

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002348-01

김치유산균의 유전체분석 및 생물학적 진화(순화)과정을 통한 김치발효용 스타터균주 개발 최종보고서

2018. 11. 2.

주관연구기관 / 중앙대학교
협동연구기관 / 충북대학교
(주)대상

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “김치유산균의 유전체분석 및 생물학적 진화(순화)과정을 통한 김치발효용 스타터균주 개발”(개발기간 : 2014. 8. ~ 2018. 8.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 김원용 (인)
협동연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 최상훈 (인)
참여기관명 : 주식회사 대상 (대표자) 임정배 (인)



주관연구책임자 : 전 체 옥
협동연구책임자 : 한 남 수
참여기관책임자 : 류 병 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 김치에서 분리한 우수 김치유산균의 유전체 연구를 통해 김치유산균의 기능적, 유전적 특성을 이해하고 김치발효환경에 맞도록 진화(적응)시키고 대사과정을 조절하여, 고품질의 표준화된 김치를 생산하기 위한 우수한 발효능과 기능성을 가진 김치유산발효종균(starter)을 개발하고자 함. ○ 김치에서 분리한 김치유산균의 유전체 분석을 통해 기능적, 유전적 특성분석 및 우수 발효능, 기능성을 가진 우수한 발효종균용 김치유산균 발굴 ○ 실험실적 진화기법 및 시스템 생물학적 진화기법을 이용하여 김치환경(low pH, salt, 저온)에 최적화되고 기능성이 향상된 김치유산종균개량 ○ 개량된 김치유산균의 유전체 분석(genome, transcriptome) 및 대사체(metabolome) 분석을 통해 김치유산균의 발효능, 기능성, 안전성 검증 ○ 개량된 김치유산균의 발효능, 기능성, 안전성의 실증연구 및 고기능성, 고품질을 가진 표준화된 김치개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 김치에서 분리한 김치유산균의 유전체 분석을 통해 기능적, 유전적 특성분석 및 우수 발효능, 기능성을 가진 우수한 발효종균용 김치유산균 발굴 ○ 실험실적 진화기법 및 시스템 생물학적 진화기법을 이용하여 김치환경(low pH, salt, 저온)에 최적화되고 기능성이 향상된 김치유산종균개량 ○ 개량된 김치유산균의 유전체 분석(genome, transcriptome) 및 대사체(metabolome) 분석을 통해 김치유산균의 발효능, 기능성, 안전성 검증 ○ 개량된 김치유산균의 발효능, 기능성, 안전성의 실증연구 및 고기능성, 고품질을 가진 표준화된 김치개발 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 김치유산균의 기능성 규명 및 안전성에 대한 과학적 정보를 제공하여 김치의 우수성 및 이미지 제고에 기여 ○ 우수 김치발효종균을 사용한 김치의 표준화 및 고급화는 김치산업의 매출증대로 이어지고 김치의 국제화 및 수출증대에 기여할 것임 ○ 우수 김치발효종균을 개발하여 특허 및 산업재산권을 확보하고 김치유산균을 김치종균으로서의 활용뿐만 아니라 유산균자체 제품화 가능함 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	김치유산균	유전체 분석	실험실 진화	오믹스분석	종균개발
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Kimchi, lactic acid bacteria	Genome analysis	Adaptive laboratory evolution	Omics analysis	starter development

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	2
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	7
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	129
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	140
붙임. 참고 문헌	140

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 김치에서 분리한 우수 김치유산균의 유전체 연구를 바탕으로 우수 김치유산균의 대사적, 생리적, 발효적, 유전학적 특성을 이해하고 우수 발효능 및 기능성을 가진 김치 유산발효종균(starter) 대상균주를 발굴하고자 함.
- 김치유산균을 실험실 진화를 통해 김치발효환경에 적응성을 높이고 대사과정을 조절하여 우수한 기능성을 가진 김치유산균으로 개량하고자 함.
- 궁극적으로 김치 유산균의 안전성, 기능성 검증 및 실증화 연구를 통하여 고품질의 표준화된 김치 생산을 위한 우수한 발효능과 기능성을 가진 발효종균을 개발하고자 함.



<연구개발 개요 및 연구개발의 목적>

2. 연구개발의 필요성

- 김치는 김치 고유의 맛뿐만 아니라 발효산물의 건강에 증진효과에 관한 인식고조로 최근 세계적인 관심이 높아지고 있고 발효식품 산업분야에서 그 중요도가 높아지고 있음.
- 우리나라 전통발효 김치의 특성상 제조공정과 관련기술이 표준화 되어 있지 않아 김치 발효에 참여하는 발효 미생물이 균일하지 못하고 따라서 발효되는 김치의 맛도 다르게 될 수 있으며 이것은 김치의 세계화와 산업화를 가로막는 주요한 요소이며 김치가 한국의 대표적 전통 발효 식품임에도 불구하고 김치의 국제 경쟁력을 저하시키는 요인으로

작용하고 있음.

- 김치는 종균(스타터)을 사용하지 않고 김치원료에서 유래되는 유산균에 의한 자연발효에 의존함으로써 동일한 제조법을 사용하더라도 김치 원료 조성, 원료의 재배시기, 원료산지에 따라 미생물 천이가 다르게 나타나고 형성되는 맛과 풍미가 다르게 나타날 수 있음.
- 현재 일본과 중국 등에서 김치에 대한 과학적 연구가 활발하게 수행하고 있으며 이로 인하여 김치의 종주국으로서의 지위를 상실할 수 있는 위기에 놓여 있으며 중국의 값싼 저 품질의 김치가 대량으로 국내 도입 및 세계적으로 수출됨으로써 김치의 이미지가 손상되어 우려되고 있는 실정임.
- 따라서 표준화된 고품질 김치를 생산하기 위해서는 발효과정 및 제조 방법의 표준화가 시급하여 이를 위해서는 우수한 발효능과 기능성을 가진 김치유산종균개발이 절대적으로 요구되고 있음.
- 현재 국내에서도 표준화된 품질 김치를 생산하기 위해서 김치에서 분리한 유산균 (*Leuconostoc (Leu.) mesenteroides*, *Leu. citreum*, *Lactobacillus (Lb) plantarum*, *Lb sakei* 등)을 김치유산종균으로 사용하고 있음. 그러나 접종한 김치유산종균이 김치 환경(낮은 pH, 저온, 원료에서 유래한 유산균과의 경쟁 실패, 소금 농도 등)에 적응하지 못해 김치발효가 항상 성공을 거두지는 못하는 상황임.
- 또한 사용하고 있는 김치유산종균의 발효적, 기능적, 유전적 특성 등이 규명되지 않은 상황이고 김치유산종균의 안전성도 검증되지 않았음.
- 종균 유산균을 사용한 김치의 항시적인 발효의 성공을 위해서는 접종한 김치 유산균이 김치 환경에서의 잘 적응하도록 김치 유산균의 개량이 요구됨. 또한 김치의 품질 향상 및 좀 더 많은 시장 개척을 위해서는 김치의 풍미 및 기능적 특성을 증가시키기 위한 김치유산균의 개량 연구도 반드시 필요한 상황임.
- 식품에 사용하는 종균의 개량을 위해 종균의 유전공학적 개량(genetically modification)을 통한 종균 개량은 GMO (genetically modified organism) 사용의 안정성이 검증되지 않은 상황에서, 김치유산균의 자연적인 변화(진화)을 유도하는 non-GMO 종균화 전략은 보다 안전한 식품의 섭취를 추구하는 현대인에게도 거부감이 없으며 김치가 건강식품이라는 시장과 소비자의 요구를 동시에 충족시키면서 자연스럽게 받아들여질 수 있는 방안임.
- 미국의 Lenski의 연구팀에서 실험적 진화 연구를 이용하여 E. coli를 유전적 변화의 관찰할 결과 미생물이 매우 빠른 시간 안에 환경에 적응함을 보여 주었고 이러한 연구결과를 바탕으로 실험실 진화(adaptive laboratory evolution)를 이용한 종균 개발이 이루어질 수 있음을 제시함(Blount et al., 2008. PNAS; Barrick et al., 2009, Nature).
- 네덜란드의 Bechmann 연구팀은 *Lactobacillus lactis*를 실험실 진화를 통하여 젖산 발효능과 성장능이 우수한 균주를 얻을 수 있어 실험실적 진화(시스템 생물학적 진화기법)가 균주 개량에 매우 유용한 방법임을 제시함(Bechmann et al., 2012. Genome Research).
- 취리히공대 Sauer 연구팀은 초산 생산균인 *Acetobacter aceti*을 고농도 초산에 장시간 계

대 배양하여 초산 저항성이 매우 우수한 균주 개발을 보고함(Steiner & Sauer, 2003. Biotechnol. & Bioeng.).

- 최근에는 미생물 균주의 환경적응성을 높이는 연구 이외에 미생물의 대사 경로를 변경시키는 systematic evolutionary engineering을 사용한 균주개량이 이루어지고 있음. 한 예로 프랑스의 Dequin 연구팀은 대사과정을 조절하는 실험실 진화기법을 이용하여 발효향이 우수한 새로운 포도주 발효종균 효모를 개발하였음을 보고함(Cadière et al., 2012. Food Microbiol.). 또한 세포내 환원력을 증가시키기 위한 위오탄당 인산화 대사경로의 활성화로 초산 생성은 감소되고 발효향이 향상된 효모균주를 얻을 수 있었음(Cadière et al., 2011. Met. Eng.).
- 이외에 외국의 경우 진화기법을 이용하여 고품질 발효제품을 생산하기 위한 종균개량연구가 활발하게 수행되고 있음.
- 국내의 경우 오래전부터 김치, 술, 간장, 된장과 같이 전통발효 방법을 사용하여 발효식품을 제조해온 나라임에도 불구하고 국내 전통식품 관련 발효 미생물의 계량 관련 기술은 외국에 비해 연구가 매우 미진한 형편임.
- 우수 김치유산균을 non-GMO 종균화 전략의 핵심인 실험실 진화(시스템 생물학적 진화 기법)를 통하여 발효환경에 맞도록 순화(domestication)시키는 물론 김치유산균의 대사과정을 변화시키고 개량하여 표준화된 고품질의 김치를 생산하기 위한 우수한 발효능과 기능성을 가진 발효종균(starter) 개발이 유용함.
- 김치의 발효특성(미생물 균집 및 발효산물) 및 김치 고유의 맛, 김치의 건강에 증진 효과가 김치유산균의 발효과정에 의해 기인됨에도 불구하고 김치 유산균의 유전체 연구 및 유전체의 기능적인 연구는 거의 전무한 실정임.
- 현재 국내의 경우 발효 기술은 선진국과 비교하여 기술적으로 크게 차이를 보이지 않으나, 유전체 분석기술 및 유전체정보 해석능력은 매우 뒤떨어져 있는 상황이며, 특히 유전체연구 전문가의 기술 및 경험적 해석능력은 선진국과 현격한 기술적 수준차이를 보이고 있음.
- 김치유산균의 유전체 연구는 김치유산균의 발효적, 기능적, 유전적 특성 등의 규명을 통하여 김치발효 특성을 이해하는 중요한 단서를 제공할 것으로 사료되고 김치발효의 향상 및 체계적이고 효율적인 김치유산종균 연구가 가능함.
- 요구르트 및 치즈 등 발효식품이 일찍 발달한 서구 선진국에서는 다양한 유산균 (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*) 균주에 대한 genome 분석을 완료하여 그 특성에 대한 연구를 활발하게 진행하고 있음. 그러나 최근 들어 국내에서도 *Lb. kimchii*, *Leu. citrium*, *Leu. mesenteroides*, *Weissella (W.) koreensis*, *Leu. carnosum*, *Leu. gellidum*, *Leu. kimchii* 등의 김치유산균 유전체분석 결과가 보고되고 있으나 단순히 유전체 서열분석에 머무르고 있는 상황임.
- 김치유산균의 기능적, 발효적 특성을 좀 더 심도 있게 통합적으로 이해하기 위해서는 김치유산균 및 개량된 김치유산종균의 전사체, 대사체와의 연계 연구 및 안전성 연구도 반드시 병행되어야 함.

- 본 연구에서는 김치에서 분리한 우수 김치유산균의 유전체 연구를 통해 김치유산균의 생리적, 발효적, 유전적 특성을 이해하고 선별된 김치유산균을 김치환경에 맞도록 적응시키고 대사과정을 조절하여 고품질의 표준화된 김치를 생산하기 위한 우수한 발효능과 기능성을 가진 김치유산균 발효종균(starter)을 개발하고자 함.

제 2 절. 연구개발의 범위

1. 제 1세부 과제: 김치유산균 유전체 분석 및 종균개량 연구(중앙대학교)

- 김치유산균의 유전체 분석을 통한 김치유산균 대사적, 기능적, 발효적, 유전적, 특성 연구
 - 국내 연구기관(주로 세부 및 협동연구 기관)에서 보유한 김치유산균의 발효특성조사(국내 김치로부터 자주 발견되는 *Leu. mesenteriodes*, *Lb. sakei*, *W. koreensis*를 우선 대상으로 할 예정임)
 - 김치유산균 중 발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서열 분석(김치유산균 유전체 5건 이상 분석 및 NABIC에 유전체 정보등록)
 - 분석된 김치유산균의 유전체 정보와 GenBank에 등록되거나 본 연구실에서 이미 확보한 김치유산균 유전체 정보(본 연구실에서 5종의 주요 김치유산균의 유전체를 이미 완전 해독함)를 바탕으로 김치유산균의 대사적, 기능적, 발효적, 유전적 특성을 분석하고 우수한 발효능 및 기능성을 가진 김치유산균을 김치종균 개발 대상균주로 선정(우수 김치유산균 자원 최소 2건 이상 확보)
 - 김치유산균의 개량타겟(김치발효환경 적응성, 저온 적응성, 산저항성, 발효능 향상, 기능적 물질 생산능 등) 선정
- Non-GMO 균주 개량기술을 이용한 김치유산균의 종균개량연구
 - 선정된 개량타겟을 대상으로 non-GMO 균주 개량기술(실험실적 진화기술, 시스템 생물학적 진화기법)을 이용한 김치유산균의 균주개량
 - 개량 김치유산균의 환경적응성(fitness) 실험 및 유전체 변화 비교분석
 - 유전체 변화에 따른 환경 적응성 변화 기작 연구
 - 개량 균주의 오믹스 분석기술(전사체(transcriptome), 대사체(metabolome) 분석)을 이용한 개량된 김치유산균 종균의 특성분석
 - 개량된 우수 김치유산종균 선정
 - 개량된 우수 김치유산종균의 김치유산종균으로의 사용에 따른 발효과정 중 김치 내 미생물 군집 및 대사체 변화 분석(단일 종균 또는 복합종균으로서의 사용가능성 타진)

2. 제 1협동 과제: 김치유산균의 기능성 및 안정성 연구(충북대)

- 김치유산균의 유전체 분석을 통한 건강 기능성의 분자생물학적 기작 규명 및 대사공학 적 조절 기술 개발
 - 해당 기능성은 mannitol, bacteriocin, γ -amino butyric acid (GABA), dextran 다당류, prebiotic 올리고당, 비타민 K, B9 생성능, 난소화성 소당류(stachyose, raffinose) 분해능,

시안배당체 분해능, phytochemical 생물전환능 등임

- 기능성 관련 유전자 클로닝, 유사 유전자 비교분석, 발현된 효소단백질의 생리학적 특성 분석, 대사과정에서의 역할 규명 및 발효기술을 통한 후성유전학적 조절
- 기 확보된 김치유산균 원균주 및 개량균주의 probiotic 효과 분석 (대장내 유익균 증식, 유해균 억제, 원활한 배변활동, 면역활성 효과)
- 식품 섭취 시 장내 정착을 위한 위산 내성, 담즙산 내성 기작 규명 및 관련 유전자 분석
- 발효과정 중 김치 유산균에서 기능성 인자 발현 여부 검증연구
- 김치유산균의 원균주 및 개량균주의 기능성 개선 여부 분석
- 김치유산종균을 사용하여 제조한 김치의 기능적 특성 변화 연구
- 김치유산종균의 기능성 발현을 극대화시키는 김치 발효 조건 규명 및 발효 기술 개발
- 김치유산균의 유전체 분석을 통한 식품용 종균의 안전성 (safety) 관련 유전자 탐색 및 기능 규명, 후성유전학적 조절 기술 개발
- 안전성 관련 유전자는 D-lactic acid 생성 효소 (d-lactate dehydrogenase), biogenic amine 생성 효소 (amino acid decarboxylase), 항생제 내성 효소 (vancomycin-resistance enzyme) 등임
- 김치유산균 원균주 및 개량균주의 안전성 관련 유전자 보유 유무 분석
- 발효과정 중 김치 유산균에서 안전성 인자 발현 여부 검증연구
- 기 확보된 김치유산균 원균주 및 개량균주의 안전성 개선 여부 분석
- 김치유산종균을 사용하여 제조한 김치의 안전성 개선 효과 분석
- 김치유산종균의 안전성을 확보하는 김치 발효 조건 규명 및 발효 기술 개발
- 김치유산종균의 probiotic 허가를 위한 안전성 분석

3. 제 2협동: 김치유산균의 실증화 및 산업화 연구(대상FNF)

- 김치 제조의 표준화
- 김치 표준 제조 Manual화를 통한 년중 일정한 품질의 제조 기반 구축 및 스펙 개발
- 우수 김치유산종균 산업적 생산을 위한 배양 및 발효조건 최적화
- 유산균 Starter 우점 효과 향상을 위한 제조공정 구축
- 우수 김치 유산종균의 김치 산업적 제조 및 품질 표준화 연구
- 제품 발효 패턴 표준화를 위한 유산균 최적 농도 설정
- 발효 단계별 김치유산종균(starter) 우점을 효과 분석 및 안정화
- 김치유산종균 김치 산업적 생산 최적화(시제품 생산 2건 이상)
- 유통 Simulation을 통한 김치 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구
- 고기능성 유산균 Starter 김치 상품화
- 맛, 기호도 증진 기능성 김치 제품 개발 및 관능 특성 객관적 분석
- 개량된 김치유산종균의 김치 발효 시스템 안정화
- 고기능 김치 유산균종의 표준화된 김치 상품화 2건

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 제 1세부(중앙대) 연구과제: 김치유산균 유전체 분석 및 종균개량 연구

1. 김치발효용 스타터 개발을 위한 우수 유산균 선정

○ 최종 유산균후보 균주선정

- 본 연구팀과 본 연구의 협동과제 참여연구팀(충북대, 대상(주))은 다양한 종류의 국내 김치로부터 약 300 여종의 김치 유래 유산균을 분리하여 보유하고 있었다.
- 논문자료, 유전체 분석 결과, 본 연구팀과 참여 연구팀의 선행연구 결과들을 바탕으로 김치환경에서 잘 적응하여 발효능과 기능성이 우수한 특성을 보이는 김치스타터용 김치유산균 8 종, 제 1협동의 선행연구를 바탕으로 프로바이오틱스 개발 후보 균주 1종을 합하여 최종적으로 9종의 후보 유산균들을 선정하였다(표 1).

표 1. 전통발효식품인 김치에서 분리 선정한 최종후보 균주 선정

균주명	Strain 명	분리기관
<i>Leuconostoc lactis</i>	EFEL005	충북대학교
<i>Leuconostoc citreum</i>	BS14	충북대학교
<i>Leuconostoc citreum</i>	M1	중앙대학교
<i>Lactobacillus sakei</i>	YR4	중앙대학교
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	J18	중앙대학교
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DRC0211	대상(주)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC 8293	공시균주
<i>Leuconostoc gelidum</i>	JB7	중앙대학교
<i>Weissella koreensis</i>	KACC 15510	중앙대학교

○ 9종의 후보 균주의 대장세포 면역 증진 및 유해미생물 방어 증진효과 연구

- 위에 선정한 9 균주를 대상으로 중앙대학 의학대학의 명순철 교수팀과의 공동으로 대장세포의 면역능 증진 및 유해미생물 방어 효과 실험을 진행하였다. 본 실험 결과를 김치유산균의 프로바이오틱스 개발 균주선정을 위한 지표로 사용하고자 하였다.
- 선정된 9종의 후보 유산균을 유산균 배양 배지인 MRS 배지에서 배양한 후 인산완충액에 현탁 후 동결 건조하여 정해진 세포의 양을 대장 세포에 처리하는 실험에 사용하였다.
- 9종의 대상 균주들을 각각 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 (CFU/ml)의 cell을 배양 되어 있는 대장 상피세포 배양액에 유산균을 첨가한 후 배양세포의 대장 상피세포의 총 전사체를 추출한 뒤, 전사체를 cDNA로 전환시켜 증폭하는 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 면역 및 방어관련 유전자의 발현의 정도를 분석하였다.
- 9종의 대상 균주들 중 *Leuconostoc (Leu.) mesenteroides* J18 의 cell 양 (CFU/ml)이 약 10^8 정도 되었을 때 normal human embryonic keratinocyte (NHEK)세포에 존재하는 면역 및 방어 관련된 HBD-1, FLG, OCLN, TJP1, TJP2, CLDN1 유전자들의 발현이 유도됨을 확인하였다(그림 1).

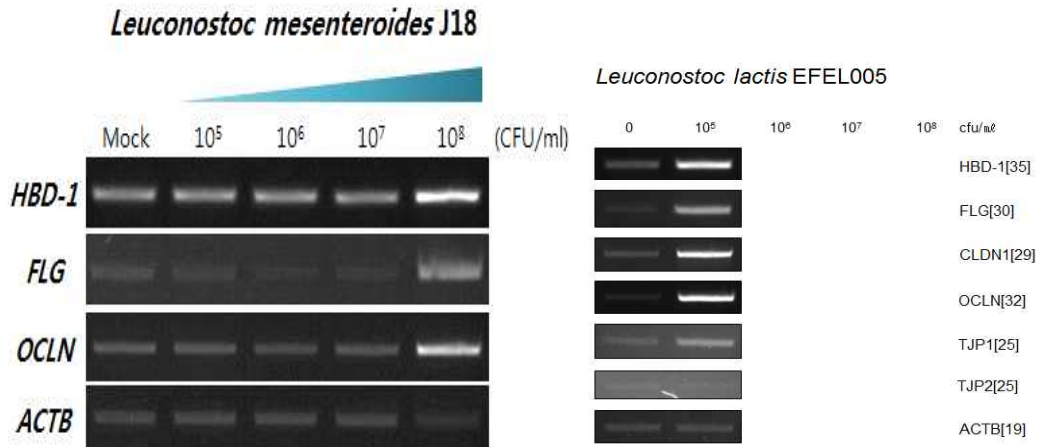


그림 1. *Leu. mesenteroides* J18와 *Leu. lactis* EFEL005의 대장세포에서의 면역 증진 및 유해미생물 방어 증진효과

- *Leu. lactis* EFEL005(제 1협동연구팀)의 투입되는 세포 양 (CFU/ml)이 약 10^5 정도 되었을 때 normal human embryonic keratinocyte (NHEK) cells 에 존재하는 다양한 면역 증진 및 유해미생물 방어와 관련된 다양한 유전자의 발현을 증가시킴을 확인하였다.
- 위 결과를 바탕으로 *Leu. mesenteroides* J18 유산 균주는 김치 스타터로써 이용하는 것뿐만 아니라 프로바이오틱스 개발의 후보 균주로도 선정 될 수 있다.
- 하지만, *Leu. lactis* EFEL005 균주는 김치발효환경에서 성장이 느리고 적응성이 떨어져 김치 발효용 스타터로써의 적용에 한계점을 가지고 있을 것으로 예상되었다.
- *Leu. gelidum* JB7와 *Weissella koreensis* KACC 15510의 경우 대장세포에서 면역능 및 유해미생물 방어관련 유전자의 발현이 유도 되지 않음을 알 수 있었다.

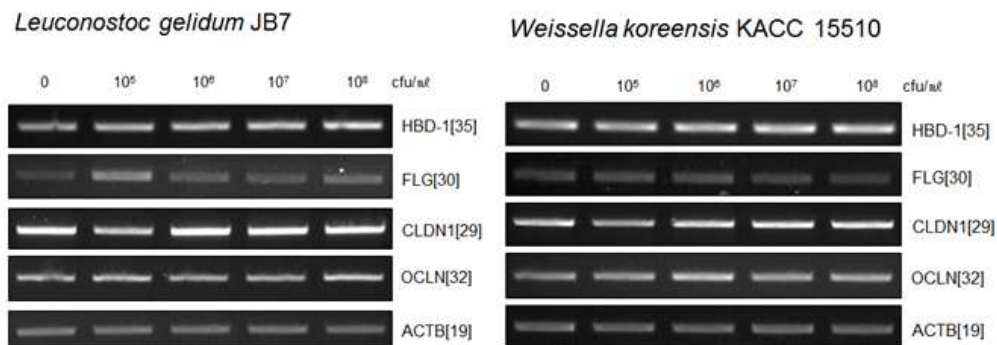


그림 2. *Leu. gelidum* JB7와 *Weissella koreensis* KACC 15510 대장세포에서의 면역 증진 및 유해미생물 방어 증진효과

- *Leu. gelidum* JB7와 *Weissella koreensis* KACC 15510는 면역 증진 및 유해 미생물 방어 증진 기능성 면에서 김치 스타터 및 프로바이오틱스로의 적용의 한계가 있다.
- 9종의 후보 균주들 중 *Leu. mesenteroides* J18와 *Leu. lactis* EFEL005를 제외한 나머지 김치 유산균 균주 7 균주(*Leu. citreum*, *Lactobacillus sakei* 등)는 대장세포에서 면역능 및 유해미생물 방어관련 유전자 발현 증진효과가 없음을 확인하였다.

○ 김치 발효용 스타터 개발을 위한 최종후보 균주선정

- 김치 발효 스타터 개발을 위한 후보 균주의 선정을 위하여 선행한 면역 증진 및 유해 미생물 방어 증진 효과 분석 결과와 후보균주들이 갖는 만니톨, 비타민 B2, B9 그리고 bacteriocin 생산 유전자와 같은 유용 유전자와 바이오제닉 아민을 생합성하는 decarboxylase의 존재 유무등을 조사하였다.
- *Leu. mesenteroides* J18은 김치의 영양과 맛에 관련된 만니톨 및 비타민 B2, B9 그리고 bacteriocin 생산 유전자를 보유하고 있을 뿐만 아니라 biogenic amine을 생성하는 amino acid decarboxylase가 없어 김치 발효용 스타터 개발을 위한 최종후보 선정하였다.
- 국내 발효 김치에서 우점종으로 발견되는 *Leu. mesenteroides*이며 대상(주)의 김치 스타터로 사용되는 *Leu. mesenteroides* J18 균주를 김치 발효용 스타터 개발을 위한 후보균주로 선정하였다.
- 김치용 스타터 개발에 대한 후보로써 이미 프로바이오틱스로 알려진 *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* GG의 유전체 분석을 수행하였다.
- 유전체 분석 수행 결과 *Lb. rhamnosus* GG 균주는 산 저항성에 관련된 유전자들을 상당수 보유하고 있고, 김치의 청량감을 주는 물질인 만니톨(mannitol), 기능성 물질로 알려진 GABA생성 유전자를 가지고 있을 뿐만 아니라 우수한 발효능을 나타내므로 김치발효 과정에서 우점하며 기능성을 나타낼 것으로 예상된다. 프로바이오틱스를 김치에 적용시키면 우수한 생리활성물질을 생산하는 건강기능성 김치를 개발할 수 있을 것으로 판단되므로 *Lb. rhamnosus* GG의 김치 발효용 스타터 개발 연구도 동시에 실시하였다.

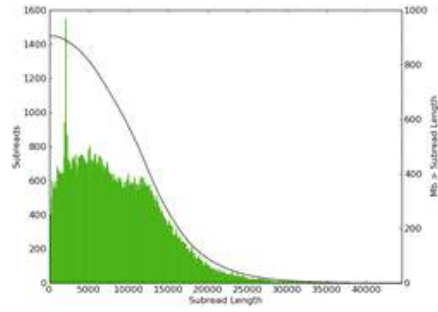
2. 프로바이오틱스 개발을 위한 김치 유산균후보 선정

- 면역 증진 및 유해 미생물 방어 기능성 및 유용 물질 생산 가능 균주인 *Leu. mesenteroides* J18 균주를 산 저항성과 같은 프로바이오틱스 특성 개발을 위한 연구를 실시하고자 하였다.

3. 우수 미생물 자원의 유전체 서열분석

○ *Leu. mesenteroides* J18 유전체의 재분석 수행

- 김치스타터 및 프로바이오틱스 후보 균주인 *Leu. mesenteroides* J18는 본 연구진이 Jung et al., 2012의 연구 논문에서 genome size는 약 2,02 Mb이며 1개의 chromosome과 5개의 plasmid들을 가지며 1,942의 단백질 발현 유전자를 가지고 있는 완전한 수준의 유전체 분석 결과를 보고 하였다.
- *Leu. mesenteroides* J18 균주를 김치발효용 스타터로 개발하기 위해서는 보다 정확한 유전 정보가 필요할 것으로 판단됨. 차세대 염기서열 분석 방법 중 염기서열을 10 kb ~ 20 kb 길이로 분석하는 PacBio 사의 염기서열 분석 방법을 이용하면 좀 더 완성도 높은 미생물의 전체염기서열을 얻을 수 있어 이 방법을 통하여 *Leu. mesenteroides* J18의 염기서열분석을 진행하였다.
- *Leu. mesenteroides* J18로부터 genomic DNA를 전통적인 chromosome spooling 방법을 이용하여 추출 한 뒤 마이크로젠에서 PacBio sequencing system을 이용하여 전체염기서열을 분석하였다.



Mean Subread length	8,550	N50	11,972
Total Number of Bases	910,898,984	Number of Reads	106,536

그림 3. *Leu. mesenteroides* J18의 전장유전체 어셈블리 결과

- PacBio사의 염기서열 분석 방법으로 분석된 *Leu. mesenteroides* J18의 chromosome의 크기는 1,900,740 bp로 결정하였다.
- *Leu. mesenteroides* J18 유전체 분석 결과는 기존의 1 개의 chromosome과 5 개의 plasmid를 보유한 것에서 1 개의 chromosome과 외에 4 개의 plasmid들을 갖는 것으로 보고됨(표 2, 그림 4).

표 2. *Leu. mesenteroides* J18의 유전체 재분석 결과

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18					
	Chromosome	pKLE01	pKLE02	pKLE03	pKLE04
Size (bp)	1,900,740	37,252	35,428	24,548	19,293
No. of coding gene sequences	1,818	43	45	27	17
C+G content (%)	37.8	34.8	35.1	38.3	35.2
tRNA	70	0	0	0	0
rRNA	12	0	0	0	0
GenBank accession no.	CP003101	CP003102	CP003103	CP003104	CP003105

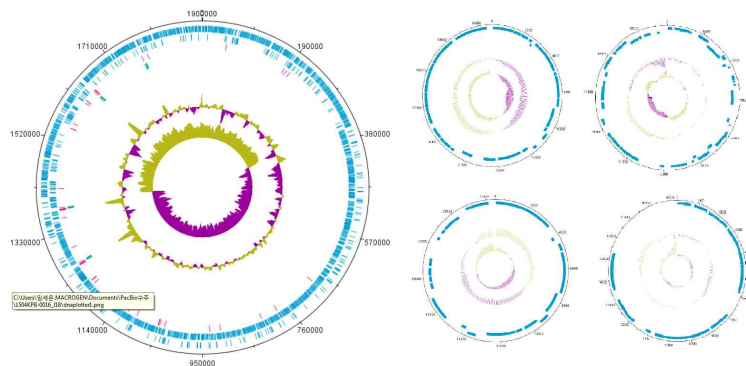


그림 4. *Leu. mesenteroides* J18의 chromosome과 plasmid의 유전체 지도

○ *Leu. mesenteroides* DRC0211 유전체 서열분석

- *Leu. mesenteroides* DRC0211균주는 현재 제 2협동연구팀인 대상(주)에서 김치 상품 제조에 스타터로 사용하는 김치유산균주으로써 본 연구에서 스타터 개발 균주인 J18 균주와 유전체의 서열 및 특성을 비교하기 위해 유전체 정보서열을 완전 해독하고자 함.
- 전체 염기서열분석을 위하여 DRC0211 균주의 DNA를 chromosome spooling방법을 이용하여 높은 순도와 농도를 갖는 gDNA를 추출함(그림 5).

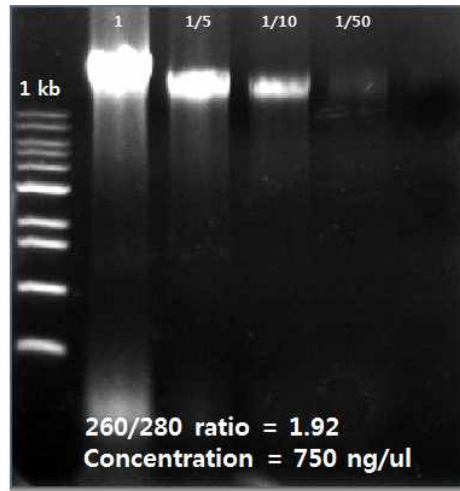


그림 5. *Leu. mesenteroides* DRC0211 균주의 genomic DNA 추출결과

- 추출된 gDNA를 이용하여 마이크로젠에서 PacBio 방법으로 전체염기서열을 분석
- 전체 유전체 염기서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 그린 결과 *Leu. mesenteroides* DRC0211에는 1개의 chromosome (1,923,948 bp)과 4개의 plasmid (59,141, 57,457, 47,426, 36,128 bp)가 존재하는 것이 확인됨 (표 3, 그림 6).
- *Leu. mesenteroides* DRC0211 균주는 tRNA, rRNA operon (16S, 23S, 5S)의 71, 12개를 가지고 있음.

표 3. *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain DRC0211의 genome 분석결과

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DRC0211					
	Chromosome	pDSK1	pDSK2	pDSK3	pDSK4
Size (bp)	1,923,948	59,141	57,457	47,426	36,128
No. of coding gene sequences	1,816	43	45	27	17
C+G content (%)	37.8	34.8	35.1	38.3	35.2
tRNA	70	0	0	0	0
rRNA	12	0	0	0	0
GenBank accession no.	CP013016	CP013017	CP014602	CP014603	CP014604

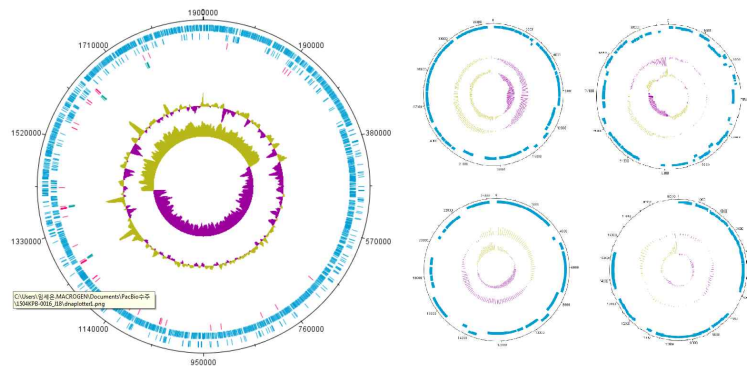


그림 6. *Leu. mesenteroides* DRC0211의 유전체 지도

○ *Leu. mesenteroides* DRC1506 유전체 서열분석

- *Leu. mesenteroides* DRC1506균주는 제 2협동연구과제를 담당하는 대상(주)에서 김치 상품의 제조에 스타터로 사용하기 위해 개발중인 김치유산균주로 본 유산균주에 대한 유전체 분석을 통하여 생리적 기능적 특성을 규명하고자 함.
- *Leu. mesenteroides* DRC1506균주의 전체 유전체 서열분석을 위하여 위의 두 유산균주와 동일하게 chromosome spooling방법을 이용하여 DNA를 추출하고 마크로젠의 PacBio 시퀀싱 시스템을 이용해 염기서열분석을 진행함.

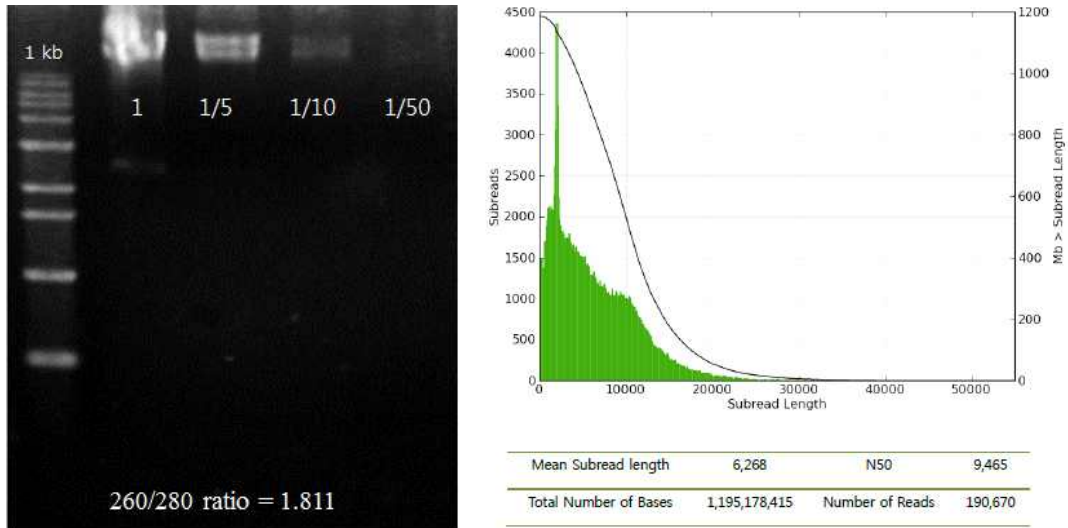


그림 7. *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주의 gDNA 추출결과 및 PacBio시퀀싱 결과를 이용한 전장유전체 어셈블리 결과

- DRC1506 균주의 DNA 추출 결과 높은 순도와 농도를 가지는 genomic DNA 추출하였으며, 이를 PacBio 시스템을 이용한 전장유전체 서열 분석 수행함(그림 7).

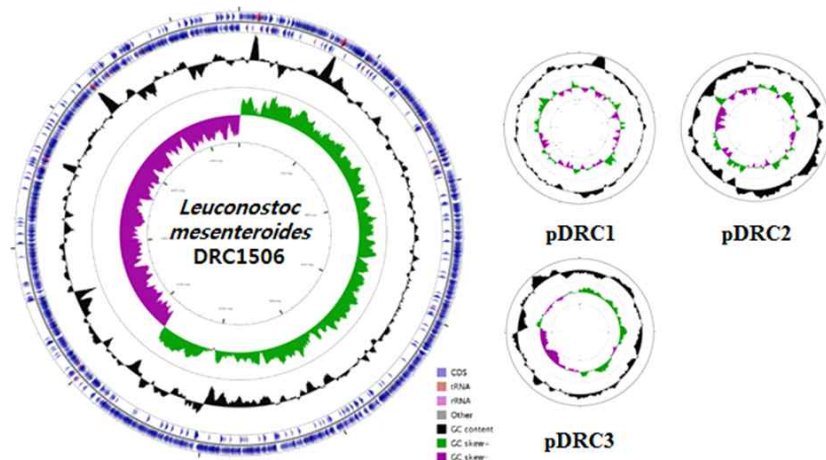


그림 8. *Leu. mesenteroides* DRC1506의 chromosome과 plasmid의 유전체 지도

- *Leu. mesenteroides* DRC1506는 1개의 chromosome과 3개의 plasmid를 가지고 있으며(그림 8), 전체 유전체의 크기는 1,983,917 bp로 분석됨. 전체 유전자 중 단백질을 코딩하는 유전자의 수는 1,931개, 그리고 tRNA와 rRNA의 수는 각각 70개, 12개를 가지고 있음(표 6).

표 5. *Leu. mesenteroides* DRC1506의 유전체 분석결과

	Chromosome	pKLE01	pKLE02	pKLE03
Size (bp)	1,893,478	46,169	24,244	20,026
No. of coding gene sequences	1,816	43	45	27
tRNA	70	0	0	0
rRNA	12	0	0	0

- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T) 유전체 서열분석
- *Leu. mesenteroides*종이 갖는 전반적인 특징을 비교하기 위해 현재 *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum*의 표준균주로 알려진 LMG 8159균주의 유전체 서열을 완전 해독하고자 함.
 - LMG 8159 균주의 DNA 추출 결과 높은 순도와 농도를 가지는 genomic DNA 추출하였으며, 이를 PacBio 시스템을 이용한 전장유전체 서열 분석 수행함(그림 9).

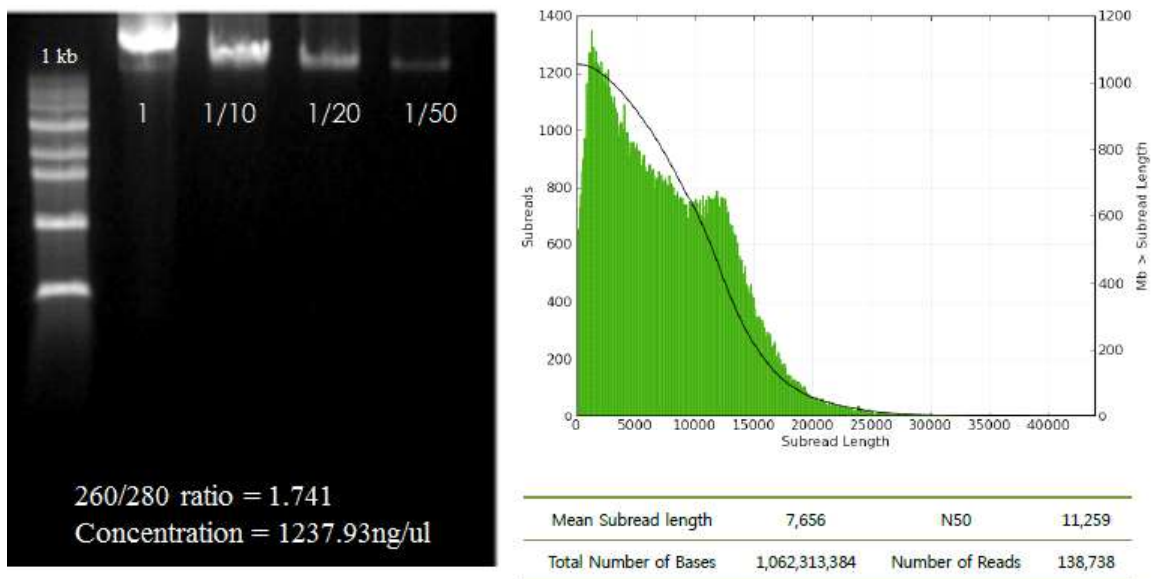


그림 9. *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T) 균주의 genomic DNA 추출결과 및 PacBio시퀀싱 결과를 이용한 전장유전체 어셈블리 결과

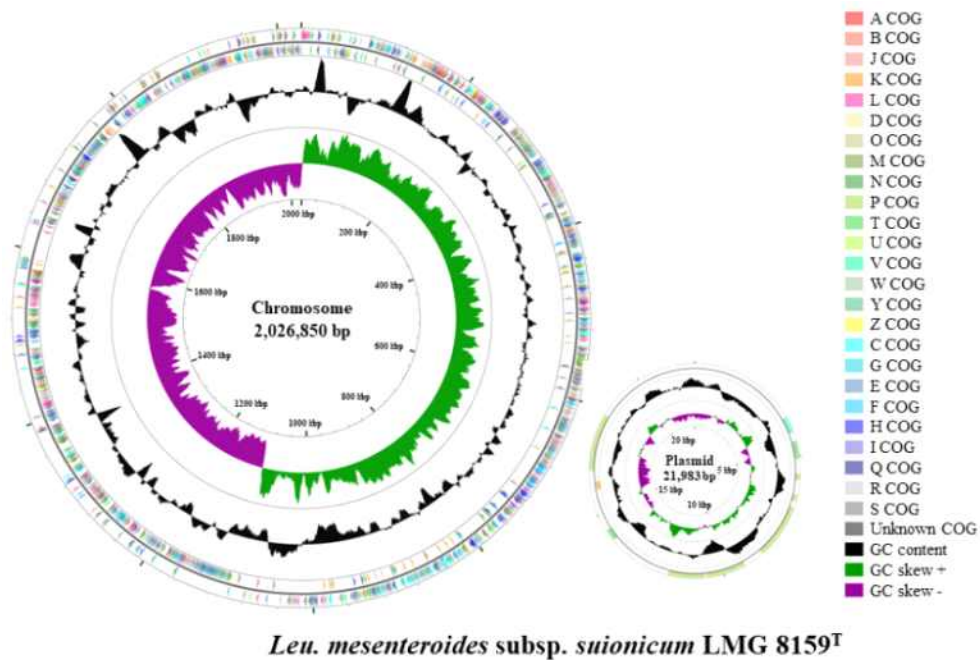


그림 10. *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)의 유전체 지도

- 유전체 염기서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 그린 결과 <그림 10>과 같이 *Leu. mesenteroides subsp. suionicum* LMG 8159(T)에는 1개의 chromosome (2,026,850 bp)과 1개의 plasmid (21,983 bp)가 존재하는 것을 확인됨.
- *Leu. mesenteroides* LMG 8159(T)는 1 개의 chromosome과 1 개의 plasmid를 가지고 있으며 (그림 10), 전체 유전체의 크기는 2,048,833 bp로 분석됨. 전체 유전자 중 단백질을 코딩하는 유전자의 수는 1,973 개, 그리고 tRNA는 82 개를 가지고 있음(표 7).

표 6. *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)의 유전체 분석결과

	Size (bp)	No. of coding gene sequences	C+G content (%)	tRNA	rRNA
Chromosome	2,026,850	1,973	37.6	70	0
plasmid1	21,983	29	37	12	0

○ *Tetragenococcus halophilus* MJ4 유전체 서열분석

- 김치유산균 *Leu. mesenteroides*과 멸치 젓갈에서 분리한 호염성 유산균 *Tetragenococcus halophilus* MJ4의 유전적, 대사적 차이를 분석하기 위하여 호염성 유산균 *Tetragenococcus halophilus* MJ4 전장유전체 서열을 완전 해독하고자 함.
- MJ4 균주의 DNA 추출 결과 높은 순도와 농도를 가지는 genomic DNA 추출하였으며, 이를 PacBio 시스템을 이용한 전장유전체 서열 분석 수행함(그림 11).

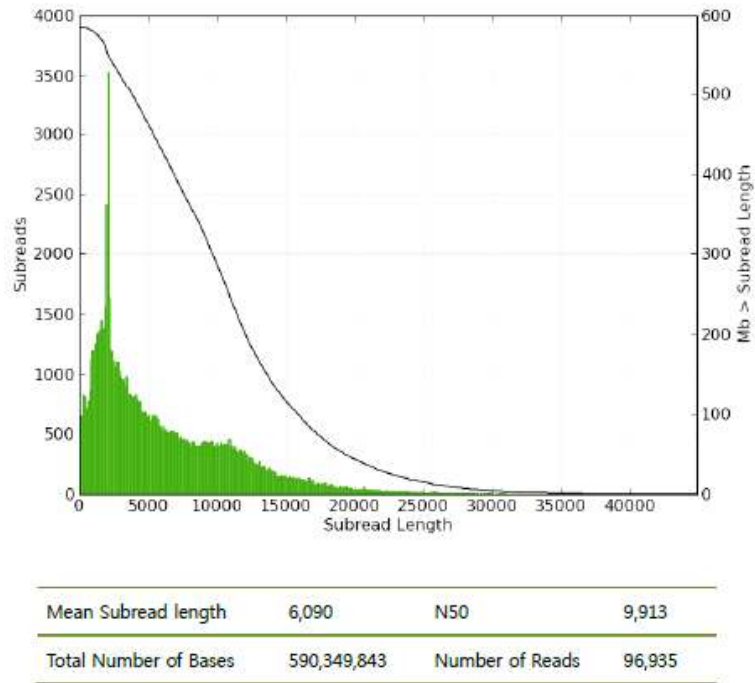


그림 11. 전장유전체 어셈블리(Whole genome assembly)

- 유전체 염기서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 그린 결과 <그림 12>과 같이 *Tetragenococcus halophilus* MJ4에는 1 개의 chromosome (2,389,470 bp)만이 단독으로 존재하는 것을 확인됨.

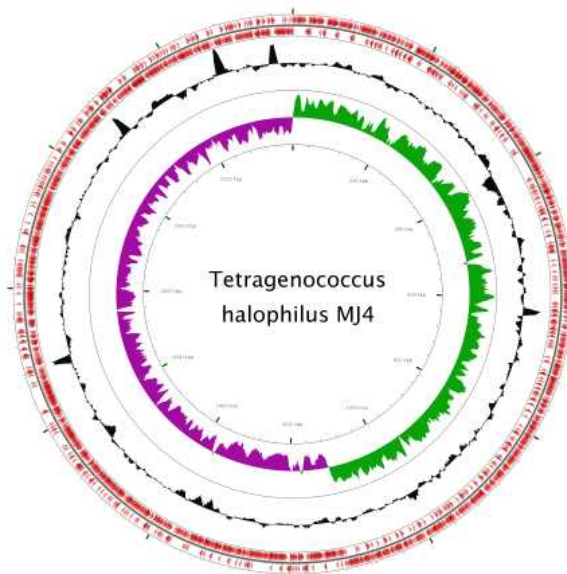


그림 12. *Tetragenococcus halophilus* MJ4의 유전체 지도

- *Tetragenococcus halophilus* subsp. *halophilus* 유전체 서열분석
 - 호염성 유산균인 *T. halophilus*종이 갖는 전반적인 특징을 비교하기 위해 *T. halophilus* subsp. *halophilus*의 표준균주인 *T. halophilus* subsp. *halophilus* DSM 20339 균주의 전장유전체 염기서열 분석을 수행하였다.

- DSM 20339 균주의 DNA 추출 결과 높은 순도와 농도를 가지는 genomic DNA 추출하였으며, 이를 PacBio 시스템을 이용한 전장유전체 서열 분석 수행하였다(그림).

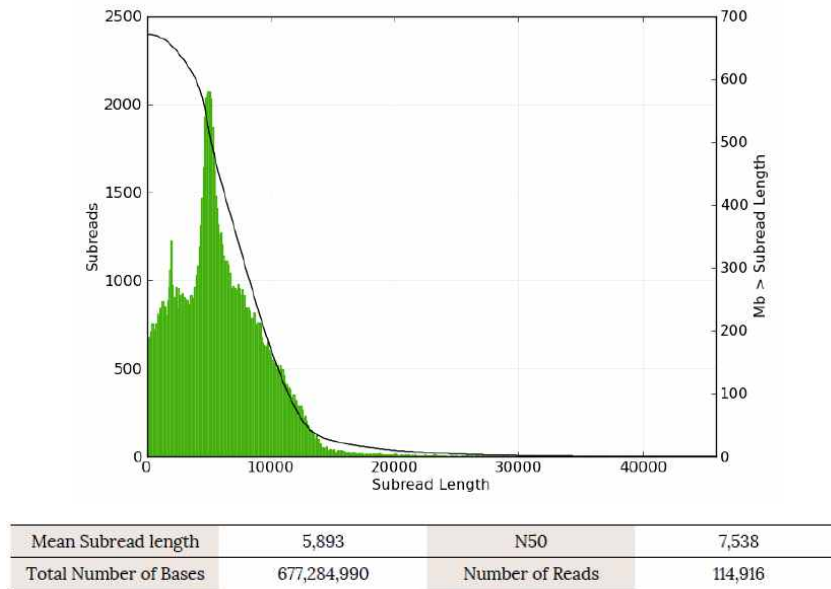


그림 13. *T. halophilus* subsp. *halophilus* DSM 20339(T) 균주의 PacBio시퀀싱 결과를 이용한 전장유전체 어셈블리 결과

- 유전체 염기서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 작성하였다(그림 13). *T. halophilus* subsp. *halophilus* DSM 20339(T)는 1개의 chromosome (2,000,642 bp)과 2개의 plasmid (586,232 bp, 28,896 bp)를 갖는 것으로 분석되었다.

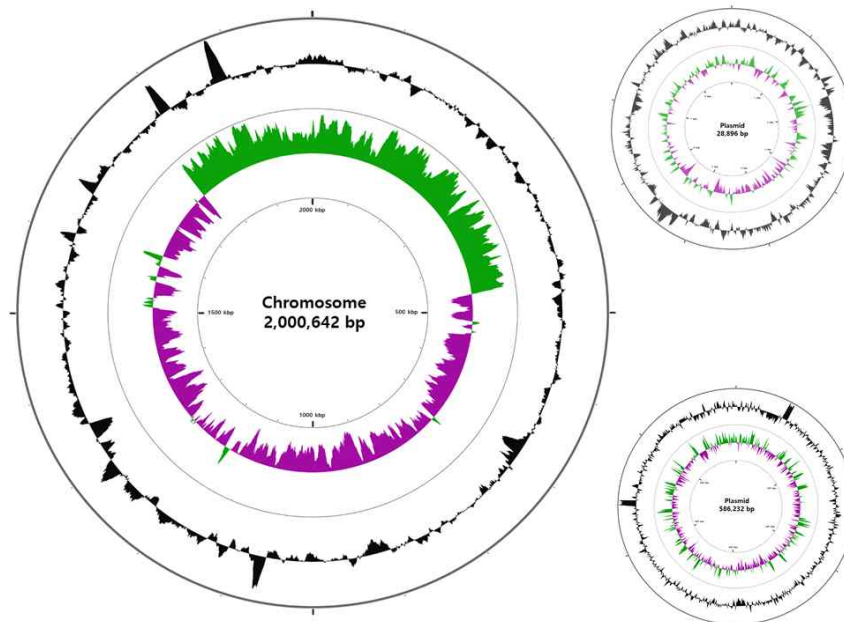


그림 14. *T. halophilus* subsp. *halophilus* DSM 20339(T)균주의 유전체 지도

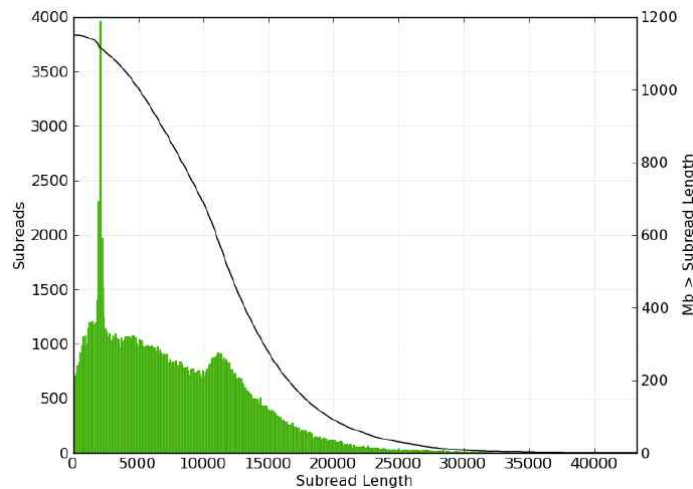
- *T. halophilus* DSM 20339(T)는 1 개의 chromosome과 2 개의 plasmid를 가지고 있으며(그림 14), 전체 유전체의 크기는 2,595,756 bp로 분석됨. 전체 유전자 중 단백질을 코딩하는 유전자의 수는 2,490 개, 그리고 tRNA는 65 개를 가지고 있음(표 7).

표 7. *T. halophilus* subsp. *halophilus* DSM 20339(T)의 유전체 분석결과

	Size(bp)	No. of coding gene sequences	C+G content (%)	tRNA	rRNA
Chromosome	2,000,642	1,894	36.0	59	9
Plasmid1	586,232	589	36.1	6	6
Plasmid2	28,896	7	34.9	0	0

○ *Tetragenococcus halophilus* subsp. *flandriensis* 유전체 서열분석

- *T. halophilus*의 아종 중 *T. halophilus* subsp. *flandriensis*의 표준균주로 알려진 LMG 26042의 유전체 서열을 완전 해독하여 *T. halophilus* 균주들의 유전적, 대사적 특징들을 분석하고자 하였다.
- LMG 26042 균주의 DNA 추출 결과 높은 순도와 농도를 가지는 genomic DNA 추출하였으며, 이를 PacBio 시스템을 이용한 전장유전체 서열 분석 수행하였다(그림 15).



Mean Subread length	7,747	N50	11,338
Total Number of Bases	1,158,267,092	Number of Reads	149,496

그림 15. *T. halophilus* subsp. *flandriensis* LMG 26042(T)균주의 PacBio시퀀싱 결과를 이용한 전장유전체 어셈블리 결과

- 유전체 염기서열 분석 결과를 바탕으로 유전자 지도를 그린 결과 그림 16과 같이 *T. halophilus* subsp. *flandriensis* LMG 26042(T)에는 1개의 chromosome (2,695,908 bp)과 1개의 plasmid (28,896 bp)가 존재하는 것이 확인되었다.

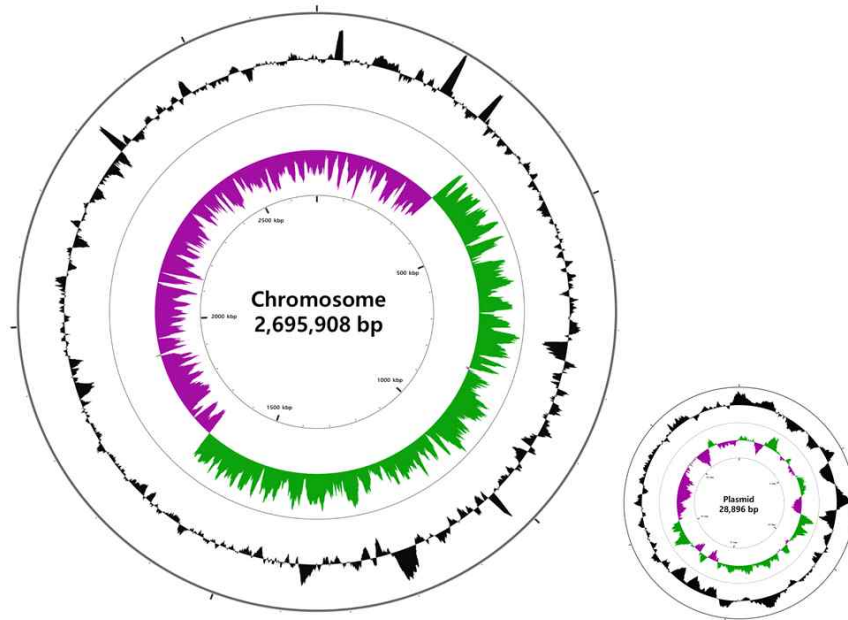


그림 16. *T. halophilus* subsp. *flandriensis* LMG 26042(T)균주의 유전체 지도

- *T. halophilus* subsp. *flandriensis* LMG 26042(T)는 1 개의 chromosome과 1 개의 plasmid를 가지고 있으며(그림 16), 전체 유전체의 크기는 2,724,804 bp로 분석되었으며, 전체 유전자 중 단백질을 코딩하는 유전자의 수는 2,635 개, 그리고 tRNA는 63 개를 가지고 있음을 확인하였다(표 8).

