

9180210  
44SB0-  
10

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

발간등록번호  
11-1543000-004044-01

식품  
장내 마이크로바이옴  
기능성 평가 시스템  
개발

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

# 장내 마이크로바이옴 기반 식품 기능성 평가 시스템 개발

2022.04.18

주관연구개발기관 / 제주대학교

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

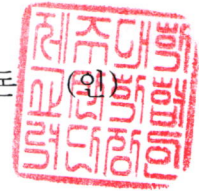
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “장내 마이크로바이옴 기반 식품 기능성 평가 시스템 개발”(개발기간 : 2018.07.02 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

22.04.18

주관연구기관명 :

(대표자) 이영돈



주관연구책임자 : 윤노 타짜야

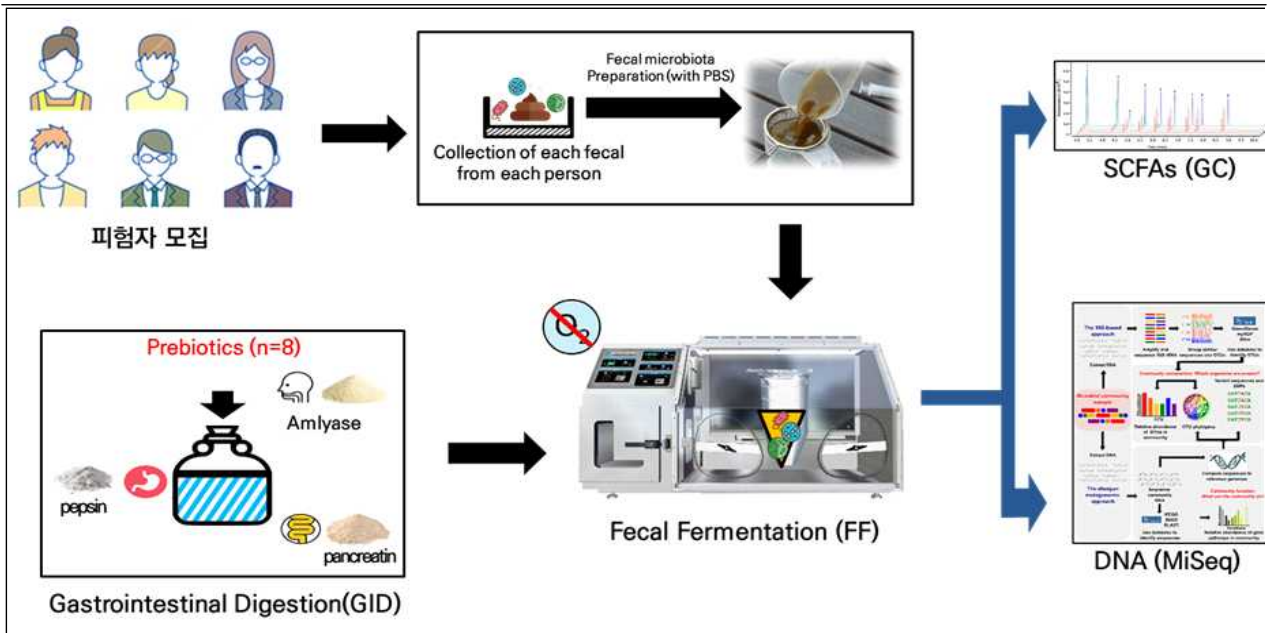
국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

사업명	포스트게놈다부처유전체사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		918021044SB010	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LC0111	50%	2순위 LC0112	30%	3순위 EF0104	20%
	농림식품 과학기술분류	1순위 CA0399	60%	2순위 RA0301	25%	3순위 PA0102	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	장내 마이크로바이옴 기반 식품 기능성 평가 시스템 개발						
전체 연구개발기간	2018.07.01. - 2021.12.31						
총 연구개발비	총 257,000천원 (정부지원연구개발비: 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[ ○ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							

연구개발 목표 및 내용	최종 목표	사람의 분변과 In vitro gastrointestinal digestion (GID)을 이용하여 fecal microbiome 기반 건강기능식품 유익효과 예측 시스템 개발
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>● In vitro GID와 분변미생물에 의한 발효(Fecal bacteria fermentation, FF)를 통해 건강기능식품(청국장, 김치, Garcinia 외 프리바이오틱스)의 생체 모방 소화 및 발효 진행</li> <li>● 건강기능식품에 의한 fecal microbiota shift를 DNA level로 분석</li> <li>● Metagenomics 분석결과 및 SCFA생성량을 바탕으로 건강기능식품이 사람에게 주는 효과를 예측</li> <li>● 다양한 사람의 분변을 이용한 Fecal fermentation(FF)를 통해 장내미생물 type과 SCFA생성량을 통해 건강기능식품 및 비건강식품의 효과 상관성 분석</li> <li>● 건강기능식품 및 비건강식품에 의한 Metagenomics 분석 기반 평가 실행</li> </ul>

○ 연구개발 개요 : 식품이 장내미생물에 주는 효과를 in vitro로 실현하고, Metagenomics 분석과 Short Chain Fatty acid(SCFA) 정량분석을 통해 식품의 효능 및 기능성의 예측 가능 시스템 개발



연구내용 개요 도식

○ 핵심기술

- In vitro gut microbiome 연구: Microbiome 연구에서 필수적인 동물실험을 대체 가능한 *in-vitro* system 구축.
- Metagenomics 기반 SCFA 생산경로 예측: 본 연구는 수 많은 장내미생물의 역할 중 SCFA 생성에 초점을 맞추고 미생물 생태, 메타유전체 분석 통하여 SCFA발생 과정을 예측하여 건강기능식품 각각에 대한 특징을 알아냄

연구개발성과	SCI논문 3편 , 특허 출원완료, 특허 등록(진행중), 저작권 등록 1건												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	본 연구 기간 중에 장내미생물 기반 식품 기능성 평가 시스템에 대한 SCI논문. 특허출원, 인력양성. 그리고 소프트웨어저작권을 도출하였다. 위 성과들을 바탕으로 장내미생물 기반 식품 평가 시스템을 위한 데이터베이스 구축이나, AI 인공지능을 이용한 빅데이터 분석에도 활용 될 수 있다. 또한 출원 완료후 특허 등록 과 , SCI논문 1편 또한 추가적으로 투고 예정에 있다. 이는 향후 기능성 식품 연구 및 관련 산업에 큰 기여를 할 것으로 사료되며, 더 나아가 기능성 식품 평가 시스템으로 실질적으로 이용될 가능성이 있다.												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화학물	신품종		
	3	1	7			1		생명 정보	생물 자원		정보	실물	
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)	식품 기능성		장내미생물		미생물생태		균유전체학		단쇄지방산				
영문핵심어 (5개 이내)	Food function		Gut microbiome		microbial community		metagenomics		SCFA				

최종보고서						보안등급	
						일반[ <input type="radio"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]	
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		포스트게놈다부처유전체사업	
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원		사업명 내역사 업명 (해당 시 작성)			
공고번호		918021-4		총괄연구개발 식 별번호 (해당 시 작성)			
				연구개발과제번호		918021044SB010	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LC0111	50%	2순위 LC0112	30%	3순위 EF0104	20%
	농림식품과학기술분류	1순위 CA0399	60%	2순위 RA0301	25%	3순위 PA0102	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문					
		영문					
연구개발과제명		국문		장내 마이크로바이옴 기반 식품 기능성 평가 시스템 개발			
		영문		Development of Evaluation System of Food Function based on Gut Microbiome			
주관연구개발기관		기관명		제주대학교		사업자등록번호	
		주소		(우)제주시 제주대학로 102		616-82-16375	
				법인등록번호			
연구책임자		성명		윤노 타쯔야		직위	
		연락처		직장전화		휴대전화	
				전자우편		국가연구자번호	
연구개발기간		전체		2018. 07. 02 - 2021. 12. 31( 3년 6개월)			
		단계 (해당 시 작성)		1단계			
				n단계			
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		합계	
		현금		현금		현금	
		현물		현물		합계	
총계		257,000		257,000		257,000	
1년차		38,000		38,000		38,000	
2년차		75,000		75,000		75,000	
3년차		72,000		72,000		72,000	
4년차		72,000		72,000		72,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위	
		휴대전화		전자우편		비고	
		역할		기관유형			
공동연구개발기관							
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							
연구개발담당자 실무담당자		성명		임혜경		직위	
		연락처		직장전화		휴대전화	
				전자우편		국가연구자번호	
						실무관	

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

2022년 03 월 29일

연구책임자: 윤노 타쯔야

주관연구개발기관의 장: 이영돈



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## 〈 목 차 〉

요약문.....	1
1. 연구개발과제의 개요.....	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용.....	6-14
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도.....	15-79
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성).....	80
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도.....	81
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	81
별첨1. 자체평가의견서.....	82
별첨2. 연구성과 활용계획서.....	87

# 1. 연구개발과제의 개요

○ 연구개발 개요 : 식품이 장내미생물에 주는 효과를 in vitro로 실현하고, Metagenomics 분석과 Short Chain Fatty acid(SCFA) 정량분석을 통해 식품의 효능 및 기능성의 예측 가능 시스템 개발

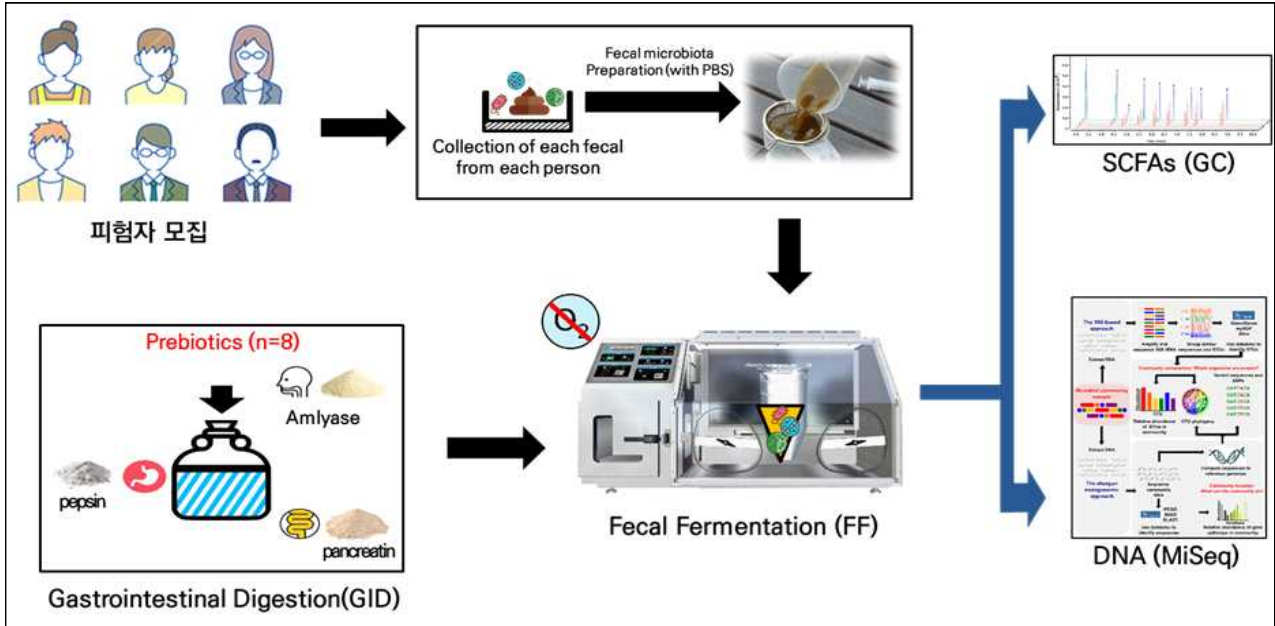


그림1. 연구개발 개요 도식

## ○ 핵심기술

- In vitro gut microbiome 연구: Microbiome 연구에서 필수적인 동물실험을 대체 가능한 *in-vitro* system 구축.
- Metagenomics 기반 SCFA 생산경로 예측: 본 연구는 수 많은 장내미생물의 역할 중 SCFA 생성에 초점을 맞추고 미생물 생태, 메타유전체 분석 통하여 SCFA발생 과정을 예측하여 건강기능식품 각각에 대한 특징을 알아냄.

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### (1) 정성적 연구개발성과

#### -1차년도 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

##### 1. In vitro GID-FF 기반 차세대 건강기능식품평가시스템 구축

##### ○ 청국장 섭취/비섭취 시의 분변을 이용한 In vitro GID-FF 실험조건 확립

- 차세대 건강기능식품평가시스템의 가능성을 검증 및 제시하기 위해 해당연도에서는 청국장을 이용한 In vitro GID-FF를 시행하였다. 이는 피험자 다섯명을 모집하여 각 피험자 당 2 주간 실험을 진행하였고, 각 주차에서는 피험자로부터 1회 분변 샘플을 채취하여 총 2회 시행하였다. 채취된 분변 샘플은 기능성식품인 청국장을 이용하여 차세대 건강기능식품평가시스템을 적용하였다. 2 주차에서는 피험자가 6일간 동일한 시간(오전,오후 9시)에 청국장환 시판 제품을 섭취하도록 하였다.

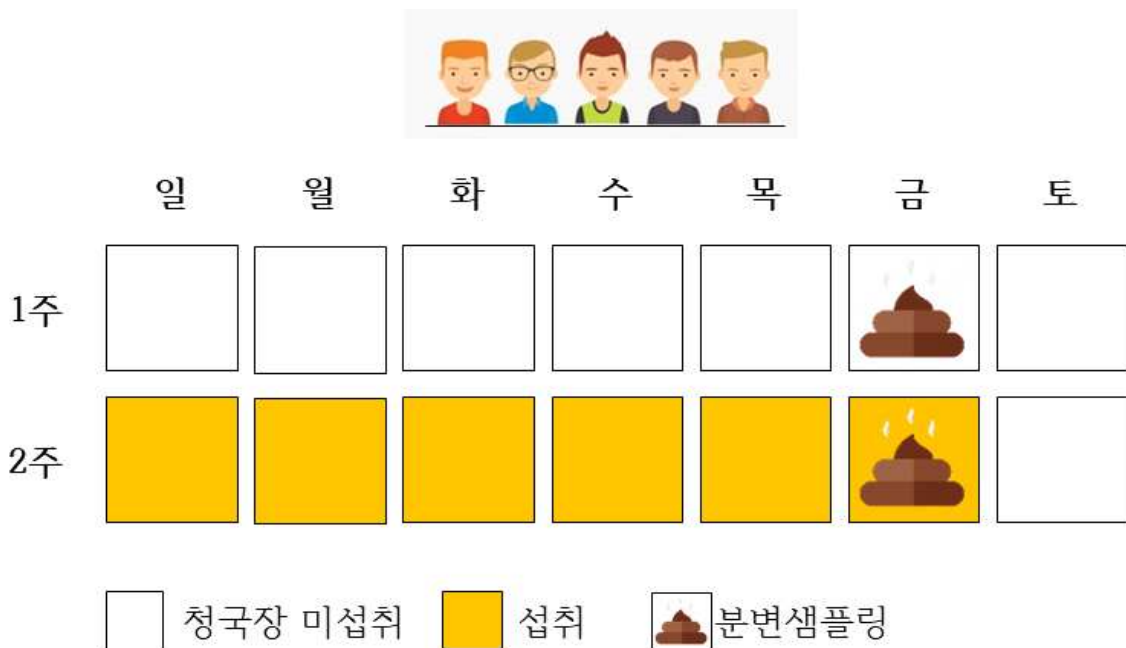


그림 1. 1 차년도 피험자 분변샘플링 일정

- 본 연구 구축 예정인 차세대 건강기능식품평가시스템의 과정은 다음과 같이 진행되었다. 청국장 시료는 인체의 소화기관인 입, 위, 십이지장에서 분비되는 소화 효소 (아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용한 GID 과정을 거쳐 소화산물을 생성하였다. 이는 사람의 분변 내 미생물을 이용한 Fecal fermentation (FF) 과정을 거쳐 최종적으로 발효산물이 만들어지도록 하였다. FF 과정 중에는 각각 0, 30, 60, 120분 간격으로 발효산물을 채취하였고, 이는 GC-MS 분석을 통해 시간대별 Acetate, Propionate, Butyrate를 포함한 SCFAs 함량을 측정하였다.

##### ○ 각 단계별 소화산물 내 단백질, 플라보노이드, 총 폴리페놀, 당 함량 변화량 분석

- 단백질 정량은 구리 이온이 peptide bond에 결합하는 Biuret method를 응용한 Lowry assay를 사용하였다. 이는  $Cu^{2+}$ 가 Folin reagent와 Folin-Ciocalteu반응을 하는 원리를 이용하였다. BSA Standard 및 Sample(1mg/mL) 100ul에 Reagent Mix 1mL를 넣고 vortex 후 상온에서 15min 반응을 시켰다. 이 때 Reagent Mix는 0.1N NaOH에 2%  $Na_2CO_3$ 를 넣은 A용액 9.8mL과 멸균 증류수 100mL에  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1g을 넣은 B용액 0.1mL, 그리고 멸균 증류수 100mL에 Potassium Sodium Tartrate 2g을 넣은 C용액 0.1mL의 비율로 제조하였다. 반응 후에는 50% Folin-phenol reagent를 100ul를 넣고 vortex한 뒤 상온에서 30분 반응시켰으며, UV-spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다.



**표 1. Lowry assay BSA Standard concentration**

Concentration (ug/mL)	0	200	400	600	800	1000
BSA(uL)	0	100	200	300	400	500
D.W(uL)	1000	900	800	700	600	500
Concentration (ug/mL)	1200	1400	1600	1800	2000	
BSA(uL)	600	700	800	900	1000	
D.W(uL)	400	300	200	100	0	

- 총 플라보이드 함량은 다음과 같은 과정을 통해 측정하였다. Standard로 쓰일 Quercetin은 10mg/mL의 농도로 만들어, Sample(1mg/mL) 및 Quercetin Standard 100ul를 1.5mL tube에 넣고 EtOH 300ul, 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 20ul, 1M CH<sub>3</sub>COOK 20ul, DW 560ul을 차례대로 넣은 후 vortex한 뒤 빛이 차단된 상온에서 1시간 반응하였으며 UV-spectrophotometer를 이용하여 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

**표 2. Quercetin Standard concentration**

Concentration (ug/mL)	0	20	40	60	80	100
Quercetin(uL)	0	10	20	30	40	50
EtOH(uL)	1000	990	980	970	960	950
Concentration (ug/mL)	120	140	160	180	200	
Quercetin(uL)	60	70	80	90	100	
EtOH(uL)	940	930	920	910	900	

- 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis원리를 사용하여 정량하였다. Garlic acid Standard 및 Sample을 1mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 20ul을 1.5ml tube에 넣었다. 이에 D.W 700ul, 50% Folin reagents 100ul을 준비하여 넣고 vortex 후 상온 암실에서 2시간동안 반응시켰다. 추가로 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 100ul을 넣고 vortex 후 빛이 차단된 상온에서 1시간 더 반응시킨 뒤, UV-spectrophotometer를 이용하여 720nm에서 흡광도를 측정하였다.

**표 3. Galic acid Standard concentration**

Concentration (ug/mL)	0	20	40	60	80	100
Garlic acid(uL)	0	10	20	30	40	50
D.W(uL)	1000	990	980	970	960	950
Concentration (ug/mL)	120	140	160	180	200	
Garlic acid(uL)	60	70	80	90	100	
D.W(uL)	940	930	920	910	900	

- 당 함량은 Phenol-Sulfuric acid assay을 이용하여 측정하였다. Standard는 Glucose(2mg/mL)로 준비하였다. Sample(1mg/mL) 및 Glucose Standard를 시험관에 500ul씩 넣고 5% phenol을 500ul 넣어 vortex 후 상온에서 15분 반응시켰고, 전동 pipet과 유리 pipet tip을 이용하여 각 시험관에 Sulfuric acid를 2.5ml 첨가한 뒤 vortex 하였다. 이는 실온에서 30분간 반응시킨 후 석영 Cuvettes을 이용하여 470nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

표 4. Glucose Standard concentration

Concentration (ug/mL)	0	20	40	60	80	100
Glucose(uL)	0	10	20	30	400	50
DW(uL)	1000	990	980	970	960	950
Concentration (ug/mL)	120	140	160	180	200	
Glucose(uL)	60	70	80	90	100	
DW(uL)	940	930	920	910	900	

○ FF 시간대별 Short Chain Fatty Acids(SCFAs) 함량 변화 분석

- SCFA 함량 변화 조사를 위한 분변산물은 각각 0, 30, 60, 120분에 채취하여 즉시 액체질소로 냉각 시킨 후 -80°C에서 보관하였고, 실험 시에는 해동 후 곧바로 200ul씩 사용하였다. 200ul의 분변산물은 1ml의 Methanol과 2분간 교반시켰으며, 이후 pH를 2-3으로 맞추어 10분간 상온에 방치하였다. 방치하는 동안에는 3분 간격으로 시료를 교반시켜주었다. 10분 뒤 시료는 0.45µm 주사기 필터를 이용하여 부유물을 걸러내었고, 추출한 시료는 다음 실험 시까지 -80°C에서 보관하였다. 추출된 시료는 1ul를 사용하였고, Gas chromatography mass spectrometer (GC-MS)를 이용하여 SCFA 함량을 조사하였다.

2. 미생물생태분석을 통한 차세대 건강기능식품평가시스템 확립

○ FF 시간대별 미생물생태 분석

- 시간대별 분변발효산물로부터 분변미생물의 DNA 추출은 QIAamp PowerFecal DNA Kit(QIAGEN사)를 이용하여 진행하였고, 추출된 DNA는 Qubit-iT dsDNA HS assay Kit를 이용하여 1uL에 DNA 양이 얼마나 들어있는지 DNA 농도를 확인하였으며, Illumina사의 16S Metagenomic Sequencing Library 과정에 들어가기에 앞서 DNA 농도 측정량에 따라 계산하여 각각 0.5 ng/ul 로 농도로 표준화시킨 샘플을 준비하였다.

- 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

\* <https://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>

a) Amplicon PCR + 전기영동

96well PCR plate에 각각 표준화시킨 DNA 2.5ul, 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 12.5ul 씩 넣고, illumina adapter를 부착하기 위해 특정 서열을 포함한 V4 region 타겟 Amplicon PCR Forward-Primer (1uM, 5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence])와, Reverse-Primer (1uM, 5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence])를 각각 5ul씩 넣어 amplicon PCR을 준비하였다. PCR 조건은 초기온도 95°C에서 3분간 열처리 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 25회 반복하고, 마지막 신장과정은 72°C에서 5분간 반응시켰다. 보관 시에는 4°C의 조건으로 냉장 보관하였다. PCR이 끝난 뒤 타겟 부분이 제대로 증폭이 되었는지는 전기영동을 통하여 확인하였고 남은 PCR 산물은 PCR Clean-Up 1 과정을 진행시켰다.

b) PCR Clean-Up 1

Amplicon PCR 산물은 primer 및 primer dimer들을 제거하기 위해 다음과 같은 과정을 거쳤다. 96 well plate는 총 4개를 준비하였고, 첫 번째 plate에는 각각의 1차 PCR 산물과 20ul AMPure XP beads를 넣어 10회 파이펫팅하여 균질화 시켰다. 이는 상온에서 5분간 반응시켰고,

여기에 96 well PCR plate를 끼운 magnetic bead extractor(96well-extractor)를 반응물이 맑아질 때 까지 넣어두었다. 두 번째 plate에는 Freshly Prepared 80% Ethanol (F-EtOH)을 각각 200ul 씩 넣었고, extractor를 두 번째 plate에 옮긴 뒤 96 well PCR plate를 탈착시켰다. 탈착된 plate로부터 beads를 모두 떨어뜨려 30초간 세척과정을 진행하였다. 세척된 beads는 96well-extractor를 이용하여 추출하였고, 이는 F-EtOH이 각각 200ul씩 담긴 세 번째 plate로 옮기고 재 탈착시켜 마찬가지로 30초간 세척과정을 거쳤다. 세척과정이 끝난 beads는 96well-extractor를 이용하여 추출하였고, 이는 10분 동안 air-dry 시켜주었다. 네 번째 plate에는 10 mM Tris(pH 8.5)를 52.5ul씩 넣었고, air-dried beads를 모두 넣어 10회 파이펫팅시켜 균질화 시켰다. 이는 상온에서 2분간 반응시켰고, 96well-extractor를 이용하여 beads를 제거시켜 1차 PCR 산물을 정제하였다.

#### c) Index PCR

96 well PCR plate에 각각 정제를 마친 1차 PCR 산물 DNA 5ul, 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 25ul, Nextera XT Index 1 Primer 5ul, Nextera XT Index 2 Primer 5ul, PCR grade water 10ul를 넣고 10회 정도 파이펫팅하여 균질화 시켰다. 96 well PCR plate의 오염방지 및 샘플손실을 막기위해 Microseal 'A'을 씌우고, 1,000g 20°C에서 1분간 원심분리하여 index PCR을 준비하였다. Index PCR 조건은 초기온도 95°C에서 3분간 열처리 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 25회 반복하고, 마지막 신장과정은 72°C에서 5분간 반응시켰다. (보관 시에는 4°C의 조건으로 냉장보관 하였다.)

#### d) PCR Clean-Up 2

2차 clean up과정은 1차 clean up과정과 동일하며, 첫 번째 plate의 AMPure XP beads는 56ul 씩, 네 번째 plate의 10 mM Tris(pH 8.5)는 27.5ul 씩 넣어 2차 PCR 산물을 정제하였다.

#### e) DNA 농도 측정 및 Pooling

Illumina사에서 Miseq 시퀀싱 진행 시 요구하는 DNA 양을 맞추기 위해 Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluormeter (invitrogen, USA)을 이용하여 샘플들의 DNA 농도를 측정하고, 모든 샘플의 PCR 산물이 동일한 농도가 되도록 샘플하나당 DNA 양을 20ng으로 조정하여, 2ml tube에 모아주었다. MiSeq 준비를 마친 샘플은 -20°C 조건으로 냉동보관 하였다.

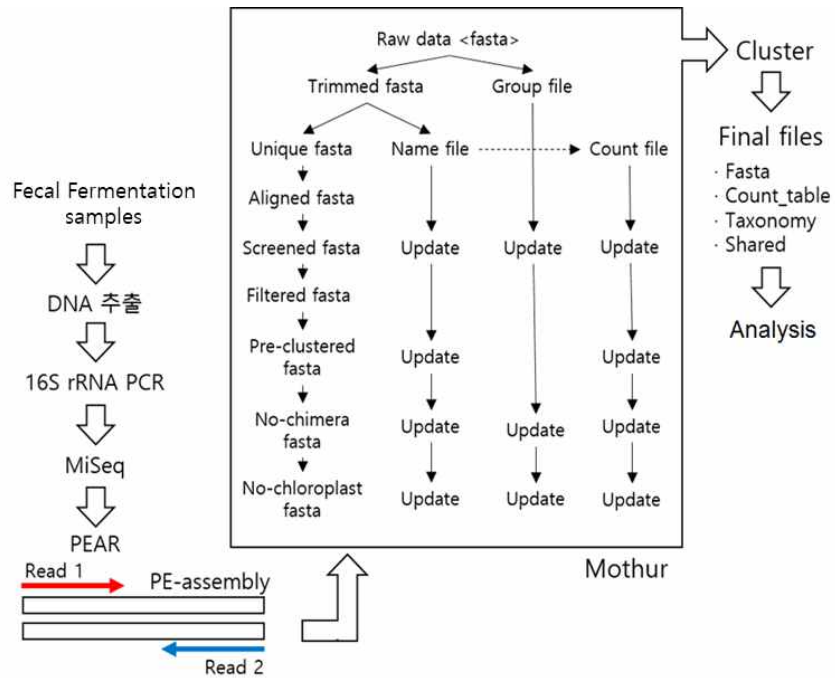


그림 2. 장내 미생물생태 분석 전 sequence data error removal 과정 >

### ○ 16s rRNA gene을 이용한 장내 미생물생태분석방법

- MiSeq 결과는 16S rRNA 유전자 증폭에 사용되었던 primer에 부착되어있는 바코드 시퀀스에 따라 Demultiplexed 된 후 각각 DNA 샘플 마다 두 개의 fastq 파일로 제공되는데, 모든 fastq 파일들은 Mothur로 분석하기 이전에 데이터프로세싱이 이루어지며, 잘못된 Read 제거와 clustering 후, 최종적으로 fasta, count\_table, taxonomy, list, shared 의 파일이 생성되어진다.

- 미생물생태분석은 분석프로그램인 Mothur을 통해 sequencing 오류제거 과정을 거친 후, 생물학적지표 및 문(phylum) 수준 그룹간 비교(ANOVA), 그룹간 연관성-거리 분석(Non-metric multidimensional scaling, NMDS), 그룹간 장내미생물생태 연관성 비교(Tree), Abundance 차이 분석(STAMP) 등의 통계학적인 분석으로 실험 조건간의 장내미생물생태 비교분석 결과를 도출해 내 고자 한다.

- 이러한 파일들은 각각 샘플 그룹의 OTUs(Operational taxonomic units)의 양적인 정보를 shared file에 담고 있으며, 이것을 간단한 명령어로 작동시키면 Tree형태의 계통수가 만들어지는데, 이는 R을 이용하여 시각화 하여 나타낼 수 있고. 샘플들의 생물학적 지표 비교와 Rarefaction 곡선 값은 즉시 얻을 수 있다.

- 생물학적 지표, 예를 들어 정보를 담고 있는 Metadata는 샘플들을 그룹화하는데 사용되고, 그에 따라 Boxplot형태로 시각화 할 수 있으며, ANOVA 테스트에 적용시켜 비교하며, Rarefaction 곡선은 R 프로그램을 통해서 도식화 할 수 있어, 이를 통해 시퀀싱 결과를 예측 할 수 있다.

### < β-Diversity 분석 >

- a) 생물학적 지표 비교(Species diversity)
- b) 시퀀싱 결과를 추산할 Rarefaction 곡선
- c) theta-yc tree을 이용한 계통수 분석

- d) 계통 구성 비교 (heatmap)
- e) Abundance 차이 분석 (Metastats)
- f) NMDS(Non-metric multidimensional scaling)를 이용한 Metadata 연관성 분석 (Biplot)

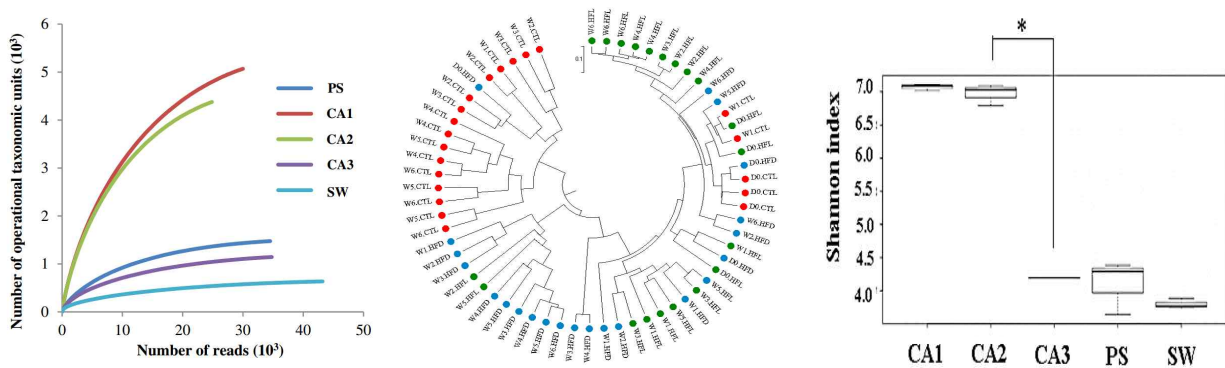


그림 3. 희박화 곡선(좌), 계통수(중), 생물학적 지표(우) 비교

- 계통 분류 데이터는 최종적으로 출력되는 Taxonomy 파일에 저장이 되고 각각 샘플의 계통 Abundance는 최종 Count\_table 파일과 함께 얻을 수 있는데, 상대적인 Abundance는 보통 엑셀을 사용하여 확인하고 도식화 할 수 있으며, R 프로그램을 접목시켜 Heatmap으로 그려진다. 추가적으로 Metastats 분석을 통해 Abundance에서 유의적인 차이를 나타내는 미생물을 확인하기 위하여 각각 계통단계(예. 계(Kingdom), 문(Phylum), 강(Class), 목(Order), 과(Family), 속(Genus))를 적용시켜 분석 하고 샘플간 유의적인 차이가 확인되면 Heatmap으로 나타낼 수 있다.

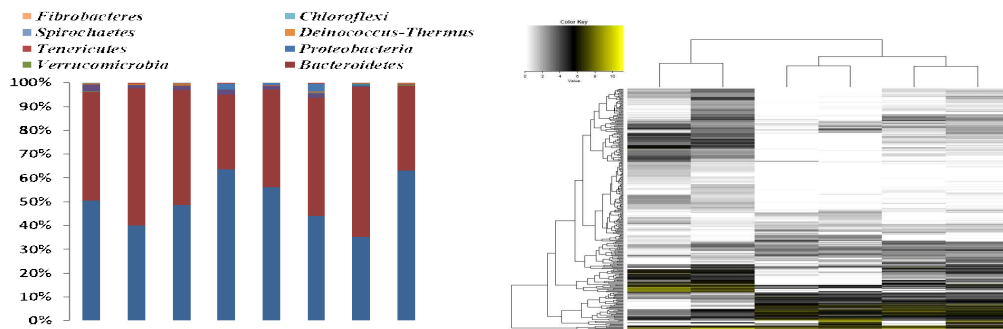


그림 4. 전체적인 박테리아 구성(좌)과 metastats-heatmap(우)의 예시

- Mothur에서 생성되는 shared 파일은 샘플들 사이의 거리를 측정하기 위해 사용되며, 2차원적으로 비교가 가능하고 도식화 할 수 있다. 이는 일반적으로 NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling)라고 알려져 있다. 각각 샘플들을 그룹화 하여 R 프로그램에 적용시켜 0.95 백분위의 Ellipse을 그릴 수 있고 corr.axes 서브루틴을 통하여 Metadata(예: phylotype taxonomy)와 NMDS 축 사이의 p-value 상관관계를 통해 Metadata 내에 포함된 파라미터에 대하여 좌표로 얻을 수 있다. R은 그러한 Bi-plot 연관성 좌표를 포함하도록 하여 NMDS 그림을 그릴 수 있는데, 이는 어떠한 파라미터에 의해 미생물생태가 변화하는지 알 수 있다.

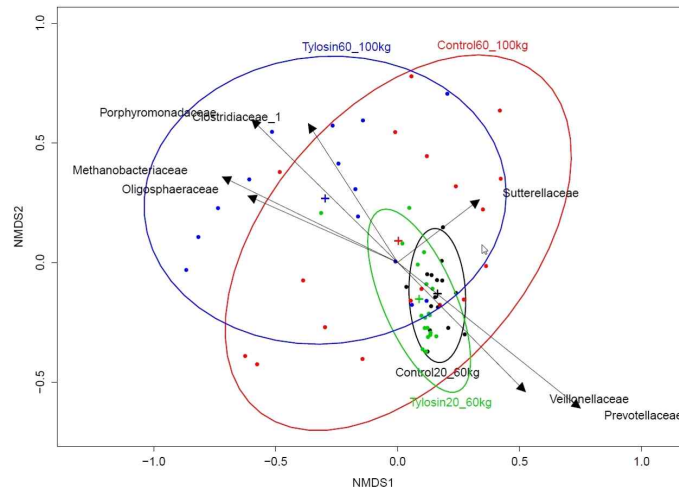


그림 5. NMDS biplot 예시

○ 통계분석

- 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 군 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 분석하였으며, Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후 검정을 실시하였음(p<0.05).

-2차년도 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1. 건강기능식품을 이용한 구축한 차세대 건강기능식품평가시스템 적용성 평가

○ 여러 피험자를 통한 차세대 건강기능식품평가시스템을 청국장에 적용 및 기능성 평가

- 1차년도에 확립한 건강기능식품평가시스템의 가능성을 평가하기 위해 추가적인 피험자를 모집하여 청국장을 이용한 In vitro GID-FF를 시행하였다. 이는 피험자 8명을 추가 모집하여 각 피험자의 분변을 이용하여 실험을 진행하였다.

○ Invitro GID-FF 진행시 Total volume에 따른 장내미생물 차이 조사

- 차세대 건강기능식품평가시스템을 건강기능식품(가르시니아 추출물, 청국장, 김치)에 적용하기 전 FF에서 사용하는 Total Volume(15ml VS 5ml)에 따라 장내미생물 차이가 나타나는지를 조사하였다.

○ 차세대 건강기능식품평가시스템을 건강기능식품(가르시니아 추출물, 청국장, 김치)에 적용 및 기능성 평가

- 2차년도에서는 차세대 건강기능식품평가시스템을 한 사람 분변을 이용하여 건강기능식품(청국장, 김치, 가르시니아)에 적용시켰고, 이를 통해 각 식품에 의해 변화하는 분변미생물생태, SCFA 생성량 및 생성경로를 파악하였다.

