

11-1543
000-002
280-01

발간등록번호
11-1543000-002280-01

미생물 유전체 기술 활용 항비만 프로바이오틱스 개발 및 기능성 식품 산업화 최종 보고서

2018
농림축산식품부

포스트게놈 다부처 유전체 사업 R&D Report

미생물 유전체 기술
활용한 항비만
프로바이오틱스 개발 및
기능성식품 산업화
최종보고서

2018 . 06. 21.

주관연구기관 / (주)종근당바이오
제1협동연구기관 / 한국식품연구원
제2협동연구기관 / 한동대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 유전체 기술 활용한 항비만 프로바이오틱스 개발 및 기능성식품 산업화”(개발기간 : 2016. 02. 29. ~ 2018 . 02. 28.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 06. 21.

주관연구기관명 : (주)중근당바이오 (대표자) 이정진 (인)
제1 협동연구기관명 : 한국식품연구원 한국식품연구원장 (인)
제2 협동연구기관명 : 한동대학교산학협력단 (대표자) 이재영 (인)

주관연구책임자 : 최인석

제1 협동연구책임자 : 임상동

제2 협동연구책임자 : Wilhelm Holzapfel

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	916002-02-1-CG000	해당 단계 연구 기간	2016. 02. 29. ~ 2018. 02. 28.	단계 구분	(2단계)/ (총 2 단계)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	포스트게놈 다부처 유전체 사업			
연구과제명	대과제명	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단			
	세부과제명	미생물 유전체 기술 활용한 항비만 프로바이오틱스 개발 및 기능성 식품 산업화			
연구책임자	최인석	해당단계 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 7명 외부: 11명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000 천원 민간: 133,400 천원 계: 200,000 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 7명 외부: 11명	총연구개발비	정부: 400,000 천원 민간: 266,800 천원 계: 666,800 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)중근당바이오 중앙연구소			참여기업명 한국식품연구원 한동대학교 산학협력단	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> o <i>In vitro</i> 스크리닝 통한 기능성 균주 선발 o 동물실험 모델 활용한 항비만 기능성 평가 o NGS 분석을 통한 유전자 정보 확보 o 배양, 코팅 및 원말 제조공정 개발 o 원말 제조 및 안정성 테스트 o 산업화 진행 o 인체 적용 시험 준비 				87 pages	

<요 약 문>

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ NGS 기반 유전체 분석기술을 활용한 건강기능성 프로바이오틱스 미생물 소재 개발 및 기능성식품 산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 항비만 기능성 균주 라이브러리 구축 및 기능성 확인 - 선별 균주에 따른 유전체 해독 및 분석 통한 기능성 메커니즘 규명 - 프로바이오틱스의 대량 생산 및 제품화 ○ 항비만 젖산균주 선별, 기능성 확인 및 최적 배양조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> 모델 활용한 항비만 기능성 균주 라이브러리 구축 - <i>In vivo</i> 모델 활용한 항비만 기능성 확인 - 배양 조건 및 제조공정 확립 (코팅, 동결건조 조건) - 대용량 탱크 scale up 적용 완료 (배양, 코팅 및 동결건조 조건) 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> 스크리닝 통한 기능성 균주 선별 <ul style="list-style-type: none"> - lipase, α-amylase, α-glucosidase 효소 활성 저해능 평가를 통한 기능성 균주 8개 확보 - 3T3-L1 cell line 이용 anti-adipogenetic activity 측정 - <i>in vitro</i> fermentation 통한 항비만 기능성 프로바이오틱스 균주 최종 선별 ○ 동물실험 모델 활용한 항비만 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vivo</i> 기능성 평가를 위한 최적 식이조제 및 동물모델 구축 완료 - 최종 선별 프로바이오틱스 (<i>L. plantarum</i> 5종)의 항비만 기능성 확인 - NGS 분석을 통하여, 장내 균총 변화 확인 및 항비만 균주들의 전장 유전체 정보 확보 ○ 배양, 코팅 및 원말 제조공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 자체보유 유산균 활용한 배양 및 scale-up 최적화 완료 및 후보균주 배양최적화 - 원심분리 및 원말 제조공정 개발 - 최종 선별 프로바이오틱스 (<i>L. plantarum</i> 5종)의 scale-up 최적화 적용 ○ 원말 제조 및 안정성 테스트 <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vivo</i> 실험 진행을 위한 후보균주 원말 제조 및 인계 - 최종 기능성 후보균주 선별 이후 안정성 테스트 - Scale-up 최적화 적용하여 대용량 원말 생산 (시제품 생산) ○ 산업화 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 사업화 진행을 위한 외부기관성적서 발행 및 품목 신고 진행 ○ 인체 적용 시험 준비 <ul style="list-style-type: none"> - 인체 적용 시험 protocol 준비 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과제 종료 후 항비만 개별인정형 프로바이오틱스 원료 등재를 위한 임상시험 추진 계획 ○ 경쟁력 있는 기능성 원료로의 승화 및 차별화 된 프로바이오틱스 제품생산과 판매 ○ 건강기능식품 원료뿐만 아니라 발효유 및 치즈 등 발효 식품에 이용 가능하므로, 농축산식품 시장의 활성화 및 제품의 다양화 ○ 청소년 및 성인의 항비만 효능을 통한 보건 향상으로 국민 생산성 증진 				
중심어	프로바이오틱스	유전체학	미생물체	항비만	제품화

〈 SUMMARY 〉

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> o Development of microbial materials for health functional probiotics using NGS-based genome analysis technology and functional food industrialization <ul style="list-style-type: none"> - Construction of an anti-obesity functional strain library and functional confirmation - Identification of functional mechanism through genetic DNA readout and analysis according to selection strains - Mass production and commercialization of probiotics o Establishment of anti-obesity probiotics and confirmation of function and setting of optimum culture condition <ul style="list-style-type: none"> - Construction of anti-obesity functional strain libraries using <i>in vitro</i> models - Identification of anti-obesity functionalities using <i>in vivo</i> model - Culture conditions and manufacturing process establishment (coating, lyophilization conditions) - Application of scale-up large capacity tank (culture, coating and freeze drying conditions) 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> o Construction of anti-obesity functional strain libraries using <i>in vitro</i> models <ul style="list-style-type: none"> - securement of functional strain by evaluating lipase, α-amylase, α-glucosidase activity inhibition - Measurement of anti-adipogenic activity using 3T3-L1 cell line - Final selection of anti-obesity functional probiotics strains through <i>in vitro</i> fermentation o Identification of anti-obesity functionalities using <i>in vivo</i> model <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of optimal dietary formulation and animal modeling for in vivo functional assessment - Identification of anti-obesity functionalities of the final screening probiotics (<i>L. plantarum</i> 5 species) - Confirmation of intestinal microflora change and obtaining whole genome information of anti-obesity strains through NGS analysis o Culture conditions and manufacturing process establishment <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of culture, scale-up optimization using company-possess probiotics and optimization of candidates culture - Development of Centrifugation and powder manufacturing process - Scale-up optimization of final selection probiotics (<i>L. plantarum</i> 5 species) o Powder manufacturing and stability testing <ul style="list-style-type: none"> - Powder preparation of candidate strains and take-over for in vivo experiments - Stability test for selection of the final functional candidate strains - Application of scale-up optimization and completion of high-volume powder production o Industrialization <ul style="list-style-type: none"> - Issuance of external agency certificate and product notification for industrialization o Preparation of clinical test <ul style="list-style-type: none"> - Preparation of clinical test protocol 		

<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> o Promoting of clinical trials for the health supplement registration of probiotics as an anti-obesity drug o Transfiguration into competitive functional probiotics and production and sales of differentiated probiotic products o Activation of agricultural and livestock food market and product diversification (fermented milk, cheese) o Improving national productivity by improving health through anti-obesity effect of adolescents and adults 				
<p>Keywords (5개 이내)</p>	<p>probiotics</p>	<p>genomics</p>	<p>microbiome</p>	<p>anti-obesity</p>	<p>commercialization</p>

< CONTENTS >

1. The outline of a study subject	7
2. Development status inside and outside of the country	8
3. Contents and results of research and development	11
4. Goal achievement and the level of contribution to the related field	73
5. Research results and application plan	75
6. Scientific technique information from foreign countries	78
7. Security level of research products	79
8. Research facility and equipment	79
9. Implementation performance of safety measure	80
10. Representative research achievement	81
11. Other detail	81
12. References	82

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	8
3. 연구수행 내용 및 결과	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	73
5. 연구결과의 활용계획 등	75
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	78
7. 연구개발성과의 보안등급	79
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	79
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	80
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	81
11. 기타사항	81
12. 참고문헌	82

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
<p>1-1. 연구개발 목적</p> <p>가. NGS 기반 유전체 분석기술을 활용한 건강기능성 프로바이오틱스 미생물 소재 개발 및 기능성식품 산업화</p> <p>(1) 항비만 기능성 균주 라이브러리 구축 및 기능성 확인</p> <p>(2) 선별 균주에 따른 유전체 해독 및 분석 통한 기능성 메커니즘 규명</p> <p>(3) 프로바이오틱스의 대량 생산 및 제품화</p> <p>1-2. 연구개발의 필요성</p> <p>가. 연구개발의 개요</p> <p>(1) 대사질환의 주요 원인 중 하나인 비만을 개선하는 효과가 우수한 프로바이오틱스 균주개발 및 제품화</p> <p>(2) 의약품과 달리 부작용이 거의 없는 기능성 프로바이오틱스 제품의 대량 생산 기술 확보</p> <p>(3) 항비만 기능성 균주 선발, NGS 활용한 장균총 및 전장 유전체 분석, <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 모델 활용한 효능 검증, 최적화 조건의 원말제조를 통한 신기능성 프로바이오틱스 제품 개발과 생산 원천기술 확보</p> <p>(4) 연구개발 결과의 논문 게재 및 특허 출원을 통한 지적재산권 확보</p> <p>나. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성</p> <p>(1) 경제적 중요성</p> <p>(가) 프로바이오틱스의 경험적 효과가 과학적 방법으로 증명되면서, 건강 기능식품시장에서 중요한 품목으로 인식</p> <p>(나) 프로바이오틱스 건강기능식품 (건기식) 시장의 급격한 성장세</p> <p>(다) 프로바이오틱스 개별인정형 제품 매출액의 증가 추세</p> <p>(라) 내수 시장의 다원화로 인한 수입단가 인하 효과 발생</p> <p>(마) 고지혈증 예방 및 치료제 개발로 인한 의약품 시장규모 확대</p> <p>(2) 산업적 중요성</p> <p>(가) 기능성 프로바이오틱스 생산 관련 원천기술 확보 및 전문인력 확보</p> <p>(나) 확보한 기술을 신규 건강기능소재 및 의약품 생산 기술 연구에 응용 연계</p> <p>(다) 신규 프로바이오틱스 제품의 상업화를 통한 국내 유산균 시장의 다변화</p> <p>(라) 의학적 효능을 가진 고부가가치 프로바이오틱스의 국내 생산 기반 구축</p> <p>(마) 신규 기능성을 갖는 미생물자원 및 생산기술의 국산화</p> <p>1-3. 연구개발 범위</p> <p>가. In vitro 스크리닝 통한 기능성 균주 탐색 및 확보</p> <p>나. 항비만 기능성 균주 in vitro 선발</p> <p>다. 비만 유도 마우스 활용한 항비만 기능성 균주의 in vivo 선발</p> <p>라. 배양 조건 최적화</p> <p>마. 코팅 기술 및 원말 제조 공정 개발</p> <p>바. 대용량 생산 설비 활용 scale up 공정 개발</p>	

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
<p>2-1. 국내 기술 수준 및 시장 현황</p> <p>가. 초기에는 배양 또는 코팅에 관한 특허 비중이 높았으나, 최근에는 기능성 유산균에 대한 특허가 주류를 이룸</p> <p>나. 2006년 이후 특허 출원 급증</p> <p>다. 국내 상위 5개 업체에서 특허의 약 70%를 보유 중이며, 균주 및 조성 특허가 약 92%를 차지함</p> <p>라. 의약적 효능을 가지는 프로바이오틱스의 개발이 중요한 사항으로 대두되고 있음 (면역활성, 장질환, 당뇨병, 아토피, 체지방 감소, 콜레스테롤 저하, 항균 활성 등)</p> <p>마. 국내 프로바이오틱스 시장 2014년 기준 1500억원 (CAGR 32.9%)이며, 2015년 시장 2000억원대 육박할 것으로 예상</p> <p>2-2. 국외 기술 수준 및 시장 현황</p> <p>가. 기능성 균주에 대한 특허가 주류를 이루며, 저장기간 및 품질 개선을 위한 연구도 진행</p> <p>나. 생리학 및 유전학적 연구결과가 많이 축적됨과 동시에 면역 활성 효과, 특정 유해균에 대한 저해 효과, 혈압강하 및 혈중 콜레스테롤 저하능 등 특수 기능에 대한 효능이 과학적으로 입증되어 상기 분야에 대한 제품화 연구가 더욱 가속화 되고 있음</p> <p>다. 국외 프로바이오틱스 시장 2014년 기준 35조원 (CAGR 12.8%)이며, 2015년 시장 60조원대에 육박할 것으로 예상</p> <p>라. 유럽, 미국, 일본 등 선진국 중심 시장이나 아시아 시장 급성장 기대되고 있음</p> <p>마. 분야별로 식품 및 음료 (91%), 식품보충제 (6%), 식품원료 (3%) 시장 형성</p> <p>2-3. 국내·외 연구 현황</p> <p>가. 장균총과 대사질환의 상관관계</p> <p>(1) 대사질환 (metabolic disorder)은 비만과 인슐린 저항성, 고지혈증, 고혈압 등이 함께 나타나는 증상으로 비만으로 인한 만성적인 염증반응과 관련이 있고, 지방조직에 염증세포의 축적이 많아지는 대사적 염증반응의 주된 과정의 하나로 대두되고 있음</p> <p>(2) 무균 마우스는 식이유도 비만에 저항성이 있으며, 정상 마우스의 장균총을 이식한 결과 지방이 축적되고 비만이 유도되었으며 이는 lipoprotein lipase inhibitor인 fasting induced adipose factor (FIAF) 발현의 감소에 의한 것임이 밝혀짐으로써 (Bäckhed 등, 2004) 장균총과 숙주 비만 간의 밀접한 관계가 있음이 증명됨</p> <p>(3) 최근의 연구결과들은 숙주 장균총과 대사질환 간의 밀접한 연관성을 보여주고 있음 (Furet 등, 2010; Greenblum 등, 2012). 특히 비만에 의해 장내 Bacteroidetes/Firmicutes 비율이 감소함이 잘 알려져 있음 (Ley 등, 2006)</p> <p>(4) BMI가 다른 쌍둥이의 분변을 두 그룹의 무균쥐에 이식한 결과 분변 제공자와 일치하는 체중 변화 패턴을 보여줌 (Ridaura 등, 2013). 즉 교란 장균총이 비만으로 인해 유발된 결과물이 아니라 비만을 유발하는 원인이 될 수 있음이 밝혀짐</p>	

- (5) 고지방식이 유도 비만 마우스는 장균총 변화로 인해 분변 내 열량이 유의적으로 높았으며 (Turnbaugh 등, 2006), 장균총과 맹장 소화물 내의 대사체 또한 유의적으로 변화됨 (Daniel 등, 2014)
- (6) 이와 같이 특정한 장균총 및 장내 대사체가 숙주 비만 및 대사질환의 핵심 인자가 될 수 있음이 밝혀지고 있음 (Delzenne 등, 2011; Turnbaugh 등, 2009). 하지만 숙주의 장균총 조절을 타겟으로 하는 선도물질 발굴은 미비한 실정임

나. 프로바이오틱스 투여에 의한 장균총 조절과 이를 통한 비만 치료

- (1) 프로바이오틱스는 숙주의 장균총 불균형을 해소하고 유익한 장균총을 조성하기 위해 사용되며 (Steer 등, 2000) 프로바이오틱스의 항비만 및 항대사질환 기능성에 대한 연구 결과가 발표되어옴
- (2) 비만 환자를 대상으로 *Lactobacillus gasseri* SBT 2055를 투여한 결과, 내장 및 피하지방이 대조군에 비해 유의적으로 감소함 (Kadooka 등, 2010)
- (3) 마우스에 프로바이오틱 *Lactobacillus sakei* 종을 투여한 결과 백색지방 및 간에서의 지질 합성 유전자의 발현량이 유의적으로 감소하였으며, 동시에 Firmicutes / Bacteroidetes 비율이 감소하고 특히 Clostridium cluster 14ab 그룹의 수가 유의적으로 감소함을 보고함 (Ji 등, 2012)
- (3) 3종류의 프로바이오틱스 후보균주를 12주간 식이유도 비만 마우스에 투여한 결과, 교란장균총이 정상적으로 회복되었으며 대사질환이 개선되는 것을 보고함 (Wang 등, 2015). 또한 LGG를 고탄수화물식이와 함께 투여하였을 때 장벽기능 (gut-barrier function)이 개선되고 간지방 축적 및 염증 반응이 억제되는 것이 보고됨 (Ritze 등, 2014)
- (4) *L. rhamnosus* GG를 고지방식이 유도 비만 마우스에 투여한 결과 adiponectin의 증가와 AMPK 활성화로 인해 지방축적이 감소하고 인슐린 감수성이 촉진되었음을 발표함(Kim 등, 2013). 뿐만 아니라 LGG의 투여로 *db/db* 마우스에서 ER stress 개선과 대식 세포 활성 개선에 의한 혈당강하작용이 나타남을 보고함 (Park 등, 2015)
- (5) 최근 스위스의 네슬레사는 자사의 프로바이오틱스인 *L. rhamnosus* CGMCC1.3724 를 24주에 걸쳐 시험한 결과, 여성군에서 플라세보군과 비교하여 유의적인 체중감소가 있음을 발표함 (Sanchez 등, 2014)
- (6) 그 외에도 미국 듀폰 다니스코사의 VSL#3를 이용한 인체적용시험에서도 플라세보군에 비해 유의적인 체중감소가 있음을 발표함 (Osterberg 등, 2015)

(다) 장균총 핵심 대사산물인 짧은사슬지방산의 조절을 통한 체지방 감소

- (1) 짧은사슬지방산 (SCFA)은 장내에서 장균총의 발효에 의해 만들어지는 주요한 대사체중 하나이며 최근 숙주의 체지방축적 및 연소와 밀접한 관계가 있음 밝혀지고 있음 (Besten 등, 2013)
- (2) 장균총에 의해 만들어진 SCFA는 일차적으로 장세포의 에너지원으로 활용되며 많은 양의 SCFA가 혈액을 통해 간, 지방 또는 근육으로 이동하여 에너지원으로 활용되거나 대사 조절 신호전달 물질로의 역할을 함 (Bloemen 등, 2009)

- (3) Gao 등이 2009년 Diabetes 저널에 발표한 바에 의하면 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에 뷰티르산을 투여할 경우 PGC1-alpha 의존적으로 근육에서의 지방산화가 증가하여 유의적인 체중감소 및 혈당의 감소가 있음을 발표함
- (4) 마우스에 *Lactobacillus plantarum*을 투여한 결과 SCFA를 흡수하는 sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 (SMCT1)의 유전자 발현이 증가하여 (Borthakur 등, 2010) 프로바이오틱스가 장균총의 SCFA 생성과 장흡수에 영향을 미치는 것이 확인됨. 장균총 주요 대사산물인 SCFA는 염증억제와 인슐린 감수성 촉진작용을 나타내고 (Al-Lahham 등, 2010), 간과 지방의 PPAR γ 를 억제함으로써 지방 축적을 억제하며, 동시에 AMPK를 활성화하여 지방산 산화를 촉진하는 것이 밝혀짐 (den Besten 등, 2015)
- (5) SCFA는 사람이 하루에 사용하는 에너지원의 10%를 차지하며(Bergman, 1990), 그 중 아세트산은 간에서 유리지방산 또는 콜레스테롤로 재합성되고 (Ballard, 1972; Wong 등, 2006) 프로피온산은 간에서 포도당신생과정에 관여함으로써 (Roy 등, 2006) 장균총 개선을 통해 소화기관내 SCFA를 조절하고 혈중 뷰티르산의 농도를 증가시킬 수 있다면 이는 프로바이오틱스를 통한 비만 치료의 새로운 작용기전이 될 수 있을 것으로 기대함

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

3-1. *In vitro* 스크리닝 통한 기능성 균주 탐색 및 확보

가. 췌장 리파아제 활성 저해능 측정 (Pancreatic lipase inhibitory activity)

(1) 연구 방법

- Porcine pancreatic lipase를 이용하여 lipase 활성 저해능을 측정하였다. p-Nitrophenylpalmitate (PNP)를 acetonitrile에 10mM 농도로 녹인 후 얻어진 용액을 다시 ethanol (1:2 = acetonitrile : ethanol)에 녹여 결과적으로 3.33mM의 PNP 용액을 만들어 사용하였다. Porcine pancreatic lipase는 5 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 사용하였다. 다음과 같은 농도로 reaction mixture를 만들어 37°C에서 10분간 반응시켰다 (Table 9). 반응 후 405nm에서 absorbance를 측정하며 blank는 enzyme을 증류수로, control은 시료를 용매로 대체하였다. 각각 농도별 시료마다 enzyme을 뺀 blank의 absorbance를 측정하여 시료의 색상을 보정하였다.

○ Lipase inhibition activity(%) = {1-(A/B)} x 100

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

Table 1. 반응용액의 조성

Total reaction mixture	200 μ l
Enzyme(porcine pancreatic lipase)	0.30mg/ml
Sample	0.1mg/ml
PNP	0.167mM
Tris-HCl buffer	0.061 M(pH 8.5)

(2) 연구 결과

- 김치, 원유 및 분변 분리한 총 366개 균주의 pancreatic lipase 활성 저해능 측정하였다 (Table 2)

Table 2. Anti-lipase activity

	10 % 이하	10-30 %	30-60 %	60-80 %	80% 이상	총계
김치	16	17	17	87	30	167
분변	46	38	26	25	3	138
원유	17	29	14	1	0	61
총계	79	84	57	114	33	366

☞ 80% 이상의 높은 anti-lipase activity를 가지는 33 종의 균주를 선발 완료

나. 알파-아밀레이즈 활성 저해능 측정 (α-amylase inhibitory activity)

(1) 연구 방법

- α-amylase 활성 저해능 측정을 위해 α-amylase를 0.1g/10mL농도로 증류수를 이용해 희석시키고, 기질인 가용성 전분은 증류수로 0.5%로 제조한 후 시료와 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다. 0.1N HCL용액으로 반응을 정지시킨 후 iodine 용액을 이용하여 30분간 발색하여 660nm로 흡광도를 측정하였다. 결과는 α-amylase만을 처리하였을 때와 시료를 혼합하여 처리하였을 때의 흡광도를 비교하여 나타내었다.

○ α-amylase inhibitory activity(%) = {1-(A/B)} x 100

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

(2) 연구 결과

- 김치 및 분변에서 분리한 236개 균주의 α-amylase 활성 저해능을 측정하였다.

(Table 3)

Table 3. α-amylase inhibitory activity

	20 % 미만	20-50 %	50-80 %	80 % 이상	총계
김치	16	27	22	86	151
분변	20	15	11	39	85
총계	36	42	33	125	236

- 80% 이상의 높은 α-amylase inhibitory activity를 가지는 125개 균주를 대상으로 3번 반복 실험 진행하였다. (Table 4)

Table 4. α-amylase inhibitory activity

	80 % 미만	80~90 %	90~95 %	95~100 %	100% 이상	총계
김치	5	11	26	30	14	86
분변	20	3	6	7	3	39
총계	25	14	32	37	17	125

- ☞ 3반복 실험을 진행하여 80% 이상의 높은 α-amylase inhibitory activity를 가지는 100 종의 균주를 선발 완료하였다.