표 8. *T. halophilus* subsp. *flandriensis* LMG 26042(T)의 유전체 분석결과

	Size(bp)	No. of coding gene sequences	C+G content (%)	tRNA	rRNA
Chromosome	2,695,908	2599	36.3	63	15
Plasmid1	28,896	36	36.7	0	0

- 미국 생물정보기술 센터(NCBI) 및 농촌진흥청 국가농생명기술정보센터(NABIC)에 미생물 염기서열 등록
- 재분석하여 완성도를 높인 *Leu. mesenteroides*J18 균주의 유전체 정보를 NCBI에 수정등록(update)하고 NABIC에 신규 등록하였다.
- 본 연구를 통하여 전장유전체 염기서열이 분석된 *Leu. meseteroides* DRC0211와 *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T), *Tetragenococcus halophilus* MJ4의 유전체 정보를 NCBI에 수정등록(update)하고 NABIC에 신규 등록하였다.
- *Leu. meseteroides* DRC1506 균주 또한 NCBI에 등록 료하였다.
- *T. halophilus* subsp. *halophilus* DSM 20339와 *T. halophilus* subsp. *flandriensis* LMG 26042의 체 정보를 NCBI에 등록하고 NABIC에 신규 등록하였다.

4. 분석된 김치유산균의 유전체 정보를 바탕으로 한 김치유산균의 대사적, 기능적, 발효적, 유전적 특성 비교분석

- 유전체 분석을 바탕으로 한 김치 유산균들의 유용 유전자의 탐색
 - 문헌등을 기초로 김치유산균의 비타민 합성에 대한 분석을 수행함.
 - 유용유전자의 탐색을 위하여 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 데이터 베이스나 NCBI의 GenBank 데이터베이스의 주석 결과를 활용함.
 - *Leu. mesenteroides* J18의 유용 유전자 탐색 결과 비타민 B1 합성유전자(riboflavin synthase)를 1 건 확보함.

• **Riboflavin synthase subunit alpha**

atgtttacaggtattacacaagaagtgtgctgttaataagcatttatcagcgtaatgacaaagaatgctgtcaaaattgctgcatccgaggactatt
 tttctgatagcagagtagcgcgatagcattatggttgatggcgtttgttaacaattaatcagctagaatcaaatatgctgaattcgatatttggtaccg
 acttttgaacgaccattgttaaatctcaagttgggcaaaaagtaaacttgagaaagcacttttagttccaaccgattgatggcactttgttcta
 ggcatgtagatcagacagctgaagtagtcaaaaaagagtacagtgaagaaaccacattgttaactttfaaattagcagaccgtcaaaaaataatca
 aatcgtcaataaagggtcagttactttcaggtgtgagcctaaccattgtcaagcgagagaagatgtattcaagttggtctaataccacttaccattaa
 ccaagacaactttgggattattgacgaacgagatttggtaaattgtgaaaccgataatttggcgaaatattaatgaaaggaaagtaa

• **Riboflavin synthase subunit beta**

atgattataaagctaagttaatgatcaacaataaaaaaattgcaattgtggccagcaagtttaattgatttaattgttaacaactttttctggcgcg
 caagaatctctagaatgcatggattgatgagagtaattgatattttgggtaccaggagcttggaaattccaatggttgcgaaagaatagcgcg
 caggttcaaaaatgatggattgttaactactaggtgctgtaataaaaggagacacagatcattatgacctgttattaatgggttgtaacggcattt
 ctcaataagtttaagtacagatgtaccaattgttttgggggtgtgactacagatactttagagcaagcacagcaacggtcaggtgccaatcaggaa
 acaaaggggcccgaagttgactcagtttgggagcttataatctttgagcaataaaatccattga

- *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주로부터 유용유전자 vitamin B1 합성유전자(riboflavin synthase)를 1 건 확보함

• **Riboflavin synthase subunit alpha**

TGGCTTAGTTGTGTTACTGCAACAATCGATTTGAAAAAGAAAGAAATTTTATCTGGACCAGA
 TATTTTATCACGTGGTTTTGTCTATATGCGTGAATCTGGCGATTTGATTAATGAAGGTTCGACGT
 GTCATTTTCAGCAACAATGCGCCGCGTTATGAATAGTTCAAACAATAGCGAGTCAGATATTTCGT
 CAAGCTGTTATTGATGACTGTCTCGTTTCCTATTCAAAGAAACAGCTCGCAAACCAATGATT
 ATGCCAATGCTAATTTTGGTTAAGTAAAAAAACATCTAGAAAATAATCTAGGTGTTTTTTTA
 TTTCACAAATTATTACTAATTCACATTACTTTGATTCAAAGTCCAGCGTGATTCCGGTGTCTGTT
 GGTAAAATCATTAAAATAAAGAACCAATATTTCCGATAATCGGAATCAAATCAATAAATAT
 CCAACCAGCACTTCGATTTGTATCGTGCAGACGGCGTGCTTTCAAAGTAAAAGTAGCAATCC
 ACACAATTATCATGACGATTCTTGTGTCAAATTAGTAGACAAGTCACCAACAGTGTAGATAT
 CTTCAATTGAATGACCTTGCATAT

• **Riboflavin biosynthesis protein RibF**

GCAGATTGTTGATGATTTTACCAGTAACAGTGACAGCTTATTTTGAAGACGATGCATCTTT
 ACCTAACACTGTTAGTTCGGATAAAAAGAACAGTTGGATAACTTAGTGACGCTTGGGGTTGATG
 CATCACCTGCAACTATTACATTAATGACGTGGCACAATCAGATTGGGAAAACAACCTGGAAA
 CAATATTATCATGCCACCCGCATAACAAGACACATTACTGTTGTACCTTCATGGGAAAACCTTT
 GTAGCAGCTCAAAAAGATGAATATCCAATTATTATGGATCCTAAGTTAGCTTTTGGAACAGG
 AGTTCATGAAACAACACGATTAATGATCCAAGCGCTAGAAACTGTCGTTTCGTGGCGGAGAA
 AGCATGATAGACGTGGGTACGGGTTACGGAGTACTATCCGTCGCTGCAAAAACAACCTCGGTGT
 AGCAGGTATTTTAGCAACAGATATTGACGAGATGGCTGTGAATGTTGCTAAAGAAAATTTAG
 CGTTAAACCCAGTGGCCAATGATGTTACAGTGGTAACTAGTGATTTACTGGAGTCAATTGCTA
 TCGATAAAGCCTGTAGACTTGATTGTTGCTAATATTCTAGCTGACGTTATTGAACGCCTTATTCC
 ACAGACATGGTCACGCCTGAAGCCAGGTGGCTATTTCTTGGTTTCTGGAATCTATGATGCTAT
 TTCAGTATCGATTGAACAACAGCTACAACAAGCGGGATATAAAAATTTTCAACACACAACAA
 TGGGTGACTGGCATGCATTCATTGCAAAAAGGATTTTAAATAATGCAACGCTATTTTCTAAA
 CGAACCAATTAATGATACGATTGCTTGCAGCTGACAATGACATTTTTAAGCACTTTGGCAA
 AGTTTTGAGAGCTCGAGTGGGGTCAAAGCTGAATTTGTTAGTAATAATTTGGAAATCTGCCT
 TGGAGAAGTTACT

• **Riboflavin biosynthesis protein RibT**

GCTAAGTTTTAGTTATTGGAAATAACCGTGACTCTCAAAGTTCGACGGTTATTTTTTTCTGCT
 AATTTTTTCTATTAGTAGAACTACAAACGTTAGTAAACTGATGATAAAGATACCAAAAAGCTA
 GTAACGTTTGCAGTGTGTCCGAAAGGGACATCAGGCATTTCTTTCTAGAAATCTGGGTTTAC
 AGTGATTACACCATAAGCACCACCTCCGTTCCGGATAGCCACCGTCTTAACTTGTGTTGCTTCA

TCTAGTATAACATATGTAAAAACAGTAAAAATCGGGTAACAATTGTGAACAAAACCTTACTTC
GCTTTTTTCTTTATAAGTTAGGCAATTAGTGTTCTTTGATTATTATGATTAGTGCCATGAT

• **Riboflavin biosynthesis protein RibD**

TTTTCCAAGATGCTAACTAATATTCCACCCAAAAAATAATTGACAATTAACGGTACCCAGTA
CTGIGTCCTTGTGCGGTGCGATGCCAAGAAAACATTTTTGTCCAAAATTCACGATAAGCATT
AATCATATGATTTCCCCCTTTTCTCTCATCATCAATCAATGATAACACTCTTTTTGGAAAAAGT
TAATTTAGAGAATCAAGCTAGAATATGTTGACAATATAAAAAAGCAGCTTACTCTCAAACAAC
AATTTCCAAAGCTTACACTGGGTAAATTATTTTCTCATCTAAGCATCTGCTGAAATAGAG
CTATCAGGCACCATCAACATTTCTAGCCTAAACGCTGAGTAAACTGCTCCTGGATTGAAAGA
AACCCATTCCCCTTATCGTTAAGGATAACTTCAACAACCTCGCATTGTTATTAGGACTTCCTCCT
AATCTATACACATAGTATAGCATATAAATGCTCCAATTGCAAACGCTTACATTTATGATATAT
AAACCACCTCAAATGACCAGAAAAGCCAACCTCAACAAATTGTGAGTTGGCTTTTTACTAACT
GCTCCACTTGGATTGGAACCAAGGACCTGCGCATTAAACAGTGCCTTATTCTACCACTGAACTA
TGGAGCAATGAAATAAACAATGATTAATTTATAATGTATTAATTATTAGTTGTCAACATATTT
TTCAGAAAAAATATGTACTTTTATAATACAATTTAATAATAAAAAAAGCCCCAACAGACA
GGACTATATCGAGGAATTTAATTTCAATCGTCTGTTGGGGTAGTAATGTTTGTGAACAAACATT
ACTATTTTAGTATAGCCACTACTTTAACAATTATTCAAACAAATGTTAGGTTACTTATCAAGA
TGAATGTTTCTCAAAAATACTATGATTAATTTGTATCAGAAATTTATCCCCGCAATATTGAA
CATTAGGGATCATTTAACTTAATTATTCGTAAAAAAGCTGACATTATTTCTGCTTGTCTGTTGT
CAGTATGTTACAATATCATCAGTACAAAT

- *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주로부터 유용유전자 vitamin B7 합성유전자(biotin biosynthesis protein)를 1 건 확보함

• **Biotin biosynthesis protein BioY**

ATCACGTACTCTCGATAGAAATTCATCGCTTCCTCTTTATCTGAATGGTGCAACTGATGTAGT
AGTTGCTCTAACTCAGCTAAATAATTCTCCATCTGCTTATCTCTCCTTCAATAATGTGTCAACG
TTTGCTTGGAACATTACCCAATCTTGCGTATGCTAGCCAATCTGTCACGACCTCGTGTGTA
ATCTGGTAGTAACGTCGATTTCTGCCTTGATAAGGTTGATCATACTGTTGTAACAAATTGATTAT
TTTTTAATCTCCGTAGTACAGGGTATAACGTCGATTCCGAAACAGAAATCGTGCCTGCACTC
TTTGCGTTAATGCATAACCGTAATAATCTTCTTTATCTAATATCGCTAAAACGCAACCGTCTA
ATAATTCTGAACTCATTTGAATGCCATACTTATTTCTCCAATACTATACGACATATAATATA
TGTTCAAAAATATTATATGGATTTTTAATTTGTTTGTCAACAAAAAATATCTCAACAAATGT
CATTGTTGAGATATTTTTCGTTGCCTAATCATCTTT

- 김치발효용 스타터개발 후보균주 후보로 선정된 *Leu. meseteroides* J18은 김치에서 분리되었 으며, 이중발효유산균으로써 만니톨 생성 유전자를 가지고 있음.
- *Leu. meseteroides* J18은 엽산, 리보플라빈 생합성과 박테리오신 생성 등 유용유전자를 보유 하고 있으며 amino acid decarboxylase를 보유하고 있지 않아 biogenic amine을 생성하지 않는 안전한 유산균으로 판단됨.

○ *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T) 대사적 특성 분석

- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)의 전장 유전체 분석을 통하여 얻어진 정 보를 바탕으로 본 유산균이 갖는 탄소 대사 경로를 재구성함
- 그림 17과 같이 *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)는 lactose, malotose, galactose, glucose, cellobiose, mannose, sucrose, fructose, xylose, arabinose, ribose 등 다 양한 탄소원을 세포 외부로부터 받아들이며 이용할 수 있는 유전자를 보유함.
- 세포 내부로 유입되는 다양한 탄소원을 이용하는 대사 유전자를 보유함을 알 수 있으며 탄소원의 이용은 *Leu. mesenteroides* J18과 높은 유사성을 가지고 있음을 알 수 있음.

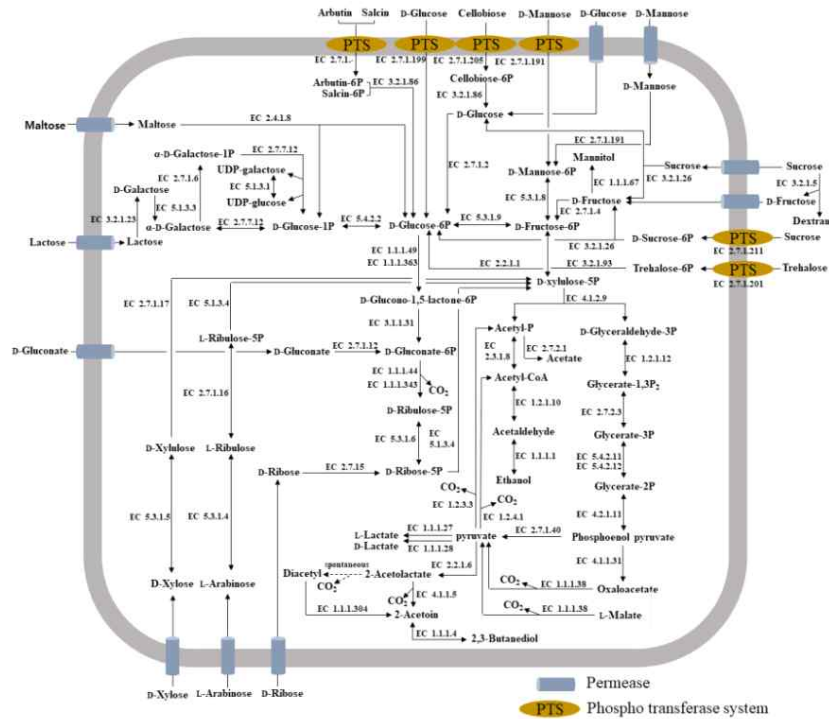


그림 17. *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)의 탄소대사경로

○ *Leu. mesenteroides* J18 와 *Leu. mesenteroides* DRC0211 유전체 비교분석

- J18균주와 DRC0211균주의 비교분석을 위해 plasmid 존재 유무이외에 두 균주 사이의 염기서열을 비교하여 차이점들을 분석함(표 9).

표 9. *Leu. mesenteroides* J18균주와 *Leu. mesenteroides* DRC0211의 염기서열 비교 분석 결과

Site	J18	DRC	CDS
22307	G	A	
22316	G	-	
144768	A	T	
144793	C	T	
144795	-	A	
144797	-	T	
144817	-	A	
144835	-	G	
473880	-	T	
590303	-	T	
676880	-	A	hypothetical protein
723176	-	A	Salicylate biosynthesis isochorismate synthase
845797	-	GCTACAACGGACAAAGTAGCGGACACAA CAGCTACAACAGATAAAGTGGCCGACAC GACG	Glucosyltransferase-SI precursor
990655	-	A	HTH-type transcriptional repressor PutR
1307697	T	-	hypothetical protein
1413498 - 1414017		491 & 527	
1416380 - 1416926		491 & 527	Type I restriction modification DNA specificity domain protein
1464166	-	TGTTTCTGTTTCTGTTTC	Signal recognition particle receptor FtsY
1575052- 1575407		418	Collagen triple helix repeat (20 copies)
1664977	-	T	hypothetical protein
1665024	C	-	hypothetical protein
1773416	T	-	Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme Nnr

- *Leu. mesenteroides* J18 균주와 *Leu. mesenteroides* DRC0211의 유전체 염기서열을 비교한 결

과 표 5와 같이 염색체 상의 22 부분에서 염기서열 차이를 보이며 나머지 염기서열은 동일함을 확인함.

- DRC0211에 비해 J18의 유전체 크기가 작은 것은 김치 발효와 같은 특정 환경속에서 오랜 시간 적응하여 환경 내 생존에 불필요한 유전자를 제거했기 때문에 유전체 크기의 축소가 일어난 것으로 사료됨.
- *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주와 기존에 분석된 유산균들 사이의 유전체 비교 분석
 - *Leu. mesenteroides* 종의 생리학, 유전학적 특성을 규명하기 위하여 본 연구진에서 분석한 *Leu. mesenteroides* J18, *Leu. mesenteroides* DRC0211, *Leu. mesenteroides* DRC1506, *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)와 NCBI GenBank 데이터베이스에 등록되어 있는 15 균주의 전장 유전체 서열을 대상으로 비교유전체 분석을 수행함.
 - 분석에 이용한 19 균주에 대한 정보는 표 10.에 나타냄.

표 10. *Leu. mesenteroides* 균주들의 기본 유전체 특성

Accession no.	Named in Genbank	Genome status ^a	Size (Mb)	GC content (%)	Total no. of genes	No. of protein coding sequences	No. of rRNA genes	No. of tRNA genes	Isolation source	References
CP014611-15	<i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506	C	1.98	37.72	1,958	1,873	12	70	Kimchi	In this study
CP000574	<i>Leu. mesenteroides</i> KFRI-MG	C	1.90	37.70	1,884	1,781	12	68	Kimchi	-
JRGZ00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> P45	D	1.87	37.50	1,837	1,718	9	51	Pulque	Riveros-Mckay et al., 2014
BBPK00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> Wikim17	D	1.86	37.80	1,844	1,725	4	53	Kimchi	-
BCMP00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> 406	D	2.00	37.70	2,018	1,880	5	48	Airag	Morita et al., 2016
LMXE00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> GL1	D	1.82	38.10	1,717	1,637	2	34	unknown	-
BCMO00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> 213MD	D	2.03	37.70	2,031	1,977	3	48	Airag	Morita et al., 2016
CP000414-15	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8295 ^T	C	2.08	37.66	2,061	1,948	12	70	Fermenting olives	-
CP003101-05	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18	C	2.02	37.68	1,981	1,867	12	70	Kimchi	Jung et al., 2012
CP013016-17, CP014602-04	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DRC0211	C	2.02	37.80	2,082	1,997	12	70	Kimchi	In this study
CP014610	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> BD3749	C	1.99	37.80	1,982	1,897	12	70	unknown	-
LAYU00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> LbE16	D	2.04	37.50	2,097	1,921	3	50	Italian soft cheese	Ilenia et al., 2015
CP012009-10	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 20484 ^T	C	1.85	38.04	1,876	1,699	12	70	Cheese	Park et al., 2016
LAYN00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> LbE15	D	2.01	37.60	2,045	1,889	3	50	Italian soft cheese	Ilenia et al., 2015
ACKV01000000	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254 ^T	D	1.74	38.50	1,702	1,470	3	48	dairy starter cultures	-
ATAZ00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> TIFN8	D	1.71	38.20	1,844	1,263	8	60	dairy starter cultures	Erikus et al., 2013
LAYV00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> LbT16	D	1.91	37.80	1,937	1,701	3	50	Italian soft cheese	Ilenia et al., 2015
JAUJ00000000	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> T26	D	1.83	38.40	1,930	1,630	3	55	Mesophilic Undefined Cheese.	Pedersen et al., 2014
CP015247-8	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> LMG 8159 ^T	C	2.05	37.60	2,034	1,907	12	70	unknown	Chun et al., 2012

^aGenome status : D, draft genome sequence, C, complete genome sequence

- 19 균주들의 유연관계를 파악하기 위하여 16S rRNA gene 서열을 바탕으로 계통수를 작성하였음.
- 19 균주들의 유연관계 파악을 위하여 전장유전체의 서열을 이용하는 average nucleotide identity (ANI)와 *in silico* DNA-DNA hybridization (*in silico* DDH) 분석을 각각 Orthologous Average Nucleotide Identity Tool (OAT)와 Genome-to-Genome Distance

Calculator (GGDC, <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) (Auch et al., 2010, Meier-Kolthoff et al., 2013)를 이용하여 분석함.

- *Leu. mesenteroides* 균주들이 갖는 생리학, 유전학적 특성 규명을 위해 Bacterial Pan Genome Analysis pipeline (BPGA)(Narendrakumar et al., 2016)을 이용하여 pan-genome 및 core-genome 분석을 수행함.
- *Leu. mesenteroides* 균주들이 갖는 단백질에 대하여 유사도 90 %의 기준을 설정하여 모든 단백질들의 클러스터링을 수행함.
- Pan-genome 및 Core-genome의 단백질들의 기능에 대해서는 KEGG 데이터베이스, Cluster of Orthologous Groups (COG) 데이터베이스를 기반으로 분석을 수행함.

○ *Leu. mesenteroides*의 계통학적 분류와 김치발효 대사 특성 분석

- 16S rRNA 유전자 서열을 기반으로 한 *Leu. mesenteroides* strain들의 계통학적 유연관계는 아래 그림 18. 와 같음.

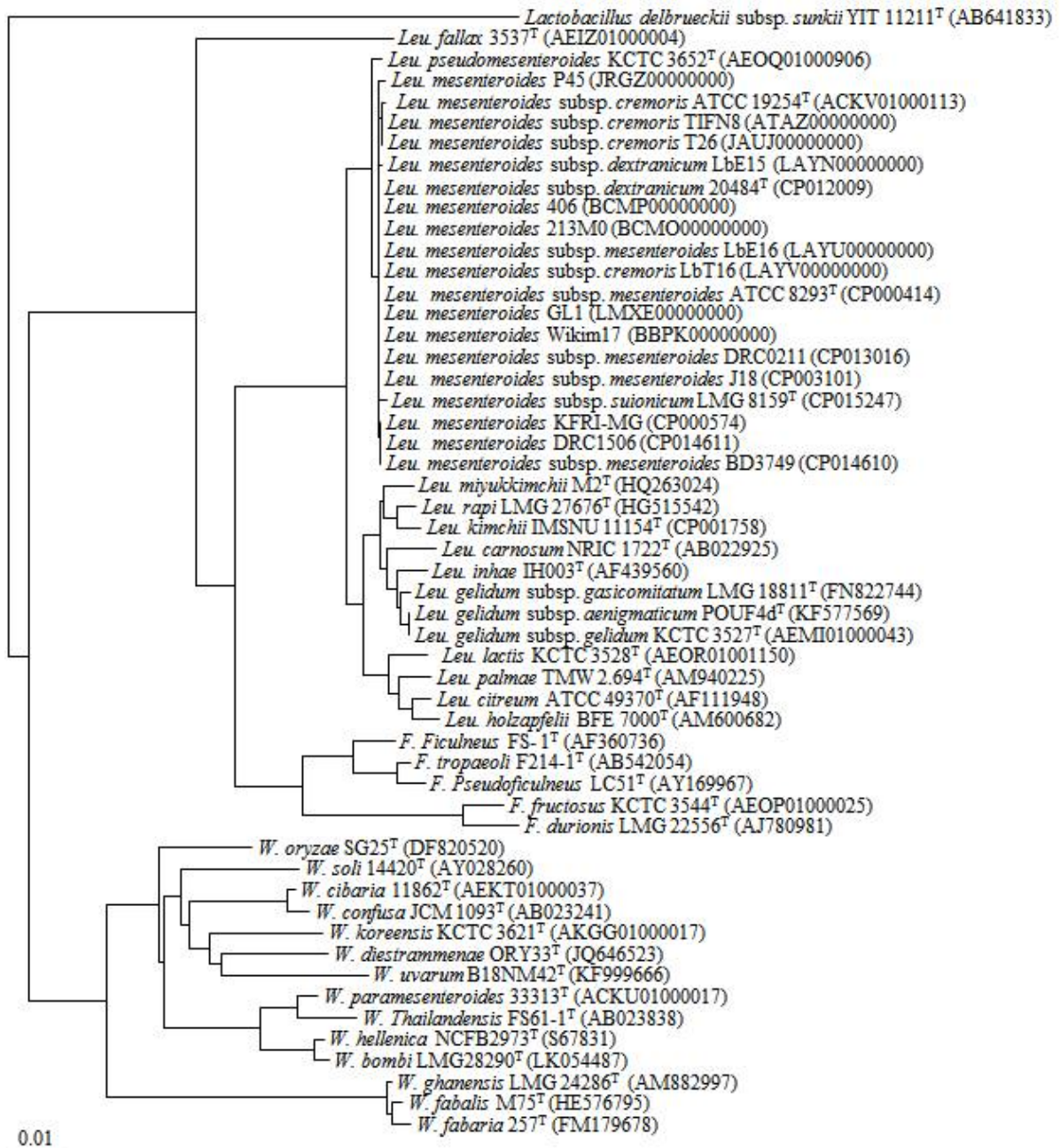


그림 18. 16S rRNA 유전자 서열을 기반으로 작성한 *Leu. mesenteroides*의 계통수

- 현재 *Leu. mesenteroides*는 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum*인 4개의 아종(subspecies)으로 그 계통이 분류되어 있음.
- 16S rRNA 서열을 기반으로 *Leuconostoc* 그룹 및 *Leu. mesenteroides*의 계통학적 분석 결과 *Fructobacillus* 및 *Weissella* 속의 균주들과 높은 유연관계를 갖는 것으로 보임.
- *Leu. mesenteroides* 종들의 16S rRNA 유전자 서열은 상동성이 굉장히 높아 아종 수준까지는 분류에 한계를 보이기 때문에 전장유전체 서열 전체를 이용하는 ANI와 in silico DDH 분석을 통하여 *Leu. mesenteroides*의 계통적 유연관계를 재분류 하였음(그림 19., 그림 20.).

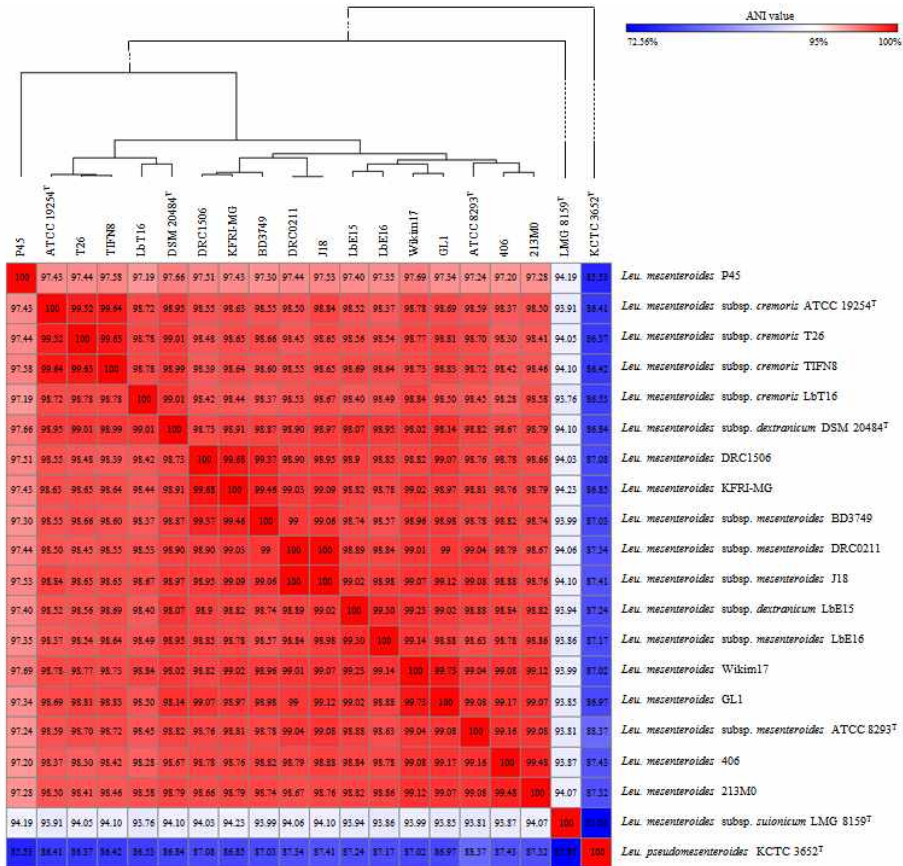


그림 19. Average Nucleotide identity(ANI) 값을 기반으로 제작된 히트맵

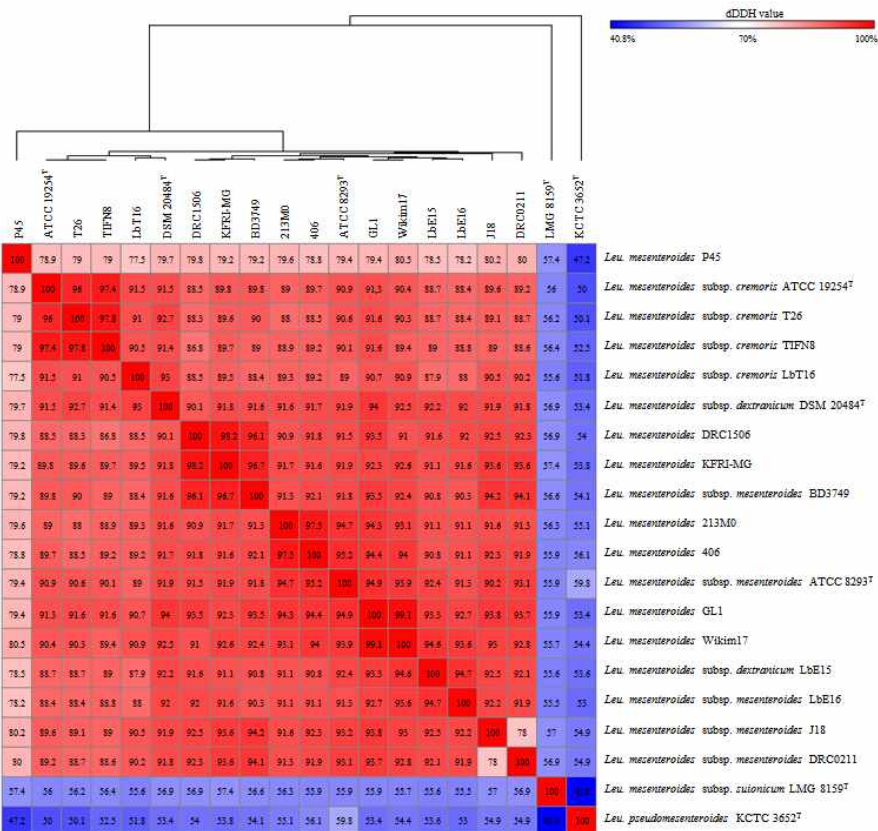


그림 20. *in silico* DNA-DNA hybridizations (in silico DDH) 값을 기반으로 제작된 히트맵

- ANI 분석결과 *Leu. mesenteroides* group은 총 5 개의 아종(subspecies)로 재분류될 수 있음 (현재 분류되어 있는 3 가지 아종(subspecies)인 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*와 새로운 2 가지 아종이 추가될 가능성이 있음.)
- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)의 경우 ANI 값이 95% 미만이기 때문에 *Leu. mesenteroides*에 속한다고 보기 어려울 것으로 판단 (일반적으로 ANI 값이 95%이상일 때 같은 종으로 분류)
- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)은 heatmap 상에서도 다른 *Leu. mesenteroides*들과 다른 색을 나타냄(흰색)
- LMG 8159 이외에 다른 *Leu. mesenteroides*는 1 그룹으로 잘 분류됨(빨간색)
- *Leu. pseudomesenteroides* KCTC 3652(T)는 *Leu. mesenteroides*와 다른 종이기 때문에 유연관계가 상당히 먼 것으로 나타남(파란색)
- *in silico* DDH 값을 기반으로 작성한 히트맵에서도 ANI분석 결과와 유사하게 *Leu. mesenteroides* group은 총 5개의 아종(subspecies)으로 재분류될 수 있음
- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)의 경우 *Leu. mesenteroides*의 균주들과 *in silico* DDH 값이 70 % 미만으로 나타남. 이는 DDH값에 의한 종의 분류 기준인 70 %를 넘기지 못하기 때문에 *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)은 *Leu. mesenteroides*에 속한다고 보기 어려움.
- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T)은 히트맵 결과 상에서도 다른 *Leu. mesenteroides*들과 다른 색을 나타내고(파란색, 70 % 이하), *Leu. pseudomesenteroides* KCTC 3652(T)와 오히려 유연관계가 가까운 것으로 생각됨.
- LMG 8159이외에 다른 *Leu. mesenteroides*는 한 그룹으로 명확히 분류됨(빨간색).
- *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* LMG 8159(T) 균주는 앞서 분석한 ANI와 dDDH value 값을 보았을 때, *Leu. mesenteroides*에 속한다고 보기 어려울 것으로 판단되어 *Leu. mesenteroides* 종의 생리학, 유전학적 특성분석에서 제외함.
- BPGA (a Bacterial Pan Genome Analysis pipeline) 을 이용하여 90% sequence identity를 cut-off value로 정하여 분석 하였을 때, 총 17균주의 *Leu. mesenteroides*의 pan-genome 분석결과, 3,185개의 pan gene과 999개의 core gene을 가지는 것으로 나타남(그림 21).

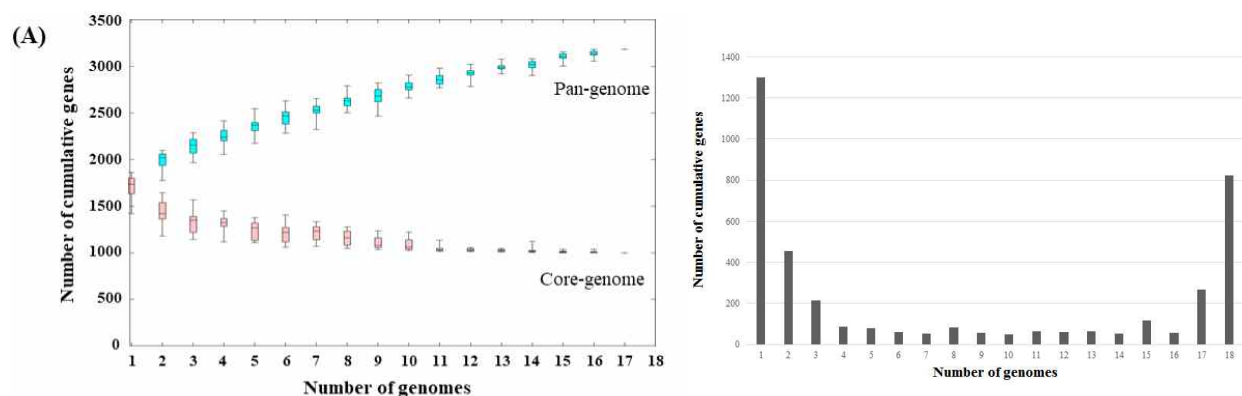


그림 21. *Leu. mesenteroides* 18 균주의 core and pan genome plot 및 Histogram of pan genome distribution

- *Leu. mesenteroides* 17 균주의 core gene pool은 999개, unique gene pool은 754개로 unique gene를 가지고 있음. *Leu. mesenteroides* 균주들은 적은 core gene을 가지고 있고, 각 균주들의 지놈 사이에 횡적 유전자 전달(horizontal gene transfer)이 일어난 결과로 추정됨.
- 가장 많은 unique gene을 보유하고 있는 균주들은 *Leu. mesenteroides* P45 균주이며, 가장 적게 보유하고 있는 균주는 J18 및 DRC0211임(그림).
- J18 및 DRC0211균주는 유전체 크기가 조금 다를 뿐, ANI value=100% 로 유전체 정보는 거의 같기 때문에 unique gene 개수가 가장 적게 분석됨.

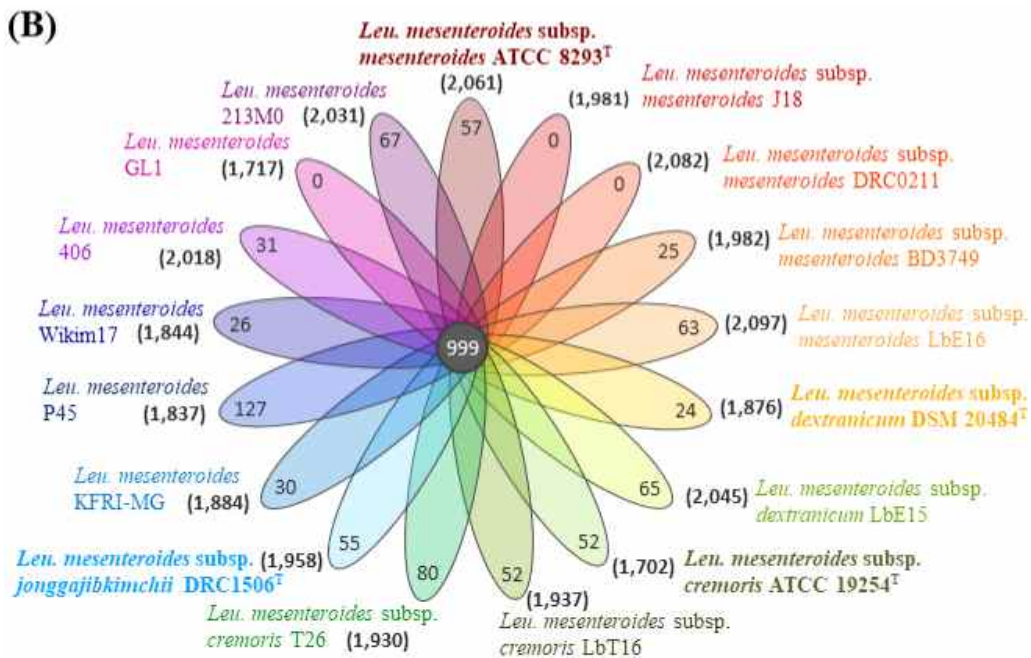


그림 22. Core 및 unique gene의 개수를 나타내는 Flower plot diagram

- Unique gene의 대부분은 hypothetical protein으로 나타남. 이는 균주 내에 유일하게 존재하는 단백질로 그 기능이 주석되어지지 않았기 때문으로 사료됨(표 11).

표 11. 각 *Leu. mesenteroides* strain들의 unique gene 리스트

	406	GL1	DRC0211	DRC1506	KFRI-MG	ATCC 19254	Lbt16	T26	TIFN8
camphor resistance protein in Crb		holin		2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase		acetyltransferase	2-hydroxyacid dehydrogenase	ABC transporter ATP-binding protein	ABC transporter substrate-binding protein
CoA-disulfide reductase		hydroxyacid dehydrogenase		3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	alpha/beta hydrolase	adenine phosphoribosyltransferase	alanyl-tRNA synthetase	ABC transporter permease	acetoin reductase
endodeoxyribonuclease				ABC transporter ATP-binding protein	antirepressor	antirepressor	beta(1,3)galactosyltransferase	acyl-CoA acetyltransferase	addiction module toxin
RusA				ABC transporter permease	Bcr/Cla family drug resistance efflux transporter	antirepressor	C4-dicarboxylate ABC transporter	antirepressor	DNA replication protein
glycosyl hydrolase family 70				acetyltransferase	DNA replication protein	bioassay protein	cell division protein FtsK	bacteriochlorophyll 4-nonyl reductase	kinase
glycosyltransferase				addiction module toxin	RelE	cell division protein FtsK	dimethyladenosine transferase	bacteriochlorophyll 4-nonyl reductase	transposase
histone acetyltransferase				alcohol dehydrogenase	GCN5 family acetyltransferase	cell division protein FtsK	histidine kinase	capsular biosynthesis protein	transposase
manganese catalase				alpha/beta hydrolase	GNAT family acetyltransferase	CopG family transcriptional regulator	lactate dehydrogenase	cell surface protein	
methylesterase				ATPase	MarR family transcriptional regulator	dNDP (cytosine-5)-methyltransferase	malate permease	chloramphenicol acetyltransferase	CAT
polysaccharide biosynthesis protein				ATPase	membrane protein	DNA invertase Pin	membrane protein	choice-of-anchor A domain-containing protein	
repressor				HsrR family transcriptional regulator	phenazine biosynthesis protein PhzF	DNA methyltransferase	molecular chaperone	Tir	damage-inducible protein ClnA
terminase				MarR family transcriptional regulator	restriction endonuclease subunit S	DNA methyltransferase	peptidase S8	DNA cytosine methyltransferase	
topoisomerase				NADPH quinone reductase		DNA primase	polysaccharide biosynthesis protein	DNA primase	
UDP-glucose 6-dehydrogenase				oxidoreductase		dTDP-4-dehydrothiamine reductase	RepB protein	endodeoxyribonuclease RusA	
XRE family transcriptional regulator				peptidase		family 2 glycosyltransferase	RepB-like protein	glycosyl transferase	
				phosphoesterase PA-phosphatase		fructose 4-O-acetylase	repressor	helicase	
				RepB protein		glycosyltransferase	sugar isomerase	helicase	
				ribitol-5-phosphate dehydrogenase		glutamine permease	terminase	helicase	
				ribonuclease III		helicase	terminase	HNH endonuclease	
				RsfI family transcriptional regulator		heme biosynthesis protein HemY	thiol-disulfide isomerase	integrase	
				sugar transferase		HNH endonuclease	transcriptional regulator	phage protein	
				thiol-disulfide isomerase		HNH endonuclease	transcriptional regulator	phage tail tape measure protein	
				transcriptional regulator		integrase	transposase	plasmid-partitioning protein	
				transposase		integrase	transposase	plasmid-partitioning protein SopA	
				transposase		MPS transporter	UDP-glucose 6-dehydrogenase	RepB-like protein	
				transposase		MooB		RepB-like protein	
				transposase		phage tail tape measure protein		replication protein	
				transposase		restriction endonuclease subunit M		restriction endonuclease	
				transposase		restriction endonuclease subunit M		single-stranded DNA-binding protein	
				transposase		terminase		stringent starvation protein B	
				transposase		thiol-disulfide isomerase		terminase	
				transposase		transcriptional regulator		thiol reductase thioredoxin	
				transposase		transcriptional regulator		toxin RelE	
				transposase		transcriptional regulator		transcriptional activator	
				transposase		transcriptional regulator		transcriptional regulator	
				transposase		transporter		transcriptional regulator	
				transposase		transposase		transcriptional regulator	
				transposase		type II restriction endonuclease HgaI		transcriptional regulator	
				transposase		tyrosine protein phosphatase		transcriptional regulator	
				transposase		UDP-glucose 6-dehydrogenase		transcriptional regulator	
				transposase		virulence protein E		transposase	
				transposase				XRE family transcriptional regulator	
hypothetical protein	45	4	3	45	35	42	55	34	28
Total	60	6	3	74	48	84	91	127	35

	Lbt16	DSM 20484	ATCC 8293	J18	Wikiml 7	BD3749	213M0	P45
ABC transporter ATPase		ABC transporter ATP-binding protein	2,3-diketo-D-gluconic acid reductase	acid restriction endonuclease subunit S	chemotaxis protein	acetyltransferase	addiction module toxin RelE	1,4-beta-xylanase
ABC transporter permease		alpha/beta hydrolase	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase		cupin	ATPase	ATPase	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
aggregation substance precursor		cell surface protein	4-carboxymuconolactone decarboxylase		DNA methylase N-4	cadmium resistance protein CroC	CroC family transcriptional regulator	5'-3'-deoxyribonucleotidase
alanyl-tRNA synthetase		sticopolysaccharide protein Wzm	ABC transporter permease		glycerol-3-phosphate transporter	class 1b ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	DNA cytosine methyltransferase	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
alanyl-tRNA synthetase		MFS transporter	acetylformithine deacetylase		glycosyl transferase	DUF305 domain-containing protein	glycosyl transferase	delta-phospho-beta-glucosidase
aminoglycoside 2'-phosphotransferase		MFS transporter permease	alanyl-tRNA synthetase		helicase	GMP synthase	histidine kinase	ABC transporter ATP-binding protein
ATP-GTP-binding protein		peptidoglycan hydrolase	aldehyde oxidase			Hg(II)-responsive transcriptional regulator	holin	ABC transporter permease
cell division protein FtsK		PTS cellobiose transporter subunit IIB	alpha/beta hydrolase			mercuric reductase	immunity protein	ABC transporter permease
cell surface protein		pyrrolidone-carboxylate peptidase	alpha-glucosidase			methylesterase	integrase	acyl-CoA acetyltransferase
DNA (cytosine-5)-methyltransferase		repressor	arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase			oxidoreductase	ion transporter	acetyltransferase
DNA methyltransferase		TetR family transcriptional regulator	AraC family transcriptional regulator			phage tail protein	peptidase S8	acetyltransferase
DNA-binding protein		transcriptional regulator	ATPase AAA			replication initiation protein	peptide ABC transporter ATP-binding protein	ACP phosphodiesterase
DNA-binding protein		transposase	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK, DnaJ chaperones			Replication initiator protein A	peptidylprolyl isomerase	alanyl-tRNA synthetase
glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase		transposase	dehydroquinate desaturase			Replication initiator protein A	phage tail protein	alcohol dehydrogenase
helicase SNF2		transposase	DNA-entry nuclease			ribonucleotide reductase assembly protein NrdJ	RepB-like protein	aldo/keto reductase
HNH endonuclease		UDP-phosphate galactose phosphotransferase	isopolysaccharide biosynthesis protein			ribonucleotide-diphosphate reductase	repressor	aldose epimerase
hydrolase			firmesyl-diphosphate firmesyltransferase			suppressor protein SugE	restriction endonuclease subunit S	alpha-rhamnosidase
integrase			flavodoxin			terminase	secretion protein MeeE	aminopeptidase C
membrane protein			flavodoxin			transcriptional regulator	terminase	arabinose isomerase
methylenecyclo A resistance protein			galactokinase			transcriptional regulator	transcriptional regulator	arsenate reductase
multidrug ABC transporter ATPase			glycosyl transferase			transposase	transcriptional regulator	ATPase
peptidase			glycosyl transferase			uracil phosphoribosyltransferase	transposase	ATPase
Rap protein			glycosyltransferase				transposase	bacteriocin ABC transporter ATP-binding protein
Replication initiator protein A			HATPase_c domain-containing protein				type I restriction endonuclease subunit M	capsular biosynthesis protein
terminase			iron reductase				type I restriction endonuclease subunit R	capsular biosynthesis protein

	LbE16	DSM20484	ATCC 8293	J18	Wikiml7	BD3749	213M0	P45
	tetracycline resistance ribosomal protection protein		LacI family transcriptional regulator				type III restriction endonuclease subunit M	cell surface protein
	thiol-disulfide isomerase		LPS biosynthesis protein				XRE family transcriptional regulator	cell surface protein
	transcriptional regulator		membrane protein					Cro/C1 family transcriptional regulator
	transcriptional regulator		MarR family transcriptional regulator					cupin
	transposase		MFS transporter permease					diacylglycerol kinase
	UDP-phosphate galactose phosphotransferase		oxidoreductase					diguanylate cyclase
	Vat family streptogramin A O-acetyltransferase		peptidase					diguanylate phosphodiesterase
	XRE family transcriptional regulator		peptide ABC transporter ATP-binding protein					DNA invertase Din
			polysaccharide transporter					DNA-binding protein
			primosomal protein N					DNA-entry nuclease
			putative transcriptional regulator					dNDP-4-keto-5-deoxy-glucose-2,3-dehydratase
								dTDP-4-dehydroammonase
			saccharopine dehydrogenase					3,5-epimerase
			serine protease					fructose-bisphosphate aldolase
			signal transduction protein					glucosyltransferase
			single-stranded DNA-binding protein					glutamine amidotransferase
			sodium:solute symporter					glycerol-3-phosphate ABC transporter permease
			succinate-semialdehyde dehydrogenase					glycerol-3-phosphate ABC transporter permease
								glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein
			transposase					glycero-phosphodiester phosphodiesterase
			UDP-phosphate galactose phosphotransferase					glycoacyl hydrolase family 3
			XRE family transcriptional regulator					glycoacyl hydrolase family 3
			XRE family transcriptional regulator					glycoacyl transferase
			Zn finger protein					GTPase
								histidine kinase
								integrase
								isomerase
								isomerase
								isopropylmalate isomerase
								kinase inhibitor
								lactoylglutathione lyase
								lantibiotic ABC transporter
								ATP-binding protein
								lysophospholipase
								LysR family transcriptional regulator
								membrane protein
								membrane protein
								membrane protein
								membrane protein
								membrane protein
								MFS transporter
								molecular chaperone Tsr
								muramidase
								muramidase
								NgoPII family restriction endonuclease
								N-methyltryptophan oxidase
								nucleoside hydrolase
								nucleoside-diphosphate succinate epimerase
								oxidoreductase
								peptide ABC transporter A
								TP-binding protein
								permease
								permease
								permease
								phage nucleotide-binding protein
								phage tail protein
								phosphatase
								phosphoglycerate mutase
								phosphonate ABC transporter ATP-binding protein
								phosphonate ABC transporter permease
								phosphonate ABC transporter permease
								phosphonate ABC transporter permease
								phosphonate ABC transporter substrate-binding protein
								polysaccharide biosynthesis protein
								potassium transporter Kup
								potassium-transporting ATPase subunit B
								prolyl-GNA synthetase
								PTS cellobiose transporter subunit IIA
								PTS cellobiose transporter subunit IIB
								PTS mannose transporter accessory protein ManD
								ribulose 5-phosphatase epimerase
								RNA-binding protein
								Rrf2 family transcriptional regulator
								sugar ABC transporter ATP-binding protein
								sugar transporter
								threonine synthase
								transcriptional regulator
								transcriptional regulator
								two-component system response regulator
								two-component system response regulator
								two-component system sensor histidine kinase
								two-component system sensor histidine kinase
								XRE family transcriptional regulator
hypothetical protein	85	24	50	0	28	29	74	119
Total	118	40	97	1	44	51	101	224

- *Leu. mesenteroides* P45 균주는 매우 다양하고 많은 unique gene을 보유함을 알 수 있음.
- 16s rRNA sequence 기반으로 *Leu. mesenteroides*를 분석하면, strains들 사이의 계통학적 거리가 서로 가깝기 때문에 이 결과만으로는 *Leu. mesenteroides*의 subspecies를 분명하게 구분하기에 어려움이 있어 균주가 공통으로 보유하고 있는 core gene들을 기반으로 계통학적 트리의 작성이 필요함.

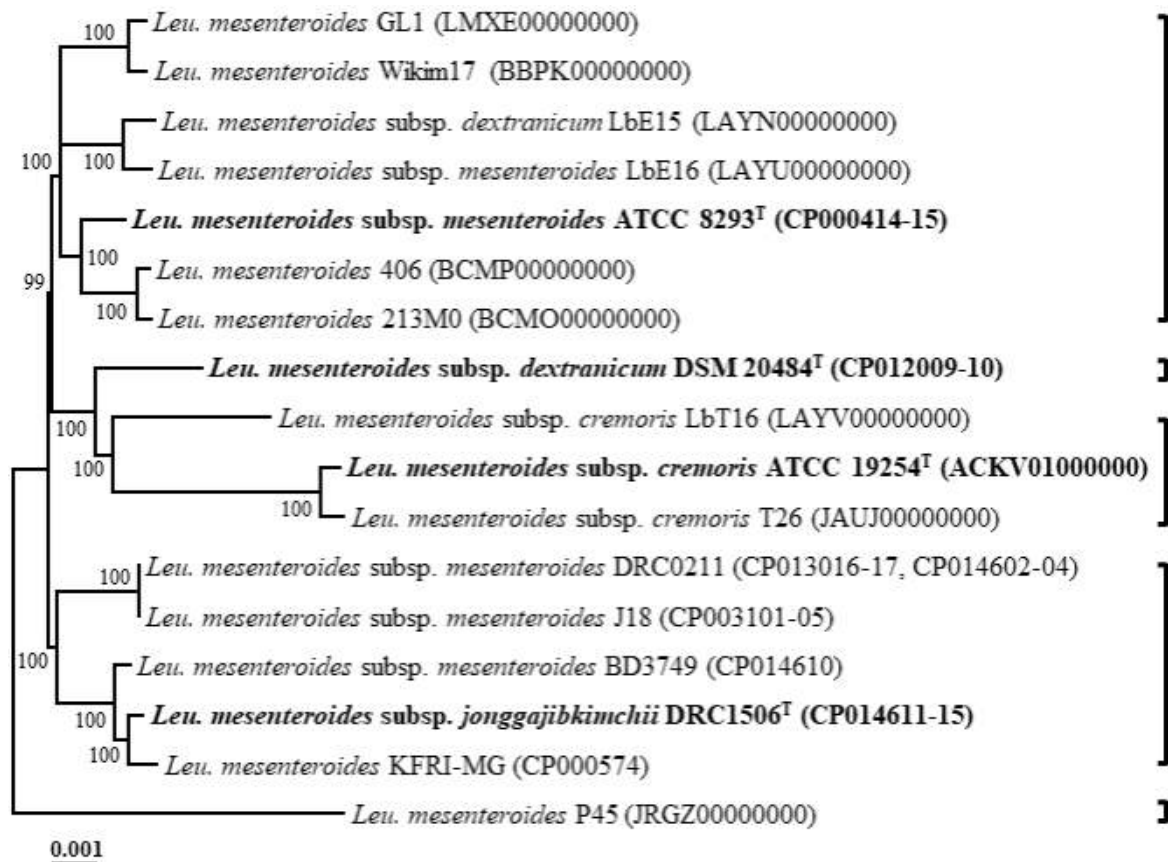


그림 23. 18 *Leu. mesenteroides* 균주의 core gene 서열을 기반으로 작성한 계통수

- core gene 서열을 기반으로 유연관계를 살펴본 결과, type strain인 ATCC 8293, ATCC 19254, DSM 20484뿐만 아니라 strain P45를 새로운 아종(subspecies)로 분류한 group과 DRC1506가 포함된 새로운 subspecies group으로 나뉘 *Leu. mesenteroides*는 총 5 subspecies 그룹으로 분류되어야 될 것으로 생각됨
- 17개의 *Leu. mesenteroides*의 cluster of ortholog genes (COG)의 존재 유무를 heatmap과 hierarchial clustering 분석을 수행한 결과 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*에 속하는 TIFN8, ATCC 19254, T26 균주들의 경우 하나로 그룹화 되는 반면, 다른 아종 균주들은 잘 분류 되지 않는 것을 알 수 있음
- 김치 유래 유산균 DRC1506의 경우 다른 균주들에 비해 적은 유전자를 보유하는 것을 알 수 있는데, 이는 환경적응성을 높이기 위해 불필요한 유전자들을 감소시키는 방향으로 진화가 일어난 것으로 사료됨.

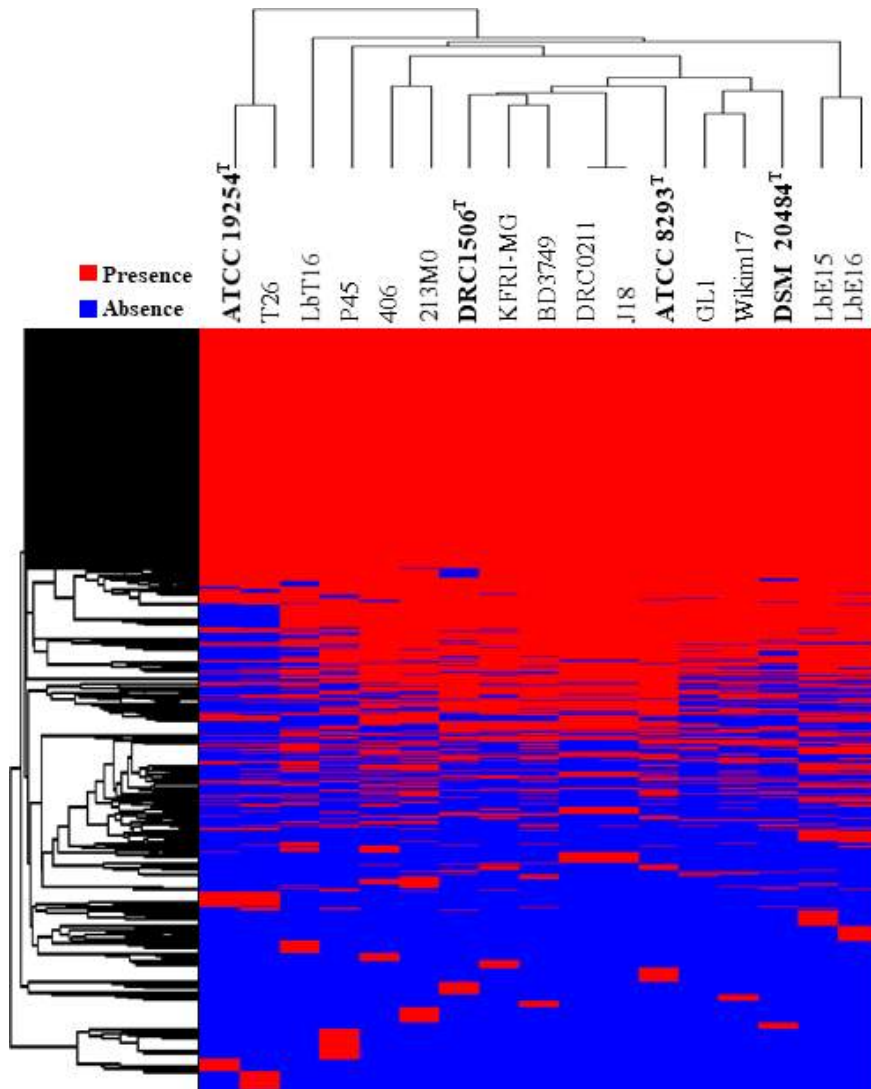


그림 24. 17 *Leu. mesenteroides*의 Clusters of Orthologous Groups (COG) 유무로 제작한 히트맵

- DRC1506의 경우 다른 균주들에 비해 파란색이 많은 것을 보아 환경적응성을 높이기 위해 불필요한 유전자들을 감소시키는 방향으로 진화가 일어난 것으로 생각됨.
- *Leu. mesenteroides*, *Leuconostoc* (*Leu. mesenteroides*을 제외), *Fructobacillus* 및 *Weissella* 종의 COG category 분석결과 *Leu. mesenteroides*는 다른 group에 비해 metabolism에 관련된 유전자를 다량 보유하고 있음을 확인함.