○ 분변발효산물로부터 추출한 DNA, RNA의 Shotgun Sequencing을 이용한 Cross-omics 분석 pipeline 구축

- SCFA 정량분석 결과와 분변발효산물로부터 Bacterial DNA 및 RNA를 추출하여 미생물생태분석과 차별 발현 유전자(Differentially Expressed Gene, DEG) 및 기능성유전자분포분석을 통해 SCFA 생성경로를 예측하였다.

○ 건강기능 및 비건강 식품 평가를 위한 GID-FF 실험 진행을 위한 피험자 선별

- 해당 연도에서는 100명의 피험자를 모집하여, 이 중 분변미생물생태 및 기초데이터를 기반으로 20명 내외의 피실험자를 선별할 계획이며, 이를 통해 3 차년도에서 본 연구에서 구축한 In vitro GID-FF 시스템을 이용하여 기능성식품평가를 진행할 계획이다.

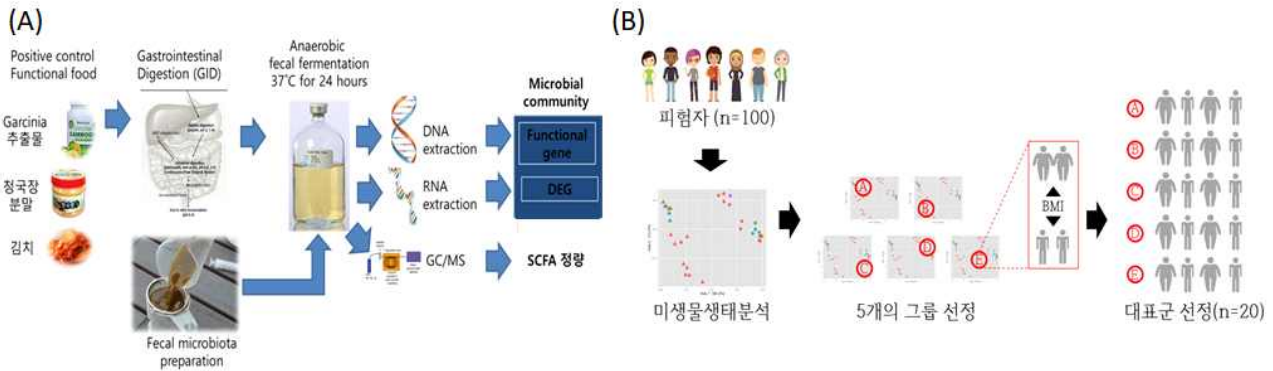


그림 6. 2 차년도 개발내용 도식화

-3차년도 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1. Omnivore, Vegetarian의 분변을 이용해 In-vitro GID-FF 진행 시 변화하는 장내미생물 생태 및 SCFAs 비교

- 기초 장내미생물과 특정 식단에 의해 변화하는 SCFAs와 장내미생물생태를 비교하기 위해 Omnivore 한국인 3명과 Vegetarian 인도인 3명의 분변을 이용하여 인체 내 소화과정을 모방하는 GID-FF(Gut Intestinal Digestion tract-Fecal fermentation)를 진행하였다.

- 주식으로 섭취하고 있는 식단이 다른 두 그룹 간 차이를 분석하기 위해 1차년도에서 FF 동안 변화하는 SCFAs 및 미생물생태를 분석하기 위해 사용한 실험적인 방법을 사용하여 GID-FF 산물 내 SCFAs를 측정하고, DNA 추출하여 장내미생물생태분석을 시행하였다.

2. 동물실험 기반 차세대 건강기능식품평가시스템의 신뢰성 검증

- 차세대 건강기능식품평가시스템이 실제로 섭취하여 나타나는 변화반응과 유사한지에 대한 신뢰성 검증 및 제시를 위해 실제 청국장 시료를 사료에 배합하여 Rat를 이용한 동물실험을 수행하였다.

- 동물실험은 청국장 배합사료를 먹인 후의 Rat의 분변 미생물생태와 청국장을 먹지 않은 Rat 분변에 청국장을 GID-FF로 처리한 미생물생태 차이를 비교 분석하기 위해 약 9주간 진행하였다.

- 청국장 비섭취군인 Rat의 분변으로 차세대 건강기능식품평가시스템 수행하여 SCFAs를 측정하고, 청국장을 섭취한 Rat로부터 적출한 맹장에서 SCFAs 측정하여 그 변화양상을 비교분석 하였다.

3. In vitro GID-FF를 이용해 다양한 식품과 장내 미생물간 상관관계분석 (3-4차년도 연구 진행)

- 다양한 기능성 식품군과의 GID-FF 실험을 통해 장내미생물과 특정 식품들에 대한 상관관계 분석 실시하고자 2차년도에 장내미생물생태를 그룹별로 분류했었던 97명의 피험자 중 다른 장내미생물 생태 유형을 갖고 있는 20명을 미생물생태분석을 통해 선별하였다.

#### -4차년도 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

##### 1. 차세대 건강기능식품평가시스템을 이용한 장내미생물생태 유형 간 기능성식품에 대한 반응성 조사

- 최종적으로 장내미생물생태 유형에 따라 기능성식품에 대한 반응이 다르게 나타나는 것을 검증하여, 차세대 건강기능식품평가시스템을 활용한 개인 맞춤형 기능식품정보 제공 플랫폼 기반 구축을 마련하고자 하였다.
- 1~3차년도에서 분석한 피험자들의 장내미생물생태를 바탕으로 장내미생물생태 유형을 분석하여, 10명의 대표 피험자 선발하였으며 사람 개개인의 장내미생물 생태에 따라 기능성 식품에 대한 반응이 어떻게 변화하는지 비교 및 분석하고자 실험을 수행하였다.
- 선발한 대표 피험자 10명으로부터 신선한 분변샘플을 채취하여 FOS, GOS, Inulin, Raffinose, Arabino-galactan, Laminarin, Beta-glucan, Ginseng을 포함한 8가지 기능성 식품을 이용하여 구축한 차세대 건강기능식품평가시스템에 포함된 실험과정인 in vitro GID-FF를 수행하여 유전체 데이터 분석을 통해 장내미생물생태 변화를 조사하였다.
- In vitro Fecal fermentation 실시 이후, gas chromatography를 이용하여 기능성 식품에 따라 사람별로 증감하는 단쇄지방산(Short chain fatty acid) 생산량 정량분석 하기 위해 FF산물 200  $\mu$ l에서 SCFA를 추출하여 Acetic acid, Propanoic acid, Butanoic acid를 선택하였으며, Gas Chromatography 를 이용하여 정량하였다.



### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### -1차년도 연구개발과제의 수행 결과

###### ○ GID 소화산물 내 단백질, 플라보노이드, 총 폴리페놀, 당 함량 변화량 분석

- GID 과정으로 인한 청국장의 소화산물 내 당, 단백질, 총 폴리페놀, 플라보노이드의 함량 변화는 각 단계별로 세 번씩 채취된 소화산물과 동일한 원물을 삼반복하여 총 12개의 샘플을 이용하여 진행하였다.

- GID 소화산물 내 당 함량은 그림 7-A에 나타내었다. 당 함량은 모의 구강 소화과정에서 유의적으로 가장 많은 것으로 나타났고, GID 과정 내 소화효소로 인해 분해되어 각 단계별로 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다( $p < 0.05$ ).

- GID 소화산물 내 단백질 함량은 그림 7-B에 나타내었고, 원물을 제외하고 측정하였다. 모의 구강 소화과정에 비해 모의 위장 소화과정에서 유의적으로 단백질 함량이 증가한 것으로 나타났는데, 이는 모의 구강 소화과정에서는 소화효소 아밀라아제에 의해 단백질이 분해된 것이 아닌, 시료 자체를 씹지 않고 섭취하였을 경우를 가정하여 시료를 원 상태로 그대로 사용하여 모의 구강 소화과정을 진행하였기 때문에 시료 자체가 모의 소화과정 시간동안 충분히 분해되지 않아서 단백질이 적게 검출된 것으로 판단되어진다. 따라서, 모의 위장 소화과정에서 단백질 함량이 유의적으로 증가한 것으로 보아 해당 단계에서는 펩신에 의하여 단백질이 분해된 것으로 보여진다. 뿐만아니라 모의 소장 소화과정이 끝난 후의 단백질 함량이 모의 위장 소화과정에 비하여 유의적으로 감소한 것으로 보아 소화효소 판크레아틴에 의하여 단백질이 분해된 것으로 판단되어진다.

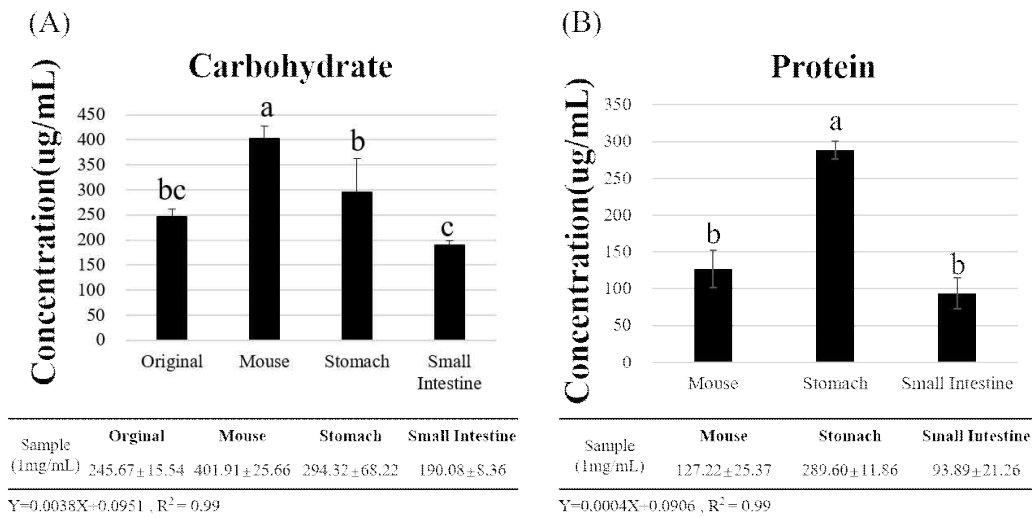


그림 7. 각 단계별 소화산물 내 중 Protein 및 Flavonoid 함량 변화 비교

\* a-b means  $P < 0.05$  in Duncan's range test

- GID 소화산물 내 전체 페놀 함량은 그림 8-A에 나타내었으며, 전체페놀 함량은 모의 위장 소화과정에서 모의 구강 소화과정에 비하여 유의적으로 증가하였고, 다시 모의 소장 소화과정에서는 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다( $p < 0.05$ ).

- GID 소화산물 내 플라보노이드 함량은 그림 8-B에 나타내었으며, 모의 구강 및 위장 소화과정 간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 최종적으로 모의 소장 소화과정에서 유의적으로 증가한 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

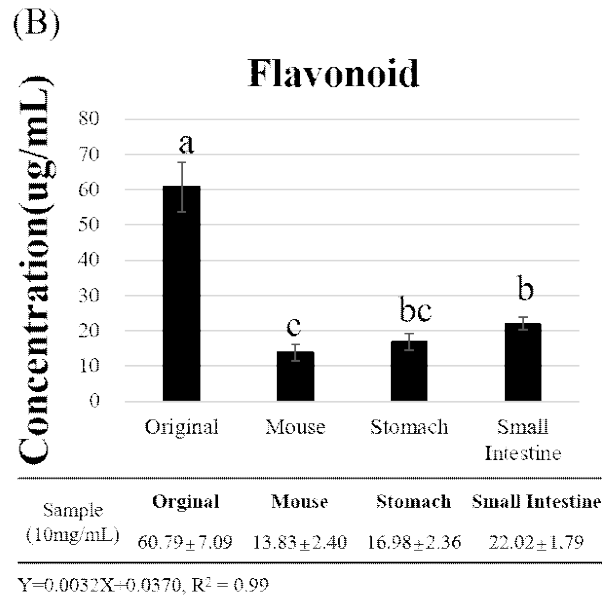
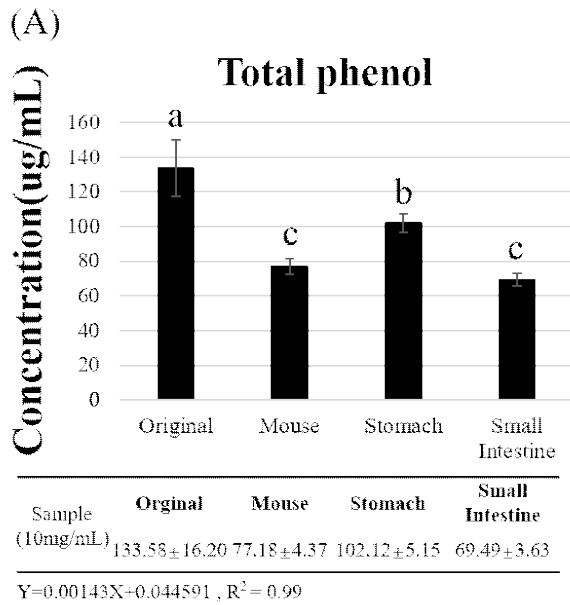


그림 8. 각 단계별 소화산물 내 중 Protein 및 Flavonoid 함량 변화 비교

\* a-b means P<0.05 in Duncan's range test

○ FF 시간대별 Short Chain Fatty Acids (SCFAs) 함량 변화 분석

- FF 시간대별 SCFAs 함량 변화 분석은 주요 SCFA인 Acetate, Propionate, Butyrate를 측정하여 그림 9에 나타내었다.

- Acetate와 propionate는 청국장을 섭취하지 않고 만들어진 분변(BF)과 섭취하여 만들어진 분변(AF)을 각각 FF에 사용하였을 때 모두 0 시간에 비하여 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(p<0.05)(그림9-A,B). 반면, 앞에 두 분변을 각각 사용하여 FF를 2시간 진행하였을 때에는 두 최종발효산물 간의 acetate 함량비교에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

- Butyrate는 AF 분변을 사용한 FF 시 0 시간 대비 유의적 증가가 나타나는 것으로 확인되었고, BF에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한, 각각 BF 와 AF의 FF가 2 시간이 되었을 시의 발효산물 간 비교에서도 유의적인 차이가 나타나지 않았다(그림9-C).

- 이를 통해 본 연구진은 피험자가 직접 청국장을 섭취하지 않아도 섭취한 것과 비슷하게 FF과정에서 주요 SCFA를 증가시킬 수 있을 것이라 판단되며, 본 연구 개발 차세대 건강기능식품평가시스템의 가능성을 검증하는 것이라 사료된다.

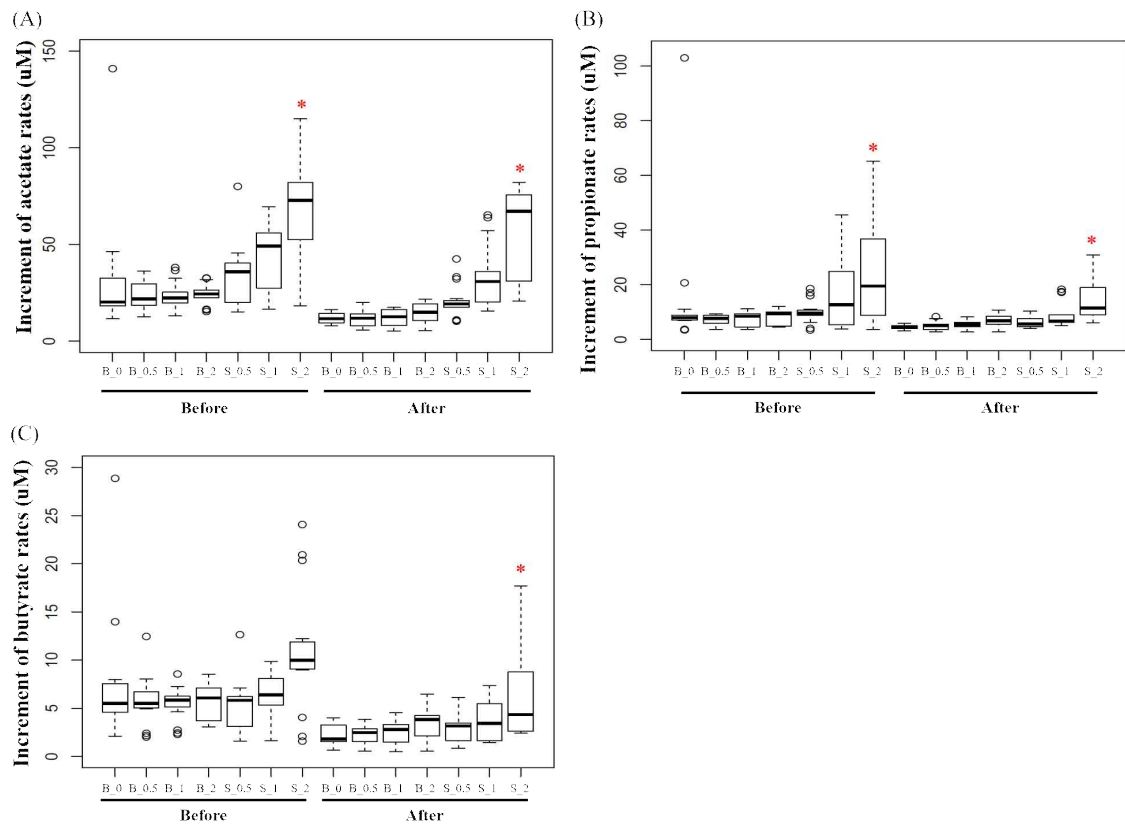


그림 9. 발효산물 내 시간별 acetate 함량 변화

\* $p < 0.05$  vs B\_0h in each Before and After group in student's t-test.

B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated. 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

○ FF 시간대별 미생물생태 분석

- FF 시간대별 미생물생태분석을 위해서는 A 피험자의 분변을 이용한 FF 발효산물로부터 Bacterial DNA를 추출하여 시퀀싱을 진행하였다(n=42, 표7). 총 42개의 raw data를 이용하였고, 모든 샘플을 동일한 20527 reads로 표준화시켜 최종적으로 총 862134 reads와 356 OTUs를 얻어 분석을 진행하였다(그림10).

표 5. 미생물생태 분석을 위한 데이터 설명

Group	Description	Before taking CKJ (BF)		After taking CKJ (AF)	
Blank Group (B)	Fermenting only feces	BF_B1_0h	BF_B1_1h	AF_B1_0h	AF_B1_1h
		BF_B2_0h	BF_B2_1h	AF_B2_0h	AF_B2_1h
		BF_B3_0h	BF_B3_1h	AF_B3_0h	AF_B3_1h
		BF_B1_0.5h	BF_B1_2h	AF_B1_0.5h	AF_B1_2h
		BF_B2_0.5h	BF_B2_2h	AF_B2_0.5h	AF_B2_2h
		BF_B3_0.5h	BF_B3_2h	AF_B3_0.5h	AF_B3_2h
Sample treated Group (S)	Fermenting Cheonggukjang with feces	BF_S1_0.5h	BF_S3_1h	AF_S1_0.5h	AF_S3_1h
		BF_S2_0.5h	BF_S1_2h	AF_S2_0.5h	AF_S1_2h
		BF_S3_0.5h	BF_S2_2h	AF_S3_0.5h	AF_S2_2h
		BF_S1_1h	BF_S3_2h	AF_S1_1h	AF_S3_2h
		BF_S2_1h		AF_S2_1h	

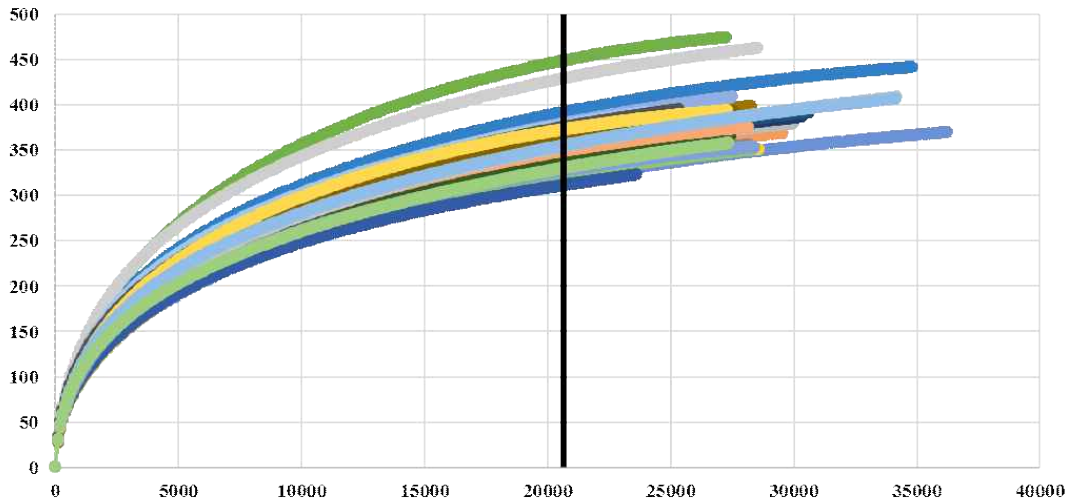


그림 10. 본 연구 미생물 생태 분석에 사용된 데이터의 희박화 곡선  
 (\*검은선은 표준화 시킨 20,527 reads를 의미한다.)

- 장내미생물군집의 alpha diversity 비교는 Chao 와 Shannon 지표를 이용하여 나타내었다 (그림 11). 생태 내 미생물의 종의 다양성을 의미하는 Chao index 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(그림 11-A). 반면, 종의 균등함을 의미하는 Shannon index 비교에서는 ANOVA 비교에서  $p < 0.05$  이하로 유의적인 차이가 나타났고, 이는 사후검정인 Duncan's range test를 통하여 나온 결과를 그래프 위에 나타냈다(그림 11-B). BF 분변을 사용한 FF의 시간대별 생태는 분변만 처리(B)한 FF에서만 유의적으로 낮게 나타났고 다른 생태간의 차이는 나타나지 않았다.

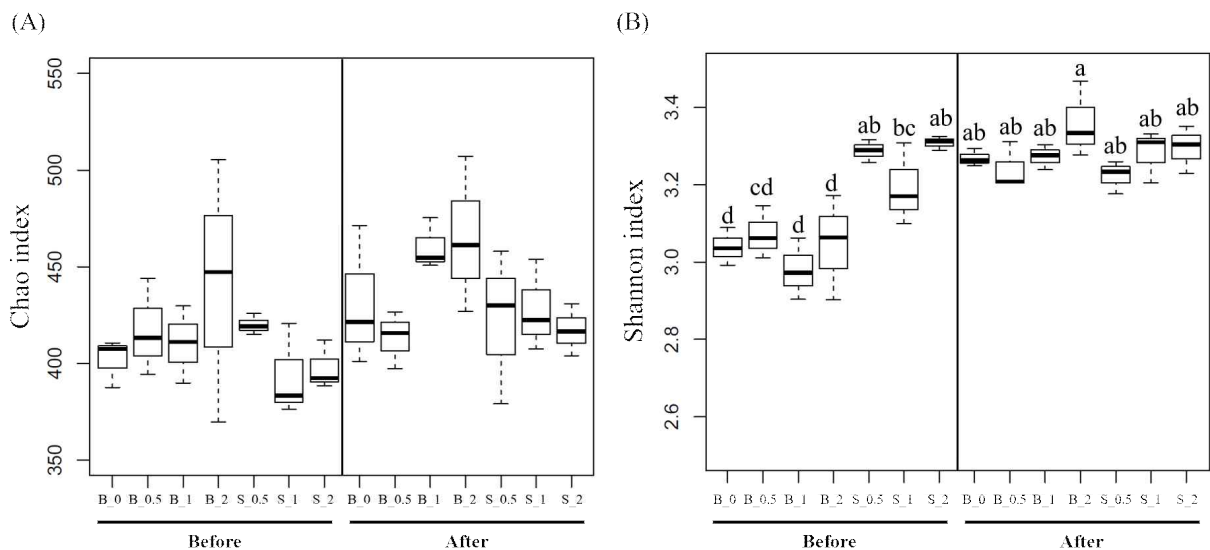


그림 11. 종 다양성 지표 비교 - (A) Chao index, (B) Shannon index

\* a-d means  $P < 0.05$  in Duncan's range test

B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated. 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

- 미생물생태간의 유사성 비교는 Phylotype과 Operational taxonomic unit(OTU)을 기준으로 비교하였다. 우선 OTU를 기반으로 미생물 생태 유사성 비교를 위해 나타난 Tree에서는 미생물생태가 나뉘지 않고 뒤섞여 있는 것으로 보아, 청국장을 섭취하지 않고 생성된 분변과 섭취하고 생성된 분변을 사용한 FF 간 미생물생태적 차이가 유의적으로 나타나지 않는 것으로 판단된다(그림12).

- Phylotype을 기반으로 phylum 수준에서 미생물생태를 비교하였을 때에는 청국장 섭취 전 분변과 섭취 후 분변의 Blank 그룹간에서는 차이가 보이지 않았다(그림13). 반면, 각 분변에 청국장을 넣어 FF를 진행한 Sample 그룹간에서는 차이가 나타나 보였다. 청국장을 섭취한 미생물을 이용하였을 시 청국장을 섭취하지 않은 미생물생태보다 Firmicutes는 감소한 상태가 유지되고 반대로 Bacteroidetes는 증가한 상태를 유지하는 것으로 보였다. 한편 Actinobacteria는 섭취 전 생태보다 섭취 후 생태에서 높은 비율로 FF 진행한지 30분부터 증가하는 양상을 보였지만 궁극적으로 2시간이 되었을 시 두 그룹은 비슷한 비율로 나타났다. 또한 이 phylum이 증가함에 따라 Bacteroidetes의 비율은 감소하는 양상이 나타났다. 이에 본연구진은 청국장 섭취여부에 따른 미생물생태 변화는 크게 Firmicutes와 Bacteroidetes에서 차이가 나는 것을 확인하였고, 궁극적으로 분변에 청국장을 처리하였을 시에는 Firmicutes의 비율은 유지되지만, Actinobacteria가 증가함에 따라 Bacteroidetes 가 감소하는 양상을 보이는데, 이는 섭취여부와 상관없이 동일하게 나타나는 것으로 판단되어진다.

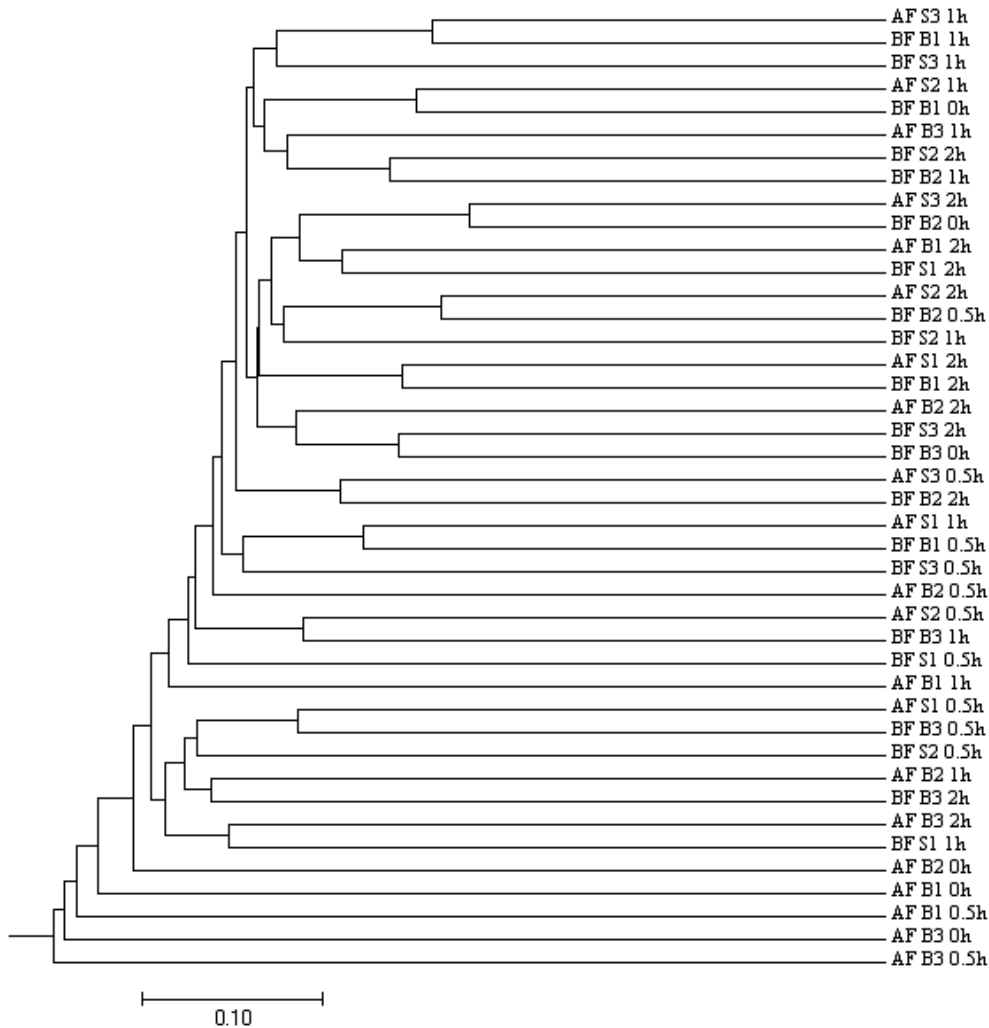


그림 12. OTU를 기반으로 Tree를 이용한 미생물생태 간 유사성 비교

BF : Before sample, AF: After sample, B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

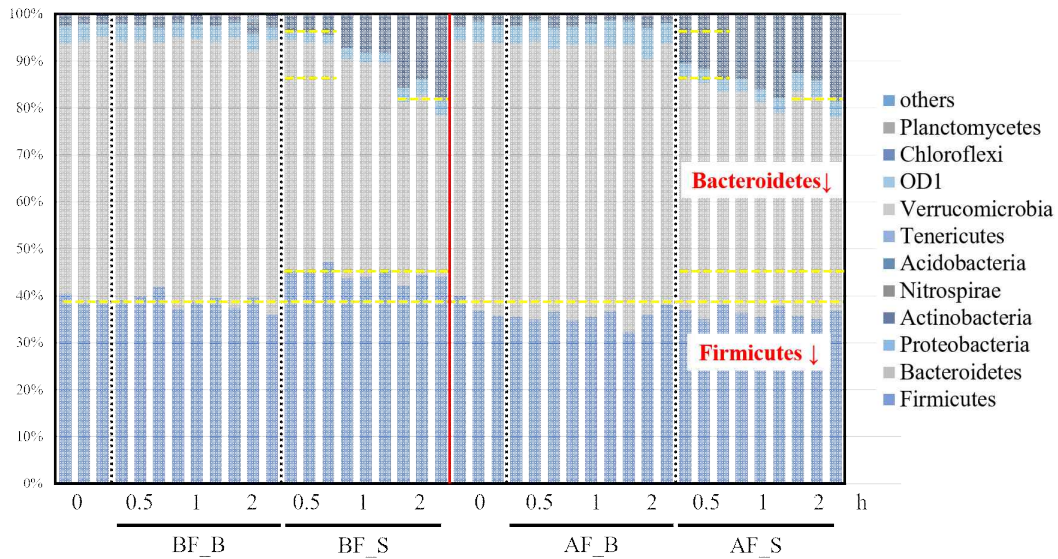


그림 13. Phylotype를 기반으로 phylum 수준에서 미생물 생태간 유사성 비교  
 BF : Before sample, AF: After sample, B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated  
 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

- NMDS 상에서 미생물생태를 비교하였을 때, 청국장 섭취여부와 관계없이 Sample 그룹의 미생물 생태는 모두 같은 방향으로 생태가 변하는 것으로 확인 되었고(그림14-A), ANOVA결과에서는 섭취여부와 관계없이 Blank 그룹간 및 Sample그룹간 차이가 없는 것으로 확인되었다(그림14-C). 이는 본 연구개발 차세대 건강기능식품평가시스템의 가능성을 검증하는 것이라 판단된다.

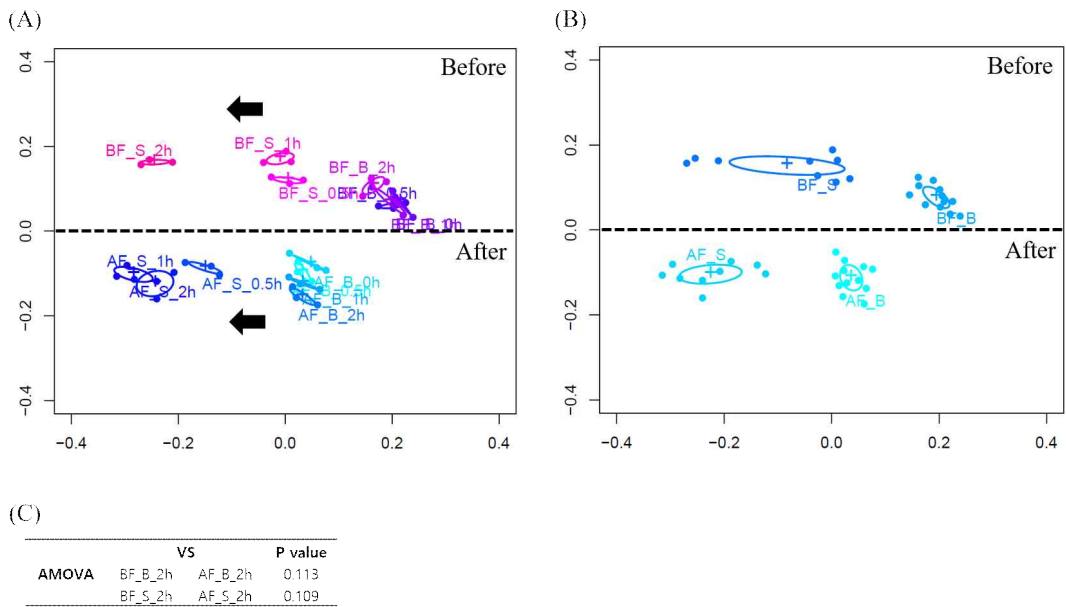


그림 14. OTUs를 기반한 NMDS 상 미생물생태 유사성 비교  
 (A) 시간과 그룹에 따른 미생물 생태, (B) 시간관계없이 그룹에 따른 미생물 생태  
 BF : Before sample, AF: After sample, B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated  
 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

- 앞서 진행한 거시적인 미생물생태 비교에서는 청국장 섭취 여부에 따라 생태변화에 차이가 없는 것으로 나타나 차세대 건강기능식품평가시스템의 가능성을 검증하였다. 이에 이어서 미시적인 미생물생태를 비교하였고, 이는 geuns와 OTU 수준에서 비교하였다.

- 우선 NMDS 상에서 미시적인 차이를 보기 위해서 genus 수준에서의 phylotype Bi-plot과 OTU 수준에서의 Bio-plot을 파라미터로 하여 비교하였다. Bio-plot은 NMDS 상에서 방향을 나타내는 화살표로 나타나며, 방향성을 띠는 곳의 미생물 생태에 유의적으로 많음을 의미한다. 통계분석으로 계산된 Bio-plot 중 p value가 0.05 이하인 것을 선택하였고, 이에 phylotype (Genus) 기반 37개, OTU 기반 66개의 Bio-plot을 선별하였다(표8). 여기서 OTU 기반 Bio-plot은 생태별 abundance를 비교하기위해 heatmap으로 나타내었다(그림15).

