

918002-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
포스트게놈다부처유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004052-01

반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발

2022.04.11

주관연구기관 / (재)농축산용미생물산업육성지원센터
협동연구기관 / 전북대학교
협동연구기관 / 우진비앤지 주식회사

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반
면역증강용 미생물제제 개발

농림식품기술기획평가원
농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

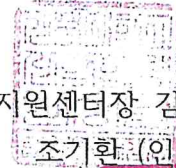
본 보고서를 “반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발”
(개발기간 : 2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.04.11

주관연구기관명 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터장 김대혁 (인)

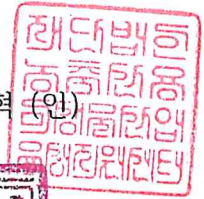
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단장

협동연구기관명 : 우진비앤지 주식회사 대표



조기환 (인)

강석진 (인)



주관연구책임자 : 김 양 현

협동연구책임자 : 신 동 현

협동연구책임자 : 이 성 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급				
							일반[√], 보안[]				
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명	사업명			포스트다부처유전체사업			
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호			918002-4				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0904	40%	LA0903	30%	LA0708	30%				
	농림식품과학기술분류	CA0103	40%	AB0299	30%	CA0302	30%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발							
		영문		Development of microbiological agent for immune enhancement based on microbiome in dogs and cats							
주관연구개발기관		기관명		(재)농축산용미생물산업육성 지원센터		사업자등록번호		624-82-00030			
		주소		(58212)전북 정읍시 칠원과학로 241		법인등록번호		211222-0006871			
연구책임자		성명		김양선		직위		팀장			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					
연구개발기간	전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3년 9개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 의 지원금		
	현금	현금	현물	지방자치단체	기타()	현금	현물	합계			
총계	1,024,000	34,201	307,800	-	-	-	-	1,058,201	307,800	1,366,001	-
1년차	220,000	7,334	66,000	-	-	-	-	227,334	66,000	293,334	-
2년차	287,000	9,587	86,100	-	-	-	-	296,587	86,100	382,687	-
3년차	301,000	10,100	90,900	-	-	-	-	311,100	90,900	402,000	-
4년차	216,000	7,200	64,800	-	-	-	-	223,200	64,800	288,000	-
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
공동연구개발기관	전북대학교	신동현	조교수			역할		공공 대학			
	우진비앤지(주)	이성호	이사			역할		공공 기업			
연구개발담당자 실무담당자	성명	김정애		직위		선임연구원					
	연락처	직장전화		휴대전화							
		전자우편		국가연구자번호							

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 2월 10일

연구책임자: 김 양 선



주관연구개발기관의 장: (재)농축산용미생물산업육성지원센터장 (직권인)
 공동연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단장 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 우진비앤지 주식회사 대표 (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

사업명		포스트다부처유전체사업		총괄연구개발 식별번호		-	
내역사업명		-		연구개발과제번호		918002-4	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0904	40%	LA0903	30%	LA0706	30%
	농림식품 과학기술분류	CA0103	40%	AB0299	30%	CA0302	30%
총괄연구개발명		-					
연구개발과제명		반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발					
전체 연구개발기간		2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31					
총 연구개발비		총1,366,001천원 (정부지원연구개발비:1,024,000천원, 기관부담연구개발비 :342,001천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형		-					
연구개발과제 특성		-					
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	○ NGS 기반 유전체 기술을 활용한 반려견·반려묘 면역증강용 미생물 제제 개발					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 반려동물 유래 기능성 미생물 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 개, 고양이 유래 장내 미생물 확보 및 기능성 평가 - 유용미생물 <i>in vivo</i> 임상 시험을 통한 혈액 성분, 간수치, 전해질 및 생화학 수치 등 건강지표 변화, 면역관련 유전자 발현을 변화, 장내 마이크로바이옴 변화 등 분석 ○ 유용미생물 유전체 해독 <ul style="list-style-type: none"> - 유전체 분석을 활용한 유용미생물 특성, 기능성 및 안전성 확보 - 배양 조건에 따른 대사체 분석 ○ 반려동물용 고농도 미생물 사료첨가제 사업화 <ul style="list-style-type: none"> - 산업화용 제형화 확보 및 산업용 대량배양공정법 확립 - 제품등록 및 사업화 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 반려동물 유래 미생물 168종 확보 ○ 프로바이오틱스 8종의 전장 유전체 분석을 통한 유전적 기능성 및 안전성 확보 ○ 프로바이오틱스 4종의 배양조건에 따른 대사체 분석 ○ 반려견 37마리 대상 유용미생물 급여 전·후 혈액 성분, 간수치, 전해질 수치, 면역 조절 유전자 발현량 수치 확보 ○ 반려견 37마리 대상 유용미생물 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 데이터 확보 ○ 반려묘 34마리 대상 유용미생물 급여 전·후 혈액내 세포수, 간수치, 전해질 수치, 면역 조절 유전자 발현량 수치 확보 ○ 반려묘 34마리 대상 유용미생물 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 데이터 확보 ○ 반려견 대상 프로바이오틱스 '멍멍정장' 제품 출시 및 사업화 ○ 반려묘 대상 프로바이오틱스 '냥냥정장' 제품 출시 및 사업화 						
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 균주 확보 및 유용미생물의 적용범위 확인 ○ 유전체 기술 활용 반려동물 고기능성 사료첨가제 개발 ○ 유전체 기술 활용 맞춤형 반려동물 건강기능 글로벌 제품 개발 ○ 신규 프로바이오틱스 제품 개발 및 산업화를 통한 매출 증대 						

	○ 신규 사업파트 활성화를 통한 전문 연구인력 및 생산인력의 청년 일자리 창출 기대 ○ 기존 축산 영업망을 통한 유럽 및 북미 지역의 수출향상 기대											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	-											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	7	7	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	
국문핵심어 (5개 이내)	반려견		반려묘		마이크로바이옴		유전체 분석		유산균			
영문핵심어 (5개 이내)	Dog		Cat		Microbiome		Genome analysis		Probiotics			

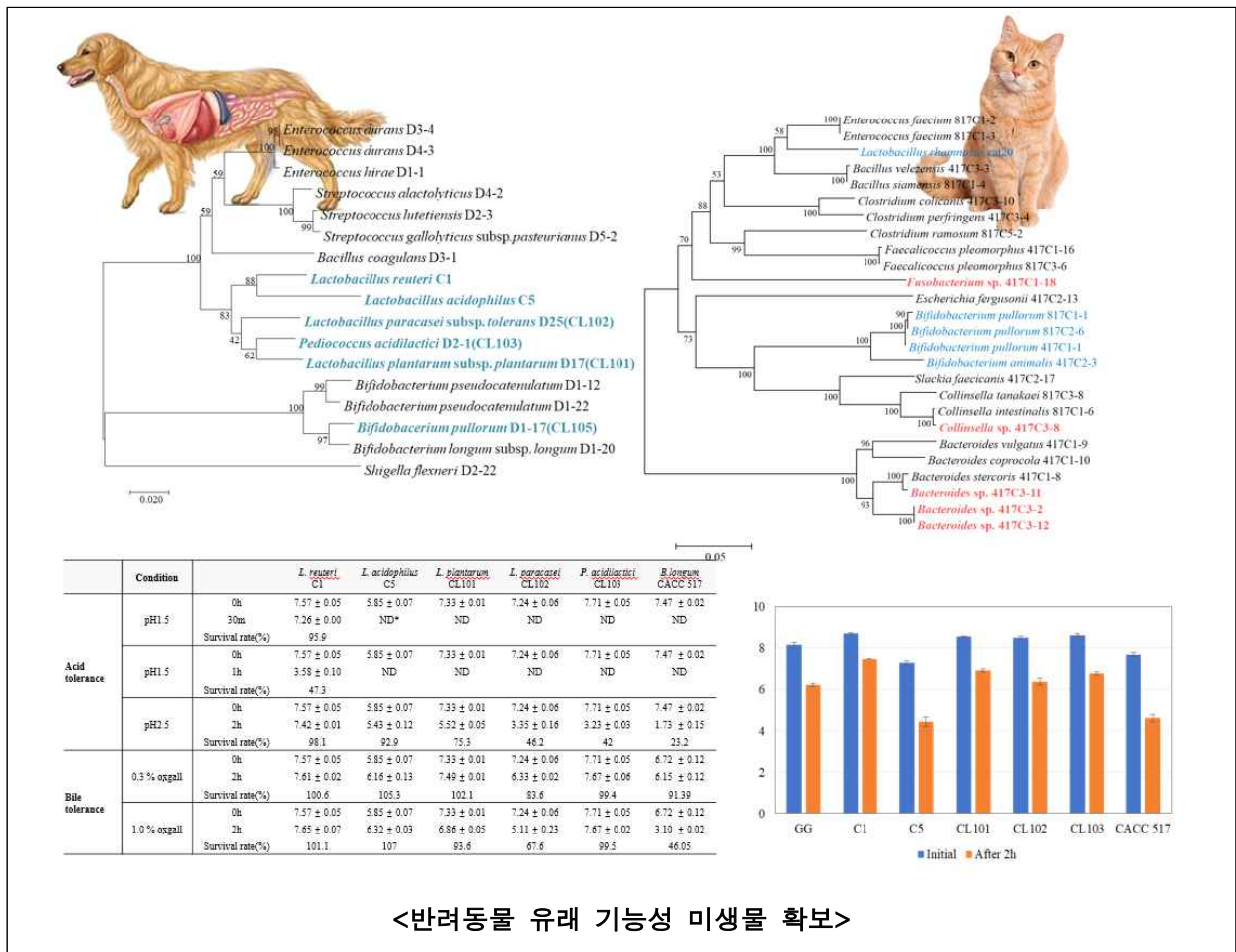
〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요.....	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용.....	7
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도.....	11
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도.....	141
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	149

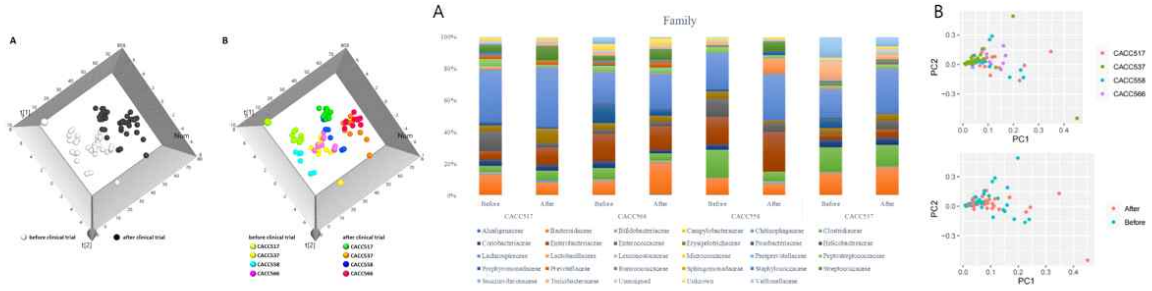
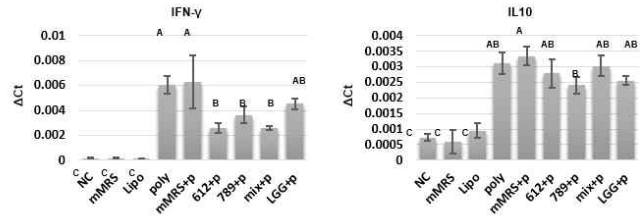
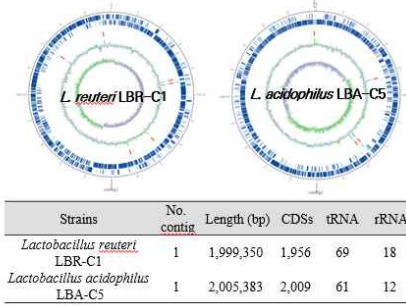
1. 연구개발과제의 개요

○ 본 연구에서는 반려동물 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발을 위해 다음과 같이 9가지의 전략을 세워 연구를 진행하였다.

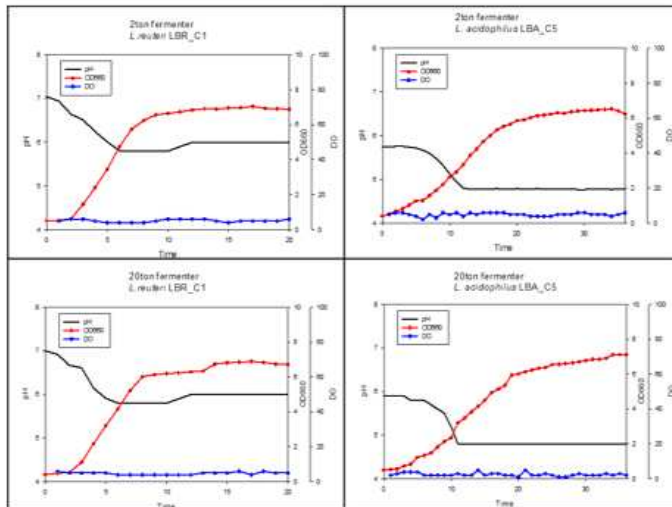
- 1) 반려견·반려묘 분변 샘플 확보 및 혐기성·호기성 미생물 분리·동정, 2) 프로바이오틱스 기능성 평가를 통한 유용미생물 선발, 3) 선발된 유용미생물의 전장유전체 및 대사체 분석을 통한 유전적 기능성 및 안전성 확보, 4) 시제품 제작 및 반려견·반려묘 대상 급여 임상실시, 5) 반려견·반려묘 대상 유용미생물 급여 전·후 혈액 성분 변화, 간수치, 전해질 등 생화학 성분 변화 및 면역조절 인자의 발현을 변화 분석, 6) 반려견·반려묘 대상 유용미생물 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 변이 분석, 7) 유용미생물의 산업용 배양 조건 탐색 및 배양 최적화, 8) 유용미생물의 산업용 제형화 연구를 통한 제품화, 9) 반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 제품 등록 및 사업화



<반려동물 유래 기능성 미생물 확보>



<유용미생물 전장 유전체 분석 및 임상실험을 통한 효과분석>



<반려동물 대상 면역증강용 미생물제품 사업화>

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 년도 (2018)	반려견·반려묘 유래 유익미생물 자원 확보 및 유익 미생물 후보 균주 10종 선정, 유익 미생물의 특성 확인, 유익 미생물 기능성, 안정성 및 면역증진 평가	-반려동물 유래 <i>in vitro</i> 스크리닝을 통한 기능성 균주 탐색 및 확보 - 혐기적 조건(90% N ₂ , 5% H ₂ , 5% CO ₂) 으로 반려견 유래 유산균 분리 - Probiotics 특성 :내산성 (pH1.5, pH2.5), 내담즙성 (0.3% oxgall), 가축유래 병원성미생물 6종에 대한 항균력, HT-29 cell을 이용한 장내 정착능
	반려동물 적용 유익 미생물의 기능성 및 안전성 검사	- EFSA 기준 항생제 내성 테스트
	유용미생물 신규 유전체 해독	- 반려견 유래 장내미생물균주 2종(<i>L. reuteri</i> 와 <i>L. acidophilus</i>)에 대한 신규 유전체해독
	유용미생물 대사체 해독	- 반려견 장내미생물균주 2종(<i>L. reuteri</i> 와 <i>L. acidophilus</i>) 유래 유용성분 평가
	유용미생물 유전체 비교분석	- 분리균주와 16S rRNA sequence가 가장 유사한 6종의 reference type strains과 유전체비교
	균주의 생화학적 특성 조사	- 선발 균주의 형태학, 생리 생화학적 특징 조사
	선발된 균주의 배양학적 특성 조사	- 기본배지 (<i>Lactobacilli</i> MRS broth) 에서 성장패턴 (pH, OD660 변화 확인), 배양조건 (온도, 산소조건, RPM, 최적 pH) 조사
	산업용 배양 배지 탐색	- 선발된 균주가 선호하는 탄소원, 질소원, 무기염류 조사 - Flask, 30L fermenter를 사용하여 산업배양배지 조성 실험 진행
시제품 제작	- 선발된 균주에 따라 선정된 산업 배양 배지 와 배양 조건에 따라 배양 후 농축, 동결건조 공정 후 1차 원료 시제품 제작	
2차 년도 (2019)	반려견·반려묘, 전통식품 유래 유익미생물 자원 확보 및 유익 미생물 후보 균주 10종 선정, 유익 미생물의 특성 확인, 및 유익 미생물 기능성 평가	- 반려동물과 전통식품 유래 <i>in vitro</i> 스크리닝을 통한 기능성 균주 탐색 및 확보 - 혐기적 조건(90% N ₂ , 5% H ₂ , 5% CO ₂) 으로 반려묘 유래 장내 유산균 분리 - 전통식품, 반려동물 유래 유산균의 probiotics 특성 :내산성 (pH2.5), 내담즙성 (0.3%, 1% oxgall), 가축유래 병원성미생물 6종, <i>Clostridioides difficile</i> 에 대한 항균력, HT-29cell을 이용한 장내 정착능 - RAW264.7(mouse) cell 이용한 NO assay - DH82, RAW264.7(mouse) cell 이용한 유용미생물의 면역증진 평가

	반려동물 적용 유익 미생물의 기능성 및 안전성 검사	- EFSA 기준 항생제 내성 테스트
	반려동물 미생물제제 안정성 및 면역증진 평가(임상시험)	- 미생물 4종 동결건조 미생물제제 제조 및 저장 중 안정성 검사 - 반려견 유용미생물제제 임상시험 참여견 모집 - 반려견 유래 유산균 4종미생물제제 저장 안정성 및 반려견 1달 급여 임상시험을 통한 면역증진 평가
	유용미생물 신규 유전체 해독	- 반려견 유래 유용미생물 3종(<i>P. acidilactici</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. longum</i>) 전장유전체 해독 - 반려묘 유래 <i>Bacteroides</i> sp. 2종 전장유전체 해독
	유용미생물 대사체 해독	- 반려견 6종, 반려묘 2종, 된장 2종 대사산물 1H NMR 분석
	유용미생물 원제에 대한 메타지놈 분석	- <i>B. longum</i> CACC 517 건강견 5, 설사환자견 5 급여 전/후 마이크로바이옴 - <i>P. acidilactici</i> CACC 537 건강견 5, 설사환자견 5 급여 전/후 마이크로바이옴 - <i>L. plantarum</i> CACC 558 건강견 4 급여 전/후 마이크로바이옴
	반려묘 기본 메타지놈 분석	- 반려묘 22마리 장내미생물 메타지놈 분석
	대량배양공정확립	- 30L jar fermenter의 조건을 바탕으로 100L, 2ton, 20ton fermenter의 배양조건 scale-up 적용시험 - 원제 제형화 연구(보조제 및 부자재 탐색) - 대량배양공정체계에 따른 생산수율 검토
	완제품 제형화	- 경쟁 제품 및 시장에 유통되는 제형 조사 - 제형 타입에 따른 시제품 생산
	사업화	- 허가 사항에 따른 제품 등록 - 제품 안전성 확인 (피부자극, 급성경구독성) - 완제품 사양시험 (면역학적 기능 조사 포함) - 제형에 따른 포장 형태 및 함량 선정
3차 년도 (2020)	반려묘 유래 유익미생물 자원 확보 및 유익 미생물 후보 균주 선정, 유익 미생물의 특성 확인, 및 유익 미생물 기능성 평가	- 반려묘 유래 <i>in vitro</i> 스크리닝을 통한 기능성 균주 탐색 및 유용 균주 선발 - 혐기적 조건(90% N ₂ , 5% H ₂ , 5% CO ₂) 으로 반려묘 유래 장내 유산균 분리 - 반려묘 유래 유산균의 probiotics 특성 :내산성 (pH2.5), 내담즙성 (0.3%, 1% oxgall), 가축유래 병원성미생물 10종에 대한 항균력, HT-29cell을 이용한 장내 정착능 - RAW264.7(mouse) cell과 Fcwf-4(cat) cell을

		WST-1 assay를 통한 숙주세포에 대한 면역증진 평가
	반려동물 적용 유익 미생물의 기능성 및 안전성 검사	- EFSA 기준 항생제 내성 테스트
	반려동물 미생물제제 안정성 및 면역증진 평가(임상시험)	- 미생물 2종 및 이들 2종 미생물의 복합균주에 대한 동결건조 미생물제제 제조 및 저장 중 안정성 검사 - 건강한 반려묘 대상 유용미생물제제 임상시험 참여묘 모집 - 반려묘 유래 유산균 3종 미생물제제(미생물 2종 및 이들 2종 미생물의 복합균주) 저장 안정성 및 반려묘 45일 급여 임상시험을 통한 면역증진 평가
	유용미생물 제품에 대한 메타지놈 분석	- 반려견/ 반려묘 유래 유용미생물유전체 해독 및 기능 유전체 분석 - 반려견유래 유용 미생물 급여 실험 개체들에 대한 메타지놈 분석
	유용미생물 제품에 대한 듀얼전사체 분석	- 반려견유래 유용 미생물 급여 실험 개체들에 대한 전사체 분석
	제품 마케팅	- 최초의 반려견 유래균, 임상실험에서 입증된 효능, 효과를 기초로 한 홍보자료 제작 - 총판, 지역매장, 동물 병원, 인터넷 쇼핑몰 등 홍보 및 영업
	개발된 제품의 안정성 평가	- 유통기한 (24개월) 보증 균수 유지 확인
	프로바이오틱스 균주의 특성 조사	- 형태학적, 생리, 생화학적 특성 조사
	선발된 프로바이오틱스 균주의 배양적 특성 조사, 산업배양배지 조사	- 기본배지에서의 배양 패턴 (pH, DO 변화) 및 균주 형태 변화 조사 - 배양 조건 확인 (온도, 산소요구량, 교반속도, 내압, 배양시간) - 프로바이오틱스 균주가 선호하는 탄소원, 질소원, 무기염류 조사 - 탄소원, 질소원, 무기염류의 조합비에 따른 최적 조건 조사
	시제품 제작 (원제)	- 선발된 균주에 따라 선정된 산업 배양 배지 와 배양 조건에 따라 배양 후 농축, 동결건조 공정 후, 1차 원료 시제품 제작
4차 년도 (2021)	반려동물 미생물제제 안정성 및 면역증진 평가(임상시험)	- 반려묘 유래 유산균 3종 미생물제제 반려묘 45일 급여 임상시험을 통한 면역증진 평가
	유용미생물 신규 유전체 해독 및 대사체 분석	- 반려묘 유래 유용미생물유전체 해독 및 기능 유전체 분석 - 반려견 유래 유용미생물의 배양 조건에 따른 대사체 분석
	유용미생물 원제에 대한	- 환자묘/정상묘에 대한 반려묘유래 유용 미생물

	메타지놈 분석	급여 전후에 대한 메타지놈 분석
	대량배양공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 30L jar fermenter의 조건을 바탕으로 100L, 2ton, 20ton fermenter의 배양조건 scale-up 적용시험 - 원제 제형화 연구(보조제 및 부자재 탐색) - 대량배양공정체계에 따른 생산수율 검토
	완제품 제형화	<ul style="list-style-type: none"> - 경쟁 제품 및 시장에 유통되는 제형 조사 - 제형 타입에 따른 시제품 생산
	사업화	<ul style="list-style-type: none"> - 허가 사항에 따른 제품 등록 - 제품 안전성 확인 (피부자극, 급성경구독성) - 완제품 사양시험 (면역학적 기능 조사 포함) - 제형에 따른 포장 형태 및 함량 선정

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

(1-1) 반려견 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발

○ 반려동물 유래 in vitro 스크리닝을 통한 기능성 균주 탐색 및 확보

- 반려견 유래 미생물 88종을 분리하였고 16S rRNA 서열을 분석하여 미생물 종을 동정하였다(표 1).

<표 1> 반려견 유래 미생물 확보

순번	유래	미생물 종류
1	시쭈	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5
2	시쭈	<i>Lactobacillus reuteri</i> C1
3	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
4	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
5	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
6	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
7	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
8	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
9	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
10	프렌치불독	<i>Enterococcus hirae</i>
11	보더콜리	<i>Pediococcus acidilactici</i>
12	보더콜리	<i>Pediococcus acidilactici</i>
13	보더콜리	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
14	보더콜리	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
15	보더콜리	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
16	보더콜리	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
17	보더콜리	<i>Pediococcus acidilactici</i>
18	보스턴테리어	<i>Bacillus coagulans</i>
19	보스턴테리어	<i>Enterococcus hirae</i>
20	보스턴테리어	<i>Enterococcus hirae</i>
21	보스턴테리어	<i>Enterococcus durans</i>
22	코커스패니얼	<i>Enterococcus durans</i>
23	코커스패니얼	<i>Streptococcus alactolyticus</i>
24	코커스패니얼	<i>Enterococcus durans</i>
25	코커스패니얼	<i>Enterococcus durans</i>
26	코커스패니얼	<i>Streptococcus alactolyticus</i>
27	코커스패니얼	<i>Enterococcus faecium</i>
28	코커스패니얼	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
29	코커스패니얼	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
30	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
31	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
32	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
33	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
34	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
36	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
37	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
38	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
39	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
40	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
41	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
42	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
43	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
44	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
45	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
46	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
47	갈색푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>

48	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
49	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
50	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
51	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
52	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
53	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
54	갈색 푸들	<i>Lactobacillus paracasei</i>
55	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
56	갈색 푸들	<i>Lactobacillus plantarum</i>
57	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
58	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
59	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
60	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
61	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
62	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
63	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
64	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
65	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
66	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium saeculare</i>
67	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
68	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
69	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
70	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
71	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
72	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
73	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
74	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
75	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
76	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
77	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
78	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
79	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
80	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
81	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
82	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
83	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
84	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
85	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
86	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
87	갈색 푸들	<i>Pediococcus acidilactici</i>
88	갈색 푸들	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>

- 유용미생물 탐색을 위해 장내생존능-내산성 테스트를 pH 1.5와 pH 2.5에서 각 30분, 1시간, 2시간의 조건에서 실시하였고, 그 중 *Lactobacillus reuteri* C1 (=LBR_C1)균주는 pH 1.5, 30분 조건에서 높은 생존률을 보였다(표 2).

<표 2> 반려견 유래 미생물의 *in vitro* 내산성 결과

구분	Acidic stress condition (viability Log ₁₀ CFU, %)			
	Initial	pH 1.5, 30m	pH 1.5, 1h	pH 2.5, 2h
C1	7.57 ± 0.05	7.26 ± 0.00 (95.9)	3.58 ± 0.10 (47.3)	7.42 ± 0.01 (98.1)
C5	5.85 ± 0.07	-	-	5.43 ± 0.12 (92.9)
CACC517	7.47 ± 0.02	-	-	1.73 ± 0.14 (23.1)
CACC558	7.33 ± 0.01	-	-	5.52 ± 0.05 (75.3)
CACC566	7.24 ± 0.06	-	-	3.35 ± 0.16 (46.2)
CACC537	7.71 ± 0.05	-	-	4.40 ± 0.11 (75.9)

- 유용미생물 탐색을 위해 장내생존능-내담즙성 테스트를 실시하였고, 그 중 *Lactobacillus acidophilus* C5 (=LBA_C5), *Lactobacillus reuteri* C1 (=LBR_C1), *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* CACC558과 *Pediococcus acidilactici* CACC537균주는 oxgall 0.3% 및 1% 조건에서 90%이상의 높은 생존률을 보였다(표 3).

<표 3> 반려견 유래 미생물의 in vitro 내담즙성 결과

구분	Oxgall concentration (viability Log ₁₀ CFU , %)		
	Initial	0.3%, 2h	1.0%, 2h
C1	7.57 ± 0.05	7.61 ± 0.02 (100.6)	7.65 ± 0.07 (101.1)
C5	5.85 ± 0.07	6.16 ± 0.13 (105.3)	6.32 ± 0.03 (107.0)
CACC517	7.47 ± 0.02	6.83 ± 0.13 (91.39)	3.53 ± 0.03 (46.05)
CACC558	7.33 ± 0.01	7.49 ± 0.01 (102.1)	6.86 ± 0.05 (93.6)
CACC566	7.24 ± 0.06	6.33 ± 0.02 (83.6)	5.11 ± 0.23 (67.6)
CACC537	7.71 ± 0.05	7.67 ± 0.06 (99.4)	7.67 ± 0.02 (99.5)

- 유용미생물 탐색을 위해 축산병원균 *Escherichia coli* KCTC 2617, *Salmonella* Derby NCCP 12238, *Salmonella* Enteritidis NCCP 14546, *Salmonella* Typhimurium NCCP 10328, *Yersinia enterocolitica* NCCP 11129 및 *Canida tetani* NCCP 10044에 대한 항균능을 검사하였고, CACC558, CACC566, CACC537이 이들 병원균에 대한 항균능 보유하고 있음을 확인하였다(표 4).

<표 4> 반려견 유래 미생물의 항균능 결과

병원균	C1	C5	CACC 517	CACC 558	CACC 566	CACC 537	MRS
<i>E. coli</i> KCTC 2617	w*	w	+	++	++	++	-
<i>S. Derby</i> NCCP 12238	-	w	+	++	++	++	-
<i>S. Enteritidis</i> NCCP 14546	-	w	+	+	+	+	-
<i>S. Typhimurium</i> NCCP 10328	-	-	++	w	w	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> NCCP 11129	-	-	-	++	+	+	-
<i>C. tetani</i> NCCP 10044	-	-	-	-	-	-	-

The inhibition zone (mm) around the paper disc containing the microbial cell-free supernatant was classified as ++, > 12~14 mm; +, > 11mm; w (weak), less than 9 mm; -, no inhibition zone.

- 유용미생물 탐색을 위해 HT-29 cell line을 이용하여 장내부착능 테스트를 실시하였고 표준 균주 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 부착능 77.4 %에 비해 *L. reuteri* C1은 85.5%, *L. acidophilus* C5는 60.8%, *L. plantarum* subsp. *plantarum* CACC558은 80.9%, *L. paracasei* subsp. *tolerans* CACC566는 75.0%와 *P. acidilactici*는 78.6%의 부착능을 보였다(표 5).

<표 5> 반려견 유래 미생물의 장부착능 결과

구분	Cell adhesion (viability Log ₁₀ CFU, %)	
	Initial	2H on HT-29 cell
LGG	8.31 ± 0.11	6.23 ± 0.08 (76.40)
C1	8.72 ± 0.05	7.48 ± 0.01 (85.78)

C5	7.29 ± 0.1	4.44 ± 0.23 (60.82)
CACC517	7.64 ± 0.09	4.71 ± 0.16 (61.72)
CACC558	8.56 ± 0.02	6.92 ± 0.07 (80.84)
CACC566	8.51 ± 0.03	6.38 ± 0.16 (74.97)
CACC537	8.59 ± 0.05	6.75 ± 0.05 (78.58)

- 항생제 내성 테스트 결과, EFSA(The European Food Safety Authority)에서 권장하는 가축사료에 사용된 제품의 bacterial cut-off values와 비교하여 ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline 항생제에 대하여 기준 내 MIC 농도를 나타냄으로써 분리균주들의 항생제 내성 안전성을 확보하였다(표 6).

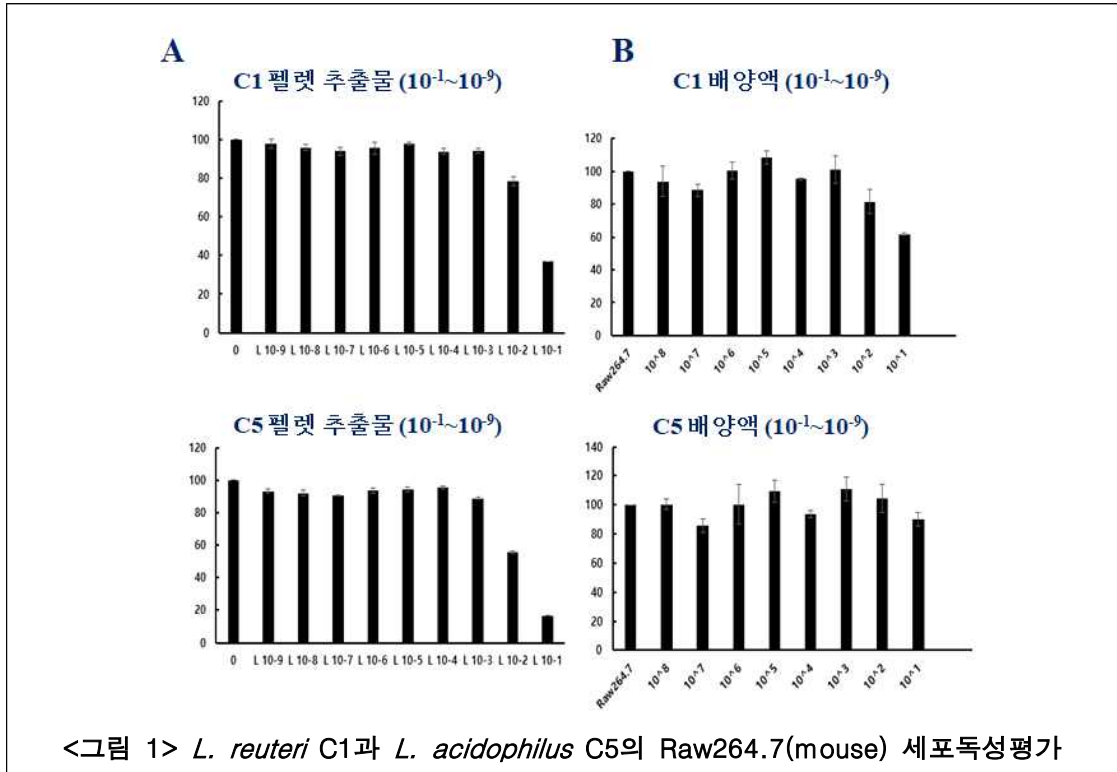
<표 6> 반려견 유래 미생물의 항생제 내성 실험

Antibiotics	Minimal inhibition concentration (MIC, µg/mL)					
	C1	C5	CACC517	CACC558	CACC566	CACC537
Amoxicillin/Clavulanic acid	0.38	0.5	0.38	0.19	1.5	3
Ampicillin	0.25	0.25	0.25	0.094	1.5	2
Clindamycin	0.032	4	s	2	0.38	0.094
Gentamicin	4	16	96	24	32	48
Imipenem	0.047	0.064	0.25	0.047	1.5	0.32
Kanamycin	>256 ^R	>256 ^R	R	>256 ^R	>256 ^R	>256 ^R
Metronidazole	>256 ^R	>256 ^R	1	>256 ^R	>256 ^R	>256 ^R
Tetracycline	8	1	0.38	16	1	24
Vancomycin	>256 ^R	0.5	0.75	>256 ^R	>256 ^R	>256 ^R
Erythromycin	0.75	0.25	0.032	1.5	0.25	0.75
Trim/Sulfa	>32 ^R	>32 ^R	4	>32 ^R	>32 ^R	>32 ^R

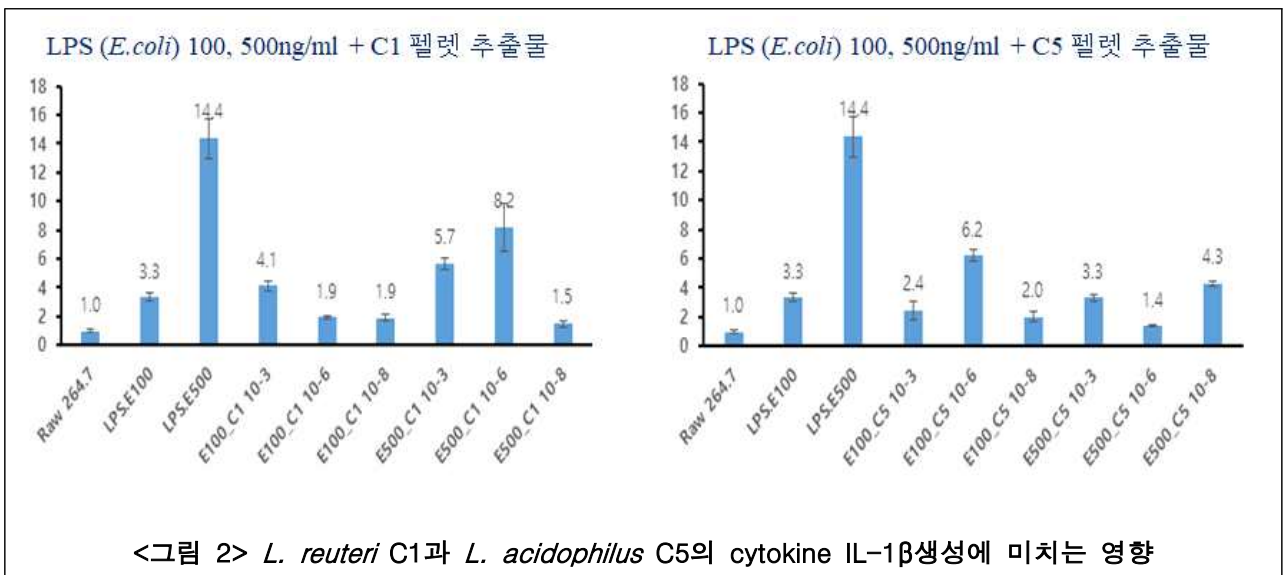
Quantitative antibiotic sensitivity is expressed as the minimum inhibitory concentration against the microbial strains and classified as R, resistant (≥ 32 and $256 \mu\text{g/ml}$) or presented as values in bold (weakly tolerant) and regular font (sensitive to the antibiotic).

○ 반려견 유래 *Lactobacillus reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5의 심화 연구

- RAW 264.7 세포에 C1을 농도별로(10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} 희석) 처리한 후에 염증 유도 반응을 위해서 LPS *E.coli* (100 & 500ng/ml)를 처리하여 세포가 사멸하지 않는 조건을 선정하였다. C1과 C5 펠렛 추출물을 10^{-1} ~ 10^{-9} 로 희석하여 Raw 264.7 세포에 처리했을 때, 10^{-2} ~ 10^{-9} 까지 독성을 나타나지 않음을 확인하였고, C1과 C5 모두 10^{-1} 농도 일 때 세포 활성이 떨어지는 것을 확인하였다 (그림 4). C1과 C5 배양액을 10^{-1} ~ 10^{-8} 로 희석하여 Raw 264.7 세포에 처리했을 때, C1은 10^{-2} ~ 10^{-8} 까지 독성을 나타나지 않았고 10^{-1} 일 때 세포 활성이 떨어지는 것을 확인하였고, C5는 10^{-1} ~ 10^{-8} 일 때 모두 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(그림 1).



- Raw 264.7 세포에 대해서 LPS (*E. coli*) 100 or 500ng/ml를 각각 해서 C1 or C5 펠릿을 농도별로(10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8}) 처리를 해서 qPCR 분석을 이용해서 IL-1 β 의 발현량을 분석하였다. RAW 264.7 세포에 LPS *E. coli* (100 & 500ng/ml)를 처리하여 C1과 C5의 펠릿 추출물을 농도별로(10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} 희석) 처리한 후에 염증 유도 반응을 살펴본 결과, IL-1 β 의 RNA 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있기에, C1과 C5의 염증 억제력을 확인할 수 있었다(그림 2).

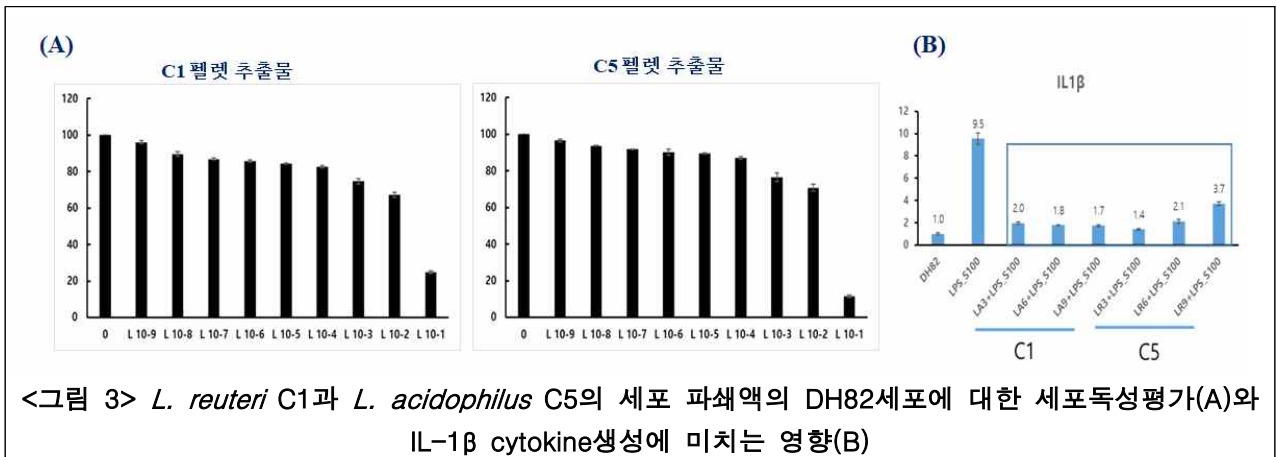


- MTS assay 분석을 통한 C1, C5 펠릿이 DH82 세포 활성에 미치는 영향 분석을 실시하였다. C1과 C5 펠릿 추출물을 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 로 희석하여 DH82 세포에 처리했을 때, $10^{-2} \sim 10^{-9}$ 까지 독성을 나타나지 않음을 확인하였고, C1과 C5 모두 10^{-1} 농도 일 때 세포 활성이 떨어지는 것을 확인하였다(그림 3).

- 염증제어 반응 분석을 위해 DH82 세포에 대해서 LPS (*Salmonella*) 100ng/ml 처리를 한

것에 대해서 C1 or C5 펠릿을 농도별로(10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8}) 처리를 해서 qPCR 분석을 이용해서 IL-1 β 의 발현량을 분석하였다. C1과 C5 펠릿 추출물을 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8} 희석하여 100ng/ml의 *Salmonella* 유래 LPS로 자극된 DH82 세포에 처리했을 때, IL-1 β 의 RNA 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있기에, DH82 세포에 대해서 C1과 C5의 염증 억제력을 확일 할 수 있었다(그림 3).

- 본 연구팀에서 동정하고 발굴한 개유래 유용미생물인 C1과 C5 균주를 고농도로 처리하였을 때, 마우스 대식세포인 RAW 264.7(mouse)와 DH82(canine) 세포의 모양과 활성을 변화시키지 않으면서도 IL-1 β 의 RNA 발현을 억제하는 것으로 나타나 프로바이오틱스로서 그 효과를 증명하였다.



<그림 3> *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5의 세포 파쇄액의 DH82세포에 대한 세포독성평가(A)와 IL-1 β cytokine생성에 미치는 영향(B)

- 반려견 암수 20마리를 대상으로 하여 시험품 투여군(10마리)과 시험품 비투여군(10마리)으로 실험군을 구분하여 생균제 활성이 검증된 C1 균주의 면역증진 효과에 대한 임상시험을 전북대학교 수의과대학에서 실시하였다. 시험품은 분말형태로 부형제는 포도당을 혼합하였다. 시험품은 1일 1회 1g씩 (10^7 CFU/g) 4주 동안 급여하였다. 임상시험견은 한국에서 조사되는 대표적인 품종들을 다수 포함하여 실시하였으며 시험견의 정보는 표7과 같다.

<표 7> *L. reuteri* C1 임상시험견 정보

그룹	이름	품종	나이(년)	성별	
시험견	1	둥이	슈нау저	13	중성화 암컷
	2	줍마	믹스 비글	9	중성화 암컷
	3	바밤바	믹스 비글	4	중성화 암컷
	4	돌돌	시츄	12	수컷
	5	쥐똥	믹스	16	중성화 수컷
	6	밍키	시츄	10	암컷
	7	점박이	믹스 비글	7	암컷
	8	아지	시츄	9	중성화 수컷
	9	촉촉	시츄	2	암컷
	10	솔이	닥스훈트	2	중성화 수컷
	11	흰눈	포메라니안	4	중성화 수컷
	12	참치	믹스	5	수컷
	13	웅이	믹스 비글	8	중성화 암컷
	14	당근	슈нау저	11	중성화 수컷
	15	알콩	말티즈	6	중성화 수컷
	16	나라	푸들	13	중성화 암컷

	17	하늘이	요크셔테리어	8	중성화 수컷
	18	가디	시바견	1	중성화 수컷
	19	송이	프렌치 불독	3	암컷
	20	뚜이	믹스	3	암컷

- 경구 항생제를 투여하여 설사를 유발시켜 장내 세균총을 제거하고 rapid type antibody titre 검사 (immunocomb)를 실시하여 baseline Ab titre를 측정하였다 (pre-evaluation). 시험품 투여 후 2주차에 임상증상 발생 유무 및 특이사항을 기록하고, DHPPi Vaccination을 실시한 후, 4주차에 임상증상 발생 유무 및 특이사항을 기록하고, rapid type antibody titre 검사 (immunocomb)를 실시하여 baseline Ab titre를 측정하였다.
- 본 시험에 참여한 반려견들의 임상증상, 혈액검사, 혈청생화학적 검사 및 면역 항체 형성 능력을 평가하였을 때 시험품을 투약한 개체들은 뚜렷한 부작용이나 특이적인 임상증상들이 관찰되지 않았으며 면역항체 형성은 시험품 비투여군에 비해 시험품 투여군에서 월등히 증가한 것으로 확인되었다. 또한 시험품 투여군에서 DHPPi 백신을 접종한 후 4주 후에 뚜렷한 항체 형성 결과 값을 보였다(표 8, 9, 10).
- 결론적으로, 본 시험에서 적용된 시험품은 반려견의 임상 적용에서 안전성이 어느 정도 확인되었으며 부작용과 같은 임상증상은 관찰되지 않았다. 면역력 증강을 뒷받침 할 수 있는 구체적인 데이터를 확인하였다.

<표 8> 실험에 참여한 반려견의 전혈검사(Complete blood counts) 결과

실험반려견 (실험군)	혈액검사의 결과						
	0주			4주			
	백혈구수 (WBC)	적혈구수 (RBC)	혈소판수 (PLT)	백혈구수 (WBC)	적혈구수 (RBC)	혈소판수 (PLT)	
시험품 투여군	1	12.7	6.6	355	11.4	6.4	366
	2	8.2	7.5	323	10.2	7.2	314
	3	9.0	6.8	402	12.3	6.4	418
	4	11.9	5.7	300	10.0	6.1	426
	5	17.1	5.5	617	13.9	5.7	511
	6	14.3	6.1	548	9.4	6.5	533
	7	10.4	8.1	459	8.8	7.9	485
	8	11.8	7.0	540	11.1	6.7	518
	9	8.5	6.3	252	10.3	6.2	438
	10	11.2	6.7	349	14.7	6.5	504
시험품 비투여 군	11	12.9	5.9	337	11.2	6.1	329
	12	11.5	5.7	290	10.8	5.8	306
	13	10.4	6.5	286	10.4	6.3	284
	14	13.2	6.6	375	12.5	5.9	304
	15	9.7	7.2	269	10.2	6.9	287
	16	12.2	7.4	332	9.2	7.3	320
	17	11.9	7.1	501	8.9	7.0	485
	18	9.9	5.4	363	10.3	6.2	356
	19	8.7	7.3	244	10.6	7.1	313
	20	13.4	8.2	476	12.2	8.0	422
정상값	6~17x10 ³ / uL	5.5~8.5x10 ⁶ / uL	200~500x10 ³ / /uL	6~17x10 ³ /uL	5.5~8.5x10 ⁶ / uL	200~500x10 ³ / /uL	

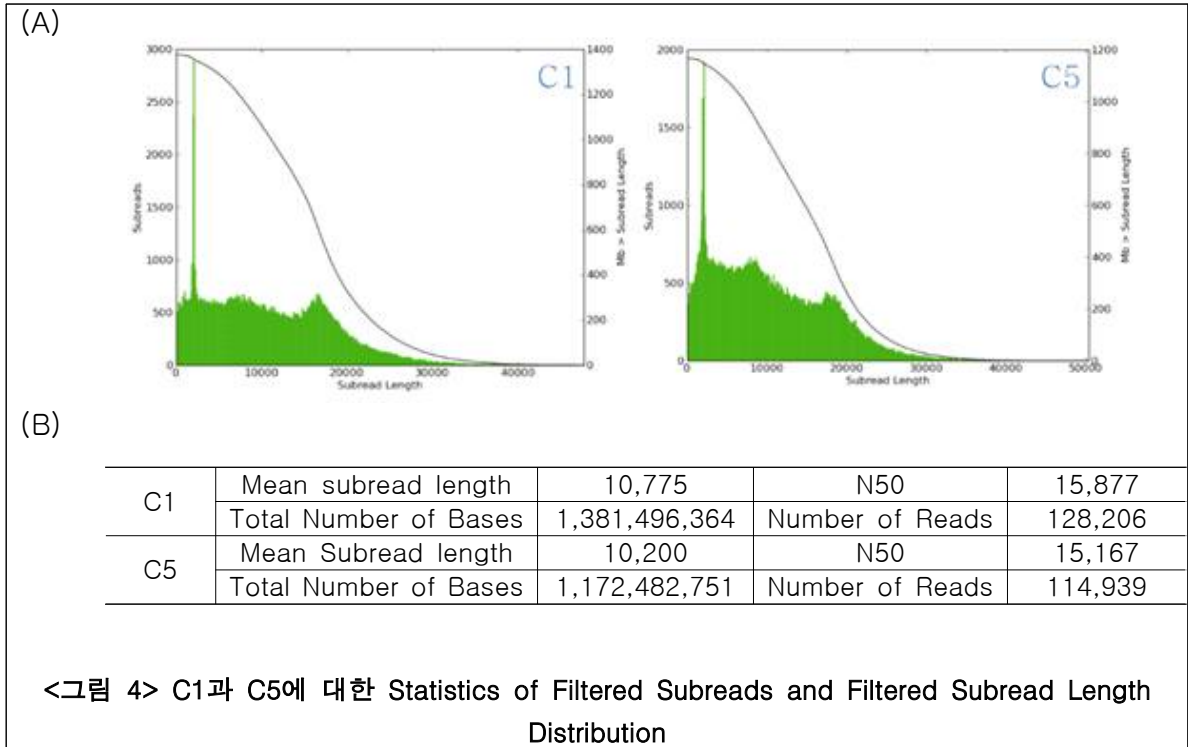
<표 9> 실험에 참여한 반려견의 혈청 화학적 검사(Serum biochemistry) 결과

실험반려견 (실험군)		혈청화학적(간수치, 신장수치) 검사 결과							
		0주				4주			
		ALP	ALT	BUN	CREA	ALP	ALT	BUN	CREA
시험품 투여군	1	201	60	12.4	0.7	175	62	16.1	1.1
	2	154	57	11.1	1.3	234	55	12.3	0.9
	3	143	34	10.0	0.5	212	46	11.2	0.6
	4	104	42	10.3	0.4	200	54	10.8	0.5
	5	437	108	9.2	1.1	386	69	10.9	1.3
	6	218	73	14.6	1.0	225	51	14.2	0.7
	7	136	55	10.4	0.5	169	52	12.0	0.6
	8	100	45	10.8	0.6	102	45	11.4	0.8
	9	97	38	12.9	0.7	118	44	11.3	1.1
	10	152	82	9.2	0.5	220	63	10.1	0.9
시험품 비투여군	11	202	46	10.5	0.9	137	34	11.3	1.2
	12	107	54	10.1	0.5	83	38	10.4	0.6
	13	124	41	11.5	0.5	95	40	11.2	0.7
	14	98	67	12.2	1.4	92	54	10.1	0.5
	15	132	33	14.3	0.6	104	43	12.6	0.7
	16	145	58	11.0	0.4	91	49	10.4	0.5
	17	109	49	10.6	1.1	102	52	10.1	0.8
	18	115	35	10.4	0.8	106	41	10.0	0.5
	19	86	22	8.7	0.6	87	45	9.5	0.9
	20	113	40	12.2	0.5	102	50	10.9	0.7
정상값		20~15 5 U/L	3~50 U/L	5~30 mg/dl	0.5~1. 5 mg/dl	20~15 5 U/L	3~50 U/L	5~30 mg/dl	0.5~1. 5 mg/dl

<표 10> Rapid type antibody titre 검사 (immunocomb test)

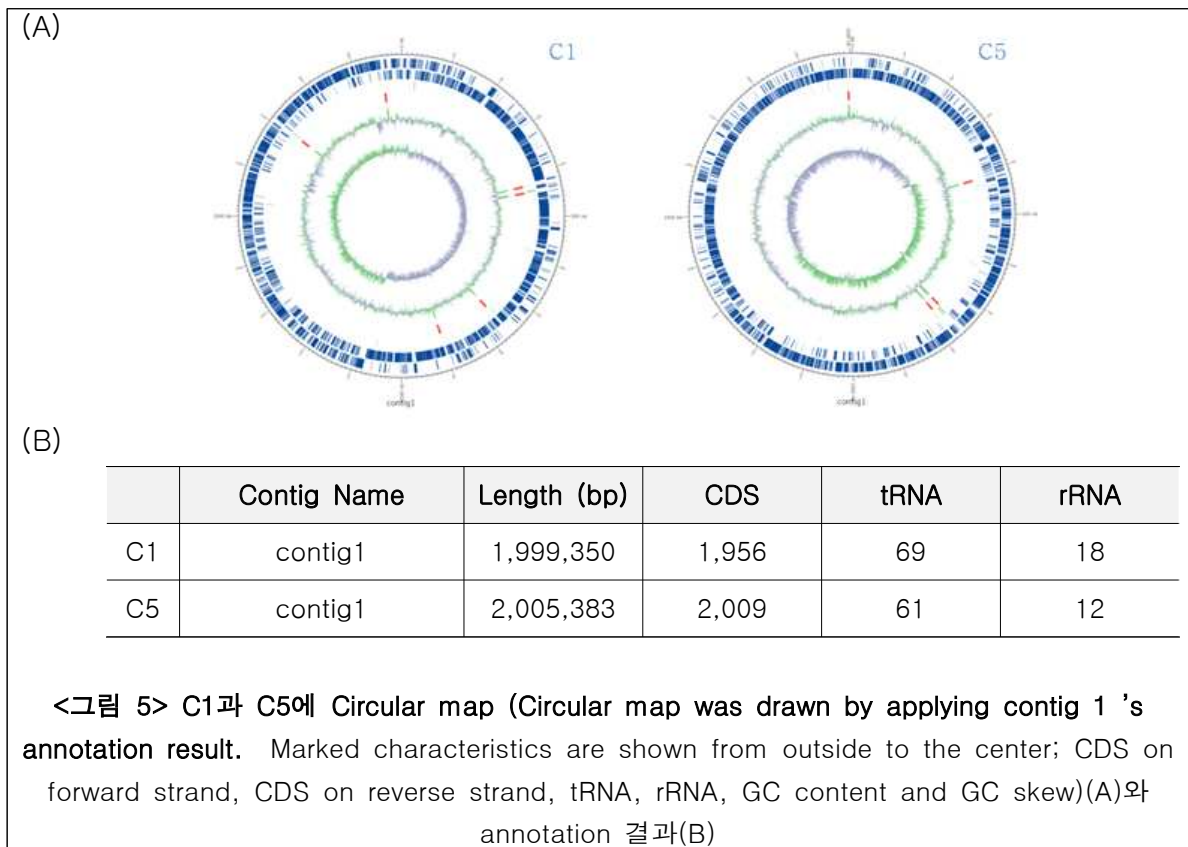
실험반려견 (실험군)		면역항체 형성의 결과			
		0주		4주	
		홍역 (Distemper)	파보장염 (Parvo)	홍역 (Distemper)	파보장염 (Parvo)
시험품 투여군	1	1	1	4	5
	2	2	1	3	3
	3	1	1	4	4
	4	2	2	5	3
	5	2	2	6	5
	6	3	1	4	5
	7	1	3	4	6
	8	1	2	3	4
	9	1	2	4	4
	10	2	1	5	6
시험품 비투여군	11	2	2	4	3
	12	1	3	3	3
	13	1	2	1	3
	14	1	2	2	2
	15	3	3	2	1
	16	4	2	3	2
	17	2	1	3	3
	18	1	1	4	5
	19	2	2	4	4
	20	1	1	3	2

- *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5의 전장 유전체를 해독하였다. C1과 C5에 대한 Pacbio seq와 Hiseq에서 생산한 유전체 데이터의 assembly와 error correction 한 결과 하나의 contig를 구성하였으며, 이는 각 미생물 균주의 circular genome이라고 판단된다. C1과 C5의 genome 사이즈는 대략적으로 2000 kbp이며, 각 2000여개의 유전자를 가지고 있음이 확인되었으며, 이는 NCBI에서 확인해볼 때 같은 species 안에 균주들과 비슷한 수준으로 확인되었다(그림 4, 표11, 그림5).

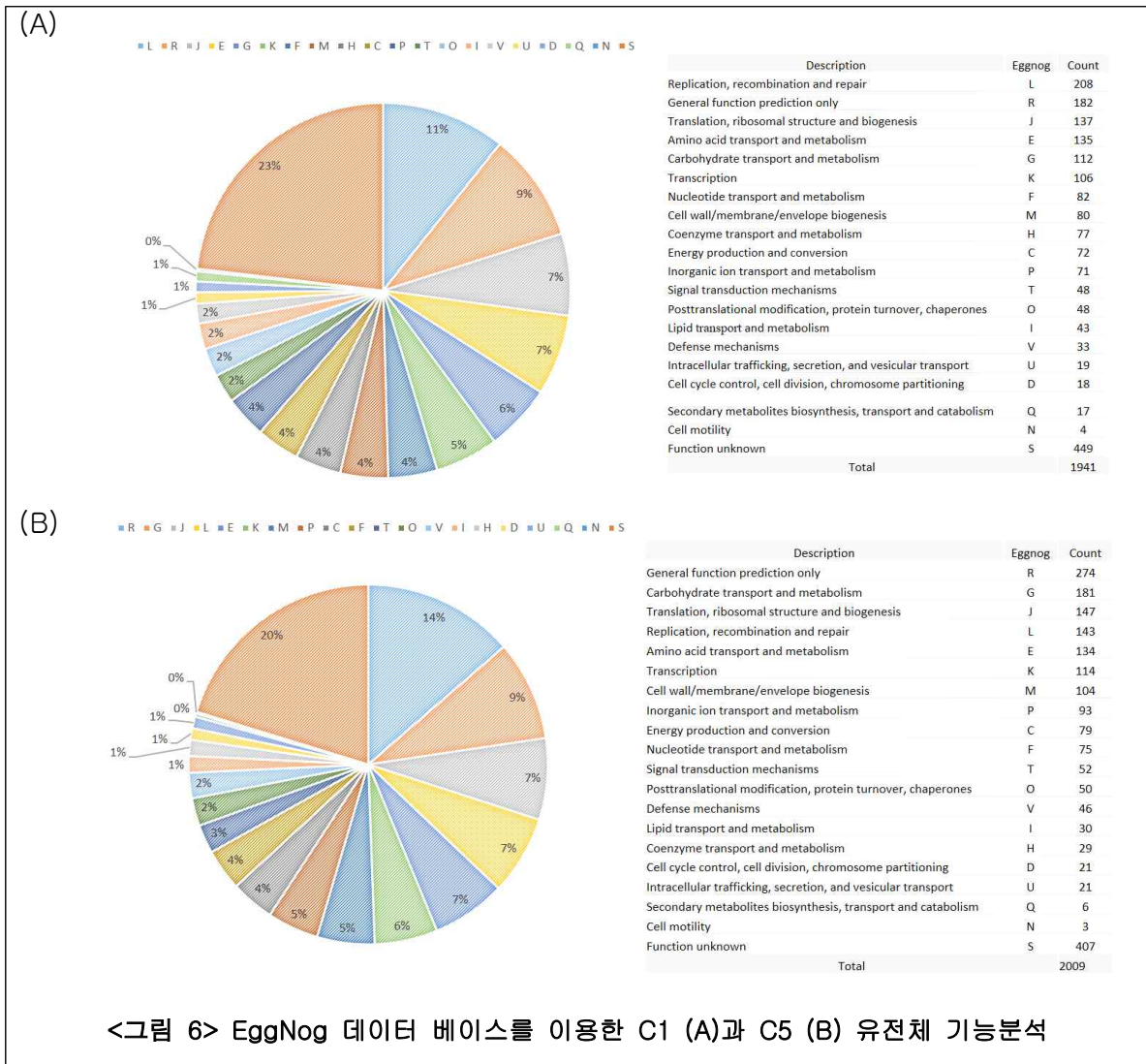


<표 11> HISEQ 유전체 데이터의 기본 통계치

		Total Number of Bases	Number of Reads	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)
C1	Raw dataset	2,974,113,214	19,696,114	38.869	96.094	90.725
	Filtered dataset	1,746,208,998	11,564,298	38.492	99.394	94.485
C5	Raw dataset	3,782,283,334	25,048,234	34.734	96.55	91.667
	Filtered dataset	2,370,992,638	15,701,938	34.482	99.428	97.616



- EggNog 데이터 베이스를 이용하여 C1의 유전체내의 유전자들에 대한 기능분석을 한 결과, Replication, recombination and repair, Translation, ribosomal structure and biogenesis, Amino acid transport and metabolism와 관련된 유전자군이 큰 것으로 확인되었다(그림 6).
- C5의 경우에는 Carbohydrate transport and metabolism와 Translation, ribosomal structure and biogenesis 그리고 Replication, recombination and repair와 관련된 유전자군이 크다고 큰 것으로 확인되었다(그림 6).