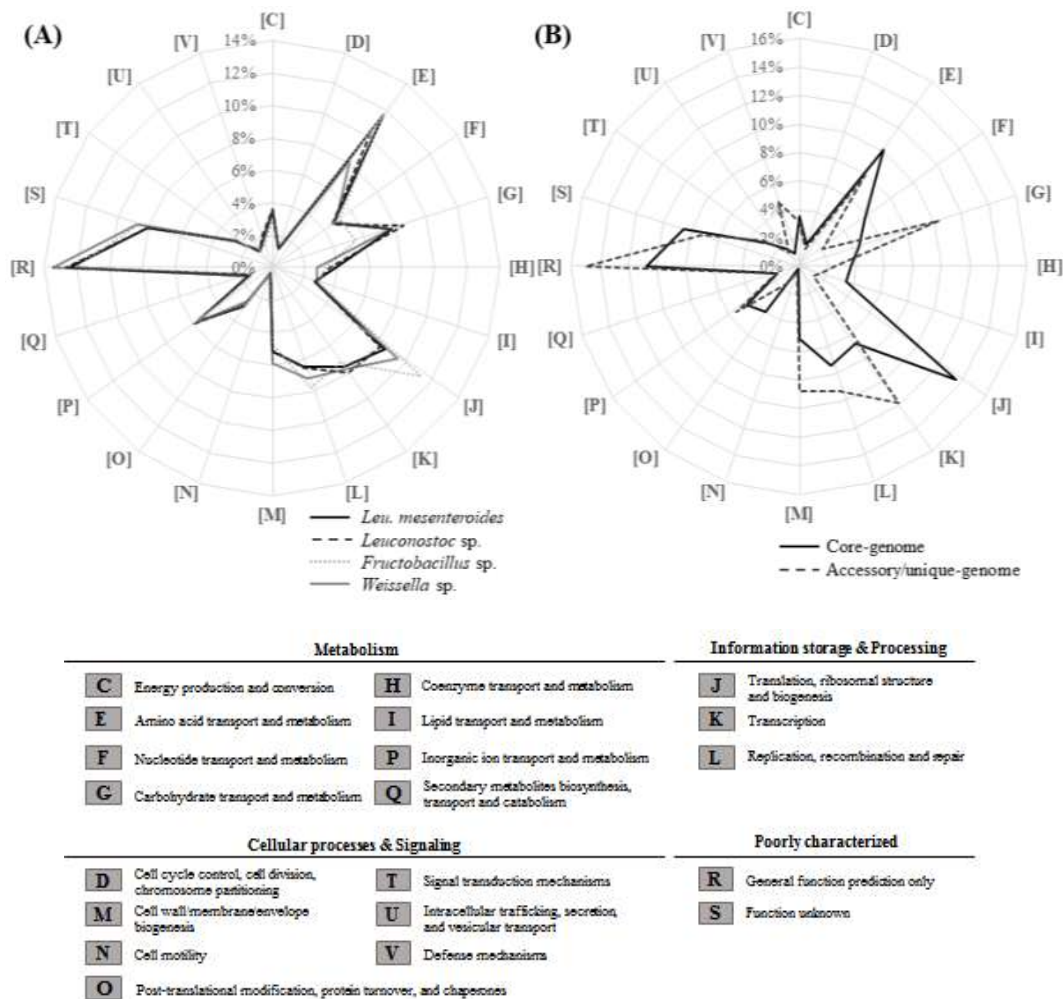
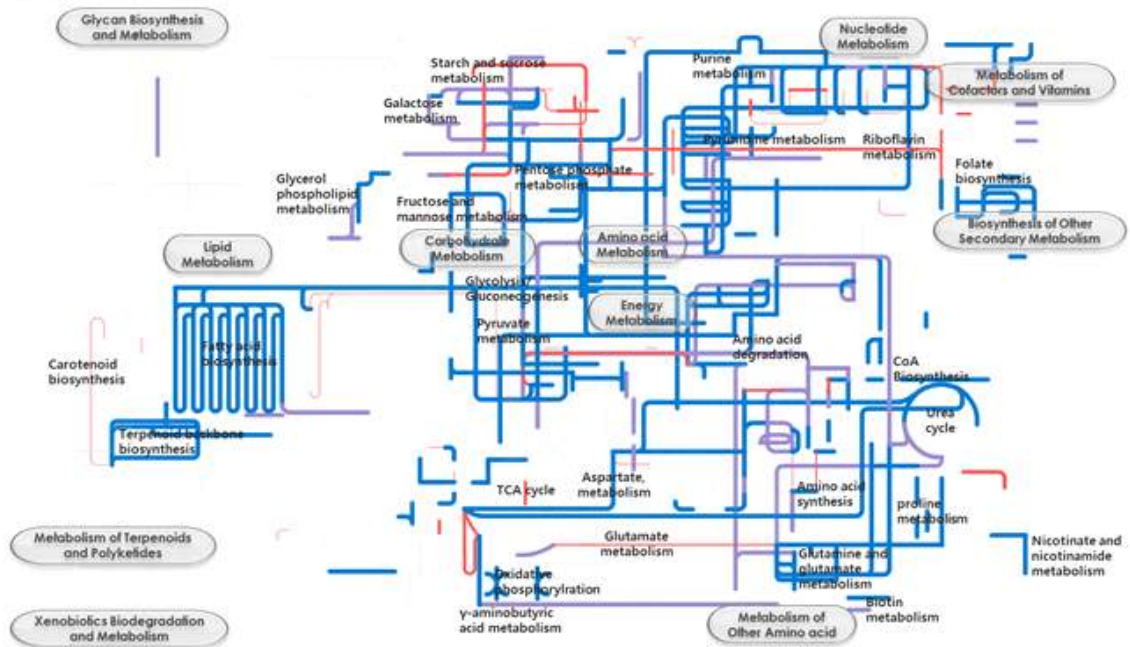


그림 25. *Leu. mesenteroides*, *Leuconostoc* (*Leu. mesenteroides*을 제외), *Fructobacillus* 및 *Weissella* 종의 COG category 분석결과

- 특히 [E] Carbohydrate transport and metabolism, [G] amino acid transport and metabolism 관련 기능 유전자의 비율이 높은 것을 관찰 할 수 있음.
- Carbohydrate metabolism 및 transporter system을 중점적으로 하여 *Leu. mesenteroides*의 대사 경로를 재구성하였음.
- KEGG 데이터베이스를 바탕으로 17개의 *Leu. mesenteroides* 균주들이 탄소원을 대사할 수 있는 대사 경로를 분석. 17개의 *Leu. mesenteroides* 균주가 모두 대사할 수 있는 경로(파랑), 15-16 균주가 모두 대사할 수 있는 경로(보라), 그 외 1-14균주가 대사할 수 있는 경로(빨강)로 표시(그림 26).
- KEGG 대사 경로 분석 결과 유산균 대부분이 공통의 대사 경로를 갖는 것으로 확인됨. 17, 15-16 균주 공통의 대사 경로(파랑, 보라색)가 대부분을 차지함.
- 주요 조절 유전자의 유무 분석 결과(B), 대부분 공통의 조절 유전자를 보유하고 있지만 phosphotransferase system의 경우 특정 유산균주만이 보유하고 이용함을 알 수 있음. 이는 유산균 종에 따라 세포 외부의 탄소원의 유입과 이용의 차이점을 일으킬 수 있는 것으로 사료됨.

- *Leu. mesenteroides*는 젖산, 에탄올, 이산화탄소, 아세트산을 생성할 수 있는 유전자들을 공통적으로 보유하고 있으며, phosphoketolase 경로를 통해 발효를 진행함을 알 수 있음.
- 젖산, 에탄올, 아세트산뿐만 아니라 당의 일종인 만니톨은 발효된 김치에서 발견되는 주요한 대사산물 중 하나로, 몇몇 분석 균주는 fructose transporter와 만니톨을 생성할 수 있는 유전자를 보유하고 있음이 확인됨. 이들 균주는 김치환경에서 다양한 대사산물들을 생성하며 발효가 가능할 것으로 판단됨.
- *Leu. mesenteroides*들은 다양한 membrane transport system을 가져 다양한 기질을 uptake 하고 이용할 수 있도록 적응되어 왔다고 추정됨

(A)



(B)

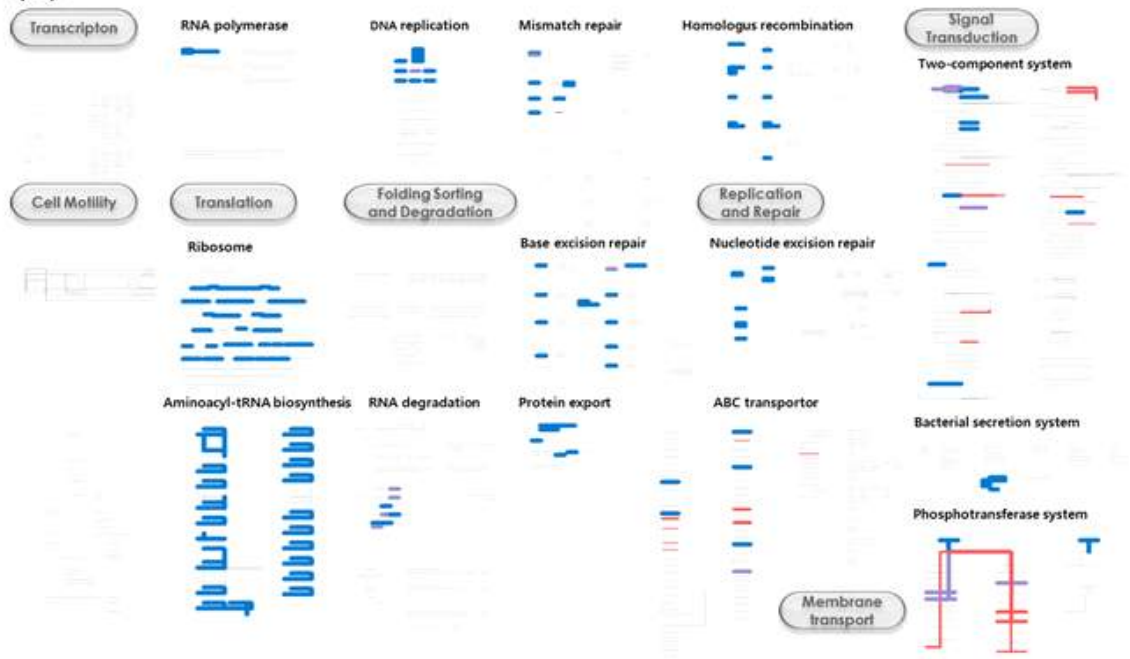


그림 26. KEGG를 이용해 제작한 *Leu. mesenteroides*의 대사 경로 (A)와 조절 경로 (B)

- 김치 발효에 중요한 역할을 하며 김치 내 미생물 군집에서 발견되는 *Leu. mesenteroides*이 김치 발효 과정 동안의 대사 경로 유전자 발현 활성에 대해 분석하는 것이 김치 발효 기간 동안 김치 내에서 일어나는 변화와 김치 유산균의 작용을 이해하는 중요한 자료가 될 수 있음.
- 김치의 발효 과정 동안 7, 13, 18, 25, 29일의 메타트랜스크립톰 데이터를 분석한 결과 *Leu. mesenteroides*의 탄소 대사 경로에 대한 시기별 유전자 발현 활성의 변화 추이를 알 수 있음(그림 27).

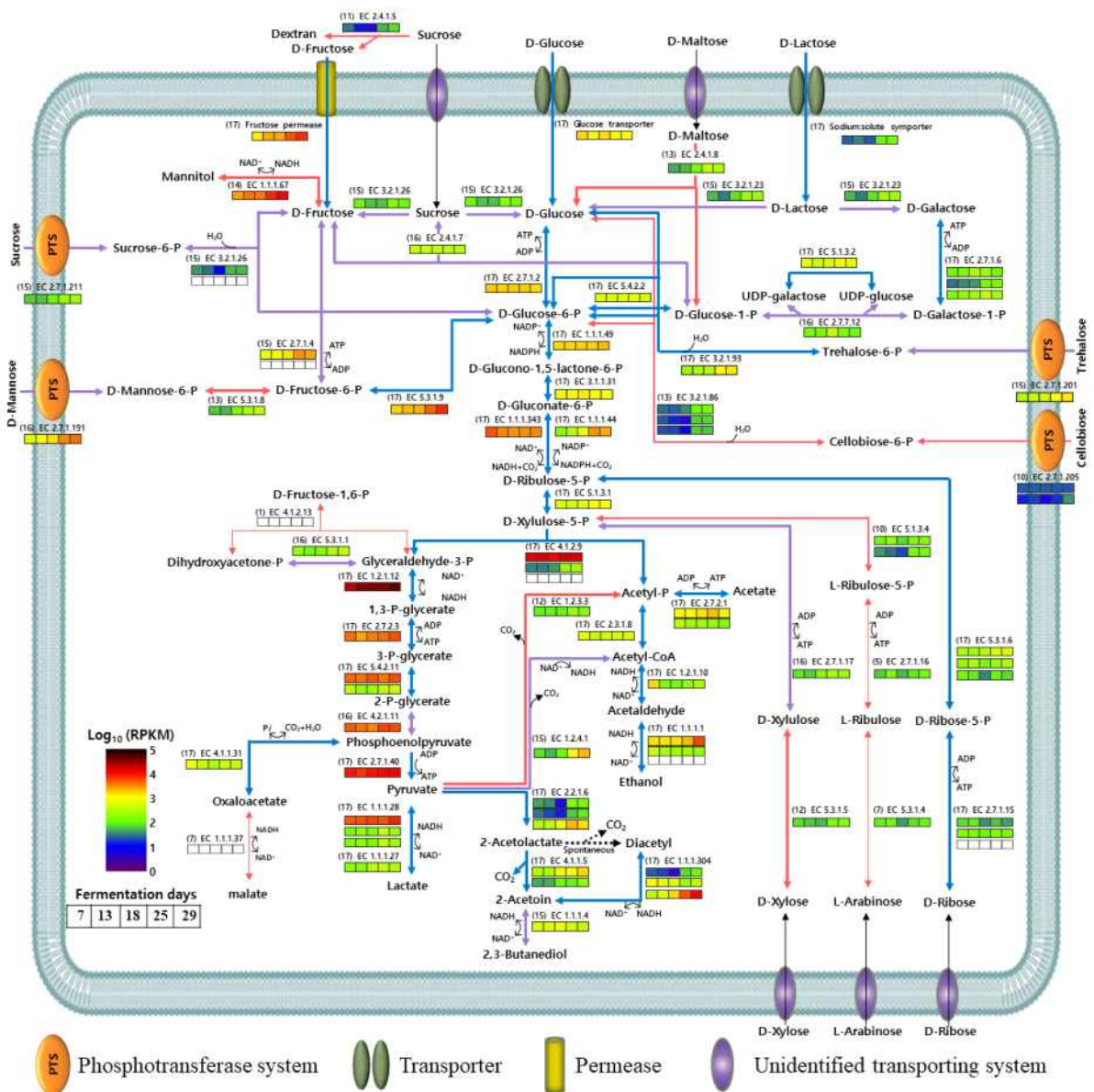


그림 27. 김치 발효 기간 동안의 *Leu. mesenteroides*의 발효 경로에 대한 유전자 발현 양상

- 김치 발효 기간 동안의 메타트랜스크립톰 분석을 한 결과, 발효 시간에 따라서 외부 탄소 원의 유입을 유도하는 채널 유전자의 발현이 점차로 증가함을 알 수 있음. 또한 김치 발

효에서 가장 중요한 역할을 하는 젖산을 생성하는 이형 젖산 발효 대사 경로의 유전자는 김치 발효 전반에 걸쳐 활성이 매우 높은 상태로 유지됨을 알 수 있음.

- 김치 메타트랜스크립톰 분석을 통해 기간별 탄소 대사 경로와 조절 유전자 발현 활성에 대해 조사한 결과(그림 28), 탄소 대사, 핵산 대사, 지방산 생합성, 산화적 인산화, 리보플라빈 대사, 그리고 아미노산 중 하나인 글루타민과 글루탐산에 관련되어 있는 유전자의 발현 활성이 김치 발효 기간 전반에 걸쳐 높은 상태인 것을 알 수 있음.

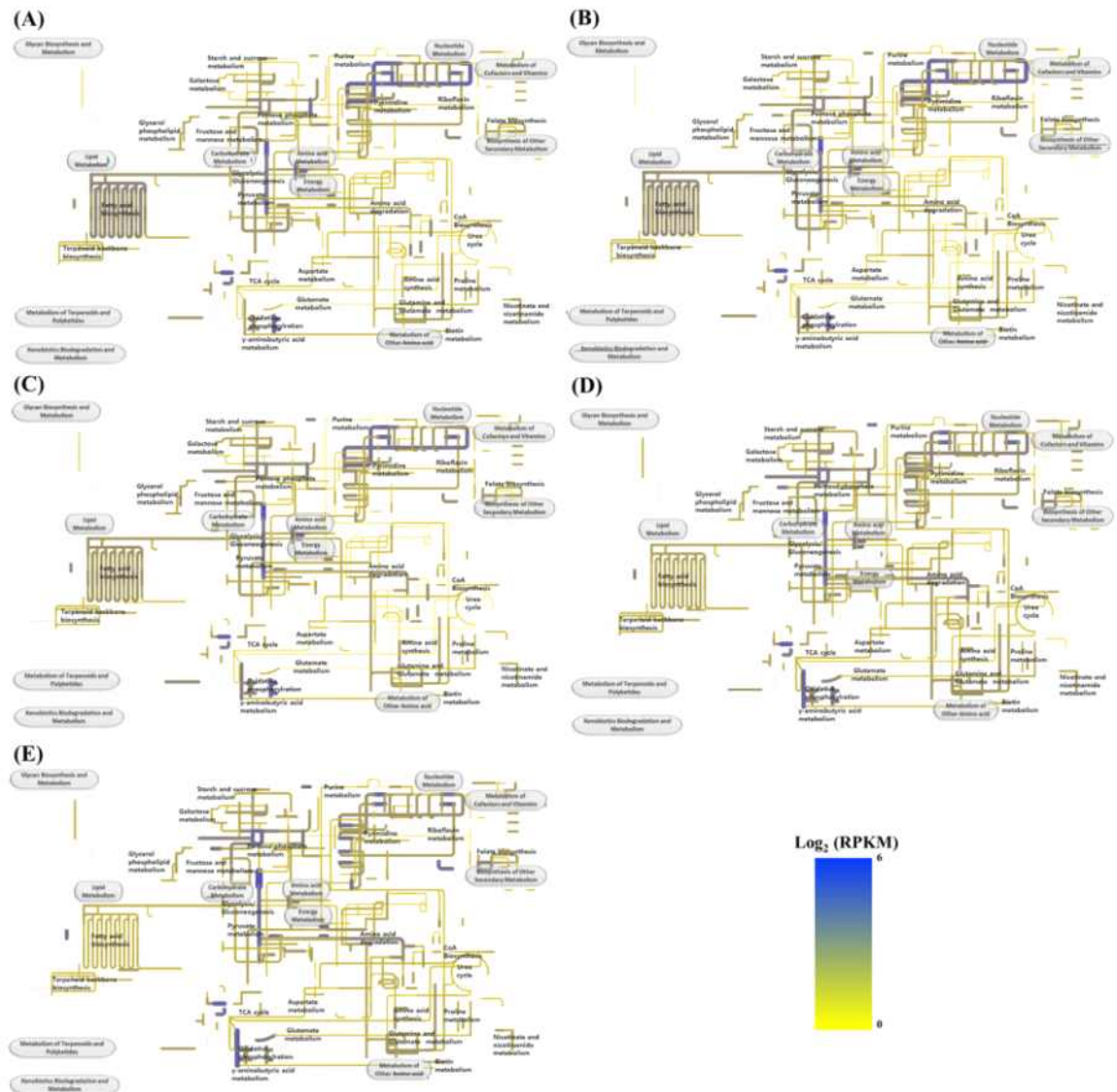


그림 28. 김치 발효 7, 13, 18, 25, 29일의 대사 경로에 관련 유전자 활성 분석 결과

- 본 연구를 통하여 *Leu. mesenteroides*이 갖는 계통학적, 유전적 특징에 대하여 심층적 파악이 가능하였으며, 김치의 발효 기간 동안의 메타트랜스크립톰 분석을 수행하여 김치 발효 기간의 김치 유산균의 대사 활성과 작용에 대한 이해가 가능함.
- 김치발효 종균으로 적용하기 위해서는 김치발효 환경으로부터 미생물에 가해질 수 있는 다양한 스트레스 조건(저온, 저산조건 등)에 견딜 수 있는 스트레스 저항성 유전자의 보유 여부가 중요한 요소로 작용 할 수 있음.

- 18 *Leu. mesenteroides* 균주가 갖고 있는 스트레스 저항성 유전자의 분석 결과는 아래 표와 같음(표 13).

표 13. Acid tolerance, heat & cold response, salt resistance, oxidative stress 대응관련 유전자 정보

Encoded protein	<i>L. mesenteroides</i> DRC1506	<i>L. mesenteroides</i> KFRI-MC	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8193(T)	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 10484(T)	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254(T)
General stress regulator						
Nucleotide-binding universal stress protein, UspA family	Ga0099685_11372, Ga0099685_11711, Ga0099685_11930, Ga0099685_111362, Ga0099685_111947	LMES_0281, LMES_0558, LMES_0739, LMES_1066, LMES_1606	Ga0101030_11343, Ga0101030_11639, Ga0101030_11828, Ga0101030_111202, Ga0101030_111718	LEUM_0340, LEUM_0631, LEUM_0816, LEUM_1284, LEUM_1848	Ga0078678_12339, Ga0078678_12645, Ga0078678_12955, Ga0078678_121188, Ga0078678_121208, Ga0078678_121745	HMPREF0555_0359, HMPREF0555_0650, HMPREF0555_1593,
Phage shock protein PspC (stress-responsive transcriptional regulator)	Ga0099685_112188	LMES_1797	Ga0101030_111927	LEUM_2047	Ga0078678_121931	HMPREF0555_1707
general stress protein 13	Ga0099685_111793	LMES_1478	Ga0101030_111578		Ga0078678_121599	
Gene related acid tolerance						
FIPO-ATPase system						
FIPO-ATP synthase gene cluster	Ga0099685_111965, Ga0099685_111966, Ga0099685_111967, Ga0099685_111968, Ga0099685_111969, Ga0099685_111970, Ga0099685_111971	LMES_1417, LMES_1620, LMES_1621, LMES_1622, LMES_1623, LMES_1624, LMES_1625, LMES_1626	Ga0101030_111735, Ga0101030_111736, Ga0101030_111737, Ga0101030_111738, Ga0101030_111739, Ga0101030_111740, Ga0101030_111741	LEUM_1868, LEUM_1869, LEUM_1870, LEUM_1871, LEUM_1872, LEUM_1873, LEUM_1874, LEUM_1875	Ga0078678_121762, Ga0078678_121763, Ga0078678_121764, Ga0078678_121765, Ga0078678_121766, Ga0078678_121767, Ga0078678_121768	HMPREF0555_0374, HMPREF0555_0375, HMPREF0555_0376, HMPREF0555_0377, HMPREF0555_0378, HMPREF0555_0379, HMPREF0555_0380
Cation transport ATPase	Ga0099685_11944			LEUM_0048, LEUM_0434, LEUM_0826, LEUM_0964, LEUM_0821		
Arginine deiminase						
Branched-chain amino acid permeases	Ga0099685_11528, Ga0099685_11529, Ga0099685_11531, Ga0099685_11532, Ga0099685_11533, Ga0099685_11973, Ga0099685_111401, Ga0099685_111547	LMES_0772, LMES_0773, LMES_1101, LMES_1219	Ga0101030_11486, Ga0101030_11487, Ga0101030_11488, Ga0101030_11489, Ga0101030_11490, Ga0101030_11865, Ga0101030_111238, Ga0101030_111362	LEUM_0849, LEUM_1440, LEUM_1322, LEUM_1319	Ga0078678_12488, Ga0078678_12489, Ga0078678_12490, Ga0078678_12491, Ga0078678_12492, Ga0078678_12493, Ga0078678_121259, (Ga0078678_121375	HMPREF0555_1452, HMPREF0555_0876, HMPREF0555_0886, HMPREF0555_0220
Heat response						
Heat shock protein GrpE/conserved chaperone complexes - GrpE-DnaK-DnaJ	GrpE (Ga0099685_111427); DnaK (Ga0099685_111428); DnaJ (Ga0099685_111429)	GrpE (LMES_1126); DnaK (LMES_1125); DnaJ (LMES_1124)	GrpE (Ga0101030_111268); DnaK (Ga0101030_111267); DnaJ (Ga0101030_111266)	GrpE (LEUM_1348); DnaK (LEUM_1347); DnaJ (LEUM_1346)	GrpE (Ga0078678_121290); DnaK (Ga0078678_121289); DnaJ (Ga0078678_121288)	GrpE (HMPREF0555_0807); DnaK (HMPREF0555_0806);
Ribosomal S05 subunit-recycling heat shock protein, contains S4 domain	Ga0099685_11437	LMES_0339	Ga0101030_11403	(LEUM_0400	Ga0078678_12405	
Heat shock protein Metallo peptidase. MEROPS		LMES_0567	Ga0101030_11649	LEUM_0640	Ga0078678_12655	HMPREF0555_1299
Heat shock protein Hsp20			Ga0101030_111009	LEUM_0978	Ga0078678_11948	
Heat shock protein Hsp33	Ga0099685_11446	LMES_0344	Ga0101030_11408	LEUM_0405	Ga0078678_12410	HMPREF0555_1537
Molecular chaperone GroES-GroEL	GroES (Ga0099685_111851); GroEL (Ga0099685_111852)	GroES (LMES_1530); GroEL (LMES_1529)	GroES (Ga0101030_111630); GroEL (Ga0101030_111629)	GroES (LEUM_1763); GroEL (LEUM_1762)	GroES (Ga0078678_121657); GroEL (Ga0078678_121656)	GroES (HMPREF0555_0114); GroEL (HMPREF0555_0113)
Heat shock protein HspX	Ga0099685_11721		Ga0101030_11649		Ga0078678_12655	
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL	ClpL (Ga0099685_11162); ClpC (Ga0099685_11200); ClpE (Ga0099685_11645); ClpA (Ga0099685_111187); ClpX (Ga0099685_111636)	ClpL (LMES_0121); ClpC (LMES_0136); ClpE (LMES_0500); ClpX (LMES_1299)	ClpL (Ga0101030_11150); ClpC (Ga0101030_11186); ClpE (Ga0101030_11579); ClpA (Ga0101030_111043); ClpX (Ga0101030_111446)	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit (LEUM_1521), ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK-DnaJ chaperone (LEUM_0150, LEUM_0185, LEUM_0571, LEUM_1076, LEUM_1111)	ClpL (Ga0078678_12128); ClpC (Ga0078678_12164); ClpA (Ga0078678_121029); ClpX (Ga0078678_121464)	ATP-binding Clp protease subunit (HMPREF0555_0339)
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	ClpP (Ga0099685_11433)	ClpP (LMES_0335); LMES_1428	ClpP (Ga0101030_11399)	ClpP (LEUM_0196); LEUM_1646	ClpP (Ga0078678_12401)	ClpP (HMPREF0555_1546, HMPREF0555_0719)
Cold response						
Cold shock protein	Ga0099685_11796, Ga0099685_111975	LMES_0630, LMES_1630	Ga0101030_11715, Ga0101030_111745	LEUM_0703, LEUM_1878	Ga0078678_12727, Ga0078678_121772	HMPREF0555_1235, HMPREF0555_0384
Salt resistance						
Sodium transporter	Ga0099685_11548, Ga0099685_11614, Ga0099685_111705, Ga0099685_112182, Ga0099685_112182	LMES_0429, LMES_0476, LMES_1354	Ga0101030_11504, Ga0101030_11554, Ga0101030_111505	LEUM_0497, LEUM_0547, LEUM_1569	Ga0078678_12508, Ga0078678_12559, Ga0078678_121522	HMPREF0555_1713, HMPREF0555_1712, HMPREF0555_1591, HMPREF0555_1105, HMPREF0555_1014, HMPREF0555_0495

Encoded protein	<i>L. mesenteroides</i> DRC1506	<i>L. mesenteroides</i> KFR1M/G	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293(T)	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 20484(T)	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254(T)
Oxidative stress response						
Glutamate-cysteine ligase	Ga0099685_112190	LMES_1799	Ga0101030_111929	LEUM_2049	Ga0078678_121938	HMPREF0555_1705
Glutathione reductase (NADPH)	Ga0099685_11917, Ga0099685_111086	LMES_0730, LMES_0870	Ga0101030_11819, Ga0101030_11969	LEUM_0806, LEUM_0947, LEUM_1019	Ga0078678_12841, Ga0078678_12916	HMPREF0555_0516
Thioredoxin (trxB)	Ga0099685_11126, Ga0099685_11764, Ga0099685_111621	LMES_0091, LMES_0240, LMES_1285, LMES_1575	Ga0101030_11115, Ga0101030_11689, Ga0101030_111432	LEUM_0114, LEUM_1507, LEUM_1122, LEUM_1807	Ga0078678_12700, Ga0078678_121449, Ga0078678_121702	HMPREF0555_0945, HMPREF0555_0162, HMPREF0555_0025
Thioredoxin reductase	Ga0099685_11321, Ga0099685_111559	LMES_0240, LMES_0528, LMES_1230	Ga0101030_11299, Ga0101030_11608, Ga0101030_111374	LEUM_0297, LEUM_0600	Ga0078678_12283, Ga0078678_12613, Ga0078678_121387	HMPREF0555_1386, HMPREF0555_0889, HMPREF0555_0212
NADH oxidase	NADH flavin oxidoreductase / NADH oxidase family protein (Ga0099685_112145, Ga0099685_112146)			NADH flavin oxidoreductase, Old Yellow Enzyme (LEUM_0233, LEUM_1866, LEUM_2008)		possible NADH flavin oxidoreductase NADH oxidase (HMPREF0555_0278, HMPREF0555_0279)
Peptide-methionine sulfonide reductase	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (Ga0099685_111585), peptide-methionine (R)-S-oxide reductase (Ga0099685_111634)	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (LMES_1254), peptide-methionine (R)-S-oxide reductase (LMES_1279)	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (Ga0101030_111400), peptide-methionine (R)-S-oxide reductase (Ga0101030_111444)	LEUM_1476, LEUM_1519	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (Ga0078678_121417), peptide-methionine (R)-S-oxide reductase (Ga0078678_121462)	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase (HMPREF0555_0960)
RecA protein	Ga0099685_11659	LMES_0513	Ga0101030_11599	LEUM_0584	Ga0078678_12598	HMPREF0555_1352
Phosphate ABC transporter	Ga0099685_11661, Ga0099685_11663, Ga0099685_11664, Ga0099685_11666, Ga0099685_11667, Ga0099685_11668	LMES_0515, LMES_0517, LMES_0518, LMES_0519, LMES_0520, LMES_0521	Ga0101030_11595, Ga0101030_11597, Ga0101030_11598, Ga0101030_11599, Ga0101030_11600, Ga0101030_11601	LEUM_0586, LEUM_0589, LEUM_0590, LEUM_0591, LEUM_0592, LEUM_0593	Ga0078678_12600, Ga0078678_12602, Ga0078678_12603, Ga0078678_12604, Ga0078678_12605, Ga0078678_12606	HMPREF0555_1343, HMPREF0555_1344, HMPREF0555_1345, HMPREF0555_1346, HMPREF0555_1347, HMPREF0555_1349

- DRC1506 균주 및 J18 균주는 김치 발효 환경에서 나타나는 다양한 stress에 견딜 수 있는 유전자들을 많이 보유하고 있으므로 우수한 김치유산균 종균으로 사용이 가능할 것으로 판단됨.
- 실제로 발효과정에서 김치 발효 종균 대상 *Leu. mesenteroides* 균주들이 생산하는 대사산물을 확인하기 위하여 ¹H-NMR을 통한 대사체 분석을 수행하였음.
- 유기산인 젖산, 아세트산 그리고 에탄올뿐만 아니라 만니톨, 포도당과 같은 탄소원 그리고 GABA와 같은 기능성을 갖는 대사산물 역시 *Leu. mesenteroides* 균주들에 의한 생성을 비교 분석함(표 14).

표 14. 대상 FNF(주)에서 개발 중인 종균들을 대상으로한 ¹H-NMR 샘플 목록

No.	샘플명
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> M2 배양상징액
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CK10 배양상징액
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSR920 배양상징액
4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC0211 배양상징액
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 배양상징액
6	MRS broth
7	<i>L. mesenteroides</i> DRC0211 김치발효 0일차 상등액
8	<i>L. mesenteroides</i> DRC0211 김치발효 3일차 상등액
9	<i>L. mesenteroides</i> DRC0211 김치발효 7일차 상등액
10	<i>L. mesenteroides</i> DRC0211 김치발효 10일차 상등액
11	<i>L. mesenteroides</i> DRC1506 김치발효 0일차 상등액
12	<i>L. mesenteroides</i> DRC1506 김치발효 3일차 상등액
13	<i>L. mesenteroides</i> DRC1506 김치발효 7일차 상등액
14	<i>L. mesenteroides</i> DRC1506 김치발효 10일차 상등액

표 15. MRS 배양액을 이용한 균주 접종 시료의 ¹H-NMR 결과

	Concentrations (mM)					
	M2	CK10	DSR920	DRC0211	DRC1506	MRS
Glucose	6.8835	7.9189	9.9371	0.1148	5.6255	40.3513
Fructose	1.3709	1.8901	1.444	0.8959	0.7498	7.2477
Sucrose	0	0.0213	0	0	0.0284	0
Glutamate	0.5653	0.54	0.5674	1.4524	1.3646	3.1843
Lactate	1.4176	1.5964	1.6415	7.8759	16.989	1.4596
Acetate	0.3143	0.3531	0.3358	0.3511	0.2868	28.0578
Ethanol	0.265	0.2983	0.2711	28.0419	11.6399	0.4609
Mannitol	0.9174	0.9822	0.6468	8.2549	8.0752	2.8983
GABA	0.2523	0.245	0.2639	0.3226	0.3803	1.0241

- *Leu. mesenteroides* (strain DRC0211, DRC1506)는 *Lactobacillus* 균주(strain M2, CK10, DSR920)에 비해 젖산(lactate)을 많이 생성하는 것을 보아 MRS 배양액에서 생장이 매우 빠르며, mannitol 및 GABA 등 김치발효조건에서 생성되는 대사물질들도 많이 생성함.

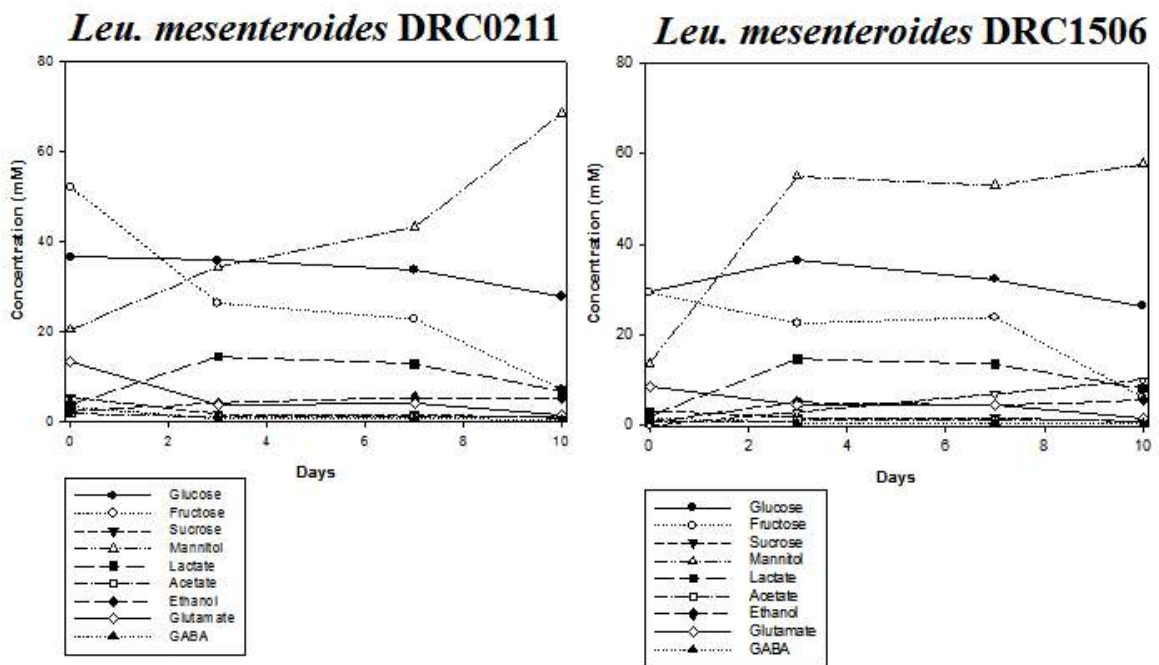


그림 29. *Leu. mesenteroides* DRC0211 및 DRC1506의 김치발효기간별 대사물질 분석

- 현재 대상(주)에서 김치발효종균으로 사용하고 있는 DRC0211과 새로 개발 중인 종균 DRC1506의 김치발효기간별 대사물질 분석을 수행한 결과 농도차이가 거의 없이 비슷함을 확인하였음. 기존 종균인 DRC0211 대신 DRC1506을 사용하면 김치 내 우점균 및 대사물

질 생성능은 비슷하지만 맛은 더욱 뛰어난 김치제조가 가능할 것으로 생각됨.

○ *Leu. mesenteroides* DRC1506의 계통학적 분류

- 1차년도에 완료한 *Leu. mesenteroides* J18과 *Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides* DRC0211, 그리고 2차년도간 전장 유전체 분석을 완료한 *Leu. mesenteroides* DRC1506와 *Leu. mesenteroides subsp. suionicum* LMG8159(T)를 포함하여 비교 유전체 분석을 수행.
- 본 연구과제를 통해 확보된 *Leu. mesenteroides* DRC1506의 전장 유전체를 이용한 계통학적 분류를 목표로 함.
- *Leu. mesenteroides* DRC1506의 정확한 계통학적 분류를 수행하기 위하여 전장 유전체 분석을 수행하였음.
- 김치 유산균 *Leu. mesenteroides* DRC1506의 계통적 분류를 위해 전장 유전체를 바탕으로한 비교 유전체 분석을 수행함.
- 유전체 데이터 베이스 GenBank로부터 현재 업로드 되어 있는 *Leu. mesenteroides*의 16S rRNA 유전자 서열을 수집하여 계통수를 제작한 결과 아래 그림 30과 같은 결과를 얻을 수 있음.

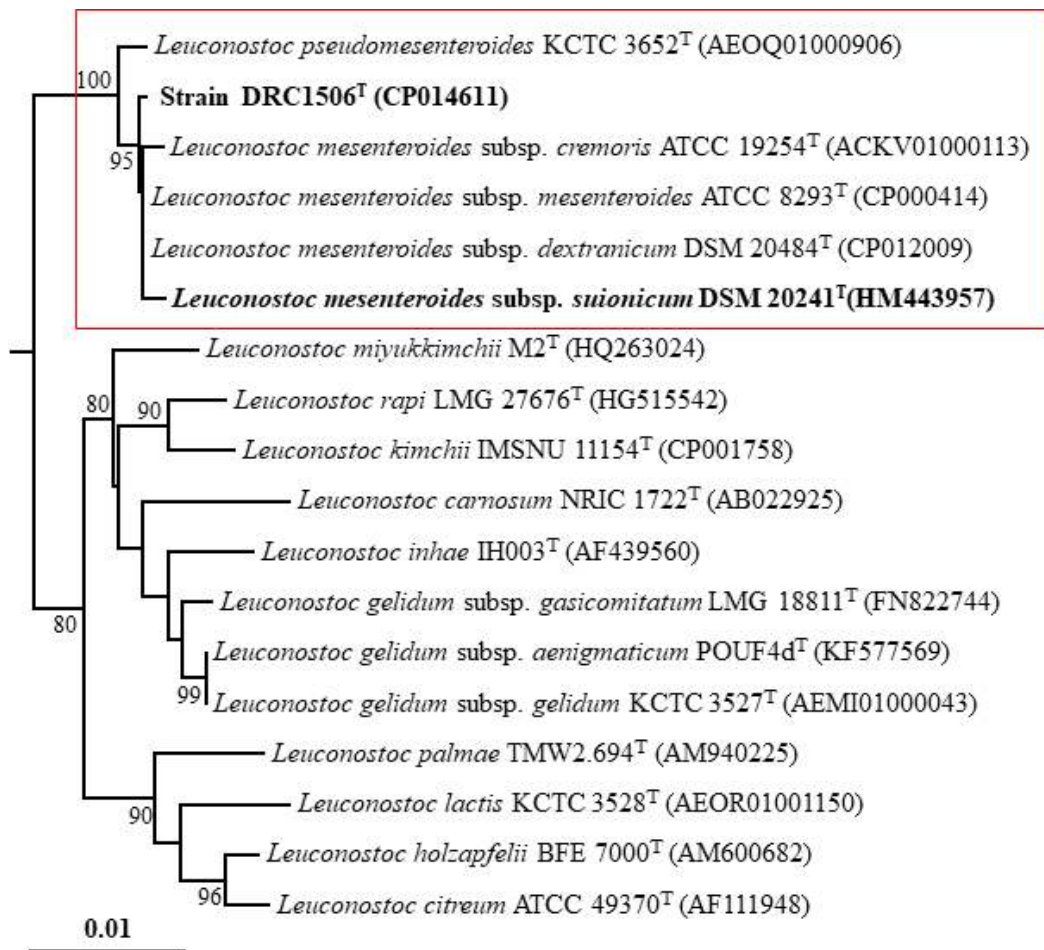


그림 30. 16S rRNA gene sequence를 기반으로 제작한 계통수

- 16S rRNA 유전자 서열을 이용한 계통수 제작 결과 *Leu. mesenteroides* DRC1506는 *Leu.*

mesenteroides 속의 미생물들과 근연관계에 있으며 *Leu. mesenteroides*의 아종으로 분류 될 가능성이 있음을 알 수 있음.

- 또한 *Leu. mesenteroides* DRC1506는 다른 김치 유래 유산균과도 하나의 단위를 형성하여 계통적으로 나뉘는 것을 알 수 있음.
- 유산균 간의 유사도가 매우 높기 때문에 16S rRNA 유전자 서열 기반의 분석만으로는 미생물의 구분에 한계점을 지니고 있음. 따라서 16S rRNA 유전자 서열뿐만 아니라 미생물의 전장 유전체를 이용하여 더 정확한 계통학적 분류를 수행함.
- 전장 유전체를 바탕으로 하는 계통 분류학적 분석 방법에는 대표적으로 average nucleotide identity(ANI)와 컴퓨터를 이용하여 DNA간의 상동성을 비교하는 *in silico* DNA-DNA hybridization (*in silico* DDH) 두 가지 방법을 이용함.
- ANI 분석의 경우 종간의 구분을 95~96 %의 유사도를 기준으로 이상인 경우 같은 종으로 이하인 경우 다른 종으로 구분하게 됨.
- *In silico* DDH는 기존의 DDH와 동일하게 70 %로 종간의 구분 기준으로 설정하여 균주간의 유사도를 파악하게 됨.
- 이들 두 방법을 이용하여 *Leu. mesenteroides*의 표준 균주들을 대상으로 미생물들의 유사도를 분석한 결과 아래 표 16과 같은 결과를 얻을 수 있음.

표 16. *Leu. mesenteroides* 내의 표준균주와 DRC 1506 균주간의 유사도 분석 결과

Taxa	Strain DRC1506 ^T	<i>L. mesenteroides</i> s. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 ^T	<i>L. mesenteroides</i> s. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 20484 ^T	<i>L. mesenteroides</i> s. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254 ^T	<i>L. mesenteroides</i> s. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> DSM 20241 ^T	<i>L. pseudomesenteroides</i> KCTC 3652 ^T
Strain DRC1506 ^T	-	98.8	98.7	98.5	94.0	87.1
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 ^T	91.5	-	98.8	98.6	93.8	88.4
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 20484 ^T	90.1	91.9	-	99.0	94.1	86.8
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254 ^T	88.5	90.9	91.5	-	93.9	86.4
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> DSM 20241 ^T	56.9	55.9	56.9	56.0	-	83.9
<i>L. pseudomesenteroides</i> KCTC 3652 ^T	54.0	59.8	53.4	50.0	40.8	-

- ANI와 *in silico* DDH를 종합하여 판단할 때, 계통적으로 *Leu. mesenteroides* DRC 1506은 *Leu. mesenteroides*에 속하는 새로운 아종으로 분류될 수 있으며 *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* DSM 20241(T)는 명확하게 *Leu. mesenteroides*의 아종이 아닌 신종 균주로 분류됨을 알 수 있음.
- 다수 미생물의 전장 유전체들을 종합적으로 비교·분석하는 pan-core genome 분석은 유전자간 유사도를 기반으로 미생물간 공통의 유전자와 균주 특이 유전자를 분석하여 미생물

간의 공통점과 차이점을 분석할 수 있는 분석 기술임

- 본 비교 유전체 기술을 이용하여 *Leu. mesenteroides*의 전장 유전체를 분석한 결과 모든 *Leu. mesenteroides*의 공통 유전자의 수는 478개로 분석됨.
- 478개의 공통 유전자를 이용하여 계통수를 제작한 결과 아래 그림 31과 같이 *Leu. mesenteroides*의 균주들과 김치 유래 유산균 DRC1506의 유연관계가 매우 유사한 것으로 나타남.

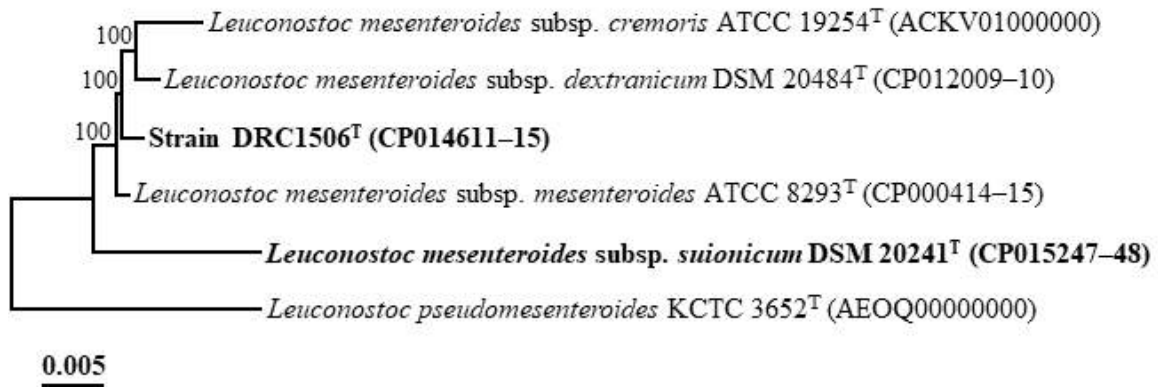


그림 31. 478개의 연쇄된 core-genome으로 제작한 계통수

- 전장 유전체를 이용한 유전체의 비교·분석 결과 김치유래 유산균 DRC 1506은 *Leu. mesenteroides*의 아종으로 분류하여 *Leu. mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii*로 명명함. 또한 *Leu. mesenteroides* subsp. *suionicum* DSM 20241(T)는 *Leu. mesenteroides*의 아종에 속하는 것이 아닌 *Leuconostoc* 속의 새로운 종인 *Leuconostoc suionicum*으로 재명명함.

5. 실험실진화를 통한 김치유산균의 특성개량연구

○ 김치유산균의 특성 개량을 위한 반응기 시스템구축

- 김치유산균의 저온 적응성 향상을 위한 실험실적 진화는 저온환경에서 개량 대상 균주를 거둬하여 계대 배양함으로 진행하고자 함.
- 김치유산균 J18 균주를 프로바이오틱스로 개발하기 위해서는 pH가 낮은 사람의 위를 통과하여 생존해야 하기 때문에 내산성을 가지고 있어야 함. 내산성 증진을 위한 실험실적 진화 연구는 유산균의 발효 진행에 따른 pH의 감소로 김치유산균의 성장이 저해되는 요소를 고려하여 김치 유산균 배양 배지 내의 일정한 pH를 유지하기 위한 시스템으로 연속배양이 가능한 발효기 시스템을 구축하여 실험실적 진화 연구를 수행하고자 함(Fermentec FMT ST-D).
- 구축한 발효기 시스템을 이용해 온도뿐만 아니라 pH도 일정하게 유지되도록 하고 배지를 일정한 속도로 공급하여 연속배양으로 운전하도록 함.
- 유산균은 혐기상태에서 젖산발효를 진행하기 때문에 질소가스를 주입하여 혐기상태가 유지되도록 함.



그림 32. 김치유산균의 실험실 진화를 위한 연속배양기 시스템구축

- 실험실진화를 통한 김치유산균 *Leu. mesenteroides* J18의 저온 저항성 향상 개량 연구
 - 실험실적 적응 진화 기법을 이용하여 *Leu. mesenteroides* J18의 저온 환경 성장 특성을 개량하고자 함. 김치는 저온 환경에서 발효를 진행하기 때문에, *Leu. mesenteroides* J18의 저온 성장 특성과 분석함.
 - *Leuconostoc* 배양에 최적 최소 배지인 CDM배지(Chemically Defined Medium)는 실험실적 적응 진화에 있어 배지 영양 성분에 의한 적응으로 미생물의 성장이 증가하는 요소를 줄일 수 있는 배지로, 그 성분은 아래 표와 같음(표).

표 17. CDM 배지 조성(Foucaud et al., 1997)

성분	g/L	성분	g/L	성분	g/L
Glucose	15	Asparagine	0.346	Vitamin B12	0.001
Fructose	15	Alanine	0.238	Orotic acid	0.005
KH ₂ PO ₄	2.5	Lysine	0.438	Riboflavin	0.001
K ₂ HPO ₄	3	Arginine	0.336	Folic acid	0.001
(NH ₄) ₃ -citrate	0.6	Cysteine	0.173	Biotin	0.01
Na-acetate	1	Tyrosine	0.05	MnSO ₄ • H ₂ O	0.028
Glutamine	0.39	Serine	0.125	MgCl ₂ • 6H ₂ O	0.2
Isoleucine	0.213	Glycine	0.25	CaCl ₂ • 6H ₂ O	0.05
Methionine	0.125	Tryptophan	0.29	FeCl ₂ • 4H ₂ O	0.005
Valine	0.325	Pyridoxal chloride	0.002	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.005
Histidine	0.15	Nicotinic acid	0.001	CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.0025
Leucine	0.475	Thiamine dichloride	0.001	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.0001
Threonine	0.225	Calcium pantothenate	0.001	Adenine	0.01
Proline	0.675	Inosine	0.005	Uracil	0.01
Phenylalanine	0.275	Pyridoxamine dichloride	0.005	Xanthine	0.01
Aspartate	0.3	Sodium p-aminobenzoate	0.01	Guanine	0.01

- *Leu. mesenteroides* J18 균주를 *Leuconostoc* 배양에 최적 최소 배지인 CDM배지(Chemically

- Defined Medium), MRS배지, minimal 배지를 이용하여 다양한 온도에서 성장을 비교함.
- CDM 배지에서 온도별 성장속도를 확인한 결과 OD600 = 1 에 도달하기까지의 시간은 30°C에서 6시간, 10°C에서 48시간, 4°C에서 6-7일 정도 소요되는 것을 확인됨. 이를 통해 10°C 이하의 저온에서 성장속도가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었음.
 - 배양 온도 조건에 따른 MRS배지, minimal배지 내 *Leu. mesenteroides* J18 균주의 성장을 관찰한 결과 30°C 온도 조건에서는 두 배지 환경 내에서 빠른 성장을 보이고 있음. 4°C 환경 조건에서 *Leu. mesenteroides* J18의 성장은 그 속도가 현저하게 느려지는 것이 관찰되며 영양소가 풍부한 MRS배지에서는 그 성장의 속도가 여타의 배지보다 상대적으로 증가되는 것을 관찰 할 수 있음(그림 33)

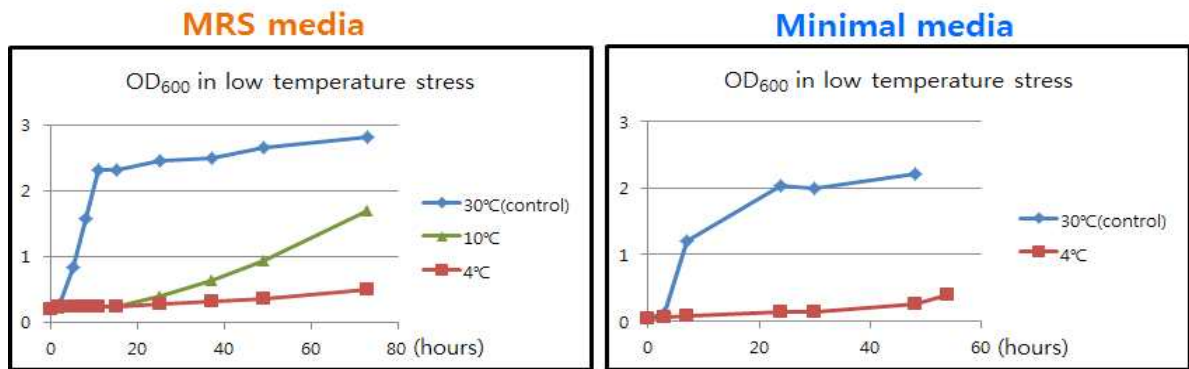


그림 33. *Leu. mesenteroides* J18의 온도별, 배지별 성장특성 비교

- 위 실험을 통하여 *Leu. mesenteroides* J18 균주의 김치 발효 스타터 적용을 위해서는 저온에서 발효 하는 김치발효환경에 잘 적응하여 성장해야 하기 때문에 저온에 대한 저항성을 좀 더 증가 시켜야 할 필요성 대두됨. 이를 위하여 실험실적 적응 진화 방법을 이용한 저온 저항성 향상 균주개발이 필요함.

○ *Leu. mesenteroides* J18의 저온 내성 증진실험

- 저온진화 연구를 위한 배지의 선택은 진화를 결정하는 요인의 경우의 수(온도, pH, 영양분 등)를 최소화하기 위해 *Leuconosotax* 종의 최소배지로 많이 사용되는 CDM (Chemically Defined Medium)을 사용하기로 결정함.
- 김치발효는 통상 낮은 온도에서 발효되기 때문에 김치발효환경에서 우점하기 위해 저온에서의 저항성을 가져야 함. 그렇기 때문에, 김치가 발효되는 저온환경에 맞도록 김치유산발효종균(starter) 개발 및 유전체분석을 통한 진화 메커니즘 연구를 목표로하여 연구를 진행함.

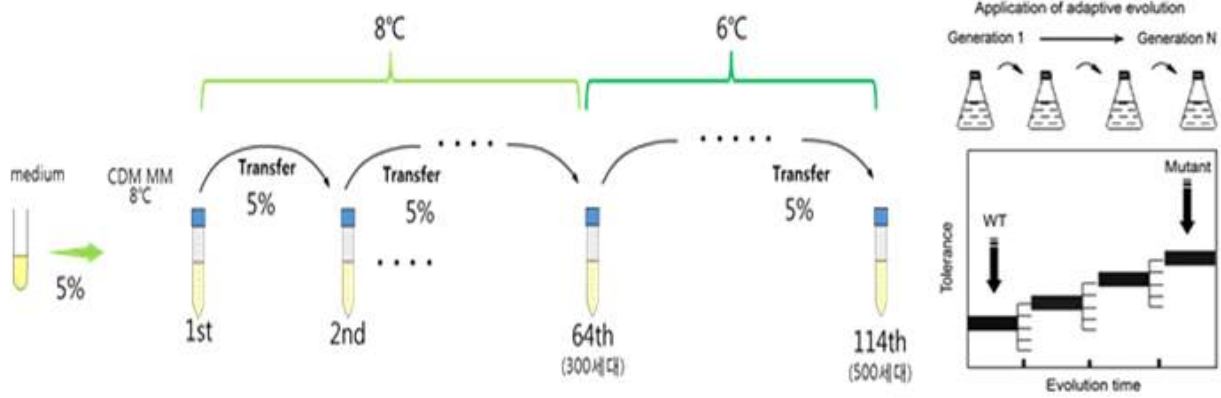


그림 34. *Leu. mesenteroides* J18의 저온성장능 향상을 위한 연속 계대배양

- 실험실내에서 진화를 유도할 때 일반적으로 연속배양 또는 계대배양(subculture)을 통해 진행하게 되는데, 저온진화를 유도하기 위해서는 일정한 온도의 조절만을 요구하므로, 계대배양(subculture)을 통해 저온진화유도를 진행함.
- 각각의 계대는 CDM 액체배지에서 배양한 배양액을 새로운 배지에 5% (vol/vol) 접종함으로써 진행함
- 최소배지인 CDM 액체배지에서 배양하였을 때, 접종량인 5%의 균이 약 100%으로 증가할 때의 세대수를 4.4 세대로 계산하였음.
- *Leu. mesenteroides* J18의 성장이 10°C 이하에서 매우 감소하며, 4°C 이하에서는 성장이 멈춤으로, 8°C에서부터 단계적으로 온도를 낮춤기로 함.
- 매 계대시점마다 저온에서의 성장속도를 측정하여, 저온진화 여부를 판단함.
- 계대 시점마다 배양액과, 30% glycerol을 1:1로 섞어서 -80°C 초저온 냉동고에 동결보존하여, 차후 시행할 환경적응력 실험이나, 비교 유전체 분석 수행에 이용하고자함.

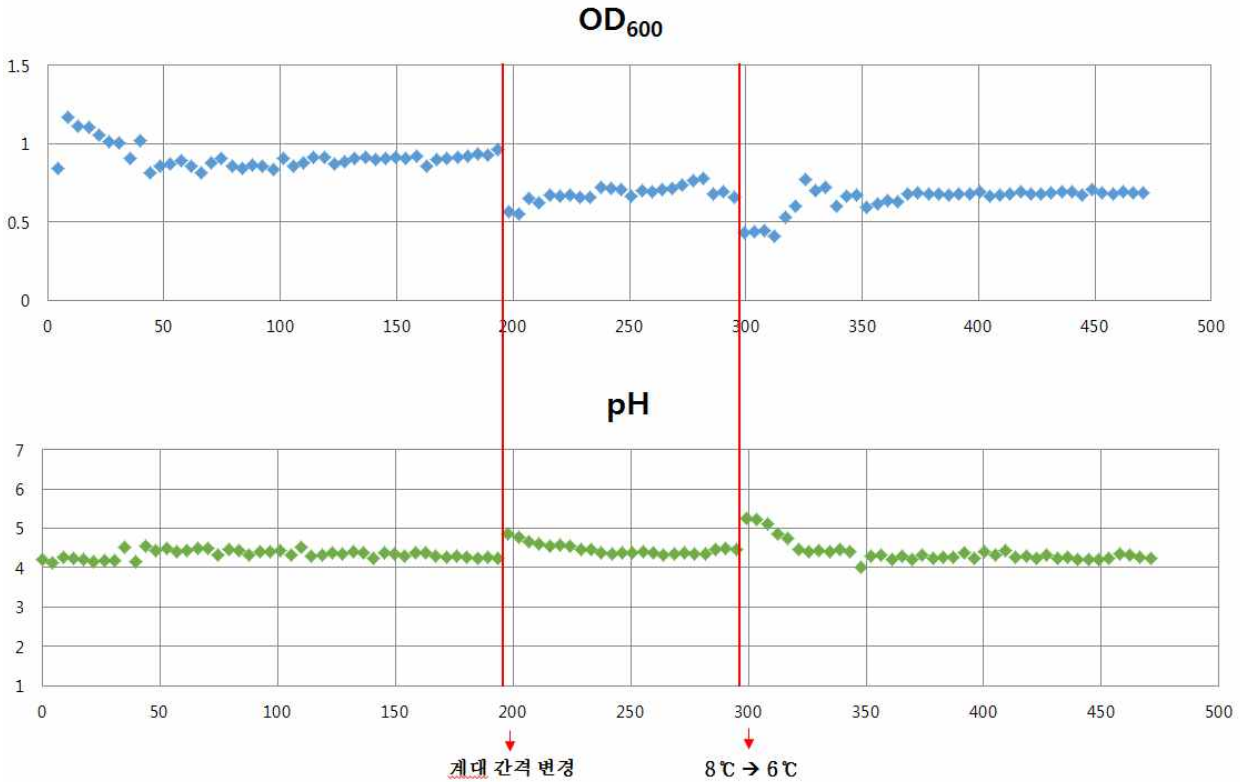


그림 35. *Leu. mesenteroides* J18의 세대별 OD600 와 pH 측정 결과

- 계대가 진행될수록 저온에서의 성장속도가 점차 증가하는 것으로 판단하여, 200세대에서 계대 간격을 100시간에서 50시간으로 짧게 진행하였으며, 300세대에서는 8°C에서 6°C로 온도를 낮춤, 그 결과 온도나 계대간격이 바뀌면 OD600 와 pH가 불안정하지만 계대를 진행할수록 안정화되는 것을 볼 수 있음. 이는 저온에서의 진화가 이루어졌다는 것을 의미하는 것으로 판단함.
- 저온에서의 진화여부를 확인하기 위하여, 8°C에서 모균주(0세대)부터 300세대까지 계대 배양한 후, MRS 고체배지에 50세대 간격으로 희석 도달하여 30°C(실온)와 6°C(저온)에서 배양을 수행하였음(그림 36).

