

918022
- 04

유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발
한국 전통 발효식품 유산균을 이용한

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004040-01

한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발

2022.03.29

주관연구기관 / 매일유업(주)
협동연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 세종대학교
위탁연구기관 / 세종대학교

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발”(개발기간 : 2018.07. ~ 2021.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.03.29

주관연구기관명 : 매일유업(주) 매일유업 대표이사
 협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단
 협동연구기관명 : 세종대학교 산학협력단
 위탁연구기관명 : 세종대학교 산학협력단



주관연구책임자 : 양 진 오
 협동연구책임자 : 이 주 훈
 협동연구책임자 : 신 학 동
 위탁연구책임자 : 김 형 옥

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			포스트게놈다부처유전체사업	
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		산업화 지원 미생물 유전체 전략 연구(조기성과 창출)				
공고번호		농축 2018-174호			총괄연구개발 식별번호						
					연구개발과제번호		918022-04				
기술면류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1702	40%	2순위 LA0204	30%						
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0102	50%	2순위 PA0201	30%	3순위 CA0105	20%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단 영문									
연구개발과제명		국문 한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발 영문 Development of functional fermented milk to improve immune/cognitive ability based on fermented food derived lactic acid bacteria									
주관연구개발기관		기관명		매일유업(주)			사업자등록번호		844-81-00466		
		주소		(우)03141, 서울특별시 종로구 종로1길 50, 더케이타워 A동 2층			법인등록번호		110111-6390770		
연구책임자		성명		양 진 오			직위		연구소장		
		연락처		직장전화 전자우편			휴대전화 국가연구자번호		- -		
연구개발기간		전체		2018. 07. 02 - 2021. 12. 31(3년 6개월)							
		단기 (해당 시 작성)		1단계		2018. 07. 02 - 2019. 12. 31(1년 6개월)					
				2단계		2020. 01. 01 - 2021. 12. 31(2년 0개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계		연차별 비의 지원금	
		현금		현금		현금		현금		현금	
		1,145,000		239,380		905,620		1,384,380		905,620	
1단계		1년차		187,000		28,060		158,950		215,050	
		2년차		330,000		49,500		280,500		379,500	
2단계		1년차		314,000		80,915		233,085		394,915	
		2년차		314,000		80,915		233,085		394,915	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		서울대학교		이 주 훈		교수		-		-	
		세종대학교		신 학 동		교수		-		-	
		위탁연구개발기관		세종대학교		김 형 옥		교수		-	
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자		성명		윤 정 후		직위		차장		비고	
		연락처		직장전화 전자우편		휴대전화 국가연구자번호		-		-	

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

2022년 3월 29일

연구책임자: 양 진 오

주관연구개발기관의 장: 매일유업 대표이사 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 세종대학교 산학협력단장 (직인)
 위탁연구개발기관의 장: 세종대학교 산학협력단장 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



최종보고서										보안등급		
										일반[√], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			포스트게놈다부처유전체사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원					내역사업명 (해당 시 작성)		산업화 지원 미생물 유전체 전략 연구(조기성과 창출)			
공고번호		농축 2018-174호			총괄연구개발 식별번호		연구개발과제번호			918022-04		
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1702	40%	2순위 LA0204		30%						
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0102	50%	2순위 PA0201		30%	3순위 CA0105		20%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단									
연구개발과제명		국문	한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발									
		영문	Development of functional fermented milk to improve immune/cognitive ability based on fermented food derived lactic acid bacteria									
주관연구개발기관		기관명	매일유업(주)			사업자등록번호		844-81-00466				
		주소	(우)03141, 서울특별시 종로구 종로1길 50, 더케이트윈타워 A동 2층			법인등록번호		110111-6390770				
연구책임자		성명	양 진 오			직위		연구소장				
		연락처	직장전화	-		휴대전화		-				
연구개발기간		전체	2018. 07. 02 - 2021. 12. 31(3년 6개월)									
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 07. 02 - 2019. 12. 31(1년 6개월)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비외 지원금	
		현금	현금	현물	지방자치단체	기타()	현금	현물	현금	현물	현금	현물
총계		1,145,000	239,380	905,620					1,384,380	905,620	2,290,000	
1단계		1년차	187,000	28,050	158,950				215,050	158,950	374,000	
		2년차	330,000	49,500	280,500				379,500	280,500	660,000	
2단계		1년차	314,000	80,915	233,085				394,915	233,085	628,000	
		2년차	314,000	80,915	233,085				394,915	233,085	628,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
공동연구개발기관		서울대학교	이 주 훈	교수	-	-	역할		기관유형			
		세종대학교	신 학 동	교수	-	-						
위탁연구개발기관		세종대학교	김 형 옥	교수	-	-						
연구개발기관 외 기관												
연구개발담당자 실무담당자		성명	윤 청 후			직위		차장				
		연락처	직장전화	-		휴대전화		-				
		전자우편	-		국가연구자번호		-					

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

2022년 3월 29일

연구책임자: 양 진 오 (인)

주관연구개발기관의 장: 매일유업 대표이사 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 세종대학교 산학협력단장 (직인)
 위탁연구개발기관의 장: 세종대학교 산학협력단장 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		포스트게놈다부처유전체사업				총괄연구개발 식별번호		
내역사업명		산업화 지원 미생물 유전체 전략 연구(조기성과 창출)				연구개발과제번호		918022-04
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1702	40%	2순위 LA0204	30%		%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA0102	50%	2순위 PA0201	30%	3순위 CA0105	20%	
총괄연구개발명		농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단						
연구개발과제명		한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발						
전체 연구개발기간		2018.07.02 - 2021.12.31 (총 42개월)						
총 연구개발비		총 2,290,000 천원 (정부지원연구개발비: 1,145,000 천원, 기관부담연구개발비 : 1,145,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>]		기술성숙도		착수시점 기준()		
		기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		(해당 시 기재)		종료시점 목표()		
연구개발과제 유형								
연구개발과제 특성								
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		○ NGS 기반 유전체 기법을 활용한 국내 전통발효식품 유래 기능성 미생물 발굴, 기능성/효능 검증 및 고부가가치 기능성 제품 개발/출시				
		전체 내용		○ 국내 전통발효식품 유래 미생물 활용 프로바이오틱 효능 및 상업적 이용 가능성 검증 ○ 한국형 장내균총 모사시스템 활용 <i>in vitro</i> 스크리닝 기반 한국인 장내환경 개선 효능의 미생물 균주 탐색 ○ 선별 균주의 전장유전체 정보 기반 유전체/대사체 분석을 통해 고기능성(면역, 인지기능) 상관성 연구 및 안전성 평가 ○ 동물모델 기반의 선별 균주의 면역, 인지기능 개선 효능 검증 및 마이크로바이옴 분석을 통한 유익 효능과 장내균총 상관성 분석 ○ 고기능성 미생물 균주를 적용한 기능성 제품 개발 및 출시				
		1단계	목표	○ 면역 기능성 미생물 균주 획득, 제품적용 및 상업화				
			내용	○ 국내 전통발효식품 유래 미생물 활용 프로바이오틱 효능 및 상업적 이용 가능성 검증 - 전통발효식품 유래 미생물의 프로바이오틱능, <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> (대장염 마우스 모델)에서 면역 조절 능력 평가 - 선별 미생물 전장유전체 분석 기반 기능성 예측/안전성 평가 - 선별 미생물 대량생산 공정 구축, 상업적 이용 가능성 검증 ○ 한국형 장내균총 모사시스템 구축 - 한국형 enterotype에서 선별 미생물 생존 확인을 통한 장내환경 개선 가능성 검증 ○ 선별 미생물의 발효유 제품 적용을 통한 조기성과창출 진행				
2단계	목표	○ 인지기능개선 미생물 균주 획득 및 상업화						
	내용	○ <i>in vivo</i> (만성 스트레스 마우스 모델)에서 선별 미생물의 인지기능개선(스트레스 완화) 능력 평가 - 만성 스트레스 마우스 모델의 선별 미생물 섭취에 따른 행동 실험 관찰을 통한 유용 기능성 검증 - 마이크로바이옴 기반 미생물 섭취에 따른 동물모델 내 장내 환경 변화/기능성 변화 확인 ○ 인체적용시험을 통한 선별 미생물의 인지기능개선(스트레스 완화) 능력 평가 - 스트레스성 질환을 진단 받은 환자(피시험자)의 선별 미생물 섭취에 따른 스트레스 완화 유용 기능성 검증 - 피시험자 마이크로바이옴 분석을 통한 스트레스 완화와 장내미생물 변화 사이 상관성 규명						

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생명정보자원 <ul style="list-style-type: none"> - Complete Genome Sequencing을 통한 국내 전통발효식품 유래 미생물 균주 유전체 정보 해독 10건(<i>Lactobacillus plantarum</i> 5종, <i>Lactobacillus curvatus</i> 2종, <i>Lactococcus lactis</i> 2종, <i>Bifidobacterium bifidum</i> 1종) - 유용 미생물 자원 확보 2건 (<i>Lactobacillus plantarum</i> 1종, <i>Bifidobacterium bifidum</i> 1종/인체적용시험 완료/KCTC 기탁 완료) - 메타유전체 분석을 통한 생명정보자원 656개 확보 (iGEM생명정보등록) ○ 사업화/상업화 <ul style="list-style-type: none"> - 특허 유산균 <i>Lactobacillus plantarum</i> 1종의 발효유 제품 3종 적용을 통한 조기성과창출 (2020/2021년 매출합 129 억원) - 스트레스 완화 프로바이오틱스(가제) 시제품 제작 1건 ○ 기술실시(이전) <ul style="list-style-type: none"> - 통상실시권 1건 (2020/2021년, 정액기술료 5,500,000원 / 경상기술료 1,187,312원) ○ 학술성과 <ul style="list-style-type: none"> - 학술등재지 연구결과 발표 2건(SCI급, 평균 IF=3.11) - 국내/외 학술대회 연구결과 발표 28건(연사발표 9건, 포스터발표 19건) ○ 지적재산권 <ul style="list-style-type: none"> - 특허 출원 2건 (2019년, 2021년 각 1건) ○ 인력양성 <ul style="list-style-type: none"> - 전문연구인력 양성 10명 (박사급 1명, 석사급 9명)
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전체 및 마이크로바이옴 기법을 활용하여 검증된 국내 전통발효식품 유래 유용 미생물 자원을 활용한 면역/인지기능 개선 발효유 개발을 통해 신규 기능성 발효유 시장 창출 ○ 한국형 장내균총 모사시스템을 활용한 식품 기능성 소재/약리 활성물질 탐색/효능 검증 및 한국인 장내환경 맞춤형 기능성 제품 개발 ○ 국내 전통발효식품 유래 미생물에 대한 응용기술과 식품 제조 기술의 융합을 통해 국내 식품소재, 질환 개선 식품 산업 선도 ○ 과학적으로 검증된 기능성 제품군 출시로 질병 예방, 의료비용 절감 등 국민 건강 복지 증진 기여 및 제품군의 소비자 신뢰도 제고
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	2	2							2			
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)	전통발효식품		유전체		마이크로바이옴		장내균총 모사시스템		고기능성			
영문핵심어 (5개 이내)	Traditional fermented food		Genomics		Microbiome		Simulated Intestinal microbiota system		Functional food			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용	5
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	12
4. 목표 미달 시 원인분석	61
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	62
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	62
7. 별첨 자료	65

1. 연구개발과제의 개요

- 국내 전통발효식품 유래 미생물 균주의 프로바이오틱 효능 및 상업적 이용 가능성 검증
- 한국형 장내균총 모사시스템 활용 *in vitro* 스크리닝 기반 한국인 장내환경 개선 효능을 지닌 미생물 균주 탐색
- 선별 균주의 전장유전체 정보 기반 유전체/대사체 분석을 통해 고기능성(면역, 인지기능) 상관성 연구 및 안전성 평가
- 동물모델 기반 선별 균주의 면역, 인지기능 개선 효능 검증 및 마이크로바이옴 분석을 통한 유익 효능과 장내균총 상관성 분석
- 고기능성 미생물 균주를 적용한 고부가가치 기능성 제품 개발 및 출시



그림 1. 연구개발과제 개요도

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1. 한국 전통발효식품(메주, 김치, 젓갈 등)에서 분리된 미생물 균주의 프로바이오틱스 특성 평가

- 기능성 미생물은 인체 위장관을 통과하여 장에 도달한 다음 기능성을 나타내기 때문에 위산, 담즙산에 대한 내성이 가장 중요함. 이에 기존 논문에 보고된 인공 위산, 담즙산을 조성하여 실험에 사용함
- 후보균 및 대조균을 37°C에서 3시간 동안 위산 처리한 후, PBS 용액을 활용하여 세척과정을 거치고 37°C에서 3시간 동안 담즙산을 처리함. 위산, 담즙산을 처리하지 않은 후보균 및 대조균을 37°C에서 6시간 배양 후, 처리한 균주들과 흡광도 측정 결과 비교를 통해 산, 담즙산 내성을 평가함(그림 2)



그림 2. 발효식품 미생물의 산, 담즙산 내성 평가

- 식품은 가공과정에서 산소에 노출 될 수 있으며 미생물을 적용한 식품 개발에서 가공특성 확장을 위해서는 선발된 균주가 산소 내성을 보유하여야 함. 따라서, 고체상, 액상 배지를 활용하여 후보균 및 대조균의 산소 내성을 평가함(그림 3)

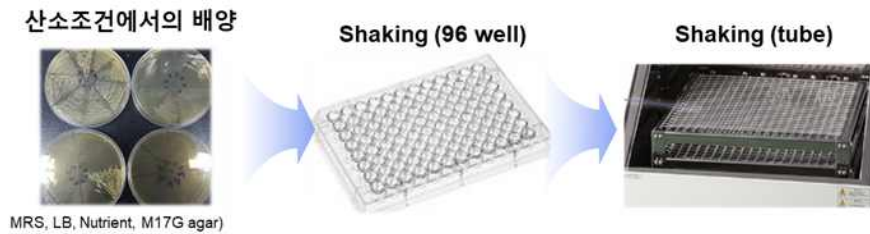


그림 3. 발효식품 미생물의 산소 내성 평가

- 장에 도달한 균주가 기능성을 발휘하기 위해서는 장내 환경에 적응하고 정착하는 것이 중요함. 본 연구에서는 장내상피세포 표면에 존재하는 점액물질인 mucin을 활용하여 장내 정착능을 평가함(그림 4)
- 96 well plate에 mucin을 주입한 다음 4°C에서 12시간 이상 배양 후, 후보균 또는 대조균을 주입하고 37°C에서 3시간 배양함. 이후 이들을 회수하여 생균수 측정을 통해 장내 정착능을 평가함

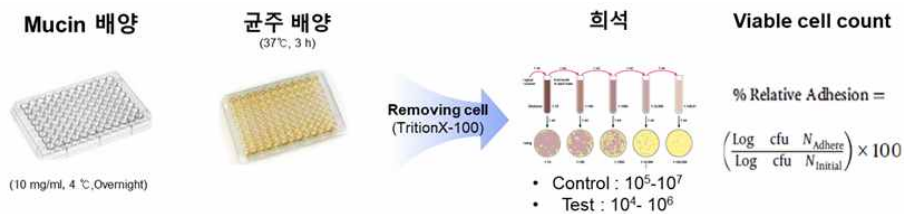


그림 4. 발효식품 미생물의 장내 정착능 평가

- 이외에도 고기능성 연구의 기반이 될 수 있는 콜레스테롤 제거, 항산화능력 평가를 함께 진행하여 기능성 후보 미생물 선별에 활용함

2. 한국 전통발효식품 유래 미생물의 *in vitro* 면역반응 평가

- RAW 264.7 cell에 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 다음 각 균을 1.0×10^8 CFU/ml 농도로 접종하고 37°C에서 24시간 배양함 (5% CO₂). 후보균 또는 대조균과 반응 후 배양 상층액을 활용하여 면역반응 물질은 nitric oxide, cytokine 을 분석함(그림 5)

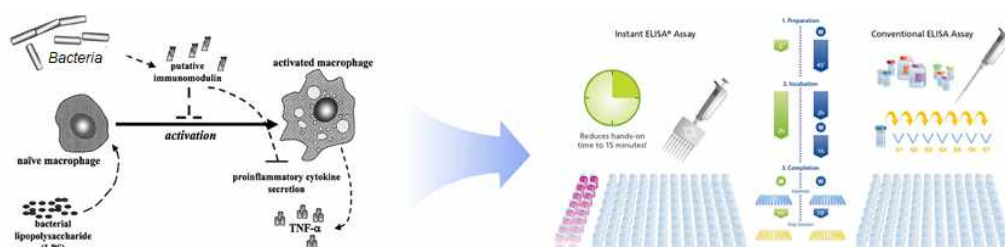


그림 5. 발효식품 미생물에 의해 생성되는 nitric oxide, cytokine 측정

3. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 전장 유전체 분석 및 안전성 평가

- 기능성 후보 미생물의 유전체 구조 분석 결과를 활용한 기능성 예측, 독성 유전자 확인을 통한 균주 안전성 평가를 위하여, 기능성 후보 미생물의 전장 유전체 분석을 진행함(그림 6)

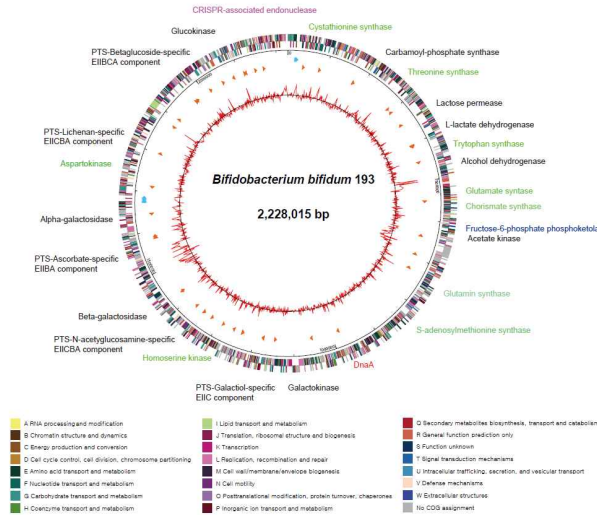


그림 6. *Bifidobacterium bifidum* 193의 전장 유전체 분석 예시

4. 한국형 장내균총 모사시스템 구축 및 최적화

- 건강한 성인 한국인 분변 샘플 및 추후 장내균총 모사시스템을 기반으로 확보할 균주에 대하여 균총 연구법 표준화 컨소시움인 Earth Microbiome Project (EMP)의 표준화 프로토콜을 기반으로, PowerSoil DNA isolation kit를 활용한 추출/정제법 확정 및 MiSeq platform을 활용한 최적 16S rRNA gene 기반 균총 메타지놈 데이터를 확보, 분석할 수 있는 파이프라인을 구축함(그림 7)

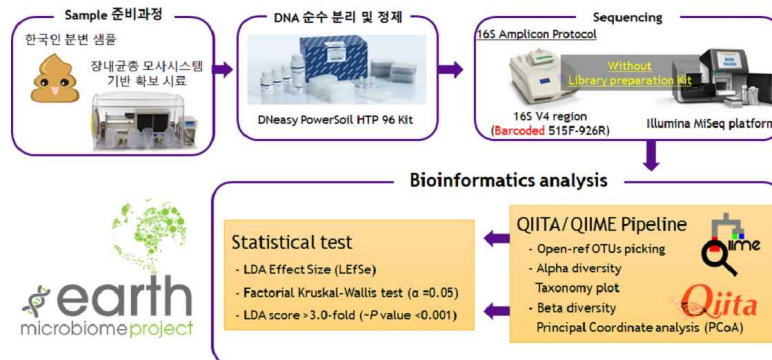


그림 7. 균총연구법 표준화 컨소시움 기반 및 분석 파이프라인

- 최적 DNA 추출을 위하여 chemical lysis 및 bead 기반 lysis가 함께 적용된 kit을 활용하였고, barcode를 연결한 primer 활용의 PCR를 통하여 최적 프로토콜을 구축함. Bioinformatic 분석에는 QIIME 및 QIITA 프로그램을 기반으로 LEfSe, PERMANOVA, non-parametric t-test 등을 기반한 통계학적 검증을 통해 한국형 장내균총 모사시스템 구축을 진행함(그림 8)

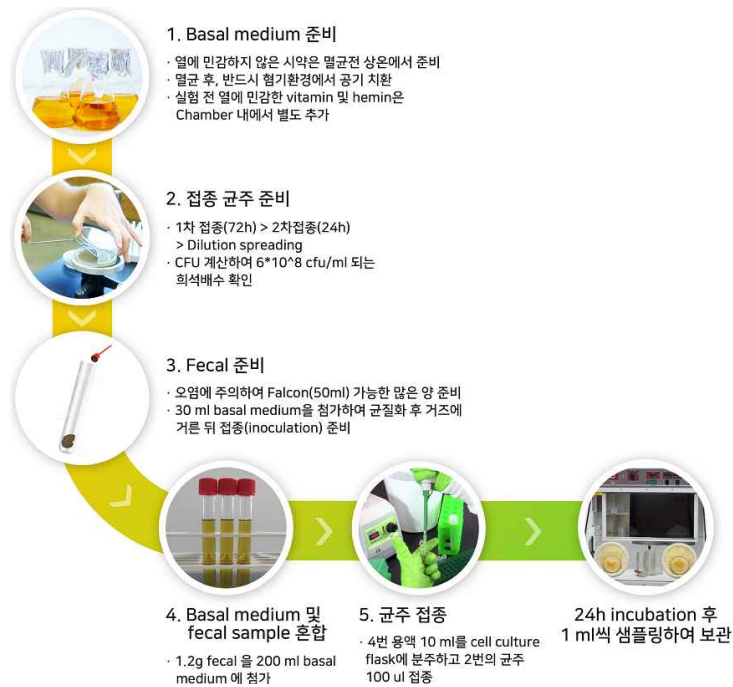


그림 8. 한국형 장내균총 모사시스템 최적화를 위한 실험 진행도

5. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 대량생산 공정 구축

- 식품 산업용 균주 생산법 확립에 관련하여 검증된 고농도 배양기술(10^{10} CFU/g 이상), 고농도 배양 배지/생육 조건 최적화 및 최적 배양방법에 대한 대량생산 검토를 통해 기능성 후보 미생물의 균수가 $10^{10} \sim 10^{11}$ CFU/g으로 유지될 수 있는 제조공정 구축함(그림 9)

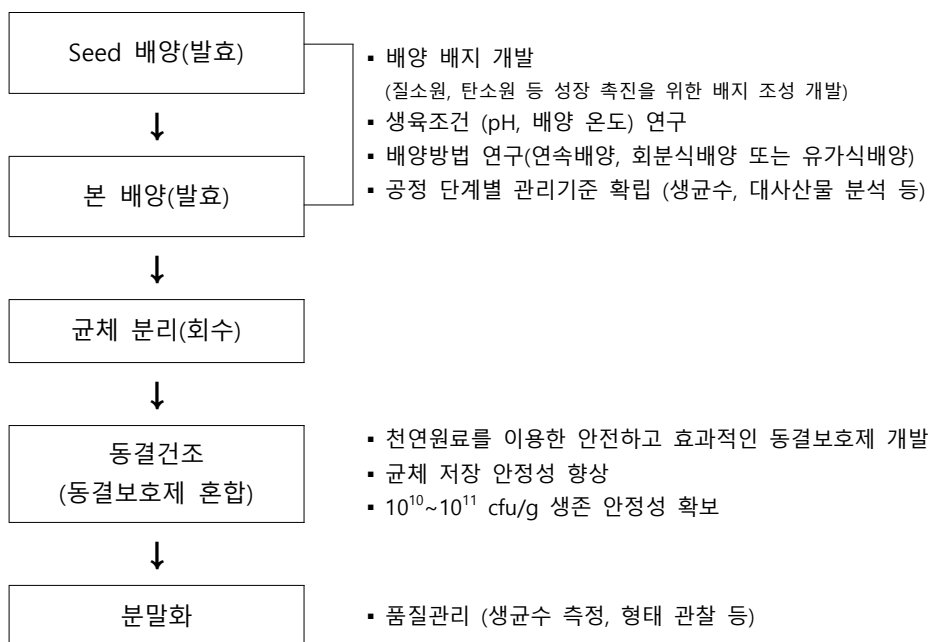


그림 9. 미생물 대량생산 공정 모식도

6. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물을 적용한 발효유 출시/판매
- 선별된 균주를 적용한 기능성 발효유의 최적 생산공정 조건을 확립하고, 생산된 제품의 품질관리를 위한 표준화 규격 설정을 진행함. 아울러 생산된 발효유 제품 내 생균수와 이화학적 보존검사 기반의 제품 품질 평가를 진행함(그림 10)

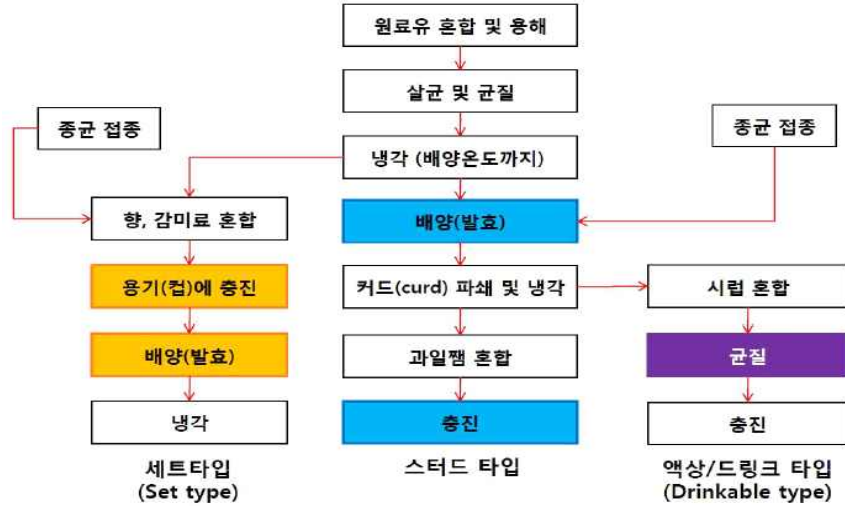


그림 10. 발효유 제품 type별 제조공정 구축 모식도

7. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 *in vivo* 면역활성 평가 및 장내환경 개선 효능 검증

- DSS (dextran sulfate sodium) 활용 대장염을 유도한 마우스 모델을 기반으로 기능성 후보 미생물 섭취에 의한 대장염 증상, 염증성 & 항염증성 cytokine, 장내균총 변화 등을 분석하여 기능성 후보 미생물의 면역활성과 장내환경 개선 효능을 검증하고자 함(그림 11)

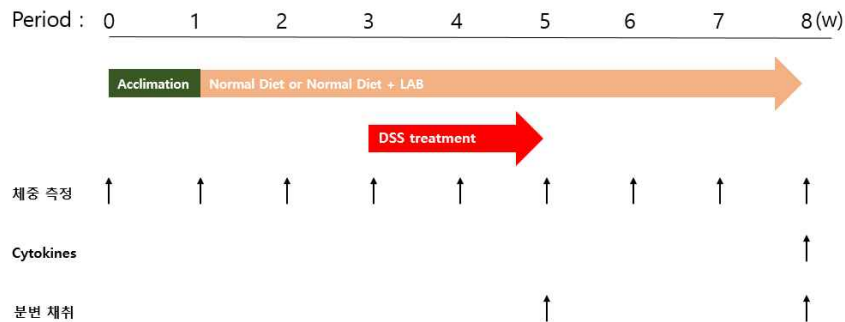


그림 11. 기능성 후보 미생물 활용 *in vivo* 면역활성 실험 계획표

- 보다 면밀한 메타지놈 분석을 위하여 QIIME2 및 DADA2 workflow 도입을 진행함. 이는 염기서열 sequencing 오류가 분석 결과에 미치는 영향을 최소화함으로써 기능성 후보 미생물이 장내균총에 미치는 영향에 대한 면밀한 분석을 진행함(그림 12)

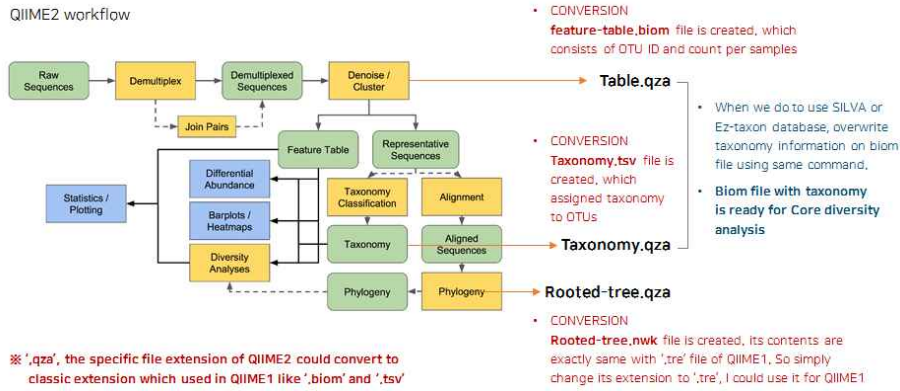


그림 12. QIIME2 및 DADA2 workflow 분석 흐름도

8. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 *in vivo* 인지기능개선(스트레스 완화) 효능 평가 및 장내환경 개선 효능 검증
- 불규칙적인 만성 스트레스를 부여한 마우스 모델을 기반으로 기능성 후보 미생물 섭취에 의한 인지기능(우울/불안, 기억/학습)과 관련된 행동능력 변화를 관찰하여, 기능성 후보 미생물의 유익 효능을 검증하고자 함(그림 13)

