

317043-3

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( ), 비공개( O ) 발간등록번호( O )

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

유산균체

대사물

연구를

통한

건강  
기능성

유제품

개발

및

상품화

최종  
보고서

2020

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

발간등록번호

11-1543000-003049-01

# 유산균체 대사물 연구를 통한 건강기능성 유제품 개발 및 상품화 최종보고서

2020. 3. 30.

주관연구기관 / (주) 비피도  
협동연구기관 / 가천대학교 산학협력단  
숙명여자대학교 산학협력단

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유산균체 대사물 연구를 통한 건강기능성 유제품 개발 및 상품화”(개발기간 : 2017. 6 15. ~ 2019. 12 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 3. 30.

주관연구기관명 : (주) 비 피 도 (대표자) 지근억 (인)  
협동연구기관명 : 가천대학교 산학협력단 (대표자) 강정애 (인)  
숙명여자대학교 산학협력단 (대표자) 성미경 (인)

주관연구책임자 : 권 빈

제 1 협동연구책임자 : 박종현

제 2 협동연구책임자 : 성미경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	317043-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 6. 15 - 2019. 12. 31 (31개월)	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	유산균체 대사물 연구를 통한 건강기능성 유제품 개발 및 상품화			
연구책임자	권 빈	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 8명 외부: 8명	해당단계 연구개발비	정부: 960,000천원 민간: 330,000천원 계:1,290,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 16명 내부: 8명 외부: 8명	총 연구개 발비	정부: 960,000천원 민간: 330,000천원 계:1,290,000천원
연구기관명 및 소속부서명	주식회사 비피도			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당 없음				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

본 연구에서는 500여 후보균주에서 GRAS 인증 균주 2균주를 포함하여 고부가가치 우수 후보균주를 선정하였으며, *B. bifidum* BGN4를 이용하여 selenomethionine이 169.6 µg/g 함유된 소재를 개발함. 선발균주의 게놈분석 통하여 25 균주의 게놈에서 thioredoxin, kojibiose 등 기능성 물질 관련 유전자를 확보하였고, 또한 RD47 및 BGN4의 β-galactosidase를 이용하여 GOS를 생산함. 열처리, 초음파처리, 라이소자임 처리, 고압세포파쇄 처리 등의 조건을 비교 평가하여 라이소자임과 고압세포파쇄처리 병행조건 확립함. 선발균주 3종에 대한 라이소자임 처리 후 사균체 제조 방법 최적화하고 사균체 유래의 EPS를 이용한 prebiotics 효능 평가 완료 및 EPS 구성당 분석하였음. *S. aureus* 파지 유래 endolysin의 활용가능성도 평가함. 선발균주의 대량생산을 위한 배양조건 최적화를 통하여 5톤 발효기에서 1012 CFU/g 원말 생산 완료함. 사균체 유래의 EPS에 대한 항산화기능, 프리바이오틱스 기능 등 평가함. 선발균주 3종의 사균체물의 38종 유해균에 대한 항균활성 평가 완료 및 각종 사이토카인 및 항염증 활성을 평가함. DSS 유도 대장염 모델에서 선발균주 3종의 열처리, 라이소자임처리, 생균에 대한 장내 마이크로바이옴 변화에 대한 평가 완료함. DSS 유도 및 고지방 식이로 유도된 대장염 모델에서 선발균주 3종의 열처리, 라이소자임처리, 생균에 대한 항염증 효능 평가 완료함. 각 선발 균주의 고농도 배양 조건을 최적화 하였으며 회수조건 및 동결건조 조건을 최적화 하여 원말을 생산하였음. 사균체 첨가에 따른 물성 변화 평가를 실시하고, 다당류 고생산 선발균주인 *W. confusa* VP30을 활용한 발효음료 소재 개발완료, *B. bifidum* BGN4 등 3종 유산균 파쇄물이 함유된 원료를 개발하여 화장품원료 적합성 및 기능성에 대한 공인기관 평가를 완료하였으며 제품화 완성함.

보고서 면수  
294쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><b>[연구목적]</b>                  기능성 및 안전성이 확보된 유산균 Probiotics를 이용하여 최적화된 사균화 공정을 개발, 사균체와 그 대사물의 생리적/건강기능적 특성을 규명하며 유효 사균체물의 대량 생산기술을 확보하고 이를 바탕으로 고부가 가치의 유산균 소재를 개발하여 제품화</p> <p><b>[연구내용]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 건강기능성 Probiotics 유산균/전통발효식품 유산균 선정</li> <li>• 기능성 지표물질 Metagenomic 선정/분석법 확립</li> <li>• 물리학/생물학적인 사균화 공정 최적화 확립 (heat, sonication 열처리, bacteriophage 및 endolysin, sonication 등의 조합)</li> <li>• In vitro probiotic 기능성 유효 성분 강화법 확보 (분리/정제/농축/분획물)</li> <li>• In vivo 동물실험에 의한 사균체물과 생균체와의 장내균총분석 (항균성/유익균총증식)/항염증(염증성장질환/비만모델)/면역기능성 등 비교평가</li> <li>• 선발균주의 고농도 대량 배양 기술개발/생산최적화 공정 확립</li> <li>• 기능성 지표물질에 의한 제품 표준화 및 안전성/독성 평가 분석</li> <li>• 사균체물을 활용한 유가공식품 및 다양한 식품 적용범위 확대개발</li> <li>• 사업화 및 영업 전략 제시</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지식재산권 (특허출원 5건, 특허등록 1건)</li> <li>• 기술이전실시 2건</li> <li>• 사업화 (요구르트 및 화장품 제품화 2건, 매출액 9190만원 - 국내 40만원, 해외 9150만원, 수출액 6억 5천만원)</li> <li>• 인력양성 10명 및 고용창출 3명</li> <li>• 본 연구를 통해서 확보 할수 있는 학술 성과는 논문 (SCI급 10편) 및 학술발표 (27건)가 있음</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 자체에서 개발된 균주의 경우 특정 효능에 대한 근거 및 사균체의 작용 메커니즘에 대한 체계적이고 과학적인 연구를 통한 근거를 확보하여 고부가가치 기능성식품 소재로 활용</li> <li>• 연구팀에서 생산하고 있는 유산균 균주를 바탕으로 하는 현재 수출상품으로 진입하고 있는 사균체 제품의 수출 경쟁력을 제고에 활용</li> <li>• 유산균 사균체의 프로/프리 바이오틱스의 활용 가능 영역의 추가를 통한 국내 기능성 식품의 글로벌화에 기여</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	유산균	사균화	생리기능성	프로바이오틱스	고부가가치식품 소재
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Lactic acid bacteria(LAB)	Tyndallization	Bioactivity	Probiotics	High value added foods

## < 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	6
1. 연구개발 목적 .....	6
2. 연구개발의 필요성 .....	6
3. 연구개발 범위 .....	20
제 2 장 연구수행 내용 및 결과 .....	24
제 1 절 연구개발 추진전략 및 방법 .....	24
1. 기술정보 활용방안 .....	24
2. 연구개발 접근 방법론 .....	24
3. 연구개발 추진 방법 .....	24
제 2 절. 연구개발 추진 체계 .....	28
제 3 절. 연구개발 추진 일정 .....	29
제 4 절. 연구 내용 및 결과 .....	31
1. 제 1 세부 (비피도) .....	31
2. 제 1 협동 연구 기관 (가천대학교) .....	153
3. 제 2 협동 연구 기관 (숙명여자대학교) .....	188
제 5 절. 연구 개발 성과 .....	281
1. 국내·외 논문 게재 .....	281
2. 국내 및 국제 학술회의 발표 .....	282
3. 생명자원(생물자원)/화합물 .....	284
4. 지식재산권 .....	284
5. 전문 연구 인력 양성 .....	284
6. 기술 이전 .....	285
7. 사업화 성과 및 매출 실적 .....	285
제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	286
제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	288
붙임. 참고 문헌 .....	292

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발 목적

본 연구개발의 최종 목적은 유산균 Probiotics를 이용하여, 사균화 최적의 신공법을 개발하고 사균체와 그 대사물(세포과쇄물, 다당체 등)의 생리적/건강기능적 특성을 구명하며 유효 사균체물의 대량 생산기술을 확보하는 것이며, 이러한 기술을 활용하여 산업적으로 기능성 사균체물 식품소재로 생산하고 유제품과 다양한 식품에 적용하여 고부가 가치 제품이 가능하도록 하는 것임.

주요 목표는 다음과 같음.

- 건강기능성 Probiotics 유산균/전통발효식품 유산균 선정
- 기능성 지표물질 Metagenomic 선정/분석법 확립
- 물리화학적/생물학적 방법을 이용하여 최적의 사균화 공정 개발 (heat, pressure, sonication, bacteriophage 및 endolysin)
- In vitro probiotic 기능성 유효 성분 강화법 확보 (분리/정제/농축/분획물)
- In vivo 동물실험에 의한 사균체물과 생균체와의 장내균총분석 (항균성/유익균총증식)/항염증(염증성장질환/비만모델)/면역기능성 등 비교평가
- 선발균주의 고농도 대량 배양 기술개발/생산최적화 공정 확립
- 기능성 지표물질에 의한 제품 표준화 및 안전성/독성 평가 분석
- 사균체물을 활용한 유가공식품 및 다양한 식품 적용범위 확대개발
- 사업화 및 영업 전략 제시

## 2. 연구개발의 필요성

### 가. 연구개발의 배경

전 세계적으로 노령인구의 증가는 뚜렷하게 나타나고 있으며 우리나라의 경우 23년 후에는 노령인구가 전체 인구의 32.8%를 차지할 것으로 예상됨(2017, 통계청). 이와 함께 건강수명 연장이 매우 시급한 사안으로 대두되고 있음.

2012년 세계보건기구의 발표에 따르면, 전 세계적으로 성인 인구의 가장 중요한 사망원인은 비전염성 만성질환임. 이들 질환의 발생은 노화와 함께 증가하고 다양한 환경요인이 관여함. 특히 섭취열량 증가 및 신체활동량 감소로 인한 비만 인구의 증가는 심혈관계질환, 암, 당뇨병 등 3대 주요 만성질환 발생과 밀접히 연관되고 이는 각 장기의 chronic inflammation에 기인하는 것으로 보임.

인체내에는 인간이 가지고 있는 세포수의 10배 정도의 미생물이 존재하고 있으며, 최근 연구 동향은 인체에 존재하는 미생물의 기능성에 포커스를 맞추고 있음.

Gut microbiota의 분포와 관련하여서도, 정상인의 경우 *Bacteroides* 속이 높은 비율을 차지하는 반면 비만 환자의 경우 *Ruminococcus* 속의 비율이 높은 것이 밝혀졌으며, 이러한 장내 미생물 분포의 차이는, 현재 장내 균총 개선 효과를 통한 건강 기능개선에 있어서 새로운 연구 패러다임을 제시하고 있음. [그림 1]

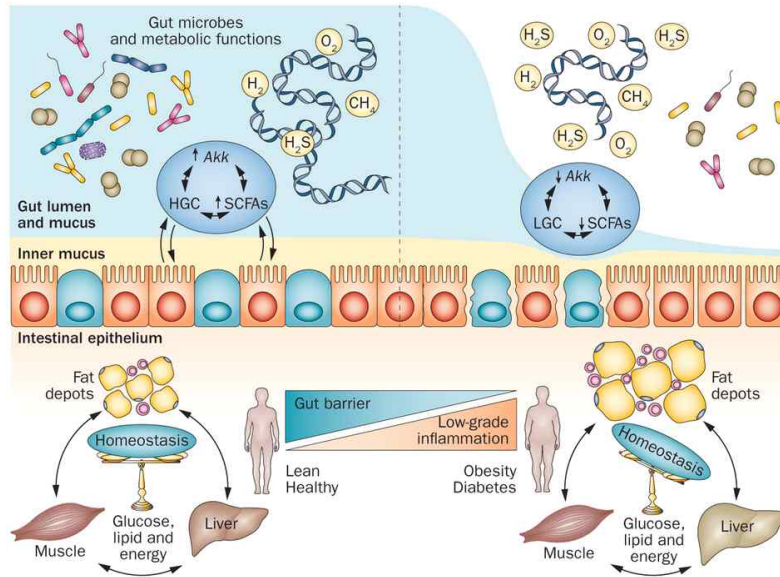


그림 1 Changes in gut microbiota composition and metabolism. Cani, PD. Nature Reviews Endocrinology (2014) 10. 74-76

장내 미생물 조성 변화는 체내 여러 대사와 연관된 다양한 유전자의 발현에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, dysbiosis로 인한 체내 유익균의 감소는 대장 미생물이 생산하는 유용한 대표적 생산물인 단쇄지방산의 체내 농도를 감소시켜 이를 에너지원으로 삼는 대장 세포의 재생 및 세포 분열에 영향을 주는 것으로 알려져 있음.

대장 세포의 세대 교체 주기가 늦어지게 되면 손상된 장 점막의 복구가 느려지게 되고 이는 gut barrier function에 영향을 주어 면역계, 염증성 사이토카인 생성, 염증 반응과 연관된 여러 유전자들의 발현에 관여하게 됨. 이러한 대사 과정의 변화는 인슐린 저항성, 에너지 밸런스 유지 등에도 영향을 주어 체내의 균형 잡힌 대사를 방해하는 것에도 연관될 수 있다는 연구 결과가 있으나 이 또한 좀 더 심도 깊은 연구를 통해 명확한 규명이 필요함.

특히 최근에는 장내 미생물의 활동이 장내 건강 뿐만 아니라 두뇌의 활동이 연계되어 있다는 Gut-Brain Axis의 개념이 도입되었으며, 이를 바탕으로 미생물과 인간의 건강과 관련하여 다양한 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있는 실정임. [그림 2]



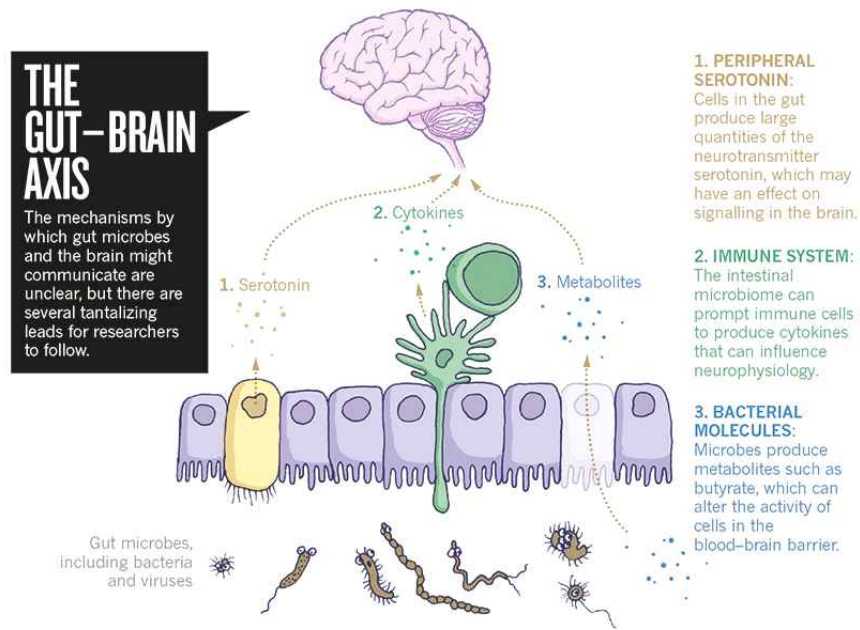


그림 2 장과 두뇌와의 생리학적 연결 관계. Smith, PA. Nature (2015) 526. 312-314

Probiotics 중 유산균은 장상피세포 및 정상적인 면역 반응을 강화시키고, 비타민과 단쇄 지방산을 생산하여 영양분 흡수를 촉진하며, 면역체계의 확립에 관여하고 있음. 또한 인체의 장관 내에서 병원성 세균과 경쟁하며 항균 물질을 생산함으로써 병원성 균의 침입을 방어하는 기작을 나타냄. 그러므로 유산균의 섭취가 장건강 개선에 효과가 높다고 알려져 있으며, 그에 따라 현대인에게 많은 관심을 받아 왔음.

동시에 건강식품 소재로써 직접 또는 간접적으로 많이 생산·섭취되어 왔으며, 그 균주 (strain)에 따라 다양한 기능성을 나타낸다고 알려져 왔음. [표 1]

표 1 Probiotic products with targeted health benefits available in the US. Bhadoria PBS and Mahapatra SC. European Journal of Food Research (2011) 1. 23-42

Indication	Strains	Products
Infant diarrhea	<i>L. rhamnosus</i> GG	Culturelle (capsule) Danimals (drikable yogurt)
	<i>L. casei</i> DN-114001 (aka "Immunitas™")	DanActive (fermented milk)
Inflammatory bowel conditions	8-strain combination of 3 <i>Bifidobacterium</i> strains, 4 <i>Lactobacillus</i> strains and <i>S. thermophilus</i>	VSL#3 (powder)
Antibiotic associated diarrhea; <i>C. difficile</i>	<i>S. boulardii</i>	Florastor (powder)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	Culturelle (capsule) Danimals (drikable yogurt)
	<i>L. casei</i> DN114001	DanActive (fermented milk)
Gut transit time	<i>B. animalis</i> DN-173 010 (aka "Bifidus regularis™")	Activia (yogurt)
Keeping healthy	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Stonyfield yogurt
	<i>L. casei</i> DN-114001	DanActive (fermented milk)

	<i>L. casei</i> Shirota	Yakult
Allergy (atopic dermatitis in infants)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Culturelle (capsule) Danimals (drikable yogurt)
Lactose intolerance	<i>L. bulgaricus</i> and/or <i>S. thermophilus</i> (most strains)	All yogurts with live, active cultures
Colic in infants	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Reuteri drops
Immune support	<i>B. lactis</i> HN019 (aka HOWARU™ or DR10)	Naked Juice Probiotic Juice Smoothie Strain sold as an ingredient for dairy and supplement products - contact Danisco
	<i>B. lactis</i> Bb-12	Good Start Natural Cultures (infant formula) Nestle; Strain also sold as an ingredient for dairy and supplement products - contact Chr. Hansens (800-558-0802)
	<i>L. casei</i> DN114001	DanActive (fermented milk)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	Culturelle (capsule) Danimals (drikable yogurt)
	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Stonyfield yogurt
Vaginal applications	<i>L. rhamnosus</i> GR-1, <i>L. reuteri</i> RC-14	Fem-Dophilus (capsules)
Irritable bowel syndrome symptoms	<i>B. infantis</i> 35264 (aka "Bifantis™")	Align (capsules)

이러한 유산균을 장내 건강개선 효과를 위한 프로바이오틱스로써 섭취를 함에 있어 가장 큰 문제로 지적받는 것이 섭취한 유산균이 위장 내를 통과할 경우 낮은 pH 및 장내의 높은 담즙염으로 인해 생균체가 사멸하게 되는 것이 개선점으로 지적되어 왔음.

하지만 2004년 영국 BBC HEALTH의 "'Dead' yoghurt just as effective"라는 제목의 보도에 따르면 유산균 사균체의 경우도 살아있는 유산균처럼 생리적기능성, 특히 면역 조절능을 나타낸다고 보도함.

그 이후로 사균체는 신개념의 유산균체로써 Paraprobiotics (또는 Parabiotics, ghost probiotics)라는 개념으로 연구가 진행되기 시작함.

궤양성대장염 (Ulcerative colitis, UC)과 크론씨병 (Crohn's disease, CD)로 대표되는 염증성 장 질환은 과거 유럽과 미국 등에서 주로 나타나는 서구형 질환이었으나 최근 10년간 우리나라에서도 급증하고 있음.

염증성 장 질환은 질병의 악화와 일시적 관해가 평생에 걸쳐 반복되는 질환으로 현재 사용되는 치료제의 대부분은 심화된 염증을 완화시키는 효과가 전부임. 이들은 장기간 복용 시 다양한 부작용을 야기하므로, 염증성 장 질환의 효율적인 관리를 위해서는 부작용이 적은 소재에 대한 수요가 큼. [그림 3]

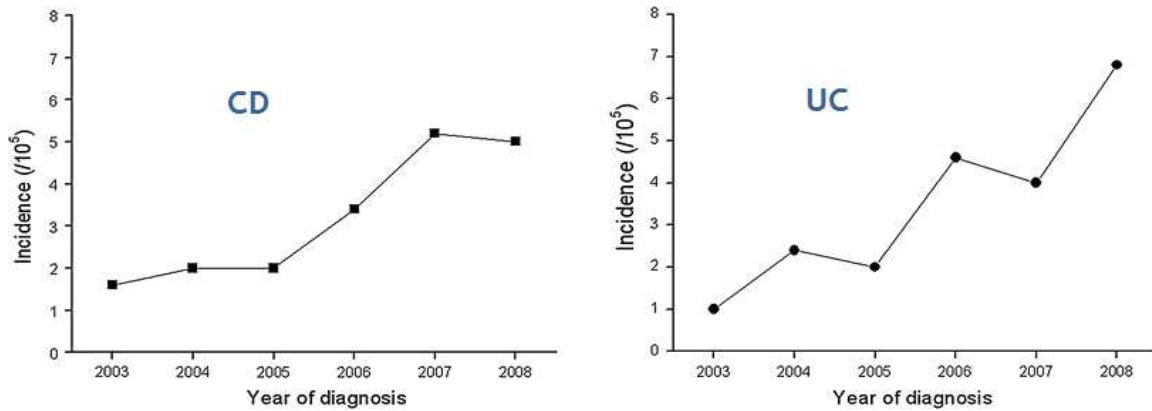


그림 3 Interaction of a Toll-like receptor made up of leucine-rich repeat domains with commensal and pathogenic ligands. Kataria J et. al. Nutrition review (2009) 67. 546-550

사균체에 의한 면역 반응은 면역 방어체계에 있어서 중요한 물질인 면역 글로블린A (IgA)는 사균체가 소장으로 흡수될 때 대식세포를 자극하여 생산되며, 소장내에서 흡수가 되지 않는 생균보다 훨씬 더 효과가 우수하다고 알려져 있음.

이때 사균체 유래의 유산균 cell wall 성분과 nucleic acid 성분이 대식 세포와 수지상 세포를 활성화 하여 병원균 등을 제거하는 식균 작용과 면역 세포의 활성을 강화하게 됨. [그림 4]

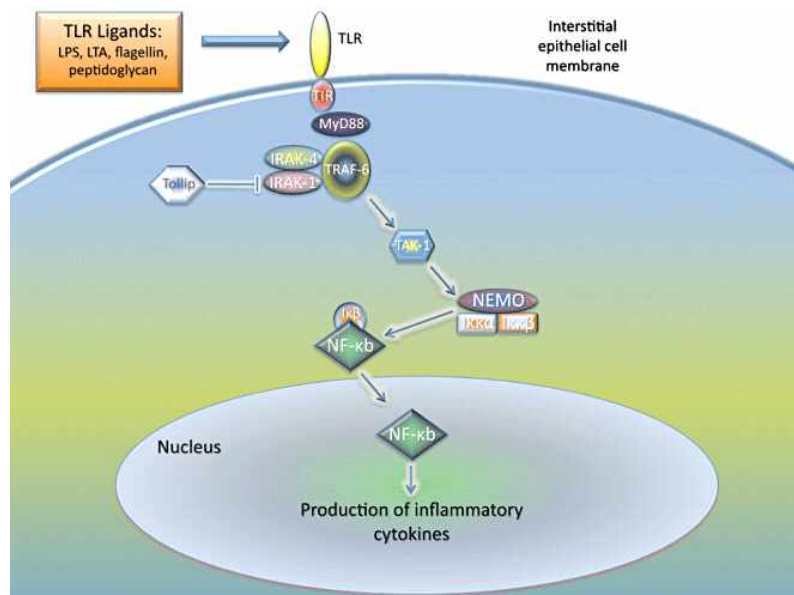


그림 4 Interaction of a Toll-like receptor made up of leucine-rich repeat domains with commensal and pathogenic ligands. Kataria J et. al. Nutrition review (2009) 67. 546-550

최근 비만과 염증성 장 질환이 장 미생물 군총 변화와 밀접히 관련된다는 다수의 연구결과들이 보고되기 시작함. 장 박테리아의 조성비는 장 면역반응 뿐 아니라 전신성 면역반응의 항상성 유지와 밀접히 관련되어 장 뿐 아니라 타 조직의 면역반응 균형을 유지하는데 관여하게 되고 그 결과 대장염 및 대장암, 지방간, 당뇨병 등의 발생에도 관여한다고 보고됨.

그러나 미생물 군총 변화와 비만 및 염증성 장 질환 간의 인과 관계 설명이 뚜렷하지 않으며, 개별 미생물을 활용한 중재 연구는 극히 제한되어 있어 기초연구 단계에서 실용화 단계로 진입하는데 어려움을 겪고 있음.

다양한 종류의 장 미생물이 소지한 면역반응 균형 유지 기능이 알려지면서 probiotics 개발 및 적용이 활성화되고 있으나 미생물 균주 사용의 safety에 대한 논란은 지속적으로 제기되어 왔고 이는 사균체 혹은 미생물 세포 추출물의 활용 가능성에 대한 연구개발을 유도하게 됨.

또한 사균의 경우 생균보다 효과적으로 GI tract에서 bile acid과 cholesterol과 결합하여 흡수를 저해하며 이를 통하여 혈중 콜레스테롤을 낮추는 기능역할을 하고 있음. 이러한 특성은 현대인의 만성 질환인 고지혈증이나 심혈관계 질환은 기능성 식품이나 제약에 의존하는 것이 아닌 새로운 기능성 유산균 제제로써 응용이 가능함.

응용 가능한 사균체의 경우 safety에 대한 우려도 없을 뿐만 아니라 위장 내의 낮은 pH에 영향을 받지 않으며, 신소재로써 보관 기간을 장기화 할 수 있는 장점이 있음.

현재의 유산균 사균화를 위해서는 heat treatment, tyndallization, lysozyme효소처리 등으로 생산되어 왔으나 [그림 5], 이러한 방법으로는 특정성분을 고농도로 생리기능성이 우수한 유효성분 생산에 한계가 있음. 본 연구개발은 bacteriophage와 endolysin와 같은 유산균을 파괴시키는 능력이 우수한 방법을 활용할 수 있으며 이러한 사균화 방법에 따라서 생산되는 기능성 물질이 다양할 것으로 기대됨.

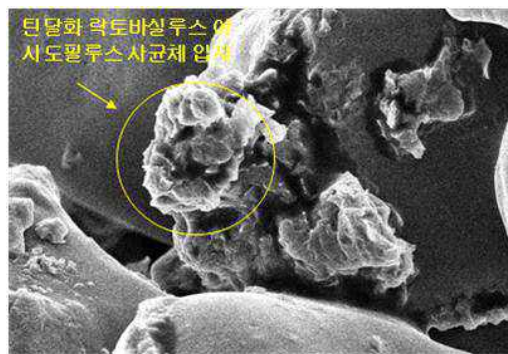


그림 5 틴달화된 유산균 전자현미경 사진

현재 유산균 이외에 bacteriophage가 병원성 세균 제어를 위한 위생처리제로써 적용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 이러한 박테리오파지는 19세기 후반에 발견된 virus로서 특정 세균을 용균(lysis)시켜 사멸시키는 특징을 갖고 있어 관련 치료제로서의 연구가 활발히 진행됨. 하지만 항생제의 발견으로 인해 연구가 지지부진해오다가 항생제 내성 세균의 출현 등의 문제로 인해 항균 항생제 대체제 및 식품 안전 등의 응용으로 다시금 활발한 연

구가 진행 중에 있음.

현재 식품에 오염되어 있는 야생형의 세균 또는 biofilm을 형성한 세균은 저감화를 위해 열처리 등의 물리적 방법이나 화학적 살균소독제 등이 사용되어 왔으나 그 효과가 크지 않은 것으로 보고됨. 아울러 소비자는 가능하면 최소의 열처리 등의 가공을 원하므로 새로운 천연 식품보존 및 살균제의 개발이 요구 되고 있으며, 이에 따라서 천연항균제, 박테리오파지, lytic enzyme인 endolysin 등이 새롭게 제안됨. 본 연구진은 이러한 bacteriophage, endolysin을 그랩 양성균인 유산균에 적용하여 유산균 세포벽을 파괴하고자 함 [그림 6].

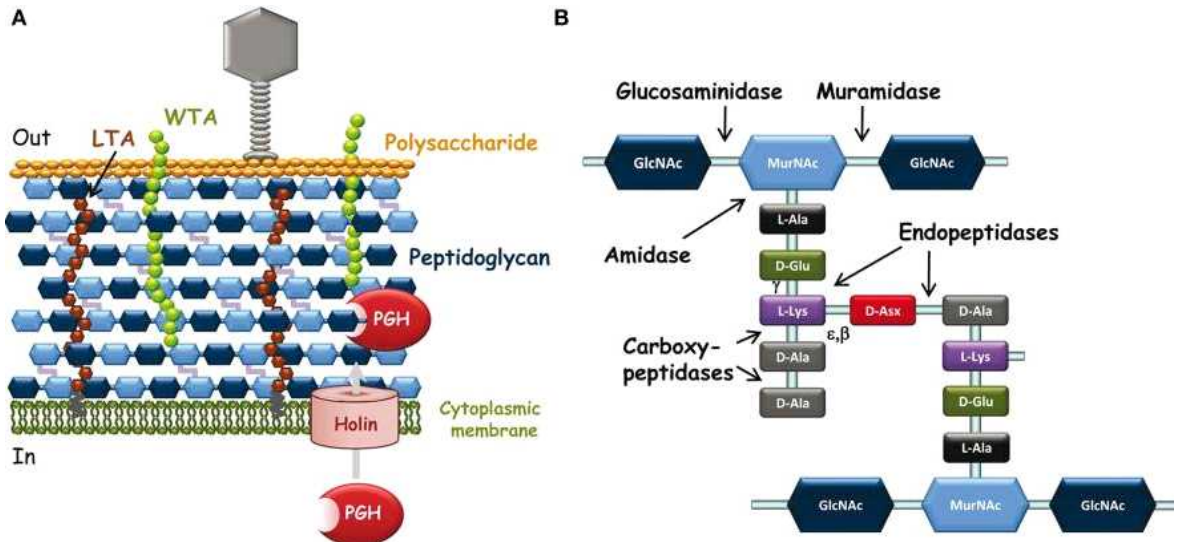


그림 6 세포벽 구조와 endolysin 작용 부위. Chapot-Chartier, MP. *Frontiers in Microbiology* (2014) 5. 1-9

또한 유산균 strain의 종류 및 사균화의 방법에 따라서 lactocepin, spermidine, sulfquinovose등과 같은 다양한 기능성을 지닌 물질이 생산되며, 이를 이용하여 고부가 가치의 사균체 생산이 가능함.

Cytosine-phosphate-guanosine motif oligodeoxynucleotides (CpG motif ODN)은 주로 미생물 안에 많이 존재하며, 메틸레이션이 되지 않은 CpG motif는 면역촉진 인자로서 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 이는 면역성 질환에 치료에 좋은 효과가 기대됨.

또한 생균의 경우, 그 probiotics로써 가지는 장점과 동시에 과량 섭취시 유발될수 있는 병리학적인 질병을 유발 할수 있는 위험성을 지니고 있는 반면, 사균은 생체내에서 대사활동을 하지 않으므로 병리학적인 위험성이 낮음. 이러한 특성은 para-probiotic/prebiotics로써의 유산균의 장점을 필요로 하는 면역 결핍환자에게 새로운 형태의 대안으로 제시가 가능함.

본 연구의 사균체물로부터 확보할 수 있는 항균, 면역, 항염증등의 기능성 성분에 대한 연구를 바탕으로 기존의 probiotic 활성을 제고시킨 고부가 가치 유산균체 제품을 기술 집약적으로 생산이 가능해질 것임.

#### 나. 기존의 기술과의 차별성

본 연구에서는 유산균에서 사균체 유효물질을 고효율로 생산하는 유산균 박테리오파지 활용 사균체 생산 신공법을 개발하고자 함. 이는 기존의 간헐멸균법, 균체 lysozyme처리 공법에 비하여 경제성이 우수하며 이를 기반으로 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 면역 조절 및 항염 활성 보유 세포벽 펩티도글리칸등의 건강기능성 물질 강화 사균체 제품 개발을 목표로 함.

### (1) 본 연구팀의 차별성 및 우수성

항목	본 연구팀의 차별성 및 우수성	주요 특성
기능성 유산균	<ul style="list-style-type: none"> <li>오랜동안 유산균주를 선별하였고 특히 한국인 장관 분리균주를 다수 확보하고 있음. 타사의 발효 유제품이나 probiotic는 대부분이 외국에서 개발되어 국내로의 수입된 균주들임. 전통식품 분리유산균 확보하고 있음.</li> <li>기능성 유산균주를 다수 확보하고 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>한국인 장관유래균 1,000 균주 이상, 중국인 장관 유래균 100 균주 이상 스크리닝 및 특성 규명</li> <li>김치류분리 유산균: <i>Weissella</i>, <i>Leuconostoc</i> 총 123 균주 보유</li> <li>항종양 chiroinositol 다당체 성분 <i>Bifidobacterium</i> BGN4.</li> <li>MeSeCys와 SeMet 형태의 유기 셀레니움 생산 우수 <i>B. bifidum</i></li> <li>항균특성 우수 <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>와 다수의 유효 유산균</li> <li>300편 이상의 논문, 50건 이상의 특허.</li> </ul>
유산균 유효성분 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>당 연구팀은 NGS sequencing system으로 유산균체중 유효한 기능성 후보물질을 30여가지 확보하고 있음. 그중 특히 lactocepin peptidoglycan, 핵산 CpG등을 유효성분물질로 일차 screening함.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1차대상기능물질: peptidoglycan, 핵산CpG, lactoceptin, chiroinositol</li> <li>mycoredoxin, thioredoxin, phosphoribosyl glycinamide, kojibiose, dihydropteroate, spermidine, cystathionine, neprilysin, sulfoquinovose, lactocepin, choloylglycine, muramoyl tetrapeptidase, lactoylglutathione, neprilusin</li> </ul>
유산균 사균화법	<ul style="list-style-type: none"> <li>간헐멸균법(tyndallization)로 세포가 쭈그러진 상태가 되고 그대로 장관에 도달함. 유효성분이 아주 낮아서 매우 많은 양을 공급해야 건강기능성의 기대하는 성과를 기대할 수 있음.</li> <li>유효물질 다량 함유하도록 사균체화 처리기술 개발을 추진함</li> <li>본 연구팀은 오랫동안 phage의 분리, 특성, 활용연구로 많은 bacteriophage collection을 완성하고 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생물학적 bacteriophage, endolysin, lysozyme 등을 처리하는 방법과 기존의 물리적인 방법으로 사균화를 단독 혹은 병행처리하여 유산균 기능성 물질의 농도를 높이려 함.</li> <li>유산균파지 150여종을 기 확보</li> </ul>
고농도 균체배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>본 주관기관은 20년동안 분말형 유산균체 자체를 생산하고 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 생산 설비 5 ton 발효조 5 대 등 발효기 30 대 이상 운전중.</li> <li>동결 건조중량 3 ton. 원말 균수 <math>10^{12}</math> CFU/g 세계 최고 수준</li> </ul>
제품 개발기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효유가 아니고 유산균체를 제품화 기술이 축적되어 있어 보관 유통문제를 해결할 수 있음. 유</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(주)비피도 Probiotic 유산균 제품은 분말, 과립, 환, 캡슐, 태블릿 등 다양한 형태 제품 제조 설비로 생산되며 공정 자동화가</li> </ul>

	산균 사균체는 펠리아드 반응에 의한 색깔변화, 지질의 산패에 의한 관능저하등의 개선기술이 필요함.	구축되어 있음.
시제품의 형태	<ul style="list-style-type: none"> <li>기존의 단순 사균체물이 아니고 건강기능성 물질이 다량 함유된 고부가가치 분말 유산균 식품을 개발</li> </ul>	(예측 시제품) <ul style="list-style-type: none"> <li>항균 설사방지용, 면역기능 제고 peptidoglycan 분획 다량 함유 유산균체 분말</li> <li>항염증 Lactocepin 다량함유 <i>Lactobacillus</i> 유산균체 분말</li> <li>유기셀레늄 다량 함유 <i>Bifidobacteria</i>유산균체 분말</li> <li>장부착 물질 강화 <i>Enterococcus</i> 유산균체 분말 제품 등</li> </ul>
사업화	<ul style="list-style-type: none"> <li>유산균체 probiotic 사업으로 인하여 국내외 거래업체의 네트워크로 쉽게 제품 판로 확보됨.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>해외거래처명: 20 여개국 수출. 북경비피도, 비나비피도(베트남), 대만, 홍콩, 싱가포르, 미국, 중국등의 국내외 거래처 적극 활용.</li> </ul>

기존 유산균의 사균체화 공정은 주로 일본이나 또는 한국이 주도하고 있으며, 그 방법으로는 가열처리, 탄탈화, 균체 lysozyme처리와 같은 다양한 기법이 제품생산에 사용되어 왔음. 그러나 bacteriophage-based 사균체 생산방법은 새로운 사균화 방법으로 기존의 방법보다 용이하며 새로운 생리기능성 유효물질의 분리가 가능할 것으로 보이며, 기존에 관련 연구를 수행해 오던 본 연구팀 [제1협동 가천대]이 참여하고 있음.

최근 주로 항생제 내성세균의 치료에 사용되는 phage therapy, 박테리오파지 유전자를 이용한 용균 효소 등의 유용 효소의 생산, 병원성 세균의 검출, 특정 protein 또는 antibody를 만들어내는 phage display, 병원성 미생물의 typing, vaccine 관련 연구, 유제품에 있어서 lactic acid bacteria의 phage resistant 균주 개발, 환경 오염 지표, phage 유전자의 전이, phage의 host specificity와 밀접한 관계를 갖는 receptor 연구 등 매우 광범위하게 연구되고 있음. 유산균 파지 연구는 유산균의 파지 저항성에 집중되어 왔는데 본 연구는 유산균을 파괴시키는 agent로 활용하고자 함.

또한 유산균 유래한 식품의 가공 및 발효와 관계된 내열성 내산소성, 장내 생존률에 관련된 내산성, 담즙산 내성, 장 정착능 그리고 장내균총의 건강과 관련된 변비개선능, 설사억제능, 병원성균 억제능, 면역증강효과 등은 비교적 국내에서도 잘 이루어지고 있음. 그러나 *in vitro* 실험 결과보다는 실제 *in vivo* 인체를 통한 검증이 더욱 필요함.

프로바이오틱스의 안전성 검증은 국내의 경우 실험실 수준에 독성유무를 검사하거나 세포 배양을 통한 테스트 수준에서 수행됨. 앞으로는 개발 균주의 유전체 분석을 통하여 전체 유전자 분석을 수행하고 병원성 유전자의 발현이 없다는 자료를 확보하여야 함.

최근의 신기술인 omics technology를 바탕으로 하여, 선별된 프로바이오틱스의 기능성 연구 및 검증, 그리고 gut microbiota의 genomic 연구를 바탕으로 하는 연구기법이 아직 미비함. 최근 FDA-US의 경우에는 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스의 기능성 검증 및 안전성 검증에서 필수적으로 유전체 수준에서의 기능성 및 안전성 검증을 요구하고 있으므로 산업적으로 활용하기 전에 반드시 genomic research가 선결되어야 함.

또한 최근 염증성 장 질환 환자가 빠르게 증가하면서 다양한 분야의 연구자들이 염증성 장 질환의 치료 혹은 개선 효과를 지닌 소재를 발굴하는 데에 다양한 관심을 두고 있음. 백합,

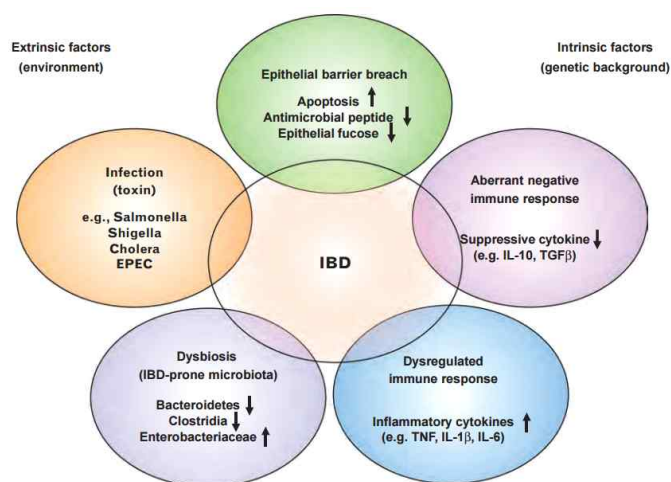
백부근, 강화약썩 등의 천연물을 활용하거나, 기존의 약물 또는 생약 제제의 활용, 유산균 등의 다양한 소재가 지속적으로 발굴되고 있음.

국내 연구진에 의해 수행된 염증성 장 질환 관련 연구는 PubMed DB에서 검색한 결과, 총 977개의 논문이 확인됨. 역학적 접근을 통한 결과를 다루는 논문들이 대부분을 차지했으며, 이 중 유산균을 소재로 한 연구는 24개에 불과했음. 24개 연구 중 실제 염증성 장 질환 환자에게 적용한 경우는 전무한 상태로 유산균 혹은 사균체를 활용하여 이를 유효 소재로 개발하기 위한 적극적 시도는 아직 미비한 상태임.

또 다른 주목할 만한 형태는 patent 출원 및 등록으로, 국내 특허 정보를 다루고 있는 키프리스 데이터베이스의 검색 결과에 따르면 염증성 장 질환의 개선과 관련된 특허가 만건에 달하는 것을 확인할 수 있음. 하지만 대부분이 천연물이나 약물을 활용한 결과인 것으로 나타나 사균체가 염증 완화에 미치는 영향을 평가한 연구결과는 추후 학문적으로나 상업적으로나 충분히 경쟁력 있는 자료가 될 것으로 생각되어짐.

대장 미생물 조성 변화는 체내 여러 대사와 연관된 다양한 유전자의 발현에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있음. Dysbiosis로 인한 체내 유익균의 감소는 대장 미생물이 생산하는 유용한 대표적 생산물인 단쇄지방산의 체내 농도를 감소시켜 이를 에너지원으로 삼는 대장 세포의 재생 및 세포 분열에 영향을 주는 것으로 알려져 있음. 대장 세포의 세대 교체 주기가 늦어지게 되면 손상된 장 점막의 복구가 느려지게 되고 이는 gut barrier function에 영향을 주어 면역계, 염증성 사이토카인 생성, 염증 반응과 연관된 여러 유전자들의 발현에 관여하게 됨. 이러한 대사 과정의 변화는 인슐린 저항성, 에너지 밸런스 유지 등에도 영향을 주어 체내의 균형 잡힌 대사를 방해하는 것에도 연관이 될 수 있다는 연구 결과가 있으나 이 또한 좀 더 심도 깊은 연구를 통해 명확한 규명이 필요함.

염증성 장 질환의 발병 원인은 명확히 밝혀져 있지 않으나, 학자들은 크게 유전적 요인과 환경적 요인 두 가지를 주요한 원인으로 설명하고 있음. 전체 염증성 장 질환 환자 중, 8-14%의 환자들이 가족력을 가지고 있으며 가족력이 있는 사람의 경우 염증성 장 질환의 발병 위험이 4배 가량 높아진다고 알려져 있으나 실제 이러한 유전적 요인에 의한 발병은 20% 미만에게서만 나타나는 것으로 알려짐. 따라서 염증성 장 질환의 발병 원인에는 유전적 요인보다는 환경적 요인으로 인한 기여도가 더 클 것으로 사료됨. [그림 7].



[그림 7] Contributing factors in inflammatory bowel disease (IBD). Goto Y et. al.



(2) 본 연구 개발 수행을 위한 핵심 사균화 처리 및 반응 최적화

핵심소재의 제품화를 위해서는 현재 가능성이 확인되어 (주)비피도에서 확보하고 있는 한국인 장 유래의 유산균 균주를 선정으로써 안전성 및 상업성을 확보하였음. [표 2]

표 2 본 연구에 사용될 후보 유산균 균주-(주)비피도 보유중심+발효식품 유산균

균주	특징 및 선정 이유
<i>Bifidobacteria bifidum</i> BGN4	한국인 장유래. 항돌연변이능과 면역강화능 우수, Chiroinositol 다당체 우수 생산균주
<i>Bifidobacteria longum</i> subsp. <i>longum</i>	내산성 우수 균주
<i>Bifidobacteria pseudocatenulatum</i> IMAUFB075	면역강화능 우수 균주
<i>Bifidobacterium breve</i>	면역강화능 우수 균주
<i>Bifidobacterium animalis</i> Bifi 506P	Bacteriocin 우수 생산균주
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Bacteriocin 우수 생산균주
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lactocepin 생산균주
<i>Lactobacillus fermentum</i> KF7	Lactocepin 생산균주
<i>Lactobacillus paracasei</i> KF10	Sulfquinovose 생성 우수균
<i>Lactobacillus brevis</i> GABA100	GABA 우수 생산균
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	설사유발 pathogen 항균능 우수
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	설사유발 pathogen 항균능 우수
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	장 부착능 우수균
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	단백질 분해 우수 균주
<i>E. faecium</i>	장 정착성우수균주. pathogen으로의 전환가능
<i>Weissella</i> spp.	김치등 발효식품 분리 균주
<i>Leuconostoc</i> spp.	김치등 발효식품 분리 균주
<i>Pediococcus</i> spp.	김치등 발효식품 분리 균주
<i>Streptococcus</i> spp.	한국인 장관 분리균주
<i>Lactococcus</i> spp.	한국인 장관 분리균주

사균의 처리로써 열처리와 음파 파쇄 및 동결건조를 통한 물리적 처리 및 bacteriophage 및 그 유래 endolysin 또는 식품 수준의 lysozyme과 같은 생물학적 처리를 이용하여 다양한 형태의 사균체를 확보하며 그 기능성을 판단하고자 함.

특히, 유산균에서 사균체를 고효율로 생산하는 유산균 박테리오파지 기반 사균체 생산은 지금까지 유산균 사균체의 상품화를 위해서는 시도되지 않은 획기적인 방법으로, 기존의 균

체 사균화 공법에 비하여 경제성 우수함. 이를 기반으로 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 면역 조절 및 항염 활성 보유 세포벽 펩티도글리칸 사균체 제품 개발 목표로 하고자 함.

따라서 본 연구는 염증성 장 질환 및 비만으로 인해 유도된 전신성 염증을 완화 할 수 있는 probiotics 및 para-probiotics strain을 찾아 그 효능을 평가하고 작용 기전을 규명하여 기존 미생물 균주가 가지고 있던 한계점을 극복하고 새로운 고부가가치 건강기능식품 소재 개발을 위한 기초 자료 및 개발 근거를 제공하고자 함.

#### 다. 향후 기술 및 세계 시장 전망

세계보건기구가 발표한 Global Action Plan for the Prevention and Control of Non-Communicable Diseases(NCDs) 2013-2020 report에서는 심혈관계질환, 암, 당뇨병, 만성 호흡기계 질환으로 인한 사망률을 2020년까지 25% 감소시키고 당뇨병이나 비만의 증가율을 50% 줄이는 것을 목표로 하고 있고 이를 위해서는 이들 질환을 예방하고 관리하는데 필요한 우수한 연구개발에 국가적 지원을 촉진해야한다고 보고함.

우리나라는 특히 당뇨병, 비만, 서구형 암의 발생률이 급속히 증가하고 있는 대표적인 국가이고 2013년 World Cancer Research Fund International의 공식 통계에서 우리나라의 대장암 발생률이 전 세계에서 가장 높은 것으로 보고된 바 있음.

서구형 질환이었던 염증성 장 질환은 급속한 세계화와 식습관의 변화, 위생 상태의 개선, 항생제 사용의 증가 등과 같은 환경 요인의 변화로 인해 최근 아시아 지역에서도 빠르게 증가하고 있는 추세임.

빠른 염증성 장 질환 발병 속도와 달리, 환자들에게 적용되는 치료법은 피상적이고 일시적인 효과를 주는 것에 불과한 형태임. 따라서 이를 체계적으로 관리하고 빠른 회복을 돕기 위해서는 적극적인 연구를 통해 일상생활에서 질병의 발병을 효과적으로 차단할 수 있도록 돕는 소재의 탐색이 시급한 상황임.

최근 국내를 비롯한 세계 연구의 흐름으로 볼 때 차세대 식품과학 기술 중의 하나로써 Gut-brain axis와 관련한 장내 미생물의 균총 개선에 맞추어져 있음.

그와 같은 맥락으로 사균을 통한 유산균 소재의 개발은 식품소재로써의 가공 및 보존기간의 증대로 이어지고 이는 현재 주로 냉장 유통되고 있는 유가공품 시장외에 새로운 시장을 창출 할 것으로 기대됨.

현재 일본이 사균에 관해 연구 및 시장을 주도하고 있으며 우리나라도 독자적인 유산균 연구 기술을 바탕으로 시장에 접근하고 있음.

다만 대부분의 사균에 관한 연구는 사균화된 균체를 이용하고자 하는데 중점을 맞추었으며, 유산균의 종류 및 각기 다른 기능성에 관한 연구는 아직 미미한 실정임.

특히 사균체로부터 생산되는 물질들이 균에 따라 다양하게 되고, 그러므로 사균이 가지고 있는 생리 활성도 다양할 것으로 기대되는 가운데에 유산균의 다양한 자원과 관련 연구기법을 확보하고 있는 당 연구팀이 주도적으로 생리활성을 및 소재화 가능성이 있다고 판단됨.

특히 생물공정 기반의 기술집약적인 bacteriophage를 이용한 사균화 공정을 통한 식품 소재로써의 안전성 및 유통기간의 개선 효과는 미생물의 사균화 기술을 한단계 더 끌어올리며, 현재 지속적으로 증가하고 있는 유산균 시장의 새로운 고부가 가치의 소재로써 적용이 쉽게

가능하다고 판단됨.

국내 중소기업청에서도 2013년에 고부가식품 분야에서 출원 건수를 기준으로 다 출원 상위 IPC 20개를 확인하였으며, 미생물 기술 제품 군 (C12N-001)은 상위 6위로 420건의 특허가 출원되어 있음. [표 3]

표 3 고부가 가치 대표 기술군 (2015' 차세대 ITC 융·복합농업 전망과 고부가식품/ 발효산업 실태분석 (지식산업정보원))

대표기술		대표출원인	대표기술 (UPC)	대표기술군	세부내용
IPC코드	특허건수				
C12N-001	420	한국생명공학연구원(KR), 한국야쿠르트(KR), 한국식품연구원(KR), MARKETBIOSCIENCE(US)	435/041, 071.1, 134, 252.9	미생물을 포함하는 식품	1. 화학적 합성 2. 단백질 또는 폴리펩티드 3. 지방산 4. 맥주 발효

미래의 식품 또는 건강기능성 소재들은 면역조절, 항산화, 고혈압예방, 노화억제, 치매억제 기능을 갖고 있는 식품 등으로 예상되며, 이를 위한 소재발굴이나 효능검증 등에 다양한 생물공학기술이 접목되어 진행되고 있음.

또한 산업체 특히 다국적 기업들은 기존의 화학제품 위주의 사업추진에서 바이오 및 생물공학 기반의 신기술개발에 중점을 두며, 이는 식품산업 전반에 있어서도 생물공학기술의 도입으로 고기능성 식품소재의 생산으로 시장이 형성되어가고 있는 반면에, 세계 시장중 유산균에 관한 본격적인 연구를 하는 대형 기업들은 미미한 실정임.

사균체를 이용한 새로운 형태의 식품 소재 연구에 관한 연구 분야는 유산균 관련 유제품 또는 관련 식품 제조에 대한 적용성 연구 등을 통하여 다양한 기능적·물성학적 특성과 더불어 건강에 이로움을 제공해 줄 수 있는 유산균 소재의 개발로 이어질 것으로 예측됨.

실제로 미생물의 viability와 관련 없이 박테리아를 구성하는 일부 물질이나 박테리아가 생성한 물질이 인체의 조직세포와 직접 접촉하여 면역기능에 영향을 줄 수도 있다는 점에서 유산균 유래의 사균체 연구의 중요성은 시의적절한 것으로 판단됨.

특히 본 연구를 통해 규명하고자 하는 특성중에 하나인 대장염과 비만으로 두 질환이 연관되는 매개 요인이 만성염증이고 이는 균형을 상실한 면역반응과 밀접히 관련된다는 점에서 이미 면역기능 조절 기능을 가지는 것으로 잘 알려진 probiotics 및 사균체 para-probiotic 연구의 시장성은 매우 클 것으로 사료됨.

## 라. 연구개발의 창의성·혁신성

본 연구 개발의 최종 목적은 기능성 및 안전성이 확보된 유산균을 이용하여 사균화된 유산균체와 그 유용 대사물의 고농도 생산을 위한 최적의 사균화 공정을 개발하며, 생산된 사균체물을 생리적/건강기능적 특성을 규명하고 이를 바탕으로 고부가 가치의 유산균 소재를 개발하여 제품화하는 것으로 유산균 사균체 제품 산업화는 세계적으로 차별화된 핵심 기술에

기반하여야 함. 본 연구진은 박테리오파지 기반 신공정 개발에 의한 신제품 후보 1, 수백 종류의 다양한 유산균, 효모균, 버섯균, 바실러스 균들 중 유기셀레니움 생산 효율이 가장 우수한 *Bifidobacterium bifidum* BGN4 기반 신제품 후보 2, 제품화 가능성이 높은 천연 항균 신제품 후보 3 중에서 우선 2 건의 제품화를 성공시켰음. 미래 핵심 기술 적용을 통한 글로벌 선도 제품 가능성이 있는 신제품 후보 4는 제품이 성공적으로 개발된다면 세계 시장에서 한국의 농림식품 산업 역량 위상 제고에 기여할 것임.

- 신제품 후보 1: 특히 본 연구에서 중점적으로 연구 개발하고자 하는 유산균체의 사균화 방법은 유산균 bacteriophage를 기반으로 하는 사균체물 생산 신공법으로, 기존에 산업적으로 이용해오던 틴달화 (tyndallization), 균체 lysozyme처리 공법에 비하여 유효 기능성 물질의 고농도화에 우수함. 이를 기반으로 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등으로부터 생산된 설사방지 항균, 면역조절 및 항염활성 보유 세포벽 peptidoglycan 중심 사균체 제품 개발을 목표로 함. 특히 bacteriophage-based 사균체는 미생물 유래의 펩타이드나 단백질계열의 유용 물질을 그대로 보존할 수 있는 측면에서 연구의 가치가 크다고 할 수 있음.

- 신제품 후보 2 : 본 연구진은 약 30 년간 중점적으로 활성 유산균 균주들을 스크리닝하였으며, 뛰어난 생리활성을 지닌 유산균을 다수 확보하고 있음. 특히 장 부착능이 가장 우수한 *Bifidobacterium* BGN4 균주는 세포벽에 항종양 활성 보유하고 있으며 chiroinositol 다당체 성분 BB-pol을 생산하며, MeSeCys와 SeMet 형태의 유기 셀레니움 생산성이 가장 우수하다는 것을 확인하였음. 이를 바탕으로 유기 셀레니움을 고효율로 생산하는 BGN4 사균체물을 제품화 목표로 함.

- 신제품 후보 3: 유산균을 이용한 천연 항균제 제품 개발로 선행 연구에서 본 연구진은 *Bifidobacterium animalis* Bifi 506P 균주가 생산하는 신규의 bacteriocin 생산 균주 개발하였으며 유산균이 보유하는 니신, 피디오신 등 항균 스펙트럼의 한계를 극복하기 위하여 박테리오파지 생산 균주를 조합하여 시너지를 극대화한 천연 항균제 제품 개발 목표로 함.

- 신제품 후보 4: 본 연구팀이 자체 보유하고 있는 NGS MiSeq system을 활용하여 상시적으로 metagenomic gut microbiota 분석 및 full genome sequencing을 수행하여 후보 균주의 염기 서열을 해독하여 이를 통한 신규 활성 물질을 개발함. *Lactobacillus* 유전체 분석으로 찾아 낸 lactocepin은 염증성 사이토카인을 제거하여 신규한 항염증 제품으로 개발할 수 있음. 이외에 수십 종류의 신규한 활성 물질을 발굴하였음. 이를 기반으로 또한 food-grade *Bifidobacterium* 유전자 발현 시스템을 이용하여 기능성 물질의 발현 및 고효율 생산 목표로 함.

본 연구에서 중점적으로 개발하고자 하는 사균체의 특징은 열처리 방법을 통해 사균화된 유산균 사균체의 다양한 생리기능성을 연구하여 고부가 가치의 식품소재를 개발하고자 하며, 유산균 사균화 방법의 다양성을 확보하여 건강 기능성 강화 여부를 연구하고자 함.

이를 기반으로 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등으로부터 생산된 설사방지 항균, 면역조절 및 항염활성 보유 세포벽 peptidoglycan 중심 사균체 제품 개발을 목표로 함. 특히 bacteriophage-based 사균체는 미생물 유래의 펩타이드나 단백질계열의 유용 물질을 그대로 보존할 수 있는 측면에서 연구의 가치가 크다고 할 수 있고 새로운 유용물질의 screening이 가능함.

본 연구팀이 자체 보유하고 있는 NGS MiSeq system을 활용하여 상시적으로 metagenomic gut microbiota 분석 및 full genome sequencing을 수행하여 후보 균주의 염기 서열을 해독하여 이를 통한 신규 활성 물질을 개발할 수 있음.

*Lactobacillus* 유전체 분석으로 찾아 낸 lactocepin은 염증성 사이토카인을 제거하여 신규의 항염증 제품으로 개발할 수 있음. 이외에 수십 종류의 신규 활성물질을 발굴하였으며 이를 기반으로 또한 food-grade *Bifidobacterium* 유전자 발현 시스템을 이용하여 기능성 물질의 발현 및 고효율 생산이 가능함.

유산균을 이용한 신규의 천연 항균제 (bacteriocin) 생산 균주 개발을 통하여, 유산균이 보유하는 니신, 피디오신 등 항균 스펙트럼의 한계를 극복하기 위하여 박테리오신 생산 균주를 조합하여 시너지를 극대화한 천연 항균제 제품 개발이 가능함.

지금까지의 장 박테리아 연구결과들로부터 질병과 장 박테리아의 조성 변화는 밀접한 연관성이 있는 것으로 밝혀져있음. 그러나 장 박테리아 조성 변화가 질병 발생과 진행의 원인을 제공하는 것인지 혹은 질병진행의 결과인지에 대한 결론을 도출하지 못하고 있어 장 박테리아 조성을 변화를 유도한 후 그 결과를 관찰함으로써 박테리아의 조성 변화가 장의 염증에 발생 및 지연에 미치는 영향을 평가하는 연구라는 점에서 뚜렷한 차별성이 제공됨.

본 연구는 대사성 질환의 효과적 관리에 유효한 소재의 개발을 목표로 하고 있으며 특히 인체에 적용가능성이 높은 para-probiotics의 활용을 통해 (안전성 확보) 구체적인 작용 기작을 밝힘으로써 (과학적 기반 확보) 임상시험 단계 진입이 용이하도록 함. 또한 실제 활용될 수 있는 가능성을 최대화함으로써 지적재산권 확보 및 기술이전까지의 시간을 최소화 하고 달성 가능성을 높이고자 함.

장 박테리아 조성 분석은 16s rRNA sequencing을 통해 수행하고 이 자료와 대사기능 DB를 접목하여 분석하는 기술을 적용함으로써 식이구성의 특징 및 질병의 종류에 따라 박테리아 종을 grouping 하고 해석하는 시도를 해보고자 함. 현재 대사기능 DB가 완벽하지 않아 도출될 결과물에 대한 예측은 쉽지 않으나 동물모델에서 비교적 뚜렷한 식이구성의 차이를 두는 경우 예상하지 못했던 고유한 연구결과가 도출될 가능성이 높다고 판단됨.

### 3. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
균주 بانک 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 차 년도에 이어 2 차 년도에도 약 500 균주의 분리 균주들에 대하여 지속적으로 균주 특성을 규명하고 업데이트하여 데이터베이스에 정리</li> </ul>	셀레니움 생산 균주, 박테리오신 생산 균주, 면역 활성 우수 균주, 올리고당 및 lactase 생산 우수균주 등에 대한 특성과 안전성 관련 특성들 지속적 분석

개발 균주 고농도 배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 각 유산균을 MRS broth 5 ml, 1 리터, 20 리터, 2 톤, 5 톤 배양 최적화 연구</li> </ul>	5 톤 배양조에서 $10^{10}$ cfu/ml 이상의 고농도 배양 기술을 개발. 원말 생산 균주는 $5 \times 10^{11}$ cfu - $10^{12}$ cfu/g.
NGS MiSeq system에 의한 기능성 유효물질 개발 및 분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자체 보유중인 Illumina Miseq 장비를 이용하여 산업적 활용 개발 가능성이 우수한 균주들의 전체 염기 서열 분석 및 장내 균총 메타지노믹스 분석</li> </ul>	NGS MiSeq으로 분석한 균주들로부터 산업적 유용성이 기대되는 12 개의 산업화 후보 유전자에 대한 구조 및 프로모터 분석
셀레늄 고농축 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 셀레늄 동화작용 및 셀레늄 내성으 우수한 균주를 선발하고 다양한 배양 조건에서의 균체내 셀레늄 축적량을 분석하였으며 ICP 분석으로 셀레늄의 정량 분석 및 셀레늄 구조 분석</li> </ul>	300 개 이상의 균주를 $Se^{2+}$ 60 mM 및 $Zn^{2+}$ 3.5mM을 함유 한 MRS 배지에 24 시간 배양해서 선발하고 셀레늄과 아연 내성 세균을 스크리닝하여 16sRNA 서열로 측정함
셀레늄 및 아연 농축 유산균 분말 섭취 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MRS 배지와 0.01mM <math>Na_2SeO_3</math> 과 3.5mM <math>ZnSO_4 \cdot 7H_2O</math>을 첨가한 MRS 각각 24시간 배양 후 박테리아 세포를 원심 분리, 세척, 동결 건조시키고 건조하여 균 분말을 얻음. 다음에 ICP-AES를 사용하여 세포 분말 안에 Zn과 Se의 농도를 측정</li> </ul>	mouse의 혈액 GSH-Px 및 SOD의 활성은 selenium 과 zinc가 보충 된 그룹(2군 및 4군)에서 증가한 것을 확인함. 특히 Se하고 Zn이 풍부한 프로바이오틱스사료를 섭취한 그룹은 GSH-Px 및 SOD의 활성이 매우 크게 증가함. 그리고 프로 바이오틱스를 섭취한, 특히 Se하고 Zn이 풍부한 프로 바이오틱스를 보충한 그룹 MDA 수준이 유의하게 감소함.
메타지노믹스 조절 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품 개발에 필요한 조합 소재로서 본 연구진에서 개발한 butyl-fructooligosaccharide과 기존에 상업적으로 판매되고 있는fructooligosaccharde를 실험 주에 투여한 후 장내세균의 메타지노믹스 조절에 미치는 영향을 분석함.</li> </ul>	본 연구진이 개발한 신소재인 butyl-fructooligosaccharide는 <i>Bifidobacterium</i> 을 비롯한 유익균과 <i>Bifidobacterium</i> 이 포함된 Actinobacteria 균총을 증가시키는 특징을 나타냄.
유산균의 물리적	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상업적 가열살균 방법으로</li> </ul>	유산균의 배양액을 50 mL씩

처리를 통한 사균화 -열처리	유산균의 가열 처리 후 사균화 수준 확인	유리 test tube에 소분하여 65 ° C, 30 min 및 121 ° C, 15 min의 조건으로 살균처리 후 plate counting을 통해 균수 감소율 확인
유산균의 물리적 처리를 통한 사균화 - 음파파쇄	<ul style="list-style-type: none"> <li>음파파쇄기를 이용하여 유산균의 음파파쇄 후 사균화 수준 확인</li> </ul>	유산균의 배양액 50 mL를 20 kHz, amplitude 30%의 음파세기로 30분간 5회 처리 후 plate counting을 통해 균수 감소율 확인
유산균의 물리적 처리를 통한 사균화 -고압파쇄	<ul style="list-style-type: none"> <li>고압파쇄기를 이용하여 유산균의 고압파쇄 후 사균화 수준 확인</li> </ul>	유산균의 배양액을 원심분리하여 균체만 멸균증류수와 희석한 후 균 당 500 mL씩 사용하여 20,000 psi, 30,000 psi 압력세기로 처리 후 plate counting을 통해 균수 감소율 확인
유산균의 생물학적 처리를 통한 사균화 -bacteriophage	<ul style="list-style-type: none"> <li>bacteriophage를 접종하여 감염시킨 후 숙주 유산균의 사균화 수준 확인</li> </ul>	overnight culture 한 유산균을 새 배지에 bacteriophage와 접종한 후 감염 시간 별 숙주 유산균의 감소율을 plate count method로 확인
유산균의 생물학적 처리를 통한 사균화 -lysozyme	<ul style="list-style-type: none"> <li>lysozyme을 일정 수준 처리하여 lysozyme 처리 이후 유산균의 사균화 수준 확인</li> </ul>	overnight culture 유산균을 원심분리하여 균체만 20mg/ml이 녹아있는 멸균증류수에 희석한 후 37 ° C, 150rpm 조건에서 처리한 후 유산균의 감소율을 plate count method로 확인
주사전자현미경	<ul style="list-style-type: none"> <li>사균화 최적 공정으로 생산된</li> </ul>	

<p>(SEM)을 이용한 유산균 사균체 성장 확인</p>	<p>유산균 균체를 형태학적으로 분석</p>	<p>유산균의 생균, 열처리 사균, lysozyme 효소와 음파파쇄 사균 3가지 실험군으로 진행함. 전처리의 경우 전고정, 세척, 후고정, 세척, 탈수, 건조, 코팅 과정을 거친 후 SEM 분석</p>
<p>유산균 사균체의 면역억제 효과 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>면역억제 효과가 기대되는 균주들의 생균, 열처리사균, 최적 공정 생산 사균체물의 면역 억제 효과 비교</li> </ul>	<p>대식세포 raw 264.7 cell을 사용하여 LPS를 처리하여 염증성 사이토카인 TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-8, IL-1b의 양을 분석</p>
<p>항균능 생산 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>박테리오신 생산 균주의 천연 식품 소재 배양 시 다양한 병원성 indicator 균주별로 항균능 분석</li> </ul>	<p>항균물질 생산 균주의 당근 배양액을 원심분리를 통해 상층액 분리(skim milk 첨가 실험의 경우 당근에 추가, 고압파쇄는 배양 후 진행) &gt; 최적 배양된 indicator 균주를 0.65%의 TSB soft agar에 100 <math>\mu</math>l 분주하여 TSA plate에 lawning &gt; 항균물질 생산 균주의 상층액 spot assay 10 <math>\mu</math>l를 indicator lawn이 깔린 plate에 분주한 후 온도별, 시간별 배양 진행</p>
<p>유산균 사균체 유래의 핵산 CpG 활성화 및 기능성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>사균화를 진행하는 균주의 CpG motif 추적</li> </ul>	<p>사균화 균주 목록 중 whole genome sequencing이 되어있는 <i>Lactobacillus acidophilus</i> PIN7, <i>Lactobacillus paracasei</i> IBS041에 대해 면역활성이 기대되는 CpG motif 관련 염기서열 선정</p>
<p>사균체의 in vitro prebiotics 효과 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>사균화 최적 공정으로 생산된 사균체물의 수용성/침전물 분획 후 prebiotics 효과 비교</li> </ul>	<p>MRS 배지와 MRS 배지에 사균체물 상등액, 침전물을 각각 첨가하여 유산균 배양 시 균수 변화를 plate count method로 확인</p>



## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 추진전략 및 방법

#### 1. 기술정보 활용방안

- 현재 본 연구 기관에서 교류하고 있는 외국 유산균 관련 회사와의 협력을 통한 다양한 응용 연구 수행
- 국·내외 유산균 및 사균체에 관한 연구기관 및 핵심기업체의 기술개발 동향 및 기술 활용가능성을 지속적으로 타진
- 또한 유산균 또는 사균체를 응용한 소재 관련 연구 해외기업의 특허 및 논문발표 성과의 지속적 모니터링을 통한 최신 연구 동향 및 가능성 확보
- 국내외 학회 및 전시회에서의 개발 연구 결과 발표를 통한 기술 활용성 홍보 연구 자문 확보

#### 2. 연구개발 접근 방법론

국내 최대의 유산균 생산 및 연구 능력을 갖춘 주관기관을 중심으로 사균화 및 그 기능성을 연구할수 있는 협동기관이 협력하여 유산균 사균체물 식품첨가물을 개발하여 제품화함. 기능성 및 안전성이 확보된 유산균과 전통발효식품 유산균을 활용함. 유효생리 기능성 물질의 최적화된 사균화 기법을 개발하고 사균체물과 그의 대사물의 생리적/건강기능적 특성을 구명함. 선정 우수 유산균 사균체의 대량 생산기술을 확보하여 이를 식품소재로 개발하여 유제품 및 다양한 식품에 적용하여 고부가 가치 제품을 생산하고자 함.

#### 3. 연구개발 추진 방법

본 연구과제에서는 주관연구기관(비피도)와 제1협동 연구기관(가천대학교), 제2협동 연구기관(숙명여자대학교)가 협력하여 각각 기능성 유효물질 개발/산업적 생산공정 개발, 사균화 기술 개발 및 식품소재 응용방안 개발, 대장염/비만을 타겟으로 하는 항염증성 생리기능 연구를 실시함.

##### 가. 주관연구기관(비피도) 연구방법

현재의 사업화 knowhow와 metageomic system에 의한 최적의 유산균 후보 균주와 건강 기능 지표물질을 선정하고 분석법을 확립하며 산업적 생산기술 개발과 신규 사균체물 제품화를 위한 표준화 및 사업화를 진행함.

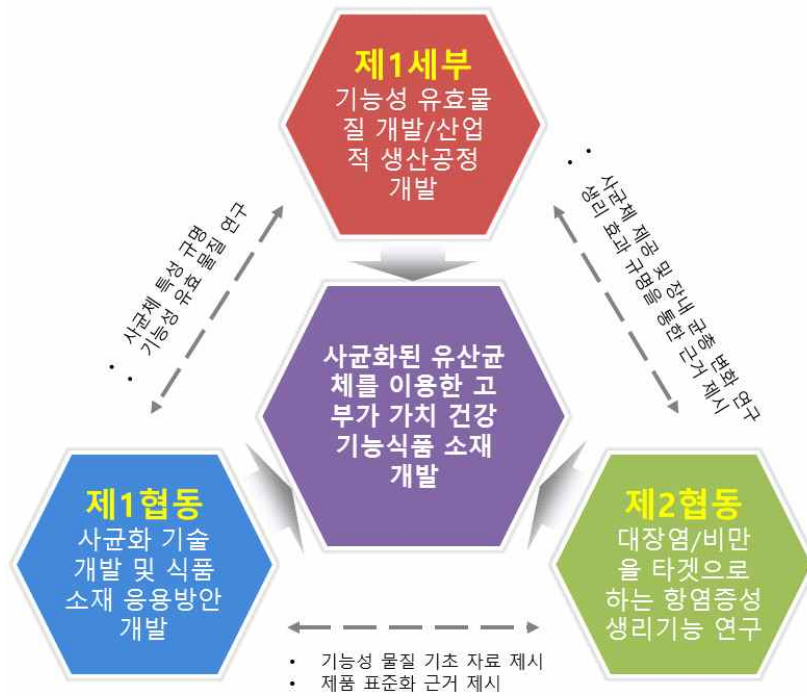


그림 8 연구개발 협력 체계도

**(1) 사균처리를 위한 최적의 유산균 후보 균주 선정 및 지표물질 개발**

- 사균화를 위한 GRAS로써 기능성 및 안전성이 확인되어 시장에서 유통되고 있는 균주
- NGS MiSeq system에 의한 지표물질 선정 및 분석법 확립 선정
- 국내 발효식품 유래의 신규 유산균 균주 확보
- 유기 셀레니움 함유된 유산균 및 사균체 개발

**(2) 선발균주의 기능성 확인 및 지표물질 강화 방법/생산기술개발**

- 사균체물에 의한 장내균총 (metagenomics) 영향 평가
- 지놈베이스 생리활성물질 탐색
- 물리화학적인 지표물질 강화방법 개발
- 산업적 생산을 위한 균주 대량 고농축 배양

**(3) 사균체물 제품화를 통한 표준화 및 사업화**

- 유산균의 대량 생산 기술 공정의 정립
- 제품 생산 방법 확립 (분무/동결 건조)
- 기능성 유제품은 유통 및 소비자 편이성을 고려하여 분말형 요구르트가 적합할 것으로 사료되어 분말 유제품 생산에 적합한 원료의 선정, 배합, 포장, 유통 기한 설정 등 요인을 분석하고 그 결과에 근거하여 상품화함.  
제품 형태는 분말형, 과립형, 스틱형 등의 유제품 형태에 대한 연구 진행
- 제품화를 위한 상품 기획 및 제품 디자인은 (주)비피도의 디자인 전공 인력을 활용하

여 3-D 입체 CAD 프로그램을 활용하여 제품디자인의 개발 효율성을 증진시킴. 상품 기획은 자체 연구 개발팀외에도 (주)비피도의 거래처와의 협의, 해외 바이어의 상품 기획 피드백 등을 통하여 시장 지향적으로 진행

- 개발 제품에 대한 소비자 테스트: 개발 제품에 대하여 관능성, 편이성, 제품 섭취 반응 평가 등을 실시하여 그 결과를 반영하여 소비자 수용도 향상
- 맞춤형 영업 전략제시

## 나. 제1협동연구기관 (가천대학교) 연구방법

사균체물 확보를 위한 전처리 기술의 개발과 기능성 prebiotic 또는 생리기능성 유효성분 최적화를 위한 최적화 기초공정을 개발하며, 이를 바탕으로 식품소재로서의 응용 방안을 개발하고자 함.

Phage endolysin cocktail 신공법은 본 연구에서 기술 역량 확충에 활용하기 위하여 새로이 추가적으로 연구할 것이며 관련하여 현재 효소 lysozyme을 사용한 특허가 한 개 있으나 phage endolysin cocktail 기술은 lysozyme 기술(특허출원 제 10-2000-0046149등)에 비하여 진보된 기술임. 즉, 본 연구에서는 RFP 상에 제시된 살균 사균체 연구를 통하여 기능성 유제품 개발을 주력으로 진행하면서 추가적으로 phage endolysin cocktail 연구를 보조 수행하여 경제성 있는 제품 개발은 물론 추가적 기술력 향상에도 노력함.

### (1) 최적의 유산균 후보 균주의 사균화 전처리법 개발

- 사균화 공정의 조건 최적화 확립 및 실험실 스케일의 공정 확보
  - 물리적 처리 (열, 음파파쇄, 건조)방법을 이용한 최적의 공정기술 확보
  - 건강 기능성 유효성분 강화를 위한 생물학적 처리 (bacteriophage, endolysin등)를 보완적으로 활용
- 수용성/침전물 사균체의 분획/농축으로 기능물질 강화법 및 지표물질 분석

### (2) 사균체물 Prebiotics의 in vitro probiotic 기능성 연구

- 항균활성평가/사균체의 설사, 과민성 장 증후군 개선, 식중독 개선효과 연구
- 장내 유산균 증식 prebiotics 효과 평가
- Scale-up 사균체 물질분리 및 가공 기술 확보
- 유산균 사균체 유래의 핵산 CpG 활성 및 기능성 분석

### (3) 사균체를 활용한 식품소재로서의 응용성 및 제품 표준화 연구

- 사균체물 생산조건 공동 연구
- 사균체물의 안정성 및 유통적성 분석
- 지표물질에 의한 표준화 분석법 연구
- 제품 형태 제시
  - 기존 유제품 적용 연구
  - 건기식 (분말형)/조제분유

## 다. 제2협동연구기관 (숙명여자대학교) 연구방법

염증성 질환(대장염/비만) 동물 모델에서 프로바이오틱스 또는 파라프로바이오틱스(사균체)의 효과 및 기전 규명. 1차년도 연구 결과를 바탕으로 선정된 사균체물이 면역기능 향상 조절을 통한 대장염/비만에 미치는 영향을 평가하여 제품화에 필요한 기반 자료를 제공함.

### (1) 대장염 유도 동물 모델을 활용한 사균체물의 보충이 대장염 완화에 미치는 영향 및 대장 미생물 군총의 변화에 주는 영향 분석

- 장 염증을 유발한 동물모델에 실험소재를 공급한 후, 대장염의 진행 차이를 분석함
- 염증반응을 유도하는 초기 단계 지표로는 gut permeability 증가와 연관된 gap junction protein을 측정함.
- 미생물 유입 지표로는 혈 중 CD14과 미생물 유입으로 활성화되는 toll-like receptors 와 하위 염증 반응 조절 T-cell 분포를 측정함.
- T-cell 활성화와 함께 혈 중 농도가 변화하는 염증성 사이토카인 중 L-6, TNF- $\alpha$ , IL-23를 측정함.
- H&E staining을 활용하여 장 상피 손상정도를 평가하고 세포사멸은 IHC를 이용해 평가함.
- 16s ribosomal pyrosequencing을 통해 장내 미생물 군총 화를 평가함
- 대장염모델: 대장염 모델에서의 염증반응 지표는 gut permeability 증가와 연관된 gap junction protein, 미생물 유입지표 인 CD14,, 장미생물과 연관하여 염증반응을 유도하는 upper target인 toll-like receptors와 하위 염증반응 조절 T-cell 분포와 관련 cytokine들 (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23)을 측정하고자 함. 조직의 H&E staining을 통한 손상 정도와 세포사멸관련 지표는 IHC로 측정할 예정임.

### (2) Para-biotics의 급여가 비만으로 인한 전신성 염증에 미치는 영향 분석 및 대장 미생물 군총과 염증과의 관련성 분석

- 고지방 식이를 통해 비만을 유도한 동물모델에 실험 소재를 공급한 후 체중 및 체내 지방 조직 변화에 주는 영향을 분석
- 염증반응을 유도하는 초기 단계 지표로는 gut permeability 증가와 연관된 gap junction protein을 측정함.
- 미생물 유입 지표로는 혈 중 CD14과 미생물 유입으로 활성화되는 toll-like receptors 와 하위 염증 반응 조절 T-cell 분포를 측정함.
- 간과 지방조직에서 지방합성과 산화 매개 분자생물 지표 (PPARs, C/EBP- $\alpha$ , SREBP-1c, aP2, LPL, FAS, CPT-1)를 정량함.
- 16s ribosomal pyrosequencing을 통해 장내 미생물 군총 변화를 평가함
- 비만모델: 전신성 염증 반응인 비만모델에서는 gut permeability 증가와 연관된 gap junction protein, 미생물 유입지표 인 CD14, toll-like receptors와 T-cell 분포를 측정함. 간과 지방조직에서 지방합성과 산화 매개 분자생물 지표 (PPARs, C/EBP- $\alpha$ ,

SREBP-1c, aP2, LPL, FAS, CPT-1)를 측정하여 장 미생물의 분포 변화와의 연관성 분석을 시행하고자 함. w혈 중 대사성 염증 지표로는 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1를 평가함.

## 제 2 절 연구개발 추진체계

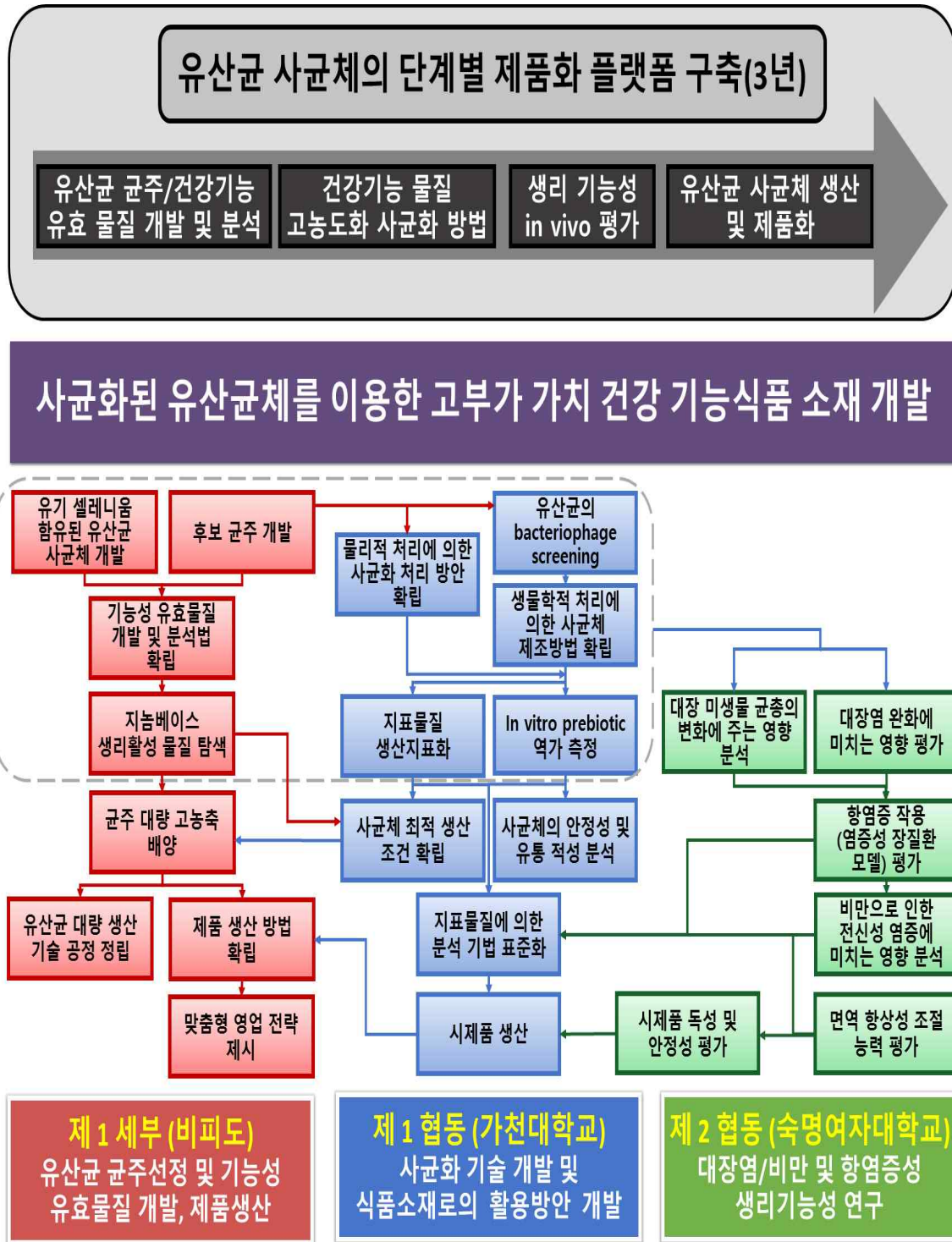


그림 9 연구개발 추진체계

### 제 3 절 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	후보 균주 선정					■	■	■							50,000	권빈 (비피도)
2	기능성 유효 물질 개발					■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	권빈 (비피도)
3	균주 특성 연구					■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	권빈 (비피도)
4	유기 셀레늄 함유 유산균 개발								■	■	■	■	■	■	50,000	권빈 (비피도)
4	물리적 사균화 방법 확립					■	■	■							10,000	박종현 (가천대)
5	Bacteriophage 스크리닝					■	■	■							15,000	박종현 (가천대)
6	생물학적 사균화 방법 확립							■	■	■	■				10,000	박종현 (가천대)
7	기능성 부분 예비 분획								■	■	■	■			25,000	박종현 (가천대)
8	In vitro prebiotic 역가 측정											■	■	■	10,000	박종현 (가천대)
2차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	균주 고농도 배양 및 사균체 생산	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	180,000	권빈 (비피도)
2	사균체 생산 및 물질 연구							■	■	■	■	■	■	■	150,000	권빈 (비피도)
3	유효물질 분획 및 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	박종현 (가천대)
4	사균화 공정확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	박종현 (가천대)
5	항균활성 평가 외 기능성 테스트							■	■	■	■	■	■	■	30,000	박종현 (가천대)
6	사균체 유래의 핵산의 활성성 평가											■	■	■	10,000	박종현 (가천대)

7	대장염 유도 실험 동물의 사육													30,000	성미경 (숙명여대)
8	사균체물 급여가 염증 및 면역 조절에 미치는 영향 분석													40,000	성미경 (숙명여대)
3차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	균주 고농도 배양 및 사균체 생산													180,000	권빈 (비피도)
2	사균체 생산 및 물질 연구													150,000	권빈 (비피도)
3	유효물질에 의한 생산지표 설정													40,000	박종현 (가천대)
4	사균체물의 안정성 설정													30,000	박종현 (가천대)
5	적용가능 제품 개발													30,000	박종현 (가천대)
6	고지방식이 공급을 통해 비만을 유도한 실험동물의 사육													30,000	성미경 (숙명여대)
7	Para-biotics 급여가 전신선 염증 및 대사 질환에 미치는 영향 분석													40,000	성미경 (숙명여대)

## 제 4 절 연구내용 및 결과

### 1. 제1세부 (비피도)

#### 가. 균주 분리

##### (1) 균주 라이브러리 구축

기존 균주의 라이브러리에 다음과 같이 신규 유산균 균주를 추가적으로 분리하여 균주의 특성 규명 및 생리 활성이 우수한 신 균주 개발에 활용하였음.

균주통합				재접종 agar배지											broth
번호	키운(사람/남/원배지)	원배지	grf	stick	현미경	MRS	GLU	SUC	GAL	LAC	FRUC	RAFF	MALT	GALA	MRS
1	110501	CH01	LBS	+	+	단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
2	110502	CH01	LBS	+	-	단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
3	110503	CH01	LBS	+	+	간균	○	○	○		○	○	○	○	○
4	110504	CH01	LBS	+	+	간균	○	○	○		○	○	○	○	○
5	110507	CH01	BL	+	-	굵은 간균	○	○	○		○	○	○	○	○
6	110523	CH01	TOS-MUP	+	+	단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
7	110526	KB01	LBS	+		단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
8	110527	KB01	LBS	+		단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
9	110530	KB01	LBS	+		단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
10	110538	KB01	BL+SUCR	+	-	간균	○	○	○		○	○	○	○	○
11	110539	KB01	BL+SUCR	+	-	간균	○	X	○		○	○	○	○	○
12	110540	KB01	BL+SUCR	+	-	간균	○	○	○		○	X	○	○	X
13	110541	KB01	BL+SUCR	+	+	단간균	○	X	○		○	X	○	○	○
14	110543	KB01	BL+SUCR	+	+	단간균	X	X	○		○	X	○	○	○
15	1105KB	KB01	TOS-MUP	+	+	간균	○								○
16	1105KT	KB01	TOS-MUP	+	+	간균	포								○
17	1105CB	CH01	TOS-MUP	+	+	간균	○								○
18	1105CT	CH01	TOS-MUP	+	+	간균	○								○
19	111711	KB02	LBS	+		구균	○	○	○		○	○	○	X	○
20	111712	KB02	LBS	+		단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
21	111713	KB02	LBS	+		구균	○	○	○		○	○	○	○	○
22	111714	KB02	LBS	+		구균	○	○	○		○	○	○	○	○
23	111715	KB02	LBS	+		구균	○	○	○		○	○	○	○	○
24	111716	KB03	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
25	111717	KB03	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
26	111718	KB03	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
27	111719	KB03	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
28	111720	KB03	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
29	111731	KB03	TOS-MUP	+	+	간균	○	○	○		○	○	○	○	○
30	111732	KB03	TOS-MUP	+	+	단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
31	111733	KB03	TOS-MUP	+	+	단간균	○	○	○		○	○	○	○	○
32	111734	KB03	TOS-MUP	+	+	단간균	○	○	○		○	○	○	○	○



33	111735	KB03	TOS-MUP	+	+	단간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
34	111727	KB02	TOS-MUP	+	++	간균	○	X	○	○	○	○	○	○	○
35	111729	KB02	TOS-MUP	+	++	간균	○	X	X	○	X	X	X	X	○
36	111738	KB03	TOS-MUP	+	++++	간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
37	111739	KB03	TOS-MUP	+	++	간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
38	120508	KB04 남	LBS	+		간균	○		○	○	○	○	○	○	○
39	120509	KB04	LBS	+		간균	○		○	○	○	○	○	○	○
40	120510	KB04	LBS	+		간균	○		○	○	○	○	○	○	○
41	120511	KB04	LBS	+		선 간균	○		○	○	○	○	○	○	○
42	120512	KB05 여 7	LBS	+	++	단간균	○		○	○	○	○	○	○	○
43	120513	KB05	LBS	+	+++	간균	○		○	○	○	○	○	○	○
44	120514	KB05	LBS	+	++	구균	○		○	○	○	○	○	○	○
45	120515	KB05	LBS	+	+++	4개씩	○		○	○	○	○	○	○	○
46	120527	KB06 여 4	TOS-MUP	+	+++	단간균	○		○	○	○	X	○	○	○
47	120528	KB06	TOS-MUP	+	++	간균	X		○	○	X	X	X	○	X
48	120529 ss-2	KB06	TOS-MUP	+	+++	몽친비	○		○	X	○	X	○	X	○
49	120530	KB06	TOS-MUP	+	+	몽친비	X		○	○	X	X	X	X	○
50	120531	KB06	TOS-MUP	+	+	몽친비	○		○	X	○	X	X	○	○
51	120535	KB04	TOS-MUP	+	++	간균	○		○	○	○	X	○	○	○
52	120536	KB04	TOS-MUP	+	+++	간균	○		○	○	○	X	○	○	○
53	12012	KB07	TOS-MUP	+									○	○	
54	12013	KB07	TOS-MUP	+									○	○	
55	12014	KB07	TOS-MUP	+									○	○	
56	12015	KB07	TOS-MUP	+									○	○	
57	12016	KB07	TOS-MUP	+									○	○	
58	120537	KB07	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
59	030815	CH02	TOS-MUP	+		단간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
60	030818	CH03	TOS-MUP	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
61	030819	CH04	TOS-MUP	+	+++	간균 둘	○	○	○	○	○	○	○	○	○
62	030820	CH04	TOS-MUP	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
63	030821	CH04	TOS-MUP	+		단간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
64	030822	CH04	TOS-MUP	+		21번이	○	○	○	○	○	○	○	○	○
65	030823	CH04	TOS-MUP	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○
66	030825	CH04	LBS	+		간균 둘	○	○	○	○	○	○	○	○	○
67	030826	CH04	LBS	+		간균	○	○	○	○	○	○	○	○	○

68	030827	CH04	LBS	+	균수적	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	030829	CH05	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	030830	CH05	LBS	+	간균 주	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	030831	CH05	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	030832	CH05	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	030833	CH05	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	030834	CH04	LBS	+	간균 연	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	030835	CH04	LBS	+	간균 늘	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	030836	CH06	LBS	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77	030837	CH06	LBS	+	굴다	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	030838	CH06	LBS	+	몽치다	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	031701	CH07	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	031702	CH07	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	031703	CH07	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	031704	CH8:CH06	TOS-MUP	+	+++ 간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	031705	CH06	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	031706	CH06	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	031707	CH07	LBS	+	+++ 간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	031708	CH07	LBS	+	간균	0						0		0	
87	031709	CH07	LBS	+	간균	0		0	0		0	0		0	
88	031710	CH08	LBS	-	간균	0								0	
89	031711	CH08	LBS	+	간균	0								0	
90	031712	CH09	TOS-MUP	+	간균	0		0	0	0	0	0		0	
91	031713	CH09	TOS-MUP	+	간균	0								0	
92	031714	CH09	TOS-MUP	+	단간균	0								0	
93	031715	CH10	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	031716	CH10	TOS-MUP	+	+++ 간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	031717	CH10	TOS-MUP	+	+++ 구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	031718	CH11	TOS-MUP	+	간균	0								0	
97	031719	CH11	TOS-MUP	+	+++ 간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	031720	CH11	TOS-MUP	+	간균	0								0	
99	031721	CH12	TOS-MUP	-	간균	0								0	
100	031722	CH12	TOS-MUP	+	간균	0								0	
101	031723	CH12	TOS-MUP	+	+++ 간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	031724	CH09	LBS	-	+++ 구균	0		0	0		0	0		0	

103	031725	CH09	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	031726	CH09	LBS	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	031727	CH10	LBS	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106	031728	CH10	LBS	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	031729	CH10	LBS	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	031730	CH11	LBS	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	031731	CH11	LBS	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	031732	CH11	LBS	+		단간균	0										0
111	031733	G7 CH12	LBS	+		간균	0										0
112	031734	CH12	LBS	+		간균	0										0
113	031735	CH12	LBS	+		간균	0						0				0
114	031736	CH13	LBS	+		간균	0					0					0
115	031737	CH13	LBS	+		구균	0										0
116	031738	CH13	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	031739	CH14	LBS	+		단간균	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
118	031740	CH14	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0		0	0			0
119	031741	CH14	LBS	+		단간균	0		0	0	0		0	0			0
120	031742	CH15	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	031743	CH15	LBS	+		간균	0		0	0	0		0	0			0
122	031744	CH15	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
123	031745	CH13	TOS-MUP+			단간균	0										0
124	031746	CH13	TOS-MUP+			단간균	0		0		0	0	0	0	0	0	0
125	031747	CH13	TOS-MUP+			단간균	0										0
126	031748	CH16	LBS	+		단간균	0										0
127	031749	CH16	LBS	+		간균	0										0
128	031750	CH16	LBS	+		간균	0			0	0		0	0			0
129	042101	CH15	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	042102	CH15	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131	042103	CH15	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132	042104	CH17	LBS	+		간균 포	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133	042105	CH17	LBS	+	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134	042106	CH17	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
135	042107	CH17	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136	042108	CH17	LBS	+		안자람											
137	042109	CH18	TOS-MUP+			간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

138	042110	CH18	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139	042111	CH18	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
140	042112	CH05	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
141	042113	CH05	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	042114	CH19	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
143	042115	CH19	TOS-MUP +	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	042116	CH19	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145	042117	CH18	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
146	042118	CH18	TOS-MUP -		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147	042119	CH18	TOS-MUP -		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
148	042120	CH19	LBS	-	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	042121	CH19	LBS	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	042122	EPS CH19	LBS	+	물처럼	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	042123	CH20		+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	042124	CH20		+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
153	042125	CH20		+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	042126	CH18	LBS	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
155	042127	CH18	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	042128	CH18	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
157	042129	CH16	LBS	-	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
158	042130	CH16	LBS	-	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
159	042131	CH16	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	042132	CH14	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
161	042133	CH14	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
162	042134	CH14	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	042135	CH17	TOS-MUPred		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164	042136	CH17	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
165	042137	CH17	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
166	042138	CH15	TOS-MUP -		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
167	042139	CH15	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	042140	CH15	TOS-MUP -		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
169	042141	CH15	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
170	042142	CH17	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
171	042143	CH14	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
172	042144	CH18	LBS	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	042145	CH20	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

174	042146	CH19	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	042147	CH15	LBS	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
176	042148	CH18	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
177	042149	CH19	TOS-MUP	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
178	042150	CH18	TOS-MUP	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179	051701	CH21	TOS-MUP	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
180	051702	CH21	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
181	051703	CH21	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	051704	CH22	TOS-MUP	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	051705	CH22	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
184	051706	CH22	TOS-MUP	+		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185	051707	CH22	TOS-MUP	+		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
186	051708	CH23	TOS-MUP	+		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
187	051709	CH23	TOS-MUP	+		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188	051710	CH23	TOS-MUP	+		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
189	051711	CH23	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
190	051712	CH23	TOS-MUP	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
191	051713	CH25	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	051714	CH25	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
193	051715	CH25	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
194	051716	CH25	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	051717	CH25	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
196	051718	CH21	TOS-MUP	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
197	051719	CH21	TOS-MUP	+	++	효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
198	051720	CH21	TOS-MUP	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
199	051721	CH21	TOS-MUP	+	++	효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	051722	CH22	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
201	051723	CH22	TOS-MUP	+	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202	051724	CH22	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
203	051725	CH22	TOS-MUP	+		효모	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
204	051726	CH24	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
205	051727	CH24	TOS-MUP			안자람	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
206	051728	CH24	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
207	051729	CH24	TOS-MUP	+		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208	051730	CH22	LBS	+	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

209	051731	CH22	LBS	+	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
210	051732	CH22	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
211	051733	CH22	LBS	+	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
212	051734	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
213	051735	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
214	051736	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	051737	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
216	051738	CH21	LBS	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
217	051739	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
218	051740	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	051741	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
220	051742	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	051743	CH21	LBS	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	051744	CH22	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	051745	CH22	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	051746	CH22	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
225	051747	CH22	LBS	+		간균선	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
226	051748	CH22	LBS	+	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
227	051749	CH21	LBS	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	051750	CH22	LBS	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229	082601	CH26	여 4 TOS-MUP	+	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	082602	CH26	TOS-MUP	+		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
231	082603	CH26	TOS-MUP	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
232	082604	CH26	TOS-MUP	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
233	082605	CH26	TOS-MUP	+	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	082606	CH26	TOS-MUP	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	082607	CH26	TOS-MUP	+	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	082608	CH27	남 1 TOS-MUP	+	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	082609	CH27	TOS-MUP	+	+	포자있	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	082610	CH27	TOS-MUP	+	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239	082611	CH27	TOS-MUP	+	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	082612	CH27	TOS-MUP	+	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	082613	CH27	TOS-MUP	+	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	082614	CH27	TOS-MUP	+	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
243	082615	CH28	남 1 TOS-MUP	+		안자람											

244	082616	CH28	TOS-MUP +		간균 도	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	082617	CH28	TOS-MUP +		오염?간	0	0	0	0	0	0	0	0	0
246	082618	CH28	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
247	082619	CH28	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	082620	CH28	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
249	082621	CH29 <sup>남0</sup>	TOS-MUP + + +		포자있	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	082622	CH29	TOS-MUP + + +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	082623	CH29	TOS-MUP + + +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
252	082624	CH29	TOS-MUP + + +		포자있	0	0	0	0	0	0	0	0	0
253	082625	CH29	TOS-MUP + + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
254	082626	CH29	TOS-MUP + + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
255	082627	CH29	TOS-MUP + + +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	082628	CH29	TOS-MUP + + +		포자있	0	0	0	0	0	0	0	0	0
257	082629	CH29	TOS-MUP + + +		포자있	0	0	0	0	0	0	0	0	0
258	082630	CH29	TOS-MUP + + +		포자있	0	0	0	0	0	0	0	0	0
259	082631	CH30 <sup>여 2</sup>	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
260	082632	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
261	082633	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
262	082634	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
263	082635	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
264	082636	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
265	082637	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
266	082638	CH30	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
267	082639	CH26	LBS +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
268	082640	CH26	LBS +	+++	간균 도	0	0	0	0	0	0	0	0	0
269	082641	CH26	LBS +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	082642	CH26	LBS +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
271	082643	CH26	LBS +	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
272	082644	CH27	LBS +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	082645	CH27	LBS +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
274	082646	CH27	LBS +	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	082647	CH27	LBS +	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
276	082648	CH27	LBS +	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
277	082649	CH27	LBS +	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
278	082650	CH27	LBS +	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0

279	090901	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	090902	CH31	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	090903	CH31	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
282	090904	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	090905	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
284	090906	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
285	090907	CH32 여 3	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
286	090908	CH32	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
287	090909	CH32	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	090910	CH32	TOS-MUP +	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
289	090911	CH32	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290	090912	CH32	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
291	090913	CH33 남 1	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
292	090914	CH33	TOS-MUP +	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
293	090915	CH33	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
294	090916	CH33	TOS-MUP +	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	090917	CH33	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
296	090918	CH33	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	090919	CH33	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
298	090920	CH34 남 3	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
299	090921	CH34	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	090922	CH34	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
301	090923	CH34	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
302	090924	CH34	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
303	090925	CH34	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
304	090926	CH35 남 3	TOS-MUP +		간 단균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	090927	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
306	090928	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
307	090929	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	090930	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	090931	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
310	090932	CH36 남 3	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
311	090933	CH36	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
312	090934	CH36	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313	090935	CH36	TOS-MUP +	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0



314	090936	CH36	TOS-MUP +	+++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
315	090937	CH36	TOS-MUP +	++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
316	090938	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
317	090939	CH35	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
318	090940	CH32	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
319	090941	CH31	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320	090942	CH31	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
321	090943	CH31	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
322	090944	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	090945	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
324	101101	CH34	TOS-MUP -		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
325	101102	CH34	TOS-MUP +	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	101103	CH34	TOS-MUP +	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327	101104	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	101105	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
329	101106	CH34	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	101107	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
331	101108	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
332	101109	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
333	101110	CH34	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
334	101111	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
335	101112	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
336	101113	CH34	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
337	101114	CH34	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
338	101115	CH34	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
339	101116	CH32	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
340	101117	CH32	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
341	101118	CH32	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
342	101119	CH32	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
343	101120	CH32	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
344	101121	CH32	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
345	101122	CH32	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
346	101123	CH32	TOS-MUP +	+	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
347	101124	CH32	TOS-MUP +	+	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
348	101125	CH32	TOS-MUP +	+++	단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0

349	101126	CH32	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	101127	CH32	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
351	101128	CH32	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
352	101129	CH32	TOS-MUP +	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
353	101130	CH32	TOS-MUP--	++	간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
354	101131	CH31	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
355	101132	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
356	101133	CH31	TOS-MUP-		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
357	101134	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
358	101135	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
359	101136	CH31	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
360	101137	CH31	TOS-MUP-		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	101138	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
362	101139	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
363	101140	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
364	101141	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
365	101142	CH31	TOS-MUP-		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
366	101143	CH31	TOS-MUP-		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
367	101144	CH31	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
368	101145	CH31	TOS-MUP-		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
369	110201	KB08	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
370	110202	KB08	TOS-MUP + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	110203	KB08	TOS-MUP-		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
372	110204	KB08	TOS-MUP + + + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
373	110205	KB09	TOS-MUP +		안자람									
374	110206	KB09	TOS-MUP + ++		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
375	110207	KB09	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
376	110208	KB09	TOS-MUP + + + + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
377	110209	KB10	TOS-MUP +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
378	110210	KB10	TOS-MUP + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
379	110211	KB10	TOS-MUP + +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
380	110212	KB10	TOS-MUP- +		간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
381	110213	KB11	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
382	110214	KB11	TOS-MUP + +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
383	110215	KB11	TOS-MUP + +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
451	102376	CH42	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
452	102377	CH41	TOS-MUP + +		구균	0	0	x	0	x	x	0	0	0
453	102378	CH41	TOS-MUP + +		단간균	0	0	0	0	0	x	0	0	0
454	102379	CH41	TOS-MUP +		단간균	x	x	0	0	x	x	0	x	0
455	102380	CH40	TOS-MUP +		구균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
456	102381	CH40	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0
457	102382	CH40	TOS-MUP +		단간균	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 6 신규 균주 라이브러리

## (2) 개발 균주 유전체 분석

본 연구에서는 다양한 균들에 대한 활성 평가를 하였고 대사 증후군 관련 저감화 효과를 나타낸 균으로서 *Lactobacillus paracasei* CH88과 *Bifidobacterium longum* BORI 균을 선발하였음. 프리바이오틱스 관련 모유 올리고당을 생산하는 균으로는 *Bifidobacterium longum* BORI RD47 균을 선정하여 지속적으로 연구에 이용하였음. 유전체 분석은 본 연구실에서 구비하고 있는 Illumina의 Miseq 장비를 이용하였음. 본 연구에서 사용한 Miseq 장비를 이용한 유전체 분석 과정과 위의 3 세균에 대한 유전체 정보는 그림 다음과 같음. 본 연구 결과는 균주 고유성 확보, 균주의 safety 관련 유전자, 올리고 당 생산 효소 유전자 클로닝 등에 사용됨.

- Genome sequencing: Genomic DNA의 library 제작 및 Sequencing 방법은 다음과 같음.
- Illumina Miseq Library 제작에서 Miseq을 이용한 Sequencing은 다음과 같은 4단계로 진행됨

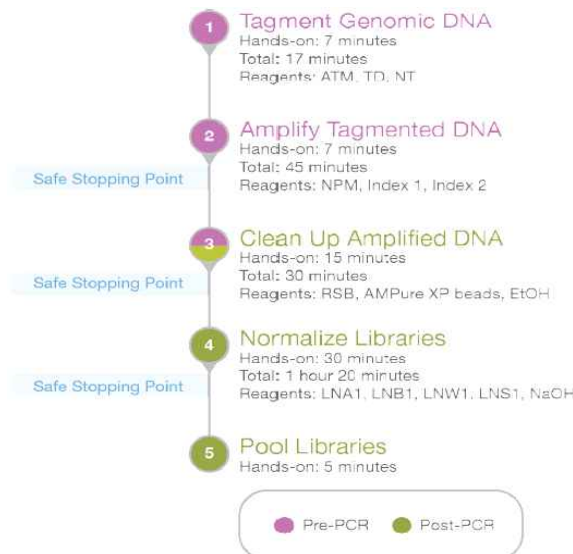


그림 10 Illumina Miseq Library workflow

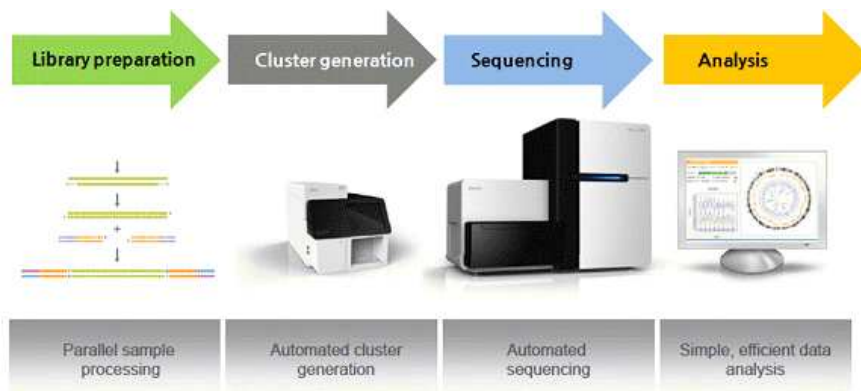


그림 11 Illumina Miseq sequencing workflow

- 위의(그림 1.2, 1.3) workflow로 library preparation이 이루어지고, 각 시료로부터 추출한 gDNA 중 OD260/280의 비율이 1.8~2.0정도 이상이며, 농도는 반드시 0.2ng/ul이어야 하며 EDTA가 없는 elution buffer나 멸균 DW를 용매로 함. 완성된 단편을 PCR amplification에 의해 적절한 농도로 증폭시키고 이를 Agilent Bioanalyzer을 통해 한 번 더 Quality check함. 여기서 적당한 size는 250 - 1000 bp임.
- Cluster generation에서 정량된 amplified targeted DNA library를 이용하여 시퀀싱이 일어나는 flow cell에 Illumina 사의 c-Bot 기기를 이용하여 cluster generation을 진행하였음. 이때 cluster가 적당한 밀도로 균일하게 생성되도록 하는 것이 시퀀싱의 정확도와 throughput을 결정하는 가장 중요한 요소가 됨으로 특별한 주의가 필요함. Cluster generation과정은 크게 3단계로 구분 할 수 있음.

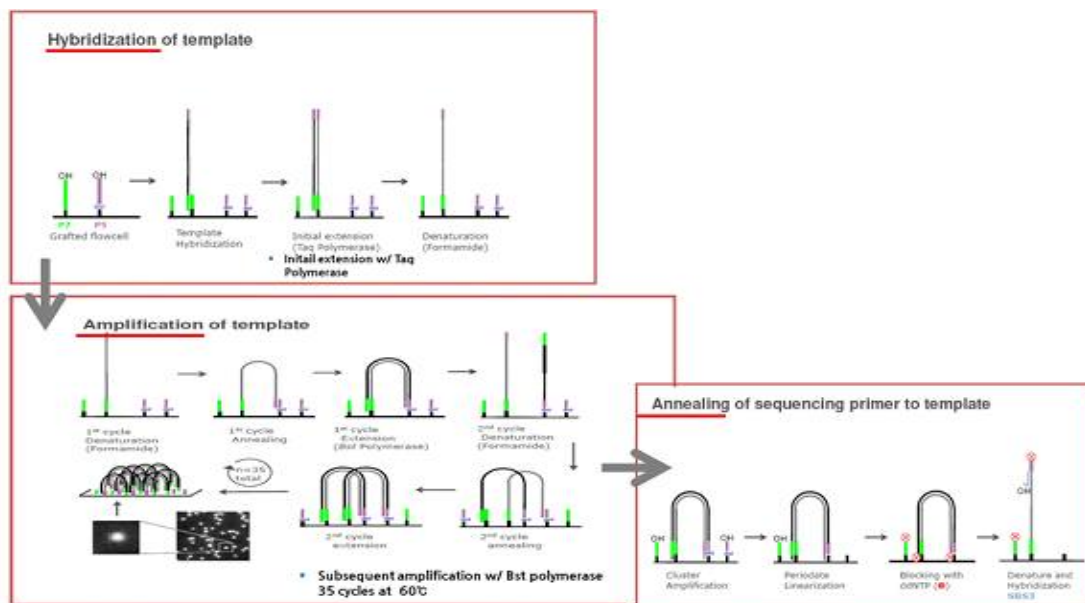


그림 12 Cluster generation 과정

- Hybridization of template: 정량된 library template을 flow cell에 흘려주게 되면. flow cell에 고정되어 있는 primer와 library에 존재하는 adapter가 결합하게 되고 이를 주형으로 하여 1차 합성이 이루어짐.
- Bridge amplification: flow cell의 primer에 고정된 DNA단편이 bridge를 형성하면서 다른 쪽 말단의 adapter가 flow cell에 결합됨. 이는 다시 denaturation되어 두 가닥의 주형을 형성하게 되고, 이 과정이 반복되어 대략 1000분자의 증폭이 하나의 cluster가 되고 결국 하나의 read로 형성됨.
- 하나의 cluster가 형성되면 periodate linearization과정을 통해 더 이상의 증폭을 방지하고 sequencing을 하기 위한 준비 상태를 마칩(그림 1.5)

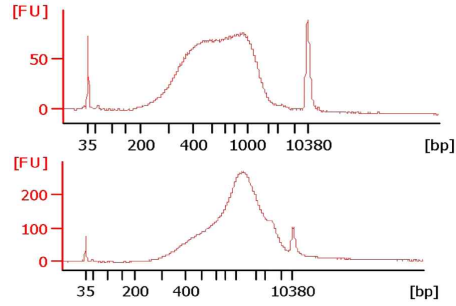


그림 13 Successful Genomic DNA Library Size Distributions

Miseq을 이용한 sequencing의 방법은 아래와 같다

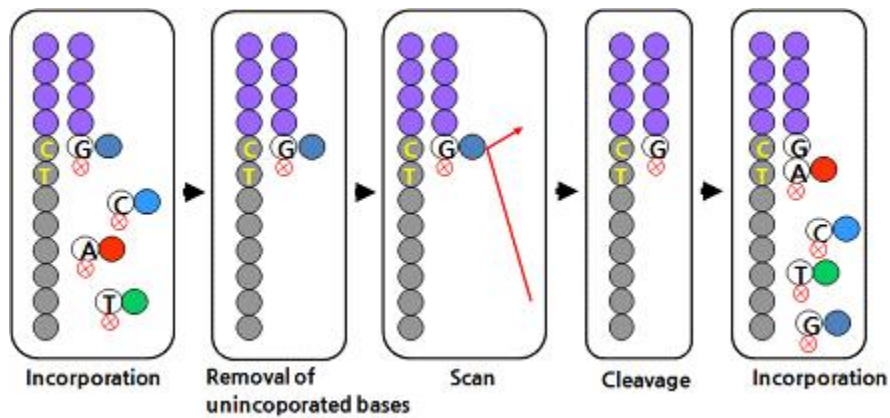


그림 14 Miseq sequencing원리

- Sequencing-by-Synthesis(SBS) : Clonal amplification으로 cluster가 만들어지면 4종류의 nucleotide를 한꺼번에 흘려주게 됨. 각각의 nucleotide에는 A, G, T, C 각각을 동정 할 수 있도록 다른 색의 형광 tag이 수식되어 있으며, template에 상보적인 nucleotide가 결합하게 됨. 이는 reversible terminator로 작용하여 다른 nucleotide의 결합을 막고 해당하는 형광을 통해 sequencing이 이루어지고. 하나의 cycle이 끝나면 형광 tag을 제거하고 다음 nucleotide를 붙일 수 있도록 화학적 처리를 함으로써 다음 cycle을 준비함. 이와 같은 방법으로 Miseq 기기를 이용하여 cluster가 만들어진 flow cell에서 염기서열 분석을 실시함.
- Variants 검증: Sequencing by synthesis 방법을 이용한 Illumina 사의 NGS 방법으로 찾아진 rare variants의 경우 시퀀싱 에러에 의한 false positive의 가능성을 확인하는 정확한 검증과정이 필요함. 이러한 검증은 각 염기서열 하나의 해상도가 가장 좋으며 정확한 Capillary electrophoresis 방법을 사용하는 Sanger Sequencing 방법이 가장 확실한 방법으로 세계적으로 가장 많이 사용되는 ABI3730 기기를 이용하여 분석함. 첫 단계로 검증하고자 하는 변이가 포함된 부분을 PCR 기법으로 증폭 분리함. 이때 specific한 결과를 얻기 위한 primer design 뿐 아니라 PCR과정의 error를 배제하기 위한 proof reading 기능을 가진 hi fidelity polymerase를 사용함. 증폭된 PCR 절편은 분리정제 과정을 거친 뒤 시퀀싱을 통하여 그 정확도를 검증함.

