

918006-04

김치용
프로
바이오
틱스
개발
및
건강
기능
김치
산업화

최
종
보
고
서

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004042-01

김치용 프로바이오틱스 개발 및 건강기능 김치 산업화

2022.03.30

주관연구기관 / 충북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 한국식품연구원 부설 세계김치연구소
대상(주)

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “김치용 프로바이오틱스 개발 및 건강기능 김치 산업화”(개발기간 : 2018.04.25 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.03.30.

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 이영정 (인)
협동연구기관명 : 한국식품연구원
부설 세계김치연구소 (대표자) 장해준 (인)
참여기관명 : 대상 (주) (대표자) 임정배 (인)

주관연구책임자 : 한남수
협동연구책임자 : 이세희
참여기관책임자 : 류병희

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

최종보고서							보안등급		
							일반[○], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명	사업명			
전문기관명 (해당 시 작성)					내역사업명 (해당 시 작성)				
공고번호					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
					연구개발과제번호		918006-04		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0903	35%	LB1702	25%	LB1703	20%		
	농림식품과학기술 분류	PA0102	40%	CA0302	30%	CA0105	20%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단						
		영문	Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food						
연구개발과제명		국문	김치용 프로바이오틱스 개발 및 건강기능 김치 산업화						
		영문	Development of kimchi probiotics and industrialization of health functional kimchi						
주관연구개발기관		기관명	충북대학교 산학협력단		사업자등록번호	3018216304			
		주소			법인등록번호	150171-0001816			
연구책임자		성명	한남수		직위	교수			
		연락처	직장전화	휴대전화					
		전자우편	국가연구자번호						
연구개발기간		전체	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3년 9개월)						
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 04. 25 - 2018. 12. 31 (9개월)					
			2단계	2019. 01. 01 - 2019. 12. 31 (12개월)					
			3단계	2020. 01. 01 - 2020. 12. 31 (12개월)					
			4단계	2021. 01. 01 - 2021. 12. 31 (12개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체		합계		연구개발 비의 지원금
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계		1,041,000	91,100	609,198			1,132,100	609,198	1,741,298
1단계		209,000	18,200	121,800			227,200	121,800	349,000
2단계		278,000	24,300	162,466			302,300	162,466	464,766
3단계		277,000	24,300	162,466			301,300	162,466	463,766
4단계		277,000	24,300	162,466			301,300	162,466	463,766
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		
		한국식품연구원 부설 세계김치연구소	이세희	선임급			역할	기관유 형	
공동연구개발기관		대상(주)	류병희	부장			공동, 수요		
연구개발담당자 실무담당자		성명	공선영		직위	참여연구원			
		연락처	직장전화	휴대전화					
		전자우편	국가연구자번호						

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

2022 년 3 월 11 일

연구책임자: 한 남 수 (인)

주관연구개발기관의 장: 이영성 (직인)

공동연구개발기관의 장: 장해춘 (직인)

공동연구개발기관의 장: 임정배 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		포스트게놈다부처유전체사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호			918006-04
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0903	35%	LB1702	25%	LB1703	20%	
	농림식품 과학기술분류	PA0102	40%	CA0302	30%	CA0105	20%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단						
연구개발과제명		김치용 프로바이오틱스 개발 및 건강기능 김치 산업화						
전체 연구개발기간		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (45개월)						
총 연구개발비		총 1,741,298 천원 (정부지원연구개발비: 1,041,000 천원, 기관부담연구개발비 : 700,298 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내 용	최종 목표	본 연구의 목적은 NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 김치 발효식품의 프로바이오틱스 기능성 미생물을 종균화하고 고부가가치 기능성 식품으로 산업화하는 것으로 전략미생물 해독 6건, 유용 유전자원 확보 9건; SCI 논문 7편; 특허 3건; 상품화 1건을 목표로 함						
	전체 내용	<p>연구 목적을 이루기 위한 전략으로 (1) 질환 중심의 맞춤형 프로바이오틱스 선발, (2) 미생물 유전체 기반 프로바이오틱스 후보 선별 및 선발 균주 특성 분석, (3) 경쟁력 높은 연구진의 밀접한 산학 협력 통한 산업화를 수립함</p> <p>○ 제 1전략으로, 질환 중심의 맞춤형 프로바이오틱스의 선발 조건과 단계는 아래와 같음</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 김치 또는 한국인의 장에서 유래한 유산균 ② 장에서 높은 정착능을 보이는 유산균(위산과 담즙 내성, 장 상피세포 결합능) ③ 김치와 인체에서 안전한 유산균 (바이오제닉 아민 무 생성, 전이성 항생제 내성 유전자 비 보유) ④ 김치 환경에 적합한 유산균 (빠른 성장속도와 높은 향미 품질) ⑤ 장에서 높은 1차 기능성을 보이는 유산균 (단쇄지방산 생성능, 장내 안정성, 항균 작용) ⑥ 장에서 높은 2차 기능성을 보이는 유산균(장 건강 - 위장염과 장염 억제, 간 건강 - 간 질환 억제, 정신 건강 - 우울증 완화) <p>○ 제 2전략으로, 미생물 유전체 기반 프로바이오틱스 후보 선별 및 선발 균주 특성을 분석함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 건강기능성 후보 유산균을 선별하는 과정에 선택배지를 이용하는 배양법과 함께 유전체 정보를 기반으로 마커 유전자를 high throughput 탐색하는 방법을 이용함 						

		<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 프로바이오틱스의 유전체 정보를 포함한 오믹스 정보를 분석하여 유산균의 건강기능성 기작을 분자수준에서 규명함 <p>○ 제 3전략으로, 경쟁력 높은 연구진의 밀접한 산학협력을 통한 산업화를 위해, 충북대, 한국식품연구원 부설 세계김치연구소, 대상(주)이 과제에 참여함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 충북대 식품생명공학과 효소발효공학연구실은 발효식품 유산균 개발 연구로 특성화하여 국제 논문 170여편을 발표하고 특히 20건, 김치 및 제빵용 유산균 산업화 실적 4건이 있음. 프로바이오틱스 후보 선발, 유전체 분석 및 in vitro 건강 기능성 분석, 과제 책임을 맡음 • 한국식품연구원 부설 세계김치연구소 기능성식품연구단은 김치의 세계화를 위해 설립한 정부 연구소로 기능성식품 특히 프로바이오틱스 개발의 임무를 맡고 있으며 in vitro 및 in vivo 연구 시설이 확립되어 있음. 프로바이오틱스 비교유전체 분석 및 in vivo 건강기능성 검증을 맡음 • 대상(주)는 2004년 류코노스톡 메센테로이데스 DRC 김치 종균을 산업화한 이래 국내 김치시장의 최고 점유율을 유지하고 있으며 2017년에는 제2세대 종균(DRC1506)의 개발 및 산업화에 성공함. 프로바이오틱스 생산 기술 최적화 및 건강기능 김치제품 상품화를 맡음
	<p>1단계 (해당 시 작성)</p>	<p>목표 프로바이오틱스 후보 균주 선정 및 미생물 특성분석</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관(충북대학교) : Microbiome 기반 유산균 확보 및 프로바이오틱스 후보 발굴 - 협동연구기관 1 (세계김치연구소) : <ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 김치발효 맞춤형 종균 및 건강기능성 프로바이오틱스 후보균주 발굴 • 동물 질환모델 시스템 구축 - 기능성 프로바이오틱스의 효능검증 및 작용기전 구명을 위한 질환유도 동물모델(마우스) 시스템 구축준비 - 협동연구기관 2 (대상(주)) : 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 및 후보균주 생산기술 최적화
	<p>2단계 (해당 시 작성)</p>	<p>목표 프로바이오틱스 기능성 및 안전성 분석</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관(충북대학교) : 우수 균주 선정 및 프로바이오틱스 기능성 및 안전성 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 김치에서 적응 진화 - 기존에 개발된 probiotics는 김치 환경에서 느린 성장을 보이거나 효능을 위해 고농도의 균체를 원하는 단점이 있음. 따라서 본 연구에서는 초기 screening 단계에서 김치배지에서 우수한 성장속도를 보이는 균주를 선발하여 기존의 연구와 차별성을 둠. 또한, 효능에서도 장건강, 간건강, 정신건강으로 선정하여 기존의 연구와 중복되지 않음 - 협동연구기관 1 (세계김치연구소) : <ul style="list-style-type: none"> • 동물실험 1차 : 질환유도 동물 모델시스템을 활용한 프로바이오틱스 실제 효능검증 • 투여한 프로바이오틱스 균주로 인한 장내미생물과 질환동물모델간의 상호작용 분석

			- 협동연구기관 2 (대상(주)) : 후보 균주의 종균 특성 분석 및 기능성 김치 시제품 제작
	3단계	목표	최종 선정 프로바이오틱스 기능성 인허가 자료 확보 및 김치 적용 기술 확립
		내용	<ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관(충북대학교) : <ul style="list-style-type: none"> • 멀티오믹스 기반 프로바이오틱스 기능성/ 안전성 기전 규명 - 표적 유전자 선정 및 규명 • 프로바이오틱스 개량 - 김치 환경 적응 및 품질개선 - 협동연구기관 1 (세계김치연구소) : <ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스 기능성/안전성 분석 - 비교유전체 분석을 이용한 선발된 기능성 프로바이오틱스 균주의 기능적 특성 및 안전성 검증 • 동물실험 2차 - 동물 질환모델 이용 2차 프로바이오틱스 효능 검증 • 프로바이오틱스 작용기작 분석 - 전 단계에서 이루어진 기능성/안전성 유전체분석 결과와 동물실험결과와의 대응을 통한 프로바이오틱스 작용기작 분석 - 협동연구기관 2 (대상(주)) : <ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스 이용 고품질 김치 적용기술 확립 • 우수 향미 김치제조 - 향미분석을 위한 GC 정량 분석 활용 • 고 기능성 김치제조
	4단계	목표	부가가치 프로바이오틱스 김치 개발 및 출시
		내용	<ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관(충북대학교) : <ul style="list-style-type: none"> • 기능성 인허가 자료 준비 <ol style="list-style-type: none"> 1) 균주 기탁 및 지적재산권 출원 2) In vitro/in vivo 건강기능성 데이터 3) 안전성/안정성 데이터 - 협동연구기관 1 (세계김치연구소) : <ul style="list-style-type: none"> • 동물실험 3차 <ol style="list-style-type: none"> 1) 동물실험을 통한 후보 프로바이오틱스 안전성 검증 2) 단회투여 독성/반복투여 독성 평가 - 협동연구기관 2 (대상(주)) : <ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스 김치 개발 및 출시
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전략미생물 해독 11건, 유용 유전자원 확보 11건으로 초과 달성함 ○ 개발된 스타터의 프로바이오틱스 기능을 입증할 SCI급 논문 11건을 게재하여 목표한바 에 비해 초과 달성함 ○ 프로바이오틱 기능이 있는 신규의 발효 종균을 포함한 특허 6건 출원 및 3건 등록 ○ 프로바이오틱스 특성을 가진 김치유산종균을 사용하여 기능성 김치개발 3건 및 1건을 상품화하였으며 645,000(천원)의 매출액 창출으로 초과 달성함 ○ 연구 인력 활용 및 양성 9명으로 초과 달성함 		

표. 미생물 유전체사업의 성과 목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전체 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		6	9				6			
1차년도	목표	2	3				2			
	실적	2	4				2			
2차년도	목표	2	3				2			
	실적	3	3		1		2			
3차년도	목표	2	3				2			
	실적	6	6				6			
4차년도	목표									
	실적		1							
계	목표	6	9				6			
	실적	11	11			1	10			

표. 기타 성과 목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표						기타 (타 연구 활용 등)			
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성		정책 활용 홍보		
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SCI	논문 비SCI	논문 평균 IF				학술 발표	정책 활용	홍보 전시
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		10	15	15	10					10	10		10					
최종목표	3	3		1	20	2	80				10	3	8		4					
1차년도	목표										1	3	2		1					
	실적	3									2	3.27	2		0					
2차년도	목표	2									2	3	2		1					
	실적										1	3.75	13		2					
3차년도	목표	1									2	3	2		1					
	실적	2	2								4	4.26	14		4					
4차년도	목표		2	1	20	1	10				2	3	2		1					
	실적		1	2	87	2	645				3	4.78	14		3					
소계	목표	3	2	1	20	2	10				7	3	8		4					
	실적	6	3	3	87	2	645				11	4.31	43		9					
종료 1차년도		1				1	20				2	3								
종료 2차년도							20				1	3								
종료 3차년도							30													
종료 4차년도																				
소계		1				1	70				3									
합계	6	4	3	87	3	715					14	3	43		9					

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>○ 기술적 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 생물학정보기술을 이용한 프로바이오틱스 종균의 특성(발효 적성, 건강기능성, 안전성) 규명, 생산 기술 개발 및 프로바이오틱스 특성을 가진 김치유산종균의 사용으로 인한 김치의 표준화 및 고급화 - 특허 및 산업재산권을 확보하고 김치종주국으로서의 위상확보 - 다양한 식물성 건강발효식품 개발 및 상품화 <p>○ 경제적 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선발된 프로바이오틱스 종균의 기능성 및 안전성 분석을 통한 개별 인정형 건강기능식품 소재 등록 추진, 식물성 프로바이오틱 종균 이용 다양한 발효 상품의 산업화 및 세계화, 김치의 건강기능성을 향상시킴으로 인한 김치 대중화 및 세계화, 김치 프로바이오틱스 지적재산권 확보, 다양한 식물성 건강발효식품 개발 및 상품화 - 김치유산균의 기능성 규명 및 안전성에 대한 과학적 정보를 제공하여 김치의 우수성 및 이미지 제고에 기여, 김치 프로바이오틱스 사용한 김치의 고급화는 김치산업의 매출증대로 이어지고 김치의 국제화 및 수출증대에 기여할 것임 												
<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>	<p>해당 없음</p>												
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	<p>논문</p>	<p>특허</p>	<p>보고서 원문</p>	<p>연구시설 및 장비</p>	<p>기술요약 정보</p>	<p>소프트웨어</p>	<p>표준</p>	<p>생명자원</p>		<p>화합물</p>	<p>신품종</p>		
<p>11</p>	<p>6</p>							<p>생명 정보</p>	<p>생물 자원</p>		<p>정보</p>	<p>실물</p>	
<p>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</p>	<p>구입기관</p>	<p>연구시설·장비명</p>	<p>규격 (모델명)</p>	<p>수량</p>	<p>구입 연월일</p>	<p>구입가격 (천원)</p>	<p>구입처 (전화)</p>	<p>비고 (설치장소)</p>	<p>ZEUS 등록번호</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>김치 유산균</p>		<p>유전체</p>	<p>종균</p>		<p>김치</p>		<p>프로바이오틱스</p>					
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Kimchi lactic acid bacteria</p>		<p>Genomics</p>	<p>Starter</p>		<p>Kimchi</p>		<p>Probiotics</p>					

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요.....	9
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	11
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	16
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	108
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	109
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	110

별첨 자료

*자체평가의견서.....	111
*연구성과 활용계획서.....	115
*기타 증빙자료.....	119

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 개요

1-1-1. 연구 필요성

- 요구르트로 대표되는 발효유 시장은 아래 그림과 같은 3단계 발전 과정을 거쳤는데, 1단계는 유산균 종균 첨가를 통한 품질 균일화, 2단계는 프로바이오틱스 첨가를 통한 건강기능성 향상, 3단계는 소비자 맞춤형 소재 첨가 등을 통한 제품 다양화임
- 그 결과 요구르트는 “건강에 좋은 발효식품”이라는 소비자 인식이 확대되어 국내 발효유 제품시장 규모가 지난 10년간 2배로 확대되어 약 2조원에 달함
- 반면, 김치는 2000년 초반부터 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides*이 대기업에 의해 종균으로 사용되기 시작하였으나, 아직까지 본격적인 김치용 프로바이오틱스 유산균의 개발 및 산업화가 진행되지 못하고 있음
- 따라서, 우수한 건강기능성을 보이면서 김치환경에 적합한 **김치용 프로바이오틱스 유산균**을 개발하여 세계인이 선호하는 차세대 김치 상품으로 글로벌 산업화하는 것이 필요함
- 본 연구에서는 최신 연구동향인 정신건강 프로바이오틱을 신규 연구분야로 선정하였음. 또한, 장건강과 간건강은 시급한 국민건강 위협요소인 반면, 김치에 고효율로 사용가능한 프로바이오틱 유산균은 아직 개발되지 않았음

1-1-2. 연구 개발 목표 및 전략

- 본 연구의 목표는 “**우수한 건강기능성을 보이면서 김치환경에 적합한 김치용 프로바이오틱스 유산균을 개발하고 산업화**”하는 것임
- 전략미생물 해독 6건, 유용 유전자원 확보 9건; SCI 논문 7편; 특허 3건; 상품화 1건을 목표로 함
- 연구 목적을 이루기 위한 전략으로 (1) 질환 중심의 맞춤형 프로바이오틱스 선발, (2) 미생물 유전체 기반 프로바이오틱스 후보 선별 및 선발 균주 특성 분석, (3) 경쟁력 높은 연구진의 밀접한 산학 협력 통한 산업화를 수립함
- 제 1전략으로, **질환 중심의 맞춤형 프로바이오틱스의 선발 요건**과 단계는 아래와 같음
 - ① 김치 또는 한국인의 장에서 유래한 유산균
 - ② 장에서 높은 정착능을 보이는 유산균(위산과 담즙 내성, 장 상피세포 결합능)
 - ③ 김치와 인체에서 안전한 유산균(바이오제닉 아민 비생성, 전이항생제 내성 유전자 비 보유)
 - ④ 김치 환경에 적합한 유산균(빠른 성장속도와 높은 향미 품질)
 - ⑤ 장에서 높은 1차 기능성을 보이는 유산균(단쇄지방산 생성능, 장내 안정성, 항균 작용)
 - ⑥ 장에서 높은 2차 기능성을 보이는 유산균(장 건강 - 위장염과 장염 억제, 간 건강 - 간 질환 억제, 정신 건강 - 우울증 완화)
- 제 2전략으로, **미생물 유전체 기반 프로바이오틱스 후보 선별 및 선발 균주 특성**을 분석함
 - 건강기능성 후보 유산균을 선별하는 과정에 선택배지를 이용하는 배양법과 함께 유전체 정보를 기반으로 마커 유전자를 high throughput 탐색하는 방법을 이용함
 - 선발된 프로바이오틱스의 유전체 정보를 포함한 오믹스 정보를 분석하여 유산균의 건강기능성 기작을 분자수준에서 규명함

- 제 3전략으로, 경쟁력 높은 연구진의 밀접한 산학협력을 통한 산업화를 위해, 충북대, 한국 식품연구원 부설 세계김치연구소, 대상(주)이 과제에 참여함
- 대상(주)는 2004년 류코노스톡 메센테로이데스 DRC 김치 종균을 산업화한 이래 국내 김치시장의 최고 점유율을 유지하고 있으며 2017년에는 제2세대 종균(DRC1506)의 개발 및 산업화에 성공함. 프로바이오틱스 생산 기술 최적화 및 건강기능 김치제품 상품화를 맡음

1-2. 연구개발의 목표 및 내용

1-2-1. 연구개발의 최종목표

가. 최종목표

[연구목표]

NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 김치 발효식품의 프로바이오틱스 기능성 미생물을 종균화하고 고부가가치 기능성 식품으로 산업화함

[연구전략]

(1) 기능성 발효 균주를 선정하고, (2) 균주 특성을 분석하여 (3) 기능성 및 효능을 검증하고, (4) 발효 종균 생산 공정을 표준화하여 (5) 고부가가치 기능성 식품을 개발 및 출시함(매출액 창출)

[정량목표]

- 전략미생물 해독 6건, 유용 유전자원 확보 9건
- 개발된 스타터의 프로바이오틱스 기능을 입증할 SCI급 논문 7편 이상 게재
- 특허 3건 이상 출원 및 3건 이상 등록
- 프로바이오틱스 특성을 가진 김치유산종균을 사용하여 기능성 김치개발 3건 이상 및 1건 이상 상품화
- 프로바이오틱스 개별 인정위한 임상시험용 김치유산종균 균주 개발 1건 이상

나. 세부목표

- 마이크로바이옴 기반 *in vitro* 스크리닝을 통한 기능성 미생물 균주 탐색 및 확보
 - 김치 및 장내 세균으로부터 프로바이오틱스 기능을 가진 유산균 선별
 - 김치 환경에 적응한 산/담즙 내성 프로바이오틱스 후보 균주군 확보
 - 프로바이오틱스(장 건강, 간 건강, 정신 건강 등) 특성 유산균 선별
 - 선정 균주 특성, 유전체 구조 및 대사체 분석
- 기능성 유전자/물질 분석, 발효공정 최적화(개량) 및 표준화
 - 우수한 발효능과 기능성을 가진 김치발효용 스타터균주를 개발하기 위해 김치환경에 최적화된 균주로 개량
- 유용성(기능성), 안정성, 안전성 등 평가 및 검증
 - 장 환경에서 미생물/미생물, 미생물/상피세포, 식품/미생물 상관관계 분석
 - 동물효능평가를 통해 장내 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원할 기능 등 프로바이오틱스 효능 검증
- 고부가가치 기능성 식품 상품화

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 제1 세부과제 연구결과

2-1-1. Microbiome 기반 유산균 확보

- *L. mesenteroides* DRC 1506을 대조균으로 저 산생성, 고생육 후보균주 탐색
 - 선행연구를 통해 종균과 같이 첨가해 동시발효가 가능한 후보 균주로 *Lb. plantarum*을 선정 총 33개의 균주를 확보
 - 실험실 기 분리균주 11종 확보
 - 총 43개의 후보 유산균 확보
- 상업용 프로바이오틱스의 김치 효용성 검증
 - 상업용 probiotics를 이용하여 김치 효용성을 시험한 결과, 김치 유산균과 비교 시 생육과 pH 및 유기산 생성량에서 큰 차이가 없었음.
 - 상업용 probiotics 균주도 김치 환경에서 적응이 가능한 것으로 보여지나 sensory test결과에서 좋지 못한 결과를 얻음

2-1-2. 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 (장 건강)

- Selective medium (color medium) 을 통한 산 생성 확인
 - Bromocresol green을 사용한 M5 medium : 산 생성 시 blue -> yellow
 - Plate count agar with BCP (bromo cresol purple) : purple -> yellow
 - MRS medium with 2% CaCO₃ : colony 주변 투명 환을 생성하는 결과를 얻음
 - 시험한 모든 균주에서 산 생성을 보여 산 생성량을 비교하는 것이 필요
- Simulated kimchi medium (SKM) 환경에서 후보 유산균 생육확인
 - 10°C, 37°C 모두 SKM 배지에서 DRC1506보다 *Lb. plantarum*이 더 빠른 성장속도를 보임
 - 동일한 속의 균주라도 분리원에 따라 다른 성장을 보임
 - 각 균주별 유기산 생성량에 차를 보여 cell number당 lactic acid 생성 비교가 필요
- 후보 균주의 장내 안정성 평가
 - 장 상피세포 부착능을 평가한 결과, *Lb. plantarum* CBNU1810 균주가 LGG보다 높은 부착능을 보여 프로바이오틱스 후보 균주로 사용가능할 것으로 기대됨

2-1-3. 식약처 고시형 17종 프로바이오틱스 김치 적용 우수 종 선정

- SKM media 환경에서의 적용 및 분석
 - 최적온도에서 5종 성장
 - 저온에서 3종 성장하였고 이외의 종들은 성장하지 않음
- 김치 적용 균주의 실제 김치 적용 및 상업균주와의 관능평가 비교
 - 관능 평가 결과 상업균주가 가장 좋았고 이와 평가가 비슷한 2종(*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*) 선정
- 고시형 5종 적용 김치 대사산물 분석
 - H-NMR 분석 결과 DRC 균주와 비슷한 발효 패턴으로 보이는 *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* 종으로 결정

2-1-4. 프로바이오틱스 우수 후보 발굴(장 건강)

- 후보 프로바이오틱스 균주 분리 및 library 구축
 - *Lb. fermentum*: 막걸리와 구강에서 14균주 분리
 - *Lb. reuteri*: Sourdough, 모유 분변에서 20 균주 분리

- *Le. mesenteroides*: 분변에서 8균주 분리
- *in vitro* 안정성 및 항염증 분석
- 산담즙 내성 및 장상피세포 부착능 평가
- NO assay를 통한 항염증 활성 평가
- 안정성 및 면역 활성 우수 균주 선정(총 12균주)

2-1-5. 장건강 프로바이오틱스 우수 후보 발굴

- 안전성 분석
 - 장건강 후보 6종 유산균은 용혈능과 바이오제닉아민 유전자를 보유하고 있지 않아 안전한 것으로 판단됨
- 항산화 활성 분석
 - *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 13, 14는 LGG와 유사한 항산화 활성을 보임
- *In vitro* 항염증 활성 분석
 - NO test: 모든 장건강 후보 균주는 NO를 억제함
 - RT-qPCR: 모든 장 건강 후보 균주는 iNOS, COX-2의 발현양을 억제함
 - Cytokine: *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 13, 14는 LGG보다 더 높은 항염증 활성을 보임
 - ▶ 결론적으로 장 건강 후보 유산균 6종 중 *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 14는 동물실험 최종균주로 선발됨
- *In vivo* (동물실험)-장 건강 프로바이오틱스 항염증 활성 검증
 - DSS 유도 대장염 마우스 모델 설계
 - *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 14의 대장염 억제 효능 분석 진행
 - ▶ *L. reuteri* 14의 대장염 완화 및 억제 효능 분석 완료

2-1-6. 장 건강 프로바이오틱스의 김치 적용 가능성 분석

- DRC1506과 장 건강 후보 균주 사이의 공동배양
 - *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 14은 DRC1506 성장에 큰 영향을 미치지 않음
- 김치묘사배지에서의 성장률 확인
 - *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 14은 실온에서 DRC1506보다 더 높은 성장률을 보이며, 저온에서도 성장함
- 장/간/정신 건강 유산균을 접종한 다양한 김치의 품질특성 분석
 - 배추김치, 동치미김치, 나박김치를 제조하여 pH, 총산도, NMR, GC/MS를 통한 대사산물 분석과 관능평가를 수행함
 - ▶ 결론적으로 *L. fermentum* 16, *L. reuteri* 14은 DRC1506와 가장 유사한 발효 패턴을 보임

2-1-7. DRC 1506 균주 산업화 연구

- 김치 환경 스트레스 적응 돌연변이 균주 제작
 - 산(pH, 젖산) 내성 균주 개발
 - 저온 스트레스 내성 균주 개발

2-2. 제1 협동과제 연구결과

2-2-1. 프로바이오틱스 우수후보 균주 발굴 및 유전체 서열분석

- 균주 및 유전체 정보 확보
 - 선행연구에서 *Lactococcus laffinolactis* Wikim0068를 비롯한 약 30여종의 김치유래 유산균 확보
 - (주)대상(제2협동)에서 균주 *Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266 & *Lactobacillus brevis* DSR J301의 유전체 정보 전달받음
- 유전체 정보 분석
 - *Lactococcus laffinolactis* Wikim0068의 유전자와 실제 대사물질(비타민)의 발현 검증, 아미노산 대사관련 유전자 분포도 작성, 다양한 탄소원을 이용한 대사경로 예측
 - *Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266와 *Lactobacillus brevis* DSR J301를 이용하여 항생제 저항성 유전자 분석(확인되지 않음), bacteriocin 생산 관련 유전자 확인(J266 균주에서만 확인됨)
 - *Lacticaseibacillus paracasei* CBA3611과 *Lactobacillus casei* group에 속하는 32개 균주의 유전체 정보를 취합하여 비교유전체 분석
- ▶ CBA3611 균주의 기능성 프로바이오틱스 및 김치종균으로서의 가능성 예측

2-2-2. 프로바이오틱스 우수 후보 발굴(정신건강)

- 균주 기본 정보 확보
 - 유전체 분석을 통해 GABA생성 유전자 유무 확인
 - 신경전달물질(GABA, taurine)의 생성량 측정
 - QGP-1(enterochromaffin 세포주 중 한 종류) 세포와 선정된 균주들과의 공배양으로 5-HT(5-hydroxytryptamine, serotonin) 생성유도 측정
- ▶ 트립토판 대사관련 유전자의 발현 빈도 탐색, pathway 구성

2-2-3. 마우스모델을 이용한 균주효능 검증(정신건강)

- 인지기능 저하 마우스 모델 설계
- 인지기능개선(정신건강) 기능성 프로바이오틱스 균주를 이용한 동물실험 수행:
 - 행동실험(Y-maze, fear conditioning test), 혈액 내 세로토닌 함량측정
- ▶ 유산균 섭취로 인해 정신건강 개선 효능 확인

2-2-4. 마우스모델을 이용한 균주효능 검증(간건강)

- 균주 확보
 - 제 2협동에서 발굴한 균주 2종(*Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266, *Lactobacillus brevis* DSR J301)을 대상으로 실험을 진행
- 마우스모델을 이용한 균주효능 검증
 - 알콜성 간손상 마우스 모델 설계
 - 알콜성 간손상 예방 기능성 프로바이오틱스 균주를 이용한 동물실험 수행: 혈액내 간수치, 염증성 cytokine측정, 간 조직 내 지방 축적정도, 장내미생물 변화 확인, 장내 미생물 기능적 유전자 변화 예측
- ▶ 유산균 섭취를 통해 알콜성 간손상 예방 및 장내 미생물 개선 효능 확인

2-2-5. 기능성 프로바이오틱스 유전체 데이터베이스 구축

- 유전체 분석 균주정보 확보

- 대표적인 식품 및 인체유래 유산균 100종(*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*)을 선발하여 유전자 정보 확보
- 세부적으로는 기능성 물질 생성(GABA, short chain fatty acid 생산 유전자), 스트레스 저항성(저온·저pH저항성 유전자), 장내 정착능(exopolysaccharide 생산, sortase 유전자 등)관련 유전자 정보로 데이터베이스 구성

2-3. 제2 협동과제 연구 결과

2-3-1. 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 (간 건강)

- 김치 유래 유산균 분리
 - 시판 김치, 재래식 김치, 별미 김치 등 다양한 김치로부터 유산균 분리
 - 김치 유산균 500종 이상 분리
- 내산성, 내담즙산 균주 선별
 - pH 3.0 2시간 처리 후 생존율 60% 이상 유산균 분리
 - Oxgall 1% 2시간 처리 후 생존율 60% 이상 유산균 분리
 - 내산성, 내담즙산 균주 18종을 분리
- 알코올 분해성 활성 측정
 - alcohol dehydrogenase 및 acetaldehyde dehydrogenase 활성 측정
 - 알코올 분해 균주 3종을 분리
- 알코올성 간질환 세포 모델에서 효능 균주 선별
 - 알코올 유래 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-8) 억제 활성 유산균 선별
 - 간 기능 개선 균주 2종을 선발

2-3-2. 후보균주 생산기술 최적화

- 간기능 개선 균주 최적 배양조건 수립
 - MRS 배지를 변형하여 선별한 기능성 유산균의 적합한 배지 조성 개발
 - 변형된 MRS 배지에서의 생육 패턴 확인
 - 최적 배양 배지 개발

2-3-3. 후보균주 종균 특성 분석

- 후보균주(간, 정신 건강) 발효 품질 분석
 - 간 건강 후보 균주 2종을 맛김치에 적용하여 비교적 관능 품질이 우수한 균주 1종 선별
 - 선별한 간 건강 후보 균주 1종과 정신 건강 후보 균주 1종을 스타터로 첨가한 맛김치의 발효 품질 비교
- 후보균주 기능성 김치 시제품 제작
 - 후보균주 2종 적용 맛김치 제조
 - 후보 균주 2종의 최적 맛김치 배합비 개발

2-3-4. 기능성 김치 적용 김치 개발 및 발효 품질 안정화

- 기능성 유산균 별 김치 컨셉 조사
 - 기능성 유산균 별 나박물 김치 및 동치미 관능 비교 결과 장건강 균주(*Lb. reuteri*14)에서의 선호도가 높게 나타남
 - 500명 소비자 대상 기능성 컨셉별 김치 조사결과 장건강-백김치: *Lb. reuteri* 14

간건강-동치미: *Lb. brevis* DSR 301

정신건강-물김치: *Lb. paracasei* CBA3611)로 결정함

○ 김치 시제품 제조 및 품질 모니터링

- 장/간/정신건강 컨셉별 김치 제조 및 우점율, 대사체, 향미 분석 진행중

- 김치 3종 소비자 관능평가 진행 중

2-3-5. 후보균주 종균 NABIC 등록

○ 간 건강 후보균주 2종(*Lb. brevis* DSR 301, *Lb.platarum* DSR 266) 전장 유전체 분석

2-3-6. 간, 장, 정신 건강 후보 유산균 적용 김치 중 상품성이 가장 우수한 김치 선별

○ 선별된 기능성 김치의 대량 생산을 위한 제조 공정 개발

: 3차년 소비자 조사결과 컨셉 및 관능결과 ⇒ 장건강/백김치 선정

- 백김치 종균별 제조 및 관능 테스트

2-3-7. 유산균 Starter 김치 산업적 생산 최적화

○ 백김치 적용 대량 생산라인 적용 테스트 : *Lb. reuteri* 14

- 종균배양 최적화 및 김치 접종농도 설정

종균 배양 공정 개발 하여 산균 Starter 활성 온도, 시간 관리 기준 확

○ 대량생산제품 품질 안정화

- 김치유산균의 산업적 적용을 위한 특성연구 및 최종 선발전 장건강 유산균 *Lb. reuteri* 14 균주 현장 생산라인 적용 백김치 품질은 발효품질, 대사산물, 향기분석, 우점율, 관능 소비자 조사함

2-3-8. 프로바이오틱스(장건강 LBRE14균주) 김치개발 및 상품화

○ 장건강 LBRE14균주 기능성

- LBRE14는 식품에 사용하기에 안전하며, 산 담즙 내성 및 부착능 우수, 항염증 활성 및 항산화 활성이 우수함

○ 김치 컨셉 적합도 및 관능평가

- 장건강 김치 필요성 요구되며, 배추김치가 어울리는것으로 조사됨

- 장건강 유산균 적용 백김치(변경)가 종합선호도 및 종합기호도 유의성 있게 높게 나타남

- 외관, 식감, 맛 모두 장건강 유산균 적용 백김치(변경)가 높게 나타남

○ 백김치 적용 생산라인 적용 품질

- 발효품질, 대사산물, 유통품질, 관능평가 모두 안정적으로 나타남

○ 백김치 상품화

- 장건강 유산균 LBRE14균주 백김치 생산적용, 제품리뉴얼 완료

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

3-1. 연구수행 결과

3-1-1. 제 1세부과제 수행 결과

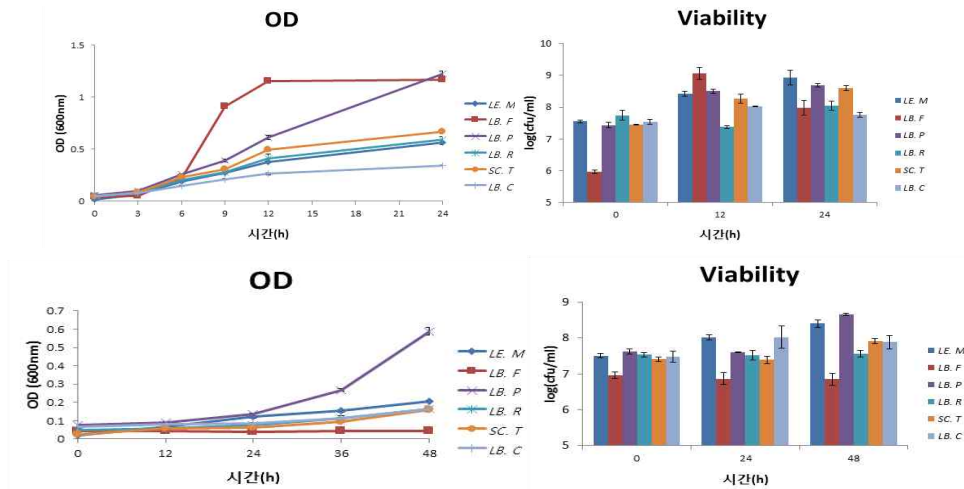
(1) Microbiome 기반 유산균 확보

- DRC1506을 대조군으로 저 산생성, 고생육 후보균주 탐색
- *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* 속을 포함하여 총 43개의 후보 균주를 확보
- 상업적 probiotic 균주를 분리하기 위해 시판되는 요구르트를 준비하여 50 μ l 시료를 0.85% NaCl용액 450 μ l에 희석한 다음 0.85 NaCl에 반복하여 10⁻⁶ 까지 희석. 희석된 용액을 BPB(bromophenol blue)를 첨가한 MRS 고체배지에 spreading하여 37 $^{\circ}$ C 혐기조건하에서 48시간 배양. Morphology가 다른 단일 colony를 취하여 액체 MRS 배지에서 48시간 배양하여 균주를 얻음(*Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lb. casei*)

<표3-1> 마이크로바이옴 기반 확보 유산균

Source	#	Identification	Source	#	Identification	
Control	1	<i>Le. mesenteroides</i> DRC 1506	21	21	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1819	
	2	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917	22	22	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1820	
	3	<i>Le. citreum</i> CBNU1801	23	23	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1821	
	4	<i>Lc. lactis</i> CBNU1802	24	24	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1822	
	5	<i>Le. citreum</i> CBNU1803	25	25	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1823	
EFEL isolates	6	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1804	26	26	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1824	
	7	<i>Lb. brevis</i> CBNU1805	27	27	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1825	
	8	<i>Le. holzafelii</i> CBNU1806	Laphet	28	28	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1826
	9	<i>Le. lactis</i> CBNU1807		29	29	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1827
	10	<i>Le. mesenteroides</i> CBNU1808		30	30	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1828
	11	<i>W. cibaria</i> CBNU1809		31	31	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1829
	12	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1810		32	32	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1830
	13	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1811		33	33	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1831
	14	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1812		34	34	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1832
	15	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1813		35	35	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1833
Gut	16	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1814		36	36	<i>Lb. plantarum</i> DS1801
	17	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1815		37	37	<i>Lb. plantarum</i> DS1802
	18	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1816	38	38	<i>Lb. plantarum</i> DS1803	
	19	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1817	Daesang	39	39	<i>Lb. plantarum</i> DS1804
	20	<i>Lb. plantarum</i> CBNU1818		40	40	<i>Lb. plantarum</i> DS1805
				41	41	<i>Lb. plantarum</i> DS1806
		42		42	<i>Lb. plantarum</i> DS1807	
		43	43	<i>Lb. plantarum</i> DS1808		

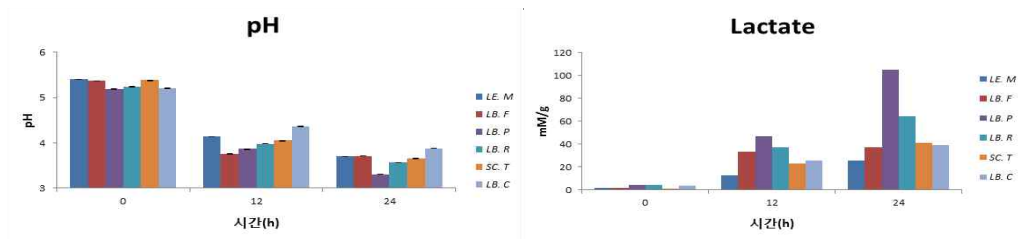
- SKM medium 환경에서 probiotics의 생육을 확인하기 위해 서로 다른 종을 가진 균주를 이용하여 온도별(37 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C) 성장 곡선, pH 및 유기산 생성량을 측정함
- 성장 곡선 실험은 SKM (Standard kimchi media) 용액에 24시간 전배양한 균체를 1%접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간까지 배양하여 3시간마다, 10 $^{\circ}$ C에서 48시간까지 배양하여 12시간마다 O·D_{600nm}를 측정하였고, 생균수는 37 $^{\circ}$ C에서 24시간까지 배양하여 12시간마다, 10 $^{\circ}$ C에서 48시간까지 배양하여 24시간마다 생균수를 측정하여 온도 별 생육을 확인
- 상업용 probiotics 균주의 성장 곡선과 생균수를 측정한 결과, *Le. mesenteroides*와 비교해서, 모든 균주가 SKM 배지에서 37 $^{\circ}$ C에서 잘 자랐지만, 10 $^{\circ}$ C에서는 *Lb. plantarum*이 SKM 배지에서 빠르게 성장, 분리한 다른 균주는 10 $^{\circ}$ C에서 성장이 느린 것으로 관찰됨



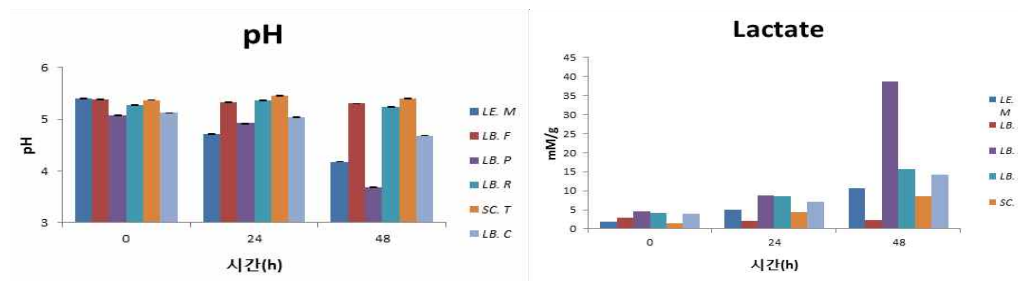
<그림3-1> Probiotics 후보균주의 성장 곡선 및 생균수

- pH 및 유기산 측정은 SKM (Standard Kimchi media) 용액에 24시간 전배양한 균체를 1% 접종하여 37°C에서는 24시간까지 배양하였고, 10°C에서는 48시간까지 배양한 뒤 3mL씩 샘플링하여 pH와 유기산을 측정하였다. 유기산은 lactic acid를 standard 물질로 사용 하였고, Agilent Infinity 1260 HPLC 분석기계를 이용하여 조건은 컬럼: Aminex HPX-87H 용매: 0.008N H2SO4 , 유속: 0.6 mL/min, 온도: 40°C, UV wavelength: 215nm 및 Injection volume: 20µl 하에서 수행
- pH와 lactate를 측정하여 변화 값을 나타낸 결과, *Le. mesenteroides*와 비교하여 37°C에서 모든 probiotics 균주의 pH 변화량이 컸지만, 10°C에서는 *Lb. plantarum*만이 pH 변화가 급격하게 나타나고, 이 외의 균주들에서는 pH 변화량이 적은 것이 관찰됨. Lactate 총량은 37°C에서 대부분 균주가 많은 산을 생성하였지만, 10°C에서는 *Lb. plantarum*만이 많은 산을 생성하였고 나머지 균은 적게 산을 생성하였음

① 37°C

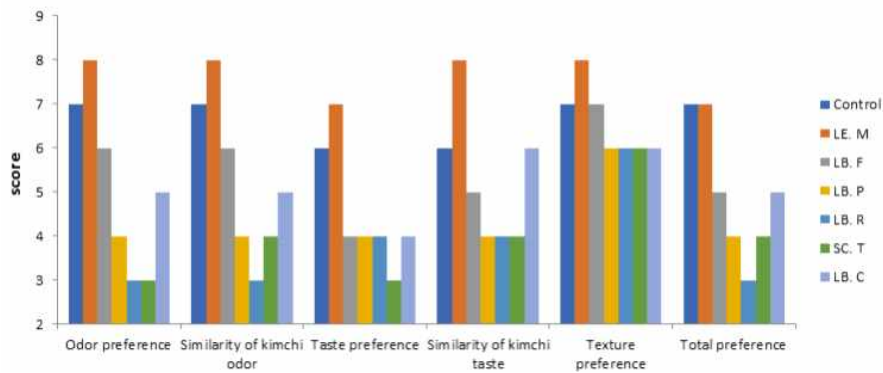


② 10°C



<그림3-2> Probiotics 균주의 pH 및 유기산 생성량

- Sensory test는 배추 500g을 기준으로 배추를 8% 소금물에 15시간 동안 절인 뒤, 무 16.5g, 부추 25g, 생강 2g, 마늘 8g, 고춧가루 16g, 액젓 18g, 전분 16g을 넣은 김치를 제조하여 상업용 probiotics 균주를 1%씩 접종하여 25℃에 숙성 시킨 뒤, pH가 4.5 도달하면 4℃에 보관하여 sensory test를 진행함. Control은 균을 접종하지 않은 김치로 설정
- 종합적 평가로 보았을 때, 김치 맛은 control과 *Le. mesenteroides*가 가장 좋았고, 대부분의 상업용 probiotics를 접종한 김치에서는 평가가 좋지 못하였음
- 유제품이 분리원인 상업용 probiotics를 이용하여 김치 효용성을 시험한 결과, 김치 유산균과 비교하여 생육에서도 큰 차이가 없고, pH 및 유기산 결과에서도 일정 산도를 생성하는 것으로 보아 상업용 probiotics 균주도 김치 환경에서 적응이 가능한 것으로 보여짐. 그러나, sensory test 결과에서 control로 사용한 *Le. mesenteroides*보다 낮은 평가를 보임
- 결과적으로, 동물성 source에서 분리한 probiotics를 식물성 source에 적용 시 잘 적응은 할 수는 있으나, 맛이나 향기에서는 맞지 않은 것으로 보임



<그림3-3> 상업용 probiotics를 starter로 제조한 김치의 sensory test

(2) 프로바이오틱스 우수 후보 발굴

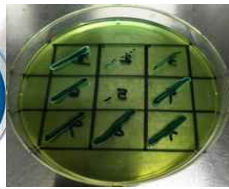
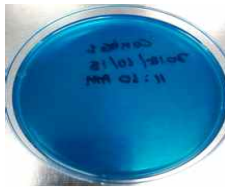
○ Selective medium (color medium) 을 통한 산 생성 확인

- 저 산 생성 균주를 선별하기 위해 bromocresol green을 사용한 M5 medium : 산 생성 시 blue → yellow로 배지색이 변화, plate count agar with BCP (bromo cresol purple) : 산 생성 시 purple → yellow로 배지색이 변화, MRS medium with 2% CaCO₃ : colony 주변 투명 환 생성하는 원리를 이용하여 각 후보균주의 산 생성량을 비교함
- 사용한 배지의 조성은 <표3-2>와 같음

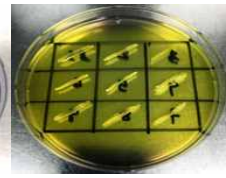
<표3-2> color medium 조성

M5		Plate count agar with BCP		MRS medium with 2% CaCO ₃	
Component	g/L	Component	g/L	Component	g/L
Tryptone	10	Peptic digest of animal tissue	5	Proteose peptone	10
Yeast extract	5	Yeast extract	2.5	Beef extract	10
Fructose	2.5	Dextrose	1	Yeast extract	5
KH ₂ PO ₄	2.5	Polysorbate 80 (Tween 80)	1	Dextrose	20
Tween 80	1	L-Cysteine	0.1	Polysorbate 80	1
L-Cysteine HCl	0.5	Bromo cresol purple	0.040	Ammonium citrate	2
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	Agar	15	Sodium acetate	5
MnSO ₄ 1H 2O	0.05			Magnesium sulphate	0.1
Calcium pantothenate	0.01			Manganese sulphate	0.050
Bromocresol green	20mL			Dipotassium phosphate	2
Agar	20			CaCO ₃	20
				Agar	12
pH	6.5	Final pH (at 25℃)	6.8±0.2	Final pH (at 25℃)	6.5±0.2

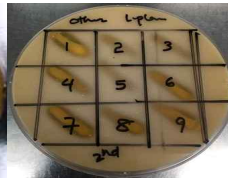
A. M5 medium



B. plate count agar with BCP



C. MRS medium with 2% CaCO₃

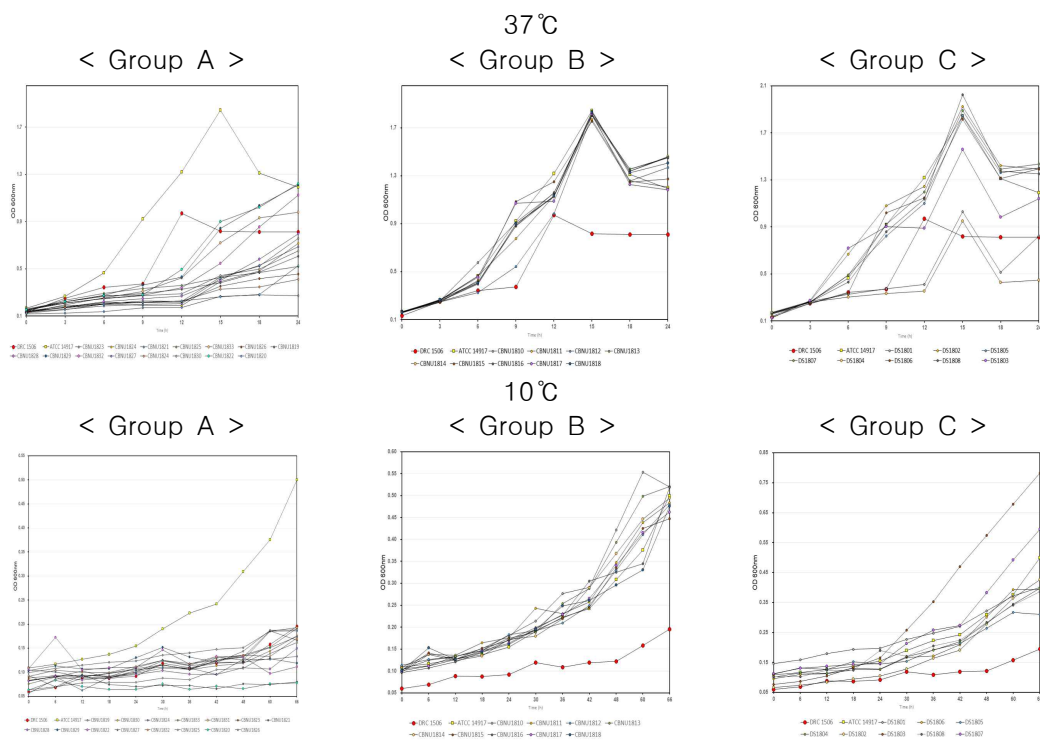


<그림3-4> Color medium을 통한 산 생성 비교

- 시험한 모든 균주에서 산 생성을 보였으나, 각 균주에 따른 차이를 시각적으로 한눈에 판단할 수 없어 균주별 산 생성량을 정량하여 비교할 필요가 있음

○ SKM medium 환경에서 후보 유산균 생육확인

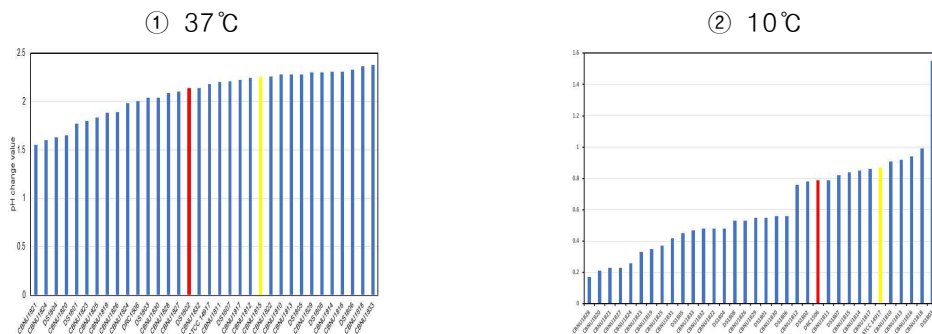
- 후보 유산균 생육확인을 위해 분리원이 서로 다른 *Lactobacillus plantarum* 균주들의 온도별 (37°C, 10°C) 성장 곡선, pH 및 유기산 생성량을 측정함
- 성장 곡선 실험은 SKM (Standard Kimchi Media) 용액 25mL에 24시간 전배양한 균체를 1% 접종하여 37°C에서는 24시간까지 배양하여 3시간마다, 10°C에서는 48시간까지 배양하여 6시간마다 O·D_{600nm}를 측정하여, 온도 별 생육을 확인함
- 모든 *Lb. plantarum* 균주의 성장 곡선을 측정한 결과, *Le. mesenteroides*와 비교해서, 장내 및 김치에서 분리한 균주는 SKM 배지에서 37, 10°C에서 빠르게 성장하였지만, Laphet에서 분리한 균주는 37, 10°C에서 성장이 느린 것으로 나타남



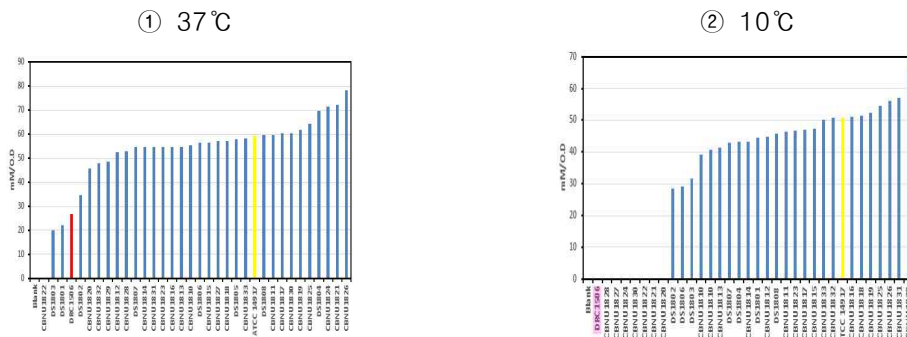
* 분리원에 따라 group을 나눔; Group A : Laphet, GroupB : human faeces, Group C : Kimchi