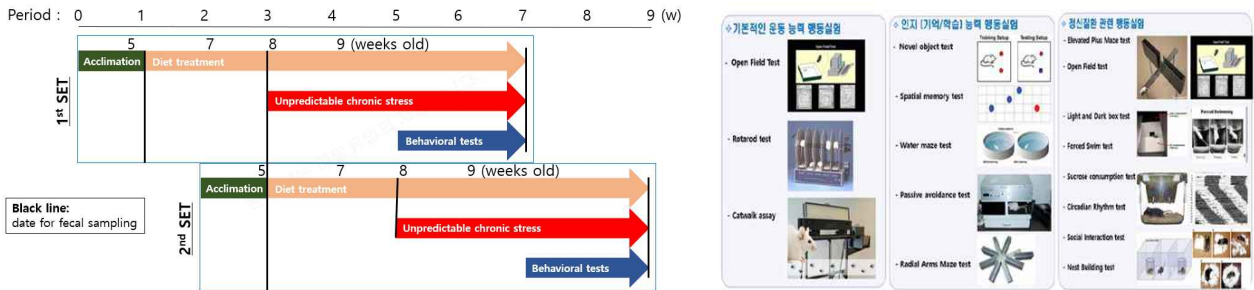


그림 13. 기능성 후보 미생물 활용 *in vivo* 인지기능개선(스트레스 완화) 실험 계획표 및 행동실험 종류

- 기능성 후보 미생물 섭취가 장내환경 개선에 미치는 영향을 분석하기 위하여, EPM 표준화 프로토콜 기반으로 마우스 분변 메타지놈 분석을 진행함. 획득한 sequencing data는 기 구축한 QIIME2 및 DADA2 workflow를 수행하여 장내균총 분석을 진행함(그림 14)

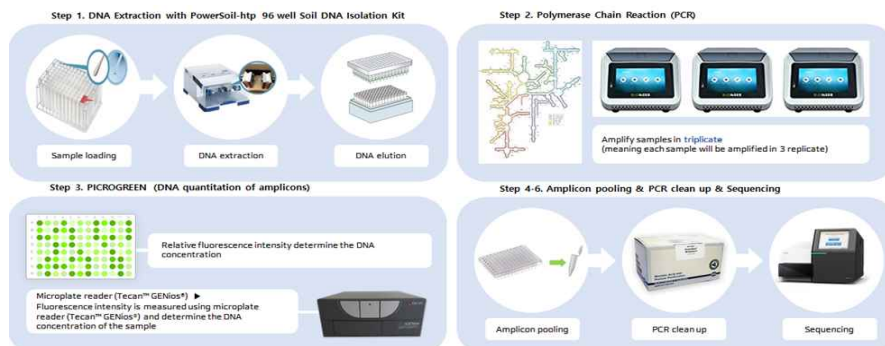


그림 14. EPM 프로토콜 기반 분변 균총 분석법

9. 인지기능개선(스트레스 완화) 인체적용시험을 통한 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 유용 효능 검증

- 외래 방문을 통해 스트레스성 질환(만성 두통, 불면증, 만성 피로, 과민성 대장염 등)을 진단 받은 환자를 대상으로 피시험자를 모집하였으며, 기능성 후보 미생물 2종(*B. bifidum* 193, *L. plantarum* 182) 복용 전/후 인지기능개선(스트레스 완화) 유용성 검증을 진행함(그림 15)
- 섭취 시료는 분말 형태로 제작하였으며, 대조군(placebo)과 실험군(기능성 후보 미생물)의 시료는 기능성 후보 미생물 제외하고는 동일한 원료로 구성하였음
- 인지기능개선(스트레스 완화) 유용성은 우울/스트레스 척도, 혈액검사, 마이크로바이옴 분석을 기반으로 평가하였으며, 평가 결과를 바탕으로 스트레스 완화와 마이크로바이옴 변화 사이의 상관성 분석을 함께 진행함



그림 15. 인지기능개선(스트레스 완화) 인체적용시험 계획표

10. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 인지기능개선(알츠하이머) 효능 평가 및 장내 환경 개선 검증

- 사전연구인 인지기능개선(스트레스 완화) 동물실험 결과를 바탕으로, 후보 미생물의 퇴행성 뇌질환 증상 완화 효능 검증을 위하여 알츠하이머 마우스 모델 (5XFAD mice)을 구축함
- 아울러 <그림 16>에 나타난 일정과 방법으로 인지기능 측정 행동실험을 수행하였고, 알츠하이머 증상 및 분변샘플을 활용한 마이크로바이옴 분석(QIIME2 및 DADA2 workflow 기반)을 진행하여 장내환경 개선 효능 검증을 진행하고자 함

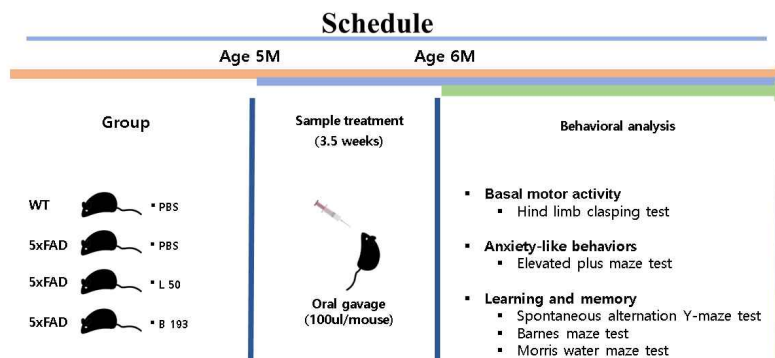


그림 16. 알츠하이머 마우스 모델 활용 인지기능개선(알츠하이머) 행동실험 계획표(Blue vertical line; 분변 수집 시점)

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

1. 한국 전통발효식품에서 분리된 미생물 균주의 프로바이오틱스 특성 평가

- 선행연구를 통해 확보한 1,589개 미생물을 식약처 고시형 또는 국내/외 프로바이오틱스 제품으로 판매되고 있는 strain과 동일한 미생물 20개를 1차적으로 선별하여, 현재 시판 중인 프로바이오틱스 균주와 프로바이오틱스 특성 비교 분석을 진행함(그림 17)

균주	Gastric acid & Bile acid (%)	Mucin adhesion (%)	Heat shock test (ABS)	콜레스테롤 제거율 (%)	DPPH %inhibiton (%)	Total Glutathione (ug)
1 <i>L. plantarum</i> 조개117	91.15±1.07 ^{bc}	89.35±0.48 ^a	0.873	65.91±2.19 ^h	59.43±3.04 ^{ab}	1.52±1.32 ^{de}
2 <i>L. plantarum</i> 조개120	91.1±0.63 ^{bc}	86.64±1.56 ^{bcd}	0.943	66.76±2.30 ^{gh}	65.35±1.55^a	0 ^e
3 <i>L. plantarum</i> 조개182	89.22±10.58 ^c	87.52±1.13 ^{bc}	1.07	35.16±2.12 ⁱ	61.25±3.06^{ab}	0 ^e
4 <i>L. plantarum</i> 백김치37	98.12±0.58 ^a	88.37±2 ^{ab}	1.051	38.62±3.84 ^{kl}	23.95±0.93 ^{fg}	3.33±3.00 ^{bcd}
5 <i>L. plantarum</i> 백김치50	93.88±0.54 ^{abc}	88.47±1.89 ^{ab}	1.061	34.34±1.45 ^j	26.84±2.7 ^{ef}	5.09±0.81^{ab}
6 <i>L. plantarum</i> HD-2	53.76±1.83 ^e	80.82±1.90 ^{gh}	0.09	58.60±1.99 ^f	39.76±4.95 ^c	0 ^e
7 <i>L. brevis</i> 백김치20	94.46±3.74 ^{abc}	83.91±1.04 ^{def}	0.51	76.98±2.76^{cd}	30.57±1 ^{def}	4.27±0.27 ^{abc}
8 <i>L. brevis</i> 백김치132	89.78±0.41 ^{bc}	78.36±0.99 ^{gh}	0.811	77.55±2.17^c	33.19±1.28 ^{cde}	5.45±0.09^{ab}
9 <i>L. brevis</i> HD-1	38.09±1.04 ^g	80.18±1.53 ^{gh}	0.829	51.69±6.09 ^d	56.68±7.24 ^b	0 ^e
10 <i>Lc. lactis</i> 새우137	-	81.04±2.19 ^{gh}	0.735	83.68±0.50 ^b	23.99±1.16 ^{fg}	0 ^e
11 <i>Lc. lactis</i> 새우140	75.28±0.08 ^d	83.59±1.96 ^{def}	0.626	73.16±1.65 ^{def}	24.49±4.40 ^{fg}	4.82±0.27 ^{ab}
12 <i>Lc. lactis</i> 새우160	41.24±2.77 ^f	73.33±2.61 ^f	0.788	89.44±0.29 ^a	24.34±11.92 ^{fg}	4.73±0.16 ^{abc}
13 <i>Lc. lactis</i> 새우166	22.02±1.82 ^f	85.69±1.3 ^{bcd}	0.706	72.94±2.54 ^{def}	25.24±1.93 ^{ef}	4.39±0.78 ^{abc}
14 <i>Lc. lactis</i> 새우167	43.63±0.51 ^f	87.4±1.26 ^{abc}	0.71	74.58±1.20 ^{def}	39.64±4.03 ^c	6.27±1.40 ^a
15 <i>Lc. lactis</i> 새우186	42.49±0.72 ^f	85.15±2.31 ^{de}	0.862	72.30±1.06 ^{def}	32.28±3.75 ^{cdef}	3.67±1.73 ^{bcd}
16 <i>Lc. lactis</i> 새우189	32.31±2.82 ^h	82.69±1.92 ^{efg}	0.886	69.32±1.14 ^{gh}	36.74±5.27 ^{cd}	0 ^e
17 <i>Lc. lactis</i> 새우192	31.58±3.25 ^h	83.74±2.1 ^{def}	0.394	71.49±1.52 ^{efg}	16.3±4.49 ^g	1.82±1.97 ^{de}
18 <i>Lc. lactis</i> 깻두기211	57.35±1.84 ^e	75.81±0.28 ^l	0.864	50.08±4.65 ⁱ	65.42±2.54 ^a	0 ^e
19 <i>B. bifidum</i> 배추김치193	43.66±0.28 ^f	-	0.16	89.10±2.70^a	61.02±2.15^{ab}	3.79±3.37 ^{bcd}
20 <i>B. bifidum</i> 배추김치204	52.61±3.25 ^e	84.03±2.7 ^{def}	0.66	75.51±2.79 ^{de}	63.9±1.86 ^{ab}	2.33±1.98 ^{cde}
21 <i>B. animalis</i> BB12	95.8±5.88 ^{ab}	95.8±5.88 ^{ab}	0.819	41.19±5.28 ^k	33.79±8.95 ^{cde}	4.67±0.66 ^{abc}
22 <i>L. rhamnosus</i> GG	89.11±0.92 ^c	88.84±1.55 ^{ab}	1.021	34.90±3.06 ^j	27.94±2.36 ^{ef}	0.67±0.88 ^e
23 <i>L. sakei</i> probio65	33.89±4.92 ^{gh}	89.45±1.13 ^a	0.811	89.97±0.89 ^a	32.46±4.64 ^{cdef}	4.85±0.14 ^{ab}

그림 17. 전통발효식품 유래 미생물 균주의 프로바이오틱스 특성 평가

2. 한국 전통발효식품 유래 미생물의 in vitro 면역반응 평가

- LPS (lipopolysaccharide)로 염증을 유도한 RAW 264.7 cell을 활용하여 기능성 후보 미생물의 염증 완화 능력을 in vitro 상에서 평가하였으며, 전염증성 cytokine에 속하는 TNF-α, IL-6, 항염증성 cytokine에 속하는 IL-10과 염증 지표인 NO (nitric oxide)를 측정함(그림 18)

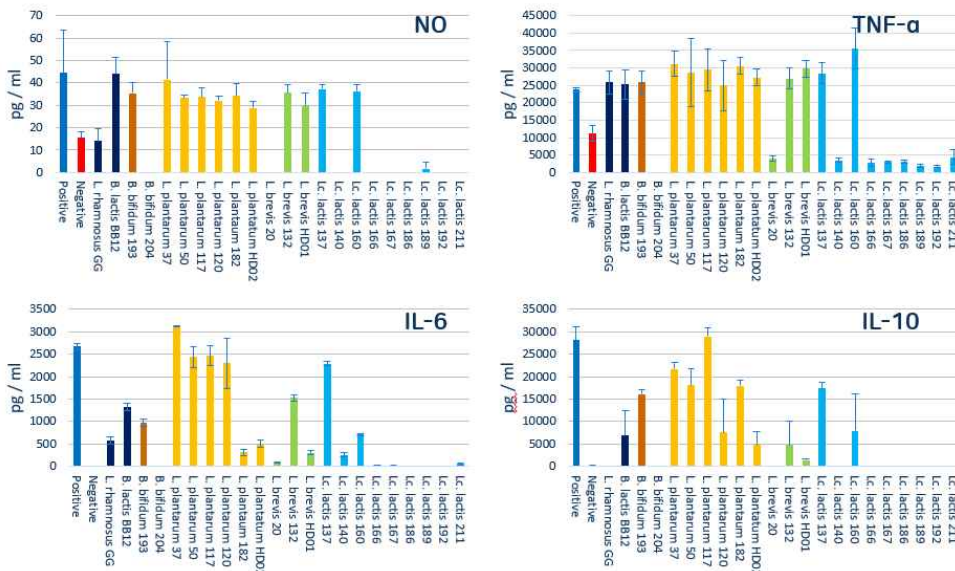


그림 18. in vitro 실험에서 면역반응 측정 결과

3. 한국형 장내균총 모사시스템 구축 및 최적화

- Basal medium과 기 확보된 한국인 분변 샘플을 이용하여 혐기 조건하에서 배양조건 최적화를 진행함. 그 후, sequencing data를 이용하여 QIIME를 활용한 Open-reference OTU picking을 수행한 균총 분석 결과를 바탕으로 한국형 enterotype를 결정함. 그 다음, 배양 전/후 균총 다양성 차이 확인을 통해 배양 후에도 enterotype 그룹에 따라 샘플이 모여 있는 양상을 확인함으로써 한국형 장내균총 모사시스템을 구축함(그림 19)

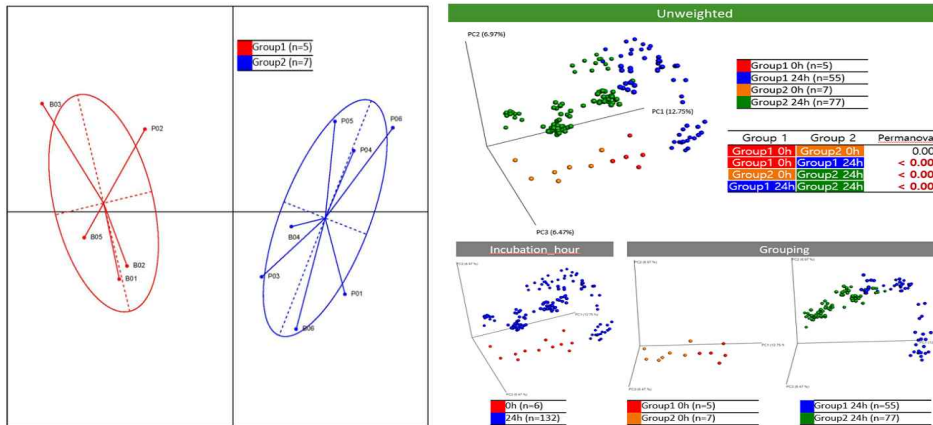


그림 19. 한국인 장내균총 enterotyping 결과(좌) 및 배양 전/후 균총 다양성 결과(우)

- 기능성 후보 미생물의 한국형 enterotype에 대한 적응성을 관찰하기 위하여, 한국형 장내모사시스템에 기능성 후보 미생물을 접종한 후, 24시간 배양된 샘플에 대하여 초기 미생물 양 대비 배양 후 남은 미생물의 비를 계산함. 그룹1에서는 기능성 후보 미생물 *L. plantarum* 37, 50, 182가 LGG 대비 안정적인 유지비율을 보였으며, 그룹2에서는 *L. plantarum* HD02, 37이 안정적인 유지비율을 보여줌(그림 20)

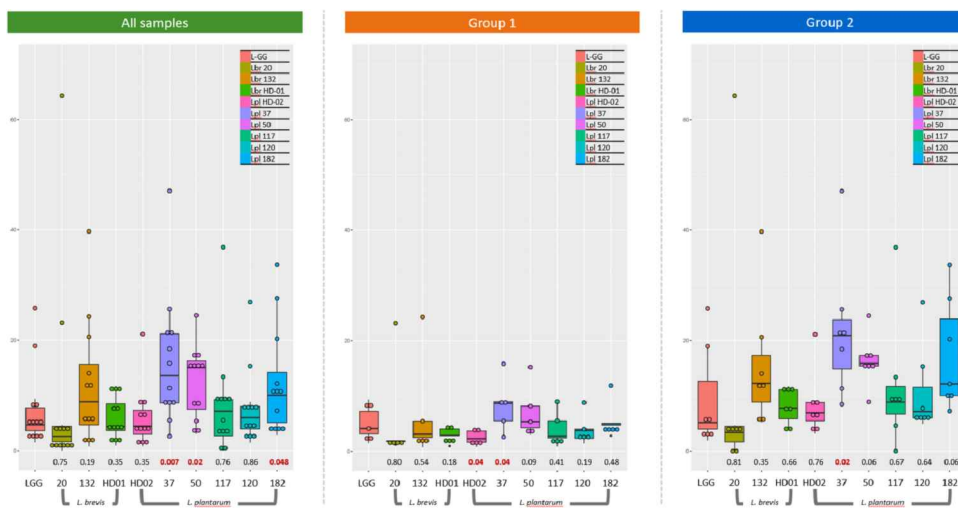


그림 20. LGG 및 기능성 후보 미생물의 피험자 enterotype 별 균총 내 유지비율 확인

4. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 대량생산 공정 구축

- 기능성 후보 미생물의 안정적인 고농도 배양기술 개발을 위하여 배양배지, 배양조건, 배양방법, 동결건조 방법 최적화 등 대량생산 공정에 들어가는 방법에 대한 연구를 진행하였으며, *Lactobacillus* spp.는 1.0×10^{11} CFU/g 이상, *Bifidobacterium* spp.는 1.0×10^9 CFU/g 생산 수준을 달성함(그림 21)

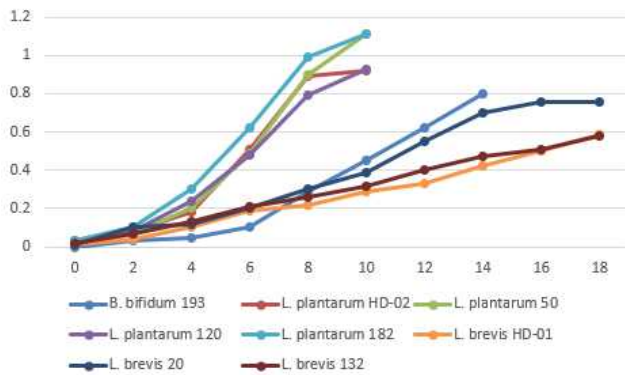


그림 21. 미생물 배양시간에 따른 흡광도(좌) 및 대량생산 공정으로 생산된 미생물 분말(우)

5. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 *in vivo* 면역활성 평가 및 장내환경 개선 효능 검증

- 장 면역체계에 영향을 주는 미생물들은 장에 존재하는 M cell을 통해 Peyer's patch에 도달하고 dendritic cell, macrophage와 같은 antigen-presenting cell에 인식되며, Th₁, Th₂, T_{reg}의 반응 방향을 결정하여 획득면역을 조절함
- 일반적인 병원균의 경우 장내에서 dendritic cell이 인식 후 전염증성 cytokine을 분비하도록 하지만, 프로바이오틱스의 경우 strain별로 차이는 있지만 항염증성 cytokine을 분비를 유도하여 장내 면역 조절에 영향을 주는 것으로 보고됨(그림 22)

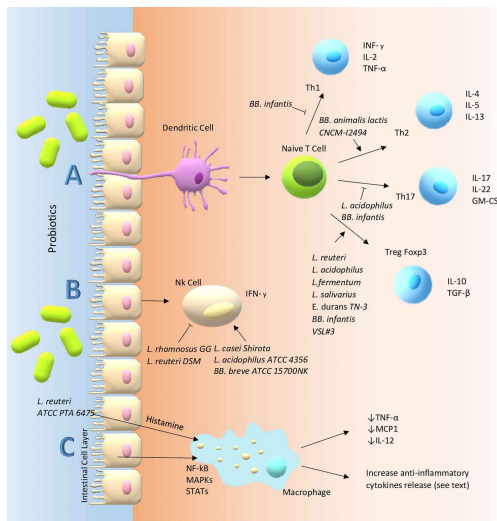


그림 22. 프로바이오틱스의 장내에서 면역 조절 기작 모식도(Fernanda Cristofori et al., 2021, *Frontiers in Immunology*)

- DSS 2%를 3주 동안 5일 간격으로 간헐적 처리를 통해 만성 대장염을 유발한 마우스 모델에 기능성 후보 미생물 균주는 1.0×10^9 CFU/kg/day로 8주간 경구투여를 진행한 다음, 마우스 체중/장 길이, 장 조직 내 cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17), 분변 마이크로바이옴 분석을 수행함
- DSS를 처리한 경우 마우스 체중이 감소하는 경향을 확인하였고, *L. plantarum* 37을 제외한 나머지 기능성 후보 미생물에서 체중 회복을 나타내었으며, *L. plantarum* 182와 *B. bifidum* 193 그룹의 체중 감소가 가장 적었음(그림 23)

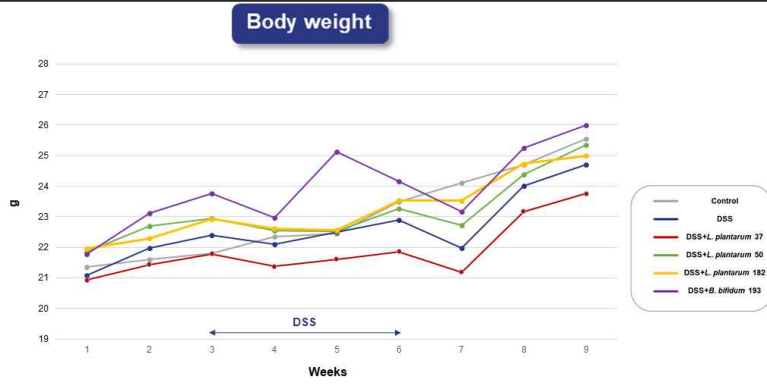


그림 23. 마우스 체중 측정 결과

- 대장염이 유도되면 마우스 대장 길이가 짧아지는 현상이 나타나는데, *L. plantarum* 182 와 *B. bifidum* 193 그룹의 대장 길이가 일부 회복되는 현상을 확인하였음(그림 24)

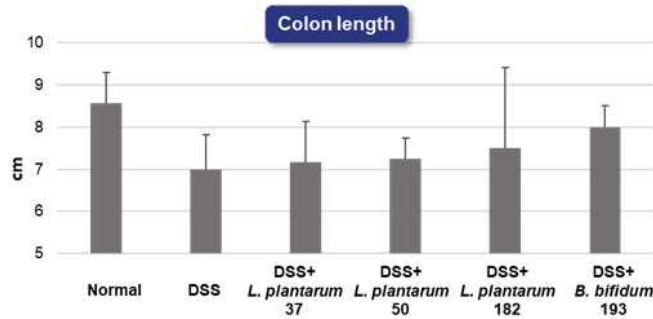


그림 24. 마우스 대장 길이 측정 결과

- TNF- α 는 전염증성 cytokine으로 급성 염증반응의 주요 인자로, 적절한 양이 존재하면 국소적 염증 반응으로 항원을 제거함. TNF- α 는 모든 그룹에서 유의한 차이를 나타내지 않았음(그림 25)

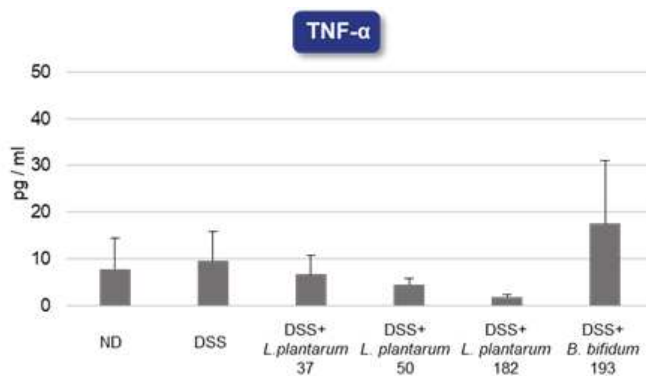


그림 25. 마우스 대장조직의 TNF- α 측정 결과

- IL-1 β 는 전염증성 cytokine으로 급성 염증반응과 T_H2세포 증식에 관여함. DSS 처리는 IL-1 β 의 급격한 증가를 유도하였고, 기능성 후보 미생물 섭취에 의해 증가 현상이 완화됨. 특히 *B. bifidum* 193, *L. plantarum* 182에서 감소 현상이 가장 우수하였음(그림 26)

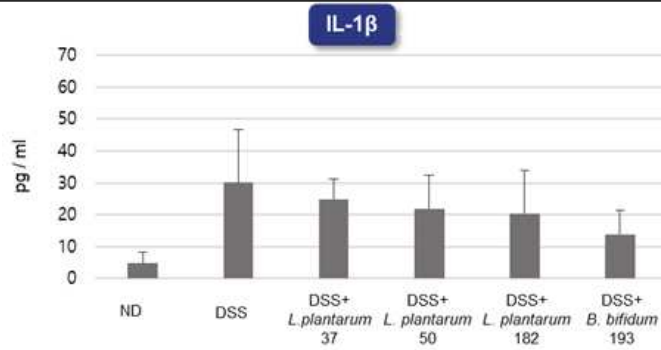


그림 26. 마우스 대장조직의 IL-1 β 측정 결과

- IL-6는 전염증성 cytokine으로 T세포 활성화, B세포 증식 및 항체 분비에 관여함. DSS 처리는 마우스 장 조직 내 IL-6 농도를 증가시켰고, 기능성 후보 미생물 섭취 그룹의 IL-6 농도와 큰 차이가 나타나지 않았음(그림 27)

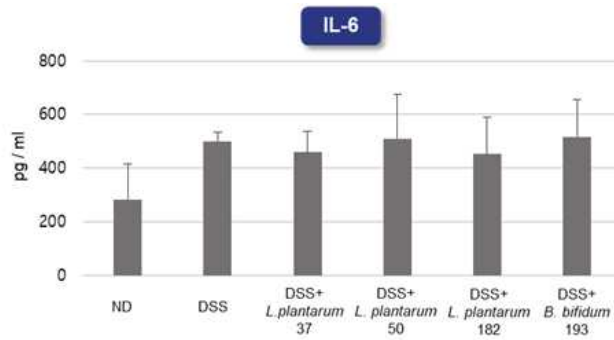


그림 27. 마우스 대장조직의 IL-6 측정 결과

- IL-10은 항염증성 cytokine으로 T_H1 세포 활성 및 대식세포 기능 저해로 항염증 반응을 유도함. DSS 처리는 마우스 장 조직 내 IL-10 농도를 감소시켰지만, 기능성 후보 미생물 섭취 그룹은 모두 장 조직 내 IL-10 농도가 증가하였음. 특히, *B. bifidum* 193은 양성대조군 보다 높은 농도를 나타냄(그림 28)

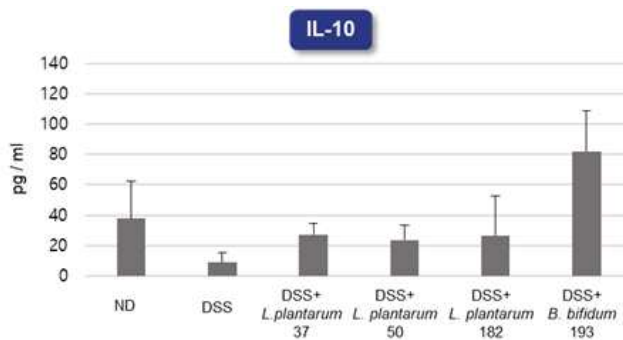


그림 28. 마우스 대장조직의 IL-10 측정 결과

- IL-17은 외부 미생물의 제거, 장 상피세포 점액소 생성, 밀착연접 강화와 같은 숙주 방어 기능을 담당함. DSS 처리는 마우스 장 조직 내 IL-17 감소를 유도하였고, 기능성 후보 미생물 섭취는 IL-17 농도 증가를 유도함. 특히, *B. bifidum* 193은 양성대조군 보다 높은 IL-17 농도를 나타냄(그림 29)