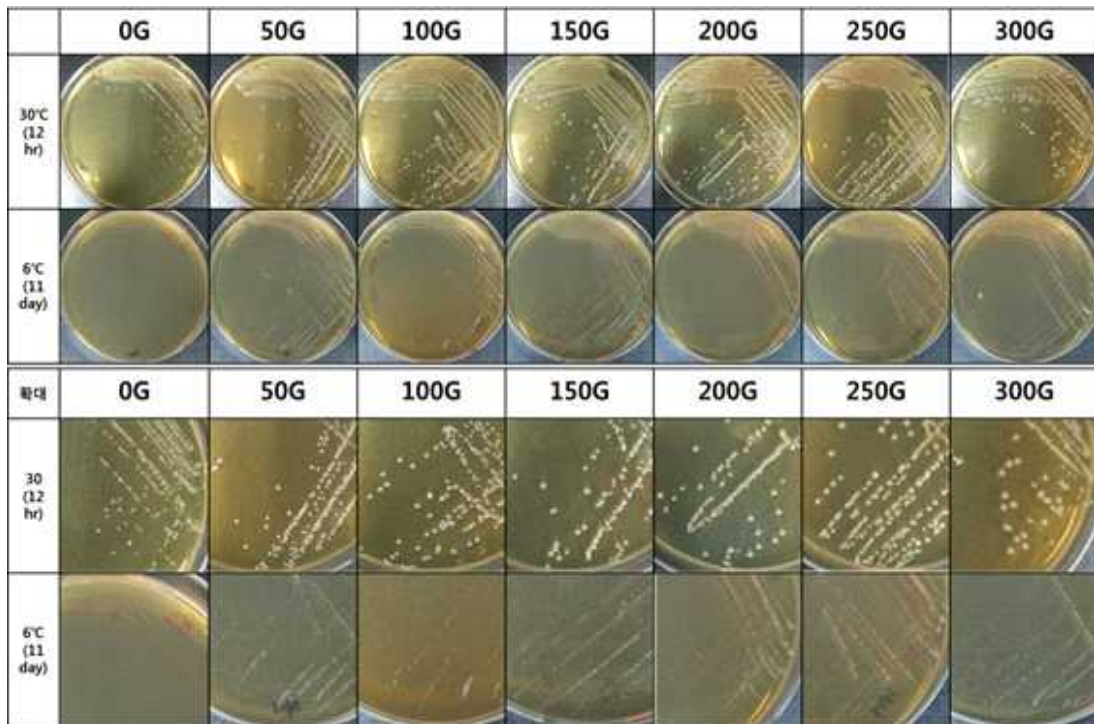


그림 36. 온도에 따른 각 세대별 MRS 고체배지에서의 성장속도 비교 (30°C, 6°C)

- 30°C와 6°C 모두 모균주에 비해서, 300세대에서 좀 더 빠른 성장을 확인할 수 있었음. 이는 저온 성장을 증진시킨 균주의 경우 저온에서 뿐만 아니라 상온에서도 성장이 증가되어 종균으로서 사용시 좀 더 우점이 될 것으로 판단됨(스타터로서의 유용성 증가할 것으로 판단됨).
- 형태학적 특징 또한, 모균주의 콜로니 크기보다 300세대에서의 콜로니가 조금 더 크며, 조금 더 퍼진 모양을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.
- 0, 50, 200, 250, 300, 500세대의 진화 균주들에 환경 적응성 실험을 진행하였음. 구체적으로는 각 세대별 진화균주의 glycerol stock으로부터 MRS broth에 배양 후 MRS 고체배지 10배씩 희석하여 spotting한 후 30°C, 8°C, 6°C의 다른 온도 조건에서 배양의 경향을 비교함(그림 37).

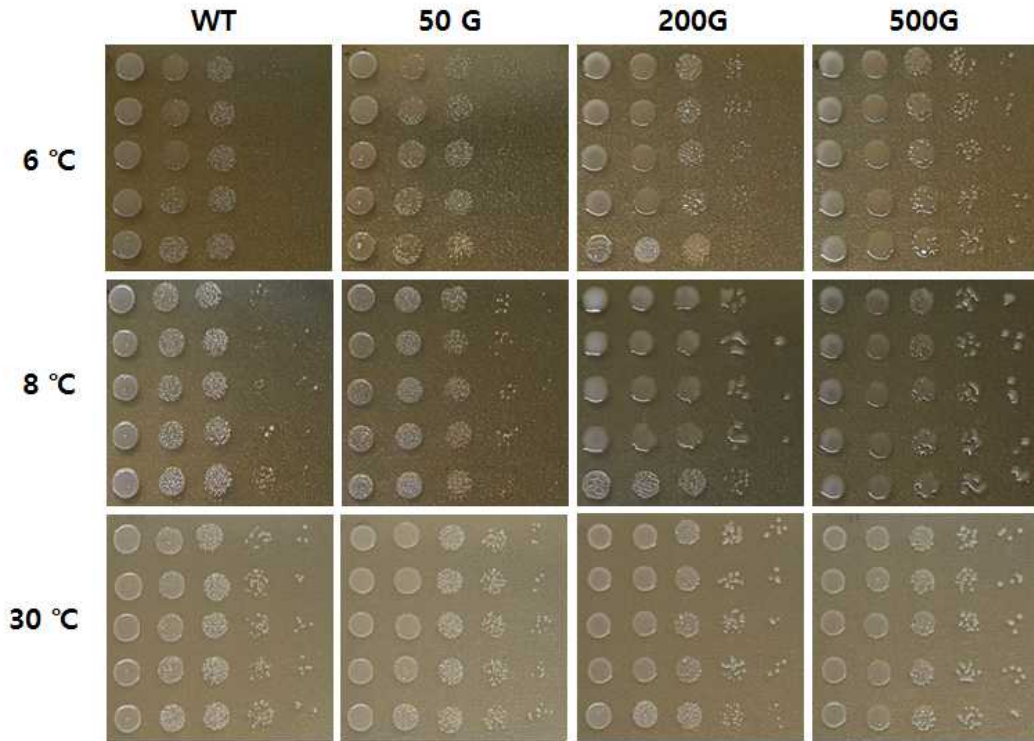


그림 37. 온도에 따른 각 세대별 MRS 고체배지에서 성장속도 비교

- 각각 1 일, 7 일 배양한 결과, 30°C에서는 모균주(wild type)와 비교하였을 때, 미약하게 성장속도가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 8°C와 6°C에서의 성장속도는 진화의 세대가 증가할수록 그 성장이 더욱 빠르게 나타남을 알 수 있음. 이를 통해 진화 균주의 저온에 대한 내성 획득이 이루어진 것으로 판단됨.
- 저온에서 진화시킨 *Leu. mesenteroides* J18 균주 중 0 (wild type), 50, 200, 500 세대에서 집락(colony)을 각 두 개씩 선정함.
- 진화 과정 중 *Leu. mesenteroides* J18의 유전체에 생긴 변이를 파악하기 위하여 각 단일 콜로니 배양체로부터 genomic DNA를 추출(그림 38), 이를 Illumina Hiseq 2500을 이용한 분석을 수행함.

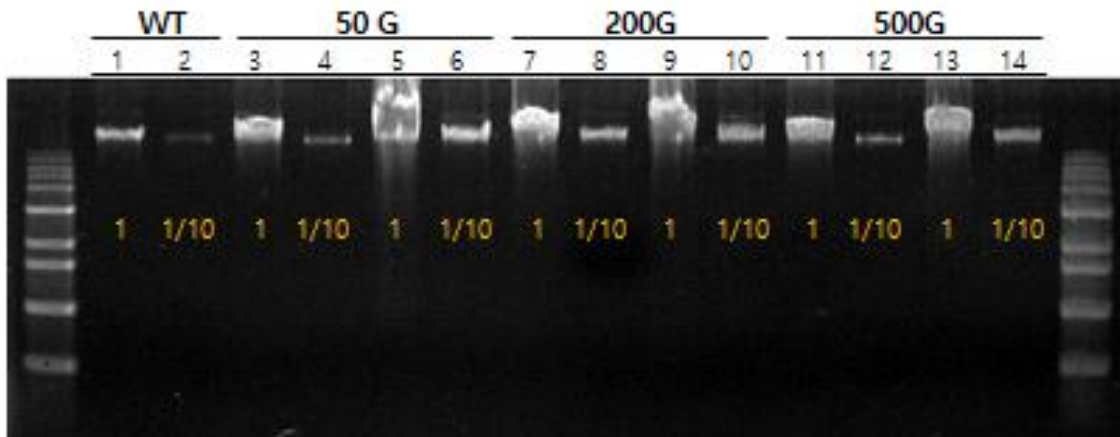


그림 38. 저온진화 균주의 genomic DNA 추출결과

- Illumina Hiseq 2500 시스템을 이용하여 유전체 서열 분석 진행하였으며 그 결과는 아래 표 18와 같음.

표 18. Illumina hiseq 결과

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC (%)	Q30 (%)
WT	5,743,388,028	56,865,228	37.244	93.846
50G-1	5,573,305,644	55,181,244	37.295	93.702
50G-2	5,114,649,898	50,640,098	37.395	93.874
200G-1	5,600,504,338	55,450,538	37.333	93.795
200G-2	5,286,375,956	52,340,356	37.139	93.908
500G-1	4,662,839,932	46,166,732	37.223	93.775
500G-2	5,552,975,748	54,979,948	37.288	93.752

- Illumina Hiseq 2500을 통하여 분석된 유전체 서열을 모균주(WT)와 비교하여 각 진화균주의 전장 유전체 서열상에 생긴 뉴클레오타이드 변이를 분석함(표 19).

표 19. 저온진화 과정에 따른 *Leu. mesenteroides* J18 유전체의 SNP 분석

No	Gene annotation.	position	J18	Ref.	50G-1	150G-2	200G-1	200G-2	500G-1	500G-2
1	hemolysin	206162	C	A	C	C	C	C	C	C
2	4-aminobutyrate aminotransferase	517426	G	G					GGCAG	GGCAG
3	chloride channel protein	771995	??	TA				T		
4	Not annotated	991278	G-	G-	GT	GT	GT	GT	GT	GT
5	pseudouridine synthase	1181920	TAGACTAGAC	TAGACTAGAC				T-----		
			CCGCTT	CCGCTT				-T		
6	exopolysaccharide biosynthesis protein	1323615	G	G			A		A	A
7	restriction endonuclease subunit S	1413871	A	A		G->A				
8	restriction endonuclease subunit S	1416208	C	C			T->C		T->C	T->C
	restriction endonuclease subunit S	1416212	G	T->G		G		G	G	
	restriction endonuclease subunit S	1416216	C	T->C		C		C	C	C
9	Not annotated	1773715	AT	AT	A	A	A	A	A	A

- 단일염기 다형성 분석 및 유전자의 삽입, 결실이 일어난 부분을 확인 한 결과 hemolysin, 4-aminobutyrate aminotransferase, chloride channel protein, exopolysaccharide biosynthesis protein으로 annotation되는 부분에 염기서열 변화가 생긴 것을 확인하였음
- 확인된 염기서열의 변화가 실제 진화에 따른 변화인지 서열 분석 과정에서 발생한 오류인지 재확인하기 위해 각각의 position을 포함하도록하는 primer set를 제작해 PCR을 한 후 정확도가 높은 sanger 시퀀싱을 진행하여 유전체 서열을 확인하였음(표 20, 그림 39).

표 20. 저온진화 균주의 SNP 확인을 위한 primer

No.	Oligo name	Oligoseq	Temp. (°C)	Oligo name	Oligoseq	Temp. (°C)
1	J18-SNP1-F	TCGAGTACCGGCTGCATAAC	60.5	J18-SNP1-R	GGCTTCAATTGCGGATGGAC	60.5
2	J18-SNP2-F	GATCGGATGCAAACGATGCGA	61.3	J18-SNP2-R	TGCTTTAGCCAACTCACCCA	58.4
3	J18-SNP3-F	TCGGTAGTGTGATTGCTGCC	60.5	J18-SNP3-R	TGTGCTAACGACCGACCATT	58.5
4	J18-SNP4-F	ACGATGTTGATGCGGCATTG	58.4	J18-SNP4-R	ATTCACCTTTCAGCTGGCGA	58.4
5	J18-SNP5-F	CATCATCATTGGTTGTCACAAC	58.4	J18-SNP5-R	CGCAAGCACAACTCGAAACA	58.4
6	J18-SNP6-F	CCATGGCTGTGCGATGAATG	60.5	J18-SNP6-R	CTTCGGAAGGTAAGTCAACAG	59.4
7	J18-SNP7-F	GGAAGGTGCTCGTAATCATG	58.4	J18-SNP7-R	CCATCATGCGTAAACCCTTC	58.4
8	J18-SNP8-F	CTCATCAGATATATCGTCTATTC	57.5	J18-SNP8-R	CACACGATGGTTGCAAGAC	57.3
9	J18-SNP9-F	GCCTACGCGACAGTCCAAC	59.5	J18-SNP9-R	TTCTGTAGCTGTAACAAGTCGC	60.3

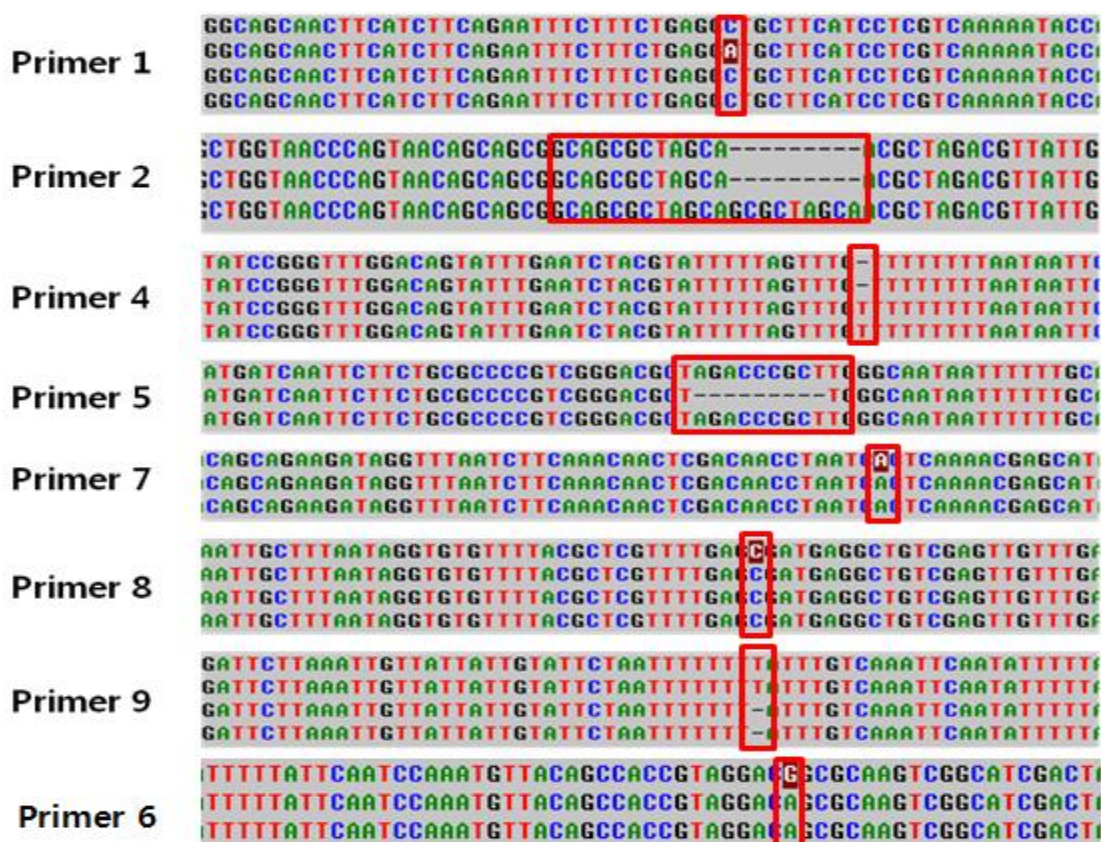


그림 39. 각 SNP 부분에 해당되는 염기서열의 변화

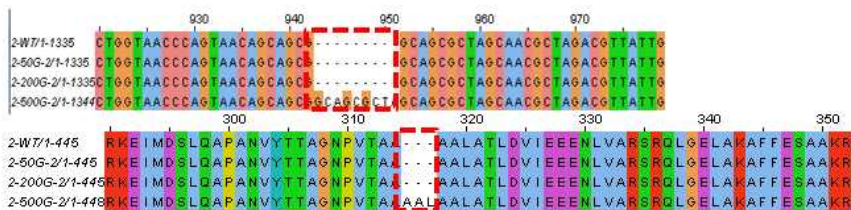
- Illumina Hiseq 결과에 대한 PCR을 이용한 확인실험을 수행한 결과, 생물정보학 프로그램을 이용하여 나타나는 유전자의 변이 중 일부는 시퀀싱에 대한 오류를 포함하고 있음을 알 수 있으며, 최종적으로 네 개의 유전자에 대한 변이가 일어난 것으로 확정함.
- 저온의 환경에서 세포 내부의 효소들을 보호하여 그 활성을 유지하도록 도와주는 compatible solutes의 한 종류인 클루탐산 생합성에 역할을 하는 4-aminobutyrate aminotransferase 단백질의 경우 모균주의 뉴클레오타이드 G를 대신하여 5'-GGCAGCGCTA-3'의 서열이 삽입됨으로 인해 알라닌-알라닌-라이신 아미노산이 단백질

서열상에 삽입됨을 발견함.

- 특히 세포막의 구조에 변화를 주어 저온 환경에서도 세포막의 유동성을 유지시키며 물질의 유입과 유출을 원활히 이룰 수 있는 exopolysaccharide biosynthesis protein의 유전자 서열에서 모균주의 뉴클레오타이드 G가 500세대 균주에서 A로 치환된 것을 관찰할 수 있었는데, 이러한 치환으로 아르기닌의 아미노산이 세린으로 치환되는 것을 알 수 있음.
- 이러한 두 변화를 통하여 저온의 환경에서 좀 더 활성이 높은 단백질을 생합성 해 내고 이들을 통한 저온 내성 기작을 획득한 것으로 예측하고 이후 연구를 수행 중.

4-aminobutyrate aminotransferase

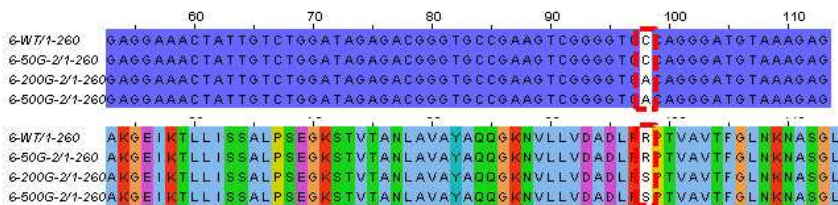
Primer No.	annotation	position	J18	Ref.	50G-2	50G-5	200G-2	200G-5	500G-2	500G-5
2	4-aminobutyrate aminotransferase	517426	G	G					GGCAG CGCTA	GGCAG CGCTA



A (Alanine), L (Leucine) 이 추가됨

Exopolysaccharide biosynthesis protein

Primer No.	annotation	position	J18	Ref.	50G-2	50G-5	200G-2	200G-5	500G-2	500G-5
6	exopolysaccharide biosynthesis protein	1323615	G	G			A		A	A



R (Arginine) -> S (Serine) 치환

그림 40. 4-aminobutyrate aminotransferase와 exopolysaccharide biosynthesis protein의 유전체 서열 변화와 아미노산 서열 변화

- 유전자 서열의 변화로 저온에 대한 내성의 획득 여부를 확인하기 위하여 경쟁적 환경 적응 실험(comparative fitness test)를 진행함.
- 경쟁적 환경 적응 실험 수행 과정은 0, 50, 200, 500세대의 각 콜로니를 택하여 이들이 저온 환경 내에서 혼합 배양 되었을 때, 진화 균주의 성장 양상과 활성에 대한 분석을 수행하는 것으로 혼합 배양액 내 각 세대 세포들의 상대적인 양을 파악하기 위하여 Illumina sequencing을 수행함(그림 41)

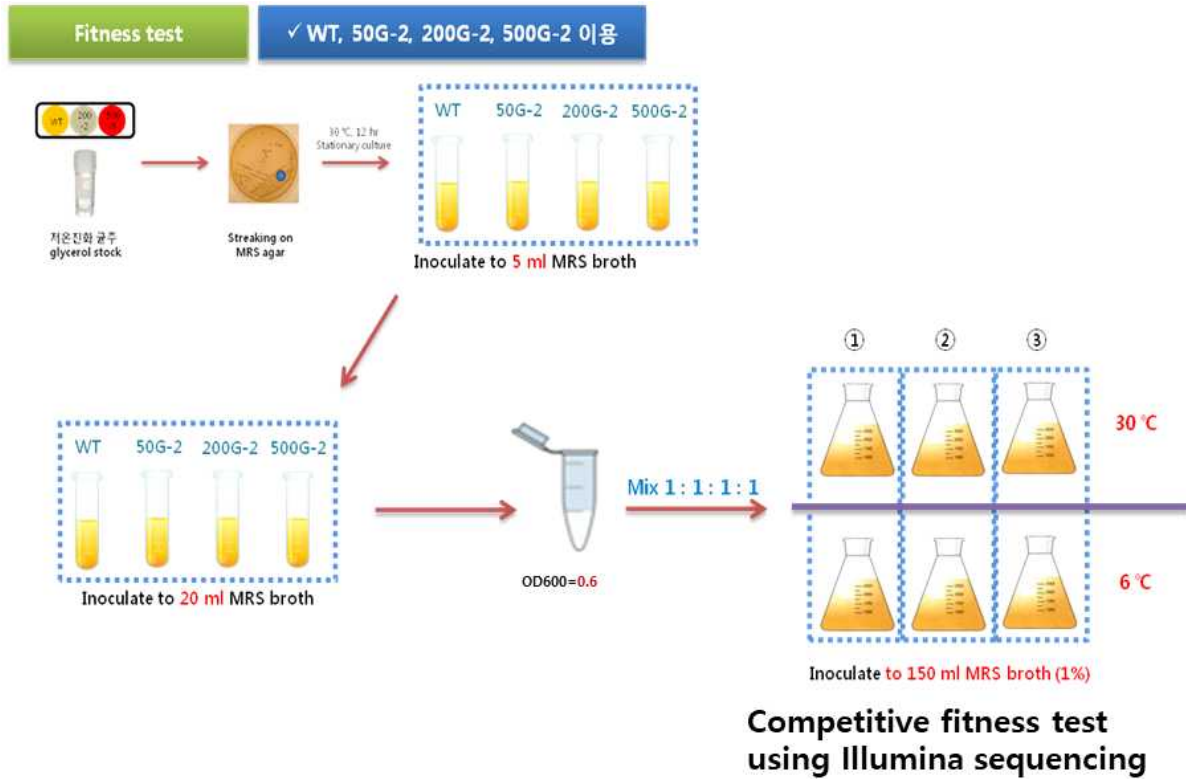


그림 41. 경쟁적 환경 적응 확인 실험 수행 모식도

- 상대적 적응성(relative fitness)를 비교하기 위하여 각 세대에서 선발된 0, 50, 200, 500 집락 배양액을 1:1:1로 섞은 후 MRS broth에 1% 접종하고 30°C, 6°C에서 각각 배양하며 성장곡선을 작성하였음(그림 42).

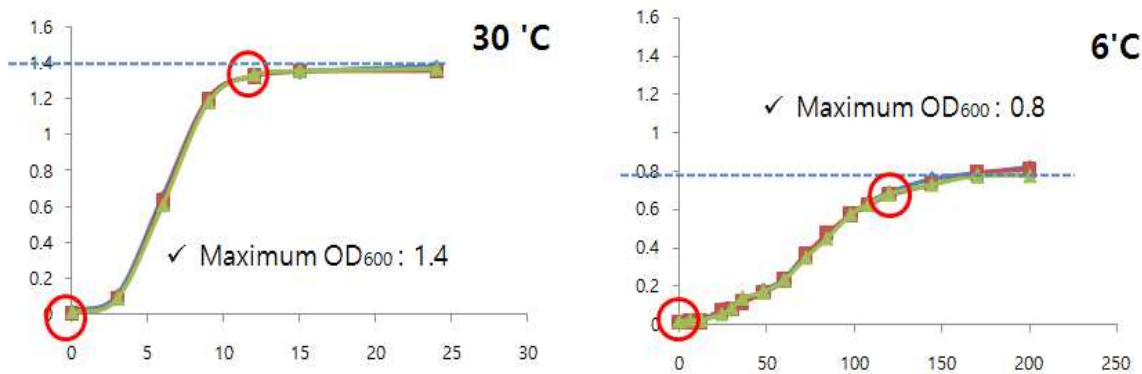


그림 42. 각 세대에서 선발된 0, 50, 200, 500 colony들의 배양액을 1:1:1로 섞어 접종후 배양한 생육곡선

- 30°C에서 배양한 균주의 최대 OD 값은 1.4로 확인된 반면 6°C에서 배양한 경우 최대 OD 값은 0.8로 저온에서 균주의 성장이 확실히 지연되는 것을 확인하였음.
- 상대적 적응성(relative fitness)를 비교하기 위하여 모세균과 각 세대의 진화 균주들이 갖는 특이적 mutation site를 증폭하는 primer set을 이용한 PCR을 통한 증폭 후 Illumina Miseq 염기서열 분석 시스템을 이용하여 어느정도의 상대적 비율로 각 세대의 균주들이

존재하는 지를 분석하고자 함.

- 세포의 샘플링은 접종 직후인 0h에 실시하였고 30°C의 경우 12 시간, 6°C의 경우 120 시간에 실시하였다.
- 각 세대에 특이적 mutation site를 검출을 위한 primer set의 서열은 아래 표에 나타내었다(표 21).

표 21. 저온 진화균주의 저온 적응성(fitness)을 확인하기 위한 primer

First PCR step				
PCR Primer	pre-adapter	primer sequence	Specific locus primer	Combined sequence (final sequence_forward)
LTAE 2-F	TCGTCGGCAGCGTC	AGATGTGTATAAGAGACAG	CGATTGCCAGTGGATTGC (58°C)	TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-CGATTGCCAGTGGATTGC
LTAE 2-R	GTCTCGTGGGCTCGG	AGATGTGTATAAGAGACAG	TGCTTTAGCCAACCTCACCA (57°C)	GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-TGCTTTAGCCAACCTCACCA
LTAE 4-F	TCGTCGGCAGCGTC	AGATGTGTATAAGAGACAG	GCCTTTGGGATGGCTACAC (57°C)	TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-GCCTTTGGGATGGCTACAC
LTAE 4-R	GTCTCGTGGGCTCGG	AGATGTGTATAAGAGACAG	CGGTTCCAGAAGGTCAGGT (58°C)	GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-CGGTTCCAGAAGGTCAGGT
LTAE 6-F	TCGTCGGCAGCGTC	AGATGTGTATAAGAGACAG	CATGGCTGTGGATGAATG (57°C)	TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-CATGGCTGTGGATGAATG
LTAE 6-R	GTCTCGTGGGCTCGG	AGATGTGTATAAGAGACAG	CGGAAGGTAAGTCAACAGT (56°C)	GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-CGGAAGGTAAGTCAACAGT
Second PCR step				
i5 Index read	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC 3'			
i7 Index read	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG 3'			

- 채취한 시료에 5% chelex를 첨가하여 DNA를 추출한 뒤 위에서 확인된 염기서열 중 각 세대를 구분할 수 있는 4-aminobutyrate aminotransferase (517,426), Not annotated (991,278), exopolysaccharide biosynthesis protein (1,323,615)의 차이를 이용해 각 세대의 비율 계산하였다.
- LTAE2 (4-aminobutyrate aminotransferase), LTAE4 (Not annotated), LTAE6 (exopolysaccharide biosynthesis protein) primer set을 이용해 first PCR을 진행하였고 i5 index와 i7 index를 이용해 각 시료에 adapter를 부착한 뒤 Illumina miseq system을 이용하여 적응성(fitness) 결과를 확인하였다.

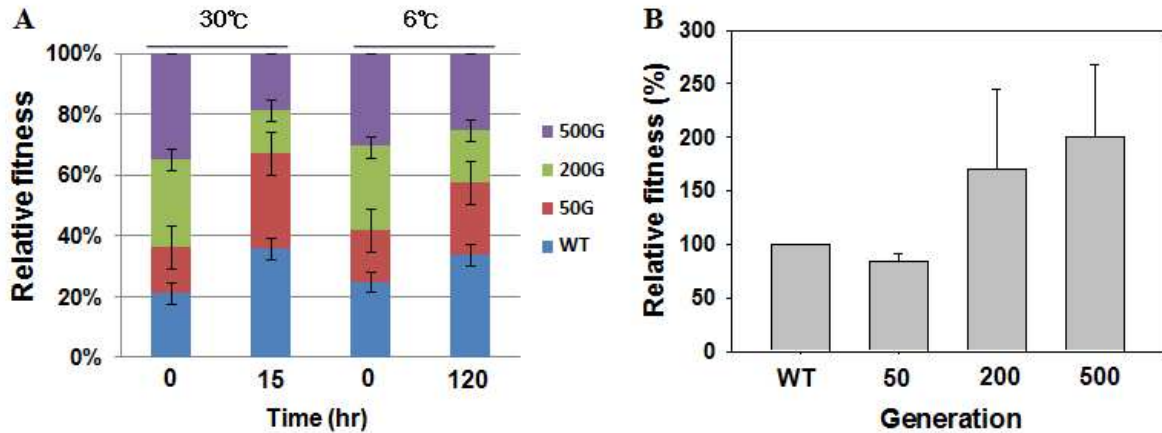


그림 42. 온도에 따른 relative fitness 차이

- 30°C에서는 15시간 배양 후 WT과 50G의 비율이 30% 이상인 것으로 확인되었고 상대적으로 200G, 500G의 비율은 초기 값에 비해 20% 정도 감소하는 경향을 보였다.
- 6°C에서는 WT과 50G의 증가율이 30°C에서의 증가율 보다 낮았고, 500G의 감소폭이 줄어드는 것으로 확인되었다.
- WT을 기준으로 진화 균주의 상대적 적응성(relative fitness)를 확인한 결과 50G는 오히려 fitness가 약간 감소하는 경향을 보였고, 200G와 500G는 각각 170%, 200% 이상 증가하는 경향을 보여 저온 조건에서 *Leu. mesenteroides* J18 균주의 진화가 성공적으로 이루어진 것을 확인하였다.

○ *Leu. mesenteroides* J18의 저온 저항성 기작 규명

- 진화된 *Leu. mesenteroides* J18의 저온 저항성 기작을 규명하기 위하여 6°C와 30°C 온도 조건에서 모균주(WT)와 50세대 진화 균주의 전사체 분석 실험을 수행하였다.
- 각 균주들은 생물학적으로 3반복으로 구성하였다. 각 균주들의 전사체 추출을 위하여 각 온도 조건에서 균주를 배양한 뒤 이들의 성장곡선을 그리고 대수기 초기에 세포들은 초저온 냉동고에 전사체 추출 전까지 보관하였다(그림 44).

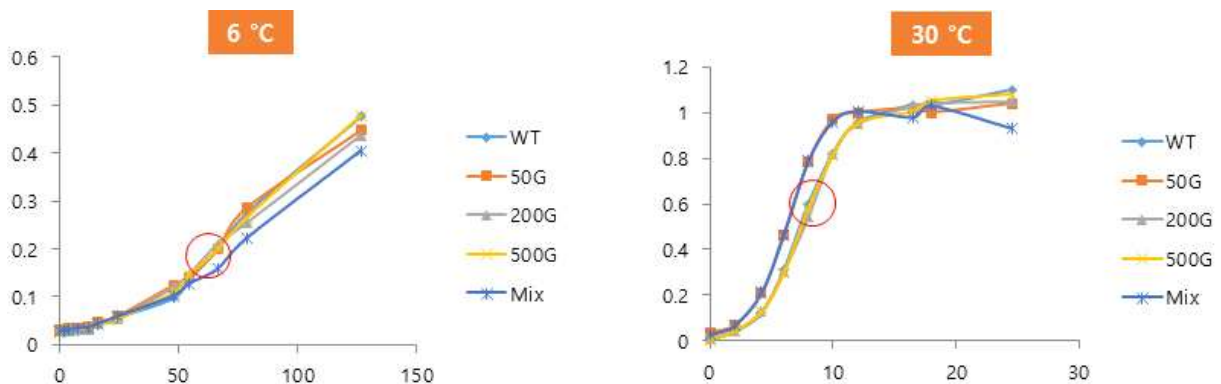


그림 44. 6°C와 30°C 온도 조건에서 각 진화균주들의 성장곡선

- 각 환경조건으로부터 모은 세포들로부터 전사체의 추출은 Trizol 시약을 이용하여 수행하였으며, 추출된 전사체의 순도와 농도를 파악하기 위한 전기영동 결과는 아래 그림과 같다(그림 45).

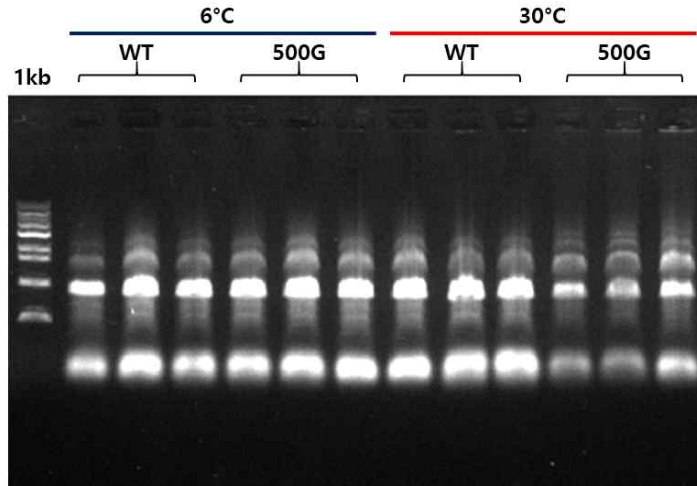


그림 45. 세포로부터 추출된 전사체의 전기영동 결과

- 순도와 농도가 적합한 샘플을 이용하여 RNA 시퀀싱을 수행하였다. RNA시퀀싱을 위해서 16S rRNA gene을 제거하여 mRNA를 농축하고 이를 cDNA로 역전사하여 시퀀싱에 이용하였다. 제작된 cDNA의 시퀀싱은 Illumina 사의 Hiseq 2500 paired-end 시퀀싱을 수행하였다.
- RNA 시퀀싱결과는 아래 표와 같다(표 21).

표 21. 6°C와 30°C 온도 조건 균주의 RNA 시퀀싱 결과

Sample	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
30°C-WT	3,116,678,604	30,858,204	40.8	59.2	98.2	95.0
6°C-WT	3,767,968,620	37,306,620	40.5	59.5	98.4	95.4
6°C-500G	4,029,386,516	39,894,916	40.6	59.4	98.4	95.5

- RNA 시퀀싱 결과 세가지 샘플 모두에서 고품질의 시퀀싱 결과들을 얻을 수 있었다. 시퀀싱 결과를 이용하여 환경조건에 따른 발현량의 변화를 분석하였다.
- 세 조건의 전사체를 *Leu. mesenteroides* J18의 전장유전체에 맵핑하였다. 각 유전자의 매핑된 리드의 개수를 세고 이를 이용하여 RPKM 값을 이용하여 normalization을 수행하였다.
- *Leu. mesenteroides* J18의 각 유전자의 발현 양상은 아래 그림과 같이 히트맵으로 제작하여 그 경향을 파악하였다(그림 46).

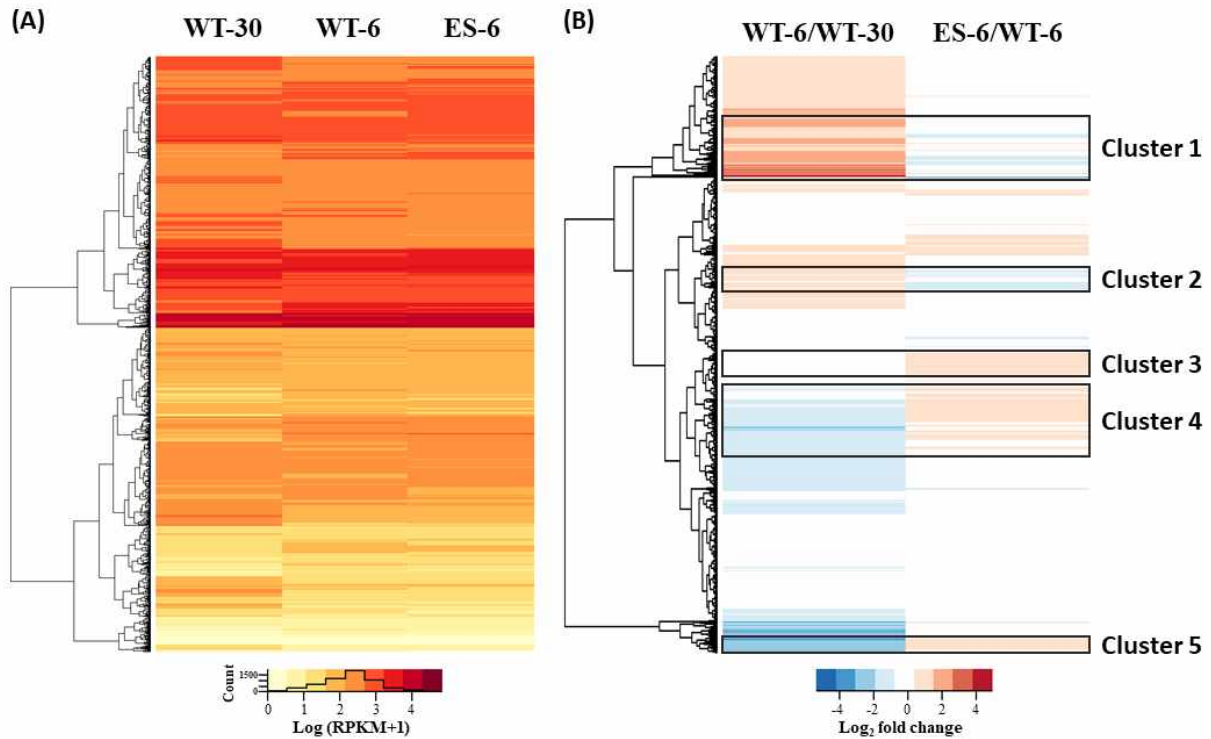


그림 46. 세가지 샘플에서 *Leu. mesenteroides* J18의 유전자 발현 양상 히트맵

- 6°C와 30°C의 조건에서 WT과 진화균주의 유전자 발현 양상은 거의 비슷한 양상을 보이는 것을 알 수 있다(그림 46(A)). 6°C와 30°C의 조건의 차이에 따른 미생물의 반응과 6°C 조건에서 WT과 진화균주 사이의 발현량 차이를 좀 더 조사하기 위하여 이들의 발현량을 비교하였다(그림 46(B)).
- 그림 46(B)에 WT과 진화 균주 사이의 극명한 차이를 보이는 유전자를 5 개의 클러스터로 분류 한 뒤 이들의 발현양상과 그 기능에 대하여 좀 더 심층적 분석을 수행할 예정이다.
- WT과 진화 균주 사이의 발현량이 2배 이상 증감하는 유전자들을 아래 표 22., 표 23.와 같이 정리하였다.

표 22. WT과 진화 균주 사이의 발현량이 2배 이상 증가 하는 유전자의 목록

Locus_tag	Annotation (GenBank)	Log ₂ fold change (ES-6/WT-6)
MI1_00095	multidrug MFS transporter	1.08
MI1_00605	RNA methyltransferase	1.01
MI1_01325	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	1.28
MI1_01330	beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	1.06
MI1_01470	sporulation initiation inhibitor Soj	1.13
MI1_01580	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	1.16
MI1_01595	aspartate aminotransferase	1.25
MI1_02880	sugar transporter	1.06
MI1_03045	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	1.07
MI1_03300	phosphoribosylformylglycinamide synthase	1.00
MI1_03595	L-asparaginase	1.17
MI1_03955	lipase	1.16
MI1_07125	DNA polymerase IV	1.07
MI1_07730	translation factor Sua5	1.01
MI1_07945	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1.38
MI1_08115	ATP synthase FOF1 subunit C	1.35
MI1_08355	XRE family transcriptional regulator	1.30
MI1_08705	hypothetical protein	1.23
MI1_09421	hypothetical protein	1.13
MI1_09431	cell division protein FtsK	1.10
MI1_09436	hypothetical protein	1.18
MI1_09976	galactoside permease	1.09
MI1_10290	hypothetical protein	1.07

표 23. WT과 진화 균주 사이의 발현량이 2배 이상 감소 하는 유전자의 목록

Locus_tag	Annotation (GenBank)	Log 2 fold change (E S-6/WT-6)
MI1_00615	hypothetical protein	-2.71
MI1_00750	30S ribosomal protein S 10	-1.10
MI1_01225	nucleoside hydrolase	-1.03
MI1_01560	hypothetical protein	-1.13
MI1_01565	hypothetical protein	-1.38
MI1_01620	preprotein translocase subunit YajC	-1.05
MI1_01680	hypothetical protein	-1.22
MI1_01805	MFS transporter	-1.21
MI1_01995	bifunctional folylpolyglutamate synthase/dihydrofolate synthase	-1.11
MI1_02070	aminodeoxychismate lyase	-1.21
MI1_02325	hypothetical protein	-1.42
MI1_02675	PhoU family transcriptional regulator	-1.17
MI1_02680	carboxylate transporter	-1.35
MI1_02800	peptide ABC transporter permease	-1.64
MI1_02960	hypothetical protein	-1.28
MI1_03180	lysophospholipase	-1.16
MI1_03310	amidophosphoribosyltransferase	-1.41
MI1_03390	dihydrolipoamide dehydrogenase	-1.03
MI1_03820	MFS transporter permease	-1.54
MI1_03830	LacI family transcriptional regulator	-1.12
MI1_03835	hypothetical protein	-1.14
MI1_04115	daunorubicin resistance protein DnrC	-1.18
MI1_04655	pyruvate oxidase	-1.16
MI1_04800	hypothetical protein	-1.08
MI1_04825	hypothetical protein	-1.04
MI1_04835	hypothetical protein	-1.42
MI1_04840	hypothetical protein	-1.21
MI1_04845	AAA family ATPase	-1.26
MI1_04850	type IV secretion system protein VirD4	-1.12
MI1_04875	hypothetical protein	-1.87
MI1_04880	hypothetical protein	-1.23
MI1_04910	hypothetical protein	-2.42
MI1_06065	asparagine--tRNA ligase	-1.05
MI1_07020	ribonuclease III	-1.01
MI1_07025	phosphoglucosamine mutase	-1.28
MI1_08360	MFS transporter permease	-1.11
MI1_08370	hypothetical protein	-1.04
MI1_08380	phosphoglycerate kinase	-1.22
MI1_08615	30S ribosomal protein S 6	-4.46
MI1_08620	peptidase M20	-4.21
MI1_08720	3-keto-L-gulonate-6-phosphate decarboxylase	-1.14
MI1_09381	hypothetical protein	-1.15
MI1_09851	glyoxalase	-1.09
MI1_09856	fruc tokinase	-1.01

- 이들 목록의 유전자들이 저온 환경 내에서의 적응을 위한 생리학적 기능에 대하여 심층적 분석을 수행할 예정이다.
- 저온 환경에서 진화된 *Leu. mesenteroides* J18의 mutation site와 유전자 전사체의 발현량의 관계를 파악하기 위하여 4 개의 mutation site와 유전자 발현의 양을 목록화 하였다(표 24).

표 24. mutatio site와 유전자 발현량의 양상

Genome position	Wild-Type	Generation 500G-5	Change in protein	Description	WT-30	WT-6	500-6
517426	G	GGCAGCG CTA	Insertion A, A, and L (315-317)	4-Aminobutyrate aminotransferase	281	134	119
991278	G	GT	-	Intergenic region 1	165	161	170
1323615	G	A	Substitution R98S	Exopolysaccharide biosynthesis protein	178	207	210
1773715	AT	A	-	Intergenic region 2	719	253	366

- 저온환경 내에서 진화된 *Leu. mesenteroides* J18 균주의 저온환경 적응 기작에 대한 규명을 위해 mutation site와 관련된 유전자들의 기능, 저온환경에서 특이적으로 발현량이 변화하는 유전자의 기능, 대사경로에 참여하는 유전자의 발현량 변화 등을 종합하여 심층적으로 규명할 예정이다.

○ *Leu. mesenteroides* J18의 내산성 연구

- *Leu. mesenteroides* J18 균주를 프로바이오틱스로 개발하기 위해서는 pH가 낮은 위를 통과하여 생존하는 능력이 필요함으로 *Leu. mesenteroides* J18 균주는 높은 내산성이 필요성이 대두되었다.
- *Leu. mesenteroides* J18 균주를 pH를 조정한 MRS 배지를 이용하여 내산성 실험을 실시함.

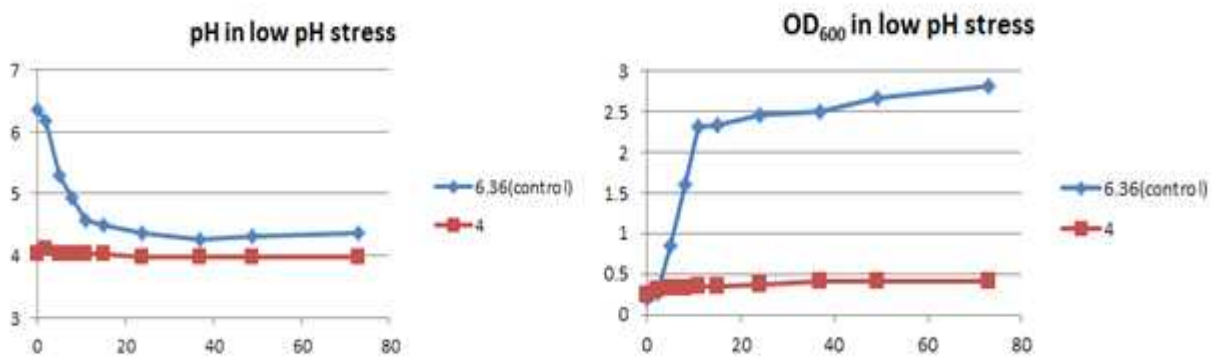


그림 47. *Leu. mesenteroides* J18의 pH별 성장속도 비교

- *Leu. mesenteroides* J18의 pH별 성장실험을 실시한 결과, 대조군인 pH 6.36(무조정 pH)에 비해 pH 4.0에서는 J18 균주의 성장이 현저히 낮아짐을 확인.
- pH 4.0에서는 거의 pH가 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있었음. 즉, 성장이 거의 일어나지 않음을 확인.
- 김치발효환경에서 우점하는 것으로 보고된 대표 유산균 중 *Leu. mesenteroides*의 산 저항성이 다른 김치 유산균들에 비하여 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있음: 내산성 향상을 위한 균주개량이 필요함.

표 25. 프로바이오틱스 개발을 위한 *Leu. mesenteroides* J18의 내산성 실험

Viable cell count (CFU/mL)				
Time	0 min	75 min	90 min	120 min
pH 3.0	3.20 X 10 ⁹			1.51 X 10 ⁹
pH 2.5	2.35 X 10 ⁹	1.14 X 10 ⁵	2 X 10 ²	9 X 10

Viable cell count (log CFU/mL)				
Time	0 min	75 min	90 min	120 min
pH 3.0	9.51			9.18
pH 2.5	9.37	5.06	2.30	1.95

- *Leu. mesenteroides* J18 배양액을 강산(pH 2.5, 3.0)에 노출시킨 후, 노출 시간별 생균수를 측정하여 산성 조건에서 생존능을 조사함.
- 그 결과 *Leu. mesenteroides* J18은 pH 3.0에서는 산 저항성이 높은 편이지만 pH 2.5에서는 2시간이 지나면 거의 사멸하여 존재하지 않는 것을 보아, 위산과 거의 동일한 pH에서는 내산성이 매우 낮은 것으로 확인됨, 따라서 사람의 위산에 살아남아 장까지 도달하기 위해서는 좀 더 낮은 pH에서 생존할 수 있는 내산성 증진이 필요함.
- *Leu. mesenteroides* J18의 반응기를 이용한 산성조건에서 진화를 유도하게 되면 김치환경에서 생존을 및 우점도를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 위산과 같은 낮은 pH에서 생존율이 높아질 것으로 사료됨.
- 젖산(lactic acid)에 대한 저항성을 높이는 것이 아니라 pH에 대해 진화가 이루어져야하기 때문에 다음과 같이 젖산의 양을 다르게 조정한 배지에서 젖산에 대한 내성실험을 실시하였음(그림 48).

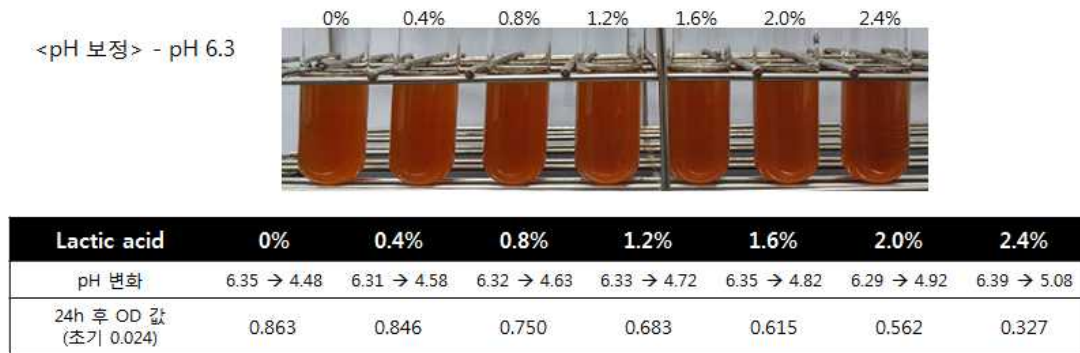
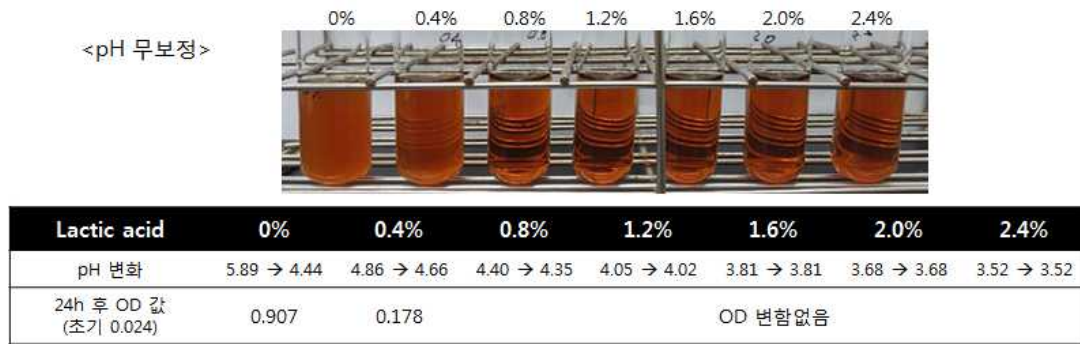


그림 48. MRS 배지를 이용한 젖산 내성 실험

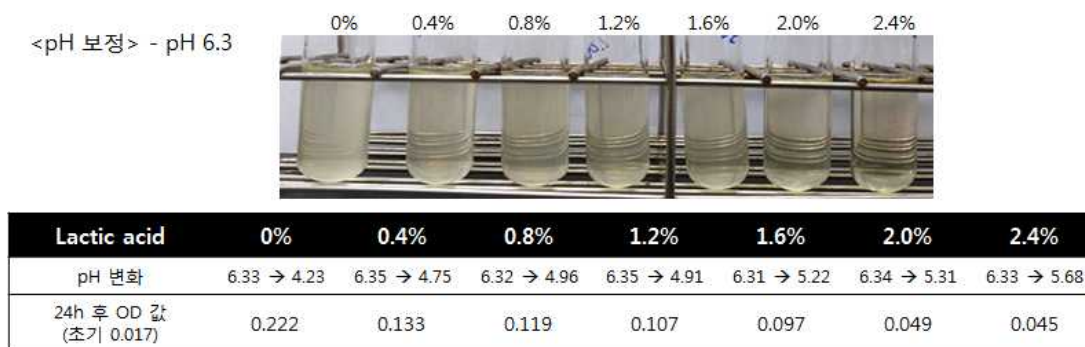
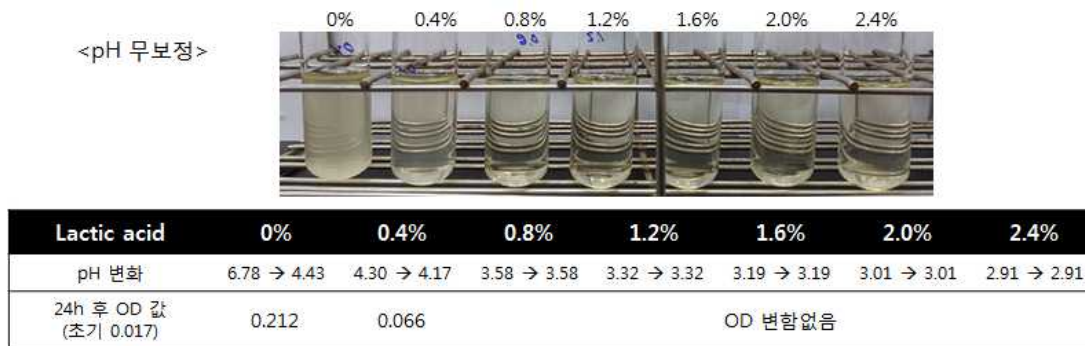


그림 49. CDM 배지를 이용한 젖산 내성 실험

- pH가 중성으로 변화시키면 젖산이 존재하여도 성장속도가 어느 정도 유지함. 즉, 유산균의 성장은 젖산보다는 pH에 더 영향을 받으므로 저산조건에서의 적응성을 향상시키기 위한 진화연구 수행이 필요함이 제시됨(저산조건에서 연속배양시 pH에 대한 내성증가)

○ *Leu. mesenteroides* J18의 내산성 증진 실험

- 김치 환경내에서 발효 후기단계까지 *Leu. mesenteroides*가 우점하고 또한 프로바이오틱스로 개발하기 위해서는 내산성 증진이 필요함. 김치유산균의 내산성 증진연구를 진행하고 내산성이 증진된 균주의 유전체 분석을 통한 산성 조건에서의 미생물의 환경적응성 변화 기작을 알아내는 것을 목표로 함.
- J18의 저산진화 실험을 위한 배지로 최소배지인 CDM을 설정하였으며, CDM 배지에서 시간에 따른 *Leu. mesenteroides* J18의 성장속도를 측정함(그림 50).

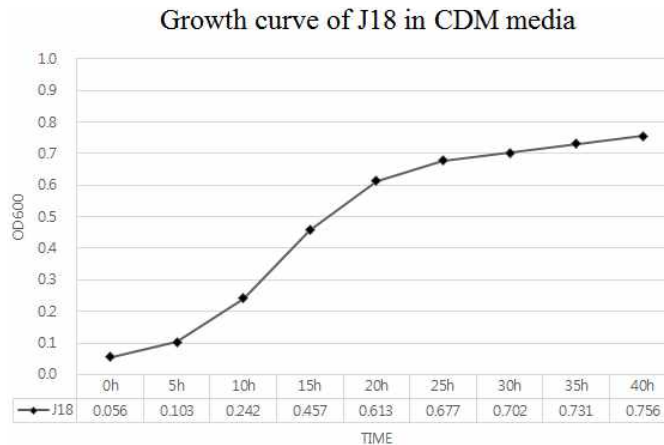


그림 50. pH 4.0인 CDM 배지에서 *Leu. mesenteroides* J18의 성장속도 관찰

- pH는 유산균이 성장함에 따라 생성되는 젖산, 아세트산 등으로 계속해서 낮아지므로 일정한 pH 조건에서 진화를 유도하기 위해서 계대배양방법대신 연속배양방법을 이용할 필요성이 대두됨.
- *Leu mesenteroides* J18의 산저항성 향상을 위한 진화 연구를 위해 반응기(Fermentor)를 이용한 batch culture를 수행하였음.
- 공급하는 CDM배지의 pH는 1N HCl를 사용하여 4.0으로 조정함.
- 배지의 volume은 700 ml, 균 접종량을 3%로 설정하였고, 최적온도인 30°C에서 배양을 진행함.
- 0시간부터 5시간까지는 유도기(lag phase)이며, 5시간부터 20시간까지 대수기(log phase), 그 이후부터는 점차 정지기(stationary phase)에 도달함을 확인.

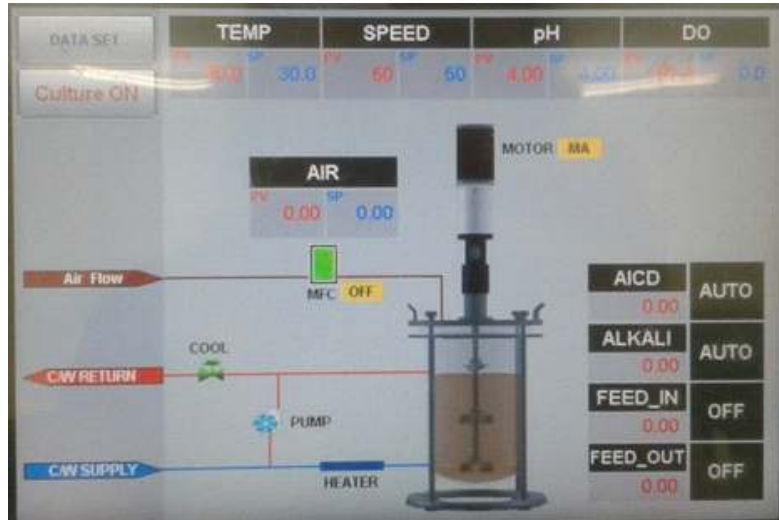


그림 51. 반응기 시스템의 조건 설정

- 저산산화 실험을 위한 연속배양(continuous culture) 조건 설정을 완료함
- pH 4.0 / 30°C / 혐기적 조건 (질소 가스 주입) / 접종량 3%
- 해당조건에서 연속적으로 *Leu mesenteroides* J18의 배양을 실시함

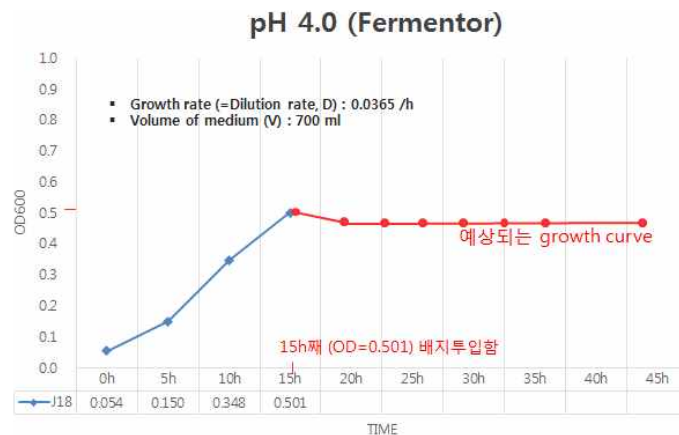


그림 52. 반응기 시스템을 이용한 *Leu. mesenteroides* J18 의 연속배양

- OD가 일정하게 0.5가 되도록 유지시킴, 가장 성장이 활발한 대수기에서 연속배양진행
- 약 15시간째 OD=0.501에 도달하였으며, 이때부터 연속적으로 새로운 배지를 투입하기 시작함.
- 배지를 주입하는 속도인 Flow rate는 7.6ml/h임. 하루 동안 약 182.4 ml의 배지가 투입됨.
- 약 3.84일에 1세대로 계산 하여 최소 100세대까지 저산산화를 진행할 예정.
- 그림 과 같이 반응기(Fermentor)를 사용하여 실험실 진화기법을 이용한 내산성 유산균 개량 연구를 시작하였으며, 약 500여일, 100세대 이상의 진화과정을 거쳐 진화균주를 얻을 수 있었다.