다. 알파-글루코시데이즈 활성 저해능 측정 (α -glucosidase inhibitory activity)

(1) 연구 방법

- α -glucosidase 활성억제 효과 측정을 위해, 시료 50 uL를 0.75 unit/mL α -glucosidase 효소액 50 uL, 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) 50 uL와 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation한 후 0.1 M phosphate buffer (pH7.0)에 녹인 3 mM p-NPG (p-nitrophenyl α -glucopyranoside) 100 uL를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.1 M Na₂CO₃ 750 uL로 반응을 정지시키고 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

○ α -glucosidase inhibitory activity(%) = {1-(A/B)} x 100

A ; 시료의 absorbance,

B ; control의 absorbance

(나) 연구 결과

- α -amylase inhibitory activity 실험에서 선발된 균주 100종을 대상으로 α -glucosidase inhibitory activity 측정하였다. (Table 5)

Table 5. α -glucosidase inhibitory activity

	85 % 미만	85~90 %	90~95 %	95 %~100 %	100 % 이상	총계
김치	47	1	5	18	10	81
분변	19	0	0	0	0	19
총계	66	1	5	18	10	100

☞ 85% 이상의 높은 α -glucosidase inhibitory activity를 가지는 균주 34종을 선발완료 하였다.

Table 6. 항비만 선발균주

No.	Strain ¹	α -amylase inhibitory activity	α -glucosidase inhibitory activity	Lipase inhibitory activity
1	KC3	95.52±5.71 ²	97.97±1.08	90.97±1.80
2	KC4	93.22±3.93	99.81±0.36	82.16±0.99
3	KC19	93.54±3.89	98.67±0.41	-
4	KC20	92.70±3.92	99.92±0.18	87.51±5.00
5	KC27	38.83		87.90±2.63
6	KC28	97.17±4.31	99.64±0.47	87.75±1.85
7	KC29	99.16±1.39	99.31±0.45	91.09±2.21
8	KC39	94.73±5.32	60.03	89.92±0.87
9	K4	96.82±2.08	99.45±0.56	91.32±1.93
10	K6	96.78±3.29	92.55±9.62	85.17±0.79
11	K8	49.64		87.40±1.41
12	K10	94.66±4.34	99.78±0.28	87.40±1.41
13	K13	78.47		89.13±2.16
14	K14	74.24		83.43±2.03
15	K20	46.65		84.02±1.96
16	K23	28.45		88.62±2.43
17	K39	32.25		90.46±3.68
18	K50	97.01±4.88	99.99±0.38	89.39±3.48

19	K60	75.80		81.29±0.96
20	K61	59.95		87.40±6.02
21	K62	96.13±4.37	61.63	85.30±2.39
22	K63	86.85±2.57	99.37±0.32	-
23	K66	72.54		89.13±1.52
24	K71	93.31±5.85	99.91±0.49	-
25	K73	97.40±3.69	99.66±0.5	-
26	K79	76.55		93.01±2.90
27	K82	94.50±6.11	55.92	90.13±3.22
28	K97	99.70±1.15	99.92±0.09	-
29	K98	98.60±2.50	98.94±0.5	-
30	K99	99.95±0.67	95.18±5.66	-
31	K101	95.98±7.34	86.41±2.28	-
32	K105	96.34±1.43	99.86±0.09	-
33	K106	93.48±3.21	98.13±0.78	-
34	K107	93.72±2.89	97.55±1.49	-
35	K109	95.60±3.54	95.09±3.4	-
36	K110	98.64±2.89	98.85±1.19	-
37	K111	93.77±1.54	92.48±3.36	-
38	K114	95.26±1.46	73.63	92.38±1.87
39	K117	94.46±0.85	73.67	91.10±1.51
40	K118	94.92±0.91	90.96±9.03	-
41	K119	96.14±3.20	90.58±6.28	-
42	K120	89.77±5.69	96.33±5.23	87.59±2.46
43	K257	80.82±8.24	14.89	88.00±1.27
44	K259	96.20±4.23	98.62±0.4	91.52±1.82
45	K261	99.65±0.66	99.67±0.3	-
46	K262	91.83±5.23	97.4±2.16	82.98±0.08
47	K263	98.00±3.06	98.7±0.44	-
48	K264	99.23±3.13	99.66±0.22	88.46±1.93
49	Q164			88.64±1.12
50	BB39	74.09		89.92±0.87
51	BB48	18.91		91.33±1.20

¹검치분리균: KC균, K균; 분변분리균: Q균, BB균.

☞ Lipase, α-amylase 및 α-glucosidase의 저해 효과가 우수한 균주 51종을 선발 완료 하였다.

라. 확보한 기능성 균주의 동정 (16S rRNA sequencing)

(1) 연구 방법

- 젖산균의 DNA sequence는 universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, solgent EF-Taq을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭과정은 95℃, 15분을 한 후 95℃, 20초; 50℃, 40초; 72℃, 1분30초를 30회 시행하였으며 72℃, 5분으로 마무리 하였다. 서열분석은 PCR product를 solgent PCR purification kit로 purify한 후 ABI 3730XL DNA sequencer로 자동분석 하였다.

(2) 연구 결과

Table 7. 16S rRNA sequencing

No.	Strain		Identities
1	KC3 ¹	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1505/1505 (100%)
2	KC4	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1504/1505 (99%)
3	KC19	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1515/1515 (100%)
4	KC20	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1504/1505 (99%)
5	KC27	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1453/1454 (99%)
6	KC28	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1465/1466 (99%)
7	KC29	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1454/1455 (99%)
8	KC39	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1489/1489 (100%)
9	K4	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1514/1520 (99%)
10	K6	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1503/1505 (99%)
11	K8	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1515/1515 (100%)
12	K10	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1506/1506 (100%)
13	K13	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1515/1515 (100%)
14	K14	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1524/1527 (99%)
15	K20	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1522/1524 (99%)
16	K23	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1514/1515 (99%)
17	K39	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1515/1515 (100%)
18	K50	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1505/1505 (100%)
19	K60	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1516/1516 (100%)
20	K61	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1509/1513 (99%)
21	K62	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1507/1509 (99%)
22	K63	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1503/1505 (99%)
23	K66	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1512/1516 (99%)
24	K71	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1510/1515 (99%)
25	K73	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1522/1528 (99%)
26	K79	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1517/1520 (99%)
27	K82	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1523/1528 (99%)
28	K97	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1512/1515 (99%)
29	K98	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1508/1511 (99%)
30	K99	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1445/1445 (100%)
31	K101	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1511/1513 (99%)
32	K105	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1508/1509 (99%)
33	K106	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1522/1529 (99%)
34	K107	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1476/1476 (100%)
35	K109	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1515/1520 (99%)
36	K110	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1519/1523 (99%)
37	K111	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1504/1505 (99%)
38	K114	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1467/1467 (100%)

39	K117	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1467/1468 (99%)
40	K118	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1510/1511 (99%)
41	K119	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1505/1505 (100%)
42	K120	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1504/1505 (99%)
43	K257	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1516/1516 (100%)
44	K259	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1505/1505 (100%)
45	K261	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1505/1505 (100%)
46	K262	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1380/1380 (100%)
47	K263	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1446/1446 (100%)
48	K264	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1391/1391 (100%)
49	Q164	Lactobacillus plantarum WCFS1 strain WCFS1	1388/1388 (100%)
50	BB39	Enterococcus faecium strain DSM 20477	1440/1441 (99%)
51	BB48	Pediococcus pentosaceus ATCC 25745 strain ATCC 25745	1515/1515 (100%)

¹김치분리균: KC균, K균; 분변분리균: Q균, BB균.

- 총 51개의 균주를 대상으로 16S rRNA 동정한 결과 *Pediococcus pentosaceus* 10종, *Enterococcus faecium* 1종, *Lactobacillus plantarum* 40종으로 확인하였다.

마. 당 발효 실험

(1) 연구 방법

- API 50CHL kit (API bioMerieux, France)를 이용하여 당 발효 실험을 실시하였다.

▶ 연구 결과

Table 8. API 당 발효 실험

Strains	KC3	KC4	KC20	KC27	KC28	KC29	KC39	K4	K6	K10
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	±	-	-	-	-	±	±	-	±
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl-αD-Mannopyranoside	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

Table 8 (계속)

Methyl- α D-Glucopyranoside	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	±	+	+	+	+	+	+	+	±	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
Arbutin	+	+	±	±	+	±	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Salicin	±	±	±	±	±	±	+	±	+	+
D-Celiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
D-Turanose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium Gluconate	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
potassium 2-KetoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Strains	K50	K61	K62	K63	K66	K71	K73	K79	K82	K97
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl- β D-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	±	±	-	±	±	±	±	-	±	±
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl- α D-Mannopyranoside	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
D-Celiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 8 (계속)

D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	±	±	±	±	-	±	±	±	±	±
D-Turanose	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium Gluconate	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
potassium 2-KetoGluconate	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-
potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Strains	K98	K99	K101	K105	K106	K107	K109	K110	K111	K114
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	+	+	+	-	±	+	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	±	±	±	±	±	-	±	±	±	±
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	±	±	+	±	±	±	±	±	+	+
D-Celiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 8 (계속)

Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium Gluconate	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
potassium 2-KetoGluconate	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-
potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Strains	K117	K118	K119	K120	K259	K261	K262	K263	K264	K164
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	±	±	±	±	±	-	+	±	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl-αD-Mannopyranoside	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
D-Celiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	-	+	-	-	+	±	+	+	-	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	±	±	±	±	±	±	+	±	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 8 (계속)

L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium Gluconate	±	±	±	±	±	±	+	±	+	+
potassium 2-KetoGluconate	-	-	-	-	±	-	-	±	-	-
potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

↳ anti-lipase, α-amylase 및 α-glucosidase inhibitory activity 실험과 16S rRNA sequencing, 당발효 실험 결과를 바탕으로 KC3, KC4, KC28, K6, K10, K50, K120, K259 총 8개 균주를 선발하였다.

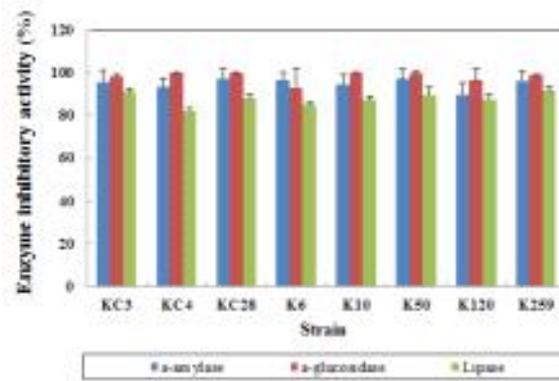


Figure 1. 항비만 선발 균주의 효소 억제 활성

바. Anti-adipogenetic activity (3T3-L1 cell line)

(1) 연구 방법

- 3T3-L1 세포배양 방법은 Hemati 등 (1997)의 방법을 변형하여 사용하였다. Adipogenesis (지방세포분화) 측정은 3T3-L1 cell line을 분화시키고 지방축적(adipogenesis)을 유도하여 특정한 소재의 첨가가 지방축적에 미치는 영향을 측정하는 방법으로서 pre-adipocyte 상태의 3T3-L1 cell에 dexamethasone, 3-isobuthylmethyl-xanthine 그리고 insulin으로 처리하여 cell의 분화(differentiation)를 유도하면 PPARγ 등의 지방합성촉진 인자들의 발현이 일어나고 궁극적으로 지방의 세포내 축적이 이루어진다. 대체적으로 3T3-L1 cell의 pre-adipocyte 기간을 포함하여 9일 안에 지방의 축적이 일어나며 이들 축적된 지방구를 Oil Red O 용액으로 추출하고 520nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포내 지방축적 정도를 측정하였다 (Ramirez- Zacarias 등, 1992).

(2) 연구 결과

- 8개의 선발 균주의 3T3-L1 지방세포 분화 억제율 측정하였다. (Table 9, Figure 2)

Table 9. 3T3-L1 지방세포 분화 억제율

	대조군	KC3	KC4	KC28	K6	K10	K50	K120	K259
억제율 (%) ¹	-	37.59	45.35	36.99	22.27	32.61	6.96	7.95	22.09

¹대조군 대비 억제율

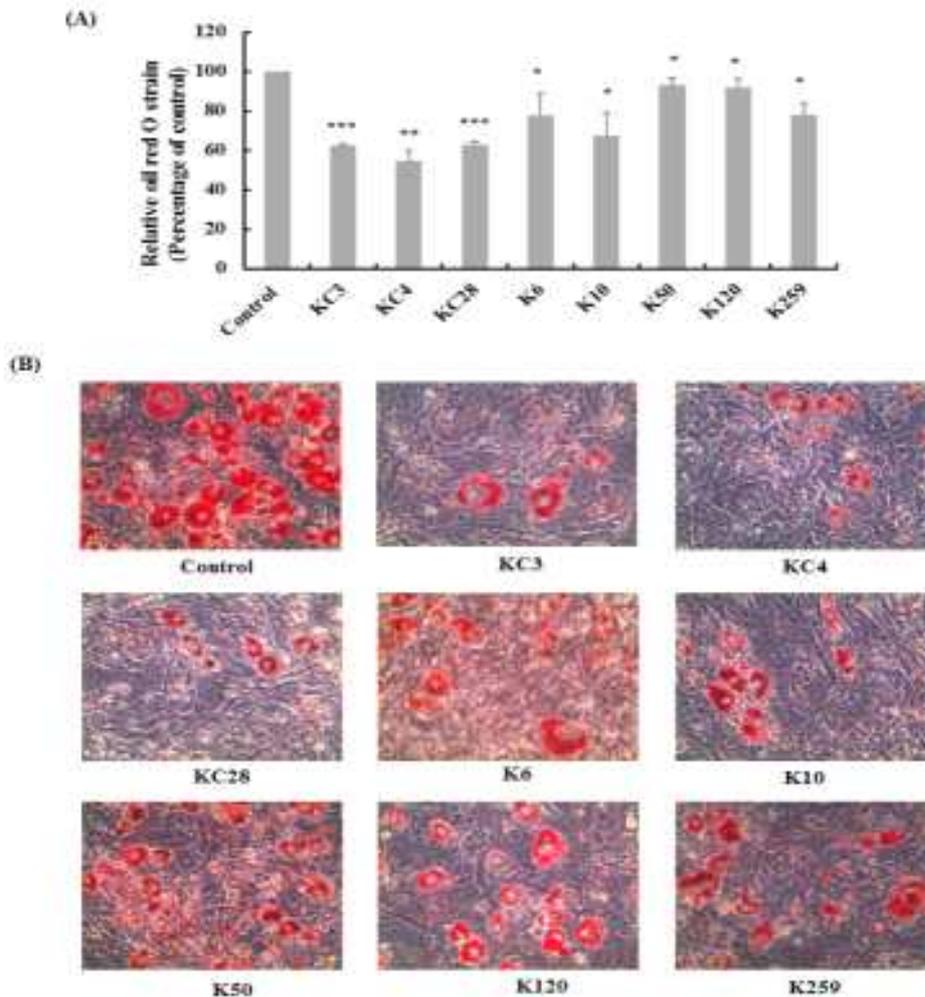


Figure 2. (A) 3T3-L1 지방 전구 세포 분화 억제 및 (B) Oil-red 염색 사진

* $p < 0.05$, (vs. control). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to control (t -test).

사. 균주 특성 조사

(1) 항생제 내성

(가) 연구 방법

- 항생제 내성 시험은 MRS 액체배지에 균주를 접종하고, 37°C에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone 용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도 별로 포함된 tryptic soy 액체배지에 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 수준으로 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 성장 여부를 결정하였다. 항생제 내성 측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma (USA)로부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Ampicillin, Penicillin-G, Oxacillin, Bacitracin, Polymyxin B, Ciprofloxacin, Tetracycline, Clindamycin, Erythromycin, Rifampicin, Vancomycin 및 Chloramphenicol을 시험에 사용하였다.

(나) 연구 결과

Table 10. 선별균주의 항생제 감수성

Antimicrobial agents	MIC (ug/mL)								
	KC3	KC4	KC28	K6	K10	K50	K120	K259	299v
Amikacin	4	8	8	4	4	4	32	2	8
Gentamycin	1	1	1	1	1	1	16	0.5	2
Kanamycin	16	32	32	16	64	16	16	8	32
Streptomycin	8	16	16	8	16	8	32	4	16
Ampicillin	256	1024	2048	1024	2048	2048	8	2048	1024
Penicillin-G	1	4	2	2	16	4	8	4	2
Oxacillin	8	16	16	16	32	16	512	16	16
Bacitracin	32	32	16	16	64	16	32	16	16
Polymyxin B	128	256	128	256	256	512	256	256	256
Ciprofloxacin	8	16	128	16	64	16	16	16	16
Tetracycline	16	16	16	16	32	16	64	16	16
Clindamycin	0.0156	0.0625	0.125	0.25	0.5	0.5	32	0.5	1
Erythromycin	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.125	4	0.0625	0.125
Rifampicin	1	2	1	0.5	4	2	1	1	2
Vancomycin	2048	2048	2048	2048	2048	2048	4096	2048	2048
Chloramphenicol	4	8	4	8	8	4	8	4	4

- 8개의 선별 균주의 항생제 감수성을 측정하였다. (Table 10)

(2) 효소 활성

(가) 연구 방법

- MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 10⁵~10⁶ CFU/mL 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit (API bioMerieux, Lyon, France)를 이용하여 37°C에서 5시간 배양한 다음 효소반응시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, β-fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

(나) 연구 결과

Table 11. 선별균주의 효소활성

Enzyme	KC3	KC4	KC28	K6	K10	K50	K120	K259	299v
Alkaline phosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esterase (C4)	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Esterase Lipase (C8)	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Lipase (C14)	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Leucine arylamidase	5	5	5	3	5	5	4	4	5
Valine arylamidase	5	4	4	2	5	4	3	3	5
Cystine arylamidase	2	2	3	0	2	2	1	0	4
Trypsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-chymotrypsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	1	2	2	1	2	2	1	1	4
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	1	2	3	1	3	2	1	2	3
α-galactosidase	3	0	1	0	0	0	0	0	0
β-galactosidase	4	5	5	3	5	5	2	3	5
β-glucuronidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-glucosidase	3	3	4	0	2	2	1	1	4
β-glucosidase	3	4	5	2	3	4	4	4	4
N-acetyl-β-glucosaminidase	5	3	3	1	4	3	4	3	5
α-mannosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-fucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*: A value ranging from 0 to 2 is assigned to the standard color: zero represents a negative; 5 represents a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength: 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles; 2, to 10 nanomoles; 3, to 20 nanomoles; 4, to 30 nanomoles; and 5, to 40 nanomoles or more.

- 8개의 선별 균주의 효소 활성을 측정하였다. (Table 11)

(3) 내담즙 활성

(가) 연구 방법

- Gilliland와 Walker (1990)의 방법에 따라 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양된 균주를 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에 0.3% oxgall을 첨가한 배지와 대조구로서 oxgall을 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였다. 37°C의 incubator에서 7시간까지 혐기배양하면서 시간별로 BCP plate count agar 평판에서 부어 균힌 후 37°C에서 48시간 혐기배양하여 계수하였다.

(나) 연구 결과

- 8개의 선별 균주를 0.3% oxgall이 첨가된 MRS 액체 배지에서 내담즙 활성 측정하였다 (Table 12, Figure 3)

Table 12. 선별균주의 내담즙 활성

	KC3	KC4	KC28	K6	K10	K50	K120	K259
생존률 (%)	95.55	93.03	92.46	93.47	94.32	92.73	93.46	94.43

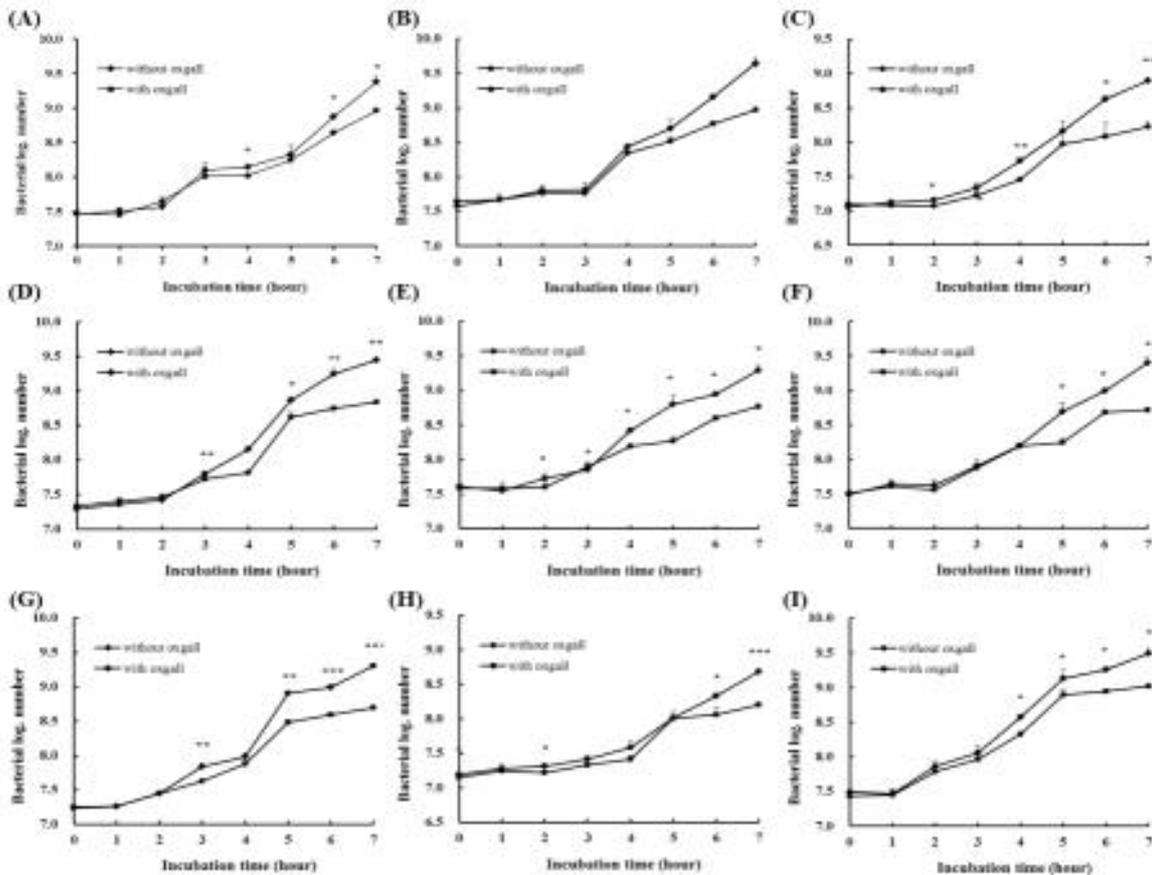


Figure 3. 0.3% oxgall 처리 MRS 배지에서 균주 배양성 확인

* *Lactobacillus plantarum* KC3 (A), KC4 (B), KC28 (C), K6 (D), K10 (E), K50 (F), K120 (G), K259 (H), and 299v (I)

(4) 내산성 확인

(가) 연구 방법

- Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 2, 3, 4 용액과 대조구로서 pH 6.4 용액을 제조하였고, 제조된 pH 용액 10 mL에 0.05% cysteine이 함유된 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양된 균주(약 10⁹ CFU/mL)를 1 mL씩 섞은 후 37°C에서 혐기 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 BCP plate count agar 평판에서 부어 균힌 후 37°C에서 48시간 혐기배양한 다음 계수하였다.