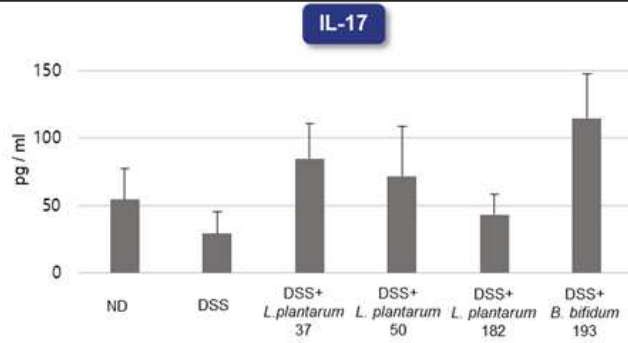


그림 29. 마우스 대장조직의 IL-17 측정 결과

- 기능성 후보 미생물 섭취에 의한 장내균총 조성 변화를 확인하기 위하여, 마우스 분변 내 total DNA를 기반으로 메타지놈 분석을 수행하였고, 장내균총 다양성 측정을 위하여 α/β -diversity 분석을 수행함
- α -diversity (faith_PD) 분석 결과, DSS 처리로 발생한 장 염증에 의해 장내균총 다양성이 감소하는 것을 확인하였고, 기능성 후보 미생물 섭취 그룹들 모두 장내균총 다양성이 더 감소한 것을 확인함. 이는 섭취된 기능성 후보 미생물이 장내에 우점하면서 다양성이 감소한 것으로 추측됨(그림 30)

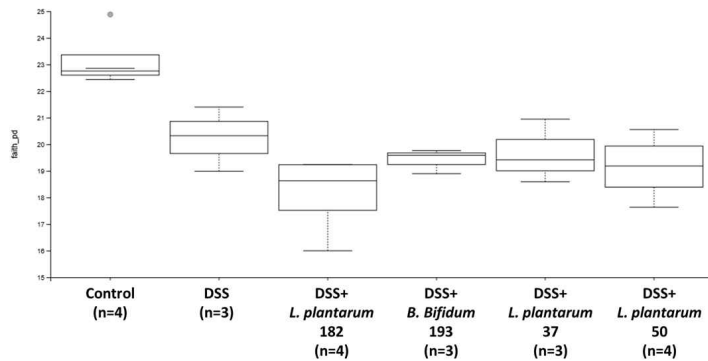


그림 30. α -diversity 분석 결과

- β -diversity (Bray-curtis) 분석 결과, DSS 처리 전/후 다른 그룹화 현상이 나타남을 확인하였고, 염증이 회복되면서 점차적으로 DSS 섭취 전으로 회복되는 경향을 확인함. *L. plantarum* 182와 *B. bifidum* 193을 먹인 쥐 각각 1개의 샘플들은 DSS 처리 직후에도 회복 후의 그룹들과 같이 그룹핑이 되는 것을 확인하였으며, 이는 다른 쥐들에 비하여 염증이 빠르게 회복되는 것으로 보여짐(그림 31)

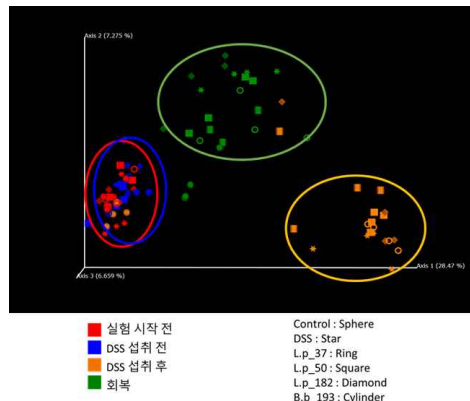


그림 31. β -diversity 분석 결과

- 보다 세부적인 장내균총 조성 변화를 확인하기 위하여 Family, Genus 수준에서 균총 분석을 수행함. Family 수준에서 분석 결과, DSS 처리 후 염증 이 유발됨에 따라 Lactobacillaceae의 비율이 급격하게 감소하고, Bacteroidaceae와 Erysipelotrichaceae가 증가함을 확인함. *Lactobacillus* spp. 섭취 그룹에서는 Lactobacillaceae가 크게 감소하지 않았으며, *Bifidobacterium* spp. 섭취 그룹에서는 Akkermansiaceae가 증가하였음 (그림 32)

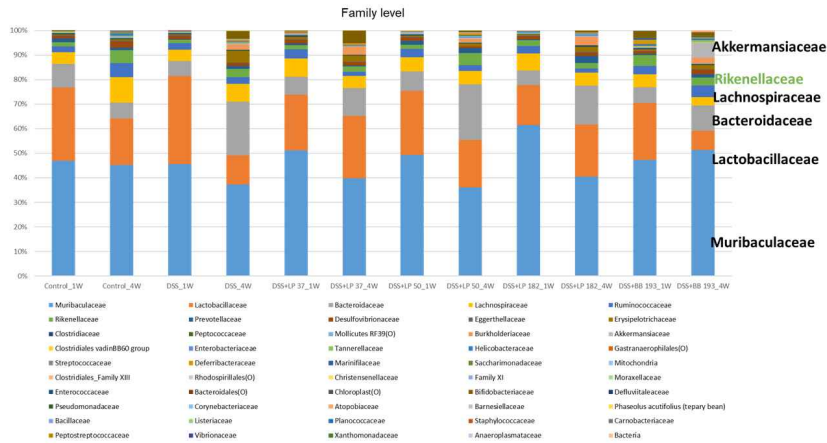


그림 32. Family 수준에서의 장내균총 조성 분석 결과

- Genus 수준에서 분석 결과, DSS 처리 후 염증 이 유발됨에 따라 *Lactobacillus* 비율이 급격하게 감소하고 *Bacteroides*가 급격하게 증가하였음. *Lactobacillus* spp.를 섭취한 그룹에서는 *Lactobacillus* 감소가 거의 나타나지 않았고, *Bifidobacterium* spp.를 섭취한 그룹은 next generation probiotics로 주목받고 있는 *Akkermansia*가 증가하였음(그림 33)

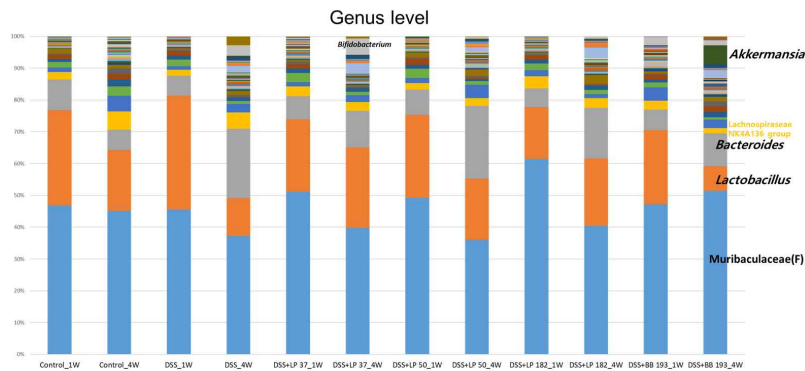


그림 33. Genus 수준에서의 장내균총 조성 분석 결과

6. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 유전적/형태학적 기능 및 안전성 평가
 - 기능성 후보 미생물의 전장 유전체 염기서열 정보를 바탕으로 항생제 내성 유전자 및 유해인자 탐색을 통해 균주 안전성 평가를 수행함. 먼저, Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), Virulence Factor Database (VFDB)를 기반으로 유전자 탐색을 진행하였음
 - *B. bifidum* 193 균주에서 91.55%의 일치로 rifamycin 내성을 지니고, *L. plantarum* 182에서 75.22%의 일치로 fibrinogen-binding protein A 유해인자를 지니고 있음을 확인함 (그림34)

Bifidobacteria bifidum 193



VFDB 검색 결과

Target gene	Virulence factor	% Identity of Matching Region	Matching strain
<i>Lactobacillus plantarum</i> 182	<i>clfA</i> (fibrinogen-binding protein A, clumping factor)	75.215%	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus N315

그림 34. 유전체 정보 활용 CARD/VFDB 기반의 항생제 내성, 유해인자 탐색 결과

- *B. bifidum* 193 균주에 rifamycin 내성 유전자가 실제 존재하고 발현하는지 PCR, qRT-PCR 기법을 활용하여 분석을 진행하였음. 분석 결과, 실제 rifamycin 내성 유전자가 존재하였지만, 상용 균주인 *B. lactis* BB-12도 해당 유전자를 지니고 있었고 발현 정도도 BB-12보다 낮았음(그림 35). 참고문헌 탐색을 통해 해당 항생제 내성 유전자는 *Bifidobacterium* spp.의 내재 내성임을 확인하여 안전성에 문제가 없을 것으로 판단함

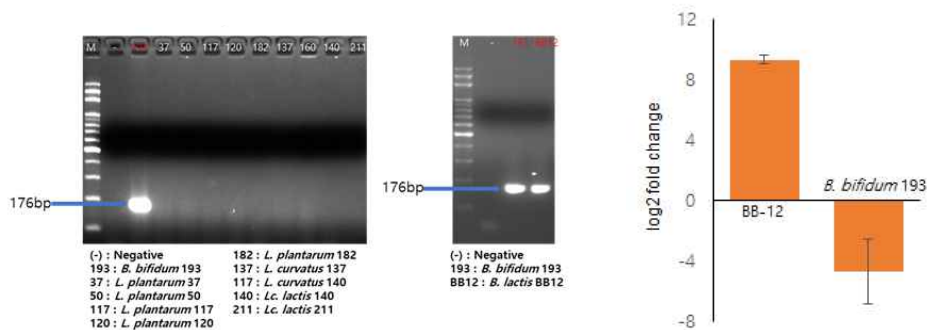


그림 35. PCR 기반 내성 유전자 확인 결과(좌) 및 qRT-PCR 기반 내성 유전자 발현량(우)

- *L. plantarum* 182 균주에 fibrinogen-binding protein A 유해인자 유전자가 실존하는지 PCR 기법을 활용하여 분석을 진행하였으며, 대조균으로 fibrinogen-binding protein A를 지니고 있는 병원균인 *Staphylococcus aureus* 균주를 사용하였음. 분석 결과, *L. plantarum* 182 균주에는 해당 DNA 밴드가 관찰되지 않아 안전성에 문제가 없을 것으로 판단함(그림 36)

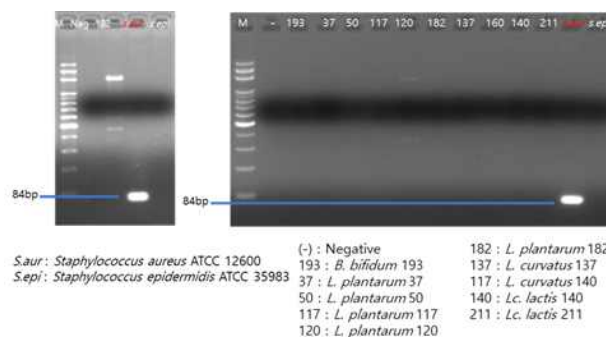


그림 36. PCR 기반 유해인자 유전자 DNA 밴드 확인 결과

- 기능성 후보 미생물의 형태학적 안전성 평가를 위하여 용혈활성 시험과 항생제 최소 저해 농도 시험(minimum inhibitory concentration test)을 수행함. TSA-sheep blood 배지에 대조균인 *S. aureus*와 후보 미생물들을 선조점종 하였으며, *S. aureus*를 제외한 나머지 균주에서는 β -hemolysis가 나타나지 않아 용혈활성이 없는 것으로 확인됨(그림 37)

Beta-hemolysis (+) Strain
Staphylococcus aureus ATCC 29213

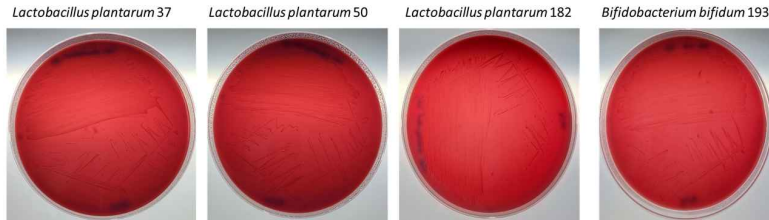


그림 37. 기능성 후보 미생물의 용혈활성 시험 결과

- MIC test 결과, *Lactobacillus* spp. 및 *Bifidobacterium* spp. 모두 유럽 EFSA의 항생제 내성 cut-off 기준을 만족하여 안전상 문제가 없음을 확인함(표 1, 표 2)

표 1. *Lactobacillus* spp.를 사용한 MIC test 결과 및 EFSA 기준 cut-off

	Ampicillin	Gentamicin	Kanamycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Streptomycin	Vancomycin
EFSA cut-off	2	16	64	1	2	32	8	N.R.	N.R.
<i>L. plantarum</i> 37	0.5	2 (BHI)	32 (BHI)	0.75	0.16 이하	2	1.5	128	256 이상
<i>L. plantarum</i> 50	0.5	1.5 (BHI)	24 (BHI)	0.75	0.16 이하	4	2	1024 이상	256 이상
<i>L. plantarum</i> 182	0.5	1 (BHI)	24 (BHI)	0.5	0.16 이하	3	3	256	256 이상

표 2. *Bifidobacterium* spp.를 사용한 MIC test 결과 및 EFSA 기준 cut-off

	Ampicillin	Gentamicin	Kanamycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Streptomycin	Vancomycin
EFSA cut-off	2	64	N.R.	1	1	8	4	128	2
<i>B. bifidum</i> 193	0.23	16 (BHI)	256 이상 (BHI)	0.47	0.23	0.38	0.5	12 (BHI)	0.5

N.R : Not required

- 기능성 후보 미생물의 유전체 염기서열을 기반으로 NCBI (national center for biotechnology information, 미국 국립생물정보센터)에서 획득한 *L. plantarum* 8종 전장 유전체 및 *B. bifidum* 7종 전장 유전체와 pan-genome 비교 유전체 분석을 통해 이들 기능성 후보 미생물만이 지니는 특이적인 유전자 탐색을 수행함
- *B. bifidum* 193 균주와 *B. bifidum* spp.균의 pan-genome 비교 분석 결과, *B. bifidum* 193만이 nagH 유전자(Hyaluronidase/ β -N-acetylglucosaminidase 효소)를 가지고 있음을 확인함(그림 38). 우유에 존재하는 당 단백질은 β -N-acetylglucosaminidase 효소에 의해 분해되는 것으로 보고된 바 있으며, 이는 *B. bifidum* 193이 다른 *B. bifidum* 보다 우유에서 더 잘 살아남을 것으로 예측할 수 있음. 이는 다른 *B. bifidum* 균주 보다 발효 유 제작에 유리한 균주로 판단됨

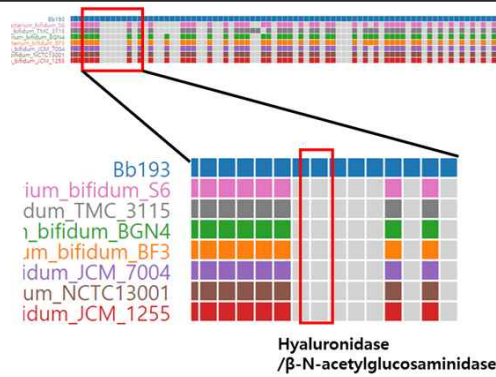


그림 38. *B. bifidum* 균주들의 pan-genome 비교 분석 결과

- *L. plantarum* 37, 50, 182 균주와 *L. plantarum* spp.군의 pan-genome 비교 분석 결과, *L. plantarum* 37, 50, 182 균주에서 Sotrase A 유전자와 melibiose/raffinose/stachyose ABC transporter 유전자를 확인함(그림 39). Sortase A 효소는 장내 정착능과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있고, 보다 많은 탄수화물을 세포 내로 수송하는 수송체가 있기 때문에(그림 40), *L. plantarum* 37, 50, 182 균주는 다른 *L. plantarum* spp.군 보다 장내 정착능이 우수하고, 다양한 탄소원을 이용하여 장내 환경에서 잘 생육할 것으로 판단됨

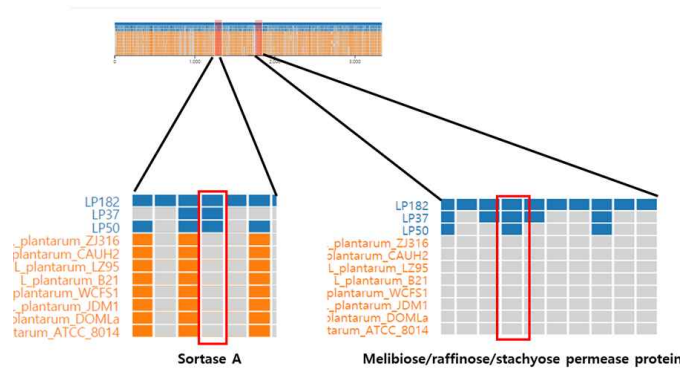


그림 39. *L. plantarum* 균주들의 pan-genome 비교 분석 결과

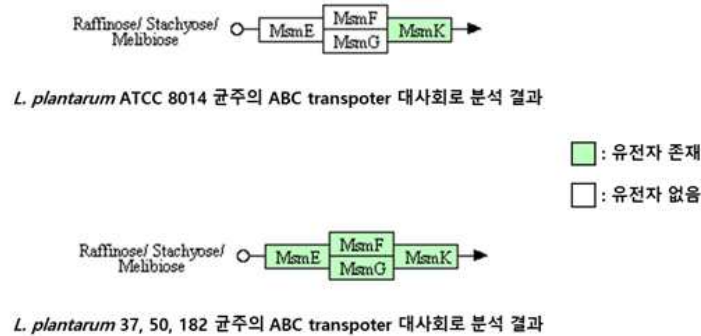


그림 40. KEGG pathway 기반 *L. plantarum* 균주들의 대사회로 분석 결과

7. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물을 적용한 발효유 출시를 통한 조기성과창출
 - Lab scale 발효유 제품 배합비 시험을 통해 기능성 후보 미생물과 길항작용이 없는 배양 종균을 선정하고, 해당 미생물의 생균수 유지, 보존이 가능한 배양 조건(시간, 온도) 확립을 진행함. 또한, 제품의 관능 및 생균수 보존을 위한 이화학적 및 미생물학적 규격(산도, pH, Brix, 점도, 비중, 유산균 수 등)을 설정함. 그 후 동물실험으로 확인된 기능성 후보 미생물 *L. plantarum* 182 (면역 조절 능력이 있는 특허 유산균) 단일 균주를 적용한 시제품 생산(1.0×10^8 CFU 이상/85 g) 및 제품 출시/판매를 진행함(그림 41)



원재료명 및 함량 유기농 황금 99.99% 유기농원유(99%국산), 유기농크림(국산), 유기농지방분(미국산), 유기농이베리(일본산), L-GG 우산균 4억 이상 / 85g, BB-12 우산균 5천만 이상 / 85g, 전통식물유(미국산) 1% 이상 / 85g, 우산균 0% 함유

원산지 한국

유통기한 2024.04.04부터 2024.04.07

제조업체 상하목장 (주) 청양공과유

충청남도 청양군 청양읍 충절로 1335-28

본 제품은 공중개방제품이고 소포(개봉) 후 공기 접촉 또는 보습을 수 있습니다. 무균·멸균 처리된 것은 100% 보습은 어느 정도 보습을 사용 시에는 변질될 수 있습니다. 변질 시에는 폐기하십시오. 유통기한 경과 후 사용 시에는 변질될 수 있습니다. 기온 변화에 따라 유통기한이 달라질 수 있습니다. 기온 변화에 따라 유통기한이 달라질 수 있습니다.

본 제품은 공중개방제품이고 소포(개봉) 후 공기 접촉 또는 보습을 수 있습니다. 무균·멸균 처리된 것은 100% 보습은 어느 정도 보습을 사용 시에는 변질될 수 있습니다. 변질 시에는 폐기하십시오. 유통기한 경과 후 사용 시에는 변질될 수 있습니다. 기온 변화에 따라 유통기한이 달라질 수 있습니다. 기온 변화에 따라 유통기한이 달라질 수 있습니다.

상하목장

ORGANIC

Baby

유기농 베이비 요구르트

농후발효유 85g (75kcal)

냉장제품

STEP 1

6개월부터

영양성분		총 내용량 85g / 75kcal	
총 내용량	85g	에너지	147kcal
탄수화물	5g	지방	2.7g
단백질	4.9g	염분	0.1g
지방	4.9g	탄수화물	5g
단백질	4.9g	지방	2.7g
염분	0.1g	염분	0.1g
탄수화물	5g	탄수화물	5g
지방	2.7g	지방	2.7g
염분	0.1g	염분	0.1g

그림 41. *L. plantarum* 182 균주가 적용된 상하목장 유기농 베이비 요구르트 3종 제품(위) 및 제품 패키지 라벨(아래)

8. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 *in vivo* 인지기능개선(스트레스 완화) 효능 평가 및 장내 환경 개선 검증

- 만성 스트레스에 의한 인지 기능 이상 증상에 대한 프로바이오틱스의 완화 효과에 대한 기전 연구는 해당 분야에서 활발하게 연구되고 있으나 아직 초기 단계로, 현재는 인과성 보다는 상관관계를 밝히는데 머무르고 있음
- 관련 분야 연구그룹의 선행연구 결과를 살펴보면 BDNF와 같은 brain neurotrophic marker의 증가, inflammation marker의 감소, apoptotic marker의 감소 등이 보고되고 있으며, 아울러 프로바이오틱스 유래 대사체에 의해 해당 biomarker들의 변화가 유도될 수 있는 기전 연구가 수행되고 있음
- 기능성 후보 미생물의 스트레스 완화 효능 검증을 위하여 unpredictable chronic stress (예측 불가능한 만성 스트레스) 마우스 모델을 구축하였고, 스트레스와 종류는 <표 3>과 같음. 인지기능 측정 행동실험 중 하나인 Elevated plus maze test를 통해 우울/불안 증상이 유도되는 것을 확인함(그림 42)

표 3. USMC 마우스 모델 구축을 위한 스트레스 종류 및 일정

	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun
Week 1	Changed cage				Empty cage	Tilted cage	Foreign cage
	Feecal sampling	Water deprivation Sleep cycle change	Sleep cycle change	Sleep cycle change Empty cage	Tilted cage	Foreign cage	Water deprivation Wet cage
Week 2	Wet cage		Tilted cage	Wet cage	Empty cage	Foreign cage	
	Pause/Changed cage	Restraint Tilted cage	Wet cage	Water deprivation Empty cage	Restraint Foreign cage	Sleep cycle change	Sleep cycle change
Week 3	Sleep cycle change	Empty cage	Tilted cage	Empty cage	Wet cage		Sleep cycle change
	Pause/Changed cage	Restraint	Cold water bath	Water deprivation	Restraint	Sleep cycle change	Cold water bath
Week 4	Feecal sampling	Tilted cage	Empty cage	Wet cage	Sleep cycle change		Tilted cage
	Tilted cage	Foreign cage	Empty cage	Empty + tilted cage	Changed cage	Illumination	Empty cage
Week 4	Water deprivation		Restraint		Cold water bath	Water deprivation	Restraint
	Foreign cage	Empty cage	Tilted cage	Foreign + wet cage	Illumination	Empty cage	

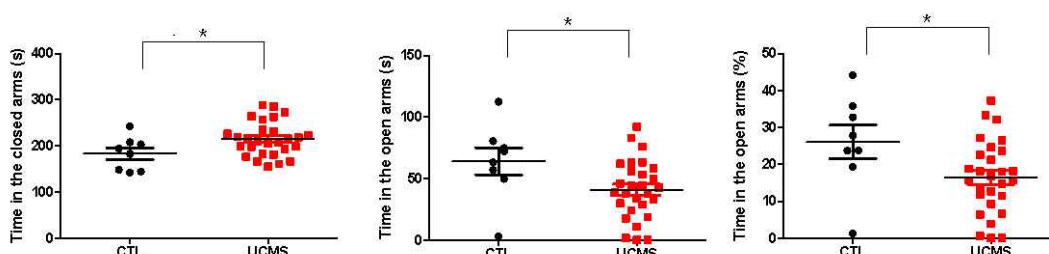


그림 42. USMC 마우스 모델 구축을 위한 Elevated plus maze test 결과

- 인지기능 감소 마우스 모델에 대한 기능성 후보 미생물의 효능 검증 실험 계획은 <그림 43>과 같으며, 사전연구로 선별된 *L. plantarum* 50, 182 및 *B. bifidum* 193와 양성 대조군으로는 사전연구 논문을 참조하여 인지기능 개선이 있는 *L. reuteri* ATCC 23272 균주를 선정하여 실험을 수행함

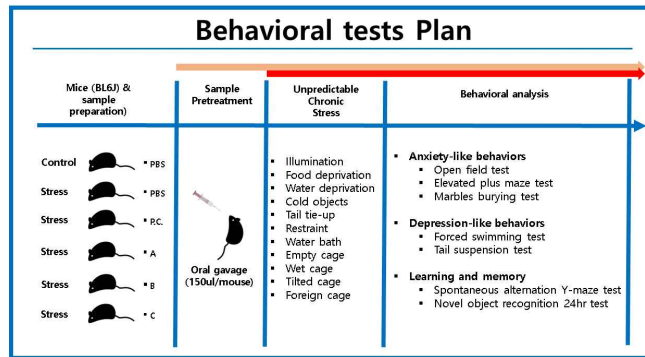


그림 43. 인지기능개선 동물실험 계획표

- 마우스 체중 측정 결과, 기능성 후보 미생물 투여 그룹과 대조군 사이에서 유의미한 체중 차이는 나타나지 않았음(그림 44)

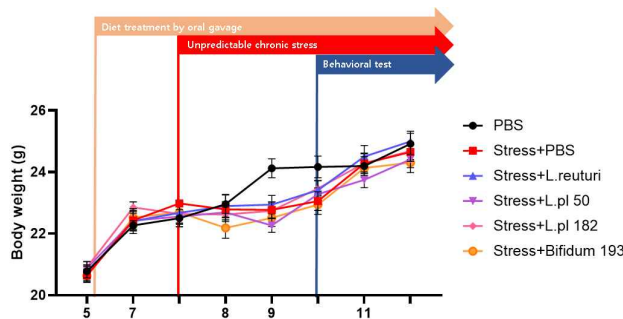


그림 44. 실험 마우스의 체중 측정 결과

- 만성 스트레스에 의해 감소된 인지기능 개선 효능을 확인하고자 불안/우울, 기억/학습 능력과 관련된 Open field test, Elevated plus maze test, Forced swimming test, Tail suspension test, Y-maze spontaneous alternation test를 수행함
- Open field test 결과, 실험에 사용된 모든 균주가 side zone에서 움직인 거리가 감소하는 경향을 보였으며, *L. plantarum* 182 및 *B. bifidum* 193 균주가 대조군(stress+PBS) 대비 corner zone에서 머무르는 시간이 감소함으로써 만성 스트레스에 의한 우울/불안 증상 개선 효능을 보임(그림 45)

Open field test

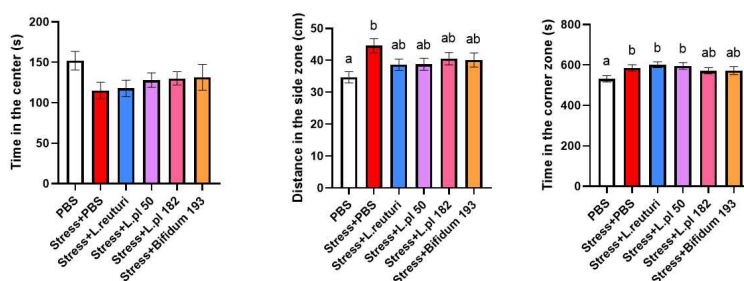


그림 45. Open field test 결과

- Elevated plus maze test 결과, *B. bifidum* 193이 대조군 대비 closed arm에서 머무르는 시간이 감소함으로써 만성 스트레스에 의한 우울/불안 증상 개선 효능을 보임(그림 46)

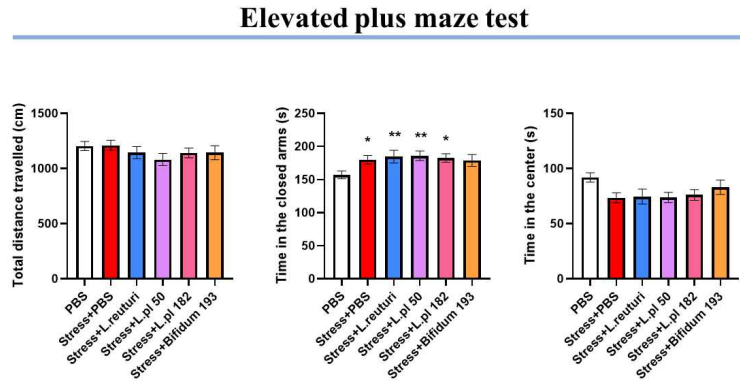


그림 46. Elevated plus maze test 결과

- Forced swimming test에서는 통계적으로 유의한 개선 효능을 관찰할 수 없었지만, Tail suspension test에서는 *L. plantarum* 182 및 *B. bifidum* 193이 대조군 대비 immobility time이 감소하는 경향을 보임으로써 만성 스트레스에 의한 우울/불안 증상 개선 경향을 보임(그림 47)