표 6 . NMDS 상 genus 수준의 전체 Phylotype 및 OTU 기반 Bi-plot(p<0.05)

Phylotype Bi-plot		OTU Bi-plot		
Phylum	Genus	Species	OTU	
<b>X&lt;0, Y&gt;0</b>				
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Otu0010	
<b>X&lt;0, Y&lt;0</b>				
Bacteroidetes	<i>Alistipes spp.</i>	<i>Alistipes putredinis</i> <i>Alistipes massiliensis</i> <i>Alistipes indistinctus</i>	Otu0011 Otu0048 Otu0128	
Firmicutes	<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Bacteroides spp.</i> <i>Bacteroides uniformis</i>	Otu0002,0025,0256 Otu0012	
	<i>Blautia spp.</i>	<i>Blautia spp.</i>	Otu0022,0038,0109,0238	
	<i>Dorea spp.</i>	<i>Dorea formicigenerans</i> <i>Dorea spp.</i>	Otu0096 Otu0164	
	<i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i> <i>[Eubacterium] spp.</i>	- - <i>[Eubacterium] dolichum</i> <i>[Eubacterium] cylindroides</i>	- - Otu0084 Otu0277	
	<i>Holdemania spp.</i>	<i>Holdemania spp.</i>	Otu0104,0155	
	<i>Lachnospiraceae</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Phascolarctobacterium spp.</i>	- - <i>Phascolarctobacterium spp.</i>	- - Otu0072	
	Ruminococcaceae Family	Ruminococcaceae Family	Otu0004,0066,0079,0086, 0119,0217,0249	
	<i>[Ruminococcus] spp.</i>	<i>[Ruminococcus] torques</i>	Otu0018,0721	
	Lentisphaerae	<i>Victivallis spp.</i>	<i>Victivallis vadensis</i>	Otu0959
	Proteobacteria	<i>Bilophila spp.</i> <i>Desulfovibrio spp.</i> <i>Escherichia spp.</i>	<i>Bilophila spp.</i> <i>Desulfovibrio spp.</i> -	Otu0013 Otu0235 -
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia spp.</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Otu0062	
<b>X&gt;, Y&lt;0</b>				
Bacteroidetes	<i>Butyricimonas spp.</i> <i>Odoribacter spp.</i>	<i>Butyricimonas spp.</i> <i>Odoribacter spp.</i>	Otu0085,0110,0136 Otu0051	
Proteobacteria	<i>Sutterella spp.</i>	<i>Sutterella spp.</i>	Otu0019	
<b>X&gt;0, Y&gt;0</b>				
Actinobacteria	<i>Rothia spp.</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	Otu0231	
Bacteroidetes	<i>Prevotella spp.</i>	<i>Prevotella spp.</i> <i>Prevotella stercorea</i>	Otu0196 Otu0202	
Chloroflexi	Ellin6529 Class	Ellin6529 Class	Otu0263	
Firmicutes	Clostridiales Order	Clostridiales Order	Otu0023,0043,0135,0201, 0411	

	<i>Clostridium spp.</i> (Lachnospiraceae Family)	<i>Clostridium spp.</i> (Lachnospiraceae Family)	Otu0039,0267
	<i>Faecalibacterium spp.</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Otu0040,0240
	<i>Granulicatella spp.</i>	-	-
	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	Otu0112
	<i>Roseburia spp.</i>	<i>Roseburia faecis</i>	Otu0103
		<i>Roseburia inulinivorans</i>	Otu0030
		<i>Roseburia spp.</i>	Otu0076,0153
	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus infantis</i>	Otu0161
		<i>Streptococcus spp.</i>	Otu0017,0114
Nitrospirae	<i>Nitrospira spp.</i>	<i>Nitrospira spp.</i>	Otu0224
Proteobacteria	Betaproteobacteria Class	Betaproteobacteria Class	Otu0106
	<i>Gallionella spp.</i>	<i>Gallionella spp.</i>	Otu0172
	<i>Haemophilus spp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Otu0132
	<i>Novosphingobium spp.</i>	<i>Novosphingobium spp.</i>	Otu0122
	<i>Sphingomonas spp.</i>	<i>Sphingomonas wittichii</i>	Otu0181
Tenericutes	RF39 Order	RF39 Order	Otu0098,0100

- heatmap 결과는 각 생태별 abundance를 Log<sub>2</sub> scale로 나타낸 것이며, metastats 결과 중 유의적인 차이를 보인 미생물에 대한 표시는 표에 나타내었다. 또한 해당미생물이 유의적으로 많은 그룹에 대해서는 색이 들어간 셀로 구분하였다(그림15,16,17).

- OTU 기반 Bio-plot에 따른 abundance를 비교하였을 때에는 청국장 섭취전과 후가 Cluster BF, AF로 나뉘었고(파랑,분홍), FF 시행 시의 청국장 처리 여부에 따라 Cluster B, S로 나뉘는 것이 확인되었다. Cluster B는 FF 시 시간경과에 따라 뒤섞여 있는 것으로 확인되었지만(빨강,주황,노랑), 이에 반하여 Cluster S는 샘플링 시간별로 그룹화 되어 나타났다(연두,보라,하늘)(그림15).

- 한편, 그림 15의 왼쪽 Cluster는 OTU의 abundance에 따라 나타난 것으로, 크게 두 Cluster I, II로 나뉘었고, II는 다시 두 Cluster II-a와 II-b로 나뉘었다. 이 중 NMDS 상에 나타내어 비교하기 위해 abundance가 높게 나타난 Cluster I와 Cluster II-a의 Bio-plot을 선별하였고, 총 24개의 OTU 기반 Bio-plot이 선정되었다(표9). 또한 이에 따라 phylotype(Genus) Bio-plot은 16개를 선정하여 그림 15에 나타내었다(표9).



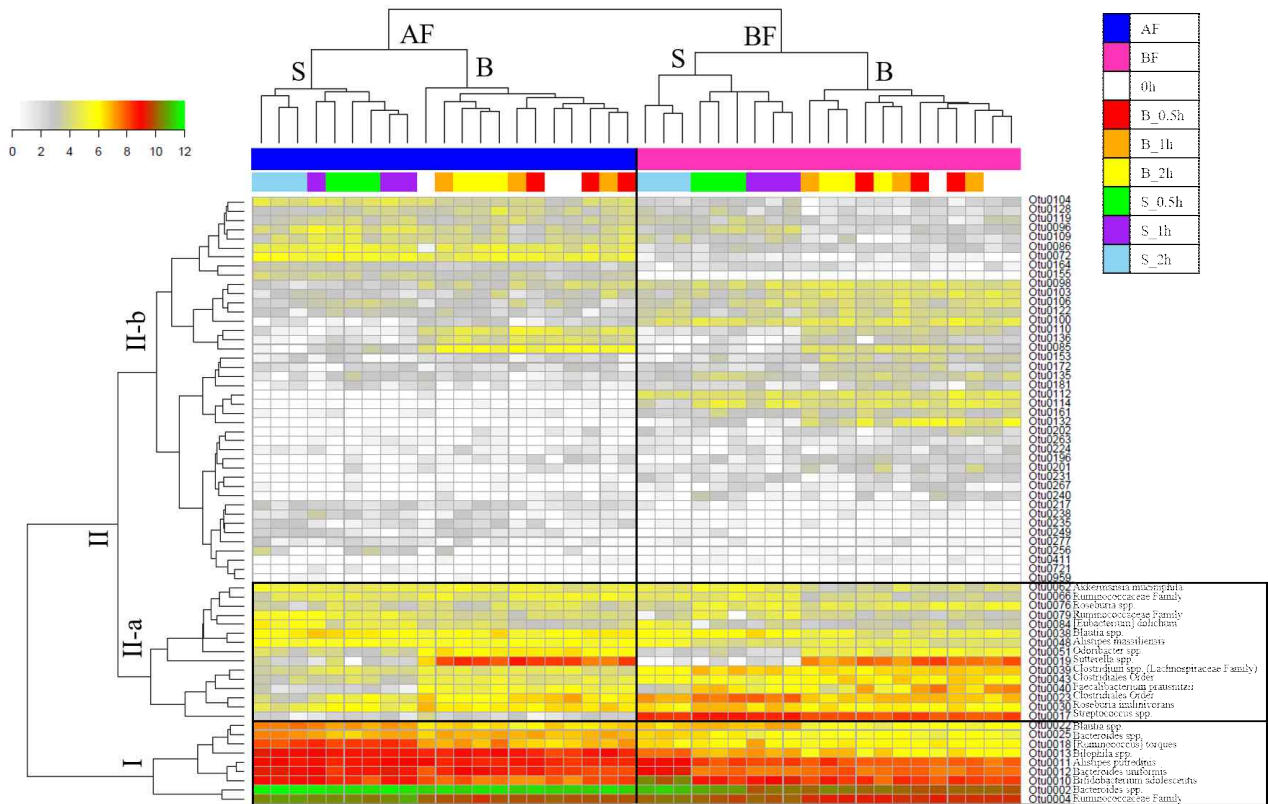


그림 15. OTU Bi-plot 기반 생태별 abundance 비교(heatmap)

BF : Before sample, AF: After sample,  
 B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated  
 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

- NMDS상 Bio-plot은 영점을 기준으로 총 네 방향으로 나뉘었고, 크게 BF\_S(x<0,y>0), AF\_S(x<0,y<0), AF\_B(x>0,y<0), BF\_B(x>0,y>0) 방향으로 나타났다. BF\_S 방향에서는 *Bifidobacterium spp.*(그림14-1)가 유의적으로 많은 것으로 나타났고, OTU수준에서는 *Bifidobacterium adolescentis*가 유의적으로 많았다. AF\_S 방향에서는 *Alistipes spp.*, *Bacteroides spp.*, *Blautia spp.*, *[Eubacterium] spp.*, *Ruminococcaceae Family*, *[Ruminococcus] spp.*, *Bilophila spp.*, *Akkermansia spp.* 가 유의적으로 많은 것으로 나타났고, OTU수준에서는 *Alistipes putredinis*, *Alistipes massiliensis*, *Bacteroides spp.*, *Bacteroides uniformis*, *Blautia spp.*, *[Eubacterium] dolichum*, *Ruminococcaceae Family*, *[Ruminococcus] torques*, *Bilophila spp.*, *Akkermansia muciniphila*가 유의적으로 많았다. AF\_B 방향에서는 Clostridiales Order, *Clostridium spp.* (Lachnospiraceae Family), *Faecalibacterium spp.*, *Roseburia spp.*, *Streptococcus spp.*가 유의적으로 많았고, OTU 수준에서는 Clostridiales Order, *Clostridium spp.* (Lachnospiraceae Family), *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia inulinivorans*, *Roseburia spp.*, *Streptococcus spp.*이 많은 것으로 나타났다. BF\_B 방향에서는 phylotype(Genus) 과 OTU Bio-plot 둘 다 *Odoribacter spp.*와 *Sutterella spp.*가 유의적으로 많았다.

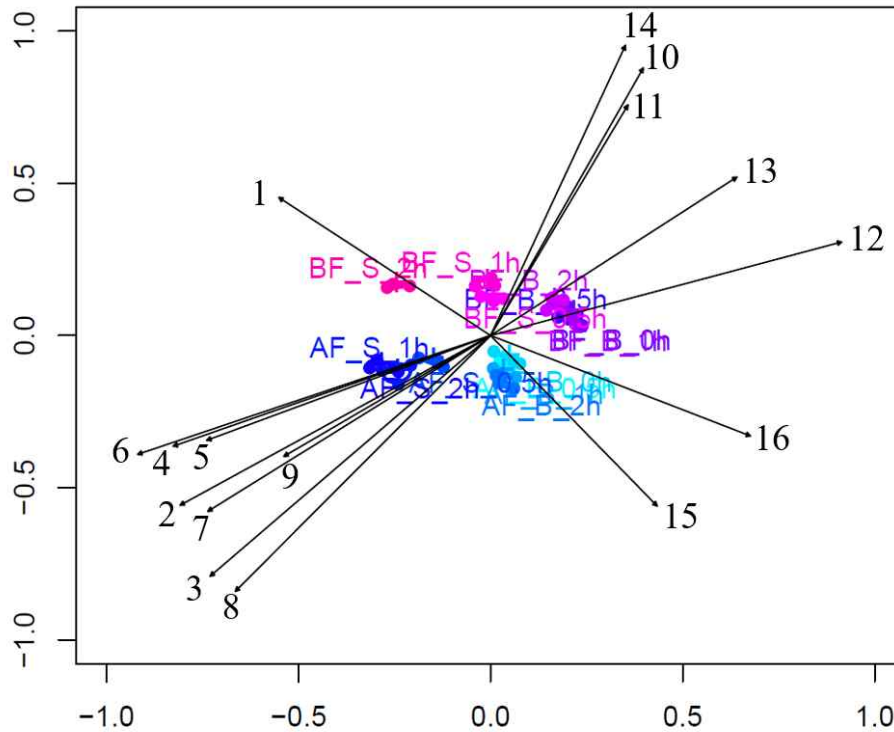


그림 16. NMDS 상 미생물생태 비교와 선택된 Phylotype Bi-plot

BF : Before sample, AF: After sample,  
 B : Blank, S : Sample(Cheonggukjang) treated  
 0, 0.5, 1 and 2 h means sampling time.

표 7 . NMDS 상 선정된 genus 기반 Phylotype Bi-plot 및 OTU 기반 Bi-plot

Phylum	Phylotype biplot		OTU biplot	
	No	Genus	Species	OTU
<b>X&lt;0, Y&gt;0</b>				
Actinobacteria	1	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Otu0010
<b>X&lt;0, Y&lt;0</b>				
Bacteroidetes	2	<i>Alistipes spp.</i>	<i>Alistipes putredinis</i>	Otu0011
			<i>Alistipesma ssiliensis</i>	Otu0048
	3	<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Bacteroides spp.</i>	Otu0002,0025
			<i>Bacteroides uniformis</i>	Otu0012
	4	<i>Blautia spp.</i>	<i>Blautia spp.</i>	Otu0022,0038
Firmicutes	5	<i>[Eubacterium] spp.</i>	<i>[Eubacterium] dolichum</i>	Otu0084
	6	Ruminococcaceae Family	Ruminococcaceae Family	Otu0004,0066, Otu0079
	7	<i>[Ruminococcus] spp.</i>	<i>[Ruminococcus] torques</i>	Otu0018
Proteobacteria	8	<i>Bilophila spp.</i>	<i>Bilophila spp.</i>	Otu0013
Verrucomicrobia	9	<i>Akkermansia spp.</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Otu0062
<b>X&gt;0, Y&gt;0</b>				
Firmicutes	10	Clostridiales Order	Clostridiales Order	Otu0023,0043
	11	<i>Clostridium spp.</i> (Lachnospiraceae Family)	<i>Clostridium spp.</i> (Lachnospiraceae Family)	Otu0039

12	<i>Faecalibacterium spp.</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Otu0040
13	<i>Roseburia spp.</i>	<i>Roseburia inulinivorans</i>	Otu0030
		<i>Roseburia spp.</i>	Otu0076
14	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	Otu0017

X>0, Y<0

Bacteroidetes	15	<i>Odoribacter spp.</i>	<i>Odoribacter spp.</i>	Otu0051
Proteobacteria	16	<i>Sutterella spp.</i>	<i>Sutterella spp.</i>	Otu0019

- 하지만, Bio-plot만으로는 FF 시와 청국장섭취여부에 따른 해당 미생물의 증/감 여부를 알 수가 없기 때문에, 이에 따른 추가적인 비교분석이 필요하다. 이에 본 연구에서는 미생물 생태 간 1:1 비교에서는 metastats, 다중 비교에서는 lefse를 사용하여 비교분석을 진행하였다.

- 청국장 섭취 전, 후의 달라진 미생물 생태를 비교하기 위해 OTU 기반 metastats를 통해 Blank 그룹 간의 비교를 진행하였다(BF\_B\_0h vs AF\_B\_0h, BF\_B\_0h vs BF\_B\_2h, AF\_B\_0h vs AF\_B\_2h, BF\_B\_2h vs AF\_B\_2h). 각각 116, 56, 42, 139 OTUs를 얻었고(p<0.05), 그 중 각 그룹의 abundance 비율을 구하여 그룹 간 평균 차가 1% 이상인 것(6, 2, 1, 9 OTUs)을 선택하여 그림 17에 나타내었다.

- 청국장을 섭취함에 따라 유의적으로 증가한 미생물은 *Bacteroides spp.*(Otu0002), Ruminococcaceae Family(Otu0004)로 나타났고, 유의적으로 감소한 미생물은 *Prevotella copri*(Otu0001), *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007), *Streptococcus spp.*(Otu0017)로 나타났다. *Prevotella stercorea*(Otu0008)는 청국장의 섭취로 인해 유의적으로 감소하였고, 이와 더불어 FF 시에도 감소하는 것으로 나타났다. 한편 *Bacteroides uniformis*(Otu0012), *Bilophila spp.*(Otu0013)는 AF\_B\_2h에서 청국장 섭취와 FF로 인한 유의적인 증가는 나타나지 않았지만, BF\_B\_2h 그룹보다 유의적으로 많은 것으로 나타났고, *Dialister spp.*(Otu0003)는 BF\_B\_2h 그룹에서 AF\_B\_2h 그룹보다 유의적으로 많았다.

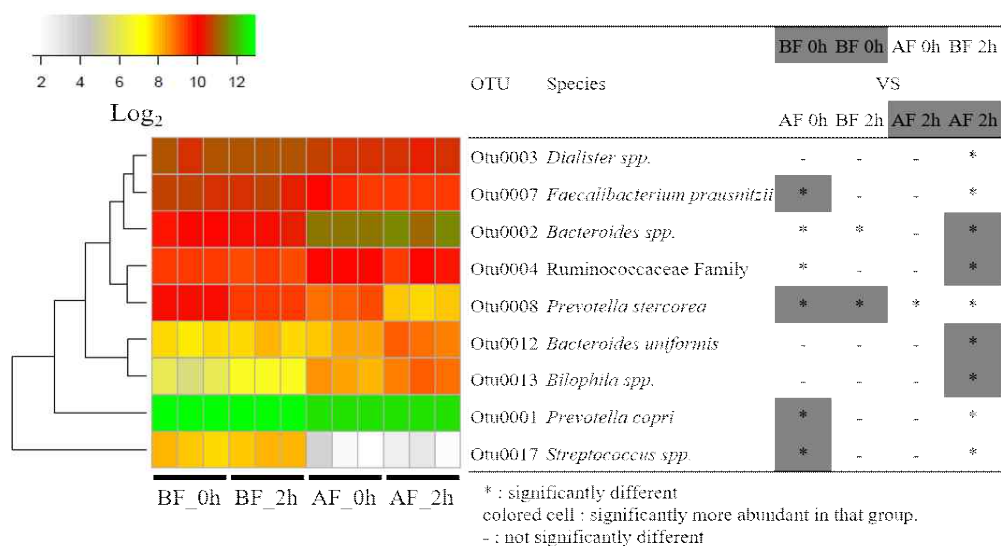


그림 17. 청국장 섭취 전, 후의 Blank 그룹 간 미생물 생태별 relative abundance 비교(heatmap) 116, 56, 42 and 139 OTUs in each comparison were selected using metastats based on OTU (P<0.05). 6, 2, 1 and 9 OTUs were selected that showing more than 1 % difference by comparing an average of abundance proportion in each comparison.

- 다중 그룹간 비교를 위해서는 Phylotype(Genus)와 OTU 기반으로 Lefse를 시행하였고, 다음 그룹을 함께 비교하였다(BF\_B\_0h vs BF\_B\_2h vs AF\_B\_0h vs AF\_B\_2h). 각각 43, 115개의 OTUs를 얻었고 ( $p < 0.05$ ), 그 중 각 그룹의 abundance 비율을 구하여 그룹 간 평균 차가 1% 이상인 것(6, 8 OTUs)을 선택하여 그림 18에 나타내었다.

- Lefse 결과는 다중 그룹 중 각 그룹에 대해 유의적으로 많은 미생물을 나타내주며, 모두 양의 수로 결과가 나타난다. 그림에 나타난 음의 수는 시각적인 비교를 위해 나타낸 것으로, 감소가 아닌 양의 수와 동일한 수치다(그림 17,19,20).

- BF\_B\_0h에는 *Prevotella stercorea*(Otu0008)와 *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007)가 유의적으로 많으며, Metastats결과에서는 *Prevotella stercorea*(Otu0008)가 청국장 섭취로 인한 장내미생물생태 내에서 감소하였고, FF시에도 감소한 결과가 나타났었다. 마찬가지로 *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007)은 metastats결과에서 청국장 섭취로 인한 장내미생물생태 내 감소와 FF 시 감소가 있었다. BF\_B\_2h에는 *Streptococcus spp.*(Otu0017)와 *Prevotella copri*(Otu0001)가 유의적으로 많았다. 이들은 metastats결과에서 FF 시에는 증가하지 않았으며 청국장 섭취 시에만 감소한 것으로 나타났었다.

- Ruminococcaceae Family(Otu0004)는 AF\_B\_0h에서 유의적으로 많았고, 이는 metastats결과에서 청국장 섭취 시 생태 내 증가하는 것으로 나타났으며, FF시에는 변화가 없는 것으로 나타났었다. *Bacteroides uniformis*(Otu0012), *Bilophila spp.*(Otu0013), *Bacteroides spp.*(Otu0002)는 AF\_B\_2h에서 유의적으로 많은 것으로 나타났으며, 그 중 *Bacteroides spp.*(Otu0002)는 청국장 섭취 시 미생물생태 내에서 유의적으로 증가한 것으로 나타났다.

- 한편, Blank 그룹 내 0 시간(BF\_B\_0h, AF\_B\_0h)과 2 시간(BF\_B\_2h, AF\_B\_2h)간 비교는 phylotype(genus)과 OTU 기반으로 Lefse를 진행하였다. phylotype 기반에서는 유의적으로 차이 나는 미생물이 나타나지 않았으며, OTU 기반에서는 유의적으로 차이 나는 OTU가 9개 나타났으나, 각 그룹의 abundance 비율을 구하여 그룹 간 평균 차가 1% 이상인 것이 전무하여 결과를 나타내지 않았다.

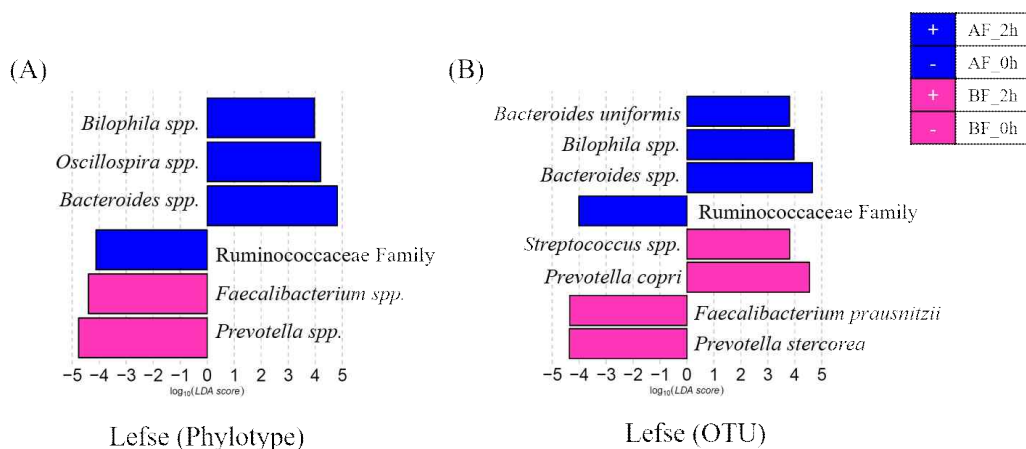


그림 18. 청국장 섭취 전, 후의 Blank 그룹 간 미생물생태 비교(Lefse)

43 and 115 OTUs were selected using Lefse based on phylotype(genus) and OTU, respectively( $p < 0.05$ ). Each 6 and 8 OTUs were selected that showing more than 1 % difference by comparing an average of abundance proportion in each comparison.

- 청국장 섭취 유무에 따라 변화하는 장내미생물생태와 FF 시 in vitro로 인한 미생물생태변화를 비교하기 하였다(BF\_B\_0h vs BF\_S\_2h, AF\_B\_0h vs AF\_S\_2h, BF\_S\_2h vs AF\_S\_2h). 이를 통해 각각 105, 109, 111 OTUs를 얻었고(p<0.05). 그 중 각 그룹의 abundance 비율을 구하여 그룹 간 평균차가 1% 이상인 것(11, 11, 10 OTUs)을 선택하여 그림 18에 나타내었다. 위해 앞서 Blank 그룹 간 미생물생태 비교를 진행하였다. 다음은 본 연구개발 차세대 건강기능식품평가시스템을 검증하기 위해 FF 시행 시의 Blank 그룹과 청국장을 처리한 그룹(Sample)들 간의 비교를 진행하였다(그림18)

- FF 시행 시 청국장을 처리함에 따라 BF와 AF의 미생물 생태에서 모두 유의적으로 증가한 미생물은 *Bacteroides spp.*(Otu0002), Ruminococcaceae Family(Otu0004), *Collinsella aerofaciens*(Otu0006), *Bifidobacterium adolescentis*(Otu0010), *Bacteroides uniformis*(Otu0012)으로, *Bacteroides spp.*(Otu0002)와 Ruminococcaceae Family(Otu0004)는 FF 시행 시 BF 그룹에 비하여 AF 그룹에서 유의적으로 더 많았으며, 이는 청국장 섭취 시에도 증가하는 미생물로 나타났었다(그림16). *Bifidobacterium adolescentis*(Otu0010)는 BF 그룹에서 유의적으로 더 많았다.

- FF 시행 시 청국장을 처리함에 따라 BF와 AF의 미생물 생태에서 모두 유의적으로 감소한 미생물은 *Prevotella copri*(Otu0001), *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007), *Prevotella stercorea*(Otu0008), *Sutterella spp.*(Otu0019) 으로, *Prevotella copri*(Otu0001)와 *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007)는 청국장 섭취에 따라서도 장내미생물생태에서 감소하는 것으로 나타났었다(그림16). 또한 *Prevotella stercorea*(Otu0008)는 BF 그룹에 비하여 AF 그룹에서 유의적으로 감소하였는데, 이는 청국장의 섭취로 인해 유의적으로 감소하고, FF시에도 감소하는 것으로 나타났었다(그림16).

- 한편 FF 시행 시 청국장을 처리하였을 때에 *Dialister spp.*(Otu0003)는 BF 그룹 내에서만 증가하였고, 이는 AF\_2h 그룹보다 유의적으로 많은 것으로 나타났는데, 이는 BF blank에서만 증가한 미생물로 나타났었다. 마찬가지로 *Alistipes putredinis*(Otu0011)는 BF 그룹내에서만 증가하였으나, BF\_S\_2h는 각각 AF의 0, 2시간과의 비교에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

- 반면 *Bilophila spp.*(Otu0013)는 FF 시행 시 청국장을 처리하였을 때 AF 그룹 내에서만 증가하였고, BF\_2h 그룹보다 유의적으로 많았다. 또한 AF Blank에서만 증가한 미생물로 나타났었다. 이와 더불어 *Parabacteroides distasonis*(Otu0015), *[Ruminococcus] torques*(Otu0018)는 청국장 처리에 의해 AF 그룹 내에서만 증가하는 양상을 보였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았고, BF\_2h 그룹보다 유의적으로 많았다. Lachnospiraceae Family(Otu0016)는 AF 그룹 내에서만 감소하였으나, AF\_S\_2h는 각각 BF의 0, 2시간과의 비교에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

- *Streptococcus spp.*(Otu0017)와 Enterobacteriaceae Family(Otu0029)는 청국장 섭취 시 유의적으로 감소하는 미생물로 나타났으며(BF>AF), FF 시행 시 청국장 처리와는 유의적인 관계가 나타나지 않았다. 또한 *Streptococcus spp.*(Otu0017)는 그림16에서 청국장 섭취 시 유의적으로 감소하는 미생물로 나타났었다.

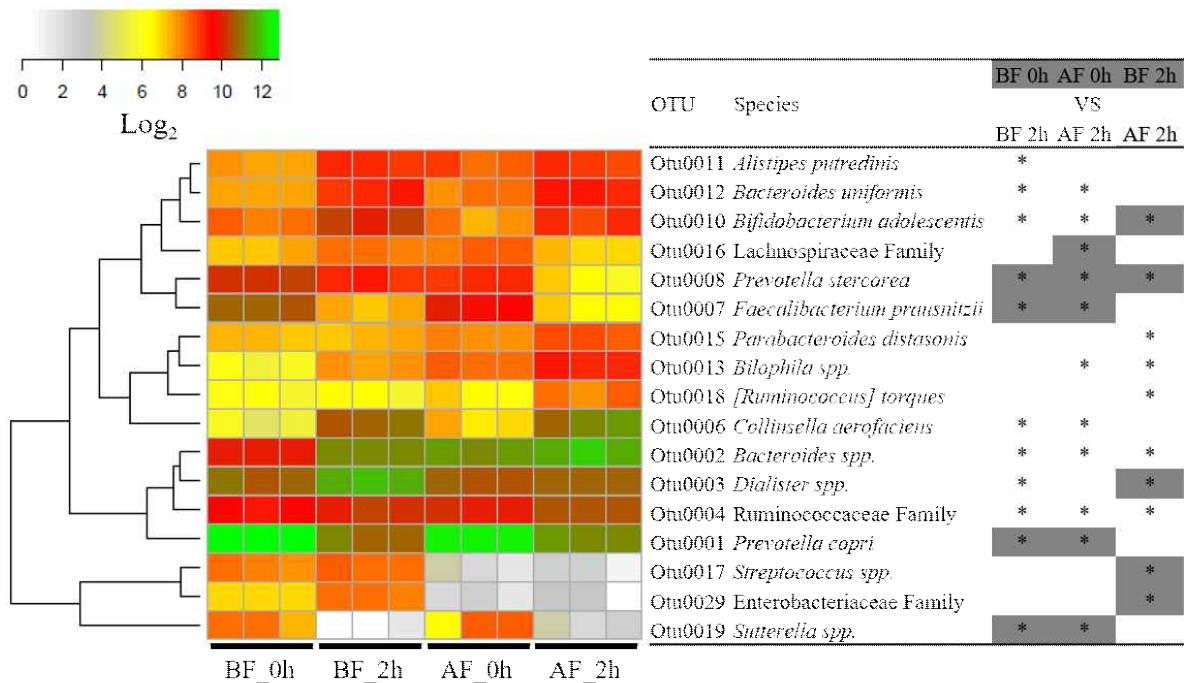


그림 19. FF 시 청국장 처리 전, 후의 그룹 간 미생물 생태별 relative abundance 비교(heatmap) 105, 109 and 111 OTUs in each comparison were selected using metastats based on OTU ( $P < 0.05$ ). 11, 11 and 10 OTUs were selected that showing more than 1 % difference by comparing an average of abundance proportion in each comparison.

- 다중 그룹간 비교를 위해서는 Phylotype(Genus)와 OTU 기반으로 Lefse를 시행하였고, 다음 그룹을 함께 비교하였다(BF\_B\_0h vs BF\_S\_2h vs AF\_B\_0h vs AF\_S\_2h). 각각 42, 138개의 OTUs를 얻었고 ( $p < 0.05$ ), 그 중 각 그룹의 abundance 비율을 구하여 그룹 간 평균 차가 1% 이상인 것(16, 18 OTUs)을 선택하여 그림 19에 나타내었다.

- BF\_B\_0h에는 *Sutterella spp.*(Otu0019), *Prevotella stercorea*(Otu0008), *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007), *Prevotella copri*(Otu0001)가 유의적으로 많은 것으로 나타났으며, 이는 청국장 처리 한 BF와 AF 그룹 모두에게서 유의적으로 감소한 것으로 나타났었다. 그 중 *Prevotella stercorea*(Otu0008)는 청국장 처리 시 AF\_S\_2h 그룹에서 BF 그룹 보다 더 유의적으로 감소하였다(그림18). 또한 *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007)와 *Prevotella copri*(Otu0001)는 Blank 그룹 간 비교에서 청국장 섭취 시 장내미생물생태에서 감소한 것으로 나타났었다(그림16). BF\_S\_2h에서는 Enterobacteriaceae Family(Otu0029), *Alistipes putredinis*(Otu0011), *Streptococcus spp.*(Otu0017), *Bifidobacterium adolescentis*(Otu0010), *Dialister spp.*(Otu0003)가 유의적으로 많았다. Enterobacteriaceae Family(Otu0029)와 *Streptococcus spp.*(Otu0017)는 BF\_S\_2h에서 AF\_S\_2h보다 유의적으로 많이 나타났지만, 동일 그룹의 0시간과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. *Alistipes putredinis*(Otu0011)는 BF 그룹 내에서만 증가하였지만, AF 그룹의 0, 2시간 각각과의 비교에서는 유의적인 미생물생태차이는 나타나지 않았다.

- Lachnospiraceae Family(Otu0016) 와 *Oscillospira spp.*(Otu0020)는 AF\_B\_0h에서 많은 것으로 나타났으며, 그 중 Lachnospiraceae Family(Otu0016)는 AF 그룹 내에서 유의적으로 감소하였고, BF 그룹의 0, 2시간 각각과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았었다. BF\_S\_2h에서는 *[Ruminococcus] torques*(Otu0018), *Parabacteroides distasonis*(Otu0015), *Bacteroides uniformis*(Otu0012), *Bilophila spp.*(Otu0013), Ruminococcaceae Family(Otu0004), *Collinsella aerofaciens*(Otu0006), *Bacteroides*

*spp.*(Otu0002)가 유의적으로 많은 것으로 나타났으며, *Bacteroides uniformis*(Otu0012), Ruminococcaceae Family(Otu0004), *Collinsella aerofaciens*(Otu0006), *Bacteroides spp.*(Otu0002)는 청국장 처리 시 BF와 AF 그룹 모두에게서 유의적으로 증가하였다. 그 중 Ruminococcaceae Family(Otu0004)와 *Bacteroides spp.*(Otu0002)는 청국장 섭취로 인해 장내미생물생태 내에서 유의적으로 증가하였다. *[Ruminococcus] torques*(Otu0018)와 *Parabacteroides distasonis*(Otu0015)는 청국장 처리 시 AF 그룹에서만 증가하는 양상을 보였지만, 0시간과 유의적인 차이는 나지 않았으며, BF\_S\_2h보다 유의적으로 많게 나타났다. 반면 *Bilophila spp.*(Otu0013)는 AF 그룹에서만 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.

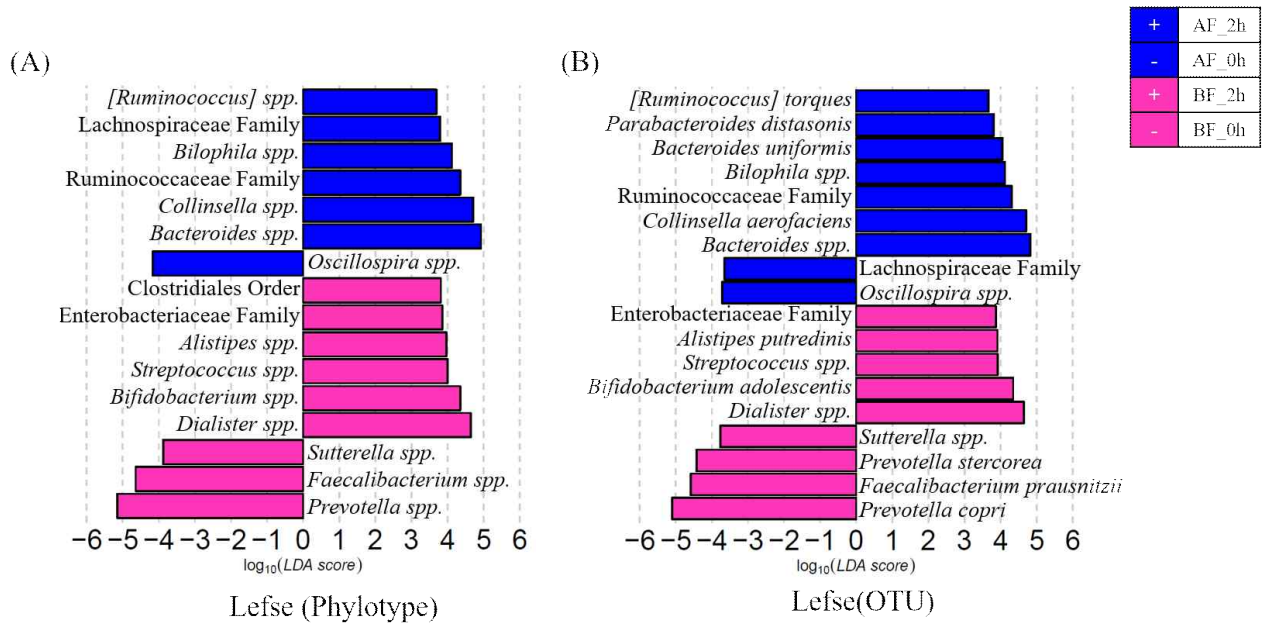


그림 20. FF 시 청국장 처리 전, 후의 그룹 간 미생물 생태 비교(Lefse)

42 and 138 OTUs were selected using Lefse based on phylotype(genus) and OTU, respectively( $p < 0.05$ ).

Each 16 and 18 OTUs were selected that showing more than 1 % difference by comparing an average of abundance proportion in each comparison.

- 한편 Blank그룹(BF\_B\_0h, AF\_B\_0h)과 청국장 처리 그룹(BF\_S\_2h, AF\_S\_2h)간 비교는 phylotype(genus)와 OTU 기반으로 Lefse를 진행하였다. 각각 18, 65개의 OTUs를 얻었고( $p < 0.05$ ), 그 중 각 그룹의 abundance 비율을 구하여 동일 그룹 간 평균 차가 1% 이상인 것(9, 9 OTUs)을 선택하여 그림 20에 나타내었다.

- Blank에서는 *Sutterella spp.*(Otu0019), *Prevotella stercorea*(Otu0008), *Faecalibacterium prausnitzii*(Otu0007), *Prevotella copri*(Otu0001)가 유의적으로 많은 것으로 나타났는데, 모두 BF와 AF 그룹 모두에 청국장 처리 시 둘 다 유의적으로 감소하였다. 반면 *Bacteroides uniformis*(Otu0012), Ruminococcaceae Family(Otu0004), *Bifidobacterium adolescentis*(Otu0010), *Collinsella aerofaciens*(Otu0006)는 Sample에서 유의적으로 많은 것으로 나타났고, 이는 BF와 AF 그룹 모두에 청국장 처리 시 둘 다 유의적으로 증가하는 양상을 보였다. 한편 *Alistipes putredinis*(Otu0011)는 BF 그룹에 청국장 처리 시에만 유의적으로 증가하였으며, BF\_S\_2h는 AF그룹의 0, 2시간 각각과 유의적으로 차이가 나지 않았다.

## -2차년도 연구개발과제의 수행 결과

### ○ 여러 피험자를 통한 차세대 건강기능식품평가시스템을 청국장에 적용 및 기능성 평가

- 피험자별 BLK 2h과 Treatment(청국장) 2h SCFAs 함량변화 비교 분석은 주요 SCFA인 Acetate, Propionate, Butyrate를 측정하여 그림 21에 나타내었다.