(나) 연구 결과

- 8개의 선별 균주를 pH2, 3, 4, 6.4에서 내산성 측정하였다. (Figure 4)

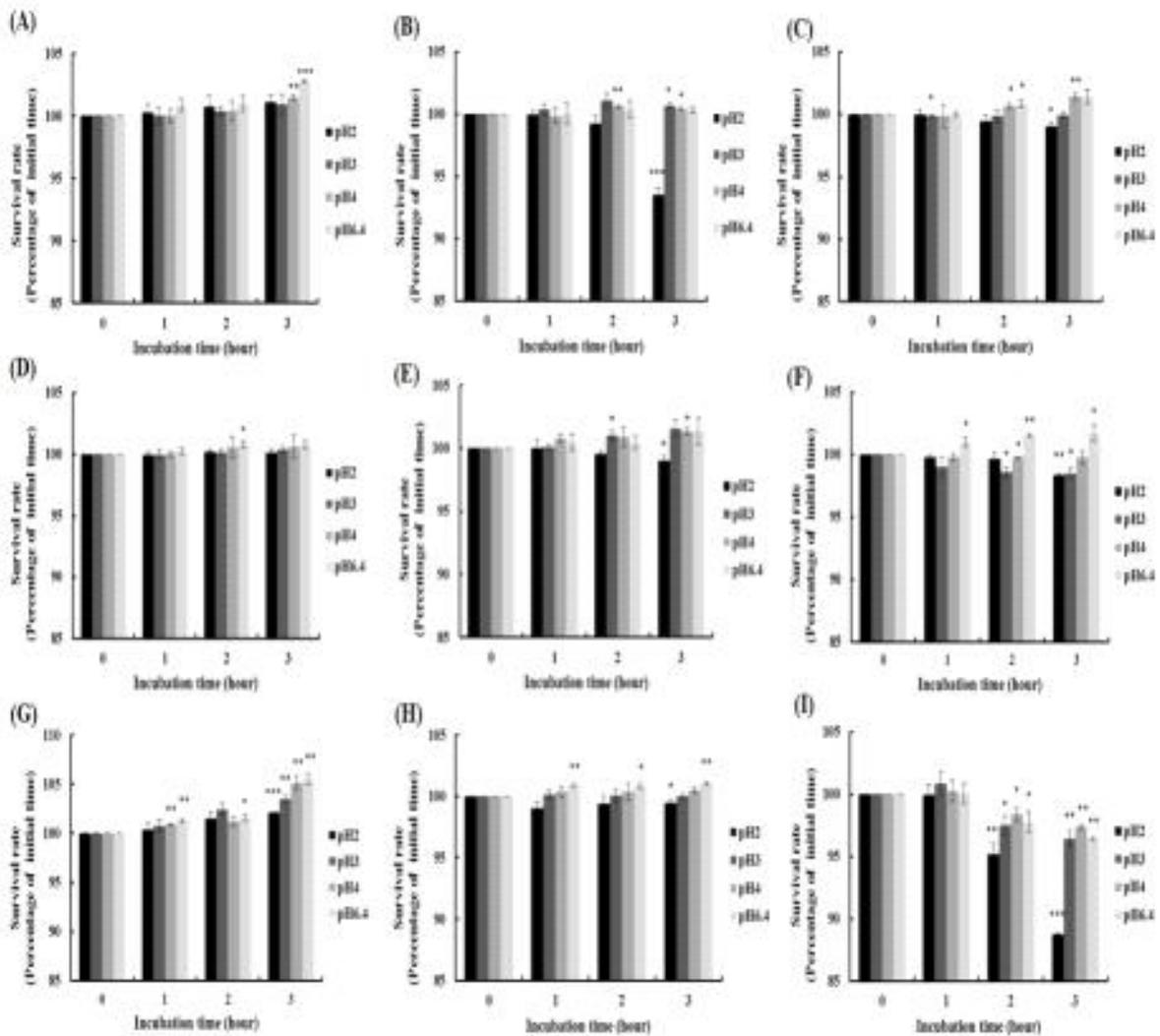


Figure 4. *L. plantarum* 균주의 내산성 확인 (pH2.0, 3.0, 4.0 and 6.4)

* *Lactobacillus plantarum* KC3 (A), KC4 (B), KC28 (C), K6 (D), K10 (E), K50 (F), K120 (G), K259 (H), and 299v (I)

(5) 항균력 확인

(가) 연구 방법

- Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품연구원으로부터 분양받았으며, 지시균의 증식배지로서 *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 선택배지로서 *Escherichia coli*는 EMB agar, *Salmonella Typhimurium*은 Bismuth sulfite agar, *Listeria monocytogenes*는 Supplement(X123)가 함유된 *Listeria Isolation Agar*, *Staphylococcus aureus*는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{○ Inhibition (\%)} = (A-B)/A$$

A; 대조군 균수 (CFU/ml)

B; 혼합 배양 후의 균수 (CFU/ml)

(나) 연구 결과

- 8개의 선별 균주를 병원성 균주에 대하여 항균력 확인하였다. (Table 13~21)

Table 13. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* KC3의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		KC3+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	3.23±0.25×10 ⁶	5.98	1.51±0.15×10 ⁶	4.98	53.78%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	6.46±0.35×10 ⁶	6.10	1.50±0.26×10 ⁶	5.54	76.80%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.57±0.20×10 ⁵	6.06	1.16±0.12×10 ⁵	5.07	26.27%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.46±0.87×10 ⁶	6.08	2.26±0.11×10 ⁶	5.05	34.61%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* KC3: 2.10±0.17 × 10⁶CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 14. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* KC3의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		KC4+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	3.23±0.25×10 ⁶	5.98	8.50±0.05×10 ⁵	4.84	73.98%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	6.46±0.35×10 ⁶	6.10	4.00±0.26×10 ⁶	5.25	38.14%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.57±0.20×10 ⁵	6.06	1.13±0.06×10 ⁵	4.94	27.97%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.46±0.87×10 ⁶	6.08	2.83±0.61×10 ⁶	4.9	18.27%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* KC4: 4.43±0.57 × 10⁶CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 15. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* KC28의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		KC28+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	8.30±0.98×10 ⁵	5.93	7.56±1.29×10 ⁵	5.53	8.84%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.13±0.04×10 ⁷	5.91	7.43±0.38×10 ⁶	5.58	34.41%
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.20±0.92×10 ⁵	5.94	2.13±0.15×10 ⁵	5.54	70.37%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.87±0.03×10 ⁶	5.93	8.27±1.12×10 ⁵	5.57	55.79%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* KC28: 6.23±0.40×10⁶ CFU/mL^a Determined after 6 h of incubation at 37°CTable 16. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* K6의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		K6+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	8.30±0.98×10 ⁵	5.93	4.00±0.20×10 ⁵	5.60	51.81%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.13±0.04×10 ⁷	5.91	6.53±0.72×10 ⁶	5.60	42.35%
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.20±0.92×10 ⁵	5.94	2.77±0.71×10 ⁵	5.56	61.57%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.87±0.03×10 ⁶	5.93	8.43±1.02×10 ⁵	5.55	54.90%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K6: 5.23±0.32×10⁶ CFU/mL^a Determined after 6 h of incubation at 37°CTable 17. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* K10의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		K10+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	3.23±0.25×10 ⁶	5.98	3.03±0.06×10 ⁵	4.94	90.71%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	6.46±0.35×10 ⁶	6.10	5.70±0.79×10 ⁶	5.35	11.86%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.57±0.20×10 ⁵	6.06	1.35±0.18×10 ⁵	5.1	14.19%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.46±0.87×10 ⁶	6.08	2.67±0.75×10 ⁶	5.02	23.08%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K10: 4.43±0.15 × 10⁶CFU/mL^a Determined after 6 h of incubation at 37°CTable 18. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* K50의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		K50+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	3.23±0.25×10 ⁶	5.98	2.10±0.36×10 ⁶	4.89	35.71%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	6.46±0.35×10 ⁶	6.10	3.63±0.42×10 ⁶	5.37	43.81%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.57±0.20×10 ⁵	6.06	1.15±0.13×10 ⁵	5.03	26.91%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.46±0.87×10 ⁶	6.08	2.20±0.78×10 ⁶	4.98	36.54%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K50: 4.13±0.81×10⁶ CFU/mL^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 19. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* K120의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		K120+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	8.30±0.98×10 ⁵	5.93	7.10±1.05×10 ⁵	5.61	14.46%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.13±0.04×10 ⁷	5.91	7.63±0.35×10 ⁶	5.61	32.65%
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.20±0.92×10 ⁵	5.94	4.67±0.21×10 ⁵	5.61	35.19%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.87±0.03×10 ⁶	5.93	1.15±0.10×10 ⁶	5.60	38.32%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K120: 2.00±0.10×10⁶ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 20. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* K259의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		K259+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	8.30±0.98×10 ⁵	5.93	1.58±0.50×10 ⁶	5.65	81.00%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.13±0.04×10 ⁷	5.91	1.07±0.06×10 ⁷	5.67	5.00%
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.20±0.92×10 ⁵	5.94	3.27±0.38×10 ⁵	5.62	54.63%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.87±0.03×10 ⁶	5.93	1.43±0.14×10 ⁶	5.66	23.17%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* K259: 3.33±0.49×10⁶ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 21. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* 299v의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		299v+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	3.23±0.25×10 ⁶	5.98	1.86±0.06×10 ⁶	4.95	43.16%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	6.46±0.35×10 ⁶	6.10	1.50±0.26×10 ⁶	5.40	76.80%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.57±0.20×10 ⁵	6.06	1.16±0.12×10 ⁵	5.12	76.80%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.46±0.87×10 ⁶	6.08	2.26±0.11×10 ⁶	5.02	34.61%

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* 299v: 2.87±0.42×10⁶ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

(6) 장내 부착능 (HT-29) 확인

(가) 연구 방법

- 실험에 사용한 HT-29 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)을 통하여 구입하였고, Kim 등(2008)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 첨가된 RPMI 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂/95% air가 공급되는 조건의 항온기(incubator)에서 배양하였다. HT-29 세포를 배양하기 위하여 세포를 12 well plate의 각 well에 10⁶ cells/well로 분주하고, 2일에 한 번씩 배지를 교체해 주며, 실험 전날, 95%까지 세포가 찻을 때 serum free medium으로 교체하여 cell이 더 이상 차는 것을 막아주었다. 균주의 장 내 부착능을 실험하기 위해 2차 계대배양한 균주 1 mL를 취해 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 serum free medium을 이용해 두 번 세척하였다. 세척한 균주를 RPMI 배지로 희석하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 0.5값이 나오도록 맞춘 후 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring 하여 초기 균수를 측정하였다. OD 값을 맞춘 균체 100 mL를 well에 분주한 후 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한 뒤 PBS를 이용해 붙지 않은 균을 5번 세척해 준다. Trypsin-EDTA 1 mL를 첨가하여 cell-bacteria를 떼어낸 후 0.1% peptone 용액으로 희석한 다음 BCP plate count agar에 pouring하여 균수를 측정하였다.

(나) 연구 결과

- 8개의 선별 균주의 장 상피세포 (HT-29)의 부착능 확인하였다. (Figure 5)

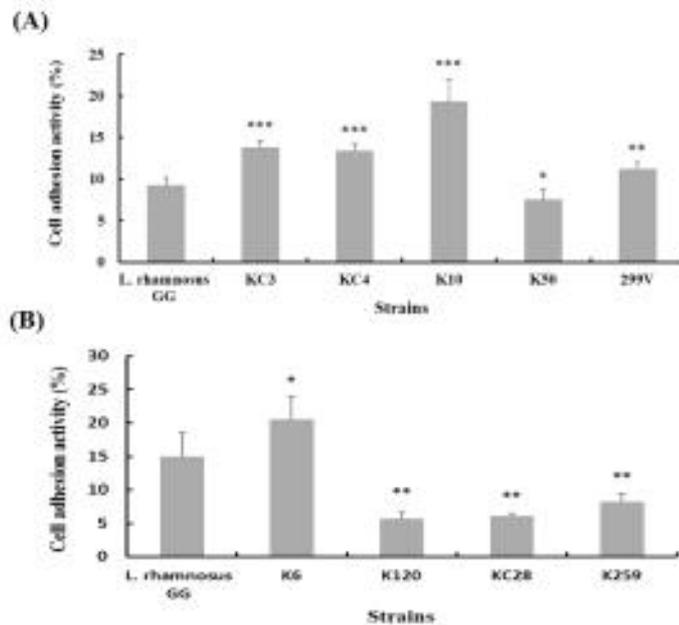


Figure 5. *L. plantarum* 의 장 상피 세포 부착률 (KC3, KC4, K10, K50, and 299v (A), K6, K120, KC28, and K259 (B))

All values are within the mean±standard deviation of the three replicates; *p< 0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 compared with control strain (t-test).

(7) Biogenic amine (BA) 생성능

(가) 연구 방법

- 아미노산 전구체(L-Tyrosine disodium salt, L-Histidine monohydrochloride monohydrate, L-Ornithine monohydrochloride, L-Lysine monohydrochloride)를 0.1% 첨가한 MRS broth를 만든 다음 18시간 배양한 균주 1% 접종한 뒤 5~10번 교대 배양하여 decarboxylase 효소를 활성화시켰다. Bover-Cid and Holzapfel(1999)에 의해 고안된 decarboxylase media에 효소 활성화된 균을 도말하고 37℃에서 24~48시간 배양 후 보라색으로 변함을 통하여 BA 생성균을 판별하였다.

(나) 연구 결과

- 8개의 선별 균주의 바이오제닉 아민 생성능 확인하였다. (Table 22)

Table 22. 선별 균주의 바이오제닉 아민 생성능

Strains	Biogenic amines			
	Putrescine	Tyramine	Histamine	Cadaverine
KC3	-	-	-	-
KC4	-	-	-	-
KC28	-	-	-	-
K6	-	-	-	-
K10	-	-	-	-
K50	-	-	-	-
K120	-	-	-	-
K259	-	-	-	-
299v	-	-	-	-

☞ *In vitro* screening 결과 안정성이 확인된 *L. plantarum* KC3, KC4, KC28, K6, K10, K50, K120, K259 총 8개 균주 선발하였다.

아. *In vitro* fermentation을 통한 균주 선별

(1) 연구 방법

- *In vitro* fermentation : 쥐의 맹장을 추출하여, 조직을 제거한 맹장액에 각각 10개의 프로바이오틱스 균주를 접종하고, 이를 혐기환경에서 발효 시킨 후, gas chromatography를 통해 배양액의 SCFA 양을 비교함으로써 프로바이오틱스에 의한 장균총의 SCFA 생성능 변화를 확인하였다.
- SCFA 분석 : Gas chromatography (Shimadzu GC2010)를 이용하여 분석했다. Sigma (Supelco) 사의 volatile fatty acid mixture (ultrapure)를 사용하여 standard curve 와 피크 검출retention time을 분석한 후 분변과 혈액에서 SCFA를 추출하여 standard curve에 대조하여 분석하였다. SCFA추출은 Schwiertz et.al., (2009)에서 기술한 방법을 사용하였다. 간략하게 oxalic acid (0.1mole/liter) 와 sodium azide (40mmole/liter) 가 들어간 추출액을 샘플 (최대80mg) 에 섞은 후 1시간 동안 상온에서 shaking incubation 한 후 16,000 g, 24℃, 5분간 원심분리하여 상등액을 (FID) 기기를 사용하여 분석했다. 컬럼은 HP INNO-WAS 30m x 32mm를 사용하며 splitter 온도 260℃, FID 260℃, 컬럼은 100℃에서 180℃까지 25℃/m 의 속도로 27.1 psi 압력으로 분석하였다.

(2) 연구 결과

- *In vitro* fermentation 실험 결과로 보아 8개의 균주 중 KC4, K10, K50, K259가 SCFA 생산을 통한 선별 기준에 부합한다고 볼 수 있다. KC28의 경우 acetate 생성이 크게 감소하면서 propionate와 butyrate의 생성은 증가했으므로, 다른 균주와 확연히 다른 패턴을 보이고 있기 때문에 KC4를 대체하여 실험 균주로 선택하였다.

(Figure 6)

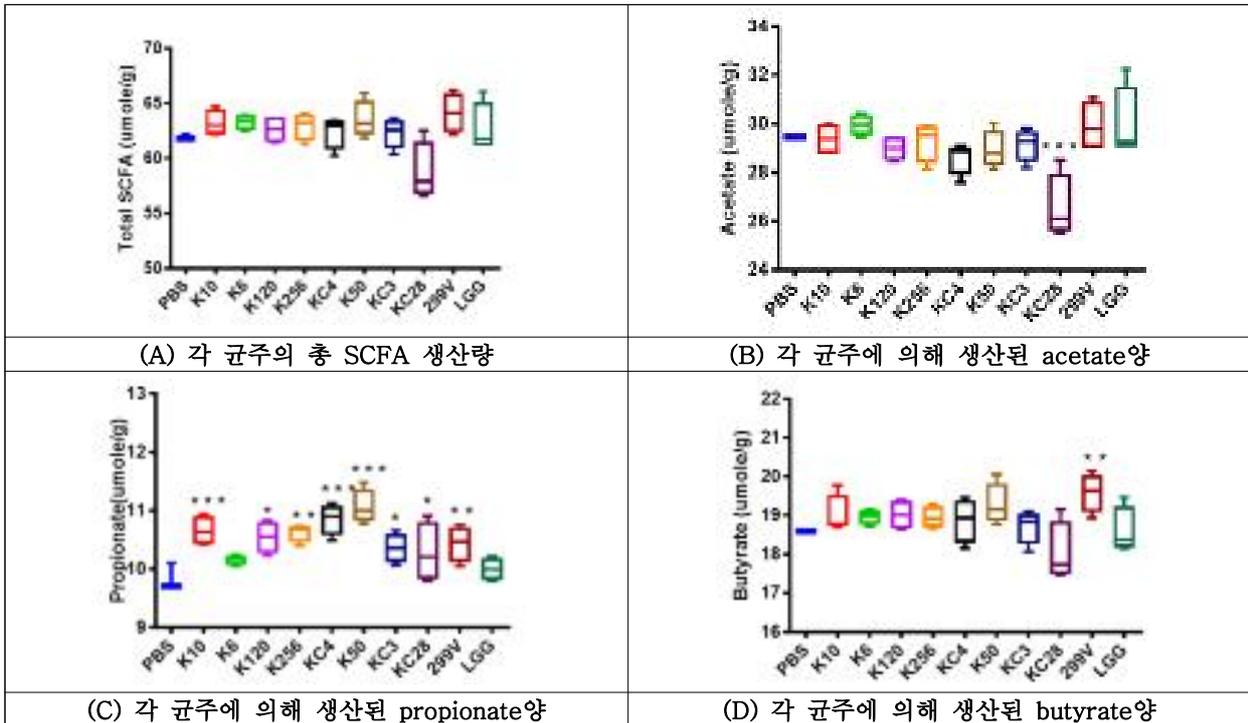


Figure 6. 선별 균주의 SCFA(short chain fatty acid) 생산량

3-2. *In vivo* 스크리닝 통한 기능성 균주 탐색 및 확보

가. 비만 마우스 모델 구축을 위한 최적의 고지방 및 고탄수화물 식이 조제

(1) 연구 결과

- 항비만 기능성 균주 연구를 위한 연구모델 구축을 위하여, 일반 마우스 식이인 AIN93G를 기본으로 지방과 탄수화물 배합을 서로 다르게 하여 이상식을 조제하였다. (Table 23)

Table 23. 마우스 연구모델 구축에 사용된 조제 식이의 종류

	Maximum Fat (MF)	Intermediate Fat (IF)	Intermediate Carbohydrate (IC)	Maximum Carbohydrate (MC)
성분 (g)				
AIN-93G	100	100	100	100
Sucrose	50	99	115	165
Maltodextrin	50	99	115	165
Casein	80	80	80	80
Lard	172	128	114	70
영양소 (Kcal%)				
Carbohydrate	25%	40%	45%	60%
Fat	60%	45%	40%	25%
Protein	15%	15%	15%	15%

나. 마우스 실험을 통한 최적의 이상식이 조성 결정 및 대사질환 마우스 모델 구축

(1) 연구 방법

- AIN93G식이를 비롯하여 4가지의 조제된 이상 식이들 (Table 17 참조)과 Research Diet사의 10%fat (D12450B), 45%fat (D12451), 60%fat (D12492)식이를 투여한 그룹의 무게변화 차이를 비교하였다. 식이 및 물은 자유급여되었으며 매주 1회 체중을 측정하였다. 또한 실험 4주차에는 당부하검사 (oral glucose tolerance test)를 실시하여 대사질환의 중요한 지표인 내당성을 악화 정도를 검증하였다. (16시간 금식한 마우스의 공복혈당 측정 후 2g/kg의 포도당을 경구투여, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분 간격으로 혈당치 체크. 혈당 체크는 꼬리 끝 정맥혈을 혈당지를 통해 측정) 식이 투여 14주 후 실험을 종료한 후에는 마우스 희생 후 간과 지방등의 조직을 수거하여 무게를 측정, 비교하였다.

(2) 연구 결과

(가) 당부하검사

- 마우스 모델의 비만 유도 정도뿐만 아니라 대사질환 심화 정도 또한 파악하기 위하여 당부하 검사를 식이 투여 4주 경과 후에 실시하였다. 그 결과 IF 투여그룹의 마우스의 내당성이 유의적으로 악화된 것을 확인할 수 있었다.

(Figure 7)

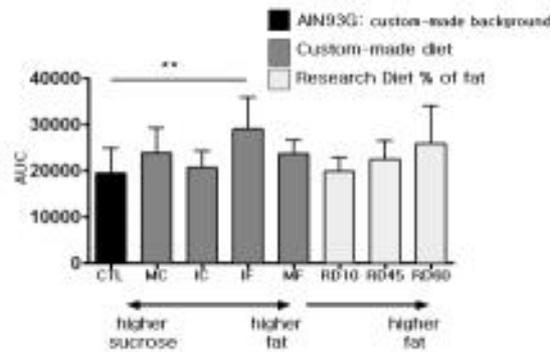


Figure 7. 4주차 당부하검사 결과의 시간별 혈당변화 그래프의 area under the curve

CTL: control (AIN93G식이 투여그룹), MC: maximum carbohydrate, IC: Intermediate carbohydrate, IF: Intermediate fat, MF: maximum fat, RD10: Research Diets 10% fat, RD45: Research Diets 45% fat, RD60: Research Diets 60% fat. 그래프는 평균과 표준편차로 나타내었으며, AIN93G식이 투여그룹(CTL)에 대하여 t-test 양측 검정 후 $p < 0.05$ 일 때 *, $p < 0.01$ 일 때 **를 표기함 (A그래프에서는 IF, B그래프에서는 RD60그룹에 해당).

(나) 무게 변화

- 각 그룹마다 해당 식이와 멸균된 식수를 자유식으로 공급하였고 14주간 각각의 식이를 투여한 후 총 무게 변화는 Figure 8과 같으며, 당부하검사뿐 아니라 무게변화에서도 조제식이 그룹 중 IF그룹의 무게변화가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다. (Figure 8)

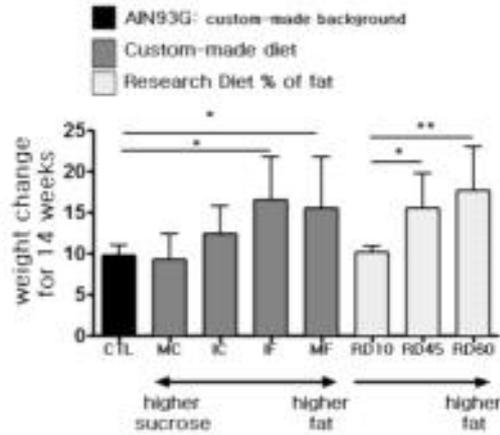


Figure 8. 14주간의 마우스의 최종적인 무게 변화

CTL: control (AIN93G식이 투여그룹), MC: maximum carbohydrate, IC: Intermediate carbohydrate, IF: Intermediate fat, MF: maximum fat, RD10: Research Diets 10% fat, RD45: Research Diets 45% fat, RD60: Research Diets 60% fat. 그래프는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 제조식이 (MC, IC, IF, MF) 투여그룹은 AIN93G식이 투여그룹(CTL)에 대하여, Research Diet사의 고지방식이 투여그룹은 RD10그룹에 대하여 Dunnet으로 One-way ANOVA 사후 검정 후 $p < 0.05$ 일 때 *, $p < 0.01$ 일 때 **를 표기함.