<그림3-5> *Lactobacillus plantarum*의 성장 곡선

- pH 및 유기산 측정은 SKM (standard kimchi media) 용액 25mL에 24시간 전배양한 균체를 1% 접종하여 37°C에서는 24시간까지 배양하였고, 10°C에서는 48시간까지 배양한 뒤 3mL씩 샘플링하여 pH와 유기산을 측정. 유기산은 lactic acid를 standard 물질로 사용 하였고, Agilent Infinity 1260 HPLC 분석기계를 이용하여 조건은 컬럼: Aminex HPX-87H 용매: 0.008N H₂SO₄ , 유속: 0.8 mL/min, 온도: 40°C, UV wavelength: 215nm 및 Injection volume: 20μl 하에서 수행
- 모든 *Lb. plantarum*의 pH를 측정하여 변화 값을 나타낸 결과 37°C, 10°C 에서는 pH가 각각 1.5~2.5, 0.2~1.6 차이가 있었다. 그리고 *Le. mesenteroides*와 비교해서, 장내 및 김치에서 분리한 균주는 SKM 배지에서 pH 변화량이 컸지만, laphet에서 분리한 균주는 pH 변화량이 적은 것으로 나타남



<그림3-6> *Lactobacillus plantarum*의 pH 변화



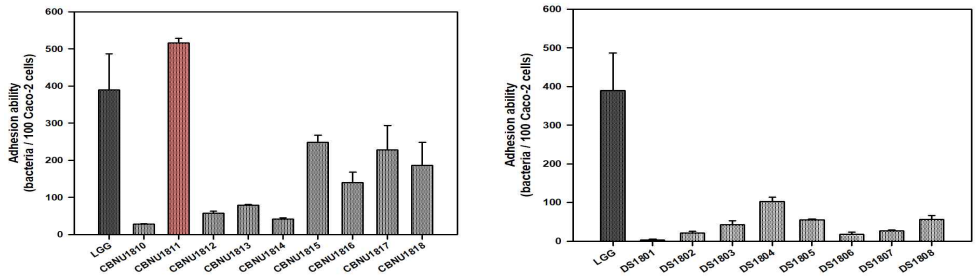
<그림3-7> *Lactobacillus plantarum*의 organic acid/O.D 분석

- 모든 *Lb. plantarum*의 유기산(Lactic acid)을 측정하여 O.D를 나눈 결과 37°C에서 *Le. mesenteroides*와 비교하였을 때, *Lb. plantarum* DS1803, DS1801 균주가 cell 당 유기산 생성량이 적은 균으로 관찰되었고, 10°C에서는 *Lb. plantarum* DS1802, DS1806, DS1803 이 평균 30mM/cell로 유기산 생성량이 비교적 적은 것을 관찰함
- *Lb. plantarum* JS 1-9균주와 김치 유산균은 저온에서 성장이 가능한 김치 스타터로 높은 후보로 판단됨. 특히 *Lb. plantarum* DS1803, DS1801, DS1802, DS1806은 산을 적게 내는 김치 스타터 후보 균주로 판단됨

○ 후보 균주의 장내 안전성 확인

- 기능성 연구에 앞서 유산균의 장내 생존력 및 안정성을 관찰하기 위해 확보한 여러 후보 프로바이오틱스 균주들의 장 상피세포 부착능 평가 실험을 진행함
- 장 상피세포 부착능을 평가하기 위해 폴리스틸렌 막(polystyrene membrane)처리가 된 well plate를 사용하여 인간 대장암에서 유래한 세포주인 Caco-2 세포를 monolayer로 기른 후 장 상피와 유사한 환경을 조성하여 실험에 사용. 그 위에 10⁸까지 배양한 균주를 접종하고, 2시간 동안 배양 후 cell monolayer에 붙은 균을 계수하는 방법으로 후보 균주의 장내 안전성을 비교함

- 실험에 사용한 균주 대부분이 대조균으로 사용한 LGG (*Lb. rhamnosus* GG) 보다 장 상피세포 부착능이 낮은 것으로 관찰됨. 그 중 *Lb. plantarum* CBNU1810 균주가 LGG보다 높은 부착능을 보여 프로바이오틱스 후보 균주로 사용가능할 것으로 기대됨. 이 외에도 시험한 균주들 중에서 비교적 높은 부착능을 보인 몇 가지 균주를 선정하여 다음 기능성 평가를 위한 후보 균주로 사용할 예정



<그림3-8> 후보 균주의 장 상피세포 부착능 분석 결과

- ▶ 최종적으로 산 생성량이 적고, 김치에서 생육이 가능한 균주를 screening 한 후, 프로바이오틱스로서 장내 안정성을 평가하여 총 3종(*Lb. plantarum* DS1803, *Lb. plantarum* CBNU1811, *Lb. plantarum* DS1802)의 균주를 선발함

(3) 고시형 17종 프로바이오틱스 균주 확보 및 김치 적합성 분석

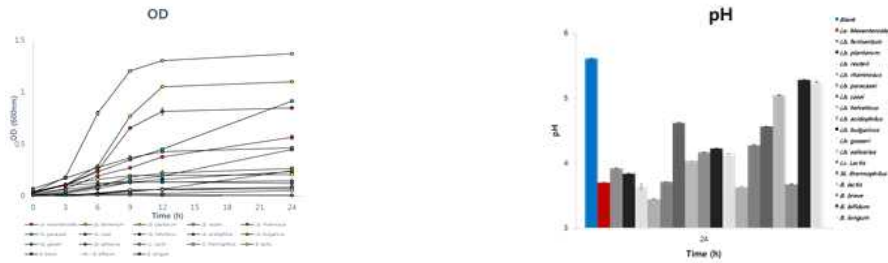
- 식약처에서 승인한 고시형 17종 균주들을 확보 후 상업균주 DRC 1506 비교
- 균주들은 농촌진흥청(KACC), 생물자원센터(KCTC) 에서 분양을 받았으며 17종 균주의 이름과 조건은 표와 같음

<표3-3> 마이크로바이옴 기반 확보 유산균

번호	균주명	실험실 확보 균주	최적 온도
0	<i>Leuconocstoc mesenteroides</i>	DRC 1506	30 °C
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	KACC11441	37 °C
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KACC11451	37 °C
3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	KACC11452	37 °C
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KACC11953	37 °C
5	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	KACC12361	30 °C
6	<i>Lactobacillus casei</i>	KACC12413	30 °C
7	<i>Lactobacillus helveticus</i>	KACC12418	37 °C
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KACC12419	37 °C
9	<i>Lactobacillus delbruechii sub. bulgaricus</i>	KACC12420	37 °C
10	<i>Lactobacillus gasseri</i>	KACC12424	37 °C
11	<i>Lactobacillus salivarius</i>	KACC10006	37 °C
12	<i>Lactococcus lactis</i>	KACC13877	30 °C
13	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	KACC11857	37 °C
14	<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	KACC16638	37 °C
15	<i>Bifidobacterium breve</i>	KACC16639	37 °C
16	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KACC20601	37 °C
17	<i>Bifidobacterium longum</i>	KCTC3128	37 °C

- 고시형 17종 프로바이오틱스의 김치 효용성 검증
- 고시형 17종 균주가 김치 환경에 적응하여 성장하여 생육 확인하기 위해 SKM medium 환경에 접종하여 적정 온도(37°C), 저온(15°C)에서 성장 곡선 및 pH 측정함
- 실험은 적정 온도에서 24시간동안 2시간 마다, 저온에서 5일 동안 1일 마다 600nm에서 흡광도 및 pH 측정함
- 측정 결과 *Le. mesenteroides*와 비교해서 최적 온도에서는 *Lb. reuteri*, *Lb fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius*이 자랐고 저온 에서는 *Lb fermentum*, *Lb. paracasei*이 성장 추세를 보여졌지만, 이들을 제외한 균주는 성장하지 않은 것으로 보임

37℃



15℃



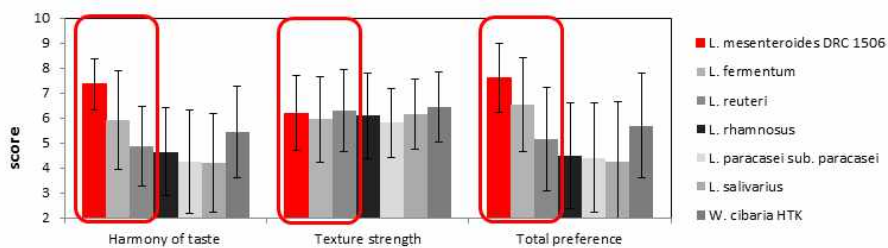
<그림3-9> 고시형 17종 probiotics 균주를 SKM medium에 접종하여 적정 온도(37℃), 저온(15℃)에서 성장 곡선 및 pH 변화

- 김치 적응 가능한 균주를 총 5종 균주(*Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius*)로 선정하였고 이들을 김치 스타터로 사용하여 실제 김치에 접종하여 다음 실험을 진행하였음
- 처음 pH에서 적정 pH까지 약 2일에서 5일정도 걸렸고 약 pH 4.7까지 떨어지는 것을 확인하고 3℃에서 보관하였고 모든 김치가 적정 산도가 되면 관능평가를 실시하였음

<표3-4> 스타터 적용 김치 pH 변화

번호	구분	균	출처	pH					
				0일	1일	2일	3일	4일	5일
1	Lactobacillus	<i>mesenteroides</i> DRC 1506	대상	5.46	5.31	4.92	-	-	-
2		<i>fermentum</i>	충북대	5.44	5.4	5.21	4.69	-	-
3		<i>reuteri</i>		5.54	5.41	5.34	4.88	-	-
4		<i>rhamnosus</i>		5.44	5.46	5.37	4.9	-	-
5		<i>paracasei sub. paracasei</i>		5.61	5.43	5.38	5.14	4.72	-
6		<i>salivarius</i>		5.72	5.5	5.36	5.13	4.76	-

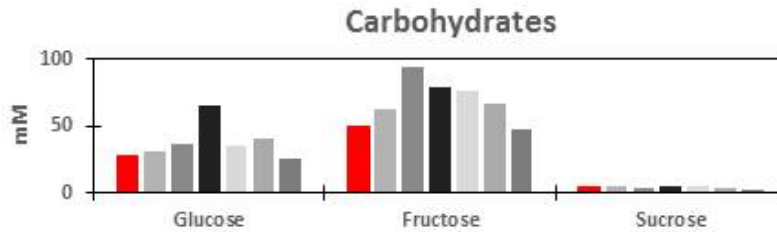
- 비교균은 *Le. mesenteroides*와 비교하였고 조건은 스타터 첨가 후 실온에서 보관 뒤 적정 pH 산도가 되면 저온 보관 후 40명이 관능 평가를 하였음
- 관능평가 결과, 종합적 김치 맛은 *Le. mesenteroides*가 가장 좋았고, 그 다음으로는 *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* 순으로 좋았으며 *Lb. salivarius*가 가장 낮은 평가 점수를 받았음



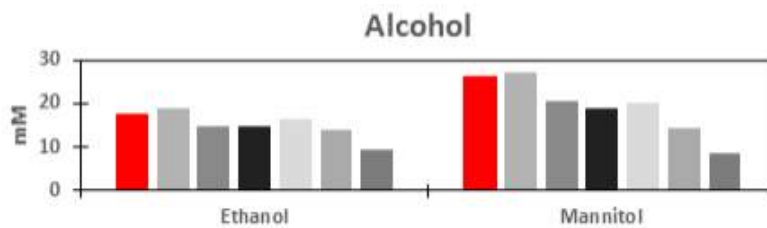
<그림3-10> 스타터 접종 김치 관능 평가 결과

- 위에서 접종한 김치로 김치 숙성 발효 후 성분을 각각 비교하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 대사 산물 분석을 하였음.
- 모든 김치에서는 탄소원 glucose와 fructose와 같은 주요 유리당으로 검출이 되었고, 또한 알코올과 유기산 성분을 비교 시 ethanol, mannitol, lactate, acetate가 검출된 것으로 보아 Hetero-type 젖산발효가 일어나는 것을 알 수 있었음

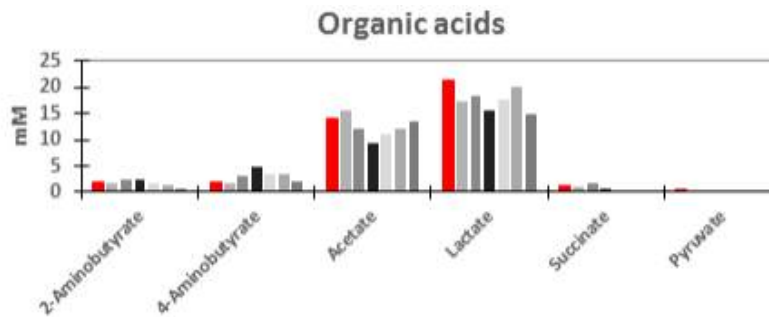
① 탄소원



② 알코올

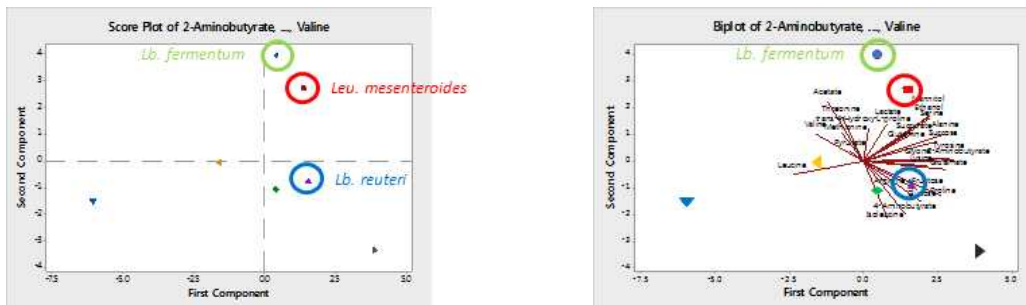


③ 유기산



<그림3-11> 김치 주요 성분 및 농도

- $^1\text{H-NMR}$ 결과를 PCA 분석으로 비슷한 그룹끼리 묶었음
- *Le. mesenteroides*와 비교하여 *Lb. fermentum*은 같은 경향으로 발효가 진행되었고, 그 다음으로 *Lb. reuteri*가 비슷한 패턴을 보임



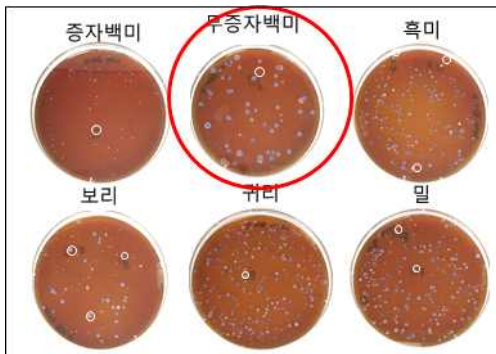
<그림3-12> 김치 샘플 성분 PCA 분석 결과

- ▶ 최종적으로 고시형 17종 중 김치에 적용 가능하고 *Le. mesenteroides*와 비슷한 발효 패턴으로 보이는 후보 종으로 *Lb. fermentum*와 *Lb. reuteri*가 결정됨

(4) 프로바이오틱스 후보 종 분리 및 균주 확보

○ *Lactobacillus fermentum* 분리

- *L. fermentum*은 주로 곡물발효식품이나 인체 환경에서 분리됨
- 문헌조사를 토대로 백미 누룩과 인체 구강에서 *L. fermentum* 균주 분리하였고, ribose을 첨가한 BPB+MRS를 선택배지로 사용함
- 무증자 백미 누룩에서 10균주, 구강에서 4균주, 총 14종의 *L. fermentum*을 분리하였음



<그림3-13> Morphology 결과

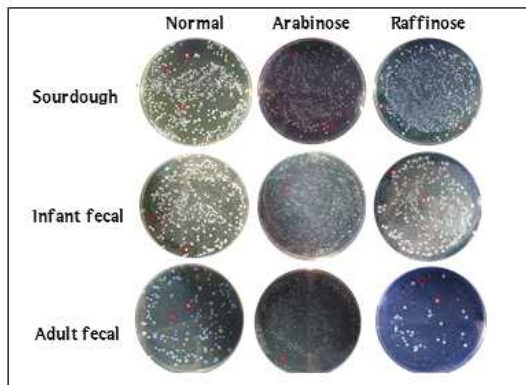
<표 3-5> *L. ferementum* 분리 결과

분리원	Species	Strain name
무증자 백미	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2
		2-1
		2-3
		2-4
		2-5
		2-6
		2-7
		2-8
		2-9
		2-10
Saliva	<i>Lactobacillus fermentum</i>	HTS1
		HTS3
		HTS7
		HTS9

○ *Lactobacillus reuteri* 분리

- *Lactobacillus reuteri*는 사람 분변과 사위도우에서 주로 분리됨
- 문헌을 토대로 여러 가지 샘플(사위도우, 성인 분변, 아기 분변)에서 균주를 분리하였고, raffinose를 첨가한BPB-MRS를 선택배지로 사용하였음
- Infant fecal에서 10종, 성인 분변에서 3종, 사위도우에서 7종 분리하여 총 20종의 *L. reuteri*를 분리하였음

<표3-6> *Lb. reuteri* 분리 결과



<그림3-15> Morphology 결과

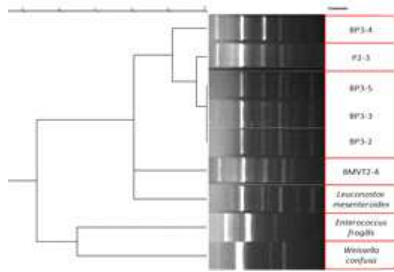
분리원	Species	Strain name
KACC, KCTC 분양균주	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LBRE-1
유아분변	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LBRE-2
		LBRE-3
		LBRE-4
		LBRE-5
		LBRE-6
		LBRE-7
		LBRE-8
		LBRE-9
		LBRE-10
		LBRE-11
		LBRE-12
성인분변	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LBRE-13
		LBRE-14
메주	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LBRE-15
수수도우	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LBRE-16
메주	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LBRE-17
		LBRE-18
		LBRE-19
		LBRE-20
		LBRE-21

○ 장내 *Leuconostoc* spp. 분리

- *Leuconostoc* spp.는 김치 발효에 중요한 역할을 하지만, 장내 안정성이 낮음
- 장내 생존성이 높은 *Leuconostoc* spp.를 확보하기 위해 분변에서 인간분변에서 균을 분리하고 향후 김치 종균으로서의 가능성을 보았음
- Sucrose가 첨가된 BPB-phenyl ethyl alcohol agar를 선택배지로 사용하였음
- RAPD-PCR을 통해 같은 밴드양상끼리 그룹화를 하였음
- 실험결과, 8종의 *Le. mesenteroides* 이 분리되었음
- ▶ 결과적으로 최종 분리 균주는 *Lb. fermentum*: 12 균주, *Lb. rueteri*: 20 균주, *Le. mesenteroides* 8 균주 분리하였음

<표3-7> *Le. mesenteroides* 분리 결과

분리원	RAPD group	Species	Strain name
분변	BPB3-4	<i>Le. mesenteroides</i>	LEM-15
	P2-3		LEM-16
	BPB3-5		LEM-17
	BPES-3		LEM-18
	BPES-2		LEM-19
	BMVT2-4		LEM-20
	BP41-3		LEM-21
	BP41-2		LEM-22
	BMVT3-3S		LEM-23
	BP31-S		LEM-24



<그림3-16> RAPD 결과

(5) 후보 균주 장내 안정성 및 면역 활성 측정

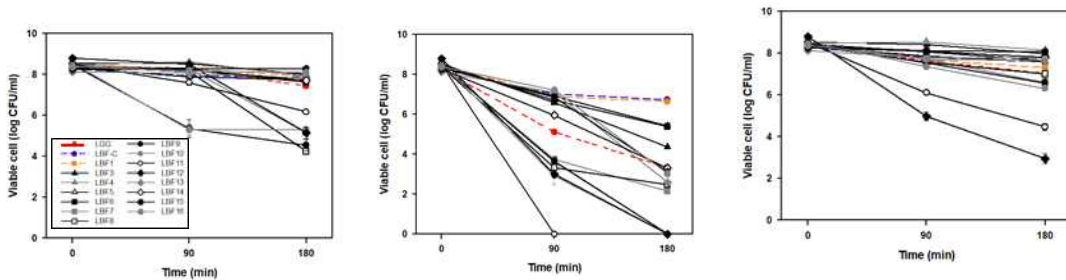
- 분리균주의 장내 생존력 및 안정성을 보기 위해 후보 프로바이오틱스 균주들의 산담즙 내성 및 장 상피세포 부착능 평가 실험을 진행함
- 산 담즙 내성 측정
 - 장 환경 스트레스 중 산/담즙 내성 측정하기 위해 균주를 전배양 24시간, 본배양 16시간 배양한 후 0.85% NaCl로 2번 washing하고 남은 균체에 6M HCl을 이용하여 pH 3.0과 2.5로 조절된 PBS (phosphate buffered saline) 완충용액을 처리 한 후 37°C에서 3시간동안 배양하는 중 90분 간격으로 생균수를 측정하여 비교균은 LGG (*Lb. rhamnosus* GG)와 비교
 - 산담즙 내성 평가 결과, LGG와 비교시 *Lb. fermentum*에서는 7종이 비슷하거나 우수한 내성을 가지고 있었고, *Lb. reuter*에서는 모든 균주들이 우수한 강한 내성을 가지고 있는 것으로 나타남. 마지막으로 *Le. mesenteroides*에서는 대부분이 산내성이 취약했지만 2균주에서 우수한 것으로 보임
 - 이와 같은 결과로 토대로 스크리닝을 하여 다음 실험을 수행함

① *Lb. fermentum* 결과

[A] pH 3

[B] pH 2.5

[C] 0.3% Bile salt



<그림3-17> *Lb. fermentum* 산 담즙 내성 결과

<표3-8> *Lb. fermentum* 산 담즙 내성 결과

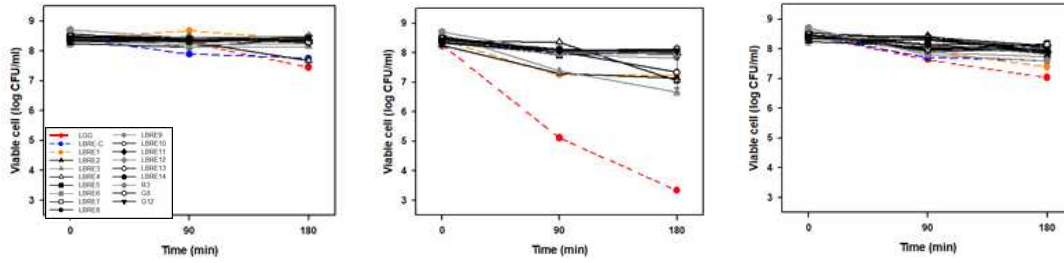
Strains	Control	pH 3.0		pH 2.5		Bile salt 0.3%	
		90m	180m	90m	180m	90m	180m
LGG	8.46±0.109	8.449±0.137 ^{ab}	8.164±0.042 ^{af}	6.999±0.061 ^{de}	3.07±0.091 ^{fg}	7.633±0.058 ^{cd}	7.032±0.046 ^d
LBF-C	8.288±0.069	7.933±0.063 ^{bc}	7.864±0.038 ^{def}	7.014±0.086 ^{de}	6.738±0.01 ^g	7.805±0.085 ^{def}	7.577±0.046 ^d
LBF1	8.490±0.086	8.273±0.040 ^{cd}	7.914±0.077 ^{def}	6.905±0.024 ^{de}	6.634±0.029 ^f	7.685±0.027 ^{cd}	7.315±0.080 ^{de}
LBF3	8.537±0.046	8.525±0.016 ^c	7.995±0.011 ^{def}	6.585±0.027 ^d	4.365±0.016 ^g	8.411±0.057 ^a	7.988±0.01 ^h
LBF4	8.482±0.067	8.614±0.045 ^a	7.913±0.031 ^{def}	3.612±0.153 ^h	0±0	8.546±0.018 ^a	8.159±0.014 ^h
LBF5	8.33±0.072	7.892±0.02 ^{bc}	7.74±0.026 ^{de}	6.914±0.037 ^{de}	5.428±0.023 ^f	7.85±0.018 ^{def}	7.608±0.056 ^{de}
LBF6	8.447±0.008	8.249±0.006 ^{cd}	7.613±0.023 ^d	6.719±0.031 ^{de}	5.392±0.024 ^f	8.068±0.066 ^{cd}	7.641±0.055 ^{de}
LBF7	8.448±0.036	8.274±0.024 ^{cd}	5.169±0.077 ^g	3.739±0.04 ^h	2.151±0.151 ^h	7.714±0.024 ^d	6.601±0.054 ^f
LBF8	8.4±0.022	8.158±0.108 ^{bc}	4.248±0.072 ^g	3.34±0.153 ^h	2.483±0.04 ^h	7.576±0.014 ^{cd}	7.007±0.029 ^f
LBF9	8.469±0.071	5.361±0.428 ^g	4.543±0.276 ^g	3.653±0.011 ^h	NG	7.525±0.138 ^{cd}	6.581±0.223 ^f
LBF10	8.555±0.119	5.298±0.274 ^g	5.3±0.031 ^g	2.92±0.456 ^h	NG	7.347±0.101 ^c	6.308±0.09 ^f
LBF11	8.506±0.03	7.604±0.116 ^e	6.176±0.012 ^f	NG	NG	6.1±0.085 ^h	4.465±0.163 ^g
LBF12	8.793±0.093	8.493±0.05 ^{ab}	5.141±0.27 ^g	3±0 ^h	NG	4.975±0.209 ^g	2.938±0.239 ^g
LBF13	8.133±0.083	8.068±0.098 ^{bc}	7.823±0.172 ^{def}	7.082±0.047 ^{de}	2.58±0.051 ^h	7.776±0.028 ^{cd}	7.794±0.037 ^{de}
LBF14	8.263±0.083	8.255±0.089 ^{cd}	7.712±0.13 ^{de}	5.958±0.103 ^f	3.303±0.104 ^h	8.105±0.024 ^d	7.79±0.07 ^{de}
LBF15	8.332±0.112	8.306±0.089 ^{cd}	8.272±0.11 ^d	6.852±0.192 ^{de}	3.121±0.091 ^h	8.123±0.058 ^d	8.074±0.02 ^h
LBF16	8.386±0.11	8.179±0.117 ^{cd}	8.097±0.073 ^{def}	7.227±0.02 ^{de}	3.023±0.067 ^h	7.726±0.05 ^{cd}	7.658±0.062 ^{de}

② *Lb. reuteri* 결과

[A] pH 3

[B] pH 2.5

[C] 0.3% Bile salt



<그림3-18> *Lb. reuteri* 산 담즙 내성 결과

<표3-9> *Lb. reuteri* 산 담즙 내성 결과

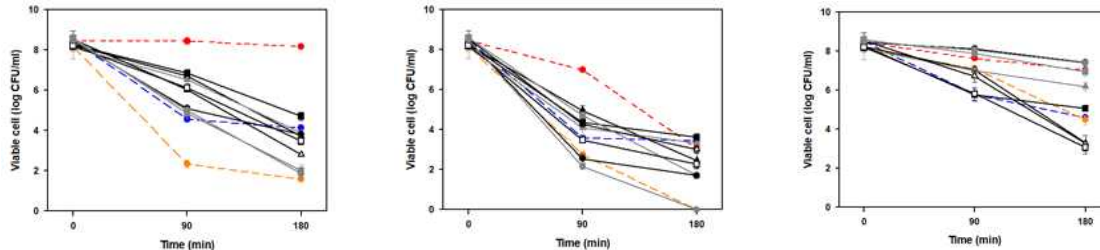
Strains	Control	pH 3.0		pH 2.5		Bile salt 0.3%	
		90m	180m	90m	180m	90m	180m
LGG	8.46±0.109	8.449±0.137 ^f	8.164±0.042 ^g	6.999±0.061 ^h	3.07±0.091 ^c	7.633±0.058 ^c	7.032±0.046 ^d
LBRE-C	8.446±0.066	7.971±0.029 ^g	7.954±0.007 ^g	7.891±0.046 ^c	7.753±0.018 ^{gh}	7.711±0.064 ^{gh}	7.593±0.014 ^{bc}
LBRE1	8.423±0.024	8.674±0.049 ^g	8.381±0.048 ^{gh}	7.244±0.03 ^g	7.224±0.047 ^c	7.922±0.061 ^{gh}	7.397±0.106 ^g
LBRE2	8.244±0.127	8.131±0.093 ^{gh}	8.435±0.065 ^{gh}	7.299±0.034 ^g	7.137±0.081 ^{bc}	8.066±0.099 ^{gh}	7.867±0.087 ^{gh}
LBRE3	8.617±0.049	8.124±0.021 ^{gh}	8.146±0.022 ^{bc}	7.375±0.117 ^g	6.655±0.124 ^{bc}	7.876±0.053 ^{gh}	7.727±0.138 ^{gh}
LBRE4	8.411±0.031	8.313±0.043 ^{gh}	7.677±0.133 ^g	8.357±0.033 ^f	7.062±0.084 ^{bc}	8.442±0.063 ^h	7.786±0.037 ^{gh}
LBRE5	8.423±0.071	8.376±0.034 ^{gh}	8.334±0.085 ^{gh}	7.918±0.037 ^{gh}	8.089±0.017 ^g	7.954±0.04 ^{gh}	8.174±0.028 ^g
LBRE6	8.504±0.054	8.278±0.016 ^{gh}	8.414±0.035 ^{gh}	8.012±0.012 ^{gh}	7.983±0.036 ^g	7.877±0.019 ^{gh}	8.037±0.052 ^{gh}
LBRE7	8.456±0.056	8.352±0.014 ^{gh}	8.368±0.075 ^{gh}	8.04±0.062 ^{gh}	7.932±0.021 ^g	7.944±0.035 ^{gh}	7.952±0.052 ^{gh}
LBRE8	8.481±0.05	8.454±0.019 ^g	8.379±0.082 ^{gh}	8.126±0.068 ^{gh}	8.003±0.027 ^g	8.161±0.017 ^{gh}	8.109±0.08 ^{gh}
LBRE9	8.332±0.1	8.213±0.017 ^{gh}	8.245±0.045 ^{gh}	7.944±0.018 ^{gh}	7.823±0.068 ^{gh}	8.158±0.112 ^{gh}	7.825±0.061 ^{gh}
LBRE10	8.333±0.103	8.307±0.084 ^{gh}	8.394±0.055 ^{gh}	8.036±0.018 ^{gh}	7.337±0.52 ^{bc}	8.321±0.065 ^{gh}	8.05±0.095 ^{gh}
LBRE11	8.433±0.059	8.382±0.033 ^{gh}	8.352±0.014 ^{gh}	8.044±0.022 ^{gh}	7.943±0.03 ^g	8.396±0.108 ^{gh}	8.098±0.09 ^{gh}
LBRE12	8.392±0.073	8.456±0.04 ^g	8.499±0.056 ^g	8.111±0.02 ^{gh}	8.04±0.027 ^g	8.325±0.021 ^{gh}	7.931±0.04 ^{gh}
LBRE13	8.528±0.101	8.433±0.07 ^g	8.273±0.071 ^{gh}	8.06±0.074 ^{gh}	7.948±0.044 ^g	8.352±0.051 ^{gh}	7.885±0.062 ^{gh}
LBRE14	8.353±0.048	8.369±0.064 ^{gh}	8.334±0.065 ^{gh}	8.014±0.068 ^{gh}	7.932±0.069 ^g	8.286±0.101 ^{gh}	7.966±0.031 ^{gh}
R3	8.695±0.057	8.428±0.017 ^g	8.291±0.050 ^{gh}	8.027±0.048 ^{gh}	7.962±0.074 ^g	7.806±0.035 ^{gh}	7.601±0.032 ^{gh}
G8	8.482±0.044	8.392±0.016 ^{gh}	8.301±0.095 ^{gh}	8.083±0.069 ^{gh}	8.132±0.010 ^g	8.000±0.160 ^{gh}	8.143±0.007 ^g
G12	8.428±0.074	8.379±0.108 ^{gh}	8.452±0.093 ^{gh}	8.08±0.046 ^{gh}	8.060±0.059 ^g	8.120±0.136 ^{gh}	7.918±0.162 ^{gh}

③ *Le. mesenteroides* 결과

[A] pH 3

[B] pH 2.5

[C] 0.3% Bile salt



<그림3-18> *Le. mesenteroides* 산 담즙 내성 결과

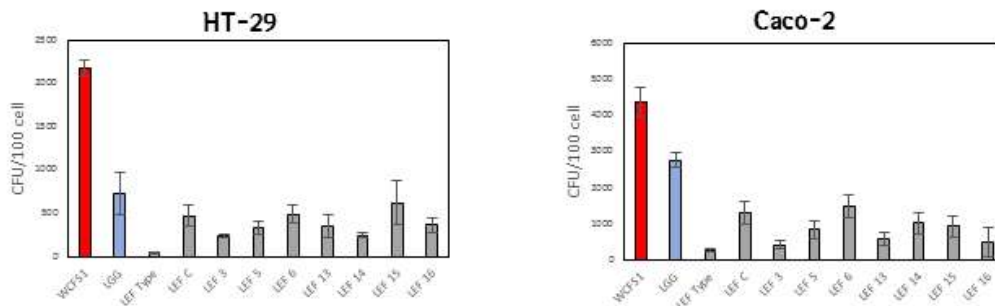
<표3-10> *Le. mesenteroides* 산 담즙 내성 결과

Strains	Control	pH 3.0		pH 2.5		Bile salt 0.3%	
		90m	180m	90m	180m	90m	180m
LGG	8.46±0.109	8.449±0.137 ^f	8.164±0.042 ^g	6.999±0.061 ^h	3.07±0.091 ^c	7.633±0.058 ^c	7.032±0.046 ^d
LEM-C	8.501±0.202	4.566±0.109 ^b	4.126±0.137 ^e	3.587±0.129 ^{cd}	3.427±0.137 ^{cd}	5.793±0.356 ^a	4.603±0.098 ^b
LEM1	8.154±0.248	2.34±0.198 ^a	1.583±0 ^a	2.746±0.096 ^b	NG	7.039±0.06 ^b	4.48±0.231 ^b
LEM15	8.251±0.078	6.701±0.023 ^c	3.711±0.059 ^d	4.958±0.241 ^e	2.452±0.414 ^b	7.047±0.188 ^b	3.292±0.111 ^a
LEM16	8.111±0.547	6.525±0.182 ^c	3.879±0.081 ^{de}	4.091±0.357 ^{de}	3.333±0.056 ^{cd}	7.002±0.125 ^b	6.191±0.199 ^c
LEM17	8.528±0.418	6.038±0.119 ^d	2.806±0.094 ^c	4.265±0.115 ^{ef}	3.008±0.185 ^c	6.711±0.301 ^a	3.279±0.404 ^a
LEM20	8.256±0.061	6.852±0.066 ^c	4.712±0.204 ^f	4.36±0.219 ^{ef}	3.622±0.135 ^d	5.77±0.302 ^a	5.059±0.102 ^b
LEM21	8.604±0.048	4.858±0.275 ^{bc}	2.017±0.275 ^b	4.71±0.063 ^{ef}	1.699±0 ^a	7.899±0.058 ^c	6.955±0.231 ^d
LEM22	8.211±0.212	6.128±0.1 ^d	3.477±0.176 ^d	3.466±0.118 ^c	2.276±0.174 ^b	5.819±0.146 ^a	3.059±0.318 ^a
LEM23	8.46±0.08	5.1±0.054 ^c	3.812±0.080 ^{de}	2.551±0.218 ^{ab}	1.699±0 ^a	8.136±0.09 ^c	7.43±0.044 ^d
LEM24	8.498±0.083	5.013±0.102 ^c	1.849±0.213 ^{ab}	2.159±0.151 ^a	NG	8.079±0.037 ^c	7.391±0.034 ^d

○ 후보 균주의 장내 안전성 확인

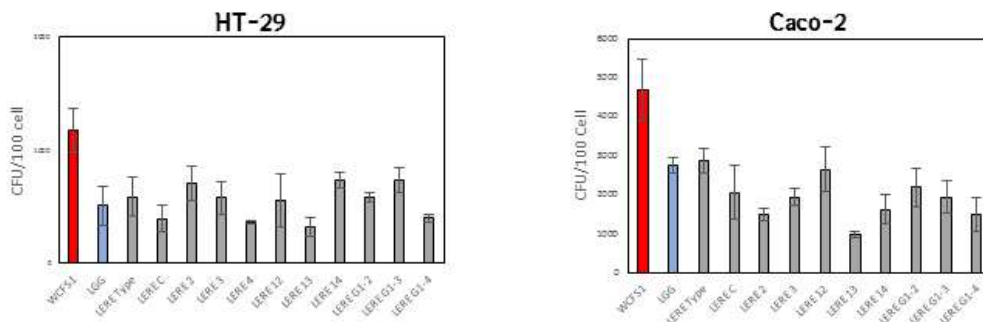
- 기능성 연구에 앞서 유산균의 장내 생존력 및 안정성을 관찰하기 위해 확보한 여러 후보 프로바이오틱스 균주들의 장 상피세포 부착능 평가 실험을 진행함
- 장 상피세포 부착능을 평가하기 위해 폴리스틸렌 막(polystyrene membrane)처리가 된 well plate를 사용하여 인간 대장암에서 유래한 세포주인 Caco-2, HT-29 세포를 monolayer로 기른 후 장 상피와 유사한 환경을 조성하여 실험에 사용. 그 위에 10⁸까지 배양한 균주를 접종하고, 2시간 동안 배양 후 cell monolayer에 붙은 균을 계수하는 방법으로 후보 균주의 장내 안정성을 비교함
- 실험에 사용한 *Lb. fermentum* 균주 대부분이 대조군으로 사용한 LGG (*Lb. rhamnosus* GG) 보다 장 상피세포 부착능이 낮은 것으로 관찰됨. 그 중 *Lb. fermentum* 6, 12 균주가 LGG보다 높은 부착능을 보여 프로바이오틱스 후보 균주로 사용가능할 것으로 기대됨. 또한, *Lb. reuteri*에서는 대부분이 LGG 보다 우수하였지만 상업균주와 비교하여 *Lb. reuteri* 12번 균주가 우수하였음. 마지막으로 *Le. mesenteroides*에서는 *Le. mesenteroides* 15,16,17,20번 균주가 높은 부착능을 보여진 것으로 나타나 장 건강 우수후보 균주로 보임

① *Lb. fermentum* 결과



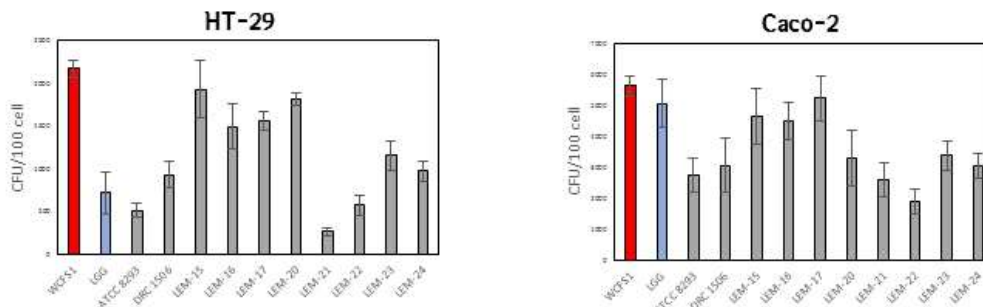
<그림3-19> *Lb. fermentum* 장 상피세포 부착능

② *Lb. reuteri* 결과



<그림3-20> *Lb. reuteri* 장 상피세포 부착능

③ *Le. mesenteroides* 결과

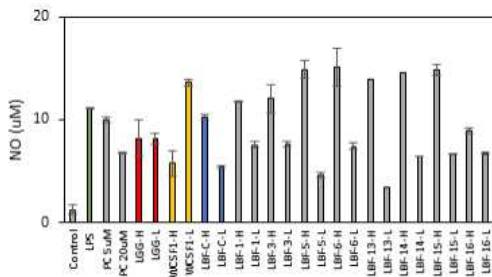


<그림3-21> *Le. mesenteroides* 장 상피세포 부착능

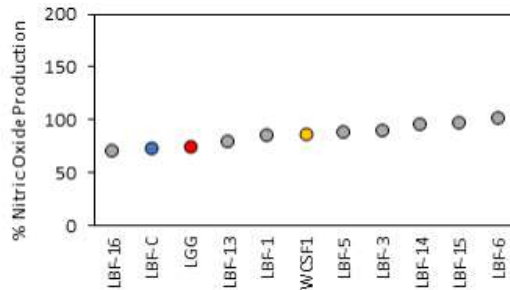
○ 항염증 활성 측정

- 실험에 사용된 세포주 RAW 264.7 mouse macrophage는 한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank) 에서 분양받아 사용하였음. RAW 264.7 mouse macrophage는 10 % FBS, 1% antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin)을 함유한 DMEM 배지에서 5% CO₂ incubator에서 37°C로 배양함
- 항염증 활성 측정을 위해 RAW 264.7 macrophage 세포를 2×10⁵ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고, 6시간 후 시료 (Heat-killed cell, Lysate cell) 와 LPS 1 µg/mL (*Escherichia coli* 0111; B4) 를 첨가하고 24시간 배양함
- 24시간 후 상등액을 취하여 동양의 griess reagent (Sigma, USA)를 가하고 15분간 상온에서 반응시킨 후, 540 nm 에서 흡광도를 측정함. 검량선은 sodium nitrite 용액을 이용하여 작성하였고, 이를 이용하여 배양액의 nitric oxide(NO) 농도를 결정함
- 실험에 사용한 *Lb. fermentum*, *Le. mesenteroids* 균주 대부분이 대조군으로 사용한 LGG 보다 유의미한 NO 억제능을 보이지 않았지만, *Lb. fermentum* 16번 균주, *Le. mesenteroids* 23균주에서에서 유의미한 항염증 효과를 보임. *Lb. reuteri*의 경우, 대부분이 NO생성을 억제하였고, 그 중 13, 14 균주에서 가장 높은 항염증 활성을 보임

① *Lb. fermentum* 결과

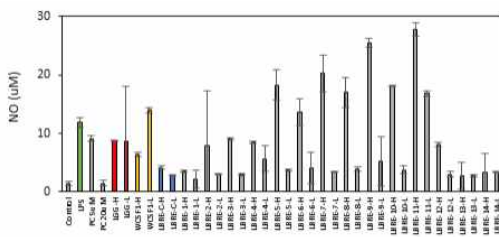


<그림3-22> NO 생성 억제 효과 결과

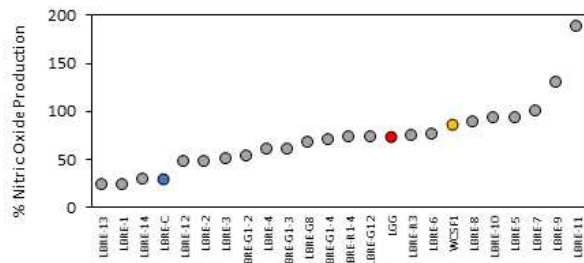
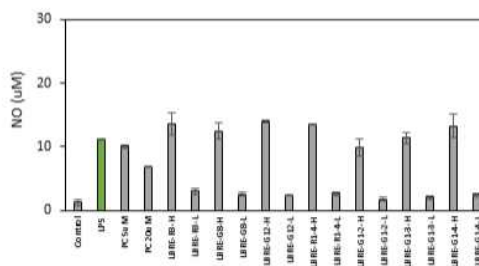


<그림3-23> NO 생성량 결과

② *Lb. reuteri* 결과

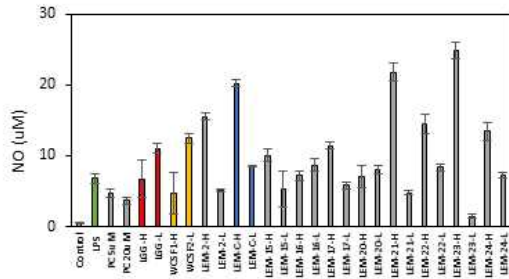


<그림3-24> NO 생성 억제 효과 결과

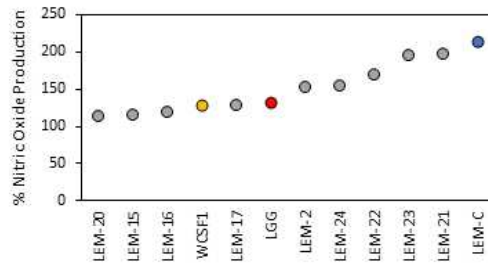


<그림3-25> NO 생성량 결과 (heat-killed+lysate)

③ *Le. mesenteroides* 결과



<그림3-26> NO 생성 억제 효과 결과



<그림3-27> NO 생성량 결과

(6) DRC 1506 산업화 연구

○ 종균 specific barcode 개발

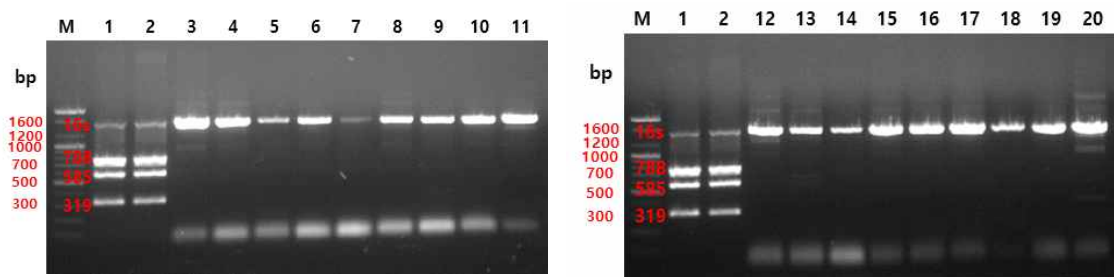
- 우리나라 김치에서 뛰어난 풍미와 우수한 맛의 보존 및 저장기능을 가진 김치유산균 (DRC1506)을 분리하였음. 이 균주는 산의 생성기능이 낮아 보관에 유리하고 이에 대한 유전체 분석연구를 통해 김치유산균의 김치환경에서 발효 및 기능적 특성을 밝혀내고 이를 토대로 종균으로 개발 목적을 둠
- *L. mesenteroides* DRC1506과 *L. mesenteroides* ATCC 8293의 NCBI blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 align되지 않는 contig 부분을 폭 넓게 종균 특이적인 sequence를 가진 부분으로 보고 1차적으로 screening 함. 이렇게 1차적으로 screening한 sequence들을 NCBI에서 mega-blast를 통하여 다른 *L. mesenteroides*를 포함한 *Leuconostoc*에서 highly similar sequence가 있는지 비교 분석함
- 그 결과, 969,480~982,032 사이와 1,306,091~1,315,826 사이에 DRC1506이 다른 *Leuconostoc*과 다른 특이적 부분이 발견되었고, 다른 균과 mega-blast하였을 때도 발견되지 않았음 이 부분을 *L. mesenteroides* DRC1506의 특이적인 sequence로 보고 이 sequence에서 각각 788, 585, 319bp의 primer를 디자인함
- 모든 PCR 수행 template으로는 균주의 gDNA를 추출하여 사용함. 16S rRNA 증폭을 위한 universal primer (27F, 1492R) 한 쌍과 DRC specific primer 세 쌍으로 Ex taq polymerase를 이용하여 증폭하였고 이 때 사용한 PCR 조성과 조건은 아래와 같이 진행함.
- 예비실험 결과, 밴드크기가 큰 16S rRNA의 경우, 밴드가 굵고 진하게 나오고 밴드 크기가 작은 경우 (319bp) 밴드가 흐리게 나와 이를 일정하게 조절하기 위해 primer의 양을 아래와 같이 조정함. 전기영동은 1% agarose gel을 사용하여 135V에서 40분 실시함
- 고안한 primer들 중 서로 상보적으로 영향을 주지 않고, T_m (meltingtemperature) 값이 비슷하며 band의 크기가 서로 유의적인 차이가 나도록 primer 조합을 선택하였고 밴드 크기에 따라 각 primer의 이름을 788F/R, 585F/R, 319F/R로 명명함

<표3-11> PCR 구성 및 조건

Composition	Volume (μL)	Concentration	
Ex taq buffer	2		Stage 1 Step 1 95°C 1 cycle Stage 2 Step 1 95°C Step 2 56.5°C 30 cycle Step 3 72°C Stage 3 Step 1 72°C Step 2 4°C 1 cycle
dNTP	1.6		
585-F	1	10pmol	
585-R	1	10pmol	
788-F	1	10pmol	
788-R	1	10pmol	
319-F	1.5	10pmol	
319-R	1.5	10pmol	
27F	1	5pmol	
1492R	1	5pmol	
Template DNA	1	5~20ng	
Ex taq	0.4		
DW	6		
Total	20		

<표3-12> Barcode primer 정보

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Amplicon size
788-F	TGTCTTTGATAATCCCCATACCA	788bp
788-R	CACTAAGCCCTAAGTTAGTAAGTA	
319-F	AGAGAGCGCTAAAGGTTGGT	319bp
319-R	GTTGCTTGTGGTCCCAAATTCT	
585-F	TCACTTGGCGCATCATACAA	585bp
585-R	ACCCACAGAACAAGATGGAGATA	



<그림3-28> *Leuconostoc* 20종을 이용한 multiplex PCR

- Blast를 통하여 찾은 primer 후보들이 실제로도 *Leuconostoc*에서도 잘 작동하는지 확인하기 위해 후보 primer 3세트와 16S rRNA를 증폭하는 primer 세트를 이용해 *Leuconostoc* 20종에서 multiplex PCR을 진행함. 그 결과, 목적하는 밴드의 크기인 788bp, 585bp, 319bp가 DRC1506에서만 증폭되어 바코드처럼 나타났고 다른 *Leuconostoc* 19종에서는 증폭되지 않았음
- 이로써 유전체 분석 데이터를 기반으로 blast를 이용하여 디자인한 primer 3세트가 종균을 외부유출 및 부당 사용하였을 경우, 이를 추적할 DRC1506 바코드 primer로 이용할 수 있을 것으로 보임

○ **종균 qPCR용 primer 개발**

- 일반적으로 이상적인 qPCR은 100~200bp를 target한다고 알려져 있음. 따라서 바코드 프라이머를 위해 585bp를 target하는 primer중에서 161bp를 target하는 primer를 새로 디자인하고 각각 161F, 161R로 명명함

<표3-13> qPCR을 위한 프라이머

Primer	Sequence (5' to 3')	
161-F	GGACTTCTAAAGTAACACTCTCA	161bp
161-R	CTTCAATAGCTCATTA ACTCAGGA	

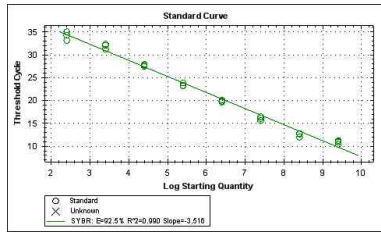
- qPCR 수행을 위해 균주의 gDNA를 추출하여 사용하였음. Glycerol stock으로 보관되어 있는 DRC1506을 선택배지인 MRS broth배지에서 활성화시킨 후, MRS broth에 1% 접종하여 30°C에서 24시간 배양하고 각각 0, 3, 6, 12, 18, 24 시간에 gDNA 추출을 위해 배양액 1mL을 샘플링 하였음
- 솔젠트 사의 genomic DNA Prep Kit (for Gram(+) Bacteria)를 이용하여 gDNA를 추출하여 4반복을 진행하고 DNA는 각각 1/10 씩 희석하여 qPCR에 이용되었음. 이 때 qPCR을 위해 표5와 같이 Bioneer사의 2x SYBR mix 2x greenstar qPCR master mix와 dye를 이용하여 다음과 같은 조성으로 진행함

<표3-14> qPCR 구성

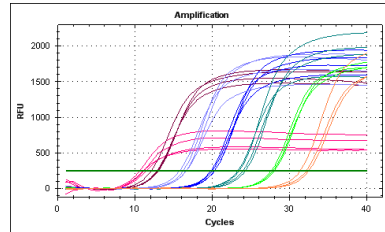
Composition	Volume (μL)
DNA template	5
2x SYBR mix	10
2x Greenstar qPCR master mix	
161-F	0.5
161-R	0.5
Dye	0.5
DW	3.5
Total	20

- PCR조건은 아래의 그림 2와 같이 50°C에서 5분, 90°C에서 10분 DNA의 denaturation 과정을 거친 후 15초, 58°C 30초 2step으로 39cycle 진행하였고 그 이후는 melt peak와 curve를 확인하기 위한 step으로 진행함
- qPCR정량은 C1000 Thermal Cycler and CFX96 Real-time System (Bio-rad, CA, USA)를 이용하여 진행하였고 정량 결과는 MRS-agar에서 viable cell count를 측정하여 비교하였다. qPCR 데이터는 Bio-Rad CFX Manager V 1.5.534.0511 프로그램을 이용하여 분석함

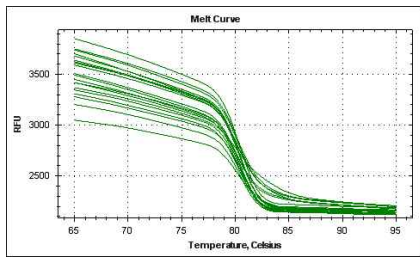
(a)