- 염기서열 분석 결과 정도관리: Reference가 있는 genome의 경우 위와 같은 pipeline에 따라 분석이 진행됨. 선 생성된 raw data를 CASAVA를 통해 FASTAQ형태의 파일로 변환하고 일정 quality이상 되는 read만을 선별해 BWA를 이용하여 reference에 alignment를 시키고 SAMTOOLS 또는 GATK를 이용하여 reference와 다른 genetic variation을 동정함. 동정된 위치가 어떤 유전자 인지를 ANNOVAR를 통해 Annotation 함. (그림 15)

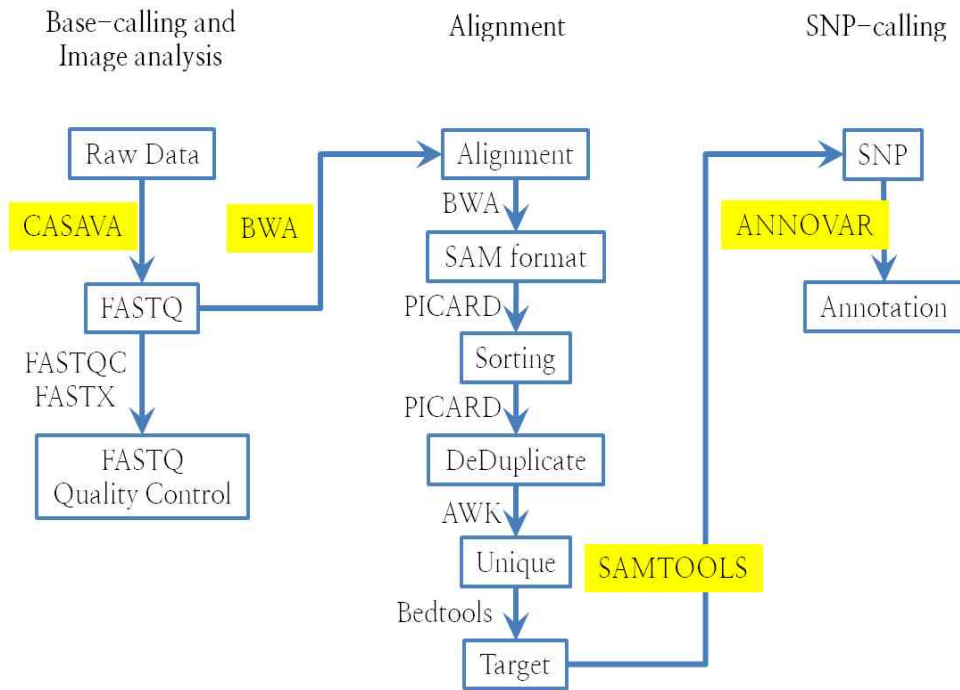


그림 15 Genomic DNA analysis pipeline of resequencing

- chunlab.com의 genome browser인 CLgenomics를 이용하여, 유전자정보를 확인하고 분석함.

*Lactobacillus paracasei* CH88의 유전자정보

**EzTaxon-e name :** *Lactobacillus paracasei*

**Property :**

**Strain :** CH88

**Taxonomy (EzTaxon-e) :**

**Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus;Lactobacillus paracasei**

**Original Name :** *Lactobacillus paracasei* CH88

**EzGenome Accession : 13075.LPKF10.1**

**Genome size : 3,086,873 bp**

**GC ratio : 46.36 %**

**Number of chromosomes : 0**

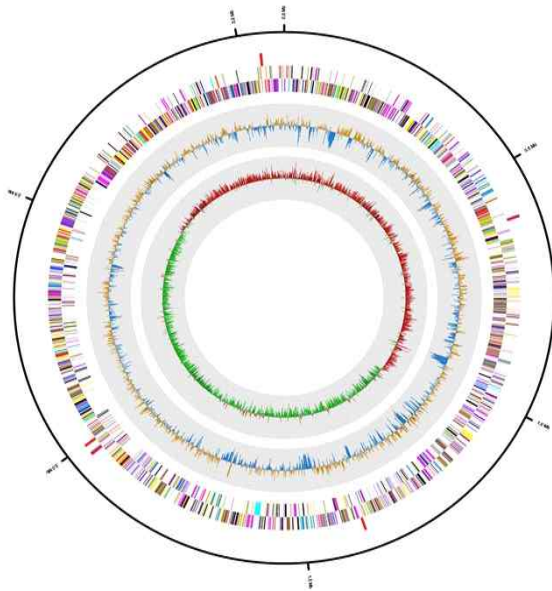
**Number of plasmids : 0**

**Number of contigs : 1**

**Number of scaffolds : N/A**

**Number of rRNA genes : 15**

**Number of tRNA genes : 61**



**Number of ORFs : 2,941**

**Method : PacBio\_20K**

**Method reads : 130871**

**Method coverage : 195.75**

**Assembler : PacBio SMRT Analysis 2.3.0**

**Coverage : 195.75**

**N50 : 3,086,873**

**Sequences :**

**Comment : O4537\_S51280**

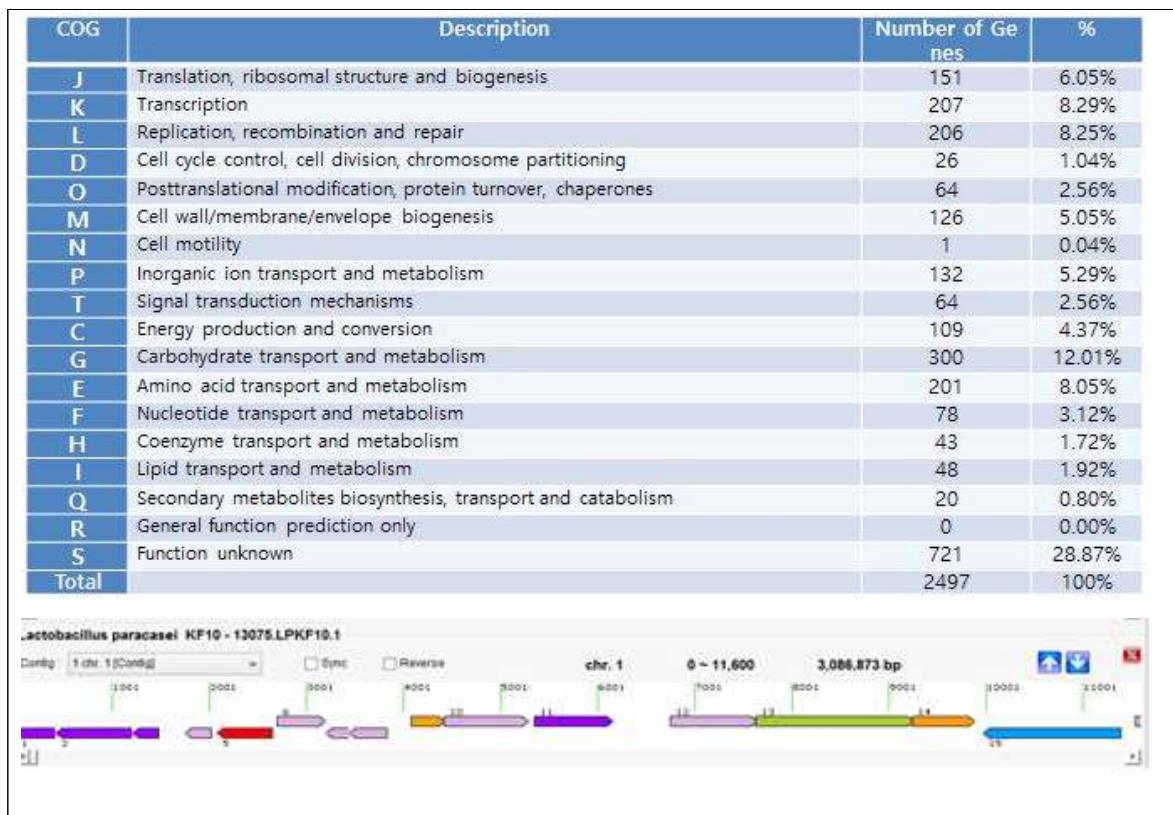


그림 16 Lactobacillus paracasei CH88의 유전자정보

*Bifidobacterium longum* RD47의 유전자정보:

**EzTaxon-e name :** Bifidobacterium longum subsp. longum

**Property :**

**Strain :** RD47

**Taxonomy (EzTaxon-e) :**

**Original Name :** Bifidobacterium longum subsp. longum RD47

**EzGenome Accession :** 13075.BIRD47.1

**Genome size :** 2,415,180 bp

**GC ratio :** 59.94 %

**Number of chromosomes :** 0

**Number of plasmids :** 0

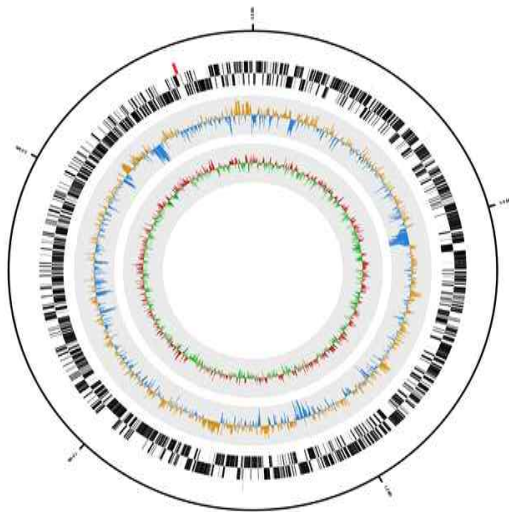
**Number of contigs :** 80

**Number of scaffolds :** 0

**Number of rRNA genes :** 3

**Number of tRNA genes :** 54





**Number of ORFs : 2,182**

**Method : Ion\_Torrent\_PGM\_316**

**Method reads :**

**Method coverage : 84.5**

**Assembler : CLCbio CLC Genomics Workbench 7.5.1**

**Coverage : 84.5**

**N50 : 63,966**

**Sequences :**

**Comment : Order2336**

COG	Description	Number of Genes	%
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0	NaN%
K	Transcription	0	NaN%
L	Replication, recombination and repair	0	NaN%
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	0	NaN%
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	0	NaN%
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	0	NaN%
N	Cell motility	0	NaN%
P	Inorganic ion transport and metabolism	0	NaN%
T	Signal transduction mechanisms	0	NaN%
C	Energy production and conversion	0	NaN%
G	Carbohydrate transport and metabolism	0	NaN%
E	Amino acid transport and metabolism	0	NaN%
F	Nucleotide transport and metabolism	0	NaN%
H	Coenzyme transport and metabolism	0	NaN%
I	Lipid transport and metabolism	0	NaN%
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	0	NaN%
R	General function prediction only	0	NaN%
S	Function unknown	0	NaN%
Total		0	100%

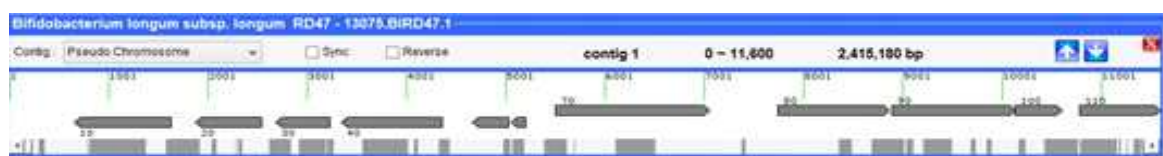


그림 17 Bifidobacterium longum RD47의 유전자 정보

*Bifidobacterium longum* BORI 유전자정보

EzTaxon-e name : **Bifidobacterium longum**

Property :

Strain : BORI

Taxonomy (EzTaxon-e) :

**Bacteria;;;Actinobacteria;;Actinobacteria\_c;;Bifidobacteriales;;Bifidobacteriaceae;;Bifidobacterium;;Bifidobacterium longum**

Original Name : **Bifidobacterium longum BORI**

EzGenome Accession : **22236.BLB.1**

Genome size : **2,332,025 bp**

GC ratio : **59.95 %**

Number of chromosomes : **0**

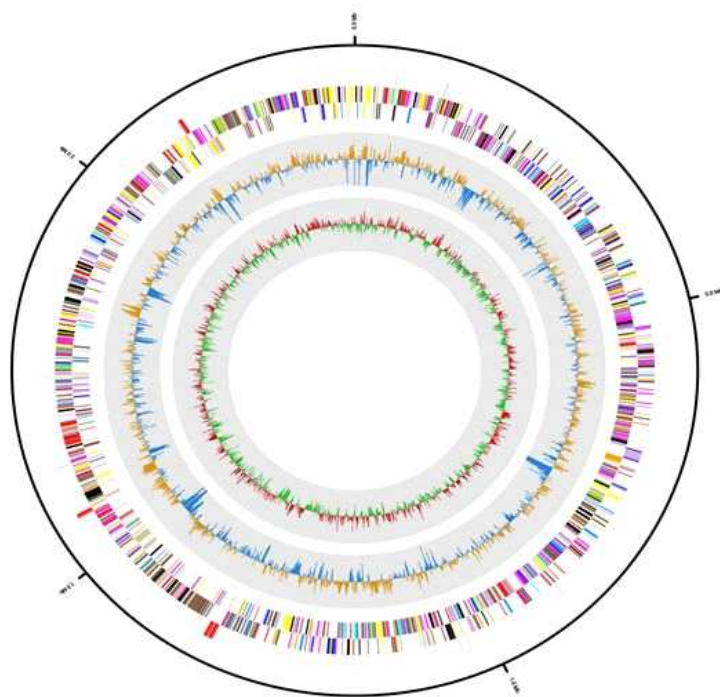
Number of plasmids : **0**

Number of contigs : **1**

Number of scaffolds : **N/A**

Number of rRNA genes : **12**

Number of tRNA genes : **57**



Number of ORFs : 1,902

Method : PacBio\_20K

Method reads : 92219

Method coverage : 369.45

Assembler : PacBio SMRT Analysis 2.3.0

Coverage : 369.45

N50 : 2,332,025

Sequences :

Comment : O4635\_S52684

COG	Description	Number of Genes	%
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	140	8.16%
K	Transcription	112	6.53%
L	Replication, recombination and repair	167	9.74%
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	17	0.99%
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	57	3.32%
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	75	4.37%
N	Cell motility	0	0.00%
P	Inorganic ion transport and metabolism	91	5.31%
T	Signal transduction mechanisms	52	3.03%
C	Energy production and conversion	50	2.92%
G	Carbohydrate transport and metabolism	202	11.78%
E	Amino acid transport and metabolism	172	10.03%
F	Nucleotide transport and metabolism	70	4.08%
H	Coenzyme transport and metabolism	38	2.22%
I	Lipid transport and metabolism	39	2.27%
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	4	0.23%
R	General function prediction only	0	0.00%
S	Function unknown	429	25.01%
Total		1715	100%

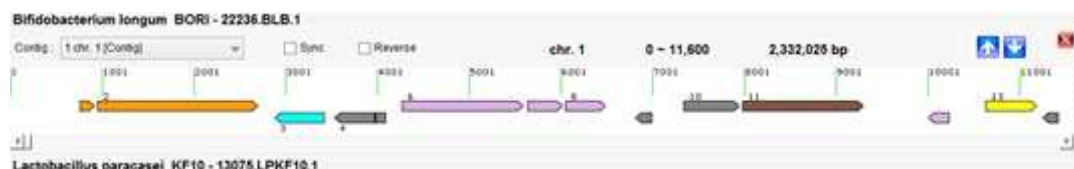


그림 18 Bifidobacterium longum BORI의 유전자정보

### (3) 유전자 조사

본 연구에서는 자체 분리 개발한 Bifidobacterium 및 Lactobacillus 등의 유산균 균주 25 균주에 대하여 산업적으로 새로운 가능성을 제시하는 유전자들을 조사하였고 각각의 유전자들에 대한 유전체상에서의 발현 가능 유전자를 조사함.

- thioredoxin: 산화환원 signaling에 관여하는 물질이며, 세포의 발생 단계에서 중요하게 작용함. thioredoxin의 기질은 ribonuclease, choriogoradotropins, coagulation factor, glucocorticoid receptor, insulin. 항염증작용을 함. thioredoxin을 이용해 항산화작용을

촉진하여 thioredoxin의 물질대사를 촉진하는 방법으로 효모의 대량생산에 이용될 수 있다는 논문이 있음. (Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., & Matallana, E. (2010). Improving yield of industrial biomass propagation by increasing the Trx2p dosage. *Bioengineered Bugs*, 1(5), 352 - 353.)

- kojibiose: 꿀에 존재하는 이당류이며 포도당 캐러멜화의 산물이기도 함. 단맛을 내지만 칼로리가 낮아 설탕 대용으로 사용할 수 있고, 프로바이오틱의 성격을 띄기도 함. 그러나 상업적 규모로 합성하기 힘들다는 단점이 있음. 그러나 최근 sucrose와 glucose를 kojibiose로 만드는 효소가 발견됨. 따라서 합성문제 해결의 가능성이 있음.
- neprilysin: glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, bradykinin 같은 펩타이드 호르몬을 불활성화시킴. 알츠하이머에 의해 변형된 신경세포가 있다면, 변형이 있는 amyloid-beta peptide를 분해시킴. neprilysin은 알츠하이머와 깊은 관련이 있음-amyloid beta degradation의 rate-limiting step에서 작용함. neprilysin의 저해제 (inhibitor)는 developing anesthetic(진통제) and anti-hypertension로 사용됨. 급성 림프구백혈병을 일으키기도 함. 따라서 급성림프구백혈병 진단 시에 질병 척도로 이용됨.(marker) T세포, B세포로 분화될 수 있으며 면역 화학에 많이 쓰임.
- sulfoquinovose: (=6-sulfoquinovose, 6-deoxy-6-sulfo-D-glucopyranose) 단당류이며 황을 포함하는 유일한 당임. 박테리아에 의해 소화되면 황이 배출됨. 장에 좋은 박테리아에 많으며(good gut bacteria) 식중독을 막음. 녹색잎채소에 많음.
- <https://focusonfoodsafety.wordpress.com/2016/02/23/have-you-had-your-sulfoquinovose-today/>
- rhamnose: acid-fast bacteria 외막의 구성성분임.(tuberculosis와 관련 있음) 자연에서 L-form으로 존재하는 몇 안되는 당 중 하나임. 항염증효과와 피부 진정 효과가 있다고 밝혀짐. 의학적으로 콜라겐과 엘라스틴 형성을 촉진하고 세포 전도(cellular turnover)에 의한 피부 회춘(rejuvenation)의 효과를 주장하기도 함. “당의 달콤한 노화방지 비밀 (a sweet anti-aging secret form a sugar)” 라고 알려짐.
- alpha-L-rhamnosidase: alpha-L-rhamnosides의 non-reducing terminal을 가수분해함. 실제 산업에서는 신 과일 주스의 쓴맛을 줄이거나 없애는데 적용되고 있으며 hesperidin과 pectin 가수분해를 통해 오렌지주스를 맑게하고(clarification), 와인의 향과 풍미를 높여주는 monoterpenoid이 용해되게 함.
- glutamate-cysteine ligase: =GCL, GCS(gamma-glutamyl cysteine synthase) GSH 생합성 첫단계의 효소이며 이 효소가 손상되면 GSH 생합성을 감소시켜 많은 사람 질병과 관련이 많음(ex. 파킨슨병, 알츠하이머, COPD, HIV, 암). 맥주의 anti-staling capacity (퀴퀴한 냄새를 나지 않게 하는 것)를 높일 수 있다는 연구 논문이 있음.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257239>
- glyoxylase(\*glyoxalase 로 검색한 결과): methyl glyoxal 과 다른 reactive aldehyde 의 해독 작용을 함(detoxication). 당화반응의 효소적 방어에 있어 중요한 역할을 함. Methylglyoxal 형성과 해독작용(detoxification)에 대한 매커니즘에 관여하는 것을 이용하여 노화관련 질환에 대한 예방을 할 수 있을 것이라고 보여짐.
- arginase: L-arginine -> L-ornithine + urea, urea cycle에 관여함으로써 해로운 암모니아를 재배치함. 간세포에 주로 있다고 알려졌는데 다른 세포들에서도 꽤 나타나는 것

으로 미루어 보았을 때 nonepatic tissue의 raginase에는 더 다양한 기능이 있을 수도 있다는 것을 시사함. 식물세포에서 생산되는 arginase와 threonine deaminase는 곤충 성장에 필수적인 아미노산을 분해함. 이 효소들은 효소가 곤충 장에서 활성을 띠기 전까지는 아미노산에 아무 영향을 미치지 않음. 식물에서 arginase와 threonine deaminase의 과다생산은 초식 곤충에 대한 영양학적 방어로 작용하며 절지동물과 초식 동물에 대한 저항력도 높임.

(<http://techportal.eere.energy.gov/technology.do/techID=657>)

- (S)-2-haloacid dehalogenase: gamma-hexachlorocyclohexane (lindane)과 1,2-dichloroethane의 분해에 관련되어 있음. lindane : GABA를 방해하는 신경독성물질. 농업 제초제로 사용되며 이와 비듬에 대한 제약적 치료에도 사용됨.
- diguanylate cyclase: 2-guanosine triphosphate <-> 2-diphosphate + cyclic di 3,5-guanylate의 효소. 박테리아 genome에서 많이 나타남. 아주 흔한 second messenger의 형성에 관여하며 박테리아의 생체막(biofilm) 형성을 조절함.
- beta-fructofuranosidase(=invertase): sucrose를 glucose와 fructose의 1:1 혼합물로 분해함. 효모 꿀(yeast honey)만들 때 사용됨. 그러나 invertase는 비싸서 현재는 glucose isomer를 이용하여 fructose를 만듦. beta-fruanosidase food supplement는 beta-fructofuranosidase, cellulase, hemcellulase로 구성되어 oligosaccharide에 의한 장내 통증을 완화하는데 사용됨.
- chloramphenicol o-acetyltransferase(=CAT): chloramphenicol에 내성이 있는 세균에서 chloramphenicol을 해독시킴.(\*chloramphenicol : 세균감염 치료의 항생제로 사용되는 물질.)프로모터 혹은 tissue-specific expression의 발현 정도를 측정하는 reporter system임.
- cyanophycinase: cyanobacteria의 구성 물질인 cyanophycin을 분해시킴. branched polypeptide cyanophycin에 매우 특수하게 반응. 합성 폴리아크릴의 생분해 대책이 될 수 있기 때문에 고부가가치 미생물로 주목받고 있음. 그러나 대량 생산이 어려움.
- S-adenosylmethionine synthase: L-methionien -> S-adenosyl-L-methionine adoMET 생성에 관여함. SAME의 형성에 중요한 효소이며 SAME의 결핍은 다양한 신경질환으로 이어짐. 치료에서는 SAME는 많이 필요로 함. 따라서 저비용의 발효과정을 통한 대량 생산이 요구됨.

	BBGN41.1	LACE21.1	LACP201	BIFB18.1	LACF18.1	PIFP17.1	LACA16.1	LACA15.1	LACR13.1	LACC12.1	ENTF11.1	BIFB9.1	BIFB8.1	LTBC7.1	LPAR6.1	LTBC5.1	LACR4.1	BIFB3.1	BIFL1.1
thioredoxin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
diguanylate cyclase	.	0	0	.	.	.	0	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	.	.
beta fructofuranosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-adenosylmethionine synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
glyoxalase	0	0	0	.	0	0	.	.	.	.	0	0	0	0	.	0	0	.	.
ribose	0	0	.	0	0	0	.	0	0	0	.	0	0	0	.	.	.	0	0
Alpha-L-rihamosidase	.	0	0	.	.	0	0	.	0	.	0	.	.	0	.	0	.	0	.
arginase	.	0	.	.	0	.	0	0	.	.	.	0	0	0	.	.	.	.	.
(S)-2-haloacid dehalogenase	.	0	0	0	.	.	0	0	0	.	0	.	.	.	.	0	0	.	.
chloramphenicol-O-acetyltransferase	.	0	0	.	0	.	.	.	.	.	.	0	0	0	.	0	0	.	.
cyanophycinase	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	.	.	.
kojibiose	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
nepilysine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
sulfoquinovose	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
glutamate-cysteine ligase	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

표 7 유전자 조사

표 8 각 유전자 별 단백질 조사

Thioredoxin						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBG41.1	Putative thioredoxin-2	94713	95075	362	MATVQLNAQDFEKTITDNNLVFVDFWATWCGPCRAFGPTFEAASEENPDIVFGKVDIDANQDLASAAGIQAVPTLMIKQGGIIFKQAGALRAEDLDDLIAQAKALDVSAAAQDSAASAE
61427	LACF21.1	Thioredoxin	58994	59308	314	MSVHETSDATFEQDTATGVALIDFWATWCGPCRMQSPVV EALDQEMGEQVGFHKLDVDANPNVAEQFQIMSIPITLTKD GQVVDQLIGYHSKEQVAQLLKQYL
		Thioredoxin	31080	31391	311	MVAATTDKTFTTDTASGVTLTDFWATWCGPCRMQSPVV EQLADEMGDKVTFNKMDVDANPETASNFGIMSIPITLLVKK DGEVVDTLVGYSKEQIQQTLAQYL
		Thioredoxin-like protein	13213	13533	320	MIKEIHDQDFAKETDTGIAVIDFRADWCPCRMMDPILKSLS EDPAYKDQVNFVSLNIDHDQATASQFVQGIPTFLIKKDGQV VSHMVGARPKPDFETELKKVLA
		Thioredoxin	1718	2032	314	MIKEIHDQDFAKETDTGIAVIDFRADWCPCRMMDPILKSLS EDPAYKDQVNFVSLNIDHDQATASQFVQGIPTFLIKKDGQV VSHMVGARPKPDFETELKKVLA
61426	LACP20.1	Thioredoxin-like protein	20597	20917	320	MIKEIHDQDFAKETDTGIAVIDFRADWCPCRMMDPILKSLS EDPAYKDQVNFVSLNIDHDQATASQFVQGIPTFLIKKDGQV VSHMVGARPKPDFETELKKVLA
		Thioredoxin	29321	29632	311	MVAATTDKTFTTDTASGVTLTDFWATWCGPCRMQSPVV EQLADEMGDKVTFNKMDVDANPETASNFGIMSIPITLLVKK DGEVVDTLVGYSKEQIQQTLAQYL
61425	BIFB18.1	Putative thioredoxin-2	7199	7573	374	MATTAITSADFEKTITDNEIVFVDFWATWCGPCRAFGPIFEAASNEPENANIAFVKVDIDANQDLAQAAGIQAVPTLMIKQGEVIFQQAGALQAADLDDLIAQTKALDLAAAKAAQSGADQQA
61424	LACF18.1	Thioredoxin	57476	57790	314	MSVHETSDATFEQDTATGVALIDFWATWCGPCRMQSPVV EALDQEMGEQVGFHKLDVDANPNVAEQFQIMSIPITLTKD GQVVDQLIGYHSKEQVAQLLKQYL
		Thioredoxin	1583	1897	314	MAVAETTDATFEQDTNSGVVLTDFWATWCGPCRMQSPIVE TVADDMAGQVTVNKLVDANPQTAAAFGVMSIPTLLIKK DGQVVDKLIHLTKDQIEDTLKKYL
61423	PIFP17.1	Thioredoxin O1, mitochondrial	14672	14992	320	MIPNSLEELAGYVETGKSVEFFTAAWCGDCRFIKPQMPEIENDFSDWQFIEVDRDKYIDVAAEWNIFGIPSFVVIQDGKELGR LVNKRDKTKQEIESFLESVIKG
		Thioredoxin	4386	4700	314	MSQVITDKTFNEETDKGLVLIDFWATWCGPCRMQAPILDQLEQEYDEEEFRIAKMDVDENPETPQQFGIMSIPITLMLKKGQV VEKAVGVHSKEQLRQMQIDQYL
61422	LACA16.1	Thioredoxin	45170	45481	311	MVEAINDNQNFEEETNSGVVALIDFWATWCGPCKMQSPVIEQLAEERQDVVKFYKMDVDQNQDTAKNLGIMAIPITLIKKDGNIVDRITGYTPKEKLNQLDQYAN
		Thioredoxin-2, mitochondrial	13788	14108	320	MEKIKELSEDKLEITKSGRTVLEFSAEWCPCDRCFLDPFLPEIEKDFSDAKFYQIDRDGSDVAKKLMIMGIPSFVVYQDGKEIGRLVNKRDKTKDEVENFLRSLD

61421	LACA15.1	Thioredoxin H-type	40132	40452	320	MEEIKALTEDKLQEITKSGRVVLEFSAAWCPDCRFLDPFLP EIEKDFSEAKFYKIDRDDSIDVAKKLMIMGIPSFVYQDGKE IGRLVnkDRKTKDEVEKFLRSLD
		Thioredoxin	51298	51609	311	MVDAINDQNDFEETSNGVALVDFWATWCGPCKMQSPVIE QLSEERQDVNFYKMDVDQNDTAKNLGIMAIPTLIIKKDGN IVDRITGYTPKEKLDQILDQYTD
61420	LACR13.1	Thioredoxin	186840	187151	311	MVQAVTDSNYKTETDTGVTLTDFWATWCGPCRMPQSPVID KLAESRDDVKFVKMDVDANPETPKSFGIMAIPTLVIKKDGG VVEKLVGYQTKDQLEATLNKYTA
		Thioredoxin	275	595	320	MPTNATKATLKSLTARGTVVDFWAPWCGPCKILEPILTA LEAELSGLTIVRYNVEKDPQLPQTMGIMSVPTLVVYQDGH KEKVTGVYAKEKLRKRYFEKKLEAGR
61419	LACC12.1	Thioredoxin-1	445	777	332	MEGDHIMAIEATKDNLKALTAEGTVVDFWAPWCGPCKV LDPMLTAEQELPALKVRYNVEKDHTLPSMTMGIMSVPTL VIYQQGEAREKVTGVYPKDKLRKRYFEQKLEA
		Thioredoxin	16752	17063	311	MVQAVTDSNYKTETDTGVTLTDFWATWCGPCRMPQSPVID KLAESRDDVKFVKMDVDANPETPKSFGIMAIPTLVIKKDGE VVEKLVGYQTKDQLESTLNKYTA
61418	ENTF11.1	Thioredoxin-like protein YtpP	202122	202442	320	MIIPNSLEELAGYVETGKSVFFFTAGWCGDCRFIKPQMP EIE NDFSDWQFIEVDRDKYIDVAAEWNIFGIPSFVVIQDGKELGR LVNKDRKTKQEIESFLESVTKG
		Thioredoxin	131660	131974	314	MSQVITDKTFNEETDKGLVLIDFWATWCGPCRMPQAPILDQ LEQEYDEEEFRIAKMDVDENPETPQQFGIMSIPTLMLKKDG QVVEKAVGVHSKEQLRQIMIDQYL
61417	BIFB9.1	Thioredoxin	7092	7406	314	MSVHETS DATFEQDTATGVALIDFWATWCGPCRMPQSPV V EALDQEMGEQVGFHKLVDANPNVAEQFQIMSIPTLMITKD GQVVDQLIGYHSKEQVAQLLKQYL
		Thioredoxin	46	360	314	MAVAETTDATFEQDTNSGVVLTDFWATWCGPCRMPQSPV I ETVADDMAGQVTVNKLDVDANPQTAAAFGVMSIPTLLIK KDGQVVDKLGHTKQIEDTLKKYL
61416	BIFB8.1	Thioredoxin	61666	61980	314	MAVAETTDATFEQDTNSGVVLTDFWATWCGPCRMPQSPV I KDGQVVDKLGHTKQIEDTLKKYL
		Thioredoxin	58576	58890	314	MSVHETS DATFEQDTATGVTLIDFWATWCGPCRMPQSPV V EALDQEMGEQVGFHKLVDANPNVAEQFQIMSIPTLMITKD GQVVDQLIGYHSKEQVAQLLKQYL
61415	LTBC7.1	Thioredoxin H-type	82633	82953	320	MEEIKELTSEKLKEITKNGNVLLFSAAWCPDCRFLDPFLP QIEKDNDAKFKYKVD RDGSDVAKELNIFGIPSFVYQDGK EIGRLVnkDRKTKEEVENFLNSLK
		Thioredoxin	71127	71438	311	MVDEITDATFEDETSEGVVLTDFWATWCGPCKMQSPVIDQ LSEEMDDVKFTKMDVDQNDTARNLGIMAIPTLIIKKDGG VDRLTGYTPKEKLEQILDQYTD



		Thioredoxin	48718	49032	314	MAVAETTDATFEQDTNSGVVLTDFWATWCGPCRMQSPV ETVADDMAGQVTVNKLVDANPQTAAAFVMSIPTLLIK KDGQVVDKLGHLTKDQIEDTLKKYL
		Thioredoxin	271	687	416	MSVHETSDATFEQDTATGVALIDFWATWCGPCRMQSPV EALDQEMGEQVGFHKLDVDANPNVAEQFQIMSIPITLMI TKDGQVVDQLIGYHSKEQVAQLLKALCQILLMGHFR RRPV LAPGAAFFQLPFPDAIGSGR
61414	LPAR6.1	Thioredoxin	110926	111237	311	MVQAVTDSNYKTETDTGVTLTDFWATWCGPCRMQSPV DKLAESRDDVKFVKMDVDANPETPKSFGIMAIPITLVI KKDGEVVEKLVGYQTKDQLESTLNKYTA
		Thioredoxin	210	542	332	MEGEHIMAIEATKDNLKALTAEGTVVDFWAPWCGPCKV LDPMSTALEQELPALKVVRYNVEKDHTLPSTMGIMSV PTLVYQQGEAREKVTGVYPKDKLKRYFEQKLEA
61413	LTBC5.1	Thioredoxin-like protein	65714	66034	320	MIKEIHDQDFAKETDTGIAVIDFRADWCPCRMMDPILK SLSEDPAYKQVNFVSLNIDHDQATASQFVQGIPTFLIK KDGQVVSMMVGARPKPDFEAEELKKALA
		Thioredoxin	444724	445035	311	MVAATTDKFTTDTASGVTLTDFWATWCGPCRMQSPV EQLADEMGDKVTFNKMDVDANPETASNFGIMSIPITL LVKKDGEVVDTLVGYHSKEQIQQLAQYL
		Thioredoxin	1572	1856	284	MVKLDIPKLKMLVFENDWCAQCYTERPIIHLAIKYHDQ LEVEVLNADNNPLMVKKYNVLTAPSILIKNDEMVERIS RFIDQNQLETVIRYYL
		Thioredoxin	3622	3936	314	MIKNVTDQDFKKTNTGVTLTDFWATWCPCRMQGP IIIEELDKDMGDKVKISKMDVDANQNTPAEFGIMSIP ITLIKKDGGIMEKLVGLHSDQLKQVLSQYTD
		Thioredoxin-like protein YdbP	5200	5523	323	MEQLSVMNKKEFDKCLKNGKYILVFIASWCPDCSFI KPHLP EIEQEFKDYTFISVDRDENTELAQELNIFGIP SFVIFRDGQEIGRLVNKDRKTKEEVENFITNTIN
		Thioredoxin	5544	5858	314	MVKNLTDKDFVKETS TGVTLTDFWATWCPCRMQGP IIIEQLDKEIGDKVKITKMDVDANQKTPMAFGIMSIP ITLIKKDGGQVVDKLVGLHSDQLKTVLAQYTN
61412	LACP4.1	Thioredoxin-like protein	20597	20917	320	MIKEIHDQDFAKETDTGIAVIDFRADWCPCRMMDPILK SLSEDPAYKQVNFVSLNIDHDQATASQFVQGIPTFLIK KDGQVVSMMVGARPKPDFETELKKVLA
		Thioredoxin	29321	29632	311	MVAATTDKFTTDTASGVTLTDFWATWCGPCRMQSPV EQLADEMGDKVTFNKMDVDANPETASNFGIMSIPITL LVKKDGEVVDTLVGYHSKEQIQQLAQYL
61411	BIFB3.1	Putative thioredoxin-2	13257	13628	371	MATTAITSAEFKTTITDNEIVFVDFWATWCGPCRAFG PIFEAASNEPENANIAFVKVDDANQDLAQAAGIQAVP TLMIAKQGEVIFQQAGALQASDLDDLIAQAKALDLAA AKAAQQAQEQ
61410	BIFL1.1	Putative thioredoxin-2	71422	71796	374	MATTAITSADFEKTTITDNEIVFVDFWATWCGPCRAFG PIFEAASNEPENANIAFVKVDDANQDLAQAAGIQAVP TLMIAKQGEVIFQQAGALQAADLDDLIAQAKALDLAA AKAAQSGADQQA

diguanylate cyclase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBGN41.1	없음				
61427	LACF21.1	Diguanylate cyclase	37469	38659	1190	MLHLLTLSSLGRDLFNIKMLIVILITIGLITLMTILTYLLEQQV HRRQNRYWTIGAHGAEALSVLISMILLRQIFITLNSGSIISWT YATVQLTILLFSLNTRNLAVEIINLLMPLFIYQQAIWLGHST TQYLPVFLAMAILISTVVYITHNYQELHATQWKYLLFQIL YSGTWWGVIWSVHPFKLSHTLVIIAFVLYMWLIRLAVNR VQKFFNEVLTFDQQVNYDELGTGIRNRASFDTHAHEVFAAY QHHQMGPVTMVMFDDIDHFKAFNDQYGHLAGDVVLRHVA HFVELELNQRSTHGQIFRYGGEEFVIIFRGISALETGQIMRTI QRKCLKTVPIKFNAQTLNVTVSIGISELQPTDQFTDWFVRV DDYLYQSKQAGRDTTVESQLLTD
		Diguanylate cyclase	4957	6093	1136	MTWSHWEIFPFITSVFFILGVLTLFWVVSQNWIINFFNTHH WRVDQSLITDQWYGLIYMMLFVFGMQTAVVGGQNDVAFWFM NFQLIGLTFCGYFLNVRVRYYYLYPLVFIIFMGFNHSLYYWE SWGHAHTLILFFATLGRRLRKHVPLQTKQQQVTLYLVTAG FGAVLWWFMIKLFNLSWATYWQEWYLLVFAASLLIYVA SMLSANAHLKQNLVAFANHDALTKIENFAAYKTAINYQV TSSRKNQSQTMLMFDIDHFKQVNDTYGHLAGDKILQHVAV QVATIVFHANNPQISLYRTGGEEFNVIFFPNYDLTEALAVAE QLFAAINHIAVPVNDHQIQLSISIGLSELAADDQSPTAFYQR VDANLYHSHKKGHRMQRITAK
		Diguanylate cyclase	20619	21749	1130	MTWSNWRISPFTSIFFILGVLTLYWVLFNWITTFWHARH INIDDDTVNAWHGVYIMLVFVFMQLSVVGGKADSWEFVN FHLIAVVFCSFFLNIRMPYYSLLPVVIVYMVFDQSFYWES WSYAVVFLFFWSMNYLRLWVPKHRYPWLYYYGAVAFY GGILWGLIKLKYSLDWDNTLQYGYLMIFAGLLYAYVNMML TQDSEIKLRLAQFASHDALTEFENFAAYTEHIKYLFDSDAK NNLNLSSMMFDDIDHFKHVNDTYGHLAGDRVLQEVAAATVT TVLAANDEKVKLYRTGGEEFNVLFPGYDLASTKVIVRQVF EAVNHLVVKYEDEEINVSVGVSTLHQADGSPIDLINRVD QNLVYFSKRHGRMRVTV
61426	LACP20.1	Diguanylate cyclase	67649	68839	1190	MLHLLTLSSLGRDLFNIKMLIVILITIGLITLMTILTYLLEQQV HRRQNRYWTIGAHGAEALSVLISMILLRQIFITLNSGSIISWT YATVQLTILLFSLNTRNLAVEIINLLMPLFIYQQAIWLGHST TQYLPVFLAMAILISTVVYITHNYQELHATQWKYLLFQIL YSGTWWGVIWSVHPFKLSHTLVIIAFVLYMWLIRLAVNR VQKFFNEVLTFDQQVNYDELGTGIRNRASFDTHAHEVFAAY QHHQMGPVTMVMFDDIDHFKAFNDQYGHLAGDVVLRHVA HFVELELNQRSTHGQIFRYGGEEFVIIFRGISALETGQIMRTI QRKCLKTVPIKFNAQTLNVTVSIGISELQPTDQFTDWFVRV DDYLYQSKQAGRDTTVESQLLTD
		Diguanylate cyclase	20619	21749	1130	MTWSNWRISPFTSIFFILGVLTLYWVLFNWITTFWHARH INIDDDTVNAWHGVYIMLVFVFMQLSVVGGKADSWEFVN FHLIAVVFCSFFLNIRMPYYSLLPVVIVYMVFDQSFYWES WSYAVVFLFFWSMNYLRLWVPKHRYPWLYYYGAVAFY GGILWGLIKLKYSLDWDNTLQYGYLMIFAGLLYAYVNMML TQDSEIKLRLAQFASHDALTEFENFAAYTEHIKYLFDSDAK NNLNLSSMMFDDIDHFKHVNDTYGHLAGDRVLQEVAAATVT TVLAANDEKVKLYRTGGEEFNVLFPGYDLASTKVIVRQVF EAVNHLVVKYEDEEINVSVGVSTLHQADGSPIDLINRVD QNLVYFSKRHGRMRVTV

		Diguanylate cyclase	21485	22621	1136	MTWSHWEITPFITSVFFILGVLTLFWVWSQNWIINFFNTHHWRVDQSLITDWYGLIYMMLFVFGMQTAVVGGQNDAWIFMNFQLIGLTFCGYFLNVRVRYLYPLVFIWGFNHSLYYWE SWGHAVTLILFFFTALGRLRKHVPLQTKQGQVTLYLVT CAGFGAVLWVFMKLFNLSWATYWQEWYLLVFAASLLYIYA SMLSANAHKQNLVAFANHDALTKIENFAAYKTAINYQV TSSRKNGSQLTMLMFDIDHFKQVNDTYGHLAGDKILQHVA QVATIVFHANNPQISLYRTGGEEFNVIFFPNYDLTEALAVAEQLFAAINHIAVPVNDHQIQLSISIGLSELAADDQSP TAFYQRVDANLYHSKKHGRMQITAK
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACF18.1	없음				
61423	PIFP17.1	없음				
61422	LACA16.1	Diguanylate cyclase	73	714	641	MLHLYLEHQQLDFTVSILAGTFFIIAENSRMYEYEQKQKEEIEKLYHESVRDDL TGLLN YRAFDEEMQGLSKDES NMPIFIAVLDIDHFKQVNDTYGHLNGNTVLS TFSKLLKLDIHHNFDPECAVYRFGGEEFTILIKTKDNTKIIKILNSINKYYSKHPVITDEGQKIFFSFGGLTEHHNNEKF TKTLERADEL VYQAKK TGRAKILIG
61421	LACA15.1	없음				
61420	LACR13.1	없음				
61419	LACC12.1	없음				
61418	ENTF11.1	없음				
61417	BIFB9.1	없음				
61416	BIFB8.1	없음				
61415	LTBC7.1	없음				
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	Diguanylate cyclase	232442	233632	1190	MLHLLTLSSLGRDLFNIKMLIVLITIGLITLMTILTYLLEQQVHRRQNR YW TIGA HGA EALS VLISMILLRQIFITLNSGSIISW T YATVQLTILFSLNTMRNLAVEIINLLMPLFIYQQAIWLGHS TQYLPVFLAMAILISTVVYITHNYQELHATQWKYLLFQIL YSGTWWGVIWSVHPFKLSHTLVILAFVLYMWLIRLAVNR VQKFFNEVLTFDQQVNYDEL TGIRNRASFDTHAREVFAAY QHHQMG PVTMVMFDIDHFKAFNDQYGHLAGDAVLRHVA HFVELELNQRSTHGQIFRYGGEEFNVIIFRGISALEAGQIMRTIQRKLTVPKFN VQTLNVTVSI GISELQPTDQTF TDWVFRV DDYLYQSKQAGR DQTTVESQLLTD
		Diguanylate cyclase	104462	105592	1130	MTWSNWRISP FVTSIFFILGVL TLYWVLFNWITTFWHARH INIDDDTVNAWHGV IYMLVFVFMQLSVV GKADSW EFN FHLIAVVFCSFFLNIRMPYYSLLPVVIVYMFVDQSIFYWES WSYAVVFLFFWSMNYLRLWVPKHRYPWLYYYGAVAFYGGILWGLIKLKYSLDWDNTLQEYGYLMIFAGLLYAYVNMLTQDSEIKLRLAQFASHDALTE TENFAAYTEHIKYLFD DSAKNNLNLSMMMFDIDHFKHVNDTYGHLAGDRVLQEV AATV TTVLAANDEKVKLYRTGGEEFNVLFPGYDLASTKVI VRFV EAVNHLVV KYEDEEINVSISVGVSTLHQADGSPIDL YNRVDQNL YFSKRHGRMRVTVE

		Diguanylate cyclase	183009	184145	1136	MTWSHWETPPFITSVFFILGVLTLFWVVSQNWIINFFNTHHW RVDQSLITDWYGLIYMMLFVFGMQTAVVGQNDAWIFMNFQ LIGLTFCGYFLNVRVRYYYLYPLVFIFMGFNHSLYYWESWG HAVTLILFFTALGRLRKHVPLQTKQGQVALYLVTCAFGAV LWWMKLFKFNLSWATYWQEWTYLLVFASLLYIASMLSA NAHLKQNLVAFANHDALTKIENFAAYKTAINYQVTSSRKN GSQLTMLMFDIDHFKQVNDTYGHLAGDKILQHVAQVATIVF HANNPQISLYRTGGEEFNVIFFNYDLTEALAVAEQLFAAINH IAVPVNDHQIQLSISIGLSELAADDQSPTAFYQRVDANLYHSK KHGRMQITAK
61412	LACP4.1	Diguanylate cyclase	78602	79792	1190	MLHLLTSSLGRDLFNIKMLIVILITIGLITLMTILTYLLEQQV HRRQRNYWTIGAHGAEALSVLISMILLRQIFITLNSGSIISWT YATVQLTILLFSLNTPMRNLAVEIINLLMPLFIYGGAIWLGHST QYLPVFLAMAILISTVVYITHNYQELHATQWKYLLFQILYS GTWWGVIVSVHPPKLSHTLVIIAFVLYMVLIRLAVNRRVQK FFNEVLTFDQQVNYDELTGIRNRASFDTHAHEVFAAYQHH QMGPVTMVMFDDIDHFKAFNDQYGHLAGDVVLRHVAVHVE LELNQRSTHGQIFRYGGEEFVIFRGISALETGQIMRTIQRKLL TVPKFNQAQTLNVTVSIGISELQPTDQTFDWFVRVDDYLY QSKQAGRQDQTTVESQLLTD
		Diguanylate cyclase	65802	66932	1130	MTWSNWRISPFVTSIFFILGVLTLYWVLFNWITTFHARHI NIDDDTVNAWHGVYMLVVFVMQLSVVGKADSWEFVNF HLIAVVFCSFFLNIRMPYYSLPVVIVYMVFDQSFYWESWS YAVVFLFFWSMNYLRLWVPKHRYPWLYYYGAVAFYGGI LWGLIKLYSLDWDNTLQEYGYLMIFAGLLYAYVNMLTQD SEIKLRLAQFASHDALTEENFAAYTEHIKYLFDSDAKNNL NLSMMMFDIDHFKHVNDTYGHLAGDRVLQEVAAATVTTVL AANDEKVKLYRTGGEEFNVLFPGYDLASTKIVFVRQVFEAVN HLVVKYEDEEINVSISVGVSTLHQADGSPIDLXNRVDQNLVYF SKRHGRMRVTVE
		Diguanylate cyclase	21485	22621	1136	MTWSHWETPPFITSVFFILGVLTLFWVVSQNWIINFFNTHHW RVDQSLITDWYGLIYMMLFVFGMQTAVVGQNDAWIFMNFQ LIGLTFCGYFLNVRVRYYYLYPLVFIFMGFNHSLYYWESWG HAVTLILFFTALGRLRKHVPLQTKQGQVTLYLVTCAFGAV LWWMKLFKFNLSWATYWQEWTYLLVFASLLYIASMLSA NAHLKQNLVAFANHDALTKIENFAAYKTAINYQVTSSRKN GSQLTMLMFDIDHFKQVNDTYGHLAGDKILQHVAQVATIVF HANNPQISLYRTGGEEFNVIFFNYDLTEALAVAEQLFAAINH IAVPVNDHQIQLSISIGLSELAADDQSPTAFYQRVDANLYHSK KHGRMQITAK
61411	BIFB3.1	없음				
61410	BIFL1.1	없음				

beta-fructofuranosidase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBG41.1	Beta-fructofur anosidase	264187	264351	164	MYGWTS PFVEPIPMQDDG WCGQLTLPREIMLV AESGSLTVT SLTLHHLK SIGLD
61427	LACF21.1	Beta-fructofur anosidase	5771	7276	1505	MIWNRKTRYTPYEQWPATKLPQLVAQARQSKWRMQHHIQ PTSGLLNDPNGFSYFDGQWHLFYQVFPFGPVHGLKSWQHIV TSKNLVDWHDEGLAIRPDPYD SHGAYTGTALPIDDQLFIM YTG NVRTADWQRESYQLGAWMDTDNHIKLSRPLIAHAPA GYTSSFRDPLIRTDHGYYALIGAQTTEIGAILVYFSKDLT TWTCQGELNVPANARGYMI ECPNLVWIDQQPVLLFCPQGLS QTTTPYQNIYPNMYLVADQLDLAQAQFTEPHALTQLDDGF DVYATQAINAPDGRALAVSWIGLPEISYPTDRENWAHCLSL VKELTLKDGHL YQNPVAAVDDLRTTAHDLVFEQQRATVAA LNGSFELLLTVPADKTVTVNIADQQESGQLQVTV DANHGG VMIDRRHTGNSFAEDYGQTRQVELTAHKTIKIRLIDVSVFE CYIDNGYSVMTGRFFLNA TPRSRLNVQGDTTAVTGKVWEW RQSEHTGV DNNETKIK
		Beta-fructofur anosidase	20064	21536	1472	MEWTRQQRYSYDHYTAQQLELQSQAATDPVQVRYHLH PSLGLLNDPNGFSYFNGQWHLFYQSFPPGATHGIKSWMHT VSEDLVHWRNLGLAVAPD TKFDSHGAYSGSAKAFGDRLFL MYTGNHRDADWNRISYQVGA WMDKDGQVTKLDHEL FVNF PHFTEL RDPQLLVKDGHYALLGAQRTADKTGVADLWESD QLESGWHEVGEVDLGQSDLGYMVECPNYVDVDGRAVMIFC PQGLDHQTAPYQNIYPNMYL TGQDFDLTAPRLVNPDETLTN LDEGFDVYATQAFNAPDGTAYAVSWVGLPDTTYPTDDHN WANVMSQVKELHYRDGHL YQTPVEAMADLRHTHHA TIFT GQPTVIKEDAGQQFELQVTIEPNQAGTLTLAGDQSLEHG VFL NFDTTAGQLVIDRAKAGQPVAEDHGTRTLTVSGHQELKL DIFVDHSLVEIFVNDGYKVATLRYFADQAHGQVAF TNPTKA TGTLWPIKPY
61426	LACP20.1	Beta-fructofur anosidase	266020	267325	1505	MIWNRKTRYTPYEQWPATKLPQLVAQARQSKWRMQHHIQ PTSGLLNDPNGFSYFDGQWHLFYQVFPFGPVHGLKSWQHIV TSKNLVDWHDEGLAIRPDPYD SHGAYTGTALPIDDQLFIM YTG NVRTADWQRESYQLGAWMDTDNHIKLSRPLIAHAPA GYTSSFRDPLIRTDHGYYALIGAQTTEIGAILVYFSKDLT TWTCQGELNVPANARGYMI ECPNLVWIDQQPVLLFCPQGLS QTTTPYQNIYPNMYLVADQLDLAQAQFTEPHALTQLDDGF DVYATQAINAPDGRALAVSWIGLPEISYPTDRENWAHCLSL VKELTLKDGHL YQNPVAAVDDLRTTAHDLVFEQQRATVAA LNGSFELLLTVPADKTVTVNIADQQESGQLQVTV DANHGG VMIDRRHTGNSFAEDYGQTRQVELTAHKTIKIRLIDVSVFE CYIDNGYSVMTGRFFLNA TPRSRLNVQGDTTAVTGKVWEW RQSEHTGV DNNETKIK

61425	BIFB18.1	Beta-fructofuranosidase	2481	4037	1556	<p>MTDFTPETPVLTPIRDHAAELAKAEAGVAEMAANKRNNRW  YPKYHIASNGGWINDPGLCFYKGRWHVFFYQLHPYGTQW  GPMHWGHVSSDMLNWKREPIMFAPSLEQEKGDFVSGSA  VIDDNGDLRFYYTGHRWANGHDNTGGDWQVQMTALPDN  DELTSATKQGMIDCPTDKVDHHRDPKVWKTGDTWYMT  FGVSSADKRGQMWLFSSKDMVRWEYERVLFGHPDPDVFMI  LECPDFFPIKDKDGNEKWWIGFSAMGSKPSGFMNRRVNSNA  GYMIGTWEPPGGEFKPETEFRLWDCGHNYYPQSFNVDGRQ  IVYGWMSPFVQPIPMEDDGWCGQLTLPREITLGDDGDVVT  APVAEMEGLREDTLDHGSVTLDMDEQIADDAEAVEIEMT  IDLAASTAERAGLKIHA TEDGAYTYVA YDQGIGRVVVDQR  AMANGDRGYRAAPLTD AELASGKLDLRVFDVDRGSEVEYV  NGGHQVLSSYSYASEGPRAIKLVAESGSLKVDLSLKLHHMKS  IGLE</p>
61424	LACF18.1	Beta-fructofuranosidase	38740	40212	1472	<p>MEWTRQQRYQSYDHYTAQQLLELQSQAAATDPVQVRYHLH  PSLGLLNDPNGFSYFNGQWHLFYQSFPFGATHGKSWMHT  VSEDLVHWRNLGLAVAPDTKFD SHGAYS SAKAFGDRFLFL  MYTGNHRDADWNRISYQVGA WMDKDGQVTKLDHELFFVN  PPHFTELRDPQLLVKDGHYALLGAQRTADKTGVADLWES  DQLESGWHEVGEVDLGGSDLGYMVECPNYVDVDGRAVMI  FCPQGLDHQTAPYQNIYPNMYLTGQDFDLTAPRLVNPDET  LTNLDEGFDVYATQAFNAPDGTAYAVSWVGLPDTTYPTD  DHNWANVMSQVKELHYRDGHLYQTPVEAMADLRHTTHHA  TIFTGQPTVIKEDAGQQFELQV TIEPNQAGTLTLAGDQSLE  HGVFLNFDTTAGQLVIDRAKAGQPVAEDHGTTRTLTVPGH  QELKLDIFVDHSLVEIFVNDGYKVATLRYFADQAHGQVAF  NPTKATGTLPWIKPY</p>
61423	PIFP17.1	Beta-fructofuranosidase	117473	119029	1556	<p>MTGFTPDAPVLHEIKNHSEALAQAEAGVAAMAASRNNRW  YPKFHIASNGGWINDPGLCFYKGRWHVFFYQLHPYGTQWG  PMHWGHVSSNDMLNWKREPIMFAPLLEEEKDGDFVSGSAVI  GDDGELKFYYTGHRWANGIDNTGGDWQVQMI AEPDNDL  TSATKRGMIIDCPLDKVDHHRDPKVWKTGDKWYMTFGV  SSAEKRGQMWLFSSDDMVRWVWYERVLFEHPDPNVFMLE  PDPFFPIKDADGNEKWWIGFSAMGAKASGFMNRRVNSNAGY  MIGTWTWPGFAFQPETEFRLWDCGHNYYPQSFNDGERQIV  YGWMSPFVEPIPMQDDGWCGNL TLPREITLGADGDLHTAP  VVEMEGLRENTTDFGAISLDVNGEQTIADDAEAVEIEMTID  LNASTAERAGLKIHA TEDGAYTYVA FDDQIGRVVIDRQAA  AQGDRGYRTAPLSAEELASGELKLRVFDVDRGSEVEYVNDG  RQAMSSFSYASEGPRAIKLVAESGTLEVKSLKLHTMKSIGL  E</p>

		Beta-fructofuranosidase	7454	8932	1478	MKLKENWSRTDRYRPFYKEWSEEHLHSLEKKINSSHWRLG YHIQPVGTGLNDPNGFSYFDGKWQLFYQAYPMGSVHGLKS WYHLSSVNLIDWKNLGLKLPDNSFDSHGVSYSALPIDNQ LFLAYTGNVRDSNWGRHSFQLGAWMDKNGNITKIPTPLIS SPPPGYQTQEIROPQLIAYDDGYLLIVGAQTEQKQGRILTYYS KDLQNWQFLGTLGFTEEMGMFIECPNLLFVNGKALLVFC PQGLSHEIHSYSNIYPNTYVIGQTFDFEKNELSDPTHKNIDE GFDIYATHCFSDENGRTLAISWIGLPEISYPTDEEGWAHCLS IVKELTIEKEQLYQRPVKETAQLRKGGKPYHFSGLETTIDAEL NQYELQLEFDYSQKGTILLFADEQKQKHGLTSLFDMIHGKMS MDRSHAGKSF AENFGTVREFSIEKKPLKQIFVDRSVVEVF VNDGQQTATARVFPKDDQTGLYIKSDREFKGGKWLHRLNM NK
61422	LACA16.1	Beta-fructofuranosidase	41172	42326	1154	MYYQYNPYAPHWDSMHWGHARSKDGIHWQDMPVAMKPF DHEYDKSGVFSGSAIEKGGKLYVIYTGHVDENGKAVETQC VAVSDDGVDFKKYKNNPVMTIADLPGEVDESFRDPKVF HDGKYVCVIAAANGHGSLLIFEEDLLHWSFKSILLQGEKY GLMTECPDYFNIDGKDYLAFSVILGDDKHSIVYIAEGHMDW QTFKFELEKCDRLDDGDDFYASQSF MNEKGERIVIPWLRSA DHNYLEESGHLWNGMMGPRKLTIDNNELIQSPLGKFKQI SLSDSEITLGINQLAEDIPVSYSLILKGDNGEIIYTRTNESEQYT IDIHSPAFTEELVWHSNKHKLTLVIDNSSLEIFSQTKTLSVV TFIAGINRMELKKVDL
		Beta-fructofuranosidase	19281	20738	1457	MEWTREKRYLPYSKWDADTLLHLQAQAANSPLYQMHYHL HPISGLINDPNGFSYFNGAYHLFYQSYPPGAVHGLKSWVHF KSKDLVHWENLGLAIEPDTMADSHGAYSGSAREIDGKLF MYTGNHRDENWIRTPYQIGAWMDKNGKVS DKTILFKNPD HITEHFRDPQILKKNDDTYAILGAQDNAEKHGHIDVWKS DLKNWEELGYLDFTDQDMGYMIECPNLVEVDGHVVLIFCP QGLDKKVAADYDDIYPNMYVIADGIDFENHKLINPGPLQNL KGFVYATQAFNALDGKAYEISWVGLPDIYPTDDENWA NCLSQVKELTIKNGQLIQKPVKSMASLHKNEKDVADQVVS ENAGQQYELELTIKAGQKGNLYLAANDDLSSGLKISFDTKN GQLILDRSIAGQKVAVDYGENRTAPLQPDSDVKNLIYIDHSL IEIFVNDGENVLTGRYFADQAHSKIAFDKKNFNGKLVNMM KTIL
61421	LACA15.1	Beta-fructofuranosidase	22747	24195	1448	MEWTREKRYLPYSKWDADTLLHLQAQAANSPLYQMHYHL HPISGLINDPNGFSYFNGEYHLFYQSYPPGAVHGLKSWVHF KSSDLVNWESLGLAVEPDTMADSHGAYSGSAREIDGKLF MYTGNHRDENWVRIPYQVGAWMDKNGKVAADKTLFKNPD DHITEHFRDPQILKKNDDTYAILGAQDKAEKHGHIDVWKS DLKNWEELGFLDMGTDDLGYMIECPNIVRVDGHVVVIFCPQ GLDKKIADYDDIYPNMYIADDIDFKNHKLINPGKLNLDKG FDVYATQAFNAPNGKVEISWVGLPDTTYPTDNENWANC LSQVKKLSIKDGKLMQKPVSAMQELRYNEKEISDENKASQ QYEAELTIKAGQKGSLYLAANDNLTSGLKLDLDFDTENGTLIL DRSNAGQKVSVDYGETRQANFEANTDLKLNIFIDHSLIEIFV NHGEEVLTGRYFADQNNTKFAFAQKTHYNGKLVQMKTIL

61420	LACR13.1	Beta-fructofuranosidase	16699	18177	1478	MTDSIENMAKRYQPYSTWTPEYVASLKAEVAASQWRKT HIQPDGLINDPCSLNFFNGKWHLYYQQFPFPGVHGLKSWA HVVSKDLFNWRRVPGDLLPDNELDAQGAYTGSALVTHGT LRIMYTGNVVRDEQWHRQSTQLGAVLGADSRLYKDPKPLIA NPPAGYTQEFRDPFLFNQDKTYVLIGGQRADHTGAILLYE KQPKDTRWFVAPLSIPDEFCEGYMVECPNIAFINGKVVLYC PQGLDQDFFEYENVYPNIALVADSFDPETGTLTHQRLQNI KGFDFYATRLANTEKDGTLAISWGLPDTNYPTDADGWE GVLSYVRQLDLRDGHVCLKPHPNIEQLRETA TDALPVVSQN TDQCSVTALSGAFELSMTLAAGQKATVHVDPGDHDLQLLN LSDSDGQGMVQRENRRNNGSLRQFGFPAGKTVTIRLFDV SVFELFIDGGRVVSGRFFGDTCTAARVNPPAAVSNVQA WNLRKDNNGGL
61419	LACC12.1	Beta-fructofuranosidase	67990	69468	1478	MKEATWSTAARYQPYSSWAPDYIVKLKAQVAASKWRKT THVQPDTGLINDPCSLNFFNKNWHLYYQQFPFPGVHGLKS WAHAVSKDLFNWRRVPGDLLPDNEYDISHGAYTGSALVTH GTLRLMYTGNARDDQWHRHSTQLGAVLGADGRFLKDPKP LILTPPTGYTQEFRDPFLFNQEGQTYVLIGGQRPDHTGAIL YAKQTDKS WRFVAPLSIPDEFCEGYMVECPNITFINGKVV YCPQGLDQDFFEYENVYPNIALVADSFDPETGTLTHQRLQ IDKGFDFYATRLANTDDDGTLAISWGLPDTTYPTDDDGW AGVLSYVRQLTLRDDHVCLYPHPAIKSLRETA VENLPVIQ HDDEWTVTNLEGAFELAFTLAAGQKTTIHLPDGDHDLQLL HLSDSDGQGMQRENRRNNGSLRQFGFPAGKTVVIRLFDV SVFELFIDGGRVVSGRFFGNEAPT AARITPPSAASDVVSW NLKKNNGGL
61418	ENTF11.1	Beta-fructofuranosidase	5410	6849	1439	MNLPREIRAYSDWTKDEMDEKIDNVKRSPWRASYHIEP KTGLLNDPNGFSFFNGKYTLFYQNWPFGAHGLKEWVHN ESDDLHIFHV TGAELLPDTRKDSHGAYSAYSAYEIEENFL YTGNVNRNENWERD TLQIGAWMDKDYNTKGENVLIHKPAD V TDHFRDPQMFNYEGQLY AIVGAQNLEKSGFIKLYKADD NN VETWEEVGNLDFGGTGSEYMIECPNLVFDKPKPVLIC PQG LDKSELNYGNIYPNTFKICQSLDIEKVKLVGASEIQN LDYGF EAYATQGFNTPDGRALIVSWIGLPDIDYPTDKYD YQGAMSL VKELSIKDGKLYQYPVEAITSLRASSEQFTAKA ETNNTYEL ELTFPPNQSELLFSDSKGNGLSLIVDTKEGK ILDRSKAGI QYATDFGTIRECSIDTKETTANIFVDNSIIE IFINKGEKVFTS RVFPENHQNGIQIKSGEPTGKYFELKY
61417	BIFB9.1	Beta-fructofuranosidase	4709	6181	1472	MEWTRQQRYQSYDHYTAQQLLELQSQAATDPVQVRYHLH PSLGLLNDPNGFSYFNGQWHLFYQSFPFGATHGKSWMHT VSEDLVHWRNLGLAVAPDTKFDSDHGAYSAGAKAFGDRLFL MYTGNHRDADWNRIYQVGAWMDKDGQVTKLDHELFLVN PPHFTELRDPQLLVKEGHYYALLGAQRTADKTVADLWES DQLESGWHEVGEVDLQSDLGVMVECPNYVDVDRAMMI FCPQGLDHQTAPYQNIYPNMYLTGQDFDLTAPRLVNPDET LTNLDEGFDVYATQAFNAPDGTAYAVSWVGLPDTTYPTD DHNWANVMSQVKELHYRDGHLYQTPVEAMADLRHTHHA TIFTGQPTVIKEDAGQQFELQV TIEPNQAGTLTLAGDQSL E HGVFLNFDTTAGQLVIDRAKAGQPV AEDHGTTRTLTVPGH QELKLDIFVDHSLVEIFVNDGYKVATLRYFADQAHGQVAF T NPTKATGTLWPICKY



61416	BIFB8.1	Beta-fructofuranosidase	4868	6343	1475	MEWTRQQRYQSYDHHTAQQLLELQRQAATDPAQVRYHLH PSSGLLNDPNGFSYFNGQWHLFYQSFPFGATHGIKSWMHT VSEDLVHWRDLGLAVAPDTKFDSDHGAYSGSAKAFGDRLFL MYTGNHRDADWNRIPIYQVGAWMDKDGQVTKLDHELDFVN PPHFTTEHFRDPQLLVKDGHYAYAILGAQRTADKTGVADLWE SDQLESGWHEVGEVDLGGSDLGYMVECPNYVDVDRGAVMI FCPQGLDHQTAAPYQNIYPNMYLTGQDFDLTAPRLVNPDET LTNLDEGFDVYATQAFNAPDGTAYAVSWVGLPDTTYPTD DHNWANVMSQVKELHYRDGHLYQTPVEAMADLRHHTHA TIFTGQPTVIKEDAGQQFELQVTEPNQAGTLTLAGDQSLE HGVFLNFDTTAGQLVIDRAKAGQPV AEDHGTTRTLTVPGH QELKLDIFVDHSLVEIFVNDGYKVA TLRYFTDQAHGQVAF NPTKATGTLWPIKPY
61415	LTBC7.1	Beta-fructofuranosidase	25107	26576	1469	MEWTREGRYRKYKDWDQAQTLLDLQAQAATSPYQMHYHI HPLSGLLNDPNGFSYNGEYHLFCQSYFPGVHGVKSWIHF ASPDLVHWHYLGPAIDPDSLDNAGAYSGSAMENHGKLL MYTGNHRDEDWTRIPYQVIAEMDEDNHIKPKDKASILPPDH VSEHFRDPQLFEHNGKYVLLGAQDAKTKTGHIDIYESGDL KNWHENGYLDLKGDEMGMIECPNLVFDNYPVLIFCPQG LDKSIADYQNIYPNMYWIGKDINLSKAQFTPLQDHPANLDD GFDVYATQAFNAPDGNAYAISWVGLPDCYPTDKNWAN CYSQVKRLEIKDGVLYQHPVDAIKNLRHNEKQLNDEKISQK AGKQYELKHLAAGQAGKHLASNEDELSASLVVDFNTAQD AKLTIDRASSGPAVNPDYGATRTEIENANQDLDLDFVDGSL CEIFINDGRHVATLRFAPSSNQKIAFDKDTKYTGRLWSMN SIL
		Beta-fructofuranosidase	34877	36406	1529	MTNRREQFEHLVSNLKDIPKENLIKEKNSVKKSPYRQRIHIE SLFGMLGDPNGFSYFNGYHHLFHQWFPMKYSTNPNYFQQ GWFHWKSRNLVDWIPVGEAMNNDTVFDKYGVYSGSAIPIN NKLFLMYNGNSWTNTDTHDWHVRVPCQLGAYMNENDNVA KLANPLIKGPISGYTSHFRDPKIFKKNKGYYSIIGAQTKAKT GTVLIYESQNLRIWNKVGEVKTNFEKTGYMWECPDYFELD NKGILLFCPQGLKSKGSQFLNTFQACYAIGNKLDLFRNLYFEG KKFEIDSDFDYAPQTMIEPDGRRILSAWMSIMNSNSPLIK YHYDGLIFPRELSVQNDKLIQKPVSEIKKLYTDDYK GKRAI SKNQEIVAGLVNCRDIKFDISTKDNSAISIDLFANRENTSHL RLVLNRMKNRFIVQRGKAGIEFEDEFGNERSCELKVANSVSI RIIQDISSAEIFINNGENVFTMRVFPKDYHIFVKNVNGEV NVKYQIHQLRKMSS
		Beta-fructofuranosidase	10782	12254	1472	MEWTRQQRYQSYDHHTAQQLLELQSQQAATDPVQVRYHLH PSLGLLNDPNGFSYFNGQWHLFYQSFPFGATHGIKSWMHT VSEDLVHWRNLGLAVAPDTKFDSDHGAYSGSAKAFGDRLFL MYTGNHRDADWNRIPIYQVGAWMDKDGHVTKLDHELDFVN PPHFTELRDPQLLVKDGHYAYALLGAQRTADKTGVADLWES DQLESGWHEVGEVDLGGSDLGYMVECPNYVDVDRGAVMI FCPQGLDHQTAAPYQNIYPNMYLTGQDFDLTAPRLVNPDET LTNLDEGFDVYATQAFNAPDGTAYAVSWVGLPDTTYPTD DHNWANVMSQVKELHYRDGHLYQTPVEAMADLRHHTHA TIFTGQPTVIKEDAGQQFELQVTEPNQAGTLTLAGDQSLE HGVFLNFDTTAGQLVIDRAKAGQPV AEDHGTTRTLTVPGH QELKLDIFVDHSLVEIFVNDGYKVA TLRYFADQAHGQVAF NPTKATGTLWPIKPY

61414	LPAR6.1	Beta-fructofuranosidase	45937	47415	1478	MKEATWSTAARYQPYSSWAPDYIMKLLKAQVAASKWRTK THVQPDGTGLINDPCSLNFFNKNWHLYYQQFPFPGVHGLKS WAHAVSKDLFNWRRVPGDLLPDNEYDSHGAYTGSALVTH GTLRLMYTGNARDDQWHRHSTQLGAVLGDGRLFKDPKP LVLTPPTGYTQEFRDPFLFNIEGQTYVLIIGGQRPDHTGAILL YAKQTDKSWRFVAPLSIPDEFCEGYMVECPNITFINGKVVLV YCPQGLDQDFEYENVYPNIALVADSFDPPTGNLTHQRLQN IDKGFDFYATRLANTDDDGTLAISWGLPDTTYPTDDDGW AGVLSYVRQLTLRDDHVCLYPHPAIKLNRETAVEDLPVIQQ HDDEWTVTNLEGAFELALTLAAGQKTTIHLDPGDHDQLLI HLSDSDSGQMIQRENRRNGGSLRQFGFPAGKTVEIRLFIDVS VFELFIDQGYRVVSGRFFGNEAPTAAARVTPPSAASDVVSW NLKKDNGGL
61413	LTBC5.1	Beta-fructofuranosidase	421105	422610	1505	MIWNRKTRYTPYEQWPATKLPQLVAQARQSKWRMQHHIQ PTSGLLNDPNGFSYFDGQWHLFYQVFPFPGVHGLKSWQHV TSKNLVDWHDEGLAIRPDTPYDSHGAYTGTALPIDDQLFIM YTGNVRTADWQRESYQLGAWMDTDNHIKKLSRPLIAHAP AGYTSSFRDPDLIRTDHGYYALIGAQTTEIGAILVYFSKDL TTWTCQGELNVPANARGYMIIECPNLVWIDQQPVLLFCPQG LSQTTTPYQNIYPNMYLVADQLDLAQAQFTEPHALTQLDD GFDVYATQAINAPDGRALAVSWIGLPEISYPTDRENWAHCL SLVKELTLKDGHLVQNPVAAVDDLRTTAHDLVFEQQRAT VAALNGSFELLTVPADKTVTVNIADQQESGQLQVTV DAN HGQVMIDRRHTGNSFAEDYGQTRQVELTAHKTIKIRLIIDVS VFECYIDNGYSVMTGRFFLNATPSRLNVQGDTTAVTGKV WEWRQSEHTGVDNNETKIK
61412	LACP4.1	Beta-fructofuranosidase	266015	267520	1505	MIWNRKTRYTPYEQWPATKLPQLVAQARQSKWRMQHHIQ PTSGLLNDPNGFSYFDGQWHLFYQVFPFPGVHGLKSWQHV TSKNLVDWHDEGLAIRPDTPYDSHGAYTGTALPIDDQLFIM YTGNVRTADWQRESYQLGAWMDTDNHIKKLSRPLIAHAP AGYTSSFRDPDLIRTDHGYYALIGAQTTEIGAILVYFSKDL TTWTCQGELNVPANARGYMIIECPNLVWIDQQPVLLFCPQG LSQTTTPYQNIYPNMYLVADQLDLAQAQFTEPHALTQLDD GFDVYATQAINAPDGRALAVSWIGLPEISYPTDRENWAHCL SLVKELTLKDGHLVQNPVAAVDDLRTTAHDLVFEQQRAT VAALNGSFELLTVPADKTVTVNIADQQESGQLQVTV DAN HGQVMIDRRHTGNSFAEDYGQTRQVELTAHKTIKIRLIIDVS VFECYIDNGYSVMTGRFFLNATPSRLNVQGDTTAVTGKV WEWRQSEHTGVDNNETKIK
61411	BIFB3.1	Beta-fructofuranosidase	92596	93993	1397	MPKLYYQFPGTWFGDCMPFGKGNFFLYHQDRNRNPEPFG EPPGWDLATTSDFVHYKDCGVAVPRGRDDEQDQFIFAGSV FEGEGQYHIFYTGYNRDYPQRDKPAQVLMHAVSDDLHYHW TKTQNAITFTPQEGYDPPDWRDPWVIRDEHDQYLLILGAR KIGPKTQQTGRTVKFTSKDLKNWTFEGDFWAPNLYTMEH MPDLFKMGEWYHIVTEYSDRHKMVMYMAKSLEGPWIAF DDDAFDGSAYYAGRTFELGGRRILFGWVATKEDCDDVKNF EWAGTFVPHVEVYQRTDGLGVRIPTVWDAFNEREQIVTN AVIDGTDARRNAVLAEGCGDLYSFEADVMMFSEGTRSFGLR VYRDEASERGYQFIFPIGEHRYVFEQSPNFPWFNCMNIGLER PIELVAGREYHIQLIVDDTIATLYVNGVALNARMYQHPGDA LSMFVTDGTLTVTNATISRGLKEV

		Beta-fructofuranosidase	33314	34870	1556	<p>MTGFTPDAPVLHEIKNHSEALAEAGVAAMAERNNRW  YPKFHASNGGWINDPNGLCFYKGRWHVIFYQLHPYGTQWG  PMHWGHVSSDMLNWKREPIMFAPTLLEEKDGVSFSGSAVI  GDDGELKFYYTGHRWANGQDNTGGDWQVQMLAEPDNDEL  TSATKRGMIIDCPTDKVDHHRDPKVWKTGDTWYMTFGV  SSADKRGQMWLFSSKDMVRWEYERVLQHPDPDVFMLECP  DFFPIKDKDGNEKWVIGFSAMGSKPSGFMNRRVNNAGYMIG  TWEPGGEFKPETEFRLWDCGHNYAPQSFNVDGRQIVYGW  MSPFVQIPMEDDGWCGQLTLPREITLGDDGDVVTAPVAEM  EGLREDTLDHGSITLMDGGEQVIADDAKAVEIEMTIDLAAST  AERAGLKIATEDGAYTYVAYDDQIGRVVDRQAMANGDR  GYRAAPLTDDELASGKLDLRFVDRGSVEVYVNGGHQVLS  YSYASEGPRAIKLVAEFGNLKVESLKLHHMKSIGLE</p>
61410	BIFL1.1	Beta-fructofuranosidase	462941	464497	1556	<p>MTDFTPETPVLTPHIDHAAELAKAEAGVAEMAANRRNRW  YPKYHIASNGGWINDPNGLCFYKGRWHVIFYQLHPYGTQWG  PMHWGHVSSDMLSWKREPIMFAPSLEQEKDGVFSGSAVI  DDNGDLRFYYTGHRWANGHDNTGGDWQVQMTALPDNDEL  TSATKQGMIIIDCPTDKVDHHRDPKVWKTGDIWYMTFGVS  SADKRGQMWLFSSKDMVRWEYERVLQHPDPDVFMLECP  DFFPIKDKDGNEKWVIGFSAMGSKPSGFMNRRVSNAGYMIG  TWEPGGEFKPETEFRLWDCGHNYAPQSFNVDGRQIVYGW  MSPFVQIPMEDDGWCGQLTLPREITLGDDGDVVTAPVAEM  EGLREDTLDHGSITLMDGGEQIADDAEAVEIEMTIDLAAST  AERAGLKIATEDGAYTYVAYDGQIGRVVDRQAMANGDR  GYRAAPLTDDELASGKLDLRFVDRGSVEVYVNGGHQVLS  SYSYASEGPRAIKLVAESGSLKVDSLKLHHMKSIGLE</p>

S-adenosylmethionine synthase (Methionine Adenosyltransferase)						
sample 번호	Contig accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBGN41.1	Methionine adenosyltransferase	400544	401761	1217	MTNQERKLISAESVTEGHPDKVCDQISDEILDELLRQDPQSH VAVETSAATGVFLVFGVETSKGYVDVQSTVRETLRRIGYT SSEVGLDADSCGVIVAITGQSAEINQGVARLTGEKETEASRE ERYEAQAGDQGV MFGYATDETDVLMPLPIYLAHRLAFRL TEVRKSGEVPHLRPDGKTQVTIEYDENDKPLRVDTVLISLQ HDPEASREWLAAQLKEHVIDPVLDEVLGDGVKHDDYRQLV NPTGSFVLGGPAADAGLTGRKIIVDTYGGAHHGGGAFSG KDPSKVDRAAAYATRWWAKNIVAAGLAHRVELQVAYAIG VAEPVSVNVETFGTEIGVTREQIQQAVRKVFDLRPAIIDE DLKRPIYAKTAAAYGHFGRVDIEFPWERTDKVEELKAAIR
61427	LACF21.1	Methionine adenosyltransferase	949	2136	1187	MSERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDAMLAQDPQARV AVETSVTTLGLVLFGEVSTKAYVDIQKVVVDTIKISIGYVDG QYGFDDGNCVAVLVSLEQSPDIAQGVDDSLSTRSGDADPLD QIGAGDQGM MFGYAINETPELMPLPIALSHRLMRKIAALRK DGTIKWLRPDAKAQVTVVEYDEDNQPKRIDTVVLSLQHDPPD VDLDTIRQTVIDQVIKAVLPADLLDDQTKYLVNPTGRFVIGG PQGDAGLTGRKVIIVDTYGGFAHHGGGAFSGKDATKVDRA SYAARYIAKNVVAAGLADQVEVQLAYAIGVAEPVSIADV AGTGKVSDEALINAIRENFDLRPAGIHKMLDLQRPIYRQTAA YGHFGRTDIDLPWEHTDKVDALKAAAFK
		Methionine adenosyltransferase	6100	7287	1187	MKERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDALLEKDPDARVA VETSVTTLGLVLFGEISTAYVDIQHVRETIKEIGYTDGK YGFDDGNCVAVLVSLEQSKDIAQGVDDSLIIRREGQVDPDQI GAGDQGLMFGFATDETPEYMPLPLILSHKLMRRIAILRKDK VIKYLRPDAKAQVTVVEYDADGKPVVVDTVVLSLQHDPPDV LEQIQADVKEQVIKAVIPAEYLDQTKYFINPTGRFVIGGPG GDAGLTGRKIIVDTYGGAHHGGGAFSGKDATKVDRA AARYIAKNLVAAGYAKKLEIQVAYAIGVAKPVSIIDNFTG GTKSEEMIAAVRQVFDLRPAGIHKMLDLQRPIYKQTAAYG HFGRTDIDLPWEKLDKVAELKKILG
61426	LACP20.1	Methionine adenosyltransferase	14325	15512	1187	MSERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDAMLAQDPQARV AVETSVTTLGLVLFGEVSTKAYVDIQKVVVDTIKISIGYVDG QYGFDDGNCVAVLVSLEQSPDIAQGVDDSLSTRSGDADPLD QIGAGDQGM MFGYAINETPELMPLPIALSHRLMRKIAALRK DGTIKWLRPDAKAQVTVVEYDEDNQPKRIDTVVLSLQHDPPD VDLDTIRQTVIDQVIKAVLPADLLDDQTKYLVNPTGRFVIGG PQGDAGLTGRKVIIVDTYGGFAHHGGGAFSGKDATKVDRA SYAARYIAKNVVAAGLADQVEVQLAYAIGVAEPVSIADV AGTGKVSDEALINAIRENFDLRPAGIHKMLDLQRPIYRQTAA YGHFGRTDIDLPWEHTDKVDALKAAAFK
61425	BIFB18.1	Methionine adenosyltransferase	154763	155983	1220	MTEEHRLISAESVTEGHPDKVCDQISDAILDDLLAQDSSSHV AVETSAAATGVFLVFGVETSEGYCDVQSKVRETLRNIGYTS SEVGLDADSCGVVVAITEQSAEINQGVARLTGDQETAASRE ERYEAQAGDQGV MFGYATDETPMLPLPIYLAHRLAFRL TEVRKSGEVPHLRPDGKTQVTIEYDDNDKPVRLD TVLISLQ HDPEVTQDWLAVELKKHVIDPVLDEVLGSRVPHDNRYRQLV NPTGSFILGGPAADAGLTGRKIIVDTYGGAHHGGGAFSGK DPSKVDRAAAYATRWWAKNIVAAGLAHKVEIQIAYAIGVA DPVSVNVETFGTEQGVTRGQIAAAVRKVFDLRPAIIDE LKRPIYLKTAAYGHFGRTDVEFPWEKTDKVEELKAAIAAE

61424	LACF18.1	Methionine adenosyltransferase	6875	8062	1187	MKERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDALLEKDPDARVA VETSVTTGLALVFGEISTSAYVDIQHVRETIKEIGYTDGK YGFDDGNCAVIVALDEQSKDIAQGVDDSLIREGQVDPLDQI GAGDQGLMFGFATDETPEYMPLPLLSHKLRRRIAILRKDK VIKYLRPDAKAEVTVEYDADGKPVVRVDTVVVSTQHDPDVS LEQIQADVKEQVIKAVIPAEYLDDQTKYFINPTGRFVIGGPQ GDAGLTGRKIIVDTYGGAAHHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNLVAAGYAKKLEIQVAYAIGVAKPVSISIDNFGT GTKSEEMIAAVRQVFDLRPAGIIMLDLQRPYKQTAAAYG HFGRTDIDLPEWKLKDKVAELKKILG
61423	PIFP17.1	Methionine adenosyltransferase	202874	204088	1214	MAELKLISAESVTEGHDPKVCQISDAILDDMLAQDPQSHV AVETCATVGGFFVFGEVTSEGYSDIQSVRSVVRNIGYTSSR VGLDADSCGVTVSLTEQSSEINQGVARLSGEAESKASREQR YEAQGAGDQGMFGYACDETDVLMPLPIYLAHRLAYRLTE VRKNGEVPHLRPDQGTQVTIEYDEHDAPVRLDTVLVSTQH DPQVDQAWLKEQLTEHVIRPVLDDVLADRV AHDEYRVLVN PTGSFVLGGPAADAGLTGRKIIVDTYGGAAHHGGGAFSGK DPSKVDRSAAAYARWVAKNIV AAGLAHKVEVQVAYAYIGV ADPVSINVEYGTENGVTREQIQAVRKFVFDLRPAIIIDELD LKRPIYSKTAAYGHFGRNDADFTWETTNKVDELKAAIEG
		Methionine adenosyltransferase	28258	29451	1193	MVERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDAILEQDPTARVA CETSVTTGLVLFVGEISTAYVDIQKVVRETIKEIGYTRAKF GFDGDTAAVLVAIDEQSPDIAQGVDEALEIRDEDKDKVDLKI GAGDQGLMFGFAVDETPELMPLPIALSHRLVRRADLRKSN ELTYLRPDAKSQVTVEYDDQGPQPERVDTIVISTQHDDAVD NETIRHDVIEKVVKEVPAELLDDQTKYYINPTGRFVIGGPQ GDAGLTGRKIIVDTYGGYARHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNIV AAGLARKAEVQLAYAYIGVAQPVSISINFTGTG TVPEEELIAAVRENFDLRPAGIEMLDLRRPIYKQTAAAYGHF GRTDVDLPWEHTDKVDALKASLAK
61422	LACA16.1	Methionine adenosyltransferase	1525	2724	1199	MEKRLFTSESVSEGHDPKVADQISDAILDAMLKDPNSHV ACETIVTTGMVVFVGEISTSAYVDIQDVVRKTIKIGYDRPE LGFDDGNCAVMVDIDEQSPDIADGVDHSLETRENKSDNDEL DQIGAGDQGLMFGFAIKETPELMPLPISLSHRLMRRVASLRK DHTLEWLRPDAKQVTVEYDENGKPLCVDTVVISTQTD AEVSNEEIRRAMIDLVIKEVIPAKYLDENTKFLINPSGRFVIGGP KGDGSLTGRKIIVDTYGGYARHGGGAFSGKDPKTVDRSAS YAARYVAKNIVAAGLAYRCEVQLAYAYIGVAHPV SIMIDTAG TGTVDDELTEAVRNVFDLRPAGIIMLDLRRPIYEQTAAY GHFGRTDVDLPWEKTDKTDALLDYIKNNQ
61421	LACA15.1	Methionine adenosyltransferase	1757	2956	1199	MERRLFTSESVSEGHDPKVADQISDAILDAMLKDPNSHVA CETIVTTGMVVFVGEISTNAYVDIQDVVRKTVLKIGYDRPE LGFDDGNCAVMVDIDEQSPDIAGGVDHSLETRENKSDKDEL DQIGAGDQGLMFGFAIKETPELMPLPISLAHRLMRRVAALR KDHTLDWLRPDAKQVTVEYDENNKPLRVDTVVISTQTD AEVSNEEIRRAMIDLVIKEVIPAEYLDEKTKFLINPSGRFVIG GPKGDGSLTGRKIIVDTYGGYARHGGGAFSGKDPKTVDRS ASYAARYVAKNIVAAGLAYRCEVQLAYAYIGVAHPV SIMIDT AGTGKVDDELTEAVRNVFDLRPAGIIMLDLRRPIYEQTA AYGHFGRTDVDLPWEKTDKTDQLLDYIKDHQ

61420	LACR13.1	Methionine adenosyltransferase	1585	2769	1184	MQERHLFTSESVSEGHDPKIDQISDAILDAMLEKDPNSRV ACETTVTTGLVLVVEISTNAYVDIQSVVRGTIKKIGYTK SGFDPDSVGVVALDEQSPDIAQGVDESLEARDSDTDPLDKI GAGDQGMFVGFADDETDTYMPPLISLAHALMRQTDKLRHA GEISYLRPDAKAQVTVEYDDNEQPVRVDTVVLSVQHDPDV TLEEIRRDVEAKIIRKIIPADMMDDDTKIYVNPTGRFVLGGP QADSGLTGRKIIVDTYGGFARHGGGAFSGKDATKVDRSAS YAARYIAKNIVAAGLAKRVEVQLAYAIGVAKPVS SVNTF GTNVISEQVIEQAIRENFDLRPAGIIMLMLDKRPIYEQTAAYG HFGRTDVLDPWEHLDKVQALLKYRD
61419	LACC12.1	Methionine adenosyltransferase	1082	2266	1184	MQERHLFTSESVSEGHDPKIDQISDAILDAMLEQDPDSRV ACETTVTTGLVLVVEISTKAYVDIQSVVRGTIKKIGYTK SGFDPDSVGVVALDEQSPDIAQGVDESLEARESDTDPLDKI GAGDQGMFVGFADDETENYMPPLISLAHALMRKTDLSRHK GEISYLRPDAKAQVTVEYDDDDNPIRVDVSVVSVQHDPDV TLEEIRRDVEAKIIRTVIPEALMDDDTKIYVNPTGRFVLGGP ADSGLTGRKIIVDTYGGFARHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNVVAAGLAKRVEVQLAYAIGVAKPVS SVNTFG TSAVSENVIEQAIRENFDLRPAGIIMLMLDKRPIYEQTAAYG HFGRTDVLDPWEHLDKVQALLKYRD
61418	ENTF11.1	Methionine adenosyltransferase	25349	26542	1193	MVERHLFTSESVSEGHDPKIDQISDAILDAILKQDPTARVA CETSVTTGLVLVVEISTTAYVDIQKVVRETIKEIGYTRAKF GFDGDTAAVLVAIDEQSPDIAQGVDEALEIRDEDKDDVLDEI GAGDQGLMFGFAVDETPELMPLPIALSHRLVRRADLRKSN ELTYLRPDAKSQVTVEYDDQGPVVDVIVISTQHDDAVD NETIRHDVIEKVVKEVIPAELLDDQTKYINPTGRFVIGGPQ GDAGLTGRKIIVDTYGGYARHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNIVAAGLARKAEVQLAYAIGVAQPVSISINFTGTG TVPEEELIAAVRENFDLRPAGIEMMLDLRPIYKQTAAYGHF GRTDVLDPWEHTDKVDALKASLAK
61417	BIFB9.1	Methionine adenosyltransferase	6447	7634	1187	MKERHLFTSESVSEGHDPKIDQISDAILDALLEKDPDARVA VETSVTTGLLALVFGEISTSAYVDIQHVRETIKEIGYTDGK YGFDDGNCVAVIVALDEQSKDIAQGVDDSLIREGQVDPDQI GAGDQGLMFGFATDETPEYMPPLILSHKLMRRIAILRKDK VIKYLPRDAKAQVTVEYDADGKPVVRVDTVVVLSVQHDPDV LEQIQADVKEQVIKAVIPAAYLDDQTKYFINPTGRFVIGGPQ GDAGLTGRKIIVDTYGGAHHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNLVAAGYAKKLEIQVAYAIGVAKPVSISIDNFGT GTKSEEMIAAVRQVFDLRPAGIIMLMLDLRPIYKQTAAYG HFGRTDIDLDPWEKLDKVAELKKILG
61416	BIFB8.1	Methionine adenosyltransferase	178886	180073	1187	MKERHLFTSESVSEGHDPKIDQISDAILDALLEKDPDARVA VETSVTTGLLALVFGEISTSAYVDIQHVRETIKEIGYTDGK YGFDDGNCVAVIVALDEQSKDIAQGVDDSLIREGQVDPDQI GAGDQGLMFGFATDETPEYMPPLILSHKLMRRIAILRKDK VIKYLPRDAKAQVTVEYDADGKPVVRVDTVVVLSVQHDPDV LEQIQADVKEQVIKAVIPAAYLDDQTKYFINPTGRFVIGGPQ GDAGLTGRKIIVDTYGGAHHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNLVAAGYAKKLEIQVAYAIGVAKPVSISIDNFGT GTKSEEMIAAVRQVFDLRPAGIIMLMLDLRPIYKQTAAYG HFGRTDIDLDPWEKLDKVAELKKILG

61415	LTBC7.1	Methionine adenosyltransferase	67831	69039	1208	MRKEKRLFTSESVSEGHDPDKVADQISDAILDAILAKDPNGR VACETTVTTGLVLVVGGEISTSAAYVDIQSVVRKILEIGYNRP ELGFDGNNCAILVDIDEQSSDIAGGVNESLETRENHEDKDDL DKIGAGDQGLMFGFAIKETPELMPLPISLAHSLMRRVASLR KEGRLDWLRPDAKAQVTVEYDDDNKPKRVDTVVISTQTD ATVTNDEIREAMIDMVIKKVIPSQYLDENTKFLINPSGRFVI GGPKGDSGLTGRKIIVDTYGGYARHGGGAFSGKDLTKVDRS ASYAARYVAKNIVAADLAYQCEIQLAYAIGVAHPVSIMVDT HGTSKVSDDLVEAVRNVFDLRPAGHEMLNLRRIYRQTAA YGHFGRTDIDLPEWHTDKVEALKNYVSEHAK
		Methionine adenosyltransferase	6781	7968	1187	MKERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDALLEKDPDARVA VETSVTGLALVFGEISTSAAYVDIQHVRETIKEIGYTDGK YGFDDGNCVAVLALDEQSKDIAQGVDDSLIREGQVDPLDQI GAGDQGLMFGFATDETPEYMPLPLILSHKLMRRIAILRKDK VIKYLRPDAKAQVTVEYDADGKPVVVDVVLSTQHDPDV LEQIQADVKEQVIKAVIPAEYLDQTKYFINPTGRFVIGGPQ GDAGLTGRKIIVDTYGGAAHHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNLVAAGYAKKLEIQVAYAIGVAKPVSISIDNFGT GTKSEEMIAAVRQVFDLRPAGIHKMLDLQRPIYKQTAAYG HFGRTDIDLPEWELDKVAELKKILG
61414	LPAR6.1	Methionine adenosyltransferase	63185	64369	1184	MQERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDAMLEQDPDSRV ACETTVTTGLVLVVGGEISTKAYVDIQSVVRGTIKKIGYTK SGFDPDSVGLVALDEQSPDIAQGVDESLEARESDDPLDKI GAGDQGMFGFAIDETENYMPPLISLAHALMRKTDSLRRH GEISYLRPDAKAQVTVEYDDDNPIRVDSVVSVQHDPDVT LEEIRRDVEAKIIRTVIPEALMDDDTKIYVNPTGRFVLGGPQ ADSGLTGRKIIVDTYGGFARHGGGAFSGKDATKVDRSASY AARYIAKNVV AAGLAKRVEVQLAYAIGVAKPVS SVNFTG TSAVSENVEQAIRENFDLRPAGIHKMLDLKRPIYEQTAAAYG HFGRTDIDLPEWELDKVQALLKYRD
61413	LTBC5.1	Methionine adenosyltransferase	322812	323999	1187	MSERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDAMLAQDPQARV AVETSVTGLVLVVFGEVSTKAYVDIQKVVRDTIKSIGYVDG QYGFDDGNCVAVLVLDEQSPDIAQGVDDSLSTRSGDADPLD QIGAGDQGMFGYAINETPELMPLPIALSHRLMRKIAALRK DGTIKWLRPDAKAQVTVEYDEDNQPKRIDTVVLSTQHDPD VDLDTIRQTVIDQVIKAVLPADLLDDQTKYLVNPTGRFVIGG PQGDAGLTGRKVIIVDTYGGFAHHGGGAFSGKDATKVDRSA SYAARYIAKNVV AAGLADQVEVQLAYAIGVAEPVSIADVDT AGTGKVSDEALINAIRENFDLRPAGIHKMLDLQRPIYRQTAA YGHFGRTDIDLPEWHTDKVDALKAAAFK
61412	LACP4.1	Methionine adenosyltransferase	69483	70670	1187	MSERHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAILDAMLAQDPQARV AVETSVTGLVLVVFGEVSTKAYVDIQKVVRDTIKSIGYVDG QYGFDDGNCVAVLVLDEQSPDIAQGVDDSLSTRSGDADPLD QIGAGDQGMFGYAINETPELMPLPIALSHRLMRKIAALRK DGTIKWLRPDAKAQVTVEYDEDNQPKRIDTVVLSTQHDPD VDLDTIRQTVIDQVIKAVLPADLLDDQTKYLVNPTGRFVIGG PQGDAGLTGRKVIIVDTYGGFAHHGGGAFSGKDATKVDRSA SYAARYIAKNVV AAGLADQVEVQLAYAIGVAEPVSIADVDT AGTGKVSDEALINAIRENFDLRPAGIHKMLDLQRPIYRQTAA YGHFGRTDIDLPEWHTDKVDALKAAAFK

61411	BIFB3.1	Methionine adenosyltransferase	117201	118421	1220	MTEEHRLISAESVTEGHPDKVCDQISDAILDDLLAQDPSSHV AVETSAATGVFLVFGVETSEGYCDVQSKVRETLRNIGYTSS EVGLDADSCGVVVVAITEQSAEINQGVARLTGAQETAASREE RYEAQGAGDQGV MFGYATDETPTLMPLPIYLAHRLAFRLTE VRKSGEVPHLRPDGKTQVTIEYDDNDRPVRLDTVLISTQHDF EVTQDWLAVELKKHVIAPVLDEVLGSKVPHDNRYQLVNP GSFVILGGPAADAGLTGRKIIVDTYGGAAHHGGGAFSGKDP KVDRSAAYATRWVAKNIVAAGLAHKVEIQVAY AIGVADPV SINVETFGTEQGVTRGQIAAAVRKVFDLRPAAIIDELDLKRPI YLKTAAYGHFGRTDVEFPWEKTDKVEELKAAIAGE
		Methionine adenosyltransferase	365	493	128	MLDLRRPIYKQTAAYGHFGRTDV DLPWEHTDKVDALKASL AK
61410	BIFB1.1	Methionine adenosyltransferase	303702	304922	1220	MTEEHRLISAESVTEGHPDKVCDQISDAILDDLLAQDSSSHV AVETSAATGVFLIFGEVTSKGYCDVQSKVRETLRNIGYTSS EVGLDADSCGVVVVAITEQSAEINQGVARLTGDQETAASREE RYEAQGAGDQGV MFGYATDETPTLMPLPIYLAHRLAFRLTE VRKSGEVPHLRPDGKTQVTIEYDDDDKPVRLDTVLISTQHD PEVTQDWLAVELKKHVIDPVLDEVLGSKVPHDNRYQLVNP TGSFILGGPAADAGLTGRKIIVDTYGGAAHHGGGAFSGKDP KVDRSAAYATRWVAKNIVAAGLAHKVEIQIAY AIGVADPV VNVETFGTEQGVTRGQIAAAVRKVFDLRPAAIIDELDLKRPI YLKTAAYGHFGRTDVEFPWEKTDKVEELKAAIAAE



glyoxalase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBGN41.1	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein	70218	70982	764	MDSWFTVEQIDQDTFVISEYRHWEEETHCYLLCGTKRAILIDT GLGVSNIREVIDGLTKLPVTVITTHVHWDHIGGHHKYFRSIAV HEAEKEWLSVKFPIPLQVVKNNIMCNPCDFPSDFNVEKYQIF QGVVPQMLHDEDCIDLGNRKLVIHTPGHSPGHCCFYEADRK YLYSGDLIYSGCLDAFYPTNPQEFWKSVRKIQSLKISRILPG HHHLSIPVTIIDKIETAFHNLSNEGKLGKQNGGIFSYEGFQIHI
61427	LACF21.1	Lactoylglutathione lyase	12956	13348	392	MKMRRIDHVLPVADLNVARRFYHEVDFMPVLDQQSTDDV VTLRCGHLIRLEKVDKSDLVATKLVPGAADLCLVAGDDM DAIVHHLRSYFVDLVAGPVAKNGAEGPMTSVYLRDPDQNL EIAVYENK
		uncharacterized protein	12234	12944	710	MKINKISNIYQLAFLRHVFPINCYLIDETQGLTLIDTGMGFCK NGLKEAKKLGKPKITKIILTHPHVDHIGSLDSVKNEYPGASVY VSARDARLMNGDFSLNKTEPKLRVKGGFNSKVKTTPDVL NTGNMIGSLKVIAAPGHTPGSIVLYQQTSKTLFAGDTMVTH GGIFIAGGGSWIFPFSAKATWDKELAIKSMESINKLPIEWLM VRHGKLINHANSKIGQAIQHAKAALS
		Glyoxalase	27025	27699	674	MKKVLIVETNITRYQGTNEPTGLWLGEAAEFVDEMHAQAI AVDYVSPNGGFVPLDPRSMKYTDAATMAVYEDSDFINRAL KNTLKPSQVDPDDYTAIYYTGGHGMWDFPDNPELQAIAL AIYQHGGYVTSVCHGIAGLLNIKDQGTQGYLIAGKTITGFTAT EELIAGKKRIVPFLNRERATAHGAIFSQHRFYREYAITDGQLI TGQNPFSARAVARQLIAKL
		Lactoylglutathione lyase	33565	34014	449	MVHAKSDEYDTFNNELFLKGFELVNIRDIDHLLTLTVTDIARS LRFYHEVFDLPIVTFDGDRAVLVVGKQKINFQTTNQPHPQPIA AKPTPGSADLCLIAKDNIDDIQHHLKSYFVDVITGPVERTGA HGKLTSLYVRDPDNNLIEISNYH
61426	LACP20.1	Glyoxalase	166461	167135	674	MKKVLIVETNITRYQGTNEPTGLWLGEAAEFVDEMHAQAI AVDYVSPNGGFVPLDPRSMKYTDAATMAVYEDSDFINRAL KNTLKPSQVDPDDYTAIYYTGGHGMWDFPDNPELQAIAL AIYQHGGYVTSVCHGIAGLLNIKDQGTQGYLIAGKTITGFTAT EELIAGKKRIVPFLNRERATAHGAIFSQHRFYREYAITDGQLI TGQNPFSARAVARQLIAKL
		Lactoylglutathione lyase	72294	72743	449	MVHAKSDEYDTFNNELFLKGFELVNIRDIDHLLTLTVTDIARS LRFYHEVFDLPIVTFDGDRAVLVVGKQKINFQTTNQPHPQPIA AKPTPGSADLCLIAKDNIDDIQHHLKSYFVDVITGPVERTGA HGKLTSLYVRDPDNNLIEISNYH
		uncharacterized protein	4021	4731	710	MKINKISNIYQLAFLRHVFPINCYLIDETQGLTLIDTGMGFCK NGLKEAKKLGKPKITKIILTHPHVDHIGSLDSVKNEYPGASVY VSARDARLMNGDFSLNKTEPKLRVKGGFNSKVKTTPDVL NTGNMIGSLKVIAAPGHTPGSIVLYQQTSKTLFAGDTMVTH GGIFIAGGGSWIFPFSAKATWDKELAIKSMESINKLPIEWLM VRHGKLINHANSKIGQAIQHAKAALS
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACP18.1	Lactoylglutathione lyase	131195	131587	392	MKMRRIDHVLPVADLNVARRFYHEVDFMPVIDQQSTDDV VTLRCGHLIRLEKVDKSDLVATKLVPGAADLCLVAGDDM DAIVHHLRSYFVDLVAGPVAKNGAEGPMTSVYLRDPDQNL EIAVYENK

61423	PIFP17.1	Lactoylglutathione lyase	989	1360	371	MKMAHTCVRVKDLEASIEFYQKAFGFEESSRRRDFPENKFTLVYLTLPGDDYELELTYNVDHGSYDLGNGYGHIAIAADDLEKLHEQHKAAAGLEITDLKGLPGTAPSYFVIDPDGYKIEVIRG
		D-lactate dehydratase	1340	2017	677	MKKILIVETNVNQYKGTNKAATGLWLGETVEFLAEIYKYQFEADFVSPGGYVPIDPRSMKNLSDVMDIYSNATFIEKGLRNTLSPANVKSEDIYAIYFTGGHGVMMWDFPENNALQKIASDIYESNGYVLSVCHGIAGLLNIRLANNDYLIANKKLTGFTKTEERLAMKSKVVPFDNEEMTVKRKGHFVKKRFKSHVVKDGHLLITGQNPYSTRELARTFIKEVI
61422	LACA16.1	없음				
61421	LACA15.1	없음				
61420	LACR13.1	없음				
61419	LACC12.1	없음				
61418	ENTF11.1	Lactoylglutathione lyase	110074	110445	371	MKMAHTCVRVKDLEASIEFYQKAFGFEESSRRRDFPENKFTLVYLTLPGDDYELELTYNVDHGSYDLGNGYGHIAIAADDLEKLHEQHKAAAGLEITDLKGLPGTTPSYFVIDPDGYKIEVIRG
61417	BIFB9.1	Lactoylglutathione lyase	3376	3768	392	MKMRRIDHVVLVADLNVARRFYHEVFDMPVLDQQSTDDVVTLCRGGHQLIRLEKVDSDVATKLVPGAADLCLVAGDDMDAIVHHLRSYFVDLVAGPVAKNGAEGPMTSVYLRDPDQNLIEIAVYENK
61416	BIFB8.1	Lactoylglutathione lyase	3798	4190	392	MKMRRIDHVVLVADLNVARRFYHEVFDMPVLDQRSSTDDVVTLCRGGHQLICLEKVDSDVATKLVPGAADLCLVAGDDMDAIVHHLRSYFVDLVAGPVAKNGAEGPMTSVYLRDPDQNLIEIAVYENK
61415	LTBC7.1	Lactoylglutathione lyase	14782	15210	428	MNGKIGKEEIGSMKMRRIDHVVLVADLNVARRFYHEVFDMPVLDQQSTDDVVTLCRGGHQLICLEKVDSDVATKLVPGAADLCLVAGDDMDAIVHHLRSYFVDLVAGPVAKNGAEGPMTSVYLRDPDQNLIEIAVYENK
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	Glyoxalase	331752	332426	674	MKKVLIVETNITRYQGTNEPTGLWLGEAAEFVDEMQAQIAVDYVSPNGGFVPLDPRSMKYTDAATMAVYEDSDFINRALKNTLKPSQVDPDDYTAIYYTGGHGVMMWDFPDNPELQAIALAIYQHGGYVTSVCHGIAGLLNIKDQGTGQYLIAGKTITGFTATEELIAGKKRIVPFLNRERATAHGAIFSQHRFYREYAITDGQLITGQNPFSARAVARQLIAKL
		Lactoylglutathione lyase	228446	228895	449	MVHAKSDEYDTFNNEFLKGFELVNIRDIDHLTLTVDIARSLRFYHEVFDLPIVTFDGDRAVLVGKQKINFQTTNQPHQPIAAKPTPGSADLCLIAKDNIDDIQHHLKSYFVDVIAGPVERTGAHGKLTSLYVRDPDNNLIEISNYH
61412	LACP4.1	Glyoxalase	166461	167135	674	MKKVLIVETNITRYQGTNEPTGLWLGEAAEFVDEMQAQIAVDYVSPNGGFVPLDPRSMKYTDAATMAVYEDSDFINRALKNTLKPSQVDPDDYTAIYYTGGHGVMMWDFPDNPELQAIALAIYQHGGYVTSVCHGIAGLLNIKDQGTGQYLIAGKTITGFTATEELIAGKKRIVPFLNRERATAHGAIFSQHRFYREYAITDGQLITGQNPFSARAVARQLIAKL
		Lactoylglutathione lyase	74698	75147	449	MVHAKSDEYDTFNNEFLKGFELVNIRDIDHLTLTVDIARSLRFYHEVFDLPIVTFDGDRAVLVGKQKINFQTTNQPHQPIAAKPTPGSADLCLIAKDNIDDIQHHLKSYFVDVITGPVERTGAHGKLTSLYVRDPDNNLIEISNYH
61411	BIFB3.1	없음				
61410	BIFL1.1	없음				

rhamnose						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBGN4.1	Lactose phosphotransfer ase system repressor	11369 0	114493	803	MISSQRQHLLSRLRTRGAVRITALSKELGVSAMTIRRDIALD SDKGLLKRVHGGAVSTSALLSEPLFSVKSQMDIGLKDAIAR EAVQYVAPGDVIAIGGGTTAYVFAQHLLSQASGITILTNS IPVAELVQALESKDVEVIVTGGVTTRSNSLVGPIADKVIASL RVNTVFLGTHSVSIPRGFLMPNSLEAATDMAMMGADRTVI LTDHTKWSCSTLSLFFARFDQVDTVITDDGLDHESIAKTRDL VKELVLAHQSEHTEESE
		UDP-N-acetylgl ucosamine--un decaprenyl-phos phateN-acetylgl ucosaminephosp hotransferase	58280	59461	1181	MRIYLLIAAIAGGVTWLVTPLRHVAIHIGAVGEVRARDVHT IPTPRMGGLGMLIGFAFAMIYSSRIAFTTGLFENNNQEWVIL AGAVLICLLGMADDLWDLWMLKMAGQLLISVFFVAWGGL QIISLPLGSLITASPSISVTITAILVASINAVNFVDGLDGLAAG IVAIGGVAFAAYSYIARNSPSYASMATLIDVAMVGCIVGFIL HNWHPAKLFMGDSGSMMLGYLITCASIVMTGRLDPASIHAS VYLPVEMPILLPILVFLPVLDMCLAIVRRLSHGQSPMHPDR MHLHHRMLRIGHTVQGA VLLWGWAALIAVGSIMTLFFKV HYVLIGFVIAVLLTVATMYPYLKRRLPEIAAENQSYASAR RRARHSFDES GDGKRRP
		Lactaldehyde reductase	11828 3	119434	1151	MVYRMIFNQTAYFGRGAIKEIPAVAKSHGFTKAFIVTDPILL KTGTVKKVTDVLEAGLPYEVFDNVKPNPPVECIQDGVKKK FAESGADFLIGLGGGSPQDTCKGIGIITANPEFADVLSLEGVA DTKNPSVPVIFGVPTTAGTASETTINYVVVTDANKRKFVAV DPHDIPVAFVDPDLTDTMPRGLKVATGLDALTHAIEGYITP GAWSLSDCLSMQTIRMIKLNLAKSADGDVPAGEQMAYASY ITGMAYSNVGLGLVHGMAHPLGGRLGVAHGVANGILLAPV MEYNKDFTEKEYRDIADAFGIEDAYTGDKLEKVVREAVQAV HQLTVDLKNPTTISEVGATEADLAPLAHDAFNDVCPGNPR KATEEDILKIY TSLM
		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	11520 8	116233	1025	MAYGGVFEPRNILVTGGCGFIGANFVRYVARNHPYAHIHTVL DKLTYAGNPENIAGLPPSQVDLVVGDICDVALLERIVPGHDA IVHFAAESHNDNSIANPEPFIRTNVEGTMRLLEAARQHDVR FHHISTDEVYGDALDDPARFTEDTPYRPPSSPYSASKASSD HLVRAWVRTYGLRATISNCSNNGPYQHVEKFIPRQITSIME GARPKLYGTGENVRDWIHTEDHSRAVWAILTRGRIGETYLI GADGEMSNIAVLRMILQLMGQPEDAFDWVRDRPGHDDRYAI DASKLRAELGWSPMHTDFASGLRNVIDWYAEHRDWWAPA KEATEARYRAQQQ
		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	13928 9	140338	1049	MQPCRYSEIVSSEFFKPRNIIVTGGCGFIGANFVRYVARNHT DVRTVLDKLTAGNPQNIAGLPQSQVELVQGDICDVALLER IVPGHDAIVHFAAESHNDNSIANPEPFITTNVEGTFHLLAA RKHDVRFHHISTDEVYGDALDDPCKFTESTTYKPPSSPYS SKAASDQLARAWVRTYGLRATISNCSNNGPYQHVEKFIPR QITSIMEGVRPKLYGTGENVRDWIHTEGHSSAVWEILTRGRI GETYLIGADGEMSNVAVMRMLRLMGAEDAFAFDWVRDRPG HDDRYAIDSSKLRTELGWKPVHTDFEAGLQATIAWYVANR VWWEPAKAAATEARYRAQQQ