- 피험자 S2는 청국장을 첨가하였을 경우 모든 SCFAs가 유의적으로 증가하였으며, 피험자 S4, S6 및 S7 경우에는 모든 SCFAs가 유의적으로 증가하지 않음을 확인할 수 있었다. 피험자 S1는 Acetate, Propionate가 유의적으로 증가하였으며, 피험자 S3와 S5는 Acetate만이 피험자 S8는 Acetate, Butyrate만이 유의적으로 증가하였다.

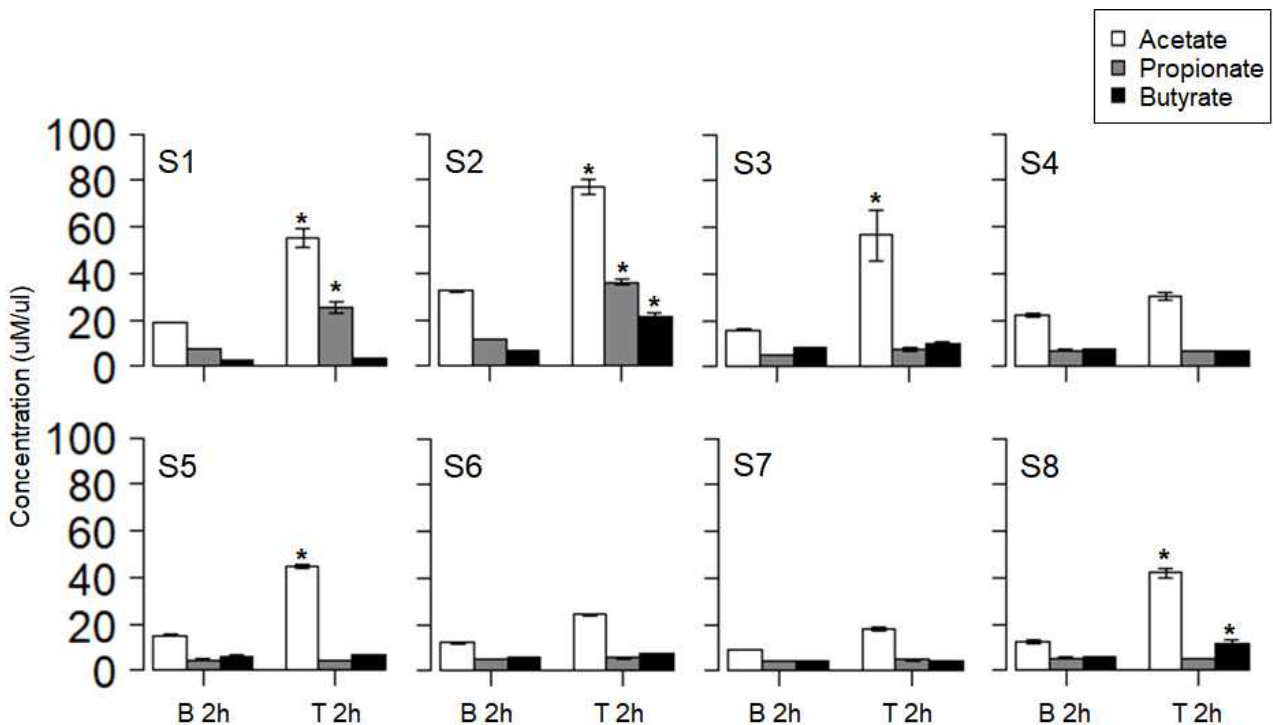


그림 21. In vitro상에서 피험자별 청국장에 의해 변화한 SCFAs 함량

Mean values  $\pm$  S.D. are shown. One-way ANOVA was used to compare B 2h and T 2h with the same subject (\* $p < 0.001$ ). B 2h : Blank group at 2 hours in vitro fermentation; T 2h : CGJ group at 2 hours in vitro fermentation

- In vivo와 In vitro에서의 장내미생물 차이분석은 총 72개의 raw datat를 이용하였고, 총 2,977,183 reads와 35,364 OTUs를 얻었다. 모든 샘플은 동일한 18,098 reads로 표준화시켜 분석을 진행하였다.

- OTUs기반 tree 결과를 그림 22에 나타내었다. 그 결과 작게는 피험자별로 clustering되었으며, 크게는 총 3개의 그룹으로 피험자들의 장내미생물생태가 cluster되었다. 피험자 S8, S5, S4는 Cluster I에 피험자 S7, S6는 Cluster II-a, 피험자 S3, S2, S1는 Cluster II-b에 clustering 되었다. 또한 모든 피험자에서 BLK 0h과 BLK 2h 샘플은 한 cluster에 청국장을 첨가한 샘플은 BLK 샘플들과는 clustering되지 않았다.



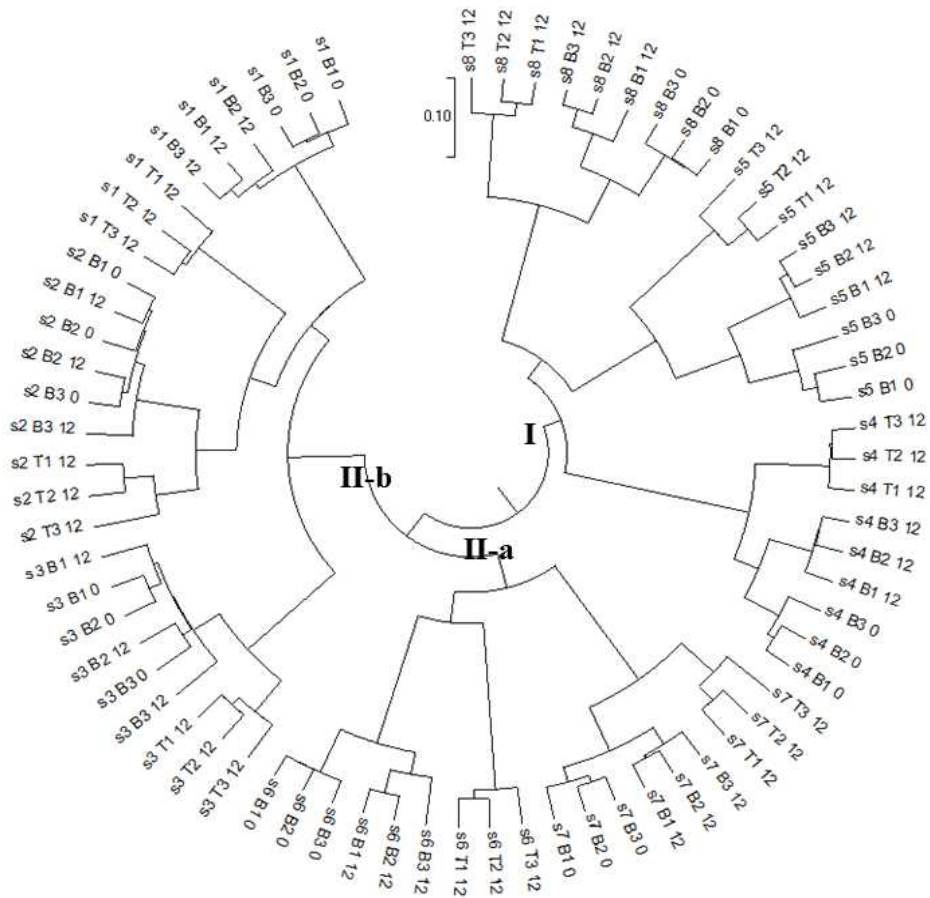


그림 22. OTUs기반 tree를 이용한 피험자별 장내미생물생태 비교

- NMDS상 피험자별 그룹에 따른 장내미생물생태를 그림 23에 나타내었다. 피험자 S3만을 제외한 모든 피험자들은 BLK 0h을 기준으로 BLK 2h과 Treatment 2h의 방향성이 달라지는 것을 확인할 수 있었으며, 피험자별로 청국장에 의해 변화하는 장내미생물생태가 다르다는 것을 확인할 수 있었다.

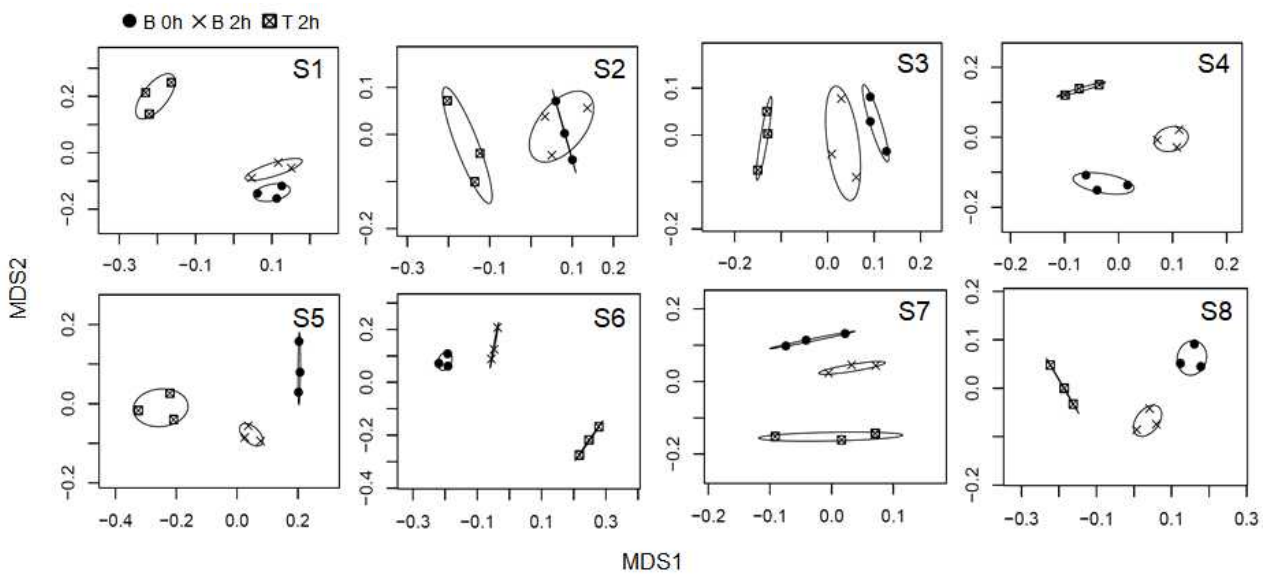


그림 23. NMDS를 통한 피험자별 청국장에 의해 변화하는 장내미생물

NMDS was plotted based on Bray-Curtis. Filled circles and x symbols indicates the microbiota of only fecal fermentation at 0 and 2 hours, respectively. Squares containing x mean the microbiota treating digested-CGJ for 2 hours.

- Phylum 수준에서 피험자별 청국장 첨가/비첨가 및 Fermentation 시간에 따른 장내미생물차이를 그림 23에 나타내었다. 그 결과 Cluster I 및 Cluster II\_a의 피험자들은 Cluster II\_b의 피험자보다 Firmicutes의 abundance가 풍부했으며, Cluster II\_a의 피험자 S7은 다른 피험자들보다 Verrucomicrobia의 abundance가 풍부하였다.

- 청국장을 첨가하지 않은 BLK그룹에서 0h과 2h을 비교하였을 경우 Cluster I에 속해있는 피험자들에게서 Actinobacteria 가 Fermentation됨에 따라 증가하는 경향을 보였으며, Cluster II\_b에 속해있는 피험자들의 경우에는 큰 변화가 없었다. 또한 피험자 S4와 S5의 경우 Firmicutes가 Fermentation됨에 따라 감소하는 경향을 보였다.

- 청국장을 첨가하지 않은 BLK 0h과 청국장을 첨가한 CGJ 2h을 비교하였을 경우 BLK 2h과 유사하게 모든 피험자들에게서 Actinobacteria가 증가하였지만, 증가하는 양상이 훨씬 더 컸으며, Firmicutes경우에는 피험자별마다 감소(S1, S3) 혹은 증가(S6, S7, S1, S2)하는 경향을 보였다.

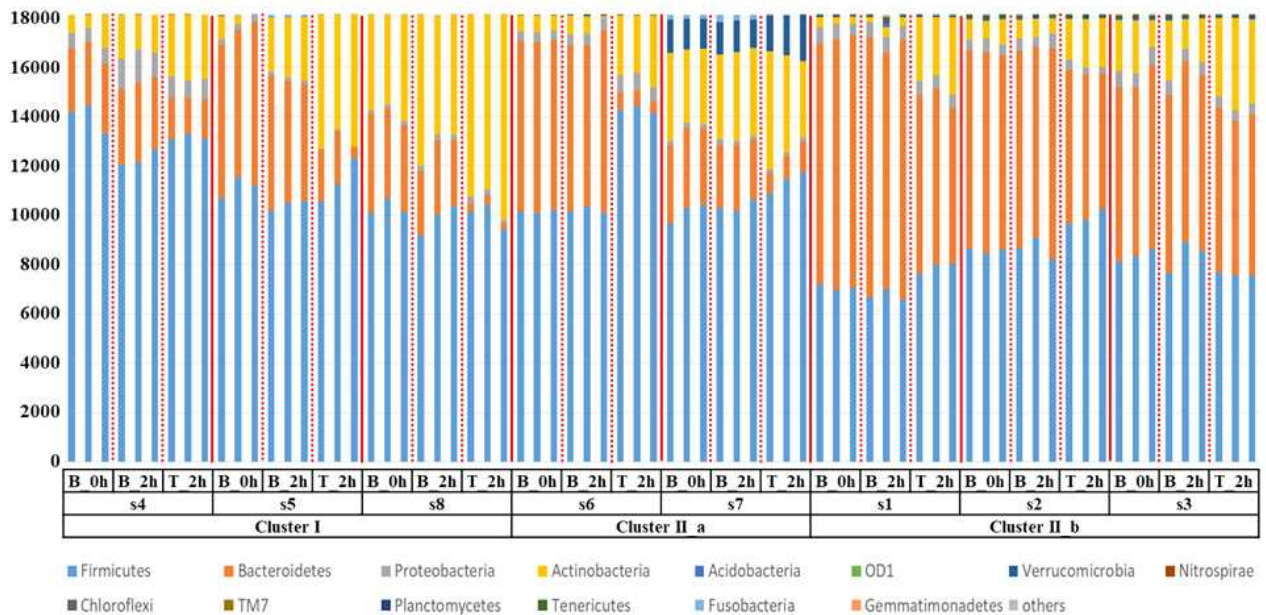


그림 23. Phylotype를 기반 phylum 수준에서 피험자별 장내미생물생태 비교

- OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통해 피험자별 BLK 0h 과 BLK 2h을 비교 시 증가 혹은 감소한 장내미생물들을 표2 에 나타내었다 (LDA>3.0). 그 결과 모든 피험자들에게서 Fermentation 2h 후 *Faecalibacterium prausnitzii* (Otu0005)이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 피험자 S4, S5, S6, S7 및 S8는 Relative Abundance기준 1%이상 감소하였으며, 피험자 S1, S2 및 S3는 Relative Abundance기준 0.5%이상 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로 *Faecalibacterium prausnitzii* (Otu0005)의 감소는 In vitro상에서의 세균배양으로 인한 변화에 의해 감소한 것으로 사료된다.

표 8 . OTUs 수준 피험자별 In vitro Fermentation 진행 동안 변화한 장내미생물

Phylum	Species (OUTs)	Subjects							
		Cluster I			Cluster II_a		Cluster II_b		
		S4	S5	S8	S6	S7	S1	S2	S3
<b>Actinobacteria phylum</b>									
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (Otu0001)		I	I					
<b>Bacteroidetes phylum</b>									
	<i>Bacteroidesspp.</i> (Otu0004)		I		I	D	I		
	<i>Bacteroidesspp.</i> (Otu0017)				I				
	<i>Bacteroidesspp.</i> (Otu0100)								D
	<i>Bacteroidesspp.</i> (Otu0158)					D			
	<i>Bacteroides fragilis</i> (Otu0011)	I							
	<i>Bacteroides plebeius</i> (Otu0095)			D					
	<i>Bacteroides uniformis</i> (Otu0020)		D						
	<i>Prevotellaspp.</i> (Otu0057)		D						
	<i>Prevotella copri</i> (Otu0002)			D	D				
	<i>Prevotella stercorea</i> (Otu0036)						D		
<b>Firmicutes phylum</b>									
	f__Ruminococcaceae (Otu0009)				I	+			
	f__Ruminococcaceae (Otu0091)		D						
	<i>Blautiaspp.</i> (Otu0003)		I						
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Otu0005)	D	D	D	D	D	-	-	-
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Otu0084)				D				
	<i>Megamonasspp.</i> (Otu0006)			I					
	<i>Megasphaeraspp.</i> (Otu0022)			D					
	<i>Ruminococcuspp.</i> (Otu0016)	I			+				
<b>Proteobacteria phylum</b>									
	<i>Sutterellaspp.</i> (Otu0030)	I							

Fecal samples for *in vitro* fermentation were obtained from eight volunteer's feces (S1~8). All OTUs were selected as showing LDA > 3.0, p value in T.Test < 0.05 comparing Relative Abundance (RA) between B 0h and B 2h, and the ratio of gap of RA > 1.0 %. Among them, decreased or Increased OUT shown D or I, respectively. - and + means decreased or increased OTU which showing more than 0.5 % of the ratio of RA gap. Blank means not detected OTU.

- OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통해 피험자별 BLK 2h과 Treatment (청국장) 2h을 비교 시 증가 혹은 감소한 장내미생물들과 Sung, Jaeyun, et al.(2017) 을 바탕으로 species수준에서 이 장내미생물들이 SCFAs (Acetate, Propionate, Butyrate) 생산을 하는지에 대해 표3 에 나타내었다(LDA>3.0).

- 표2의 결과와 유사하게 *Faecalibacterium prausnitzii* (Otu0005) 경우에는 모든 피험자들에게서 감소를 하였으나, *Faecalibacterium prausnitzii* (Otu0023) 경우에는 피험자 S1, S2, S6 및 S7에서 증가하였다. *Bifidobacterium spp.*는 청국장과 유사한 *Bacillus subtilis*에 의해 콩을 발효한 낫또를 섭취했을 시 증가한다고 알려져 있으며, *Bifidobacterium spp.*의 일종인 *Bifidobacterium adolescentis* (Otu0001) 경우에는 피험자 S7을 제외한 피험자들에게서 모두 증가하였다.

- Acetate를 생성하는 장내미생물들은 각각의 피험자들에게서 증가 혹은 감소를 하였으나, 그림 21에서의 결과에서 피험자 S1, S2, S3, S5 및 S8의 피험자들에게서만 유의적으로 증가를 하였다. 또한 본 실험 결과에서 각각의 피험자들에게서 L-Lactate ([S]-Lactate, Lactate, D-Lactate, [R]-Lactate)를 생성하는 *Collinsella aerofaciens* (OTU0034), *Lactobacillus spp.* (Otu0047), *Lactobacillus ruminis* (Otu0045), *Dorea spp.* (Otu0041) 및 *Coprococcus spp.* (Otu0008, OTU0012) 등의 장내미생물들이 증가하였다. 이 물질은 Pyruvate metabolism에 의해 Acetate로

변환되어지며, 본 실험의 결과에서 이 물질을 소비하는 *Megasphaera spp.* (Otu0022)와 *Bacteroides fragilis* (Otu0011) 미생물들이 Acetate가 유의적으로 증가하지 않은 피험자 S7 혹은 S4에서는 감소하였다. 또한 그림 24 Picrust 결과에서도 Acetate가 유의적으로 증가한 대부분의 피험자에서 Pyruvate metabolism이 증가하였으며(S3제외), Acetate가 증가하지 않은 피험자들은 유의적인 차이가 없었거나 감소하였다. 이 결과를 바탕으로 청국장을 통해 Invitro-FF진행시 피험자들에 따라 L-Lactate를 소비하는 미생물들에 의해 Pyruvate metabolism이 증가 혹은 감소하여 Acetate가 증가 혹은 감소하는 것으로 사료된다.

- 또한 장내미생물들에 의해 생성된 L-Lactate는 Pyruvate metabolism과정을 통해 Succinate가 전환되어지며, 이 물질이 다시 Propanoate (Propionate) metabolism에 의해 Propanoyl-CoA로 전환되어지고 결과적으로 Propionate로 전환된다. 그런데 Propanoyl-CoA에서 Propionate로 전환에는 c5-branched dibasic acid metabolism이 관여되어있다. 즉 전환된 Propanoyl-CoA 물질이 c5-branched dibasic acid metabolism을 통해 Propionate 이외의 물질로 전환되어질 수 있다.

- 표3에서 Propanoate를 생성하는 장내미생물이 오직 피험자 S1, S2, S6에서만 증가 하였지만, 결과적으로 S1과 S2피험자만이 Propanoate가 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 위의 설명한 바와 같이 장내미생물에 의해 생성된 L-Lactate가 Pyruvate metabolism 과정을 통해 Succinate 물질이 생성되어 피험자 S1, S2, S5 및 S8에게서 Pyruvate metabolism이 증가한 것으로 사료된다. 또한 이 피험자들 중 S1과 S2는 c5-branched dibasic acid metabolism과정이 감소하여 결과적으로 Propanoyl-CoA물질을 Propionate로 전환하는 Propanoate (Propionate) metabolism에 의해 피험자 2명에게서만 Propionate가 청국장에 의해 유의적으로 증가한 것으로 사료되며, 이는 그림 21에서의 결과에서도 확인할 수 있었다.

- 본 실험 결과에서 Butyrate와 청국장에 의해 증가 혹은 감소한 장내미생물과의 상관관계는 찾지 못하였지만 그 외의 Acetate와 Propanoate 물질은 Picrust결과와 연결지어 생성경로를 예측하였으며, 각각의 피험자에 따라 청국장에 의해 생성되는 SCFAs (Acetate, Propanoate, Butyrate)양 및 증가 혹은 감소하는 장내미생물들이 다양하다는 것을 확인할 수 있었다.

표 9 . OTUs 수준 피험자별 In vitro Fermentation 진행 시 청국장에 의해 변화한 장내미생물

OTUs	SCFAs	Cluster I			Cluster II_a		Cluster II_b		
		S4	S5	S8	S6	S7	S1	S2	S3
<b>Actinobacteria phylum</b>									
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (Otu0001)	A	I	I	I	I		I	I	I
<i>Collinsella aerofaciens</i> (Otu0034)							I	I	
<b>Bacteroidetes phylum</b>									
<i>Alistipes putredinis</i> (Otu0033)	A,B,P						I		-
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu0004)				D	D	D	I		
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu0010)			D		-				
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu0017)					D			D	
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu0024)			D		D			D	
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu0038)		D							
<i>Bacteroides caccae</i> (Otu0052)	A,B,P		D			-			
<i>Bacteroides fragilis</i> (Otu0011)	A,B,P	D				-			
<i>Bacteroides ovatus</i> (Otu0069)	A,B,P			D	-	-			
<i>Bacteroides uniformis</i> (Otu0020)	A,B,P		D	-		-	I		
<i>Parabacteroides spp.</i> (Otu0015)				D		-			
<i>Parabacteroides distasonis</i> (Otu0040)				D					
<i>Prevotella copri</i> (Otu0002)	A,P			-	D		D	D	D
<b>Firmicutes phylum</b>									
o__Clostridiales (Otu0032)		+	I						
f__Lachnospiraceae (Otu0026)			D		I				
f__Lachnospiraceae (Otu0037)					I				
f__Ruminococcaceae (Otu0009)			+		I	+	I		
<i>Anaerostipes spp.</i> (Otu0071)									D
<i>Blautia spp.</i> (Otu0003)				I	I				
<i>Blautia spp.</i> (Otu0019)					I				
<i>Clostridium perfringens</i> (Otu0089)	A,B,P				I				
<i>Clostridium ramosum</i> (Otu0067)		I	+						
<i>Coprococcus spp.</i> (Otu0008)		I	I	+	+				
<i>Coprococcus spp.</i> (Otu0012)			I		I				
<i>Dialister spp.</i> (Otu0007)					D		I		
<i>Dorea spp.</i> (Otu0041)					I	+		+	
<i>[Eubacterium] dolichum</i> (Otu0074)			I						
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Otu0005)	±A,B,P	D	D	-	D	D	D	D	D
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Otu0023)	±A,B,P				I	I	+	I	
<i>Lactobacillus spp.</i> (Otu0047)		I							
<i>Lactobacillus ruminis</i> (Otu0045)	A			+					I
<i>Megasphaera spp.</i> (Otu0022)				+		D			
<i>Phascolarctobacterium spp.</i> (Otu0063)				D					
<i>Ruminococcus spp.</i> (Otu0016)		D			I	I			
<i>Ruminococcus bromii</i> (Otu0018)	A								D
<i>[Ruminococcus] gnavus</i> (Otu0013)	A	D	I	I					
<i>[Ruminococcus] torques</i> (Otu0043)	A	-							D
<i>Streptococcus spp.</i> (Otu0014)		I				I			
<b>Fusobacteria phylum</b>									
<i>Fusobacterium spp.</i> (Otu0116)						D			
<b>Proteobacteria phylum</b>									
f__Enterobacteriaceae (Otu0048)					I		+		
<i>Sutterella spp.</i> (Otu0030)		D							
<i>Sutterella spp.</i> (Otu0088)					D				
<b>Verrucomicrobia phylum</b>									
<i>Akkermansia muciniphila</i> (Otu0021)						I			

All OTUs were selected as showing LDA > 3.0, p value in T.Test < 0.05 comparing Relative Abundance (RA) between B 2h and T 2h, and the ratio of gap of RA > 1.0 %. Among them, decreased or Increased OUT shown D or I, respectively. - and + means decreased or increased OTU which showing more than 0.5 % of the ratio of RA gap. Blank means not detected OTU.

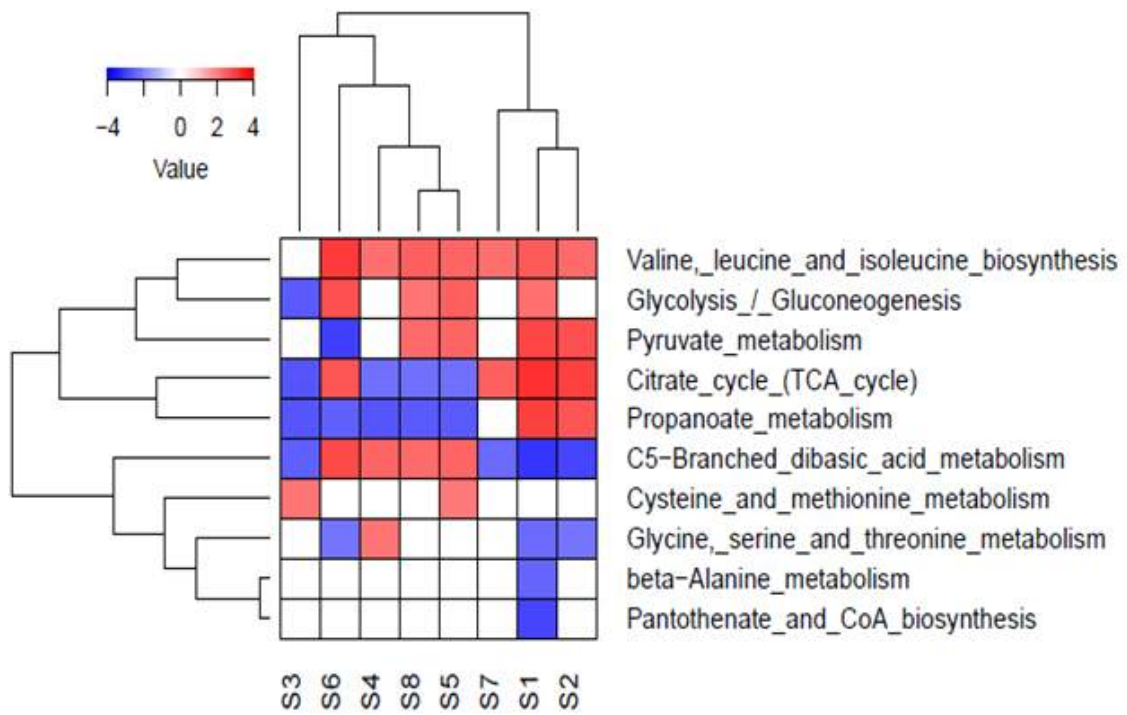


그림 24. LefSe analysis including the differentially abundant in metabolism of PICRUSt after fecal fermentation with CGJ.

Predicted KEGG functional pathway difference between blank (blue) and treatment (red) groups at 2 hours of fecal fermentation. White means not significantly different pathway between them. CGJ-cheonggukjang; LefSe-Linear discriminant analysis effect size; PICRUSt-Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States

○ Invitro GID-FF 진행시 Total volume에 따른 장내미생물 차이 조사

- Invitro GID-FF 진행시 Total volume에 따른 장내미생물 차이 조사는 피험자 한명의 분변을 이용하여 실험을 진행하였으며, 총 27개의 raw datat를 이용하였고, 총 1,124,285 reads와 293개의 OTUs를 얻었다. 모든 샘플은 동일한 35,624 reads로 표준화시켜 분석을 진행하였다.

- OTUs기반 tree 결과 그림25에 나타내었다. 크게 BLK그룹과 청국장을 첨가한 그룹별로 Clustering되었으며, BLK그룹 경우 작게는 Total volume 20ml 120min과 Total volume 5ml 120min이 한 Cluster에 Clustering되었다. 청국장을 첨가한 그룹은 30min과 120min 경우 Total volume과는 상관없이 Fermentation 시간에 따라 Clustering 되었다. 60min 경우에는 크게 한 Cluster에 속해 있으나 작게는 한 Cluster에 속해 있지 않았다.

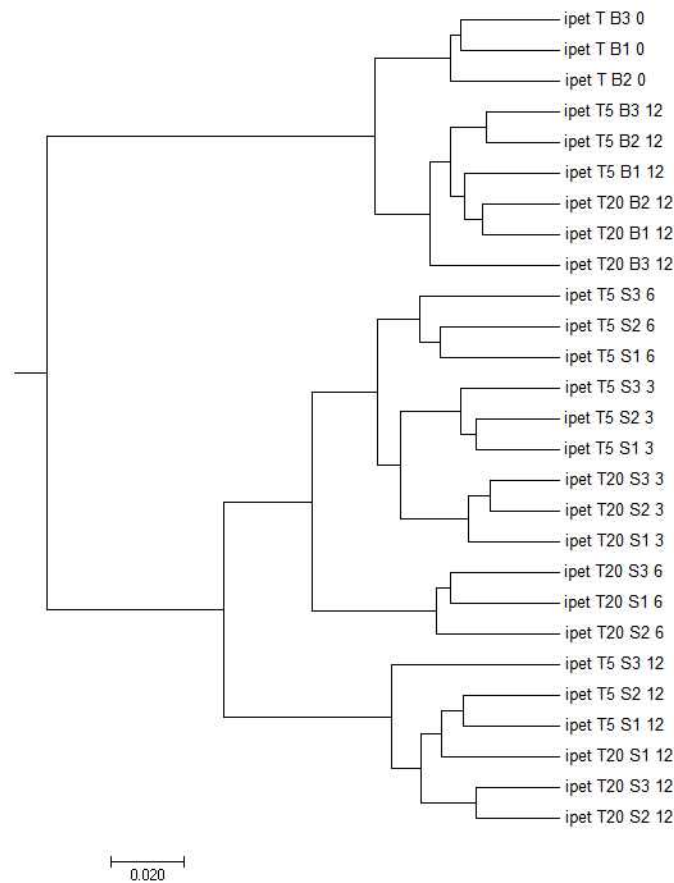


그림 25. OTUs기반 tree를 이용하여 Total volume별 장내미생물생태 비교

- 그러나 NMDS상에서 청국장을 첨가한 후 60min 뒤의 샘플에서는 Total volume과는 크게 차이가 없었으며, 0min과의 샘플과 비교를 했을 경우에도 방향성은 오른쪽 위로 유사하였다 (그림 26). 또한 Analysis of Molecular Variance (AMOVA)를 이용한 샘플별 장내미생물생태 비교분석에서 Total volume 20ml(30min)과 5ml(30min)을 비교 시  $p > 0.05$ 로 두 샘플사이의 유의적인 차이는 없었다.

- 이러한 결과를 바탕으로 본 연구진은 Invitro GID-FF 진행시 Total volume 20ml 과 5ml 사이에 미생물 군집 생태의 차이가 없는 것을 확인하였다.

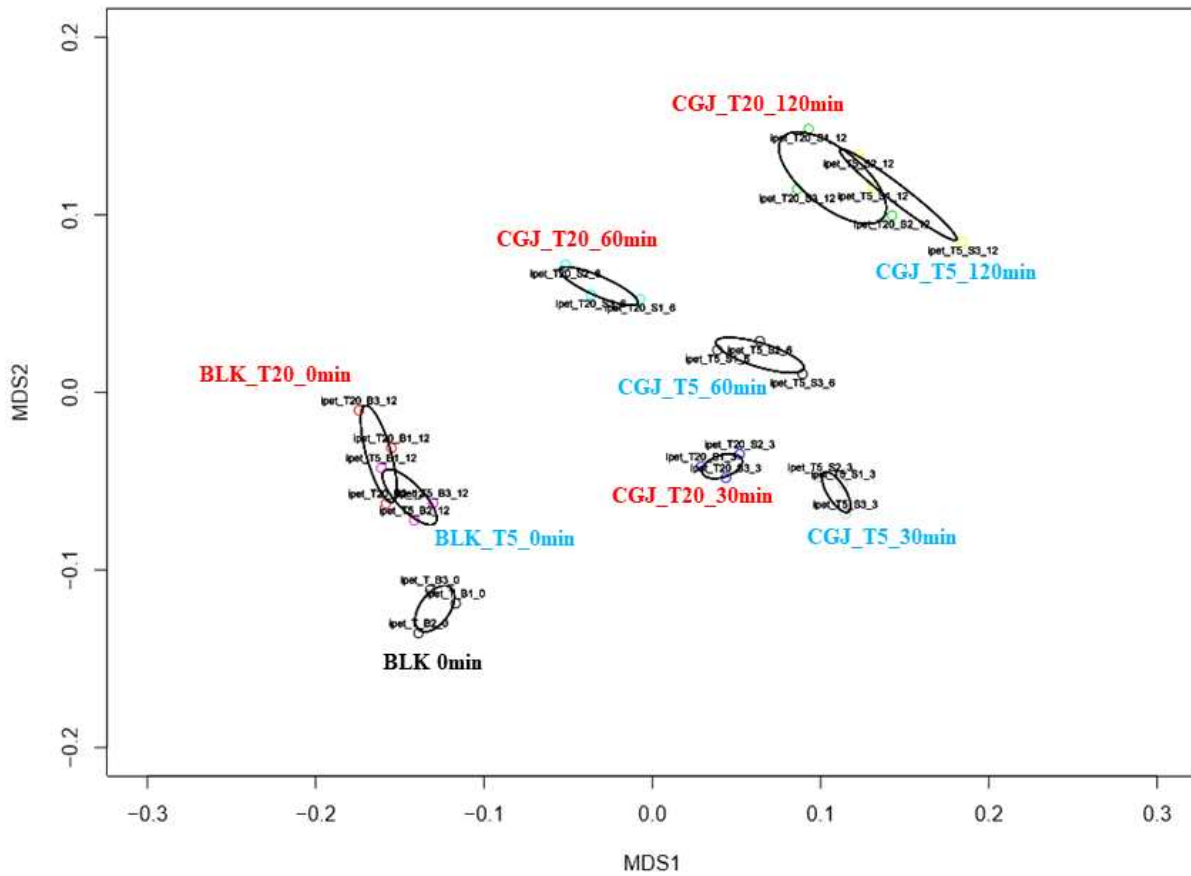


그림 26. NMDS를 통한 Total volume별 변화하는 장내미생물

NMDS was plotted based on Bray-Curtis. BLK : sample from in vitro fecal fermentation without CGJ, CGJ: sample from in vitro fecal fermentation with CGJ, T20 : Total volume 20ml, T5 : Total volume 5ml

○ 차세대 건강기능식품평가시스템을 건강기능식품(가르시니아 추출물, 청국장, 김치)에 적용 및 기능성 평가

- 건강기능식품별 Fermentation함에 따라 변화하는 SCFAs 함량 비교 분석은 주요 SCFA인 Acetate, Propionate, Butyrate를 측정하여 그림 27에 나타내었다.

- 모든 건강기능식품에서 Acetate, Propionate, Butyrate가 유의적으로 증가하였다. Acetate는 Fermentation 시간이 지남에 따라 청국장, 가르시니아, 김치 순으로 더 많은 양의 Acetate가 생성되었으며, Propionate경우 60min까지는 청국장, 김치, 가르시니아 순으로 증가하였으나 60min이후로는 가르시니아가 김치보다 더 많은 Propionate가 생성되었다. Butyrate경우에는 30min까지는 가르시니아, 김치, 청국장 순으로 더 많은 양의 Butyrate가 생성되었고 60min에는 모두 비슷한 양이 생성되었으며, 60min 이후로는 청국장, 가르시니아, 김치 순으로 더 많은 양이 생성되었다.



