		절감율 (%)
	A社	C社			발효	건조	
3 (Control)	3수준	0수준	1,000 L	7.2	3.3×10 ⁹	1.9×10 ¹¹	-
6	2수준	1수준		7.3	3.3×10 ⁹	2.2×10 ¹¹	20%
9	1수준	2수준		7.5	3.6×10 ⁹	1.6×10 ¹¹	8%
11	0수준	3수준		7.5	3.6×10 ⁹	1.2×10 ¹¹	-14%

- Yeast extract 조합 실험(A社, C社 수준 별 비교) 결과 6번의 조합이 배양성과 경제성이 가장 좋은 것으로 나타났다.
- 6번 조합: 배양성은 동일하나, 공정 사멸율이 낮아, 생산성 향상 효과가 있으며, 더불어 원료비 절감에 따른 원가 절감 효과도 발생하였다.
- 9번 조합: 원료 단가 하락으로 원가 절감 효과는 발생했으나, 생산성 하락으로 효과 부족함. 생산성 하락으로 인한 추가 생산도 필요하였다.
- 11번 조합: 배양성은 좋으나, 공정 사멸율이 높아, 생산성이 감소하여, 원료단가가 낮

아저 발생한 원가 절감 효과가 상쇄되었다.

③ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화 검증(3회 validation)

Table 6-26. Yeast extract 조합 배지 조성 선정으로 대량 3회 배양하여 재현성 검증

실험 횟수	발효액량	건조량	분석 결과		생산성	절감율(%)
			발효	건조		
1	1,000 L	7.3	3.3×10^9	2.2×10^{11}	119%	20%
2		7.4	3.5×10^9	2.4×10^{11}	131%	28%
3		7.3	3.5×10^9	2.2×10^{11}	122%	22%
평균		7.3	3.4×10^9	2.3×10^{11}	124%	23%

- Validation 결과(3회 재현성 확인 및 평균결과): 생산성 개선(24%), 원가 절감(23%)

(다) *L. rhamnosus* LR5

① Protein & peptone 조합의 최적화

- N-source로써 protein 배지인 ISP(Isolate Soybean Protein)와 peptone배지인 soy peptone을 이용하여 각각의 농도 별 조합을 만들어 가장 최적의 배양성을 보이는 배지 조성을 확립하였다.
- 기존의 peptone 배지는 protein 배지 대비 가격원가가 높은 편이며, 경제성을 확보하기 위하여 저가 배지인 protein 배지류인 ISP를 혼합하여 최적의 배양성을 확보하고자 하였다.
- 배지 조성에서 ‘기준’이라 함은 생산현장에서 생산 배지로서 사용되는 양을 기준으로 그 절반 수준과 없이 “0%”로 3가지 조성 조합을 만들어 최적 배지원을 선정하였다.

Table 6-27. 고가배지와 저가배지의 조합으로 얻은 배지 최적화

계획			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	기준 1/2	기준
B: peptone (고가)	B0	0%	제외	1	2
	B1	기준 1/2	3	4	5
	B2	기준	6	7	제외

- 7가지 배지 조성 조합을 만들어 배양성 테스트를 진행하였다.

Table 6-28. 7가지 조합 배지 별 배양 생균수 비교

결과			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	×1	×2
B: peptone (고가)	B0	0%	제외 (불필요)	3.8×10^9 (탈락1)	1.1×10^{10} (1순위)
	B1	×1	5.2×10^9 (탈락1)	1.2×10^{10} (2순위)	1.1×10^{10} (탈락2)
	B2	×2	1.1×10^{10} (3순위)	1.1×10^{10} (탈락2)	제외 (경제성X)

- 7가지 배지 조성 조합으로 각각 배양 후 생균수 분석을 하여 가장 높은 생균수를 나타내는 배지조성을 1순위부터 3순위까지 3개의 후보군을 도출하였다.
- 순위 선정 기준으로는 배양성(생균수)과 경제성을 종합하여 순위 선정을 하였다.

② Yeast extract 저가 배지의 최적화

Table 6-29. Yeast extract의 제조사 별(단가 별) 배양성 비교 결과

배양시간 (h)	실험 조건		
	1	2	3
	A社(고가)	B社(중가)	C社(저가)
0	1.4×10^6	1.2×10^6	1.3×10^6
2	3.5×10^7	3.3×10^7	3.5×10^7
4	1.6×10^8	1.5×10^7	2.0×10^7
6	4.5×10^8	4.2×10^8	6.3×10^8
8	1.7×10^9	1.5×10^9	2.1×10^9
10	3.3×10^9	3.1×10^9	4.4×10^9
12	5.3×10^9	4.5×10^9	8.3×10^9
14	7.5×10^9	6.6×10^9	1.0×10^{10}
16	1.1×10^{10}	9.6×10^9	1.0×10^{10}
18	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
20	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	1.0×10^{10}

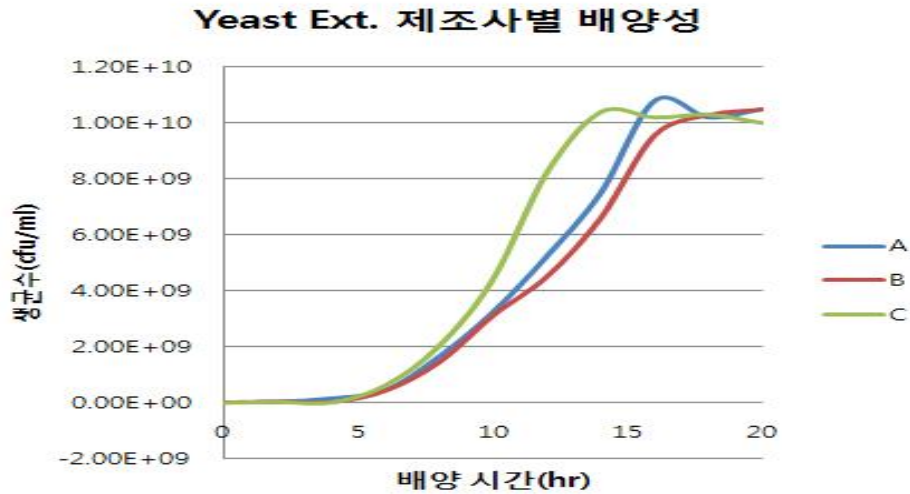


Figure 6-29. Yeast extract의 제조사 원료 별 성장곡선 비교.

- 배양성 비교 결과 yeast extract 제품 별 배양성 차이는 크지 않음. 단, C社 사용시 배양시간이 빨라지는 특성이 있다.
- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 C社 수준 별 비교): 3인자 3수준 실험계획
- A사 원료와 B사, C사 원료를 농도 별 수준으로 '3인자 3수준' 배지 조성을 만들어 배양성을 비교하였다.

Table 6-30. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성표(3인자 3수준)

계획			A: A社(고가)									
			A1 1수준			A2 2수준			A3 3수준			A0 0수준
			C: C社(저가)									
			C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C3 3수준
B: B社 (중가)	B0	0수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	1	2	3	4	제외 (경제성×)	5
	B1	1수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	6	7	8	9	10	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	2수준	제외 (불필요)	11	12	13	14	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	3수준	15	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)

Table 6-31. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성으로 배양한 생균수 결과(3인자 3수준)

결과			A: A社(고가)									
			A1 1수준			A2 2수준			A3 3수준			A0 0수준
			C: C社(저가)									
			C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2	C3
			0수준	1수준	2수준	0수준	1수준	2수준	0수준	1수준	2수준	3수준
B: B社 (증가)	B0	0수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	6.3× 10 ⁹ (탈락1)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (탈락2)	제외 (경제 성×)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)
	B1	1수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	8.1× 10 ⁹ (탈락1)	8.4× 10 ⁹ (탈락1)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (탈락2)	1.0× 10 ¹⁰ (탈락2)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)
	B2	2수준	제외 (불필요)	7.2× 10 ⁹ (탈락1)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (탈락2)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)
	B3	3수준	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)	제외 (경제 성×)

- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 수준 별 비교): 3인자 3수준 배지 조성 조합으로 각각 배양하여 생균수를 측정하여 7개의 후보군을 도출하였다.

③ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화

Table 6-32. Yeast extract 조합 후보군배양 배지 조성으로 대량 배양한 생균수 결과

실험 No.	Yeast extract (상대비율)			발효액량	건조량	분석 결과		절감율 (%)
	A社	B社	C社			발효	건조	
2	2수준	0수준	2수준	1,000 L	7.6	1.0×10 ¹⁰	4.5×10 ¹¹	-11%
3 (Control)	3수준	0수준	0수준		7.8	1.1×10 ¹⁰	5.6×10 ¹¹	-
5	0수준	0수준	3수준		7.9	1.1×10 ¹⁰	2.5×10 ¹¹	-70%
8	2수준	1수준	1수준		7.5	1.1×10 ¹⁰	6.5×10 ¹¹	21%
12	1수준	2수준	2수준		7.5	1.1×10 ¹⁰	2.4×10 ¹¹	-93%

13	2수준	2수준	0수준		7.6	1.1×10 ¹⁰	4.2×10 ¹¹	-22%
15	0수준	3수준	0수준		7.8	1.1×10 ¹⁰	1.5×10 ¹¹	-194%

- 현장 배양결과: 8번 조합에서 배양성은 동일하나, 공정 사멸율이 낮아, 생산성 향상 효과가 있으며, 더불어 원료비 절감에 따른 원가 절감 효과가 발생하였다.

④ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화 검증(3회 validation)

Table 6-33. Yeast extract 조합 배지 조성 선정으로 대량 3회 배양하여 재현성 검증

실험 횟수	발효액량	건조량	분석 결과		생산성	절감율 (%)
			발효	건조		
1	1,000 L	7.5	1.1×10 ¹⁰	6.5×10 ¹¹	112%	20%
2		7.6	1.1×10 ¹⁰	6.3×10 ¹¹	109%	19%
3		7.5	1.1×10 ¹⁰	6.5×10 ¹¹	111%	20%
평균		7.5	1.1×10 ¹⁰	6.4×10 ¹¹	111%	20%

- Validation 결과(3회 재현성 확인 및 평균결과) : 생산성 개선(11%), 원가 절감(20%)

(라) *B. animalis* subsp. *lactis* BL3

① Protein & peptone 조합의 최적화

- N-source로써 protein 배지인 ISP(Isolate Soybean Protein)와 peptone배지인 soy peptone을 이용하여 각각의 농도 별 조합을 만들어 가장 최적의 배양성을 보이는 배지 조성을 확립하였다.
- 기존의 peptone 배지는 protein 배지 대비 가격원가가 높은 편이며, 경제성을 확보하기 위하여 저가 배지인 protein 배지류인 ISP를 혼합하여 최적의 배양성을 확보하고자 하였다.
- 배지 조성에서 ‘기준’이라 함은 생산현장에서 생산 배지로써 사용되는 양을 기준으로 그 절반 수준과 없이 “0%”로 3가지 조성 조합을 만들어 최적 배지원을 선정하였다.

Table 6-34. 고가배지와 저가배지의 조합으로 얻은 배지 최적화

계획			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	기준 1/2	기준
B: peptone (고가)	B0	0%	제외	1	2
	B1	기준 1/2	3	4	5
	B2	기준	6	7	제외

- 7가지 배지 조성 조합을 만들어 배양성 테스트를 진행하였다.

Table 6-35. 7가지 조합 배지 별 배양 생균수 비교

결과			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	×1	×2
B: peptone (고가)	B0	0%	제외 (불필요)	2.7×10^9 (탈락1)	5.7×10^9 (1순위)
	B1	×1	3.2×10^9 (탈락1)	5.1×10^9 (2순위)	5.2×10^9 (탈락2)
	B2	×2	5.2×10^9 (3순위)	5.2×10^9 (탈락2)	제외 (경제성X)

- 7가지 배지 조성 조합으로 각각 배양 후 생균수 분석을 하여 가장 높은 생균수를 나타내는 배지조성을 1순위부터 3순위까지 3개의 후보군을 도출하였다.
- 순위 선정 기준으로는 배양성(생균수)과 경제성을 종합하여 순위 선정을 하였다.

② Yeast extract 저가 배지의 최적화

Table 6-36. Yeast extract의 제조사 별(단가 별) 배양성 비교 결과

배양시간 (h)	실험 조건		
	1	2	3
	A社(고가)	B社(중가)	C社(저가)
0	1.2×10^6	1.2×10^6	1.3×10^6
2	2.5×10^6	3.3×10^6	3.2×10^6
4	3.5×10^6	4.2×10^6	5.4×10^6
6	4.5×10^7	4.2×10^7	5.7×10^7
8	7.9×10^7	8.2×10^7	1.0×10^8
10	1.3×10^8	1.3×10^8	3.2×10^8
12	1.3×10^9	1.1×10^9	2.2×10^9
14	3.2×10^9	3.2×10^9	4.3×10^9
16	4.3×10^9	4.1×10^9	5.1×10^9
18	5.8×10^9	5.3×10^9	5.1×10^9
20	5.2×10^9	5.2×10^9	4.9×10^9

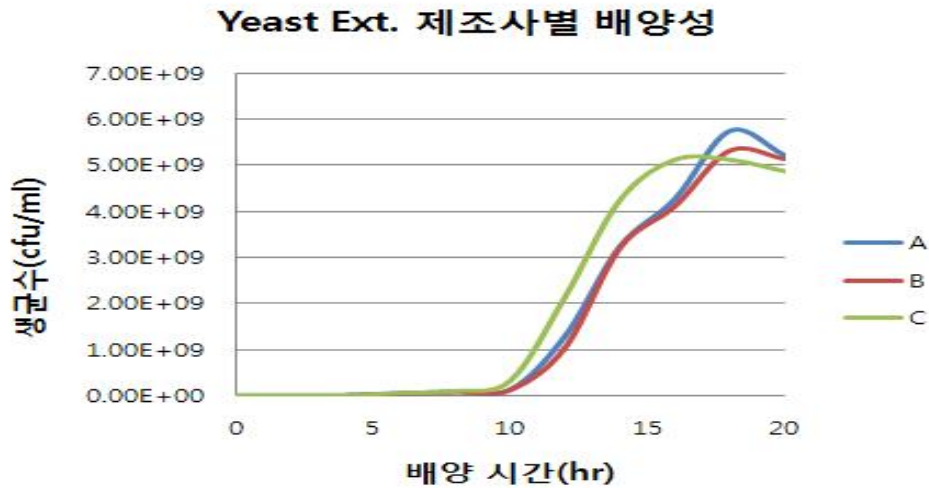


Figure 6-30. Yeast extract의 제조사 원료 별 생장곡선 비교.

- 배양성 비교 결과, yeast extract 제품 별 배양성 차이는 크지 않으며, C社 사용시 배양시간이 빨라지는 특성이 있다.
- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 C社 수준 별 비교): 3인자 3수준 실험계획
- A사 원료와 B사, C사 원료를 농도 별 수준으로 '3인자 3수준' 배지 조성을 만들어 배양성을 비교하였다.

Table 6-37. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성표(3인자 3수준)

계획			A: A社(고가)									
			A1 1수준			A2 2수준			A3 3수준			A0 0수준
			C: C社(저가)									C3 3수준
			C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2	
0수준	1수준	2수준	0수준	1수준	2수준	0수준	1수준	2수준	3수준			
B: B社 (중가)	B0	0수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	1	2	3	4	제외 (경제성×)	5
	B1	1수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	6	7	8	9	10	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	2수준	제외 (불필요)	11	12	13	14	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	3수준	15	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)

Table 6-38. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성으로 배양한 생균수 결과(3인자 3수준)

결과			A: A社(고가)									
			A1 1수준			A2 2수준			A3 3수준			A0 0수준
			C: C社(저가)									
			C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C3 3수준
B: B社 (중가)	B0	0수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	3.3× 10 ⁹ (탈락 1)	5.2× 10 ⁹ (1차선 정)	5.1× 10 ⁹ (1차선 정)	5.3× 10 ⁹ (탈락 2)	제외 (경제성×)	5.2× 10 ⁹ (1차선 정)
	B1	1수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	4.1× 10 ⁹ (탈락 1)	4.4× 10 ⁹ (탈락 1)	5.0× 10 ⁹ (1차선 정)	5.3× 10 ⁹ (탈락 2)	5.2× 10 ⁹ (탈락 2)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	2수준	제외 (불필요)	4.3× 10 ⁹ (탈락 1)	5.1× 10 ⁹ (1차선 정)	5.1× 10 ⁹ (1차선 정)	5.0× 10 ⁹ (탈락 2)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B3	3수준	5.1×10 ⁹ (1차선 정)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)

- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 수준 별 비교): 3인자 3수준 배지 조성 조합으로 각각 배양하여 생균수를 측정하여 7개의 후보군을 도출하였다.

③ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화

Table 6-39. Yeast extract 조합의 6개 후보군배양 배지 조성으로 대량 배양한 생균수 결과(3인자 3수준)

실험 No.	Yeast extract (상대비율)			발효액량	건조량	분석 결과		절감율 (%)
	A社	B社	C社			발효	건조	
2	2수준	0수준	2수준	1,000 L	7.1	5.2×10 ⁹	3.9×10 ¹¹	-35%
3 (Control)	3수준	0수준	0수준		7.2	5.1×10 ⁹	5.9×10 ¹¹	-
5	0수준	0수준	3수준		7.3	5.2×10 ⁹	1.2×10 ¹¹	-257%
8	2수준	1수준	1수준		7.1	5.1×10 ⁹	5.7×10 ¹¹	-6%
12	1수준	2수준	2수준		7.2	5.1×10 ⁹	3.3×10 ¹¹	-38%

13	2수준	2수준	0수준		7.2	5.0×10 ⁹	7.3×10 ¹¹	28%
15	0수준	3수준	0수준		7.3	5.1×10 ⁹	3.2×10 ¹¹	-43%

- 현장 배양결과 13번 조합의 배양성은 동일하나, 공정 사멸율이 낮아, 생산성 향상 효과가 있으며, 더불어 원료비 절감에 따른 원가 절감 효과가 발생하였다.

④ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화 검증(3회 validation)

Table 6-40. Yeast extract 조합 배지 조성 선정으로 대량 3회 배양하여 재현성 검증

실험 횟수	발효액량	건조량	분석 결과		생산성	절감율 (%)
			발효	건조		
1	1,000 L	7.2	5.0×10 ⁹	7.3×10 ¹¹	124%	28%
2		7.2	5.2×10 ⁹	7.3×10 ¹¹	123%	28%
3		7.3	5.1×10 ⁹	7.2×10 ¹¹	124%	28%
평균		7.2	5.1×10 ⁹	7.2×10 ¹¹	124%	28%

- Validation 결과(3회 재현성 확인 및 평균결과) 생산성 개선(24%), 원가 절감(28%)

(마) *B. longum* BG7

① Protein & peptone 조합의 최적화

- N-source로써 protein배지인 ISP(Isolate Soybean Protein)와 peptone배지인 soy peptone을 이용하여 각각의 농도 별 조합을 만들어 가장 최적의 배양성을 보이는 배지 조성을 확립하였다.
- 기존의 peptone 배지는 protein 배지 대비 가격원가가 높은 편이며, 경제성을 확보하기 위하여 저가 배지인 protein 배지류인 ISP를 혼합하여 최적의 배양성을 확보하고자 하였다.
- 배지 조성에서 ‘기존’이라 함은 생산현장에서 생산 배지로서 사용되는 양을 기준으로 그 절반 수준과 없이 “0%”로 3가지 조성 조합을 만들어 최적 배지원을 선정하였다.

Table 6-41. 고가배지와 저가배지의 조합으로 얻은 배지 최적화

계획			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	기존 1/2	기존
B: peptone (고가)	B0	0%	제외	1	2
	B1	기존 1/2	3	4	5
	B2	기존	6	7	제외

- 7가지 배지 조성 조합을 만들어 배양성 테스트를 진행하였다.

Table 6-42. 7가지 조합 배지 별 배양 생균수 비교

결과			A: Protein(저가)		
			A0	A1	A2
			0%	×1	×2
B: peptone (고가)	B0	0%	제외 (불필요)	1.3×10 ⁹ (탈락1)	5.3×10 ⁹ (3순위)
	B1	×1	3.2×10 ⁹ (탈락1)	7.2×10 ⁹ (2순위)	8.1×10 ⁹ (탈락2)
	B2	×2	1.1×10 ¹⁰ (1순위)	1.0×10 ¹⁰ (탈락2)	제외 (경제성X)

- 7가지 배지 조성 조합으로 각각 배양 후 생균수 분석을 하여 가장 높은 생균수를 나타내는 배지조성을 1순위부터 3순위까지 3개의 후보군을 도출하였다.
- 순위 선정 기준으로는 배양성(생균수)과 경제성을 종합하여 순위 선정을 하였다.

② Yeast extract 저가 배지의 최적화

Table 6-43. Yeast extract의 제조사 별(단가 별) 배양성 비교 결과

배양시간 (h)	실험 조건		
	1	2	3
	A社(고가)	B社(중가)	C社(저가)
0	2.1×10 ⁶	3.2×10 ⁶	2.5×10 ⁶
2	1.9×10 ⁷	1.3×10 ⁷	1.5×10 ⁷
4	3.3×10 ⁷	3.5×10 ⁷	5.3×10 ⁷
6	4.5×10 ⁸	3.3×10 ⁸	5.2×10 ⁸
8	1.7×10 ⁹	1.5×10 ⁹	2.1×10 ⁹
10	3.3×10 ⁹	3.7×10 ⁹	4.7×10 ⁹
12	6.3×10 ⁹	5.5×10 ⁹	8.4×10 ⁹
14	9.3×10 ⁹	8.3×10 ⁹	1.1×10 ¹⁰
16	1.2×10 ¹⁰	1.2×10 ¹⁰	1.1×10 ¹⁰
18	1.2×10 ¹⁰	1.0×10 ¹⁰	1.1×10 ¹⁰
20	1.2×10 ¹⁰	1.1×10 ¹⁰	1.0×10 ¹⁰

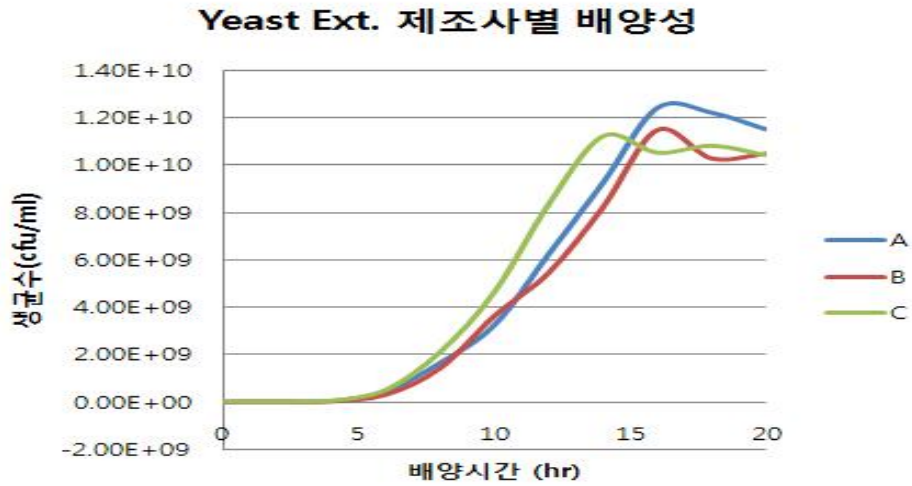


Figure 6-31. Yeast extract의 제조사 원료 별 성장곡선 비교.

- 배양성 비교 결과: yeast extract 제품 별 배양성 차이는 크지 않으며, C社 사용시 배양시간이 빨라지는 특성이 있다.
- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 C社 수준 별 비교): 3인자 3수준 실험계획
- A사 원료와 B사, C사 원료를 농도 별 수준으로 '3인자 3수준' 배지 조성을 만들어 배양성을 비교하였다.

Table 6-44. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성표(3인자 3수준)

계획			A: A社(고가)									
			A1 1수준			A2 2수준			A3 3수준			A0 0수준
			C: C社(저가)									C3 3수준
			C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	
B: B社 (증가)	B0	0수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	1	2	3	4	제외 (경제성×)	5
	B1	1수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	6	7	8	9	10	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	2수준	제외 (불필요)	11	12	13	14	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	3수준	15	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)

Table 6-45. Yeast extract 조합의 배양 배지 조성으로 배양한 생균수 결과(3인자 3수준)

결과			A: A社(고가)									
			A1 1수준			A2 2수준			A3 3수준			A0 0수준
			C: C社(저가)									
			C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C0 0수준	C1 1수준	C2 2수준	C3 3수준
B: B社 (증가)	B0	0수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	제외 (불필요)	5.2× 0 ⁹ (탈락 1)	8.3× 10 ⁹ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.2× 10 ¹⁰ (탈락 2)	제외 (경제성×)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)
	B1	1수준	제외 (불필요)	제외 (불필요)	6.2× 10 ⁹ (탈락 1)	7.4× 10 ⁹ (탈락 1)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (탈락 2)	9.6× 10 ⁹ (탈락 2)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B2	2수준	제외 (불필요)	5.2× 10 ⁹ (탈락 1)	1.3× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	1.0× 10 ¹⁰ (탈락 2)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)
	B3	3수준	1.1× 10 ¹⁰ (1차선 정)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)	제외 (경제성×)

- Yeast extract 조합 실험(A社, B社 수준 별 비교): 3인자 3수준 배지 조성 조합으로 각각 배양하여 생균수를 측정하여 7개의 후보군을 도출하였다.

③ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화

Table 6-46. Yeast Extract 조합의 6개 후보군배양 배지 조성으로 대량 배양한 생균수 결과(3인자 3수준)

실험 No.	Yeast extract (상대비율)			발효액량	건조량	분석 결과		절감율 (%)
	A社	B社	C社			발효	건조	
2	2수준	0수준	2수준	1,000 L	7.1	8.3×10 ⁹	2.3×10 ¹¹	-40%
3 (Control)	3수준	0수준	0수준		7.2	1.1×10 ¹⁰	3.4×10 ¹¹	-
5	0수준	0수준	3수준		7.2	1.1×10 ¹⁰	1.3×10 ¹¹	-119%
8	2수준	1수준	1수준		7.2	1.1×10 ¹⁰	3.5×10 ¹¹	12%
12	1수준	2수준	2수준		7.3	1.3×10 ¹⁰	2.3×10 ¹¹	-22%
13	2수준	2수준	0수준		7.2	1.1×10 ¹⁰	3.1×10 ¹¹	0%
15	0수준	3수준	0수준		7.1	1.1×10 ¹⁰	2.5×10 ¹¹	-14%

- 현장 배양결과 8번 조합의 배양성은 동일하나, 공정 사멸율이 낮아, 생산성 향상 효과가 있으며, 더불어 원료비 절감에 따른 원가 절감 효과가 발생하였다.

④ 대량생산(1,000 L)을 위한 현장 최적화 검증(3회 validation)

Table 6-47. Yeast extract 조합 배지 조성 선정으로 대량 3회 배양하여 재현성 검증

실험 횟수	발효액량	건조량	분석 결과		생산성	절감율 (%)
			발효	건조		
1	1,000 L	7.2	1.1×10^{10}	3.5×10^{11}	103%	12%
2		7.3	1.2×10^{10}	4.0×10^{11}	118%	23%
3		7.3	1.1×10^{10}	3.7×10^{11}	110%	18%
평균		7.2	1.2×10^{10}	3.8×10^{11}	110%	17%

- Validation 결과(3회 재현성 확인 및 평균결과) 생산성 개선(10%), 원가 절감(17%)

나. 산업용 대량생산을 위한 저가배지 개발 및 배양 조건 최적화 결과

- 5개 후보균주에 대한 배지 및 배양조건 최적화 및 대량생산(1,000 L)을 통한 scale-up 과정에서의 저가 배지 도입과 배양성 향상을 목표로 진행하였으며, 배양성 향상을 통한 생산성 측면과 저가 배지를 활용한 경제성 측면의 원가 절감의 결과를 Table 6-48와 같은 최종 결과를 도출하였다.

Table 6-48. 5개 선정 후보균주에 대한 배지(저가) 최적화 및 배양조건 최적화 결과(단위:%)

항목	LA1	LF1	LR5	BL3	BG7	비고
생산성 향상	40	24	11	24	10	
원가 절감	55	23	20	28	17	

5. 생산 프로세스 상에서의 충격으로 유기산 생성, agitation, 공정 과정에 따른 균수의 변화를 측정하고 충격조사를 통한 검증체계 구축

가. 생산 프로세스 상에서의 충격조건 조사 및 검증

(1) 유산균의 배양시간 별 생균수 및 유기산 분석

- 유산균 배양시간에 따른 유기산 생성 농도와 균수의 상관관계를 측정하기 위하여 배양시간 별 샘플을 채취하고 생균수와 배양액 상에서의 유기산의 농도를 측정하였다 (Figure 6-32).



Figure 6-32. *L. acidophilus* LA1 배양시간 별 생균수 및 유기산 분석.

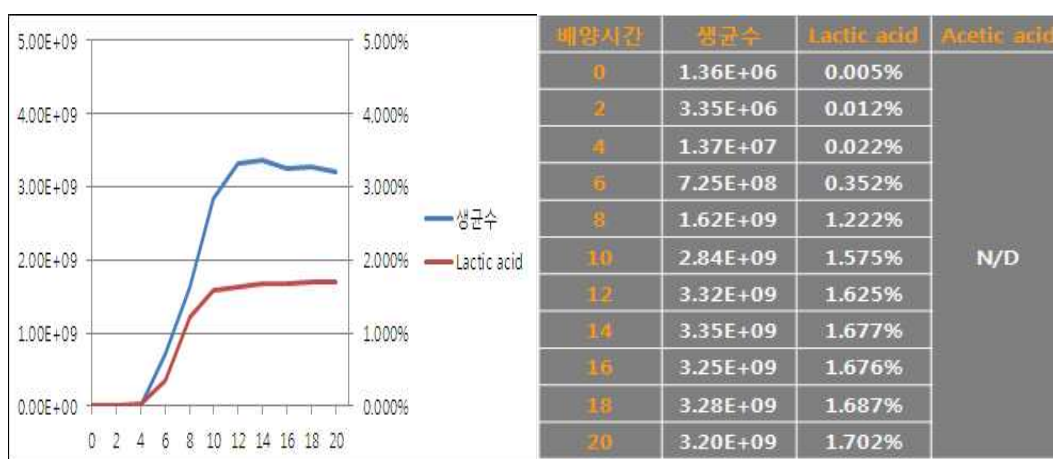


Figure 6-33. *L. fermentum* LF1 배양시간 별 생균수 및 유기산 분석.



Figure 6-34. *L. rhamnosus* LR5 배양시간 별 생균수 및 유기산 분석.



Figure 6-35. *B. lactis* BL3 배양시간 별 생균수 및 유기산 분석.

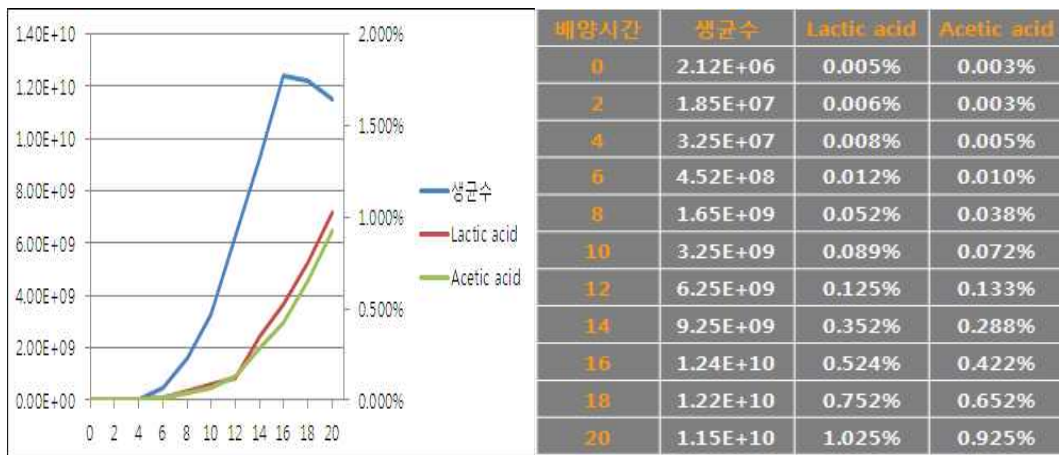


Figure 6-36. *B. longum* BG7 배양시간 별 생균수 및 유기산 분석.

- 균주별 배양시간에 따른 생균 수 및 유기산 분석결과 배양 중 분비하는 유기산의 종류와 양은 균주별로 차이를 보이나, 균주가 분비하는 유기산과 농도에 의한 배양성의 저해는 관찰되지 않았다. 이 결과로 미루어 보아 유기산이 생산 공정 중 발생하는 충격 요인은 아닌 것으로 판단된다.

(2) Agitation 속도 별 배양성 비교실험

- 균주별 최적의 agitation 조건을 확인하고자 교반속도에 따른 배양성을 비교하기 위하여 각 조건 별 샘플을 수거하여 생균수를 확인하였다(Figure 6-37~6-41).

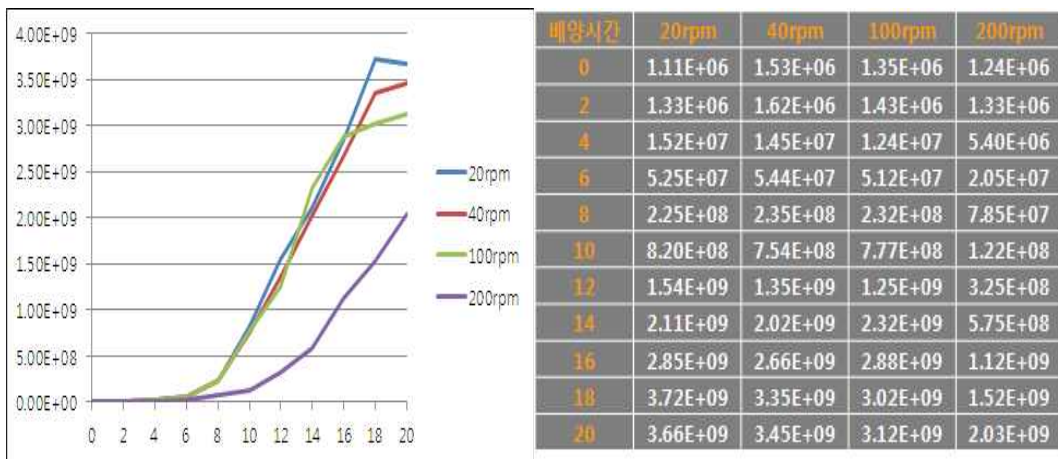


Figure 6-37. *L. acidophilus* LA1 agitation 속도 별 배양성 확인.

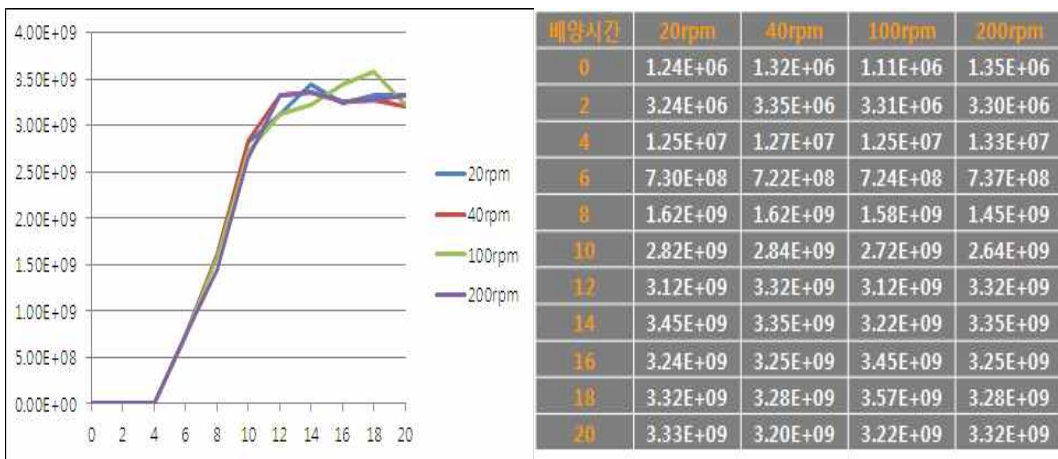


Figure 6-38. *L. fermentum* LF1 agitation 속도 별 배양성 확인.

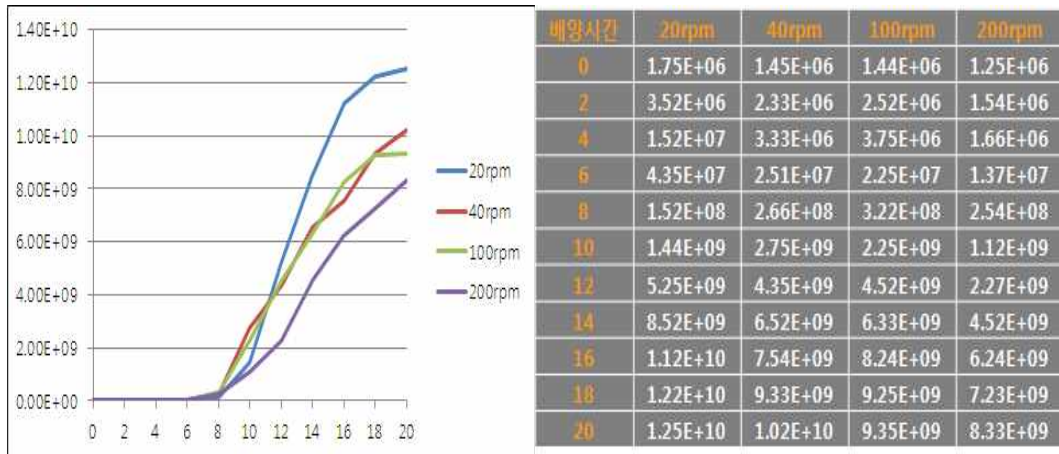


Figure 6-39. *L. rhamnosus* LR5 agitation 속도 별 배양성 확인.

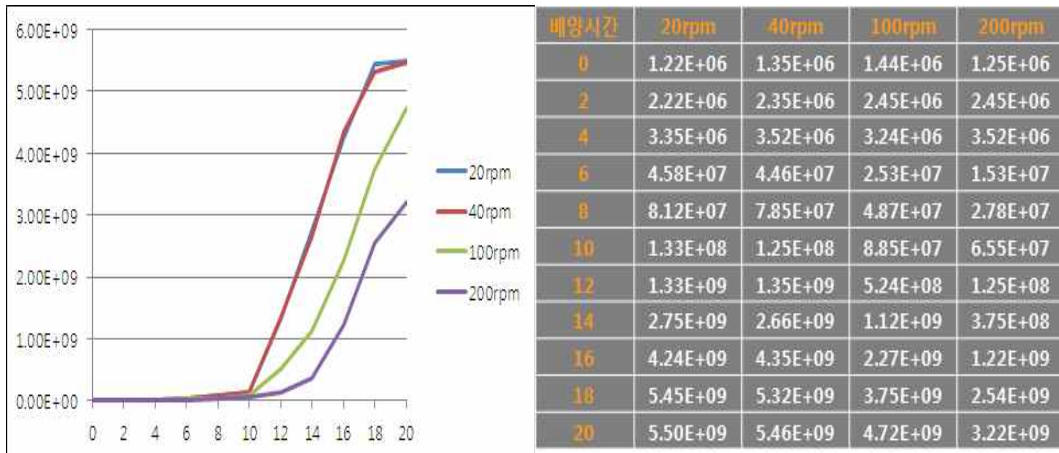


Figure 6-40. *B. lactis* BL3 agitation 속도 별 배양성 확인.

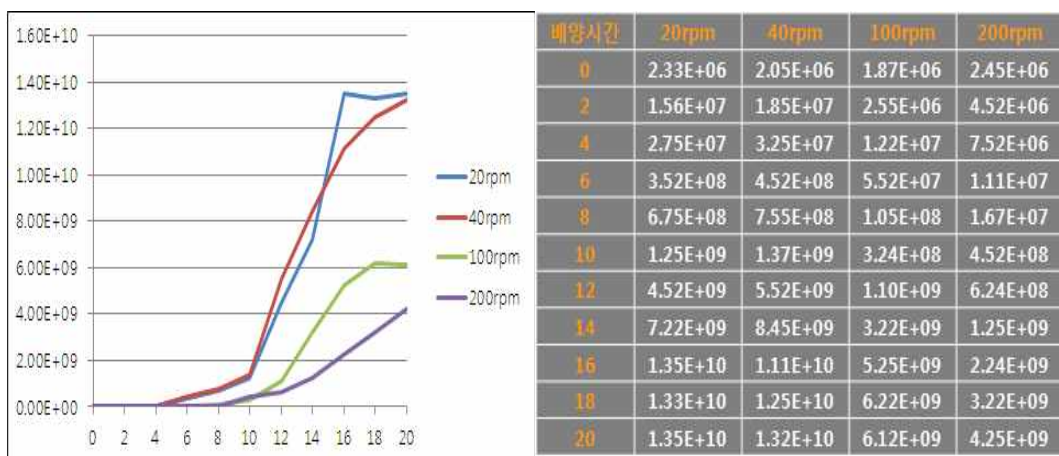


Figure 6-41. *B. longum* BG7 agitation 속도 별 배양성 확인.

- 균주별 agitation 속도에 따른 배양성 차이 비교실험 수행 결과 배양 중 교반속도 (agitation)는 대체적으로 배양성에 영향을 주는 것으로 확인이 되었고, 고속 회전으로 갈수록 배양성이 낮아지는 것이 관찰되었다. 그러나 특이하게 LF1 균주는 교반속도에 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

(3) 각 유산균주의 생산 공정 별 사멸을 평가

- 각 생산 공정상에서의 균주의 생존율에 영향을 미치는 충격조건을 조사하기 위하여 공정 별 샘플을 수거하고 생균수 및 생존율을 측정하였다(Figure 6-42).

균주명	단위공정							
	발효 (6/7)		균체분리 (6/8)		동결 (6/9)		건조 (6/14)	
	생균수	생존율	생균수	생존율	생균수	생존율	생균수	생존율
<i>Lacidophilus</i>	3.22E+09	100%	1.28E+11	99%	1.22E+11	95%	4.52E+11	70%
<i>L.fermentum</i>	3.35E+09	100%	1.32E+11	98%	1.22E+11	91%	3.24E+11	48%
<i>L.rhamnosus</i>	1.25E+10	100%	4.52E+11	90%	4.35E+11	87%	3.45E+11	14%
<i>B.lactis</i>	5.24E+09	100%	2.05E+11	98%	1.25E+11	60%	3.24E+11	31%
<i>B.longum</i>	1.11E+10	100%	3.33E+11	75%	2.45E+11	55%	1.52E+11	7%

균주명	단위공정			
	발효	분리	동결	건조
<i>Lacidophilus</i>	100%	99%	95%	70%
<i>L.fermentum</i>	100%	98%	91%	48%
<i>L.rhamnosus</i>	100%	90%	87%	14%
<i>B.lactis</i>	100%	98%	60%	31%
<i>B.longum</i>	100%	75%	55%	7%

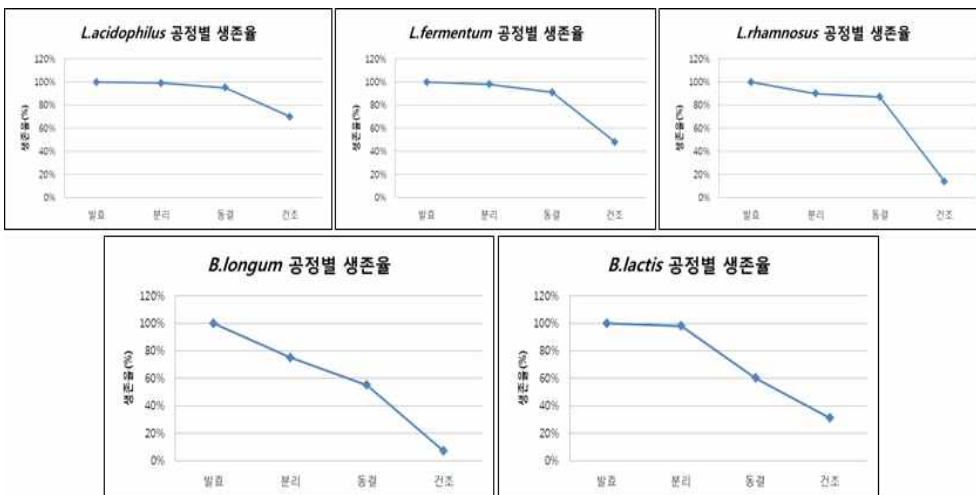


Figure 6-42. 유산균주의 단위공정 별 생존율 확인.