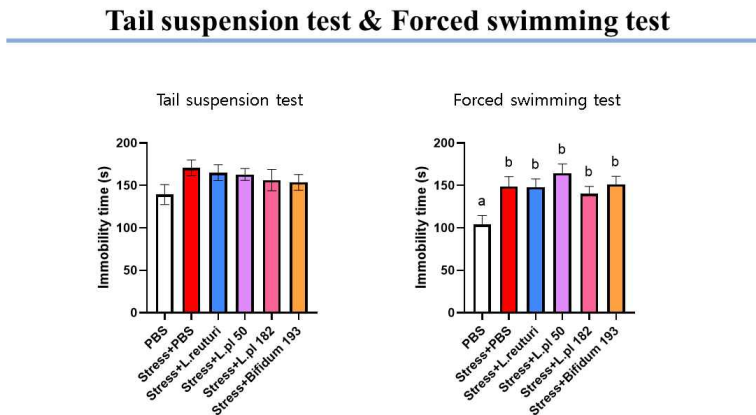


그림 47. Tail suspension test & Forced swimming test 결과

- Y-maze spontaneous alternation test 결과, spontaneous alternation에서 *L. plantarum* 50이 대조군 대비 기억/학습 능력이 개선되는 경향을 보임(그림 48)

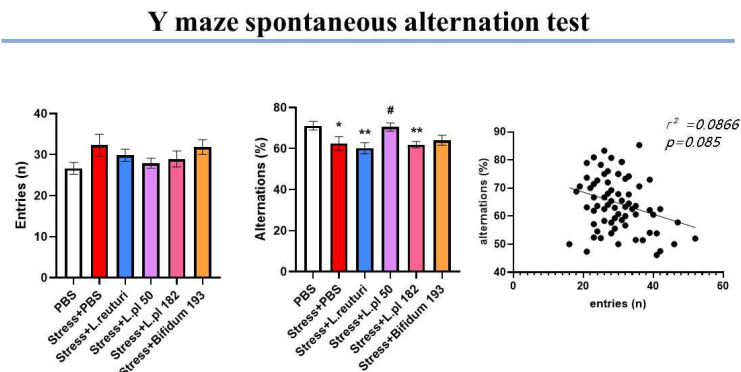


그림 48. Y-maze spontaneous alternation test 결과

- 마우스 행동실험 결과를 종합하면, 만성 스트레스에 의한 인지기능 이상을 보이는 마우스 모델에 기능성 후보 균주 투여 시, *L. plantarum* 182 및 *B. bifidum* 193 가 우울/불안 증상을 개선하는 경향을 보여주었고, *L. plantarum* 50이 기억/학습 감소 증상을 개선하는 경향을 보임
- 균주를 섭취한 그룹 모두 negative control (stress, PBS) 대비 corticosterone이 감소하는 경향을 보였으며, 양성 대조군(*L. reuteri*)과 *L. plantarum* 50 그룹에서 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것을 확인함(그림 49)

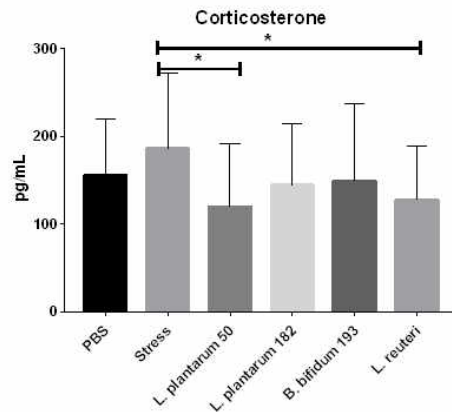


그림 49. Serum 내 corticosterone ELISA 분석 결과

- 최근 장내균총 구성 변경이 정신장애와 기억 능력과 관련된 중추신경계에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며(Cryan JF et al., 2012), *B. longum* 균주를 섭취한 마우스 모델의 불안 유사 행동에 관해 테스트한 연구에서 긍정적인 결과를 보였음(Bercik P et al., 2011, Savignac HM et al., 2014)
- *Bifidobacterium* 뿐만 아니라 *L. fermentum*을 섭취한 마우스 모델에서도 항불안 효과를 나타낸 바 있으며(Wang T et al., 2015), *B. longum*, *B. breve*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* 를 마우스모델에 투여한 연구에서 항우울 효과를 보였음(Bravo JA et al., 2011, Desbonnet et al., 2008, Savignac HM et al., 2014)
- 또한, 마우스 모델을 통해 인지 기능을 테스트하였을 때, 프로바이오틱스가 기억력에 유익한 것으로 보고됨(Liang S et al., 2015, Luo J et al., 2014, Smith CJ et al., 2014)
- 마이크로바이옴 기반 기능성 후보 미생물 첨가에 따른 인지기능개선 유익 효능 그리고 동물모델 장내환경 개선 효능 검증을 위하여 1주차, 3주차, 7주차 총 3회에 걸쳐 분변 샘플을 수집하였고, 해당 실험은 <그림 50>에 나타난 일정으로 수행됨

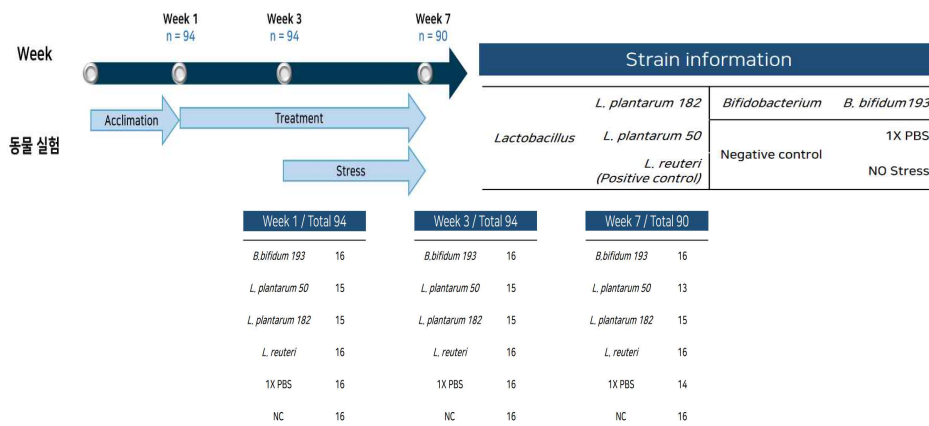


그림 50. 동물모델 내 장내균총 조성 변화 및 유익 효능 검증을 위한 실험 계획표

- 확보된 동물모델 분변 샘플은 균총 연구법 표준화 컨소시움의 표준화 protocol을 기반으로 NGS에 도입 가능한 DNA 순도, 정량을 확보하였으며, sequencing data를 이용하여 QIIME2 및 DADA2 workflow를 수행하여 균총 분석을 진행함
- 통계학적 차이 규명을 위해 LefSe, PERMANOVA를 이용하였고, 그룹별 기능성 차이 규명을 위해 PICRUST 분석을 진행하였으며, 섭취 균주별 섭취 기간에 따른 변화를 확인함
- α -diversity (Faith pd) 확인 결과, 음성 대조군(1X PBS) 및 양성 대조군(*L. reuteri*) 그룹을 제외한 모든 그룹에서 1주차 대비 7주차에서 유의한 diversity 감소를 확인함(그림 51)

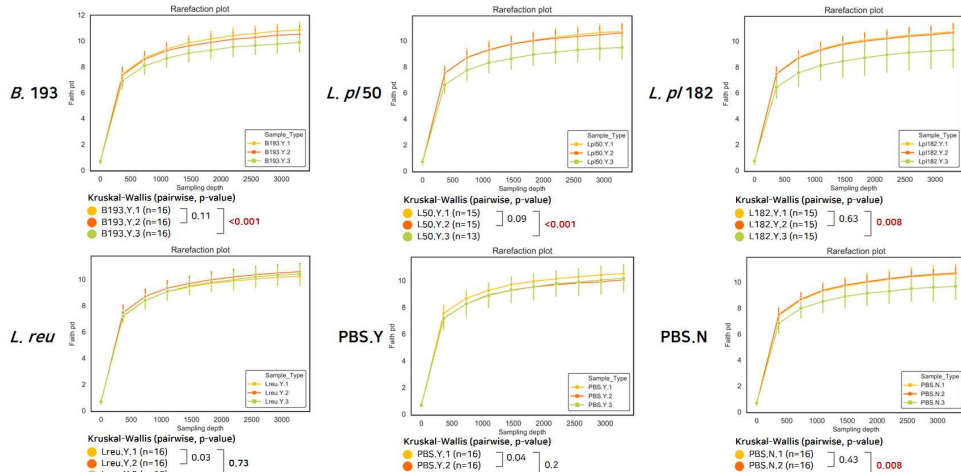


그림 51. 균주 별 섭취 기간에 따른 α -diversity (Faith pd) 분석 결과

- β -diversity (Unweighted UniFrac) 확인 결과, 1주차 대비 3주차에서 음성 대조군(no stress, PBS), 양성 대조군(*L. reuteri*) 및 *B. bifidum* 193 그룹에서 유의적인 장내균총 변화를 확인하였고, 1주차 대비 7주차에서 음성 대조군(1X PBS)와 양성 대조군(*L. reuteri*)을 제외한 모든 그룹에서 유의적인 장내균총 변화를 확인할 수 있었음(그림 52)

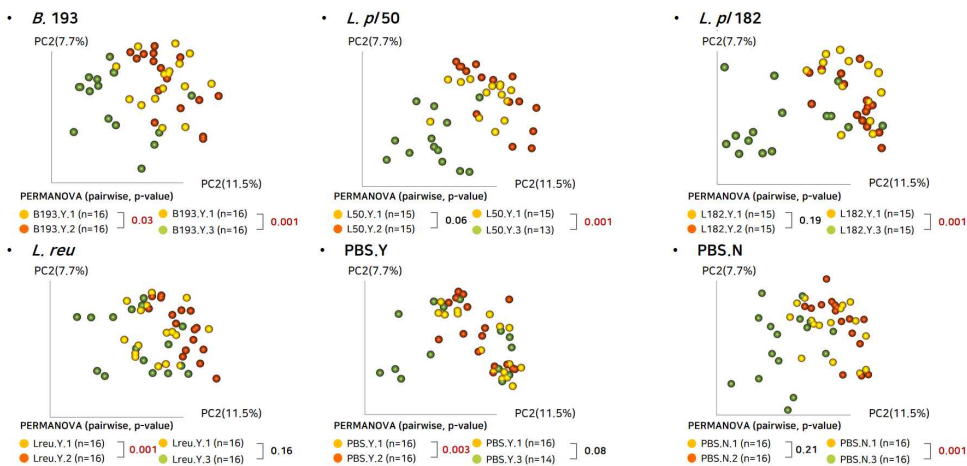


그림 52. 균주 별 섭취 기간에 따른 β -diversity (Unweighted UniFrac) 분석 결과

- 각 그룹별 taxa plot을 통해 균주 섭취 그룹과 음성 대조군(1X PBS) 그룹을 비교하여 상대적인 장내균총 구성 변화를 확인하였으며, minor한 taxa 변화를 확인하기 위하여 LefSe 분석을 수행함
- 양성 대조군(*L. reuteri*) 그룹에서는 섭취 6주 후 음성 대조군(1X PBS) 그룹 대비, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Romboutsia*, *Ruminococcaceae* UGG_010, *Eubacterium_coprostanoligenesgroup*이 유의하게 증가하였고 *Lachnospiraceae* UGG_004, *Turicibacter*가 유의하게 감소함(그림 53)

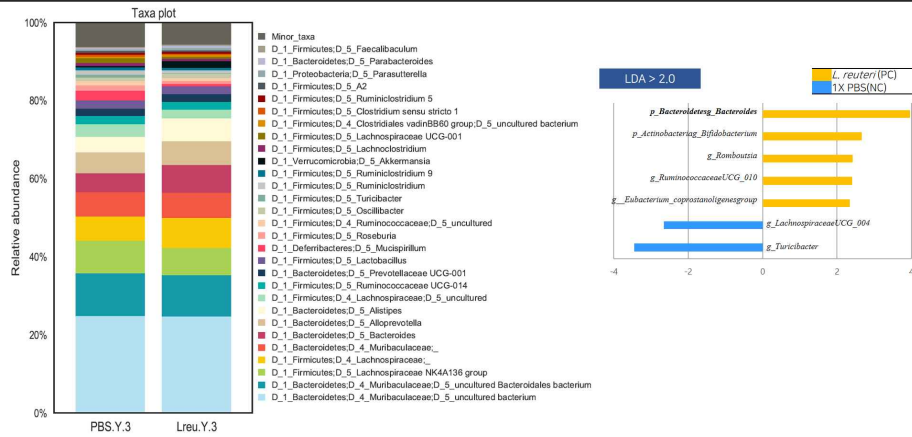


그림 53. 6주 동안 양성 대조군(*L. reiteri*) 균주 섭취 후 균총 변화 분석 결과

- *B. bifidum* 193 그룹에서는 섭취 6주 후 음성 대조군(1X PBS) 그룹 대비, *Alloprevotella*, *Akkermansia*, *Parasutterella*, *Ruminococcus1*, *Tyzzera3*, *Romboutsia*가 유의하게 증가하였고 *Ruminococcaceae NK4A214 group*, *Ruminiclostridium6*, *Lachnospiraceae UGG_004*, *Clostridiumsensustricto1*, *Peptococcus*, *Ruminiclostridium*, *Lachnospiraceae UGG_0010*이 유의하게 감소함(그림 54)

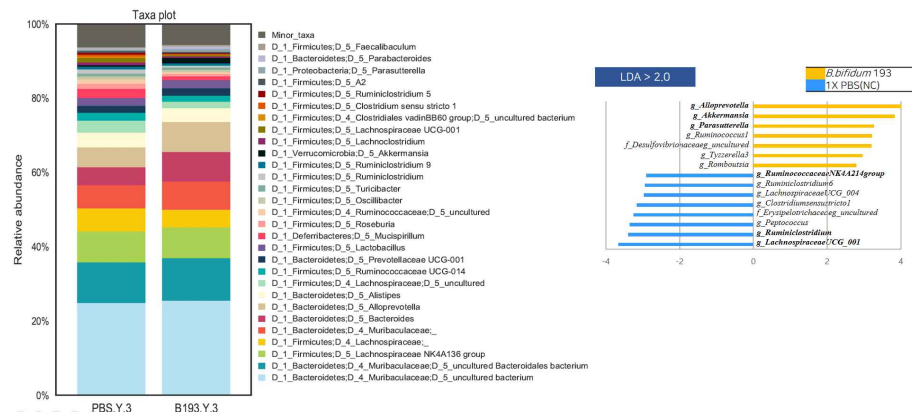


그림 54. 6주 동안 *B. bifidum* 193 균주 섭취 후 균총 변화 분석 결과

- *L. plantarum* 182 그룹에서는 섭취 6주 후 음성 대조군(1X PBS) 그룹 대비, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Rikenellaceae RC9 gut group*의 장내 상대 함량이 증가하였고 *Ruminococcaceae NK4A214 group*, *Ruminiclostridium6*, *Lachnospiraceae UGG_004*, *Faecalibaculum*, *Ruminiclostridium5*, *Peptococcus*, *Lachnoclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Lachnospiraceae UGG_001*의 장내 상대 함량이 감소함(그림 55)

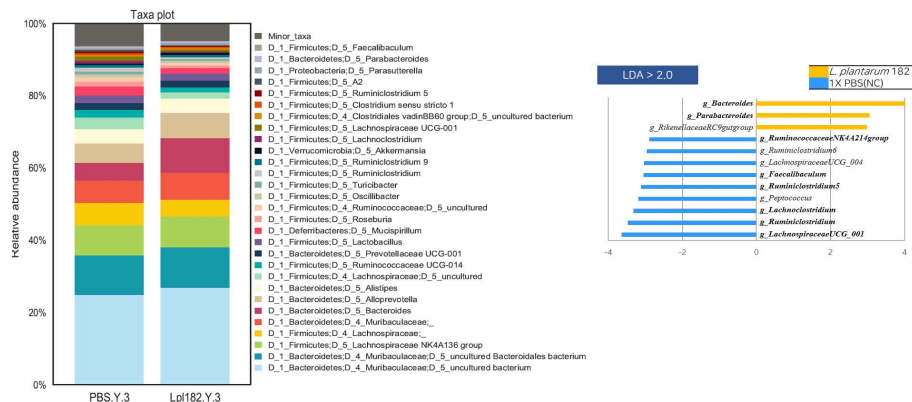


그림 55. 6주 동안 *L. plantarum* 182 균주 섭취 후 균총 변화 분석 결과

- *L. plantarum* 50 그룹에서는 섭취 6주 후 음성 대조군(1X PBS) 그룹 대비, *Tyzzereella*의 장내 상대 함량이 유의하게 증가하였고 *Eubacterium_coprostanoligenes* group, *Ruminococcaceae* NK4A214 group, *Lachnospiraceae* UGG_004, *Ruminococcaceae* UGG_013, *Ruminiclostridium*6, A2, *Clostridium_sensu_stricto*1, *Lachnospiraceae* UGG_001의 장내 상대 함량이 유의하게 감소함(그림 56)

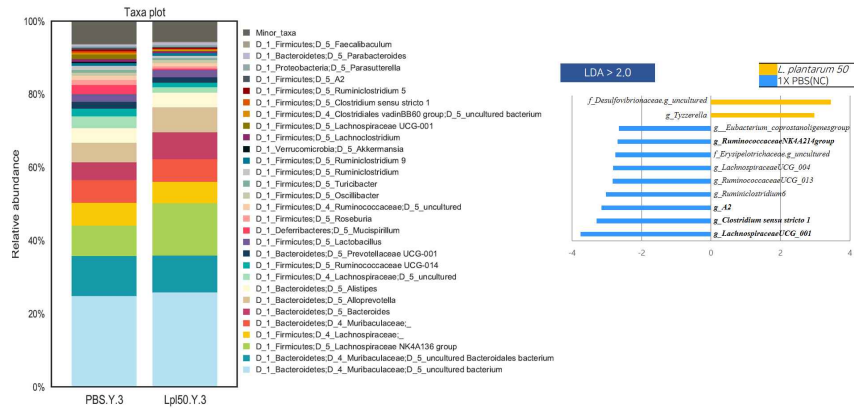


그림 56. 6주 동안 *L. plantarum* 50 균주 섭취 후 균총 변화 분석 결과

- 각 그룹별 균총의 taxa plot과 LEfSe를 음성 대조군(1X PBS) 그룹과 비교하여 장내미생물 상대함량을 측정하였으며, 양성 대조군 (*L. reuteri*) 그룹에서는 *Bacteroides*, *B. bifidum* 193 그룹에서는 *Alloprevotella*, *Akkermansia*, *Parasutterella*, *L. plantarum* 182 그룹에서는 *Bacteroides*, *Parabacteroides*가 major하게 증가하였음(그림 57, 58)

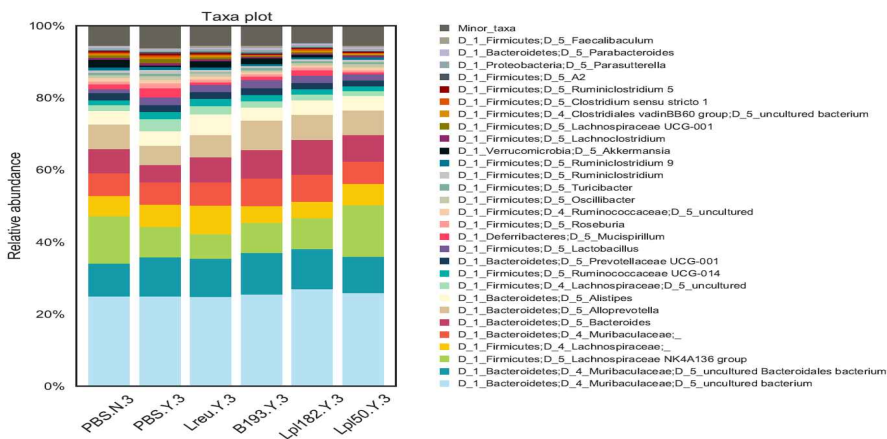


그림 57. 6주 동안 제공된 균주 섭취 후 전체 그룹의 균총 변화 분석 결과

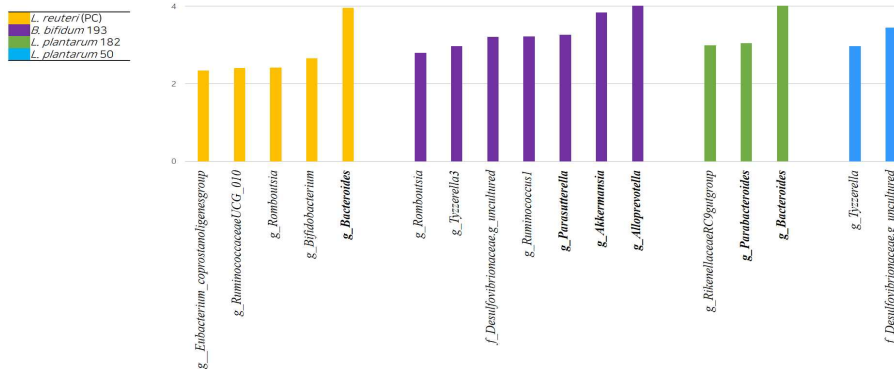


그림 58. 6주 동안 제공된 균주 섭취 후 각 그룹과 음성 대조군(1X PBS) 그룹 사이의 LEfSe 비교 분석 결과

- 기능성 후보 미생물 섭취 시 나타나는 균총 변화가 가져올 수 있는 기능성 변화를 규명하기 위하여 PICRUST 분석을 수행함(LDA > 2.0). 균주 섭취 그룹 별로 음성 대조군(1X PBS) 그룹과 비교하였을 때 유의적으로 높은 풍부도를 보이는 대사경로를 확인함
- *B. bifidum* 193 그룹에서는 Sporulation, Secretion system, Signal transduction mechanisms, Pyruvate metabolism과 관련된 대사경로에서 높은 상대적 풍부도를 보임 (그림 59)

Function	B193	
	LDA	P-value
Sporulation	2.956695	0.046001
Secretion system	2.577108	0.046001
Signal transduction mechanisms	2.146234	0.027578
Pyruvate metabolism	2.030705	0.019915

그림 59. *B. bifidum* 193 그룹과 음성 대조군(1X PBS) 그룹의 PICRUST 비교 분석 결과

- *L. plantarum* 182 그룹에서는 Membrane and intracellular structural molecules, Alanine aspartate & glutamate metabolism, Poresion channels, Lipopolysaccharide biosynthesis, Sphingolipid metabolism 등 41개와 관련된 대사경로에서 높은 상대적 풍부도를 보임(그림 60)

Function	Lpl182		Function	Lpl182	
	LDA	P-value		LDA	P-value
Nitrogen metabolism	2.354397	0.029096	Glycine serine and threonine metabolism	2.147226	0.02324
DNA replication	2.290435	0.044685	Sulfur metabolism	2.11955	0.007762
Glycosyl transferases	2.257332	0.012858	Adipocytokine signaling pathway	2.114437	0.029096
Phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis	2.228059	0.003971	Cellularantigens	2.096687	0.029096
Glycosphingolipid biosynthesis ganglio series	2.224432	0.040243	VitaminB6 metabolism	2.081619	0.029096
Histidine metabolism	2.222615	0.012858	Glutathione metabolism	2.069555	0.044685
Biotin metabolism	2.210987	0.014524	Valine leucine and isoleucine degradation	2.068284	0.008829
Peroxisome	2.210398	0.011363	Carbonfixationinphoto synthetic organisms	2.048444	0.02324
Arginine and proline metabolism	2.192884	0.040243	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.025606	0.020717
Cellcycle Caulobacter	2.159437	0.044685	Lipoicacid metabolism	2.012493	0.014524
			Lipid biosynthesis proteins	2.004973	0.007762
Function	LDA	P-value	Function	LDA	P-value
Otherglycan degradation	2.84657	0.018435	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	2.489909	0.016377
Membrane and intracellular structural molecules	2.784334	0.020717	One carbon pool by folate	2.484539	0.029096
Lipopolysaccharide biosynthesis proteins	2.71817	0.010025	Galactose metabolism	2.476536	0.006812
Poresion channels	2.693907	0.02324	Folatebio synthesis	2.465645	0.044685
Alanine aspartate and glutamate metabolism	2.689978	0.02324	Cyanoaminoacid metabolism	2.454188	0.020717
Lipopolysaccharide biosynthesis	2.68168	0.018435	Starch and sucrose metabolism	2.451644	0.003
Sphingolipid metabolism	2.600149	0.018435	Homologousre combination	2.446885	0.026026
Citrate cycle TCA cycle	2.598816	0.010025	Energy metabolism	2.368512	0.016377
Carbonfixation pathways in prokaryotes	2.585766	0.016377	RNA degradation	2.36278	0.02324
DNA replication proteins	2.577096	0.014524	Phenylpropanoid biosynthesis	2.360495	0.011363

그림 60. *L. plantarum* 182 그룹과 음성 대조군(1X PBS) 그룹의 PICRUST 비교 분석 결과

- *L. plantarum* 50 그룹에서는 Replication recombination and repair proteins와 관련된 대사경로에서 높은 상대적 풍부도를 보임(그림 61)

Function	LDA	Lpl50 P-value
Replication recombination and repair proteins	2.239417	0.036922

그림 61. *L. plantarum* 50 그룹과 음성 대조군(1X PBS) 그룹의 PICRUSt 비교 분석 결과

- 동물모델에서 기능성 후보 미생물을 적용하여 장내균총 다양성 변화, 구성 변화, PICRUSt 분석을 통한 기능성 예측 등을 확인하였을 때, *L. plantarum* 182와 *B. bifidum* 193이 유익한 장내균총 조성 변화와 유익 기능성을 제공할 것으로 판단함

9. 인지기능개선(스트레스 완화) 인체적용시험을 통한 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 유용 효능 검증

- 스트레스성 장 질환 환자를 대조군(placebo), 실험군(기능성 후보 미생물) 두 그룹으로 나눈 다음, 각 시료 복용 전/후 소아, 성인 우울척도(CDI, BDI), 스트레스 반응척도(SRI) 및 혈중 스트레스 호르몬(cortisol) 측정을 통해 기능성 후보 미생물의 스트레스 완화 효능을 검증하고자 함
- 대조군과 실험군에 대하여 시료 복용 전/후 유의하게 증상 변화가 있는지 전체 연령군 대상, 18세 미만군과 18세 이상 군으로 나누어서 비교하였으며, 결과는 <표 4>와 같았음

표 4. 대조군과 실험군 그룹 내 연령 별 시료 복용 전/후 변화 분석 결과

	대조군				실험군			
	n	복용 전	복용 후	p 값	n	복용 전	복용 후	p 값
SRI 전체	42	76.98±25.08	80.60±28.28	0.239	38	80.97±29.71	58.63±21.69	0
Cortisol 전체	42	10.61±5.91	9.75±3.86	0.263	38	7.31±3.30	9.43±4.26	0.007
SRI 성인	38	77.18±25.59	80.71±28.87	0.297	33	80.03±31.03	58.45±22.82	0
Cortisol 성인	38	10.77±6.04	9.96±3.96	0.325	33	7.73±3.25	9.41±3.58	0.015
SRI 소아	4	75.00±22.64	79.50±25.48	0.285	5	87.20±20.09	59.80±13.63	0.043
Cortisol 소아	4	9.05±4.87	7.83±2.21	0.465	5	4.54±2.21	9.54±8.07	0.136
BDI	38	9.55±6.04	11.74±7.29	0.022	34	11.35±7.35	5.91±6.19	0
CDI	4	9.00±4.83	11.25±6.70	0.141	4	15.00±9.66	7.50±7.00	0.068

* CDI : 0~25 (정상), 26~28 (경미한 우울), 29~54 (심한 우울); BDI : 0~9 (정상), 10~15 (가벼운 우울), 16~23 (중증 우울), 24~63 (심각한 우울); SRI : ~50 (낮은 스트레스), 51~80 (마음관리가 필요), 81~120 (스트레스가 많은 편), 120~ (심한 스트레스, 상담치료 필요)

- 대조군에서 BDI가 유의적으로 상승하였으며, 실험군에서는 SRI 전체, SRI 성인/소아, BDI가 복용 전 대비 복용 후 점수가 통계적으로 유의하게 호전되는 것을 확인하였음 ($p < 0.05$). 또한, 실험군에서 CDI가 감소하는 경향을 보였지만 통계적 유의성은 없었음
- 다만, 실험군에서 스트레스 호르몬 수치가 상승하는 현상을 나타내었는데, 스트레스 호르몬인 cortisol은 생체리듬에 따라 변동성이 있는 호르몬이며 일정한 시간에 검체 채취를 하지 못한 점 등의 여러 통제 요인을 조절하지 못한 점을 고려한다면 해당 변화에 대한 의미를 부여한 해석에는 한계점이 있다고 판단됨

- 앞서 <표 4>는 대조군과 실험군 그룹 내 복용 전/후 비교라면, <표 5>는 그룹 간 비교로. 대조군과 실험군은 복용 전 cortisol 수치를 제외하고는 통계적으로 유의한 차이가 없었음
- 복용 후를 비교하였을 때, SRI 전체 연령 수치에서 대조군은 3.62점 상승한 반면, 실험군은 22.34점 감소하였음. 또한 연령을 나누어 분석하였을 때 SRI 성인에서 유의적인 감소 효과를 나타냄
- BDI 수치에서도 통계적 유의적으로 대조군은 1.98점 평균점이 상승하였고, 실험군에서는 4.87점 감소하였음. CDI 수치에서는 대조군이 2.25점 평균점이 상승하였고, 실험군에서는 7.50점이 감소하였지만 통계적으로 유의하지는 않았음