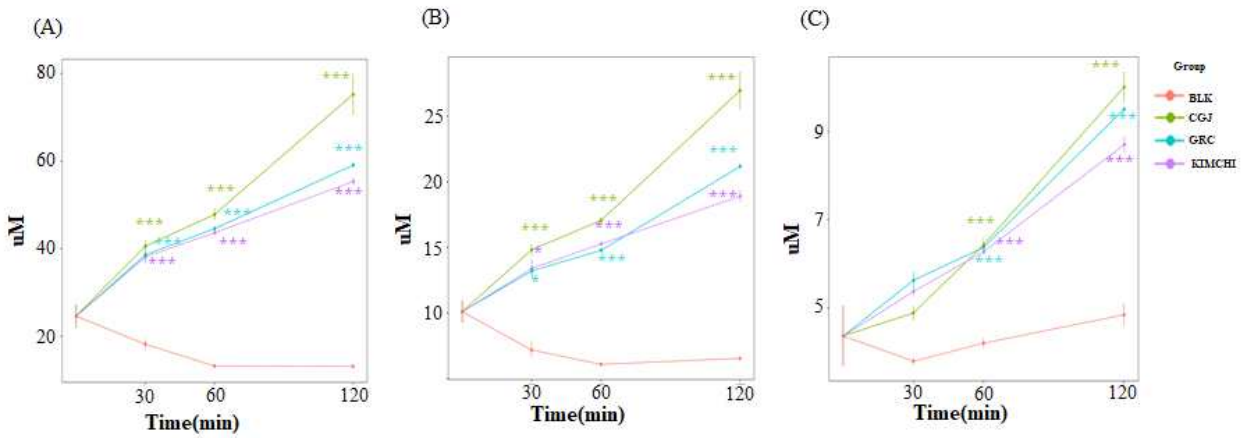


그림 27. 건강기능식품별 분변발효산물 내 SCFA 함량 변화 비교 (A) Acetate, (B) Propionate, (C) Butyrate

Mean values  $\pm$  S.D. are shown. One-way ANOVA was used to compare BLK 0min and sample (\* $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  vs BLK\_0min).

- Invitro GID-FF 진행시 건강기능식품에 따른 장내미생물 차이 조사는 피험자 한명의 분변을 이용하여 실험을 진행하였으며, 총 39개의 raw datat를 이용하였고, 총 2,198,327 reads와 466개의 OTUs를 얻었다. 모든 샘플은 동일한 26,942 reads로 표준화시켜 분석을 진행하였다.

- OTUs기반 tree 결과를 그림 28에 나타내었다. 그 결과 크게 건강기능식품을 첨가하지 않은 BLK그룹들은 하나의 Cluster에 Clustering되었으나 건강기능식품별 샘플들은 건강기능식품별 Clustering되지 않았다. 그러나 청국장 30min샘플 중 하나를 제외한 건강기능식품을 첨가 후 30min 샘플들은 하나의 Cluster에 Clustering되었으며, 그 외 건강기능을 첨가한 60min과 120min 샘플은 Fermentation 시간별로 Clustering되지 않았다.

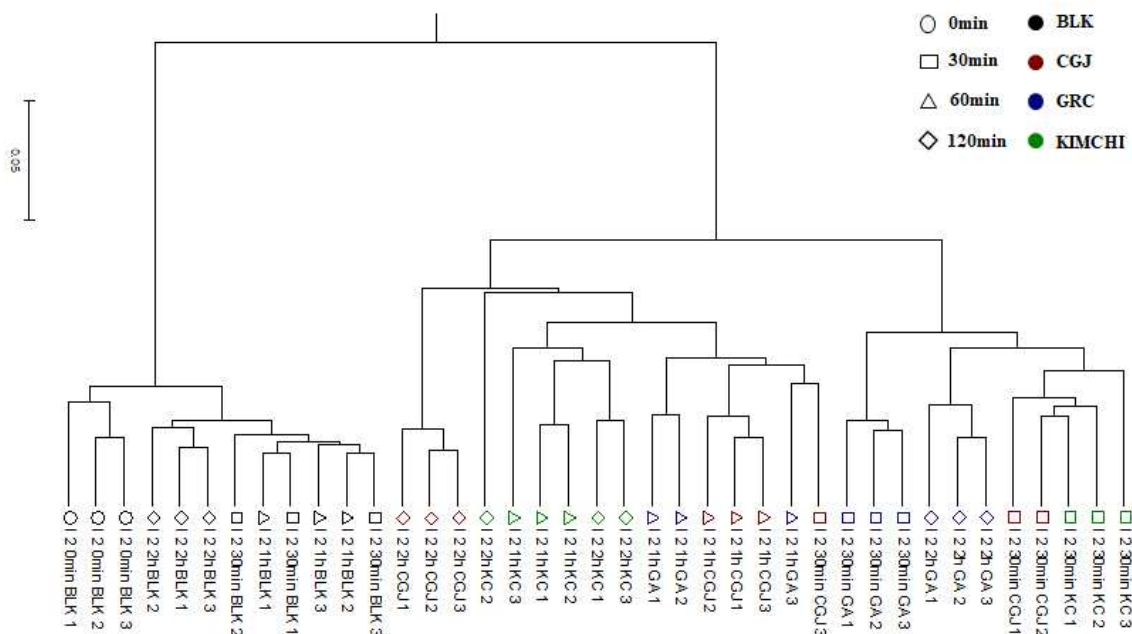


그림 28. OTUs기반 tree를 이용하여 Total volume별 장내미생물생태 비교

- NMDS상 건강기능식품별에 따른 장내미생물생태를 그림 29에 나타내었다. 그 결과 건강기능을 첨가하지 않은 BLK그룹은 시간이 지나면서 왼쪽위로 이동하는 경향을 보였다. 가르시니아와 김치경

우에는 시간이 지남에 따라 변화하는 장내미생물생태의 방향성이 유사하였으며, 건강기능식품별로 변화하는 장내미생물생태가 다르다는 것을 확인 할 수 있었다.

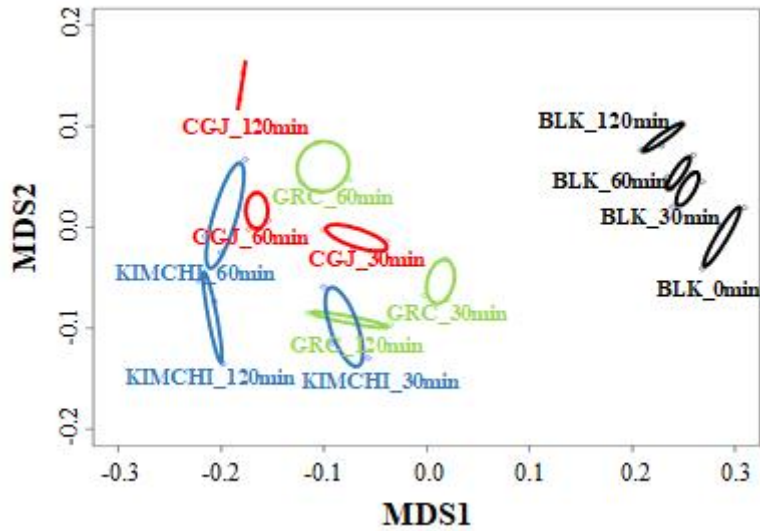


그림 29. NMDS를 통한 건강기능식품별 변화하는 장내미생물

Fecal samples for *in vitro* fermentation were obtained from one volunteer's feces. NMDS was plotted based on Bray-Curtis

- Phylum 수준에서 건강기능식품(청국장, 가르시니아, 김치)별 Fermentation 시간에 따른 장내 미생물차이를 그림 30에 나타내었다. 그 결과 건강기능식품을 첨가하지 않은 BLK그룹은 시간에 따른 차이가 없었지만, 건강기능식품을 첨가한 모든 샘플에서는 Firmicutes와 Actinobacteria 미생물이 증가하였다. 청국장을 첨가한 샘플은 Fermentation됨에 따라 60min까지는 Firmicutes가 증가를 하였지만 그 이후로는 감소하는 경향을 보였다. 가르시니아 혹은 김치를 첨가한 샘플은 Fermentation됨에 따라 차이는 없었다.

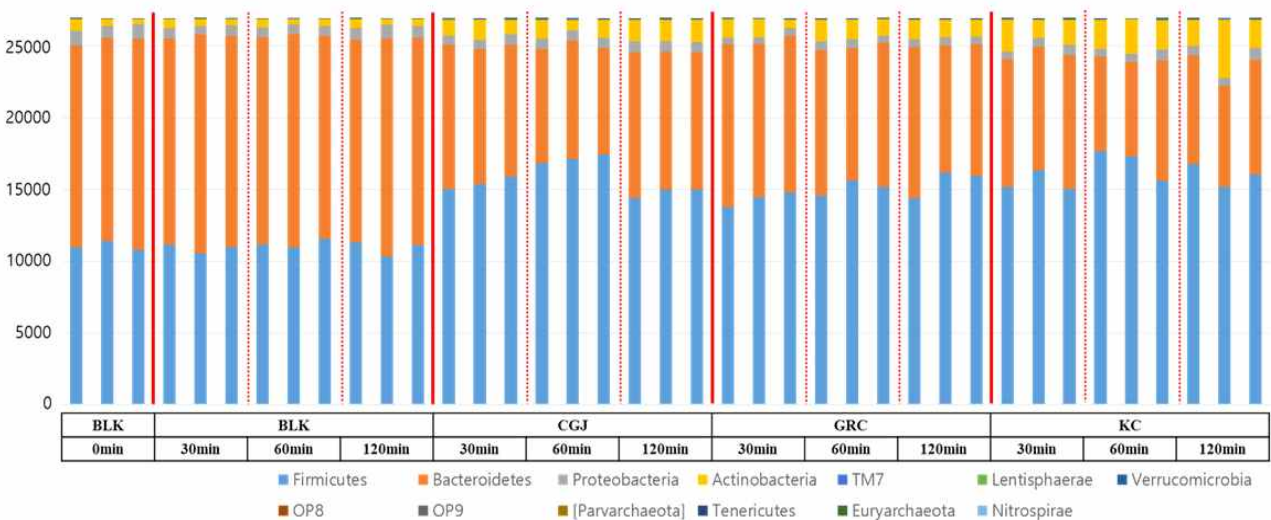


그림 30. Phylotype를 기반 phylum 수준에서 건강기능식품별 장내미생물생태 비교

- OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통해 건강기능식품별 0min과 120min을 비교 시 변화하는 장내미생물들을 그림 31에 나타내었다. 모든 그룹에서 감소 혹은 증가한 미생물은 각각 *Faecalibacterium prausnitzii* (OTU0013)과 *Bacteroides spp.*

(OTU0004)이였으며, *Prevotella copri* (OTU0001), *Prevotella stercorea* (OTU0014) 및 *Sutterella spp.* (OTU0029)는 모든 건강기능식품에서 감소하였으나 건강기능식품을 첨가하지 않은 BLK에서는 감소하지 않았다. 이와는 반대로 family Ruminococcaceae (OTU0003), *Bifidobacterium adolescentis* (OTU0005) 및 *Dialister spp.* (OTU0002)가 모든 건강기능식품에서 증가하였으며 건강기능식품을 첨가하지 않은 BLK에서는 증가하지 않았다.

- Fermentation 120min 이후 청국장에서는 *Oscillospira spp.* (OTU0008), 김치에서는 *Alistipes putredinis* (OTU0006)이 증가하지 않았으며, family Lachnospiraceae (OTU0009)는 청국장, 김치 두 개의 건강기능식품에서 증가하지 않았다.

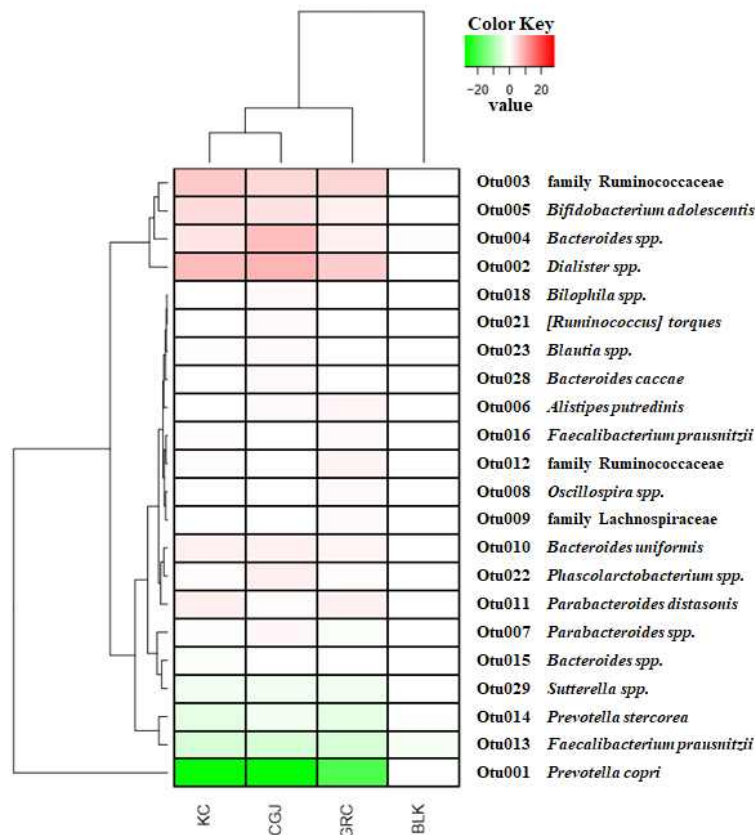


그림 31. OTU 수준 0min과 건강기능식품 및 BLK 120min 비교 시 변화하는 장내미생물

All OTUs were selected as showing LDA > 3.0, p value in T.Test < 0.05 comparing Relative Abundance (RA) between BLK 0min and Treatment (Cheonggukjang, Garsinia, Kimchi) 120min, and the ratio of gap of RA > 1.0 %.

- 30min, 60min을 포함한 OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통한 건강기능식품에 따른 시간별 유의적으로 증가 혹은 감소한 장내미생물들은 표4에 나타내었다 (LDA>3.0). 그 결과 Fermentation 후 30min까지 제일 큰 변화가 있었으며, 30min에서 60min 사이에서 제일 적은 변화가 있었다.

- 건강기능식품첨가시 *Prevotella copri* (OTU0001)가 60min까지는 감소하였으나 그 이후에는 청국장만이 계속 감소하였으며, Proteobacteria에 문의 *Sutterella spp.* (OTU0029), *Bilophila spp.* (OTU0018), Firmicutes 문의 *Faecalibacterium prausnitzii* (OTU0013, OTU0016) 및 Bacteroidetes 문의 *Alistipes putredinis* (OTU0006), *Parabacteroides distasonis* (OTU0011) 미생물들이 Fermentation 후 30min 까지만 증가 혹은 감소하였다.

- 30min과 60min을 비교했을 경우에는 청국장을 첨가한 샘플에서만 family Ruminococcaceae (OTU0003) 미생물이 증가하였으며, *Bacteroides uniformis* (OTU0010), *Bacteroides caccae* (OTU0028) 미생물들은 가르시니아를 첨가한 샘플에서만 증가하였다. 또한 김치만을 첨가한 샘플에서만 *Bacteroides spp.* (OTU0004) 미생물이 감소하였으며, *Dialister spp.* (Otu002), family Ruminococcaceae (OTU0012) 미생물이 증가하였다. 60min과 120min을 비교했을 경우에는 청국장을 첨가한 샘플에서만 *Bifidobacterium adolescentis* (OTU0005), *Prevotella stercorea* (OTU0014) 및 *Phascolarctobacterium spp.* (OTU0022) 미생물들이 감소하였으며, family Ruminococcaceae (OTU0003), *Oscillospira spp.* (OTU0008) 및 order Clostridiales (OTU0019) 미생물들이 감소하였다. 또한 김치를 첨가한 샘플에서만 *Bacteroides uniformis* (OTU0010)이 증가하였으며, *Bacteroides spp.* (OTU0015)는 감소하였다.

표 10 . OTU 수준 건강기능식품별 In vitro Fermentation 진행 시 변화하는 장내미생물

OTUs	0min vs 30min			30min vs 60min			60min vs 120min		
	(%)			(%)			(%)		
	CGJ	GRC	KC	CGJ	GRC	KC	CGJ	GRC	KC
<b>Actinobacteria</b>									
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (Otu005)	+1.5		+2.8				+1.7		
<b>Bacteroidetes</b>									
<i>Prevotella copri</i> (Otu001)	-21.5	-15	-20.9	-5	-9.7	-6.6	-1.2	+5.3	
<i>Prevotella stercorea</i> (Otu014)	-2.9	-3.1	-3.5				+1		
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu004)	+3.6	+4.1	+2.8			-1.9	+4.8		+2.7
<i>Alistipes putredinis</i> (Otu006)	+2.1	+1.9	+2.2						
<i>Bacteroides uniformis</i> (Otu010)	+1.6	+1.1	+1.6		+1.3				+1
<i>Bacteroides spp.</i> (Otu015)		-1.3	-1.6		+1.6	+1.4			-1
<i>Parabacteroides distasonis</i> (Otu011)		+1	+1.6						
<i>Bacteroides caccae</i> (Otu028)					+1.2				
<i>Parabacteroides spp.</i> (Otu007)							+1.4	-2.2	
<b>Firmicutes</b>									
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Otu013)	-4.6	-4.5	-4.7						
<i>Dialister spp.</i> (Otu002)	+5.8	+4.3	+5.6			+1.3			
family Ruminococcaceae (Otu003)	+5.4	+2.8	+5.1	+2			-2.7		
<i>Oscillospira spp.</i> (Otu008)	+1.9	+2.2	+1.7				-1.7		
family Ruminococcaceae (Otu012)	+1.2	+1.6	+1.1			+1	-1.4		-1.2
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (Otu016)	+1.1		+1.6						
order Clostridiales (Otu019)							-1		
<i>Phascolarctobacterium spp.</i> (Otu022)							+1.8		
<b>Proteobacteria</b>									
<i>Sutterella spp.</i> (Otu029)	-2.1	-2.1	-2.1						
<i>Bilophila spp.</i> (Otu018)	+1.1		+1.1						

Fecal samples for *in vitro* fermentation were obtained from one volunteer's feces. All OTUs were selected as showing LDA > 3.0, p value in T.Test < 0.05 comparing Relative Abundance (RA), and the ratio of gap of RA > 1.0 %. - and + means decreased or increased OTU. Blank means not detected OTU.

- 건강기능식품별 Functional gene 조사는 MGI-Seq을 이용하여 수행하였다. Assembly 후 각 샘플별로 BLK (0min) : 196,688, BLK (120min) : 197,374, CGJ (120min) : 164,846, Garcinia (120min) : 221,616 및 Kimchi (120min) : 236,160의 Contigs를 얻었으며, 김치, 가르시니아, BLK 순으로 증가하는 패턴을 보였으며 반대로 청국장을 처리한 샘플에서는 contig수가 감소함을 확인하였다. 유전체 assembly의 품질을 설명할 수 있는 N50 또한 김치, Garcinia, blk\_120 순으로 증가하였고 반대로 청국장을 처리한 샘플에서의 N50이 가장 낮게 나타남을 확인하였다 (표 5).

**표 11 . 각 샘플별 assembly 후 contig수와 N50**

Sample	Contigs	N50 (bp)
BLK (0min)	196,688	4483
BLK (120min)	197,374	4503
CGJ (120min)	164,846	4158
GA (120min)	221,616	4844
KC (120min)	236,160	5441

- Annotation 결과로 출력된 Metabolism pathway 중 SCFA의 연관된 butanoate metabolism, propanoate metabolism, pyruvate metabolism 이 3가지 pathway에 관여하는 효소를 생성하는 유전자들을 조사하여 표 6에 나타내었다.

- Butanoate metabolism에 관여하는 효소들은 각 샘플별로 BLK (0min)에서 56개, BLK (120min)에서 55개, CGJ (120min)에서 56개, Garcinia (120min)에서 59개, Kimchi (120min)에서 58개가 존재함을 확인하였다.

- Propanoate metabolism관여하는 효소들은 각 샘플별로 BLK (0min)에서 57개, BLK (120min)에서 58개, CGJ (120min)에서 56개, Garcinia (120min)에서 62개, Kimchi (120min)에서 59개가 존재함을 확인하였다.

- pyruvate metabolism 관여하는 효소들은 각 샘플별로 BLK (0min)에서 74개, BLK (120min)에서 71개, CGJ (120min)에서 73개, Garcinia (120min)에서 75개, Kimchi (120min)에서 76개가 존재함을 확인하였다.

표 12 . 3가지 metabolism pathway에 관여하는 샘플별 gene 수

Metabolism	BLK (0min)	BLK (120min)	CGJ (120min)	GA (120min)	KC (120min)
Butanoate	56	55	56	59	58
Propanoate	57	58	56	62	59
pyruvate	74	71	73	75	76

- 각 샘플에서 Butanoate metabolism에 관여하는 효소에 대한 abundance패턴의 어떠한 차이가 있는지 그림 32에 나타내었다. 전체적인 패턴은 blank 샘플끼리, Garcinia와 김치를 처리한 샘플끼리 cluster를 형성하였고, 청국장을 처리한 샘플이 나머지 그룹과 분리되어 cluster가 형성되었다. blank를 기준으로 가르시니아 와 김치를 처리한 샘플에서 유전자가 대부분 증가함을 확인하였다.

- 해당 pathway에서 차이를 보였던 gene은 모두 총 6개 (K00656: formate C-acetyltransferase, K01652: acetolactate synthase I/II/III large subunit, K20509: carboxybiotin decarboxylase, K03737: pyruvate-ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase, K01653: acetolactate synthase I/III small subunit, K04072: acetaldehyde dehydrogenase/alcohol dehydrogenase)로 확인하였으며, 주로 pyruvate 를 다른 물질로 전환시키는데 관여하는 효소를 생성하는 유전자였다. K00656, K03737은 pyruvate를 acetyl-CoA로, K01652, K01653 역시 pyruvate를 (S)-2-Acetolactate로 전환시킬 때 관여하는 효소를 생성하는 gene임을 확인하였으며, K04072는 1-Butanol에서 butanoyl-CoA로 전환 시 관여하는 효소들을 생성할 수 있는 gene으로 확인하였다.

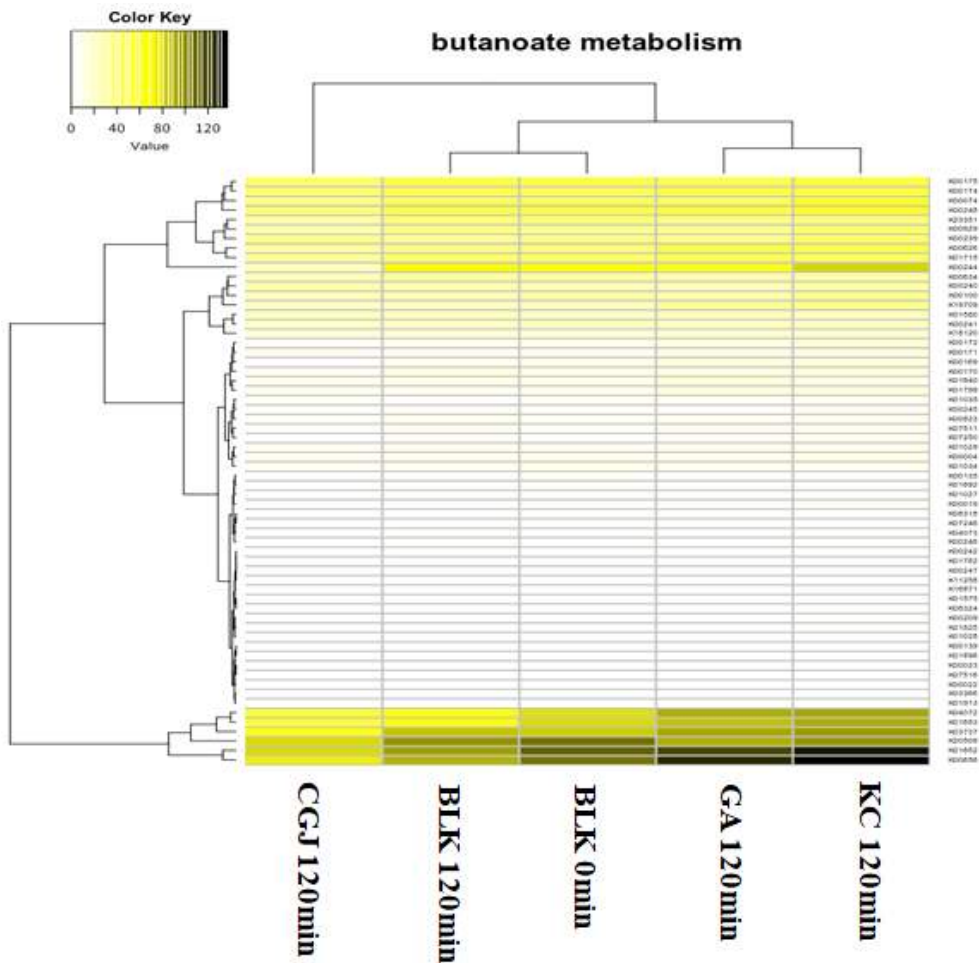


그림 32. 각 샘플별 Butanoate metabolism pathway에 대한 gene의 abundance

- 각 샘플에서 Propanoate metabolism에 관여하는 효소에 대한 abundance패턴의 어떠한 차이가 있는지 그림 33에 나타내었다. 청국장을 2시간동안 처리한 샘플에서 유전자가 감소하는 패턴을 보였다. blk샘플끼리의 클러스터 형성과 garcinia, 김치를 처리한 샘플의 클러스터가 형성되었고, 청국장을 처리한 샘플에서 해당 metabolism에 관여하는 효소를 생성하는 gene이 대부분 감소하였다. Propanoyl-CoA와 2-Oxobutanoate의 전환시에 관여하는 효소를 생성할 수 있는 K00656 (formate C-acetyltransferase)과 Propanoyl phosphate 와 Propanoate 사이의 반응에 관여하는 acetate kinase를 생성할 수 있는 K00925이 garcinia 및 김치를 2시간동안 처리한 샘플에서 증가함을 확인하였다. 또한 감소한 K01734 는 Glycerone-P 와 Methyglyoxal 사이 반응에서 관여하는 methylglyoxal synthase를 생성할 수 있는 gene임을 확인하였다.

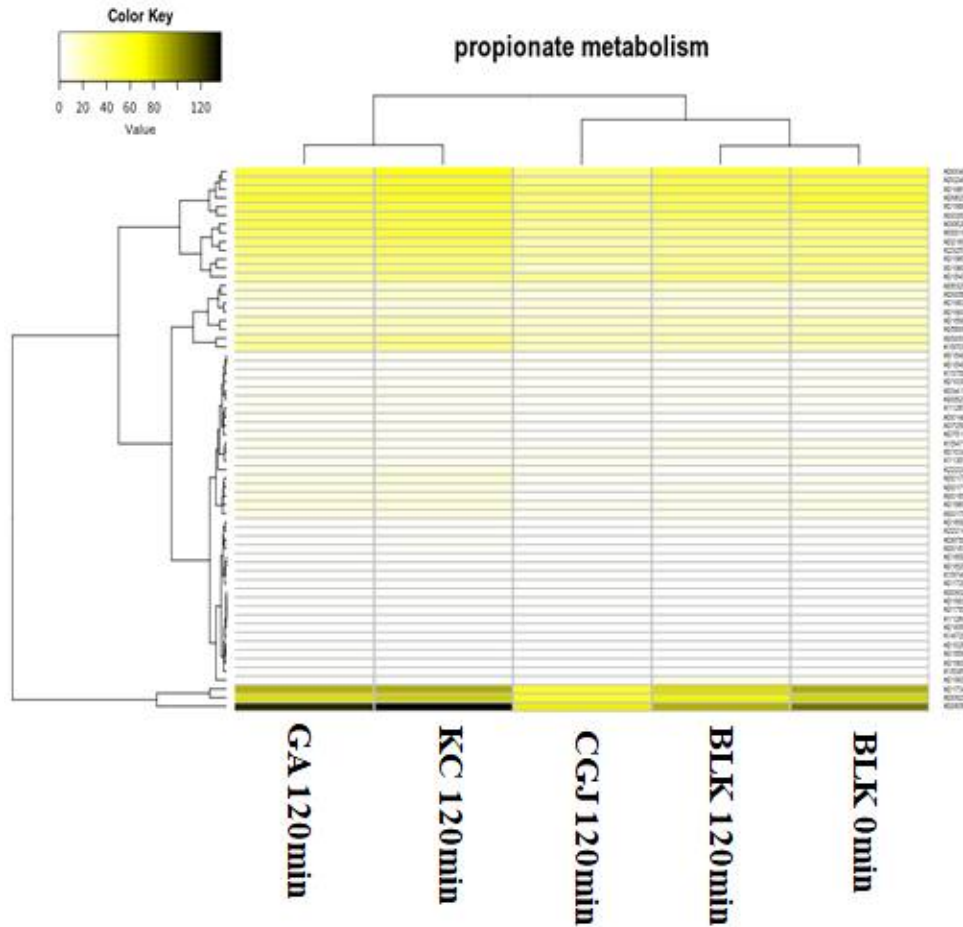


그림 33. 각 샘플별 Propionate metabolism pathway에 대한 gene의 abundance

- 각 샘플에서 Pyruvate metabolism에 관여하는 효소에 대한 abundance패턴의 어떠한 차이가 있는지 그림 34에 나타내었다. Butanoate metabolism 및 Propanoate metabolism과 마찬가지로 Pyruvate metabolism pathway 또한 blk샘플 (0min, 120min)끼리, 김치와 Garcinia 샘플이 각 클러스터를 형성하는 패턴을 보였다. 청국장을 처리한 샘플은 3가지의 metabolism pathway에서 모두 blk와 비교하여 가장 많이 감소하는 것으로 나타났다. Garcinia 및 김치를 120분 처리한 샘플에서 증가한 K00656, K03737, K00873, K01960가 pyruvate와 연관된 gene이었으며 formate 및 acetyl-CoA사이에서의 반응에 관여하는 효소를 생성하거나 phosphoenol-pyruvate로부터 pyruvate로 전환과정에서 관여하는 효소를 생성하는 gene으로 나타났다.



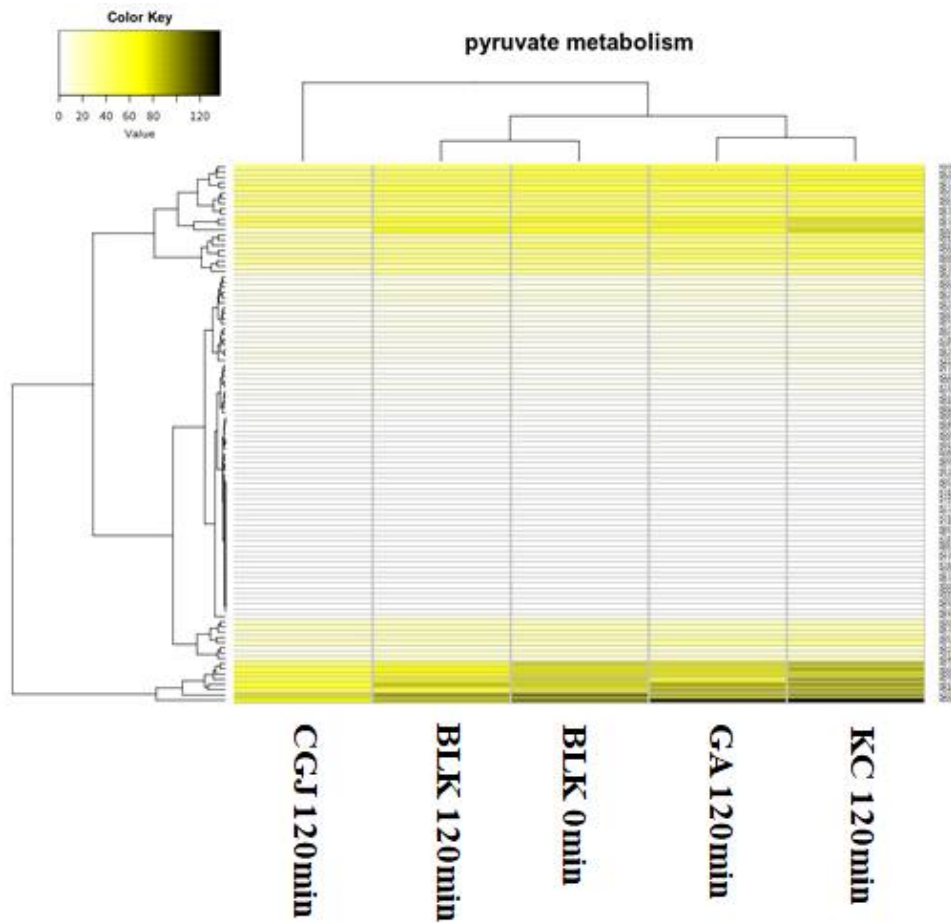


그림 34. 각 샘플별 Pyruvate metabolism pathway에 대한 gene의 abundance

○ 분변발효산물 내 DNA, RNA로부터 Shotgun Sequencing을 이용한 Cross-omics 분석 pipeline 구축.

- 본 실험에서 RNA seq을 통한 분석은 총 3번을 시도한 결과 eukaryote와 prokaryote의 rRNA를 모두 제거하는 데에 기술적인 문제가 있어 실패하였으며 수행하지 못하였다. 그래서 본 연구진은 DNA, RAN Shotgun Sequencing을 이용한 Cross-omics pipeline 구축을 MiSeq으로 부터 얻은 유전체데이터를 PICRUST2를 이용하여 Metabolic pathway를 예측 가능한 파일로부터 LEfSe 및 Metabolic pathway간 상관관계를 Heatmap으로 시각화하여 주는 프로그램을 개발하였다.

- 프로그램 특징 및 주요기능 :

MOTHUR는 유전체데이터 분석결과를 텍스트형태의 파일로 제공해주기 때문에 비생물정보 학자가 이용하여 시각화하기에는 어려움이 있다. 따라서, 본 프로그램은 MOTHUR와 PICRUST2로 부터 얻은 장내미생물과 Metabolic pathway 결과를 이용하여 시각화 해주는 파이프라인으로 구축 되었다.

MOTHUR는 LEfSe 알고리즘을 기반으로 유의적인 차이를 나타내는 Operational taxonomic units (OTUs)를 선별하여 주며 (\*.lefse\_summary), 또한 fasta 파일을 shared 파일형 태로 변경하고 “make.biome” 서버루틴을 이용하여 Metabolic pathway를 예측 할 수 있는 biom 파일을 제공해준다 (\*.biom). biom 파일은 PICRUST2를 이용하여 “path\_abun\_unstrat\_descrip.tsv”라는 각 샘플에 대한 Metabolic pathway 결과 정보가 담겨있

는 파일을 얻을 수 있다. Metabolic pathway 결과 파일인 tsv 파일을 metadata로 사용하여 MOTHUR에서 "otu.association" 서브루틴으로 장내미생물과 Metabolic pathway 간 상관관계를 분석한 결과를 제공하여준다. 위에서 설명한 결과 파일들은 본 프로그램에서 필요하며, 그 파일들을 정리하면 다음과 같다.

1. MOTHUR (lefse 명령어)> \*.lefse\_summary (유의적인 차이를 나타내는 미생물 정보)
2. MOTHUR (make.biom 명령어)> \*.biom> PICUSt2> path\_abun\_unstrat\_descrip.tsv (Metabolic pathway 결과)
3. MOTHUR (otu.association 명령어)> \*.corr (장내미생물과 Metabolic pathway 간 상관관계 결과)
4. 추가적으로 필요한 파일: 샘플 그룹정보를 포함하고 있는 텍스트 파일 및 OTUs의 Taxonomy 정보를 포함하고 있는 \*.cons.taxonomy 파일

위 파일을 이용하면, 본 연구팀에서 개발한 파이프라인을 통해 Metabolic pathway 결과파일인 'path\_abun\_unstrat\_descrip.tsv'에서 ALDEx2 알고리즘으로 유의적인 차이를 나타내는 Metabolic pathway를 선별하여 주며, 이 결과와 lefse\_summary 파일을 이용해 장내미생물과 Metabolic pathway 간 상관관계를 분석한 결과를 포함하고 있는 corr 파일에서 유의적인 차이를 나타내는 OTUs와 Metaboilic pathway간 상관관계만 선별하여 나타내준다. 그 결과는 유의적인 차이를 나타내는 OTUs와 Metaboilic pathway간 상관계수를 포함하고 있는데, 이 정보를 이용하여 양의 상관관계는 빨간색, 음의 상관관계는 검은색으로 확인 할 수 있는 heatmap으로 시각화하여 준다. 또한, Metabolic pathway의 자세한 정보 및 OTUs에 대한 taxonomy 정보를 각각 pathway\_decription.txt, otu\_names.txt라는 텍스트 파일로 저장하여 제공하여 준다.

- 사용방법 : MORHUR에서 얻게 되는 결과파일 (예: \*.cons.taxonomy, \*.corr, \*.lefse\_summary)과 PICRUSt2의 Infer pathway abundance를 이용하여 얻게 되는 결과파일 (예: path\_abun\_unstrat\_descrip.tsv)을 얻을 수 있다. 사용자는 샘플정보가 들어간 design.txt 을 만들고, 본 프로그램 소스 내에서 사용자가 얻은 MOTHUR 및 PICRUSt2 결과 파일명으로 변경하여 작동시킨다.