- 단위 공정 별 유산균주의 생존율 측정 결과 *Lactobacillus* 계열의 3종(LA1, LF1, LR5)은 동결단계까지 높은 안정성을 유지하고 있으나 건조 단계에서만 사멸율이 증가하는 반면, *Bifidobacterium* 계열 2종(BL3, BG7)은 동결 단계부터 급격하게 생존율이 감소하는 것을 확인하였다.
- 동결 및 건조단계에서 각 유산균주의 생존율 증가를 위해 동결건조 조건 및 보호제를 변경하여 생존율을 증가시키기 위한 연구를 추가로 진행 중이다.

나. 생산 프로세스 외에 예상되는 충격조건

(1) 내산성, 내담즙성 시험

- 각 생산 공정 외에 예상되는 충격조건으로 위액 또는 담즙산에 의한 균주의 사멸을 극복하기 위해 유산균을 코팅하고 안정성을 평가하였다. 인공위액(pH 2.5) 및 담즙액(0.5% oxgall) broth에 non-coating 및 dual-coating 유산균을 넣고, backlight 처리 후 형광현미경으로 관찰하였고(Figure 6-43~6-47), 생존수를 측정하였다(Figure 6-48).

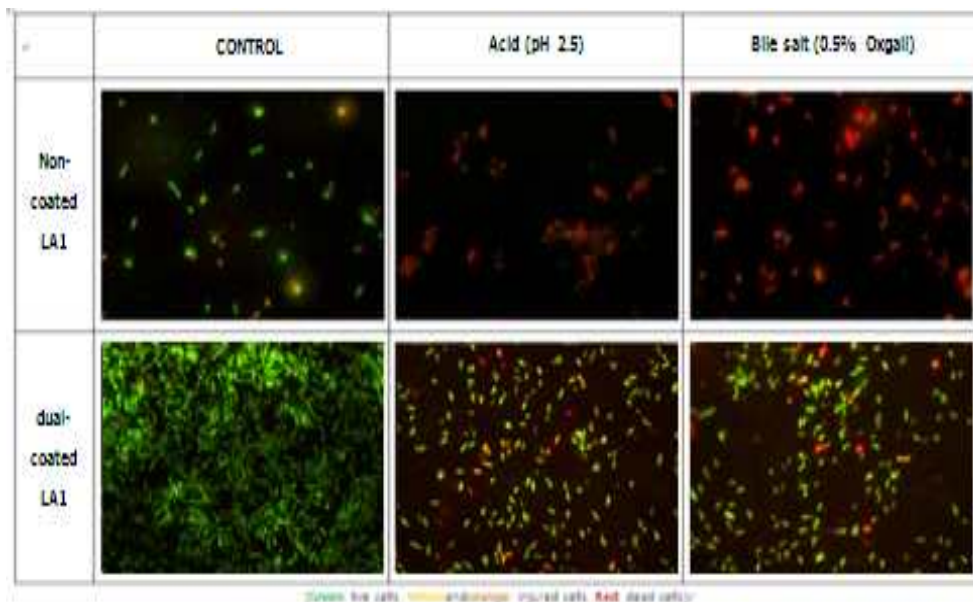


Figure 6-43. *L. acidophilus* LA1 유산균주의 내산, 내담즙 안정성.

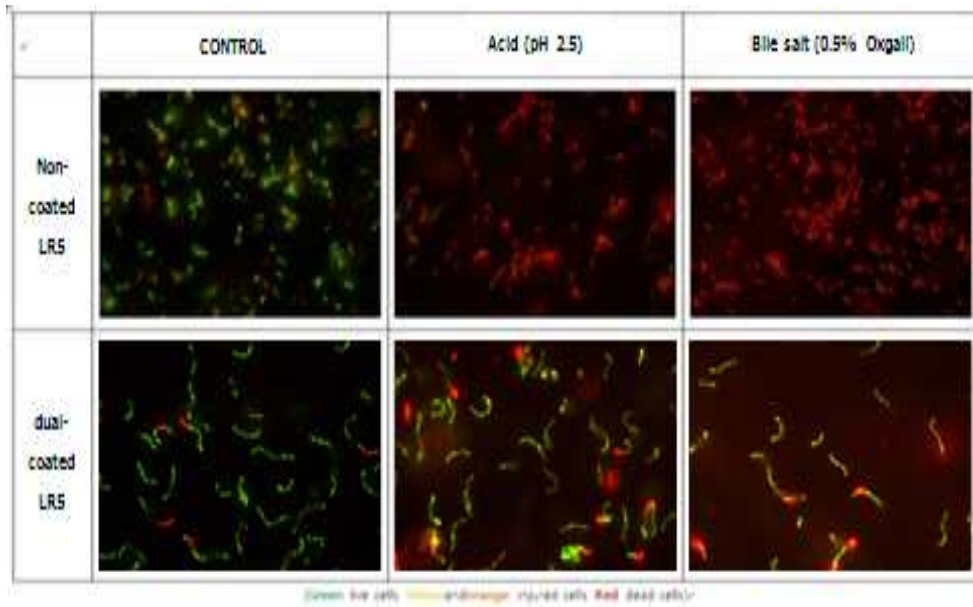


Figure 6-44. *L. rhamnsus* LR5 유산균주의 내산, 내담즙 안정성.

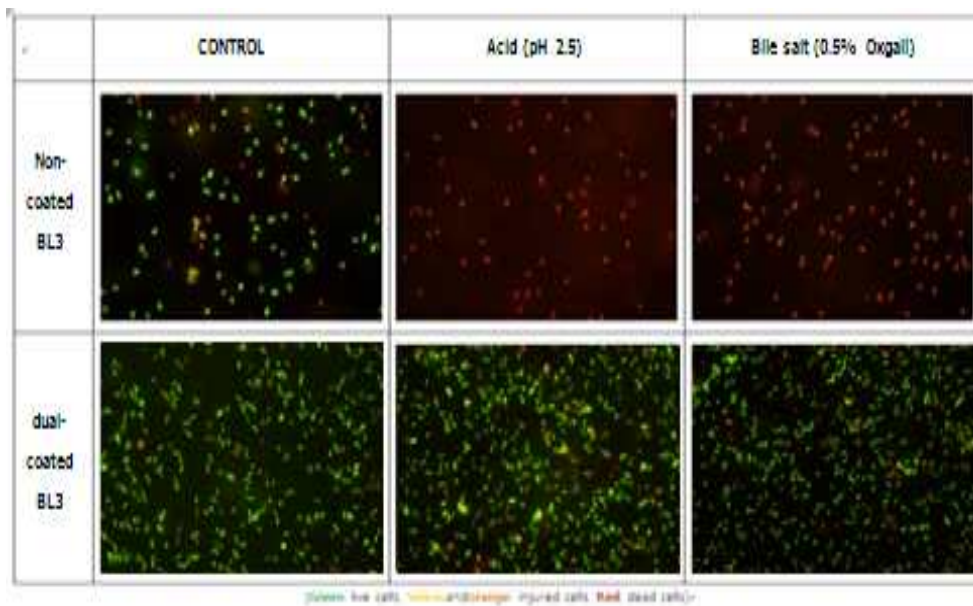


Figure 6-45. *B. lactis* BL3 유산균주의 내산, 내담즙 안정성.

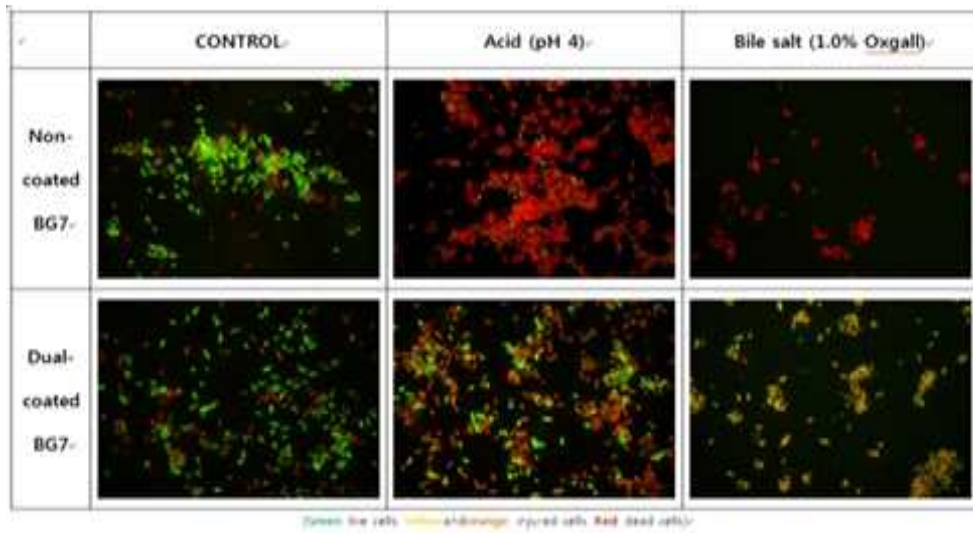


Figure 6-46. *B. longum* BG7 유산균주의 내산, 내담즙 안정성.

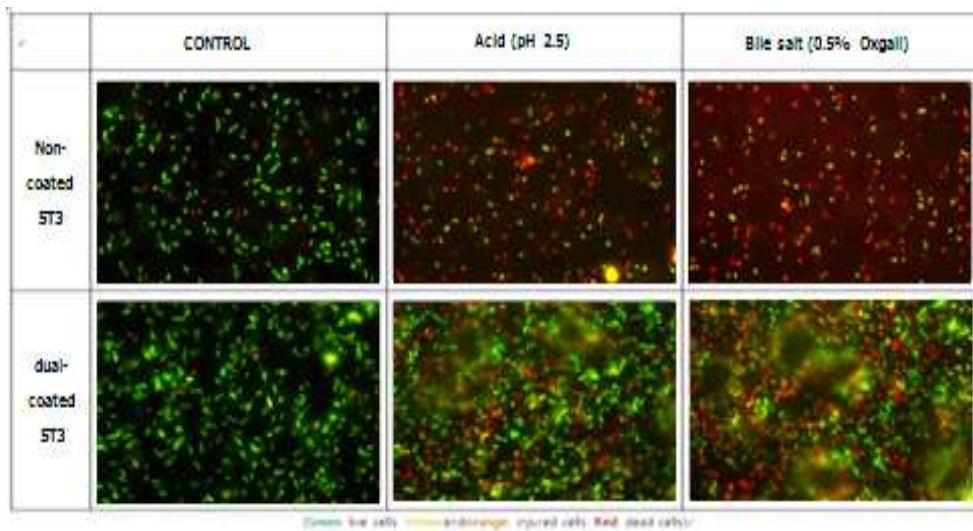


Figure 6-47. *Streptococcus thermophilus* ST3 유산균주의 내산, 내담즙 안정성.

Strain	Initial	Acid 60min	Acid 120min	Bile 60min	Bile 120min
<i>L. acidophilus</i> CBT-LA1	1.00E+11	6.74E+10	2.87E+10	9.16E+10	1.44E+11
<i>L. rhamnosus</i> CBT-LR5	1.00E+11	5.79E+10	4.73E+10	9.29E+10	8.62E+10
<i>B. lactis</i> CBT-BL3	1.00E+11	8.85E+10	8.54E+10	6.79E+10	8.08E+10
<i>B. longum</i> CBT-BL7	1.00E+11	5.51E+10	2.58E+10	1.48E+11	1.32E+11
<i>S. thermophilus</i> CBT-ST3	1.00E+11	4.89E+10	4.74E+10	7.87E+10	6.82E+10

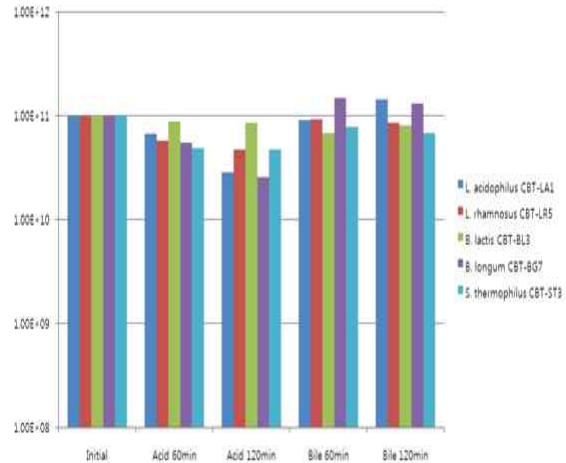


Figure 6-48. 각 유산균주의 인공위액 및 담즙액 조건에서의 생존 수.

- 인공위액 및 담즙액을 이용한 균주의 안정성 평가 결과 non-coating 유산균보다 dual-coating 유산균에서 내산·내담즙 활성이 더 우수한 것을 확인 하였으며, L계열 B계열 균주간의 차이는 확인할 수 없었다.
- 생산 공정상에서의 충격조건 및 생산 공정 외에 발생하는 충격조건에 대한 균주의 안정성을 평가한 결과 균주에 따라 다양한 충격조건에서의 sensitivity가 서로 다를 수 있음을 확인하였으며, 생산균주 별 충격조건에 대한 영향을 감안하여 대응방법을 찾는 것이 필요함을 확인하였다.

6. 오염도 저하를 위한 생산 위생도 강화시스템 연구

가. 생산 현장의 오염도 모니터링 및 오염 방지 설비 개선 및 강화 시스템 연구

(1) 생산 현장의 오염도 모니터링(clean room)

(가) 부유균 및 낙하균 검사

- 부유균은 작업장 내 공기 1,000 L을 air sample로 포집하여 진행하였으며, air sample의 위치는 작업장 별 출입문에서 내부 왼쪽으로 약 30 cm, 바닥에서 약 1 m 위치에 설치 후 측정하였다.
- 낙하균의 경우 작업장 별 바닥으로부터 약 80 cm 높이에서 plate을 약 15분 개방시킨 후 배양하였다.

- 측정 배지로는 일반세균의 경우 TSA, 진균은 SDA, 대장균군은 DLA를 사용하였으며, TSA, DLA의 경우 37℃에서 2일 간 배양 하였고, SDA의 경우 25℃에서 5일 간 배양 후 결과를 확인하였다.

낙하균		부유균		대장균군	
기준	측정주기	기준	측정주기	기준	측정주기
≤20cfu/plate, 15min	2주 1회	≤200cfu/m3	월 1회	음성	2주 1회

Figure 6-49. 낙하균과 부유 미생물의 기준 및 측정 주기.

작업장	기준	부유균(cfu)		낙하균(cfu)		
		일반세균	진균	일반세균	진균	대장균군
전실	100,000 Class	52	15	20	6	0
Seperator실		51	16	21	7	0
혼합코팅실		39	15	16	5	0
원심분리실		40	13	22	4	0
원료정량실		46	18	17	3	0
건기식 작업장(FD실)		38	18	12	3	0
분쇄실		41	20	19	5	0
혼합포장실		36	16	15	6	0
원료입출전실		34	19	18	5	0
세척실		39	14	16	2	0
건조실		51	21	20	6	0

Figure 6-50. 위생도 강화시스템 적용 전 부유균 및 낙하균 측정 결과.

나. 생산 현장의 오염도 저하를 위한 위생도 강화 시스템

(1) 위생도 강화 시스템

- 생산 현장에서 오염도 저하를 위해 소독제 및 세척제 최적 사용 조건을 선정하고 설비 및 배관의 scale 잔류를 예방하기 위해 잔류 성분에 맞는 CIP(Clean In Place) 방법을 적용하였다.

- 소독제 및 세척제의 종류, 농도, 사용 횟수 등의 방법을 조사하여 비교실험을 통하여 최적화를 진행하였으며(cleaning validation), 소독제 및 세척제가 제품에 유입되는 것을 방지하기 위해 잔류검사를 시행하였다.

소독제/세척제 종류	농도(%)	Swab Test 결과	판정
자이염소산나트륨 (락스)	0.01	++	효과 없음.
	0.03	+	감소되나, 부족함.
	0.05	-	적합
	0.1	-	적합
헵스듀얼 (세제)	0.1	+	효과 없음.
	0.5	-	적합
	1	-	적합

Figure 6-51. 소독제 및 세척제의 최적 농도를 설정하기 위한 미생물 제거효과 확인.

- 소독제 및 세척제 농도 별 미생물 제거효과 확인 실험 결과 설비 및 작업장 내 오염 (미생물)제거는 세척제 및 소독제의 농도에 따라 효과의 차이가 있었으며, 작업장의 구조 및 세척도구의 종류에 따라 그 정도가 달라질 수 있음을 확인하였다.
- 위 결과를 토대로 소독제 및 세척제의 종류와 유효 농도의 선정은 위생 강화에 있어 중요한 항목임을 알 수 있었다.

(2) 위생도 강화 시스템 적용에 따른 부유균 및 낙하균 측정

작업장	기준	부유균(cfu)		낙하균(cfu)		
		일반세균	진균	일반세균	진균	대장균군
정실	100,000 Class	37	12	11	3	0
Seperator실		36	8	10	4	0
혼합포팅실		30	9	9	2	0
원심분리실		29	7	12	2	0
원료정량실		35	10	10	1	0
건기식 작업장(FD실)		30	11	7	1	0
분쇄실		32	12	11	2	0
혼합포장실		29	9	9	3	0
원료입출전실		27	10	12	3	0
세척실		31	9	10	1	0
건조실		35	14	13	4	0

Figure 6-52. 위생도 강화시스템 적용 후 부유균 및 낙하균 측정 결과.

- 결론: 소독제 및 세척제의 농도, 횟수, 사용방법 등의 조건을 최적화하는 cleaning validation을 통하여 작업 환경에서의 오염도를 낮출 수 있는 조건을 확립 하였으며, 설비 및 배관의 scale 잔류 예방을 위해 잔류 성분에 맞는 CIP(Cleaning In Place) 방법을 적용하고 오염도를 낮출 수 있었다. 또한 잔류검사를 통해 소독제 및 세척제가 잔류함으로써 제품에 유입되는 것을 방지함으로써 생산 공정에서의 오염도를 낮출 수 있는 시스템을 개선하였다.

7. 식품산업용 균주 고농도 배양기술 확보 및 원말 사업화

가. *Lactobacillus plantarum* Ln4, *Lactobacillus plantarum* Lb41, *Lactobacillus brevis* G1의 대량생산 공정 최적화

(1) 16S rRNA sequence 확인을 통한 동정 및 API kit를 이용한 당 이용능 확인

- Ln4의 경우 API Kit를 이용한 당 이용능 및 동정 결과 현장에서 사용 중인 glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose를 모두 이용하였으며, *Lactobacillus plantarum*(CIP 103151)과 99.8%의 상동성을 보였다.
- G1의 경우 API Kit를 이용한 당 이용능 및 동정 결과 현장에서 사용 중인 glucose, fructose, maltose를 이용하였으며, *Lactobacillus brevis*(NRIC 0137)과 99.7%의 상동성을 보였다.
- Lb41의 경우 API Kit를 이용한 당 이용능 및 동정 결과 현장에서 사용 중인 glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose를 모두 이용하였으며, *Lactobacillus plantarum*(CIP 103151)과 99.8%의 상동성을 보였다.

(2) SSR 최적화

- Ln4의 경우 LGA1 배지에서 4.2×10^9 CFU/mL으로 배양성이 가장 우수하여 SSR 배지로 선정하였다.
- G1의 경우 LGA1 배지를 제외한 모든 배지 조건에서 잘 자랐으며, LV2 배지에서 3.610^9 CFU/mL으로 배양성이 가장 좋아 SSR 배지로 선정하였다.
- Lb41의 경우 G1과 마찬가지로 경우 LGA1 배지를 제외한 모든 배지 조건에서 잘 자랐으며, LA1 배지에서 2.4×10^9 CFU/mL으로 배양성이 가장 좋아 SSR 배지로 선정하였다.

Table 6-49. Ln4 균주의 16S rRNA sequencing 결과

Sample	Ln4																																																																											
Sequence	(Univ.-C-F-primer region) AGAGTTTGGATCC TGGCTCAGGACGACGACGCTGGCGGGCATGCCCTAATACATGCAAGTCGAACGA ACTCTGGTATTTGATTGGTGTCTGCAATCATGATTTACATTTGAGTGAAGTGGCGAAC TGGTGAGTA ATACCTGGGAAACCTTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCAT AACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGAAGAGGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCC CGCGGCCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTG AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGAGCAGTA GGGAACTTTCACAATGGACGAAAGTCTTGATGGAGCAACGGCCGCTGAGTGAAGAAAGGGTTT CGGCTCGTAAACTCTGTGTGTTAAAGAAGAACAATATCTGAGAGTAACCTGTTCAAGTATTGACG GTATTAACAGAAAGCCACGGCTAACATACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGCAA CGCTTGTCCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCCGAGGGCGGTTTTTAAAGCTGATGTGAAAG CCTTCGGCTCAACCGAAGAAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAGGACAG TGGAACTCCATGTTGAGCGGTGAAATCGGTAGATATATGGAAGAACCAGGTGGCGAAGCGG GCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATAGATACCC CTGGTAGTCCATACGTAACGATGAAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTG CAGCTAACGCATTAAGCATTCGCC TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGAAAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGTACCGCAAGAACCTT ACCAGTCTTGGACATCTATGCAAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGIATACA GGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTCGGGGTGAGCAAAAC GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGGTACACACGTTGCTA CAATGGATGGTACAACGAGTTGGGAACTCGGAGAGTAAGTAATCTCTTAAAGCAATTCCTCA GTTCGGATGTAGGCTGCAACTCGCCATACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGGGGATCAGC ATGCCCGGGGAATACGTTCCCGGGCTTTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGAGAGTTGTA ACCACCAAAAGTCGGTGGGGTAACTTTTAGTAAACAGCGCCCTAAGTGGGACAGATGATTA GGGTGAAGTCGTAAC AAGGTAGCCGTAGGAGAACC TGGCTGGGATCACCTCTT (Univ.-C-R-primer region)																																																																											
Sequence distance	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="6">Percent Identity</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th rowspan="6">Divergence</th> <th>1</th> <td>■</td> <td>92.5</td> <td>89.0</td> <td>83.8</td> <td>99.8</td> <td>83.8</td> <td>1</td> </tr> <tr> <th>2</th> <td>5.6</td> <td>■</td> <td>89.2</td> <td>85.2</td> <td>92.6</td> <td>85.1</td> <td>2</td> </tr> <tr> <th>3</th> <td>9.5</td> <td>9.7</td> <td>■</td> <td>84.1</td> <td>88.7</td> <td>85.2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <th>4</th> <td>15.1</td> <td>13.8</td> <td>14.4</td> <td>■</td> <td>82.4</td> <td>98.4</td> <td>4</td> </tr> <tr> <th>5</th> <td>0.2</td> <td>6.4</td> <td>9.0</td> <td>15.1</td> <td>■</td> <td>83.5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <th>6</th> <td>14.9</td> <td>13.7</td> <td>13.9</td> <td>1.6</td> <td>14.8</td> <td>■</td> <td>6</td> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th></th> </tr> </tbody> </table> Ln4 L. brevis(NRIC 0137) L. casei(ATCC 393) L. helveticus(NCIMB 11971) L. plantarum(CIP 103151) L. acidophilus(NBRC 13951)			Percent Identity								1	2	3	4	5	6		Divergence	1	■	92.5	89.0	83.8	99.8	83.8	1	2	5.6	■	89.2	85.2	92.6	85.1	2	3	9.5	9.7	■	84.1	88.7	85.2	3	4	15.1	13.8	14.4	■	82.4	98.4	4	5	0.2	6.4	9.0	15.1	■	83.5	5	6	14.9	13.7	13.9	1.6	14.8	■	6			1	2	3	4	5	6	
		Percent Identity																																																																										
		1	2	3	4	5	6																																																																					
Divergence	1	■	92.5	89.0	83.8	99.8	83.8	1																																																																				
	2	5.6	■	89.2	85.2	92.6	85.1	2																																																																				
	3	9.5	9.7	■	84.1	88.7	85.2	3																																																																				
	4	15.1	13.8	14.4	■	82.4	98.4	4																																																																				
	5	0.2	6.4	9.0	15.1	■	83.5	5																																																																				
	6	14.9	13.7	13.9	1.6	14.8	■	6																																																																				
		1	2	3	4	5	6																																																																					
Phylogenetic tree	<p>Ln4 L. plantarum(CIP 103151) L. brevis(NRIC 0137) L. casei(ATCC 393) L. helveticus(NCIMB 11971) L. acidophilus(NBRC 13951)</p> <p>Nucleotide Substitutions (x100)</p>																																																																											
동정 결과	Ln4의 경우 <i>Lactobacillus plantarum</i> (CIP 103151)과 99.8%의 상동성을 보임																																																																											

Table 6-50. G1 균주의 16S rRNA sequencing 결과

Sample	G1																																																																											
Sequence	(Univ.-C-F-primer region) AGAGTTTGGATCC TGGCTCAGGACGACGACGCTGGCGGGCATGCCCTAATACATGCAAGTCGAACGA GCCTCCGTTGAAATGACGTGCTTGCATCTGATTTCACAATGGAGCGAGTGGCGAAC TGGTGAGT AACACGTGGGGAAATCTTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTA TAAACAACAAAATCCGCAATGGATTTGTTTGAAGAAGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCC CGCGGCCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCTCAACCAAGACGATGATCACTAGCCGACCTG AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGAGCAGCAGTA GGGAACTTTCACAATGGACGAAAGTCTTGATGGAGCAATGCCGCTGAGTGAAGAAAGGGTTT CGGCTCGTAAACTCTGTGTGTTAAAGAAGAACAACCTTTGAGGGTAACTGTTCAAGGGTTGAC GGTATTAAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGTGGGTGGA AGCTTGTCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGCGGTTTTTAAAGCTGATGTGAAA GCCTTCGGCTTAAACCGGAAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGACA GTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGCGGAAGGC GGCTGTCTAGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATAGATAC CCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGAATGAGTGCATAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTCT GCAGCTAAACGGATTAAGCTCTCGCTTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAGCTCAAGGAA TTGACCGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGGGTTTAAATCGAAGCTACGGCAAGAAACT TACCAAGTCTTGACATCTTCGCCAATCTTAGAGATAAAGACGTTCCCTTGGGGACAGAAATGA CAGGTGGTGCATGGTGTGCTGCTAGCTCGTGTGCTGAGAGTGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCTTATATCAGTTGCCAGCATTCGGT TGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAA CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTTGC TACAATGGACGGTACAAACGAGTCCGCAAGTCTGAGGGCTAAGCTAATCTTAAAGCCGTCT CAGTTCGGATTGAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA GCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCC TGTACACACCGCCCGTCAACCATGAGAGTTT TAAACACCAAAAGCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAAGCGTCTAAGGTGGGACAGATGATT AGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACC TGGCTGGGATCACCTCTT (Univ.-C-R-primer region)																																																																											
Sequence distance	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="6">Percent Identity</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th rowspan="6">Divergence</th> <th>1</th> <td>■</td> <td>85.0</td> <td>99.7</td> <td>89.3</td> <td>84.8</td> <td>92.5</td> <td>1</td> </tr> <tr> <th>2</th> <td>14.3</td> <td>■</td> <td>85.1</td> <td>85.2</td> <td>98.4</td> <td>83.5</td> <td>2</td> </tr> <tr> <th>3</th> <td>0.3</td> <td>14.1</td> <td>■</td> <td>89.2</td> <td>85.2</td> <td>92.6</td> <td>3</td> </tr> <tr> <th>4</th> <td>9.7</td> <td>14.1</td> <td>9.7</td> <td>■</td> <td>84.1</td> <td>88.7</td> <td>4</td> </tr> <tr> <th>5</th> <td>14.7</td> <td>1.6</td> <td>14.4</td> <td>14.5</td> <td>■</td> <td>82.4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <th>6</th> <td>6.7</td> <td>14.9</td> <td>6.5</td> <td>9.0</td> <td>15.3</td> <td>■</td> <td>6</td> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th></th> </tr> </tbody> </table> G1 L. acidophilus(NBRC 13951) L. brevis(NRIC 0137) L. casei(ATCC 393) L. helveticus(NCIMB 11971) L. plantarum(CIP 103151)			Percent Identity								1	2	3	4	5	6		Divergence	1	■	85.0	99.7	89.3	84.8	92.5	1	2	14.3	■	85.1	85.2	98.4	83.5	2	3	0.3	14.1	■	89.2	85.2	92.6	3	4	9.7	14.1	9.7	■	84.1	88.7	4	5	14.7	1.6	14.4	14.5	■	82.4	5	6	6.7	14.9	6.5	9.0	15.3	■	6			1	2	3	4	5	6	
		Percent Identity																																																																										
		1	2	3	4	5	6																																																																					
Divergence	1	■	85.0	99.7	89.3	84.8	92.5	1																																																																				
	2	14.3	■	85.1	85.2	98.4	83.5	2																																																																				
	3	0.3	14.1	■	89.2	85.2	92.6	3																																																																				
	4	9.7	14.1	9.7	■	84.1	88.7	4																																																																				
	5	14.7	1.6	14.4	14.5	■	82.4	5																																																																				
	6	6.7	14.9	6.5	9.0	15.3	■	6																																																																				
		1	2	3	4	5	6																																																																					
Phylogenetic tree	<p>G1 L. brevis(NRIC 0137) L. plantarum(CIP 103151) L. casei(ATCC 393) L. acidophilus(NBRC 13951) L. helveticus(NCIMB 11971)</p> <p>Nucleotide Substitutions (x100)</p>																																																																											
동정 결과	G1의 경우 <i>Lactobacillus brevis</i> (NRIC 0137)과 99.7%의 상동성을 보임																																																																											

Table 6-51. Lb41 균주의 16S rRNA sequencing 결과

Sample	Lb41																																																																			
Sequence (Size : 1559 bp)	(Univ-C-F-primer region) AGAGTTTGATCTTGGCTCAG GACGAAACGCTGGCGGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGA ACTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGGAGTGGCGGAACCTGGTGGAGTA ACACGTGGGAAACCTGCTCAGAACGGGGGATACACCTGGGAAACAGATGCTAATACCGCAT AACACTTGGACCCGATGGTCCGAGTTTGAAGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCC CGCGGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTG AGAAGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGGCCAAACTCCTACGGGGAGGACAGGTA GGGAACTCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGGAGTGAAGAAGGGTTT CGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATATCTGAGAGTAACCTGTTACGGTATTGACG GTATTAACAGAAAGCCACGGCTAACACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGTGGCAA GCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGAGCGGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAG CCTTCGGCTCAACC GAAGAAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAGAGGACAG TGGAACTCCATGTTGAGCGGTGAAATCGGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGGCG GCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAAGATACC CTGGTAGTCCATACCCTAAACGATCAATATCTAAGTGTGGACGGTTCGCCCTTCAGTGTCTG CAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCCGAAGAACCTT ACCAGGTCTEAACATACATGCAAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACA GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACAGAGCGC AACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTCCGGGTGACAAACC GGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAATCATGCCCCCTATGACCTGGGGTACACACGTTGCTA CAATGGATGGTACAAACGAGTTGCGAACTCGGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCA GTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCATCATGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCCGGGATCAGC ATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGATTGTA ACACCTAAAGTCCGGTGGGTAACTTTTAGTAAACACCGCTAAGGTGGGACAGATGATTA GGGTGAAGTCTGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTCG GGCTGGATACACTGCTTT (Univ-C-R-primer region)																																																																			
Sequence distance	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="6">Percent Identity</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th rowspan="6">Divergence</th> <th>1</th> <td>83.7</td> <td>92.5</td> <td>88.9</td> <td>83.8</td> <td>99.8</td> <td>1</td> </tr> <tr> <th>2</th> <td>14.9</td> <td>85.1</td> <td>85.2</td> <td>98.4</td> <td>83.5</td> <td>2</td> </tr> <tr> <th>3</th> <td>6.6</td> <td>13.7</td> <td>89.2</td> <td>85.2</td> <td>92.6</td> <td>3</td> </tr> <tr> <th>4</th> <td>9.5</td> <td>13.9</td> <td>9.7</td> <td>84.1</td> <td>88.7</td> <td>4</td> </tr> <tr> <th>5</th> <td>15.1</td> <td>1.6</td> <td>13.8</td> <td>14.4</td> <td>82.4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <th>6</th> <td>0.2</td> <td>14.8</td> <td>6.4</td> <td>9.0</td> <td>15.1</td> <td>6</td> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </tbody> </table> <p>Lb41 L. acidophilus(NBRC 13951) L. brevis(NRIC 0137) L. casei(ATCC 393) L. helveticus(NCIMB 11971) L. plantarum(CIP 103151)</p>			Percent Identity								1	2	3	4	5	6	Divergence	1	83.7	92.5	88.9	83.8	99.8	1	2	14.9	85.1	85.2	98.4	83.5	2	3	6.6	13.7	89.2	85.2	92.6	3	4	9.5	13.9	9.7	84.1	88.7	4	5	15.1	1.6	13.8	14.4	82.4	5	6	0.2	14.8	6.4	9.0	15.1	6			1	2	3	4	5	6
		Percent Identity																																																																		
		1	2	3	4	5	6																																																													
Divergence	1	83.7	92.5	88.9	83.8	99.8	1																																																													
	2	14.9	85.1	85.2	98.4	83.5	2																																																													
	3	6.6	13.7	89.2	85.2	92.6	3																																																													
	4	9.5	13.9	9.7	84.1	88.7	4																																																													
	5	15.1	1.6	13.8	14.4	82.4	5																																																													
	6	0.2	14.8	6.4	9.0	15.1	6																																																													
		1	2	3	4	5	6																																																													
Phylogenetic tree	<p>Nucleotide Substitutions (x100)</p>																																																																			
동정 결과	Lb41의 경우 <i>Lactobacillus plantarum</i> (CIP 103151)과 99.8%의 상동성을 보임																																																																			

Sugar substrate	Result	Sugar substrate	Result
Control	-	25. Esculin	+
1. Glycerol	-	26. Salicin	+
2. Erythritol	-	27. Cellulose	+
3. D-arabinose	-	28. Maltose	+
4. L-arabinose	+	29. Lactose	+
5. Ribose	+	30. Melibiose	+
6. D-Xylose	-	31. Sucrose	+
7. L-Xylose	-	32. Trehalose	+
8. Adonitol	-	33. Inulin	+
9. β-Methyl-D-xylose	-	34. Melezitose	-
10. Galactose	+	35. Raffinose	+
11. Glucose	+	36. Starch	-
12. Fructose	+	37. Glycogen	-
13. Mannose	+	38. Xylitol	-
14. Sorbose	-	39. Gentobiose	+
15. Rhamnose	-	40. D-turanose	+
16. Dulcitol	-	41. D-lyxose	-
17. Inositol	-	42. D-tagatose	-
18. Mannitol	+	43. D-fucose	-
19. Sorbitol	+	44. L-fucose	-
20. α-Methyl-D-mannoside	+	45. D-arabitol	-
21. α-Methyl-D-glucoside	-	46. L-arabitol	-
22. N-Maetyl-glucosamine	+	47. Gluconate	+
23. Amygdalin	+	48. 2-keto-gluconate	-
24. Arbutin	+	49. 5-keto-gluconate	-

DOUBTFUL PROFILE			
스트립	API 50 CHL VS 2		
숫자화된 생화학적 패턴	-----+-----		
참고사양			
동정결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)
Lactobacillus plantarum 1	99.3	0.6	INU 0% MLZ 92%
자순위 동정결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)
Lactobacillus brevis 1	0.4	0.44	SOR 14% MDM 0% TUR 14%

Figure 6-53. Ln4 API kit을 이용한 당 이용능 분석 결과.

Table 6-52. Seed 배지 조성 연구

원료명	배지명				
	MRS (BD Difco)	LA	LGA	LP	LV
분말결정포도당 Lactose	2.0	3.0	2.0	4.0	2.5
Soy peptone(A3) 대두분리단백(ISP)	peptone 1.0	2.0		1.0	2.0
효모추출물(DSM)	0.5			1.00	1.00
효모추출물(SEN)		3.00	3.00		
효모추출물(ANG)					
Liver extract					
Beef extract	1.0				
Skim milk			1.0		
KH ₂ PO ₄					
K ₂ HPO ₄	0.2	0.1	0.2	0.10	0.10
Sodium acetate	0.5	0.1	0.5	0.10	0.20
Sodium carbonate					
Potassium citrate					
Ammonium citrate	0.2	0.1		0.10	
Citric acid		0.1			
CaCO ₃		0.1			
Propionic acid					
Tween 80	0.1	0.1	0.1		0.100
L-시스테인염산염			0.50		
L-아스코르빈산					
L-글루타민산			0.50		
FeSO ₄					
MgSO ₄	0.01		0.10	0.01	0.01
MnSO ₄	0.005		0.005	0.005	0.005
NaCl			1.00		
프로테아제			0.006		
겉종농도		1.0	1.0	1.0	1.0
pH		6.5	7.5	6.8	6.5

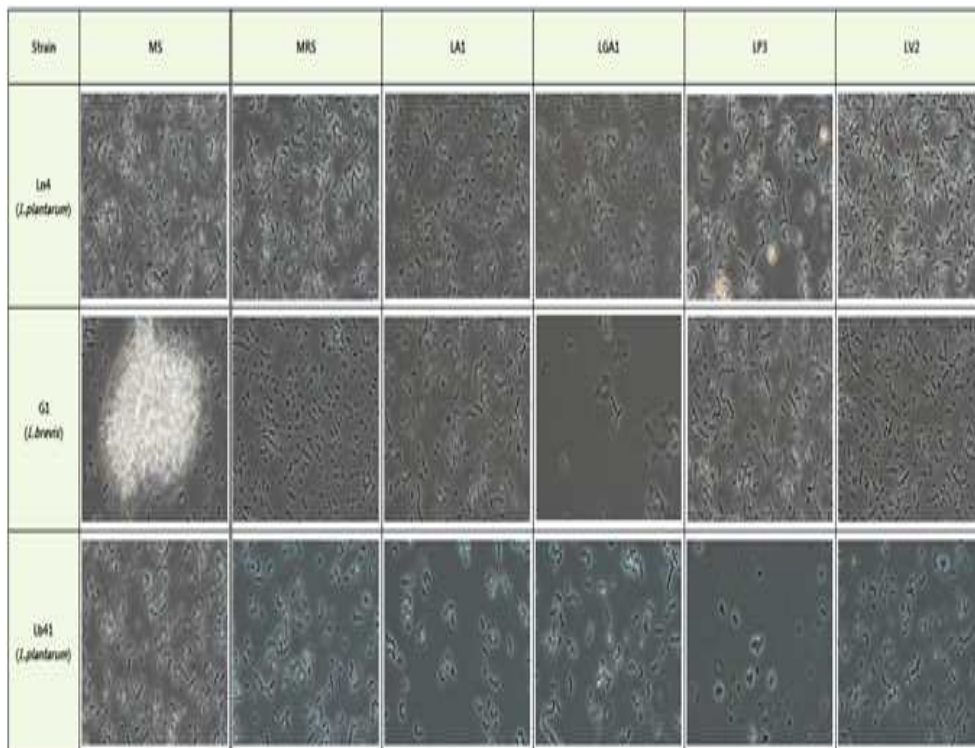


Figure 6-56. Seed 검경 결과.

Strain Medium	Ln4			G1			Lb41		
	OD ¹⁾	pH	생균수 ²⁾	OD	pH	생균수	OD	pH	생균수
MRS	0.582	3.82	3.02 x 10 ⁹	0.220	4.76	4.44 x 10 ⁹	0.554	3.93	2.81 x 10 ⁹
LA1	0.368	4.16	2.62 x 10 ⁹	0.254	4.65	2.23 x 10 ⁹	0.371	4.22	2.40 x 10 ⁹
LGA1	0.481	4.25	4.16 x 10 ⁹	0.069	6.71	3.67 x 10 ⁹	0.056	6.39	3.18 x 10 ⁸
LP3	0.412	3.60	8.90 x 10 ⁸	0.278	4.00	3.37 x 10 ⁹	0.421	3.67	1.23 x 10 ⁹
LV2	0.576	3.70	2.50 x 10 ⁹	0.239	4.56	3.59 x 10 ⁹	0.581	3.81	1.27 x 10 ⁹

1) OD(1/20X, 610nm)

2) CFU/mL

Figure 6-57. Seed 흡광도 및 pH 분석 결과.

(3) Scale-up(Jar-Fermenter 실험)

(가) *L. plantarum* Ln4

- 37°C, pH 6.0으로 배양하였으며, 배양 16시간에 ΔOD 0.843에 OB 생균수는 5.7×10⁹ CFU/mL이었다.
- Jar-Fermenter 배양 후 회수하여 원말 제조하였으며, 생균수 분석 결과 7.4×10¹¹ CFU/g의 생균수를 보였다.

(나) *L. brevis* G1

- 37°C, pH 5.0으로 배양하였으며, 배양 16시간에 ΔOD 0.464에 OB 생균수는 3.8×10⁹ CFU/mL이었다.
- Jar-Fermenter 배양 후 회수하여 원말 제조하였으며, 생균수 분석 결과 3.9×10¹¹ CFU/g의 생균수를 보였다.
- G1의 경우 자체적으로 암모니아를 생성하여 암모니아 소비가 거의 없었다.
- Broth 배양 시 균이 멍치는 현상이 발생하였다.

(다) *L. plantarum* Lb41

- 37°C, pH 6.0으로 배양하였으며, 배양 16시간에 ΔOD 0.732에 OB 생균수는 5.5×10⁹ CFU/mL이었다.
- Jar-Fermenter 배양 후 회수하여 원말 제조하였으며, 생균수 분석 결과 9.3×10¹¹ CFU/g의 생균수를 보였다.

Table 6-53. Jar-Fermenter 배지 조성

원료명	비율 (%)		
	Ln4 J03R	G1 J09R	Lb41 J05R
혼합유당	2		
포도당			
과당		3	3
Soy(kerry)	1	2	1
Yeast(DSM)		2	
Yeast(SEN)	3		3
ISP			
Skim milk	1		
제이인산칼륨	0.2	0.1	0.1
초산나트륨	0.5	0.5	0.1
구연산칼륨			0.1
황산마그네슘	0.1	0.01	0.01
황산망간	0.005	0.005	0.005
L-시스테인염산염	0.1		
L-아스코르빈산	0.1		0.05
정제염	0.6	0.5	0.2
프로테아제	0.0025		
폴리소르베이트-80	0.1	0.1	0.1

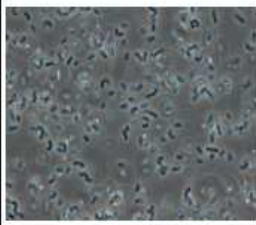
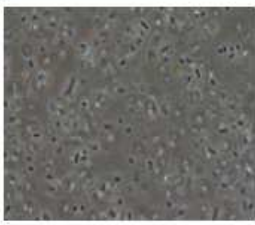
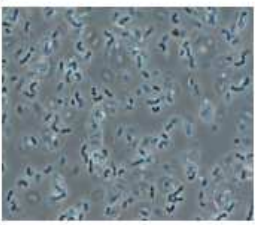
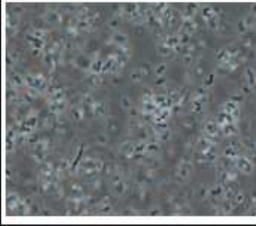

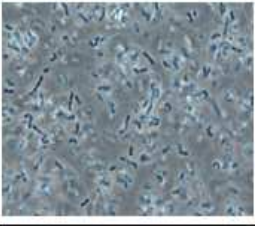
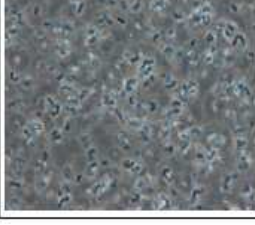

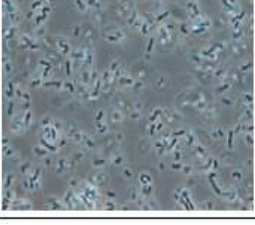
Batch No. / 배양시간 (hr)	Ln4 J03R	G1 J04R	Lb41 J05R
12			
14			
16			

Figure 6-58. Jar-Fermenter 배양액 검경 결과.