- 진화분석을 이용한 유용 유전자 발굴은 신규 미생물 유전체 지도를 확보한 후에, 같은 genus, 같은 species 상에서 기존에 밝혀진 미생물 균주들과 유전자 레벨에서 진화적으로 선택적 압력(selective pressure)을 받은 흔적들, 즉 진화적 선발신호를 발굴하고자 하였다.
- 미생물 유전체상의 진화적 선발 신호 발굴을 위해서 DNA 염기서열과, 아미노산 염기서열을 동시에 고려하여 유전자 레벨에서 종간의 차이를 알려주는 dN/dS 추정값을 사용하는 것이 적합하다고 생각되며, 같은 species 상의 미생물 유전체 지도 확보부터, Orthologous 유전자 확보, 정렬 및 편집 그리고 dN/dS 값을 추정하는 프로그램들을 이용한 파이프라인을 구축하였다(그림 7).

dN/dS 분석 Method

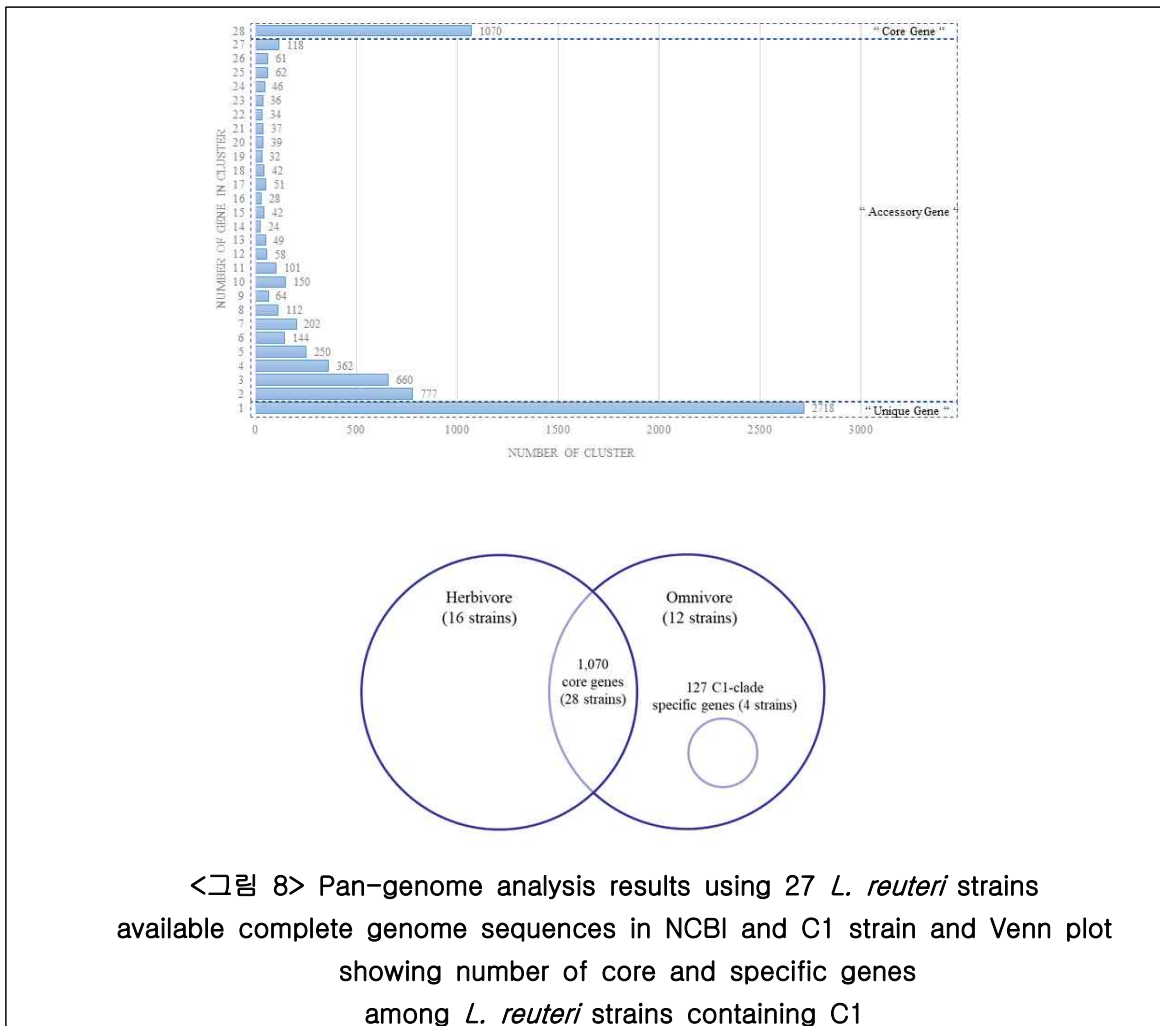
1. Ensemble Data complete genome sequence Download
2. OrthoFinder-1.1.10 (orthologous gene define, >5 strains)
3. prank.linux64.140110
4. pal2nal.v14
5. Gblocks_Linux64_0.91b
6. paml4.9e (Branch-Site Model)

```

1 seqfile = ./Gblocks/G0000184.pal2nal.cds.fa.gb
2 treefile = ./Ptree/G0000184.dz.tree
10 outfile = ./Ptree/G0000184.dz.tree
4 noisy = 0
6 verbose = 1
7 runmode = 0
8
9 seqtype = 1
10 CodonFreq = 2
11 ndata = 1
12 clock = 0
13
14 aadist = 0
15
16 model = 2
17
18 NSites = 2
19
20 icode = 0
21 Ngene = 0
22
23 fix_kappa = 0
24 kappa = 2
25 fix_omega = 1
26 omega = 1
27
28 getSE = 0
29 Katakancestor = 0
30
31 Small_diff = 5e-7
32 clustdata = 0
33 fix_blength = 1
34 method = 0
35
36 seqfile = ./Gblocks/G0000184.pal2nal.cds.fa.gb
37 treefile = ./Ptree/G0000184.dz.tree
100 outfile = ./Ptree/G0000184.dz25582a/G0000184.dz25582a
4 noisy = 0
6 verbose = 1
7 runmode = 0
8
9 seqtype = 1
10 CodonFreq = 2
11 ndata = 1
12 clock = 0
13
14 aadist = 0
15
16 model = 2
17
18 NSites = 2
19
20 icode = 0
21 Ngene = 0
22
23 fix_kappa = 0
24 kappa = 2
25 fix_omega = 0
26 omega = 1
27
28 getSE = 0
29 Katakancestor = 0
30
31 Small_diff = 5e-7
32 clustdata = 0
33 fix_blength = 1
34 method = 0
35
  
```

<그림 7> 진화유전체 분석전략

- 반려견 유래 *L. reuteri* C1과 NCBI 데이터베이스 내의 동물에서 유래한 27개 *L. reuteri* 유전체 데이터(표12)를 이용하여 Pan-genome 분석을 수행하여 1,070개의 core 유전자를 발굴하였고, 2,718개의 Unique 유전자를 발굴하였다(그림 8).

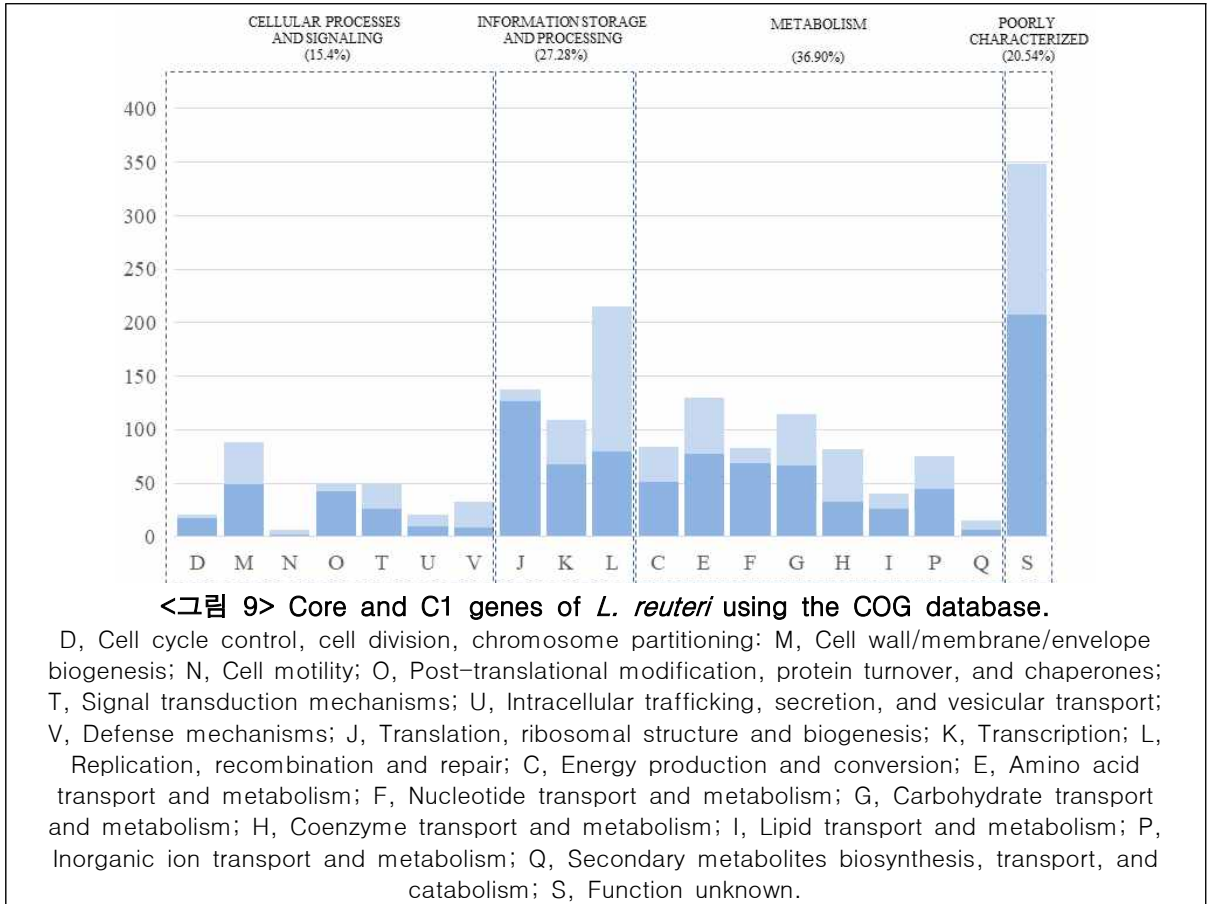


<그림 8> Pan-genome analysis results using 27 *L. reuteri* strains available complete genome sequences in NCBI and C1 strain and Venn plot showing number of core and specific genes among *L. reuteri* strains containing C1

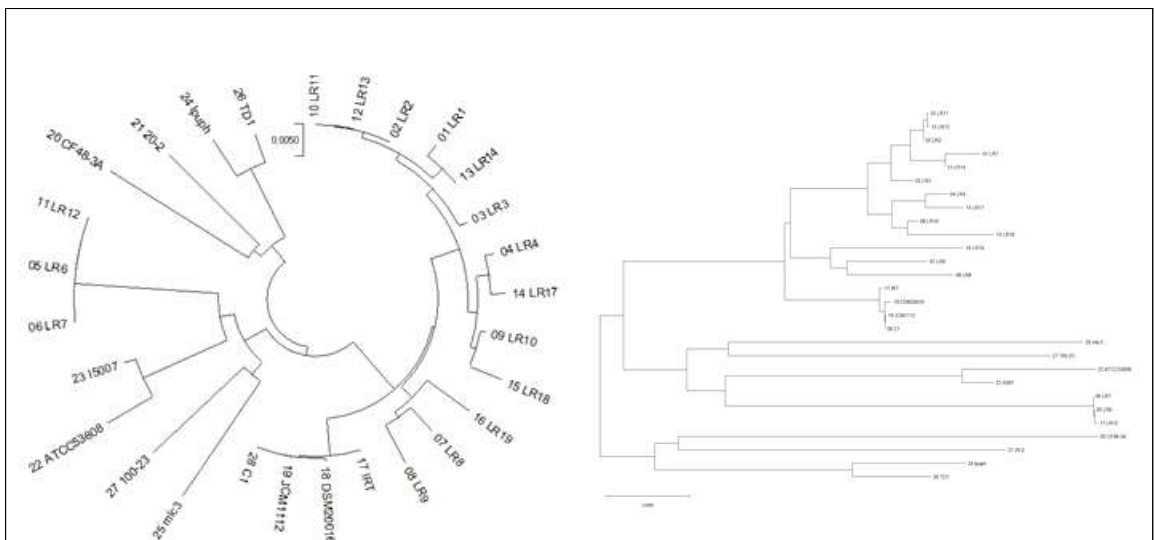
<표 12> Genome information of 28 used *L. reuteri* strains

Strain	Assembly	TaxonID	Length (bp)	Unique Gene	CDS	ANI (%)	Reference
01_R1	ASM317512v1	1598	2,255,596	960	2,295	98.50	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
02_R2	ASM317501v1	1598	2,367,543	960	2,416	98.51	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
03_R3	ASM317493v1	1598	2,300,219	940	2,366	98.54	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
04_R4	ASM317485v1	1598	2,166,445	941	2,194	98.44	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
05_R6	ASM317511v1	1598	2,139,733	911	2,228	95.83	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
06_R7	ASM317508v1	1598	2,138,434	912	2,234	95.82	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
07_R8	ASM317487v1	1598	2,255,884	967	2,271	98.30	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
08_R9	ASM317486v1	1598	2,303,268	977	2,317	98.39	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
09_LR10	ASM317507v1	1598	2,441,700	958	2,534	98.36	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
10_LR11	ASM317499v1	1598	2,365,809	961	2,412	98.51	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
11_LR12	ASM317503v1	1598	2,151,450	912	2,231	95.84	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
12_LR13	ASM317494v1	1598	2,365,331	960	2,414	98.51	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
13_LR14	ASM317495v1	1598	2,251,273	959	2,296	98.51	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
14_LR17	ASM317491v1	1598	2,205,694	942	2,205	98.40	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
15_LR18	ASM317481v1	1598	2,470,207	946	2,503	98.37	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
16_LR19	ASM317502v1	1598	2,202,319	970	2,237	98.39	Yu J et al., Front Microbiol. 2018 Jun
17_IRT	ASM104683v1	1598	1,993,967	921	1,956	99.98	Institute of Basic Science and POSTECH
18_DSM 20016	ASM1682v1	557436	1,999,618	909	1,983	99.96	US DOE Joint Genome Institute
19_JCM 1112	ASM1000v1	557433	2,039,414	920	2,026	100.00	Morita H et al., DNA Res, 2008 May
20_CF48-3A	ASM15961v1	525341	2,107,903	926	2,009	95.26	Wegmann U et al., BMC Genomics, 2015 Dec
21_20-2	ASM288865v1	1598	2,232,947	943	2,194	95.98	Wegmann U et al., BMC Genomics, 2015 Dec
22_ATCC 53608	ASM23645v2	927703	1,943,635	926	2,052	95.66	Wegmann U et al., BMC Genomics, 2015 Dec
23_I5007	ASM41099v1	1340495	1,947,706	905	2,038	96.24	Hou C et al., J Biotechnol. 2014 Jun
24_Ipuph	ASM17945v1	863368	2,116,621	905	2,008	96.12	Frese SA et al., PLoS Genet, 2011 Feb
25_mlc3	ASM17943v1	863369	2,018,630	958	1,934	95.58	Frese SA et al., PLoS Genet, 2011 Feb
26_TD1	ASM43927v1	1358027	2,145,445	902	1,981	96.25	Leonard MT et al., Genome Announc, 2014 May
27_100-23	ASM16825v1	349123	2,305,557	911	2,171	95.84	Livingston M et al., Immunol Cell Biol. 2010 Jan
28_C1	-	-	1,999,350	918	1,962	*	-

- COG 데이터베이스를 이용하여 core 유전자와 C1(*L. reuteri*)의 전체 유전자에 대해서 기능을 추정하였고, 그 결과 C1(*L. reuteri*)에는 Replication, recombination and repair (L), Amino acid transport and metabolism (E), Carbohydrate transport and metabolism (G)와 관련된 유전자가 특이적으로 많았음을 확인할 수 있었으며 이는 개의 진화과정에서 유래한 생물학적 스토리와 매우 연관이 깊음을 확인할 수 있었다(그림 9).



- C1을 포함한 28개의 *L. reuteri*에 대해서 유전체 전체 정보를 바탕으로 ANI 정보를 추정하여 계통 분석을 수행한 결과, 특이적으로 사람에서 유래한 3개의 *L. reuteri*와 매우 가까운 유연관계를 가지는 것으로 나타나며, 이는 인간과 오랫동안 환경을 공유해서 미생물 군총이 비슷해진 것이 아닐까 추정을 했으며, 본 연구의 *L. reuteri*의 계통 정보에서 C1과 사람에서 유래한 세 균주를 C1-clade라고 정의하였다(그림 10).

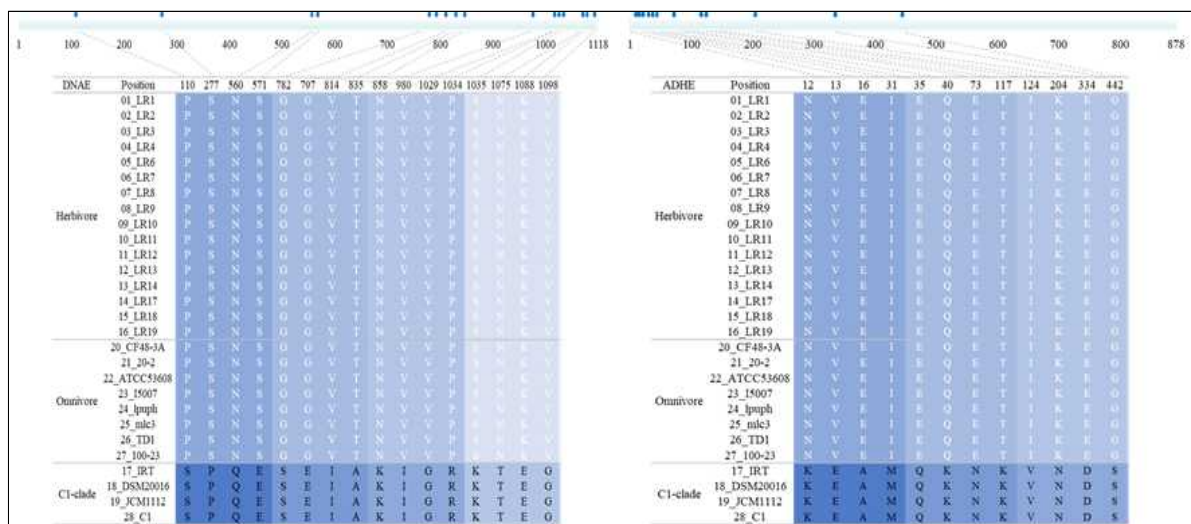


<그림 10> ANI tree analysis of *L. reuteri* C1 with twenty seven available complete genome sequences of *L. reuteri* in NCBI. (ANI, average nucleotide identity)

- 28개의 *L. reuter*에서 제일 많은 아미노산 코드를 기준으로, 통계적으로 C1 포함한 clade에서 높은 비율로, 나머지에서 낮은 비율로 있는 C1-clade 특이적인 아미노산을 발굴하였고, 이러한 아미노산이 많은 유전자가 DNAE와 ADHE임을 확인하였으며, 이는 호스트 환경에 적응하면서 생긴 결과라고 추정하고 있다(표 13, 그림 11).

<표 13> Core genes (28 strains) containing many significant C1-clade specific amino acid change (top 5%). All 11 genes are in CDS region

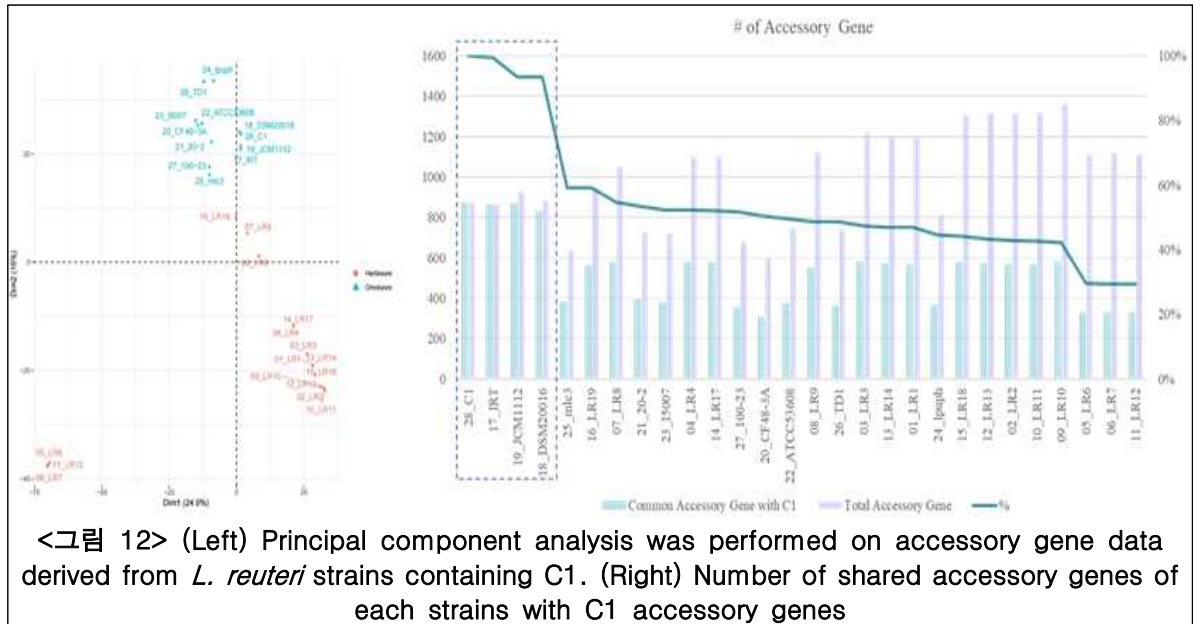
C1 ID	Gene Name	Start	End	#AA	COG gene annotation	Gene product
OJAHFFHM_00272	DNAE	242,989	246,336	16	[L] Replication, recombination and repair	DNA polymerase III (alpha subunit)
OJAHFFHM_00755	ADHE	709,170	711,806	12	[C] Energy production and conversion	Dehydrogenase
OJAHFFHM_01293	-	1,266,951	1,267,475	5	[S] Function unknown	Saccharopine dehydrogenase related protein
OJAHFFHM_01618	RLMD	1,580,992	1,582,371	5	[J] Translation, ribosomal structure and biogenesis	23S rRNA uracil-5-methyltransferase
OJAHFFHM_00123	SUN	110,212	111,579	5	[J] Translation, ribosomal structure and biogenesis	NOL1 NOP2 sun family protein
OJAHFFHM_00750	DNAX	702,308	704,143	5	[L] Replication, recombination and repair	DNA polymerase iii
OJAHFFHM_00267	SCPA	238,312	239,103	5	[S] Function unknown	Participates in chromosomal partition during cell division.
OJAHFFHM_01403	CTPF	1,367,366	1,370,029	4	[P] Inorganic ion transport and metabolism	cation-transporting atpase
OJAHFFHM_00846	-	801,497	802,153	4	[G] Carbohydrate transport and metabolism	phosphoglycerate mutase
OJAHFFHM_00842	MURF	797,863	799,242	4	[M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis	Involved in cell wall formation.
OJAHFFHM_00240	PARE	210,338	212,347	4	[L] Replication, recombination and repair	DNA topoisomerase IV (Subunit B)



<그림 11> Significant C1-clade specific amino acid change in *DNAE* and *ADHE*

- Pan-genome 분석 수행 후, 전체 균주에 있는 유전자를 core 유전자라고 정의하고 하나의 균주에만 있는 Unique 유전자를 발굴하는데, *L. reuteri* C1에만 있는 유전자를 발굴할

수 없었으며, 이는 C1이 자기 clade 내의 균주와 매우 가깝기 때문이라고 추정되었다. 따라서 C1의 Unique 유전자 대신 accessory 유전자에서 C1-clade에만 있는 유전자가 유의미하게 많음을 확인하고 이 유전자군에 대한 분석을 수행하였고, 우리는 127개의 C1-clade 특이적인 유전자를 발굴할 수 있었고, 많은 C1-clade 특이적인 유전자(48개)가 Transposase와 관련이 있음을 알 수 있었다(그림 12).



- *L. acidophilus* C5의 비교유전체 분석을 실시하였다. NCBI Database(2018.10기준)에서 *L. acidophilus*은 37개이고, 이 중에서 논문을 통해서 confirm된 complete genome은 6개이며(표 14, 15), 본 연구에서는 6개의 *L. acidophilus* complete genome sequence와 CBNUC5 genome sequence를 이용하여 진화분석을 수행하였다.

<표 14> 비교 유전체 분석을 위한 6개의 *L. acidophilus* 균주 유전체 정보

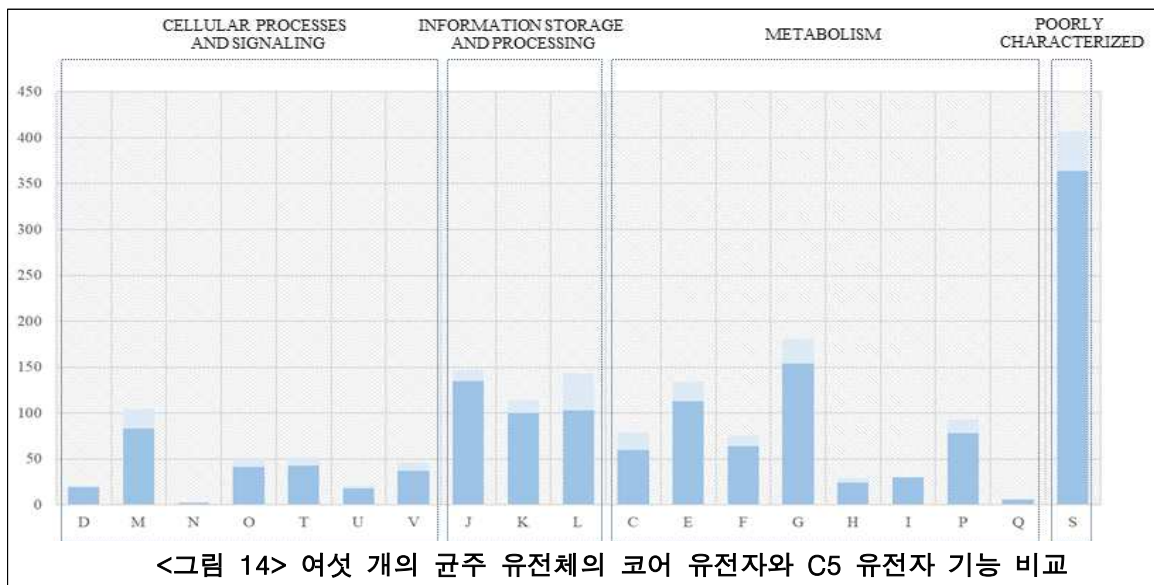
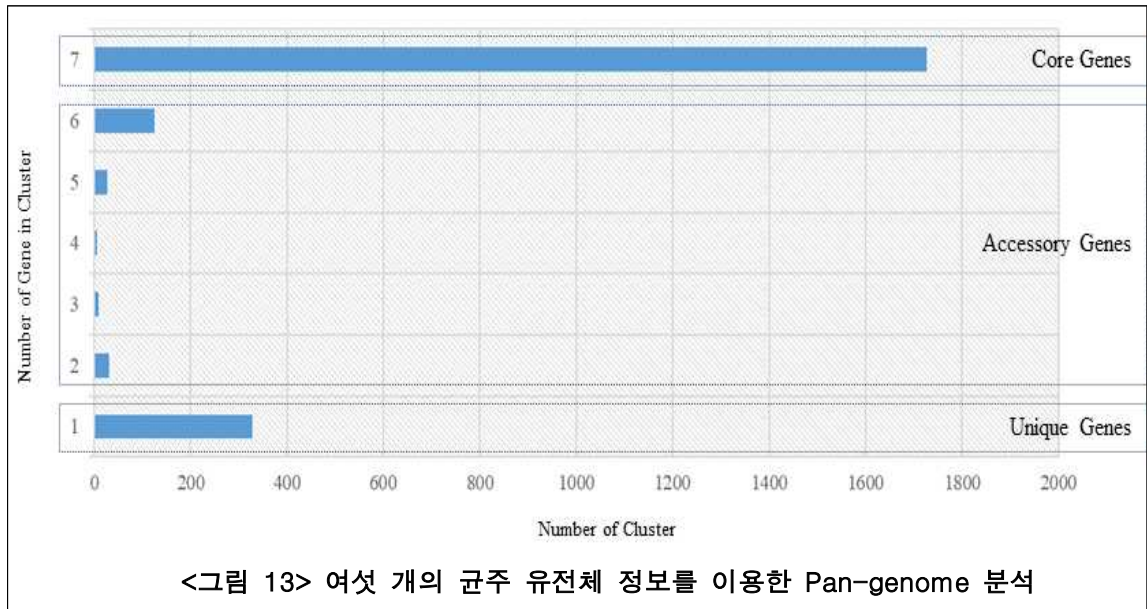
Strain	Assembly	Taxon ID	Length	Genes	Reference
NCFM	ASM1198v1	272621	1,993,560	1,963	Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>J. Bacteriol.</i> 189 (13), 4624-4634 (2007)
La14	ASM38967v2	1314884	1,991,579	1,978	Complete Genome Sequence of Probiotic Strain <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14
FSI4	ASM93462v1	1579	1,991,969	1,977	Complete Genome Sequence of <i>Lactobacillus acidophilus</i> FSI4, Isolated from Yogurt
ATCC53544	ASM222430v1	1579	1,991,906	1,977	Genome of <i>Lactobacillus acidophilus</i> strain ATCC 53544
LA1	ASM228621v1	1579	1,991,195	2,002	Complete genome sequence of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA1
DSM20079	ASM304706v1	1579	2,009,973	2,020	The whole genome sequencing and assembly of <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079T strain

<표 15> Comparison of the chromosomal properties of *L. acidophilus*

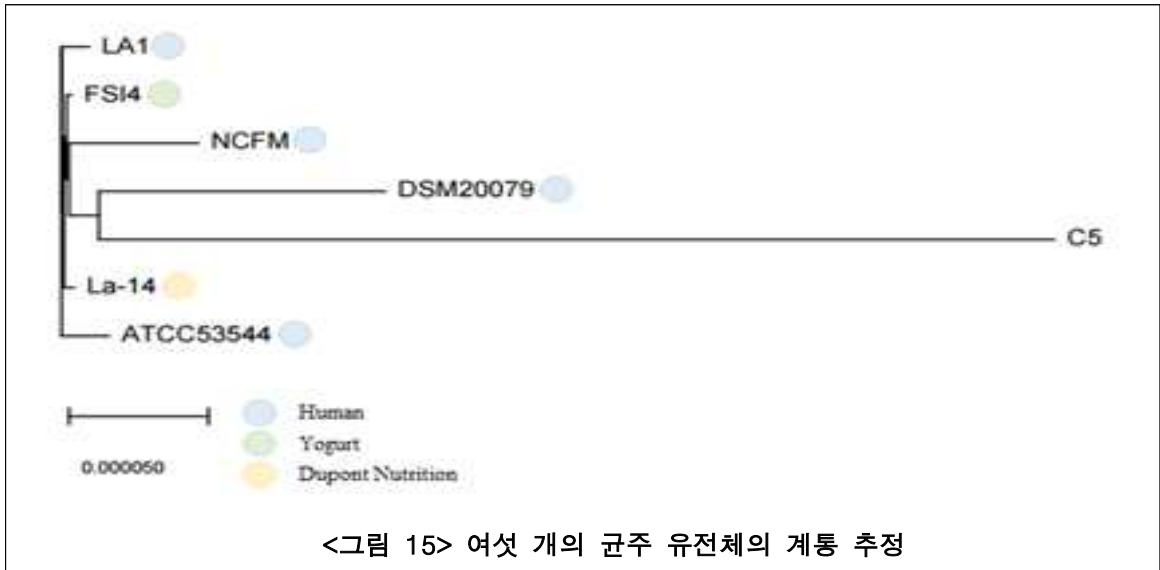
Strain	CBNUC5	NCFM	La14	FSI4	ATCC53544	LA1	DSM20079
Genome Size (bp)	2,005,383	1,993,560	1,991,579	1,991,969	1,991,906	1,991,195	2,009,973
Gene	2,082	1,963	1,978	1,977	1,977	2,002	2,020
Coding genes	2,009	1,832	1,862	1,868	1,852	1,886	1,840

Noncoding genes	73	131	116	109	125	116	180
ANI (Average Nucleotide Identity)	*	99.28%	99.28%	99.29%	99.28%	99.28%	99.24%

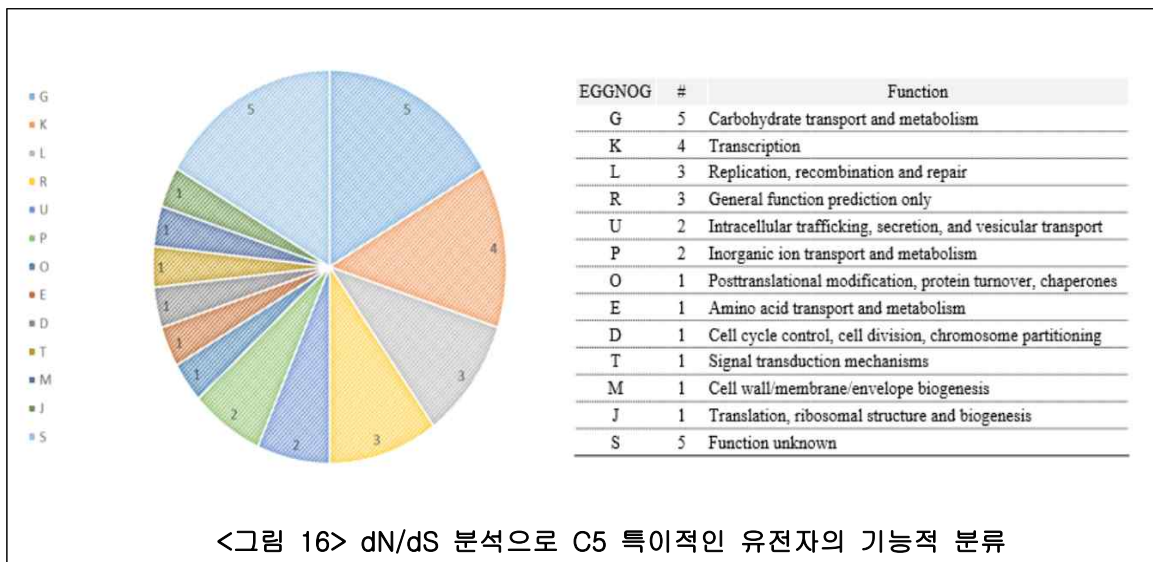
- *L. acidophilus* C5 균주에 대해서 팬지놈 분석을 통해서 코어 유전자 확인하였고, 이를 통해 C5의 특이적인 균주 및 dN/dS 분석을 수행하였다(그림 13, 14)



- 여섯 개의 *L. acidophilus* 균주를 분석한 결과 탄수화물 대사 관련 유전자 부분이 많지만 C5의 경우에 특히 많다고 확인되었으며, 이는 진화적으로 C5의 유전자가 탄수화물 유전자와 연관이 있을 것으로 추정하였으며 dN/dS 분석을 위해서 계통분석을 수행하였고, 인간유래 균주와 제일 가까운 것으로 확인하였다(그림 15).



- 여섯 개의 *L. acidophilus* 균주에 대해서 dN/dS 분석을 하여 C5 특이적인 균주를 분석한 결과, 탄수화물 관련 유전자가 제일 많음을 알 수 있었으며, 개의 호스트의 진화유전체 분석을 한 기존의 논문에서 인간과 생활환경을 공유하면서 늑대와의 공통 조상에서 분화되면서 탄수화물 관련 유전자가 늘어났음을 알 수 있었으며, 이와 비슷하게 개유래 균주에서도 이와 비슷한 진화적 선택을 했을 것이라고 추정되었으며 개 유래 *L. acidophilus* 균주의 특성임을 다시 한 번 확인하였다(그림 16).

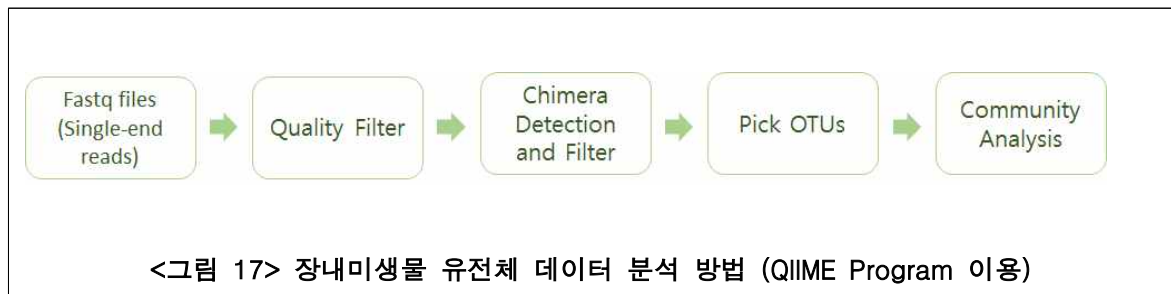


- 반려견 유래 유용미생물 (개별 균주; C1, C5 & 제품; C1+C5)을 급여한 처리군과 미생물을 처리하지 않은 대조군(Control) 대해서 장내 미생물을 관찰하고자 16s rRNA 유전체 분석을 위해서 주령 별(1~4주)로 유용미생물을 급여 처리하여 샘플링을 진행하였다(표 16).

<표 16> 개 유래 probiotics 급여 마우스 장내 미생물 샘플링 현황

샘플링 내역	샘플링 수
(1) 대조군(Control) 장내미생물 유전체 분석	마우스 3마리 * 1~4주(4건) = 12건
(2) 마우스 대상 <i>L. acidophilus</i> (C5)급여 장내미생물 유전체 분석	마우스 4마리 * 1~4주(4건) = 16건
(3) 마우스 대상 <i>L. reuteri</i> (C1)급여 장내미생물 유전체 분석	마우스 4마리 * 1~4주(4건) = 16건
(4) 마우스 대상 <i>L. acidophilus</i> (C5) + <i>L. reuteri</i> (C1) 급여 장내미생물 유전체 분석	마우스 4마리 * 1~4주(4건) = 16건

- 마우스 메타지놈 데이터 생산 및 파이프라인 구축 : QIIME 프로그램을 이용하여 16s rRNA 시퀀싱 raw 데이터인 single-end read (fastq 파일)을 Quality filter와 Chimera detection and filter 과정을 거쳐서 OTUs를 확인을 통하여 장내미생물 군집 확인 및 비교 분석을 진행하였다(그림 17).

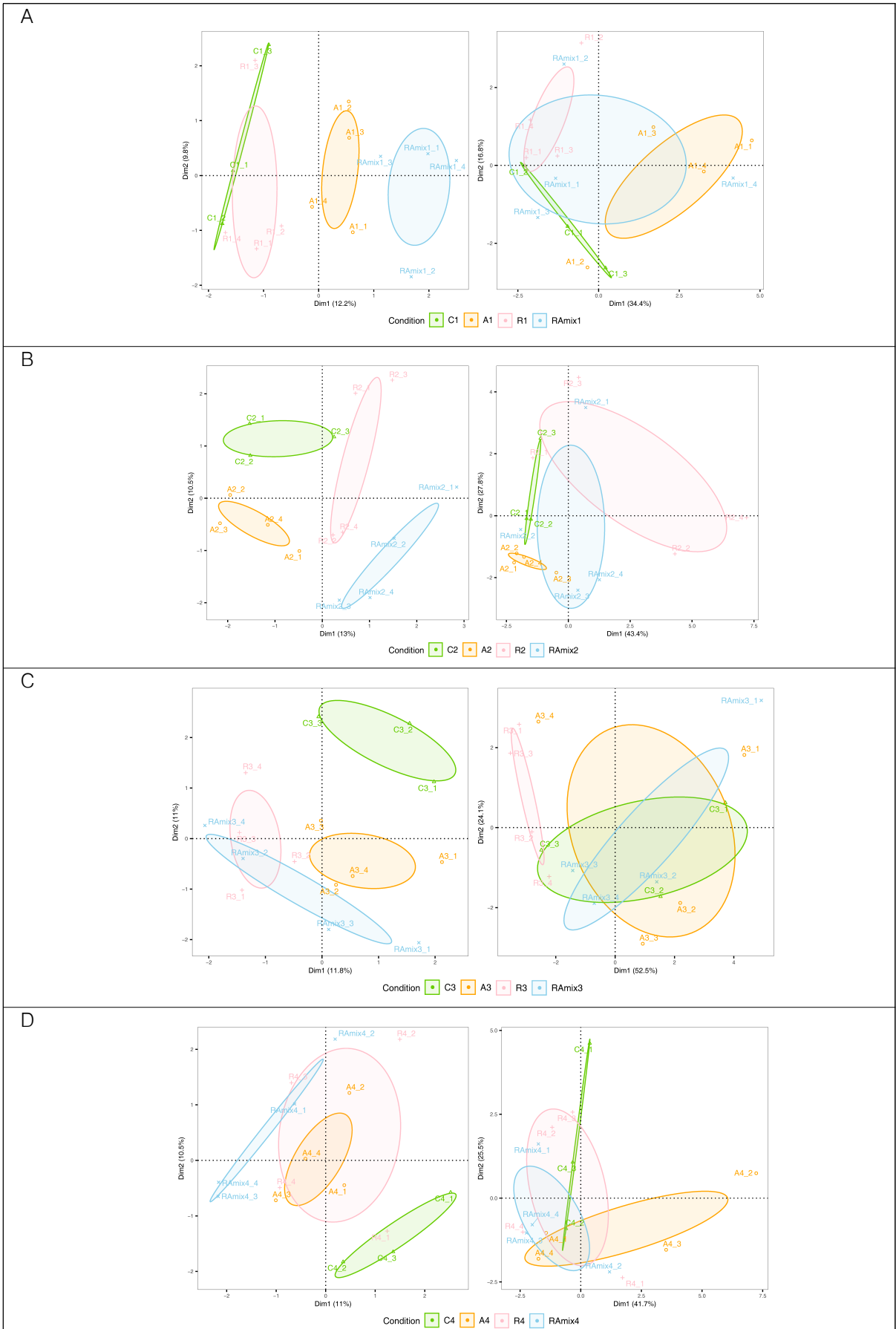


- 주령 별 유용 미생물 처리 후 장내 미생물 유전체 분석 : 유용미생물로 예측되어 동정한 3종 (*L. acidophilus* C5, *L. reuteri* C1, *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1) 미생물을 급여하여 장내 미생물 유전체 분석 연구를 수행하고자 대조군과 함께 샘플링하여 Illumina Miseq을 이용하여 16s rRNA의 V3-V4 region에 대해 시퀀싱 데이터를 생산하였고, 본 연구에서 생산된 샘플링에 대한 기본 통계치 및 샘플 정보는 표 17과 같다.

<표 17> 대조군 및 유용미생물 3종 급여군 샘플링 정보

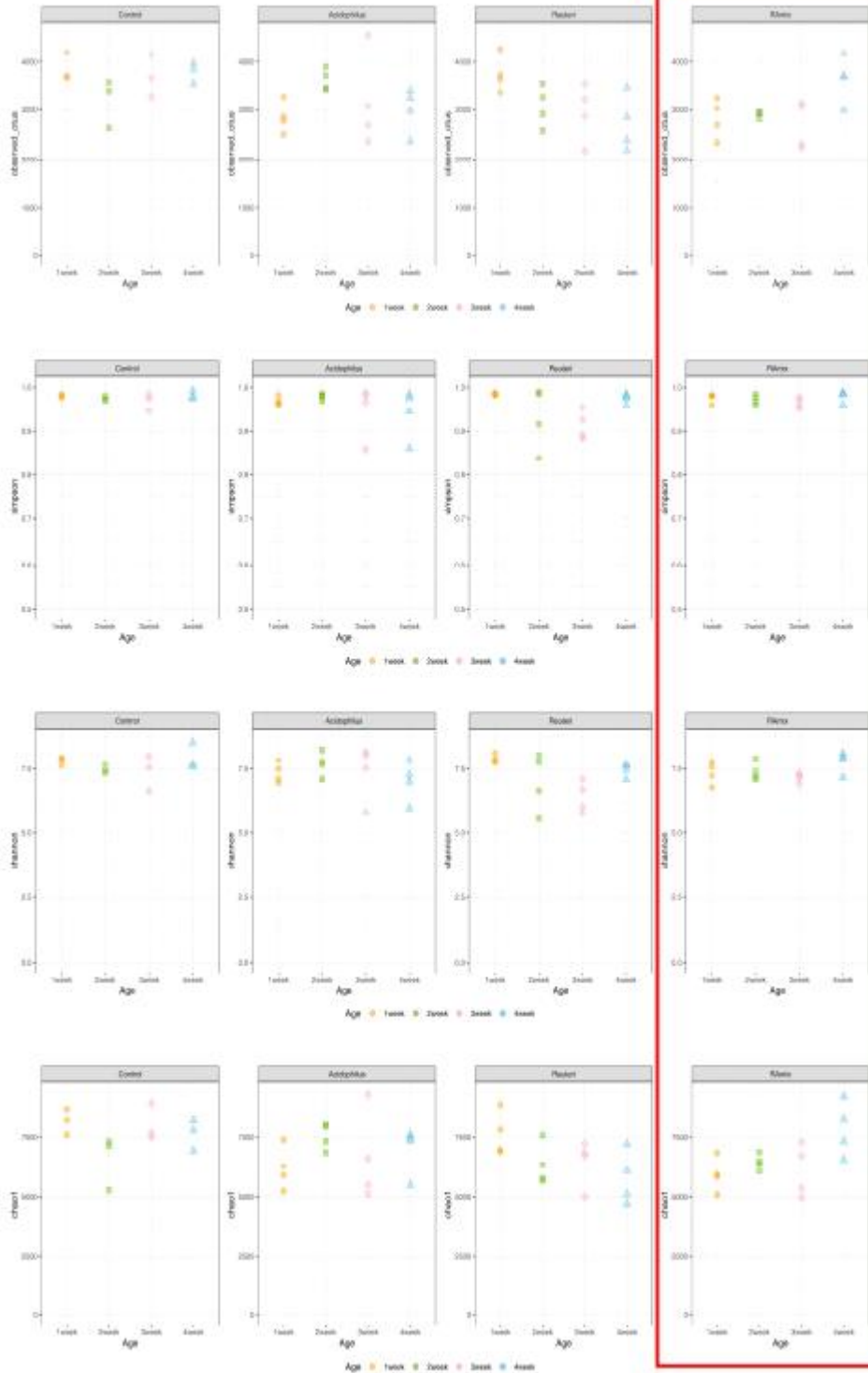
그룹	급여미생물	샘플	개체 수	처리기간 (주령)	샘플번호
Group 1	Control	C	3	1week	C1_1, C1_2, C1_3
				2week	C2_1, C2_2, C2_3
				3week	C3_1, C3_2, C3_3
				4week	C4_1, C4_2, C4_3
Group 2	<i>L. acidophilus</i> C5	A	4	1week	A1_1, A1_2, A1_3, A1_4
				2week	A2_1, A2_2, A2_3, A2_4
				3week	A3_1, A3_2, A3_3, A3_4
				4week	A4_1, A4_2, A4_3, A4_4
Group 3	<i>L. reuteri</i> C1	R	4	1week	R1_1, R1_2, R1_3, R1_4
				2week	R2_1, R2_2, R2_3, R2_4
				3week	R3_1, R3_2, R3_3, R3_4
				4week	R4_1, R4_2, R4_3, R4_4
Group 4	<i>L. acidophilus</i> C5 + <i>L. reuteri</i> C1	RAmix	4	1week	RAmix1_1, RAmix1_2, RAmix1_3, RAmix1_4
				2week	RAmix2_1, RAmix2_2, RAmix2_3, RAmix2_4
				3week	RAmix3_1, RAmix3_2, RAmix3_3, RAmix3_4
				4week	RAmix4_1, RAmix4_2, RAmix4_3, RAmix4_4

- 대조군과 유용 미생물 3종을 급여한 장내미생물 유전체의 PCoA 분석을 수행한 결과, unweighted uniFrac distances의 경우에는 모든 주령에서 전반적으로 유용 미생물 3종에 대하여 대조군과의 차이가 보이는 것을 알 수 있었다(그림 18).
- 특히, 대조군을 기준으로 *L. acidophilus* C5 급여군(A)과 *L. reuteri* C1급여군(R) 보다 둘을 섞은 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 (RAmix)가 더 명확하게 구분이 되는 것을 확인하였고, weighted uniFrac distances의 경우에는 그룹 간의 차이가 명확히 구분되지 않았다(그림 18).



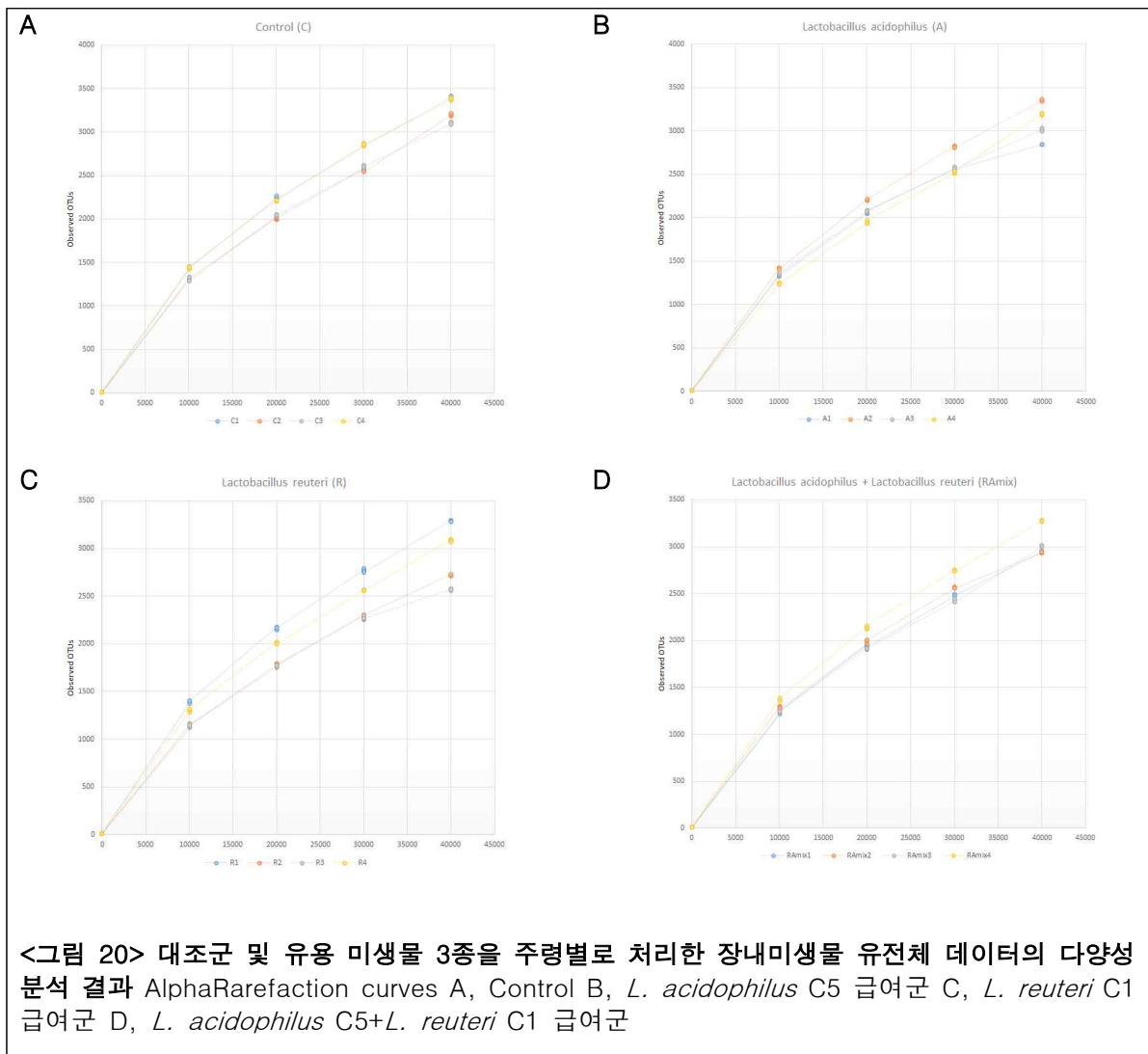
<그림 18> 대조군 및 유용 미생물 3종을 주령별로 처리한 장내미생물 유전체 데이터의 PCA 분석 결과
 A, (왼쪽) PCoA of unweighted UniFrac distances (오른쪽) PCoA of weighted UniFrac distances (1주)
 B, (왼쪽) PCoA of unweighted UniFrac distances (오른쪽) PCoA of weighted UniFrac distances (2주)
 C, (왼쪽) PCoA of unweighted UniFrac distances (오른쪽) PCoA of weighted UniFrac distances (3주)
 D, (왼쪽) PCoA of unweighted UniFrac distances (오른쪽) PCoA of weighted UniFrac distances (4주)

- 대조군과 유용 미생물 3종을 급여한 마우스의 처리한 장내미생물 유전체 데이터를 이용하여 미생물의 다양성 및 풍부도를 주령별로 분석한 결과, 대조군은 2주령에서 미생물의 풍부도가 (observed_otus, chao1)가 감소하였으며 3주, 4주령에서는 큰 변화가 없음을 확인하였다. 미생물의 다양성(simpson, shannon)도 주령별로 큰 변화가 없음을 확인하였고, 전반적으로 대조군에서는 주령의 변화에 따른 미생물의 다양성 및 풍부도가 큰 변화가 없음을 확인하였다(그림 19).
- *L. acidophilus* C5 급여군은 2주령에서 미생물의 풍부도가 (observed_otus, chao1)가 증가하였으며 3주령에서는 다양성이 증가한 한 개의 샘플을 제외한 나머지 3개의 샘플은 다양성에 변화가 없었으며, 4주령에서도 다양성에 큰 변화가 없음을 확인하였고, 미생물의 다양성(simpson, shannon)도 주령별로 큰 변화가 없음을 확인하였다. 전반적으로 *L. acidophilus* C5 급여군은 주령의 변화에 따른 미생물의 다양성 및 풍부도가 큰 변화가 없음을 확인하였다(그림 19).
- *L. reuteri* C1 급여군은 1주령을 기준으로 2, 3, 4주령 모두에서 미생물의 풍부도가 (observed_otus, chao1)가 감소하는 것을 확인하였고, 미생물의 다양성(simpson, shannon)은 2, 3주령에서 작은 폭으로 감소하였으며, 4주령에서는 1주령과 비슷한 수준으로 증가함을 확인하였다. 전반적으로 *L. reuteri* C1 급여군은 주령의 변화에 따른 미생물의 풍부도와 다양성은 감소하였다가 4주령에 증가하는 경향을 보임을 확인하였다(그림 19).
- *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 (RA mix)급여군의 4주령에서 미생물의 풍부도 (observed_otus, chao1)가 확연하게 증가하는 것을 확인하였고, 반면에 미생물의 다양성(simpson, shannon)은 주령별로 큰 변화가 없음을 확인하였으며, RA mix 급여군의 경우에는 다른 처리군과는 다르게 4주령에서 미생물의 풍부도의 변화가 1, 2, 3주령과 비교하여 확연하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 19).



<그림 19> 대조군 및 유용 미생물 3종을 주령별로 처리한 장내미생물 유전체 데이터의 다양성 분석 결과. Microbiota diversity 분석 (Line 1) observed otus (Line 2) simpson (Line 3) shannon (Line 4) chao1

- 대조군과 유용 미생물 3종을 주령별로 처리 한 장내 미생물 데이터를 이용하여 미생물의 다양성을 AlphaRarefaction curves를 통해 분석한 결과, *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1(RA mix) 급여군의 4주령에서 미생물의 다양성이 확연하게 증가하는 것을 확인하였다 (그림 20).



- 대조군과 유용 미생물 3종을 급여한 마우스의 주령별 장내 미생물 군집 확인 및 비교 분석을 위하여 Taxonomic 분석을 진행한 결과, Phylum(문), Class(강), Order(목), Family(과), Genus(속) 수준에서 군집을 확인하였고, T-test를 통하여(<0.1) 군집 중 유의한 미생물을 확인하였으며, 그 중 대조군을 기준으로 처리군의 변화가 가장 많이 증가한 군집과 가장 많이 감소한 군집을 각각 1개씩 선별하였다(표 18,19,20,21).
- 1주령에서 대조군과 *L. acidophilus* C5 급여군과 비교 시, Order 수준에서 Clostridiales가 *L. acidophilus* C5를 급여하였을 때 abundance가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. reuteri* C1 급여군과 비교 시, Family 수준에서 Clostridiaceae가 *L. reuteri* C1을 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 Peptococcaceae가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여군 비교 시, Genus 수준에서 Lactococcus가 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하며 Phylum 수준에서 Firmicutes가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(표 18).
- 2주령에서 대조군과 대조군과 *L. acidophilus* C5 급여군과 비교 시, Genus 수준에서 Lactococcus가 *L. acidophilus* C5를 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하며 Family 수준에서 Prevotellaceae가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. reuteri* C1 급여군 비교 시, Phylum 수준에서 Firmicutes가 *L. reuteri* C1 급여하였을

때 abundance가 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 S24-7가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여군과 비교 시, Family 수준에서 S24-7가 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여하였을 때 abundance가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(표 19).

- 3주령에서 대조군과 *L. acidophilus* C5 급여군과 비교 시, Family 수준에서 Paraprevotellaceae가 *L. acidophilus* C5를 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하며 S24-7가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. reuteri* C1 급여군과 비교 시, Genus 수준에서 Lactococcus가 *L. reuteri* C1을 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 Erysipelotrichaceae가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여군과 비교 시, Genus 수준에서 Lactococcus가 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하며 Phylum수준에서 Firmicutes가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(표 20).
- 4주령에서 대조군과 *L. acidophilus* C5 급여군 비교 시, Family 수준에서 Bacteroidaceae가 *L. acidophilus* C5를 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하며 F16가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. reuteri* C1 급여군과 비교 시, Genus 수준에서 Lactococcus가 *L. reuteri* C1 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 Phylum 수준에서 Firmicutes가 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군과 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여군과 비교 시, Family 수준에서 Bacteroidaceae가 *L. acidophilus* C5 + *L. reuteri* C1 mix 급여하였을 때 abundance가 유의하게 증가하며 F16이 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(표 21).