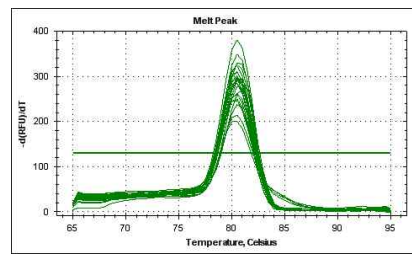
(b)



(c)



(d)



<그림3-29> 이상적인 qPCR을 나타내는 지표들 (a) standard curve, (b) standard CT-value amplicon. (c) melting curve (d) melting peak

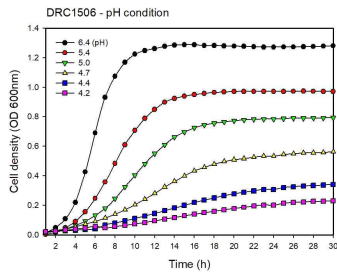
- 이를 standard curve에 활용하고자 추출한 gDNA는 1/10씩 희석하여 standard curve를 작성. 이상적인 qPCR standard curve는 R^2 값 0.99 이상, primer efficiency는 90~110%.
- 본 연구의 stand curve는 R^2 값은 0.99, primer efficiency는 92.5%로 측정되어 이로 미루어보아 적절하게 디자인 되었다고 판단할 수 있었음 (그림 3-28 a, b).
- Melting curve 분석 결과를 보면, DRC1506 gDNA는 DNA양에 상관없이 80 °C 부근에서 denaturation이 일어나는 것을 볼 수 있어 primer가 적절하게 디자인 되었다고 판단할 수 있음(그림 c, d)

▶ 바코드 primer를 이용하여 개발된 위의 종균을 외부유출 및 무단 사용하였을 경우, 이를 추적할 수 있게 되었고 개발된 qPCR 방법을 활용하여 발효 식품에 종균으로 이용 시 과학적으로 이를 정량할 수 있음

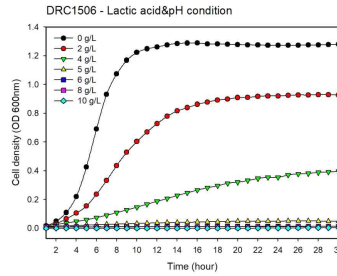
○ 스트레스 환경 적응 진화

- 김치 스타터인 *Leuconostoc mesenteroides* DRC1506가 김치 발효 시 생기는 저온, 젖산 및 pH에 대한 스트레스 내성을 갖게 적응 진화 유도하여 김치의 저장 기간 동안 균의 생존력을 높이는 것이 목적임

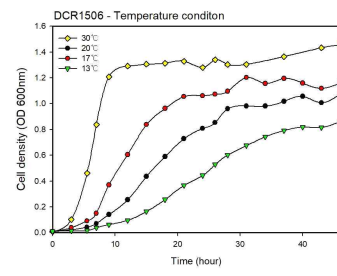
① pH



② Lactic acid



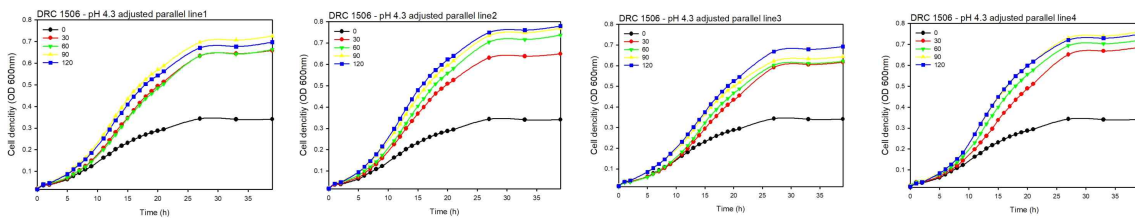
③ Low temperature



<그림3-30> 적정 스트레스 유도 설계

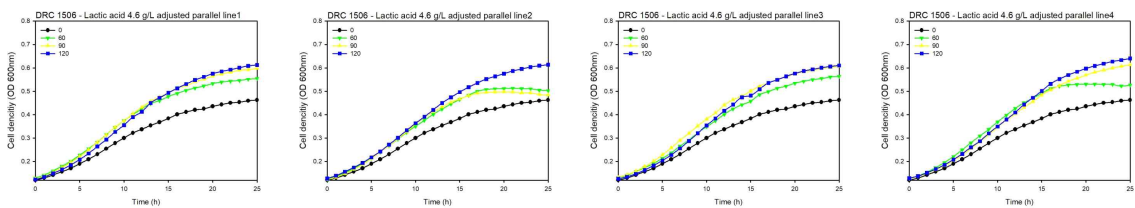
- 초기 스트레스 조건을 잡기 위해 산 내성은 다양한 농도의 젖산(0~10 g/L) 또는 HCl를 통해 pH(4.2~6.3)를 조정시킨 MRS 액체 배지에 균을 접종하고, 균이 접종된 배지를 96well 마이크로 플레이트에 한 well당 300ul씩 3번 분주하여 spectrophotometer를 통해 30°C로 배양하면서 600nm로 1시간마다 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성함
- 저온 내성은 일반 MRS 액체 배지에 다양한 온도(13~30°C)에서 배양하여 3시간마다 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성함. 세대 시간이 2~3시간이 되는 스트레스 조건에서 균을 1.5ml tube에 젖산 첨가 또는 pH가 조정된 MRS 액체배지 1ml를 분주하고 균의 배양액을 20ul를 접종하여 1일에 한 번씩 계대 배양하여 돌연변이를 유발함. 주기적으로 균의 비성장속도를 측정하여 적응 정도를 확인하고 스트레스 강도를 높임
- 산 내성 적응 실험 결과 cycle에 따라 최대 균체 농도가 증가했고, 조상 균주 대비 적응도가 증가한 것이 확인됨. 저온 내성에선 적응도의 변화가 다양한 패턴이 관찰됨

① pH



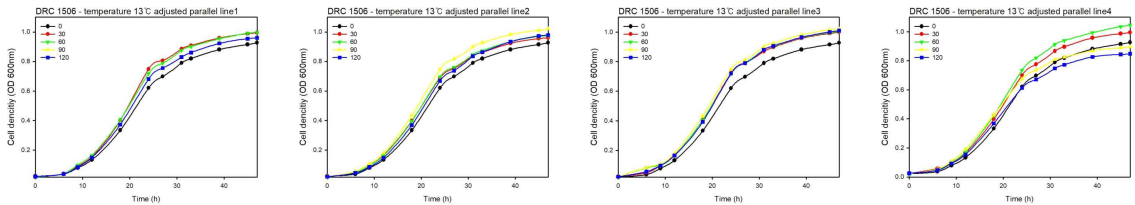
<그림3-31> pH 스트레스 실험 mutants 결과(4반복)

② Lactic acid



<그림3-32> Lactic acid 스트레스 실험 mutants 결과(4반복)

③ Low temperature



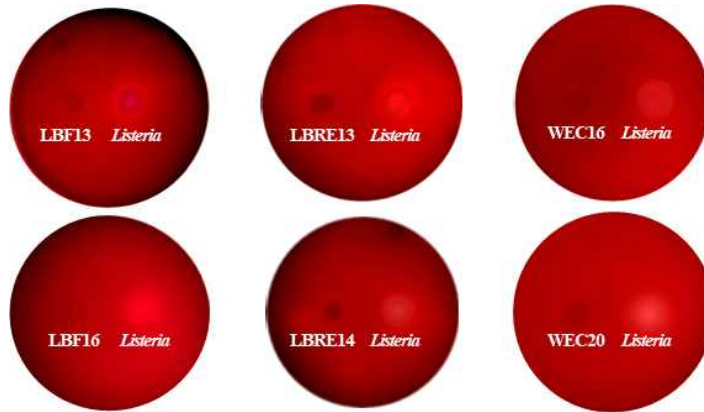
<그림3-33> 저온 스트레스 실험 mutant 결과(4반복)

- ▶ 산 내성 적응 실험 중 가장 적응도가 우수했던 균주를 선발하여 김치 스타터로 사용함으로써 유통기간동안 유산균의 생존률을 높여 보다 많은 생균의 섭취가 가능해짐

(7) 장건강 프로바이오틱스 우수 후보 발굴

○ Blood agar 배양을 통한 용혈 반응 확인

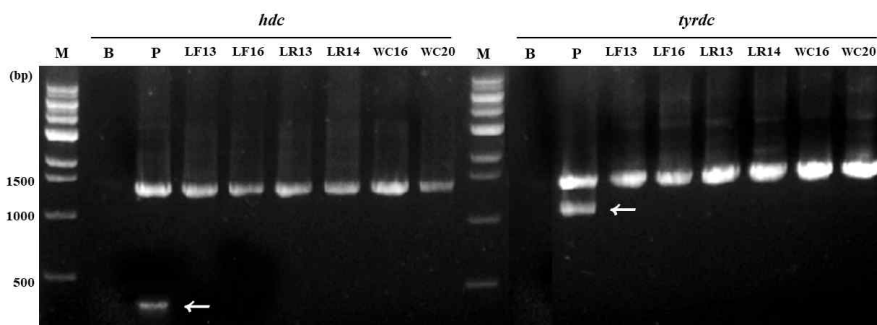
- 용혈능이 부재한 안전한 균주임을 확인하기 위해, 7% horse blood를 포함한 BHI agar에 선발 균주를 배양하였으며, 양성대조군으로 *Listeria monocytogenes* 균을 사용함
- 그 결과, 양성대조군 *Listeria* 균은 적혈구를 파괴시켜 처리액 주변에 투명한 용혈반응이 나타났으며, 이와 비교하여 선발 균주 6종은 용혈성이 부재한 것으로 나타남



<그림3-34> 선발 유산균 6종 용혈반응 확인 시험 결과

○ Biogenic amine 생성 효소 유전자 보유 여부

- 아미노산이 탈탄산되어 생성되며, 과다 복용시 인체에 유해하게 작용하는 바이오제닉 아민을 생성하는 효소(decarboxylase)에 대한 시험으로, PCR 반응을 통해 해당 효소 유전자를 보유하는지 여부 확인함. 양성대조군은 histidine decarboxylase (*hdc*) 유전자를 보유한 *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272와 tyrosine decarboxylase (*tyrdc*) 유전자를 보유한 *Enterococcus faecalis* KCCM 11729으로 사용함
- 그 결과, 각 양성대조군 균주의 PCR 반응 샘플에서 *hdc*, *tyrdc* 유전자가 증폭됨을 볼 수 있으며, 이와 비교하여 선발 균주 6종 해당 바이오제닉아민을 생성하는 탈탄산효소 유전자가 부재하였음



Lane M, 1 kb DNA marker; lane B, negative control which has no template DNA; lane P, positive controls having *hdc* (histidine decarboxylase, 440bp), and *tyrdc* (tyrosine decarboxylase, 1100bp) genes from *L. reuteri* ATCC 23272 and *Enterococcus faecalis* KCCM 11729, respectively. The DNA of 16S rRNA gene (1530bp) was also amplified.

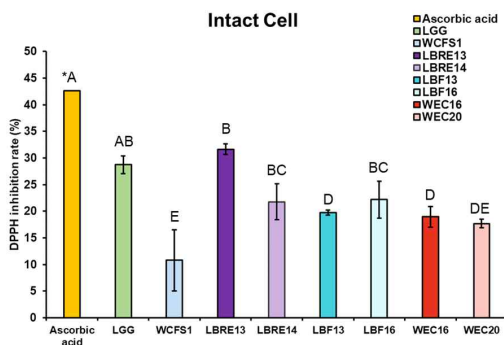
<그림3-35> 선발 유산균 6종 바이오제닉아민 보유 확인 시험 결과

▶ 결론적으로, 장 건강 후보 균주 6종은 용혈능과 바이오제닉아민 유전자를 보유하고 있지 않기 때문에 식품에 사용하기에 안전한 것으로 판단됨

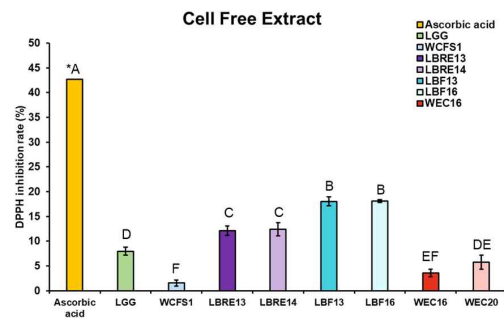
○ 항산화 활성 측정

- 후보 균주의 항산화 활성을 관찰하기 위해 항산화 활성 측정방법 중 하나인 DPPH assay를 진행함

- 균주들을 전배양 24시간, 본배양 16시간 배양한 후 O.D 600nm에서 1.0으로 흡광도를 맞추고, 0.85% NaCl로 2번 washing하고 남은 균체에 0.85% NaCl을 처리한 Intact Cell (IC), 0.85% NaCl로 2번 washing하고 남은 균체에 0.85% NaCl을 처리하고, 초음파를 통해 파쇄한 CFE (Cell Free Extract), 총 2가지의 실험군을 DPPH 용액과 함께 30분간 암실에서 반응시켜 517nm에서 흡광도를 측정하고 LGG (*Lb. rhamnosus* GG)와 WCFS1 (*Lb. plantarum* WCFS1)과 비교하였음
- 실험결과, Intact cell은 사용한 *Lb. reuteri* 13, 14 균주와 *Lb. fermentum* 16 균주가 양의 대조군으로 사용한 LGG (*Lb. rhamnosus* GG)와 유사한 항산화능을 보였으며, cell free extract에서는 *Lb. reuteri* 13, 14 균주와 *Lb. fermentum* 16 균주가 LGG보다 더 높은 항산화능을 보였음



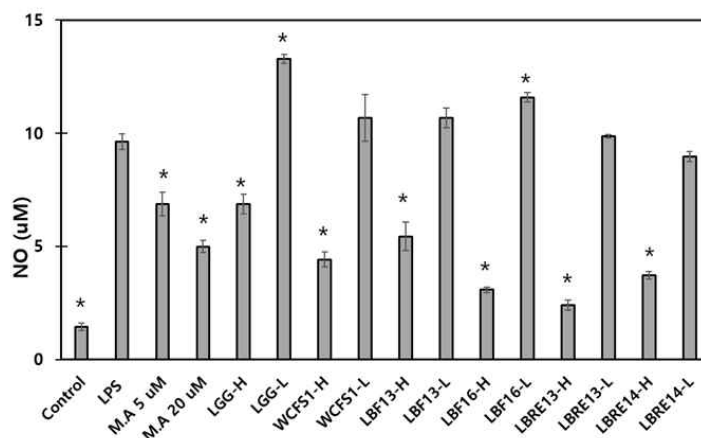
<그림3-36> Intact cell 결과



<그림3-37> Cell free extract 결과

○ 항염증 활성 측정: 산화 질소 (nitric oxide, NO) 억제능

- 선발 유산균의 항염증 활성을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포(2×10^5 cells/well)에 유산균 시료 (Heat-killed cell, Lysate cell)와 대장균 유래 lipopolysaccharide (LPS, 1 ug/ml)를 첨가하여 24시간 동안 자극하여 염증 매개물질인 nitric oxide (NO)를 과다 생성시킨 후, griess reaction을 통해 균주의 NO 억제 활성을 측정하였음
- 그 결과, LPS 처리시 NO 농도가 현저히 증가하였으며, NO 합성 효소 저해제인 메틸 아르그닌 처리는 LPS 처리 군에 비해 용량 의존적으로 NO 생성을 억제하였음 ($p < 0.001$). 또한 테스트된 모든 열불활성화 균주 (Heat-killed cell)은 LGG, WCFS1과 유사하게 NO를 유의하게 억제하였지만, 용해물 (Lysate cell)은 억제 활성이 관찰되지 않음

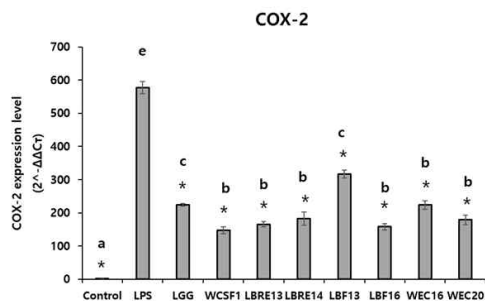


<그림3-38> 유산균 시료 (Heat-killed cell, Lysate cell)의 NO 억제능

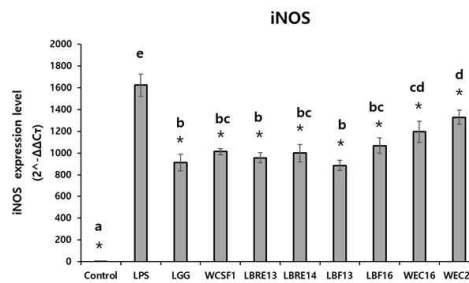
○ 항염증 활성 측정: 염증 관련 유전자(iNOS, COX-2) 발현양 측정

- 선발 유산균의 항염증 활성을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포(1×10^6 cells/well)에 유산균 시료 (Heat-killed cell, Lysate cell)와 대장균 유래 lipopolysaccharide (LPS, 1 ug/ml)를 첨가하여 24시간 동안 자극한 뒤, RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 GAPDH, iNOS, COX-2 primer를 사용하여 염증 관련 물질의 mRNA 발현양을 측정하였음
- 그 결과, LPS를 자극하지 않은 안정한 상태에서의 RAW 264.7 cell에서 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현은 거의 확인되지 않았지만, LPS 자극에 의해 발현량이 현저하게 증가되었음. 이에 비하여 테스트된 모든 균주의 열불활성화 시료는 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였으며, 그 효과는 양성대조구인 LGG, WCFS1과 유사하였음. 반면, 모든 균주의 용해물 시료는 iNOS의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였지만, LBRE13, LBRE14, LBF13 균주만이 COX-2 발현양을 유의하게 억제하였음

① COX-2

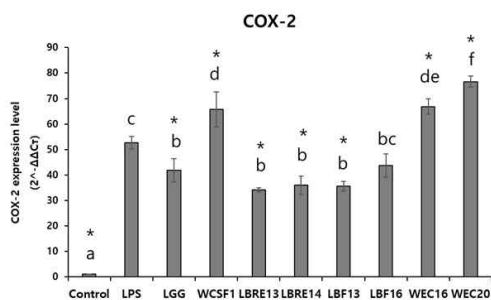


② iNOS

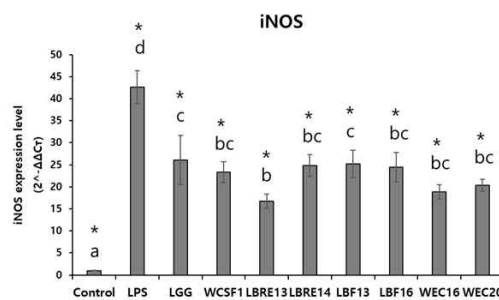


<그림3-39> 열불활성화 균주(Heat-killed cell)의 iNOS, COX-2 mRNA 발현양

① COX-2



② iNOS



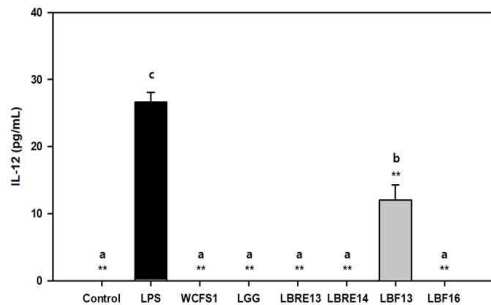
<그림3-40> 용해물(Lysate cell)의 iNOS, COX-2 mRNA 발현양

○ 항염증 활성 측정: Cytokine (IL-10, IL-12) 발현양 측정

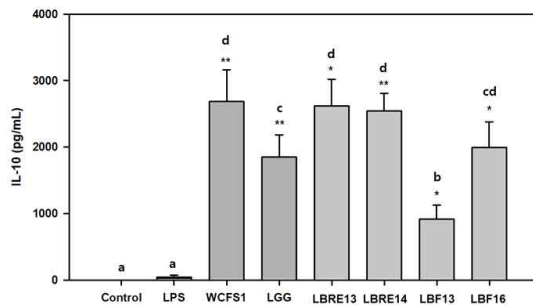
- 선발 유산균의 Cytokine 분비능을 분석하기 위해 ELISA kit를 사용하여 LPS로 유도된 마우스 대식세포에서 사이토카인의 생산을 측정하여 평가하였음
- 동물 프로토콜은 경희대학교 동물실험윤리위원회 (KHUASP(GC)-19-005)의 승인을 받았음. DMEM으로 복막 세척을 통해 7주령의 수컷 Balb/c 마우스로부터 복막 대식세포를 수집하고, 세포(4×10^5 cells/ml)에 LPS (1 μ g /ml)와 열불활성화 균주로 24시간 동안 자극하였음. 그 후에 각 웰에서 상등액을 수집하고, ELISA assay kit (R&D systems Mouse DuoSet ELISA IL-10 and IL-12, Minnesota, USA)를 사용하여 IL-10 및 IL-12를 측정하였음
- 그 결과, LPS는 염증성 사이토카인인 IL-12를 강하게 유도한 반면 항염증성 사이토카인인

IL-10은 영향을 주지 않음. 테스트된 모든 열 불활성화 균주는 IL-12의 발현을 억제하였으며, IL-10를 유의하게 유도하였음. 특히, LBRE13, LBRE14, LBF16은 LGG보다 더 높은 항염증 활성을 보임

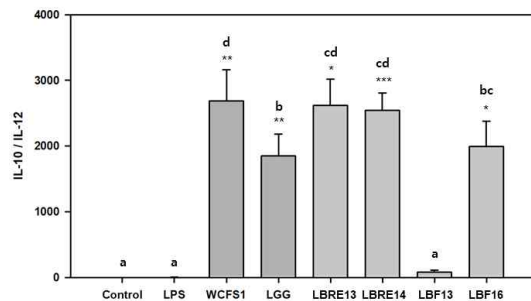
① IL-12



② IL-10



③ IL-10/IL-12 ratio

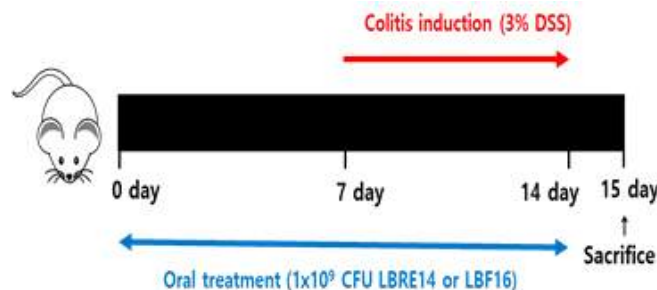


<그림3-41> 열불활성화 균주(Heat-killed cell)의 cytokine 분비능

▶ 결론적으로, 장 건강 후보 균주 6종 중 LBRE14, LBF16은 프로바이오틱 특성과 항염증 특성이 우수하므로 동물실험 최종 균주로 선발되었음

(8) 동물실험을 통한 장 건강 프로바이오틱스의 항염증 활성 검증

- DSS-induced colitis mouse model을 이용한 장 건강 프로바이오틱스 효능 검증
- 장 건강 프로바이오틱스 (LBRE14, LBF16)의 항염증 활성을 검증하기 위해 DSS-유도 대장염 모델을 설계하였음
- 동물 프로토콜은 경희대학교 동물실험윤리위원회(KHGASP-20-134)의 승인을 받았으며, BALB/c mice (7~8 weeks, female)에 3% (w/v) DSS (molecular mass36,000~50,000 Da; MP Biomedical, USA) 용액을 7일 동안 자유롭게 섭취하게 하여 염증을 유도하고, 유산균 (경구투여, 1×10^9 CFU)을 14일간 투여하며 대장염 완화 및 예방효과를 관찰하였음



<그림3-42> 대장염 동물 실험 모델

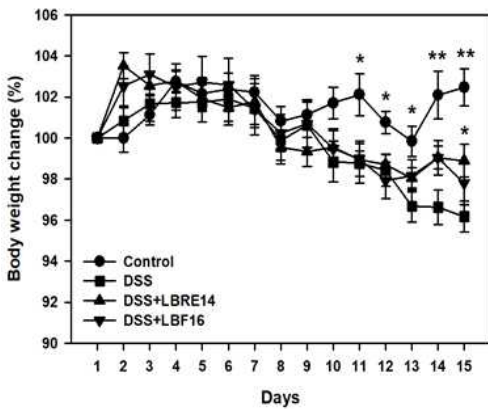
- 임상적 증상 평가: 체중, 질환 활성 지표 (DAI, disease activity index) 점수
- 총 14일의 실험 기간 동안 체중 변화를 관찰하였으며, 초기 체중에 대한 체중 변화를 %로 계산하여 결과값을 나타냄. 질환 활성 지표 (DAI)의 변화는 Jang et al., 2019의 방법을 참고하여 체중 감소 (%), 대변 일관성, 대변 내 혈액을 관찰하여 측정하였음 (표3-15)

<표3-15> DAI 점수 측정방법

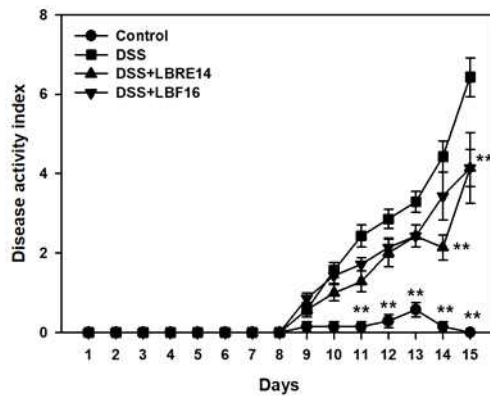
Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Blood in feces
0	None	Normal	Negative (no bleeding)
1	1.0-5.0		
2	5.0-10.0	Loose stools	Positive (slight bleeding)
3	10.0-15.0		
4	Over 15.0	Watery diarrhea	Gross bleeding

- 그 결과, 정상대조군에 비해 DSS만을 투여한 그룹은 체중이 4% 감소하였으며, LBRE14를 투여한 경우 체중 감소를 유의하게 억제함. DAI 점수 평가 결과, DSS 섭취 전에 정상 대조군은 대장염의 징후를 보이지 않았으며 DSS 섭취 시 시간이 지남에 따라 점수가 증가하였고, LBRE14 투여한 경우 DAI 점수가 유의하게 낮아짐

① 체중 변화



② DAI 점수 변화

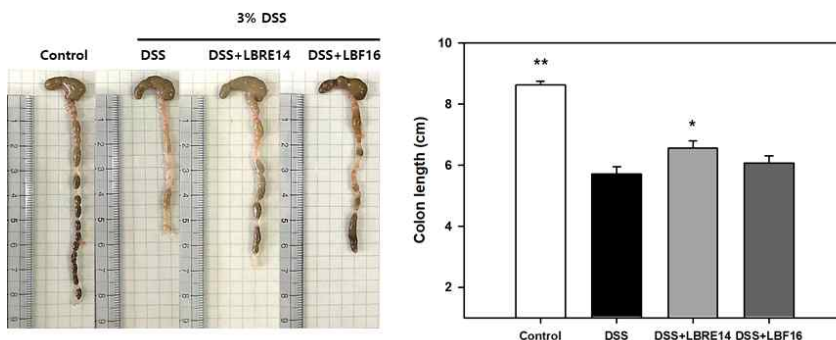


<그림3-43> 체중 변화 및 DAI 점수 변화

○ 임상적 증상 평가: 대장 길이

- 실험 15일째에 마우스를 희생시키고, 대장 길이를 측정하였음
- 그 결과, 정상 대조군에 비해 DSS 투여 시 대장 길이가 짧아졌음. LBRE14 투여한 경우 장 길이가 유의하게 복원되었으며, LBF16을 투여한 경우 유의한 차이가 없었음

① 대장 길이



<그림3-44> 대장길이 측정 결과

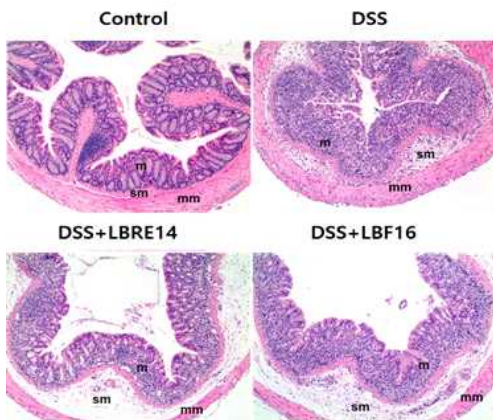
○ 임상적 증상 평가: 조직학적 변화

- 조직학적 변화 관찰을 위해, distal colon을 10% formaldehyde에 고정하고 hematoxylin와 eosin (H&E)에 염색하여 광학현미경을 통해 결장 점막 손상 정도를 관찰하였음. 조직학적 변화는 Wirtz et al. 2017 방법을 일부분 수정하여 염증과 crypt 구조의 손실 점수를 합하여 평가하였음 (표3-16)
- 그 결과, 정상 대조군에 비해 DSS 투여 시 염증세포의 심한 침투와 거의 모든 intestinal gland의 손실, erosive area(미란) 등 점막 손상 정도가 높게 나타남. 이에 비하여 LBRE14, LBF16 처리시 염증 및 점막 손상이 감소하였으며, 특히 LBRE14-treated DSS group의 조직학적 점수는 PBS-treated DSS group과 비교하여 유의적으로 낮았음 ($p < 0.05$)

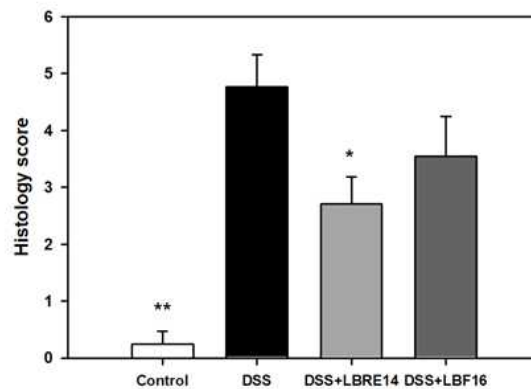
<표3-16> 조직학적 점수 평가 방법

Histological score	Inflammatory cell infiltration	Loss of crypt glands
0	Infrequent, ranged in normal	None
1	Mild increase of inflammatory cells in the lamina propria	Loss of glands, one third of mucosa
2	Moderate increase of inflammatory cells in the lamina propria	Loss of glands, two third of mucosa
3	Severe increase of inflammatory cells in the lamina propria and submucosa	Entirely loss of glands

① 조직학적 분석



② 조직학적 점수



<그림3-45> 조직학적 분석 결과

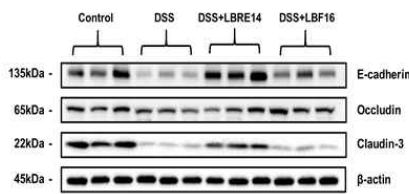
○ Tight junction protein (E-cadherin, Claudin-3, Occludin) 발현양 측정

- 대장에서의 Tight junction protein 발현양을 측정하기 위해, 대장조직을 protease inhibitor (Quartett)가 첨가된 1X RIPA buffer (50mM Tris-HCL (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100) 속에서 Tissue lyser (Qiagen)을 사용하여 조직을 분쇄하였음. 그 후에 원심분리(13000 rpm, 10 min)하여 상층액을 얻고 Bradford 방법을 통해 단백질을 정량하였음. 단백질 시료 20 ug을 8~10% gel에서 전기영동하고, gel 상의 단백질 밴드를 PVDF membrane (Bio-RAD, 1620177)에 이동시켰음. 이후 E-cadherin (Cell signaling technology, 3195S), Claudin-3 (Thermo Fisher Scientific, 34-1700), Occludin (Thermo Fisher Scientific, 40-4700)을 1차 항체로 사용하고 HRP-conjugated anti-rabbit antibody (BETHYL, A120-101P)를 2차 항체로 사용하여 표지하였으며, 화학 발광 염색법을 통해 단백질 발현양을 관찰하였음

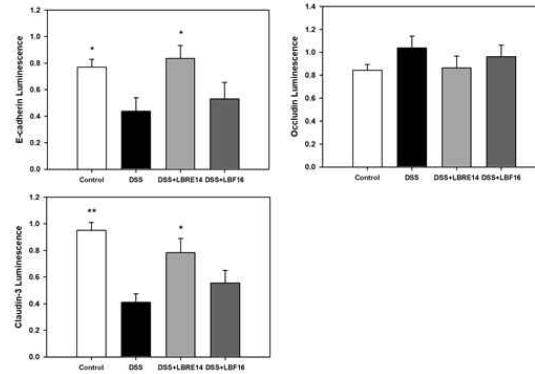
- 그 결과, 정상대조군에 비해 DSS 투여 시 E-cadherin, Claudin-3의 발현양이 감소됨. 반

면, LBRE14를 투여한 경우 PBS를 투여한 DSS group과 비교하여 대장조직에서 E-cadherin, Claudin-3의 발현양을 유의하게 증가시켰으며 ($p < 0.05$), LBF16 처리시유의한 차이를 나타내지 않음 ($p > 0.05$)

① Western blot 분석



② Tight junction 단백질 발현 정량



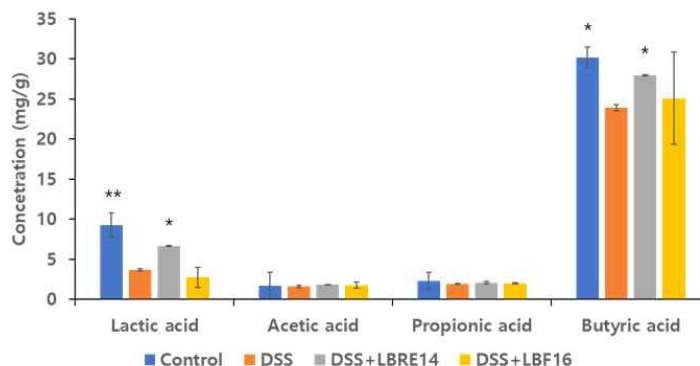
<그림3-46> 대장조직에서의 Tight junction protein 발현양 측정 결과

○ 단쇄지방산(Short chain fatty acids, SCFAs) 농도 측정

- SCFAs 농도를 측정하기 위해 맹장 내용물 90 mg를 PBS 1 mL에 현탁하고 원심분리를 통해 상층액을 얻은뒤, HPLC 분석을 통해 표 조건하에 SCFAs 농도를 측정하였음
- 그 결과, 정상 대조군에 비해 DSS를 투여한 경우 Lactic acid와 Butyric acid가 유의하게 감소됨. 반면, LBRE14 투여한 경우 Lactic acid와 Butyric acid의 농도가 유의하게 증가하였으며, LBF16을 투여한 마우스에서는 유의적인 차이가 없었음. 이러한 결과는 DSS로 인한 SCFAs의 감소가 LBRE14에 의해 회복될 수 있음을 나타냄

<표3-17> 단쇄지방산(SCFAs, Short chain fatty acids) 분석 조건

Item	Condition
Instrument	HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies, USA)
Detector	UV (215nm)
Column	AminexHPX-87H (300mm X 7.8mm, Biorad, USA)
Injection volume	20 μ l
Mobile phase	0.008NH ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/ min



<그림3-47> 맹장 내용물에서의 SCFAs 정량 결과

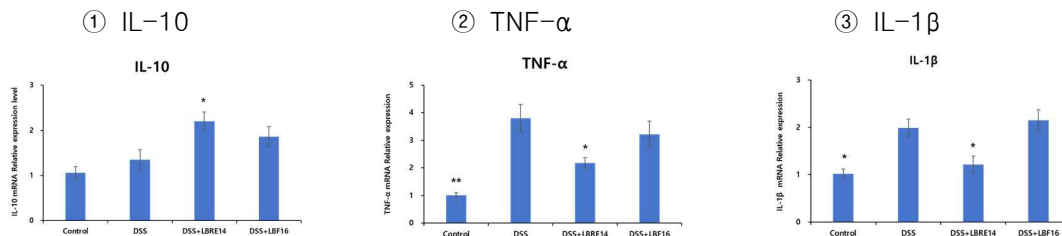
○ Cytokine (IL-10, TNF- α , IL-1 β) 발현양 측정

- 유산균의 항염증 활성을 평가하기 위해 대장조직에서의 Cytokine (IL-10, TNF- α , IL-1 β) mRNA 발현양을 측정함. 대장조직에 1ml의 Trizol 시약을 넣어 Tissue lyser (Qiagen)을 사용하여 조직을 분쇄하여 RNA를 분리하였음. 이후 분리된 RNA를 cDNA synthesis kit (LeGene Express 1st Standard cDNA Synthesis System)를 이용하여 cDNA를 합성하고 표 ~의 primer를 사용하여 real-time qPCR을 진행하였음. 중합효소연쇄반응은 95 °C에서 5분, 95 °C에서 15초, 60 °C에서 30초, 60 °C에서 30초를 40사이클을 진행함

<표3-18> cytokine primer

Gene		Primer sequence(5'→3')
GAPDH	F	TTGTCTCCTGCGACTTCAACA
	R	GCTGTAGCCGTATTCATTGTCATA
IL-10	F	GGACAACATACTGCTAACCGACTC
	R	AAAATCACTCTTCACCTGCTCCAC
IL-6	F	GAGGATACCACTCCCAACAG
	R	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATA
IL-1 β	F	GTTGACGGACCCCAAAAGAT
	R	CACACACCAGCAGGTTATCA
TNF- α	F	ATGATCCGCGACGTGGAA
	R	ACCGCCTGGAGTTCTGGA

- 그 결과, LBRE14 투여시 anti-inflammatory cytokine인 IL-10의 발현양이 유의하게 증가하였으며, LBF16 처리시 IL-10의 발현양이 증가하는 경향을 보이지만 유의하지 않았음. 또한 정상대조군에 비해 DSS 섭취시 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 발현양이 유의하게 증가하였으며, LBRE14 투여시 TNF- α , IL-1 β 를 유의하게 억제하였음.



<그림3-48> Cytokine mRNA 발현양 측정 결과

▶ 결론적으로, 장 건강 프로바이오틱스 LBRE14 투여시 대장염 완화 및 억제 효과가 관찰됨

(9) 장 건강 프로바이오틱스의 김치 적용 가능성 분석

○ DRC 1506과 후보균주 사이의 공동배양

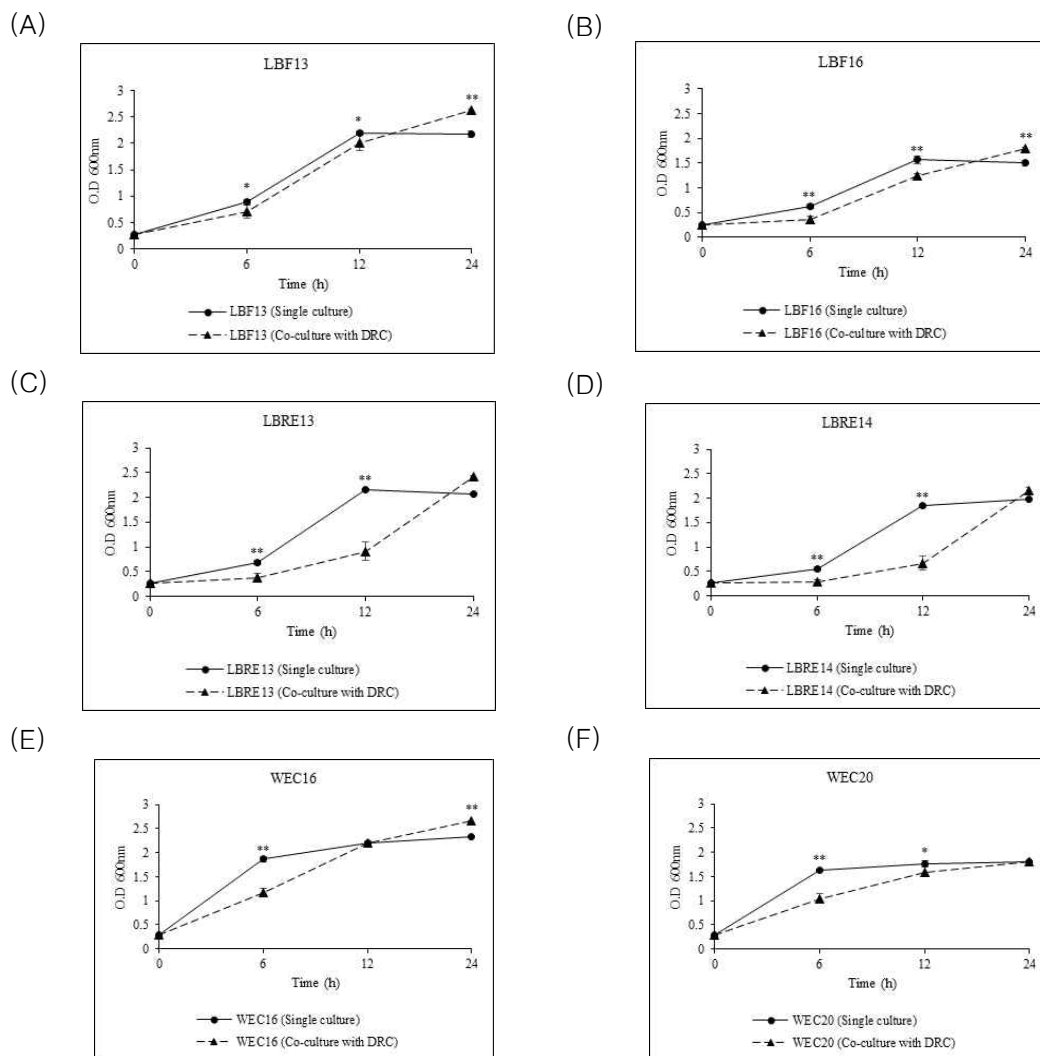
<표3-19> 장 건강 후보 유산균

#	Samples	Code
1	<i>Leconostoc mesenteroides</i> DRC1506	DRC1506
2	<i>Lactobacillus fermentum</i> 13	LBF-13
3	<i>Lactobacillus fermentum</i> 16	LBF-16
4	<i>Weissella cibaria</i> 16	WEC-16
5	<i>Weissella cibaria</i> 20	WEC-20
6	<i>Lactobacillus reuteri</i> 13	LBRE-13
7	<i>Lactobacillus reuteri</i> 14	LBRE-14

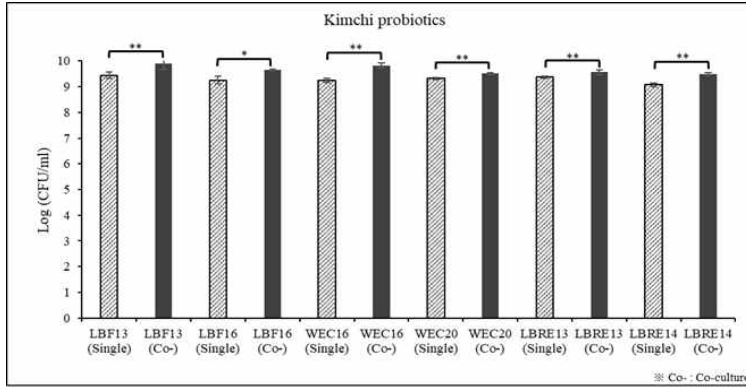
- DRC 1506의 성장을 했을 때, 후보균주의 성장에 미치는 영향을 예측하기 위해 DRC 1506과 후보균주를 공동 배양함

- 공동배양과 비교하기 위해 단일배양도 같이 실시하였으며, 기질만이 이동 가능한 Transwell을 사용하여 DRC 1506과 후보균주를 접종하고 24시간동안 배양하였으며, 미생물의 균수측정은 흡광도와 CFU측정을 통해 분석하였는데, 먼저 흡광도는 0, 6, 12, 24시간 후 96 well에 0.85% NaCl 100 μ l와 배양물 100 μ l를 분주하여 600nm에서 측정하였으며, CFU 측정은 24시간 후 배양물을 적절히 희석하여 사분면에 각각 20 μ l를 분주한 후 도말하고, 혐기챔버에서 37 $^{\circ}$ C, 48시간 배양한 뒤 Log (CFU/ml)를 측정하였음
- 공동배양 실험결과, 흡광도 측정에서 DRC 1506의 성장에 영향을 미치는 것이 적은 후보균주는 LBF13, 14였고, WEC 16, 20은 DRC 1506의 성장에 영향을 크게 미치는 것으로 나타남
- CFU 결과에서는 후보균주 모두 DRC 1506의 성장에 영향을 주었지만, LBF16과 LBRE14는 다른 후보균주들에 비해 적게 영향을 주었음

① 후보균주 결과



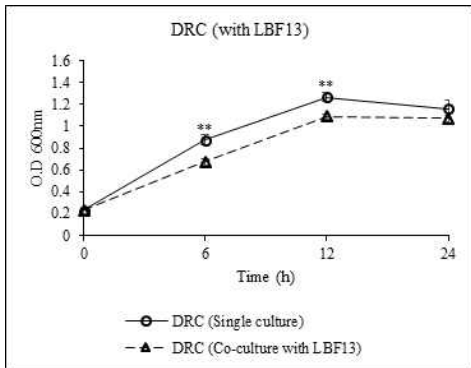
<그림3-49> DRC 1506과 공동배양한 각 균주들의 흡광도 결과;
LBF13(A), LBF16(B), LBRE13(C), LBRE14(D), WEC16(E), WEC20(F)



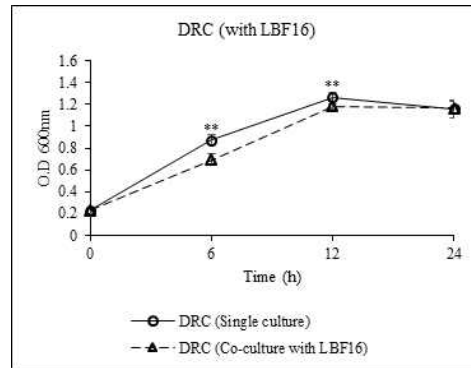
<그림3-50> DRC 1506과 공동 배양한 후보균주 CFU 결과

② DRC 1506 결과

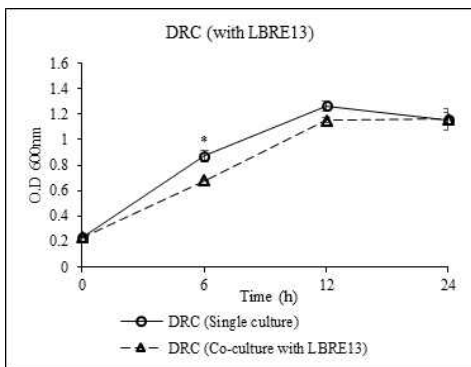
(A)



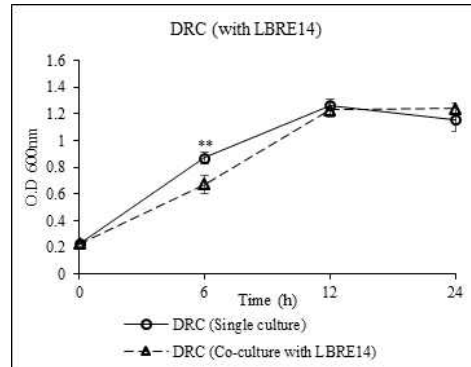
(B)



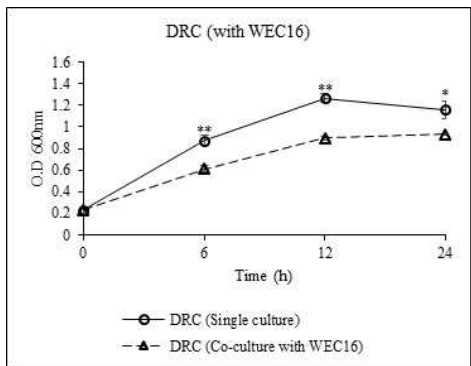
(C)



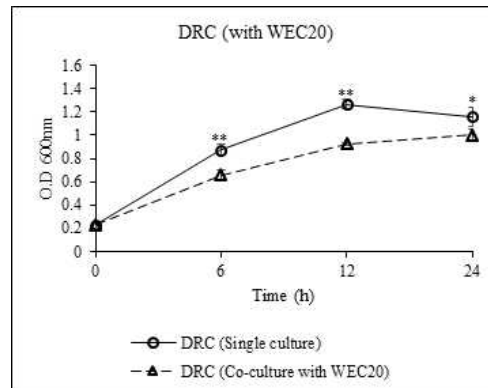
(D)



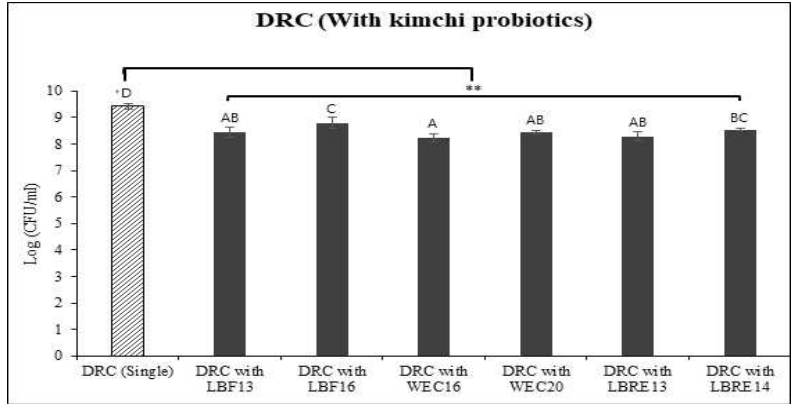
(E)



(F)



<그림3-51> 각 균주들과 공동배양한 DRC 1506 흡광도 결과; LBF13(A), LBF16(B), LBRE13(C), LBRE14(D), WEC16(E), WEC20(F)



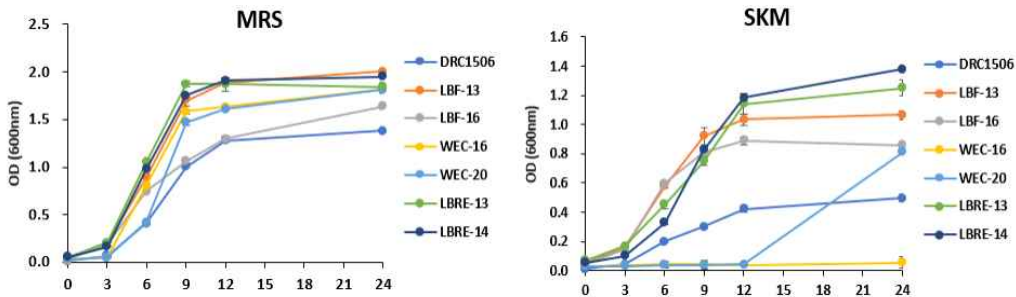
<그림3-52> 후보균주와 공동배양한 DRC 1506 CFU 결과

○ 김치모사배지에서의 성장률 확인

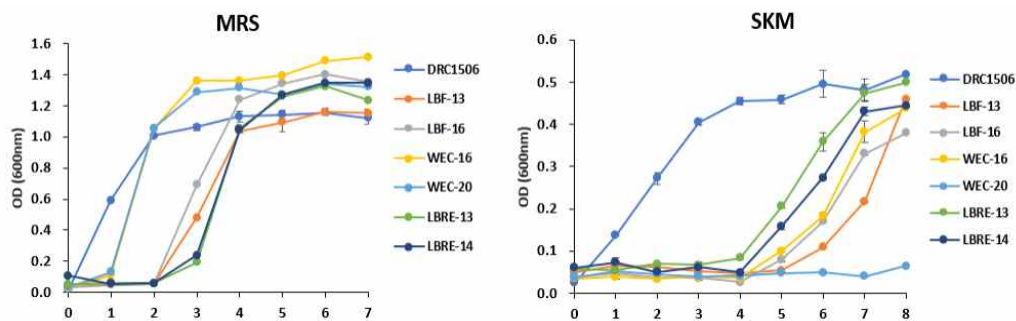
① Growth rate

- SKM medium 환경에서 장 건강 유산균의 생육을 MRS broth와 비교하여 확인하기 위해 온도별 (37°C, 15°C) 성장 곡선, pH 및 유기산 생성량을 측정함
- 성장 곡선 실험은 SKM (Standard kimchi media) 용액에 24시간 전배양한 균체를 1%접종하여 37°C에서 24시간까지 배양하여 3시간마다, 15°C에서 7일까지 배양하여 1일마다 O·D_{600nm}를 측정하여, 온도 별 생육을 확인함
- 장 건강 유산균의 성장 곡선을 측정한 결과, *Le. mesenteroides* DRC1506와 비교해서, 모든 균주가 MAS broth에서 37°C, 15°C에서 잘 자랐으며, SMK에서 37°C에서는 *Weissella cibaria* 16이 성장하지 못했으며, *Lactobacillus reuteri* 14는 성장이 저조했고, 15°C에서는 *Weissella cibaria* 20이 성장하지 못했으며, 15°C, SKM 배지에서는 성장이 느린 것으로 관찰됨