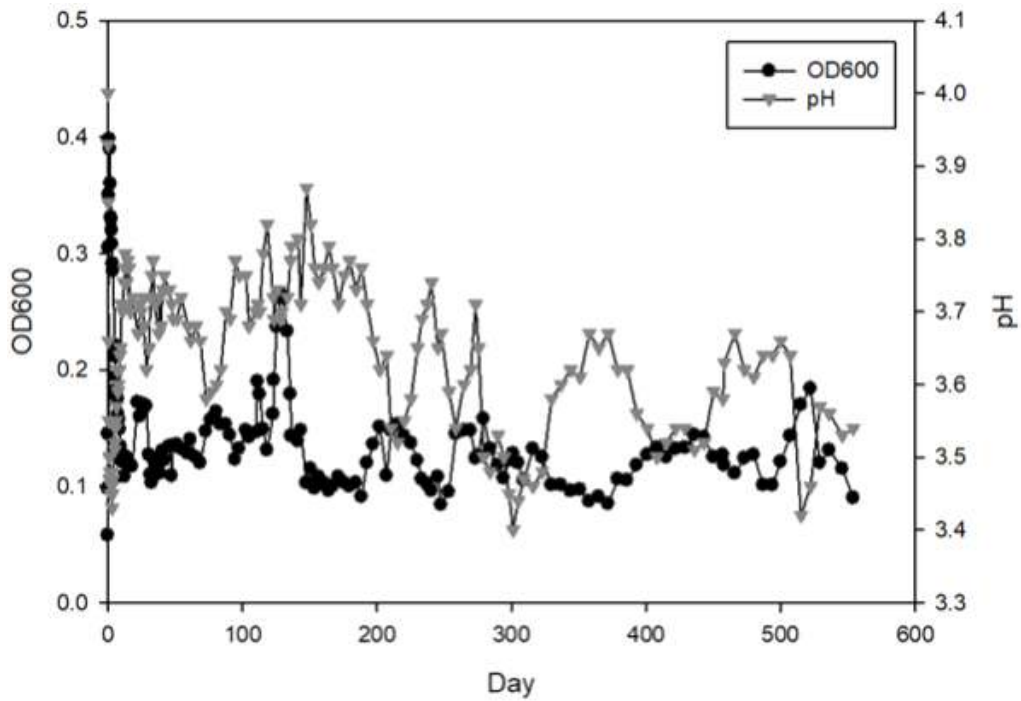


그림 53. 반응기 시스템을 이용한 *Leu. mesenteroides* J18의 연속배양

- 0일, 72.9일, 122.9일 동안의 진화균주를 선택하여 저산조건에서 환경적응성이 증가되었는지 여부를 판단하기 위해 중간점검단계로 Spotting test를 진행하였다.
- spotting test를 이용한 fitness test의 과정은 아래 그림 와 같으며 이를 이용하면 주어진 환경 내에서 균주의 적응성이 어떻게 달라지는 지를 분명하게 파악할 수 있는 장점이 있다.

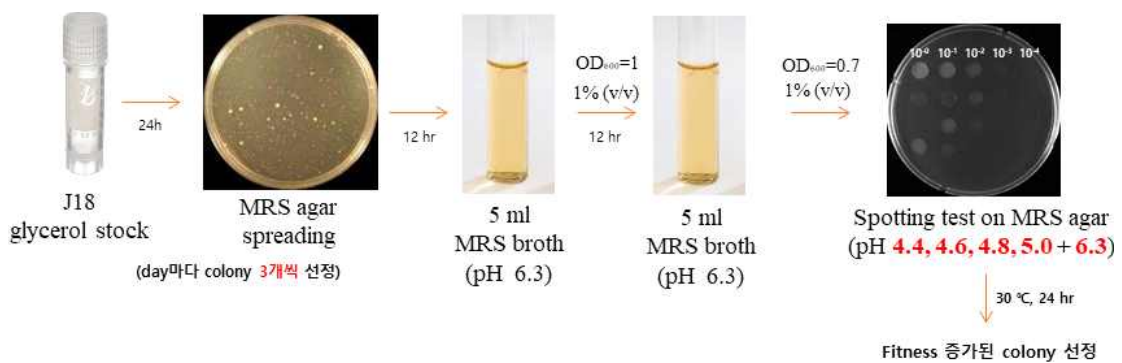


그림 54. spotting test를 이용한 환경적응성 실험과정

- 0, 72.9, 215.2, 301.1, 401, 500 day의 진화 균주를 택하여 배지 내 pH 조건에 따른 환경적응성 평가를 위하여 spotting test를 수행한 결과 pH가 4.4로 현 공급배지와 동일한 경우 그 성장이 모든 시기의 균주들에서 비슷하게 나타나며 pH가 4.3, 4.2로 감소하는 경우 진화 시간에 따라서 그 성장의 경향이 두드러진 차이를 나타내었다(그림 55).

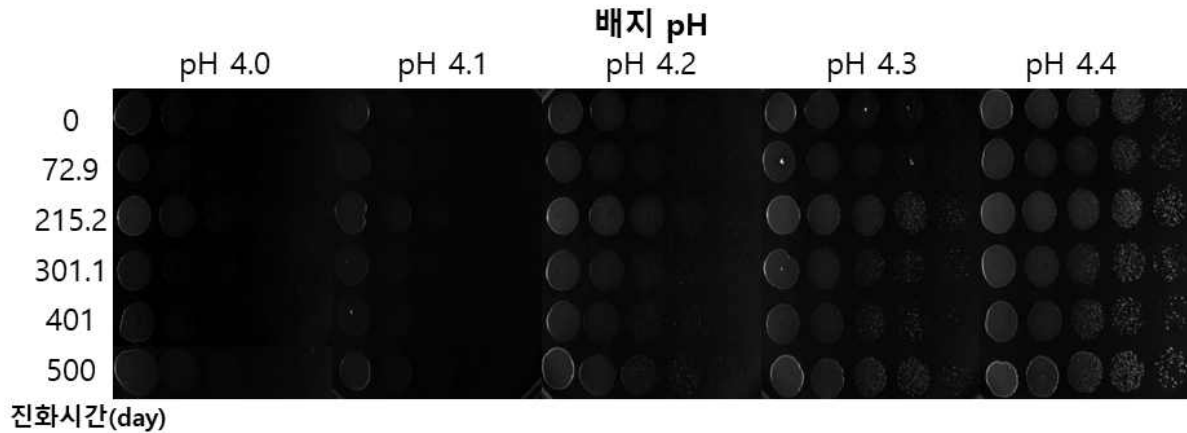


그림 55. 저산 배지 조건에서 진화중인 *Leu. mesenteroides* J18의 환경 적응성(fitness test)시험결과

- 내산성을 갖는 개량균주들은 김치발효 스타터로써 적용하여 그 생장과 생리학적 활성이 김치발효에 적절한지를 파악할 것이다. 또한, 프로바이오틱스의 중요한 요소를 가졌음으로 본 균주를 프로바이오틱스 균주로의 개발을 추후 추진할 것이다.

○ 프로바이오틱스의 김치종균개발연구

- 세계적으로 잘 알려진 프로바이오틱스 *Lb. rhamnosus* GG 균주의 실험실적 개량을 통해 김치 종균으로의 활용을 목표로 하였다.
- 프로바이오틱스를 김치에 적용시키면 우수한 생리활성물질을 생산하는 건강기능성 김치를 개발할 수 있을 것으로 판단되므로 *Lb. rhamnosus* GG의 김치 발효용 스타터 개발 연구를 수행하였다.
- *Lb. rhamnosus* GG 균주를 *Lactobacillus* 배양 전용배지인 MRS agar 배지를 이용하여 다양한 온도(처리구: 4, 6, 8, 10, 15℃. 양성 대조군: 30, 37℃)에서 다른 *Lactobacillus* 균주 3종 (*Leu. mesenteroides* 0211, *Leu. citreum* BS14, *Lb. sakei* YR4)과 성장 속도를 비교하였다(그림 56).

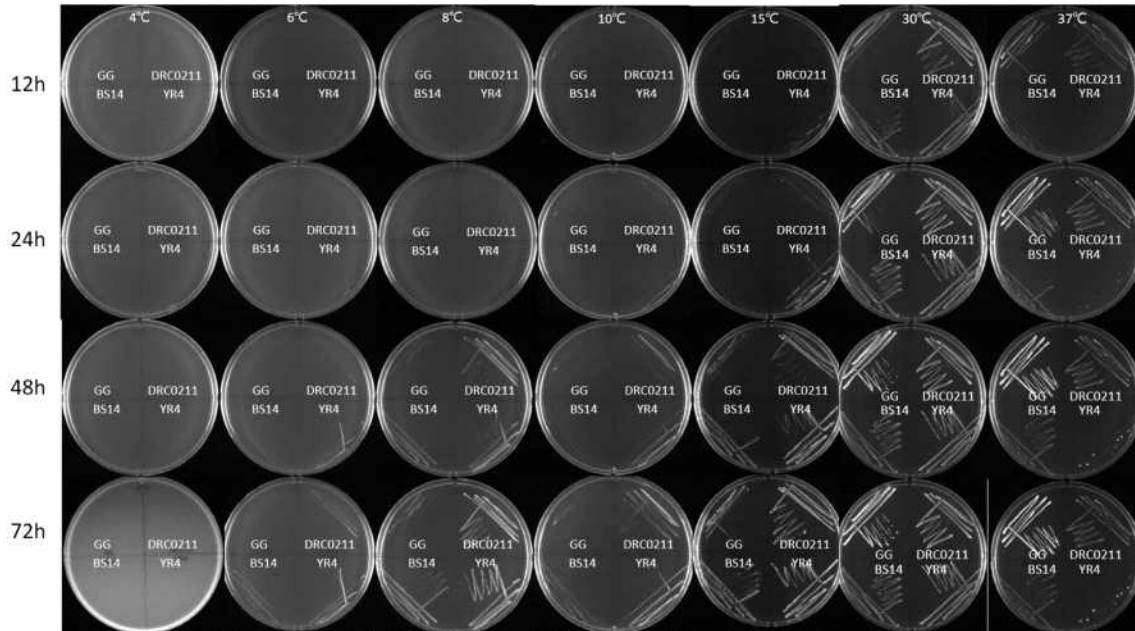


그림 56. *Lb. rhamnosus* GG와 김치유산균들의 저온 성장 특성

- MRS agar 배지에서 *Lb. rhamnosus* GG 온도별 성장 속도를 확인한 결과, 최적온도인 37°C 에서는 다른 균주들과 비교하여 굉장히 빠른 속도로 성장함을 보이나, 온도가 조금만 낮아져도 성장 속도가 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다. 또한 10°C 이하에서는 성장속도가 매우 느리며, 6°C 이하에서는 72시간 안에 전혀 성장을 보이지 않았다.
- 김치 발효 환경이 일반적으로 6°C 이하인 것을 고려하였을 때, 김치 발효 환경에서 적응하여 미생물 군집 내에서 우점종으로 성장하기 위해서는 저온환경조건에 대한 저항성을 증가시켜야 할 필요성이 있어 저온 저항성 향성을 위한 균주개량에 중점을 두고 이를 수행하고자 하였다.
- 만니톨은 김치에 단맛 및 청량감을 주고 신맛을 억제하는 물질로써, 산폐균의 증식을 억제해 신선한 상태로 오랫동안 보관·유통을 가능하게 도와주기 때문에 발효 김치에 사용되는 종균은 만니톨을 생성할 수 있어야 한다.
- 기존에 알려져있는 *Lb. rhamnosus* GG의 유전체 분석 결과, 만니톨 유전자를 보유하고 있는 것으로 알려져 있으나, 아직 실제로 생성하는지는 알려진 바가 없음. 이를 확인하기 위해 *Lb. rhamnosus* GG를 배양하여 대사체 변화를 분석, 실제 만니톨 생성능을 확인함(표 26).

표 26. $^1\text{H-NMR}$ 분석을 이용한 *Lb. rhamnosus* GG의 대사물질 생성능 분석

Concentrations (mM)	LGG	MRS
Glucose	2.6486	50.3153
Fructose	130.7904	192.3461
Sucrose	0	26.0241
Lactate	5.2907	2.4667
Acetate	0.501	34.2027
Ethanol	0.8749	1.0025
Mannitol	7.1073	6.0652
GABA	2.2731	1.8822

- 배지는 같은 *Lactobacillus*에 속하는 *Lb. fermentum* CRL 573에서 만니톨 생성을 확인하기 위하여 사용했던 조성(Rodríguez C, et al., 2012)을 따라서 수행하였다.
- *Lb. rhamnosus* GG가 만니톨을 생성하는지 위의 배지(MRS medium containing glucose(1%, w/v)and fructose(6.5%, w/v))에서 37°C, 24시간 배양하여 ¹H-NMR분석을 통해 당, 유기산 등의 농도를 확인하였다.
- 또한 *Lb. rhamnosus* GG는 Glutamate decarboxylase 유전자를 보유하고 있지 않지만 같은 종에 속하는 *Lb. rhamnosus* YS은 GABA (γ -aminobutyric acid)를 생성하는 것이 보고되었기 때문에 *Lb. rhamnosus* GG가 실제 GABA 생성능이 있는지 확인하기 위해 배양하여 대사체 변화를 분석, 실제 GABA 생성능 역시 확인하였다.
- 같은 *Lactobacillus*에 속하는 *Lb. buchneri*에서 GABA생성을 확인하기 위하여 사용했던 배지 조성을 따라 수행하였다(Cho, et al., 2006).
- *Lb. rhamnosus* GG가 GABA를 생성하는지 위의 배지(MRS containing 5% monosodium glutamic acid (MSG))에서 37°C, 24시간 배양하여 ¹H-NMR분석을 통해 농도를 확인하였다.
- *Lb. rhamnosus* GG가 생성한 GABA는 적은 양을 생성하였으나 24시간 배양이라는 것과, glucose 와 fructose 등이 많이 감소한 것을 감안하여 1주 이상 배양하였을 시에는 더 많은 양을 생산 할 수 있을 것으로 예측되었다.
- 이와 같이 프로바이오틱스인 *Lb. rhamnosus* GG 균주는 산내성에 관련된 유전자들을 상당수 보유하고 있고 만니톨 및 GABA와 같은 기능적 대사물질을 생성할 수 있기 때문에, 김치에 발효종균으로 적용하고 우점균을 분석하여 김치발효종균으로 개량이 가능한지 여부를 시험하고자 하였다. 또한 저온에서 성장이 느리므로 저온에서 발효되는 김치의 환경에서 빠른 적응을 위해 저온진화실험이 필요할 것으로 판단하였다.
- 프로바이오틱스인 *Lb. rhamnosus* GG를 김치종균으로 개발하기 위해 실제 김치에 starter로서 접종하여 우점종이 되기 위한 적절 발효 온도와 발효 시간을 알아내기 위한 연구를 진행하였으며 발효의 각 단계에 따른 pH변화, 생균수의 변화, ¹H-NMR을 통한 대사체 분석 방법을 사용하여 실험을 수행하였다.
- 세계 김치연구소에서 사용하는 김치 원료조성을 이용하여 김치를 제조한 후, 6등분 하여

1/6은 대조군으로 사용하고, 5/6의 김치에 *Lb. rhamnosus* GG균을 접종하였다.

- 종균으로 사용할 *Lb. rhamnosus* GG는 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양하여 centrifuge 후 0.9% saline에 2번 세척하고, 다시 0.9% saline에 현탁하여 10^7 cells/g이 되도록 한 후 양념에 접종하였다(Jung, et al., 2012).
- 양념과 함께 버무린 배추를 각 5kg씩 나누어 김장비닐에 담고 입구를 고무줄로 봉하였다.
- 대조군 김치는 4°C에서 바로 저장하였고, 종균 접종 김치의 경우 적정 온도를 관찰하기 위해 4°C에서 바로 저장 전에 4, 15, 25°C에 일정 기간 보관하여 숙성시켰다. 또, *Lb. rhamnosus* GG가 김치 숙성 환경에서 우점종이 될 수 있기 위한 적절 숙성 시간을 관찰하기 위하여 15°C, 25°C에서 숙성하는 김치는 24시간 보관, 48시간 보관하여 숙성 시간이 끝난 후에는 4°C에 보관하여 그 차이를 알고자 하였다.

■ Preparation of kimchi (control 5kg + starter 첨가 김치 25kg)

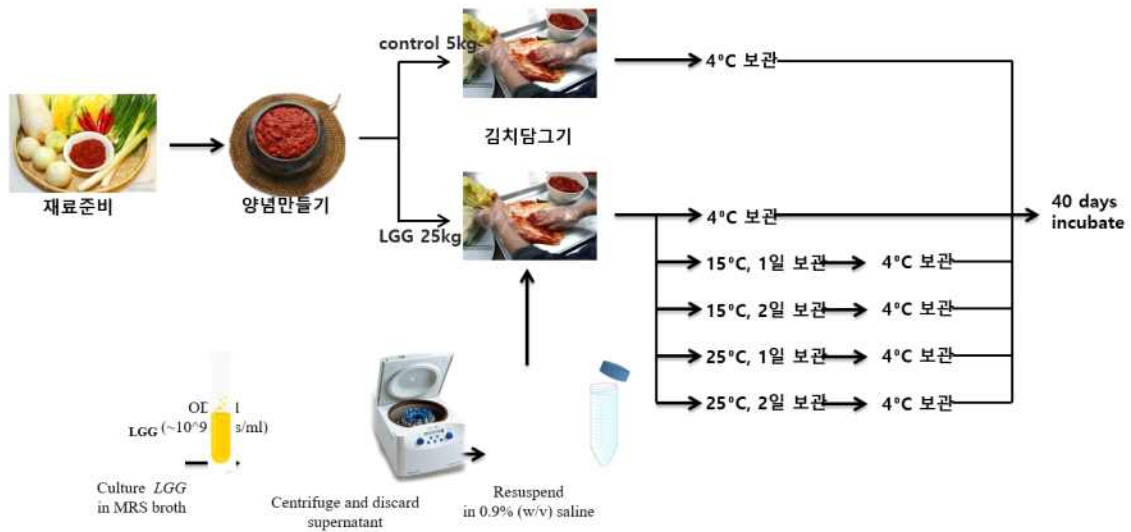


그림 57. *Lb. rhamnosus* GG를 종균으로 사용한 김치제조 방법

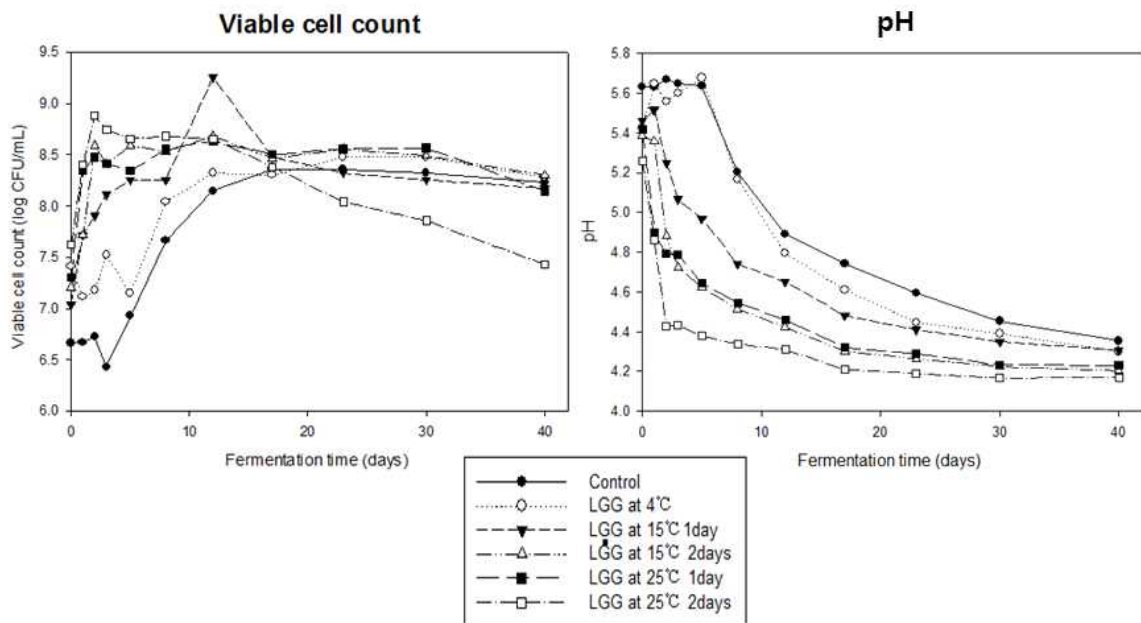


그림 58. 발효기간에 따른 pH와 생균수 변화

- 40일 간의 김치 발효 과정동안 pH는 계속 감소하고 있으나 그 변화폭이 처음에 비해 상당히 감소함. 생균수도 거의 모든 시료에서 비슷한 값으로 수렴하는 것으로 보였다. 대조군에 비해 15, 25℃에서 숙성시킨 김치가 pH가 더 낮고, 생균수가 더 많은 것을 알 수 있었다.
- 김치 발효 기간 동안 김치 내 유산균의 증식과 젖산의 생산이 나타나며 김치 내 유산균 중 *Lb. rhamnosus* GG의 우점도를 확인하기 위하여 콜로니 PCR을 이용하여 ARDRA 패턴 분석 실험을 수행한 결과 김치 발효 기간 동안의 *Lb. rhamnosus* GG 생존율이 매우 낮은 것을 확인할 수 있었다.
- 김치 종균으로써 김치발효 기간동안의 *Lb. rhamnosus* GG의 우점율을 높이기 위해서는 *Lb. rhamnosus* GG의 실험실적 진화(순화)로 인한 저온 환경 내에 고 성장을 보이는 균주로의 개량이 필요함을 알 수 있었다.
- *Lb. rhamnosus* GG는 저온에서 생장이 저하됨이 보고되었음. 이를 보완하기 위해 김치 발효 온도인 6℃ 이하의 조건에서 최상의 성장율을 갖도록 저온 내성을 갖는 것이 매우 중요한 요인으로 본 개량 연구에서는 *Lb. rhamnosus* GG의 저온내성 획득 진화 균주의 개발과 진화균주의 저온 내성 기작 규명을 목표로 진행하였다.
- 실험실 내 진화를 위하여 그림 와 같이 저온환경(최초 15℃로 시작하여 단계적으로 낮춤) 내 계대배양을 통한 저온 진화 방법을 선택하여 수행하였다.

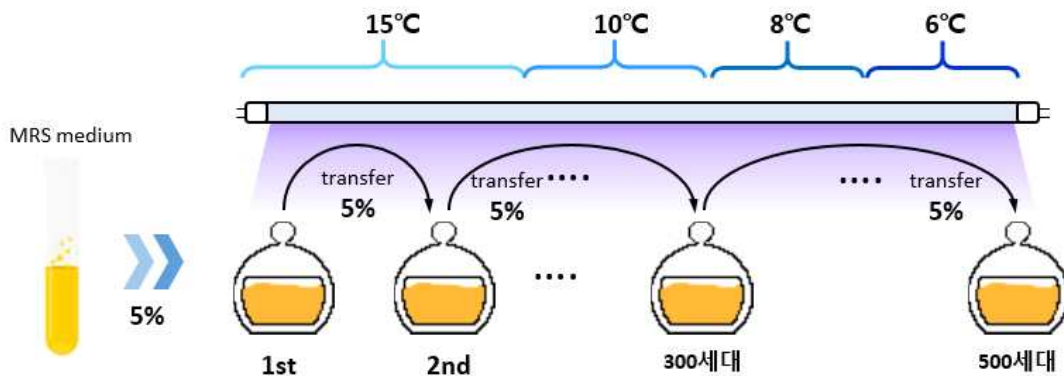


그림 59. *Lb. rhamnosus* GG의 저온성장능 향상을 위한 연속 계대배양

- 실험실내에서 진화를 유도할 때 일반적으로 연속배양 또는 계대배양(subculture)을 통해 진행하게 되는데, 저온진화를 유도하기 위해서는 일정한 온도의 조절만을 요구하므로, 계대배양(subculture)을 통해 저온진화유도를 진행하였다.
- 각각의 계대는 MRS 액체배지에서 배양한 배양액을 새로운 배지에 5% (vol/vol) 접종함으로써 진행되었다.
- MRS 액체배지에서 배양하였을 때, 접종량인 5%의 균이 약 100% 으로 증가할 때 계대 진행하였다.
- 저온 진화를 촉진 할 수 있는 방법으로 4W UV-C lamp를 저온 인큐베이터 안에 설치하여 시간당 10분 동안 lamp가 켜지도록 타이머를 설정하여 UV에 의한 진화의 단계를 추

가하였다.

- *Lb. rhamnosus* GG의 성장이 15°C 이하에서는 매우 감소하고, 4°C 이하에서는 성장이 정지함으로, 15°C 에서부터 단계적으로 온도를 저하시키기로 결정하여 현재까지 11.5°C의 온도에서 진화를 진행하고 있다.
- 매 계대시점마다 저온에서의 성장속도를 측정하여, 저온진화 여부 판단하며 계대 시점마다 배양액과, 30% glycerol을 1:1로 섞어서 -80°C 초저온 냉동고에 동결·보존하여, 차후 시행할 환경적응력 실험이나 비교 유전체 분석 수행에 이용할 수 있도록 준비하였다.

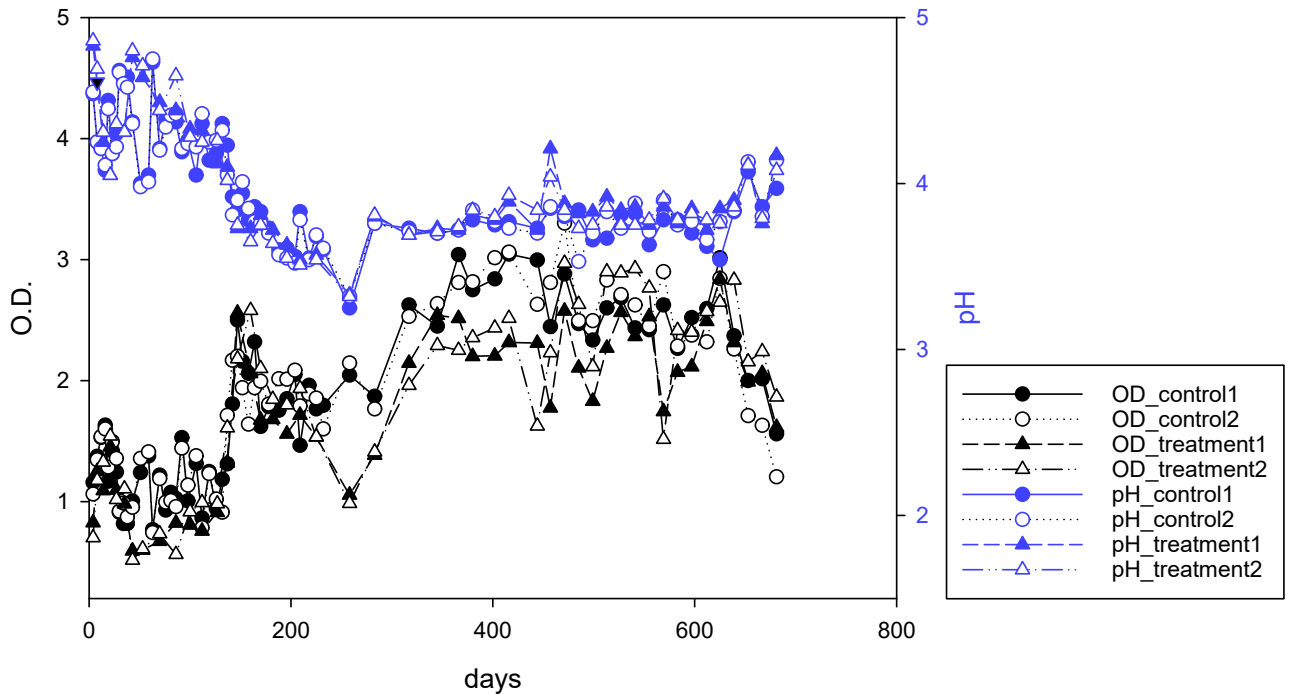


그림 60. *Lb. rhamnosus* GG의 저온성장능 향상을 위한 연속 계대배양 성장곡선

- *Lb. rhamnosus* GG 균주의 저온 진화는 약 680일을 진행하였으며 진화과정 중 600일이 지난 시점부터 *Lb. rhamnosus* GG의 성장이 감소하는 경향을 보이고 있는 상황으로 현재 11.5°C 온도 조건에 대한 적응성이 감소하여 위와 같은 결과가 나타는 것으로 사료된다.
- 온도를 꾸준히 감소하여 저온에 대한 적응 진화를 진행한 뒤 김치발효에 대한 스타터 균주로서 적용하여 김치환경 내에서의 성장과 발효능력, 기능성에 대한 조사를 수행하고자 한다.

○ 다중 오믹스 분석기술(대사체, 전사체 분석)을 이용한 개량균주 적용 김치의 발효특성 분석

- 개량된 김치 스타터 균주를 적용한 김치의 발효 특성을 규명하기 위하여 아래의 그림과 같은 순서를 통하여 분석을 수행하고자 한다(그림 61)

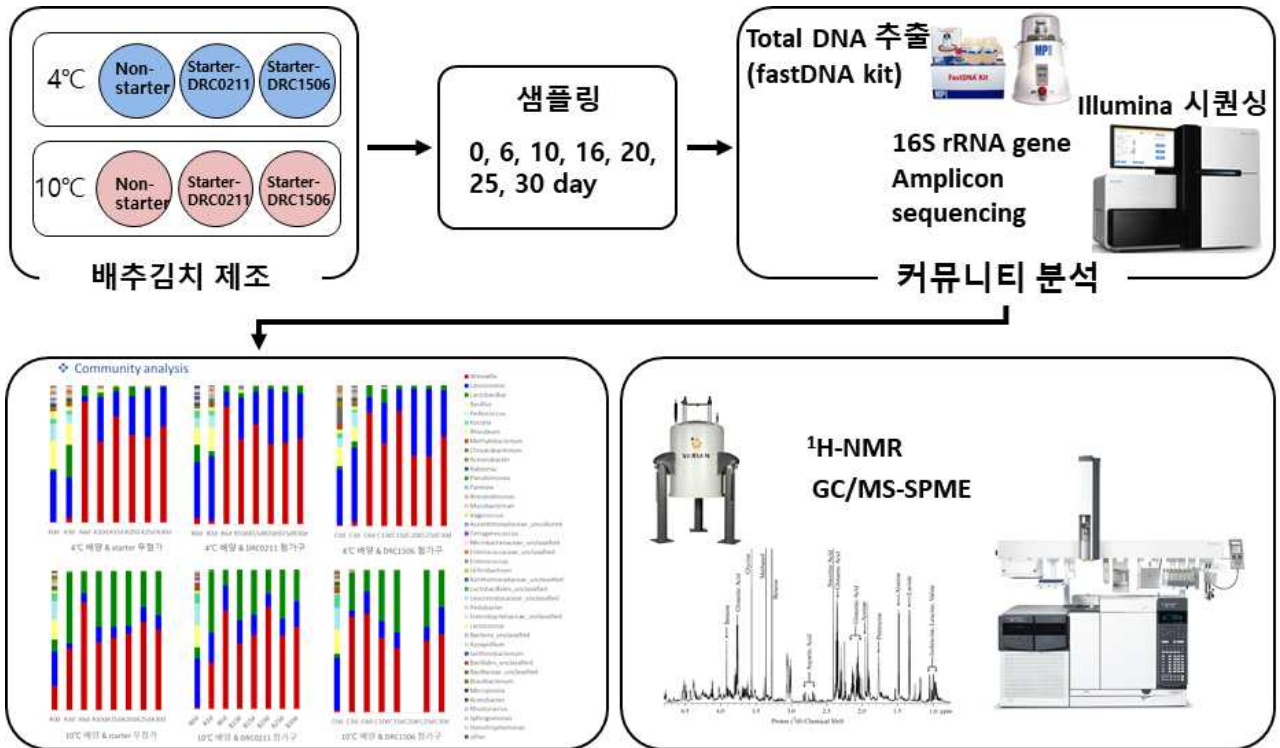


그림 61. 다중 오믹스 기술을 이용한 김치 종균 적용 김치의 발효특성 규명 과정

- 본 과정을 통하여 개량된 김치 종균을 적용한 김치의 발효 과정에 따른 미생물 군집의 변화와 대사체의 변화를 메타지노믹스 기술과 메타볼로믹스 기술을 이용하여 규명하고자 하였다.
- 미생물 군집의 변화와 대사체의 변화를 파악하기 위하여 정해진 날짜(0, 6, 10, 16, 20, 25, 30 일)에 샘플링하여 상층액과 미생물 세포를 분리하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.
- 미생물 군집이 갖는 전체 DNA를 추출하기 위하여 MPbio사의 fastDNA kit을 이용하여 전체 DNA를 추출하였다.
- DNA를 추출한 후 16S rRNA 유전자의 V3~V5 region을 증폭하는 primer set과 Illumina 시퀀싱에 사용되는 adaptor 염기서열, 그리고 barcode를 포함하는 primer set을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- 동일한 양의 증폭 DNA를 혼합하여 library를 제작한 뒤, 이를 Illumina사의 Miseq 플랫폼을 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다.
- Miseq 플랫폼을 이용한 미생물 군집의 변화 분석은 Qiime 파이프라인을 이용하였으며 이는 그림 62. 로 나타내었다.

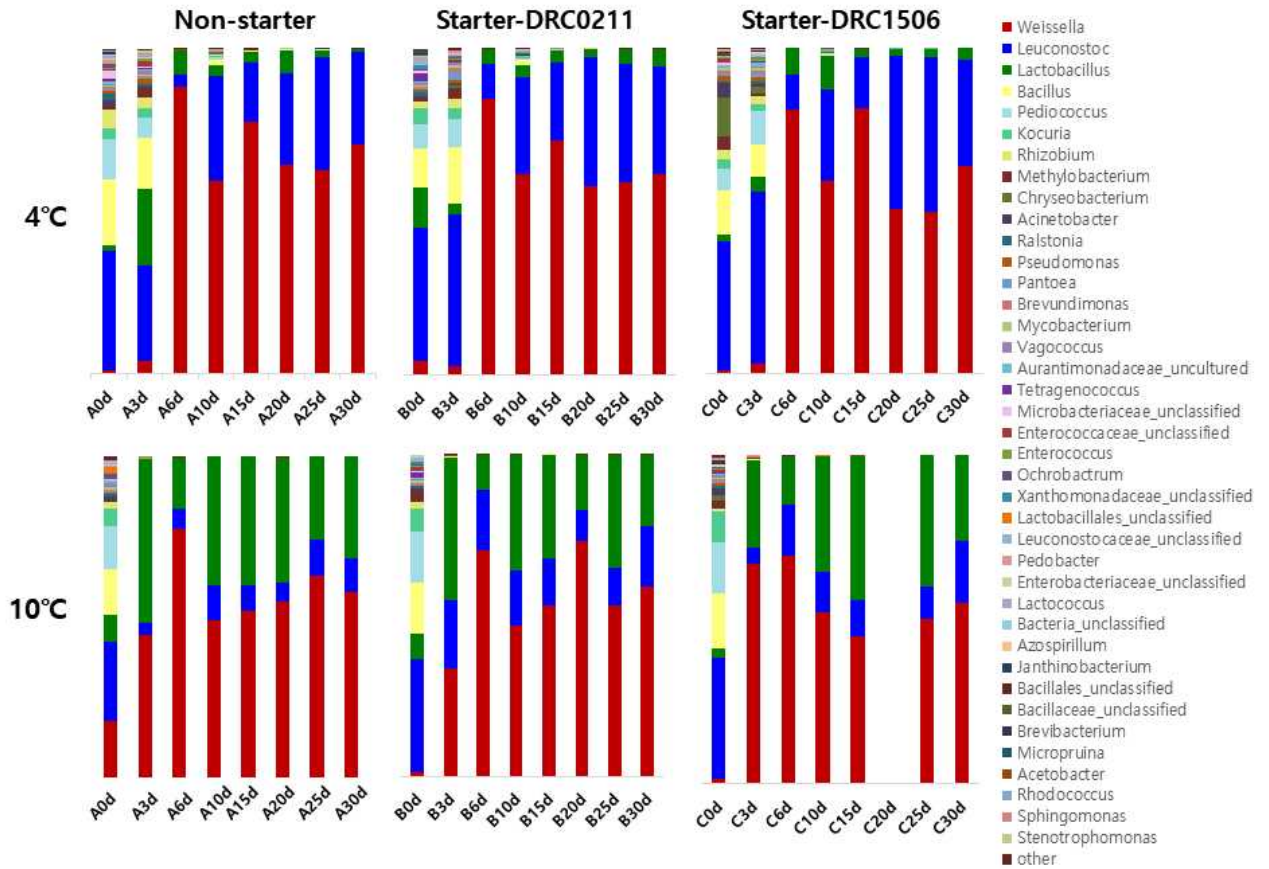


그림 62. 김치 종균 적용 김치의 발효 기간 동안의 미생물 군집 변화

- 본 연구에서 개량 김치 종균을 접종한 김치의 발효 기간 동안의 미생물 군집 변화를 관찰한 결과 본 실험조건에서의 미생물 군집은 스타터 접종 여부에 관계없이 그 군집이 거의 동일한 것을 알 수 있었다.
- 본 연구에서 온도 조건을 4°C와 10°C로 설정하여 실험하였는데, 4°C는 김치의 저장 온도이며 10°C는 상품 김치의 유통온도이다. 두 온도 조건하에서 김치 내 미생물 군집은 큰 차이를 보이고 있으며 4°C에 비하여 10°C에서 미생물 군집의 변화가 더욱 빠르게 나타나는 것을 알 수 있었다.
- 김치 종균의 접종 여부와 관계없이 4°C 조건에서 발효한 김치에서는 *Weissella*와 *Leuconostoc* 속의 미생물이 주요 미생물로 관찰되는 반면, 10°C조건에서 발효한 김치에서는 *Weissella*와 *Lactobacillus* 속의 미생물이 주요 미생물로 관찰되었다.
- 김치의 발효 중 김치발효의 온도조건이 미생물 군집의 변화에 중요한 영향을 주는 요소임을 알 수 있으며 온도에 따라 변화된 미생물 군집으로 인한 대사체 생산 양상의 차이가 있을 사료된다.
- 4°C와 10°C 온도 조건에서 발효한 김치의 발효 기간에 따른 김치 내 당과 유기산의 변화 양상은 아래 그림 63.에 나타내었다.

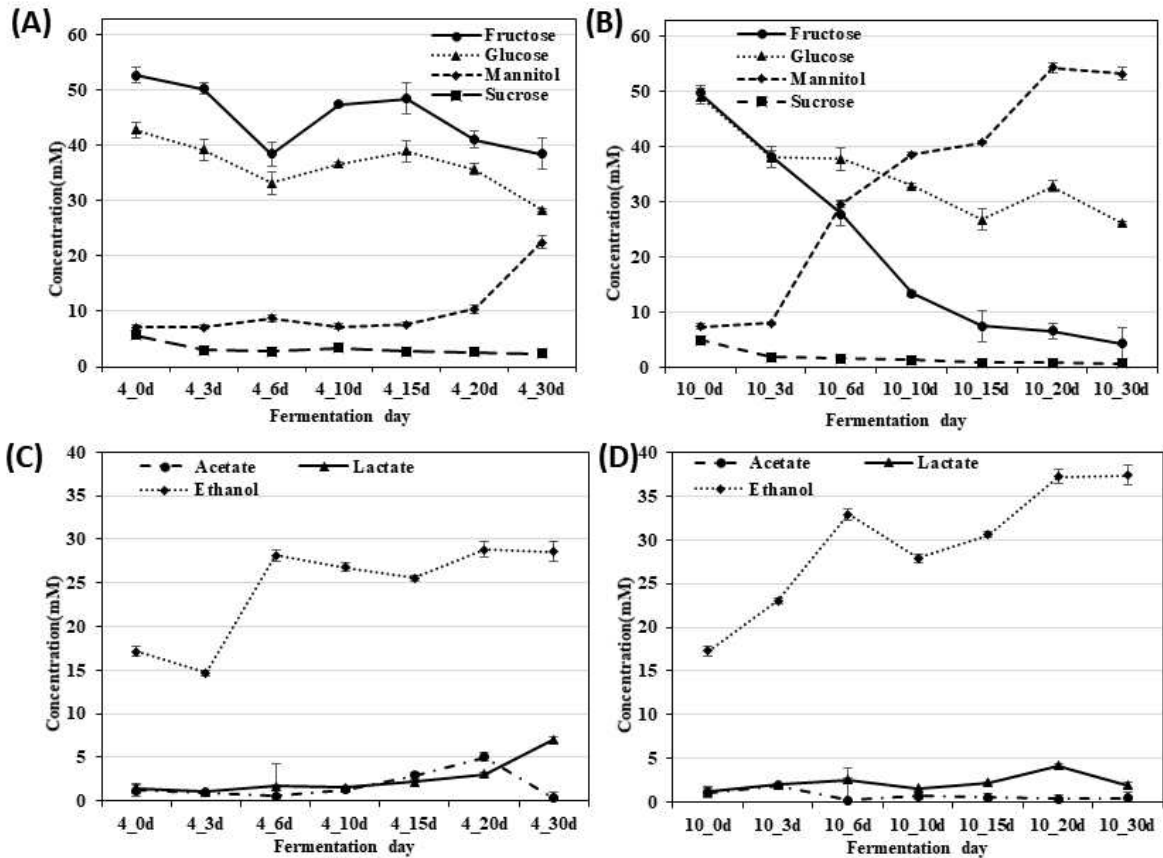


그림 63. 4°C와 10°C 온도 조건에서 발효한 김치의 발효 기간에 따른 당과 유기산의 변화 양상

- 당과 유기산의 변화양상은 4°C와 10°C 온도 조건에서 확인한 차이를 나타낸다. 4°C 발효 온도 조건에서는 과당, 포도당의 농도의 감소가 발효 30일 차에도 크게 나타나지 않는 것을 관찰 할 수 있다. 이는 10°C 발효 조건의 결과와는 차이를 나타낸다. 10°C 발효 조건에서는 과당의 농도는 큰폭 감소하였으며 포도당의 경우 그 잔존하는 농도가 매우 낮을 것을 알 수 있다.
- 이러한 결과를 통하여 4°C에 비하여 10°C 온도 조건에서 미생물에 의한 김치의 발효가 더욱 빠르게 진행되는 것을 알 수 있다.
- 김치 발효 온도 조건의 차이에 따른 김치 내 미생물 균집의 변화와 그로부터 생산되는 대사체의 변화를 관찰하기 위하여 ¹H-NMR을 통한 대사체 분석을 수행하였다.
- 그 방법으로는 김치의 상등액을 채취하여 10 mM의 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS)를 포함한 중수소수와 1:1로 혼합하여 600 MHz ¹H-NMR 측정을 수행하였다.
- ¹H-NMR의 분석 결과 아미노산의 농도는 아래의 그림 64과 같다.

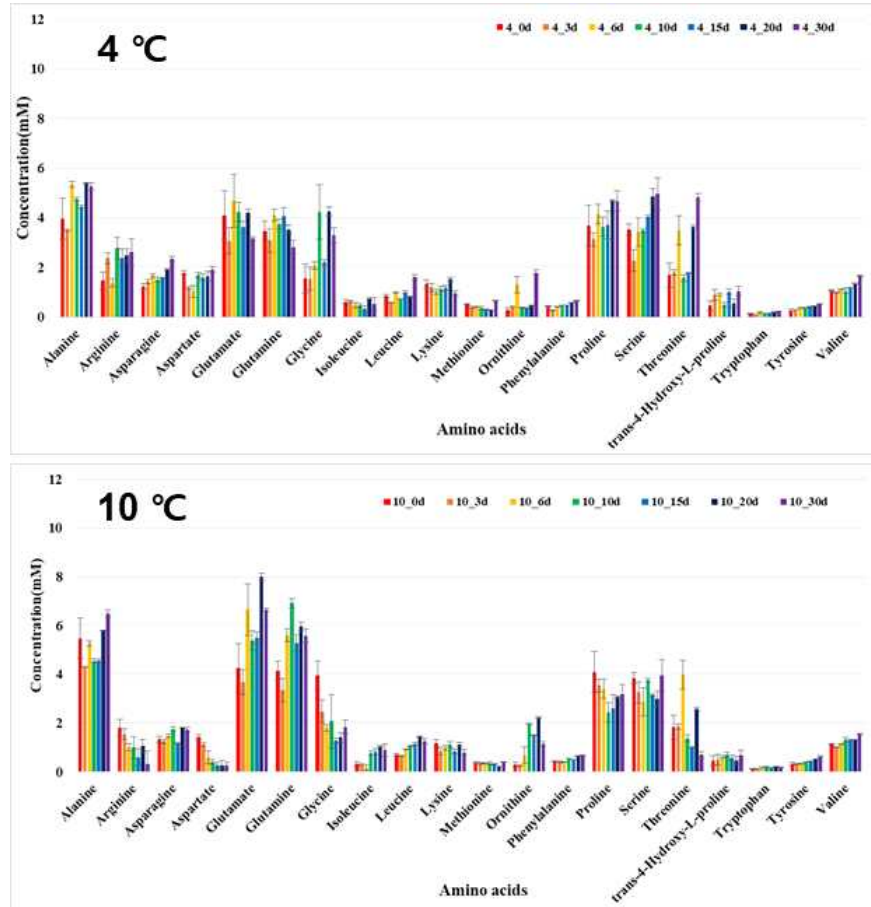


그림 64. 4°C와 10°C 온도 조건에서 발효한 김치의 발효 기간에 따른 아미노산 농도

- 4°C와 10°C 온도 조건에 따른 발효 김치 내의 아미노산의 변화 양상은 두 온도 조건에서 동일하여 큰 차이가 나타나지 않는 것을 알 수 있다.
- 발효 온도 조건에 따른 미생물 군집의 변화와 발효 김치내의 대사체의 변화를 종합적으로 분석하고자 하였다.

제 2절. 제 1협동(충북대) 연구과제: 김치유산균의 기능성 및 안전성 연구

1. 김치유산균의 유전체 연구

가. 김치유산균 중 발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 분석

○ *Leu. lactis* EFEL005 Draft genome 서열 분석

- EFEL005균주의 경우 프로바이오틱 특성을 보이는 김치 유산균으로 기존의 우유에서 분리한 (KCTC 3528) type strain과 다른 특징을 가지고 있어 유전체 정보서열을 해독했다(그림 65).

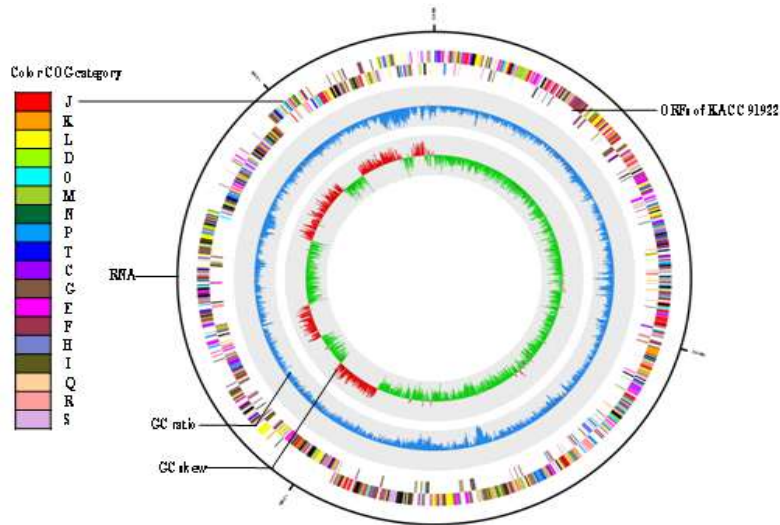


그림 65. *Leu. lactis* EFEL005 유전자 지도

- 균주의 genome size는 1,688,202bp이며 GC contents 43.43%, Contigs 35, Scaffolds 32 로 분석되었다.

○ *Leu. citreum* EFEL 2700 NGS 분석

- 차세대 김치 스타터 균주로서 이용 될 수 있는 균주인 *Leuconostoc citreum* EFEL 2700 균주와 그 플라스미드의 NGS 서열 분석을 통해 농업생명공학정보센터(NABIC)에 생명정보를 등록하였다.

생명정보 등록 확인서				생명정보 등록 확인서			
시행구분	국외소재	사실관	등록번호	시행구분	국외소재	사실관	등록번호
주한연구자세명	국문	김지용산감의 유전학적 기능성 및 안전성 연구	9160204158010	주한연구자세명	국문	김지용산감의 유전학적 기능성 및 안전성 연구	9160204158010
영문	Geomic study of kimchi lactic acid bacteria on health function and safety			영문	Geomic study of kimchi lactic acid bacteria on health function and safety		
주한연구책임자	소속 및 부서명	장영남대학교 의과대학 교수		주한연구책임자	소속 및 부서명	장영남대학교 의과대학 교수	
	성명	(한글) 장영남 (영문) Cho Ok Jeon			성명	(한글) 장영남 (영문) Cho Ok Jeon	
공동 연구책임자	소속 및 부서명	충주대학교 의과대학 교수		공동 연구책임자	소속 및 부서명	충주대학교 의과대학 교수	
	성명	(한글) 한상수 (영문) Nam Soo Han			성명	(한글) 한상수 (영문) Nam Soo Han	
연락처	(전화) 010-4218-3298 (E-mail) namsoo@chma.ac.kr			연락처	(전화) 010-4218-3298 (E-mail) namsoo@chma.ac.kr		
연구/실용 연구/특허명	(내부) 김지용산감의 유전학적 기능성 및 안전성 연구			연구/실용 연구/특허명	(내부) 김지용산감의 유전학적 기능성 및 안전성 연구		
ATIS 연계정보	<i>Leuconostoc citreum</i>			ATIS 연계정보	<i>Leuconostoc citreum</i>		
생명정보	Genome	생물정보	WGSI	생명정보	Genome	생물정보	WGSI
등록번호	생물정보명	등록내용	연수	등록번호	생물정보명	등록내용	연수
			총량				총량
등록			1	1.14 MB			4
내용			3,828,308	3,828,308			34,338,308
계			1	1.14 MB			4
				3,828,308			34,338,308
"생명연구자원의 확보 권리와 활용에 관한 법률" 제10조(2010.3)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(NABIC)에 등록되었습니다.				"생명연구자원의 확보 권리와 활용에 관한 법률" 제10조(2010.3)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(NABIC)에 등록되었습니다.			
2017년 10월 26일				2017년 10월 26일			
국립농업과학원장 (직인)				국립농업과학원장 (직인)			

그림 66. *Leu. citreum* EFEL 2700 균주와 그 플라스미드의 생명정보 등록

표 27. *Leu. citreum* EFEL 2700 균주와 그 플라스미드의 NGS 서열 분석 결과

No	유전체, 유전자원 명칭	분석내용	등록필증번호	용량
1	<i>Leuconostoc citreum</i> EFEL 2700	complete genome	NG-0897-000001	1.14 MB 1.82Mbp
2	<i>Leuconostoc citreum</i> EFEL 2700 (plasmid)	complete genome (4건)	NG-0898-000001~ NG-0898-000004	63.67KB 94.58kbp

- *Leuconostoc citreum* EFEL 2700 (NG-0897-000001)의 유전체 크기는 1.82Mbp, 그 플라스미드 4건 (NG-0898-000001 ~ NG-0898-000004)의 유전체 크기는 94.58kbp 로 분석되었다.

2. 김치유산균의 안전성 및 효능 연구

가. *Leu. lactis* EFEL005 균주 안전성 및 효능 연구

① 안전성

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 산 내성

- EFEL005균주의 경우 김치 유래 유산균으로써, 프로바이오틱 특성을 가진 균주이다.

표 28. *Leu. lactis* EFEL 005의 내산성

Strain	Initial mean counts (Log CFU/ml)	pH 2.0 (Log CFU/ml)	pH 3.0 (Log CFU/ml)
<i>L. lactis</i> KCTC 3528 ^T	9.32±0.10	4.48±0.05	8.60±0.05
<i>L. lactis</i> M	9.23±0.08	6.19±0.10	8.62±0.06
<i>L. lactis</i> EFEL005	9.29±0.03	6.31±0.09	8.72±0.04
<i>L. lactis</i> K8	9.20±0.05	5.50±0.06	8.60±0.05
<i>L. lactis</i> KCTC 3773	9.32±0.09	4.24±0.11	8.79±0.08
<i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	9.20±0.17	4.03±0.15	4.85±0.26
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	9.64±0.01	8.67±0.05	9.41±0.12

* All values are means ± standard deviation

- 내산성 시험은 HCl 용액을 사용하여 pH 2.0 및 3.0으로 각각 조정된 MRS 액체배지에 유산균 배양액을 10% 접종하고, 37℃에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정했다.
- EFEL005 균주의 경우 pH 3.0에서 산내성을 보였으며 이는 LGG균주보다는 다소 낮은 산내성 특성이지만, 같은 *Leuconostoc* 종에 비해서 높은 내산성을 보였다.

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 담즙내성

표 29. *Leu. lactis* EFEL005의 내 담즙 산성

Strain	Initial mean counts (Log CFU/ml)	0.3% (Log CFU/ml)	0.4% (Log CFU/ml)
<i>L. lactis</i> KCTC 3528 ^T	9.32±0.10	7.36±0.07	5.79±0.06
<i>L. lactis</i> M	9.23±0.08	7.27±0.11	5.85±0.04
<i>L. lactis</i> EFEL005	9.29±0.03	7.59±0.06	6.08±0.08
<i>L. lactis</i> K8	9.20±0.05	7.87±0.01	5.74±0.04
<i>L. lactis</i> KCTC 3773	9.32±0.09	6.60±0.11	5.57±0.07
<i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	9.20±0.17	4.49±0.19	4.23±0.07
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	9.64±0.01	8.65±0.04	7.77±0.03

* All values are means ± standard deviation

- 내 담즙 산성 시험은 담즙(Oxgall, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 0.3%가 첨가된 MRS 액체배지에 유산균 배양액을 10% 접종하여 37°C에서 4시간 배양한 후 담즙을 첨가하지 않은 대조군의 생균수와 비교하여 생존율을 계산했다.
- EFEL005 균주는 0.3% 담즙산의 함량에서는 GG균주보다는 낮은 내 담즙 산성을 보이지만, 같은 *Leuconostoc* 종에 비해서 높은 내 담즙 산성을 보였다.

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 항생제 내성

표 30. *Leu. lactis* EFEL005의 항생제 내성

Antibiotic (µg/ml)	Strain					EFSA Breakpoint (µg/ml)
	<i>L. lactis</i> KCTC 3528 ^T	<i>L. lactis</i> M	<i>L. lactis</i> EFEL005	<i>L. lactis</i> K8	<i>L. lactis</i> KCTC 3773	
Ampicillin	1	1	1	1	1	2
Vancomycin	>512	>512	>512	>512	>512	n.r.
Streptomycin	8	16	8	16	16	64
Penicillin G sodium	1	1	1	1	1	n.a.
Kanamycin	16	16	8	16	16	16
Novobiocin	4	4	4	4	4	n.a.
Chloramphenicol	4	4	2	2	2	4
Ciprofloxacin	2	2	2	2	1	n.a.
Erythromycin	1	1	1	1	1	1
Rifampicin	1	1	1	1	1	n.a.
Tetracyclin	2	2	2	2	2	8

* LAB with MICs higher than the EFSA breakpoints are considered as resistant strains . n.r., not required; n.a., not available.

* All values are means ± standard deviation

- 모든 균주는 vancomycin을 제외하고 모든 항생제에 대해 민감하였고, 원래 *Leuconostoc*은 원래 vancomycin 내성을 가지고 있음. 또한, 식품 관련 유산균들이 가지는 항생제 내성과

비교하면 다른 균주들에 비해 내성 유전자가 적은 것으로 나타났다.

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 biogenic amines 유전자 유무

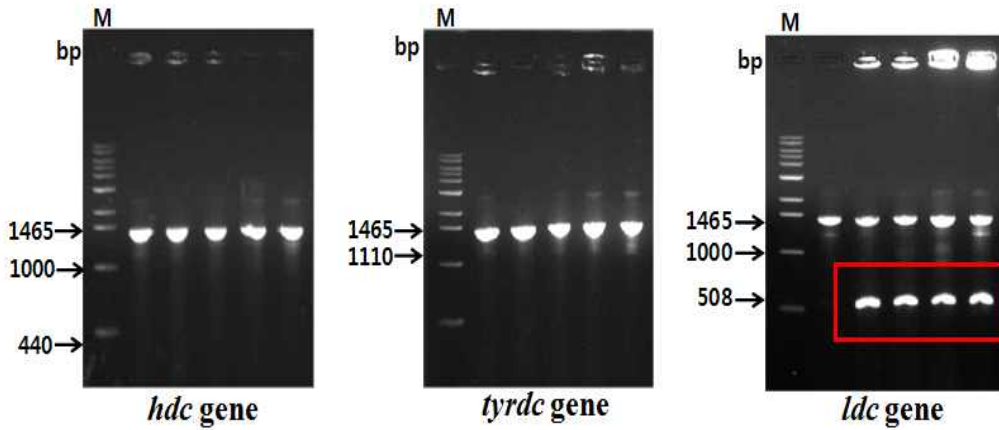


그림 67. *Leu. lactis* EFEL005의 Biogenic amines 유전자 검출

- Biogenic amines을 생성하는 gene의 유무를 확인하기 위해, genome data 분석 결과 lysine decarboxylase gene이 존재하였고 이를 PCR을 통해서 확인한 결과, Lysine을 제외한 Tyrdc 와 Hdc 유전자는 존재하지 않았다.

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 용혈성 시험

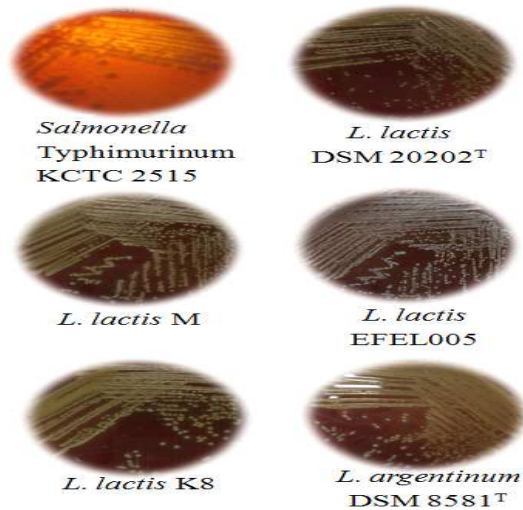


그림 68. *Leu. lactis* EFEL005의 용혈현상 실험

- 용혈성 검사에서 *Leu. lactis* EFEL005은 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 환이 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않았다.
- 대조균으로 사용한 KCTC 2515는 균체 주위 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환을 생성하여 용혈반응을 일으켜 유해균으로 판단된다. 유산균은 GRAS 등급 미생물로 안전하고 유익한

균종임이 이미 밝혀져 있으나 본 연구에서는 김치로부터 분리된 신규 *Leu. lactis*이 유해균에 대하여 항균작용은 있으나 용혈성과 같은 유해 작용이 전혀 없음을 검증하였다.