Batch	배양 조건	살균 후 pH	ΔOD (610 nm)	배양시간 (hr)	OB (CFU/mL)	원말 (CFU/g)
Ln4 J03R	37°C / pH6.0	5.59	0.843	16.0	5.73×10^9	7.39×10^{11}
G1 J09R	37°C / pH 5.0	6.37	0.464	16.0	3.79×10^9	3.86×10^{11}
Lb41 J05R	37°C / pH6.0	5.95	0.732	16.0	5.47×10^9	9.26×10^{11}

※ OD (1/20 X, 610 nm), 생균수(CFU/mL)

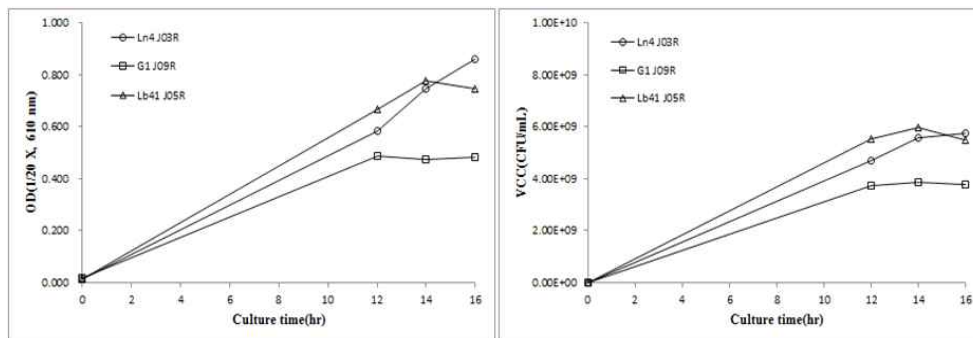


Figure 6-59. Jar-fermenter 배양액 분석 결과.

(4) 현장 적용

(가) *L. plantarum* Ln4

- 현장 적용 결과 배양 14시간에 ΔOD 0.906에 cutting되었으며, OB 생균수는 6.2×10^9 CFU/mL이었다.
- 회수 후 원말 제조 결과 생균수 5.9×10^{11} CFU/g, 내산성 61%, 내담즙성 60%, 가속 4주 안정성 40%이었다.

(나) *L. brevis* G1

- 현장 적용 결과 배양 12시간에 ΔOD 0.353으로 cutting되었으며, OB 생균수는 3.8×10^9 CFU/mL이었다.
- 회수 후 원말 제조 결과 생균수 1.6×10^{11} CFU/g, 내산성 100%, 내담즙성 65%, 가속 4주 안정성 44%이었다.
- 원말 분석 시 뭉침 현상이 발생하였다.

(다) *L. plantarum* Lb41

- 현장 적용 결과 배양 14시간에 ΔOD 0.587으로 cutting되었으며, OB 생균수는 4.2×10^9 CFU/mL이었다.
- 회수 후 원말 제조 결과 생균수 8.6×10^{11} CFU/g, 내산성 67%, 내담즙성 48%, 가속 4주 안정성 44%이었다.

Table 6-54. 현장 배지 조성

원료명	비율(%)			1000 L 발효(단위 g)		
	Ln4 P01R	G1 P01R	Lb41 P01R	Ln4 P01R	G1 P01R	Lb41 P01R
혼합유당	2			20000		
포도당						
과당		3	3		30000	30000
Soy(kerry)	1	2	1	10000	20000	10000
Yeast(DSM)		2			20000	
Yeast(SEN)	3		3	30000		30000
ISP						
Skim milk	1			10000		
제이인산칼륨	0.2	0.1	0.1	2000	1000	1000
조산나트륨	0.5	0.5	0.1	5000	5000	1000
구연산칼륨			0.1			1000
황산마그네슘	0.1	0.01	0.01	1000	100	100
황산망간	0.005	0.005	0.005	50	50	50
L-시스테인염산염	0.1			1000		
L-아스코르빈산	0.1		0.05	1000		500
정제염	0.6	0.5	0.2	6000	5000	2000
프로테아제	0.0025			25		
폴리소르베이트-80	0.1	0.1	0.1	1000	1000	1000

Batch	배양 조건	ΔOD (610 nm)	배양시간 (hr)	OB (CFU/mL)	원말 (CFU/g)	내산성 (%)	내담즙성 (%)	가속안정성(%)	
								2주	4주
Ln4 P01R	37°C / pH6.0	0.906	14.0	6.20×10^9	5.87×10^{11}	61%	60%	48%	40%
G1 P01R	37°C / pH 5.0	0.353	12.0	3.79×10^9	1.60×10^{11}	100%	65%	46%	44%
Lb41 P01R	37°C / pH6.0	0.587	14.0	4.16×10^9	8.60×10^{11}	67%	48%	54%	44%

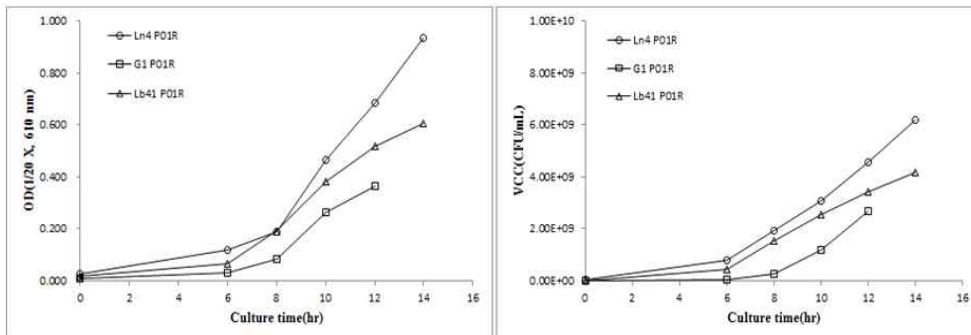


Figure 6-60. 현장 배양성 분석 결과.







Batch No.	원말 생균수 (CFU/g)	성상	
		원말	외관
Ln4 P01R	5.87×10^{11}		
G1 P01R	1.60×10^{11}		
Lb41 P01R	8.60×10^{11}		

Figure 6-61. 원말 성상 확인 결과.

(5) 원말 오염 검사 결과

(가) 현장 생산 *L. plantarum* Ln4 균주의 오염검사





배지명	시험 항목	배양 온도	배양 시간	시험 기록	시험기준	판정결과 (적합, 부적합)
Sheep Blood Agar (SBA)	일련균주	37°C	48hr		배양시 침착을 생성하지 않는다	적합
Slanetz & Bartley Agar (SBA)	일련균주	42°C	48hr		배양시 침착을 생성하지 않는다	적합
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)	일련균주	24-26°C	120hr		배양시 침착을 생성하지 않는다	적합
Brilliant Green Bile Broth (BGLB)	대장균주	35-37°C	72hr		배양시 기포를 생성하지 않는다	적합

Figure 6-62. *L. plantarum* Ln4 원말 오염 검사 분석 결과.

(나) 현장 생산 *L. brevis* G1 균주의 오염검사





배지명	시험 항목	배양 온도	배양 시간	시험 기록	시험기준	판정결과 (적합, 부적합)
Sheep Blood Agar (SBA)	알타리아균	37°C	48hr		배양시집락을 생성하지않는다	적합
Slanetz & Bartley Agar (SBM)	알타리아균	42°C	48hr		배양시집락을 생성하지않는다	적합
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)	알타리아균	24-26°C	120hr		배양시집락을 생성하지않는다	적합
Brilliant Green Bile Broth (BGLB)	대장균군	35-37°C	72hr		배양시기포를 생성하지않는다	적합

Figure 6-63. *L. brevis* G1 원말 오염 검사 분석 결과.

(다) 현장 생산 *L. plantarum* Lb41 균주의 오염검사





배지명	시험 항목	배양 온도	배양 시간	시험 기록	시험기준	판정결과 (적합, 부적합)
Sheep Blood Agar (SBA)	알타리아균	37°C	48hr		배양시집락을 생성하지않는다	적합
Slanetz & Bartley Agar (SBM)	알타리아균	42°C	48hr		배양시집락을 생성하지않는다	적합
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)	알타리아균	24-26°C	120hr		배양시집락을 생성하지않는다	적합
Brilliant Green Bile Broth (BGLB)	대장균군	35-37°C	72hr		배양시기포를 생성하지않는다	적합

Figure 6-64. *L. plantarum* Lb41 원말 오염 검사 분석 결과.

나. 시제품 및 사업화

(1) 시제품 생산

(가) *L. plantarum* Ln4

- 평균 수 5.9×10^{11} CFU/mL의 시제품 생산(6.2 kg).
- 내산, 내담, 가속안정성 시험 완료.

(나) *L. brevis* G1

- 평균 수 1.6×10^{11} CFU/mL의 시제품 생산(5.4 kg).
- 내산, 내담, 가속안정성 시험 완료.

(다) *L. plantarum* Lb41

- 평균 수 8.6×10^{11} CFU/mL의 시제품 생산(5.0 kg).
- 내산, 내담, 가속안정성 시험 완료.

(2) 시제품 사업화

- *L. plantarum* Lb41 균주는 OEM 형식으로 원말을 제조하여 완제품 제조사인 (주)아람에 판매하는 방법으로 사업화를 추진하고 있다.
- *L. plantarum* Ln4 및 *L. brevis* G1 균주는 향후 주관기관이 기술이전을 통해 사업화할 계획이며 본사는 대량생산을 지원할 예정이다.
- 자사 유통망을 통하여 국내 판매 및 유럽, 동남아시아, 중국 등으로 수출하여 매출 발생을 유도할 계획을 세우고 있다.

제 16절 전통발효식품용 종균의 생산 환경 및 제품 적합성 검증 시스템 구축 및 사업화

1. 곰팡이 종균 생산용 최적배지의 개발

- 전통발효식품(장류 및 전통주) 제조과정에서 제국 또는 입국(粒麴)과정에 사용되는 종국(種麴)을 제조하기 위해 가장 널리 사용되어온 국균(麴菌)을 사용하여 단일균주로 단백질과 전분 분해능력이 우수한 국균만을 선발 배양하여 고농도의 분생포자를 함유하는 집종용 종균(Starter)으로서의 종국을 제조하여 우수한 전통 발효식품 제조용 종국(種麴)을 개발하였다. (순수 분리된 종균용 균주는 국립농업과학원 농업미생물은행(KACC)에 균주기원 자료 및 균주기탁을 통해 국가미생물자원으로 등록, Table 7-2에 KACC 기탁번호를 기재함.)

가. 곰팡이 공시균주 및 순수분리배양

- 전통발효식품에서 순수 분리하여 (주)충무발효 연구실에서 확보한 곰팡이 *Aspergillus* sp. 5종(Table 6-1)을 MEA 배지에 25℃, 5일 간 계대배양한 후, 4℃ 보관하면서 배양 형태학적 특징을 조사한 후(Table 6-2) 본 연구에 사용하였다.

Table 7-1. Strains of koji mold

No	Strains
1	<i>Aspergillus oryzae</i> var. CF1001
2	<i>Aspergillus oryzae</i> var. CF1002
3	<i>Aspergillus oryzae</i> var. CF1003
4	<i>Aspergillus oryzae</i> var. CF1004
5	<i>Aspergillus luchuensis</i> var. CF1005

Table 7-2. Morphological character and safety of *Aspergillus* koji seed molds

Scientific name	Strain No.	KACC No.	Colony	Stipe size (μm)	Conidia size	Aflatoxin	Cyclopiazonic acid	Sterigmatocystin
<i>Aspergillus oryzae</i>	CF1001	47838	Floccose	Middle (866)	6.1	ND ¹⁾	ND	ND
	CF1002	47839	Floccose	Short (527)	4.5	ND	ND	ND
	CF1003	47840	Floccose	Middle (1115)	5.9	ND	ND	ND

<i>Aspergillus</i>								
<i>us luchensis</i>	Cf1005	47841	Floccose	Short (470)	5.0	ND	ND	ND
<i>sis</i>								

¹ND: Not detected.

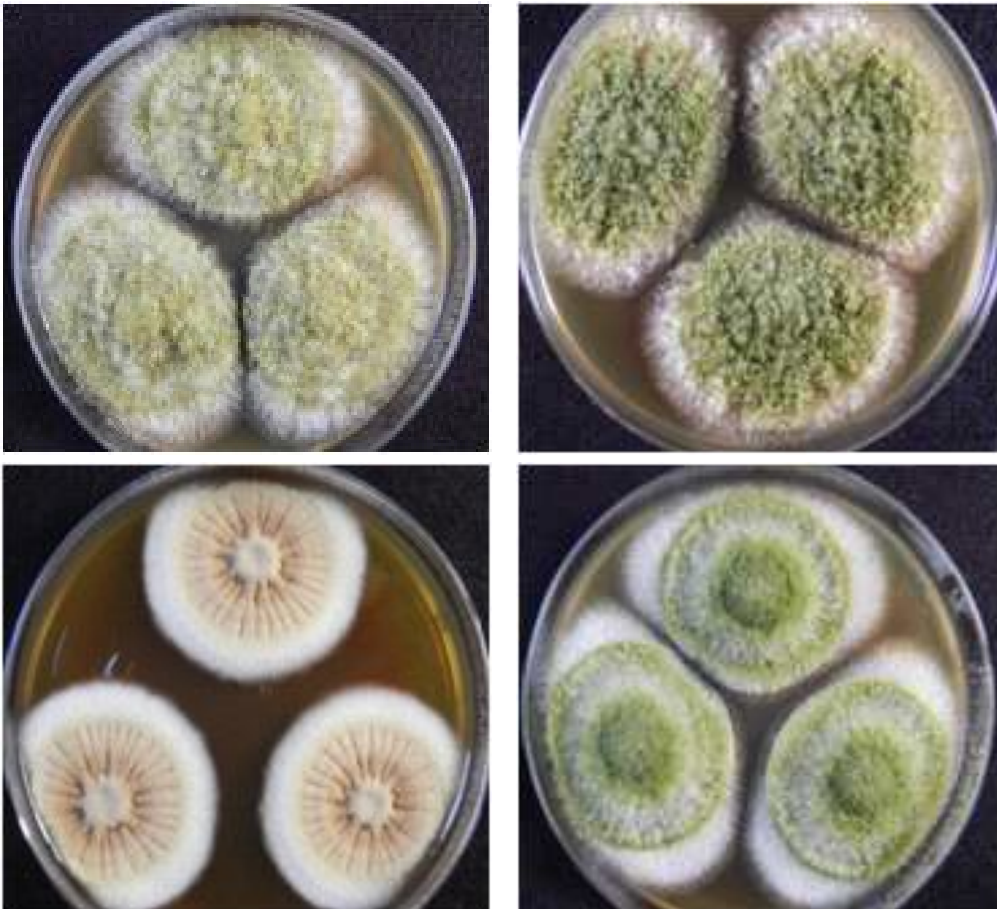


Figure 7-1. Morphological character of culture *Aspergillus* sp. molds.

나. 곰팡이 종균의 탄소원 이용능

- 공시균인 곰팡이가 생육에 필요한 최적 탄소원, 질소원을 구명하기 위해 곰팡이 포자 현탁액(4.1×10^9 spores/mL)을 각 탄소원 및 질소원 배지에 접종하여 8일 간 25°C에서 배양한 후, 균체성장 및 생육도(A_{660})를 측정하여 결과를 Table 7-3과 Table 7-4에 나타내었다.
- 황국균인 *Aspergillus oryzae*의 탄소원 이용성은 arabinose > sorbitol > sucrose 순으로 나타났고, 백국균인 *Aspergillus luchensis* 균주가 이용하는 탄소원은 xylose > galactose = maltose = inositol = sorbitol 순이었다.

Table 7-3. Carbon sources for mold culture

Carbon compounds	Strains			
	CF1001	Cf1002	CF1003	CF1005
Sucrose	2.69	1.82	1.70	1.45
Lactose	1.81	0.55	0.90	1.54
Mannose	1.55	1.85	1.45	1.90
Rhamnose	0.82	0.75	0.81	0.69
Galactose	0.95	0.89	0.99	2.00
Fructose	1.55	1.17	1.28	1.49
Maltose	2.00	1.72	1.48	1.78
Glycerol	1.45	1.14	1.85	0.07
Melibiose	1.00	0.80	0.81	1.42
Xylose	1.21	1.05	1.05	2.15
Inositol	0.98	0.68	0.79	1.97
Mannitol	1.22	0.86	0.99	1.67
Sorbitol	1.94	1.73	1.85	1.95
Arabinose	2.35	2.89	2.30	1.32
Amygdalin	0.88	0.87	0.90	1.22
Lactate	0.20	0.16	0.17	1.16
Gluconate	1.13	1.15	1.37	0.69

다. 곰팡이 종균의 질소 이용능

- 공시균인 곰팡이가 생육에 필요한 최적 질소원을 구명하기 위해, 각각의 질소원을 첨가한 배지에서 8일 배양하여 각 균주들이 생육한 결과를 Table 7-4 에 나타내었다.
- 곰팡이는 meat extract를 첨가한 배지에서 가장 높은 생육도를 보였으며 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, Tryptone, KNO₃, NaNO₃에서 유사한 정도의 생육도를 보였다. 한편, ethylamine-HCl에서는 거의 성장하지 못하였다.

Table 7-4. Nitrogen source for mold culture

Nitrogen source	Strains			
	CF1001	Cf1002	CF1003	CF1005
NaNO ₃	+++	++	++	+
(NH ₄) ₂ SO ₄	+++	++	++	++
NH ₄ Cl	++	++	+++	++
Meat extract	+++	+++	+++	+++
Tryptone	++	++	++	++
KNO ₃	++	++	++	++
Ethylamine-HCl	-	-	-	-

라. 곰팡이 종균의 최적 배양조건

- 앞서 각 균주 별로 선발된 탄소원(xylose, arabinose, sucrose)과 질소원을 첨가한 배지에 초기 pH, 배양온도, 배양시간에 따른 최적 조건을 조사하였다. *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus oryzae* 곰팡이는 초기 pH는 7, 배양온도는 30℃와 35℃에서 생육의 차이가 크지 않아 최적 배양온도는 30℃로, 배양시간은 8일이 이들 곰팡이가 생육하기 가장 좋은 최적 조건이 설정되었다(Table 7-5).

Table 7-5. Culture conditions for mold

Condition	Growth(A_{660})				
		CF1001	CF1002	CF1003	CF1005
pH	5	1.14	0.99	0.88	1.52
	6	1.10	1.09	1.10	1.49
	7	1.20	1.29	1.30	1.58
	8	1.23	1.20	1.05	1.53
Temperature (°C)	25	1.17	1.20	1.05	1.48
	28	1.30	1.35	1.24	1.30
	30	1.42	1.33	1.41	1.60
	35	1.52	1.48	1.48	1.59
Time (days)	0	0	0	0	0
	4	0.44	0.11	0.18	0.40
	6	0.67	0.48	0.49	0.43
	8	1.51	1.33	1.02	1.09

마. 곰팡이 종균의 최적 액체배지 조건

- 상기 실험 결과로 볼 때 산업용 곰팡이 종균의 액체 배양배지 최적 조건은 재료 구입의 편리함이나 경제성을 고려하여 최적 배지조건을 설정 하였다. 최적 액체배지 조성 및 배양조건은 아래의 Table 7-6과 같다.

Table 7-6. Optimum culture media for industrial mold

Wheat rice powder	5.5 g
Sucrose	18 g
Meat extract	1.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
Tap water	1,000 mL
pH	Non adjusted
Temperature	30~35℃
Rotor speed	160 rpm

바. 곰팡이 종균의 최적 고체배양 배지 조건

- 곰팡이와 같은 고등균류는 절대 호기성 균주(strict aerobes)이므로 액체 배양과 같은 submerged culture보다는 산소가 풍부한 대기상태 즉, 고체 배양배지에서 생육도가 훨씬 높으며 종균으로 사용가능한 외생포자를 다량으로 충분히 착생시키는 고상 발효배양법(solid-state fermentation)이 적합하다. 본 연구에서는 주위에서 흔히 구할 수 있고, 비교적 배지 원료비가 저렴하여 경제적이며 전통적으로 누룩 제조 등에 사용되어 왔던 곡물재료를 사용하여 곰팡이 종균 배지로서의 산업적 응용을 실시하였다.

사. 곡물 원료 별 곰팡이 배양 포자수 측정 실험

- 곰팡이와 같은 고등균류는 외생포자로 번식해 나가므로 충분한 양의 포자가 생산되어야 한다. 따라서 본 실험에서는 다양한 곡물원료를 대상으로 곰팡이 균주를 착생시켜 배양 후 포자 생산에 가장 적합한 곡물의 종류를 선정하여 최적 대량생산 배지로 사용하기 위한 실험을 실시하였다.
- 상기 실험결과로 볼 때 가장 우수한 외생포자 착생률을 보이는 곡물로는 곡물의 입도가 가장 작고, 글루텐 함량이 낮아 호화시 점도가 낮아 덩어리지는 현상이 낮은 메조가 가장 우수하였고 밀쌀, 보리쌀이 비교적 양호한 외생포자 착생률을 보였다.
- 따라서 산업용 곰팡이 고상배양용 종균배양용 곡물배지원료로 좁쌀과 밀쌀을 최적 배지로 선정하여 고상 발효 최적 배양조건을 선정하였다.

Table 7-7. Molds spore counting of various grains

곡물종류	Hemocytometer를 사용한 곰팡이 포자수 측정($\times 10^8$ g)			
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
	<i>oryzae</i> CF	<i>oryzae</i> CF	<i>oryzae</i>	<i>luchuensis</i>
	1001(중모)	1002(단모)	CF1003(청주용)	CF 1005(백국)
메조	58	62	60	98
차조	22	20	29	29
현미	21	25	20	43
일반미	19	20	20	38
보리쌀	21	26	29	44
밀쌀	22	25	26	43
백태콩(소립종)	11	19	15	28
백태콩(중립종)	14	18	17	19

2. 효모 종균 생산용 최적 배지의 개발

가. 공시균주 및 순수분리배양

- 효모생산용 최적 배지를 선정하기 위해 당사에서 보유 중인 효모균주인 *Saccharomyces cerevisiae* SJ-1균주를 YM 배지상에 배양된 공시균주로 사용하여 배양 최적 조건 실험을 실시하였다.

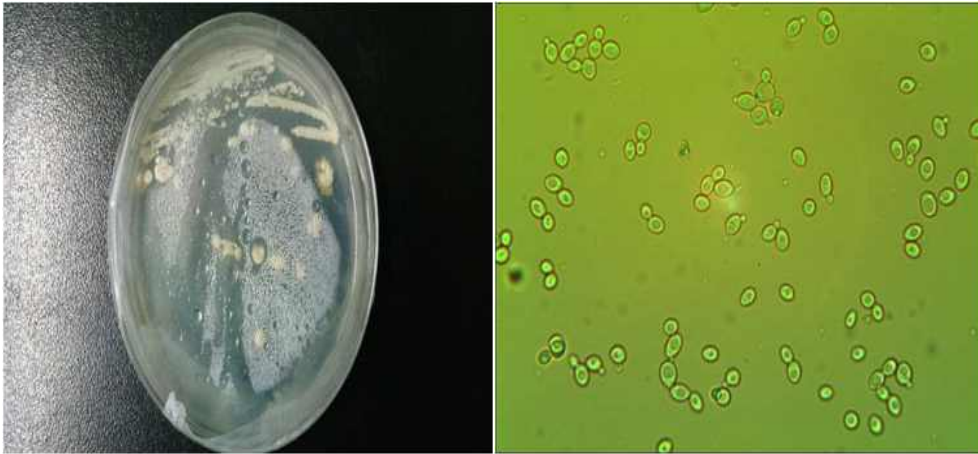


Figure 7-2. Pure culture of *Saccharomyces cerevisiae* TY-2.

나. 효모 균주의 최적 배지조건

- 공시균주 효모가 생육에 필요한 최적 탄소원, 질소원, 무기염의 종류를 선정하기 위해 24시간 배양된 효모배양액(2×10^9 CFU/mL)을 각종 탄소원 및 질소원 및 무기염 배지에 접종하여 2일 간 30°C에서 배양한 후 생육도(A_{600})를 측정한 결과를 Table 7-8부터 Table 7-11에 나타내었고 효모배양 공정은 Figure 7-3과 같다.
- 상기 실험결과에 따르면 탄소원으로는 fructose>glucose>maltose>sucrose 순으로 우수하였으며 유기태 질소원으로는 peptone>yeast extract>corn steep liquor 순, 무기태 질소원으로는 ammonium sulfate>ammonium chloride>ammonium nitrate 순, 무기염으로는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ > $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ >NaCl 순으로 나타났다.
- 비교적 경제적인 질소원으로는 corn steep liquor(CSL) 등이 사용되고 있으나 발효과정 중 오염발생, 탈색공정 추가 등의 이유로 본 실험에서는 CSL을 제외하였다.

Table 7-8. Effect of carbon source for yeast growth

Organic nitrogen source (0.5%)	Growth (OD at 600 nm)
Nutrient broth	3.4
Yeast extract	3.0
Trypton	2.8
Peptone	3.1
Corn steep liquor	3.1
Casein hydrolysate	1.9

Table 7-9. Effect of nitrogen source for yeast growth

Carbon source (1%)	Growth (OD at 600 nm)
Glucose	4.0
Maltose	3.0
Xylose	3.1
Arabinose	2.0
Fructose	3.8
Lactose	2.0
Sucrose	3.1
Soluble starch	1.7
Potato starch	0.5
Corn starch	0.9

Table 7-10. Effect of inorganic salts for yeast growth

Inorganic nitrogen source (0.2%)	Growth (OD at 600 nm)
Ammonium sulfate	2.4
Ammonium nitrate	2.0
Ammonium chloride	1.8
Ammonium phosphate	1.4
Sodium nitrate	1.0

Table 7-11. Effect of mineral salts for yeast growth

Inorganic mineral salt (0.1%)	Growth (OD at 600 nm)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.9
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.9
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.8
NaCl	1.8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.3

Table 7-12. Optimum culture medium for yeast growth

Glucose	20 g
Yeast extract powder	15 g
Ammonium sulfate	1 g
Magnesium sulfate	1g
Ca ₂ PO ₄	0.5 g
Water	1,000 mL
Initial pH	5.7



Figure 7-3. Culture process for yeast.

제 17절 전통발효식품용 종균생산 방법의 최적화 시스템 개발

1. 곰팡이 종균생산용 고상 발효공법의 최적화 시스템 개발

가. 곰팡이 종균생산용 최적 곡물배지의 선정

- 곰팡이종균 생산은 액체배양보다는 고체배양이 종균 활성 유지에 우수하므로 곡물을 2시간 정도 침수, 배수한 후 121℃에서 약 1시간 정도 고압스팀 살균 처리하였다. 37℃로 냉각한 후 순수분리 배양된 곰팡이 포자를 접종하여 고체배양 공정에 사용하였다. 곡물을 사용한 곰팡이 고체배양에는 접종용 중 배양 곡물조건과 본 생산용 곡물 배양조건을 별도로 사용하였다.

나. 접종용 중 배양(inoculum for mold starter) 곡물배지 조건

- 대량생산을 위한 접종용 곡물은 곡물의 표면적이 많은 입자가 미세한 곡물인 좁쌀을 사용한 것이 고농도 포자수 생성이 우수하여 아래와 같은 비율로 곡물 배지조성을 결정하여 사용하였다.
- 곡물 배지조성: nonglutinous millet(메조) 99%, potassium phosphate 0.2%.

다. 본 생산용 곡물배지조건

- 곰팡이 고체배양을 위한 본 생산용 곡물은 호화 시 곡물은 점성이 너무 높으면 뭉침 현상이 발생하여 곡물의 표면적이 줄어들고 통기성이 나빠져서 곰팡이 포자형성에 불리해진다. 따라서 본 생산용 곡물배지의 조성은 아래와 같이 설정하여 실시하였다.
- 또한 곡물의 경도가 너무 딱딱하면 곰팡이 성장 시 곡물 내부로 균사의 침투 및 발생이 힘들므로 아래와 같이 당화효소액을 희석 처리하여 실시하였다.
- 본 생산용 곡물배지 조건: wheat(밀) 70%, barley(보리) 27.5%, 효소처리 malt extract juice 2%, potassium phosphate 0.5%.

라. 곰팡이 종균생산용 최적 고상 발효시스템(solid-state fermentation system) 개발

- 곰팡이 등과 같은 고등균류(fungi)의 산업적 발효방법은 기존 세균 및 효모와 같은 단세포균에 주로 이용되는 액상배양 발효법(submerged fermentation)보다 고체 매트릭스 내에 산소전달이 용이하고 고체매트릭스 내에 함유수분을 이용하는 고상 발효공법이 생산에 유리하였다.

- 또한 대부분의 호기성 고등균류배양에 있어 고상 발효공법을 적용 시 효소 및 균사체의 생산 수율이 높았다. 또한 고상 발효공법은 액상발효공법에 비해, 시설비 및 운영 유지비가 저렴하여 경제적인 대량생산이 가능하다는 이점을 가지고 있다.

마. 곰팡이 종균생산용 고상 발효시스템의 설계

- 곰팡이 종균 대량 생산을 목적으로 한 고상 발효시스템은 배양실내의 청정도유지, 원활한 산소공급과 항온·항습 유지, 온도편차의 최소화 등을 충분히 고려하여 설계하여야 한다. 따라서 발효시스템의 설계에는 아래와 같은 기준으로 발효실의 설계를 실시하였다.

바. 고상 발효시스템 설계의 기본사항

- 배양장치의 내부 재질은 내약품성, 내부식성 재질을 사용해야하며 미생물에 독성을 나타내지 않아야 한다 (내부재질 100T 방폭우레탄재질, 내면 0.5T 스테인리스 스틸 재질사용).
- 공정 상 오염이 방지되어야 하고 공기의 출입 부분에 공기 여과장치 등이 필요하며 출입구는 에어커튼 장치가 부착되어야 한다 (외부공기 유입구 HEPA 필터장치 부착, 실내공기압력 상시 양압유지, 자외선 살균 초음파 가습을 통한 실내습도 자동제어 시스템 채택).
- 온도, 수분 활성도 및 산소농도를 적절히 제어가 가능하여야 한다.
- 교체매트릭스배지 내 온도,수분의 균일성 유지가 매우 중요하며 특히 기질 내 온도의 불균일성을 최소화하는 공정관리가 중요하다 (발효실내 온도, 습도조절은 자동제어 마이컴 방식을 통한 자동제어 시스템 적용).



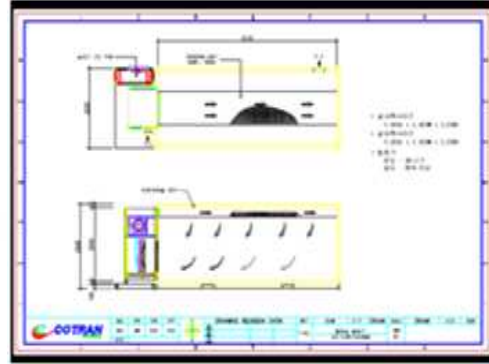
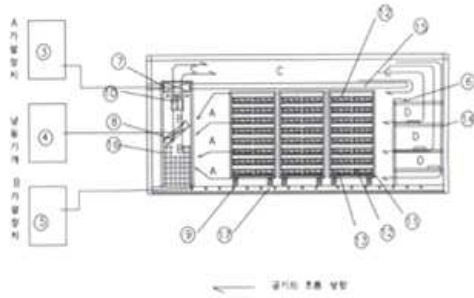


Figure 7-4. 곰팡이 종균용 고상 발효 배양시스템의 설계.

사. 곰팡이 종균 생산 제조

- ① 원료증자(121℃/1 h) → ② 원료냉각(35℃로 냉각) → ③ 목회첨가(냉각한 원료에 첨가제로서 육송이나 참나무의 재를 0.1~1%, 중탄산소다를 0.1~1% 첨가) → ④ 종균접종(종균배양 한 좁쌀(중국의 starter)을 본 배양 할 곡물의 중량에 대하여 0.1~5% 농도로 접종) → ⑤ 고체배양(28~35℃로 통풍이 가능한 상자(산소농도 0.2% 이상)에 광목을 덮어 수분율을 50±10%, 35℃가 넘지 않는 조건으로 2~3일 간 배양) → ⑥ 건조공정(포자가 충분히 착생되면 35~40℃로 온도를 높이고 제습을 실시하면서 1~2일 간 건조하여 수분율이 6~10% 정도가 되도록 건조) → ⑦ 분쇄 및 포장(건조된 종균(포자와 균사에 덮인 통밀)은 별도의 분쇄공정을 거쳐 일정 용량으로 진공 또는 질소충진 포장으로 제품화).

2. 효모 종균생산용 분말화 기술 및 잡균 오염방지법 개발

- 고농도의 효모 종균의 생산을 위한 효모의 수율과 생산성을 최대화하기 위해 일반적인 batch fermentation법보다는 영양분의 간헐적인 보충을 실시하는 유가식 배양법(feed-batch fermentation)이 유리하다. 또한 효모의 생리적 특성인 산소공급이 원활할 때는 알콜발효보다는 세포분열로 유도하기 위해 1 vvm 이상의 산소분압과 100 rpm 이상의 교반을 충분히 실시하여야 한다.

가. 효모 종균 생산용 최적 배지조건과 대량 생산 최적 조건 설정

- 효모 종균생산의 최적 배지조성은 효모의 수율과 배지의 경제성을 고려하여 아래와 같이 최적 배지조성을 설정하였다. 발효조 배양조건은 30℃에서 약 54시간동안 탄소 원으로 1% 고과당을 6시간 간격으로 투입하면서 실시하였다. 배양종료 후 배양액은 10,000 rpm의 연속 원심분리 공정을 통해 균체를 회수하여 건조공정에 투입한 후 유당분말을 혼합하여 효모분말을 제조하였다.

Table 7-13. 산업용효모생산용 최적 배지조성

Component	Amount
Glucose	20 g
Yeast extract powder	15 g
Ammonium sulfate	1 g
Magnesium sulfate	1 g
Ca ₂ PO ₄	0.5 g
Water	1,000 mL
Initial pH	5.7

- 배양액 working volume : 3,000 L 배양액
- Temp. adjust : 30°C setting,
- pH adjust : 6.0 (1N NaOH 사용)
- rotor speed : 100 ~ 500 rpm 단계적 증가
- 산소분압 adjust : pO₂ : 1.0 ~ 5.0 vvm 단계적 증가
- Total Culture time : 54 hrs.
- anti-foam adding: 0.01% mineral silicon anti-foam detergent (소포제)
- feeding rate : fructose syrup (55 brix.) 1 % 용액을 6 hrs 간격으로 투입(fed batch 용 carbon source feeding)

Figure 7-5. 유가식 발효 배양기(fed-batch fermenter) 운전 조건.

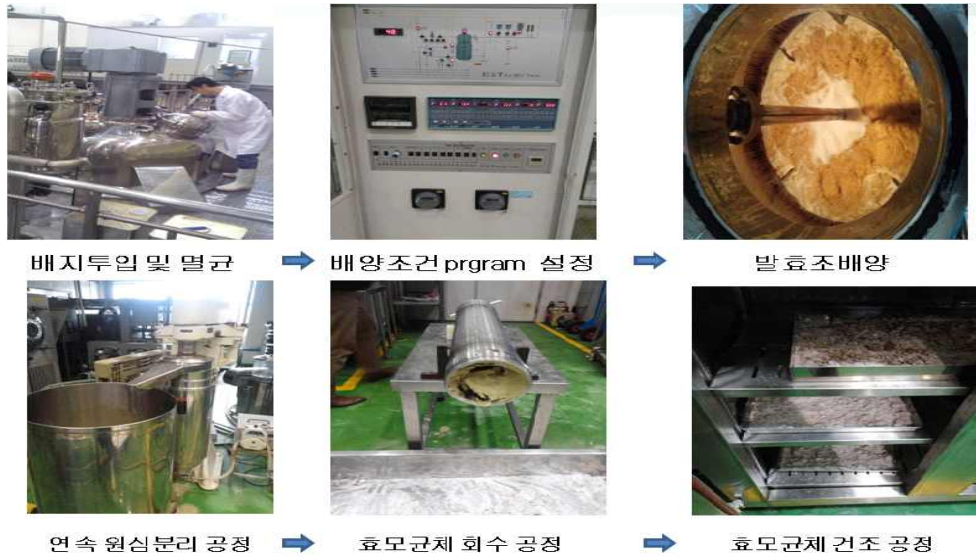


Figure 7-6. 종균효모 발효생산 공정.

나. 현장 오염 저감기술과 건조공법 설정

(1) 현장 오염 저감기술의 개발(C.I.P. 기법)

- 생산 현장 미생물 제어는 생산공정 중에 잡균오염을 최소화시키는 기술로서 통상 C.I.P.(clean-in-place)라고 일컬어지는 현장 미생물 오염제어 기술이다. 현장 미생물의 오염도를 파악하기 위해 배양실, 연속 원심분리기, 건조기를 대상으로 미생물 오염도를 측정하였다.
- 더불어 현장 오염 미생물의 제어를 위해 다양한 알콜류, 염소류, 과산화수소 소독살균제를 대상으로 미생물 검출 시험을 실시해본 결과 과산화수소 계열의 물질이 살균 소독력이 가장 우수 하였다.

Table 7-14. 현장 별 미생물의 오염도 측정(단위: CFU/g)

샘플링 장소	균종별 미생물 오염도		
	일반세균	곰팡이류	대장균군
배양실	80,000,000	500,000	10,000
연속원심분리장치	1,000,000	100,000	0
건조기내부	20,000	10,000	0

Table 7-15. 과산화수소 계열 살균제의 농도 별 살균 효과

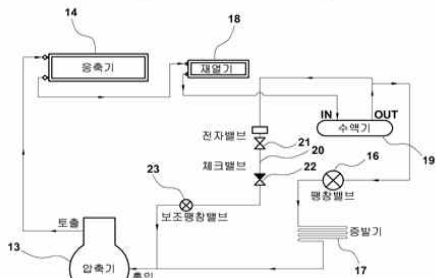
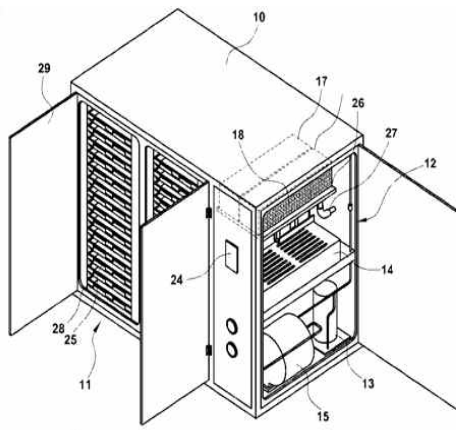
과산화수소 희석농도(%)	세균의 종류	
	일반 세균	대장균군
0.1	검출	불검출
0.2	불검출	불검출
0.3	불검출	불검출
0.4	불검출	불검출
0.5	불검출	불검출

(2) 건조공법 설정

- 완제품의 품질과 보관 안정성을 유지하기위한 품질 안정방법으로 건조기술은 제품의 유통 안정성과 상품화의 중요한 요소이다.
- 일반적인 미생물의 분말화 기술로서 동결건조법이나 열풍건조법, 냉풍건조법을 실시 하였으나 균체의 생존률, 건조비용, 공정의 경제성을 고려할 때 하이브리드 냉각제습 건조법이 가장 우수한 것으로 판단된다.

Table 7-16. 건조방법 및 장단점 비교

건조방법 및 건조기 비교			
구분	하이브리드 건조기	냉풍 건조기	히트펌프열풍건조기
건조 방식	히트펌프냉풍건조 + 데시칸트로터 재습건조	히트펌프냉풍건조	히트펌프 열풍건조
건조 방법	1차 히트펌프 증발기에 의한 저온 감습과 동시에 2차 데시칸트로터에 의한 저온 재습으로 연속 건조를 진행한다.	히트펌프 증발기에 의한 저온 감습.	히트펌프 증발기에 의한 감습건조와 히트펌프 응축기에 의한 열풍건조를 동시 수행
건조 온도	20°C ~ 30°C 저온 건조	30°C ~ 45°C	30°C ~ 90°C
건조후 함유량	8% 이하	12% 이상	10%
장점	1. 저온에서 연속으로 건조시키므로, 건조물의 성질이 변화되지 않고, 최상의 품질을 생산한다. 2. 저온에서 연속 건조를 시키므로, 잡균이 번식되지 않고 건조물이 안전하다. 3. 에너지를 재생사용하므로 건조비용이 저렴하다. 4. 저온건조가 연속하게 이루어지므로, 발효균(생균)을 건조하는데 적합하다.	1. 장비가격이 하이브리드 건조기에 비해 싸다. 2. 냉풍건조를 하므로, 품질의 상태를 유지시킬 수 있다.	1. 히트펌프 감습 및 열풍건조로 건조속도가 빠르다. 2. 건조속도가 빨라 건조물의 품질을 최상으로 건조한다. 3. 히트펌프 재생열을 사용하므로 에너지 절약형이다.(에너지절감기기 등록 및 에너지절리화자금 사용) 4. 건조속도가 빨라 생산적이고, 경제적이다. 5. 일반 전기열풍기에 비해 건조온도가 낮고, 건조속도가 빠르므로, 건조물의 성질을 최상으로 유지하고, 건조 성능이 우수하다. 6. 일반 냉풍 및 히트펌프 건조기에 비해, 추가된 기능으로(신기술 특허) 성능이 뛰어나고, 건조시 냉풍기능으로 에어컨으로 사용할 수 있다.(옵션기능)
단점	1. 장비가격이 다소 높다.	1. 증발기에 의한 저온 감습으로, 건조를 하므로, 건조온도가 낮을 경우 상대습도가 높아 건조속도가 낮다. 2. 건조물의 부패가 쉬운온도에서 건조하므로 건조속도가 늦을 경우 건조물이 부패하기 쉽다. 3. 건조시간이 길다. 4. 증발기에 의한 감습으로 최대 5°C 이하로 감습을 할 수 없어, 건조물의 수분함량이 높다. 5. 장비가격이 다소 높다.	1. 일반 전기열풍기에 비해 비싸다. 2. 저온건조에서 냉풍건조의 성능과 동일하여, 냉풍건조의 단점을 가진다.



1. 하이브리드 건조기의 구조와 원리



2. 하이브리드 건조기 외부



3. 하이브리드 건조기 내부



4. 건조완료 중국제품

Figure 7-7. 하이브리드 냉각제습건조기 구조 및 원리.

제 18절 전통발효식품용 종균 시제품 개발

1. 종균제품의 보관 활성 유지법 개발

- 종균 제품은 제품의 특성상 포장용기의 미생물학적 무균화와 보관 및 유통기간 중의 변질 방지가 필수적이다. 액상 효모 제품은 보관 과정 중 탄산가스 발생으로 인한 효모액의 누출의 위험성이 있으므로 용기 내부의 가스압력을 방지 할 수 있는 유리용기나 내압용 PET 용기의 사용이 필요하다. 곰팡이 등의 분말 포자 상의 제품은 흡습을 방지할 수 있는 밀폐형 용기이거나 은박 파우치 진공포장 방법을 사용해야 유통기간 중 흡습으로 인한 제품의 변질을 예방할 수 있다.