(다) 장기 무게 변화

- 비만 및 대사질환 진행도와 밀접한 상관관계를 가지는 간과 각종 지방의 무게 차이를 비교한 결과 조제식이 중 IF 투여군에서 비만이 가장 효과적으로 유도된 것을 확인할 수 있다. (Figure 9)

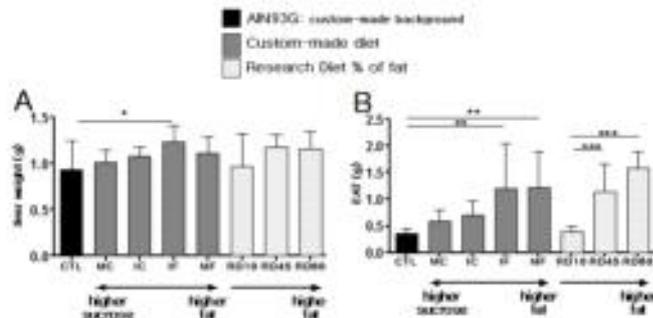


Figure 9. 적출한 간 (A)과 정소지방 (B)의 무게 차이

CTL: control (AIN93G식이 투여그룹), MC: maximum carbohydrate, IC: Intermediate carbohydrate, IF: Intermediate fat, MF: maximum fat, RD10: Research Diets 10% fat, RD45: Research Diets 45% fat, RD60: Research Diets 60% fat. 그래프는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 제조식이 (MC, IC, IF, MF) 투여그룹은 AIN93G식이 투여그룹(CTL)에 대하여, Research Diet사의 고지방식이 투여그룹은 RD10그룹에 대하여 Dunnet으로 One-way ANOVA 사후 검정 후 $p < 0.05$ 일 때 *, $p < 0.01$ 일 때 **를 표기함.

☞ 각 이상식이 투여 그룹에서의 당부하 검사 및 총무게변화와 장기무게를 고려하였을 때, 조제식이 중 IF식이 가장 비만 및 대사질환 유도에 가장 적합할 것이라는 결론을 내렸다.

다. 비만 유도 마우스에 대한 기능성 확인

(1) 연구 방법

- 각 그룹당 8마리의 5주령 C57BL/6 수컷 마우스에 프로바이오틱스 후보 균주, 2개의 참고균주 (해외 수입 프로바이오틱스), 그리고 항비만 약물 대조군인 Xenical을 투여하였다. AIN-93G를 사용하는 음성대조군과 IF식을 사용하는 10 그룹을 12주간 체중 증가량을 확인함으로 분리된 프로바이오틱스의 항비만/항대사질환 기능성을 확인하였다. 연구 종료 후에 희생하여 장기 무게 및 프로바이오틱스를 통한 장균총, 대사체 조절 및 지방내 생체지표를 규명하였다. (Table 24)

Table 24. 마우스 실험 그룹 (N=10)

그룹명	투여물질	투여식이
1	ND	-
2	HFD	-
3	Xenical	40mpk (Anti-obesity drug)
4	LGG	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
5	299V	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> 299V
6	KC3	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> KC3
7	KC4	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> KC4
8	KC28	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> KC28
9	K10	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> K10
10	K50	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> K50
11	K259	1x10 ⁹ CFU <i>Lactobacillus plantarum</i> K259

IF 식이
 탄수화물: 45%;
 지방: 40%;
 단백질: 15%

(2) 연구 결과

(가) 무게 변화

- IF식을 이용한 12주간의 식이 유도 비만/대사질환 연구를 수행한 결과 본 연구를 통해 개발된 KC3, KC28, K50 균주가 상용화된 수입 프로바이오틱스 균주인 LGG 보다 우수한 체중 감소가 확인되었으며 고지방, 고탄수화물이 투여되지 않은 ND군과 항비만 약물인 Xenical 군에서 가장 유의적인 체중 감소가 확인되었다. (Figure 10)

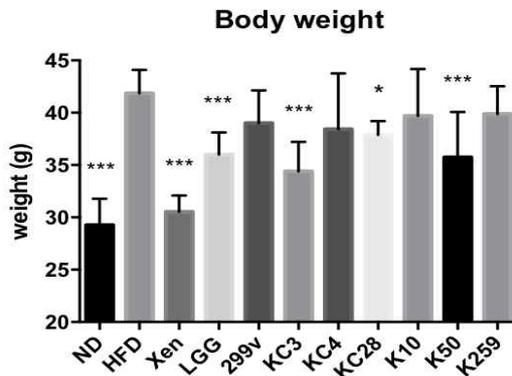


Figure 10. 12주 연구 후 각 그룹의 마우스 무게 (g)

그래프는 평균과 표준편차 (SD)로 나타내었으며, 통계적 유의성은 HFD군에 대하여 Fisher's LSD test로 검정하였다(p<0.05 일 때 *, p<0.01 일 때 **, p<0.001 일 때 ***를 표기함).

(나) 장기 무게 변화

- 2주간의 마우스 실험이 종료된 후 마우스를 희생하여 혈청, 간, 정소지방 (EAT), 피하지방 (SAT), 내장지방 (MAT), 장, 맹장 및 근육을 적출하여 무게를 측정 후 - 80°C에 보관하였다. 항비만 지표의 주요 장기인 간, 정소지방, 피하지방, 내장지방의 무게는 아래와 같다 (Table 25). KC3 투여군에서는 간, 정소지방, 피하지방, 내장지방의 무게가 유의적으로 감소함이 확인되었으며, K50 투여군에서는 간 및 정소지방의 무게가 유의적으로 감소함을 확인하였다. K 10 투여군의 경우 내장지방 무게가 유의적으로 감소하여 KC3, K50, K10이 가장 우수한 항비만 균주로 판명되었다. (Figure 11)

Table 25. 장기 무게 및 증감량

그룹명	무게 (g) / HFD군 대비 증감량 (%)								
	간		정소지방		피하지방		내장지방		
1	ND	1.04	-32%	0.81	-60.1%	0.38	-73.6%	0.34	-61.8%
2	HFD	1.53	0%	2.03	0%	1.44	0%	0.89	0%
3	Xenical	1.26	-17.6%	0.75	-63.1%	0.36	-75.0%	0.25	-71.9%
4	LGG	1.22	-20.3%	1.73	-14.8%	0.97	-32.6%	0.57	-36.0%
5	299V	1.44	-5.88%	1.81	-10.8%	1.12	-22.2%	0.76	-14.6%
6	KC3	1.20	-21.6%	1.64	-19.2%	0.91	-36.8%	0.52	-41.6%
7	KC4	1.39	-9.15%	1.75	-13.8%	1.05	-27.1%	0.79	-11.2%
8	KC28	1.39	-9.15%	1.76	-13.3%	1.03	-28.5%	0.61	-31.5%
9	K10	1.50	-1.96%	1.94	-4.43%	1.01	-29.9%	0.57	-36.0%
10	K50	1.28	-16.3%	1.68	-17.2%	0.96	-33.3%	0.68	-23.6%
11	K259	1.39	-9.15%	1.83	-9.85%	0.92	-36.1%	0.68	-23.6%

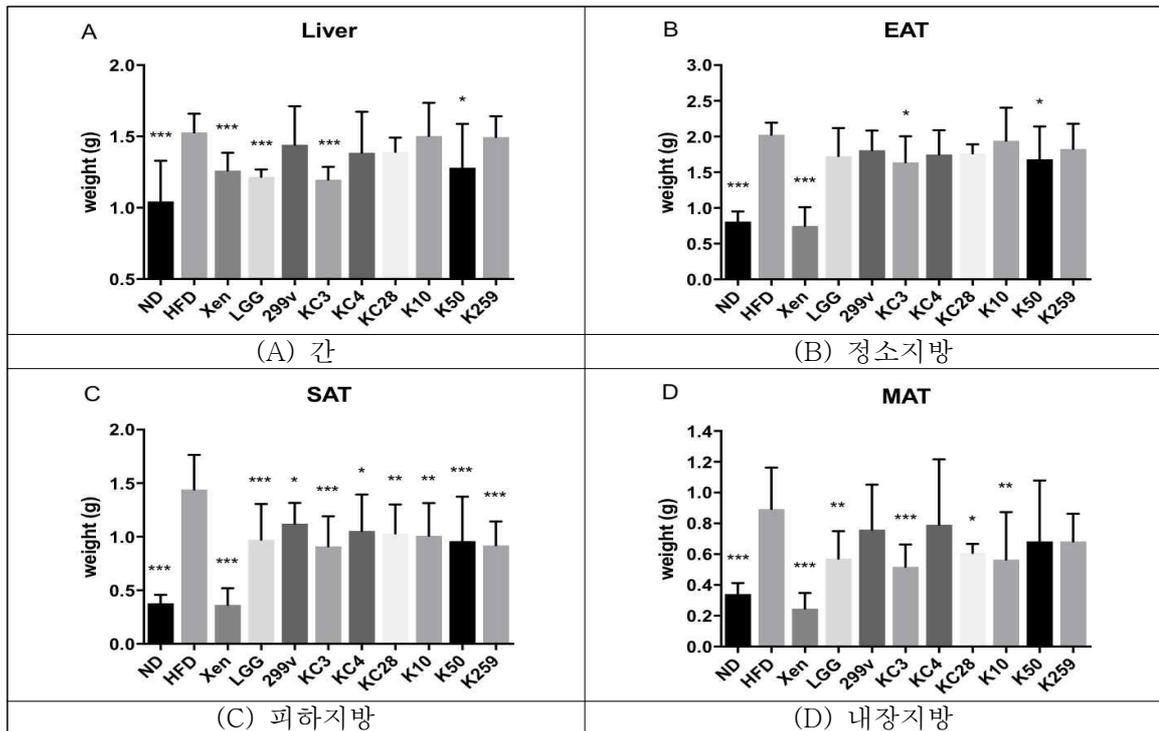


Figure 11. 적출한 (A)간, (B)정소지방, (C)피하지방, (D)내장지방 무게 차이.

그래프는 평균과 표준편차 (SD)로 나타내었으며, 통계적 유의성은 HFD군에 대하여 Fisher's LSD test로 검정하였다 (p<0.05 일 때 *, p<0.01 일 때 **, p<0.001 일 때 ***를 표기함).

(다) 장투과성 차이 확인

- Fluorescein isothiocyanate conjugated dextran (FITC-dextran) (Sigma-Aldrich)를 이용한 장 투과성을 측정법을 사용하였고, 15주간 IF 식이를 투여한 마우스에 FITC-dextran을 쥐 무게 100g당 44mg을 투여한 후 혈청내 존재하는 FITC-dextran의 양을 측정하여 장 투과성을 확인하였다. *Lactobacillus plantarum* K10, K50, KC28, KC259 및 299v는 대조군 (HFD)에 비해 장 투과성이 유의적으로 개선되었다. (Figure 12)

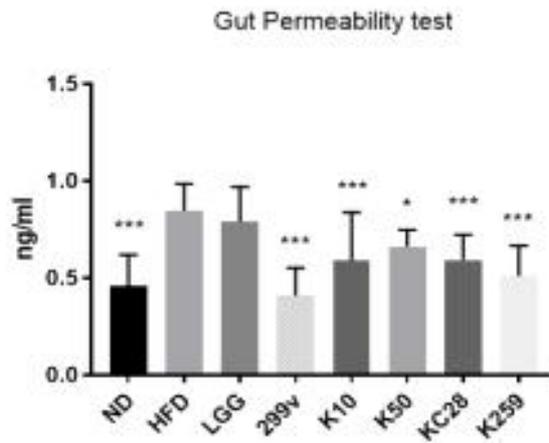


Figure 12. Fluorescein isothiocyanate conjugated dextran (FITC-dextran) (Sigma-Aldrich)를 이용한 후보균주 장 투과성 차이 측정

그래프는 평균과 표준편차 (SD)로 나타내었으며, 통계적 유의성은 HFD군에 대하여 Fisher's LSD test로 검정하였다(p<0.05 일 때 *, p<0.01 일 때 **, p<0.001 일 때 ***를 표기함).

(라) 혈액 생화학 분석을 통한 비만 및 질병 상태 평가

- 비만을 유도했을 때 KC3, KC28, K10, K50을 투여한 군에서 HFD보다 유의적으로 낮은 농도의 총콜레스테롤이 측정이 되었으며, 심지어 KC3, K50은 상용화된 수입 프로바이오틱스인 LGG와 299v보다 유의적인 콜레스테롤 감소가 확인되었다. 또한 혈중저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDLC) 농도를 측정해본 결과 KC3, KC28, K10, K50에서 유의적으로 감소함을 확인하였다. 또한 대사성질환과 밀접한 관련이 있는 중성지방의 수치 또한 KC3, KC4, KC28, K10, K259 투여군에서 LGG와 299V보다 유의적으로 감소함을 확인하였다. (Figure 13)

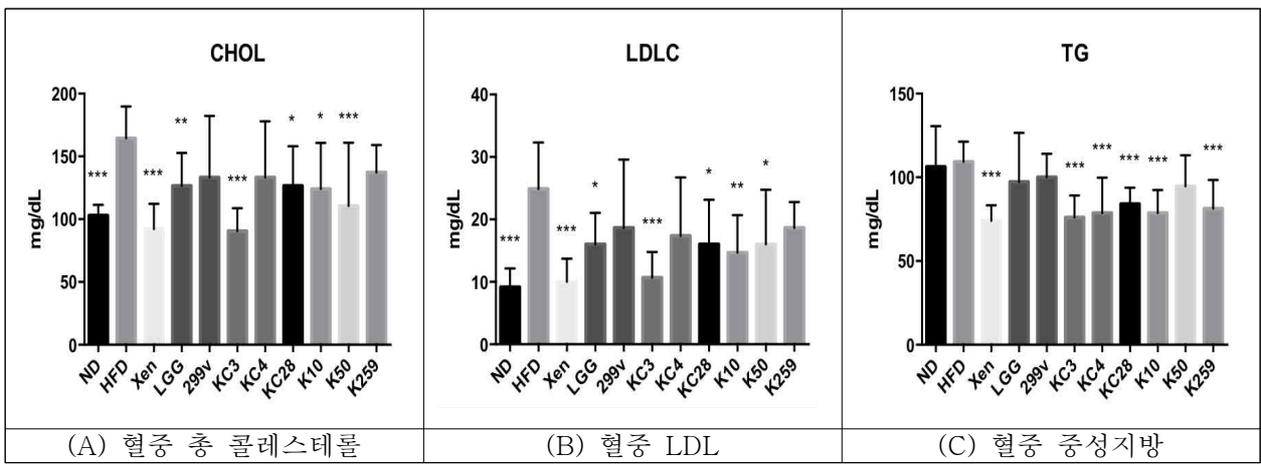


Figure 13. (A)혈중 총콜레스테롤, (B) LDL 및 (C) 중성지방 분석 결과

그래프는 평균과 표준편차 (SD)로 나타내었으며, 통계적 유의성은 HFD군에 대하여 Fisher's LSD test로 검정하였다(p<0.05 일 때 *, p<0.01 일 때 **, p<0.001 일 때 ***를 표기함).

(마) Gas chromatography를 이용한 짧은 사슬 지방산 측정

- 마우스의 SCFA를 맹장에서 측정하였으며 KC4, K28, K10, K50에서 HFD 대조군에 비해 유의적으로 높은 부티르산 농도가 확인되었다 (Figure 14).

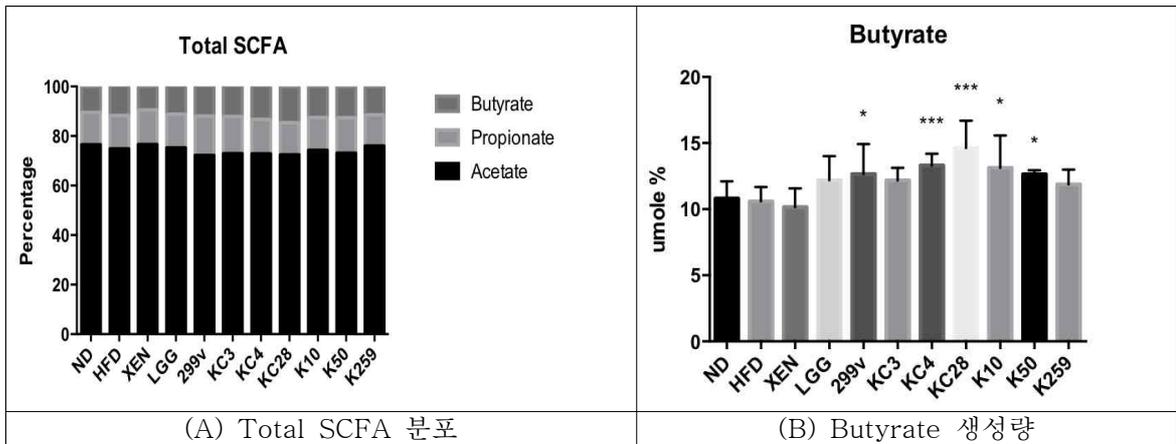


Figure 14. (A)Total SCFA 분포 및 (B) Butyrate 생성량

그래프는 평균과 표준편차 (SD)로 나타내었으며, 통계적 유의성은 HFD군에 대하여 Fisher's LSD test로 검정하였다(p<0.05 일 때 *, p<0.01 일 때 **, p<0.001 일 때 ***를 표기함).

(바) 프로바이오틱스 투여에 따른 장균총 변화 관찰

- 마우스의 맹장내 장균총을 분석하였다. 맹장에서 Qiagen stool mini kit를 이용하여 DNA를 추출한 후 바코딩하여 16s rRNA의 V3-V4 구간의 유전체를 분석하였고 이를 통해 샘플당 15,000 read 이상, 450bp read length 이상의 데이터를 수집하여 QIIME pipeline을 통해 분석한 결과는 다음과 같다 (Figure 15, 16).

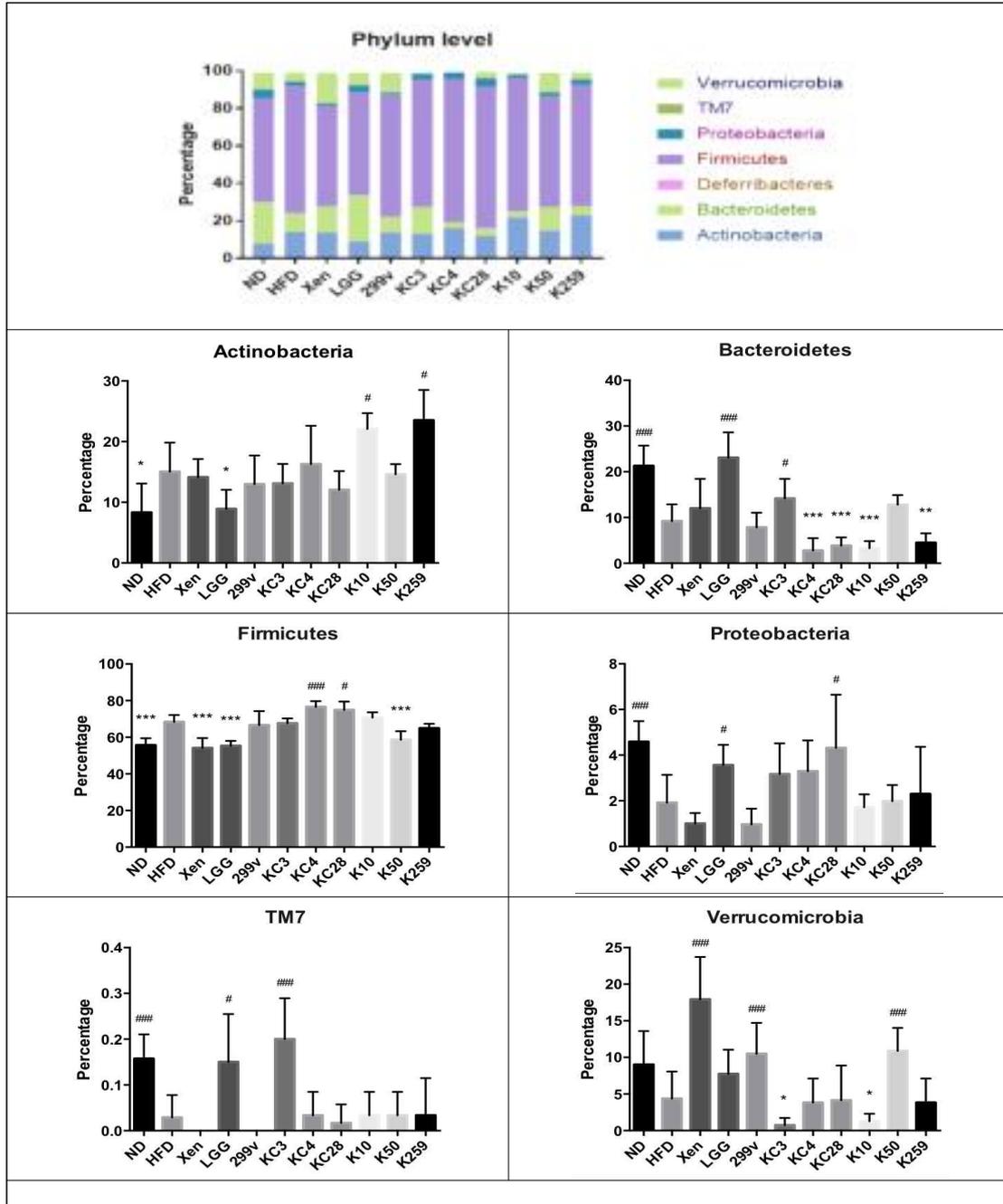


Figure 15. 미생물의 문(phylum) 수준에서 분석한 장균총 결과

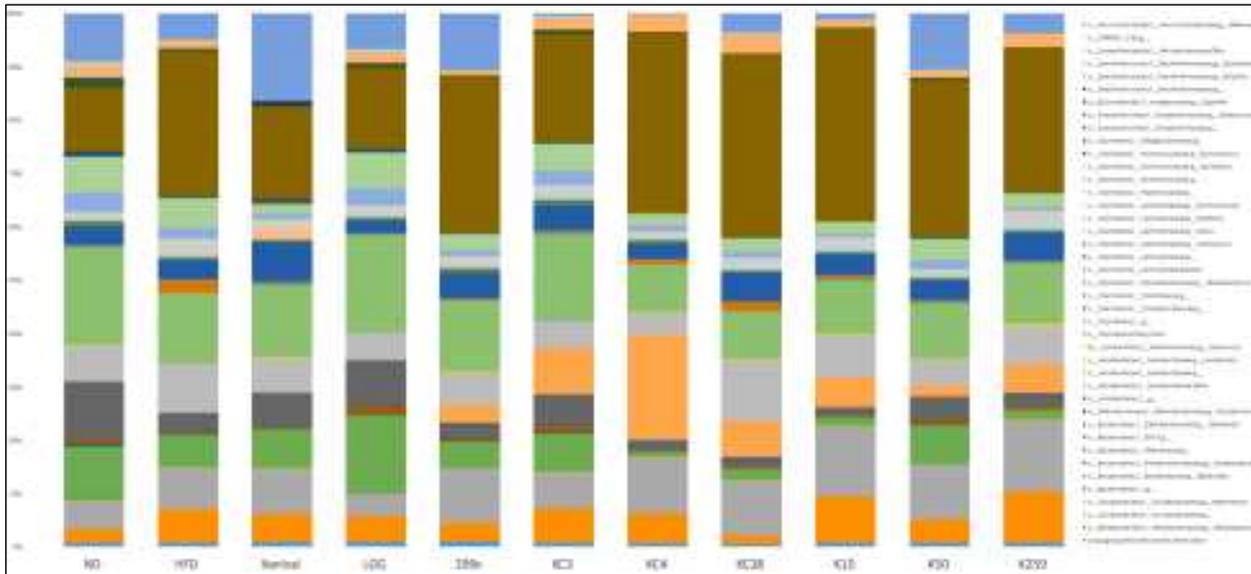


Figure 16. 미생물의 속(genus) 수준에서 분석한 장균총 결과

(사) 비만 및 대사질환 생체지표 분석 통한 선발 균주의 항비만 메커니즘 규명

- 실험 종료 후 적출한 정소지방에서 항비만 생체지표를 분석하였다. 정소지방 무게가 유의적으로 감소한 KC3, K10 투여군에서 지방산 산화에 관여하는 CPT1a(Carnitine palmitoyltransferase 1a) 및 PPARα (Peroxisome proliferator activated receptor alpha)가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며, KC4의 경우 CPT1a가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. KC28의 경우 PPARα가 유의적으로 증가하였다. 염증 지표인 IL10과 IL12를 비교하였을 때 K50, K259에서 IL10인 항염증 관련 지표가 유의적으로 증가하였고, HFD 대조군에 비해서 IL12에서는 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 IL12/IL10 염증생체지표/항염증생체지표 비율을 봤을 때 HFD군에 비교하여, ND, KC4 및 Xenical을 제외한 나머지 군들에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 17).