61427	LACF21.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	11981	12913	932	MNILVTGGAGFIGSHFLRYQLSHYPTDRVVNLDCLTYAGNL ANVADLASTPRYHFIQGDIRDAAATVSEVLATHQIDVVVNF AESHVDRSIEDPAPFVSTNVVGVQVLLDACRRAQVRLVQVS TDEVYGSIVAGRVDEEAPLQPSPPYAATKASADLLAMAAH HTFGQDVVITRSANNYGPNQHPEKLVPMIITNDYQQRPLTIQ GAGDDIRDWLYVVDNQCQIDLVMRKGVA GEVYNIGGFERR TVLEVVASLQALLGFPPDSQVVHVAERLGHDRHYAVDDTKL RRALGWQPSTSLAAGLTKTVRALQH
61426	LACP20.1	없음				
61425	BIFB18.1	UDP-N-acetylgl ucosamine--un decaprenyl-phos phateN-acetylgl ucosaminephosp hotransferase	24703 9	248322	1283	MRIYLLIAAIAGGVTVLVTPLIRHVAIEIGAVGEVRARDVHTI PTPRMGGLGMLIGFAVATVVFASRLPFLSGLFNGNYQMWVIL AGGIMISLGMADDLWDLWMLKLAGQLLISVFWAWGGLQI ISLPLGSLITASPSLSMAIT AFLIVASINAVNFVDGLDGLAA GIVAIGGIAFAAYSIIARSSPSYASLATALIDVMMVGCVGF LHNWHPAKLFMGDSGSMMLLGYLITCASIVMTGRLLDPASIH SIYLPVFMPIILPILVFLPVLDMCLAIVRRLAKGQSPMHPDR MHLHHRMLKIGHSVRGAVLILWGWAALIAFGSLTILFFKAQ HVAVGMPIAVVVLTIAATMYPYLRHRIPEIQAENLTLESARK NAQHATVKSQSAVGESRDSIGSQAADSM TDPADSRDSQA GEVQDPAADK
		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	10754 5	108567	1022	MAEELFTPHNIIVTGGCGFIGSNFVHYVYNNHPD VHVTVLD ALTYAGNLENIRGLGDRVEFVHGNICDAELLDKIVPGHDAIV HYAAESHNDNSIANPEPFLKTNVEGTFRLEAARKYDVR HHVSTDEVYGDALDDPAKFTEQTPYHPSSPYSSTKASSDL LVRAWHRFTFGIRATISNCSNNGPFQHVKEKFI PRQITNVLEG LRPKLYNGENVRDWHITDDHSTGVWTLTKGRLGETYLI ANGERNNITVLRDILTVMGQDPDAFDWVKDRPGHDRRYAID STKLRTTELGWKPTHTDFQKGLEQTIKWYTDNRAWWEP AAATEAKYKQQGQ
		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	536	1558	1022	MADEVFSPKNVIVTGGCGFIGSNFVHYVYDHPDVHVTVL DALTYAGNLENIRPILGDRVEFVHGNICDAELLDKIVPGHDAI VHYAAESHNDNSIANPEPFLKTNVEGTFRLEAARKYDVR YHHVSTDEVYGDALDDPAKF TERTPYHPSSPYSSTKASS DLLVRAWHRFTFGIRATISNCSNNGPYQHVEKFI PRQITNILE GLKPKLYNGENVRDWHITDDHSTGVWTLTKGRLGETYLI GANGERNNITVLRDILTVMGQDPDAFDWVKDRPGHDRRYA IDSTKLRTTELGWKPTHTDFQKGLEQTIKWYDPDNRAWWEP KAATEAKYKQQGQ
61424	LACF18.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	12242	12835	593	MNILVTGGAGFIGSHFLRYQLSHYPTDRVVNLDCLTYAGNL ANVADLASTPRYHFIQGDIRDAAATVSEVLATHQIDVVVNF AESHVDRSIEDPAPFVSTNVVGVQVLLDACRRAQVRLVQVS TDEVYGSIVAGRVDEEAPLQPSPPYAATKASADLLAMAAH HTFGQDVVITRSANNYGPNQHPEKLVPMIITNDY
61423	PIFP17.1	UDP-N-acetylgl ucosamine--un decaprenyl-phos phateN-acetylgl ucosaminephosp hotransferase	32883 8	329998	1160	MRIYLFIAAIAGGVTYLITPLIRHIAIEIGAVGEVRARDVHTIP TPRLGGLGMLIGFTVSM LFASRIPFIQGLFAQSQQA WVILAG AIMISLGMADDLWDLWMLKLAGQLLISVFWAWGGLQIIS LPLGSLVTASPSLSMAIT AFLIVASINAVNFVDGLDGLSSGIV AIGGIAFAIYSIIARNSPSYASMATLIDIAMVGM CVGFLMH NWHPAKLFMGDSGSMMLLGYLITCASIVMTGRLLDPASIHASI YLPVFMPIILPILVFLPILDMCLAIVRRLRKGQSPMHPDRMH LHHRMLRIGHSVQGA V LILWGWAALIAFGSIMTLFFKAQYV LVGFLLAAVVLTVAATMYPYVKHRIPEMLEDAADGGRRHAS VRSSKRRKN

		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	4133	5185	1052	MMQPCQYPEMVSSSEIFKPRNIIVTGGCGFIGANFVRYVAHNH PDVRITVLDKLTAGNPQNIAGLPQSQVELVQGDCDAALLE RIVPGHDAIVHFAAESHNDNSIANPEPFITNVEGTFHLEAA RKHDVRFHHISTDEVYGDALDDPCKFTTESTPYKPSPPYSAS KAASDQLVRAWVRTYGLRATISNCSNNYGPYQHVEKFIQRQI TSIMEGVRPKLYGTGENVRDWHITEDHSSAVWKLTRGRIGE TYLIGADGEMSNIAVMRMILRLMGCAEDAFDWVRDRPGHDR RYAIDSSKLRTELGWKPVRTDFEAGLQATIAWYAANRAWW EPAKAATEARYRAQQG
61422	LACA16.1	없음				
61421	LACA15.1	dTDP-4-dehydr orhamnose reductase	908	1180	272	MISIQTKLRICYSWYDFTKIYRQAGYDTKVTPVTTAEYGLS KAVRPFNSRLDKSKLVKNGFKPLTPWDAVHRYLEILKKQG FFDELNK
		dTDP-4-dehydr orhamnose reductase	2373	2864	491	MRIAWVFGVNGSNFIKTMLKVGSNHDEVKVVDDQIGTPIYT FDLARLLVDMIEETDKYGYHATNSELPTASGYDENGTKTG YISWYDFTKIYRQAGYDTKVTPVTTAEYGLSKAVRPFNSR LDKSKLVENGFKPLPLWTDVAVSRYLEILKKQGGFFDELDNK
61420	LACR13.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	1383	2408	1025	MKLMITGGAGFIGSNFVHFVYQHHPDVQIMVLDKLTAGNK ANIEDVLGDRVKLVVGGDIADKELVDQLMGQVDTVVNFAAES HNDNSLINPDPFLHSNVIGTYTLLEAARKYDVRFHISTDEV YGDPLREDLPGHGEGPGEKFTINSRYNPSSPYSSTKAASDM LVHAWARSFGVRATISNCSNNYGPYQHIEKFIPRQITNLSG KPKLYGTGKNVRDWHITNDHSSAIWDILTGGKIGETYLIGAN GEQDNKTVLELILKLMGKPTDYDQVKDRPGHDMRYAIDAS KTREELGWKPQYDFEGLADTIKWYTDHRSWWQDEKSA VEAKYKKNSSQ
		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	3982	5007	1025	MKLMITGGAGFIGSNFVHFVYKNHPDVQIMVLDKLTAGNK ANIEDVLGDRVKLVVGGDIADKELVDQLMGQVDTVVNFAAES HNDNSLINPDPFLHSNVIGTYTLLEAARKYDVRFHISTDEV YGDPLREDLPGHGEGPGEKFTINSRYNPSSPYSSTKAASDM LVHAWARSFGVRATISNCSNNYGPYQHIEKFIPRQITNLSG KPKLYGTGKNVRDWHITNDHSSAIWDILTGGKIGETYLIGAN GEQDNKTVLELILKLMGKPTDYDQVKDRPGHDMRYAIDAS KTREELGWKPQYDFEGLADTIKWYTDHRSWWQDEKSA VEAKYKQNGG
61419	LACC12.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	38464	39489	1025	MKLMITGGAGFIGSNFVHFVYKNHPDVQIMVLDKLTAGNK ANIADLLGDRVQLVGGDIADKEVVDKWMKVDTVVNFAAE SHNDNSLINPDPFLHSNVIGTYTLLEAARKYDVRFHISTDEV YGDPLREDLPGHGEGPGEKFTINSRYNPSSPYSSTKAASDM MLVHAWARSFGVRATISNCSNNYGPYQHIEKFIPRQITNLSG IKPKLYGTGKNVRDWHITNDHSSAIWDILTGGKIGETYLIGA NGEKDNKTVLELILKLMGKPTDYDQVKDRPGHDMRYAID ASKTREELGWKPQYDFEGLADTIKWYTEHRDWWQDEK AAVEEKYQEHGQ
61418	ENTF11.1	없음				
61417	BIFB9.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	4796	5752	956	MMFLRLLVTGGAGFIGSHFIDYELAHDQSIEIVNLDALTYAG NVANNAQAAGNARYHFVHGSINNRELVDWLLQEFADHIVN FAAESHVDNSLKNPELFTKTNVLGTQVLLDAAYQANIQKFI QISTDEVYGTMAPGQAAKETDPLYPSSPYAASKAGADMLA MAMVHTFGMPICITRSTNNGFPRQHHEKLLSMLIQNALRNR PLTIYGGQTDRRDWLYVKDNCAIDLVLRHGQLGQIFNIGAH QEKSNNNEVTKMVQMELGFSQDLIRHV AERPGHDLRYSLDT QIETQLHWKSQTDFVVLGLQETIAWYRKHQR

		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	1944	2876	932	MNILVTGGAGFIGSHFLRYQLSHYPTDRVVNLDCLTYAGNL ANVADLASTPRYHFIQGDIRDAA TVSEVLATHQIDVVVNF AESHVDRSIEDPAPFVSTNVVGVQVLLDACRRAQVRLVQVS TDEVYGSIVAGRVDEEAPLQSSPYAATKASADLLAMA HTFGQDVVITRSANNYGPNQHPEKLVPMITNARQQRPLTIQ GAGDDIRDWLYVVDNCAIDLVMRKGVEGEVYNIIGGFERR VLEVVASLQALLGFPDSQVVHVAERLGHDRHYAVDDTKLR RALGWRPSTSLAAGLTQTVRALQH
61416	BIFB8.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	19748	20680	932	MNILVTGGAGFIGSHFLRYQLSHYPADRVVNLDCLTYAGNL ANVADLASNPRYHFIQGDIRDAA TVSEVLATHQIDVVVNF AESHVDRSIEDPAPFVSTNVVGVQVLLDACRRAQVRLVQVS TDEVYGSIVAGRVDEEAPLQSSQYAATKASADLLAMA HTFGQDVVITRSANNYGPNQHPEKLVPMITNARQQRPLTIQ GAGDDIRDWLYVVDNCAIDLVMRKGVAGEVYNIIGGFERR VLEVVASLQALLGFPDSQVVHVAERLGHDRHYAVDDTKLC RALGWRPSSISLAAGLTQTVRALQH
61415	LTBC7.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	4116	5153	1037	MKVIVTGGAGFIGSNFIFYMLKKHPDYEIICLDSLTYAGNLST LKDVMNDNPNFKFVKLDIRDREGVYKLFEEKPDVVVNF SHVDRSIENPEIFLETNIIGTSVLMDACRKYGIKRFHQVSTDE VYGDLPDLRDLFFHEDTPLHTSSPYSSSKASADLLV RTFHLPTVITRSCSNNGPYQFPEKLIPLMIQRALNNEKLPVYG DGKNVRDWLYVEDHCKAIDLILEKGTPEVYNIIGGHNEMHN IDIVKLICDYLDKPYSLIEHV TDRKGGHRRY AIDPEKIHNELG WLPETMFKDGIKKTIQWYLDNKEWENIISGDYQNYDEM YGKKQVLDKD
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	없음				
61412	LACP4.1	없음				
61411	BIFB3.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	9348	10370	1022	MTQEVFTPKNIIVTGGCGFIGSNFVHYVYNNHPDVHITVLD LTYAGNLDNIKPLLGDRVDFVHGNICDAELLDKLVPGHDAIV HYAAESHNDNSIANPEPFLKTNVEGTFRLLAARKYDVR HVS TDEVYGDALDDPHKFTEETPYHPSSPYSSTKASSD VRAWHRTFGVRMTISNCSNNGPYQHVEKFIQRQITNILEGI RPKLYGDGLNVRDWIHTDDHSSAVWTILTKGVLGETYLIG NGERNNITVLKDILEVMGKAPNDFDHVKDRPGHRRY AID TKLQTELGWKPRHTDFQSGLEHTIRWYTDNRDWWEPVKA ATEAKYKQQGQ
61410	BIFL1.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	3501	4523	1022	MTQEVFTPKNIIVTGGCGFIGSNFVHYVYNNHPDVHITVLD LTYAGNLDNIKSLGDRVDFVHGNICDAELLDKLVPGHDAIV HYAAESHNDNSIANPEPFLKTNVEGTFRLLAARKYDVR HVS TDEVYGDALDDPHKFTEETPYHPSSPYSSTKASSD VRAWHRTFGVRMTISNCSNNGPYQHVEKFIQRQITNILEGI RPKLYGDGLNVRDWIHTDDHSSAVWTILTKGVLGETYLIG NGERNNITVLKDILEVMGKSPDDFDHVKDRPGHRRY AID TKLQTELGWKPLHTNFQSGLEHTIKWYTDNRDWWEPVKA ATEAKYKQQGQ

Alpha-L-rhamnosidase

sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBDN41.1	없음				
61427	LACF21.1	Alpha-L-rhamnosidase	8240	8812	572	MTVTFSNEDDHKFKHLTDQCFTANPKLLTKANISVPLTTRT IQPRRYLVVTKINQATLATATWQPVTGAIALHKHERLIYDLG ALYVGHFQVAIDVAGSPMDAPLLMRTRFAEQLQELSV DASR VTSWLPATAWIQDDTRHVLELLPTTVQFERRYSORYMILEPVG QSLKWQPV LADAEFEEIIDDFRQAA
		Alpha-L-rhamnosidase	5646	7598	1952	MSKEAVWLWYPGDFEIHQGM LQNFKREERGMGWPAWYI DDCNRNVNFKRHYDLKESTQFTVLAKGTGYVDVNGTKYRL NHAINCDAGATDIQVFVGNVQGLPTIYIVGEIHKSDSGWLASN FVTTLPAGHDILYTDNRQDPNVIEYRTEKVVAKAQQAVDGG VLYDFGRAVNGTVTVKTNGPVTLCYGESETEARDVEMCYI KQSDVTATTKVRKRAFRYVFPVPHCQLGDIELTAMHEYIPKN NPSSTSDNKLINQIWNVATETLNLCSDLFFIDGKRDRIWI AGDAYQANFINQYSFFNEDIDKRTLLALRGQDDIKQHMTIV DYSMLWVIGVLNHYQMTGDREFLKIYPKLESMVQYFIQQT NEHGFYGRKNDWIFVDWSEMDKQGTVA AEQILLEDYKTI MTCGEVLGKDVAGYQAKYDQLFKNLKMYFWDDEQGA FIDS YESGKRHVTRHANIFAILFDVV DENKQQLILKNVLLNNAITQI TTPYFKFFEQDALCKLGEQHRVYQVLLDYWGGMLDRGAVT FWEEDPSQHGKDMYAMYGDYKSLCHAWGASPIYLLGR HFVGLRPTAPGYQTFEIKPELSEFHHLHTVLPKGGTVTVVK DQHQLSVTASRAGGTLIVDGQRQSLEPNRTAVVPV
		Alpha-L-rhamnosidase	2691	4268	1577	MAFTFQINNDVQFRHNQALLDKSASYRPILKETQVKAASIV ALERDTQYLEGWGVKQIAPIERLSSYELKRDDQIIIDFGDHQV GQFSININAVGSPMDAPLCFKIKFAEMPAELARKSEYDGLW SKSWIQEETVHLDVLP TTLPRRYSFRYA EITVVDTS PKW RAVFSNPVVTATS AVDTATVHQPELADAQLQRIYEVGLKTL ADCMQDVFEDGPKRDRRLWIGDLRLQALANYATFKD TDLV KRCLYLFGAMP TTAGRIPANVFTKPTAVPDDTFLFDYSLFFI SILADYEA FSSDKTVLNDLYRVAKKQMDLALAQVTSEGLK LTEENPVFIDWSNDFDKETAGQAIIYTLKQFITLAELVNDTS LETYTAILRKLNQYAKTQLFDSQSGLFVSGDQREVNVA SQV WMTLAHVLDPEQTTALMQTTVTKLFPITGIATPYMYHHIT EALFEAGLKQEAVQLMKDYWGKMITLGADTYWEAFDPNQP DYSPYGGPILNSYCHAWSCPTVYLINKYLV
61426	LACP20.1	Alpha-L-rhamnosidase	41760	42332	572	MTVTFSNEDDHKFKHLTDQCFTANPKLLTKANISVPLTTRT IQPRRYLVVTKINQATLATATWQPVTGAIALHKHERLIYDLG ALYVGHFQVAIDVAGSPMDAPLLMRTRFAEQLQELSV DASR VTSWLPATAWIQDDTRHVLELLPTTVQFERRYSORYMILEPVG QSLKWQPV LADAEFEEIIDDFRQAA

		Alpha-L-rhamn osidase	7089	9041	1952	MSKEAVWLWYPGDFEIHQGMQLQNFKREERGMGWPA YWYI DDCNRNVNFKRHYDLKESTQFTVLAKGTGYVDVNGTKYR LNHAINCDAGATDIQVFGVNVQGLPTIYIVGEIKSDSGWLA SNFVT TLPAGHDILY TDRNQDPNVIEYRTEKVVAKAQQAV DGGVLYDFGRAVNGTVTVKTNPGVTVLCYGESE TEARDVE MCYYKQSDVTATTKVRKRAFRYVFPVPHCQLGDIELTAMH EYIPKNNPSSFTSDNKLINQIWNVA TETLNLCSDLFFIDGIKR DRWIWAGDAYQANFINQYSFFNEDIDKRTLLALRGDDIKQ HMNTIVDYSMLWVIGVLNHYQMTGDREFLKIIYPKLESMV QYFIQQTNEHGFYGRKNDWIFVDWSEMDKQGTVA AEQILL LEDYKTIMTCGEVLGKDVAGYQAKYDQLFKNLMKYFWDD EQGAFIDSYESGKRHVTRHANIFAILFDVVDENKQQLILKNV LLNNAITQITTPYFKFFEQDALCKLGEQHRVYQVLLDYWGG MLDRGAVTFWEEFDPSEQHGKDMYAMYGDPYGHSLCHAW GASPIYLLGRHFVGLRPTAPGYQTFEIKPELSEFHHLTVLPI KGGTVTVVKDQHQLSVTASRAGGTLIVDGQRQSLEPNRTA VVPV
		Alpha-L-rhamn osidase	10419	11996	1577	MAFTFQINNDVQFRHNQALLDKSASYRPILKETQVKAASIV ALERDTQYLEGWGVKQIAPIERLSSYELKRDDQIIDFGDHQ VGQFSININAVGSPMDAPLCFKIKFAEMPAELARKSEYDYG WLSKSWIQEETVHLDVLP TLLTLPRRYSFYAEITVVDTSF KWRAVFSNPVVTATSAVDATVHQPELADAQLQRIYEVG LKTLDACMQDVFEDGPKRDRRLWIGDLRLQALANYATFKD TDLVKRCLYLFGAMP TTAGRIPANVFTKPTAVPDDTFLFD YSLFFISILADYEAFFSSDKTVLNDLYRVAKKQMDLALAQV T SEGKLLKTEENPVFIDWSNDFDKETAGQAI IYTLKQFITLA ELVNDTSLETYTALRKL NQYAKTQLFDSQSGLFVSGDQRE VNVASQVWMTLAHVLDPEQT TALMQTTVTKLFPITGIAT PYMYHHITEALFEAGLKQEA VQLMKDYWGKMITLGADTY WEAFDPNQPDYSPYGPILNSYCHAW SCTPVYLINKLYL
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACF18.1	없음				
61423	PIFP17.1	Alpha-L-rhamn osidase	53341	56013	2672	MAITDPQIVPSTLASDLDIISFTVEHYPGDALGIATA APRMT WVCSGMLPIDAQILLKVTRRVPGGQPVEERTYLP TDTSVLIP WQFAPLASREEVFATMQAVSASHQPLGKPSATLHFVGLL EEHEHVAD FVGPSWSESETDHRHPLVRTEVELKEQPKRA RLYLSALGLVEAEINGVKVGN DALVPGWSNYNQRVECFY DVTDELQSGANALGFWLG DGWYRGR LGFDGGYSNFYGDRI AVFAQLEVEYADGSMQNIYSNAWDRQWKATLGPVCSDL C EGERYDARLEQPGW SKPGFDDSSWQPVAEVMYDPARIENP ETSPVRAHESHEPVSIERIGNTEDGRGIWLVDFGQNC SQRIR LHM RDLEAEQSVTLRHVEVLEPDGSIATRTLRRGQQCDVY TSNGSDAWWEPRAFAMHGFRYAQIEGFAGELTAADMDCRV YHSVMERTGELTTSNPLLNR LHENAVWSMRSNFVSIPTDC PQRDERMGW TGDICLFVPTAAYLYDVYGF LKSWLKD VRA DQVKWGTVPFYPFVPLGVWAHPQAISTWGS AVEVPWT LYMESGDVQVLADS YDLIRDWIDEVAGYLS PDGVWDRKPD YPLGQLGDWLDPTAPPEDPTQAMTEKELVATAFYARSCM QGTHIAHILGKT DDETRFAALRDRVIDGFLQRF TNL DGTMT SDTQCA YALAIAGLLDGE PVRVKAGNRLACLRESGK VSTGFAGT PFVLPALTMTGHNDEAYALLTSTECPSWLYQV VMGATTTWERWDSMRADGSLNPGGMTSFNHAYLGSVAE WMHAHIGGLEAVEPGWKRFR IAPVIGGDLTHAETSHITPYG KAEVQWEVNDNVLDLTVAVPAGTTAFVDIVDHERVDLVA GTHHLQMAL



61422	LACA16.1	Alpha-L-rhamn osidase	583	3372	2789	MKITNILVNQMEHPLGFDLSNLRITFELTEMENIIGNVYKNIS VGKVESEQPIYFEPDELYENNAFKINMELEPRTKYWVKIGV RNDNEVTSNTWFETGKMDEKFGKWITNKKDVENTLTK KDFELANKQIKSARLYSTTLGVYEVDLNGVKVGNFLAPG FTNYDKIVQLQTYDVTKLVTKNSNNELVFSVGDGWYKGN LGFDDGGQTNIGDKKSILAEHLVTTYDNSEQVIS TDSSWL TEGKIIKSSIIYGEDIDDTKDILDWSSVVILNKSTSIVRDRLSL PIMKKEVLKVKEIIHTPKNEIVLDFGQNHAGWPVFINRLARG KKITLQMGELQDGNFYKNLRLARAAFTYISDGEEKLRPH FTYFGFRYVKISGVTDVNKDDFESWVLYSDLKQTFGIKT NDKVNRLFKNVIWGQKSNFMDVPTDCPQRDERLGTGDA EIFAPTASFNMTYEFYKKYAKDMLVEQEDNKGMLPIIVPS LKQKSTGMAIWSDAATIPWVYTYRFFDDLGVKQNYSQMK NWVDWITQNTKTKYLWIGQMQLGDWLSLDNGANPQGGK NEDYIASIYYFVSASIVSKAARLLHYDMESDYENLARNIK TNILNEFVTEKGRIADTQTALVSAHFGLVHDYQKSQVVA DLVKKVKDDNKHLQTFVGTFFLLSVLSNNNQHHLAMDI MQEDCPSWLYEVNMGATTIWERWNSVLPDGKMNPEGMN SLNHYSFGAVMMWMYQCVVGLNQFDAGFKEIYFAPKFD RLKDIYSEFDSTYGGKIKVEYHLETNEKHLIRMNLVIPPV MKVKLPRSAKYLINGKEKIGIVKLEYGKYDISYIPTKS YDLNSKLVLDNNDLVKRIDQIDEKILQKVKRMGNTRSIFIN KKIDELLDFFEISQEEKNQLVDILHKTIFIKLNL
61421	LACA15.1	없음				
61420	LACR13.1	Alpha-L-rhamn osidase	152649	155372	2723	MPNITPSLLAPDHLRVNLQHFAYNVQTQPHFSWWNHSNRIT GASQSAYQLTVFQRLQDRQDQHKYLYDSGWVTSNNNTAVT AAKLSDDLQVAGQLYYWQVRIKDNAGNISDFSQPAKLICADP SLPVKHGIWRQPQPKTAQELAHIGQVVFLRSPQLKINPSEVD TAIIVAVARGNEPVFAQSFDLYLNGHCLGVGSARQQEHDHG TEKTAIYYNVYEATDFLQDGANTVAALATASSDKQAFWC QLILYKHDGTKEVATTTDNTWRALDGSSAFGDYGVKIRIQ YFGMVSENIDMRYYPQNWTSsafddhdwplawqnpqmi ADNEVLVPYRSENERVEVHDRNKRVVTFSDQNYLLDLGK EIIIGGLKVNLFSAFDQRTVMMGEQLNDDGHVRHEMACGP DYIENWALVKGQNTTLQMKNFYVELVGFEGDLPLDAI NGWAMQQAFPDNESRFDSSELLNREYELSKYTKATNQD VFVDSQARERRPYEGDLLVNANTSYSVSSNYSLARHSLDY LIDNPTWPEDYKLFIEMAWLDYLYTGDDDLQTRYTDLQ YKLNKRGKSAESFDGASQSF TGLKNSQGVDFDAAVGLVT NDGLVDWPISERDGFMEGTYNTPFNAIHFGACATMAKIAR VLHHPDDADRYQKRAEIIKTNLIDKLYDPQTGRFFDSLAD LSVNRHSHHASAYALCYGVYTDQDMADRLSHFVANDGH FVGSYFYFMLKGLFEAGHAADAITLLTDPDNHKDHKSF AILEDLKA TIAPEAWSNAYKPNLTLSHPWGATPGLTIVQGV FGIVPLAPGFTTFRVKVRPGLKHLDTTPSVKGLITLHYR HEPTHQTLDVTPMNTTAQVELPDDAHAIIVVHDQYQGDW TTSIEHDHDTLSIPMGRYQIQYQA
61219	LACC12.1	없음				

61418	ENTF11.1	Alpha-L-rhamn osidase	113850	115865	2015	<p>MTNEKHKDRWLWYPGDFEIRHGLLQNFQREERGFDWPAY WYMDDCHRNVKFKRYFLDQPSMFKVTIQGVGYVEINGQK HPCGKWLTCPAGKAKIRIFVGHSTGLPAMFIEGDEVKSDIGW TASNFIIEYPAGWSPLYVDIAKDPNQIYYQKECVHPVTETE GGGILDFDGRAVNGCVLISLDDHIESITLCYGESDVEAMDID YCYKQIGMTRKMKARKRAFRLFIPEVSTGMVQLQVFHE FLSLSKQAAAFSSDSSLNLIQIWSVSEETFKLCSLDFFDGKRD RWIWSGDAYQSFMINQYLFDFEINKRRTILALRGQNEIKQHM NTIVDYSILWLGIEHNYMMTKDYEFRLRIVPKMQSLMRYL MEQTNELGFIYGRAKDWIFIDWSEMDKEGTAAAEQVLLKA YHSMITCRDILAEITYGENENYHHLHYQEKYQLLQNLFDYF WDEELGAFIDCYESGRRNVTRHANIFAVLDFDFANKDQQSIL KNVLLNDTITQITTPYFKFYEQDALCKLQGTNIVYQTILDYW GGMLSHDAVTFWEEYDPTQTGNEKYSMYGDPYGGKSLCHA WGASPIYLLGRYFIGLYPTKPGYEEFMIQPNLDSFETLNLCTLP IKDGKISLEKTKDKIVTSDRTGGTVKMGNGKSYPLLAKQPLV LTSYSKINA</p>
61417	BIFB9.1	없음				
61416	BIFB8.1	없음				
61415	LTBC7.1	Alpha-L-rhamn osidase	1350	2933	1583	<p>MAFTFQINDDVEFNHDERLLKRADELKPRLNKQNIKPLRLV QLVPASSKLEGVGVVEEAGSIDELNEQTFSRNGQVILDFGNHY VGRFKIGIEHVSPQDAPLKLKIRFAEVPALSYQASDYDGW LSKSWVQEELVHIDQLPVTLELPRRYAFRYVELTVVDTSPK WAVKFKVPSMVALSSAKVANLPQVVIKDTELKQIYDVSVK TLEDCMQEVFEDGPKRRDRRLWGLDLRLQALANYATFDNQE LVKRCLYLFGAMTAKDGRIVANVFTGAEYLPDDTFLFDYSL FFISTLADYYRHTGDQEA YRDLLPIAKKQMDLALQRVSDQG EYLEDSDYPVFIDWSNEFDKATSGQAVLTYALRQLIALLPED DDDKKRYQEKLQDMVSFAREKLFQDQKGLYVSGPKREINV ASQVWMVLAQVSVGDEAKQVMNTMVKELFPIRGATPYM YHHVTEALLSGLKAGIKLMKEYWGMISMAGADTYWEA FEPEKPDYSPYGSPIVSSYCHAWSCTPAYLITKYLLPEE</p>
		Alpha-L-rhamn osidase	38721	41507	2786	<p>MKISNIQVNHMKNKPMGFNLSSLRIDFKIEDTNETNLKQLIIS SNDQVVYDSNLITYNNNYFNVPFNLEPRKHVDVKVIVSGKE KVEGTTFEFETGKINEKWTAKWIANKNKDLQNTLTKKFSV KDSVKSARLYITGLGLYEAYLNDPKIGNEYLTPGSTAYDKW VEVQTYDITNQLKEDNEILISTGDGWYKGNIGFDGGQINIGD QQMAIAELHIEYEDGHEEVVNTDASWQTTSGQITKSGIYYG EDYDATIEIKDWQNVVVLDKDTSVLKDRLSLPITVHENLKP VKLIHTPKGEEVLDGQNHAGLLEFYNNREP KGTKIILQVGEIL QEGNFYRDNLKARAAFTYISDGKEGWVRPHFTYYGFRYV KVTGNTKPINIDNFRAPVLYSDMRETGDIE TDNKL VNRLLK NIQWGGKSNFIDIP TDCPQRDERLGTWGDADIFSN TAALNM NVFEFFKKYAKDMAVEQEDHNGMLTMYAPKMGTDGGA AIWGDAATFIPWNMYQAYGDSAILKQNYSDMKAWVDWIT KHTKVPNLWIGCFQFGDWLALDGEVPGPLTGKTNEDYIASV YYYASIKIV AETA KVLGHSKDAK KYQKQAEKILQAIRDEYIT KNGRLAIDTQTAYALALYFNIVAKDKKARVAKDLVTRLHK DNDHLKTGFVGTFFINQVLSQNGYHKLAMKIFMQEDFPSWL YAVKLGATTVWERWNSVEADGSMNPEGMNSLNHYSGAV MEWVYRYVLGIREHKNGYQRIEFAPMFYRLKHVKGHYDS SYGRFNVEYQIETDESHTIKVNLDVPGYTVVKADLPRAKRV NVNGEEKDNGFELTVGHYEINYPHDIERYTEETPVKVM NDKELVVKIDEVSGALKMFENNPSSLNGLPGLSGMSLAKINEIIP TFNISNEEFEKINSILTSTPIESERKQ</p>

		Alpha-L-rhamn osidase	368	2326	1958	MTNYWLWYPGDFEIHQGM LQNFQREERGMVWPAYWYM DDCYRNVHFKN DYTLDKSTFTVYATGTGYV SIDGNKSM IGKKLTCTEGKHTVEV FVGNSEGLPSIYVIGEVIKSDPTWE VSNFLQTKQVGYSDRYTKL FQNP NKLYYATNTVLP AEIKE IDGGTLYDFGRAINGKLELDWLA TDIEQVTL CYGESATEAR DVEMCY YKQEGVTKDSLIRKRAF RYIFIPGVK EGSIGLIAKH EFYPRSHRAKWKSDQKRIDQIWRVAQTTFDLCS D WFFIDG IKRDRWIWAGDAYQANFINQYLN FDEETDKRTILALRGHD EVKQNLNTIVDYSILWVVISVYNYHMMTG DREFLAQVFSK MKSMMDYLM DQTDENGFIYERPGDWIFVDWSEIDKEGPT AAEQLFLVAGYQALVACGKVLGLKVS NYQKEAERLLENT LKYFWDEGKGC FIDSYQSGKSHVSRHPN IAVIFDLVSEER QQQILNNVLLNDEITQITTPYFKFFEQDALCKLGKLV DQVLD TINTYWGGM LDQGATTFWEEYDAAKKGAQHYEMYGDR YGKSLCHAWGASPLYLLGKYV VGLRPLEPGYQSFEICPRLD SFKEVECTLPVKG GQITITKNDGMIRV VSTRPGGKIVVGKD SKELPANEV VEMTI
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	Alpha-L-rhamn osidase	93458	95410	1952	MSKEAVWLWYPGDFEIHQGM LQNFKREERGMGWPA YWY IDDCNRNVNFKRHYDLKES TQFTVLA KGTGYVDVNGTKY RLNHAINCDAGATDIQV FVGNVQGLPTIYIVGEI KSDSGWL ASN FVT TLPAGHDILY TDRNQDPNVIEYRTEKVVAKAQQA VDGGVLYDFGRAVNGTVTVK TNGPVTL CYGESETEARDV EMCY YKQSDV TATTKVRKRAF RYV FVPHCQLGDIELTAM HEYIPKNNPSSFTSDNKLINQIWNVATETLNLCS DLFFIDGI KRDRWIWAGDAYQANFINQYSFFNEDIDKRTLLALRGQDD IKQHMNTIVDYSMLWVIGV LNHYQMTGDREFLKHIYPKLES MVQYFIQQTNEHGFIYGGKNDWIFVDWSEMYKQGTVA AE QILLEDYKTIMTCGEVLGKDVAGYQAKYDQLFKNLMKYF WDEQGA FIDSYESGKRHVTRHANIFAILFDVVDENKQQLL LKNVLLNNAITQITTPYFKFFEQDALCKLGEQHRVYQVLLD YWGGMLDRGAVTFWEEFDPSQH GKDMYAMYGDPY GKS LCHAWGASPIYLLGRHFVGLRPTAPGYQTFEIKPELSEFHHL HTVLPKGGT VTVVKDQHQLSVTASRAGGTLIVD GQRQSL EPNRTAVV PV
		Alpha-L-rhamn osidase	96788	98365	1577	MAFTFQINNDVQFRHNQALLDKSASYRPILKETQVKAASI VALERDTQYLEGWGVKQIAPIERLSSYELKRDDQIIFDGDH QVGGQFSININAVGSPMDAPLCFKIKFAEMPAELARKSEYD GWLKSWIQEETVHLDVLP T T L P R R Y S F R Y A E I T V V D T SPKWRAVFSNPVVTATSAVD TATVHQPKLAD AQLQRIYE VGLKTLADCMQDVFEDGPKRDRRLWIGDLRLQALANYAT FKD TDLVKRCLYLFGAMP TTAGRIPANVFTKPTAVPDDTF LFDYSLFFISILADYEAFSSDKTVLNDL YRVAKKQMDLALA QVTSEGLK L TEENPVFIDWSNDFDKETAGQAIIYTLKQFI TLAELVNDT SLETYTALRKL NQYAKTQLFDSQSGLFVSG DQRENVNASQVWMTLAHVLDPEQT TALMQTTVTKLPIT GIATPYMYHHITEALFEAGLKQEAVQLMKDYWGKMITLG ADTYWEAFDPNQPDYSPY GSPILNSYCHAWSC TPVYLINK YLV
		Alpha-L-rhamn osidase	7585	8157	572	MTVTF SNEDDHK FHKLTDQCFTANPKLLTKANISVPLTT RTIQPRRYLVVTKINQATLATA TWQPVTGAIALHKHERLI YDLGALYVGHFQVAIDVAGSPMDAPLLMRTRFAEQQLS VDASRVTSWLP TAWIQDDTRHVELLP TTVQFERRYSRYI MLEPVGQSLK WQPV LADAEFEEIIDDFRQAA

61412	LACP4.1	없음				
61411	BIFB3.1	Alpha-L-rhamn osidase	168162	170843	2681	MTAANVPQIVPGTTLTGDLDITSFTVEHYPGDALGIAVRAPR MNWTYSHTVPEDAQILLTLTRRVPGSKPREEKTYLPADDG VLVPWQFEPLVSREEVFATVQAVSASHKPLGAVSRTLHFE AGLFEEDHVADDFVGPSWAEPESDHRHLPLVRTEIELKDQP VRARLYLTALGLVEAEINGAKVGNDALIPGWTNYEQRVEM WTYDVTENLSAGTNAMGFWLGDGWYRGRGLGFDGGYANY YGDRIGVFAQLEVEYADGSTDAVYSNSWDRRWKTTLGPV CSDLCEGERYDARFEMPGWSKPGFDDSDWKPVAEVFDPA RIENPDTSPVRAHERNQPASIERIGSTDDGRGIWLVDFEQNC SQRIRLNMRLGLEAGQSVTLRHVEVLEPDGTIATRLLRRGQQ CDIYTSNGTDAWWEPRFAMHGFRYAQIEGYAGELTAEDM DCRVYHSVMDRTGELTCSNSLLNRLHANAVWSMRSNRFVSI PTDCPQRDERMGWTGDICLFAPTATYLYDVHGFLLKSWLKD VRADQVKWGTVPFYVPFIPLGVWAHPQSISTWGDSAVEVP WTLYMESGDPQVLADSYDLSRDWVNEVEQYLSPDGVWDR KPDFPLGQLGDWLDPTAPPEDPTQAMTAKELVATAFYARS CIQITRIAEILGYADDAARYAALRDHVIAGFLDRFIRLDGTM TSDTQCAYALAIAFGLLDGEPVRKVKAGNRLACLVRESGG KVSTGFAGTPFVLPALQTQGHDEAYQLLSTECPSWLYQ VTMGATTTWERWDSMRPDRSLNPGGMTSFNHYALGSVA EWMHAHIGGLETEIEPGWKKFRVAPIVGGGLTEASTSHITPF GRAAVTWQMGADGSTVDVTVTVPVGTTAVVDIPDHEVQ NLTAGTHHLQFHI
61410	BIFL1.1	없음				

arginase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBDN41.1	없음				
61427	LACF21.1	arginase	10949	11662	713	MTIPVADVNAPEVLEECQHGIDAYQALQGQLTTVQGVLATK QPKVLRVGGDCAVSLAPFDYLSGRYGRDLGVVWLDTHPD ISTTEESHHLHEMVVSSLLGKGAPGFNAHHPLASDQVILAG LIEEDLRPMDHNVFDYQVQRLTPKQLREAPNALS DWVRGH GFKQVAVHFDL DALLPTAFRSIYPAEPGTDPADFPATVGQL TLPEVANLLTQLDQNAELVGLTVAEHMAWDALNLR
61426	LACP20.1	없음				
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACF18.1	arginase	19183	19896	713	MTIPVADVNAPEVLEECQHGIDAYQALQGQLTTVQGVLATK QPKVLRVGGDCAVSLAPFDYLSGRYGRDLGVVWLDTHPD ISTTEESHHLHEMVVSSLLGKGAPGFNAHHPLASDQVILAG LIEEDLRPMDHNVFDYQVQRLTPKQLREAPNALS DWVRGH GFKQVAVHFDL DALLPTAFRSIYPAEPGTDPADFPATVGQL TLPEVANLLTQLDQNAELVGLTVAEHMAWDALNLR
61423	PIFP17.1	없음				
61422	LACA16.1	arginase	31034	31897	863	MIEKTIRLVVPDWQAGDNPVYKLGAKV LKAIAPENKEQKTI TVK TADSNQTLEKENVTAQSAVLKNIRNTKKVIITEQPN KIITFGGNCLVSQQPIDYLNIGYGEKLGVIWIDAHDPDISNPEV FYNEHAMVVG NLLHRGDP AIQKEVDNPLKSNQIFYAGLQEP TNNEKKLIEGAGIKYKVDENQIDSERVIDWIKENNF EHIYH LDVDVMNSDSKNFYATYFNNPDLGEIPDAAV GKMRSKSI WQFISNFSQEYNLVGLTLAEYLPWSAKEMLDLMNNTNIF
61421	LACA15.1	arginase	23458	24330	872	MTKTVRLNYPQWEGGMNPNYIIGNQIMNVIVPKTKLMENV DIPV ASINRLNSFKRENGVDAEEILKQQTSAIAISLLLKSPDK VITIGGDCSTSLAPFNYSKYKKNLGIWLD AHPDISDTTQ SHHLHEMVVSTLMHQGAESFEELINHPINKQQVLF TGLITK DLRPMDDKVT KLDMKCLTPSDLENDESQITSWIRSNKFTKI AVHWDLDVLSYEDFRSIYPAEPHTNPNKFPAAVGTMKLKK IFDILNDIEQISDLVGLTIAEHMPWDAINMRMGLKKNLNFKEI
61420	LACR13.1	없음				
61419	LACC12.1	없음				
61418	ENTF11.1	없음				
61417	BIFB9.1	arginase	244	900	656	MQGQLTAVQGVLATKQPKVLMVGGDCAVSLAPFDYLSG RYGRDLGVVWLDTHPDISTTEESHNLHEMVVSSLLGKGAP DHPLASDQVILAGLIEEDLRPMDHNVFDYQVQRMTPKQLRE PPNALSDWVRGHGFKQVAVHFDL DALSPTAFRSIYPAEPG TDPADFPATVGQLTLPEVANLLTQLDQNAELVGLTVAEHM AWDALNLRQSLSGLSLLE
61416	BIFB8.1	arginase	37293	37868	575	MKRLKIVLPQWEGGVNPNYV LGARLMDLIVPAEQLPVTV TIP VADVNAPEVLERQHGIDAYQALQGQLTAVQGVLATKQPK VLMVGGDCAVSLAPFDYLSGHYGRDLGVVWLD AHPDIS T EESHHLHEMVVSSLLGKGAPGFNAHHPLASDQVILAGLIEE DPAADGPQRFR L PGPTADAQAAARNSKR P

61415	LTBC7.1	arginase	628	1371	743	MTIPVADVNAPEVLERQHGIDAYQALQGQLTAVQGVLATK QPKVLMVGGDCAVSLAPFNYSGRYGRDLGVVWLDTHP DISTTEESHHLHEMVVSSLLGKGAPGFNAHHPLASDQVILA GLIEEDLRPMDHNVFDYQVQRMTPKQLREPPNALS DWVRG HGFKQVAVHFDL DALSPTAFRSIYPAEPGTDPADFPATVGG LTLPEVANLLTQLDQNAELVGLTVAEHMAWDALNLRQSL GLSLL
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	없음				
61412	LACP4.1	없음				
61411	BIFB3.1	없음				
61410	BIFL1.1	없음				

(S)-2-haloacid dehalogenase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBG41.1	없음				
61427	LACF21.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	12048	12710	662	MTKKYLTFDCYGTLINEPLYQWVANLGLAVGLDPLTVRK AYATYEDDPASVNPYLDYSTLVRADLKHLDRLEQRHFFE SHYVECLEVQRHLLPYADVPTLIAWQQLGYQLIIMSNSW DIMPANIAALKVSFTAVVTAEDIQAYKPALAFFETVQERFK LTADNHWHLIARGYESDVVPASAMQWPMIWINRDQRQPTSS ERPTHMVTDLAAVKQWVN
		(S)-3-haloacid dehalogenase	16745	17320	575	MALTTLFEKHGIAPTPSLVAAYQRYNTSLWCQIEAGALTK DELFAKRFVTFEKEQLGQTVGPEVDQEYLYGLGTQHELMF GAMAMLKQAQRLGYQLGIITNGVAKVQKSWLSESLVPLF SSVLVSETVGVVEKPDVIFERFFATSEVAPERSMIGDGLPS TSLGRIRPTWRRSGTTRAGWRTPAGSPQP
61426	LACP20.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	24076	24738	662	MTKKYLTFDCYGTLINEPLYQWVANLGLAVGLDPLTVRK AYATYEDDPASVNPYLDYSTLVRADLKHLDRLEQRHFFE SHYVECLEVQRHLLPYADVPTLIAWQQLGYQLIIMSNSW DIMPANIAALKVSFTAVVTAEDIQAYKPALAFFETVQERFK LTADNHWHLIARGYESDVVPASAMQWPMIWINRDQRQPTSS ERPTHMVTDLAAVKQWVN
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACF18.1	없음				
61423	PIFP17.1	(S)-2-haloacid dehalogenase 4A	87731	88567	836	MAIAAAGKAATMPMKGPAMENVTHTPKYEVVFFDLYGT LIDIRTDEQCDAAWQALYDTACELGAQYDSVEALRERFEKL EAREMLHQSNHAIVRNGWDEFDVLVYRSLLMNRNDEAER LLALPQAAQKAAWAFRQGSTSMIRLYPGALEMIEKLQEAGI VVALLSNAQSCYTRAELEMTGLASVLDDVIESSEKIRKPAR DLYMLALDREFVTAKHALMVGNDKNDIVGARSAGIDGVY FRTEISPADDDPASSYAVRSFKGADYEGLLDYVLNA
		(S)-2-haloacid dehalogenase	6714	7409	695	MRYNTLLFDVDDTLLDFQQTEANALSALFAEQGITLTPEIK TSYKALNHHLWQEFKGRLSREEVTGSRFGLLFQQFGKTV DSRQMEKRYRHYLNQGHDLIPGSLELLKKLHPHAELYIVTN GVSHYQYQRLTDAGMLDYFKDIFVSEAVGAQKPMKEFFDH VFSHLLDLKKQTVIIGDSLTSDIKGGNMGADITWPNKNKL PEIEEIQPTYRIDSLEELYSLEIEKD
61422	LACA16.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	3708	4367	659	MSTFNTLFIPEGSLLNEKLAVKTALRQTLKYGLDWGPAE RLRYTSLQKQFKTSLSITEQIDLSLTFLLKNDLSEHTHTIFDNE MKKQTRLVKGAIEFLDEISSKVSLLLAKETKEQIEPRLMPT ELLSLFDHAYFADDFKEKLPKNIFFKILKDHPEIDPDNIVL GTNLDEEIQGAENANLKSLLWLPKPKDKIPSPRPTLHLSKLS DLSFYLDVN
61421	LACA15.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	15379	16035	656	MSTFETLFIPEGSLLNQKLAEKTALRQALKHFGLDWGPAE RLRYTSLQKQFKTSLDDEQIDLSLTFLLDKDIKETRPVFDL MKEQTRLVKGTPDFLDQLSSFRILLAKETKAIEPRLAPSE LLSSFDYTYFADDFDEKLPKKNIFFKILKDHPEIDPDNIVL TNIDEEIQGAENANLKSLLWLPKPKDKIPSPHPTLHLSKLRD LSFYLDIN
61420	LACR13.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	67807	68463	656	MDITFDCYGTLLDTRPIRTPQFMFSAHGHIDGQAAWHQFES WEDRLMYGETTLPFTTLLKRDLQYLDMTFHTNSLFSHYFH DLFESYINLQWPEVIPALQQLRQAGHRIIMSNSPTDLMTH HFDQLEHQVDQAILPEQTHCYKPTLSFFTAEATRLNPHLH VAMGYWWDIVPCHKLWGPCVWINRQQLSPLDITPTYSLP NLTELPALVEKIAS

61419	LACC12.1	없음				
61418	ENTF11.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	128416	129111	695	MKYKTLLEFDVDDTLLDFQLTEANALSALFAEQGITLTPEIE TSYKALNHHLWQEFKGRLSREEIIGSRFGLLFQQFGKTVD SDQMEKRYRHYLNQGHDLVPGSLEILKKVHPHADLYIVTN GVSHTQHRRLTDAGMLDYFKDIFVSEAVGAQKPMKEFFDH VFSHIPNFDKKQTVIIGDSLTSDIKGGNMAGIDTIWFNRNKL PEIEEIQPTYRIDSLEELYSLEIEKD
61417	BIFB9.1	없음				
61416	BIFB8.1	없음				
61415	LTBC7.1	없음				
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	24280	24942	662	MTKKYLTFCYGTLINEPLYQWVANLGLAVGLDPLTVRK AYATYEDDSASVNPYLDYSTLVRADLKHLDRLEQRHFFE SHYVECLEVQRHLLPYADVIPTLTAWQQLGYQLIIMSNSW DIMPANIAALKVSFTAVVTAEDIQAYKPALAFFETVQERFK LTADNHWHIARGYESDVVPASAMQWPMIWINRDQRQPTSS ERPTHMVTDLAAVKQWVN
61412	LACP4.1	(S)-2-haloacid dehalogenase	24192	24854	662	MTKKYLTFCYGTLINEPLYQWVANLGLAVGLDPLTVRK AYATYEDDPASVNPYLDYSTLVRADLKHLDRLEQRHFFE SHYVECLEVQRHLLPYADVIPTLIAWQQLGYQLIIMSNSW DIMPANIAALKVSFTAVVTAEDIQAYKPALAFFETVQERFK LTADNHWHIARGYESDVVPASAMQWPMIWINRDQRQPTSS ERPTHMVTDLAAVKQWVN
61411	BIFB3.1	없음				
61410	BIFL1.1	없음				



chloramphenicol O-acetyltransferase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBGN41.1	없음				
61427	LACF21.1	Chloramphenicol O-acetyltransferase	5382	5828	446	MRIGYLNDQLVTFDVLHPSYTIHADRMANLWTTYDTD FETFYQHYLADQAEFSALPGMPKTPQTPNLVNICLPGV HFSSYTPLPFKPLDSFFPIFQAGQFKKDADKTIMPLSITVNH ATIDGDHLSRFFNELQSCLEQPTQYLA
		Chloramphenicol O-acetyltransferase	5909	6049	140	MTTTKPNMHAVAINPAAWPRQTYFYFYFTKIAPSGFSLTV NMDITAT
		Chloramphenicol acetyltransferase	4182	4808	626	MHIEFPKLRDEPTLGEGVQVNKTTFGQWVELGDRTLAD NCTIGDYTYTGQNCYLQNSDLKRFISIAAQVRIGPTNHPYN RASQHVFAFYNGTTFGFDQPDVEFLANRKQVRTTIGNDVWI GHGAIQAGLTVGDGAVIGSGAVVTHDVEPYTIVGGVSAK KIKDRFPDEIKADLEKIAWWDWSREQLEANYLDFRLPIEEF VQKHLHD
61426	LACP20.1	Chloramphenicol O-acetyltransferase	121537	122001	464	MTTHPEMRIGYLNDQLVTFDVLHPSYTIHADRMANLW TTYDTD FETFYQHYLADQAEFSALPGMPKTPQTPNLVNI GCLPGVHFSSYTPLPFKPLDSFFPIFQAGQFKKDADKTIMP LSITVNHATIDGDHLSRFFNELQSCLEQPTQYLA
		Chloramphenicol O-acetyltransferase	122064	122204	140	MTTTKPNMHAVAINPAAWPRQTYFYFYFTKIAPSGFSLTV NMDITAT
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACF18.1	Chloramphenicol O-acetyltransferase	28425	29051	626	MHIEFPKLRDEPTLGEGVQVNKTTFGQWVELGDRTLAD NCTIGDYTYTGQNCYLQNSDLKRFISIAAQVRIGPTNHPYN RASQHVFAFYNGTTFGFDQPDVEFLANRKQVRTTIGNDVWI GHGAIQAGLTVGDGAVIGSGAVVTHDVEPYTIVGGVSAK KIKDRFPDEIKADLEKIAWWDWSREQLEANYLDFRLPIEEF VQKHLHA
61423	PIFP17.1	없음				
61422	LACA16.1	없음				
61421	LACA15.1	없음				
61420	LACR13.1	없음				
61419	LACC12.1	없음				
61418	ENTF11.1	없음				
61417	BIFB9.1	Chloramphenicol acetyltransferase	6286	6912	626	MHIEFPKLRDEPTLGEGVQVNKTTFGQWVELGDRTLAD NCTIGDYTYTGQNCYLQNSDLKRFISIAAQVRIGPTNHPYN RASQHVFAFYNGTTFGFDQPDVEFLANRKQVRTTIGNDVWI GHGAIQAGLTVGDGAVIGSGAVVTHDVEPYTIVGGVSAK KIKDRFPDEIKADLEKIAWWDWSREQLEANYLDFRLPIEEF VQKHLHA
		Chloramphenicol O-acetyltransferase	165	815	650	MNFNKIDLDNWKREIFNHYLNQQTTFSITTEIDISVLYRNI KQEGYKFPYAFIFLVTRVINSNTAFRTGYNSDGELGYWVK LEPLYTIFDGVSKTFSGIWTPVKNDFKEFYDLYLSDVEKYN GSGKLPKTPIPENAFSLIIPWTSFTGFNLNINNSNYLLPII TAGKFINKGNSIYLPVSLQVHHSVCDGYHAGLFMNSIQELS DRPNDWLL

61416	BIFB8.1	Chloramphenicol acetyltransferase	44306	44932	626	MHIEFPKLRDEPTLGEGVQVNKTTFGQWVELGDRTLADN CTIGDYTYTGQNCYLQNSDLKRFISIAAQVRIGPTNHPYNRA SQHVFAYNGTTFGFDQPDVEFLANRKQVRTTIGNDVWIGH GAIQAGLTVGDGAVIGSGAVVTHDVEPYTIVGGVSAKKIK DRFPDEIKADLEKIAWWDWSREQLEANYLDFRLPIIEEFVQK HLHD
61415	LTBC7.1	Chloramphenicol acetyltransferase	44471	45097	626	MHIEFPKLRDEPTLGEGVQVNKTTFGQWVELGDRTLADN CTIGDYTYTGQNCYLQNSDLKRFISIAAQVRIGPTNHPYNRA SQHVFAYNGTTFGFDQPDVEFLANRKQVRTTIGNDVWIGH GAIQAGLTVGDGAVIGSGAVVTHDVEPYTIVGGVSAKKIK DRFPDEIKADLEKIAWWDWSREQLEANYLDFRLPIIEEFVQK HLHA
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	Chloramphenicol O-acetyltransferase	156237	156905	668	MTTTKPNMHAVAINPAAWPRQTYFYFYFTKIAPSGFSLTV NMDITATLAWTKAHHVKFNAVYLYLVSRLLTTHPEMRI GYLNDQLVTFDVLHPSYTIHLADRTMANLWTTYDITDFE TFYQHLYADQAEFSALPGMPKTPQTPNLVNIIGCLPGVHF SSYTPLPFKPLDSFFPIFQAGQFKKADKTIMPLSITVNHA TIDGNHLSRFFNELQSCWEQPTQYLA
61412	LACP4.1	Chloramphenicol O-acetyltransferase	281752	281892	140	MTTTKPNMHAVAINPAAWPRQTYFYFYFTKIAPSGFSLTV NMDITAT
		Chloramphenicol O-acetyltransferase	281955	2824119	2542164	
61411	BIFB3.1	없음				
61410	BIFL1.1	없음				

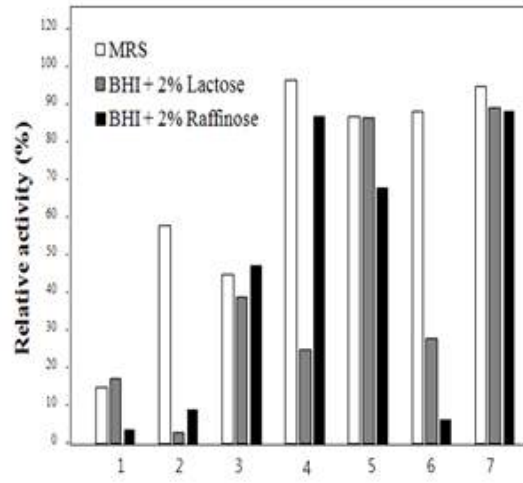
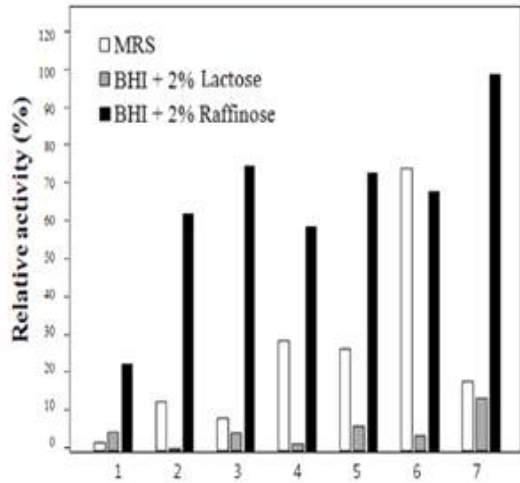
cyanophycinase						
sample 번호	Conting accession	product	begin	end	length	protein
61428	BBG41.1	없음				
61427	LACF21.1	없음				
61426	LACP20.1	없음				
61425	BIFB18.1	없음				
61424	LACF18.1	없음				
61423	PIFP17.1	없음				
61422	LACA16.1	없음				
61421	LACA15.1	없음				
61420	LACR13.1	없음				
61419	LACC12.1	없음				
61418	ENTF11.1	없음				
61417	BIFB9.1	없음				
61416	BIFB8.1	없음				
61415	LTBC7.1	없음				
61414	LPAR6.1	없음				
61413	LTBC5.1	Cyanophycinase	216118	216744	626	MSEMLLFGGNPPILSQRALKIIDDFVKGNSVHVLVYTVWRP NWKPYMTKYIEPIKLLKINVTFEYILGDVENASLLDKISEGN IVIFGGGDTMKYFDQFCNEANRSKIKELKEKNILFIGFSAGS LLGNVGYVSPLDNVSGKSVLRNGLGLYDNFVVSVHHDL WNDTMDFYKATEHLQIIKLSINNAGFVFKNLDGLLLNDTV LKC
61412	LACP4.1	없음				
61411	BIFB3.1	없음				
61410	BIFL1.1	없음				

## 나. 올리고당 생산용 효소생산 균주의 선발

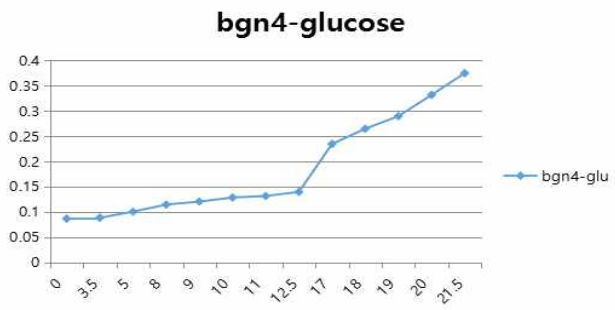
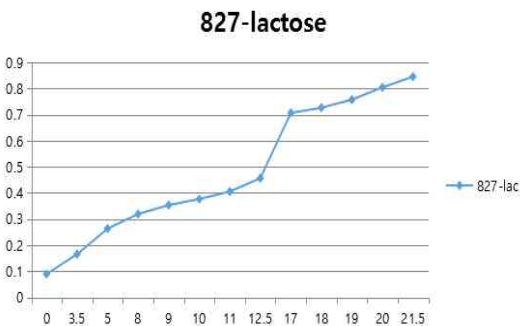
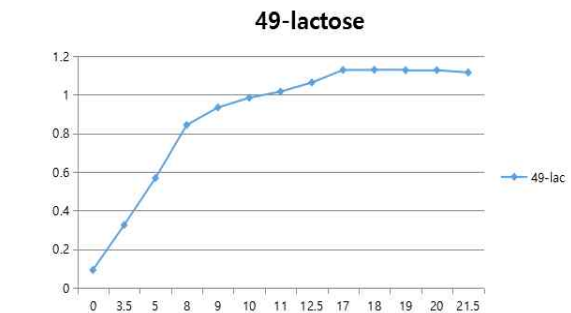
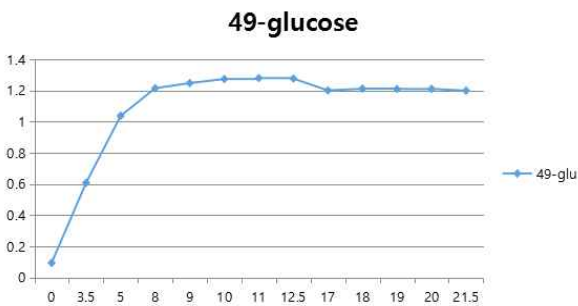
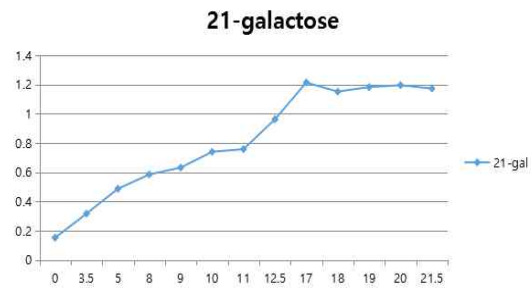
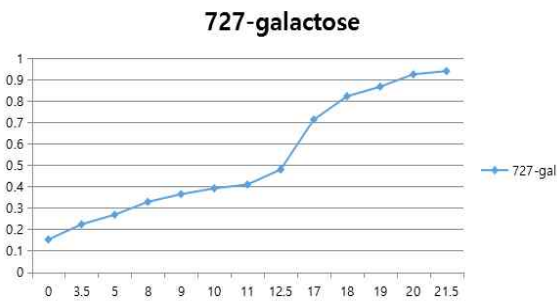
- $\beta$ -galactosidase는 유당불내증의 개선과 갈락토올리고당의 생산을 위하여 산업적으로 활용함. 현재는 *Kluyveromyces* 및 *Aspergillus* 등이 생산하는  $\beta$ -galactosidase가 상업화되어 있고 갈락토올리고당의 제조에도 이용됨. 본 연구진이 선행연구를 통하여 유산균 균주 은행에서  $\beta$ -galactosidase 생산이 우수한 균주들을 스크리닝 및 개발함. 약 500 균주중  $\beta$ -galactosidase 활성이 상대적으로 우수한 균주를 선발하였고 각 균주별로 raffinose 등 다양한 당을 첨가한 배지에서 배양한 균주들의 효소 활성을 조사함. 특히, *B. longum* RD47 균주와 *B. bifidum* BGN4 균주는  $\beta$ -galactosidase의 생산성에서 *Kluyveromyces*를 능가하는 것으로 나타남. RD47의 경우에는 세포질에 존재하고 BGN4의 경우에는 세포벽에 존재함. 본 연구에서는 RD47 alc BGN4이외에 더 추가적으로  $\beta$ -galactosidase 생산이 우수한 균주를 스크리닝하였고 RD47 과 BGN4를 이용한  $\beta$ -galactosidase의 생산 및 올리고당의 생산을 더 효율적으로 수행하기 위한 연구를 계속 수행함.

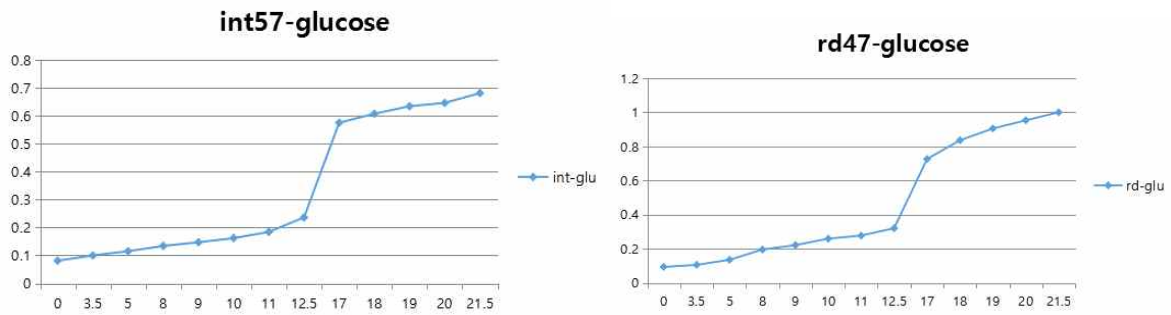
strain	Enzyme activity									
	raffinose	fructose	galactose	lactose	maltose	glucose	sucrose	arabinose	without	control
031727	0.152	0.135	0.104	0.09	0.068	0.066	0.051	0.015	0.011	
030829	0.067	0.048	0.053	0.011	0.361	0.05	0.062	0.008	0.006	
031732	0.013	0.056	0.007	0.007	0.035	0.144	0.052	0.054	0.009	
030819	0.186	0.164	0.095	0.236	0.097	0.292	0.144	0.079	0.059	0.059
042121	0.329	0.075	0.364	0.023	0.061	0.21	0.018	0.028	0.024	0.004
SS29	0.006	0.007	0.007	0.007	0.01	0.01	0.062	0.02	0.006	0.005
042103	0.007	0.01	0.027	0.016	0.028	0.15	0.017	0.004	0.007	0.003
030827	0.062	0.011	0.007	0.258	0.046	0.136	0.094	0.009	0.017	0.004
031706	0.005	0.019	0.012	0.005	0.009	0.006	0.001	0.007	0.008	0.005
031707	0.1	0.021	0.153	0.2	0.056	0.142	0.038	0.031	0.009	0.008
042149	0.079	0.075	0.056	0.128	0.063	0.121	0.064	0.079	0.007	0.005
111731	0.007	0.026	0.048	0.043	0.084	0.195	0.031	0.028	0.013	0.005
BGN4(whole cell)	0.1	0.042	0.013	0.012	0.006	0.193	0.001	0.005	0.005	
BGN4(sonicated cell)	0.005	0.019	0.014	0.006	0.175	0.999	0.039	0.014	0.0053	
RD47	0.026	0.005	0.064	0.067	0.055	1.353	0.04	0.047	0.027	
INT57	0.014	0.014	0.014	0.042	0.038	0.43	0.016	0.019	0.011	0.0046

표 9



Screening for  $\alpha$ -(A) /  $\beta$  - (B) -galactosidase activity of crude enzyme extracts from selected bifidobacteria. (1: *B. longum* SJ32, 2: *B. longum* RD81, 3: *B. longum* RD01, 4: *B. breve* KTCC 3419, 5: *B. adolescentis* Int 57 6: *B. longum* RD47)





- 탄소원의 영향은 균주 및 기본 배지에 따라 달리 나타으며. RD47 의 경우 raffinose의 첨가 효과는 BHI 배지보다는 MRS 배지를 사용하였을 때 더 현저히  $\beta$  - galactosidase 생산을 증가시킴. 균의 배양 시간과 효소의 생산은 어느 정도 비례 관계가 있었고 배양 16 시간 정도에서 가장 높은 균체 효소 활성과 올리고당 생산을 보여줌. 각종 무기질의 첨가가 효소의 생산에 미치는 영향을 평가한 결과 MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> 등의 2가 양이온이 약간의 도움을 주었으며 EDTA가 의외로 높은 효소활성을 보이는 것으로 나타남.
- 효소/기질의 비율에 따라 GOS의 생산성은 달라짐
- 효소/기질 농도에 따른 최적의 생산성을 평가하고자 다양한 비율에서 GOS 생산을 관찰한 결과는 아래와 같음.



그림 20 Effect of ratio between crude enzyme and substrate concentration on the production of GOS

- BGN4 효소 생산을 위하여 는 배양기(fermentor)에서 탄소원을 lactose로 하여 배양하였음. 배양액을 회수하여 올리고당 역합성에 사용하였음. 배양액을 15 ml 튜브에 넣고 원심분리하여 0.1 g, 0.2 g, 0.3 g의 균체를 얻었음. Lactose 0.8 g씩을 각각의 튜브에 넣고 lactose의 농도가 40 %가 되도록 0.1 g의 균체에는 1.1 ml, 0.2 g의 균체에는 1 ml, 그리고 0.3 g의 균체에는 0.9 ml의 phosphate buffer (pH 7.0)을 넣었음. 2 $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub> 를 넣고 37 °C에서 3 시간 동안 반응시켜 올리고당 역합성을 진행하였음. 반응이 끝나면 원심분리 (10000 rpm, 200 s)하여 상등액은 샘플링하여 TLC로 올리고당 역합성의 여부를 확인하고 침전물에 다시 0.8 g의 lactose와 2  $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub> , 그리고 lactose의 농도가

40 %가 되도록 phosphate buffer를 넣어주고 3 시간 동안 37 °C에서 반응시켜주었음. 전개용매는 1-propanol: D.W.: Ethyl acetate를 7: 2: 1의 비율로 섞어서 조제하고, 발색시약은 ethanol: sulfuric acid를 9: 1의 비율로 혼합하여 사용했음. 역합성은 총 3번(9시간) 진행하였음.

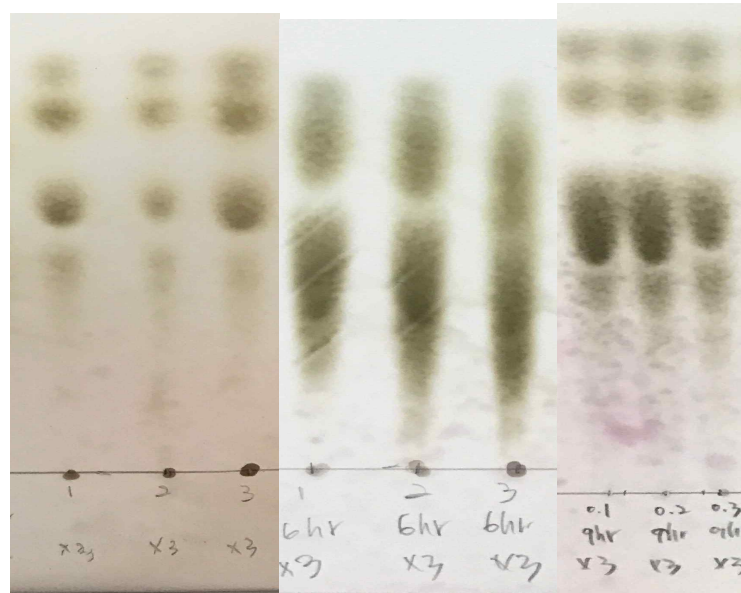


그림 21 0.1 g, 0.2 g, 0.3 g의 BGN4 균체를 이용하여 역합성한 올리고당 TLC

- 초기 3 시간 반응의 TLC 결과를 보면 0.3 g 보다 1 g의 균체에서 역합성을 진행한 실험군의 올리고당 생산이 증가하였음. 이 후에 6 시간과 9 시간 반응한 후에 올리고당 생산이 더욱 많아졌음.
- 올리고당 생산에 대한 pH와 온도의 영향: 베타갈락토시다아제는 pH 6.0, 35°C에서 최적의 활성을 보였고 알파 갈락토시다아제는 pH 6.6, 42°C에서 최적 활성을 보였음. 본 연구의 실질적인 목적인 올리고당의 생산에는 온도와 pH가 어떤 영향을 미치는지 분석한 결과 transglycosylation 작용은 pH 6.6, 온도는 37°C에서 15시간 반응 하였을 때 가장 좋은 결과를 보였음.

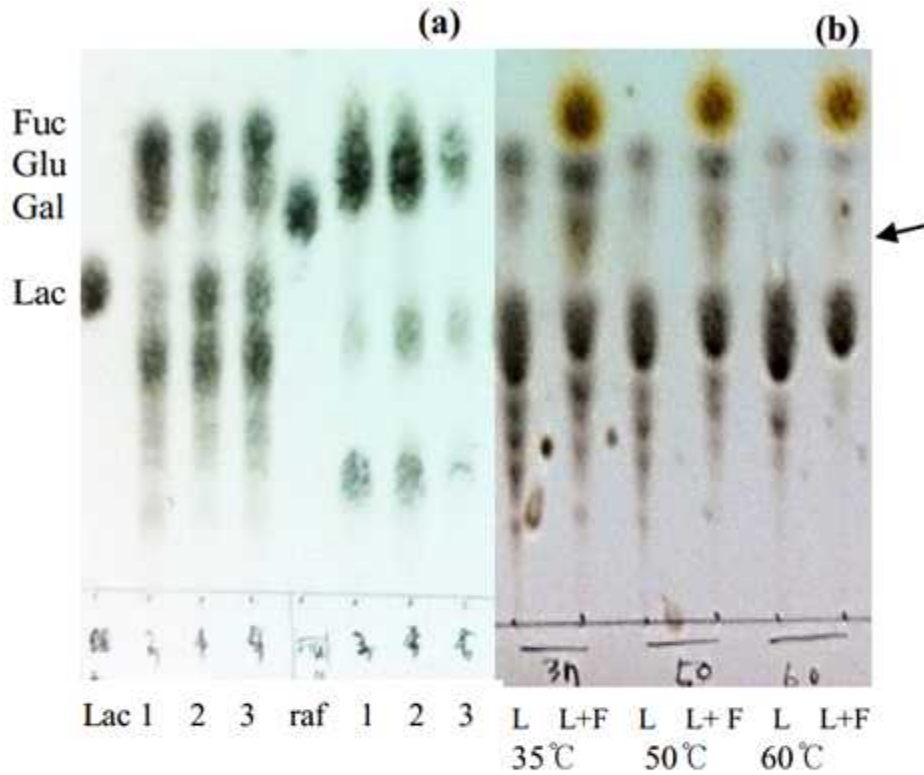


그림 22 Effect of pH(a) and temperature(b) on transglycosylation activity of crude enzyme extracts from RD47. (a) 1:pH6.3, 2: 6.8, 3: 7.1, (b): analysis of reaction mixture with lactose(L) and lactose and fucose at various temperature was performed by TLC.

## 다. Se 함유 유산균 개발

### (1) 유산균 screening

- 소장 중인 수백 균주의 유산균 중에서 se 존재하에서도 균의 배양이 잘 이루어지고 배지중의 sodium selenite를 균체 내로 동화하는 능력이 우수하며 유기 Se 형태로 전환하는 능력이 우수한 균주를 개발함. 여러 미생물들이 셀레늄을 uptake하고 무기 셀레늄을 유기 셀레늄으로 생물전환 할 수 있다는 능력이 보고되면서 효모와 유산균의 셀레늄 생물전환능력을 평가·탐색하여 고효율의 균주를 선별하고, 이를 이용하여 식품산업에 적용할 수 있는 셀레늄 강화 효모, 유산균을 제조한 사례가 보고되었음. 하지만 대부분의 유산균이 셀레늄 내성이 약하여 배지에 적은 농도의 셀레늄을 첨가하여도 균의 성장에 억제가 일어나는 약점이 있었음. 본 연구의 목적은 약한 셀레늄 내성에 의한 유산균의 성장 억제를 해결하고 보다 더 효율적으로 셀레늄 강화 유산균 제조를 목표로함.
- Sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ ), sodium selenate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), seleno-DL-methionine ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$ ) 과 se-(methyl) selenocysteine hydrochloride ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{Se}\cdot\text{HCl}$ ) 는 스탠드로 사용함. 총 셀레늄의 측정을 위하여 15 mL의 배양액



에서 수확한 dried cells를 For 8 mL의 질산에 담귀 overnight 후 microwave digestion system (Ethos 1, Milestone, Bergamo, Italy)을 사용하여 용해하고, 용해된 샘플의 volume을 DW를 사용하여 50 mL로 make up 함.

- 총 셀레늄은 inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer (ICP-AES, Optima-4300 DV, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 측정함. 총 유기 셀레늄의 분리 및 셀레늄의 종 분석을 위하여 동결건조한 셀레늄 강화 유산균을 5 mL의 20 mg of pronase E 가 함유된 phosphate buffer에 용해 후 37°C에서 16 h 배양함.
- 셀레늄 종 분석은 octopole collision cell 이 장착된 inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, Agilent 7700, Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하여 진행함. Chromatography 분리는 1260 HPLC pump (Agilent, Wilmington, DE, USA)를 delivery system으로 사용함. 셀레늄 종의 분리는 Hamilton (Reno, NV) PRP X-100 anion exchange column (250 mm X 4.1 mm id, 10µm particles) 을 사용하여 40°C에서 수행함.

S S 농도 (mM)	1	2	3	4	5	11	12	13	14	15	21	22	23	24	31	32	33	34	35
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1		+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
5		+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
10		+	+		+	+	+	+		+		+				+		+	
20		+	+		+	+	+	+		+		+				+			
30			+		+	+	+	+		+		+				+			
40			+		+	+	+	+		+		+				+			
50			+		+	+	+	+		+		+				+			
60			+		+		+	+				+				+			
100					+							+							

+: 생존할 수 있는 균

균의 번호	균종	균의 번호	균종
0317-01	Lactobacillus fermentum	0826-37	Enterococcus faecalis
0317-45	Enterococcus faecalis	0909-04	Enterococcus faecalis
0421-36	Lactobacillus plantarum	0909-31	Lactobacillus oris
0421-43	Lactobacillus pentosus	0909-34	Lactobacillus plantarum
0421-46	Lactobacillus fermentum	0909-44	Enterococcus faecalis
0517-06	Enterococcus faecalis	1011-37	Enterococcus faecalis

새번호	이전의번호	균종
1	0317-01	Lactobacillus fermentum
3	0421-36	Lactobacillus plantarum
4	0421-43	Lactobacillus pentosus
5	0421-46	Lactobacillus fermentum
9	0909-31	Lactobacillus oris
10	0909-34	Lactobacillus plantarum
13	3	Bifidobacterium longum RD47

14	5	Lactobacillus casei KFRI 699
15	12	Bifidobacterium breve KCTC 3419
16	13	Bifidobacterium catenulatum KCTC 3221
17	22	Lactobacillus lactis sups.Lactis KCTC 2013
18	32	Bifidobacterium pseudocatenulatum G4

표 10 셀레늄 농도에 따른 균주의 성장 여부

- Lactobacillus 8 균주와 Bifidobacterium 4균주를 대상으로 Se무첨가 배지와 20mM Se 첨가 배지에서 24 시간 배양한 생균수를 조사하였음. 즉 12종 균을 0과 20 mM SS MRS broth에서 24시간(37°C, 혐기) 배양하였음. 균의 0과 20 mM SS MRS broth가 0 과 24 시간 배양 후에 MRS agar (with cysteine)배지에서 생균수를 측정하였고 3 반복의 평균 균수를 표에 나타내었음 (48h, 37°C, 혐기 배양).

균 의 번호	Cfu/ml				
	0h	0ss	24h	20ss	
lacto	1	3.40E+07	1.58E+07	6.00E+08	2.57E+08
	3	9.50E+06	1.55E+07	3.00E+09	6.33E+07
	4	1.13E+07	7.75E+06	4.22E+09	8.44E+06
	5	2.15E+07	1.78E+07	1.59E+09	4.89E+06
	9	1.75E+06	0.00E+00	0.00E+00	1.00E+06
	10	2.73E+07	2.75E+07	3.30E+09	1.22E+06
	14	5.18E+07	3.75E+06	2.17E+09	0.00E+00
	17	1.00E+07	7.50E+06	3.89E+08	1.24E+07
bifido	13	4.75E+06	3.75E+06	8.11E+08	1.14E+08
	15	8.50E+06	5.00E+06	5.11E+08	1.69E+07
	16	7.00E+06	1.50E+06	8.44E+08	2.44E+07
	18	3.25E+06	3.00E+06	9.00E+08	1.33E+06

표 11 선발 균주의 24 시간 배양 생균수

- BGN4 균주는 해당하는 최적배지 조건하에서 배양되었으며 셀레늄의 농도는 배양 초기(0시간)에 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM의 농도가 되도록 첨가하여 진행하였음. 유산균 균주의 최적 온도(37 °C)로 설정된 인큐베이터에서 배양 후 UV spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 2 시간마다 시간대별로 흡광도를 측정하여 생육주기를 확인하였고, 가장 생육이 좋은 구간에서 생균수를 측정하였음.

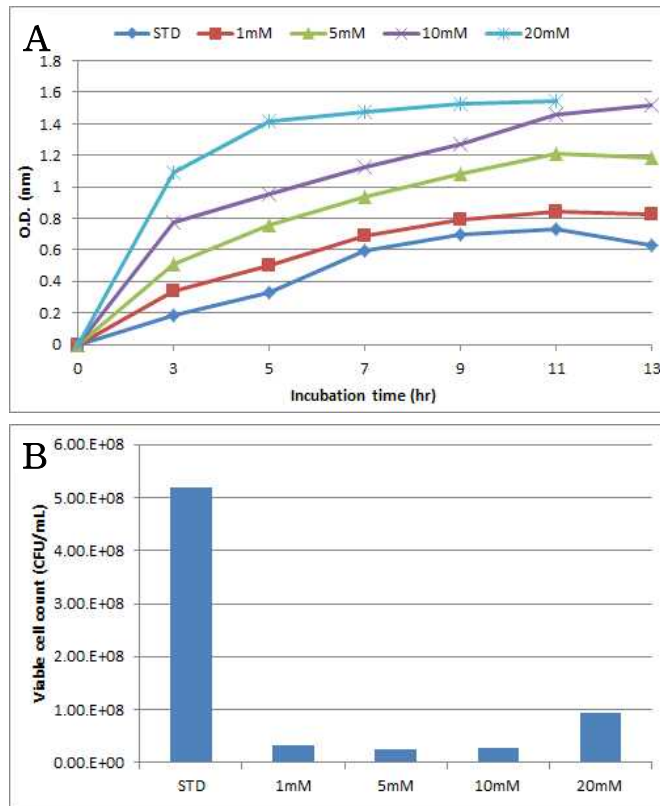


그림 23 다양한 농도의 셀레니움을 첨가한 BGN4 (*B. bifidum*)의 그래프

A: Growth curves, B: 생균수

- 첨가하는 셀레니움의 농도를 낮추고 배양 시간대별 중에 5 시간, 9 시간, 11 시간에 셀레니움이 1 mM의 농도가 되도록 첨가하여 진행하였음. 유산균 균주의 최적 온도 (37 °C)로 설정된 인큐베이터에서 배양 후 UV spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 2 시간마다 시간대별로 흡광도를 측정하여 생육주기를 확인하였고, 가장 생육이 좋은 구간에서 생균수를 측정하였음.

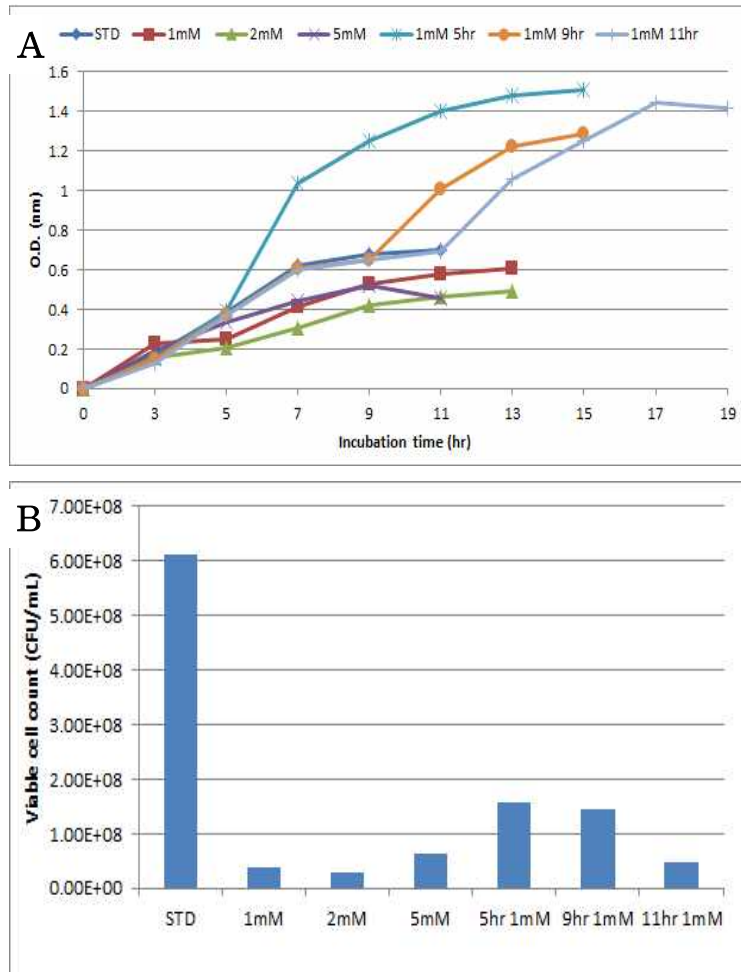


그림 24 배양 초기 (0 시간)에 1 mM, 2 mM, 5 mM의 셀레니움을 첨가하고, 배양 중에 셀레니움의 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 BGN4의 그래프

A: Growth curves, B: 생균수

- 다양한 농도의 셀레니움을 첨가한 BGN4의 배양액을 1 g씩 마이크로튜브에 넣고 원심 분리하여 상등액은 제거하고 균체만 남겨 드라이오븐 (60 °C)에서 건조시켰음. 건조된 BGN4 속에 존재하는 셀레니움의 함량을 측정하였음. 건조 BGN4 속에 존재하는 유기 셀레니움의 함량은 대체로 배지에 높은 농도의 셀레니움이 첨가되었을수록 높은 것을 확인하였음.

시료 명칭	실험항목 명칭	표시값	단위
유산균 건조물 BGN4 STD	셀레늄(Se)	ND	mg/kg
유산균 건조물 1 mM	셀레늄(Se)	73008.29	mg/kg
유산균 건조물 5 mM	셀레늄(Se)	150452.73	mg/kg
유산균 건조물 10 mM	셀레늄(Se)	132498.69	mg/kg
유산균 건조물 20 mM	셀레늄(Se)	235024.73	mg/kg

표 12 건조 BGN4 속의 셀레니움의 함량

- RD47 균주의 경우 배양 초기(0시간)에 셀레니움이 1 mM, 5 mM, 20 mM, 60 mM의 농도가 되도록 첨가하였고, 배양 시간대별 중에 5 시간, 7 시간, 9 시간에 셀레니움이 1 mM의 농도가 되도록 첨가하여 진행하였음. 유산균 균주의 최적 온도(37 °C)로 설정된 인큐베이터에서 배양 후 UV spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 2 시간마다 시간대별로 흡광도를 측정하여 생육주기를 확인하였고, 가장 생육이 좋은 구간에서 생균수를 측정하였음. 낮은 농도일수록 흡광도는 낮게 측정되었으며, 20 mM 과 60 mM을 첨가한 균주의 흡광도는 동일했음. 생균수에서 대조군 (STD)보다 초기에 셀레니움을 첨가한 균주는 낮은 경향이 있음.

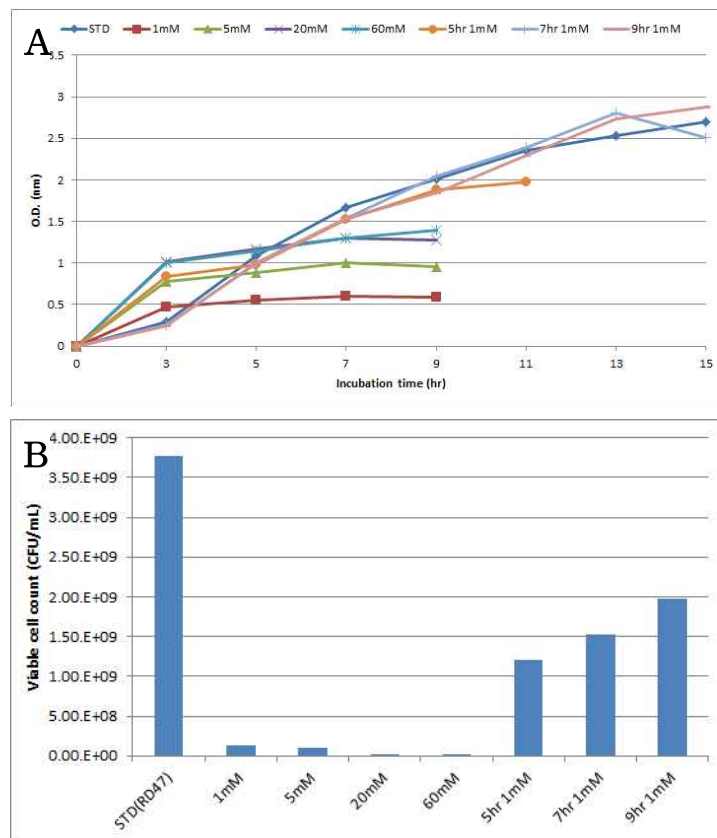


그림 26 배양 초기 (0 시간)에 1 mM, 5 mM, 20 mM, 60 mM의 셀레니움을 첨가하고, 배양 중에 셀레니움의 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 RD47의 그래프 A: Growth curves, B: 생균수

- *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, 그리고 *Lactobacillus plantarum* 균주의 경우 배양 초기(0시간)에 셀레니움이 1 mM, 10 mM의 농도가 되도록 첨가하여 진행하였음. 유산균 균주의 최적 온도(37 °C)로 설정된 인큐베이터에서 배양 후 UV spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 2 시간마다 시간대별로 흡광도를 측정하여 생육주기를 확인하였고, 가장 생육이 좋은 구간에서 생균수를 측정하였음.

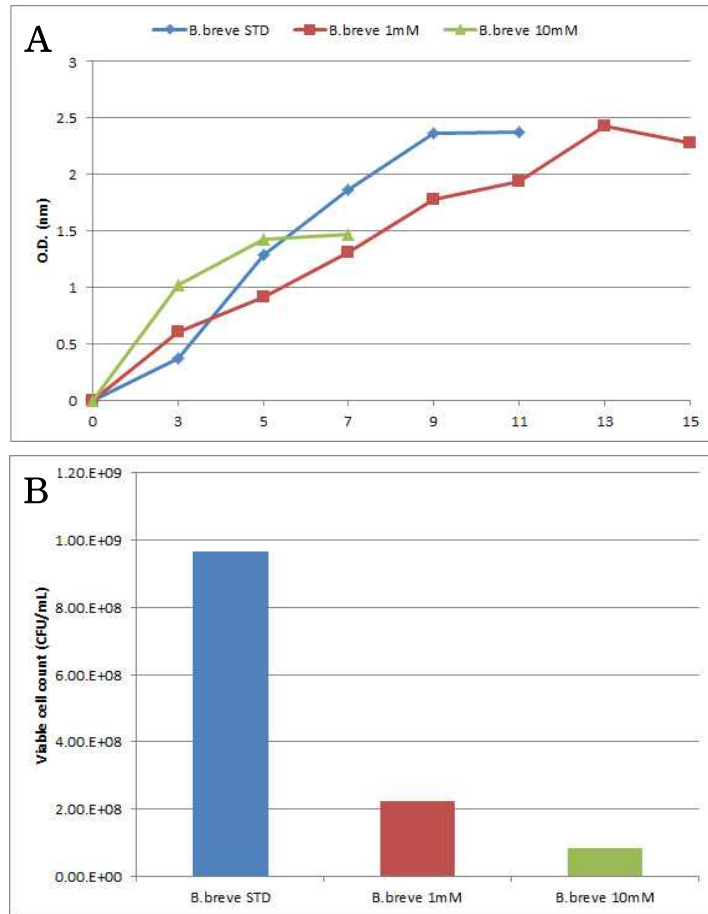


그림 27 배양 초기 (0 시간)에 1 mM과 10 mM의 셀레니움을 첨가한 *Bifidobacterium breve*의 그래프

A: Growth curves, B: 생균수

- 셀레니움이 10 mM의 농도로 첨가된 *B. breve*은 배양 7 시간 만에 정지기에 도달하는 것으로 나타났으며 생균수도 8.47E+07 CFU/mL로 대조군 (STD)보다 다소 낮음.

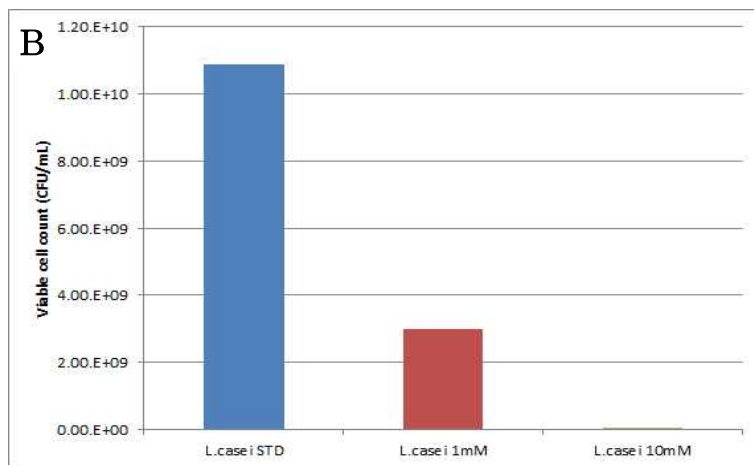
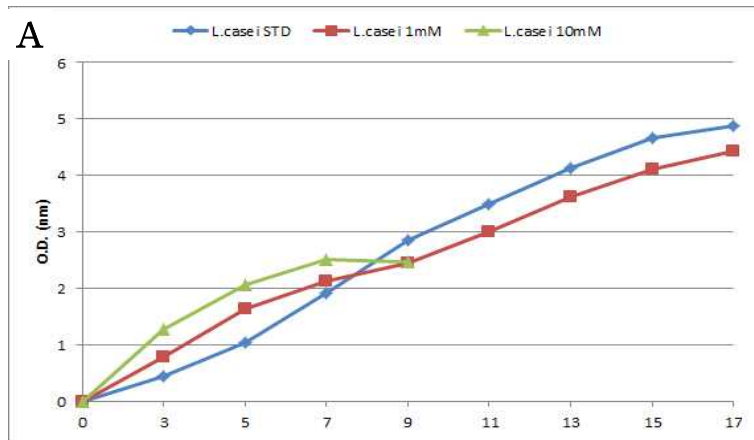


그림 28 배양 초기 (0 시간)에 1 mM과 10 mM의 셀레니움을 첨가한 *Lactobacillus casei*의 그래프 A: Growth curves, B: 생균수

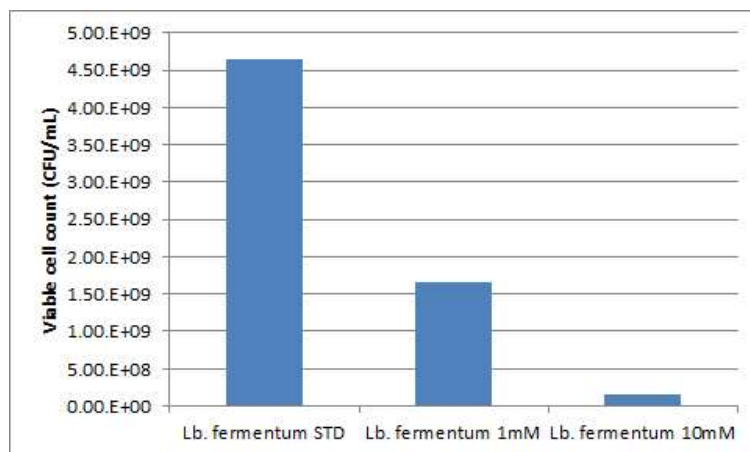


그림 29 배양 초기 (0 시간)에 1 mM과 10 mM의 셀레니움을 첨가한 *Lactobacillus fermentum*의 생균수

- *Lb. fermentum* 균주 또한 셀레니움을 첨가한 실험군의 경우 대조군 보다 낮은 생균 수가 측정되었음.

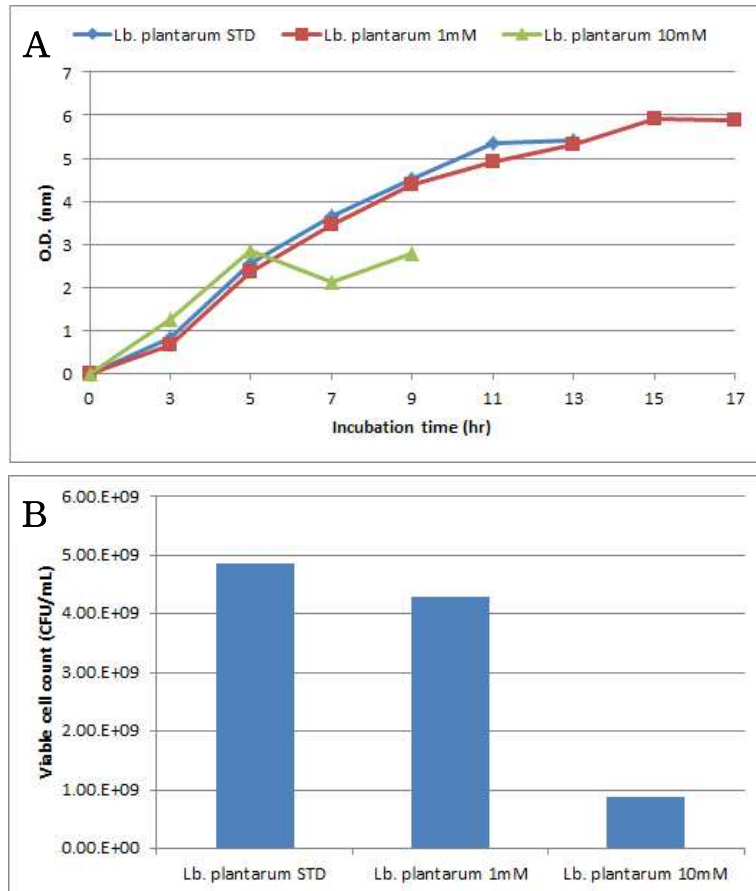


그림 30 배양 초기 (0 시간)에 1 mM과 10 mM의 셀레니움을 첨가한 *Lactobacillus plantarum*의 그래프

A: Growth curves, B: 생균수

- 다른 유산균 균주의 경우 1 mM의 셀레니움만으로도 균의 생장에 있어 피해를 받았으나 *Lb. plantarum*은 셀레니움 내성이 우수하여 셀레니움 균체 개발에 적합하다고 판단됨.

## (2) 셀레늄 종 분석

- 셀레늄 종 분석을 위하여 pronase E를 이용한 효소 가수분해를 진행함. Pronase E는 non-specific protease로 셀레늄 함유 peptide bonds를 끊는데 자주 사용하고 가장 효율적인 protease로 알려져 있음.



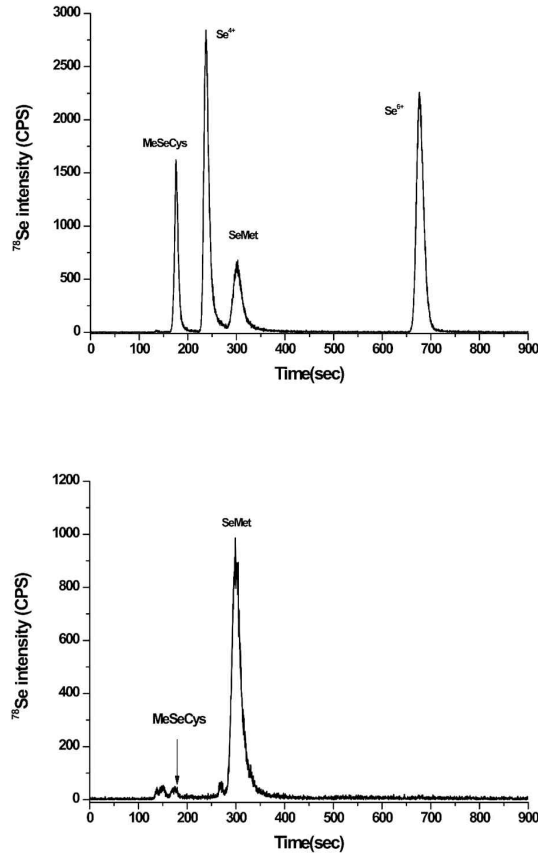


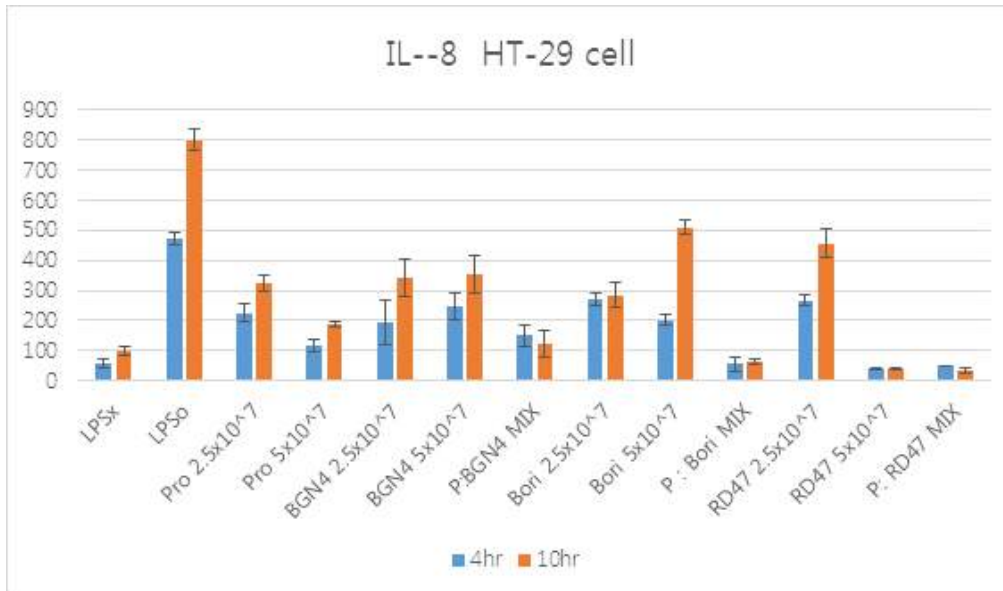
그림 31 Chromatographic profiles of mixture of selenium standards obtained by HPLC-ICP-MS

- 결과에 의하면 셀레늄 강화 *B. bifidum* BGN4 중 seleniomethionine이 169.6  $\mu\text{g/g}$ 로 가장 많음.
- Selenomethionine의 간 글루타티온과산화효소 활성이 147%이고 channel catfish의 체중 증량이 336%로 channel catfish의 사료에 무기 셀레늄 대신 selenomethionine이 45 에서 130  $\mu\text{M}$  의 농도로 human tumor cell lines (MCF-7/S breast carcinoma, DU-145 prostate cancer cells 및 UACC-375 melanoma) 의 성장을 억제하지만 normal diploid fibroblasts의 성장 억제에는 훨씬 높은 1 mM이 필요함. 생체이용률 및 독성을 고려하면, selenomethionine이 사람과 동물에게 셀레늄 공급원으로 가장 적합할것으로 보이고, Keshan disease를 예방할 수 있는 최소 셀레늄 필요량이 20  $\mu\text{g/day}$ 임.
- glutathione peroxidase (GPx) 및 selenoprotein P의 생리적 필요량은 45 - 50  $\mu\text{g/day}$  로 예상되며, Elemental selenium의 낮은 독성과 selenomethionine의 높은 생물활성 및 높은 셀레늄 흡수율을 고려하면, 셀레늄 강화 개발 균주는 매우 우수한 셀레늄 보충제 제품으로의 개발에 적합할 것으로 사료됨.

## 라. 선발 균주와 분획물의 싸이토카인 조절 및 항염증 활성

### (1) 선발균주와 분획물의 싸이토카인 조절

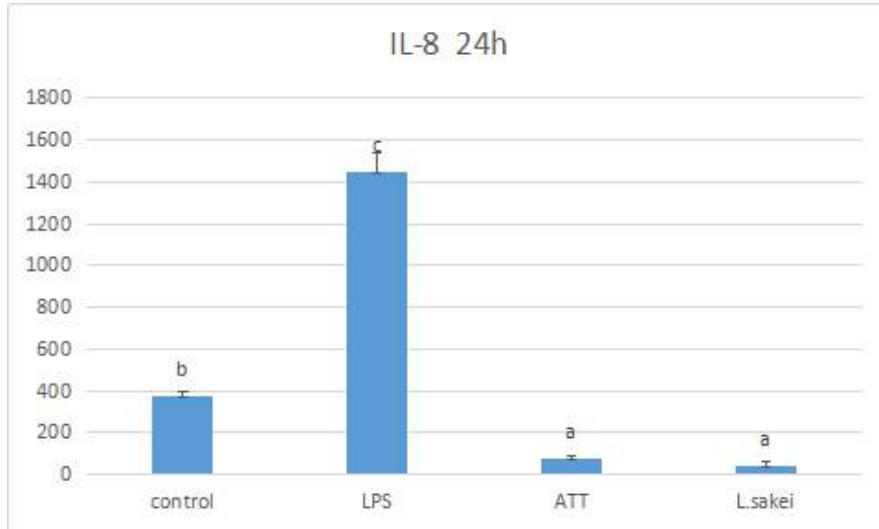
- 1 차 년도에서 관련 연구를 시작하기 위하여 일차적으로 선발 균주 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium bifidum* ATT, *Lactobacillus sakei*, *Bifidobacterium longum* Bori균들을 MRS배지에 37에서 18hr 배양 후에 이 균들의 생균수와 OD값을 측정하고 생균수를 측정한 후 각 균들을  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ 으로 맞추어 HT29 세포와 반응시킴. *Propionibacterium Freudenreichii* subsp. *Shermanii* ATCC 13673 균은 MRS배지에 37에서 3 일간 배양함.
- 각 그룹의 경우, 1) Blank(LPS 넣지 않은 셀), 2)Control(LPS를 넣은 셀) 3)*Propionibacterium*  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ (LPS를 넣은 셀), 4)*Bifidobacterium* 종류  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  (LPS를 넣은 셀), 5)*Propionibacterium*과 *Bifidobacterium*을 같이 넣어서 MIX한 것. 각 균들 마다  $2.5 \times 10^7$ 의 양으로 주입함. 나누어 셀에 넣은 후에 셀의 상층액을 가지고 ELISA로 IL-8의 양을 확인함.
- IL-8을 측정한 이유는 Pro-inflammatory 인자로 epithelial cell(대장셀)에서 초기 염증인자로 나오는 인자로 이 전 다른 논문들에서 대장 셀에 균을 처리한 후에 IL-8을 측정하여 chronic inflammation을 낮추어준다는 실험들을 찾을 수 있음.
- 균이 셀 내의 NF-kb경로에 따라 DNA를 변형 시켜 IL-8과 같은 cytokine의 양을 변화하는 Mechanism을 가지고 있음. 실험에서는 Ht-29 cell (passage 39-42) 사이의 cell을 24well에  $1 \times 10^5$ /ml로 seeding한 후에 LPS 1ug/ml 농도로 처리하고 균을 각각 위에 언급한 양만큼 1 well당 1 ml양의 배지 내에 균수 만큼 양을 주입함.. 여기에서 사용한 셀 배지는 glucose가 없는 DMEM(Gibco)를 사용하였고, DMEM 배지에 FBS 10% 첨가하였고 항생제는 첨가하지 않았음.
- Glucose가 없는 배지를 사용한 이유는 균이 glucose가 있는 보통 셀 배지에서도 성장을 하면서 산들을 생산하기 때문에 산에 의한 작용을 배제하기 위하여 glucose가 없는 배지를 사용하였고, 실제 pH측정 결과 acid변화는 크지 않았음. 배지에 LPS와 균을 주입 후 24 시간후에 셀의 상층액을 분리한 후에 ELISA(BD사 제품)을 이용하여 IL-8의 양을 측정함.



- 선발 균들은 모두 IL-8 생산을 감소 시키는 작용을 나타내었는데 그 정도는 균주의 종류와 균의 농도에 따라 상이함. 특히 Bifidobacterium Bifidum ATT, Bifidobacterium longum RD47, Propionicbacterium의 경우 IL-8의 감소 효과가 우수하였음.
- 균들의 농도별로 살펴보면, Bidobactrium longum bori 외에는 모든 균들이 2.5x10E7보다 5x10E7에서 II-8의 양을 더 감소시킴. Co-culture상 비교해 보면 BGN4의 경우 propionibacterium 2.5x10E7과 bifidobacterium bifidum BGN4 2.5x10E7을 합하여 넣은 곳 (총 volume 1ml medium)의 IL-8감소량이 단독으로 BGN4만5x10E7 (총 volume 1ml medium)곳에 비해 II-8의 양을 더 감소시키나, Propionibacterium 2.5x10E7과 bifidobacterium bifidum BGN4 2.5x10E7을 각각 넣은 곳의 IL-8 감소량을 합친 것과 비교 시에는 MIX로 두균을 넣은 Well에서의IL-8의 감소량은 각각을 합친 양보다는 더 적게 II-8을 감소시킴.

## (2) 장 부착능이 우수한 균주들의 효과

- 수백 종류 이상의 보관 균중에서 제일 장부착능이 강한 균으로서 *Bifidobacterium bifidum* ATT(*B.bifidum* ATT)와 *Lactobacillus sakei*의 IL-8 감소 효과를 재 확인함.
- 실험결과 HT-29세포에 LPS를 24h 동안 처리하였을 때 IL-8단백질 발현이 증가되었으나 LPS와 유익균을 1×10<sup>8</sup>CFU/ml 의 농도로 같이 처리할 경우 LPS에 의한 IL-8 발현 증가가 감소되었고 이는 통계적으로 의미있게 억제되었음.