표 5. 각 그룹 간 복용 전/후 증상 호전 정도의 평균값 차이 비교 결과

		SRI 전체	Cortisol 전체	SRI 성인	Cortisol 성인	SRI 소아	Cortisol 소아	BDI	CDI
대조군	n	42	42	38	38	4	4	38	4
	복용 전	76.98±2 5.08	10.61±5 .91	77.18±2 5.59	10.77±6 .04	75.00±2 2.64	9.05±4. 87	9.55±6. 04	9.00±4. 83
	복용 후	80.60±2 8.28	9.75±3. 86	80.71±2 8.87	9.96±3. 96	79.50±2 5.48	7.83±2. 21	11.74±7 .29	11.25±6 .70
	delta값	3.62±19 .62	-0.86±4 .89	3.53±20 .57	-0.82±5 .05	4.50±6. 46	-1.23±3 .51	1.98±5. 41	2.25±2. 36
실험군	n	38	38	33	33	5	5	34	4
	복용 전	80.97±2 9.71	7.31±3. 30	80.03±3 1.03	7.73±3. 25	87.20±2 0.09	4.54±2. 21	11.35±7 .35	15.00±9 .66
	복용 후	58.63±2 1.69	9.43±4. 26	58.45±2 2.82	9.41±3. 58	59.80±1 3.63	9.54±8. 07	5.91±6. 19	7.50±7. 00
	delta값	-22.34± 18.45	2.12±4. 56	-22.71± 18.92	1.59±3. 74	-19.25± 15.76	6.57±8. 50	-4.87±4 .23	-7.50±3 .11
p 값	복용 전	0.516	0.003	0.573	0.011	0.486	0.057	0.258	0.325
	복용 후	0	0.723	0.001	0.491	0.2	0.486	0.001	0.468
	delta값	0	0.006	0	0.026	0.029	0.114	0	0.003

- 각 그룹 간 복용 전/후 증상 호전 정도의 평균값 차이 비교 요약 결과는 <표 6>와 같음

표 6. 각 그룹 간 복용 전/후 증상 호전 정도의 평균값 차이 비교 요약 결과

	대조군		실험군		p value
	n	복용 후	n	복용 후	
SRI 전체	42	80.60±28.28	38	58.63±21.69	0
Cortisol 전체	42	9.75±3.86	38	9.43±4.26	0.723
SRI 성인	38	80.71±28.87	33	58.45±22.82	0.001
Cortisol 성인	38	9.96±3.96	33	9.41±3.58	0.491
SRI 소아	4	79.50±25.48	5	59.80±13.63	0.2
Cortisol 소아	4	7.83±2.21	5	9.54±8.07	0.486
BDI	38	11.74±7.29	34	5.91±6.19	0.001
CDI	4	11.25±6.70	4	7.50±7.00	0.468

- SRI(스트레스 반응척도) 및 BDI(성인 우울척도) 수치에서 대조군 대비 실험군이 유의하게 증상이 호전되는 현상을 확인하였음. 다만, 소아의 경우 SRI 및 CDI(소아 우울척도)에서 평균점수 차이는 명확하였으나 통계적 유의성을 나타내지 않았음. 이는 등록된 소아 피시험자의 n수가 적은 것에 의한 영향으로 판단됨
- 스트레스 호르몬인 cortisol 수치는 복용 전 대조군, 실험군 사이에 통계적 차이가 발생하

였기 때문에 두 그룹 내 복용 전/후 및 두 그룹 간 복용 후 차이를 비교하기에는 한계가 있으며 앞서 언급한 생체리듬에 의한 영향도 정확하게 반영할 수 없었음

- 따라서 기능성 후보 미생물 섭취는 스트레스성 질환 환자 특히, 성인에 대해서 스트레스 반응과 우울감을 감소시킬 것으로 예상되며, 추가 연구를 통해서 소아 연령에 대하여 유익한 효능을 기대할 수 있을 것으로 판단됨
- 스트레스성 장 질환 환자에게 기능성 후보 미생물이 미치는 영향을 확인하기 위하여 미생물 섭취 전, 섭취 후 6주, 섭취 후 10주차 분변 샘플을 수집하여 마이크로바이옴 분석에 활용함
- 총 90명의 모집 환자 중 중도 탈락한 환자를 제외한 80명의 분변 샘플을 수집하였으며, 실험일정을 고려하여 대조군 30명, 실험군 30명의 분변 샘플을 대상으로 장내균총 분석을 진행하였고, 샘플은 <표 7>와 같음

표 7. 스트레스성 장 질환 환자의 분변 샘플 현황

No.	Sample	Group	성별	나이(만)
1	M001	실험군	M	31
2	M003	실험군	F	54
3	M004	실험군	F	25
4	M005	실험군	F	41
5	M006	실험군	F	39
6	M008	실험군	F	42
7	M010	대조군	M	36
8	M011	실험군	F	30
9	M012	대조군	F	30
10	M013	실험군	F	25
11	M014	대조군	F	27
12	M015	대조군	F	40
13	M016	실험군	F	42
14	M017	대조군	F	50
15	M018	대조군	F	14
16	M019	대조군	M	10
17	M020	대조군	M	11
18	M021	실험군	M	35
19	M022	실험군	M	49
20	M023	실험군	F	18
21	M025	실험군	M	12
22	M026	실험군	F	43
23	M028	대조군	F	42
24	M029	대조군	F	40
25	M030	실험군	F	27
26	M031	실험군	F	26
27	M032	대조군	F	51
28	M033	실험군	F	27
29	M034	실험군	F	37
30	M035	대조군	F	29
31	M037	실험군	M	53
32	M039	실험군	M	24
33	M040	실험군	F	39
34	M041	실험군	F	24
35	M042	대조군	M	40
36	M043	대조군	F	24
37	M044	실험군	M	44
38	M045	실험군	M	36

39	M046	대조군	M	37
40	M049	대조군	F	26
41	M050	대조군	F	32
42	M051	대조군	F	32
43	M052	대조군	F	32
44	M056	실험군	F	43
45	M057	대조군	F	33
46	M058	대조군	F	44
47	M060	대조군	F	44
48	M061	실험군	F	43
49	M062	대조군	F	36
50	M063	대조군	M	43
51	M066	대조군	M	57
52	M067	실험군	M	47
53	M068	대조군	M	38
54	M069	실험군	M	51
55	M070	실험군	M	54
56	M071	대조군	M	28
57	M074	실험군	F	49
58	M075	대조군	F	39
59	M077	대조군	M	49
60	M078	대조군	M	57

- 장내균총 분석을 위하여 인체적용시험 피시험자들의 분변 샘플로부터 total fecal DNA를 추출하였고, gel electrophoresis와 Nanodrop을 이용하여 DNA quality를 확인하였음. 추출된 DNA는 16S rRNA의 V3-V4 amplicon region을 PCR 기반으로 증폭을 진행하였음 (그림 62). 증폭된 partial 16S rRNA 각 샘플에 대하여 index PCR를 통해 barcode sequence를 부여하였고, barcoding이 완료된 샘플은 MiSeq sequencer를 기반으로 분석을 진행함

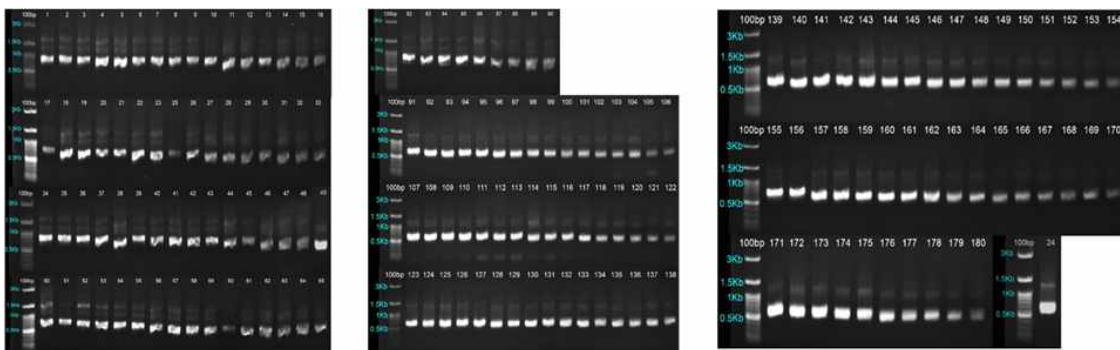


그림 62. 16S rRNA V3-V4 region PCR 증폭 후 전기영동 분석 결과

- Sequence 분석 결과 확보된 raw data를 기반으로 생물정보학 기반 통계분석 진행을 위하여 준비된 샘플 당 충분한 read 수 확보를 검증하기 위한 alpha rarefaction curve 분석을 수행함. 분석 결과, 모든 샘플의 observed features가 0에 수렴하여 충분한 read 수를 확보함을 확인함(그림 63)

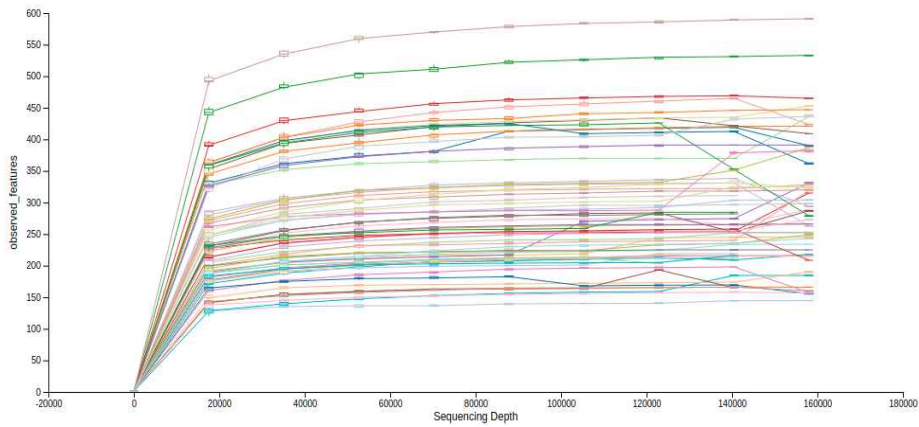


그림 63. Alpha rarefaction curve 분석 결과

- 확보된 NGS raw data를 기반으로 QIIME2 pipeline 프로그램을 활용하여 장내균총 다양성, 구성, 풍부도 등 메타게놈 분포도 분석을 진행함
- α -diversity (Shannon, Chao1 index) 분석 결과, 두 index 모두 대조군과 실험군에서 6주차에 다양성이 증가하였다가 10주차에 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않음(그림 64)

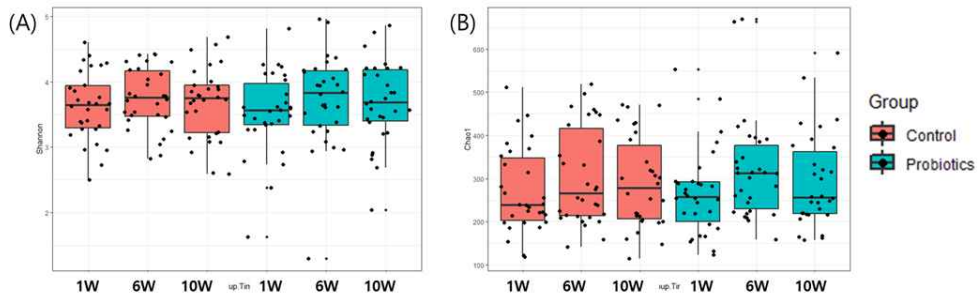


그림 64. 대조군과 실험군의 α -diversity (Shannon, Chao1 index) 분석 결과

- 샘플 간 diversity 분석을 위하여 unweighted-unifrac 알고리즘과 PCoA 분석을 기반으로 β -diversity 분석을 진행하였음. 섭취 전/후 대조군 대비 실험군에서 소폭 변화를 확인할 수 있었지만, 입원환자가 아닌 통원환자이기 때문에 섭취하는 음식이 일관적이지 않아 개인 장내균총이 매우 다르다는 한계점을 지님(그림 65)

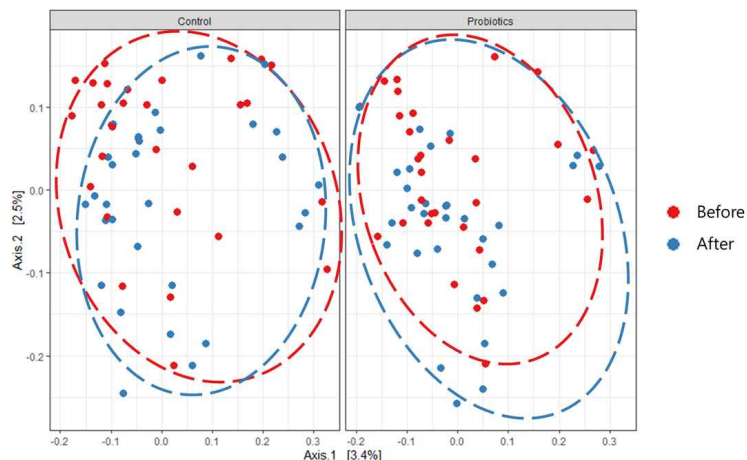


그림 65. 대조군과 실험군의 β -diversity (unweighted-unifrac) 분석 결과

- 대조군과 실험군에 대한 0주차, 6주차, 10주차 장내균총 분석을 Family, Genus 수준에서 진행하였으며, 가장 큰 비율을 차지하는 순서대로 top 11의 장내균총 비율을 측정함
- Family 수준에서 장내균총 조성 분석 결과, 섭취 후 6주차에서 실험군의 *Bacteroidaceae*의 비율이 감소하고 *Enterobacteriaceae*가 증가하였음. 10주차에서 *Ruminococcaceae*가 증가하고 *Enterobacteriaceae*가 감소하는 것을 확인함(그림 66 (A))
- Genus 수준에서 장내균총 조성 분석 결과, 섭취 후 6주차에서 실험군의 *Bacteroides*의 비율이 감소하고 *Escherichia-Shigella*의 비율이 증가 하였다가, 섭취 10주 후에 대조군보다 감소하였음. 섭취 10주차에 *Faecalibacterium*이 증가함을 확인함(그림 66 (B))

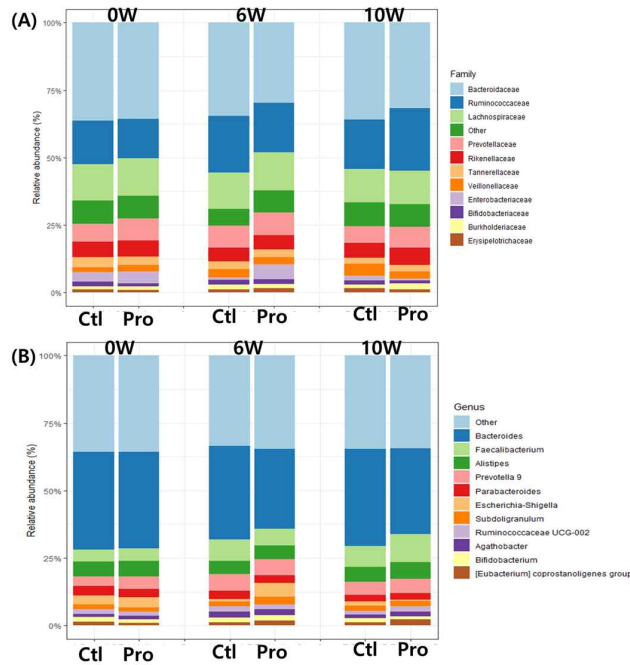


그림 66. 대조군과 실험군의 장내균총 조성 분석 결과((A) Family level, (B) Genus level)

- 또한, 상기 분석 결과를 바탕으로 Beneficial bacteria (*Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*)와 Harmful bacteria (*Escherichia-Shigella*, *Paraprevotella*, *Prevotella 2*, *Prevotella 9*, *Streptococcus*)의 Abundance 차이를 비교함(그림 67)

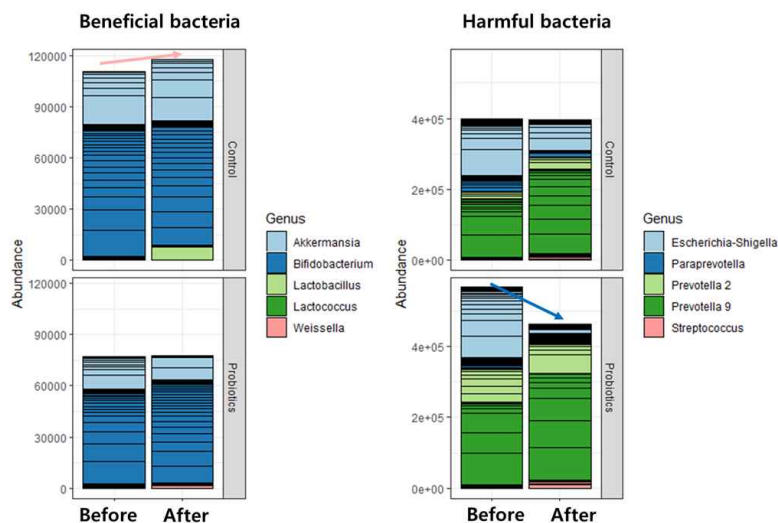


그림 67. Beneficial bacteria와 Harmful bacteria의 Group별 abundance 비교 결과

- 대조군에서는 Beneficial bacteria의 abundance 차이가 소폭 증가하였으며, 실험군에서는 섭취 전/후의 차이가 없는 것을 확인하였음. 반면, 대조군에서는 Harmful bacteria의 abundance가 차이가 없으나, 실험군에서는 Harmful bacteria의 abundance가 대폭 감소하는 경향을 확인함. 이는 기능성 후보 미생물 섭취가 IBD의 원인이 되는 Harmful bacteria 저해에 일부 영향을 주는 것으로 판단됨
- 보다 세부적인 분석을 하기 위하여 대조군과 실험군 사이의 장내미생물 조성 차이를 DESeq2프로그램을 기반으로 통계적으로 분석함(그림 68)

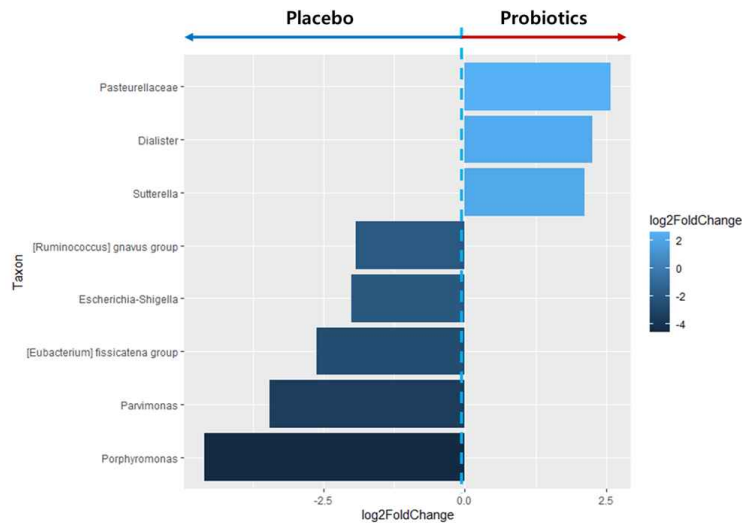


그림 68. 대조군과 실험군 사이의 Differential abundance 분석 결과

- 실험군 대비 대조군에서 *Porphyromonas*, *Parvimonas* 등의 균주가 유의적으로 증가하였으며, 대조군 대비 실험군에서 *Pasteurellaceae*, *Dialister* 등의 균주가 유의적으로 증가함을 확인함. 변화된 균주에 대해서 환자별로 섭취 전/후의 증감을 확인하고자 추가 분석을 수행함
- Differential abundance 결과와 비슷한 경향으로, *Pasteurellaceae*와 *Dialister* 균주가 대조군에서는 감소된 abundance를 보였고, 실험군에서는 증가된 abundance를 보여줌(그림 69)

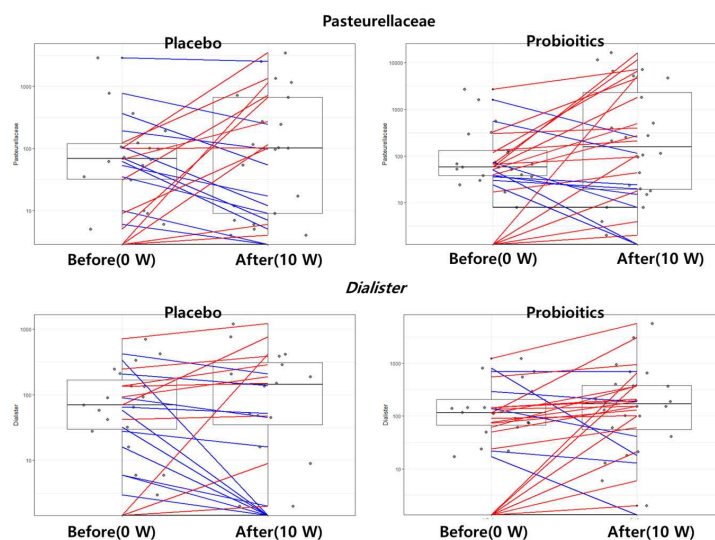


그림 69. 환자 별 샘플 섭취 전/후 *Pasteurellaceae*와 *Dialister* 균주의 증감 확인 결과 (Red line; abundance가 증가하는 샘플, Blue line; abundance가 감소하는 샘플)

- 또한 *Porphyromonas*와 *Parvimonas* 균주는 대조군 대부분 환자에서 abundance가 증가하는 반면, 실험군 대부분의 환자에서 abundance가 감소하는 것을 확인함. *Ruminococcus gnavus* group 균주도 실험군 대부분의 환자에서 감소하는 경향을 확인함(그림 70)

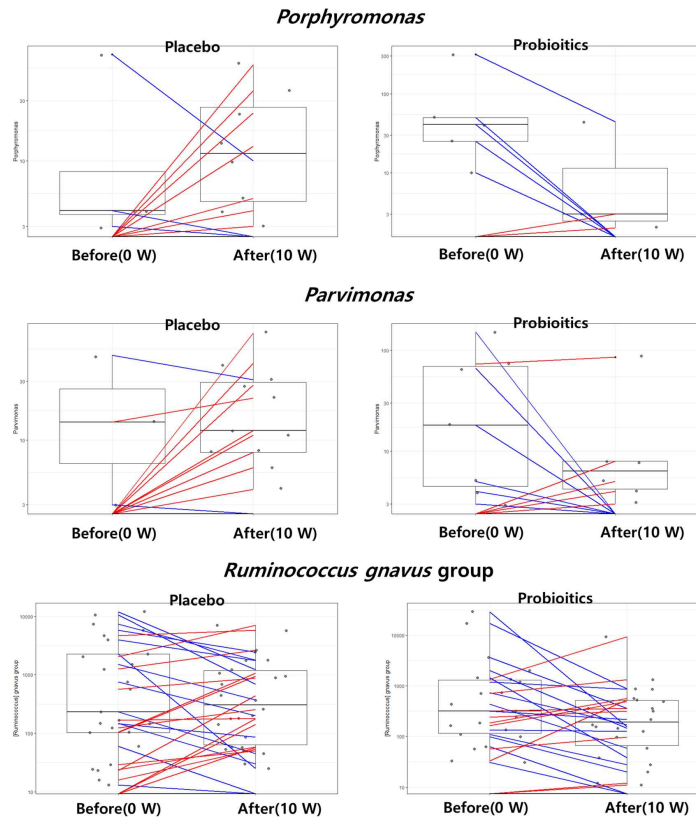


그림 70. 환자 별 샘플 섭취 전/후 *Porphyromonas*, *Parvimonas*와 *Ruminococcus gnavus* group 균주의 증감 확인 결과 (Red line; abundance가 증가하는 샘플, Blue line; abundance가 감소하는 샘플)

- 상기 변화가 나타난 균주(*Dialister*, *Parvimonas*, Pasteurellaceae, *Porphyromonas*, *Ruminococcus gnavus* group)와 IBD 및 우울증 관련 선행 연구 조사를 통해 기능성 후보 미생물에 의한 변화를 해석하고자 함
- 흥미롭게도 2019년 발표된 Nature Microbiology 논문에 의하면 총 1,000여명의 인체를 대상으로 분석 결과 *Dialister*, *Coprococcus* 균주가 우울증 환자에게 결핍되어 있음을 확인함(Mireia Valles-Colomer et al., 2019, *Nature microbiology*). 본 연구에서는 대조군의 경우 *Dialister* 균주가 감소하였고, 실험군 대부분 환자에서 증가함을 보여줌
- 또한, *Porphyromonas* 균주의 경우 *P. gingivalis* 균주가 IBD와 Alzheimer, 우울증을 유발한다고 선행 연구 되어있으며(Xida Zhao et al., 2021, *International Journal of Oral Science*, Stephen S Dominy et al., 2019, *Science Advances*, Yi-Xi Wang et al., 2019, *Brain, Behavior and Immunity*), *Ruminococcus gnavus* group 균주의 경우 역시 IBD를 유도한다고 보고되어 있음(Matthew T. Henke, 2019, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*)
- 본 연구에서 대조군 경우 IBD와 우울증을 유발하는 균주인 *Porphyromonas* 균주가 증가하는 반면, 실험군에서는 감소되는 것을 확인함. 또한, IBD를 유도하는 *Ruminococcus gnavus* group 균주도 실험군 대부분 환자에서 감소하는 것을 확인함
- 이는 실험군이 섭취한 기능성 후보 미생물이 IBD 증상을 개선하며, 우울증 관련 장내미

생물의 변화를 통해 우울증도 함께 개선할 수 있을 것으로 사료됨. 이에, 우울증 관련 임상 지표와의 상관관계 분석을 통해 장내미생물과 우울증 사이의 상관성을 분석하고자 함

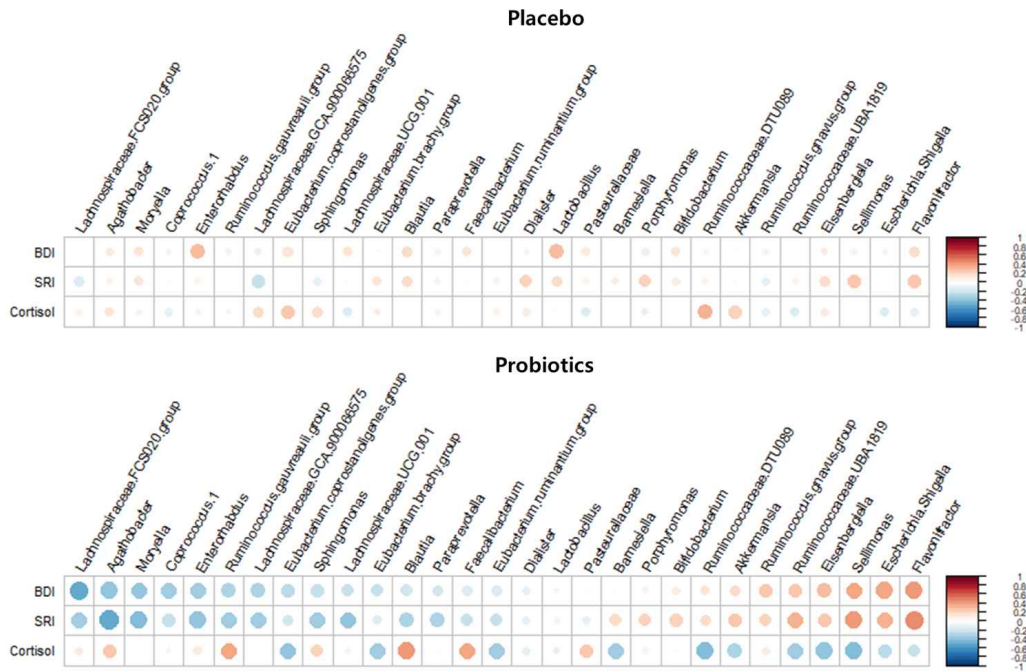


그림 71. BDI, SRI, cortisol 수치와 장내미생물과의 상관관계 분석 결과

- Spearman 상관관계 분석 결과, 실험군에서 Lachnospiraceae FCS020 group, *Agathobacter*, *Moryella*, *Corprococcus* 등의 균종이 BDI, SRI 수치와 음의 상관관계를 지니고, *Sellimonas*, *Escherichia-Shigella*, *Flavonifractor*와 같은 균종이 BDI, SRI와 양의 상관관계를 지니는 것을 확인함(그림 71)
- *Agathobacter* 균주의 경우, 수면장애를 지닌 자폐아의 장내에서 abundance가 감소한다는 사전연구 결과가 확인됨(Xueying Hua et al., 2020, *Frontiers in Psychiatry*). 해당 연구 논문에서 *Agathobacter*, butyrate와 melatonin이 양의 상관관계를 지니며, *Agathobacter*는 butyrate 생성균이기 때문에 수면장애와 *Agathobacter*가 연관성이 있다고 보고하고 있음
- 또한, 본 연구에서 *Sellimonas*와 *Flavonifractor* 균종이 BDI, SRI 수치와 양의 상관관계를 가지는 결과와 마찬가지로, 이전에 보고된 연구논문에서도 동일한 결과가 보고되었음을 확인함(Richard T. Liu., 2020. *Brain, Behavior, and Immunity*)
- 해당 논문에서는 주요 우울 장애(MDD; Major depressive disorder) 환자의 장내에서 *Sellimonas*, *Flavonifractor* 균종이 풍부하다고 보고하고 있음
- 또한 Xiaomin Yuan et al.의 연구에 따르면 우울증을 가진 ulcerative colitis(UC) 환자 그룹과 우울증이 없는 UC환자 그룹과 장내 균총을 비교 했을 때 우울증을 가진 UC환자에게서 유의미하게 *Sellimonas* 균주가 많음을 확인함 (Xiaomin Yuan et al., 2021, *Gut microbes*)