### -3차년도 연구개발과제의 수행 결과

- Omnivore 한국인과 Vegetarian 인도인의 In vitro GID-FF 소화 처리 전후의 분변 내 SCFAs 함량 변화를 <그림 35>에 나타내었다. Omnivore와 Vegetarian 그룹 전체적으로 Beef GID-FF 처리 후 Acetic acid와 Propionic acid가 증가했음을 확인하였다.

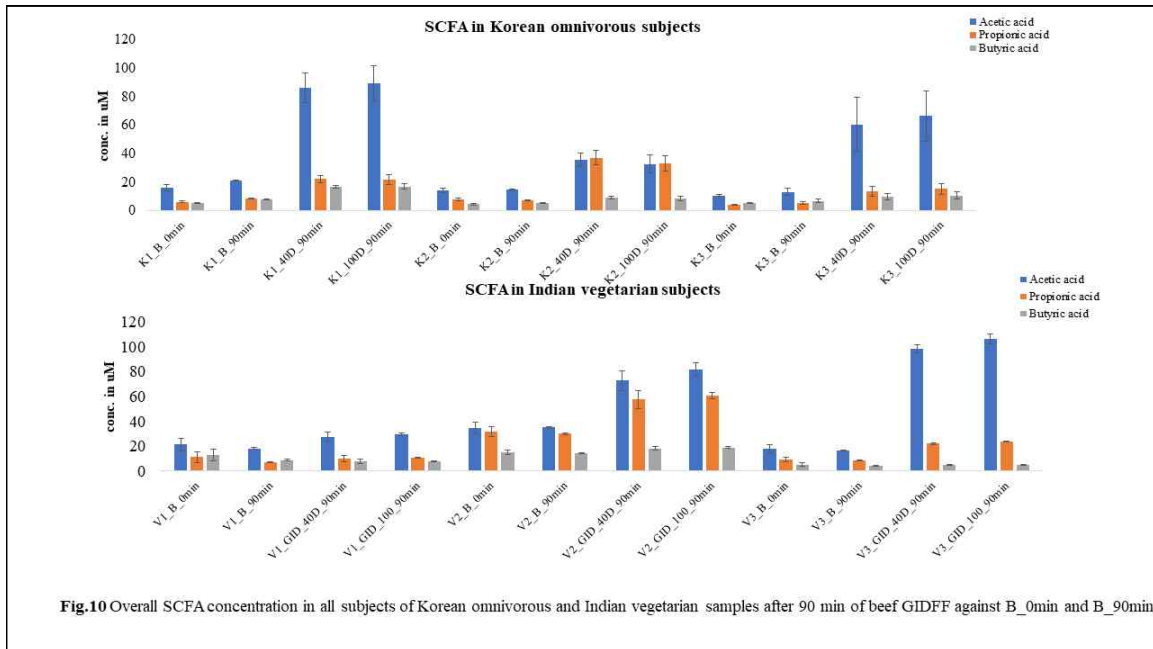


그림 35. GID-FF 처리 전후의 SCFAs(Acetate, propionate, and Butyrate) 함량 변화

-반면에 Butyrate는 Omnivore 그룹에서는 In vitro GID-FF로 Beef를 처리한 후 유의적으로 증가한 반면, Vegetarian그룹 3명중 2명에서는 증가하지 않음을 보였다. 즉, 평소 식단에 기초하는 장내 미생물에 따라 동일한 음식에 대한 미생물생태 변화 감수성이 달라질 수 있음이 확인된다. <그림 36>

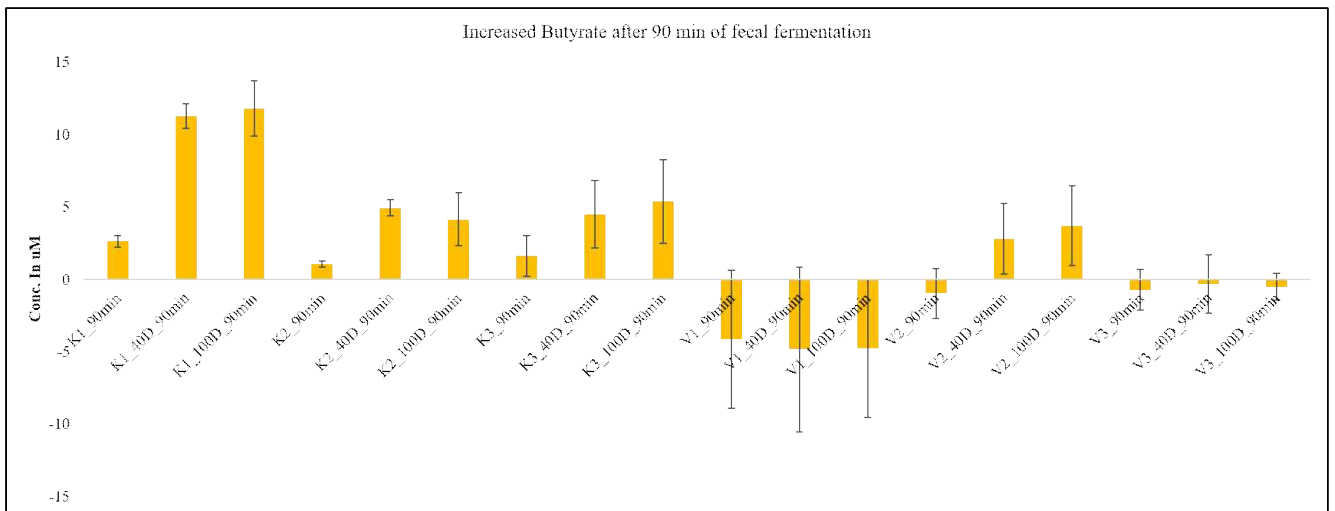


그림 36. GID-FF처리 후의 Butyrate 증가량 변화

° FF 시간대별 장내미생물생태 분석

- 시간대별 분변발효산물로부터 분변미생물의 DNA 추출은 QIAamp PowerFecal DNA Kit(QIAGEN사)를 이용하여 진행하였고, 추출된 DNA는 Qubit-iT dsDNA HS assay Kit를 이용하여 1μl에 DNA 양이 얼마나 들어있는지 DNA 농도를 확인하였으며, Illumina사의 16S Metagenomic Sequencing Library 과정에 들어가기에 앞서 DNA 농도 측정량에 따라 계산하여 각각 5 ng/μl 로 농도로 표준화시킨 샘플을 준비하였다.

- 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

\* <https://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>

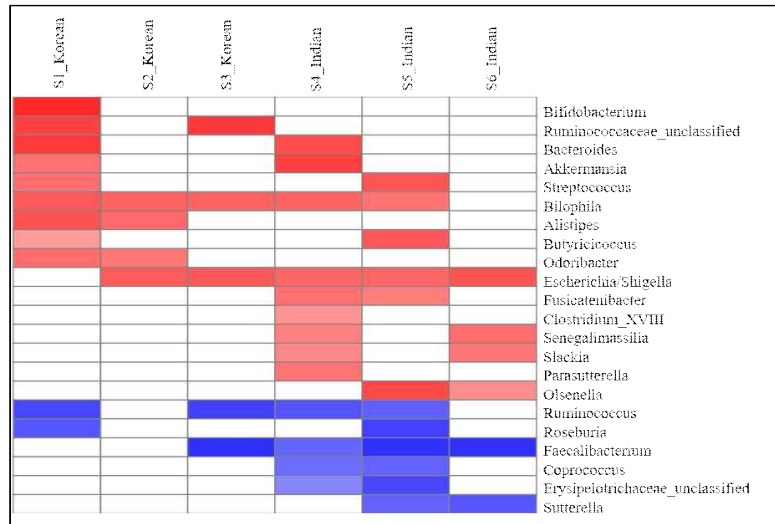


그림 37. Invitro GID-FF 효과를 확인하기 위한 피험자별 Blank 0h, 2h 미생물 생태 변화

- OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통해 피험자별 BLK 0h 과 BLK 2h을 비교 시 증가 혹은 감소한 장내미생물들을 <그림 37>에 나타내었다 (LDA>3.0). 그 결과 대부분 피험자들에게서 Fermentation 2h 후 Faecalibacterium이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 피험자 S3, S4, S5 및 S6는 Relative Abundance기준 1%이상 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로 Faecalibacterium의 감소는 In vitro상에서의 세균배양으로 인한 변화에 의해 감소한 것으로 사료된다.
- OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통해 피험자별 BLK 2h 과 Treatment (Beef) 2h을 비교 시 증가 혹은 감소한 장내미생물들 그림 38에 나타내었다.
- S1~S6까지 모든 피험자로부터 In vitro GID-FF로 Beef 처리후, 장내 유익균으로 알려진 Bifidobacterium이 증가했음을 알 수 있다. Omnivore 그룹과 Vegetarian 그룹간에 차이를 보인 genus 는 Dialister와 Olsenella을 확인 할 수있었다. Omnivore 그룹에서는 한 명도 증가 양상을 보이지 않았지만 Vegetarian 그룹에서는 3 명중 2 명이 모두 증가하는 양상을 보였다. 반대로 Barnesiella과Alistipes는 Omnivore 그룹에서만 상대적으로 감소하는 양상을 보였다.
- 이를 통해 실제로 섭취하는 음식과 더불어 기본적으로 가지고 있는 식습관과 그로 인해 지니고 있는 기초 장내미생물의 영향에 따라 같은 음식을 섭취하였다 하더라도, 각자 다른 양상의 장내미생물 생태 변화가 나타남이 확인된다.

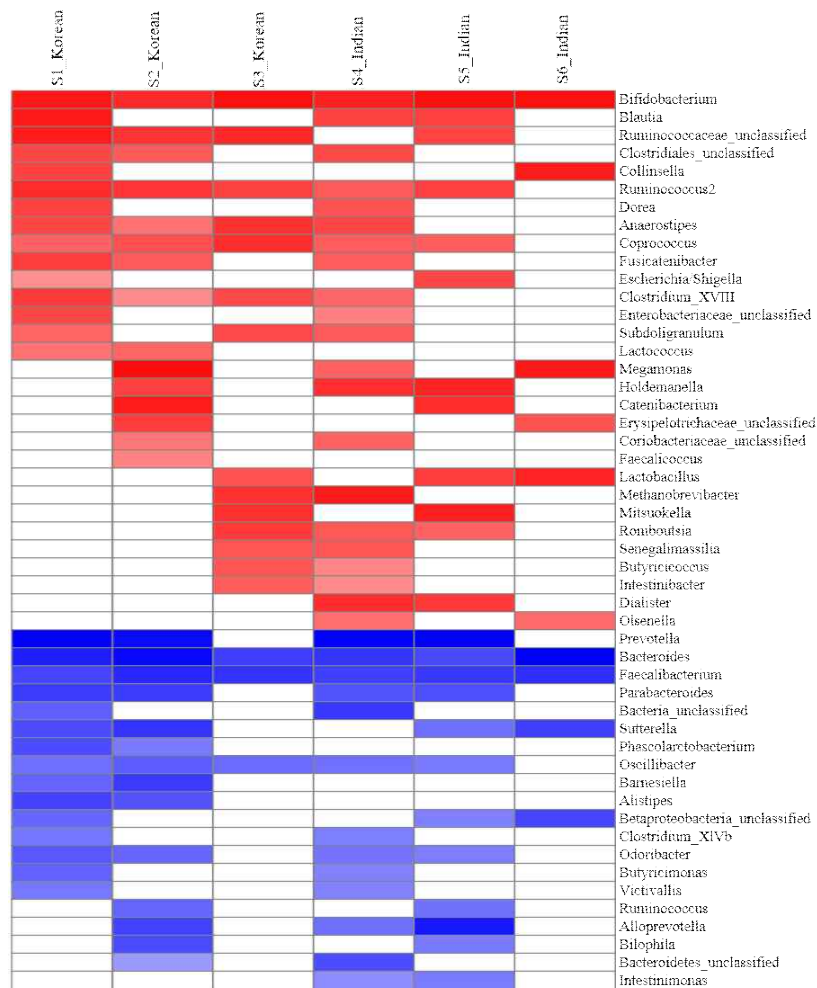


그림 38. Significantly ( $p < 0.05$ ) affected microbes in Korean omnivore and Indian vegetarian subjects at genus level, after 90-min of in-vitro beef GID-FF treatment

○ In vitro GID-FF를 이용해 다양한 식품과 장내 미생물간 상관관계분석

- 2차년도에 모집한 97명의 피험자중 20명을 선발후, 피험자들의 기초 장내미생물을 기준으로 7개의 그룹으로 분류한 후 다양한 식품과의 GID-FF 과정을 통해 기초 장내미생물과 또한 다양한 식품군 과의 장내미생물 생태와 SCFAs 생산 변화에 대한 상관관계를 조사한다.
- 같은 사람의 장내미생물 임에도 처리하는 식품군에 따라 달라지는 장내미생물 생태를 그룹간 연관 거리 분석(Non-metric multidimensional scaling, NMDS)으로 <그림39>에 나타내었다. 이를 통해 처리한 식품에 따라 달라지는 장내미생물 생태를 확인하였다.

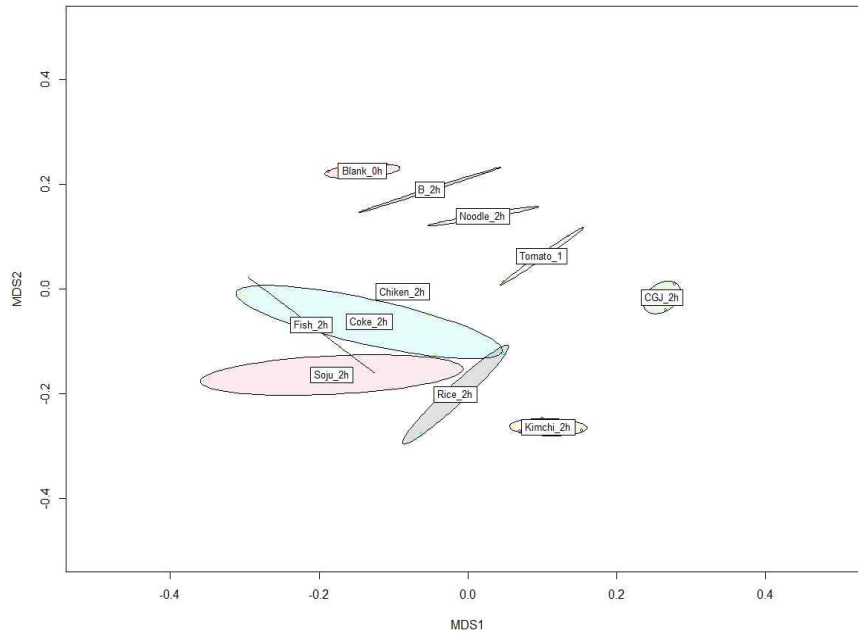


그림 39. Distribution of different treatment groups in NMDS plot.

표 13 주성분에 따른 다양한 식품군 선정

Ingredient	Food	pH
Carbohydrate	Noodle	7.7
	brown rice	6.5
	*CGJ	6.5
Protein	Fish	7
	Chicken	6
Beverage	Coke	2.5
	Soju	7.6
Fiber	Kimchi	3.5
	Tomato	4
Fat	Avocado Oil	-
	Butter	
	Beef fat	
	Fish Oil	
	Walnut Oil	
	Sesame Oil	

\*CGJ = Chunggukjang (Fermented Soybean)

- 식품은 표13에 보이는 것 처럼 탄수화물, 지방, 단백질 등의 주 영양성분을 기준으로 선정후 시료 처리전 pH를 측정하였고, 아래 표 1-2 과 같은 조성으로 GID 산물을 위한 Stock Solution을 제조하였다.

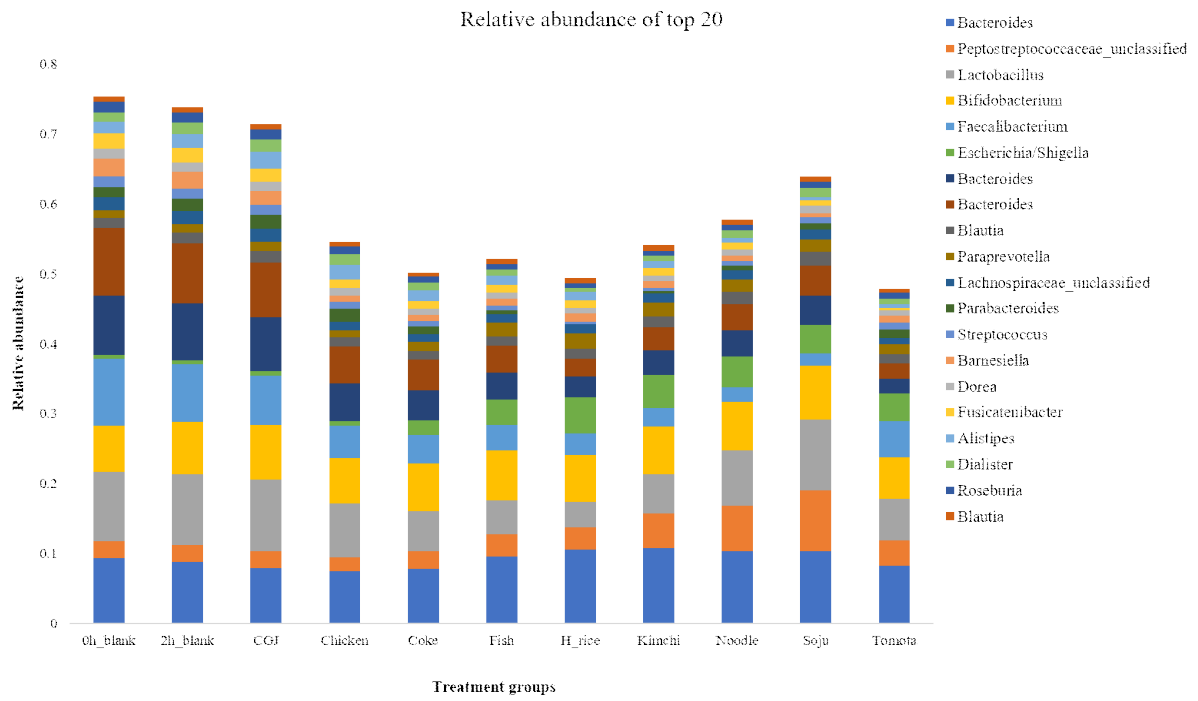


그림 40. Relative abundance Top 20 OTU after In-vitro GID-FF treatment of various food)

-식품 처리후의 장내미생물 분포를 <그림40>로 나타내었다. 같은 사람의 분변을 사용하여 다양한 식품처리를 했을 때, 장내미생물 생태가 달라짐을 확인하였다.

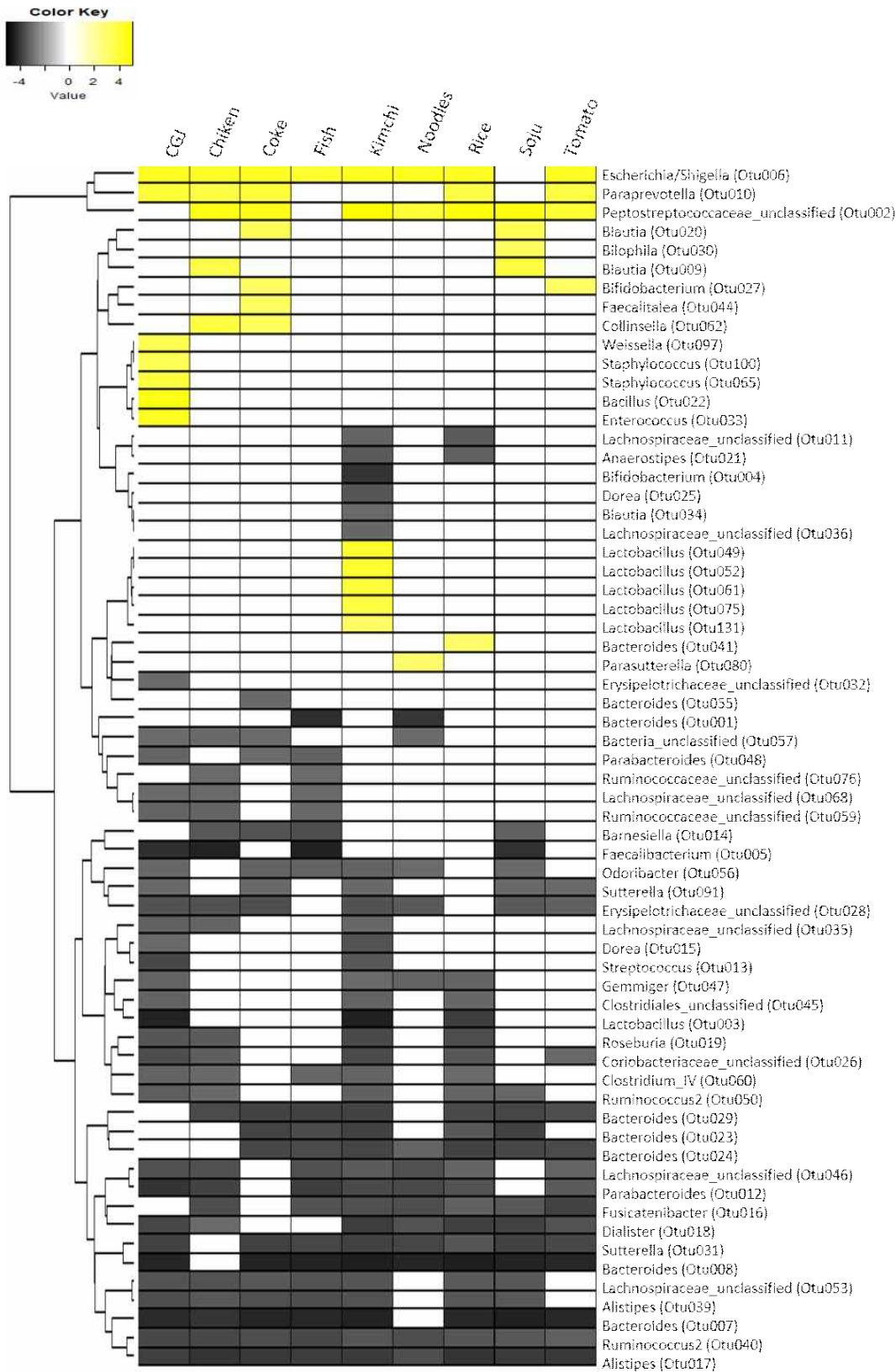


그림 41. lefse results after 2hr fecal fermentation, against B\_2h , (LDA>3)

- 다양한 식품에 대한 기능성 평가의 가능성에 대한 조사로 선발된 20명의 피험자중 1명과 9가지 다양한 식품을 이용한 In vitro GID-FF 처리 후 OTUs 수준에서 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 통해 피험자별 BLK 2h과 Treatment\_2h을 비교 시 증가 혹은 감소한 장 내미생물들 그림 41. 에 나타내었다.



-분변미생물에 청국장 GID-FF 처리후의 분변미생물에서는 Blank\_2h 샘플에 비해 청국장 발효에 쓰이는 Bacillus가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 또한 김치를 처리한 샘플에서는 발효균주와 프로바이오틱스로 알려진 Lactobacillus 가 유의적으로 증가함에 따라 Bifidobacterium도 감소하는 것을 확인하였다. Tomato를 이용한 샘플에서는 장내 유익균으로 알려진 Bifidobacterium의 증가를 확인하였다. 특히 염증성 장질환을 일으킬 수 있다고 알려진 Bilophila는 소주를 처리한 뒤 유의적으로 증가하였다.

-공동적으로 Soju-GID-FF 처리 샘플을 제외한 모든 샘플에서 Escherichia/Shigella이 유의적으로 증가하였다. 또한 Ruminococcus2와 Alistipes 가 모든 샘플 처리군에서 차이를 보였다.

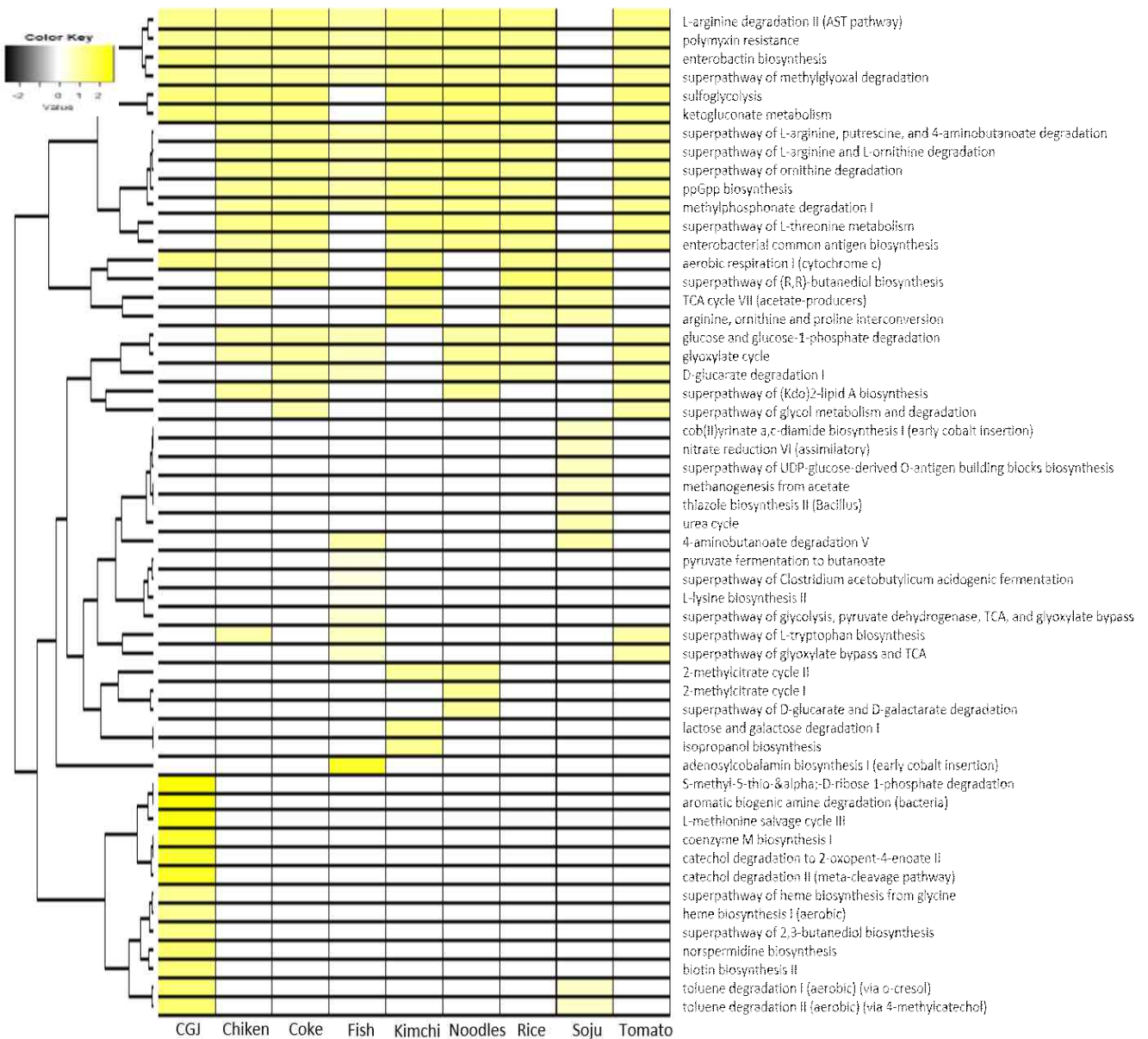


그림 42. Increased pathways including the differentially abundant in metabolism of PICRUSt, after fecal fermentation, with ALDEscore 2.

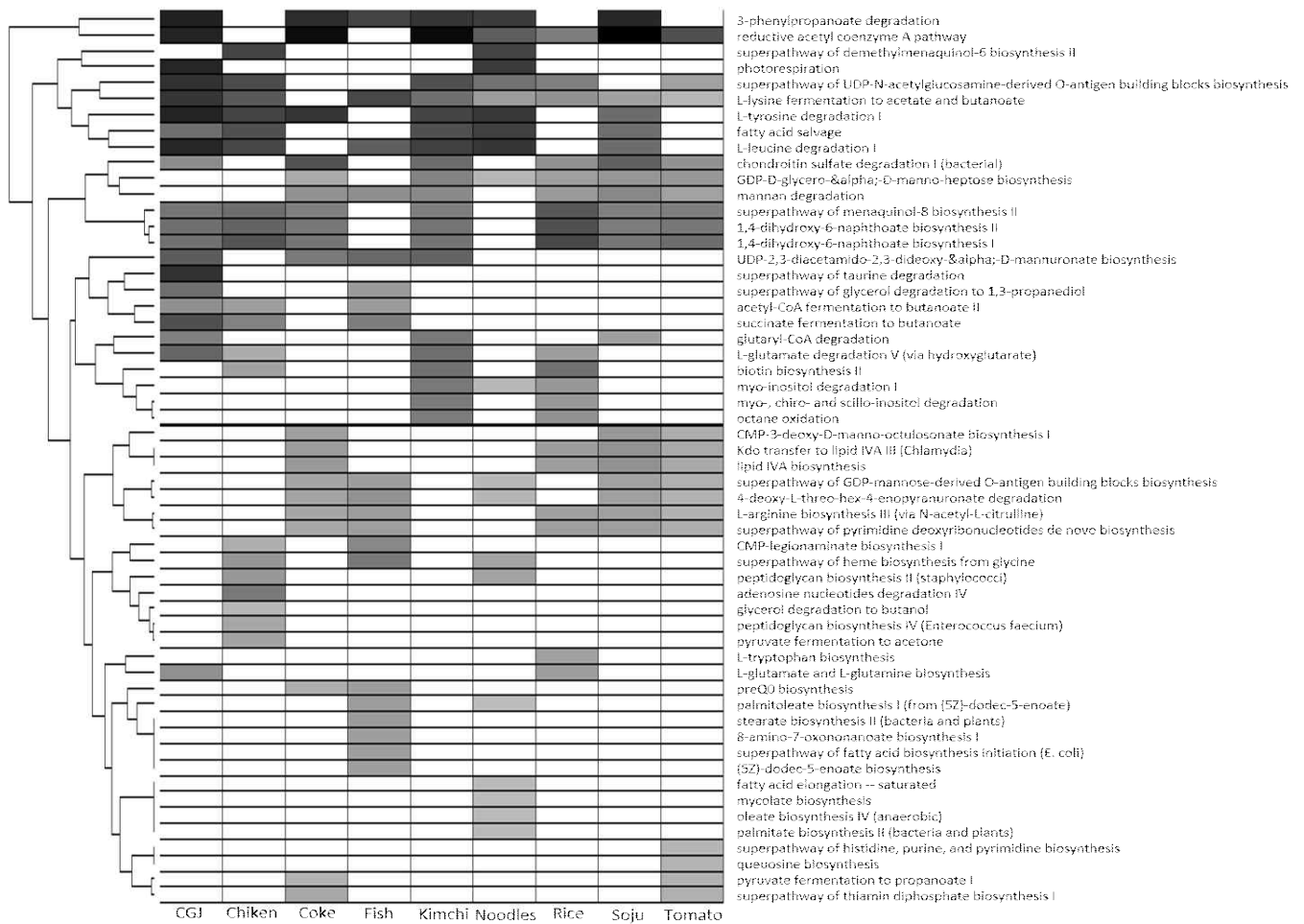


그림43 decreased pathways including the differentially abundant in metabolism of PICRUSt, after fecal fermentation, with ALDExscore 2.

- 처리한 식품군에 따라 나타낸 PICRUSt2 Metabolism pathway 분석 결과는 <그림 42>(Increased : A, Decreased : B)에 나타내었다. 처리한 식품군에 따라 달라지는 대사 경로가 CGJ-GID-FF 처리군에서 확인되었다. , 그 외 Soju-GID-FF 처리 샘플에서도 유의적인 대사물질 경로 abundance의 차이를 확인할 수 있다.
- 특히 청국장 처리 시료에서의 PICRUSt2 분석결과에서 유일하게 생체 아민을 감소시키는 (Aromatic biogenic amines degradation(Bacteria)) 대사 유전체가 유의적으로 증가했음을 볼 수 있었다.
- 유해 식품으로 잘 알려진 소주 처리 샘플의 경우 다른 식품군과의 차이가 두드러지게 보여지고, 특히 methanogenesis from acetate 대사 유전체가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있다.
- 다양한 식품군 GID-FF 처리후 시료에서 감소하는 대사 유전체들을 <그림 43>로 나타내었다. <그림 41>와 마찬가지로 식품군에 따라서 달라지는 대사 유전체의 abundance를 확인할 수 있었다. 하지만, L-lysine fermentation to acetate and butanoate biosynthesis of menaquinol-8 and 1,4 dihydroxy-6-naphthoate의 경우 대부분의 시료 전반에 걸쳐서 감소한 것을 확인 할 수 있다. 이를 통해 acetyl coenzyme A pathway 또한 함께 감소함을 확인하였다.

- 이를 바탕으로 현재 진행중인 Gas chromatograph를 통해 실제 SCFAs 함량을 조사한 뒤, 예측된 SCFAs 생산 pathway와의 상관관계를 분석함으로써, 실질적인 SCFAs 관련 장내미생물과 또 그 장내미생물 생태에 영향을 주는 식품군에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 이를 위해 Spearman correlation 분석을 <표 14 A,B> 로 나타내었다(A : Increased, B : Decreased).

**표 14A PICRUST2 analysis have shown increased metabolic activities after different treatment, with ALDExscore 2.**

Microbes	Metabolic pathways	spearman Coef	Significance (p-value)
Bacteroides(Otu041)	L-tyrosine degradation I	0.756534	0.000001
Bacteroides(Otu023)	TCA cycle V (2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase)	0.753621	0.000001
Peptostreptococcaceae_(Otu002)	CDP-diacylglycerol biosynthesis I	0.752566	0.000001
Erysipelotrichaceae_(Otu032)	adenosine nucleotides degradation IV	0.751146	0.000001
Lactobacillus(Otu003)	chorismate biosynthesis I	0.750092	0.000001
Faecalibacterium(Otu005)	peptidoglycan biosynthesis IV (Enterococcus faecium)	0.744135	0.000001
Faecalitalea(Otu044)	acetylene degradation	0.740011	0.000001
Blautia(Otu009)	adenosine nucleotides degradation II	0.737353	0.000001
Bacteroides(Otu001)	superpathway of fatty acid biosynthesis initiation (E. coli)	0.72324	0.000003
Escherichia/Shigella(Otu006)	superpathway of hexitol degradation (bacteria)	0.70757	0.000006
Bacillus(Otu022)	aerobic respiration I (cytochrome c)	0.691846	0.000012
Lachnospiraceae_(Otu036)	reductive acetyl coenzyme A pathway	0.689424	0.000013
Staphylococcus(Otu065)	toluene degradation IV (aerobic) (via catechol)	0.681637	0.000017
Lactobacillus(Otu075)	teichoic acid (poly-glycerol) biosynthesis	0.679213	0.000019
Parasutterella(Otu080)	biotin biosynthesis I	0.678437	0.00002
Enterococcus(Otu033)	fatty acid salvage	0.670219	0.000027
Bilophila(Otu030)	superpathway of N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminic acid degradation	0.665353	0.000033
Blautia(Otu020)	purine nucleotides degradation II (aerobic)	0.655059	0.000047
Bifidobacterium(Otu004)	O-antigen building blocks biosynthesis (E. coli)	0.653867	0.00005
Lactobacillus(Otu052)	isopropanol biosynthesis	0.639273	0.000082
Staphylococcus(Otu100)	catechol degradation to 2-oxopent-4-enoate II	0.633431	0.0001
Bifidobacterium(Otu027)	aspartate superpathway	0.633214	0.000101
Weissella(Otu097)	aromatic biogenic amine degradation (bacteria)	0.623915	0.000136
Barnesiella(Otu014)	phosphopantothenate biosynthesis I	0.611824	0.000199
Lactobacillus(Otu061)	superpathway of glycerol degradation to 1,3-propanediol	0.565609	0.000744
Streptococcus(Otu013)	glycogen biosynthesis I (from ADP-D-Glucose)	0.548845	0.001156
Collinsella(Otu062)	pentose phosphate pathway	0.546298	0.001219
Paraprevotella(Otu010)	adenosylcobalamin biosynthesis I (early cobalt insertion)	0.532974	0.001687
Lactobacillus(Otu049)	ectoine biosynthesis	0.519159	0.002329
Lactobacillus(Otu131)	ectoine biosynthesis	0.519159	0.002329

Fig. 14 B. Fig. PICRUSt2 analysis have shown decreased metabolic activities after different treatment, with ALDExscore 2.