### (3) 균주 분획물 및 분획물 배합소재의 면역 조절 효과

- 면역 활성화는 항상성을 유지하는 것이 바람직하므로 염증 반응이 진행될 때는 염증 반응을 억제하는 것이 바람직하고 면역 능력을 향상시켜야 하는 경우는 면역 활성화 효과를 나타내는 것이 바람직함.
- 앞의 실험에서는 대식 세포에 LPS를 처리하여 염증 상태를 유도하고 개발균들의 항염증 효과를 측정하였는데 본 실험에서는 대식세포 자체에 균 세포 분획 (WC), 세포벽 분획 (CW), 세포질 분획 (CFE)과 각 분획들의 조합물들의 효과를 조사하여 균주의 분획물에 따른 면역 활성화 효과를 측정함.
- 각 분획물에 대하여 열처리를 하여 사균체로서의 활성을 조사하였음. 균의 종류에 따라 활성화 분획이 차이가 나타났는데 BGN4 균주의 경우에는 세포벽 성분과 세포질 분획의 효과가 우수하였고 농도 의존적으로 증가하였으며 분획물을 조합하였을 때 그 효과가 더욱 증가함.

Fig. 1 Effect of combination of BGN cell fractions on IL-6 by RAW 264.7 cells

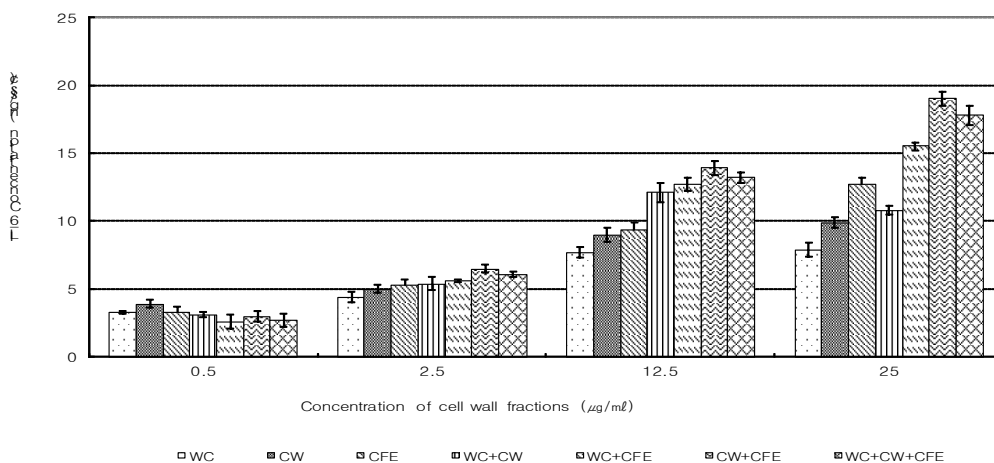
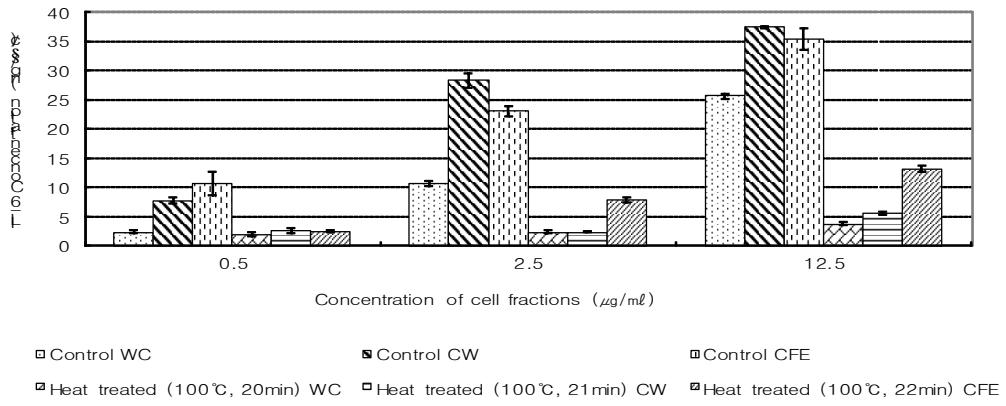
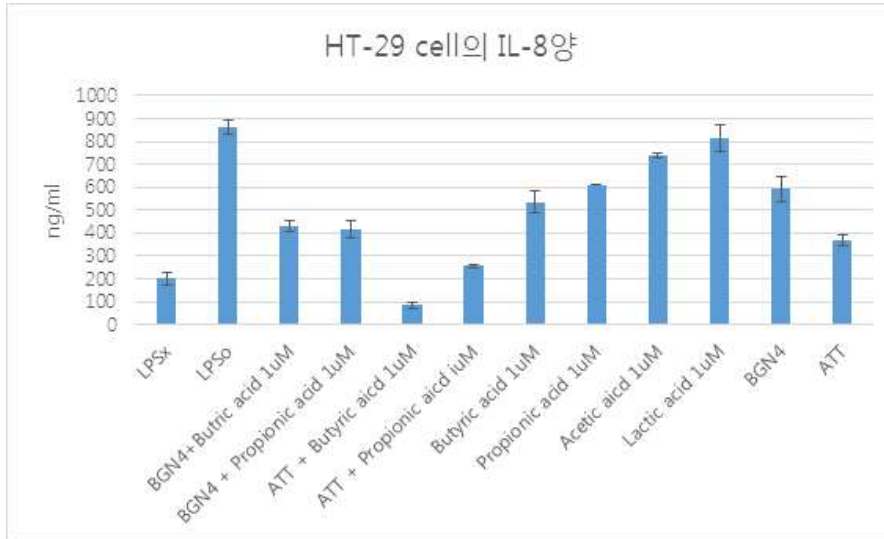


Fig. 2 Effect of heat treatment of BGN4 cell fractions on IL-6 production by RAW 264.7 cells.

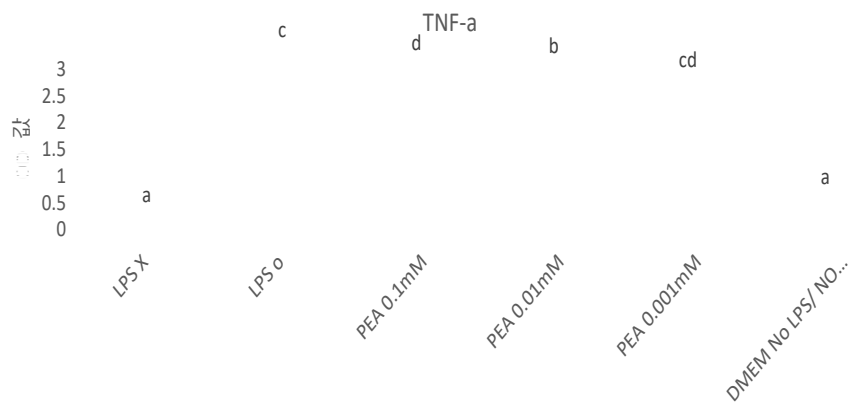


용될 수 있을 것으로 사료됨.



### (5) 대식세포를 이용한 유산균 대사체 PEA 항염증 실험

- 본 연구진의 선행 연구에서 BGN 등의 프로바이오틱스를 섭취한 인체의 대사체에서 PEA가 유의적으로 체내에서 증가하는 것을 관찰하였음.
- 본 연구에서는 PEA를 대식세포에 처리하여 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6, 염증 조절 사이토카인인 IL-10의 분석을 수행하였음.
- 대식세포주인 raw cells는 24-well plate에서 seeding 하고 ( $1 \times 10^5$  /well), 24 시간후에 배지를 제거하고 1  $\mu$ g/ml LPS(DMEM로 용해) 500 $\mu$ l 으로 처리함. 1 시간후에 0.1  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.001 $\mu$ M PEA으로 (DMSO로 용해) 처리 하고, 24 시간후에 상층액을 취하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 cytokines을 분석함



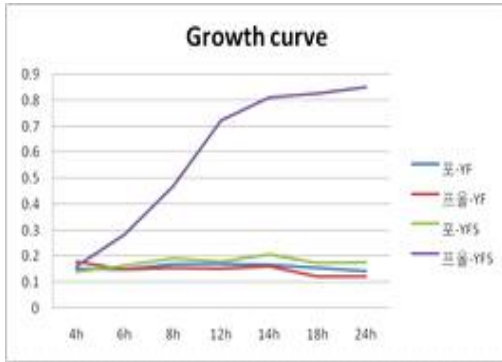
1. control: LPS 없음, DMSO 있음.
2. LPS있음, DMSO있음
3. LPS+0.1  $\mu$  M PEA
4. LPS+0.01  $\mu$  M PEA
5. LPS+0.001  $\mu$  M PEA

- 실험 결과는 위와 같이 PEA가 TNF- $\alpha$ 를 감소시켰음을 확인하였고 추가 분석을 수행중임.

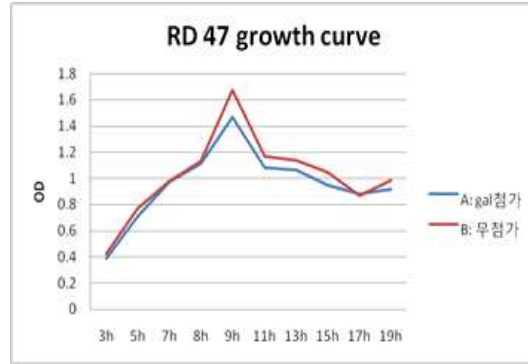
#### 마. 개발 균주 배양 최적화

- 본 연구에서 *B. longum* (RD47), *L. lactis*, *B. lactis* (AD011), *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *W. confusa* VP30 등의 균주에 대한 배양 최적화 연구를 진행하였음.
- 각 균주의 탄소원, 질소원 및 배양온도 등 조건에 따른 유산균의 생육특성을 확인. 각 균주는 1.5L fermenter 또는 100mL Bottle를 사용하여 다양한 조건에서 배양 후 ELISA(bio-med microplate reader)를 이용하여 550nm에서 배양 3시간 이후 시간별로 흡광도를 측정하여 각 균주의 생육곡선을 확인하였음.

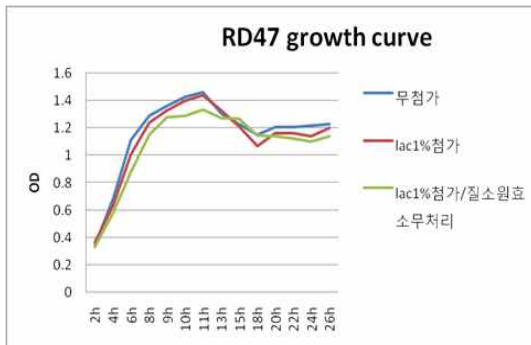
#### (1) *B. longum* RD47 의 생육특성



A 질소원-탄소원에 따른 *Bifidobacterium longum* (RD47)의 생육곡선



B *Bifidobacterium longum* (RD47) 배양시 Galactose 첨가에 따른 생육곡선



C *Bifidobacterium longum* (RD47) 배양 시 lactose 첨가에 따른 생육곡선

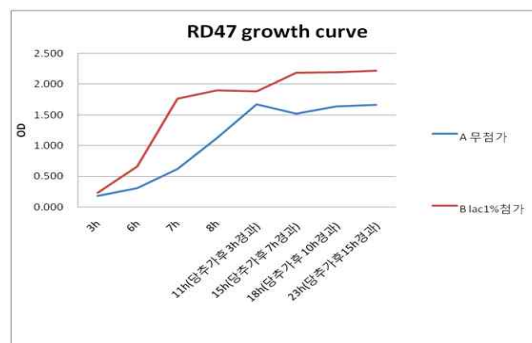
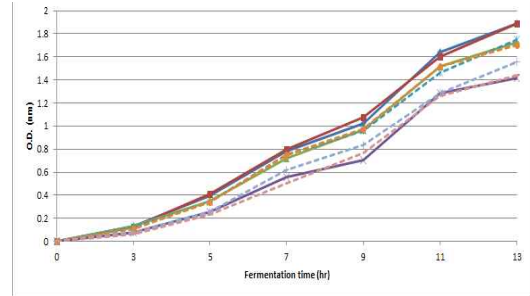
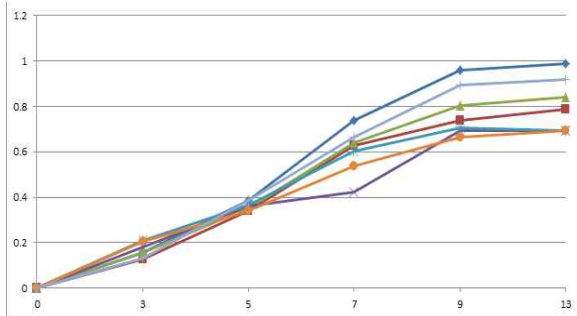


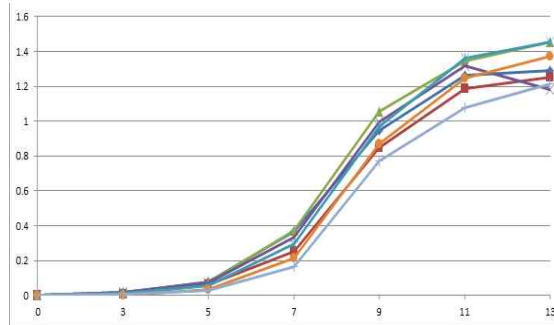
그림 37 *Bifidobacterium longum* (RD47)의 생육곡선 그래프

- *Bifidobacterium longum* (RD47)의 생장에 탄소원과 질소원이 미치는 영향을 보았을 때 탄소원을 FO로 하고 질소원으로 YE, SP, FP를 적당한 비율로 배합하여 사용하였을 때 생장이 현저히 좋았음. 배양 중 탄소원의 소모에 따라 탄소원을 추가로 투입 하였을 때 생장이 좋았음.

## (2) *L. lactis* 의 생육특성



A 탄소원 종류에 따른 *Lactococcus lactis*의 생장곡선 B 질소원 종류에 따른 *Lactococcus lactis*의 생장 곡선



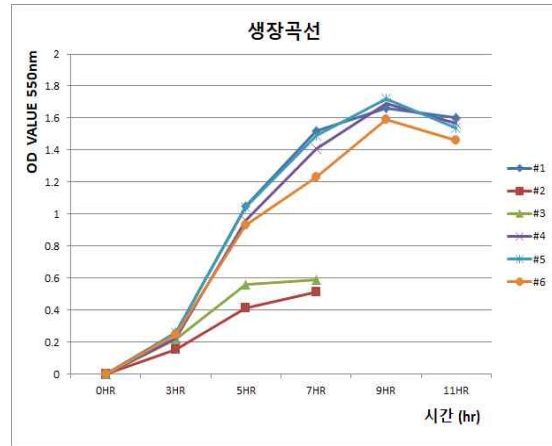
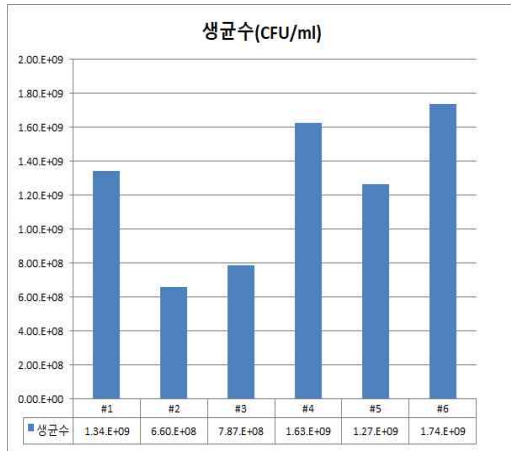
C 질소원 비율별 *Lactococcus lactis*의 생장 곡선

그림 38 *Lactococcus lactis*의 생육곡선 그래프

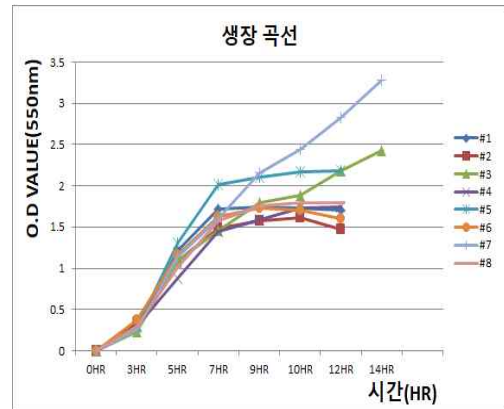
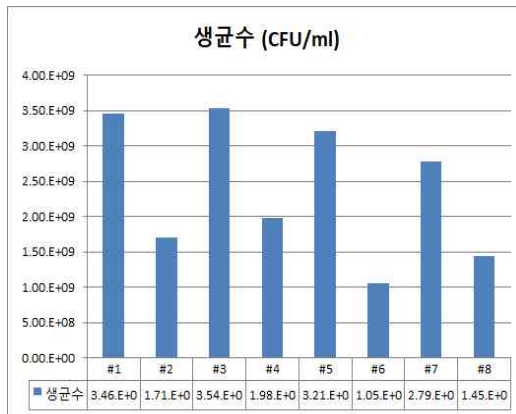
- *Lactococcus lactis*의 질소원의 최적 배합 비율을 찾기 위해 진행된 실험에서는 SP를 제외한 두 가지 질소원을 배합이 *Lactococcus lactis*의 생장에 좋은 영향을 줌.

## (3) *B. bifidum* ATT 의 생육특성





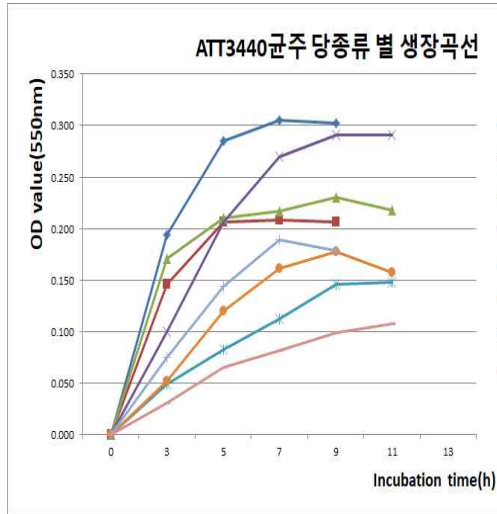
A 질소원 비율에 따른 *bifidobacterium bifidum* (ATT3440)의 성장



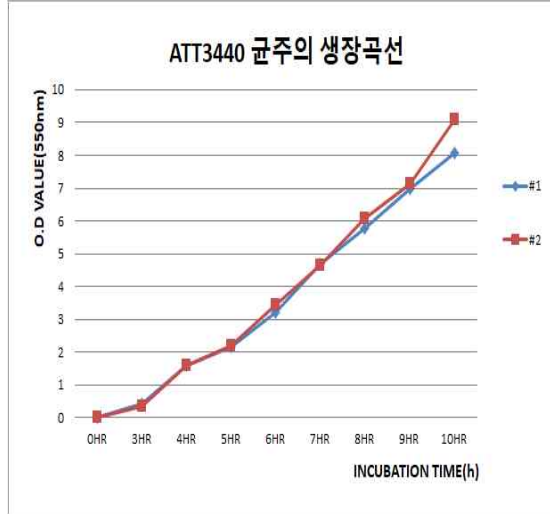
B 질소원 비율, 배지성분제외 · 제한에 따른 *bifidobacterium bifidum* (ATT3440)의 성장

그림 39. *Bifidobacterium bifidum* ATT의 성장

- 기본 bifidum 배지에 당의 종류를 포도당, 유당, 갈락토 올리고당, 결정과당, 설탕, 프락토 올리고당, 맥아당, 라피노스등 10가지 선정하여 정치배양실험을 진행하였음.
- 각 실험군 별 O.D 값을 측정하여 성장곡선을 산출하였음. 실험 결과, *Bifidobacterium bifidum* ATT (ATT3440) 균은 당들 중에서 포도당을 이용하여 성장할 때 제일 빠르게 성장하는 것을 알 수 있었음
- *Bifidobacterium bifidum* ATT (ATT3440) 균주를 scale up하여 배양함. 동일한 조제배지를 사용하여 2개의 다른 배양기에서 1L씩 배양하였음.
- 10시간째 모든 배양기에서 배양액을 회수하여 broth상태에서의 생균수를 측정하였음. 생균수 결과는  $3.25 \times 10^9$  CFU/ml 이었음.

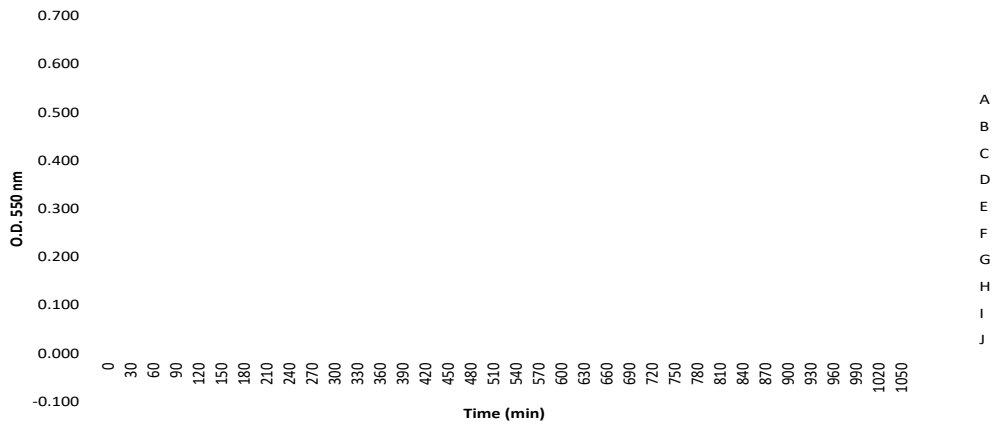


A. *Bifidobacterium bifidum* ATT (ATT3440) 균주의 당 종류 별 성장곡선

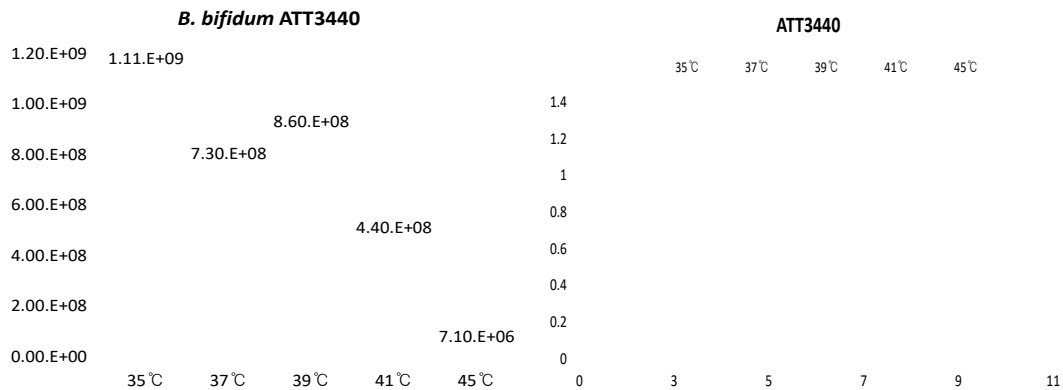


B. 그림 *Bifidobacterium bifidum* ATT (ATT3440) 균주의 배양기에서의 성장곡선

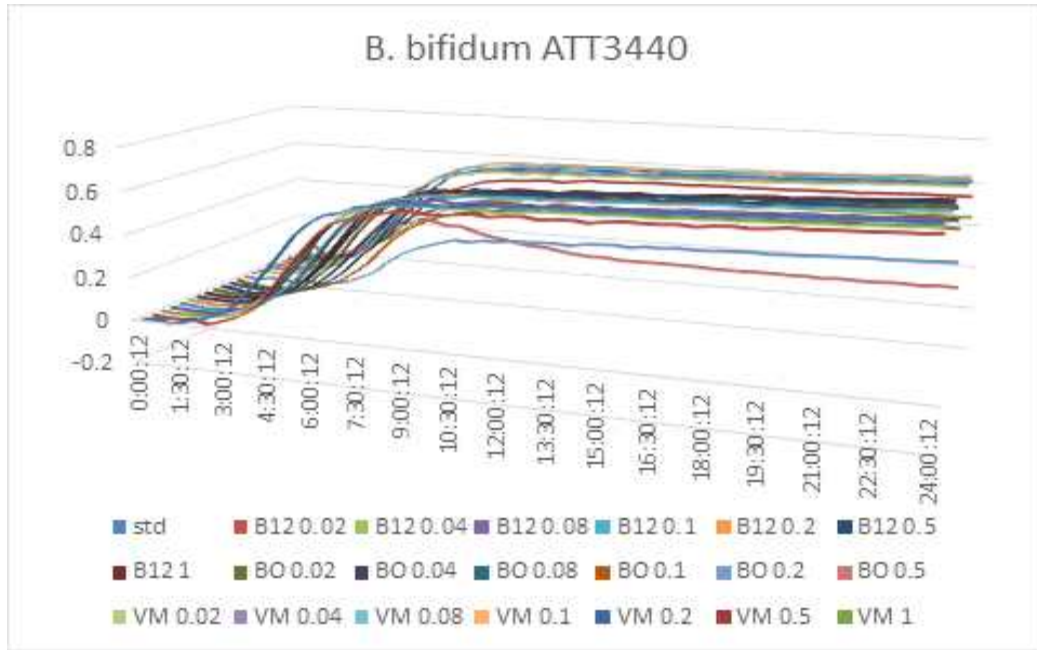
**B. bifidum ATT3440**



C. 탄소원 종류에 따른 *Bifidobacterium bifidum* (ATT 3440)의 성장곡선



D. 배양 온도별 *Bifidobacterium bifidum* (ATT 3440)의 성장

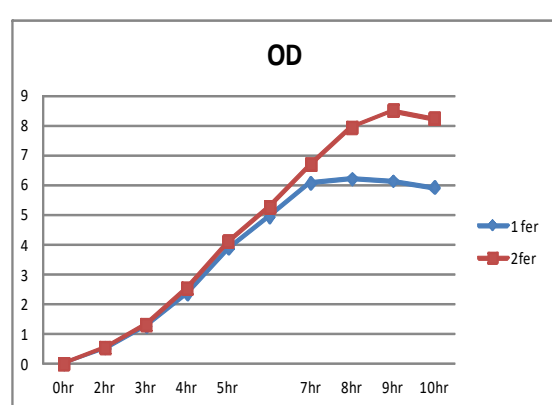
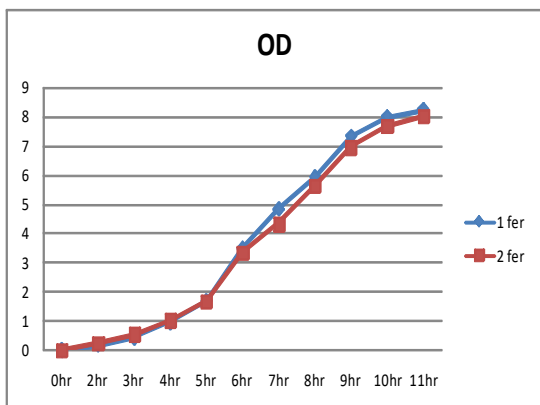
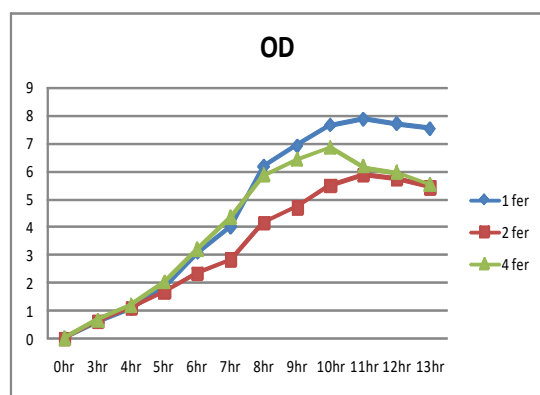
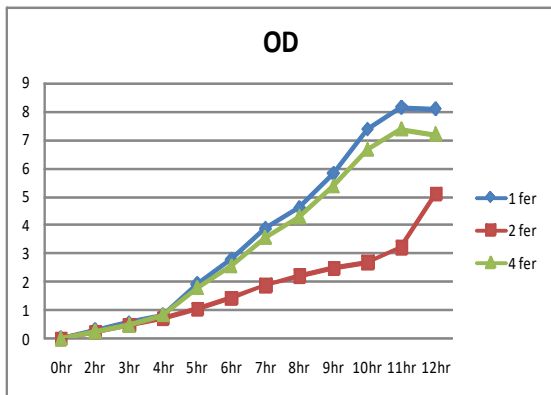
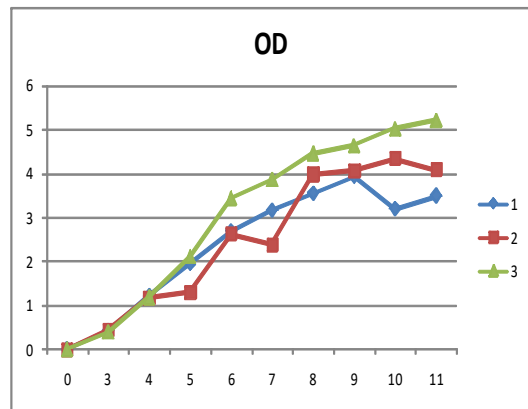
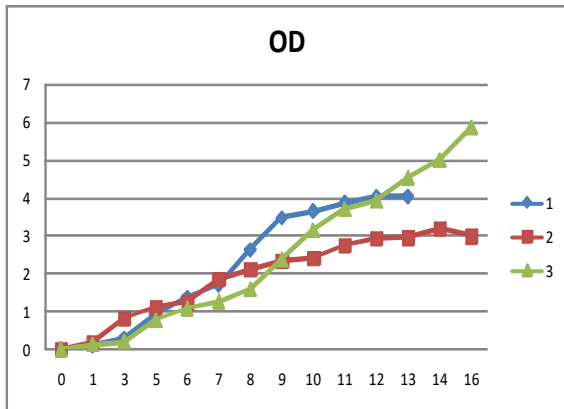


E. 신소재 첨가에 따른 *Bifidobacterium bifidum* (ATT 3440)의 성장

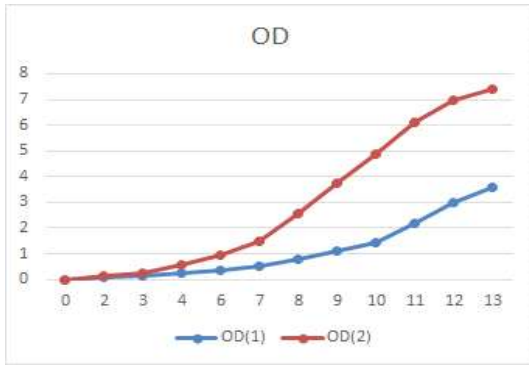
그림 40 *Bifidobacterium bifidum* (ATT3440)의 생육곡선과 생균수

- *Bifidobacterium bifidum* (ATT3440)의 배양 효율을 증가시키기 위하여 탄소원과 최적 배양온도를 선정하기 위하여 실험을 진행.
- 초기 탄소원 농도를 3%로 하여 glove box에서 실험을 진행하였음.
- *Bifidobacterium bifidum* ATT3440은 탄소원으로 삼당류 또는 FO를 사용하였을 때 성장이 빨라짐을 확인함.
- 최적 배양 온도설정 실험은 각각 35°C, 37°C, 39°C, 41°C에서 100mL bottle에 정치배양함.
- 각 온도에서 배양하며 시간별로 OD값을 측정한 결과 41°C에서 초기에 가장 좋은 성장을 보였으나 배양 중반에 들면서 37°C 배양에서와 유사한 성장을 보이고 9시간 이후 모든 균에서 급격한 성장 감소를 보임.
- 배양 완료 후 실험군별 morphology 확인 결과 41°C에서 균체가 변형됨을 확인되었고, 35°C 배양에서 생균수가 가장 높음을 확인함.
- *Bifidobacterium bifidum* (ATT3440)의 배양배지에 신소재 VT, BO, VM을 농도별로 첨가하여 성장을 확인함. 실험 결과 신소재 첨가에 따른 성장효과는 미미하였음.

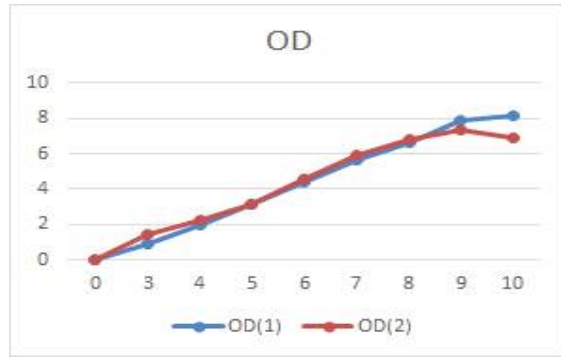
(4) *B. lactis* AD011 의 생육특성



lactis (AD011)의 성장곡선



G 배양 배지 성분 제외에 따른 *Bifidobacterium lactis* (AD011)의 성장곡선



H 배양 배지성분을 제외하고 기타 첨가물을 첨가하였을 때 *Bifidobacterium lactis*(AD011)의 성장곡선

그림 41 *Bifidobacterium lactis* (AD011)의 생육곡선 그래프

- *B. lactis* (AD011)의 배양 시 질소원을 효소처리하여 넣은 균과 초기 배양 배지에 질소원과 탄소원의 비율을 절반으로 하고 나머지 질소원 탄소원을 추가 첨가 한 균의결과는 비슷하였으나 기타 첨가물을 첨가한 균의 생장은 현저하게 낮아짐. 기타첨가물에 CM을 함께 넣었을 때 *Bifidobacterium lactis* (AD011)의 성장이 더욱 좋았으며 기본 배양배지 성분 중 SA, AC를 제외하고 VA, VE, VC를 더하고 초기 탄소원 비율을 2%로 하였을 때 생장이 좋았음. 배지 성분 중 배지의 색 변화에 관여하는 성분이 있어 그 성분을 다른 성분으로 대체 하였는데 *Bifidobacterium lactis* (AD011)의 성장에 영향을 미치지 않아 대체 성분을 배지 성분으로 사용하기로 결정함. 여러 가지 pH 조절 BASE로 pH를 조절하며 *Bifidobacterium lactis* (AD011)을 배양 하였을 때 기존에 사용하던 BASE의 효과가 가장 좋았음.

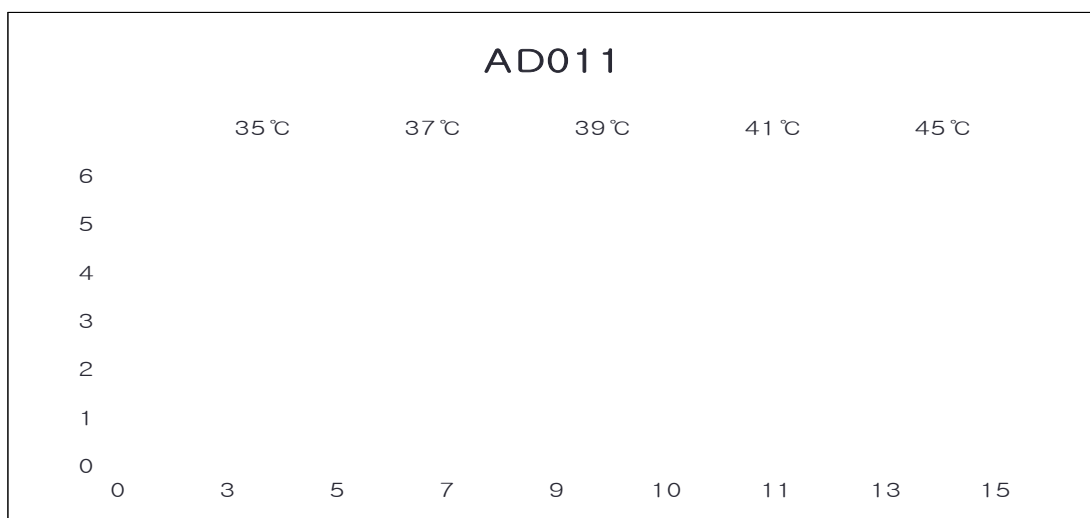


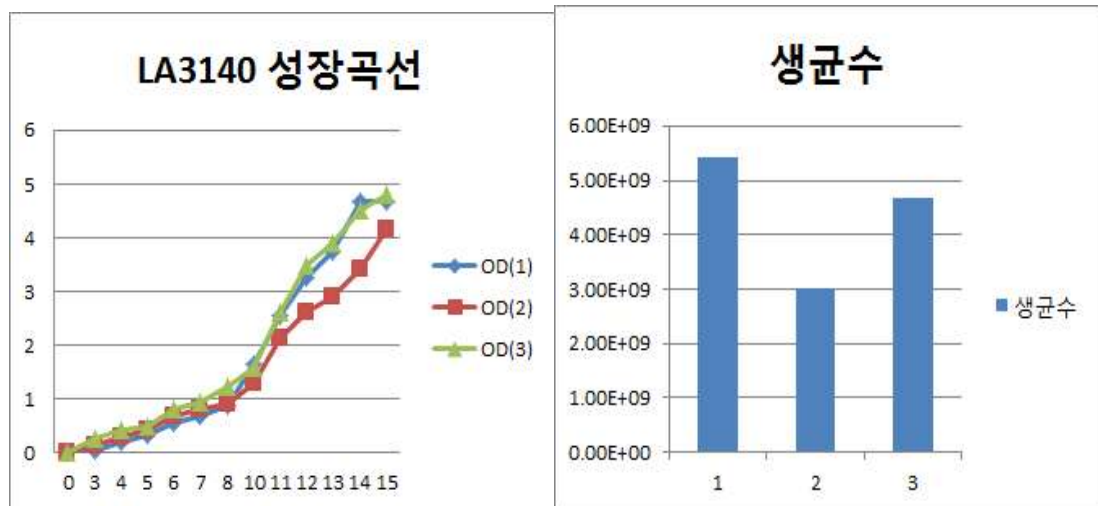
그림 배양 온도별 *Bifidobacterium lactis* (AD011)의 성장

- *Bifidobacterium lactis* (AD011) 균주가 최적으로 성장하는 온도를 탐색하여 균의 생산성

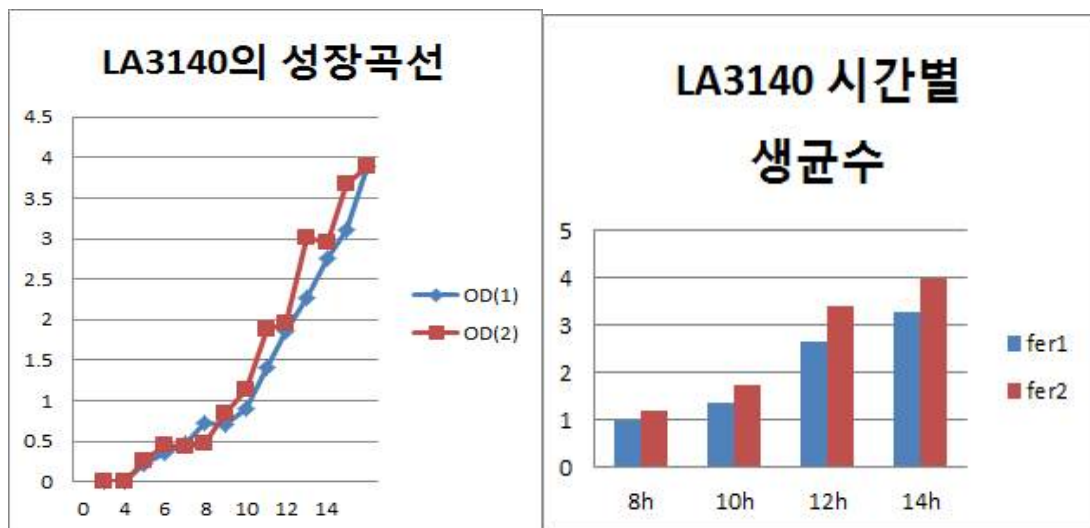
을 증대시키기 위하여 35 °C, 37 °C, 39 °C, 41 °C, 45 °C에서 정치 배양배양함.

- 배양 결과 39°C와 41°C의 초기 성장곡선의 기울기가 저온에서 배양한 조건보다 더 가파르게 올라가고 배양 10시간 만에 정지기에 도달함.
- 생균수는 39°C에서 1.83.E+09 CFU/mL로 가장 높았고, morphology 결과에서도 39°C와 41°C의 균주가 저온에서 배양한 조건에서보다 균의 상태가 더 크게 확인됨.

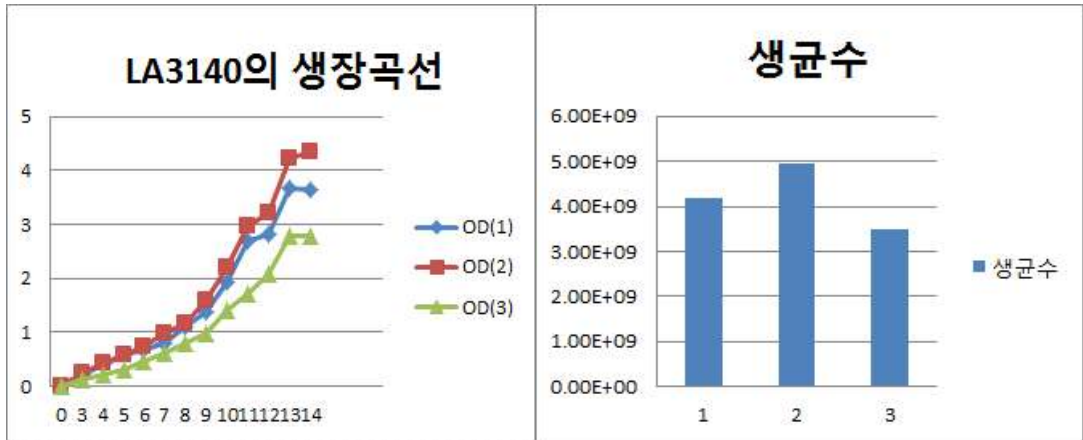
### (5) Lactobacillus acidophilus(LA3140)



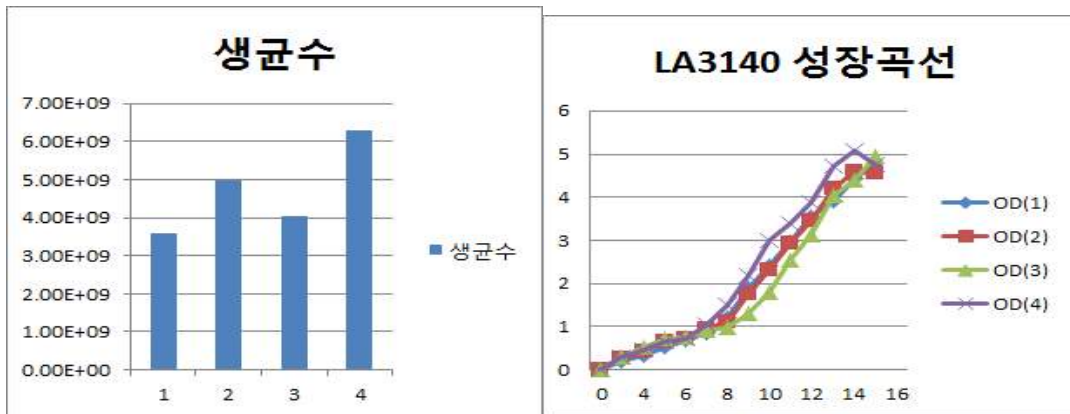
A. 초기 탄소원의 농도와 CC 첨가에 따른 Lactobacillus acidophilus(LA3140)의 성장 곡선과 생균수



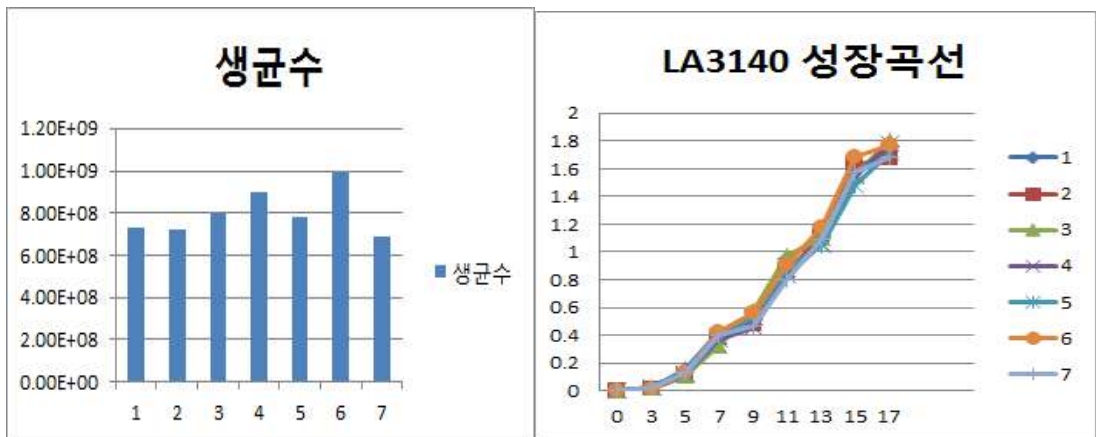
B. HMT 첨가에 따른 Lactobacillus acidophilus(LA3140)의 성장곡선과 시간별 생균수



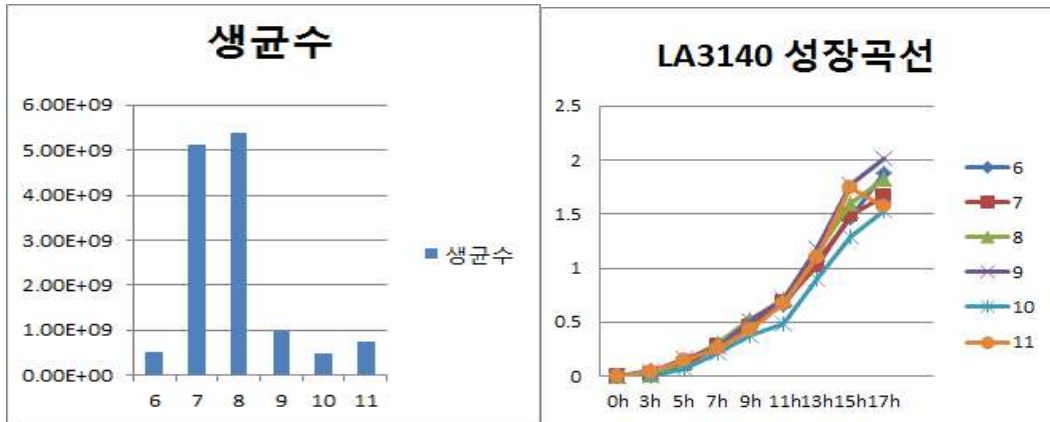
C. MC2의 첨가와 질소원 조성 변화에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수



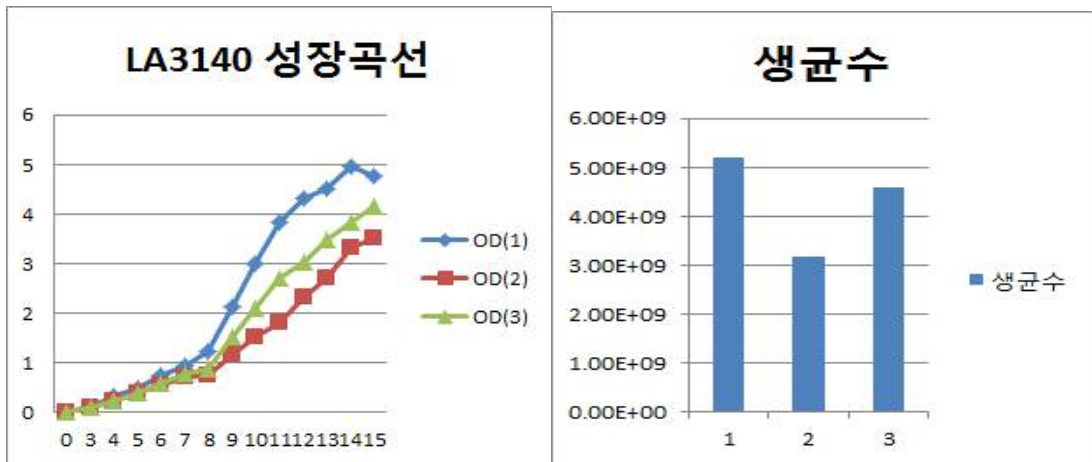
D. 배양 배지에 MC2 첨가 농도에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수



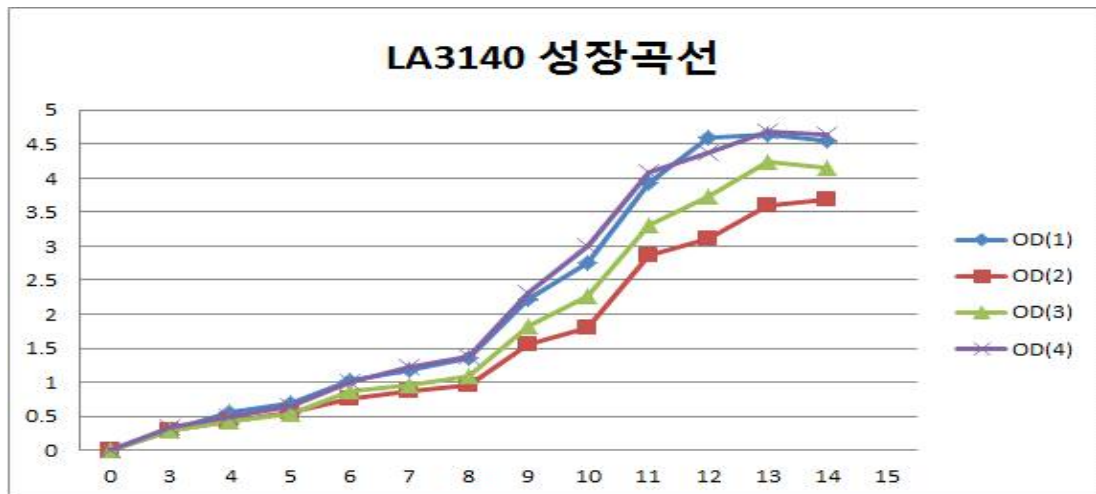
E. 배양배지에 천연물질 첨가에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수



F. RFBF, SO의 첨가농도에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수

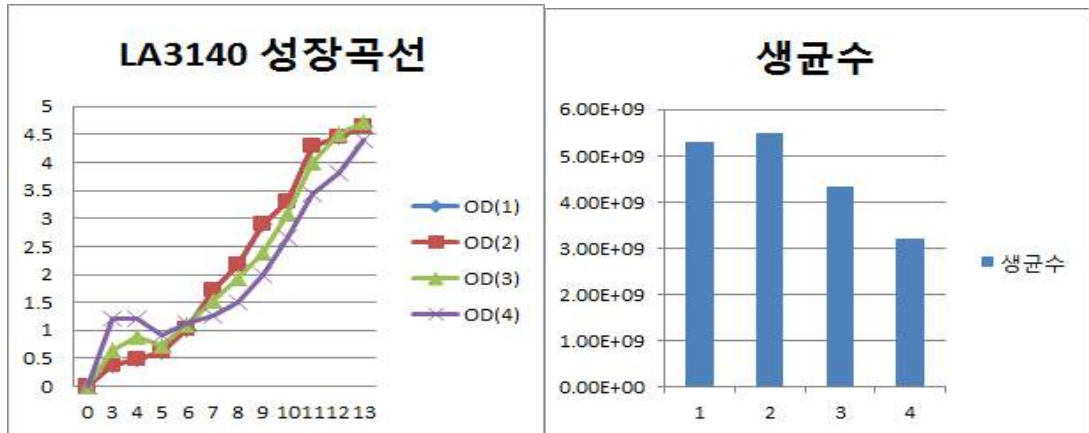


G. 배지 성분 교체에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수

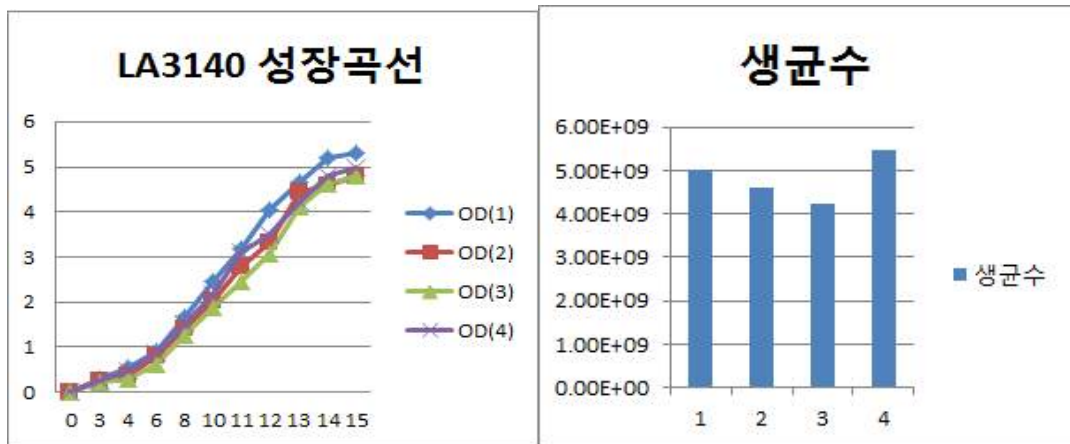


H. 배지성분 교체 농도에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선

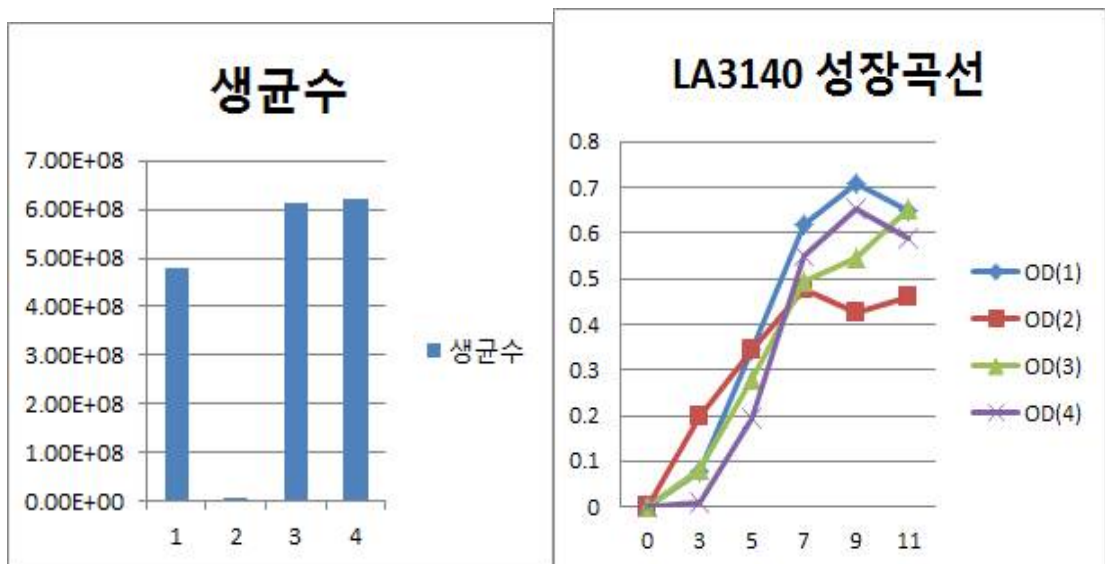




I. MS4 고농도 첨가에 의한 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수



J. 소포제 첨가에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수



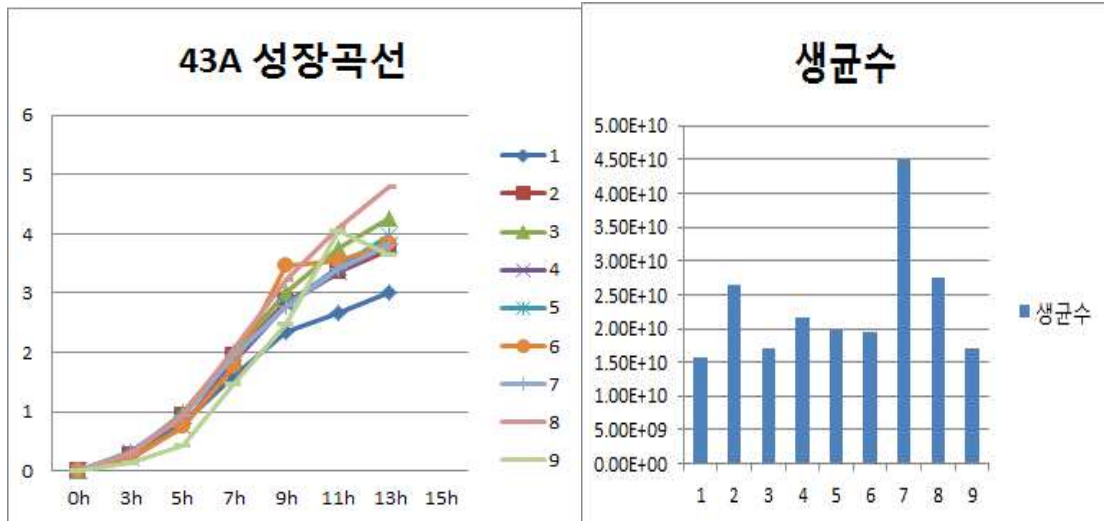
K. 배양 환경 변화와 배지 성분 농도 변화에 따른 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장곡선과 생균수

그림 42. *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장

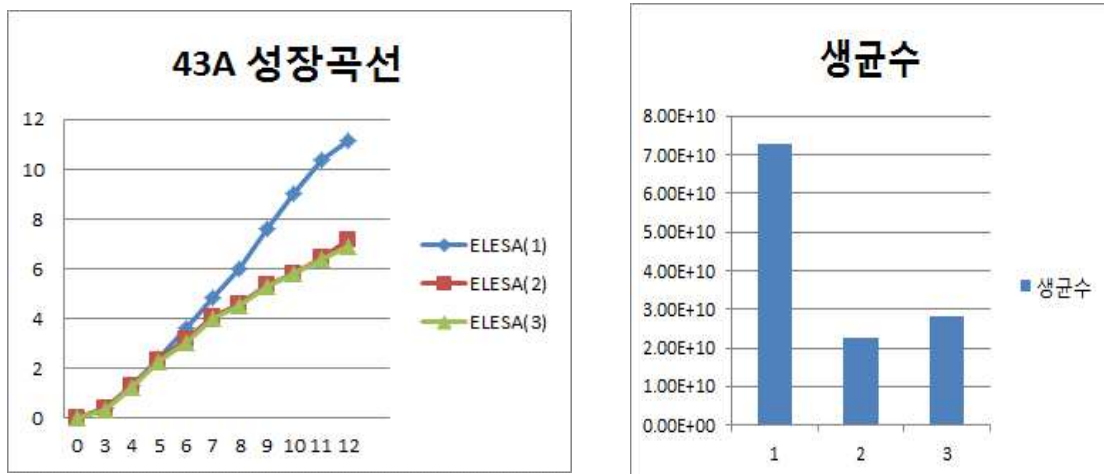
- 배양 배지에 HMT첨가가 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장에 미치는 영향을 알아봄. 배양 결과는 HMT를 배양배지에 첨가 시 배지의 색이 진해서 OD값을 측정하기에 어려워 배양 8시간 후부터 2시간 간격으로 생균수를 측정하였음. 생균수 측정결과 HMT를 첨가한 균의 균수가 다소 높았음.
- MC2의 첨가와 배지 성분 중 질소원을 반으로 줄이고 LA를 나머지 질소원으로 교체하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하였음. 배양 결과 질소원의 일부를 LA로 교체하였을 때 성장이 가장 좋지 못하였고 MC2를 배양배지에 첨가하여 배양하였을 때 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장이 가장 좋았음.
- MC2의 배양배지 중 농도를 0.5mmol, 1mmol, 3mmol로 하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하였음. 배양결과 MC2를 3mmol을 넣은 배지에서 배양하였을 때 성장이 가장 좋았고 배양 완료 후 생균수 또한 가장 높았음.
- 항산화 작용이나 살균 작용을 가지고 있는 물질을 첨가하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하였음. 배지에 첨가한 물질은 총 6가지 물질로 각 물질을 개별적으로 일정농도로 배양배지에 첨가하였음. 배양 결과 모든 균의 성장곡선에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 배양 완료 후 생균수를 보았을 때 SO 혹은 RFBF를 첨가하여 배양 하였을 때 다소 높았음.
- 배양배지 내 RFBF와 SO의 첨가 농도를 달리하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하였음. RFBF는 농도에 따라 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장에 영향을 미치지 않았고 SO는 0.01%를 첨가 하였을 때 성장도 좋았고 생균수도 높았음. RFBF를 첨가 하였을 때 SO를 0.02%, 0.005%를 첨가하였을 때보다 대체적으로 생균수가 높았으나 SO를 0.01% 넣었을 때 보다는 생균수가 현저히 낮았음.
- 배양 배지 성분 중 MC2를 MS4로 대체하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하였음. 배양 결과 모든 균에서 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장에 차이를 보이지 않았음.
- 배양배지에 MS4의 농도 각 1mmol, 3mmol, 5mmol을 첨가하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하였음. 배양 결과 STD와 MS4를 5mmol 농도로 첨가한 균에서 비슷한 성장을 보였음.
- 배양배지에 MS4의 농도를 고농도(10mmol, 20mmol, 40mmol)을 첨가하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양하고 MS4를 저 농도로 첨가 하였을 때의 성장과 비교하였음. MS4의 첨가 농도가 높을수록 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장이 좋지 못하였고 이전 배양결과와 비교 하였을 때 MS4의 첨가 농도는 10mmol 농도 이하의 범위로 하는 것이 바람직함.
- *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)균의 특성상 뭉치는 경향이 있어 최종 생균수에 영향을 주는 것으로 생각되어 소량의 소포제를 사용하여 균의 뭉침을 완화 시킬 수 있는지 확인함. 배양 결과 소량의 소포제가 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)의 성장에 직접적으로 영향을 주는 것은 아니지만 균의 뭉침을 억제하여 최종 배양액에서의 생균수를 높여주는 효과가 확인됨.
- 배양 온도, 탄소원, 배양배지 농도를 달리하여 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140)를 배양함.

## (6) *Lactobacillus plantarum* (43A)

- 본 연구는 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140) 균주의 최적 배지를 선정하는 연구 과정임.

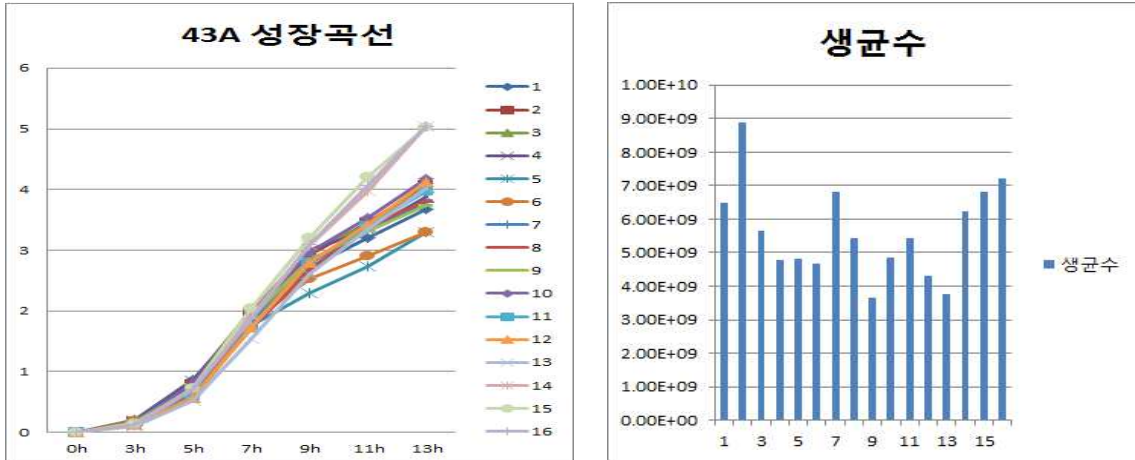


A. 탄소원 종류에 따른 *Lactobacillus plantarum* (43A)의 성장곡선과 생균수



B-1 탄소원과 질소원에 따른 *Lactobacillus plantarum* (43A)의 성장곡선

B-2 탄소원과 질소원에 따른 *Lactobacillus plantarum* (43A)의 생균수



C. 배양 중 조절 pH에 따른 *Lactobacillus plantarum* (43A)의 성장 곡선과 생균수

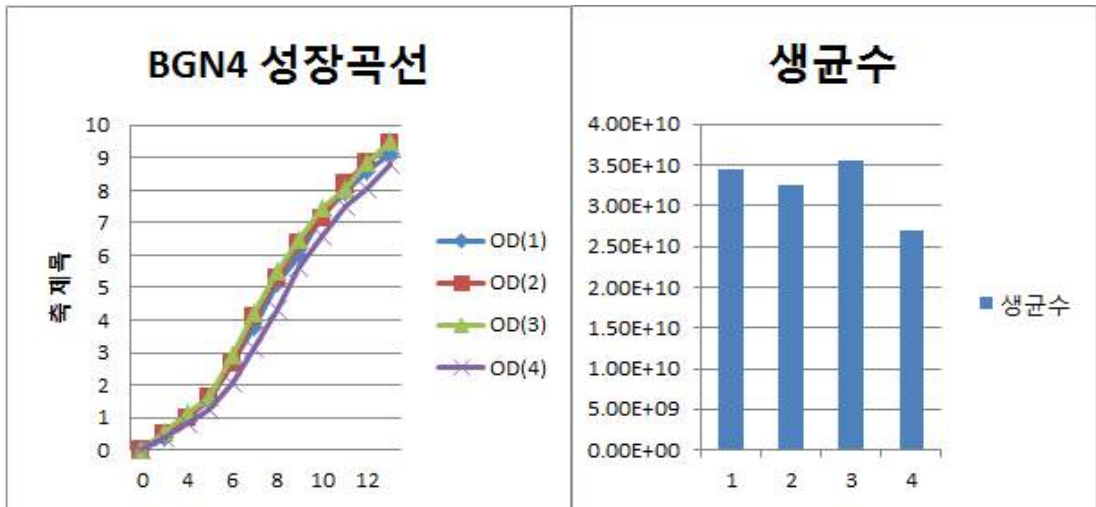
그림

### 43. *Lactobacillus plantarum* (43A)의 성장

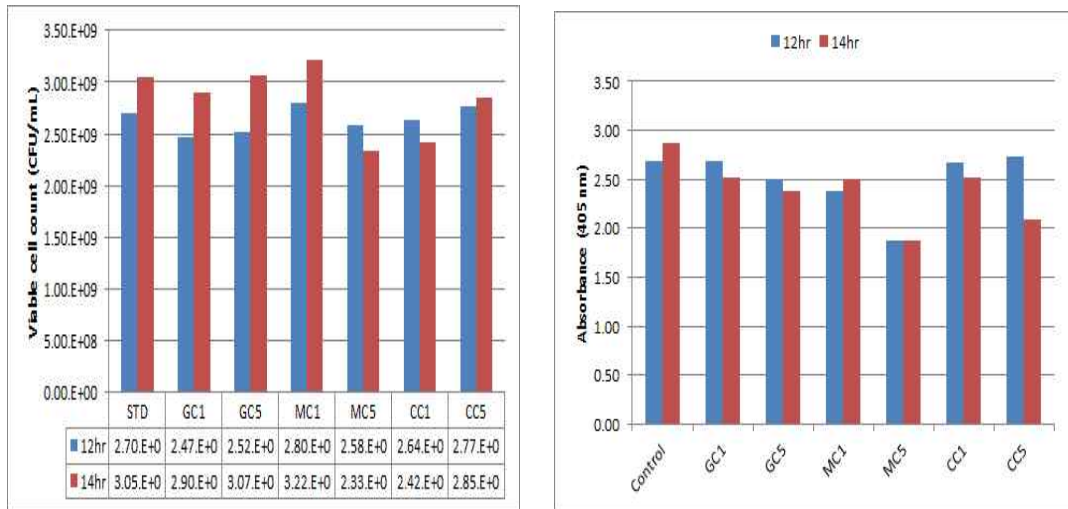
- EUR, SUR, GLU, LAT, GOS, RFN, FOS, MAL, GAL을 탄소원으로 하는 각 배지에 *Lactobacillus plantarum* (43A)를 배양함. 배양은 12시간동안 이루어졌고 배양이 완료된 후 배양액의 생균수도 확인함. 성장이 가장 좋은 결과의 세 가지 탄소원을 이용하여 질소원의 종류와 비율을 달리하여 배양 후 탄소원을 결정함.
- 탄소원과 질소원의 비율을 달리하여 *Lactobacillus plantarum* (43A)을 배양함. 또한 질소원의 효소처리 여부에 따른 *Lactobacillus plantarum* (43A)의 성장을 함께 확인함.
- 배양 중 pH를 pH5.5, pH 4.5, pH 3.5로 조절하면서 *Lactobacillus plantarum* (43A)을 배양함. *Lactobacillus plantarum* (43A)는 낮은 pH에서도 생존률이 높은 균주로 배양 시에도 유효한지 확인하려 함. 배양 결과 배양 중 낮은 pH의 유지는
- *Lactobacillus plantarum* (43A)의 성장에 좋지 않음.

### (7) *Bifidobacterium bifidum*(BGN4)

- 본 연구는 *Lactobacillus acidophilus*(LA3140) 균주의 최적 배지를 선정하는 연구 과정임.

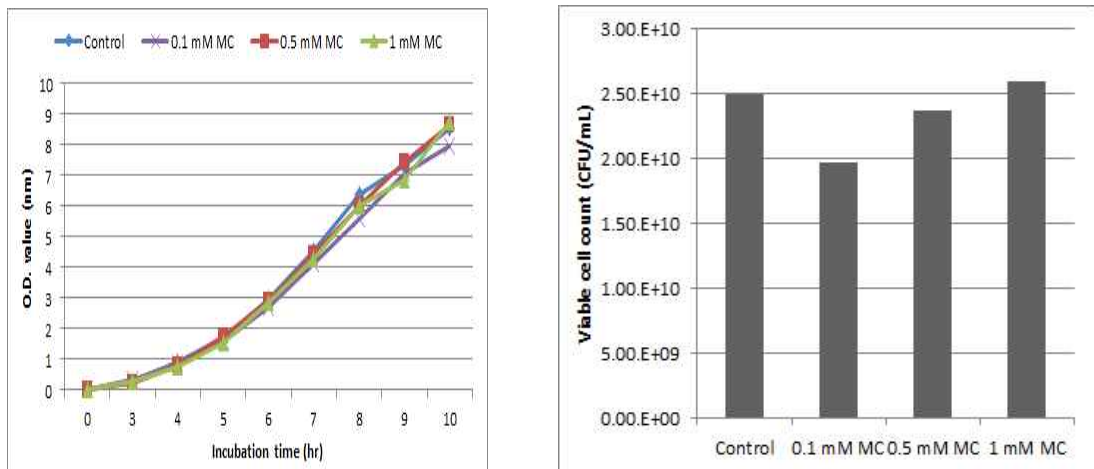


A. HMT 첨가 시점에 따른 Bifidobacterium bifidum(BGN4)의 성장곡선과 생균수

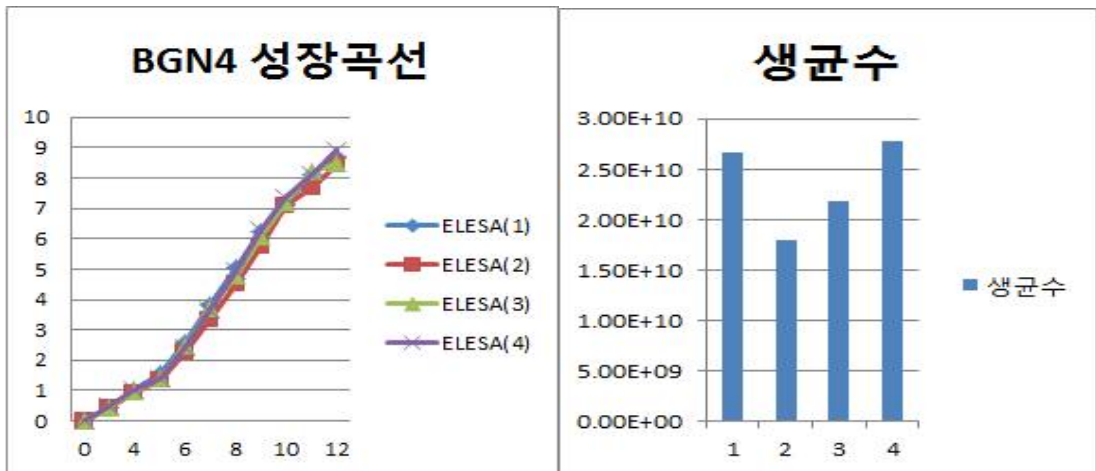


B. 1mM, 5mM 농도의 화합물을 첨가한 BGN4 (B. bifidum) 성장

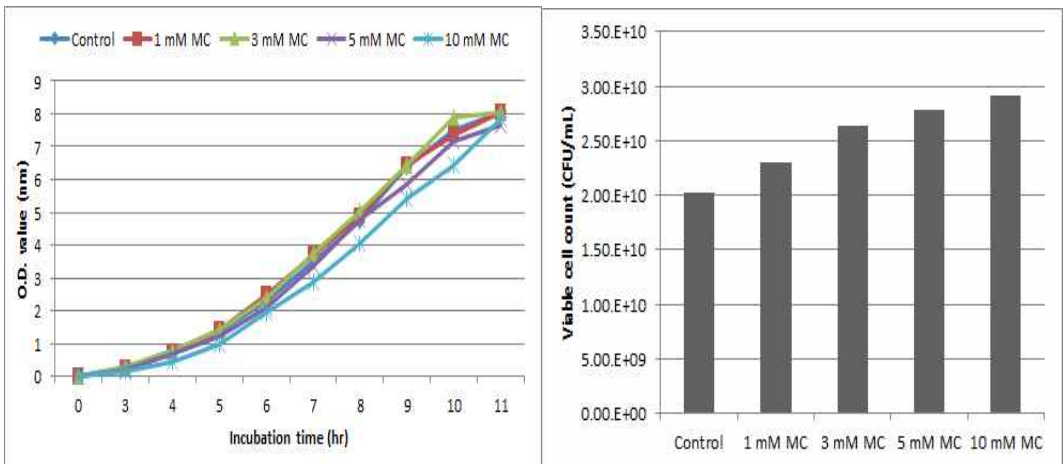
A: 생균수, B:  $\beta$ -galactosidase activity



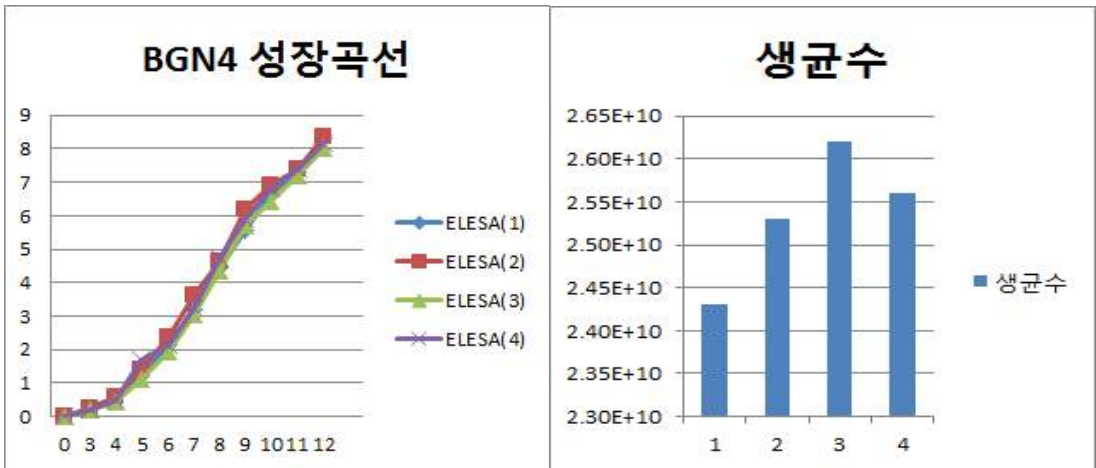
C. 배양 중 0.1, 0.5, 1 mM MC를 첨가한 BGN4의 성장 곡선과 생균수



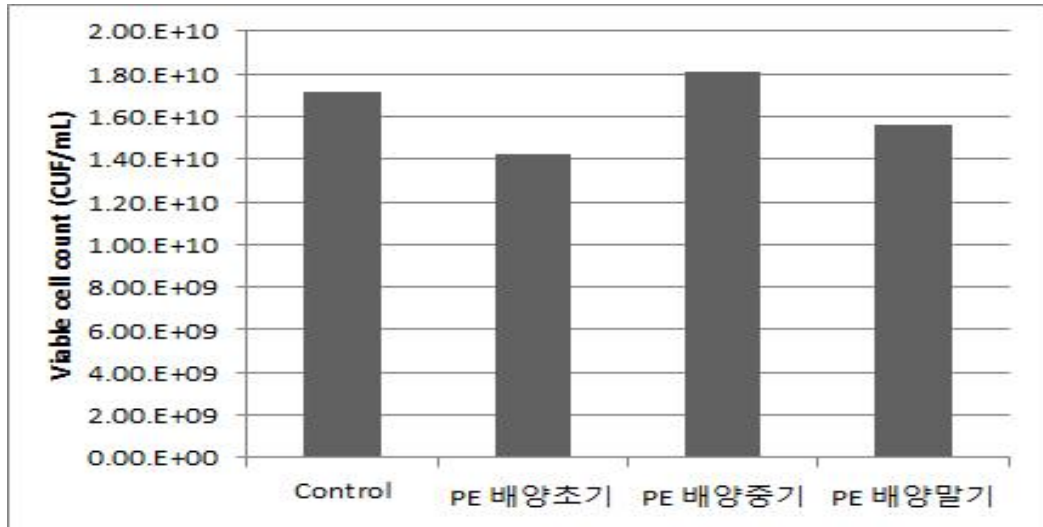
D. 소포제 첨가와 첨가 농도에 따른 Bifidobacterium bifidum(BGN4)의 성장곡선과 생균수



E. 배양 중 1 mM 이상의 MC를 첨가한 BGN4의 성장곡선과 생균수



F. 0.05% PE첨가와 첨가 시점에 따른 Bifidobacterium bifidum(BGN4)의 성장곡선과 생균수



G. 배양 중 10 g/L PE의 첨가시기에 따른 BGN4의 생균수

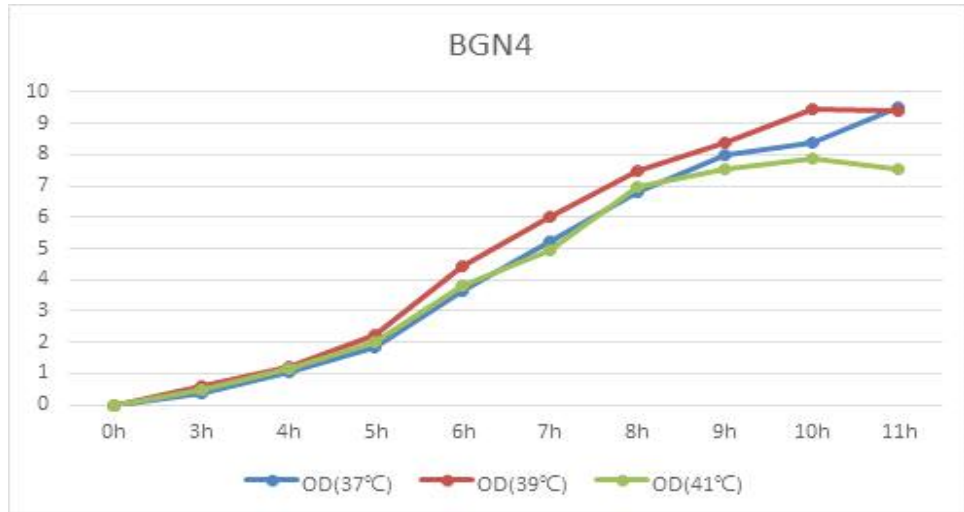
그림44. Bifidobacterium bifidum(BGN4)의 성장

- 배양 배지에 HMT첨가와 첨가시점에 따른 Bifidobacterium bifidum(BGN4)의 성장에 미치는 영향을 알아봄. 배양 결과는 HMT를 배양배지에 첨가 시 배지의 색이 진해서 OD값을 측정하기에 어려워 많은 희석이 필요하였음. 처음부터 HMT를 첨가한 균을 제외하고는 성장이 비슷하였고 생균수 또한 같은 결과를 보였음.
- MC 1 mM이 첨가된 배지에서 대조군보다 높은 생균수가 측정되었음.  $\beta$ -galactosidase 활성 효과는 모든 실험군에서 대조군보다 낮은 경향을 보였음.
- BGN4의 배양 중에 합성물을 각각 첨가했을 때 생균수가 가장 좋았던 합성물이 MC 1 mM이었기 때문에 MC로 선정하였고 이의 최적 농도를 확인하고자 우선적으로 1 mM보다 낮은 농도를 배양하였음. BNG4 최적배지에 MC를 농도별로 첨가한 후 fermenter에서 탄소원을 자동 feeding으로 첨가하며 배양하였음. UV spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 1 시간마다 흡광도를 측정하여 생육주기를 확인하였고 정지기에 도달하기 전에 배양액을 회수하여 생균수를 측정하였음. 배양 중 MC를 농도별로 첨가했을 때 생육곡선에서는 큰 차이가 보이지 않았으나 생균수에서는 0.1 mM 농도는 대조군보다 약 1.3배 낮았음. 생균수에서도 1 mM 이하의 MC 농도에서는 대조군보다 낮은 생균수를 나타냈음.
- 배양 중 1 mM 이하의 농도를 첨가했을 때 MC가 대조군보다 균의 성장에 있어 효과적이지 못했으므로 1 mM보다 높은 농도에서 유산균주를 다시 배양하였음. BNG4 최적 배지에 MC를 농도별로 첨가한 후 fermenter에서 탄소원을 자동 feeding으로 첨가하며 배양하였음. UV spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 1 시간마다 흡광도를 측정하여 생육주기를 확인하였고 정지기에 도달하기 전에 배양액을 회수하여 생균수를 측정하였음. MC를 1, 3, 5 mM의 농도로 배양 중에 첨가하였을 경우 성장곡선에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단되나 생균수에서는 첨가 농도가 높아질수록 생균수가 조금씩 증가한 것으로 확인되었음. 10 mM의 농도를 첨가한 실험군의 흡광도를 보았을 때 다른 실험군보다 느리게 성장하였으나 생균수는 가장 높게 나왔음.
- 배양 배지에 농도별 소포제를 첨가하여 Bifidobacterium bifidum(BGN4)의 성장에 미치

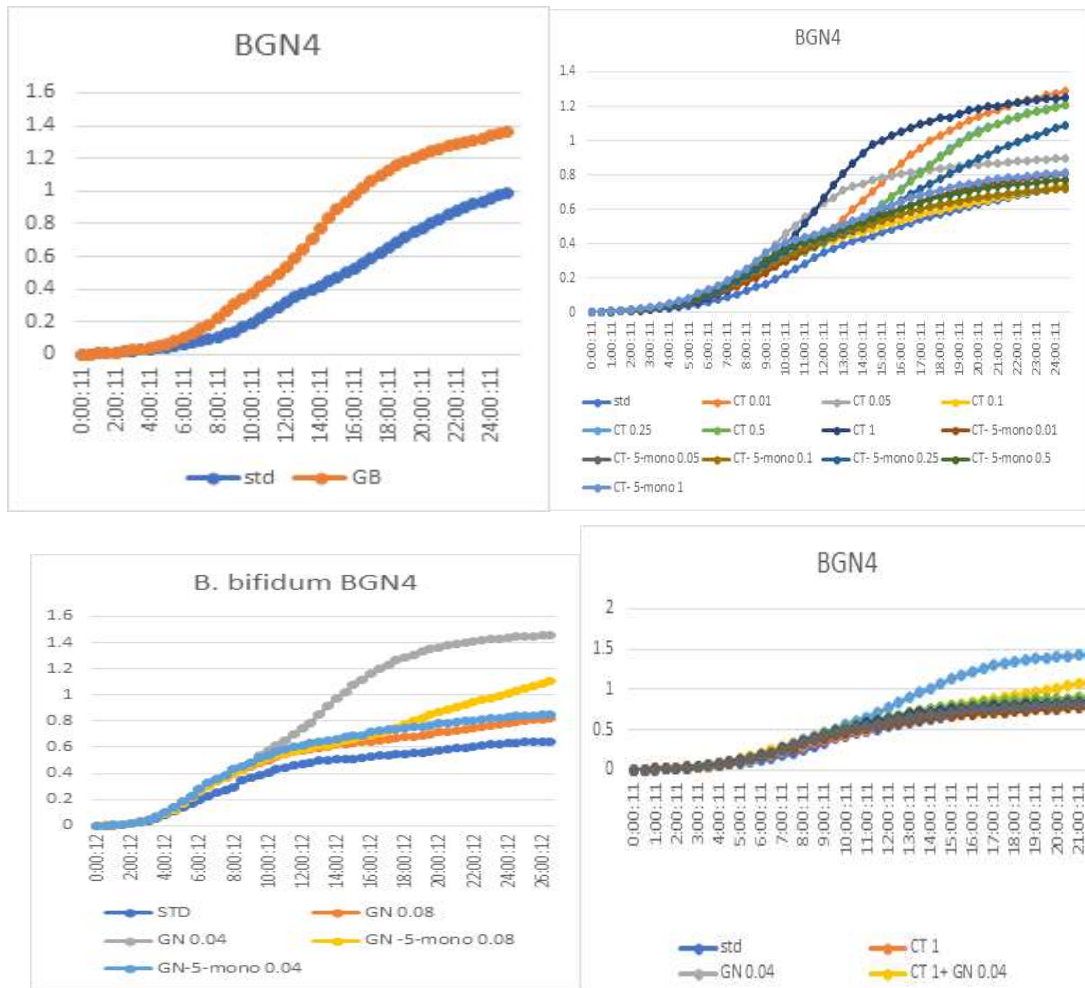
는 영향을 알아봄. 배양 결과 소포체의 첨가 유무나 농도에 따라 *Bifidobacterium bifidum*(BGN4)의 성장에 영향을 미치지 않았음.

- 배양 배지에 0.05%의 PE를 첨가 시점을 달리하여 *Bifidobacterium bifidum*(BGN4)의 성장에 미치는 영향을 알아봄. PE의 첨가는 배양 초기, 중기 말기로 하였음. 배양결과 성장곡선에서는 차이를 보이지 않았으나 배양 완료 후 생균수를 측정하였을 때 PE를 배양 중기에 첨가한 균의 생균수가 약간 높았음.
- 10 g/L 농도의 PE를 배양 중기에 첨가한 실험군에서 생균수가 대조군보다 다소 높은 생균수를 보여 유산균의 성장에 도움을 주는 것으로 판단됨. 배양 초기와 배양 말기에 첨가한 경우에는 대조군보다 더 낮은 생균수를 보였음.





A. 배양 온도별 *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 성장



B. 신소재 첨가에 따른 *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 성장

그림 45 *Bifidobacterium bifidum*(BGN4)의 생육곡선 그래프

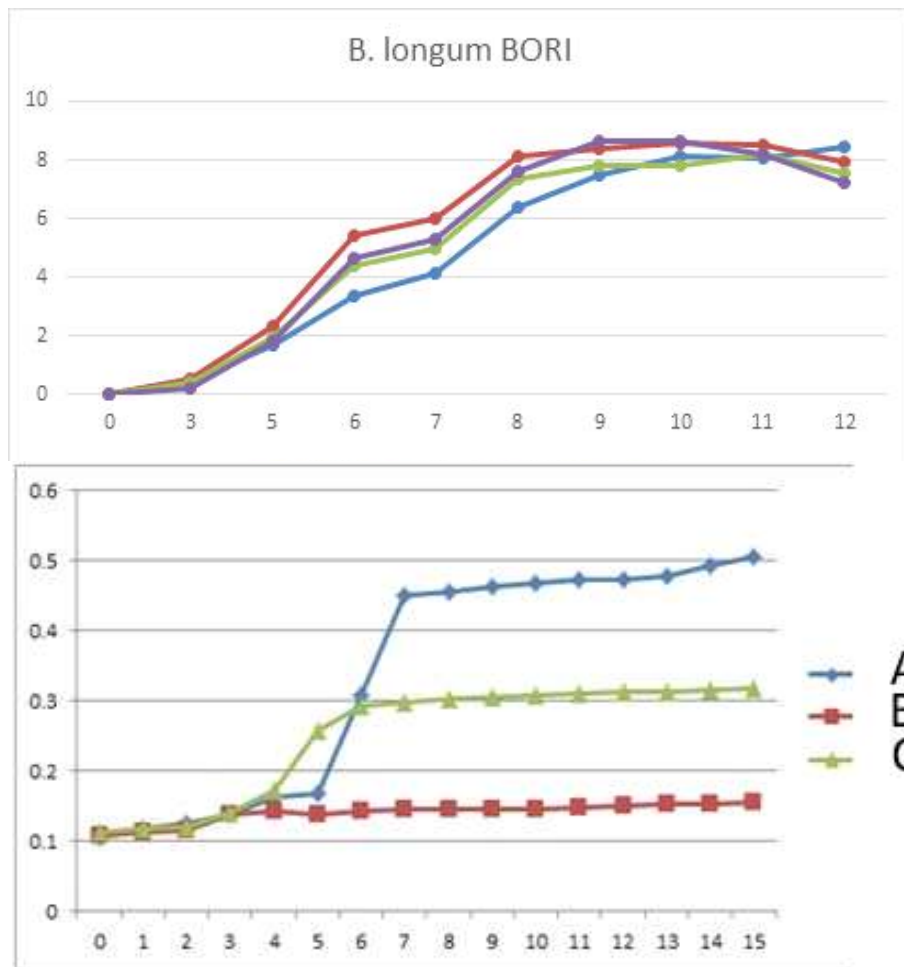
- *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 배양 효율을 증가시키기 위하여 배양 온도와 신소재

첨가 여부에 따른 *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 성장을 확인하는 실험임.

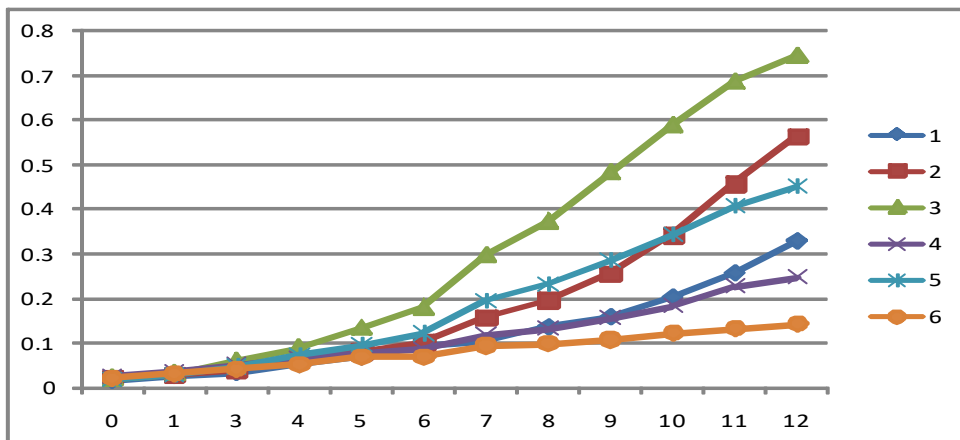
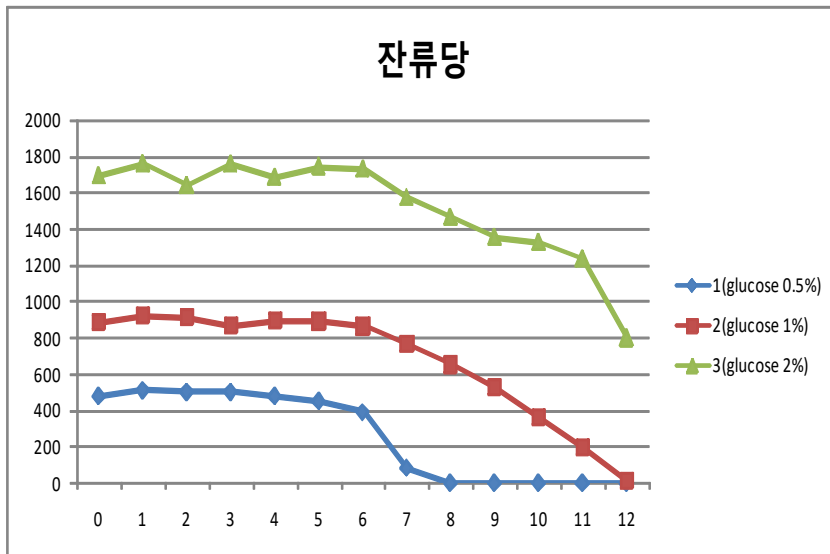
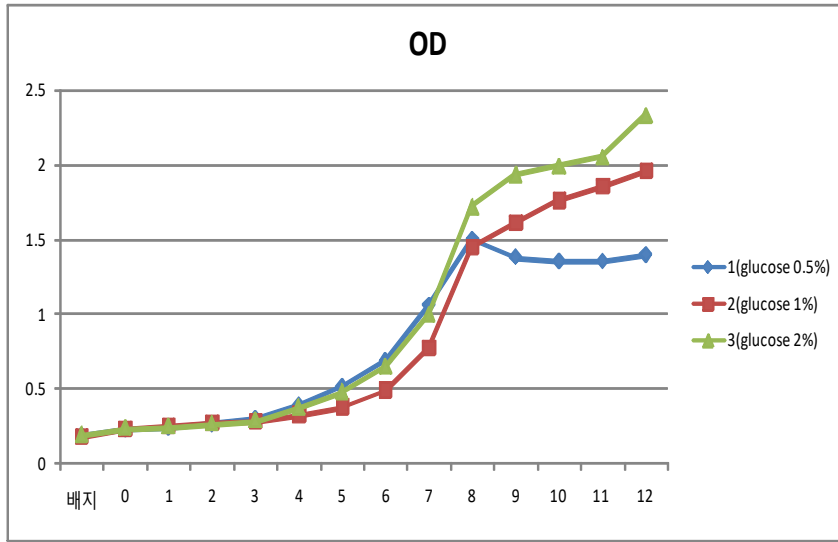
- *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 온도별 성장을 확인하기 위하여 1.5L fermentor에서 배양온도를 37℃, 39℃, 41℃로 설정하여 배양한 결과 39℃에서 *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 성장이 좋음.
- *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 배양배지에 신소재 GN, CT, GA를 단독으로 첨가하거나 혼합하여 첨가하여 *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)을 배양 한 결과 대부분 배지에 신소재를 첨가하는 것이 *Bifidobacterium bifidum* (BGN4)의 성장에 유익한 효과를 보임.

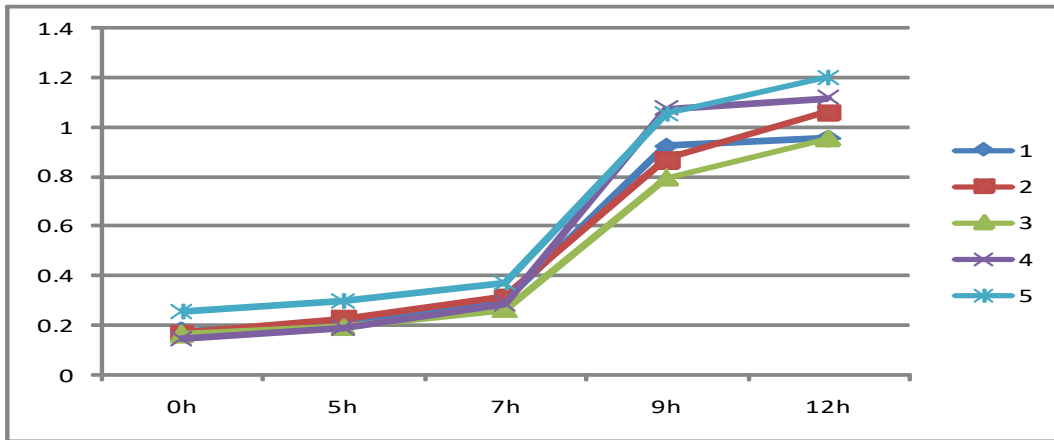
### (8) *Bifidobacterium longum* (BORI)

- 본 연구는 *Bifidobacterium longum*(BORI)균주의 최적 배양배지를 연구하는 과정임.

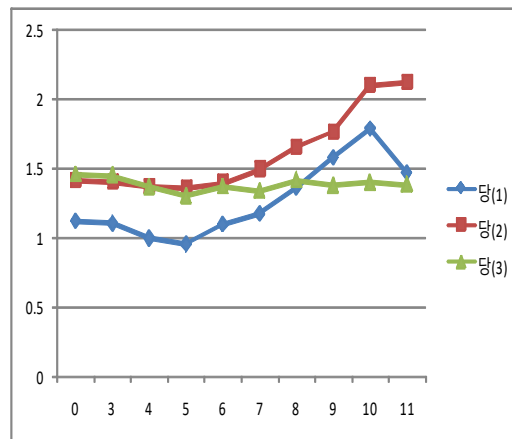
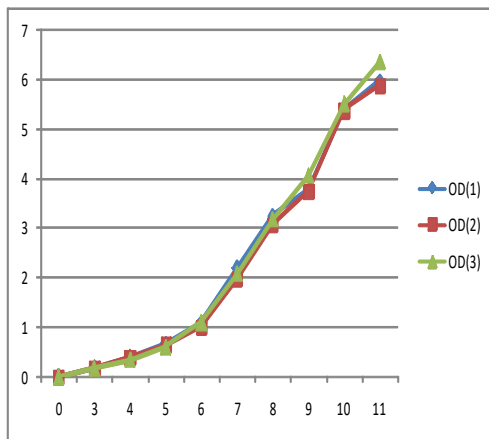
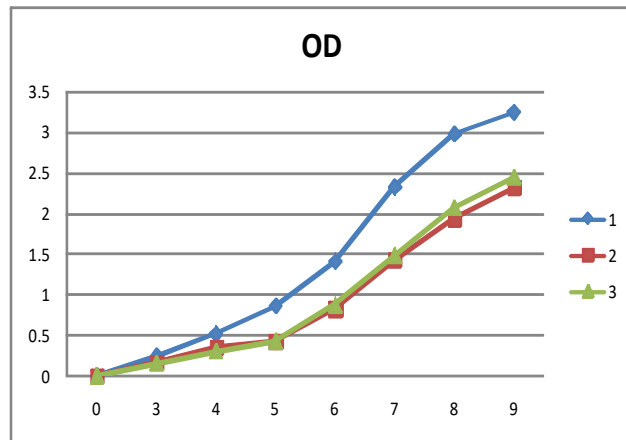


A. 탄소원 종류에 따른 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 생장곡선





D. 기타 첨가물 첨가에 따른 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 성장





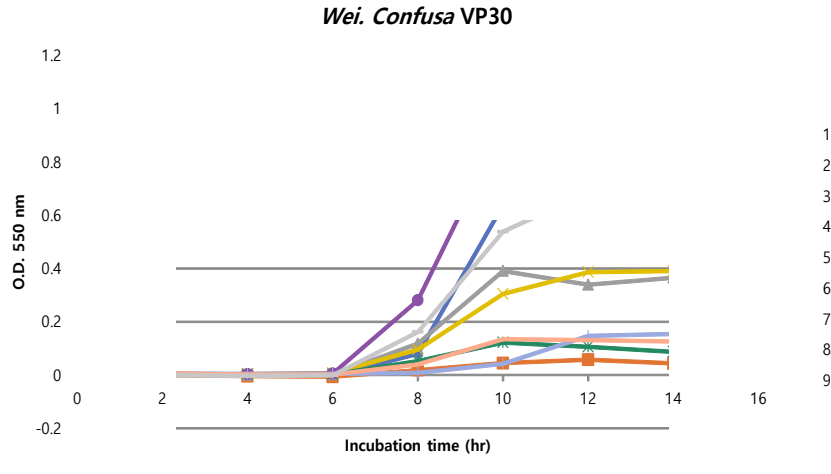
E. 배양 온도별 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 성장

그림 46 *Bifidobacterium longum*(BORI)의 생육곡선 그래프

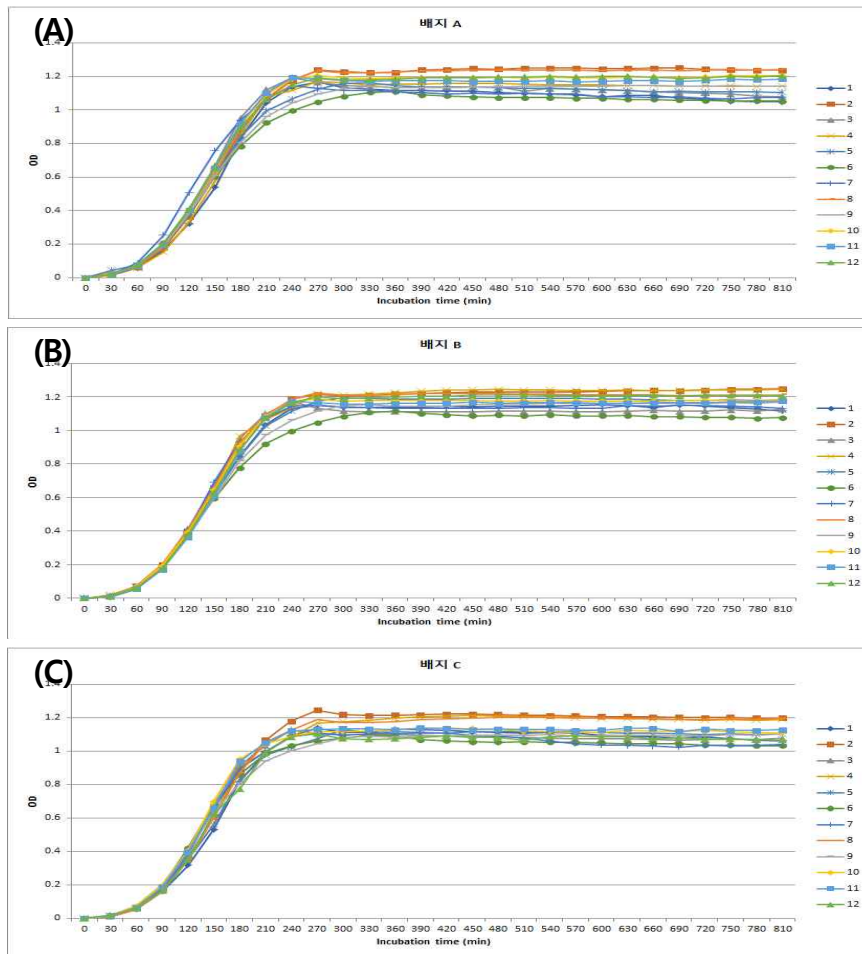
- *Bifidobacterium longum* (BORI)의 배양 효율을 증가시키기 위하여 탄소원과 배양 배지 중 탄소원과 질소원의 비율, pH 조절 BASE와 BASE에 탄소원을 혼합하는 비율 등을 알아보고자 실험을 진행
- *Bifidobacterium longum* (BORI)는 기본 배양배지 조성 중 특정 성분을 제외하였을 때 성장에 영향을 받지 않았음.
- *Bifidobacterium longum* (BORI)는 대체적으로 잘 성장하나 FRU는 잘 사용하지 못하여 성장이 저해됨.
- 초기배지에 함유된 당의 농도를 달리하여 추가 당 투입 없이 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 성장을 확인 결과 모든 군에서 유도기에는 생장의 차이를 보이지 않았으나 대수기에 들면서 초기당이 0.5%일때는 당이 부족하여 더 이상 성장하지 못하였고 초기당이 2%일때는 배양액 중 잔류 탄소원이 다량 존재함을 확인함.
- 탄소원의 비율을 질소원 1, 탄소원 2일 때 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 성장이 좋았음.
- 배양배지에 첨가물을 넣었을 때 대조군에 비하여 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 성장이 좋았음. pH 조절시 기존 BASE를 사용하였을 때 성장이 좋았음. BASE에 탄소원을 섞어 feeding 하였을 때 BASE의 탄소원 농도에 영향을 받지 않았음.
- 1.5L fermentor에서 배양온도를 달리하여 *Bifidobacterium longum* (BORI)의 성장을 확인한 결과 초기 배양 속도는 39°C에서 좋았으나 배양 완료 시점에서 37°C에서 배양하였을 때 최종 OD값과 생균수가 높았음.

## (9) *Weissella cofusa*(VP30)

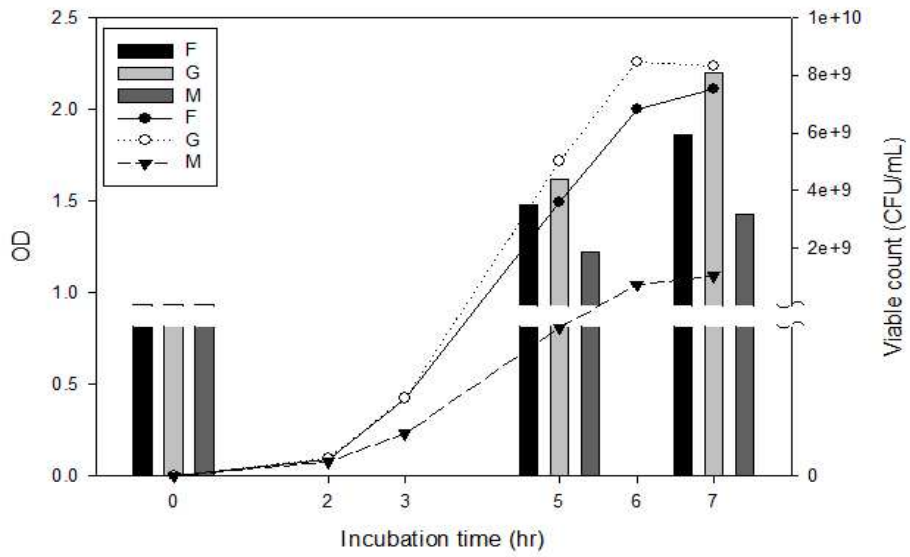
- 본 연구는 *Weissella cofusa*(VP30)균주의 최적 배양배지를 연구하는 과정임.



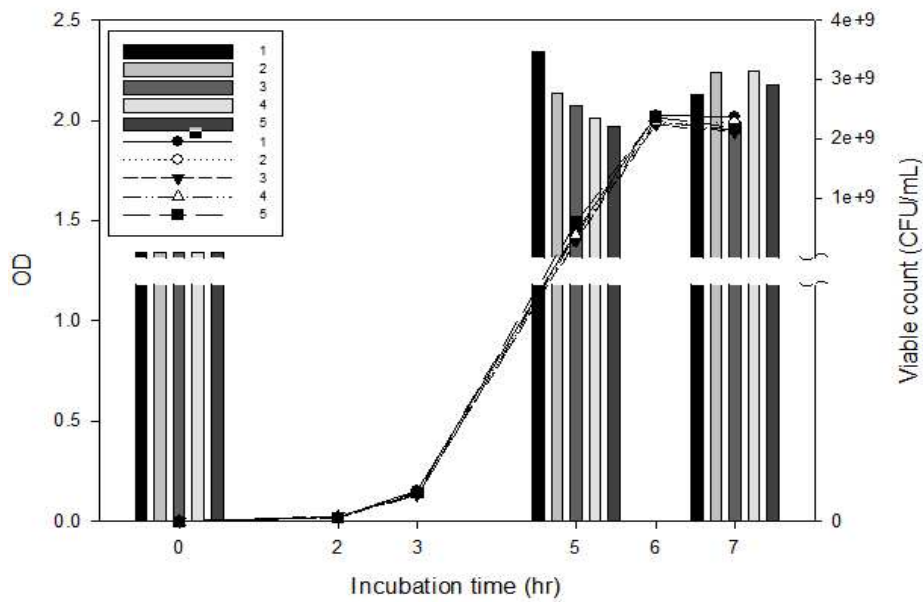
A. 탄소원 종류에 따른 *Weissella cofusa*(VP30) 성장곡선



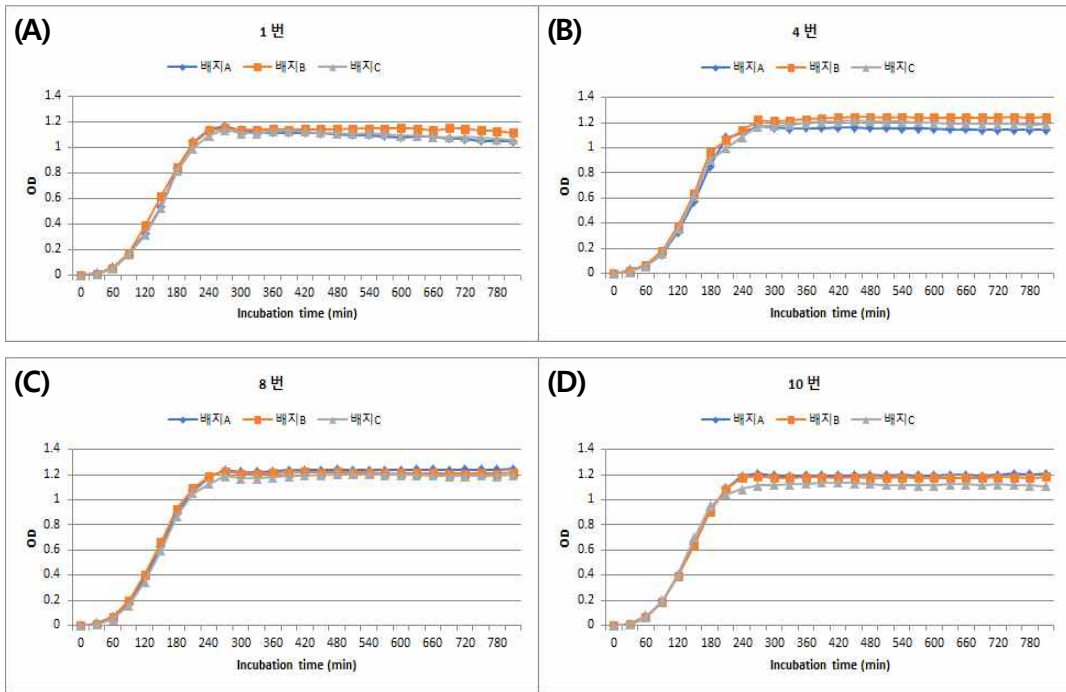
B. 질소원의 비율에 따른 *Weissella cofusa* VP30의 배지 조성별 성장 곡선 ((A) 배지 A, (B) 배지 B, (C) 배지 C)



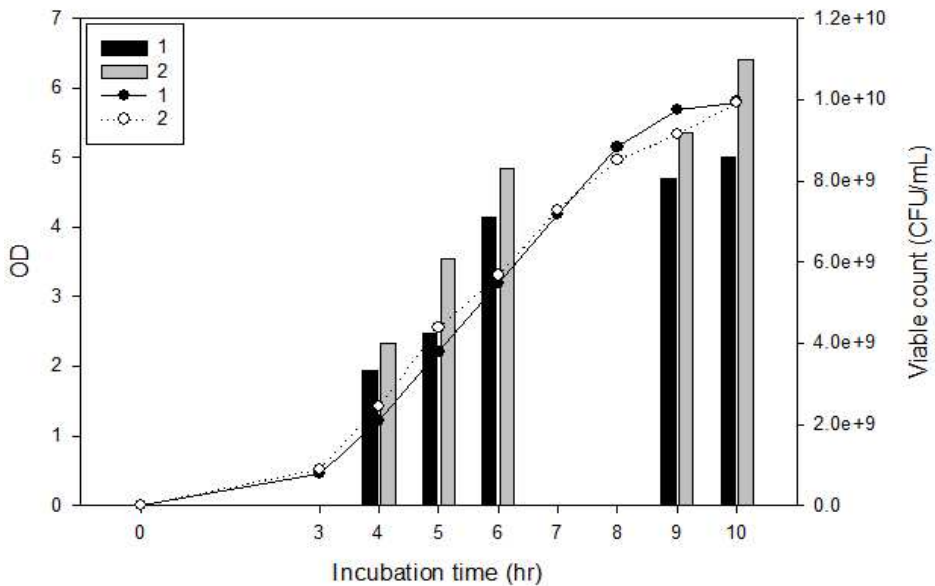
C. 탄소원 종류에 따른 *Weissella confusa* (VP30)의 성장 곡선 및 배양 중 생균수 (꺾은선 : 흡광도, 막대 : 생균수)



D. 질소원에 따른 *Weissella confusa* VP30의 성장 곡선 및 배양 중 생균수 (꺾은선 : 흡광도, 막대 : 생균수)



E. 배지 조성별 생육곡선 ((A) 질소원 비율 1번, (B) 4번, (C) 8번, (D) 10번)



F. 고농도 배양에서의 질소원에 따른 *Weissella confusa* VP30의 생장 곡선 및 배양 중 생균수 (꺾은선 : 흡광도, 막대 : 생균수)

그림 47 *Weissella confusa* VP30의 생육곡선 그래프

- *Weissella confusa* VP30은 균주를 고농도 배양하여 균주가 가장 효과적으로 성장하고, 균주를 배양하여 회수 공정을 거쳐 동결건조 후 원말 형태로 얻었을 때의 생균수 및 안정성 등을 오래 유지하기 위한 배지 최적화를 진행함.