가. 액상 종균 제품과 분말 종균 제품의 활성 유지 방안

(1) 액상 효모 종균의 보관 기간 별 생존율

- 상기 당 첨가 및 무기염류 첨가에 따른 종균의 생존율과 활성연구 결과를 토대로 하여 2% xylooligo당, 0.2% NaCl이 함유된 배양액(4.0×10^9 CFU/mL)을 액상 종균시료를 대상으로 보관기간과 온도 별 액상종균의 생존율 시험을 실시하였다.
- 해당 당류와 무기염을 적정농도로 첨가한 액상종균은 1~4°C에서 보관하였을 시는 약 2개월 간은 비교적 양호한 생존율을 보였으나 30°C이상의 고온 상태에서는 1개월 내에서도 급격한 생존율 저하를 나타냈다.

Table 7-17. 보관기간과 온도에 따른 액상 효모종균의 생존율(shelf-life test)

(단위: CFU/mL)

보관 기간(일)	1°C	4°C	20°C	30°C	40°C
30	5.0×10^9	5.0×10^9	4.0×10^9	3.0×10^9	3.0×10^9
60	4.0×10^9	4.0×10^9	4.0×10^9	2.0×10^9	1.0×10^9
90	3.0×10^9	3.0×10^9	3.0×10^9	1.0×10^9	1.0×10^9
120	2.0×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9	1.0×10^9	1.0×10^9

- 5개월 간 상온 25°C에 보관하여 균주 생존력의 shelf-life test를 실시해 본 결과, 액상효모 제품은 1개월 정도까지는 비교적 생존율이 유지가 되었으나 4개월 이후에는 생존율의 급격한 감소(생존율 약 50%대)가 일어났다.

나. 분말 중균제품의 보존 안정성

(1) 균주 별 분말 중균제품의 생존율

- 분말 중균제품은 포장 내부에 수분이 흡습되지 않는 조건에서는 효모는 5개월 후 약 20%의 균주 생존율 저하를 나타내었으나 곰팡이 분말 중균제품은 98%까지 생존율을 보여 비교적 양호한 균주 생존율을 나타내었다. 이는 효모는 세포상태에서 건조 분말화되고, 곰팡이는 포자 상태로 건조 분말화되어 비교적 높은 생존율을 보이는 것으로 사료된다. 액상 중균의 보존 안정성 저하에 따른 문제점을 해결하기 중균의 분말화를 시도한 후, 실리카겔 흡습제 사용에 따른 중균제품의 균주 활성 및 생존율을 검토하였다.

2. 중균제품의 유통 최적 포장용기 및 방법의 개발

가. 포장 용기에 따른 생존수 shelf-life test

- 본 시험에서는 유리용기 및 내압용 PET 용기(액상중균 보관용)와 진공포장용 은박지 필름(Al/PE 혼합재질, 분말중균 보관용)를 사용하여 기존 방법으로 제조한 액상중균과 분말중균 시료를 밀폐 보관하여 25℃ 상온에서 약 3개월 보관시에 액상 중균제품과 분말중균 제품의 흡습현상과 균주 생존율을 검토하였다.
- 효모의 생존율은 5개월 동안 보관 후, 월 별로 YM배지상에 희석 배양하여 생존수를 측정하였고, 곰팡이의 생존율은 PDA배지상에 중층도말 희석 배양법으로 배양하여 생존수를 측정하였다.

Table 7-18. 보관 용기별 분말중균 제품의 생존율

포장유형	보관기간 별 균주 생존율(%) (생균수 측정법에 의한 shelf-life test)				
	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월
진공포장 은박지 (분말 효모용)	90%	90%	85%	95%	81%
	수분함량 8%	수분함량 8%	수분함량 8%	수분함량 9%	수분함량 9%
진공포장 은박지 (곰팡이 분말용)	100%	100%	100%	94%	87%
	수분함량 6%	수분함량 6%	수분함량 6%	수분함량 7%	수분함량 7%
밀폐형 원터치PE 용기 (곰팡이 분말용)	100%	100%	100%	98%	98%
	수분함량 4%	수분함량 4%	수분함량 5%	수분함량 5%	수분함량 5%

3. 종균 시제품 개발

가. 연구개발 활용 시제품의 현장 적용 시험

- 본 연구를 활용한 기술로써 생산된 곰팡이종균(황국 시제품), 효모종균(효모 시제품)을 경북고령의 전통장류 제조업체((주)해단지)와 전통탁주제조업체((주)대한주조)를 대상으로 제품생산을 실시하여 종균의 품질을 평가한 결과 장류의 풍미가 우수하고, 탁주의 주질이 향상되는 결과를 얻을 수 있었다.

(1) 탁주 제조 품질평가



Figure 7-8. 탁주제조 공정도.

Table 7-19. 탁주발효 중 양조특성 품질 평가

Culture Time	12 hr.	24 hr.	48 hr.	72 hr.	96 hr.	120 hr.	144 hr.	168 hr.	180 hr.
Temp. (°C)	23	30	29	26	25	25	24	23	22
pH	4.5	4.2	4.1	4.2	4.3	4.3	4.4	4.5	4.5
Alcohol content (v/v %)	-	3	9	11	12	13	14	15	15
Titrate acidity %	-	-	9	10	8	9	10	9	9

(2) 장류제조 품질 평가

- 전분분해효소, 단백분해효소 기준 균주 대비 우수, 특히 단백분해효소 역가 우수함.
- 유리아미노산 다량 생산, 특히 감칠맛을 내는 글루타메이트, 아스파테이트 생산 우수함.
- 구수한 맛 아미노산의 다량 생산으로 콩을 이용한 장류 제조에 적합할 것으로 기대함.



Figure 7-9. 전통 장류 제조과정.

Total Amino Acid

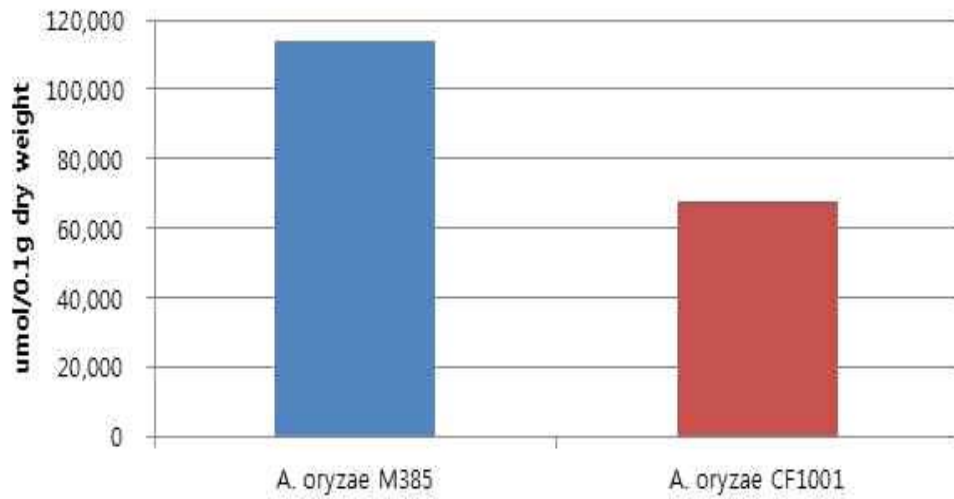


Figure 7-10. 총 유리아미노산 생성.

Amino Acid

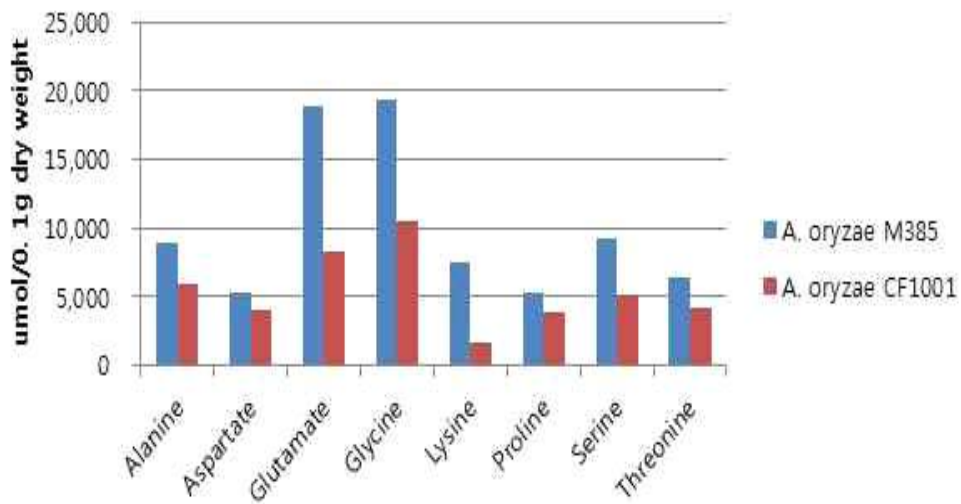


Figure 7-11. 주요 아미노산 생성.

나. 종균 시제품 2건 개발(제품 출시일: 2017. 10. 28.)

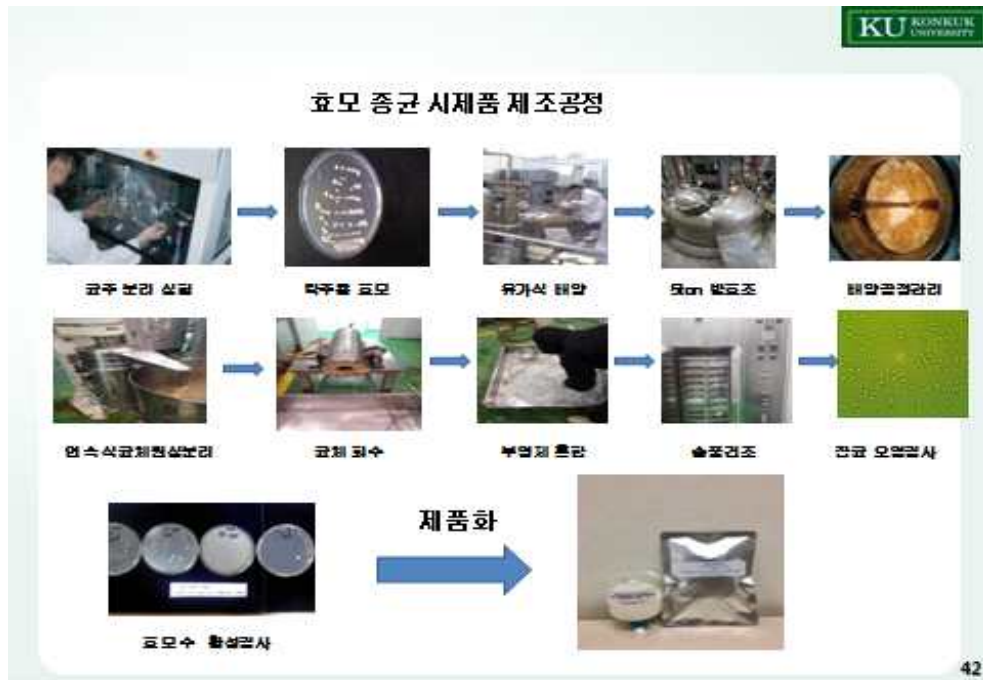


Figure 7-12. 종균(곰팡이/효모) 시제품 제조과정.



Figure 7-13. 곰팡이 종균 시제품(제품명: 황국).



Figure 7-14. 효모 종균 시제품(제품명: 중무 효모).

다. 시제품 2건 매출 증빙 세금계산서

- 시제품 개발 초기단계로 인해 매출발생이 미진하였으나 본격적인 마케팅 활성화를 통해 국내 시장 및 해외수출 시장 개척을 통해 종균제품의 매출 증대를 꾀할 계획임.

승인번호 : 20171101-41000096-66770634 관리번호 : TX2017118762338

전자 세금계산서 (공급자 보관용)		책번호	2017 권	11 호				
		일련번호	7					
등록번호	620-81-06092			등록번호	503-86-12289			
상호	중무발효	성명	양승준	상호	주식회사 해단지	성명	김석균	
사업장 주소	울산광역시 울주군 삼동면 삼동로 267-6			사업장 주소	경상북도 고령군 함림면 평덕길 40			
업태	제조업 도매	중사업장번호		업태	제조업 외	중사업장번호		
종목	식품첨가물 중곡 효소 효모외			종목	장류 외			
작성일자	2017 11 01			공금가액	1,280,000		세액	128,000
비고								
일련	번호	품목명	규격	수량	단가	공금가액	세액	비고
11	01	한국	kg	80	16,000	1,280,000	128,000	
합계금액		현금	수표	어음	외상 미수금	이 금액을 청구 함		
1,408,000		0	0	0	1,408,000			
인쇄횟수 : 0								
*본 세금계산서는 부가가치세법에 의하여 발행된 세금계산서이며, 전자서명 법에 의거한 전자인증 서명으로 인감날인이 없어도 법적 효력을 갖습니다.								
*그분업무 대행사업자 : (주)더온이즈온 [134-81-08473]								

출연번호 : 20171106-41000000-67672804 관리번호 : T82017110678373

전자 세금계산서 (곰팡이 보관용)

등록번호: 620-81-06092		등록번호: 140-81-37177						
상호: 홍무발효	상명: 발효준	상호: (주)더존비즈온	상명: 김미영					
사업장 주소: 울산광역시 울주군 삼동면 삼동로 287-6	사업장 주소: 경기도 시흥시 봉우순환로3번길 46(정왕동)	사업장 주소: 경기도 시흥시 봉우순환로3번길 46(정왕동)	사업장 주소: 경기도 시흥시 봉우순환로3번길 46(정왕동)					
업태: 제조업 도매	종사업장번호	업태: 제조	종사업장번호					
품목: 식품첨가물, 종국, 효소, 효모외	종목: 락주	종목: 락주	종목: 락주					
작성일자: 2017. 11. 06	공급가액: 400,000	세액: 40,000						
비고								
일	일	품목명	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
11	06	효모	kg	10	40,000	400,000	40,000	
합계금액		현금	수표	어음	외상 미수금	이 금액을 청구 함		
440,000		0	0	0	440,000			

인쇄횟수 : 0

*본 세금계산서는 부가치세법에 의하여 발행된 세금계산서이며, 전자서명 법에 의거한 전자인증 서명으로 인감날인이 없어도 법적 효력을 갖습니다.
*고부업무 대행사업자 : (주)더존비즈온 [134-81-08473]

Figure 7-15. 매출증빙 전자세금계산서(곰팡이 종균 매출액(1,408,000원), 효모 종균 매출액(440,000원)).

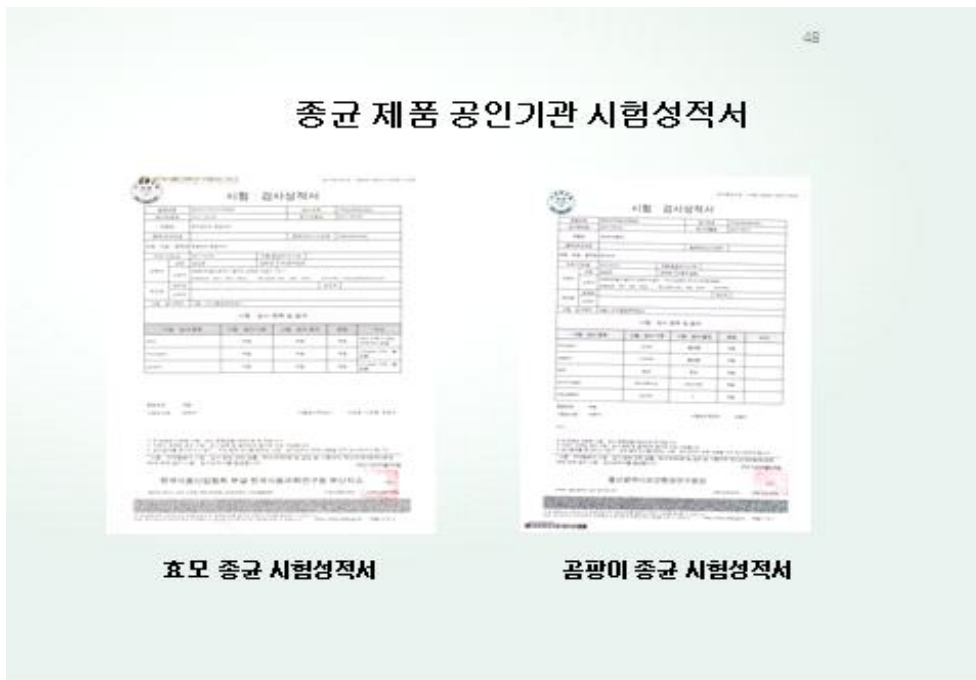


Figure 7-16. 효모 종균, 곰팡이 종균 2종 시제품의 공인기관 시험분석.

제 19절 건강기능용 균주를 위한 후보 균주의 상용화 생산 환경 및 제품 적합성 검증

1. 후보 균주의 상용화 생산 환경 적합성 검증

가. 후보 균주에 대한 성장곡선 및 pH 변화

- 건국대학교에서 최종 선발된 프로바이오틱스용 후보 균주 *Lactobacillus plantarum* Lb41에 대한 균수가 최대가 도달하는 지점을 확인하기 위하여 0시간부터 14시간까지의 시간 별 균수 및 pH에 대해 측정하였다.
- 후보균주에 대한 성장곡선 및 pH 측정 방법은 균을 접종시킨 seed culture 6 mL를 600 mL MRS broth가 담긴 1 L 삼각플라스크에 넣은 후 배양 0시간부터 14시간까지 시간 별 균수 및 pH를 측정하였다.
- 후보균주에 대한 시간 별 균수 및 pH를 측정한 결과(Figure 8-1), *Lactobacillus plantarum* Lb41이 10~12시간 사이에서 균수는 5.1×10^9 CFU/mL으로 측정되었으며 pH는 4.04까지 내려가는 결과를 통해 10시간 이후에 최대 균수가 유지되는 것을 확인할 수가 있었다.

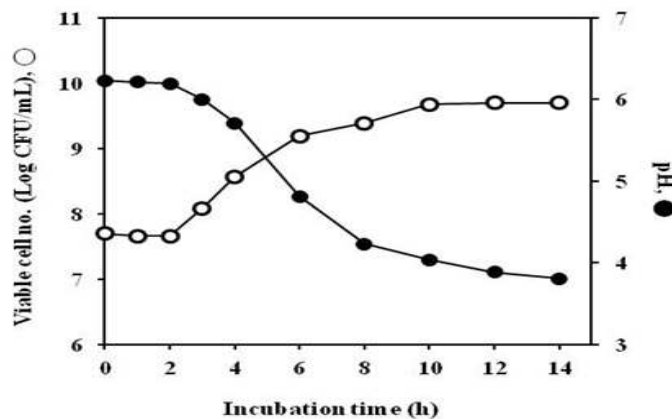


Figure 8-1. *Lactobacillus plantarum* Lb41에 대한 시간 별 균수 및 pH 변화.

나. 실험용 MRS 및 산업용 MRS배지에 대한 적합성 검증

- 실험용 MRS배지(Difco)와 1,200 L 배양 시 사용하게 될 산업용 MRS배지(유어랩바이오)의 차이점을 파악하기 위해서 각 5.5% 농도로 배지를 만든 후 후보균주 *Lactobacillus plantarum* Lb41을 실험실적으로 접종, 배양하여 10, 12시간 때 균수를 측정하였다.
- 실험용 MRS 및 산업용 MRS배지에 대한 10, 12시간 때 균수를 측정한 결과(Table 8-1), 실험용 MRS와 산업용 MRS배지에 대한 10, 12시간 때 균수가 큰 차이가 없는 것으로 나타났으므로 scale-up 배양 시 산업용 MRS 배지를 사용하기로 하였다.

Table 8-1. 실험용 MRS 및 산업용 MRS 균수 비교

배양시간(h)	실험용 MRS	산업용 MRS
10	3.2×10^9 CFU/mL	1.1×10^9 CFU/mL
12	4.6×10^9 CFU/mL	1.3×10^9 CFU/mL

다. Scale-up 생산을 위한 접종액 제조

- 1,200 L 발효조(후보균주, *Lactobacillus plantarum* Lb41) 및 300 L 발효조(상용균주, *Lactobacillus plantarum* KCTC 12036BP-(주)메디오젠으로부터 제공)를 사용한 대량생산을 위해 실험실에서 배양시킨 각 균주에 대한 배양액의 균수는 아래와 같았다(Table 8-2).
- 각 균주의 유산균 수는 배지적합성이나 균주 특성에 따라 생장성이 다르며 또 배양액 규모에 따라서도 달라지므로 위 접종액으로 scale-up 생산을 하기로 하였다.

Table 8-2. Scale-up에 사용된 각 균주에 대한 배양액의 균수

접종한 균	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 12036BP
배양 배지	MRS broth(Difco), 5.5%	
배양 시간	36°C, 12시간	
균수	2.7×10^9 CFU/mL	3.7×10^9 CFU/mL

라. Scale-up 생산

- 아래와 같은 조건으로 후보균주 및 대조구로 사용균주를 Scale-up 생산하였다(Table 8-3).

Table 8-3. Scale-up에 사용된 각 균주에 대한 배양액의 균수

접종한 균	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
	Lb41	KCTC 12036BP	
발효 조건	발효조 크기	1,200 L	300 L
	배양액 양	500 L	300 L
	접종 양	5 L	3 L
	온도	37°C	37°C
	rpm	30	30
	pH	6.0	6.0
	공기 조건	0.06 vvm	0.06 vvm
	압력	0.5 kg/cm ²	0.5 kg/cm ²
	배양 시간	12시간	12시간
	동결 건조 조건	온도	-35~25°C
압력		1.2 mbar	1.2 mbar
보호제		7% Skim milk	7% Skim milk
균수	9.8×10 ⁸ CFU/mL	1.5×10 ⁹ CFU/mL	

2. 후보 균주의 제품 적합성 검증

가. 프로바이오틱스 제형 제조

- Scale-up으로 생산된 후보균주 및 상용균주를 아래의 포물라(Table 8-4~5)로 혼합하여 타정 및 스틱 제조하여 프로바이오틱스 생존율을 검토하였다.

Table 8-4. 프로바이오틱스 제품의 포물라(Sachet)

성분	함유량(%)
올리고당류	20
정제포도당	50
치커리식이섬유	10
자일리톨	10
갈락토올리고당	10
계	100

Table 8-5. 프로바이오틱 제품의 포플라(Tablet)

성분	비율(%)
유산균	19.61
포도당	53.92
치커리식이섬유	9.80
자일리톨	9.80
갈락토올리고당	4.90
스테아린산M	1.96
계	100.00

나. 프로바이오틱스 상품 유형 및 저장 조건에 따른 유산균 수 분석

- 프로바이오틱스 상품 유형 및 저장 조건(Table 8-6)에 의하여 타정 및 분말제품을 제조하고 저장조건 및 기간 별로 유산균 수를 분석하여 압력이나 저장기간 별에 따른 제품 적합성을 검증하였다.
- 프로바이오틱스 상품 유형 및 저장 조건에 따른 유산균 수 분석은 2차년도 연구기간 중에 완료하였다.

Table 8-6. 프로바이오틱스의 상품 유형 및 저장 조건

조건	Tablet	Sachet
크기	21 mm × 5 mm	100 mm × 11 mm
중량	2 g	2 g
정제 조건	5, 10, 15 kg/cm ²	-
저장 온도	2~8℃	2~8℃
저장 기간	0, 30, 60, 90, 120일	0, 30, 60, 90, 120일

제 20절 건강기능식품용 균주의 제품 적합성 및 제품을 위한 포물라 개발

1. 제품화를 위한 프로바이오틱 포물라 개발

가. 제형별 저장조건 별 유산균 안정성 실험

(1) 실험용 유산균 제조

- 본 연구과제로 개발된 *Lactobacillus plantarum* Lb41 은 충북바이오센터에서 pilot scale로 제조하였으며, 대조구로는 시중 유산균 회사인 M사에서 판매하는 *Lactobacillus plantarum*을 구입해서 사용하였다.

(2) 타정 및 분말용 제품 제조

- 분말제품은 Table 8-4의 포물라에 따라 용량 20 L 비닐백에 위 혼합비율로 총 용량 7.5 kg되게 유산균 및 부원료를 넣고, 밀봉한 다음 손으로 약 10분 간 혼합하여 제조하였다.
- 분말은 알미늄-PE 파우치(가로 13 cm×세로 20 cm, 두께 0.1 mm)에 위 혼합물 80 g을 넣고, 열접착 밀봉하였다.
- 타정제품은 Table 8-5의 포물라에 따라 2 g/정으로 타정물드를 제작하였으며, 타정압력은 10, 15, 20 kg/cm²으로 타정하여 분말과 마찬가지로 알미늄-PE 파우치에 80 g(40정)을 넣고 열접착 밀봉하였다
- 위 분말 및 타정 제품은 실온 및 냉장 저장하면서 1개월 간격으로 꺼내어서 잔존 유산균수를 분석하였다.

(3) 유산균 분석방법(BCP 배지법)

- 멸균 샘플백에 위 분말 및 타정 형태 시료 50 g 정도를 정밀하게 달아 넣고, 9배의 생리식염수를 가한 다음 냉장고에 30분 간 넣고, 때때로 흔들어 준다. 타정 제품은 타정 형태가 완전히 붕해되었는지 확인하였다.
- 위 용해된 시료를 9 mL 멸균 희석액으로 단계 별로 희석한 다음, 1 mL 용액을 페트리디쉬에 넣고, BCP 배지(Eiken Chemical Co.)를 부어서 잘 흔들어 준다. 인큐베이터에서 35°C, 72시간 배양 후에 유산균수를 측정하였다.

(4) 유산균, 제형, 저장조건 별 안정성 실험 결과

- *Lactobacillus plantarum* Lb41 및 M사의 *Lactobacillus plantarum*을 분말제품으로 제조하고 7개월 간 실온 및 냉장(4°C 냉장고)보관하면서 측정한 결과는 Figure 8-2와 같았다.
- *Lactobacillus plantarum* Lb41의 균수는 3×10^{10} CFU/g 이며 M사 *Lactobacillus plantarum*의 균수는 6×10^{10} CFU/g으로 투입량 19.61%에 대한 이론치는 5.9×10^9 CFU/g 및 1.2×10^{10} CFU/g이었다.
- 분말제형에서 혼합 직후 프로바이오틱 제품의 유산균수는 5×10^9 CFU/g으로 이론치 5.9×10^9 CFU/g의 85%였다. 이것은 혼합 공정 중 유산균의 사멸로 인한 것으로 추정되었다.
- *Lactobacillus plantarum* Lb41의 경우 상온 및 저온 저장안정은 시중 상업화 유산균인 M사 *Lactobacillus plantarum*보다 저장 안정성이 우수하였다. 냉장저장 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수는 5×10^9 CFU/g이었으며 7개월 후 유산균수는 6×10^9 CFU/g으로 유산균수의 변화가 거의 없었다. 반면 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 1.3×10^{10} CFU/g에서 7개월 후 1×10^9 CFU/g으로 1/10로 감소하였다.
- 상온 저장의 경우 차이는 더 커서 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수는 5×10^9 CFU/g이었으며 7개월 후 유산균수는 2×10^8 CFU/g으로 1/10 감소하였으나, M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 1.3×10^{10} CFU/g에서 7개월 후 9×10^7 CFU/g으로 1/1,500로 감소하였다.

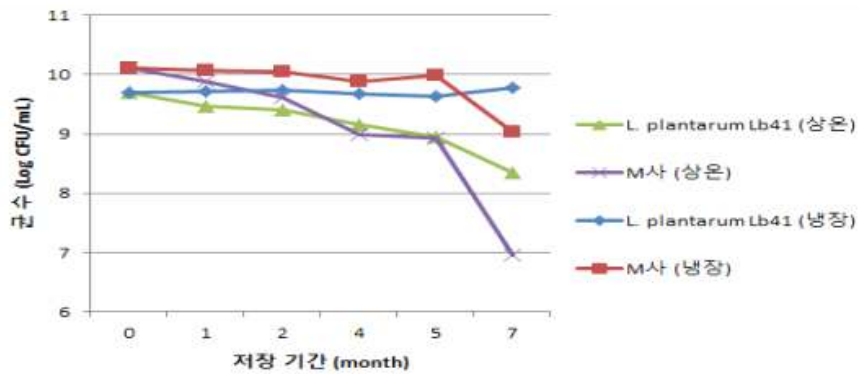


Figure 8-2. *Lactobacillus plantarum* Lb41 및 M사 *Lactobacillus plantarum*의 저장조건 및 저장기간 별 안정성(분말제형).

- 타정압력 10 kg/cm², 냉장 저장 조건에서 7개월 후 안정성을 보면 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수는 4.9×10^9 CFU/g이었으며, 7개월 후 유산균수는 3.2×10^9 CFU/g으로 약 35%정도 감소되었다(Figure 8-3). 반면 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 1×10^{10} CFU/g에서 7개월 후 5×10^9 CFU/g으로 50%정도 감소하였다.

- 상온 저장의 경우 차이는 더 커서 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수 4.9×10^9 CFU/g에서 7개월 후 유산균수는 3.9×10^8 CFU/g으로 1/100 감소하였으나 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 1×10^{10} CFU/g에서 7개월 후 6×10^7 CFU/g으로 1/5,000 감소하였다. 타정의 경우에서도 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 경우 상온 및 저온에서 시중 상업화 유산균인 M사 *Lactobacillus plantarum*보다 저장 안정성이 우수하였다.

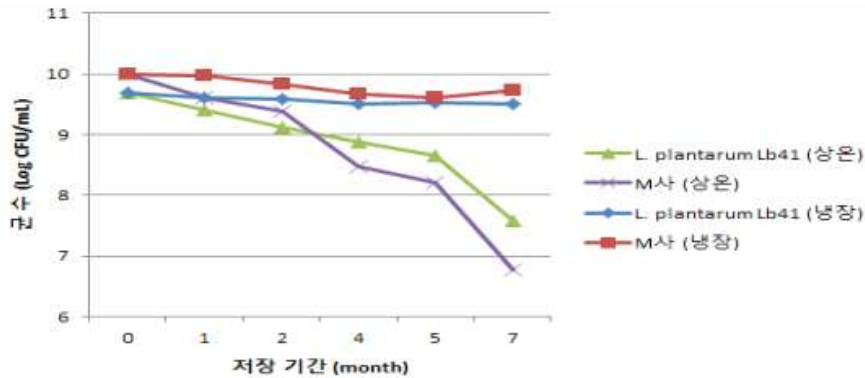


Figure 8-3. *Lactobacillus plantarum* Lb41 및 M사 *Lactobacillus plantarum*의 저장조건 및 저장기간 별 안정성(타정압: 10 kg/cm²).

- 타정압력 15 kg/cm², 냉장 저장 조건에서 7개월 후 안정성을 보면 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수 5.5×10^9 CFU/g에서 7개월 후 유산균수는 2.9×10^9 CFU/g으로 약 43%정도 감소되었다(Figure 8-4). 반면 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 9×10^9 CFU/g에서 7개월 후 4.9×10^9 CFU/g으로 46%정도 감소하여 두 제품은 유사한 저장 안정성을 나타내었다.
- 상온 저장의 경우 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수 5.5×10^9 CFU/g에서 7개월 후 유산균 수는 3.4×10^8 CFU/g으로 1/100 감소하였으나 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 9.9×10^9 CFU/g에서 7개월 후 1×10^8 CFU/g으로 1/1,000로 감소하였다. 타정압력 15 kg/cm²의 경우에서도 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 경우 상온 및 저온에서 시중 상업화 유산균인 M사 *Lactobacillus plantarum*보다 저장 안정성이 우수하였다.

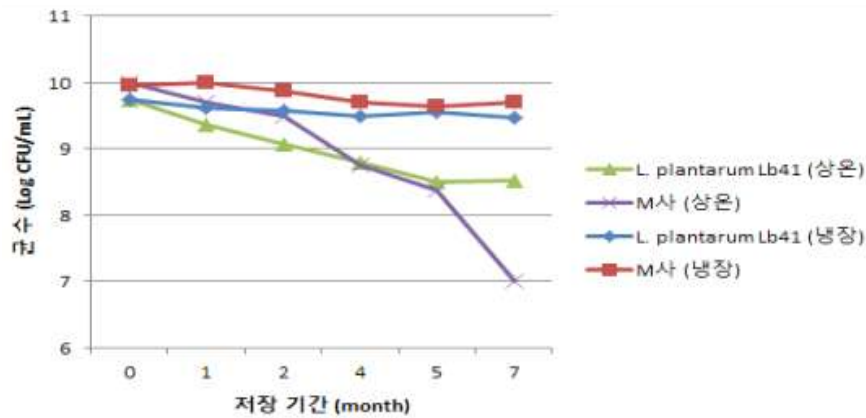


Figure 8-4. *Lactobacillus plantarum* Lb41 및 M사 *Lactobacillus plantarum*의 저장조건 및 저장기간 별 안정성(타정압: 15 kg/cm²).

- 타정압력 20 kg/cm², 냉장 저장 조건에서 7개월 후 안정성을 보면 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수 5.5×10⁹ CFU/g에서 7개월 후 유산균수는 2.7×10⁹ CFU/g으로 약 51%정도 감소되었다(Figure 8-5) 반면 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 9×10⁹ CFU/g에서 7개월 후 4.1×10⁹ CFU/g으로 55%정도 감소하여 두 제품은 유사한 저장 안정성을 나타내었다.
- 상온 저장의 경우 *Lactobacillus plantarum* Lb41의 초기 유산균수 5.5×10⁹ CFU/g에서 7개월 후 유산균수는 1.6×10⁸ CFU/g으로 1/350 감소하였으나 M사 *Lactobacillus plantarum*의 경우 초기 9×10⁹ CFU/g에서 7개월 후 3×10⁷ CFU/g으로 1/3,000로 감소하였다. 타정압력 20 kg/cm², 상온 저장의 경우 *Lactobacillus plantarum* Lb41은 시중 상업체 유산균인 M사 *Lactobacillus plantarum*보다 저장 안정성이 우수하였다.
- 전체 실험구에서 M사 *Lactobacillus plantarum*은 실온 저장 4개월 후부터 유산균의 사멸속도가 *Lactobacillus plantarum* Lb41보다 빠른 것으로 나타났다.

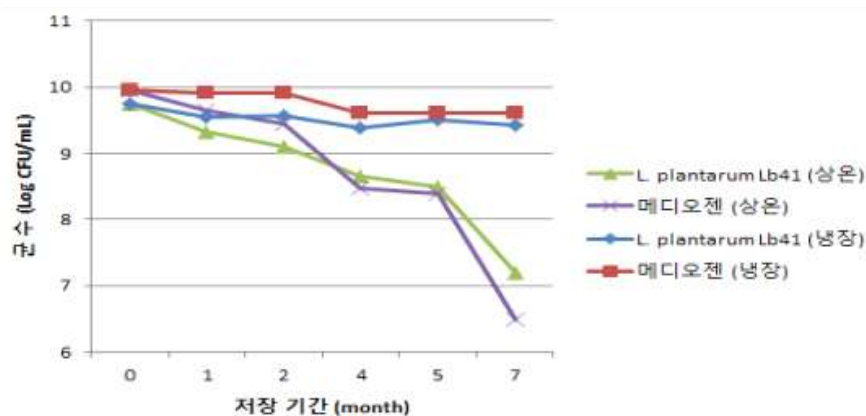


Figure 8-5. *Lactobacillus plantarum* Lb41 및 M사 *Lactobacillus plantarum*의 저장조건 및 저장기간 별 안정성(타정압: 20 kg/cm²).

나. 프리바이오틱 및 부원료별 유산균 상용성 실험

- 시중 제품에 많이 사용되는 프리바이오틱 소재 및 부원료를 선정하여 아래비율대로 유산균과 혼합하여 분말제형을 제조한 후 상용성을 비교하였다.

(1) 실험용 유산균

- 실험에 사용된 *Lactobacillus plantarum* Lb41은 2015년 10월 충북바이오센터에서 pilot scale로 제조하여 아람 냉장고에 보관하고 있는 제품을 사용하였다.

(2) 성분 배합 비율

- 시중에 판매되고 있는 프리바이오틱 제품 10종을 조사하여 부형제, 프리바이오틱스, 산미제로 분류하고 많이 사용되는 원료를 위주로 다음과 같이 배합비를 구성하였다.

Table 8-7. 프리바이오틱 및 부원료별 성분 배합 비율(%)

실험구	유산균	부형제			프리바이오틱스						산미제		
		말토덱스트린	식물성크림 분말	무수포도당	갈락토올리고당	프락토올리고당	락토로스	폴리덱스 p	차일리톨	이소말트	난소화성 말트덱스	비타민C	구연산
1	10	90											
2	10		90										
3	10			90									
4	10	20	25	25	20								
5	10	20	25	25		20							
5.1	10	15	20	15		40							
6	10	20	25	25			20						
7	10	20	25	25				20					
8	10	20	25	25					20				
9	10	20	25	25						20			
10	10	20	25	25							20		
11	10	18	25	25		20						2	
12	10	18	25	25		20							2

(3) 실험방법

- 유산균 및 부원료를 Table 8-7에 의거하여 혼합 한 다음 알미늄-PE 파우치에 50 g 씩 넣은 후 열접착 밀봉하여 실온 저장하면서 유산균 함량 분석하였다.

(4) 실험결과

- 유산균 10% 및 부형제 90%로 혼합한 후 유산균을 분석하였다. 유산균 원말은 2.4×10^{10} CFU/g으로 유산균 10% 혼합 시 이론적으로 2.4×10^9 CFU/g이 나와야한다. 식물성크림 분말이나 무수포도당은 유산균수 감소 없이 나왔으나, 말토덱스트린 혼합구에서는 역가가 38% 감소된 1.49×10^9 CFU/g으로 나왔다. 말토덱스트린 혼합구에서 유산균이 감소된 이유는 당류의 높은 삼투압이 유산균 생육에 영향을 주었을 것으로 추정된다(Figure 8-6).

- 프리바이오틱 제품에서 말토덱스트린의 사용을 줄이는 것이 효율적이다.

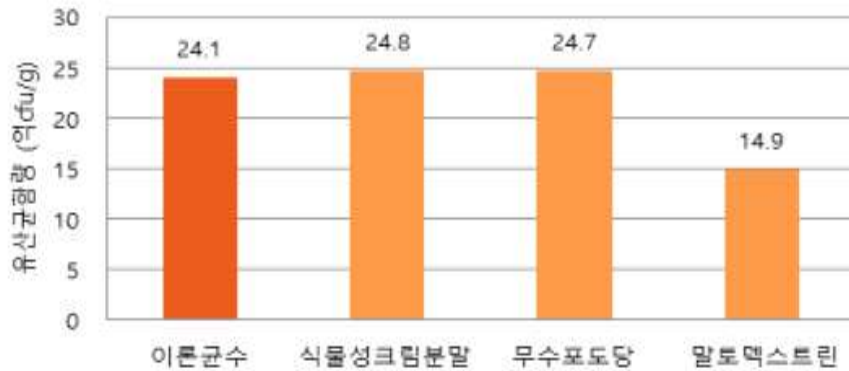


Figure 8-6. 부형제 별 상용성.

- Figure 8-7과 같이 유산균 10% 및 부형제(말토덱스트린 20%, 식물성크림분말 25%, 무수포도당 25%)에 각 프리바이오틱 소재 20%를 첨가하였다.
- 유산균 10% 첨가에 대한 이론균수는 2.4×10^9 CFU/g으로 프락토올리고당, 이소말트, 락툴로스, 자일리톨 순으로 유산균의 생육을 도우는 프리바이오틱 상용성이 우수하였으며, 폴리덱스트로스나 난소화성 말토덱스트린의 프리바이오틱 효과는 알려진 것 보다는 미흡한 것으로 나왔다. 갈락토올리고당의 경우는 프리바이오틱 효과가 우수한 것으로 알려졌으나 본 실험에서는 약하게 나왔다.

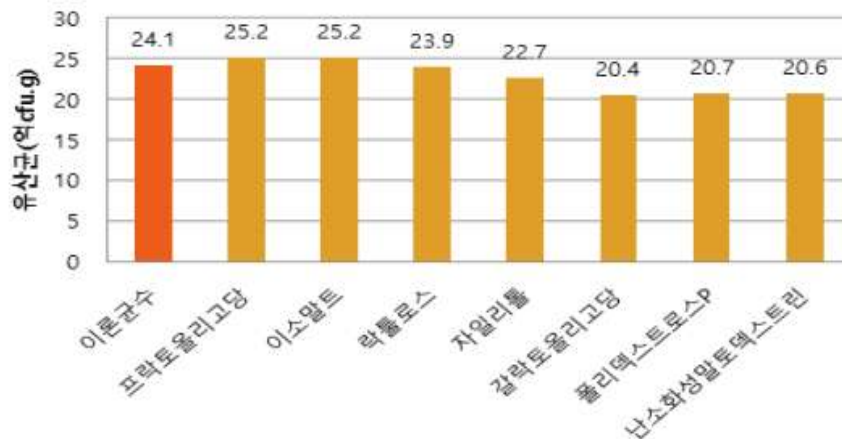


Figure 8-7. 프리바이오틱 소재 별 상용성.

- 프리바이오틱 효과가 우수한 프락토올리고당의 함량 별 효과를 분석하였다(Figure 8-8). 기본 포물라는 프리바이오틱 소재 별 상용성 포물라와 같으나 프락토올리고당 40% 함량의 경우는 말토덱스트린과 무수포도당 함량을 10% 줄이고, 프락토올리고당을 20% 더 추가하였다.

- 프락토올리고당의 경우 이론 균수보다 약간씩 높은 경향을 보였으며 함량 40%의 경우가 더 높았으나 프락토올리고당 함량에 비례적으로 높아지진 않았다.

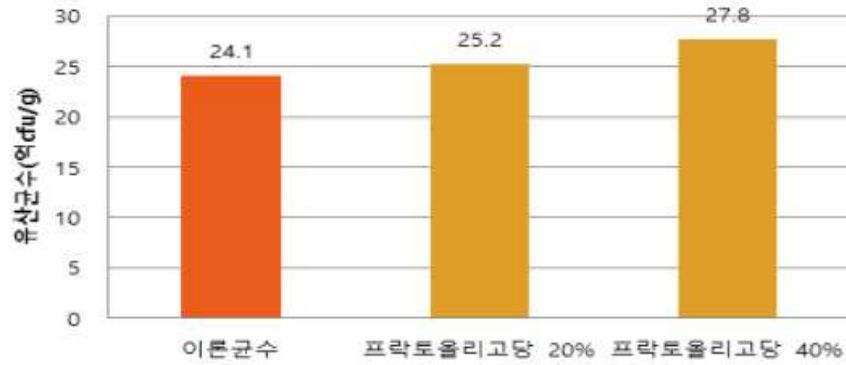


Figure 8-8. 프락토올리고당 함량 별 상용성.

- 유산균 분말제품의 기호성을 증진하기 위해서 비타민C나 구연산을 첨가하기도 하는데 전체 용액의 pH가 산성이 됨으로서 유산균 생육에 영향을 줄 수가 있는데 이것을 파악하기 위함이다.
- 기본 포물라는 프리바이오틱 소재 별 상용성 실험과 같으나 말토덱스트린 함량을 2% 줄이고, 산미제를 첨가 하였다. 비타민 C나 구연산 모두 유산균수에 영향을 미쳐서 20%내외의 유산균 감소현상을 나타내었다(Figure 8-9).
- 산미제의 경우 현재 투입량보다 더 줄여서 보완 실험이 필요하다.



Figure 8-9. 산미제 별 상용성.

다. 프리바이오틱 및 부원료별 유산균 저장 안정성 실험

- 혼합된 제품을 하절기 2개월 간 실온저장(2016. 06. 27.~2016. 08. 25.)하면서 유산균 함량 변화를 분석하였다(Figure 8-10).
- 유산균 10% 및 부형제 90%로 혼합한 후 2개월 실온 저장한 후 잔존 유산균을 분석하여 부형제 별 저장 안정성을 분석하였다. 말토덱스트린 혼합구는 유산균 사멸률이 가장 높았다.