② 기능성

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 항균활성

표 31. *Leu. lactis* EFEL005의 항균활성 특성

Strain	Inhibition(pathogen)			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. lactis</i> KCTC 3528 ^T	+	+	+++	+
<i>L. lactis</i> M	+	+	+++	+
<i>L. lactis</i> EFEL005	+	+	++	+
<i>L. lactis</i> K8	++	++	+++	++
<i>L. lactis</i> KCTC 3773	+	+	++	+

+ , 10-15mm; ++, 16-19mm; +++, 20-23mm; -, no inhibition zone

- 분리 유산균 EFEL005의 항균 spectrum을 알아보기 위하여, 병원성 세균인 *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Bacillus cereus* KCTC1092를 검정균주로 사용하여 생육 저해 여부를 조사했다. 이를 위하여 각 검정균주를 도말한 배지 위에 종이디스크(paper disk)를 올리고 그 위에 분리 유산균 배양액 150 μ l를 분주한 다음, 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 penicillium 주변에 형성된 투명환 (Clear Zone) 의 직경을 측정함으로써 저해환(inhibitor zone)의 형성여부를 확인하였다.
- (표 31.) 에서 보여지는 바와 같이, EFEL005의 배양액에 의하여 생성된 저해환 크기. 즉, EFEL005 균주는 모든 검정균주들의 생육을 저해하는 활성을 나타냈다. 본 시험의 검정균주들은 김치에서 자주 발생하는 식중독 원인균으로서 지금까지 류코노스톡 락티스속의 균주 중에서 이들 검정균주들을 모두 저해하는 활성을 나타내는 균주는 보고된 바가 없다.
- 항생제 감수성을 European Food Safety Authority(2008)의 지침에 따라 다음 11종의 ampicillin, vancomycin, streptomycin, penicillin G sodium, kanamycin, novobiocin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, rifampicin, tetracycline(Sigma, St. Louis, MO, USA) 항생제에 대하여 Minimal Inhibitory Concentrations(MIC) 방법으로 측정하였으며, 결과를 아래의 표 4. 에 나타내었다. 실험의 대조균으로 *Leu. lactis* KCTC 3528T균주를 사용하였다.
- EFEL005는 기존의 *Leu. lactis* 균주와 동등한 항생제 내성을 보이며, Vancomycin에 대한 내성만을 가지고 있음을 확인하였다. Vancomycin은 *Leuconostoc* 균주의 세포벽 조성의 차이에서 유래하는 본원적 항생제 내성으로서타세균으로는 전이되지 않는 형질이다. 따라서, 본 균주는 프로바이오틱스의 요구조건인 비전이항생제내성(non-transferable antibiotic genes)을 가지는 것으로 항균활성 시험은 Paper disc 방법이용 각 균주의 상등액을 유해 미생물을 indicator로 하여 측정하였다.

○ *Leu. lactis* EFEL005 의 dextran 생성능

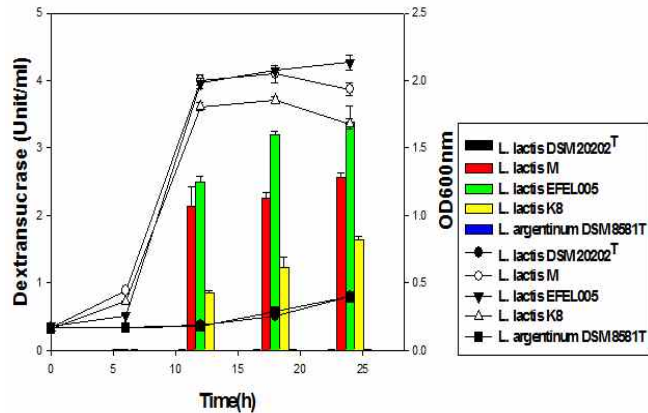


그림 69. *Leu. lactis* EFEL005의 Dextranase 효소 활성

- 에탄올 침전법으로 텍스트란 생성량을 측정하고 DNS법으로 fructose의 농도변화로 효소 활성을 측정한 결과, 밀크 유래의 *Lb. lactis*는 텍스트란을 생성하지 않았고, 효소 활성도 측정되지 않았으며, 김치 유래의 *Lb. lactis* EFEL005가 3.3 Unit/ml의 효소 활성이 측정되었다.
- 텍스트란은 포도당으로서 알파 1-6 당쇄구조를 가지는 다당류이며, 미생물에 의해 주로 생성됨. 식품으로 섭취하는 경우 위와 소장에서 분해되지 않은 상태로 대장에 도달하여 장내세균에 의해 발효되어 단쇄 지방산을 생성함으로써 잡균의 성장을 억제하는 물질이다.
- EFEL005 균주의 텍스트란 생성량을 측정하기 위하여 S-배지(sucrose 24.7 g, peptone 4.2 g, yeast extract 4.2g, K₂HPO₄ 20g, MgSO₄·2H₂O 0.2g, NaCl 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnSO₄·H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.13 g/L D.W)에서 배양한 다음, 에탄올 침전법을 이용하여 측정하였다. 실험의 대조균으로 *Lb. lactis* KCTC 3528균주를 사용했다.

<i>L. lactis</i> EFEL005	20.1 (mg/ml)
<i>L. lactis</i> KCTC 3528T	1.3 (mg/ml)

- 우유에서 유래한 KCTC 3528 균주는 텍스트란을 생성하지 않은 반면, 김치 유래의 분리균주인 *Leu. lactis* EFEL005는 20 mg/ml의 텍스트란을 생성했다.

표 32. *Leu. lactis* EFEL005의 유전체 비교 분석

Feature	EFEL005	KCTC 3528T	KCTC 3773
Genome size (bp)	1,688,202	2,011,205	1,720,683
G+C Content (%)	43.43	42.64	42.89
Chromosomes	0	0	0
Plasmids	0	0	0
Contigs	35	1,151	98
Scaffolds	32	1,151	98
rRNA genes	3	3	3
tRNA genes	50	46	48
Predicted ORFs	1,644	2,727	1,759
Genes encoding signal peptides by SignalP (%)	4.86	2.78	3.92
Isolated from	Kimchi	Milk	Raw milk
GenBank number	PRJNA244961	PRJNA68683	PRJNA64589

- EFEL005는 김치 유래 유산균이며, KCTC 3528와 비교 하여 Signal peptide가 전체 유전체 중 4.86 % > 2.78 % 로 확인됐다.
- 분리된 균주 EFEL005의 생화학적 특성을 VITEK2 COMPACT(BioMerieux, France)를 사용하여 측정했다. Gram Positive Colorimetric Identification Card를 이용하여 총 43개의 생화학적 특성을 조사하였다. 실험의 대조군으로 L. lactis KCTC 3528 균주를 사용했다.
- EFEL 005균주는 N-acetyl-D-glucosamine, Dmaltose, Bacitracin resistance, Novobiocin resistance, D-mannitol, D-mannose, Saccharose/Sucrose, Optochin Resistance에 대해 반응을 나타내는 것을 확인하였다.

○ EFEL005 균주의 프리바이오틱스 이용특성

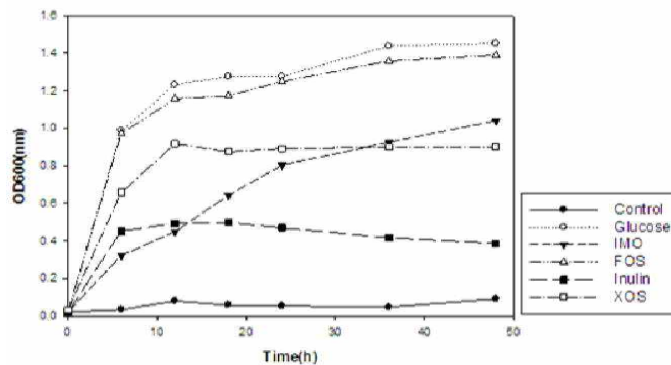


그림 70. 공시균주로 specific PCR 결과

- EFEL 005 균주의 프리바이오틱스 이용특성을 분석하기 위하여, 다음과 같은 상업용 프리바이오틱스에 대한 생장을 분석하였다. IMO, FOS, XOS (Wako,Japan), Inulin(VIXXOL), Glucose(Sigma). 전 배양으로 우선, EFEL005 균주를 MRS-배지(5 ml)에서 30°C 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 유산균을 원심분리(7000 rpm, 5 분)하여 pellet을 얻은 다음, 0.85% 염화나트륨(sodium chloride)으로 2회 세척하고 다시 1%로 보정하여 균체를 얻었다. 글루코스가 없는 MRS 배지(30 ml)에 각각의 프리바이오틱스 2%가 포함되도록

조성한 배지에서 상기 균체를 각각 배양하면서 6시간 간격으로 OD 660nm에서 세포의 성장을 측정하였다.

③ *Leuconostoc lactis*-specific PCR 방법을 통한 균주 분리

- *Leu. lactis*의 genome sequencing을 통해 얻은 genome data로 specific PCR 프라이머 디자인하고 이 방법을 김치에 적용하여 균주를 분리했다.

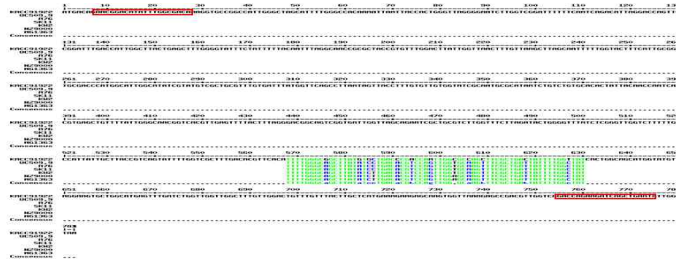


그림 71. target gene을 다른균주와의 alignment 결과

- genome data로부터 여러 개의 hypothetical protein을 찾아 NCBI의 blast를 통해 다른 균주와 상동성이 가장 적은 gene으로 프라이머를 디자인하였다.

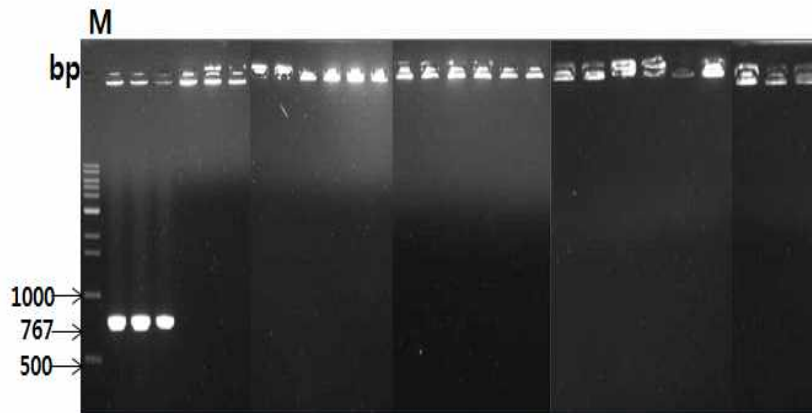


그림 72. 공시균주로 specific PCR 결과

- 16종의 *Leuconostoc*과 2종의 *Weissella*, 9종의 *Lactobacillus*의 공시균주와 PCR 한 결과 *Leu. lactis*에서만 특이적으로 증폭되었다.

나. *Leu. mesenteroides* DRC1506와 *Leu. citreum*의 안정성 및 효능 연구

① 안전성

- 장내 정착을 위한 위산 내성, 담즙산 내성 기작 규명 및 관련 유전자 분석
 - 균주의 장관안정성을 측정하기 위하여 *Leu. citreum* EFEL2061, *Leu. lactis* EFEL005, *Leu. mesenteroides* DRC1506의 내산성과 내담즙산성을 측정하였다.
 - 내산성 실험은 HCl 용액을 사용하여 pH 2.0 및 3.0으로 각각 조정한 50mM의 Sodium phosphate buffer에 유산균 배양액을 10% 접종하고, 30°C에서 2시간 배양한 후 생존수를 측정했다.

- 내 담즙 산성 실험은 담즙(Oxgall, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 0.3, 0.4%가 첨가된 MRS 액체배지에 유산균 배양액을 10% 접종하여 30℃에서 180분 배양 후 생균수를 측정했다.

표 33. *Leu. mesenteroides* DRC1506의 내산성

Strain	Initial mean counts (Log CFU/ml)	pH 2.0 (Log CFU/ml)	pH 3.0 (Log CFU/ml)
<i>Le. mesenteroides</i> DRC1506	9.83±0.08	4.65±0.08	4.96±0.06
<i>Le. lactis</i> EFEL005	9.73±0.08	0	8.94±0.23
<i>Le. citruem</i> EFEL2061	9.48±0.17	0	0
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	9.67±0.03	8.41±0.11	9.10±0.06

* All values are means ± standard deviation

표 34. *Leu. mesenteroides* DRC1506의 내 담즙산성

Strain	Initial mean counts (Log CFU/ml)	0.3% (Log CFU/ml)	0.4% (Log CFU/ml)
<i>Le. mesenteroides</i> DRC1506	9.52±0.09	0	0
<i>Le. lactis</i> EFEL005	9.11±0.02	8.14±0.02	7.64±0.28
<i>Le. citruem</i> EFEL2061	9.37±0.06	6.62±0.02	3.31±0.28
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	9.26±0.10	4.25±0.13	4.69±0.03

* All values are means ± standard deviation

- *Leu. citruem* EFEL2061, *Leu. mesenteroides* DRC 균주의 내산성을 측정한 결과 pH 2.0, 3.0에서 모두 낮은 내산성을 나타냈다. 내담즙산을 측정한 결과 담즙산 농도 0.3, 0.4에서 매우 낮은 내 담즙산 성을 나타냈다. 반면 *Leu. lactis* EFEL005 균주는 위 조건에서 각각 높은 내성을 보여 위산과 소장 담즙산에서 다수 생존하여 대장에 도달할 것으로 판단된다.
- *Leu. lactis* EFEL005 균주는 류코노스톡 속 균주 중에서 가장 프로바이오틱스 가능성이 높은 후보로 판단된다. 반면 *Leu. citruem* EFEL2061, *Leu. mesenteroides* DRC 두 균주는 산내성과 담즙산내성 향상을 위한 실험실 진화기술을 이용하는 전략이 요구된다.

○ Biogenic amine 생성 효소 amino acid decarboxylases 관련 유전자 분석

- Histidine, Tyrosine decarboxylase gene을 specific primer를 제작하여, PCR을 통해 gene의 유무를 실험을 통해 알아보았다.
- 다음과 같은 조건으로 PCR을 진행하였으며, Specific primer는 Coton의 논문을 참고 하여 제작하였다.

<PCR>

Pre-denaturation	95 °C, 5min	} 35 cycles	Master mix	10 µl
Denaturation	95 °C, 45s		Primer	2 µl
Annealing	52 °C, 45s		DNA	1 µl
Extension	72 °C, 1.25min		D.W	25 µl
Final extension	72 °C, 5min		total	40 µl
	4 °C, ∞			

Gene	Primer	Sequence(5' to 3')	Reference
histidine decarboxylase (hdc)	HDC3	GATGGTATTGTTTCKTAIGA	Coton, 2005
	HDC4	CAAACACCAGCATCTTC	
tyrosine decarboxylase (tyrdc)	TD2	ACATAGTCAACCATRITGAA	Coton et al. 2004
	TD5	CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	

그림 73. PCR 조건 및 specific primer 서열



그림 74. *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주의 Biogenic amines 유전자 검출

- *Leu. citreum* EFEL2061, *Leu. lactis* EFEL005, *Leu. mesenteroides* DRC 균주는 Histidine, Tyrosine decarboxylase gene을 PCR을 통해 확인한 결과 biogenic amine 생성관련 유전자를 가지고 있지 않은 것을 확인 했다.
- 상기 3개 균주는 발효과정에서 건강에 해로운 대사산물을 생성하지 않는 유산균으로 우수한 프로바이오틱스 후보 균주라 판단된다.

② 유전체 분석을 통한 기능성 규명

- 비타민 K, B9 생성능, 난소화성 소당류 (stachyose, raffinose 분해능
- 1차년도에 선발한 *Leuconostoc* 속 균주를 대상으로 미생물 난소화성 다당류인 stachyose, raffinose와 같은 다당류를 분해하는 능력을 측정하였다.

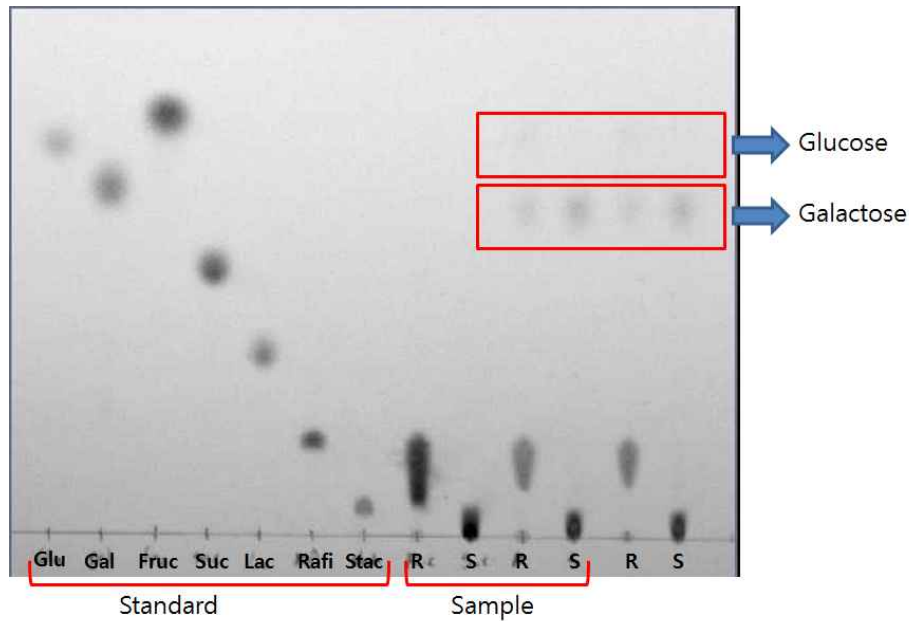


그림 75. *Leu. mesenteroides* DRC1506의 난소화성 다당류 분해능 측정

- *Leu. citreum* EFEL2061, *Leu. lactis* EFEL005, *Leu. mesenteroides* DRC 균주가 난소화성 다당류 stachyose, raffinose를 분해하여 galactose와 glucose가 생성되었다. 분석 결과 α -galactosidase 유전자를 보유한다고 판단된다.
- 따라서, 콩 발효시 가스발생을 억제하고 난소화성 당을 이용하여 생육이 가능함을 확인했다. 본 균주는 식물성 원료 발효에 적합한 프로바이오틱 후보균주로 판단된다.

○ *Leuconostoc citreum* EFEL2061의 면역 조절 활성

- 김치에서 분리한 *Leu. citreum* EFEL2061 균주를 이용하여 면역활성을 측정하였다.
- *Leu. citreum* EFEL2061를 배양 후 Th2-매개 면역조절 활성을 확인하였다.

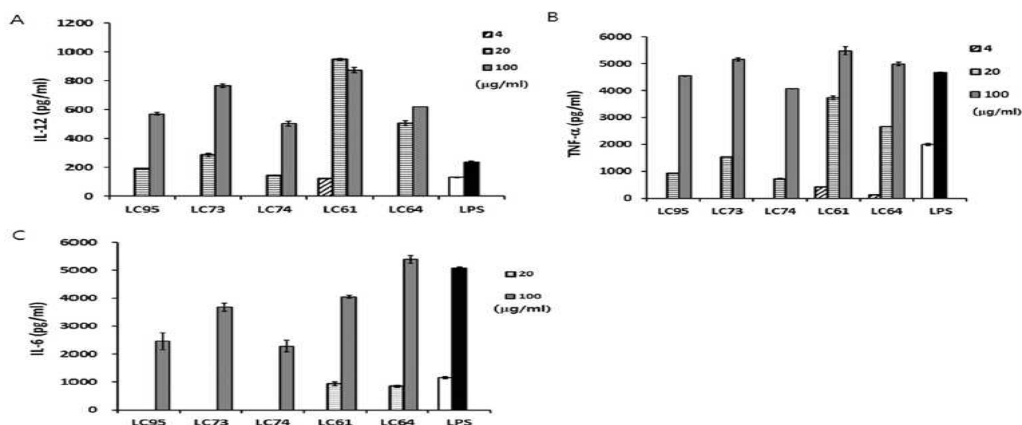


그림 76. 김치에서 면역에 관여하는 IL-12, TNF- α , IL-6를 다량 생성하는 *Leu. citreum* EFEL2061의 분리

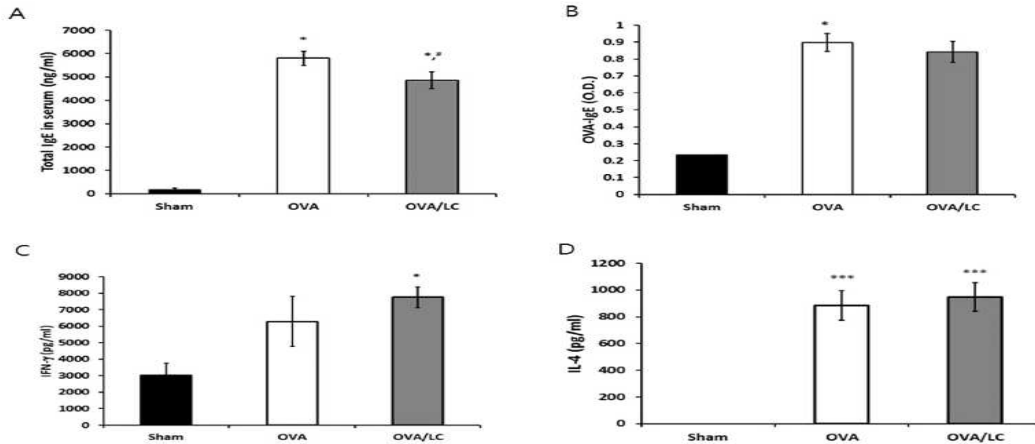


그림 77. *Leu. citreum* EFEL2061을 투여한 쥐에서의 사이토카인 분비량 측정

- 면역 활성화에 관여하는 IL-12, TNF- α , IL-6 를 다량 생산 하는 *Leu. citreum* EFEL2061 균주를 김치에서 분리하였으며, 본 균주를 배양하여 얻은 배양액을 복강대식세포가 배양된 쥐의 장내 상피세포에 투여시 면역 활성화에 관여하는 사이토카인 분비량이 증가하여 Th2-매개 면역조절에 영향을 주는 것을 in vitro 상에서 확인하였다.
- 김치로부터 분리한 균주 *Leu. citreum* EFEL2061가 면역활성에 도움을 주는 사실을 실험을 통하여 입증하였다.

○ *Leu. mesenteroides* DRC 1506균주의 동결건조물을 이용한 면역 활성화 측정

- 대식세포 분리 및 배양 : 마우스 복강에 3.5% tioglycollate media (BD, Sparks, MD, USA) 2ml을 주사하였다. 4일 후에 마우스를 경추탈골한 후, 복강에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Utah, USA), 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM (Hyclone) 8ml을 주사하여 대식세포를 수집했다. 1000rpm에 10분 원심분리하고 대식세포를 배지로 suspension한 후 세포수를 Countess II FL Automated Cell Counter (Life Technologies)를 이용하여 측정했다. 실험에 필요한 대식세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에 overnight 배양해 바닥에 붙지 않은 대식세포는 제거하고 100ng/ml LPS로 24시간 자극하여 ex vivo 염증반응을 유도한 후 배지와 대식세포를 회수했다.
- 사이토카인 측정 : 사이토카인 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용하여 측정했다. TNF- α , IL-6 Duoset (R&D Systems, USA), IL-12 OptEIA set (BD, USA)을 사용하였으며 제조사의 프로토콜을 따라 ELISA를 수행했다.

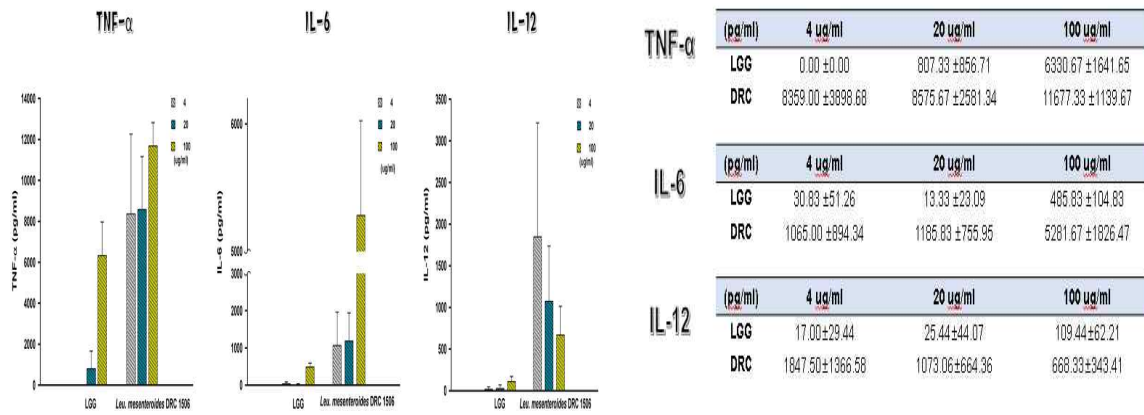


그림 78. 및 표 . 분리균주의 면역활성 유도능

- 마우스 복강 대식세포의 TNF-α, IL-6 분비는 균의 농도에 따라 증가하는 경향을 보이나, IL-12는 다른 사이토카인과 달리 최고 농도인 100 ug/ml보다 4-20 ug/ml의 균을 처리하였을 때 유도능이 높게 나타난 경향을 보였다. 시험 한 *Leu. mesenteroides* DRC 1506균주는 대조균으로 사용한 LGG(*Lb. rhamnosus* GG)균주보다 면역 활성 유도능이 높은 것을 확인했다.

○ *Leu. mesenteroides* DRC 1506의 β-glucosidase 활성능 조사

- *Leuconostoc* 속 균주가 glucose free(adding cellobiose) 조건에서 생성하는 βglucosidase 효소가 배당체를 분해하는 능력을 측정하기 위해 β-Glucosidase gene screening 했다.
- NCBI 사이트를 통하여 유산균(*Lactobacilli*, *Lactococci*, *Leuconocae*, *Weisella*, *Bifidobacteria*)을 대상으로 전체유전체를 검색하고 β-glucosidase 효소 유전자를 데이터베이스로 저장, 각각의 유전자 서열과 아미노산서열을 상대 비교하여 상동성을 분석하고 근연관계를 phylogenetic tree 계통수로 표현했다. 각각의 그룹(group)을 대표하는 종을 대상으로 문헌의 자료를 근거로 비활성(sp. activity)을 비교하여 건강기능성 배당체 폴리페놀화합물의 생물전환 반응에 사용했다.

표 35. *Leuconostoc mesenteroides* DC102 균주의 효소 활성능 문헌조사

Microorganism Genus	species (strain no.)	Gene seq. no. Gene sequence(Bgl)	Amino acid seq. Accession on. AA seq(BGL)	Optimal condition of enzyme pH 6-8 30°C	Enzyme specifcity		Note	Ref.
					Substrate -->	Product		
Leuconostoc	mesenteroides DC102				Ginsenoside - Rb1	- Rd, F2, XVII compound K	degradate broad ginsenoside R1, R3 site	Slin-Hu Quan 2011

- 1) 각각의 유산균 별로 β-glucosidase 효소 유전자 데이터베이스를 구축했다. 2) 계통수를 작성하고 각 그룹별로 대표 유산균을 선정하고, 3) 대표 유산균의 균주를 기탁기관에서 분양받거나 직접 분리하여 효소활성을 분석했다. 4) 문헌조사를 통해 이미 분석된 비활성 정

보를 모으고, 5) 각종 건강기능 폴리페놀배당체 화합물과의 반응 특성을 조사하였다.

- *Leuconostoc mesenteroides* 균주가 식물성 원료 발효에 적합한 프로바이오틱 후보균주임을 발견함. 본 사업에서 사업화한 *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주도 좋은 기능성 후보인 것으로 판단되었다.

○ *Leu. mesenteroides* DRC 1506 균주로부터 얻은 β -glucosidase를 이용한 ginsenoside Rb1의 ginsenoside Rd로 생물전환

- *Leu. mesenteroides* DRC 1506 균주를 whole cell enzyme fraction, lysed fraction, cell precipitated crude enzyme으로 나누어 준비한 후 pH 7.0 Sodium phosphate buffer에 녹인 0.3% ginsenoside Rb1과 20 : 10의 비율로 30°C에서 72시간 반응시켰다. 24시간마다 TLC plate에 sampling. whole cell enzyme fraction은 cell pellet을 이용하였고, lysed fraction은 cell pellet을 초음파로 파쇄하여 준비하고, cell precipitated crude enzyme은 상등액을 에탄올에 4배 농축하여 준비했다.

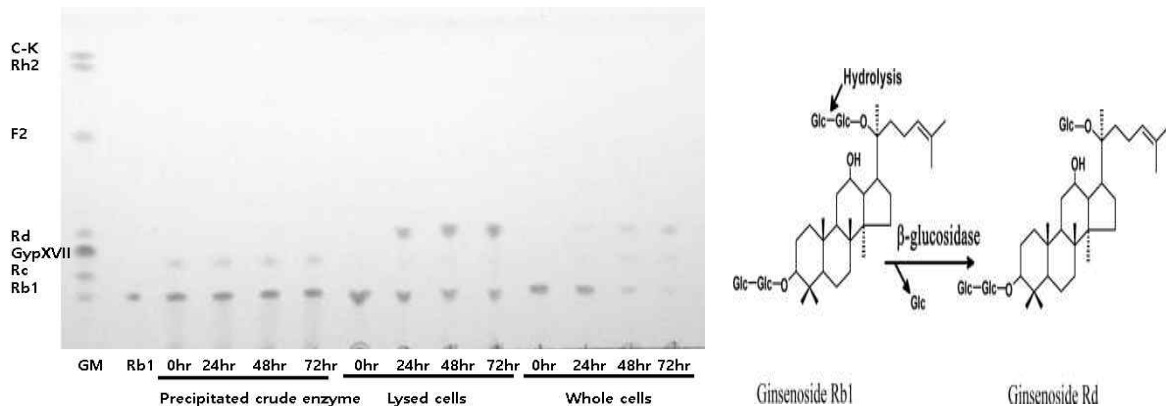


그림 79. *Leu. mesenteroides* DRC 1506으로부터 얻은 조효소의 ginsenoside Rb1 생물전환 확인

- *Leu. mesenteroides* DRC 1506으로부터 얻은 whole cell fraction, lysed fraction에서 24시간 후부터 ginsenoside Rd로 생물전환이 되었으므로, *Leu. mesenteroides* DRC 1506균주의 세포막과 세포내부에 ginsenoside Rb1의 20-C- β -(1→6)-glucoside 결합을 분해하는 β -glucosidase가 존재하는 것을 확인했다.

○ *Leu. mesenteroides* DRC 1506 균주로부터 얻은 β -glucosidase를 이용한 ginsenoside Rb1의 ginsenoside Rd로 생물전환

- *Leu. mesenteroides* DRC 1506 균주를 Sonication으로 파쇄하여 crude enzyme 준비한 후 pH 7.0 Sodium phosphate buffer에 녹인 0.3% ginsenoside Rb1과 20 : 10의 비율로 30°C에서 72시간 반응시킴. 32시간마다 sampling하여 TLC와 HPLC 분석. HPLC 전처리시 sample에 동량의 에탄올 처리하여 분석했다.

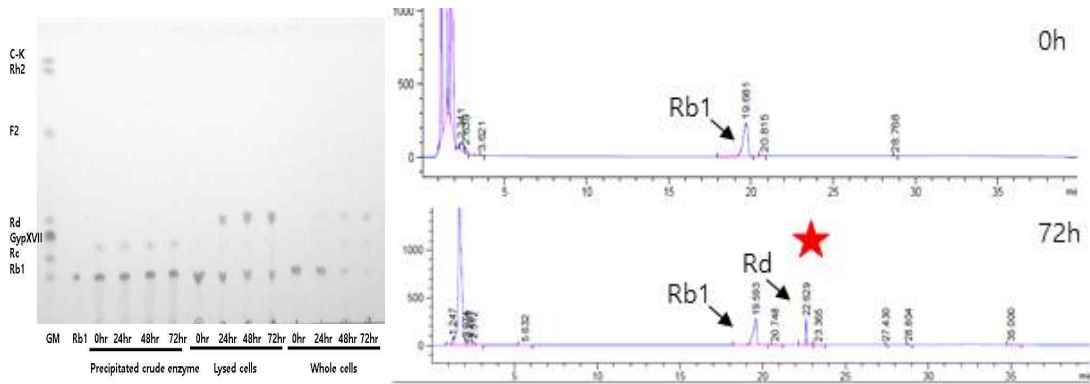


그림 80. *Leu. mesenteroides* DRC 1506를 처리한 Rb1의 TLC 및 HPLC 분석 결과

표 36. *Leu. mesenteroides* DRC 1506으로부터 얻은 조효소의 ginsenoside Rb1 생물전환율

Strain	Ginsenoside Rb1 (mM)			Ginsenoside Rd (mM)			Conversion rate (%)
	0 h	36 h	72 h	0 h	36 h	72h	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC 1506	0.094	0.080	0.087	0.0	0.019	0.034	36.2

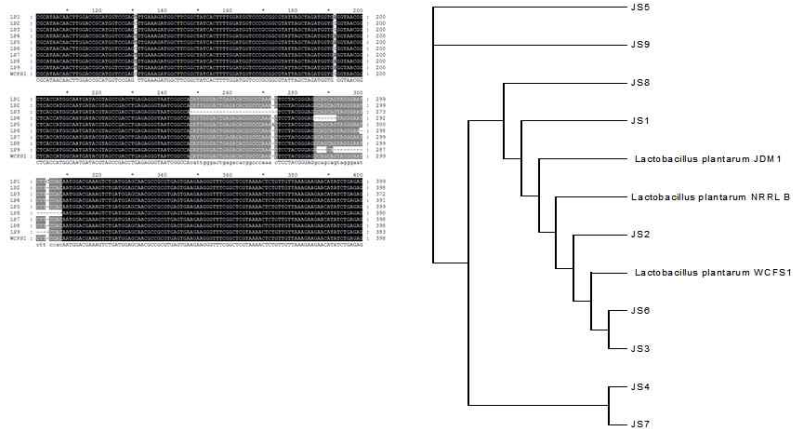
- *Leu. mesenteroides* DRC 1506으로부터 얻은 lysed fraction의 조효소에서 32시간 후부터 ginsenoside Rd로 생물전환이 되었으므로, *Leu. mesenteroides* DRC 1506균주에 ginsenoside Rb1의 20-C-β-(1→6)-glucoside 결합을 분해하는 β-glucosidase가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 72시간 이후 조효소의 Rb1에서 Rd로의 생물전환율은 36.2%로 나타났다.

3. 신규 분리 균주의 안전성 및 효능 연구

가. 김치유산균종 후보균주 분리

① *Lactobacillus plantarum* JS 9종 분리

- 산, 담즙에 대해 내성이 좋은 균주를 선별하고 BPB-MRS 선별배지로 2차 선별된 simple staining, 16S rRNA sequencing을 통해 9가지 균주를 분리하였다.
- 성인 분변을 산조건(pH3.0), 담즙조건(bile salt 0.25%)으로 각각 조정된 PBS buffer에 접종하고 37 °C에서 120분간 배양한 후 BPB-MRS 선택배지에 도말하여 1차적으로 선별한 뒤, Simple staining을 거쳐 16S rRNA sequencing을 통하여 최종적으로 선별하였다.



	JS1	JS2	JS3	JS4	JS5	JS6	JS7	JS8	JS9
Identity	99.7	100	96.5	97.8	99.8	99.3	99.8	99.8	98.7

그림 81. *Lb. plantarum* JS 1-9 균주의 16S rRNA sequencing결과

- 성인 분변으로부터 분리한 프로바이오틱스 후보균주는 16s rRNA sequencing결과 모두 *Lactobacillus plantarum* 균주로 나타났으며, phylogenetic tree 결과 Reference 균주로 사용한 *Lactobacillus plantarum* WCFS1 균주와도 유사한 Identity를 나타냈다.
- 산내성과 담즙산내성을 가지며 김치발효에 있어서 저온성장에도 적합한 프로바이오틱스 후보균주로 판단된다.

② 안전성

○ 분리 균주의 산·담즙 내성

- 분리균주의 장관안정성을 측정하기 위하여 *Lb. plantarum* JS 1-9의 내산성과 내담즙 및 내산성을 측정하였다.
- 내산성 실험은 HCl 용액을 사용하여 pH 2.0 및 3.0으로 각각 조정된 50mM의 Sodium phosphate buffer에 유산균 배양액을 10% 접종하고, 30°C에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.
- 내 담즙 산성 실험은 담즙(Oxgall, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 0.3, 0.4%가 첨가된 MRS 액체배지에 유산균 배양액을 10% 접종하여 30°C에서 180분 배양 후 생균수를 측정하였다.

표 37. *Lactobacillus plantarum* JS 1-9의 내산성

Strains	Factors (pH)			
	Control	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0
JS1	9.53±0.07	5.23±0.07	7.54±0.05	9.33±0.04
JS2	9.65±0.01	4.37±0.17	6.15±0.04	9.35±0.03
JS3	9.45±0.03	NG	5.21±0.12	8.16±0.08
JS4	9.30±0.14	NG	6.29±0.09	9.30±0.03
JS5	9.60±0.08	NG	5.94±0.05	9.34±0.04
JS6	9.66±0.03	6.17±0.05	8.79±0.05	9.29±0.03
JS7	9.47±0.05	NG	5.53±0.02	8.87±0.06
JS8	9.65±0.04	5.68±0.05	8.81±0.02	9.35±0.03
JS9	9.60±0.04	NG	5.99±0.04	8.79±0.07
LGG	9.50±0.03	NG	6.28±0.09	9.11±0.07

표 38. *Lactobacillus plantarum* JS 1-9의 내담즙산성

Strains	Factors (Bile salt%)		
	Control	0.25%	0.3%
JS1	9.53±0.07	9.28±0.02	8.93±0.04
JS2	9.65±0.01	9.42±0.03	9.33±0.04
JS3	9.45±0.03	9.21±0.06	9.15±0.02
JS4	9.30±0.14	9.29±0.04	9.24±0.03
JS5	9.60±0.08	9.30±0.04	9.20±0.07
JS6	9.66±0.03	9.32±0.04	8.96±0.05
JS7	9.47±0.05	9.26±0.02	9.15±0.03
JS8	9.65±0.04	9.38±0.01	9.20±0.03
JS9	9.60±0.04	9.37±0.04	9.13±0.04
LGG	9.50±0.03	9.24±0.04	8.98±0.05

- *Lb. plantarum* JS 1-9균주의 내산성을 측정된 결과 pH3.0에서 모두 *Lb. plantarum* JS 균주가 높은 내성을 보였다. 특히 pH2.0에서는 *Lb. plantarum* JS 6, 8균주가 높은 내성을 보였다. 내담즙산도를 측정된 결과 담즙산 농도 0.3, 0.4에서 모든 균주가 높은 담즙산 내성을 보였다.
- *Lb. plantarum* JS 1-9균주는 산내성과 담즙산내성을 가진 프로바이오틱스 가능성이 높은 후보로 판단되었고, 특히 *Lb. plantarum* JS 6, 8균주는 우수한 내산성 프로바이오틱스 후보로 판단된다.

○ 분리 균주의 장내 부착능 평가

- 분리균주의 장내부착능을 측정하기 위하여 *Lb. plantarum* JS 1-9의 Caco-2 cell부착능을 측정했다.
- 인체 대장 Caco-2 세포는 10%FBS, 2mM L-글루타민, 100U / mL 페니실린 및 스트렙토

마이신 (HyClone)이 첨가 된 Dulbecco Modified Eagle배지에서 37°C, 5% CO₂조건에서 배양했다. 배양된 세포를 24-well tissue plate에 4.7 x 10⁴ cells/cm²에 도달하고 분리된 *Lactobacillus plantarum* JS 1-9 균주를 108 CFU/mL 접종하여 3시간동안 배양하며 부착능을 측정하였다.

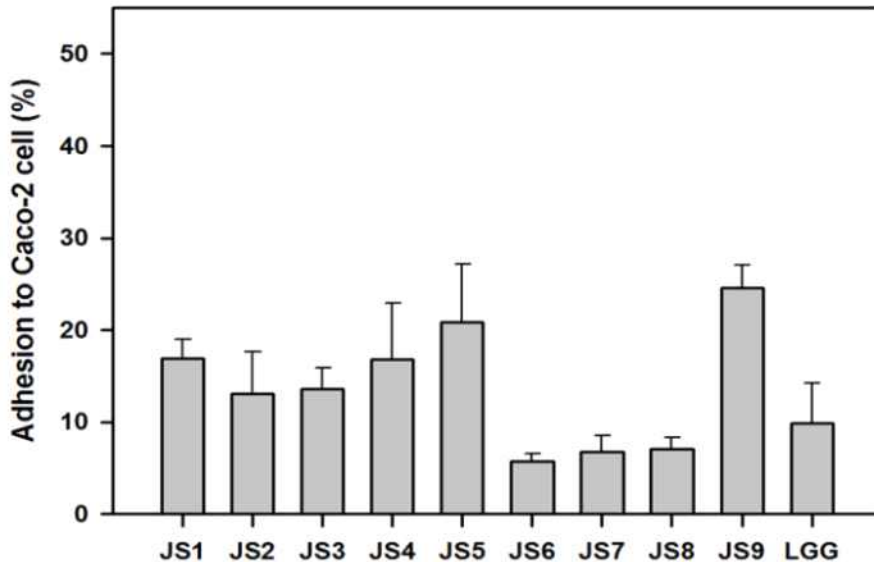
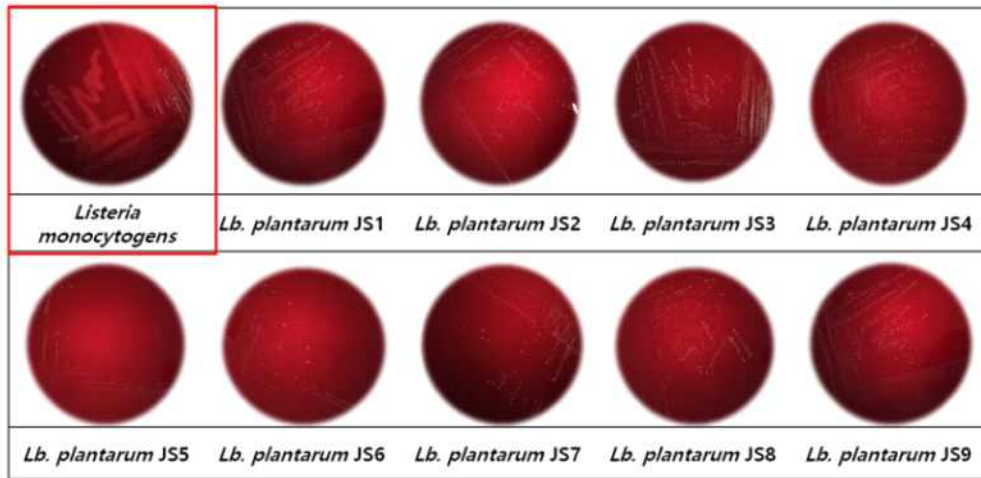


그림 82. *Lb. plantarum* JS 1-9균주의 Caco-2 cell 부착능

- *Lb. plantarum* JS 1-9균주의 장내부착능을 측정한 결과 프로바이오틱스로 널리 알려진 *Lb. rhamnosus* GG균주와 유사한 수준의 장내 상피세포 부착능을 보였다.
- *Lb. plantarum* JS 9균주는 *Lb. rhamnosus* GG균주보다 약 2배 이상의 장내 상피세포 부착능을 보이며 높은 장내부착능 가진 프로바이오틱스 가능성이 높은 후보로 판단된다.

○ 분리 균주의 용혈 유무 측정

- 분리균주의 용혈유무를 측정하기 위하여 *Lactobacillus plantarum* JS 1-9의 Hemolysis test를 측정했다.
- BHI에 5% Horse blood를 첨가하여 배지를 제조한 뒤 *Lactobacillus plantarum* JS 1-9 균주를 도말하여 37°C에서 48시간 용혈유무를 평가했다.



Listeria monocytogenes: α -hemolysis induced strain

그림 83. *Lb. plantarum* JS 1-9균주의 용혈테스트 결과

- *Lb. plantarum* JS 1-9균주의 용혈유무를 측정한 결과 용혈되지 않는 것으로 보였다. control 로써 용혈현상을 나타내는 것으로 알려진 *Listeria monocytogenes* 유해균주 주변에는 용혈되어 환이 생성된 것으로 보였다.
- *Lb. plantarum* JS 1-9균주는 장내에서 용혈현상을 일으키지 않는 프로바이오틱스 균주로 판단된다.

○ 항생제 내성 유전자 분석

- 3차년도에 선발한 *Lactobacillus plantarum* JS 1-9균주를 대상으로 9가지 항생제 내성 효소 관련 유전자를 분석했다.
- ampicilin, erythromycin, streptomycin, erythromycin, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin, vancomycin, tetracycline, novobiocin, penicillin 항생제에 대한 내성을 분석했다.

표 39. *Lactobacillus plantarum* 균주의 항생제 내성분석 (MIC, Minimum inhibitory concentration)

Strains	Ery	Str	Amp	Kan	Van	Chl	Pen	Nov	Tet
JS1	1	64	1	>512	>512	2	1	1	8
JS2	1	64	1	256	>512	2	1	1	8
JS3	1	64	1	>512	>512	2	1	1	8
JS4	1	64	1	>512	>512	2	1	1	8
JS5	1	64	1	>512	>512	2	1	1	8
JS6	1	64	1	512	>512	4	1	1	8
JS7	1	64	1	>512	>512	2	1	1	8
JS8	1	64	1	512	>512	2	1	1	8
JS9	1	128	1	>512	>512	4	1	1	8
LGG	1	128	32	256	>512	2	1	4	1

* E : Erythromycin, S : Streptomycin, A : Ampicillin, K : Kanamycin, V : Vancomycin, C : Chloramphenicol, P : Penicillin, N : Novobiocin, T : Tetracycline

- *Lactobacillus plantarum* 균주는 control로써 프로바이오틱스로 널리 알려진 *Lactobacillus rhamnosus* GG균주와 유사하거나 더 우수한 항생제 내성을 가지는 것을 확인했다. 특히 ancomycin, kanamycin에서 강한 내성을 보였다.
- 따라서, 상기 9개의 분기균주는 항생제에 대해 안정성을 보이는 프로바이오틱스 후보 균주로 판단된다.

○ 김치유산균의 모균주 및 개량균주의 발효능 및 안전성 분석

- histidine, tyrosine decarboxylase gene을 specific primer를 제작하여, PCR을 통해 gene의 유무를 실험을 통해 밝혔다.
- 다음과 같은 조건으로 PCR을 진행하였으며, Specific primer는 Coton의 논문을 참고 하여 제작하였다.

<Tyramine PCR condition >		<Histamine PCR condition>			
Pre-denaturation	95°C, 5min	Pre-denaturation	95°C, 5min	Master mix	10 µl
Denaturation	95°C, 45s	Denaturation	95°C, 45s	Primer	2 µl
Annealing	52°C, 45s	Annealing	48°C, 45s		2 µl
Extension	72°C, 1.25min	Extension	72°C, 1.25min	DNA	1 µl
Final extension	72°C, 5min	Final extension	72°C, 5min	D.W	25 µl
	4°C, ∞		4°C, ∞	total	40 µl

Gene	Primer	Sequence(5' to 3')	Reference
histidine decarboxylase (hdc)	HDC3	GATGGTATTGTTTCKTATGA	Coton, 2005
	HDC4	CAAACACCAGCATCTTC	
tyrosine decarboxylase (tyrdc)	TD2	ACATAGTCAACCATRTTGAA	Coton et al. 2004
	TD5	CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	

그림 84. PCR 조건 및 specific primer 서열

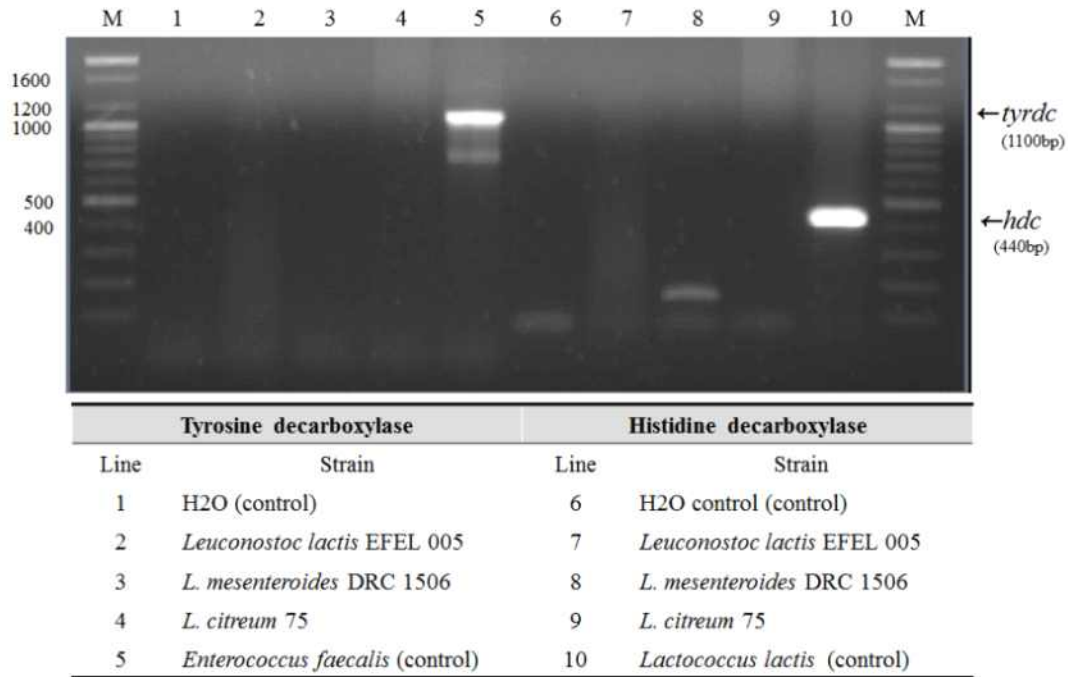


그림 85. *Leu. mesenteroides* DRC1506 균주의 Biogenic amines 유전자 검출

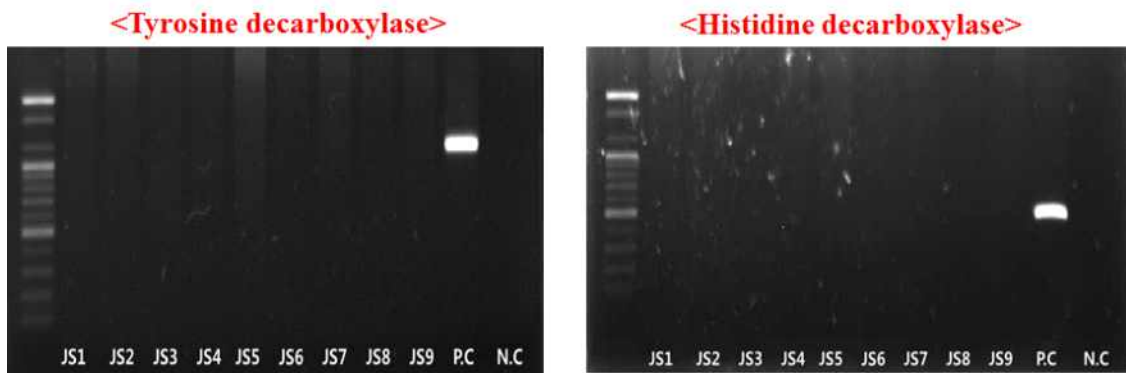


그림 86. *Lb. plantarum* JS 1~9 균주의 Biogenic amines 유전자 검출

- *Leu. mesenteroides* DRC, *Lb. plantarum* JS 1~9 균주는 Histidine, Tyrosine decarboxylase gene을 PCR을 통해 확인한 결과 biogenic amine 생성관련 유전자를 가지고 있지 않는 것으로 판단된다.
- 상기 3개 균주는 발효과정에서 건강에 해로운 대사산물을 생성하지 않는 유산균으로 우수한 프로바이오틱스 후보 균주로 판단된다.

③ 기능성

○ 헬리코박터 저해능 측정 - Paper disc method

- *Helicobacter pylori*가 107 CFU/mL 접종 된 평판배지에 paper disc를 얹어 각 fraction으로 처리한 유산균 10종(*Lb. plantarum* JS1~9, *Le. citreum* BS14)을 로딩해 미호기성 환경에서 2~3일 배양한 뒤 저해환의 지름 측정했다. (*Lb. plantarum* 9종 : 김치에서 분리, *Leu. citreum* BS14 : bacteriocin생산균주)

표 40. 각 균주에서의 헬리코박터 저해능 비교

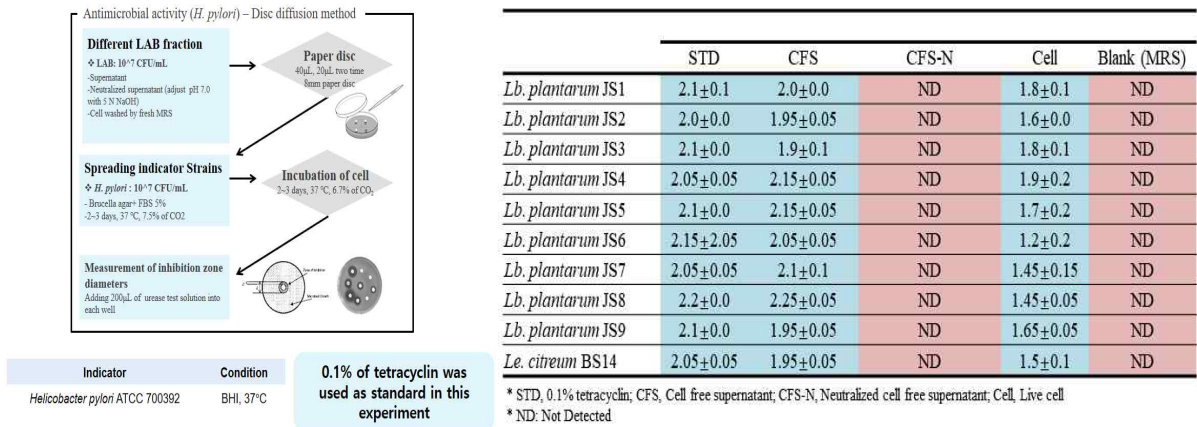


그림 87. 헬리코박터 저해능 측정과정

- 모든 균주의 CFS(Cell Free Supernatant, 균 펠렛 제거 상층액)와 Cell(세척 된 생균)에서 H. pylori의 생육 저해능 측정 결과, 특히 CFS fraction에서 standard인 0.1% tetracyclin과 비슷하게 저해한 것 확인했다.

○ Co-aggregation assay

- 10⁷ CFU/mL 으로 배양한 유산균과 유해균 4종(Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella Typhitimum, Helicobacter pylori)을 co-aggregation buffer에 동량 첨가해 섞고, 10분 뒤 상층액의 흡광도를 측정하여 결과값을 산출했다. (Lb. plantarum 9종 : 사람 분변에서 분리, Leu. citreum BS14 : 김치에서 분리, bacteriocin생산균주)

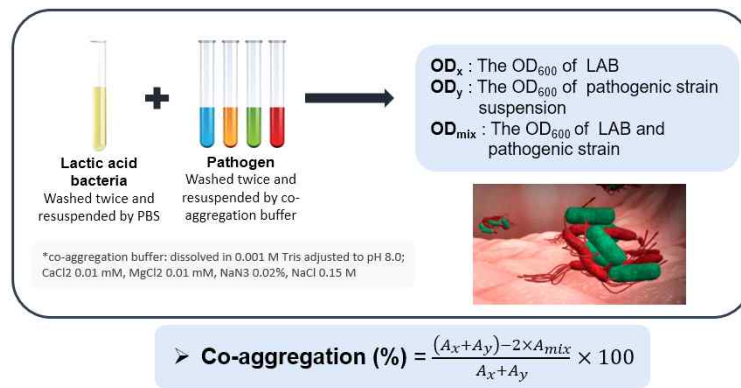


그림 88. 헬리코박터 저해능 측정과정

표 41. 각 균주에서의 응집능력 백분율 비교

	pH 3		pH 7	
	<i>Helicobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Lb. plantarum</i> JS1	13.75	7.17	26.94	12.04
<i>Lb. plantarum</i> JS2	43.59	18.49	50.83	44
<i>Lb. plantarum</i> JS3	44.25	46.18	66.18	60
<i>Lb. plantarum</i> JS4	11.42	17.6	19.91	5.97
<i>Lb. plantarum</i> JS5	61.69	40.19	59.66	51.27
<i>Lb. plantarum</i> JS6	46.41	45.29	40.27	9.29
<i>Lb. plantarum</i> JS7	22.34	11.03	19.87	14.38
<i>Lb. plantarum</i> JS8	21.37	13.4	17.04	20.36
<i>Lb. plantarum</i> JS9	21.72	8.49	16.96	38.17
<i>Le. citreum</i> BS14	16.01	10.95	3.2	8.75

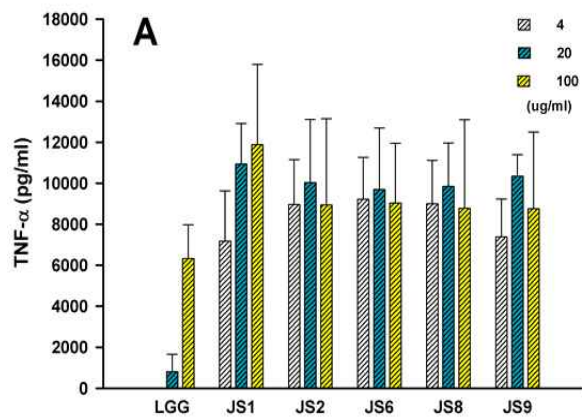
- 모든 유해균에 대해 공통적으로 *Lb. plantarum* JS3, 5, 6이 높은 응집력을 보였다. 특히 *L. monocytogenes*에서는 *Lb. plantarum* JS2, 3, 5 균주가, *S. Typhitirum*에서는 *Lb. plantarum* JS3, 5가 50% 이상으로 높은 응집력을 보였다.

○ *Lb. plantarum* JS 균주의 동결건조물을 이용한 면역 활성 측정

- 대식세포 분리 및 배양 : 복강에 3.5% tioglycollate media (BD, Sparks, MD, USA) 2ml을 주사한 마우스를 4일 후경추탈골한 후, 복강에 DMEM (Hyclone)을 주사하여 대식세포를 수집. 실험에 필요한 대식세포는 37°C, 5% CO2 조건의 인큐베이터에 overnight 배양해 100ng/ml LPS로 24시간 자극하여 ex vivo 염증반응을 유도한 후 배지와 대식세포를 회수했다.
- 사이토카인 측정 : 사이토카인 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용하여 측정함. TNF- α , IL-6 Duoset (R&D Systems, USA), IL-12 OptEIA set (BD, USA)을 사용하였으며 제조사의 프로토콜을 따라 ELISA를 수행했다.