- 탄소원 최적화를 위하여 초기 탄소원 농도를 3%로 하여 glove box에서 배양실험을 진행하였음
- 탄소원 선정 실험을 scale up하여 진행한 결과 흡광도는 1차 스크리닝 결과와 유사하게 탄소원1이 초기 성장 기울기와 배양 종료 시점의 흡광도 값 모두 높게 측정됨으로서 *Weissella confusa* VP30 균주의 탄소원으로 선정함.
- 대체적으로 질소원으로 YE와 SF의 배합을 사용하였을 때 성장이 좋았음. 또한 기본 배지조성에서 LC가 0.05%가 첨가된 배지에서 성장이 안정적임.
- 질소원 선정을 위한 배양을 진행하면서 조제배지 성분의 차이에 따른 배양 효과도 같이 확인하고자 배지의 조성을 달리하여 배양함. 배양배지는 MRS broth 기본 배지 조성인 배지 A와 *Weissella confusa* (VP30)균주는 통섭혐기균으로 산소가 다소 존재하여도 성장 할 수 있지만 LC를 첨가함으로써 성장에 도움이 되는지를 확인하기 위하여 0.05%를 첨가한 배지 B, 그리고 유해균의 성장을 억제해 배양 중에 오염을 줄이는 역할을 하는 MA와 삼투압 조절을 하여 세포의 막이 받는 스트레스를 줄여주는 TA을 각각 0.01%, 0.031% 씩 첨가한 배지 C 조성을 배양 진행.
- 배지 조성별 결과 *Weissella confusa* VP30 균주는 대체적으로 YE와 SF의 배합에서 성장이 좋았고, 기본 배지조성에서 LC가 0.05%가 첨가된 배지에서 성장이 안정적임.

## 바. 유산균 안정성 최적화

각 유산균의 최적 배양배지에 배양 후 회수하여 조건 별 동결보호제를 넣고 동결 후 건조함. 건조된 균은 분쇄·소분하여 가속조건( 40℃ 65%)에 저장하며 일정 주기로 생균수를 측정하여 생존률을 확인함.

### (1) *L. lactis*의 안정성

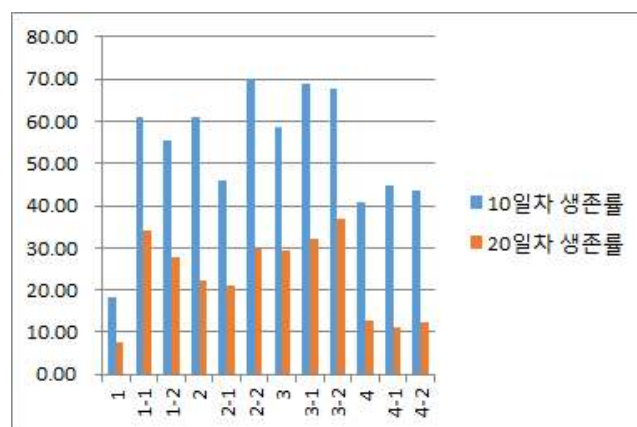


그림 48 동결보호제별 *Lactococcus lactis* 생존률

- 배양 완료 후 회수한 *Lactococcus lactis*를 농축하여 동결보호제 CD, AO, TR을 각각 넣고 건조한 균의 안정성을 측정한 결과 동결보호제로 AO, TR을 사용했을 때 10일차 20일차

생존률 모두 높음.

## (2) B. lactis AD011의 안정성

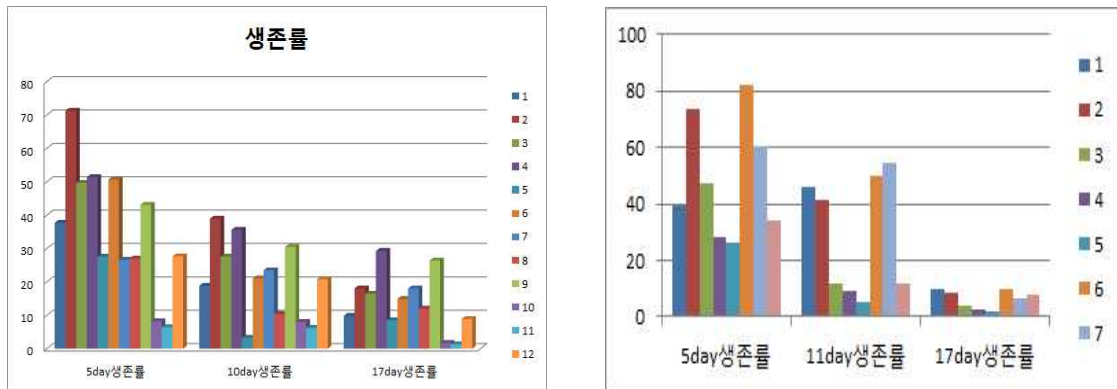


그림 49 Bifidobacterium lactis (AD011) 생존률

- Bifidobacterium lactis (AD011)를 배양 조건을 달리하여 배양 한 후 회수하여 동결 보호제를 넣고 건조한 균의 안정성을 측정한 결과 시간이 지남에 따라 생존률이 확연히 떨어졌지만 단일 탄소원을 동결 보호제로 사용 할 때보다 AO를 함께 사용하였을 때 생존률이 높음.

### **B. lactis AD011**



그림 50 Bifidobacterium lactis (AD011)저장 중 안정성

- Bifidobacterium lactis (AD011) 배양액을 회수하여 저장 중 안정성 평가를 통해 동결보호제로서 VC 농도에 따른 효과의 평가도 진행함. 안정성 확인 결과 VC의 농도는 3%보다 기본 첨가 농도인 0.3%가 첨가되었을 때 더 안정적임.

### (3) B. bifidum BGN4의 안정성

유산균 균주의 배양배지에 첨가된 여러 아미노산이 유산균 균주가 산소에 노출되었을 때 안정성에 대한 영향을 조사하였음. 아미노산(L-cysteine, L-methionine, L-histidine)이 배양배지에서 각각 0.5 %, 0.3 %, 0.1 % 가 되도록 조제하였음. 배양배지의 pH를 6.5로 맞추고 autoclave를 사용하여 멸균 (121 °C, 15 min)하였음. 계대 배양한 BGN4를 배양배지에 1 % 접종하여 0 시간대의 생균수를 측정하였음. 96 well plate에 200 µl씩 분주하고 산소 스트레스에 노출하였음. 혐기조건으로 37 °C의 인큐베이터에서 배양하였음. 24 시간 뒤에 멸균 증류수 100 µl씩을 분주하였고, 다시 48 시간 뒤에 멸균 증류수 100 µl씩을 추가 분주하였음. 결과에 의하면 특히 L-cysteine의 첨가에 의하여 균의 안정성이 증가하였음.

	0 time		5 day	
	농도	CFU/mL	CFU/mL	생존율 (%)
L-Cysteine	0.1	6.4E+08	TLTC	-
	0.3	4.4E+08	3.2E+05	0.05
	0.5	4.4E+08	5.6E+05	0.13
L-Methionine	0.1	6.7E+08	TLTC	-
	0.3	4.2E+08	TLTC	-
	0.5	2.3E+08	TLTC	-
L-Histidine	0.1	8.2E+08	TLTC	-
	0.3	5.5E+08	TLTC	-
	0.5	5.6E+08	TLTC	-
MRS		8.1E+08	TLTC	-

표 13 L-cysteine, L-methionine, L-histidine 농도별 첨가배지에서 배양된 BGN4의 산소 노출에 대한 안정성

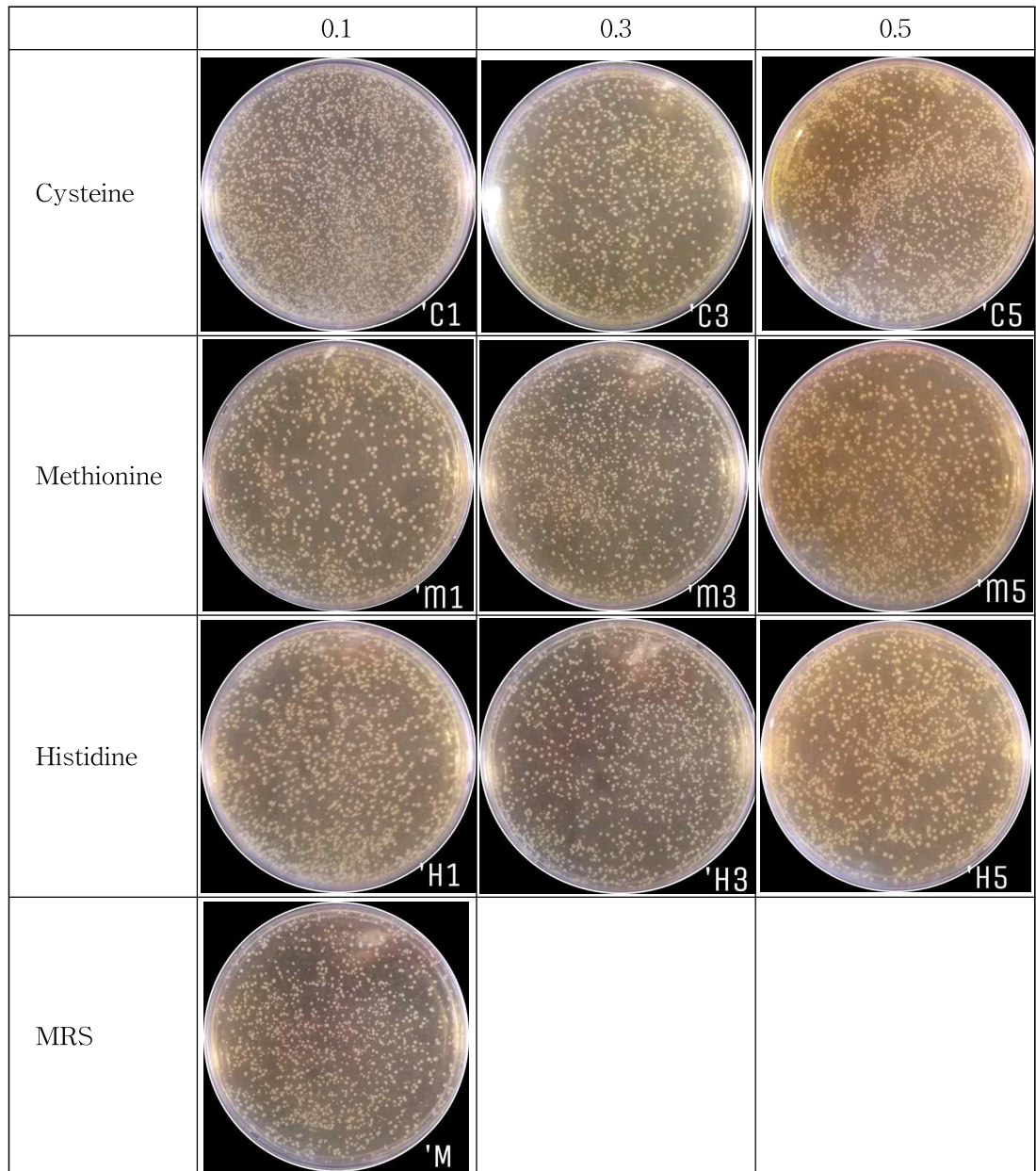


표 14 L-cysteine, L-methionine, L-histidine 농도별 첨가배지에서 배양된 BGN4의 생균수 ( $10^{-5}$ 배 희석)

- 여러 가지의 유기물질들이 배지에 존재할 때 셀레니움을 첨가한 배지에서 성장한 유산균 균주가 산소에 노출되었을 때의 안정성을 평가했음.
- 각각 histidine 0.3%, asparagines 0.3%, glucosamine 0.3%씩을 첨가한 MRS broth를 조제하고 필터를 사용하여 멸균하였음. 계대 배양한 BGN4를 1 % 접종하고, sodium selenite를 무첨가, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM 씩 넣고 37 °C의 water bath에서 6 시간 동안 배양하였음. 배양 후 산소 노출 0 시간대의 생균수를 측정했음.
- 96 well plate에 각각의 배양액을 200  $\mu$ l씩 분주하고 추가적으로 셀레니움이 첨가되지

얇은 무첨가군에 0.3 mM의 sodium selenite를 첨가하여 산소에서 노출시켰음 (표 15).

Se 농도	1mM			0.1mM			0.01mM			Control		
Asparagine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Asparagine +0.3mM										△	△	△
Glutamine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Glutamine+0.3mM										△	△	△
Histidine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Histidine+0.3mM										△	△	△

표 15 산소에 노출시키기 위한 96 well plate 도식화

(x: 기본 유기물+se 첨가 배지, △: se 무첨가군 + se 0.3 mM)

- 배양액에 24 시간 뒤 200 µl의 멸균증류수를 첨가하고, 48 시간 뒤 150 µl의 멸균 증류수를 첨가하였음. 72 시간이 지난 후 생균수를 측정하여 생존율을 확인하였음. 생존율은 [(72 시간 산소 노출 생균수 / 0 시간 생균수)\*100]로 계산하였음.

Se 농도		0 시간 CFU/mL	72 시간 CFU/mL	생존율 (%)
Histidine	1		0	0.00
	0.1		2.65.E+08	46.49
	0.01		3.80.E+08	66.67
	Control	5.70.E+08	2.30.E+08	40.35
	0.3	7.10.E+08	2.10.E+07	3.68
Glutamine	1		0	0.00
	0.1		1.48.E+07	2.60
	0.01		2.39.E+08	41.93
	Control	1.14.E+09	2.47.E+08	43.33
	0.3	7.10.E+08	0	0.00
Asparagine	1		0	0.00
	0.1		4.90.E+07	8.60
	0.01		1.90.E+08	33.33
	Control	6.80.E+08	3.27.E+08	57.37
	0.3	7.60.E+08	0	0.00

표 16 Histidine, glutamine, asparagine 0.3 % 첨가 배지에 다양한 농도의 셀레니움을 추가한 배지에서 배양된 BGN4의 산소 노출에 대한 안정성

- 셀레니움을 첨가하지 않은 대조군 (control)에서는 Asparagine이 57.37 %의 생존율로 가장 높았고, glutamine이 43.33 %, 그리고 Histidine이 40.35 %로 확인되었음. Histidine 0.3 %가 첨가된 배지에 0.01 mM의 셀레니움을 추가한 실험군이 생존율이 가장 높은 것으로 확인했음.
- Histidine, glutamine, 그리고 asparagine 유기물질 중 특이 사항을 보였던 histidine과

glutamine을 혼합한 배지에서 배양한 유산균 균주의 산소 저항성을 확인해 보았음. Histidine 0.3 %, glutamine 0.3 %, 그리고 histidine+glutamine 0.3 %가 첨가된 MRS broth를 조제하여 필터를 통해 멸균하였음. 배지에 BGN4를 1 % 접종하고 37 °C의 인큐베이터에서 배양하였음. 0.3 M의 sodium selenite 용액을 1 % 첨가하여 0.3 mM이 되도록 한 후 37 °C의 water bath에서 110 rpm으로 6시간 배양하였음. 배양 후 산소 노출 0 시간대의 생균수를 측정했음.

- 96 well plate에 셀레늄이 1 mM, 0.1 mM, 0.01 mM의 농도가 되도록 희석된 배양액을 200 µl씩 분주하여 산소에 노출시켰음. 혐기적 조건으로 37 °C의 인큐베이터에서 배양하였음. 24 시간 후 멸균 증류수 100 µl를 보충하였음. 72 시간동안 산소에서 노출된 배양액의 생균수를 측정하였음.

		0 시간	72 시간	
Se 농도		CFU/mL	CFU/mL	생존율 (%)
MRS	1		0	0.00
	0.1		4.20.E+06	0.40
	0.01		3.00.E+06	0.29
	Control	1.05.E+09	4.30.E+06	0.41
	0.3	2.00.E+08	0	0.00
Histidine	1		0	0.00
	0.1		2.34.E+07	2.23
	0.01		5.20.E+07	4.95
	Control	1.05.E+09	6.80.E+07	6.48
	0.3	2.00.E+08	0	0.00
Glutamine	1		0	0.00
	0.1		1.02.E+07	0.97
	0.01		1.10.E+07	1.05
	Control	9.50.E+08	1.81.E+08	17.24
	0.3	0	0	0.00
Histidine + Glutamine	1		0	0.00
	0.1		1.22.E+08	11.62
	0.01		1.38.E+08	13.14
	Control	8.50.E+08	5.00.E+07	4.76
	0.3	1.90.E+08	0	0.00

표 17 Histidine, glutamine, Histidine+glutamine 0.3 % 첨가 배지에 다양한 농도의 셀레늄을 추가한 배지에서 배양된 BGN4의 산소 노출에 대한 안정성

- 모든 아미노산에서 낮은 셀레늄의 농도를 첨가했을 때 생존율이 다소 증가하는 것을 확인했음. 그 중 Histamine + glutamine을 0.3 % 첨가한 배지에 0.1 mM과 0.01 mM을 추가한 실험군에서 각각 11.62 %, 13.14 %로 생존율이 높은 것을 확인했음.
- 배양배지에 첨가하는 아미노산의 함량을 0.5 %로 증가시키고 0.3 mM의 셀레늄을 추가한 배지에서 배양한 유산균 균주의 산소 저항성을 확인해 보았음.

- 아미노산(GABA, L-histidine, L-arginine)이 배양배지에서 각각 0.5 %가 되도록 2 개씩 조제하였음. 배양배지의 pH를 6.5로 맞추고 autoclave를 사용하여 멸균 (121 °C, 15 min)하였음. 0.3 M의 sodium selenite를 조제하여 필터로 멸균하였음. 계대 배양한 BGN4를 배양배지에 1 % 접종하고 한 개의 배양배지에는 0.3 M의 sodium selenite를 1 % 첨가하여 0.3 mM이 되도록 하였음. 37 °C의 water bath에서 100 rpm으로 6 시간 동안 배양한 뒤 0 시간대의 생균수를 측정하였음.
- 96 well plate에 200 µl씩 분주하고 산소에 노출하였음. 혐기조건으로 37 °C의 인큐베이터에서 배양하였음. 24 시간 뒤에 멸균 증류수 100 µl씩을 분주하였고, 다시 48 시간 뒤에 멸균 증류수 100 µl씩을 추가 분주하였음. 72 시간 동안 배양한 후 BGN4의 생균수를 측정하였음.

	0 시간		72 시간	
	Se 농도	CFU/mL	CFU/mL	생존율 (%)
MRS	Control	7.0.E+08	TMTC	TMTC
	0.3	2.4.E+08	9.4.E+06	3.92
GABA	Control	2.4.E+08	TMTC	TMTC
	0.3	1.7.E+08	4.8.E+07	28.18
L-Arginine	Control	5.9.E+08	3.1.E+07	5.20
	0.3	7.4.E+08	1.0.E+06	0.14
L-Histidine	Control	1.1.E+08	TMTC	TMTC
	0.3	6.2.E+08	TMTC	TMTC

표 18 GABA, L-arginine, L-histidine 0.5 % 첨가배지에 0.3 mM 셀레늄을 추가한 배지에서 배양된 BGN4의 산소 노출에 대한 안정성

- GABA를 첨가한 배지에서 배양된 BGN4의 산소에 72 시간 노출 후 측정된 생균수는  $10^5$  희석 배수에서 셀 수 없을 정도의 colony가 검출되어 L-arginine 첨가군 보다 생존율이 높은 것을 확인하였음.

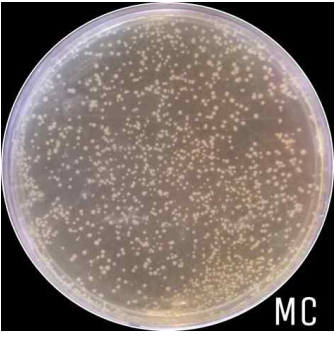
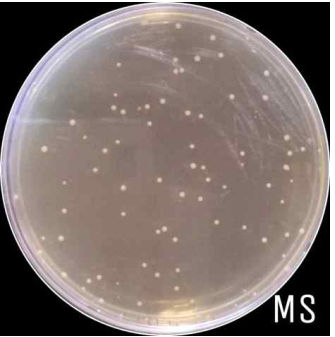
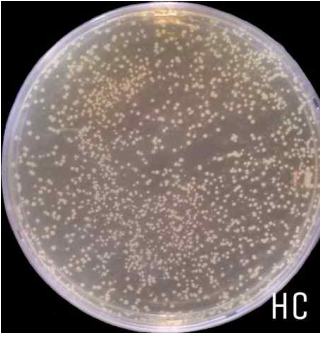
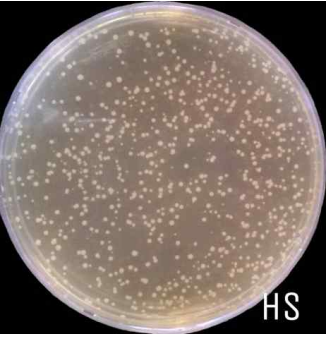


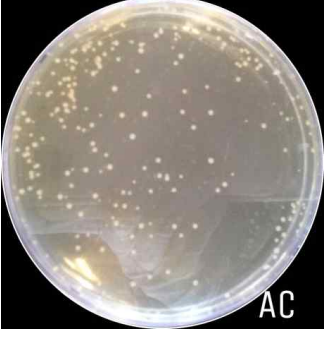
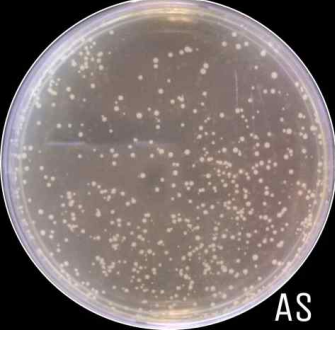
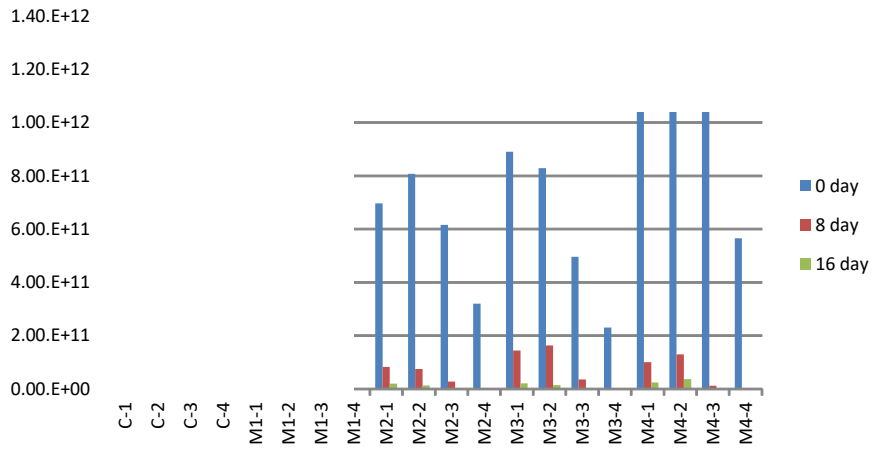
	Control	Se 0.3
MRS		
Histidine		
GABA		
Arginine		

표 19 GABA, L-arginine, L-histidine 첨가배지에 레니움을 추가한 배지에서 배양된 BGN4의 생균수 ( $10^{-5}$  배 희석)

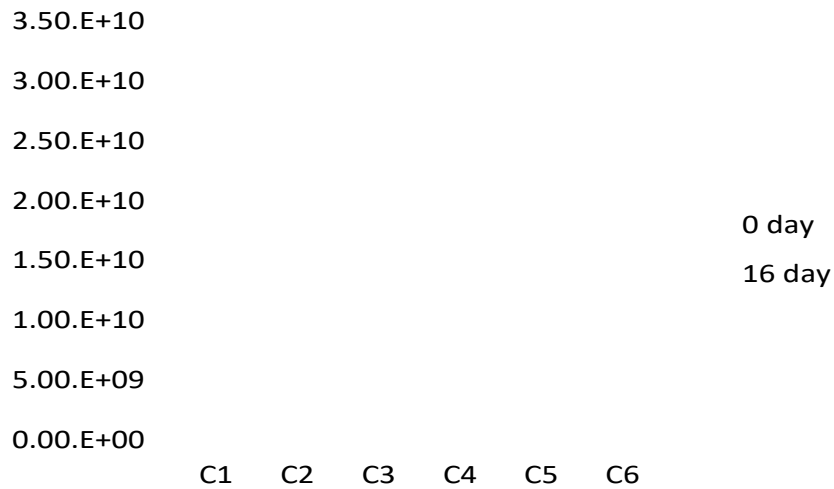


### B. bifidum BGN4



A. 배양 중 MC의 첨가와 동결보호제로써 MC의 효과

### B. bifidum BGN4



B. 동결보호제로써 VC의 효과

그림 51 *Bifidobacterium bifidum*(BGN4) 건조분말의 저장 중 안정성

- 각 조건으로 동결 건조된 *Bifidobacterium bifidum*(BGN4)을 가속조건에서 주기를 가 지고 생균수를 측정한 결과 동결보호제로서의 효과는 첨가된  $MnCl_2$ 의 농도가 올라 갈수록 생균수 및 생존율이 크게 감소하고, 동결보호제로 VC 사용하였을 때 안정성이 좋음.

(4) *W. confusa* VP30의 안정성

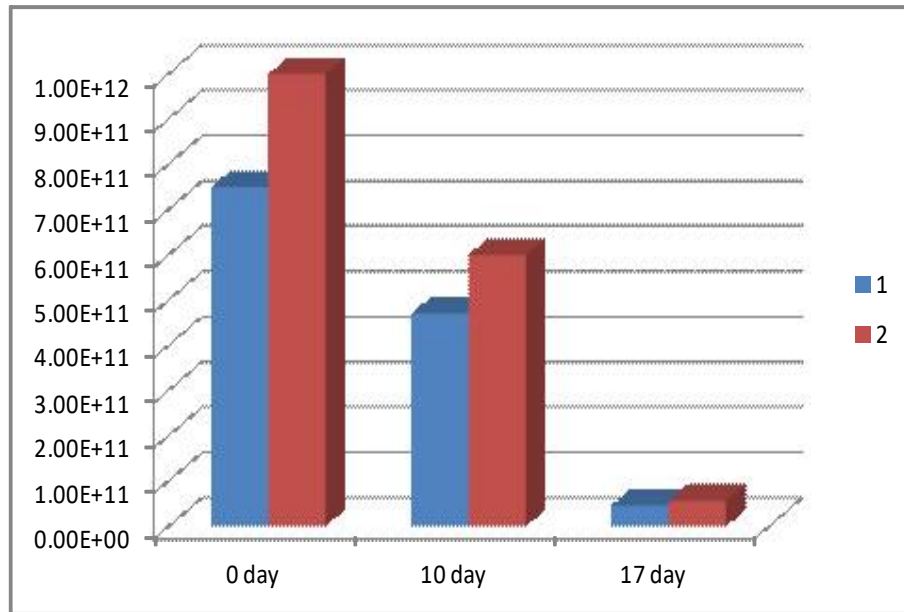


표 20 5ton 배양조에서 고농도 배양된 균주들의 저장 중 안정성

	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			26DAY
1	170613wc	DU	46.78%
2	170613wc	A	64.18%
3	170613wc	TI	65.70%
4	170704BGN4	DU	8.06%
5	170704BGN4	A	5.79%
6	170704BGN4	TI	8.67%
7	170606BGN4	A	11.15%
8	170606BGN4	DU	10.05%
9	170607BGN4	A	11.61%
10	170607BGN4	DU	12.54%
11	170607BGN4	TI	21.50%
12	170627BGN4	A	6.63%
13	170627BGN4	DU	6.85%
14	170627BGN4	TI	13.26%
	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			21DAY
15	170918LA(A)	TI	21.00%
16	170918LA(A)	DU	14.16%
17	170918LA(A)	A	27.68%
18	170925LA(A)	TI	22.22%
19	170925LA(A)	DU	16.70%
20	170925LA(A)	A	16.82%
21	170925LA(B)	TI	8.60%
22	170925LA(B)	DU	11.86%
23	170925LA(B)	A	9.59%
24	180205LA (A)	DU	8.45%
25	180205LA (A)	ADU	19.92%
26	180205LA (A)	TIA	55.92%
27	180208BL (B)	DU	14.76%
28	180208BL (B)	ADU	15.42%
29	180208BL (B)	TIA	25.64%
30	180213BL (B)	ADU	40.97%
31	180213BL (B)	TIA	40.68%
32	180220BL (A)	DU	43.19%
33	180220BL (A)	ADU	38.87%
34	180220BL (A)	TIA	47.34%

	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			26DAY
1	170613wc	DU	46.78%
2	170613wc	A	64.18%
3	170613wc	TI	65.70%
4	170704BGN4	DU	8.06%
5	170704BGN4	A	5.79%
6	170704BGN4	TI	8.67%
7	170606BGN4	A	11.15%
8	170606BGN4	DU	10.05%
9	170607BGN4	A	11.61%
10	170607BGN4	DU	12.54%
11	170607BGN4	TI	21.50%
12	170627BGN4	A	6.63%
13	170627BGN4	DU	6.85%
14	170627BGN4	TI	13.26%
	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			21DAY
15	170918LA(A)	TI	21.00%
16	170918LA(A)	DU	14.16%
17	170918LA(A)	A	27.68%
18	170925LA(A)	TI	22.22%
19	170925LA(A)	DU	16.70%
20	170925LA(A)	A	16.82%
21	170925LA(B)	TI	8.60%
22	170925LA(B)	DU	11.86%
23	170925LA(B)	A	9.59%
24	180205LA (A)	DU	8.45%
25	180205LA (A)	ADU	19.92%
26	180205LA (A)	TIA	55.92%
27	180208BL (B)	DU	14.76%
28	180208BL (B)	ADU	15.42%
29	180208BL (B)	TIA	25.64%
30	180213BL (B)	ADU	40.97%
31	180213BL (B)	TIA	40.68%
32	180220BL (A)	DU	43.19%
33	180220BL (A)	ADU	38.87%
34	180220BL (A)	TIA	47.34%

	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			21DAY
35	171219LA (B)	DUA	4.27%
36	171219LA (B)	TIA	42.23%
37	171219LA (B)	TIADU	13.82%
38	180313LA (B)	DUTI	25.14%
39	180313LA (B)	TI	14.71%
40	180315LA (B)	DUTI	27.50%
41	180315LA (B)	DUA	0.28%
42	180322LA (B)	DUTI	37.27%
43	180322LA (B)	DUA	1.39%
44	180403LA (B)	DUA	1.57%
45	180403LA (B)	ADUTI (균 : 전분 = 1 : 1)	23.64%
46	180405LA (B)	DUA	1.73%
47	180405LA (B)	ADUTI	25.78%
48	180326LF (B)	DUTI	9.85%
49	180326LF (B)	DUA	1.06%
50	180410BL (B)	DUTI	53.27%
51	180410BL (B)	DUA	21.52%
52	180221BL (A)	DU	20.96%
53	180409BL (A)	DU (균 : 전분 = 1 : 1)	18.69%
54	180321LA (A)	DUATI	7.57%
55	180404LA (A)	DUA (균 : 전분 = 1 : 1)	36.00%
56	180509LC (B)	DUATI	0.00%
57	180510 (A)	DUATI (균 : 전분 = 1 : 1)	0.00%
58	180503BGN4(B)	DUA	0.07%
59	180503BGN4(B)	DUATI	19.57%
60	180604BGN4(A)	(균 : 전분 = 1 : 1)	3.21%
61	180606BGN4(A)	(균 : 전분 = 1 : 1)	11.68%
62	180605BGN4(B)	DUA	0.13%
63	180605BGN4(B)	DUATI	12.92%

	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			22DAY
64	171024BGN4	TI	2.05%
65	171024BGN4	DU	2.63%
66	171024BGN4	A	5.05%
67	171031BL	TI	9.16%
68	171031BL	DU	11.58%
69	171031BL	A	19.70%
70	171114LA	TI	21.97%
71	171114LA	DU	17.21%
72	171114LA	A	25.47%
73	171128LA	TI	12.93%
74	171128LA	DU	11.94%
75	171128LA	A	14.43%
	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률 (%)
			32DAY
76	171206LC	DU	9.23%
77	171206LC	ADU	45.49%
78	171206LC	TIA	11.67%
79	171207LR	DU	0.06%
80	171207LR	ADU	0.45%
81	171207LR	TIA	0.09%
82	171212LR	DU	0.00%
83	171212LR	ADU	0.61%
84	171212LR	TIA	1.83%
85	171214LR	DU	0.00%
86	171214LR	ADU	0.41%
87	171214LR	TIA	2.74%
88	171219BGN4	DU	1.38%
89	171219BGN4	ADU	2.91%
90	171219BGN4	TIA	27.25%
91	171221BGN4	DU	1.00%
92	171221BGN4	ADU	3.44%
93	171221BGN4	TIA	18.45%
94	180109BGN4(B)	DU	0.30%
95	180109BGN4(B)	ADU	1.88%
96	180109BGN4(B)	TIA	29.76%
97	180111BGN4(B)	DU	1.69%
98	180111BGN4(B)	ADU	0.48%
99	180111BGN4(B)	TIA	60.91%

	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률(%)
			20day
100	180220BGN4(B)	DU	0.96%
101	180220BGN4(B)	ADU	3.78%
102	180220BGN4(B)	TIA	36.93%
103	180222BGN4(B)	ADU	3.00%
104	180222BGN4(B)	TIA	42.31%
105	180222BGN4(B)	TIADU	54.46%
106	180306BGN4(B)	ADU	0.14%
107	180306BGN4(B)	DUTI	17.97%
108	180306BGN4(B)	TIA	6.52%
109	180308BGN4(B)	DUA	0.06%
110	180308BGN4(B)	DUTI	21.57%
111	180308BGN4(B)	TIA	11.47%
112	180320LA(B)	DU	2.76%
113	180320LA(B)	TI	16.86%
114	180320LA(B)	DUTI	15.50%
115	180412BL(B)	DUTI	55.04%
116	180412BL(B)	DUA	15.34%
117	180417LC(B)	DUTI	36.54%
118	180417LC(B)	DUA	3.10%
119	180419LC(B)	DUTI	30.41%
120	180419LC(B)	DUA	11.83%
121	180424BGN4(B)	DUTI	23.70%
122	180424BGN4(B)	DUA	0.38%
123	180426BGN4(B)	DUA	0.19%
124	180426BGN4(B)	ADUTI	33.70%
125	180501BGN4(B)	DUA	0.17%
126	180501BGN4(B)	ADUTI	21.14%

	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률(%)
			31day
127	190109BGN4(B)	ADUTI	4.77%
128	190121LR(B)	ADUTI	4.29%
129	190129BL(B)	ADUTI	55.46%
130	190329LC(B)	ADUTI	5.62%
131	190329LC(B)	ADMTI	0.40%
	5ton 배양	동결보호제 조건	생존률(%)
			266day
132	190116BL(B)	ADUTI	5.40%
133	190129BL(B)	ADUTI	8.12%
134	190211BL(B)	ADUTI	5.13%

아. 사균체를 활용한 제품개발

(1) *W. confusa* VP30을 이용한 살균 발효유의 개발

본 연구를 통하여 개발된 다당류를 다량 생산하는 *W. confusa* VP30을 종균으로 활용하여 우유를 기본으로 한 발효유를 개발하였으며 이를 증점제로 활용하기 위한 업체에 원료로서 납품하여 매출이 발생하였음.

발급번호 : 11EV-RCSZ-007E-BXPR-7605

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인			
영업소			
제품정보	식품의 유형	유산균음료	요청하는 품목제조 보고번호
	제품명	VP3039	
	유통기한	12개월까지	
	품질유지기한		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	덧장에 기재	
	용도 용법	덧장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	덧장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	밀봉포장(25L,50L,100L등)	
	성상	흰노란색 액상고유의 색택과 향미를 가지며 이미,이취가 없음.	
	품목의 특성	■ 고열량·저열량 식품 해당 여부 [ ]에 [ ]아니오 [○]해당 없음 ■ 알칼리성 식품 해당 여부 [ ]에 [○]아니오 ■ 영,유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 [ ]에 [○]아니오	
기타			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2019년 12월 02일  
보고인 자근역

**강원도 홍천군수 귀하**

품목보고번호	
처리부서	

그림 53 *W. confusa* VP30을 종균으로 한 발효유 품목제조보고서



## (2) *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI 세포 파쇄물을 이용한 화장품개발

본 과제를 통하여 개발한 세포파쇄조건을 활용하여 *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI 균주 등의 균체 파쇄물을 원료로 한 화장품을 개발하여 국내 출시하였으며 해외 수출 실적도 도출하였음.

<p style="text-align: center;"><b>KTR</b></p> <p style="text-align: center;"><b>최 종 보 고 서(초안)</b></p> <p style="text-align: center;">TBK-2018-011253</p> <p style="text-align: center;">비피도 3종 발효 용해물</p> <p style="text-align: center;">비피도 3종 발효 용해물의 주름개선 유효성을 평가하기 위한 세포내 콜라게나제 활성억제 시험(Collagenase inhibition assay)</p>	<p style="text-align: center;"><b>시험개요</b></p> <p>시험 제목 : 비피도 3종 발효 용해물을 평가하기 위한 세포내 콜라게나제 활성억제시험 [Study title] (Collagenase inhibition assay)</p> <div style="border: 1px solid black; height: 150px; width: 100%;"></div>
<p><b>6. 고찰 및 결론 (Discussion &amp; conclusion)</b></p> <p>본 시험은 비피도 3종 발효 용해물의 주름개선 유효성을 평가하기 위하여 세포내 콜라게나제 활성억제시험을 실시하였다.</p> <p>- 비피도 3종 발효 용해물의 세포독성 농도를 (1, 10, 100, 1000)<math>\mu</math>g/mL의 농도로 처리하였더니 각각 94.61 <math>\pm</math> 4.08 %, 96.80 <math>\pm</math> 4.61 %, 99.44 <math>\pm</math> 6.00 %, 105.88 <math>\pm</math> 6.13 %의 세포 생존율을 보였다. 이 결과 비피도 3종 발효 용해물은 1000 <math>\mu</math>g/mL 이하 농도에서 70 % 이상의 세포 생존율이 관찰되었다. CCD-986SK 세포를 이용한 세포내 콜라게나제 활성억제시험에서 사용되는 시료의 최고 농도는 1000 <math>\mu</math>g/mL로 선택하였다.</p> <p>- 세포내 콜라게나제 활성억제시험은 비피도 3종 발효 용해물을 (10, 100, 1000)<math>\mu</math>g/mL의 농도로 설정하여 시험결과 각각 1120.05 <math>\pm</math> 9.46 %, 109.06 <math>\pm</math> 4.85 %, 48.35 <math>\pm</math> 11.24 %로 콜라게나제 활성이 억제되는 것이 측정되었다.</p> <p>한편 양성대조물질인 TGF-<math>\beta</math>1을 10 ng/mL를 처리하였더니 대조군에 비해서 83.21 <math>\pm</math> 6.69 %로 세포내 콜라게나제 활성이 억제되는 것을 관찰하였다.</p> <p>이상의 결과로부터 세포내 콜라게나제 활성억제시험에서 비피도 3종 발효 용해물은 1000 <math>\mu</math>g/mL 농도에서 콜라게나제 활성을 억제시키는 것으로 사료된다.</p>	 <p style="text-align: right; font-size: small;">이백 기능성 화장품 피부자극 테스트 완료</p>

## 2. 제 1 협동 연구 기관 (가천대학교)

### 가. 유산균 사균체물의 지표 물질에 의한 표준화 분석법 연구

#### (1) 유산균 사균체물의 antibacterial activity 측정

본 연구에서는 유산균 균주 3종인 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus acidophilus* PIN7, *Lactobacillus paracasei* IBS041의 식중독 세균에 대한 항균 활성 여부를 확인하는 실험을 진행하였음. 2차년도 연구에서 유산균 3종의 생균, 열처리 사균, lysozyme 효소 처리 후 음파파쇄를 진행한 사균체의 침전물에 대한 항균물질 생성능을 확인하였음.

Lysozyme 효소 처리 후 음파파쇄를 진행한 사균체물 이외의 분획물에 대한 항균능은 확인되지 않았으며, 이는 추가적으로 lysozyme과 음파 파쇄 처리 후 각각의 항균능 확인이 필요하다고 판단됨. 특히 lysozyme은 균의 세포벽을 용해시키는 효소로써, 잔존하는 lysozyme에 의한 항균작용이라고 문제가 제기될 것을 예상하여 3차년도 연구에서 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus acidophilus* PIN7, *Lactobacillus paracasei* IBS041의 lysozyme과 음파파쇄 처리에 의한 사균체 분획물에 대한 추가 분석을 진행하였음.

유산균 균주의 항균활성평가 시험을 위한 pathogen 지표 균주로는 총 38주의 다양한 병원성 균주를 선정하여 이에 대한 항균 활성능을 평가하고자 하였음 (표 21). 38주의 병원성 균주 중에서는 strain 차이만 존재하는 균주도 확인하였으며, 이는 병원성 균주에 대한 유산균의 항균활성이 strain 특이성을 갖는지 확인하기 위함임.

병원성 지표 균주에 대한 배양은 일차적으로 glycerol stock으로 -80°C 에 보관되어 있는 병원성 균주를 Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) 에 희석도말법으로 배양한 후 성장을 확인하고, single colony를 획득하여 BHI broth 에 계대배양하여 실험에 사용하였음.

*Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus acidophilus* PIN7, *Lactobacillus paracasei* IBS041 총 3주의 균은 생균 분말을 phosphate-buffered saline(PBS)에 현탁하여 overnight으로 방치하여 균의 활성을 높였으며, 각 균의 농도는  $4.83 \times 10^9$  CFU/g,  $1.89 \times 10^{10}$  CFU/g,  $1.47 \times 10^{12}$  CFU/g으로 모두  $10^9$  CFU/mL 수준으로 희석하여 사용함. 음파파쇄의 경우 희석된 그대로 사용하였으며, lysozyme의 경우 같은 부피의 양을 넣어주어 반응시켰음.

사균체 분획물은 음파파쇄의 경우, 5 sec on, 2 sec off, 30% amplitude 조건으로 2차년도 조건과 동일하게 진행하였으며, 총 30분씩 5번 진행하였음. Lysozyme의 경우 30 mg/mL (Bioseutica, Zeewolde, Netherlands) food grade를 사용하였고, 2시간동안 반응시켰으며 반응이 끝난 분획물은 8000 g에 20분간 원심분리를 진행한 후 이의 침전된 부분을 PBS 완충액에 수세하고 이를 멸균 증류수에 현탁하여 실험에 사용함. 모든 분획물은 agar plate에 도말하여 균의 사멸 여부를 확인하고 진행하였음. 각 분획물은 농도별로 준비하여 항균 활성을 비교하였음.

항균활성평가 시험 방법은 BHI agar plate 위에 0.6% BHI soft agar를 병원성 균주를 접종한 채 lawn을 만들어주는 double layer agar method로 진행하였음. 그 위에 paper disc를 이용하여 농도별로 각각의 sample을 적신 후 이를 말려준 후 agar위에 올려 약 8시간 후 paper disc 주변에 halo 생성 여부를 확인함.

표 21 Pathogenic indicator bacteria strains list

	Pathogen indicator strain		Selective media	Culture condition
P1	<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 12021			
P2	<i>Salmonella enteritidis</i> chicken isolate			
P3	<i>Salmonella heidelberg</i>			
P4	<i>Salmonella typhimurium</i> ACTC 14028	<i>Salmonella</i>	XLD Agar	
P5	<i>Salmonella</i> Type-3A			
P6	<i>Salmonella</i> Type-8A			
P7	<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC 12023			
P8	<i>Salmonella javia</i>			
P9	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
P10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664_SEE			
P11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23235_SED	<i>Staphylococcus</i>	BPA Agar	
P12	<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220			
P13	<i>Staphylococcus aureus</i> 19095_SEC			37°C 24 h
P14	<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	<i>Listeria</i>	LPM Agar	
P15	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1703			
P16	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 14925(B-42)			
P17	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1094	<i>Bacillus</i>	MYP Agar	
P18	<i>Bacillus subtilis</i> 11315			
P19	<i>Bacillus thuringensis</i> KCCM 1034			
P20	<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3206	<i>Enterococcus</i>	BAA Agar	
P21	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	<i>Yersinia</i>	CIN Agar	
P22	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Klebsiella</i>	HiCrome Agar	
P23	<i>Vibrio parahemolyticus</i> KCCP 60041	<i>Vibrio</i>	TCBS Agar	
P24	<i>E.coli</i> NCCP 13970(O111,VT1, 2+)			
P25	<i>E.coli</i> O5 NCCP 15959	<i>Escherichia</i>		
P26	<i>E.coli</i> O55 NCCP 15960	<i>coli</i>	EMB Agar	
P27	<i>E.coli</i> O26 NCCP 15961			

P28	<i>E.coli</i> O21 NCCP 15962
P29	<i>E.coli</i> NCCP 13893 (O serotype non-typable)
P30	<i>E.coli</i> O91 NCCP 15957
P31	<i>E.coli</i> NCCP 14010 (O25)
P32	<i>E.coli</i> NCCP 13999 (O104, VT2+)
P33	<i>E.coli</i> NCCP 13988 (O104, VT2+)
P34	<i>E.coli</i> O157:H7 505B
P35	<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 932
P36	<i>E.coli</i> NCCP 14018 (O91,VT1+)
P37	<i>E.coli</i> ATCC 15597
P38	<i>Propionibacterium acne</i> KCCM

3종류의 샘플 중 최적화 공정을 통한 수용성과 침전물 분획에서는 lysozyme을 30 mg/mL 사용하기 때문에 lysozyme의 영향으로 항균활성이 발생할 수 있음. 이는 negative control로 30 mg/mL의 lysozyme을 사용함. 본 실험은 각각의 병원성 indicator 마다 3회 반복 실험을 진행하여 재현성 여부를 확인함.

표 22 Antimicrobial activity of *Bifidobacterium bifidum* BGN4

<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	Lysozyme pellet	Sonication pellet	Lysozyme 30 mg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 12021	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> chicken isolate	-	-	-
<i>Salmonella heidelberg</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ACTC 14028	-	-	-
<i>Salmonella</i> Type-3A	-	-	-
<i>Salmonella</i> Type-8A	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC 12023	-	-	-
<i>Salmonella javia</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664_SEE	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23235_SED	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 19095_SEC	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1703	-	-	-

<i>Bacillus cereus</i> KCCM 14925(B-42)	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1094	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 11315	-	-	-
<i>Bacillus thuringensis</i> KCCM 1034	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3206	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
<i>Vibrio parahemolyticus</i> KCCP 60041	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13970(O111,VT1, 2+)	-	-	-
<i>E.coli</i> O5 NCCP 15959	-	-	-
<i>E.coli</i> O55 NCCP 15960	-	-	-
<i>E.coli</i> O26 NCCP 15961	-	-	-
<i>E.coli</i> O21 NCCP 15962	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13893 (O serotype non-typable)	-	-	-
<i>E.coli</i> O91 NCCP 15957	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 14010 (O25)	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13999 (O104, VT2+)	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13988 (O104, VT2+)	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7 505B	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 932	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 14018 (O91,VT1+)	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC 15597	-	-	-
<i>Propionibacterium acne</i> KCCM	-	-	-
TOTAL( include +/-)	0/38	0/38	0/38

### ㉔ 23 Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* PIN7

<i>Lactobacillus acidophilus</i> PIN7	Lysozyme pellet	Sonication pellet	Lysozyme 30 mg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 12021	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> chicken isolate	-	-	-
<i>Salmonella heidelberg</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ACTC 14028	-	-	-
<i>Salmonella</i> Type-3A	-	-	-
<i>Salmonella</i> Type-8A	-	-	-

<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC 12023	-	-	-
<i>Salmonella javia</i>	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 6538	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 27664_SEE	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 23235_SED	-	-	-
Staphylococcus aureus RN 4220	-	-	-
Staphylococcus aureus 19095_SEC	-	-	-
Listeria monocytogenes KCCM 40307	-	-	-
Bacillus cereus KCTC 1703	-	-	-
Bacillus cereus KCCM 14925(B-42)	-	-	-
Bacillus cereus KCTC 1094	-	-	-
Bacillus subtilis 11315	-	-	-
Bacillus thuringensis KCCM 1034	-	-	-
Enterococcus faecalis KCTC 3206	-	-	-
Yersinia enterocolitica ATCC 9610	-	-	-
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	-	-	-
Vibrio parahemolyticus KCCP 60041	-	-	-
E.coli NCCP 13970(O111,VT1, 2+)	-	-	-
E.coli O5 NCCP 15959	-	-	-
E.coli O55 NCCP 15960	-	-	-
E.coli O26 NCCP 15961	-	-	-
E.coli O21 NCCP 15962	-	-	-
E.coli NCCP 13893 (O serotype non-typable)	-	-	-
E.coli O91 NCCP 15957	-	-	-
E.coli NCCP 14010 (O25)	-	-	-
E.coli NCCP 13999 (O104, VT2+)	-	-	-
E.coli NCCP 13988 (O104, VT2+)	-	-	-
E.coli O157:H7 505B	-	-	-
E.coli O157:H7 ATCC 932	-	-	-
E.coli NCCP 14018 (O91,VT1+)	-	-	-
E.coli ATCC 15597	-	-	-
Propionibacterium acne KCCM	-	-	-
TOTAL( include +/-)	0/38	0/38	0/38

☿ 24 Antimicrobial activity of *Lactobacillus paracasei* IBS041

<i>Lactobacillus paracasei</i> IBS041	Lysozyme pellet	Sonication pellet	Lysozyme 30 mg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 12021	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> chicken isolate	-	-	-
<i>Salmonella heidelberg</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ACTC 14028	-	-	-
<i>Salmonella</i> Type-3A	-	-	-
<i>Salmonella</i> Type-8A	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC 12023	-	-	-
<i>Salmonella javia</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664_SEE	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23235_SED	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 19095_SEC	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1703	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCCM 14925(B-42)	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1094	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 11315	-	-	-
<i>Bacillus thuringensis</i> KCCM 1034	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3206	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCP 60041	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13970(O111,VT1, 2+)	-	-	-
<i>E.coli</i> O5 NCCP 15959	-	-	-
<i>E.coli</i> O55 NCCP 15960	-	-	-
<i>E.coli</i> O26 NCCP 15961	-	-	-
<i>E.coli</i> O21 NCCP 15962	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13893 (O serotype non-typable)	-	-	-
<i>E.coli</i> O91 NCCP 15957	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 14010 (O25)	-	-	-

<i>E.coli</i> NCCP 13999 (O104, VT2+)	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 13988 (O104, VT2+)	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7 505B	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 932	-	-	-
<i>E.coli</i> NCCP 14018 (O91,VT1+)	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC 15597	-	-	-
<i>Propionibacterium acne</i> KCCM	-	-	-
TOTAL( include +/-)	0/38	0/38	0/38

항균활성평가 결과, 3균주의 분획물 2종에서 모두 38주의 병원성 지표 균주에서 항균 활성능이 없는 것으로 나타남. 즉, 3종의 유산균 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus paracasei* IBS041, *Lactobacillus acidophilus* PIN7 모두 bacteriocin과 같은 항균활성물질이 없을 것으로 판단됨.

기존 사균화 방법인 라이소자임 처리 후 음파파쇄를 한 분획물에서는 최대 30주까지 항균능이 확인되었으나 이번 라이소자임, 음파파쇄 각각 처리한 분획물에서 항균능이 나오지 않은 것으로 보아 세포벽이 덜 파쇄되어 기능성 물질이 얻어지지 않은 것으로 판단됨. 라이소자임 처리는 세포벽 파쇄를 용이하게 하기 위한 전처리 방법으로써, 라이소자임만 처리할 경우 세포벽 내 기능성 물질을 얻기에는 한계가 있었을 것으로 예상됨. 음파파쇄 또한, 그람음성균의 세포벽 파쇄에는 적합하나, 그람양성균의 두꺼운 세포벽을 파쇄하기에는 한계가 있었을 것으로 사료됨.

따라서, 최적화 공정을 통한 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus paracasei* IBS041, *Lactobacillus acidophilus* PIN7 유산균 3종의 사균체물에 대한 항균활성평가 결과 항균활성이 몇몇 균주에서 확인되었으나 lysozyme과 음파 파쇄를 한 분획물의 경우 disk 주위에 환이 형성되지 않았음. 이는 최적화된 방법으로 생산된 유산균 사균체만 항균활성을 가진 것으로 판단되며, 이는 lysozyme과 음파 파쇄의 세포벽 파쇄 효과가 세포내 물질과 세포벽 내 기능성 물질들을 함유하기 때문일 것으로 생각됨.

추가적으로 2차년도 연구에서 생균, 열처리 사균 2종을 농도를 높여 다시 항균능을 측정하고자 하였음. 이는 라이소자임과 음파파쇄 처리한 사균에서는 9 log CFU/mL 에서 항균을 보였으나 생균과 열처리 사균에서 병원성 균주 38주에서 모두 항균능을 나타내지 않아 농도를 높였을 때도 항균 효과가 없는지 확인하기 위함임.

연구는 위의 유산균 3종으로 진행되었으며, 생균과 열처리 사균 3종은 9-11 log CFU/mL 농도로 농축하여 사용하였음. 농축 방법은 유산균 3종을 각각 1 L 스케일로 배양 후, 원심분리 (8,000 g, 20 min)하여 상등액을 제거하고 pellet에 PBS 완충액 10 mL를 현탁하여 사용하였음. 열처리 또한 이러한 방법으로 현탁하여 autoclave (121°C, 15 min)로 열처리한 후 사용함.

모든 방법은 활성평가 시험 방법은 BHI agar plate 위에 0.6% BHI soft agar를 병원성 균주를 접종한 채 lawn을 만들어주는 double layer agar method로 위와 동일하게 진행하였으며, paper disc 방법도 동일하게 진행함. 병원성 균주 38주는 위 표와 같으며 (표 21) 결과는 모두 3반복 실험을 통해 재현성을 확인함 (표 25-26).



표 25 Antimicrobial activity of three live lactic acid bacteria

Concentration of lactic acid bacteria	Strain		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> PIN7	<i>Lactobacillus paracasei</i> IBS041	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4
11	1/38	1/38	1/38
10	1/38	1/38	1/38
9	0/38	0/38	0/38

표 26 Antimicrobial activity of three heat-killed lactic acid bacteria

Concentration of lactic acid bacteria	Strain		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> PIN7	<i>Lactobacillus paracasei</i> IBS041	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4
11	8/38	11/38	8/38
10	8/38	12/38	7/38
9	6/38	10/38	4/38

위 결과, 생균과 열처리 사균 모두 9-11 log CFU/mL 농도로 높여 진행한 결과 항균능을 가지는 균주가 증가하였음을 확인할 수 있었음. 생균의 경우, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 균주에 대하여 유산균 3종이 모두 10 log 이상에서 항균 효과를 보였으며, 이는 생균이 농도가 높아짐에 따라 항균능이 증가한 것으로 판단됨. 열처리 사균의 분획물 항균능 측정 결과, *L. acidophilus* PIN7 균주의 경우 10 log 이상에서 *Salmonella javia*, *Staphylococcus aureus* RN4220, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *E. coli* O91 NCCP 15957, *Bacillus cereus* KCCM 14925, *Bacillus cereus* KCTC 1094, *Bacillus cereus* KCCM 40935, *Bacillus thuringensis* KCCM 1034 총 8주에 대하여 항균 효과를 나타내었음. 9 log 에서는 *Salmonella javia*, *Staphylococcus aureus* RN 4220균주에 대하여 항균 효과를 보이지 않았으나 10 log 이상 농도가 높아질수록 위 2균주와 총 8주에 대하여 항균 효과를 나타냄. *L. paracasei* IBS041의 경우, *Bacillus cereus* KCCM 14925, *Bacillus cereus* KCTC 1094, *Bacillus cereus* KCCM 40935, *Bacillus thuringensis* KCCM 1034, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Vibrio parahaemolyticus* KCCP 60041, *E. coli* O26 NCCP 15961, *E. coli* O21 NCCP 15962, *E. coli* O91 NCCP 15957, *E. coli* NCCP 14018, *E. coli* ATCC 1559 총 11주에 대하여 항균 효과를 보였으며, LA PIN7 균주와 달리 다양한 그람음성 균주에도 항균능을 나타냄. *B. bifidum* BGN4 균주의 경우 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* KCCM 19095, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Propionibacterium acne* KCCM 41747, *E. coli* O26 NCCP 15961, *Bacillus cereus* KCCM 14925, *Bacillus cereus* KCCM 40935, *Bacillus thuringensis* KCCM 1034 총 8주에 대하여 항균 효과를 보였으며, 농도가 높아질수록 항균능을 보인 균주가 증가하였음. 특히, BGN4 균주의 경우 그람양성 균주의 항균에 효과를 더 보였으며, 이는 균은 사균화 되었지만 세포벽 펩티도글리칸 층의 성분과 박테리오신, exopolysaccharides(EPS)와 같은 균이 생육하면서 생성하는 성분들은 보존되기 때문에 이러한 성분들에 의한 효과로 보여짐.

따라서, 생균과 열처리 사균 유산균의 경우 농도가 높아짐에 따라 항균 효과가 증가하는 것을 확인함. 시중에 판매되는 유산균 사균체를 주성분으로 하는 제품들도 1012 CFU/g 가까이 되는 고농도 제품이 많으며, 이는 사균체의 경우 생균처럼 1회에 다량 섭취하여도 복통과 같은 다른 부작용 문제점이 덜 하기 때문임. 본 연구에서 사용한 사균체 또한 높은 농도로 농축한다면 그 효과가 증가할 것이며 고압멸균(autoclave)으로 열처리하였기 때문에 생균과 같은 살아있는 미생물을 사용하였을 때 나타나는 부작용은 거의 없을 것으로 사료됨. 또한, 생균의 경우 높은 농도로 제품을 제조할 경우 유통기한과 보관 중 사멸할 확률이 있지만, 사균의 경우 1012 CFU/g 가까이 되는 농도로 제조하여도 사균 처리된 균이기 때문에 생균보다 더 오래 보관할 수 있을 것이라 사료됨.

## 나. 사균체물 생산 조건 공동 연구

### (1) 사균체물 대량 생산 조건 최적화

본 연구에서는 1-2차년도 기간 동안 물리적 처리와 생물학적 처리를 이용한 사균화 공정을 확보하는 연구를 수행하였음. 2차년도에 최종적으로 음파파쇄기와 식품용 라이소자임을 이용하여 사균화하는 공정을 최적화하였으나 음파파쇄의 경우 시간이 너무 많이 소요되는 경향이 있어 대량 생산에는 부적합한 생산 방법으로, 3차년도 연구에서는 더욱 신속한 사균화 방법을 찾고자 하였음.

2차년도에서 면역조절과 항균 효과가 확인된 균주는 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus paracasei* IBS041, *Lactobacillus acidophilus* PIN7 총 3주로, 이 균주들에 대하여 사균화 공정을 수행하였으며 특히 *B. bifidum* BGN4 균주의 경우 생균과 열처리 사균보다 라이소자임과 음파파쇄를 이용한 사균 처리 후에 뛰어난 항염 효과를 보였음. 이는 유산균 균체 자체가 항염 효과를 가진 것으로 확인되며, 그 중에서도 사균체물의 주 성분인 peptidoglycan 및 lipoteichoic acid 성분에 의한 것으로 사료됨. 하지만, 열처리 사균의 경우 세포벽이 심하게 쭈그러져 그 효과가 낮았던 것으로 판단됨.

이러한 결과를 통해 음파파쇄와 라이소자임 처리가 세포벽의 기능성 성분과 세포질 내의 생리활성성분을 얻기 위한 방법 중 유효 성분들을 고농도로 얻기 위한 가장 적합한 방법으로 판단되었음. 따라서 세포벽의 기능성 성분을 보존하기 위하여 세포벽 파쇄에 중점을 두고 사균화 방법을 고안하였으며, 본 연구팀에서 보유하고 있는 고압파쇄기를 사용하여 유산균 사균화를 진행하고자 하였음. 고압파쇄기의 경우, 1 pass 당 소요되는 시간이 매우 짧으며 기기 조작이 간편하여 대량 생산 공정에도 적용할 수 있는 장점이 있음.

고압파쇄의 경우 2차년도 연구에는 단독으로 사균화를 진행하였으나, 이번 년도에는 효율적인 사균화 공정을 위하여 라이소자임을 처리하여 세포벽을 용해시킨 후 파쇄를 진행하였음. 라이소자임의 경우 추후 식품 적용에 문제가 제기 되지 않도록 식품용 라이소자임을 사용하였음.

본 연구에서는 사전 연구에서 라이소자임 처리 후 균수 감소 수준을 고려하여 고압

과쇄를 진행하였음. 라이소자임 30 mg/mL 으로 처리하였을 때, 균수가 9 log CFU/mL에서 4.8 log CFU/mL 수준으로 감소하였으므로, 고압과쇄 처리할 것을 고려하여 좀 더 적은 양인 20 mg/mL 수준으로 라이소자임 처리를 진행하였음. 라이소자임의 경우 500 mL의 멸균증류수에 희석하여 0.22 um 필터한 후, 원심분리하여 얻은 균체에 넣어 37°C에서 진탕하여 3시간 동안 반응하였음.

고압과쇄의 경우 30,000 psi가 최대 압력 세기이나 이처럼 높은 압력으로 처리할 경우 열이 발생하여 열 때문에 균이 사멸할 수 있으므로, 20,000 psi로 진행하였음. 열 때문에 균이 사멸할 경우, 사균은 이루어지지만 세포벽의 peptidoglycan에 영향을 미쳐 유효 성분을 손실할 가능성이 있음. 과쇄는 총 10 pass 까지 진행하였으며, 압력을 가하는 동안은 기기에 냉각수를 흘려주어 기기 열 발생을 최소화하였음. 사균화 후에는 최대 107배까지 희석하여 plate에 도말하여 혐기성 조건에서 overnight 배양 후 균수를 확인하였음.

생균은 보통 실험실 수준에서 최대 9 log CFU/mL 까지 생육하며, 시제품 또한 1 g 당 수억개 수준으로 판매되고 있음. 사전 연구에 의하면 생균의 경우 1조 수준의 유산균을 섭취하여야 면역 효과를 얻을 수 있지만, 이렇게 많은 유산균을 한 번에 섭취하기에는 어려움이 있음. 하지만 사균체의 경우 유효 성분만을 추출하여 부피를 줄여 판매가 가능하므로 최대한 고농도로 생산하는 것이 시제품 적용에 유리함. 따라서, 추후 건강기능식품 원료로써 활용될 것을 고려하여 3 균주 모두 11-12 log CFU/mL 수준으로 농축하여 사균 공정을 진행하였음.

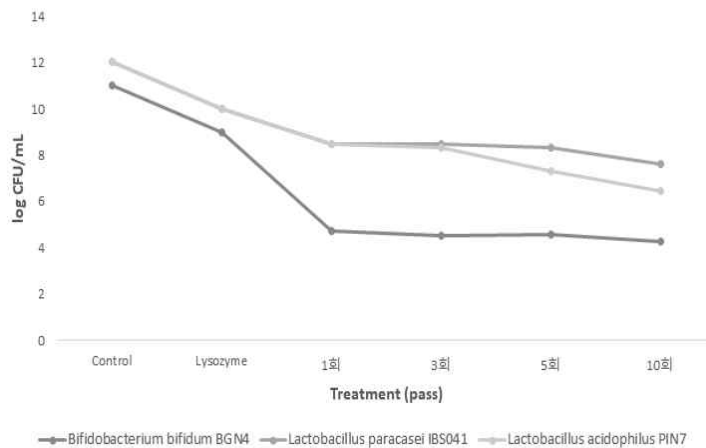


그림 54 Reduction of lactic acid bacteria (12 log) by food-grade lysozyme and high pressure homogenization under 20,000 psi (unit: log CFU/mL)

고압과쇄 전, 생균의 경우 B. bifidum BGN4, L. paracasei IBS041, L. acidophilus PIN7 3주 각각 11 log CFU/mL, 12 log CFU/mL, 12 log CFU/mL 였으며, 라이소자임 3시간 처리 후에는 각각 2 log 씩 감소하였음. 1회 고압과쇄 후에는 BGN4 균주가 4

log CFU/mL 수준으로 감소하였으나 나머지 2주의 경우 8 log CFU/mL 수준에 그쳤음(그림 54). 또한, 10회 처리 시 까지 3 군주 모두 균수의 변화가 미미하였으며, 이는 초기에 라이소자임에 의해 일부 용해된 세포벽에 파쇄를 처리하여 균이 다소 사멸하였으나 점차 고압파쇄에 의한 영향은 크게 받지 못한 것으로 판단됨.

2차년도 연구에서는 실험실 스케일로 균을 키운 후 사균화를 진행하였을 때 균의 사멸이 점차적으로 이루어진 것을 확인하였음. 하지만 추후 기능식품에 적용할 것을 고려하여 12 log 수준으로 농축시킨 결과 균의 농도가 너무 높아 라이소자임과 파쇄에 의한 영향을 거의 받지 못한 것으로 판단되며, 이는 균을 희석하여 진행하는 것이 파쇄가 더 용이할 것으로 생각되어 6-7 log CFU/mL 수준으로 시작하여 다시 사균화 처리하였음.

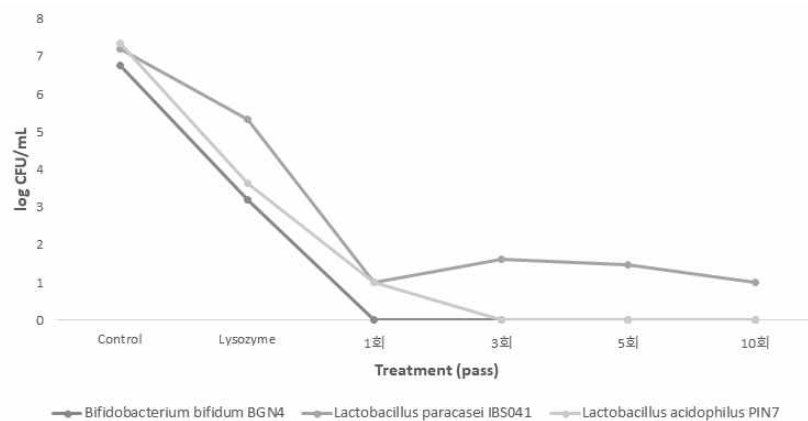


그림 55 Reduction of lactic acid bacteria (7 log) by food-grade lysozyme and high pressure homogenization under 20,000 psi (unit: log CFU/mL)

균수를 7 log CFU/mL 수준으로 희석하여 위와 같은 방법으로 라이소자임 처리를 진행한 결과 BGN4와 PIN7은 3 log CFU/mL 까지 크게 감소하였으며, IBS041의 경우 5 log CFU/mL로 2 log 만 감소하였음. 이는 12 log CFU/mL 로 농축하였을 때보다 감소 폭이 큰 것으로 보아 희석하였을 때 균의 세포벽이 라이소자임에 의해 더 큰 영향을 받는 것으로 판단할 수 있음. 또한, 고압파쇄 1 pass 처리 시 균 3주 모두 1 log CFU/mL 수준 이하로 크게 균수가 감소한 것을 확인하였음 (그림 55. IBS041의 경우 나머지 2주보다 다소 균수가 높은 것으로 보아 라이소자임과 고압파쇄에 의해 영향을 덜 받는 것으로 판단되나, 10 pass 처리 시 1 log 수준이었으므로 이는 사균화 대량 생산 공정을 최적화하는데 적용할 수 있을 것으로 사료됨.

위 결과에 의하면, 물리적인 방법으로 한 번에 높은 균수를 사멸시키는 데에는 어려움이 있는 것으로 보여짐. 이는 적은 균수로 나누어 파쇄를 진행하여 사균체를 생산하는 것이 적절한 사균화 방법으로 생각됨. 또한, 라이소자임과 고압파쇄기를 이용한 방법은 다른 물리적인 방법보다 적은 시간 내에 사균체물의 기능성 유효성분을 다량 얻을 수 있으며, 식품용 라이소자임을 사용함으로써 안정적이며 건강기능식품 또는 유제품 같은 식품에 적용하는데 문제가 되지 않을 것으로 사료됨.

생균의 경우 장기적으로 섭취할 시 패혈증 유발 및 항생제 내성균과의 교차 등 안전성에 대한 문제가 제기 되고 있음. 하지만 사균체는 죽은 균이기 때문에 이러한 위험성에서 안전하다고 평가되어 왔음. 특히 시판 되고 있는 살아있는 유산균 제품들도 유통과정에서 사멸될 가능성이 높고 살아있는 균으로 섭취한다 하여도 산성의 소화액에 의해 대부분 사멸하여 장까지 도달하는 균은 거의 없는 것으로 나타남.

그러나 사균체의 경우 섭취 후 체내에서 생리적 활성을 일으키지 않아 보다 안전하며, 유효 성분만을 추출하여 부피를 낮춰 고농도로 섭취가 가능하여 섭취 효율을 높일 수 있음. 또한, 살아있는 균은 안정성이 낮아 유통기한이 짧은 반면 사균체는 온도 및 시간에 대한 영향을 덜 받는 것으로 알려져 있음.

열처리 사균의 경우 안정성과 유통 적성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있지만, 라이소자임과 고압파쇄를 이용한 사균화 공정에 대해서는 연구가 필요한 실정임. 따라서 본 연구에서는 위와 같은 방법으로 생산된 사균체물의 기능성 식품 소재로서의 적용 가능성 확인을 위해 온도, 시간 등과 관련하여 안정성 평가를 진행할 것임.

## 다. 유산균 유래 다당체를 이용한 제품 개발

### (1) Exopolysaccharide의 분리 및 이화학적 특성 분석

최근 유산균 연구는 생균 보다 사균체, 유산균이 생성하는 다당체나 박테리오신 등과 같은 기능성 물질을 분석하는데 더 주목하고 있음. 이는 유산균 사균체뿐만 아니라 유산균이 생산하는 물질의 항염, 항암, 항균 등의 효과를 규명하여 항생제 대체 및 면역 증진 기능성 식품에 적용 가능할 것임을 보여줌. 이러한 물질은 균체를 포함하고 있지 않으므로 생균의 안전성 논란에 대하여 문제점이 없다는 장점이 있음.

특히, 본 연구팀에서 보유하고 있는 *Bifidobacterium longum* BORI 균주는 유산균이 생육하면서 점도 높은 다당체, 즉 exopolysaccharides (EPS)를 생산하는 것으로 나타남. 본 연구의 최종 목적은 사균체물의 생리적/건강기능적 특성을 규명하여 고부가 가치의 유산균 제품을 개발하는 것이므로 이러한 다당체의 기능적 특성을 분석하고 사균체와 같이 사용되어 시너지 효과를 낼 수 있는지에 대한 건강기능식품 소재로서의 적용성을 확인할 것임. 이는 다당체로써 장내 유익균의 먹이가 되어 prebiotic 효과도 볼 수 있으므로 다른 유산균 제품의 첨가물로도 사용할 수 있을 것으로 기대됨.

EPS 생산 균주는 사전 연구에서 *Bifidobacterium longum* BORI 균주가 EPS 생산 효율이 높은 것을 확인하였고, 2차년도 연구의 항염증 실험에서 높은 효과가 확인된 *Bifidobacterium bifidum* BGN4 균주 또한 생육하면서 생산하는 EPS에 의한 항염증 효과가 기대됨. 따라서, 본 연구에서는 기능성 평가 전에 *B. longum* BORI와 *B. bifidum* BGN4 두 균주를 사용하여 EPS를 생산하는 방법을 확립하고 이화학적 특성을 분석하고자 하였음.

## (가) EPS의 정제 및 분리

EPS를 분리 및 정제하는 방법은 기존 문헌들을 참고하여 진행하였으며, 수율은 페놀 황산법을 이용한 총당 정량법을 통해 구하였음. 균 2주는 MRS broth에 0.1% cysteine HCl을 첨가한 배지를 사용하였고, 2 L 스케일로 1% 접종하여 24시간동안 배양하였음. 24시간 배양 후, 원심분리(8,000 g, 10 min)를 통해 균을 제거하였고, 상등액만을 취하여 Trichloroacetic acid (TCA) 용액을 상등액 전체 부피의 10% 첨가하여 30분 동안 실온에서 stirring 하였음. 다시 용액을 원심분리(8,000 g, 30 min)를 통해 단백질을 제거하였고 상등액은 에탄올과 1:2 비율로 섞어 냉장고에 24시간 방치하였음. 24시간 후, 침전된 다당체 부분을 확인하였고 다시 원심분리(8,000 g, 10 min)하여 침전물을 회수하였음. 침전물은 멸균증류수로 소량 희석하여 0.45 um 필터를 사용하여 여과하였고 24시간동안 3.5 kD 투석막을 사용하여 투석하였음. 건조된 상태로 보관하기 위해 투석된 EPS는 동결건조하여 보관하였음 (그림 56).



그림 56 유산균 유래 EPS 정제 및 동결건조 후 사진

(Left; *Bifidobacterium longum* BORI, Right; *Bifidobacterium bifidum* BGN4)

EPS의 수율을 확인하기 위하여 페놀 황산법을 이용한 총당 정량을 진행하였음. 또한, 균수 별 수율을 확인하기 위해 MRS agar plate에 spreading하여 균수를 확인하였음.

페놀황산법은 glucose를 표준물질로 하여 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12 mg/mL 농도로 standard curve를 그리고 EPS 농도도 정확성을 위해 그 사이 속하는 값인 0.01% 용액을 제조하여 분석하였음.

표 27 Production yields of EPS from lactic acid bacteria

Strain	Polysaccharides (mg/L)	EPS production (CFU/mL)
<i>Bifidobacterium longum</i> BORI	235.8	$2.35 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	198.4	$3.42 \times 10^9$

총 당 정량 결과, BORI EPS의 경우 44.81%, BGN4 EPS의 경우 35.47%의 당이 함유된 것으로 확인됨 (표 27). 따라서 동결건조 후 무게에서 총 당 정량값을 %로 곱하여 수율을 계산한 결과 BORI와 BGN4 각각 235.6, 198.4 mg/mL 의 생산 수율값을 얻었음. 또한, 균수를 plate 상의 colony를 계산한 결과  $2.35 \times 10^9$ ,  $3.42 \times 10^9$  CFU/mL 값이 나왔음 (표 27). 두 균주 모두 대략  $10^9$  CFU/mL 수준이므로 사전 연구 결과와 비교하였을 때 실험실 스케일에서 최대로 생육한 것으로 판단됨. EPS 또한 균이 생육하면서 합성되는 다당체이므로 최대 생산량에 가까울 것으로 예상됨.

EPS의 경우 투석을 진행하여 단백질과 같은 고분자는 제거하였지만 소량의 단백질이 잔존할 수 있음. 따라서, 단백질 함량을 Bradford assay로 측정하였음. 표준물질은 Bovine serum albumin (BSA)을 사용함. Standard curve는 BSA 용액 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1% 농도로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 그리고 EPS는 그 사이에 속하는 값인 0.1%를 사용해서 총 단백질 함량을 구하였음.

표 28 Total protein amount of EPS from lactic acid bacteria

Strain	Absorbance (595 nm)	Total proteins (%)
<i>Bifidobacterium longum</i> BORI	$0.589 \pm 0.02$	$3.19 \pm 0.02$
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	$0.605 \pm 0.01$	$5.53 \pm 0.01$

단백질 정량 결과, BORI EPS의 경우 3.19%, BGN4 EPS의 경우 5.53%로 BORI가 총당 함량이 높고 단백질 함량이 낮은 것으로 보아 순도가 더 높은 것으로 확인됨 (표 28). EPS 생산은 3.5 kD 투석막을 이용하여 투석을 진행하였으나 완전한 단백질 제거는 이루어지지 않았음. 하지만, 단백질 함량이 5% 내외로 나온 것을 보아 균은 거의 제거되었다고 판단할 수 있음. 당과 단백질 외에 나머지 부분은 균 유래 다른 핵산 물질이나 총당 정량법으로 정량되지 않는 uronic acid와 같은 산성당일 것으로 생각됨.

## (나) EPS의 구성당 분석

분리된 EPS는 구조 예측을 위하여 구성당 분석을 진행하였음. 구성당 분석은 high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) with pulsed amperometric detector (PAD, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA). system을 이용하여 분석하였으며, EPS는 산분해한 sample을 희석하여 분석에 사용하였음.

산분해 방법은 1% EPS 용액 1 mL과 4 M trifluoroacetic acid (TFA) 1 mL을 섞어 총 농도 2 M trifluoroacetic acid (TFA)이 되게 하여 heating block을 121°C으로 맞추고 2시간동안 가열하였음. 2시간 후에, 질소 가스를 약하게 불어 넣어주며 잔존하는 산을 제거하였고 약 1시간 건조 후 증류수 1 mL을 다시 넣어줌. 최종 농도는 1%로, peak 감도를 고려하여 중성당은 0.2%, 산성당은 0.1%로 희석하여 분석하였음.

HPAEC-PAD system 분석 컬럼은 CarboPac PA-1 pellicular anion-exchange column (ThermoScientific, Sunnyvale, CA)을 사용하였고 분석 용매는 18 mM NaOH를 사용하여 15분 동안 flow rate 1 mL/min 조건으로 분석하였음. 당 표준물질은 fucose, arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose, mannose, glucosamine, galactosamine, fructose로 총 10가지 중성당을 사용하였음. 산성당 유무도 확인하기 위해 용매 150 mM NaOH와 150 mM NaOH+600 mM NaOAc를 사용하여 isocratic mode로 20분동안 분석하고 150 mM NaOH+600 mM NaOAc 용매로 washing 해주었음. Glucuronic acid, galacturonic acid의 유무도 확인하였음. 모든 당은 standard 당과 EPS의 당이 겹치는 경우 정확한 확인을 위해, standard 당과 EPS sample을 합쳐서도 분석을 진행하였음.

HPAEC-PAD system을 이용하여 중성당 분석 결과, galactosamine과 glucosamine, galactose, glucose, mannose+xylose와 peak가 겹치는 것이 확인됨 이러한 결과를 통해 peak의 area 값을 구하여, 구성당 각각 standard curve 식으로 계산하였고 총 당의 상대적인 비율을 계산하였음. 산성당의 경우, galacturonic acid와 glucuronic acid 모두 겹치는 peak가 확인되지 않아 중성당 100%로 이루어져있다고 가정하여 계산하였음 (그림 57).

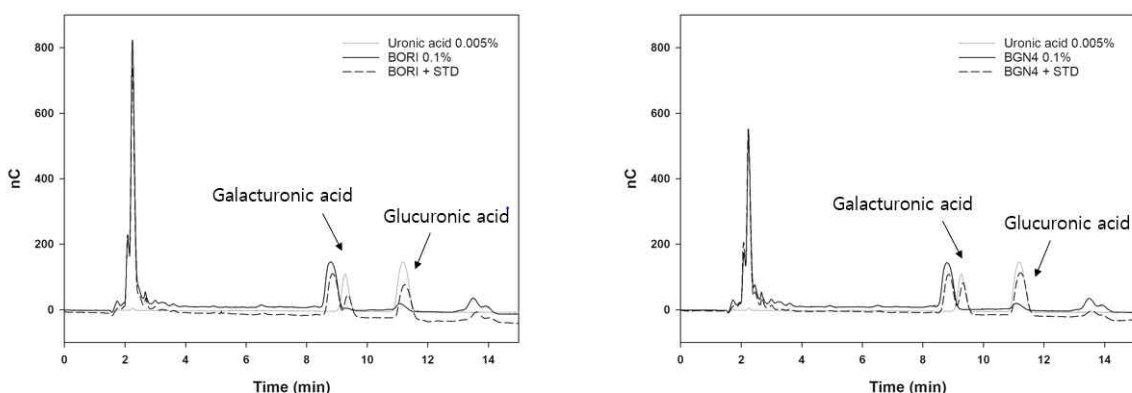


그림 57 Chromatogram of uronic acids and EPS



	Sugar composition (%)				
	Galactosamine	Glucosamine	Galactose	Glucose	Mannose Xylose
EPS from <i>Bifidobacterium longum</i> BORI	19.8 ± 1.9	5.9 ± 1.2	5.4 ± 0.3	43.1 ± 0.2	25.7 ± 0
EPS from <i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	24.1 ± 1.8	2.1 ± 1.3	3.2 ± 0.5	42.9 ± 0.0	27.6 ± 0

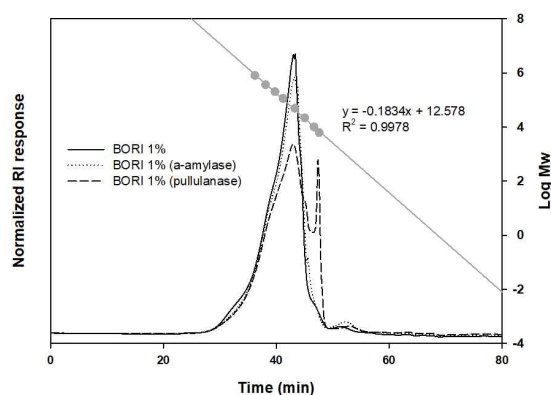
표 29 The neutral sugar contents of EPS from lactic acid bacteria

EPS의 중성당을 상대적인 비율로 계산한 결과, BORI EPS와 BGN4 EPS 모두 glucose가 backbone으로 이루어진 glucan 형태로 예상됨. 특히 mannose와 galactosamine의 비율도 높은 것을 보아 glucomannan 또는 glycosaminoglycan의 형태일 확률이 높음.

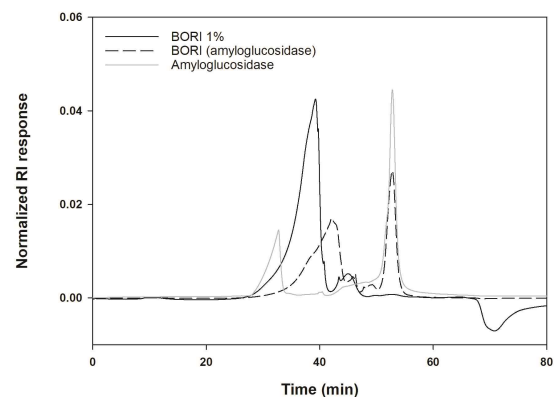
#### (다) HPSEC-RI를 이용한 체내 소화 가능성 분석

EPS의 장내 프리바이오틱스 효과를 확인하기 앞서, 체내에서 효소에 의하여 EPS가 분해되는지 여부를 확인하였음. 체내 소화 가능 여부는 high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) combined with refractive index (RI) systems (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA)를 이용하여 control, 효소, 효소 반응 sample과 3가지를 비교하였음. 사용된 효소는 포유류와 미생물 유래를 사용하였으며  $\alpha$ -amylase와 pullulanase, amyloglucosidase 3가지를 사용함. HPLC column은 Shodex OH-806 HQ 과 Shodex OH-804 HQ을 연결하여 사용하였고 용매는 0.22  $\mu$ m filter와 탈기한 3차 증류수를 사용하여 flow rate 0.4 mL/min 조건으로 분석하였음.

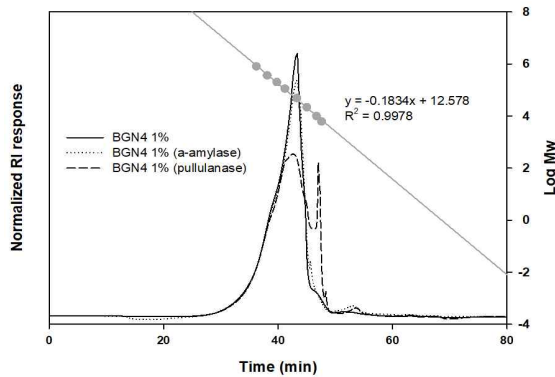
A



B



C



D

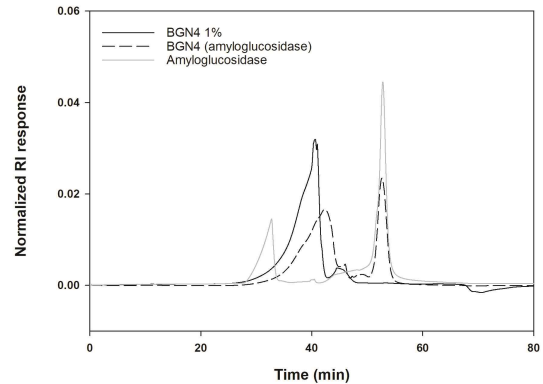


그림 58 Enzyme reaction  $\alpha$ -amylase and pullulanase results of EPS (A; BORI-  $\alpha$ -amylase and pullulanase, B; BGN4-  $\alpha$ -amylase and pullulanase, C; BORI-amyloglucosidase, D; BGN4-amyloglucosidase)

$\alpha$ -amylase 효소는  $\alpha$ -1,4 결합을 분해하는 효소로, 이 효소에 의해 분자량이 낮아지는 크로마토그램을 보인다면  $\alpha$ -1,4 결합을 가지고 있어 체내 흡수되면 이러한 효소에 의해 분해되어 소화된다고 예상할 수 있음. pullulanase는  $\alpha$ -1,6 결합을 분해하고 amyloglucosidase는 glucose 단위로 고분자를 분해하며  $\alpha$ -amylase 효소와 마찬가지로 효소 처리 후 분자량의 낮아지는 현상을 보인다면 이러한 효소들에 의해 분해되는 것으로 예상할 수 있음.

BORI EPS와 BGN4 EPS 모두 거의 동일한 크로마토그램 결과를 보였음. 이는 Bifidobacterium속으로 같은 속인 것으로 생각되며 다른 유산균속도 추가 실험하여 그 결과를 확인해야 할 것으로 보임.  $\alpha$ -amylase에 의해 분해되는 양상을 보이지 않았으나, pullulanase에 의해 약간의 분해된 패턴을 보임 (그림 58). HPSEC의 경우 분자량이 클수록 먼저 detect되고, 낮을수록 나중에 detect되는데 EPS control peak가 40분 정도에 형성되고 pullulanase 처리한 EPS가 40분 이후에 작은 peak가 형성된 것이 확인됨. 이는 BORI와 BGN4 유래 EPS가  $\alpha$ -1,4 결합은 없으나  $\alpha$ -1,6 결합은 가지고 있는 것으로 예상되며 사람이 섭취할 경우 다소 분해될 가능성이 있음. Amyloglucosidase 처리한 EPS 또한 control 보다 peak가 늦게 나온 것으로 보아 조금 분해된 것으로 볼 수 있음.

따라서 BORI와 BGN4 EPS는  $\alpha$ -1,6 결합을 가지고 있는 것으로 판단되며 amyloglucosidase 효소에 의해 glucose 단위로 조금 분해될 가능성이 보임. 이는 체내에서 완전히 소화되지 않는 다당체는 아니며 amyloglucosidase 효소에 의해 조금 소화될 수는 있으나 완전히 소화되지 않은 다당체 일부분이 대장까지 도달하여 프리바이오틱 효과를 줄 수 있다고 판단됨.

## (라) EPS의 프리바이오틱 효과 측정

HPSEC-RI를 이용하여 EPS의 장내 소화 가능성을 확인하였고 프리바이오틱 효과를 좀 더 알아보기 위하여 추가적으로 논문을 참고하여 여러 유산균주를 이용하여 프리바이오틱 효과를 측정하였음.

프리바이오틱 indicator strain은 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium longum* BORI, *Lactobacillus paracasei* IBS041, *Lactobacillus acidophilus* PIN7 총 4주로, 모두 비피도에서 분리한 균주를 사용하였음.

실험은 MRS broth (Oxoid) 배지 조성에서 dextrose를 제외하고 대체 탄소원으로 EPS를 첨가하고 Inulin을 positive control로 사용하였음. Negative control은 dextrose, 프리바이오틱스 모두 포함하지 않은 MRS broth를 사용하였음 (표 30). EPS는 MRS 부피의 0.1%씩 첨가하였음.

표 30 프리바이오틱스 배지 조성

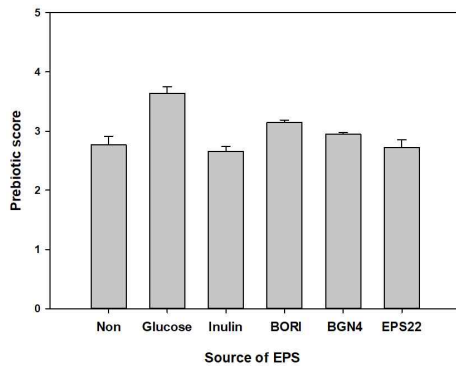
	Typical formula (g/L)
Proteose peptone No.3	10
Beef extract	10
Yeast extract	5
Polysorbate 80	1
Ammonium citrate	2
Sodium acetate	5
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Dipotassium phosphate	20

모든 균주는 5 mL broth에 1% (10<sup>6</sup> CFU/mL) 접종하여 24시간동안 배양하였으며, 배양액은 십진희석법으로 희석하여 원액부터 10 uL씩 plate 위에 분주하였음. Overnight 배양 후 plate 위의 colony를 counting하였고, 24시간 colony 수에서 0시간의 colony 수를 빼어 값을 나타내었음. 값은 log CFU/mL로 나타냄. (그림 59)

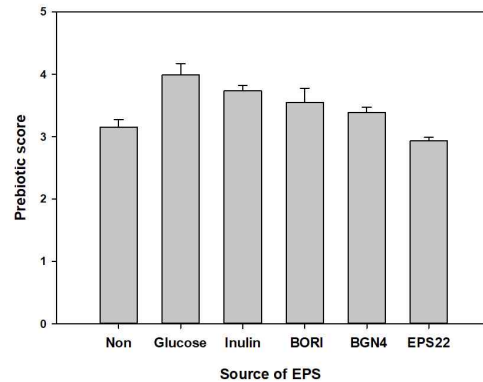
프리바이오틱 실험 결과, 원래 MRS broth가 glucose를 탄소원으로 구성된 것처럼 glucose에서 가장 높은 생육을 보였음. 프리바이오틱스는 전체적으로 BORI와 BGN4 유래의 EPS가 Inulin과 유사한 프리바이오틱 활성을 보였음. EPS22는 다른 균주 유래 EPS로 비교하기 위해 사용하였으나 BORI와 BGN4 EPS에 비하여 큰 효과는 없었음. 특히 BORI EPS의 경우 *Lactobacillus paracasei* IBS041 균주를 제외한 3균주에서 inulin과 유사하거나 더 높은 프리바이오틱 효과를 나타냄. BGN4보다는 BORI 유래 EPS가 효과가 더 높은 이유로써 BORI의 총 당 정량에서 BGN4보다 높았으므로 당의 함량이 높아 그만큼 유산균이 탄소원으로 이용할 수 있는 부분이 많다고 생각됨.

시중에 알려져있는 inulin은 예상보다 높은 프리바이오틱 효과를 보이지 않았고, EPS와 전체적으로 프리바이오틱 효과가 유사한 것을 보아 이는 유산균과 함께 섭취할 시 시너지 효과를 줄 수 있으며, 식품 첨가물로써 요거트나 다른 발효유제품에 사용한다면 유산균 생육 효과와 더불어 대장 내 프리바이오틱 효과를 줄 수 있을 것으로 예상됨.

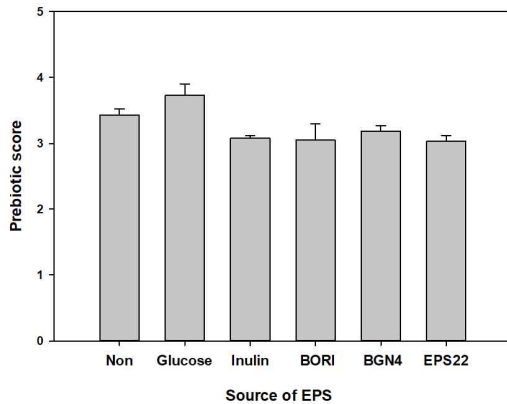
A



B



C



D

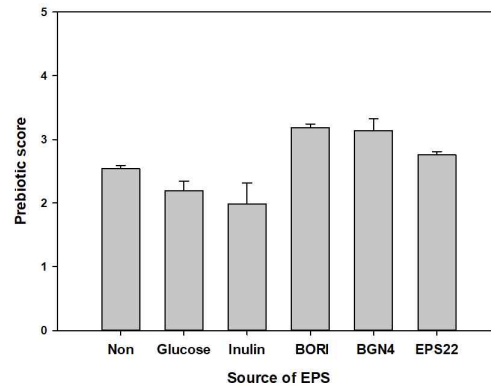


그림 59 Prebiotic activity score of EPS and commercial prebiotic inulin (A; *Bifidobacterium bifidum* BGN4, B; *Bifidobacterium longum* BORI, C; *Lactobacillus paracasei* IBS041, D; *Lactobacillus acidophilus* PIN7)

#### (마) EPS의 항산화능 연구

본 연구에서는 EPS의 항산화 효과를 연구하기 위해 DPPH(1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)을 이용하여 자유 라디칼 소거활성을 측정하고자 하였음. DPPH에 의한 항산화 활성은 화합물이 DPPH radical에 전자를 공여함으로써 자유기를 소거하는 활성을 측정하는 것으로 DPPH는 0.1 mM 농도가 되게 측정하여 에탄올에 녹여 사용하였음. 또한 positive control은 ascorbic acid를 사용하였고 이는 희석하여 0.001~1 mg/mL, 1~7 mg/mL 농도로 제조하여 EPS와 비교하였음. negative control은 에탄올을 사용하였으며, 반응은 sample 1 mL와 DPPH 0.1 mM 용액 3 mL를 희석한 후 암소에서 30 분간 반응하여 517 nm에서 흡광도를 측정함. 자유 라디칼 소거능을 구하는 식은 아래

와 같음.

$$\text{Scavenging ability (\%)} = \left[ 1 - \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Blank는 0.1 mM DPPH 용액의 흡광도 값을 넣고, control은 에탄올만 넣은 negative control 값을 넣어 값을 구하였음.

Ascorbic acid의 경우 항산화 효과가 매우 강한 것을 고려하여 0.05%, 0.1%~0.7%까지 희석하여 항산화 효과를 측정하였음 (그림 60)

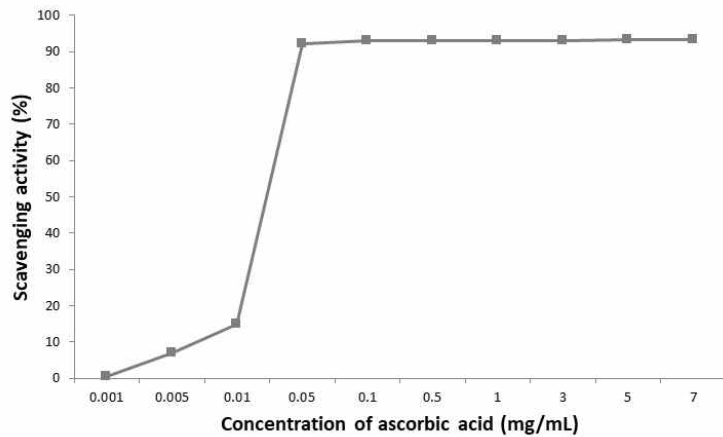


그림 60 DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid

Ascorbic acid의 항산화 효과 측정 결과, 0.05 mg의 소량으로도 높은 라디칼 소거능을 나타내는 것을 확인함. 따라서 BORI EPS와 BGN4 EPS를 이용하여 항산화 효과를 측정할 때 0.05 mg 수준에서 희석을 할 것을 참고하였음. 또한, EPS의 경우 동결건조된 상태로써 소량임에도 불구하고 부피가 매우 커서 농도가 짙어져 1% 이상일 경우 517 nm에서 흡광도 측정을 할 경우 라디칼 소거능 때문인지, EPS 자체의 색 때문인지 구분하기가 어려워 1% 이하로 0.1~0.7%까지 희석하여 항산화 효과를 측정함. BORI EPS와 BGN4 EPS를 이용한 항산화능 결과는 아래와 같음 (그림 61).

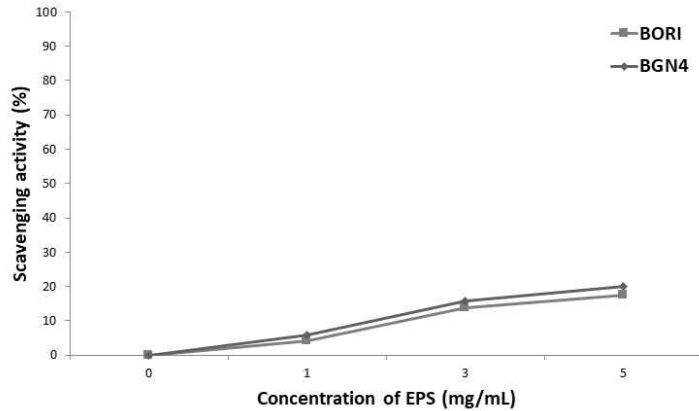


그림 61 DPPH radical scavenging activity of EPS

EPS의 항산화능 측정 결과, BGN4 유래 EPS가 BORI 유래 EPS 보다 항산화 효과가 약간 더 높았지만 2균주 유래 EPS 모두 농도가 높아짐에 따라 항산화 효과가 증가하는 양상을 보였으나 ascorbic acid와 비교하면 높은 농도에 비하여 항산화 효과가 낮은 것을 볼 수 있음. 이는 농도를 더 높여서 진행하는 것이 좋을 것으로 생각되며 DPPH 용액 반응으로는 EPS의 무게 대비 부피가 매우 크므로 흡광도값으로 항산화 효과를 판단하기에는 부적합하다고 사료됨. 이는 다른 항산화 효과를 보는 방법을 선정하여 추후에 EPS의 항산화 효과를 볼 필요가 있음.

농도를 높였을 경우 항산화 효과가 증가한다면 사균체와 같은 기능성식품에 첨가함으로써 제품 자체에서 항산화 효과를 줄 수 있으며 섭취하였을 때 항산화 효과도 볼 수 있고 위 연구 결과에 따르면 프리바이오틱스 효과도 확인하였으므로 사균체 등 유산균 제품에 첨가함으로써 여러 이로운 기능을 할 수 있을 것으로 판단됨.

## 라. 유산균 사균체물 제품 형태 제시

### (1) 사균체의 유제품 적용 분석 연구

본 연구에서는 유산균 사균체의 대량 생산 공정을 최적화하였고 식품에서의 적용성 확인을 위하여 사균체를 유제품에 첨가하여 관능적인 측면에서 개선하고자 하였음.

유산균의 경우 건강기능식품 분말형으로도 많이 판매가 되고 있지만, 맛과 가격적인 이유로 소비자가 접하기에 쉽지 않음. 이러한 이유로 대중적으로는 발효유에 의한 섭취 비율이 매우 높으며, 시중에 판매되고 있는 요거트 제품의 경우 유산균 섭취보다 발효에 의한 점도 형성, 산미, pH 저하에 의한 보존성이 주요 목적임. 따라서 사균체의 경우도 이러한 효과를 얻지 못하면 소비자에게 호감을 얻기 힘들 수 있음.

따라서 본 연구는 사균체의 요거트 제품 적용을 통해 점도 상승 및 겔 형성에 주목하여 실험을 진행하였음. 이는 사균체를 첨가함으로써 건강 측면에서의 기능성 향상과 동시에 관능적 요소도 개선된 요거트를 생산하기 위함임.

요거트의 경우 판매되고 있는 제품은 대부분 당이 다량 함유되어, 그에 의해 점도가 향상되는 영향을 배제할 수 없음. 이를 고려하여 본 연구에서는 당 함량이 0% 이며, 유산균, 우유로만 발효된 제품을 사용하였음.

마트에서 구입한 발효 요거트 제품을 동결 건조하여 수분을 제거한 뒤, 8% yogurt solution 8 mL (w/v)를 제조하였음. 사균체는 *B. bifidum* BGN4, *L. paracasei* IBS041, *L. acidophilus* PIN7 균주 3주를 이용하였고, 열처리, 라이소자임과 음과파쇄에 의한 사균체를 각각 75 mg/10 mL solution을 만들어 각 균마다 2 mL씩 넣어주어 사용하였음. Blank는 사균체를 넣지 않은 yogurt solution을 사용하였으며, control은 생균, standard의 경우 테라 1조 바이오스틱 사균 분말 제품을 사용하였음. 모든 실험은 3반복으로 진행하였음.

제조한 yogurt solution 8 mL에 사균체를 2 mL 씩 넣어주었고, 완전히 섞은 후 겔 형성을 위해 냉장고에 2시간 동안 보관하였음. 2시간 후에 확인한 결과, 모든 샘플들이 요거트 부분과 수분이 분리되는 현상을 볼 수 있었음. 유제품 적용 실험은 겔 안정성 향상 및 시간이 지났을 때 발생하는 수분 분리 현상을 방지하기 위한 실험이었으나, 육안으로 확인하였을 때는 수분 분리 현상이 개선되지는 않았음 (그림 62).



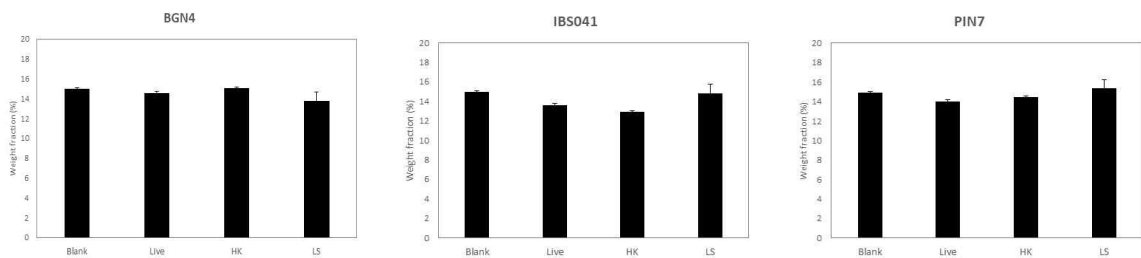


그림 62 요거트와 사균체를 섞은 후 2시간 냉장 보관 결과

(1~6; BGN4의 live, heat-killed, lysozyme and sonication, 7~12; IBS041의 live, heat-killed, lysozyme and sonication, 13~18; PIN7 균주의 live, heat-killed, lysozyme and sonication)

2시간 냉장보관 후, 각 샘플들은 2시간동안 13,000 g에서 원심분리를 진행하였으며 상등액을 제거하고 남은 침전물의 무게를 재어 weight fraction (WF)를 측정함.

Weight fraction 계산 결과, 유산균 3종 모두 사균체 첨가 후 겔 무게 값이 큰 차이를 보이지는 않았음 (그림 63). 모든 샘플 중 IBS041 균주의 heat-killed 샘플이 가장 낮은 값을 나타내었으나, live와 lysozyme과 음파파쇄 처리한 샘플과의 유의적인 차이는 없는 것으로 확인됨. 또한, PIN7 균주의 LS 샘플이 가장 높은 값으로 15.3을 나타내었으나 이 또한 live와 lysozyme과 음파파쇄 처리한 샘플과의 유의적인 차이가 없으므로 겔 형성에 는 영향을 주지 않은 것으로 판단됨.



\*HK; heat-killed, LS; lysozyme and ultrasound

그림 63 The weight fraction of yogurt added dead cells of lactic acid bacteria

유제품 적용 결과, 사균체는 유제품의 겔 형성에 거의 영향을 주지 않는 것으로 판단됨. 이는 사균체가 유제품의 점도나 식감에 영향을 주지 않아 기능성 소재로써만 작용할 수 있으나, 너무 질거나 다른 이물감을 주지 않아 유제품의 기호도에는 영향을 끼치지 않을 것으로 사료됨.

따라서, 사균체를 유제품에 적용하여 점도나 겔 형성능을 원할 경우 펙틴이나 다른 점도 상승에 영향을 주는 소재를 사용하여 기호도를 높이거나, 사균체 자체로써의 기능성을 추가하여 기능성 유제품을 제조하는데 사용될 수 있을 것임.



## 마. 박테리오파지 유래 용균효소 Endolysin 분리정제 및 특성확인

### (1) Endolysin LysSAP33의 분리정제

*S. aureus*는 현존하는 다양한 항생제에 대해 내성을 나타내기 때문에 문제가 되고 있으며, 이를 해결하기 위해 여러 가지 천연 소재 및 항균물질들이 연구되고 있고, 박테리오파지 유래 용균효소인 endolysin은 항생제 대체제로서 각광받고 있는 소재 중 하나임. 따라서 본 연구에서는 *S. aureus* 유래 phage 의 Whole genome sequence로 부터 phage 의 용균효소인 endolysin sequence를 annotation 하고 분석한 뒤, *E. coli* pET vector expression system을 통해 endolysin을 분리 및 정제를 실시함.

*S. aureus* phage SAP33의 endolysin gene의 PCR을 진행하기 위해 DNA extraction kit (Norgen Biotek Co., Thorold, Ontario, Canada)을 이용해 phage SAP33의 DNA를 추출한 후, 추출한 DNA를 표 31 의 primer를 이용하여 Gradient PCR을 진행하여 PCR 산물의 양을 확인하고 최적조건을 결정함 (그림 63). 이후 band가 가장 두꺼웠던 온도인 55°C를 annealing temperature로 결정하여 PCR을 다시 진행한 뒤, PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 을 이용하여 정제 하여 DNA 농도를 확인함. 정제된 DNA 와 미리 추출해놓은 pET23a vector 에 제한효소 XhoI (TaKaRa, Tokyo, Japan)과 NdeI (TaKaRa, Tokyo, Japan)을 처리한 후 ligation 하여 heat-shock 기법을 이용하여 Rosseta(DE3)에 transformation을 진행하고 ampicillin이 포함된 LB agar에 spreading하고 37°C에서 24시간동안 배양함.

Ligation이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위해 배양된 colony 24개를 임의로 선별하여 T7 promotor 와 T7 terminator primer를 이용해 colony PCR을 진행하였고, lane 12에서 LysSAP33 gene이 들어간 것으로 확인되어 (그림 64) lane 12의 colony를 streaking 및 계대배양하여 -80°C에 glycerol stock으로 보관하였음.

표 31 PCR primer for amplification of LysSAP33

Primer	Oligonucleotide sequences (5' - 3')	Product Size
LysSAP33_F	AGG AGG TAA ACA TAT GAA AAC ATA C	829bp
LysSAP33_R	AAA TAA ACT CGA GTT ACA TAA AAA AAT AAT	

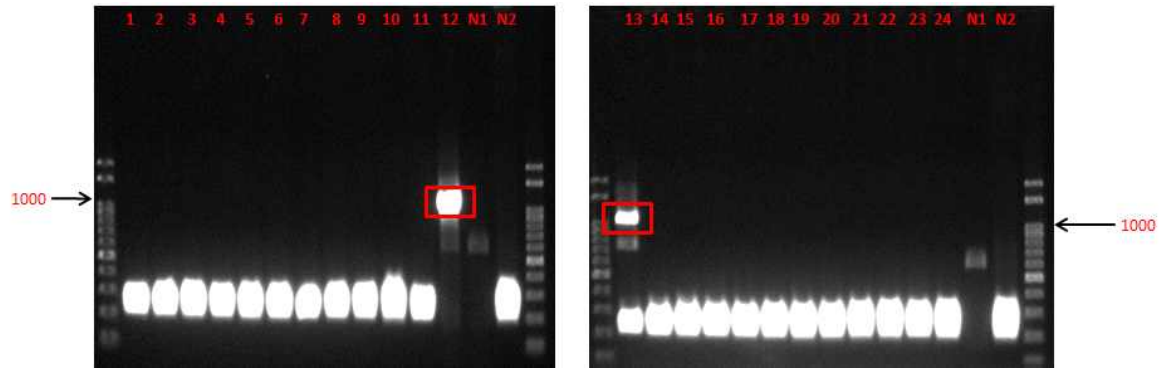


그림 64 Agarose gel showing gradient PCR amplicons of the pET-23a\_LysSAP33

\* Target size : 1076bp, N1: host DNA, N2: pET23a

LysSAP33의 단백질 발현을 위해 *E. coli* Rosetta(DE3)에 pET23a\_LysSAP33를 transformation 시키고 24시간동안 배양하였음. 24시간 배양한 *E. coli* 용액 1%를 ampicillin이 포함된 LB broth 500mL에 37°C에서 log phase (OD600; 0.5)까지 배양한 뒤 IPTG 1mM을 넣고 18°C에서 18시간동안 150rpm으로 배양하여 overexpression step을 진행함. Induction이 끝난 *E. coli*를 5,000rpm에서 10분동안 원심분리 하여 침전된 cell을 harvest하여 200 mL에 해당하는 *E. coli* pellet당 50 mL의 lysis buffer (50mM Tris-HCl /500mM NaCl /10mM imidazole, pH 8.0)로 washing 해주고 30분 동안 sonicator (VCX130, Vibracell, Sandy Hook, CT, USA)로 sonication 해주었음 (5/2s pulse on/off, Amp 40%). Lysate의 debris를 제거하기 위해 원심분리 (13,000rpm, 10 min)를 진행하여 상등액의 soluble한 protein들만을 얻어내고, Ni-NTA superflow resin (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 단백질 정제를 진행함. 레진은 20mL의 lysis buffer와 20mL의 soluble한 상등액을 통과시킨 뒤 washing buffer (50mM Tris-HCl /500mM NaCl /50mM imidazole, pH 8.0)을 이용하여 2회 washing 해주고 20mL의 elution buffer (50mM Tris-HCl /500mM NaCl /200 mM imidazole, pH 8.0)을 이용하여 3회에 걸쳐 elution하였음. 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 발현 및 정제 여부를 확인함 (그림 65).

실험결과, 30kDa에 해당하는 target band가 나타나 overexpression이 잘 일어났는지 확인 가능하였고 (그림 65 Lane2), 레진을 통해 정제한 결과 또한 하나의 밴드만 나타났기 때문에 LysSAP33이 순수하게 soluble형태로 정제되었다고 판단할 수 있었음 (그림 65 Lane3).