<표 18> 대조군 및 유용 미생물 3종을 급여한 마우스의 장내미생물 유전체 데이터의 Taxonomic 분석결과 (1 week)

Condition	Level	Microbe	Mean		T-test P-value (<0.1)
			Control	Probiotics	
Control vs <i>Lactobacillus acidophilus</i> C5	Phylum	<i>k__Bacteria;p__Firmicutes</i>	20955.000	13840.000	0.008
		<i>k__Bacteria;p__Proteobacteria</i>	1210.000	462.000	0.021
	Class	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia</i>	13663.667	6226.000	0.006
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria</i>	335.000	114.750	0.035
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria</i>	617.000	134.500	0.017
	Order	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales</i>	13663.667	6226.000	0.006
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales</i>	335.000	114.750	0.035
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria; o__Campylobacterales</i>	617.000	134.500	0.017
	Family	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae</i>	2070.333	1264.500	0.094
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Dehalobacteriaceae</i>	133.333	52.250	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae</i>	2294.000	1259.750	0.047
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Peptococcaceae</i>	7.000	1.500	0.030
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae</i>	3021.667	882.250	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales; f__Desulfovibrionaceae</i>	335.000	114.750	0.035
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria; o__Campylobacterales; f__Helicobacteraceae</i>	617.000	134.500	0.017
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Dehalobacteriaceae; g__Dehalobacterium</i>	133.333	52.250	0.062
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Ruminococcus</i>	1262.000	359.750	0.073
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira</i>	1096.333	370.750	0.017
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__cc_115</i>	48.667	3.750	0.003
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales; f__Desulfovibrionaceae; g__Desulfovibrio</i>	121.333	42.000	0.061
<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Enhydrobacter</i>		2.333	0.500	0.074	
Control vs <i>Lactobacillus reuteri</i> C1	Class	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia</i>	290.000	588.750	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia</i>	0.000	0.750	0.052
	Order	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales</i>	290.000	588.750	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia; o__Flavobacteriales</i>	0.000	0.750	0.052
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Gemellales</i>	4.333	26.000	0.052
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales</i>	2.667	94.500	0.037
	Family	<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Xanthomonadales</i>	0.000	2.000	0.093
		<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae</i>	290.000	588.750	0.002
<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia; o__Flavobacteriales; f__Weeksellaceae</i>		0.000	0.750	0.052	
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Gemellales; f__Gemellaceae</i>	4.333	26.000	0.052

		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae</i>	527.333	1449.250	0.078
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Peptococcaceae</i>	7.000	2.250	0.070
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae</i>	2.667	94.500	0.037
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Xanthomonadales; f__Xanthomonadaceae</i>	0.000	2.000	0.093
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae; g__Adlercreutzia</i>	274.000	567.750	0.001
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia; o__Flavobacteriales; f__Weeksellaceae; g__Wautersiella</i>	0.000	0.750	0.052
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Gemellales; f__Gemellaceae; g__Gemella</i>	4.333	25.000	0.053
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus</i>	11.667	34.250	0.008
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Candidatus Arthromitus</i>	467.000	1343.750	0.071
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Lachnobacterium</i>	0.000	0.750	0.052
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria; o__Campylobacterales; f__Helicobacteraceae; g__Flexispira</i>	1.000	0.000	0.093
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__Enterobacter</i>	0.000	42.250	0.048
	Phylum	<i>k__Bacteria;p__Firmicutes</i>	20955.000	14675.750	0.006
	Class	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia</i>	290.000	182.750	0.061
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia</i>	13663.667	8620.000	0.056
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria</i>	617.000	251.500	0.087
	Order	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales</i>	290.000	182.750	0.061
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales</i>	13663.667	8620.000	0.056
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria; o__Campylobacterales</i>	617.000	251.500	0.087
	Family	<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales</i>	3.000	0.250	0.042
		<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;</i>	290.000	182.750	0.061
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Thermoactinomycetaceae</i>	1.000	0.000	0.093
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	12.000	171.750	0.020
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Christensenellaceae</i>	2.667	0.000	0.005
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Peptococcaceae</i>	7.000	2.250	0.092
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae</i>	3021.667	1019.000	0.010
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria; o__Campylobacterales; f__Helicobacteraceae</i>	617.000	251.500	0.087
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae</i>	2.333	0.000	0.025
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae; g__Adlercreutzia</i>	274.000	174.250	0.067
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae; g__Rikenella</i>	90.333	5.750	0.094
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus</i>	0.333	164.500	0.015
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira</i>	1096.333	518.250	0.076
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__Eubacterium</i>	2.667	14.250	0.097
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__cc_115</i>	48.667	0.000	0.001
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales; f__Desulfovibrionaceae; g__Desulfovibrio</i>	121.333	1.000	0.006
<i>Lactobacillus acidophilus C5 vs Lactobacillus reuteri C1</i>					

		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Epsilonproteobacteria; o__Campylobacterales; f__Helicobacteraceae; g__Flexispira</i>	1.000	0.000	0.093
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Enhydrobacter</i>	2.333	0.000	0.025

<표 19> 대조군 및 유용 미생물 3종을 급여한 마우스의 장내미생물 유전체 데이터의 Taxonomic 분석결과 (2 week)

Condition	Level	Microbe	Mean		T-test P-value (<0.1)
			Control	Probiotics	
Control vs <i>Lactobacillus acidophilus</i> C5	Phylum	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria</i>	296.333	68.000	0.033
		<i>k__Bacteria; p__Cyanobacteria</i>	94.667	14.500	0.096
	Class	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia</i>	293.000	68.500	0.032
	Order	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales</i>	293.000	68.500	0.032
	Family	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae</i>	293.000	68.500	0.032
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae</i>	592.667	211.750	0.066
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Prevotellaceae</i>	1143.667	94.500	0.040
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Planococcaceae</i>	17.333	0.375	0.082
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae</i>	1.667	0.375	0.075
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	18.000	115.125	0.048
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae</i>	1.667	0.375	0.075
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae; g__Adlercreutzia</i>	280.667	68.875	0.041
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__Parabacteroides</i>	591.333	213.000	0.068
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae; g__AF12</i>	81.667	108.750	0.058
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus</i>	1.667	0.375	0.075
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus</i>	14.667	114.250	0.050
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium</i>	7.000	66.250	0.043
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Anaerotruncus</i>	0.000	0.500	0.007
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__Coprobaecillus</i>	144.000	13.250	0.065
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Enhydrobacter</i>	1.333	0.375	0.045
Control vs <i>Lactobacillus</i>	Phylum	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes</i>	13359.000	23142.250	0.013
	Family	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Prevotellaceae</i>	1143.667	74.000	0.026
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__S24-7</i>	20319.000	14310.250	0.060

<i>reuteri</i> C1		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Planococcaceae</i>	17.333	0.000	0.078
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	18.000	143.000	0.086
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Paraprevotellaceae; g__Prevotella</i>	1141.000	74.000	0.026
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae; g__AF12</i>	81.667	293.250	0.078
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus</i>	3.333	13.000	0.016
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Dorea</i>	7.000	21.500	0.069
<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5 vs <i>Lactobacillus reuteri</i> C1	Phylum	<i>k__Bacteria; p__Cyanobacteria</i>	94.667	5.750	0.040
	Class	<i>k__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__4C0d-2</i>	20.667	3.250	0.064
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria</i>	4.667	1.500	0.054
	Order	<i>k__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__4C0d-2; o__YS2</i>	20.667	3.250	0.064
	Family	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Prevotellaceae</i>	1143.667	19.000	0.022
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__S24-7</i>	20319.000	13635.000	0.072
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Planococcaceae</i>	17.333	0.000	0.078
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae</i>	1.667	0.250	0.075
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	18.000	140.750	0.039
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae</i>	570.333	248.750	0.054
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae</i>	1.667	0.000	0.031
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Odoribacteraceae; g__Butyricimonas</i>	5.000	0.000	0.093
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Paraprevotellaceae; g__Prevotella</i>	1141.000	19.000	0.022
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae; g__AF12</i>	81.667	237.250	0.096
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus</i>	1.667	0.250	0.075
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus</i>	14.667	137.500	0.038
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Candidatus Arthromitus</i>	530.333	196.750	0.034
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium</i>	7.000	37.750	0.074
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__Coprobacillus</i>	144.000	15.500	0.064
	<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Enhydrobacter</i>	1.333	0.000	0.005	

<표 20> 대조군 및 유용 미생물 3종을 급여한 마우스의 장내미생물 유전체 데이터의 Taxonomic 분석결과 (3 week)

Condition	Level	Microbe	Mean		T-test P-value (<0.1)
			Control	Probiotics	
Control vs Lactobacillus acidophilus C5	Phylum	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria</i>	512.667	148.500	0.061
		<i>k__Bacteria; p__TM7</i>	1114.667	332.750	0.068
	Class	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia</i>	511.333	148.250	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__4C0d-2</i>	4.333	18.250	0.040
		<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3</i>	1114.667	332.750	0.068
	Order	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales</i>	511.333	148.250	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__4C0d-2; o__YS2</i>	4.333	18.250	0.040
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales</i>	80.000	0.000	0.027
		<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040</i>	1114.333	332.750	0.068
	Family	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae</i>	511.333	148.250	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Barnesiellaceae</i>	1.667	0.250	0.018
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Paraprevotellaceae</i>	0.000	135.750	0.097
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__S24-7</i>	17919.667	12373.250	0.071
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Planococcaceae</i>	4.667	0.000	0.068
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae</i>	74.667	0.000	0.026
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Thermoactinomycetaceae</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae</i>	5.667	0.000	0.067
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae</i>	130.333	0.000	0.089
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Enterococcaceae</i>	1.667	0.000	0.073
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	7.333	142.000	0.023
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae</i>	1126.000	498.250	0.100
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Eubacteriaceae</i>	0.667	0.000	0.062	
	<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040; f__F16</i>	1114.333	332.750	0.068	
	Genus	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae; g__Bifidobacterium</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae; g__Adlercreutzia</i>	455.000	139.500	0.065
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Jeotgalicoccus</i>	16.667	0.000	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus</i>	58.000	0.000	0.045
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae; g__Aerococcus</i>	5.667	0.000	0.067
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae; g__Carnobacterium</i>	129.333	0.000	0.088

		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Enterococcaceae; g__Enterococcus</i>	1.667	0.000	0.073
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus</i>	0.000	130.750	0.028
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium</i>	112.000	40.250	0.009
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Eubacteriaceae; g__Anaerofustis</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Coprococcus</i>	22.333	62.000	0.085
Control vs <i>Lactobacillus reuteri</i> C1	Phylum	<i>k__Bacteria; p__Deferribacteres</i>	8.667	0.500	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Tenericutes</i>	128.667	22.250	0.076
		<i>k__Bacteria; p__TM7</i>	1114.667	197.000	0.035
	Class	<i>k__Bacteria; p__Deferribacteres; c__Deferribacteres</i>	8.667	0.500	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi</i>	2353.667	609.500	0.085
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria</i>	303.667	118.750	0.037
		<i>k__Bacteria; p__Tenericutes; c__Mollicutes</i>	128.667	22.250	0.076
		<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3</i>	1114.667	197.000	0.035
	Order	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Deferribacteres; c__Deferribacteres; o__Deferribacterales</i>	8.667	0.500	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales</i>	80.000	1.000	0.028
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales</i>	2353.667	609.500	0.085
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales</i>	303.667	118.750	0.037
		<i>k__Bacteria; p__Tenericutes; c__Mollicutes; o__RF39</i>	59.333	6.250	0.018
		<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040</i>	1114.333	197.000	0.035
	Family	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Barnesiellaceae</i>	1.667	0.000	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Prevotellaceae</i>	244.333	19.750	0.075
		<i>k__Bacteria; p__Deferribacteres; c__Deferribacteres; o__Deferribacterales; f__Deferribacteraceae</i>	8.667	0.500	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Planococcaceae</i>	4.667	0.500	0.097
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae</i>	74.667	0.000	0.026
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae</i>	5.667	0.000	0.067
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae</i>	130.333	0.000	0.089
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	7.333	289.500	0.073
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Mogibacteriaceae</i>	43.667	10.500	0.028
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae</i>	1911.667	579.750	0.068
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae</i>	2353.667	609.500	0.085
<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales; f__Desulfovibrionaceae</i>		303.667	118.750	0.037	
<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040; f__F16</i>		1114.333	197.000	0.035	

Genus	<i>k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae; g__Bifidobacterium</i>	0.667	0.000	0.062	
	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Odoribacteraceae; g__Butyricimonas</i>	4.333	0.000	0.032	
	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Paraprevotellaceae; g__Prevotella</i>	244.000	19.750	0.075	
	<i>k__Bacteria; p__Deferribacteres; c__Deferribacteres; o__Deferribacterales; f__Deferribacteraceae; g__Mucispirillum</i>	8.667	0.500	0.062	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Jeotgalicoccus</i>	16.667	0.000	0.002	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus</i>	58.000	0.000	0.045	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae; g__Aerococcus</i>	5.667	0.000	0.067	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae; g__Carnobacterium</i>	129.333	0.000	0.088	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus</i>	0.000	285.750	0.071	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Ruminococcus</i>	548.000	260.750	0.063	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Anaerostipes</i>	401.667	65.000	0.041	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Lachnobacterium</i>	1.333	0.000	0.062	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira</i>	763.333	183.750	0.078	
	<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__cc_115</i>	32.000	2.000	0.036	
	<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales; f__Desulfovibrionaceae; g__Desulfovibrio</i>	178.333	50.500	0.009	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5 vs <i>Lactobacillus reuteri</i> C1	Phylum	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes</i>	25349.333	17221.750	0.091
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes</i>	24836.667	15942.750	0.040
		<i>k__Bacteria; p__TM7</i>	1114.667	127.250	0.028
	Class	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia</i>	25349.333	17221.750	0.091
		<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3</i>	1114.667	127.250	0.028
	Order	<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales</i>	25349.333	17221.750	0.091
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales</i>	80.000	0.250	0.027
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Gemellales</i>	42.333	18.750	0.086
		<i>k__Bacteria; p__Tenericutes; c__Mollicutes; o__RF39</i>	59.333	7.750	0.019
	Family	<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040</i>	1114.333	127.250	0.028
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Barnesiellaceae</i>	1.667	0.000	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Prevotellaceae</i>	244.333	27.000	0.078
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__S24-7</i>	17919.667	10207.500	0.047
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Planococcaceae</i>	4.667	0.000	0.068
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae</i>	74.667	0.250	0.026
<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Thermoactinomycetaceae</i>		0.667	0.000	0.062	
<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Gemellales; f__Gemellaceae</i>		42.333	18.750	0.086	
<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae</i>	5.667	0.000	0.067		

		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae</i>	130.333	0.000	0.089
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae</i>	7.333	202.750	0.068
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae</i>	1126.000	166.250	0.008
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Eubacteriaceae</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040; f__F16</i>	1114.333	127.250	0.028
Genus		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Odoribacteraceae; g__Butyricimonas</i>	4.333	0.000	0.032
		<i>k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Paraprevotellaceae; g__Prevotella</i>	244.000	27.000	0.078
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Jeotgalicoccus</i>	16.667	0.000	0.002
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus</i>	58.000	0.250	0.046
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Gemellales; f__Gemellaceae; g__Gemella</i>	41.000	18.250	0.089
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae; g__Aerococcus</i>	5.667	0.000	0.067
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae; g__Carnobacterium</i>	129.333	0.000	0.088
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus</i>	0.000	197.000	0.064
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Candidatus Arthromitus</i>	974.333	121.250	0.014
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium</i>	112.000	36.500	0.007
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Eubacteriaceae; g__Anaerofustis</i>	0.667	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Anaerostipes</i>	401.667	29.500	0.021
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Lachnobacterium</i>	1.333	0.000	0.062
		<i>k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__cc_115</i>	32.000	3.750	0.045
		<i>k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales; f__Desulfovibrionaceae; g__Desulfovibrio</i>	178.333	49.750	0.022

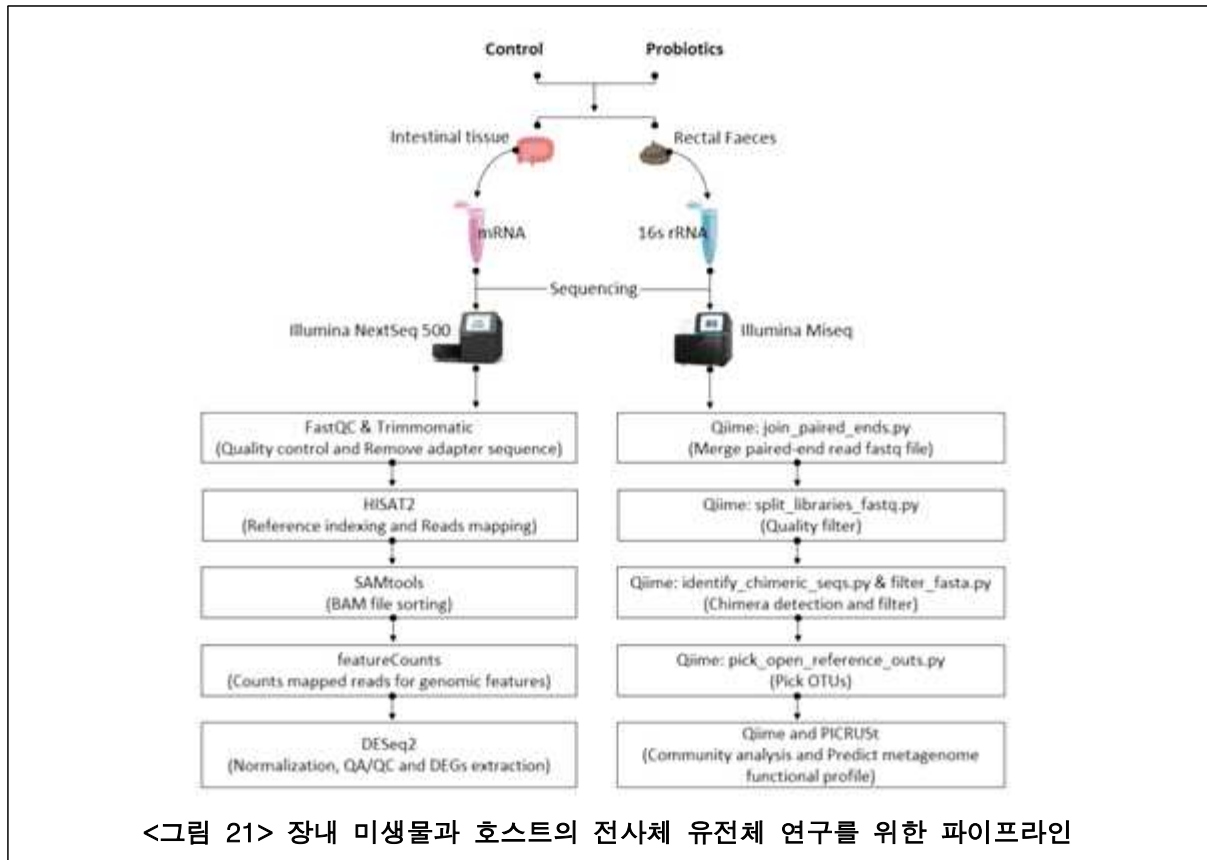
<표 21> 대조군 및 유용 미생물 3종을 급여한 마우스의 장내미생물 유전체 데이터의 Taxonomic 분석결과 (4 week)

Condition	Level	Microbe	Mean		T-test P-value (<0.1)
			Control	Probiotics	
Control vs <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> C5	Phylum	k__Bacteria;p__TM7	1117.000	225.500	0.0079
	Class	k__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__Chloroplast	2.000	7.000	0.0146
		k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria	454.333	182.750	0.0575
		k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3	1117.000	225.500	0.0079
	Order	k__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__Chloroplast; o__Streptophyta	2.000	6.750	0.0115
		k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfovibrionales	454.333	182.750	0.0575

		k_Bacteria; p_TM7; c_TM7-3; o_CW040	1117.000	225.500	0.0079
	Family	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Odoribacteraceae	530.333	1208.250	0.0915
		k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae	890.667	2392.500	0.0380
		k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae	333.333	30.000	0.0012
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae	5.333	116.000	0.0023
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Peptococcaceae	4.333	1.250	0.0569
		k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Deltaproteobacteria; o_Desulfovibrionales; f_Desulfovibrionaceae	454.333	182.750	0.0575
		k_Bacteria; p_TM7; c_TM7-3; o_CW040; f_F16	1117.000	225.500	0.0079
	Genus	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Odoribacteraceae; g_Odoribacter	527.667	1205.500	0.0925
		k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides	890.667	2392.500	0.0380
		k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_AF12	117.000	306.500	0.0659
		k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_Rikenella	225.333	39.250	0.0816
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Bacillales; f_Staphylococcaceae; g_Staphylococcus	0.667	0.000	0.0624
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Lactococcus	2.000	110.750	0.0018
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia	2.667	0.500	0.0706
		k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Enterobacteriales; f_Enterobacteriaceae; g_Enterobacter	0.000	1.250	0.0784
Control vs <i>Lactobacillus reuteri</i> C1	Phylum	k_Bacteria; p_Firmicutes	20485.000	13692.750	0.0756
	Class	k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Deltaproteobacteria	454.333	220.250	0.0815
	Order	k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Deltaproteobacteria; o_Desulfovibrionales	454.333	220.250	0.0815
	Family	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae	5.333	11.750	0.0618
		k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Deltaproteobacteria; o_Desulfovibrionales; f_Desulfovibrionaceae	454.333	220.250	0.0815
	Genus	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_Rikenella	225.333	33.000	0.0769
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Bacillales; f_Staphylococcaceae; g_Staphylococcus	0.667	0.000	0.0624
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Lactococcus	2.000	9.500	0.0221
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Dorea	31.667	10.000	0.0790
		k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Epsilonproteobacteria; o_Campylobacteriales; f_Helicobacteraceae; g_Flexispira	0.667	0.000	0.0624
<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5 vs <i>Lactobacillus reuteri</i> C1	Phylum	k_Bacteria; p_TM7	1117.000	588.250	0.0695
	Class	k_Bacteria; p_TM7; c_TM7-3	1117.000	588.250	0.0695
	Order	k_Bacteria; p_TM7; c_TM7-3; o_CW040	1117.000	588.250	0.0695
	Family	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae	890.667	2884.750	0.0874
		k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae	1641.000	3435.250	0.0091
		k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae	5.333	435.000	0.0546

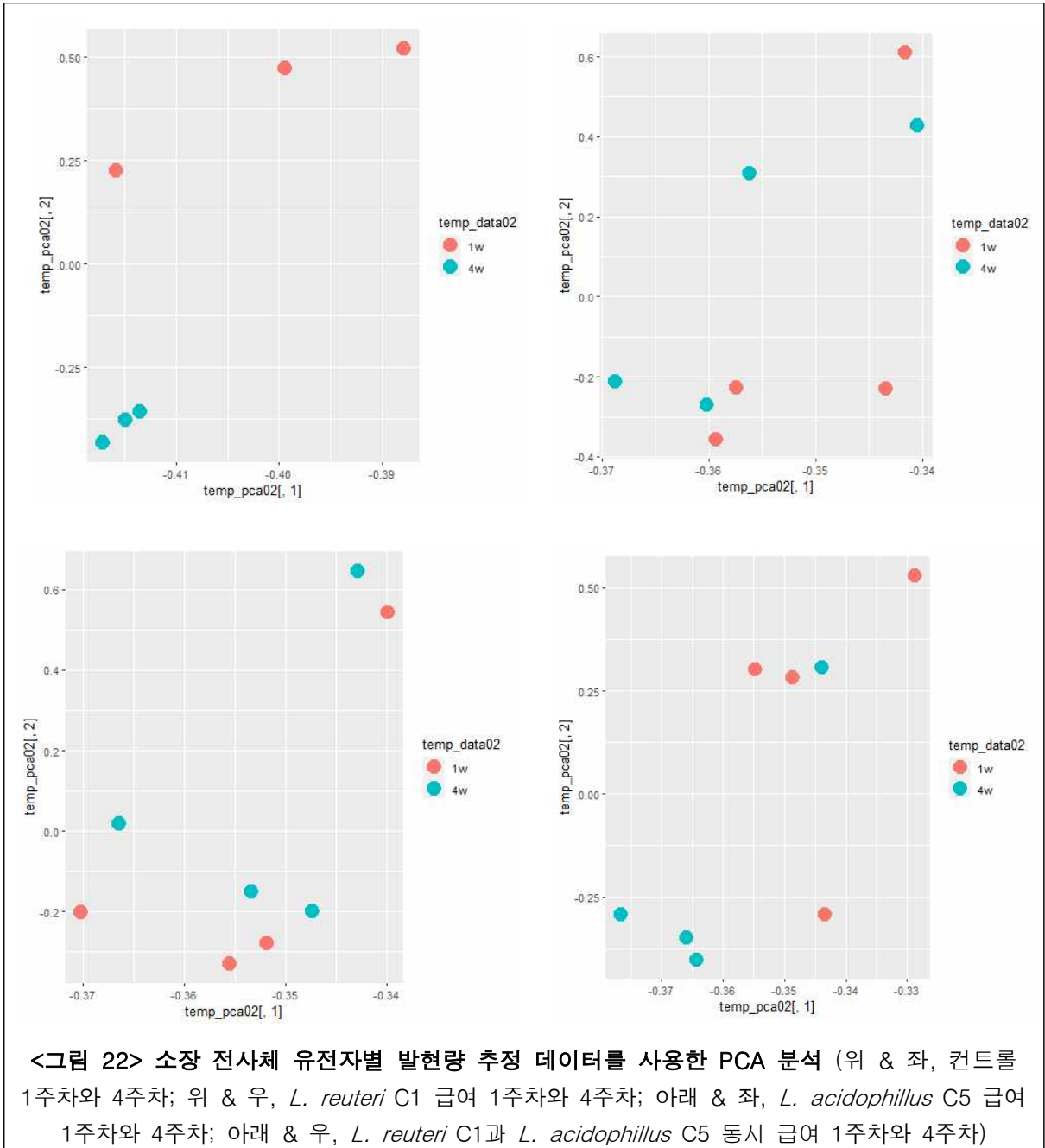
		k__Bacteria; p__TM7; c__TM7-3; o__CW040; f__F16	1117.000	588.250	<i>0.0695</i>
Genus		k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides	890.667	2884.750	<i>0.0874</i>
		k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae; g__AF12	117.000	427.750	<i>0.0572</i>
		k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Rikenellaceae; g__Rikenella	225.333	12.750	<i>0.0543</i>
		k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Lactococcus	2.000	419.000	<i>0.0558</i>
		k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus	3.333	16.000	<i>0.0248</i>
		k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Candidatus Arthromitus	657.667	220.000	<i>0.0683</i>
		k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Roseburia	2.667	0.000	<i>0.0153</i>
		k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Anaerotruncus	1.667	0.000	<i>0.0735</i>

- *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5의 마우스 급여군에 대한 소장 of 전사체를 분석하였다. Total RNA(mRNA)를 일루미나 플랫폼 형식으로 시퀀싱한 후에 생산된 전사체 데이터로 FAST QC를 수행하여 품질체크를 하고 Trimmomatic 프로그램으로 어댑터 및 일정 품질 이하의 시퀀스를 제거한 후 HISAT2 프로그램을 이용하여 맵핑, SAMTOOLS 프로그램을 이용하여 정렬한 다음 FeatureCount 프로그램으로 각 샘플들의 유전자별 발현량을 추정하였다(그림 21).

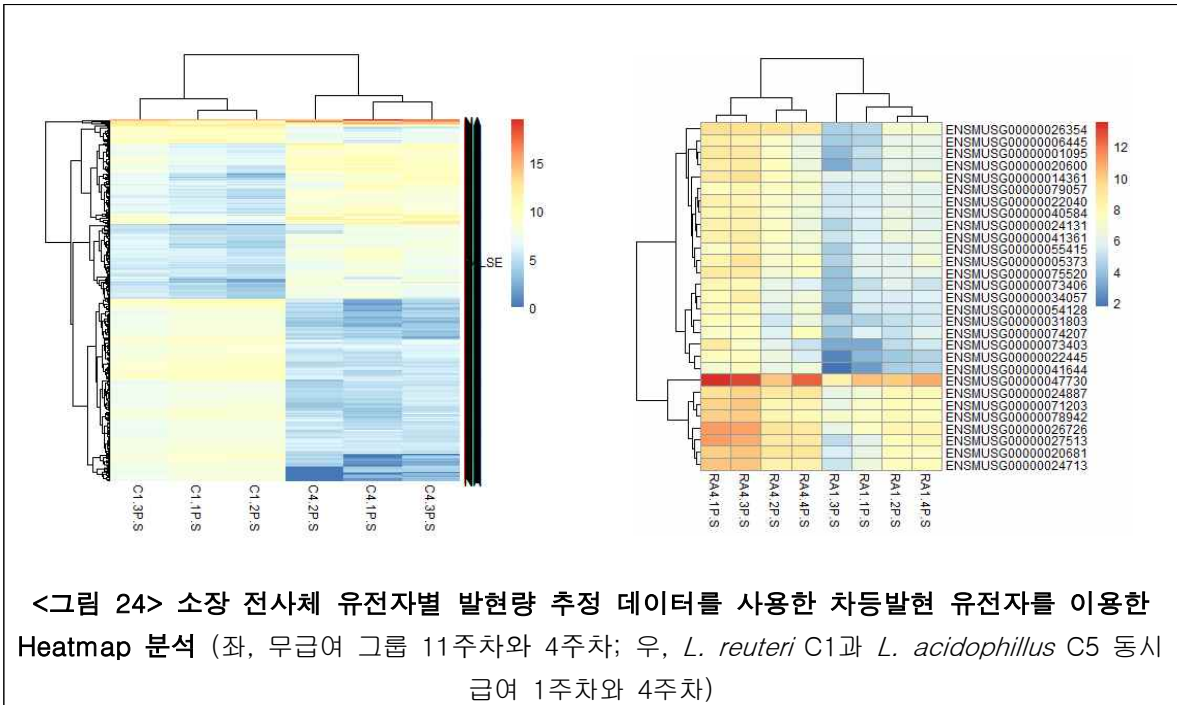
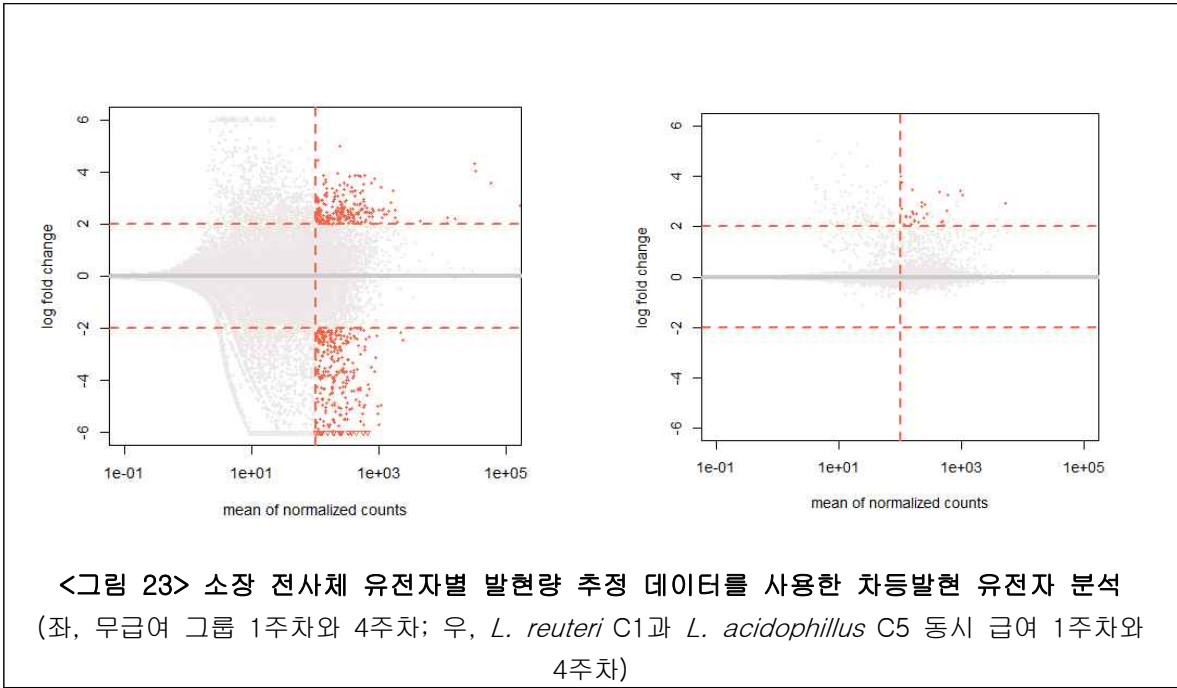


<그림 21> 장내 미생물과 호스트의 전사체 유전체 연구를 위한 파이프라인

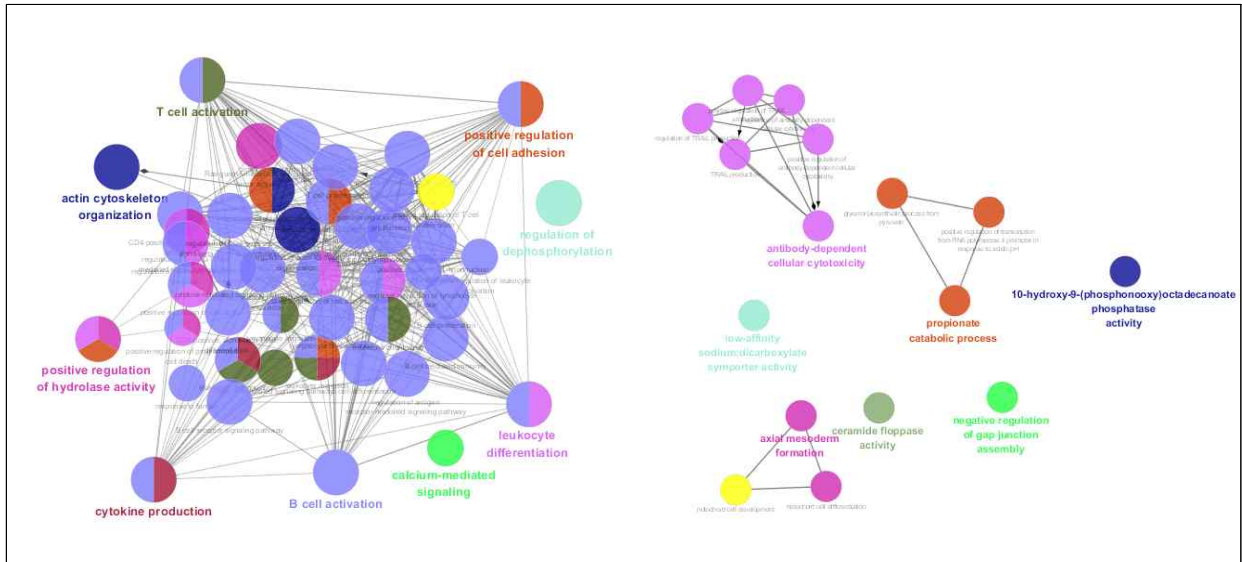
- FeatureCount 프로그램을 이용하여 각 샘플들의 유전자별 발현량을 추정한 결과로 PCA 분석을 수행하였다. 그 결과 무급여 컨트롤 그룹과 *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5를 같이 급여한 실험군의 1주차와 4주차의 전사체 발현 차이가 분명하게 클러스터링 되는 것을 알 수 있었으며, *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5를 독립적으로 급여했을 경우에는 많은 차이가 나지 않았다. 이는 장내 마이크로바이옴 분석에서도 두 균주를 같이 급여했을 때 미생물의 균총 다양성이 증가했던 결과와 연관이 있다고 추정된다(그림 22).



- FeatureCount 프로그램을 이용하여 각 샘플들의 유전자별 발현량을 추정한 결과로 차등발현 유전자를 추정한 결과, 무급여 그룹의 1주차와 4주차에서는 523개의 유전자, *L. reuteri* C1급여시 1주차와 4주차 간에서는 1개의 유전자, *L. acidophilus* C5 급여시에 1주차와 4주차 간에서는 5개의 유전자, *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5 동시 급여시 1주차와 4주차 간에서 29개의 유전자가 발현차이를 보였다(그림 23, 24).



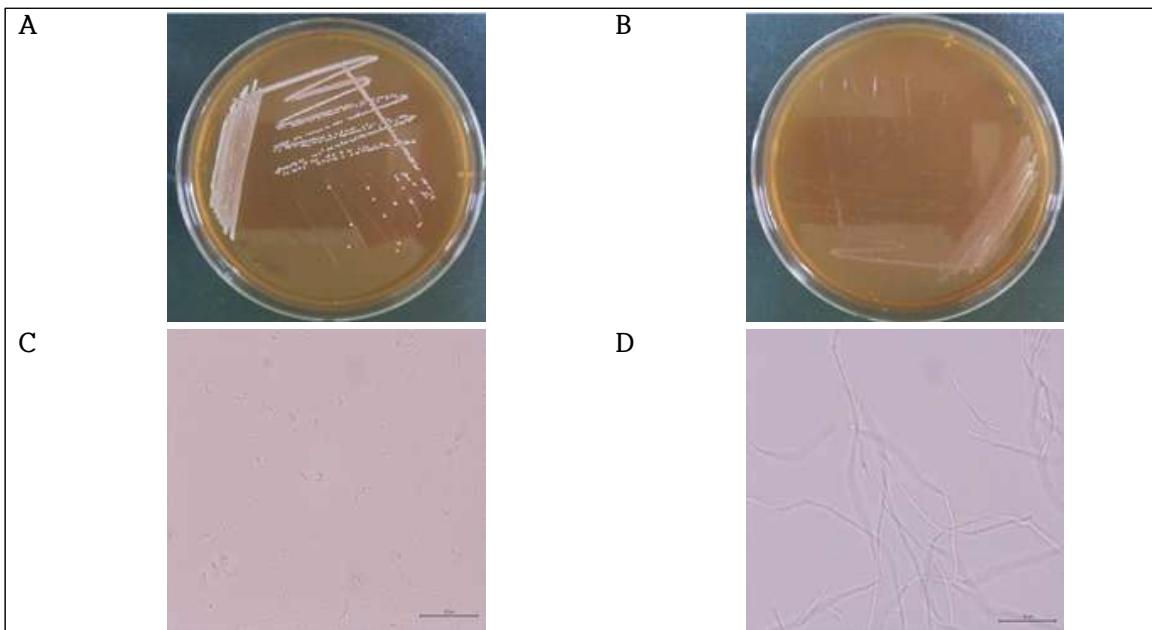
- 대조군의 차등발현 유전자의 경우에는 면역유전자가 주를 이루었고, 이는 성장에 따른 면역력 확보 차원에서 쉽게 예측될 수 있는 결과이며, *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5 동시 급여군에서 나온 차등발현 유전자의 경우 세포 독성 및 프로피오네이트 관련 유전자로 확인되었다. 유익한 미생물은 프로피오네이트와 같은 단쇄 지방산(SCFA)를 생성한다고 알려져 있으며, 이러한 화합물은 산성 pH조절, 결장을 위한 에너지 기질, 뮤신 및 항균성 펩타이드 생산 등의 형태로 장내 건강을 유지하고 염증 조절 및 림프구 생성과 같이 면역계의 기능을 최적화하는데 필수적이라고 알려져 있기 때문에 프로바이오틱스에 의한 긍정적 효과라고 판단된다(그림 25).



<그림 25> 소장 전사체 유전자별 발현량 추정 데이터를 사용한 차등발현 유전자군의 기능분석 (좌, 무급여 그룹 11주차와 4주차; 우, *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5 동시 급여 1주차와 4주차)

○ 반려견 유래 *L. reuteri* C1과 *L. acidophilus* C5의 제품화

- 형태학적 실험은 “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 진행하였고, Colony 형태는 각 균주를 Lactobacilli MRS agar (difco) 배지에 streaking 하여 37°C 혐기성 배양기에서 24시간 배양 후 육안으로 관찰하였고, cell 형태는 Lactobacilli MRS broth (difco) 배지에 1 colony 접종하여 37°C 정치배양기에서 12 시간 배양 후 위상차 현미경 (Phase contrast microscope)으로 촬영하여 유산균의 형태를 확인하였다(그림 26).



<그림 26> Lactobacilli MRS agar 에서의 colony 형태 (37°C, 24시간 배양)와 12 시간 배양 후 위상차 현미경 (Phase contrast microscope) 촬영 사진
A. *L. reuteri* C1; B. *L. acidophilus* C5; C. *L. reuteri* C1; D. *L. acidophilus* C5

- 당 발효 실험은 API사의 50 CHL Test kit을 이용하여 공급회사의 실험방법에 준하여 실험하였으며, 37°C 에서 12~16 시간동안 배양하면서 색 변화를 관찰하였다(표 22, 23).

<표 22> *L. reuteri* C1의 형태학적, 생화학적 특성

Morphology			Culture characteristics		
Gram staining		Positive	Growth in air		Positive
Shape		Rod	Growth anaerobically		Positive
Spore		Negative	Growth at 50°C		Negative
Motility		Negative	Growth at broth at		
Chain		short chain		pH 2.0	Negative
				pH 9.0	Negative
			Growth in 6.5 % NaCl		Negative
			Growth in broth at		
				10°C	Positive
				45°C	Positive
Sugar-fermentation					
Glycerol		Negative	Salicin		Negative
Erythritol		Negative	D-Cellobiose		Negative
D-Arabinose		Negative	D-Maltose		Positive
L-Arabinose		Positive	D-Lactose (bovine)		Positive
D-Ribose		Positive	D-Melibiose		Positive
D-Xylose		Negative	D-Saccharose(sucrose)		Positive
L-Xylose		Negative	D-Trehalose		Negative
D-Adonitol		Negative	Inulin		Negative
β-Methyl-D-Xyrose		Negative	D-Melazitose		Negative
D-Galactose		Positive	D-Raffinose		Positive
D-Glucose		Positive	Amidon (Starch)		Negative
D-Fructose		Negative	Glycogen		Negative
D-Mannose		Negative	Xylitol		Negative
L-Sorbose		Negative	Gentiobiose		Negative
L-Rhamnose		Negative	D-Turanose		Negative
Dulcitol		Negative	D-Lyxose		Negative
Inositol		Negative	D-Tagatose		Negative
D-Mannitol		Negative	D-Fucose		Negative
D-Sorbitol		Negative	L-Fucose		Negative
Methyl-α D-Mannopyranoside		Negative	D-Arabitol		Negative
Methyl-α D-Glucopyranoside		Negative	L-Arabitol		Negative
N-Acethyl-Glucosamine		Negative	Potassium Gluconate		Positive
Amygdalin		Negative	Potassium 2-Keto-Gluconate		Negative
Arbutin		Negative	Potassium 5-Keto-Gluconate		Negative
Esculin ferric citrate		Negative			

<표 23> *L. acidophilus* C5의 형태학적, 생화학적 특성

Morphology		Culture characteristics	
Gram staining	Positive	Growth in air	Positive
Shape	Rod	Growth anaerobically	Positive
Spore	Negative	Growth at 50°C	Negative
Motility	Negative	Growth at broth at	
Chain	long chain		pH 2.0 Negative
			pH 9.0 Negative
		Growth in 6.5 % NaCl	Negative
		Growth in broth at	
			10°C Positive
			45°C Positive
Sugar-fermentation			
Glycerol	Negative	Salicin	Positive
Erythritol	Negative	D-Cellobiose	Negative
D-Arabinose	Negative	D-Maltose	Positive
L-Arabinose	Negative	D-Lactose (bovine)	Positive
D-Ribose	Negative	D-Melibiose	Negative
D-Xylose	Negative	D-Saccharose(sucrose)	Positive
L-Xylose	Negative	D-Trehalose	Positive
D-Adonitol	Negative	Inulin	Negative
β-Methyl-D-Xyrose	Negative	D-Melazitose	Negative
D-Galactose	Positive	D-Raffinose	Positive
D-Glucose	Positive	Amidon (Starch)	Negative
D-Fructose	Positive	Glycogen	Negative
D-Mannose	Positive	Xylitol	Negative
L-Sorbose	Negative	Gentiobiose	Positive
L-Rhamnose	Negative	D-Turanose	Negative
Dulcitol	Negative	D-Lyxose	Negative
Inositol	Negative	D-Tagatose	Negative
D-Mannitol	Negative	D-Fucose	Negative
D-Sorbitol	Negative	L-Fucose	Negative
Methyl-α D-Mannopyranoside	Negative	D-Arabitol	Negative
Methyl-α D-Glucopyranoside	Negative	L-Arabitol	Negative
N-Acethyl-Glucosamine	Positive	Potassium Gluconate	Negative
Amygdalin	Negative	Potassium 2-Keto-Gluconate	Negative
Arbutin	Positive	Potassium 5-Keto-Gluconate	Negative
Esculin ferric citrate	Negative		

- 선발된 프로바이오틱스 균주의 배양적 특성을 조사하기 위해 Flask 와 15L jar fermenter 사용하여 배양조건을 조사 하였다(그림 27).

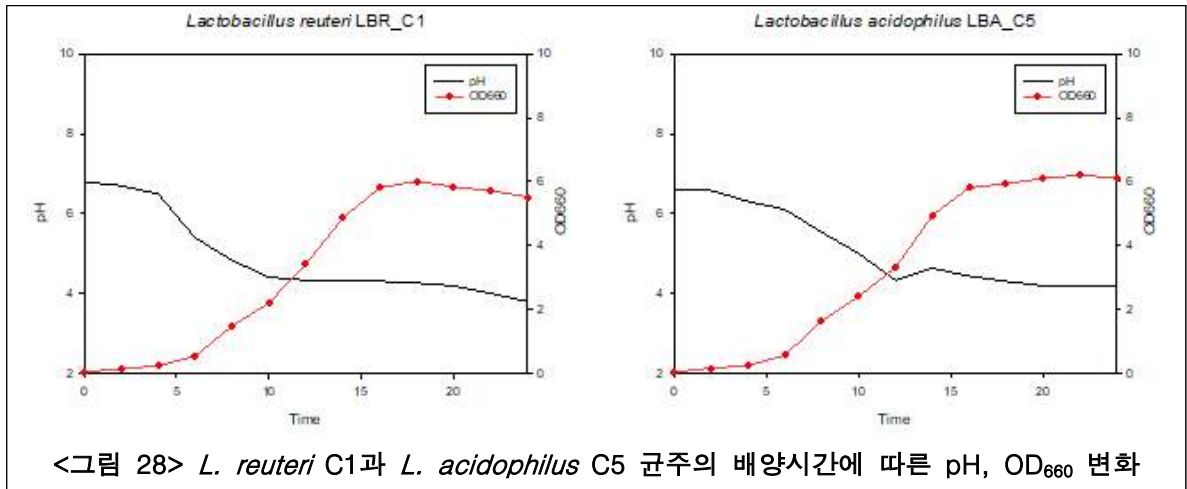


<그림 27> 15L, 30L jar fermenter

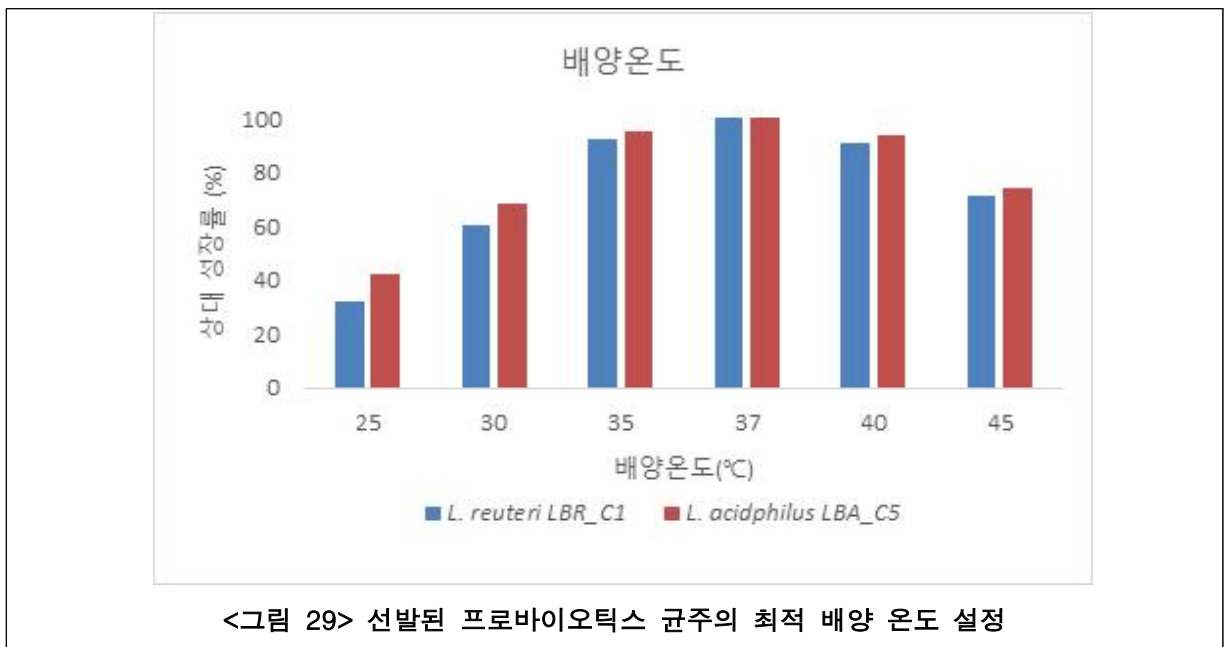
- 기본배지에서의 배양 패턴 (pH, OD 변화) 및 균주 형태 변화 조사: Lactobacilli MRS broth (Beef extract → Yeast extract 대체)를 기본배지(표 24)로 하고 30L jar fermenter 를 사용하여 배양하였다. 배양 조건(표 24)은 37℃, 100 rpm, 최소 양압, working vol. 8 L, 접종량 0.5 %, 초기 pH 7.0 (control 없음), 혐기조건으로 24 시간 동안 배양 패턴을 기록했으며, 배양 시간에 따른 pH 와 OD₆₆₀ 의 변화를 측정하기 위해 배양 2 시간 간격으로 샘플링하여 값을 측정하였다. 그 결과 *L. reuteri* C1 은 초기 pH 7.0에서 3.8 까지 떨어졌고, OD₆₆₀ 값은 최대 6.02 까지 오른 뒤 서서히 낮아졌으며, 균주는 짧은 간균 형태를 보였다. *L. acidophilus* C5 은 pH 4.2 까지 떨어졌고, OD₆₆₀ 값은 6.21 까지 오른 뒤 서서히 낮아졌으며, 긴 간균 형태를 보였다(그림 28).

<표 24> 프로바이오틱스 균주의 15 L jar fermenter 기본 배양 배지

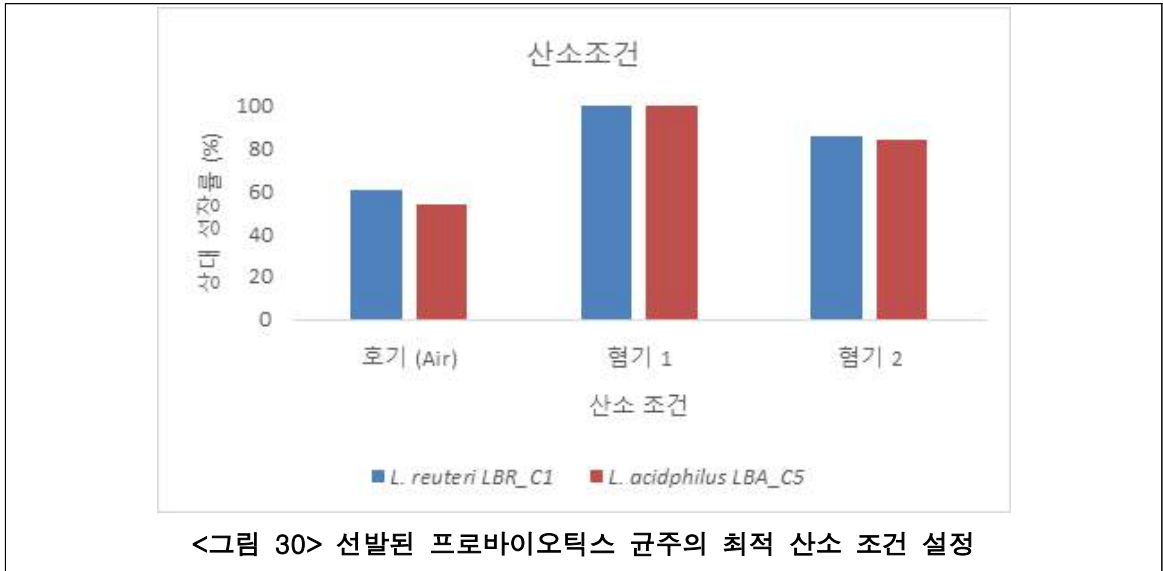
조성	함량(%)	조건	
Peptone	1.000	온도(℃)	37
Yeast extract	1.500	초기 pH	7.0
Glucose	2.000	rpm	100
Sodium acetate trihydrate	0.500	내압(bar)	0.1~0.2
Polysorbate 80	0.100	혐기	-
Dipotassium hydrogen phosphate	0.200	종균 접종량(%)	1.0
Triammonium citrate	0.200		
Magnesium sulfate heptahydrate	0.020		
Manganese sulfate tetrahydrate	0.005		
소포제	0.100		



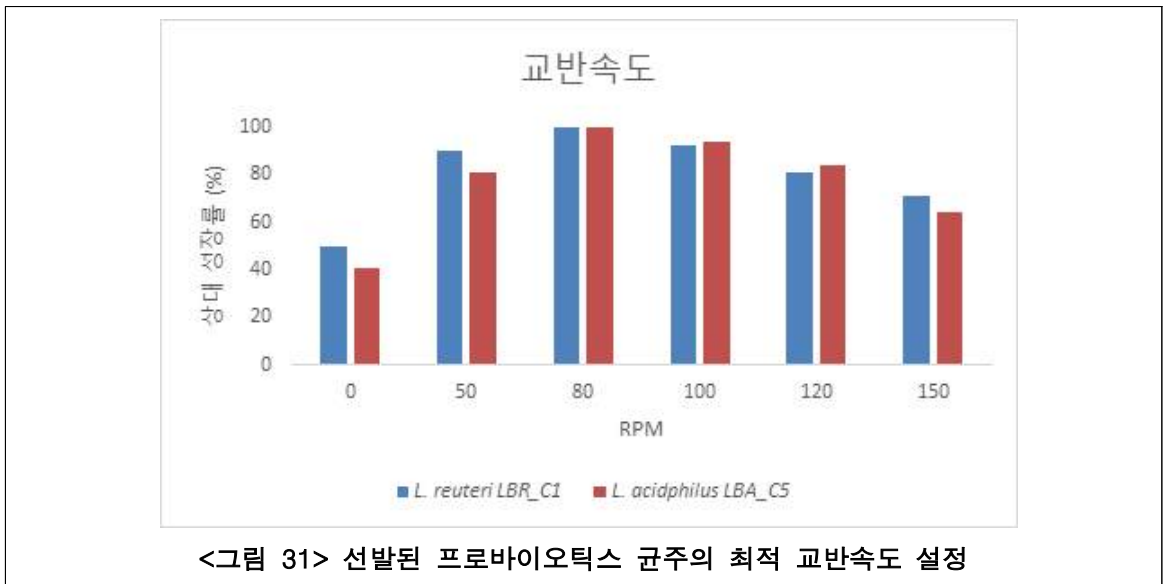
- 최적 배양온도 설정: 선발된 프로바이오틱스 2종의 배양 온도에 따른 효율 비교를 위해 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C의 온도 조건을 설정 하였고, Lactobacilli MRS broth 배지를 사용하여 100 ml bottle flask에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 4종의 균주 모두 37°C에서 수율이 높게 측정되어 최적의 배양조건을 37°C로 결정하였다(그림 29).



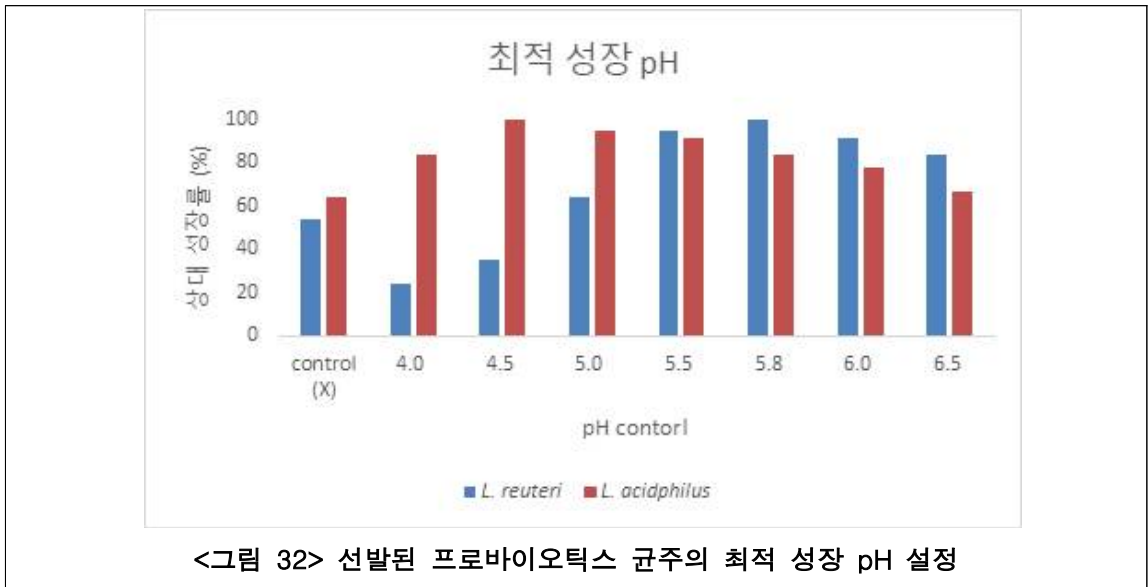
- 최적 산소 조건 설정: 산소 조건에 따른 균주의 성장효율을 관찰하기 위해 산소조건을 혐기1(CO₂ 공급), 혐기2 (air flow, vent 잠금), 호기 (air 공급, 0.1~0.2 vvm)로 설정하여 Lactobacilli MRS broth (Beef extract → Yeast extract 대체)를 기본배지로 하고 15 L jar fermenter를 사용하여 배양하였다. 배양 조건은 37°C, 100 rpm, 최소 양압, working vol. 8 L, 접종량 0.5 %, 초기 pH 7.0 (control 없음)으로 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. reuteri* C1, *L. acidophilus* C5 모두 혐기1 조건에서 빠른 활성을 보였다(그림 30).



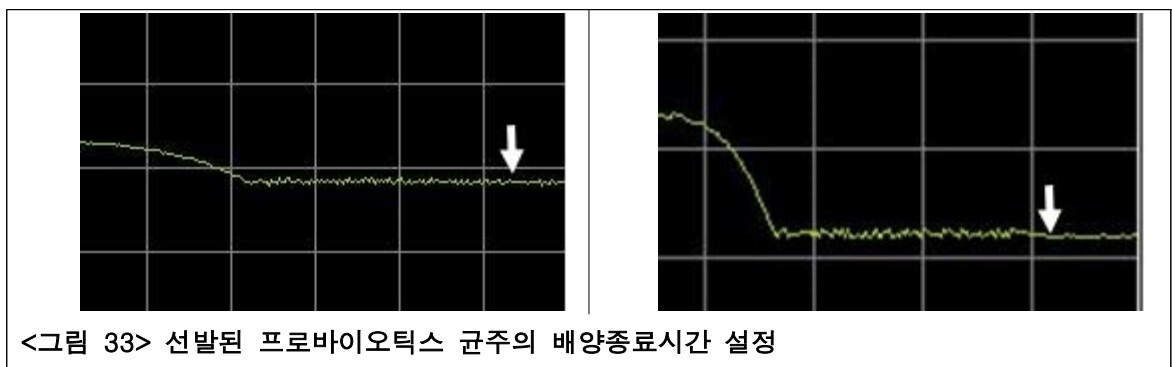
- 최적 교반속도 설정: 교반속도에 따른 균주의 성장효율을 관찰하기 위해 교반속도(rpm)를 0, 50, 80, 100, 120, 150으로 설정하였다. 배지 및 배양 조건은 산소 조건 실험과 동일하게 설정하고 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 2개의 균주 모두 80 ~ 100 rpm에서 최대 성장률을 보였고, 80 rpm 미만, 100 rpm 초과 조건에서는 비교적 낮은 수율을 보였다(그림 31).



- 최적 성장 pH 설정: 유산균은 배양시간에 따라 생성되는 Lactic acid 에 의해 pH가 낮아 지나 적정 pH를 유지시켜주는 것이 배양의 중요한 요소이다. 따라서 최적의 성장효율의 pH 선정하기 위해 20% NaOH을 이용하여 pH 4.5 ~ 6.5 (0.5 단위, pH 5.8 추가)로 설정하였고 배양 조건은 산소조건 test 와 동일하게 설정하고 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. acidophilus* C5 는 pH 4.5, *L. reuteri* C1은 pH 5.8에서 가장 높은 수율을 보였다(그림 32).

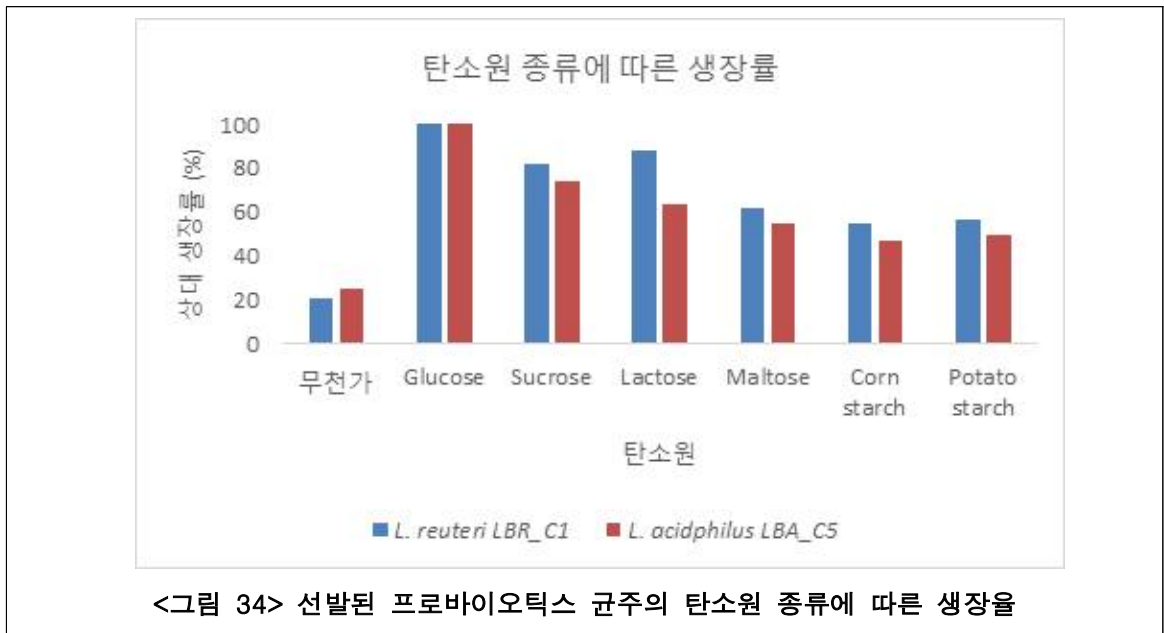


- 최적 접종량 설정: 유산균 배양에서 초기 접종량이 배양 시간 및 최종 수율에 영향을 주는 요소이다. 따라서 최적의 초기 접종량을 선정하기 위해 seed 량을 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % (1.0 % 초가 투입시 종균을 준비하기 위한 공정이 추가되므로 1.0 %를 최대량으로 설정하였다.) 세 구간으로 설정하였고, 위의 배양 실험 결과를 바탕으로 설정한 최적 배양 조건에서 24시간동안 배양하여 pH, OD₆₆₀ 값의 추이, 배양 종료 후 생균수를 측정하였다. 그 결과 네 균주 모두 1.0 %의 seed를 접종하였을 때 다른 실험구보다 빠르게 성장(짧은 시간에 pH control 구간까지 도달)하며 가장 높은 수율을 보였다. 배양 종료 시점은 pH control이 끝나는 지점에서 가장 높은 OD₆₆₀ 값과 수율을 보였고 이후 시간이 지날수록 OD₆₆₀ 값과 수율이 감소하는 것을 확인하였다(그림 33).

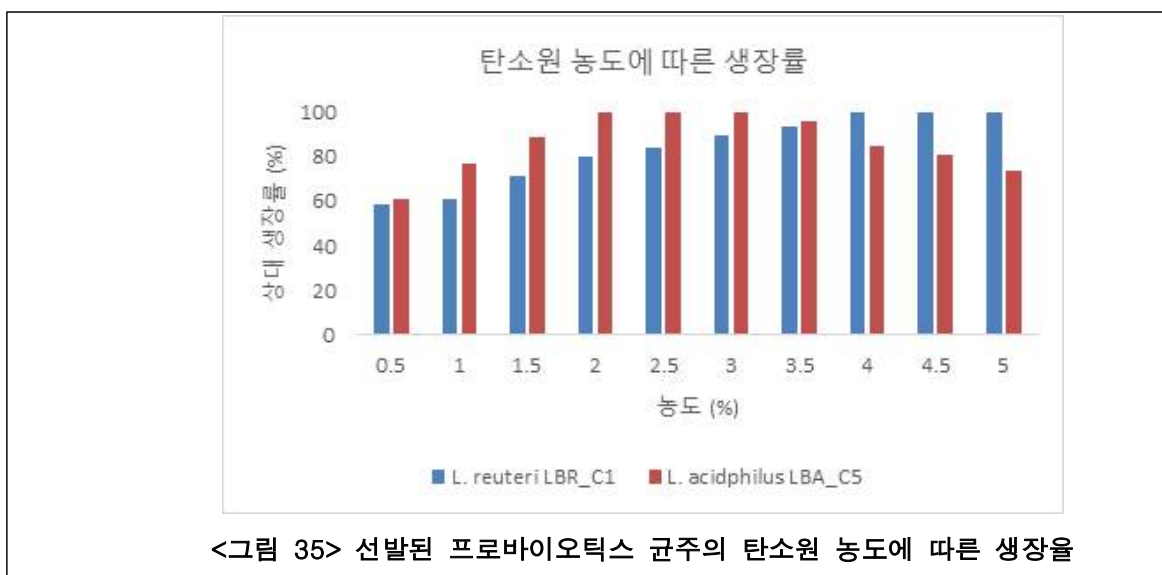


- 산업배지용 배양 배지를 탐색하기 위해 최적 탄소원, 질소원, 무기염류 조사: 미생물을 배양하기 위해서는 배양체가 필요로 하는 영양물질을 공급해야 하며, 그 중 탄소원 및 질소원은 미생물의 배양에 필수적으로 작용한다. 탄소원은 대부분의 에너지원으로 사용되어 균체의 성장에 영향을 미치고, 질소원은 미생물 증식에 요구되는 단백질 구성성분으로 사용이 미생물 배양에서 가장 주요한 역할을 담당하고 있다. 따라서, 최적 성장조건에 맞는 탄소원과 질소원 선정을 위해 media bottle, 15 L jar fermenter를 이용하여 실험을 실시하였다.

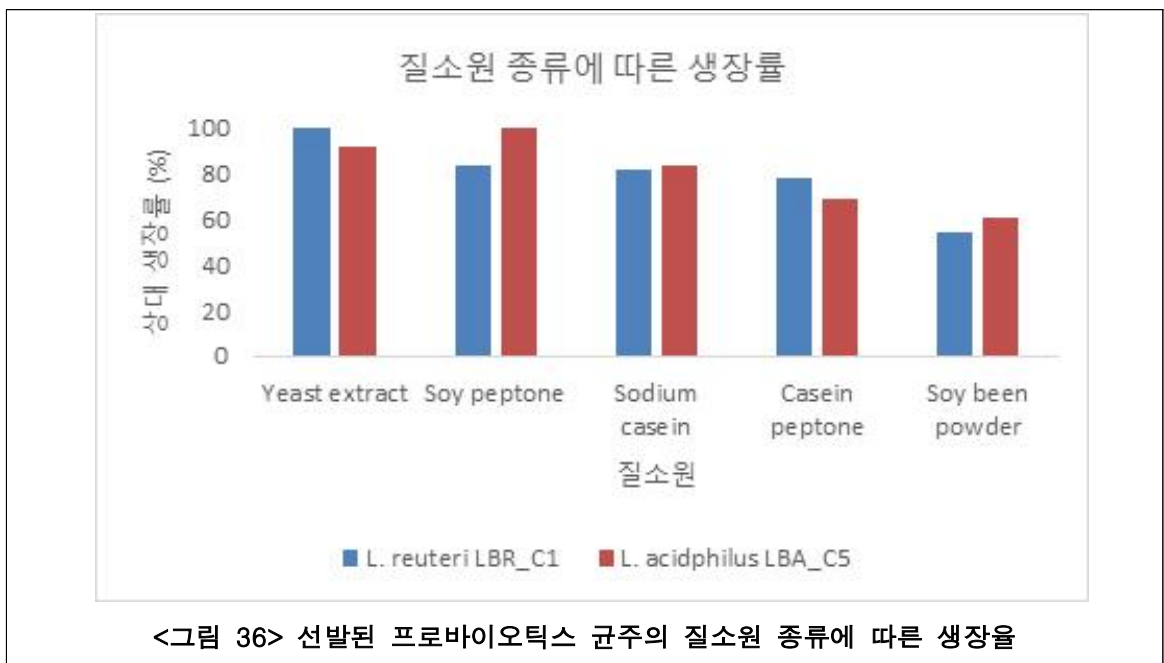
- 기본배지(표 24)에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고, 탄소원만 변화를 주어 탄소원 종류별 영향을 조사하였다. 탄소원은 자사에서 사용하고 있는 원료로 glucose, sucrose, lactose, maltose corn starch, potato starch 6종의 탄소원을 사용하였다. 투입량은 기본배지의 탄소원량과 동일하게 2.0 %를 첨가하였으며, 100 ml media bottle 에 배지를 제조 후 균주 1.0% 접종, 37°C 혐기성배양기에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 4개의 균주 모두 glucose를 첨가 시 가장 높은 수율을 보여 탄소원으로 glucose를 선정하였다(그림 34).