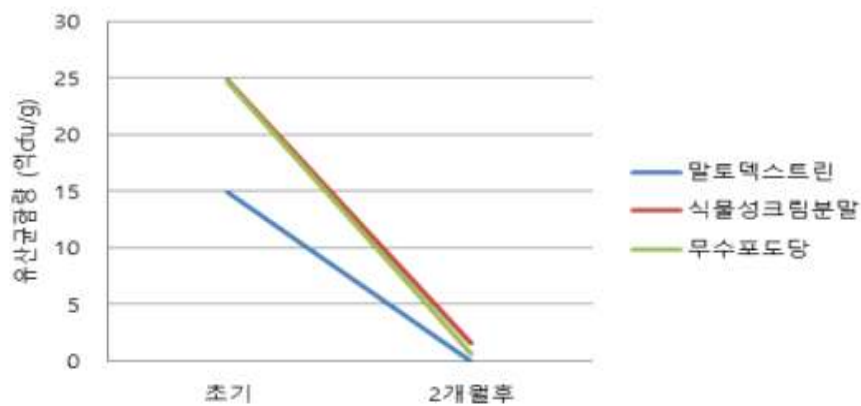


Figure 8-10. 부형제 별 저장 안정성.

- 유산균 10% 및 부형제(말토덱스트린 20%, 식물성크림분말 25%, 무수포도당 25%)에 각 프리바이오틱 소재 20%를 첨가하고, 실온에서 2개월 저장 후 잔존 유산균을 분석하였다(Figure 8-11). 프로바이오틱 소재 중에서는 프락토올리고당의 저장 안정성이 가장 좋았으나 모든 실험구에서 1% 이하로 사멸되어 프로바이오틱 소재가 저장 안정성에 미치는 영향은 부정적이었다.
- 비타민 C나 구연산은 큰 차이 없으며 둘 다 저장 안정성에는 부정적인 영향을 주었다(Figure 8-12).

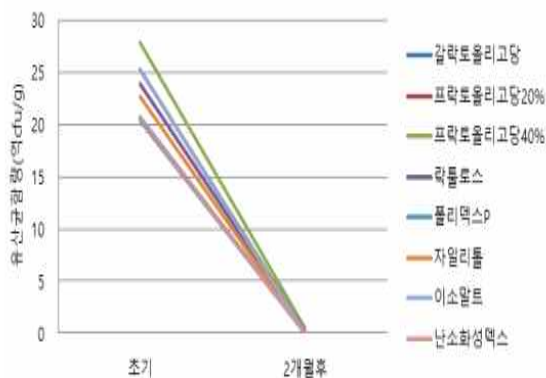


Figure 8-11. 프리바이오틱 소재 별 저장 안정성.

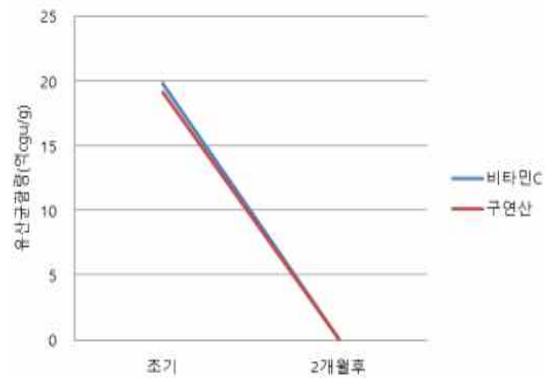


Figure 8-12. 산미제 별 저장 안정성.

제 21절 건강기능식품용 균주의 시제품 개발

1. 포장 형태 및 포장 환경에 따른 저장 안정성 검증

- 시중 프리바이오틱스 제품은 주로 분말 스틱 형태와 하드캡슐 형태의 2가지 종류가 있다. 이 두가지 포장 형태를 실온 및 상온에 저장하면서 생균수를 측정하여 안정성을 검증하였다.

가. 저장 안정성 실험을 위한 성분 배합 및 포장 형태

(1) 실험용 유산균

- 실험에 사용된 *Lactobacillus plantarum* Lb41은 2015년 10월 충북바이오센터에서 pilot scale로 제조하여 아랍 냉장고에 보관하고 있는 제품을 사용하였다. 제조직후는 3.0×10^{10} CFU/g이었으며 냉장보관 15개월 후는 1.0×10^{10} CFU/g으로 감소되었다. 16종 혼합유산균은 유산균제조사(M사)에서 구입하였으며 역가는 2.0×10^{11} CFU/g였다.

(2) 포장 형태

- 스틱포장은 PE-알미늄코팅지를 사용하였으며 각 2 g씩 수동포장하고, 열접착기로 밀봉하고 실온 및 냉장 상태로 6개월 간 저장하면서 유산균수를 MRS배지법으로 분석하였다. 캡슐은 350 mg 용량의 HPMC 하드캡슐을 이용하여 수동으로 유산균 혼합물을 200 mg 충전하고, PE통에 실리카겔 방습제와 함께 밀봉 포장한 후 실온 및 냉장 상태로 6개월 간 저장하면서 유산균수를 MRS배지법으로 분석하였다.

Table 8-8. 스틱 저장 안정성 실험용 배합 비율(%)

(2 g/스티크)

성분	비율(%)	비고
16종 유산균	5	2.0×10^{11} CFU/g
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	5	1.5×10^{10} CFU/g
무수포도당	30	
프락토올리고당	10	
자일리톨	5	
이소말트	20	
식물성크립분말	25	
계	100	

* 유산균 함량 이론치 : 215억 CFU/g

Table 8-9. 캡슐 저장 안정성 실험용 배합 비율(%)

(200 mg/캡슐)

성분	비율(%)	비고
16종 유산균	50	2.0×10^{11} CFU/g
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	50	1.5×10^{10} CFU/g
계	100	

* 유산균 함량 이론치 : 215억 CFU/g

나. 저장 안정성 실험 결과

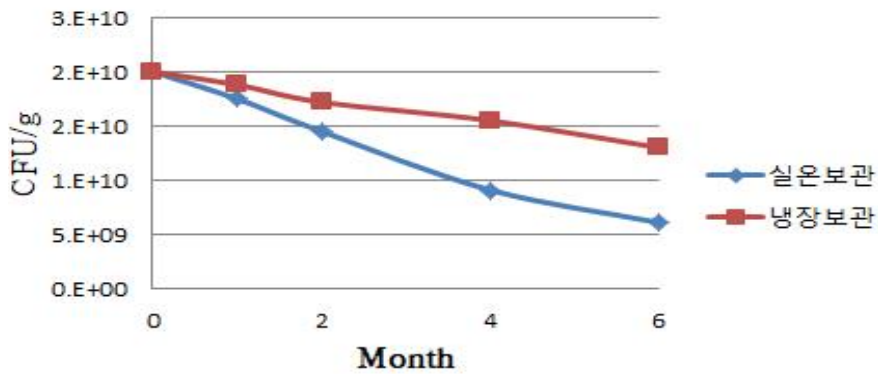


Figure 8-13. 스틱포장 후 저장조건 별 안정성.

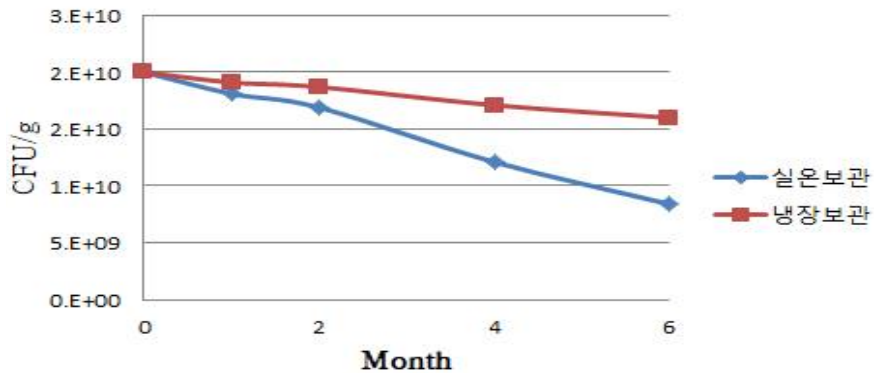


Figure 8-14. 하드캡슐 포장후 저장조건 별 안정성.

- 국내에서 프로바이오틱스 제품 형태로 가장 많은 스틱포장의 경우 초기 유산균 함량 2×10^{10} CFU/g에서 실온 보관 6개월 후에는 6.1×10^9 CFU/g으로 약 70%가 사멸되었으며 냉장 보관의 경우 1.3×10^{10} CFU/g으로 35%정도가 사멸하였다. 2차년도 실험결과와 같이 프로바이오틱스 제품의 경우 냉장보관 제품이 실온보다 안정하였다.

- 캡슐 형태의 프로바이오틱스 제품은 주로 수입품에서 많이 사용되는데 프리바이오틱스 소재나 향, 맛 등의 첨가 없이 유산균 만을 캡슐에 포장하는 형태이다. 초기 유산균 2×10^{10} CFU/g에서 실온 보관 6개월 후에는 8.4×10^9 CFU/g으로 약 58%가 사멸되었으며 냉장 보관의 경우 1.6×10^{10} CFU/g으로 20%정도가 사멸하였다. 캡슐 형태의 포장도 마찬가지로 냉장 상태에서의 안정성이 더 우수하였다.
- 스틱포장은 하드캡슐 포장의 안정성을 비교하면 하드캡슐 포장이 더 안정한 것으로 나타났다. 이 원인으로서는 스틱포장의 경우 유산균분말 이외에 여러 가지 당류나 맛, 향 분말 등을 첨가함으로써 유산균과 접촉하는 당류의 삼투압 영향으로 안정성이 떨어지는 것으로 추정된다. 이와는 다르게 캡슐은 다른 당류나 향분말 등의 부원료 없이 순수한 유산균 만 충전하기 때문에 부원료에 의한 영향이 없어서 안정성이 더 높은 것으로 추정이 된다.
- 프로바이오틱 제품은 올리고당 등 프리바이오틱스 성분이나 당류 등의 첨가에 의해 제품 안정성이 떨어지지만, 실험실적인 유산균수 분석치보다는 실제 사람이 섭취해서 장내에서 어떻게 영향을 주는가가 더 중요하다. 따라서 실제 사람의 장내 유산균의 생육을 도우는 올리고당 등 프리바이오틱스 소재가 함유된 제품이 더 효과가 있을 것으로 추정된다.

2. 시제품 개발

- 본 과제로 개발된 *Lactobacillus plantarum* Lb41 유산균을 활용하여 다음과 같이 시제품 2종을 제조하였다.

가. 스틱포장형 제품

(1) 사용 유산균

- 아래와 같이 3종류의 생 유산균을 사용하였다. 본 과제 수행으로 기술이전 받은 *Lactobacillus plantarum* Lb41, (주)아람에서 농업실용화재단으로부터 통상실시권을 부여받은 *Bifidobacterium longum* KACC 91563 및 건강기능식품 공전에 등록된 혼합유산균 16종을 첨가하여 초기 유산균 투입량을 7×10^9 CFU/2 g으로 하였다.

Table 8-10. 유산균 종류

유산균명	생산업체	생산일자	균주역가
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	(주)셀바이오텍	2017. 08. 30.	5.0×10^{11} CFU/g
16종 유산균	(주)메디오젠	2017. 01. 19.	1.0×10^{11} CFU/g
<i>Bifidobacterium longum</i> KACC 91563	(주)메디오젠	2017. 10. 28.	9.0×10^{10} CFU/g

(2) 포장 형태

- PE-알미늄코팅 스틱지를 사용하고, 10열 스틱포장기로 자동 충전하였으며 10개씩 필로 포장하여 케이스에 3필로(30스틱) 포장하였다. 유산균수는 MRS배지법으로 분석하였다.

(3) 제품 특징

- 본 시제품은 건강기능식품으로 초기 유산균 투입량을 7×10^9 CFU/2 g, 보장량을 2×10^8 CFU/2 g스틱으로 설정하였으며 유산균의 생육을 도우는 프리바이오틱스 소재로 프락토올리고당 및 락츄로스, 비충치성 기능성당류인 이소말트, 비타민C 등을 첨가하였다. 또한 맛은 레몬 맛으로 하여 유산균제품이면서도 먹을 때 상쾌한 맛을 느끼게 설계하였다.

(4) 원료 배합비(Table 8-11)

Table 8-11. 프로바이오틱스 시제품 성분 비율(2 g 스틱제품)

성분	비율(%)	비 고
혼합유산균 16종 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>)	1.50	2.0×10^{11} CFU/g
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	0.50	5.0×10^{11} CFU/g
<i>Bifidobacterium longum</i> KACC 91563	1.00	9.0×10^{10} CFU/g
프락토올리고당	5.00	
이소말트	21.50	
락츄로스	5.00	
초유분말	0.10	
자일리톨	10.00	
레몬농축분말	5.00	

레몬향분말	1.00
효소처리스테비아	0.30
무수포도당	48.60
비타민C	1.00
구연산	1.00
계	100.00

(5) 제조공정

- 원료 건조: 원료의 수분을 낮춰서 유산균의 안정성을 높이고 흐름성을 좋게 하기 위해 프락토올리고당 등 일부 원료를 유통층 건조기를 이용하여 건조시켰다.
- 칭량: 배합비율에 맞게 원료들을 칭량하였다.
- 혼합: 각 원료들을 더블콘 혼합기 혹은 스피드믹서기를 이용하여 혼합하고, 미량원료는 미리 배산 방법으로 혼합하여 두었다.
- 스틱충진: 10열 스틱기를 이용하여 2 g씩 충전하였다.
- 포장: 스틱 10개를 필로로 포장하고 한 박스에 3 필로씩 포장하였다.
- 품질검사: 대장균군 음성, 프로바이오틱스 수 7×10^9 CFU/2 g 이상이면 적합하다.

(6) 제품 사진



Figure 8-15. 락토랑 Y 시제품.

나. 타정/PE통 포장 제품

(1) 사용 유산균

- 아래와 같이 2종류의 생 유산균을 사용하였다. 본 과제 수행으로 기술이전 받은 *Lactobacillus plantarum* Lb41 및 (주)아람에서 농업실용화재단으로부터 통상실시권을 부여 받은 *Bifidobacterium longum* KACC 91563을 사용하였다.

Table 8-12. 유산균 종류

유산균명	생산업체	생산일자	균주역가
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	(주)셀바이오텍	2017. 08. 30.	5.0×10 ¹¹ CFU/g
<i>Bifidobacterium longum</i> KACC 91563	(주)메디오젠	2017. 10. 28.	9.0×10 ¹⁰ CFU/g

(2) 포장 형태

- 1.43 g/tablet로 타정하여 PE통에 60정씩 넣고 방습제를 넣어서 밀봉 포장하였다.

(3) 제품 특징

- 본 시제품은 비타민C 및 유산균 보충용 캔디류로 제조하였다. 전 연령대에 걸쳐서 간식 개념으로 간편하게 먹을 수 있으며 타정형이라서 유산균수는 보장할 수 없어서 식품유형을 캔디류로 하였다. 비충치성 당류인 자일리톨과, 상쾌하고 새콤한 맛을 내기 위해서 레몬 엑기스 및 무수구연산과 DL-사과산을 첨가하였다.

(4) 원료 배합비

Table 8-13. 프로바이오틱스 시제품 성분 비율(1.43 g 타정제품)

성분	비율(%)	비 고
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41	0.50	5.0×10 ¹¹ CFU/g
<i>Bifidobacterium longum</i> KACC 91563	1.00	9.0×10 ¹⁰ CFU/g
정제포도당	82.00	
자일리톨	9.65	
비타민C	2.00	
DL-사과산	0.50	
레몬엑기스분말	1.00	
김치유산균 추출분말	1.00	
스테아린산마그네슘	0.70	
합성향료(레몬향)	1.00	
무수구연산	0.50	
효소치리스테비아	0.15	
계	100.00	

(5) 제조공정

- 원료 건조: 원료의 수분을 낮춰서 유산균의 안정성을 높이고 흐름성을 좋게 하기 위해서 프락토올리고당 등 일부 원료를 유통층 건조기를 이용하여 건조시켰다.
- 칭량: 배합비율에 맞게 원료들을 칭량하였다.
- 혼합: 각 원료들을 더블콘 혼합기 혹은 스피드 믹서기를 이용하여 혼합하고, 미량원료는 미리 배산 방법으로 혼합하여 두었다.
- 타정: 42 T 타정기를 이용하여 1.43 g으로 15 kg/cm²의 압력으로 타정하고, 강도를 10 kg/cm² 이상으로 하였다.
- 포장: PE통에 타정제품 60개 및 방습제를 같이 넣고, 초음파실링하였다.
- 품질검사: 일반세균 1×10⁴ CFU/g 이하면 적합하다.

(6) 제품 사진



Figure 8-16. 락토랑 타블렛 시제품.

다. 시제품 제조에 사용된 설비



유동층 건조기



더블콘믹서



진동체



스피드믹서기



타정기



10열 스택기

Figure 8-17. 시제품 제조에 사용된 (주)아람 생산설비.

라. 사업화 전략

(1) 사업화 배경

- 건강 관심 증대 및 인구 고령화에 따른 건강기능 식품 수요 증대
- 근래 유산균의 면역활성 향상, 항염증, 항비만, 정장작용 등 다양한 기능이 부각됨.
- 건강식품 중 프로바이오틱제품 시장은 매년 큰 폭으로 증가 (2016년: 전년대비 20% 예상)
- (주)아람에서 프로바이오틱 제품을 자체브랜드 및 OEM 으로 생산, 판매 중
- 시장 성장성이 높은 프로바이오틱제품 분야의 생리기능성 확보 유산균으로 시장 점유율 향상

(2) 핵심경쟁요인

(가) 생리기능성: 종균과제로 개발된 유산균 제품의 생리기능성 확보로 시장경쟁력 강화
L. plantarum Lb41 은 항당뇨, 항비만 기능성 보유

(나) 아람 핵심경쟁요소: 우수한 생리기능성을 보유한 자사 유산균을 확보, 효율적인 유산균 생산, 유통망 확보

(3) 건강기능식품 시장 구조

(가) 경쟁기업 현황

- 건강기능식품 분야 대기업 및 중소기업들 간의 경쟁 치열함.
- 국내 유산균 업체도 유산균 원말뿐만 아니라 프로바이오틱 완제품 사업에도 진출
- 일부 업체들은 생리기능성(아토피 등)을 부각시킨 제품 출시함.

(나) 경쟁구조

- 대기업의 브랜드 파워 및 대량생산에 의한 저가 제품
- 중소기업은 주로 대기업제품 OEM 형태로 시장 참여

(다) 시장진입 장벽

- 대기업의 브랜드 파워 및 유통망

(4) 수익 확보 전략

(가) 주요 고객층

- *L. plantarum* Lb41을 활용하여 항당뇨, 항비만 효능을 지닌 프로바이오틱제품 출시
- 추가적인 생리기능성 연구 (임상시험)로 개별인정형 취득 추진

(나) 동남아 등 김치가 생소한 국가의 김치유산균의 우수성 홍보 및 수출 추진

마. 사업화 계획 및 매출예상

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	0.5			
	소요예산(백만원)	50			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		-	3	5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	-	0.6	1.0
		국외	-	-	-
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		기술이전 받은 <i>L. plantarum</i> Lb41 및 Ln4를 자사제품 및 OEM 프로바이오틱 건강기능식품에 사용할 계획임			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년 후	5년 후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	0.5	1	

제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

제 1절 목표달성도

1. 연구개발 목표 달성도

가. 1차년도

연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
□ 제1세부 (건국대학교, 백현동) 식품 산업용 균주 연구를 위한 유용 미생물 자원 확보 및 실험법의 국제 표준화	100	• 기초생리활성 실험법과 관련한 표준화 동향 조사
	100	• 분리균주, 상용균주, 표준균주 및 관련 자료 확보
	100	• 미생물 자원 확보(6,000주)
	100	• 타깃을 대상으로 한 스크리닝 툴 개발 및 적용 (2,000주)
	100	• 분리균주, 상용균주, 표준균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화
□ 제1협동 (한국식품연구원, 임성일) 국내외 시장개척을 위한 식품 미생물 안전성 및 기능성 평가 시스템 확보를 위한 전략 수립	100	• 잠재적 수출 대상국가의 국가 별 식품 미생물에 대한 안전성 판단기준/방법 현황 파악
	100	• 식품 산업용 균주의 안전성 평가 시스템 구축 - 식품 미생물에서 생성되는 toxin 등, 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 등의 평가 시스템 구축 - Mouse 모델을 이용 안전성을 평가할 수 있는 <i>in vivo</i> 검증법 구축
	100	• 항당뇨, 간기능 개선, 항비만, 면역질환(아토피, 식품알레르기 등), 장 건강 증진 활성 평가를 위한 <i>in vitro/in vivo</i> 기능성 평가 시스템 구축
□ 제2협동 (단국대학교 천안캠퍼스, 강대경) 발효특성 분석조건 확립 및 1차 선발된 균주들의 발효특성 분석	100	• 요구르트용 균주의 발효 적합성: 발효배지에서의 생장 특성, pH 및 적정산도 변화, 유기산 생산 패턴, 저장 안정성 분석
	100	• 양조용 균주의 발효 적합성: 알콜 생산과정 중의 알콜 생산능 조사 및 향미 분석
	100	• 전통발효식품용 균주의 발효 적합성: 효소 생산능 조사 및 비교 분석
□ 제3협동 (가천대학교, 박영서) 식품 산업용 균주의 genome분석을 통한 유전자 표지 탐색 및	100	• 유전자지문 분석법의 문헌 조사 및 장단점 비교 분석
	100	• 식품 발효용 균주의 full genome 염기서열 수집
	100	• 식품 산업용 균주의 genome 분석을 통한 유전자

표준균주를 이용한 각종 유전자 지문 분석 및 최적 분석법의 선정		표지 탐색
	100	• Ribotyping, PFGE, PCR-DGGe, rep-PCR, T-RFLP, multiplex PCR
	100	• 유전자 지문 분석방법의 정확도와 편의성 및 경제성 등을 고려한 최적의 유전자 지문 분석방법 선정
□ 제4협동 ((사)한국 종균협회, 김유진) 유용 균주에 대한 안전성, 발효특성, 기능 자료 홈페이지 구축	100	• 산업용 유용 미생물 자원 확보 및 균주 제공
	100	• 유용 균주에 관한 미생물 정보를 효율적으로 검색할 수 있도록 홈페이지의 구축
	100	• 산업화 후보 종균의 분리, 분류 및 동정에 관한 다양한 정보(문헌, 이미지, 균주정보 등)을 지원
	100	• 산업체 등 민간에 산업화 활용 종균의 조희, 검색 서비스 제공
□ 제5협동 ((주)썬바 이오텍, 김진웅) 고농도 배양 기술을 위한 배지 최적화 및 배양 조건 최적화	100	• 배지 최적화 및 배양 조건 최적화: 탄소원, 유기질 소원, 무기염이온의 영향
	100	• 산업용 대량생산을 위한 저가배지 개발: 식품용 whey, soybean, flour 등을 이용한 저가형 배지 개발
□ 제6협동 ((주)충무 발효, 김재민) 전통발효식품용 종균의 최적배지의 개발	100	• 곰팡이 종균생산용 최적 배지의 개발
	100	• 효모 종균생산용 최적 배지의 개발
□ 제7협동 ((주)아 람, 박대철) 건강기능식품용 균주를 위한 후보 균주의 상용화 생산 환경 및 제품 적합성 검증	100	• 후보 균주의 상용화 생산 환경 적합성 검증
	100	• 후보 균주의 제품 적합성 검증

나. 2차년도

연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
□ 제1세부 (건국대학교, 백현동) 식품 산업용 균주 연구를 위한 유용 미생물 자원 확보, 생화학적 특성 및 기초생리활성의 데이터베이스화	100	<ul style="list-style-type: none"> 유제품, 전통발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 토종 균주의 수집 및 스크리닝(2,000주)대상으로 한 스크리닝 툴 개발 및 적용(2,000주)
	100	<ul style="list-style-type: none"> 분리균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화
	100	<ul style="list-style-type: none"> 기초생리활성 항목 별 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 산업용 후보 균주 제공
□ 제1협동 (한국식품연구원, 임성일) 식품 산업용 균주의 통합 안전성 평가 및 분리균주의 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 식품 산업용 균주의 통합 안전성 평가 시스템 구축 및 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 식품 미생물에서 생성되는 toxin 등, 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 등의 평가 시스템 구축 및 성능 평가 - Mouse 모델을 이용한 안전성 평가 시스템 구축 및 평가 - 산업체에서 간단하고 빠르게 검증할 수 있는 안전성 검증 시스템 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> 항당뇨, 간기능 개선, 항비만, 면역질환(아토피, 식품알레르기 등), 장 건강 증진 활성 평가를 위한 <i>in vitro/in vivo</i> 평가 시스템 구축 및 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro/in vivo</i> 평가 시스템 구축 - 항당뇨, 항비만, 간기능 및 면역질환 개선 활성 평가
□ 제2협동 (단국대학교 천안캠퍼스, 강대경) 1, 2차 선발된 균주들의 발효특성 비교 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 요구르트용 균주의 발효 적합성: 발효배지에서의 생장 특성, pH 및 적정산도 변화, 유기산 생산 패턴, 저장 안정성 분석
	100	<ul style="list-style-type: none"> 양조용 균주의 발효 적합성: 알콜 생산과정 중의 알콜 생산능 조사 및 향미 분석
	100	<ul style="list-style-type: none"> 전통발효식품용 균주의 발효 적합성: 효소 생산능 조사 및 비교 분석
□ 제3협동 (가천대학교, 박영서) 최적 미생물 추적 기술 선정 및 분리	100	<ul style="list-style-type: none"> 유전자지문 분석법의 단독 혹은 병용 분석을 통한 최적 분석법 확립
	100	<ul style="list-style-type: none"> 암호화 작업표준 균주를 이용한 각종 유전자 지문 분석 및 최적 분석법의 선정

균주의 유전자 지문 데이터베이스 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> • 분리 균주의 유전자 지문 데이터베이스 구축
□ 제4협동 ((사)한국 중균협회, 김유진) 웹 기반 DB의 활용 방안 및 연계	100	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 구축된 DB의 활용 방안 및 연계
	100	<ul style="list-style-type: none"> • 웹기반 DB의 구축에 단어별 검색 엔진을 연동하여 인터넷 상에서 사용자가 간단히 유용 균주를 찾을 수 있는 기반 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> • 타 연구기관의 균주 활용을 위한 DB의 연동화 구축
□ 제5협동 ((주)셀바 이오텍, 김진웅) 후보 균주의 충격 조건 검증 및 생산 위생도 강화 시스템 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> • 생산 프로세스상에서의 다양한 충격(shock) 조사 및 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 생산 프로세스 상에서의 충격으로, 유기산 생성, agitation, 당 농도 등에 따른 균수의 변화를 특징하여 충격을 조사하여 검증 체계를 구축 - 상기 조건에 맞춰 통계프로그램에 의한 영향 결정 후 최적화
	100	<ul style="list-style-type: none"> • 오염도 저하를 위한 생산 위생도 강화 시스템 연구
□ 제6협동 ((주)충무 발효, 김재민) 전통발효식품용 중균 생산 방법의 최적화 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 곰팡이 중균 생산용 최적배지 및 고상 발효공법의 최적화 시스템 개발
	100	<ul style="list-style-type: none"> • 효모 중균 생산용 최적배지 및 고상 발효공법의 최적화 시스템 개발
□ 제7협동 ((주)아 람, 박대철) 건강기능식품용 균주의 제품 적합성 및 제품을 위한 포물라 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 제품화를 위한 포물라 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 프로바이오틱스의 생존률을 향상시키면서 시너지 효능이 있는 올리고당의 종류에 따라 검토하여, 이를 부원료로 적용하여 완제품의 포물라로 개발 - 어린이, 성인, 노인 등이나 향산화, 대사질환 별 등의 특정 용도나 대상을 상대로 하여 적합한 형태의 포물라를 개발

다. 3차년도

연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
□ 제1세부 (건국대학교, 백현동) 기초생리활성 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 검증된 식품 산업용 균주의 후보 수집	100	<ul style="list-style-type: none"> 유제품, 전통발효식품, 건강기능식품을 타깃으로 한 토종 균주의 수집 및 스크리닝(2,000주)대상으로 한 스크리닝 툴 개발 및 적용(2,000주)
	100	<ul style="list-style-type: none"> 분리균주의 생화학적 특성 및 인체 적용을 위한 기초생리활성의 데이터베이스화
	100	<ul style="list-style-type: none"> 기초생리활성 항목 별 실험분석법에 따른 실험결과의 평가 범위표 구축 및 산업용 후보 균주 제공
□ 제1협동 (한국식품연구원, 임성일) 식품 산업용 균주의 안전성 및 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 식품 산업용 균주의 안전성 평가 시스템 구축 및 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 주관 및 협동기관에서 제공하는 식품산업용 균주의 toxin, 바이오제닉 아민, ethyl carbamate 생성능 평가 - Mouse 모델을 이용한 식품산업용 균주의 안전성 평가 - 산업체에서 간단하고 빠르게 검증할 수 있는 안전성 검증 시스템 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> 항당뇨, 간기능 개선, 항비만, 면역질환(아토피, 식품알레르기 등), 장 건강 증진 활성 평가를 위한 <i>in vitro/in vivo</i> 평가 시스템 구축 및 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro/in vivo</i> 평가 시스템 구축 - 항당뇨, 항비만, 간기능 및, 면역질환 개선 활성 평가를 통한 기능성 우수균주 제시
	100	<ul style="list-style-type: none"> 식품산업용 미생물의 인체적용시험을 통한 검증법 표준화(전북대학교 병원 위탁)
□ 제2협동 (단국대학교 천안캠퍼스, 강대경) 최종 선발된 균주들의 발효특성 비교 분석 및 발효 적합성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> 요구르트용 균주의 발효 적합성: 발효배지에서의 성장 특성, pH 및 적정산도 변화, 유기산 생산 패턴, 저장 안전성 분석
	100	<ul style="list-style-type: none"> 양조용 균주의 발효 적합성: 알콜 생산과정 중의 알콜 생산능 조사 및 향미 분석
	100	<ul style="list-style-type: none"> 전통발효식품용 균주의 발효 적합성: 효소 생산능 조사 및 비교 분석
□ 제3협동 (가천대학교, 박영서)	100	<ul style="list-style-type: none"> 시판 발효 식품에 존재하는 미생물의 유전자지문 분석

선정 균주를 이용하여 제조한 발효식품에서의 미생물 추적 평가		
	100	<ul style="list-style-type: none"> 특정 발효 균주를 이용한 발효 식품에서의 미생물 추적 기술 평가
□ 제4협동 ((사)한국종균협회, 김유진) 유용 균주 보존, 관리 시스템 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 균주의 장기 보존 및 분양을 위한 분양시스템 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> 유용 균주의 특성에 따라서 동결 건조, L-drying, 초저온 보존법 등의 보존 방법을 통하여 안정적인 균주 보존
	100	<ul style="list-style-type: none"> 웹 DB에 균주의 보존 방법, 보존 위치 및 재고 파악을 통합적으로 관리할 수 있는 균주 관리 시스템 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> 유용 균주의 분양 신청 및 분양 과정 그리고 분양 후 사후 관리를 할 수 있는 관리 시스템의 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> 보존 균주의 backup본을 주관 및 협동 기관에 이중으로 보존하여 안전하게 보존 관리
	100	<ul style="list-style-type: none"> 산업화 후보 종균 및 프로바이오틱스 등의 유전체 분석을 통한 고유성(identity) 자료 확보
□ 제5협동 ((주)셀바이오텍, 김진웅) 대량생산공정 구축 및 수출 전략 수립	100	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산 공정 적용 및 대량생산 공정 구축
	100	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 개발 및 수출 전략 수립
□ 제6협동 ((주)충무발효, 김재민) 전통발효식품용 종균 시제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 종균제품의 보관 활성 유지법 개발
	100	<ul style="list-style-type: none"> 종균제품의 유통 최적 포장용기 및 방법의 개발
	100	<ul style="list-style-type: none"> 종균 시제품 개발
□ 제7협동 ((주)아람, 박대철) 건강기능식품용 균주의 시제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 포장 형태 및 포장 환경에 따른 저장 안정성 검증
	100	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 개발

2. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	지식재산권			논문		학술 발표	기술 거래	보고서 ¹⁾	시제품 ²⁾	산업화	인력양성	홍보 전시	기타 ³⁾
	출원	등록	품종 등록	SCI	비SCI								
최종목표	10	1	-	8	2	10	5	7	5	1	18	7	1
연구기간 내 달성 실적	15	3	6,087 ⁴⁾	13	3	28	5	8	7	1	19	8	1
달성율 (%)	150%	300%		162%	150%	280%	100%	115%	140%	100%	106%	115%	100%

¹⁾ 식품미생물 자원 스크리닝 도구(tool)의 개발, 가이드라인 구축 보고서/ 식품 산업용 균주의 안전성 평가 시스템 구축 보고서/ 발효적합성, 기능성 평가 시스템 구축 보고서/ 고유성 자료 분석 보고서/ 개발 DB 및 상용화 용도별 활용적합성, 안전성 및 기능성 평가 모델의 민간 보급·확산을 위한 관련 연구 보고서/ 충격(shock) 조건상에서의 사전 검증 도구 구축 보고서/ 본 연구를 활용한 민간, 공공 분야에서 부가가치를 창출한 성과 실적 보고서

²⁾ 수입 대체용 식품 산업용 균주 5종 이상 발굴 및 발굴된 균주를 활용한 시제품

³⁾ 식품 산업용 균주 데이터베이스화 및 관련 업체, 민간 분양기반 구축과 서비스

⁴⁾ 목표 외 달성: 품종등록 6,087건, 매출액 1,848,000원, 고용창출 3건

가. 특허 출원

1. 이미경, 권효정, 방보연, 변옥희, 김유진, 박정민, 배동훈. 카제인 인산펩티드를 생산하기 위한 균주 및 이를 이용하여 카제인 인산펩티드를 생산하는 방법. (사)한국종균협회. 대한민국 출원 제 10-2015-0138111호(출원일: 2015. 09. 30.)
2. 이소영, 손동화, 임성일, 남영도, 박소림, 김효진, 이지연. 바실러스 아밀로케파시엔스 플란타륨 아종 균주를 유효성분으로 포함하는 Th1-매개 면역 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물. 한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2015-0140588호(출원일: 2015. 10. 06.)
3. 이소영, 신희순, 임성일, 남영도, 박소림, 김효진, 엄지은. 스타필로코쿠스 에피데미디스 균주를 유효성분으로 포함하는 Th1-매개 면역 질환 또는 Th2-매개 면역 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물. 한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2015-0140589호(출원일: 2015. 10. 06.)
4. 백현동, 이은정, 이소영, 이나경, 임성일, 박소림, 손성호, 전은비, 이장은. 신규한 락토바실러스 플란타륨 Lb41 균주 및 이를 포함하는 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2016-0132761호(출원일: 2016. 10. 13.)
5. 백현동, 이은정, 임성일, 이소영, 이나경, 남영도, 손성호, 전은비, 김재호. 신규한 락토바실러스 플란타륨 Lb41 균주 및 이를 포함하는 당뇨 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 및 치료용 약학적 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2016-0132770호(출원일: 2016. 10. 13.)
6. 백현동, 이은정, 손성호, 이나경, 임성일, 이소영, 김효진, 김혜련. 신규한 락토바실러스 플

- 란타륨 Ln4 균주 및 이를 포함하는 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2016-0132778호(출원일: 2016. 10. 13.)
7. 이상우, 이규연, 변옥희, 방보연, 김유진, 박정민, 배동훈. 증가된 엑소폴리사카라이드 생산량을 갖는 신규한 류코노스톡 시트리움 균주. (사)한국종균협회. 대한민국 출원 제 10-2016-0132782호(출원일: 2016. 10. 13.)
 8. 백현동, 이은정, 손성호, 이나경, 이소영, 임성일, 이지연, 김태완. 신규한 락토바실러스 플란타륨 Ln4 균주 및 이를 포함하는 당뇨 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 및 치료용 약학적 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2016-0132787호(출원일: 2016. 10. 13.)
 9. 이소영, 이은정, 신희순, 임성일, 엄지은, 남영도. 프로바이오틱스 혼합균주를 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 또는 치료용 조성물. 한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2016-0172930호(출원일: 2016. 12. 16.)
 10. 백현동, 임성일, 이소영, 이은정, 이나경, 전해린, 남영도, 박소림, 손성호. 신규 락토바실러스 브레비스 G1 균주 및 이를 포함하는 식품 알레르기 예방 또는 치료용 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 출원 제 10-2017-0056898호(출원일: 2017. 05. 04.)
 11. 강대경, 김상훈, 정명훈. 락토코커스 락티스 SL6에 의해 발효된 소 탈지유로부터 분리하여 동정한 신규 항산화능 보유 펩타이드. 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2017-0087592호(출원일: 2017. 07. 11.)
 12. 박영서, 이설희, 자스민 카우어, 안솔 사마. 유산균의 균주동정 방법. 가천대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2017-0088057호(출원일: 2017. 07. 11.)
 13. 백현동, 손성호, 양서진, 이나경, 전해린. 신규 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 포함하는 식중독 원인균 예방 또는 치료용 조성물. 대한민국 출원 제 10-2017-0117039호(출원일: 2017. 09. 13.)
 14. 백현동, 김기태, 이나경, 송명욱, 장혜지, 손성호. 신규 락토바실러스 플란타륨 균주 및 이를 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물. 대한민국 출원 제 10-2017-0123250호(출원일: 2017. 09. 25.)
 15. 남영도, 이소영, 신희순, 임미영, 정원형, 이은숙, 서동호, 신동욱. 비만 억제 활성을 갖는 페디오코커스 에시디락티시 AO22 균주 및 이를 포함하는 비만 개선 또는 치료용 조성물. 대한민국 출원 제 10-2017-0168086호(출원일: 2017. 12. 08.)

나. 특허 등록

1. 이미경, 권호정, 방보연, 변옥희, 김유진, 박정민, 배동훈. 카제인 인산펩티드를 생산하기 위한 균주 및 이를 이용하여 카제인 인산펩티드를 생산하는 방법. (사)한국종균협회. 대한민국 등록 제 10-1726349호(등록일: 2017. 04. 06.)
2. 백현동, 이은정, 임성일, 이소영, 이나경, 남영도, 손성호, 전은비, 김재호. 신규한 락토바실러스 플란타륨 Lb41 균주 및 이를 포함하는 당뇨 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 및 치료용 약학적 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 등록 제

10-1825836호(등록일: 2018. 01. 31.)

3. 백현동, 이은정, 손성호, 이나경, 이소영, 임성일, 이지연, 김태완. 신규한 락토바실러스 플란타룸 Ln4 균주 및 이를 포함하는 당뇨 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 및 치료용 약학적 조성물. 건국대학교 산학협력단/한국식품연구원. 대한민국 등록 제 10-1825837호 (등록일: 2018. 01. 31.)

다. 품종 등록

1. 미생물 자원 6,087주 (사)한국중균협회에 기탁

라. 논문 성과 (SCI급)

1. Han, K. J., Lee, N. K., Park, H., Paik, H. D. 2015. Anticancer and anti-inflammatory activity of probiotic *Lactococcus lactis* NK34. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1697-1701.
2. Lee, N. K., Han, K. J., Son, S. H., Eom, S. J., Lee, S. K., Paik, H. D. 2015. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT - Food Science and Technology*, 64: 1036-1041.
3. Jeon, E. B., Son, S. H., Jeewanthi, R. K. C., Lee, N. K., Paik, H. D. 2016. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lb41, an isolate from kimchi and its application as a probiotic in cottage cheese. *Food Science and Biotechnology*, 25: 1129-1133.
4. Sharma, A., Kaur, J., Lee, S. H., Park, Y. S. 2016. RAPD typing of *Lactobacillus brevis* isolated from various food products from Korea. *Food Science and Biotechnology*, 25: 1651-1655.
5. Lee, N. K., Paik, H. D. 2017. Bioconversion using lactic acid bacteria: Ginsenosides, GABA, and phenolic compounds. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 869-877.
6. Kaur, J., Lee, S. H., Park, Y. S., Sharma, A. 2017. RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 77: 383-388.
7. Kim, S. H., Lee, J. Y., Balolong, M. P., Kim, J. E., Paik, H. D., Kang, D. K. 2017. Identification and characterization of a novel anti-oxidant peptide from bovine skim milk fermented by *Lactococcus lactis* SL6. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37: 402-409.
8. Son, S. H., Jeon, H. L., Jeon, E. B., Lee, N. K., Park, Y. S., Kang, D. K., Paik, H. D. 2017. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*, 85: 181-186.

9. Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Lee, N. K., Paik, H. D. 2017. *In vitro* characterization of *Lactobacillus brevis* KU15006, and isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. *Microbial Pathogenesis*, 112: 135-141.
10. Sharma, A., Kaur, J., Lee, S. H., Park, Y. S. 2017. Molecular discrimination of *Lactobacillus brevis* strains isolated from food products in South Korea using multilocus sequence typing. *LWT - Food Science and Technology*, 86: 337-343.
11. Choi, D. W., Jung, S. Y., Kang, J. S., Nam, Y. D., Kim, K. T., Shin, H. S. 2018. Preventive effects of a probiotic mixture in an ovalbumin-induced food allergy model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 65-76.
12. Shin, H. S., Eom, J. E., Shin, D. U., Yeon, S. H., Lim, S. H., Kim, K. T., Shin, H. S. 2017. Immune-enhancing effect of nanometric *Lactobacillus plantarum* nF1 (nLp-nF1) in a mouse mode of cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 218-226.
13. Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Sim, M. H., Kim, Y. J., Lee, N. K., Paik, H. D. 2018. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. *Food Science and Biotechnology*, 27: 123-129.

라. 논문 성과 (비SCI급)

1. 이설희, 박영서. 2015. *Pediococcus pentosaceus*의 multilocus sequence typing 분석에서 신규 sequence type의 확인. *Food Engineering Progress*, 19: 427-432.
2. 이미경, 권효정, 변옥희, 방보연, 김유진, 박정민, 배동훈. 2016. Casein phosphopeptide를 생산하는 김치 유래 유산균의 분리 및 특성 연구. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 44: 68-73.
3. Kaur, J., Lee, S. H., Sharma, A., Park, Y. S. 2017. Molecular typing of *Leuconostoc citreum* strains isolated from Korean traditional fermented foods using a random amplified polymorphic DNA marker. *Food Engineering Progress*, 21: 174-179.

마. 학술발표

1. Lee, S. H., Paik, H. D., Park, Y. S. 2015. Multilocus sequence typing of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from vegetables. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Busan. 2015. 06. 3-5.
2. Jeon, E. B., Yu, H. H., Son, S. H., Lee, N. K., Paik, H. D. 2015. Screening of *Bacillus* strains for potential probiotics isolated from kimchi. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Busan. 2015. 06. 3-5.
3. Son, S. H., Lee, N. K., Jeon, E. B., Jung, G. H., Paik, H. D. 2015. Anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* KU3 isolated from kimchi. Annual Meeting of

- Korean Society of Food Science and Technology in Busan. 2015. 06. 3-5.
4. Son, S. H., Lee, N. K., Eom, S. J., Paik, H. D. 2015. Antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Busan. 2015. 06. 3-5.
 5. Son, S. H., Jeon, E. B., Yu, H. H., Lee, N. K., Paik, H. D. 2015. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. Annual Meeting of The Korean Society for Microbiology and Biotechnology in Gyeongju. 2015. 06. 24-26.
 6. Eom, J. E., Shon, D. H., Jung, S. Y., See, H. S., Nam, Y. D., Lee, S. Y. 2015. Immunomodulatory and anti-allergic effects of orally administered *Lactococcus lactis* in OVA-sensitized BALB/c Mice. Annual Meeting of The Korean Society for Microbiology and Biotechnology in Gyeongju. 2015. 06. 24-26.
 7. Jeon, E. B., Jeewanthi, R. K. C., Son, S. H., Han, K. J., Lee, N. K., Lee, G. Y., Paik, H. D. 2016. Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* Lb41 isolated from kimchi on cottage cheese. Institute of Food Technologists, Annual Meeting in Chicago. 2016. 07. 16-19.
 8. Jeon, E. B., Son, S. H., Yu, H. H., Lee, N. K., Paik, H. D. 2016. Probiotic properties of *Lactobacillus brevis* G1 isolated from kimchi. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Daegu. 2016. 08. 17-19.
 9. Son, S. H., Jeon, E. B., Jeon, H. L., Lee, N. K., Paik, H. D. 2016. Probiotic property of *Lactobacillus plantarum* Ln4 isolated from kimchi. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Daegu. 2016. 08. 17-19.
 10. Kaur, J., Sharma, A., Lee, S. H., Paik, H. D., Park, Y. S. 2016. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus brevis* from Korea. Annual Meeting of T Korean Society of Food Science and Technology in Daegu. 2016. 08. 17-19.
 11. Kaur, J., Sharma, A., Lee, S. H., Paik, H. D., Park, Y. S. 2016. Comparative characterization of *Lactobacillus brevis* strains from South Korea using RAPD and Rep-PCR Molecular Fingerprinting. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Daegu. 2016. 08. 17-19.
 12. Kaur, J., Lee, S. H., Paik, H. D., Park, Y. S. 2016. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus brevis*, and *Leuconostoc mesenteroides* strains. The International Union of Food Science and Technology, Annual Meeting in Dublin. 2016. 08. 21-25.
 13. Lee, S. Y. Development of anti-allergic food using probiotics. Annual Meeting of The Korean Society of Food Science and Nutrition in Jeju. 2016. 10. 31.-11. 02.
 14. Sim, M. H., Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Lee, N. K., Paik, H. D. 2016. Evaluation of potential new probiotic lactic acid bacteria isolated from kimchi. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies in Ilsan. 2016. 11. 03-04.
 15. Jeon, H. L., Son, S. H., Jeon, E. B., Lee, N. K., Paik, H. D. 2016. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* G72 isolated from Korean traditional fermented food.