1) 37°C



2) 15°C



<그림3-53> 장 건강 유산균의 MAS broth와 SKM에서의 성장 곡선

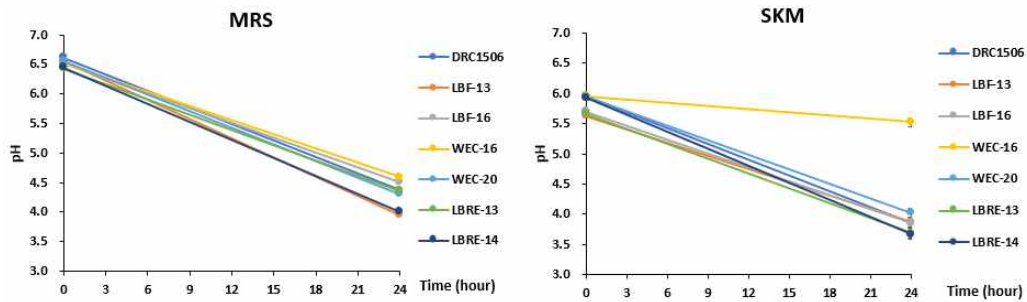
② pH 및 유기산 측정

- pH 및 유기산 측정은 SKM (Standard Kimchi media) 용액에 24시간 전배양한 균체를 1%

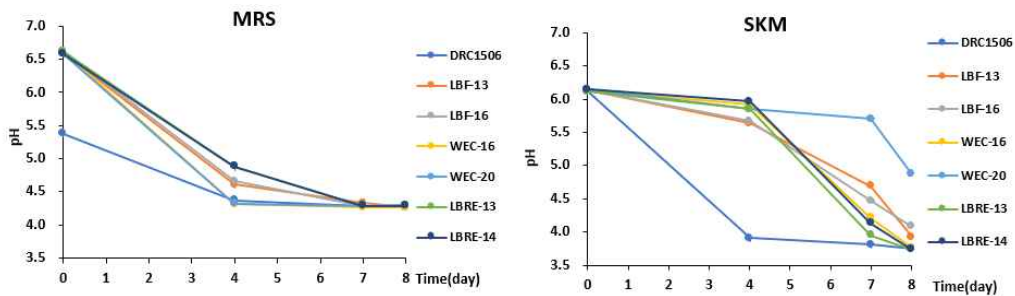
접종하여 37℃에서는 24시간까지 배양하였고, 15℃에서는 8일까지 배양한 뒤 3mL씩 샘플링하여 pH를 측정함

- pH를 측정하여 변화 값을 나타낸 결과 *Le. mesenteroides* DRC1506와 비교하여 MRS broth, 37℃와 15℃에서 모든 장건강 유산균의 pH 변화량이 컸으며, 37℃, SKM에서도 pH 변화량이 컸지만, 15℃에서는 *Le. mesenteroides* DRC1506만이 pH 변화가 급격하게 나타나고, 이 외의 균주들에서는 4일차 부터 pH 변화했으며, *W. cibaria* 16는 pH 변화량이 적은 것이 관찰됨

1) 37℃



2) 15℃



<그림3-54> 장 건강 유산균의 MAS broth와 SKM에서의 pH 측정량

(10) 장/간/정신 건강 유산균을 접종한 다양한 김치의 품질특성 분석

○ 장 건강 유산균을 접종한 배추김치의 품질특성 분석

① 관능평가

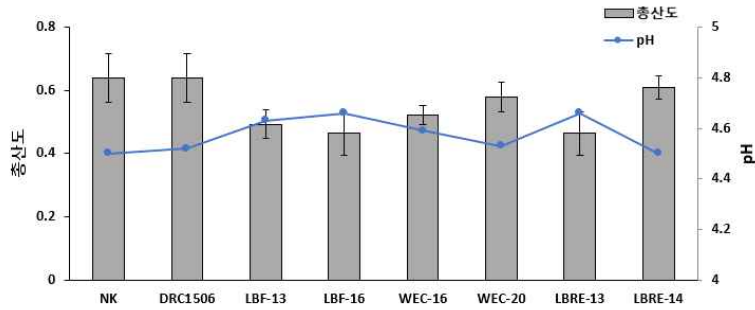
- DRC1506을 대조군으로하여 장 건강 유산균을 김치 스타터로 사용하여 실제 김치에 접종하여 다음 실험을 진행하였음

- 10℃에서 김치를 발효시키며, 처음 pH에서 적정 pH까지 약 8일에서 9일정도 걸렸고 약 pH 4.5까지 떨어지는 것을 확인하고 3C에서 보관하였으며, 모든 김치가 적정 산도가 된 것을 확인한 후 관능평가를 실시하였음

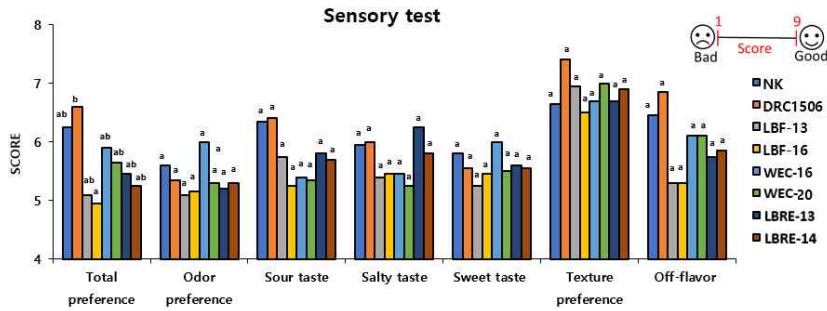
_ 종합적으로, *Le. mesenteroides* DRC1506 첨가 김치가 가장 높은 선호도를 보이며, 그 다음으로는 *W. cibaria* 16이 좋았으며, *L. fermentum* 16첨가 김치가 가장 낮은 선호도를 보임

<표3-20> 장 건강 유산균 접종 김치 pH 변화

Number	Samples	Code	pH			
			0일	8일	9일	10일
1	자연발효	NK	5.83	4.45	4.41	4.25
2	<i>Leconostoc mesenteroides</i> DRC1506	DRC1506	5.95	4.54	4.54	4.55
3	<i>Lactobacillus fermentum</i> 13	LBF-13	5.95	4.69	4.47	4.39
4	<i>Lactobacillus fermentum</i> 16	LBF-16	5.91	4.72	4.51	4.29
5	<i>Leconostoc mesenteroides</i> 16	LEM-16	5.89	4.43	4.44	4.43
6	<i>Leconostoc mesenteroides</i> 20	LEM-20	6.06	4.66	4.52	4.46
7	<i>Lactobacillus reuteri</i> 13	LBR-13	6.02	4.64	4.52	4.32
8	<i>Lactobacillus reuteri</i> 14	LBR-14	6.07	4.67	4.42	4.28



<그림3-55> 장 건강 유산균 적용 김치 pH와 총산도

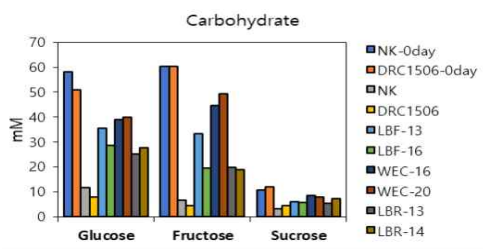


<그림3-56> 장 건강 유산균 접종 김치 관능 평가 결과

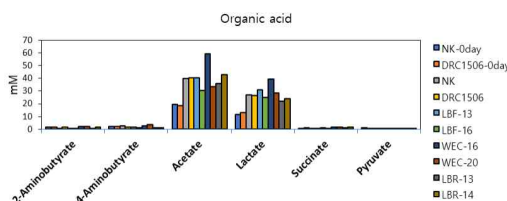
② ¹H-NMR을 통한 대사산물 분석

- 위에서 접종한 김치의 김치 숙성 발효 후 성분을 각각 비교하기 위해 H-NMR을 통해 대사산물 분석하였으며 Chenomx NMR Suite v. 6.1 를 사용하여 DSS 0.5 mM (내부물질)의 피크 면적을 기준으로 하여 각 대사체의 농도를 결정함
- 모든 김치에서는 탄소원 glucose와 fructose와 같은 주요 유리당으로 검출이되었고, 발효 후에 감소하였으며, 또한 알코올과 유기산 성분을 비교 시 ethanol, mannitol, lactate, acetate가 증가되어 검출된 것으로 보아 Hetero-type 젖산발효가 일어나는 것을 알 수 있었으며, 김치의 주요 아미노산으로 alanine, glutamate, glutamine, glycine, serine, threonine이 검출되었음
- ¹H-NMR 결과를 PCA 분석으로 정리하였을 때, *Le. mesenteroides*와 비교하여 자연발효와, *Lb. reuteri*은 비슷한 경향으로 발효가 진행되었음

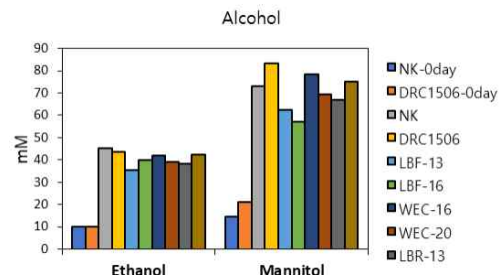
(A) 탄소원



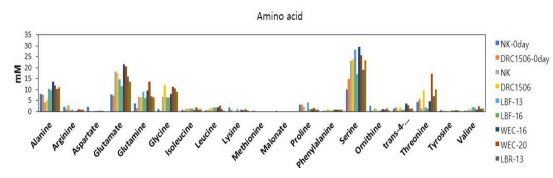
(C) 유기산



(B) 알코올

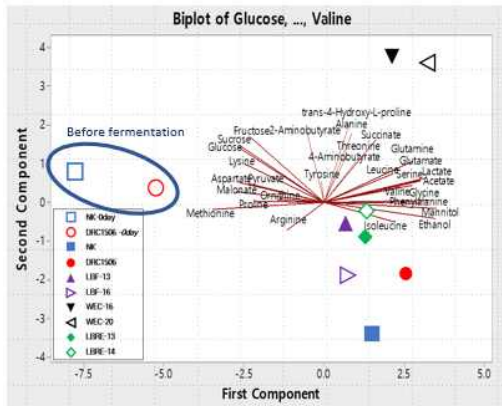


(D) 아미노산

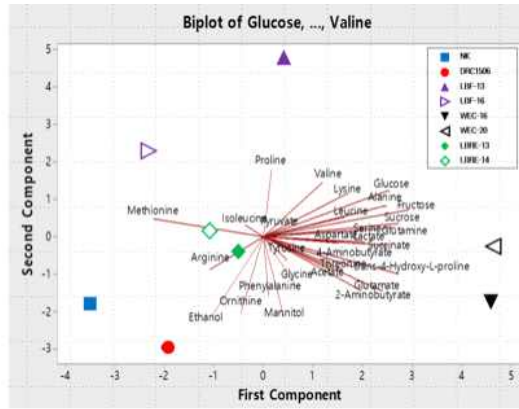


<그림3-57> 장 건강 유산균 김치 주요 성분 및 농도

(A) Included before fermentation



(B) Except before fermentation



<그림3-58> 장 건강 유산균 김치 성분 PCA 분석결과

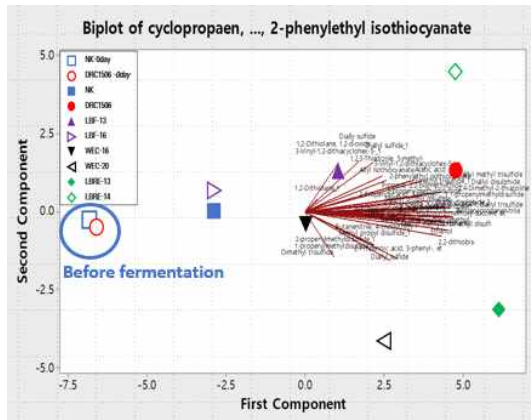
③ GC/MS를 통한 휘발성 향기성분 분석

- 위 김치의 김치 숙성 발효 후 향기 화합물을 각각 비교하기 GC/MS를 사용하여 Methyl cinnamate 100 ppm의 피크 면적 기준으로 하여 각 향기 성분의 농도를 결정함
- 발효 후에 휘발성 향 화합물 (Diallyl disulphide, Ally methyl tisulfide, 2-phopenoic acid, 3-phenyl-, Methyl ropyl disulfide)의 농도가 증가함
- 발효 전과 발효 후의 휘발성 화합물은 확연한 차이가 있으며, *Le. mesenteroides* DRC1506 첨가 김치와 비슷한 패턴으로 발효가 진행되는 것은 *L. reuteri* 14 첨가 김치이며 자연발효와 비슷한 패턴으로 발효되는 것은 *L. fermentum* 16 첨가 김치임

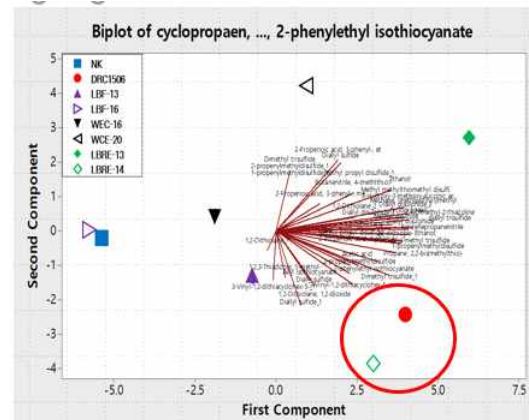
<표3-21> 장 건강 유산균 접종 김치 향기화합물 및 농도

NO.	RT	Volatile compounds	Formula	Aroma descriptions	Sample									
					NK-0day	DRC1506-0day	NK	DRC1506	LBF-13	LBF-16	WCE-16	LEM-20	LBR-13	LBR-14
1	3.22	cyclopropan	C ₃ H ₆	Petroleum-like	-	-	1.07	1.997	1.443	0.925	1.681	2.052	2.406	2.201
2	6.667	Ethanol	C ₂ H ₅ O	strong alcoholic	1.585	1.82	2.523	4.585	4.133	2.848	4.354	6.742	6.684	5.234
3	10.137	Methyl disulfide	C ₂ H ₅ S ₂		0.615	0.707	1.205	3.284	1.683	1.119	1.507	3.329	2.756	3.058
4	12.494	Diallyl sulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Alliaceus, Green, Onion	-	-	0.377	-	-	-	0.34	0.99	1.157	0.365
5	12.694	Diallyl sulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Alliaceus, Green, Onion	-	-	-	0.917	0.763	0.428	0.256	-	-	0.635
6	15.273	Methyl propyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Sulfureous, alliaceus, radish	-	-	0.248	0.705	-	0.242	0.325	0.437	0.352	0.44
7	15.304	Methyl propyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Sulfureous, alliaceus, radish	-	-	-	-	-	-	-	-	0.247	-
8	16.793	Methyl allyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	strong odor, garlic and onion	4.483	3.976	20.03	27.687	17.061	9.423	13.211	13.873	20.266	18.381
9	16.801	Methyl allyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂		-	-	-	-	-	-	-	6.262	-	-
10	16.993	1-propenylmethyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	onion	-	0.08	0.295	0.738	0.423	0.227	0.392	0.38	0.577	0.471
11	17.016	1-propenylmethyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂		-	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-
12	19.035	Allyl isothiocyanate	C ₃ H ₃ N ₃ S	wasabi, horseradish, mustard	-	0.082	0.287	0.562	0.332	0.1	0.122	0.377	-	0.48
13	19.611	Dimethyl trisulfide	C ₂ H ₅ S ₃	Sulfureous, alliaceus	-	-	-	-	-	-	-	2.044	-	-
14	19.657	Dimethyl trisulfide	C ₂ H ₅ S ₃	Sulfureous, alliaceus	0.485	0.517	1.481	4.442	2.769	1.376	2.927	1.796	3.15	3.322
15	20.993	1,2-Dithiolane	C ₃ H ₆ S ₂	Sulfureous	0.676	0.611	1.33	3.229	3	1.332	-	2.171	3.513	2.012
16	21.177	1,2-Dithiolane	C ₃ H ₆ S ₂	Sulfureous	-	-	-	-	0.074	-	-	-	-	-
17	21.409	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	Vinegar	-	0.117	0.29	0.527	0.485	0.174	0.592	0.8	0.774	2.142
18	21.945	Diallyl disulphide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Alliaceus, Green, Onion	0.102	0.085	0.267	0.549	0.412	0.237	0.361	0.459	0.567	0.458
19	22.444	Diallyl disulphide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Alliaceus, Green, Onion	23.61	19.653	52.432	108.211	81.753	41.178	61.088	76.094	92.705	60.685
20	22.528	Diallyl disulphide	C ₆ H ₁₀ S ₂	Alliaceus, Green, Onion	0.962	0.788	2.251	4.651	3.259	1.771	3.081	3.592	4.439	2.866
21	23.542	droy-3-methoxy-succinic acid, dimethyl	C ₁₁ H ₁₂ O ₆		0.121	0.165	0.683	1.489	0.981	0.561	1.229	1.461	1.683	1.365
22	23.634	Ethanol, 2,2-dithiobis-	C ₂ H ₆ O ₂ S ₂		0.037	0.065	0.176	0.484	0.354	0.136	0.26	0.356	0.392	0.348
23	23.787	Cyclopentyl isothiocyanate	C ₅ H ₉ NS		-	-	0.172	0.356	0.282	0.11	0.106	0.187	0.592	0.423
24	25.2	Allyl methyl trisulfide	C ₄ H ₈ S ₃	Alliaceus, Green, Onion	1.091	1.178	3.954	8.949	5.573	3.057	5.37	7.776	7.184	8.469
25	26.874	Methyl methylthiomethyl disulfide	C ₃ H ₆ S ₃	werful, penetrating aroma, oni	-	-	-	0.089	0.058	0.031	0.053	0.092	0.115	0.071
26	28.271	Propane, 2,2-bis(methylthio)-	C ₃ H ₈ S ₂		-	-	0.075	0.058	-	0.063	-	-	0.08	0.057
27	28.394	2,4-Dimethyl-2-thiazoline	C ₆ H ₁₁ N ₂ S		-	-	0.07	0.188	0.18	0.065	0.135	0.129	0.217	0.118
28	28.616	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	C ₆ H ₈ S ₂	garlic	0.146	0.135	0.466	0.92	0.642	0.373	0.633	-	0.922	0.849
29	28.678	1,2-Dithiolane, 1,2-dioxide	C ₃ H ₄ O ₂ S ₂		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.078
30	29.638	diallyl trisulfide	C ₆ H ₁₀ S ₃	Sulfureous, strong garlic	0.059	0.063	0.252	0.607	0.446	0.211	0.387	0.493	0.568	0.463
31	29.852	Diallyl sulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	intense garlic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.189
32	30.735	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	C ₆ H ₈ S ₂		-	-	-	-	-	0.045	-	-	-	0.083
33	31.127	Methane, (methylsulfanyl)(methylthio)-	C ₃ H ₆ S ₂ O		-	-	-	0.087	0.064	0.036	0.063	0.083	0.112	0.08
34	31.319	1,2,3-Thiadizole, 5-methyl-	C ₃ H ₄ N ₂ S		-	-	0.086	0.109	0.09	0.093	0.092	0.092	0.154	0.154
35	32.632	3-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester	C ₁₀ H ₁₀ O ₂		-	-	-	0.073	0.092	0.12	0.135	0.136	0.154	0.154
36	34.037	Benzenepropanenitrile	C ₉ H ₉ N		0.02	-	0.059	0.118	0.108	0.061	0.072	0.106	0.15	0.131
37	34.167	1,2-Dithiolane	C ₃ H ₆ S ₂		-	-	-	-	-	0.056	0.103	0.129	0.295	0.254
38	34.351	Butanenitrile, 4-(methylthio)-	C ₅ H ₉ NS		-	-	-	-	-	-	-	-	0.086	-
39	34.858	3-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester	C ₁₀ H ₁₀ O ₂		-	-	-	-	-	-	-	-	0.117	0.108
40	35.564	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, ethyl ester	C ₁₁ H ₁₂ O ₂		-	1.098	0.891	1.792	1.472	2.539	3.266	3.945	5.68	1.294
41	37.361	2-phenylethyl isothiocyanate	C ₉ H ₉ NS	Musty, strong green, raddish	-	-	0.11	0.114	0.115	0.074	0.067	0.102	0.173	0.314

(A) Included before fermentation



(B) Only after fermentation



<그림3-59> 장 건강 유산균 김치 향기 화합물 PCA 분석 결과

- ▶ 최종적으로 장 건강 유산균 중 김치에 적용 가능하고 *Le. mesenteroides* DRC1506와 비슷한 발효 패턴으로 보이는 후보 유산균으로 *Lb. fermentum* 16와 *Lb. reuteri* 14가 결정됨

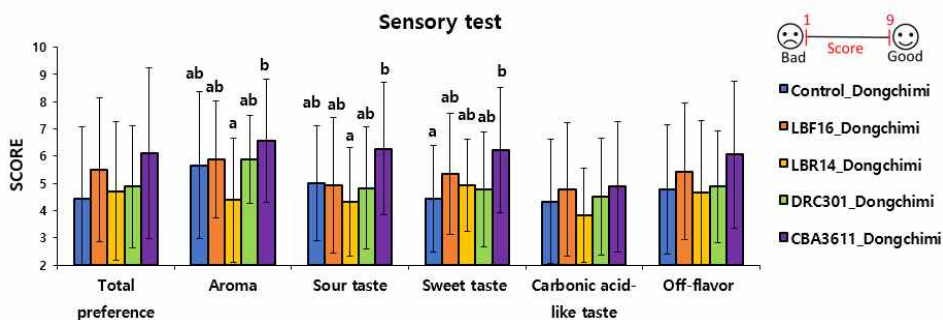
○ 장 /간/정신 건강 유산균 첨가된 다양한 물김치(나박김치, 동치미) 제조

<표3-22> 실험에 사용한 장/간/정신 건강 유산균

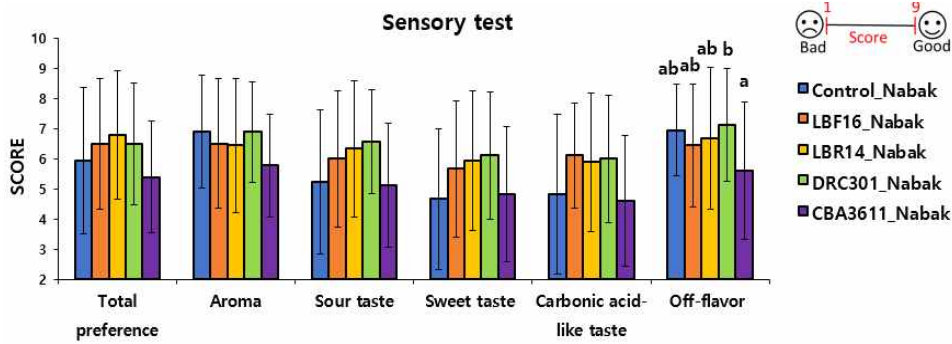
#	Samples	Code	기타사항
1	자연발효	NK	Blank
2	<i>Le. mesenteroides</i> DRC1506	DRC1506	Positive control
3	<i>Lb. fermentum</i> 16	LBF16	장 건강
4	<i>Lb. reuteri</i> 14	LBRE14	장 건강
5	<i>Lb. brevis</i> DRC301	DRC301	간 건강
6	<i>Lb. paracasei</i> CBA3611	CBA3611	정신 건강

① 관능평가

- 장/간/정신건강 유산균 첨가된 다양한 물김치의 관능적 특성을 확인하기 위해, 장/간/정신건강 유산균 첨가 동치미와, 나박김치를 제조하여 관능평가를 실시함
- 장/간/정신건강 유산균 첨가 물김치의 관능평가를 위하여 각 starter를 0.5% 접종한 동치미와 나박김치를 10 °C 에서 발효시켰으며, Positive control로 자연발효를 사용함
- 동치미의 종합적인 선호도 평가결과, *Lb. paracasei* CBA3611 첨가 동치미가 대조구 동치미에 비해 더 높은 선호도를 보이지만 유의적인 차이는 없었으며, *L. reuteri* 14 첨가 동치미김치가 가장 낮은 선호도를 보였고, 나박김치의 종합적인 선호도 평가결과, *L. reuteri* 14를 첨가한 나박김치가 대조구 나박김치에 비해 더 높은 선호도를 보이지만 유의적인 차이는 없었으며, *Lb. paracasei* CBA3611 첨가 나박김치가 가장 낮은 선호도를 보임



<그림3-60> 장/간/정신건강 유산균 첨가 동치미 관능 평가 결과



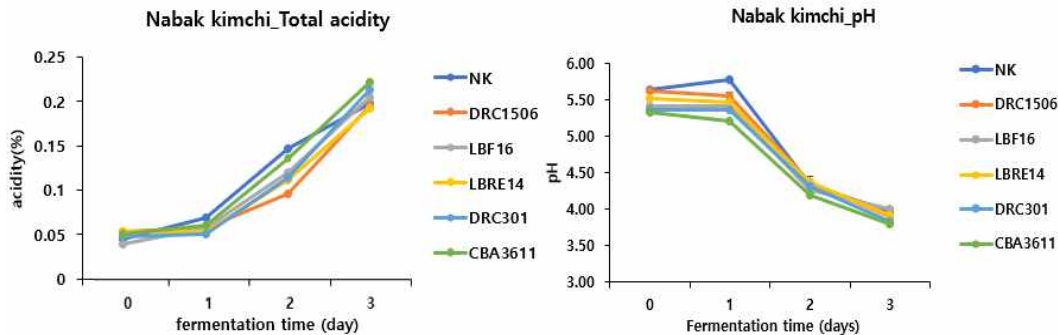
<그림3-61> 장/간/정신건강 유산균 첨가 나박김치 관능 평가 결과

- 동치미와 나박김치의 관능평가 결과 나박김치의 선호도가 더 높아 자연발효와, 장/간/정신건강 유산균 첨가나박김치의 추가적인 분석을 진행함

○장/간/정신 건강 유산균 첨가된 나박김치의 품질특성 분석

① pH 및 총산도 분석

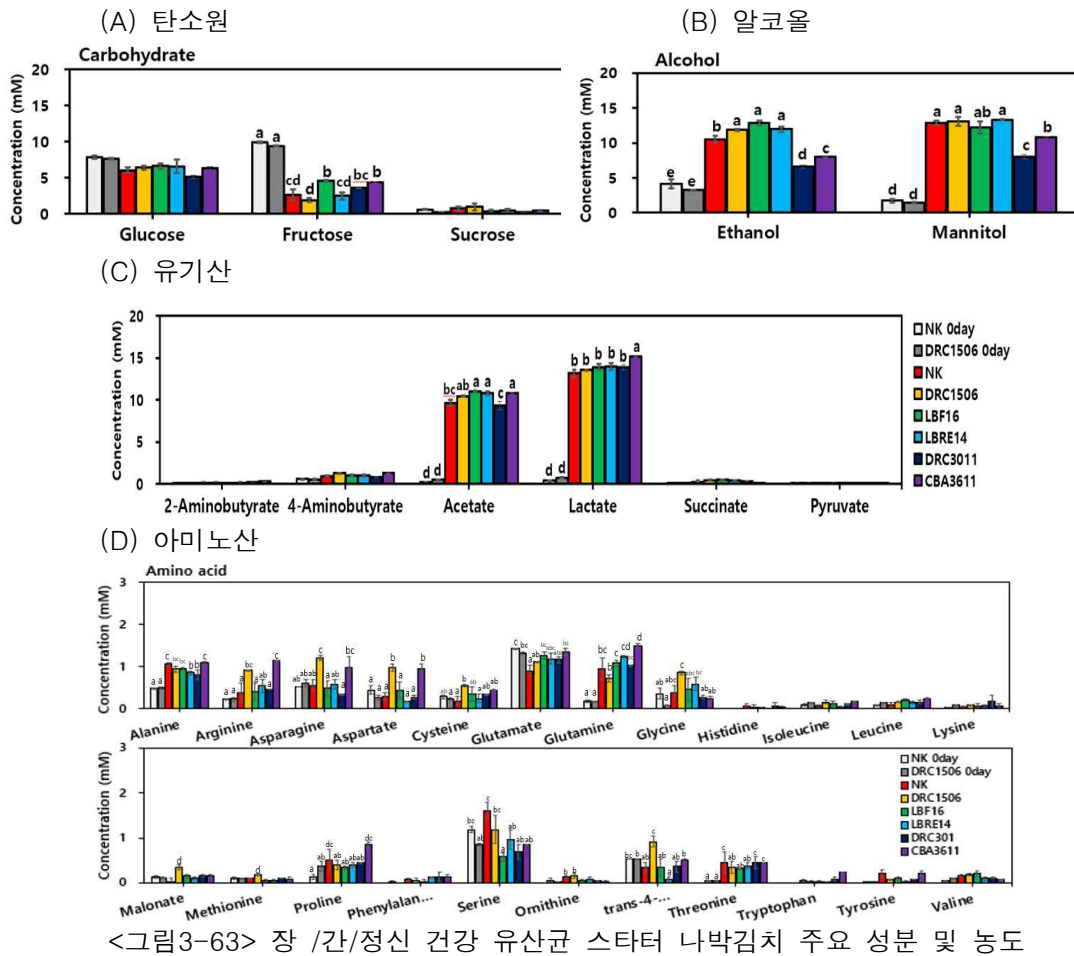
- 자연발효와, *Le. mesenteroides* DRC1506을 대조군으로 하여 장 /간/정신 건강 유산균을 스타터로 사용하여 실제 나박김치에 접종하여 다음 실험을 진행하였음
- 10℃에서 김치를 발효시켰으며, 3일 후에 모든 나박김치가 적정 pH(pH 3.99)에 도달하였고, 산도 또한 최적 적식기 산도인 0.17 ~ 0.31 % 범위 안에 포함되는 것을 확인하였으며, 배추김치보다 빨리 발효되며, 산도가 더 낮은 결과를 보였음



<그림3-62> 장 /간/정신 건강 유산균 스타터 나박김치 pH와 총산도

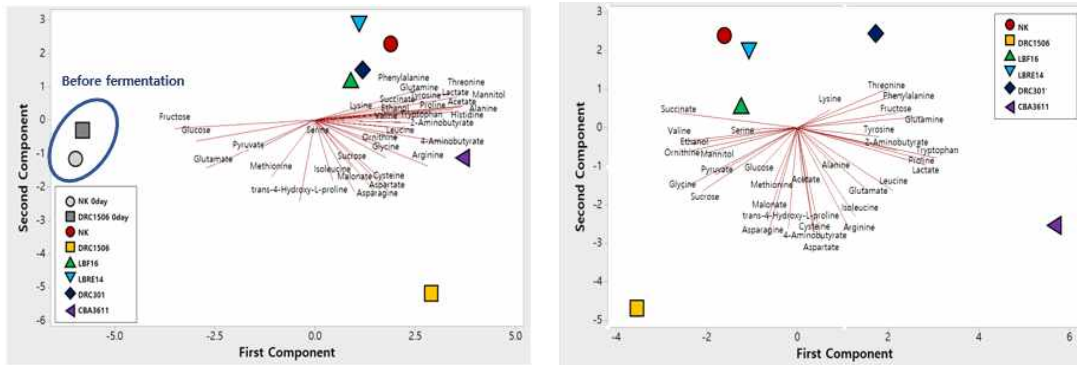
② ¹H-NMR을 통한 대사산물 분석

- 장 /간/정신 건강 유산균 스타터 나박김치의 숙성 발효 후 성분을 각각 비교하기 위해 ¹H-NMR을 통해 대사 산물 분석하였으며 Chenomx NMR Suite v. 6.1 를 사용하여 DSS 0.5 mM (내부물질)의 피크 면적을 기준으로 하여 각 대사체의 농도를 결정함
- ¹H-NMR 결과, glucose 은 발효 전후에 유의 한 차이가 없었으나 발효 후 fructose는 감소하였으며, 알코올은 발효 후 유의하게 증가했으며 DRC301 나박김치는 가장 적게 검출되고, 유기산 중에서는 acetate와 lactate가 크게 증가했으며 CBA3611 나박김치가 가장 많이 검출되었으며 이는 발효 중에 glucose는 소비되어 ethanol과 acetate, lactate를 생성하지만 배추와 무에서 glucose가 계속 추출되어 발효 전후에 차이가 없으며fructose는 mannitol 생성으로 인해 소모된 것으로 보임
- 김치 발효로 확인 된 주요 아미노산의 주요 대사 산물은 alanine, glutamate, glutamine, serine으로 검출되었으며, 발효 전 나박김치에서 glutamate 와 serine 이 검출되고, 발효 후에는 alanine, glutamine, proline, threonine이 검출됨
- ¹H-NMR 결과를 PCA 분석으로 정리하였을 때, 발효 전과 발효 후의 대사산물은 확연한 차이가 있으며, *L. reuteri* 14 나박김치는 자연 발효 나박김치와 가장 유사한 발효 패턴을 보임



(A) Included before fermentation

(B) Only after fermentation

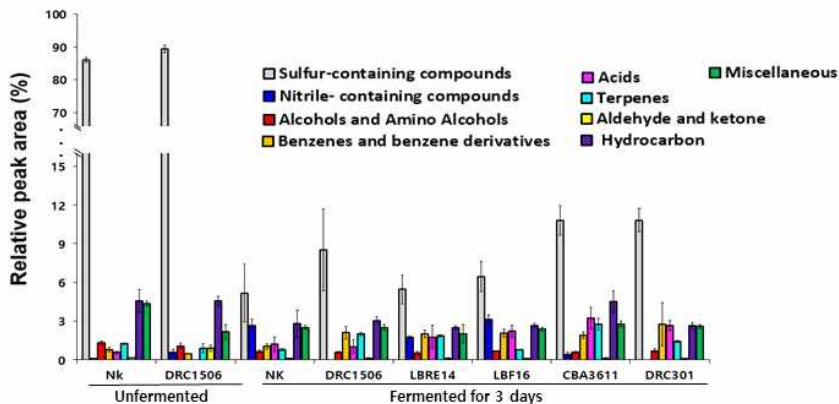


③ GC/MS를 통한 휘발성 향기성분 분석

- 위 나박김치의 숙성 발효 후 향기 화합물을 각각 비교하기 GC/MS를 사용하여 Methyl cinnamate 100 ppm의 피크 면적 기준으로 하여 각 향기 성분의 농도를 결정함
- 발효 전에는 Diallyl disulphide와 disulfide methyl 1-propenyl이 가장 많이 검출되고, 마늘, 양파 등의 냄새를 가진 향기 화합물이 주성분이었으며, 발효 후에는 acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-, 1-Butene 4-isothiocyanato-, 과 cyclohexene 4-methylene-1-(1-methylethyl)- 이 주로 검출되었으며, 매운 냄새와 양배추 향이 나는 다양한 휘발성 화합물이 검출됨

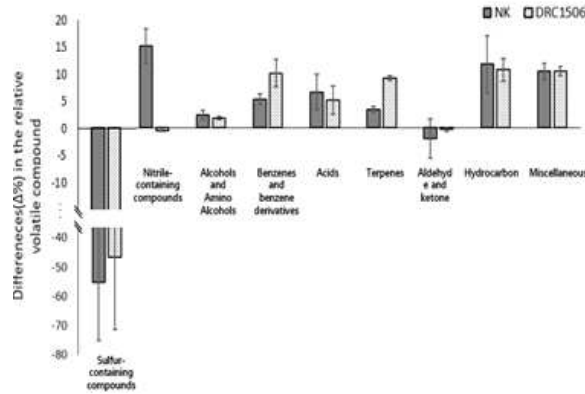
<표3-23> 장 /간/정신 건강 유산균 스타터 나박김치 향기화합물 및 농도

volatile compound	odor description	Unfermented			Fermented for 3 days				
		Nk Odor	DRC Odor	NK	DRC1503	LBRE14	LBF16	CBA3611	DRC301
Total compounds		100.00±13.36	100.00±9.45	16.95±3.54	19.87±4.66	20.34±5.04	20.74±1.63	27.04±3.36	21.94±2.17
Sulfur-containing compounds		85.95±0.76	89.35±1.20	5.18±2.24	8.52±3.16	5.46±1.11	6.45±1.17	10.80±1.15	10.82±0.90
2-Thiophenecarboxylic acid, 5-(1,1-dimethylethoxy)			1.16±0.58						
N-Methylsaurine	unpleasant		0.63±0.01						
Allyl methyl sulfide	an onion type flavor	18.43±0.56	16.60±0.58		1.66±0.10	1.29±0.03	1.05±0.74	1.46±0.30	1.18±0.13
Disulfide, dipropyl	onion and garlic type flavor	0.34±0.00	0.39±0.02						
1,5,2,4-Dioxadithiepane, 2,2,4,4-tetraoxide						0.10±0.05		0.24±0.05	0.20±0.01
1,2-Dithiolane	sulfurous type odor; an onion type flavor	2.53±0.20	1.65±1.02	0.70±0.37					
1-Butene, 4-isothiocyanato-	pungent tasting, cabbage type flavor			2.06±0.20	1.91±1.00	1.42±0.69	2.20±0.27	3.06±0.38	3.00±0.27
Diallyl disulfide	strong garlic odor	64.65±0.43	68.92±2.26	2.42±1.69	2.81±1.28	2.66±0.43	3.21±0.87	2.53±0.35	2.92±0.33
Cyclopentyl isothiocyanate	strong irritating green aroma				2.13±1.06			3.52±0.34	3.52±0.24
Nitrile-containing compounds		0.09±0.02	0.60±0.20	2.68±0.46		1.76±0.07	3.14±0.36	0.39±0.20	0.10±0.01
2,6,6-Triethyl bicyclo[3.1.1]hept-3-ylamine							0.71±0.51		
Hydroxysa							0.03±0.05		0.10±0.01
2-(1-Butyl-1-methyl-3-phenyl-imidazolidin-4-one	leafy type flavor							0.20±0.18	
N-Methylcaprolactam	weak amine odor		0.60±0.20	2.68±0.46		1.76±0.07	2.33±0.16		
R(-)-Cyclohexylethylamine	Amine-like	0.09±0.02							
N-Methoxy-1-nbutylamino-4-imidazolecarboxylic amide								0.08±0.01	
N-Methoxy-1-nbutylamino-4-imidazolecarboxylic amide								0.11±0.02	
Alcohols and Amino Alcohols		1.33±0.13	1.07±0.20	0.63±0.14	0.56±0.08	0.53±0.10	0.69±0.02	0.56±0.07	0.71±0.15
4-amino-1-pentanol	smells like apricot	0.63±0.10		0.21±0.01	0.20±0.01	0.14±0.11	0.30±0.08	0.28±0.12	0.22±0.04
4-amino-1-pentanol	smells like apricot	0.14±0.04		0.09±0.00	0.08±0.01	0.07±0.03	0.10±0.01		0.07±0.01
L-Valinol	amino alcohol		0.65±0.14						
4-amino-1-pentanol	smells like apricot	0.03±0.03							0.14±0.10
2-(2-Aminopropyl)phenol			0.19±0.07	0.24±0.13	0.18±0.06	0.22±0.02	0.18±0.03	0.18±0.06	0.20±0.01
4-amino-1-pentanol	Amine-like odor		0.08±0.03						
1-Methylene-2b-hydroxyethyl-3,3-dimethyl-4b-(3-methylbut-2	floral odor	0.18±0.02	0.14±0.02	0.09±0.01	0.10±0.01	0.11±0.02	0.11±0.02	0.10±0.01	0.08±0.00
2-Methyl-1-β-methyl-6-(1-methylethylidene)-3-cyclohexan-1-yl	phenolic odor	0.35±0.15							
Benzenes and benzene derivatives		0.80±0.17	0.45±0.03	1.04±0.20	2.10±0.49	2.02±0.32	2.08±0.31	1.91±0.23	2.76±1.68
Benzeneethanamine, N-[(4-hydroxyhydrocinnaamyl)-					0.52±0.37	0.38±0.27	0.94±0.17		0.42±0.30
Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)		0.23±0.17			0.79±0.08	0.78±0.05		1.02±0.15	
Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)				0.26±0.13	0.12±0.09	0.19±0.02	0.35±0.26		1.58±1.96
Benzaldehyde, 3-(2,4,6-trichlorophenoxy)methyl-4-methoxy	alcoholic odor			0.19±0.05	0.16±0.02	0.14±0.02	0.11±0.01	0.12±0.03	0.10±0.02
Benzaldehyde, 3-(2,4,6-trichlorophenoxy)methyl-4-methoxy					0.04±0.01	0.09±0.03		0.17±0.12	0.10±0.03
Benzeneethanamine, 3-fluoro-β,β-dihydroxy-N-methyl-						0.09±0.02	0.07±0.01		
Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-heptyl)-4-methyl-	Herbal odor	0.56±0.02	0.45±0.03	0.34±0.01	0.26±0.03	0.26±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	0.20±0.01
Benzene, (2-isothiocyanatoethyl)-	odors from Brassicaceae			0.33±0.05	0.26±0.12	0.13±0.08	0.27±0.01	0.37±0.01	0.35±0.01
Acids		0.57±0.11		1.22±0.55	1.02±0.52	1.77±0.91	2.20±0.48	3.23±0.83	2.67±0.41
(Allylthio)acetic acid	pungent odor					0.41±2.57	0.34±0.08	0.56±0.10	0.60±0.15
Oxalitic acid	fruity, pungent odor			1.22±0.55	1.02±0.52	1.36±0.77	1.86±0.46	2.68±0.74	0.63±0.06
2-Suboxyethyl acetate	fruity odor	0.57±0.11							
Terpenes		1.25±0.05	0.88±0.35	0.78±0.07	1.99±0.12	1.86±0.08	0.77±0.02	2.74±0.45	1.40±0.08
β-Terpinen	terpentine-like odor				1.19±0.01	1.11±0.12		1.84±0.42	0.78±0.05
β-Caryophyllene	spiciness of black pepper odor	1.25±0.05	0.88±0.35	0.78±0.07	0.80±0.13	0.75±0.05	0.77±0.02	0.90±0.03	0.63±0.07
Aldehyde and ketone		0.14±0.03	0.90±0.25	0.10±0.04	0.11±0.04	0.11±0.05	0.10±0.04	0.11±0.05	0.10±0.04
Methyl salicylate	sweet, fruity odor, mint candies	0.14±0.03	0.12±0.02	0.10±0.04	0.11±0.04	0.11±0.05	0.10±0.04	0.11±0.05	0.10±0.04
Dodecanal	oranges, aldehydic type odor		0.64±0.21						
1,1-Dodecanediol, diacetate	Amine-like odor		0.14±0.06						
Hydrocarbon		4.56±0.88	4.56±0.35	2.79±1.07	3.04±0.27	2.48±0.12	2.67±0.15	4.51±0.86	2.63±0.24
Limonene	lemon, Pine, floral, fresh odor	4.56±0.88	4.56±0.35	2.79±1.07	2.80±0.22	2.48±0.12	2.67±0.15	4.51±0.86	2.63±0.24
Propane	paraffin type odor				0.25±0.06				
Miscellaneous		4.36±0.20	2.16±0.59	2.52±0.14	2.50±0.25	2.02±0.71	2.37±0.14	2.78±0.24	2.48±0.14
Pentylamine, tri-TMS	light acetic odor and tastes slightly bitter	0.37±0.39		0.05±0.03	0.07±0.02	0.08±0.03	0.06±0.01		0.05±0.02
Silane, trichlorodocosyl-	pungent odor	0.86±0.26	0.39±0.24	0.44±0.02	0.43±0.01	0.32±0.15	0.48±0.08	0.43±0.02	0.40±0.03
Silane, trichlorodocosyl-	pungent odor				0.25±0.13		0.39±0.07		0.31±0.04
2-Trifluoroacetyldodecane		0.76±0.02	0.54±0.14	0.36±0.07				0.34±0.06	
Silane, trimethyl(1-methyl-1-phenylethoxy)-							0.26±0.19	0.18±0.13	
trans (2-Chlorovinyl)dimethylethoxysilane		0.12±0.01		0.06±0.04	0.11±0.04	0.24±0.18			
trans (2-Chlorovinyl)dimethylethoxysilane	minty type odor	0.15±0.06							
Silanediol, dimethyl-	slightly sweet smell	2.05±0.59	1.18±0.37	1.52±0.06	1.54±0.16	1.30±0.37	1.38±0.27	1.84±0.22	1.68±0.10
Metaaminol		0.06±0.01				0.04±0.03	0.11±0.02		
Topotecan			0.05±0.01		0.03±0.02	0.04±2.80			0.07±0.00
Topotecan				0.09±0.02	0.07±0.04		0.07±0.01		

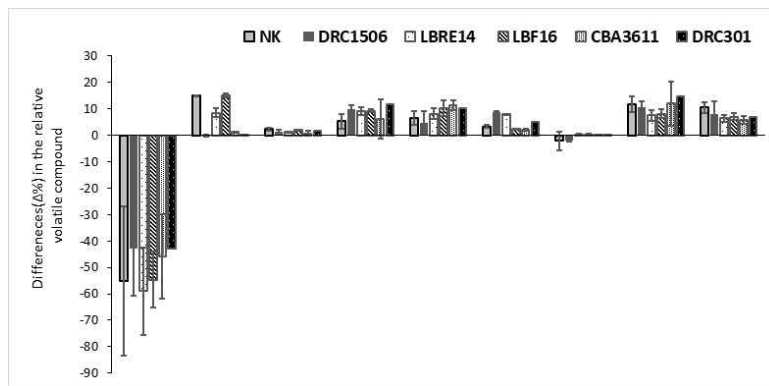


<그림3-65> 장 /간/정신 건강 유산균 스타터 나박김치 향기 화합물의 relative peak area(%)

- 향기 화합물의 비율은 이전보다 발효 후 현저하게 감소하였고, 특히 황 화합물의 비율을 크게 감소함. 황화합물 중 마늘 냄새가 나는 diallyl disulfide 와 allyl methyl sulfide 가 현저히 감소하였으며, 발효 후 DRC1506, CBA3611, DRC301 나박김치는 다른 스타터 나박김치보다 더 높은 황화합물을 나타내었고, CBA3611 나박김치에서 다른 스타터 나박김치보다 산이 더 많이 검출됨



<그림3-66> 자연발효와 스타터 (*Le. mesenteroides* DRC1506) 나박김치의 향기 화합물 증감률

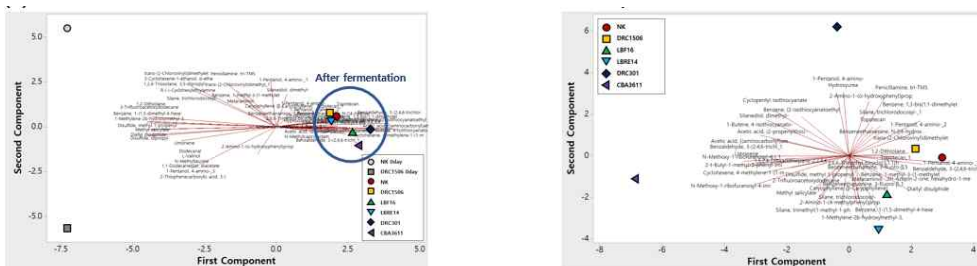


<그림3-67> *Le. mesenteroides* DRC1506와 장 /간/정신 건강 유산균 스타터 나박김치의 향기 화합물 증감률

- 자연발효와 DRC1506 휘발성 화합물을 비교하였을 때 자연발효 나박김치가 황화합물 비율이 줄었으며 질소화합물과 산이 DRC1506 보다 많이 생성되었고, Starter 나박김치를 자연 나박김치 발효 전과 비교하였을 때 LBRE16 나박김치의 황화합물 비율이 가장 많이 줄었으며, LBF16 나박김치는 질소 화합물 비율이 증가하고, DRC1506 나박김치가 산을 가장 적은 비율로 생산하였으며, DRC1506과 LBRE14 나박김치는 terpenes을 다른 starter 나박김치보다 많은 비율로 생산함

(A) Included before fermentation

(B) Only after fermentation



<그림3-68> 장/간/정신 건강 유산균 스타터 나박김치 향기 화합물 PCA 분석법

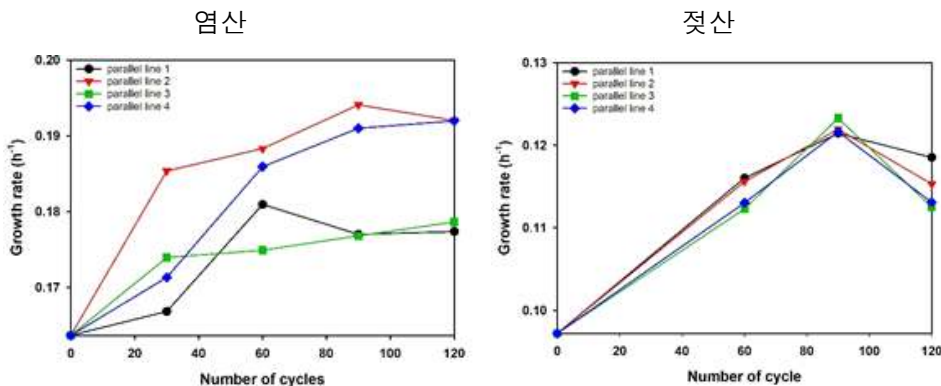
- 발효 전과 발효 후의 휘발성화합물은 확연한 차이가 있고, 스타터 유무에 따른 차이가 크며 스타터를 첨가한 나박김치는 마늘, 양파냄새를 가진 휘발성 화합물이 많이 검출된 경향을 보였으며, 발효 후에는 자연발효와 *Le. mesenteroides* DRC1506 나박김치의 휘발성화합물이 비슷하였으며, 그 다음으로 LBF16이 비슷한 경향을 보임

(11) DRC 1506 산업화 연구

○ 스트레스 환경 적응 진화

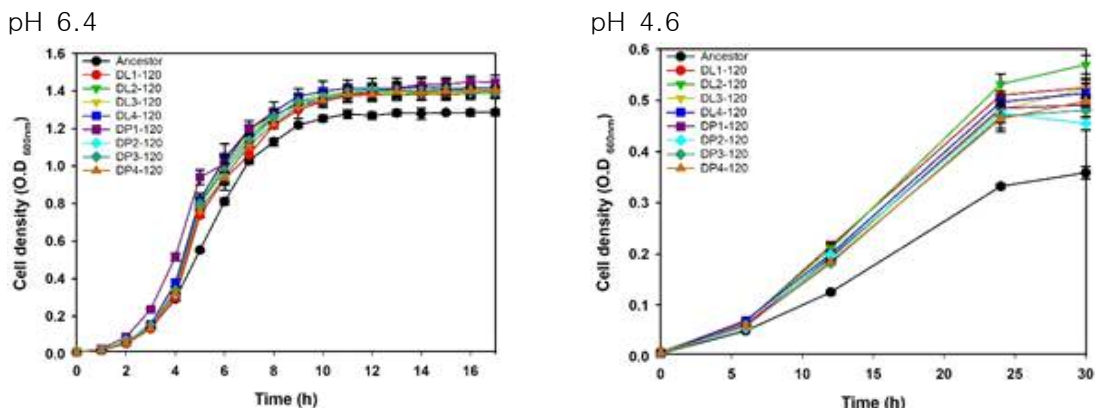
- 김치 스타터인 *Leuconostoc mesenteroides* DRC1506가 김치 발효 시 생기는 젖산 및 pH에 대한 스트레스 내성을 갖게 적응 진화 유도하여 김치의 저장 기간 동안 균의 생존력을 높이는 것이 목적임.
- 산 내성 적응 진화를 얻어진 균주의 cycle별 적응도 변화를 관찰하기 위해 젖산 4.6g/L를 첨가하거나 HCl로 pH 4.3으로 조정시킨 MRS 액체 배지에 균을 접종하고, 균이 접종된 배지를 96well 마이크로 플레이트에 한 well당 300ul씩 3번 분주하여 spectrophotometer를 통해 30°C로 배양하면서 600nm로 1시간마다 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성함. 이후 얻어진 성장곡선을 통해 균의 비성장속도를 측정하여 적응 정도를 확인함 또한 균주 간 차이를 비교하기 위해 pH 6.4와 pH 4.6으로 조정된 MRS 액체 배지에서 같은 방법으로 성장곡선을 측정함.
- 산 내성 적응 실험 결과, cycle에 따라 산 내성 균주의 적응도가 조상 균주 대비 적응도가 증가한 것이 확인되었으며 pH에 따라 최대 세포 농도의 차이를 보임.

① 적응도 변화



<그림3-69> pH 또는 젖산 내성 균주의 cycle별 적응도 변화(4반복)

② 성장곡선 변화



<그림3-70> pH 또는 젖산 내성 균주와 조상 균주의 성장곡선 비교

③ 산 내성 변화

- 각 스트레스 그룹에서 우수한 세포 농도 또는 적응도를 보였던 균주를 선발하여 조상 균주와의 산 내성을 측정함. 이를 위해 pH를 조절한 PBS에서 0, 90, 180분 처리한 샘플의 CFU를 측정하여 생존율을 비교함. 스트레스 강도와 처리 시간에 증가할수록 산 내성 균주의 생존율이 조상 균주와 비교하여 높은 것을 확인됨

<표3-24> pH 또는 젖산 내성 균주와 조상 균주의 산 내성 비교

Strains	Control	pH 4.0		pH 3.5		pH 3.0		pH 2.5	
		90m	180m	90m	180m	90m	180m	90m	180m
Ancestor	8.156 ± 0.122	8.378 ± 0.115	5.584 ± 0.182	7.372 ± 0.085	NG	4.109 ± 0.065	NG	NG	NG
DP2-120	8.465 ± 0.063	8.340 ± 0.103	8.279 ± 0.113	8.17 ± 0.068	4.927 ± 0.095	3.624 ± 0.109	NG	2.596 ± 0.073	NG
DL4-120	8.369 ± 0.083	7.754 ± 0.063	6.244 ± 0.118	7.289 ± 0.066	1.133 ± 0.084	2.492 ± 0.084	NG	0.667 ± 0.943	NG

④ 탄수화물 대사능 변화

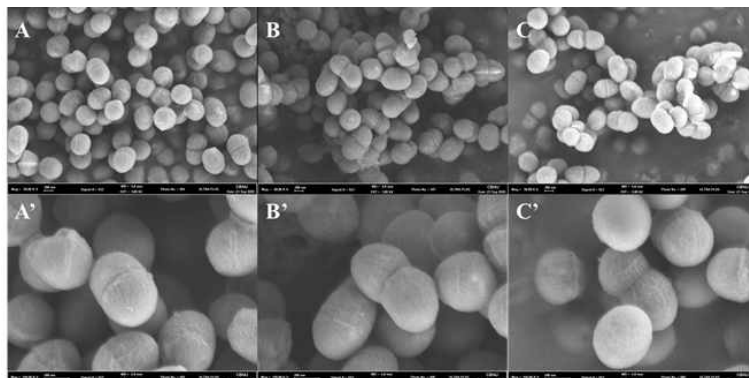
- 돌연변이가 되면서 신진대사의 변화가 있었는지 관찰하기 위해서 API 50CHL 키트를 사용하여 탄수화물 발효 패턴을 측정함. 48시간 결과, 모든 균주에서 동일한 발효 패턴이 관찰되었고, 예외적으로 젖산 내성 균주에서 탄수화물 대사 속도가 감소한 것을 확인됨.