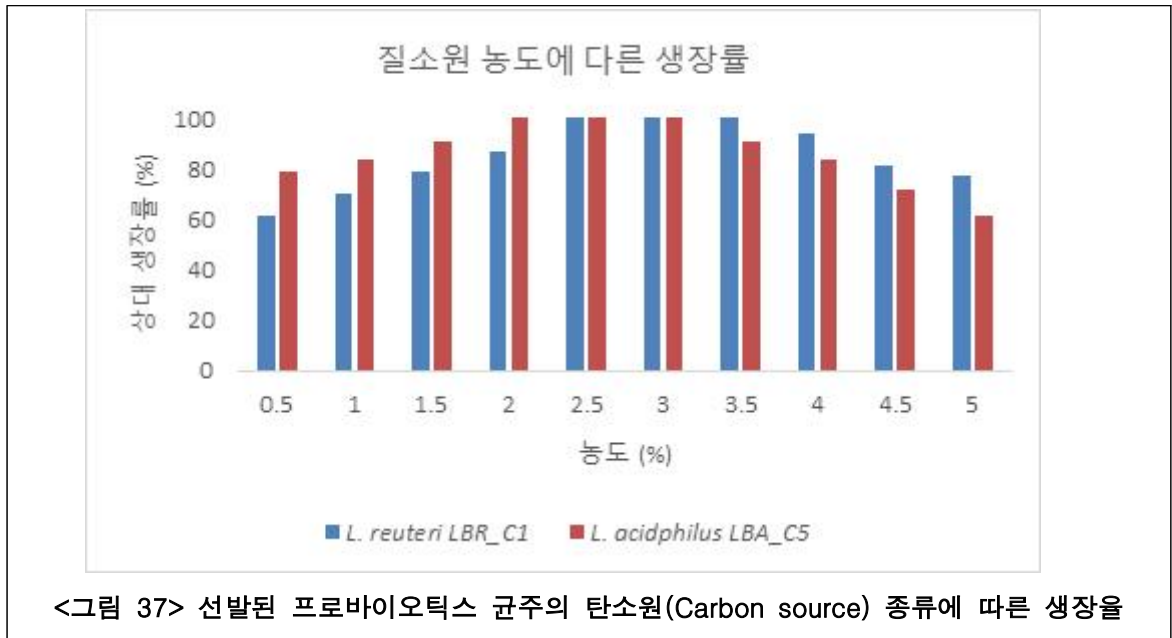
- 기본배지(표 24)에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고, 선정된 탄소원(glucose)의 농도 (0.5~5.0 %)변화를 주어 100 ml media bottle 에 배지를 제조하여 균주 1.0% 접종 후 37°C 혐기성배양기에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. reuteri* C1 은 4.0~5.0 %, *L. acidophilus* C5 는 2.0~3.0%가장 높은 수율을 보였다(그림 35).



- 기본배지(표 24)에서 나머지 영양분은 변화를 주지 않고 질소원만 변화를 주어 질소원 종류별 영향을 조사하였다. 질소원은 자사에서 보유하고 있는 원료로 yeast extract, soy peptone, sodium casein, tryptone, soy been meal 5종의 질소원을 사용하였다. 투입량은 기본배지의 질소원량과 동일하게 2.5%를 첨가하였으며, 100 ml media bottle 에 배지를 제조하여 균주 1.0% 접종 후 37℃ 혐기성배양기에서 24 시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. reuteri* C1은 yeast extract 첨가 시 가장 높은 수율을 보였고, *L. acidophilus* C5는 soy peptone 첨가 시 가장 높은 수율을 보여, 최적 질소원으로 선정하였다(그림 36).



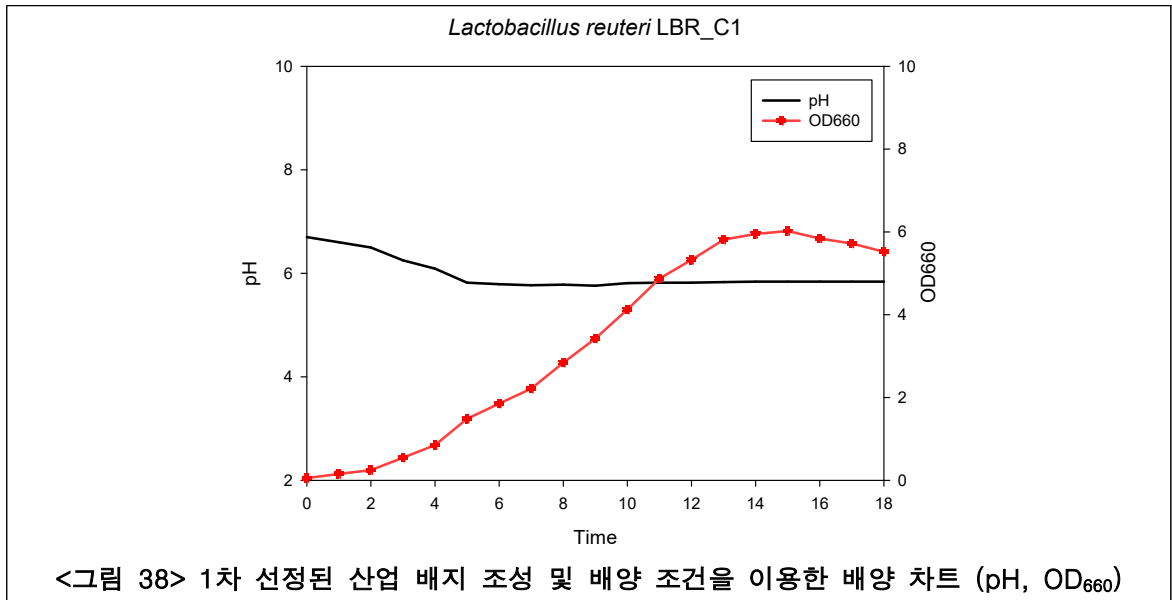
- 기본배지(표 24)에서 나머지 영양분은 변화를 주지 않고, 선정된 질소원의 농도(0.5~5.0 %) 변화를 주어 100 ml media bottle 에 배지를 제조하여 균주 1.0% 접종 후 37℃ 혐기성배양기에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. reuteri* C1은 yeast extract 2.5~3.5% 가장 높은 수율을 보였으며 4.0%, 4.5% 이상에서는 수율이 낮아지는 것을 확인하였다. 그리고 *L. acidophilus* C5는 soy peptone 2.0~3.0%에서 가장 높은 수율을 보였으며, 3.5%, 4.0% 이상에서는 수율이 낮아지는 것을 확인하였다(그림 37).



- 위 실험을 바탕으로 *L. reuteri* C1 의 최적 질소원은 yeast extract 2.5%, *L. acidophilus* C5 의 최적 질소원은 soy peptone 2.0%로 확정하였다.
- 선정된 산업배지 조성 및 배양 조건을 이용한 배양 수율 확인 실험을 수행하였다.
- *L. reuteri* C1 배양 실험: 1차 선정된 산업 배지 조성 및 배양 조건으로 30 L jar fermenter 를 이용하여 배양 실험을 진행하였다(표 25). 3회 반복 실험을 진행 하였고, 그 결과 1.8×10^9 , 2.1×10^9 , 2.5×10^9 cfu/ml (평균 2.1×10^9 cfu/ml) 수율을 확보하였다(그림 38).

<표 25> *L. reuteri* LBR_C1 의 산업배양배지 조성 및 배양 조건

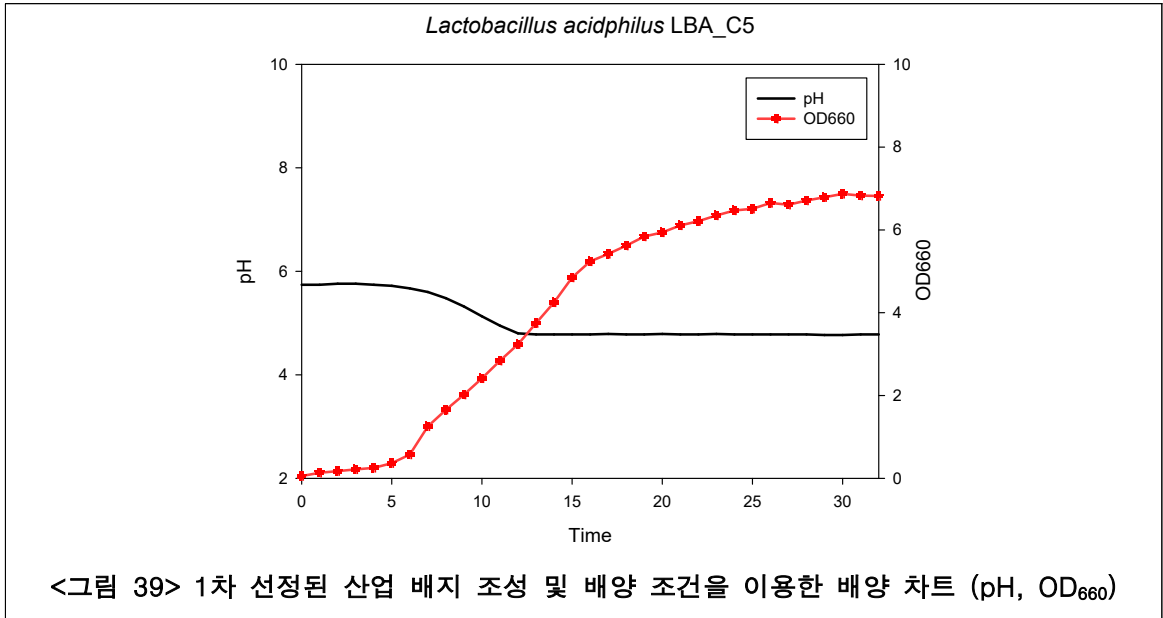
조성	함량(%)	조건	
Glucose	4.000	온도(°C)	37
Yeast extract	2.000	초기 pH 및 control	6.8 (5.8 pH control)
Magnesium sulfate 7H2O	0.100	rpm	80
Manganese sulfate 7H2O	0.040	내압(bar)	0.2
L-cysteine-HCl	0.010	혐기(gas)	CO ₂
Calcium chloride	0.100	종균 접종량(%)	1.0
Sodium phosphate, di	0.600		
Calcium carbonate	0.100		
소포제	0.100		



- *L. acidophilus* C5 배양 실험: 1차 선정된 산업 배지 조성 및 배양 조건으로 30L jar fermenter를 이용하여 배양 실험을 진행하였다(표 26). 3회 반복 실험을 진행 하였고, 그 결과 4.7×10^8 , 4.5×10^8 , 4.1×10^8 cfu/ml (평균 4.4×10^8 cfu/ml) 수율을 확보하였다 (그림 39).

<표 26> *L. acidophilus* C5 의 산업배양배지 조성 및 배양 조건

조성	함량(%)	조건	
Glucose	2.000	온도(°C)	37
Soy pepton	2.000	초기 pH 및 control	- (4.5 pH control)
Potassium phosphate, di	0.350	rpm	80
Ammonium citrate	0.200	내압(bar)	0.2
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.020	혐기(gas)	CO ₂
Sodium acetate	0.500	총균 접종량 (%)	1.0
Calcium chloride	0.100	/	
L-cysteine-HCl	0.150		
Tween 80	0.100		
소포제	0.100		



- 동결건조는 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법으로 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등의 장점을 가지고 있으며 동결건조 시 세포의 손상을 보호하기 위하여 동결보존제 (cryoprotectant agents)를 사용하는데, 이는 미생물의 종류에 따라 그리고 보존제의 성분에 따른 서로 다른 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 동결건조 과정 중에서의 생존과 동결건조 후 장기간 보존을 위해서는 그 미생물의 종류 및 특성에 맞는 적절한 동결보존제의 사용이 필요함. 따라서 동결건조 시 사용되는 탈지분유, 트레할로스, 덱스트린, glycerol 등을 이용하여 조성을 설정 뒤 실험을 실시하였다.
- 1차 선정된 산업배양배지 및 배양 조건으로 *L. reuteri* C1, *L. acidophilus* C5 의 원제 시생산을 진행하였고, 30L jar fermenter를 사용하여 배양하였으며, 대용량 원심분리기를 사용하여 농축 후 보존제를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음 -80℃에서 완전히 동결한 후 동결건조기를 사용하여 5 일간 동결건조 하였다(그림 40).
- 동결건조 미생물시료의 안정성을 알아보기 위하여 수율을 확인하였다. 그 결과 *L. reuteri* C1 는 1.0×10^{10} cfu/g, *L. acidophilus* C5 는 5.0×10^7 cfu/g 균수를 확보하였다.



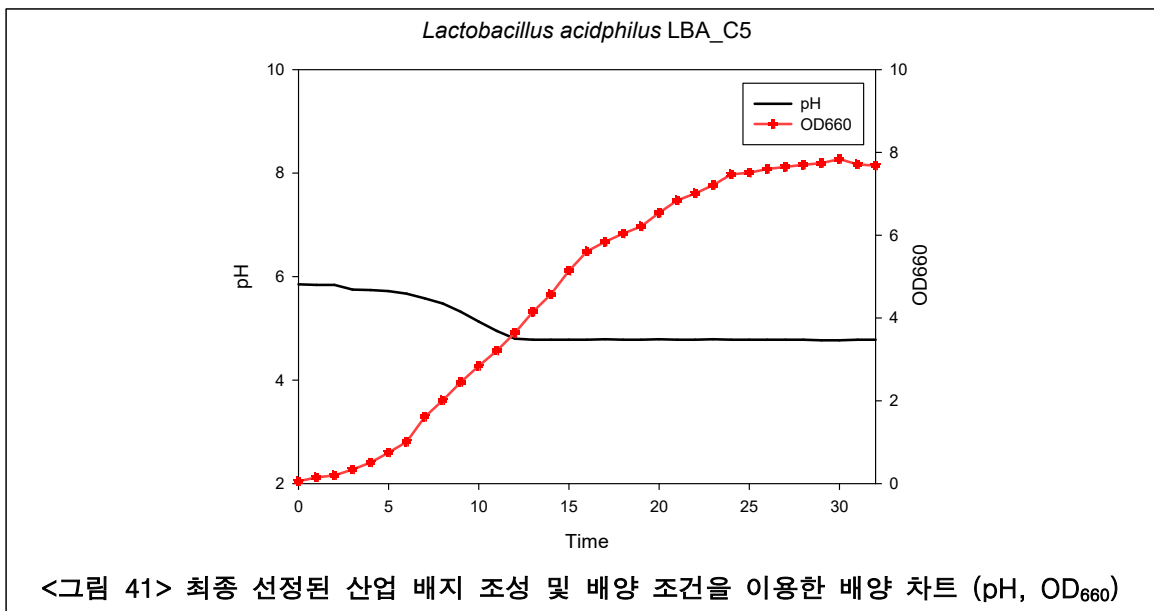
- *L. acidophilus* C5 배양 수율 개선: 1차로 선정된 배양 배지 조성으로 4.4×10^8

cfu/ml 수율을 확보하였다. 하지만 제조원가 절감 및 고농도의 제품 스펙을 위한 추가 수율 확보가 필요, 배지 조성 개선을 통한 수율 향상 실험을 진행하였다. 질소원 변경에 앞서 탄소원 변경 실험을 하였지만, glucose, lactose, glycerol 등 탄소원을 추가로 투입해도 수율 차이를 보이지 않아 질소원 변경 실험을 진행하였다.

- *L. acidophilus* C5 배지조성(질소원) 변경 실험: 기존에 사용하는 Soy pepton 2.0%를 Soy pepton 1.0%, Yeast extract 1.0% 로 변경(표 27)하여 진행하였으며, 배양 중 1시간 단위로 샘플링을 진행하여 pH 와 OD₆₆₀ 값을 확인하였다(그림 41). 그 결과 9.6×10^8 cfu/ml (기존 4.4×10^8 cfu/ml) 로 수율 향상을 확인하였다. 또한 2회 추가 반복 실험을 통해 안정적인 수율 (2회 ; 7.0×10^8 , 3회 : 1.2×10^9 cfu/ml) 확인하였다.

<표 27> *L. acidophilus* C5 최종 선정 산업배양배지 조성 및 배양 조건

조성	함량(%)	조건	
Glucose	2.000	온도(℃)	37
Soy pepton	1.000	초기 pH 및 control	- (4.5 pH control)
Yeast extract	1.000	rpm	
Potassium phosphate, di	0.305	내압(bar)	0.2
Ammonium citrate	0.200	혐기(gas)	CO ₂
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.002	종균 접종량 (%)	1.0
Sodium acetate	0.500		
Calcium chloride	0.100		
L-cysteine-HCl	0.150		
Tween 80	0.100		
소포제	0.100		



- 대량생산공정을 확립하기 위해 스케일업 적용 시험을 수행하였다. 15 L, 30 L jar fermenter 조건을 바탕으로 100 L, 2 ton, 20 ton fermenter의 배양조건 scale-up 적용 시험을 진행 하였다. 동일한 배지 조성과 배양 조건 (배양 rpm은 배양 scale에 따라 변경)

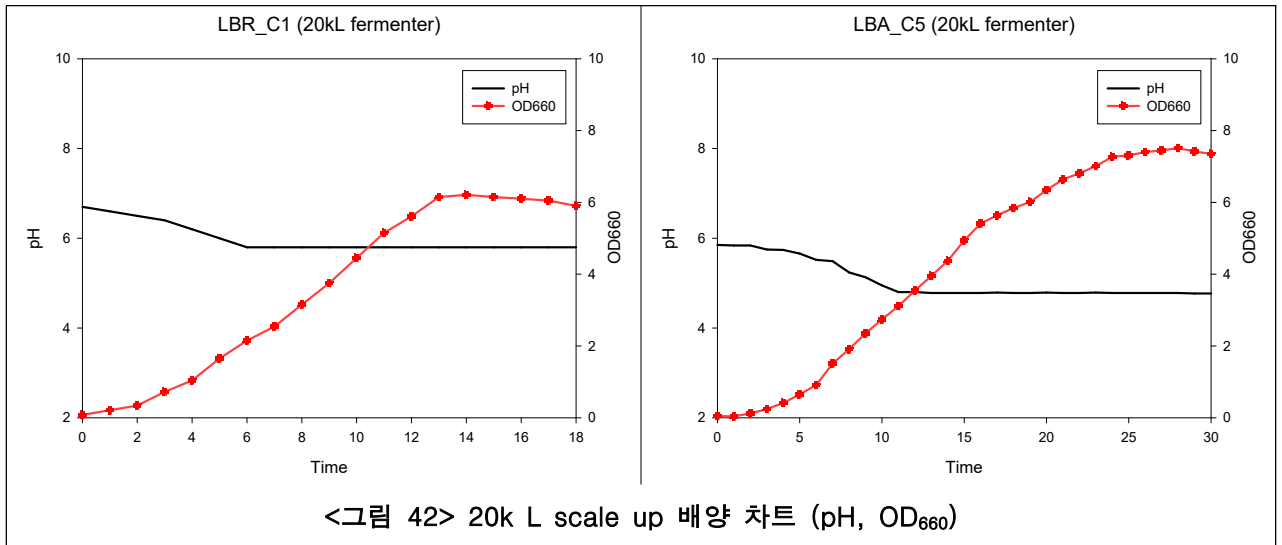
에서 배양하였으며, 각 scale 별 3회 반복 실험을 통해 안정적인 수율 확보 여부를 판단하였다. 그 결과 *L. reuteri* LBR_C1 100L : 4.8×10^9 cfu/ml, 2ton : 5.0×10^9 cfu/ml, 20ton : 4.9×10^9 cfu/ml, *L. acidophilus* LBA_C5 100L : 9.7×10^8 cfu/ml, 2ton : 9.6×10^8 cfu/ml, 20ton : 9.5×10^8 cfu/ml 의 수율을 확인하였으며, 위의 결과를 바탕으로 생산 20 ton에서의 배지 및 배양조건을 확립하였다(표 28, 29, 그림 42).

<표 28> *L. reuteri* LBR_C1 생산 scale 배양 배지 및 조건

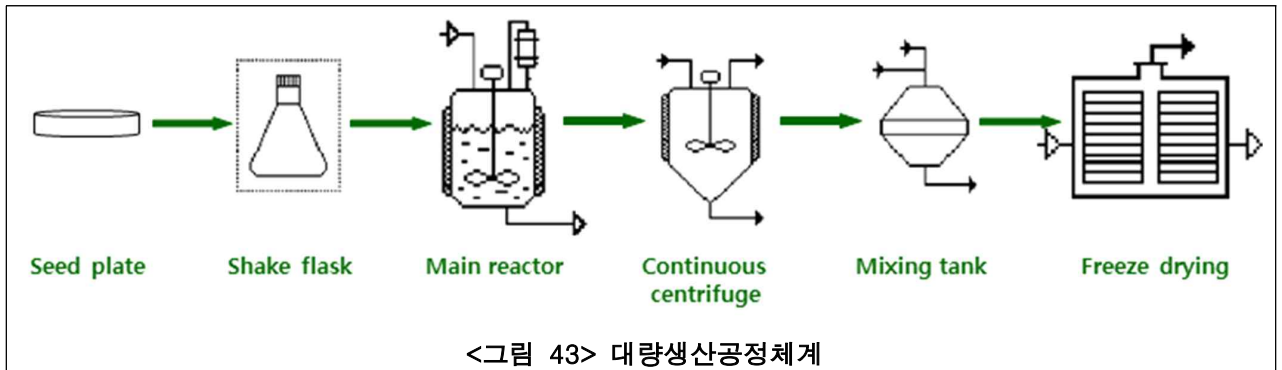
조성	함량(%)	조건	
Glucose	4.000	Fermenter	20ton
Yeast extract	2.000	working volume	15ton
Magnesium sulfate 7H2O	0.100	온도(°C)	37
Manganese sulfate 7H2O	0.040	초기 pH 및 control	6.8 (5.8 pH control)
L-cysteine-HCl	0.010	rpm	80
Calcium chloride	0.100	내압(bar)	최소 양압
Sodium phosphate, di	0.600	혐기(gas)	CO ₂
Calcium carbonate	0.100	종균 접종량(%)	1.0
소포제	0.100		

<표 29> *L. acidophilus* LBA_C5 생산 scale 배양 배지 및 조건

조성	함량(%)	조건	
Glucose	2.000	Fermenter	20ton
Soy pepton	1.000	working volume	15ton
Yeast extract	1.000	온도(°C)	37
Potassium phosphate, di	0.350	초기 pH 및 control	6.8 (5.8 pH control)
Ammonium citrate	0.200	rpm	80
Magnesium sulfate 7H2O	0.020	내압(bar)	최소 양압
Sodium acetate	0.500	혐기(gas)	CO ₂
Calcium chloride	0.100	종균 접종량(%)	1.0
L-cysteine-HCl	0.150		
Tween 80	0.100		
소포제	0.100		



- 최종 생산수율 검토를 위해 완료된 대량배양공정체계에 따라 원제 시생산을 진행하였다(그림 43).



- 그 결과 *L. reuteri* C1 2.4×10^{10} cfu/g, *L. acidphilus* C5 4.2×10^9 cfu/g 수율을 확인하였다.
- 완제품 부형제 및 향료 선정은 주로 간식에 사용되는 향료 종류 중 치즈향, 소고기향, 닭고기향으로 샘플을 제작하였다(네츄럴바이오(주)). 샘플 제작 후 사람 기준의 관능적 및 애견센터의 반려견을 대상으로 간이 선호도 시험을 통하여 치즈향으로 선정했다(표 30).

<표 30> 원제 제형화 부형제 조성표

성분명	조성(%)
유산균 원료	10.0
포도당	11.0
밀크맛분말	10.0
D-sorbitol	15.0
자이리톨	21.5
치즈향 분말	1.0
기타	34.5
합계	100

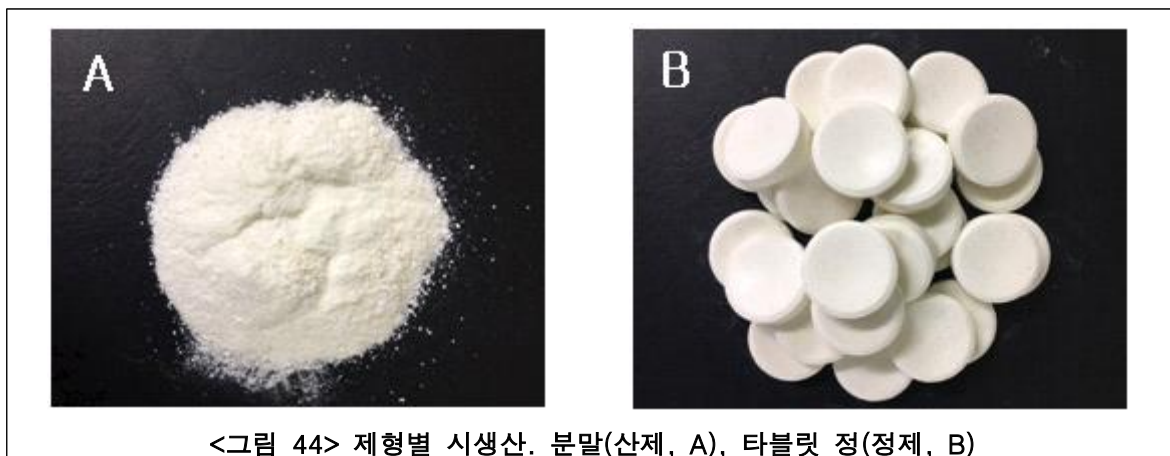
- 현재 시장에 유통되는 제품들은 *L.reuteri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L.*

acidophilus 등 다양한 유산균을 함유하고 있으며 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^9$ cfu/g 까지 포함된 제품이 유통되고 있다. 이들 제품의 제형은 타블렛 정 (정제)와 분말, 과립 (산제)가 주를 이루며 일부 액제도 판매되고 있다(표 31).

<표 31> 현재 유통되고 있는 제품의 함량 및 제형(반려견 유산균제)

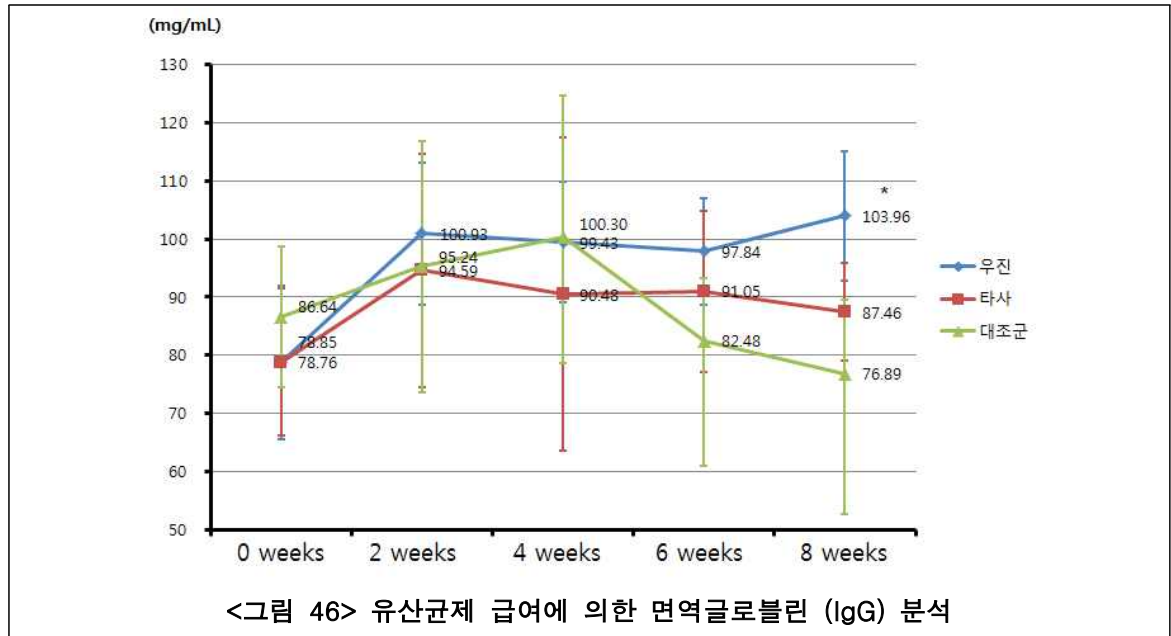
회사	주 성분	함량	제형
A	락토바실러스 루테리	1×10^5 cfu/g	타블렛
	락토바실러스 프란타럼	1×10^5 cfu/g	
B	생균 건조분말	33.3mg	분말
	난황건조분말	966.7mg	
C	비피도박테리움 비피둠	5×10^7 cfu/g	타블렛
	락토바실러스 에시도필러스	5×10^7 cfu/g	
	엔테로코커스 페시움	5×10^7 cfu/g	
D	락토바실러스 퍼멘텀	5×10^7 cfu/g	분말
	효모	첨가	
	바실러스 서브틸리스	첨가	

- 선정된 부형제와 향료를 바탕으로 분말 (입제)와 츄어블 정 (정제) 시제품을 생산하였다. 분말은 유산균 원제와 부형제, 향료를 섞어 생산하였으며, 타블렛 제형은 균수 손실이 작고 파손 부분에 있어서 안정적인 압력 200KN, 중량 1.5g 조건으로 선택하여 시생산을 완료하였다(그림 44).

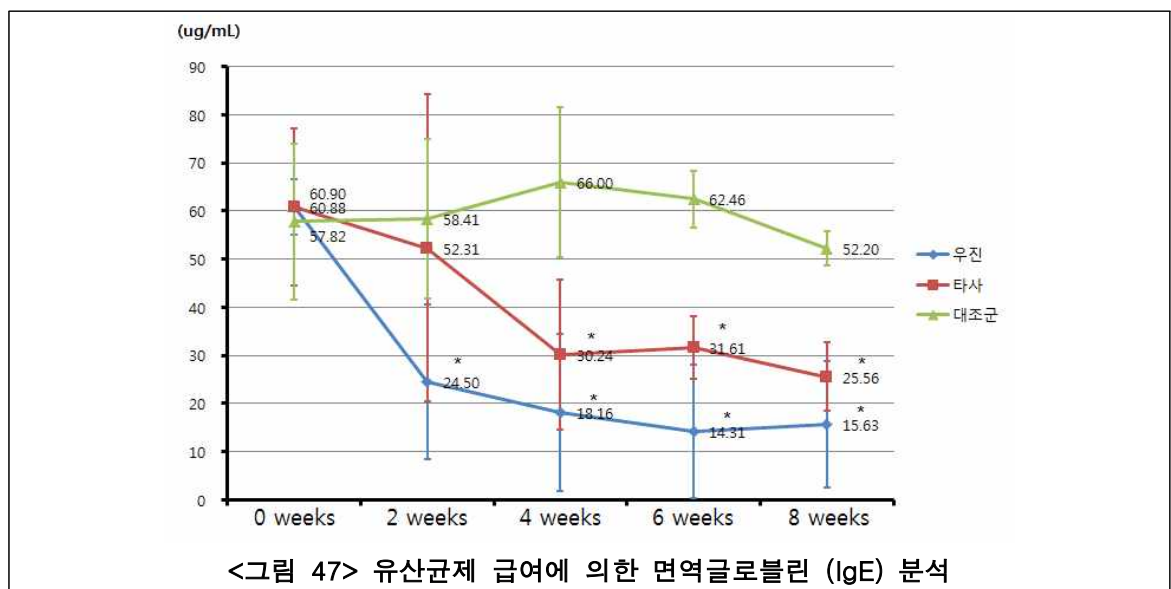


- 완제품 안전성 시험, 임상 실험 등을 위하여 화성시청에 보조사료 제품 등록하였다. 제품명은 '멍멍정장'이며, 보증성분 1.0×10^7 cfu/g 이상으로 등록하였다(그림 45).
- 완제품의 안전성 확인을 위해 (주)한국생물안전성연구소에서 독성시험을 수행하였다. 독성 시험은 GLP 규정으로 진행 하였으며, 토끼에 대한 피부자극성시험, 랫트에 대한 급성경구 독성시험을 진행하였다. 그 결과 본 제품은 두 항목에 대한 안전성을 확인하였다(그림 45).

유산균 급여에 의한 혈중 IgG 농도의 변화는 6주차 까지 관찰되지 않다가 8주차 시료에서는 ‘멍멍정장’을 급여한 개체에서 유의적으로 IgG 양이 증가했다(그림 46). 이는 유산균제 급여에 의해 반려견의 면역증강 효과가 있을 것으로 사료된다.

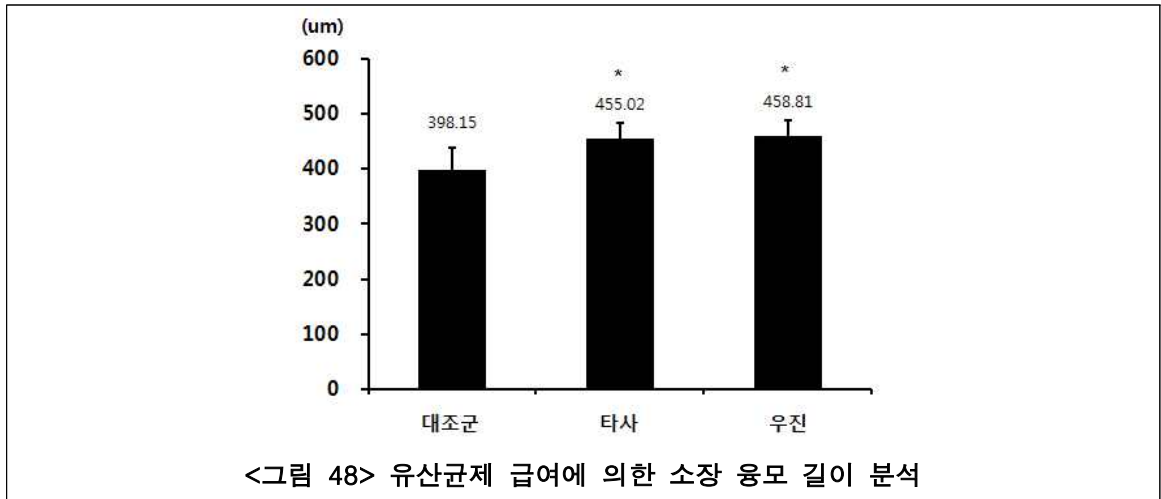


- 알려지 반응을 나타내는 IgE 농도 분석 결과 유산균제(우진, 타사) 급여에 의한 혈중 IgE 농도가 4주차부터 대조군에 대비해 유의적으로 감소했다. 이는 유산균제 급여에 의해 반려견의 피부질환 등의 감소 효과가 있을 것으로 사료된다(그림 47).
- ‘멍멍정장’ 급여 시 타사 유산균제를 급여 하였을 때 보다 혈중 IgE 농도가 감소하였으나 통계적 유의는 없었다(그림 47).

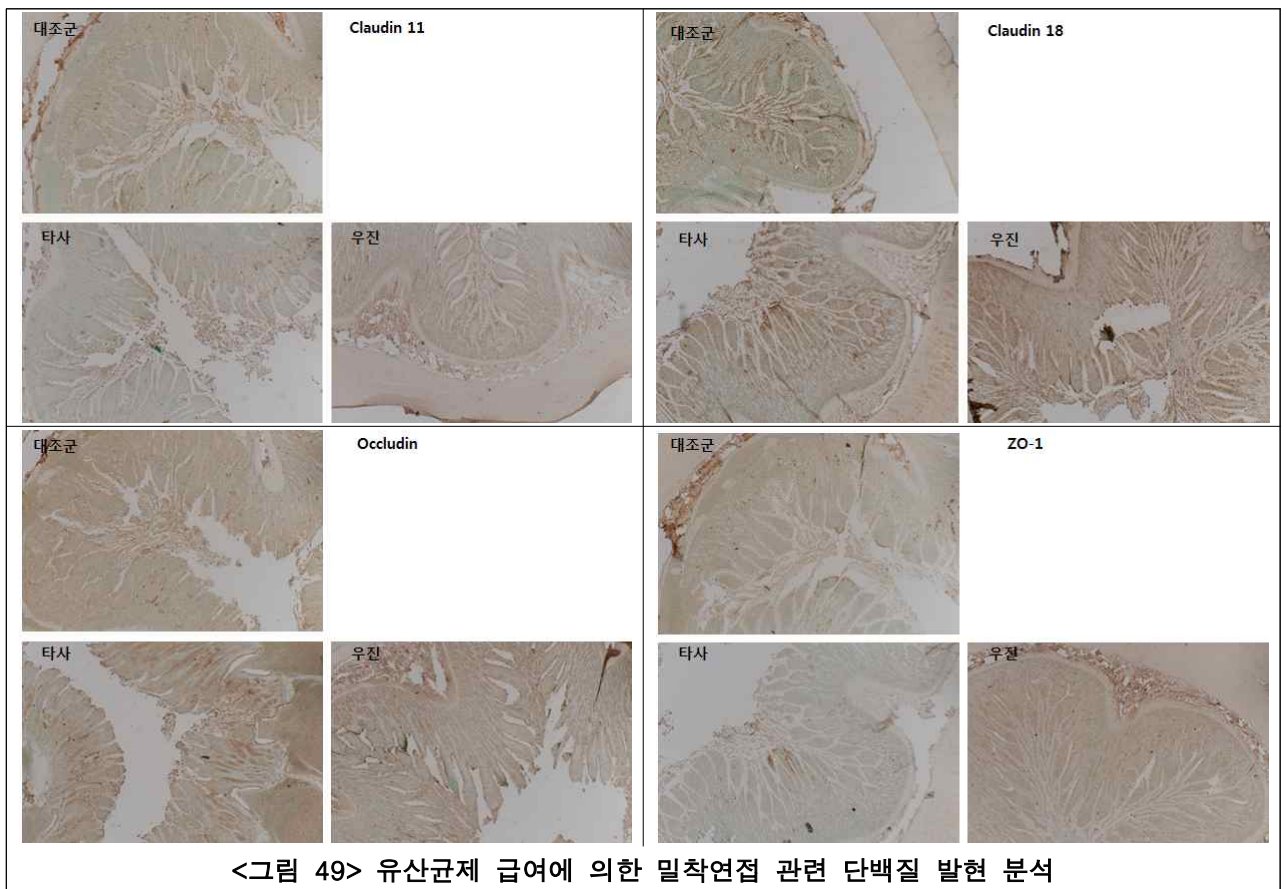


- 대조군, 타사 유산균제, ‘멍멍정장’ 급여에 의한 소장 상피 조직에서의 용모 길이를 분석

한 결과 유산균제 급이(타사, '멍멍정장')시 소장 용모의 길이가 상승 하는 결과를 보였다. 소장용모 길이의 증가는 소장 상피층의 표면적을 넓혀주어 소화율을 증가시킬 수 있을 것 이라 추정된다(그림 48).

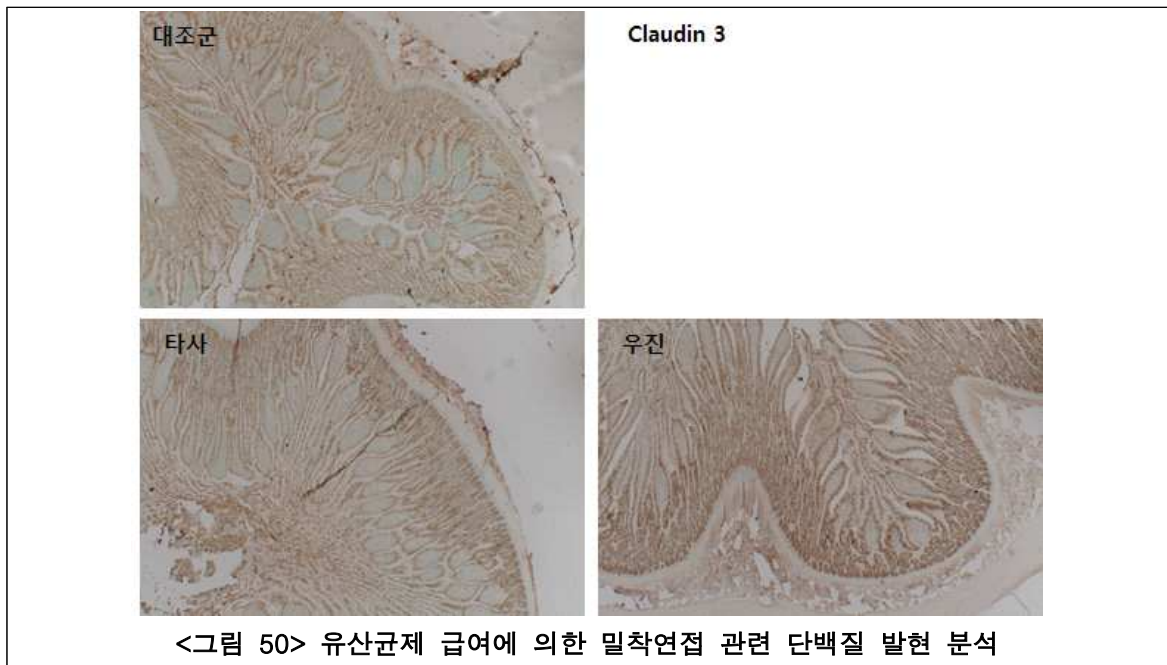


- 대조군 타사 유산균제 급여군, '멍멍정장'을 정량 급이하고 8주차에 소장 조직을 채취한 후 밀착연접과 관련된 단백질 발현을 분석한 결과, Claudin 11, 18, Occludin, ZO-1 단백질은 개 소장 상피 조직에서의 발현이 관찰되었으나, 각 군 간의 차이를 보이지 않았다(그림 49).

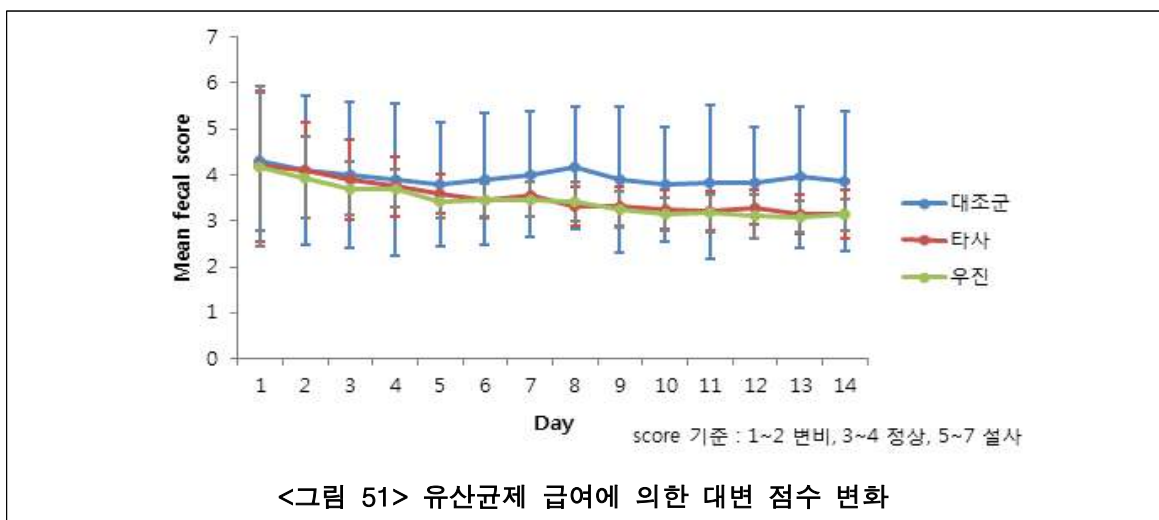


- Claudin 3 단백질은 개 소장 상피 조직에서 발현이 관찰되었으며 '멍멍정장' 급여시

claudin 3 발현량이 증가했음을 관찰하였다(염색 색깔이 진해짐). 밀착연접 단백질 발현의 증가는 장 상피층의 건강이 좋다는 것을 의미하기에 개발된 유산균이 장 상피층의 건강을 개선시키는 것으로 보인다(그림 50).



- 대조군, 타사 유산균제 급여군, '멍멍정장'을 정량 급이 하고 매일 분변을 채취한 후 육안으로 분변점수(fecal score) 평가를 실시하였다. 분변점수 평균결과 개체별로 점수 차이가 있으나 평균적인 수치는 아래 그림과 같다. 대조군의 평균 수치는 양호하나 개체간의 편차가 심했으나, 유산균제(타사, '멍멍정장') 급여 개시 후 3~4 일경부터 분변의 상태가 좋아졌다는 관찰자 의견이 있었고, 유산균제(우진비앤지_멍멍정장) 급여 시 시험급여 2 주(14 일) 후 거의 모든 개체가 정상 분변으로 확인됐다(그림 51).



- 멍멍정장 츄어블 정(정제)는 타정 후 PTP 포장, 분말(산제)는 스틱 포장으로 선정하였으며, 보증함량은 두 제형 모두 10^7 이상으로 제품등록 완료했다(그림 52).



<그림 52> 멍멍정장(좌,정제; 우, 산제)

- 제품 홍보 및 마케팅을 위해 제품 ‘멍멍정장’의 특징(반려견 유래 프로바이오틱스 균주를 최초로 활용한 반려견 전용 정장제)과 주요 특성(뛰어난 내담즙성, 내산성, 장내 정착능), GLP 기준 안전성 시험, 면역력 증가, 변 냄새 감소 등의 사양시험 결과를 바탕으로 홍보자로(팸플릿)를 제작 했다(그림 53).

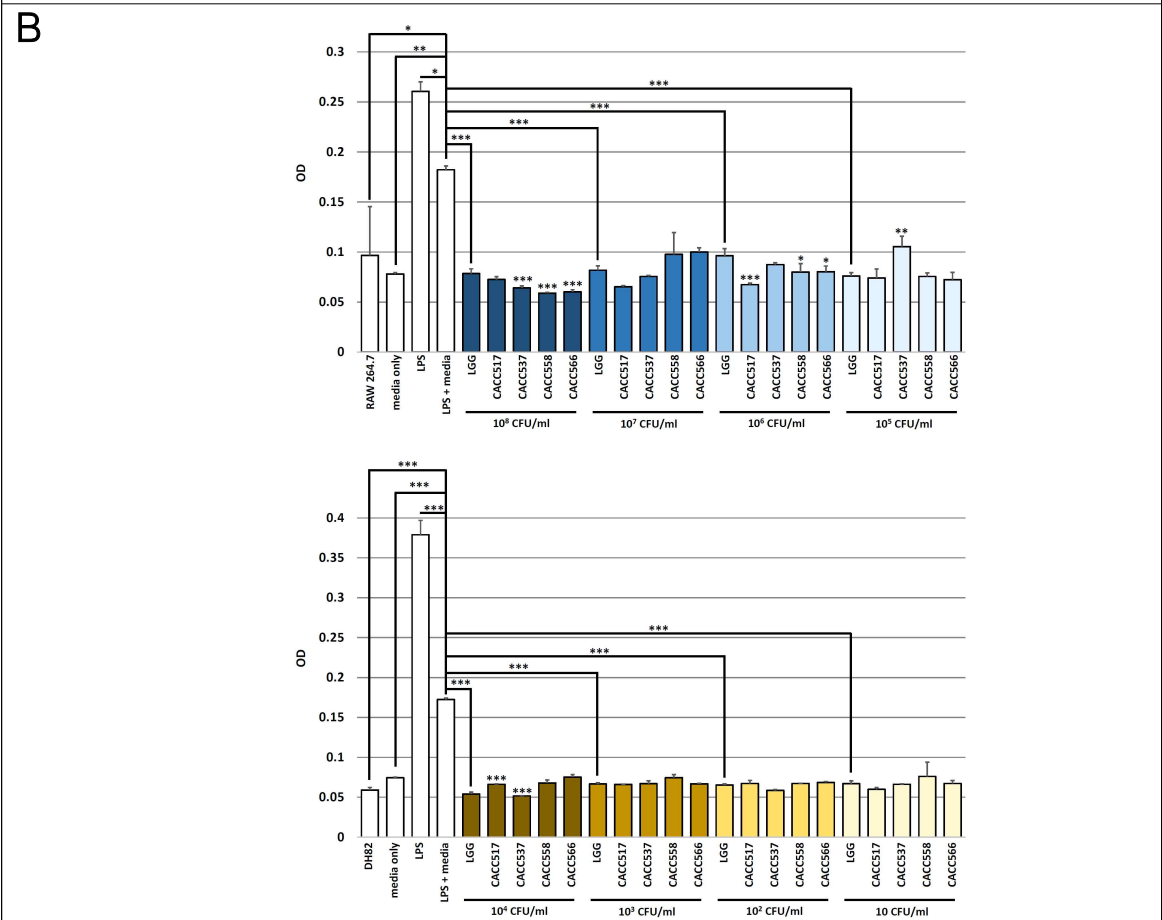
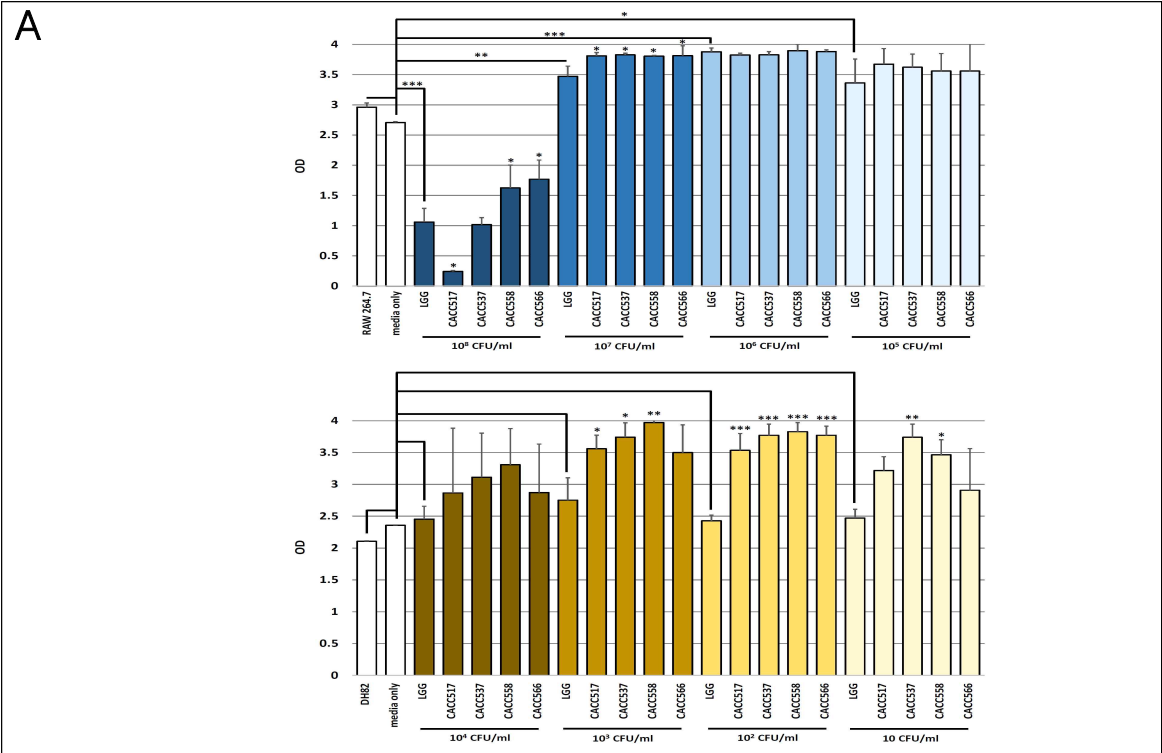


<그림 53> ‘멍멍정장’제품 홍보 마케팅 팸플릿

- 2차년도에 개발 완료한 ‘멍멍정장’ 제품 홍보를 위해 런칭 세미나, 반려동물 박람회 홍보 등을 계획하고 있었지만, COVID-19 감염증의 확산으로 인한 사회적 거리두기로 국외는 물론 국내 학회, 박람회 일정이 취소되었다. 그러나 지속적인 제품 홍보를 위해 총판(제일사료, 더키코, 아지냥이, 굽네몰, 폴리파크)와 반려동물 전문 인력 교육기관 등의 방문을 통해 제품 홍보를 진행 중이다.

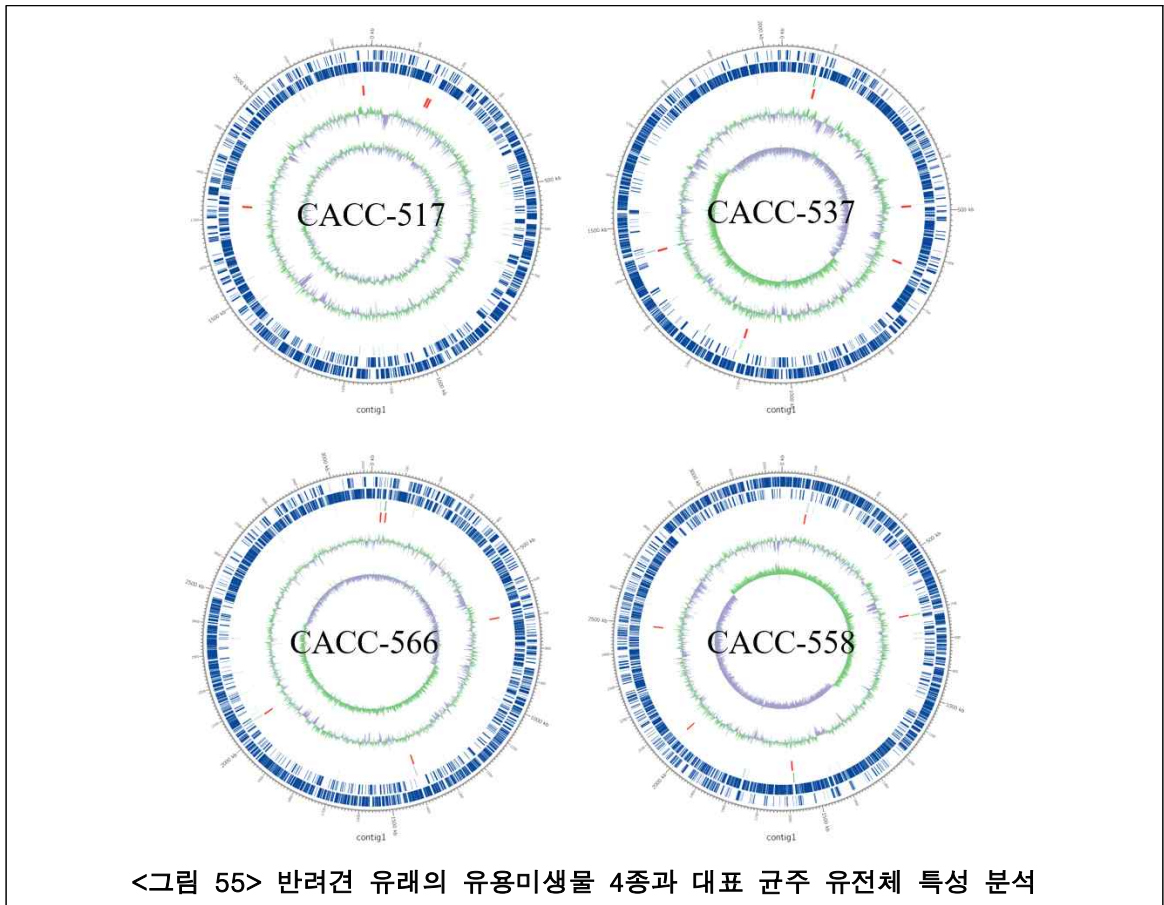
○ 반려견 유래 *Bifidobacterium longum* CACC517, *Pediococcus acidilactici* CACC537, *L. plantarum* subsp. *plantarum* CACC558 및 *L. paracasei* subsp. *tolerans* CACC566의 심화 연구

- 반려견 유래 유용미생물의 세포 활성 평가는 KCTC에서 마우스 대식세포인 RAW264.7세포를, ATCC에서 개 대식세포 DH82 세포를 분양받아 실험에 사용하였다.
- RAW264.7(mouse)세포와 DH82(canine) 세포는 DMEM에 10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 함유된 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 배양하였다. 유산균 배양상등액을 RAW264.7(mouse)세포와 DH82(canine) 세포에 첨가하고 24시간 배양 후 WST-1 assay를 통해서 세포 활성을 측정하였다. 이때, 기존 유산균과 활성비교하기 위하여 현재까지 학술적, 산업적으로 가장 널리 알려진 *L. rhamnosus* GG ATCC53103(LGG)의 배양상등액을 양성대조군으로 하여 *B. longum* CACC517의 배양상등액, *P. acidilactici* CACC537의 배양상등액, *L. plantarum* CACC558의 배양상등액, *L. paracasei* subsp. *tolerans* CACC566의 배양상등액을 계단희석법으로 희석하여 세포활성 효과를 비교하였을 때 RAW264.7 세포에서는 10⁷ CFU/ml 이하의 농도에서 모든 균주가 LGG와 동등하거나 높은 세포활성을 보였 주었고(그림 1A 위, $P < 0.05$), DH82 세포에서는 10⁴ CFU/ml 이하의 농도에서 LGG와 비교하여 동등하거나 뚜렷하게 뛰어난 세포 활성을 나타내었음(그림 54A 아래, $P < 0.05$). 또한 고농도(10⁸ CFU/ml 이상)로 배양상등액 처리할 시에 오히려 세포 활성을 저해하는 현상을 확인하였음. 특히 DH82 세포의 경우 RAW264.7 세포에 비하여 상대적으로 낮은 농도 조건에서 LGG보다 향상된 세포 활성 결과를 얻을 수 있었다(그림 54A).
- 숙주세포의 항염증 기능 분석을 위하여 숙주세포의 NO 산화물인 NO₂(nitrite)을 Griess reagent system(Promega, USA)반응을 이용하여 측정하였다. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis의 lipopolysaccharide (LPS, sigmal-Aldrich)를 Raw264.7(mouse)세포에 500ng/ml 첨가한 것을 대조군으로 하여 유산균 배양액을 첨가한 시험구와 비교하였다. 유산균 배양액은 MRS액체배지 37°C에서 24시간 배양한 후, 원심분리하여 제균한 배양상등액을 계단희석법으로 희석하여 준비하였다. LPS와 유산균 배양액을 첨가한 숙주세포는 24시간 처리한 후, 상등액을 취하여 Griess 시약 sulfanilamide solution과 N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride(NED) solution을 반응시켜 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과로부터 RAW264.7 세포에서는 모든 균주가 LGG와 비교하여 10⁸ CFU/ml 농도에서 동등하거나 더 나은 항염증 효과를 보였으며(그림 1B 위, $P < 0.05$), DH82 세포에서는 10³ CFU/ml 이하의 농도에서 LGG와 동등한 항염증 효과를 나타냈다(그림 54B 아래, $P < 0.05$). 세포활성 실험과 마찬가지로 DH82 세포의 경우 RAW264.7 세포에 비하여 상대적으로 낮은 농도 조건에서 LGG보다 향상된 세포 항염증 결과를 얻을 수 있었다(그림 54B).
- *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566 유전체 정보를 생산한 후에 각 균주가 1개의 complete genome으로 성공적으로 assembly 되어서, 각 균주의 유전체를 성공적으로 해독했다고 판단되었다(그림 55).



<그림 54> 반력견 후보 유산균 배양상등액에 의한 숙주세포 세포활성(A) 및 항염증 능력검정(B)

A. WST assay; B. NO assay(Griess assay)

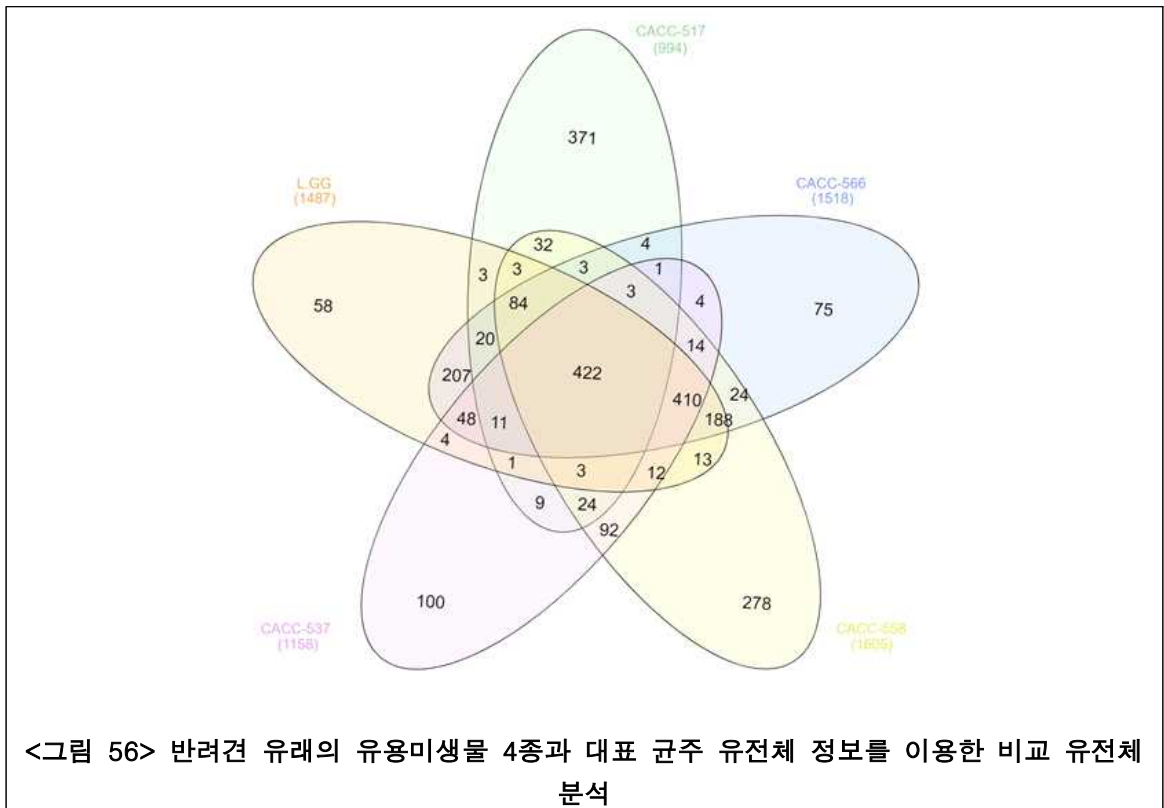


○ *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566과 NCBI에 있는 대표 균주 (*L. rhamnosus* GG)의 유전체 정보 특성 분석을 수행한 결과, *B. longum* CACC517이 유전자 수가 제일 적었고, *L. plantarum* CACC558 이 유전자 수가 제일 많고, *L. paracasei* CACC566이 대표 균주 *L. rhamnosus* GG와 유전적 거리가 제일 가까운 것으로 확인이 되었다(표 32)

<표 32> *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566과 NCBI에 있는 대표 균주 (*L. rhamnosus* GG)의 유전체 정보

	ASM2650v1	CACC517	CACC537	CACC566	CACC558
strains	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>B. longum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>
Genome Size (bp)	3,010,111	2,281,664	2,035,984	3,123,521	3,250,114
GC (%)	46.7	59.8	42.0	46.3	44.6
CDS	2,832	1,835	1,897	2,984	3,030
tRNA	57	56	56	59	68
rRNA	15	12	15	15	16
Average Nucleotide Identity	-	64.46	66.20	77.47	65.80

- *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566과 *L. rhamnosus* GG의 유전체 정보를 이용해서 비교 유전체 분석을 수행한 결과, 422개의 core gene를 발굴할 수 있었고, 이는 본 연구팀이 발굴한 유용미생물 4종의 특성을 담고 있을 것이라고 생각된다. 각각의 균주들은 특이적 유전자(Unique gene)를 가지고 있었으며 CACC517 (*B. longum*)의 유전체가 가장 적은 유전자를 가지고 있었지만, 또한 가장 많은 균주 특이적인 유전자를 가지고 있었다(그림 56).