☞ *In vivo* 실험 결과, 항비만 기능이 우수한 균주로 *L. plantarum* K10, K50, K259, KC3, KC28 균주가 선별되었다.

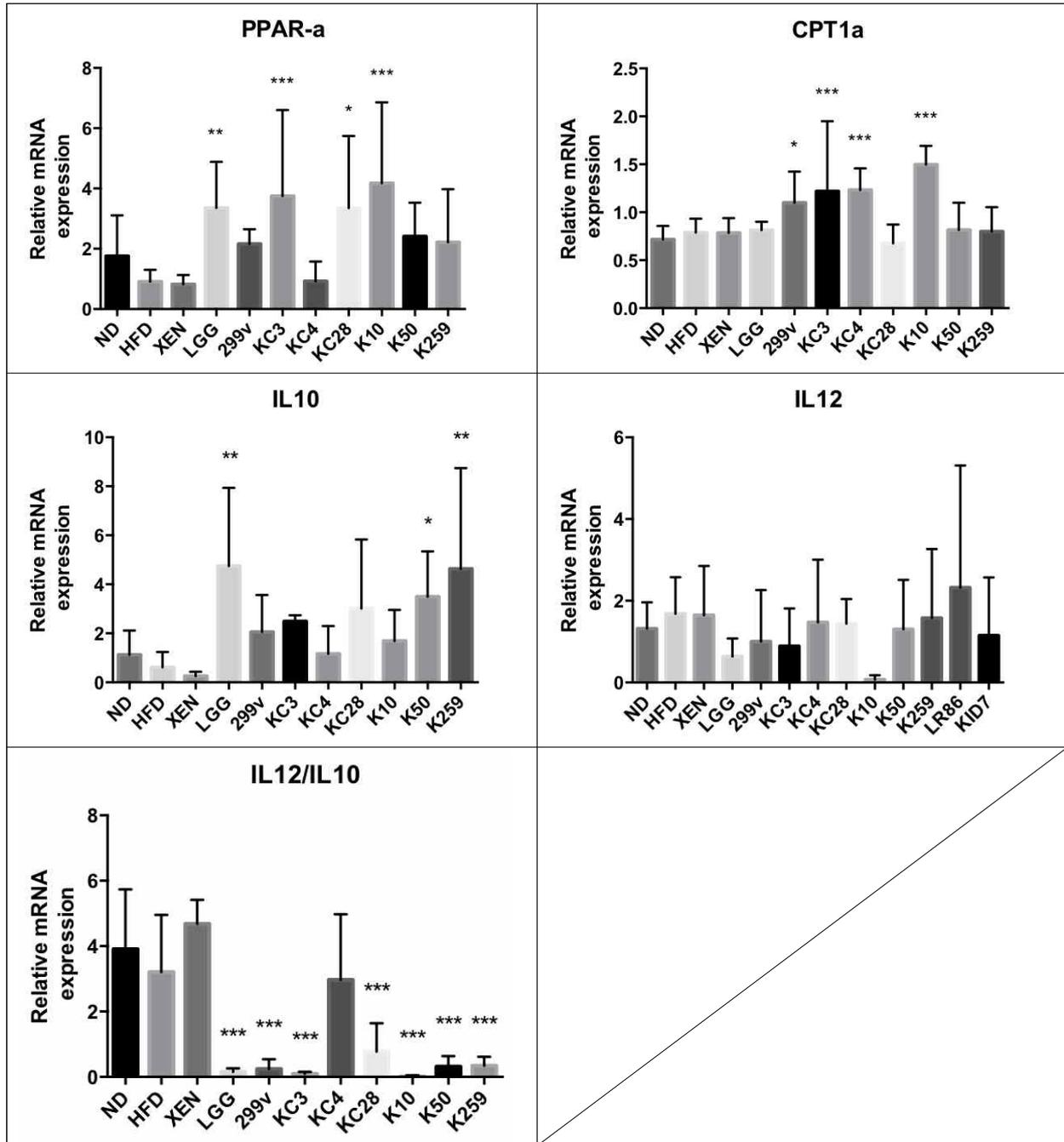


Figure 17. 정소지방에서 생체지표 분석 결과

그래프는 평균과 표준편차 (SD)로 나타내었으며, 통계적 유의성은 HFD군에 대하여 Fisher's LSD test로 검정하였다. (p<0.05 일 때 *, p<0.01 일 때 **, p<0.001 일 때 ***를 표기함).

다. 항비만 후보균주 유전체 분석

(1) 연구 방법

- 항비만 후보균주로 선별된 *L. plantarum* K10, K50, K259, KC3, KC28 균주의 유전체 분석을 위하여, 각각의 균주를 배양한 후 전장유전체 분석 업체 ((주)테라젠이텍스)에 유전체 의뢰를 수행 하였다.

(2) 연구 결과

(가) 전략미생물해독

- *L. plantarum* K10 유전체분석 결과 3,282,775 bp 크기의 유전체였으며, *L. plantarum* KC28 균주는 3,291,849 bp, *L. plantarum* K259 균주는 3,332,097 bp 크기의 유전체를 가지고 있었다 (Figure 18).

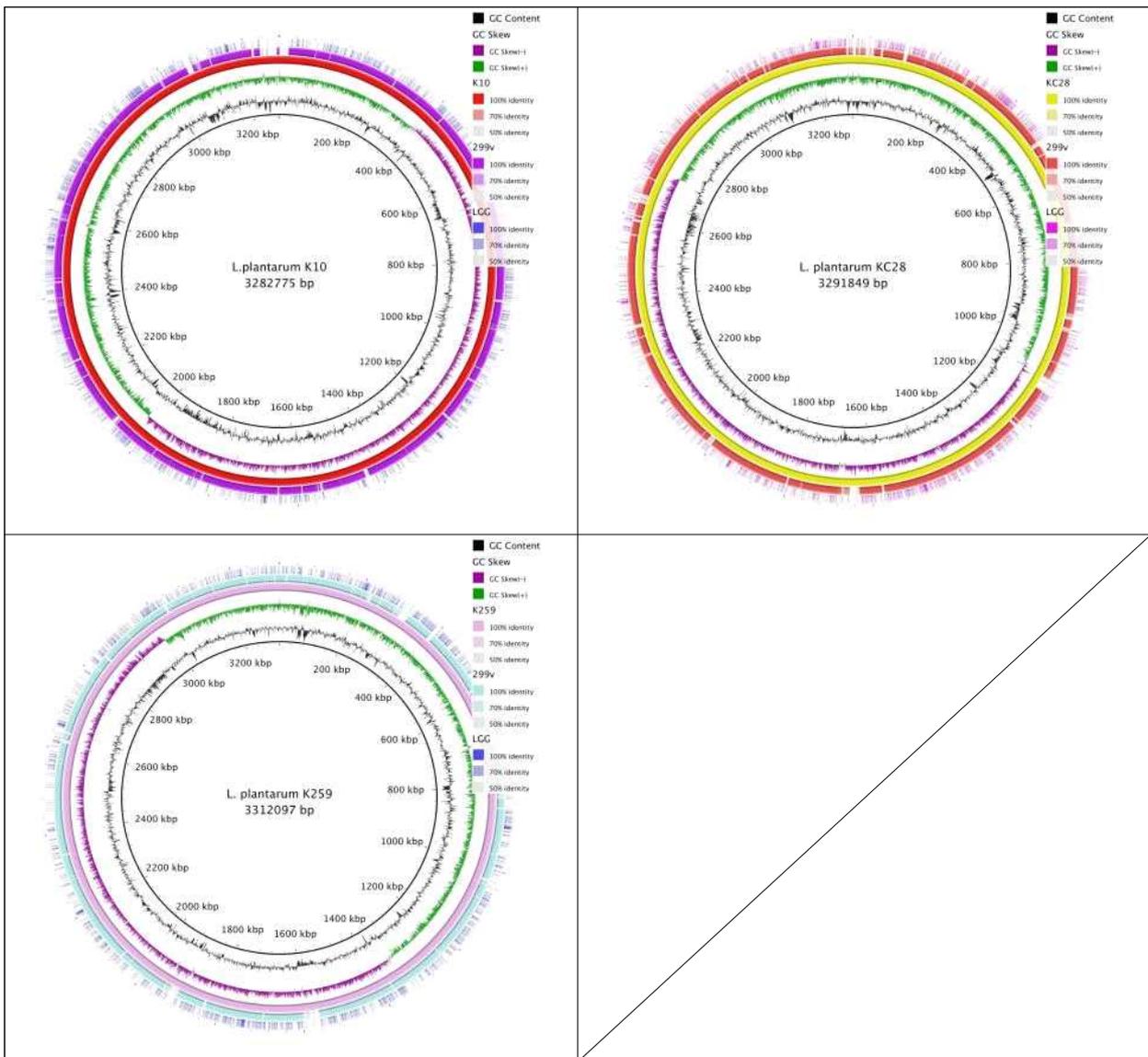


Figure 18. 전략미생물해독 결과

(나) 표준유전체해독

- *L. plantarum* KC3과 K50균주는 표준유전체해독을 통하여 control (299v)균주와 유전자차이를 확인하였다 (Figure 19, Table 26, 27).

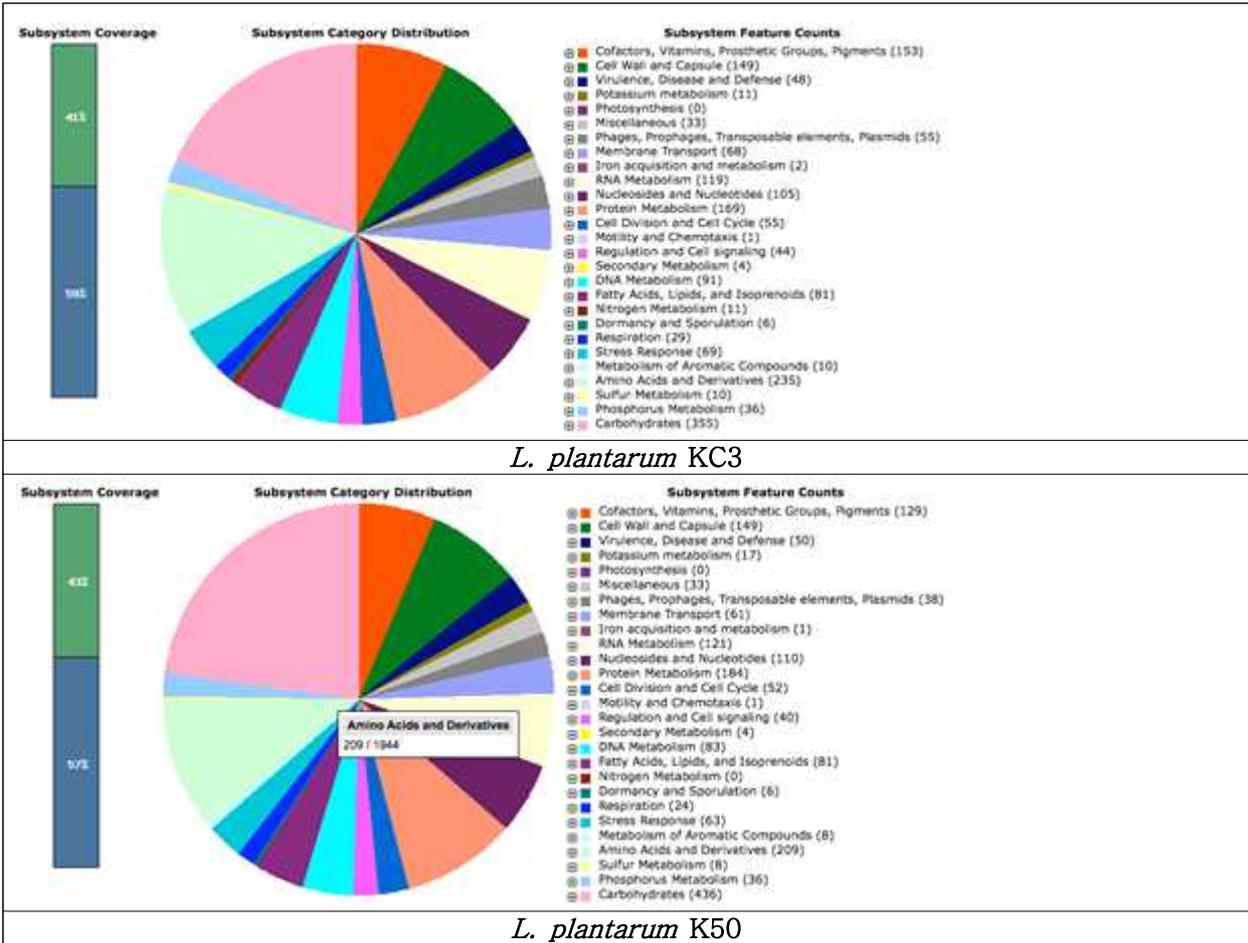


Figure 19. 표준유전체해독 결과

Table 26. Control (299v)와 KC3 균주의 유전자 비교 (KC3 균주만 존재하는 유전자)

Presence	Category	Subcategory	Subsystem	Role
KC3	Amino Acids and Derivatives	Aromatic amino acids and derivatives	Chorismate: Intermediate for synthesis of Tryptophan, PAPA antibiotics, PABA, 3-hydroxyanthranilate and more.	Para-aminobenzoate synthase, amidotransferase component (EC 2.6.1.85)
KC3	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysacchrides	dTDP-rhamnose synthesis	dTDP-rhamnosyl transferase RbfF (EC 2.-.-.-)

Table 26. 계속

KC3	Clustering-based subsystems	Two related proteases	CBSS-257314.1.peg.676	Competence/damage-inducible protein CinA
KC3	Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	Riboflavin, FMN, FAD	Riboflavin, FMN and FAD metabolism	5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase (EC 1.1.1.193)
KC3	Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	Riboflavin, FMN, FAD	Riboflavin, FMN and FAD metabolism	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase (EC 3.5.4.26)
KC3	DNA Metabolism	DNA repair	DNA repair, bacterial	Methyl-directed repair DNA adenine methylase (EC 2.1.1.72)
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage capsid proteins	Phage head maturation protease
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage capsid proteins	Phage major capsid protein
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage capsid proteins	Phage minor capsid protein
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage replication	DNA helicase, phage-associated
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage replication	Phage replication protein
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage tail proteins	Phage major tail protein
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage tail proteins	Phage minor tail protein
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage tail proteins	Phage tail assembly
KC3	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage tail proteins	Phage tail protein
KC3	Regulation and Cell signaling	no subcategory	Sex pheromones in Enterococcus faecalis and other Firmicutes	Putative pheromone precursor lipoprotein, related to Cad

Table 26. 계속

KC3	Regulation and Cell signaling	no subcategory	cAMP signaling in bacteria	Prophage Clp protease-like protein
KC3	Stress Response	Osmotic stress	Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Choline binding protein A
KC3	Stress Response	Osmotic stress	Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, ATP-binding protein OpuAA (EC 3.6.3.32)
KC3	Stress Response	Osmotic stress	Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, glycine betaine-binding protein OpuAC
KC3	Stress Response	Osmotic stress	Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, permease protein OpuAB

Table 27. Control (299v)와 K50 균주의 유전자 비교 (K50 균주만 존재하는 유전자)

Presence	Category	Subcategory	Subsystem	Role
K50	Amino Acids and Derivatives	Lysine, threonine, methionine, and cysteine	Cysteine Biosynthesis	Sulfate permease, Trk-type
K50	Carbohydrates	Central carbohydrate metabolism	Pyruvate metabolism II: acetyl-CoA, acetogenesis from pyruvate	Pyruvate oxidase [ubiquinone, cytochrome] (EC 1.2.2.2)
K50	Carbohydrates	Di- and oligosaccharides	Maltose and Maltodextrin Utilization	Putative oxidoreductase YcjS (EC 1.-.-), NADH-binding
K50	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysacchrides	Exopolysaccharide Biosynthesis	Glycosyl transferase, group 2 family protein
K50	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysacchrides	dTDP-rhamnose synthesis	dTDP-rhamnosyl transferase RfbF (EC 2.-.-)
K50	Clustering-based subsystems	Two related proteases	CBSS-257314.1.peg.67 6	Competence/damage-inducible protein CinA

Table 27. 계속

K50	Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	Riboflavin, FMN, FAD	Riboflavin, FMN and FAD metabolism	5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase (EC 1.1.1.193)
K50	Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	Riboflavin, FMN, FAD	Riboflavin, FMN and FAD metabolism	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase (EC 3.5.4.26)
K50	DNA Metabolism	DNA repair	DNA repair, bacterial	Methyl-directed repair DNA adenine methylase (EC 2.1.1.72)
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage capsid proteins	Phage major capsid protein
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage packaging machinery	Phage DNA packaging
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage replication	DNA helicase, phage-associated
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage replication	DNA replication protein, phage-associated
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage replication	Phage replication protein
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage tail fiber proteins	Phage tail fibers
K50	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	Phages, Prophages	Phage tail proteins	Phage major tail protein
K50	Potassium metabolism	no subcategory	Potassium homeostasis	Osmosensitive K ⁺ channel histidine kinase KdpD (EC 2.7.3.-)
K50	Potassium metabolism	no subcategory	Potassium homeostasis	Potassium-transporting ATPase A chain (EC 3.6.3.12) (TC 3.A.3.7.1)
K50	Potassium metabolism	no subcategory	Potassium homeostasis	Potassium-transporting ATPase B chain (EC 3.6.3.12) (TC 3.A.3.7.1)

Table 27. 계속

K50	Potassium metabolism	no subcategory	Potassium homeostasis	Potassium-transporting ATPase C chain (EC 3.6.3.12) (TC 3.A.3.7.1)
K50	Protein Metabolism	Protein biosynthesis	tRNAs	tRNA-Ser-GGA
K50	RNA Metabolism	no subcategory	Group II intron-associated genes	Retron-type RNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.49)
K50	Regulation and Cell signaling	no subcategory	cAMP signaling in bacteria	Prophage Clp protease-like protein
K50	Stress Response	Osmotic stress	Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, glycine betaine-binding protein OpuAC

3-3. 배양 조건 및 제조공정 확립

가. 배양 조건 최적화

(1) 연구 방법

① Flask level

㉠ 탄소원 최적화

- 배양 조건 최적화를 위해 탄소원 종류별 실험을 진행하였다. 탄소원은 glucose, fructose, sucrose, mannose, galactose를 각각 20 g/L의 농도로 사용하였다. 배양은 500ml flask에서 37 °C, 정치배양, 혐기적인 조건에서 24시간 동안 수행하였다. 탄소원 종류별 실험을 진행한 후, 선정된 탄소원에 대하여 10, 20, 30, 40, 50 g/L 농도별로 실험을 진행하였다.

㉡ 질소원 최적화

- 최적화된 탄소원을 기준으로 질소원 최적화를 실험을 진행하였다. 질소원은 Yeast extract, Skim milk, Tryptone, Peptone, Soy peptone, Potato peptone을 각각 20 g/L의 농도로 첨가하여 배양하였다. 또한 질소원 종류별 실험을 진행한 후 선정된 질소원에 대하여 10, 20, 30 g/L 농도별 실험 및 두 종류 질소원의 조합 영향을 조사하였다.

② Jar-fermenter

㉠ 탄소원 최적화

- 배양 조건 최적화를 위해 탄소원 종류별 실험을 진행하였다. 탄소원은 glucose, fructose, sucrose, mannose, galactose를 각각 20 g/L의 농도로 사용하였다. 전배양을 위하여 100 mL flask, 37 °C, pH 5.5 조건에서 12~20시간 동안 정치배양하였고, 본배양은 Jar fermentor (7 L)에서 37 °C, pH 6.0 80 rpm, 1vvm 혐기적인 조건에서 16~20시간 동안 수행하였다. 별도의 언급이 없는 한 모든 배양실험은 상기 조건과 동일하게 하였다. 탄소원 종류별 실험을 진행한 후, 선정된 탄소원에 대하여 10, 20, 30, 40, 50 g/L 농도별로 실험을 진행하였다.

㉡ 질소원 최적화

- 최적화된 탄소원을 기준으로 질소원 최적화를 실험을 진행하였다. 질소원은 Yeast extract, Skim milk, Tryptone, Peptone, Soy peptone, Potato peptone을 각각 20 g/L의 농도로 첨가하여 배양하였다. 또한 질소원 종류별 실험을 진행한 후 선정된 질소원에 대하여 10, 20, 30 g/L 농도별 실험 및 두 종류 질소원의 조합 영향을 조사하였다.

㉢ 전배양 시간 및 접종량

- 전배양 시간 및 접종량 최적화 실험을 위하여 전배양 시간은 10, 14, 18, 22 시간으로 달리하였고, 접종량은 각각 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 %로 하여 진행하였다.

㉣ 전배양 온도 및 접종량

- 최적 전배양 온도를 파악하기 위하여 25, 30, 37, 45 °C에서 각각 전배양을 수행하였고, 온도를 제외한 나머지 전배양 조건과 본배양 조건은 상기 조건과 동일하게 진행하였다.

㉞ 본배양 pH control

- 본배양 시 pH의 영향 실험은 pH를 조절하지 않았을 경우와 pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 조절한 경우를 비교하였으며, pH 조절을 위해 암모니아수를 사용하였다.

③ 350L-fermenter

㉠ 탄소원 최적화

- 배양 조건 최적화를 위해 탄소원 종류별 실험을 진행하였다. 탄소원은 glucose, fructose, sucrose, mannose, galactose를 각각 20 g/L의 농도로 사용하였다. 전배양을 위하여 350 mL flask, 37 °C, pH 5.5 조건에서 12~20시간 동안 정치배양하였고, 본배양은 Jar fermentor (350 L)에서 37 °C, pH 6.0 80 rpm, 1vvm 혐기적인 조건에서 16~20시간 동안 수행하였다. 별도의 언급이 없는 한 모든 배양실험은 상기 조건과 동일하게 하였다. 탄소원 종류별 실험을 진행한 후, 선정된 탄소원에 대하여 10, 20, 30, 40, 50 g/L 농도별로 실험을 진행하였다.