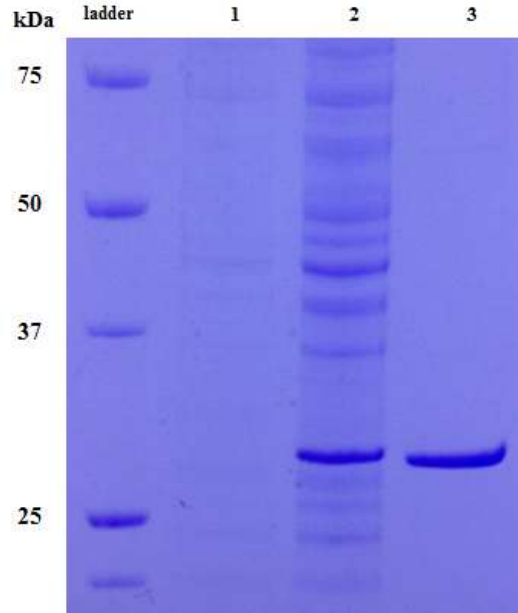


그림 65 SDS-PAGE analysis for expression and purification of the LysSAP33.

\* Recombinant LysSAP33 target size: 30kDa. Lane 1: total lysate of IPTG-induced *E. coli* harboring the backbone plasmid; Lane 2: total lysate of IPTG-induced *E. coli* harboring the recombinant plasmid; Lane 3: partially purified endolysin.

#### 바. Endolysin LysSAP33의 특성확인

*S. aureus* phage SAP33으로 부터 분리, 정제한 endolysin LysSAP33의 용균 능력 및 상업화 가능성을 평가하기 위해 숙주 저해능, 숙주 저해범위 및 온도, 염, pH, 2가 양이온에 대한 안정성 평가를 진행함. 또한 LysSAP33의 단백질 특성 확인을 위해 단백질 구조 및 domain에 대한 in silico 분석을 추가적으로 진행함.

LysSAP33의 숙주저해범위를 확인하기 위해서 Ni-NTA resin을 이용하여 정제한 LysSAP33을 Amicon Ultra-4 (Merck-Millipore Bioscience, St.Charles, MO, USA)를 이용하여 2차 정제한 뒤 Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질의 농도를 측정하고 Reaction buffer (50mM Tris-HCl /500mM NaCl, pH 8.0)로 희석한 10uM의 LysSAP33을 실험에 사용하였음. 숙주 저해범위 확인 실험에는 Meticillin Resistant Staphylococcus aureus (메티실린 내성 황색포도상구균, MRSA)를 포함한 Staphylococcus spp, Bacillus, Enterococcus, Lactobacillus, Listeria, Streptococcus 및 다른 그람양성균들을 사용하였음. 각 균들을 exponential phase까지 배양한 후 0.6% LBC soft agar에 접종하여 LBC agar에 증충 하였음 이후 soft agar가 굳으면 준비된 LysSAP33을 10uL씩 분주하고 37°C에서 overnight culture 하여 clear zone의 형성 유무를 확인하는 spotting assay method를 통해 숙주 저해범위를 확인함.

실험 결과, LysSAP33은 *S. aureus*에는 대부분 clear zone을 형성하였고 (80/84), 이 중 MRSA 32종에 대해 clear zone을 형성하는 것을 확인함. *S. aureus*를 제외한

Staphylococcus spp (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*)에 대해서도 clear zone을 형성함 (표 32). 반면 다른 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해서는 clear zone을 형성하지 못함 (data not shown). 박테리오파지와는 다르게 endolysin은 세포벽을 기질로 인식하여 분해하는 방식으로 용균을 일으키기 때문에 세포벽의 구조가 비슷하다면 그 균의 생리적, 항생제 내성 특성과 관계없이 용균 시킬 수 있는 것이 특징이며 따라서 그 용균 범위도 파지에 비해 매우 넓은 것으로 알려져 있음. 따라서 본 실험 결과는 LysSAP33을 *S. aureus*의 제어목적으로 사용할시, 유산균과 같은 유용미생물은 죽이지 않으면서 *S. aureus*만을 선택적으로 용해시키는 것이 가능할 것으로 사료됨.

표 32 Lysis spectrum of the LysSAP33

	Strains	Activity	MRSA
Type strains	<i>S. aureus</i> KCTC 1621	○	
	<i>S. aureus</i> KCCM 12103	○	
	<i>S. aureus</i> ATCC 13565_SEA	○	
	<i>S. aureus</i> ATCC 23235_SED	○	
	<i>S. aureus</i> ATCC 19095_SEC	○	
	<i>S. aureus</i> ATCC 14458_SEB	○	
	<i>S. aureus</i> ATCC 27664_SEE	○	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	○	
	<i>S. aureus</i> RN4220	○	
	<i>S. condimentii</i> KCCP 60045	X	
	<i>S. epidermidis</i> KCCM 35494	X	
	<i>S. epidermidis</i> KCCM 40416	X	
	<i>S. epidermidis</i> KCCP 60047	○	
	<i>S. hominis</i> KCCP 60048	○	
	<i>S. sciuri</i> KCCP 60061	○	
	<i>S. sciuri</i> KCCP 60058	○	
	<i>S. warneri</i> KCCP 11224	○	
	<i>S. warneri</i> KCCP 11105	○	
<i>S. warneri</i> KCCP 60052	○		
<i>S. warneri</i> KCCP 60053	○		
<i>S. warneri</i> KCCP 60054	○		
<i>S. warneri</i> KCCP 60055	○		
<i>S. warneri</i> KCCP 60056	○		
<i>S. warneri</i> KCCP 60057	○		
<i>S. xylosus</i> KCCP 60059	○		
Clinical isolates	<i>S. aureus</i> S-67C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-68C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-69C	○	
	<i>S. aureus</i> S-70C	○	
	<i>S. aureus</i> S-71C	○	✓

	<i>S. aureus</i> S-72C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-73C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-74C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-75C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-76C	○	
	<i>S. aureus</i> S-77C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-78C	○	
	<i>S. aureus</i> S-79C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-80C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-81C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-82C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-83C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-84C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-85C	○	
	<i>S. aureus</i> S-86C	X	✓
	<i>S. aureus</i> S-87C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-88C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-89C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-90C	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-91D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-92D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-93D	X	✓
	<i>S. aureus</i> S-94D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-95D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-96D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-97D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-98D	○	✓
Food isolates	<i>S. aureus</i> S-99D	○	
	<i>S. aureus</i> S-100D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-101D	○	
	<i>S. aureus</i> S-102D	○	
	<i>S. aureus</i> S-103D	○	
	<i>S. aureus</i> S-105D	○	
	<i>S. aureus</i> S-106D	○	
	<i>S. aureus</i> S-108D	○	
	<i>S. aureus</i> S-109D	○	
	<i>S. aureus</i> S-111D	○	
	<i>S. aureus</i> S-112D	○	✓
	<i>S. aureus</i> S-113D	○	
	<i>S. aureus</i> S-115D	○	
	<i>S. aureus</i> S-117D	○	
	<i>S. aureus</i> S-118D	○	
	<i>S. aureus</i> S-119D	○	
	<i>S. aureus</i> S-120D	○	
	<i>S. aureus</i> S-121E	○	
<i>S. aureus</i> S-122E	○		
<i>S. aureus</i> S-123E	○		
<i>S. aureus</i> S-124E	○		
<i>S. aureus</i> S-125E	○		

<i>S. aureus</i> S-126E	○	
<i>S. aureus</i> S-127E	○	
<i>S. aureus</i> S-128E	○	
<i>S. aureus</i> S-129E	○	
<i>S. aureus</i> S-130E	○	
<i>S. aureus</i> S-131E	○	
<i>S. aureus</i> S-132E	○	
<i>S. aureus</i> S-133E	○	
<i>S. aureus</i> S-134E	○	
<i>S. aureus</i> S-136E	○	✓
<i>S. aureus</i> S-137E	○	
<i>S. aureus</i> S-138F	○	
<i>S. aureus</i> S-139F	○	
<i>S. aureus</i> S-140F	○	
<i>S. aureus</i> S-141F	X	✓
<i>S. aureus</i> S-142F	○	
<i>S. aureus</i> S-143F	○	
<i>S. aureus</i> S-144F	○	
<i>S. aureus</i> S-145F	X	✓
<i>S. aureus</i> S-146F	○	
<i>S. aureus</i> S-147F	○	
Symbols, +: endolysin sensitive strain; X: endolysin insensitive strain		

LysSAP33의 *S. aureus*에 대한 최소 저해농도를 알아보기 위해 2차 정제된 LysSAP33을 reaction buffer (Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0)를 이용하여 여러 가지 농도로 희석한 뒤, log phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하여 reaction buffer로 2회 washing 해주고, washing이 끝난 균은 96-well plate에 180uL씩 분주하였음. 이후 96-well plate에 LysSAP8을 최종 농도가 0.1, 1, 10, 100, 1000nM이 되도록 20uL씩 분주함. 분주가 완료된 plate를 30°C에 30분 동안 배양하고, UV spectrophotometer를 이용해 OD600 값을 측정하였음. 실험은 3회 반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.01 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단함.

실험 결과, 농도에 비례하여 용균능력이 늘어났고 최종 농도가 1000nM일 때, 용균 능력이 가장 높게 나타났으나 0.1nM과 1nM일 때에는 상대적으로 낮은 용균 능력을 보임 (그림 66). 본 실험 결과로 보았을 때, LysSAP33을 *S. aureus* 제어 목적으로 응용하기 위해서는 최소 10nM이상 사용하여야 할 것으로 사료됨.

LysSAP33의 열 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP33 10 uM을 여러 가지 온도(30, 37, 40, 45, 50, 60°C)에 30분간 반응시켜 주었음. Target 균주로는 *S. aureus* KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, log phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심 분리하여 reaction buffer로 2회 washing해주고 1.5 micro centrifuge tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 1.5 micro centrifuge tube에 여러 가지 온도에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안

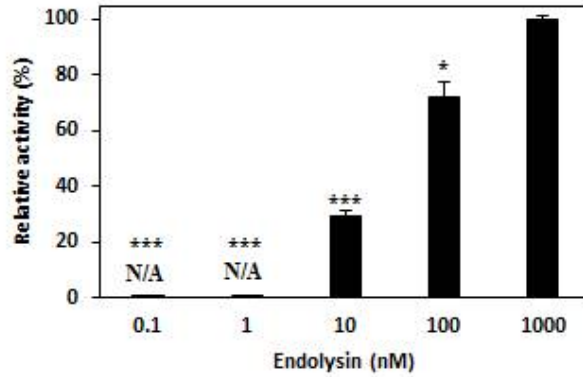


그림 66 Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the LysSAP33. \*:  $P < 0.01$ ; \*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*:  $P < 0.0001$ ; N/A: not available.

30°C에서 반응시켰음. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD600 값을 측정하였음.

실험결과, 30°C에서 가장 활성이 높았고 *S. aureus*가 가장 잘 자랄 수 있는 온도인 37°C에서는 활성이 약간 떨어지는 것이 확인되었으나 유의할만한 차이는 나타나지 않았으며, 40°C부터는 활성이 떨어지는 것이 확인됨 (그림 67). 따라서, LysSAP33는 30-37°C에서 가장 안정하며 고온에서는 매우 불안정한 단백질인 것으로 사료됨.

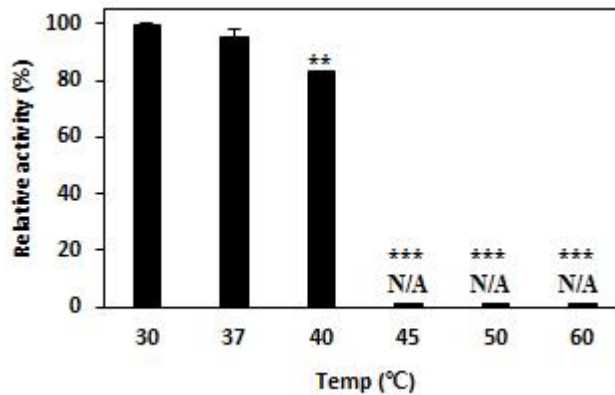


그림 67 Stabilities of the LysSAP33 upon high temperature treatment for 30 min. \*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*:  $P < 0.0001$ ; N/A: not available.

LysSAP33의 pH에 따른 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP33 10uM을 다양한 pH 조건 (pH 3-9)의 buffer에 30분간 반응시켜 주었음. pH 3-5는 50mM citrate buffer, pH 6은 50mM imidazole-HCl buffer, pH 7-9는 Tris-HCl buffer로 제조하여 실험을 진행함. Target 균주로는 *S. aureus* KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, log phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리 하여 reaction buffer로 2회 washing해주고 1.5 micro centrifuge tube 에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있

는 1.5 micro centrifuge tube 에 여러 가지 온도에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시킴. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD600 값을 측정함.

실험결과, 낮은 pH 조건에서는 단백질이 매우 불안정하였으며, pH 3-4 조건에서는 활성이 나타나지 않았음. 또한 pH 8-9의 염기성조건에서도 기준점인 pH 7에 비해서 활성이 떨어지는 것이 확인되었으나 유의할만한 수준의 감소효과는 나타나지 않았음. 따라서 LysSAP33의 최적 pH는 7부근의 중성 pH임을 알 수 있었고 제어목적으로 사용 시 reaction buffer의 pH를 7정도로 적정한 뒤 사용해야 할 것으로 사료됨 (그림 68).

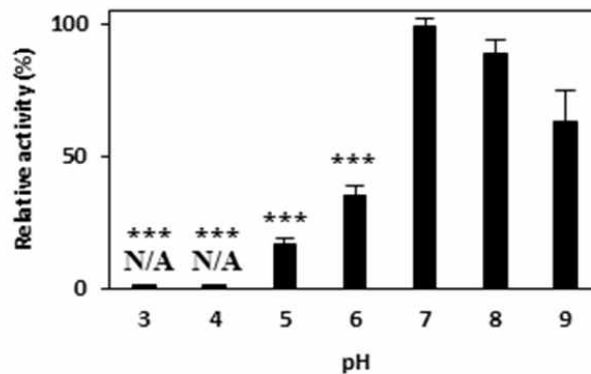


그림 68 Effects of pH on lysis activity of LysSAP33. \*\*\*: P < 0.0001; N/A: not available.

LysSAP33의 2가 양이온에 대한 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP33 10uM을 여러 가지 1mM 금속양이온을 녹인 buffer(Ca, Co, Cu, Mg, Mn, Hg, Zn)에 30분간 반응시켜 주었음. 또한 cofactor의 유무에 따른 효과를 확인하기 위해 1mM의 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)에 대한 반응 실험 또한 동시에 진행하였음. Target 균주로는 S. aureus KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, log phase까지 배양한 S. aureus KCCM 12103을 원심분리 하여 Optimized buffer(Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0)로 2회 washing해주고 1.5 micro centrifuge tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 1.5 micro centrifuge tube에 여러 가지 2가 양이온에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시킴. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD600 값을 측정함.

실험결과, Cu, Hg, Zn이 단백질의 활성을 완전히 저해하는 것으로 확인되었으며, Mg, Co, Mn에는 약간의 단백질 활성을 저해하는 효과가 있는 것으로 확인되었음. EDTA에 반응 시에는 활성이 급격하게 감소되었으며 Ca 첨가 시에는 활성이 유의한 수준으로 증가됨 (P<0.0001) (그림 69). 이는 LysSAP33이 cofactor로 2가 금속양이온을 필요로 하며, 일부 중금속에는 불안정하여 활성을 잃지만, Ca와 같은 이온은 오히려 활성을 촉진한다는 것을 의미함. 또한 Ca의 처리에 따라 가장 높은 활성 증가율을 보였기 때문에 제어목



적의 LysSAP33 사용 시 Ca이온의 첨가가 *S. aureus* 의 제어 효율을 증대시킬 것으로 사료됨.

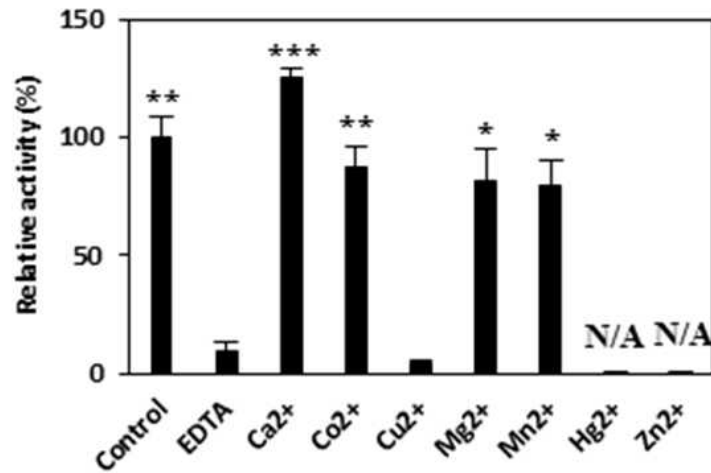


그림 69 Effects of divalent metal ion on lysis activity of LysSAP33. \*:  $P < 0.01$ ; \*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*:  $P < 0.0001$ ; N/A: not available.

LysSAP33의 염에 대한 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP33 10uM을 여러 가지 농도의 NaCl 용액(0, 500, 750, 1000mM)에 30분간 반응시켜 주었음. Target 균주로는 *S. aureus* KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, log phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리 하여 Optimized buffer(Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH8.0)로 2회 washing해주고 1.5 micro centrifuge tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 1.5 micro centrifuge tube에 여러 가지 농도의 염에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시켰음. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD600 값을 측정하였음.

실험결과, 1000mM의 NaCl에서 약간의 활성 감소효과가 나타났으나 유의할만한 수준의 활성 감소효과가 나타나지 않았고, 500nM 및 750nM의 염 또한 단백질의 활성의 증가 또는 감소 효과를 나타내지 않았음 (그림 70). 이는 LysSAP33이 750-1000mM의 고농도의 염에도 안정하다는 것을 의미하며, 이러한 높은 염 안정성은 제어목적의 LysSAP33의 활용에 있어 큰 이점을 줄 것으로 사료됨.

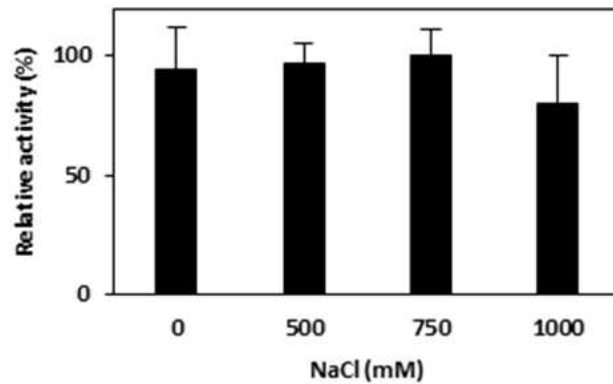


그림 70 Effects of NaCl on lysis activity of LysSAP33

LysSAP33의 단백질 분석을 위해서 NCBI database를 reference로 하여 아미노산 서열 분석을 실시하고, LysSAP33의 3차원 단백질 구조 예측을 ICM-Browser (Zhang Lab, University of Michigan, MI, USA)와 I-TASSER (Molsoft LCC, San Diego, CA, USA)을 이용하여 실시하였음.

분석결과 LysSAP33은 1-143 부분은 실질적으로 펩티도글리칸층을 분해하는 역할을 하는 histidine dependent amidohydrolases/peptidases (CHAP) domain을 가지며 나머지 부분인 143-251은 한번도 annotation 되지 않은 unknown domain인 것으로 확인됨 (그림 71). *S. aureus* phage 유래 endolysin들은 대개 그 domain의 구성에 따라 6가지 type으로 구분되는데 (그림 72), LysSAP33은 구조상 type I에 속하며, 많은 연구가 되어 있지 않은 type임. 이는 LysSAP33이 다른 *S. aureus* phage 유래 endolysin에 비해 unique한 단백질임을 의미하며, 143-251 서열은 단백질의 specificity를 주기 위한 cell-wall binding domain일 것으로 예상됨. 또한 in silico 분석 결과, LysSAP33은 다른 endolysin에 비해 비교적 작은 globular 형태의 단백질 구조를 보였음 (그림 73). 따라서 LysSAP33은 다른 endolysin에 비해 작은 크기가 장점으로 작용할 것으로 생각되며, 143-251 sequence의 기능 규명을 통해 type I endolysin의 활용 가능성을 연구하는 것이 필요할 것으로 사료됨.

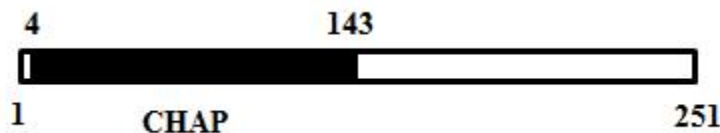


그림 71 Modular organization of the LysSAP33. Black box: histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP); Unit: amino acid sequence.

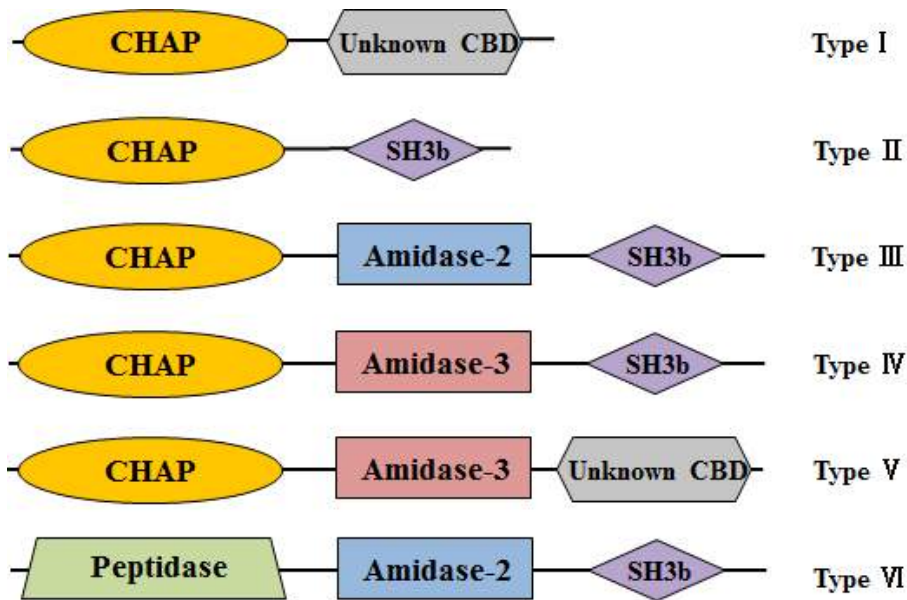


그림 72 Modular organization of staphylococcal endolysins. Schematic representation of six types staphylococcal endolysins based on domain compositions.

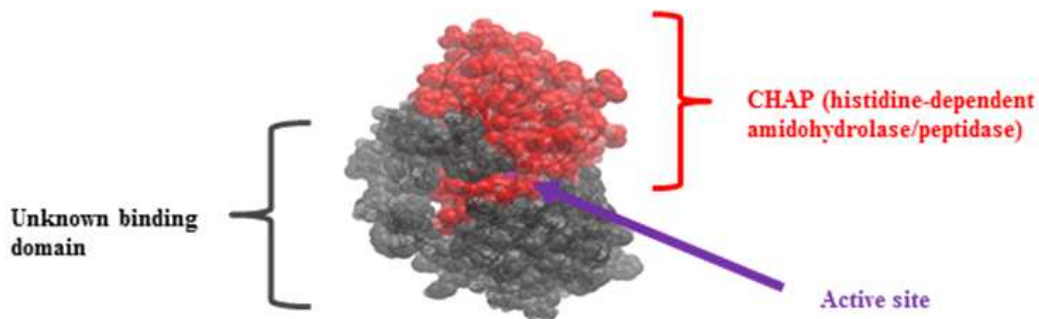


그림 73 Overall structure of the LysSAP33

## 사. 결론

본 연구는 유산균 사균체물의 대장암 및 항염증 개선과 같은 기능성을 확인하고 지표물질을 탐색하여 건강기능식품 및 유제품 개발을 목적으로 하였음. 1차년도 연구에서 실험실 스케일 공정으로 최적화된 사균화 공정을 확보하였으며, 이어서 2차년도 연구에서 사균체물 생산 조건 공동 연구를 목적으로 신속한 사균화 방법을 연구하였음. 또한, 최적 공정으로 생산된 사균체물의 항균능과 항염증 활성을 확인하였고 항균능의 경우 lysozyme에 의한 항균능으로 판단될 논란의 여지가 있어 3차년도에 lysozyme만 진행한 사균체물의 항균활성평가를 추가적으로 진행하였음.

최근에는 생균의 장기 보관 시 안정성 문제와 더불어 미생물 생균 사용 논란도 제기되고 있어 본 연구에서는 유산균 사균체 제품 개발에 초점을 두고 연구를 진행하였음. 또한 유산

균 유래 다당체 또한 사균체 제품과 시너지 효과를 나타낼 것으로 기대되어 다당체 생산 유산균의 다당체를 분리하여 분석 및 기능성 평가를 진행하였음. 이는 요거트 및 건강기능 식품 (분말형)에 첨가물으로써 작용할 수 있어 제품 개발에 유용할 것으로 판단됨.

다당체의 경우 유산균 유래 기능성 물질로, 박테리오신 등과 더불어 기능성 물질로써 관심이 높아지고 있음. 본 연구에서 생산한 다당체는 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium longum* BORI 총 2주를 사용하였고 총당 정량을 통한 수율 계산 및 단백질 함량을 측정하였고 HPAEC-PAD 분석 결과, 모두 glucan 형태인 것을 확인하였음. 또한, HPSEC-RI를 통해  $\alpha$ -amylase, pullulanase, amyloglucosidase를 이용하여 24시간동안 효소 반응한 후 다당체를 분석하였으며 결과적으로 pullulanase에 의해 약간 분해되는 양상을 보아 체내에 흡수될 경우 소장에서  $\alpha$ -1,6 결합이 조금은 분해될 것으로 예상됨. 추가적으로 장내 프리바이오틱스 효과를 확인하기 위하여 glucose와 inulin 대비 유산균 생육을 확인하였으며 glucose 보다는 낮지만 inulin과 유사한 프리바이오틱스 효과를 나타내었음. 항산화 효과 실험도 진행하였지만 ascorbic acid에 비하여 현저히 낮은 항산화 효과를 나타내었으며, 이는 다른 방법을 선정하여 농도를 높여 항산화 효과를 볼 필요가 있음.

본 연구는 사균체의 제품 개발을 위해 유제품 적용 후 겔 형성능을 실험하였음. 유산균 3주의 생균, 열처리, 최적화된 사균체 분획물을 첨가하여 진행하였으나 분획물 아무것도 넣지 않은 요거트와의 유의적인 차이가 없는 것으로 확인됨. 이는 겔 형성능에 추가적인 영향을 주진 못하지만 사균체를 첨가함으로써 물성이 바뀌지 않는 것으로 보아 소비자 기호도에는 크게 영향을 미치지 않으면서 기능성이 더해진 유제품 개발을 할 수 있을 것으로 판단됨.

Endolysin은 박테리오파지 유래의 cell lysis 효소로, 최근 문제되고 있는 항생제 내성균에 대한 대안으로서 각광받고 있는 소재 중 하나임. 본 연구에서는 *S. aureus* 유래 phage의 whole genome sequence로부터 endolysin sequence를 annotation 하고 분석한 뒤, *E. coli* pET vector expression system을 통해 endolysin을 분리 및 정제를 실시함.

Endolysin의 경우, 효소이기 때문에 박테리오파지와는 다르게 세포벽을 기질로 인식하여 분해하는 방식으로 용균을 일으킴. 따라서 세포벽의 구조가 비슷하다면 그 균의 생리적, 항생제 내성 특성과 관계없이 용균이 가능하고 endolysin의 용균 범위 또한 파지에 비해 매우 넓은 것으로 알려져 있음. 분리된 endolysin인 LysSAP33을 *S. aureus*의 제어목적으로 사용하게 되면 유산균과 같은 유용미생물은 죽이지 않으면서 *S. aureus*만을 선택적으로 용해시키는 것이 가능할 것으로 보임. 추후에 유산균과 pathogen bacteria로부터 분리된 endolysin을 함께 첨가하여 제품 개발에 적용하게 되면 장내에서 유해 미생물을 억제하고 유용 미생물은 증대되는 시너지 효과를 기대할 수 있을 것으로 보임.

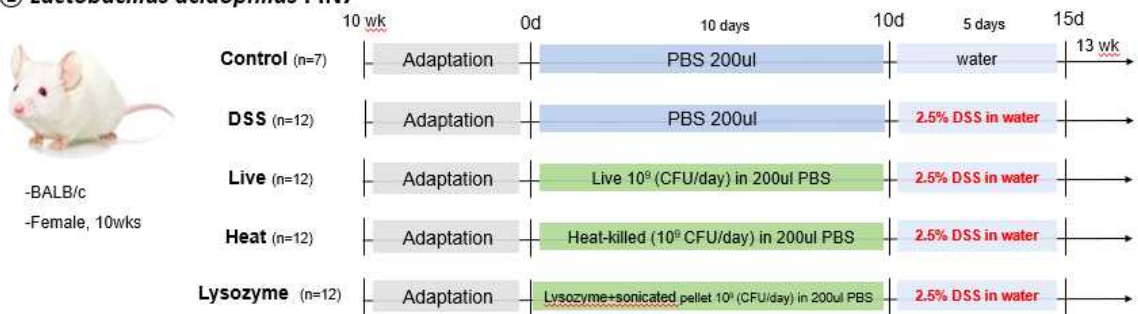
### 3. 제 2 협동 연구 기관 (숙명여자대학교)

#### 가. 연구방법

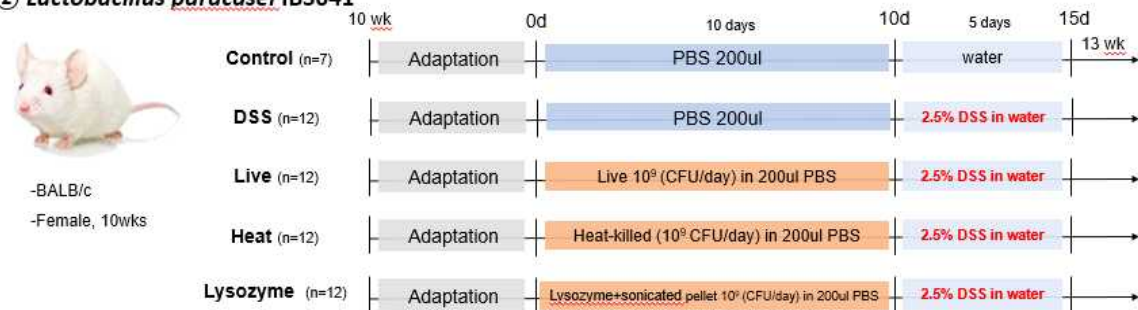
#### (1) 2차년도 : DSS로 유도된 대장염 모델

#### (가) 연구 디자인

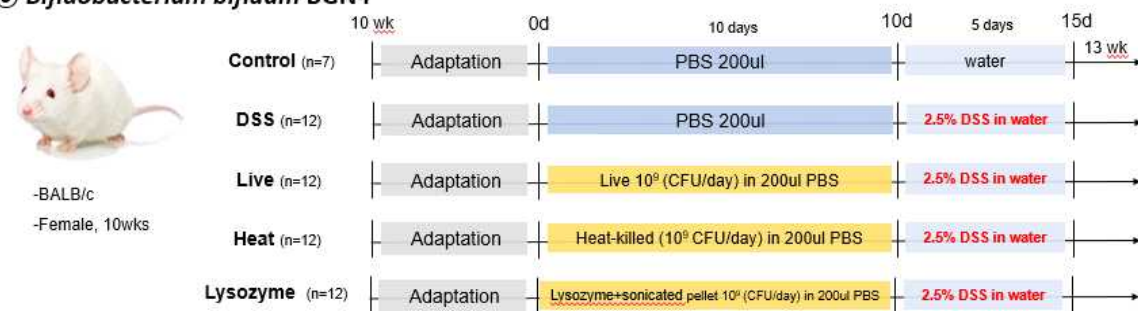
##### ① *Lactobacillus acidophilus* PIN7



##### ② *Lactobacillus paracasei* IBS041

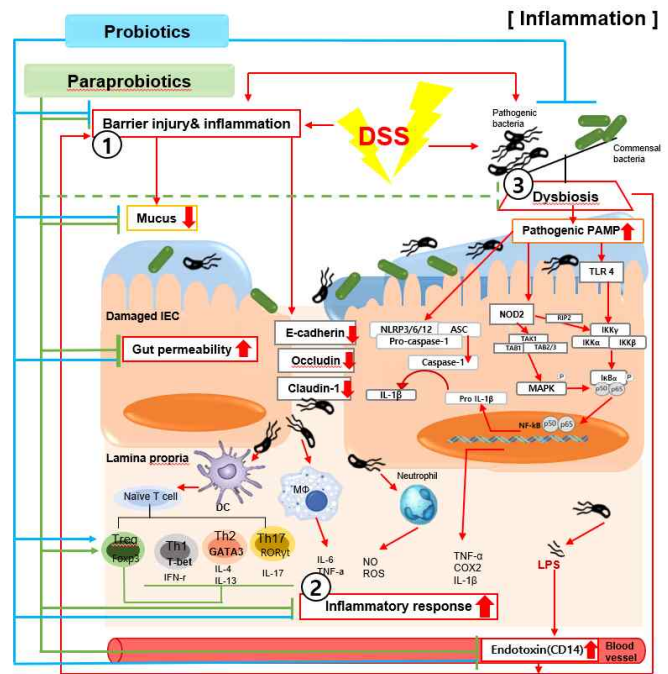
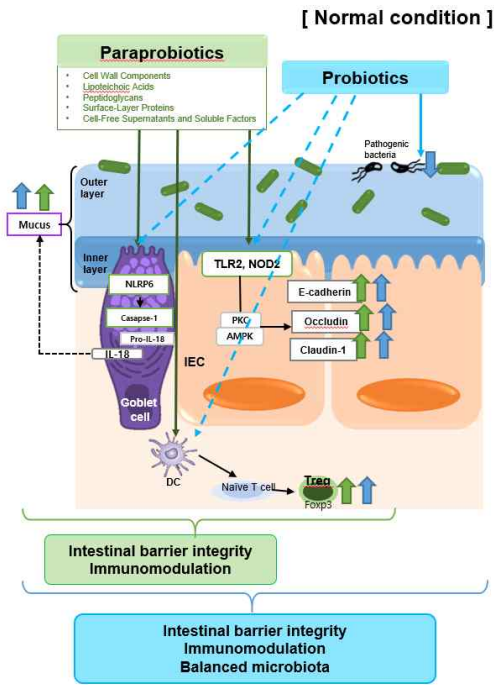


##### ③ *Bifidobacterium bifidum* BGN4



- 10주령 암컷 BALB/c 마우스 55마리를 CON군(대조군, n=7), DSS군(음성 대조군, n=12), LIVE군(live bacteria, 10<sup>9</sup>CFU/day/mouse, n=12), HEAT군(heat-killed bacteria, 10<sup>9</sup>CFU/day/mouse, n=12), LYSOZYME군(lysozyme-treated pellet of bacteria) 총 5 군으로 나누고 10일 동안 시험시료를 경구 투여함. 이후 CON군을 제외한 4군에 2.5% DSS를 식수로 공급하여 대장염을 유도하였음. 동일한 디자인으로 probiotics 균주 3종 (*Lactobacillus acidophilus* PIN7, *Lactobacillus paracasei* IBS041, *Bifidobacterium bifidum* BGN4)의 프로바이오틱스 혹은 파라프로바이오틱스가 대장염 예방에 미치는 효과를 평가하는 총 3개 set의 실험을 수행하였음.

## (나) 가설 수립

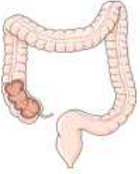



- DSS(Dextran sulfate sodium)로 유도되는 대장염은 염증성 대장염(IBD)를 재현하는 일반적인 모델로 DSS 농도, 제공 기간 등으로 급성 혹은 만성 대장염 유발이 가능함. DSS로 유도되는 대장염은 장벽의 파괴, 면역항상성 소실 및 dysbiosis를 특징으로 함.
- 프로바이오틱스(probiotics)란 적절한 양을 제공하였을 때, 숙주에게 이로운 역할을 수행하는 살아있는 균으로 정의되며 파라프로바이오틱스(paraprobiotics)란 적절한 양을 제공하였을 때 숙주에게 이로운 역할을 하는 non-viable microbial cells (intact or broken) or crude cell extracts임. 프로바이오틱스의 효과는 장벽의 강화, 면역 조절 능력, 대장 미생물 조성 조절 등 다양하며 균주 특이적인 효과를 보유함이 밝혀진 바 있음. 파라프로바이오틱스는 장내 균총에 직접적인 영향을 미치는 프로바이오틱스와는 달리 간접적으로 영향을 주는 것으로 알려졌으며, 효과는 프로바이오틱스의 효과와 동일하거나 덜한 효과를 보이는 것으로 보고되고 있음. 본 연구에 쓰인 probiotics 3 종(*Lactobacillus acidophilus* PIN7, *Lactobacillus paracasei* IBS041, *Bifidobacterium bifidum* BGN4)은 새로 분리된 균주로 효능 연구가 매우 제한적임. 따라서 10일 간의 프로바이오틱스 혹은 파라프로바이오틱스 사전 공급이 DSS로 유도되는 대장염의 특징인 장벽의 파괴, 염증 반응, dysbiosis에 어떤 영향을 보이는지 확인하여 균주별 효과를 분석하였음. 균주 효과의 메커니즘 규명을 위하여 분석 결과를 기반으로 문헌을 조사하여 추가적 지표를 측정 및 비교분석하였음.

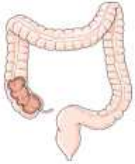
## (다) 분석 지표

- 총 3 sets의 동물 모델에서 공통적으로 체중 변화, DAI score(대장염 증상 심각도),
- 대장 길이를 측정하였으며 DSS로 유도되는 대장염의 특징인 장벽 파괴 정도, 염증 반


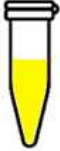
### ① *Lactobacillus acidophilus* PIN7

대장 (Colon)	분변 (Stool)	혈청 (Serum)
 <ul style="list-style-type: none"> <li>• H&amp;E staining               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직병리학적 병변</li> <li>- 조직 손상도</li> </ul> </li> <li>• Protein &amp; mRNA 발현 측정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflammation (p-I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>, COX2)</li> <li>- T-cell activation (GATA3, IL-4)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장미생물 조성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gut microbiota composition</li> <li>- <math>\alpha</math>-diversity(ACE, Chao)</li> <li>- <math>\beta</math>-diversity(PCoA)</li> <li>- LDA score</li> </ul> </li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gut permeability               <ul style="list-style-type: none"> <li>- FITC-dextran 농도</li> </ul> </li> </ul>

### ② *Lactobacillus paracasei* IBS041

대장 (Colon)	분변 (Stool)
 <ul style="list-style-type: none"> <li>• H&amp;E staining               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직병리학적 병변</li> <li>- 조직 손상도</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장미생물 조성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gut microbiota composition</li> <li>- <math>\alpha</math>-diversity(ACE, Chao)</li> <li>- <math>\beta</math>-diversity(PCoA)</li> <li>- LDA score</li> </ul> </li> </ul>

### ③ *Bifidobacterium bifidum* BGN4

대장 (Colon)	분변 (Stool)	혈청 (Serum)
 <ul style="list-style-type: none"> <li>• H&amp;E staining               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직병리학적 병변</li> <li>- 조직 손상도</li> </ul> </li> <li>• Protein 발현 측정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Intestinal barrier integrity(<u>occludin</u>, E-cadherin, claudin-1)</li> <li>- Predicted mechanism of <u>paraprobiotics</u> on intestinal barrier (NLRP6/ caspase-1/IL-18)</li> <li>- Inflammation (p-I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>, p-MAPK COX2, IL-1<math>\beta</math>)</li> <li>- T-cell activation (GATA3, T-bet, FOXP3)</li> </ul> </li> <li>• <u>Alcian blue staining</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mucus layer integrity                   <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Number of Goblet cell</li> <li>2) <u>Alcian blue intensity</u></li> </ol> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장미생물 조성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gut microbiota composition</li> <li>- <math>\alpha</math>-diversity(ACE, Chao)</li> <li>- <math>\beta</math>-diversity(PCoA)</li> <li>- LDA score</li> </ul> </li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gut permeability               <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD14 농도 확인</li> </ul> </li> <li>• Inflammation               <ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-10 농도 확인</li> </ul> </li> </ul>

응, 대장 미생물 조성 변화를 확인하였음. 장벽의 파괴 정도를 파악하기 위하여 대장 조직의 H&E staining과 junction protein 발현을, 염증 정도를 확인하기 위하여 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , COX2 protein 발현을, 대장 미생물 조성 변화를 확인하기 위해 분변으로부터 16s rRNA sequencing을 통해 대장 미생물 조성 변화 및 다양성을 분석했음. *L. paracasei* IBS041의 경우, DSS군 대비 시험시료 공급군들의 체중감소 정도, DAI score 증가, 대장 길이 감소가 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다는 점과 대장미생물 조성 다양성이 CON군 대비 DSS 제공받았던 군에서 감소하지 않았다는 점에서 시험시료 공급이 효과가 없다는 것으로 판단되어 추가적인 분석을 진행하지 않았음.

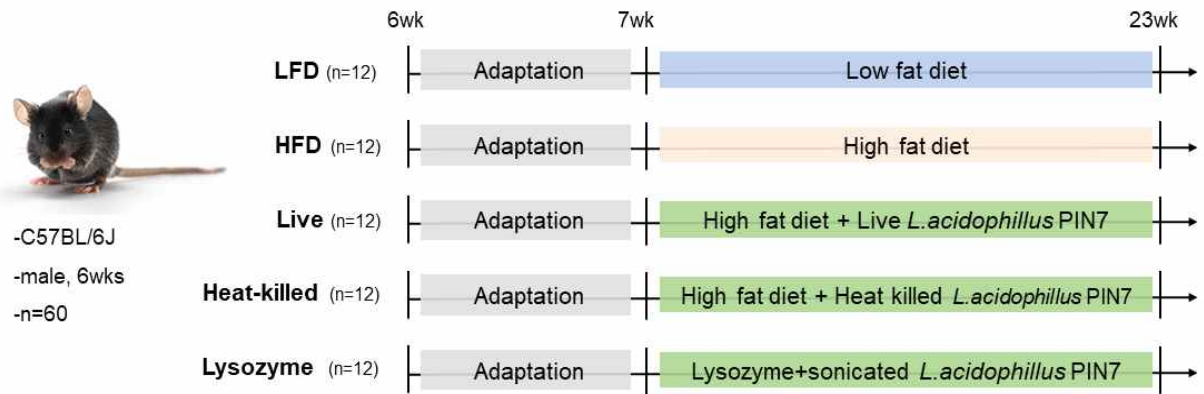
## (2) 3차년도 : 고지방식으로 유도된 비만 모델

당해 연도 연구에서는 *Lactobacillus acidophilus* PIN7 균주의 전신성 염증을 유발하는 비만의 억제효능 평가 결과 체중감소 및 지방축적 지표에서 기대했던 수준의 억제 효능이 나타나지 않아 기전관련 지표 측정을 최소화하고 해당 효능을 소지할 것으로 보이는 추가 균주의 지방축적 억제 스크리닝 시험이 추가되었고 그 중 비교적 우월한 효과를 보이는

*L.paracasei* CH88을 사용하여 항비만 효능 평가를 수행 중에 있음.

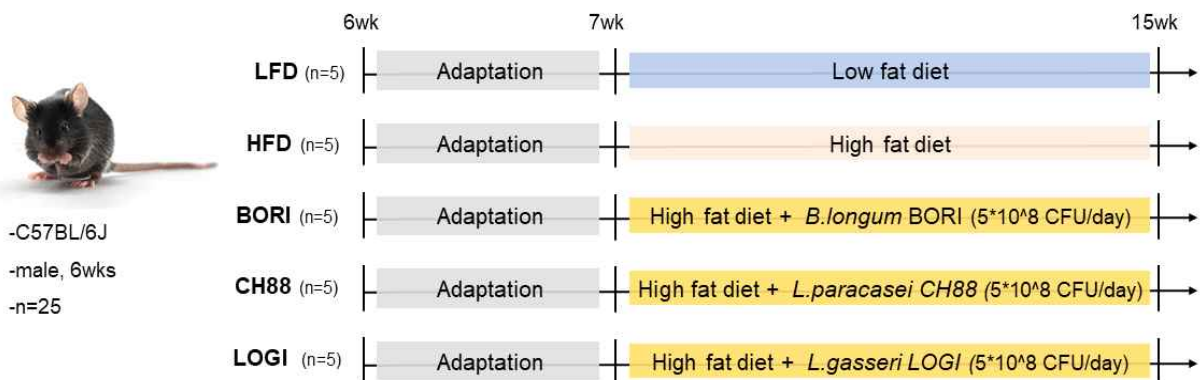
(가) 연구 디자인

① *Lactobacillus acidophilus* PIN7



- 6주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 LFD군(일반 식이 공급, n=12), HFD군(고지방 식이 공급, n=12), LIVE군(고지방식이+live bacteria 10<sup>9</sup>CFU/day/mouse, n=12), HEAT군(고지방식이+heat-killed bacteria, n=12), LYSOZYME군(고지방식이+lysozyme-treated pellet of bacteria, n=12) 총 5 군으로 나눔. 사용된 균주인 *Lactobacillus acidophilus* PIN7은 선행 연구 및 문헌에서 비교적 우수한 항염증 효능을 소지한 것으로 보고된 바 있음. 일주일 적응기 후 LFD군에는 10% 지방 함유 식이를, HFD군에는 60% 지방 함유 식이를 LIVE 군, HEAT군, LYSOZYME군은 각각의 실험시료를 10<sup>9</sup> CFU/day/mouse가 섭취될 수 있도록 60% 지방 함유 사료와 혼합하여 제공함. 16주간의 실험 기간을 통해 *Lactobacillus acidophilus* PIN7의 probiotics 혹은 paraprobiotics 형태가 고지방식으로 유발된 전신성 염증에 미치는 영향을 비교 평가함.

② Probiotics screening (*B.longum* BORI, *L.paracasei* CH88, *L.gasseri* LOGI)

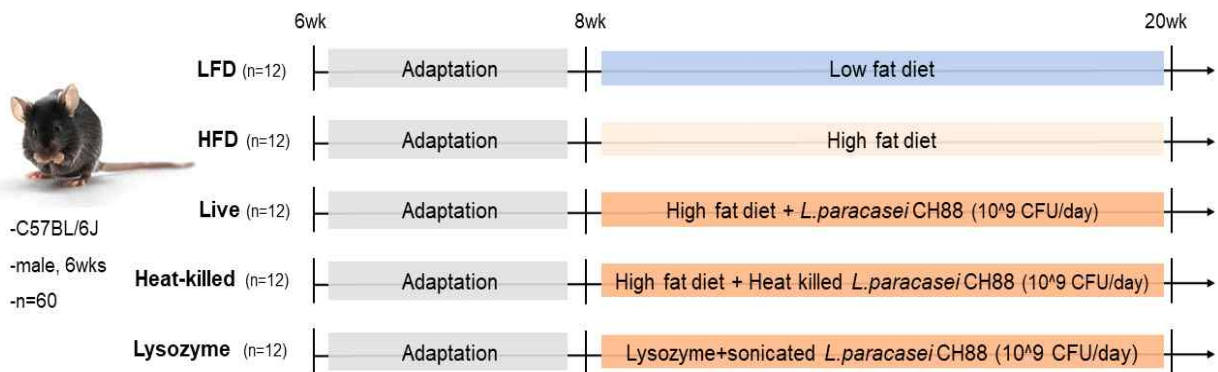


- 6주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 LFD군(일반 식이 공급, n=5), HFD군(고지방 식이 공급, n=5), BORI군(고지방식이+B.longum BORI 5\*10<sup>8</sup>CFU/day/mouse, n=5), CH88군(고지방식이



+ *L.paracasei* CH88  $5 \times 10^8$ CFU/day/mouse, n=5), LOGI군(고지방식이 + *L.gasseri* LOGI  $5 \times 10^8$ CFU/day/mouse, n=5) 총 5 군으로 나눔. 일주일 적응기 후 LFD군에는 10% 지방 함유 식이를, LFD군을 제외한 모든 군에 60% 지방 함유 식이를 제공함. 8주 동안 LFD군, HFD군은 PBS(200ul)를, 시험시료 공급 군에는 각각의 균을 경구 투여함. 이와 같은 모델을 통해 *B.longum* BORI, *L.paracasei* CH88, *L.gasseri* LOGI, 세 균체의 probiotics 형태로서의 공급이 고지방 식이로 인한 전신성 염증 모델에 미치는 영향을 평가하여, 추후 parabiotics 형태의 공급을 통한 완화 효과를 기대할 수 있는 균체를 선별하고자 함.

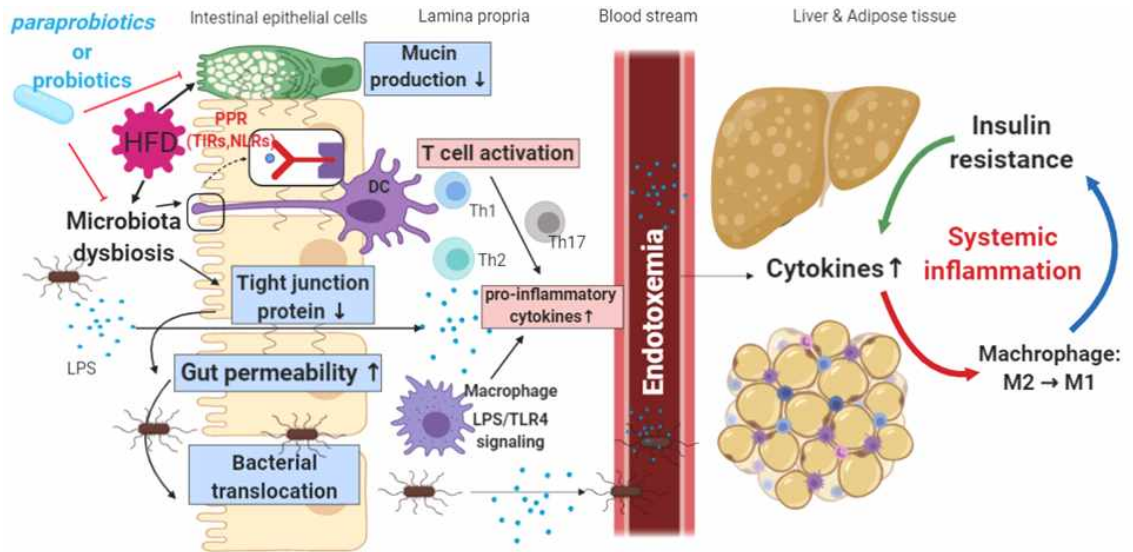
### ③ *Lactobacillus paracasei* CH88



- 세 가지 균체의 효과를 확인한 2차 실험의 결과를 통해 선별된 *L.paracasei* CH88를 사용함. 6주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 LFD군(일반 식이 공급, n=5), HFD군(고지방 식이 공급, n=5), LIVE군(고지방식이 + live bacteria  $10^9$ CFU/day/mouse, n=12), HEAT군(고지방식이 + heat-killed bacteria, n=12), LYSOZYME군(고지방식이 + lysozyme-treated pellet of bacteria, n=12) 총 5 군으로 나누었음. 일주일 적응기 후 LFD군에는 10% 지방 함유 식이를, LFD군을 제외한 모든 군에 60% 지방 함유 식이를 제공함. 12주 동안 LFD군, HFD군은 PBS(200ul)를, LIVE군은 live bacteria, HEAT군은 heat-killed bacteria, LYSOZYME군은 lysozyme-treated pellet of bacteria를 경구 투여함. 이와 같은 모델을 통해 *Lactobacillus acidophilus* PIN7의 probiotics 혹은 parabiotics 형태가 고지방식으로 유발된 전신성 염증에 미치는 영향을 비교 평가함.

#### (나) 가설 수립

- 고지방 식이를 통해 유도된 비만 모델은 대표적인 전신성 염증 모델임. 장기간의 고지방 식이는 장 내 미생물 균총 불균형, 장 점막층 약화, 장 투과성 증가를 유발하고 이에 따라 유해균 또는 LPS가 혈관으로 이동하여 전신을 순환하며 전신성 염증을 유발하게 됨. 프로바이오틱스 또는 파라프로바이오틱스의 공급이 장 내 미생물 균총 불균형, 장 점막층 및 장 투과성을 개선하여 대표적인 전신성 염증 반응인 인슐린 저항성과 부적절한 면역 반응을 개선 할 수 있다고 가설을 수립 함. 군주 효과의 메커니즘 규명을 위하여 분석 결과를 기반으로 문헌을 조사하여 추가적 지표를 측정 및 비교 분석하였음.



(다) 분석 지표

지방 조직 (Fat)	간(Liver)	경구 포도당 부하 검사
<ul style="list-style-type: none"> <li>• H&amp;E staining</li> <li>- 조직학적 특징 및 지방구 크기 확인</li> <li>• mRNA 발현 측정</li> <li>- Inflammation(TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IL-17)</li> <li>- Lipid metabolism(SREBP1c, FAS, LPL)</li> <li>• Protein 발현 측정</li> <li>- Inflammation(TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-1b)</li> <li>- Lipid metabolism(HSL, p-HSL, ACC, p-ACC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H&amp;E staining</li> <li>- 조직학적 특징 및 지방구 크기 확인</li> <li>• mRNA 발현 측정</li> <li>- Inflammation(TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IL-17)</li> <li>- Lipid metabolism(SREBP1c, FAS, LPL)</li> <li>• Protein 발현 측정</li> <li>- Inflammation(TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-1b)</li> <li>- Lipid metabolism(HSL, p-HSL, ACC, p-ACC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16주차에 Glucose 2g/kg을 경구투여 하여 0분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분 뒤의 혈당 측정</li> <li><b>혈청(Serum)</b></li> <li>• insulin, leptin, CD14 함량 측정</li> <li><b>분변(Stool)</b></li> <li>• 대장 미생물 조성 변화 확인</li> <li><b>대장(Colon)</b></li> <li>• Protein 발현 측정</li> <li>- Tight junction protein (Occludin, Claudin-1)</li> </ul>

- Probiotics 혹은 parabiotics 형태의 공급이 고지방식으로 유도된 비만 모델에 미치는 영향을 확인하기 위하여 H&E staining을 통해 지방구 크기를 확인하고, 지방 조직과 간에서 관련 지표(SREBP-1c, ACC, FAS, HSL, LPL 등)의 발현을 확인하여 지방 대사 변화를 비교 평가함. 또한 혈청에서 leptin, CD14 함량 측정, 지방 조직과 간에서 염증 지표(TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-17 등) 발현량 측정, 대장 조직에서 tight junction protein 발현량을 확인함으로써 균체의 공급이 전신성 염증으로서의 비만에 영향을 주는 경로를 규명함. OGTT, fasting blood glucose, insulin 측정을 통해 인슐린 저항성 유발을 평가하였음. 추후 분변으로부터 16s rRNA sequencing을 통해 분석한 대장 미생물 조성 변화의 연관성을 제시하고자 함.

나. 연구 결과

(1) DSS로 유도된 대장염 모델에서 *Lactobacillus acidophilus* PIN7의 효능 평가 (SET1)

(가) 체중 변화

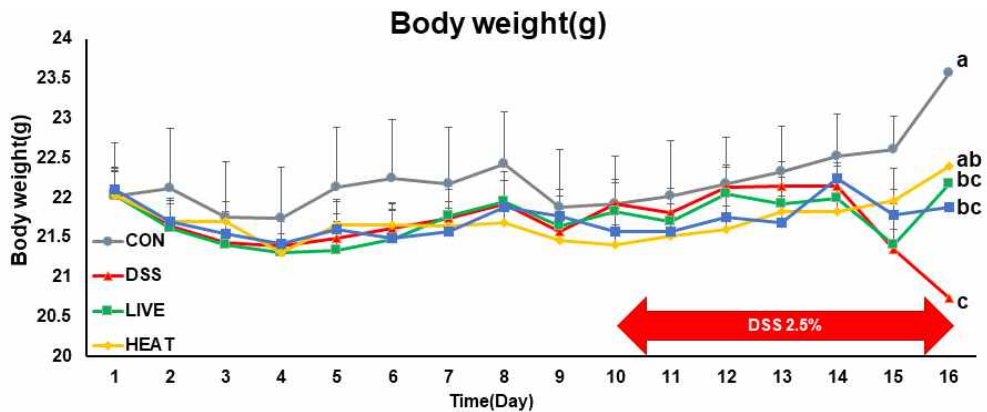


Figure 1 Body weight changes of experimental animals

Table 1. Final body weight of experimental animals

Group	Body weight (g)
CON	23.57 ± 0.38 <sup>a</sup>
DSS	20.74 ± 0.29 <sup>c</sup>
Live	21.68 ± 0.52 <sup>bc</sup>
Heat	22.40 ± 0.41 <sup>ab</sup>
Lysozyme	21.88 ± 0.37 <sup>bc</sup>
P-value	0.0012

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- DSS 공급으로 대장염이 유도됨에 따라 실험동물의 체중 감소가 나타나기 때문에 일별 체중을 확인하였고 그 결과를 Figure 1과 Table 1에 제시하였음. 대장염 유발 전 시험 시료(live *L. acidophilus* PIN7, heat-killed *L. acidophilus* PIN7, lysozyme-treated and then sonicated pellet of *L. acidophilus* PIN7)의 경구 투여기간에 군간 체중 변하는 유의 미한 차이가 없었음. DSS 공급 6일차(실험 16일차) DSS군에서 CON군 대비 유의적인 체 중 감소가 나타남. 시험시료 공급군들의 체중은 DSS군 대비 유의적인 감소는 보이지 않 았으나, 특히 HEAT군은 CON군 수준의 체중을 유지하였음.

(나) 조직 무게 비교

각 군별로 시험시료를 10일 간 경구투여한 뒤 DSS로 대장염을 유발하여 희생시킨 동물들의 장기 무게 및 길이를 관찰한 결과는 다음과 같음.

Group	Colon (cm)	Small intestine (cm)
CON	8.11 ± 0.30 <sup>a</sup>	37.61 ± 0.65
DSS	6.23 ± 0.22 <sup>b</sup>	36.77 ± 0.80
LIVE	6.08 ± 0.18 <sup>c</sup>	38.44 ± 0.51
HEAT	6.46 ± 0.18 <sup>bc</sup>	37.44 ± 0.73
LYSOZYME	6.87 ± 0.28 <sup>b</sup>	38.61 ± 0.51
P-value	<0.0001	0.252

**Table 2 Colon and small intestine length of experimental animals**

Means with different s are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan' s multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- 실험 식이에 따른 군간 대장, 소장의 길이를 Table 2에 나타내었음. 대장 길이는 DSS 군에서 CON군 대비 유의적인 감소를 보였음. LYSOZYME군은 DSS군 대비 감소했으나 유의적인 차이가 없었음. LIVE군은 오히려 DSS군 대비 유의적으로 감소하였음.

**Table 3. Thymus, lymph node and spleen weights of experimental animals**

Group	Thymus (g) (% body weight)	Lymph node (g) (% body weight)	Spleen (g) (% body weight)
CON	0.1348 ± 0.0053 <sup>ab</sup>	0.0249 ± 0.0026 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.02 <sup>b</sup>
DSS	0.1203 ± 0.0090 <sup>d</sup>	0.0156 ± 0.0017 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>a</sup>
LIVE	0.1336 ± 0.0099 <sup>c</sup>	0.0222 ± 0.0028 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>ab</sup>
HEAT	0.1486 ± 0.0075 <sup>ab</sup>	0.0270 ± 0.0019 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>a</sup>
LYSOZYME	0.1369 ± 0.0078 <sup>bc</sup>	0.0220 ± 0.0019 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>ab</sup>
P-value	<0.001	0.005	0.0417

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan' s multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- 실험 식이에 따른 군간 흉선, 림프절, 비장의 체중 대비 무게를 Table 3에 나타내었음. 흉선의 무게는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 무게가 감소하였고, 모든 시험시료 공급군들에서 DSS군 대비 유의적으로 증가하였음. 특히 HEAT군에서 CON군 수준의 무게를 유지하였음. 림프절의 무게는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 무게

가 감소하였으나 시험시료 공급군에서는 유의적인 차이가 없었음. 비장 무게의 경우, DSS군에서 CON군 대비 증가하였고, LIVE군과 LYSOZYME군에서 감소하였으나 유의적인 차이는 없었음.

**Table 4. Liver and cecum weights of experimental animals**

Group	Liver (g) (% body weight)	Cecum (g) (% body weight)
CON	3.45 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.60 ± 0.02
DSS	4.21 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.04
LIVE	3.82 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.04
HEAT	3.44 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.50 ± 0.04
LYSOZYME	3.61 ± 0.12 <sup>bc</sup>	0.51 ± 0.04
<b>P-value</b>	<.0001	0.4026

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- 실험 식이에 따른 군간 간, 맹장의 체중 대비 무게를 Table 4에 나타내었음. 간 무게는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 증가하였고, 시험시료 공급군은 DSS군 대비 유의적으로 감소하였음. 특히 HEAT군이 CON군 수준으로 감소하였음. 맹장의 무게는 군간 유의적인 차이가 없었음.

(다) DAI(Disease Activity Index) 변화

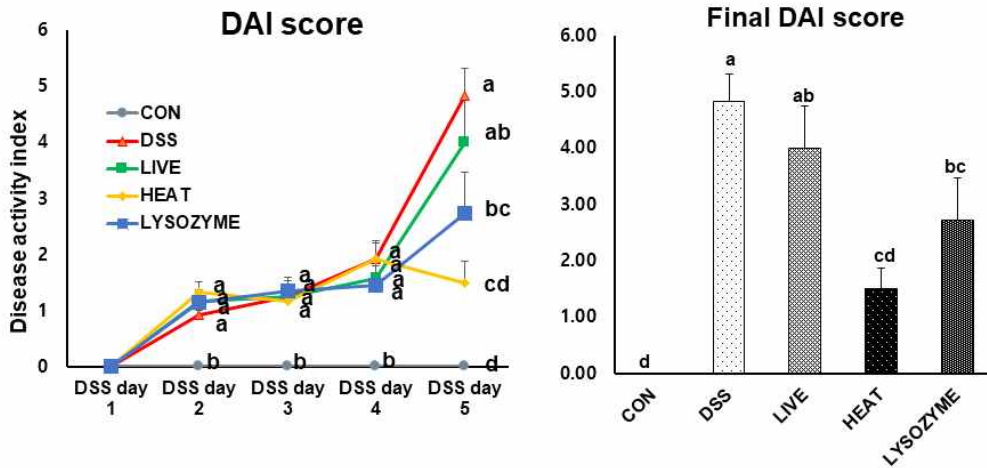


Figure 1. DAI(Disease activity index) score

**Table 5. Daily DAI scores in experimental animals**

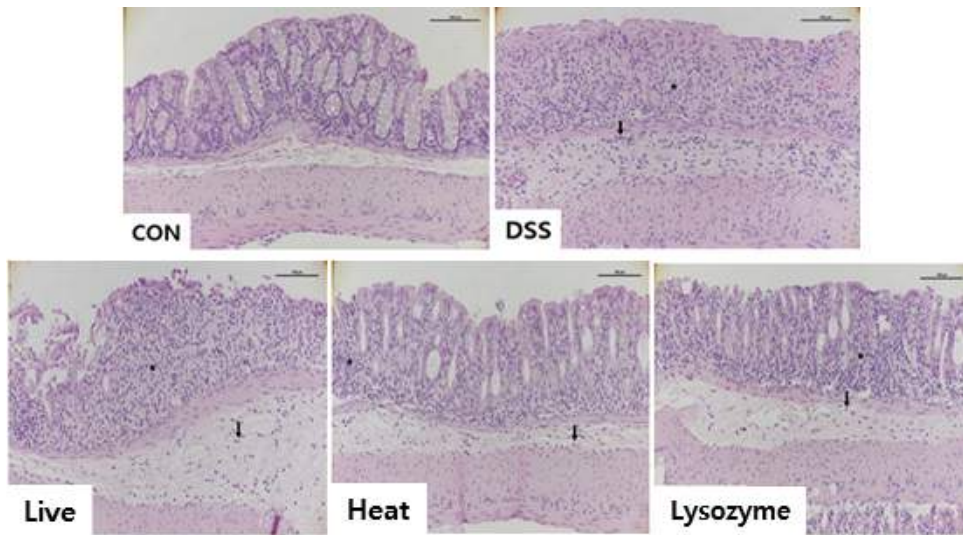
Group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
CON	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>
DSS	0.00 ± 0.00	0.92 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.50 <sup>a</sup>
LIVE	0.00 ± 0.00	1.17 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.26 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.75 <sup>ab</sup>
HEAT	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.29 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.38 <sup>cd</sup>
LYSOZYME	0.00 ± 0.00	1.14 ± 9.19 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.74 <sup>bc</sup>
P-value	-	0.0001	0.0022	0.0015	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- Weight loss, stool consistency, bleeding 총 3가지 항목으로 DSS 공급기간 동안 대장염 증상을 점수화한 DAI 결과를 Table 5와 Figure 2에 제시하였음. DSS 제공 24시간째인 DSS 공급 2일차부터 DSS으로 인한 증상이 나타나기 시작하였음. DSS 공급 5일차에서 DSS가 제공된 군 사이에서의 점수가 유의적인 차이를 보였음. HEAT군과 LYSOZYME군의 점수가 DSS군 대비 유의적으로 낮았고 특히, HEAT군은 DSS를 제공하지 않은 CON군 수준의 낮은 점수를 나타냄. LIVE군은 DSS군 대비 점수가 낮은 경향을 보였으나 유의적이진 않았으며, LYSOZYME군 대비 점수가 증가하는 경향을 보였으나 또한 유의적인 차이는 없었음.

(라) 대장 조직의 조직병리학적 특징 관찰 (H&E staining)



**Figure 3. H&E staining of colon rectum**

**Table 6. Histological score of colon rectum**

Group	Inflammatory cell infiltration	Epithelial change	Mucosal architecture	Total
CON	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>

DSS	5.80 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.20 <sup>a</sup>	14.80 ± 0.49 <sup>a</sup>
LIVE	4.80 ± 0.74 <sup>ab</sup>	3.80 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.60 ± 0.25 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
HEAT	3.80 ± 0.37 <sup>b</sup>	3.40 ± 0.60 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.20 <sup>a</sup>	11.40 ± 0.93 <sup>b</sup>
LYOZYME	4.40 ± 0.68 <sup>ab</sup>	3.40 ± 0.60 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.25 <sup>a</sup>	12.20 ± 1.32 <sup>ab</sup>
P-value	<.0001	0.0001	<.0001	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- CON군(n=7)에서 3마리, 나머지군(n=12)에서 각각 5마리 실험동물의 대장 조직에서 DSS에 의한 조직 손상도를 평가하기 위하여 H&E staining을 실시하고 판독된 slide와 점수화한 결과를 Figure 3와 Table 6에 제시하였음. Inflammatory cell infiltration, epithelial change(hyperplasia, goblet cell loss, cryptitis, crypt abscesses, erosion), mucosal architecture(ulceration, granulation tissue, irregular crypts, crypt loss) 평가항목으로 점수화하여 Table 6에 나타내었음. 모든 항목에서 DSS를 제공한 군들과 CON군 간의 유의적인 차이를 보임. Inflammatory cell infiltration 항목의 경우 시험시료 공급군에서 DSS군에 대비 점수가 낮았으나, 통계적으로 유의적인 차이를 보인 군은 HEAT군이었음. Epithelial change, mucosal architecture 항목에서는 DSS 제공 군 간의 유의적인 차이는 없었음. Total score는 HEAT군이 DSS군 대비 유의적으로 점수가 낮았고, DSS를 제공한 군들 중 조직 손상이 가장 적음을 알 수 있었음. Lysozyme 군 역시 total score는 낮았으나 유의적인 차이는 없었음.

#### (마) 장 투과도 분석

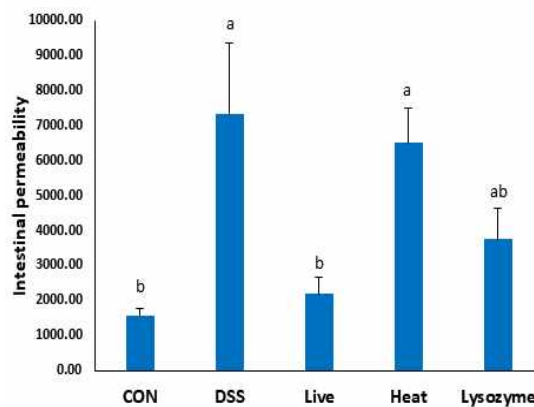


Figure 3. Intestinal permeability

Table 7. FITC-dextran concentrations in serum

Group	Gut permeability	
CON	1579.69	± 173.88 <sup>b</sup>
DSS	7348.72	± 2015.64 <sup>a</sup>
LIVE	2183.66	± 462.83 <sup>b</sup>
HEAT	6503.50	± 1001.71 <sup>a</sup>
LYSOZYME	3748.32	± 882.50 <sup>ab</sup>
P-value	0.0064	

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- 경구 투여한 형광물질(FITC-dextran)의 혈액 속 유입 정도 비교하여 장 투과도를 분석 결과를 Table 7과 Figure 3에 제시하였음. DSS군에서 CON군 대비 장 투과도가 유의적으로 증가하였음. LIVE군은 CON군 수준으로 장 투과도의 증가가 억제되었고 LYSOZYME군은 장 투과도 증가를 억제하였으나 유의적인 차이는 없었음.

(바) 대장 조직 occludin, E-cadherin, claudin-1 단백질 발현 분석

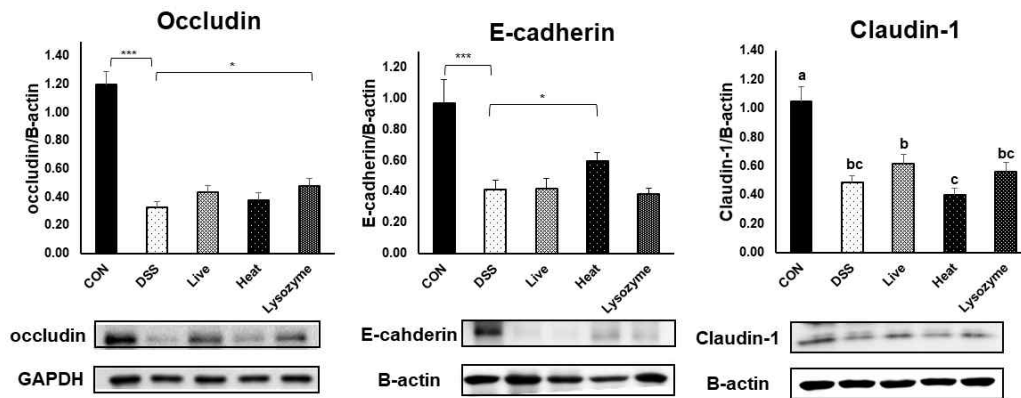


Figure 4. Colonic occludin, E-cadherin and claudin-1 protein expressions



Table 8. Colonic occludin, E-cadherin and claudin-1 protein expressions

Group	Occludin	E-cadherin	Claudin-1
CON	1.20 ± 0.09	0.97 ± 0.15	1.05 ± 0.11 <sup>a</sup>
DSS	0.33 ± 0.04 <sup>***</sup>	0.41 ± 0.06 <sup>***</sup>	0.67 ± 0.07 <sup>bc</sup>
LIVE	0.43 ± 0.05	0.42 ± 0.06	0.67 ± 0.09 <sup>b</sup>
HEAT	0.38 ± 0.05	0.59 ± 0.05 <sup>*</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>c</sup>
LYSOZYME	0.48 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.38 ± 0.04	0.66 ± 0.11 <sup>bc</sup>
p-value	<.0001	<.0001	0.0008

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

\* Significantly different from the DSS group (\*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.001)

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- 대장 조직에서 junction protein 발현을 측정 한 결과를 Figure 4와 Table 8에 제시하였 음. Tight junction protein인 occludin, claudin-1과 adhesion protein인 E-cadherin 발현은 모두 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. Occludin은 DSS군 대비 LYSOZYME군에서 유의적으로 발현이 높았고, LIVE군과 HEAT군은 유의적인 차이가 없었음. E-cadherin 발현은 HEAT군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았고, LIVE군과 LYSOZYME 군은 유의적인 차이가 없었음. Claudin-1 발현은 시험시료 공급에 영향을 받지 않았음.

(사) 대장 조직 p-IκBα, COX2 단백질 발현 분석

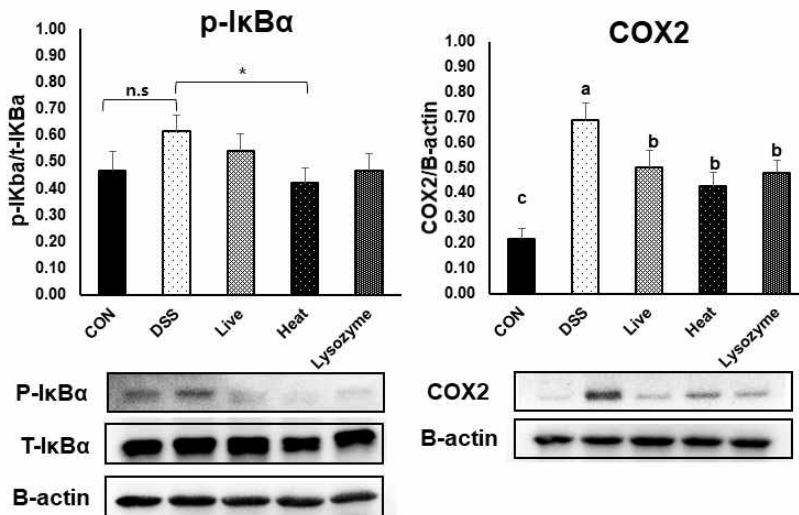


Figure 5. Colonic p-IκBα, COX2 protein expressions

Table 9. Colonic p-IκBα, COX2 protein expressions

Group	p-IκBα	COX2
CON	0.47 ± 0.07	0.22 ± 0.04 <sup>c</sup>
DSS	0.62 ± 0.06	0.69 ± 0.07 <sup>a</sup>

LIVE	0.54 ± 0.06	0.50 ± 0.07 <sup>b</sup>
HEAT	0.42 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.47 ± 0.06	0.48 ± 0.05 <sup>b</sup>
p-value	0.1792	0.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value < 0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

\*Significantly different from the DSS group (\* < 0.05; \*\* < 0.01; \*\*\* < 0.001)

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria (*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria (*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria (*L. acidophilus* PIN7).

- 대장 조직에서 염증반응에 대표적인 NF- $\kappa$ B 발현을 예측하기 위해 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 와 COX2 단백질 발현을 측정된 결과를 Figure 5와 표 9에 제시하였음. p-I $\kappa$ B $\alpha$  발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의차가 나지 않았으나, HEAT군이 DSS군 대비 유의적으로 발현이 낮았음. COX2 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았으며 시험시료를 공급군에서 DSS군 대비 유의적으로 모두 낮았음.

(아) 대장 조직 Th2 단백질 발현 및 IL-4 mRNA 발현 분석

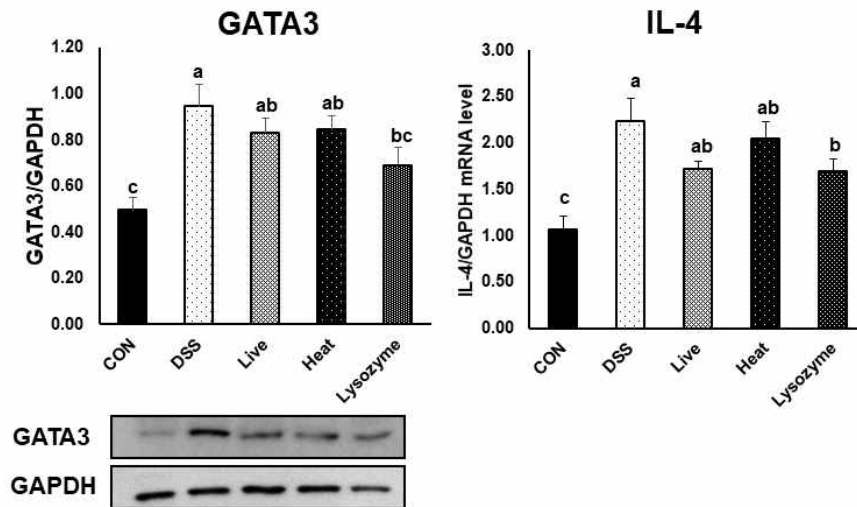


Figure 6. Colonic GATA3 protein expression and IL-4 mRNA expression

Table 10. Colonic GATA3 protein expression and IL-4 mRNA expression

Group	GATA3	IL-4
CON	0.50 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.07 ± 0.14 <sup>c</sup>
DSS	0.95 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.23 ± 0.25 <sup>a</sup>
LIVE	0.83 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.72 ± 0.08 <sup>ab</sup>
HEAT	0.85 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.04 ± 0.18 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	0.69 ± 0.07 <sup>bc</sup>	1.69 ± 0.14 <sup>b</sup>

p-value	0.0025	0.0011
Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan' s multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria( <i>L. acidophilus</i> PIN7), Heat: heat-killed bacteria( <i>L. acidophilus</i> PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria( <i>L. acidophilus</i> PIN7).		

- Th2 전사인자인 GATA3의 단백질 발현과 Th2의 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-4의 발현을 확인한 결과를 Figure 6와 표 10에 제시하였음. GATA3 protein 발현과 IL-4 mRNA 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았음. 시험시료 공급군에서는 DSS 군 대비 낮은 경향을 보였고, 그 중 유의적인 차이를 보인 군은 LYSOZYME군이었음.

### (자) Gut microbiome analysis

#### ① Valid reads and OTUs of fecal microbiome analysis

**Table 11. Valid reads of fecal microbiome**

Group	Valid reads
CON	36086.25 ± 1153.14 <sup>c</sup>
DSS	49127.50 ± 4347.69 <sup>b</sup>
LIVE	59444.00 ± 3771.67 <sup>a</sup>
HEAT	42292.00 ± 3212.27 <sup>bc</sup>
LYSOZYME	44313.00 ± 3370.58 <sup>bc</sup>
P-value	0.0025

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan' s multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- 각 군별 샘플에서 유효한 시퀀스 총 925,051개가 미생물 분석에 이용되었음. Valid reads는 DSS군과 LIVE군이 CON군 대비 수치가 유의적으로 높았음. LIVE군은 DSS군, HEAT군, LYSOZYME군 대비 수치가 유의적으로 높았음.

**Table 12. OTUs of fecal microbiome**

Group	OTUs
CON	548.75 ± 50.60 <sup>a</sup>
DSS	238.00 ± 14.51 <sup>b</sup>
Live	281.50 ± 7.10 <sup>b</sup>
Heat	222.25 ± 21.60 <sup>b</sup>
Lysozyme	260.50 ± 12.65 <sup>b</sup>
P-value	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan' s multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L.*

*acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

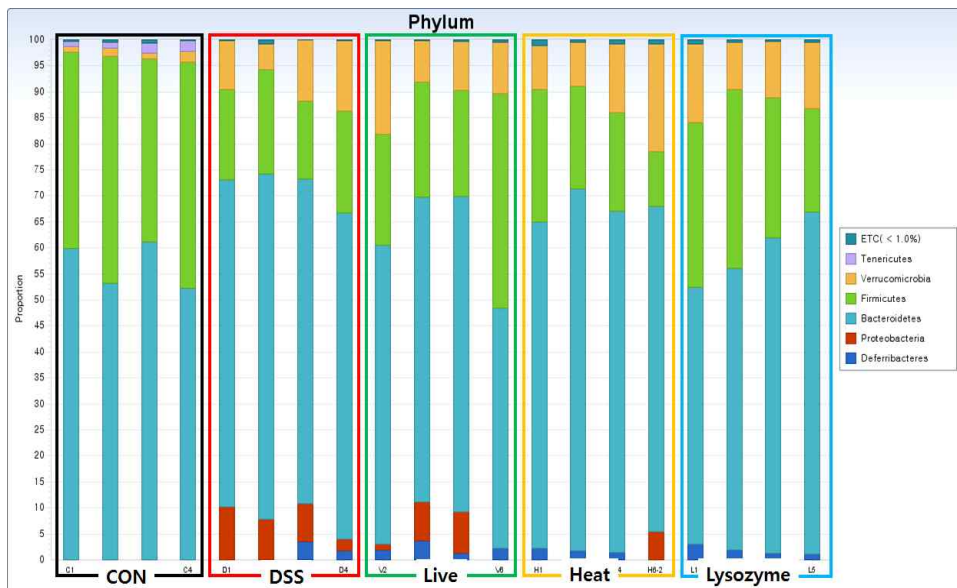
- 시퀀스에 따른 OTUs(species)는 Table 12에 제시하였음. CON군 대비 DSS군, LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군에서 유의적으로 낮았으나 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았음.

## ② Gut microbiota composition

미생물의 분류법은 다음과 같이 Phylum(문) - Class(강) - Order(목) - Family(과) - Genus(속)-Species(종)으로 분류할 수 있음. 16s rRNA sequencing을 통해 실험동물의 대장 미생물 균총을 분석하였으며 이를 바탕으로 각 level 별 미생물 균총 변화를 확인하고 통계분석을 수행하였음. 선택 기준은 전체 균총의 1% 이상으로 하였음.

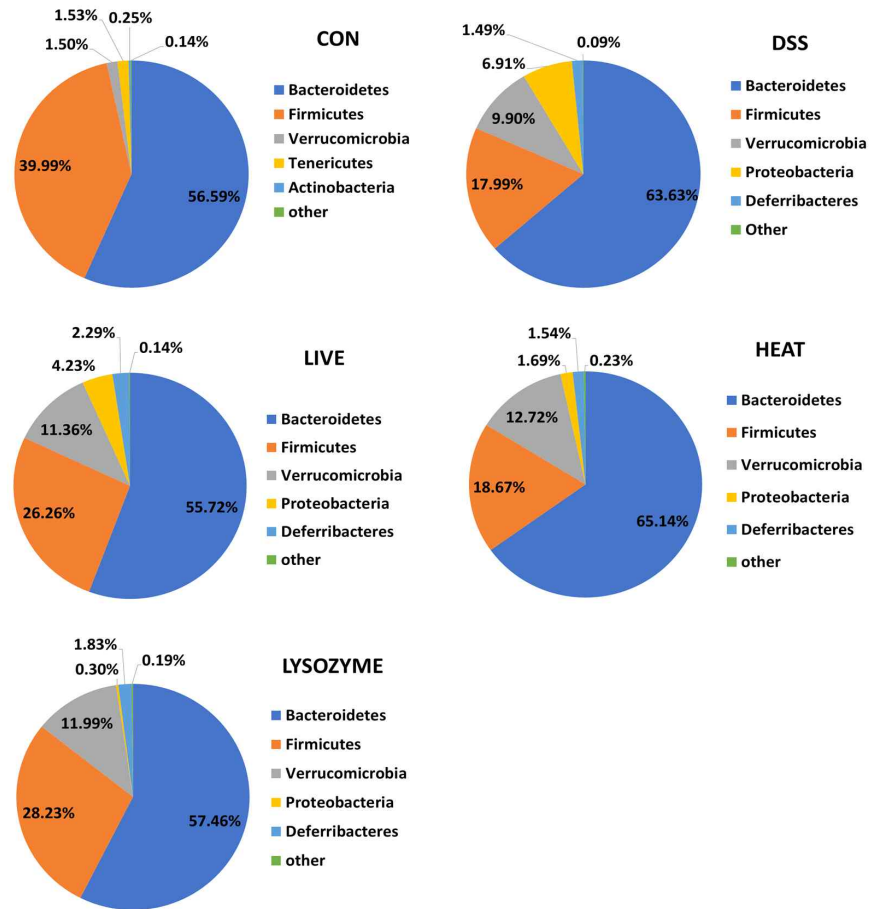
### ㉞ Taxonomy level별 microbiota composition

장내 미생물의 microbiota composition을 level별로 Figure 7, Figure 9, Figure 11, Figure 13, Figure 14, Figure 15에 제시하였음. Phylum, class, order level에서의 microbiota composition은 pie graph로 각각 Figure 8, Figure 10, Figure 12에 제시하였음.



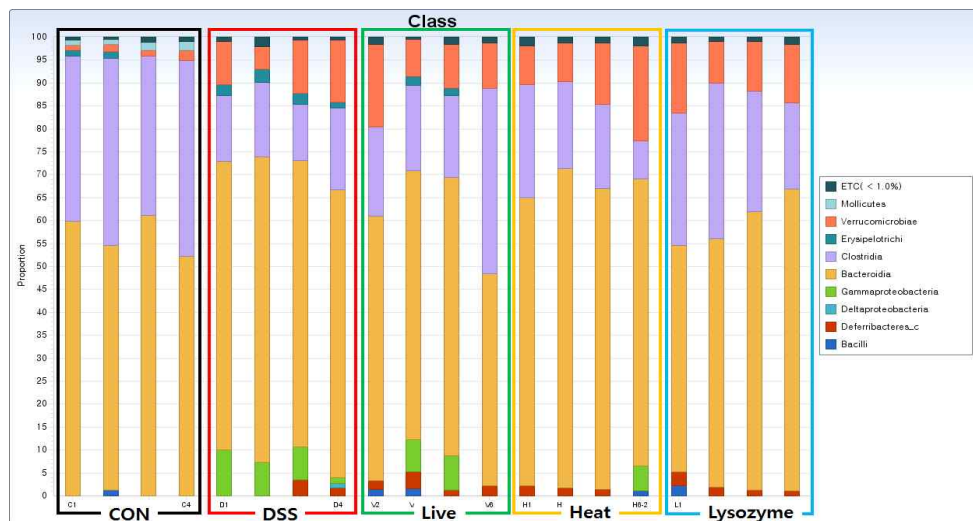
**Figure 7. Gut microbiota composition in phylum level**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).



**Figure 8. Pie graph of gut microbiota in phylim level**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).



**Figure 9. Gut microbiota composition in class level**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

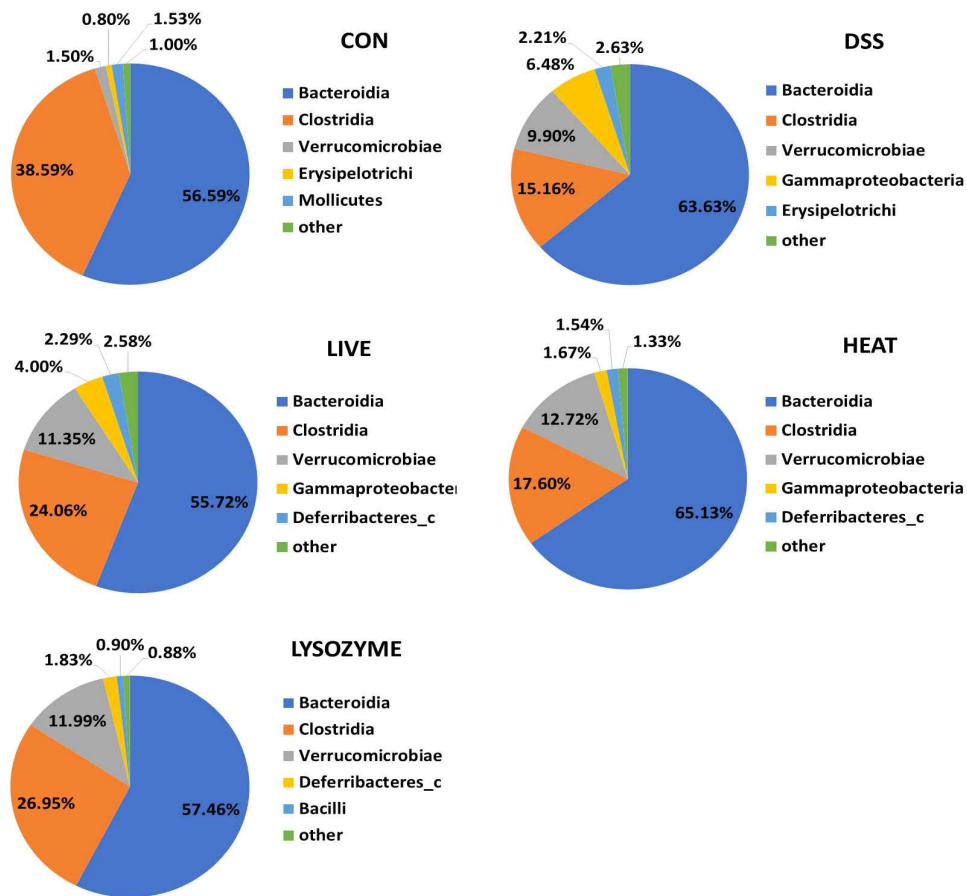


Figure 10. Pie graph of gut microbiota in class level

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

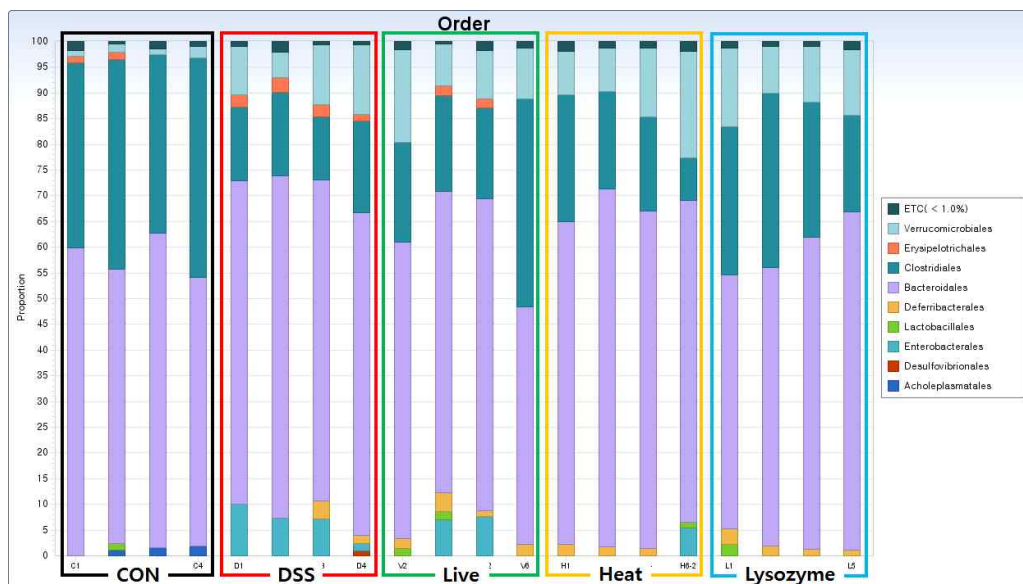
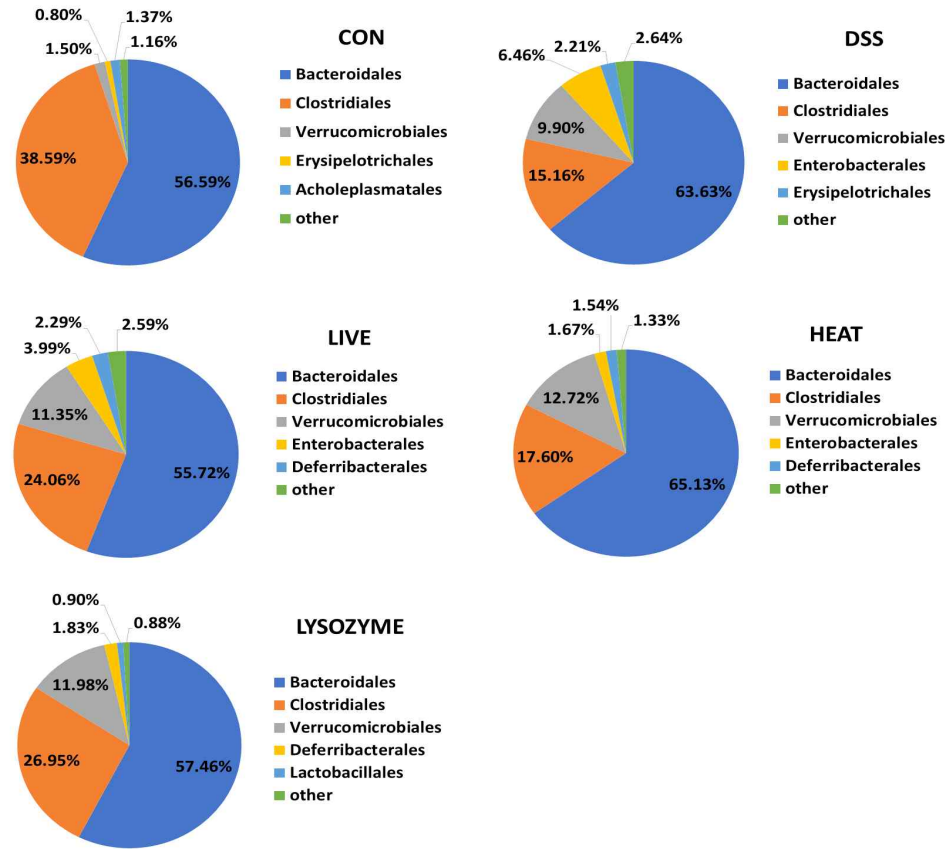


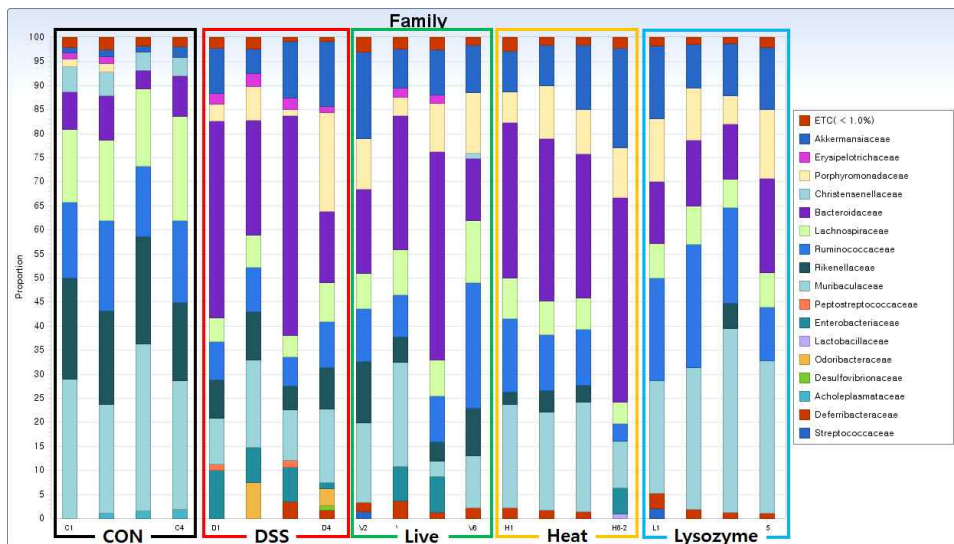
Figure 11. Gut microbiota composition in order level

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).



**Figure 12. Pie graph of gut microbiota in order level**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).



**Figure 13. Gut microbiota composition in family level**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

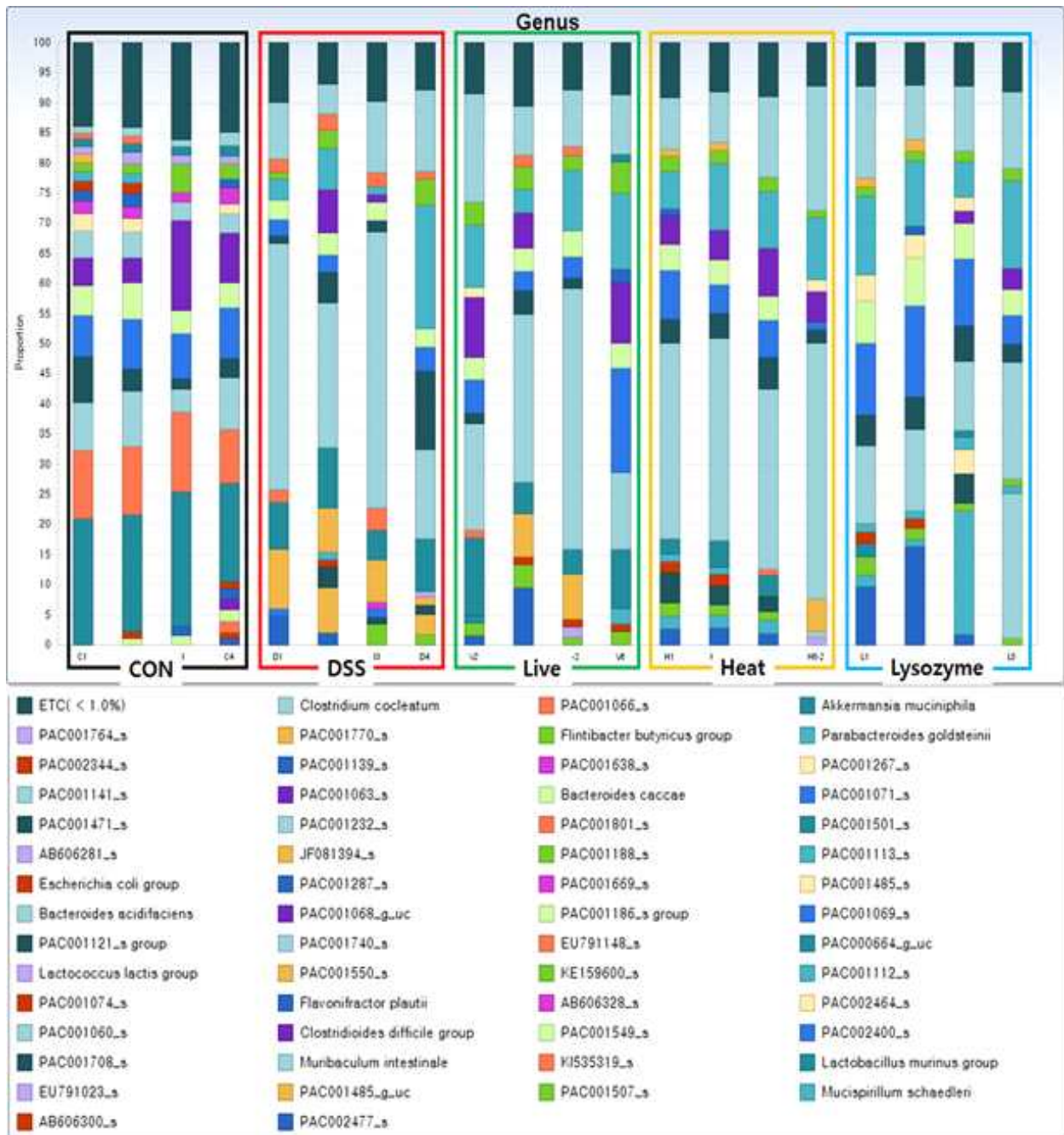


Figure 14. Gut microbiota composition in genus level

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).



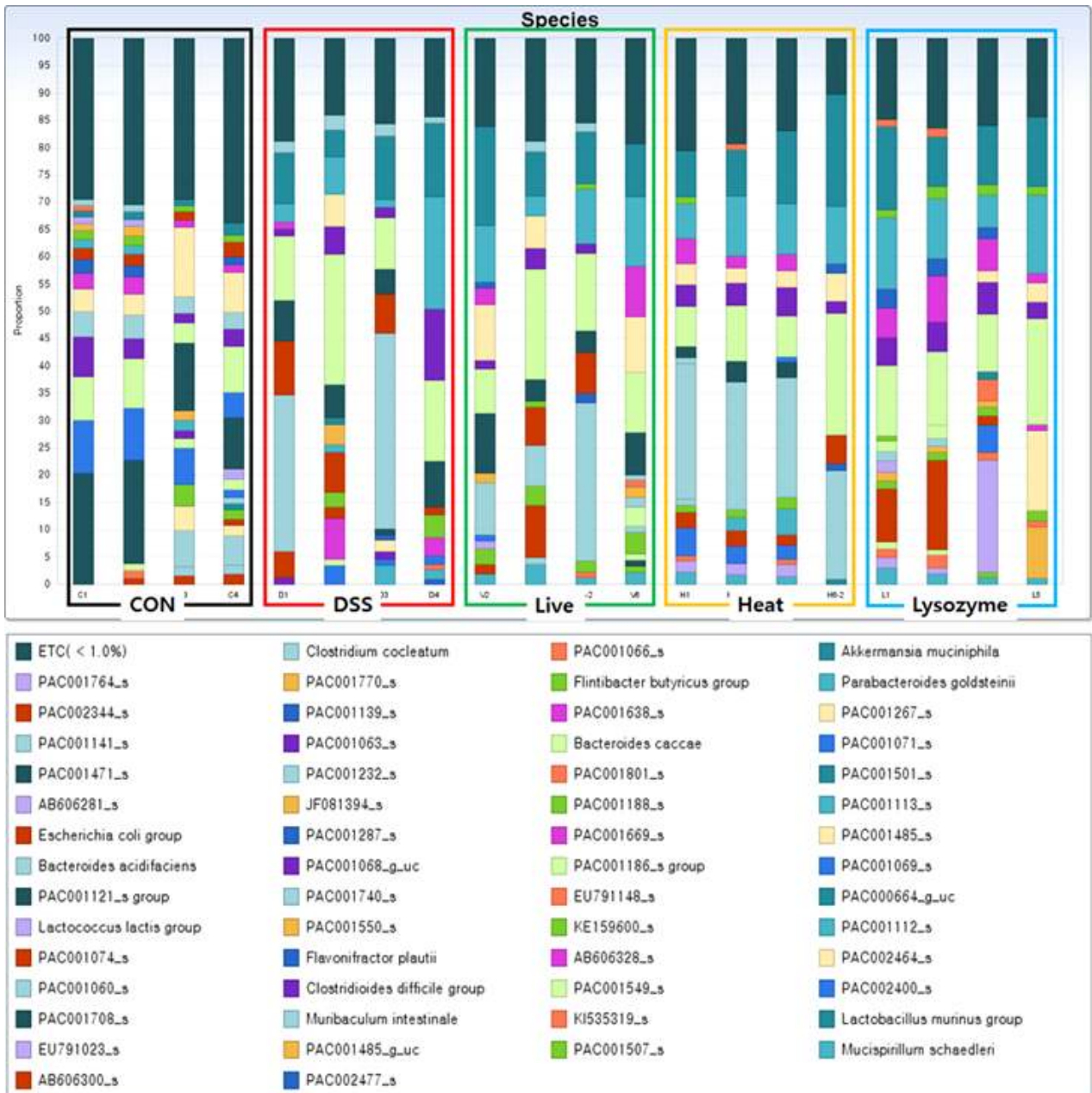


Figure 15. Gut microbiota composition in species level

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

⊕ CON군 대비 DSS군에서 통계적으로 유의하게 증가 또는 감소한 균총  
 CON군 대비 DSS군에서 통계적으로 유의하게 증가 또는 감소한 taxa를 level별로 정리하여 Table 13으로 나타내었음.

Table 13. Changes of specific taxa abundances in DSS-treated mice

Level	Name	CON군 대비 DSS군 증감
Phylum	<i>Deferribacteres</i>	↑
	<i>Verrucomicrobia</i>	↑
	<i>Firmcutes</i>	↓
	<i>Cyanobacteria</i>	↓
	<i>Tenericutes</i>	↓
	<i>Actinobacteria</i>	↓
Class	<i>Gammaproteobacteria</i>	↑
	<i>Erysipelotrichi</i>	↑
	<i>Verrucomicrobiae</i>	↑
	<i>Deferribacteres_c</i>	↑
	<i>Clostridia</i>	↓
	<i>Coriobacteriia</i>	↓
	<i>Mollicutes</i>	↓
Order	<i>Erysipelotrichales</i>	↑
	<i>Enterobacterales</i>	↑
	<i>Deferribacterales</i>	↑
	<i>Verrucomicrobiales</i>	↑
	<i>Clostridiales</i>	↓
	<i>Acholeplasmatales</i>	↓
	<i>Coriobacteriales</i>	↓
	PAC001057_o	↓
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>	↑
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	↑
	<i>Bacteroidaceae</i>	↑
	<i>Akkermansiaceae</i>	↑
	<i>Deferribacteraceae</i>	↑
	<i>Muribaculaceae</i>	↓
	<i>Christensenellaceae</i>	↓
	<i>Rikenellaceae</i>	↓
	<i>Lachnospiraceae</i>	↓

	<i>Acholeplasmataceae</i>	↓
Genus	<i>Bacteriodes</i>	↑
	<i>Clostridium_g6</i>	↑
	<i>Escherichia</i>	↑
	<i>Akkermansia</i>	↑
	<i>Mucispirillum</i>	↑
	<i>Acetatifactor</i>	↓
	<i>Alistipes</i>	↓
	<i>Acholeplasma_g2</i>	↓
	<i>Muribaculum</i>	↓
	PAC001402g,	↓
	PAC001141g	↓
	PAC001118g	↓
	PAC001068g	↓
	KE159571g	↓
Species	<i>Clostridium cocleatum</i>	↑
	<i>Escherichia coli group</i>	↑
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	↑
	<i>Mucispirillum schaedleri</i>	↑
	<i>Flintibacter butyricus group</i>	↓
	PAC001139_s	↓
	PAC001141_s	↓
	PAC002344_s	↓
PAC001071_s	↓	
AB606300_s	↓	
<i>Muribaculum intestinale</i>	↓	

⊕ DSS 제공으로 증가 또는 감소한 taxa에 대한 시험시료 영향 평가

CON군 대비 DSS군에서 변화를 보인 taxa 중 시험시료 공급에 의해 변화가 나타난 경우를 level별로 제시하였음.

<Phylum level>

1) CON군 대비 DSS군에서 증가한 군총

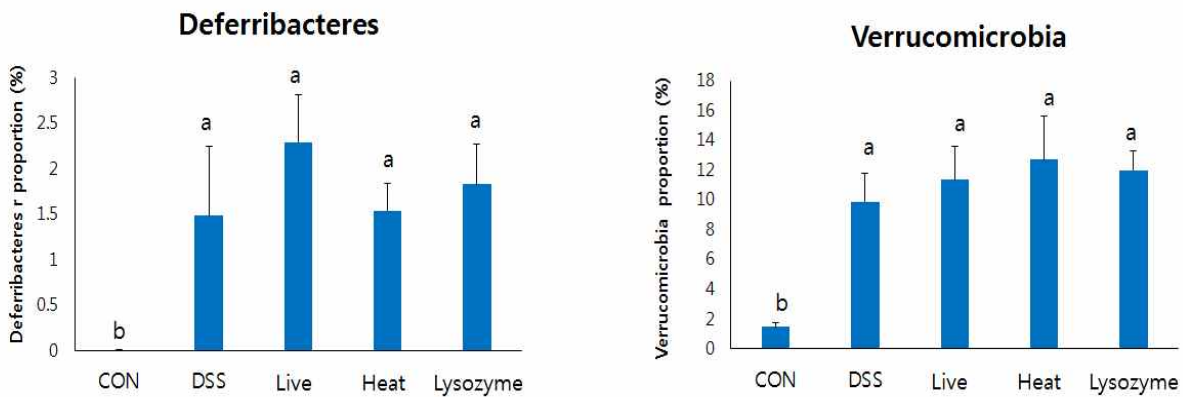


Figure 16. Proportion of Deferribacteres and Verrucomicrobia

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- DSS군에서 *Deferribacteres*, *Verrucomicrobia* phylum 비율이 CON군 대비 유의적으로 높았음. *Deferribacteres*, *Verrucomicrobia* phylum 비율은 DSS 제공받은 군 간 유의적인 차이를 보이지 않았음.

2) CON군 대비 DSS군에서 감소한 군총

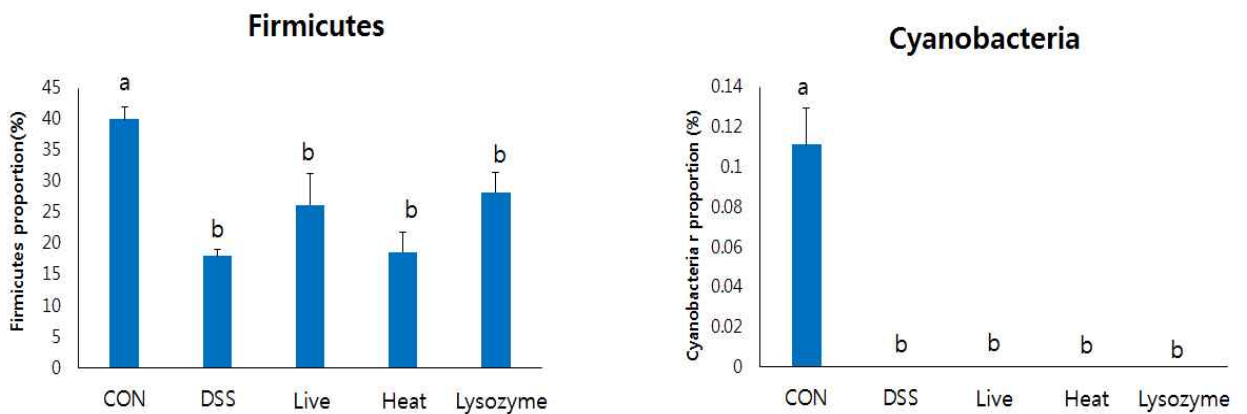
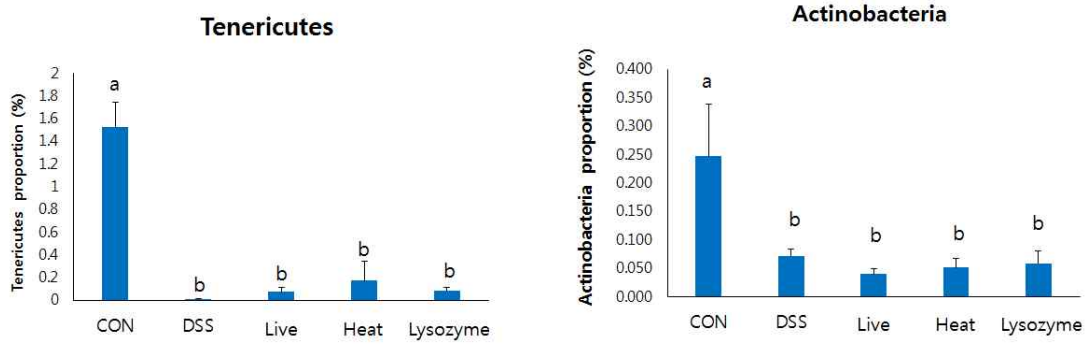


Figure 17. Proportion of Firmicutes and Cyanobacteria



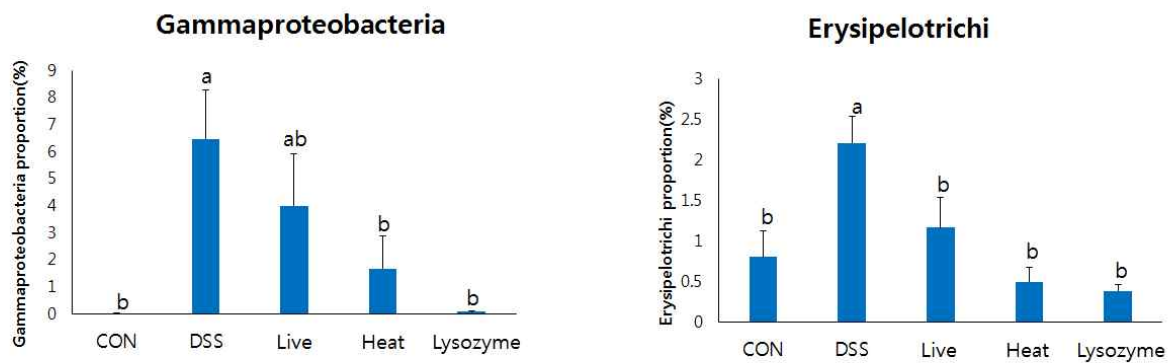
**Figure 18. Proportion of Tenericutes and Actinobacteria**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- DSS군에서 *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* phylum 비율이 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS 공급 군간의 *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* phylum 비율은 유의적인 차이가 없었음.