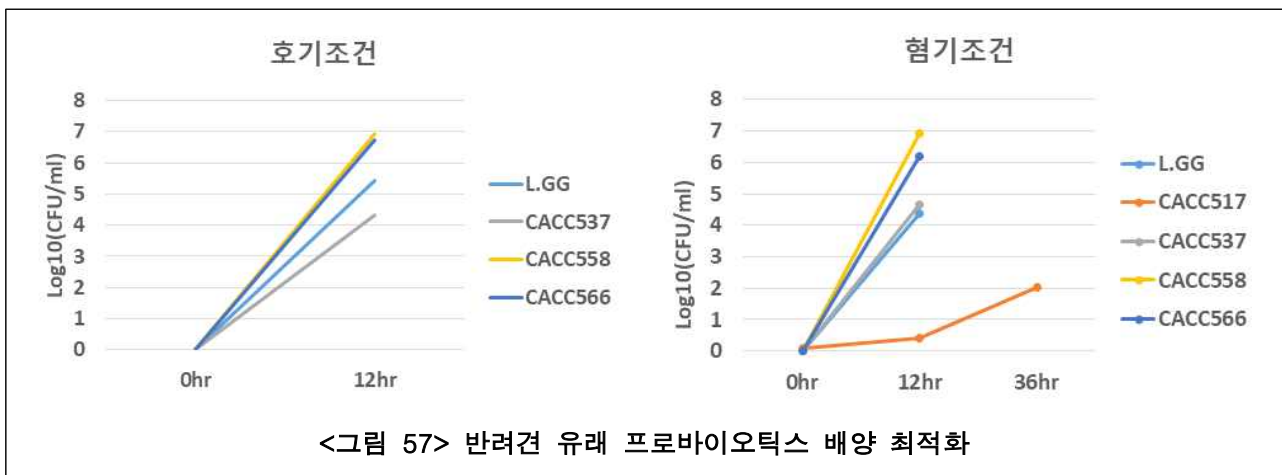
- 반려견 유래의 유용미생물 4종과 대표 균주 LGG (*L. rhamnosus* GG)의 유전체 정보를 이용하여 eggNOG mapper를 이용하여 annotation을 수행한 결과, LGG의 경우에는 탄수화물 대사(Carbohydrate transport and metabolism)에 관련한 유전자가 제일 많았으며, 이는 다른 반려견 유래의 유용미생물 3종도 동일한 결과이고, *L. plantarum* CACC558의 경우에는 2번째로 탄수화물 대사에 관련한 유전자가 많음을 알 수 있었다(표 33).

<표 33> 반려견 유래의 유용미생물 4종과 대표 균주 유전체 특성 분석

Clusters	Eggnog	Description	L.GG	CACC517	CACC566	CACC558	CACC537
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	36	30	37	38	27
	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	124	79	137	177	111
	N	Cell motility	8	5	8	14	7
	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	52	43	56	52	36
	T	Signal transduction mechanisms	57	62	58	69	47
	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	35	42	41	72	44
	V	Defense mechanisms	86	53	89	64	47
	W	Extracellular structures	0	0	0	3	0

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	B	Chromatin structure and dynamics	0	1	0	0	0
	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	167	143	168	170	160
	K	Transcription	230	161	250	303	185
	L	Replication, recombination and repair	162	169	193	153	109
METABOLISM	C	Energy production and conversion	92	57	116	122	66
	E	Amino acid transport and metabolism	193	180	199	224	110
	F	Nucleotide transport and metabolism	112	82	109	129	109
	G	Carbohydrate transport and metabolism	257	195	293	259	220
	H	Coenzyme transport and metabolism	66	67	64	107	47
	I	Lipid transport and metabolism	57	39	61	68	50
	P	Inorganic ion transport and metabolism	145	95	148	165	81
	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	24	11	32	29	17
POORLY CHARACTERIZED	S	Function unknown	498	294	544	577	334
	-	Not define	300	99	322	328	91

- 반려견 유래 4종 *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566 및 LGG에 대하여 혐기 또는 호기 조건별 배양 최적 조건을 확인하기 위하여 24시간 및 36시간 배양 후 CFU를 측정하여 혐기조건에서 LGG, CACC537, CACC558, CACC566은 12시간 배양, CACC517은 36시간 배양 최적 조건을 결정하였으며, 호기조건에서 LGG, CACC537, CACC558, CACC566은 12시간 배양 최적 조건을 결정하였다(그림 57).



- 반려견 유래 4종 *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566 및 LGG에 대하여 혐기 또는 호기 조건별 미생물 및 미생물 배양액내 대사체를 NMR 방법을 이용하여 분석하여 미생물에서 38종 대사체를 확인 하였다(표 34).

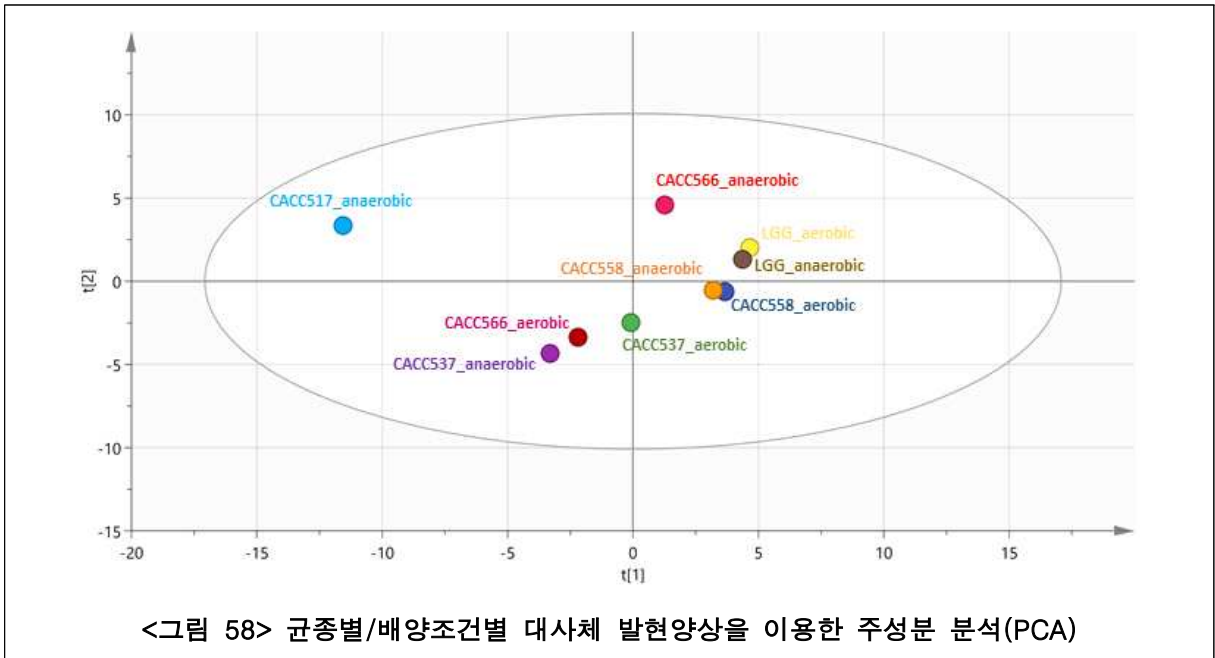
<표 34> 반려견 유래 프로바이오틱스 4종 대사체 분석결과

단위: mM

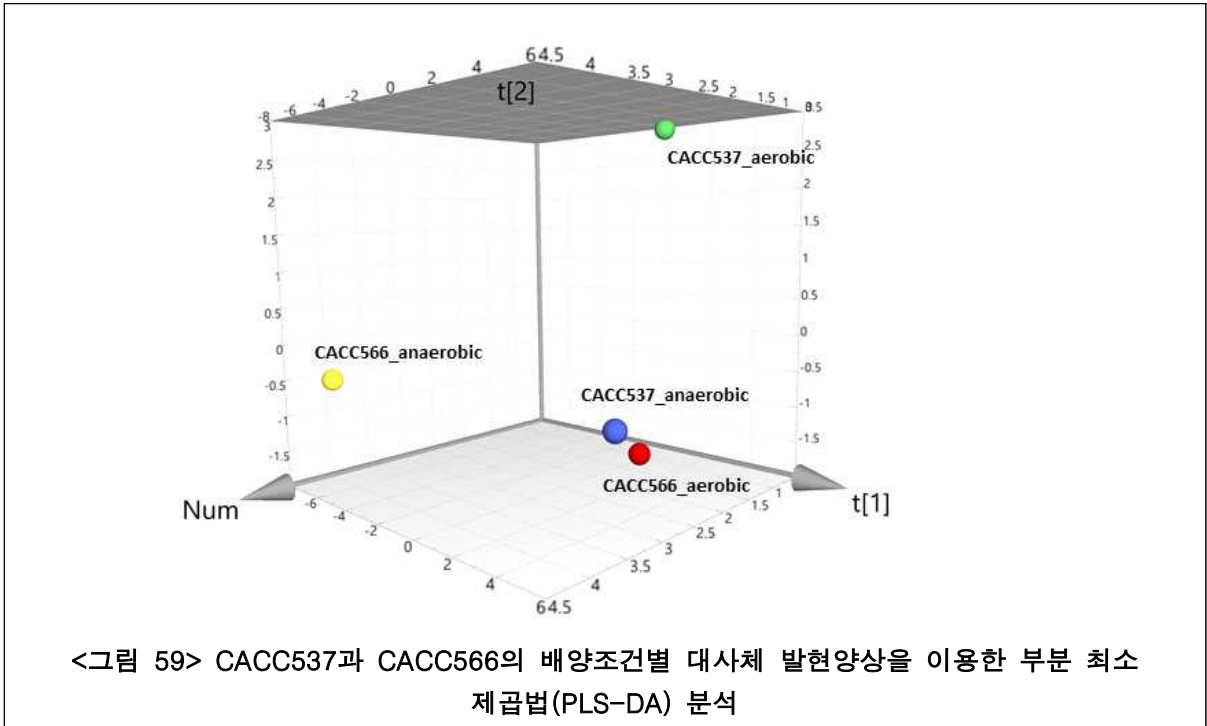
	aerobic_CACC537	aerobic_CACC558	aerobic_CACC566	aerobic_L.GG	Anaerobic_CACC517	Anaerobic_CACC537	Anaerobic_CACC558	Anaerobic_CACC566	Anaerobic_L.GG
Acetate	1.6543	1.391	0.3795	0.2836	6.5667	2.9066	0.6805	0.6268	0.2479
Alanine	2.07	2.244	2.0893	1.65	5.6056	1.9872	1.9992	3.7728	1.6123

Asparagine	0.356	0.4884	0.3544	0.0561	1.7081	0.1669	0.2368	0.9683	0.1302
Aspartate	0.2762	0.0056	0.2263	0.0056	2.3306	0.0928	0.033	0.7125	0.0177
Betaine	1.8695	3.3923	2.9891	0.6926	0.7908	3.7188	2.454	4.4767	0.6225
Butyrate	0.5098	0.4026	0.6183	0.5155	2.3883	0.4001	0.5998	1.3277	0.4865
Choline	0.9568	0.7707	1.981	0.3051	0.113	0.8073	0.7824	2.2119	0.2601
Formate	0	0.008	0	0.0255	5.1657	0.0027	0.0034	0.011	0.0033
Glutamate	0.9101	1.0127	0.7273	0.4552	6.3626	1.1031	1.0604	2.4431	1.1141
Glutamine	0.5644	1.5235	1.5964	1.4114	0.705	0.4235	1.3356	3.032	1.3229
Glycerol	1.3702	1.4772	1.075	2.1828	0.6601	1.1052	1.4972	3.0353	1.5629
Glycine	0.4574	0.4389	0.3217	0.7329	3.0593	0.5164	0.49	0.9165	0.616
Hypoxanthine	0.0136	0	0.0041	0.0082	0.2859	0.0302	0.0101	0.0104	0.0049
Isoleucine	1.1656	1.391	1.1948	2.3147	2.5009	1.0419	1.4851	2.3044	2.1272
Lactate	0.3825	0.2532	0.9109	0.8709	5.1047	0.6079	0.2057	1.7754	0.7322
Leucine	3.4821	3.0217	3.4445	4.9955	4.7685	3.4525	4.1265	6.3513	4.4797
Lysine	0.9805	1.1681	0.7531	0.7	2.6618	0.8669	1.0686	1.7333	0.7188
Methanol	51.4261	70.6642	38.7056	75.19	23.235	34.7378	67.6856	64.4096	74.4878
Methionine	0.2994	0.1644	0.3182	0.2771	0.923	0.2258	0.1786	0.6528	0.2905
Nicotinate	0.0017	0	0.008	0.0132	0.0252	0.0027	0.007	0.0143	0.0034
O-Phosphocholine	0.2044	0.2774	0.4322	0.3398	0.0516	0.7175	0.2811	1.0129	0.1073
Ornithine	0.6624	0.6961	0.4613	0.3146	1.7946	0.5242	0.659	1.2407	0.2771
Phenylalanine	0.6705	1.1514	1.4046	1.901	2.0127	0.6518	1.0042	2.0556	1.2612
Proline	0.8525	0.3673	1.0161	1.3964	0.9391	0.8607	0.252	2.5706	1.0363
Propylene glycol	0.2257	0.1582	0.3084	0.4521	0.5898	0.3615	0.4068	0.5742	0.4199
Pyroglutamate	1.4018	0.6433	1.4743	1.3105	1.7002	0.9365	0.6724	3.7264	1.5967
Pyruvate	0.1666	0.1923	0.1353	0.2316	0.0318	0.1631	0.1974	0.523	0.1621
Serine	1.4245	1.9201	1.1176	2.3804	2.1254	1.4297	1.7671	2.7549	2.0521
Succinate	0.1409	0.2174	0.3614	0.3155	0.5188	0.1988	0.2173	0.512	0.2907
Threonine	0.7335	0.3061	0.8353	0.7834	2.5498	0.9191	0.355	2.1434	0.8364
Tryptophan	0.0919	0.1619	0.2789	0.2115	0.7994	0.1334	0.0962	0.2337	0.2693
Tyramine	0.1106	0.162	0.1005	0.1441	0.266	0.1033	0.1546	0.3131	0.1417
Tyrosine	0.2159	0.1891	0.4611	0.6069	0.6443	0.2616	0.1947	0.6205	0.5671
UMP	0.004	0.0073	0.011	0.0099	0.1329	0.0029	0.0278	0.009	0.0029
Uracil	0.0053	0.0083	0.019	0.0203	0.0858	0.0069	0.0135	0.0234	0.0145
Valine	1.357	1.6057	1.2857	2.6507	3.6135	1.2688	1.7483	2.1623	2.4215
Xanthine	0.0054	0.0039	0.0251	0.0651	0.1898	0.0053	0	0.0634	0.116
sn-Glycerol-3-phosphocholine	0.36	0.5872	2.2038	0.3702	0.2314	1.0955	0.6021	2.9502	0.3386

- 대사체 분석을 통하여 확인된 38종 대사체에 대한 배양조건별 주성분 분석결과 LGG와 CACC558은 배양조건에 따라 대사체 차이가 거의 없었으나, CACC537과 CACC566은 배양조건에 따라 대사체 발현양상이 크게 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 절대 혐기균인 CACC517의 경우 나머지 프로바이오틱스와 대사체 발현양상이 크게 다름을 확인할 수 있었다(그림 58).



- CACC537과 CACC566의 배양조건별 부분 최소 제곱법(PLS-DA) 분석결과 주성분 분석과 유사하게 CACC537 혐기조건과 CACC566 호기 조건 배양시 유사한 대사체 발현 양상을 나타내며 CACC537 호기 조건 배양과 CACC566 혐기 조건 배양이 독립적인 대사체 발현 양상을 확인하였다(그림 59).



- CACC537과 CACC566의 배양조건별 부분 최소 제곱법(PLS-DA) 분석결과에 대한 VIP(Variable Importance Plots) score를 분석한 결과 Methanol, sn-Glycero-3-phosphocholine, Betaine, Glutamine, Leucine, Choline, Phenylalanine, Lactate 등의 대사체 발현양상이 각 균종별 배양 조건 차이에 주요하게 영향을 미치는 것으로 나타났다(VIP score > 1)(표 35).

<표 35> 그림 의 부분 최소 제곱법(PLS-DA) 분석에 대한 VIP score 분석

Var ID (Primary)	VIP score	3.18246 * VIPcvSE	Var ID (Primary)	VIP score	3.18246 * VIPcvSE
Methanol	3.95468	3.66182	Butyrate	0.615912	0.680107
sn-Glycero-3-phosphocholine	1.78881	1.36234	Succinate	0.599041	0.334736
Betaine	1.72679	2.09716	Valine	0.569689	0.837728
Glutamine	1.26454	0.917509	Lysine	0.548881	0.877945
Leucine	1.09653	1.70521	Asparagine	0.511487	0.477574
Choline	1.0579	1.85607	Tryptophan	0.507668	0.658522
Phenylalanine	1.02713	0.704622	Ornithine	0.499362	0.601565
Lactate	1.01982	0.96865	Propylene glycol	0.494114	0.45542
Pyroglutamate	0.99915	1.12898	Aspartate	0.439272	0.272211
Proline	0.896255	1.13855	Methionine	0.391603	0.43233
Alanine	0.852692	1.21667	Glycine	0.389416	1.36977
O-Phosphocholine	0.831971	0.758641	Pyruvate	0.37533	0.67704
Threonine	0.816572	1.08834	Tyramine	0.287213	0.462019

Glycerol	0.816426	1.13126	Xanthine	0.189685	0.140712
Glutamate	0.758666	1.82546	Uracil	0.138274	0.10962
Acetate	0.709187	4.50609	Nicotinate	0.100811	0.054476
Isoleucine	0.699648	0.910191	UMP	0.077364	0.237071
Serine	0.697134	1.65368	Formate	0.069379	0.120093
Tyrosine	0.615963	0.314939	Hypoxanthine	0.037031	0.501776

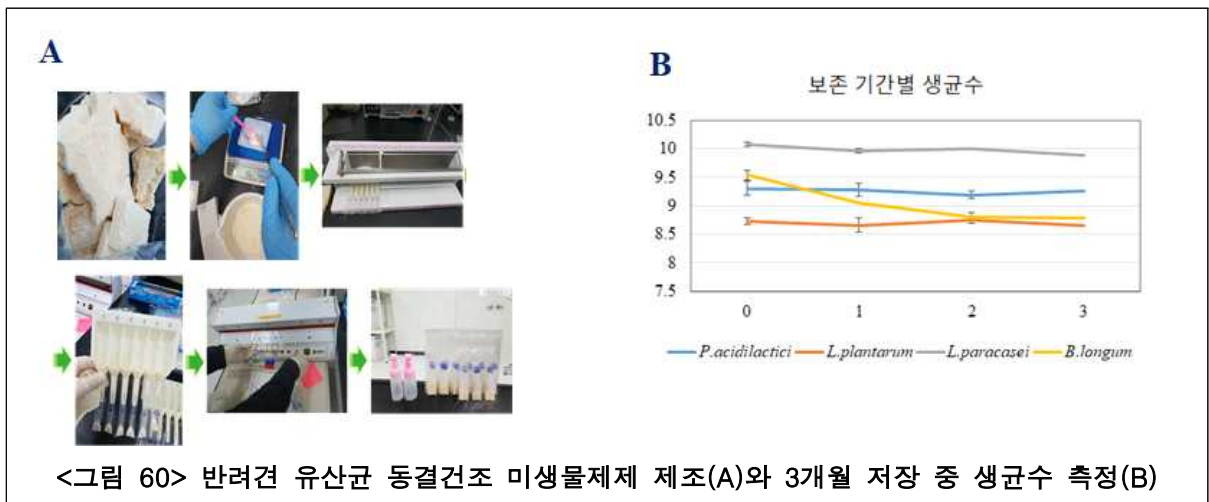
- 반려견 유래 유산균 4종미생물제제 저장 안정성 및 반려견 1달 급여 임상시험을 통한 면역 증진 평가를 실시하였다. 가정견을 대상으로 하여 반려견 보호자의 동의를 받아 본 시험을 수행하였다(표 36).

<표 36> 반려견 유래 프로바이오틱스 4종 임상대상 정보

그룹	이름	생년	품종	성별	체중	비고	
CACC517 급여군	1	테디	2013	푸들	중성수컷	5.58	
	2	다운	2015	푸들	중성수컷	5.48	
	3	쫓꼬	2013	푸들	미중성암컷	3.68	
	4	벌이	2015	푸들	미중성암컷	2.74	
	5	콩이	2016	푸들	미중성암컷	3.96	
	6	몽이	2014	푸들	미중성암컷	2.8	설사/무른변으로내원
	7	모찌	2016	푸들	중성수컷	4.45	간헐적으로 설사와 정상변을 반복
	8	똥이	2015	말티즈	중성수컷	3.5	만성설사
	9	연두	2015	비송프리제	중성수컷	5.3	설사/무른변으로내원
	10	바비	2017	프렌치 불독	수컷	17.2	설사/무른변으로내원
CACC537 급여군	1	감자	2016	말티즈	중성수컷	2.5	
	2	다래	2014	포메라니언	암컷	5.9	
	3	베비	2009	푸들	중성암컷	9.54	
	4	꼬봉	2013	코커스파니엘	중성수컷	12.4	
	5	쫓	2015	말티즈	중성수컷	6.47	
	6	미니	2018	말티즈	미중성암컷	4.12	구토/설사(점액변)
	7	이엘	2018	비송프리제	미중성암컷	3.86	평소무른변자주봄
	8	요염	2004	코커스파니엘	중성수컷	10.8	만성설사, 처방식사로 급여중
	9	막내	2019	도고아르젠티노	미중성수컷	2.2	설사/무른변으로내원
	10	절미	2018	웰시코기	중성암컷	8.8	설사/무른변으로내원
CACC558 급여군	1	해룡	2009	푸들	중성수컷		
	2	두부	2014	포메라니언	중성암컷		
	3	다울	2014	말티즈	중성암컷		
	4	설	2017	믹스	중성암컷		
	5	루디	2006	몰티즈	중성수컷		단백소실성 장병증, 면역성 설사
	6	홀리	2012	말티즈	중성수컷		
CACC566 급여군	1	초롱이	2011	말티즈	중성수컷	5	
	2	콩	2012	말티즈	중성암컷	4.4	
	3	서준	2016	말티즈	중성수컷	4.3	
	4	쫓쫓	2011	시츄	중성수컷	6.75	
	5	꼬미	2017	말티즈	미중성암컷	2.1	무른변으로내원
	6	초코	2012	푸들	중성수컷	6.4	구토/설사
	7	훈	2016	닥스훈트	중성수컷	7.4	구토/설사
	8	만두	2019	리트리버	미중성수컷	9.7	구토/설사

	9	몽이	2016	푸들	중성수컷	5.54	외이염
--	---	----	------	----	------	------	-----

- 반려견 유래 유산균 4종, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566, *P. acidilactici* CACC537, *B. longum* CACC517균주를 대상으로 본 실험을 수행하였다. 미생물은 MRS액 체배지 37°C에서 24-48시간 배양한 후, 원심분리하여 균체만을 수집하여 이미 보고된 미생물 제제 보존제로 skim milk 10%, trehalose 15%, glycerin 0.5%, NaCl 1% (한국생물공학회, KSBB journal 2015, 30(3): 109-113)를 첨가하여 동결건조를 실시하였다. 동결건조된 미생물제제는 1포에 0.2g씩 남아 소포장 하였으며(생균수 10⁸ CFU/포, 0.2g), 4°C에서 3개월 저장 기간 중 생균수를 측정하여 미생물제제의 안정성을 확인하였다(그림 60).



- 2차년도 반려견 유래 *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566에 대한 미생물제제 급여 임상실험의 혈액 및 소변 분석 데이터를 통합하였다(표 37).
- 4종의 유산균을 급여한 결과 공통적으로 혈액 내 백혈구, 적혈구, 헤마토크립, 헤모글로빈 수치가 증가하는 경향을 보였고, 단백뇨가 억제되었으며 전해질 수치가 전반적으로 개선되었고, 간 기능이 개선되는 효과를 보였다(표 37).

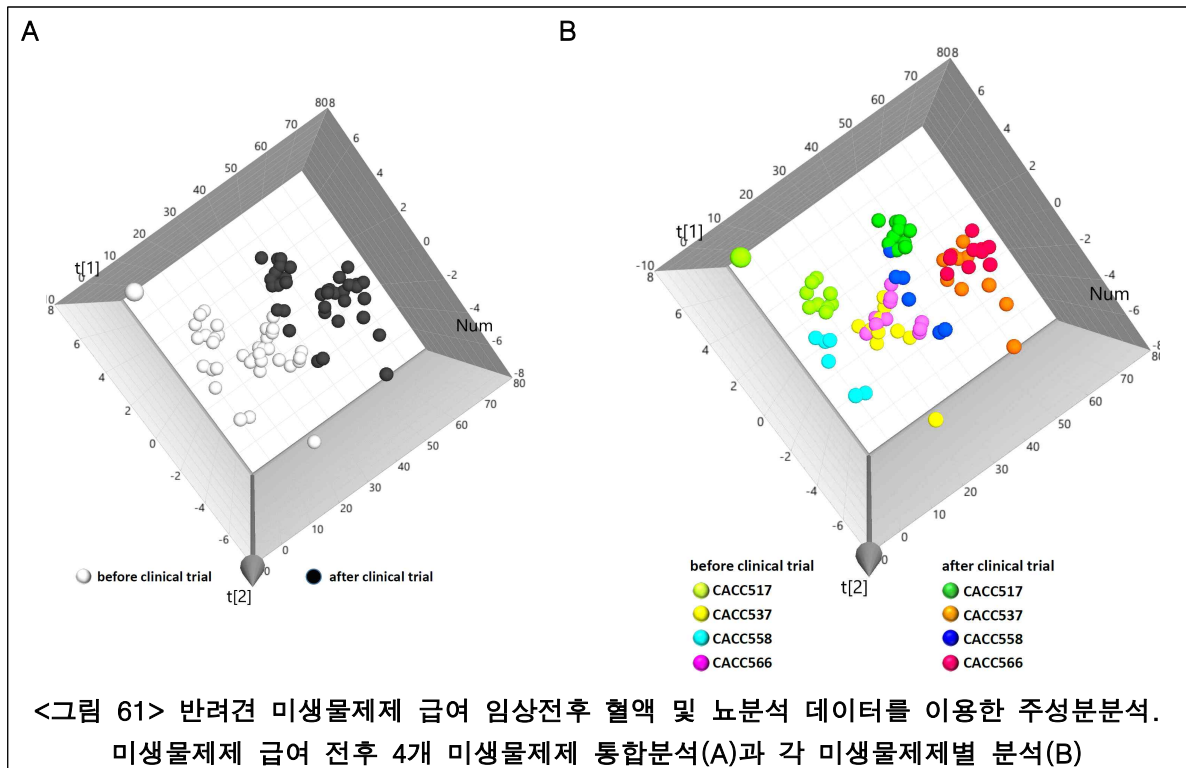
<표 37> 반려견 유래 미생물제제에 대한 임상데이터

ID	strain	clinical trial	HCT	HGB	MCH	MCHC	MCV	MPV	RBC	RDW-CV	WBC	WBC-GRAN(#)	WBC-GRAN(%)	WBC-LYM(#)	WBC-LYM(%)	ALP	AMY	BUN	Ca	Cl	K	LIPA	Na	Na/K	pH	
Dog1	CACC537	before	38.7	13.8	24.8	35.6	69.8	10.5	5.55	10.3	6.4	3.3	51.3	1.6	24.9	63	379	10	10.4	108	4.8	25	159	33	5	
Dog1	CACC537	after	42	15.9	26.3	37.8	69.6	9.9	6.04	11.2	11.1	7.7	68.9	1.9	17.5	55	327	15.4	10.5	108	3.9	25	161	41	6.5	
Dog2	CACC566	before	41.2	15.3	25.5	37.1	68.8	9	5.99	11.4	13.5	8.2	60.6	3.4	25.4	80	229	25.2	10.3	103	4.4	25	157	36	6.5	
Dog2	CACC566	after	44.9	16.1	24.8	35.8	69.4	10.3	6.47	11.3	16.3	7.9	48.8	5.5	33.6	65	331	38.2	10.7	105	3.8	25	157	41	6.5	
Dog3	CACC537	before	40.5	15.2	25.5	37.5	68.1	12.6	5.95	10.6	12.1	8.7	72.1	2.3	18.9	59	1577	25.2	11	127	4.8	25	157	33	7	
Dog3	CACC537	after	40.2	15.9	25.9	39.5	65.8	13.4	6.12	11.8	16.3	10.7	65.9	3.6	21.9	50	1442	21.4	10.3	123	3.8	25	157	41	6.5	
Dog4	CACC537	before	44.6	16.7	24.8	37.4	66.5	14.4	6.72	10.8	9.4	6.6	70.5	2	21.4	56	589	22.5	10.9	111	4.3	25	157	37	7	
Dog4	CACC537	after	46.3	17.5	25.5	37.7	67.5	13.6	6.86	11.6	7.4	4.4	59.9	2.1	28.6	55	540	13.2	10.5	97	3.9	27	159	41	7	
Dog5	CACC517	before	48.95	17	23.17	34.72	67	8.21	7.34	15.87	6.46	3.8	57.3	2.2	34.9	3.8	465	16.9	12.2	104	4.4	50	139	31.6	7.6	
Dog5	CACC517	after	50.76	17.12	22.02	33.73	65	8.78	7.77	16.88	6.87	4	55.9	2.4	36	4.1	508	19	12.3	112	4.9	45	148	30.2	7.3	
Dog6	CACC558	before	38.5	14.6	25.7	37.9	68.1	11.5	5.66	14.7	12.6	7.9	63	3.7	29.1	63		16.8	11.7	113	4.2	26	148		7	
Dog6	CACC558	after	39.5	13.8	24.9	37.9	69.6	11.2	5.72	15.1	13.6	7.4	65	3.2	29.8	52		15.8	10.7	112	4.6	24	142		7	
Dog7	CACC558	before	48.5	17.9	24.2	36.9	65.8	11.6	7.38	15.2	8.8	5.5	63.2	2.5	27.8	38		29.6	11	110	4	35	149		6	
Dog7	CACC558	after	50.3	18.2	23.2	33.8	66.5	10.5	7.21	15.2	9.2	6.5	73.2	3	29.1	41		29.4	12	112	4	37	148		6	
Dog8	CACC517	before	53.58	17.48	19.47	32.62	60	12.26	8.98	17.52	9.59	5.9	60.4	2.6	28.1	111	1921	13.2	267	1	75	151	76	38.7	6.7	
Dog8	CACC517	after	61.33	19.76	23.05	32.22	72	8.13	8.57	16.55	10.52	6.4	60.1	3.4	32.4	358	1020	17.1	12.1	114	4	36	148	37	7.1	
Dog9	CACC537	before	31.4	10.8	26.5	34.3	77.3	13.5	4.07	12.8	39.4	28.4	72.2	8	20.1	2000	257	16.8	10.6	87	5.4	25	154	29	6.5	
Dog9	CACC537	after	33.4	11.6	25.8	34.7	74.6	11.8	4.49	12.3	39.9	30.7	77.1	6.2	15.5	1334	534	21.3	10.6	96	4.4	25	151	34	6	
Dog10	CACC558	before	28.2	11.6	27.7	41.1	67.7	10.5	4.18	15.5	15.3	10.3	67.3	3.9	25.5	1643	675	18.8	10					35	8	
Dog10	CACC558	after	30.5	14.2	31.6	46.5	68.1	12.3	4.49	14.7	19.4	10.1	52.2	5.3	27.1	161		22.7	11.1	102	4.5		145		8	
Dog11	CACC537	before	21.8	7.8	23.9	35.7	67.1	10.4	3.26	14.3	11.4	4.5	39.6	5.2	45.7	166	831	14.3	11.6	111	5	25	157	31	5.5	
Dog11	CACC537	after																								
Dog12	CACC566	before	27	10.9	23.3	40.3	58	12.3	4.66	12.1	11.5	5.3	46.3	4.4	38.1	125	506	16.7	11	99	4.4	25	154	35	7	
Dog12	CACC566	after	28.8	11.2	22.7	38.8	58.6	12.8	4.93	11	10.2	4.2	41.2	4.3	41.8	125	591	12.4	11.4	103	3.9	25	155	40	9	
Dog13	CACC517	before	49.54	16.52	20.21	33.34	61	8.88	8.17	16.22	5.96	3.4	54.5	2.1	36.1	151	464	13.8	11.3	114	4.1	17	146	35.6	6.9	

Dog13	CACC5 17	after	53.94	17.52	17.64	32.48	60	9.41	8.92	17.26	6.48	3.1	46.2	2.8	44.4	187	533	14.4	11.6	118	4.4	31	150	34.1	7.1
Dog14	CACC5 17	before	41.09	14.14	21.78	34.42	63	9.27	6.49	17.19	4.68	2.7	55.2	1.5	33.2	120	412	19.2	11.5	104	4.1	27	144	33.5	7.3
Dog14	CACC5 17	after	45.25	14.43	20.35	31.88	64	8.34	7.09	15.59	4.82	2.6	53.9	1.9	39.4	111	373	17.4	10.8	112	4.6	27	145	31.5	7.1
Dog15	CACC5 66	before	50.3	18.6	25.5	36.9	69.3	11.9	7.27	11.3	9.5	6.9	72.6	1.8	18.9	41	554	14.9	9.9	108	3.4	44	158	46	6
Dog15	CACC5 66	after	50.5	18.2	24.8	36	68.9	13	7.33	11.3	8.6	5	58.3	2.1	23.9	41	608	21.4	9.8	108	3.3	76	155	47	5
Dog16	CACC5 37	before	51.1	18.7	26.4	36.5	72.4	10.8	7.06	11	11.7	7.7	65.5	2.8	24.8	71	433	29.2	10.8	104	3.7	25	153	41	6
Dog16	CACC5 37	after	50.9	18.5	26	36.3	71.8	10.7	7.09	11	11.3	6.1	54.3	3.4	29.8	59	485	24.2	11.3	110	3.8	25	159	42	7.5
Dog17	CACC5 17	before	53.87	18.35	22.71	34.07	67	8.98	8.08	16.95	6.66	4.6	66.5	1.5	23.3	128 3	1044	16.7	14.2	98	4.2	16	148	35.2	6.1
Dog17	CACC5 17	after	44.71	14.55	20.54	32.55	63	9.38	7.08	17.13	10.11	6	58.8	3.2	31.8	190	862	14.7	11.8	108	4.8	31	147	30.6	8.1
Dog18	CACC5 17	before	39.29	12.92	21.08	32.89	64	8.5	6.13	16.9	6.3	4	62.3	1.8	28.6	3.5	449	25.5	10.9	104	4.1	45	144	40.9	7.8
Dog18	CACC5 17	after	43.24	14.47	21.35	33.47	64	8.85	6.78	16.58	5.89	3.4	55.8	2	34.6	3.7	352	24.7	11.4	113	3.9	45	151	38.7	8.2
Dog19	CACC5 37	before	42.6	16	25.9	37.5	69.2	10.7	6.16	11.3	8	5.1	63.8	1.9	23.3	44	555	15.3	10.5	116	4.1	25	156	38	5
Dog19	CACC5 37	after	45.2	16.2	24.7	35.8	69.2	10.1	6.54	11.3	9.2	6.5	70.9	1.6	17.3	61	812	15.1	10.2	117	3.8	25	156	41	5.5
Dog20	CACC5 66	before	43.9	15.8	24.3	35.9	67.6	12	6.5	11.5	11.5	7.8	67.8	2.7	23.2	74	674	11.8	10.7	107	3.2	37	158	49	5
Dog20	CACC5 66	after	41.8	15.6	25	37.3	67.1	9.6	6.23	10.7	12.9	10.2	79.3	1.7	13.2	84	515	12.9	11	101	4	30	160	40	7
Dog21	CACC5 58	before	46.1	15.4	24.2	33.4	72.7	10	6.35	14.7	10.4	6.7	64.6	2.7	26.3	53		17.5	12.3	113	4.2	27	149		7
Dog21	CACC5 58	after	45.1	15.2	23.2	35.1	71.2	10	7.6	15.2	10.1	6.7	65.6	2.5	24.8	60		17.3	11.9	115	4.1	27	148		7
Dog22	CACC5 17	before	47.43	16.01	20.16	33.76	60	8.01	7.94	17.68	6.98	3.5	47.7	2.6	38.5	94	346	9.3	10.4	110	4.2	34	145	34.5	7.1
Dog22	CACC5 17	after	42.56	13.65	18.82	32.08	59	10.88	7.25	17.18	5.86	2.9	46.1	2.3	40.6	111	471	16.9	11.3	116	3.7	32	148	40	7.7
Dog23	CACC5 37	before	38	14.5	26.2	38.1	69	11	5.52	11.3	8.5	6.5	76.9	1.5	17.2	194	2429	58.5	12.1	140	6.3	92	136	22	6
Dog23	CACC5 37	after	37.2	13.9	26.7	37.3	71.8	12.4	5.19	11	11	8.1	73.5	2.1	18.5	187	3000	57.6	11.4	134	6.4	176	145	23	6
Dog24	CACC5 37	before	43.5	15.9	25	36.5	68.6	11.6	6.35	11.4	8.6	4.8	56.2	2.6	30.2	74	558	22.5	10.9	112	3.8	25	154	41	5.5
Dog24	CACC5 37	after	42.5	15.7	25.4	36.9	68.9	12.1	6.18	11.3	8.6	5.1	58.9	2	23.3	51	486	24.8	10.6	104	3.9	25	159	41	5.5
Dog25	CACC5 37	before	41.6	18	31.8	43.2	73.7	13.5	5.65	10.8	9.2	6.3	68.8	2.1	22.2	117	699	26.3	10.5	114	3.9	25	159	41	7
Dog25	CACC5 37	after	41.9	16.9	29.7	40.3	73.8	14.9	5.69	11.6	22.3	17.5	78.8	3.4	15.1	79	338	31	11.1	102	3.9	25	157	40	5.5
Dog26	CACC5 17	before	47.56	15.95	21.65	33.55	65	8.91	7.37	15.89	6.81	4.9	70.7	1.5	22.1	3.9	401	25	12.1	117	4.7	49	149	31.7	8
Dog26	CACC5 17	after	55.81	19.45	22.28	34.85	64	9.32	8.73	16.76	5.05	2.5	48.4	2	39.7	4.2	342	20.5	11.5	116	4.4	48	148	33.6	7.1
Dog27	CACC5 37	before	45.5	17	25.6	37.3	68.6	10.9	6.64	11.4	7.9	4.6	58.2	2.2	28.2	59	423	10.5	11.3	101	4.1	39	152	37	7

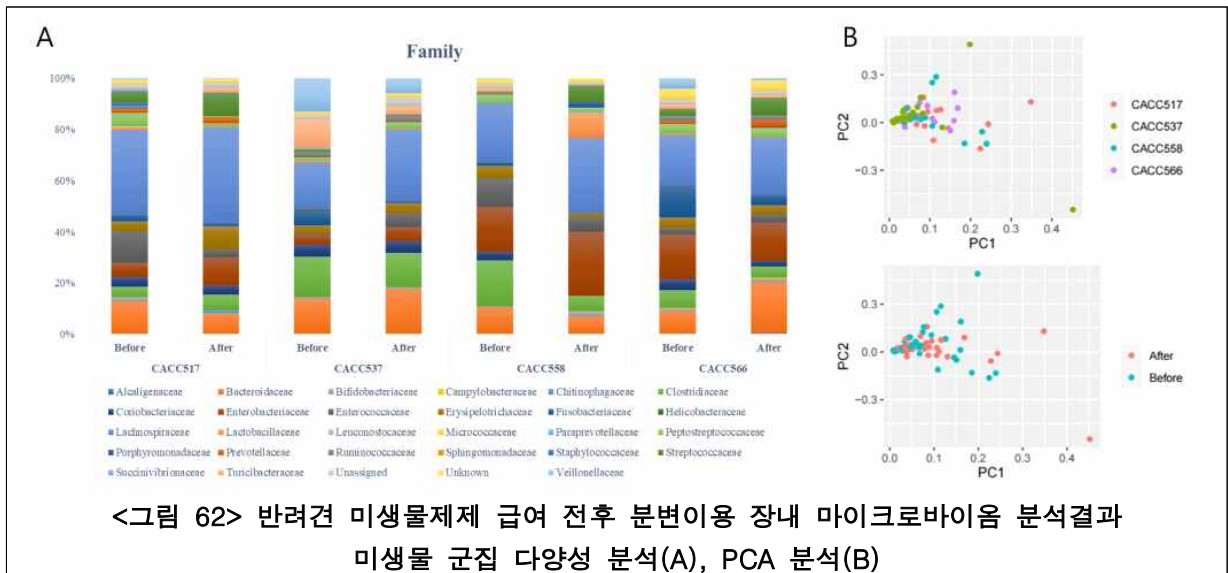
Dog27	CACC5 37	after	46.6	16.8	24.8	36	68.9	10.9	6.77	11.3	7.1	4.8	67.9	1.8	24.8	61	472	12.1	10.6	110	4.4	39	156	35	7
Dog28	CACC5 66	before	39.6	14.5	24.3	36.6	66.6	10.4	5.95	10.8	8.1	5.3	65.5	1.8	21.8	77	378	12.9	10.2	96	4.3	39	147	34	7
Dog28	CACC5 66	after	39	14.5	24.7	37.1	66.5	9.7	5.87	11.7	7.6	5.7	74.1	1.2	16.2	41	649	19.9	10.4	105	4.5	55	152	34	6
Dog29	CACC5 66	before	47	16.9	25.7	35.9	71.6	11	6.57	11.1	7.5	4.8	64	1.6	21	108	518	11.4	10.2	97	5.5	91	150	27	7
Dog29	CACC5 66	after	37.8	13.6	24.3	35.9	67.8	13.8	5.58	11.5	16.1	9.6	60.2	4.2	25.8	543	804	9.2	9.6	106	3.6	48	145	40	7
Dog30	CACC5 66	before	34.9	15.4	29.8	44.1	67.7	11.9	5.16	10.6	12.8	8.6	67.1	3.2	25.1	41	605	13.6	10.3	107	4	51	157	39	6
Dog30	CACC5 66	after	41.9	15.4	24.6	36.7	67	13.1	6.26	11.6	9.7	7	71.8	2.1	21.6	41	612	21.6	11.2	106	3.7	78	156	42	7
Dog31	CACC5 66	before	42	18.7	29.2	44.5	65.7	12.2	6.4	11.9	16.9	13	76.6	2.5	14.9	123	718	12.9	10.9	104	4.5	69	153	34	6
Dog31	CACC5 66	after	47.8	17.8	24.5	37.2	65.9	12.9	7.26	10.9	10.1	8.2	81.3	1.2	12	118	599	24.8	10.8	118	3.8	93	163	43	8.5
Dog32	CACC5 66	before	55	19.3	25	35	71.5	10.4	7.7	11.1	10.3	5.5	53.5	2.5	24.1	60	406	21.8	10.9	84	6.2	40	174	28	8
Dog32	CACC5 66	after	53	18.3	24.6	34.5	71.4	10.6	7.43	11.1	8.3	5.5	66.5	1.7	20.4	41	367	22	9.4	104	4.2	29	149	35	6
Dog33	CACC5 17	before	49.15	16.29	20.23	33.15	61	8.66	8.05	16.25	4.26	2.3	51.7	1.6	38.9	4.2	437	19.2	11.3	119	4.4	34	149	33.9	7.8
Dog33	CACC5 17	after	49.38	16.37	20	33.16	60	9.57	8.19	17.25	5.56	3.1	52	2	37.4	3.8	493	19	11.1	116	4.1	39	147	35.9	6.9
Dog34	CACC5 17	before	44.87	16.38	23.92	36.5	66	10.41	6.85	15.91	4.42	2	45	2.1	47.8	3.8	562	13.2	11.8	108	4.1	44	140	34.1	6
Dog34	CACC5 17	after	47.68	16.18	22.09	33.93	65	10.87	7.32	16.72	5.7	2.8	48	2.5	44.6	4	556	13.2	12	107	4.3	38	146	34	6.3
Dog35	CACC5 58	before	34.3	16.1	32.3	46.9	69.2	11.9	4.97	13.8	17.1	11.5	67.6	4.5	26.1		368	20.4	11.3			51			7
Dog35	CACC5 58	after	35.8	15.7	30.1	43.8	69	11.4	5.2	13.1	18.6	11.4	61.5	5.6	30.2			21	12.6			120			7
Dog36	CACC5 58	before	45.3	15.1	22.8	33.3	68.7	9.9	6.6	15.3	11.1	8.3	74.7	2.5	22.3	130		12.1	10.6	95	4.4	60	158		6
Dog36	CACC5 58	after	53.4	17.3	21.7	32.3	67.2	10.8	7.95	17	7.6	4	52.1	2.5	32.9	131		9.2	10.7	96	4.5		159	35	6
Dog37	CACC5 66	before	44.6	17.2	26	38.5	67.7	16	6.6	10.6	16.4	12.5	76	2.8	17	100	593	10.5	10.4	105	3.2	34	156	49	8
Dog37	CACC5 66	after	42.5	17.3	27.4	40.7	67.6	10.9	6.3	11.5	8.1	5.4	66.5	1.8	22.7	53	677	15.9	10.6	114	3.7	209	159	43	6

- 통합한 임상데이터를 이용하여 주성분분석을 수행한 결과 미생물제제 급여전후로 뚜렷하게 클러스터가 구분되는 것을 확인하였으며(그림 61A), 나아가 각 프로바이오틱스 별로 급여 전후 서로 다른 클러스터링을 나타내는 것을 확인하였다(그림 61B).

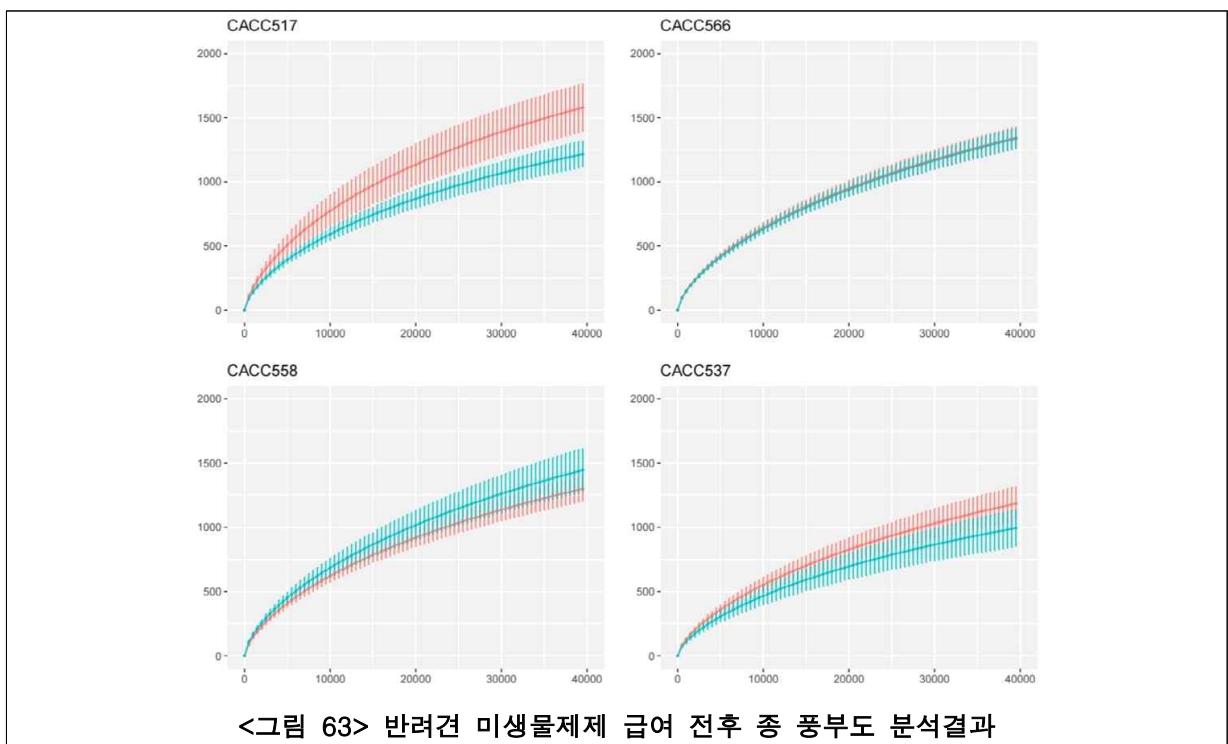


- *B. longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* CACC558, *L. paracasei* CACC566에 대한 미생물제제 급여 전·후 분변샘플을 이용 장내 미생물군집을 분석하였다. Illumina Miseq을 이용하여 16s rRNA의 V3-V4 region에 대해 시퀀싱 데이터를 생산하였고, QIIME 프로그램을 이용하여 16s rRNA 시퀀싱 raw 데이터인 paired-end read (fastq 파일)을 하나의 fastq 파일로 합친 뒤에 Quality filter와 Chimera detection and filter 과정을 거쳐서 OTU를 확인을 통하여 장내미생물 군집 확인 및 비교 분석을 진행하였다.
- *B. longum* CACC517 급여 전·후 phylum 수준에서 Fusobacteria의 상대적 풍부도 비율이 유의하게 차이가 났으며, order 수준에서는 Erysipelotrichales와 Fusobacteriales의 상대적 풍부도가 각각 p-value 0.036 및 0.079로 확연히 다른 것으로 나타났다. Family 수준에서는 Erysipelotrichaceae와 Fusobacteriaceae가 급여 전후에 유의한 차이를 보였고, genus 수준에서 Clostridium, Fusobacterium는 16S rRNA sequencing 결과에서 유의한 차이를 보였다(그림 62).
- *P. acidilactici* CACC537 급여 전·후 phylum 수준의 Bacteroidetes, class 수준의 Bacteroidia, order 수준의 Bacteroidales, family 수준의 Bacteroidaceae, genus 수준의 Bacteroides의 상대적 풍부도가 유의하게 달랐으며, genus 수준의 taxonomy는 Bacteroides의 상대적 풍부도가 유의하게 다른 것으로 나타났다(그림 62).
- *L. plantarum* CACC558 급여 전·후 phylum 수준에서 Fusobacteria의 상대적 풍부도 비율은 유의하게 달랐으며, order 수준에서 taxonomy는 Coriobacteriales, Erysipelotrichales,

Fusobacteriales의 상대적 풍부도가 큰 차이를 보였다. Family 수준에서는 Clostridiaceae, Coriobacteriaceae, Erysipelotrichaceae, Fusobacteriaceae, Fusobacteriaceae 가 차이를 보였으며, genus 수준에서는 Collinsella, Fusobacterium의 16S rRNA 시퀀싱 결과가 유의한 차이가 있었다(그림 62).



- Rarefaction curve에서 볼 수 있듯이, CACC517과 CACC537에서 프로바이오틱스 처리 후 OTU(Operational Taxonomic Units)의 수가 프로바이오틱스 처리 전보다 많았지만(그림 6), CACC566 처리 전과 후 사이에 명확한 차이를 찾지 못했으며, CACC558 처리 후 다양성 증가 변화도 확인할 수 없었다(그림 63). CACC517과 CACC537이 장내 미생물 군집의 다양성을 증가시키는 방향으로 변화를 주도하였음을 알 수 있다.



(1-2) 반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발

○ 반려묘 유래 *in vitro* 스크리닝을 통한 기능성 균주 탐색 및 확보

- 반려묘 유래 미생물 78종을 분리하였고 16S rRNA 서열을 분석하여 미생물 종을 동정하였다(표 38).

<표 38> 반려묘 유래 미생물 확보

순번	유래	미생물 종류
1	페르시아친칠라_12세	<i>Bifidobacterium saeculare</i>
2	페르시아친칠라_12세	<i>Bacteroides vulgatus</i>
3	페르시아친칠라_12세	<i>Bacteroides coprocola</i>
4	페르시아친칠라_12세	<i>Bifidobacterium saeculare</i>
5	페르시아친칠라_12세	<i>Faecalicoccus pleomorphus</i>
6	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
7	노르웨이숲_12세	<i>Collinsella tanakaei</i>
8	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium animalis</i>
9	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
10	노르웨이숲_12세	<i>Collinsella tanakaei</i>
11	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium animalis</i>
12	노르웨이숲_12세	<i>Collinsella intestinalis</i>
13	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium saeculare</i>
14	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium animalis</i>
15	노르웨이숲_12세	<i>Enterococcus faecium</i>
16	노르웨이숲_12세	<i>Escherichia fergusonii</i>
17	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
18	노르웨이숲_12세	<i>Bifidobacterium animalis</i>
19	노르웨이숲_12세	<i>Faecalicoccus pleomorphus</i>
20	노르웨이숲_12세	<i>Slackia faecicanis</i>
21	노르웨이숲_12세양이	<i>Slackia faecicanis</i>
22	페르시아친칠라_9세	<i>Bacteroides uniformis</i>
23	페르시아친칠라_9세	<i>Bacillus subtilis</i>
24	페르시아친칠라_9세	<i>Collinsella stercoris</i>
25	페르시아친칠라_9세	<i>Collinsella stercoris</i>
26	페르시아친칠라_9세	<i>Collinsella stercoris</i>
27	페르시아친칠라_9세	<i>Bacillus subtilis</i>
28	페르시아친칠라_9세	<i>Bacteroides stercoris</i>
29	페르시아친칠라_9세	<i>Bacteroides uniformis</i>
30	페르시아친칠라_9세	<i>Bacteroides stercoris</i>
31	페르시아친칠라_9세	<i>Collinsella stercoris</i>
32	페르시아친칠라_9세	<i>Bacteroides vulgatus</i>
33	페르시아친칠라_12세	<i>Bifidobacterium saeculare</i>
34	페르시아친칠라_12세	<i>Bacteroides stercoris</i>
35	페르시아친칠라_12세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
36	페르시아친칠라_12세	<i>Bacteroides stercoris</i>
37	페르시아친칠라_12세	<i>Fusobacterium perfoetens</i>
38	페르시아친칠라_12세	<i>Clostridium perfringens</i>
39	페르시아친칠라_12세	<i>Clostridium colicanis</i>
40	페르시아친칠라_12세	<i>Enterococcus faecium</i>
41	페르시아친칠라_12세	<i>Collinsella stercoris</i>
42	페르시아친칠라_12세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
43	페르시아친칠라_12세	<i>Enterococcus faecium</i>
44	페르시아친칠라_12세	<i>Enterococcus faecium</i>
45	코리안쇼트헤어_4세	<i>Enterococcus faecium</i>
46	코리안쇼트헤어_4세	<i>Enterococcus faecium</i>
47	코리안쇼트헤어_1세	<i>Clostridium perfringens</i>
48	코리안쇼트헤어_1세	<i>Enterococcus faecium</i>
49	코리안쇼트헤어_1세	<i>Enterococcus faecium</i>
50	코리안쇼트헤어_1세	<i>Enterococcus faecium</i>

51	코리안쇼트헤어_1세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
52	코리안쇼트헤어_1세	<i>Clostridium perfringens</i>
53	코리안쇼트헤어_1세	<i>Clostridium perfringens</i>
54	코리안쇼트헤어_1세	<i>Enterococcus faecium</i>
55	코리안쇼트헤어_1세	<i>Bifidobacterium animalis</i>
56	삼_1세	<i>Enterococcus faecium</i>
57	삼_1세	<i>Enterococcus faecium</i>
58	코리안쇼트헤어_3세	<i>Enterococcus faecium</i>
59	코리안쇼트헤어_3세	<i>Enterococcus faecium</i>
60	코리안쇼트헤어_3세	<i>Bifidobacterium pullorum</i>
61	코리안쇼트헤어_8세	<i>Enterococcus faecium</i>
62	코리안쇼트헤어_8세	<i>Enterococcus faecium</i>
63	코리안쇼트헤어_8세	<i>Enterococcus faecium</i>
64	코리안쇼트헤어_8세	<i>Enterococcus faecium</i>
65	코리안쇼트헤어_8세	<i>Enterococcus faecium</i>
66	코리안쇼트헤어_1세	<i>Bifidobacterium gallinarum</i>
67	삼_1세	<i>Collinsella tanakaei</i>
68	코리안쇼트헤어_3세	<i>Collinsella aerofaciens</i>
69	코리안쇼트헤어_3세	<i>Bacillus subtilis</i>
70	삼_1세	<i>Faecalicoccus pleomorphus</i>
71	삼_1세	<i>Bacteroides uniformis</i>
72	코리안쇼트헤어_4세	<i>Bacteroides uniformis</i>
73	코리안쇼트헤어_3세	<i>Bifidobacterium saeculare</i>
74	페르시아친칠라_12세	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
75	페르시아친칠라_12세	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
76	페르시아친칠라_12세	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
77	페르시아친칠라_12세	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
78	페르시아친칠라_12세	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

- 유용미생물 탐색을 위해 장내생존능-내산성 테스트를 pH 2.5조정한 MRS액체배지, 내담즙성 테스트는 0.3%, 1% oxgall을 첨가한 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 2시간 처리하여 생균수를 측정하였다. *L. rhamnosus* CACC 612균주는 내산성, 1% 내담즙성이 우수하였으며, *Bifidobacterium* 중에서는 균주마다 큰 차이를 나타내었다. *B. animalis* 균주 CACC789과 CACC858은 다른 고양이에서 분리된 균주이지만 비슷한 80%이상의 내산성, 내담즙성 생존율을 나타내었다(표 39).

<표 39> 반려묘로부터 분리한 프로바이오틱스 균주의 내산성, 내담즙성(Log₁₀CFU)

Strains	pH2.5			0.3 % oxgall			1.0 % oxgall		
	0h	2h	Survival rate(%)	0h	2h	Survival rate(%)	0h	2h	Survival rate(%)
<i>L. rhamnosus</i> CACC 612	7.52 ± 0.02	4.40 ± 0.11	75.9	7.52 ± 0.02	7.36 ± 0.03	97.9	7.52 ± 0.02	7.43 ± 0.02	98.8
<i>B. animalis</i> CACC789	7.58 ± 0.26	6.29 ± 0.06	82.92	7.58 ± 0.26	6.55 ± 0.06	86.35	7.58 ± 0.26	6.38 ± 0.2	84.16
<i>B. pullorum</i> CACC845	7.22 ± 0.16	6.42 ± 0.15	88.89	7.22 ± 0.16	6.95 ± 0.13	96.31	7.22 ± 0.16	6.47 ± 0.20	89.64
<i>B. pullorum</i> CACC854	7.24 ± 0.11	1.72 ± 0.34	23.7	6.44 ± 0.12	5.62 ± 0.48	87.29	6.44 ± 0.12	2.83 ± 0.20	43.92
<i>B. animalis</i> CACC858	8.05 ± 0.10	7.14 ± 0.06	88.78	8.05 ± 0.10	7.11 ± 0.08	88.33	8.05 ± 0.10	6.68 ± 0.25	83.13
<i>B. pullorum</i> CACC863	7.33 ± 0.09	7.14 ± 0.05	97.4	6.90 ± 0.13	6.87 ± 0.08	99.51	6.90 ± 0.13	6.58 ± 0.04	95.34

- HT-29 cell line을 이용하여 *L. rhamnosus*는 호기적, *Bifidobacterium*은 혐기적으로 장내부착능 테스트를 실시하였고 표준균주 *L. rhamnosus* GG와 비교하였다. *L. rhamnosus* CACC 612는 78.4%를, *B. pullorum* CACC854, 858을 제외한 *Bifidobacterium*균주들은 GG균주

의 81.93%에 비해 비슷한 부착능을 보였다(표 40).

<표 40> 반려묘로부터 분리한 프로바이오틱스 균주의 장부착능

Strains	Log ₁₀ CFU/ml(mean ± S.D)		
	0h	2h	Adherence (%)
<i>L. rhamnosus</i> CACC612	8.75 ± 0.03	6.86 ± 0.05	78.40
<i>B. animalis</i> CACC789	8.06 ± 0.12	6.33 ± 0.25	78.43
<i>B. pullorum</i> CACC845	8.16 ± 0.13	6.44 ± 0.01	78.90
<i>B. pullorum</i> CACC854	7.62 ± 0.07	3.82 ± 0.44	50.11
<i>B. animalis</i> CACC858	7.20 ± 0.17	4.68 ± 0.08	64.90
<i>B. pullorum</i> CACC863	7.84 ± 0.26	6.52 ± 0.10	83.19
<i>L. rhamnosus</i> GG(협기조건)	7.63 ± 0.23	6.25 ± 0.11	81.93

- 유용미생물 탐색을 위해 축산병원균 *Escherichia coli* KCTC 2617, *Salmonella* Derby NCCP 12238, *Salmonella* Enteritidis NCCP 14546, *Salmonella* Typhimurium NCCP 10438, *Clostridioides difficile* JCM 1296^T, *Klebsiella pneumoniae* NCCP 16052, *Pseudomonas aeruginosa* NCCP 16100, *Staphylococcus aureus* NCCP 14560, *Yersinia enterocolitica* NCCP 11129에 대한 항균능을 검사하였다. 반려묘, 된장 유래 유산균 100여종은 MRS액체배지 37°C에서 24-48시간 배양한 후, 0.22µm syringe filter를 이용하여 제균한 배양상등액 80µl를 사용하였으며, 각 병원성균의 적정배지에 병원성균을 도말하고 8mm paper disc 위에 준비된 배양상등액을 접종하여 배양한 후 형성된 clear zone의 지름을 측정하여 항균력을 확인하였다. 반려묘 유래 *L. rhamnosus* CACC 612균주는 *Salmonella* 균에 대한 항균능이 우수하였다(표 41).

<표 41> 반려묘로부터 분리한 프로바이오틱스 균주의 항균력

	<i>E. coli</i> KCTC 2617	<i>S.</i> Derby NCCP 12238	<i>S.</i> Enteriti dis NCCP 14546	<i>S.</i> Typhim urium NCCP 10328	<i>Cl.</i> <i>difficile</i> JCM 1296 ^T	<i>K.</i> <i>pneum</i> <i>oniae</i> NCCP 16052	<i>P.</i> <i>aerugin</i> <i>osa</i> NCCP1 6100	<i>Sta.</i> <i>aureus</i> NCCP1 4560	<i>Y.</i> <i>entero</i> <i>colitica</i> NCCP1 1129
<i>L. rhamnosus</i> CACC 612	+++	+	++	+	+	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> CACC789	-	-	+	++	-	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i> CACC845	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i> CACC854	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> CACC858	-	+	++	-	-	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i> CACC863	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*+, 10-11mm; ++, 11-12mm; +++, >12mm; w, weakly inhibition

- 반려묘로부터 분리한 15종의 미생물에 대한 항생제 내성 테스트 결과, EFSA(The European

Food Safety Authority)에서 권장하는 가축사료에 사용된 제품의 bacterial cut-off values와 비교하여 ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline 항생제에 대하여 기준 내 MIC 농도를 나타냄으로써 분리균주들의 항생제 내성 안전성을 확보하였다(표 42).