- International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies in Ilsan. 2016. 11. 03-04.
16. Lee, S. Y. 2016. Functionality and safety of probiotic bacteria from Korean fermented foods. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies in Ilsan. 2016. 11. 03-04.
 17. Kang, D. K. 2016. Isolation and characterization of antioxidative peptide from fermented milk. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies in Ilsan. 2016. 11. 03-04.
 18. Kaur, J., Sharma, A., Lee, S. H., Park, Y. S. 2017. Characterization of *Lactobacillus brevis* isolates using PCR-based molecular typing technique. Annual Meeting of The Korean Society for Food Engineering in Seoul. 2017. 04. 21.
 19. Kaur, J., Sharma, A., Lee, S. H., Park, Y. S. 2017. DNA profiling of *Leuconostoc mesenteroides* isolates distributed in Korean fermented foods by multilocus sequence typing (MLST) and repetitive element PCR (rep-PCR). Annual Meeting of The Korean Society for Microbiology and Biotechnology in Jeju. 2017. 06. 21-23.
 20. Yang, S. J., Son, S. H., Jeon, H. L., Lee, N. K., Kim, Y. J., Paik, H. D. 2017. Probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 200655 isolated from tomato kimchi. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Jeju. 2017. 06. 21-23.
 21. Yang, S. J., Son, S. H., Jeon, H. L., Lee, N. K., Kim, Y. J., Paik, H. D. 2017. Screening of plant lactic acid bacteria for potential probiotics isolated from kimchi. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Jeju. 2017. 06. 21-23.
 22. Shin, D. U., Lee, E. S., Song, E. J., Eom, J. E., Lee, S. Y., Nam, Y. D. 2017. Anti-obesity effect of *Lactobacillus zae* in diet-induced obese mice. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology in Jeju. 2017. 06. 21-23.
 23. Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Lee, N. K., Paik, H. D. 2017. A reduction in lactose in probiotic yogurt using *Lactobacillus plantarum* Ln4 with high β -galactosidase activity. Federation of European Microbiological Society in Valencia. 2017. 07. 09-13.
 24. Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Lee, N. K., Paik, H. D. 2017. An antidiabetic effect of novel probiotic *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. Federation of European Microbiological Society in Valencia. 2017. 07. 09-13.
 25. Hong, J. Y., Son, S. H., Yi, S. H., Lee, N. K., Hong, S. P., Park, J. M., Paik, H. D. 2017. Probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from traditional fermented foods with a cholesterol-lowering effect. Federation of European Microbiological Society in Valencia. 2017. 07. 09-13.
 26. Jeon, H. L., Son, S. H., Lee, N. K., Kim, Y. J., Paik, H. D. 2017. Screening and characterization of lactic acid bacteria as potential probiotics isolated from kimchi. Federation of European Microbiological Society in Valencia. 2017. 07. 09-13.

27. Park, J. M. 2017. Probiotic properties of *Lactobacillus brevis* KCCM 200080 isolated from Korean traditional fermented foods. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology in Marina Bay. 2017. 07. 17-21.
28. Kang, D. K., Kim, S., Lee, J. 2017. A novel antioxidant peptide from fermented milk. International Symposium on Lactic Acid Bacteria in Egmond aan Zee. 2017. 08. 27-31.

바. 기술거래

1. “전통발효식품 분리균주의 효소활성 측정”에 관한 기술이전. 건국대학교 산학협력단. 기술이전(기술이전료: 10,000,000원). 2015. 06. 24.
2. “전통 발효식품 유래 프로바이오틱 분리 및 특성에 관한 기술”에 관한 기술이전. 건국대학교 산학협력단. 기술이전(기술이전료: 30,000,000원). 2015. 07. 01.
3. “김치유산균 락토바실러스 플란타람 Lb41”에 관한 기술이전. 건국대학교 산학협력단. 기술이전(기술이전료: 10,000,000원). 2016. 03. 21.
4. “곰팡이균 고상발효 적합성 분석”에 관한 기술이전. 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 기술이전(기술이전료: 2,200,000원). 2017. 09. 26.
5. “김치유산균 락토바실러스 브레비스 G1”에 관한 기술이전. 건국대학교 산학협력단. 기술이전(기술이전료: 10,000,000원). 2017. 10. 16.

사. 보고서

1. “충격(Shock)조건상에서의 사전 검증 도구 구축 보고서”. (주)셀바이오텍. 2017. 11. 01.
2. “식품미생물 자원 스크리닝 도구의 개발 보고서”. 건국대학교 산학협력단. 2017. 11. 10.
3. “본 연구를 활용한 민간, 공공분야에서 부가가치를 창출한 성과 보고서. (주)충무발효. 2017. 12. 13.
4. “개발 DB 및 상용화 용도별 활용적합성, 안전성 및 기능성 평가 모델의 민간 보급 확산을 위한 연구보고서”. (사)한국종균협회. 2017. 12. 14.
5. “고유성 자료 분석 보고서”. (사)한국종균협회. 2017. 12. 14.
6. “식품산업용 균주의 안전성 평가 시스템 구축”. 한국식품연구원. 2017. 12. 14.
7. “식품산업용 균주의 기능성 평가 시스템 구축”. 한국식품연구원. 2017. 12. 15.
8. “식품산업용 균주의 용도별 발효적합성 평가시스템 보고서”. 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2017. 12. 15.

아. 시제품

1. *Lactobacillus plantarum* Lb41, *L. plantarum* Ln4, *L. brevis* G1에 대한 원말 시제품 3건 생산. (주)셀바이오텍. 2017. 10. 11.
2. 황국, 충무종효모 시제품 2건 생산. (주)충무발효. 2017. 10. 28.

3. 락토랑 와이, 락토랑 타블렛 시제품 2건 생산. (주)아람. 2017. 12. 08.

자. 산업화

1. 황국, 충무중효모 제품판매에 의한 산업화. (주)충무발효. 매출액: 1,848,000원.

차. 인력양성

1. 학사 졸업생(김나래). 건국대학교 산학협력단. 2015. 02. 23.
2. 학사 졸업생(전은비). 건국대학교 산학협력단. 2015. 02. 23.
3. 학사 졸업생(임세혁). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2015. 02. 25.
4. 학사 졸업생(황인찬). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2015. 02. 25.
5. 석사 졸업생(변옥희). 가천대학교 산학협력단. 2015. 08. 20.
6. 학사 졸업생(정기훈). 건국대학교 산학협력단. 2015. 08. 24.
7. 학사 졸업생(전혜린). 건국대학교 산학협력단. 2016. 02. 22.
8. 학사 졸업생(유환희). 건국대학교 산학협력단. 2016. 02. 22.
9. 석사 졸업생(오주경). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2016. 02. 24.
10. 석사 졸업생(이진아). 가천대학교 산학협력단. 2016. 02. 25.
11. 석사 졸업생(김상훈). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2016. 08. 24.
12. 석사 졸업생(봉오바곤베르나데트). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2016. 08. 24.
13. 박사 졸업생(에드워드과자릴로). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2016. 08. 24.
14. 석사 졸업생(박자원). 가천대학교 산학협력단. 2016. 08. 25.
15. 석사 졸업생(전은비). 건국대학교 산학협력단. 2017. 02. 22.
16. 석사 졸업생(황인찬). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2017. 02. 23.
17. 박사 졸업생(채종표). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2017. 02. 23.
18. 박사 졸업생(발레리아노발레리). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단. 2017. 08. 23.
19. 석사 졸업생(JASMINE KAUR). 가천대학교 산학협력단. 2017. 08. 24.

카. 홍보전시

1. BK21 플러스 건국대학교 “축산식품사업단” 기사 게재. 건국대학교 산학협력단. Dynamic KOREA잡지. 2015. 03. 01.
2. 식품산업 활용 중군의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 홍보. (사)한국중균협회. 2015 (사)한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회. 2015. 06. 04-05.
3. 식품산업 활용 중군의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 홍보. (사)한국중균협회. 2015 (사)한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회. 2015. 06. 25-26.
4. 식품산업 활용 중군의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 홍보. (사)한국중균협회. 2016 (사)한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회. 2016. 06. 22-24.

5. 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 홍보. (사)한국종균협회. 2016 (사)한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회. 2016. 08. 17-19.
6. 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 웹기반 DB의 기능성 및 정보 제공의 효율적인 구성에 대한 홍보 동영상 재생. (사)한국종균협회. 2017 (사)한국미생물학회 국제학술대회. 2017. 04. 26-28.
7. 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 유용 미생물의 장기보존을 위한 보존 기술에 대한 홍보 동영상 재생. (사)한국종균협회. 2017 (사)한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회. 2017. 06. 28-30.
8. 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구 소개 및 분양 신청 및 활용 피드백 시스템에 대한 홍보 동영상 재생. (사)한국종균협회. 2017 (사)한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회. 2017. 06. 28-30.

타. 고용창출

1. 고용창출 2건. (주)셀바이오텍.
2. 고용창출 1건. (주)아람.

차. 기타

1. 식품 산업용 균주 데이터베이스화 및 관련 업체, 민간 분양기반 구축과 서비스 개시. (사)한국종균협회. 분양 매출액: 990,000원. 2017. 07. 28.

3. 관련분야 기여도

가. 전통발효식품에서 분리한 종균 수집, 보관 및 분양서비스 구축

- 2016년 5월 18일 일동제약은 최근 개관한 분당서울대학교병원 헬스케어이노베이션파크(HIP)내에 부설 프로바이오틱스 종균은행을 구축함. 일동제약이 설립한 종균은행에서 보유하고 있는 균주는 1940년대 유산균 연구를 시작하여 현재까지 축적한 총 3,000여 균주에 이르는 방대한 유산균 은행 데이터를 제품개발 및 기타 연구에 활용하고 있는 실정임(서울경제, 2016년). 본 연구에서는 각 협동에서 전통발효식품에서 분리한 균주(유산균, *Bacillus*, 효모, 곰팡이)에 대한 기초생리활성 및 기능성에 대한 데이터를 (사)한국종균협회에 제공함으로써 홈페이지를 이용한 분양서비스를 통해 산업적인 면에서 외부에서 균주를 구입하여 균주를 산업적으로 활용할 가치를 높일 수 있을 것이라고 기대됨.

나. 기능성 및 발효 적합성이 증명된 균주의 산업적 활용 가치

- 현재까지 우리나라는 외국종균을 활용하는 조건으로 로열티만 200억원 지불하고 있

는 실정임(전라일보, 2015년). 본 연구를 통해 기초생리활성 및 기능성이 우수한 균주(유산균, 효모, 곰팡이)를 선별하여 (주)셀바이오텍, (주)충무발효, (주)아람에게 균주를 제공하여 산업적 적합성을 확인하고, 시제품 및 산업화함으로써 많은 외국 종균에 의존하고 있는 국내시장에 활기 및 수익을 창출할 수 있다고 사료됨.

- 국내 전통식품에서 분리한 발효미생물은 전 세계적으로 기능성, 경쟁에 있어서 무한한 가능성을 가짐. 국내의 전통 발효식품(김치, 간장, 된장, 고추장 등)에 대한 발효미생물의 종균화 연구가 진행될시 기능적, 활성적인 측면에서 우수한 균주가 발견되어 식품, 의학계는 물론 여러 산업에 걸쳐 무한한 발전을 이룰 수 있음.
- 사업화 전략
 - 균주협회 및 종균 제조업체를 통한 개발된 종균발효제의 독자적인 균주정보제공 및 산업용 종균 공급 및 판매 시스템 개발
 - 발효업체 특성에 맞는 주문형 발효 종균제품의 개발 (현장 접목형)

제 5장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

제 1절 추가 연구의 필요성

1. 기초생리활성이 뛰어난 산업용 후보 균주에 대한 다양한 기능성에 관한 연구

- 본 연구에서는 기초생리활성이 뛰어나고, 안전성이 입증된 다양한 종균(유산균, *Bacillus*, 효모, 곰팡이)들을 이용하여 항당뇨, 항비만, 항염, 발효적합성을 평가하여 과제 참여기업을 통해 다양한 건강기능식품용, 유제품용, 전통발효식품용 종균관련 시제품을 생산 및 산업화하였음. 그러나 프로바이오틱 유용 균주들의 다른 기능성에 관한 추가 연구를 통해 균주의 활용가능성을 높일 방안에 관한 연구가 필요함.

제 2절 타 연구에서의 응용

1. 다양한 균주 확보를 통한 타 연구에 대한 응용 가능성

- 본 연구를 통해 전통발효식품에서 다양한 균주(유산균, *Bacillus*, 효모, 곰팡이)들을 저장하여 확보함으로써 산업화 적용한 균주를 제외한 유용 균주를 이용하여 타 연구에 많은 도움이 될 수 있을 것이라고 생각됨.

2. 산업화 기술의 응용

- 본 연구를 통해 확립된 여러 상용화 기술(배지 최적화 및 배양 방법)이 타연구에 크게 도움이 되리라 판단됨.

제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		코드번호	D-08																																																																																																																								
No.	논문명	저자	저널명																																																																																																																								
1	Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable	<i>Lee et al.</i> (2016)	LWT-Food Science and Technology																																																																																																																								
내용																																																																																																																											
프로바이오틱스 특성 측정실험을 진행함.																																																																																																																											
<p>Table 2 Enzyme activities of 4 isolated strains by API-ZYM kit.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Enzymes</th> <th>Substrates</th> <th>C4</th> <th>C10</th> <th>C182</th> <th>F27</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Alkaline phosphatase</td> <td>2-naphthyl phosphate</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Esterase</td> <td>2-naphthyl butyrate</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Esterase Lipase</td> <td>2-naphthyl caprylate</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Lipase</td> <td>2-naphthyl myristate</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Leucine arylamidase</td> <td>L-leucyl-2-naphthylamide</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Valine arylamidase</td> <td>L-valyl-2-naphthylamide</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Cystine arylamidase</td> <td>L-cystyl-2-naphthylamide</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Trypsin</td> <td>N-benzoyl-α-arginine-2-naphthylamide</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>α-chymotrypsin</td> <td>N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Acid phosphatase</td> <td>2-naphthyl phosphate</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase</td> <td>Naphthol-AS-BI-phosphate</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>α-galactosidase</td> <td>6-Br-2-naphthyl-α-D-galactopyranoside</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>β-galactosidase</td> <td>2-naphthyl-β-D-galactopyranoside</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>β-glucuronidase</td> <td>Naphthol-AS-BI-β-D-glucuronide</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>α-glucosidase</td> <td>2-naphthyl-α-D-glucopyranoside</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>β-glucosidase</td> <td>6-Br-2-naphthyl-β-D-glucopyranoside</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>N-acetyl-β-glucosaminidase</td> <td>1-naphthyl-N-acetyl-β-D-Glucosaminide</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>α-mannosidase</td> <td>6-Br-2-naphthyl-α-D-mannopyranoside</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>α-fucosidase</td> <td>2-naphthyl-α-L-fucopyranoside</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>(-), negative (colorless or very pale yellow); (+), positive (violet or orange or blue).</p>				Enzymes	Substrates	C4	C10	C182	F27	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	-	-	-	-	Esterase	2-naphthyl butyrate	-	-	-	-	Esterase Lipase	2-naphthyl caprylate	-	-	-	-	Lipase	2-naphthyl myristate	-	-	-	-	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	+	+	+	+	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	+	+	+	+	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	-	-	-	-	Trypsin	N-benzoyl- α -arginine-2-naphthylamide	-	-	-	-	α -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	-	-	-	-	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	-	-	+	-	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	+	+	-	-	α -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside	+	+	-	+	β -galactosidase	2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	+	+	+	+	β -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- β -D-glucuronide	-	-	-	-	α -glucosidase	2-naphthyl- α -D-glucopyranoside	+	+	+	+	β -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside	+	+	+	+	N-acetyl- β -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminide	-	-	+	-	α -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-mannopyranoside	-	-	-	-	α -fucosidase	2-naphthyl- α -L-fucopyranoside	-	-	-	-
Enzymes	Substrates	C4	C10	C182	F27																																																																																																																						
Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	-	-	-	-																																																																																																																						
Esterase	2-naphthyl butyrate	-	-	-	-																																																																																																																						
Esterase Lipase	2-naphthyl caprylate	-	-	-	-																																																																																																																						
Lipase	2-naphthyl myristate	-	-	-	-																																																																																																																						
Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	+	+	+	+																																																																																																																						
Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	+	+	+	+																																																																																																																						
Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	-	-	-	-																																																																																																																						
Trypsin	N-benzoyl- α -arginine-2-naphthylamide	-	-	-	-																																																																																																																						
α -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	-	-	-	-																																																																																																																						
Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	-	-	+	-																																																																																																																						
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	+	+	-	-																																																																																																																						
α -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside	+	+	-	+																																																																																																																						
β -galactosidase	2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	+	+	+	+																																																																																																																						
β -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- β -D-glucuronide	-	-	-	-																																																																																																																						
α -glucosidase	2-naphthyl- α -D-glucopyranoside	+	+	+	+																																																																																																																						
β -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside	+	+	+	+																																																																																																																						
N-acetyl- β -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminide	-	-	+	-																																																																																																																						
α -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-mannopyranoside	-	-	-	-																																																																																																																						
α -fucosidase	2-naphthyl- α -L-fucopyranoside	-	-	-	-																																																																																																																						
<p>Table 4 Acid and bile tolerance of 4 isolated strains.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Control^a (log CFU/ml)</th> <th>pH 2.0 (log CFU/ml)</th> <th>SR^b (%)</th> <th>pH 3.0 (log CFU/ml)</th> <th>SR^b (%)</th> <th>0.3% BS (log CFU/ml)</th> <th>SR (%)</th> <th>pH 2.0+ 0.3% BS^c (log CFU/ml)</th> <th>SR (%)</th> <th>pH 3.0+ 0.3% BS^c (log CFU/ml)</th> <th>SR (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C4</td> <td>9.38 ± 0.12</td> <td>6.43 ± 0.04</td> <td>0.11</td> <td>1.3 × 10⁸</td> <td>5.41</td> <td>8.86 ± 0.08</td> <td>30.41</td> <td>5.65 ± 0.05</td> <td>0.01</td> <td>7.57 ± 0.06</td> <td>1.58</td> </tr> <tr> <td>C10</td> <td>9.54 ± 0.09</td> <td>6.83 ± 0.03</td> <td>0.19</td> <td>2.1 × 10⁸</td> <td>6.00</td> <td>9.17 ± 0.06</td> <td>42.85</td> <td>5.72 ± 0.07</td> <td>0.01</td> <td>7.79 ± 0.09</td> <td>1.8</td> </tr> <tr> <td>C182</td> <td>9.61 ± 0.11</td> <td>8.25 ± 0.04</td> <td>5.62</td> <td>2.1 × 10⁹</td> <td>52.50</td> <td>9.38 ± 0.13</td> <td>58.53</td> <td>8.32 ± 0.05</td> <td>5.12</td> <td>9.11 ± 0.07</td> <td>31.70</td> </tr> <tr> <td>F27</td> <td>9.53 ± 0.06</td> <td>6.07 ± 0.05</td> <td>0.03</td> <td>2.2 × 10⁸</td> <td>6.47</td> <td>9.14 ± 0.10</td> <td>41.17</td> <td>5.62 ± 0.03</td> <td>0.01</td> <td>7.72 ± 0.06</td> <td>1.55</td> </tr> </tbody> </table> <p>^a Control, cells under no stress. ^b SR (Survival ratio, %), viable counts after stress in MRS/viable counts of control in MRS × 100. ^c Cells exposed to pH 2.0 or 3.0 for 3 h first and then exposed to 0.3% bile salts for 3 h.</p>					Control ^a (log CFU/ml)	pH 2.0 (log CFU/ml)	SR ^b (%)	pH 3.0 (log CFU/ml)	SR ^b (%)	0.3% BS (log CFU/ml)	SR (%)	pH 2.0+ 0.3% BS ^c (log CFU/ml)	SR (%)	pH 3.0+ 0.3% BS ^c (log CFU/ml)	SR (%)	C4	9.38 ± 0.12	6.43 ± 0.04	0.11	1.3 × 10 ⁸	5.41	8.86 ± 0.08	30.41	5.65 ± 0.05	0.01	7.57 ± 0.06	1.58	C10	9.54 ± 0.09	6.83 ± 0.03	0.19	2.1 × 10 ⁸	6.00	9.17 ± 0.06	42.85	5.72 ± 0.07	0.01	7.79 ± 0.09	1.8	C182	9.61 ± 0.11	8.25 ± 0.04	5.62	2.1 × 10 ⁹	52.50	9.38 ± 0.13	58.53	8.32 ± 0.05	5.12	9.11 ± 0.07	31.70	F27	9.53 ± 0.06	6.07 ± 0.05	0.03	2.2 × 10 ⁸	6.47	9.14 ± 0.10	41.17	5.62 ± 0.03	0.01	7.72 ± 0.06	1.55																																																												
	Control ^a (log CFU/ml)	pH 2.0 (log CFU/ml)	SR ^b (%)	pH 3.0 (log CFU/ml)	SR ^b (%)	0.3% BS (log CFU/ml)	SR (%)	pH 2.0+ 0.3% BS ^c (log CFU/ml)	SR (%)	pH 3.0+ 0.3% BS ^c (log CFU/ml)	SR (%)																																																																																																																
C4	9.38 ± 0.12	6.43 ± 0.04	0.11	1.3 × 10 ⁸	5.41	8.86 ± 0.08	30.41	5.65 ± 0.05	0.01	7.57 ± 0.06	1.58																																																																																																																
C10	9.54 ± 0.09	6.83 ± 0.03	0.19	2.1 × 10 ⁸	6.00	9.17 ± 0.06	42.85	5.72 ± 0.07	0.01	7.79 ± 0.09	1.8																																																																																																																
C182	9.61 ± 0.11	8.25 ± 0.04	5.62	2.1 × 10 ⁹	52.50	9.38 ± 0.13	58.53	8.32 ± 0.05	5.12	9.11 ± 0.07	31.70																																																																																																																
F27	9.53 ± 0.06	6.07 ± 0.05	0.03	2.2 × 10 ⁸	6.47	9.14 ± 0.10	41.17	5.62 ± 0.03	0.01	7.72 ± 0.06	1.55																																																																																																																

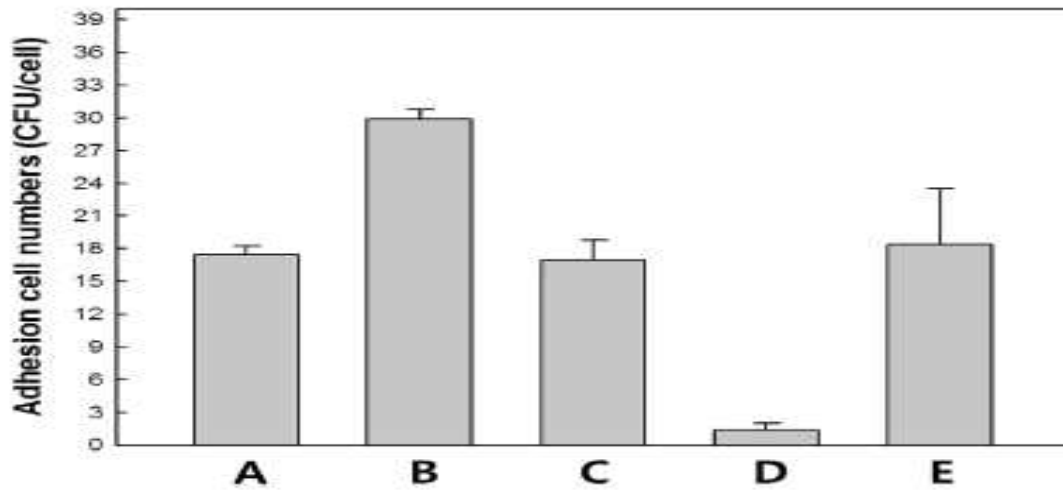
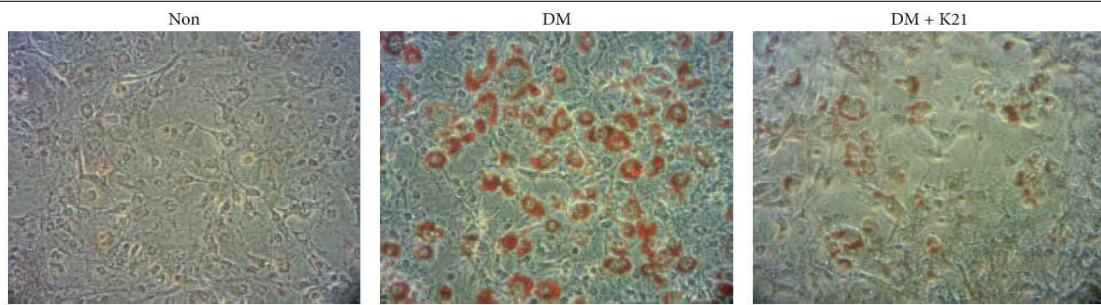


Fig. 4. The adhesion capacity of 4 strains to HT-29 cells. A, *Lb. rhamnosus* GG; B, *Leu. mesenteroides* C4; C, *Leu. mesenteroides* C10; D, *Lb. plantarum* C182; E, *Leu. mesenteroides* F27. The capacity was expressed as the adhered bacterial cell numbers per HT-29 cell (CFU/cell). *Lb. rhamnosus* GG was used as a positive control. Each adhesion assay was conducted three times (three different passages). The error bars indicate standard deviations.

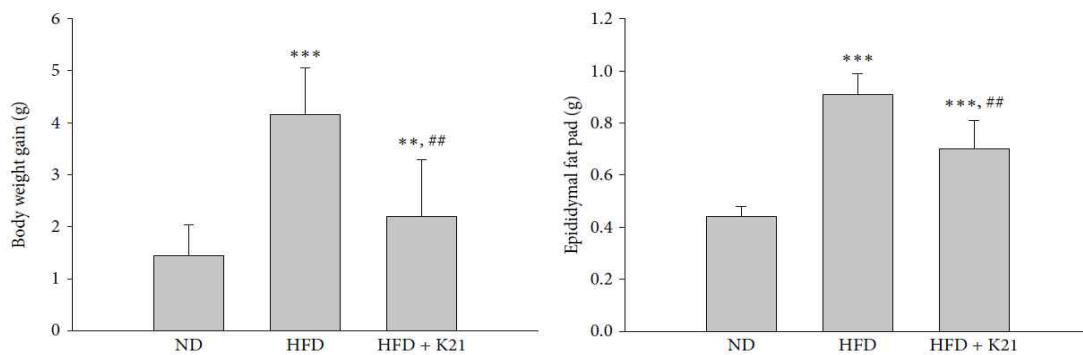
No.	논문명	저자	저널명
2	Effect of <i>Lactobacillus plantarum</i> Strain K21 on high-fat diet-fed obese mice	Wu <i>et al.</i> (2015)	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

내용

생균(*L. plantarum*)을 활용한 항비만 효능을 *in vitro* 및 *in vivo* 측정실험을 진행함.



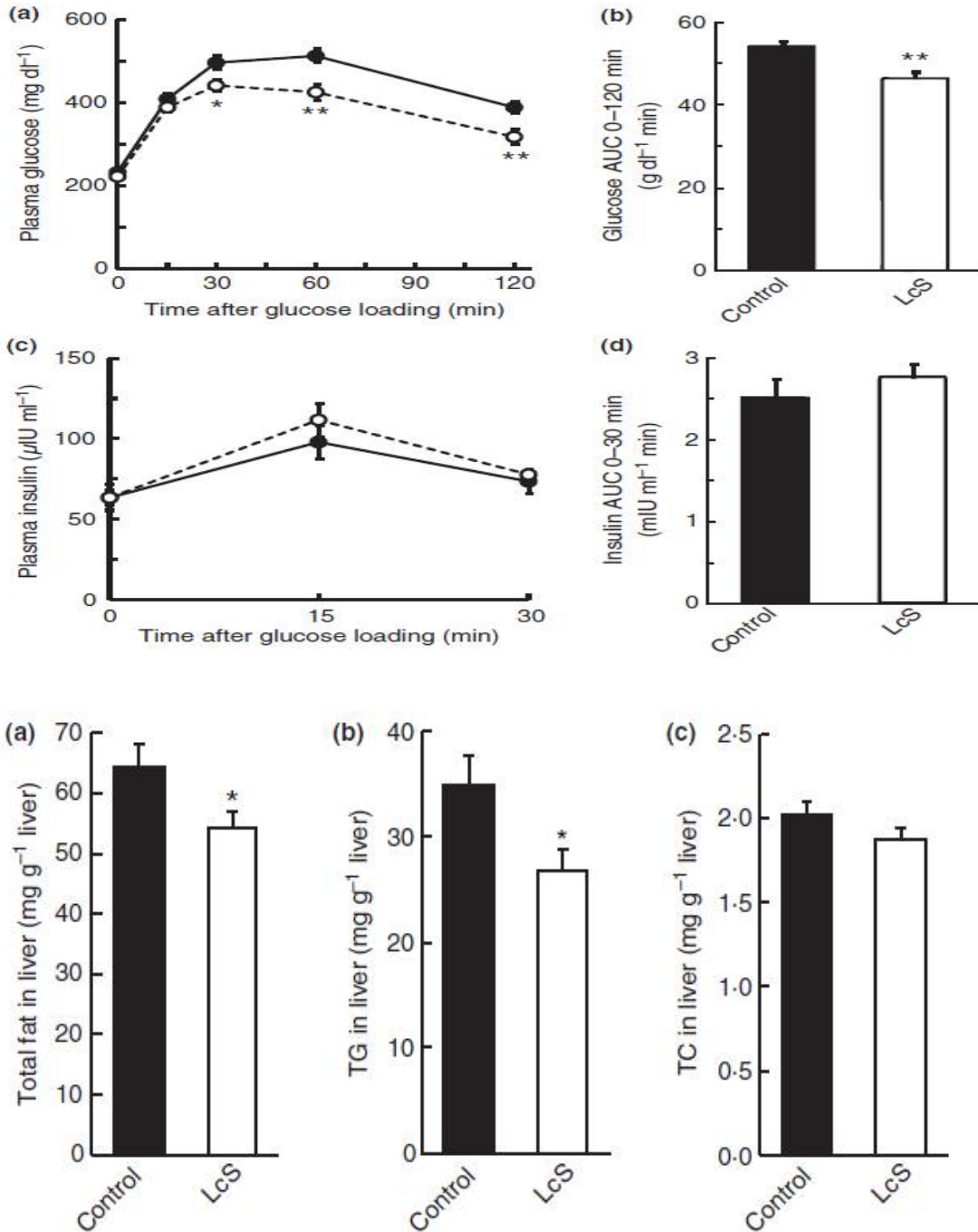
(b)



No.	논문명	저자	저널명
3	Beneficial effect of oral administration of <i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice	Naito <i>et al.</i> (2011)	Journal of applied microbiology

내용

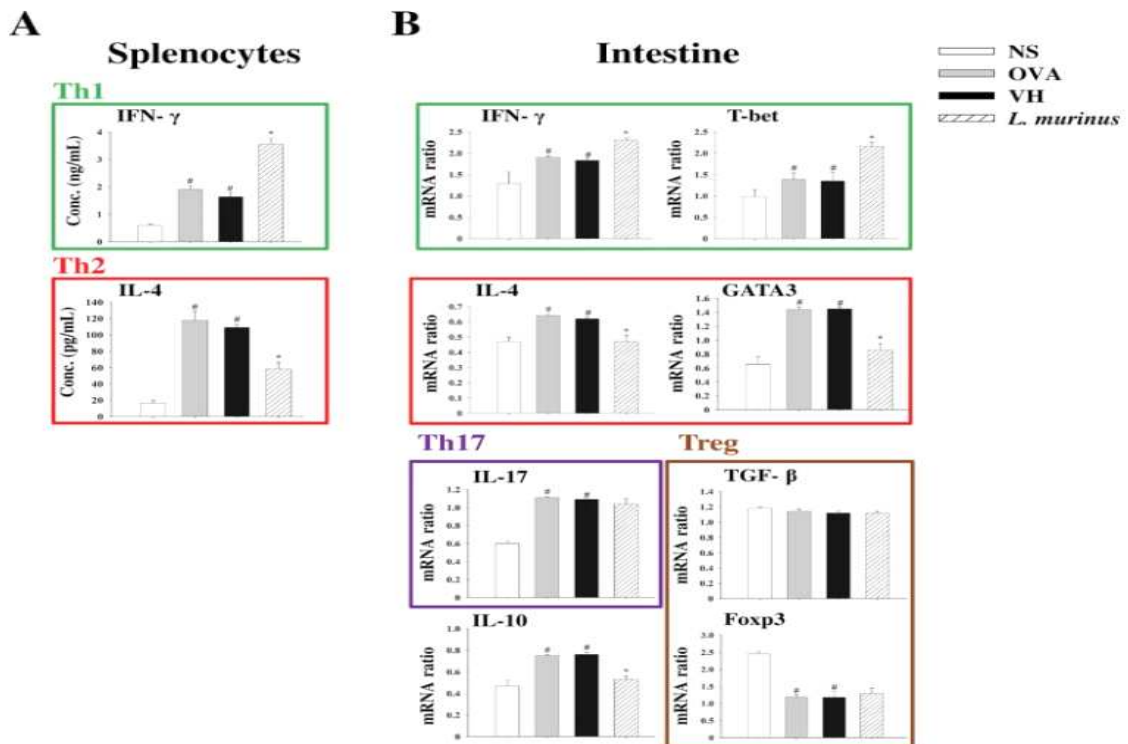
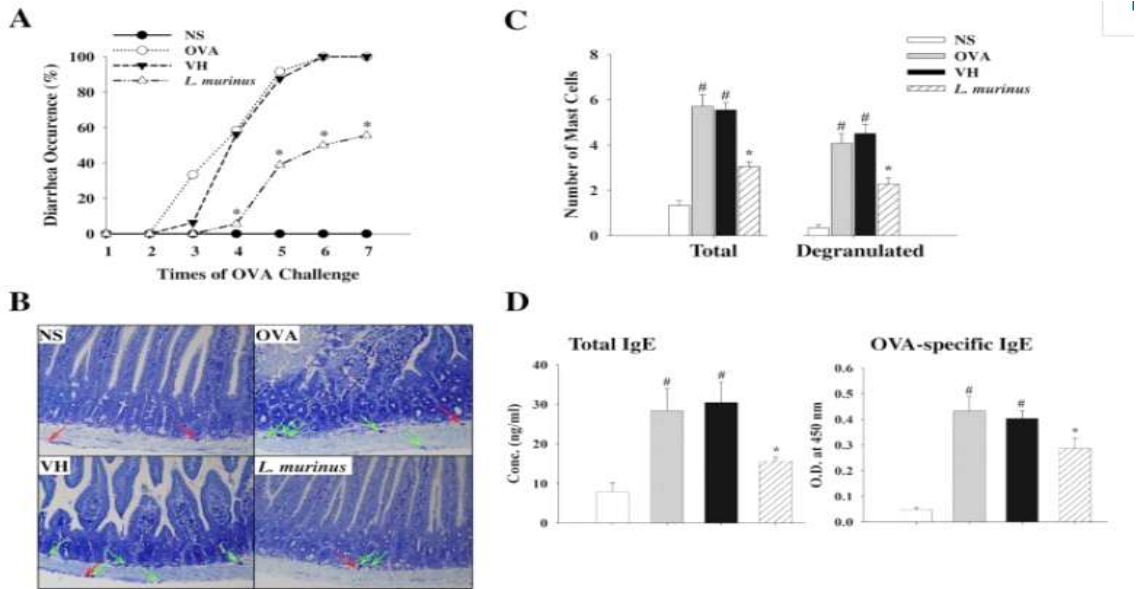
*Lactobacillus casei*를 활용한 *in vivo* 항당뇨 측정실험을 진행함.

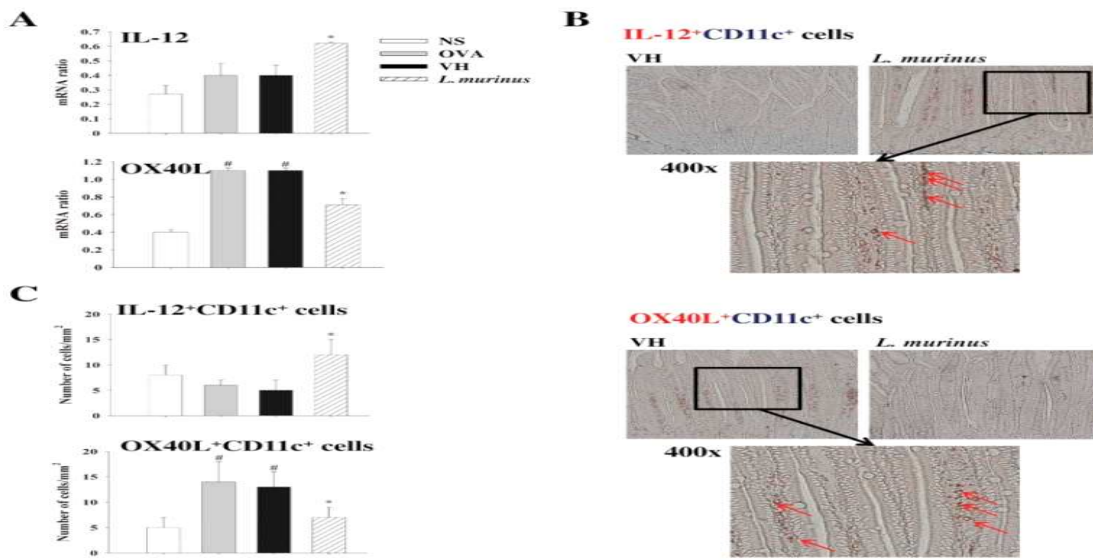


No.	논문명	저자	저널명
4	The probiotic activity of <i>Lactobacillus murinus</i> against food allergy	Huang <i>et al.</i> (2016)	Allergy

내용

Lactobacillus murinus 경구 투여 시 Th1/Th2 balance를 유도하고 intestinal dendritic cell 기능 조절을 통한 식품알레르기 증상 완화 측정실험을 진행함.





No.	논문명	저자	저널명
5	Protective effects of selenium-enriched probiotics on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats	Yunhuan <i>et al.</i> (2015)	Journal of Agricultural and food chemistry

내용

사염화탄소로 유도된 간섬유화 동물모델에 프로바이오틱스와 셀레늄을 섭취시켜 간 보호효과 측정실험을 진행함.

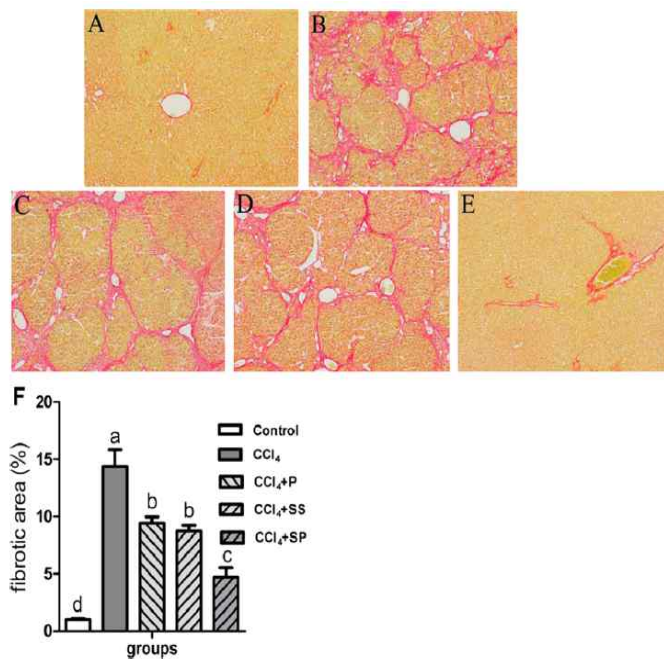


Figure 2. Liver sections were stained with Sirius red (original magnification 100 \times). (A) Control group, (B) CCl₄ group, (C) CCl₄ + P group, (D) CCl₄ + SS group, and (E) CCl₄ + SP group. Area ratio of stained collagen was quantified and shown in (F). Values of each bar are means \pm SD ($n = 8$). Columns with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

No.	논문명	저자	저널명
6	Update of the list of QPS - recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA	EFSA panel on biological hazards (2017)	EFSA journal

내용

유럽의 미생물 안전성 평가 체계인 Qualified presumption of safety(QPS) system에 대한 설명과 함께 2016년에 신규로 평가된 미생물 정보와 QPS list에 업데이트 된 미생물 목록을 제시함.