표 42. 실험에 사용한 6균주

Strains	Abbreviation
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	LGG
<i>Lb. plantarum</i> JS1	JS1
<i>Lb. plantarum</i> JS2	JS2
<i>Lb. plantarum</i> JS6	JS6
<i>Lb. plantarum</i> JS8	JS8
<i>Lb. plantarum</i> JS9	JS9



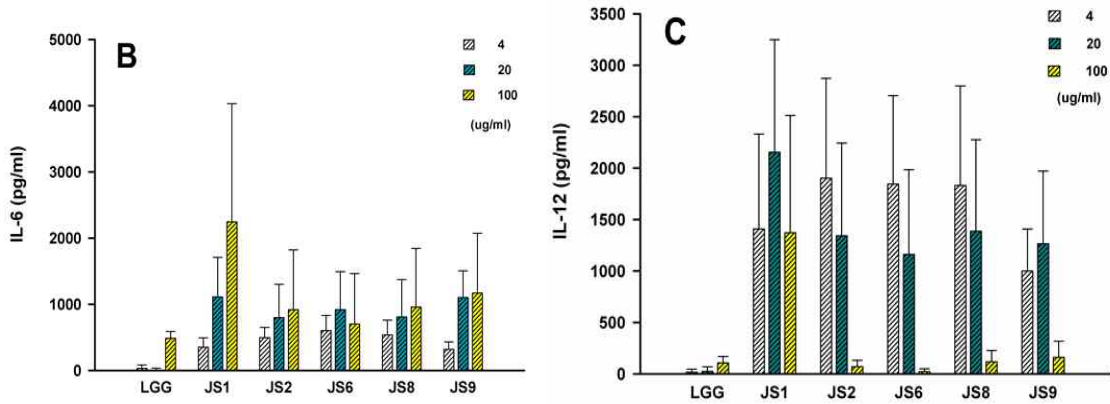


그림 89. 분리균주의 면역 사이토카인 유도능 A. TNF- α B. IL-6 C. IL-12

- 마우스 복강 대식세포의 TNF- α , IL-6 분비는 균의 농도에 따라 증가하는 경향을 보이나, IL-12는 다른 사이토카인과 달리 최고 농도인 100 ug/ml보다 4-20 ug/ml의 균을 처리하였을 때 유도능이 높게 나타난 경향이 보임. 시험 한 *Lb. plantarum* JS 균주 5가지는 대조균으로 사용한 LGG(*Lb. rhamnosus* GG)균주보다 면역 활성화 유도능이 높은 것을 확인했다.

4. 김치 스타터 산업적 생산을 위한 배양 및 발효조건 최적화 종균 생산 연구

가. 김치유산종균 메인 발효 유도를 위한 김치 표준화(산도, pH, 염도)

○ 분리 유산균 김치 적응성 분석을 위한 표준화된 살균 김치배지 제조

- 다양한 김치 주재료 부재료 포함하여 김치 원료 표준화. 살균조건 최적화로 영양성분 손실 최소화 및 무균 배지 제조. 실용적이고 편리한 공정 선택하였다.
- 본 배지를 이용하여 probiotics 유산균 성장정도를 측정하였다.

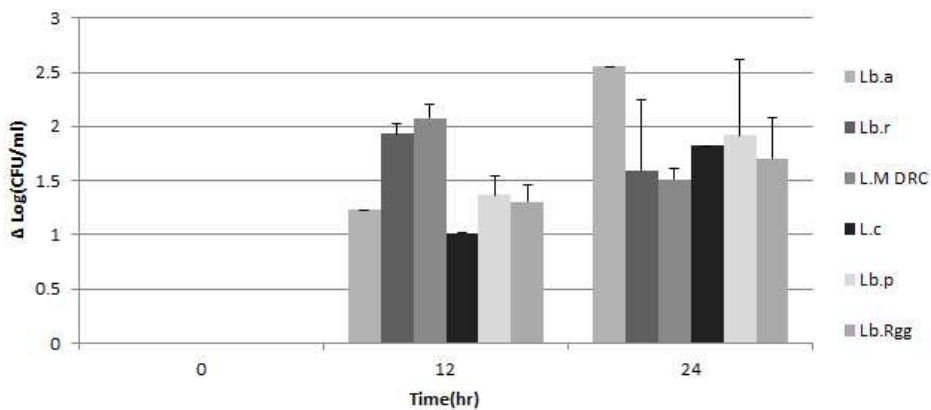


그림 90. 살균 김치 배지에서의 유산균 성장률 비교

표 43. 살균 김치 배지에서의 유산균 성장률 (OD600)

Strain	0 hr	12hr	24hr
<i>Lb. acidophilus</i>	0	1.2±0.33	2.5±0.47
<i>Lb. reuteri</i>	0	1.9±0.09	1.5±0.65
<i>Le. mesenteroides</i> DRC1506	0	2.0±0.12	1.5±0.10
<i>Le. citreum</i> KM-20	0	1.0±0.1	1.8±0.0
<i>Lb. plantarum</i> 299V	0	1.3±0.17	1.9±0.70
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	0	1.3±0.15	1.7±0.37

- 배추 주재료 및 무, 파, 마늘, 생강, 고추, 젓갈 등의 부재료 포함하여 다양한 김치 원료를 망라한 표준화 배지 조성 선정. 저온살균법 및 방사선 살균법을 적용하여 영양성분 및 화학조성 변화를 분석한 결과, 방사선법은 배지의 색상과 냄새가 많이 변하고 다량의 비타민 및 아미노산이 파괴되는 것을 확인했다. 반면, 70℃ 30분 저온 살균법은 색상과 냄새 변화가 미미하며 비타민과 아미노산의 분해되어 최소로 유지되었다. 또한, 미생물 살균 효과도 높았다.
- 유산균들을 살균 김치 배지에 접종하여 배양한 결과 김치발효에 가장 적합한 *Leu. mesenteroides* 균주의 성장률이 높게 나타났으며, 다른 미생물의 성장률 또한 이와 비슷하였고, 6가지 유산균 중 *Lb. acidophilus* 가 가장 높은 성장률을 보였다.
- 저온살균법이 기업에서 적용 가능한 실용적인 방법이며, 살균 김치 배지에 유산균 배양 실험을 진행한 결과 앞으로의 김치 미생물 실험에 도움이 될 것으로 사료된다.

○ 김치 배지 표준화

- 염 농도에 따른 김치 표준 배지에서의 균 성장 관찰, 그에 따른 pH변화와 발효패턴 조사, 그 외 여러 가지 인자(물리적 차이, 삼투압추출조건)를 고려하여 배지 최적화 실험을 수행했다.
- (표 .)와 같은 구성요소를 조합함으로써 김치 배지 표준화를 위한 실험을 수행했다.

표 44. 표준화를 위한 김치 배지 구성

P. control	N. control - Extract		Sample - Blend			
	Salt x pulp x	Salt x pulp 100%	Salt x	Salt 3%	Salt 6% water 50%	Salt 6% water 50% centrifuge
MRS						

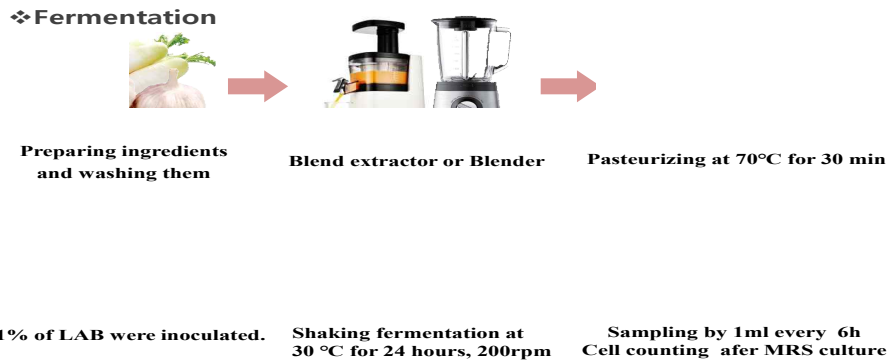


그림 91. 염농도에 따른 김치 표준화배지에서의 균성장 관찰 과정

- 액체 김치배지는 pulp를 첨가해 저온살균한 균이 균 성장이 좋은 것으로 판단된다. 일반 착즙기로 착즙했을 때 보다 blender로 처리해 주었을 때 더 좋은 균 성장을 관찰. 소금 농도에 따른 균 성장을 관찰한 결과 소금농도 3%와 6%첨가, 24h 삼투압추출 후 6%에만 1:1 비율의 물을 첨가해주어 농도를 같게 맞추어 비교했을 때 삼투압추출을 해준 배지가 대조균인 MRS배지와 유사한 균 성장을 보여주었고, 6% 소금 첨가 배지를 같은 농도로 맞춰 주어 그 양을 2배 늘렸음에도 3%첨가 배지와 같은 결과를 보였다.
- 김치에서 유산균의 배양 특성을 연구하기 위해 김치 조건을 대표할 수 있는 최적화된 표준 배지 조성을 확립. 더 높은 배지 수율을 얻을 수 있는 기업에 실용적인 방법을 구축했다.

나. 발효 조건 규명 및 종균 생산 최적화 연구

- *Leu. mesenteroides* ATCC 8293의 거대분자 및 원소 조성분석
- *Leu. mesenteroides* ATCC 8293의 세포 구성 및 대사 화합물은 혐기성 케모스타트에서 배양한 후 분석했다.
- C) O) N) H) S 순으로, 케모스타트 배양 물에서의 대사산물은 lactic acid (73.34 mM), acetic acid (7.69 mM) 및 mannitol (9.93 mM)으로 분석되었다.
- 분자 조성물은 24.4 %의 다당류, 29.7 %의 단백질, 7.9 %의 지질, 2.9 %의 DNA 및 7.4 %의 RNA로 구성되어 있고, 아미노산 조성은 많은 양의 라이신, 글루탐산, 알라닌 및 류신을 포함하고 있음이 분석되었다.

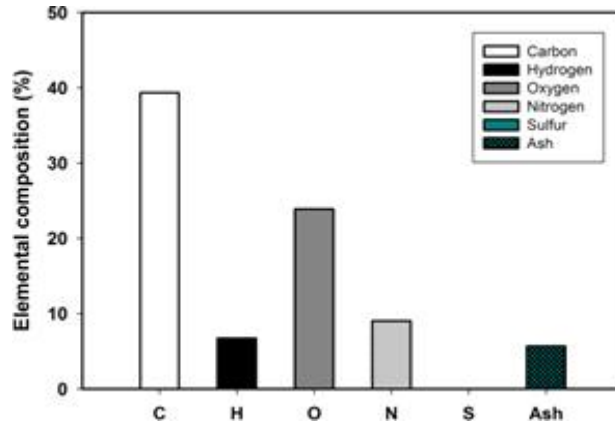


그림 92. *Leu. mesenteroides* ATCC 8293 세포의 원소 조성

표 45. *Leu. mesenteroides* ATCC 8293의 바이오 매스 조성 및 3 가지 다른 유산균과의 비교

LAB	Biomass composition (% w/w)						Reference
	Proteins	Lipids	Polysaccharides	DNA	RNA	Other	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	29.7	7.9	24.4	2.9	7.4	22	This study
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	29.9	6.3	9.9	1.9	9	43	[16]
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	46	3.4	12	2.3	10.7	25.6	[19]
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG18311	43.3	6.1	24.1	1	8.2	17.2	[20]

- 신진 대사와 같은 기본적인 미생물 연구에 필수적인 화학적 조성을 필요로 한다. 이 연구를 통해 *Leuconostoc* spp.에 대한 최초의 바이오매스 정보로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.
- 유산균의 in silico 계놈 모델 구축과 대사 공학 기술 이용
 - 유전체 분석을 통해 확보 되는 많은 양의 데이터를 분석하고, 예측 가능한 수학적 모델링 및 시뮬레이션을 통한 총체적인 분석이 필요하다.
 - 복잡한 생물학적 과정의 원리를 수학적으로 이해할 수 있는 컴퓨터 가상모델을 구축했다.

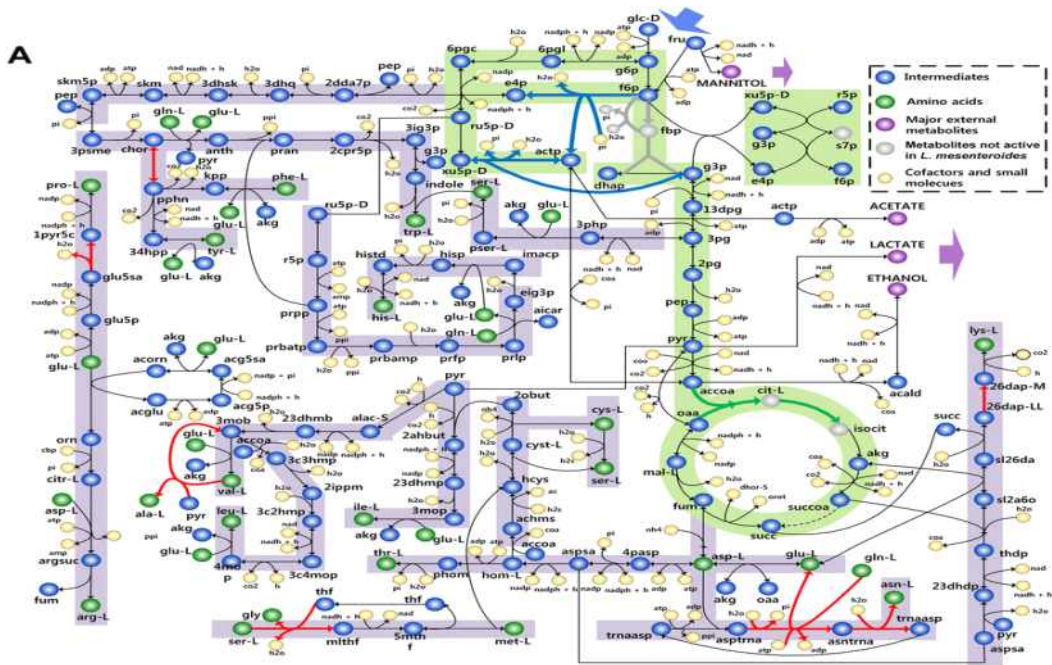


그림 93. *Leu. mesenteroides*의 게놈 모델링 및 전사체 분석

- 유산균의 경우는 이미 *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *St. thermophilus*에 대해서 컴퓨터 가상모델이 개발되었으며, 본 연구실에서는 싱가포르국립대 이동엽교수 연구실과 공동으로 헤테로발효 유산균, *Leu. mesenteroides* (iLME620)의 게놈 규모의 대사 모델을 개발했다.
- in silico 대사 모델링과 omics 데이터 통합을 기반으로 하는 시스템 생물학 접근법으로 유산균의 대사 환경을 이해하여 현재 시스템 수준에서 불완전한 대사 경로를 Constraint-based flux 분석 했다. 이에 따라 *Leu. mesenteroides*에서 알려지지 않은 대사 기능이 모델 재구성을 통해 정보를 추측할 수 있을 것으로 기대하며, 잠재적으로 프로바이오틱 및 세포 공장 적용을 위한 설계에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

○ 류코노스톡 스타터 산업적 생산용 Cabbage juice medium(CJM) 개발

- 김치 스타터 산업적 생산을 위해 김치 주재료를 포함한 표준 배지를 구축하고자 탄소원, 질소원 및 염류와 같은 다양한 부족한 영양소를 보충함으로써 조성을 최적화했다.
- 류코노스톡 스타터의 산업적 생산을 위해 배지 최적화를 수행하여 경제적이고 고효율의 CJM을 개발했다.

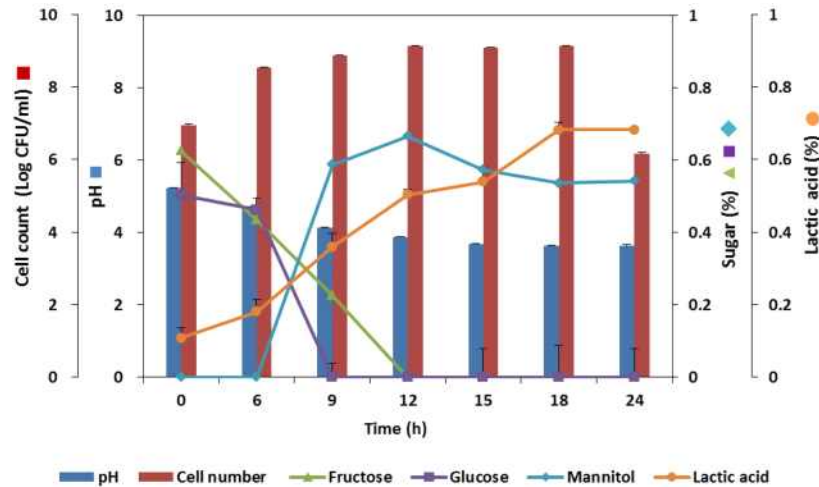


그림 94. CJM을 이용한 *Leu. mesenteroides* 균주 성장 및 대사산물 프로파일

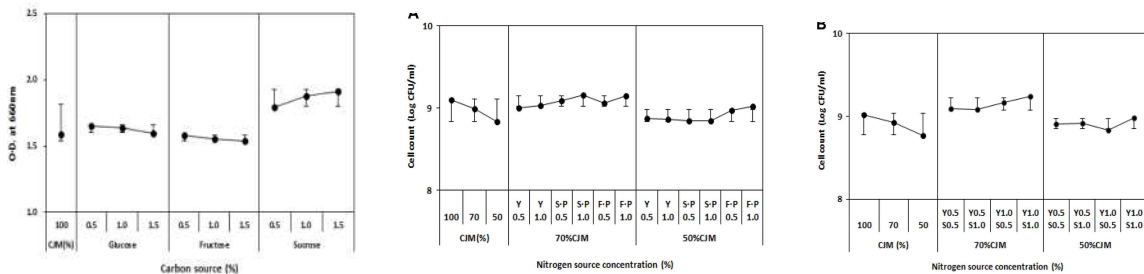


그림 95. 자당 및 효모추출물 등과 같은 영양분 첨가 하였을 때 생균 수

- cabbage juice medium (CJM)에 탄소원을 보충하기 위해 glucose, fructose, sucrose를 0.5%, 1.0%, 1.5% 첨가하여 생육에 미치는 영향을 평가함. 질소원을 보충하기 위해 yeast extract, soy peptone, fish peptone을 각각 0.5%, 1.0% 첨가하거나 다양한 조합으로 혼합하여 첨가하며 생육에 미치는 영향을 평가했다. 살균 방법에 따른 조성변화를 분석하기 위해 80°C에서 1시간 살균 (pasteurized CJM)하거나, 121°C에서 15분 살균 (the sterilized CJM) 하여 Gas Chromatography를 이용하여 분석했다.
- 배추 즙을 이용하여 김치 스타터를 대량으로 배양하기 위한 조성 최적화를 수행했다. 그 결과 MRS 배지에서 수율과 동등한 수율 값을 얻을 수 있었다.
- 고품질 김치 생산을 위한 류코노스톡 메센테로이데스 스타터의 산업적 생산이 효율적, 경제적으로 가능할 것으로 사료된다.

제 3 절. 제 2협동(대상(주)) 연구과제: 김치유산균 실증화 및 산업화 연구

1. 김치 제조의 표준화 연구 및 제조 기반 구축

가. 김치 표준 스펙 개발 및 공정 표준 제조 Manual화

- 표준화된 김치 제조 연구를 통해 Manual화 하여 년중 일정한 품질의 제조 기반 구축
 - 김치 제조 공정을 Manual화 하여 표준화된 품질의 김치를 생산할 수 있게 연구하였다.
 - 표준 김치 제조 설계

- ① 배주 1/2절 후 절입탱크에 넣고 염수로 절인다.
(염수 농도, 절입시간, 온도 : 대외비로 관리)
 - ② 절입이 끝난 배추는 세척 후 탈수한다.
(절입배추 염도 기준 : 대외비로 관리)
 - ③ 부재료인 무, 마늘, 양파, 생강을 비롯한 농산물 원료는 용도에 맞게 가공한다.
(각 원료별 가공 기준 수립)
 - ④ 표준 김치 Recipe로 양념을 제조한다.
(양념 관리 기준 : 염도, 대외비로 관리)
 - ⑤ 절입배추와 양념을 비율에 맞게 혼합한다.
(혼합비율 : 대외비로 관리)
 - ⑥ 생산된 제품은 품질규격에 맞게 검사를 진행한다.
(기준 규격에 준한 검사를 통한 적부 판단)
 - ⑦ 출하기준에 맞게 출하한다.
(출하기준 : 염도, 산도, pH, 대외비로 관리)
- 우수한 김치유산균 Starter 적용한 김치의 산업적 생산을 위한 표준화 연구
- 김치의 식품 공전 규격 외 자체 품질규격을 설정하여 김치 표준화 검증을 실시하였다(표 46).

표 46. 배추김치 기준 규격

품질규격		산도	대외비
		염도	대외비
		pH	대외비
법적 규격	개별 규격	성상	고유의색택과향미를가지며, 이미·이취가없어야함
		납	0.3 mg/kg 이하
		카드뮴	0.2 mg/kg 이하
		타르색소	불검출
		보존료	불검출
	공통 규격	장출혈성 대장균	음성
		<i>L. monocytogenes</i>	음성
		<i>S. aureus</i>	음성
		<i>Salmonelaspp.</i>	음성
		<i>C. perfringens</i>	100 이하 / g
		<i>B. cereus</i>	10,000 이하 / g
		<i>V. parahaemolyticus</i>	음성

나. 김치 유산균의 발효 안정화 제조공정 설계

- 유산균 Starter 표준 김치 연구를 위해 발효 안정화
- 유산균 Starter 활성 온도, 시간 관리 기준 설정
- Starter 활성 최적 배양 온도 및 시간 설정 후 관리 기준 확립하였다(그림 96).

○ 유산균 Starter 적용 제품 숙성 발효 Pattern 모니터링

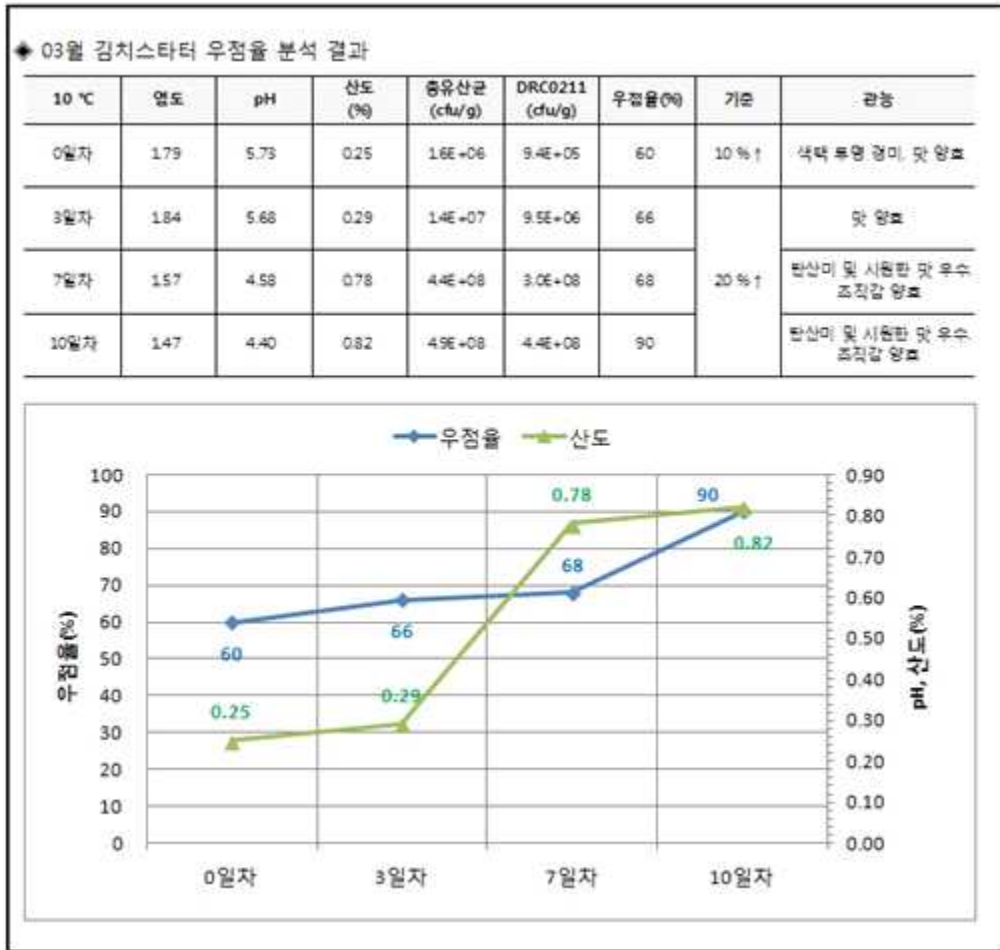


그림 96. 생산제품 숙성 발효 Pattern 모니터링

다. 균주 접종 시스템 개발 및 우점률 향상

○ 균주 보관, 배양 및 활성화 System 구축(그림 97, 표 47)

- 유산균 Starter의 활성화 최적화를 위한 김치 접종 단계 설정하였다.
- 유산균 Starter 접종 시스템 확립하였다.

공정	내용	CCP
1차 계대 배양	Stock vial을 5분 이내 해동하여 식용 배지에 접종 후 배양	- 배양 온도, 시간 확인 - 접종 농도 확인
▼		
2차 계대배양	상기 배양액을 식용 배지에 접종 후 배양	- 배양 온도, 시간 확인 - 접종 농도 확인 - 생균수 및 산도 규격 확인
▼		
3차 계대배양 (본배양)	상기 배양액을 식용 배지에 접종 후 배양	- 배양 온도, 시간 확인 - 접종 농도 확인 - 생균수 및 산도 규격 확인 - 오염여부 확인
▼		
김치 제조	접종량에 맞게 희석 후 양념에 혼합	- 생균수 및 산도 규격 확인 - 오염여부 확인

그림 97. 맛 및 발효 품질을 고려한 숙성 단계별 우점율 기준 설계

표 47. 우점률 관리 기준

관리기준	제조직후~3일 이내	10% 이상
	6일 이후	20% 이상

2. 김치유산균의 산업적 적용을 위한 특성연구

가. 유산균 Staretr 최적 농도 설계

○ 최적의 우점률 공정 설계

- 유산균 농도별 적용하여 우점률, 미생물 및 이화학적 특성 분석하여 최적 적용 농도 확립 하였다(농도 대외비)(표 48).
- 김치 starter 산업적 생산을 위한 배양 및 발효 조건을 확립하였다.

표 48. 김치 starter 제조 및 김치 적용 QC정도

QC 공정도		작성	검토	승인	문서 번호	DSF-RD01-A0-C27			
김치유산균발효액 I					개정 번호	0			
					제정 일자	2015.12			
공정명	사용설비명	공정내용	관리점 - : CP * : CCP	공정 및 품질관리			점검 부서		
분류	순서	세부 공정		항목	기준	방법	주기		
원료 입고	1	입고	- 원료는 각 입고규격에 적합 여부 검사 후 입고 - 색택 및 이물 검사	- 원료별 검사규격 - 색택 : 연회색 - 이물 : 없어야 함	검사규격 색택 및 이물	적합 적합	입고검사일지 육안검사	매입고시	QA팀
	2	보관	Deepfreezer	- 입고된 원료를 lot. 표시한 뒤 관리표에는 품목, 입고일, 납품업체명 기록관리 - QA팀 내 Deepfreezer 보관	- lot. 관리 - 보관창고 온도	lot.관리 온도	대외비		
유산 균 활성	3	활성화 활성 점검 보관	Cleanbench 냉장고	- 배지는 멸균하여 사용한다. - 배지 용균(121 °C 15분) 후 냉장 보관 후 사용한다. - 냉동 보관중인 유산균 starter를 온도 영향을 최소화하기 위해 단시간에 녹인다. - 배지에 접종하여 활성화 시킨다. - 활성 후 생균수, pH 확인 한다. - 활성 끝난 유산균은 냉장보관한다.	- 활성 조건 - 생균수, pH 규격 - 보관일	온도, 시간 생균수, pH	대외비	검사 일지 보관 일지	매입고시 QA팀
	4	회색	저울	- 회색비율에 맞게 회색한다.	- 회색비를 준수	회색비율		유산균회색일지	매입고시 QA팀
회색 및 접종	5	소분포장 접종		- 필요한 양으로 소분 - 접종 후 충분히 혼합한다	- 회색역 보관 시간	시간			

- 배추김치 외 별미김치 유산균 Starter 적용 연구
 - 제품 적용 농도 및 숙성 단계별 품질 표준화하였다.
 - 별미김치에 맞는 유산균 starter 적용 공정 확립 및 우점률 분석 진행하였다.

나. 발효 단계별, 계절별 우점률 효과 분석

- 계절별 김치 유산균 Starter 우점률 모니터링
 - 유통모니터링(10°C)을 진행하여 이화학, 미생물 변화를 확인하였다(표 49).
 - 우점률 약 40 % 이상으로 우점 양호하였다.

표 49. 포기김치 유통모니터링 분석 결과

	산도(%)	pH	총유산균	Starter	우점율(%)	관능
0일차	0.23	5.67	1.70.E+06	대외비	-	맛 양호
3일차	0.53	4.50	5.40.E+08	2.80.E+08	40.41	맛 양호
7일차	0.86	4.07	6.85.E+08	3.50.E+08	52.2	탄산미 및 시원한 맛 우수
10일차	0.97	4.00	5.00.E+08	1.95.E+08	39.49	탄산미 및 시원한 맛 우수

- 맛테스터기를 이용한 초기, 적숙기의 맛패턴 변화 확인
 - 무첨가군과 스타터 첨가군의 초기 맛패턴은 유의차 없었으나, 적숙기(10 °C, 7일차, 산도 약 0.8%) 패턴 결과, 신맛이 상대적으로 적은 것을 확인하였다(차이 1.0 이상이면 유의차 있음)(그림 98).

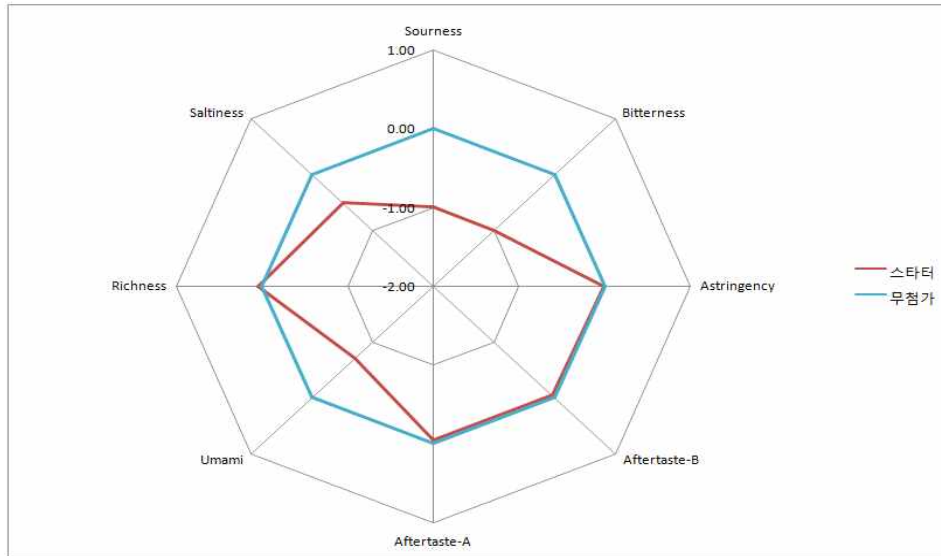


그림 98. Taste Sensing System 통한 숙성 김치 맛 패턴 결과

○ 계절별 김치 유산균 Starter 우점률 모니터링

- 계절별 유산종균 적용 김치를 제조하여 우점률을 확인하였다(그림 99).
- 총 유산균수는 여름철 가장 높게 나타났고, 봄철 우점률이 가장 높게 나타났다.

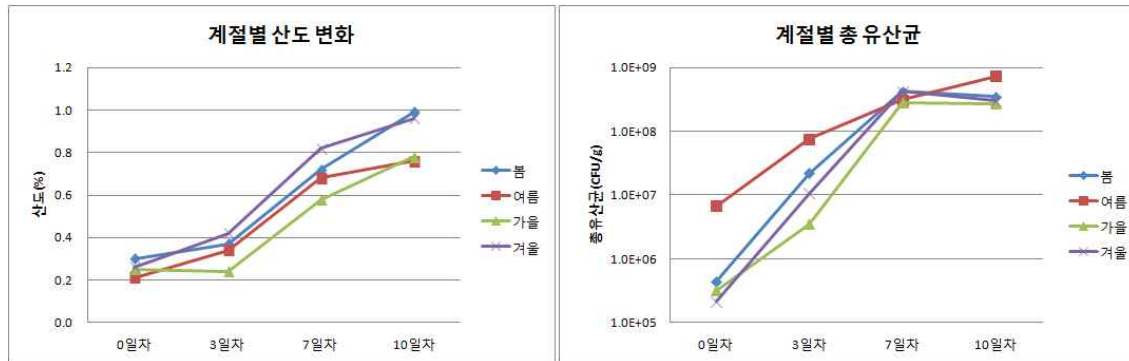


그림 99. 계절별 김치 산도 및 총 유산균수 변화

다. 김치 유통 Simulation

○ 각 온도별 김치 발효 Pattern 분석 및 품질 안정화 연구

- 5, 10 15 °C 유통 모니터링을 통한 우점을 확인하고 이화학 분석하여 발효 패턴 확인하였다(표 50).
- 5 °C 보관 시, 미생물 증식은 거의 일어나지 않았으며, 10 °C, 20 °C 보관 시, 발효가 진행됨에 따라 우점율도 규격 이상으로 확인하였다.

표 50. 저장 온도별 김치 발효 패턴

저장 온도	분석 일자	미생물 분석 (CFU/g)				이화학 분석		
		일반세균	총유산균 수	Starter	우점율 (%)	pH	산도 (%)	염도 (%)
5°C	0일	3.16.E+06	3.98.E+05	7.94.E+04	19.95	6.25	0.26	1.83
	3일	2.69.E+07	2.00.E+06	3.16.E+05	15.85	4.98	0.32	1.79
	7일	6.31.E+07	7.94.E+06	7.94.E+05	10.00	4.58	0.89	1.80
	10일	7.94.E+06	8.91.E+06	1.58.E+06	17.78	4.38	1.04	1.72
10°C	0일	2.28.E+06	8.52E+05	2.30E+05	27.00	5.34	0.24	1.77
	3일	7.20.E+07	4.90E+07	2.30E+07	46.94	5.20	0.36	1.86
	7일	1.66.E+08	1.00.E+09	5.21E+08	52.10	4.07	0.89	1.45
	10일	1.35.E+08	9.20E+08	5.60E+08	60.87	4.23	1.12	1.65
20°C	0일	2.00.E+06	3.98.E+05	6.31.E+04	15.85	6.25	0.26	1.68
	3일	1.58.E+09	1.58.E+09	3.98.E+08	25.12	4.10	0.87	1.82
	7일	1.00.E+09	3.16.E+09	2.51.E+08	7.94	3.60	1.21	1.86
	10일	1.00.E+08	1.26.E+08	1.58.E+07	12.59	3.40	1.74	1.69

○ 설정된 품질 규격 적합성 확인

- 미생물 분석, 이화학적(pH, 산도, 염)분석하여 설정된 규격 적합성 검사 실시하였다(표 51).
- 스타터 적용 시에도 규격 적합임을 확인하였다.

표 51. 김치 규격 적합성 결과

구분		항목	규격	적/부
품질규격		산도	대외비	적합
		염도	대외비	적합
		pH	대외비	적합
법적 규격	개별 규격	성상	고유의색택과향미를가지며, 이미·이취가없어야함	적합
		납	0.3 mg/kg 이하	적합
		카드뮴	0.2 mg/kg 이하	적합
		타르색소	불검출	적합
		보존료	불검출	적합
	공통 규격	장출혈성 대장균	음성	적합
		<i>L. monocytogenes</i>	음성	적합
		<i>Salmonella</i> spp.	음성	적합
		<i>S. aureus</i>	음성	적합
		<i>C. perfringens</i>	100 이하 / g	적합
		<i>B. cereus</i>	10,000 이하 / g	적합
		<i>V. parahaemolyticus</i>	음성	적합

3. 김치유산균의 실증화 및 산업화 연구

가. 김치 Starter 적용 표준 모델 개발

○ 년중 균일한 품질의 메인 발효 유도

- 계절별 유산균 스타터 적용 김치를 제조하여 미생물 및 이화학 분석을 진행하였다(그림 100).
- 발효 초기 및 숙성 이후 계절별로 균일한 우점율 패턴을 보임. 적숙기 기준 겨울철에 우점율이 가장 높으며 봄철에 우점율이 가장 낮았다.
- 발효 초기 및 숙성 이후 산도 변화는 균일한 산도 패턴을 보임. 여름철 가장 높게 나타났으며 봄철에 가장 낮았다.

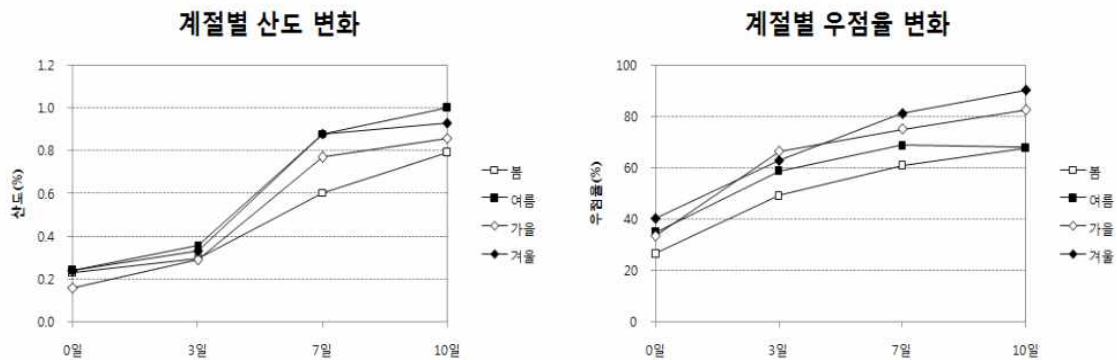


그림 100. 계절별 김치 *Leu. mesenteroides* DRC1506 우점율 및 산도 변화

나. 균주 접종 시스템 안정화

○ 우점율 향상 및 발효 안정화

- 균주 접종 시스템 통한 김치 제조 후 우점율 및 발효 패턴 모니터링 진행하였다(표 52).
- 미생물, 이화학 및 관능 분석하여 설정된 규격 적합성 확인하였다.
- 스타터 균주 접종 시스템 안정화를 통한 우점율 향상 및 발효 안정화하였다.

표 52. 균주 접종 시스템 통한 김치 제조 후 우점율 및 발효 패턴 모니터링

<i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506	우점율(%)	산도(%)
0일차	35.21	0.24
3일차	66.57	0.33
7일차	75.26	0.88
10일차	72.76	0.93

○ 기존 김치 및 스타터 적용 김치 발효 패턴 비교 분석

- 기존 김치 및 *Leu. mesenteroides* DRC1506 적용 김치 산도 패턴 분석하였다(그림 101).
- 적숙기 이후 기존 김치 대비 *Leu. mesenteroides* DRC1506 적용 김치 산도 1.0% 도달 기준 3일 차이 발생, 가식기간 연장 효과를 확인하였다.

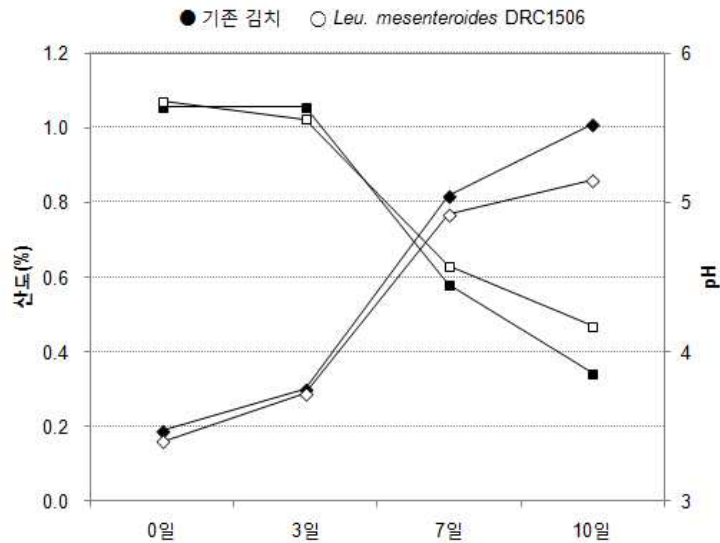


그림 101. 기존 김치 및 *Leu. mesenteroides* DRC1506 적용 김치 산도 변화

다. 유산균 Starter 김치 산업적 생산 최적화(시제품 생산 2건 이상)

○ 설계된 제조 공정에 맞게 김치 제조 후 규격 적합성 확인 및 우점율 분석

- 유산균 starter 적용 김치 시생산 결과, 포기김치 우점율 규격 기준치 적합하였다(적숙기 우점율 평균 87.89%)(표 53).
- 현장 적용시 우점율 및 발효 품질 안정화 확보하였다.

표 53. 김치 Starter 시생산 적용 및 우점율 측정

분석일자	시생산 차수					
	1차	2차	3차	4차	5차	6차
0일차	55.22	69.1	66.27	45.29	59.77	60.78
3일차	77.01	84.44	80.85	74.63	88.82	79.35
7일차	72.41	90.24	96.45	85.66	98.74	83.85
10일차	47.17	59.68	69.51	77.13	80.51	72.86

라. 유통 Simulation을 통한 김치 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구

○ 유통 온도에 맞게 보관 후 발효 패턴 분석

- 유통모니터링 결과 적숙기 우점율 약 50% 이상으로 발효 안정화 확보하여 김치의 품질 향상과 균일화 확보하였다(표 54).

표 54. 유통온도 숙성 김치 모니터링 및 발효 패턴

유통모니터링(10℃)	우점율(%)	산도(%)	관능 평가
0일차	대외비	0.27	맛 양호, 조직감, 절임상태 양호
3일차	53.95	0.32	맛, 조직감 양호
7일차	72.86	0.87	탄산미 및 시원한 맛 우수, 조직감 양호
10일차	68.27	1.01	탄산미 및 시원한 맛 우수, 조직감 양호

마. 개량 균주의 김치 발효 안정화

○ 개량 균주 적용 김치 제조 후 모니터링(미생물, 이화학 및 관능)

- 균주 적용 김치 발효 품질 모니터링 결과, 적숙기 기준 우점율 약 50% 이상으로 발효 안정화 확보하였다(표 55).
- 김치 숙성 시, 적용 균주 생산 대사산물인 만니톨, 이산화탄소, 유기산 등이 탄산미 및 시원한 맛을 부여하여 관능 품질을 향상시켰다.

표 55. 균주 적용 김치 발효 품질 모니터링

	산도(%)	pH	총유산균	Starter	우점율(%)	관능
0일차	0.23	5.67	1.70.E+06	대외비	-	맛 양호
3일차	0.53	4.50	5.40.E+08	2.80.E+08	40.41	맛 양호
7일차	0.86	4.07	6.85.E+08	3.50.E+08	52.2	탄산미 및 시원한 맛 우수
10일차	0.97	4.00	5.00.E+08	1.95.E+08	39.49	탄산미 및 시원한 맛 우수

바. 개량 균주의 메인 발효 기능성 대사산물 생성 최적화

○ 개량 균주 적용 김치 대사산물 분석(적숙기, 과숙기)

- 발효 기간별 김치 대사산물 분석 결과, 과당 함량은 0일에서 발효 10일까지 급격히 감소하였으며, 그 이후 발효 일수가 진행될수록 서서히 감소하였다(그림 102).
- 만니톨 함량은 0일에서 발효 10일까지 급격히 증가하였으며, 이는 유산균에 의해 발효가 진행되면서 과당을 대사하여 만니톨로 전환된 것으로 확인하였다.
- 유기산 함량 분석 결과, 구연산이 발효 초기에 급격히 감소하며 젖산은 10일까지 젖산발효가 진행되면서 증가하며 이후에 감소하는 것을 확인하였다.
- 기능성 대사산물 생성 최적화 개량 균주 농도 확인하였다.

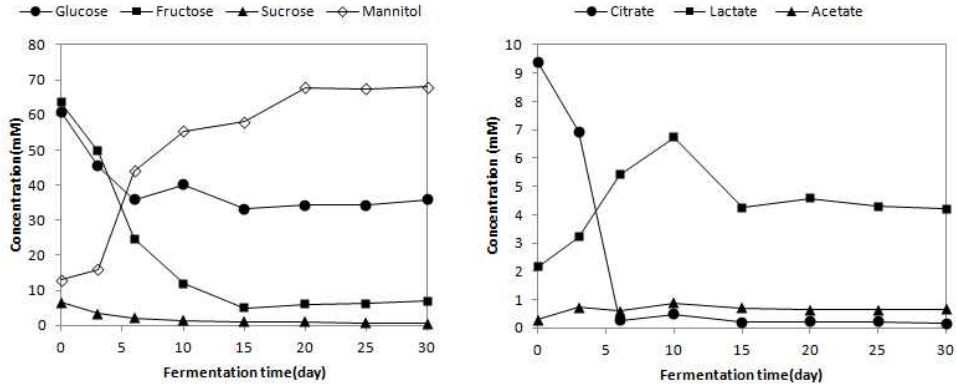


그림 102. 유산균 균주 적용 김치 발효 기간별 대사산물 분석

사. 다양한 김치에 적용성 검증을 통한 제품별 특성 연구

○ 유산균 starter 적용 김치 제품 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구

- 맛김치, 깍두기, 열무김치, 총각김치 미생물, 이화학 및 관능 평가 진행하였다(그림 103).
- 김치 종류별 발효 품질 차이 발생하며 이는 김치 원부재료 함량 차이에서 기인한 것으로 사료된다.
- 열무김치는 다른 종류의 김치에 비해 발효 속도가 느리며, 이는 김치 내 유산균의 증식 속도가 크게 증가하지 않은 것으로 관찰된다.

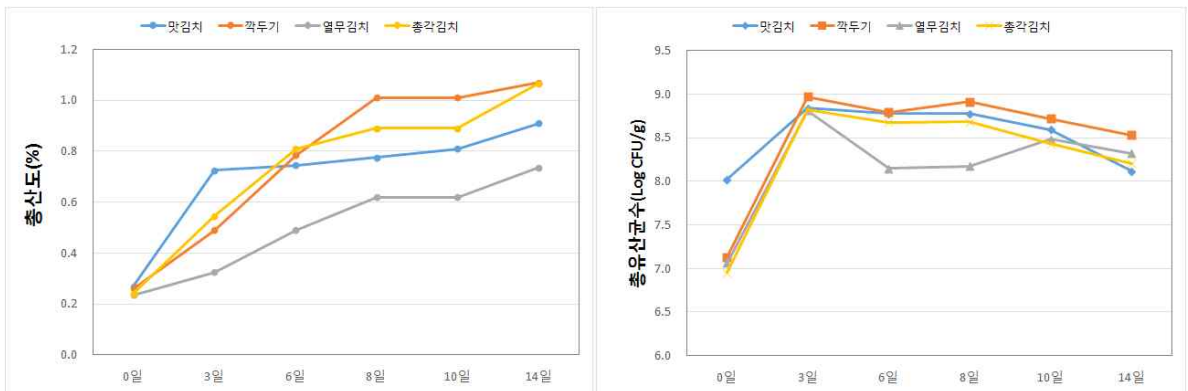


그림 103. 유산균 starter 적용 김치 제품별 발효 특성 분석

4. 김치의 사업화·실용화

가. 관능성(맛 기호도) 증진 기능성 김치 제품 개발

○ 외부 소비자 조사 통한 맛기호도 확인

- 아삭한 식감, 시원한 맛, 알맞은 간은 공통적으로 선호되는 주요 요인임을 확인하였다.
- 적당한 숙성도, 아삭한 식감, 시원한 맛은 공통적으로 선호되는 주요 요인임을 확인하였다(그림 104, 105).

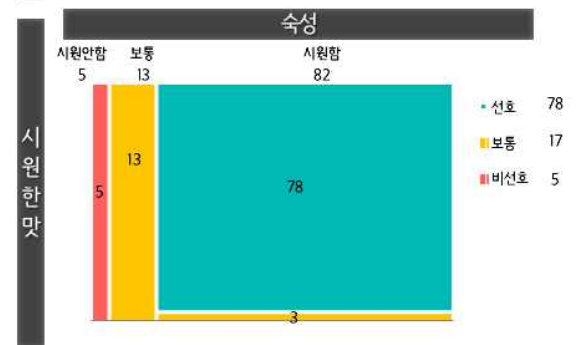


그림 104. 맛기호도 외부 소비자 조사

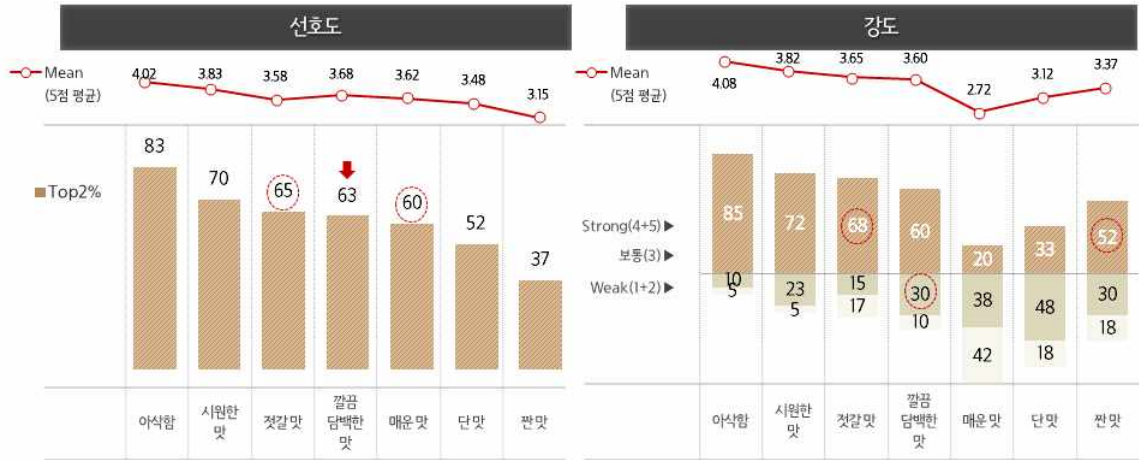


그림 105. 김치 맛 및 외관 속성별 선호도 및 강도 비교

나. 고기능성 김치유산균종(개량 균종) 적용 표준화된 김치 상품화 2건

○ 김치 유산균종 메인 발효

- 119개 colony 동정 결과 85.7 % *Leu. mesenteroides* 균주로 동정하였다(표).

표 56. 적숙기 김치의 PES 배지에서 colony sequence 동정

Strains	Count	%
<i>Leuconostocmesenteroides</i>	102	85.71
<i>Leuconostoc citreum</i>	7	5.88
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	4	3.36
<i>Weissella cibaria</i>	3	2.52
Uncultured <i>Leuconostoc</i> sp.	2	1.68
<i>Lactococcus lactis</i>	1	0.84
Total	119	100

- 김치 유산균종 적용 김치 미생물 균총 분석 결과, 적숙 김치에서 40% 이상 우점 확인하였다(그림 106).

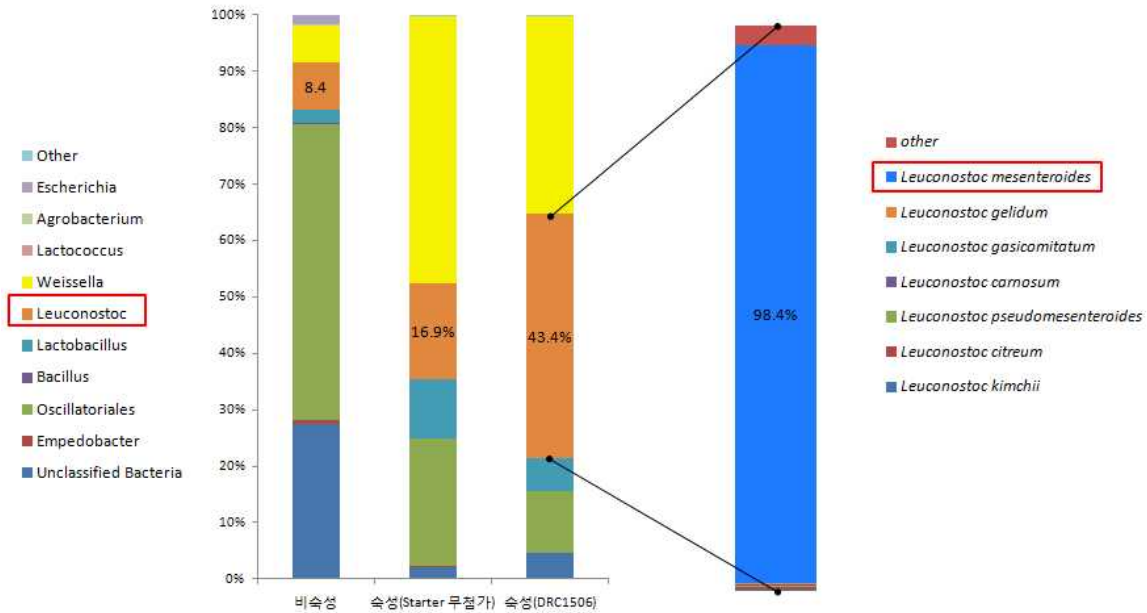


그림 106. 유산균종 적용 김치 미생물 군총 분석

○ 김치 제조 표준화 및 기능성 김치 Spec 개발

- 유산균의 최적 발효조건 및 공정표준 → QC 공정도 구성 및 점검하였다.
- 김치의 원부재료는 대부분 농산물로 토양미생물 등에 의해 위생적이지 못한 제품이 제조될 수 있기 때문에 김치 원부재료 세척 전후의 일반세균, 대장균, 효모 분석하였다(표 57).
- 김치 원부재료의 미생물 수는 세척 전에 비해 세척 후 감소됨을 확인하였다.

표 57. 김치 원부재료의 세척 전, 후 미생물 변화

원재료	항목	세척전	세척후
마늘	일반세균	4.40E+06	2.38E+04
	대장균군	6.00E+02	10 이하
	효모	7.00E+03	1.50E+01
생강	일반세균	2.42E+06	2.16E+03
	대장균군	2.20E+01	10 이하
	효모	5.0.E+04	1.39E+02
절임배추	일반세균	1.01E+05	2.70E+03
	대장균군	4.10E+02	10 이하
	효모	3.2.E+03	3.00E+01

○ 맛 기호도 확보 고품질 제품

- 김치 유산균종 적용 김치 특성 분석 결과, 기존 김치 대비 만니톨 고생성으로 김치에 시원한 청량감 부여, 신맛 masking 효과를 확인하였다.
- 산도 1.0% 도달 기준 5일 차이 발생, 가식기간 연장 효과를 확인하였다(그림 107).

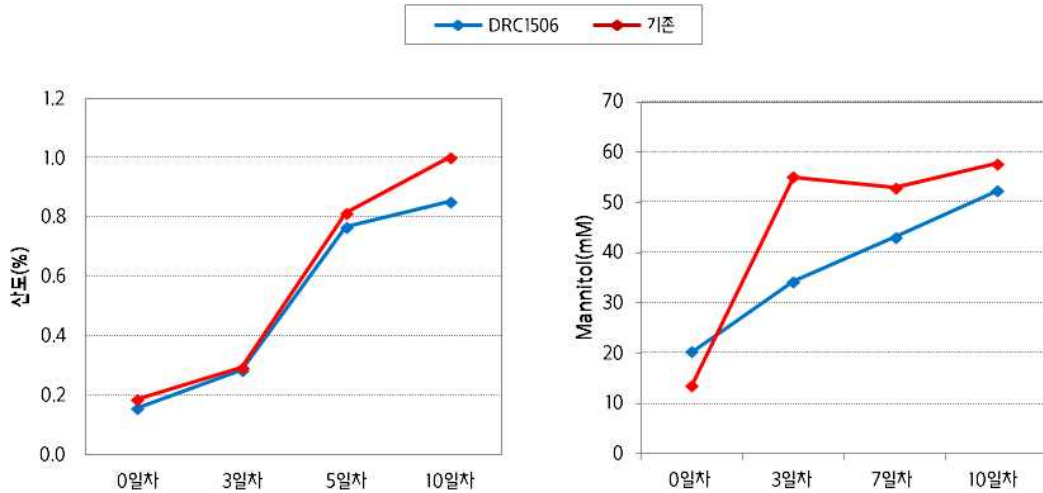


그림 107. 유산균종 적용 김치 산도 및 만니톨 함량 분석

- 숙성 단계별 향미 Profile 구축
- 유통 안정성 안전성 검증
- 포기김치의 식중독 미생물 균총변화 분석 결과, 일반세균수와 유산균수는 유사하게 확인 되었으며, 초기 대장균군이 검출되었으나 발효가 진행되면서 감소됨을 확인하였다(표).