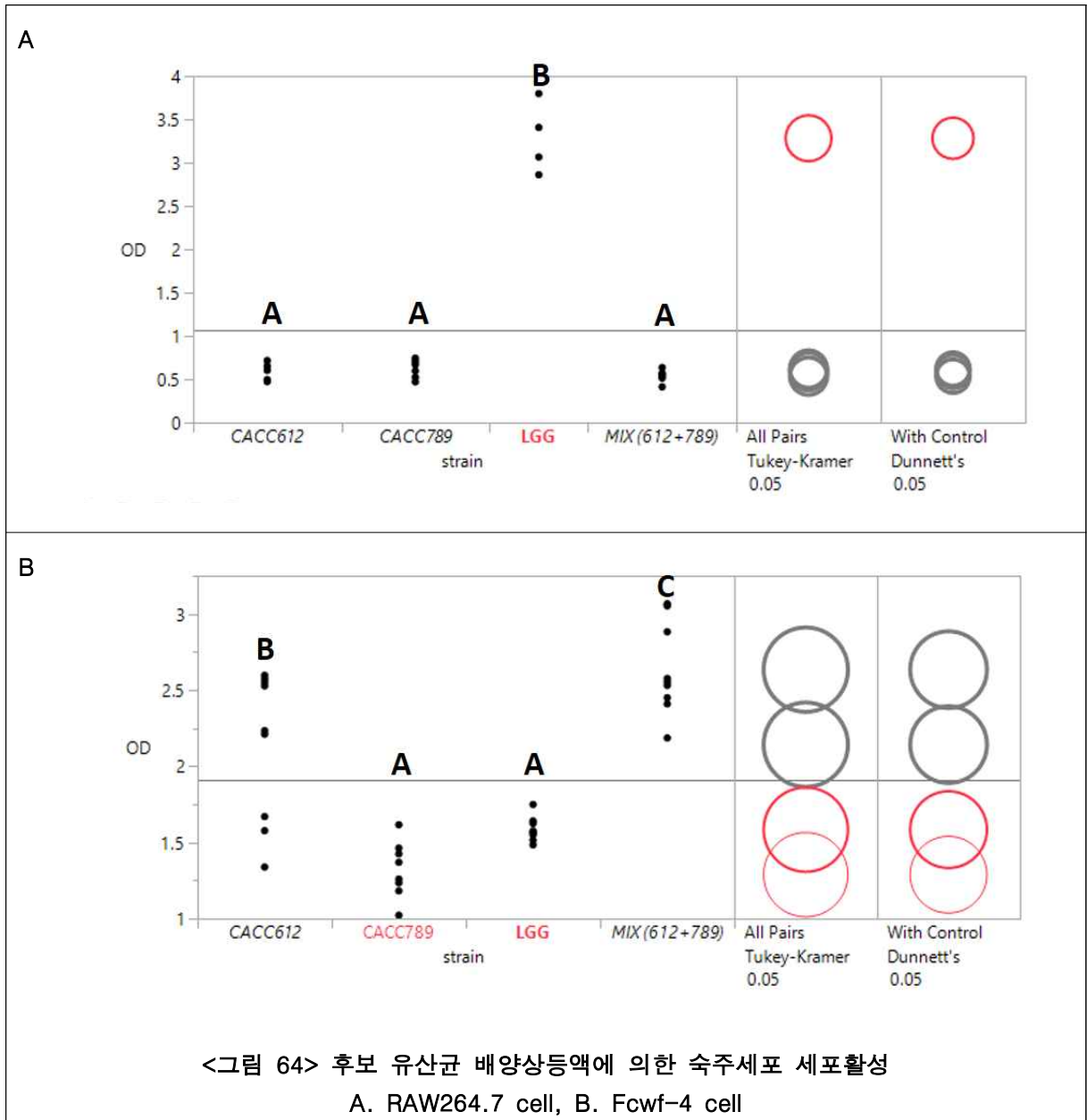
<표 42> 반려묘로부터 분리한 프로바이오틱스 균주의 항생제 내성 결과

		Amoxicillin/Clavulanic acid (XL)	Ampicillin (AM)	Clindamycin (CM)	Gentamicin (GM)	Imipenem (IP)	Kanamycin (KM)	Metronidazole (MZH)	Tetracycline (TC)	Vancomycin (VA)	Erythromycin (EM)	Trim/Sulfa (TS)	Doxycycline (DC)
반려묘	<i>L. rhamnosus</i> CACC 612	3	2	0.094	48	0.38	>256 ^R	>256 ^R	8	>256 ^R	1	>32 ^R	0.125
	<i>B. animalis</i> CACC789	0.125	0.064	<0.016 ^S	192	0.19	>256 ^R	2	8	0.75	0.047	0.003	12
	<i>B. pullorum</i> CACC845	0.19	0.125	0.023	>256	0.38	>256 ^R	3	16	0.75	0.032	0.023	12
	<i>B. pullorum</i> CACC854	0.023	0.016	2	192	0.064	>256 ^R	>256 ^R	1	1	0.064	0.094	0.5
	<i>B. animalis</i> CACC858	0.125	0.125	0.016	128	0.5	>256 ^R	6	12	1	0.047	0.023	8
	<i>B. pullorum</i> CACC863	0.19	0.094	0.016	128	0.5	>256 ^R	6	6	1	0.047	0.016	4
EFS A*	<i>Bifidobacterium</i>	n.r	2	1	64	n.r	n.r	n.r	8	2	1	n.r	n.r
	<i>Pediococcus</i>	n.r	4	1	16	n.r	64	n.r	8	n.r	1	n.r	n.r
	<i>Leuconostoc</i>	n.r	2	1	16	n.r	16	n.r	8	n.r	1	n.r	n.r
	<i>Other Gram+</i>	n.r	1	0.25	4	n.r	16	n.r	2	2	0.5	n.r	n.r
	<i>L. rhamnosus</i>	n.r	4	1	16	n.r	64	n.r	8	n.r	1	n.r	n.r

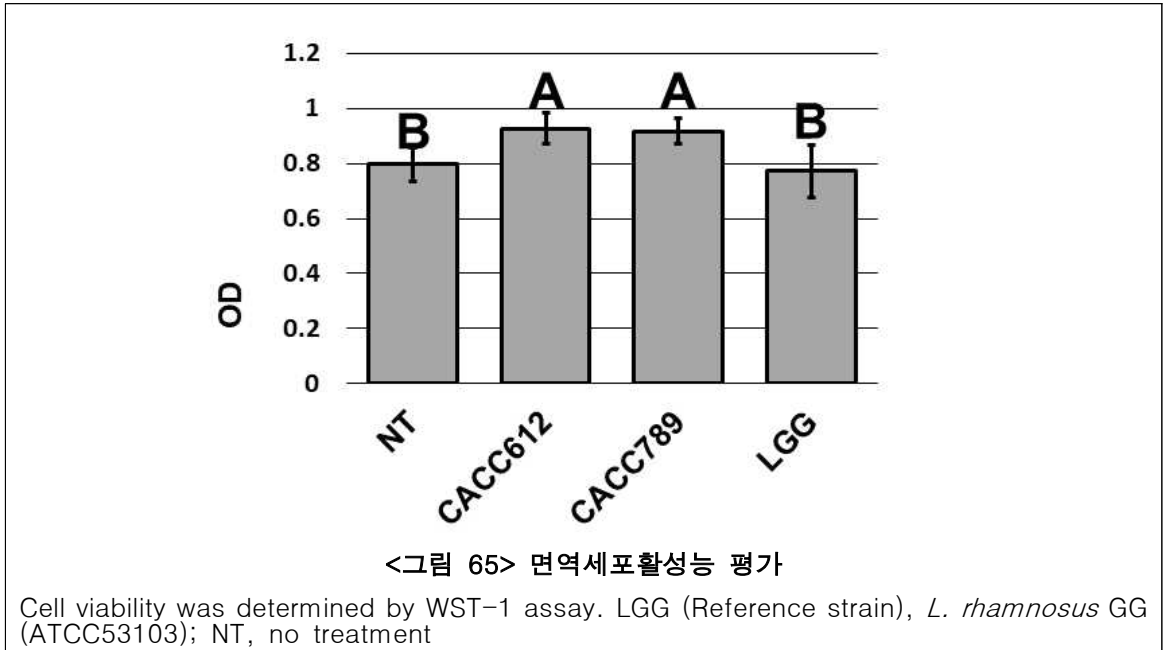
*EFSA, The European Food Safety Authority Guidance on the assessment of bacterial antimicrobial susceptibility

○ 반려묘 유래 *L. rhamnosus* CACC612과 *B. animalis* CACC789의 심화 연구

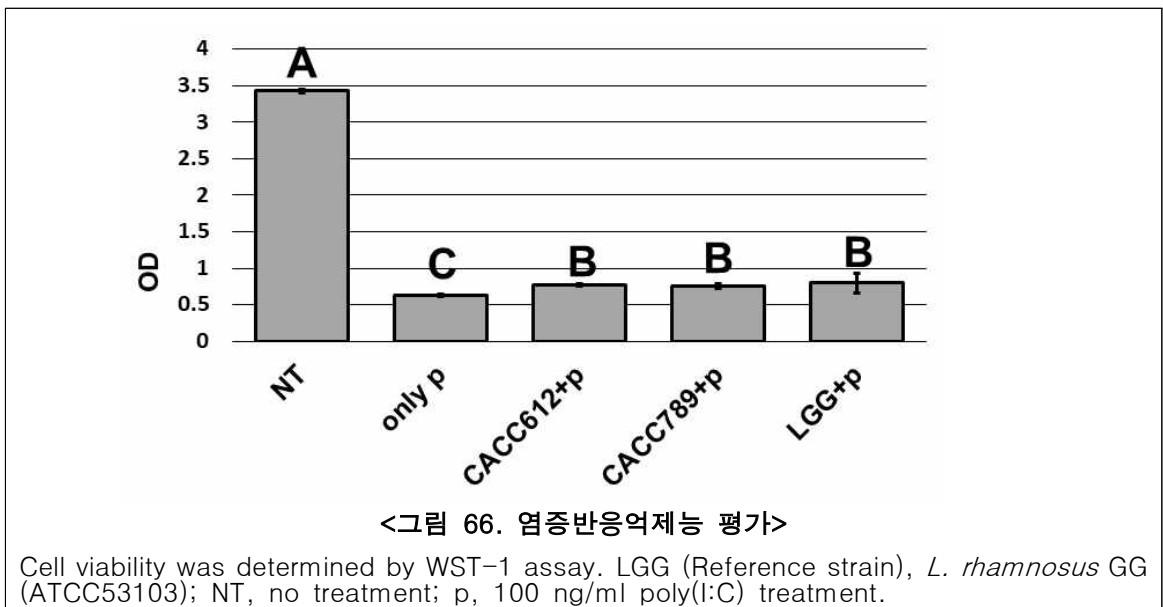
- 숙주세포의 활성을 측정하기 위해, 유산균 배양상등액을 RAW264.7(mouse)세포와 Fcwf-4(feline) 세포에 첨가하고 24시간 배양 후 WST-1 assay를 통해서 세포 활성을 측정하였다. 이때, *L. rhamnosus* GG ATCC53103(LGG)의 배양상등액을 양성대조군으로 하여 *L. rhamnosus* CACC612의 배양상등액, *B. animalis* CACC789의 배양상등액, 그리고 *L. rhamnosus* CACC612과 *B. animalis* CACC789 1:1로 혼합한 배양상등액의 세포 활성 효과를 비교하였을 때 RAW264.7 세포에서는 LGG와 비교하여 낮은 세포 활성을 나타내었으며(그림 64A), Fcwf-4 세포에서는 LGG와 비교하여 CACC612가 높은 세포 활성을 나타내었을 뿐만 아니라 CACC612와 CACC789의 1:1 혼합 상등액에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다(그림 64B).



- 고양이 면역세포주인 Fcwf-4를 이용한 면역세포주 활성 평가 결과 LGG는 대조구에 비하여 유의적인 Fcwf-4 세포 활성효과를 나타내지 않았으나($P < 0.05$), CACC612와 CACC789는 각각 대조구에 비하여 16.31%, 15.23% 면역 세포활성 증진 효과가 있었다($P < 0.05$) (그림 65).

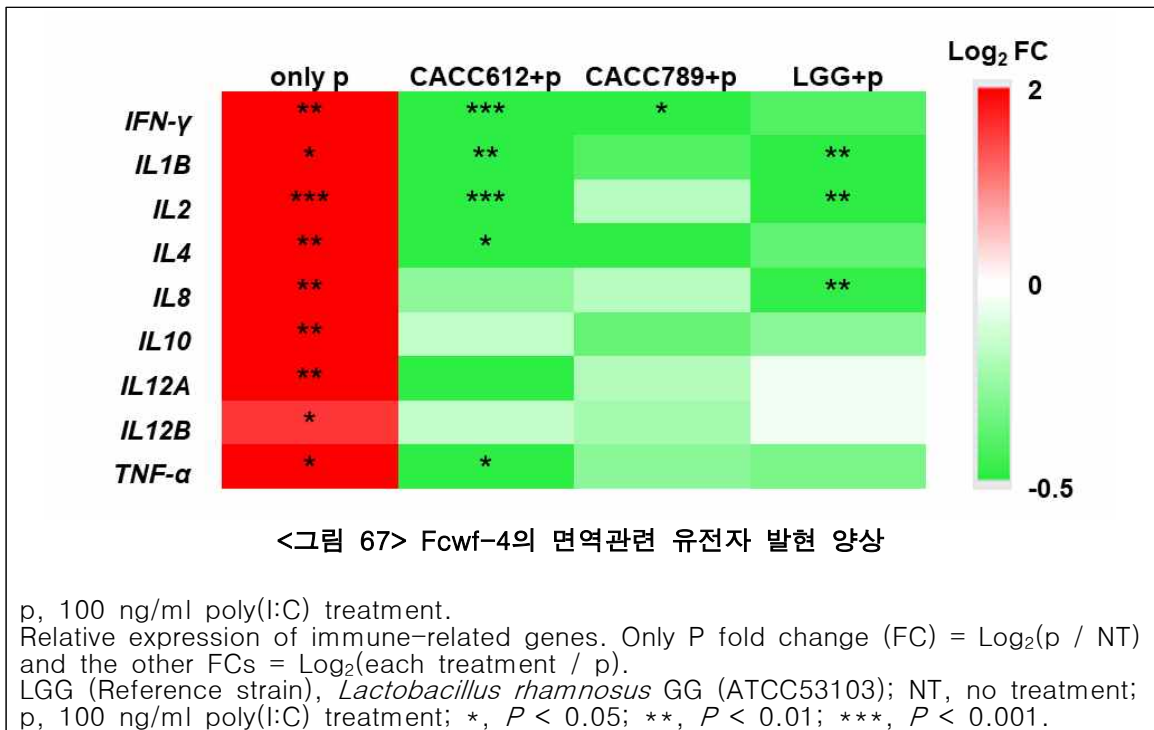


- Fcwf-4에 poly(I:C)를 처리하여 염증반응 유도 후 염증효과 억제능을 평가하였을 때 면역반응을 일으킨 Fcwf-4에 비하여 CACC612, CACC789, LGG 처리 후 해당 세포주의 활성이 유의적으로 증가하였으며($P < 0.05$), LGG와 비교하여 CACC612와 CACC789가 세포활성에 차이를 보이지 않음으로써($P < 0.05$), CACC612와 CACC789가 LGG와 동등한 염증효과 억제능을 가지고 있음을 확인하였다(그림 66).

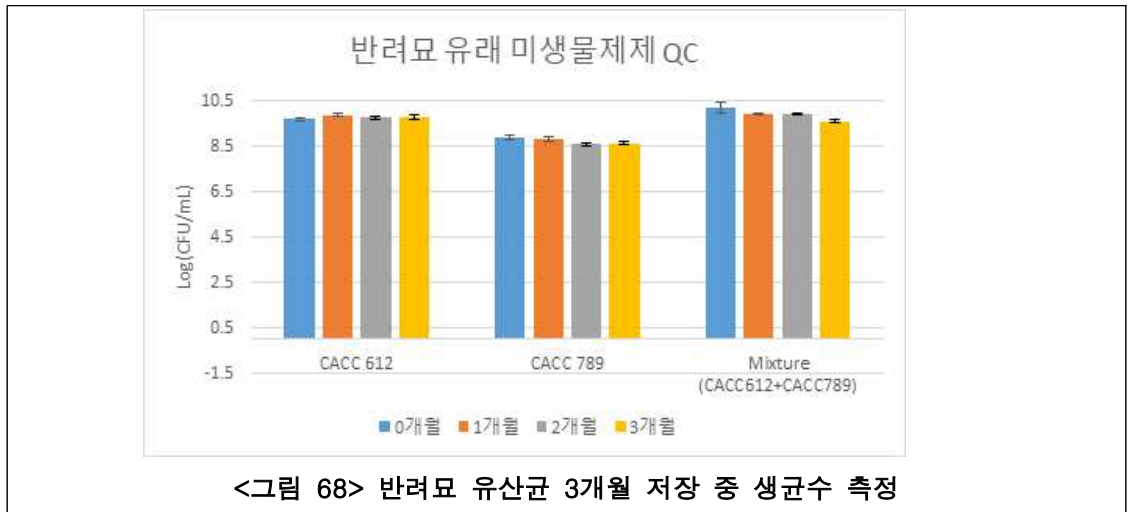


- Fcwf-4 세포에 대한 *IFN-γ*, *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL8*, *IL10*, *IL12A*, *IL12B*, *TNF-α* 등 면역반응 관련 유전자 발현 양상을 QPCR 방법을 이용하여 분석하였을 때 poly(I:C) 처리 후 분석 9종의 면역관련 유전자 모두 유의적으로 증가하였으며($P < 0.05$), poly(I:C)에 의해 증가한 면역관련 유전자들의 발현은 LGG, CACC612, CACC789 처리 후 그 발현이 감소하는 양상을 확인하였다. 특히, CACC612를 처리하였

을 때 *IFN-γ*, *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *TNF-α* 등이 유의적으로 감소하였으며, CACC789를 처리하였을 때 *IFN-γ*가 감소하였고, LGG 처리 후 *IL1B*, *IL2*, *IL8* 등이 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$)(그림 67).



- 반려묘 유래 유산균 3종 미생물제제(CACC612, CACC789, CACC612+789)의 저장 안정성 및 반려견 45일 급여 임상시험을 통한 면역증진 평가를 실시하였다. 가정묘 대상 반려묘 보호자의 동의를 받아 본 시험을 수행하였다.
- 유산균 기능성 검증 실험을 바탕으로 반려묘 유래 유산균 2종, *L. rhamnosus* CACC612와 *B. animalis* subsp. *lactis* CACC789 균주를 대상으로 본 실험을 수행하였다. 미생물은 MRS액체배지 37°C에서 24시간 배양한 후, 원심분리하여 균체만을 수집하여 이미 보고된 미생물제제 보존제로 skim milk 10%, trehalose 15%, glycerin 0.5%, NaCl 1% (한국생물공학회, KSBB journal 2015, 30(3): 109-113)를 첨가하여 동결건조를 실시하였다. 동결건조된 미생물제제는 1포에 0.2g씩 담아 소포장 하였으며(생균수 10^8 CFU/포, 0.2g, 혼합제제의 경우 총균수 기준 1:1 비율로 혼합), 4°C에서 3개월 저장 기간 중 생균수를 측정하여 모든 미생물제제에 대하여 생균수 10^8 CFU/포 이상의 안정성을 확인하였다(그림 68).



- 건강한 반려묘 35마리를 대상으로 플라시보제제(제제 생산시 미생물균주 제외한 보존성분), 양성대조군(기존 시판 제품, 리얼비피더스켓, 제조업체 에스틴), CACC612, CACC789, CACC612+789(총균수 기준 1:1 혼합제제)등 5개 실험군에 각 7마리씩 임상시험을 수행하였다. 시험품은 분말형태로 부형제는 포도당을 혼합하였다. 각 미생물제제는 1일 1회 0.2g씩 (10^8 CFU/g) 45일간 동안 급여하였고, 임상시험묘의 개체별 정보는 다음과 같다(표 43).

<표 43> 반려묘 유산균 급여 임상시험묘 정보

구분	Name	ProbioticType	Breed	Sex	Neutralization	Age
1	까망	CACC789	Korean short hair	male	Yes	8
2	까미	CACC789	Korean short hair	male	Yes	7
3	꽃	CACC612+789	Korean short hair	female	Yes	4
4	늘꾸	CACC789	Korean short hair	female	Yes	5
5	딱지	CACC612	Bengal	female	No	4
6	라디	commercial	Bengal	female	No	4
7	라떼	CACC789	Turkish Angora	male	Yes	8
8	루비	commercial	Bengal	female	No	2
9	메이	commercial	Bengal	male	No	1
10	묘랑	placebo	Bengal	female	No	4
11	묘리	CACC612	Bengal	female	No	4
12	묘아	placebo	Bengal	female	No	4
13	밍키	commercial	Bengal	female	No	1
14	바비	placebo	Bengal	female	No	2
15	빵떡	placebo	Bengal	male	No	3
16	산	CACC612+789	Korean short hair	male	No	4
17	설기	CACC612	Bengal	female	No	1
18	썬더	CACC612	Bengal	male	No	1
19	아리	CACC789	Korean short hair	male	Yes	7
20	아미	CACC789	Korean short hair	female	Yes	7
21	아비	commercial	Abyssinian	male	No	1

22	알콩	commercial	Russian Blue	female	No	1
23	연	CACC612+789	Korean short hair	male	Yes	4
24	온	CACC612+789	Korean Shot Hair	male	Yes	4
25	울버린	CACC612	Persian chinchilla	male	No	1
26	웅	CACC612+789	Persian chinchilla	male	Yes	11
27	윤	CACC612+789	Korean short hair	male	Yes	6
28	제리	CACC612	Devon Rex	male	Yes	2
29	춘식	placebo	Sphynx	male	No	1
30	치즈	CACC789	Korean short hair	female	Yes	7
31	큐리	commercial	Bengal	female	No	3
32	핑코	CACC612	Korean short hair	male	No	1
33	해	CACC612+789	Korean Shot Hair	female	Yes	2
34	호야	placebo	Persian chinchilla	male	No	3

- 임상 전후 전혈검사 및 혈청화학적 검사를 통하여 각 실험군에 대하여 총 52가지 혈액 내 임상 인자들의 수치를 확인하고 데이터베이스화 하였다(표 44, 45,46).

<표 44> 반려묘 유산균 급여 전·후 혈청화학 검사 결과

Name	Owner	Clinical application	Probiotic Type	FDC_NX500									
				Protein-Total (g/dL)	Albumin (g/dL)	Glucose (mg/dL)	ALKP (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Globulin (g/dL)	Albumin/Globulin ratio	BUN:Creatinine ratio
까망	A	before	CACC789	8.4	3.3	124	107	38	17	0.91	5.1	0.6	18.7
까미	A	before	CACC789	8.5	2.9	136	86	54	22.7	1.11	5.6	0.5	20.5
꽃	C	before	CACC612+789	7.8	3.3	191	74	61	26.8	1.68	4.5	0.7	16
늘꾸	A	before	CACC789	9.7	3	126	116	30	24.6	1.05	6.7	0.4	23.4
딱지	B	before	CACC612	9.2	2.7	86	126	82	25.9	0.85	6.5	0.4	30.5
라디	B	before	commercial	8.2	2.8	82	83	54	23.5	1.16	5.4	0.5	20.3
라떼	A	before	CACC789	9.2	3.3	151	112	122	27.3	1.34	5.9	0.6	20.4
루비	B	before	commercial	9.2	2.8	119	87	73	33.3	1.14	6.4	0.4	29.2
메이	B	before	commercial	7.8	3.2	92	223	59	22.1	1.29	4.6	0.7	17.1
묘랑	B	before	placebo	8.2	2.7	171	143	52	20.3	0.92	5.5	0.5	22.1
묘리	B	before	CACC612	7.7	2.8	95	132	65	34.4	1.19	4.9	0.6	28.9
묘아	B	before	placebo	9.5	2.4	115	107	120	20.1	0.77	7.1	0.3	26.1
밍키	B	before	commercial	6.9	2.3	89	214	73	33.2	0.81	4.6	0.5	41
바비	B	before	placebo	7.9	2.5	112	93	74	32.7	1.23	5.4	0.5	26.6
빵떡	B	before	placebo	10.4	3.2	92	149	82	23.7	0.83	7.2	0.4	28.6
산	C	before	CACC612+789	7.4	3.1	157	117	68	21.9	1.16	4.3	0.7	18.9
설기	B	before	CACC612	7.2	2.4	68	140	69	25.4	0.77	4.8	0.5	33
썬더	B	before	CACC612	8.2	3.2	90	123	63	22.8	0.77	5	0.6	29.6
아리	A	before	CACC789	9.1	3.3	122	106	30	22.2	1.2	5.8	0.6	18.5
아미	A	before	CACC789	8.4	3.3	113	221	39	19.9	1	5.1	0.6	19.9
아비	B	before	commercial	8.1	2.6	89	224	52	21.2	0.83	5.5	0.5	25.5
알콩	B	before	commercial	7.8	2.6	122	263	50	41.5	0.69	5.2	0.5	60.1
연	C	before	CACC612+789	7.5	3.1	110	74	104	26	1.81	4.4	0.7	14.4
온	C	before	CACC612+789	7.3	3.2	122	126	61	21.5	1.25	4.1	0.8	17.2
올버린	B	before	CACC612	7	2.2	96	215	46	30.9	0.67	4.8	0.5	46.1

응	D	before	CACC612+789	7.1	3	107	112	53	21.7	1.31	4.1	0.7	16.6
윤	C	before	CACC612+789	7.4	3	174	59	46	18.4	1.28	4.4	0.7	14.4
제리	B	before	CACC612	8.2	3.3	94	161	89	31.7	0.73	4.9	0.7	43.4
춘식	B	before	placebo	6.2	2.7	107	292	52	19.6	0.5	3.5	0.8	39.2
치즈	A	before	CACC789	8.2	2.6	118	112	46	22.8	0.99	5.6	0.5	23
큐리	B	before	commercial	7.5	2.7	104	113	41	18.5	1.05	4.8	0.6	17.6
핑코	B	before	CACC612	7.9	2.9	91	149	36	22	0.95	5	0.6	23.2
해	C	before	CACC612+789	7	3.1	102	71	49	23.4	1.77	3.9	0.8	13.2
호야	B	before	placebo	9.7	2.8	97	75	46	17	1.11	6.9	0.4	15.3
까망	A	after	CACC789	7.8	2.6	114	82	31	20.7	1.03	5.2	0.5	20.1
까미	A	after	CACC789	8.5	3.2	139	76	48	26	1.25	5.3	0.6	20.8
꽃	C	after	CACC612+789	7.6	3.3	211	83	81	30	1.84	4.3	0.8	16.3
늘꾸	A	after	CACC789	9.6	3	148	107	32	25.6	1.32	6.6	0.5	19.4
딱지	B	after	CACC612	8.5	2.7	105	110	78	28.1	1.12	5.8	0.5	25.1
라디	B	after	commercial	8.2	3.1	101	115	41	23.1	1	5.1	0.6	23.1
라떼	A	after	CACC789	9	3.1	120	106	96	26.3	1.44	5.9	0.5	18.3
루비	B	after	commercial	9.1	2.9	83	97	73	32.8	1.32	6.2	0.5	24.8
메이	B	after	commercial	7.9	3.2	92	208	61	22.2	1.31	4.7	0.7	16.9
묘랑	B	after	placebo	10.5	2.9	116	94	69	25.3	1.1	7.6	0.4	23
묘리	B	after	CACC612	7.7	2.8	97	117	32	31.4	1.14	4.9	0.6	27.5
묘아	B	after	placebo	8.9	2.7	114	120	106	24.4	1.03	6.2	0.4	23.7
밍키	B	after	commercial	7.4	2.8	214	285	73	28.3	1.5	4.6	0.6	18.9
바비	B	after	placebo	9.9	2.9	100	84	81	24.3	1.28	7	0.4	19
빵떡	B	after	placebo	9	2.8	85	131	90	21.3	1.03	6.2	0.5	20.7
산	C	after	CACC612+789	7.4	3.3	129	140	59	27.7	1.36	4.1	0.8	20.4
설기	B	after	CACC612	6.7	2.4	91	179	103	22.8	0.94	4.3	0.6	24.3
썬더	B	after	CACC612	8	3.2	104	187	72	20.9	0.93	4.8	0.7	22.5
아리	A	after	CACC789	8.6	3.4	159	112	208	17.2	0.79	5.2	0.7	21.8
아미	A	after	CACC789	8	3.2	150	208	46	14.4	0.65	4.8	0.7	22.2
아버	B	after	commercial	8.5	2.7	87	215	46	23	1.02	5.8	0.5	22.5

알콩	B	after	commercial	8.2	3	140	379	61	30.9	0.94	5.2	0.6	32.9
연	C	after	CACC612+789	7.4	3.2	104	70	88	28.6	2.03	4.2	0.8	14.1
은	C	after	CACC612+789	7.1	3	115	149	59	23.9	1.56	4.1	0.7	15.3
올버린	B	after	CACC612	7.5	2.5	95	373	73	19.6	0.67	5	0.5	29.3
응	D	after	CACC612+789	7.2	3	108	101	47	19.6	1.33	4.2	0.7	14.7
윤	C	after	CACC612+789	6.9	3	166	73	49	23	1.41	3.9	0.8	16.3
제리	B	after	CACC612	7.9	3	85	166	85	25.7	1.07	4.9	0.6	24
춘식	B	after	placebo	7.3	2.9	93	241	49	24	0.68	4.4	0.7	35.3
치즈	A	after	CACC789	9.3	3	124	106	35	26.8	1.17	6.3	0.5	22.9
큐리	B	after	commercial	9.4	2.9	99	102	45	24.8	1.22	6.5	0.4	20.3
핑코	B	after	CACC612	7.9	3.3	93	165	54	29.2	1.19	4.6	0.7	24.5
해	C	after	CACC612+789	7.2	3.3	108	86	44	26.3	1.83	3.9	0.8	14.4
호야	B	after	placebo	9.2	3	133	103	61	24.7	1.37	6.2	0.5	18

<표 45> 반려묘 유산균 급여 전·후 전해질 검사 결과

Name	Owner	ClinicalApp lication	ProbioticType	pH	PCO 2 (mm Hg)	PO2 (mm Hg)	Hct (%)	Na+ (mm ol/L)	K+ (mm ol/L)	Cl- (mm ol/L)	Ca+ + (mm ol/L)	Mg+ + (mm ol/L)	Lact ate (mm ol/L)	TCO 2 (mm ol/L)	nCa	nMg	AnG ap(k +) (mm ol/L)	Ca+ +M g++	SO2 (%)	Hbc (g/d L)	BE- ecf (mm ol/L)	BE- b	SBC	HCO 3 (mm ol/L)	A
까망	A	before	CACC789	7.406	31.2	41.7	41	156.3	4.48	119.7	1.33	0.54	2.1	20.8	1.34	0.55	21.2	2.5	78.2	13.8	-5.1	-3.2	21.3	19.8	109.6
까미	A	before	CACC789	7.386	36.6	128.1	41	150.3	3.65	116.4	1.35	0.48	1.8	23.3	1.34	0.47	15.3	2.8	98.9	13.6	-3.1	-1.8	22.9	22.2	103.5
꽃	C	before	CACC612+789	7.354	34.1	50.6	44	152.9	3.49	115.9	1.39	0.51	4	20.2	1.36	0.49	21.3	2.7	84.2	14.5	-6.6	-4.9	20.1	19.2	107
늘꾸	A	before	CACC789	7.359	34.1	65.2	39	153.6	3.84	119.4	1.38	0.53	3.3	20.5	1.35	0.52	18.6	2.6	91.9	12.8	-6.3	-4.6	20.5	19.4	106.4
딱지	B	before	CACC612	7.293	40.1	53.5	39	153.5	3.85	118.4	1.38	0.51	2.3	20.8	1.3	0.47	19.4	2.7	83.6	13	-7.2	-5.9	19.3	19.6	98.5
라디	B	before	commercial	7.386	36	45.1	38	153.4	3.94	118	1.33	0.5	1.3	22.9	1.32	0.5	17.5	2.7	80.5	12.7	-3.5	-2.1	22.3	21.8	103.5
라떼	A	before	CACC789	7.279	49.8	51.6	45	158.5	4.49	119.9	1.36	0.49	5.2	25.1	1.27	0.45	19.6	2.8	81	15	-3.4	-3.1	21.4	23.6	87.4
루비	B	before	commercial	7.252	41	70.8	42	154.9	4.52	118.4	1.36	0.54	6	19.5	1.26	0.49	22.8	2.5	91.1	14	-9.2	-8	17.9	18.2	97.3
메이	B	before	commercial	7.392	34.3	96.6		155.8	5.12	120.7	1.37	0.58	4.6	22.1	1.37	0.58	19.2	2.4	97.5		-4.1	-2.5	22.3	21	105.6
료랑	B	before	placebo	7.321	40.1	40.5	31	154	4.7	121.3	1.36	0.49	2	22.1	1.3	0.47	16.5	2.8	71.5	10.5	-5.4	-4.2	20.5	20.9	98.6
료리	B	before	CACC612	7.304	38.4	49.6	40	156.5	3.94	121.3	1.39	0.55	4.4	20.5	1.32	0.51	19.9	2.6	81.1	13.3	-7.3	-5.9	19.3	19.3	100.7

묘아	B	before	placebo	7.316	36.2	71.6	37	153	3.59	122.5	1.33	0.5	1.8	19.8	1.27	0.47	15.4	2.7	92.9	12.3	-7.7	-6.2	19.3	18.7	103.1
밍키	B	before	commercial	7.248	41.6	35	43	155	4.77	121.9	1.38	0.51	4.8	19.6	1.27	0.46	19.5	2.7	57.8	14.3	-9.1	-8	17.3	18.3	96.6
바비	B	before	placebo	7.23	47.5	83.6	41	154.3	4.26	119.3	1.42	0.49	3.8	21.6	1.3	0.43	19.2	2.9	93.9	13.5	-7.7	-6.9	18.8	20.1	89.6
빵떡	B	before	placebo	7.336	42.8	38.3	45	156.4	4.33	119.8	1.3	0.44	2.5	24.4	1.26	0.42	17.8	3	68.7	14.9	-3	-2.2	21.9	23.1	95.3
산	C	before	CACC612+789	7.418	25.9	55	49	153.4	3.66	120.6	1.32	0.46	6.2	17.7	1.33	0.46	19.6	2.9	89.5	16.2	-7.8	-5.1	20.1	16.9	116.9
설기	B	before	CACC612	7.218	51.9	65.7	37	154.4	4.16	118.9	1.38	0.52	3.5	22.9	1.25	0.46	18.4	2.6	87.8	12.4	-6.6	-6	19.3	21.3	84.3
썬더	B	before	CACC612	7.316	42.9	52.8	49	155.2	3.59	117.7	1.36	0.5	2.4	23.4	1.3	0.47	19	2.7	83.9	16.4	-4.2	-3.5	21.2	22.1	95.1
아리	A	before	CACC789	7.313	41.4	140.2	40	157.4	3.68	118.3	1.39	0.53	5	22.5	1.33	0.5	21.6	2.6	98.9	13.4	-5.2	-4.2	21	21.2	97.7
아미	A	before	CACC789	7.297	44.4	39.3	48	158.1	4.34	118	1.3	0.47	6.3	23.3	1.23	0.44	22.6	2.8	68	15.8	-4.8	-4.1	20.4	21.9	93.8
아비	B	before	commercial	7.359	37.5	43.3	36	152.6	4.87	118.9	1.4	0.49	0.8	22.5	1.37	0.48	17.2	2.9	77.3	11.8	-4.3	-3.1	21.5	21.3	101.8
알콩	B	before	commercial	7.256	44.7	51.2	36	155	4.53	117.1	1.46	0.51	5.3	21.4	1.35	0.47	22.4	2.8	80	12	-7.3	-6.3	19	20	93.2
연	C	before	CACC612+789	7.4	28.8	53.5	40	153.2	3.86	120.3	1.43	0.49	2.6	18.9	1.43	0.49	18.7	2.9	87.9	13.2	-7	-4.9	20.2	18	113.4
온	C	before	CACC612+789	7.379	31.7	65.5	46	154.3	4.02	120.9	1.35	0.48	1.8	19.9	1.34	0.47	18.6	2.8	92.4	15.4	-6.5	-4.5	20.6	18.9	110.1
올버린	B	before	CACC612	7.371	32.1	51.4	33	147.9	4.51	116.9	1.39	0.47	1.2	19.7	1.37	0.46	16.7	2.9	85.5	11	-6.7	-5	20.1	18.8	108.3
응	D	before	CACC612+789	7.325	36.2	49	39	151.9	3.77	119.7	1.35	0.54	0.9	20.2	1.3	0.51	16.8	2.5	81.6	12.8	-7.2	-5.7	19.5	19.1	103.2
윤	C	before	CACC612+789	7.428	28	67.1	42	152.4	3.88	118	1.36	0.49	1.5	19.5	1.38	0.5	19.6	2.8	93.9	13.9	-5.9	-3.7	21.3	18.6	114.4
제리	B	before	CACC612	7.35	36.7	35	40	152.4	4.32	116.2	1.38	0.48	1.1	21.6	1.34	0.46	20	2.9	64.7	13.4	-5.3	-4	20.5	20.5	102.7
춘식	B	before	placebo	7.357	35.4	43	31	149.2	5.18	116.4	1.41	0.48	1.6	21.1	1.38	0.46	17.9	3	77.1	10.5	-5.6	-4.2	20.6	20.1	104.3
치즈	A	before	CACC789	7.377	38.5	43.8	42	152.7	4.07	117.8	1.31	0.47	3	24	1.29	0.47	16.2	2.8	78.6	13.9	-2.6	-1.5	22.7	22.8	100.9
큐리	B	before	commercial	7.318	35.9	46.5	42	153.8	4.09	121	1.36	0.55	2.4	19.7	1.3	0.52	18.3	2.5	78.9	14	-7.7	-6.2	19	18.6	103.8
핑코	B	before	CACC612	7.31	36.2	65	40	154.3	4.16	118.8	1.44	0.54	2.2	19.5	1.37	0.51	21.2	2.7	90.6	13.3	-8.1	-6.5	19	18.4	103.2
해	C	before	CACC612+789	7.426	28.9	46.9	37	152.3	4.07	119	1.39	0.47	1.1	20.1	1.41	0.48	18.2	3	84.3	12.4	-5.4	-3.5	21.3	19.2	113.5
호야	B	before	placebo	7.324	37.5	47	46	154.2	4.16	121.9	1.32	0.43	2.8	20.9	1.27	0.41	16.7	3.1	79.6	15.2	-6.5	-5.1	19.8	19.7	101.7
까망	A	after	CACC789	7.432	32.6	192	35	155.2	3.61	119.9	1.32	0.52	1.3	22.9	1.34	0.54	17	2.5	99.7	11.5	-2.6	-1.1	23.5	21.9	108.5
까미	A	after	CACC789	7.364	38.2	145.1	40	153.7	3.7	116.5	1.34	0.53	2.1	23.2	1.31	0.51	18.8	2.5	99.2	13.3	-3.6	-2.4	22.4	22	101.7
꽃	C	after	CACC612+789	7.353	38.8	40.1	44	149.9	3.46	118.8	1.42	0.45	3.4	23	1.39	0.44	12.7	3.1	72.8	14.8	-4	-2.8	21.5	21.8	100.2
늘꾸	A	after	CACC789	7.434	33	60.8	36	154.4	4.06	115.9	1.31	0.57	3	23.3	1.34	0.59	20.2	2.3	92	11.9	-2.1	-0.7	23.7	22.3	108.7
막지	B	after	CACC612	7.362	34.9	57.9	38	153.9	4.04	121.8	1.37	0.48	2	21.1	1.34	0.46	16.1	2.9	88.9	12.5	-5.6	-4.1	20.8	20	105.2

라디	B	after	commercial	7.348	42.7	47.6	36	153.9	4.14	117.6	1.4	0.49	3.4	25	1.36	0.47	16.8	2.9	80.8	12	-2.2	-1.4	22.9	23.6	95.6
라떼	A	after	CACC789	7.374	42	38	39	154.4	4.5	119.2	1.36	0.49	2.1	26	1.34	0.48	14.9	2.8	70.5	12.8	-0.7	0	23.9	24.7	97.9
루비	B	after	commercial	7.333	44.8	35.8	41	155.6	4.52	118.2	1.28	0.46	4.8	25.4	1.23	0.44	17.9	2.8	64.3	13.5	-2.1	-1.5	22.5	24	93.4
메이	B	after	commercial	7.38	38.2	35.4	46	152.6	3.97	119.4	1.3	0.41	2.1	24	1.29	0.41	14.4	3.1	67	15.2	-2.5	-1.4	22.5	22.8	101.2
묘랑	B	after	placebo	7.337	38.1	95.1	39	153	4.39	118.6	1.28	0.47	3.8	21.8	1.24	0.45	18.2	2.7	96.9	13.1	-5.4	-4.1	21	20.6	101.1
묘리	B	after	CACC612	7.28	44.5	32.7	40	158.4	4.8	121.7	1.36	0.54	4.8	22.5	1.27	0.5	20.4	2.5	55.1	13.5	-5.8	-5	19.5	21.1	93.6
묘아	B	after	placebo	7.327	39.1	31.5	43	153.7	4.16	121.4	1.25	0.44	3.2	21.9	1.2	0.42	15.8	2.9	56.2	14.3	-5.5	-4.3	20	20.7	100.2
밍키	B	after	commercial	7.161	48.8	50.4	35	156.3	5.53	121.2	1.41	0.53	9.7	19.1	1.24	0.46	23	2.6	74.4	11.7	-11.3	-10.3	15.9	17.6	88.4
바비	B	after	placebo	7.328	39.7	45.4	40	154.6	4.51	120	1.39	0.45	3.2	22.2	1.33	0.43	18.1	3.1	77.9	13.4	-5.2	-4	20.7	21	99.4
빵떡	B	after	placebo	7.392	35.9	38.6	39	151	3.85	117.8	1.29	0.43	1.7	23.1	1.28	0.42	15	3	73	13	-3.1	-1.8	22.4	22	103.8
산	C	after	CACC612+789	7.45	29.2	45.9	48	151.9	3.7	120.6	1.34	0.39	3	21.3	1.37	0.41	14.5	3.4	84.4	16	-3.7	-1.6	22.7	20.4	111.8
설기	B	after	CACC612	7.372	33.2	53.2	34	151.3	4.38	119.2	1.34	0.49	1.3	20.5	1.32	0.48	17	2.7	86.6	11.3	-6	-4.4	20.6	19.4	107.1
썬더	B	after	CACC612	7.331	39.2	51.7	48	150.5	4.21	118.8	1.27	0.41	4.5	22.1	1.22	0.39	15.1	3.1	83.8	16.1	-5.2	-4.1	20.7	20.9	100
아리	A	after	CACC789	7.358	36.8	49.4	36	155.9	4.18	116.4	1.4	0.53	4.5	22	1.37	0.52	22.8	2.6	83.2	11.9	-4.8	-3.5	21.2	20.9	104.2
아미	A	after	CACC789	7.365	34.8	54.4	43	153.5	4.36	117.1	1.29	0.54	3.9	21.1	1.27	0.53	20.8	2.4	87.1	14.4	-5.5	-4	20.9	20	106.6
아비	B	after	commercial	7.391	35.1	44.5	41	152.9	4.31	120.1	1.35	0.42	0.8	22.6	1.34	0.42	15.6	3.2	80.2	13.6	-3.6	-2.2	22.2	21.5	104.8
알콩	B	after	commercial	7.332	37.9	53.6	41	153.4	3.69	117	1.35	0.43	6.3	21.4	1.3	0.41	19.8	3.1	85.3	13.7	-5.9	-4.5	20.4	20.2	101.6
연	C	after	CACC612+789	7.407	31.2	50.3	42	153.8	3.81	121.1	1.47	0.47	1	20.8	1.48	0.47	16.6	3.2	86.1	13.9	-5	-3.2	21.5	19.9	109.5
온	C	after	CACC612+789	7.462	26.2	75.5	46	151.6	3.56	121.4	1.3	0.43	0.5	19.7	1.35	0.45	14.8	3	96.1	15.4	-5.1	-2.5	22.3	18.9	115.5
올버린	B	after	CACC612	7.389	37	98.8	33	149.6	4.62	116	1.41	0.44	1.2	23.7	1.4	0.44	15.7	3.2	97.6	11.2	-2.6	-1.4	23.2	22.6	102.7
웅	D	after	CACC612+789	7.357	34.8	50.8	39	152.1	3.57	122.7	1.34	0.55	1	20.8	1.31	0.53	13.2	2.5	84.4	13.1	-6	-4.4	20.5	19.7	106.1
윤	C	after	CACC612+789	7.426	31.6	55.6	40	151.1	3.71	119.3	1.38	0.43	1.1	21.9	1.4	0.44	14.5	3.2	89.7	13.2	-3.6	-1.9	22.6	21	108.8
제리	B	after	CACC612	7.393	36.4	38	42	151.9	4.04	117.3	1.33	0.46	1.8	23.5	1.33	0.46	16.2	2.9	72.1	14	-2.7	-1.5	22.6	22.4	103.4
춘식	B	after	placebo	7.362	38.4	53.2	38	151	4.62	116.1	1.36	0.45	1.8	23.2	1.33	0.43	17.5	3	86	12.5	-3.6	-2.5	22.1	22	101.1
치즈	A	after	CACC789	7.252	49.7	74.5	43	156.2	4.35	118.2	1.35	0.53	5.4	23.6	1.24	0.48	20.2	2.6	92	14.3	-5.3	-4.9	20.3	22.1	87.8
큐리	B	after	commercial	7.419	34.6	29.3	40	151.5	4.13	118.1	1.31	0.46	2.1	23.6	1.33	0.47	15	2.8	57.7	13.4	-2.1	-0.7	22.9	22.6	105.5
핑코	B	after	CACC612	7.362	39.4	38.3	46	149.2	4.44	115.8	1.33	0.42	2	23.8	1.31	0.41	15.3	3.2	70.6	15.3	-3.1	-2	22.1	22.6	99.9
해	C	after	CACC612+789	7.401	33.6	42.6	41	152.4	4	119.4	1.59	0.48	1.7	22	1.59	0.48	16	3.3	78.8	13.5	-4	-2.4	22	21	106.5
호야	B	after	placebo	7.422	29.4	50.4	48	152.2	3.9	120.4	1.26	0.38	4.2	20.2	1.27	0.39	16.4	3.3	86.7	16	-5.3	-3.1	21.6	19.3	111.7

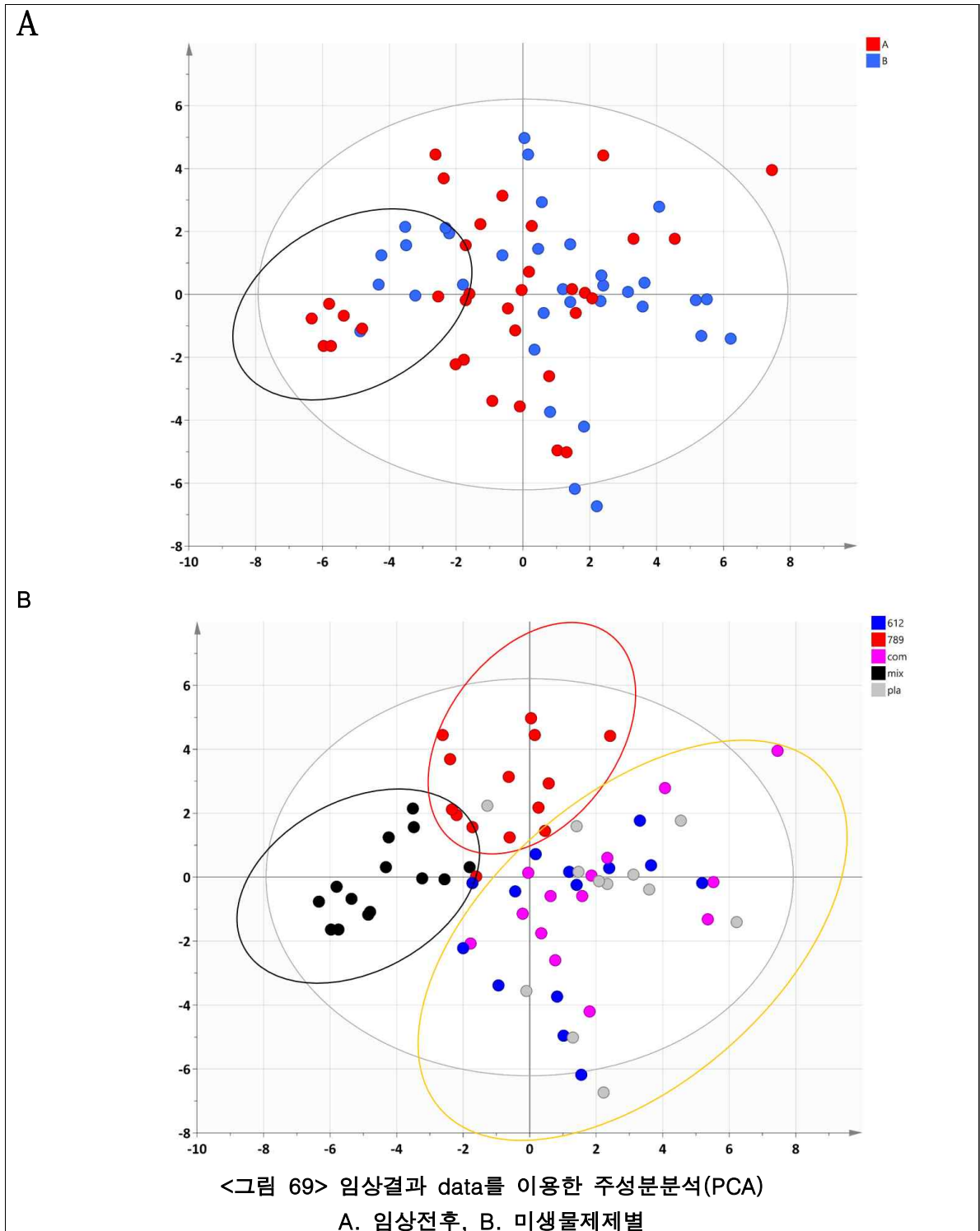
<표 46> 반려묘 유산균 급여 전·후 전혈 검사 결과

Name	Owner	Clinical Application	Probiotic Type	WBC (10x9/L)	RBC (10x12/L)	Hemoglobin [Hb] (g/dL)	Hematocrit [Hct] (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)	Platelet (10x9/L)	MPV (fL)	PCT (%)	PDW-CV (%)	WBC-Lymph (%)	WBC-Mono (%)	WBC-Gran (%)	WBC-Eos (%)	WBC-Lymph (#) (10x9/L)	WBC-Mono (#) (10x9/L)	WBC-Gran (#) (10x9/L)	WBC-Eos (#) (10x9/L)
까망	A	before	CACC 789	6.1	9.99	14.3	43.4	43.5	14.4	33.1	14.5	24	11.2	0.026	5.2	23	1.9	75.1	21	1.4	0.1	4.6	1.3
까미	A	before	CACC 789	17.3	7.59	13	39.7	52.3	17.1	32.7	13.4	126	10.6	0.133	17.8	11.5	1	87.5	7.9	2	0.2	15.1	1.4
꽃	C	before	CACC 612+789	6.3	9.53	15.2	46.2	48.5	16	32.9	14.3	268	9.9	0.265	20.5	35.2	2.2	62.6	9.7	2.2	0.1	4	0.6
늘꾸	A	before	CACC 789	17.4	6.62	12.6	36.9	55.7	19	34.1	13.8	388	11.8	0.457	18.4	8.6	1.1	90.3	7.9	1.5	0.2	15.7	1.4
딱지	B	before	CAC C612	11.3	11.58	14.5	49.4	42.7	12.5	29.2	15.7	190	10.9	0.207	10.4	17.4	1.9	80.7	3.7	2	0.2	9.1	0.4
라디	B	before	commercial	10.6	8.61	11.2	37.1	43.1	13	30.3	17.1	463	8.9	0.414	18.6	9.9	2.3	87.8	2.9	1	0.2	9.4	0.3
라떼	A	before	CACC 789	16.6	8.76	14.1	42.7	48.7	16.1	33	14.3	57	9.4	0.053	18.2	37.6	2.2	60.2	10.1	6.2	0.4	10	1.7
루비	B	before	commercial	15.4	10.47	14.4	47.4	45.3	13.7	30.3	15.2	503	9.8	0.491	20.8	15.8	1.9	82.3	3.8	2.4	0.3	12.7	0.6
메이	B	before	commercial	18.8	12.45	14	48.4	38.9	11.2	28.9	15.1	366	9.6	0.353	14.5	25	2.2	72.8	7.7	4.7	0.4	13.7	1.4
료랑	B	before	placebo	55.6	5.86	8.3	28.4	48.5	14.2	29.3	15.6	220	10.1	0.222	16.3	15	2.4	82.6	6.4	8.3	1.3	46	3.6
료리	B	before	CACC 612	26.3	8.31	11	36	43.4	13.2	30.6	15.5	403	10.2	0.412	15.8	15.8	2.2	82	6.3	4.2	0.6	21.5	1.7
료아	B	before	placebo	21.9	9.42	11.9	39.8	42.3	12.6	29.8	15.8	423	9.8	0.415	20.1	13.7	2.8	83.5	3.4	3	0.6	18.3	0.7
밍키	B	before	commercial	23.8	9	11.8	40.7	45.2	13.1	29.1	15.8	350	10.2	0.359	16.9	13.6	1.5	84.9	4.8	3.2	0.3	20.3	1.1
바비	B	before	placebo	14.9	12.78	15.9	53.3	41.7	12.4	29.8	16.2	229	9.7	0.222	11.3	17.1	2.1	80.8	3.3	2.6	0.3	12	0.5
빵떡	B	before	placebo	13.9	9.62	11.7	39.5	41	12.2	29.7	15.1	545	9.3	0.508	20.8	6.4	1.8	91.8	3.9	0.9	0.3	12.7	0.5
산	C	before	CACC 612+789	9.4	10.9	17.2	52.7	48.4	15.8	32.6	14.2	239	10.2	0.244	19.9	24.8	1.9	73.3	8.4	2.3	0.2	6.9	0.8
설기	B	before	CACC 612	23.6	11.03	13.1	45	40.8	11.8	29	15.8	220	10.2	0.224	10.2	13	1.2	85.8	4	3.1	0.3	20.2	1
썬더	B	before	CACC 612	21.3	11.21	14.3	46.9	41.9	12.8	30.5	16	302	9.9	0.298	16.7	16.6	1.7	81.7	5.2	3.5	0.4	17.4	1.1
아리	A	before	CACC 789	15.7	9.58	15	45.9	47.9	15.7	32.7	14	321	11.6	0.371	18.5	10.2	0.8	89	4.8	1.6	0.1	14	0.8
아미	A	before	CACC 789	11.5	8.88	13.7	41.9	47.1	15.4	32.7	14	105	11.2	0.117	13.4	15.9	1.8	82.3	6.5	1.8	0.2	9.5	0.8

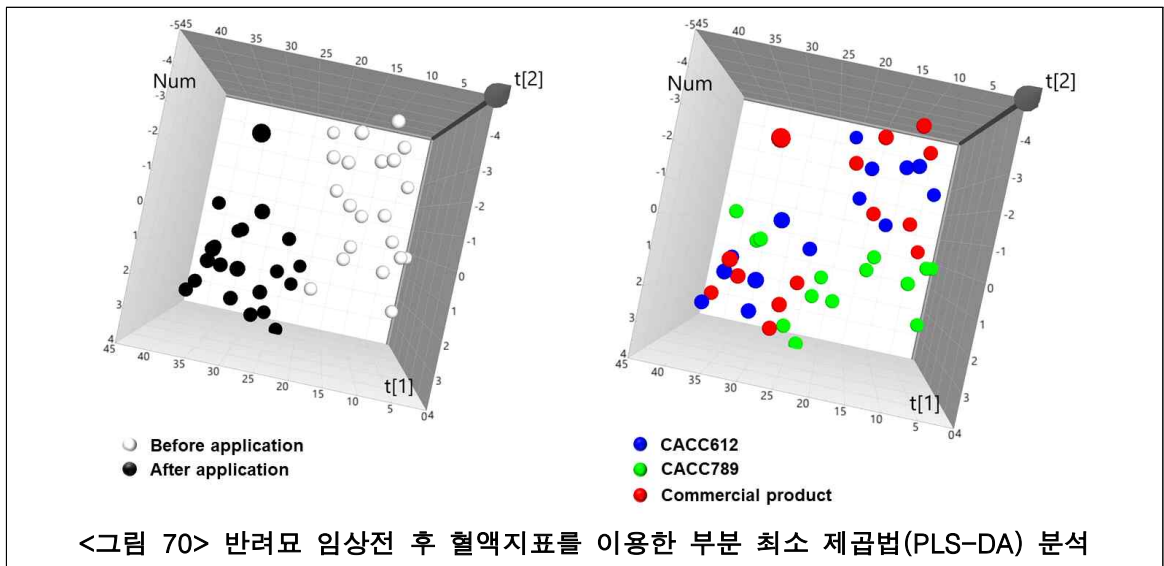
아비	B	before	commercial	14	7.57	9.9	33.2	43.9	13.1	29.9	15.7	677	9.4	0.638	18.1	34.4	1.9	63.7	7.2	4.8	0.3	8.9	1
알콩	B	before	commercial	14.8	7.05	10.5	33.5	47.5	14.9	31.3	16.1	638	9.3	0.591	19.2	19.3	1.9	78.8	12.8	2.9	0.3	11.6	1.9
연	C	before	CACC 612+789	7.3	9.82	13.8	42.9	43.7	14	32.1	14.7	206	10.3	0.211	15.7	25.7	1.8	72.5	9.7	1.9	0.1	5.3	0.7
은	C	before	CACC 612+789	3.3	10.23	16.5	50.1	49	16.1	32.9	14.6	221	9.6	0.213	19.6	40.1	2	57.9	6.5	1.3	0.1	1.9	0.2
올버린	B	before	CACC 612	13.1	6.75	9.3	30.7	45.5	13.8	30.4	15.6	577	10.1	0.585	19.1	50	2.3	47.7	4.6	6.5	0.3	6.3	0.6
응	D	before	CACC 612+789	2.7	9.23	13.3	40.6	44	14.4	32.7	15	298	9.8	0.294	17.3	24.8	1.5	73.7	11	0.7	0	2	0.3
윤	C	before	CACC 612+789	8	8.93	14.8	44.8	50.1	16.6	33.1	14.6	206	9.7	0.2	19.1	24.7	1.4	73.9	6.2	2	0.1	5.9	0.5
제리	B	before	CACC 612	9.4	10.01	11.5	39.9	39.8	11.5	28.9	15.7	253	10.2	0.259	13.8	29.1	2.8	68.1	7.4	2.8	0.3	6.3	0.7
춘식	B	before	placebo	18.3	8.24	8.5	30.2	36.7	10.4	28.2	15.5	252	8.9	0.224	13	28.4	2.2	69.4	7.5	5.2	0.4	12.7	1.4
치즈	A	before	CACC 789	18.9	9.1	13.5	41.8	45.9	14.8	32.2	13.5	155	10.8	0.167	19.7	12.4	0.8	86.8	8.1	2.4	0.2	16.3	1.5
큐리	B	before	commercial	26.8	9.04	12.4	39.6	43.8	13.7	31.3	15.4	529	8.8	0.465	20	15.4	1.5	83.1	5.9	4.1	0.4	22.3	1.6
핑코	B	before	CACC 612	9.4	10.28	11.9	40.2	39.1	11.5	29.5	15.8	301	10.1	0.305	11	17.8	1.4	80.8	4.4	1.7	0.1	7.6	0.4
해	C	before	CACC 612+789	6.2	7.58	12.6	37.7	49.7	16.7	33.5	15.1	138	10.5	0.144	23.2	35.6	2.2	62.2	9.1	2.2	0.1	3.9	0.6
호야	B	before	placebo	25.6	9.11	13.3	42.6	46.8	14.6	31.2	15	322	10.2	0.328	20.5	13.5	1.3	85.2	4	3.5	0.3	21.8	1
까망	A	after	CACC 789	8.4	7.69	11.2	34.3	44.6	14.5	32.5	14.8	320	10.8	0.346	16.3	8.5	1.5	90	15.9	0.7	0.1	7.6	1.3
까미	A	after	CACC 789	12	7.5	13.5	38.7	51.6	18	35	13.6	188	11.2	0.212	20.8	16.7	1.4	81.9	9.8	2	0.2	9.8	1.2
꽃	C	after	CACC 612+789	4.2	9.86	15.9	47	47.7	16.1	33.8	14.2	227	9.8	0.222	22	39.1	2.1	58.8	10.3	1.6	0.1	2.5	0.4
늘꾸	A	after	CACC 789	10.6	6.84	15.3	38.7	56.6	22.4	39.5	14.3	464	11	0.511	18.1	13.6	1.9	84.5	4.8	1.4	0.2	9	0.5
딱지	B	after	CACC 612	10.5	14.41	19.2	61.4	42.6	13.3	31.3	15.5	165	10.6	0.174	8.1	21.8	2.5	75.7	6.4	2.3	0.3	7.9	0.7
라디	B	after	commercial	9.7	8.07	12.1	36.9	45.8	15	32.8	16.7	348	11	0.383	16.2	19.9	1.8	78.3	4.5	1.9	0.2	7.6	0.4
라떼	A	after	CACC 789	12.1	7.7	12.5	39	50.7	16.2	31.9	14.4	139	10.9	0.151	16.9	24.2	1.8	74	8.6	2.9	0.2	9	1
루비	B	after	commercial	19	11.85	16.6	53.5	45.2	14	31	15.8	372	10.3	0.384	16.6	19.3	1.9	78.8	4.7	3.7	0.4	14.9	0.9
메이	B	after	commercial	14.5	12.44	15.8	50	40.2	12.7	31.5	15.2	226	10.3	0.233	10.3	21	2.1	76.9	8	3.1	0.3	11.1	1.2
묘랑	B	after	placebo	47.8	7.65	12.5	38.9	50.9	16.3	32	15.4	281	11.1	0.313	18.8	20	2	78	7.4	9.5	1	37.3	3.5

묘리	B	after	CACC 612	15.7	11.48	17.1	53.1	46.3	14.9	32.1	16.7	522	10.5	0.549	19.9	15.6	1.9	82.5	14.2	2.5	0.3	12.9	2.2
묘아	B	after	placebo	13	10.52	14.2	44.6	42.4	13.5	31.9	14.9	310	10.3	0.319	15.6	15.7	2.1	82.2	7.1	2	0.3	10.7	0.9
밍키	B	after	commercial	35.5	7.72	12.6	38.9	50.3	16.3	32.4	15.9	495	11.2	0.553	18.5	12	1.4	86.6	5.4	4.3	0.5	30.7	1.9
바비	B	after	placebo	21.3	9.86	13.4	42.7	43.3	13.6	31.3	16.4	167	9.3	0.156	11.1	13.4	2	84.6	9.8	2.9	0.4	18	2.1
빵떡	B	after	placebo	17.1	9.98	12.8	40.2	40.3	12.8	31.8	15.2	216	9.9	0.213	12.7	24.8	3.7	71.5	4.1	4.3	0.6	12.2	0.7
산	C	after	CACC 612+789	5.8	10.23	16.6	49.7	48.6	16.3	33.4	14	220	9.5	0.209	21.3	16.9	1.8	81.3	11.5	1	0.1	4.7	0.7
설기	B	after	CACC 612	20.9	14.06	21.4	66.8	47.5	15.2	32	16	146	10.5	0.153	11.5	5.7	1	93.3	8.3	1.2	0.2	19.5	1.7
썬더	B	after	CACC 612	9.8	15.28	21.6	67	43.9	14.2	32.3	15.4	205	10.2	0.21	10.3	25.2	1.9	72.9	6.4	2.5	0.2	7.1	0.6
아리	A	after	CACC 789	13.4	6.98	10.9	32.4	46.4	15.6	33.5	14.2	426	11.2	0.477	16.3	10.6	1.3	88.1	4.1	1.4	0.2	11.8	0.5
아미	A	after	CACC 789	14.4	9.43	15	43.9	46.5	15.9	34.2	14.3	233	10.5	0.244	17.8	8	1.4	90.6	4.9	1.2	0.2	13	0.7
아비	B	after	commercial	23.4	9.58	13.1	40.7	42.5	13.7	32.3	15.2	563	10.6	0.598	17.1	25	1.7	73.3	10.1	5.9	0.4	17.1	2.4
알콩	B	after	commercial	20	8.37	13.3	41.4	49.4	15.9	32.2	14.9	387	10.7	0.415	18.6	27.6	2.3	70.1	16.8	5.5	0.5	14	3.4
연	C	after	CACC 612+789	4.4	9.38	13.5	41.3	44.1	14.3	32.5	14.3	272	9.7	0.265	21.3	23.5	2.1	74.4	9.9	1	0.1	3.3	0.4
은	C	after	CACC 612+789	3.4	10.12	16.5	49	48.4	16.3	33.7	14.1	248	9.5	0.236	21	36.4	2	61.6	6.7	1.2	0.1	2.1	0.2
울버린	B	after	CACC 612	12	6.62	9.8	30.7	46.4	14.8	31.9	16.6	856	10.5	0.902	17.5	22.3	1.9	75.8	4.9	2.7	0.2	9.1	0.6
웅	D	after	CACC 612+789	2.8	9.61	13.5	41.4	43.1	14	32.5	14.8	344	8.8	0.304	18.7	20.1	1.8	78.1	10.9	0.6	0.1	2.1	0.3
윤	C	after	CACC 612+789	5	8.17	13.9	39.9	48.8	17	34.8	14.5	167	10.1	0.169	22.3	37.7	2	60.3	6.4	1.9	0.1	3	0.3
제리	B	after	CACC 612	16.5	8.53	11.8	38.3	44.9	13.8	30.8	15	204	10.6	0.216	16.4	34.2	3.1	62.7	7.5	5.7	0.5	10.3	1.2
춘식	B	after	placebo	22.1	8.18	10.8	34.9	42.6	13.2	31	16.7	230	9.3	0.214	11.9	30.4	2.2	67.4	3.3	6.7	0.5	14.9	0.7
치즈	A	after	CACC 789	17.9	9.41	13.9	43.3	45.9	14.8	32.1	13.8	219	10.4	0.228	21	8.9	1	90.1	10.6	1.6	0.2	16.1	1.9
큐리	B	after	commercial	25.1	8.76	13	38.9	44.4	14.9	33.5	14.7	456	10.1	0.459	18.6	9.9	0.9	89.2	5.6	2.5	0.2	22.4	1.4
핑코	B	after	CACC 612	11.1	11.79	15.6	49.6	42.1	13.3	31.5	14.7	230	10.6	0.245	12.8	24.5	1.8	73.7	11	2.7	0.2	8.2	1.2
해	C	after	CACC 612+789	6	8.43	14.3	42.7	50.7	17	33.6	15	121	10.5	0.128	23.3	32.4	2.3	65.3	6.7	1.9	0.1	4	0.4
호야	B	after	placebo	29.6	11.07	17.1	51.4	46.5	15.4	33.2	14.6	249	10.4	0.26	17.4	7.6	1.1	91.3	6	2.3	0.3	27	1.8

- 임상항목 52개에 대한 데이터베이스의 주성분분석 결과 전체적으로 미생물 급여전후 임상지표사이에 식별되는 클러스터링을 확인할 수 없었다(그림 69A). 미생물제제별 주성분분석에서 크게 3개의 클러스터를 확인할 수 있었는데 이는 임상을 수행한 묘주 그룹과 일치하는 양상을 보여주었다(그림 69B). 이를 통해 혈액 임상데이터가 환경에 큰 영향을 받는다는 사실을 확인하였다. 또한 흥미롭게도 혼합미생물제제(CACC612+789)의 경우를 한정하였을 때 미생물제제급여 전후에 뚜렷하게 식별되는 클러스터링을 보여주었다(그림 69A).