<표3-25> pH 또는 젖산 내성 균주와 조상 균주의 탄수화물 대사능 비교

Strain	24 hour	48hour
Ancestor	+	+
DP1-120	+	+
DP2-120	+	+
DL4-120	-	+

⑤ 형태학적 변화

- 형태학적 변화를 분석하기 위해 주사 전자 현미경을 통해 산 내성 균주와 조상 균주의 형태와 표면을 비교 분석함. 비교 분석 결과, 조상 균주와 산 내성 균주의 형태에 특이적인 변화는 관찰되지 않음



<그림3-71> pH 또는 젖산 내성 균주와 조상균주의 표면 분석 (A-L. mesenteroides DRC1506, B-젖산 내성 균주, C-염산 내성 균주)

⑥ 유전자 변이

- 돌연변이를 통해 변이된 유전자를 분석하기 위해 산내성 균주로부터 gDNA를 추출하고, 이후 유전체 재분석 과정은 (주) Macrogen에서 수행함. 유전체 서열 분석은 Novaseq 6000을 이용하여 유전자 서열을 short read로 읽고, 원본 균주의 서열을 바탕으로 읽혀진 short read들을 aligning함. aligning된 염기 서열 단편들(contig)을 다시 원본 균주 서열 중 어느 위치에 있는지 mapping함. Aligning과 mapping에 사용하는 툴은 각각 BWA (v0.7.17)과 Sambamba (v0.6.8)를 사용함. 변이(Variants) 발굴을 위해 SnpEff (v4.3t) 툴을 사용하여 변이의 위치 및 변이에 영향을 annotation함. 발굴된 변이가 산내성에 미

치는 영향을 분석하기 위해 변이가 발견된 위치에 암호화된 단백질 서열을 NCBI의 Blast 검색을 통해 연관된 단백질들을 선별함

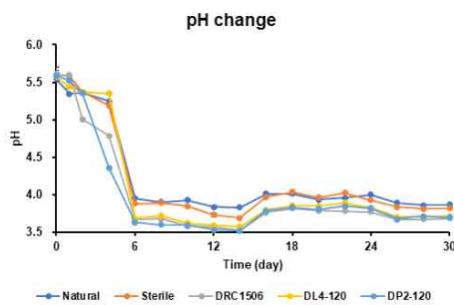
- 산 내성 균주 간에 변이된 유전 서열이 여럿 발견되었으며, 특히 산 내성에 연관된 것으로 알려진 수송 단백질 유전자와 막 단백질 조절 유전자에서 주로 변이가 발견됨

<표3-26> pH 또는 젖산 내성 균주의 유전자 변이

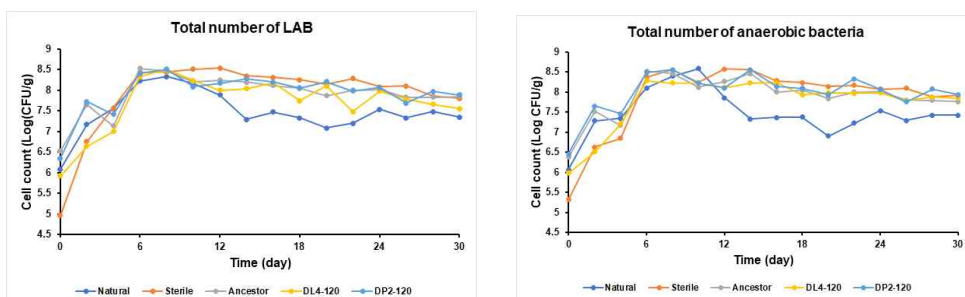
Chromosome	DP4-120-5		DP4-120-5		
	Annotation type	Protein	Annotation type	Protein	
Common	frameshift_variant	ABC transporter	frameshift_variant	ABC transporter	
	frameshift_variant	ATP-binding protein	frameshift_variant	ATP-binding protein	
	frameshift_variant	50S ribosomal protein L24	frameshift_variant	50S ribosomal protein L24	
	frameshift_variant	DUF3021 family protein	frameshift_variant	DUF3021 family protein	
	frameshift_variant&stop_gained	gluconate permease	frameshift_variant&stop_gained	gluconate permease	
	intra-genic_variant	gene-ARAO2_RS01205	intra-genic_variant	gene-ARAO2_RS01205	
	missense_variant	rRNA maturation RNase YbeY	missense_variant	rRNA maturation RNase YbeY	
	frameshift_variant&stop_lost	CPIP family intramembrane metalloprotease	frameshift_variant&stop_lost	CPIP family intramembrane metalloprotease	
	frameshift_variant&stop_gained	SPFH domain-containing protein	frameshift_variant&stop_gained	SPFH domain-containing protein	
	frameshift_variant	hypothetical protein	frameshift_variant	hypothetical protein	
	frameshift_variant	HAMP domain-containing protein	frameshift_variant	HAMP domain-containing protein	
	frameshift_variant	helix-turn-helix transcriptional regulator	frameshift_variant	helix-turn-helix transcriptional regulator	
	upstream_gene_variant	peptide ABC transporter substrate-binding protein	upstream_gene_variant	peptide ABC transporter substrate-binding protein	
	frameshift_variant&stop_lost	hypothetical protein	frameshift_variant&stop_lost	hypothetical protein	
	frameshift_variant	hypothetical protein	frameshift_variant	hypothetical protein	
	Individual	synonymous_variant	restriction endonuclease subunit 5	synonymous_variant	restriction endonuclease subunit 5
		missense_variant		missense_variant	
		missense_variant		missense_variant	
synonymous_variant		synonymous_variant			
synonymous_variant		synonymous_variant			
missense_variant		missense_variant			
frameshift_variant	hypothetical protein	synonymous_variant	hypothetical protein		
frameshift_variant	hypothetical protein	synonymous_variant	class III bacteriocin, lactobin A, cerein TB family		
missense_variant	AEC family transporter	stop_gained	hypothetical protein		
		frameshift_variant	hypothetical protein		
		conservative_inframe_deletion	signal recognition particle-docking protein FtsY		
pDRC1	frameshift_variant	CapA family protein			
	frameshift_variant	SHOCT domain-containing protein			
	frameshift_variant	hypothetical protein			

⑦ 김치 pH 및 생균수 변화

- 산 내성 균주의 김치 종균 사용 시 변화를 분석하기 위해 맛김치를 제조하여 약 10⁶/g으로 종균을 접종하여 30일에 걸쳐 비교 분석함
- 균주를 접종한 김치는 그렇지 않은 김치보다 pH가 더 낮게 측정되었고, 특히 산 내성이 우수했던 염산 내성 균주(DP2-120)가 조상 균주보다 더 빨리 pH가 감소된 것이 확인됨. 반면에 젖산 내성 균주(DL4-120)는 조상 균주에 비해 pH의 감소가 느려진 것으로 확인됨
- 생균수는 자연 김치에서 가장 먼저 감소되는 것이 확인됨. 반면에 살균 및 접종 김치에서는 비교적 느리게 생균수가 감소되는 것이 확인됨



<그림3-72> 산 내성 균주를 사용한 김치의 pH 변화



<그림3-73> 산 내성 균주를 사용한 김치의 생균수 변화

▶ ALE를 통한 균주의 산에 대한 내성을 향상시킬 수 있는 것을 확인했고, 개발된 위의 종균을 김치 종균으로 이용 시 생균수를 유지할 수 있을 것으로 예상됨

3-1-2. 제 1협동과제 수행 결과

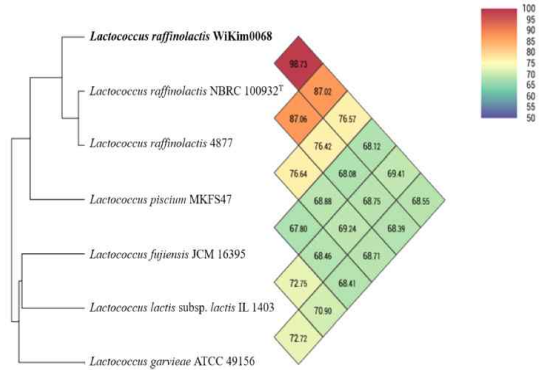
(1) 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 및 유전체 서열분석

○ 김치유산균 유전체서열분석 1 (*Lactococcus lactis* Wikim0068)

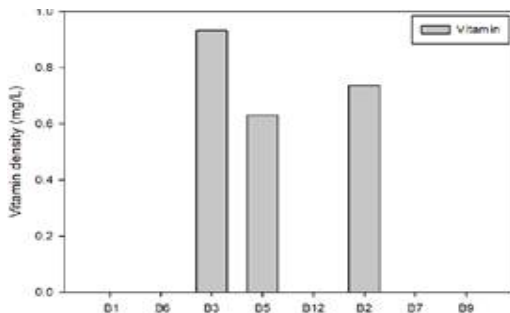
- 김치에서 분리된 유산균 중 다양한 종류의 비타민을 생산하는 기능성 균주를 선발. 그 결과, *Lactococcus lactis* Wikim0068균주를 선발할 수 있었고, 비타민 생성 및 다양한 탄소원을 이용한 대사경로를 유전체 분석을 통해 예측 및 검증할 수 있었음(Jung et al. BMC Microbiology (2020) 20:136, IF: 3.287)

	Strain		
	Wikim0068	4877	NBRC 100932 [†]
Assembly size (Mb)	2.29	2.28	2.18
DNA G + C content (mol%)	39.7	38.7	39.8
CDSs*	2187	2362	2123
Scaffolds	3	127	114
Genes	2258	2409	2141
Proteins	2123	2070	2030
rRNAs	13	12	2
tRNAs	55	48	29
Finishing quality	Complete	Scaffold	Contig

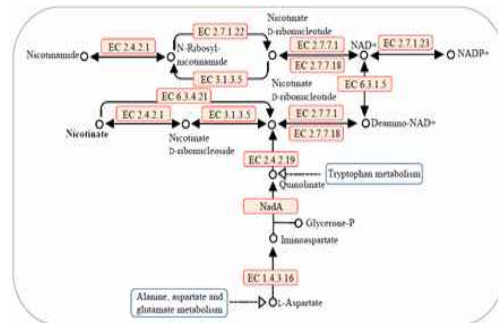
*CDSs Coding Sequences



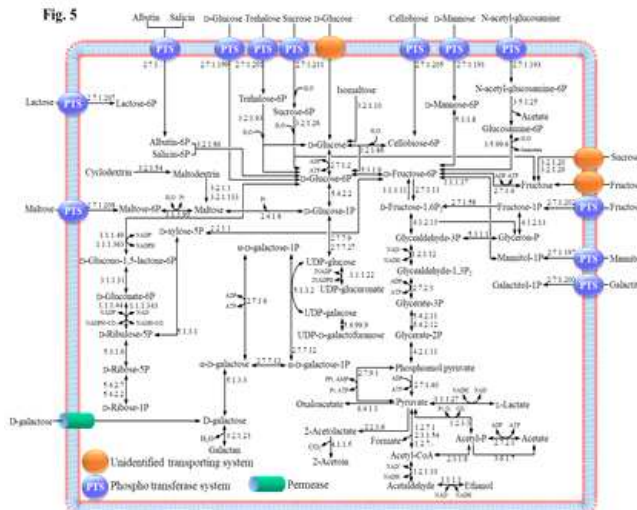
<그림3-74> *Lactococcus raffinolactis* 0068균주와 근연 종간의 비교유전체 분석



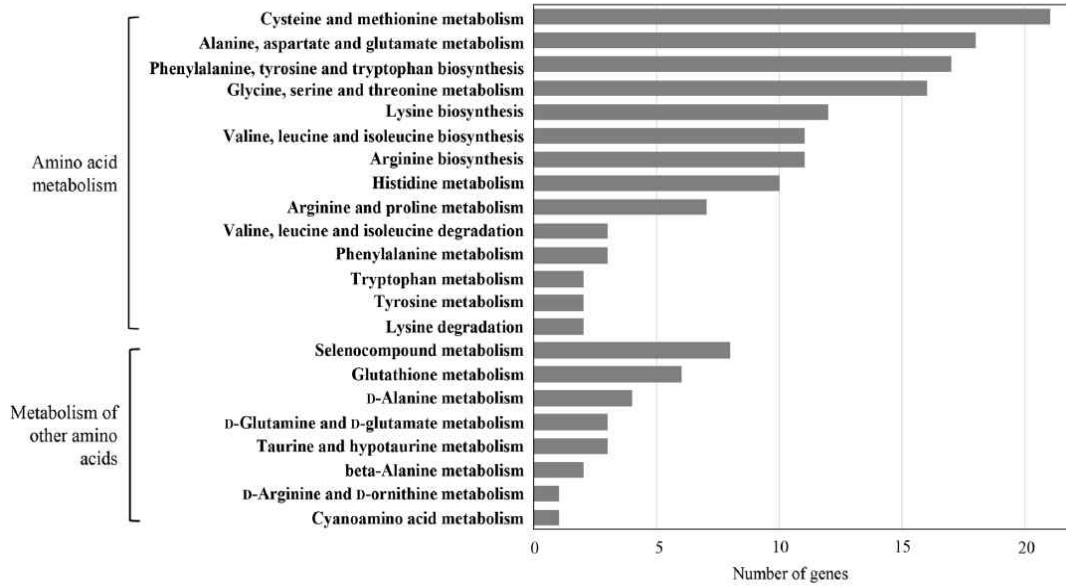
<그림3-75> *Lactococcus lactis* Wikim0068균주의 비타민 생산량



<그림3-76> 유전체 분석을 통한 *Lc. lactis* Wikim0068의 비타민 생산경로



<그림3-77> *Lactococcus lactis* Wikim0068균주의 다양한 탄소원에 따른 대사경로



<그림3-78> *Lactococcus lactis* WiKim0068균주의 아미노산 대사관련 유전자 분포

○ 김치유산균 유전체서열분석 2(*Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266 & *Lactobacillus brevis* DSR J301)

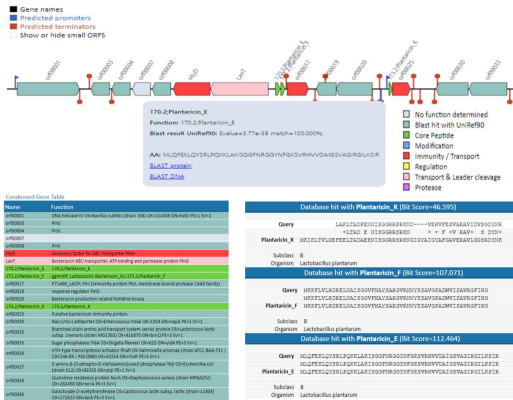
- (주)대상(제2협동)에서 균주의 유전체 정보를 전달받아 균주 안전성, 기능성 관련 분석을 실시함. 항생제 저항성 유전자는 두 균주 모두에서 확인되지 않았으며, bacteriocin 생산 관련 유전자는 *Lactiplantibacillus plantarum* J266에서 plantaricin K, plantaricin F, plantaricin E 유전자를 확인함

Summary <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR J266					
Filename	Date (UTC)	RGI Criteria	# Perfect Hits	# Strict Hits	# Loose Hits
Lpl266	May 14, 2021 05:48:25	Perfect, Strict, complete genes only	0	0	0

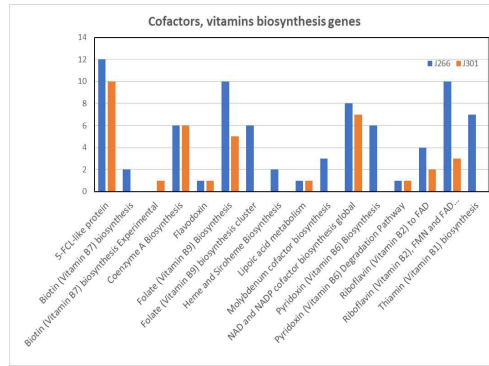
Summary <i>Levilactobacillus brevis</i> DSR J301					
Filename	Date (UTC)	RGI Criteria	# Perfect Hits	# Strict Hits	# Loose Hits
Lb301	May 14, 2021 06:10:55	Perfect, Strict, complete genes only	0	0	0

<그림3-79> *Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266, *Lactobacillus brevis* DSR J301의 항생제 저항성 유전자

- Cofactors, vitamins 생합성관련 유전자는 *Lactobacillus brevis* DSR J301보다 *Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266 균주에서 더 많이 확인할 수 있었는데, 주로 biotin(vitamin B7), folate(vitamin B9), coenzyme A, pyridoxin (vitamin B6), riboflavin (vitamin B2), thiamin (vitamin B1) 생합성 관련 유전자를 포함하고 있는 것으로 확인되었음

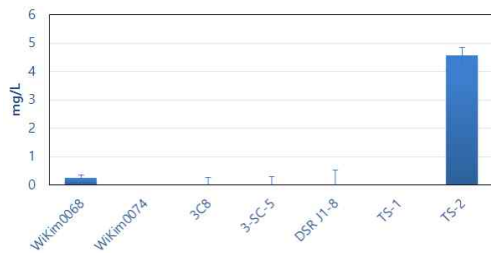


<그림3-80> *Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266의 Bacteriocin 생성관련 유전자

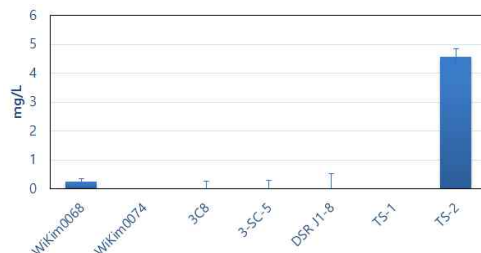


<그림3-81> *Lactiplantibacillus plantarum* DSR J266, *Lactobacillus brevis* DSR J301의 cofactors, vitamins 생합성관련 유전자

- 정신건강 도움을 위한 신경전달물질 생성 프로바이오틱스 균주선발
- 김치에서 분리한 유산균 중에서 whole genome sequencing 결과를 통해 얻어진 정보를 바탕으로 대표적인 신경전달물질로 알려진 GABA(gamma-Aminobutyric acid)를 생산하는 glutamate decarboxylase 유전자를 가지고 있는 2종의 균주를 1차 선발 (*Lactococcus affinolactis* Wikim0068, *Lactobacillus sakei* WiKim0074)
- 유전자 발현의 실제 검증 및 추가 균주 확보를 위해 GABA 검출키트(GABA ELISA Kit; OKEH02564)를 사용하여 배양액 중 GABA생산량을 측정. 확인결과, 유전체 상에서 glutamate decarboxylase를 가지고 있는 두 종의 균주 중 1종의 균주(*Lactococcus affinolactis* Wikim0068)에서만 생산을 확인할 수 있었으며, 추가적으로 GABA를 생산하는 1종류의 균주(*Lactobacillus paracasei* TS-2)를 확보할 수 있었음. 그중에서도 *Lactobacillus paracasei* TS-2는 GABA의 생산량이 48시간까지 증가하다가 생산량이 그 이후에는 유지되는 것을 확인
- 균주의 추가적인 신경전달물질 생성능 확인을 위해 taurine의 생산량을 검출키트(Cell Biolabs, Inc. Taurine Assay kit)를 사용하여 확인하였으며, 그 결과 taurine생산량이 높은 2종류의 균주 (*Lactobacillus sakei* WiKim0074, *Lactobacillus paracasei* TS-2)를 확인



<그림3-82> GABA생산 검증 확인



<그림3-83> Taurine생산 검증 확인

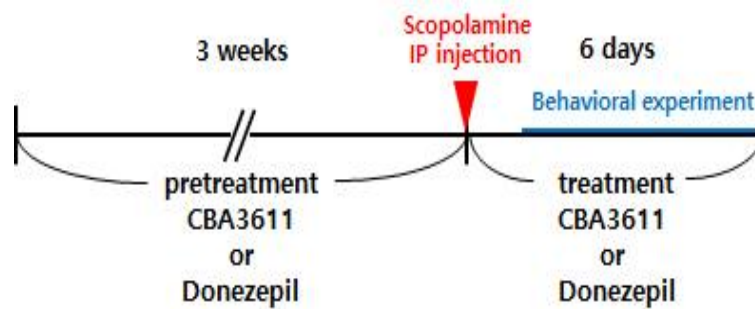
- *Lactobacillus paracasei* CBA3611에 의한 QGP-1(enterochromaffin 세포주 중 한 종류) 세포의 5-HT생성 유도 확인 및 트립토판 대사, serotonergic synapse관련 유전자의 발현 유도 확인을 통해 해당 균주의 신경전달물질 생성 유도 및 조절특성을 세포 수준에서 확인함. 이 같은 결과를 통해, CBA3611균주를 인지기능이 저해된 동물에게 처리 시 해당 균주로 인한 5-HT생성 및 이를 이용한 인지기능 회복을 기대할 수 있을지 확인하기 위해 실험을 동물실험을 수행함
- 2년차 연구에서에 발굴된 *Lactobacillus paracasei* CBA3611균주의 인지기능 개선 효과를 확인하기 위해 인지기능 손상 마우스 모델을 대상으로 실험을 진행함

- RNA sequencing으로 트립토판 유도 활성이 확인된 균주를 이용하여 인지기능 개선효과 확인을 위한 동물실험을 진행함. 총 20마리의 ICR 마우스를 5마리씩 임의로 4개의 그룹으로 나누고 었다. 그 중 첫 번째 그룹(G1)은 정상 대조군으로서 투여하고자 하는 유산균의 용매인 PBS(phosphate buffered saline)만 투여하였고, 나머지 세 그룹(G2-4)은 PBS와 인지기능저해에 사용되는 scopolamine을 2mg/kg씩 복강 투여하여 인지기능 손상을 유발함. 그 중 G2그룹은 오직 scopolamine만 투여하였으며(음성대조군), G3와 G4그룹은 손상된 인지기능 회복을 확인하기 위해 *Lactobacillus paracasei* CBA3611(실험군)과 donepezil(인지기능 회복에 사용되는 치료제 성분, 양성대조군)을 각각 투여하였음

<표3-27> 인지기능개선 기능성 프로바이오틱스 균주 특성분석 동물실험 군

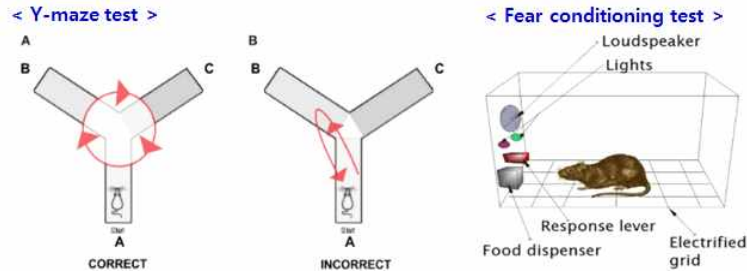
실험군	동물수
G1 PBS	정상대조군 5
G2 PBS + scopolamine	음성대조군 5
G3 PBS + scopolamine + <i>Lactobacillus paracasei</i> CBA3611	실험군 5
G4 PBS + scopolamine + donepezil	양성대조군 5

- 투여 방법은 실험 시작 후 3주간 유산균이나 donepezil을 경구 투여 하였으며, 4주차에 scopolamine으로 인지기능 저하를 유발 후 1주일간 다시 유산균이나 donepezil을 경구 투여 하였음. 이 기간동안 행동 실험으로 인지능력을 측정하였음. 실험 종료 후 마우스를 희생하고 뇌 조직 및 혈액 시료를 채취하여 -80°C에 보관하였음. (참고문헌: Mol. Cells 2015; 38(9): 796~805; Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(2), 363; Front. Pharmacol., 21 November 2017; Front. Pharmacol., 12 October 2018)



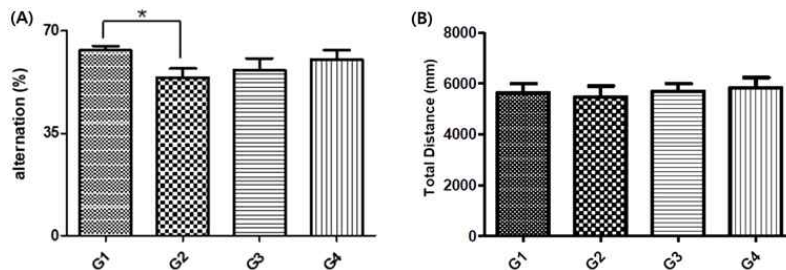
<그림3-84> 인지기능개선 기능성 프로바이오틱스 균주 특성분석 동물실험 과정

- 행동실험은 Y-maze, fear conditioning test를 수행함. 각각의 수행방법은 다음과 같음.
 - ※Y-maze test: 길이 30cm, 폭 3cm, 높이 10cm로 120도 각도인 3개의 미로를 A,B,C 구역으로 나눠 마우스의 이동을 10분간 관찰몸통 전체가 미로에 들어간 경우와 2초 이상 존에서 움직였을 때만 entry로 인정함. A,B,C 세 구역을 순서와 상관없이 한번씩 순차적으로 들어갔을 때를 alternation number로 세었고 전체 엔트리에서 2를 뺀 값으로 나누어 spontaneous alternation 값을 산출함.
 - ※Fear conditioning test: 암실의 상자에서 마우스를 200초간 가만히 두었으며 그 후에는 60초 간격으로 4번, 5초간 460Hz, 75db의 소리를 들려줌. 소리가 난 다음에는 바로 2초간 0.5mA 세기의 전류로 자극을 줌. 훈련을 시작한지 24시간 후에는 초반 200초간 contextual fear를 측정하였으며 240초간 전기 자극 없이 소리만 들려주며 tone test를 측정함



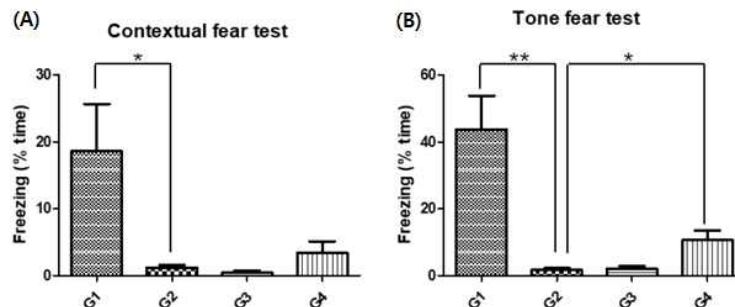
<그림3-85> 행동실험(Y-maze, fear conditioning)방법

- Y-maze 행동실험결과, 대조군(G1)군과 비교하여 scopolamine 투여군(G2)에서 인지능 저하가 유도되어 spontaneous alternation percent가 유의하게 감소함. CBA3611 투여군(G3)과 donepezil 투여군(G4)에서는 G2대비 회복한 결과를 확인할 수 있었지만, 통계적으로 유의하지는 않음. 모든 군의 이동 거리는 유의한 차이가 확인되지 않음



<그림3-86> Y-maze 행동평가결과. (A) Spontaneous alteration percent 결과; (B) 실험군 별 전체 이동거리

- Fear conditioning 행동평가 결과, 암실 공간을 기억하는 contextual fear test 에서 대조군(G1)과 비교하여 scopolamine 투여군(G2)에서 인지능 저하가 현저히 유도되어 freezing percent가 유의하게 감소함을 확인함. Donepezil 투여군(G4) 에서는 G2군에 비해 회복함을 확인할 수 있었으나, CBA3611 투여군(G3)에서는 효과를 확인할 수 없었음. 소리에 대한 기억을 검사하는 tone fear test에서도 역시 대조군(G1)군과 비교하여 scopolamine 투여군(G2)에서 인지능 저하가 유도되어 freezing percent가 유의하게 감소함을 확인함. CBA3611 투여군(G3)과 donepezil 투여군(G4)에서 G2대비 회복함을 확인함



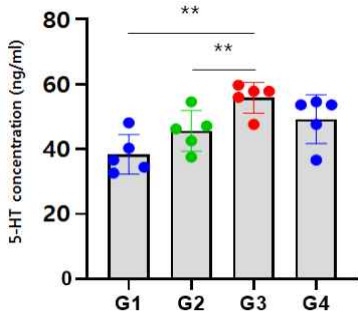
<그림3-87> Fear conditioning 행동평가결과. (A) contextual fear test 결과; (B) tone fear test

- 세 종류의 행동평가결과, contextual fear test를 제외한 나머지 Y-maze, tone fear test에서 CBA3611처리군이 G2군보다 유의적이지는 않지만 인지기능 저하가 회복됨을 확인할 수 있었음

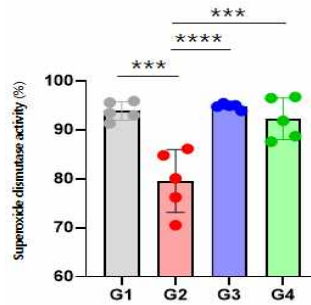
- 마우스 혈액 내 5-HT(5-hydroxytryptamine, serotonin) 측정(Mouse 5-HT ELISA Kit (CUSABIO) 사용) 결과, 세포수준 실험결과와 마찬가지로 CBA3611처리군(G3)에서 5-HT의

함량이 대조군(G1)대비 증가하였음

- 마우스 뇌의 해마(hippocampus)부분을 채취하여 조직 내 superoxide dismutase(SOD) 활성을 측정한 결과(Superoxide Dismutase Activity Assay kit 사용), 정상 대조군(G1) 대비 인지기능 저하군(G2)에서 현저한 활성감소를 확인할 수 있었으며, 유산균(G3)과, donepezil(G4) 투여로 인해 SOD활성이 회복하였음

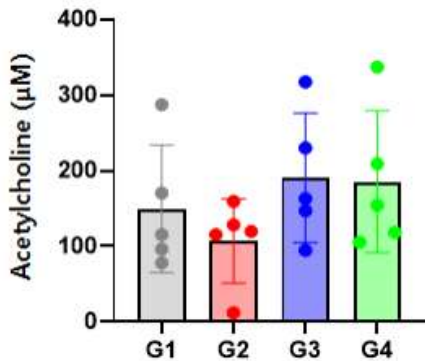


<그림3-88> 마우스 혈액 내 5-HT(5-hydroxytryptamine, serotonin) 측정 결과(The data were analyzed by using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. *P < 0.05, **P < 0.01)

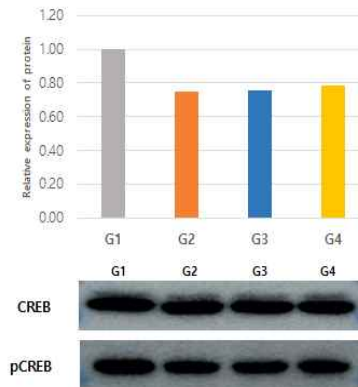


<그림3-89> 마우스 뇌의 해마(hippocampus) 조직 내 superoxide dismutase(SOD) 활성 측정 결과 (The data were analyzed by using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001)

- 마우스 뇌의 해마(hippocampus)부분을 채취하여 조직 내 신경 전달물질인 acetylcholine의 농도를 측정한 결과(Ampex® Red Acetylcholine Assay Kit 사용), 정상 대조군(G1) 대비 인지기능 저하군(G2)에서 현저한 감소를 확인할 수 있었으며, 유산균(G3)과, donepezil(G4) 투여로 인해 해마 내 acetylcholine농도가 증가함을 확인할 수 있음

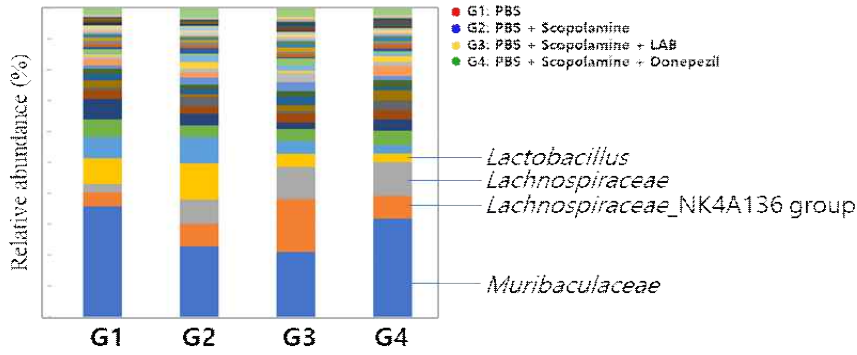


<그림3-90> 마우스 뇌의 해마(hippocampus) 조직 내 acetylcholine 농도 측정 결과

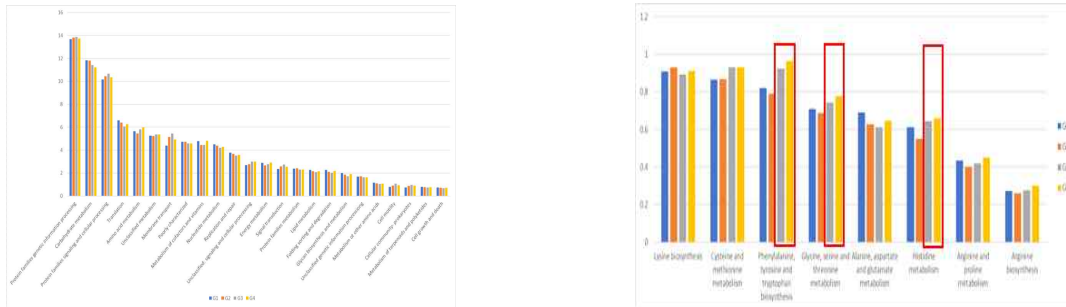


<그림3-91> 마우스 뇌의 해마(hippocampus) 조직 내 cAMP response element-binding protein(CREB) 발현 측정

- 인지기능개선 기능성 프로바이오틱스 균주를 이용한 동물실험 진행 후 분변 시료 내 미생물을 확인한 결과, 유산균 투여로 인해 양성대조군(donepezil)을 투여한 그룹보다 short-chain fatty acids (butyrate, acetate)를 생산하는 *Lachnospiraceae* 증가함. 또한 유산균과 양성대조군의 투여로 인해 tryptophan(serotonin 전구체)과 같은 아미노산 합성 관련 유전자가 증가함



<그림3-92> 인지기능 저하 유도 후 기능성 프로바이오틱스 균주 투여 시 장내 미생물 변화



<그림3-93> 인지기능 저하 유도 후 기능성 프로바이오틱스 균주 투여 시 장내 미생물 기능적 유전자 변화

- 기능성 프로바이오틱스 유전체 데이터베이스 구축
 - 대표적인 식품 및 인체유래 유산균 100종(*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*)을 선발하여 그들의 기능성 유전자를 확인함.
 - 기능성 유전자의 카테고리는 기능성 물질 생성, 스트레스 저항성, 장내 정착능 등으로 크게 3개로 분류. 세부적으로는 기능성 물질 생성(GABA, short chain fatty acid 생산 유전자), 스트레스 저항성(저온·저pH저항성 유전자), 장내 정착능(Exopolysaccharide 생산, sortase 유전자 등)관련 유전자들로 데이터베이스를 구축함. 본 내용을 아래의 표에 간단히 정리하였음 (표1). 앞으로 연차에 따라 분석할 유산균의 종류 및 기능성 유전자의 수는 계속 늘리면서 데이터베이스의 내용을 강화할 예정

<표3-28> 기능성 프로바이오틱스 유전체 데이터베이스 요약

유전자 종류		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Weissella</i>
기능성 물질 생산관련 (생산 물질)	Glutamate decarboxylase (GABA)		7	9			1	
	Acetate kinase (acetate)	10	97	24	34	4	10	6
	Butyrate kinase (butyrate)		25					
	Propionate kinase (propionate)	1						
장 정착능 관련	Exopolysaccharide biosynthesis protein		12	14	14		2	1
	LPXTG-motif cell wall anchor	37	354	77	23	6	46	1

	domain-containing protein							
	Sortase	35	138	32	58	2	11	8
	Teichoic acid	17	289	73	122	14	45	18
스트레스 저항성 관련	Cold resistance gene	5	15	4	13			4
	F0F1 ATPase		30		22			9

○ 알콜성 간손상 예방을 위한 프로바이오틱스 균주선발

- 김치 유산균의 알콜성 간손상 예방효과를 확인을 위해 마우스 알콜성 간손상 유도를 진행함. 실험에 이용한 김치 유산균은 1차 년도에 제 2협동에서 발굴한 균주 2종(*Lactobacillus plantarum* DSR J266, *Lactobacillus brevis* DSR J301)을 대상으로 실험을 진행함. 30마리의 C57BL/6N마우스를 5마리씩 임의로 4개의 그룹으로 나누었으며, 그중 3개의 그룹은 알콜이 포함된 식이(alcohol diet, AD)에 대조군으로 PBS를 투여하거나 실험군으로 유산균을 함께 투여하였다(AD+PBS, AD+2종 김치유산균 1×10⁹, AD + *Lactobacillus rhamnosus* GG 1×10⁹). 또 다른 대조군으로는 알콜이 포함되지 않은 식이에 PBS만 투여하였다(ND-PBS). 식이는 오전(10-11시)에 투여하였으며, 유산균은 오후(16-17시)에 투여함

Group	1week (양정화)	액체식이 적응기 (5 days, EtOH%)					유산균(10-11 am) 및 에탄올(4-5 pm) 액체식이 기간 (10 days, EtOH%)										에탄올 binge (5g/kg, 1기)	동물회상 및 AST, ALT 측정
		1d	2d	3d	4d	5d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d		
		Normal diet - PBS	0	0	0	0	0	200 µl PBS 투여 (10-11 am)										
Normal diet + L.p+L.b	0	0	0	0	0	L.p+L.b 1.5X10 ⁹ /200 µl 투여 (10-11 am)												
Normal diet - LGG	0	0	0	0	0	LGG 1.5X10 ⁹ /200 µl 투여 (10-11 am)												
EtOH diet - PBS	0	1.4	3.1	4.2	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5		
EtOH diet + L.p+L.b	0	1.4	3.1	4.2	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5		
EtOH diet - LGG	0	1.4	3.1	4.2	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5		
각 군별 식이량 (액체식이 11 ml/마리)																		

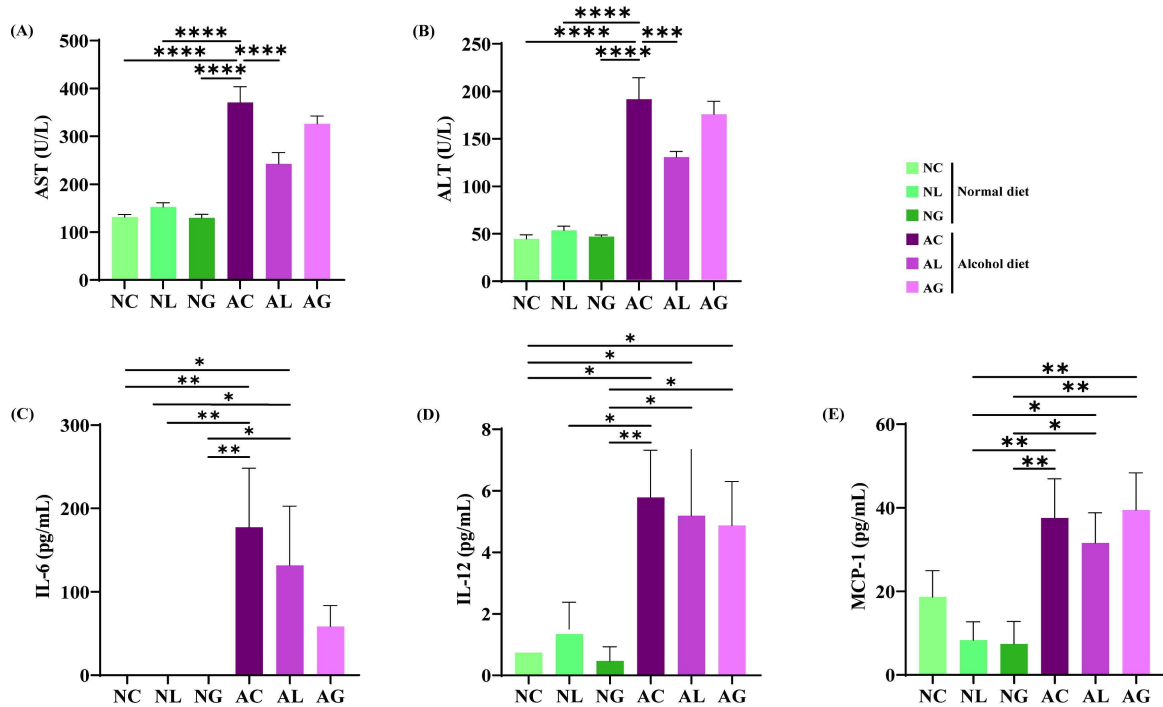


C57BL/6, male 5 weeks
 L.p + L.b : *Lactobacillus plantarum* 5 X 10⁹ + *Lactobacillus brevis* 5 X 10⁹ - (주)대상 간손상 예방 균주
 LGG : *Lactobacillus rhamnosus* GG 1 X 10⁹

<그림 3-94> 김치 유산균의 알콜성 간손상 예방 및 보호 기능성 확인 실험 계획

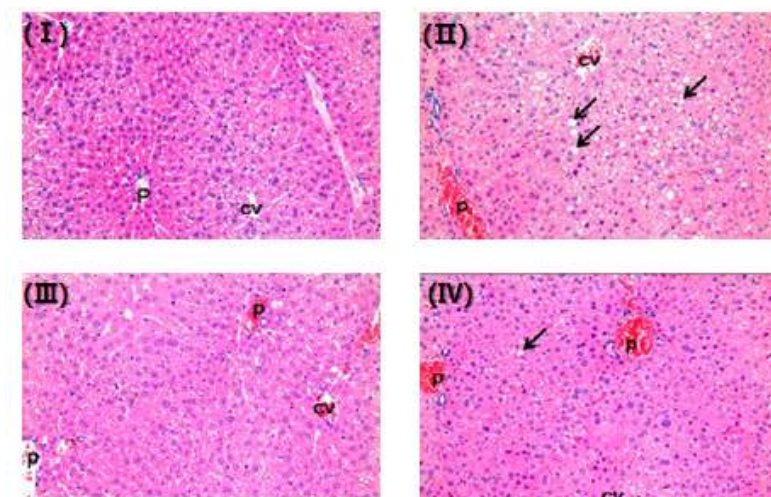
○ 알콜성 간손상 예방을 위한 프로바이오틱스 균주선발

- 알콜성 간손상 유도 후 혈액 내 간수치와 proinflammatory cytokine의 함량을 측정 한 결과, 정상군 대비 간수치(ALT, AST)가 유의적으로 증가하였고, 김치 유산균 섭취 후 감소한 것을 확인함. IL-6, IL-12, MCP-1과 같은 염증세포의 양을 측정하였고, 정상군 대비알콜 섭취 그룹에서 유의적으로 증가하였으며, 유산균의 섭취로 인해 감소한 것을 확인함



<그림3-95> 혈액 내 AST, ALT, IL-6, IL-12, MCP-1 함량

- 간조직에서의 지방침착은 시험물질에 따라 일정한 패턴으로 나타나게 되는데, 형태학적으로는 간세포질 내에 선명한 원형의 공포로 나타남. 본 시험의 경우 정상식이 대조군(NC)의 간조직에서는 정상적인 간 조직의 형태를 확인할 수 있었으나, 알콜 식이만 섭취한 대조군(AC)의 간은 지방 침착을 확인할 수 있었음. 알콜 식이만 섭취한 대조군의 간조직에서 관찰된 지방 침착은 주로 간문맥 구역과 중심정맥 사이에 위치하는 midzonal 구역에서 관찰되었으며, 화살표로 표시된 다수의 원형의 공포가 확인되어 뚜렷한 지방간 양상을 보여줌. 하지만 알콜 식이와 김치유산균을 함께 섭취한 군(AL)에서는 상대적으로 지방 침착정도가 완화된 것으로 확인되었으며, 알콜 식이와 *L. rhamnosus* GG를 함께 섭취한 군(AG)에서도 지방 침착이 확인은 되지만, AD-PBS군 비교하였을 때 상대적으로 완화된 것으로 확인됨

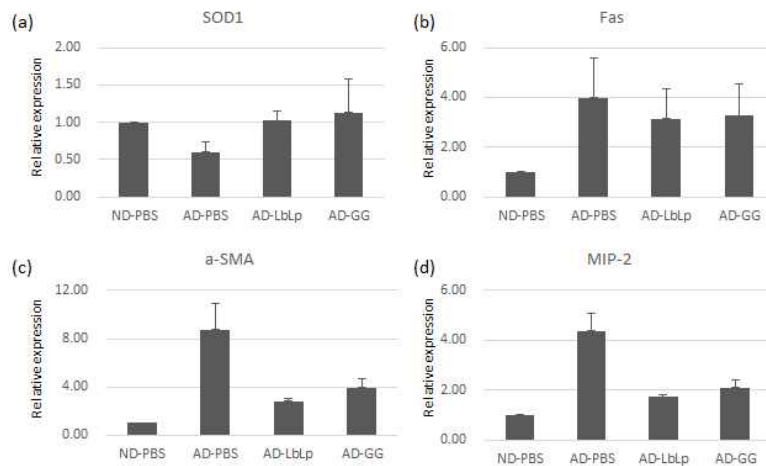


<그림3-96> H&E(hematoxylin and eosin)염색을 통한 간 조직내 지방 침착정도 확인

- 알콜 식이에 의해 마우스의 간손상이 일어남을 간수치 측정을 통해 확인할 수 있었으며, 2종의 복합 김치 유산균 (*Lactobacillus plantarum* DSR J266, *Lactobacillus brevis* DSR J301)에 의해 AST 효소의 수치가 상대적으로 감소함을 확인함. 하지만 ALT 효소의 수치는

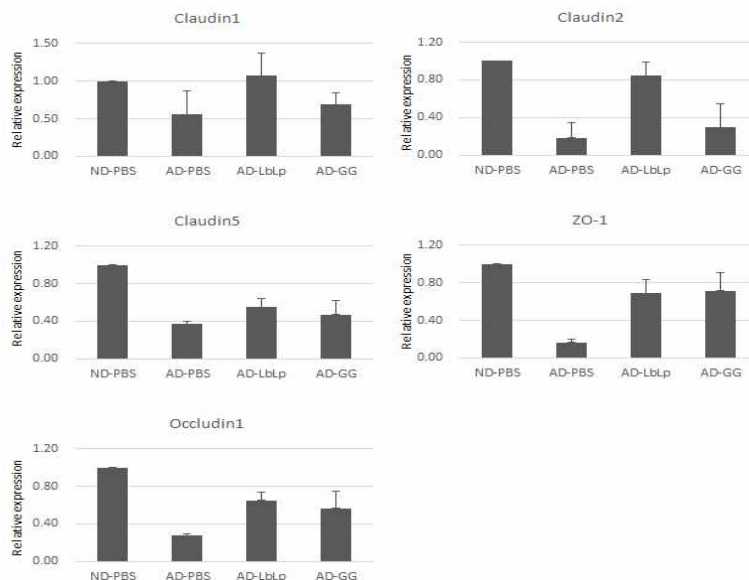
알콜 섭취군과 *Lb. plantarum* DSR J266, *Lb. brevis* DSR J301 복합 유산균 섭취 군간의 차이가 거의 없는 것으로 보아, 급성으로 유도한 간손상의 경우는 ALT 효소의 수치 변화에 영향을 끼치지 않았던 것으로 사료됨

- 간에서 산화적 stress를 감소시키는 SOD(Superoxide dismutase)의 발현양이 유산균 처리군에서 알콜을 투여한 대조군에 비해 상대적으로 증가함을 확인함. 뿐만 아니라 염증관련 cytokine의 수치 역시 유산균 처리군에서 상대적으로 감소함을 확인함. 알콜성 간손상을 일정 수준으로 방지하는 효과를 확인할 수 있었음



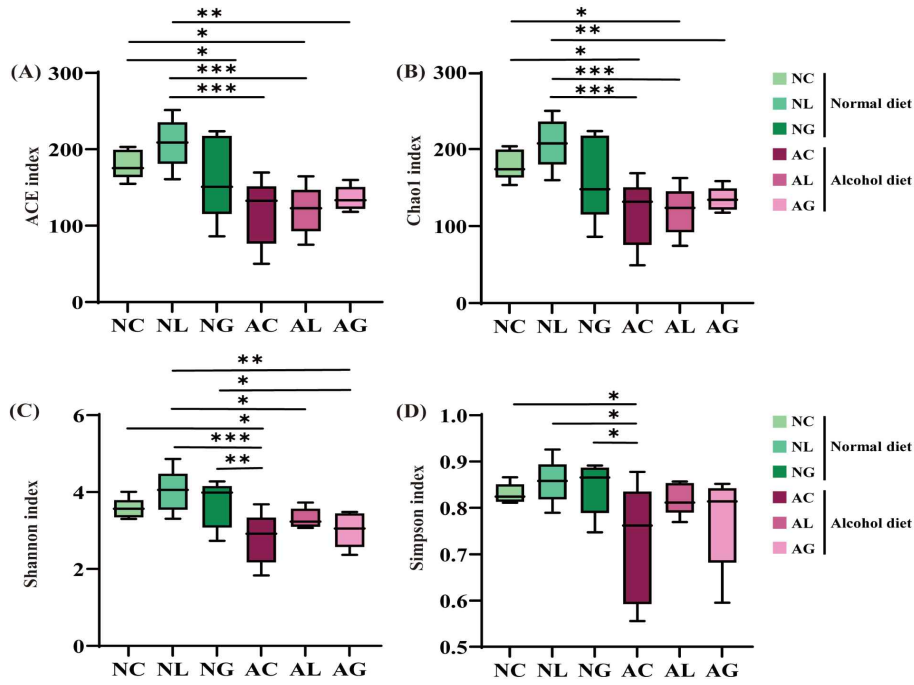
<그림3-97> 마우스 간에서의 염증 관련 유전자의 mRNA 상대적 발현 수준 (a) SOD(Superoxide dismutase), (b) fatty acid synthase, (c)α-SMA(alpha-smooth muscle actin), (d) MIP-2(Macrophage inflammatory protein-2)

- 장에서도 알콜 섭취로 인해 장의 상피세포간 연결을 하는 유전자(claudin, ZO-1, occludin)의 발현이 감소함을 확인할 수 있었고, 유산균의 섭취는 이를 회복시키는 결과를 확인하여 섭취한 유산균이 장 세포간 tight junction을 연결하는데 도움을 준 것으로 확인됨



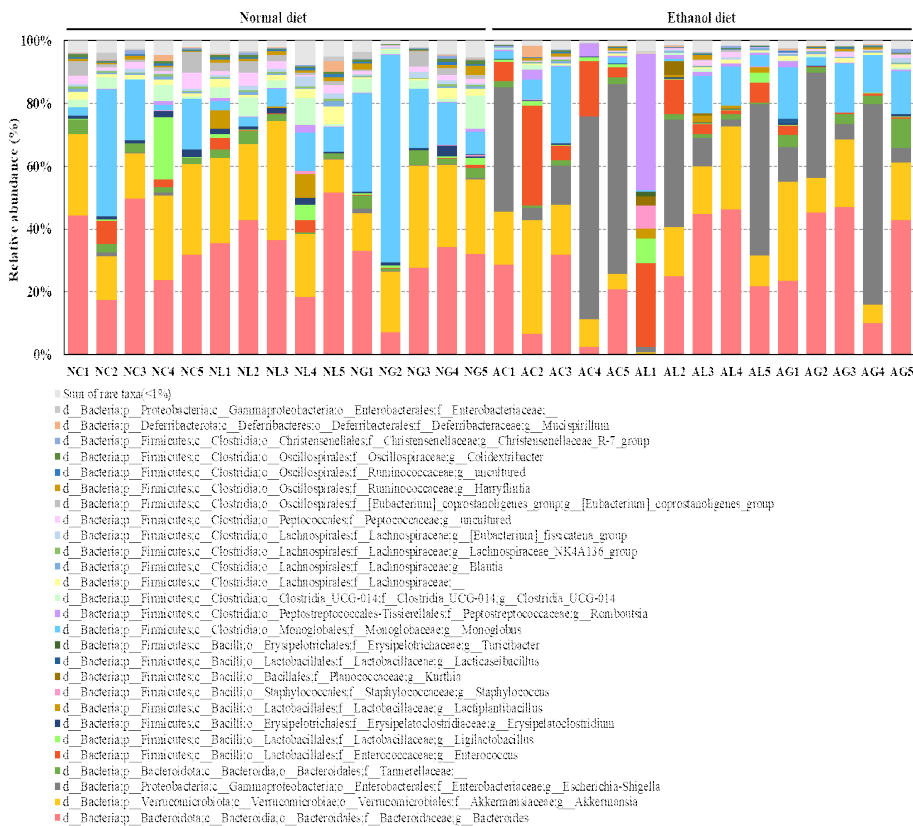
<그림3-98> 마우스 장에서의 tight junction관련 유전자(claudin, ZO-1, occludin)의 상대적 발현 수준