㉡ 질소원 최적화

- 최적화된 탄소원을 기준으로 질소원 최적화를 실험을 진행하였다. 질소원은 Yeast extract, Skim milk, Tryptone, Peptone, Soy peptone, Potato peptone을 각각 20 g/L의 농도로 첨가하여 배양하였다. 또한 질소원 종류별 실험을 진행한 후 선정된 질소원에 대하여 10, 20, 30 g/L 농도별 실험 및 두 종류 질소원의 조합 영향을 조사하였다.

㉢ 전배양 시간 및 접종량

- 전배양 시간 및 접종량 최적화 실험을 위하여 전배양 시간은 10, 14, 18, 22 시간으로 달리하였고, 접종량은 각각 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 %로 하여 진행하였다.

㉣ 전배양 시간 및 접종량

- 최적 전배양 온도를 파악하기 위하여 25, 30, 37, 45 °C에서 각각 전배양을 수행하였고, 온도를 제외한 나머지 전배양 조건과 본배양 조건은 상기 조건과 동일하게 진행하였다.

㉞ 본배양 pH control

- 본배양 시 pH의 영향 실험은 pH를 조절하지 않았을 경우와 pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 조절한 경우를 비교하였으며, pH 조절을 위해 암모니아수를 사용하였다.

(2) 연구 결과

① 제2 협동 연구기관으로부터 입수한 균주의 Flask 배양

- 대상 균주 (3종) : *L. plantarum* K1-2f, *L. paracasei* 5, *L. sakei* HACO7
- Flask level : 500ml flask
- 배양 조건 : 37 °C, 정치배양
- 배양 결과

Table 28. 항비만 입수 균주의 flask 배양 결과

균주	배지 종류	배양성 (CFU/ml)	시간
<i>L. plantarum</i> K1-2f	MRS	2.19E+09	22hr
	LPC	3.33E+08	18hr
	LPV10	1.00E+09	22hr
<i>L. paracasei</i> 5	MRS	1.82E+09	18hr
	LPC	7.43E+08	18hr
	LPCV1	7.00E+08	22hr
	LPCV2	6.00E+08	14hr
	LPCV3	3.50E+08	22hr
	LPCV4	9.00E+08	22hr
	LPV7	5.00E+08	22hr
	LPV8	9.75E+08	14hr
	LPV11	6.00E+08	14hr
<i>L. sakei</i> HAC07	진행 보류		

- *L. plantarum* K1-2f : LPV10 배지에서 22시간 배양 시 최대 균수 1.00E+09 CFU/ml 확인하였다.
- *L. paracasei* 5 : LPV8 배지에서 14시간 배양 시 최대 균수 9.75E+08 CFU/ml 확인하였다.

② 자체 보유 균주 Mini-Jar 배양

- 대상 균주 (4종) : *L. reuteri* CKDB16, *L. rhamnosus* 86, *L. fermentum* CKDB002, *L. plantarum* CKDB081
- Jar level : 7L fermenter
- 배양조건 : 37 °C, pH, 6.0 control, RPM 80
- 배양 결과

Table 29. 자체 보유 유산균의 Mini jar 배양 결과

균주	배지종류	배양성 (CFU/ml)	시간
<i>L. reuteri</i> CKDB16	LRV2	2.23E+09	20hr
<i>L. rhamnosus</i> 86	LRC	4.90E+09	14hr
<i>L. fermentum</i> CKDB002	LFC	1.05E+09	18hr
<i>L. plantarum</i> CKDB081	LPV10	1.03E+10	14hr

- *L. reuteri* CKDB16 : LRV2 배지에서 20시간 배양 시 최대 균수 2.23E+09 CFU/ml 확인하였다.
- *L. rhamnosus* 86 : LRC 배지에서 14시간 배양 시 최대 균수 4.90E+09 CFU/ml 확인하였다.
- *L. fermentum* CKDB002 : LFC 배지에서 18시간 배양 시 최대 균수 1.05E+09 CFU/ml 확인하였다.
- *L. plantarum* CKDB081 : LPV10 배지에서 14시간 배양 시 최대 균수 1.03E+10 CFU/ml 확인하였다.

③ 제 1협동기관 (한국식품연구원)으로부터 입수한 균주의 Mini-Jar 배양

- 대상 균주 (2종, 10균주) : *L. plantarum* 8균주
control 2균주 (*L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299v)
- Jar level : 7L fermenter
- 배양조건 : 37 °C, pH, 6.0 control, RPM 80

- 배양 결과

Table 30. 항비만 입수 균주의 mini-jar 배양 결과

균종	Strain	배양 growth (CFU/ml)	배양시간
<i>L. plantarum</i>	K10	3.6E+9	16hr
	K6	5.0E+9	16hr
	K120	1.63E+9	16hr
	K259	3.0E+9	16hr
	KC4	3.0E+9	16hr
	K50	2.23E+9	16hr
	KC3	2.95E+9	16hr
	KC28	5.0E+9	16hr
<i>L. plantarum</i> ¹⁾	299V	4.8E+9	16hr
<i>L. rhamnosus</i> ¹⁾	GG	3.0E+9	16hr
1) : Control 균주			
* 사용 media : <i>L. plantarum</i> - LPC media <i>L. rhamnosus</i> - LRC media			

- 모든 균주에 대해 mini-jar level에서 16시간 배양 시 최대 균수를 확인하였다.

④ 자체 보유 균주 350L fermenter 배양

- 대상 균주 (4종) : *L. plantarum* CKDB081
- Jar level : 350L fermenter
- 배양조건 : 37 °C, pH, 6.0 control, RPM 80
- 배양 결과

Table 31. *L. plantarum* CKDB081의 350L fermenter 배양 결과

균주	배지 종류	배양성 (CFU/ml)	시간
<i>L. plantarum</i> CKDB081	LPC	2.0E+09	16hr
	LPV1	3.5E+09	16hr
	LVP2	4.1E+09	24hr
	LPV4	1.1E+09	24hr
	LPV7	1.1E+09	20hr
	LPV9	5.0E+09	22hr
	LPV10	5.4E+09	20hr

- *L. plantarum* CKDB081 : Mini jar level 최적 배지 scale-up 진행 결과 LPV10 배지에서 20hr 배양시 최대 균수 5.4E+09 CFU/ml 확인하였다.
(Min-jar 대비 52%수준)

나. 균체 회수, 코팅 및 동결 건조 조건 최적화

(1) 연구 방법

① 원심 분리 및 농축 조건

㉠ 원심 분리 조건에 따른 영향

- 배양액을 농축하기 위하여 350L fermenter에서 16~24시간 배양된 배양액을 2~5 L 취하여 batch type인 원심 분리기로 균체를 회수하였다. 원심분리 시 온도의 영향을 알아보기 위해 4, 10, 15, 20 °C 조건으로 5,000 RPM에서 20분간 원심분리한 후 균체를 합하여 약 20배로 농축하였다. 원심 분리의 RCF에 관한 영향을 알아보기 위해 1509, 2683, 4193, 6037 RCF의 조건으로 10 °C, 20분간 원심분리 후 균체를 합하여 약 20 배로 농축하였다. 각각의 최적조건은 동결건조 후 생존율로 확인하였다.

㉡ 원심 분리 조건에 따른 영향

- 농축 정도에 따른 동결건조 생존율의 영향을 확인하기 원심분리 최적 조건인 10 °C, 4193 RCF에서 20분간 원심분리 하여 약 20, 40, 60배 농축이 되도록 하였고, 동결건조 후 생존율을 조사하였다.

② 보호제 종류에 따른 동결 건조 생존율

- 동결 시 유산균의 생존율을 향상시키는 조건을 확인하기 위하여 위의 방법으로 농축한 유산균 농축액에 보호제 (lactose, trehalose, maltose, glucose, fructose, MSG, Yeast extract, sorbitol, proline, valine, levan)를 5, 10 g/L 농도로 첨가하여 보호제에 대한 동결과 해동을 거친 후 생존율을 확인하였다.

③ 동결 시간 및 동결건조 온도에 따른 생존율

㉠ 동결시간의 영향

- 동결시간을 최적화하기 위하여 원심 분리하여 얻어진 농축액 및 코팅액의 동결 시간을 0, 24, 48, 60, 72, 84시간으로 달리하여 각각 동결 및 해동한 후 생균수를 측정하였다.

㉡ 동결시간의 영향

- 동결시간 최적화 후 동결건조 조건을 최적화하기 위하여, 동결한 농축액을 이용하여 동결건조 일차별로 제조된 원말의 생균수를 측정하였다.

(2) 연구 결과

① 원심 분리 조건에 따른 영향 확인

- 대상균주 : *L. plantarum* CKDB081
- Fermenter level : 350L fermenter
- 배양 조건 : 37 °C, pH 6.0 control, RPM 60
- 원심분리 조건 (농축배수 20배)
- 온도 (4, 10, 15, 20 °C)
- RCF (1509, 2683, 4193, 6037)
- 원심분리 시간 (10분, 15분, 20분)

Table 32. 원심분리 조건에 따른 생균수

원심 분리 조건		배양 생균수 (CFU/ml)	생균수 (CFU/ml)
원심분리온도	4℃	5.4E+09	4.40E+10
	10℃		5.40E+10
	15℃		2.20E+10
	20℃		1.40E+10
RCF	1,509		4.30E+10
	2,683		4.50E+10
	4,193		5.40E+10
	6,037		5.50E+10
원심분리 시간	10분		3.60E+10
	15분		4.60E+10
	20분		5.30E+10

- 원심분리 온도 : 10 ℃에서 최대 생균수 5.4E+10 CFU/ml 확인하였다.
- 원심분리 속도 : 4,193 RCF에서 최대 생균수 5.4E+10 CFU/ml 확인하였다.
- 원심분리 시간 : 20분에서 최대 생균수 5.3E+10 CFU/ml 확인하였다.

② 농축 정도에 따른 영향 확인

- 대상 균주 : *L. plantarum* CKDB081
- Fermenter : 350L fermenter
- 배양 조건 : 37 ℃, pH 6.0 control, RPM 80
- 농축배수 : 20, 40, 60배

Table 33. 농축 배수에 따른 생균 수

원심 분리 조건		배양 생균수 (CFU/ml)	생균수 (CFU/ml)
농축배수	20배	5.4E+09	3.60E+10
	40배		4.60E+10
	60배		5.30E+10

- 40배 농축 시 최대 생균수 5.3E+10 CFU/ml 확인하였다.

③ 보호제 종류에 따른 동결 생존율 확인

- 대상 균주 : *L. plantarum* CKDB081
- Fermenter : 350L fermenter
- 배양 조건 : 37 ℃, pH 6.0 control, RPM 80
- 보호제 종류 : Lactose, trehalose, maltose, glucose, fructose, MSG, Yeast extract, sorbitol, valine, proline, levan

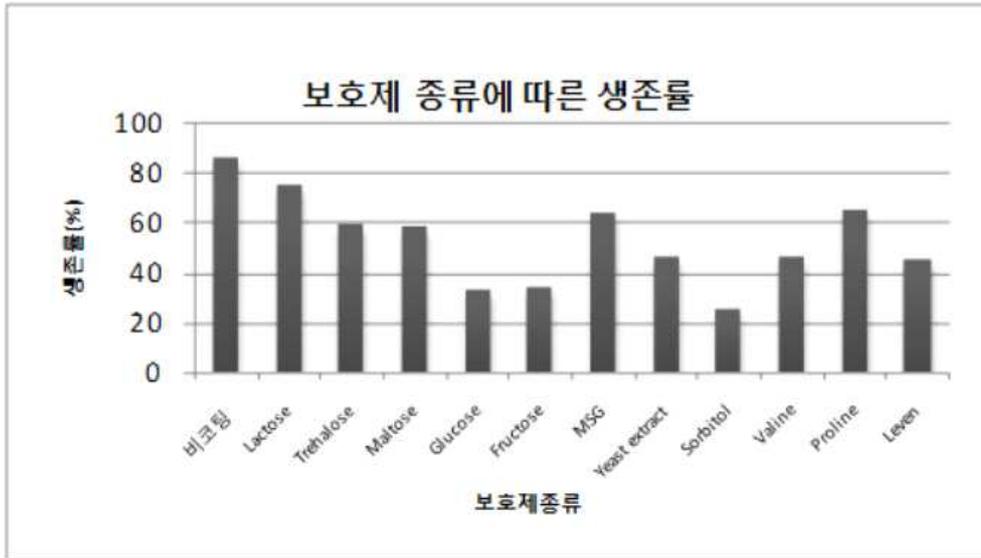


Figure 20. 보호제 종류에 따른 생존율

- 보호제 종류에 따른 생존율을 비교한 결과, 비코팅 시의 생존율이 가장 높음을 확인 하였다.

④ 동결 시간, 동결건조 온도 및 건조 시간에 따른 생존율 확인

- 대상 균주 : *L. plantarum* CKDB081
- Fermenter : 350L fermenter
- 배양 조건 : 37 °C, pH 6.0 control, RPM 80
- 동결건조 조건
 - : 동결 시간 (24, 48, 60, 84시간)
 - : 동결건조 온도 (30, 37, 42°C)
 - : 건조 시간 (1, 2, 3, 4일)

Table 34. 동결시간 및 동결건조 온도에 따른 생존율

동결건조 조건		생존율
동결시간	24시간	80%
	48시간	72%
	60시간	66%
	84시간	60%
동결건조 온도	30°C	66%
	37°C	75%
	42°C	50%
건조시간	1일	45%
	2일	50%
	3일	65%
	4일	54%

- 동결시간 : 24시간에서 최대 생존율(80%) 확인하였다.
- 동결건조온도 : 37 °C에서 최대 생존율(75%) 확인하였다.
- 건조시간 : 3일에서 최대 생존율 (65%) 확인하였다.

다. 원말 제조

(1) *In vivo* 항비만 후보 균주 선발용 원말 제조

(가) 연구 결과

- 대상 균주 (2종, 10균주) : *L. plantarum* 8균주,
control 2균주 (*L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299v)
- Jar level : 7L fermenter
- 배양 조건 : 37 °C, pH 6.0 control, RPM 80,
- 원심분리 조건 : 10 °C, 4,193 RCF, 농축시간 20분, 농축배수 40배
- 동결건조 조건 : 비코팅, 동결시간 24시간, 동결건조 온도 37°C

Table 35. 항비만 입수 균주 원말 생산 결과

균종	Strain	원말 생산 결과			
		배양 growth (CFU/ml)	Product (g)	원말 (CFU/g)	Total CFU
<i>L. plantarum</i>	K10	3.6E+9	13.35	5.4E+11	7.28E+12
	K6	5.0E+9	8.15	7.0E+11	5.74E+12
	K120	1.63E+9	7.1	2.6E+11	1.85E+12
	K259	3.0E+9	13.09	5.6E+11	7.0E+12
	KC4	3.0E+9	11.17	1.94E+11	2.17E+12
	K50	2.23E+9	11.48	5.6E+11	6.43E+12
	KC3	2.95E+9	12.96	2.5E+11	3.24E+12
	KC28	5.0E+9	14.74	6.1E+11	8.99E+12
<i>L. plantarum</i> ¹⁾	299V	4.8E+9	12.65	7.4E+11	9.36E+12
<i>L. rhamnosus</i> ¹⁾	GG	3.0E+9	19.0	3.4+11	6.46E+12

1) : Control 균주

- 확립한 원말 제조공정 조건을 적용하여 기능성 후보 균주에 대한 원말을 제조한 결과, 1.94E+11 ~ 7.40E+11 CFU/g spec. 범위에 해당하는 원말을 획득하였다.

라. 최적화 배양 조건 적용 및 원말 안정성 확인

(1) 최적화 배양 및 원말 조건 적용

(가) 연구 방법

① 배양 조건 적용

- *In vivo* 실험 결과 선별된 5종의 유산균을 앞서 최적화된 유산균 배양 조건에 적용시켜, Mini-Jar(7L)에서 배양하였다.

② 원말 제조

- *In vivo* 실험 결과 선별된 5종의 유산균을 앞서 최적화된 유산균 원말 제조 조건에 적용시켜, 원말을 제조 하였다.

(나) 연구 결과

① 배양 조건 적용

- 대상 균주 (5균주) : *L. plantarum* KC3, KC28, K10, K50, K259
- Jar level : 7L fermenter
- 배양 조건 : 37 °C, pH 6.0 control, RPM 80

Table 36. 항비만 선별 균주 최적화 배지 적용 결과

균주	배지 종류	배양성 (Max)	배양 시간 (hr)
<i>L. plantarum</i> KC3	LPC	3.0E+09	16
	LPV1	2.1E+09	18
	LVP2	3.3E+09	19
	LPV4	4.1E+09	22
	LPV7	5.3E+09	20
	LPV9	4.9E+09	21
	LPV10	6.3E+09	20
<i>L. plantarum</i> K10	LPC	3.5E+09	16
	LPV1	3.1E+09	20
	LVP2	4.2E+09	22
	LPV4	4.7E+09	20
	LPV7	3.3E+09	18
	LPV9	5.2E+09	20
	LPV10	6.6E+09	18
<i>L. plantarum</i> K50	LPC	2.5E+09	16
	LPV1	1.4E+09	16
	LVP2	3.8E+09	22
	LPV4	4.3E+09	21
	LPV7	5.0E+09	18
	LPV9	5.3E+09	18
	LPV10	5.6E+09	18
<i>L. plantarum</i> KC28	LPC	5.0E+09	16
	LPV1	5.0E+09	18
	LVP2	4.2E+09	16
	LPV4	3.3E+09	20
	LPV7	5.4E+09	20
	LPV9	6.2E+09	16
	LPV10	6.5E+09	14
<i>L. plantarum</i> K259	LPC	3.0E+09	16
	LPV1	4.0E+09	18
	LVP2	4.2E+09	16
	LPV4	3.3E+09	20
	LPV7	5.1E+09	16
	LPV9	5.5E+09	18
	LPV10	6.3E+09	16

Table 37. 항비만 선별 균주 최적화 배지 적용 비교 (LPV10 배지)

균주	배지 종류	배양성 (CFU/ml)	배양 시간 (hr)	초기 배지 대비 증감률
<i>L. plantarum</i> KC3	LPV10	6.3E+09	20	210%
<i>L. plantarum</i> K10		6.6E+09	18	190%
<i>L. plantarum</i> K50		5.6E+09	18	220%
<i>L. plantarum</i> KC28		6.5E+09	14	130%
<i>L. plantarum</i> K259		6.3E+09	16	210%

- 항비만 선별 균주를 Mini jar level 최적 배지 scale-up 진행 결과 LPV10 배지에서 최대 배양성을 확인하였다. (5.6 ~ 6.6E+09 CFU/ml)

② 원말 제조

- 대상 균주 (5균주) : *L. plantarum* KC3, KC28, K10, K50, K259
- Jar level : 5L fermenter
- 배양 조건 : 37 °C, pH 6.0 control, 100 rpm
- 농축 조건 : 40배 농축
- 동결건조 조건 : 동결시간 - 24시간, 온도 - 37 °C, 건조시간 - 3일 (최적 조건 적용)

Table 38. 원말 제조용 항비만 선별 균주 배양

균주	동물실험 결과	배지 종류	배양 시간 (hr)	O.D	배양성 (CFU/ml)
<i>L. plantarum</i> KC3	내장, 정소 및 피하지방의 무게 감소	LPV10	18	0.496	5.2E+09
<i>L. plantarum</i> KC28	피하지방의 무게 감소			0.581	1.2E+10
<i>L. plantarum</i> K10	내장지방의 무게 감소			0.611	8.8E+09
<i>L. plantarum</i> K50	정소지방의 무게 감소			0.602	1.1E+10
<i>L. plantarum</i> K259	피하지방의 무게 감소			0.567	7.6E+09

- 최적화된 배지를 이용하여 선별균주를 18시간동안 배양한 결과, 5.2E+09 ~ 1.2E+10 CFU/ml 의 배양성을 확인하였고, 이를 이용하여 원말을 제조하였다.

Table 39. 항비만 선별 균주 원말 제조 결과

균주	동결보호제	원말 (CFU/g)	동결건조생존 률 (%)	총 무게 (g)
<i>L. plantarum</i> KC3	무첨가	1.0E+12	95	4.98
	Trehalose	1.1E+12	163	5.48
	Sucrose	8.2E+11	119	5.52
	Trehalose + Proline	1.0E+12	147	5.76
<i>L. plantarum</i> KC28	무첨가	1.8E+12	78	5.21
	Trehalose	9.3E+11	59	5.85
	Sucrose	9.2E+11	60	5.46
	Trehalose + Proline	1.0E+12	66	5.79
<i>L. plantarum</i> K10	무첨가	1.2E+12	71	5.36
	Trehalose	6.8E+11	60	5.76
	Sucrose	9.0E+11	82	5.78
	Trehalose + Proline	8.6E+11	81	6.09
<i>L. plantarum</i> K50	무첨가	1.2E+12	63	5.53
	Trehalose	1.2E+12	93	5.78
	Sucrose	1.3E+12	98	5.86
	Trehalose + Proline	1.3E+12	104	6.13
<i>L. plantarum</i> K259	무첨가	1.3E+12	87	5.23
	Trehalose	1.0E+12	100	5.60
	Sucrose	1.1E+12	111	5.69
	Trehalose + Proline	1.1E+12	114	5.77

- 최적의 원말 제조 조건과 보호제를 사용하여 선별균주의 원말을 제조한 결과, 6.8E+11 ~ 1.8E+12 CFU/g spec.의 원말을 제조하였다.

(2) 원말 안정성 확인

(가) 연구 방법

① 가혹 조건 가속 안정성 확인

- 제조한 원말을 PE 재질의 포장지와 알루미늄 재질의 포장지로 이중 포장하여 40°C, 습도 75% 조건의 항온 항습기에서 0~4주까지 유지하고, 식품공전에 명기된 유산균 분석 방법에 따라 생균수를 측정하였다.

② 장관 환경 안정성 확인

- 제조한 원말 1g을 pH 2.5로 조절한 MRS 배지에서 잘 섞은 후, 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2시간 후의 생균수를 식품공전에 명기된 유산균 분석 방법에 따라 생균수를 측정하였다.
- 제조한 원말 1g을 0.3% oxgall이 포함된 MRS 배지에 잘 섞은 후, 37°C에서 배양하면서 0, 1, 2시간 후의 생균수를 식품공전에 명기된 유산균 분석 방법에 따라 생균수를 측정하였다.