< Class level >

1) CON군 대비 DSS군에서 증가하는 균총



**Figure 19. Proportion of Gammaproteobacteria and Erysipelotrichi**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- Proteobacteria* phylum에 속하는 *Gammaproteobacteria* class 비율은 CON군 대비 DSS군에서 유의적으로 높았음. HEAT군과 LYSOZYME군은 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. *Firmicutes* phylum에 속하는 *Erysipelotrichi* class 비율은 CON군 대비 DSS군에서 유의적으로 높았고, LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군 모두에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

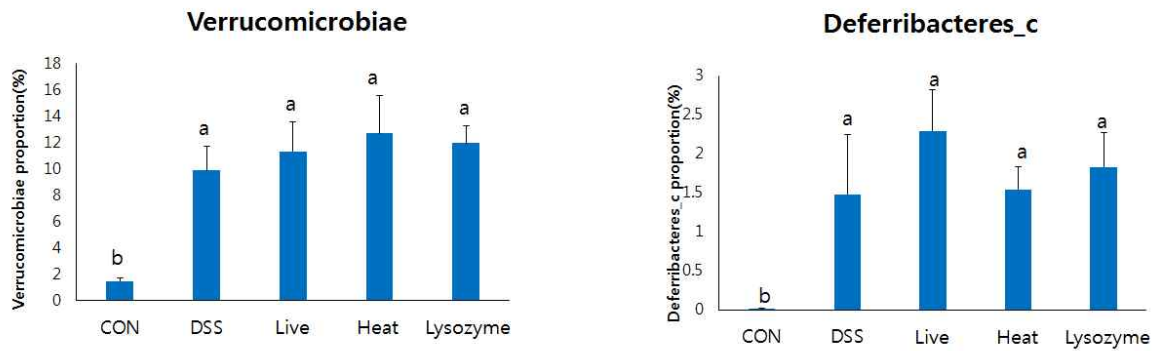


Figure 20. Proportion of Verrucomicrobiae and Deferribacteres\_c

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Verrucomicrobia* phylum에 속하는 *Verrucomicrobiae* class, *Deferribacteres* phylum에 속하는 *Deferribacteres\_c* class 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았음. DSS 공급 군간의 *Verrucomicrobiae*과 *Deferribacteres\_c* class 비율은 유의적인 차이가 없었음.

## 2) CON군 대비 DSS군에서 감소하는 균총

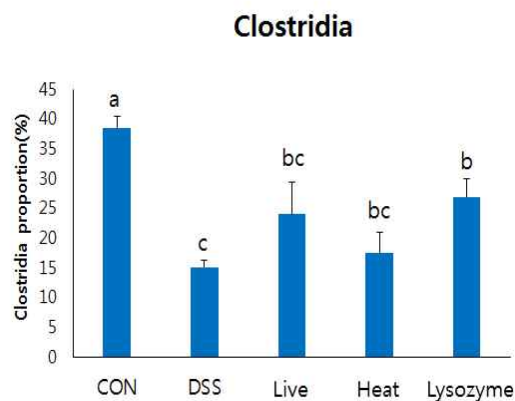
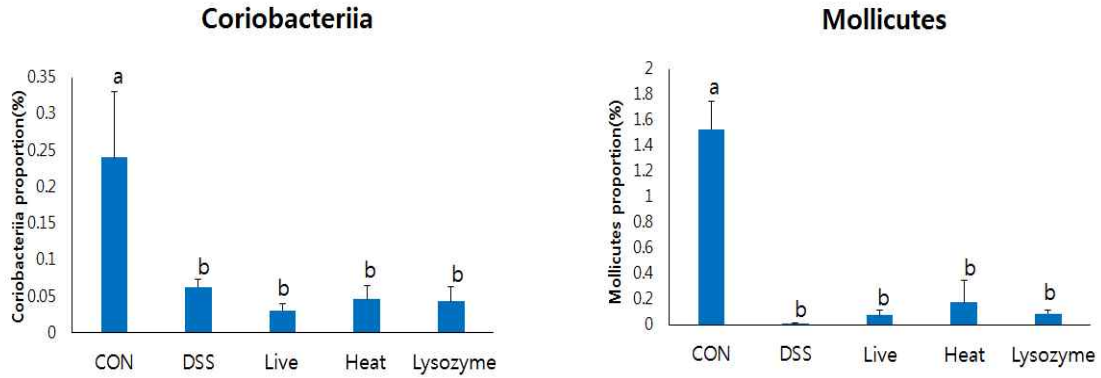


Figure 21. Proportion of Clostridia

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Firmicutes* phylum에 속하는 *Clostridia* class 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의하게 낮았음. LYSOZYME군은 DSS군 대비 *Clostridia* class의 비율이 유의적으로 높았음.



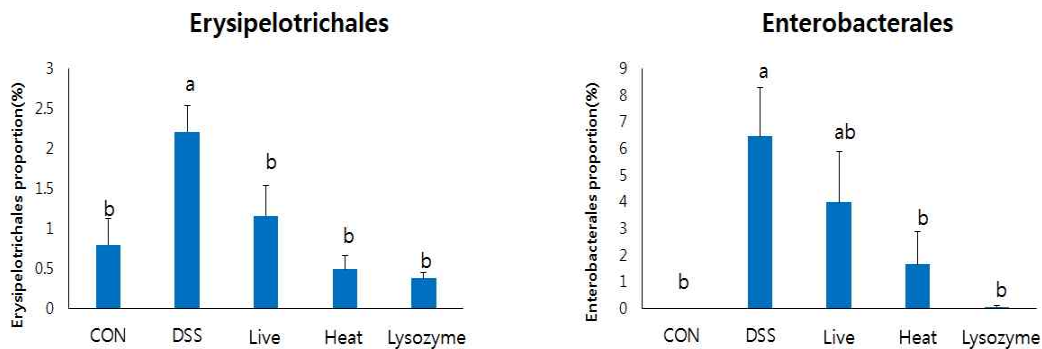
**Figure 22. Proportion of Coriobacteriia and Mollicutes**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Actinobacteria* phylum에 속하는 *Coriobacteriia* class과 *Firmicutes* phylum에 속하는 *Mollicutes*의 비율은 DSS군이 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS 공급 군간의 *Coriobacteriia*, *Mollicutes* class 비율은 모두 유의적인 차이가 없었음.

< Order level >

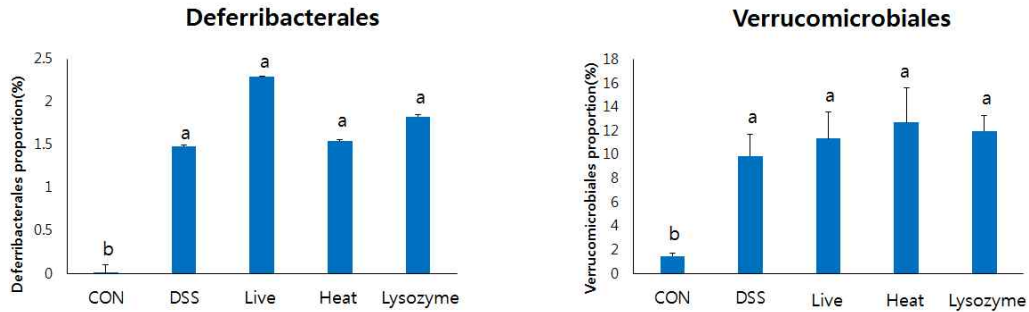
1) CON군 대비 DSS군에서 증가하는 균총



**Figure 23. Proportion of Erysipelotrichales and Enterobacterales**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Firmicutes* phylum, *Erysipelotrichi* class에 속하는 *Erysipelotrichales* order의 비율은 DSS군에서 CON군에 대비 유의적으로 높았고, 시험시료 공급군이 DSS군 대비 모두 유의적으로 낮았음. *Proteobacteria* phylum, *Gammaproteobacteria* class에 속하는 *Enterobacterales* order의 비율은 DSS군에서 CON군에 대비 유의적으로 높았고, HEAT군, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

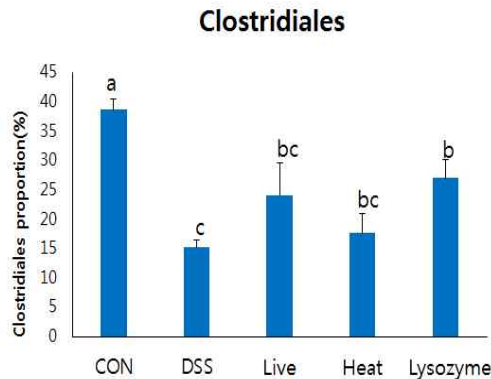


**Figure 24. Proportion of Deferribacterales and Verrucomicrobiales**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Deferribacteres* phylum, *Deferribacteres\_c* class에 속하는 *Deferribacterales* order, *Verrucomicrobia* phylum, *Verrucomicrobiae* class에 속하는 *Verrucomicrobiales* order의 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고 DSS 공급 군간의 *Deferribacterales* 과 *Verrucomicrobiales* order 비율은 유의적인 차이가 없었음.

2) CON군 대비 DSS군에서 감소하는 균총

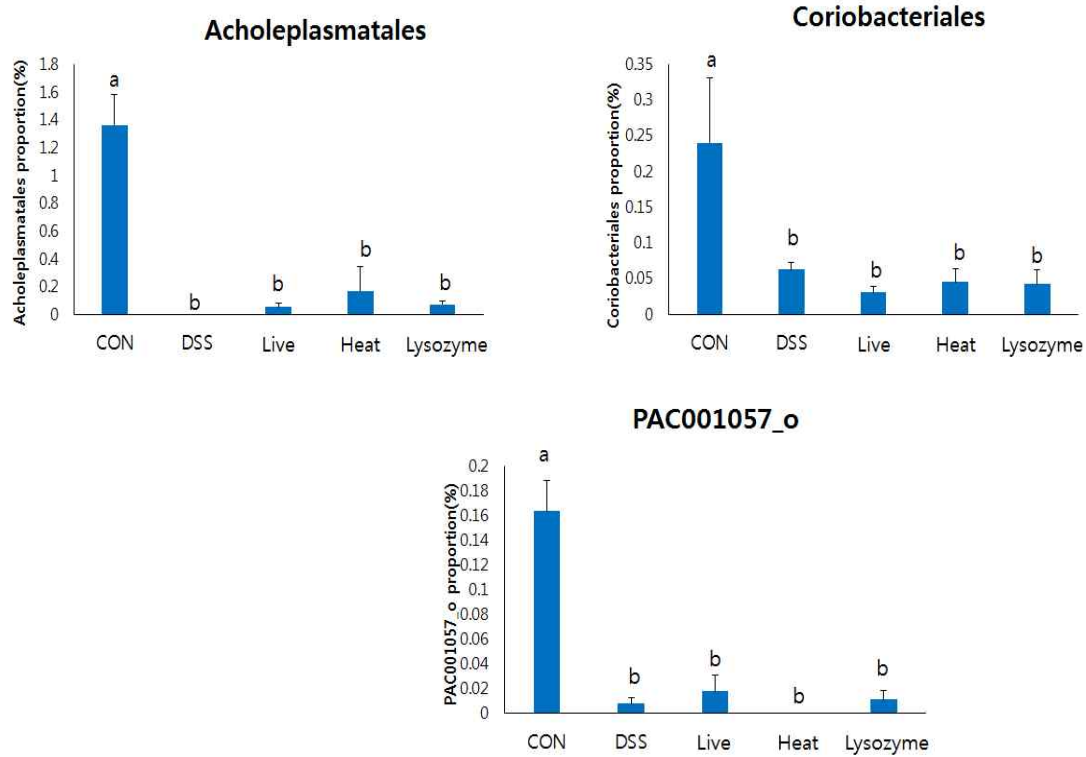


**Figure 25. Proportion of Clostridiales**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Firmicutes* phylum, *Clostridia* class에 속하는 *Clostridiales* order 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았음.





**Figure 27. Proportion of Acholeplasmatales, Coriobacteriales and PAC001057\_o**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Tenericutes* phylum, *Mollicutes* class에 속하는 *Acholeplasmatales* order, *Actinobacteria* phylum, *Coriobacteriia* class에 속하는 *Coriobacteriales* order와 PAC001057\_o order 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS 공급 군간의 *Acholeplasmatales*, *Coriobacteriales*와 PAC001057\_o order 비율은 유의적인 차이가 없었음.

< Family level >

1) CON군 대비 DSS군에서 증가하는 균총

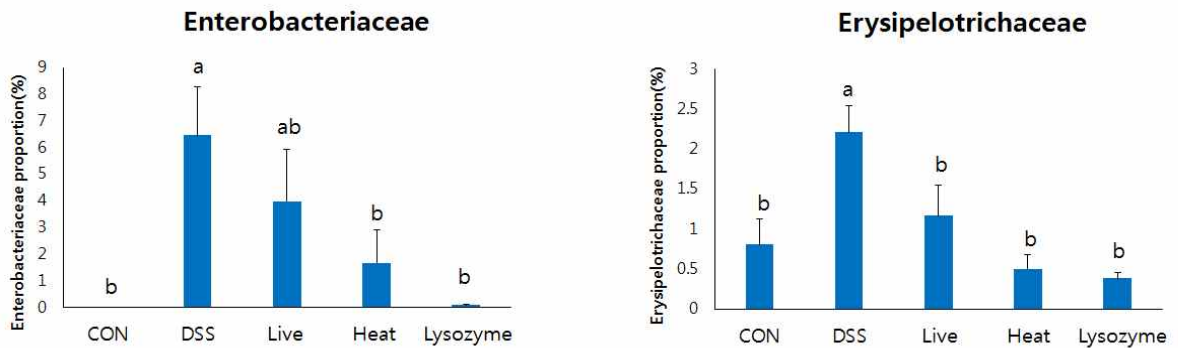


Figure 28. Proportion of Enterobacteriaceae and Erysipelotrichaceae

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Enterobacteriaceae* family 비율은 DSS군이 CON군 대비 유의적으로 높았고, HEAT군, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. *Erysipelotrichaceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, 모든 실험시료 공급군에서 DSS군 대비 유의하게 낮았음.

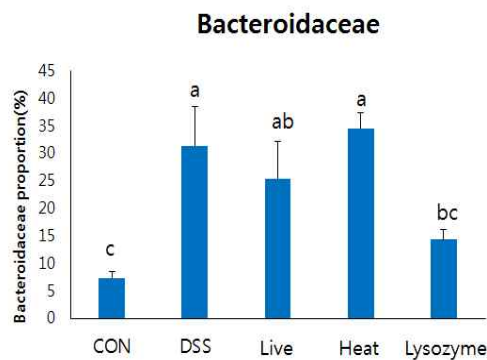


Figure 29. Proportion of Bacteroidaceae

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Bacteroidaceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

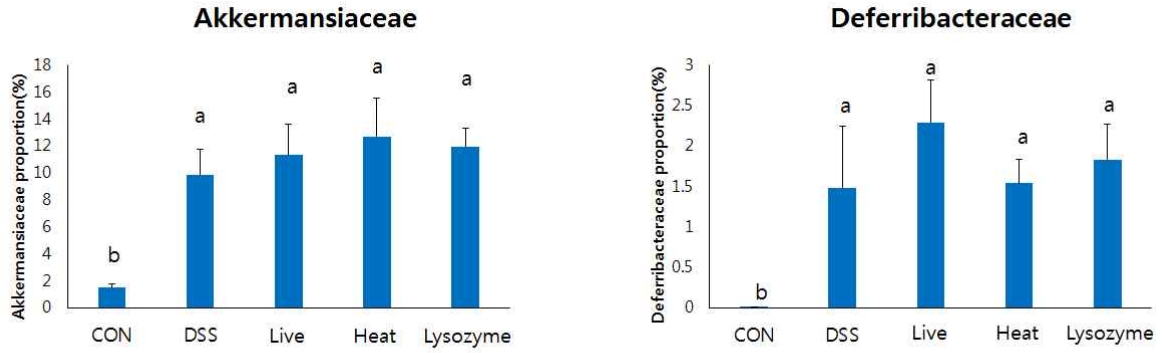


Figure 30. Proportion of Akkermansiaceae and Deferribacteraceae

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Akkermansiaceae*와 *Deferribacteraceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, DSS 공급 군간의 *Akkermansiaceae*와 *Deferribacteraceae* family 비율은 유의적인 차이가 없었음.

2) CON군 대비 DSS군에서 감소하는 균총

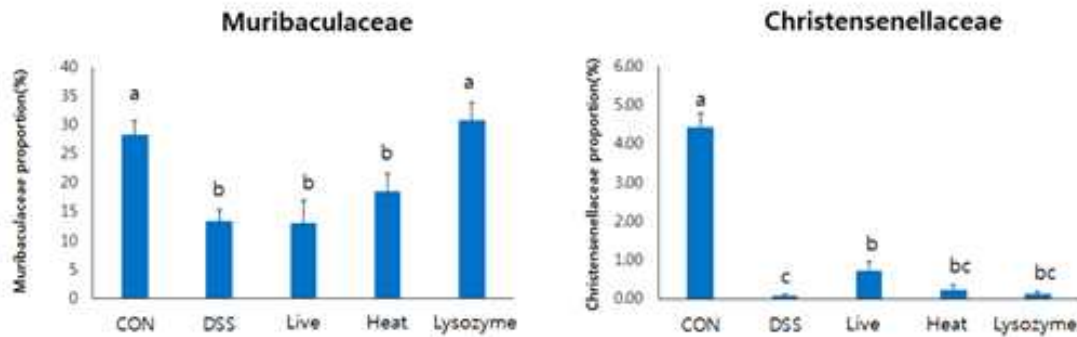
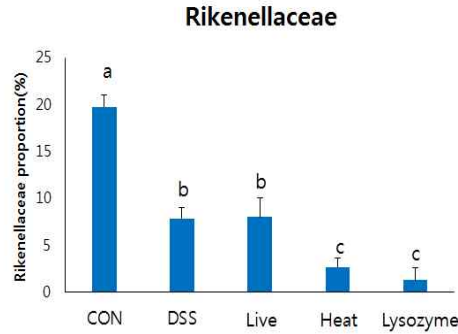


Figure 31. Proportion of Muribaculaceae and Christensenellaceae

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

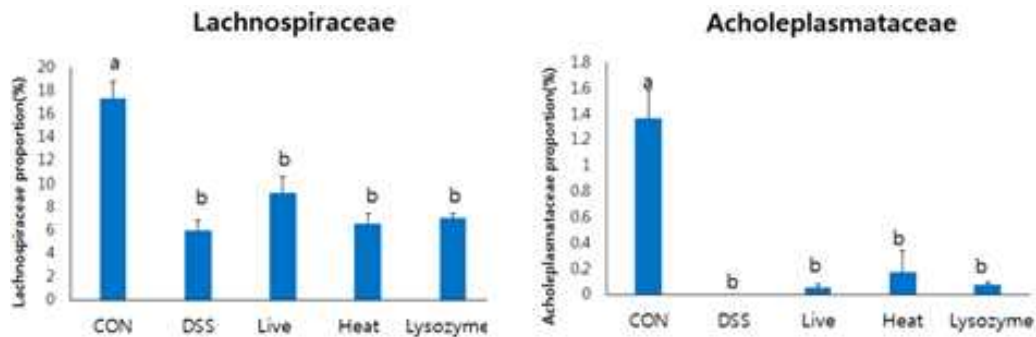
- *Muribaculaceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LYSOZYME 군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았음. LIVE군, HEAT군에서는 DSS군 대비 유의적인 차이가 없었음. *Christensenellaceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LIVE군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았음.



**Figure 32. Proportion of Rikenellaceae.**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Rikenellaceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. HEAT군과 LYSOZYME군은 DSS군 대비 유의적으로 낮았고, LIVE군은 DSS군 대비 유의적인 차이가 없었음.



**Figure 33. Proportion of Lachnospiraceae and Acholeplasmataceae**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Lachnospiraceae* family와 *Acholeplasmataceae* family 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, DSS 공급 군간의 *Lachnospiraceae*와 *Acholeplasmataceae* family비율은 유의적인 차이가 없었음.

< Genus level >

1) CON군 대비 DSS군에서 증가하는 균총

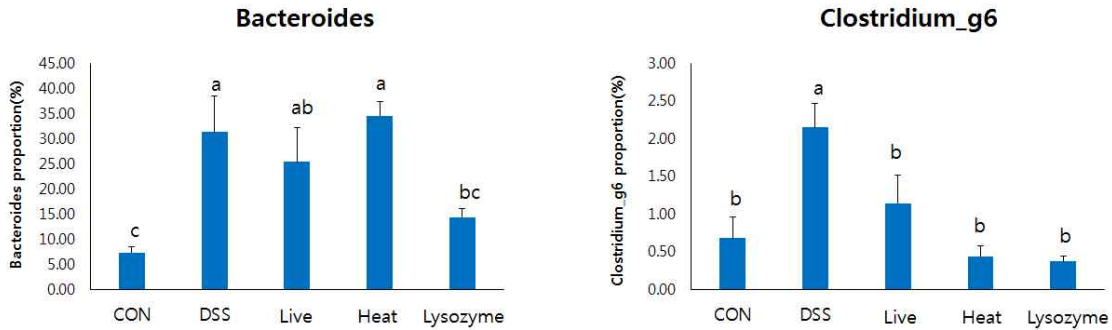


Figure 34. Proportion of Bacteroides and Clostridium\_g6

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Bacteroides* genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았음. LYSOZYME군은 DSS군 대비 유의적으로 낮았고 HEAT군은 DSS군과 유의적인 차이가 없었음. *Clostridium\_g6* genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, 모든 시험시료 공급군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

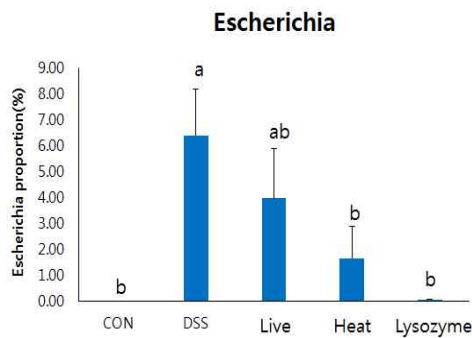


Figure 35. Proportion of Escherichia

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Escherichia* genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

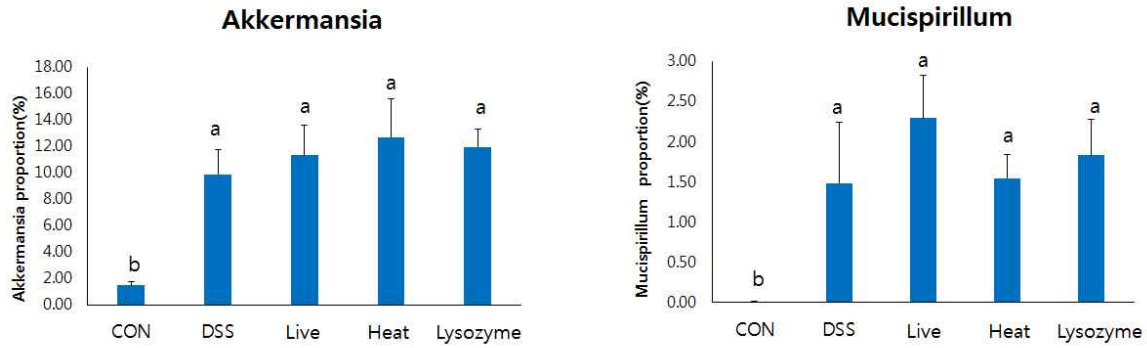


Figure 36. Proportion of *Akkermansia* and *Mucispirillum*

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Akkermansia* genus와 *Mucispirillum* genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, DSS 공급 군간의 *Akkermansia*와 *Mucispirillum* genus 비율은 유의적인 차이가 없었음.

## 2) CON군 대비 DSS군에서 감소하는 균총

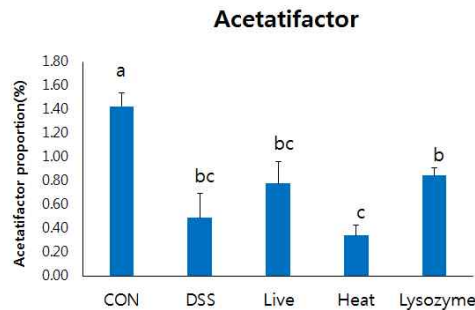
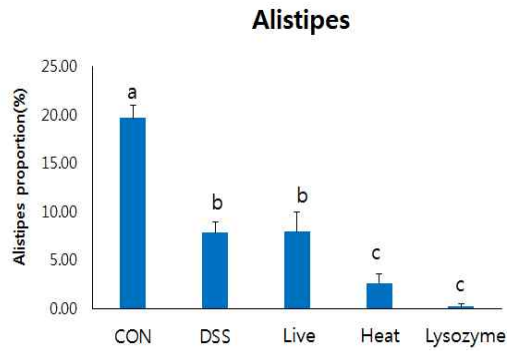


Figure 37. Proportion of *Acetatifactor*

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

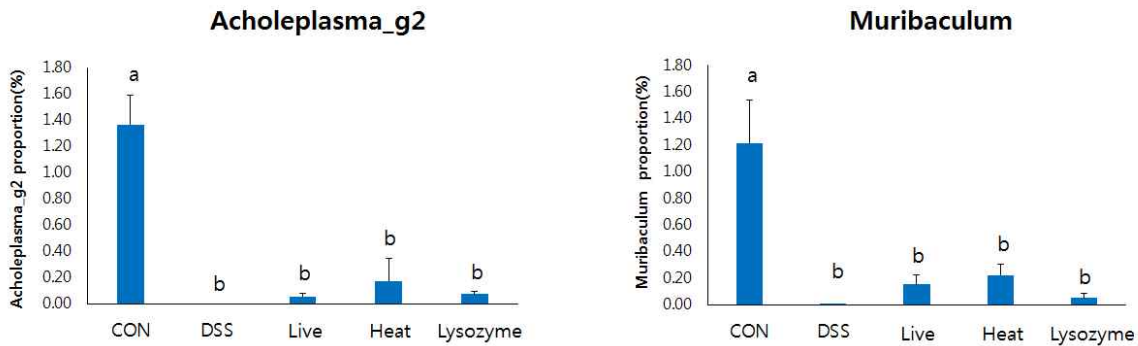
- *Acetatifactor* genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 높아졌으나 유의적인 차이는 없었음. HEAT군, LIVE군은 DSS군 대비 유의적인 차이가 없었음.



**Figure 38. Proportion of *Alistipes***

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Alistipes*의 genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, HEAT군, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. LIVE군은 DSS군 대비 유의적인 차이가 없었음.



**Figure 39. Proportion of *Acholeplasma\_g2* and *Muribaculum***

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Acholeplasma\_g2* genus와 *Muribaculum* genus 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS 공급 군간의 *Acholeplasma\_g2*와 *Muribaculum* genus 비율은 유의적인 차이가 없었음.

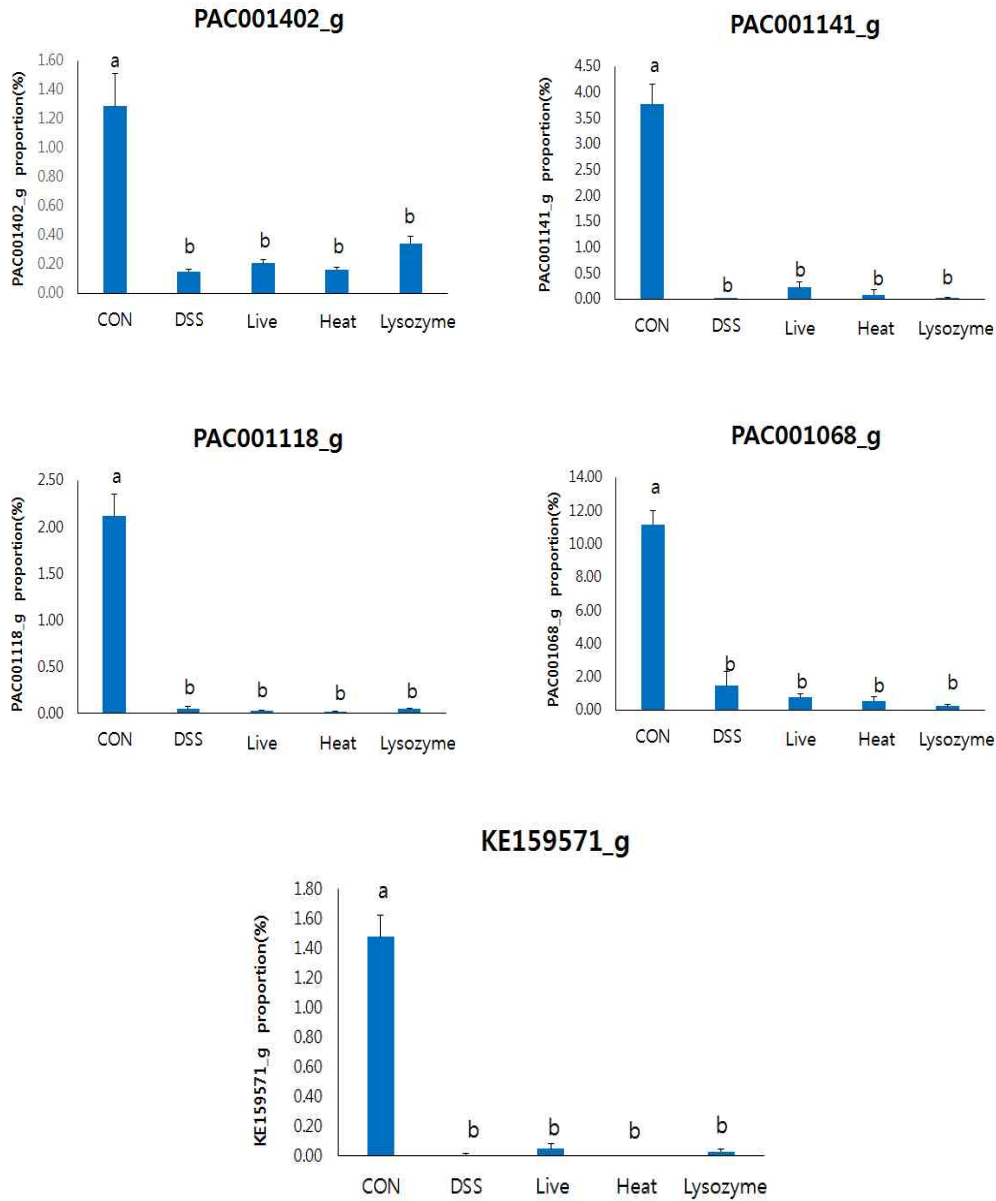


Figure 41. Proportion of PAC001402g, PAC001141g, PAC001118g, PAC001068g and KE159571g

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- PAC001402\_g, PAC001141\_g, PAC001118\_g, PAC001068\_g, KE159571\_g genus 비율은 DSS 군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS 공급 군간의 PAC001402\_g, PAC001141\_g, PAC001118\_g, PAC001068\_g, KE159571\_g genus 비율은 유의적인 차이가 없었음.

< Species level >



1) CON군 대비 DSS군에서 증가하는 경우

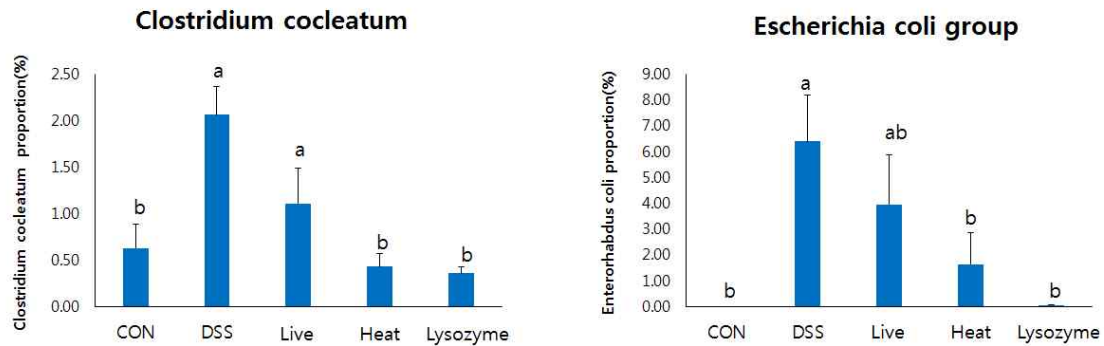


Figure 42. Proportion of *Clostridium cocleatum* and *Escherichia coli* group

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Clostridium cocleatum* species 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았음. HEAT군, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. *Escherichia coli* group species 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, HEAT군, LYSOZYME군은 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

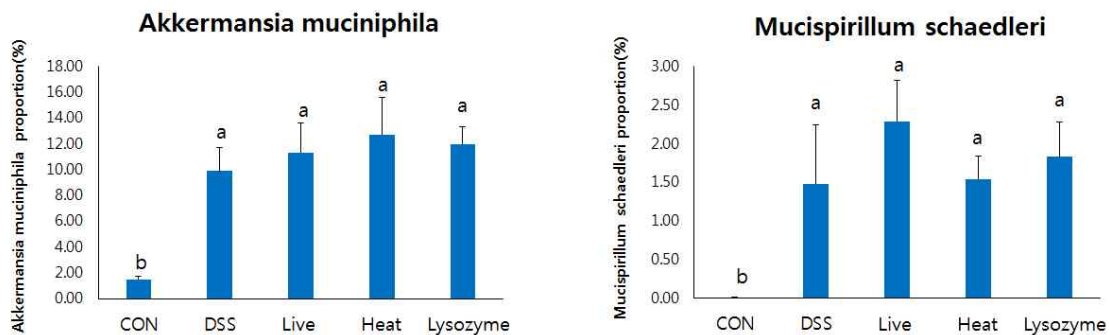
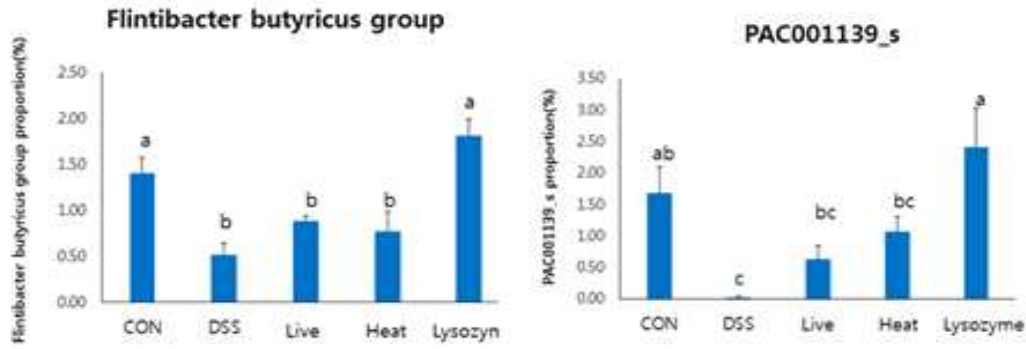


Figure 43. Proportion of *Akkermansia muciniphila* and *Mucispirillum schaedleri*

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Akkermansia muciniphila* species와 *Mucispirillum schaedleri* species 비율은 DSS군이 CON군 대비 유의적으로 높았고, DSS 공급 군간의 *Akkermansia muciniphila*와 *Mucispirillum schaedleri* species 비율은 유의적인 차이가 없었음.

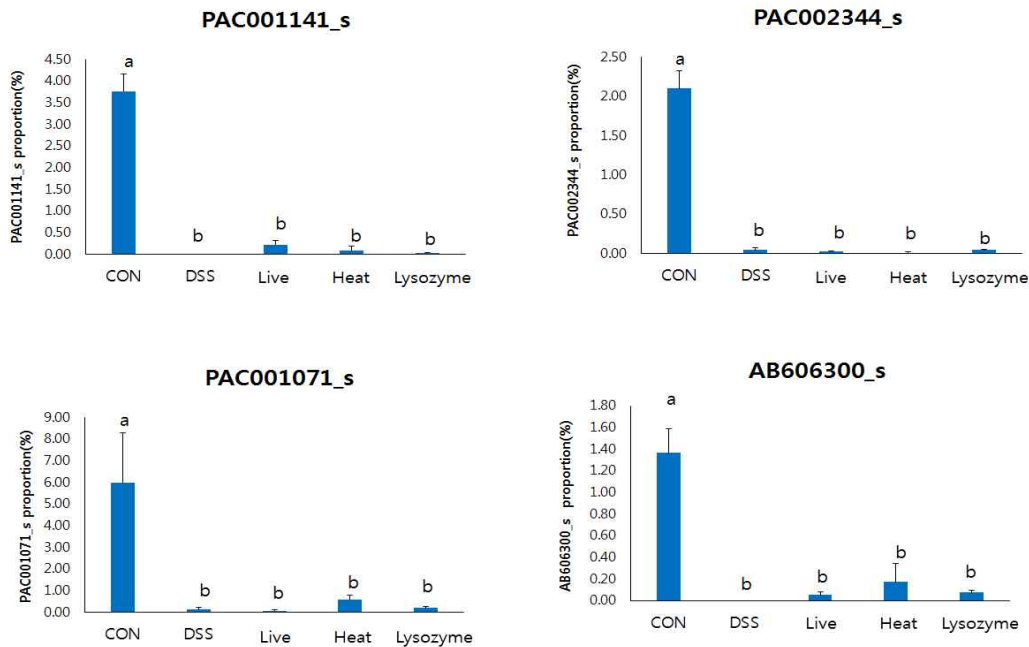
2) CON군 대비 DSS군에서 감소하는 경우



**Figure 44. Proportion of *Flintibacter butyricus* group and PAC001139\_s**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- *Flintibacter butyricus* group species 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았음. LIVE군과 HEAT군은 DSS군과 유의적인 차이가 없었음. PAC001139\_s species 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LYSOZYME군은 DSS 대비 유의적으로 높았음.



**Figure 45. Proportion of PAC001141\_s, PAC002344\_s, PAC001071\_s and AB606300\_s**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

- PAC001141\_s, PAC002344\_s, PAC001071\_s, AB606300\_s, *Muribaculum intestinale* species 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS 공급 군간의 PAC001141\_s, PAC002344\_s, PAC001071\_s, AB606300\_s, *Muribaculum intestinale* species 비율은 유의적인 차이를 보이지 않음.

이상의 microbiota composition 연구 결과를 다음의 표로 요약하였음. 표 11에는 대장염

에 의해 증가한 microbiota를 감소시키는 시험시료를, 표 12에는 대장염에 의해 감소하는 microbiota를 증가시키는 시험시료를 제시하였음.

Table 11. 대장염에 의해 증가한 microbiota를 감소시키는 시험시료

Level	Name	효과를 보인 시험시료
Class	<i>Gammaproteobacteria</i>	HEAT, LYSOZYME군
	<i>Erysipelotrichi</i>	LIVE, HEAT, LYSOZYME군
Order	<i>Erysipelotrichales</i>	LIVE, HEAT, LYSOZYME군
	<i>Enterobavterales</i>	HEAT, LYSOZYME군
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>	HEAT, LYSOZYME군
	<i>Etysipelotrichaceae</i>	LIVE, HEAT, LYSOZYME군
	<i>Bacteroidaceae</i>	LYSOZYME군
Genus	<i>Bacteroides</i>	LYSOZYME군
	<i>Clostirdium_g6</i>	LIVE, HEAT, LYSOZYME군
	<i>Eschrichia</i>	HEAT, LYSOZYME군
Species	<i>Clostridium cocleatum</i>	HEAT, LYSOZYME군
	<i>Escherichia coli group</i>	HEAT, LYSOZYME군

Table 12. 대장염에 의해 감소한 microbiota를 증가시키는 시험시료

Level	Name	효과를 보인 시험시료
Class	<i>Clostridia</i>	LYSOZYME군
Order	<i>Clostridiales</i>	LYSOZYME군
Family	<i>Muribacalaceae</i>	LYSOZYME군
Species	<i>Flintibacter butyricus group</i>	LYSOZYME군
	PAC001139_s	LYSOZYME군

### ③ PCoA

장내 미생물 군별 분포를 PCoA를 통해 살펴본 결과를 Figure 46에 제시하였음. 장내 미생물의 분포는 CON군 대비 DSS 제공받은 군이 모두 분리된 분포를 보였으며, LYSOZYME군만 DSS군 뿐만 아니라 HEAT군, LIVE군과 별개의 분포를 보였음.

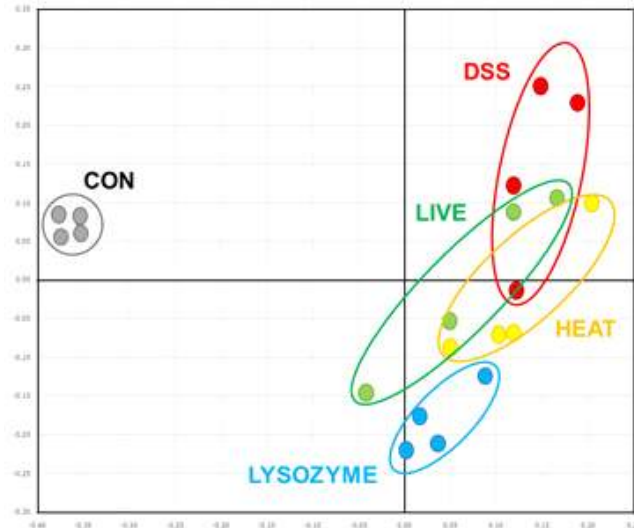
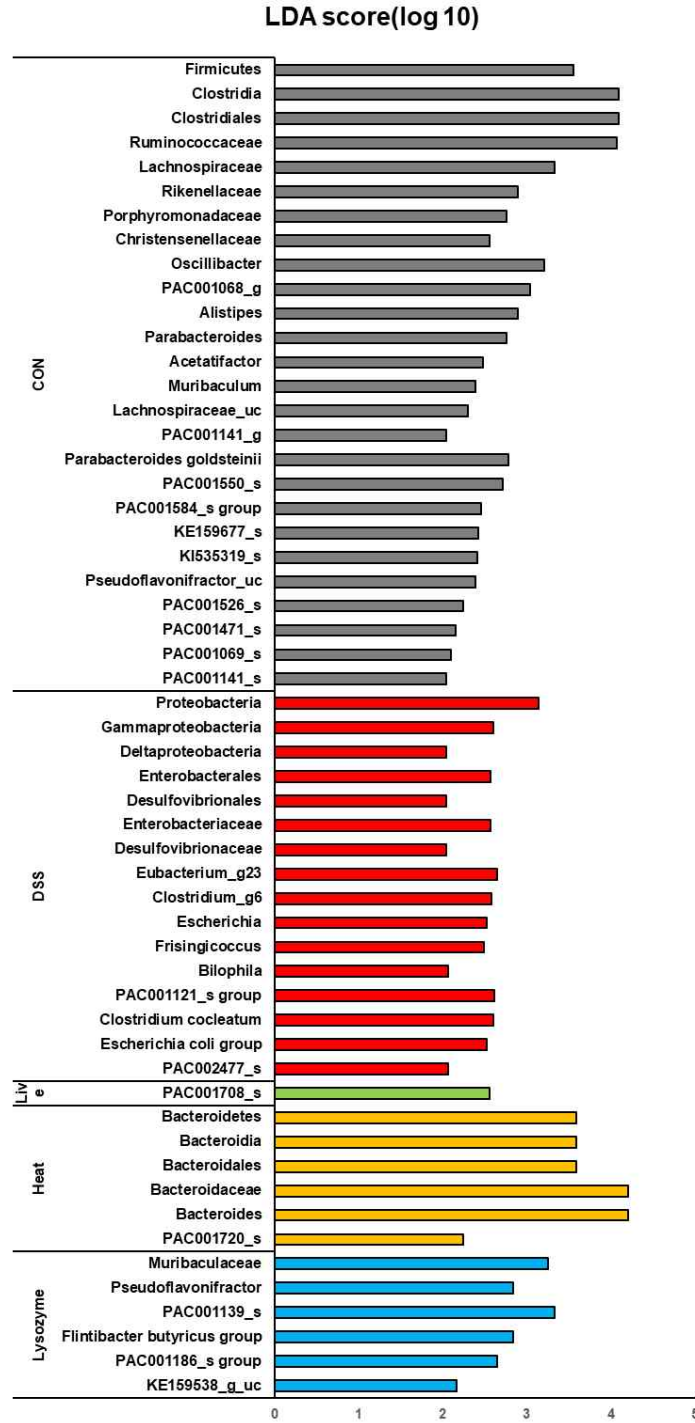


Figure 46. PCoA analysis

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

### ④ LDA score

특정 군의 그룹 간 상대적 abundance를 비교하는 LDA score결과를 분류체계가 높은 순으로 정렬한 뒤 동일한 수준에서 값이 큰 순서로 정리하여 Figure 47에 제시하였음. CON군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Firmicutes*, class level에서 *Clostridia*, order level에서 *Clostridiales*, family level에서 *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Christensenellaceae* 였고, genus level에서 *Oscillibacter*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Mucispirillum* *Lachnospiraceae\_uc*으로 나타났음. DSS군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Proteobacteria*, class level에서 *Gammaproteobacteria*와 *Deltaproteobacteria*, order level에서 *Enterobacteriales*와 *Desulfovibrionales*, family level에서 *Enterobacteriaceae*와 *Desulfovibrionaceae*, genus level에서 *Eubacterium\_g23*, *Clostridium\_g6*, *Escherichia*, *Frisingicoccus*, *Bilophila*, species level에서 *Clostridium cocleatum*, *Escherichia coli group* 이 있었음. LIVE군에서 상대적으로 풍부했던 군은 species level의 PAC001708\_s하나로 확인되었음. HEAT군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Bacteroidetes*, class level에서 *Bacteroidia*, order level에서 *Bacteroidales*, family level에서 *Bacteroidaceae*, genus level에서 와 *Bacteroides*으로 나타났음. 마지막으로 LYSOZYME군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 family level에서 *Muribaculaceae*, genus level에서 *Pseudoflavonifractor*, species level에서 *Flintibacter butyricus group*가 있었음.



**Figure 47. LDA score**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7).

(2) DSS로 유도된 대장염 모델에서 *Lactobacillus. paracasei* IBS041 효능 평가 (SET 2)

(가) 체중 변화

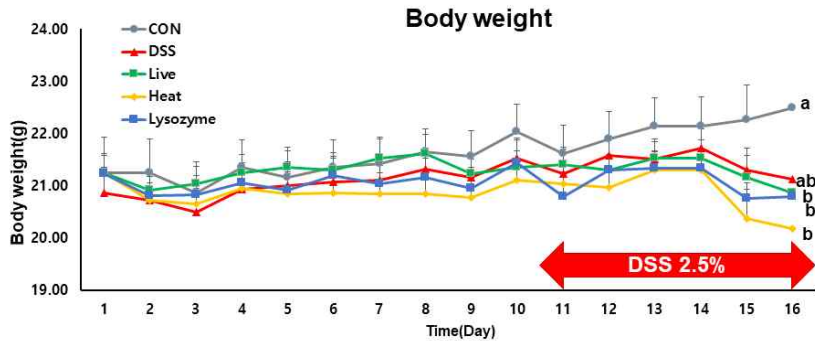


Figure 48. Body weight changes of experimental animals

Means with different letters are significantly different at  $p$ -value $<0.05$  as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

DSS 공급으로 대장염이 유도됨에 따라 체중의 감소가 나타나기 때문에 실험동물의 체중 변화를 관찰하였고 시험시료 공급에 따른 일별 체중 변화를 관찰한 결과와 16일차의 체중을 비교한 결과를 Figure 48에 제시하였음. DSS 공급 전 10일간 시험시료를 경구 투여하고 체중 변화를 관찰한 결과 DSS 공급 6일차(실험 16일차)에 모든 시험시료 공급군에서 CON군 대비 유의적인 체중 감소가 관찰되었고, DSS군은 체중이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었음.

(나) 조직 무게 비교

군간 서로 다른 형태의 균(생균, HEAT, lysozyme 처리 후 음파 파쇄한 사균 침전물)을 10일 동안 제공한 뒤 DSS로 대장염을 유발한 동물들의 장기 무게와 길이를 관찰한 결과는 다음과 같음.

Table 16. Colon and small intestine length of experimental animals.

Group	Colon (cm)	Small intestine(cm)
CON	8.86 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	39.29 $\pm$ 0.95
DSS	6.68 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	39.35 $\pm$ 0.71
LIVE	6.28 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	38.91 $\pm$ 1.08
HEAT	6.46 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	38.45 $\pm$ 0.90
LYSOZYME	6.63 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	37.79 $\pm$ 0.83
P-value	$<0.001$	0.7029

Means with different letters are significantly different at  $p$ -value $<0.05$  as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

- 실험 식이에 따른 군간 대장, 소장 길이를 표 16에 나타내었음. 대장 길이는 모든

DSS 공급 군에서 CON군 대비 유의하게 감소하였고, 소장 길이는 모든 군 간의 유의적인 차이는 없었음.

Table 17. Thymus, lymph node and spleen weights of experimental animals

Group	Thymus (g) (% body weight)	Lymph node (g) (% body weight)	Spleen (g) (% body weight)
CON	0.1863 ± 0.0051	0.0320 ± 0.0051	0.57 ± 0.02 <sup>b</sup>
DSS	0.1522 ± 0.0090	0.0320 ± 0.0043	0.67 ± 0.04 <sup>a</sup>
Live	0.1595 ± 0.0095	0.0370 ± 0.0046	0.60 ± 0.03 <sup>ab</sup>
Heat	0.1618 ± 0.0186	0.0237 ± 0.0044	0.52 ± 0.02 <sup>b</sup>
Lysozyme	0.1440 ± 0.0109	0.0396 ± 0.0045	0.58 ± 0.03 <sup>ab</sup>
<b>P-value</b>	0.2823	0.1408	0.0148

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

- 실험 식이에 따른 군간 흉선, 림프절, 비장의 체중 대비 무게를 표 17에 나타내었음. 비장의 무게는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 증가함. 모든 시험시료 공급 군에서 DSS군 대비 감소하는 경향을 보였고, 특히 HEAT군은 유의적으로 감소하여 CON군 수준의 무게를 나타냄. 흉선과 림프절 무게는 군 간 유의적인 차이가 없었음.

Table 18. Liver and cecum weights of experimental animals

Group	Liver (g) (% body weight)	Cecum (g) (% body weight)
CON	3.89 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.28
DSS	4.59 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.18
LIVE	4.36 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.56 ± 0.19
HEAT	3.97 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.17
LYSOZYME	4.11 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.17
<b>P-value</b>	0.0234	0.7192

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

- 실험 식이에 따른 군간 간, 맹장의 체중 대비 무게를 Table 18에 나타내었음. 간의 경우 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 증가하였음. 모든 시험시료 공급 군에서 DSS군 대비 감소하는 경향을 보였고, 특히 HEAT군은 유의적으로 감소하여 CON군 수준의 무게를 유지함. 맹장 무게의 경우 군 간 유의적인 차이가 없었음.

(다) DAI(Disease Activity Index) 변화

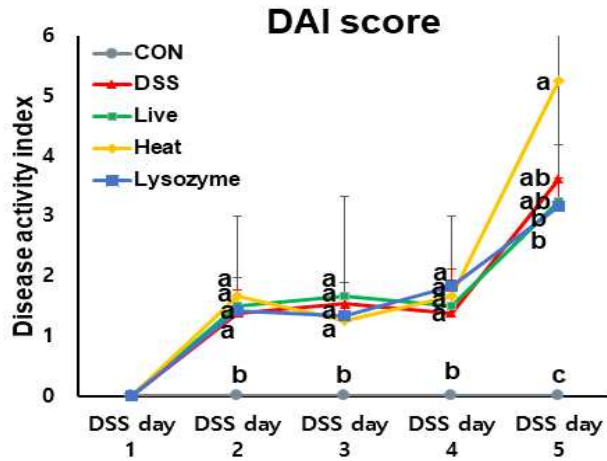


Figure 49. DAI(Disease activity index) score.

Table 19. DAI(Disease activity index) score.

Group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
CON	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
DSS	0.00 ± 0.00	1.38 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.62 ± 0.58 <sup>ab</sup>
LIVE	0.00 ± 0.00	1.50 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.65 <sup>b</sup>
HEAT	0.00 ± 0.00	1.67 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.26 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.83 <sup>a</sup>
LYSOZYME	0.00 ± 0.00	1.42 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.17 ± 0.48 <sup>b</sup>
<b>P-value</b>	-	0.0110	0.0038	0.0001	0.0002

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

- Weight loss, stool consistency, bleeding 총 3가지 항목으로 DSS 공급기간 동안 대장염 증상을 점수화한 DAI 결과를 Table 19과 Figure 49에 제시하였음. DSS 공급 5일 차에서 LIVE군과 LYSOZYME군의 DSS군 대비 점수가 낮았으나 유의적인 차이는 없었음. HEAT군은 DSS군 대비 점수가 높은 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었음.



(라) 대장 조직의 조직병리학적 특징 관찰 (H&E staining)

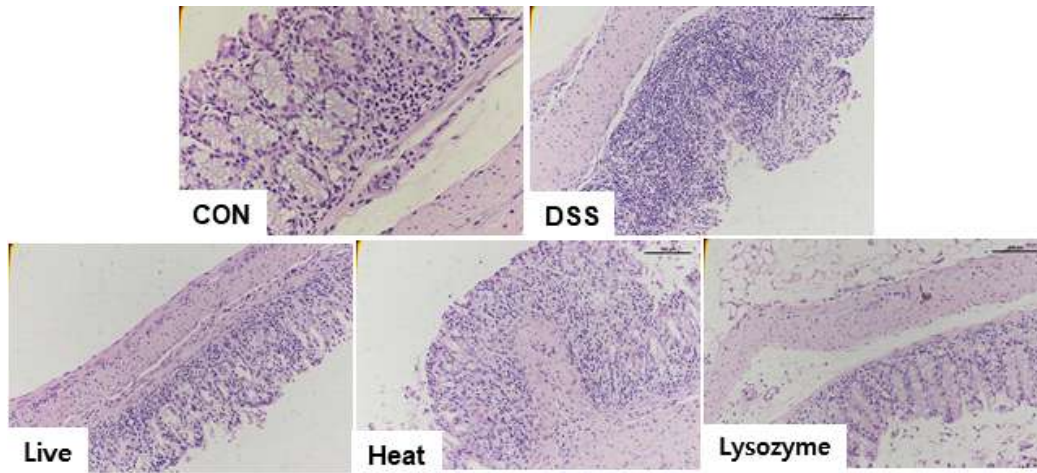


Figure 50. H&E staining of experimental animals.

Table 20. Histological score of colon rectum.

Group	Inflammatory cell infiltration	Epithelial change	Mucosal architecture	Total
CON	2.67 ± 0.33	3.67 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.33 ± 1.33 <sup>c</sup>	8.67 ± 1.45 <sup>b</sup>
DSS	4.20 ± 0.20	4.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	5.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	17.20 ± 0.20 <sup>a</sup>
LIVE	4.00 ± 0.32	4.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.20 <sup>ab</sup>	16.80 ± 0.20 <sup>a</sup>
HEAT	3.60 ± 0.40	4.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.00 ± 1.00 <sup>ab</sup>	15.60 ± 1.40 <sup>a</sup>
LYSOZYME	3.60 ± 0.40	2.20 ± 0.73 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.98 <sup>bc</sup>	11.60 ± 1.57 <sup>b</sup>
P-value	0.1004	0.0083	0.0259	0.0003

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

- CON군(n=7)에서 3마리, 나머지군(n=12)에서 각각 5마리의 동물 대장 조직에서 DSS에 의한 조직병리학적 병변을 평가하기 위해 H&E staining을 실시함. 분석 결과를 inflammatory cell infiltration, epithelial change(hyperplasia, goblet cell loss, cryptitis, crypt abscesses, erosion), mucosal architecture(ulceration, granulation tissue, irregular crypts, crypt loss) 평가항목으로 점수화하여 Table 20에 나타내었음. 모든 항목에서 DSS 공급 군들과 CON군 간의 유의적인 차이를 보임. Epithelial change의 경우 LYSOZYME군의 점수가 다른 군들에 비해 유의적으로 낮았음. Mucosal architecture의 경우 DSS군에서 CON군 대비 점수가 유의적으로 높았고, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. Inflammatory cell infiltration의 경우 군간 유의적인 차이는 없었음. Total score는 LYSOZYME군이 DSS군 대비 점수가 유의적으로 낮았고, DSS 공급 군들 중 조직 손상이 가장 적음을 알 수 있었음.

(마) Gut microbiota analysis

① Alpha-diversity of gut microbiota

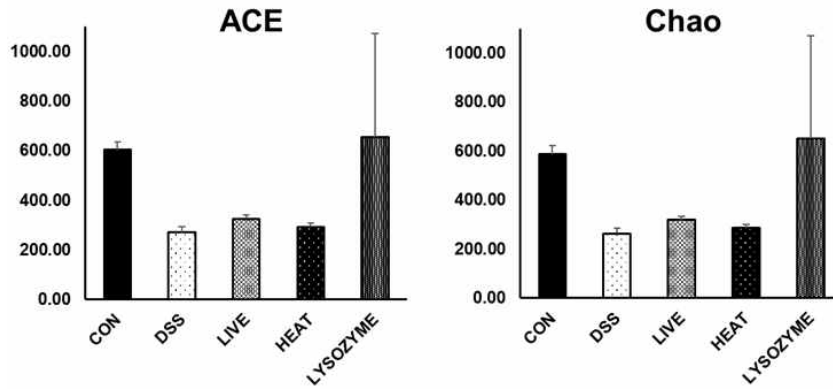


Figure 51. Alpha-diversity of gut microbiota.

Table 21. Alpha-diversity of gut microbiota.

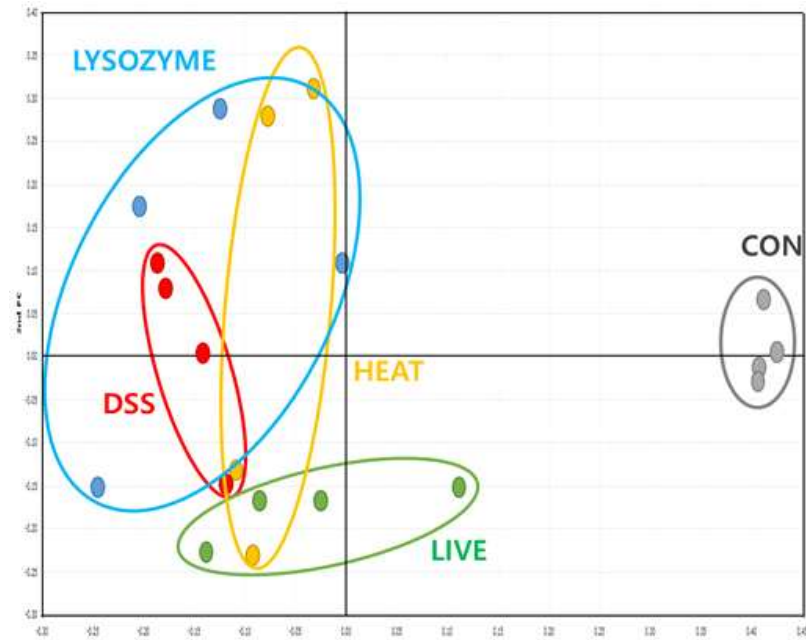
Group	ACE	Chao
CON	603.32 ± 33.49	587.22 ± 33.90
DSS	270.17 ± 23.64	263.65 ± 22.38
LIVE	325.67 ± 13.89	319.29 ± 14.32
HEAT	291.92 ± 14.74	286.47 ± 14.67
LYSOZYME	654.65 ± 419.12	651.16 ± 418.47
P-value	0.4594	0.4595

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

- 장내 미생물 다양성을 확인하기 위해 alpha-diversity 지표인 Chao와 ACE index 결과를 Figure 51과 Table 21에 제시하였음. 장내 미생물 다양성은 군 간 유의적인 차이가 없었음.

② PCoA

장내 미생물 군별 분포를 PCoA를 통해 살펴본 결과를 Figure 52에 제시하였음. 장내 미생물의 분포는 모든 DSS 공급 군이 CON군 대비 분리된 분포를 보였으며, 시험시료 공급 군들 중 LIVE군이 DSS군과 다른 별개의 분포를 보였음.



**Figure 52. PCoA analysis.**

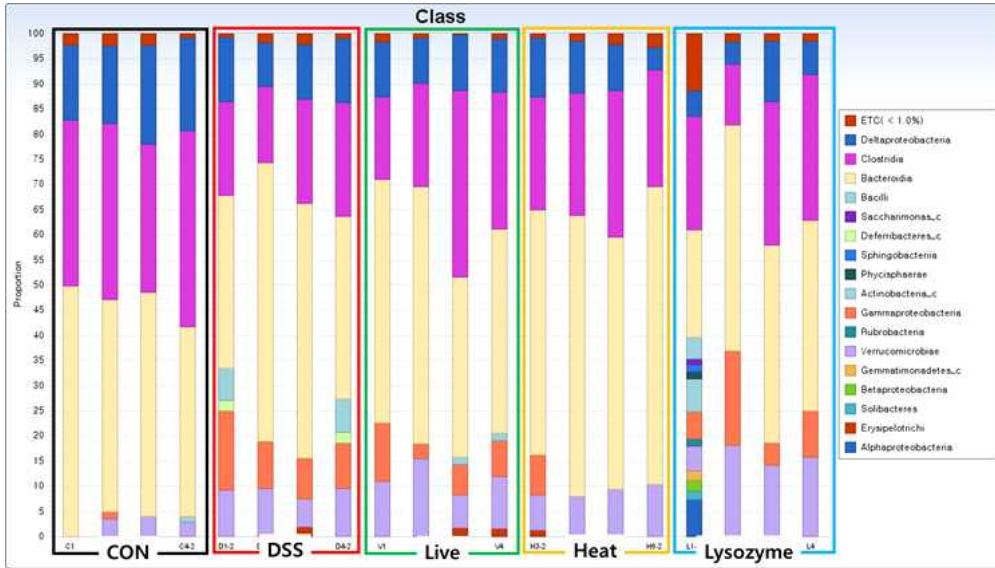
Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

### ③ Gut microbiota composition

미생물의 분류법은 다음과 같이 Phylum(문) - Class(강) - Order(목) - Family(과) - Genus(속)-Species(종)으로 분류할 수 있음. 16s rRNA sequencing을 통해 실험동물의 대장 미생물 균총을 분석하였으며 이를 바탕으로 각 level 별 미생물 균총 변화를 확인하고 통계분석을 수행하였음. 선택 기준은 전체 균총의 1% 이상으로 하였음.

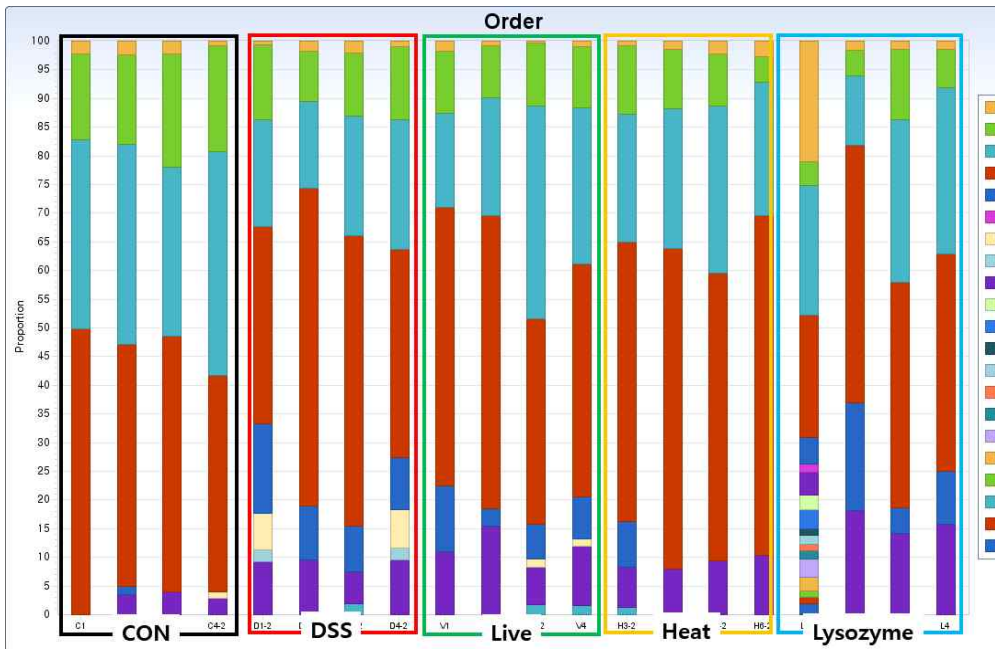
### ㉞ Taxonomy level별 microbiota composition

장내 미생물의 microbiota composition을 level 차례대로 Figure 53, Figure 54, Figure 55, Figure 56, Figure 57, Figure 58으로 제시하였음. CON군(n=7), DSS군(n=12), LIVE군(n=12), HEAT군(n=12), LYSOZYME군(n=12)에서 각각 4개씩 분석을 진행하였음.



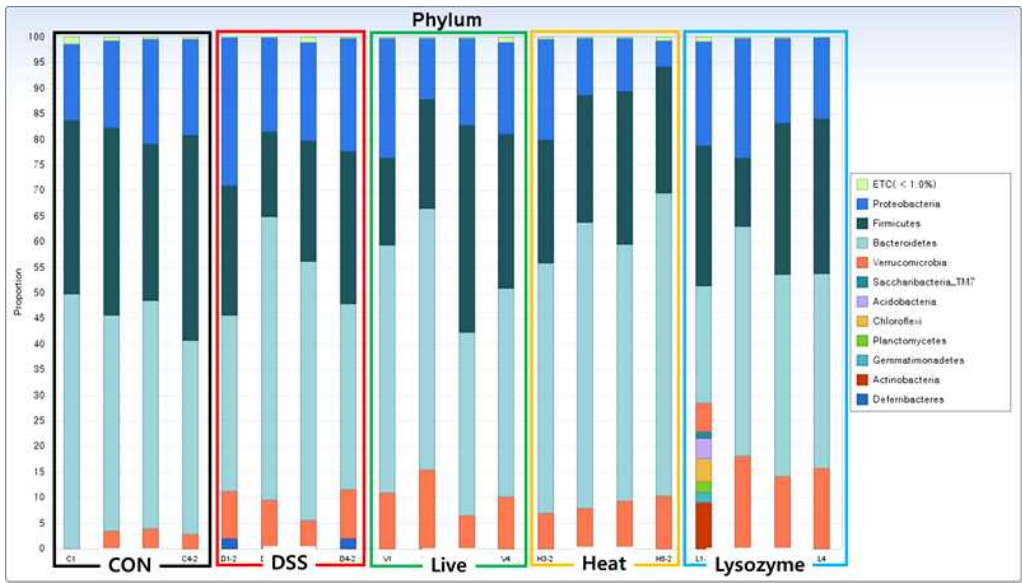
**Figure 53. Gut microbiota composition in class level.**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).



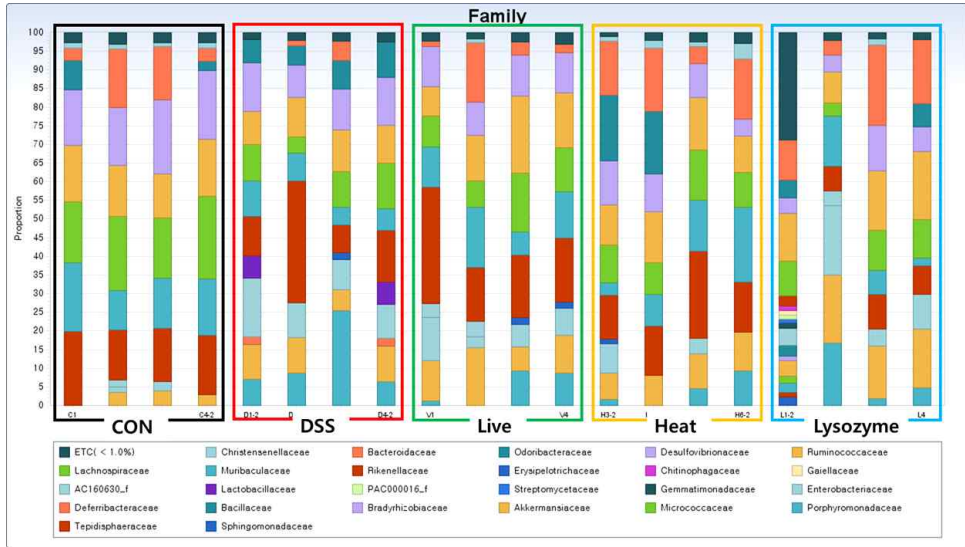
**Figure 54. Gut microbiota composition in order level.**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).



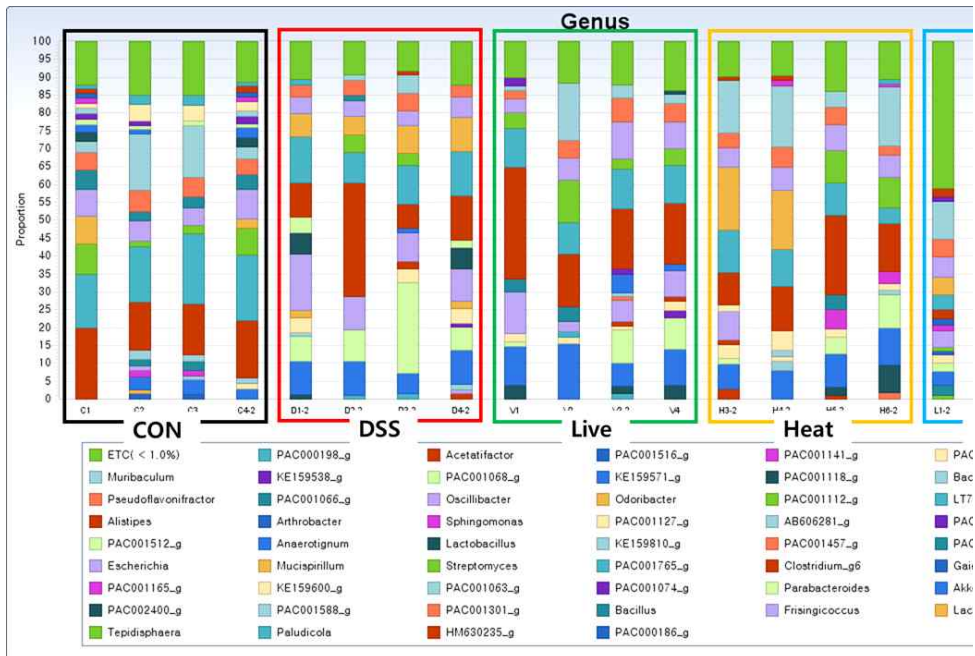
**Figure 55. Gut microbiota composition in phylum level.**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).



**Figure 56. Gut microbiota composition in family level.**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).



**Figure 57. Gut microbiota composition in genus level.**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

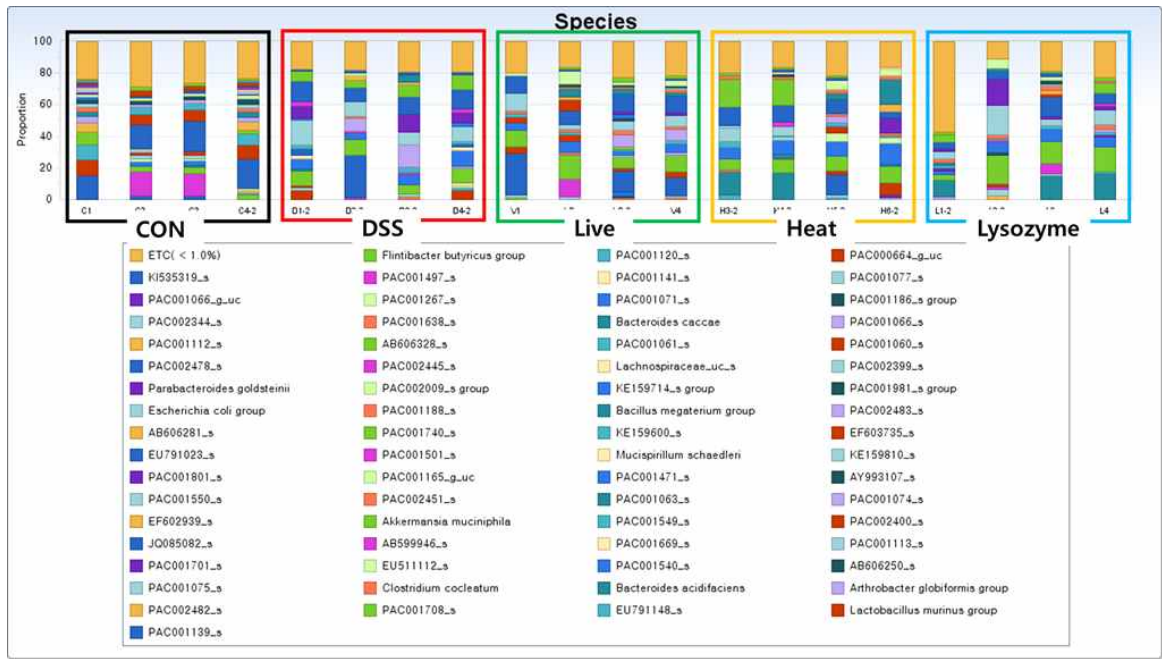


Figure 58. Gut microbiota composition in species level.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

⊕ DSS 제공으로 유의적인 변화가 있던 taxa에서 시험시료 공급 효과

CON군 대비 DSS군에서 통계적으로 유의하게 증가 또는 감소한 taxa를 level별로 정리하였고 동시에 시험시료 공급의 효과를 아래 Table 22에 제시하였음.

Table 22. Changes of specific taxa abundances in DSS-treated mice

Level	Name	CON군 대비 DSS군 증감	시료 공급 효과 있었던 군
Phylum	<i>Deferribacteres</i>	↑	LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군
	<i>Verrucomicrobia</i>	↑	
	<i>Tenericutes</i>	↓	
Class	<i>Gammaproteobacteria</i>	↑	HEAT군
	<i>Deferribacteres_c</i>	↑	LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군
	<i>Verrucomicrobiae</i>	↑	
	<i>Deferribacteres_c</i>	↑	
	<i>Clostridia</i>	↓	
	<i>Coriobacteriia</i>	↓	
	<i>Mollicutes</i>	↓	
Order	<i>Enterobacterales</i>	↑	HEAT군

	<i>Deferribacterales</i>	↑	LIVE균, HEAT균, LYSOZYME균
	<i>Verrucomicrobiales</i>	↑	
	<i>Clostridiales</i>	↓	
	<i>Acholeplasmatales</i>	↓	
	<i>Desulfovibrionales</i>	↓	
	PAC001057_o	↓	
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>	↑	HEAT균
	<i>Akkermansiaceae</i>	↑	
	<i>Deferribacteraceae</i>	↑	LIVE균, HEAT균, LYSOZYME균
	<i>Acholeplasmataceae</i>	↓	
	<i>Christensenellaceae</i> PAC000197_f	↓	HEAT균
	<i>Mogibacterium_f</i>	↓	
	<i>Desulfovibrionaceae</i>	↓	
	<i>Peptococcaceae</i>	↓	
	<i>Lachnospiraceae</i>	↓	
Genus	<i>Bilophila</i> <i>Mucispirillum</i> PAC001588_g	↑	LIVE균, HEAT균, LYSOZYME균
	<i>Escherichia</i>	↑	HEAT균
	<i>Akkermansia</i>	↑	
	HM630235_g	↑	
	PAC001524_g	↑	LIVE균, HEAT균
	<i>Acetatifactor</i>	↓	
	<i>Alistipes</i>	↓	
	Harryflintia	↓	LIVE균, HEAT균, LYSOZYME균
	Clostridium_g24	↓	
	Agathobaculum	↓	
	Acholeplasma_g2	↓	
	Acetivibrio_g1	↓	
	PAC001092_g	↓	HEAT균, LYSOZYME균
	PAC001141_g	↓	HEAT균
	Species	<i>Akkermansia muciniphila</i>	↑
<i>Escherichia coli group</i>		↑	HEAT균



<i>Mucispirillum schaedleri</i> PAC001508_s	↑	LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군
EU507515_s EU791148_s PAC001471_s PAC001488_s group	↑	LIVE군, LYSOZYME군
PAC001524_s	↑	LIVE군, HEAT군
<i>Acetatifactor_uc</i>	↓	
<i>Akkermansia_uc</i>	↓	
<i>Alistipes_uc</i>	↓	
EU511827_s	↓	LYSOZYME군
<i>Oscillibacter_uc</i>	↓	
PAC001128_s PAC001141_s PAC002511_s group	↓	HEAT군
<i>Pseudoflavonifactor_uc</i>	↓	
<i>Roseburia intestinalis</i> group	↓	

- DSS에 의한 변화를 완화시키는 빈도를 비교해본 결과, HEAT군(21번)> LIVE군(16번)> LYSOZYME군(15번)으로 나타났음. 또한 HEAT군은 DSS로 인해 증가한다고 알려진 *Proteobacteria* phylum의 하위 level에 속하는 taxa(Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, Escherichia, E. coli)의 증가를 억제한 것으로 나타났음.

#### Ⓢ LDA score

- 특정 군의 그룹 간 상대적 abundance를 비교하는 LDA score결과를 분류체계가 높은 순으로 정렬한 뒤 동일한 수준에서 값이 큰 순서로 정리하여 Figure 59에 제시하였음. CON군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 class level에서 *Deltaproteobacteria*, order level에서 *Desulfovibrionales*, family level에서 *Desulfovibrionaceae* 으로 나타났음. DSS군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 order level에서 *Enterobacteriales*, family level에서 *Enterobacteriaceae*, genus level에서 *Escherichia*, species level에서 *Escherichia coli* group이 있었음. LIVE군에서 상대적으로 풍부했던 군은 family level의 *Rikenellaceae*, genus level의 *Alistipes*으로 나타났음. HEAT군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 family level에서 *Christensenellaceae*이었고 LYSOZYME군에서 상대적으로 다른 군과 비교하여 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Verrucomicrobia*, class level에서 *Verrucomicrobiae*, *Gammaproteobacteria*, order level에서 *Verrucomicrobiales*, family level에서 *Akkermansiaceae*, genus level에서 *Akkermansia*, species level에서 *Akkermansia*

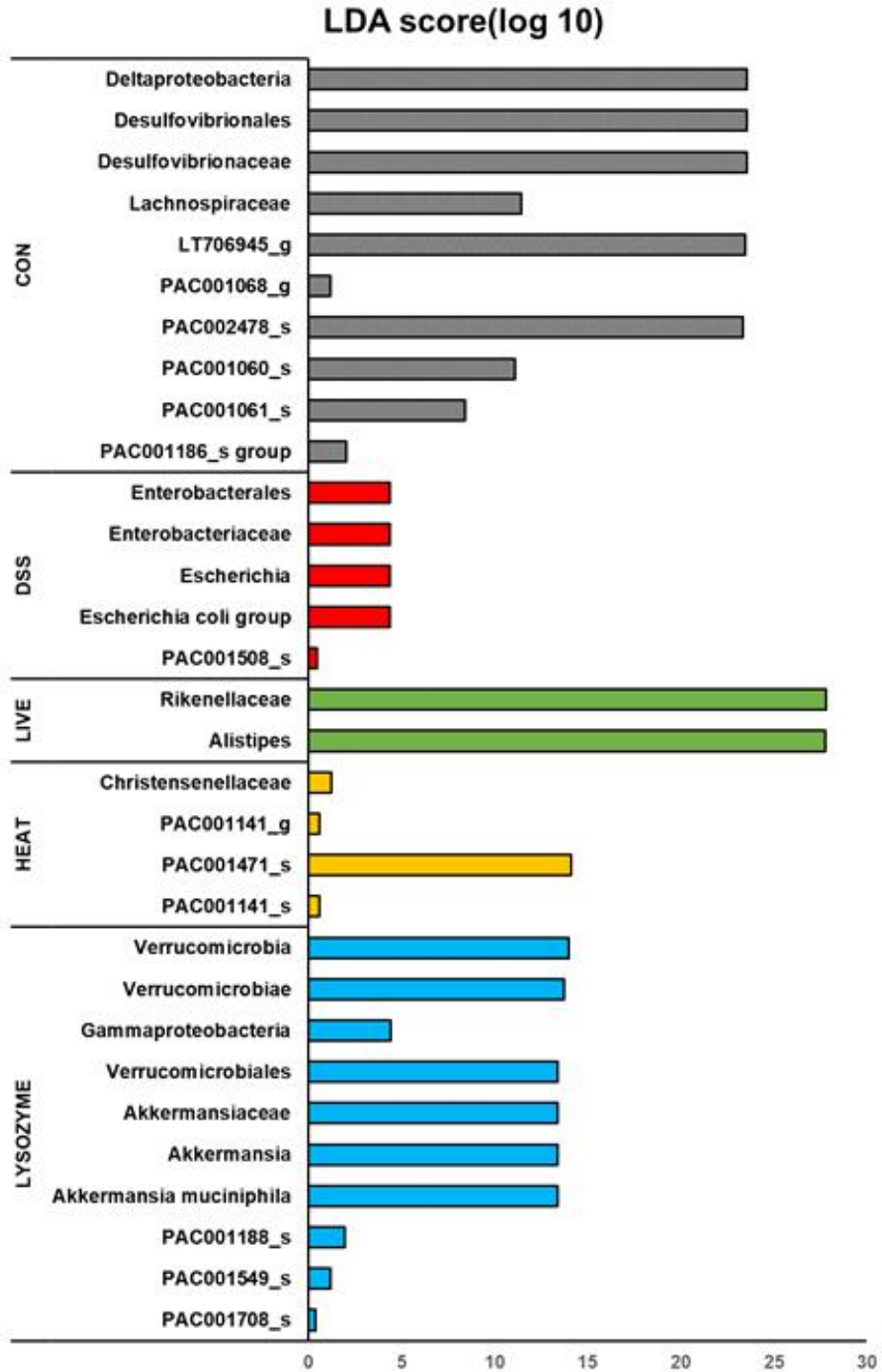


Figure 59. LDA score.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*L. paracasei* IBS041), Heat: heat-killed bacteria(*L. paracasei* IBS041), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. paracasei* IBS041).

*muciniphila*으로 나타났음.

(3) DSS로 유도된 대장염 모델에서 *Bifidobacterium bifidum* BGN4 효능 평가 (SET3)

(가) 체중 변화

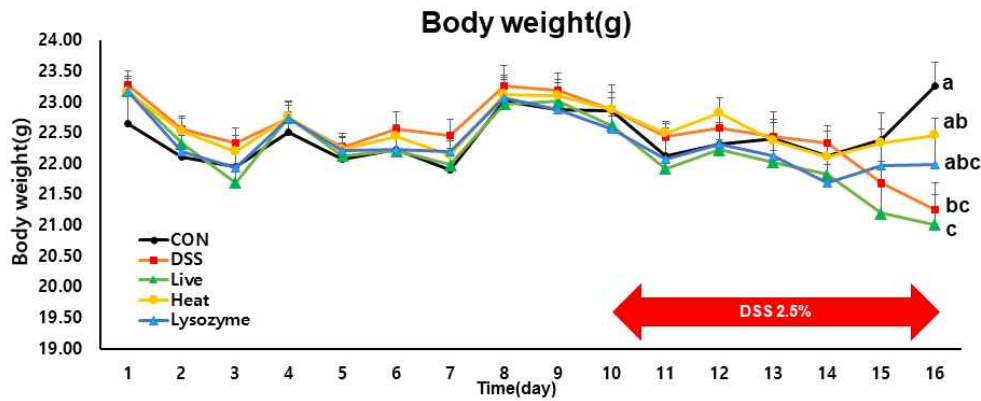


Figure 60. Body weight changes of experimental animals.

Table 23. Final body weight of experimental animals.

Group	Body weight (g)
CON	23.26 ± 0.39 <sup>a</sup>
DSS	21.26 ± 0.43 <sup>bc</sup>
LIVE	21.02 ± 0.48 <sup>c</sup>
HEAT	22.46 ± 0.27 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	22.00 ± 0.44 <sup>abc</sup>
p-value	0.0007

Means with different letters are significantly different at p-value < 0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- DSS 공급으로 대장염이 유도됨에 따라 실험동물의 체중 감소가 나타나기 때문에 실험 기간 동안 일별 체중을 확인하였음. 체중 변화를 관찰한 결과를 Figure 60에, 16일자 체중을 비교한 결과를 Table 23에 제시하였음. DSS 공급 6일차(실험 16일차)에 DSS군에서 CON군 대비 체중이 유의적으로 감소하였음. HEAT군과 LYSOZYME군의 체중은 DSS군 대비 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었음.

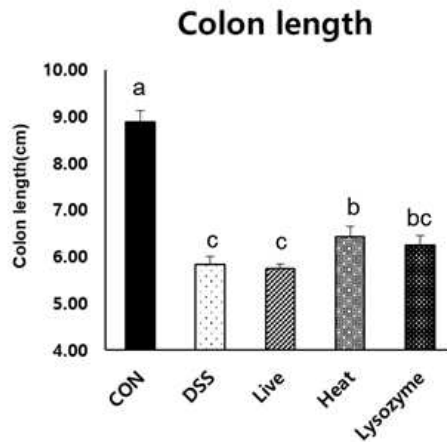
(나) 대장 길이 비교

Means with different letters are significantly different at

**Table 24. Length of colon.**

Group	Colon length (cm)
CON	8.89 ± 0.25 <sup>a</sup>
DSS	5.84 ± 0.16 <sup>c</sup>
LIVE	5.74 ± 0.10 <sup>c</sup>
HEAT	6.43 ± 0.21 <sup>b</sup>
LYSOZYME	6.25 ± 0.20 <sup>bc</sup>
p-value	<.0001

p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).



**Figure 61. Length of colon.**

- DSS 공급으로 대장염이 유도되는 경우 실험동물 대장 길이 감소가 나타나기 때문에 실험동물 희생 시 대장 길이를 측정하였음. DSS 제공으로 변화된 대장 길이 비교 결과를 Figure 61과 Table 24에 제시하였음. 모든 DSS 공급군에서 CON군 대비 유의적으로 대장 길이가 감소하였으나, HEAT군이 DSS군 대비 유의적으로 길이가 길었고, LYSOZYME군은 긴 경향을 보였음.

(다) DAI(Disease Activity Index) 변화

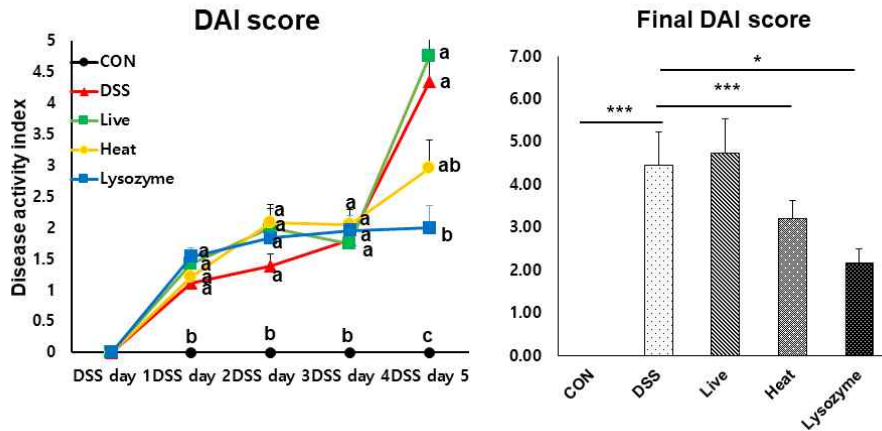


Figure 62. DAI score change & final DAI score.

Table 25. DAI scores in experimental animals.

Group	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
CON	0.00±0.00	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
DSS	0.00±0.00	1.23±0.12 <sup>a</sup>	1.46±0.18 <sup>a</sup>	1.92±0.24 <sup>a</sup>	4.46±0.78 <sup>a***</sup>
LIVE	0.00±0.00	1.50±0.15 <sup>a</sup>	2.17±0.41 <sup>a</sup>	1.92±0.23 <sup>a</sup>	4.75±0.80 <sup>a</sup>
HEAT	0.00±0.00	1.42±0.23 <sup>a</sup>	2.17±0.21 <sup>a</sup>	2.17±0.24 <sup>a</sup>	3.21±0.43 <sup>ab***</sup>
LYSOZYME	0.00±0.00	1.58±0.15 <sup>a</sup>	1.92±0.29 <sup>a</sup>	2.00±0.25 <sup>a</sup>	2.17±0.34 <sup>b*</sup>
p-value	-	0.0001	0.0251	0.0001	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

\* Significantly different from the DSS group (\*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.001)

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Weight loss, stool consistency, bleeding을 평가해 대장염 증상의 심각도를 평가하는 DAI score를 DSS 제공기간에 평가하였고 그 결과를 Figure 62와 Table 25에 제시하였음. DAI score는 DSS 공급 5일차에 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. LIVE군은 DSS군 대비 유의적인 차이가 없었음.

(라) 대장 조직의 병리학적 분석

① 조직 손상도 평가(Histological score)

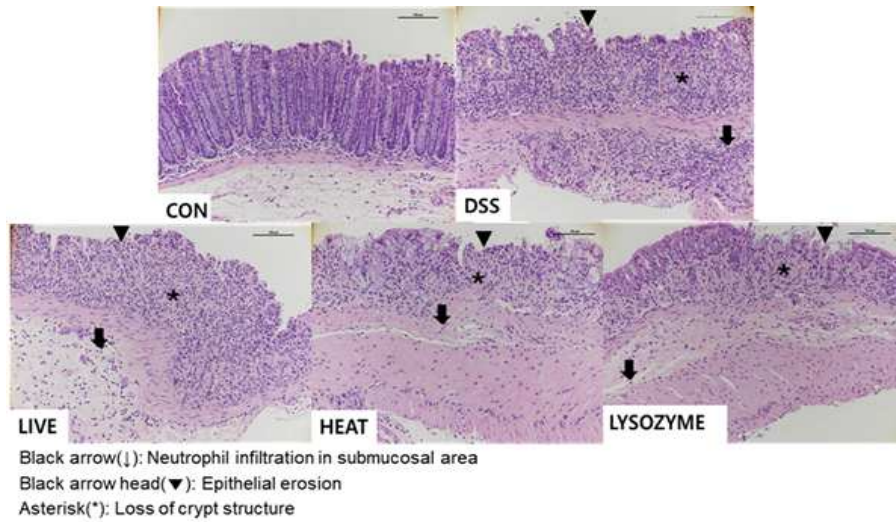


Figure 63. H&E staining of colon rectum.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

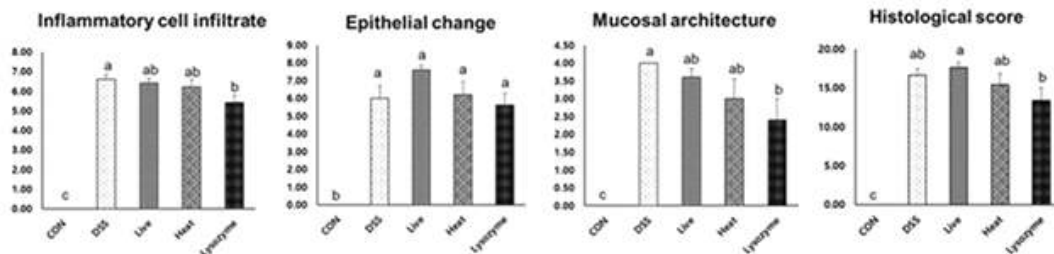


Figure 64. Histological score of colon rectum.

Table 26. Histological score of colon rectum.

Group	Inflammatory cell infiltrate	Epithelial change	Mucosal architecture	Histological score
CON	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
DSS	6.60 ± 0.24 <sup>a</sup>	6.00 ± 0.71 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	16.60 ± 0.87 <sup>ab</sup>
LIVE	6.40 ± 0.24 <sup>ab</sup>	7.60 ± 0.24 <sup>a</sup>	3.60 ± 0.24 <sup>ab</sup>	17.60 ± 0.68 <sup>a</sup>
HEAT	6.20 ± 0.37 <sup>ab</sup>	6.20 ± 0.73 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.55 <sup>ab</sup>	15.40 ± 1.44 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	5.40 ± 0.40 <sup>b</sup>	5.60 ± 0.68 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.60 <sup>b</sup>	13.40 ± 1.57 <sup>b</sup>
<b>p-value</b>	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001

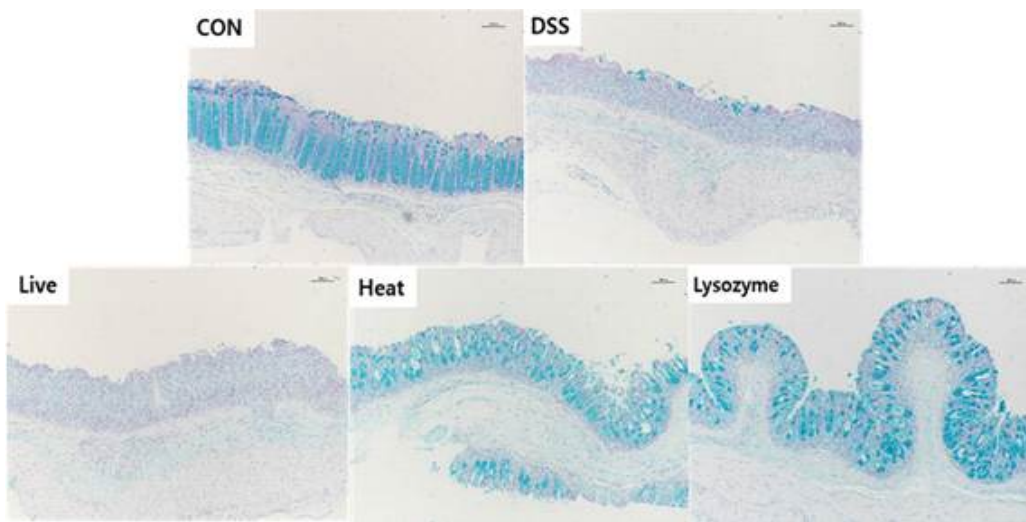
Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- DSS 공급에 의한 조직 손상도를 확인하기 위하여 대장 결장 부위를 H&E 염색하여 염증

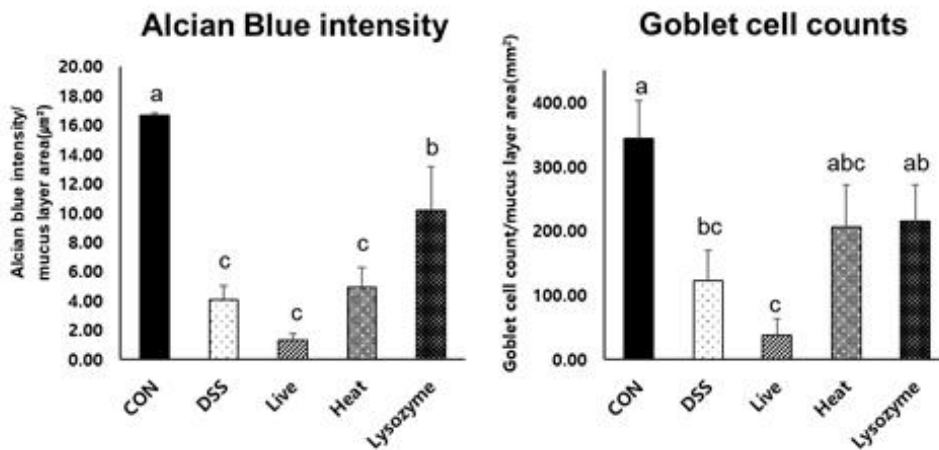
세포 침윤(inflammatory cell infiltrate), 장 상피 변형(epithelial changes), 점막 구조 변화(mucosal architecture) 총 3가지 항목으로 조직 손상도를 평가하였고 그 결과를 Figure 64와 Table 26에 제시하였음. 모든 평가 항목에서 CON군 대비 DSS군에서 유의적으로 점수가 높아 DSS 제공이 유의적으로 대장 조직을 손상시켰음을 확인할 수 있었음. Inflammatory cell infiltrate과 mucosal architecture에서 LYSOZYME 군이 DSS군 대비 유의적으로 점수가 낮았고, HEAT군과 LIVE군은 낮은 경향을 보였음. Epithelial changes은 시험시료 공급에 영향을 받지 않았음. Total score는 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 조직 손상도가 낮은 경향을 보였음.

## ② Mucus layers integrity 확인



**Figure 65. Alcian blue staining of colon rectum.**

Means with different letters are significantly different at  $p$ -value $<0.05$  as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.



**Figure 66. Alcian blue intensity and goblet cell counts**

Table 27. Alcian blue intensity and goblet cell counts

Group	Alcian blue intensity (%)	Goblet cell counts
CON	16.68 ± 0.17 <sup>a</sup>	343.66 ± 59.16 <sup>a</sup>
DSS	4.09 ± 0.97 <sup>c</sup>	122.11 ± 47.94 <sup>bc</sup>
LIVE	1.30 ± 0.47 <sup>c</sup>	37.69 ± 25.83 <sup>c</sup>
HEAT	4.94 ± 1.35 <sup>c</sup>	206.40 ± 66.03 <sup>abc</sup>
LYSOZYME	10.20 ± 2.95 <sup>b</sup>	214.63 ± 57.25 <sup>ab</sup>
p-value	0.0001	0.0177

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- DSS 공급에 의한 점액층(mucus layers) 손상도 확인을 위해 대장 결장 부위에서 alcian blue 염색을 진행하여 alcian blue intensity와 goblet cell 개수를 측정된 결과를 Figure 66와 Table 27에 제시하였음. 면적당 alcian blue intensity는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았으며 LIVE군, HEAT군은 유의적인 차이가 없었음. Mucin을 생성하는 goblet cell 개수를 alcian blue positive cell counting을 통해 확인해본 결과, DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 적었고, HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 많은 경향을 보였으며 LIVE군은 유의적인 차이가 없었음.

(마) 대장 조직 occludin, E-cadherin, claudin-1 단백질 발현 분석

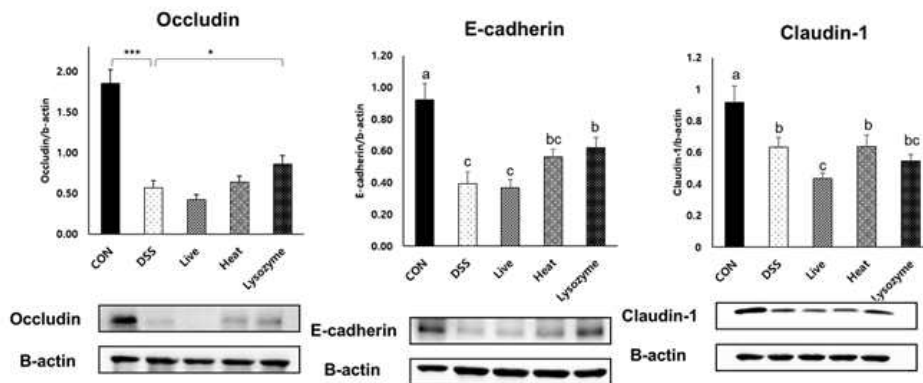


Figure 67. Colonic occludin, E-cadherin and claudin-1 protein expressions

Table 28. Colonic occludin, E-cadherin and claudin-1 protein expression

Group	Occludin	E-cadherin	Claudin-1
CON	1.85 ± 0.17	0.92 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.10 <sup>a</sup>
DSS	0.57 ± 0.09 <sup>***</sup>	0.39 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>b</sup>
	0.06	0.05 <sup>c</sup>	0.04 <sup>c</sup>



LIVE	0.42 ±	0.37 ±	0.43 ±
HEAT	0.64 ± 0.08	0.56 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.64 ± 0.08 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.86 ± 0.11*	0.62 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>bc</sup>
<b>p-value</b>	<.0001	<.0001	0.0002

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

\* Significantly different from the DSS group (\*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.001)

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 대장 조직에서 junction protein 발현을 측정된 결과를 Figure 67와 Table 28에 제시하였음. Tight junction protein인 occludin, claudin-1과 adhesion protein인 E-cadherin 발현은 모두 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. Occludin은 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 발현이 높았고, LIVE군과 HEAT군은 유의적인 차이가 없었음. E-cadherin은 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 발현이 높았고, HEAT군은 높은 경향을 보였고, LIVE군은 유의적인 차이가 없었음. Claudin-1 발현은 시험시료 공급에 영향을 받지 않았음.

#### (바) 혈청 CD14 농도 분석

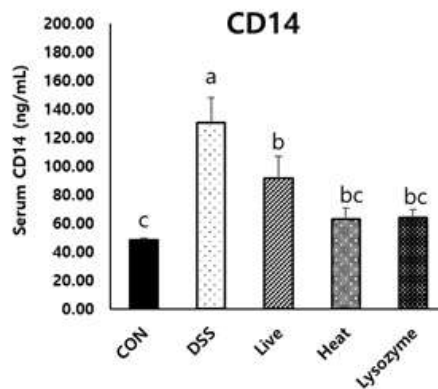


Figure 68. Serum CD14 concentration

Table 29. Serum CD14 concentration

Group	Serum CD14 (ng/mL)
CON	48.39 ± 1.08 <sup>c</sup>
DSS	130.65 ± 17.22 <sup>a</sup>
LIVE	91.77 ± 15.41 <sup>b</sup>
HEAT	62.96 ± 7.63 <sup>bc</sup>
LYSOZYME	64.09 ± 5.55 <sup>bc</sup>
<b>p-value</b>	0.0002

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 장벽의 기능을 확인하기 위하여 혈액으로 유입된 LPS 농도를 간접적으로 확인할 수 있는 CD14의 농도를 혈청에서 측정한 결과를 Figure 68와 Table 29에 제시하였음. 혈청 CD14 농도는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, 모든 시험시료 공급군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. 특히, HEAT군과 LYSOZYME군은 CON군 수준의 농도를 보여 장벽의 기능이 잘 유지되었음을 확인할 수 있었음.

(사) 대장 조직 NLRP6, caspase-1, IL-18 단백질 발현 분석

Table 30. Colonic NLRP6, caspase-1 and IL-18 protein expressions

Group	NLRP6	Caspase-1	IL-18
CON	1.11 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.06 <sup>c</sup>
DSS	0.31 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.44 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.10 <sup>c</sup>
LIVE	0.24 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.07 <sup>c</sup>
HEAT	0.49 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.07 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.57 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.11 <sup>a</sup>
p-value	<.0001	<.0001	<.0001

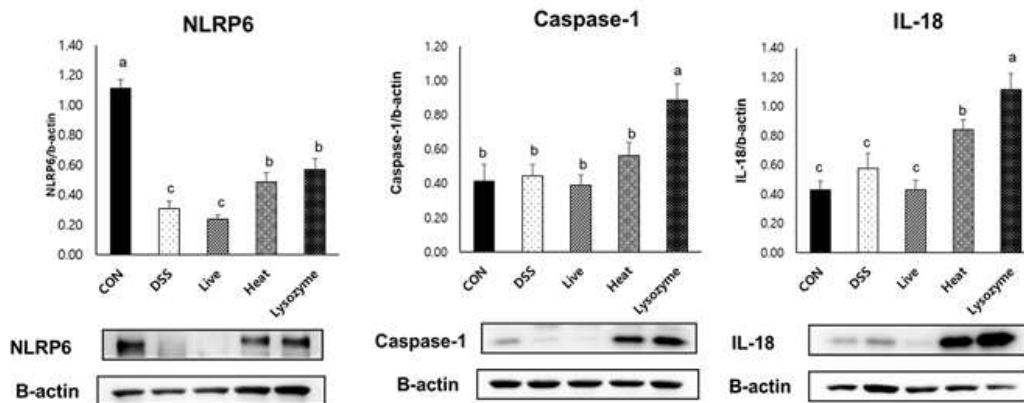


Figure 69. Colonic NLRP6, caspase-1 and IL-18 protein expressions

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 대장 조직에서 NLRP6, caspase-1, IL-18 단백질 발현 측정 결과를 Figure 69, Table 30에 제시하였음. NLRP6 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았던 반면, HEAT군과 LYSOZYME군은 DSS군 대비 유의적으로 높았음. Caspase-1과 IL-18 발현은 CON군 대비 DSS군에서 유의차가 없었으나, Caspase-1 발현은 LYSOZYME군에서 LIVE군 대비 유의적으로 높았고, IL-18 발현은 HEAT군과 LYSOZYME군에서 LIVE군 대비 유의적으로 높았

음.

(아) 대장 조직 p-IκBα, p-MAPK 단백질 발현 분석

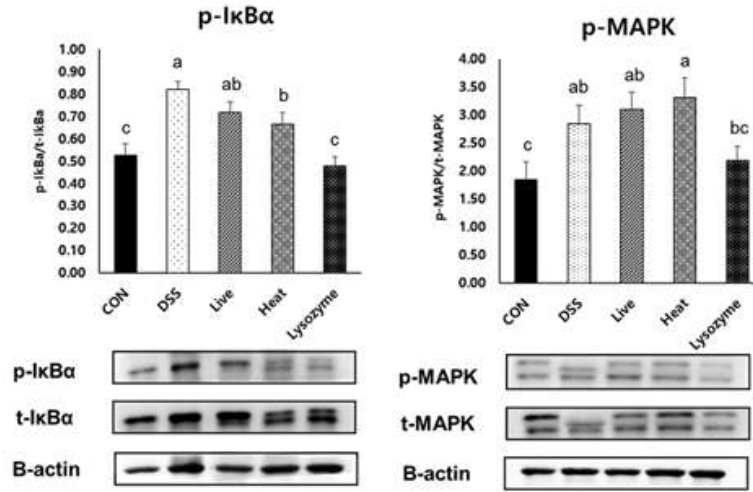


Figure 70. Colonic p-IκBα and p-MAPK protein expressions

Table 31. Colonic p-IκBα and p-MAPK protein expressions

Group	p-IκBα	p-MAPK
CON	0.53 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.84 ± 0.32 <sup>c</sup>
DSS	0.82 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.33 <sup>ab</sup>
LIVE	0.72 ± 0.05 <sup>ab</sup>	3.09 ± 0.31 <sup>ab</sup>
HEAT	0.66 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.31 ± 0.35 <sup>a</sup>
LYSOZYME	0.48 ± 0.04 <sup>c</sup>	2.19 ± 0.25 <sup>bc</sup>
<b>p-value</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0161</b>

Means with different letters are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 대장 조직에서 염증에 의한 NF-κB 활성화 정도를 파악하기 위해 p-IκBα와 p-MAPK 발현을 확인한 결과를 Figure 70과 Table 31에 제시하였음. p-IκBα와 p-MAPK 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았음. p-IκBα 발현은 HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았으며 특히, LYSOZYME군은 CON군 수준으로 낮았음. LIVE군의 p-IκBα 발현은 DSS군 대비 낮은 경향을 보였음. p-MAPK 발현은 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 낮은 경향을 보였고, LIVE군과 HEAT군은 유의차가 없었음.

(자) 대장 조직 COX2, IL-1β 단백질 발현 분석

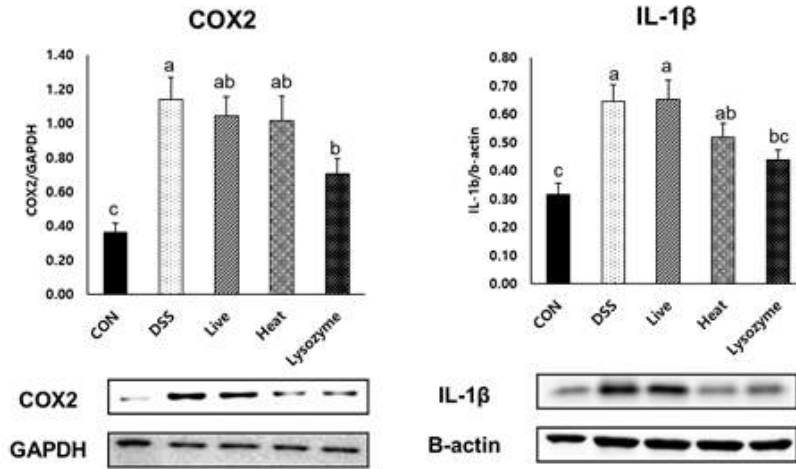


Figure 71. Colonic COX2 and IL-1 $\beta$  protein expressions

Table 32. Colonic COX2 and IL-1 $\beta$  protein expressions

Group	COX2	IL-1 $\beta$
CON	0.36 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>c</sup>
DSS	1.14 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>a</sup>
LIVE	1.04 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>a</sup>
HEAT	1.01 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	0.70 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>bc</sup>
p-value	0.0064	0.0004

Means with different superscripts are significantly different at p-value < 0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 대장 조직에서 NF- $\kappa$ B 활성화에 의한 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$  과 염증성 사이토카인에 의해 만들어지는 inducible enzyme인 COX2 단백질 발현을 확인한 결과를 Figure 71와 Table 32에 제시하였음. COX2 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았으며, LYSOZYME군에서 유의적으로 DSS군 대비 낮았고, LIVE군과 HEAT군은 낮은 경향을 보였음. IL-1 $\beta$  발현 또한 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았으며, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았고, HEAT군은 낮은 경향을 보였으나 LIVE군은 유의적인 차이가 없었음.

(차) 대장 조직 Th1, Th2, Treg 전사인자 단백질 발현 분석

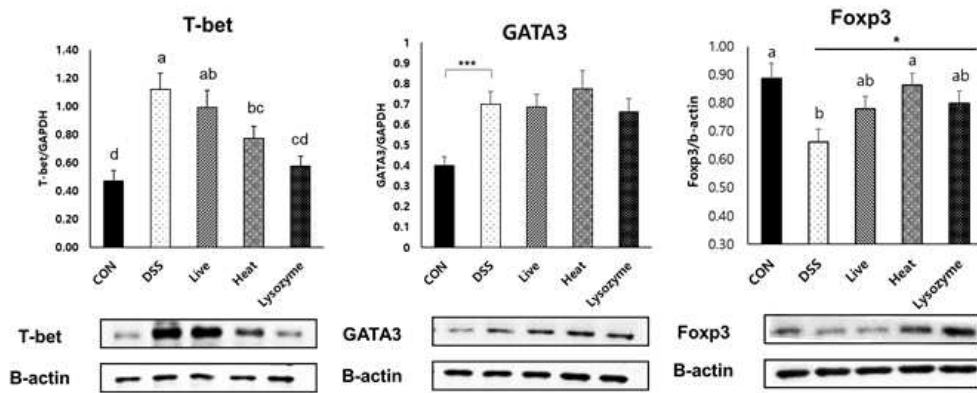


Figure 72. Colonic T-bet, GATA3 and Foxp3 protein expressions

Table 33. Colonic T-bet, GATA3 and Foxp3 protein expressions

Group	T-bet	GATA3	FOXP3
CON	0.47 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.40 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.05 <sup>b</sup>
DSS	1.12 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.06 <sup>a**</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>b</sup>
LIVE	0.99 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.04 <sup>ab</sup>
HEAT	0.77 ± 0.08 <sup>bc</sup>	0.77 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.04 <sup>a</sup>
LYSOZYME	0.58 ± 0.07 <sup>cd</sup>	0.66 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>ab*</sup>
p-value	<.0001	0.0153	0.0073

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

\* Significantly different from the DSS group (\*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.001)

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Th1 전사인자인 T-bet과 Th2 전사인자인 GATA3, Treg 전사인자인 FOXP3의 단백질 발현을 통해 T-helper cell의 분화 방향을 확인해 본 결과를 Figure 72과 Table 33에 제시하였음. T-bet 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. 특히 LYSOZYME군은 CON군 수준의 발현을 보였음. LIVE군은 DSS군 대비 낮은 경향을 보였음. GATA3 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았지만, 시험시료 공급에 영향을 받지 않았음. FOXP3 발현은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았고, HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 높았음. LIVE군은 DSS군 대비 높은 경향을 보였음.