- 마우스 장내 미생물의 alpha-diversity를 분석함. ACE, Chao1를 이용하여 종 풍부도를, Shannon Simpson 종 균등도를 분석하였다. 그 결과 알콜을 섭취하지 않은 정상 식이군 대비, 알콜 식이군의 다양성은 현저히 감소하였으며, 유산균의 섭취로 미생물의 다양성이 회복됨

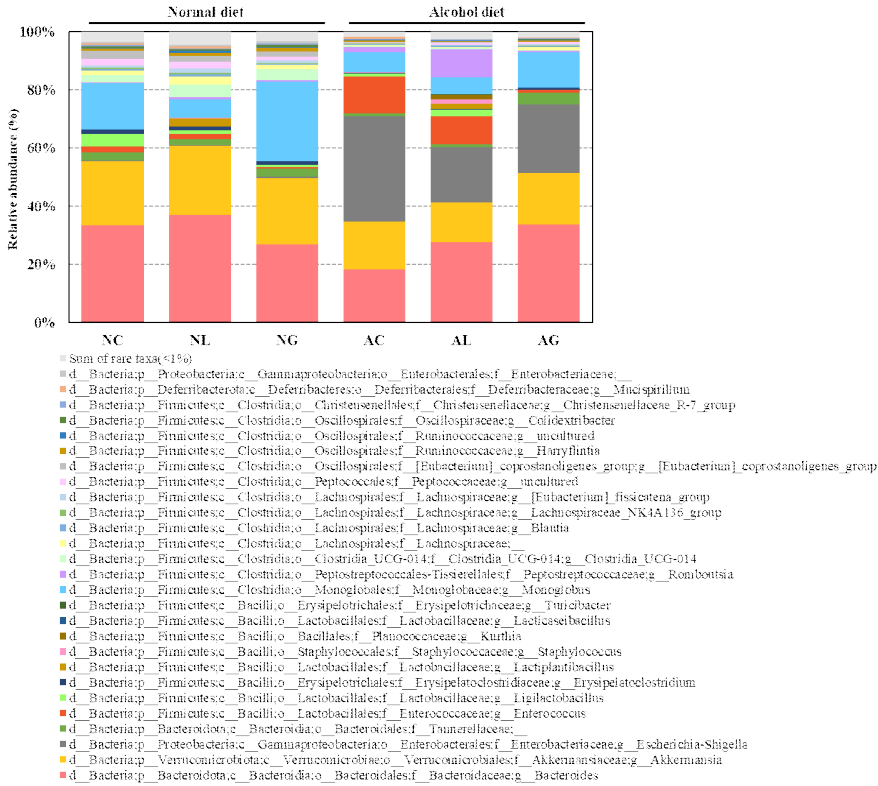


<그림3-99> 마우스 장내 미생물의 alpha-diversity 측정 (A)ACE, (B)Chao1, (C)Shannon, (D)Simpson

- 마우스 장내 미생물은 알콜 투여유무에 따라 뚜렷하게 미생물 군집양상이 달라지는 것을 확인할 수 있었고, 알콜 섭취 시 병원균에 해당하는 *Echerichia-Shigella*의 비중이 상대적으로 증가한 것을 확인할 수 있었으나, 유산균 섭취군에서는 *Echerichia-Shigella*가 감소함을 확인할 수 있었음. 투여한 유산균이 장내 미생물 균총을 조절할 수 있음을 확인함

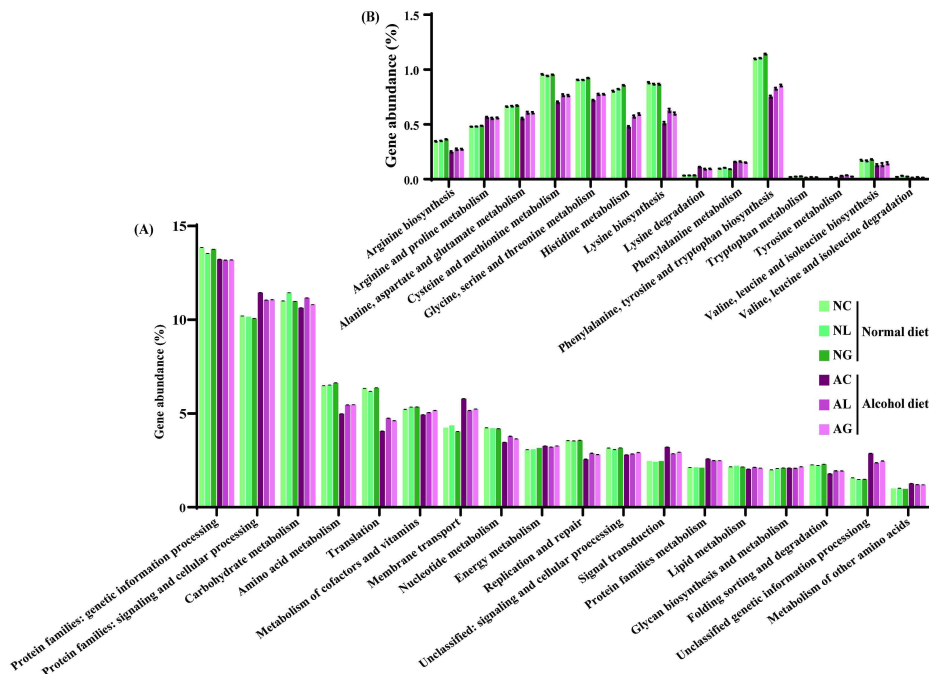


<그림3-100> 마우스 장내 미생물 군집분석 결과(시료별)



<그림3-101> 마우스 장내 미생물 군집분석 결과(시험군 별)

- PICRUSt(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)분석을 통해 마우스 장내의 전체미생물의 유전체를 유추한 결과, 알콜성 간손상 마우스의 장내에는 아미노산 대사(amino acid metabolism)의 유전자가 감소하였다. 그 중에서도 arginine, alanine, aspartate, glutamate, cystein, methionine, glycine, serine, threonine, histidine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan 생합성 관련 유전자의 수가 감소하였다. 유산균의 섭취는 감소한 아미노산 생합성, 대사 관련 유전자의 수가 증가함



<그림3-102> KEGG 카테고리별 유전자 분포. (A) secondary level, (B) tertiary level (아미노산 대사)

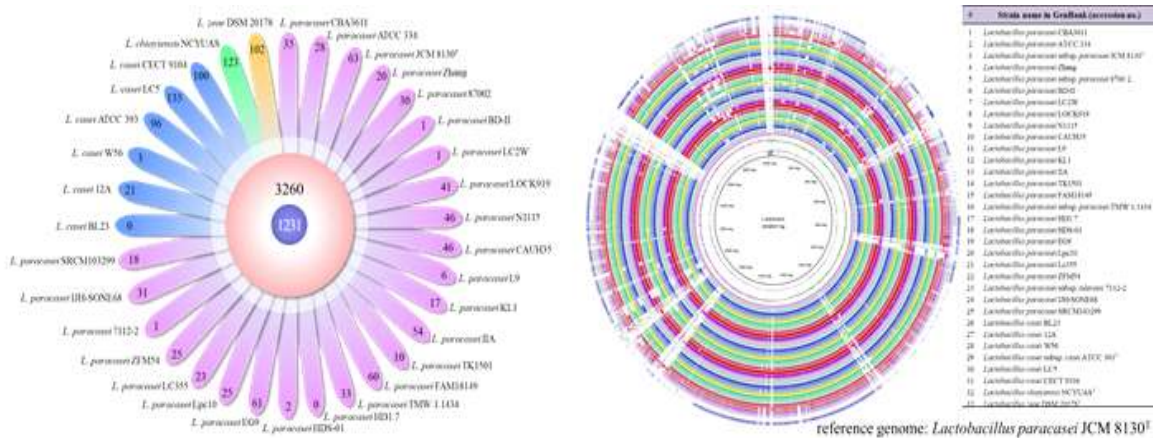
○ 유산균 유전체서열분석(*Lactobacillus paracasei* CBA3611)

- 장내 상피세포인 enterochromaffin cell과 유산균을 공배양(co-culture) 하여 세로토닌 생산을 유도하는 유산균을 선발함. 그 결과, *Lactococcus paracasei* CBA3611(Sc11), *Leuconostoc mesenteroides* CBA3628균주 2종을 선발함. 해당 균주는 각각 미생물 유전체 정보 자원관리시스템(iGEM.or.kr)에 등록 진행함



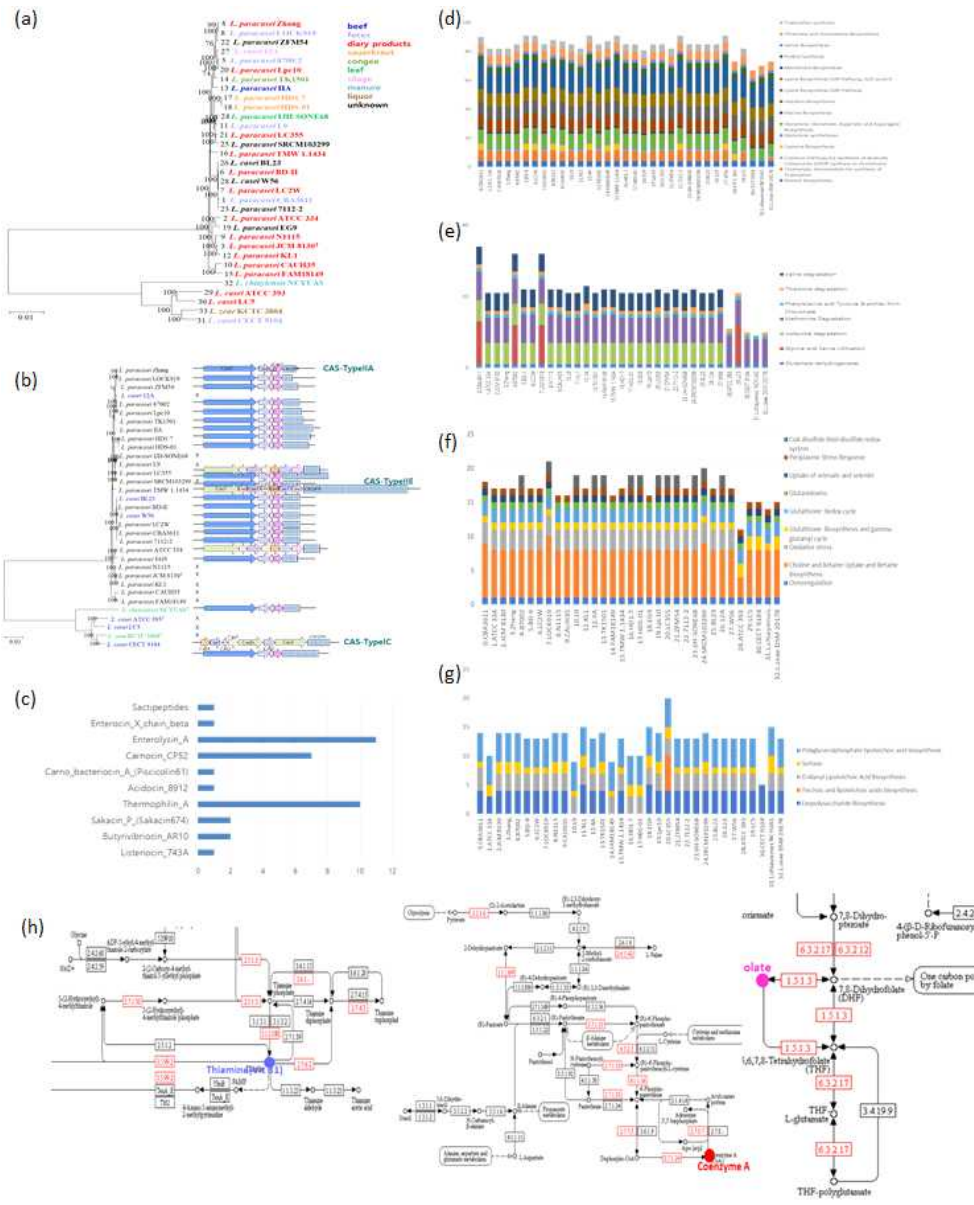
<그림3-103> 유산균의 세로토닌 유도능 측정

- 기능성을 예측하기 위해 *Lac. paracasei* CBA3611균주는 *Lac. casei* group 균주 32개와의 비교 유전체 분석을 실시함



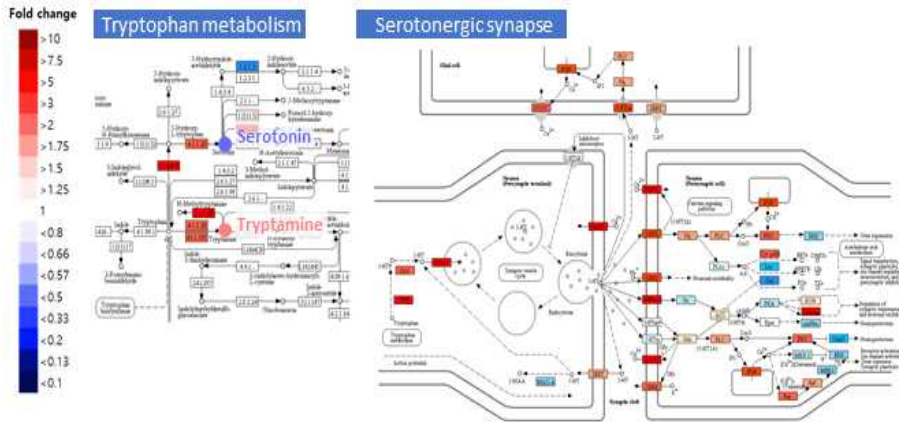
<그림3-104> *Lactobacillus paracasei* CBA3611균주를 포함한 33개 strain의 비교유전체 분석

- *Lactobacillus casei* group에 속하는 33개의 strain의 유전체를 취합하여 계통학적 분석, pan-, core-genome 분석, COG, SEED, KEGG 분석, 아미노산 생합성, 아미노산 분해, 스트레스(염도, 온도, 산화) 저항성, 비타민 생합성, 박테리오신 생성, CRISPR-CAS, 장 부착관련 유전자 보유 여부 확인 및 다양한 탄소원을 이용한 대사경로를 유전체 분석을 통해 예측하고 김치 종균 으로서의 가능성을 확인함



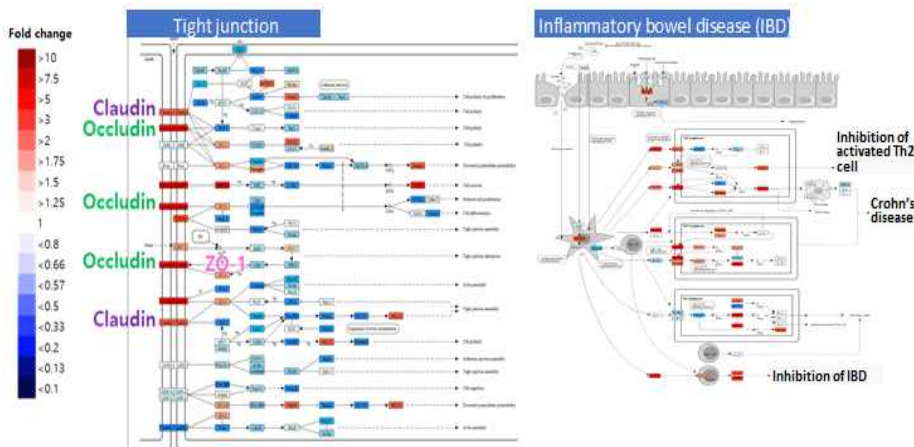
<그림3-105> *Lactobacillus paracasei* CBA3611균주의 기능성 유전자 보유여부 분석결과: (a) core-genome pyrogenetic tree, (b)CRSPR-CAS 유전자, (c) 박테리옌 유전자, (d) 아미노산 생합성 유전자, (e) 아미노산 분해 유전자, (f) 스트레스 저항성 유전자, (g) 장 부착관련 유전자, (h) 비타민 생합성 유전자

- Enterochromaffin(QGP-1) 세포를 이용한 RNA-seq 분석
 - *Lb. paracasei* CBA3611균주가 enterochromaffin(QGP-1)로 하여금 신경전달 물질인 세로토닌의 생산을 유도할 때 발현되는 QGP-1의 유전자를 확인하기 위하여 QGP-1세포에 CBA3611균주의 세포파쇄물, 배양 상등액 (균주제거), 살아있는 균주, MRS 배지를 처리한 다음 일정시간이 지난후에 QGP-1세포를 회수함. 회수한 세포의 RNA를 추출하고 RNA-sequencing 및 유산균에 의해 발현이 유도된 유전자를 확인함
 - 세로토닌뿐만 아니라, 또 다른 신경전달물질인 tryptamine을 생산하는 유전자의 발현이 유도됨을 확인함. 특히 배양 상등액이나 세포 파쇄액 보다 살아있는 균주를 처리하였을 경우에 더욱 높게 유도됨. 또한 세로토닌을 생성하여 다음 신경세포로 전달하는 시냅스 소포(vesicular monoamine transporter)의 발현도 증가하며, 생성된 세로토닌을 전달받아 재 흡수하는 유전자의 발현역시 증가함. CBA3611균주의 신경전달물질 생산 및 조절의 역할을 확인하는 것을 통해 잠재적 정신건강 기능성 프로바이오틱스로서의 가능성을 검증함



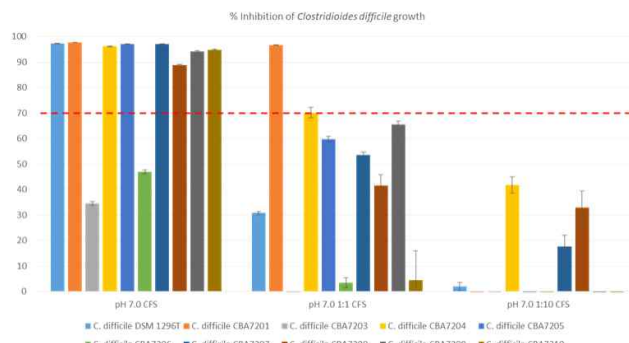
<그림3-106> *Lactobacillus paracasei* CBA3611에 의한 QGP-1 세포의 트립토판 대사 및 serotonergic synapse관련 유전자의 발현 유도확인

- 장 건강 관련 기능에서도 CBA3611균주의 장 누수 증후군(leaky gut syndrome)과 염증성 장질환 예방효과를 확인함. 장 상피세포 사이를 연결하는 tight junction protein(claudin, occludin, ZO-1)의 발현이 증가하고 염증성 장질환의 억제와 관련된 IL-10 cytokine의 발현이 증가하였으며, 크론병으로 진행되는 염증성 cytokine의 생산관련 유전자 발현이 감소됨을 확인함. 이것을 통해 CBA3611균주의 잠재적 장건강 기능성을 예측함



<그림3-107> *Lactobacillus paracasei* CBA3611에 의한 tight junction, 염증성 장 질환 관련 cytokine 생산 유전자의 발현정도 확인

- 장내 염증을 일으키는 병원균인 10종의 *Clostridioides difficile* strain에 대한 *L. paracasei* CBA3611의 성장 저해활성 확인함. *L. paracasei* CBA3611균주의 배양액을 pH7.0으로 조정하고 10종의 *Clostridioides difficile*균주 중 8종의 균주에서 항균활성을 확인함



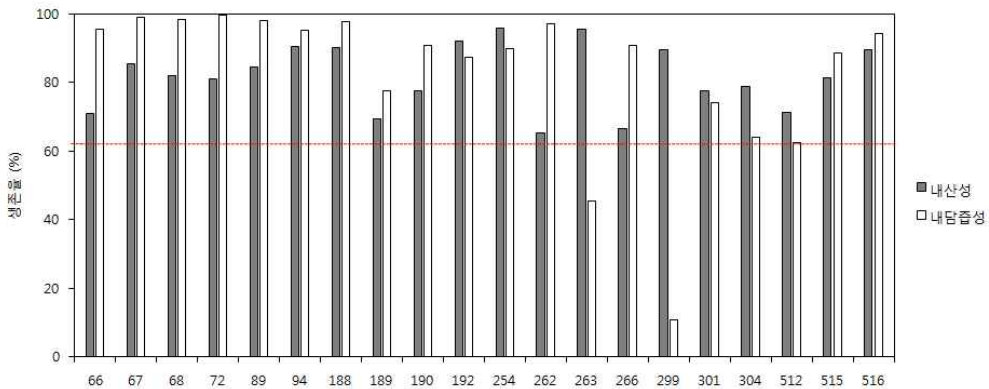
<그림3-108> *L. paracasei* CBA3611의 *Clostridioides difficile*에 대한성장 저해활성 측정

3-1-3. 제 2협동과제 수행 결과

(1) 프로바이오틱스 우수 후보 발굴

○ 김치 유래 유산균 분리 및 내산성, 내담즙성 균주를 선별

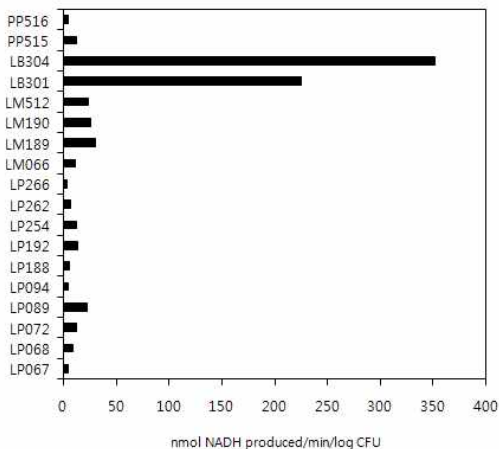
- 시판 김치, 재래식 김치, 별미 김치 등 다양한 김치로부터 MRS배지를 이용하여 500종 이상의 유산균을 분리하였고, 내산성, 내담즙성 활성이 우수한 균주를 분리하여 장내 환경에 적합한 유산균을 선별하고자 함
- pH 3.0, Oxgall 1%를 각각 2시간씩 처리하여 생존률 60% 이상의 내산성, 내담즙성 균주 18종을 선별함



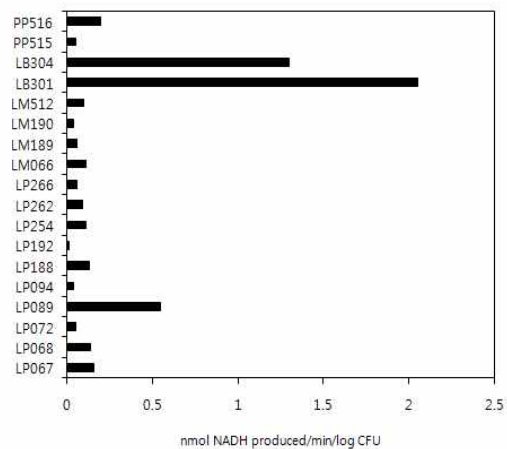
<그림3-109> 내산성, 내담즙성 유산균선별 결과

○ 간기능 개선 유산균 선별

- 효소 활성을 측정법을 이용하여 alcohol dehydrogenase 및 acetaldehyde dehydrogenase 활성이 뛰어난 균주를 선별하여 알코올 분해 도움을 줄 수 있는 유산균을 선별하고자 함
- 알코올 유도성 간질환 세포 모델에서 염증성 사이토카인 억제능이 우수한 균주를 선별하여 알코올성 간질환 개선 효능 유산균을 선별하고자 함
- 알코올을 기질로 하여 NAD 환원정도를 측정하여 alcohol dehydrogenase 활성이 우수한 균주 *Lactobacillus brevis* 301, 304 2종을 선별하였음
- 아세트알데하이드를 기질로 하여 NAD 환원정도를 측정하여 acetaldehyde dehydrogenase 활성이 우수한 균주 *Lactobacillus brevis* 301, 304, *Lactobacillus plantarum* 89 3종을 선별하였음

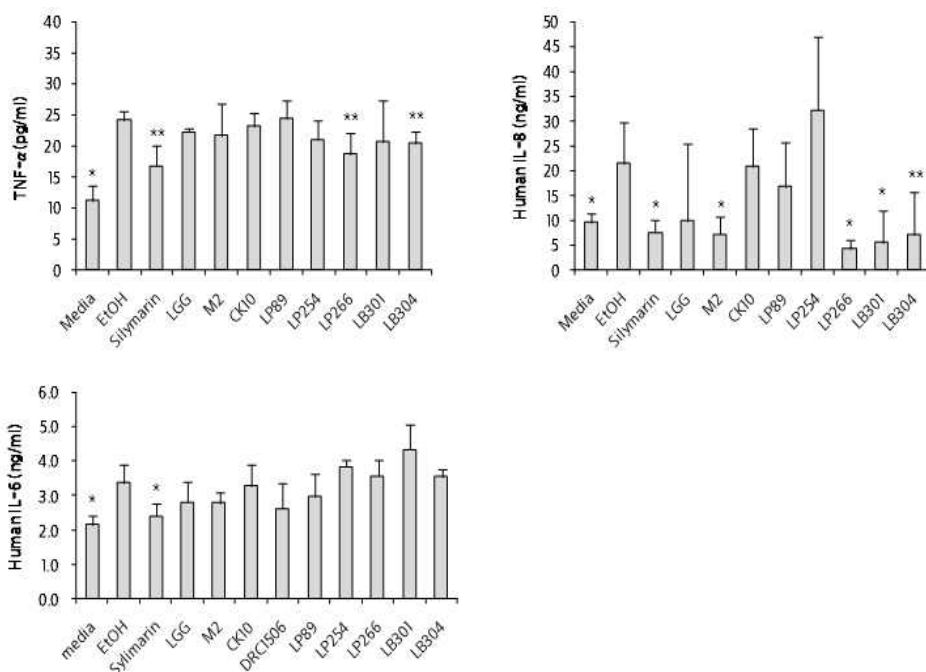


<그림3-110> alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 측정 결과



<그림3-111> acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정 결과

- HepG2 세포에 알코올을 처리하여 유도된 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6, IL-8의 억제 정도를 측정 하여 알코올성 간질환에 개선 효능 후보 균주 *Lactobacillus plantarum* 266, *Lactobacillus brevis* 301 2종을 선별하였음



<그림3-112> 간세포 내 알코올 유도 염증성 사이토카인 억제능 측정 결과

○ 간건강 기능성 유산균 2종 전장 유전체 분석 및 NABIC 등록

- 간건강 기능성 후보 균주 *L. brevis* DRC301 및 *L. plantarum* DSR266 균주 전장 유전체 분석

<표3-29> *L. plantarum* DSR266 of overall mapping stats and result of assembly: 5 contigs were formed

Library name	Total reads	Mapped reads	Coverage (%)	Depth	Ins.size (Std.)
Lb-DSR-J266	10,228,244	10,226,045 (99.98%)	100.00	433.78	469.35 (102.93)

Contig name	Length	GC (%)	Depth	Circular	Alias
contig1	3,257,032	44.52	142	YES	Chromosome1
contig2	50,514	39.02	211	YES	Plasmid2
contig3	48,900	38.73	219	YES	Plasmid3
contig4	11,203	36.96	41	YES	Plasmid4
contig5	9,007	36.62	78	YES	Contig5
Total	3,376,656	44.31	143		

<표3-30> *L. brevis* DRC301 of Overall mapping stats and Result of assembly: 5 contigs were formed

Library name	Total reads	Mapped reads	Coverage (%)	Depth	Ins.size (Std.)
Lb-brevis-301	7,296,984	7,214,653 (98.87%)	100.00	419.09	424.35 (89.95)

Contig name	Length	GC (%)	Depth	Circular	Alias
contig1	2,357,971	46.03	182	YES	Chromosome1
contig2	57,669	39.63	86	YES	Contig2
contig3	37,378	39.04	38	YES	Plasmid3
contig4	28,914	40.41	48	YES	Contig4
contig5	24,678	39.31	45	YES	Contig5
contig6	18,211	36.15	142	YES	Plasmid6
Total	2,524,821	45.58	174		

(2) 후보균주 생산기술 최적화

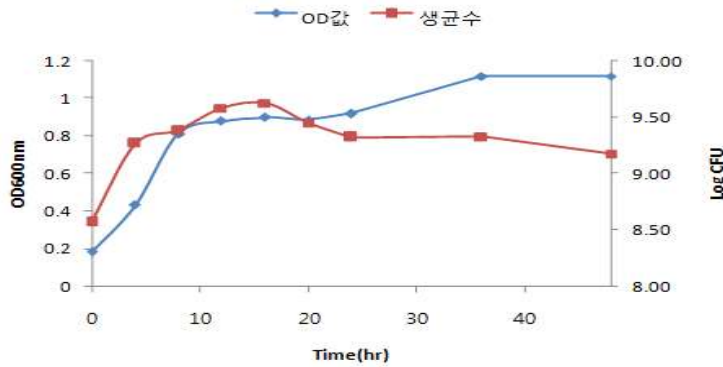
○ 간기능 개선 균주 최적 배양조건 수립

- 선별한 간개선 효능 유산균의 최적 배지 조성을 개발하기 위하여 MRS 배지를 변형하여 최적 발효배지 조성을 개발 함

<표3-31> *L. brevis* 301 생육 테스트 결과

	MRS	M1	M2	M3	M4
12H	2.20E+09	8.00E+08	2.50E+09	3.50E+09	1.20E+09
24H	9.80E+08	7.20E+08	1.10E+09	1.29E+09	9.40E+08

- 간 개선 효능이 우수한 *L. brevis* 301을 MRS배지와 MRS 변형 배지 4종에서 배양한 결과 M3 배지에서 성장률 높게 나타남 (배지조성 대외비)
- M3 배지에서 36℃, 48시간 동안 *L. brevis* 301의 생육 곡선을 확인 한 결과 16시간 배양 시 최대 증식하였음



<그림3-113> M3 배지에서의 *L. brevis* 301 생육 곡선

(3) 간기능 후보균주 종균 특성 분석

○ 간건강 후보 균주 2종 적용 맛김치 관능 평가

- 간건강 후보 균주 2종 *Lactobacillus plantarum* DSR J266, *Lactobacillus brevis* DSR J301을 맛김치의 스타터로 첨가하여 숙성 시킨 후 11명을 대상으로 비교 관능 평가를 실시함
- 5점 척도로 전반맛, 신맛, 단맛, 짠맛, 외관, 이미/이취 6개 항목의 선호도를 조사한 결과 전반맛, 이미/이취에서 *Lactobacillus plantarum* DSR J266에 비하여 *Lactobacillus brevis* DSR J301의 선호도가 우위적으로 나와 맛김치의 스타터 후보 균주로 *Lactobacillus brevis* DSR J301을 선발함

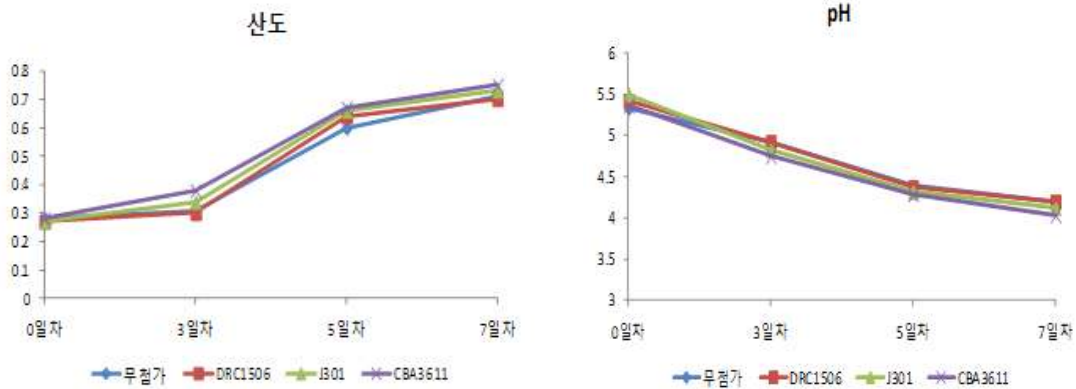
<표3-32> 간건강 후보 균주 2종 비교 관능 평가 결과

	전반맛	신맛	단맛	짠맛	외관	이미/이취
266	3.27	3.55	3.18	3.00	3.55	2.64
301	3.91	3.64	3.36	2.82	3.64	3.27

○ 간, 정신 건강 후보 균주 맛김치 내에서의 발효 특성 비교

- 간건강 후보 균주 2종 중 관능이 우수한 *Lactobacillus brevis* DSR J301와 세계김치연구소에서 선발한 정신 건강 후보 균주 *Lactobacillus paracasei* CBA3611을 맛김치의 스타터로 첨가하여 증가집 스타터 균주 *Leuconostoc mesenteroides* DRC1506 균주와 발효 특성을 비교 함

- *Leuconostoc mesenteroides* DRC1506(기존), *Lactobacillus brevis* DSR J301(간), *Lactobacillus paracasei* CBA3611(정신)을 각각 스타터로 접종한 맛김치와 스타터를 첨가하지 않은 맛김치를 제조하여 10℃에서 보관 후 산도, pH를 측정하여 발효 속도를 비교한 결과 세균주 모두 차이 없음



<그림3-114> 10℃보관 산도, pH 측정 결과

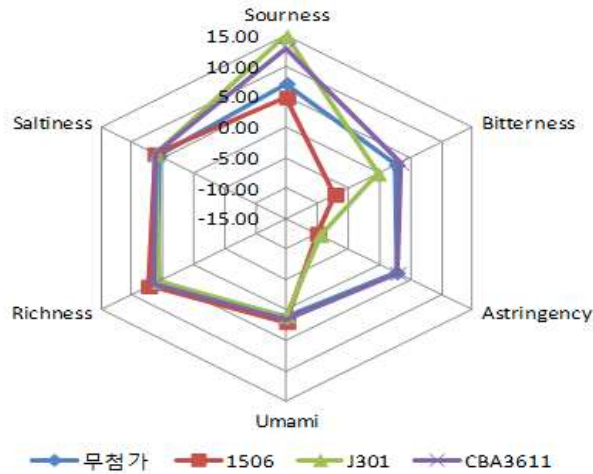
- 기능성 후보 간기능, 장건강 균주 맛김치 배합비 개발 및 시제품 제작
- 기능성 후보 균주 2종을 각각 스타터로 적용한 최적 맛김치 배합비 개발(대외비)
- *Leuconostoc mesenteroides* DRC1506(기존), *Lactobacillus brevis* DSR J301(간), *Lactobacillus paracasei* CBA3611(정신)을 각각 스타터로 접종한 맛김치와 스타터를 첨가하지 않은 맛김치를 제조하여 적당히 숙성(산도 0.65)시킨 후 맛테스터기(Insert TS-5000Z)를 측정한 결과 신맛(Sourness), 쓴맛(Bitterness), 떫은 맛(Astringency)에 대하여 *Leuconostoc mesenteroides* DRC1506(기존)를 스타터로 사용한 맛김치가 다른 맛김치에 비하여 우위로 나타남. 반면 스타터 무첨가 군과 *Lactobacillus paracasei* CBA3611(정신) 접종한 맛김치가 쓴맛(Bitterness), 떫은 맛(Astringency)이 비교적 높게 나타나 다른 두 김치보다 관능 품질이 떨어짐



[*Lactobacillus brevis* DSR J301]

[*Lactobacillus paracasei* CBA3611]

<그림3-115>기능성 후보 균주 적용 맛김치 시제품

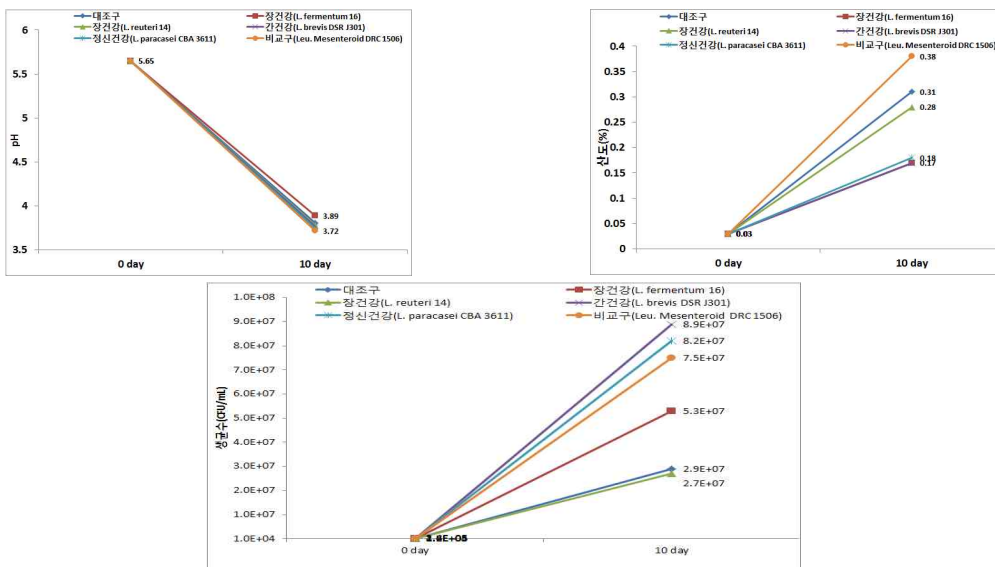


<그림3-116> 스타터 별 숙성 맛김치 맛테스기 측정 결과

(4) 기능성 유산균 적용 김치 개발 및 발효 품질 안정화

○ 나박 물김치를 이용한 각 기능성유산균 김치제조 품질 모니터링

- 나박물김치를 활용한 장건강/간건강/정신건강 유산균 별 발효/숙성 비교
- 기능성 유산균 별로 나박물김치 접종 후 발효/숙성 결과 분석 대조구(유산균 무첨가) 대비 유산균 첨가구들에서 공통적으로 정상발효가 진행되었으며, 발효패턴 은 장건강(*L. fermentum* 16)이 가장 느리게 나타났음. 비교구로 사용한 DRC 1506 이 가장 빨리 발효가 진행되었음. 산도 증가는 대조구 다소 둔화되며 신맛이 부드러워지는 경향을 보임
- 발효/숙성 기간 중 유산균 생균수 변화는 평균 1.6×10^6 CFU/mL 로 접종되어 10일간 발효 숙성 완료 후 전체 실험구들은 $2.9 \sim 8.9 \times 10^7$ CFU/mL 수준으로 생육이 진행되었음. 대조구(무첨가구) 대비 유산균 첨가구들은 장건강(*L. reuteri* 14)를 제외하고 생균수가 2배이상 증가하였음



<그림3-117> 유산균 별 나박물김치 발효/숙성 테스트(10°C, 7 day)

- 각각의 기능성 유산균이 접종된 나박물김치에 대한 1차/ 2차에 걸쳐 관능검사를 진행한 결과, 대조구(무첨가) 대비 장건강 유산균(*L. reuteri* 14)을 첨가한 나박물김치의 관능에 대한 선호도가 높았으며, 전체적으로 유산균 첨가구들의 나박물김치에 대한 선호도가 높게 확인되었음

- 2차에 걸친 관능검사 결과를 바탕으로 나박물김치 2차 관능 샘플 대상으로 맛테스터기 (Insert TS-5000Z)로 측정된 결과는 아래표와 같음

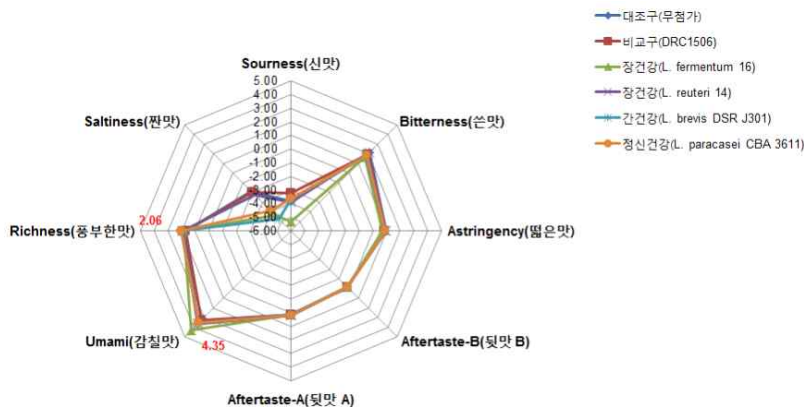
<표3-33> 기능성균주 나박 물김치 맛테스터기 결과

	Sourness (신맛)	Bitterness (쓴맛)	Astringency (떫은맛)	Aftertaste-B (뒷맛 B)	Aftertaste-A (뒷맛 A)	Umami (감칠맛)	Richness (풍부한맛)	Saltiness (짠맛)
대조구 (무첨가)	-3.81	2.16	0.91	-0.19	0.19	3.64	1.73	-1.89
비교구 (DRC1506)	-3.21	1.97	0.85	-0.17	0.17	3.27	1.69	-2.00
장건강 (<i>L. fermentum</i> 16)	-5.31	1.60	0.66	-0.19	0.14	4.35	1.84	-4.39
장건강 (<i>L. reuteri</i> 14)	-3.93	2.16	0.98	-0.21	0.20	3.67	1.90	-2.24
간건강 (<i>L. brevis</i> DSR J301)	-3.73	1.69	0.87	-0.20	0.17	3.58	1.98	-4.72
정신건강 (<i>L. paracasei</i> CBA3611)	-3.63	1.82	0.92	-0.20	0.20	3.52	2.06	-3.90



<그림3-114> 대조구(무첨가) vs 간건강(*L. brevis* J301) 시제품

- 신맛, 쓴맛, 떫은맛, 감칠맛, 풍부한맛, 짠맛, 뒷맛A, 뒷맛B에 대해서 각각 분석한 결과 대조구(무첨가) 대비 유산균 첨가 나박물김치에서 쓴맛 감소, 감칠맛 증가, 풍부한맛 증가, 짠맛 감소 효과가 확인되었음. 또한 4종의 기능성 유산균 첨가 나박물김치들이 비교구(DRC1506) 나박물김치 대비 감칠맛, 풍부한맛이 우수한 결과를 확인하였음



<그림3-118> 유산균 별 나박물김치 맛테스터기 (10°C, 7 day)

(5) 장/간/정신건강 컨셉에 맞는 김치 소비자 조사

○ 각 건강기능성 김치의 필요성과 기능성에 어울리는 김치 컨셉조사를 진행

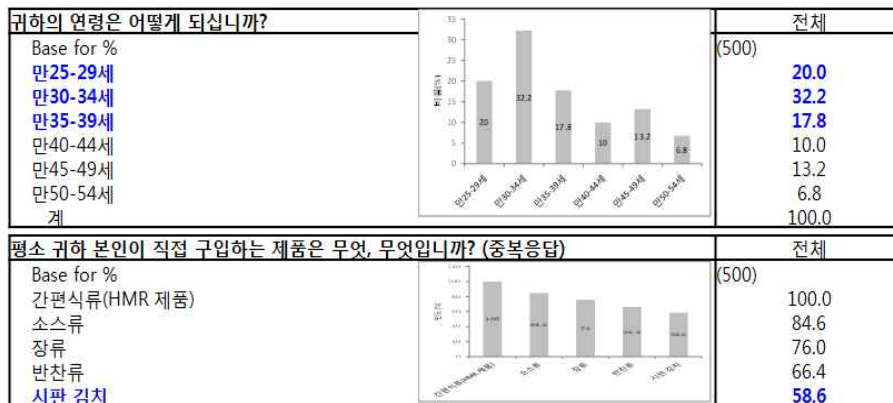
- 그 결과, 정건강> 간건강> 정신건강의 필요성, 신뢰성이 나타남

- 장건강- 배추김치(백김치), 간건강- 동치미, 정신건강- 물김치가 각 기능성과 어울리는 김치로 선정됨



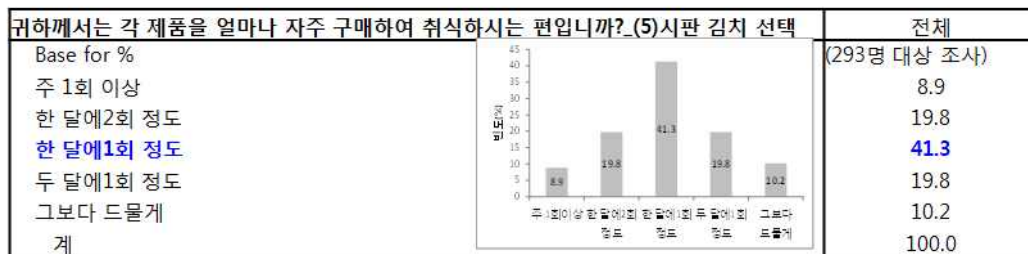
<그림3-119> 컨셉조사표 1

□ 귀하의 연령은 어떻게 되십니까? □ 평소 귀하 본인이 직접 구입하는 제품은 무엇, 무엇입니까? (중복응답)



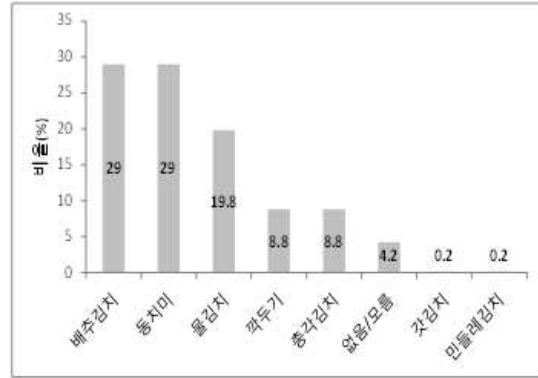
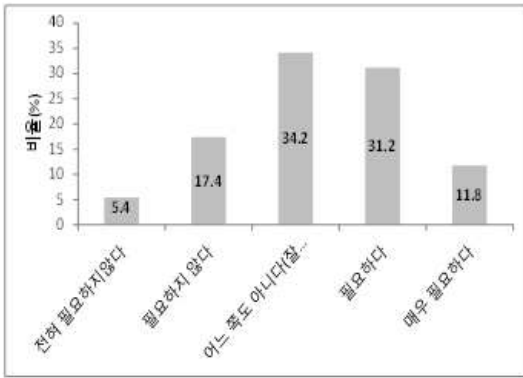
<그림3-120> 컨셉조사표 2

□ 귀하께 서는 각 제품을 얼마나 자주 구매하여 취식하시는 편입니까?_(5)시판 김치 선택 소비자 293명 기준

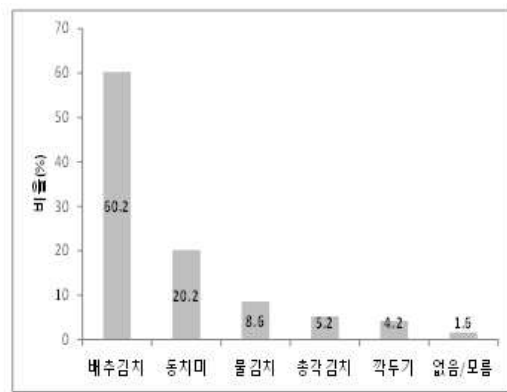
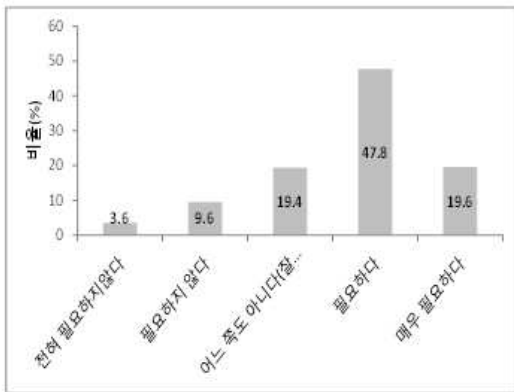


<그림3-121> 컨셉조사표 3

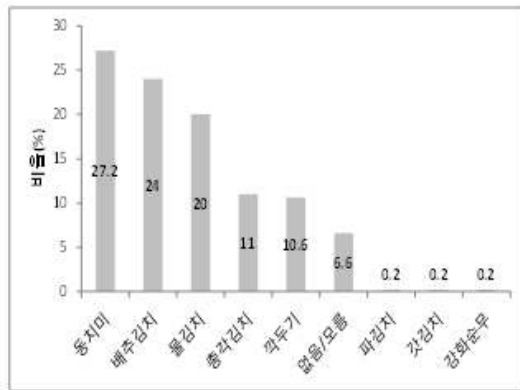
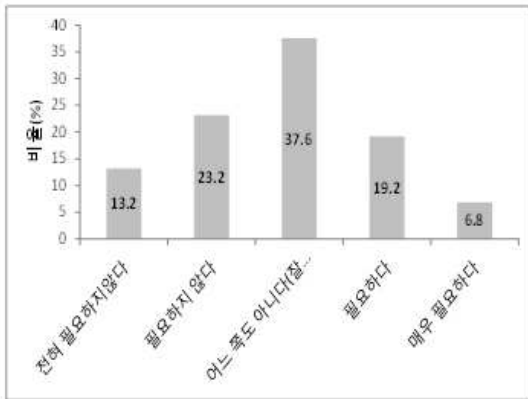
- 컨셉 김치 소비자 조사 결과



<그림3-122> 간 건강에 좋은 김치



<그림3-123> 장건강에 좋은 김치



<그림3-124> 정신건강에 좋은 김치

<표3-34> 주요 지표 결과

	필요성		신뢰성	
	Top2%	Mean	Top2%	Mean
Base for %	(500)	(500)	(500)	(500)
장 건강에 좋은 김치	67.4	3.70	62.6	3.65
간 건강에 좋은 김치	43.0	3.27	26.0	2.87
정신 건강에 좋은 김치	26.0	2.83	14.2	2.44

<표3-35> 기능성 별 적합 김치 응답결과(단수응답)

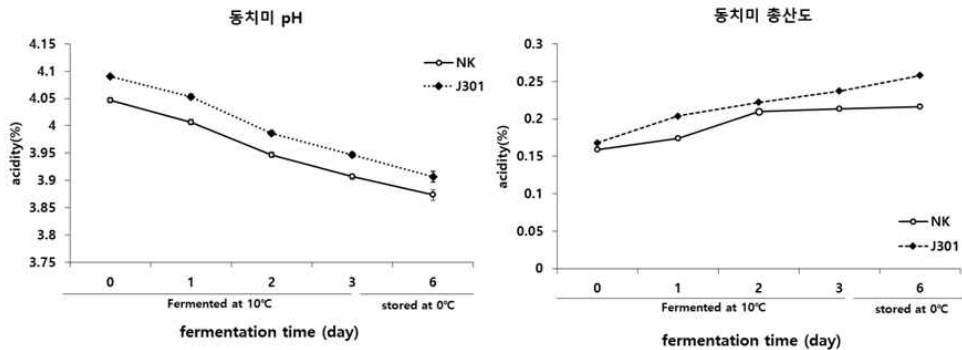
	장건강	간건강	정신건강
	%	%	%
Base for %	(500)	(500)	(500)
배추김치(백김치)	60.2	29.0	24.0
동치미	20.2	29.0	27.2
물김치	8.6	19.8	20.0
총각김치	5.2	8.8	11.0
깍두기	4.2	8.8	10.6
없음/모름	1.6	4.2	6.6

▶ 장건강- 백김치 , 간건강-동치미, 정신건강-물김치 제조 결정

(6) 장 건강/간 건강/정신 건강 컨셉 별 기능성 김치 제조(Lab스케일)

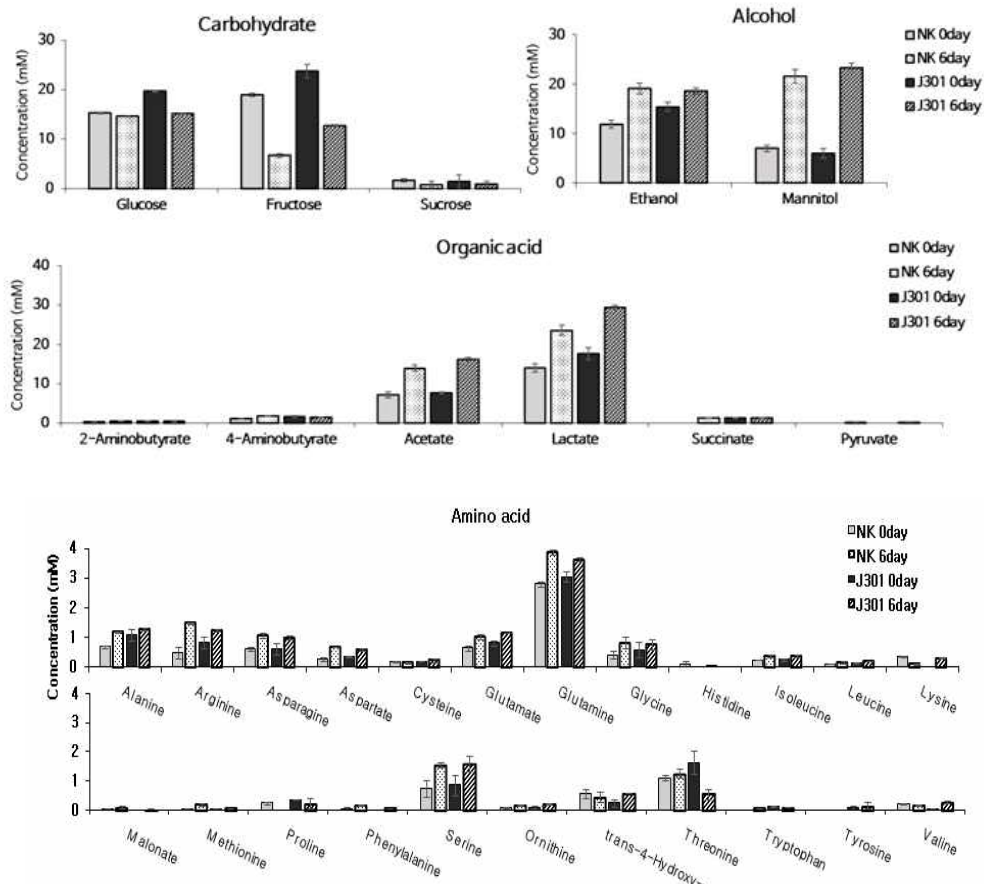
○ 간건강 후보 균주 발효 특성 및 컨셉에 맞는 김치 제조

- 컨셉 조사 결과를 반영하여 선정된 동치미 김치에서의 *L. brevis* DRC301 유산균 발효 특성 분석
 - 동치미 김치 내에서 *L. brevis* DRC301 유산균의 기능성이 발현될 수 있도록 발효 품질 안정화 진행 : *L. brevis* DRC301 우점을 분석 및 대사체, 향기성분 분석 진행
- pH 측정결과, 두 동치미 모두 발효 3일 이후에 최적 적숙기(pH 3.99, 총산도 0.17~0.31%)에 도달함. 자연 동치미와 비교하였을 때, 간 건강 유산균의 동치미의 pH와 총산도가 더 높았음