Microbes	Metabolic pathways	Spearman	Significance
		Coef	( <i>p</i> -value)
Bacteroides(Otu008)	fatty acid elongation -- saturated	0.756507	0.000001
Bacteroides(Otu024)	D-fructuronate degradation	0.754857	0.000001
Bacteroides(Otu055)	6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis III (Chlamydia)	0.754492	0.000001
Ruminococcaceae_(Otu076)	superpathway of taurine degradation	0.754062	0.000001
Bacteroides(Otu023)	TCA cycle V (2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase)	0.753621	0.000001
Bacteroides(Otu007)	superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis II	0.753574	0.000001
Bacteroides(Otu029)	superpathway of pyrimidine ribonucleosides salvage	0.752979	0.000001
Ruminococcaceae_(Otu059)	L-lysine fermentation to acetate and butanoate	0.751444	0.000001
Erysipelotrichaceae_(Otu032)	adenosine nucleotides degradation IV	0.751146	0.000001
Lactobacillus(Otu003)	chorismate biosynthesis I	0.750092	0.000001
Roseburia(Otu019)	L-isoleucine biosynthesis I (from threonine)	0.748579	0.000001
Dialister(Otu018)	chorismate biosynthesis from 3-dehydroquinate	0.748304	0.000001
Clostridiales_unclassified(Otu045)	L-glutamate and L-glutamine biosynthesis	0.748052	0.000001
Sutterella(Otu091)	superpathway of purine nucleotides de novo biosynthesis I	0.745747	0.000001
Faecalibacterium(Otu005)	peptidoglycan biosynthesis IV (Enterococcus faecium)	0.744135	0.000001
Bacteria_unclassified(Otu057)	superpathway of demethylmenaquinol-6 biosynthesis II	0.741565	0.000001
Sutterella(Otu031)	superpathway of purine nucleotides de novo biosynthesis I	0.731364	0.000002
Erysipelotrichaceae_(Otu028)	superpathway of demethylmenaquinol-6 biosynthesis II	0.729475	0.000002
Alistipes(Otu039)	UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-&alpha;-D-mannuronate biosynthesis	0.728256	0.000002
Bacteroides(Otu001)	superpathway of fatty acid biosynthesis initiation (E. coli)	0.72324	0.000003
Clostridium_IV(Otu060)	succinate fermentation to butanoate	0.716303	0.000004
Ruminococcus2(Otu050)	L-glutamate and L-glutamine biosynthesis	0.713448	0.000005
Lachnospiraceae_(Otu046)	L-lysine fermentation to acetate and butanoate	0.701012	0.000008
Blautia(Otu034)	superpathway of aromatic amino acid biosynthesis	0.697947	0.000009
Ruminococcus2(Otu040)	L-lysine fermentation to acetate and butanoate	0.691722	0.000012
Parabacteroides(Otu048)	pantothenate and coenzyme A biosynthesis I	0.691567	0.000012
Lachnospiraceae_(Otu035)	superpathway of UDP-N-acetylglucosamine-derived O-antigen building blocks biosynthesis	0.690989	0.000012
Lachnospiraceae_(Otu036)	reductive acetyl coenzyme A pathway	0.689424	0.000013
Odoribacter(Otu056)	L-tyrosine degradation I	0.686961	0.000014
Gemmiger(Otu047)	inosine-5'-phosphate biosynthesis III	0.681672	0.000017
Lachnospiraceae_(Otu053)	succinate fermentation to butanoate	0.678339	0.00002
Lachnospiraceae_(Otu068)	L-lysine fermentation to acetate and butanoate	0.65782	0.000043
Bifidobacterium(Otu004)	O-antigen building blocks biosynthesis (E. coli)	0.653867	0.00005
Coriobacteriaceae_(Otu026)	L-arginine biosynthesis IV (archaeobacteria)	0.638563	0.000085
Alistipes(Otu017)	superpathway of thiamin diphosphate biosynthesis I	0.631738	0.000106
Barnesiella(Otu014)	phosphopantothenate biosynthesis I	0.611824	0.000199
Dorea(Otu015)	chorismate biosynthesis I	0.60022	0.000284
Anaerostipes(Otu021)	L-glutamate and L-glutamine biosynthesis	0.594941	0.00033
Dorea(Otu025)	L-glutamate and L-glutamine biosynthesis	0.591238	0.000367
Lachnospiraceae_(Otu011)	L-lysine biosynthesis VI	0.559435	0.000894
Parabacteroides(Otu012)	L-tyrosine degradation I	0.558203	0.0009
Streptococcus(Otu013)	glycogen biosynthesis I (from ADP-D-Glucose)	0.548845	0.001156
Fusicatenibacter(Otu016)	pyruvate fermentation to propanoate I	0.538032	0.001494

- 대표적으로 앞서 확인한 청국장 처리 시료에서의 Aromatic biogenic amines degradation(Bacteria) 증가가 확인되었는데, 이를 Spearman Correlation 분석을 통해 Weissella(Otu097)에 의한 상관관계를 예측 할 수 있다(<그림 42>,<표14B>). 청국장 처리시료 에서 유일하게 유의적인 증가를 보인 Weissella를 통해 생체 아민 저해영향과 청국장에 의한 장내미생물 생태와의 상관관계를 예측할 수 있다.

#### -4차년도 연구개발과제의 수행 결과

○ *In vitro* GID-FF 실시 이후, Blank 그룹 피험자 (S01~S10)의 Baseline gut microbiota 비교

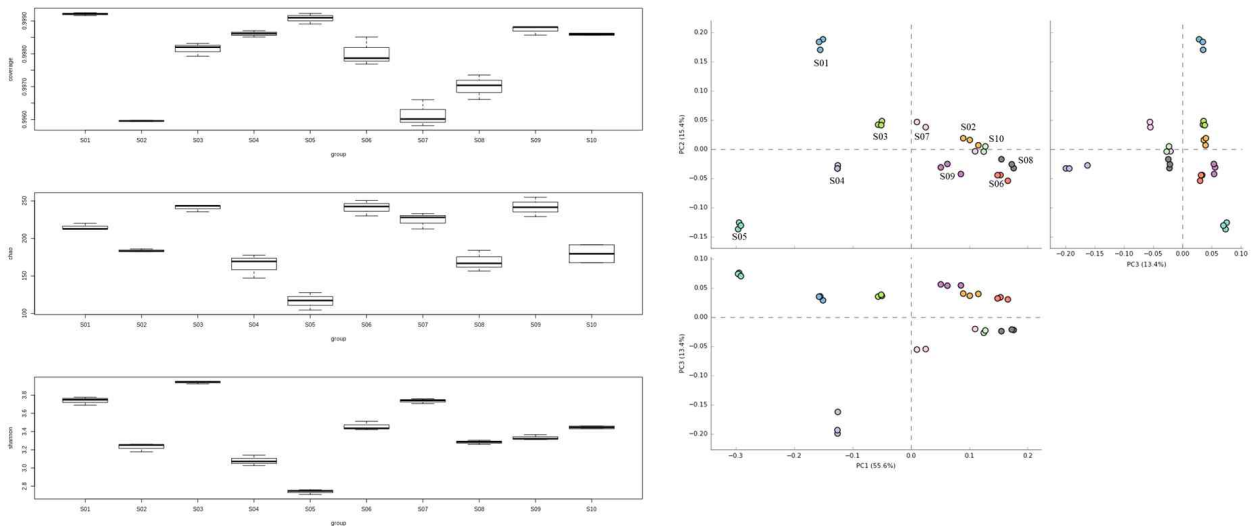


그림 44. 피험자별 Baseline gut microbiota  $\alpha$ -diversity와 PCA analysis 결과

- 피험자들의 Baseline gut microbiota에 대한 비교를 했을 때, S05의 Chao1과 Shannon 지표값이 모든 피험자들중 가장 낮은 결과를 나타냈다. 그 외의 피험자들의 사이에 유의적인 차이는 보이지 않았다. 또한 PCA analysis 결과를 볼 때, 10명의 피험자 모두 서로 다른 장내미생물생태를 보임이 나타났다. 하지만, Genus 수준의 장내미생물 생태를 보았을 때(그림 45), Prevotella를 상대적으로 많이 보유하고 있는 피험자 그룹들이 서로 비슷한 PCA 결과를 보임을 알 수 있다.

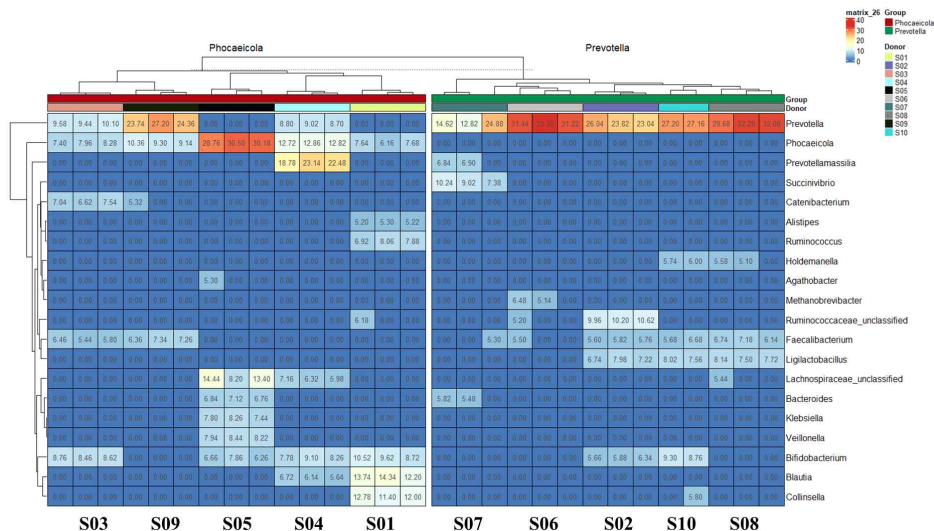


그림 45. Relative abundance of baseline gut microbiota at Genus level

또한, 그림 45을 볼 때, 10명의 피험자는 크게 *Phocaeicola* 와 *Prevotella* 두 개의 그룹으로 나눠짐을 확인했다. 이에 따라 기능성 식품을 처리하였을 때, 그룹별로 유사한 결과를 나타내는지 관찰하기 위해 Stamp software를 이용하여 기능성 식품 처리 전후로 유의적으로 차이를 보인 장내미생물들을 조사하였고 이를 그림 46에 나타내었다.

○ *In vitro* GID-FF 실시 이후, 기능성 식품 처리 전후의 유의적으로 증가한 장내미생물 생태 분석 - 그림 46은 같은 그룹(*Prevotella* or *Phocaeicola* 그룹)에 속한 피험자일지라도, 개인의 다양한 장내미생물 조성에 따라 기능성 식품에 의한 영향이 상이할 수 있다는 것을 관찰하였다. 이에 사람마다 갖고 있는 다양한 장내미생물 생태에 따라 기능성 식품의 영향을 확인할 수 있었다. 심지어 특정 기능성 식품 처리 이후에 인체에 유해하다고 알려진 균( e.g. *E.coli*, *Klebsiella*, *Succinivibrio*)이 증가하는 피험자들도 관찰할 수 있었다.

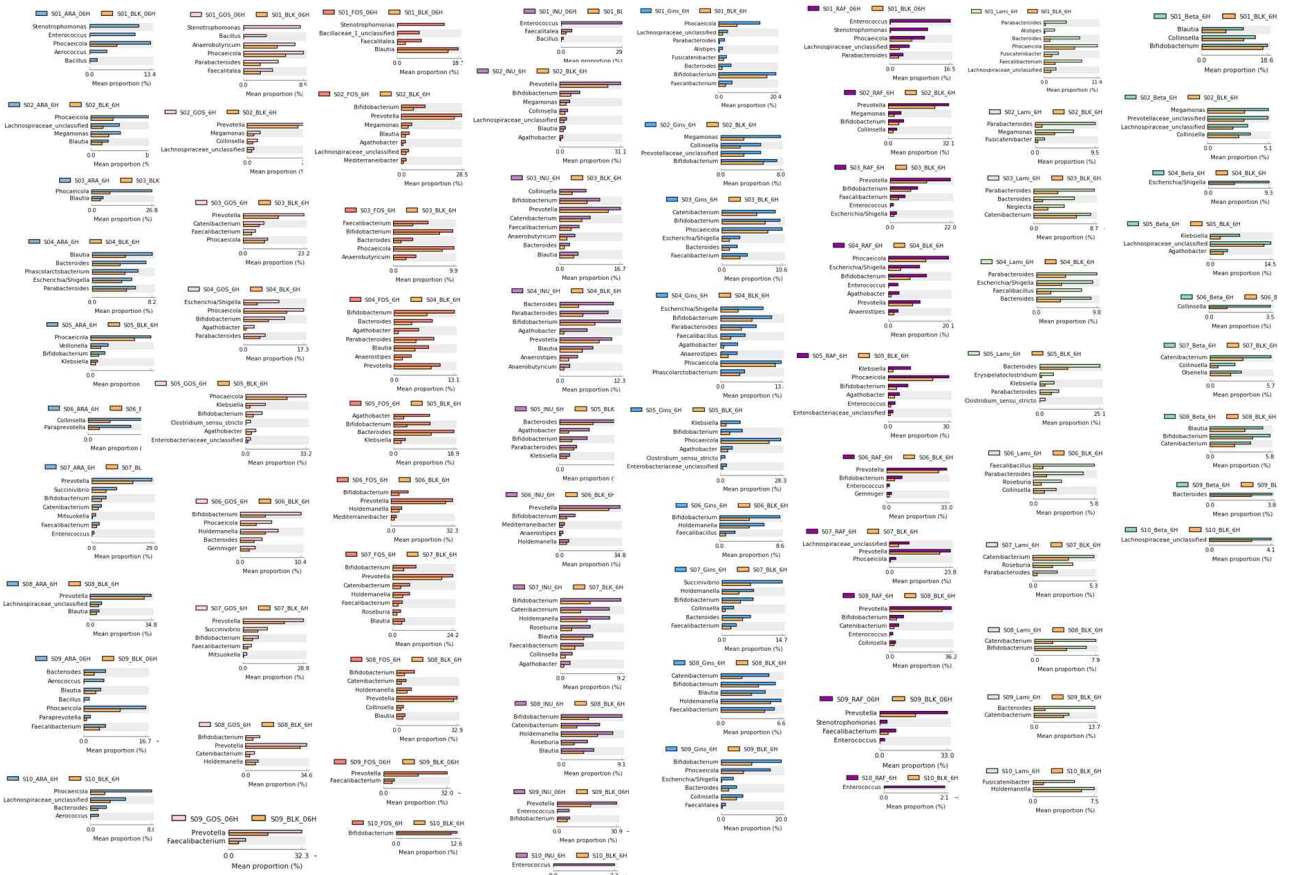


그림 46 피험자 별 기능성 식품 처리 전후의 장내미생물 증감 결과 (Stamp analysis)

○ GC를 이용한 기능성 식품 처리 전후의 단쇄지방산(Short chain fatty acid:SCFA) 생산량 정량 분석

-개인별로 갖고 있는 장내미생물 생태에 따라 기능성 식품에 대한 Microbiota shift를 관찰할 수 있었다. 이에 인체 건강에 큰 영향일 미치는 장내미생물의 대사산물, 단쇄지방산의 생산량에 대해 조사하였다.

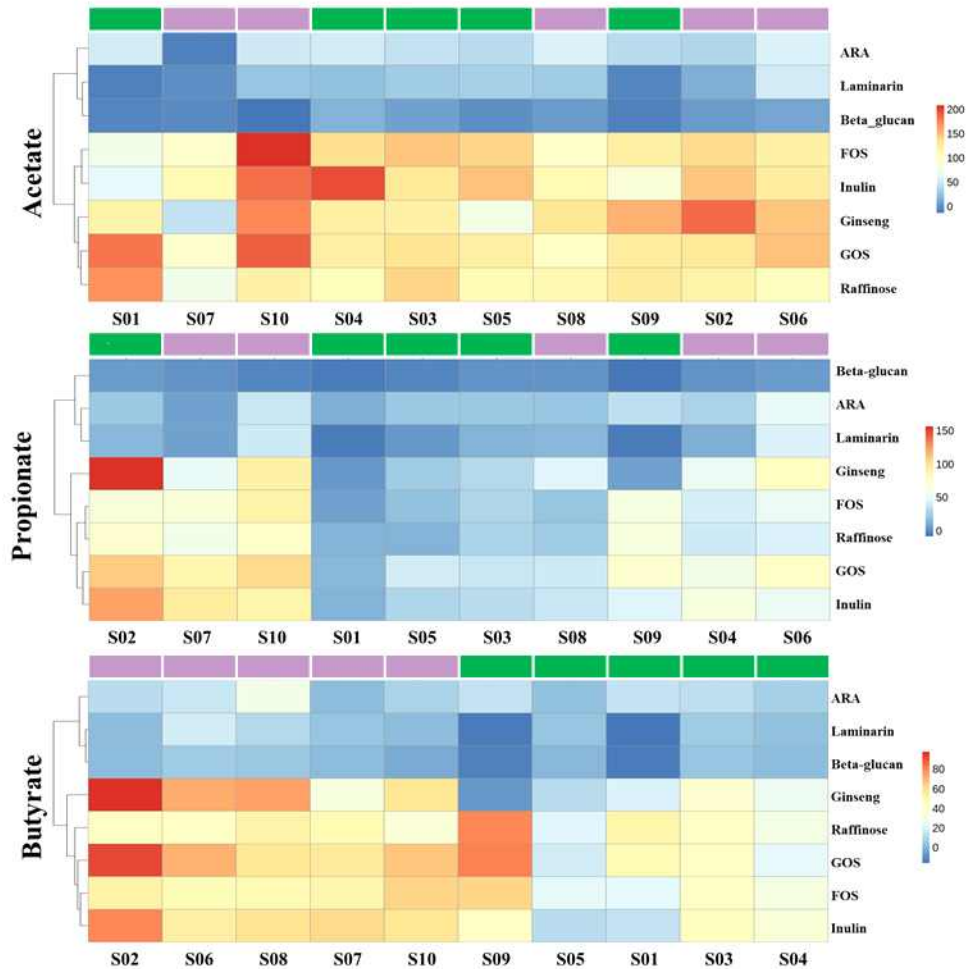


그림 47. 피험자별로 기능성 식품 처리에 따라 증감한 SCFAs 생산량

- 그림 47를 통해 피험자별로 어떤 기능성 식품이 SCFA(Acetate, Propionate, and Butyrate) 생산에 영향을 미치는지 나타냈다. 또한 상단의 Color key를 이용해 genus 수준에서 구분되었던 그룹(Prevotella(자색) or Phocaeicola(녹색))을 나타내었다. 이를 통해 Acetate 와 Propionate 생산에 있어서 두 그룹내에서도 서로 다양한 반응을 관찰 할 수 있었다. 하지만 Butyrate 생산량 결과를 볼 때, Prevotella를 주로 갖고 있는 피험자들에게서 더 높은 Butyrate 생산량을 확인할 수 있었다. 전체적으로 봤을 때, Arabino-galactan, Laminarin, Beta-glucan 위 세가지 기능성 식품은 SCFA 생산량에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 보인다. 이외의 5가지 기능성 식품들은 처리 전후를 비교했을 때, 모두 유의적으로 SCFA 생산량이 증가함을 나타냈다.

○ Spearman correlation을 이용한 피험자 별 SCFA생산 기여 장내미생물 조사

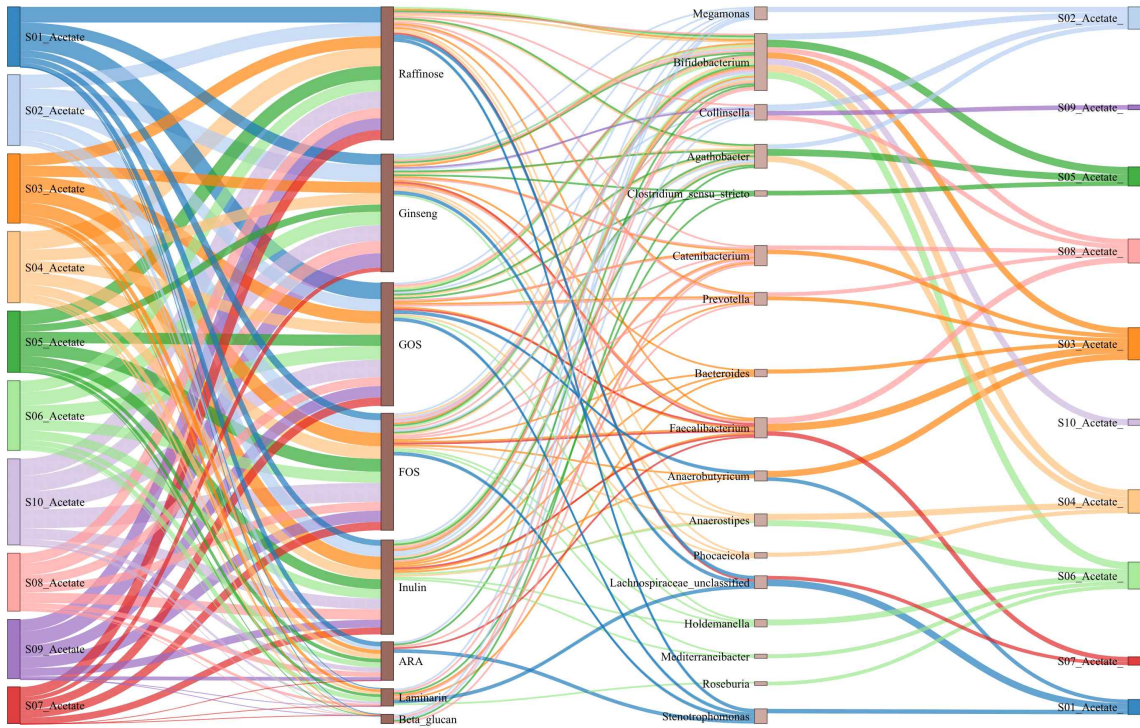


그림 48A. Sankey analysis for acetate producing bacteria

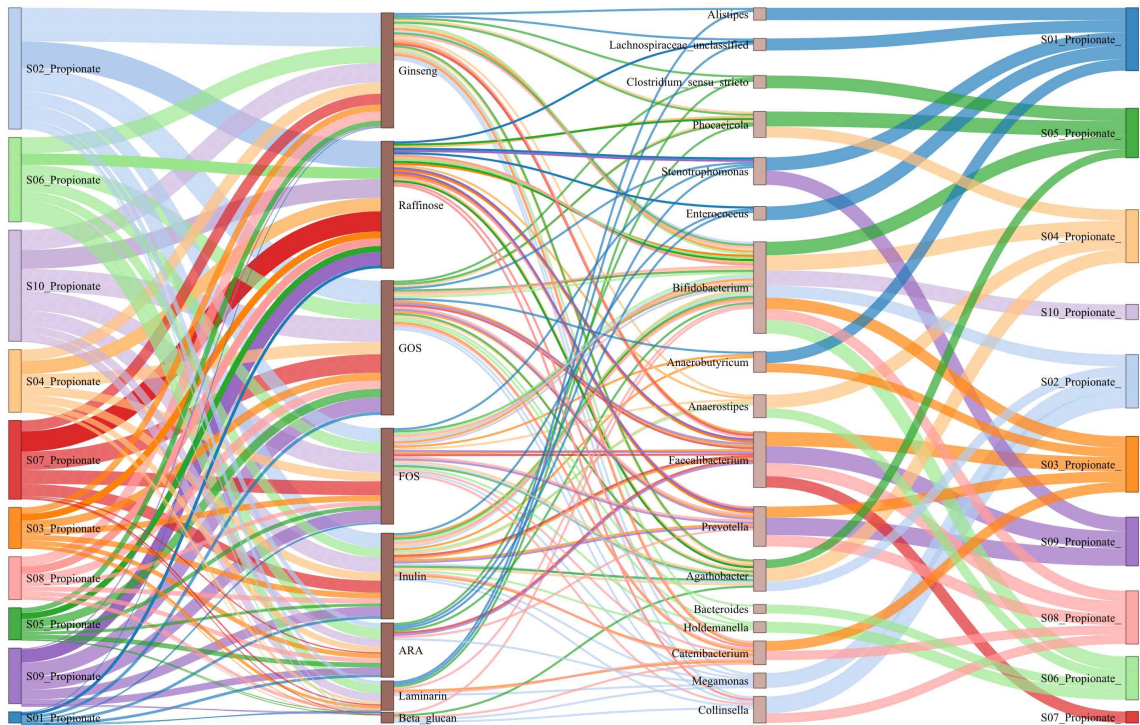


그림 48B. Sankey analysis for Propionate producing bacteria



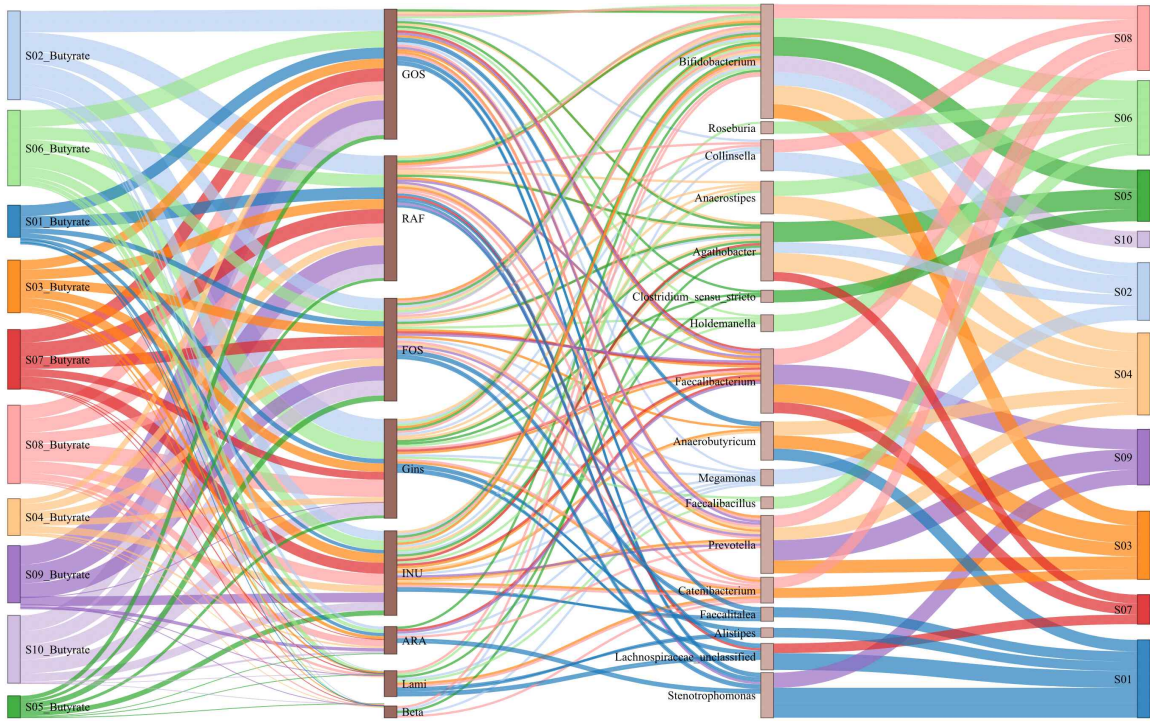
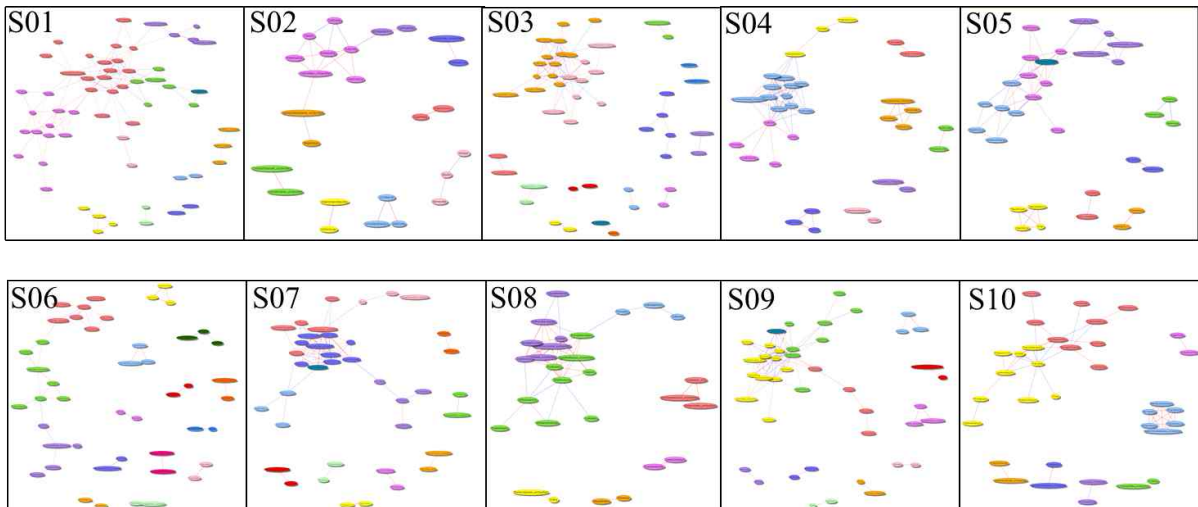


그림 48C. Sankey analysis for Butyrate producing bacteria

- 위 결과는 사람별로 SCFA 생산량과 양의 상관관계에 있는 장내미생물을 조사함으로 실질적으로 SCFA 생산에 기여하는 장내미생물 조사하기 위함이다. 먼저, 사람별로 기능성 식품 처리후 증가한 SCFA양을 flow의 Width로 나타내었고, 이후 기능성 식품 처리 이후 유의적으로 증가한 미생물 node와 연결시켰다. 또한 그 증가한 미생물중에서 SCFA생산과 양의 상관관계에 있는 미생물만을 선별하여 spearman correlation coef.를 width로 나타내었다.

○ Network analysis을 이용한 hub 장내미생물 조사

- 이후에 Network analysis를 이용하여 각 피험자안에서 가장 많은 미생물들과 상관관계에 있는 장내미생물을 'Core bacteria'로 명칭하였고, 사람별로 어떤 미생물이 생태의 중심에서 microbiota shift에 가장 큰 영향을 미치는지 조사하였다.



<그림 49. 피험자별 Network analysis 결과>

표 15. Network analysis 결과 정리

Donor	Core bacteria	Relative Abundance (%)	Connected Bacteria	Connected SCFA producer
S01	<i>Anaerostipes</i>	0.26	12	<i>Ligilactobacillus, Paraprevotella, Agathobacter, Anaerobutyricum, Stenotrophomonas</i>
S02	<i>Romboutsia</i>	1.82	6	<i>Akkermansia, Collinsella</i>
S03	<i>Akkermansia</i>	1.85	13	<i>Ligilactobacillus, Bifidobacterium, Faecalibacterium</i>
S04	<i>Roseburia</i>	0.52	11	<i>Agathobacter, Anaerostipes, Bifidobacterium</i>
S05	<i>Bifidobacterium</i>	6.92	7	<i>Agathobacter, Faecalimonas</i>
S06	<i>Agathobacter</i>	0.28	6	<i>Bifidobacterium, Holdemanella, Anaerostipes</i>
S07	<i>Romboutsia</i>	0.56	12	<i>Megasphaera, Ruminococcus</i>
S08	<i>Dialister</i>	3.05	8	<i>Prevotellamassilia, Ruminococcus, Faecalibacterium</i>
S09	<i>Prevotella</i>	28.47	15	<i>Roseburia, Faecalibacterium, Butyricimonas, Agathobacter, Latilactobacillus, Alistipes, Akkermansia</i>
S10	<i>Ligilactobacillus</i>	7.79	5	<i>Phocaeicola, Prevotella</i>

- 위의 결과를 볼 때, S02와 S07의 Romboutsia를 제외한 모든 피험자에서 각기 다른 Core bacteria를 확인하였다. 또한 이들과 유의적인 상관관계를 갖고 있는 Connected bacteria의 수를 나타내었고, 그 중에 SCFA로 알려진 미생물들을 나타내었다(양의 상관관계, 음의 상관관계). 이를 통해 사람별로 어떤 장내미생물이 생태의 변화의 중심에 있는지, 또한 어떤 SCFA 생산 미생물들과 상관관계가 있는지 조사가 가능하였다. 이를 통해 장내미생물 기반 식품 기능성 평가 시스템의 가능성을 검증하였다.

○ 머신러닝 알고리즘을 통한 SCFA 생산량 예측 모델 구축

- 그간 많은 연구를 통해 SCFA 생성에 관여하는 미생물이 밝혀졌다. 장에는 수없이 많은 종류의 미생물이 함께 살아가고 있다. 하나의 미생물 종에 중점을 두어 연구하는 것도 중요하지만, 미생물 사이 일어나는 복잡한 상호작용을 감안했을 때, 장내 미생물을 하나의 바이옴(biome)으로 이해할 필요가 있다. 이에 연구진은 특정 미생물과 단쇄지방산 사이의 관계를 알아보는 것에서 더 나아가, 머신러닝 알고리즘을 이용하여 장 마이크로바이옴을 통해 SCFA 생산량을 예측하는 모델을 구축해 보았다.

- 본 연구에서 확보한 미생물 군집 데이터를 바탕으로 SCFA 생산량을 예측하고자 random forest (RF), XGBoost (extreme gradient boosting), lasso, ridge, elastic-net (ENet), support vector machine (SVM) 및 k-nearest neighbor (KNN) 알고리즘을 적용해 보았다. 미생물 군집 데이터의 경우 속(genus) 수준 OTU의 상대빈도를 구한 후 반복수(replicate)의 평균값을 사용했다. 하이퍼파라미터 튜닝(hyperparameter tuning) 없이도 예측력이 좋은 xgboost 알고리즘을 제외하고는 모두 grid search 교차 검증을 통해 최적의 하이퍼파라미터를 찾는 과정을 거쳤다. 학습(train) 데이터와 시험(test) 데이터를 구분하기 위해 각 시료의 ID를 임의로 섞어주는 과정을 총 3번 진행했으며, 각각의 ID를 4:1 비율로 학습 및 시험 데이터로 나눠 5-fold 교차검증 하였다. 이를 통해 각 ID 당 총 3개의 예측값을 확보했고, 최종 예측값은 3개의 값의 평균을 계산하여 산출했다. 머신러닝 및 하이퍼파라미터 튜닝은 python의 'scikit-learn' 패키지를 통해 수행하였다.

- 머신러닝 알고리즘 적용 결과, 예측된 SCFA 생산량과 실제 SCFA 생산량 사이 상관관계가 높은 (상관계수 > 0.6) 모델들을 구축할 수 있었다 (그림 50).

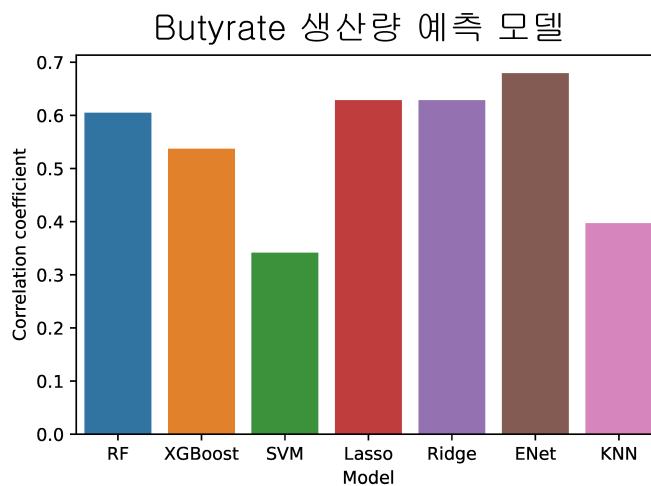
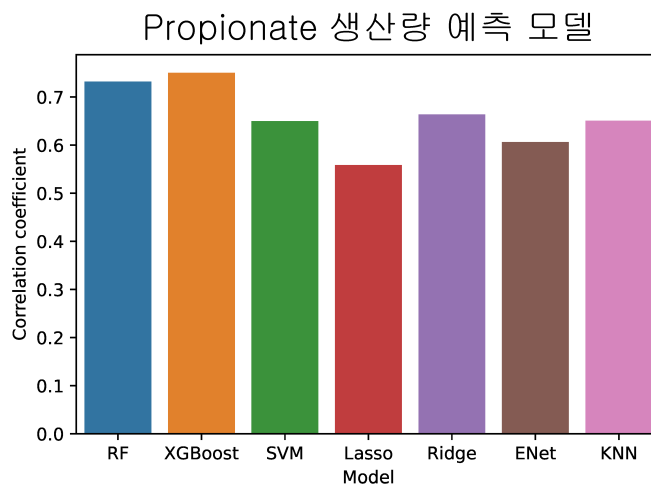
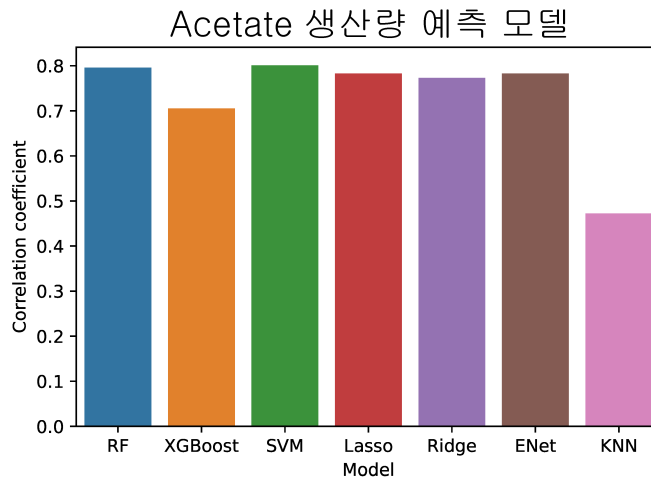


그림 50. 모델별 미생물 군집 기반 예측된 SCFA 생산량과 실제 SCFA 생산량 사이 상관 계수

- Mean squared error 값을 기반으로 어떤 미생물 속이 random forest 모델에서 중요하게 작용하는지 확인해본 결과 (그림 51), acetate의 경우 중요도가 *Bifidobacterium*, “Clostridiales Incertae Sedis XIII unclassified”, *Romboutsia*, *Bacillus*, *Streptococcus* 순으로 높았다. Propionate의 경우 *Megamonas*, “Clostridiales Incertae Sedis XIII unclassified”, *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Blautia* 순으로 높았으며, butyrate의 경우 *Faecalibacterium*, “Clostridiales Incertae Sedis XIII unclassified”, *Prevotella*, *Bilophila*, *Romboutsia* 순으로 높았다. Random forest 모델에서의 특성 중요도(feature importance)는 해당 특성이 모델에 포함되

있을 때 줄어드는 mean squared error를 표준화(normalize)한 것으로, 모든 특성의 중요도 합은 1이다. 특성 중요도가 높다는 것은 의사결정나무(decision tree)에서 샘플을 구분하는 중요한 분기점 역할을 한다는 것을 뜻하므로, 해당 특성값이 높을수록 SCFA 값이 높게 예측될 수도 있지만, 반대로 해당 특성값이 낮을수록 SCFA 값이 높을수도 있다. 구축된 모델에서 중요도가 높은 미생물은 잘 알려진 SCFA 생산자(예, *Bifidobacterium*, *Megamonas*, *Faecalibacterium*, *Prevotella*)도 있었지만 SCFA 생산자로 밝혀진 적이 없는 다른 미생물 속도 있었다. 이들 미생물 사이 서로 돕거나 경쟁하는 상호작용이 존재하는지 추가로 연구해보는 것도 의미 있을 것이다.