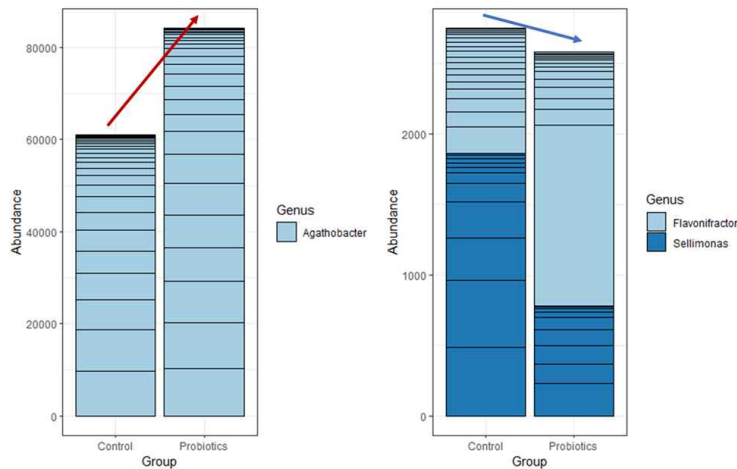


그림 72. 우울척도(BDI), 스트레스 반응척도(SRI)와 상관관계에 있는 균주의 abundance 측정 결과

- 이전 보고된 연구결과를 바탕으로, 기능성 후보 미생물 섭취 시 *Agathobacter*가 증가하고 *Sellimonas*, *Flavonifractor*가 감소하는 것을 확인하였으며(그림 72), 이에 따라 BDI, SRI수치가 유의적으로 감소함을 확인함. 이를 통해 본 연구에서 제공된 기능성 후보 미생물이 IBD 개선뿐만 아니라 우울, 스트레스 척도 개선에도 효능이 있다는 것을 시사함

10. 한국 전통발효식품 유래 기능성 후보 미생물의 인지기능개선(알츠하이머) 효능 평가 및 장내 환경 개선 검증

- 마우스 체중 측정 결과, 알츠하이머 마우스 그룹 중, 후보 미생물 투여 그룹과 대조군(1X PBS) 사이에서 유의미한 체중 차이는 나타나지 않음(그림 73)

Body weight

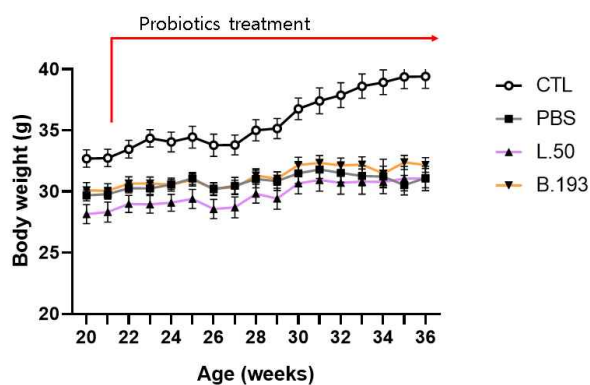


그림 73. 알츠하이머 마우스 모델의 체중 측정 결과

- Hind-limb clasping test 결과, 8개월 시점의 *L. plantarum* 50 그룹에서 clasping score가 다소 감소하는 경향을 보였음(그림 74)

Hind-limb clasp test (HCT)

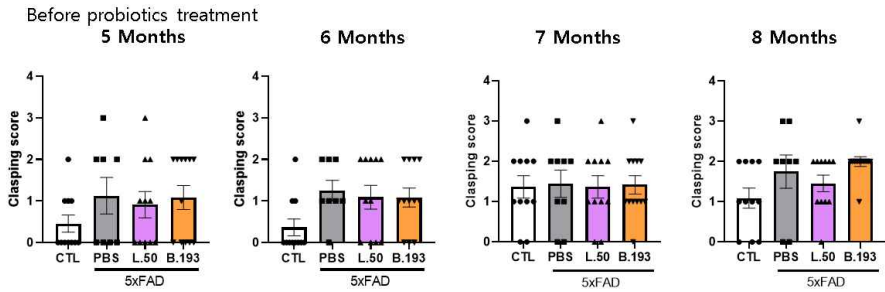


그림 74. Hind-limb clasp test 결과

- Elevated plus maze test 결과, *L. plantarum* 50 그룹에서 알츠하이머 증상 중 하나인 hyperactivity 가 다소 감소하는 경향을 보였음(그림 75)

Elevated plus maze test (EPM)

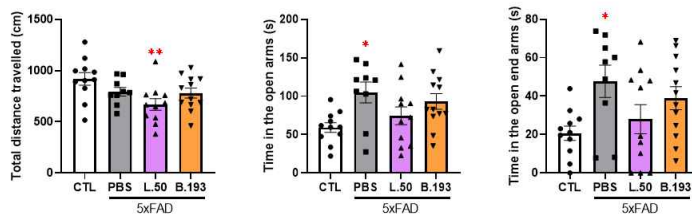


그림 75. Elevated plus maze test 결과

- Morris water maze test 결과, 8개월 시점에서 PBS, *B. bifidum* 193 그룹에 비해 *L. plantarum* 50 그룹이 대조군 마우스 그룹과 유사하게 기억 학습 능력이 개선되는 경향을 보였음(그림 76)

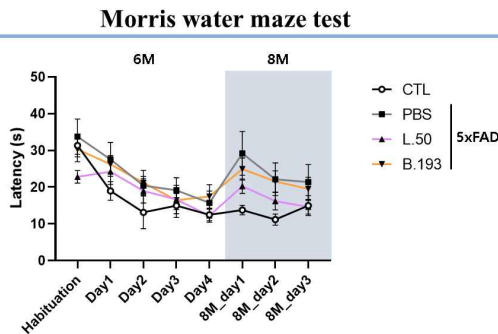


그림 76. Morris water maze test 결과

- 기존 문헌에 따르면 장내균총은 알츠하이머병 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으며 (Cryan JF et al., 2020), 장내균총 개선이 알츠하이머병의 진행에 유익한 효과를 유도할 수 있음을 시사함 (Clark A et al., 2017)
- 알츠하이머 마우스 모델에 프로바이오틱스를 투여하였을 때 염증 및 산화 스트레스 관련 유전자의 발현을 억제한다고 보고되었으며 (Kobayashi Y et al., 2017), 알츠하이머병 환자를 대상으로 한 연구에서 12주간 프로바이오틱스 섭취가 알츠하이머병 관련 마커 일 수 있는 MDA, HS-CRP, 인슐린 대사 마커, 중성지방 및 VLDL의 혈청 수준에 유리한 영

향을 미침 (Elmira Akbari et al., 2016)

- 따라서, 기능성 후보 미생물 첨가에 따른 알츠하이머 마우스 모델의 인지기능개선 효능 및 장내환경 개선 효능 검증을 위하여 0주차, 3주차, 6주차 총 3회에 걸쳐 분변 샘플을 수집하였으며 이때, 알츠하이머 마우스 모델의 5개월 노화 과정 이후 시점을 0주차로 명시하였고, 3주 간격으로 분변 샘플을 수집함
- α -diversity (Faith pd, Observed features) 확인 결과, *B. bifidum*193 그룹에서 0주차 대비 6주차의 diversity가 감소하는 경향을 보였고, *L. plantarum* 50 그룹에서 0주차 대비 6주차의 유의한 diversity 증가를 확인함(그림 77)

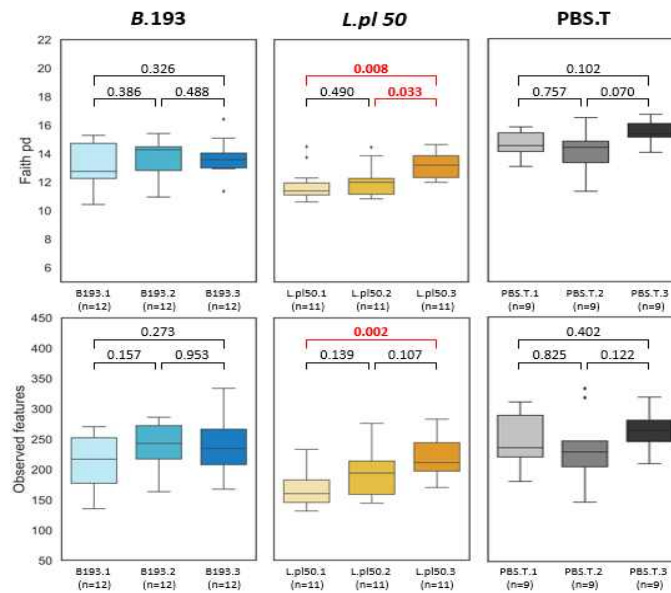


그림 77. 군주 별 섭취 기간에 따른 α -diversity (Faith pd, Observed features) 분석 결과

- β -diversity (Unweighted UniFrac) 확인 결과, 음성 대조군(1X PBS) 및 *L. plantarum* 50 그룹에서 0주차 대비 6주차의 유의적인 장내균총 변화를 확인하였고, *L. plantarum* 50 그룹의 Weighted UniFrac 결과에서 0주차 대비 3주차, 0주차 대비 6주차 모두 유의적인 장내균총 변화를 확인함(그림 78)

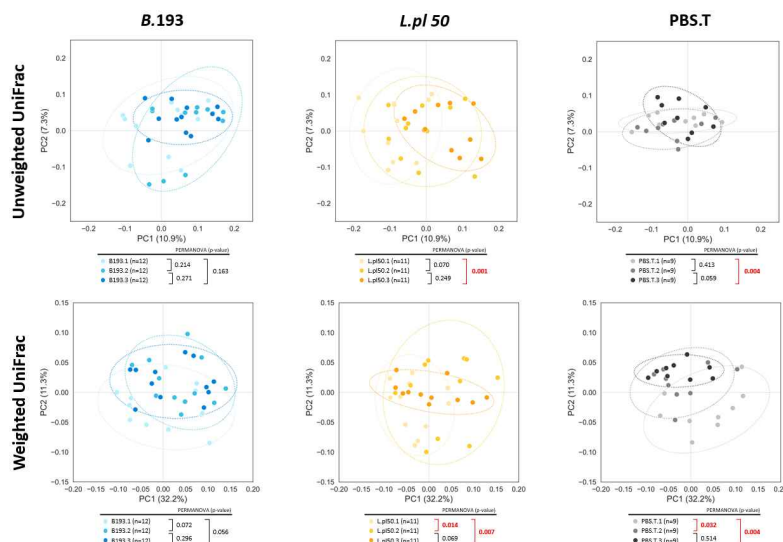


그림 78. 군주 별 섭취 기간에 따른 β -diversity (Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac) 분석 결과

- Taxonomy classification을 통해 genus 수준의 장내균총 구성 변화를 확인하였고(LDA > 3.0), minor한 taxa 변화를 확인하기 위해 LEfSe 분석을 수행하였으며, p value가 0.05 이하인 경우 *로 표기하여 통계학적으로 유의한 차이를 표시함
- *B. bifidum* 193 그룹에서 섭취 기간에 따라 *Lachnospiraceae* NK4A136 및 *Lachnospiraceae* family의 장내 상대 함량이 유의하게 증가하였고, *Parasutterella*, *Faecalibaculum*, *Dubosiella*, *Rikenellaceae* RC9 gut group의 장내 상대 함량은 유의하게 감소함
- 또한, LEfSe 분석을 통해 minor한 taxa 중 *Rikenella*, *Saccharimonas*, *Tyzzerella*의 장내 상대 함량이 유의하게 증가한 것을 확인함(그림 79)

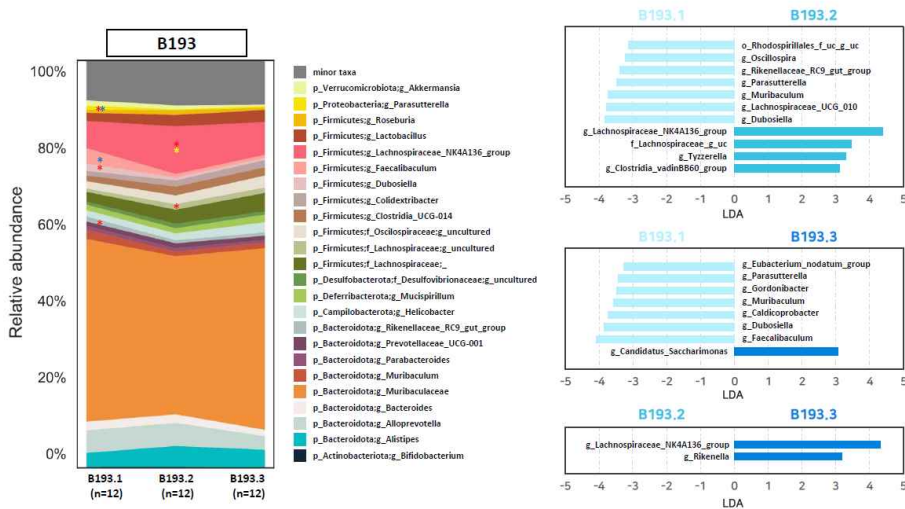


그림 79. *B. bifidum* 193 섭취 후 6주간 장내균총 변화 분석 결과

- *L. plantarum* 50 그룹에서 섭취 기간에 따라 *Lactobacillus*, *Mucispirillum*, *Helicobacter*, *Dubosiella*, *Colidextribacter* 및 *Lachnospiraceae* family의 장내 상대 함량이 유의하게 증가하였고, *Alistipes*, *Bacteroides*, *Faecalibaculum*의 장내 상대 함량은 유의하게 감소함
- 또한, LEfSe를 통해 minor한 taxa 중 *Clostridium sensu stricto* 1, GCA 900066575, *Oscillibacter*, *Turicibacter*의 장내 상대 함량이 유의하게 증가한 것을 확인함(그림 80)

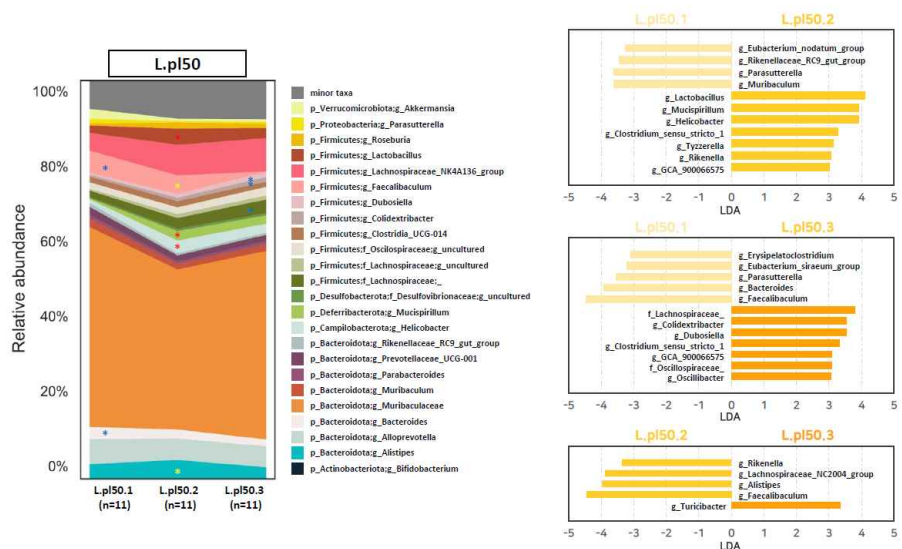


그림 80. *L. plantarum* 50 섭취 후 6주간 장내균총 변화 분석 결과

- 음성 대조군 (1X PBS) 그룹에서 섭취 기간에 따라 *Lactobacillus*, *Clostridia* UCG 014, *Prevotellaceae* UCG 001, *Roseburia*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*의 장내 상대 함량이 유의하게 증가하였고, *Oscillospiraceae* family 및 *Mucispirillum*, *Dubosiella*, *Faecalibaculum*의 장내 상대 함량은 유의하게 감소함
- 또한, LEfSe를 통해 minor한 taxa 중 *Springomonas*, *Clostridia* vadinBB60 group, *Anerotruncus*, ASF356의 장내 상대 함량이 유의하게 증가한 것을 확인함(그림 81)

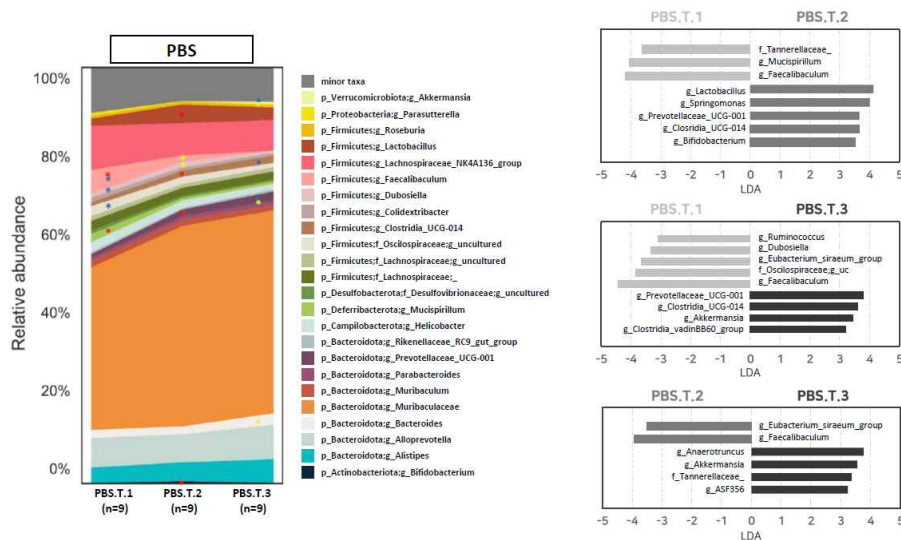


그림 81. 음성 대조군 (1X PBS) 섭취 후 6주간 장내균총 변화 분석 결과

- 기존 문헌을 통해 알츠하이머 환자의 분변에는 *Bacteroides* 속, *Alistipes* 속이 정상인에 비해 높은 비율로 존재하는 것으로 보고되었으며, *Lachnospiraceae* NK4A136은 치매 환자의 분변에서 특이적으로 낮은 비율이 존재하는 것으로 확인됨. 이러한 알츠하이머 질병 Biomarker를 중점적으로 Taxonomy 분석을 진행함
- Taxa plot 결과를 통해 *L. plantarum* 50 섭취 그룹에서 알츠하이머 질병의 Biomarker인 *Bacteroides* 속, *Alistipes* 속, *Lachnospiraceae* NK4A136의 변화가 확인되었으며, 이는 음성 대조군 (1X PBS) 과 *B. bifidum* 193 섭취에 비해 *L. plantarum* 50 섭취 그룹의 장내 환경 변화에 효과적인 것을 확인할 수 있었으며, 알츠하이머 질병 개선에 가능성이 있음을 간접적으로 보여줌
- PICRUSt 분석을 수행하여 후보 유산균 섭취 시 나타나는 균총 변화가 가져올 수 있는 기능성 변화를 규명함 (LDA > 2.0). 각 군주 섭취 그룹 별로 섭취 기간에 따라 비교하였을 때 유의적으로 높은 relative abundance를 보이는 대사경로를 확인함
- *L. plantarum* 50 그룹 결과, 0주차 대비 6주차에서 Glycolysis gluconeogenesis, Pentose phosphate pathway, Biosynthesis of unsaturated fatty acids 등 28개와 관련된 대사경로에서 높은 relative abundance를 보임(그림 82)

Level2	Level3	Lp193.1 (n=11)		vs.	Lp193.2 (n=11)		vs.	Lp193.3 (n=11)		vs.	Lp193.2 (n=11)		vs.	Lp193.3 (n=11)	
		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value
Lipid metabolism	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	-	-	-	-	0.020	2.365	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fatty acid biosynthesis	-	-	-	-	0.020	2.971	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycolipid metabolism	-	0.017	2.469	-	0.014	2.508	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycerophospholipid metabolism	-	0.036	2.362	-	0.014	2.216	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sphingolipid metabolism	2.583	0.041	-	2.518	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Steroid hormone biosynthesis	2.201	0.014	-	2.241	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Synthesis and degradation of ketone bodies	-	0.005	2.880	-	0.035	2.702	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism of cofactors and vitamins	-	3.583	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Biotin metabolism	3.094	0.020	-	3.819	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Folate biosynthesis	2.948	0.014	-	2.928	0.041	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lipoic acid metabolism	3.113	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Porphyrin and chlorophyll metabolism	-	-	-	-	0.017	2.743	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vitamin B6 metabolism	2.726	<0.001	-	2.397	0.041	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism of other amino acids	-	0.009	3.182	-	0.020	3.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Alanine metabolism	-	0.014	2.718	-	0.007	2.710	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Asparagine and D-serine metabolism	-	0.002	2.827	-	<0.001	2.873	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	-	0.014	2.648	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism of terpenoids and polyketides	Selenocompound metabolism	-	-	-	0.041	2.377	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	2.729	0.035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Polyketide sugar unit biosynthesis	2.760	0.045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nucleoside metabolism	Terpenoid backbone biosynthesis	-	0.009	2.540	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	0.005	2.594	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xenobiotics biodegradation and metabolism	Purine metabolism	-	0.006	2.266	-	0.029	2.214	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pyrimidine metabolism	-	0.014	2.372	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Atrazine degradation	-	0.017	2.205	-	<0.001	2.388	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism of other amino acids	Benzate degradation	-	0.006	2.311	-	0.041	2.165	-	-	-	-	-	-	-	-
	Caprolactam degradation	-	0.014	2.194	-	0.035	2.041	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nitroalkane degradation	-	-	-	-	0.002	2.625	-	0.009	2.606	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Level2	Level3	Lp193.1 (n=11)		vs.	Lp193.2 (n=11)		vs.	Lp193.3 (n=11)		vs.	Lp193.2 (n=11)		vs.	Lp193.3 (n=11)	
		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value
Amino acid metabolism	Alanine aspartate and glutamate metabolism	-	0.020	2.570	2.501	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cysteine and methionine metabolism	-	-	-	0.006	2.625	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycine serine and threonine metabolism	-	-	-	0.041	2.325	-	0.030	2.466	-	-	-	-	-	-
	Lysine biosynthesis	-	0.017	2.695	-	0.005	2.663	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tryptophan metabolism	-	0.008	2.271	-	0.011	2.232	-	-	-	-	-	-	-	-
	Valine leucine and isoleucine degradation	2.158	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biosynthesis of other secondary metabolites	-	2.867	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Isoflavonoid biosynthesis	-	0.027	2.782	-	<0.001	2.990	-	0.033	2.398	-	-	-	-	-
	Penicillin and cephalosporin biosynthesis	-	0.020	2.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Streptomycin biosynthesis	2.670	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbohydrate metabolism	Tropaeol piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	2.565	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	0.041	3.577	-	0.035	3.541	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aminosugar and nucleotide sugar metabolism	-	0.009	2.612	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ascorbate and aldarate metabolism	-	-	-	0.041	2.232	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Citrate cycle TCA cycle	2.613	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fructose and mannose metabolism	-	0.001	2.718	-	0.041	2.585	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycerol gluconogenesis	-	0.035	2.528	-	0.006	2.463	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inositol phosphate metabolism	2.002	0.041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pentose phosphate pathway	-	0.007	3.034	-	0.024	2.965	-	-	-	-	-	-	-	-
	Propanoate metabolism	-	0.035	2.499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Energy metabolism	Pyruvate metabolism	-	0.020	2.642	-	0.017	2.647	-	-	-	-	-	-	-	-
	Carbon fixation in photosynthetic organisms	-	-	-	0.035	2.395	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Methane metabolism	-	0.049	2.372	-	0.029	2.429	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycan biosynthesis and metabolism	Methane metabolism	2.251	0.029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nitrogen metabolism	3.779	0.011	-	3.708	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycoaminoglycan degradation	3.278	0.014	-	3.213	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lipopolysaccharide biosynthesis	3.106	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N-Glycan biosynthesis	2.172	0.035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism of other amino acids	Other glycan degradation	3.480	0.006	-	3.440	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-

그림 82. *L. plantarum* 50 그룹의 섭취 기간에 따른 PICRUST 비교 분석 결과

- *B. bifidum* 193 그룹에서는 Penicillin and cephalosporin biosynthesis, Ascorbate and aldarate metabolism, Pentose and glucuronate interconversions, Lipid metabolism, Atrazine degradation과 관련된 대사경로에서 높은 relative abundance를 보임(그림 83)

Level2	Level3	B193.1 (n=12)		vs.	B193.2 (n=12)		vs.	B193.3 (n=12)		vs.	B193.2 (n=12)		vs.	B193.3 (n=12)	
		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value		LDA	p value
Amino acid metabolism	Lysine degradation	2.176	0.010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biosynthesis of other secondary metabolites	Penicillin and cephalosporin biosynthesis	-	0.031	2.189	-	0.014	3.025	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbohydrate metabolism	Ascorbate and aldarate metabolism	-	<0.001	2.447	-	0.042	2.555	2.431	0.031	-	-	-	-	-	-
	Galactose metabolism	-	0.049	2.375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycolysis gluconeogenesis	-	0.036	2.510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pentose and glucuronate interconversions	-	0.036	2.666	-	0.027	2.737	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pentose phosphate pathway	-	0.042	2.936	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipid metabolism	Starch and sucrose metabolism	-	0.049	2.571	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	0.022	3.239	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism of other amino acids	Phosphonate and phosphinate metabolism	-	-	-	-	-	-	-	0.036	2.342	-	-	-	-	-
Xenobiotics biodegradation and metabolism	Atrazine degradation	-	0.019	2.218	-	0.002	2.718	-	-	-	-	-	-	-	-

그림 83. *B. bifidum* 193 그룹의 섭취 기간에 따른 PICRUST 비교 분석 결과

- 또한, PICRUST 분석을 수행하여 균주 섭취 그룹 별로 음성 대조군 (1X PBS) 그룹과 비교 하였을 때 유의적으로 높은 relative abundance를 보이는 대사경로를 확인함
- 6주차 비교 결과에서 *L. plantarum* 50 그룹에서는 Valine leucine and isoleucine degradation, Tryptophan metabolism, Propanoate metabolism 등 15개와 관련된 대사 경로에서 높은 relative abundance를 보임(그림 84)

Level 2	Level 3	PBS.T.1 (n=9)		vs.	Lp150.1 (n=11)		PBS.T.2 (n=9)		vs.	Lp150.2 (n=11)		PBS.T.3 (n=9)		vs.	Lp150.3 (n=11)	
		LDA	p value		LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value
Amino acid metabolism	Arginine and proline metabolism	3.316	0.041	-	-	-	-	-	-	-	-	0.014	3.477	-	-	-
	Cystine and proline metabolism	2.706	0.009	-	-	-	-	-	-	-	-	0.018	2.300	-	-	-
	Lysine biosynthesis	2.833	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	0.027	2.535	-	-	-
	Lysine degradation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.001	2.287	-	-	-
	Tryptophan metabolism	-	-	-	-	-	-	0.034	2.025	-	-	0.004	2.214	-	-	-
	Valine, leucine and isoleucine degradation	-	0.017	2.326	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Isoflavonoid biosynthesis	-	0.006	3.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tropene, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	-	0.009	2.876	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.001	2.459	-	-
	Carbohydrate metabolism	Triose phosphate metabolism	3.643	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biosynthesis of other secondary metabolites	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	2.536	0.009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Butanoate metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.034	2.556	-	-	
	Fructose and mannose metabolism	2.662	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Glycolysis gluconeogenesis	2.564	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.034	2.481	-	-	
	Pentose phosphate pathway	3.022	0.027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Propanoate metabolism	2.507	0.041	-	-	-	-	-	-	-	-	0.022	2.643	-	-	
	Pyruvate metabolism	2.734	0.018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Carbon fixation in photosynthetic organisms	2.572	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Energy metabolism	Methane metabolism	2.438	0.028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycan biosynthesis and metabolism	Nitrogen metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.027	2.062	-	-	
	Glycosaminoglycan degradation	-	0.011	3.263	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N-glycan biosynthesis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.086	0.022	-	-	-	
	Other glycan degradation	-	0.027	3.442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Peptidoglycan degradation	2.720	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

그림 84. *L. plantarum* 50 그룹과 음성 대조군 (1X PBS) 그룹의 PICRUST1 비교 분석 결과

- 6주차 비교 결과에서 *B. bifidum* 193 그룹에서는 Tryptophan metabolism, Propanoate metabolism, Synthesis and degradation of ketone bodies 등 6개와 관련된 대사경로에서 높은 relative abundance를 보임(그림 85)