Table B.1: The 2016 updated list of QPS status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA Scientific Panels and Units

Bacteria			
Gram-positive non-sporulating bacteria			
Species	Qualifications ^(a)		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>		
<i>Carnobacterium divergens</i> ^(b)			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ^(c)			QPS only applies when the species is used for amino acid production.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ^(d)	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus farciminus</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<i>Lactobacillus aviaris</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> ^(e)	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lactococcus lactis</i>			
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	
<i>Leuconostoc lactis</i>			
<i>Microbacterium imperiale</i> ^(f)			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Oenococcus oeni</i>			
<i>Pasteuria nishizawae</i> ^(g)			
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus parvulus</i> ^(h)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Pediococcus deshnericus</i>			
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>Propionibacterium acidipropionid</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>			
Gram-positive spore-forming bacteria			
Bacillus			
Species	Qualifications ^(a)		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	Absence of toxigenic activity.
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Paenibacillus lentus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus smithii</i> ⁽ⁱ⁾	
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus flexus</i> ^(j)		<i>Bacillus vallismortis</i>	

Gram-positive spore-forming bacteria			
Species	Qualifications ^(a)		
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>			Absence of toxigenic activity.
Gram-negative bacteria			
Species	Qualifications ^(a)		
<i>Glucobacter oxydans</i>			QPS only applies when the species is used for vitamin production.
<i>Xanthomonas campestris</i> ^(k)			QPS only applies when the species is used for the production of xanthan gum.
Yeasts ^(l)			
Species	Qualifications		
<i>Candida cylindracea</i> ^(m)			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Debaryomyces hansenii</i>			
<i>Hanseniaspora uvarum</i>			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		
<i>Komagataella pastoris</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Lindnera jadinii</i>			
<i>Ogataea angusta</i>			
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁽ⁿ⁾	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Absence of resistance to antimicrobials used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain Saccharomyces cerevisiae this qualification applies for yeast strains able to grow above 37°C.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			QPS only applies when the species is used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>			
Viruses			
Plant viruses			
Family			
Alphaflexiviridae	Potyviridae		

Insect viruses

Family

Baculoviridae

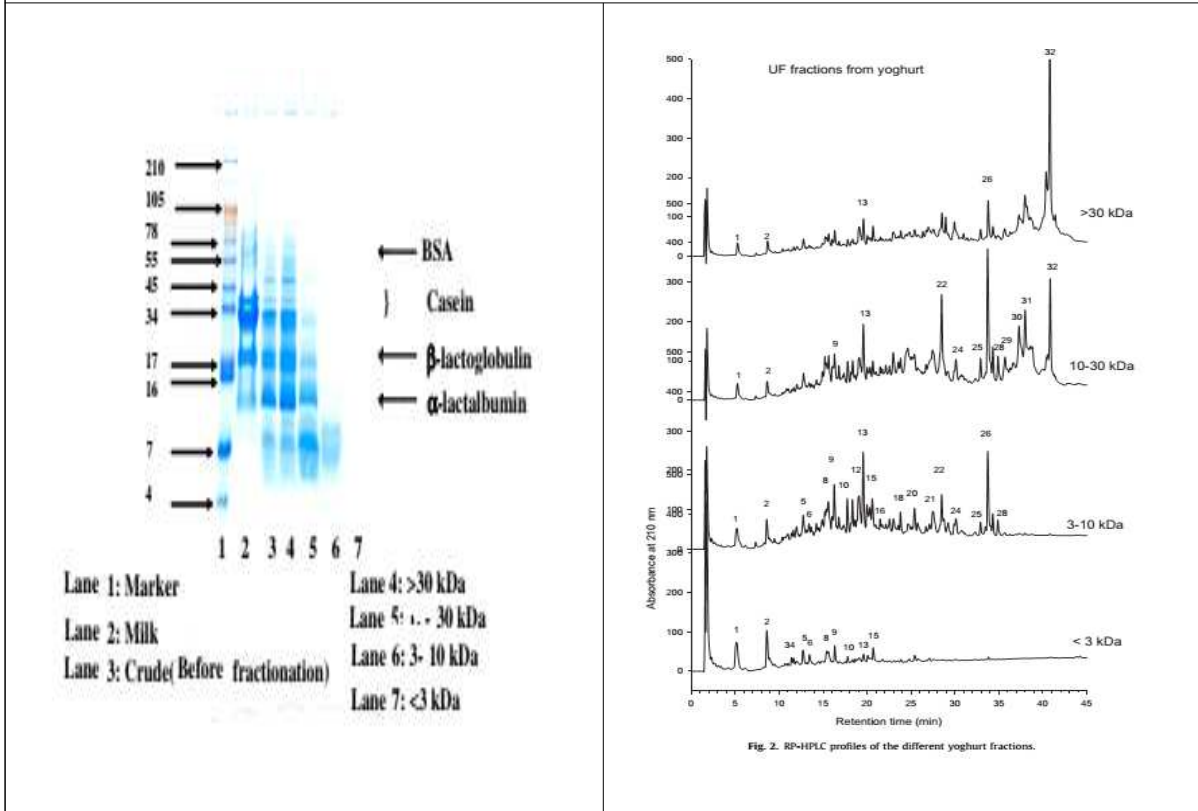
A specific representative of a QPS proposed taxonomic unit, does not need to undergo a further safety assessment other than to satisfy the specified qualifications, if applicable. On the other hand, representatives of taxonomic units that fail to satisfy a qualification would be considered unfit for the QPS list and would remain subject to a full safety assessment, in the frame of a notification by the responsible EFSA Scientific Panel.

- (a): Generic qualification for all QPS bacterial taxonomic units: the strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.
- (b): Microorganisms recommended in the Panel Statement published in December 2014.
- (c): *Brevibacterium lactofermentum* is a synonym of *Corynebacterium glutamicum*.
- (d): The previously described species '*Lactobacillus zeae*' has been included in the species *Lactobacillus casei*.
- (e): Microorganisms recommended in the Panel Statement published in June 2016.
- (f): Microorganisms recommended in the Panel Statement published in December 2015.
- (g): Microorganisms recommended in this Panel Statement published in January 2017.
- (h): Microorganisms recommended in the Panel Statement published in June 2015.
- (i): Yeast synonyms commonly used in the feed/food industry:
 - *Debaryomyces hansenii*: anamorph *Candida famata*;
 - *Hanseniaspora uvarum*: anamorph *Kloeckera apiculata*;
 - *Kluyveromyces lactis*: anamorph *Candida spherica*;
 - *Kluyveromyces marxianus*: anamorph *Candida kefyri*;
 - *Komagataella pastoris*: synonym *Pichia pastoris*;
 - *Lindnera jadinii*: synonyms *Pichia jadinii*, *Hansenula jadinii*, *Torulopsis utilis*, anamorph *Candida utilis*;
 - *Ogataea angusta*: synonym *Pichia angusta*;
 - *Saccharomyces cerevisiae*: synonym *Saccharomyces boulardii*;
 - *Saccharomyces pastorianus*: synonym *Saccharomyces carlsbergensis*;
 - *Wickerhamomyces anomalus*: synonyms *Hansenula anomala*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces anomalus*, anamorph *Candida pelliculosa*;
 - *Xanthophyllomyces dendrorhous*: anamorph *Phaffia rhodozyma*.
- (j): *Saccharomyces cerevisiae*, subtype *boulardii* is contraindicated for persons with fragile health, as well as for patients with a central venous catheter in place.

No.	논문명	저자	저널명
7	Antioxidant activity of yoghurt peptide s: Part 2 - Characterization of peptide fractions	Sabeena Farvin <i>et al.</i> (2010)	Food Chemistry

내용

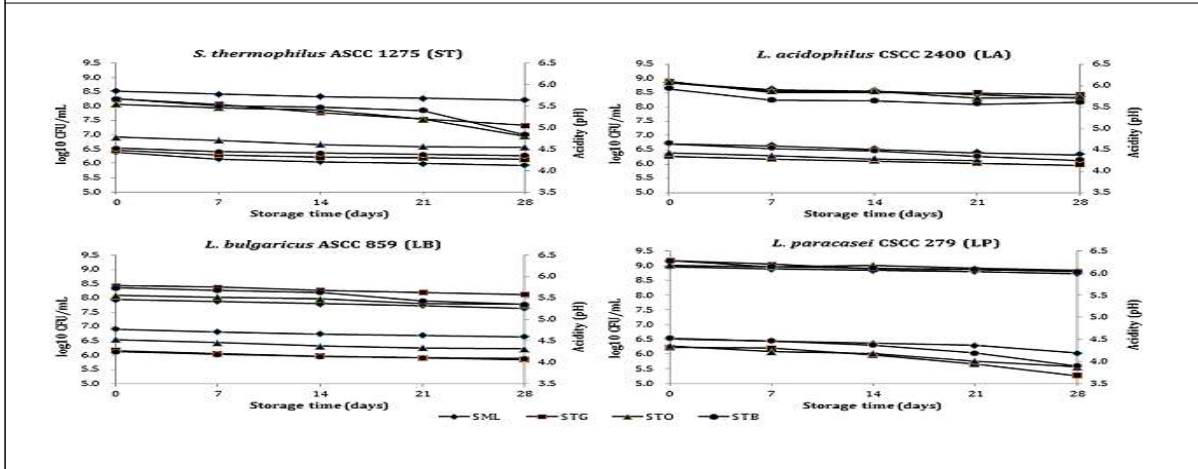
발효유 내 항산화 펩타이드 분리실험을 진행함.



No.	논문명	저자	저널명
8	Effect of tea extract on lactic acid bacterial growth, their cell surface characteristics and isoflavone bioconversion during soymilk fermentation	Danyue <i>et al.</i> (2014)	Food Research International

내용

두유 발효에서의 저장 안정성 및 적정산도 측정실험을 진행함.



No.	논문명	저자	저널명
9	Amylase production by <i>Aspergillus niger</i> in submerged cultivation on two wastes from food industries	Hernandez <i>et al.</i> (2006)	Journal of Food Engineering

내용

Amylase 및 protease 효소능 측정실험을 진행함.

Effect of the nitrogen source on production of amylase and protease by *A. niger* strain UO-1

Nitrogen sources (0.21 g N/L)	Amylase activity (EU/mL)	Protease activity (EU/mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (control)	60.0	6.0
Yeast extract	81.2	14.1
Casein	19.7	12.1
Casaminoacids	89.8	11.6
Peptone	89.9	13.1
Alanine	40.9	5.9
NaNO ₃	61.2	5.6
NH ₄ NO ₃	80.0	5.3

No.	논문명	저자	저널명
10	The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in Kefir	Chen <i>et al.</i> (2005)	Asian-Australasian Journal of Animal Sciences

내용

케피어에서의 저장안정성 실험을 진행함.

Table 1. Survival of microorganism (%) in different combinations of lyoprotectants and rehydration conditions for freeze dried kefir

	Survival of bacteria (%)			Survival of yeasts (%)		
	None	Galactose	Sucrose	None	Galactose	Sucrose
25°C						
water	7.42 ^{ay}	49.63 ^{bx}	48.99 ^{bx}	4.42 ^{ax}	73.33 ^{cx}	58.90 ^{bx}
10% SM	7.00 ^{ay}	46.67 ^{bx}	49.63 ^{bx}	4.79 ^{axy}	75.94 ^{cx}	63.83 ^{bx}
4°C						
water	6.24 ^{ax}	42.67 ^{bx}	49.03 ^{cx}	5.57 ^{ay}	84.15 ^{cy}	68.43 ^{byz}
10%SM	6.84 ^{axy}	44.68 ^{bx}	49.55 ^{cx}	5.62 ^{ay}	81.30 ^{cy}	71.66 ^{bz}

Values in the same column with different letter ^{a,b,c} and the same row with different letters ^{x,y,z} were significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05). SM: Skim milk.

No.	논문명	저자	저널명
11	A novel multi-locus sequence typing (MLST) protocol for <i>Leuconostoc lactis</i> isolates from traditional dairy products in China and Mongolia	Dan <i>et al.</i> (2014)	BMC Microbiology

내용

*L. lactis*의 MLST 분석을 위한 sequence type을 8개의 target 유전자를 선정하여 분석실험을 진행함.

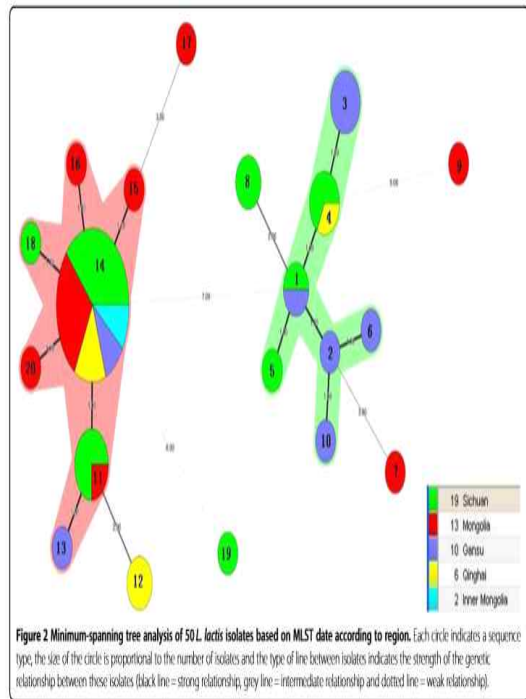
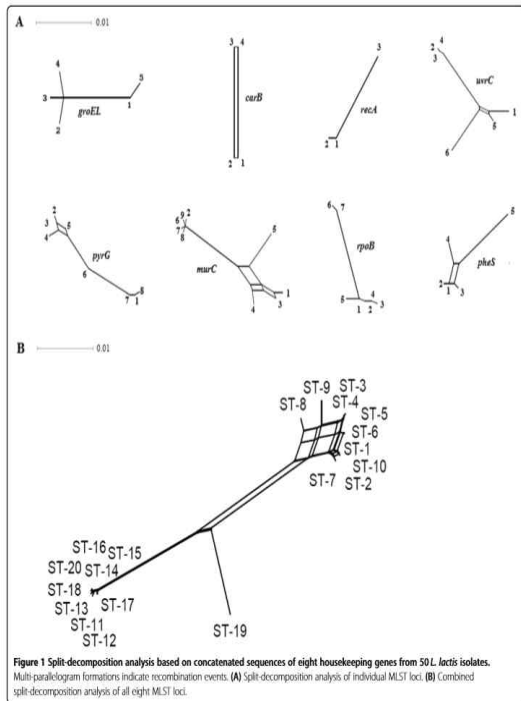


Table 2 Genes and sequencing primers used

Gene	Protein	PCR primers	Amplicon size (bp)	Location*
<i>pyrG</i>	CTP synthase	5'-AGCAAACACCCAAGAACG-3' 5'-TGGTGAAGCGAAGACAAA-3'	598	481322 to 482935
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	5'-CACTGTGCGGTCGCTCC-3' 5'-GCGTTCCTGGTATCTAIT-3'	608	1798123 to 1801731
<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	5'-CGGTGATAAGGCTGCTGT-3' 5'-TTTGTGGTCCACGATA-3'	892	1734716 to 1736335
<i>recA</i>	Recombinase A	5'-GGAGTCGTTCTGGGTTAC-3' 5'-GTTGCTTTAGGCGTTGGTG-3'	550	555064 to 556221
<i>uvrC</i>	Excinuclease ABC subunit C	5'-AGAAATACAAGCCGTACTACAA-3' 5'-TCTTCATCAGCGGAACCAA-3'	560	483053 to 484852
<i>carB</i>	Carbamoyl phosphate synthase large subunit	5'-ATGGGTGTGGGAGTTGTA-3' 5'-ACTGTTCGTCGTGGTGT-3'	833	1202174 to 1205353
<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	5'-TTTCATAGGCGAATCAT-3' 5'-GTGCCATTGTTGGTCAG-3'	619	679802 to 681136
<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	5'-TTTCTTAGGTTTAGGCTTTG-3' 5'-CCTTTCGGTTAAATGTGA-3'	665	406737 to 407813

*Positions correspond to the complete genome sequence of *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293.

No.	논문명	저자	저널명
12	Application of repetitive extragenic palindromic elements based on PCR in detection of genetic relationship of lactic acid bacteria species isolated from traditional fermented food products	Tajabadi <i>et al.</i> (2015)	Journal of Agricultural Science and Technology

내용

이런 전통 식품으로부터 분리된 유산균주의 다양성을 rep-PCR로 분석실험을 진행함.

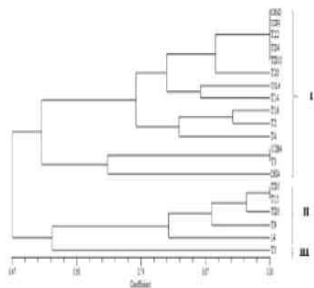


Figure 3. UPGMA dendrogram of isolates based on REPIR-I marker by NTSYS software.

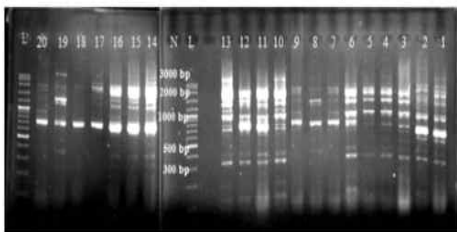


Figure 4. REP-PCR profile of isolates studied based on REP2-I primer on 1.5% agarose gel. 1: C6M3, 2: Y1L4, 3: T20, 4: T22, 5: TD4, 6: TD10, 7: Y2B4, 8: T3, 9: T14, 10: T16, 11: T2, 12: T4, 13: Y2P3, L: 100 bp DNA ladder, N: Negative control, 14: TD5, 15: T15, 16: 14, 17: TD3, 18: T9, 19: T5, 20: C6I4, L: 100 bp DNA ladder.

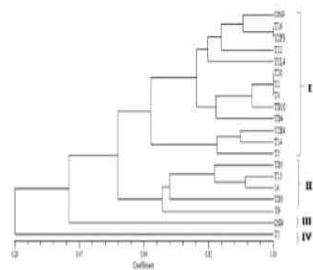


Figure 5. UPGMA dendrogram of isolates based on REP2-I marker by NTSYS software.

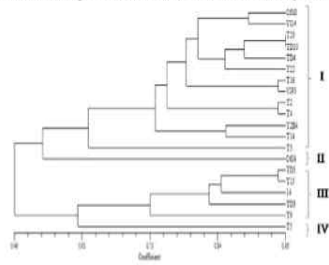


Figure 6. UPGMA dendrogram of lactobacilli isolates based on combination of REPIR-I and REP2-I primers by NTSYS software.

Table 2. Number and range of amplified bands by REP-PCR primers.

Primer	Total band in isolates	Polymorph band	Monomorph band	Unique band	Range of band
REPIR-I	112	13	0	2	200-2500 bp
REP2-I	165	13	1	1	350-3000 bp
REPIR-I+ REP2-I	257	26	0	3	200-3000 bp

No.	논문명	저자	저널명
13	Comparative genome analysis of <i>Pediococcus damnosus</i> LMG 28219, a strain well-adapted to the beer environment	Snauwaert <i>et al.</i> (2015)	BMC Genomics

내용

P. damnosus LMG 28219의 draft genome sequence를 수행하여 유전체를 분석실험을 진행함.

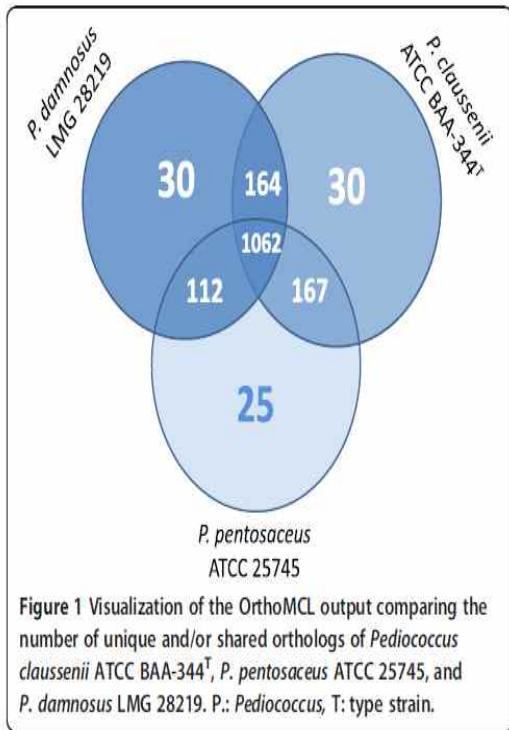


Table 2 Comparison of genome characteristics of *P. pentosaceus* ATCC 25745, *P. clausenii* ATCC BAA-344^T, and *P. damnosus* LMG 28219 (based on the IMG-ER server)

	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	<i>P. clausenii</i> ATCC BAA-344 ^T	<i>P. damnosus</i> LMG 28219
Accession number*	CP000422	CP003137*	JANK000000000
Origin	Plant	beer	beer
Size	1,832,387	1,966,362	2,231,216
CDSs	1755	1892	2178
rRNA genes	5	4	3
tRNA genes	55	57	56
GC%	37.4	37.0	38.2

*Only the Genbank record of the chromosomal DNA is given, P.: *Pediococcus*, T: type strain, CDSs: coding sequences, IMG-ER: integrated microbial genomics expert review.

Table 1 Overview of the *Pediococcus damnosus* LMG 28219 draft genome and the best BLAST hits

Draft genome of <i>P. damnosus</i> LMG 28219	Mean GC content (%)	Mean size consensus (bp)	Best BLAST hit
82, 98, 145, 116, 77, 119, 47, 53, 5, 89, 56, 76, 166, 84, 81, 136, 102, 141, 72, 30, 52, 129, 74, 54, 19, 110, 147, 49, 26, 85, 137, 61, 146, 177, 7, 68, 131, 104, 87, 32, 17, 80, 66, 165, 2, 20, 101, 96, 4, 59, 45, 164, 118, 64, 176, 69, 90, 24, 127, 10, 46, 139, 114, 60, 124, 23, 83, 51, 151, 169, 106, 11, 121, 78, 55, 43, 130, 48, 65, 168, 27, 62, 60, 79, 6, 152, 120, 73, 35, 99, 29, 71*	38.3	20814	chromosomal DNA (NC_016605)
21, 39, 41, 183	36.9	4040	pPECL-3 (NC_016636)
12, 21, 94, 95, 112, 135	38.5	3419	pPECL-4 (NC_016607)
1, 21, 39, 40, 95, 97, 107, 132, 135, 170	38.6	5198	pPECL-5 (NC_016608)
21, 107, 135, 178	37.0	4924	pPECL-6 (NC_017017)
8, 21, 39, 41, 86, 94, 182, 183	38.1	3926	pPECL-7 (NC_017018)
70, 14, 97*	42.5	9516	pPECL-8 (NC_017019)
16, 57	49.0	2538	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 (pBM400, NC_004604) and WSH-002 (WSH-002_p1, CP003018)
123, 134, 140	37.2	4034	<i>L. brevis</i> 925A (pLB925A04, NC_012551), KB290 (pKB290-4, AP012171), and ATCC 367 (plasmid 1, NC_008498)
37	44.6	1242	<i>L. plantarum</i> WCFS1 (pWCFS103, NC_006377)
100, 122	33.9	5879	<i>L. buchneri</i> CD034 (pCD034-3, CP003044) and NRRL-B-30929 (pLBUC01, NC_015420)
18, 22, 93, 108, 109, 113, 115, 143, 158, 162, 163	40.6	2797	Several <i>Lactobacillus</i> spp.

Contigs with the highest hit scores are highlighted in bold. *Contig numbers are mentioned in ordered fashion. p: plasmid, L: *Lactobacillus*, P.: *Pediococcus*, T: type strain, bp: base pairs.

제 7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
해당 사항 없음.	

제 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비
현황(해당 사항 없음)

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

제 1절 안전조치 이행실적

1. 건국대학교

가. 생물 안전 교육 이수

- 2015년 전반기 생물 안전 교육 이수
 - 2015년 3월 건국대학교에서 실시
 - 제1세부 기관 참여 연구원들이 참석하여 온라인 및 오프라인 교육 수행
- 2016년 전반기 생물 안전 교육 이수
 - 2016년 4월 건국대학교에서 실시
 - 제1세부 기관 참여 연구원들이 참석하여 온라인 및 오프라인 교육 수행
- 2017년 전반기 생물 안전 교육 이수
 - 2017년 4월 건국대학교에서 실시
 - 제1세부 기관 참여 연구원들이 참석하여 온라인 및 오프라인 교육 수행

나. 위험물 보관함 설치

- 가연성 위험물 보관함을 제1세부 기관에 설치하여 알콜 및 가연성 물질의 보관(2016년 7월 1일)

2. 한국식품연구원

가. 안전조치 이행

- 연구기간 동안 모든 참여연구원이 건강검진을 실시하였으며, 아래 내용의 상해보험에 가입하였음.
- 각 연구실마다 소화시설 운영 등을 설치하고 있음.

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
단체 상해보험	- 사망: 1억원 - 암치료비: 1천만원/인당 - 입원의료비지원: 5만원/일 - 상해의료실비: 7천만원/인당	위촉 연구직 포함 전직원	총무재무실

나. 교육 훈련

- 연구기간동안 모든 참여연구원이 산업안전보건법 제31조(안전보건교육)에 따라 매월 1시간 이상 아래와 같은 방법으로 정기 교육을 의무적으로 실시하였음,
- 교육구분
 - 교육방법: 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상 교육), 자료/유인물, 외부 온라인상, 외부강사, 전문교육기관 의뢰 등
 - 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

3. 단국대학교 천안캠퍼스

가. 연구실 안전 교육 이수

- 2015학년도 연구실 온라인 정기안전교육 실시
 - 강좌명 : 연구실 안전 교육
 - 교육대상 : 과제참여 연구원(교원, 연구원, 대학원생, 학부생)
 - 안전교육 이수 조건(출석 : 12강, 시험 : 60점 이상 이수)
 - 교육결과 : 교육대상 전원 이수완료
- 2016학년도 연구실 온라인 정기안전교육 실시
 - 강좌명 : 연구실 안전 교육
 - 교육대상 : 과제참여 연구원(교원, 연구원, 대학원생, 학부생)
 - 안전교육 이수 조건(출석 : 12강, 시험 : 60점 이상 이수)
 - 교육결과 : 교육대상 전원 이수완료
- 2017학년도 연구실 온라인 정기안전교육 실시
 - 강좌명 : 연구실 안전 교육
 - 교육대상 : 과제참여 연구원(교원, 연구원, 대학원생, 학부생)
 - 안전교육 이수 조건(출석 : 12강, 시험 : 60점 이상 이수)
 - 교육결과 : 교육대상 전원 이수완료

4. 가천대학교

가. 생물 안전 교육 이수

- 2015년 전·후반기 생물 안전 교육 이수
 - 2015년 3월(전반기), 11월(후반기) 가천대학교에서 실시
 - 제3협동 기관 참여 연구원들이 참석하여 오프라인 교육 수행
- 2016년 전·후반기 생물 안전 교육 이수

- 2016년 3월(전반기), 9월(후반기) 가천대학교에서 실시
- 제3협동 기관 참여 연구원들이 참석하여 오프라인 교육 수행
- 2017년 전반기 생물 안전 교육 이수
 - 2017년 3월 가천대학교에서 실시
 - 제3협동 기관 참여 연구원들이 참석하여 오프라인 교육 수행

5. (사)한국중균협회

가. 연구실 안전 교육 이수

- 정기 교육 실시
 - 상반기, 하반기 연 2회 생물안전 집합 교육 실시
 - 2015년 1월, 2015년 7월, 2016년 1월, 2016년 7월, 2017년 1월, 2017년 7월 집합 교육 실시
- 외부 교육 이수
 - 국가연구안전관리본부 주관 연구활동종사자 오프라인 교육 수료
2016년 6월 16일(3시간), 2017년 7월 20일(3시간)
 - 국가연구안전관리본부 주관 생물안전관리자 오프라인 교육 수료
2015년 9월 22일(4시간), 2016년 6월 15일(4시간), 2017년 9월 14일(4시간)

나. 연구실 안전 점검

- 연구실 일상점검 : 주 5회 연구실 일상점검 실시함(연구시설 운영 점검표 작성).

다. 연구활동종사자 건강검진

- 참여연구원 매년 건강검진 실시함.
 - 2015년 11월 24일, 2016년 10월 11일, 2017년 11월 17일 실시

6. (주)셀바이오틱

가. 정밀안전진단 실시 및 후속조치 진행

- 일반, 소방 안전
 - 안전표지, 안전관리 규정, 비상시 응급조치 요령이 포함된 표시판을 각 연구실 출입에 부착 및 비치
 - 사고 상황 발생 별 응급조치 매뉴얼 작성
- 화공 안전
 - 보호장구 및 중화제 비치: 화학약품 및 폐시약, 폐기물 전도사고 및 폭발사고 발생

시 응급조치(연구활동 종사자 교육 시 사용법 교육 진행)

- 미사용 시약 정리: 년 2회 정기적으로 공문을 통하여 일괄 처리 진행함으로써 화재 예방 및 공간 확보
- 배기형 시약장 및 안전 캐비닛 설치: 실험실 별 공문을 통한 수요조사 진행하여 설치
- 가스안전
 - 가스용기 전도 방지 장치 설치, 가스라인 벤딩처리, 충전기한 지난 가스 용기 정리

나. 정기안전 점검 진행

- 2016년 6월 미래창조과학부에서 시행한 연구시설 정밀안전진단 현장실태 점검 후 시행령 제7조에 의거 연구시설 안전점검 후속조치 이행 보고 완료(2016. 11)
- 점검 방법 및 주기
 - 일상점검: 연구활동 종사자, 1회/1일
 - 정기점검: 연구실 안전환경 관리자 및 전문 대행기관, 1회/1년
 - 정밀안전진단: 전문 대행기관 1회/2년

다. 연구활동 종사자 교육 진행

- 반기 별 6시간 이상 집합 교육 진행, 상하반기 각 1회 진행
- 개별 메일을 이용하여 수시로 공지사항 전달 및 교육자료 발송

라. 참여연구원 대상 건강검진 시행

- 특수건강진단과 일반건강진단 병행 시행

마. 연구공간 및 연구자 보안관리를 위한 출입통제 시스템 설치 및 시행

제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부	특기사항
1	논문	RAPD analysis of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> strains associated with vegetables and food products from Korea	가천대	교신 저자	LWT-Food Science and Technology	2.329	2017. 04. 15.	단독	SCI급
2	논문	Potential probiotic <i>Lactobacillus plantarum</i> Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities	건국대	교신 저자	LWT-Food Science and Technology	2.329	2017. 11. 15.	단독	SCI급
3	논문	<i>In vitro</i> characterization of <i>Lactobacillus brevis</i> KU15006, and isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties	건국대	교신 저자	Microbial Pathogenesis	2.009	2017. 11. 15.	중복	SCI급
4	논문	Preventive effects of a probiotic mixture in an ovalbumin-induced food allergy model	한국식품연구원	교신 저자	Journal of Microbiology and Biotechnology	1.750	2017. 12. 09.	중복	SCI급

5	논문	Molecular discrimination of <i>Lactobacillus brevis</i> strains isolated from food products in South Korea using multilocus sequence typing	가천대	교신 저자	LWT-Food Science and Technology	2.329	2017. 12. 15.	단독	SCI급
---	----	---	-----	----------	---------------------------------	-------	---------------	----	------

제 11장 기타사항

코드번호

D-13

해당사항 없음.

제 12장 참고문헌

코드번호	D-14
1.	강하니. 메밀싹 첨가 요구르트의 제조 및 발효특성. 석사 학위논문 (2008).
2.	박동준. 탈지유와 두유를 이용한 요구르트의 제조조건 최적화. 박사 학위논문 (1994).
3.	박종현, 신지영. β -Glucuronidase 생산 인체장내 <i>Clostridium</i> sp.의 분리·동정. Korean Journal of Food Science Technology, 31:1357-1362 (1999).
4.	“순창 발효미생물 증가 ‘우뚱’”, 『전라일보』, 2016. 08. 02.
5.	식품공전. 한국식품산업협회 (2016).
6.	식품의약품안전처, 국립독성연구원 임상시험 관련자를 위한 전문교재 (2006).
7.	식품의약품안전처, 식품의약품안전평가원, 바이오제닉아민류 위해평가 (2016).
8.	“우리 기술로 ‘김치발효종균’ 개발”, 『한국농어민신문』, 2017. 07. 14.
9.	“일동제약, 프로바이오틱스 종균은행 설립”, 『서울경제』, 2016. 05. 18.
10.	“전통 된장에서 대장염 억제 토종 유산균 개발”, 『MBC뉴스』, 2016. 10. 17.
11.	“전통장류식품에서 찾은 청국장 종균 5종 특허출원”, 『국제뉴스』, 2016. 12. 16.
12.	주류분석규정. 국세청훈령 제2024호 (2013).
13.	“토종발효 종균의 무한 가능성”, 『대산농촌문화』, 2017. 01. 24.
14.	“프로바이오틱스 시장 커진다…국산 vs 수입산 ‘격돌’”, 『산업뉴스』, 2017. 03. 09.
15.	2010년 국정감사 결과보고서, 농림수산식품위원회 (2017).
16.	Ahn BH. A study on the quality standardization and shelf-life extension of Makgeolli (2013).
17.	Akinmokon, A. Selby PL, Ramaiya K, Alberti KG. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: A comparison with the euglycaemic clamp. Diabetic Medicine, 9:432-437 (1992).
18.	Araya R, Tani K, Takagi T, Yamaguchi N, Nasu M. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent <i>in situ</i> hybridization and DGGE analysis. FEMS Microbiology Ecology, 43:111-119 (2003).
19.	Ayoub MJ, Legras JL, Saliba R, Gaillardin C. Application of multi locus sequence typing to the analysis of the biodiversity of indigenous <i>Saccharomyces cerevisiae</i> wine yeasts from Lebanon. Journal of Applied Microbiology, 100:699-711 (2006).
20.	Baek SY, Lee YJ, Kim JH, Yeo SH. Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavor and quality. Journal of Microbiology and Biotechnology, 43:56-64 (2015).
21.	Baek SY, Lee YJ, Kim MD, Yi JH, Mun JY, Yeo SH. Characterization of ethanol fermentation with wild type yeast strains. Microbiology and Biotechnology Letters, 3:227-235 (2015).
22.	Bang JH, Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. Probiotic potential of <i>Lactobacillus</i> isolates. Journal of Life Science, 22:251-258 (2012).
23.	Berner D, Viernstein H. Effect of protective agents on the viability of <i>Lactococcus</i>

- lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Scientia Pharmaceutica*, 74:137-149 (2006).
24. Beyer W, Mukendi FM, Kimmig R, Bohm R. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella Entrica* serovar Saint Paul. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:1549-1554 (1998).
 25. Bischoff H. The mechanism of alpha-Glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical and Investigative Medicine*, 18:303-311 (1995).
 26. Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 52:141-148 (2002).
 27. Blom J, Albaum SP, Doppmeier D, Puhler A, Vorholter FJ, Zakrzewski M, Goesmann A. EDGAR: A software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics*, 10:154 (2009).
 28. Boon N, Windt W, Verstraete W, Top EM. Evaluation of nested PCR-DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:101-112 (2002).
 29. Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154:87-97 (2012).
 30. Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53:33-41 (1999).
 31. Buchan A, Alber M, Hodson R. Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via DGGE analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *FEMS Microbiology Ecology*, 35:313-321 (2001).
 32. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15:798-808 (2007).
 33. Cai H, Rodriguez BT, Zhang W, Broadbent J, Steele JL. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 153:2655-2665 (2007).
 34. Casado Muñoz Mdel C, Benomar N, Lerma LL, Gálvez A, Abriouel H. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 172:110-118 (2014).
 35. Cayman chemical, D-Lactate assay kit protocol, Item NO. 700520.

36. Chaillou S, Lucquin I, Najjari A, Zagorec M, Champomier-Verges MC. Population genetics of *Lactobacillus sakei* reveals three lineages with distinct evolutionary histories. PLoS ONE, 8:e73253 (2013).
37. Chang JY, Chang HC. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. Journal of Food Science, 75:103-110 (2010).
38. Chang M, Chang HC. Characteristics of bacterial-Koji and *doenjang*(soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 4:325-333 (2007).
39. Charlton M. Obesity, hyperlipidemia, and metabolic syndrome. Liver Transplantation, 15:83-89 (2009).
40. Chen HC, Lin CW, Chen MJ. The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in Kefir. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 1:126-130 (2006).
41. Chen LH, Marlatt AL. Effects of dietary vitamin B-6 levels and exercise on glutamic-pyruvic transaminase activity in rat tissues. Journal of Nutrition, 105:401-407 (1975).
42. Cho HK, Seo WT, Lee JY, Cho KM. Quality characteristics of cereal Makgeolli rice Nuruk prepared *Rhizopus oryzae* CCS01. Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition, 7:1002-1008 (2012).
43. Cho JR, Kim JH, In MJ. Effect of garlic powder on preparation and quality characteristics of yogurt. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 1:48-52 (2007).
44. Choe M, Hong SJ, Lim JH, Kwak Y, Back CG, Jung HY, Lee IJ Shin JH. Korean paddy soil microbial community analysis method using denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Applied Biological Chemistry, 56:95-100 (2013).
45. Choi JS, Jung ST, Kim JY, Choi HS, Yeo SH. Quality characteristics of wheat Nuruk and optimum condition of liquid starters for *Aspergillus* sp., Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 4:357-363 (2011).
46. Christensen LS, Soerensen KJ, Lei JC. Restriction fragment pattern (RFP) analysis of genomes from Danish isolates of suid herpes virus 1(Aujeszky's disease virus). Archives of Virology, 97:215-224 (1987).
47. Chun MS, Kim SJ, Noh BS. Analysis of free amino acids and flavors in fermented jujube wine by HPLC and GC/MS. Korean Journal of Food Science and Technology, 6:779-784 (2012).
48. Chung RW. Physicochemical properties of traditional liquor with different brewing method of Mit-sool. Journal of Korean Society of Food Culture, 3:377-386 (2015).
49. Clarridge JE III, Osting C, Jalali M, Osborne J, Waddington M. Genotypic and phenotypic characterization of *Streptococcus milleri* group isolates from a veterans

- administration hospital population. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:3681–3687 (1999).
50. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Eighth approved standard, M07–A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2009).
 51. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Tenth approved standard, M02–A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2009).
 52. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. M100–S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2011).
 53. Coffey TJ, Pullinger GD, Urwin R, Jolley KA, Wilson SM, Maiden MC, Leigh JA. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: A multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:1420–1428 (2006).
 54. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 1:1–12 (1987).
 55. Dan T, Liu W, Sun Z, Lv Q, Xu H, Song Y, Zhang H. A novel multilocus sequence typing (MLST) protocol for *Leuconostoc lactis* isolates from traditional dairy products in China and Mongolia. *BMC Microbiology*, 14:150 (2014).
 56. de Bruijn FJ. Use of repetitive (repetitive extragenic element and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:2180–2187 (1992).
 57. de Las RB, Marcobal A, Munoz R. Allelic diversity and population structure of *Oenococcus oeni* determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7210–7219 (2004).
 58. de Las RB, Marcobal A, Munoz R. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*, 152:85–93 (2006).
 59. de Man JC, Rogosa M, Sharpe MEA. Medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23:130–135 (1960).
 60. Delétoile A, Passet V, Aires J, Chambaud I, Butel MJ, Smokvina T, Brisse S. Species delineation and clonal diversity in four *Bifidobacterium* species as revealed by multilocus sequencing. *Research in Microbiology*, 161:82–90 (2010).
 61. Delorme C, Poyart C, Ehrlich SD, Renault P. Extent of horizontal gene transfer in evolution of streptococci of the salivarius Group. *Journal of Bacteriology*, 189:1330–1341 (2007).
 62. Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, Ehrlich SD, Renault P. Emergence of a cell wall

- protease in the *Streptococcus thermophilus* population. Applied and Environmental Microbiology, 76:451-460 (2010).
63. Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. Applied and Environmental Microbiology, 67:190-197 (2001).
 64. EFSA. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. EFSA Journal, 226:1-12 (2005).
 65. EFSA. Opinion of the scientific committee on introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA Journal, 587:1-16 (2007).
 66. EFSA Panel on Additives and products or substances used in animal feed. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 10:2740-2750 (2012).
 67. EFSA. Scientific colloquium summary report: Qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. <http://www.efsa.europa.eu/> (2004).
 68. EFSA. Scientific opinion of the panel on biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. EFSA Journal, 923:1-48 (2008).
 69. EFSA. Scientific opinion of the panel on biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. EFSA Journal, 7:1-93 (2009).
 70. EFSA, Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. EFSA Journal, 15:6-63 (2017).
 71. Elya B, Basah K, Mun'im A, Yuliastuti W, Bangun A, Septiana EK. Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of apocynaceae, clusiaceae, euphorbiaceae, and rubiaceae. BioMed Research International, 2012:1-6 (2012).
 72. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods, 56:297-314 (2004).
 73. Fierbințeanu-Braticevici C, Mohora M, Tribus L, Petrișor A, Crețoiu SM, Crețoiu D, Usvat R, Ioniță L. Hepatocyte steatosis in patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. Romanian Journal of Morphology Embryology, 51:235-242 (2010).
 74. Fernández E, Alegría A, Delgado S, Cruz Martín M, Mayo B. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 77:5324-5335 (2011).

75. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshink P. Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 42:166–170 (1992).
76. Fraser R, Albright F, Smith PH. The value of the glucose tolerance test, the insulin tolerance test and the glucose insulin tolerance in the diagnosis of endocrinologic disorders of glucose metabolism 1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1:297–306 (1941).
77. Gancheva A, Pot B, Vanhonacker K, Hoste B, Kersters K. A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Systematic and Applied Microbiology*, 22:573–585 (1999).
78. Gevers D, Huys G, Swings H. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205:31–36 (2001).
79. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3:733–739 (2005).
80. Goderska K. Different methods of probiotics stabilization (2012).
81. Guilherme, Adilson, *et al.* Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9:367–377 (2008).
82. Guo X, Kan L. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *Gene*, 251:45–53 (2000).
83. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Volatile flavor components in mash of Takju prepared by using different Nuruks. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 29:563–570 (1997).
84. Han SM, Lee SY, Lee HB, Lee JS. Isolation of wild yeasts from soils of reed fields in seocheon-gun county, Chungcheongnam-do, South Korea, and characterization of unrecorded yeasts. *The Korean Journal of Mycology*, 3:234–240 (2017).
85. Han Y, Xu X, Jiang Y, Zhou G, Sun X, Xu B. Inactivation of food spoilage bacteria by high pressure processing: Evaluation with conventional media and PCR-DGGE analysis. *Food Research International*, 43:1719–1724 (2010).
86. Han YJ, Yu TS. Characterization of two forms of glucoamylase from traditional Korean Nuruk fungi, *Aspergillus coreanus* NR 15-1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2:239–246 (2005).
87. Handschur M, Pinar G, Gallist B, Lubitz W, Haslberger AG. Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing. *Food and Chemical Toxicology*, 43:1595–1605 (2005).
88. Haryani Y, Noorzaleha AS, Farimah AB, Noojahan BA, Patrick GB, Shamsinar AT, Laila RAS, Son R. Incidence of *Klebsiella pneumoniae* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD-PCR analysis. *Food Control*, 18:847–853 (2007).

89. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:199-207 (2005).
90. Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viarf JP, Ricour C, Jacquemin JL, Berche P. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii fungemia*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19:16-20 (2000).
91. Herman L, Heyndrickx M, Waes G. Typing of *Bacillus sporothermodurans* and the *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 26:183-188 (1998).
92. Hernandez M S, Rodriguez M R, Guerra Nelson, Roses R P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 73:93-100 (2006).
93. Higgins CF, Ames GFL, Barnes WM, Clement JM, Hofnung M. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature*, 298:760-762 (1982).
94. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JD, Willems RJ. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:1963-1971 (2002).
95. Hong OS, Ko YT. Study on preparation of yogurt from milk and rice. *The Korean Journal of Food Science and Technology*, 5:587-592 (1991).
96. Hsieh HS, Chai T, Hwang DF. Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control*, 18:369-374 (2007).
97. Hu P, Zhou G, Xu X, Li C, Han Y. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control*, 20:99-104 (2009).
98. Huang Y, Wang Y, Xu Y. Purification and characterization of an acid-protease from the *Aspergillus hennebergii* HX08 and its potential in traditional fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 123:432-441 (2017).
99. Hudson CR, Quist C, Lee MD, Keyes K, Dodson SV, Morales C, Sanchez S, White DG, Maurer JJ. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from non-domestic birds in Southeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1318-1323 (2000).
100. Huis I, Veld JHJ, Havenaar R. Probiotics and health in man and animals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51:562-567 (1991).
101. Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and other *Enterobacteria*. *Molecular Microbiology*, 5:825-834 (1991).
102. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23:254-267 (2006).
103. Hyytia E, Bjorkroth J, Hielm S, Korkeala H. Characterization of *Clostridium*

- botulinum* groups I and II by randomly amplified polymorphic DNA analysis and repetitive element sequence-based PCR. International Journal of Food Microbiology, 48:179-189 (1999).
104. Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Ezaki O. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: Differential effects of dietary oils. Metabolism, 45:1539-1546 (1996).
 105. Ilavenil S, Vijayakumar M, Kim da H, Valan Arasu M, Park HS, Ravikumar S, Choi KC. Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96:593-601 (2015).
 106. Isenberg HD. Gelatin liquefaction test. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol.1, American Society of Microbiology. pp. 1.19.42-1.19.43. Washington D.C., U.S.A. (1992).
 107. Isenberg HD. Hemolysis on sheep blood agar. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol.1, American Society of Microbiology. pp. 1.20.16-1.20.17. Washington D.C., U.S.A. (1992).
 108. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. The American Journal of Clinical Nutrition, 73:465S-470S (2001).
 109. Jang HY, Oh CH, Oh NS. Production of glutathione by the yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* Sa59. Korean Journal of Food Science and Technology, 6:801-804 (2013).
 110. Jeong DW, Lee JH. Safety assessment of starters for traditional Korean fermented foods. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 42:1-10 (2014).
 111. Jeong JH, Chai HS, Lee YH, Kim JM, Lee JH. Quality characteristics of Takju, Yakju, Spirit made by cereal Nuruks. Korean Journal of Culinary Research, 1:267-280 (2015).
 112. Jeong JW, Park KJ, Kim MH, Kim DS. Quality characteristics of Takju fermentation by addition of chestnut peel powder. Korean Journal of Food Preservation, 3:329-336 (2006).
 113. Jeong SY, Lee YH, Kang SN, Shin BK, Park SM. Exploration of optimal *Lactobacillus plantarum* strains for curdling milk for yogurt and evaluation of physicochemical and sensory properties. Korean Journal of Food Science and Technology, 6:548-554 (2016).
 114. Jersek B, Gilot P, Gubina M, Klun N, Mehle J, Tcherneva E, Rijpens N, Herman L. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. Journal of Clinical Microbiology, 37:103-109 (1999).
 115. Ji KH, Jang NY, Kim YT. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25:1569-1577 (2015).