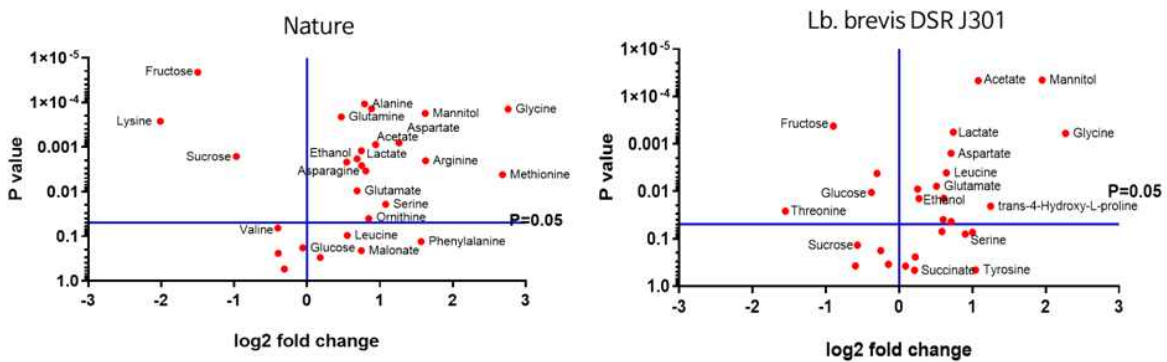


<그림3-125> 간건강 균주적용 동치미 발효품질

- 동치미의 주요 유리당으로 glucose와 fructose가 검출됨. 발효 6일 후 lactate, acetate, ethanol, mannitol의 농도가 증가함. Fructose가 glucose보다 더 많이 감소 하였는데, 이는 fructose가 mannitol을 생산함으로써 야기되었을 수 있음(Wisselink et al., 2002)
- 동치미의 주요 아미노산은 glutamine, glutamate, glycine, alanine, arginine, glutamate, serine, threonine으로 검출됨 특히 발효 0일째에 glutamine이 많이 검출됨. 발효 6일 수 대부분의 아미노산이 증가함
- 두 동치미 모두 fructose를 가장 많이 소비하고, mannitol이 가장 많이 생성됨. 자연 동치미와 비교하여 간 건강 유산균 첨가 동치미는 glucose를 현저히 감소시키고, acetate가 유의하게 증가함
- 대부분의 아미노산은 동치미 발효 후에 증가하는 경향을 보임



<그림3-126> 간건강 균주 적용 동치미 대사산물

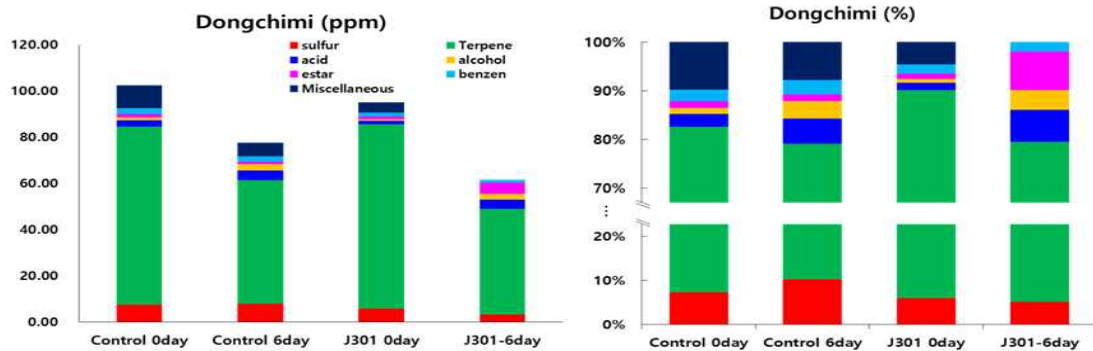


<그림3-127> 간건강 균주적용 동치미 대사산물 변화 결과

- 두 동치미에서는 황화합물보다 terpene이 더 많이 검출되었으며, 발효 후 acid와 alcohol 화합물이 증가함
- 자연 동치미와 비교하였을 때, 간 건강 유산균 첨가 동치미에서는 황화합물이 감소하였고, ester 화합물은 증가하였으며, 기타 화합물은 검출되지 않음

○ 정신건강 후보 균주 발효 특성 및 컨셉에 맞는 김치 제조(Lab 스케일)

- 컨셉 조사 결과를 반영하여 선정된 나박물김치에서의 *L. paracasei* CBA3611 유산균 발효 특성 분석



<그림3-128> 장건강 균주적용 동치미 대사산물

- 나박물김치에서 *L. paracasei* CBA3611 유산균의 기능성이 발현될 수 있도록 발효 품질 안정화 진행

: *L. paracasei* CBA3611 적용 나박물 김치 대사체, 향기성분 분석

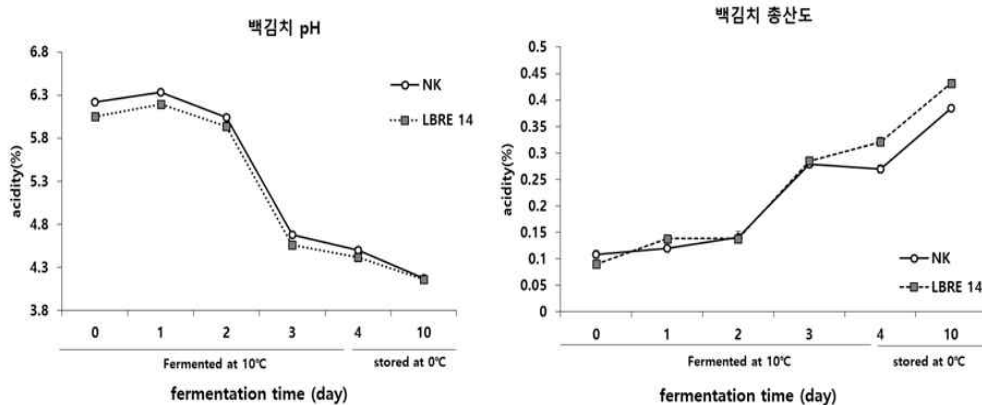
○ 장건강 후보 균주 발효 특성 및 컨셉에 맞는 김치 제조(Lab 스케일)

- 컨셉 조사 결과를 반영하여 선정된 백김치에서의 *L. reureri* 14 유산균 발효 특성 분석

- 백김치에서 *L. reureri* 14 유산균의 기능성이 발현될 수 있도록 발효품질 안정화 진행

: *L. reureri* 14 적용 백김치 대사체, 향기성분 분석

- pH 측정결과, 두 백김치 모두 발효 4일 이후에 최적 적숙기 (pH 4.5~4.2, 총산도 (0.4~0.75%) 에 도달함. 자연 백김치와 비교하였을 때, 4일 이후에 장 건강 유산균의 백김치의 총산도가 더 높았음

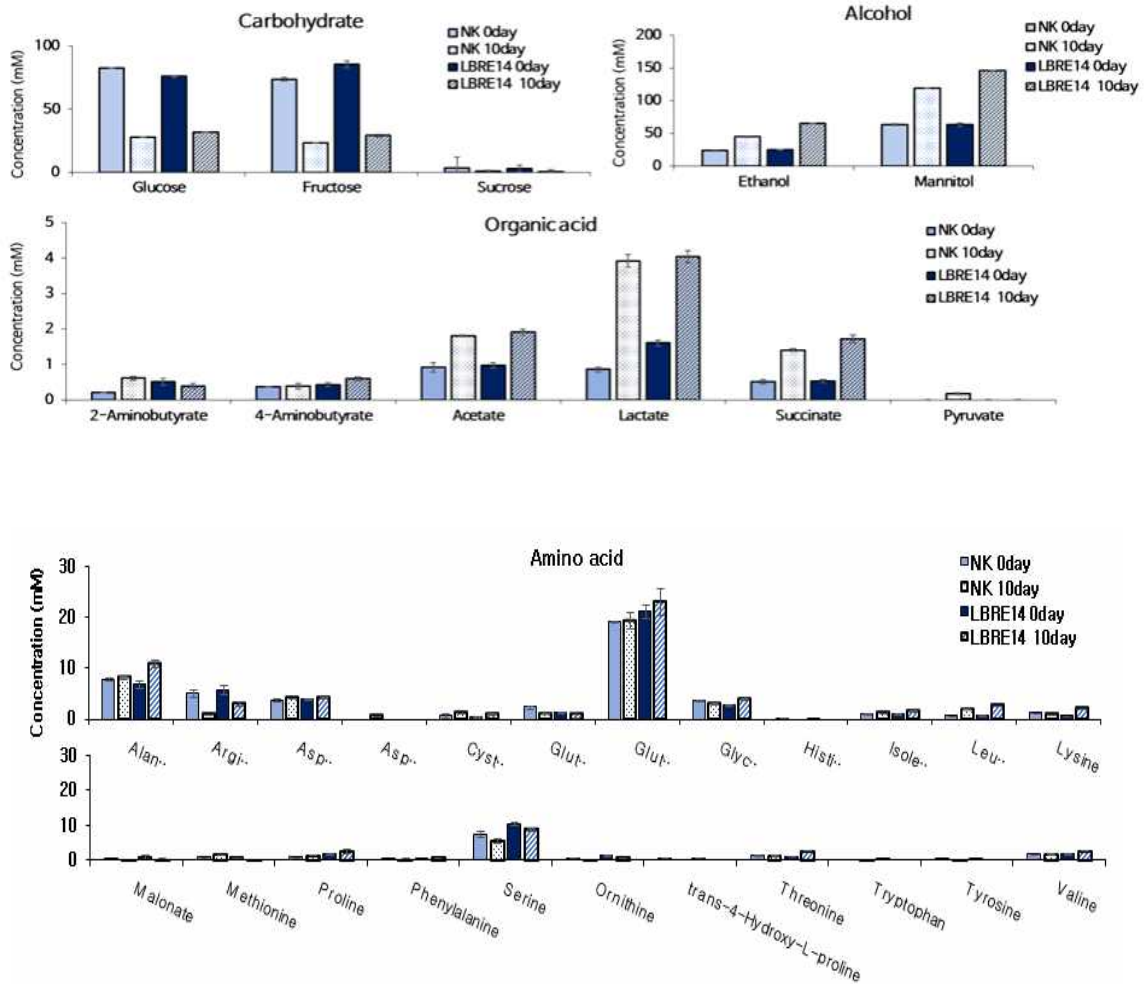


<그림3-129> 장건강 균주적용 백김치 발효품질

- Glucose와 fructose가 감소함에 따라 heterotactic fermentation의 주요 산물인 lactate, acetate, mannitol은 증가함. 백김치에서는 ethanol보다 mannitol이 더 많이 생성되었고, acetate 보다 lactate가 더 많이 증가하였는데 이는 고춧가루를 첨가하지 않았기 때문이라 생각됨 (Jeong, 2013) 또한 동치미와 달리 백김치에서는 succinate도 증가함

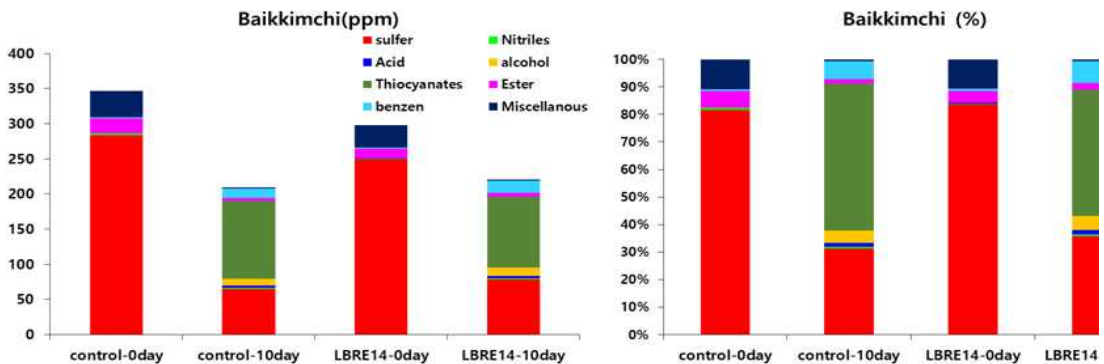
- 백김치의 주요 아미노산으로 glutamine, glycine, alanine, arginine, 그리고 serine이 검출됨

- 특히 발효 초기에는 alanine, arginine, glutamine, serine이 많이 검출됨. 대부분의 아미노산은 증가하였지만, serine과 arginine은 약간 감소함



<그림3-130> 장건강 균주적용 백김치 대사산물

- 두 백김치 모두 발효 전에는 다량의 황화합물이 검출된 반면, 발효 후(10day)에는 주로 thiocyanates 화합물이 많이 검출됨. 또한 acid와 alcohol, benzene 화합물은 발효 후 증가한 반면, ester 화합물과 기타 화합물은 발효 후 감소함. 자연 발효와 비교하였을 때, 장 건강 유산균 첨가 백김치에서 황화합물과 alcohol이 더 많이 검출됨



<그림3-131> 장건강 균주적용 백김치 향기분석

<표3-36> 장건강 균주적용 백김치 향기분석 표

Peak	RT	Name	Formula	Odor description	control-0day	control-10day	LBRE14-0day	LBRE14-10day
total					347.38±3.01	209.23±8.91	298.13±17.30	221.14±5.91
sufer-containing compounds					283.47±2.76	65.35±4.07	249.42±14.55	79.01±2.21
1	9.984	Dimethyl disulfide	C2H6S2	Cabbage onion	5.11±0.20	8.25±1.31	6.74±0.49	8.36±0.17
2	16.548	Methyl-2-propenyl disulfide	C4H8S2	Sulfury	-	13.71±1.46	25.75±17.52	16.09±0.41
3	16.556	1,3-Dithiane	C4H8S2	Alliaceous	40.33±0.53	-	15.59±14.47	-
4	16.786	Allyl methyl disulfide	C4H8S2	Alliaceous garlic onion	5.00±0.19	-	-	-
5	19.465	Dimethyl trisulfide	C2H6S3	Green onion	95.68±1.03	17.51±0.69	69.32±4.63	20.30±0.46
6	22.116	Diallyl disulfide	C6H10S2	Onion garlic metallic	14.40±0.34	16.15±0.70	18.15±0.64	18.31±0.61
7	22.306	Diallyl disulfide	C6H10S2	Onion garlic metallic	3.80±0.14	-	4.35±0.22	1.42±0.06
8	23.45	2-Thiadamantane	C9H14S	-	-	-	6.87±0.30	-
9	25.008	Allyl methyl trisulfide	C4H8S3	Creamy garlic onion	74.62±0.93	8.40±0.34	64.74±3.15	12.66±0.47
10	28.24	Methyl propyl disulfide	C4H10S2	Onion radish mustard	1.70±0.19	-	1.58±0.10	-
11	28.517	1,3,5-Trithiane	C3H6S3	Sulfurous type odor	2.03±0.32	-	1.79±0.05	-
12	28.616	Dimethyl tetrasulfide	C2H6S4	Strong garlic and spicy	16.89±1.44	-	9.30±1.06	-
13	31.181	Disulfide, bis(1,1-dimethylpropyl)	C10H22S2	-	5.38±0.66	-	-	-
14	28.617	Dimethyl tetrasulfide	C2H6S4	Strong garlic and spicy	-	-	5.89±0.33	-
15	31.181	Dipentyl disulfide	C10H22S2	-	-	1.35±0.05	-	1.88±0.09
16	34.052	1,3-Benzenedithiol, 5,5'-dimethyl-	C8H10S2	-	15.68±2.63	-	16.73±0.69	-
17	37.307	2-Ethyl-1,3-dithian-2-yl)-3-methyl-1-butyl	C11H22O2S2	-	2.84±0.09	-	2.62±0.23	-
Nitriles					2.66±0.02	1.19±0.08	0.67±0.48	1.13±0.02
18	18.498	5-Cyano-1-pentene	C6H9N	-	1.59±0.05	1.19±0.08	0.67±0.48	1.13±0.02
19	33.952	Benzenepropanenitrile	C9H9N	Fresh Chinese cabbage	1.07±0.06	-	-	-
Acid					-	3.39±0.00	1.07±0.00	3.65±0.00
20	21.362	Acetic acid	C2H4O2	Sharp sour vinger	-	3.39±0.48	1.07±0.13	3.65±0.31
alcohol					-	9.20±0.00	-	11.43±0.00
21	3.374	2-Amino-1-propanol	C3H9NO	smells like apricot	-	9.20±1.44	-	11.43±0.71
Thiocyanates					-	111.44±2.88	-	101.02±1.83
22	21.477	3-Butenyl isothiocyanate	C5H7NS	Mustard	-	28.08±0.22	-	24.66±0.29
23	23.642	Cyclopentyl isothiocyanate	C6H9NS	Strong green aroma	-	83.36±2.72	-	76.36±1.54
Ester					21.19±0.33	3.40±0.17	13.02±0.69	5.35±0.20
24	23.35	Iroxy-3-methoxy-succinic acid, dimethyl	C7H12O6	-	10.58±0.04	-	8.44±0.45	1.41±0.06
25	23.45	ine, n-propargyloxy carbonyl-, undecyl	C20H35NO4	-	7.05±0.13	-	-	-
26	23.626	oxy-4-methylhex-5-enoic acid, tert-but	C11H20O3	-	1.32±0.16	-	1.54±0.13	-
27	20.793	Acetic acid, 2-(thiocarboxy)hydrazide	C4H8N2O2S	pungent odor	2.24±0.09	3.40±0.17	3.04±0.15	3.94±0.15
benzen					1.91±0.19	13.93±0.44	2.11±0.39	17.59±0.46
28	34.044	Benzene, 1-(2-chloroethyl)-2-methoxy-	C9H11ClO	-	-	2.07±0.07	-	3.12±0.17
29	37.254	Benzene, (2-isothiocyanatoethyl)-	C9H9NS	dorants from Brassicaceae	-	10.03±0.30	-	12.49±0.23
30	37.868	Benzene, 1,1'-(1,3-propanediy)bis-	C15H16	-	1.91±0.19	1.82±0.15	2.11±0.39	1.98±0.10
Miscellaneous compounds					37.83±2.50	1.32±0.15	31.83±2.57	1.54±0.19
31	3.404	Cyclopropane	C3H6	-	31.56±2.52	-	27.39±2.52	-
32	26.544	Hexahydropyrrrolizine-3-thione	C7H11NS	-	-	1.32±0.15	-	1.54±0.19
33	28.455	Thiourea, trimethyl-	C4H10N2S	-	4.72±0.14	-	4.44±0.05	-
34	32.378	4,5-Dimethylthiazole	C5H7NS	-	1.55±0.17	-	-	-

(7) 간/장/정신 건강 후보 유산균 적용 김치 중 상품성이 가장 우수한 김치 선별

○선별된 기능성 김치의 대량 생산을 위한 제조 공정 개발

: 3차년 소비자 조사결과 컨셉 및 관능결과 ⇒ 장건강/백김치 선정

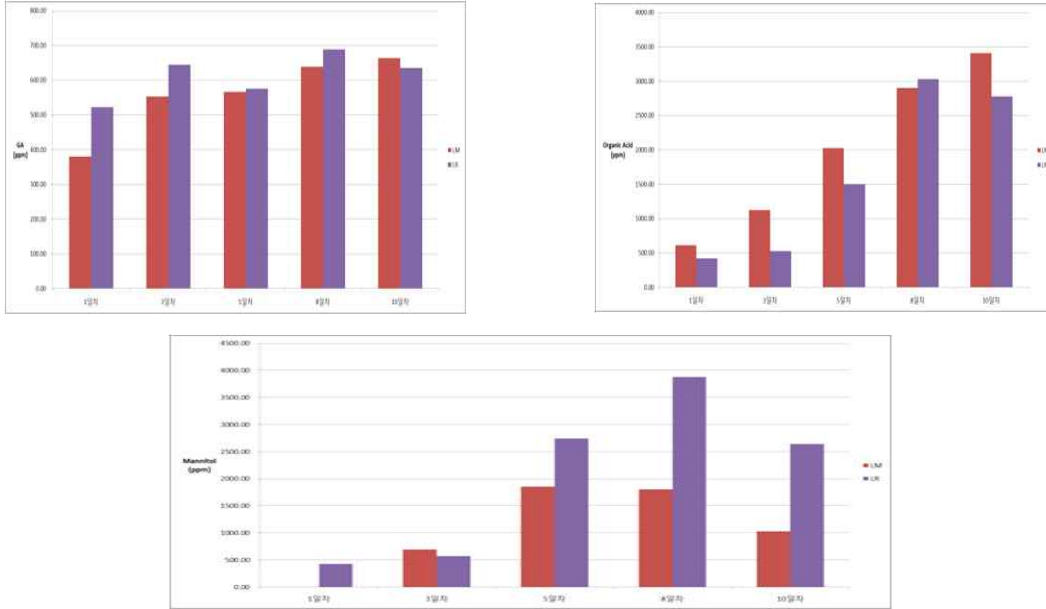
- 백김치 종균별 제조 및 관능 테스트

대조구(*Le. mesenteroides* DRC 1506) 및 각각의 유산균이 접종된 백김치의 관능검사를 진행한 결과, 다른 유산균과 비교하여, 장건강 유산균(*L. reuteri* 14)을 첨가한 백김치의 기호도가 가장 높고, 감칠맛과, 풍미가 우수한 것으로 나타남



<그림3-132> 종균별 백김치 제조

- 대조구(*Le. mesenteroides* DRC 1506)와 건강 유산균(*L. reuteri* 14)백김치 제조시 발효패턴은 유사하게 나타났으며, GA함량은 대조군과 유사하게 나타났으며, 유기산 함량은 대조군과 비교하여 낮게 생성되었고, 만니톨 함량은 높게 생성되어 김치의 맛품질 향상에 기여함

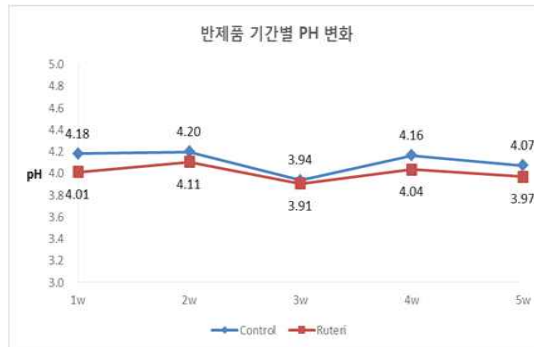


<그림3-133> 종균별 대사산물 생성

- 선별된 기능성 김치의 대량 생산을 위한 제조 공정 개발
- 건강기능성 균주 장건강 효능 *Lb. reuteri* 14 제품 적용 현장적용 방안 검토
- * 발효 조건 설정 및 운영: 반제품 적용시 유의성 없음
- 반제품 유통품질 모니터링
- 반제품 적용 모티커링 결과, 유통테스트 중 관능품질이 상이하어, 완제품에 적용하기로 함



반제품 운영 기간 설정 테스트



0°C, ~4주 : 반제품 숙성도 유지 (~8주 모니터링 예정)



Aging 기간별, 유통 품질 안정성 확인 중 (10 °C, ~4주)
: 관능, 팽창, 이화학, 미생물
⇒ pH차이 없으나, 미생물 관능차이 발생함



주차별 재포장 및 제품 출하 가정,
10°C 유통 모니터링 진행

<그림3-134> 반제품 운영 품질 모니터링

(8) 유산균 Starter 김치 산업적 생산 최적화

○ 백김치 적용 대량 생산라인 적용 테스트 : *Lb. reuteri* 14

- 종균배양 최적화 및 김치 접종농도 설정

종균 배양 공정 개발 하여 산균 Starter 활성 온도, 시간 관리 기준 확립

- 종균 접종농도 설정: 유산균 Starter 적용 제품 숙성 발효 Pattern 모니터링(적숙기)

종균 접종균수 확정: 김치발효품질 및 관능양호

<표3-37> 종균 배양프로세스

공정	내용	CCP
1차계대배양	해동직 후 접종, 배양	온도, 시간,균수
2차 본배양	상기배양액 접종, 배양	온도, 시간,균수
김치접종	접종농도에 따른 김치양념 혼합	균수, 오염여부



<그림3-135> 종균 배양 공정 및 김치에 접종 모식도

<표3-38> 종균 농도별 품질 특성

종균농도	산도(%)	총유산균수	관능
대외비	0.55	7.81×10^7	양호
대외비	0.60	3.50×10^8	양호
대외비	0.63	5.05×10^8	시원한맛
대외비	0.71	8.83×10^8	탄산미우수, 양호

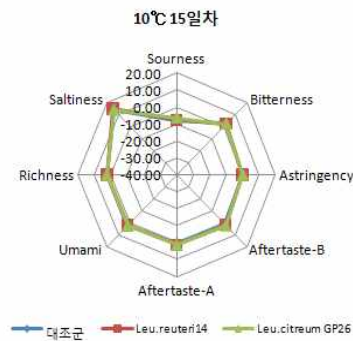
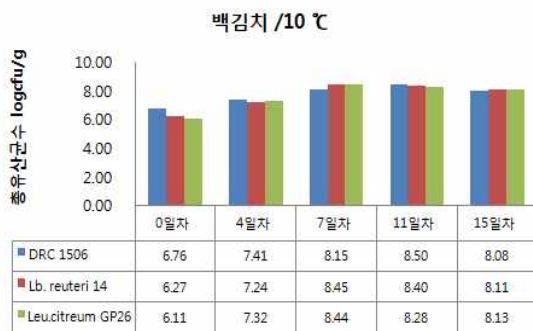
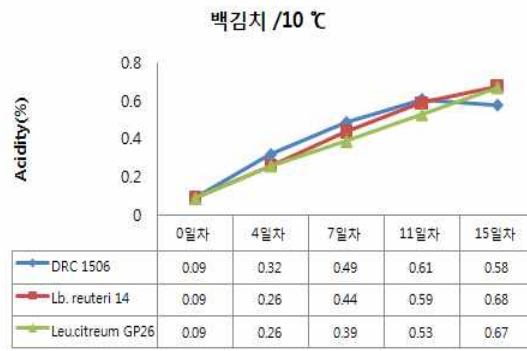
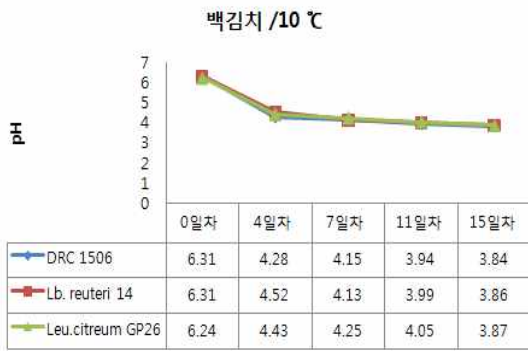
○ 대량생산제품 품질 안정화

- 김치유산균의 산업적 적용을 위한 특성연구 및 최종 선발된 장건강 유산균 *Lb. reuteri* 14 균주 현장 생산라인 적용 백김치 품질은 발효품질, 대사산물, 향기분석, 우점율, 관능 소비자 조사함

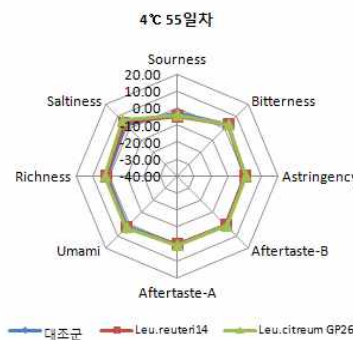
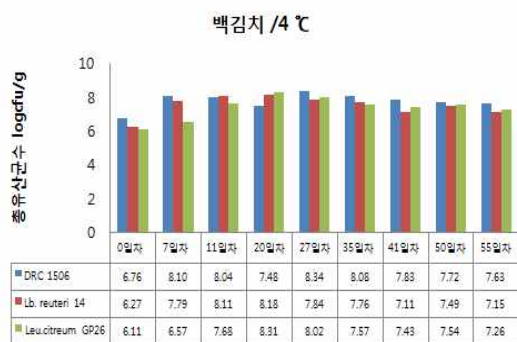
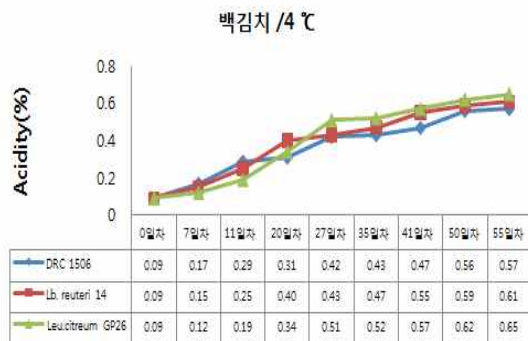
- 각 온도별 김치 발효 Pattern 분석 및 품질 모니터링

- 4, 10 °C 유통 모니터링을 통한 이화학, 유산균 분석하여 발효 패턴 확인함

- 4°C 보관 시, 미생물 증식이 서서히 진행되었으며, 10 °C, 보관 시, 발효가 진행됨에 따라 발효품질이 안정적인 것을 확인함. 관능품질 또한 대조군(DRC1506)과 비슷하거나 좋은 것으로 나타남

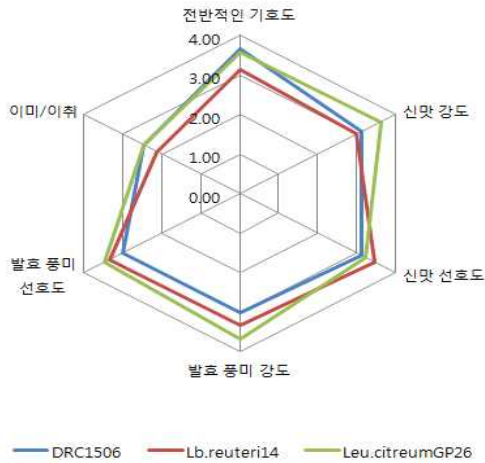


<그림3-136> 백김치 10℃ 발효 시, 품질 특성 모니터링



<그림3-137> 백김치 4℃ 발효 시, 품질 특성 모니터링

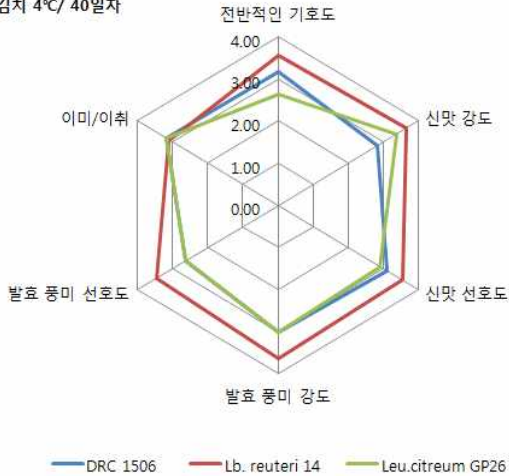
백김치 10℃/7일차



	DRC 1506	Lb. reuteri 14	Leu.citream GP26
전반적인 기호도	1순위	3순위	2순위
신맛 강도	2순위	3순위	1순위
신맛 선호도	3순위	1순위	2순위
발효 풍미 강도	3순위	2순위	1순위
발효 풍미 선호도	3순위	2순위	1순위
이미/이취	1순위	3순위	1순위

<그림3-138> 백김치 10℃ 발효 시, 관능 평가 결과

백김치 4℃/ 40일차



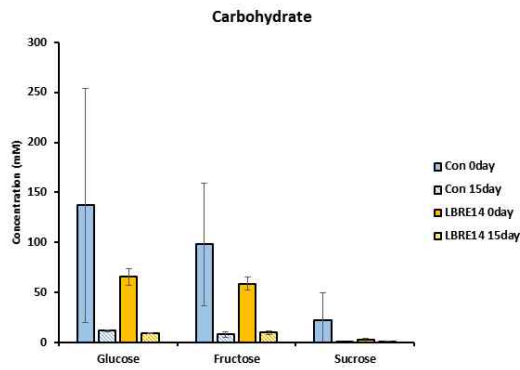
	DRC 1506	Lb. reuteri 14	Leu.citream GP26
전반적인 기호도	2순위	1순위	3순위
신맛 강도	3순위	1순위	2순위
신맛 선호도	2순위	1순위	3순위
발효 풍미 강도	2순위	1순위	2순위
발효 풍미 선호도	2순위	1순위	2순위
이미/이취	1순위	3순위	1순위

<그림3-139> 백김치 4℃, 발효 시, 관능 평가 결과

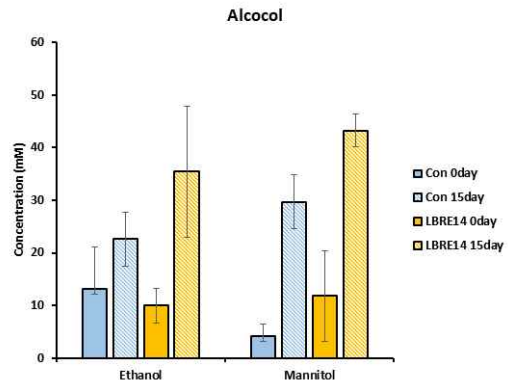
○ 대사산물 분석(¹H-NMR)

- *Le. mesenteroides* DRC1506을 대조군으로 하여 장 정신 건강 유산균(*Lb. reuteri* 14) 및 *Le. citream* GP26 을 스타터로 사용하여 백김치 제조 함
- 장 건강 유산균(LBRE14) 및 GP26을 접종한 김치를 10 °C에서 김치 숙성 발효 후 성분을 각각 비교함
- 모든 김치에서는 glucose와 fructose가 주요 유리당이었으나 발효 후에 감소하였으며, 알코올과 유기산 성분 중 ethanol, mannitol, lactate, acetate가 발효 전보다 증가한 것으로 보아 Hetero-type 젖산발효가 진행되었음. 백김치 내 아미노산 함량을 분석한 결과, alanine, glutamate, glutamine, glycine, serine,threonine이 주요 아미노산이었음

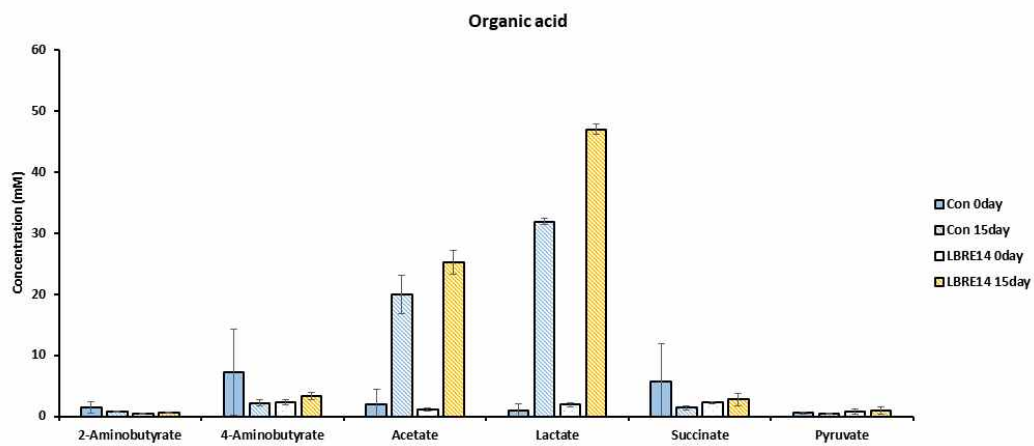
(A)



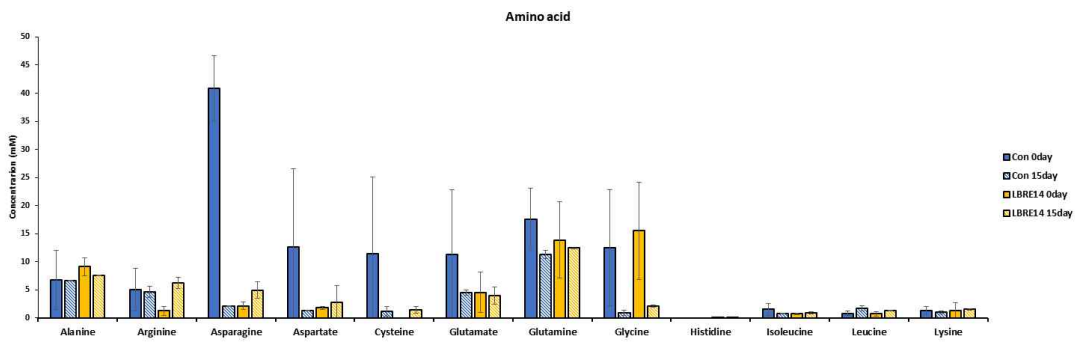
(B)



(C)



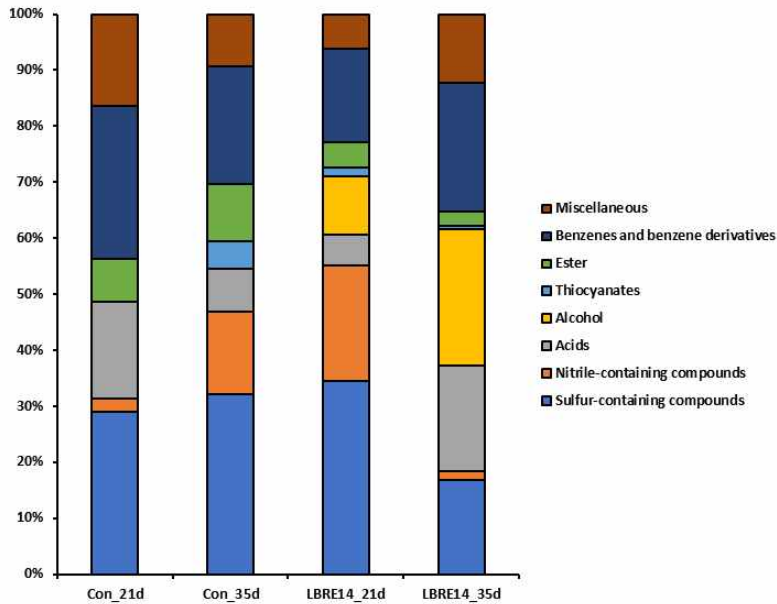
(D)



<그림3-140> 장 건강 유산균 및 GP26 발효 백김치 내 탄소원(A), 알코올(B), 유기산(C), 아미노산(D) 종류 및 농도, Con, *Le. mesenteroides* DRC1506 첨가 백김치; LBRE14, *L. reuteri* 14 첨가 백김치; GP26, *Le. citreum* GP26 첨가 백김치

○ 휘발성 향기성분 분석 (GC/MS)

- 장 건강 유산균(LBRE14) 및 GP26을 접종한 백김치를 4 °C에서 발효한 향기 화합물을 분석함
- 발효 후에 휘발성 향 화합물(Diallyl disulphide, Ally methyl tisuifide, 2-phopenoic acid, 3-phenyl-, Methyl propyl disulfide)의 농도가 증가함



<그림3-141> 장 건강 유산균(LBRE14) 및 GP26 발효 백김치 내 향기 화합물의 relative peak area (%), Con, *Le. mesenteroides* DRC1506 첨가 백김치; LBRE14, *L. reuteri* 14 첨가 백김치; GP26, *Le. citreum* GP26 첨가 백김치

<표3-39> 장 건강 유산균(LBRE14) 및 GP26 발효 백김치 내 향기화합물 및 농도, Con, *Le. mesenteroides* DRC1506 첨가 백김치; LBRE14, *L. reuteri* 14 첨가 백김치; GP26, *Le. citreum* GP26 첨가 백김치

Name	Formula	Odor description	대조군_21d	대조군_35d	LBRE14_21d	LBRE14_35d
			Relative peak area (%)			
Total compounds			181.50	194.28	341.58	275.15
sulfur-containing compounds			52.63	62.29	117.94	46.11
Disulfide, dimethyl	C2H6S2	Cabbage onion	29.61±0.65	19.49±0.76	38.09±2.62	25.08±1.11
Diallyl sulfide	C6H10S	Onion garlic metallic	-	-	-	-
Disulfide, methyl propyl	C4H10S2	Onion radish mustard	-	-	1.91±0.56	-
Disulfide, methyl 2-propenyl	C4H8S2	Sulfury	24.91±0.70	12.69±0.41	-	11.39±0.18
1,3-Dithiane	C4H6S2	Alliacious	-	-	21.13±2.30	-
Dimethyl trisulfide	C2H6S3	Green onion	3.76±0.21	1.80±0.16	5.58±0.60	-
Diallyl disulphide	C6H10S2	Onion garlic metallic	23.96±0.24	10.58±0.24	21.71±2.53	9.63±0.31
4-Ethyl-5-methylthiazole	C6H8NS	Strong green aroma	-	17.73±0.79	38.51±4.19	-
Nitriles			4.25	28.80	70.47	4.46
5-Cyano-1-pentene	C6H9N	white bread crust	2.07±0.15	1.34±0.05	1.76±0.18	2.17±0.09
1-Butene, 4-isothiocyanato-	C5H7NS	Mustard	-	9.73±0.65	21.75±2.21	-
4-Ethyl-5-methylthiazole	C6H8NS	odorants from Brassicaceae	-	17.73±0.79	38.51±4.19	-
Benzenepropanenitrile	C9H9N	Fresh Chinese cabbage	2.17±0.17	-	1.88±0.09	2.29±0.11
Benzene, (2-isothiocyanatoethyl)-	C9H9NS	odorants from Brassicaceae	-	-	5.57±0.39	-
Acid			31.41	14.73	18.87	52.02
Acetic acid	C2H4O2	Sharp sour vinger	31.41±4.87	14.73±0.55	18.87±0.98	52.02±2.23
Alcohol			-	-	35.09	67.02
Ethanol	C2H6O	wine-like odor	-	-	35.09±4.17	67.02±0.97
1-Octanol	C8H18O	Fresh orange rose odor	-	-	1.67±0.19	1.10±0.04
Thiocyanates			-	9.73	5.57	1.67
1-Butene, 4-isothiocyanato-	C5H7NS	Mustard	-	9.73±0.65	21.75±2.21	-
Benzene, (2-isothiocyanatoethyl)-	C9H9NS	odorants from Brassicaceae	-	-	5.57±0.39	-
Ester			13.76	19.80	15.63	6.82
Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	C8H18O4Si2	plant taste sour	-	-	-	1.16±0.03
4-Hydroxy-4-methylhept-5-enoic acid, tert-butyl ester	C11H20O3	fruity odor	-	-	-	1.57±0.09
Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	C8H18O4Si2	plant taste sour	-	-	-	1.06±0.11
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	C10H12O2	Spicy pungent taste	-	-	-	1.38±0.03
Benzenepropanoic acid, methyl ester	C10H12O2	Spicy pungent taste	-	-	-	1.64±0.31
Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	C16H30O4	musty	-	1.14±0.20	-	-
2-Propenoic acid, 3-phenyl-, ethyl ester	C11H12O2	Floral, Fruit, Honey	13.76±1.25	9.00±0.42	15.63±1.51	-
Benzene			49.73	40.79	56.76	63.14
Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	C14H22	-	27.13±1.24	19.76±0.35	24.10±2.43	24.84±1.19
Benzaldehyde	C7H6O	almond odor	20.49±2.81	10.89±0.33	11.54±1.26	14.86±0.54
Benzenepropanoic acid, methyl ester	C10H12O2	Flower, Fruit	-	1.14±0.20	-	1.64±0.31
Benzene, (1-methoxypropyl)-	C10H14O	Floral (rose) with green (biigi)	-	12.23±0.79	13.67±0.61	23.44±0.90
Benzenepropanenitrile	C9H9N	Fresh Chinese cabbage	2.17±0.17	-	1.88±0.09	2.29±0.11
Benzene, (2-isothiocyanatoethyl)-	C9H9NS	odorants from Brassicaceae	-	-	5.57±0.39	-
Miscellaneous compounds			29.72	18.13	21.25	33.92
Silane, trichlorodicyl-	C10H21Cl3Si	pungent odor	-	-	-	-
Dodecane	C12H26	-	9.81±0.90	6.41±0.32	8.33±0.91	14.78±0.87
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	C15H30	-	-	-	-	2.11±0.25
Tetradecane	C14H30	-	12.49±0.44	9.62±0.52	10.27±0.42	12.19±0.21
2-Undecenal	C11H20O	-	4.93±0.34	-	-	-
Methyl salicylate	C8H8O3	Pungent-sweet, fruity-rooty odor	2.50±0.31	2.10±0.17	2.65±0.07	2.73±0.13

○ 백김치 내의 장 건강 유산균(LBRE14) 우점을 분석

- 백김치에서 장 건강 유산균의 우점을 분석하고 발효 종균 모니터링을 위해, 식품용 종균 (species/strain)이 특이적으로 가지고 있는 유전자를 유전체 분석 기술로 탐색함

- 유전체 분석을 토대로 장 건강 유산균(LBRE14)의 특이적 유전자 약 2.5 kb를 발굴하였고 150 bp의 LBRE 특이적 primer를 제작함. 발효기간 동안 백김치에서 gDNA를 추출 후, 디자인한 프라이머를 사용해 qPCR을 진행하여 cell count 결과와 대조함
- 제작된 primer를 사용하여 백김치에서 LBRE14를 정량한 결과, 4 °C와 10 °C에서 발효한 백김치 내 LBRE14는 발효가 진행됨에 따라 초기 균수보다 그 양이 감소하였으며 우점을 하지 못하였음

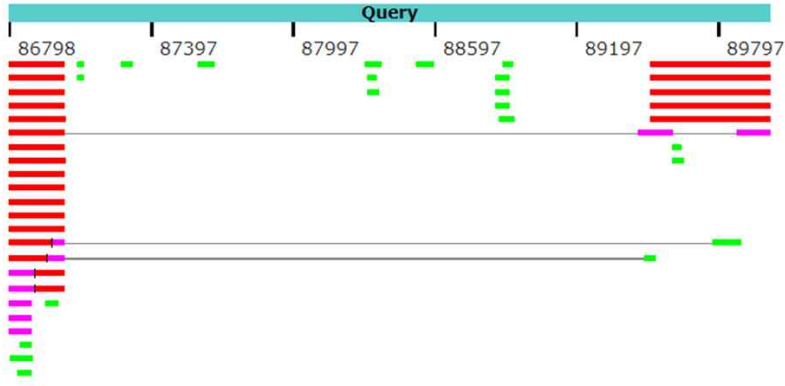
○ 장 건강 유산균(LBRE14) 첨가 백김치 발효 온도 최적화 및 우점률 분석

- 장 건강 유산균(LBRE14) 접종 백김치의 우점률을 형성하는데 최적 조건을 탐색하기 위해, LBRE14를 접종(6 Log CFU/mL)한 김치를 실온(25 °C)에서 발효 후, 저온 조건(4 °C 또는 10 °C)으로 변경하여 발효함
- 김치와 국물의 혼합액을 블렌딩하여 여과한 후, 0.85% NaCl로 연속 희석하여 MRS 배지에 도달하고 viable cell을 counting함
 - *혼합액 = 국물 100 g + 건더기 100 g
- 혼합액의 pH 측정 결과, 25 °C에서 발효한 백김치는 2일차에 최적 적식기 범위 안에 포함되었음
- 실온(25 °C)에서 발효 후, 저온 조건(4 °C 또는 10 °C)으로 변경한 후에도 pH는 적식기의 범위 안에 유지됨
- 혼합액의 유산균 수 측정결과, 25°C에서 발효한 백김치에서 8.5 Log CFU/mL에 도달하였고 저온 조건으로 변경한 후에는 그 수가 감소하였으나 약 8 Log CFU/mL 유지함
- 백김치에서 장 건강 유산균의 우점율을 분석하고 발효 종균 모니터링을 위해, 식품용 종균 (species/strain)이 특이적으로 가지고 있는 유전자를 유전체 분석 기술로 탐색함
- 유전체 분석을 토대로 장 건강 유산균(LBRE14)의 특이적 유전자 약 2.5 kb를 발굴하였고 150 bp의 LBRE 특이적 primer를 제작함
- 발효기간 동안 백김치에서 gDNA를 추출 후, 디자인한 프라이머를 사용해 qPCR을 진행하여 cell count 결과와 대조함
- 제작된 primer를 사용하여 백김치에서 LBRE14를 정량한 결과, 25 °C에서 2일 동안 발효하고 10 °C에 발효한 후 약 7.5 Log CFU/mL를 유지함

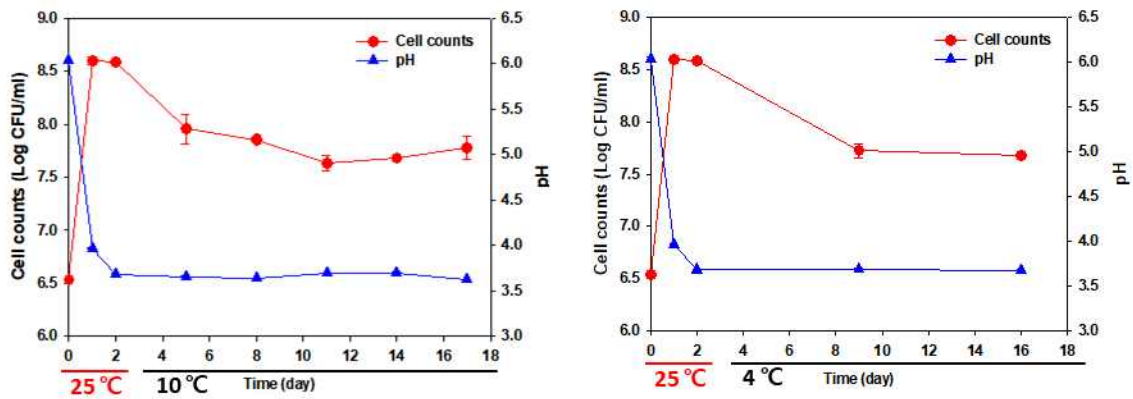
<표3-40> 장 건강 유산균(LBRE14)의 specific primer

프라이머 이름	서열	bp
LBRE14_158F	AGTCTGTTTCATATACTGGCAACCA	24
LBRE14_158R	GTAAATCAACCAGTAAGCGAGGT	23

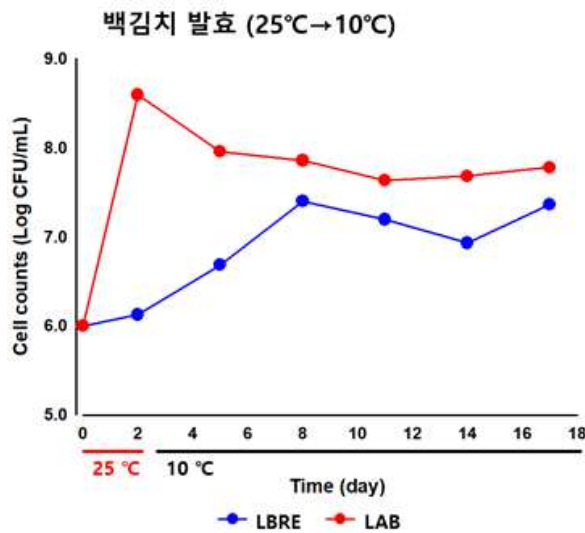
Distribution of the top 56 Blast Hits on 44 subject sequences