- 임상 전후 혈액 내 52개 지표들에 대하여 부분 최소 제곱법(PLS-DA)을 이용하여 분석하였을 때 미생물 제제 급여 전후 그룹이 나뉘었으며, 시판중인 유산균 효능이 검증된 제품과 차이를 보이지 않았다(그림 70).



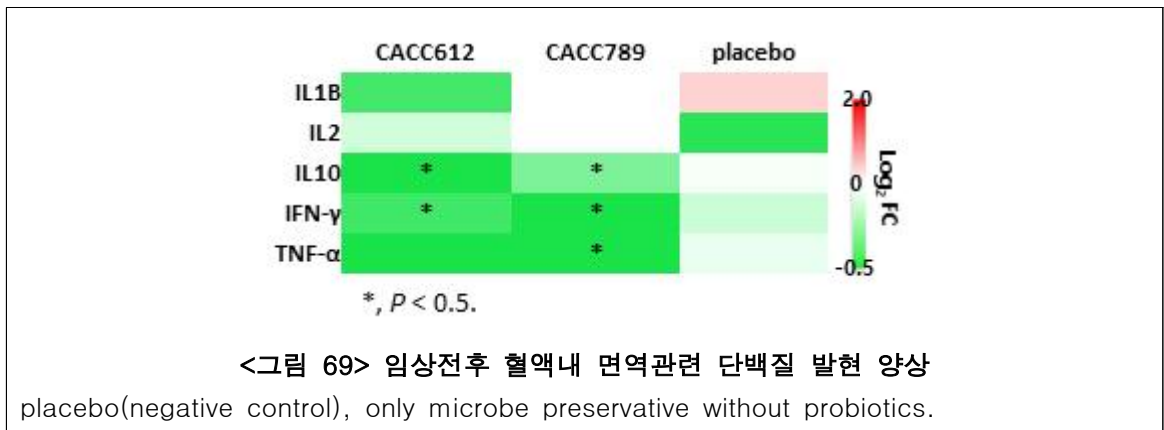
- *L. rhamnosus* CACC612와 *B. animalis* CACC789에 대한 임상 전후 혈액샘플을 이용하여 혈액내 IL1B, IL2, IL10, IFN- γ , TNF- α 등 5종의 면역 단백질을 ELISA 방법을 이용하여 개별로 정량 분석하였다(표 47).

<표 47> 임상전후 혈액내 면역단백질 정량 분석

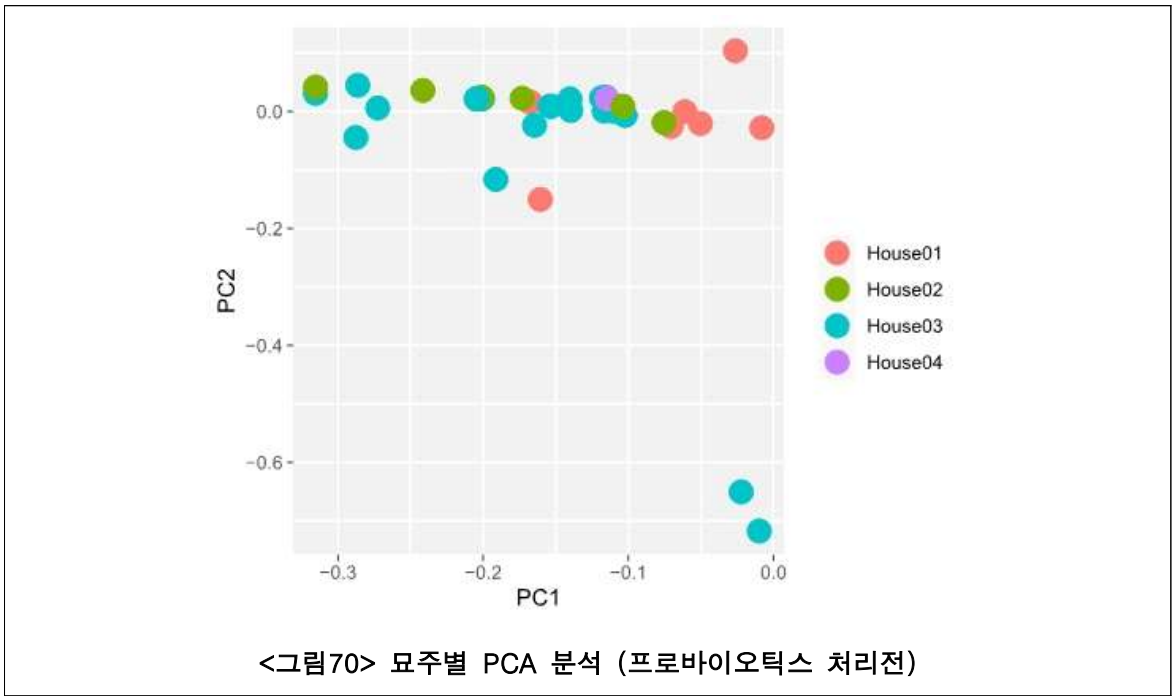
cat ID	ProbioticType	before					after				
		IL1B (pg/ml)	IL2 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	IFNG (pg/ml)	TNFA (pg/ml)	IL1B (pg/ml)	IL2 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	IFNG (pg/ml)	TNFA (pg/ml)
C01	CACC789	39.04759	73.59588	985.9508	302.7189	8.743827					
C02	CACC789	63.38731	68.84782	1359.202	363.1587	5.326229					
C03	CACC612+789	645.0419	3051.263	425.4246	501.8438	129.4573	1735.198	5432.03	0	447.7724	144.1415
C04	CACC789	36.42924	73.0445	1310.671	334.4823	10.32401	36.82855	74.60363	1244.079	191.8447	5.280715
C05	placebo	43.163	70.69057	1243.763	319.6449	7.275832					
C06	CACC612	59.35048	70.63319	1272.408	95.54021	9.114429	40.99227	72.63011	1407.093	79.10408	0
C07	commercial	110.0558	69.50945	944.4491	0	7.931364	69.39099	69.96214	780.8817	124.3003	5.343325
C08	CACC789	47.14449	70.89574	1451.934	293.0609	9.853938	46.886	71.51894	1439.496	293.8627	10.22239
C09	commercial	111.3922	72.53418	0	185.7345	0	88.95522	67.665	475.1027	282.5275	1.521657
C10	commercial	1247.58	3548.892	2508.01	107.6658	132.7152	392.1285	716.9028	431.277	126.7428	27.85027
C11	placebo	47.37151	68.09015	253.1434	303.0422	2.803439	53.5517	67.71951	316.8839	297.8801	3.747867
C12	CACC612	122.3002	194.7505	1132.008	317.8435	0	74.33093	101.6966	910.922	263.775	0
C13	placebo	134.5984	234.3976	866.1541	0	0	67.02163	69.21558	1003.434	203.5893	5.529501
C14	commercial	52.00858	71.16939	1565.092	262.9938	4.263662	40.7306	73.59588	1207.84	273.0339	6.535379
C15	placebo	53.76455	71.23171	1094.038	296.4323	10.62038	54.76551	69.48699	878.3858	294.9862	8.641253
C16	placebo	508.9423	2733.693	3340.461	326.7119	88.94331	615.4406	1767.32	3845.849	136.5832	80.77952
C17	CACC612+789	55.96147	118.0813	527.9412	362.9892	0	241.1881	891.8701	0	315.3914	7.850331
C18	CACC612	46.24431	72.23231	1791.362	350.5031	5.037924	107.4109	81.5817	1018.088	119.5712	0

C19	CACC612	1152.144	3562.583	0	499.2349	116.2523	717.0304	3265.718	0	361.6336	76.24355
C20	CACC789	37.63807	73.12162	1268.574	334.6482	10.07583	36.66839	73.47547	1176.042	283.6402	9.007056
C21	CACC789	55.45195	72.74148	1211.289	233.5598	7.397958	43.46706	73.79932	1000.804	136.0335	1.149118
C22	commercial	49.58445	71.88507	1810.107	279.0375	9.520921	47.37151	72.6671	1513.047	255.6773	9.822872
C23	commercial	42.05202	73.59588	1756.66	336.3079	0.349527	37.36662	76.16645	0	323.2556	9.585839
C24	CACC612+789	89.39659	91.65579	1256.781	337.9697	0	3569.696	10195.49	725.7111	369.2769	135.198
C25	CACC612+789	36.34981	71.29458	350.3432	368.0851	2.493752	142.6306	407.8072	1065.288	331.0045	20.4981
C26	CACC612	39.38535	72.51997	1559.544	366.2143	9.623493	92.07227	150.3981	0	297.8801	0
C27	CACC612+789	49.81983	71.26308	1241.545	305.3076	8.089181	41.54897	77.57246	1120.414	338.4687	10.19441
C28	CACC612+789	45.92588	68.07935	1044.663	360.6178	7.263343	2068.327	6405.161	1151.412	390.2204	128.8633
C29	CACC612	112.513	67.66129	1565.786	182.8384	2.781438	104.5875	68.73528	1242.179	135.4842	4.599989
C30	placebo	36.42924	69.74154	2084.562	404.4791	11.27271	60.76665	71.55154	1515.101	361.4643	9.936945
C31	CACC789	39.95344	73.92303	1429.444	412.1904	9.982009	53.33944	72.09177	607.6164	225.2312	6.683945
C32	commercial	43.163	71.26308	991.1839	316.3716	8.532507					
C33	CACC612	72.63172	67.75646	1285.862	323.9132	5.749441	67.51609	67.66129	1252.33	339.8003	9.195242
C34	CACC612+789	70.15011	95.44462	25.65988	388.3188	0	1314.09	5299.458	236.9691	271.302	127.0579
C35	placebo	82.63199	89.59321	480.3834	318.1709	0	290.5671	316.8424	370.3723	213.5325	0

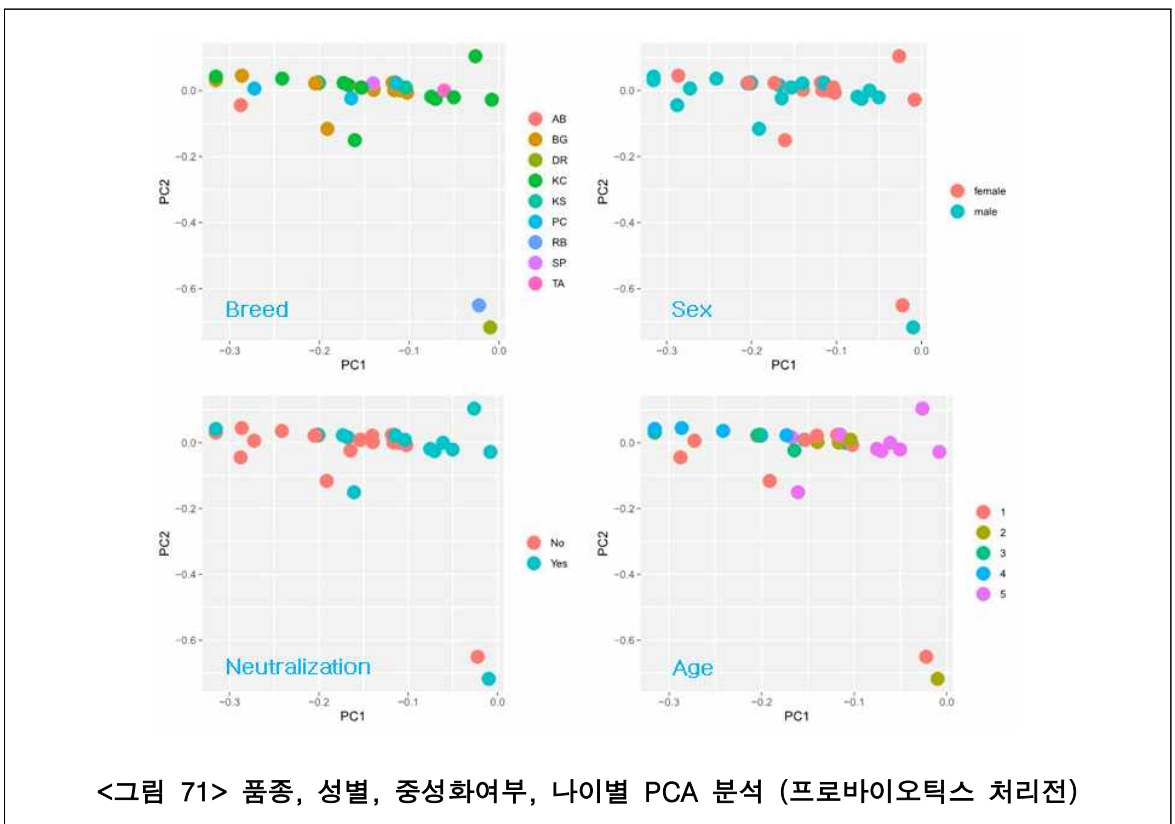
- IL1B, IL2, IL10, IFN- γ , TNF- α 등 5종 면역단백질 정량분석 ELISA 결과를 임상 전후 비교한 결과 CACC612 급여 후 반려묘 혈액내 IL10, IFN- γ 수치가 감소하였으며, CACC789 급여 후 IL10, IFN- γ , TNF- α 수치가 감소하는 것을 확인하였다(그림 69).



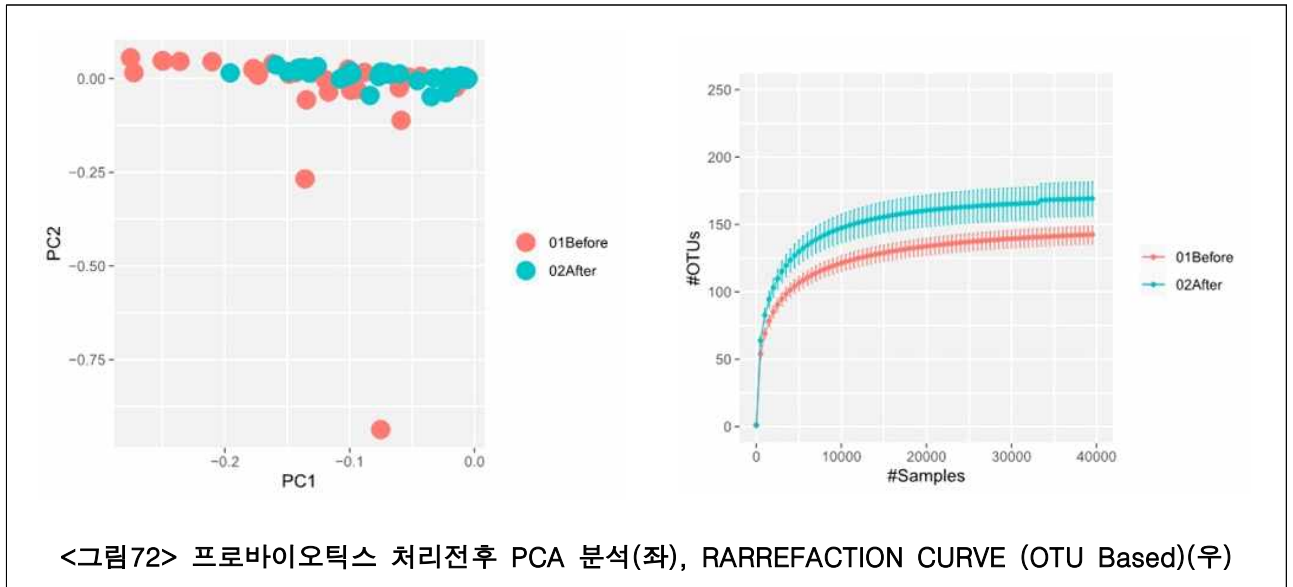
- 임상 전·후 분변샘플을 이용하여 장내 마이크로바이옴 변화를 분석하였다. 메타지놈 분석에서는 차등적으로 존재하는 개별 미생물 발굴이 아니라 및 전체적인 메타지놈의 경향성을 보는 것이 매우 중요하다. 따라서, QIIME으로 QC, Mapping, 키메라 제거 이후에 PCA를 이용한 구조 분석, RAREFACTION CURVE 이용한 다양성 분석, Alpha-Diversity 통계 추정을 통한 다양성 분석을 수행하여 처리 그룹 별 메타지놈 경향성 비교를 수행하였다(R 프로그램으로 수행).
- 묘주는 고양이 먹이와 밀접하게 관계가 있기 때문에 PCA에서 House03 그룹의 두개의 아웃라이어만 제외하면 비교적 그룹별로 잘 묶여 있는 것을 확인하였다(그림 70).



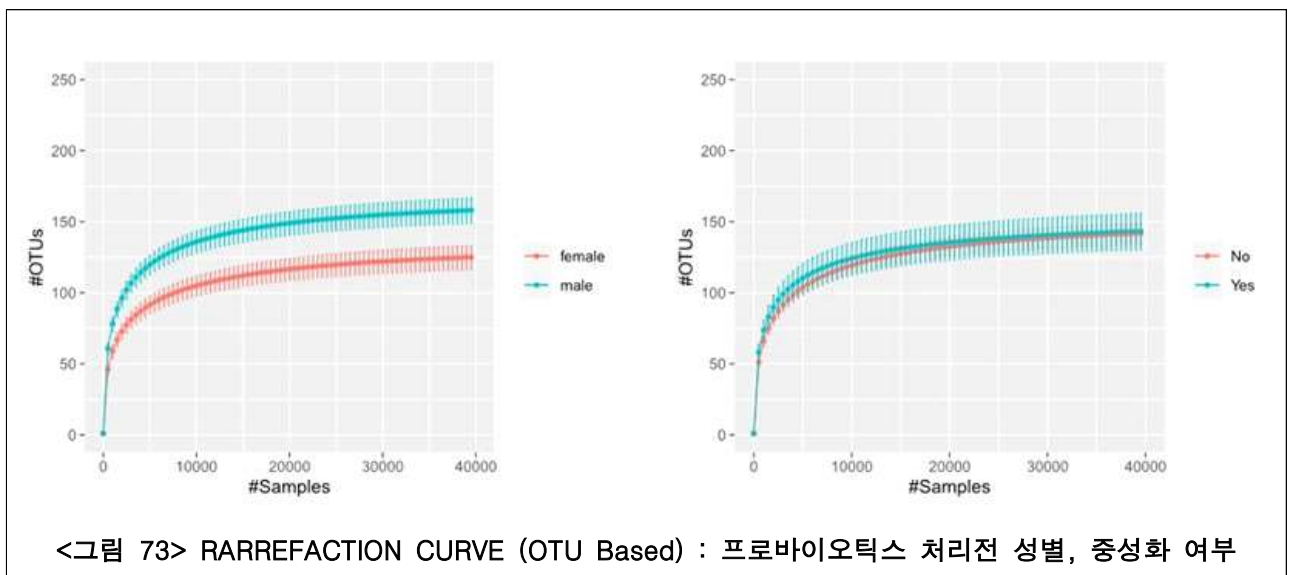
- 품종, 성별, 중성화 여부 및 나이에 대해서 PCA 분석을 수행하였으며, 품종, 성별, 중성화 여부는 그룹화이 뚜렷하게 나지 않았으며, 나이에 대해서만 비교적 그룹화가 되었다고 생각되지만, 이는 묘주별 고양이 그룹의 평균 나이가 뚜렷이 차이가 나는 것을 고려하면 나이가 직접적으로 영향을 주었다고 판단하기는 아직 어렵다고 판단되고, 묘주 효과로 해석하는 것이 타당하다(그림 71).



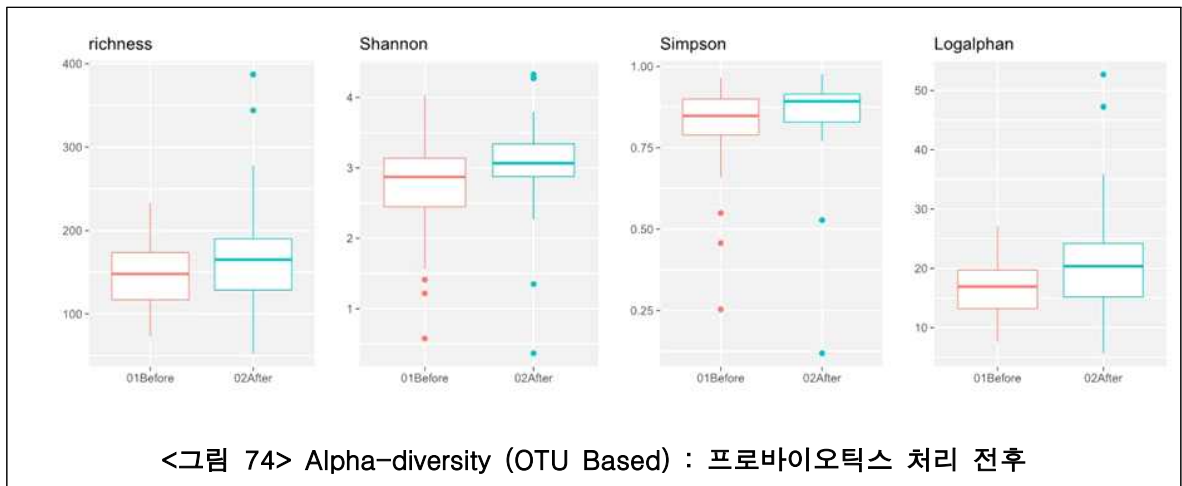
- 34마리의 고양이에 대해서 프로바이오틱스 처리 전후에 대해 PCA를 수행했으며, 여기에서 프로바이오틱스 처리 후에는 처리 전보다 데이터가 한곳으로 모이는 경향을 보였으며, 정상 개체를 대상으로 급여 실험을 했다는 점을 생각하면 프로바이오틱스 효과가 있었을 것으로 추정된다(그림 72).



- 묘주는 고양이 먹이와 밀접하게 관계가 있기 때문에 묘주별로 미생물 다양성의 차이가 나는 것으로 판단된다. 품종이나 나이도 케이스별로 샘플양이 적기 때문에 성별 및 중성화 여부에 대해서만 미생물 다양성 측정하였다.
- 흥미로운 것은 본 연구의 데이터에서는 묘주 효과가 뚜렷하게 있음에도 불구하고 성별에서는 마이크로바이옴 다양성에 대해서 차이가 뚜렷하게 차이가 나고, 중성화 여부는 차이가 나지 않는다. 이는 고양이의 성은 마이크로바이옴에 직접 혹은 간접적으로 영향을 주는 것으로 추정된다(그림 73).

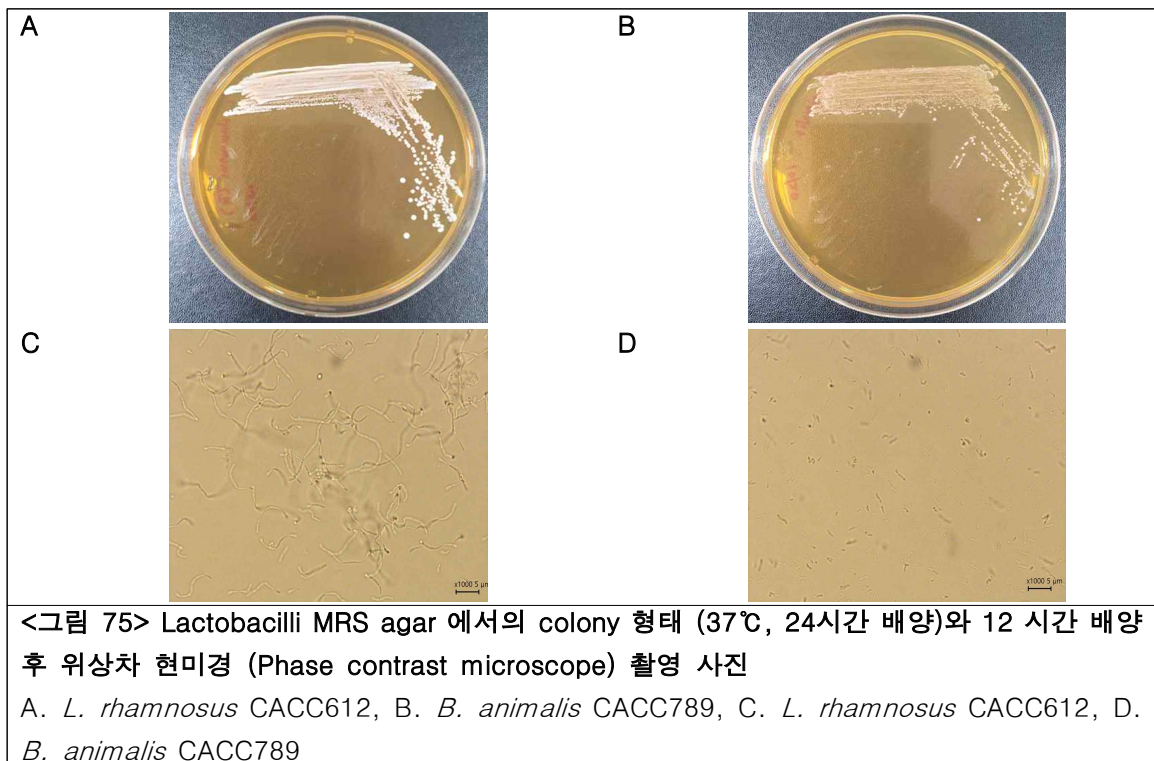


- Alpha 다양성 평가에서도 4가지 통계치를 이용해서 프로바이오틱스 처리 후에 마이크로바이옴의 다양성이 증가함을 알 수 있었다(그림 74).



○ 반려묘 유래 *L. rhamnosus* CACC612와 *B. animalis* CACC789의 제품화 연구

- 형태학적 실험은 “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 진행하였고, Colony 형태는 각 균주를 Lactobacilli MRS agar (difco) 배지에 streaking 하여 37°C 혐기성 배양기에서 24시간 배양 후 육안으로 관찰하였고, cell 형태는 Lactobacilli MRS broth (difco) 배지에 1 colony 접종하여 37°C 정치배양기에서 12 시간 배양 후 위상차 현미경 (Phase contrast microscope)으로 촬영하여 유산균의 형태를 확인하였다(그림 75).



- 당 발효 실험은 API사의 50 CHL Test kit을 이용하여 공급회사의 실험방법에 준하여 실험

하였으며, 37°C 에서 12~16 시간동안 배양하면서 색 변화를 관찰하였다(표 48, 49).

<표 48> *L. rhamnosus* CACC612의 형태학적, 생화학적 특성

Morphology			Culture characteristics		
Gram staining		Positive	Growth in air		Positive
Shape		Rod	Growth anaerobically		Positive
Spore		Negative	Growth at 50°C		Negative
Motility		Negative	Growth at broth at		
Chain		long chain		pH 2.0	Negative
				pH 9.0	Negative
			Growth in 6.5 % NaCl		Negative
			Growth in broth at		
				15°C	Positive
				45°C	Positive
Sugar-fermentation					
Glycerol		Negative	Salicin		Positive
Erythritol		Negative	D-Cellobiose		Positive
D-Arabinose		Negative	D-Maltose		Positive
L-Arabinose		Negative	D-Lactose (bovine)		Positive
D-Ribose		Positive	D-Melibiose		Negative
D-Xylose		Negative	D-Saccharose(sucrose)		Negative
L-Xylose		Negative	D-Trehalose		Positive
D-Adonitol		Negative	Inulin		Negative
β-Methyl-D-Xyrose		Negative	D-Melzitose		Positive
D-Galactose		Positive	D-Raffinose		Negative
D-Glucose		Positive	Amidon (Starch)		Negative
D-Fructose		Positive	Glycogen		Negative
D-Mannose		Positive	Xylitol		Negative
L-Sorbose		Positive	Gentiobiose		Negative
L-Rhamnose		Positive	D-Turanose		Positive
Dulcitol		Negative	D-Lyxose		Negative
Inositol		Negative	D-Tagatose		Positive
D-Mannitol		Positive	D-Fucose		Negative
D-Sorbitol		Positive	L-Fucose		Negative
Methyl-α D-Mannopyranoside		Negative	D-Arabitol		Negative
Methyl-α D-Glucopyranoside		Positive	L-Arabitol		Negative
N-Acetyl-Glucosamine		Positive	Potassium Gluconate		Positive
Amygdalin		Positive	Potassium 2-Keto-Gluconate		Negative
Arbutin		Positive	Potassium 5-Keto-Gluconate		Negative
Esculin ferric citrate		Positive			

<표 49> *B. animalis* CACC789의 형태학적, 생화학적 특성

Morphology			Culture characteristics		
Gram staining		Positive	Growth in air		Negative
Shape		Rod	Growth anaerobically		Positive
Spore		Negative	Growth at 50°C		Negative
Motility		Negative	Growth at broth at		
Chain		single of short chain		pH 2.0	Negative
				pH 9.0	Negative
			Growth in 6.5 % NaCl		Negative
			Growth in broth at		
				10°C	Positive
				45°C	Positive
Sugar-fermentation					
Glycerol		Negative	Salincin		Negative
Erythritol		Negative	D-Cellobiose		Negative
D-Arabinose		Negative	D-Maltose		Positive
L-Arabinose		Negative	D-Lactose (bovine)		Positive
D-Ribose		Negative	D-Melibiose		Positive
D-Xylose		Negative	D-Saccharose(sucrose)		Positive
L-Xylose		Negative	D-Trehalose		Negative
D-Adonitol		Negative	Inulin		Negative
β-Methyl-D-Xyrose		Negative	D-Melazitose		Negative
D-Galactose		Negative	D-Raffinose		Positive
D-Glucose		Positive	Amidon (Starch)		Negative
D-Fructose		Negative	Glycogen		Negative
D-Mannose		Negative	Xylitol		Negative
L-Sorbose		Negative	Gentiobiose		Negative
L-Rhamnose		Negative	D-Turanose		Negative
Dulcitol		Negative	D-Lyxose		Negative
Inositol		Negative	D-Tagatose		Negative
D-Mannitol		Negative	D-Fucose		Negative
D-Sorbitol		Negative	L-Fucose		Negative
Methyl-α D-Mannopyranoside		Negative	D-Arabitol		Negative
Methyl-α D-Glucopyranoside		Negative	L-Arabitol		Negative
N-Acetyl-Glucosamine		Negative	Potassium Gluconate		Negative
Amygdalin		Negative	Potassium 2-Keto-Gluconate		Negative
Arbutin		Negative	Potassium 5-Keto-Gluconate		Negative
Esculin ferric citrate		Positive			

- 선발된 프로바이오틱스 균주의 배양적 특성을 조사하기 위해 Flask 와 15 L jar fermenter 사용하여 배양조건을 조사 하였다(그림 76).

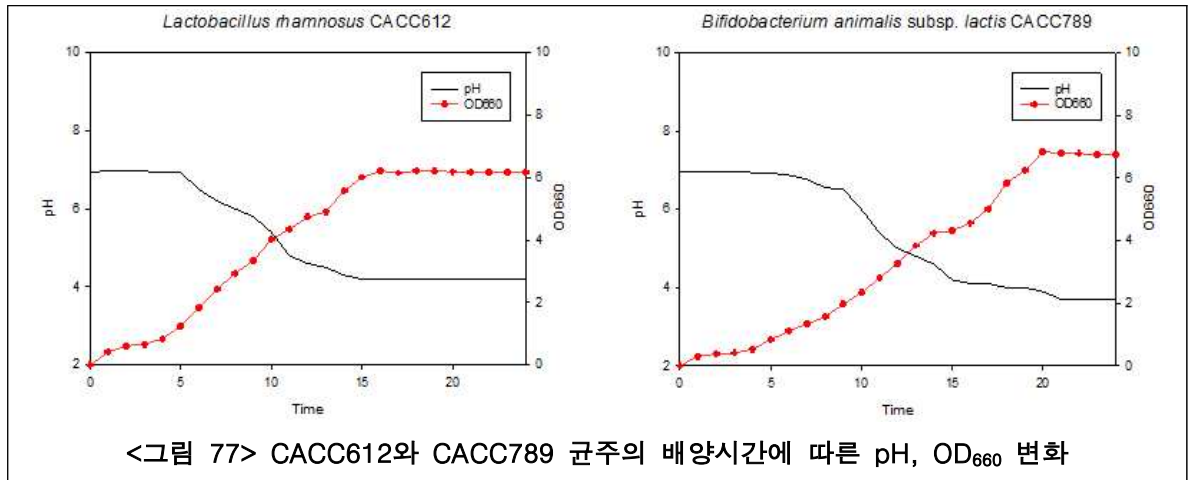


<그림 76> 15 L, 30 L jar fermenter

- 기본배지에서의 배양 패턴 (pH, OD 변화) 및 균주 형태 변화 조사: Lactobacilli MRS broth (Beef extract → Yeast extract 대체)를 기본배지(표 50)로 하고 30L jar fermenter 를 사용하여 배양하였다. 배양 조건(표 50)은 37℃, 100 rpm, 최소 양압, working vol. 8 L, 접종량 0.5 %, 초기 pH 7.0 (control 없음), 혐기조건으로 24 시간 동안 배양 패턴을 기록했으며, 배양 시간에 따른 pH 와 OD₆₆₀ 의 변화를 측정하기 위해 배양 2 시간 간격으로 샘플링하여 값을 측정하였다. *L. rhamnosus* CACC612 는 초기 pH 7.0에서 4.2 까지 떨어졌고 OD₆₆₀ 값은 최대 6.21 까지 오른 뒤 서서히 낮아졌으며, 균주는 long chain 형태를 보였다. *B. animalis* CACC789는 *L. rhamnosus* CACC612 와 유사한 배양 패턴으로 초기 pH 7.0에서 3.7 까지 떨어졌고 OD₆₆₀ 값은 최대 6.83 까지 오른 뒤 서서히 낮아졌으며, 균주는 짧은 간균(불특정) 형태를 보였다(그림 77).

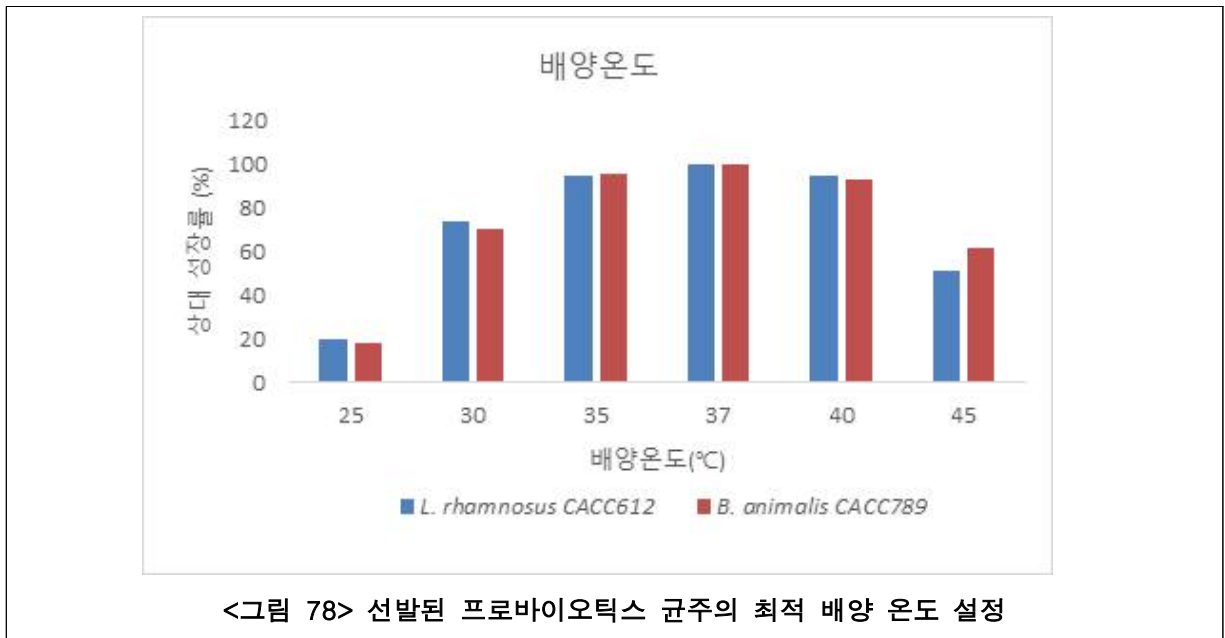
<표 50> 프로바이오틱스 균주의 15 L jar fermenter 기본 배양 배지

조성	함량(%)	조건	
Peptone	1.000	온도(℃)	37
Yeast extract	1.500	초기 pH	7.0
Glucose	2.000	rpm	100
Sodium acetate trihydrate	0.500	내압(bar)	0.1~0.2
Polysorbate 80	0.100	혐기	-
Dipotassium hydrogen phosphate	0.200	총균 접종량(%)	1.0
Triammonium citrate	0.200		
Magnesium sulfate heptahydrate	0.020		
Manganese sulfate tetrahydrate	0.005		
소포제	0.100		



<그림 77> CACC612와 CACC789 균주의 배양시간에 따른 pH, OD₆₆₀ 변화

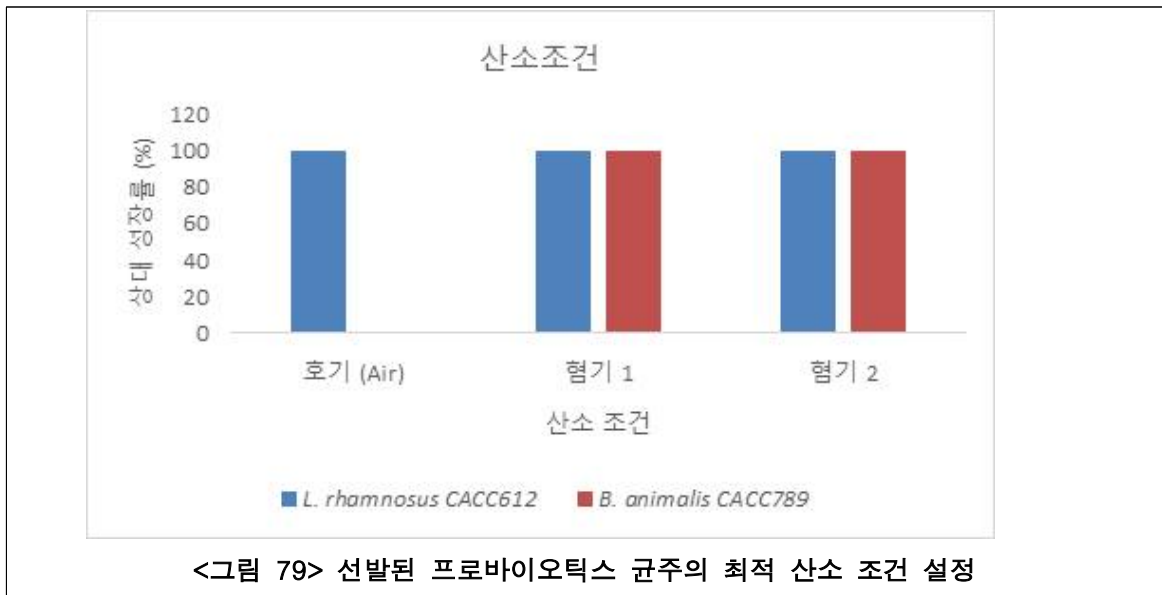
- 최적 배양온도 설정: 선발된 프로바이오틱스 2종의 배양 온도에 따른 효율 비교를 위해 25℃, 30℃, 35℃, 37℃, 40℃, 45℃의 온도 조건을 설정 하였고, Lactobacilli MRS broth 배지를 사용하여 100 ml bottle flask에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 4종의 균주 모두 37℃에서 수율이 높게 측정되어 최적의 배양조건을 37℃로 결정하였다(그림 78).



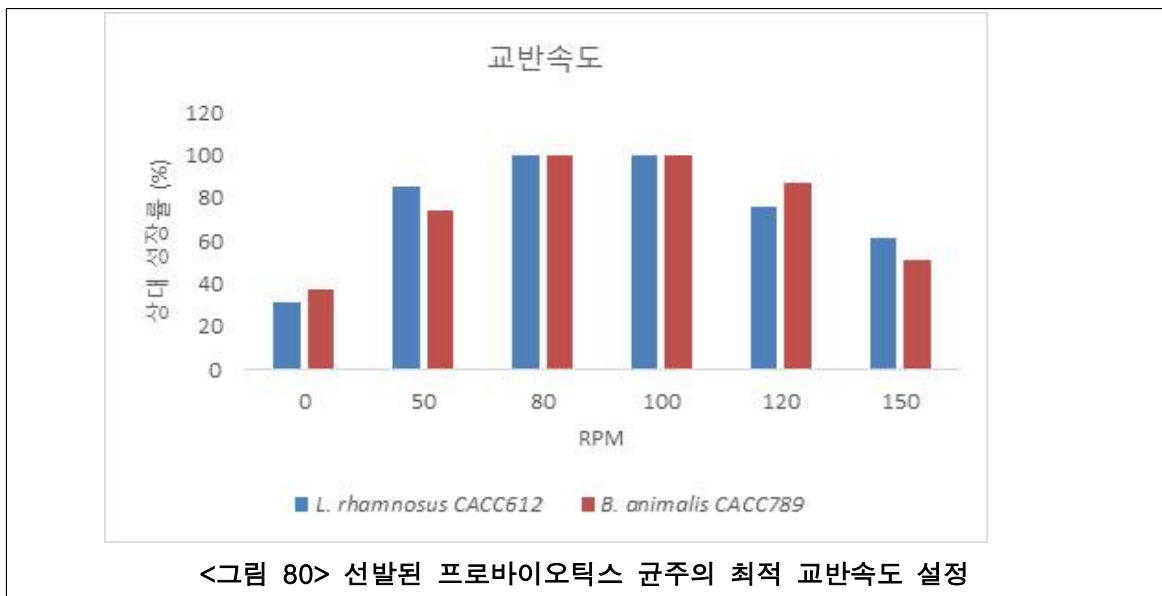
<그림 78> 선발된 프로바이오틱스 균주의 최적 배양 온도 설정

- 최적 산소 조건 설정: 산소 조건에 따른 균주의 성장효율을 관찰하기 위해 산소조건을 혐기1(CO₂ 공급), 혐기2 (air flow, vent 잠금), 호기 (air 공급, 0.1~0.2 vvm)로 설정하여 Lactobacilli MRS broth (Beef extract → Yeast extract 대체)를 기본배지로 하고 15 L jar fermenter를 사용하여 배양하였다. 배양 조건은 37℃, 100 rpm, 최소 양압, working vol. 8 L, 접종량 0.5 %, 초기 pH 7.0 (control 없음)으로 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612 는 모든 조건에서 차이를 보이지 않았다.

B. animalis CACC789 는 호기조건에서 성장하지 않았고, 혐기1, 2 조건에서는 조건 1에서 초기 활성화가 조금 빨랐지만, 배양 종료 수율은 차이를 보이지 않았다. 따라서 *L. rhamnosus* CACC612 은 혐기2 조건, *B. animalis* CACC789 은 혐기1 조건에서 빠른 활성을 보였지만, 결과적으로 수율 차이가 없고 배양 공정 단가 절감을 위해 혐기2 조건으로 최종 설정하였다(그림 79).

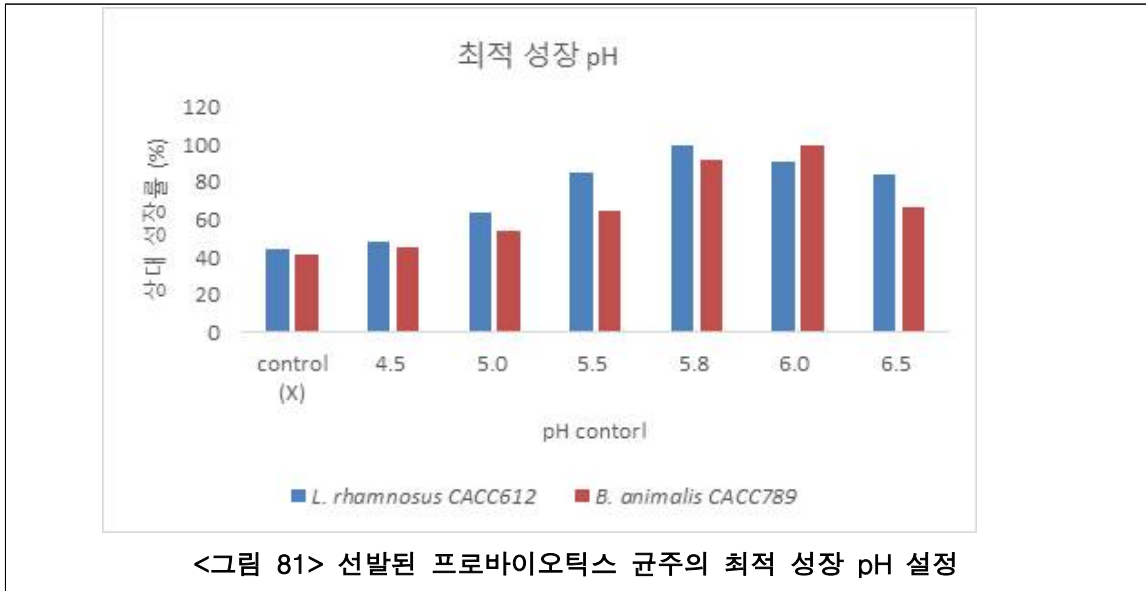


- 최적 교반속도 설정: 교반속도에 따른 균주의 성장효율을 관찰하기 위해 교반속도(rpm)을 0, 50, 80, 100, 120, 150으로 설정하였다. 배지 및 배양 조건은 산소 조건 실험과 동일하게 설정하고 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 2개의 균주 모두 80 ~ 100 rpm에서 최대 성장률을 보였고, 80 rpm 미만, 100 rpm 초과 조건에서는 비교적 낮은 수율을 보였다(그림 80).

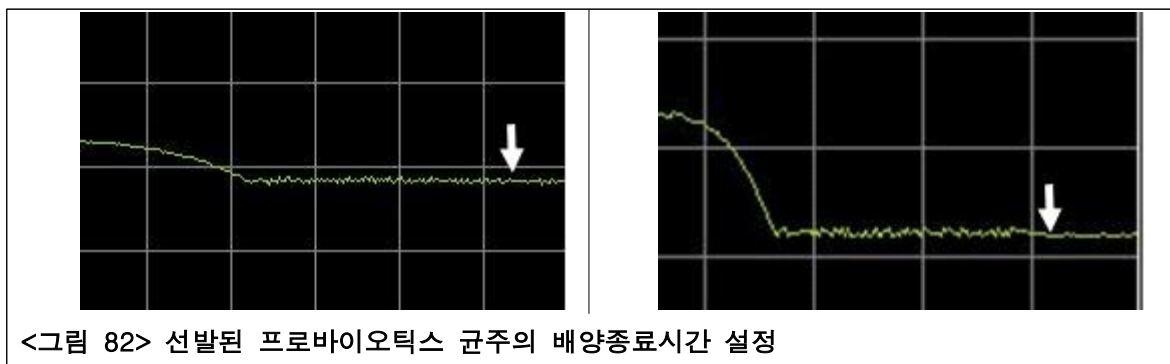


- 최적 성장 pH 설정: 유산균은 배양시간에 따라 생성되는 Lactic acid 에 의해 pH가 낮아

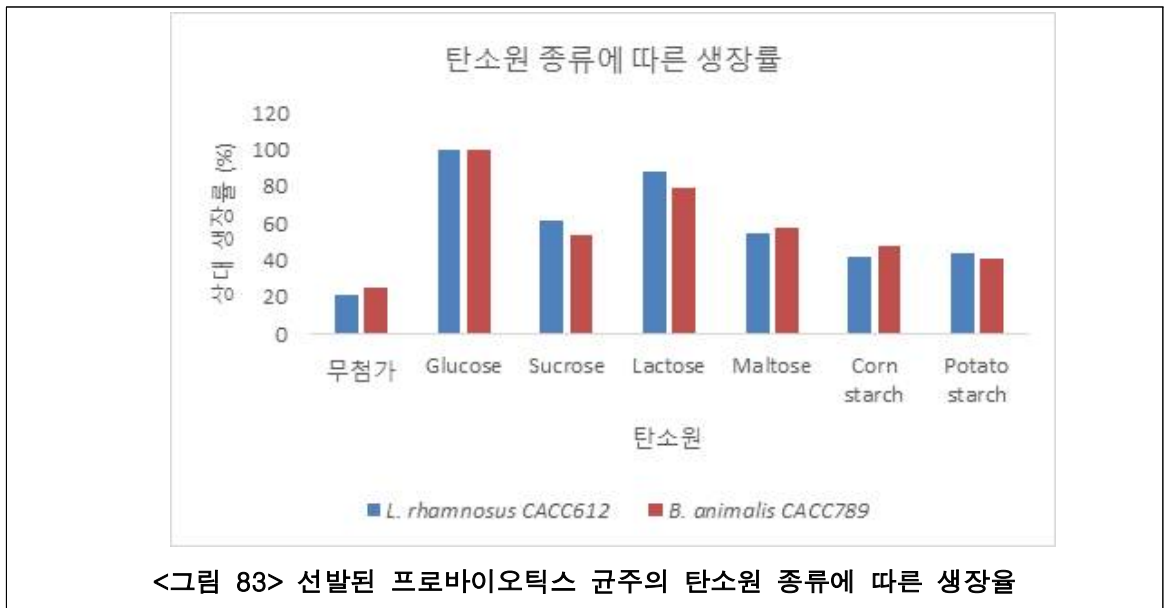
지나 적정 pH를 유지시켜주는 것이 배양의 중요한 요소이다. 따라서 최적의 성장효율의 pH 선정하기 위해 20 % NaOH을 이용하여 pH 4.5 ~ 6.5 (0.5 단위, pH 5.8 추가)로 설정하였고 배양 조건은 산소조건 test 와 동일하게 설정하고 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612는 pH 5.8, *B. animalis* CACC789 pH 6.0에서 가장 높은 수율을 보였다(그림 81).



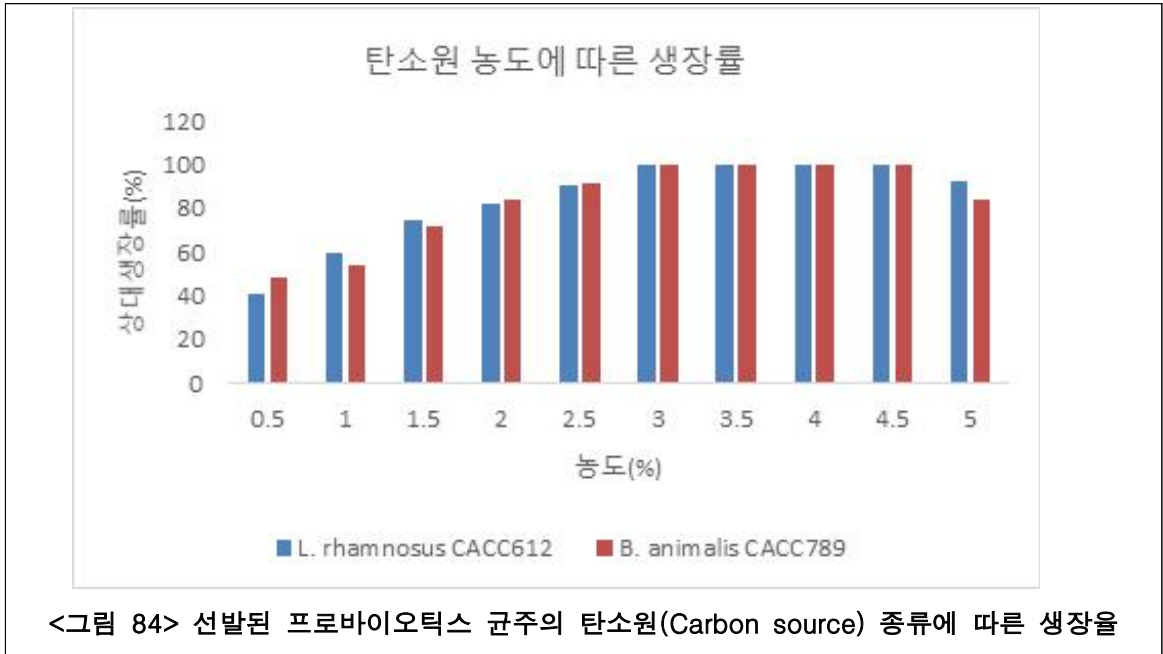
- 최적 접종량 설정: 유산균 배양에서 초기 접종량이 배양 시간 및 최종 수율에 영향을 주는 요소이다. 따라서 최적의 초기 접종량을 선정하기 위해 seed 량을 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % (1.0 % 초가 투입시 종균을 준비하기 위한 공정이 추가되므로 1.0 %를 최대량으로 설정하였다.) 세 구간으로 설정하였고, 위의 배양 실험 결과를 바탕으로 설정한 최적 배양 조건에서 24시간동안 배양하여 pH, OD₆₆₀ 값의 추이, 배양 종료 후 생균수를 측정하였다. 그 결과 네 균주 모두 1.0 %의 seed를 접종하였을 때 다른 실험구보다 빠르게 성장(짧은 시간에 pH control 구간까지 도달)하며 가장 높은 수율을 보였다. 배양 종료 시점은 pH control이 끝나는 지점에서 가장 높은 OD₆₆₀ 값과 수율을 보였고 이후 시간이 지날수록 OD₆₆₀ 값과 수율이 감소하는 것을 확인하였다(그림 82).



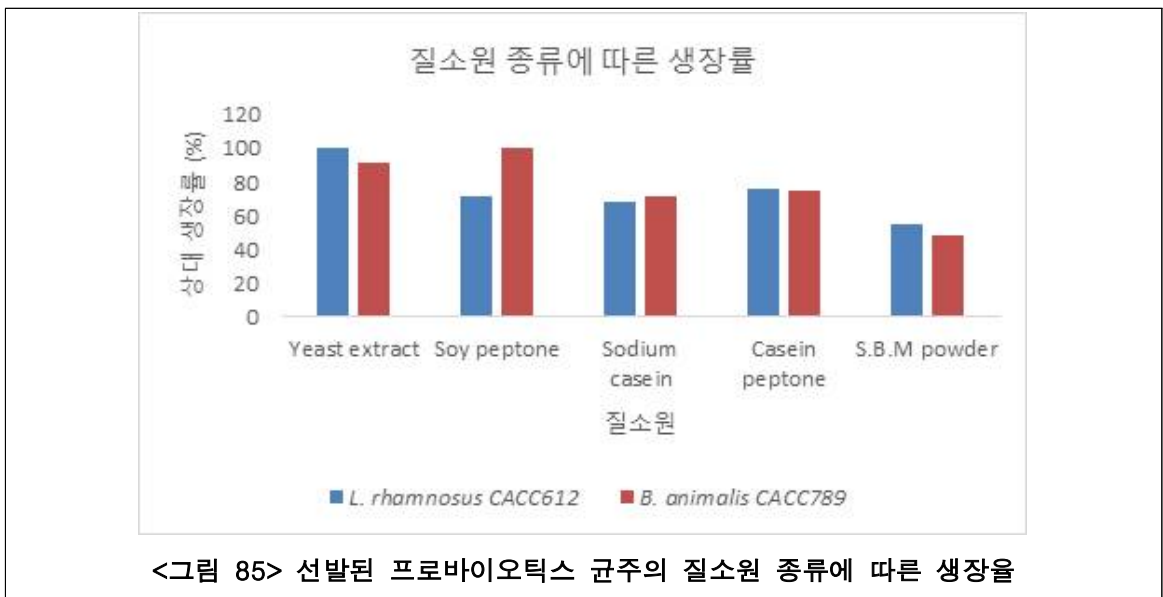
- 산업배지용 배양 배지를 탐색하기 위해 최적 탄소원, 질소원, 무기염류 조사: 미생물을 배양하기 위해서는 배양체가 필요로 하는 영양물질을 공급해야 하며, 그 중 탄소원 및 질소원은 미생물의 배양에 필수적으로 작용한다. 탄소원은 대부분의 에너지원으로 사용되어 균체의 성장에 영향을 미치고, 질소원은 미생물 증식에 요구되는 단백질 구성성분으로 사용이 미생물 배양에서 가장 주요한 역할을 담당하고 있다. 따라서, 최적 성장조건에 맞는 탄소원과 질소원 선정을 위해 media bottle, 15 L jar fermenter를 이용하여 실험을 실시하였다.
- 기본배지(표 50)에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고, 탄소원만 변화를 주어 탄소원 종류별 영향을 조사하였다. 탄소원은 자사에서 사용하고 있는 원료로 glucose, sucrose, lactose, maltose corn starch, potato starch 6종의 당을 사용하였다. 투입량은 기본배지의 탄소원량과 동일하게 2.0 %를 첨가하였으며, 100 ml media bottle 에 배지를 제조 후 균주 1.0% 접종, 37°C 혐기성배양기에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 4개의 균주 모두 glucose를 첨가시 가장 높은 수율을 보여 탄소원으로 glucose를 선정하였다(그림 83).



- 기본배지(표 5)에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고, 선정된 탄소원(glucose)의 농도 (0.5~5.0 %)변화를 주어 100 ml media bottle 에 배지를 제조하여 균주 1.0% 접종 후 37°C 혐기성배양기에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612 는 3.0~4.0%, *B. animalis* CACC789는 3.0~4.5%에서 가장 높은 수율을 보였다. (그림 84).

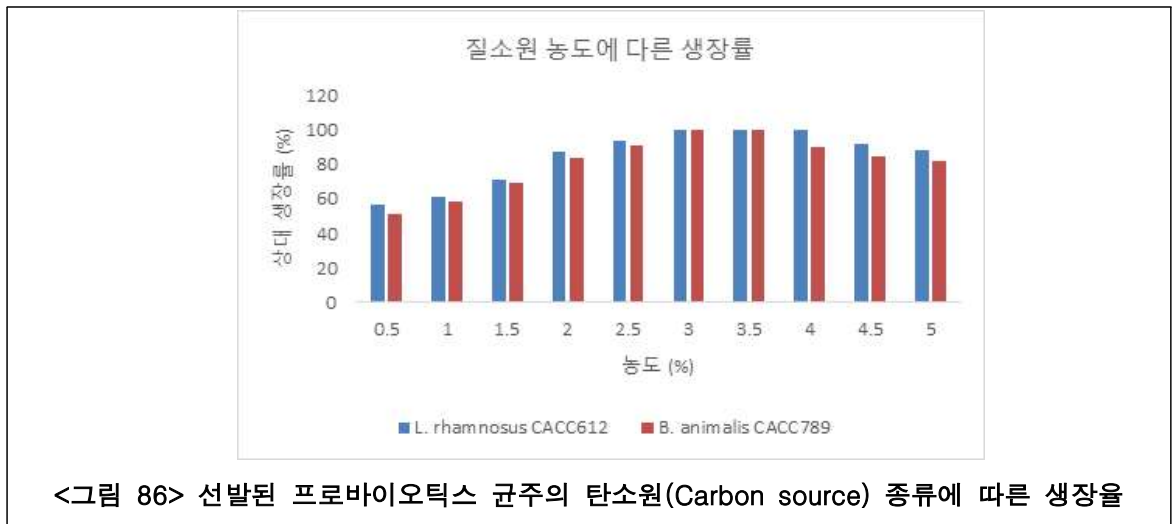


- 기본배지(표 50)에서 나머지 영양분은 변화를 주지 않고 질소원만 변화를 주어 질소원 종류별 영향을 조사하였다. 질소원은 자사에서 보유하고 있는 원료로 yeast extract, soy peptone, sodium casein, tryptone, soy been meal 5종의 질소원을 사용하였다. 투입량은 기본배지의 질소원량과 동일하게 2.5%를 첨가하였으며, 100 ml media bottle 에 배지를 제조하여 균주 1.0% 접종 후 37℃ 혐기성배양기에서 24 시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612는 yeast extract 첨가 시 가장 높은 수율을 보였고, *B. animalis* CACC789는 soy peptone 첨가 시 가장 높은 수율을 보여, 최적 질소원으로 선정하였다(그림 85).