Level 2	Level 3	PBS.T.1 (n=9)		vs.	B193.1 (n=12)		PBS.T.2 (n=9)		vs.	B193.2 (n=12)		PBS.T.3 (n=9)		vs.	B193.3 (n=12)	
		LDA	p value		LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value	LDA	p value
Amino acid metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	-	-	-	-	-	2.591	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-
	Arginine and proline metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020	2.483	-	-	-
	Lysine degradation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.025	2.569	-	-	-
	Tryptophan metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	2.605	-	-	-
	Valine, leucine and isoleucine degradation	-	0.044	2.127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biosynthesis of other secondary metabolites	Isoflavonoid biosynthesis	-	0.005	2.130	-	-	0.011	2.150	-	-	-	-	-	-	-	-
	Streptomycin biosynthesis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.784	0.044	-	-	-	-
Carbohydrate metabolism	Alcortate and aldarate metabolism	-	-	-	-	-	0.002	3.315	-	-	-	-	-	-	-	-
	Propanoate metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020	2.637	-	-	-
Energy metabolism	Carbon fixation in photosynthetic organisms	2.678	0.003	-	-	2.447	0.037	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Carbon fixation pathways in prokaryotes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycan biosynthesis and metabolism	Other glycan degradation	-	-	-	-	3.575	0.037	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycosaminoglycan degradation	-	-	-	-	3.038	0.037	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Peptidoglycan biosynthesis	2.602	0.037	-	-	3.229	0.037	-	-	3.301	0.044	-	-	-	-	-
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	-	-	-	-	-	0.044	2.249	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fatty acid degradation	-	-	-	-	2.125	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipid metabolism	Primary bile acid biosynthesis	-	-	-	-	2.336	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Secondary bile acid biosynthesis	-	-	-	-	3.285	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sphingo lipid metabolism	-	0.019	3.408	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Steroid biosynthesis	-	0.002	2.132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Synthesis and degradation of ketone bodies	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.044	2.772	-	-	-
	Metabolism of cofactors and vitamins	Biotin metabolism	-	-	-	2.922	0.030	-	-	3.543	0.030	-	-	-	-	-
	Folate biosynthesis	-	-	-	-	-	-	-	2.989	0.044	-	-	-	-	-	-
	Lipoic acid metabolism	-	-	-	-	-	-	-	3.165	0.044	-	-	-	-	-	-
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	-	-	-	-	2.435	0.030	-	-	2.544	0.037	-	-	-	-	-
	Diet carbon pool by folate	-	-	-	-	2.752	0.007	-	-	2.780	0.030	-	-	-	-	-
Vitamin B6 metabolism	-	-	-	-	-	-	-	2.677	0.006	-	-	-	-	-	-	

그림 85. *B. bifidum* 193 그룹과 음성 대조군 (1X PBS) 그룹의 PICRUST1 비교 분석 결과

-
- 마우스 행동실험 결과를 종합하면, 인지기능 이상을 보이는 알츠하이머 마우스 모델 (5XFAD) 에 기능성 후보 균주 투여 시, PBS 그룹, *B. bifidum* 193 그룹과 비교하여, *L. plantarum* 50이 알츠하이머 증상인 hyperactivity를 감소시키는 경향을 보이며, 기억/학습 능력 이상 증상을 개선하는 경향을 보임
 - 또한, 알츠하이머 마우스 모델에서 기능성 후보 미생물을 적용하여 장내균총 다양성 변화, 구성 변화, PICRUISt 분석을 통한 기능성을 예측하였을 때, *L. plantarum* 50이 알츠하이머로 인해 손상된 장내균총 개선 가능성과 유익 기능성을 제공할 수 있을 것으로 기대됨
 - 알츠하이머병 환자의 경우와 같이, 알츠하이머 모델 마우스 또한 주령이 늘어날수록 알츠하이머 관련 증상이 심각해지며, 알츠하이머병의 유병률은 성별에 차이가 있음. 따라서 후속 연구를 통해, 알츠하이머 증상 완화 가능성을 보여준 *L. plantarum* 50의 투여시점을 앞당겨 사전 투여 기간을 늘리고, 장기간의 걸친 시점별 증상 개선 효능 연구를 마우스 모델 성별에 따라 분석한다면 임상 적용 연구에 도움이 될 근거 자료를 확보할 수 있으리라 사료됨

(2) 정량적 연구개발성과

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		10	1		200					
1차년도	목표									
	실적				10					
2차년도	목표	10			100					
	실적	10			239					
3차년도	목표				50					
	실적				278					
4차년도	목표		1		50					
	실적		2		129					
계	목표	10	1		200					
	실적	10	2		656					

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치					40	40							20						
최종목표	2	2			2	29,000					2	1.5	7						
1차년도	목표												1						
	실적												3						
2차년도	목표					1					1	1.5	2						
	실적					1							10	4					
3차년도	목표	1	1				2,000						2						
	실	1		1	6.1		6,4				2	3.1	7	6					

도	적				9	46												
4	목	1	1			1	2,000					1	1.5	2				
차	표																	
년	실	1			0.49	1	6,477							8				
도	적																	
소	목	2	2			2	4,000					2	1.5	7				
계	표																	
	실	2	0		6.68	2	12,923					2	3.1	28		10		
	적																	
종							5,000											
료																		
1																		
차																		
년																		
도																		
종																		
료																		
2																		
차																		
년																		
도																		
종																		
료																		
3																		
차																		
년																		
도																		
종																		
료																		
4																		
차																		
년																		
도																		
종																		
료																		
5																		
차																		
년																		
도																		
소																		
계																		
합		2	0		6.68	2	12,923					2	3.1	28		10		

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Complete genome sequencing	<i>B. bifidum</i> 193의 유전체 염기서열 분석	2019.11.22	igem-0001021	11.8
2	Complete genome sequencing	<i>L. plantarum</i> 37의 유전체 염기서열 분석	2019.11.22	igem-0001022	6
3	Complete genome sequencing	<i>L. plantarum</i> 50의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001025	14.2
4	Complete genome sequencing	<i>L. plantarum</i> 182의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001026	7.6
5	Complete genome sequencing	<i>L. plantarum</i> 120의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001029	8.1
6	Complete genome sequencing	<i>L. plantarum</i> 117의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001030	5.9
7	Complete genome sequencing	<i>Lc. lactis</i> 140의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001031	16.4
8	Complete genome sequencing	<i>Lc. lactis</i> 211의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001032	13.1
9	Complete genome sequencing	<i>L. curvatus</i> 137의 유전체 염기서열 분석	2019.11.24	igem-0001301	11.2
10	Complete genome sequencing	<i>L. curvatus</i> 160의 유전체 염기서열 분석	2019.11.24	igem-0001302	10.3

iGEM 생명정보 등록확인서

사업명	포스트게놈산학융합을위한다목적유전체사업(2020(농림부))			NITE고유번호	1545017918
바이오프로젝트	과제명	유전체 기반 발효식품 미생물 기능성 분석 및 면역활성 검사			
	책임자명	이주훈	부책임자명	918022-04-1-HK020	
	소속기관	경희대학교	부사업	NCDA	직위
총 연구기간	2019-07-02 ~ 2021-12-31		과제유형	일반	
실험	실험명	비피도박테리움 비피덤 193의 유전체 염기서열 분석			
	실험설명	비피도박테리움 비피덤 193 균주의 유전체 수준에서의 특성을 파악하기 위하여 전장유전체 염기서열 분석을 진행함			
	생과지표	표준유전체해독	등록번호	igem-0001021	
	Platform	PacBio RS II (7B)	연수사업	농림축산식품부 생명유전체전략연구사업단	
샘플	생물정보 (형태-대분류>수분류)	Nucleotide> Nucleotide> DNA			
	공개일	2020-11-30	NANAC 번호		
	샘플	샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.			

「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품부 생명유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인합니다.
등록확인 : 2019년 11월 22일

농림축산식품
미생물유전체전략연구사업단장

- 전략미생물해독(B.bifidum 193) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.curvatus 137) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.curvatus 160) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.plantarum 117) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.plantarum 120) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.plantarum 182) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.plantarum 37) 대외비문서
- 전략미생물해독(L.plantarum 50) 대외비문서
- 전략미생물해독(Lc.lactis 140) 대외비문서
- 전략미생물해독(Lc.lactis 211) 대외비문서

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Complete genome sequencing	<i>B. bifidum</i> 193의 유전체 염기서열 분석	2019.11.22	igem-0001021	11.8
2	Complete genome sequencing	<i>L. plantarum</i> 182의 유전체 염기서열 분석	2019.11.23	igem-0001026	7.6

iGEM 생명정보 등록확인서

사업명	포스트게놈산학융합을위한다목적유전체사업(2020(농림부))			NITE고유번호	1545017918
바이오프로젝트	과제명	유전체 기반 발효식품 미생물 기능성 분석 및 면역활성 검사			
	책임자명	이주훈	부책임자명	918022-04-1-HK020	
	소속기관	경희대학교	부사업	NCDA	직위
총 연구기간	2019-07-02 ~ 2021-12-31		과제유형	일반	
실험	실험명	비피도박테리움 비피덤 193의 유전체 염기서열 분석			
	실험설명	비피도박테리움 비피덤 193 균주의 유전체 수준에서의 특성을 파악하기 위하여 전장유전체 염기서열 분석을 진행함			
	생과지표	표준유전체해독	등록번호	igem-0001021	
	Platform	PacBio RS II (7B)	연수사업	농림축산식품부 생명유전체전략연구사업단	
샘플	생물정보 (형태-대분류>수분류)	Nucleotide> Nucleotide> DNA			
	공개일	2020-11-30	NANAC 번호		
	샘플	샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.			

「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품부 생명유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인합니다.
등록확인 : 2019년 11월 22일

농림축산식품
미생물유전체전략연구사업단장

iGEM 생명정보 등록확인서

사업명	포스트게놈산학융합을위한다목적유전체사업(2020(농림부))			NITE고유번호	1545017918
바이오프로젝트	과제명	유전체 기반 발효식품 미생물 기능성 분석 및 면역활성 검사			
	책임자명	이주훈	부책임자명	918022-04-1-HK020	
	소속기관	경희대학교	부사업	NCDA	직위
총 연구기간	2019-07-02 ~ 2021-12-31		과제유형	일반	
실험	실험명	락토비실러스 곡산이럼 182의 유전체 염기서열 분석			
	실험설명	락토비실러스 곡산이럼 182 균주의 유전체 수준에서의 특성을 파악하기 위하여 전장유전체 염기서열 분석을 진행함			
	생과지표	표준유전체해독	등록번호	igem-0001026	
	Platform	PacBio RS II (7B)	연수사업	농림축산식품부 생명유전체전략연구사업단	
샘플	생물정보 (형태-대분류>수분류)	Nucleotide> Nucleotide> DNA			
	공개일	2020-11-30	NANAC 번호		
	샘플	샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.			

「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품부 생명유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인합니다.
등록확인 : 2019년 11월 23일

농림축산식품
미생물유전체전략연구사업단장

□ 표준유전체 해독

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

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. rhamnosus</i> GG 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
2	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. brevis</i> 20 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
3	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. brevis</i> 132 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
4	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. brevis</i> HD-01 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
5	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. plantarum</i> 37 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
6	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. plantarum</i> 50 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
7	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. plantarum</i> 117 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
8	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. plantarum</i> 120 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
9	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. plantarum</i> 182 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
10	16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. plantarum</i> HD-02 도입	18.11.06	IGEM-0000187	0.03
11, 11_0- 153	12명 피험자 분변의 16S <i>rRNA</i> 유전자 기반 균총분석	장내균총 모사시스템 내 <i>L. rhamnosus</i> GG 외 9종 유산균주 도입	19.11.22- 20.11.21	IGEM0001028, 0001033-0001 103, 0001105-1155, 0001157-1000 1166, 0001168-0001 178	3.6
154-24 8	쥐 분변의 16s rRNA 유전자 기반 균총 분석	Control 쥐, DSS 섭취 쥐, DSS+유산균주 섭취 쥐의 1,2,3,4주차 분변 샘플 분석	2019.11.24	IGEM0001303- 0001379, 0001381-0001 398	3.6
249-52 6	쥐 분변의 16s rRNA 유전자 기반 균총 분석	1XPBS 섭취 쥐, PBS+Stress 쥐, 유산균주+Stress 쥐의 1,3,7주차 분변 샘플 분석	20.10.19-21.11.30	IGEM0001655, 0001658-1673, 0001675-1686, 0001689, 0001691-1766, 0001768-0001 937, 0001948-0001 948	10.08
526-65 5	쥐 분변의 16S rRNA 유전자 기반 균총 분석	1XPBS, LP50, BB193 섭취한 알츠하이머 쥐의 1~3주차 분변 샘플 균총분석	21.12.22	IGEM0002407- 0002469, 0002471-0002 504, 0002506-0002 537	0.30

- 🔍 메타유전체분석(001-010)
- 🔍 메타유전체분석(014)
- 🔍 메타유전체분석(019)
- 🔍 메타유전체분석(024)
- 🔍 메타유전체분석(029)
- 🔍 메타유전체분석(034)
- 🔍 메타유전체분석(039)
- 🔍 메타유전체분석(044)
- 🔍 메타유전체분석(049)

- 🔍 메타유전체분석(011)
- 🔍 메타유전체분석(015)
- 🔍 메타유전체분석(020)
- 🔍 메타유전체분석(025)
- 🔍 메타유전체분석(030)
- 🔍 메타유전체분석(035)
- 🔍 메타유전체분석(040)
- 🔍 메타유전체분석(045)
- 🔍 메타유전체분석(050)

- 🔍 메타유전체분석(011_0)
- 🔍 메타유전체분석(016)
- 🔍 메타유전체분석(021)
- 🔍 메타유전체분석(026)
- 🔍 메타유전체분석(031)
- 🔍 메타유전체분석(036)
- 🔍 메타유전체분석(041)
- 🔍 메타유전체분석(046)

- 🔍 메타유전체분석(012)
- 🔍 메타유전체분석(017)
- 🔍 메타유전체분석(022)
- 🔍 메타유전체분석(027)
- 🔍 메타유전체분석(032)
- 🔍 메타유전체분석(037)
- 🔍 메타유전체분석(042)
- 🔍 메타유전체분석(047)

- 🔍 메타유전체분석(013)
- 🔍 메타유전체분석(018)
- 🔍 메타유전체분석(023)
- 🔍 메타유전체분석(028)
- 🔍 메타유전체분석(033)
- 🔍 메타유전체분석(038)
- 🔍 메타유전체분석(043)
- 🔍 메타유전체분석(048)

A 메타유전체분석(501)
 A 메타유전체분석(506)
 A 메타유전체분석(511)
 A 메타유전체분석(516)
 A 메타유전체분석(521)
 A 메타유전체분석(526)-인지BB193
 A 메타유전체분석(531)
 A 메타유전체분석(536)
 A 메타유전체분석(541)-질량PBS
 A 메타유전체분석(546)-질량BB193

A 메타유전체분석(502)
 A 메타유전체분석(507)
 A 메타유전체분석(512)
 A 메타유전체분석(517)
 A 메타유전체분석(522)
 A 메타유전체분석(527)-질량BB193
 A 메타유전체분석(532)
 A 메타유전체분석(537)-질량PBS
 A 메타유전체분석(542)-질량BB193
 A 메타유전체분석(547)

A 메타유전체분석(503)
 A 메타유전체분석(508)
 A 메타유전체분석(513)
 A 메타유전체분석(518)
 A 메타유전체분석(523)
 A 메타유전체분석(528)
 A 메타유전체분석(533)
 A 메타유전체분석(538)-질량BB193
 A 메타유전체분석(543)-질량PBS
 A 메타유전체분석(548)

A 메타유전체분석(504)
 A 메타유전체분석(509)
 A 메타유전체분석(514)
 A 메타유전체분석(519)
 A 메타유전체분석(524)
 A 메타유전체분석(529)
 A 메타유전체분석(534)
 A 메타유전체분석(539)
 A 메타유전체분석(544)-질량BB193
 A 메타유전체분석(549)

A 메타유전체분석(505)
 A 메타유전체분석(510)
 A 메타유전체분석(515)
 A 메타유전체분석(520)
 A 메타유전체분석(525)-인지BB193
 A 메타유전체분석(530)
 A 메타유전체분석(535)
 A 메타유전체분석(540)
 A 메타유전체분석(545)-질량PBS
 A 메타유전체분석(550)

A 메타유전체분석(551)
 A 메타유전체분석(556)
 A 메타유전체분석(561)-질량BB193
 A 메타유전체분석(566)
 A 메타유전체분석(571)-질량BB193
 A 메타유전체분석(576)-질량BB193
 A 메타유전체분석(581)
 A 메타유전체분석(586)-질량LP50
 A 메타유전체분석(591)-질량PBS
 A 메타유전체분석(596)-질량PBS

A 메타유전체분석(552)
 A 메타유전체분석(557)-질량PBS
 A 메타유전체분석(562)-질량PBS
 A 메타유전체분석(567)
 A 메타유전체분석(572)-질량PBS
 A 메타유전체분석(577)-질량PBS
 A 메타유전체분석(582)-질량LP50
 A 메타유전체분석(587)-질량PBS
 A 메타유전체분석(592)-질량LP50
 A 메타유전체분석(597)

A 메타유전체분석(553)-질량PBS
 A 메타유전체분석(558)
 A 메타유전체분석(563)-질량BB193
 A 메타유전체분석(568)
 A 메타유전체분석(573)-질량BB193
 A 메타유전체분석(578)
 A 메타유전체분석(583)-질량PBS
 A 메타유전체분석(588)
 A 메타유전체분석(593)
 A 메타유전체분석(598)-질량LP50

A 메타유전체분석(554)-질량BB193
 A 메타유전체분석(559)-질량BB193
 A 메타유전체분석(564)
 A 메타유전체분석(569)-질량PBS
 A 메타유전체분석(574)-질량PBS
 A 메타유전체분석(579)
 A 메타유전체분석(584)-질량LP50
 A 메타유전체분석(589)
 A 메타유전체분석(594)-질량PBS
 A 메타유전체분석(599)-질량PBS

A 메타유전체분석(555)
 A 메타유전체분석(560)-질량PBS
 A 메타유전체분석(565)
 A 메타유전체분석(570)
 A 메타유전체분석(575)
 A 메타유전체분석(580)
 A 메타유전체분석(585)-질량PBS
 A 메타유전체분석(590)-질량LP50
 A 메타유전체분석(595)-질량LP50
 A 메타유전체분석(600)

A 메타유전체분석(601)-질량LP50
 A 메타유전체분석(606)-질량LP50
 A 메타유전체분석(611)-질량PBS
 A 메타유전체분석(616)-질량LP50
 A 메타유전체분석(621)-질량PBS
 A 메타유전체분석(626)-질량PBS
 A 메타유전체분석(631)-질량LP50
 A 메타유전체분석(636)-질량PBS
 A 메타유전체분석(641)
 A 메타유전체분석(646)-질량LP50
 A 메타유전체분석(651)

A 메타유전체분석(602)-질량PBS
 A 메타유전체분석(607)-질량PBS
 A 메타유전체분석(612)
 A 메타유전체분석(617)-질량PBS
 A 메타유전체분석(622)-질량LP50
 A 메타유전체분석(627)-질량LP50
 A 메타유전체분석(632)-질량PBS
 A 메타유전체분석(637)
 A 메타유전체분석(642)-질량PBS
 A 메타유전체분석(647)-질량PBS
 A 메타유전체분석(652)

A 메타유전체분석(603)
 A 메타유전체분석(608)-질량LP50
 A 메타유전체분석(613)-질량LP50
 A 메타유전체분석(618)-질량LP50
 A 메타유전체분석(623)
 A 메타유전체분석(628)
 A 메타유전체분석(633)-질량LP50
 A 메타유전체분석(638)-질량LP50
 A 메타유전체분석(643)
 A 메타유전체분석(648)
 A 메타유전체분석(653)

A 메타유전체분석(604)-질량LP50
 A 메타유전체분석(609)-질량PBS
 A 메타유전체분석(614)
 A 메타유전체분석(619)-질량PBS
 A 메타유전체분석(624)
 A 메타유전체분석(629)-질량PBS
 A 메타유전체분석(634)-질량PBS
 A 메타유전체분석(639)-질량PBS
 A 메타유전체분석(644)-질량LP50
 A 메타유전체분석(649)-질량LP50
 A 메타유전체분석(654)

A 메타유전체분석(605)-질량PBS
 A 메타유전체분석(610)-질량LP50
 A 메타유전체분석(615)-질량PBS
 A 메타유전체분석(620)-질량LP50
 A 메타유전체분석(625)
 A 메타유전체분석(630)
 A 메타유전체분석(635)-질량LP50
 A 메타유전체분석(640)-질량LP50
 A 메타유전체분석(645)-질량PBS
 A 메타유전체분석(650)-질량PBS
 A 메타유전체분석(655)

□ 유전체 분석기술 개발

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

□ NABIC 등록

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

□ 병원성미생물진단마커 개발

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

□ 병원성미생물 정보 완성

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

□ 미생물 병발생 기작 규명

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

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Microbiome Study of initial Gut Microbiota from Newborn Infants to Children Reveals that Diet Determines Its Compositional Development	Journal of Microbiology and Biotechnology	Hye-Jin Ku	Vol. 30 No. 07	대한민국	한국미생물생명공학회	SCI (IF 1.992, 2020년)	2020.04.09	1017-7825(pISSN) 1738-8872(eISSN)	
2	Delayed Establishment of Gut Microbiota in Infants Delivered by Cesarean Section	Frontiers in Microbiology	Gyungcheon Kim	Vol. 11	SWITZERLAND	FRONTIERS MEDIA SA	SCI (IF 4.235, 2020년)	2020.09.11	1664-302X (ISSN)	



J. Microbiol. Biotechnol. 2020, 30(7), 1067-1071
https://doi.org/10.4014/jmb.2003.02042



ORIGINAL RESEARCH
published: 11 September 2020
doi: 10.3389/fmicb.2020.02099

Microbiome Study of Initial Gut Microbiota from Newborn Infants to Children Reveals that Diet Determines Its Compositional Development

Hye-Jin Ku¹, You-Tae Kim¹, and Ju-Hoon Lee^{*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

To understand the formation of initial gut microbiota, three initial fecal samples were collected from two groups of two breast milk-fed (BM1) and seven formula milk-fed (FM1) infants, and the compositional changes in gut microbiota were determined using metagenomics. Compositional change analysis during week one showed that *Bifidobacterium* increased from the first to the third fecal samples in the BM1 group (1.3% to 35.1%), while *Klebsiella* and *Serratia* were detected in the third fecal sample of the FM1 group (4.4% and 34.2%, respectively), suggesting the beneficial effect of breast milk intake. To further understand the compositional changes during progression from infancy to childhood (i.e., from three weeks to five years of age), additional fecal samples were collected from four groups of two breast milk-fed infants (BM2), one formula milk-fed toddler (FM2), three weaning food-fed toddlers (WF), and three solid food-fed children (SF). Subsequent compositional change analysis and principal coordinates analysis (PCoA) revealed that the composition of the gut microbiota changed from an infant-like composition to an adult-like one in conjunction with dietary changes. Interestingly, overall gut microbiota composition analyses during the period of progression from infancy to childhood suggested increasing complexity of gut microbiota as well as emergence of a new species of bacteria capable of digesting complex carbohydrates in WF and SF groups, substantiating that diet type is a key factor in determining the composition of gut microbiota. Consequently, this study may be useful as a guide to understanding the development of initial gut microbiota based on diet.

Keywords: Microbiome, initial gut microbiota, breast milk feeding, formula milk feeding, diet

Delayed Establishment of Gut Microbiota in Infants Delivered by Cesarean Section

Gyungcheon Kim^{1,2*}, Jaewoong Bae¹, Mi Jin Kim³, Hyeji Kwon⁴, Gwoncheol Park⁵, Seok-Jin Kim¹, Yon Ho Choe¹, Jsook Kim⁶, Sook-Hyun Park⁷, Byung-Ho Choe¹, Hakdong Shin⁸ and Ben Kang^{1*}

¹R&D Institute, BioScience Co., Ltd., Seoul, South Korea, ²Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, Gyeongju University, Gyeongju, South Korea, ³Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, South Korea, ⁴Department of Pediatrics, School of Medicine, Hanyang National University, Seoul, South Korea

OPEN ACCESS

Edited by: Fabrice Martin, INRA Centre de Jouy-en-Josas, France
Reviewed by: Luis Ojeda, Nestlé Research Center, Switzerland; Zhifeng Sun, Inner Mongolia Agricultural University, China
*Correspondence: Gyungcheon Kim, gkim@khu.ac.kr; Ben Kang, bskang@khu.ac.kr
†These authors have contributed

The maternal vaginal microbiome is an important source for infant gut microbiome development. However, infants delivered by Cesarean section (CS) do not contact the maternal vaginal microbiome and this delivery method may perturb the early establishment and development of the gut microbiome. The aim of this study was to investigate the early gut microbiota of Korean newborns receiving the same postpartum care services for two weeks after birth by delivery mode using fecal samples collected at days 3, 7, and 14. Early gut microbiota development patterns were examined using 16S rRNA gene-based sequencing from 132 infants either born vaginally (VD, n = 64) or via Cesarean section (CS, n = 68). VD-born neonates showed increased alpha diversity in infant fecal samples collected at days 7 and 14 compared to those from day 3, while those of CS infants did not differ (p < 0.015). Bacterial structures of infants from both groups separated at day 7 (p < 0.001) and day 14 (p < 0.01). The bacterial structure of VD infants gradually changed over time (day 3 vs. day 7, p < 0.012; day 3 vs. day 14, p < 0.004). Two 14 members of *PCoA* indicate different from day 3 and 7, respectively.