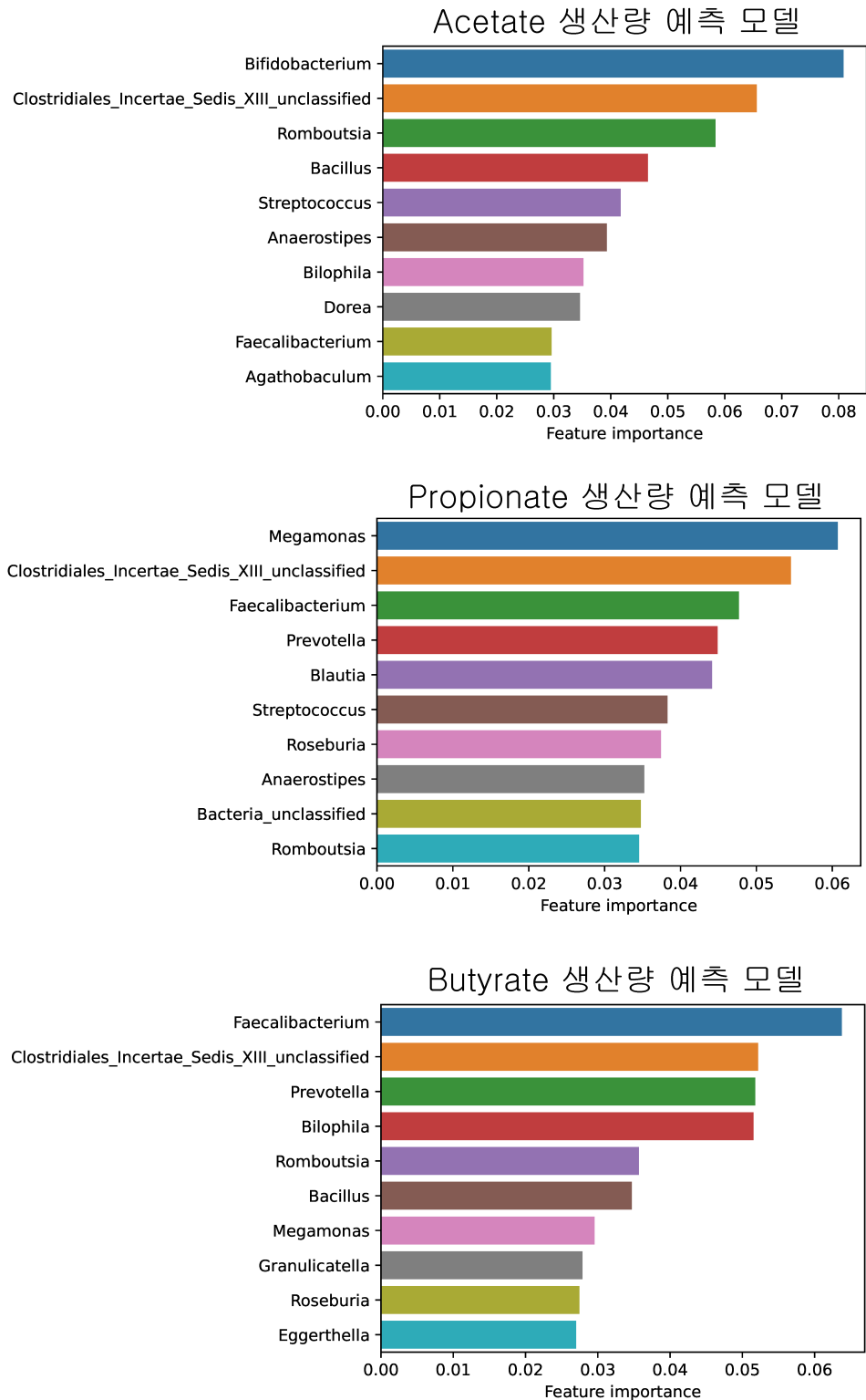


그림 51. 미생물 군집 기반 random forest 모델에서의 feature importance

- 동일한 방법을 이용하여 장내 미생물 군집의 대사 과정(PICRUST2 결과) 기반 SCFA 생산량을 예측하는 모델 또한 구축해보았다. 그 결과, 마찬가지로 SCFA 생산량과 실제 SCFA 생산량 사이 상관관계가 높은 (상관계수 > 0.6) 모델들을 구축할 수 있었다 (그림 52).

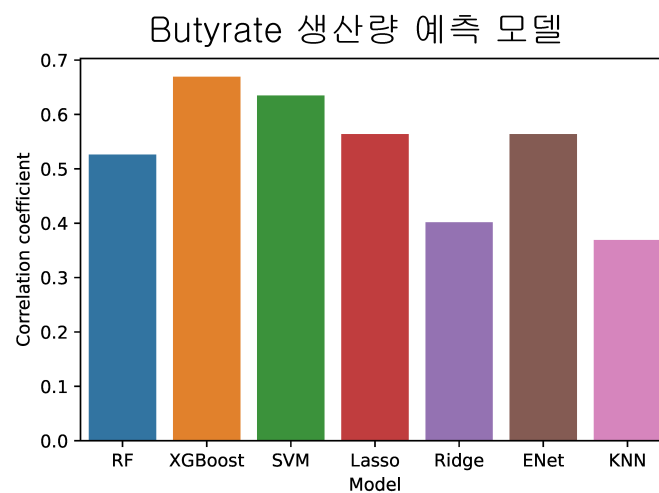
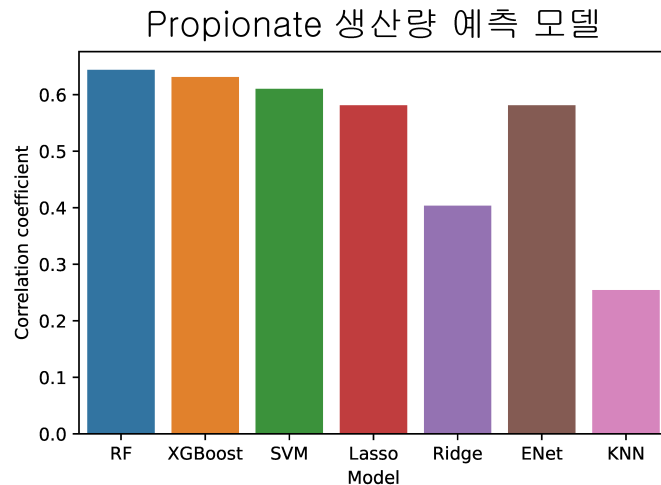
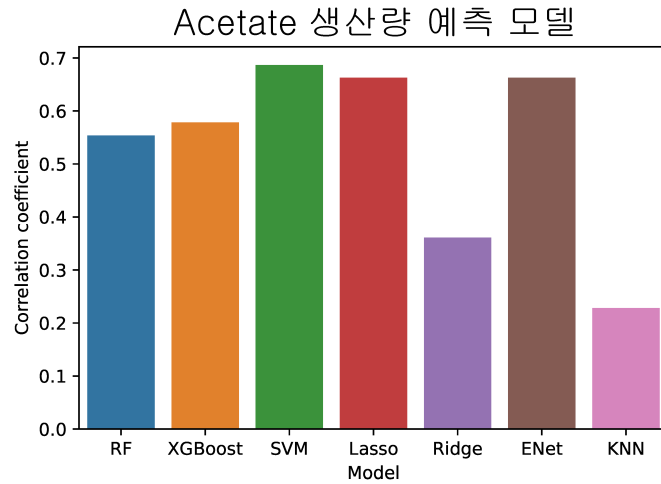


그림 52. 모델별 대사 과정 기반 예측된 SCFA 생산량과 실제 SCFA 생산량 사이 상관 계수

- Mean squared error 값을 기반으로 어떤 대사 과정이 random forest 모델에서 중요하게 작용하는지 확인해본 결과 (그림 51), acetate의 경우 중요도가 “thiazole biosynthesis I (*E. coli*)”, “pyruvate fermentation to acetone”, “tetrapyrrole biosynthesis I (from glutamate)”, “superpathway of pyrimidine deoxyribonucleotide de novo biosynthesis (*E. coli*)”,

“pentose phosphate pathway” 순으로 높았다. Propionate의 경우 “dTDP-N-acetylthomosamine biosynthesis”, “thiazole biosynthesis II (*E. coli*)”, “1,4-dihydroxy-6-naphthoate biosynthesis II”, “pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis IV”, “superpathway of L-serine and glycine biosynthesis I” 순으로 높았다. Butyrate의 경우 “superpathway of L-serine and glycine biosynthesis I”, “dTDP-N-acetylthomosamine biosynthesis”, “thiazole biosynthesis II (*Bacillus*)”, “superpathway of menaquinol-8 biosynthesis II”, “L-methionine salvage cycle III” 순으로 높았다.

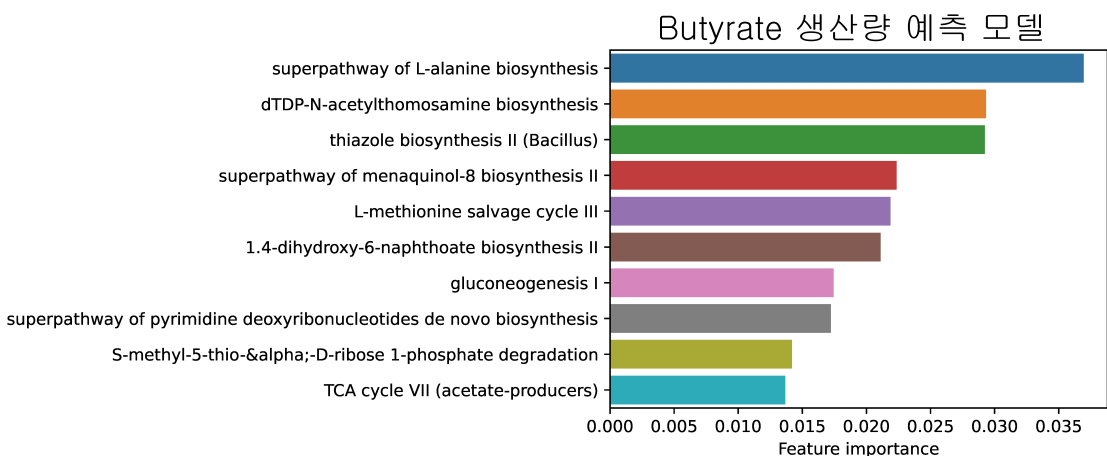
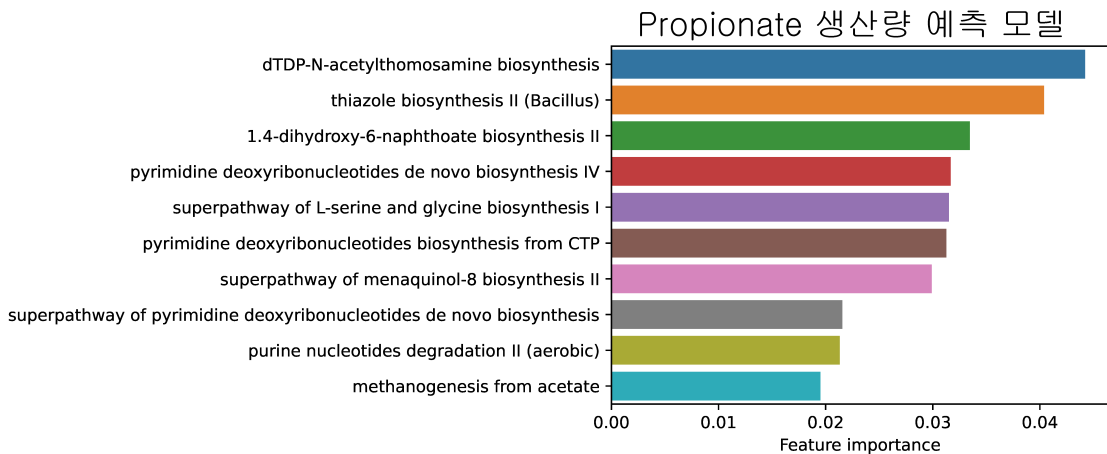
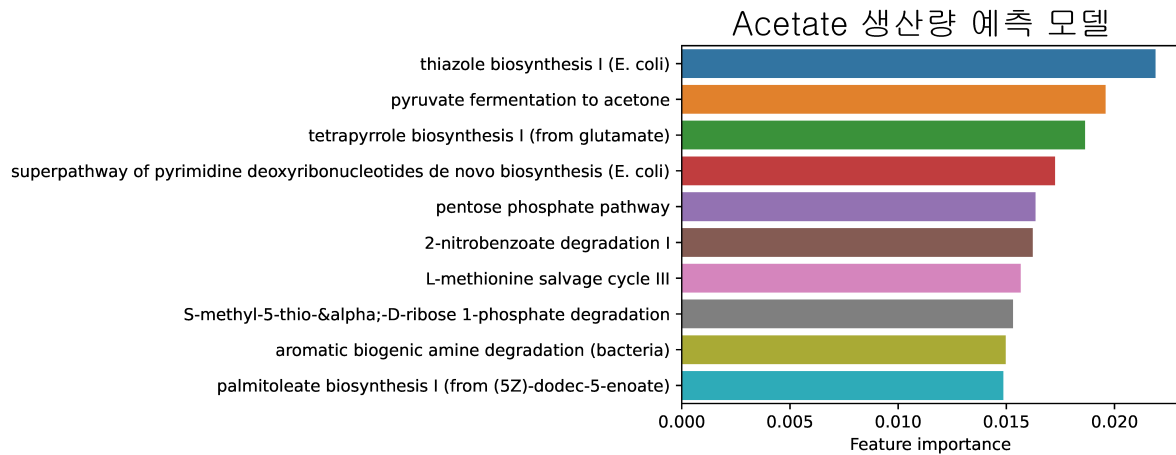


그림 53. 대사 과정 기반 random forest 모델에서의 feature importance

- 본 연구과제에서 구축된 머신러닝 모델은 최상의 probiotics 조합을 연구하는데 있어 유용하게 이용될 수 있을 것으로 보인다. 피험자 수를 늘린다면 피험자별 최적의 prebiotics를 파악하는 데에도 머신러닝 기술을 이용할 수 있을 것이다.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 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					5	1	30			
1차년도	목표				1	-	1			
	실적				1	-	1			
2차년도	목표				2	1	9			
	실적				5	1	16			
3차년도	목표				1	-	5			
	실적				1	-	18			
4차년도	목표				1	-	15			
	실적				1	-	18			
계	목표				5	1	30			
	실적				8	1	53			

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표									연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용 정보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	60											20			20				
최종목표	1	1									3	2.6			3				
1차년	목표																		
	실																		

도	적																			
2차년도	목표	1									1	2				1				
	실적	1									1	1.6				2				
3차년도	목표										1	3				1				
	실적										-	-	2			1				
4차년도	목표		1								1	3				1				
	실적										2	3.0	2			2				
소계	목표	1	1								3	2.6				3				
	실적	1									3	2.5	4			5				
종료 1차년도																				
종료 2차년도		1									1	1.5				2				
종료 3차년도													2			1				
종료 4차년도											2	3	2			2				
소계		1									3	2.5	4			5				
합계		1									3	2.5	4			5				

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

[미생물유전체사업 성과]

전략미생물 해독 (해당없음)

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

유용 유전자원 확보 (해당없음)

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

표준유전체 해독 (해당없음)

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



□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	시험관 내 미생물 생태	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성 평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태분석	18.11.12	igem-0000218	0.0004
2	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펙신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 8명의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 분석.	19.10.31	igem-0000513	0.0008
3	시험관 내 미생물 생태	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성 평가 가능성 검증을 위한 in Vitro, in Vivo 장내미생물생태 분석 데이터	19.10.29	igem-0000734	0.0002
4	시험관 내 미생물 생태	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성 평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 상에서 total volume에 따른 장내미생물 생태 차이 조사 분석 데이터	19.10.29	igem-0000674	0.0001
5	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 건강기능식품(청국장, 김치, 가르시니아)을 소화 효소(아밀라아제, 펙신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 1명의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 분석.	19.07.05	igem-0000400	0.0001
6	시험관내 분변발효로 인한 Functional gene	In-vitro 상에서 건강기능식품(청국장 등 3개) 소화 효소들을 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정 후 피험자의 분변을 이용하여 fecal fermentation 을 120분 동안 진행한 샘플로부터 얻어진 mgi-seq rawdata의 assembly, ORF_prediction data, annotation	19.11.07	igem-000819	1.9755
7	시험관 내 미생물 생태 (분석 데이터)	In-vitro 상에서 Beef를 소화 효소(아밀라아제, 펙신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자(Omnivorous A,B,C & Vegiterian D,E,F)의 분변을 이용하여 0,30,60,90분 동안 fecal fermentation 과정을 진행한 분석 데이터	20.07.14	igem-0001506	0.127
8	시험관 내 미생물 생태 (분석 데이터)	In vitro 상에서 10명의 피험자 분변을 이용하여 8가지 기능성 식품에 대한 장내미생물 생태 변화 분석 데이터	21.12.28	igem-0002663	0.225

□ 유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)
1	유전체	장내미생물 및 Metabolic pathway간 상관 관계를 Heatmap으로 시각화하여 줌.	한국저작권위원회	20191021	C-2019-029498

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	시험관 내 미생물 생태	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 내 미생물 16S rRNA gene sequencing raw data	18.11.12	igem-0000210	0.4
2	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펙신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 B의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보.	19-10-29	igem-0000504	0.1
3	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펙신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 C의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보.	19-10-29	igem-0000505	0.1

4	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 D의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000506	0.14
5	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 E의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000507	0.13
6	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 F의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000508	0.13
7	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 G의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000509	0.11
8	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 청국장을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 H의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000510	0.12
9	시험관 내 미생물 생태	피험자 S2의 분변을 이용한 건강기능식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro, in Vivo 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000732	0.15
10	시험관 내 미생물 생태	피험자 S3의 분변을 이용한 건강기능식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro, in Vivo 장내미생물생태 정보	19-10-29	igem-0000733	0.15
11	시험관 내 미생물 생태	사람분변을 이용한 건강기능식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 상에서 total volume에 따른 장내미생물 생태 차이 조사 분석 정보	19-10-29	igem-0000673	0.58
12	시험관 내 미생물 생태	In-vitro 상에서 건강기능식품(청국장, 김치, 가르시니아)을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 1명의 분변을 이용하여 FF(Fecal Fermentation)을 진행시 변화하는 장내미생물생태 정보	19-10-28	igem-0000399-1	0.67
13	시험관내 분변발효로 인한 Functional gene	In-vitro 상에서 건강기능식품 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자의 분변을 이용하여 fecal fermentation을 진행한 mgi-seq의 raw data 중 건강기능식품을 처리하지 않은 blank 샘플 (0분 fermentation)	19-11-04	igem-0000788	16.9
14	시험관내 분변발효로 인한 Functional gene	In-vitro 상에서 건강기능식품 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자의 분변을 이용하여 fecal fermentation을 진행한 mgi-seq의 raw data 중 건강기능식품을 처리하지 않은 blank 샘플 (120분 fermentation)	19-11-04	igem-0000820	16.8
15	시험관내 분변발효로 인한 Functional gene	in-vitro 상에서 건강기능식품(청국장)을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자의 분변을 이용하여 fecal fermentation을 120분 동안 진행한 샘플로부터 얻어진 mgi-seq raw의 분석 데이터	19-11-04	igem-0000864	15
16	시험관내 분변발효로 인한 Functional gene	in-vitro 상에서 건강기능식품(가르시니아)을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자의 분변을 이용하여 fecal fermentation을 120분 동안 진행한 샘플로부터 얻어진 mgi-seq raw의 분석 데이터	19-11-04	igem-0000823	14
17	시험관내 분변발효로 인한 Functional gene	in-vitro 상에서 건강기능식품(김치)을 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자의 분변을 이용하여 fecal fermentation을 120분 동안 진행한 샘플로부터 얻어진 mgi-seq raw의 분석 데이터	19-11-04	igem-0000850	15.6
18	시험관 내 미생물 생태(Omni_A_40day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous A)의 분변을 이용하여 분변인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-0001485	0.175
19	시험관 내 미생물 생태(Omni_A_100day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자(Omnivorous A)의 분변을 이용하여 분변인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-0001486	0.145
20	시험관 내 미생물 생태(Omni_A_Blank)	In-vitro 상에서 Beef를 소화 효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자(Omnivorous A)의 분변을 이용하여 분변인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-0001487	0.326

21	시험관 내 미생물 생태(Omni_B_40day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous B)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01488	0.19 1
22	시험관 내 미생물 생태(Omni_B_100day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous B)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01489	0.19 4
23	시험관 내 미생물 생태(Omni_B_Blank)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous B)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01490	0.30 8
24	시험관 내 미생물 생태(Omni_C_40day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous C)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01491	0.18 8
25	시험관 내 미생물 생태(Omni_C_100day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous C)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01492	0.19 4
26	시험관 내 미생물 생태(Omni_C_Blank)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Omnivorous C)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01493	0.27 6
27	시험관 내 미생물 생태(Vege_D_40day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian D)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01494	0.22 6
28	시험관 내 미생물 생태(Vege_D_100day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian D)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01495	0.24 1
29	시험관 내 미생물 생태(Vege_D_Blank)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian D)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01496	0.28 4
30	시험관 내 미생물 생태(Vege_E_40day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian E)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01497	0.22 9
31	시험관 내 미생물 생태(Vege_E_100day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian E)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01498	0.20 5
32	시험관 내 미생물 생태(Vege_E_Blank)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian E)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01499	0.28 8
33	시험관 내 미생물 생태(Vege_F_40day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian F)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01500	0.18 4
34	시험관 내 미생물 생태(Vege_F_100day)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian F)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01501	0.18 2
35	시험관 내 미생물 생태(Vege_F_Blank)	In-vitro 상에서 Beef를 소화효소(아밀라아제, 펩신, 판크레아틴)를 이용해 소화 과정을 모방한 gastrointestinal digestion 과정을 거친 후 피험자 (Vegetarian F)의 분변을 이용하여 분동인 fecal fermentation 과정을 진행한 16s rRNA 데이터	20-07-24	igem-00 01502	0.29 9
36	시험관 내 미생물 생태(S01_BLK)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 In Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-28	igem-00 02664	0.11 2
37	시험관 내 미생물 생태(S01_ARA)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-00 02665	0.05 4
38	시험관 내 미생물 생태(S01_Gin)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 In Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-00 02666	0.24 5
39	시험관 내 미생물 생태(S01_GOS)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-00 02667	0.05 4
40	시험관 내 미생물 생태(S01_FOS)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 In Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-00 02668	0.05 5
41	시험관 내 미생물 생태(S01_Lami)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-00 02669	0.02 3
42	시험관 내 미생물 생태(S01_Beta)	사람 분변을 이용한 건강기능성 식품기능성평가 가능성 검증을 위한 In Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-00 02670	0.02 5

43	시험관 내 미생물 생태(S01_Inulin)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002671	0.055
44	시험관 내 미생물 생태(S01_Raffinose)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002672	0.053
45	시험관 내 미생물 생태(S02_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002673	0.085
46	시험관 내 미생물 생태(S03_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002674	0.221
47	시험관 내 미생물 생태(S04_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002675	0.168
48	시험관 내 미생물 생태(S05_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002676	0.187
49	시험관 내 미생물 생태(S06_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002677	0.157
50	시험관 내 미생물 생태(S07_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002678	0.095
51	시험관 내 미생물 생태(S08_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002679	0.085
52	시험관 내 미생물 생태(S09_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002680	0.173
53	시험관 내 미생물 생태(S10_all)	사람분변을 이용한 건강기능성식품기능성평가 가능성 검증을 위한 in Vitro 장내미생물생태 분석 데이터	21-12-27	igem-0002681	0.161

□ 병원성미생물진단마커 개발 (해당없음)

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

□ 병원성미생물 정보 완성 (해당없음)

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

□ 미생물 병발생 기작 규명 (해당없음)

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/BISS CIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여 율
1	Investigation of MiSeq reproducibility on biomarker identification	Applied Biological Chemistry	Jiwan Hong, Hyejun Jo	62		Springer Link	SCI	2019. 10/29	2468-0842	
2	Effects of digested Cheonggukjang on human microbiota assessed by in vitro fecal fermentation	Journal of Microbiology	Singh Vineet	59		Springer	SCI	2021. 02/01	1225-8873	
3	Dietary Intervention Induced Distinct Repercussions in Response to the Individual Gut Microbiota as Demonstrated by the In Vitro Fecal Fermentation of Beef	Applied Sciences	Singh Vineet	11		MDPI	SCI	2021. 07/25	2076-3417	

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020 KSABC International Conference	전다빈	2020.08.20	E-conference	대한민국
2	2020 KSABC International Conference	김지연	2020.08.20	E-conference	대한민국
3	2021 KMB International Conference	전다빈	2021.06.24.	백스코	대한민국
4	2021 mBIOME Conference	전다빈	2021.12.10	연세대학교	대한민국

기술 요약 정보 (해당없음)

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

보고서 원문 (해당없음)

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 (해당없음)

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[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	Functional food evaluation method and kit	기능성 식품 평가방법 및 키트	제주대학교 산학협력단	19.01.15	10-2019-0005295	-	-	-	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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율
1	에이치피엘 (HPL, Heatmap using PICRUSt2 with LEfSe analysis)	19.10.17	제주대학교 산학협력단	2019.10.21	C-2019-029498	제주대학교 산학협력단	100%

신기술 지정 (해당없음)

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증 (해당없음)

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

표준화

○ 국내표준 (해당없음)

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준 (해당없음)

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작 (해당없음)

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전) (해당없음)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- \* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적 (해당없음)

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

사업화 현황 (해당없음)

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 1) 기술이전 또는 자기실시
- \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- \* 3) 국내 또는 국외

매출 실적(누적) (해당없음)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과 (해당없음)

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

고용 창출 (해당없음)

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

고용 효과 (해당없음)

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

비용 절감(누적) (해당없음)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과 (해당없음)

(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) (해당없음)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역 (해당없음)

(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 (해당없음)

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용 (해당없음)

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영 (해당없음)

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

전문 연구 인력 양성 (해당없음)

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	졸업	2021	2	3			4	1	3	1	1		

산업 기술 인력 양성 (해당없음)

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

다른 국가연구개발사업에의 활용 (해당없음)

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과 (해당없음)

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적 (해당없음)

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적 (해당없음)

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관



[인프라 성과]

연구시설·장비 (해당없음)

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다) (해당없음)

---



---

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다) (해당없음)

---



---

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ Gut Microbiome 기반 <i>in vitro</i> 건강기능식품평가 시스템 구축	○ 장내미생물을 기반으로 In vitro 실험방법을 이용하여 개인별 식품 기능성 평가 시스템 개발	○ 100%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

---

2) 자체 보완활동

---

---

3) 연구개발 과정의 성실성

---

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

본 연구를 통해 *In vitro* 실험방법을 이용한 장내미생물 기반 식품 기능성 평가 시스템의 가능성을 충분히 확인했다고 보여진다. 이 시스템을 보완 및 도입하여 보다 많은 n수의 데이터를 확보한다면 사람별로 가장 효율적인 기능성 식품 더 나아가, individual 식단 제공에 기여할 수 있다고 보여진다.

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	매년 목표치
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	
	국외	
	계	
특허등록	국내	
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	상품출시	
	기술이전	
	공정개발	
제품개발	시제품개발	
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		918021-4	
사업구분	포스트게놈 다부처 유전체사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	장내 마이크로바이옴 기반 식품 기능성 평가 시스템 개발			과제유형	(개발)
연구개발기관	제주대학교			연구책임자	윤노 타쯔야
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	18.07.02 ~18.12.31	38,000		38,000
	2차년도	19.01.01~12.31	75,000		75,000
	3차년도	20.01.01~12.31	72,000		72,000
	4차년도	21.01.01~12.31	72,000		72,000
	계		257,000		257,000
	참여기업				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

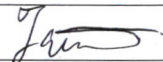
2. 평가일 : 2022년 4월 5일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
제주대학교	교수	윤노 타쯔야

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

## 1. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 보통

최근에 들어 장내미생물 개선을 위한 기능성 식품개발 연구가 활발하다. 하지만 대부분의 연구가 동물실험을 통한 장내미생물생태 변화를 분석하는 것이 대다수이며, 이를 통해 개발된 기능성 식품이 실제 인체 장내미생물에 동일한 영향을 주지 않을 가능성이 높다. 이에 본 연구는 기능성 식품의 효과를 In vitro GID-FF 시스템을 통해 간편하지만 실제 다양한 인체 장내미생물 Type에 적용할 수 있는 방법을 연구했기에 식품-장내미생물 관련 연구에 창의적이고, 적합한 방법으로 사료된다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 보통

수많은 기능식품이 개발 되어 있으나 개개인에 따라 기능성 식품의 효능 차이가 있다. 이는 개인 장내미생물 생태 차이에 따른 대사과정 차이 때문이며, 더 나아가 섭취한 기능성 식품이 인체내 유익한 산물(ex SCFA 등)의 생산으로 대사 되지 않을 수도 있다. 본 연구에서 개발한 방법을 통해 개인 맞춤형 기능식품 영향 평가가 가능하며, 이는 기능성 식품시장 활성화의 기여가 할 수 있을 것으로 예상 된다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

최근에 인공지능을 이용한 연구가 생물학분야에도 많이 적용되고 있다. 장내미생물 정보는 단연 Big Data이며 이를 분석하여 기능성 식품효과를 예측한 것이 올바른 접근법이다. 하지만 동물실험과 인체실험을 통한 연구로 DB 구축은 막대한 시간과 비용이 필요하여 지금까지 실천이 잘 이뤄지지 않고 있다. 본 연구에서 개발한 방법을 이용한다면 더 신속하고 저렴한 비용으로 데이터베이스 구축이 수행가능 할 것으로 여겨진다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 보통

COVID19에 의해 피험자 모집이나, 실험 장비 수급에 어려움을 겪었지만, 큰 이슈없이 처음 계획대로 연구 성과를 달성하며 마무리했다. 본 연구에서는 연구비 절약을 위해 NGS library 제작, NGS결과 분석, Gas chromatography 정량분석 등 보통은 외부기관에 위탁하는 과정들을 모두 자체적으로 수행하여 연구비를 최대한 효율적으로 활용하였다. 또한 3년반의 연구기간동안 박사 2명, 석사 3명을 배출하였고 microbiome 분석 전문가 양성에도 기여 하였다.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 보통

3년 반의 연구 기간 중에 SCI논문 3편, 특허출원 1건, 인력양성 5명(박2,석3), 소프트웨어저작권 1건을 도출하고, 이를 통해 성과 지표에 달성 하였다. 현재 추가로 특허 등록 1건, SCI논문 1편 투고 진행중이다. 본 연구결과 바탕으로 인공지능을 도입하는 분석방법과 이를 적용한 장내 미생물기반 개인 맞춤형 기능식품 동정 알고리즘을 개발 중에 있다. 이는 향후 기능성 식품 산업에 큰 기여를 할 것으로 사료되며, 더 나아가 기능성 식품 영향 시험으로도 이용될 가능성이 있다.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
In vitro gastrointestinal digestion (GID) 및 fecal fermentation (FF) 을 이용한 인체 소화관 모방 시스템 구축 (In vitro GID-FF)	70	100	시험관내에서 소화모방과정과 장내미생물 배양 시스템을 이용하여 Invitro GID-FF 시스템 구축
건강기능식품의 Short Chain Fatty Acids (SCFAs) 생성과정이 예측 가능한 pipeline 개발	30	100	장내미생물 및 Metabolic pathway간 상관관계를 Heatmap으로 시각화하는 파이프라인을 한국저작권협회에 등록함
합계	100	100	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구를 통해 개발된 *In vitro* 실험방법을 이용한 장내미생물 기반 식품 기능성 평가 시스템의 가능성을 충분히 증명했다고 사료된다. 기능성 식품의 중요성과 해당 산업이 급진적으로 커지는 현 시점에서, 본 연구에서 개발한 연구방법은 동물실험을 대체하며, 또 시간과 비용을 절약할 수 있는 효율적이고 창의적인 식품 평가 시스템으로 사료된다. 이 시스템을 보완 및 도입하여 보다 많은 n수의 데이터를 확보한다면 사람별로 가장 효율적인 기능성 식품을 위한 데이터베이스 구축과, 더 나아가, 개인 맞춤형 식단 제공에 기여할 수 있는 연구로 보여진다. 연구 시발점에서 계획한 대부분의 연구 성과지표를 달성하였으며, 모든 연구비를 효율적이고 정당하게 사용하며 성실하게 수행된 연구로 보여진다. 특히, COVID19에 의해 피험자 모집이나, 실험 장비 수급 등에 어려움을 겪었지만, 계획대로 순탄하게 진행되었다.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구 기간 중에 장내미생물 기반 식품 기능성 평가 시스템에 대한 SCI논문, 특허출원, 인력양성, 그리고 소프트웨어저작권을 도출하였다. 위 성과들을 바탕으로 장내미생물 기반 식품 평가 시스템을 위한 데이터베이스 구축이나, AI 인공지능을 이용한 빅데이터 분석에도 활용 될 수 있다. 또한 출원 완료후 특허 등록 과 , SCI논문 1편 또한 추가적으로 투고 예정에 있다. 이는 향후 기능성 식품 연구 및 관련 산업에 큰 기여를 할 것으로 사료되며, 더 나아가 기능성 식품 평가 시스템으로 실질적으로 이용될 가능성이 있다.

#### IV. 보안성 검토 (해당없음)

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	마이크로바이옴 기반 기능성식품 연구 tool 개발			
주관연구개발기관	제주대학교		주관연구책임자	윤노 타쓰야
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	257,000			257,000
연구개발기간	2018.07.01. ~ 2021.12.31.(42개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(    ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:    )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① Gut Microbiome 기반 <i>in vitro</i> 건강기능식품 평가 시스템 구축	장내미생물을 이용한 Metagenomics 분석 및 SCFA 생산량 정량분석 과 Invitro GID-FF를 이용하여 개인별 기능성 식품에 대한 영향 비교 평가 완료

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
1차 년도	목표			1	-	1			
	실적			1	-	1			
2차 년도	목표			2	1	9			
	실적			5	1	16			
3차 년도	목표			1	-	5			
	실적			1	-	18			
4차 년도	목표			1	-	15			
	실적			1	-	18			
계	목표			5	1	30			
	실적			8	1	53			



(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 활용등)	
	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				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	60													20		20				
최종 목표	1	1														1				
당해 년도	목표															1				
	실적															2				
달성률 (%)																200				

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Invitro Gastrointestinal Digestion (소화 모방과정)
②	Invitro Fecal fermentation (장내미생물 혐기 배양)
③	Metagenomics를 이용한 Microbiome 분석

#### 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)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					v					
②의 기술					v					
③의 기술					v					

\* 각 해당란에 v 표시

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	
②의 기술	
③의 기술	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표				5	1	30			
연구기간내 달성실적				8	1	53			
연구종료후 성과창출 계획									

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용비)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평균 I-F	학술 발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건	명	건	건	
가중치	60													20		20			
최종목표	1	1										3		2.6		3			
연구기간내 달성실적	1											3		2.5		5			
연구종료후 성과창출 계획		1																	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함) (해당없음)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화에상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화에상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.