- 기본배지(표 50)에서 나머지 영양분은 변화를 주지 않고, 선정된 질소원의 농도(0.5~5.0 %) 변화를 주어 100 ml media bottle 에 배지를 제조하여 균주 1.0% 접종 후 37℃ 혐기

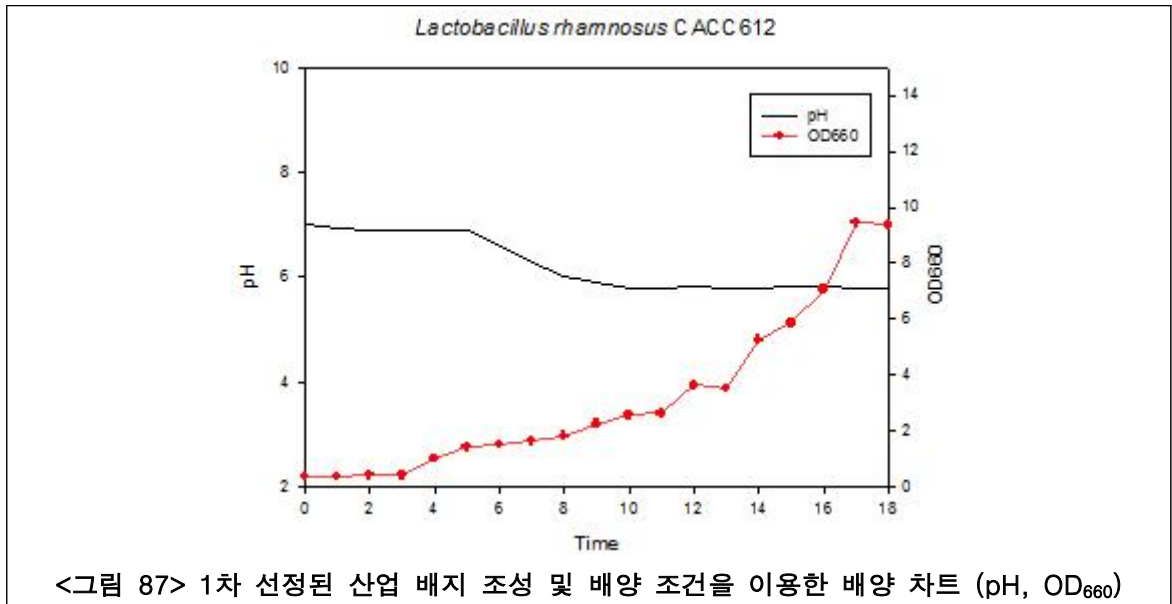
성배양기에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612는 yeast extract 3.0~3.5%에서 가장 높은 수율을 보였으며 4.0%, 4.5% 이상에서는 수율이 낮아지는 것을 확인하였다. 그리고 *B. animalis* CACC789는 soy peptone 3.0~4.0%에서 가장 높은 수율을 보였으며, 3.5%, 4.0% 이상에서는 수율이 낮아지는 것을 확인하였다(그림 86).



- 위 실험을 바탕으로 *L. rhamnosus* CACC612의 최적 질소원은 yeast extract 3.0%, *B. animalis* CACC789의 최적 질소원은 soy peptone 3.0%로 확정하였다.
- 선정된 산업배지 조성 및 배양 조건을 이용한 배양 수율 확인 실험을 수행하였다.
- *L. rhamnosus* CACC612의 배양 실험: 1차 선정된 산업 배지 조성 및 배양 조건으로 30 L jar fermenter를 이용하여 배양 실험을 진행하였다(표 51). 3회 반복 실험을 진행 하였고, 그 결과 1.8×10^9 , 2.1×10^9 , 2.5×10^9 cfu/ml (평균 2.1×10^9 cfu/ml) 수율을 확보 하였다(그림 87).

<표 51> *L. rhamnosus* CACC612 의 산업배양배지 조성 및 배양 조건

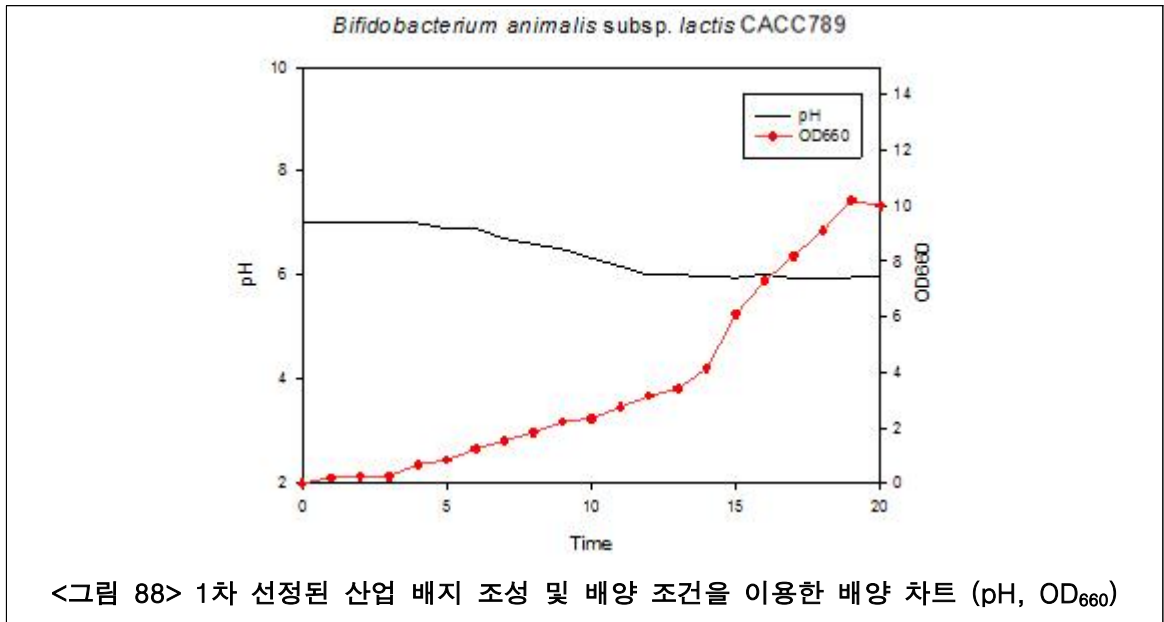
조성	함량(%)	조건	
Glucose	3.000	온도(℃)	37
Yeast extract	3.000	초기 pH 및 control	7.0 (5.8 pH control)
Magnesium sulfate 7H2O	0.010	rpm	100
Manganese sulfate 7H2O	0.005	내압(bar)	최소 양압
Potassium phosphate. di	0.100	혐기(gas)	-
Sodium acetate 3H2O	0.100	종균 접종량(%)	1.0
Ammonium citrate	0.500		
소포제	0.100		



- *B. animalis* CACC789 배양 실험: 1차 선정된 산업 배지 조성 및 배양 조건으로 30 L jar fermenter를 이용하여 배양 실험을 진행하였다(표 52). 3회 반복 실험을 진행 하였고, 그 결과 4.7×10^8 , 4.5×10^8 , 4.1×10^8 cfu/ml (평균 4.4×10^8 cfu/ml) 수율을 확보하였다 (그림 88).

<표 52> *B. animalis* CACC789의 산업배양배지 조성 및 배양 조건

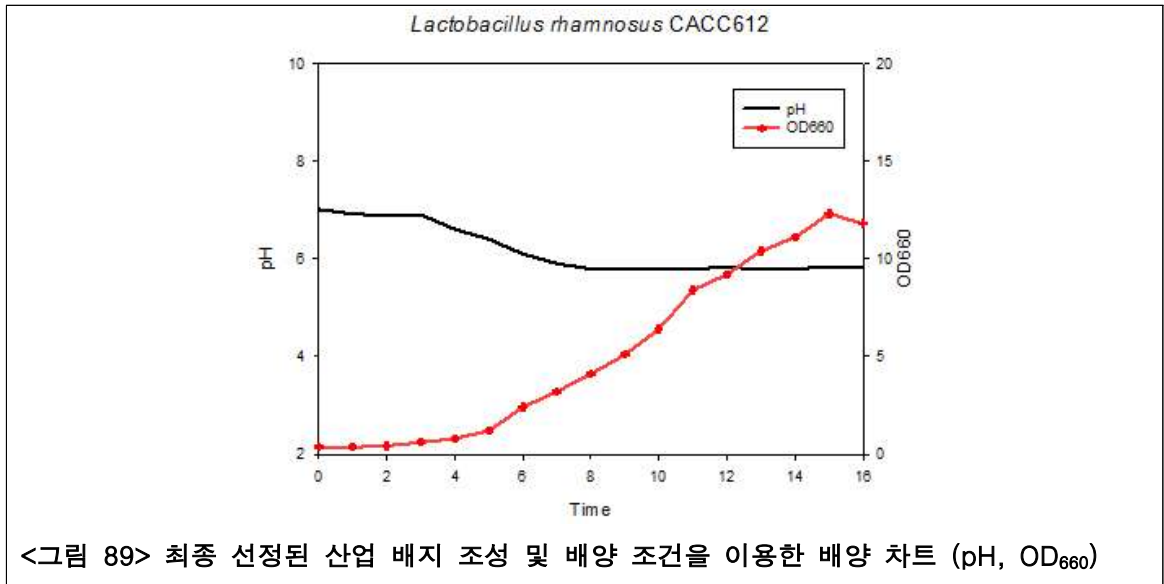
조성	함량(%)	조건	
Glucose	3.000	온도(°C)	37
Soy peptone	3.000	초기 pH 및 control	7.0 (6.0 pH control)
Potassium phosphate di	0.350	rpm	100
Ammonium citrate	0.200	내압(bar)	최소 양압
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.020	혐기(gas)	-
Sodium acetate	0.500	종균 접종량(%)	1.0
Calcium chloride	0.100	/	
L-cystein HCl	0.200		
Tween 80	0.100		
소포제	0.100		



- 1차 선정된 산업배양배지 및 배양 조건으로 *L. rhamnosus* CACC612, *B. animalis* CACC789의 원제 시생산을 진행하였고, 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612는 3.4×10^9 cfu/g, *B. animalis* CACC789는 6.8×10^9 cfu/g 균수를 확보하였다. 하지만 제조원가 절감 및 고농도의 제품 스펙을 위한 추가적인 수율 확보가 필요, 배지 조성 개선을 통한 수율 향상 실험을 진행하였다.
- *L. rhamnosus* CACC612 배양 수율 개선: 생산 수율 향상을 위해 15 L jar fermenter 를 사용하여 배지조성(질소원) 변경 실험을 하였다. 기존에서 사용하는 yeast extract 외 sodium casein, soy been meal, soy peptone, tryptone 을 추가(표 53)하여 배양 실험을 하였고 배양 중 2 시간 단위로 pH 와 OD₆₆₀ 값을 확인하였다. 그 결과, sodium casein 0.2%, soybean meal powder 0.5 %를 추가하였을 때 1.3×10^{10} cfu/ml 로 가장 높은 수율을 보였음. 또한 2회 추가 반복 실험을 통해 안정적인 수율 (2회 ; 9.8×10^9 cfu/ml, 1.7×10^{10} cfu/ml)을 확인하였다(그림 89).

<표 53> *L. rhamnosus* CACC612 최종 선정 산업배양배지 조성 및 배양 조건

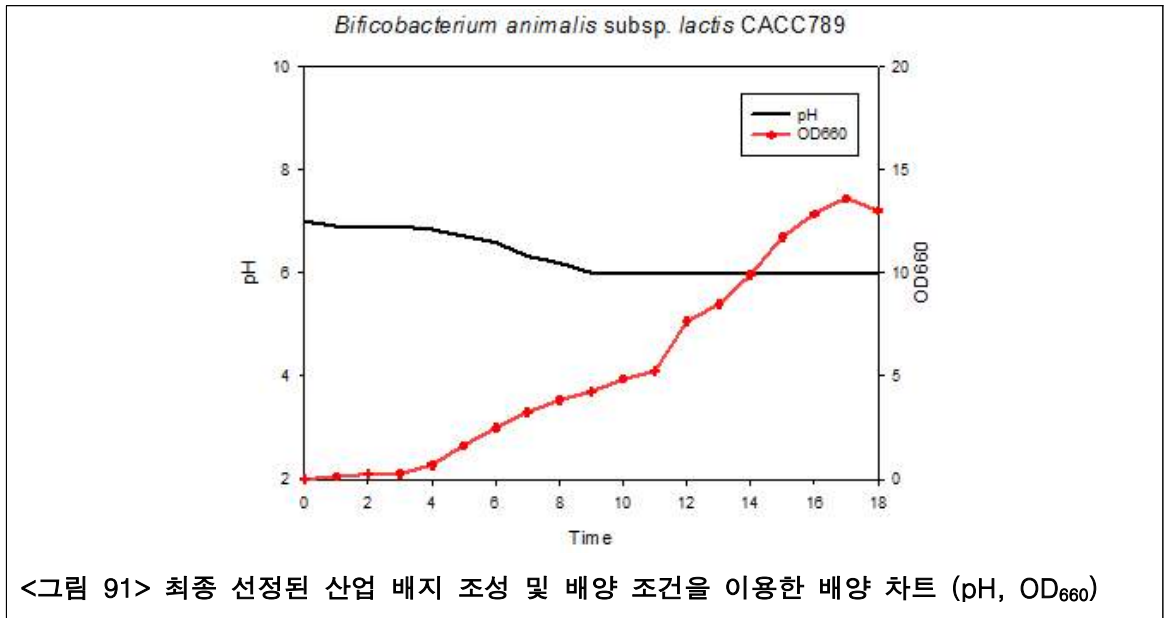
조성	함량(%)	조건	
Glucose	3.000	온도(°C)	37
Yeast extract	3.000	초기 pH 및 control	7.0 (5.8 pH control)
S.B.M (Powder)	0.500		
Soidum caseinate	0.200	rpm	100
Magnesium sulfate 7H2O	0.010	내압(bar)	최소 양압
Manganese sulfate 7H2O	0.005	혐기(gas)	-
Potassium phosphate. di	0.100	중균 접종량(%)	1.0
Sodium acetate 3H2O	0.100		
Ammonium citrate	0.500		
소포제	0.050		



- *B. animalis* CACC789 배지조성(질소원) 변경 실험: 생산 수율 향상을 위해 15 L jar fermenter를 사용하여 배지조성 (질소원) 변경 실험을 하였다. 배양 중 2시간 단위로 pH 와 OD₆₆₀ 값을 확인하였고 그 결과, soy peptone 투입량을 1.0 % 줄이고 yeast extract 1.0 % 추가 투입(표 54)했을 때 1.6×10^{10} cfu/ml 로 가장 높은 수율을 보였다. 또한 2회 추가 반복 실험을 통해 안정적인 수율 (2회 ; 1.2×10^{10} cfu/ml, 1.7×10^{10} cfu/ml)을 확인하였다(그림 90).

<표 54> *B. animalis* CACC_789 최종 선정 산업배양배지 조성 및 배양 조건

조성	함량(%)	조건	
Glucose	3.000	온도(°C)	37
Soy peptone	2.000	초기 pH 및 control	7.0 (6.0 pH control)
Yeast extract	1.000		
Potassium phosphate di	0.350	rpm	100
Ammonium citrate	0.200	내압(bar)	최소 양압
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.020	혐기(gas)	-
Sodium acetate	0.500	종균 접종량(%)	1.0
Calcium chloride	0.100		
L-cystein HCl	0.200		
Tween 80	0.100		
소포제	0.100		



- 동결건조 시 사용되는 탈지분유, 트레할로스, 덱스트린, glycerol 등을 이용하여 다양한 조성을 설정 뒤 실험을 실시하였다(표 55).

<표 55> 동결건조 보존제 조성

조성1	함량 (%)	조성2	함량 (%)	조성3	함량 (%)	조성4	함량 (%)
탈지분유	8.0	탈지분유	10.0	탈지분유	10.0	탈지분유	10.0
덱스트린	8.0	덱스트린	2.5	트레할로스	10.0	덱스트린	5.0
Glycerol	8.0	트레할로스	2.5			트레할로스	5.0
합계	24.0	합계	15.0	합계	20.0	합계	20.0

- 동결건조에 사용할 균체는 15 L jar fermenter에서 배양한 *L. rhamnosus* CACC612, *B. animalis* CACC789의 배양액을 사용하였다. 동결건조 시 균체의 생존률에 영향을 미치는 보존제의 효과를 확인하기 위해, 표 55의 4가지 조성으로 실험하였으며, 각각 보존제를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음 -80℃에서 완전히 동결한 후 동결건조기를 사용하여 5일간 동결건조 하였다. 조성 1은 5일 경과에도 성상이 끈적하고 건조가 되지 않아 폐기 하였고, 건조가 완료된 시료는 균일하게 분쇄하여 4℃ 냉장 보관하였다(그림 92).



<그림 92> 선발된 균주를 주 성분으로 제조한 동결건조 샘플

- 동결건조 미생물시료의 안정성을 알아보기 위하여 각 보존제의 조성별 수율을 확인 하였고, 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612, *B. animalis* CACC789 모두 조성 2에서 가장 높은 수율을 보였다(표 56).

<표 56> 동결건조 보존제 조성별 수율 확인

조성	조성2		조성3		조성4	
균주명	CACC612	CACC789	CACC612	CACC789	CACC612	CACC789
균수 cfu/g	8.8×10^{10}	5.7×10^{11}	7.1×10^{10}	3.7×10^{11}	7.9×10^{10}	4.1×10^{11}

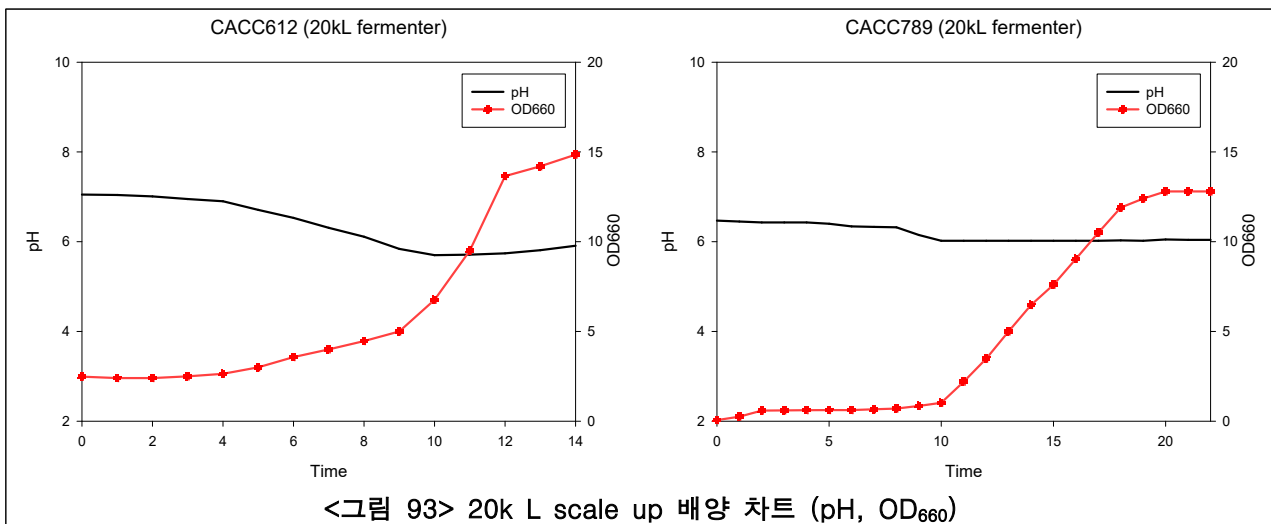
- 15L, 30L jar fermenter 조건을 바탕으로 100L, 2ton, 20ton fermenter의 배양조건 scale-up 적용시험을 진행 하였다. 동일한 배지 조성과 배양 조건 (배양 RPM은 배양 scale에 따라 변경)에서 배양하였으며, 각 scale 별 3회 반복 실험을 통해 안정적인 수율 확보 여부를 판단하였다. 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612 100L : 9.9×10^9 cfu/ml, 2ton : 1.2×10^{10} cfu/ml, 20ton : 9.8×10^9 cfu/ml, *B. animalis* CACC 789 100L : 1.8×10^{10} cfu/ml, 2ton : 1.5×10^{10} cfu/ml, 20ton : 1.7×10^{10} cfu/ml 의 수율을 확인하였으며, 위의 결과를 바탕으로 생산 20ton에서의 배지 및 배양조건을 확립하였다(표 57, 58, 그림 93).

<표 57> *L. rhamnosus* CACC612 생산 scale 배양 배지 및 조건

조성	함량(%)	조건	
Glucose	3.000	Fermenter	20ton
Yeast extract	3.000	working volume	15ton
S.B.M (Powder)	0.500	온도(°C)	37
Soidum caseinate	0.200	초기 pH 및 control	7.0 (5.8 pH control)
Magnesium sulfate 7H2O	0.010	rpm	100
Manganese sulfate 7H2O	0.005	내압(bar)	최소 양압
Potassium phosphate. di	0.100	혐기(gas)	-
Sodium acetate 3H2O	0.100	총균 접종량(%)	1.0
Ammonium citrate	0.500		
소포제	0.050		

<표 58> *B. animalis* CACC789 생산 scale 배양 배지 및 조건

조성	함량(%)	조건	
Glucose	3.000	Fermenter	20ton
Soy peptone	2.000	working volume	15ton
Yeast extract	1.000	온도(°C)	37
Potassium phosphate di	0.350	초기 pH 및 control	7.0 (6.0 pH control)
Ammonium citrate	0.200	rpm	100
Magnesium sulfate 7H2O	0.020	내압(bar)	최소 양압
Sodium acetate	0.500	혐기(gas)	-
Calcium chloride	0.100	총균 접종량(%)	1.0
L-cystein HCl	0.200		
Tween 80	0.100		
소포제	0.100		



<그림 93> 20k L scale up 배양 차트 (pH, OD₆₆₀)

- 최종 생산수율 검토를 위해 완료된 대량배양공정체계에 따라 원제 시생산을 진행하였고, 그 결과 *L. rhamnosus* CACC612 1.1×10^{11} cfu/g, *B. animalis* CACC789 5.3×10^{11} cfu/g 수율을 확인했다.
- 완제품 부형제 및 향료 선정은 주로 간식에 사용되는 향료 종류 중 어분, 아쿠아바이트로 샘플을 제작하였다. 샘플 제작 후 사람 기준의 관능적 및 고양이 카페의 반려묘를 대상으로 간이 선호도 시험을 통하여 아쿠아바이트로 선정했다(표 59).

<표 59> 원제 제형화 부형제 조성표

성분명	조성(%)
유산균 원료	10.0
프락토올리고당	5.0
덱스트린	33.0
D-솔비톨	10.0
타우린	3.0
L-lysine	2.0
DL-methionine	5.0
아쿠아바이트	10.0
기타	22.0
합계	100.0

- 현재 시장에 유통되는 제품들은 *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *L. acidophilus*, *B. longum* 등 다양한 유산균을 함유하고 있으며 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^9$ cfu/g 까지 포함된 제품이 유통되고 있다. 이들 제품의 제형은 분말, 과립(산제)가 주를 이루며 젤형(츄르)과 일부 액제도 판매되고 있다(표 60).

<표 60> 현재 유통되고 있는 제품의 함량 및 제형(반려묘 유산균제)

회사	주 성분	함량	제형
A	비피도박테리움 비피둠	4.0×10^9 cfu/g	분말
	엔테로코커스 페시움	2.0×10^9 cfu/g	
B	락토바실러스 플란타룸	5.0×10^9 cfu/g	분말
	락토바실러스 람노수스	1.0×10^9 cfu/g	
	비피도박테리움 롱검	6.0×10^8 cfu/g	
	비피도박테리움 비피둠	3.5×10^8 cfu/g	
C	락토바실러스 퍼멘텀	1.0×10^7 cfu/g	분말
	바실러스 서브틸러스	1.0×10^6 cfu/g	
	사카로마이세스 세리비지에	1.0×10^6 cfu/g	
D	락토바실러스 플란타룸	첨가	츄르

- 선정된 부형제와 향료를 바탕으로 분말 시제품을 생산하였다(그림 94).

<그림 95> 멍멍정장 제품 등록증과 완제품 안전성 시험결과
피부자극성 시험, 급성경구독성시험

- 냥냥정장 분말(산제)는 스틱 포장으로 선정하였으며, 보증함량은 10^7 이상으로 제품등록 완료했다(그림 96).



<그림 96> 반려묘용 프로바이오틱스 제품 '냥냥정장' 출시

(2) 정량적 연구개발성과

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		4	8	-	5	-	4	-	-	-
1차년도	목표	2	2	-	-	-	-	-	-	-
	실적	3	3	-	-	-	-	-	-	-
2차년도	목표	2	2	-	1	-	1	-	-	-
	실적	3	3	-	5(78)	-	83	-	-	-
3차년도	목표	-	2	-	2	-	2	-	-	-
	실적	4	4	-	5(94)	-	98	-	-	-
4차년도	목표	-	2	-	2	-	1	-	-	-
	실적	1	4	-	5(64)	-	65	-	-	-
계	목표	4	8	-	5	-	4	-	-	-
	실적	11	14	-	15(236)	-	246	-	-	-

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SC I	비 SC I						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건				
가중치																				
최종목표	5	5	-	4	20	2	250	140	21	-	-	7	-	1	10	-	3	-	-	-
1차년도	목표	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
	실적	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-
2차	목표	2	-	-	2	10	1	-	3	-	-	2	-	1	2	-	2	-	-	-

년도	실적	2	-	-	2	20	1	-	-	5	-	-	2	-	2.8	4	-	2	-	-
3차년도	목표	2	2	-	-	-	-	10	-	2	-	-	2	-	1	2	-	-	-	-
	실적	2	3	-	-	-	-	13.1	-	5	-	-	2	-	2.8 73	4	-	1	-	1
4차년도	목표	1	2	-	2	10	1	20	-	2	-	-	2	-	1	2	-	-	-	-
	실적	2	2	-	2	20	2	19.6	-	-	-	-	3	-	2.8 95	5	-	-	-	2
소계	목표	5	4	-	4	20	2	30	-	7	-	-	6	-	1	7	-	3	-	-
	실적	7	5	-	4	40	3	32.7	-	10	-	-	7	-	2.8	15	-	4	-	3
종료 1차년도		-	1	-	-	-	-	40	20	2	-	-	1	-	1	3	-	-	-	-
종료 2차년도		-	-	-	-	-	-	80	40	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 3차년도		-	-	-	-	-	-	100	80	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 4차년도		-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 5차년도		-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
소계		-	1	-	-	-	-	220	140	14	-	-	1	-	1	3	-	-	-	-
합계		5	5	-	4	20	2	250	140	21	-	-	7	-	1	10	-	3	-	-

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Bifidobacterium gallinarum</i> CACC514(CL105)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-02-08	igem-0000274	2.4Mb
2	<i>Lactobacillus reuteri</i> C1	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-11-5	igem-0000934	1.9Mb
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-11-5	igem-0000935	2.1Mb
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> CACC 566(CL102)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-10-14	igem-0000499	3.1Mb
5	<i>Pediococcus acidilactici</i> CACC 537(CL103)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-10-14	igem-0000501	2.0Mb
6	<i>Bifidobacterium longum</i> CACC 517	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-10-14	igem-0000502	2.2Mb
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> CACC 558	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-16	igem-0001646	1.3Mb
8	<i>Bacteroides</i> sp. CACC 737	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-16	igem-0001647	1.3Mb
9	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 789	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-23	igem-0001950	4.7Mb
10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC 612	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-23	igem-0001951	15.2Mb
11	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 858	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2022-02-07	igem-0002705	1.9Mb

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Bifidobacterium gallinarum</i> CACC514(CL105)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-02-08	igem-0000274	2.4Mb
2	<i>Lactobacillus reuteri</i> C1	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-11-5	igem-0000934	1.9Mb
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-11-5	igem-0000935	2.1Mb
4	<i>Bifidobacterium longum</i> CACC 517	항균능 등 우수	2019-10-14	igem-0000502	2.2Mb
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> CACC 566	항균능 등 우수	2019-10-14	igem-0000499	3.1Mb
6	<i>Pediococcus acidilactici</i> CACC 537	내산, 내담즙성, 장부착능 우수	2019-10-14	igem-0000501	2.0Mb
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> CACC 558	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-16	igem-0001646	1.3Mb
8	<i>Bacteroides</i> sp. CACC 737	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-16	igem-0001647	1.3Mb
9	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 789	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-23	igem-0001950	4.7Mb
10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC 612	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-23	igem-0001951	15.2Mb
11	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 858	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2022-02-07	igem-0002705	1.9Mb
12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC612	항균능 등 우수 (특허)	2021-06-28	KACC 92348P	-
13	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC789	항균능 등 우수 (특허)	2021-06-28	KACC 92349P	-
14	<i>Bacillus coagulans</i> CACC834	PacBio 분석 및 대사체 우수	2021-03-16	KACC 22145	-

□ 표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	반려견 대상 <i>L. reuteri</i> C1 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	환자견 4마리 * 급여 전·후 2건 = 8건	2019-10-29	igem-0000738, igem-0000740, igem-0000742, igem-0000744, igem-0000746, igem-0000748, igem-0000750, igem-0000752,	0.4
2	반려견 대상 <i>B. longum</i> CACC517 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	(정상견 5마리 + 환자견 4마리) * 급여 전·후 2건 = 18건	2019-10-29	igem-0000649(50), igem-0000647(48), igem-0000661(42), igem-0000659(60), igem-0000653(54), igem-0000662(52), igem-0000645(46), igem-0000643(44), igem-0000663(58), igem-0000655(56), igem-0000670, igem-0000669, igem-0000668, igem-0000667, igem-0000665, igem-0000664,	1.8

				igem-0000672, igem-0000913,	
3	반려견 대상 <i>P. acidilactici</i> CACC537 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	(정상견 5마리 + 환자견 5마리) * 급여 전·후 2건 = 20건	2019-10-29	igem-0000685 ~ igem-0000705	0.9
4	반려견 대상 <i>L. plantarum</i> CACC558 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	(정상견 4마리 + 환자견 1마리) * 급여 전·후 2건 = 10건	2019-10-29	igem-0000675~ igem-0000684	0.5
5	반려묘 장내미생물 유전체 분석	고양이 22마리 (환경별, 성별, 종별) = 22건	2019-10-29	igem-0000706, igem-0000709~29	1.2
6	마우스 대상 장내미생물 분석 (Control Group)	마우스 12마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 3마리) = 12건	2020-10-26	igem-0001996~ igem-0002007	0.3
7	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	마우스 16마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 4마리) = 16건	2020-10-26	igem-0002008~ igem-0002023	0.3
8	마우스 대상 <i>L. acidophilus</i> C5 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	마우스 16마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 4마리) = 16건	2020-10-26	igem-0002024 igem-0002026~ igem-0002040	0.3
9	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 + <i>L. acidophilus</i> C5 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	마우스 16마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 4마리) = 16건	2020-10-26	igem-0001980~ igem-0001995	0.3
10	반려묘 대상 프로바이오틱스 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	반려묘 34마리 프로바이오틱스 급여 전 = 34건	2020-10-26	igem-0002041~ igem-0002074	1.7
11	반려묘 대상 프로바이오틱스 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	반려묘 34마리 프로바이오틱스 급여 후 = 34건	2021-11-23	igem-0002283~ igem-0002316	0.81
12	마우스대상 Control Group 소장 전사체 분석	마우스 1주차 3마리 + 4주차 3마리 = 6건	2021-11-23	igem-0002319 igem-0002320 igem-0002330 igem-0002331 igem-0002332 igem-0002333	31.2
13	마우스 대상 <i>L. acidophilus</i> C5 급여 후 소장 전사체 분석	마우스 1주차 4마리 + 4주차 4마리 = 8건	2021-11-23	igem-0002317 igem-0002318 igem-0002325 igem-0002326 igem-0002327 igem-0002328 igem-0002329 igem-0002346	62.7
14	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 급여 후 소장 전사체 분석	마우스 1주차 4마리 + 4주차 4마리 = 8건	2021-11-23	igem-0002321 igem-0002322 igem-0002334 igem-0002335 igem-0002336 igem-0002337 igem-0002338 igem-0002339	75.4
15	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C5 + <i>L.</i> <i>acidophilus</i> C1 급여 후 소장 전사체 분석	마우스 1주차 4마리 + 4주차 4마리 = 8건	2021-11-23	igem-0002323 igem-0002324 igem-0002340 igem-0002341 igem-0002342 igem-0002343 igem-0002344 igem-0002345	64.8

□ 유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)
----	------------------------	------	------	------	-------------

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Bifidobacterium gallinarum</i> CACC 514(CL105)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-02-08	igem-0000274	2.4Mb
2	<i>L. reuteri</i> C1	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-11-05	igem-0000934	1.9Mb
3	<i>L. acidophilus</i> C5	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-11-05	igem-0000935	2.1Mb
4	<i>L. paracasei</i> CACC 566(CL102)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-10-14	igem-0000499	3.1Mb
5	<i>P. acidilactici</i> CACC 537(CL103)	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-10-14	igem-0000501	2.0Mb
6	<i>B. longum</i> CACC 517	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2019-10-14	igem-0000502	2.2Mb
7	반려견 대상 <i>L. reuteri</i> C1 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	환자건 4마리 * 급여 전·후 2건 =8건	2019-10-29	igem-0000738, igem-0000740, igem-0000742, igem-0000744, igem-0000746, igem-0000748, igem-0000750, igem-0000752,	0.4
8	반려견 대상 <i>B. longum</i> CACC517 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	(정상건 5마리 + 환자건 4마리) * 급여 전·후 2건 =18건	2019-10-29	igem-0000649(50), igem-0000647(48), igem-0000661(42), igem-0000659(60), igem-0000653(54), igem-0000662(52), igem-0000645(46), igem-0000643(44), igem-0000663(58), igem-0000655(56), igem-0000670, igem-0000669, igem-0000668, igem-0000667, igem-0000665, igem-0000664, igem-0000672, igem-0000913,	1.8
9	반려견 대상 <i>P. acidilactici</i> CACC537 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	(정상건 5마리 + 환자건 5마리) * 급여 전·후 2건 =20건	2019-10-29	igem-0000685 ~ igem-0000705	0.9
10	반려견 대상 <i>L. plantarum</i> CACC558 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	(정상건 4마리 + 환자건 1마리) * 급여 전·후 2건 =10건	2019-10-29	igem-0000675~ igem-0000684	0.5
11	반려묘 장내미생물 유전체 분석	고양이 22마리 (환경별, 성별, 종별) = 22건	2019-10-29	igem-0000706, igem-0000709~29	1.2
12	마우스 대상 장내미생물 분석 (Control Group)	마우스 12마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 3마리) =12건	2020-10-26	igem-0001996~ igem-0002007	0.3
13	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	마우스 16마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 4마리) =16건	2020-10-26	igem-0002008~ igem-0002023	0.3
14	마우스 대상 <i>L. acidophilus</i> C5 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	마우스 16마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 4마리) =16건	2020-10-26	igem-0002024 igem-0002026~ igem-0002040	0.3
15	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 + <i>L. acidophilus</i> C5	마우스 16마리 (1주차, 2주차, 3주차, 4주차 각 4마리) =16건	2020-10-26	igem-0001980~ igem-0001995	0.3

	급여 전·후 장내미생물 유전체 분석				
16	반려묘 대상 프로바이오틱스 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	반려묘 34마리 프로바이오틱스 처리후 =34건	2020-10-26	igem-0002041~ igem-0002074	1.7
17	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 789	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-23	igem-0001950	4.7
18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC 612	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-23	igem-0001951	15.2
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> CACC 558	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-16	igem-0001646	1.3Mb
20	<i>Bacteroides</i> sp. CACC 737	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2020-10-16	igem-0001647	1.3Mb
21	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 858	PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	2022-02-07	igem-0002705	1.9Mb
22	반려묘 대상 프로바이오틱스 급여 전·후 장내미생물 유전체 분석	반려묘 34마리 프로바이오틱스 처리후 = 34건	2021-11-23	igem-0002283~ igem-0002316	0.81
23	마우스대상 Control Group 소장 전사체 분석	마우스 1주차 3마리 + 4주차 3마리 = 6건	2021-11-23	igem-0002319 igem-0002320 igem-0002330 igem-0002331 igem-0002332 igem-0002333	31.2
24	마우스 대상 <i>L. acidophilus</i> 급여 후 소장 전사체 분석	마우스 1주차 4마리 + 4주차 4마리 = 8건	2021-11-23	igem-0002317 igem-0002318 igem-0002325 igem-0002326 igem-0002327 igem-0002328 igem-0002329 igem-0002346	62.7
25	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 급여 후 소장 전사체 분석	마우스 1주차 4마리 + 4주차 4마리 = 8건	2021-11-23	igem-0002321 igem-0002322 igem-0002334 igem-0002335 igem-0002336 igem-0002337 igem-0002338 igem-0002339	75.4
26	마우스 대상 <i>L. reuteri</i> C1 + <i>L. acidophilus</i> C5 급여 후 소장 전사체 분석	마우스 1주차 4마리 + 4주차 4마리 = 8건	2021-11-23	igem-0002323 igem-0002324 igem-0002340 igem-0002341 igem-0002342 igem-0002343 igem-0002344 igem-0002345	64.8

□ 병원성미생물진단마커 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
-	-	-	-	-	-

□ 병원성미생물 정보 완성

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
-	-	-	-	-	-

□ 미생물 병발생 기작 규명

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
-	-	-	-	-	-

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Investigating the probiotic characteristics of four microbial strains with potential application in feed industry	PLoS ONE	김정애	14(6)	미국	Public Library of Science	SCI	2019.06.26	1932-6203	100%
2	Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs	PLoS ONE	신동현	14(8)	미국	Public Library of Science	SCI	2019.08.28	1932-6203	100%
3	Comparative genomics of canine <i>Lactobacillus reuteri</i> reveals adaptation to a shared environment with humans	Genes & Genomics	신동현, 김양선	42(9)	한국	The Genetics Society of Korea	SCI	2020.08.06	1976-9571	100%
4	Genome analysis of <i>Bacteroides</i> sp. CACC 737 isolated from feline for its potential application	JAST	김정애	62(6)	한국	Journal of Animal Science and Technology	SCI	2020.11.30	2672-0191	100%
5	Characterization and Functional Test of Canine Probiotics	FRONTIERS IN MICROBIOLOGY	장현준	12(6255)	미국	FRONTIERS IN MICROBIOLOGY	SCI	2021.03.08	1664-302X	100%
6	Complete genome sequencing and comparative genomic analysis of <i>Lactobacillus acidophilus</i> C5 as a potential canine probiotics	JAST	손승우	63(6)	한국	Journal of Animal Science and Technology	SCI	2021.11.30	2672-0191	100%
7	Complete genome sequence of <i>Bacillus coagulans</i> CACC834 isolated from canine	JAST	김정애	63(6)	한국	Journal of Animal Science and Technology	SCI	2021.11.30	2672-0191	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	Genomic characteristics of a potential probiotic bacterium <i>Bifidobacterium</i> sp. CIA01 isolated from a dog feces	정민영	2018.10.11	한국미생물학회연합	한국
2	Practical examples of microbial use and industrial status for agriculture	김양선	2018.10.25	2018 작물보호분야 공동 국제학술대회	한국
3	Genomic characteristics of a potential probiotic bacterium <i>Bifidobacterium gallinarum</i> CACC 514 isolated from a dog feces	정민영	2019.06.17	체코IPC	체코
4	Probiotic characteristics of <i>Lactobacillus</i> stains isolated from a dog feces	김양선	2019.07.08	FEMS2019 글래스코	영국 (스코틀랜드)
5	Comparative genomics of the dog <i>Lactobacillus reuteri</i> reveals adaptation to a shared environment with humans	신동현	2019.04.17	한국 미생물학회	한국
6	Comparative genomics of the canine gut <i>Lactobacillus acidophilus</i> reveals genetic feature and lifestyle adaptation	신동현	2019.06.17	체코 IPC	체코
7	Characterization of probiotic strains	장현준	2020.08.27	한국축산학회	한국

	isolated from dog feces				
8	Genome analysis of <i>Bacteroides</i> sp. CACC 737 isolated from feline for its potential application	김정애	2020.10.21	한국생명공학회	한국
9	Probiotics roles (CACC517) on the modulation of gut microbiota for the healthy and IBD dogs	신동현	2020.10.07	한국 미생물학회	한국
10	Probiotics roles (CACC566) on the modulation of gut microbiota for the healthy and IBD dogs	신동현	2020.11.16	세계미생물학회연합	한국
11	Characterization and Function effects of Feline Probiotics	장현준	2021.08.12	한국생명과학회	한국
12	Understanding of Canine Probiotics(C1 and C5) Effect on the Modulation of Gut Microbiota	손승우	2021.08.25	한국미생물학회	한국
13	반려묘유래 유산균의 효능분석	장현준	2021.12.08	엠바이옴 국제컨퍼런스	한국
14	다양한 환경과 조건에 따른 반려묘의 장내 메타지놈의 이해	손승우	2021.12.08	엠바이옴 국제컨퍼런스	한국
15	반려동물용 건강기능성 미생물제품 개발	황영민	2021.12.08	엠바이옴 국제컨퍼런스	한국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식
-	-	-	-	-	-	-	-	-

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
-	-	-	-

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Bifidobacterium gallinarum</i> CL105유전체	igem-0000274 GCA_004135085.1	iGEM NCBI	2019 2018
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> CACC 537	KACC81098BP	KACC	2019
3	<i>Bifidobacterium longum</i> CACC 517	KACC81103BP	KACC	2019
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> CACC 566전장유전체	igem-0000499	iGEM	2019
5	<i>Bifidobacterium longum</i> CACC 517	igem-0000502	iGEM	2019
6	<i>Pediococcus acidilactici</i> CACC 537 전장유전체	igem-0000501	iGEM	2019
7	<i>Lactobacillus reuteri</i> C1	igem-0000934	iGEM	2019
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C5	igem-0000935	iGEM	2019
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> CACC 558 전장유전체	igem-0001646	iGEM	2020
10	<i>Bacteroides</i> sp. CACC 737 전장유전체	igem-0001647	iGEM	2020
11	<i>Bacteroides</i> sp. CACC 737	KACC 22065	KACC	2020
12	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 789 PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	igem-0001950	iGEM	2020
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC 612 PacBio를 이용한 유전체 데이터 생산	igem-0001951	iGEM	2020
14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC612	KACC 92348P	KACC	2021
15	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC789	KACC 92349P	KACC	2021
16	<i>Bacillus coagulans</i> CACC834	KACC 22145	KACC	2021
17	<i>Bifidobacterium animalis</i> CACC 858	igem-0002705	iGEM	2022

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	크로톤 포일라네이 추출물을 이용한 항균용 조성물	대한민국	국립생물 자원관,(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2018.09. 14	10-2018 -011024 7	10-2104 837	국립생물 자원관,(재)농축산 용미생물 산업육성 지원센터	2020.04. 21	10-2104 837	100%	-
2	신균주 페이오코쿠스 에시딜락티시 CACC537 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	대한민국	(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2019.09. 10	10-2019 -011201 3	10-2064 134	(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2020.01. 02	10-2064 134	100%	√
3	신균주 비피도박테리움 등검 CACC517 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	대한민국	(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2019.10.2 5	10-2019 -013378 2	10-2140 405	(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2020.07. 27	10-2140 405	100%	√
4	신규한 락토바실러스 루테리 LBR_C1 균주 및 신규한 락토바실러스 아시도필러스 LBA_C5 균주를 포함하는 반려동물의 면역 증강용 조성물	대한민국	우진비엔 지 주식회사 (재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2020.01 .31	10-2020 -001213 7	10-2234 835	우진비엔 지 주식회사, (재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2021.03. 26	10-2234 835	100%	√
5	신규한 락토바실러스 루테리 LBR_C1 균주 및 신규한 락토바실러스 아시도필러스 LBA_C5 균주를 포함하는 반려동물의 성장용 조성물	대한민국	우진비엔 지 주식회사 (재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2020.01 .31	10-2020 -001213 8	10-2234 836	우진비엔 지 주식회사, (재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2021.03. 26	10-2234 836	100%	√
6	신균주 락토바실러스 람노서스 CACC 612 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료조성물	대한민국	(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2021.07 .28	10-2021 -009927 7	-	-	-	-	100%	√
7	신균주 비피도박테리움 애니멀리스 CACC789 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	대한민국	(재)농축 산용미생 물산업육 성지원센 터	2021.07 .28	10-2021 -009927 8	-	-	-	-	100%	√

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1										√
2				√						
3				√						
4	√									
5	√									
6				√						
7				√						

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율
-	-	-	-	-	-	-	-

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호
-	-	-	-	-	-

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
-	-	-	-	-	-	-

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증어부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자
-	-	-	-	-	-	-	-

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	명명정장 정	-	춘천바이오산업진흥원	우진비앤지주식회사	테스트 샘플	2년	-	-

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시권	신균주 페디오코쿠스 에시달락티시 CACC537 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	우진비앤지주식회사	2019.10.16.	10,000,000	-
2	통상실시권	신균주 비피도박테리움 롱검 CACC517 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	우진비앤지주식회사	2019.10.16.	10,000,000	-
3	통상실시권	신균주 락토바실러스 람노서스 CACC612 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	우진비앤지주식회사	2021.08.19.	10,000,000	-
4	통상실시권	신균주 비피도박테리움 애니멀리스 CACC789 및 이를 유효성분으로 함유하는 반려동물용 사료 조성물	우진비앤지주식회사	2021.08.19.	10,000,000	-

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
-	-	-	-	-	-

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	제품화_명명정장 정	보조사료 등록	우진비앤지주식회사	28,195	-	2020,2021	10년
2	자기실시	신제품개발	국내	제품등록_명명정장 파우더	보조사료 등록	-	-	-	-	10년
3	자기실시	신제품개발	국내	제품등록_냥냥정장	보조사료 등록	-	-	-	-	10년

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
명명정장 제품 판매	2020	13,126	-	13,126	매출원장, 세금계산서
명명정장 제품 판매	2021	15,069	-	15,069	매출원장, 세금계산서
균주 원료 판매	2021	4,520	-	4,520	매출원장, 세금계산서
합계		32,715	-	32,715	-

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		반려동물 유래 미생물 균주 개발		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	4년		
	소요예산(천원)	1,366,001		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		32,715	100,000	500,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내		0.0002	0.0006	0.003
국외		-	-	-
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		생균제로 개발한 원료에 포스트바이오틱스 기술을 접목시켜 사균화 한 후 사균체로서의 원료화 계획 생균 및 사균체 원료를 사료, 간식 등 다양한 반려동물 분야에 첨가용으로 판매 예정		
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
		-	50,000	100,000
	수출	-	30,000	50,000

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	멍멍정장,냥냥정장	우진비엔지주식회사	3	2	5
2	멍멍정장,냥냥정장	전북대학교	1	-	1
3	멍멍정장,냥냥정장	(재)농축산용미생물 산업육성지원센터	1	3	4
합계					10

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	14
		생산인력	27
	개발 후	연구인력	16
		생산인력	23

퇴사 등에 의한 연구인력 및 생산인력 차이 발생

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
-	-	-	-	-
합계				-

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	-	-	-	-	-	-	-
기대 목표	-	-	-	-	-	-	-

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원
-	-	-	-	-	-

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용
1	행정규칙	개정	비피도박테리움 애니말리스 락티스	사료관리법 제2조제4호	2022.01.11.	농림축산식품부	「사료 등의 기준 및 규격」(농림축산식품부고시 제2021-99호, 2021.12.29.) 제8조제10항에 따라 단미사료의 범위에 해당하는 물질 등을 다음과 같이 추가 등록 및 변경하여 공고한다.

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
-	-	-	-	-	-

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용
-	-	-	-	-	-

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	전진모	2018	-	-	-	1	0	-	-	-	-	0	-
2	전진모	2019	-	-	1	-	0	-	-	-	-	0	-
3	최재영	2019	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	연구사 취업
4	백지혜	2020	-	-	-	1	-	0	-	-	0	-	-

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
-	-	-	-	-	-	-

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비
-	-	-	-	-	-

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용
-	-	-	-	-	-	-

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기사 보도	파이낸셜뉴스 외 1매체	우진비앤지,마이크로바이옴 응용 애견 정장제 '멍멍정장'출시	2020.04.22
2	전시회 참석	ISFNF(International Symposium on Fish Nutrition and Feeding)	부스 전시	2021.12.14.
3	기사 보도	한국동물약품협회	우진비앤지(주), 국내최초 고양이 유래 유산균 미생물제제 개발 및 상용화 성공	2021.12.22.

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수포스터상	2021년 한국생명과학회 국제학술대회에서 우수포스터상 수상	(재)농축산용미생물산업육성지원센터 장현준	2021.08.12	한국생명과학회

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템 * 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템 * 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)
(재)농축산용미생물산업육성지원센터	동물세포관찰용 현미경	Primovert microscope stand with binocular phototube 415510-110 1-000	X	-	-	19.02.13	6,589	(재)농축산용미생물산업육성지원센터

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과]

해당사항 없음

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

- 2020년 ‘멍멍정장’ 제품 출시에 대한 기사보도를 통해 홍보성과 기여함
- 2021년 ‘냥냥정장’ 제품 개발에 대한 기사보도를 통해 홍보성과 기여함
- 2021년 ‘멍멍정장’ 및 ‘냥냥정장’ 제품에 대한 전시회 참가 부스 전시를 통해 홍보성과 기여함

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 반려동물 유래 미생물 확보	○ 반려동물 유래 미생물 168종 분리 및 확보	100
○ 기능성 평가 및 유용미생물 선정	○ 내산성, 내담즙성, 장내생존능, 항균능, 세포활성 및 면역조절 유전자 발현율 조사를 통한 유용미생물 8종 선정	100
○ 임상을 통한 건강개선 및 면역증강 효과 확보	○ 반려견·반려묘 대상 유용미생물 8종 급여 임상 실시	100
○ 전장 유전체 분석을 통한 유전적 기능성 및 안전성 확보	○ 8종의 전장 유전체 분석 및 비교 유전체 분석 완료	100
○ 미생물 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 분석	○ 반려견·반려묘 대상 유용미생물 8종 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 236건 분석	100
○ 유용미생물의 대사체 분석	○ 유용미생물 4종에 대한 배양조건에 따른 대사체 분석 완료	100
○ 미생물 소재의 대량배양공정 확립	○ 반려견·반려묘 유래 유용미생물 4종에 대한 대량배양 공정 확립 및 원료화	100
○ 시제품에 대한 안정성 및 유효성 검증	○ 반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 시제품에 대한 GLP 급성 경구독성, 피부자극성 시험 진행 및 무독성 결과 확인	100
○ 반려동물 미생물 제제 제형화 및 사업화	○ 반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 ‘멍멍정장’, ‘냥냥정장’ 제품 출시 및 유통	100

4. 목표 미달 시 원인분석- 해당사항없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 본 연구를 통해 반려동물 장내, 발효식품 등 다양한 환경에서 분리한 미생물을 통해 프로바이오틱스로서의 가능성을 확인 할 수 있었으며 이는 향후 관련 분야에 적용 가능한 국내 미생물 자원을 확보하는 중요한 연구가 됨. 분리한 균주에 대해 유전체 기술을 활용하여 반려견, 반려묘에 급여 시 장내 마이크로바이옴 및 관련 대사체의 발현 변화를 확인 하였으며, 이를 통해 프로바이오틱스의 체내 작용 및 장 건강 개선에 대한 기초 원천 기술을 확보하였음.
 - 본 연구 결과를 통해 프로바이오틱스로서 우수한 효능을 보인 LBR_C1, LBA_C5, CACC612, CACC789 등 균주의 대량배양공정을 개발하여 프로바이오틱스의 생산성 향상 및 제작 단가, 안정성 등 신규 분리 균주의 사업화에 있어 기술 개발 사례와 기준 제시로 사용 될 수 있고, 이를 통해 경제·산업적 측면으로도 많은 효과를 기여함.
 - 그동안 반려동물, 특히 반려묘에 대한 효능평가는 실험묘 품종 및 고양이의 생리적 특성에 맞는 사육 시스템 가이드라인의 부재로 거의 실험이 이루어지지 못했으나, 지역 거점 동물 병원을 이용한 임상 후보군 모집, 소유주와의 실험 동의서 작성 등 반려동물 임상시험의 사례 및 기준으로 활용 될 수 있음.
 - 기존 반려동물 프로바이오틱스는 균주의 유래에 대한 정보가 명확하지 않고 반려동물 대상 효능평가가 체계화되어 있지 않았으며, 이러한 불명확한 프로바이오틱스가 주도하는 시장이 아니라 효능 및 안전성에 대한 정보가 명확하고 고부가가치 적인 프로바이오틱스를 생산하여 새로운 시장 창출 또는 시장 인식의 개선에 기여함.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 본 연구를 통해 반려동물 장내, 발효식품 등 다양한 환경에서 분리한 미생물을 통해 프로바이오틱스로서의 가능성을 확인 할 수 있었으며 이는 향후 관련 분야에 적용 가능한 국내 미생물 자원을 확보하는 중요한 연구가 됨. 분리한 균주에 대해 유전체 기술을 활용하여 반려견, 반려묘에 급여 시 장내 마이크로바이옴 및 관련 대사체의 발현 변화를 확인 하였으며, 이를 통해 프로바이오틱스의 체내 작용 및 장 건강 개선에 대한 기초 원천 기술을 확보하였음.
 - 본 연구 결과를 통해 프로바이오틱스로서 우수한 효능을 보인 LBR_C1, LBA_C5, CACC612, CACC789 등 균주의 대량배양공정을 개발하여 프로바이오틱스의 생산성 향상 및 제작 단가, 안정성 등 신규 분리 균주의 사업화에 있어 기술 개발 사례와 기준 제시로 사용 될 수 있고, 이를 통해 경제·산업적 측면으로도 많은 효과를 기여함.
 - 그동안 반려동물, 특히 반려묘에 대한 효능평가는 실험묘 품종 및 고양이의 생리적 특성에 맞는 사육 시스템 가이드라인의 부재로 거의 실험이 이루어지지 못했으나, 지역 거점 동물 병원을 이용한 임상 후보군 모집, 소유주와의 실험 동의서 작성 등 반려동물 임상시험의 사례 및 기준으로 활용 될 수 있음.
 - 기존 반려동물 프로바이오틱스는 균주의 유래에 대한 정보가 명확하지 않고 반려동물 대상 효능평가가 체계화되어 있지 않았으며, 이러한 불명확한 프로바이오틱스가 주도하는 시장이 아니라 효능 및 안전성에 대한 정보가 명확하고 고부가가치 적인 프로바이오틱스를 생산하여 새로운 시장 창출 또는 시장 인식의 개선에 기여함.
-

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE	-	
	계	1	
학술발표	국내	-	
	국외	1	
	계	1	
특허출원	국내	-	
	국외	-	
	계	-	
특허등록	국내	1	
	국외	-	
	계	1	
인력양성	학사	-	
	석사	-	
	박사	-	
	계	-	
사업화	매출액	220백만원	
	수출액	140백만원	
	고용창출	14명	
제품개발	시제품개발	-	
비임상시험 실시		-	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	-
		2상	-
		3상	-
	의료기기	-	
진료지침개발		-	
신의료기술개발		-	
성과홍보		-	
포상 및 수상실적		-	
정성적 성과 주요 내용		-	

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		918002-4	
사업구분	포스트게놈 신산업육성을 위한 다부처유전체사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	산업화미생물유전체전략연구				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발			과제유형	(기초,응용, <u>개발</u>)
연구개발기관	(재)농축산용미생물산업육성지원센터			연구책임자	김양선
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	9개월	220,000	73,334	293,334
	2차년도	12개월	287,000	95,667	382,667
	3차년도	12개월	301,000	101,000	402,000
	4차년도	12개월	216,000	72,000	288,000
	계		1,024,000	341,997	1,366,001
참여기업	우진비앤지(주)				
상대국	-	상대국연구개발기관		-	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.22

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(재)농축산용미생물산업 육성지원센터	팀장	김 양 선

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 김 양 선

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

[별첨 1]

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

반려동물 유래 미생물 168종을 확보하고, 기능성을 평가한 후 반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 소재 8종을 선정하였으며 8종에 대한 반려견·반려묘 대상 급이 임상을 실시하였음. 그 결과 안전성과 건강개선 및 면역개선 지표 향상 결과를 확보하고 프로바이오틱스 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 변이 분석을 실시하여 유용미생물에 의해 미생물 다양성이 증가하는 결과를 확보함. 본 결과는 짧은 시간안에 유용미생물 확보부터 기능 및 안전성 평가를 확보하고 동물대상 임상시험 결과까지 논스톱으로 수행한 매우 우수한 구성 및 결과임. 또한 장내 마이크로바이옴 변이 분석을 통한 과학적 입증까지 도출한 우수한 결과를 확보함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

반려동물 유래 유용미생물을 통한 기능성 프로바이오틱스는 반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스의 안전성을 높여주며, 반려동물 사료시장의 국산화에 크게 기여함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

반려동물 대상 프로바이오틱스로써 안전성 및 기능성 제품을 출시하고 유통하여 국내 및 국제 시장의 점유율을 확보할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

유용미생물 확보, 기능성평가, 반려견·반려묘 대상 급이 임상, 마이크로바이옴 변이 분석, 대량배양공정 확립, 시제품 생산, 반려동물 미생물제제 제형화 및 사업화 등의 전략적이고 추진력이 뛰어난 수행결과는 연구개발 기관들의 우수한 성실도로 이루어짐.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

4년의 과제 수행기간동안 특허출원 7건, 특허등록 5건, SCI 논문 7편, 학술발표 15건의 매우 우수한 연구개발 실적을 확보하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
반려동물 유래 미생물 확보	10	100	반려동물 유래 미생물 168종 분리 및 확보
기능성 평가 및 유용미생물 선정	10	100	내산성, 내담즙성, 장내생존능, 항균능, 세포활성 및 면역조절 유전자 발현을 조사를 통한 유용미생물 8종 선정
임상을 통한 건강개선 및 면역증강 효과 확보	10	100	반려견·반려묘 대상 유용미생물 8종 급여 임상 실시
전장 유전체 분석을 통한 유전적 기능성 및 안전성 확보	10	100	8종의 전장 유전체 분석 및 비교 유전체 분석 완료
미생물 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 분석	10	100	반려견·반려묘 대상 유용미생물 8종 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 236건 분석
유용미생물의 대사체 분석	10	100	유용미생물 4종에 대한 배양조건에 따른 대사체 분석 완료
미생물 소재의 대량배양공정 확립	10	100	반려견·반려묘 유래 유용미생물 4종에 대한 대량배양 공정 확립 및 원료화
시제품에 대한 안정성 및 유효성 검증	10	100	반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 시제품에 대한 GLP 급성 경구독성, 피부자극성 시험 진행 및 무독성 결과 확인
반려동물 미생물 제제 제형화 및 사업화	10	100	반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 ‘멍멍정장’, ‘냥냥정장’ 제품 출시 및 유통
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서 반려동물 유래 미생물 168종을 확보하였고, 기능성을 평가한 후 반려견·반려묘 대상 프로바이오틱스 소재 8종을 선정하였음. 8종에 대한 반려견·반려묘 대상 급이 임상을 실시하여, 안전성과 건강 개선 및 면역개선 지표 향상 결과를 얻었음. 급여 전·후 장내 마이크로바이옴 변이 분석을 실시하여 유용 미생물에 의해 미생물 다양성이 증가하는 결과를 얻었음. 유용미생물 4종에 대한 대사체 분석과 산업적 배양 최적조건과 제형화 연구를 통해 제품을 개발 등록하여 사업화를 추진하였음. 반려견 대상 프로바이오틱스 ‘멍멍정장’과 반려묘 대상 프로바이오틱스 ‘냥냥정장’ 제품을 출시하여 유통 중에 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 반려견·반려묘에 대한 임상 결과 기반 2제품을 출시하여 사업화를 완료한 점에 대한 고려 요청

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

반려동물 유래 미생물을 이용하여 생균제(프로바이오틱스) 2제품을 출시하여 유통 중에 있음. 생균제의 유통 한계성을 극복하고자 사균제(포스트바이오틱스)연구를 수행하여 보다 안정적인 제품을 개발하는데 활용할 예정임. 추후 반려동물 질병관련 개선 효과를 보기위해 추가 연구가 필요함.

[별첨 1]

IV. 보안성 검토

o 보안성 필요치 않음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용비)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문 SCI	논 문 비SCI	논 문 평 균 I F			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												건				백 만 원	건			백 만 원	
가중치																					
최종 목표	5	5	-	-	4	20	2	250	140	21	-	-	7	-	1	10	-	3	-	-	-
당해 년도	목표	1	2	-	-	2	10	1	20	-	2	-	2	-	1	2	-	-	-	-	-
	실적	2	2	-	-	2	20	2	19.6	-	-	-	3	-	2.895	5	-	-	-	2	-
달성률 (%)	200	100	-	-	100	200	200	100	-	-	-	-	150	-	289	250	-	-	-	∞	-

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	반려동물 유래 유용미생물 확보
②	반려동물 유래 유용미생물 전장 유전체 분석 및 유용미생물 급이 전·후 마이크로바이옴 DB 확보
③	반려동물 유래 유용미생물의 대량배양 공정기술 및 제형화 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v	v			
②의 기술	v									
③의 기술	v						v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	반려동물 대상 프로바이오틱스, 포스트바이오틱스 제품 개발 기대
②의 기술	반려동물 장내 마이크로바이옴 연구에 활용 가능
③의 기술	반려동물 뿐 아니라, 가축 대상 사료첨가제 개발에 활용 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전체 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	4	8	-	5	-	4	-	-	-
연구기간내 달성실적	11	14	-	15(236)	-	246	-	-	-
연구종료후 성과창출 계획	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SCI	비SCI	논문평균IF			학술발표	정책 활용		홍보 전시
												건				건	건			건	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건		명	건	건		
가중치																					
최종목표	5	5	-	-	4	20	2	250	140	21	-	-	7	-	1	10	-	3	-	-	-
연구기간내 달성실적	7	5	-	-	4	40	3	32.7	-	10	-	-	7	-	2.8	15	-	4	-	3	-
연구종료후 성과창출 계획	-	1	-	-	-	-	-	220	140	14	-	-	1	-	1	3	-	-	-	-	-

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 신산업 육성을 위한 다부처유전체 연구 개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 신산업 육성을 위한 다부처유전체 연구개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.