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2018 한국유산균, 프로바이오틱스 학회 추계 국제 심포지엄	성수현	2018. 11. 30	세종대학교	대한민국
2	2018 제3회 엠바이옴 컨퍼런스 & 제10회 연세바이옴인더스트리 포럼	이주훈	2018. 11. 30	연세대학교	대한민국
3	2018 제3회 엠바이옴 컨퍼런스 & 제10회 연세바이옴인더스트리 포럼	양진오	2018. 11. 30	연세대학교	대한민국
4	한국프로바이오틱스학회 정기 심포지움	양진오	2019. 02. 21	배화여자대학교	대한민국
5	IPC (International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health) 2019	이병민	2019.06.17~2019.06.21	프라하	체코
6	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	기윤경	2019. 04. 18	제주 서귀포시	대한민국
7	2019 ASM microbe	이요셉	2019. 06. 23	샌 프란시스코	미국
8	2019년도 한국미생물·생명공학회 동계 심포지움	성수현	2019. 01. 15	용평	대한민국
9	13TH INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON PROBIOTICS, PREBIOTICS, GUT MICROBIOTA AND HEALTH IPC2019	성수현	2019.06.17~2019.06.21	프라하	체코
10	KMB 2019 국제학술대회 및 정기학술대회	신학동	2019. 06. 24	제주	대한민국
11	2019 한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회	성수현	2019. 06. 27	인천	대한민국
12	2019년 한국임상영양학회 하계학술대회	신학동	2019. 06. 29	서울	대한민국
13	2019 한국미생물학회연합 정기학술대회	성수현	2019. 10. 25	서울	대한민국

14	2020 한국식품과학회 국제 학술대회 및 정기총회	김경천	2020. 07. 01	광주	대한민국
15	2020 한국식품과학회 국제 학술대회 및 정기총회	신학동	2020. 07. 03	광주	대한민국
16	2020 한국미생물생명공학회 국제 학술대회 및 정기총회	정선일	2020. 09. 23.	e-Conference	대한민국
17	한국미생물생명공학회 KMB2020	정예진	2020. 09. 23	e-Conference	대한민국
18	한국미생물학회 MSK2020	정예진	2020. 10. 07	e-Conference	대한민국
19	한국낙농식품응용생물학회 제81회 정기 학술대회 및 온라인 심포지엄	양진오	2020. 10. 16	e-Conference	대한민국
20	2020 한국영양학회 국제 학술대회	신학동	2020. 11. 06.	e-Conference	대한민국
21	2021 한국미생물생명공학회 국제 학술대회 및 정기총회	박지영	2021. 06. 23.	부산	대한민국
22	2021 한국미생물생명공학회 국제 학술대회 및 정기총회	유도희	2021. 06. 23.	부산	대한민국
23	2021 한국미생물생명공학회 국제 학술대회 및 정기총회	김형욱	2021. 06. 24.	부산	대한민국
24	2021 한국식품과학회	박지영	2021. 07. 07.	대전	대한민국
25	제6회 mBiome International Conference	이병민	2021. 12. 08.	서울	대한민국
26	제6회 mBiome International Conference	유도희	2021. 12. 08.	서울	대한민국
27	제6회 mBiome International Conference	이수정	2021. 12. 08.	서울	대한민국
28	제6회 mBiome International Conference	김경천	2021. 12. 08.	서울	대한민국



기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 182	KCTC 14092BP	Korean Collection for Type Cultures	2019
2	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 193	KCTC 14782BP	Korean Collection for Type Cultures	2021

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 1732, Daejeong-dae, Gilhang-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
 Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Lactobacillus plantarum</i> 182	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 14092BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: SNUR&DM Foundation, Seoul National University
 SNUR&DM Foundation, Seoul National University
 1, Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul
 Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Bifidobacterium bifidum</i> 193	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 14782BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	

[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	면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182	대한민국	경희대학교 산학협력단	2019.12.24	10-2019-0173 899				이주훈 (100%)		
2	신규한 비피도박테리움 비피덤 193 균주를 포함하는 프로바이오틱 조성물	대한민국	서울대학교 산학협력단	2021.11.25	10-2021-0164 279				이주훈 (100%)		

출원 번호 통지서

출원 일자 2019.12.24
 특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2019-0173899 (접수번호 1-1-2019-1334739-04)
 출원인 명칭 경희대학교 산학협력단(2-2004-007362-3)
 대리인 성명 위병갑(9-2004-000155-3)
 발명자 성명 이주훈
 발명의 명칭 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182
 (Lactobacillus plantarum 182)

출원 번호 통지서

출원 일자 2021.11.25
 특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1070057)
 출원 번호 10-2021-0164279 (접수번호 1-1-2021-1363073-22)
 (DAS접근코드E885)
 출원인 명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)
 대리인 성명 특허법인이름리온(9-2016-100061-5)
 발명자 성명 이주훈
 발명의 명칭 신규한 비피도박테리움 비피덤 193 균주를 포함하는 프로바이오틱 조성물

특 허 청 장 특 허 청 장

○ 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

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

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

○ 국제표준

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

* 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

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	상하목장 YO 베이비 1단계 플레인	2019.11.19~20	매일유업(주)	매일유업 청양공장	식품	-		
2	스트레스 완화 프로바이옥스(가제)	2021.03.31	뉴트리케어	뉴트리케어 식품공장(횡성)	식품	-		



□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시권	면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용	매일유업(주)	2019.12.31	5,500,000	
2	통상실시권	면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용	매일유업(주)	2020.12.31	696,852	6,196,852
3	통상실시권	면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용	매일유업(주)	2021.12.31	490,460	6,687,312

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	기존 제품 개선	국내	락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용(플레인)	기존 제품 적용	매일유업(주)	2,715,087		2020	
2	기술이전	기존 제품 개선	국내	락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용(말기바나나)	기존 제품 적용	매일유업(주)	1,824,578		2020	
3	기술이전	기존 제품 개선	국내	락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용(사과당근)	기존 제품 적용	매일유업(주)	1,907,023		2020	
4	기술이전	기존 제품 개선	국내	락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용(플레인)	기존 제품 적용	매일유업(주)	2,757,948		2021	

5	기술이전	기존 제품 개선	국내	락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용(딸기바나나)	기존 제품 적용	매일유업(주)	1,989,494	2021
6	기술이전	기존 제품 개선	국내	락토바실러스 플란타럼 182의 제품 적용(사과당근)	기존 제품 적용	매일유업(주)	1,729,795	2021

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

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 플레인)	2020	2,715,087	-	5,473,035	매출원장 발취
	2021	2,757,948	-		
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 딸기바나나)	2020	1,824,578	-	3,814,072	매출원장 발취
	2021	1,989,494	-		
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 사과당근)	2020	1,907,023	-	3,636,818	매출원장 발취
	2021	1,729,795	-		
합계					

<첨부> 동립축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	주관연구기관	연구책임자	기밀 정보	관련 실적
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 플레인)	매일유업(주)	왕진오	2020년 12월 기준	특허출원(○), 공문() 소트브레() 디자인() 상표() 기타(상사) 명칭(원호): 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182(Lactobacillus plantarum 182) (출원번호 10-2019-0173899) 기술실시 명칭: 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182

해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	내출액 (2020년 12월 기준 누계, 백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
상하목장 100 베이비 180개 락토바		국내 2,715	5

* 첨부: 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출내역표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2022년 01월 28일
연구책임자: 왕진오 (사) 매일유업(주)

<첨부> 동립축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	주관연구기관	연구책임자	기밀 정보	관련 실적
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(사과당근)	매일유업(주)	왕진오	2020년 12월 기준	특허출원(○), 공문() 소트브레() 디자인() 상표() 기타(상사) 명칭(원호): 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182(Lactobacillus plantarum 182) (출원번호 10-2019-0173899) 기술실시 명칭: 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182

해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	내출액 (2020년 12월 기준 누계, 백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
상하목장 100 베이비 200개 사과당근		국내 1,824 해외 -	5

* 첨부: 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출내역표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2022년 01월 28일
연구책임자: 왕진오 (사) 매일유업(주)

<첨부> 동립축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	주관연구기관	연구책임자	기밀 정보	관련 실적
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 딸기바나나)	매일유업(주)	왕진오	2020년 12월 기준	특허출원(○), 공문() 소트브레() 디자인() 상표() 기타(상사) 명칭(원호): 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182(Lactobacillus plantarum 182) (출원번호 10-2019-0173899) 기술실시 명칭: 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182

해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	내출액 (2020년 12월 기준 누계, 백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
상하목장 100 베이비 180개 딸기바나나		국내 1,907 해외 -	5

* 첨부: 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출내역표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2022년 01월 28일
연구책임자: 왕진오 (사) 매일유업(주)

<첨부> 동립축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	주관연구기관	연구책임자	기밀 정보	관련 실적
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 딸기바나나)	매일유업(주)	왕진오	2021년 12월 기준	특허출원(○), 공문() 소트브레() 디자인() 상표() 기타(상사) 명칭(원호): 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182(Lactobacillus plantarum 182) (출원번호 10-2019-0173899) 기술실시 명칭: 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182

해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	내출액 (2021년 12월 기준 누계, 백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
상하목장 100 베이비 180개 딸기바나나		국내 2,757 해외 -	10

* 첨부: 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출내역표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2022년 01월 28일
연구책임자: 왕진오 (사) 매일유업(주)

<첨부> 동립축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	주관연구기관	연구책임자	기밀 정보	관련 실적
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(사과당근)	매일유업(주)	왕진오	2021년 12월 기준	특허출원(○), 공문() 소트브레() 디자인() 상표() 기타(상사) 명칭(원호): 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182(Lactobacillus plantarum 182) (출원번호 10-2019-0173899) 기술실시 명칭: 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182

해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	내출액 (2021년 12월 기준 누계, 백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
상하목장 100 베이비 200개 사과당근		국내 1,989 해외 -	10

* 첨부: 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출내역표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2022년 01월 28일
연구책임자: 왕진오 (사) 매일유업(주)

<첨부> 동립축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	주관연구기관	연구책임자	기밀 정보	관련 실적
면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용(상하목장 유기농 베이비 요구르트 딸기바나나)	매일유업(주)	왕진오	2021년 12월 기준	특허출원(○), 공문() 소트브레() 디자인() 상표() 기타(상사) 명칭(원호): 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182(Lactobacillus plantarum 182) (출원번호 10-2019-0173899) 기술실시 명칭: 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182

해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	내출액 (2021년 12월 기준 누계, 백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
상하목장 100 베이비 180개 딸기바나나		국내 1,729 해외 -	10

* 첨부: 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출내역표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2022년 01월 28일
연구책임자: 왕진오 (사) 매일유업(주)

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

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 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

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

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	정 하 안	2019		1				0	0					
2	권 준 기	2019		1			0		0					
3	김 선 균	2019		1			0		0					
4	이 요 셸	2019		1			0		0					
5	김 유 태	2020	1				0		0					
6	기 윤 경	2020		1				0	0					
7	유 보 은	2020		1				0	0					
8	박 권 철	2020		1			0		0					
9	성 수 현	2020		1				0	0					
10	강 서 현	2020		1				0	0					

 강서현_학위수여 (졸업)증명서	 경희대학교 졸업 증명서_기윤경	 경희대학교 학위 기_김유태	 경희대학교 학위 수여증명서_유보 은	 권준기_학위수여 증명서	 김선균_학위수여 증명서	 박권철_학위수여 (졸업)증명서	 성수현_학위수여 (졸업)증명서	 이요셀_학위수여 증명서	 정하안_학위수여 (졸업)증명서
--	--	--	--	--	--	---	--	--	--

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

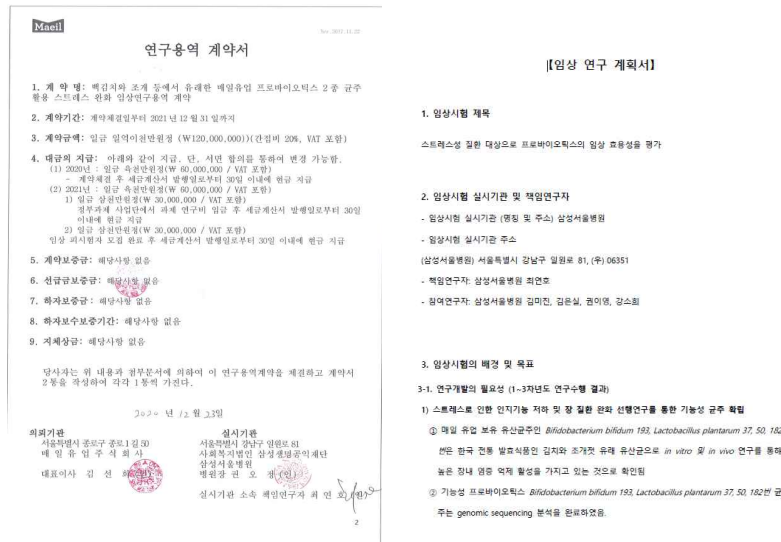
□ 연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

○ 삼성서울병원 연계의 스트레스성 질환 환자 대상 인체적용시험(스트레스 완화) 실시 (2020~2021)



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

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 전략미생물해독 10건	○ <i>B.bifidum</i> 193 외 9건 complete genome sequencing 완료	100
○ 유용 유전자원 확보 2건	○ <i>B. bifidum</i> 193 및 <i>L. plantarum</i> 182 스트레스 완화 인체적용시험 완료	100
○ 메타유전체 분석 200건	○ 장내균총 모사시스템 내 균주 도입 외 656건 완료 (iGEM 등록 완료)	328
○ 국내외 논문 게재 2건 (IF 1.5이상)	○ 구혜진, 김경천 각 1건, 총 2건 완료 (평균 IF 3.11)	100
○ 국내외 학술회의 발표 7건	○ 연사발표 8건, 포스터발표 20건, 총 28건	400
○ 특허 출원 2건	○ 신규한 비피도박테리온 비피덤 193 균주를 포함하는 프로바이오틱 조성물 (10-2021-0164279) ○ 면역 조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토 바실러스 플란타럼 182 (10-2019-0173899)	100
○ 특허 등록 2건	○ - ○ -	0
○ 사업화(제품화) 2건	○ 상하목장 유기농 베이비 요구르트 3종에 <i>L. plantarum</i> 182 균주 적용 ○ 스트레스 완화 유산균(가제) 분말 시제품(<i>B. bifidum</i> 193, <i>L. plantarum</i> 182) 생산 완료	100
○ 사업화(매출액) 4,000 백만원	○ 2020~2021년 상하목장 유기농 베이비 요구르트 3종 매출액 12,923 백만원	323
○ 전문연구인력양성 0건	○ 박사급 1명, 석사급 9명, 총 10명	-
○ 기술거래(이전) 0건	○ 통상실시권 1건	-

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 기존 연구 계획에 따라 3차년도(2020년) 인체적용시험을 진행한 후, 해당 결과를 기반으로 특허 등록 진행 예정이었으나, 2020년 발생한 COVID-19 팬데믹 여파로 인체적용시험이 진행될 대학병원의 IRB (Institutional Review Board) 승인이 늦어짐에 따라 특허 출원 및 등록이 연기되었고, 목표 미달 발생함

2) 자체 보완활동

- 현재 특허 출원은 완료된 상태이며, 특허청 등록심사 진행 중임. 특허 등록 완료를 위한 보완사항이 필요한 경우 보완자료 제출을 통해 등록 절차를 완료할 예정임

3) 연구개발 과정의 성실성

- 연구계획서에 제시된 일정에 맞추어 연구과제를 성실하게 수행하였으나, COVID-19 팬데믹으로 연구수행 일정이 일부 연기됨. 인체적용시험 외 연구 진행은 문제없이 진행되었으며 연구과제 수행에 있어 그 성실성은 문제가 없다고 판단됨

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 본 연구과제 수행을 통해 구축된 한국형 장내균총 모사시스템을 통해 선별 미생물의 한국인 장내 정착 능력을 평가함으로써 한국인 맞춤형 프로바이오틱스 개발법 구축 및 다양한 식품 소재, 약리활성 물질의 한국인 맞춤 기능성 평가 수단 제시
- 마우스 모델에서 만성 스트레스로 유도된 우울/불안 증상 및 기억학습 능력 감소에 대한 선별 미생물의 섭취에 의한 개선 효과를 확인함으로써 프로바이오틱스에 의한 인지기능개선 연구의 실험적 근거 제시 및 기능성 평가 방법 개발

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 마우스 모델을 통해 확인된 기능성 균주를 활용하여 만성 스트레스 완화 효과 뿐 아니라 노화로 인한 인지기능 감소 질환 예방에 적용함으로써 초고령화 사회에 나타나는 다양한 노인성 질환 해결 연구에 활용 가능
- 본 과제를 통해 구축된 통합적 균주 선별 및 평가 시스템을 활용하여 추후 새로운 기능성 균주의 선별 및 기존 균주의 새로운 기능성 소재 발굴에 활용 가능
- 인체적용시험이 완료된 2종 선별 미생물의 식약처 개별인정형 기능성원료 등록을 위한 추가 작업(논문게재, 특허등록, 제품 규격 및 섭취량 설정, 추가 안전성 평가 등) 진행 후, 적법한 절차에 맞추어 ‘스트레스에 의한 긴장 완화’ 개별인정형 기능성원료 등록 및 고기능성 발효 유 신제품 개발/출시 진행 예정

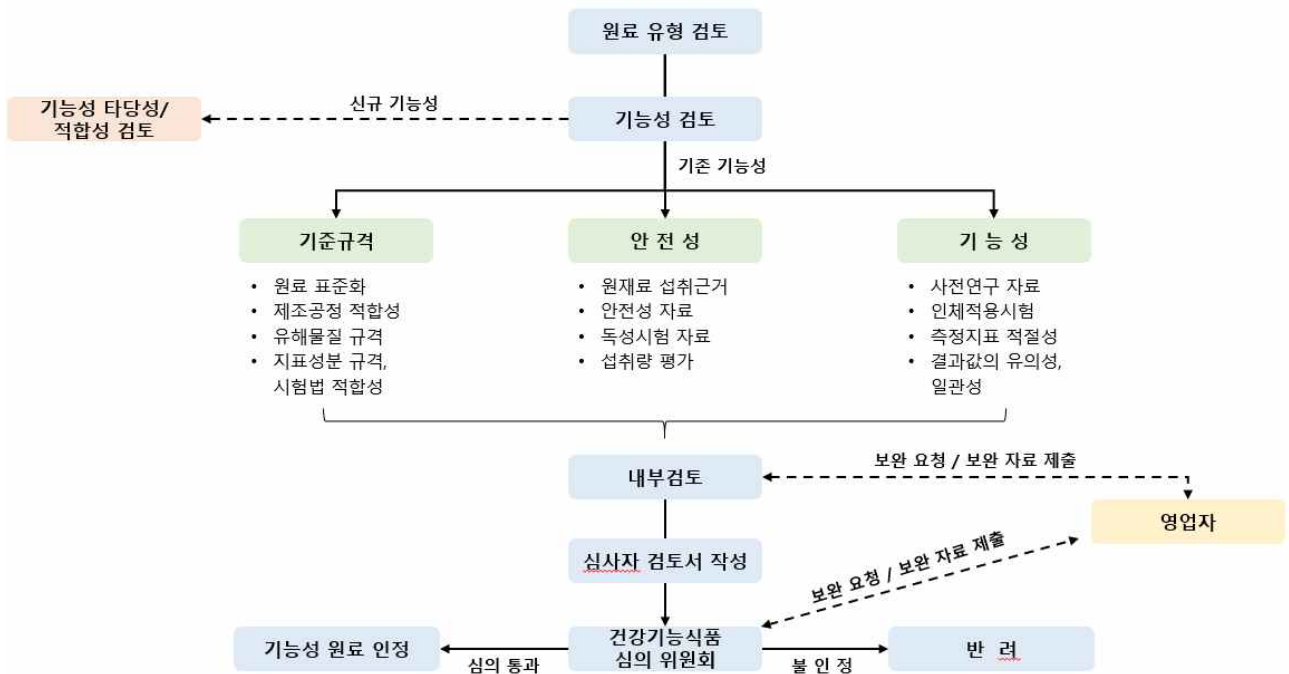


그림. 식약처 개별인정형 기능성 원료 등록 절차

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	매출액 2,500 백만원	
	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) [별첨 1] 자체평가의견서
	2) [별첨 2] 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업 한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	918022-04		
사업구분	포스트게놈다부처유전체사업				
연구분야	산업화 지원 미생물 유전체 전략 연구(조기성과 창출)		과제구분	단위	
사업명	포스트게놈다부처유전체사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발		과제유형	(개발)	
연구개발기관	매일유업(주)		연구책임자	양진오	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.07~2018.12	187,000	187,000	374,000
	2차년도	2019.01~2019.12	330,000	330,000	660,000
	3차년도	2020.01~2020.12	314,000	314,000	628,000
	4차년도	2021.01~2021.12	314,000	314,000	628,000
	계	2018.07~2021.12	1,145,000	1,145,000	2,290,000
참여기업	서울대학교 산학협력단, 세종대학교 산학협력단				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2022.02.04

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
매일유업(주)	연구소장	양진오

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	
----	---

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	918022-04		
사업구분	포스트게놈다부처유전체사업				
연구분야	산업화 지원 미생물 유전체 전략 연구(조기성과 창출)		과제구분	단위	
사업명	포스트게놈다부처유전체사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	한국 전통 발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발		과제유형	(개발)	
연구개발기관	매일유업(주)		연구책임자	양진오	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.07~2018.12	187,000	187,000	374,000
	2차년도	2019.01~2019.12	330,000	330,000	660,000
	3차년도	2020.01~2020.12	314,000	314,000	628,000
	4차년도	2021.01~2021.12	314,000	314,000	628,000
	계	2018.07~2021.12	1,145,000	1,145,000	2,290,000
참여기업	서울대학교 산학협력단, 세종대학교 산학협력단				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.04

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
매일유업(주)	연구소장	양진오

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	
----	--

[별첨 1]

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

○ 한국인의 경우, 서구와는 다른 독특한 식문화/식이습관을 지녀 한국인만의 독특한 장내균총을 지니고 있는 것으로 보고되었음. 한국 전통 발효식품으로부터 분리한 유산균 및 한국형 장내균총 모사시스템을 활용한 기능성 연구 통해 한국인에게 적합한 마이크로바이옴 연구 기법을 구축/유용 미생물 자원 개발을 진행함으로써 그 우수성과 창의성을 부여할 수 있음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

○ 한국형 장내균총 모사시스템을 통해 광범위한 식품소재, 약리활성 물질의 장내 기능성 평가를 진행하는데 중추적인 역할을 수행할 수 있을 것임
○ 인체적용시험을 통해 검증된 인지 기능 개선(스트레스 완화) 유용 미생물 자원을 기반으로 최근 이슈가 되는 '코로나 블루'와 환경 스트레스 조절에 도움을 줄 수 있을 것임

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

○ 본 연구로 구축된 한국형 장내균총 모사시스템은 최근 화두가 되고 있는 개인맞춤형 식이, 기능성 소재, 약리활성 물질 개발의 기반으로 활용할 수 있을 것임
○ 기 수행된 인지 기능 개선(스트레스 완화) 연구 결과를 바탕으로 인지 기능 질환에 대한 심층적인 연구 설계/수행을 통해 질환 예방, 케어가 가능할 것으로 사료됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

○ 본 연구를 진행한 주관기관, 협동기관 및 위탁기관은 COVID-19 팬데믹 이슈에도 불구하고 연구계획서에 제안된 연구계획을 일정에 맞추어 성실하게 수행하였으며, 전략미생물해독부터 유용미생물 사업화에 이르기까지 정량·정성적인 연구목표를 달성하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

○ 본 연구에서 유용 미생물 기술이전을 통해 산학 공동연구 활성화를 도모하고, 유용 미생물의 발효유제품 적용으로 연구기간 내 12,923 백만원이라는 조기성과를 창출함. 이외에도 전략미생물해독, 메타유전체분석 등 생물정보를 창출하고, *in vitro*부터 인체적용시험까지 일련의 연구수행 결과로 논문 게재, 학술발표를 진행하여 그 성과가 우수하다고 판단됨

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
전략미생물해독 10건	-	100	- <i>B. bifidum</i> 193외 9건 전략미생물의 complete genome sequencing 완료를 통해 유용유전자원확보 기반 마련
유용유전자원확보 1건	-	200	- <i>B. bifidum</i> 193 및 <i>L. plantarum</i> 182 균주의 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , 인체적용시험 완료를 통한 사업화를 위한 과학적 근거 마련
메타유전체분석 200건	-	328	- 장내균총 모사시스템 내 균주 도입 외 656건 완료 (iGEM 등록 완료)를 통한 메타유전체 연구 자료 확보
국내외 논문 게재 2건	-	100	- 구혜진, 김경천 각 1건, 총 2건 완료 (평균 IF 3.11)
국내외 학술회의 발표 7건	20	400	- 인지 기능 개선(스트레스 완화) 관련 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 연구발표를 통한 인체 건강과 장내균총 사이 상관성의 과학적 근거 마련
특허 출원 2건	-	100	- 유용유전자원확보 및 사업화를 위한 기반 마련
특허 등록 2건	-	0	
사업화(제품화) 2건	40	100	- 면역 조절 특허 기반 유용미생물의 발효유 제품 적용을 통한 조기성과 창출 - 인지 기능 개선(스트레스 완화) 유산균 스틱 시제품 생산 완료를 통한 인체적용시험 연구 진행
사업화(매출액) 4,000 백만원	40	323	- 면역 조절 특허 유용미생물의 발효유 제품 적용을 통한 매출 발생/증가(2020~2021년, 12,923 백만원)로 발효유 시장 성장 기여
전문연구인력양성 0건	-	-	- 박사급 1명, 석사급 9명 전문연구인력양성을 통한 국내 장내미생물 관련 기초 연구 인력 강화
기술거래(이전) 0건	-	-	- 기술이전 1건을 통한 산학연구 공동체 활성화 기여
합계	100점	89점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구과제로 확보된 기능성 유산균은 *in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험을 통해 그 효능이 검증되었음. 추후 개별인정형 원료 등록 통해 국내 최초 인지기능 개선(스트레스 완화) 유산균으로서 국민 건강 증진은 물론 국내/외 종균 산업, 식품 산업 분야에서 국가 기술경쟁력 강화에 기여할 것으로 사료됨
- 본 연구과제로 개발된 한국형 장내균총 모사시스템은 광범위한 식품소재, 약리활성 물질의 장내 기능성 평가를 통한 소재 산업, 한국인 맞춤형 헬스케어 산업 발전의 기반이 될 것으로 사료됨

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

- 국내에 존재하지 않는 인지 기능 관련 유산균(프로바이오틱스) 개발에 대한 기능적 차별성
- 한국형 장내균총 모사시스템 활용을 통한 한국인 적합한 유산균 선발
- 2년차에 선발된 유산균의 발효유 제품 적용을 통한 조기성과창출
- COVID-19 팬데믹임에도 인체적용시험 수행/완료되었다는 점이 충분히 고려되어야 함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구결과를 바탕으로 인지 기능 질환(알츠하이머, 파킨슨병, 치매 등) 예방, 치료를 위한 프로바이오틱스 조성물 또는 마이크로바이옴 치료제 연구/개발에 활용
- 한국형 장내균총 모사시스템 기반의 한국인 또는 개인맞춤형 헬스케어를 위한 식품소재, 건강기능성 소재, 약리활성 물질 효능 평가/개발에 활용

IV. 보안성 검토

해당 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당 없음

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

해당 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	산업화 지원 미생물 유전체 전략 연구(조기성과 창출)
연구과제명	한국 전통발효식품 유산균을 이용한 유전체 기반의 면역/인지 기능 개선 발효유 개발		
주관연구개발기관	매일유업(주)	주관연구책임자	양진오
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	총연구개발비
	1,145,000,000	1,145,000,000	2,290,000,000
연구개발기간	2018.07.02 ~ 2021.12.31		
주요활용유형	<input checked="" 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 전략미생물해독 10건	<i>B. bifidum</i> 193 외 9건 전략미생물의 complete genome sequencing 완료 (총 10건 확보)
② 유용유전자원확보 1건	<i>B. bifidum</i> 193, <i>L. plantarum</i> 182 균주의 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , 인체적용시험 완료로 사업화의 과학적 근거 마련 (총 2건 확보)
③ 메타유전체분석 200건	장내균총 모사시스템 내 균주 도입 외 622건 완료 (iGEM 등록 완료)
④ 국내외 논문 게재 2건 (IF 1.5 이상)	구혜진, 김경천 각 1건, 총 2건 게재(평균 IF 3.11)
⑤ 국내외 학술회의 발표 7건	주관, 협동, 위탁기관 총 28건
⑥ 특허 출원 2건	<i>B. bifidum</i> 193, <i>L. plantarum</i> 182 유용 미생물 각 1건 특허 출원 (총 2건)
⑦ 특허 등록 2건	미달
⑧ 사업화(제품화 2건)	<i>L. plantarum</i> 182 적용 발효유 제품 출시 <i>B. bifidum</i> 193 및 <i>L. plantarum</i> 182 활용 유산균 스틱 시제품 생산 완료
⑨ 사업화(매출액) 4,000 백만원	<i>L. plantarum</i> 182 균주 적용 발효유 제품 판매를 통한 매출 발생 및 조기성과 창출(2020~2021년, 12,923 백만원)
⑩ 전문연구인력양성 0건	박사급 1명, 석사급 9명 전문연구인력 양성
⑪ 기술거래(이전) 0건	기술이전 1건 진행 및 발효유 제품 3종에 기술 적용

* 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
최종목표		10	1		200					
1차 년도	목표									
	실적				10					
2차 년도	목표	10			100					
	실적	10			239					
3차 년도	목표				50					
	실적				278					
4차 년도	목표		1		50					
	실적		2		129					
계	목표	10	1		200					
	실적	10	2		656					

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		기 술 인 증	논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											SC I		비 SC I	논 문 평 균 IF		정 책 활 용	홍 보 전 시			
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치						40	40							20						
최종목 표	2	2				2	29, 000					2		1.5	7					
1차 년도	목 표													1						
	실 적													3						
2차 년도	목 표					1						1		1.5	2					
	실 적					1								10	4					
3차 년도	목 표	1	1				2,0 00							2						
	실 적	1			1	6,1 9	6,4 46					2	3.1	7	6					
4차 년도	목 표	1	1			1	2,0 00					1	1.5	2						

차 년 도	표 실 적	1			0.4 9	1	6,4 77						8				
	목 표 실 적	2	2			2	4,0 00					2	1.5	7			
소 계	목 표 실 적	2	0		6.6 8	2	12, 923					2	3.1	28		10	
	종료 1차년도						5,0 00										
종료 2차년도							5,0 00										
종료 3차년도							5, 00 0										
종료 4차년도							5, 00 0										
종료 5차년도							5,0 00										
소 계																	
합 계		2	0		6.6 8	2	12, 923					2	3.1	28		10	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	한국형 장내균총 모사시스템 구축/최적화
②	유용유전자원 유전체 및 대사회로 분석(ANI & Pan-genome 분석)
③	만성 스트레스 마우스 모델 활용 인지 기능 개선(스트레스 완화) 유용 효능 평가 방법
④	면역조절 능력이 있는 조개젓갈유래 신규한 락토바실러스 플란타럼 182
⑤	신규한 비피도박테리움 비피덤 193 균주를 포함하는 프로바이오틱 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술				v	v					
②의 기술			v	v						
③의 기술			v	v	v					
④의 기술			v	v		v	v			
⑤의 기술			v	v		v				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	한국형 장내균총 모사시스템을 활용하여 한국인 맞춤 또는 개인맞춤형 식이, 기능성 소재 및 약리 활성 물질 평가/개발
②의 기술	신규 미생물 전장유전체 정보 활용 ANI & Pan-genome 분석 기반 <i>in silico</i> 상에서 주요 기능성 예측
③의 기술	인지 기능 질환(알츠하이머, 치매, 파킨슨병 등) 마우스 모델 연구 설계/진행 기반 자료로 활용
④의 기술	락토바실러스 플란타럼 182의 발효유 제품 적용/출시 및 매출 발생
⑤의 기술	비피도박테리움 비피덤 193 활용 인지 기능 개선(스트레스 완화) 제품화 인지 기능 질환(알츠하이머, 치매, 파킨슨병 등) 케어 연구 진행

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 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	10	1		200					
연구기간내 달성실적	10	2		656					
연구종료후 성과창출 계획	-	-		-					

(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 (타연구활용영역)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI	논문평균 I F						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건		명	건	건	
가중치							40	40						20						
최종목표	2	2					2	29,000 (4,000)						2	1.5	7				
연구기간내 달성실적	2	0					2	12,923						2	3.1	28				
연구종료후 성과장출 계획								25,000												

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	신규한 비피도박테리움 비피덤 193 균주를 포함하는 프로바이오틱 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2023년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	핵심기술을 적용한 발효유 제품 품질관리/평가		

- 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) 실용화예상시기 : 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)