116. Ju MN, Hong SW, Kim KT, Yum SK, Kim GW, Chung KS. Preparation of Korean traditional alcoholic beverage(Yakju) by a protoplast fusion yeast strain utilizing starch and its quality characteristics. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 5:541-546 (2009).
117. Jung DW, Park SI. Preparation of drinkable yogurt added with green tea powder. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 4:349-356 (2005).
118. Jung DW, Ha HH, Zheng X, Chang YT, Williams DR. Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of Triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects. *Molecular BioSystems*, 7:346-358 (2011).
119. Jung HK, Jeong YS, Youn KS, Kim DS, Hong JH. Quality characteristics of soybean paste (Doenjang) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels, and deep-sea water. *Korean Journal of Food Preservation*, 3:348-534 (2009).
120. Jung IK, Ko SH, Oh SW, Lim JY, Chun TY, Kim SA, Myoung KS, Jang SS, Huh CS, Han YS. Fermentation and microbial characteristics of Korean traditional fermented milk, Tarak. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 4:602-609 (2015).
121. Kamar M, Raziel A, Susmallian S, Kyzer S, Charuzi I. D-Lactic acidosis in a patient after subtotal colectomy. *The Israel Medical Association Journal*, 5:891-892 (2003).
122. Kang CH, Han SH, Kim YG, Jeong YA, Pack NS. Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 3:199-205 (2017).
123. Karapetkov N, Georgieva R, Rumyan N, karaivanova E. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. *Beneficial Microbes*, 2:335-339 (2011).
124. Kaur J, Lee S, Park YS, Sharma A. RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 77:383-388 (2017).
125. Keroanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, de Buyser ML. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115:369-375 (2007).
126. Kim HJ, Kim YS, Chung MS, Oh DH, Bahk GJ, Chun HS, Ha SD. Trends in rapid detection methods for food-borne pathogenic microorganisms by using new technologies. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 25:376-387 (2010).
127. Kim HK, Bae HC, Nam MS. Fermentation properties of mulberry yogurt. *Journal of Agricultural Science*, 1:66-75 (2003).
128. Kim HR, Kwon YH, Jo SJ, Kim JH, Ahn BH. Characterization and volatile flavor components in glutinous rice wines Prepared with different yeasts of Nuruks.

Korean Journal of Food Science and Technology, 3:269-301 (2009).

129. Kim HR, Lee AR, Kwon YH, Lee HJ, Jo SJ, Kim JH, Ahn BH. Physicochemical characteristics and volatile compounds of glutinous rice wines depending on the milling degrees. Korean Journal of Food Science and Technology, 1:75-81 (2010).
130. Kim HR, Kim JH, Bae DH, Ahn BH. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean Nuruk. Mycobiology, 4:278-282 (2011).
131. Kim HS, Cho JS, Park KR. Methane production and T-RFLP patterns of methanogenic bacteria dependent on agricultural methods. The Korean Journal of Microbiology, 45:17-25 (2009).
132. Kim JW, Kang JE, Choi HS, Kim CW, Jeong ST. Analysis of the physicochemical characteristics and sensory properties in Makgeolli. Journal of the East Asian Society of Dietary Life, 10:497-499 (2017).
133. Kim JY, Yi YH. pH, acidity, color, amino acids, reducing sugars, total sugars, and alcohol in puffed millet powder containing millet Takju during fermentation. Korean Journal of Food Science and Technology, 6:727-732 (2010).
134. Kim SJ. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from kimchi. Journal of The Korean Society of Food Culture, 3:337-340 (2005).
135. Kim WJ, Kim KK, Lee JH, Park DW. Identification of potential species-specific marker in several fish species by RAPD using universal rice primers. Journal of the Korean Society of Fisheries Technology, 36:317-320 (2003).
136. Koch E, Song K, Osborn TC, Williams PH. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 4:341-349 (1991).
137. Koeth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. Genome Research, 5:408-418 (1995).
138. Kong TI, Lee SH, Cheong C. Quality characteristics of Cheongju by yeast strains and fermentation conditions. Food Science and Biotechnology, 2:736-738 (2015).
139. Korber B. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Computational analysis of HIV molecular sequences, dordrecht, netherlands, and Kluwer. Academic Publishers. Learn(eds). Chapter 4, pp. 55-72 (2000).
140. Korpela R, Moilanen E, Saxelin M, Vapaatalo H. *Lactobacillus rhamnosus* GG(ATCC 53103) and platelet aggregation *in vitro*. International Journal of Food Microbiology, 37:83-86 (1997)
141. Kostman JR, Elliot TD, Lipuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. Journal

- of Clinical Microbiology, 30:2084–2087 (1992).
142. Krizova J, Spanova A, Rittich B. RAPD and rep PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. Folia Microbiologica, 53:99–104 (2008).
 143. Kwon GH, Lee HA, Park JY, Km JS, Lim J, Park CS, Kwon DY, Kim YS, Kim JH. Development of a RAPD–PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. International Journal of Food Microbiology, 129:282–287 (2009).
 144. Kwon YH, Jo SJ, Kim JH, Ahn BH. Fermentation characteristics and volatile compounds in Yakju made with various brewing conditions: Glutinous rice and pre-treatment. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1:46–52 (2010).
 145. Lankaputhra W E V, Shah NP. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. Mutation Research, 197:169–182 (1998).
 146. Laulund S, Wind A, Derkx Patrick MF, Zuliani V. Regulatory and safety requirements for food cultures. Microorganisms, 5:28 (2017).
 147. Lee AR, Kang SH, Kim HR, Lee JE, Kim. Quality characteristics of distilled spirits by different Nuruk-derived yeast. Korean Journal of Food Science and Technology, 4:383–389 (2017).
 148. Lee DH, Lee JW, Lee YS, Seo JS, Park IT. Fermentation characteristics for preparation of distilled liquor made of mixed grains. Korean Journal of Food Science and Technology, 4:446–455 (2014).
 149. Lee DH, Hong JH. Physicochemical properties and antioxidant activities of fermented mulberry by lactic acid bacteria, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 45: 202–208 (2016).
 150. Lee DH, Lee YS, Seo JS, Won SY, Cho CH, Park IT, Kim TW, Kim JH. Qualities of distilled liquor using *Saccharomyces cerevisiae* 88–4 separated from traditional Nuruk. Korean Journal of Food Science and Technology, 3:279–285 (2017).
 151. Lee HJ, Suh YK, Shin JS, Goh JS, Kwak HS. Changes of quality in stirred yogurt during storage at various conditions of temperature and shaking. Korean Society of Food Science and Technology, 8:353–360 (1992).
 152. Lee HJ, Pak HO, Lee JM. Fermentation properties of yogurt added with rice bran. Korean Journal of Food and Cookery Science, 4:488–494 (2006).
 153. Lee HS, Lee TS, Noh BS. Volatile flavor components in the mashes of Takju prepared using different yeasts. Korea Society of Food Science and Technology, 6:593–599 (2006).
 154. Lee JS, Damt D, Lee EJ, Hossain MA, Belew S, Kim JY, Rhee MH, Kim JC, Park SC. Evaluation and characterization of a novel probiotic *Lactobacillus pentosus* PL11 isolated from Japanese eel (*Anguilla japonica*) for its use in aquaculture. Aquaculture Nutrition, 21:444–456 (2015).
 155. Lee JS, Lee TS, Choi JY, Lee DS. Volatile flavor components in mash of

- nonglutinous rice Takju during fermentation. Journal of the Korean Chemical Society, 39:316-323 (2016).
156. Lee KH, Cho SH. Effect of the combined fermentation with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* on the quality improvement of Doenjaang Meju. Journal of Agriculture and Life Science, 1:9-21 (2003).
 157. Lee SM, Han HY, Lee SJ. Volatile compounds in Takju(rice wine) using different types of fermentation starters. Food Engineering Progress, 4:348-354 (2014).
 158. Lee SY. Development of animal model of food allergy and its application. Korean Journal of Pediatrics, 44:340-348 (2001).
 159. Lee SY, Eom JS, Choi HS. Quality characteristics of fermented soybean products by *Bacillus* sp. isolated from traditional soybean paste. Korean Society of Food Science and Nutrition, 5:756-762 (2014).
 160. Leong PK, Chiu PY, Leung HY, Ko KM. Cytochrome P-450-catalyzed reactive oxygen species production mediates the Schisandrin B-induced glutathione and heat shock responses in AML 12 hepatocytes. Cell Biology International, 36:321-326 (2012).
 161. Leuschner RGK, Robinson TP, Hugas M, Cocconcelli PS, Richard-Forget F, Klein G, Licht TR, Nguyen-The C, Querol A, Richardson M, Suarez JE, Thrane U, Vlck JM, Wright AV. Qualified presumption of safety (QPS): A generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). Trends in Food Science and Technology, 21:425-435 (2010).
 162. Lim EM, Lee JY, Elgabbar M A A, Han KH, Lee BS, Cho YS, Kim HY. Identification and characterization of *Aspergillus oryzae* isolated from soybean products in Sunchang country. The Korean Journal of Mycology, 42:282-288 (2014).
 163. Lim ES. Effect of green tea supplementation on probiotic potential, physico-chemical, and functional properties of yogurt. Korean Journal of Microbiology, 2:103-117 (2017).
 164. Lim YS, Kim SY, Lee SK. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Kefir made of goat milk. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 1:82-90 (2008).
 165. Lim YS, Lee SY. Characteristics of cow milk and goat milk yogurt fermented by *Streptococcus thermophilus* LFG isolated from Kefir. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 6:787-795 (2013).
 166. Liu KX, Kato Y, Kaku TI, Santa T, Imai K, Yagi A, Ishizu T, Sugiyama Y. Hydroxyprolylserine derivatives JBP923 and JBP485 exhibit the anti-hepatitis activities after gastrointestinal absorption in rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 294:510-515 (2000).
 167. Lortal S, Rouault A, Guezenc S, Gautier M. *Lactobacillus helveticus*: Strain typing and genomic size estimation by pulsed field gel electrophoresis. Current

Microbiology, 34:180–185 (1997).

168. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Pathovar-specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* strains generated with repetitive sequences and the polymerase chain reaction (rep-PCR). *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2286–2295 (1994).
169. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2286–2295 (1994).
170. Lupski JR, Weinstock GM. Short and interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174:4525–4529 (1992).
171. Mack DR. D(-)-Lactic acid-producing probiotics, D(-)-lactic acidosis, and infants. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Nov:671–675 (2004).
172. Madslie EH, Olsen JS, Granum PE, Blatny JM. Genotyping of *Bacillus licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. *BMC Microbiology*, 12:230–237 (2012).
173. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Paviova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Griqoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Haung K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:15611–15616 (2006).
174. Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2:323–327 (1999).
175. Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 20:3479–3483 (1992).
176. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Tumer RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28:412–419 (1985).
177. McCartney A. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88:S29–37 (2002).
178. McDaniel J, Pillai SD. Gel alignment and band scoring for DNA fingerprinting using adobe photoshop. *BioTechniques*, 32:120–122 (2002).

179. McLellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ. Fluorimetric assay of D-lactate. *Analytical Biochemistry*, 206:12-16 (1992).
180. Meslier V, Loux V, Renault P. Genome sequence of *Leuconostoc pseudomesenteroides* strain 4882 isolated from a dairy starter culture. *Journal of Bacteriology*, 194:696-712 (2012).
181. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428 (1959).
182. Min KA, Chung. Yogurt Production using exopolysaccharide-producing *Leuconostoc* and *Weissella* isolates from kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 3:231-240 (2016).
183. Moore PD, Yedjou CG, Tchounwou PB. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental Toxicology*, 25:221-226 (2010).
184. Mora A, Leon SL, Blanco M, Blanco JE, Lopez C, Dahbi G, Echeita A, Gonzalez EA, Blanco J. Phage types, virulence genes, and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima(Peru). *International Journal of Food Microbiology*, 114:204-210 (2007).
185. Muñoz R, Gómez A, Robles V, Rodríguez P, Cebollero E, Tabera L, Carrascosa AV, Gonzalez R. Multilocus sequence typing of oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology*, 26:841-846 (2009).
186. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695-700 (1993)
187. Nampoothiri KM, Sococol C, Pandey A. Alpha-Amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *Journal of scientific and industrial research*, 66:621-626 (2007).
188. Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schellemborg D, Gascon J, Vila J. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara. Tanzania. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:3113-3117 (1999).
189. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition*, 130:3122S-3126S (2000).
190. Oberto J. SyntTax: A web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics*, 14:4 (2013).
191. Olson MV. Separation of large DNA molecules by pulsed field gel electrophoresis: A review of the basic phenomenology. *Journal of Chromatography*, 470:377-383 (1989).

192. O'Sullivan DJ. Methods for analysis of the intestinal microflora: A critical review. Norfolk (UK): Horizon Scientific Press (1999).
193. Paik SH, Bae HC, Nam MS. Fermentation properties of yogurt added with rice. *Journal of Animal Science and Technology*, 4:667-676 (2004).
194. Panchal CJ, Bast L, Dowhanick T, Stewart GG. A rapid, simple, and reliable method of differentiating brewing yeast strains based on DNA restriction patterns. *Journal of the Institute of Brewing*, 93:325-327 (1987).
195. Paranthaman R, Alagusndarum K, Indhumathi J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3:308-312 (2009).
196. Park JG, Song WH, Hong SM, Kim CH. Production of flavor compounds in fermented milk by *Lactobacillus acidophilus* isolated from breast-fed infants. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 5:596-608 (2008).
197. Park JH, Bae SM, Yook C, Kim JS. Fermentation characteristics of Takju prepared with old rice. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 4:609-615 (2004).
198. Park MJ, Kim HK, Choi KK, Koo BY, Lee SK. Fermentation characteristics of Makgeolli containing aronia(*Aronia melanocarpa*, black chokeberry). *Korean Journal of Food Science and Technology*, 1:27-35 (2016).
199. Park NY, Lee SH. Fermentative characteristics of yogurt using lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food. *Korean Journal of Food Preservation*, 5:707-713 (2017).
200. Parolo CCF, Do T, Henssge U, Alves LS, de Santana Giongo FCM, Corcao G, Maltz M, Beighton D. Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 111:105-113 (2011).
201. Philippe M. Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*, 17:732-740 (2003).
202. Praakle-Amin K, Roasto M, Korkeala H, Hanninen ML. PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. *International Journal of Food Microbiology*, 114:105-112 (2007).
203. Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 101:2512-2517 (2004).
204. PubMLST. Databases hosted on PubMLST. Available from: <http://pubMLst.org/>. Accessed Apr. 05, 2015.
205. Rademaker JLW, Louws FJ, de Bruijn FJ. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: *Molecular*

- Microbial Ecology Manual, supplement 3, Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds.), Dordrecht, Kluwer, pp. 1-26 (1998).
206. Raftis EJ, Salvetti E, Torriani S, Felis GE, O'Toole PW. Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:954-965 (2011).
 207. Ramachandran P, Lacher DW, Pfeiler EA, Elkins CA. Development of a tiered multilocus sequence typing scheme for members of the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:7220-7228 (2013).
 208. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, Koskela M. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clinical Infectious Diseases*, 28:1159-1160 (1999).
 209. Rea S, Storani G, Mascaro N, Stocchi R, Loschi AR. Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. *Food Control*, 20: 515-520 (2009)
 210. Reeson AF, Jankovic T, Kasper ML, Rogers S, Austin AD. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Molecular Biology*, 12:85-91 (2003).
 211. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, (2001).
 212. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London Ontario, Canada, (2002).
 213. Richard B, Groisillier A, Badet C, Dorignac G, Lonvaud-Funel A. Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a specific probe. *Research in Microbiology*, 152:157-165 (2001).
 214. Roy D, Ward P, Champagne G. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 29:11-29 (1996).
 215. Roy D, Ward P, Vincent D, Mondou F. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Current Microbiology*, 40:40-46 (2000).
 216. Ruan P, Gong Z, Zhang Q. Changes in plasma D(-)-lactate, di-amine oxidase and endotoxin in patients with liver cirrhosis. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 3:58-61 (2004).
 217. Ruland K, Wenzel R, Herrmann R. Analysis of three different repeated DNA elements present in the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*: Size, number, and distribution on the genome. *Nucleic Acids Research*, 18:6311-6317 (1990).
 218. Sadowsky MJ, Hur HG. Use of endogenous repeated sequences to fingerprint bacterial genomic DNA. *Bacterial genomes: Structure and analysis*. In: Lupski JR, Weinstock G, de Bruijn FJ (eds.), Chapman and Hall, New York, NY, pp. 399-413 (1998).

219. Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40:2689–2694 (2005).
220. Santiago R-M, Martin A, Benito M J, Nevado F P, Corodoba M G. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat science*, 80:715–721 (2008).
221. Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:14422–14427 (2002).
222. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 25:675–679 (1987).
223. Sechi LA, Zanetti S, Dupre I, Delogu G, Fadda G. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:128–132 (1998).
224. Seo S, Gwon HB. A metabolite of daidzein, 6, 7, 4' trihydroxyisoflavone suppresses adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes via ATP competitive inhibition of PI3K. *Molecular Nutrition and Food Research*, 7:1446–1455 (2013).
225. Serwecinska L, Cieslikowski T, Pytlos M, Jaworski A, Kaca W. Genomic fingerprinting of *Proteus* species using repetitive sequence based PCR(rep-PCR). *Acta Microbiologica Polonica*, 47:313–319 (1998).
226. Shafique S, Bajwa R, Shafique S. Screening of *Apergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. *Pakistan Journal of Botany*, 2:897–905 (2009).
227. Shao Y, Zhang W, Guo H, Pan L, Zhang H, Sun T. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 50:250–258 (2015).
228. Sheedy JR, Wettenhall RE, Scanion D, Gooley PR, Lewis DP, McGregor N, Stapleton DI, Butt HL, De Meirleir KL. Increased D-lactic acid intestinal bacteria in patients with chronic fatigue syndrome. *In Vivo*, 23:621–628 (2009).
229. Shin MG. Production of spherical granule type yogurt with improving convenience and preservation. *The Korean Journal of Food Preservation*, 5:559–564 (2017).
230. Siezen RJ, Johan ET, Vlieg H. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10:S3 (2011).
231. Sivakumar S. Production and characterization of an acid protease from a local *Aspergillus* sp. by solid substrate fermentation. *Archives of Applied Science Research*, 1:188–199 (2012).
232. So MH. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat

- flour Nuruk by *Aspergillus oryzae* L2. The Korean Journal of Food And Nutrition, 2:89-95 (1993).
233. So MH, Lee YS, Han SH, Noh WS. Analysis of major flavor compounds in Takju mash brewed with a modified Nuruk. The Korean Journal of Food and Nutrition, 12:421-426 (1999).
234. So MH, Lee YS. Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of saccharifying amylase during the preparation of rice Koji. The Korean Journal of Food and Nutrition, 4:644-649 (2009).
235. Sohier D, Coulon J, Lonvaud-Funel A. Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*. International Journal of Systematic and Bacteriology, 49:1075-1081 (1999).
236. Spinosa MR, Wallet F, Courcol RJ, Oggioni MR. The trouble in tracing opportunistic pathogens: Cholangitis due to *Bacillus* in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic. Microbiology Ecology in Health and Disease, 12:99-101 (2000).
237. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 52:1043-1047 (2002).
238. Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences, a major component of the bacterial genome. Cell, 37:1015-1026 (1984).
239. Stumvoll, M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Järvinen H, Van Haeften T, Renn W, Gerich J. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. Diabetes Care, 23:295-301 (2000).
240. Suleimenova Z, Rakhmentova ZH, Zhakipbeknova A. Screening of *Aspergillus oryzae* M/4 for extra cellular alpha-amylase production. International Journal of Engineering Research and Application, 6:55-57 (2017).
241. Sullam PM, Valone FH, Mills J. Mechanisms of platelet aggregation by viridans group streptococci. Infection and Immunity, 55:1743-1750 (1987).
242. Sun Z, Liu W, Song Y, Xu H, Yu J, Bilige M, Zhang H, Chen Y. Population structure of *Lactobacillus helveticus* isolates from naturally fermented dairy products based on multilocus sequence typing. Journal of Dairy Science, 98:2962-2972 (2015).
243. Sung SM, Choi HY. Effect of mulberry powder on antioxidant activities and quality characteristics of yogurt. The Korean Society of Food Science and Nutrition, 5:690-697 (2014).
244. Tafvizi F, Ebrahimi MT. Application of repetitive extragenic palindromic elements based on PCR in detection of genetic relationship of lactic acid bacteria species

- isolated from traditional fermented food products. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17:87–98 (2015).
245. Takahashi T, Morotomi M. Absence of cholic acid 7 α -dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Journal of Dairy Science*, 77:3275–3286 (1944).
246. Tanigawa K, Watanabe K. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiology*, 157:727–738 (2011).
247. Temmerman R, Huys G, Swings J. Identification of lactic acid bacteria: Culture dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 15:348–349 (2004).
248. Thomas LA, King A, French GL, Murphy GM, Dowling RH. Cholyglycine hydrolase and 7 α -dehydroxylase optimum assay conditions *in vitro* and caecal enzyme activities *ex vivo*. *Clinica Chimica Acta*, 268:61–72 (1997).
249. Tomlins KI, Baker DM, McDowll IJ. HPLC method for the analysis of organic acids, sugars, and alcohol in extracts of fermenting cocoa beans. *Chromatographia*, 11–12:557–561 (1990).
250. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:4351–4356 (1999).
251. Turner RC, Levy JC, Rudenski AS, Hammersley M, Page R. Measurement of insulin resistance and beta-cell function: The HOMA and CIGMA approach. *Current Topics in Diabetes Research*, 4:66–75 (1993).
252. Tynkkynen S, Satokari R, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Saxelin M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3908–3914 (1999).
253. van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, van de Lisdonk EH, Rutten GE, van Weel C. α -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes results from a cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 28:154–163 (2005).
254. van de Laar FA. Alpha-Glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4:1189–1195 (2008).
255. van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: Comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:342–349 (1999).
256. Ventura M, Zink R. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 217:141–154 (2002).

257. Vero LD, Gala E, Gullo M, Solieri L, Landi S, Giudici P. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*, 23:809–813 (2006).
258. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19:6823–6831 (1991).
259. Versalovic J, Schneide M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*, 5:25–40 (1994).
260. Versalovic J, de Bruijn FJ, Lupski R. Repetitive sequence-based PCR(rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: Lupski JR, Weinstock G, de Bruijn FJ(eds.), Chapman and Hall, New York, NY, pp. 437–454 (1998).
261. Vincent D, Roy D, Mondou F, Dery C. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 43:185–193 (1998).
262. Vishwanatha K S, Appu Rao A G, Singh S A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37:129–138 (2010).
263. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407–4414 (1995).
264. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Wang YS, Wen CY, Chiu TC, Yen JH. Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59:127–132 (2004).
265. Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in Molecular Biology*, 821:421–433 (2012).
266. Wang H, Peng DQ. New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids in Health and Disease*, 10:176–185 (2011).
267. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology*, 19:501–508 (2002).
268. Warden CH, Fisler JS. Comparisons of diets used in animal models of high fat feeding. *Cell Metabolism*, 7:277 (2008).
269. William JGK, Hanafey MK, Rafolski JA, Tingey SV. Genetics analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 218:704–740 (1993).
270. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53:S215–S219 (2004).

271. Woods C, Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:1927–1931 (1993).
272. Wu D, Cederbaum A. Glutathione depletion in CYP2E1-expressing liver cells induces toxicity due to the activation of p38 mitogen-activated protein kinase and reduction of nuclear factor- κ B DNA binding activity. *Molecular Pharmacology*, 66:749–760 (2004).
273. Wu J, Yang T, Wang C, Liu Q, Yao J, Sun H, Kaku T, Liu KX. Laennec protects murine from concanavalin: A-induced liver injury through inhibition of inflammatory reactions and hepatocyte apoptosis. *Biology and Pharmaceutical Bulletin*, 31:2040–2044 (2008).
274. Xu D, Pan L, Zhao H, Zhao M, Sun J, Liu D. Breeding and identification of novel Koji molds with high activity of acid protease by genome recombination between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38:1255–1265 (2011).
275. Yang SH, Seo SH, Kim SW, Choi SK, Kim DH. Effect of ginseng polysaccharide on the stability of lactic acid bacteria during freeze-drying process and storage. *Archives of Pharmacal Research*, 9:735–740 (2006).
276. Yeo SB, Yeo SH, Park HD. Quality characteristics, antioxidant activity and storage properties of fermented milk added with green tea powder. *Korean Journal of Food Preservation*, 5:576–584 (2017).
277. Yoo SK, Kang SM, Noh YS. Quality properties on soy bean pastes made with microorganism isolated from traditional soy bean pastes. *The Korean Journal of Food Science and Technology*, 32:1266–1270 (2000).
278. Yoon HH, Chae KS, Son RH, Jung JH. Antioxidant activity and fermentation characteristics of blueberry wine using traditional yeast. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 6:840–846 (2015).
279. Yu BL, Zhao SP, Hu JR. Cholesterol imbalance in adipocytes: A possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity. *Obesity Reviews*, 11:560–567 (2010).
280. Zhao D, Shah NP. Effect of tea extract on lactic acid bacterial growth, their cell surface characteristics and isoflavone bioconversion during soymilk fermentation. *Food Research International*, 62:877–885 (2014).
281. Zivanovic Y, Wincker P, Vacherie B, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H. Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 5:315–322 (2005).

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구				
	(영문) Construction of Commercial Infra for Korean Starter Culture in Food Industry				
주관연구기관	건국대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 건국대학교	
참 여 기 업	(주)셀바이오텍, (주)충무발효, (주)아람			(성명) 백 현 동	
총연구개발비 (2,670,000천원)	계	2,670,000	총 연구 기간	2014. 12. 17.~2017. 12. 16.(3년)	
	정부출연 연구개발비	2,000,000	총 참 연 구 원 수	총 인원	82
	기업부담금	670,000		내부인원	82
	연구기관부담금	-		외부인원	-

○ 연구개발 목표 및 성과

- 나고야 의정서에 따르면 유용한 동물, 식물, 미생물 등을 이용하여 제품을 생산하는 경우 원산지국과 그 이익을 공유하게 됨으로써 유용한 종균의 확보가 중요하다고 인식되어 왔음. 본 과제에서는 한국 전통 발효식품에서 분리한 균주를 확보한 후 유용한 균주를 선별하여 국내 종균을 확보하고자 함. 또한 균주 추적기술을 이용하여 제품의 해당 균주 유/무를 확인하고, 분리균주를 저장 및 보존하고, 홈페이지를 통한 균주 분양 서비스를 구축하여 민간에 분양하며 유용한 균주를 이용한 시제품 개발을 통하여 다양한 가치를 창출하고자 함.

○ 연구내용 및 결과

- 각 협동기관에서 받은 균주 6,087주에 대해 유제품, 건강기능식품, 전통발효식품 종균에 대한 후보 균주를 제공하기 위해 내산·내담즙성, 효소 생산능, 정상세포에 대한 세포독성, 장 부착능, 항생제 저항성, protease 활성, amylase 활성 평가를 통해 기초 생리활성이 뛰어난 후보균주 34주를 각 협동기관에 제공하였음.
- 향당노 효과(*in vivo* 실험을 이용한 내당능 개선 효능, 인슐린 저항성 분석), 항비만 효과(*ex vivo* 실험을 이용한 지방축적 억제능, *in vivo* 실험을 이용한 체지방 감소)가 뛰어난 *Lactobacillus plantarum* Lb41, Ln4를 선별하였음. 또한 면역활성 효과(*in vivo*를 통한 Th1/Th2 균형 조절 또는 Th2 관련 사이토카인 억제능, 식품 알레르기 억제능)가 뛰어난 *L. brevis* G1을 선별하였음.
- 발효적합성 평가를 통해 항산화 효과를 내는 펩타이드를 생산하는 요구르트용 종균인 *Lactococcus lactis* SL6, 알코올 생성능이 뛰어난 양조용 종균인 *Saccharomyces cerevisiae* SJ, TY-2, amylase 및 protease 활성이 뛰어난 전통발효식품용 종균인 *Aspergillus oryzae* CF1001를 선별하였음.

- 전통발효식품 및 프로바이오틱스 제품에 존재하는 해당 균주에 대해 MLST 분석 및 개발한 유전자 지문의 디지털 코드 작성에 의해 균주를 추적할 수가 있음을 확인하였음.
 - 전통발효식품에서 분리한 균주에 대해 동결건조 앰플 및 초저온냉동고 동결 보존 방법을 통해 이중으로 보존하였으며, 각 협동기관에서 받은 연구결과 데이터를 홈페이지를 통해 제공함으로써 균주 분양시스템을 구축하였음.
 - 참여기업을 통해 유용성이 입증된 선별된 종균을 이용한 7개의 시제품 생산을 통해 높은 수익 및 다양한 부가 가치를 창출하였음.
- 연구성과 활용실적 및 계획
- 본 연구를 통하여 특허출원 15건, 특허등록 3건, 품종등록 6,087건, SCI급 논문 12건, 비SCI급 논문 3건, 국내·외 학술발표 24건, 기술거래 5건, 보고서 8건, 시제품 7건, 산업화 1건, 인력양성 19건, 홍보전시 8건, 기타 1건을 발생시킴으로써 기존 목표이상의 성과를 달성함. 본 연구의 성과를 통해 기업에서는 우수한 종균을 이용한 다양한 제품을 생산하여 고부가가치를 창출하고, 수입 종균에 대해 상당부분 대체함으로써 기업의 이익을 증가시킬 수 있을 것으로 기대됨.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	314073-3	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	식품/식품공학/식품미생물·발효			과제구분	지정공모과제
사업명	고부가가치식품기술개발사업				농림식품기술 기획평가원
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	식품산업 활용 중군의 상용화를 위한 기반구축 연구			과제유형	기초
연구기관	건국대학교 산학협력단			연구책임자	백현동
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.12.17.~2015.12.16.	800,000	270,000	1,070,000
	2차년도	2015.12.17.~2016.12.16.	600,000	200,000	800,000
	3차년도	2016.12.17.~2017.12.16.	600,000	200,000	800,000
	4차년도				
	5차년도				
계			2,000,000	670,000	2,670,000
참여기업	(주)셀바이오텍, (주)충무발효, (주)아람				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 01. 22.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교	교수	백현동

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

본 과제에서는 한국 전통 발효식품에서 다양한 균주를 확보하고, 기초 생리활성, 기능성, 안전성, 발효 적합성 평가를 통해 선별된 유용 종균을 확인하여 배양공정을 통해 제품화하여 수입종균에 대체할 수 있는 유용한 종균을 이용한 제품을 개발함. 또한 제품에 포함된 균주의 존재를 개발한 방법을 통해 확인하고, 최적의 저장방법을 통해 분리균주를 저장하고, 균주 데이터베이스를 통한 홈페이지를 통해 균주 분양시스템을 구축하였음. 이러한 종합적인 한국형 종균에 대한 연구결과들이 학계 및 산업계에 큰 영향을 끼칠 것으로 사료됨. 한국형 종균의 기반 연구로서 큰 성과를 얻었음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

현재 식품에 활용되고 있는 종균의 대부분은 외국에 수입하고 있는 실정이므로 종균 수입에 의한 손실이 발생되고 있음. 본 연구를 통해 개발한 유용 종균을 활용하는 기업이 늘어날수록 국내기업의 종균 수입에 의한 손실을 막고, 이익이 증대될 것으로 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

최근 들어 종균에 관한 연구는 국내·외에서 활발하게 진행되고 있으며 종균 시장의 매출 및 생산량이 꾸준히 증가되고 있음. 본 연구를 통해 한국 전통 발효식품에서 분리한 유용 종균의 우수함을 검증하였으며 산업적으로 적용할 시 문제가 없음을 확인함. 유용 종균의 제품 적용은 기존의 종균 수입을 대체할 수 있을 것으로 예상됨. 또한 우수 종균을 활용한 연구들이 특허 및 논문을 근거로 국내·외 시장에서 활용되리라 판단됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

연구개발 기간동안 매년 수차례 정기 및 상시 과제 회의를 가졌으며, 한국 전통 발효식품에서 분리한 종균의 우수성을 검증하여 시제품을 개발하였음. 참여기업들은 종균의 제품화를 통해 판매실적 및 고용창출을 통해 경제 발전에 기여함. 또한 연구 개발을 위해 국내·외 다양한 학술대회 참석을 통해 최신 연구 동향을 파악하여 연구 수행에 성실히 임하였다고 생각됨. 이러한 결과로 계획된 연구성과를 초과 달성하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

본 연구기간동안 총 특허출원 10건, 특허등록 3건, 품종등록 6,087건, SCI급 논문 12건, 비SCI급 논문 3건, 국내·외 학술발표 28건을 진행함. 군주 데이터를 분양 홈페이지에 기재함으로써 민간에게 분양할 수 있는 기반을 구축하고, 제품화를 통해 매출 창출 및 고용 창출 등을 초과 달성함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
식품 산업용 균주 연구를 위한 농산물 매개물 및 자연 환경 유 래 유용 미생물 확보, 스크리닝 툴의 개발과 가이드라인 구축	15	100	균주를 확보하고, 스크리닝 도 구를 개발하였으며 유용 종균 을 각 협동기관에 제공함.
식품 산업용 균주의 안전성 및 기능성 평가시스템 구축	24	100	안전성 및 기능성 평가를 통해 기능성 관련 유용 종균을 선별 함.
식품 산업용 균주의 용도별 발 효 적합성 평가시스템 구축	9	100	발효 적합성 평가를 통해 발효 관련 유용 종균을 선별함.
식품 산업용 균주 추적기술 개 발	10	100	개발한 균주의 유전자 지문 분 석을 통해 제품의 존재 유/무 를 확인함.
식품 산업용 균주 데이터베이스 및 분양기반 구축	13	100	각 협동기관에서 제공받은 균 주 데이터베이스를 이용한 홈 페이지를 통해 민간에게 정보 를 제공하고 균주를 분양함.
식품 산업용 균주 고농도 배양 기술 확보 및 충격 조건 도구 구축 및 사업화	13	300	고농도 배양 및 충격 조건 연 구를 통해 적합한 조건을 정립 한 후 제품화하여 시제품 1건 이 목표였으나 3건으로 초과 달성함.
전통발효식품용 종균의 생산 환 경 및 제품 적합성 시스템 구축	8	100	개발한 전통발효식품용 종균을 이용하여 목표인 시제품 2건 및 매출실적을 달성함.
건강기능식품용 종균의 생산 환 경 및 제품 적합성 시스템 구축	8	100	개발한 건강기능식품용 종균을 이용하여 목표인 시제품 2건을 달성함.
합계	100점	125	본 연구과제 수행한 결과 125%의 초과 달성도를 기록함.

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구개발 기간동안 한국 전통 발효식품에서 분리한 균주에 대해 기초 생리활성, 안전성, 기능성, 발효 적합성에 대한 본 과제에서 예정되었던 것을 검증하였으며 유전자 지문 추적기술을 통해 개발한 종균의 존재 유무를 확인할 수 있었음. 또한 분리균주 저장 및 각 협동기관에서 제공받은 균주 데이터를 활용하여 홈페이지 구축을 통해 분양 서비스를 제공하고, 유용 종균을 이용한 제품 개발 및 매출 창출을 달성함. 본 연구를 통해 수입종균을 대체할 수 있는 다수의 국내 종균을 확보를 통해 고부가가치 기술을 개발하였다고 생각됨. 또한 본 연구의 성과를 통해 수입에 의존하던 종균을 상당부분 대체할 수 있는 국내 종균의 개발로 인해 기업의 이익을 증대시킬 수 있다고 생각되며 성공적인 과제 수행으로 판단됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

최초 목표로 하였던 SCI급 논문 8건, 비SCI급 논문 2건, 국내·외 학술발표 10건, 지적재산권 11건을 초과 달성하여 SCI논문 12건, 비SCI논문 3건, 국내·외 학술발표 28건, 지적재산권 16건을 달성함. 해외 및 국내 학술대회 참가를 통해 개발한 우수한 종균의 우수성을 알렸으며 제품 개발을 통해 경제 활성화에 기여하며 연구 목표 계획을 초과하는 125%의 연구목표를 달성함. 목표의 달성(품종등록 6,087건, 매출달성 1,848,000원, 고용창출 3건)에 대해서 긍정적인 평가를 요청함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

^품본 연구를 통해 한국 전통 발효식품에서 분리한 종균의 우수함을 확인함. 6,087주의 균주를 확보함으로써 추가적인 종균의 활용도의 다양성을 고려하여 추후 후속 연구가 필요하다고 생각됨. 연구개발 기간동안 기초 생리활성, 기능성, 발효 적합성이 뛰어난 종균을 이용한 제품화를 통해 국내 및 해외 시장으로의 판매를 통해 매출 확대가 기대됨. 또한 본 연구를 통해 종균 수입에 의존하던 국내기업이 과제를 통해 개발한 종균을 이용하여 경제 발전에 기여하는 기회가 될 것임. 또한 분리된 균주를 균주 보존기관에서의 분양을 통해 균주의 산업화 및 연구가 지속적으로 진행될 수 있다고 생각됨.

IV. 보안성 검토

해당 사항 없음.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	고부가가치식품기술개발사업	
연구과제명	식품산업 활용 종균의 상용화를 위한 기반구축 연구			
주관연구기관	건국대학교 산학협력단	주관연구책임자	백현동	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	2,000,000	670,000	-	2,670,000
연구개발기간	2014. 12. 17. ~ 2017. 12. 16.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용(사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
식품 산업용 균주 연구를 위한 농산물 매개물 및 자연 환경 유래 유용 미생물 확보, 스크리닝 툴의 개발과 가이드라인 구축	한국 전통 발효식품에서 분리한 6,087주에 대해 스크리닝 방법을 통해 기초생리활성이 우수한 균주 34주를 각 협동기관에 제공하였음.
식품 산업용 균주의 안전성 및 기능성 평가 시스템 구축	항비만, 항당뇨, 면역 활성, 간 기능 개선 등의 기능성 평가를 통해 건강 기능 식품용으로 활용 가능한 종균(<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb41, <i>L. plantarum</i> Ln4, <i>L. brevis</i> G1) 3주를 선별하였음.
식품 산업용 균주의 용도별 발효 적합성 평가시스템 구축	요구르트, 양조, 전통발효식품용 발효 적합성 평가를 통해 유제품 및 전통발효식품용으로 활용 가능한 종균(<i>Lactococcus lactis</i> SL6, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SJ, TY-2, <i>Aspergillus oryzae</i> CF1001) 3주를 선별하였음.
식품 산업용 균주 추적기술 개발	개발한 종균을 이용한 제품에 대해 유전자 지문 분석을 이용한 균주 추적 기술을 통해

	해당 종균을 확인하였음.
식품 산업용 균주 데이터베이스 및 분양기반 구축	각 협동기관에서 받은 균주 데이터베이스를 기초로 하여 제작한 홈페이지를 통해 민간에게 정보를 제공하고, 균주를 분양해주는 서비스를 제공하였으며 균주 보존 기술을 이용하여 주관기관과 함께 이중 보존을 통해 균주를 안전하게 보존하였음.
식품 산업용 균주 고농도 배양 기술 확보 및 충격 조건 도구 구축 및 사업화	고농도 배양 및 충격 조건 확립을 통해 최적의 배양 및 충격 조건 및 위생 시스템을 구축하였으며 선별된 종균을 이용해 Lb41, Ln4, G1 원말 제품을 제조하였음.
전통발효식품용 종균의 생산 환경 및 제품 적합성 시스템 구축	효소활성이 우수하여 선별된 종균을 이용해 황국, 충무종 효모 제품을 제조하였고, 매출 실적 1,848,000원을 달성하였음.
건강기능식품용 종균의 생산 환경 및 제품 적합성 시스템 구축	프로바이오틱스 특성이 우수하여 선별된 종균을 이용해 락토랑 Y(스틱형), 락토랑 Y(타정형) 제품을 제조하였음.

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 이전	사업화						기술 인증	학술성과			보고서	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록		건수	제품화	매출액 (백만원)	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
				SCI							비SCI								
최종목표	10	1	-	5	5	-	-	-	-	-	8	2	10	7	18	-	7	1	
연구기간 내 달성실적	15	3	6,087 (*)	5	7	1,848 (*)	-	3 (*)	-	-	13	3	28	8	19	-	8	1	
달성율 (%)	150	300		100	140		-		-	-	162	150	280	115	106	-	115	100	

* 목표 외 달성: 품종등록 6,087건, 매출액 1,848,000원, 고용창출 3건

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	전통발효식품 분리균주의 효소활성 측정에 관한 기술
②	전통발효식품 유래 프로바이오틱 분리 및 특성에 관한 기술
③	김치유산균 락토바실러스 플란타럼 Lb41에 관한 기술
④	김치유산균 락토바실러스 브레비스 G1에 관한 기술
⑤	곰팡이균 고상발효 적합성 분석에 관한 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v	v		
②의 기술		v					v	v		
③의 기술	v					v	v			
④의 기술	v					v	v			
⑤의 기술		v					v	v		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과 활용계획 및 기대효과
①의 기술	상업용 균주랑 비교할 때 해당 균주의 발효 특성이 우수한지 확인하는데 활용될 수 있으며 제품으로 활용 가능할지에 대한 평가기준을 정립하는데 활용될 수 있음.
②의 기술	상업용 균주랑 비교할 때 해당 균주의 프로바이오틱스 특성이 우수한지 확인하는데 활용될 수 있으며 제품으로 활용 가능할지에 대한 평가기준을 정립하는데 활용될 수 있음.
③의 기술	<i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 관련 항비만 및 항당뇨 실험을 통해 기능성이 증명된 종균을 이용해 프로바이오틱스 제품을 제조하고, 기존 수입 관련 종균을 상당한 부분 대체할 수 있음.
④의 기술	<i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 관련 알레르기 완화 실험을 통해 기능성이 증명된 종균을 이용해 프로바이오틱스 제품을 제조하고, 기존 수입 관련 종균을 상당한 부분 대체할 수 있음.

⑤의 기술	곰팡이용 고상발효 적합성 평가에 관한 기술이전을 통해 평가 기준을 정립하고, 고상발효에 적합한 곰팡이를 선별하는데 활용될 수 있음.
-------	---

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표									연구기반지표								
	지식 재산권			기술이전 건수	사업화					기술인증	학술성과			보고서	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록		제품화	매출액 (백만원)	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
				SCI						비SCI								
최종목표	10	1	-	5	5	-	-	-	-	-	8	2	10	7	18	-	7	1
연구기간 내 달성실적	15	1	6,087 (*)	5	7	1,848 (*)	-	3 (*)	-	-	13	3	28	8	19	-	8	1
연구종료 후 성과창출 계획		6	건 예정		2	건 예정					4	건 예정						

※ 목표 외 달성: 품종등록 6,087건, 매출액 1,848,000원, 고용창출 3건

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	전통발효식품 분리균주의 효소활성 측정에 관한 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	-
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		

핵심기술명 ¹⁾	전통발효식품 유래 프로바이오틱 분리 및 특성에 관한 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료	30,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	-
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		

핵심기술명 ¹⁾	김치유산균 락토바실러스 플란타럼 Lb41에 관한 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	2018년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		

핵심기술명 ¹⁾	김치유산균 락토바실러스 브레비스 G1에 관한 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	2019년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		

핵심기술명 ¹⁾	곰팡이균 고상발효 적합성 분석에 관한 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료	2,200 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	2017년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		