(나) 연구 결과

① 가혹 조건 가속 안정성 확인

Table 40. 항비만 선별 균주 원말의 가혹조건 안정성 (4주)

균주	동결보호제	초기 원말 (CFU/g)	4주 가혹 원말 (CFU/g)	4주 가혹 생존율 (%)
<i>L. plantarum</i> KC3	무첨가	1.0E+12	8.1E+11	81
	Trehalose	1.1E+12	7.4E+11	65
	Sucrose	8.2E+11	4.4E+11	54
	Trehalose + Proline	1.0E+12	5.9E+11	58
<i>L. plantarum</i> KC28	무첨가	1.8E+12	1.2E+12	64
	Trehalose	9.3E+11	9.5E+11	102
	Sucrose	9.2E+11	6.2E+11	67
	Trehalose + Proline	1.0E+12	7.8E+11	78
<i>L. plantarum</i> K10	무첨가	1.2E+12	1.1E+12	92
	Trehalose	6.8E+11	6.5E+11	96
	Sucrose	9.0E+11	8.1E+11	90
	Trehalose + Proline	8.6E+11	7.3E+11	84
<i>L. plantarum</i> K50	무첨가	1.2E+12	1.3E+12	102
	Trehalose	1.2E+12	7.9E+11	63
	Sucrose	1.3E+12	7.0E+11	56
	Trehalose + Proline	1.3E+12	6.1E+11	46
<i>L. plantarum</i> K259	무첨가	1.3E+12	1.2E+12	93
	Trehalose	1.0E+12	7.8E+11	78
	Sucrose	1.1E+12	6.1E+11	55
	Trehalose + Proline	1.1E+12	6.1E+11	56

② 장관 환경 안정성 확인

Table 41. 항비만 선별 균주 원말의 장관환경 안정성

Strain	초기원말 (CFU/g)	시간	내산성 (pH 2.5)		내담성 (0.3% oxgall)	
			CFU/g	생존율(%)	CFU/g	생존율(%)
<i>L. plantarum</i> K10	8.0E+11	0	5.4E+11	68	6.4E+11	79
		1	4.0E+11	50	5.7E+11	72
		2	3.9E+11	48	3.6E+11	45
<i>L. plantarum</i> KC28	1.1E+12	0	1.1E+12	98	1.0E+12	92
		1	9.0E+11	81	2.8E+11	25
		2	9.0E+11	80	2.2E+11	19
<i>L. plantarum</i> K259	9.6E+11	0	1.2E+12	121	1.0E+12	104
		1	1.0E+11	10	7.4E+11	77
		2	8.8E+10	9	6.8E+11	70
<i>L. plantarum</i> KC3	8.8E+11	0	5.81E+11	66	3.52E+11	40
		1	3.52E+11	40	2.90E+11	33
		2	8.80E+10	10	2.20E+11	25
<i>L. plantarum</i> K50	1.2E+12	0	9.72E+11	81	7.92E+11	66
		1	3.24E+11	27	6.00E+11	50
		2	1.32E+11	11	5.16E+11	43

- *L. plantarum* K10 균주가 배양성, 동결건조 & 가혹조건보관 안정성 및 장관환경 안정성이우수함을 확인하였다.

마. Scale-up 공정 적용

(1) Scale-up 공정 적용

(가) 연구 방법

① 배양 조건 적용

- *In vivo* 실험 결과 선별된 5종의 유산균을 앞서 최적화된 유산균 배양 조건에 적용시켜, 대용량 생산 설비 (2,000L tank)를 이용하여 배양하였다.

② 원말 제조

- *In vivo* 실험 결과 선별된 5종의 유산균을 앞서 최적화된 유산균 원말 제조 조건에 적용시켜, 대용량 원심 분리기 및 동결건조기를 이용하여 원말을 제조하였다.

(나) 연구 결과

① 배양 조건 적용

Table 42. 항비만 선별 균주의 대용량 생산 설비 (2,000L) 배양성

균주	배지 종류	배양 시간 (hr)	O.D	배양성
<i>L. plantarum</i> KC3	LPV10	0	0.078	-
		8	0.274	1.6E+09
		10	0.568	7.2E+09
		12	0.858	8.3E+09
		14	0.982	1.0E+10
		16	0.989	1.1E+10
<i>L. plantarum</i> K10	LPV10	0	0.078	-
		8	0.266	1.0E+09
		10	0.520	6.3E+09
		12	0.765	7.8E+09
		14	0.991	9.0E+10
		16	1.005	1.1E+10
<i>L. plantarum</i> K50	LPV10	0	0.080	-
		8	0.223	1.6E+09
		10	0.364	3.2E+09
		12	0.770	6.2E+09
		14	0.881	8.8E+09
		16	0.910	9.6E+10
<i>L. plantarum</i> KC28	LPV10	0	0.077	-
		8	0.136	2.1E+09
		10	0.567	4.8E+09
		12	0.880	8.6E+09
		14	0.920	1.0E+10
		16	0.993	1.3E+10
<i>L. plantarum</i> K259	LPV10	0	0.081	-
		8	0.264	2.5E+09
		10	0.631	7.7E+09
		12	0.721	8.6E+09
		14	0.988	1.0E+10
		16	1.001	1.2E+10

- 대용량 생선 설비로의 scale-up 적용 결과, 모든 균주들이 Mini-Jar 수준의 배양성을 확인하였다.

② 원말 제조

Table 43. 항비만 선별 균주의 대용량 생산 설비에서 원말 제조 결과

균주	동결보호제	원말 (CFU/g)
<i>L. plantarum</i> KC3	무첨가	1.2E+12
<i>L. plantarum</i> KC28	무첨가	1.7E+12
<i>L. plantarum</i> K10	무첨가	1.1E+12
<i>L. plantarum</i> K50	무첨가	1.0E+12
<i>L. plantarum</i> K259	무첨가	1.0E+12

- 대용량 생선 설비로의 scale-up 적용 결과, 모든 균주들이 Mini-Jar 수준의 원말 spec.을 확인하였다.

바. 사업화 진행

(1) 공인기관 성적의뢰

Table 44. 공인기관 성적의뢰 결과



(A) *Lactobacillus plantarum* K10



(B) *Lactobacillus plantarum* K50

Table 44. 계속

(다) 품목신고 허가증

☞ 락토바실러스 플랜타럼 케이 10 품목신고 및 사업화 완료

3-4. 인체 적용 시험 준비

가. 인체 적용 시험 protocol 준비

(1) 체지방 감소 protocol 제시

Table 45. 체지방 감소 예시 Protocol

제목		체지방 감소에 대한 프로바이오틱스 복합물의 유효성 및 안정성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약 대조 인체 적용 시험														
실시 기관	해당 병원 ex) 연세대학교 세브란스 병원	기간	연구심의위원회(IRB) 승인일로부터 12개월													
연구책임자	해당 교수															
대상	BMI(body mass index) 기준으로 정상 범위(18.5~25) 또는 과체중 범위(25~30)에 있는 사람	섭취방법	1) 스틱포 ex) 2회/일, 2g/회 직접 또는 물과 섭취 (유산균으로서 5.0E+09 CFU/day) 2) 캡슐 ex) 1일/2정/회 충분한 물과 함께 섭취 (5.0E+09CFU/day)													
방법		대상자수	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Drop-out 고려 예수</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>최종평가 예수</td> <td>34</td> <td>34</td> <td>68</td> </tr> </tbody> </table>			시험군	대조군	합계	Drop-out 고려 예수	40	40	80	최종평가 예수	34	34	68
	시험군	대조군	합계													
Drop-out 고려 예수	40	40	80													
최종평가 예수	34	34	68													
유효성평가	1차유효성 평가 항목	2차 유효성 평가 항목														
	1. BMI 변화 2. 체지방량 및 체지방률 변화 3. 내장지방 및 복부지방 면적 4. 체중 및 허리둘레, 허리-엉덩이 둘레비율	1. Triglyceride 2. Apoprotein A1, B 3. Lipoprotein A 4. 혈중 동맥경화지수 5. 산화 LDL 수준 6. Paraoxonase 활성 7. CETP, LCAT 활성도														

3-5. 지속적인 항비만 기능성 후보주 발굴

가. 연구 방법

- 변형 MRS 배지를 이용하여 지역별(서울, 경기, 경상, 충청, 제주) 34종의 김치로부터 156종의 균주를 확보하였다. 이를 pancreatic lipase, α-amylase, α-glucosidase 활성 저해능이 80%이상인 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 16s RNA sequencing을 통하여 동정하였고, 당 발효능, 항생제 내성, 효소활성시험, 내담즙 및 내산 실험, 항균력, 장내 부착능을 확인하였다.

나. 연구 결과

(1) In vitro 스크리닝을 통한 항비만 기능성 균주 선발

Table 46. 지속적인 항비만 균주 선발

No.	Strain ¹	Anti-lipase activity	α-amylase inhibitory activity	α-glucosidase inhibitory activity
1	KI 2	63.33±4.46 ¹	96.99±3.00	71.07±2.09
2	KI 3	69.94±0.86	94.56±0.90	77.28±1.88
3	KI 6	41.19±15.47	91.42±4.44	56.44±2.46
4	KI 7	76.25±1.51	83.82±0.83	73.55±4.81
5	KI 9	84.52±8.18	96.25±1.85	81.17±4.07
6	KI 11	65.87±3.41	83.93±2.95	79.65±2.45
7	KI 14	88.37±6.26	92.64±2.84	83.92±2.09
8	KI 15	65.44±3.61	93.90±5.27	77.70±4.24
9	KI 16	83.36±1.99	98.17±0.41	93.27±4.69
10	KI 17	73.44±2.81	98.11±1.26	79.78±2.98
11	KI 20	64.72±3.50	83.87±1.80	77.69±2.24
12	KI 22	65.84±0.16	87.73±0.38	36.82±3.66
13	KI 23	72.59±0.11	85.25±1.47	75.51±1.22
14	KI 24	67.77±1.81	98.64±0.81	65.90±0.23
15	KI 32	24.20±2.35	30.95±0.71	13.27±2.51
16	KI 34	65.02±0.92	79.28±1.19	74.55±1.94
17	KI 40	70.69±1.70	85.57±0.67	75.23±3.99
18	KI 41	63.94±3.91	91.70±5.60	76.35±1.08
19	KI 42	61.84±6.98	84.99±1.66	11.40±4.63
20	KI 46	68.56±0.23	74.45±0.90	60.67±5.91
21	KI 47	59.00±3.72	89.86±0.52	53.96±0.74
22	KI 48	74.03±0.22	91.41±0.56	78.59±5.04
23	KI 49	65.22±0.99	88.21±3.75	66.38±7.25
24	KI 62	103.32±0.89	94.86±3.30	98.59±0.52
25	KI 68	88.92±0.51	90.86±0.98	79.51±0.29
26	KI 69	81.89±1.37	91.17±2.23	98.71±4.23
27	KI 70	74.93±4.13	90.25±1.01	70.07±3.41
28	KI 73	67.02±1.91	83.83±0.95	51.30±4.62
29	KI 74	50.05±7.84	98.90±0.62	42.95±2.04
30	KI 81	68.63±0.15	84.99±2.75	53.68±1.03
31	KI 83	54.17±3.86	54.27±3.83	35.22±1.66

Table 46 계속

32	KI 85	47.14±4.75	69.37±0.49	59.21±4.20
33	KI 88	73.77±1.10	66.68±3.45	83.95±2.61
34	KI 91	63.67±1.12	60.68±1.62	62.88±2.96
35	KI 92	81.90±2.62	85.69±3.03	80.36±4.10
36	KI 97	62.07±3.15	88.91±5.62	71.23±0.85
37	KI 98	71.81±4.43	93.08±1.78	79.20±1.71
38	KI 99	58.29±2.92	62.87±2.95	43.28±2.65
39	KI 101	46.50±1.01	101.50±1.60	59.20±5.12
40	KI 102	55.23±0.49	80.71±2.66	69.23±2.07
41	KI 104	74.31±3.73	87.34±0.97	75.20±4.98
42	KI 106	71.76±1.83	67.11±3.88	64.38±2.66
43	KI 108	80.92±0.39	88.23±2.79	86.49±3.01
44	KI 110	81.26±0.07	89.47±2.44	80.19±3.67
45	KI 117	68.99±0.04	76.02±1.30	52.67±2.11
46	KI 120	80.90±0.87	94.64±3.58	89.41±0.69
47	KI 122	75.26±2.77	95.36±2.76	71.02±4.85
48	KI 129	88.63±1.25	94.75±4.73	82.03±2.44
49	KI 133	91.41±0.25	78.78±2.89	90.23±1.98
50	KI 134	80.29±0.52	91.64±5.99	75.61±0.89
51	KI 139	80.91±2.67	80.61±1.09	72.33±1.26
52	KI 143	68.21±2.45	99.89±5.99	72.36±2.08
53	KI 147	73.13±3.92	87.57±1.93	69.33±2.74
54	KI 148	82.01±5.28	84.69±4.02	82.39±3.67

☞ Lipase, α-amylase 및 α-glucosidase의 저해 효과가 우수한 균주 10종을 선발 완료 하였다.

(2) 16s rRNA sequencing (균주 동정)

Table 47. 16s RNA 균주동정

No.	Strain		Identities
1	KI 9	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1525/1527 (99%)
2	KI 14	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1516/1518 (99%)
3	KI 16	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1525/1527 (99%)
4	KI 62	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain DSM 20336	1552/1556 (99%)
5	KI 69	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1522/1524 (99%)
6	KI 108	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1516/1518 (99%)
7	KI 110	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1523/1527 (99%)
8	KI 120	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1525/1527 (99%)
9	KI 129	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain DSM 20336	1527/1537 (99%)
10	KI 148	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	1524/1527 (99%)

- 총 10종의 균을 대상으로 16S rRNA sequencing을 한 결과 *Pediococcus pentosaceus* 2종, *Lactobacillus plantarum* 8종으로 동정되었다.

☞ 16S rRNA 분석 결과 및 in vitro 스크리닝 결과 총 합이 가장 높은 KI 16, KI 62 및 KI 69를 최종 균주로 선발하여 추후 실험을 진행하였다.

(3) 당 발효실험

- 선별된 3개의 균주에 대하여 당 발효 실험을 수행하였다. (Table 48)

Table 48. 당 발효 실험

Strains	KI 16	KI 62	KI 69
Control	-	-	-
Glycerol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+
D-Ribose	+	+	+
D-Xylose	-	+	+
L-Xylose	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-
D-Galactose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-
L-Rhamnose	±	±	±
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+
Methyl-αD-Mannopyranoside	+	-	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	+	+	+
N-AcetylGlucosamine	+	+	+
Amygdalin	+	+	+
Arbutin	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+
Salicin	±	±	+
D-Celiobiose	+	+	+
D-Maltose	+	+	+
D-Lactose	+	+	+
D-Melibiose	-	+	+
D-Saccharose	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+
Inulin	+	+	±
D-Melezitose	+	+	+
D-Raffinose	-	+	+
Amidon	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	±	±	±
D-Turanose	-	-	+
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	-	+	+
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-
potassium Gluconate	±	±	±
potassium 2-KetoGluconate	-	-	-
potassium 5-KetoGluconate	-	-	-

(4) 균주 특성 조사

(가) 항생제 내성

- 선별된 3개의 균주에 대하여 항생제 내성 실험을 수행하였다. (Table 49)

Table 49. 선별 균주 항생제 내성

Antimicrobial agents	MIC (ug/mL)			
	KI 16	KI 62	KI 69	299v
Amikacin	16	64	16	8
Gentamycin	4	128	64	2
Kanamycin	64	128	64	32
Streptomycin	32	256	32	16
Ampicillin	1024	>2048	>2048	1024
Penicillin-G	4	0.5	0.125	2
Oxacillin	16	4	4	16
Bacitracin	124	128	128	16
Polymyxin B	>512	>512	>512	256
Ciprofloxacin	256	128	>512	16
Tetracycline	32	64	64	16
Clindamycin	0.25	1	8	1
Erythromycin	0.25	2	2	0.125
Rifampicin	2	0.5	0.125	2
Vancomycin	>4096	>4096	>4096	2048
Chloramphenicol	4	4	4	4

(나) 효소 활성 시험

- 선별된 3개의 균주에 대하여 효소 활성 실험을 수행하였다. (Table 50)

Table 50. 선별 균주 효소 활성

Enzyme	KI 16	KI 62	KI 69	299v
Alkaline phosphatase	0	0	0	0
Esterase(C4)	0	0	0	0
Esterase Lipase(C8)	0	0	1	1
Lipase(C14)	0	1	0	1
Leucine arylamidase	3	5	4	5
Valine arylamidase	3	4	4	5
Cystinearylamidase	1	1	2	4
Trypsin	0	0	1	0
α-chymotrypsin	0	0	0	0
Acid phosphatase	1	2	1	4
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	1	3	2	3
α-galactosidase	0	0	1	0
β-galactosidase	4	2	5	5
β-glucuronidase	0	0	0	0
α-glucosidase	2	0	0	4
β-glucosidase	5	2	5	4
N-acetyl-β-glucosaminidase	4	2	5	5
α-mannosidase	0	0	0	0
α-fucosidase	0	0	0	0

*: A value ranging from 0 to 2 is assigned to the standard color: zero represents a negative; 5 represents a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength: 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles; 2, to 10 nanomoles; 3, to 20 nanomoles; 4, to 30 nanomoles; and 5, to 40nanomoles or more.

(다) 내담즙 실험

- 선별된 3개의 균주에 대하여 내담즙 실험을 수행하였다. (Figure 21)

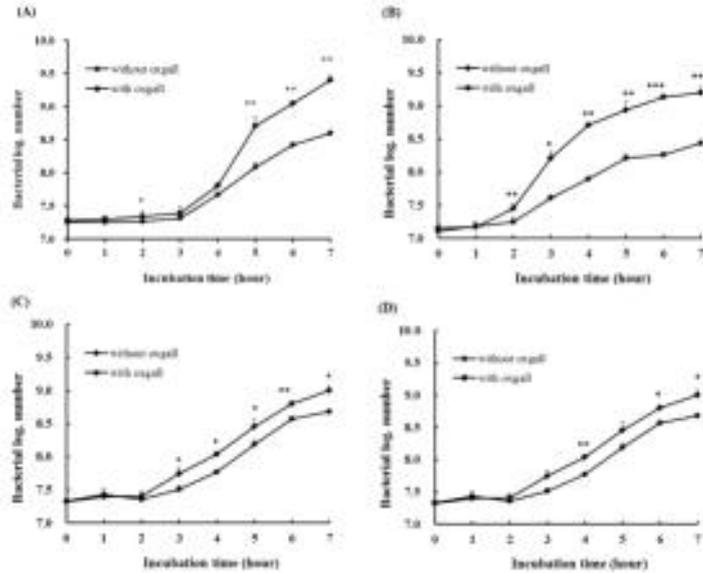


Figure 21. 0.3% oxgall 처리 MRS 배지에서 균주 배양성 확인

* *Lactobacillus plantarum* KI 16 (A), *Pediococcus pentosaceus* KI 62 (B), *Lactobacillus plantarum* KI 69 (C), and *Lactobacillus plantarum* 299v (D)

(라) 내산성 확인

- 선별된 3개의 균주에 대하여 내산성 실험을 수행하였다. (Figure 22)

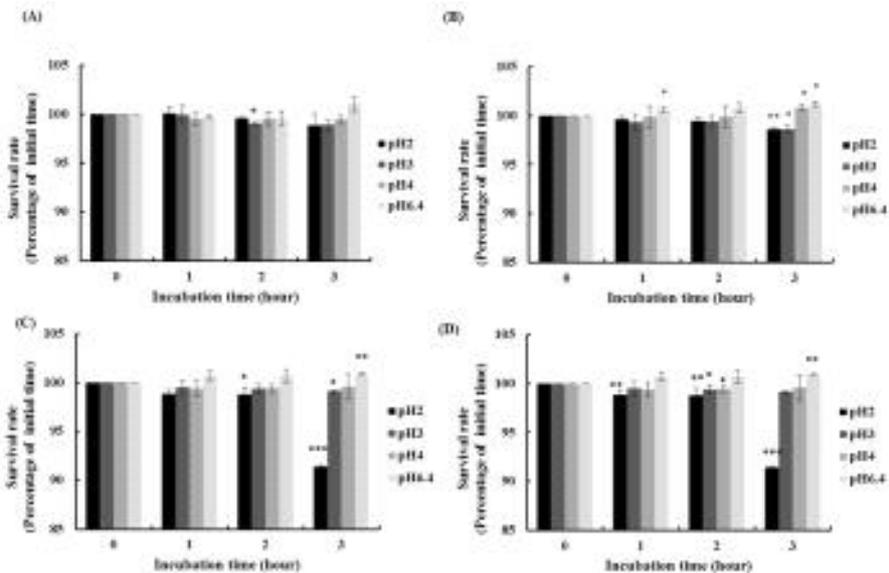


Figure 22. 선별 균주의 내산성 확인 (pH2.0, 3.0, 4.0 and 6.4)

* *Lactobacillus plantarum* KI 16 (A), *Pediococcus pentosaceus* KI 62 (B), *Lactobacillus plantarum* KI 69 (C), and *Lactobacillus plantarum* 299v (D)

(라) 항균력 확인

- 선별된 3개의 균주에 대하여 항균력 확인 실험을 수행하였다. (Table 51 ~ 53)

Table 51. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* KI 16의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		KI 16+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	6.80±0.14×10 ⁶	6.22	5.35±0.21×10 ⁶	5.83	21.32
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3.15±0.64×10 ⁷	6.17	1.50±0.14×10 ⁷	5.71	52.38
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.45±0.07×10 ⁵	6.24	8.00±0.00×10 ⁴	5.55	44.83
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.13±0.75×10 ⁶	5.24	4.73±1.10×10 ⁶	5.12	33.64

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* KI 16: 3.40±0.69×10⁶ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 52. MRS 배지에서 *Pediococcus pentosaceus* KI 62의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		KI 62+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	6.80±0.14×10 ⁶	6.22	4.80±0.28×10 ⁵	4.72	29.41
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3.15±0.64×10 ⁷	6.17	1.95±0.21×10 ⁷	4.75	38.10
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.45±0.07×10 ⁵	6.24	7.00±0.14×10 ⁴	4.67	51.72
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.13±0.75×10 ⁶	5.24	3.53±0.60×10 ⁶	4.67	50.47

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* KI 62: 3.63±0.35×10⁶ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

Table 53. MRS 배지에서 *Lactobacillus plantarum* KI 69의 병원성 균주에 대한 항균력

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	pathogens ^a		KI 69+pathogens ^a		
	CFU/mL	pH	CFU/mL	pH	
<i>Escherichia coli</i>	6.80±0.14×10 ⁶	6.22	5.75±0.35×10 ⁵	5.64	15.44
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3.15±0.64×10 ⁷	6.17	1.55±0.64×10 ⁷	5.63	50.79
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.45±0.07×10 ⁵	6.24	7.0±0.14×10 ⁴	5.47	58.62
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.13±0.75×10 ⁶	5.24	4.43±0.60×10 ⁶	5.03	37.85

* Initial count of *Lactobacillus plantarum* KI 69: 5.40±0.87×10⁶ CFU/mL

^a Determined after 6 h of incubation at 37°C

(라) 장내 부착능 확인

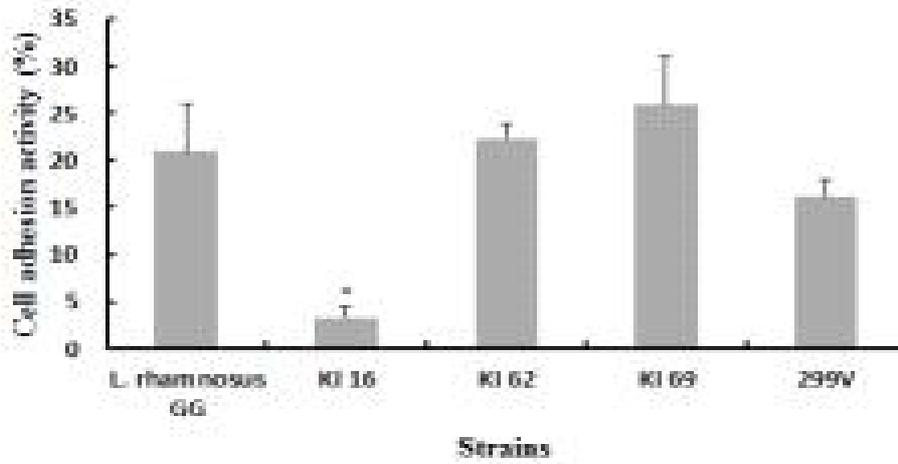


Figure 23. 장 상피 세포 부착능 확인

* $p < 0.05$ compared with control strain (t-test).