(카) 혈청 IL-10 농도 분석

Table 34. Serum IL-10 concentration

Group	Serum IL-10 (ng/mL)
CON	16.36 ± 2.35 <sup>b</sup>

DSS	45.15 ± 8.43 <sup>a</sup>
LIVE	30.91 ± 3.92 <sup>ab</sup>
HEAT	27.60 ± 2.02 <sup>b</sup>
LYSOZYME	28.94 ± 2.58 <sup>b</sup>
<b>p-value</b>	<b>0.0083</b>

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

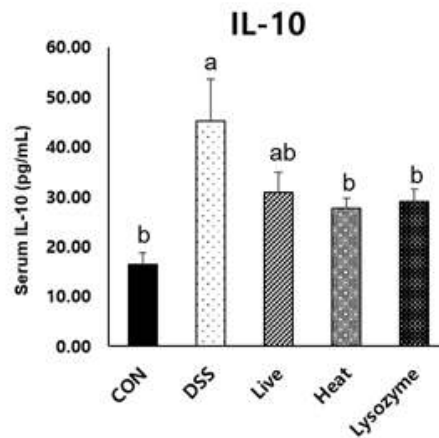


Figure 73. Serum IL-10 concentration

- 혈청 IL-10 농도 결과를 Figure 73과 Table 34에 제시하였음. 혈청 IL-10 농도는 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았으며, HEAT군과 LYSOZYME군은 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. LIVE군의 경우 DSS군 대비 유의적인 차이는 없었으나 낮은 경향을 보였음.

(타) Gut microbiota analysis

① Alpha-diversity of gut microbiota

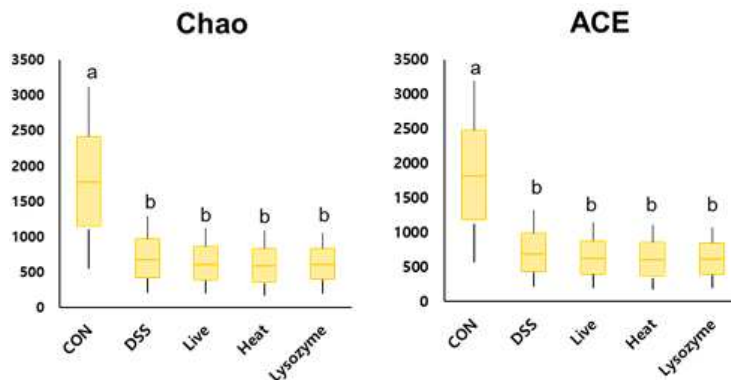


Figure 74. Alpha-diversity of gut microbiota

**Table 35. Alpha-diversity of gut microbiota**

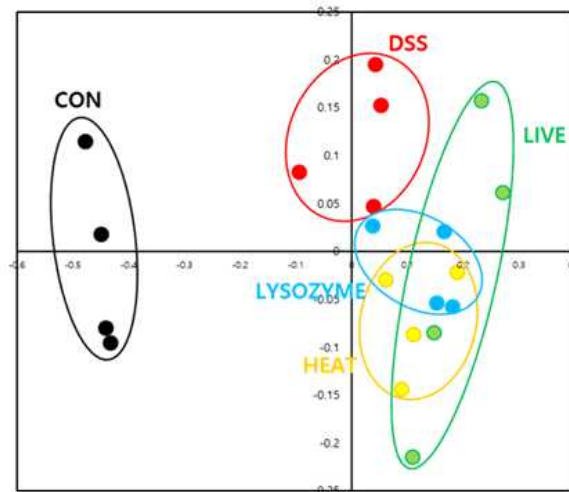
Group	Chao	ACE
CON	623.46 ± 31.48 <sup>a</sup>	639.22 ± 31.11 <sup>a</sup>
DSS	257.29 ± 28.2 <sup>b</sup>	264.12 ± 28.46 <sup>b</sup>
LIVE	223.66 ± 17.65 <sup>b</sup>	228.95 ± 17.00 <sup>b</sup>
HEAT	215.60 ± 18.99 <sup>b</sup>	221.21 ± 18.62 <sup>b</sup>
LYSOZYME	211.28 ± 7.98 <sup>b</sup>	215.52 ± 9.00 <sup>b</sup>
<b>p-value</b>	<.0001	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 장내 미생물 다양성을 확인하기 위해 alpha-diversity 지표인 Chao와 ACE index 결과를 Figure 74와 Table 35에 제시하였음. 장내 미생물 다양성은 모든 DSS 공급군에서 CON군 대비 유의적으로 감소하였음.

② PCoA



**Figure 75. PCoA analysis**

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 장내 미생물 군별 분포를 PCoA를 통해 살펴본 결과를 Figure 75에 제시하였음. DSS를 제공 받은 군들의 장내 미생물의 분포는 CON군 대비 분리된 분포를 보였으며, 시험시료 공급군의 경우 DSS군 대비 별개의 분포를 보였음. 시험시료를 공급한 LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군은 서로 겹치는 분포를 보였음.

### ③ Gut microbiota composition

미생물의 분류법은 다음과 같이 Phylum(문) - Class(강) - Order(목) - Family(과) - Genus(속)-Species(종)으로 분류할 수 있음. 16s rRNA sequencing을 통해 실험동물의 대장 미생물 균총을 분석하였으며 이를 바탕으로 각 level 별 미생물 균총 변화를 확인하고 통계분석을 수행하였음. 선택 기준은 전체 균총의 1% 이상으로 하였음.

### ㉞ Taxonomy level별 microbiota composition

장내 미생물의 microbiota composition을 level 차례대로 Figure 53, Figure 54, Figure 55, Figure 56, Figure 57, Figure 58으로 제시하였음. CON군(n=7), DSS군(n=12), LIVE군(n=12), HEAT군(n=12), LYSOZYME군(n=12)에서 각각 4개씩 분석을 진행하였음.

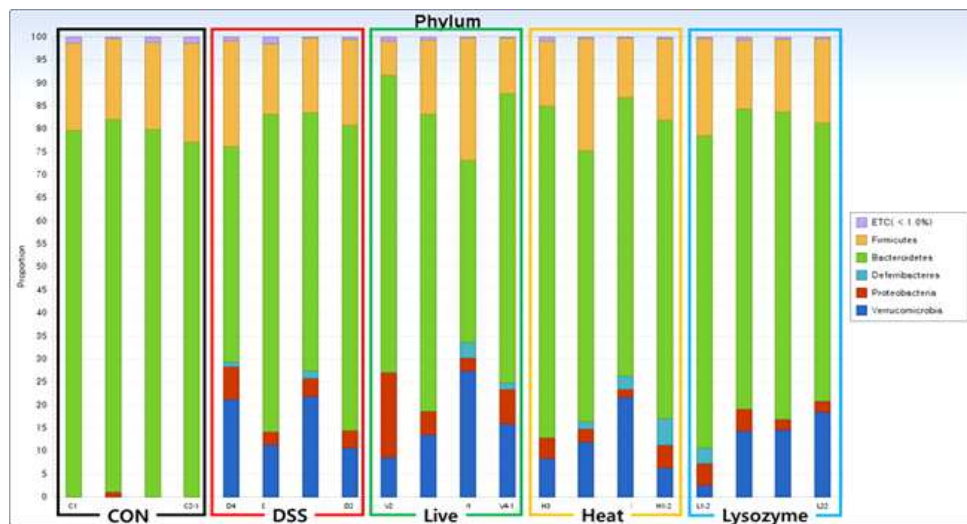


Figure 77. Gut microbiota composition in phylum level

Table 36. Abundances of specific taxa in phylum level

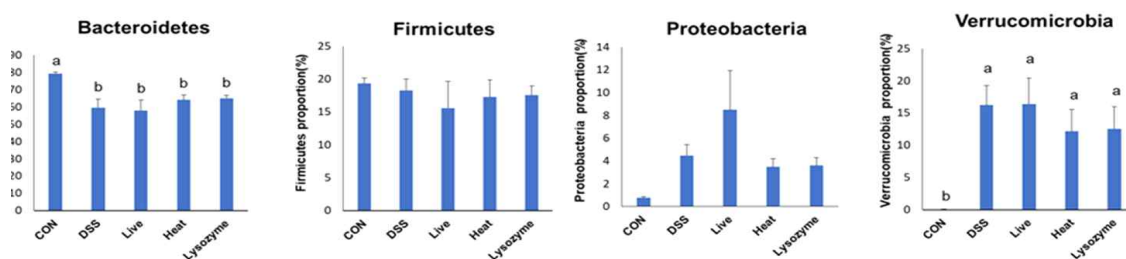


Figure 76. Abundances of specific taxa in phylum level

Group	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Verrucomicrobia</i>
CON	79.43 ± 0.82 <sup>a</sup>	19.33 ± 0.83 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>b</sup>
DSS	59.62 ± 5.07 <sup>b</sup>	18.29 ± 1.71 <sup>a</sup>	4.49 ± 0.94 <sup>ab</sup>	16.24 ± 3.04 <sup>a</sup>
LIVE	57.96 ± 6.11 <sup>b</sup>	15.58 ± 4.06 <sup>ab</sup>	8.48 ± 3.46 <sup>a</sup>	16.39 ± 4.01 <sup>a</sup>
HEAT	64.15 ± 2.95 <sup>b</sup>	17.27 ± 2.58 <sup>ab</sup>	3.47 ± 0.74 <sup>ab</sup>	12.14 ± 3.38 <sup>a</sup>
LYSOZYME	65.08 ± 1.65 <sup>b</sup>	17.56 ± 1.37 <sup>a</sup>	3.59 ± 0.71 <sup>ab</sup>	12.50 ± 3.46 <sup>a</sup>
p-value	0.011	0.8512	0.0649	0.0127



Means with different superscripts are significantly different at  $p$ -value $<0.05$  as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Phylum level에서 gut flora의 대부분을 차지하는 taxa인 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* 비율을 군별로 비교한 결과를 Figure 77, Table 36에 제시하였음. *Bacteroidetes* 비율은 CON군 대비 DSS를 제공한 모든 군에서 유의적으로

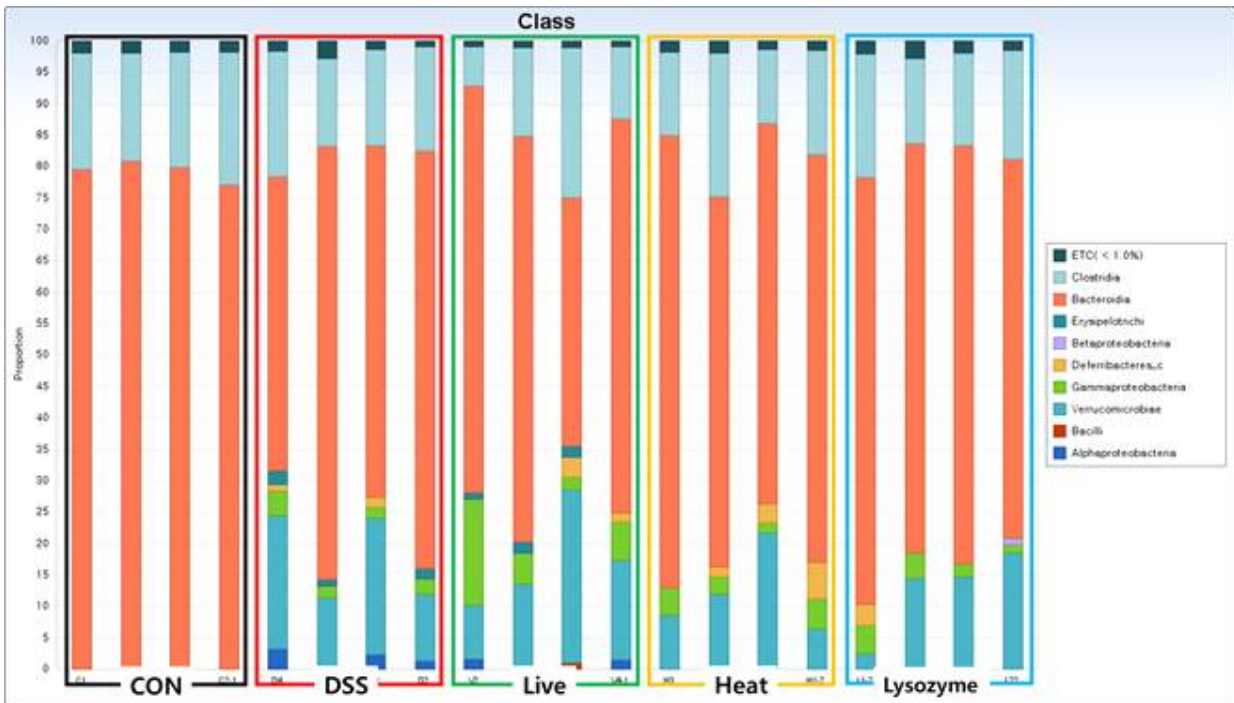


Figure 78. Gut microbiota composition in class level

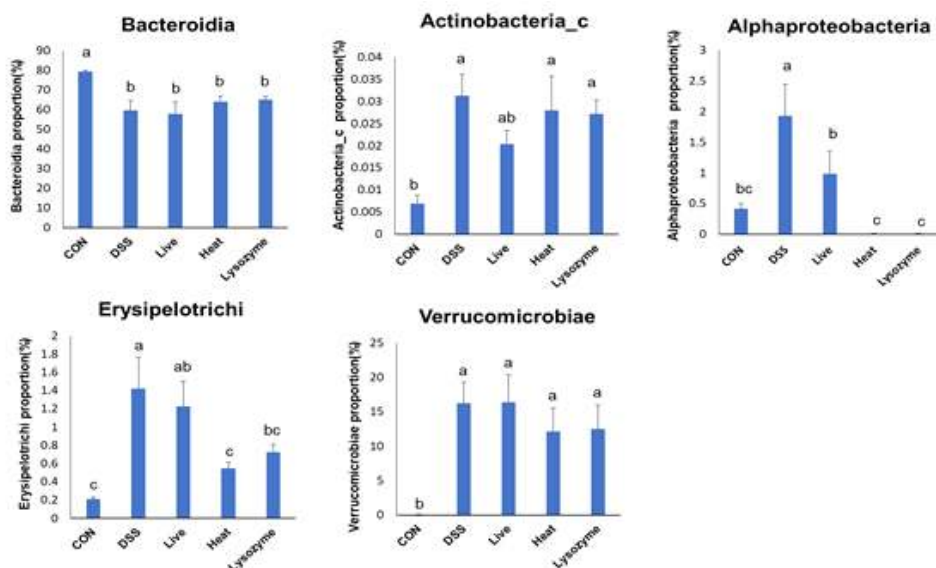


Figure 79. Abundances of specific taxa in class level

낮았고, *Firmicutes*와 *Proteobacteria* 비율은 CON군 대비 DSS군에서 유의차를 보이지 않았음. *Verrucomicrobia* 비율은 CON군 대비 DSS를 처리한 모든 군에서 유의적으로 높았음.

Table 37. Abundances of specific taxa in class level

Group	<i>Bacteroidia</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
CON	79.43 ± 0.82 <sup>a</sup>	0.007 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.09 <sup>bc</sup>
DSS	59.62 ± 5.07 <sup>b</sup>	0.031 ± 0.005 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.52 <sup>ab</sup>
LIVE	57.96 ± 6.11 <sup>b</sup>	0.020 ± 0.003 <sup>ab</sup>	0.98 ± 0.38 <sup>b</sup>
HEAT	64.14 ± 2.95 <sup>b</sup>	0.028 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>c</sup>
LYSOZYME	65.08 ± 1.65 <sup>b</sup>	0.027 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
p-value	0.011	0.0141	0.0013

Group	<i>Erysipelotrichi</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>
CON	0.21 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>b</sup>
DSS	1.42 ± 0.34 <sup>ca</sup>	16.24 ± 3.04 <sup>a</sup>
LIVE	1.23 ± 0.27 <sup>ab</sup>	16.39 ± 4.01 <sup>a</sup>
HEAT	0.55 ± 0.07 <sup>c</sup>	12.14 ± 3.38 <sup>a</sup>
LYSOZYME	0.73 ± 0.09 <sup>bc</sup>	12.50 ± 3.46 <sup>a</sup>
p-value	0.004	0.0127

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

⇒Class level에서 DSS군에서 CON군 대비 유의적인 증가 혹은 감소를 보였던 taxa abundnace를 Figure 79와 Table 37에 제시하였음. *Actinobacteria\_c*, *Alphaproteobacteria*, *Erysipelotrichi*, *Verrucomicrobiae*은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, *Bacteroidia*은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. 그 중 *Actinobacteria\_c* 비율은 LIVE군에서 DSS군 대비 낮은 경향을 보였음. *Alphaproteobacteria* 비율은 모든 시험시료 공급군에서 DSS군 대비 유의미하게 낮았고, *Erysipelotrichi* 비율은 HEAT군, LYSOZYME 군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

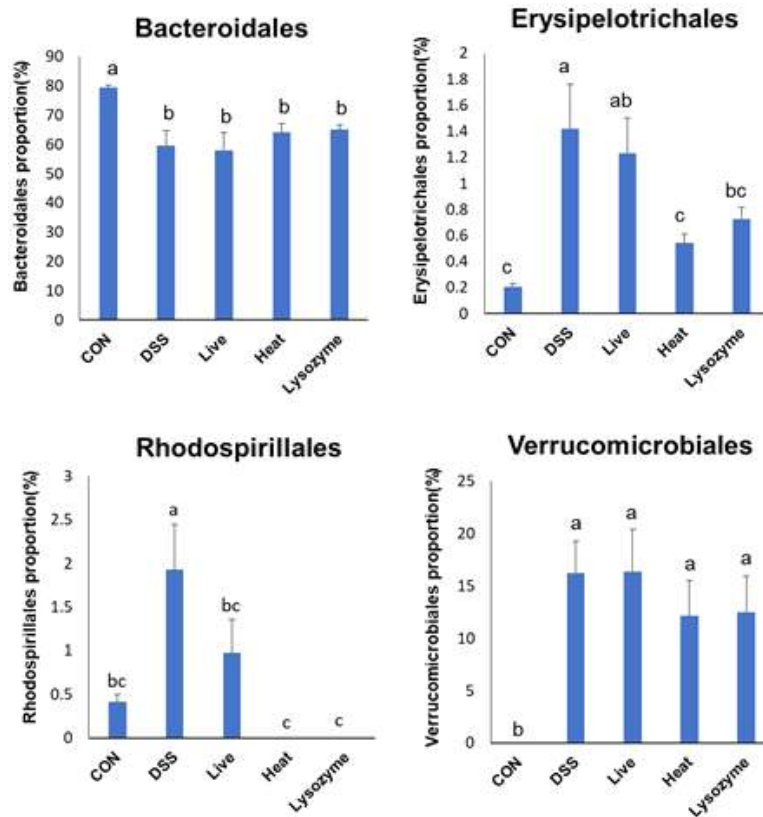


Figure 80. Abundances of specific taxa in order level  
Table 39. Abundances of specific taxa in order level

Group	<i>Bacteroidales</i>	<i>Erysipelotrichales</i>	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>
CON	79.43 ± 0.82 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>b</sup>
DSS	59.62 ± 5.07 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.52 <sup>a</sup>	16.24 ± 3.04 <sup>a</sup>
LIVE	57.96 ± 6.11 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.27 <sup>ab</sup>	0.98 ± 0.38 <sup>bc</sup>	16.39 ± 4.01 <sup>a</sup>
HEAT	64.14 ± 2.95 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	12.14 ± 3.38 <sup>a</sup>
LYSOZYME	65.08 ± 1.65 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	12.50 ± 3.46 <sup>a</sup>
p-value	0.011	0.004	0.0013	0.0127

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan' s multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Order level에서 DSS군에서 CON군 대비 유의적인 증가 혹은 감소를 보였던 taxa의 abundance를 Figure 81와 Table 39에 제시하였음. *Rhodospirillales*, *Verrucomicrobiales*, *Erysipelotrichales* 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, *Bacteroidales* 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. 그 중 *Rhodospirillales* 비율은 LIVE군, HEAT군, LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의미하게 낮았고, *Erysipelotrichales* 비율은 HEAT군과 LYSOZYME군에서 유의적으로 낮았음.

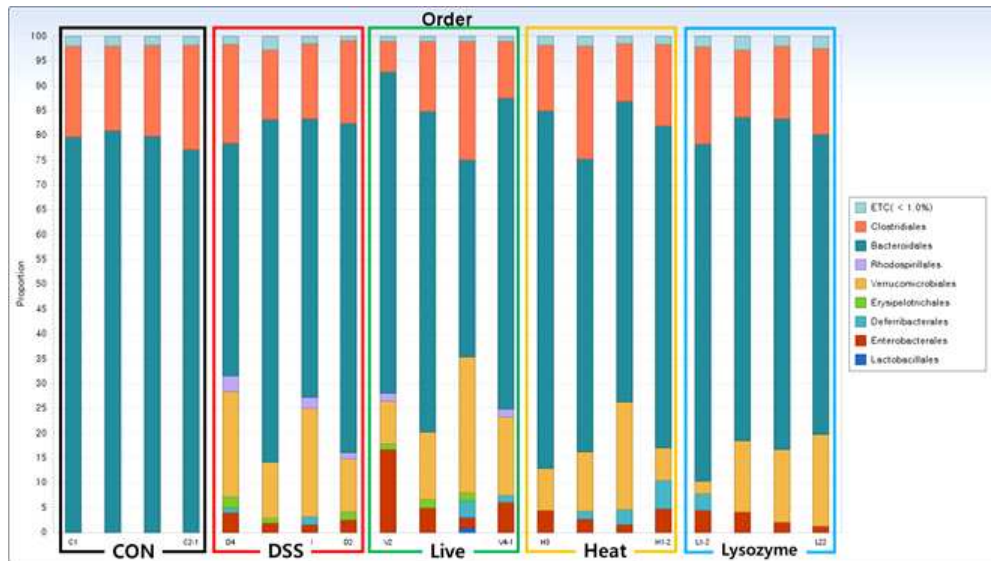


Figure 81. Gut microbiota composition in order level

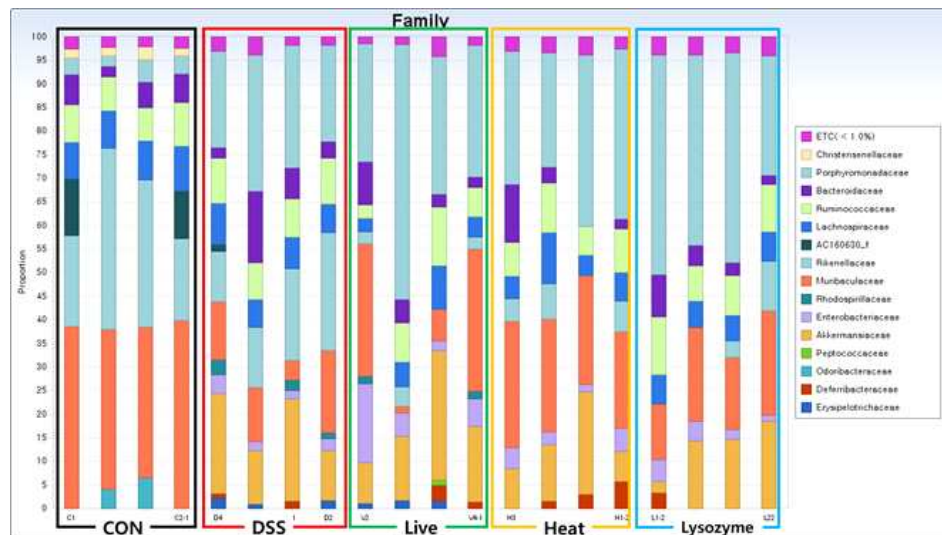


Figure 82. Gut microbiota composition in family level

Table 40. Abundances of specific taxa in order level

Group	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>
CON	3.61 ± 0.50 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.09 <sup>bc</sup>
DSS	23.90 ± 2.14 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.52 <sup>a</sup>
LIVE	34.01 ± 6.72 <sup>ab</sup>	1.23 ± 0.27 <sup>ab</sup>	0.98 ± 0.38 <sup>b</sup>
HEAT	31.15 ± 3.00 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
LYSOZYME	39.20 ± 4.76 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
p-value	0.0002	0.004	0.0013

Group	<i>Gemella_f</i>	<i>Christensenellaceae</i>	PAC000197_f
CON	0.003 ± 0.001 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.040 ± 0.010 <sup>a</sup>

DSS	0.000 ± 0.000 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.004 ± 0.002 <sup>b</sup>
LIVE	0.000 ± 0.000 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.002 ± 0.002 <sup>b</sup>
HEAT	0.001 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.009 ± 0.005 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.000 ± 0.000 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.000 ± 0.000 <sup>b</sup>
<b>p-value</b>	0.0031	<.0001	0.0005

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
 Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Family level에서 DSS군에서 CON군 대비 유의적인 증가 혹은 감소를 보였던 taxa의 abundance를 Figure 83와 Table 40에 제시하였음. *Rhodospirillaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Erysipelotrichaceae* 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, *Gemella\_f*, *Christensenellaceae*, *PAC000197\_f* 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. 그 중 *Rhodospirillaceae* 비율은 모든 시험시료 공급 군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았고, *Erysipelotrichaceae* 비율도 HEAT군과 LYSOZYME군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음.

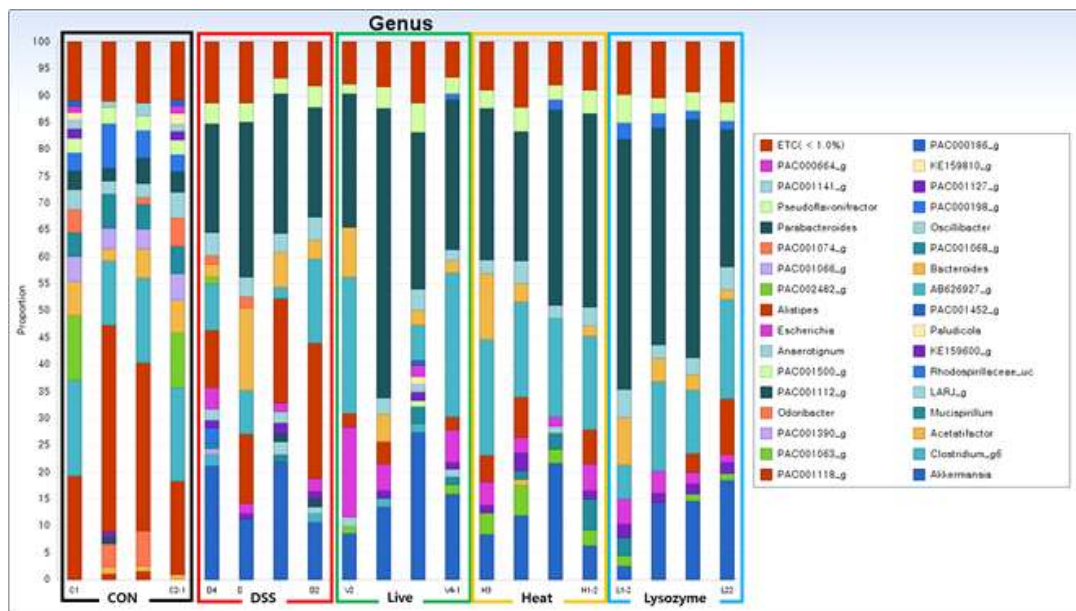


Figure 83. Gut microbiota composition in genus level

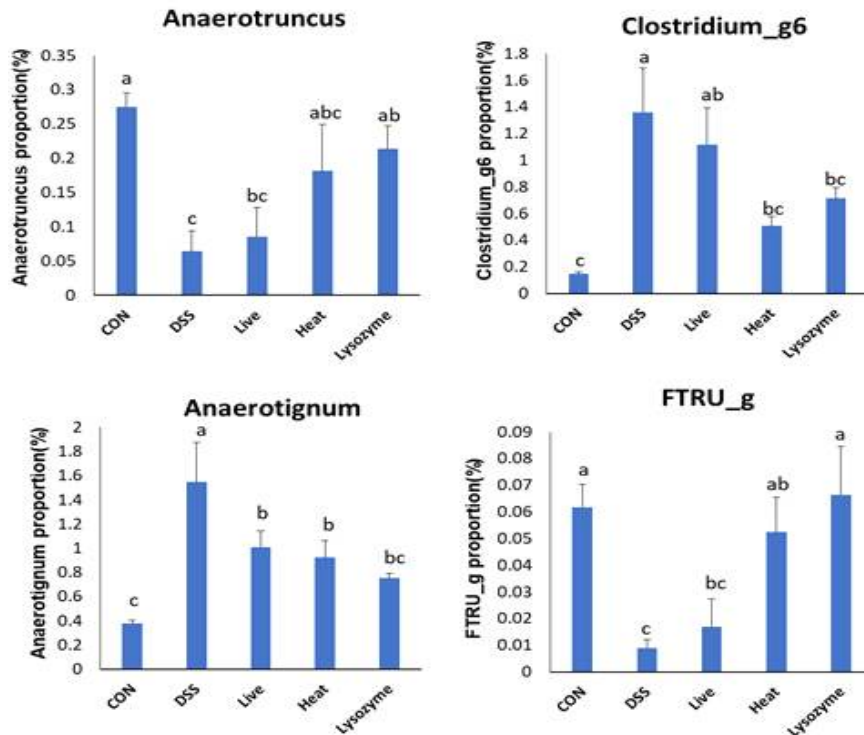


Figure 84. Abundances of specific taxa in order level

Table 41. Gut microbiota composition in genus level

Group	Anaerotruncus	Clostridium_g6	Anaerotignum	FTRU_g
CON	0.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>
DSS	0.06 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.36 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>c</sup>
LIVE	0.09 ± 0.04 <sup>bc</sup>	1.12 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.01 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>bc</sup>
HEAT	0.18 ± 0.07 <sup>abc</sup>	0.51 ± 0.07 <sup>bc</sup>	0.92 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	0.21 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.08 <sup>bc</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>
p-value	0.0152	0.0045	0.0039	0.0087

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Genus level에서 DSS군에서 CON군 대비 유의적인 증가 혹은 감소를 보인 균들 중 시험시료 공급에 영향을 받은 taxa의 abundance 결과를 Figure 85과 Table 41에 제시하였음. *Anaerotignum*, *Clostridium\_g6* 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았고, *Anaerotruncus*, *FTRU\_g* 비율은 DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았음. DSS군에서 유의적으로 높았던 *Anaerotignum*은 모든 시험시료 공급군에서 유의적으로 낮았고, *Clostridium\_g6* 비율 역시 HEAT군과 LYSOZYME군에서 유의적으로 낮았음. DSS군에서 유의적으로 낮았던 *Anaerotruncus* 비율은 LYSOZYME군에서 유의적으로 높았고, *FTRU\_g* 비율 또한 HEAT군과 LYSOZYME군에서 유의적으로 높았음.

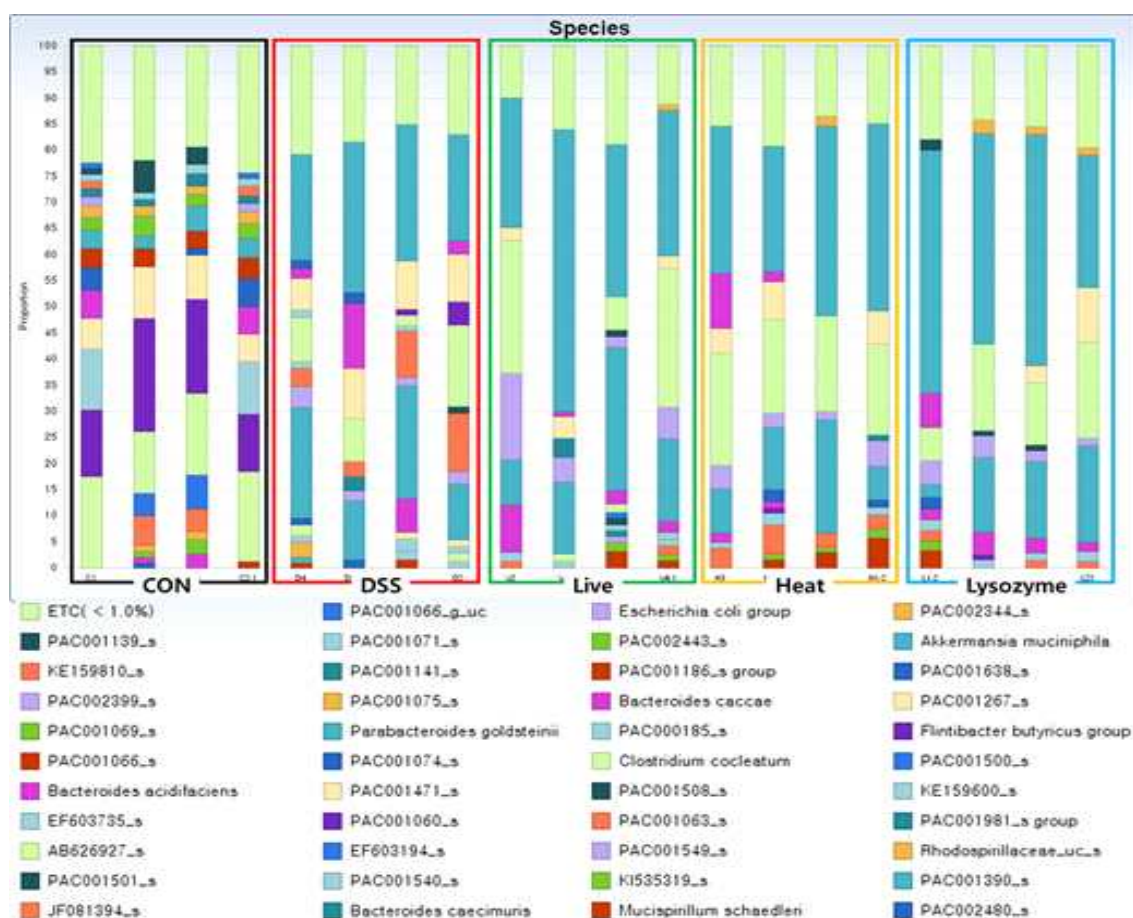


Figure 85. Gut microbiota composition in species level

Table 43. Abundances of specific taxa in species level.

Group	<i>AB626924_s</i>	<i>AF157052_s</i>	<i>JF081394_s</i>	<i>PAC001267_s</i>
CON	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	2.95 ± 1.25 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
DSS	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.59 ± 2.02 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.34 <sup>a</sup>
LIVE	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
HEAT	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
p-value	0.0302	0.0032	0.0016	0.0013

Group	<i>PAC001540_s</i>	<i>PAC001745_s</i>	<i>Clostridium cocleatum</i>
CON	0.02 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>c</sup>
DSS	0.82 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.33 <sup>a</sup>
LIVE	0.42 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.12 ± 0.27 <sup>ab</sup>
HEAT	0.31 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.07 <sup>bc</sup>
LYSOZYME	0.30 ± 0.07 <sup>bc</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.08 <sup>bc</sup>

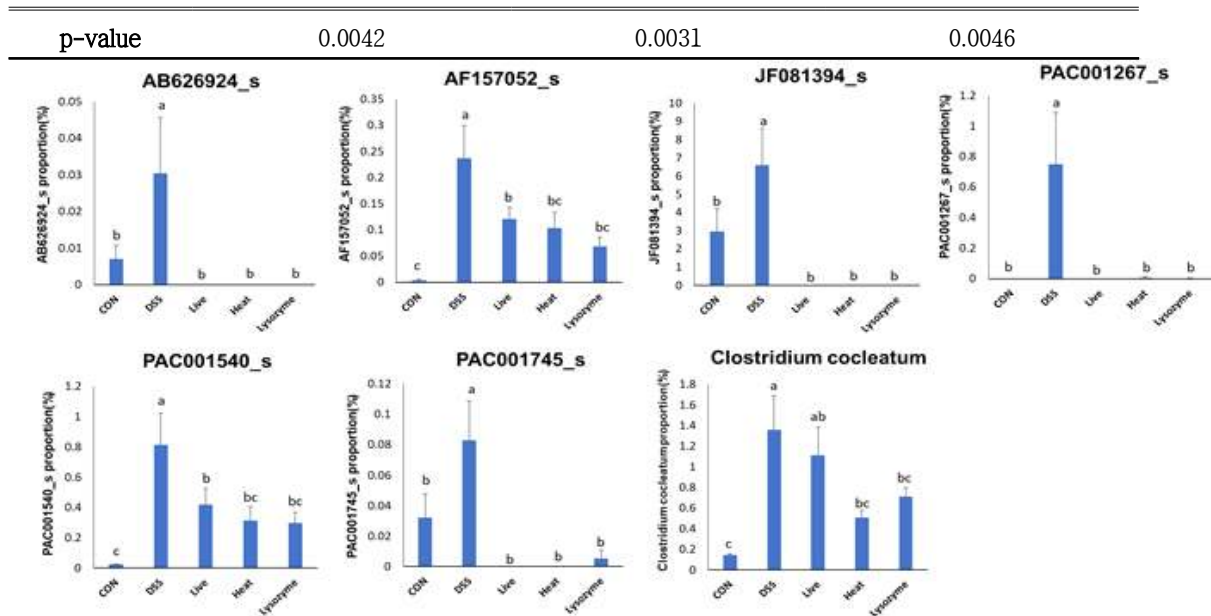


Figure 86. Abundances of specific taxa in species level

Means with different superscripts are significantly different at  $p$ -value $<0.05$  as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- Species level에서 DSS군에서 CON군 대비 유의적인 증가 혹은 감소를 보인 균들 중 시험시료 공급에 영향을 받은 taxa의 abundance 결과를 Figure 87와 Table 43에 제시하였음. DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 높았던 AB626924\_s, AF157052\_s, JF081394\_s, PAC001267\_s, PAC001540\_s, PAC001745\_s은 DSS군 대비 모든 시험시료 공급군에서 유의적으로 낮았고, *Clostridium cocleatum* 비율은 HEAT군과 LYSOZYME 군에서 DSS군 대비 유의적으로 낮았음. DSS군에서 CON군 대비 유의적으로 낮았던 KE159677\_s는 HEAT군과 DSS군 대비 LYSOZYME군에서, PAC001075\_s는 DSS군 대비 LYSOZYME군에서, PAC001786\_s군은 DSS군 대비 LIVE군에서 유의적으로 높았음.



④ LDA score

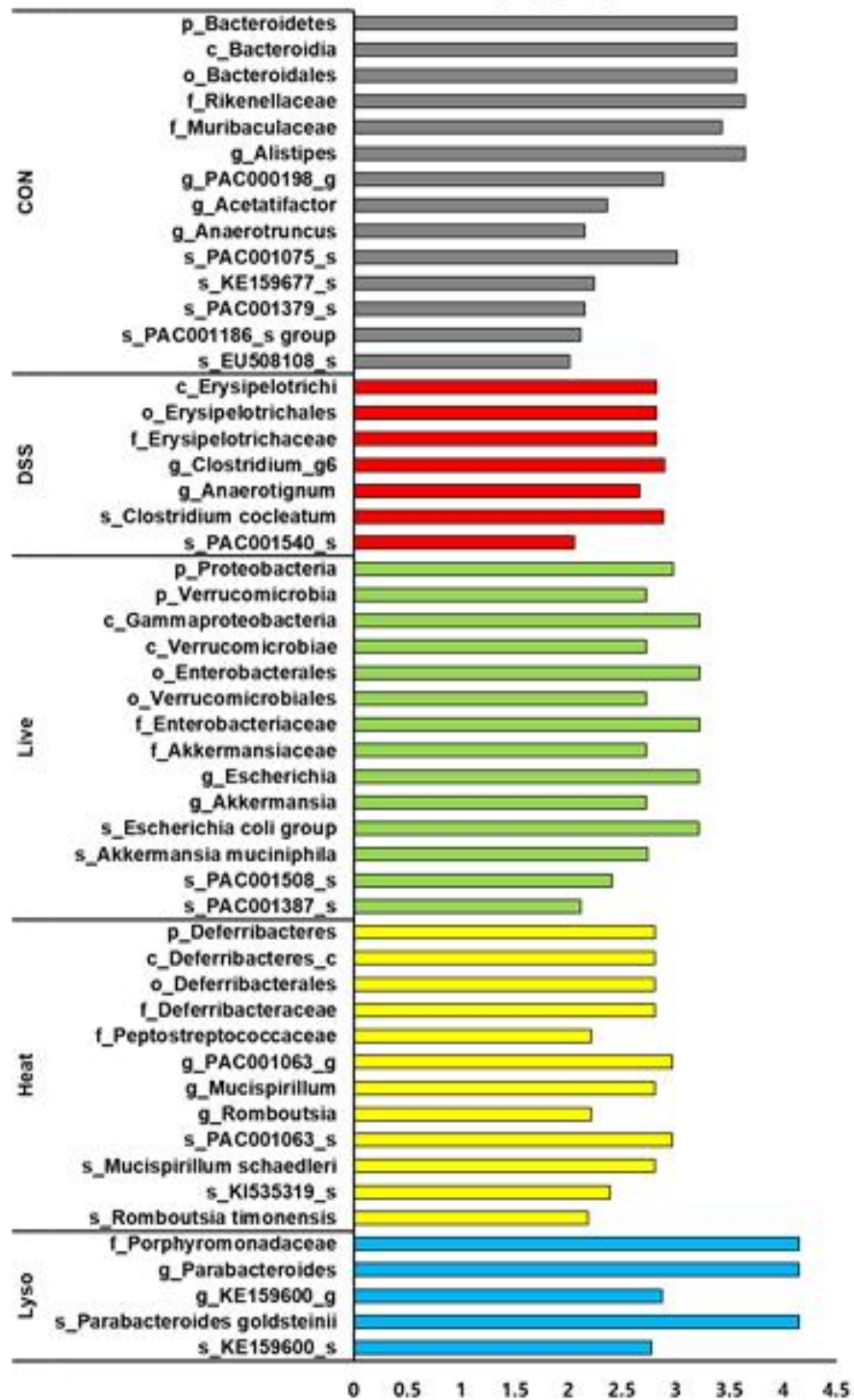


Figure 87. LDA score

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

- 특정 균의 그룹 간 상대적 abundance를 비교하는 LDA score결과를 분류체계가 높은 순으로 정렬한 뒤 동일한 수준에서 값이 큰 순서로 정리하여 Figure 88에 제시하였

음. CON군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Bacteroidetes*, class level에서 *Bacteroidia*, order level에서 *Bacteroidales*, family level에서 *Rikenellaceae*, *Muribaculaceae*였고, genus level에서 *Alistipes*, *Acetatifactor*, *Anaerotruncus*으로 나타났음. DSS군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 class level에서 *Erysipelotrichi*, order level에서 *Erysipelotrichales*, family level에서 *Erysipelotrichaceae*, genus level에서 *Anaerotignum*와 *Clostridium\_g6*, species level에서 *Clostridium cocleatum*가 있었음. LIVE군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Proteobacteria*와 *Verrucomicrobia*, class level에서 *Gammaproteobacteria*와 *Verrucomicrobiae*, order level에서 *Enterobacteriales*와 *Verrucomicrobiales*, family level에서 *Enterobacteriaceae*와 *Akkermansiaceae*, genus level에서 *Escherichia*, *Akkermansia*, species level에서 *Escherichia coli group*와 *Akkermansia muciniphila*가 있었음. HEAT군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 phylum level에서 *Deferribacteres*, class level에서 *Deferribacteres*, order level에서 *Deferribacterales*, family level에서 *Deferribacteraceae*, *Peptostreptococcaceae*, genus level에서 *Mucispirillum*와 *Romboutsia*, species level에서 *Mucispirillum schaedleri*와 *Romboutsia timonensis*으로 나타났음. 마지막으로 LYSOZYME군에서 상대적으로 풍부했던 taxa는 family level에서 *Porphyromonadaceae*, genus level에서 *Parabacteroides*, species level에서 *Parabacteroides goldsteini*가 있었음.

#### ⑤ 장내 미생물과 biomarker 상관관계 분석

염증반응 관련 지표인 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-MAPK, COX2, IL-1 $\beta$ , T-bet, 장벽 integrity 관련 지표인 occludin, E-cadherin, CD14와 장내 미생물 간의 상관관계 분석을 진행하였고 그 결과를 Figure 89에 제시하였음. Class level에서 *Alphaproteobacteria*가 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , T-bet, CD14과 양의 상관관계를, *Erysipelotrichi*가 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX2, T-bet, CD14과 양의 상관관계를 보였고, order level에서 *Rhodospirillales*가 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , T-bet, CD14과 양의 상관관계를, *Erysipelotrichales*가 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX2, T-bet, CD14과 양의 상관관계를 보였음. Family level에서 *Rhodospirillaceae*가 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , T-bet, CD14과 양의 상관관계를, *Erysipelotrichaceae*가 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX2, T-bet, CD14과 양의 상관관계를 보였음. Genus level에서 *Clostridium\_g6*와 *Anaerotignum*는 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX2, T-bet, CD14과 양의 상관관계를 보였고, *Anaerotruncus*은 occludin, E-cadherin과 양의 상관관계를, *FTRU\_g*는 E-cadherin과 양의 상관관계를 보였으며 species level에서 *Clostridium cocleatum*는 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX2, T-bet, CD14과 양의 상관관계를 보였음.

Taxa	p-IkB $\alpha$	p-MAPK	COX2	IL-1 $\beta$	T-bet	CD14	Occludin	E-cadherin
	R,	R,	R,	R,	R,	R,	R,	R,
	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
<b>Class</b>								
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.73962	ns	ns	ns	0.78002	0.86481	ns	ns
	0.0002				<.0001	<.0001		
<i>Erysipelotrichi</i>	0.70939	ns	0.7513	0.83515	0.83591	0.87608	ns	ns
	0.0005		0.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<b>Order</b>								
<i>Rhodospirillales</i>	0.73845	ns	ns	ns	0.77907	0.86429	ns	ns
	0.0002				<.0001	<.0001		
<i>Erysipelotrichales</i>	0.70939	ns	0.7513	0.83515	0.83591	0.87608	ns	ns
	0.0005		0.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<b>Family</b>								
<i>Rhodospirillaceae</i>	0.73845	ns	ns	ns	0.77907	0.86429	ns	ns
	0.0002				<.0001	<.0001		
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.70939	ns	0.7513	0.83515	0.83591	0.87608	ns	ns
	0.0005		0.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<b>Genus</b>								
<i>Clostridium_g6</i>	0.69328	ns	0.75463	0.83071	0.82968	0.87467	ns	ns
	0.0007		0.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<i>Anaerotignum</i>	0.77685	ns	0.8031	0.8218	0.8629	0.86445	ns	ns
	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<i>FTRU_g</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.75284 0.0001
<i>Anaerotruncus</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.72908 0.0003	0.84017 <.0001
<b>Species</b>								
<i>Clostridium codeatum</i>	ns	ns	0.75466 0.0001	0.83106 <.0001	0.83074 <.0001	0.87537 <.0001	ns	ns

Figure 88. Correlation between bacteria and immune or intestinal barrier integrity biomarkers

Abbreviation- CON: control group, DSS: DSS group, LIVE: Live bacteria(*B. bifidum* BGN4), Heat: heat-killed bacteria(*B. bifidum* BGN4), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*B. bifidum* BGN4).

(4) 고지방 식이로 유도된 비만 모델에서 *Lactobacillus acidophilus* PIN7 효능 평가 (3차년도)

(가) 체중 변화

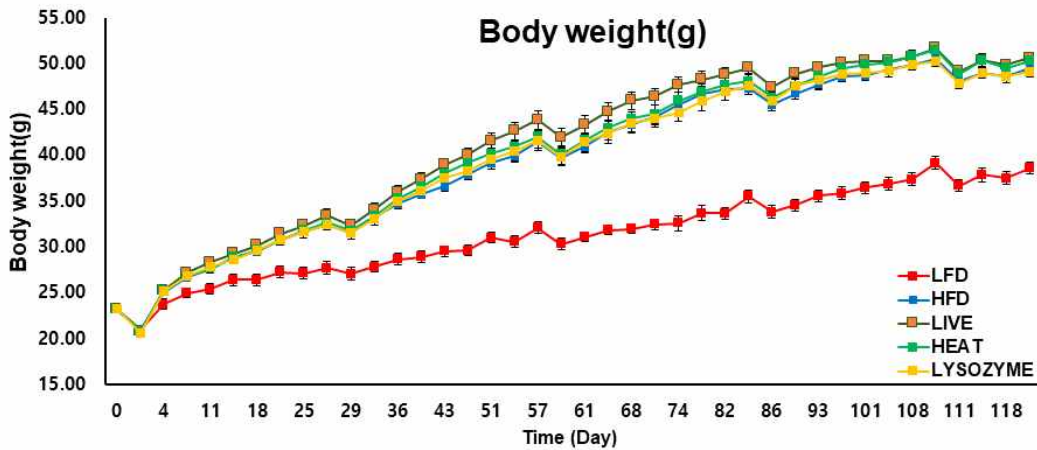


Figure 89. Body weight changes of experimental animals

Table 45. Final body weight of experimental animals

Group	Body weight (g)
LFD	38.55 ± 0.66 <sup>b</sup>
HFD	49.42 ± 0.48 <sup>a</sup>
LIVE	50.59 ± 0.55 <sup>a</sup>
HEAT	50.28 ± 0.71 <sup>a</sup>
LYSOZYME	49.09 ± 0.63 <sup>a</sup>
P-value	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 고지방 식이 및 시험 시료의 공급에 따른 체중 변화를 확인하기 위해 실험 기간 동안 주 2회 체중을 측정하였음. 체중 변화를 관찰한 결과를 Figure 90에, 최종 체중을 비교한 결과를 Table 45에 제시하였음. LFD군과 HFD군 간 체중 차이는 유의적이었으나 시험시료의 공급으로 인한 유의적인 체중 감소는 없었음.

(나) 조직 무게 비교

각 군별로 시험시료를 16주 간 공급한 뒤 희생시킨 동물들의 장기 무게를 관찰한 결과는 다음과 같음.

**Table 46. Adipose tissue weights of experimental animals**

Group	Epididymal adipose tissue	Perirenal adipose tissue	Mesentric adipose tissue	Subcutaneous adipose tissue	Total white adipose tissue
LFD	1.74 ± 0.06	0.56 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.97 ± 0.16 <sup>b</sup>
HFD	1.74 ± 0.09	1.00 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.06 <sup>a</sup>
LIVE	1.62 ± 1.86	1.06 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.43 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.13 <sup>a</sup>
HEAT	1.86 ± 0.09	0.99 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.70 ± 0.15 <sup>a</sup>
LYSOZYME	1.84 ± 0.12	0.94 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.13 <sup>a</sup>
P-value	0.3844	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 실험 식이에 따른 군간 지방 조직의 무게를 Table 67에 나타내었음. 부고환 지방을 제외한 나머지 지방 조직무게는 HFD군에서 LFD군 대비 유의적으로 증가하였음. 시험시료 공급 군에서 지방 조직 무게의 유의적인 감소는 없었음.

**Table 47. Liver and spleen weights of experimental animals**

Group	Liver (g)	Spleen (g)
LFD	1.28 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.002 <sup>b</sup>
HFD	2.19 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.002 <sup>a</sup>
LIVE	2.59 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.006 <sup>a</sup>
HEAT	2.30 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.09 ± 0.005 <sup>a</sup>
LYSOZYME	2.18 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.004 <sup>a</sup>
P-value	<.0001	0.0076

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 실험 식이에 따른 군간 간, 비장의 무게를 Table 47에 나타내었음. 간과 비장의 무게는 HFD군에서 LFD군 대비 유의적으로 증가하였음. 간의 무게는 LIVE군에서 HFD군 대비 유의적으로 증가하였고 HEAT군은 감소하는 경향을 보였으며 LYSOZYME군은 HFD군 대비 유의적인 차이가 없었음. 비장의 무게는 LFD군과 HFD군 간 유의적인 차이가 있었으나 시험시료공급 군에 의한 유의적인 무게 변화는 없었음.

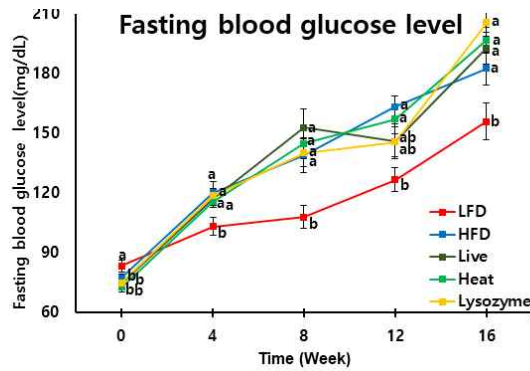
**Table 48. Colon and small intestine length of experimental animals**

Group	Colon (cm)	Small intestine (cm)
LFD	6.00 ± 0.12 <sup>b</sup>	35.08 ± 0.43 <sup>b</sup>
HFD	6.72 ± 0.17 <sup>a</sup>	37.04 ± 0.46 <sup>a</sup>
LIVE	6.66 ± 0.13 <sup>a</sup>	37.30 ± 0.31 <sup>a</sup>
HEAT	6.80 ± 0.19 <sup>a</sup>	37.23 ± 0.79 <sup>a</sup>
LYSOZYME	6.73 ± 0.15 <sup>a</sup>	37.52 ± 0.28 <sup>a</sup>
<b>P-value</b>	<b>0.0031</b>	<b>0.0073</b>

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
 Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 실험 식이에 따른 군간 대장과 소장의 길이를 Table 48에 나타내었음. 대장과 소장의 길이는 HFD군에서 LFD군 대비 유의적으로 증가하였음. 시험시료 공급에 의한 대장, 소장 길이의 유의적인 변화는 없었음.

**(다) 공복 혈당 측정**



**Figure 90. Fasting blood glucose level changes of experimental animals**

**Table 49. Fasting blood glucose levels of experimental animals**

Group	week 0	week 4	week 8	week 12	week 16
LFD	83.42 ± 2.95 <sup>a</sup>	103.21 ± 44.40 <sup>b</sup>	107.96 ± 5.72 <sup>b</sup>	126.75 ± 6.08 <sup>b</sup>	156.03 ± 9.12 <sup>b</sup>
HFD	77.42 ± 2.10 <sup>ab</sup>	120.29 ± 5.60 <sup>a</sup>	139.17 ± 8.71 <sup>a</sup>	163.5 ± 5.49 <sup>a</sup>	182.58 ± 8.10 <sup>a</sup>
LIVE	74.67 ± 1.99 <sup>b</sup>	117.13 ± 3.42 <sup>a</sup>	152.79 ± 9.54 <sup>a</sup>	145.92 ± 8.65 <sup>ab</sup>	192.89 ± 8.03 <sup>a</sup>
HEAT	72.75 ± 2.29 <sup>b</sup>	115.79 ± 3.17 <sup>a</sup>	144.88 ± 7.62 <sup>a</sup>	157.21 ± 7.28 <sup>a</sup>	196.75 ± 6.60 <sup>a</sup>
LYSOZYME	75.08 ± 2.35 <sup>b</sup>	118.71 ± 3.39 <sup>a</sup>	140.25 ± 6.84 <sup>a</sup>	145.79 ± 7.30	205.65 ± 6.96 <sup>a</sup>
<b>P-value</b>	<b>0.0241</b>	<b>0.0362</b>	<b>0.0021</b>	<b>0.0068</b>	<b>0.0005</b>

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
 Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 실험 시작 0주차, 4주차, 8주차, 12주차, 16주차에 실험동물을 12시간 절식 시킨 뒤 공복 혈당의 변화를 Figure 91에, 각 시점 별 공복혈당 측정 결과를 Table 49에 제시하였음.. LFD군과 HFD군은 4주차, 8주차, 12주차, 16주차에서 공복혈당의 유의적인 차이가 관찰 되었으나 시험 시료 공급에 의한 유의적인 차이는 없었음.

(라) 경구 포도당 부하 검사(Oral glucose tolerance test)

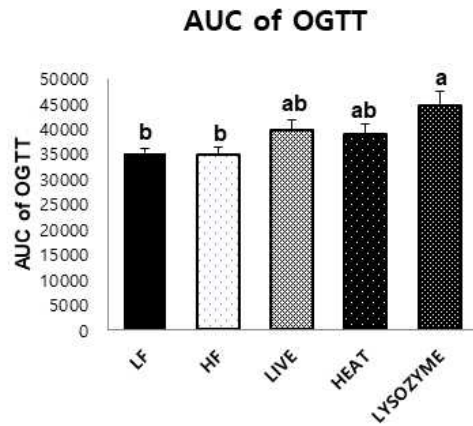


Figure 91. Area under the curve of oral glucose tolerance test

Table 50. Area under the curve of oral glucose tolerance test

Group	Area under the curve (g)
LFD	35243 ± 955 <sup>b</sup>
HFD	34730 ± 1598 <sup>b</sup>
LIVE	39723 ± 2011 <sup>ab</sup>
HEAT	39043 ± 1825 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	44519 ± 3024 <sup>b</sup>
P-value	0.0068

Means with different superscripts are significantly different at  $p$ -value $<0.05$  as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 실험 16주차에 인슐린 저항성을 확인하기 위해 OGTT를 실시하였음. 실험동물을 12시간 절식시킨 뒤 glucose 2g/kg을 경구투여 한 뒤 0분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분에 실험동물의 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였음. 혈당 수치를 통해 계산한 AUC를 Figure 92와 Table 50에 제시하였음. LFD군과 HFD군간의 유의적인 차이는 없었으며, LIVE군과 HEAT군에서 HFD군 대비 AUC가 증가하는 경향을 보였고, LYSOZYME군에서는 유의적으로 증가하였음.

(마) 부고환 지방조직 TNF- $\alpha$ , IFN-r, IL-17 mRNA 발현량 분석

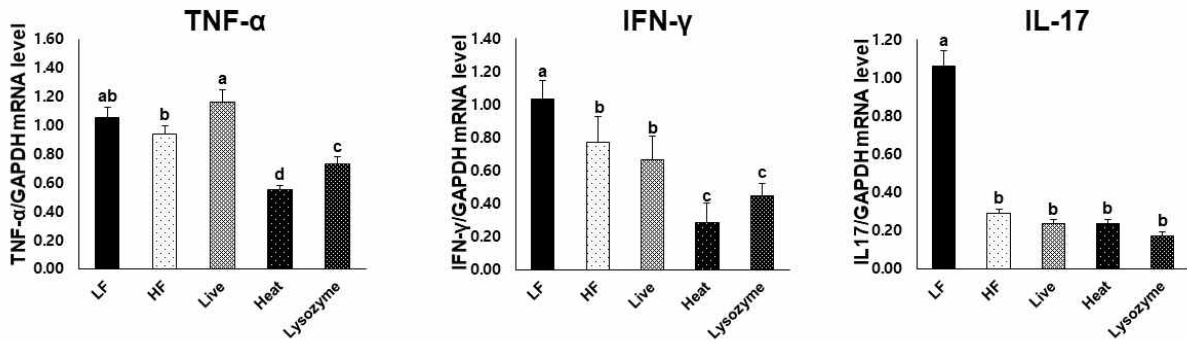


Figure 92. TNF- $\alpha$ , IFN-r, IL-17 mRNA expression level in epididymal adipose tissue

Table 51. TNF- $\alpha$ , IFN-r, IL-17 mRNA expression levels in epididymal adipose tissue

Group	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-17
LFD	1.06 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	1.04 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
HFD	0.94 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
LIVE	1.16 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
HEAT	0.55 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.73 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
p-value	<.0001	<.0001	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 부고환 지방에서 염증 지표인 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 mRNA 발현량을 측정한 결과를 Figure 93과 Table 51에 제시하였음. LIVE군에서 HFD군 대비 TNF- $\alpha$  발현량이 유의적으로 높아졌고 HEAT군과 LYSOZYME군에서는 유의적으로 낮아졌음. IFN- $\gamma$ 은 HEAT군과 LYSOZYME군에서 HFD군 대비 유의적으로 발현량이 감소함. IL-17의 경우, 실험시료 공급에 의한 유의적인 차이는 없었음.

(바) 부고환 지방조직 SREBP-1c, FAS, LPL mRNA 발현량 분석

Table 52. SREBP-1c, FAS, LPL mRNA expression level in epididymal adipose tissue

Group	SREBP-1c	FAS	LPL
LFD	0.95 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
HFD	0.34 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	4.21 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>



LIVE	0.30 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.29 ± 0.18 <sup>b</sup>
HEAT	0.36 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	3.81 ± 0.39 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.25 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.58 ± 0.37 <sup>b</sup>
p-value	<.0001	<.0001	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
 Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

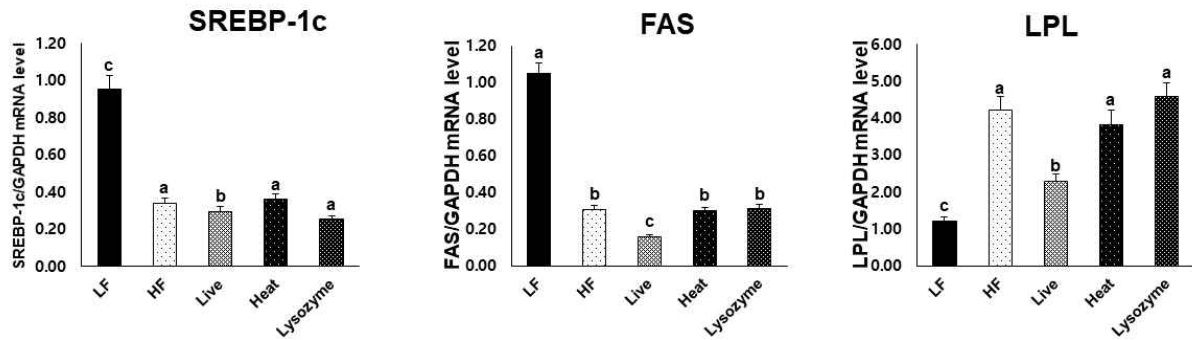


Figure 93. SREBP-1c, FAS, LPL mRNA expression level in epididymal adipose tissue

- 부고환 지방에서 지방 대사 관련 지표인 SREBP-1c, FAS, LPL mRNA 발현량을 측정 한 결과를 Figure 94와 Table 52에 제시하였음. SREBP-1c와 LPL은 모든 시험시료 공급군에 서 HFD 대비 발현량의 유의적인 차이가 없었음. FAS는 LIVE군에서 HFD군 대비 유 의적으로 감소하였음.

(사) 부고환 지방조직 GPR43 mRNA 발현량 분석

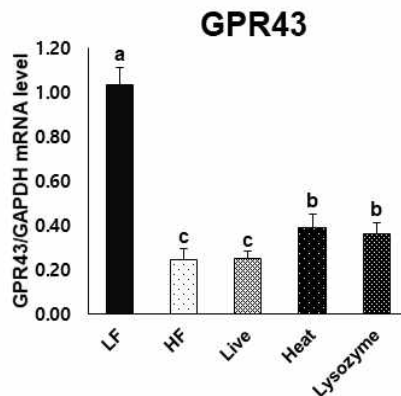


Figure 94. GPR43 mRNA expression level in epididymal adipose tissue

Table 53. GPR43 mRNA expression level in epididymal adipose tissue

Group	GPR43
-------	-------

LFD	1.03 ± 0.05 <sup>a</sup>
HFD	0.25 ± 0.02 <sup>c</sup>
LIVE	0.25 ± 0.02 <sup>c</sup>
HEAT	0.39 ± 0.03 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.36 ± 0.03 <sup>b</sup>
P-value	<.0001

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 부고환 지방에서 단쇄지방산의 수용체인 GPR43 mRNA 발현량을 측정된 결과를 Figure 95와 Table 53에 제시하였음. HFD군에서 LFD군 대비 감소하였고 HEAT군과 LYSOZYME 군에서 HFD군 대비 유의적으로 발현이 증가한 반면 LIVE군은 유의적인 차이가 없었음.

#### (아) 간 조직 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 mRNA 발현량 분석

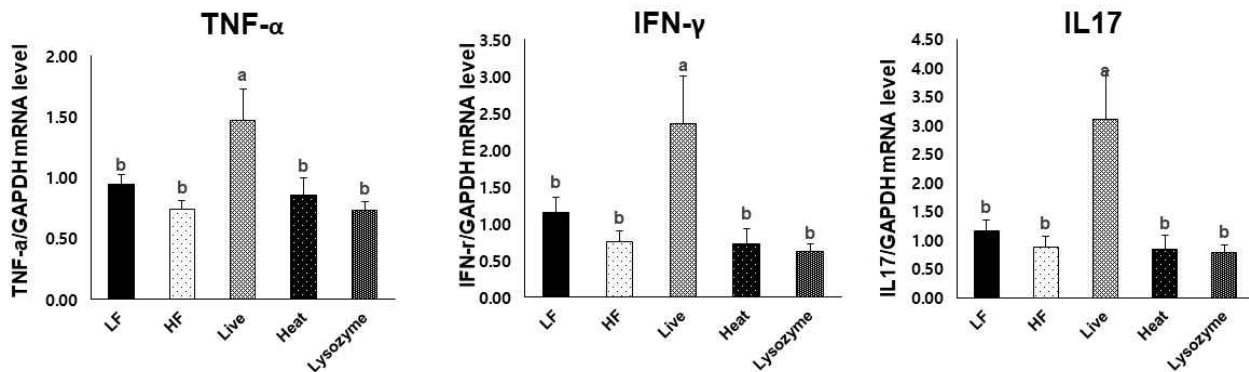


Figure 95. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 mRNA expression level in liver

Table 54. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 mRNA expression levels in liver

Group	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-17
LFD	0.95 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.19 <sup>b</sup>
HFD	0.74 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.20 <sup>b</sup>
LIVE	1.47 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.66 <sup>a</sup>	3.10 ± 0.85 <sup>a</sup>
HEAT	0.85 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.25 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.73 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.14 <sup>b</sup>
p-value	0.0018	0.0014	0.0011

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 간에서 염증 지표인 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 mRNA 발현량을 측정한 결과를 Figure 96과 Table 54에 제시하였음. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 모두 LIVE군에서 LFD군, HFD군 대비 유의적으로 증가하였고 다른 군 간에는 유의적인 차이가 없었음.

(자) 간 조직 SREBP-1c, FAS mRNA 발현량 분석

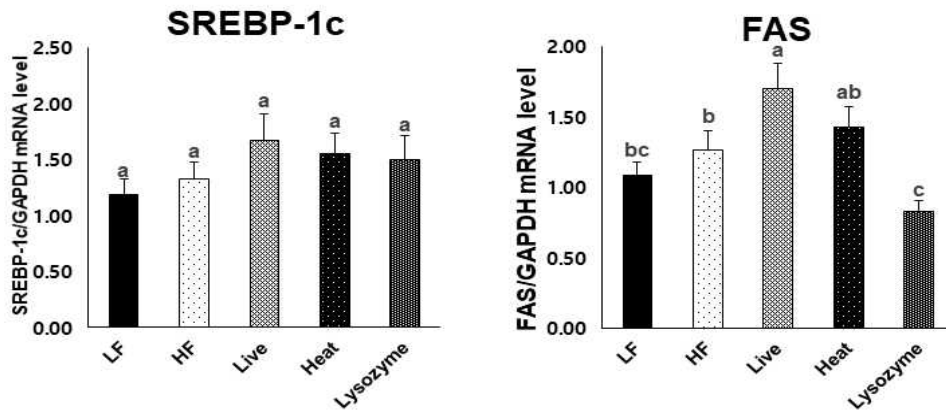


Figure 96. SREBP-1c, FAS mRNA expression level in liver

Table 55. SREBP-1c, FAS mRNA expression level in liver

Group	SREBP-1c	FAS
LFD	1.18 ± 0.14	1.08 ± 0.10 <sup>bc</sup>
HFD	1.33 ± 0.15	1.27 ± 0.13 <sup>b</sup>
LIVE	1.67 ± 0.24	1.70 ± 0.18 <sup>a</sup>
HEAT	1.55 ± 0.18	1.43 ± 0.15 <sup>ab</sup>
LYSOZYME	1.49 ± 0.22	0.83 ± 0.08 <sup>c</sup>
P-value	0.4428	0.0002

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 간에서 지방 대사 관련 지표인 SREBP-1c, FAS, LPL mRNA 발현량을 측정한 결과를 Figure 97과 Table 55에 제시하였음. SREBP-1c의 경우 모든 군에서 유의적인 차이가 없었음. FAS는 LIVE군에서 HFD군대비 유의적으로 증가 했고 HEAT군에서는 감소하는 경향을 보였으며 LYSOZYME군에서는 유의적으로 감소하였음.

(차) 간 조직 GPR43 mRNA 발현량 분석

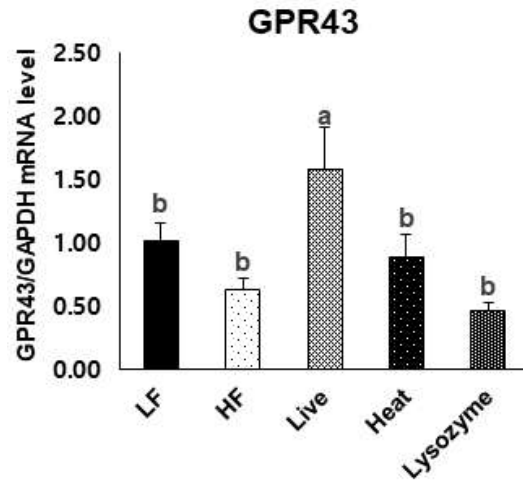


Figure 97. GPR43 mRNA expression level in liver

Table 56. GPR43 mRNA expression level in liver

Group	GPR43
LFD	1.02 ± 0.14 <sup>b</sup>
HFD	0.63 ± 0.09 <sup>b</sup>
LIVE	1.58 ± 0.33 <sup>a</sup>
HEAT	0.88 ± 0.18 <sup>b</sup>
LYSOZYME	0.46 ± 0.06 <sup>b</sup>
P-value	0.0006

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: Live bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Heat: heat-killed bacteria(*L. acidophilus* PIN7), Lysozyme: lysozyme-treated and then sonicated bacteria(*L. acidophilus* PIN7)

- 간에서 단쇄지방산의 수용체인 GPR43 mRNA 발현량을 측정된 결과를 Figure 98과 Table 56에 제시하였음. HFD군과 비교하여 LIVE군에서 유의적으로 증가했으나 다른 시료군에서는 통계적 유의차가 관찰되지 않음.
- 실험시료의 공급이 실험동물의 phenotype에 유의미한 영향을 미치지 못했고 관련 지표 분석에서도 consistent한 기전 설명이 이루어지지 않아 항비만 스크리닝 추가 연구를 진행하여 probiotics를 재선정 하였고, 선정된 probiotics의 사군체 실험 진행 중에 있음.

(5) 고지방 식이로 유도된 비만 모델에서 3가지 probiotics 스크리닝 실험

(가) 체중 변화

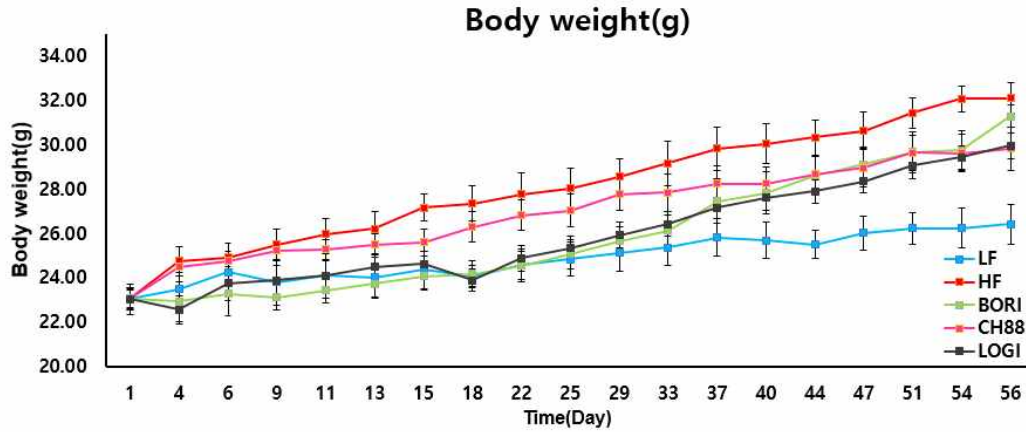


Figure 98. Body weight changes of experimental animals

Table 57. Final body weight of experimental animals

Group	Body weight (g)
LFD	26.43 ± 0.91 <sup>b</sup>
HFD	32.13 ± 0.68 <sup>a</sup>
BORI	31.31 ± 0.51 <sup>a</sup>
CH88	29.83 ± 0.96 <sup>a</sup>
LOGI	29.97 ± 0.59 <sup>a</sup>
P-value	0.0019

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, BORI: *B. longum* BORI, CH88: *L. paracasei* CH88, LOGI: *L. gasseri* LOGI

- 고지방 식이 및 시험 시료의 경구 투여에 따른 체중 변화를 확인하기 위해 실험 기간 동안 주 2회 체중을 확인하였음. 체중 변화를 관찰한 결과를 Figure 99에, 최종 체중을 비교한 결과를 Table 57에 제시하였음. 최종 체중에서 LFD군과 HFD군 간에 체중 차이는 유의적이었고 HFD군과 시료군 체중 차이는 유의적이지 않았음. 그러나 HFD 대비 BORI군에서 2.57%, CH88군에서 7.15%, LOGI군에서 6.73% 체중 감소 경향이 관찰 됨.

(나) 조직 무게 비교

각 군별로 시험시료를 8주 간 공급한 뒤 희생시킨 동물들의 장기 무게를 관찰한 결과는 다음과 같음.

**Table 58. Adipose tissue weights of experimental animals**

Group	Epididymal adipose tissue	Perirenal adipose tissue	Mesentric adipose tissue	Subcutaneous adipose tissue	Total white adipose tissue
LFD	0.38 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.08 <sup>b</sup>
HFD	1.20 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.72 ± 0.37 <sup>a</sup>
BORI	1.09 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.25 <sup>a</sup>
CH88	0.79 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.51 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.93 ± 0.27 <sup>a</sup>
LOGI	1.02 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.08 <sup>ab</sup>	2.29 ± 0.35 <sup>a</sup>
P-value	0.0016	0.0178	0.0019	0.0668	0.0047

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, BORI: *B. longum* BORI, CH88: *L. paracasei* CH88, LOGI: *L. gasserii* LOGI

- 실험 식이에 따른 군간 지방 조직의 무게를 Table 58에 나타내었음. 부고환 지방, 신장 주위 지방 조직, 장간막 지방 조직, 피하 지방에서 LFD군과 비교하여 HFD군의 조직 무게는 유의적으로 증가하였음. 부고환 지방에서는 통계적 유의차는 없었지만 BORI,CH88,LOGI군에서 지방 양이 상대적으로 줄었고 신장주위 지방 조직에서는 CH88군에서 지방 양이 감소하는 경향을 보였음. 장간막 지방에서는 BORI군에서 HFD군과 비교하였을 때 유의적으로 지방 양이 감소하였고 피하 지방에서는 HFD군과 비교하여 CH88, LOGI군에서 감소하는 경향을 보였음. 총 백색지방 양은 LFD군과 비교하여 HFD군에서 유의적으로 증가하였고 BORI, CH88, LOGI군은 통계적 유의차는 없었지만 지방 양의 상대적 감소를 확인 할 수 있었음.

**Table 59. Liver and spleen weights of experimental animals**

Group	Liver (g)	Spleen (g)
LFD	0.82 ± 0.03	0.06 ± 0.007
HFD	0.89 ± 0.04	0.06 ± 0.002
BORI	0.92 ± 0.09	0.07 ± 0.003
CH88	0.85 ± 0.03	0.07 ± 0.005
LOGI	0.90 ± 0.06	0.06 ± 0.008
P-value	0.5507	0.2473

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM. Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, BORI: *B. longum* BORI, CH88: *L. paracasei* CH88, LOGI: *L. gasserii* LOGI

- 실험 식이에 따른 군간 간, 비장의 무게를 Table 59에 나타내었음. 간과 비장의 무게는 A모든 군에서 통계적 유의차를 보이지 않았음.

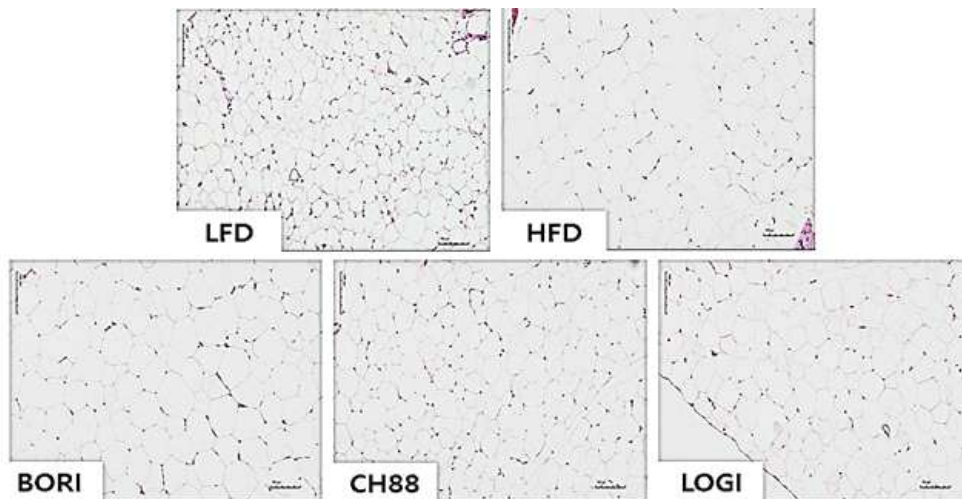
**Table 60. Colon and small intestine length of experimental animals**

Group	Colon (cm)	Small intestine (cm)
LFD	6.92 ± 0.48	35.30 ± 0.66
HFD	7.26 ± 0.42	35.10 ± 0.71
BORI	7.27 ± 0.37	35.40 ± 0.90
CH88	7.20 ± 0.09	36.42 ± 0.94
LOGI	6.90 ± 0.23	35.00 ± 1.22
P-value	0.9018	0.7715

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.  
 Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, BORI: *B. longum* BORI, CH88: *L. paracasei* CH88, LOGI: *L. gasseri* LOGI

- 실험 식이에 따른 군간 대장, 소장의 길이를 Table 60에 나타내었음. 대장과 소장의 길이는 모든 군에서 통계적 유의차를 보이지 않았음.

(다) 부고환 지방 조직의 조직병리학적 특징 관찰 (H&E staining)



**Figure 99. H&E staining of epididymal adipose tissue**

**Table 61. Average adipocyte size of epididymal adipose tissue**

Group	Adipocyte size(µm)
LFD	213.98 ± 7.83 <sup>b</sup>
HFD	311.68 ± 7.05 <sup>a</sup>

BORI	319.57 ± 18.98 <sup>a</sup>
CH88	263.54 ± 10.83 <sup>b</sup>
LOGI	293.25 ± 15.50 <sup>ab</sup>
<b>P-value</b>	<b>&lt;.0001</b>

Means with different superscripts are significantly different at p-value<0.05 as determined by Duncan's multiple range tests. Values are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, BORI: *B. longum* BORI, CH88: *L. paracasei* CH88, LOGI: *L. gasseri* LOGI

- 실험동물의 부고환 지방 조직에서 시험 시료의 공급에 의한 지방구 크기의 변화를 관독하기 위해 H&E staining을 실시함. H&E staining을 통해 촬영한 지방 조직 사진을 Figure 100에, 측정된 평균 지방구 크기를 Table 61에 제시하였음. LFD군과 비교하여 HFD군의 평균 지방구 크기는 통계적으로 유의적인 증가를 보였음. HFD군과 비교하여 BORI군은 지방구 크기의 변화가 관찰되지 않았지만 LOGI군은 감소하는 경향을 보였고 CH88군은 유의적으로 지방구 크기가 감소하였음을 확인 함.

#### (6) 고지방 식이로 유도된 비만 모델에서 *Lactobacillus paracasei* CH88 효능 평가

- 생균 스크리닝 연구를 통해 *L.paracasei* CH88의 지방구 크기 감소 효능을 확인하여 CH88의 사균체가 비만으로 인해 유도 된 전신성 염증에 미치는 영향을 확인하는 추가 실험을 진행 중임. 2020년 1월 10일 C57BL/6J 6주령 male 60마리가 입고 되어 2주간의 적응기를 가진 뒤 2020년 1월 24일부터 Live *L.paracasei* CH88, Heat heat-killed *L.paracasei* CH88, Lysozyme-treated and then sonicated *L.paracasei* CH88 세가지의 시험 시료 공급을 시작하였고 12주 뒤에 실험 동물을 희생하여 분석을 진행 할 예정임.

#### (가) 체중 변화

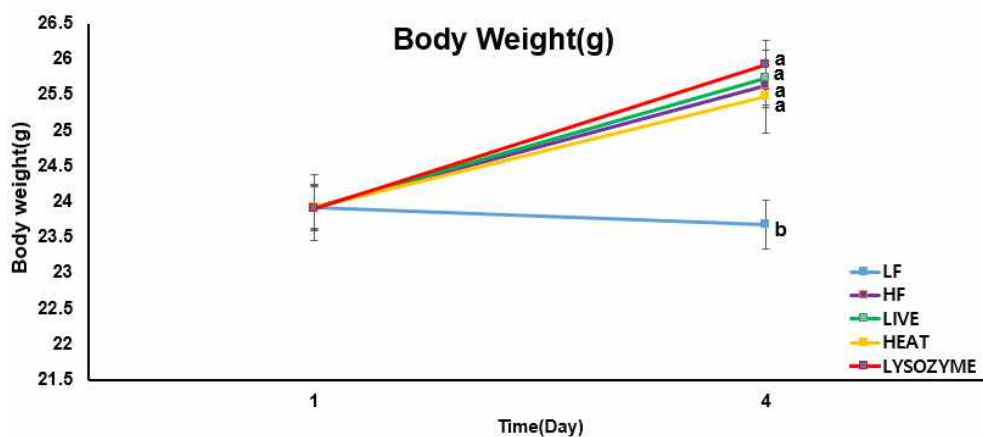


Figure 100. Body weight changes of experimental animals.

Abbreviation- LFD: Low fat diet group, HFD: High fat diet group, LIVE: live bacteria(*L. paracasei* CH88), HEAT: heat-killed bacteria(*L. paracasei* CH88), LYSOZYME: lysozyme-treated and then sonicated pellet of bacteria(*L. paracasei* CH88)



- 고지방 식이 및 시험시료의 공급에 따른 체중 변화를 확인하기 위해 4일 간격으로 2회 체중을 확인하였음. LFD군과 HFD군 간 체중 차이는 유의적이었으나 시험시료의 공급으로 인한 체중 감소는 아직 관찰되지 않았음.

## 제 5 절 연구개발성과

### 1. 국내외 논문 게재

- Li YC, Ku SM, Park MS, Li ZP, Ji G.E. Acceleration of aglycone isofalvone and g-aminobutyric acid production from doenjang using whole cell biocatalysis accompanied by protease treatment. *J Microbiol Biotechnol* 27, 1952-1960 (2017)
- Oh SY, Youn SY, Park MS, Lee YG, Baek NI, Ji GE. Synthesis of stachyobifiose using bifidobacterial  $\alpha$ -galactosidase purified from recombinant *Escherichia coli*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 1184-1190 (2018)
- Ahn HJ, You HJ, Park MS, Johnston TV, Ku SM, Ji GE. Biocatalysis od platycoside E and Platycodin D3 using fungal extracellulaf beta-glucoside responsible for rapid platycodin D production *Int. J. Mol. Sci.* 9, (2018)
- Jin WH, Yoon CH, Johnston TV, Ku SM, Ji GE. Production of selenomethionine-enriched *Bifidobacterium bifidum* BGN4 via sodium selenite bioconversion. *Molecules* 23, 2860 (ip 3.1)(2018)
- Park MJ, Park MS, Ji GE. Improvement of elctroporation-mediated transformation efficiency for a *Bifidobacterium* strain to a high stable level. *J. Microbiological Methods.* in press (2018)
- Yeo Ok Han<sup>1</sup>; Yunju Jeong<sup>1,2</sup>; Hyunju You<sup>1,3</sup>; Seockmo Ku<sup>4</sup>; GeunEog Ji<sup>1,2</sup>; MyeongSoo Park<sup>2</sup> The anti-rotaviral activity of low molecular weight and non-proteinaceous substance from *Bifidobacterium longum* BORI cell extract. *Microorganisms* 7, 108-115 (2019)
- Oh SY, Park MS, Lee YG, Thi AN, Baek NI, Ji GE. Enzymatic synthesis of  $\beta$ -galactosyl fucose using recombinant bifidobacterial  $\beta$ -galactosidase and its prebiotic effect. *Glycoconjugate Journal.*39, 199-209 (IF 2.5) 2019
- Hui Jin, Jeong YJ., Yoo SH, Johnston TV, Ku SM, Ji GE. Isolation and Characterization of High Exopolysaccharide-Producing *Weissella confusa* VP30 from Young Children's Feces. *J. Microbial Cell Factories.* 18. 110-122 (2019)
- Park MJ, Park MS, Ji GE. Cloning and heterologous expression of the  $\beta$ -galactosidase gene from *Bifidobacterium longum* RD47 in *B. bifidum* BGN4. *J. Microbiol.; Biotechnol.* accepted (2019)
- Kang S, You HJ, Lee YG, Jeong YJ, Johnston TV, Baek NI, Ku SM, Ji GE. Production, structural characterization, and in vitro assessment of the prebiotic potential of butyl-fructooligosaccharides. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 455, 2020.

## 2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭 및 발표주제	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 10th international Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functionl Foods.GSCO / Synthesis of stachyobifiose using bifidobacterial $\alpha$ -galactosidase purified from recombinant Escherichia coli	Oh SY, Youn SY, Park MS, Baek NI, Ji GE	2017	GSCO, 군산	대한민국
2	The 10th international Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functionl Foods.GSCO / Development of novel fucosylated galactose using recombinant bifidobacterial $\beta$ -galactosidase and its prebiotic effect.	Oh SY, Park MS, Baek NI, Ji GE	2017	GSCO, 군산	대한민국
3	The 10th international Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functionl Foods / Safety evaluation of Bifidobacterium bifidum BGN4	Kim MJ, Kim SY, Kang SN, Kwon B, Ji GE	2017	GSCO, 군산	대한민국
4	The 10th international Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functionl Foods / Safety evaluation of Bifidobacterium logum BORI	Kim MJ, Kim SY, Kang SN, Kwon B, Ji GE	2017	GSCO, 군산	대한민국
5	KoSFoST beyond 50 Years: Renew the New in Food Sciences /	Nayeon Lee, Soomin Lee, Junhyeok Yu, Byung-Hoo Lee, Jong Hyun Park	2018. 06	BEXCO, 부산	대한민국
6	Food, Nutrition and Health: Human Microbiome	Se-won Jang, Nayeon Lee, Soo-min Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2018. 10	BEXCO, 부산	대한민국
7	Food, Nutrition and Health: Human Microbiome	Soomin Lee, Sewon Jang, Nayeon Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-hyun Park	2018. 10	BEXCO, 부산	대한민국
8	Viruses of microbes 2018, EMBO(European Molecular Biology Organization) workshop	Se-Jin Kong, Jong-Hyun Park	2018. 07	University of Wroclaw, Wroclaw	Poland (폴란드)
9	2018 International Conference and the 23rd Annual Meeting of the Korean Society of Cancer Prevention(KSCP)	Soyoung Lee	2018. 11	서울대학교, 서울	대한민국
10	KoSFoST International Symposium and Annual Meeting (2018) / Optimization of exopolysaccharide production from Lactobacillus fermentum EPS22	Hui Jin,	2018. 06	부산 벅스코	대한민국
11	KoSFoST International Symposium and Annual Meeting (2018) / Development of human origin Lactobacillus with high level of selenium and zinc.	Rui Li,	2018. 06	부산 벅스코	대한민국
12	KoSFoST International Symposium and Annual Meeting / Metagenomic insights into potential prebiotic butyric-fructooligosaccharide effects on gut microbiota in ICR mouse.	Sini Kang, Geun Eog Ji.	2019	인천 송도컨벤시아	대한민국
13	KoSFoST International Symposium and Annual Meeting /	Min Ju Park, Myeong Soo Park, Geun Eog	2019	인천 송도컨벤시아	대한민국

	Lactose intolerance alleviation in post-weaning Balb/c mice following consumption of Bifidobacterium bifidum highly expressing $\beta$ -galactosidase.	Ji		아	
14	KoSFoST International Symposium and Annual Meeting / Screening of High Exopolysaccharide-Producing Weissella confusa VP30 from Human Feces and its application to Yogurt production with Improved Texture.	Hui Jin, Ji won Park, Yunju Jeong , Tony V. Johnston, SeockmoKu, Geun Eog Ji.	2019	인천 송도컨벤시아	대한민국
15	Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition	Ga-Yeon Lim, Ho-Tak Jung, Nayeon Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2017년 11월	HICO, 경주	Korea
16	Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition	Nayeon Lee, Ho-Tak Jung, Ga-Yeon Lim, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2017년 11월	HICO, 경주	Korea
17	KoSFoST beyond 50 Years: Renew the New in Food Sciences	Nayeon Lee, Soomin Lee, Junhyeok Yu, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2018년 6월	BEXCO, 부산	Korea
18	Food, Nutrition and Health: Human Microbiome	Se-won Jang, Nayeon Lee, Soomin Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2018년 10월	BEXCO, 부산	Korea
19	Food, Nutrition and Health: Human Microbiome	Soomin Lee, Sewon Jang, Nayeon Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2018년 7월	BEXCO, 부산	Korea
20	Viruses of microbes 2018, EMBO(European Molecular Biology Organization) workshop	Se-Jin Kong, Jong-Hyun Park	2018년 11월	University of Wroclaw ,Wroclaw	Poland (폴란드)
21	IPC 2019 (International scientific conference probiotics, prebiotics gut microbiota, and health)	Soomin Lee, Nayeon Lee, Sewon Jang, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2019년 6월	prague congress centre	Czech Republic
22	2019 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	Soomin Lee, Nayeon Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2019년 6월	Songdo ConvensiA, Incheon	Korea
23	KMB 2019 The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	Soomin Lee, Nayeon Lee, Byung-Hoo Lee, Jong-Hyun Park	2019년 6월	ICC Jeju	Korea

### 3. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Weissella cibaria</i> bacteriophage No.54 (WCP54)	PBDP1001	박테리오페이 지은행	2020
2	<i>Weissella cibaria</i> bacteriophage No.56 (WCP56)	PBDP1002	박테리오페이 지은행	2020

### 4. 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭	국명	출원/등록인	출원/ 등록일	출원/ 등록번호	상태
1	셀레늄 강화 유산균의 배양방법	대한 민국	권빈/김위홍	2017.11.29	10-2017-01 61980	출원
2	락토코커스 락티스 유산균으로 발효시킨 기능성 발효 당근주스의 제조방법	대한 민국	권빈/박종현/ 이병호	2019년 09월 26일	제10-20280 76호	등록
3	부티릴 프락토올리고당을 포함하는 프리바이오틱스 조성물	대한 민국	(주)비피도	2018.05.08.	10-2018-00 52402	출원
4	Composition of prebiotics with butyryl - fructooligosaccharides	미국	(주)비피도	2018.06.29.	USA 16/023,834	출원
5	당근액 및 박테리오파지를 이용한 락토코커스 락티스 내 나이신의 대량 생산 방법	대한 민국	박종현/이병호	2018.10.29	10-2018-01 30060	출원

### 5. 전문연구 인력양성

No	분류	기준년도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사졸업 (임가연)	2017		○				○	○				
2	석사졸업 (박다솜)	2018		○				○	○				

3	석사졸업 (정호탁)	2019		○		○		○					
4	석사졸업 (유준혁)	2019		○		○		○					
5	석사졸업 (이수민)	2020		○			○	○					
6	석사졸업 (정소정)	2020		○			○	○					
7	석사과정 (이나연)	2020			○		○	○					

## 6. 기술이전

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	양도계약	락토코커스 락티스 유산균으로 발효시킨 기능성 발효 당근주스의 제조방법	(주) 비피도	2020년 2월 5일	5,500,000원	
2	양도계약	당근액 및 박테리오파지를 이용한 락토코커스 락티스 내 나이신의 대량생산방법	(주) 비피도	2018년 11월 2일	15,000,000원	

## 7. 사업화성과 및 매출실적

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.92억원
			향후 3년간 매출	3.00억원

### 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

연구 목표 및 내용	달성도 (%)	수행 내용
GRAS로써 기능성 및 안전성이 확인되어 시장에서 유통되고 있는 균주 선정	100	500여 균주에서 GRAS인증 균주 2균주 포함하여 본 과제 진행을 위한 우수균주 선정 완료
유기 셀레니움 함유된 유산균 사균체 개발	100	B. bifidum BGN4를 이용하여 selenomethionine이 169.6 µg/g 함유된 소재를 개발함
NGS MiSeq system에 의한 기능성 유효물질 개발 및 분석법 확립 지놈베이스 생리활성물질 탐색	100	선발균주의 Genome sequencing 통하여 25 균주의 게놈에서 thioredoxin, kojibiose 등 기능성 물질 관련 유전자를 탐색하였음, 또한 RD47 및 BGN4의 β-galactosidase를 이용하여 GOS를 생산함
열, 음파파쇄, 건조 방법과 같은 물리적 처리에 의한 사균화 처리방법 개발 및 bacteriophage screening을 통한 생물학적 사균화 방법 연구	100	열처리, 초음파처리, 라이소자임 처리, 고압세포파쇄처리 등의 조건을 비교 평가하여 라이소자임과 고압세포파쇄처리 병행조건 확립함
Phageendolysin, lysozyme과 같은 생물학적 처리에 의한 사균체 제조방법 확립	100	선발균주 3종에 대한 라이소자임 처리 후 사균체 제조 방법 최적화 함
사균체물의 in vitro prebiotic 역가 측정	100	사균체 유래의 EPS를 이용한 prebiotics 효능 평가 완료 및 EPS 구성당 분석
균주대량 고농축 배양 기술 개발	100	5톤 발효기에서 10 <sup>12</sup> CFU/g 원말 생산 완료함
사균화 방법에 따른 수용성/침전물 사균체의 분획 및 유효 기능성 물질 분석	100	사균체 유래의 EPS에 대한 항산화기능, 프리바이오틱스 기능 등 평가함
사균화 공정의 최적화 조건 확립 및 실험실 스케일의 공정 확보	100	선발균주 3종에 대한 열처리, 라이소자임처리, 고압세포파쇄 조건에 대한 비교 평가를 통하여 최적의 사균화 공정을 구축하였음
항균활성평가/사균체의 설사, 과민성 장 증후군 개선, 식중독 개선 prebiotics 효과 연구	100	선발균주 3종의 사균체물의 38종 유새균에 대한 항균활성 평가 완료
면역 기능 및 염증 지표 평가	100	선발균주 분획물을 이용하여 각종 사이토카인 및 합염증 활성을 평가함
장내 미생물 군총 변화 평가	100	DSS 유도 대장염 모델에서 선발균주 3종의 열처리, 라이소자임처리, 생균에 대한 장내 마이크로바이옴 변화에 대한 평가 완료함
유산균 유래 사균체물의 대량 생산 기술	100	각 선발균주의 고농도배양 및 대량

공정의 정립		과쇄조건을 확립하여 시제품 생산 완료함
항염증 작용 (비만 모델) 평가	100	DSS 유도 및 고지방 식이로 유도된 대장염 모델에서 선발균주 3종의 열처리, 라이소자임처리, 생균에 대한 항염증 효능 평가 완료함
제품 생산 방법 확립 (분무/동결 건조)	100	각 선발 균주의 고농도 배양 조건을 최적화 하였으며 회수조건 및 동결건조 조건을 최적화 하여 원말을 생산하였음
사균체 유산균이 적용된 건강기능성 유제품 개발	100	사균체 첨가에 따른 물성 변화 평가 다당류 고생산 선발균주인 <i>W. confusa</i> VP30을 활용한 발효음료 소재 개발완료
상품기획, 디자인 및 소비자 테스트	100	<i>B. bifidum</i> BGN4 등 3종 유산균 과쇄물이 함유된 원료를 개발하여 화장품원료 적합성 및 기능성에 대한 공인기관 평가를 완료하였으며 제품화 완성함
사균체물의 안정성 및 유통적성 분석	100	선발균주의 안정성 최적화 연구를 수행하여 각 균주별 최적 조건 확립함
합계	100	



## 제 4 장 연구결과의 활용 계획

### 가. 예상되는 활용분야 및 활용방안

- 본 연구는 대장 미생물 군총의 변화가 대사성 질환에 어떠한 영향을 미치는 지를 평가하고 관련 기작을 규명하는 연구로 장내 미생물 변화와 대사성 질환 간의 상호작용을 포함으로써 주요 유전자의 후성 유전체학적 변화, 그에 따라 변화할 수 있는 각종 전사인자, 단백질의 발현 수준 변화를 확인함. 이러한 과정에서 확인하는 여러 가지 지표들은 대장 미생물과 염증성 장 질환 사이의 상호 작용을 설명하는 상세한 기전 규명 시 활용 가능할 것으로 사료됨. 다양한 기법을 이용한 사균화에 기반을 둔 새로운 사균체 제품은 국내·외 유산균 응용식품 소재산업 분야의 육성에 기여하는 바가 클 것으로 예상됨.
- 사균화된 유산균체의 경우 식품에서 가장 중요하게 평가되고 있는 인체 safety 확보가 용이 하며, 균체내의 기능성 성분들이 사균체의 strain에 따라 다양할 것으로 판단됨. 특히 기존의 열에 의한 사균화의 방법을 대신하는 bacteriophage 활용 신공법을 이용한 방법은 유효 성분 강화면에서 우위를 차지 할 수 있으며, 사균체에 존재하는 유산균 유래의 효소와 같은 활성 단백질들을 열에 의한 변성을 억제하여, 기능성을 유지할 수 있으므로 열에 의해 사균화한 유산균보다 고기능성의 제품화에 우수하며 생 유산균 보완재로서의 활용을 통하여 새로운 고부가 가치 식품 개발에 기여할 수 있음.
- 본 연구진이 기 확보 하고 있는 유산균체 생산 설비를 이용한 산업적 사균체 생산 설비 공정은 시스템 구축의 편이성을 제공할 수 있음. 또한 본 연구진이 확보하고 있는 NGS MiSeq 시스템을 활용한 metagenome 군총 분석 및 full genome sequencing 수행을 통한 신규 활성 물질을 탐색하고, food-grade *Bifidobacterium* 유전자 발현 시스템을 이용하여, 다양한 유산균 균체 및 사균체로부터 유래한 기능성 물질의 데이터 베이스화 및 대량 생산이 가능함.
- 염증성 장 질환 동물 모델을 활용한 대장 미생물 조성 차이 확인 및 염증 지표 발현 차이의 확인은 추후에 환자-대조군 비교 연구와 인체 중재 연구 등에서 유용한 기초자료로서 활용이 가능하며 혈중 지표 등은 관련 기작 규명 연구를 통해 진단 마커로서도 활용이 가능할 것으로 예상됨. 또 염증 억제에 관여하는 장 미생물의 프로바이오틱스의 활용 가능성에 대한 논의도 이루어질 수 있음.
- 본 연구에서 활용한 동물모델로부터 얻은 미생물학적 profile은 해당 질환의 미생물학적 특성을 설명할 수 있는 데이터베이스 구축에 중요한 역할을 할 것으로 사료되며, 이는 추후 장 박테리아 유전자의 기능 설명 및 유전자 지도 작성 시에도 유용한 기초자료로 활용되리라 사료됨.
- 동일한 연구 디자인(DSS-induced colitis)에서 다른 종류의 균주 공급에 따른 다회의 마이크로바이옴 분석을 통해, DSS로 유발되는 dysbiosis에서 유의적인 변화를 보이는 taxa에 기반으로 하여, eubiosis/ dysbiosis 평가 기준으로 활용하거나 장에서의 염증을 촉진 혹은 억제하는 것으로 보이는 미생물 선별을 통해 프로바이오틱스 개발 자료로 활용함. 또한 염증성 장질환의 관리에서 활용될 수 있는 synbiotics 및 probiotics의 개발가능성에 대한 연구 결과를 제공하여 연구결과물이 지식재산권으로 등록되고 활용될 수 있음.

- 연구책임자를 포함한 연구진은 만성적 염증성 질환의 일종인 비만에서 생균(프로바이오틱스) 혹은 사균체(파라프로바이오틱스)를 항비만 소재로 제안하기 위하여, high-fat 식이를 공급하여 만든 비만 동물 모델에 선별된 생균(probiotics) 혹은 사균체(paraprobiotics)를 경구 투여하여 지방 축적 및 그로인한 만성적 염증 증가에 미치는 영향과 관련 기전을 연구하려함. 여러 개의 생균을 8주간 경구투여하여 항비만 효과를 갖는 생균(probiotics)를 선별하였으며, 현재 생균과 사균체를 공급하는 연구를 진행하고 있음. 해당 연구 결과는 학술 논문으로 투고 예정임.
- 국내 자체에서 개발된 균주의 경우 특정 효능에 대한 근거가 부족한 경우가 많아 국제 경쟁력이 떨어지며 수출이 되더라도 저가에 공급되고 있는데 유산균 사균체의 작용 매커니즘에 대한 체계적이고 과학적인 연구를 통한 객관적인 증거를 확보하여 국제경쟁력을 확보.
- 외국의 경우 균주 고농도 배양 및 제품화에 대한 기업 기밀이 철저히 관리되고 있음. 따라서, 본 연구팀에서 생산하고 있는 유산균 균주를 바탕으로 하는 현재 수출상품으로 진입하고 있는 사균체 제품의 수출 경쟁력을 배양에 기여할 수 있음.
- 유산균 사균체의 프로/프리 바이오티크스의 활용 가능 영역의 추가를 통한 국내 기능성 식품의 글로벌화에 기여.

#### 나. 연구개발 관련 추가 연구의 필요성

- *Bifidobacterium bifidum* BGN4의 염증성 대장염 예방 효과 기전 중 장벽의 강화에 있어 NLRP6/caspase-1/IL-18 시그널링이 관여했을 가능성이 존재하나, 정확한 인과관계를 확인하기 위해선 in vitro 실험을 통해 인과관계의 증명이 필요함.
- *Bifidobacterium bifidum* BGN4를 현재 젊은 층에서도 증가하는 염증성 대장염의 치료제이자 보조제로서 쓰이기 위해선 임상실험을 통해 동물실험에서 나타났던 효과들이 재현되는지 확인해볼 필요가 있음.
- 사균체에서도 생균과 유사한 염증조절효과, 비만억제 결과를 얻을 수 있기 때문에 동물 유효성 평가, 인체적용 연구를 거쳐 개별인정형 기능성식품 소재로 개발이 가능함.
- 유기셀레늄(selinomethionine)을 고 함유한 *B. bifidum* BGN4의 경우 신규 하게 개발된 기능성 식품소재로 세포과쇄물, 건조균체 등으로 활용하여 식품소재로 활용할 수 있으며 독성평가, 동물유효성 평가, 인체적용 연구를 거쳐 일반식품 소재나 개별인정형 기능성식품 소재로 개발이 가능함.
- *W. confusa* 가 생산하는 다당류를 활용한 변비개선 기능성식품의 경우 기존 고시형 프로바이오틱스 19종에 해당하지 않는 소재로, 동물실험을 통한 효능평가와 독성평가, 인체적용 연구를 통하여 개별인정형 식품으로 등록을 진행.

#### 다. 기업화, 사업화 및 기술이전 계획

- 새로운 개념의 사균화된 건강기능성식품 제품 개발 및 시판이 가능하며, 개발기술 및 공정의 특허화 및 기술이전

- 사균화된 유산균체 및 그 유래 물질에 의한 Para-pro/Pre-biotics 효과로 “항염증 개선”, “항당뇨 및 metabolic syndrome 개선”, “항균등으로 설사방지”, “면역기능 강화” 등에 대한 효능 특허화 및 기술이전
- 다양한 기능성의 사균화된 유산균체의 건강기능식품 인허가로 타 건강기능식품과의 기능성 시너지 효과 검토 후 활용
- 본 연구를 통해 얻은 동물모델 별 대장 미생물 profile은 각 질환의 개선 및 증상 완화에 효과적으로 적용할 수 있는 새로운 프리바이오틱스 소재로써 추후 실용화 연구를 통해 기업화 추진
- 본 연구에서 진행하는 유산균 사균체 제품화 기술은 기존의 단순한 열처리 사균체 기술을 보다 진척시켜 사균체 기술의 다양한 기술 개발에 기여하고 또한 유산균 균체의 일반적 물질에 비하여 부가가치가 더 높은 물질 개발을 통하여 기술 수준의 발전에 기여함.
- 본 연구팀이 주력하고 있는 해외 시장의 기존 유통망을 바탕으로 기능성 사균화 유산균의 제조 기술 및 제품 진출 가능성 큼
- 유산균 사균체 기술개발 후 예측되는 국내·외 주요 판매처 현황

판매처	국가 명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량(개)	예상 판매기간(년)	예상 총판매금 (천원)	관련제품
북***도	중국	3.5	100,000	2020	350,000	분말요구르트
비****이	대만	3.5	30,000	2020	105,000	분말요구르트
w*	홍콩	3.5	20,000	2020	70,000	분말요구르트
g*****h	싱가폴	3.5	20,000	2020	70,000	분말요구르트
***S	미국	3.5	100,000	2020	350,000	분말요구르트
s****p	중국	3.5	50,000	2020	175,000	분말요구르트
*이	중국	3.5	80,000	2020	280,000	분말요구르트
비***도	베트남	3.5	100,000	2020	350,000	분말요구르트

- 유산균 사업화 계획 및 기대효과

구 분		2020년 (개발종료 후 1년)	2021년 (개발종료 후 2년)
사업화 제품		분말요구르트	
투자계획(백만원)		1,800	2,000
판매 계획 (백만원)	내 수	20,000	30,000
	직접수출	6,300	9,000
	간접수출	700	1,000
	계	27,000	40,000
비용절감(백만원)		7,000	10,000
수입대체(백만원)		35,000	50,000

- 다양한 유산균 사균체의 건강기능식품 인허가로 인한 관련 산업 및 타 산업의 경제성 증진
- 유산균 사균체의 프로/프리 바이오티크스의 활용 가능 영역의 추가를 통한 국내 기능성 식

품의 글로벌화에 기여

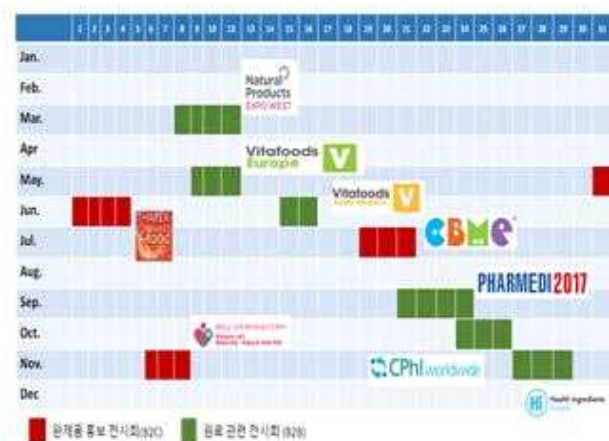
- 세계 수출 1,000억 원/년 달성을 위한 기반 기술 확보
- 관련 식품업계의 신규 기능성 식품소재로의 개발 가능성 높음.
- 일본 시장의 경우 현재 일본 유통망을 보유하고 있는 distributor를 통하여 일본 소비자청 '기능성표시식품' 으로 신고를 통한 수출가능성 검토 필요

[산업화 및 실용화 전략]



[해외시장 진출 전략]

해외 전시회를 통한 신규 바이어 발굴



(주)비피도 해외거래처를 통한 영업



## 붙임. 참고문헌

- Laurent, M. A., & P. Boulenger. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 445-454 (2003).
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133-139 (2014).
- Blay, G. L., Lacroix, C., Zihler, A., & Fliss, I. *In vitro* inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA1 and antibiotics against common intestinal bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 252-257 (2007).
- Das, D., Rwivoo, B., & Arun, G. A food additive with prebiotic properties of an  $\alpha$ -D-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20-26 (2014).
- Tsuda, H., & Taku, M. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, 16(1), 87-92 (2010).
- Ciszek Lenda, M., Nowak, B., Śróttek, M., Gamian, A., & Marcinkiewicz, J. "Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages." *International Journal of Experimental Pathology*, 92(6), 382-391 (2011).
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., Clara, G., Suárez, A., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 227-237 (2012).
- Bouzar, F., Jutta, C., & Michel, D. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2310-2317 (1997).
- Izawa, N., Hanamizu, T., Iizuka, R., Sone, T., Mizukoshi, H., Kimura, K., & Chiba, K. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(2), 119-123 (2009).
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., & Rastall, R. A. *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852 (2012).
- Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., & Corsaro, M. M. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. *Marine Drugs*, 16(2), 69 (2018).
- Abaev, I., Foster-Frey, J., Korobova, O., Shishkova, N., Kiseleva, N., Kopylov, P., ... & Donovan, D. M. "Staphylococcal phage 2638A endolysin is lytic for *Staphylococcus aureus* and harbors an inter-lytic-domain secondary translational start site." *Applied*

- microbiology and biotechnology 97.8, 3449–3456.(2013).
- Chang, Yoonjee, Minsik Kim, and Sangryeol Ryu. "Characterization of a novel endolysin LysSA11 and its utility as a potent biocontrol agent against *Staphylococcus aureus* on food and utensils." *Food microbiology* 68, 112–120, (2017).
  - Gutierrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. "Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5." *PloS one* 9.9 (2014).
  - Heselpoth, R. D., Yin, Y., Moulton, J., & Nelson, D. C. "Increasing the stability of the bacteriophage endolysin PlyC using rationale-based FoldX computational modeling." *Protein Engineering, Design and Selection* 28.4, 85–92. (2015).
  - Jasim, Hayder Nsaif, Rand Riadh Hafidh, Ahmed Sahib Abdulmir. "Formation of therapeutic phage cocktail and endolysin to highly multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*: in vitro and in vivo study." *Iranian journal of basic medical sciences* 21.11, 1100, (2018).
  - Knox, Justin, Anne-Catrin Uhlemann, Franklin D. Lowy. "Staphylococcus aureus infections: transmission within households and the community." *Trends in microbiology* 23.7, 437–444, (2015)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.