표 58. 포기김치 숙성 중 품질 변화

	미생물분석(cfu/g)							이화학 분석	
	일반세균	유산균	대장균군	대장균	<i>B.Cereus</i>	<i>Cl. perfringens</i>	효모	산도 (%)	pH
1일차	1.3.E+06	1.1.E+06	3.0.E+01	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.25	5.74
3일차	3.5.E+07	2.5.E+07	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.33	5.51
7일차	2.6.E+08	5.0.E+07	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.56	4.48
14일차	1.3.E+08	3.4.E+08	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.92	4.04
21일차	7.0.E+07	1.6.E+08	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	1.3.E+02	1.02	4.04
28일차	5.3.E+07	5.7.E+07	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	2.3.E+02	1.06	3.9

5. 연구성과

- 사업성과

가. 전략미생물 해독

	No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1차 년 도	1	<i>Leu. mesenteroides</i> DRC0211	유전체 서열 완전해독	대상(주) 김치종균 균주
	2	<i>Leu. mesenteroides</i> J18	유전체 서열 재분석	김치종균 및 프로바이오틱스 개발 균주
	3	<i>Leu. lactis</i> EFEL005	Draft 유전체 서열 해독	제 1협동 연구팀 프로바 이오틱스 개발 균주
2차 년 도	1	<i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506	유전체 서열 완전해독	대상(주) 김치종균 개발 균주
	2	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> LMG 8159(T)	유전체 서열 완전해독	<i>Leu. mesenteroides</i> 의 표준균주
	3	<i>Tetragenococcus</i> sp. MJ4	유전체 서열 완전해독	김치유산균과 젓갈유산균의 유전적, 생리적 특성 비교
4차 년 도	1	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>halophilus</i> DSM 20339	유전체 서열 완전해독	김치유산균과 젓갈유산균의 유전적, 생리적 특성 비교
	2	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i> LMG 26042	유전체 서열 완전해독	김치유산균과 젓갈유산균의 유전적, 생리적 특성 비교
	3	<i>Leuconostoc citreum</i> EFEL 2700	유전체 서열 완전 해독	차세대 김치 스타터 후보 균주

나. 유용 유전자원 확보

년차	No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1차 년 도	1	<i>Leu. mesenteroides</i> J18의 riboflavin 생합성 유전자	Vitamin B1 합성유전자 확보	
2차 년 도	1	<i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506의 riboflavin 생합성 유전자	vitamin B1 합성유전자 확보	-riboflavin synthase subunit alpha -riboflavin biosynthesis protein RibF, RibT, RibD
	2	<i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506의 biotin 생성 유전자	vitamin B7 합성유전자 확보	-biotin biosynthesis protein BioY
	3	<i>Leu. citreum</i> EFEL2061의 면역조절활성 유전자	면역조절활성 유전자 보유	
	4	<i>Leu. lactis</i> EFEL005의 산/담즙 내성 유전자	산/담즙 내성 유전자 보유	
3차 년 도	1	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS2	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	3	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS3	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	4	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS4	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	5	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS5	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	6	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS6	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	7	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS7	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	8	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS8	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	9	<i>Lactobacillus plantarum</i> JS9	저온생장능, 산/담즙 내성 김 치 유산균 선발	
	10	<i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2700	형질전환용 유산균 숙주 세 포	

다. 표준유전체 해독

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고

라. 메타지놈 분석

	No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
3차 년 도	1	국내 전통 막걸리 (J막걸리)	국내 막걸리 1종 메타지놈 분석	
	2	국내 전통 막걸리 (S막걸리)	국내 막걸리 1종 메타지놈 분석	
	3	국내 전통 막걸리 (N막걸리)	국내 막걸리 1종 메타지놈 분석	
4차 년 도	4	우수종균 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506을 적용한 배추김치	종균 접종 배추김치의 미생물 천이분석을 위한 16S rRNA gene을 이용한 메타지놈 분석 수행	

마. 유전체 분석기술 개발

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	In silico metabolic flux model for <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	유산균 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 의 유전체, 전사체 분석을 바탕으로 한 대사흐름을 예측하는 모델을 제시	
2	Characterization of metabolic features in <i>Leuconostoc mesenteroides</i> species	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> species의 전체 유전체를 이용하여 대사적 특성을 나타내는 모델을 제시	

바. NABIC 등록

	No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1차 년 도	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> J18	complete genome	
	2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KACC 91922	complete genome	
2차 년 도	1	<i>Leu. mesenteroides</i> DRC0211	complete genome	
	2	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> LMG 8159(T)	complete genome	
	3	<i>Tetragenococcus</i> sp. MJ4	complete genome	
4차 년 도	1	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>halophilus</i> LMG	complete genome	
	2	<i>Tetragenococcus halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i>	complete genome	
	3	<i>Leuconostoc citreum</i> EFEL 2700	complete genome	
	4	<i>Leuconostoc citreum</i> EFEL 2700 plasmid	complete genome	

- 기타성과

가. 국내외 논문 게재

	No	논문명	학술지명	주저 자명	호	코드번호		C-06-01		
						국명	발행 기관	SCI 여부 (SCI/ 비SC I)/IF	게재 일	등록 번호
1차 년 도	1	Source tracking and succession of kimchi lactic acid bacteria during fermentation	Journal of Food Science	이세희, 전체욱	80(8): M1871 -7	미국	Wiley Online Library	SCI /IF 1.696	2015. 08.11	
2차 년 도	1	Simple Synthesis of Isomaltooligosaccharides during Sauerkraut Fermentation by addition of <i>Leuconostoc</i> Starter and Sugars	Food Science and Biotechnology	조승기, 한남수	24(4):1 443-14 46	대한 민국	The Korean Society of Food Science and	SCIE /IF 0.699	2015. 08.31	

						Technology			
2	A zinc-dependent protease AMZ-tk from a thermophilic archaeon is a new member of the Archaemetzincin protein family	Frontiers in Microbiol.	Baolei Jia, 전채욱	6:1380	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE /IF 4.165	2015.12.17	
3	Development of Bile Salt-Resistant <i>Leuconostoc citreum</i> by Expression of Bile Salt Hydrolase Gene	J. Microbiol. Biotechnol.	조승기, 한남수	25(12):2100-2105	대한민국	The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCIE /IF 1.685	2015.12.31	
4	Immunomodulatory effects of <i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2061 isolated from kimchi, a traditional korean food, on the Th2 type-dominant immune response in vitro and in vivo	Journal of functional foods	강희, 한남수	20	영국	Elsevier	SCI /IF 3.973	2016.01.01	
5	<i>Halomonas garicola</i> sp. nov., isolated from saeu-jeot, a Korean salted and fermented shrimp sauce	Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.	정우용, 전채욱	66:731-737	영국	MICROBIOLOGY	SCI /IF 2.134	2016.01.02	
6	In vitro digestion and fermentation of sialyllactoses by infant gut microflora	Journal of functional foods	문진석, 한남수	21	영국	Elsevier	SCIE /IF 3.973	2016.03.01	
7	Effects of temperature on bacterial communities and metabolites during fermentation of myeolchi-aekjeot, a traditional Korean fermented anchovy sauce	PLoS ONE	정지영, 전채욱	11(3):e0151351	미국	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCIE /IF 3.057	2016.03.15	
8	Application of In Vitro Gut Fermentation Models to Food Components: A Review	Food Science and Biotechnology	문진석, 한남수	25	한국	한국식품과학회	SCIE /IF 0.699	2016.03.30	
9	Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of doenjang: A traditional Korean	Frontiers in Microbiol.	정우용, 전채욱	7:827	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE /IF 4.165	2016.05.31	

		fermented soybean paste								
3 차 년 도	1	Integrative view of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent oxygenase diversity and functions in bacteria	BBA-Gen eral Subjects	가보뢰, 전체옥	1861(2): 323-33 4	네덜 란드	Elsevier	SCI /IF 4.702	2017. 2.1	
	2	Evolutionary, computational, and biochemical studies of the salicylaldehyde dehydrogenases in the naphthalene degradation pathway	Scientific Reports	가보뢰, 전체옥	7: 43489	영국	NATUR E PUBLIS HING GROUP	SCI /IF 4.259	2017. 2.24	
	3	Macromolecular and elemental composition analyses of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293 cultured in a chemostat	Journal of Microbiol ogy and Biotechno logy	방정수, 한남수	27	한국	Korean Society for Microbio logy and Biotechn ology	SCIE /IF 1.75	2017. 05. 28	
	4	A proposal of <i>Leuconotoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i> subsp. nov. and transfer of <i>Leuconotoc mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> (Gu <i>et al.</i> , 2012) as <i>Leuconostoc suionicum</i> sp. nov., comb. nov. based on complete genome sequences	Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.	전혜희, 전체옥	67:222 5-2230	영국	MICROB IOLOGY	SCI /IF 2.134	2017. 07. 03	
4 차 년 도	1	Large-scale examination of functional and sequence diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent oxygenases in Metazoa	BBA-Gen eral Subjects	가보뢰, 가Ke Tang, 천병희, 전체옥	1861: 2922-2 933	네덜 란드	Elsevier	SCI /IF 3.679	2017. 11.1	
	2	Pan-genomic and transcriptomic analyses of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation	Scientific Reports	천병희, 김경현, 전혜희, 이세희, 전체옥	7: 11504	영국	NATUR E PUBLIS HING GROUP	SCI /IF 4.122	2017. 9.14	
	3	Characteristics of Korean Rice Sourdough, Jeung-Pyun	Journal of Microbiol ogy and	박재현, 서지선, 김설아,	27(10): 1736-1 743	한국	The Korean Society	SCIE /IF 1.650	2017. 10.02	

		Biotechnol ogy	신소연, 박종현, 한남수			for Microbio logy and Biotechn ology			
4	Identification of trans-4-hydroxy-L-proline as a compatible solute and its biosynthesis and molecular characterization in <i>Halobacillus halophilus</i>	Frontiers in Microbiol ogy	김경현, 가보뢰, 전체옥	8: 2054	스위 스	FRONTI ERS MEDIA SA	SCIE /IF 4.019	2017- 10-20	
5	<i>Sphingobacterium humi</i> sp. nov., isolated from soil	Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.	이윤희, 진현미. 정혜수, 전체옥	67(11), 4632-4 638	영국	MICROB IOLOGY	SCI /IF 1.932	2017- 11-01	
6	<i>Cohnella algarum</i> sp. nov., isolated from a freshwater green alga <i>Paulinella chromatophora</i>	Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.	이윤희, 전체옥	67(11), 4767-4 772	영국	MICROB IOLOGY	SCI /IF 1.932	2017- 11-01	
7	Genome-scale modeling and transcriptome analysis of <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> unravel	Scientific Report	Lokana and Koduru , 이동엽, 한남수	15721 (2017)	영국	Nature	SCI /IF 4.122	2017- 11-16	
8	<i>Sphingobium paulinellae</i> sp. nov. and <i>Sphingobium</i> <i>algicola</i> sp. nov., isolated from a freshwater green alga <i>Paulinella</i> <i>chromatophora</i>	Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.	이윤희, 전체옥	67(12), 5165-5 171	영국	MICROB IOLOGY	SCI /IF 1.932	2017- 12-01	
9	Integrative View of the Diversity and Evolution of SWEET and SemiSWEET Sugar Transporters	Frontiers in Plant Science	가보뢰, 전체옥	8: 2178	스위 스	FRONTI ERS MEDIA SA	SCIE /IF 3.678	2017- 12-20	
	Development of Cabbage Juice Medium for Industrial Production of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Starter.	J Microbiol ogy and Biotechnol ogy	정은지, 한남수	27(12): 2112-2 118	한국	Korean Society for Microbio logy and Biotechn	SCIE /IF 1.650	2017- 12-28	

						ology			
--	--	--	--	--	--	-------	--	--	--

나. 국내 및 국제학술회의 발표

		코드번호			C-06-02	
	No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1차 년도	1	15th International Symposium on Microbial Ecology	이세희, 전체옥	2014.08.24	서울	대한민국
	2	Dasan conference	한남수	2014.12.04	평창	대한민국
	3	Dasan conference	주우하	2014.12.04	평창	대한민국
	4	International conference on Tempe and its related products	전체옥	2015.02.17	족자카르타	인도네시아
	5	한국미생물학회	한남수	2015.04.18	창원	대한민국
	6	한국식품과학회	문진석	2015.06.03	부산	대한민국
	7	한국식품과학회	주우하	2015.06.04	부산	대한민국
	8	한국식품과학회	dhanashekaran sharon shiny	2015.06.04	부산	대한민국
	9	한국식품과학회	권예원	2015.06.04	부산	대한민국
2차 년도	1	International Conference on Food Factors (ICoFF2015)	한남수	2015.11.23	서울	대한민국
	2	ICoFF2015	이령	2015.11.23	서울	대한민국
	3	ICoFF2015	주우하	2015.11.23	서울	대한민국
	4	ICoFF2015	이수진	2015.11.23	서울	대한민국
	5	ICoFF2015	문진석	2015.11.24	서울	대한민국
	6	2016 한국미생물학회	김혜립	2016.04.20	광주	대한민국
	7	2016 한국미생물학회	전혜희	2016.04.21	광주	대한민국
	8	International conference of beneficial microbe	전체옥	2016.06.01	푸켓	태국
	9	International Conference of Beneficial Microbe	한남수	2016.06.01	푸켓	태국
	10	한국미생물생명공학회	전체옥	2016.06.23	대전	대한민국

3차 년도	1	2016 한국유전체학회	전혜희	2016.09.06	서울	대한민국
	2	2016 한국유산균·프로바이오틱스학회 정기학술대회	전체옥	2016.11.18	서울	대한민국
	3	5th Asian Federation of Societies for Lactic Acid Bacteria International Symposium (5th AFSLAB)	방정수	2016.11.28	타이페이	대만
	4	5th AFSLAB	서지선	2016.11.28	타이페이	대만
	5	5th AFSLAB	한남수	2016.11.29	타이페이	대만
	6	2016 한국미생물학회	천병희	2016.12.22	강원	대한민국
	7	한국미생물생명공학회 동계 심포지엄	서지선	2017.01.16	강원	대한민국
	8	2016 한국유전체학회 동계심포지엄	전체옥	2017.02.09	강원	대한민국
	9	2017 한국미생물학회 국제학술대회	김경현	2017.04.27	부산	대한민국
	10	2017 한국미생물학회 국제학술대회	천병희	2017.04.27	부산	대한민국
4차 년도	1	2018 한국 미생물학회 국제학술대회	전체옥	2018.04.25	평창	대한민국
	2	2018 한국 미생물학회 국제학술대회	한동민	2018.04.25	평창	대한민국
	3	2018 한국 미생물학회 국제학술대회	김정은	2018.04.25	평창	대한민국
	4	ISAPP2018	박다민	2018.06.05	싱가포르	싱가포르
	5	ISAPP2018	한남수	2018.06.05	싱가포르	싱가포르
	6	2018 한국 미생물 생명공학회	장예지	2018.06.27	여수	대한민국
	7	2018 한국 미생물 생명공학회	박다민	2018.06.27	여수	대한민국

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	코드번호		발생년도
		등록/기탁번호	등록/기탁기관	
			C-06-03	

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

						코드번호	C-06-04			
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율	
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호		
1	면역조절 활성을 갖는 류코노스톡 시트리움 EFEL2061 균주 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2015.06.15	10-2015-0084101					
2	류코노스톡 메센테로이드 DRC1506 균주 및 이의 용도	대한민국	대상주식회사	2016.11.25	10-2016-0158488					

마. 전문연구 인력양성

						코드번호	C-06-06						
No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
	인력양성	2015	3				2	1	2	1			
	인력양성	2016	1	3			2	2	1	3			
	인력양성	2017		7			1	6	7				
	인력양성	2018		3			2	1	1	2			

바. 기술거래(이전) 등

					코드번호	C-06-08	
8	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황	

사. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화 명	내용	업체명	코드번호		C-06-10	
							매출액 (백만원)		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자가실시	기존제품개선	국내·국외	배추김치류 스타터 중균 산업적 적용	배추김치류 내수 및 외식 수출김치 스타터 중균 적용	(주)대상	68,020	5,534	17.02	15년
2	자가실시	기존제품개선	국내·국외	무김치류 스타터 중균 산업적 적용	무김치류 내수 및 외식 수출김치 스타터 중균 적용	(주)대상	6,120	1,479	17.02	15년

아. 기타 (홍보·전시)

No	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자	
1차년도	(27권/06호 / 359)	학술기고	한국미생물생명공학회 e-생물산업	“실험실 진화기법을 이용한 전통발효식품용 중균개발 및 산업적 활용”	2014년 11월
2차년도	41권/4호/ ISSN 2383-5338 (Online)	학술기고	한국미생물학회 웹진(MSK Webzine)	실험실 진화기법의 적용을 통한 전통발효식품의 중균 개발 및 산업적 이용	2015년 12월
3차년도	1	TV방송	SBS 뉴스	김치 유산균의 1% '결정적 재료'...마늘의 힘	2016년 7월
	2	TV방송	SBS 뉴스	빨간 김치와 하얀 김치... '고춧가루의 비밀'	2016년 7월
	3	TV방송	SBS 뉴스	[건강리포트] 빨간 김치·하얀 김치...색에 따라 달라지는 효능	2016년 7월
	4	보도자료	연합TV 뉴스, 전업농신문	김치종주국의 자존심을 세운다 - 유전체 연구를 통해 표준화된 고품질 김치의 산업적 생산 길 열어	2017년 7월
4차년도	1	TV방송	YTN 사이언스	김치 맛과 향 조절하는 유산균 원리 밝혔다	2017년 10월

(포상 및 수상 실적)

No	종류	포상명	포상내용	대상	일자	포상기관	
2차년도	1	학회시상	Young Investigator	구두 발표 우수자	이 령	2015.11.25	ICoFF
3차년도	1	학회시상	우수포스터발표상	우수포스터발표상	서지선	2017.01.17	한국미생물생명공학회

차. 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	관련제품	개발후 현재까지	3,360 억원
			향후 3년간 매출	8,642 억원
	시장 점유율	관련제품	개발후 현재까지	국내 : 47.6 % 국외 : 67.6 %
			향후 3년간 매출	국내 : 53.7 % 국외 : 76.5 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		4년		
	소요예산(백만원)		1,633		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			3,360	3,475	4,205
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
			국내	47.6	53.7
국외			67.6	76.5	83.1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		김치 신제품 적용 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		1.06	1.37	1.66
	수 출		54.9	60.4	66.5

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	관련제품	개발후 현재까지	3,360 억원
			향후 3년간 매출	8,642 억원
	시장 점유율	관련제품	개발후 현재까지	국내 : 47.6 % 국외 : 67.6 %
			향후 3년간 매출	국내 : 53.7 % 국외 : 76.5 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1 위

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 제1세부과제: 김치유산균 유전체 분석 및 종균개량 연구

구분	연구개발목표	세부연구목표
1차년도 (2014)	○김치유산균의 특 성 및 유전체 해 독연구	○세부 및 협동연구 기관에서 보유한 김치유산균(필요시 국 내외 연구기관으로 김치유산균 분양 예정)의 발효특성(pH 내성, mannitol. bacteriocin, 성장온도 및 성장 salt 범위, 성장 속도 등) 조사(국내 김치로부터 자주 발견되는 <i>Leu.</i> <i>mesenteriodes</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>W. koreensis</i> 가 우선대상 균주 임) ○발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서 열 완전해독(유전체 2건 이상 해독 및 NABIC에 등록; 대 상(주)에서 사용 중인 유산균도 분석 대상임) ○분석된 김치유산균의 유전체 정보와 GenBank에 등록되거 나 본 연구실에서 이미 확보한 김치유산균 유전체 정보를 바탕으로 김치유산균의 대사적, 기능적, 발효적, 유전적 특 성 분석 ○김치유산종균의 특성 개량을 위한 반응기 시스템제작
2차년도 (2015)	○김치유산균의 유 전체 분석 및 김 치유산종균 개량 연구	○발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서 열 해독(유전체 2건 이상 해독 및 NABIC에 등록) ○기존에 분석된 김치유산균의 유전체 정보와 비교분석 ○김치유산종균의 특성 개량 대상 균주선정(최소 2종 선정) ○김치유산균의 개량타겟(김치발효 환경 적응성, 저온 적응 성, 산저항성, 발효능 향상, 기능적 향상 등) 선정 ○김치유산종균 개량을 위한 반응기 운전 최적화 및 종균개 량연구
3차년도 (2016)	○김치유산균의 종 균개량 및 특성 분석	○발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서 열 해독(유전체 1건 이상 해독 및 NABIC에 등록) ○김치유산균의 개량타겟(김치 발효 환경, 대사 경로 조절)에 대한 김치유산균의 균주개량연구

		<ul style="list-style-type: none"> ○개량 김치유산균의 환경적응성(fitness) 실험을 통한 균주 개량확인 및 유전체 변화 비교분석(Illumina sequencing에 의한 resequencing) ○유전체 변화에 따른 환경 적응성 변화 기작 연구(pH 내성, mannitol, bacteriocin, GABA 생산능, 성장온도 및 salt 범위, 성장 속도 등)
4차년도 (2017)	○개량김치유산균주의 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○개량 균주의 오믹스 분석기술(전사체, 대사체 분석)을 이용한 개량균주 특성분석 ○개량된 우수 김치유산종균 선정 ○김치유산종균으로의 사용에 따른 발효과정 중 김치 내 미생물 군집 및 대사체 변화 분석연구(pyrosequencing과 NMR을 이용하여 각각 미생물 군집 및 대사체를 분석할 예정임): 단일 종균 또는 복합종균으로서의 사용시 미생물 군집 및 대사체 변화 분석연구 수행

나. 제1협동과제:

구분	연구개발목표	세부연구목표
1차년도 (2014)	○김치유산균의 기능성 및 안전성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○김치유산균의 유전체 분석을 통한 3가지 기능성 규명 (mannitol생성, bacteriocin 생성, prebiotic 올리고당생성) ○안전성(D-lactic acid 생성 효소, d-lactate dehydrogenase) 관련 유전자 분석 및 관련 유전자들의 분자생물학적 기작 규명 및 대사공학적 조절 기술 개발 ○원균주 및 개량균주의 probiotic 효과 분석(대장내 유익균 증식, 유해균 억제, 원활한 배변활동, 면역활성 효과)
2차년도 (2015)	○김치유산균의 기능성 및 안전성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○김치유산균의 유전체 분석을 통한 2가지 기능성 규명(비타민 K, B9 생성능, 난소화성 소당류(stachyose, raffinose) 분해능) ○1가지 안전성(biogenic amine 생성 효소균, amino acid decarboxylases) 관련 유전자 분석 ○관련 유전자들의 분자생물학적 기작 규명 및 대사공학적 조절 기술 개발 ○장내 정착을 위한 위산 내성, 담즙산 내성 기작 규명 및 관련 유전자 분석 ○발효과정 중 김치 유산균에서 기능성 인자 발현 여부 검증연구 ○김치유산종균의 probiotic 허가를 위한 안전성 분석
3차년도 (2016)	○김치유산균의 기능성 및 안전성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○김치유산균의 유전체 분석을 통한 2가지 기능성 규명 (시안배당체 분해능, phytochemical 생물전환능) ○1가지 안전성(항생제 내성 효소, vancomycin-resistance) 관련 유전자 분석 ○김치유산균의 원균주 및 개량균주의 발효능 및 안전성 연구 ○김치유산종균을 사용하여 제조한 김치의 기능적 특성 변화 연구 ○김치유산종균 메인 발효 유도를 위한 김치 표준화(산도, pH, 염도)

		○김치 Starter 산업적 생산을 위한 배양 및 발효조건 최적화 중균 생산 연구 : 대량 배양 조건 확립
4차년도 (2017)	○제조 김치의 기능적 특성 연구	○김치유산중균의 사용하여 제조한 김치의 기능적 및 안전성 특성 변화 연구 ○김치유산중균의 기능성과 안전성을 확보하는 김치 발효 조건 및 발효 기술의 효과 검증

다. 제2협동과제: 김치유산균 실증화 및 산업화 연구

구분	연구개발목표	세부연구목표
1차년도 (2014)	○김치 제조의 표준화 연구 및 제조 기반 구축	○김치 표준 스펙 개발 및 공정 표준 제조 Manual화 -계절별 균일한 발효 품질 김치 공정 개발 ○김치 유산중균의 발효 안정화 제조공정 설계 ○균주 접종 시스템 개발 및 우점율 향상 제조 공정 구축
2차년도 (2015)	○김치유산균의 산업적 적용을 위한 특성연구	○유산균 Starter 최적 농도 설계 -최적의 우점율 공정 설계 -배추김치 외 별미김치 유산균 Starter 적용 연구 ○발효 단계별, 계절별 우점율 효과 분석 -김치 적숙기, 과숙기 품질 분석 (이화학, 맛 분석) -계절별 김치 유산균 Starter 우점율 모니터링 ○김치 유통 Simulation -각 온도별 김치 발효 Pattern 분석 및 품질 안정화 연구 -미생물 분석, 이화학적 특성 분석, 유통 안정성 확인
3차년도 (2016)	○김치유산균의 실증화 및 산업화 연구	○김치 Starter 적용 표준 모델 개발 -년중 균일한 품질의 메인 발효 유도 ○균주 접종 시스템 안정화 -우점율 향상 및 발효 안정화 ○유산균 Starter 김치 산업적 생산 최적화(시제품 생산 1건 이상) ○유통 Simulation을 통한 김치 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구 ○개량 균주의 김치 발효 안정화 ○개량 균주의 메인 발효 기능성 대사산물 생성 최적화 ○균주 접종 시스템 안정화 ○다양한 김치에 적용성 검증을 통한 제품별 특성 연구
4차년도 (2017)	○김치의 사업화·실용화	○맛 기호도 증진 기능성 김치 제품 개발 ○고기능성 김치유산균종(개량 균종) 적용 표준화된 김치 상품화 2건 -김치 유산균종 메인 발효 -숙성 단계별 향미 Profile 구축 -유통 안정성 안전성 검증 -배추김치 및 무김치 상품화 2건

3-2. 목표 달성여부

가. 제1세부과제: 김치유산균 유전체 분석 및 중균개량 연구

구분	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
1차년도 (2014)	○세부 및 협동연구 기관에서 보유한 김치유산균의 발효특성 조사	100 %	○연구팀이 보유하고 있는 김치유산균(<i>Leu. mesenteriodes</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>W. koreensis</i>) 중 김치 내 우점 및 발효특성 (pH 내성, mannitol, bacteriocin, 성장온도 및 성장 salt 범위, 성장 속도 등) 조사 ○김치발효용 스타터 개발 및 진화 대상균주로서 만니톨, 비타민 B2, B9 생성 유전자, 박테리오신 생성유전자를 보유하고 있는 <i>Leu. meseteroides</i> J18을 선정
	○발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서열 완전해독	100 %	○김치유산균 2 균주 (<i>Leu. meseteroides</i> J18 및 DRC0211) 유전체 정보서열 완전해독
	○김치유산균의 대사적, 기능적, 발효적, 유전적 특성 분석	100 %	○대장세포 면역 증진 및 유해미생물 방어 증진효과 연구 ○개량 후보 균주의 비타민, 박테리오신 생성 등의 유용 유전자 보유여부 분석 ○개량 후보 균주의 바이오제닉 아민 생성 유전자와 같은 안전성 분석
	○김치유산중균의 특성 개량을 위한 반응기 시스템제작	100 %	○김치유산중균의 특성개량을 위한 반응기 시스템구축 및 반응기 시험운전완료
2차년도 (2015)	○발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서열 해독	100 %	○우수한 발효능과 기능성을 가진 <i>Leu. meseteroides</i> J18와 프로바이오틱스 <i>Lb. rhamnosus</i> GG를 개량 대상 균주로 최종 선정 ○유전체 분석결과 <i>Leu. meseteroides</i> J18은 만니톨, 비타민 B2, B9 생성 유전자, 박테리오신 생성유전자 등 다양한 유용유전자를 보유하고 있음을 확인 ○ <i>Lb. rhamnosus</i> GG 균주는 내산성 관련 유전자 보유 여부 분석
	○기존에 분석된 김치유산균의 유전체 정보와 비교분석	100 %	○ <i>Leu. mesenteroides</i> DRC0211 (대상FNF, 종가집김치)와 기존 종가집김치에서 분리된 <i>Leu. mesenteroides</i> J18균주 사이의 유전체 서열을 비교 분석함으로써 김치유산균의 대사적, 기능적, 발효적, 유전적 특성을 연구 ○ <i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506 균주(대상FNF,

			<p>종가집김치 스타터 예정 균주)와 기존에 분석된 유산균들 사이의 김치 발효 관련 gene 및 대사산물 비교분석</p>
	○김치유산중균의 특성 개량 대상 균주선정 및 개량 타겟 선정	100 %	<p>○ <i>Leu mesenteroides</i> J18의 저온진화를 위한 계대배양 연구 진행</p> <p>○ <i>Leu mesenteroides</i> J18의 내산성 향상을 위한 진화 연구 진행</p> <p>○ <i>Lb. rhamnosus</i> GG의 김치환경 및 저온 저항성 향상을 위한 균주개량 연구 진행</p>
	○김치유산중균 개량을 위한 반응기 운전 최적화 및 중균개량연구	100 %	<p>○김치환경에서 생존율 및 우점도를 향상시키기 위해 J18의 저산 적응성 향상 실험을 위한 반응기 시스템 구축 및 운전 조건 최적화</p> <p>○ <i>Lb. rhamnosus</i> GG을 김치 발효 환경에 적응시키기 위한 연구 수행</p>
3차년도 (2016)	○발효능과 기능성이 우수한 균주 선정 및 유전체 정보 서열 해독	100 %	<p>○1H-NMR 및 LC/MS를 이용한 김치유산균의 대사체 분석 및 Growth test 진행</p> <p>○PacBio와 Illumina의 혼합 시스템을 이용한 김치유산균 유전체 완전해독 수행</p>
	○김치유산균의 개량타겟(김치 발효 환경, 대사 경로 조절)에 대한 김치유산균의 균주개량연구	100 %	<p>○저온 (6°C)환경 내 김치유산균 <i>Leu mesenteroides</i> J18의 생존율을 높이기 위한 계대배양을 수행</p> <p>- 최종 500세대의 계대배양을 수행</p> <p>○발효기를 이용한 연속 배양 방법으로 저산성의 배지 투입방법으로 <i>Leu mesenteroides</i> J18 균주의 내산성 획득 개량 수행</p> <p>○ <i>Lb. rhamnosus</i> GG의 김치환경 및 저온 내 생존율 향상을 위한 자외선 조사를 통한 돌연변이 유도 및 저온 환경 내 계대배양 수행</p>
	○개량 김치유산균의 환경적응성(fitness) 실험을 통한 균주 개량확인 및 유전체 변화 비교분석	100 %	<p>○spotting test를 이용한 환경적응(fitness) 실험을 통한 대상 균주의 개량 여부 분석 연구 수행</p> <p>-저온 적응성 균주들을 Illumina Hiseq으로 전체 염기서열의 유전적 변이(SNP) 탐색</p> <p>-변이된 유전체와 저온에 대한 저항성의 상관관계 연구</p> <p>-유전체 변이 지점을 마커로 이용한 저온 환경내 경쟁적 적응성에 대한 연구를 수행</p> <p>○환경적응(fitness) 실험을 통한 개량 확인 연구</p> <p>-낮은 pH 조건에 대한 개량 수행 균주들에</p>

			대한 개량 여부 확인을 위해 spotting test 를 진행
	○유전체 변화에 따른 환경 적응성 변화 기작 연구	100 %	○Illumina Hiseq을 통하여 생산된 유전체 서열 정보를 분석하여 저온 환경에 대한 적응성과의 상관관계를 파악 -각 개량 균주들의 대사체 분석을 통하여 김치 종균으로의 기능성 측면 분석
4차년도 (2017)	○개량 균주의 오믹스 분석기술(전사체, 대사체 분석)을 이용한 개량균주 특성분석	100 %	○온도 조건에 따른 전사체 분석을 통하여 개량 균주의 특성 분석
	○개량된 우수 김치유산종균 선정	100 %	○우수 김치유산종균 <i>Leu. mesenteroides</i> DRC 1506의 선정
	○김치유산종균으로의 사용에 따른 발효과정 중 김치 내 미생물 군집 및 대사체 변화 분석연구	100 %	○우수 김치유산종균 <i>Leu. mesenteroides</i> DRC 1506의 적용김치의 미생물 군집의 변화 분석 ○1H-NMR을 이용한 김치 유산 종균 적용 김치의 발효과정에 따른 대사체 변화 분석

나. 제1협동과제: 김치유산균의 기능성 및 안전성 연구

구분	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
1차년도 (2014)	○김치유산균의 유전체 분석	100 %	○ <i>Leu. lactis</i> EFEL005 유전체분석
	○특성 규명 dextran생성	100 %	○ <i>Leu. lactis</i> EFEL005의 dextransucrase 활성 측정
	○우수 미생물자원의 유전체 정보서열 완전해독	100 %	○ <i>Leu. lactis</i> EFEL005 NABIC 등록
2차년도 (2015)	○유전체 분석을 통한 기능성 및 안전성 관련 유전자 분석	100 %	○1차년도에 선발한 <i>Leuconostoc</i> 속 균주를 대상으로 미생물 난소화성 다당류인 stachyose, raffinose와 같은 다당류를 분해하는 능력을 측정 ○Histidine, tyrosine decarboxylase gene을 specific primer를 제작하여, PCR을 통해 gene의 유무를 실험을 통해 밝힘
	○장내 정착을 위한 위산 내성, 담즙산 내성 기작 규명 및 관련 유전자 분석	100 %	○균주의 장관안정성을 측정하기 위하여 <i>Leu. citreum</i> EFEL2061, <i>Leu. lactis</i> EFEL005, <i>Leu. mesenteroides</i> DRC의 내산성과 담즙산 내성을 측정
	○분리 유산균 김치 적용성 분석을 위한 표준화된 살균 김치배지	100 %	○다양한 김치 주재료 부재료 포함하여 김치 원료 표준화 ○살균조건 최적화로 영양성분 손실 최소화 및

	제조		무균 배지 제조 ○실용적이고 편리한 공정 선택
3차년도 (2016)	○김치유산균의 유전체 분석을 통한 2가지 기능성 규명 (시안배당체 분해능, phytochemical 생물전환능)	100 %	○ <i>Leuconostoc</i> 속 균주가 glucose free (adding cellobiose) 조건에서 생성하는 β -glucosidase 효소가 다당류를 분해하는 능력을 측정하기 위해 β -Glucosidase gene을 탐색
	○김치유산균의 원균주 및 개량균주의 발효능 및 안전성 연구	100 %	○김치발효에 적합한 프로바이오틱스 후보균주 9 종 분리 ○김치유산균종 후보균주 <i>Lactobacillus plantarum</i> 9 종에 대한 9가지 항생제 내성을 측정 ○Histidine, Tyrosine decarboxylase gene을 specific primer를 제작하여, PCR을 통해 gene의 유무를 실험을 통해 밝힘
	○김치유산종균을 사용하여 제조한 김치의 기능적 특성 변화 연구	100 %	○균주의 장관안정성을 측정하기 위하여 <i>Lactobacillus plantarum</i> JS 1-9 균주의 내산성과 내담즙산성을 측정 ○균주의 장내정착성을 측정하기 위하여 <i>Lb. plantarum</i> JS 1-9 균주의 Caco2-cell 부착능을 측정 ○균주의 용혈현상 유무를 측정하기 위하여 <i>Lb. plantarum</i> JS 1-9 균주의 용혈실험을 실시
	○김치유산종균 메인 발효 유도를 위한 김치 표준화(산도, pH, 염도)	100 %	○다양한 김치 주재료 부재료 포함하여 액체 김치 배지 조성의 표준화 ○준비 과정별 차이를 두어 김치 표준화 배지에서의 유산균 적응성시험 수행(물리적 차이, 삼투압추출조건)
	○김치 스타터 산업적 생산을 위한 배양 및 발효조건 최적화 종균 생산 연구	100 %	○산업적 생산을 위해 김치 주재료를 포함한 표준 배지를 구축하고자 탄소원, 질소원 및 염류와 같은 다양한 부족한 영양소를 보충함으로써 조성을 최적화
4차년도 (2017)	○김치유산종균을 사용하여 제조한 김치의 기능적 및 안전성 특성 변화 연구	100 %	○식품 유래 유해균인 <i>H.pylori</i> 의 생육 저해능을 조사하기 위하여 Paper disc법을 이용하여 항균활성을 평가 ○4종의 장내 유해균 (<i>H. pylori</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i>)에 대한 항균활성을 Co-aggregation 시험을 통해 평가 ○ <i>Leu. mesenteroides</i> DRC 1506 종균의 면역조절 활성능 조사를 위해 3가지 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-12) 유도능을 평가 ○ <i>Lb. plantarum</i> JS 균주의 동결건조물을 이용한 면역 활성 측정

	○김치유산종균의 기능성과 안전성을 확보하는 김치 발효 조건 및 발효 기술의 효과 검증	100 %	○유산균의 in silico 계놈 모델 구축과 대사 공학 기술 이용
--	---	-------	---------------------------------------

다. 제2협동과제: 김치유산균 실증화 및 산업화 연구

구분	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
1차년도 (2014)	○김치 표준 스펙 개발	100 %	○표준 김치 제품 규격 설정완료 -이화학적 기준 (염도, pH, 산도 등) ○제조 공정 설계 -각 공정별 관리 규격 설정(절입, 양념제조공정, 출하공정)
	○김치 유산균종의 발효 안정화 공정 설계	100 %	○종균 공정 및 품질관리 기준 설정 -Starter 관리 공정별 내용 정의, CCP 및 관리기준 설계 ○제품 숙성 품질 점검 -제품 숙성 발효 Pattern 모니터링
	○균주 접종 시스템 개발 및 우점을 향상 제조공정 구축	100 %	○균주 배양 및 활성화, 접종 System 구축 ○우점을 관리 기준 설계 및 모니터링
2차년도 (2015)	○김치 유산종균 최적 농도 설정	100 %	○유산종균 최적 농도 설계 ○최적의 우점을 공정 설계 -유산균 농도별 적용하여 우점을, 미생물 및 이화학적 특성 분석하여 최적 적용 농도 확립 -김치 starter 산업적 생산을 위한 배양 및 발효 조건을 확립 ○배추김치 외 별미김치 유산균 Starter 적용 연구 -제품 적용 농도 및 숙성 단계별 품질 표준화 -별미김치에 맞는 유산균 starter 적용 공정 확립 및 우점을 분석 진행
	○발효 단계별 유산균 Starter 우점을 효과 분석	100 %	○발효 단계별, 계절별 우점을 효과 분석 ○김치 적숙기, 과숙기 품질 분석 (이화학, 맛 분석) -유통모니터링을 진행하여 이화학, 미생물 변화를 측정 -우점을 약 40 % 이상으로 우점 양호함.

			<ul style="list-style-type: none"> -맛테스터기를 이용하여 초기, 적숙기의 맛패턴 변화를 확인 -무침가군과 스타터 첨가군의 초기 맛 패턴의 유의차는 없었으나, 적숙기(10 °C, 7일차, 산도 약 0.8%) 패턴 결과, 신맛이 상대적으로 적은 것을 확인 ○계절별 김치 유산균 Starter 우점을 모니터링 -계절별 유산균 starter 적용 김치를 제조하여 우점을 측정
	○유통 Simulation을 통한 김치 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○각 온도별 김치 발효 Pattern 분석 및 품질 안정화 연구 -온도별(5°C, 10°C, 20 °C) 유통모니터링 진행, 발효 pattern 확인 ○미생물 분석, 이화학적 특성 분석, 유통 안정성 확인 -스타터 적용 시에도 규격 적합임을 확인
3차년도 (2016)	○김치 Starter 적용 표준 모델 개발	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○연중 균일한 품질의 메인 발효 유도 -계절별 유산균 스타터 적용 김치를 제조하여 미생물 및 이화학 분석 -발효 초기 및 숙성 이후 계절별로 균일한 우점을 패턴을 보임. 적숙기 기준 겨울철에 우점율이 가장 높으며 봄철에 우점율이 가장 낮음 -발효 초기 및 숙성 이후 산도 변화는 균일한 산도 패턴을 보임. 여름철 가장 높게 나타났으며 봄철에 가장 낮음
	○균주 접종 시스템 안정화	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○균주 접종 시스템 통한 김치 제조 후 우점율 및 발효 패턴 모니터링 진행 -미생물, 이화학 및 관능 분석하여 설정된 규격 적합성 확인 ○동월 기존 및 신규 스타터 발효 패턴 비교 분석 -기존 김치 및 <i>Leu. mesenteroides</i> DRC 1506 적용 김치 산도 패턴 분석 -적숙기 이후 기존 김치 대비 <i>Leu. mesenteroides</i> DRC1506 적용 김치 산도 1.0% 도달 기준 3일 차이 발생, 가식기간 연장 효과
	○유산균 Starter 김치 산업적 생산 최적화 (시	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○설계된 제조 공정에 맞게 김치 제조 후 규격 적합성 확인

	제품 생산 2건 이상)		<ul style="list-style-type: none"> -유산균 starter 시생산 결과, 포기김치 우점을 규격 기준치 적합함 (적숙기 우점을 평균 87.89%). -현장 적용시 우점을 및 발효 품질 안정화 확보
	○유통 Simulation을 통한 김치 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○유통 온도에 맞게 보관 후 발효 패턴 분석 -유통모니터링 결과 적숙기 우점을 약 50% 이상으로 발효 안정화 확보하여 김치의 품질 향상과 균일화 확보
	○개량 균주의 김치 발효 안정화	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○개량 균주 적용 김치 제조 후 모니터링(미생물, 이화학 및 관능) -균주 적용 김치 발효 품질 모니터링 결과, 적숙기 기준 우점을 약 50% 이상으로 발효 안정화 확보함 -김치 숙성 시, 적용 균주 생산 대사산물인 만니톨, 이산화탄소, 유기산 등이 탄산미 및 시원한 맛을 부여하여 관능 품질 향상
	○개량 균주의 메인 발효 기능성 대사산물 생성 최적화	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○개량 균주 적용 김치 대사산물 분석(적숙기, 과숙기) -발효 기간별 김치 대사산물 분석 결과, 과당 함량은 0일에서 발효 10일까지 급격히 감소하였으며, 그 이후 발효 일수가 진행될수록 서서히 감소함 -만니톨 함량은 0일에서 발효 10까지 급격히 증가하였으며, 이는 유산균에 의해 발효가 진행되면서 과당을 대사하여 만니톨로 전환된 것으로 확인 -유기산 함량 분석 결과, 구연산이 발효 초기에 급격히 감소하며 젖산은 10일까지 젖산발효가 진행되면서 증가하며 이후에 감소하는 것을 확인 ○기능성 대사산물 생성 최적화 개량 균주 농도 확인
	○다양한 김치에 적용성 검증을 통한 제품별 특성 연구	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ○유산균 starter 적용 김치 제품 숙성 패턴 분석 및 발효 안정화 연구 -맛김치, 깍두기, 열무김치, 총각김치 미생물, 이화학 및 관능 분석 진행 -김치 종류별 발효 품질 차이 발생하며 이는 김치 원부재료 종류 및 함량 차이에서 기인한 것으로 사료

			-열무김치는 다른 종류의 김치에 비해 발효 속도가 느리며, 이는 김치 내 유산균의 증식 속도가 크게 증가하지 않은 것으로 관찰
4차년도 (2017)	○관능성(맛 기호도) 증진 기능성 김치 제품 개발	100 %	○외부 소비자 조사 통한 맛기호도 확인 -아삭한 식감, 시원한 맛, 알맞은 간은 공통적으로 선호되는 주요 요인임을 확인 -적당한 숙성도, 아삭한 식감, 시원한 맛은 공통적으로 선호되는 주요 요인임을 확인
	○고기능성 김치유산균종(개량 균종) 적용 표준화된 김치 상품화 2건	100 %	○김치 유산균종 메인 발효 -119개 colony 동정 결과 85.7 % <i>Leu. mesenteroides</i> 균주로 동정 -김치 유산균종 적용 김치 미생물 균총 분석 결과, 적숙 김치에서 40% 이상 우점 확인 ○김치 제조 표준화 및 기능성 김치 Spec 개발 -유산균의 최적 발효조건 및 공정표준 → QC 공정도 구성 및 점검 -김치 원부재료 세척 전후의 일반세균, 대장균, 효모 분석 -김치의 원부재료는 대부분 농산물로 토양미생물 등에 의해 위생적이지 못한 제품이 제조될 수 있음 -김치 원부재료의 미생물 수는 세척 전에 비해 세척 후 감소됨을 확인 ○맛 기호도 확보 고품질 제품 -김치 유산균종 적용 김치 특성 분석 결과, 기존 김치 대비 만니톨 고생성으로 김치에 시원한 청량감 부여, 신맛 masking 효과 -산도 1.0% 도달 기준 5일 차이 발생, 가식기간 연장 효과 ○숙성 단계별 향미 Profile 구축 ○유통 안정성 안전성 검증 -포기김치의 식중독 미생물 균총변화 분석 결과, 일반세균수와 유산균수는 유사하게 확인되었으며, 초기 대장균군이 검출되었으나 발효가 진행되면서 감소됨을 확인 ○배추김치 및 무김치 상품화 2건 -별미김치 단량 다양화 및 FS 경로 어린이 맞춤형 김치 등 김치유산균 적용 표준화 김치 상품화 완료

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

- 본 연구 과제를 통하여 검증된 안정성과 기능성이 뛰어난 김치유래유산균의 산업적 적용은 세계 시장에서 우위를 점할 수 있다.
- 안정성과 기능성이 뛰어난 김치유래유산균을 종균으로 적용한 고기능성의 표준화된 김치의 생산에 활용할 수 있다. 이를 통하여 세계시장에서 우리 김치의 위상을 높일 수 있다.
- 본 연구 과제를 통하여 개발된 기능적으로 검증된 김치유래유산균을 프로바이오틱스 유산균제로 상업화함으로써 관련 산업의 발전을 도모하는데 활용하고자 한다.
- 우수한 김치종균의 산업적 적용으로 김치제품의 매출증대, 고용창출 등의 시장 파급효과, 생산성 향상을 통한 산업화를 통한 기대효과를 얻을 수 있다.
- 안정적이며 고기능성의 김치를 생산하기 위한 김치 종균 개발에 본 연구 과제의 연구 방법을 활용할 수 있다.
- 본 연구과제를 통하여 개발된 개량 김치 종균을 김치 생산 기업에의 기술 이전할 수 있다.

붙임. 참고문헌

- Jeong EJ, Moon DW, Oh JS, Moon JS, Seong H, Kim KY, Han NS. (2017) Development of Cabbage Juice Medium for Industrial Production of *Leuconostoc mesenteroides* Starter. *J Microbiol Biotechnol.* 27(12), 2112-2118
- Lokanand Koduru, Yujin Kim, Jeongsu Bang, Meiyappan Lakshmanan, Nam Soo Han & Dong-Yup Lee. (2017) Genome-scale modeling and transcriptome analysis of *Leuconostoc mesenteroides* unravel
- Bang J, Li L, Seong H, Kwon YW, Lee DY, Han NS. (2017) Macromolecular and Elemental Composition Analyses of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 Cultured in a Chemostat. *J Microbiol Biotechnol.* 27(5), 939-942
- Ahn, D.K., Han, T.W., Shin, H.Y., Jin, I.N., Ghim, S.Y., 2003. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 191-196.
- Ahn, J.B., Park, J.A., Jo, H., Woo, I., Lee, S.H., Jang, K., 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of commercial doenjang and traditional doenjang in Korea. *Korean J. Food Nutr.* **25**: 142-148.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K.,

- Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**: 75.
- Baek, Y.H., Kwak, J.R., Kim, S.J., Han, S.S., Song, Y.O., 2001. Effects of kimchi supplementation and/or exercise training on body composition and plasma lipids in obese middle school girls. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 906-912.
- Chaillou, S., Champomier-Verges, M.C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.M., Dudez, A.M., Martin, V., Beaufile, S., Darbon-Rongere, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M., 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23 K. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1527-1533.
- Chang, S.K., 2007. Fermentation properties and *in vitro* anticancer effect of kimchi prepared with potato. *Korean J. Food cookery Sci.* **23**: 227-234.
- Cheigh, H.S., Hwang, J.H., 2000. Antioxidative characteristics of kimchi. *Food Industry and Nutrition.* **5**: 52-56.
- Cheigh, H.S., Lee, J.S., Moon, G.S., Prak, K.Y., 1993. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**: 565-569.
- Cheigh, H.S., Park, K.S., Moon, G.S., Park, K.Y., 1990. Antioxidative characteristics of fermented soybean paste and its extracts on the lipid oxidation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **19**: 163-167.
- Choi, C., Choi, K.S., Lee, S.H., Hong, S.P., Lee, H.D., Bae, D.K., 1998. Characteristics and action pattern of α -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean traditional meju. *Agr. Chem. Biotechnol.* **41**: 489-495.
- Choi, M.R., Yoo, E.J., Lim, H.S., 2003. Effect of lactic acid bacterium on antioxidative and ACE inhibitory activity in dolsan leaf mustard kimchi. *Korean J. Life Sci.* **13**: 59-66.
- Choi, S.H., Kwon, M.J., Baek, Y.H., Song, Y.O., 2001. The effect of kimchi pill supplementation on plasma lipid concentration in healthy people. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 913-920.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen,

- A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **37**: D141–D145.
- Dziuba, J., Iwaniak, A., Niklewicz, M., 2003. Database of protein and bioactive peptide sequences – BIOPEP. www.uwm.edu.pl/biochemia.
- Egert, M., de Graaf, A. A., Smidt, H., de Vos, W.M., Venema, K., 2006. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* **14**: 86–91.
- Ghai, R., Martin-Cuadrado, A.B., Molto, A.G., Heredia, I.G., Cabrera, R., Martin, J., Verdu, M., Deschamps, P., Moreira, D., Lopez-Garcia, P., Mira, A., Rodriguez-Valera, F., 2010. Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing. **4**: 1154–1166.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in Yeast. *Mol. Cell Biol.* **19**: 1720–1730.
- Handelsman, J., 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 669–685.
- Heng, N.C.K., Tagg, J.R., Tompkins, G.R., 2007. Competence-dependent bacteriocin production by *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis). *J. Bacteriol.* **189**: 1468–1472.
- Hong, S.W., Hah, Y.C., Min, K.H., 1970. The biochemical constituents and their changes during the fermentation of Takju. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **8**: 107–115.
- Hwang, J.H., Song, Y.O., Cheigh, H.S., 2000. Fermentation characteristics and antioxidative effect of red mustard leaf Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 1009–1015.
- Jeon, H.Y., Park, S.G., 2011. Comprehensive development plan for the promotion of traditional Korean liquors industry. *Food Sci. Industry* **44**: 28–32.
- Jeong, E.J., Kim, Y.S., Jeong, D.Y., Shin, D.H., 2006. Yeast selection and comparison of sterilization method for making strawberry wine and changes of physicochemical characteristics during its fermentation. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **38**: 642–647.
- Ji, S.T., Park, J.H., Hyun, C.K., Shin, H.K., 2000. The antigenotoxic effects of korean native fermented food, Baechu kimchi using comet assay. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 316–321.

- Johansson, P., Paulin, L., Sade, E., Salovuori, N., Alatalo, E.R., Bjorkroth, K.J., Auvinen, P., 2011. Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811^T, in association with specific spoilage reactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 4344–4351.
- Jun, H.K., Bae, K.M., Kim, Y.H., Baik, H.S., 2000. Production and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. JK-43 isolated from kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 42–48.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Jeon, C.O., 2012c. Complete genome sequence of *Leuconostoc gelidum* strain JB7, isolated from kimchi. *J. Bacteriol.* **194**: 6665.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Jeon, C.O., 2012d. Complete genome sequence of *Leuconostoc carnosum* strain JB16, isolated from kimchi. *J. Bacteriol.* **194**: 6672–6673.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Lee, S.H., Jeon, C.O., 2012a. Complete genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain J18, isolated from kimchi. *J. Bacteriol.* **194**: 730.
- Kang, S.Y., Han, M.J., 2005. Effect of kimchi ingredients on the growth of pathogenic and lactic acid bacteria. *Korean J. Food cookery Sci.* **21**: 838–843.
- Kim, B.J., Oh, J.Y., Kwon, M.S., Jung, H.W., Lee, K.P., 2011. Novel *Leuconostoc citreum*, fermentation foods and compositions comprising the same. Korean patent. 10-1099924.
- Kim, J.F., Jeong, H., Lee, J.S., Choi, S.H., Ha, M., Hur, C.G., Kim, J.S., Lee, S., Park, H.S., Park, Y.H., Oh, T.K., 2008. Complete genome sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. *J. Bacteriol.* **190**: 3093–3094.
- Kim, J.H., Park, W.S., Koo, Y.J., 1996. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverages with different input sep and treatment of rice and nuruk. *Kor. J. Dietary Culture* **11**: 339–348.
- Kim, J.H., Ryu, J.D., Song, Y.O., 2002. The effect of kimchi intake on free radical production and the inhibition of oxidation in young adults and the elderly people. *Korean J. Community Nutr.* **7**: 257–265.
- Kim, J.Y., Sung, K.W., Bae, H.W., Yi, Y.H., 2007. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added takju during

- fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. **39**: 266-271.
- Kim, M.J., Kim, G.R., 2006. In Vitro Evaluation of cholesterol reduction by lactic acid bacteria extracted from kimchi. Korean J. Culinary Res. **12**: 259-268.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol. **62**: 716-721.
- Kim, S.J., Ko, S.H., Lee, W.Y., Kim, G.W., 2004. Cytotoxin effects of Korean rice-wine (yakju) on cancer cells. Korean J. Food Sci. Technol. **36**: 812-817.
- Kim, Y.J., 2000. Physiological properties of kimchi. Food industry and nutrition. **4**: 59-65.
- Kim, Y.S., Shin, D.H., 2008. Hygienic superiority of kimchi. J. food hygiene and safety. **23**: 91-97.
- Ko, Y.J., Kang, S.D., Kang, S.T., Ryu, C.H., 2011. Quality properties and anti-allergic effect of makgeolli added with garlic. J. Life Sci. **21**: 1592-1598.
- Köhler, K., Domdey, H., 1991. Preparation of high molecular weight RNA. Methods in Enzymology **194**: 398-405.
- Kong, C.S., Bak, S.S., Rhee, S.H., Rho, C.W., Kim, N.K., Choi, K.L., Park, K.Y., 2006. Fermentation properties of young radish kimchi prepared using young radish cultivated in the soil containing sulfur, it's inhibitory effect on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. **35**: 158-163.
- Kong, Y.H., Cheigh, H.S., Song, Y.O., Jo, Y.O., Choi, S.Y., 2007. Anti-obesity effects of kimchi tablet composition in rats fed high-fat diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. **36**: 1529-1536.
- Kwon, J.Y., Cheigh, H.S., Song, Y.O., 2004. Weight reduction and lipid lowering effects of kimchi lactic acid powder in rats fed high fat diets. Korean J. Food Sci. Technol. **36**: 1014-1019.
- Lee, C.H., 1993. History of Korean liquor. Bioindustry News **6**: 4058-4061.
- Lee, I.H., Lee, S.H., Lee, I.S., Park, Y.K., Chung, D.K., Choue, R.W., 2008. Effects of

- probiotic extracts of kimchi on immune function in NC/Nga mice. Korean J. Food Sci. Technol. **40**: 82-87.
- Lee, J.B., Park, H.K., Lee, J.S., Kim, M.H., Studies on antioxidant activity, total flavonoids and polyphenols, and reducing power in yakju with different ratios of dandelion root. J. East Asian Soc. Dietary Life **21**: 882-887.
- Lee, J.J., Lee, Y.M., Kim, A.R., Chang, H.C., Lee, M.Y., 2008. Effect of *Leuconostoc kimchii* GJ2 isolated from kimchi (Fermented korean cabbage) on lipid metabolism in high cholesterol-fed rats. Korean J. Food Preserv. **15**: 760-768.
- Lee, S.H., Jung, J.Y., Lee, S.H., Jeon, C.O., 2011b. Complete genome sequence of *Weissella koreensis* KACC 15510, isolated from kimchi. J. Bacteriol. **193**: 5534.
- Lee, S.H., Park, N.Y., 2000. Nitrite depletion and Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **29**: 39-44.
- Lee, S.J., Kim, J.H., Jung, Y.W., Park, S.Y., Shin, W.C., Park, C.S., Hong, S.Y., Kim, G.W., 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial makgeolli. Korean. J. Food. Sci. Technol. **43**: 206-212.
- Lee, Y., Chang, H.C., 2008. Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria showing anti-*helicobacter pylori* activity. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. **36**: 106-114.
- Lee, Y.M., Kwon, M.J., Kim, J.K., Suh, H.S., Choi, J.S., Song, Y.O., 2004. Isolation and identification of active principle in Chinese cabbage kimchi responsible for antioxidant effect. Korean J. Food Sci. Technol. **36**: 129-133.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**:15611-15616.
- McLeod, A., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C., Naterstad, K., Axelsson, L., 2010. Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis. BMC

Microbiol. **10**:120.

- Moreno, F.J., Corzo-Martinez, M., Castillo, M.D., Villamiel, M., 2006. Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Res. Int.* **39**: 891–897.
- O’Flaherty, S., Klaenhammer, T.R., 2011. The impact of omic technologies on the study of food microbes. *Annu. rev. food sci. technol.* **2**: 353–371.
- Park, D.C., Park, J.H., Gu, Y.S., Han, J.H., Byun, D.S., Kim, E.M., Kim, Y.M., Kim, S.B., 2000. Effects of salted-fermented fish products and their alternatives on angiotensin converting enzyme inhibitory activity of kimchi during fermentation. *Korean J. Food Sci. technol.* **32**: 920–927.
- Park, H.R., Lee, M.S., Jo, S.Y., Won, H.J., Lee, H.S., Lee, H., Shin, K.S., 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 228–234.
- Park, K.Y., Jeong, J.K., Lee, Y.E., Daily, J.W. 3rd, 2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J. Med. Food* **17**: 6–20.
- Park, K.Y., Son, M.H., Moon, S.H., Kim, K.H., 1999. Cancer preventive effects of doenjang *in vitro* and *in vivo* (1). *J. Korean Assoc. Cancer Prevent.* **4**: 68–78.
- Ram, R.J., VerBerkmoes, N.C., Thelen, M.P., Tyson, G.W., Baker, B.J., Blake, R.C. II, Shah, M., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2005. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* **308**: 1915–1920.
- Ryu, B.H., Sim, G.S., Lee, J.H., Ha, W.K., 2011. *Novel Leuconostoc mesenteroides* DSR 218 and use thereof. Korean patent. 10-1055949.
- Ryu, B.H., Sim, G.S., Lee, J.H., Ha, W.K., 2012. Plant originated *Lactobacillus plantarum* DSR CK10, DSR M2 to keep freshness and use thereof. Korean patent. 10-1124056.
- Ryu, B.M., Ryu, S.H., Lee, Y.S., Jeon, Y.S., Moon, G.S., 2004. Effect of different kimchi diets on oxidation and photooxidation in liver and skin of hairless mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 291–298.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source,

platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7537–7541.

Shin, D.H., 1998. Modification of traditional fermented soy products by modern technology. Gyeonggi: Ministry of Science and Technology.

Shin, J.H., Ju, J.C., Kwon, O.C., Yang, S.M., Lee, S.J., Sung, N.J., 2004. Physicochemical and physiological activities of garlic from different area. *Korean J. Food Nutr.* **17**: 237–245.

Shin, J.H., Kang, M.J., Yang, S.M., Lee, S.J., Ryu, J.H., Kim, R.J., Sung, N.J., 2010. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activities of Korean traditional kanjang and garlic added kanjang. *J. Agric. Life Sci.* **44**: 39–48.

Siggins, A., Gunnigle, E., Abram, F., 2012. Exploring mixed microbial community functioning: recent advances in metaproteomics. *FEMS Microbiol. Ecol.* **80**: 265–280.

Sivagnanam, K., Raghavan, V., Shah, M., Hettich, R., Verberkmoes, N., Lefsrud, M., 2011. Comparative shotgun proteomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* from butanol fermentation using glucose and xylose. *Proteome Sci.* **9**: 66.

Son, M.H., Moon, S.H., Choi, J.W., Park, K.Y., 1999. Cancer preventive effects of doenjang *in vitro* and *in vivo* (2). *J. Korean Assoc. Cancer Prevent.* **4**: 143–154.

Song, E.S., Jeon, Y.S., Cheigh, H.S., 2001. Antioxidative effect of chlorophylls and carotenoids in mustard leaf kimchi activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 421–425.

Song, J.C., Park, H.J., 2003. Takju brewing using the uncooked germed brown rice at second stage mash. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 847–854.

Taylor, E.B., Williams, M.A., 2010. Microbial protein in soil: influence of extraction method and C amendment on extraction and recovery. *Microb. Ecol.* **59**: 390–399.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66–74.

Wang, S.J., Lee, H.J., Cho, J.Y., Jang, M.Y., Park, K.H., Moon, J.H., 2012. Inhibition effect

against the rat blood plasma oxidation of the makgeolli (takju) Korean rice Wine. Korean J Food Preserv. **19**: 116-122.

Wang, W., de Mejia, E.G., 2006. A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **4**: 63-78.

Wilmes, P., Bond, P.L., 2004. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. Environ. Microbiol. **6**: 911-920.

Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. Microbiology. **140**: 517-526.

Yoo, T.J., 1981. Korean famous wine. Central New Book. Seoul, Korea. p 96.

Yu, M.H., Im, H.G., Im, N.K., Hwang, E.Y., Choi, J.H., Lee, E.J., Kim, J.B., Lee, I.S., Seo, H.J., 2009. Anti-hypertensive activities of *Lactobacillus* isolated from kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. **41**: 428-434.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처유전체사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.