- 선별된 3개의 균주에 대하여 장 상피 세포 부착능 확인 실험을 수행하였다.
(Figure 23)

☞ *L. platarum* KI 69 및 *P. pentosaceus* KI 62 균주는 상피세포 표면에 부착능이 우수한 것으로 확인됐다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
1. 연구 개발 목표 및 달성도			
구분 (연도)	연구개발의 목표	연구개발 수행 내용	달성도
1차년도 (2016년)	<i>In vitro</i> 모델 활용한 항비만 기능성 균주 라이브러리 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> 스크리닝 통한 기능성 균주 탐색 및 확보 <ul style="list-style-type: none"> - Anti-lipase activity (porcine pancreatic lipase이용) - α-amylase activity ○ 항비만 기능성 균주 선별 <ul style="list-style-type: none"> - Anti-adipogenic activity (3T3-L1 cell line 이용) 	100%
	<i>In vivo</i> 모델 활용한 항비만 기능성 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 유도 마우스에 대한 기능성 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 고지방식이 유도 비만 마우스 모델 - 고탄수화물 식이 유도 비만 마우스 모델 ○ NGS 활용하여 선발균주의 장관총 조절능 확인 	100%
	배양 조건 및 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양 조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 배지 및 발효조 가동 조건 ○ 코팅 기술 및 원말 제조공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 동결 보호제 및 최적 코팅 조건 ○ 원말 제조 및 안정성 테스트 <ul style="list-style-type: none"> - 저장, 장관환경 및 가속 안정성 	100%
2차년도 (2017년)	제품화 가능 안전성 및 안정성이 확보된 균주 선별	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발 균주 특성화 <ul style="list-style-type: none"> - 항생제 내성 : Amikacin 등 15종에 대한 MIC - 효소활성 : API ZYM kit - 내담즙성 : 0.3% oxgall 첨가 배지 배양 - 내산성 - 항균력 : 선발 젖산균이 <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella typhimurium</i> 및 <i>Staphylococcus aureus</i>의 억제율 측정 - 장내 부착성 - Biogenic amine (BA) 생성능 - 동정 	100%
	기능성 균주의 계속적 선별	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항비만 기능성 균주의 <i>in vitro</i> 모델 활용한 계속적 선별 	100%
	대사체 및 생체지표 분석을 통한 항비만 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대사체 분석 통한 선발 균주 유래 항비만 기능성 물질 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 소화 기관 및 분변 대사체 분석 ○ 비만 및 대사질환 생체지표 분석 통한 선발 균주의 항비만 메커니즘 규명 	100%
	NGS 활용 프로바이오틱스 유전체 해독 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ NGS 활용하여 선발 균주의 전장 유전체 분석 	100%
	건강 기능성 프로바이오틱스 제품화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양 최적화 조건 pilot scale 적용 및 가속안정성 확인 ○ 코팅 및 원말 제조공정 scale-up ○ 제품의 제형화 및 디자인 연구 (시제품 제조) ○ 안정성 테스트 및 유통기한 설정 	100%
	항비만 기능성 프로바이오틱스의 개별인정 위한 후속 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험 protocol 준비 	100%

4-2. 관련분야 기여도

- 항비만 선별 균주에 대한 지적 소유권 확보 및 특허화 진행
- 항비만 기능성 유산균 선별을 위한 in vitro, in vivo 실험 기술력 확보
- 이너뷰티. 건강기능식품시장 참여를 통한 기업의 매출 창출
- 고 부가가치 균주의 개발을 통한 안정적인 수익 마련

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

가. 연구개발결과의 활용방안 (제품화, 산업화(시기) 계획 등 명시)

(1) 연구결과 논문화 및 특허 계획

본 연구를 통해 개발된 프로바이오틱스 균주는 동물실험을 통하여 기존에 많이 알려진 *L. rhamnosus* GG (LGG) 및 *L. plantarum* 299v (299v)에 비교하여 우수한 항비만 효과가 있음이 확인되었다.

이들 균주의 항비만 우수성에 대한 과학적 근거 제시를 위해 다수의 특허, 논문 및 해외 발표를 수행하였으며, 이들 이외의 균주 또한 계속적으로 발굴하고 있는 중이다. 과제 종료 후 논문은 과제 종료 1년차 (2018년) 상반기에 3건, 하반기에 3건을 투고할 계획이며, 출원한 특허는 종료 2년차 (2019년)에 모두 등록할 예정이다.

[표 1. 논문 및 특허 등록 계획]

		2018 (종료 1년차)		2019 (종료 2년차)	
		상반기	하반기	상반기	하반기
특허 등록		-	-	2	3
논문	한동대학교	2	2	-	-
	한국식품연구원	1	1	-	-
합계		3	3	2	3

(2) 산업화계획

선별된 균주는 배지 및 원말 최적화 과정과 scale-up 과정 등을 통한 원료 표준화를 진행하여 5개 제품의 시제품을 만들었으며 그중 1개의 제품에 대해서는 품목신고를 완료하였고, 고시형 프로바이오틱스로 판매 예정이다. 이후 인체 적용 시험을 착수하고 완료된 후에는 개별인정형 프로바이오틱스로 등록한 후, 개별인정형 제품으로 제품을 판매할 예정이다.

[표 2. 고시형, 개별인정형 제품 판매 및 고용 계획]

		2018년	2019년	2020년	2021년
고시형 제품 매출액 (백만원)	국내	200	1,000	600	-
	해외	50	100	60	-
개별 인정형 제품 매출액 (백만원)	국내	-	-	12,000	14,000
	해외	-	-	1,000	2,000
고용목표 (명) *연구, 생산, 품질, 마케팅, 영업 인력		2	4	2	2

(3) 후속 연구 계획

과제 종료 후에는 개발된 균주를 활용하여 항비만 인체 적용 시험을 수행할 예정이며, 이를 통하여 개별인정형 프로바이오틱스 원료로 등재하고자 한다.

개별인정형 프로바이오틱스 원료 등재를 위하여, *in vitro* 세포 분석(지질합성 유전자 및 단백질 발현수준등)과 *in vivo* 동물실험 (지방합성 및 체지방 합성의 분자적 메카니즘 분석 등) 추가적으로 수행하여 항비만 메카니즘을 확인하고, 완료한 전장 유전체 분석을 통하여 유전자 level에서의 기작을 규명할 예정이다. 그리고 표준화된 유산균 원료를 활용하여 인체 적용 시험용 샘플 레시피를 개발하고 완제 시제품 제작 후, 인체 적용 시험을 착수할 예정이다.

[표 3. 인체 적용시험 및 개별인정형 등록 계획]

	항목	기간
인체 적용 시험	- Protocol 개발 - 레시피 개발 및 완제 시제품 생산 - IRB 승인 및 인체 적용 시험 개시 - 결과 모니터링 및 보고서 작성	2년 (2018년 ~ 2019년)
개별 인정 원료 신청 및 등록	- 개별 인정 원료 신청 - 개별 인정 원료 등록	1년 (2019년 ~ 2020년)
제품 생산 및 출시	- 개별 인정 원료로써 품목 신고 - 개별 인정 원료 생산 및 출시	6개월 (2020년 ~ 2021년)

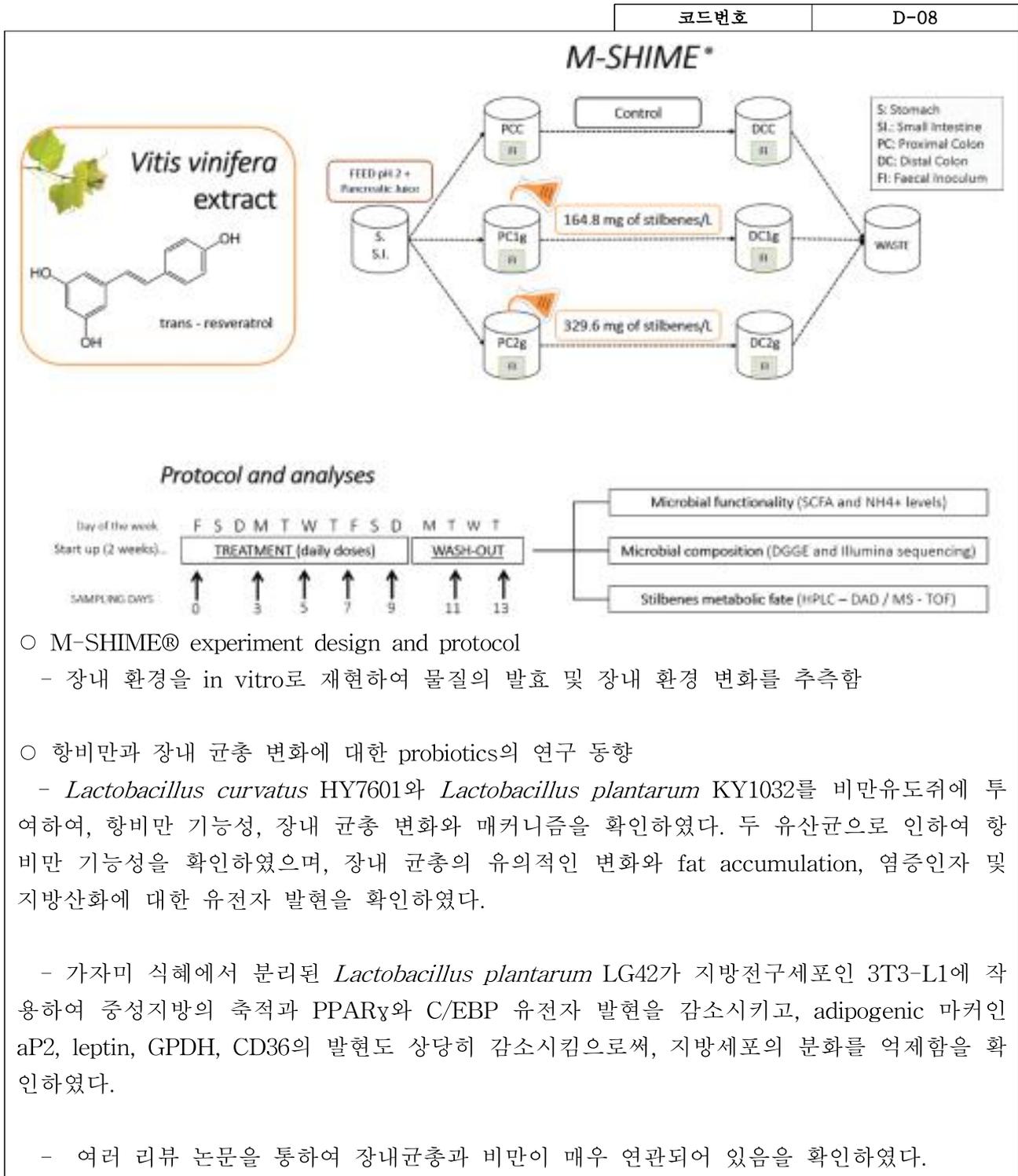
[과제 종료 후 연구 계획 추진일정]

	2018				2019				2020				2021				2020			
	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q
메카니즘 확인을 위한 세포실험 및 동물실험	██████████																			
레시피 개발 및 완제 시제품 생산	██████████																			
임상실험 검토, 착수 및 실행					██████████															
식약처 개별인정 추진					██████████															
개별인정제품 출시 및 판매 (개별인정 등록 시)									██████████											
고시형 제품 판매 (원료 및 완제품)	██████████																			

나. 기대성과

- 기술적 측면
 - 항비만 프로바이오틱스 균주 개발은 건강기능식품 원료뿐만 아니라 발효유 및 치즈 등 발효 식품에 이용 가능함으로 제품의 다양화를 유도하여 신기술 개발에 이용할 수 있음
- 경제적·산업적 측면
 - 항비만 프로바이오틱스를 개발함으로써 소비기반 및 경쟁력 확보
 - 2000억원 (2015년 기준)대로 형성되어 있는 국내 프로바이오틱스 시장 중, 점유시장을 10%로 예측할 때 200억원의 신규 시장 형성 가능함
 - 본 제품 개발로 기능성 프로바이오틱스 종균의 수입대체 효과
 - 경쟁력 있는 프로바이오틱스 제품으로 항비만 식품시장에 참여
 - 청소년 및 성인의 항비만 효능을 통한 보건 향상으로 국민 생산성 증진

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보



7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 일반 과제		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호	
○ 해당 사항 없음									

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

- 안전관리대책
 - 개인 보호 장비 및 실험실 안전 보호 장비 구축
 - 작업공정의 위험성 및 안전 작업 방법에 관한 사항 숙지
 - 유해위험물 취급 안전 교육 실시
 - 안전관리보건 규정 준수
- 실험실 안전 점검 체계
 - ※ 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제 6조 제1항의 규정에 의거 한동대학교의 연구실(실험실)에서 실험, 실습 및 연구 활동을 수행할 때 발생할 수 있는 안전사고예방과 대책에 관한 사항을 규정(‘연구실 안전관리 규정’, 제정 2007. 10. 25 규정 제102호)하여 연구자원을 효율적으로 관리하고 연구 활동의 안전을 확보한다.
 - ※ 해당 연구실의 소속기관(한동대학교)은 특수실험실에 관한 해당사항이 없음.



- 정기점검 및 실험실 정밀안전진단 실시
 - 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실
 - 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고
- 교육 훈련
 - 1) 개요 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙 제9조에 따라 연구활동 종사자를 대상으로 안전 사고 예방과 환경 오염방지에 관한 교육 및 훈련을 연 1회 이상 실시한다.
 - 2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체 직원 등
 - 3) 교육구분
 - 비정기 임시교육 :
 - 대상 : 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)
 - 방법 : 자료/유인물, 외부 온라인상, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등
 - 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시
- 추가 이행 실적

1) 실험실 환경개선공사	일상점검을 통한 지속적인 실험실 노후화 모니터링 및 개선공사 시행
2) 고압가스 안전관리	안전시설 설치
3) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	항비만 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸 K10 균주 및 이의 용도	(주)중근광바이오, 한국식품연구원 한동대학교	-	한국	-	2017.12.26	단독사사	-
2	특허	항비만 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸 K50 균주 및 이의 용도	(주)중근광바이오, 한국식품연구원 한동대학교	-	한국	-	2017.12.26	단독사사	-
3	특허	항비만 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸 K259 균주 및 이의 용도	(주)중근광바이오, 한국식품연구원 한동대학교	-	한국	-	2017.12.26	단독사사	-
4	특허	항비만 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸 KC3 균주 및 이의 용도	(주)중근광바이오, 한국식품연구원 한동대학교	-	한국	-	2017.12.26	단독사사	-
5	특허	항비만 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸 KC28 균주 및 이의 용도	(주)중근광바이오, 한국식품연구원 한동대학교	-	한국	-	2017.12.26	단독사사	-
6	논문	Physiological Characteristics and Anti-Obesity Effect of <i>Lactobacillus plantarum</i> K6 isolated from Kimchi	한국식품 연구원	제1저자, 교신저자	Journal of Milk Science and Biotech- nology	-	2017.12.31	단독사사	비SCI
7	논문	The Inhibitory Effect of <i>L. plantarum</i> Q180 on Adipocyte Differen- tiation in 3T3-L1 and Reduction of Adipocyte Size in Mice Fed High-fat Diet	한국식품 연구원	제1저자, 교신저자	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	0.484	2018.2.28	중복사사	SCIE
8	논문	Modulation of Active Gut Microbiota by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG in a Diet Induced Obesity Murine Model.	한동대학 교	제1저자, 교신저자	Frontiers in Microbiology	4.504	2018.4.10	중복사사	SCI

11. 기타사항

코드번호		D-13
○ 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. <i>Microbiol. Rev.</i> 49:359-378.		
2. Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M. and Valtonen, V. 2003. Safety of probiotics that contain <i>Lactobacillus</i> or <i>bifidobacteria</i> . <i>Clin. Infect. Dis.</i> 36:775-780.		
3. Bover-Cid, S. and Holzaofel, W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> 53: 33-41.		
4. Carrera-Silva, E. A., Silvestroni, A., LeBlanc, J. G., Piard, J. C., de Giori, G. S., and Sesma, F. 2006. A thermostable α -galactosidase from <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL722: genetic characterization and main properties. <i>Current microbiology</i> , 53: 374-378.		
5. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. <i>J. Food Prot.</i> 64:2007-2014.		
6. Clark, P. A., Cotton, L. N. and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of human stomachs. <i>Cul. Dairy Prod. J.</i> 28: 11-14.		
7. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. <i>J. Food Technol.</i> 43: 164-167.		
8. EFSA. 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance. <i>The EFSA J</i> 732: 1 - 15.		
9. Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. <i>Meat Sci.</i> 55: 279-300.		
10. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 33:15-18.		
11. Gilliland, S. E. and Walker, D. K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of <i>Lactobacillus acidophilus</i> as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. <i>J. Dairy Sci.</i> 73:905-911.		
12. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. 1984. Importance of bile tolerance of <i>Lactobacillus acidophilus</i> used as a dietary adjunct. <i>J. Dairy Sci.</i> 67: 3045-3051.		
13. Havinaar, R., Brink, B. T. and Veid, J. H. J. I. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. (ed), <i>Probiotics</i> , Chapman & Hall, London. pp. 209-224.		

14. Hemati, N., Ross, S. E., Erickson, R. L, Groblewski, G. E. and MacDuygald, O. A. 1997. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding proteina (C/EBPa) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes: Correlation with CLUT4 gene expression. *J. Biol. Chem.* 272:25913-25919.
15. Izquierdo-Pulido, M., Marine-Font, A. and Vidal Carou, M. C. 1994. Biogenic amine formation during malting and brewing. *J. Food Sci.* 59:1104-1107.
16. Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. and Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.
17. Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., and Park, H. J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 493-500.
18. Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., and Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* 59: 900-912.
19. Kumar, M., Ghosh, M. and Ganguli, A. 2012. Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 703-711.
20. Larsen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephsen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 113-122.
21. Lim, S. D., Kim, K. S. and Do, J. R. 2011. Physiological characteristics and production of vitamin K2 by *Lactobacillus fermentum* LC272 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 31:513-520
22. Mcdonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbial.* 56: 2120-2124
23. O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Murphy, L., Thornton, G., Shanahan, F., O'Sullivan, G. C., and Collins, J. K. 1997. Adhesion of potential probiotic bacteria to human epithelial cell lines. Poster in conference: Functional Foods: Designer Foods for the Future, Cork, Ireland.
24. Ouwehand, A.C. and Salminen, S. 2003. In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microb. Ecol. Health D.* 15: 175 - 184.

25. Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. and Villani, F. 2004. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Sci. 67: 309-317.
26. Perichon, B. and Courvalin, P. 2000. Update on vancomycin resistance. Int J Clin Pract 115: 88 - 93.
27. Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. Histochem. 97: 493-497.
28. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215.
29. Salminen, S., Isolauri, E., and Salminen, E. 1996. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. Asia Pacific J. Clin. Nutr. 5: 53 - 56.
30. SCAN, 2002. Opinion of the Scientific Committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General; Directorate C, Scientific Opinions, 18 April 2002.
31. Servin, A. L. and Coconnier, M. H. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 17: 741 - 754.
32. Si, M. M., Lou, J. S., Zhou, C. X., Shen, J. N., Wu, H. H., Yang, B., He, Q. J., and Wu, H. S. 2010. Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* in vitro and in vivo. J. Ethnopharmacol. 128: 154 - 159.
33. Vandekerckove, P. 1977. Amines in dry fermented sausage: a research not. J. Food Sci. 42:283-285.
34. Velez, M. P., De Keersmaecker, S. C., and Vanderleyden, J. 2007. Adherence factors of Lactobacillus in the human gastrointestinal tract. FEMS Microbiol. Lett. 276, 140 - 148.
35. Vidal-Carou, M. C., Ambatle-Espunyes, A., Ulla-Ulla, M. C. and Marine-Font, A. 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the winemaking process. Am. J. Enol. Vitic. 41: 160-167.
36. Al-Lahham, S.H. et al., (2010) Biological effects of propionic acid in humans: metabolism, potential applications and underlying mechanisms. Biochim. Biophys. Acta 1801, 1175 - 1183.
37. Bäckhed, F. et al., (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 15718 - 15723.

38. Ballard, F.J. (1972) Supply and utilization of acetate in mammals. *Am J Clin Nutr.* 25, 773-779.
39. Bergman, E.N. (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 70, 567-590.
40. Bloemen, J.G. et al., (2009) Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin Nutr.* 28, 657-661.
41. Borthakur, A. et al., (2010) The probiotic *Lactobacillus plantarum* counteracts TNF- α -induced downregulation of SMCT1 expression and function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G928-934.
42. Daniel, H. et al., (2014) High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.* 8, 295-308.
43. Delzenne, N.M. et al., (2011) Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 639-646.
44. den Besten, G. et al., (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 54, 2325-2340.
45. den Besten, G. et al., (2015) Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR γ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*, 64, 2398-2408.
46. Drissi, F. et al., (2014) Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr. Diabetes* 4, e109.
47. Furet, J.P. et al. (2010) Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049-3057.
48. Gao, Z. et al., (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58, 1509-1517.
49. Greenblum, S. et al. (2012) Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 594-599.
50. Ji, Y.S. et al., (2012) Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. *Benef. Microbes* 3, 13-22.
51. Ji, Y.S. et al., (2013) Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. *Food Control* 31:467-473.
52. Kandler W et al., (1967) The amino acid sequence of the serine-containing mureins of *Lactobacillus viridescens* and *Leuconostoc*. *Biochim. Biophys. Acta.* 147, 252-261.
53. Kadooka, Y. et al., (2010) Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 636-643.

54. Kim, S.W. et al., (2013) *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 258-263.
55. Lee, H.J. et al., (2011) Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 155-161.
56. Ley, R.E. et al., (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022 - 1023.
57. Osterberg, K.L. et al., (2015) Probiotic supplementation attenuates increases in body mass and fat mass during high-fat diet in healthy young adults. *Obesity* 23, 2364-2370.
58. Park, H. et al., (2014) Autoinducer-2-associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* 45, 62-69.
59. Park, K.Y. et al., (2015) *Lactobacillus rhamnosus* GG improves glucose tolerance through alleviating ER stress and suppressing macrophage activation in db/db mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 56, 240-246.
60. Ridaura, V.K. et al., (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341, 1241-1244.
61. Ritze, Y. et al., (2014) *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One* 9, e80169.
62. Roy, C.C. et al., (2006) Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutr Clin Pract.* 21, 351-366.
63. Sanchez, M. et al., (2014) Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *Brit. J. Nutr.* 111, 1507-1519.
64. Steer, T. et al., (2000) Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics.
65. Turnbaugh, P.J. et al., (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
66. Turnbaugh, P.J. et al., (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 11, 6ra14.
67. Wang, J. et al., (2015) Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 9, 1-15.
68. Wong, J.M.W. et al., (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 40, 235-243.
69. Yang, J. et al., (2014) Selection of functional lactic acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel). *Int. J. Food Microbiol.* 191, 164-171.

70. Yeo, S. et al., (2015) Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Ecology*, 91, 2015, fiv065, doi:10.1093/femsec/fiv065.
71. Yoon, H.S. et al., (2011) *Lactobacillus rhamnosus* BFE 5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 Promote Cholesterol Excretion Through the Up-Regulation of ABCG5/8 in Caco-2 Cells. *Probiotics & Antimicrob. Prot.* 3:194 - 203.
72. Yoon, H.S. et al., (2012) The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 promote cholesterol efflux and suppress inflammation in THP-1 cells. *J. Sci. Food. Agric.* 2012 Jul17. doi: 10.1002/jsfa.5797.
73. Yoon, H.S. et al., (2013) Reduction in cholesterol absorption in Caco-2 cells through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 by the putative probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 from fermented foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2012 64, 44-52.