<그림3-142> 장 건강 유산균(LBRE14)의 specific 유전자 sequences



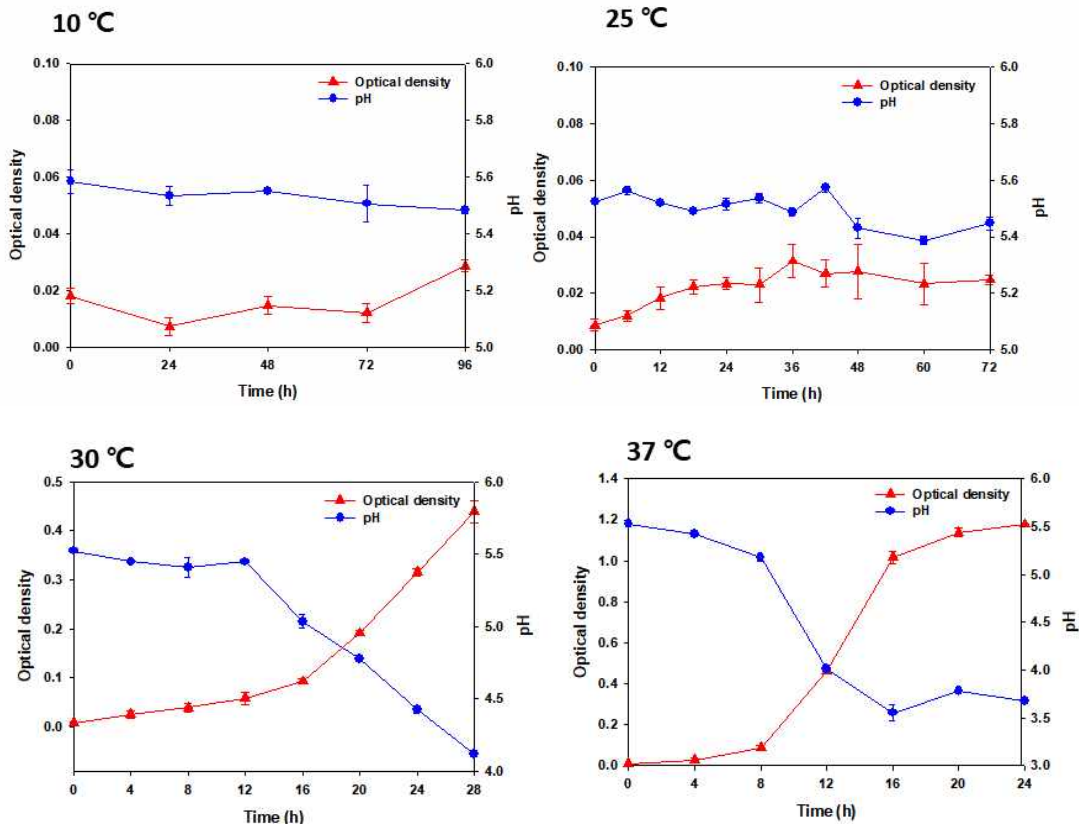
<그림 3-143> 발효 온도 최적화를 위한 장 건강 유산균(LBRE14) 첨가 백김치 pH와 생균수 측정



<그림 3-144> 발효기간 동안 백김치 내 장 건강 유산균(LBRE14) 수의 변화

- 김치모사배지(Simulated kimchi juice, SKJ)에서 장 건강 유산균(LBRE14)의 발효 온도 최적화
- 장 건강 유산균(LBRE14)의 최적 발효 조건을 확립하기 위해 SKJ를 이용하여 다양한 온도(10, 25, 30, 37 °C)에서 발효하고 흡광도 및 pH 변화를 측정함

- 흡광도 측정 결과, 10, 25 °C에서 각각 4일, 3일 발효 했을 때 흡광도(OD₆₀₀)가 0.01~0.03이며 pH 또한 5.39~5.58이므로 LBRE14가 성장하지 않았음
- 30 °C에서 배양 시 16시간부터 흡광도(OD₆₀₀)가 증가하는 경향을 보였으며 pH는 12시간부터 감소하였고, 28시간까지 발효했을 때 pH는 4.0에 도달하였지만 흡광도(OD₆₀₀)는 0.4로 낮은 수준을 유지함
- 37 °C에서 20시간 배양했을 때 최고 흡광도(OD₆₀₀ 1.177)에 도달하였고 pH는 16시간 배양했을 때 pH3.5에 도달함



<그림 3-145> 발효 온도 최적화를 위한 SKJ에서 장 건강 유산균(LBRE14)의 pH와 생균수 측정

○ 관능조사 : 외부 소비자 조사 통한 맛기호도 확인

- 종합선호도 및 종합기호도 유의성있게 증가하였으며, 외관, 식감, 맛 모두 장건강 유산균백 김치(변경)가 높게 나타나 관능품질 우의성을 확보하였음

(9) 프로바이오틱스(장건강 LBRE14균주) 김치개발 및 상품화

○ 장건강 LBRE14균주 기능성

- LBRE14는 식품에 사용하기에 안전하며, 산 담즙 내성 및 부착능 우수, 항염증 활성 및 항산화 활성이 우수함/ 균주는 용혈성과 바이오제닉아민을 생성하는 탈탄산효소 유전자가 부재함
- LBRE14 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였으며, IL-12의 발현을 억제하였으며, IL-10를 유의하게 유도하여 높은 항염증 활성을 보임
- LBRE14 투여한 경우 DAI 점수가 유의하게 낮아짐, 정상 대조군에 비해 DSS 투여 시 대장 길이가 짧아졌고 LBRE14 투여한 경우 장 길이가 유의하게 복원되었으며, LBRE14 처리시 염증 및 점막손상이 감소하였으며, LBRE14-treated DSS group의 조직학적 점수는

평가 요약

1. 종합선호 및 종합기호

제품	종합선호 ¹⁾	종합기호 ²⁾	
		평균	Top3 ³⁾
기존	20	4.75	54.2
변경	38	5.24	78.0
두 제품 동일 ⁴⁾	1		
P-value	0.017	0.080	

- 1) 종합선호, 선택빈도(명)
- 2) 종합기호 평균, 7점 척도
- 3) Top3: 종합기호에 대한 "조금 좋다" 이상의 긍정반응(5-7점) 비율(%)
- 4) 두 제품 간 선택차이가 없을 경우

2. 세부기호

제품	외관		식감		맛	
	평균 ¹⁾	Top3 ²⁾	평균	Top3	평균	Top3
기존	4.39	39.0	5.02	66.1	5.02	64.4
변경	4.86	59.3	5.29	79.7	5.44	81.4
P-value	0.012		0.254		0.100	

- 1) 세부기호 평균, 7점 척도
- 2) Top3: 세부기호에 대한 "조금 좋다" 이상의 긍정반응(5-7점) 비율(%)

종합 선호도 선택비율



유의성 검정 [p value: 0.0172]

3. 속성별 적합도 평가

3.1. 적합 빈도(n) 및 비율(%)

속성	제품	Too Weak*		Just Right		Too Strong	
		빈도(n)	비율(%)	빈도(n)	비율(%)	빈도(n)	비율(%)
시원한맛	기존	11	18.6	40	67.8	8	13.6
	변경	8	13.6	41	69.5	10	16.9
짭맛	기존	4	6.8	36	61.0	19	32.2
	변경	3	5.1	43	72.9	13	22.0
단맛	기존	21	35.6	38	64.4	0	0.0
	변경	15	25.4	43	72.9	1	1.7
익은정도	기존	4	6.8	40	67.8	15	25.4
	변경	4	6.8	41	69.5	14	23.7

- * Too Weak: 약해서 싫다(너무 약해 싫음, 약해서 싫음, 조금 약해서 싫음)
- Just Right: 딱 좋다(딱 좋음)
- Too Strong: 강해서 싫다(조금 강해서 싫음, 강해서 싫음, 너무 강해서 싫음)

3.2. 적합 평균(7점) 및 유의차

제품	시원한맛		짭맛		단맛		익은정도	
	평균 ¹⁾	유의차	평균	유의차	평균	유의차	평균	유의차
기존	3.95	a	4.25	a	3.63	a	4.37	a
변경	4.03	a	4.19	a	3.76	a	4.31	a
P-value	0.497		0.438		0.088		0.641	

1) 적합도 평균, 7점 척도

<그림3-146> 백김치 외부 소비자조사 관능결과
 PBS-treated DSS group과 비교하여 유의적으로 낮았음(p<0.05)
 - 결론적으로, 장 건강 프로바이오틱스 LBRE14 투여시 대장염 완화 및 억제 효과가 관찰됨
 ○ 김치 컨셉 적합도 및 관능평가

(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 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	6	9				6			
1차 년도	목표	2	3			2			
	실적	2	4			2			
2차 년도	목표	2	3			2			
	실적	3	3	1		2			
3차 년도	목표	2	3			2			
	실적	6	6			6			
4차 년도	목표								
	실적		1						
계	목표	6	9			6			
	실적	11	11		1	10			

○ 나. 기타 성과목표

표. 기타 성과 목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		SCI	비SCI	논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
											건					건	건			
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		10	15	15	10					10	10		10					
최종목표	3	3		1	20	2	80				10	3	8		4					
1차 년도	목표										1	3	2		1					
	실적	3									2	3.27	2		0					
2차 년도	목표	2									2	3	2		1					
	실적										1	3.75	13		2					
3차 년도	목표	1									2	3	2		1					
	실적	2	2								4	4.26	14		4					
4차 년도	목표		2		1	20	1	10			2	3	2		1					
	실적		1		2	87	2	645			3	4.78	14		3					
소 계	목표	3	2		1	20	2	10			7	3	8		4					
	실적	6	3		3	87	2	645			11	4.31	43		9					
종료 1차년도		1				1	20				2	3								
종료 2차년도							20				1	3								
종료 3차년도							30													
종료 4차년도																				
소 계		1				1	70				3									
합 계	6	4		3	87	3	715				14	3	43		9					

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Lactobacillus sakei</i> Wikim0074	유전체서열 분석	18.11.20	CP025206-8 iGEM-0000248	0.02
2	<i>Lactococcus lactis</i> Wikim0068	유전체서열 분석	18.11.20	CP023392-4 iGEM-0000207	0.02
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CBA3628	유전체서열 분석	19.10.31	CP042404 igem-0000812	0.02
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> CBA3611	유전체서열 분석	19.11.06	CP041657 igem-0000412	0.03
5	<i>Lactobacillus</i> sp. CBA3605(WiKim0092)	유전체서열 분석	20.07.13	CP027190 igem-0001470	0.03
6	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> CBA3613	유전체서열 분석	20.07.13	CP058617 igem-0002075	0.02
7	<i>Lactobacillus brevis</i> DSR301	유전체서열 분석	20.12.17	igem-0002131	0.02
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSR-J266	유전체서열 분석	20.12.17	igem-0002132	0.02
9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 L4-120-5	유전체서열 분석	20.11.11	igem-0002125	4.4
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 L4-120-6	유전체서열 분석	20.11.11	igem-0002125	2.1
11	마우스 장내미생물 군집 분석	장내미생물 군집 분석	19.11.21	igem-0000813	

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Lactobacillus</i> sp. CBA3605	정신 건강 유산균	18.07.17	KACC8106 3BP	
2	<i>Lactobacillus</i> sp. CBA3606	정신 건강 유산균	18.07.17	KACC8106 4BP	
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSR J266	간 기능 개선용 유산균	18.01.23	KFCC1176 6P	
4	<i>Lactobacillus brevis</i> DSR J301	간 기능 개선용 유산균	18.01.23	KFCC1176 5P	
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> Wikim0110	정신 건강 유산균	19.05.03	KACC8109 2BP	
6	<i>Lactobacillus fermentum</i> EFEL6800	장 건강 유산균	19.11.08	KACC8110 6BP	
7	<i>Lactobacillus reuteri</i> EFEL6900	장 건강 유산균	19.11.08	KACC8110 7BP	
8	<i>Lactobacillus reuteri</i> EFEL6901	장 건강 유산균	20.06.02	KACC 81105BP	
9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 L4-120-5	장 건강 유산균	20.11.11	igem-0002 126	
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 L4-120-6	장 건강 유산균	20.11.11	igem-0002 125	
11	<i>Sporolactobacillus terrae</i> EFEL7003	PLA 생산 유산균	21.7.11	KCTC1460 7BP	

□ 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	유산균을 경구 투여한 쥐의 장내 미생물 군집 분석(FASTQ 파일 60건)	김치 유산균의 알콜성 간손상에 대한 보호 효과를 확인하기 위한 마우스 장내미생물 군집 분석 데이터	2019-11-21	igem-0000 813	1.3

□ 유전체 분석기술 개발

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

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Lactobacillus sakei</i> Wikim0074	유전체서열 분석	18.11.20	CP025206-8 iGEM-0000 248	0.02
2	<i>Lactococcus lactis</i> WiKim0068	유전체서열 분석	18.11.20	CP023392-4 iGEM-0000 207	0.02
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CBA3628	유전체서열 분석	19.10.31	CP042404 igem-0000 812	0.02
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> CBA3611	유전체서열 분석	19.11.06	CP041657 igem-0000 412	0.03
5	<i>Lactobacillus</i> sp. CBA3605(WiKim0092)	유전체서열 분석	20.07.13	CP027190 igem-0001 470	0.03
6	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> CBA3613	유전체서열 분석	20.07.13	CP058617 igem-0002 075	0.02
7	<i>Lactobacillus brevis</i> DSR301	유전체서열 분석	20.12.17	igem-0002 131	0.02
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSR-J266	유전체서열 분석	20.12.17	igem-0002 132	0.02
9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 L4-120-5	유전체서열 분석	20.11.11	igem-0002 125	4.4
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506 L4-120-6	유전체서열 분석	20.11.11	igem-0002 125	2.1

□ 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	Complete genome sequence of <i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2700, a host strain for transformation of pCB vectors.	Journal of Biotechnology	김슬아, 한남수	287	영국	Elsevier	SCI	2018. 12.	10.1016/j.jbiotec.2018.08.008
2	Development of Freeze-Thaw Tolerant <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG by Adaptive Laboratory Evolution	Frontiers in Microbiology	배재한, 한남수	9	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCI	2018. 11.	10.3389/fmicb.2018.02781
3	Suitability of <i>Lactobacillus plantarum</i> SPC-SNU 72-2 as a Probiotic Starter for Sourdough Fermentation	Journal of Microbiology and biotechnology	박다민, 한남수	11	한국	The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCI	2019.10	10.4014/jmb.1907.07039
4	Bacterial and fungal diversity in Laphet, traditional fermented tea leaves in Myanmar, analyzed by culturing, DNA amplicon-based sequencing, and PCR-DGGE methods	International Journal of Food Microbiology	Bo Bo, 한남수	320	영국	Elsevier	SCI	2020.01.16	https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108508
5	Development of <i>Leuconostoc lactis</i> -Specific Quantitative PCR and its Application for Identification and Enumeration in Fermented Foods	Food Analytical Methods	김슬아, 한남수	13	독일	Springer	SCI	2020.02.05	https://doi.org/10.1007/s12161-020-01720-8
6	Characterization of a potential probiotic bacterium <i>Lactococcus raffinolactis</i> WiKim0068 isolated from fermented vegetable using genomic and in vitro analyses	BMC Microbiology	정민영, 이창수, 서명지, 노성운, 이세희	20:136	미국	Springer Nature	SCIE	2020.05.	https://doi.org/10.1186/s12866-020-01820-9
7	Unraveling microbial fermentation features in kimchi: from classical to meta-omics approaches	Applied Microbiology and Biotechnology	이세희, 원태웅, 노성운, 전체옥	104:7731-7744	미국	Springer Nature	SCIE	2020.08.	https://doi.org/10.1007/s00253-020-10804-8

8	Screening of endogenous strong promoters of <i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2700 based on transcriptome analysis and its application for food-grade production of β -galactosidase	Journal of biotechnology	김서연 김슬아 서승오 한남수	325	영국	Elsevier	SCI	2021.01.10	https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.001
9	Suitability Analysis of 17 Probiotic Type Strains of Lactic Acid Bacteria as Starter for Kimchi Fermentation	Foods	서희 배재한 한남수	10(6)	스위스	MDPI	SCI	2021;06.21	https://doi.org/10.3390/foods10061435
10	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> MG7011: An Amylase and Phytase Producing Starter for the Preparation of Rice-Based Probiotic Beverages	Frontiers in Microbiology	조유미 김가운 한남수	12	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCI	2021.09	https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.745952
11	Development of Anti-inflammatory Probiotic <i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901 as Kimchi Starter: in vitro and In vivo Evidence	Frontiers in Microbiology	서희 성현빈 한남수	12:76 0476	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCI	2021.11	https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.760476

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2018 한국 미생물 생명공학회	김서연	2018.06.27	여수	대한민국
2	2018 한국 미생물 생명공학회	CHENG YAYUN	2018.06.27	여수	대한민국
3	2019 한국 미생물학회	이세희	2019.04.17	제주	대한민국
4	2019 한국 미생물 생명공학회	이세희	2019.06.24	제주	대한민국
5	2019 한국 미생물 생명공학회	김슬아	2019.06.24	제주	대한민국
6	2019 VIB	김슬아	2019.06.03	루벤	벨기에
7	2019 한국식품과학회	CHENG YAYUN	2019.06.26	송도	대한민국
8	2019 IPC	CHENG YAYUN	2019.06.18	프라하	체코
9	2019 한국식품과학회	곽준구	2019.06.26	송도	대한민국
10	2019 IPC	곽준구	2019.06.18	프라하	체코
11	2019 한국식품과학회	서희	2019.06.26	송도	대한민국
12	2019 한국 미생물 생명공학회	김서연	2019.06.24	제주	대한민국
13	2019 IPC	김서연	2019.06.18	프라하	체코
14	2019 한국 미생물 생명공학회	김현태	2019.06.24	제주	대한민국
15	2019 IPC	김현태	2019.06.18	프라하	체코
16	2020 한국식품과학회	서희	2020.07.01	광주	대한민국
17	2020 한국식품과학회	이일교	2020.07.01	광주	대한민국
18	2020 한국식품과학회	김슬아	2020.07.01	광주	대한민국
19	2020 한국식품과학회	천성원	2020.07.01	광주	대한민국
20	2020 한국식품과학회	김가운	2020.07.01	광주	대한민국
21	2020 한국미생물학회	조유미	2020.10.07	Online conference	대한민국
22	2020 한국미생물학회	김건희	2020.10.07	Online conference	대한민국
23	2020 한국미생물학회	이동현	2020.10.07	Online conference	대한민국
24	2020 한국미생물학회	김슬아	2020.10.07	Online conference	대한민국
25	2020 한국식품저장유통학회	이세희	2020.08.20	여수	대한민국
26	2020 IPC	서희	2020.11.11	Online conference	체코
27	2020 IPC	김건희	2020.11.11	Online conference	체코
28	2020 IPC	이일교	2020.11.11	Online conference	체코
29	2020 IPC	조유미	2020.11.11	Online conference	체코
30	2021 한국미생물생명공학회	CHENG YAYUN	2021.06.24	부산	대한민국
31	2021 한국미생물생명공학회	Tri Minh Nguyen	2021.06.24	부산	대한민국
32	2021 한국미생물생명공학회	천성원	2021.06.24	부산	대한민국
33	2021 한국미생물생명공학회	김가운	2021.06.24	부산	대한민국
34	2021 한국미생물생명공학회	홍성훈	2021.06.24	부산	대한민국
35	2021 한국미생물생명공학회	양수휘	2021.06.24	부산	대한민국
36	2021 한국식품과학회	김슬아	2021.07.07	대전	대한민국
37	2021 한국식품과학회	성현빈	2021.07.07	대전	대한민국
38	2021 한국식품과학회	이동현	2021.07.07	대전	대한민국
39	2021 한국식품과학회	김다혜	2021.07.07	대전	대한민국
40	2021 mBiome	김가운	2021.12.08	서울	대한민국
41	2021 mBiome	이세희	2021.12.08	서울	대한민국
42	2021 mBiome	류병혁	2021.12.08	서울	대한민국
43	2021 mBiome	한남수	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	Leuconostoc mesenteroides CBA3628의 전장 유전체	igem-0000812	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2019-10-31
2	Leuconostoc mesenteroides subsp. jonggajibkimchii DRC1506의 산내성 돌연변이의 전장 유전체2	igem-0002126	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2020-11-11
3	Leuconostoc mesenteroides subsp. jonggajibkimchii DRC1506의 산내성 돌연변이의 전장 유전체1	igem-0002125	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2020-11-11
4	Lactobacillus sp. CBA3605(WiKim0092)의 전장 유전체 분석	igem-0001470	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2020-07-13
5	Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum CBA3613의 전장 유전체	igem-0002075	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2020-10-26
6	Lactobacillus reuteri EFEL 6901	KACC 81105BP	국립농업과학원(KACC)	2020-06-02
7	Lactobacillus plantarum DSR-J266의 전장 유전체	igem-0002132	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단	2020-12-17
8	Lactobacillus fermentum EFEL 6800	KACC 81106BP	국립농업과학원(KACC)	2019-11-08
9	Lactobacillus reuteri EFEL 6900	KACC 81107BP	국립농업과학원(KACC)	2019-11-08
10	Lactococcus raffinolactis WiKim0068의 전장유전체	igem-0000207	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2019-11-06
11	Lactobacillus paracasei CBA3611의 전장 유전체	igem-0000412	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2019-11-06
12	Lactobacillus sakei WiKim0074의 전장 유전체	igem-0000248	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2019-02-08
13	Lactobacillus sp. CBA3606	KACC 81074BP	국립농업과학원(KACC)	2018-07-17
14	Lactobacillus sp. CBA3605	KACC 81073BP	국립농업과학원(KACC)	2018-07-17
15	Lactobacillus paracasei CBA3611	KACC 81092BP	국립농업과학원(KACC)	2019-05-03
16	Lactobacillus plantarum DSR J266	KFCC11765P	한국미생물보존센터(KCCM)	2018-01-23
17	Lactobacillus brevis DSR J301	KFCC11766P	한국미생물보존센터(KCCM)	2018-01-23
18	마우스 장내미생물 군집 분석	igem-0000813	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2019-11-21
19	Lactobacillus brevis DSR301의 전장 유전체	igem-0002131	농림축산식품 미생물유전체전략연구 사업단(iGEM)	2020-12-17
20	<i>Sporolactobacillus terrae</i> EFEL7003	KCTC14607BP	생물자원센터(KCTC)	2021-07-11

[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	간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도	한국	대상(주)	2018.11.12	10-2018-0138519	10-2121826	대상(주)	2020.06.05	10-2121826	30%	
2	클로스트리디오이데스 디피실레에 항균활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0093 균주 및 이를 포함하는 조성물	한국	한국식품연구원	2018.10.02	10-2018-0117897	10-2065180	노성운, 정민영, 이세희, 최학중	2020.01.06	10-2065180	30%	
3	클로스트리디오이데스 디피실레에 항균활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0092 및 이를 포함하는 조성물	한국	한국식품연구원	2018.10.02	10-2018-0117896	10-2065181	노성운, 정민영, 이세희, 최학중	2020.01.06	10-2065181	30%	
4	클로스트리디오이데스 디피실레에 항균활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0110 및 이를 포함하는 조성물	한국	한국식품연구원	2019.11	10-2019-0061497					30%	
5	프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스퍼멘툼EF EL6800 발효 종균	한국	충북대학교 산학협력단	2020.10.15	10-2020-0133154						
6	프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스류테리EF EL6901 발효 종균	한국	충북대학교 산학협력단	2020.12.23	10-2020-01821513						

○ 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

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

○ 국제 표준

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)

□ 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	양도	Leuconostoc mesenteroides DRC 1506 종균의 특이적 유전자 바코드 개발 및 이를 이용한 김치 내 종균의 신속하고 정확한 동정(identification)과	대상(주)	2019-09-01	10,000,000	해당 없음
2	통상실시권	프로바이오틱 기능이 있는 신규의 락토바실러스 류테리 EFEL6901 발효 종균	대상(주)	2021-08-23	22,000,000	해당 없음
3	통상실시권	프로바이오틱 기능이 있는 신규의 락토바실러스 페멘툼 EFEL6800 발효 종균	웰찬푸드	2021-11-25	65,000,000	해당 없음

- * 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	기존제품새선	국내	제프리뉴얼	종균적용	대상	645,000		2021년	10년이상

- * 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)		
락토바실러스 류테리 EFEL6901(Lb. reuteri 14)균주를 종균으로 적용	2021	645,000		645,000	매출액
합계		645,000		645,000	

□ 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	현황													
			학위별				성별		지역별							
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타			
1																

□ 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
제 220999호	포상	동림축산식품과학기술 대상	대통령상	류병희	2019.11.11	행정안전부

[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)

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 마이크로바이옴 기반 in vitro 스크리닝을 통한 기능성 미생물 균주 탐색 및 확보	○ 프로바이오틱스(장 건강, 간 건강, 정신 건강 등) 특성 유산균 선별하였고 각 균주의 특성, 유전체 구조 및 대사체 분석함	○ 100
○ 기능성 유전자/물질 분석, 발효공정 최적화(개량) 및 표준화	○ 우수한 발효능 및 기능성을 가진 김치발효용 스타터 균주를 개발하기 위해 김치환경에 최적화된 균주로 개량함	○ 100
○ 유용성(기능성), 안정성, 안전성 등 평가 및 검증	○ 동물효능평가를 통해 장내 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원할 기능 등 프로바이오틱스 효능을 검증함	○ 100
○ 고부가가치 기능성 식품 상품화	○ 고부가가치 기능성 식품을 상품화하여 상용화함	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

해당 없음

2) 자체 보완활동

해당 없음

3) 연구개발 과정의 성실성

해당 없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

<기대성과>

- 김치유산균의 기능성 규명 및 안전성에 대한 과학적 정보를 제공하여 김치의 우수성 및 이미지 제고에 기여
- 김치 프로바이오틱스 사용한 김치의 고급화는 김치산업의 매출증대로 이어지고 김치의 국제화 및 수출증대에 기여함
- 특허 및 산업재산권을 확보하고 김치종주국으로서의 위상확보
- 확립된 김치유산균 종균으로 식물성 건강발효식품 개발 및 상품화

<파급효과>

[기술적 측면]

- 확립된 김치유산종균 개량기술은 김치발효 미생물 개량뿐만 아니라 다양한 발효미생물 개량에도 사용가능하고 향후 국내 발효산업에 있어서 중요한 역할을 수행함
- 우수 김치유산균의 유전체정보 분석결과를 통해 김치유산종균개발에 활용할 뿐만 아니라 우수 김치유산균의 다양한 기능성관련 유전자 정보를 제공해주고 이를 바탕으로 한 기능성 식품소재의 개발을 이끌어냄
- 멀티오믹스데이터 분석을 통한 프로바이오틱스 작용 기전의 과학적 검증
- 김치유산균의 다양한 유전체 및 대사체 정보 및 분석기술을 국내 전통 발효미생물 연구에 활용함
- 프로바이오틱스 특성을 가진 김치유산종균을 사용한 김치의 표준화 및 고급화 기술은 김치의 국제연구 경쟁력을 확보하고, 한국의 전통발효식품의 위상을 높였음
- 맞춤형 발효식품용 다양한 프로바이오틱스 생산 기술 개발 및 유전체 분석 기술 확립함
- 본 연구과제에서 활용되는 다양한 생물정보학적 분석기술은 향후 선진국과의 오믹스 연구기술 격차를 줄이고 오믹스 관련 연구전문가의 양성에 기여함
- 프로바이오틱스 기능성 검증과 멀티오믹스 분석 시스템을 통한 프로바이오틱스 관련 핵심 기술 확보 및 프로바이오틱스 기전 분석을 위한 연구 전문연구인력 양성
- 장내 미생물 개선 및 면역 조절 기능성 기전과 유효활성 성분 규명 기술 확보

[경제적·산업적 측면]

- 선발된 프로바이오틱 종균의 기능성 및 안전성 분석을 통한 개별 인정형 건강기능식품 소재 등록
 - 식물성 프로바이오틱 종균 이용 다양한 발효 상품의 산업화 및 세계화
 - 김치의 건강기능성을 향상시킴으로 인한 김치 대중화 및 세계화
 - 우수한 김치발효 종균을 개발하여 특허 및 산업재산권을 확보하여 김치생산에 대한 독점적 지위를 확보할 수 있음
 - 김치유산균 유전체 분석을 통한 김치 및 김치유산균의 기능성 및 안전성 규명은 김치의 국제화에 이바지할 것이며 이는 김치의 수출증대에도 기여함
 - 전장 유전체 상관성 분석 및 유전자 편집 기술 개발 관련 전문연구인력 양성
 - 과학적 자료 제공을 통한 건강기능식품 효능에 대한 소비자 신뢰도 향상 및 건강기능식품 시장 성장 유도
 - 기능성 기전 및 활성유효성분이 검증된 균주로서 향후 면역조절 및 장내 균총 조절 기능을 동시에 가지는 맞춤형 프로바이오틱스 개발을 통한 차별화된 제품 제공
 - 장내 유용 미생물 기반 면역조절 및 장내균총 조절 소재의 특허 출원 및 제품화
 - 연간 약 2,500억원 규모의 프로바이오틱스 시장에서 약 300억 정도의 매출향상 기여
 - 균주 배지 및 배양공정 최적화를 통한 유틸리티 비용 등 생산 원가절감 및 생산성향상
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	3	
	비SCIE		
	계	3	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	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			

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	918006-04			
사업구분	포스트게놈다부처유전체사업					
연구분야	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업			과제구분	단위	
사업명	포스트게놈다부처유전체사업				주관	
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	김치용 프로바이오틱스 개발 및 건강기능 김치 산업화			과제유형	개발	
연구개발기관	충북대학교 산학협력단			연구책임자	한남수	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간		계
				현금	현물	
	1차년도	2018. 04. 25 - 2018. 12. 31 (9개월)	209,000	18,200	121,800	349,000
	2차년도	2019. 01. 01 - 2019. 12. 31 (12개월)	278,000	24,300	162,466	464,766
	3차년도	2020. 01. 01 - 2020. 12. 31 (12개월)	277,000	24,300	162,466	463,766
	4차년도	2021. 01. 01 - 2021. 12. 31 (12개월)	277,000	24,300	162,466	463,766
	계		1,041,000	91,100	609,198	1,741,298
참여기업	(주) 대상					
상대국	상대국연구개발기관					

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.10

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충북대학교	교수	한남수

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	
----	---

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

등급: 우수

본 연구에서는 김치에서 분리한 우수한 발효능과 기능성을 가진 김치유산발효종균 개발을 위해 균주를 선정함. 최신 연구동향을 따라 정신건강 프로바이오틱스를 선별하고 국민건강에 고위험 요소인 장 건강과 간 건강에 도움을 주고 김치에 고효율로 사용가능한 프로바이오틱 유산균을 개발함. 또한, 균주들을 사용하여 유전체 연구를 통해 김치 유산균의 기능적, 유전적 특성을 이해하고, 김치발효환경에 맞도록 개량하여 고부가가치 프로바이오틱스 김치 개발 및 출시함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

등급: 우수

기술적인 측면에서 생물학정보기술을 이용한 프로바이오틱스 종균의 특성(발효 적성, 건강기능성, 안전성) 규명, 생산 기술 개발 및 프로바이오틱스 특성을 가진 김치유산종균의 사용으로 인한 김치의 표준화 및 고급화를 이끌어냄. 또한, 특허 및 산업재산권을 확보하고 김치종주국으로서의 위상을 확보하였으며 건강기능성 프로바이오틱스를 김치용 프로바이오틱스 종균으로 사용하여 김치 개발 및 상품화함.

경제적인 측면에서는 선발된 김치유산균의 기능성 규명 및 안전성에 대한 과학적 정보를 제공하여 김치의 우수성 및 이미지 제고에 기여했으며, 김치 프로바이오틱스 사용한 김치의 고급화는 김치산업의 매출 증대로 이끌었음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

등급: 우수

우수 김치유산균종의 개발은 표준화된 고품질의 김치생산에 활용이 가능하고, 우수한 김치발효용 프로바이오틱스를 사용하여 김치의 산업화 및 세계화에 활용가능함. 또한, 김치유산균의 유전체 확보 및 데이터베이스 구축으로 향후 관련 연구를 추가적으로 수행하거나 타 발효연구에 활용할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

등급: 우수.

연구 수행 중 얻어진 결과를 비롯한 대용량의 데이터베이스 관리 및 인프라 구축을 위하여 사업 개시 후 초기에 DB관리용 전용 서버를 구매하여, 각 세부과제 및 협동과제 참여자의 연구결과 및 각종 정보를 보존, 관리하기 위한 공동 전용장비로 활용하고 모든 참여 연구팀이 유기적인 협력관계를 구축하여 최고수준의 연구결과를 도출함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

등급: 우수

정기적인 심포지엄, 세미나, 워크숍 등을 개최하여 주요 연구 분야의 정보 및 기술을 적극적으로 수집하고, 관련 정보 및 기술을 얻기 위해 국내 관련 분야 많은 전문가와 김치산업 관련자의 의견을 적극적으로 수렴하여 김치 및 종균개발에 사용할 균주의 다양한 특성 분석 방법에 활용하고자 함. 또한 국내외 산·학·연 등의 관련 연구 분야 및 타 분야 전문가들과 연구 네트워크를 구축하여 공동연구 및 상호간의 정보 교류 체제를 구축, 활성화함. 또한, 목표한 성과들에 달성 및 초과 달성함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
마이크로바이옴 기반 in vitro 스크리닝을 통한 기능성 미생물 균주 탐색 및 확보	30	100	<ul style="list-style-type: none">김치 및 장내 세균으로부터 프로바이오틱스 기능을 가진 유산균 선별하여 김치 환경에 적응한 산/담즙 내성 프로바이오틱스 후보 균주군 확보함프로바이오틱스(장 건강, 간 건강, 정신 건강 등) 특성 유산균 선별하였고 각 균주의 특성, 유전체 구조 및 대사체 분석함
기능성 유전자/물질 분석, 발효공정 최적화(개량) 및 표준화	20	100	<ul style="list-style-type: none">우수한 발효능과 기능성을 가진 김치발효용 스타터균주를 개발하기 위해 김치환경에 최적화된 균주로 개량함
유용성(기능성), 안정성, 안전성 등 평가 및 검증	20	100	<ul style="list-style-type: none">장 환경에서 미생물/미생물, 미생물/상피세포, 식품/미생물 상관관계 분석하였으며 동물효능평가를 통해 장내 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원할 기능 등 프로바이오틱스 효능을 검증함
고부가가치 기능성 식품 상품화	30	100	<ul style="list-style-type: none">프로바이오틱스 김치 개발 및 상품화
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 김치 발효식품의 프로바이오틱스 기능성 미생물을 종균화하고 고부가가치 기능성 식품으로 산업화를 이룸. 세부적으로 (1) 기능성 발효 균주를 선정하고, (2) 균주 특성을 분석하여 (3) 기능성 및 효능을 검증하고, (4) 발효 종균 생산 공정을 표준화하여 (5) 고부가가치 기능성 식품을 개발 및 출시함. 따라서, 본 과제를 충실히 수행하였으며 김치유산균의 유전체 확보 및 데이터 베이스 구축으로 향후 관련 연구를 추가적으로 수행하거나 타 발효연구에 활용할 수 있을 것으로 기대함

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

우수 김치유산균종의 개발은 표준화된 고품질의 김치생산에 활용이 가능하고, 우수한 김치발효용 프로바이오틱스를 사용하여 김치의 산업화 및 세계화에 활용 가능함.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 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	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업	
연구과제명	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단			
주관연구개발기관	충북대학교 산학협력단	주관연구책임자	한남수	
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	1,041,000	700,298		1,741,298
연구개발기간	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3년 9개월)			
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 마이크로바이옴 기반 in vitro 스크리닝을 통한 기능성 미생물 균주 탐색 및 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 김치 및 장내 세균으로부터 프로바이오틱스 기능을 가진 유산균 선별하여 김치 환경에 적응한 산/담즙 내성 프로바이오틱스 후보 균주군 확보함 • 프로바이오틱스(장 건강, 간 건강, 정신 건강 등) 특성 유산균 선별하였고 각 균주의 특성, 유전체 구조 및 대사체 분석함
② 기능성 유전자/물질 분석, 발효공정 최적화(개량) 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 우수한 발효능과 기능성을 가진 김치발효용 스타터균주를 개발하기 위해 김치환경에 최적화된 균주로 개량함
③ 유용성(기능성), 안정성, 안전성 등 평가 및 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 장 환경에서 미생물/미생물, 미생물/상피세포, 식품/미생물 상관관계 분석하였으며 동물효능평가를 통해 장내 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원할 기능 등 프로바이오틱스 효능을 검증함
④ 고부가가치 기능성 식품 상품화	<ul style="list-style-type: none"> • 프로바이오틱스 김치 개발 및 상품화

* 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 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
1차	2	3				2			
2차	2	3				2			
3차	2	3			1	2			
4차	2	3				2			
계	6	9				6			
실적	11	11		1		10			

표. 기타 성과 목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표							기타 (타 연구 활용 등)	
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용		홍보 전시
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10		10	15	15	10						10	10		10			
최종목표	3	3		1	20	2	80						10	3	8	4			
1차년도	목표												1	3	2	1			
	실적	3											2	3.27	2	0			
2차년도	목표	2											2	3	2	1			
	실적												1	3.75	13	2			
3차년도	목표	1											2	3	2	1			
	실적	2	2										4	4.26	14	4			
4차년도	목표		2		1	20	1	10					2	3	2	1			
	실적		1		2	87	2	645					3	4.78	14	3			
소계	목표	3	2		1	20	2	10					7	3	8	4			
	실적	6	3		3	87	2	645					11	4.31	43	9			
종료 1차년도		1				1	20						2	3					
종료 2차년도							20						1	3					
종료 3차년도							30												
종료 4차년도																			
소계		1				1	70						3						
합계	6	4		3	87	3	715						14	3	43	9			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스퍼멘툼 EFEL6800 발효 종균
②	프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스류테리 EFEL6901 발효 종균

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		○				○				
②의 기술		○				○				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 균주는 발효 종균으로서의 적합성과 우수한 프로바이오틱스 특성을 보임. 채소, 과일, 곡물 등의 발효 균주로서 적합하고, 항염 활성의 건강 기능성 프로바이오틱스 종균으로 사용될 수 있음. 대상에서는 본 균주의 개별인정을 통해 사업화로 이끌 것임
②의 기술	본 균주는 발효 종균으로서의 적합성과 우수한 프로바이오틱스 특성을 보임. 또한, 실제 대장염 유도 동물 모델에서 항염 활성이 우수한 것으로 나타남. 채소, 과일, 곡물 등의 발효 균주로서 적합하고, 항염증 활성의 건강 기능성 프로바이오틱스 종균으로 사용될 수 있음.

7. 연구종료 후 성과창출 계획


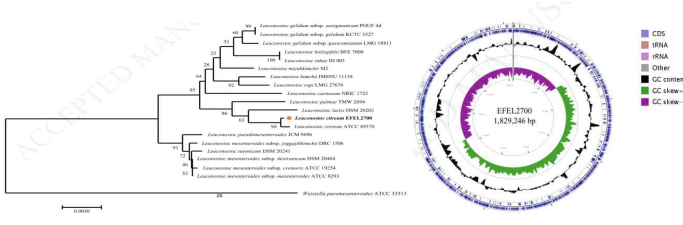

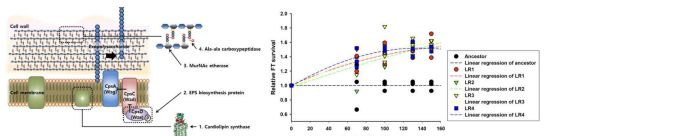

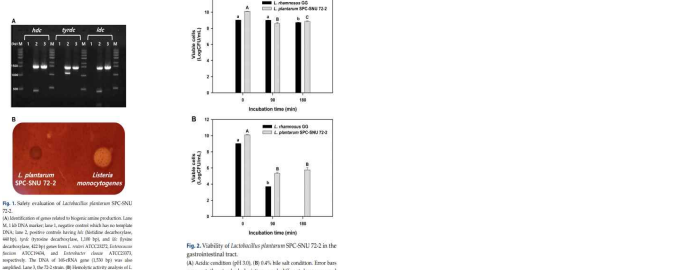
성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	표준 유전자 해독	메타 유전자 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	6	9				6			
연구기간내 달성실적	8	11		1		8			
연구종료후 성과창출 계획									

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	비SCI			논문평균 I-F	학술발표		정책 활용
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건	명	건	건		
가중치	10	10			10	15	15	10						10	10		10			
최종목표	3	3			1	20	2	80				10		3	8		4			
연구기간내 달성실적	5	3			2	87	2	715				10		4.31	43		9			
연구종료후 성과창출 계획		1			1		1					3		3						

(단위 : 건수, 백만원, 명)

연구성과 실적 증빙자료

성과유형: 연구논문

번호	실적증빙자료	주요 연구내용
1	 <p>Journal of Biotechnology 2017, 20(10): 12-16</p> <p>Complete genome sequence of <i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2700, a host strain for transformation of pCB vectors</p> <p>Seul-Ah Kim¹, Ye-Ji Jung¹, Ji Eun Heo¹, Ling Lu^{1,2}, Jin Seok Moon¹, Nam Soo Han^{1,3*}</p> <p>*Seul-Ah Kim, Ye-Ji Jung, Ji Eun Heo, Ling Lu, Jin Seok Moon, Nam Soo Han</p> <p>¹Seoul National University, ²Center for Bio-Industry Development, ³Division of Animal, Horticultural, and Food Sciences, Chungbuk National University, Chungbuk, 28164, Republic of Korea</p> <p>⁴Yongin Research Center for Chemical and Bioprocess Technology of Form Plastics, School of Biological and Chemical Engineering, Yonsei University of Science and Technology, Incheon, 406-701, Korea</p> <p>Acknowledgements</p> <p>This study was supported by a fund from the Intelligent Synthetic Biology Center of Global Frontier Project sponsored by the Korean Ministry of Science, ICT, and Future Planning (2013M3A6A8073553) and a fund from the Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea (918006-04).</p>	 <p>Phylogenetic tree showing relationships between various <i>Leuconostoc</i> species. The genome map of EFEL2700 (1,829,246 bp) is shown with various features like CDS, rRNA, tRNA, and other elements.</p>
2	 <p>Development of Freeze-Thaw Tolerant <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG by Adaptive Laboratory Evolution</p> <p>Ho Won Kwon¹, Jae-Han Bae¹, Cheol-An Kim¹ and Nam Soo Han^{1*}</p> <p>¹Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Chungbuk, Korea</p> <p>FUNDING</p> <p>This research was supported by the funds from the Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (as part of the multi-ministerial) Genome Technology to Business Translation Program (No. 918006-04) and from Traditional Culture Convergence Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning (NRF-2017M3C1B5019292).</p>	 <p>Schematic diagram of the adaptive laboratory evolution process: 1. Cell wall synthesis, 2. EPS biosynthesis protein, 3. EPS release, 4. Cell-surface entrapment.</p> <p>Growth curves showing cell count (log CFU/mL) over 160 cycles for various conditions: Accultured, Linear regression of entorator, LRI, Linear regression of LRI, Linear regression of LRI, LRI, Linear regression of LRI.</p>
3	 <p>Suitability of <i>Lactobacillus plantarum</i> SPC-SNU 72-2 as a Probiotic Starter for Sourdough Fermentation</p> <p>Do Min Park¹, Jae-Han Bae¹, Min Soo Kim¹, Hyunsoo Kim¹, Shin Dae Kang¹, Sangmin Shin¹, Doekbun Lee¹, Jin-Ha Seo¹, Hee Kang¹, and Nam Soo Han^{1*}</p> <p>*Nam Soo Han, Doekbun Lee, Hee Kang, Sangmin Shin, Shin Dae Kang, Hyunsoo Kim, Min Soo Kim, Jae-Han Bae, Do Min Park</p> <p>¹Seoul National University, ²Center for Bio-Industry Development, ³Division of Animal, Horticultural, and Food Science, Chungbuk National University, Chungbuk, 28164, Republic of Korea</p> <p>⁴Research Institute of Food and Biotechnology, SPC Group, Seoul, 06826, Republic of Korea</p> <p>⁵Department of Agricultural Biotechnology, Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University, Seoul, 151-747, Republic of Korea</p> <p>⁶Yonsei University College, Kyonggi (Seoul) University, Yongin 17384, Republic of Korea</p> <p>Acknowledgements</p> <p>The present work was supported by the SPC Group and by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agricultural Microbiome R&D Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (918006-04-2-SB010).</p>	 <p>Fig. 1. Gel electrophoresis of PCR products for <i>lactA</i> and <i>lactM</i> genes. Lane 1: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 2: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 3: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 4: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 5: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 6: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 7: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 8: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 9: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 10: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 11: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 12: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 13: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 14: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 15: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 16: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 17: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 18: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 19: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 20: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 21: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 22: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 23: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 24: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 25: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 26: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 27: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 28: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 29: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 30: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 31: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 32: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 33: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 34: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 35: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 36: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 37: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 38: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 39: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 40: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 41: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 42: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 43: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 44: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 45: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 46: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 47: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 48: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 49: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 50: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 51: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 52: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 53: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 54: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 55: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 56: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 57: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 58: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 59: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 60: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 61: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 62: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 63: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 64: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 65: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 66: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 67: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 68: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 69: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 70: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 71: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 72: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 73: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 74: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 75: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 76: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 77: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 78: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 79: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 80: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 81: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 82: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 83: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 84: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 85: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 86: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 87: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 88: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 89: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 90: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 91: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 92: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 93: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 94: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 95: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 96: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 97: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 98: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 99: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 100: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 101: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 102: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 103: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 104: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 105: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 106: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 107: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 108: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 109: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 110: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 111: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 112: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 113: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 114: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 115: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 116: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 117: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 118: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 119: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 120: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 121: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 122: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 123: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 124: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 125: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 126: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 127: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 128: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 129: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 130: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 131: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 132: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 133: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 134: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 135: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 136: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 137: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 138: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 139: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 140: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 141: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 142: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 143: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 144: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 145: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 146: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 147: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 148: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 149: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 150: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 151: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 152: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 153: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 154: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 155: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 156: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 157: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 158: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 159: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 160: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 161: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 162: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 163: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 164: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 165: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 166: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 167: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 168: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 169: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 170: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 171: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 172: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 173: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 174: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 175: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 176: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 177: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 178: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 179: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 180: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 181: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 182: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 183: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 184: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 185: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 186: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 187: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 188: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 189: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 190: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 191: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 192: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 193: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 194: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 195: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 196: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 197: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 198: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 199: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 200: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 201: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 202: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 203: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 204: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 205: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 206: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 207: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 208: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 209: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 210: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 211: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 212: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 213: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 214: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 215: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 216: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 217: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 218: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 219: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 220: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 221: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 222: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 223: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 224: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 225: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 226: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 227: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 228: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 229: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 230: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 231: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 232: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 233: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 234: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 235: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 236: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 237: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 238: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 239: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 240: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 241: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 242: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 243: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 244: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 245: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 246: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 247: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 248: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 249: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 250: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 251: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 252: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 253: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 254: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 255: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 256: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 257: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 258: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 259: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 260: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 261: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 262: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 263: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 264: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 265: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 266: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 267: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 268: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 269: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 270: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 271: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 272: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 273: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 274: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 275: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 276: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 277: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 278: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 279: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 280: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 281: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 282: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 283: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 284: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 285: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 286: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 287: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 288: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 289: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 290: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 291: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 292: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 293: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 294: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 295: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 296: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 297: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 298: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 299: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 300: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 301: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 302: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 303: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 304: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 305: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 306: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 307: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 308: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 309: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 310: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 311: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 312: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 313: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 314: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 315: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 316: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 317: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 318: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 319: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 320: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 321: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 322: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 323: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 324: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 325: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 326: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 327: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 328: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 329: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 330: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 331: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 332: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 333: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 334: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 335: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 336: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 337: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 338: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 339: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 340: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 341: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 342: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 343: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 344: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 345: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 346: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 347: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 348: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 349: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 350: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 351: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 352: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 353: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 354: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 355: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 356: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 357: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 358: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 359: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 360: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 361: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 362: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 363: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 364: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 365: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 366: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 367: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 368: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 369: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 370: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 371: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 372: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 373: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 374: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 375: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 376: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 377: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 378: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 379: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 380: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 381: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 382: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 383: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 384: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 385: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 386: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 387: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 388: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 389: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 390: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 391: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 392: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 393: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 394: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 395: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 396: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 397: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 398: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 399: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 400: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 401: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 402: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 403: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 404: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 405: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 406: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 407: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 408: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 409: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 410: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 411: <i>L. plantarum</i> SPC-SNU 72-2. Lane 412: <</p>

번호	실적증빙자료	주요 연구내용
7	<p>Applied Microbiology and Biotechnology https://doi.org/10.1007/s00253-020-10614-9</p> <p>MINI-REVIEW</p> <p>Check for updates</p> <p>Unraveling microbial fermentation features in kimchi: from classical to meta-omics approaches</p> <p>Se Hee Lee² · Tae Woong Whon¹ · Seong Woon Roh¹ · Che Ok Jeon²</p> <p>Received: 16 June 2020 / Revised: 22 July 2020 / Accepted: 30 July 2020 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020</p> <p>Abstract Kimchi is a traditional Korean fermented food prepared via spontaneous fermentation by various microorganisms originating from vegetables such as kimchi cabbage, radishes, and garlic. Recent advances in meta-omics approaches that integrate metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics have contributed to exploring and understanding food fermentation processes. Kimchi microbial communities are composed of mostly lactic acid bacteria such as <i>Leuconostoc</i>, <i>Lactobacillus</i>, and <i>Weissella</i> and fewer eukaryotic microorganisms and kimchi fermentation are accomplished by complex microbial metabolisms to produce diverse metabolites such as lactate, acetate, CO₂, ethanol, mannitol, amino acids, formate, malate, diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol, which determine taste, quality, health benefits, and safety of fermented kimchi products. Therefore, in the future, kimchi researches should be systematically performed using the meta-omics approaches to understand complex microbial metabolisms during kimchi fermentation.</p> <p>Key points • Spontaneous fermentation by raw material microbes gives kimchi its unique flavor. • The kimchi microbiome is altered by environmental factors and raw materials. • Through the multi-omics approaches, it is possible to accurately analyze the diversity and metabolic characteristics of kimchi microbiome and discover potential functionalities.</p> <p>Keywords Kimchi · Lactic acid bacteria · Fermentation · Genome · Meta-omics approaches · <i>Leuconostoc</i> · <i>Lactobacillus</i> · <i>Weissella</i></p> <p>Funding information This research was supported by a grant from the World Institute of Kimchi (KE2001-2), which is funded by the Ministry of Science and ICT, and Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (IPET) through Agricultural Microbiome R&D Program, which is funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (918006-04-1-HD020), Republic of Korea.</p>	<p>Fig. 1 The general workflow for kimchi fermentation process. (a) Raw food materials (cabbage, radish, and garlic) are prepared and mixed with salt and water. (b) The mixture is packed in a container and fermented for 1–2 weeks. (c) The fermented kimchi is stored in a refrigerator. (d) The kimchi is consumed as a side dish.</p> <p>Fig. 2 A circular phylogenetic tree showing the relationships between the kimchi microbial communities. The tree is rooted at the bottom and branches out to various species. The species names are listed around the tree, including <i>Leuconostoc</i>, <i>Lactobacillus</i>, and <i>Weissella</i>.</p>
8	<p>Journal of Biotechnology journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbt</p> <p>Screening of endogenous strong promoters of <i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2700 based on transcriptome analysis and its application for food-grade production of β-galactosidase</p> <p>Seo Yeon Kim¹, Seul-Ah Kim¹, Ye-Ji Jang¹, Seung-Oh Seo^{1,2}, Nam Soo Han^{1,2}</p> <p>Acknowledgement This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agricultural Microbiome R&D Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (918006-04-2-SB010). This work was based on the thesis submitted by the first author Kim, S. Y for Master's Thesis, Chungbuk National University, 2020.</p>	<p>Fig. 1 Phenotypic determination of β-galactosidase activity in <i>L. citreum</i> EFEL2700 transformant harboring pCB4170 promoter-Bgal plasmids on M9 agar plates containing X-gal and chloramphenicol. A, pCB4170 (empty vector); B, pCB4170-P710-Bgal; C, pCB4170-P920-Bgal; D, pCB4170-P920-Bgal; E, pCB4170-P920-Bgal.</p> <p>Fig. 2 SDS-PAGE analysis of crude enzyme extract from <i>Leuconostoc citreum</i> EFEL2700 transformants. Upper arrow shows large subunit of β-galactosidase (72 kDa), L: Protein ladder; 1: crude enzyme extract from <i>L. citreum</i> harboring pCB4170; 2: crude enzyme extract from <i>L. citreum</i> harboring pCB4170-P710-Bgal; 3: crude enzyme extract from <i>L. citreum</i> harboring pCB4170-P920-Bgal; 4: crude enzyme extract from <i>L. citreum</i> harboring pCB4170-P670-Bgal; 5: crude enzyme extract from <i>L. citreum</i> harboring pCB4170-P95-Bgal.</p>
9	<p>foods NDPI</p> <p>Article Suitability Analysis of 17 Probiotic Type Strains of Lactic Acid Bacteria as Starter for Kimchi Fermentation</p> <p>Hee Seo^{1,2}, Jae-Han Ba^{1,2}, Gayun Kim¹, Seul-Ah Kim¹, Byung Hee Ryu² and Nam Soo Han^{1,2}</p> <p>Funding: This research was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (IPET) through Agricultural Microbiome R&D Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (918006-04-3-SB010).</p>	<p>Fig. 1 Suitability analysis of 17 probiotic type strains of lactic acid bacteria as starter for kimchi fermentation. (A) PCA plot showing the first two principal components (PC1: 45.66%, PC2: 18.41%). (B) Bar chart showing the suitability score for each strain based on harmony of taste, texture strength, and total preference.</p>
10	<p>frontiers ORIGINAL RESEARCH published: 22 September 2021 doi: 10.3389/fmicb.2021.745821</p> <p>Limosilactobacillus fermentum MG7011: An Amylase and Phytase Producing Starter for the Preparation of Rice-Based Probiotic Beverages</p> <p>Hyunbin Seong¹, Yu Mi Jo¹, Seong Won Cheou¹, Chung-Ho Kang¹ and Nam Soo Han^{1,2}</p> <p>FUNDING This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agricultural Microbiome R&D Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (918006-04-4-SB010). This work was based on the thesis submitted by YJ for Master's Thesis, Chungbuk National University, 2021.</p>	<p>Fig. 1 Suitability analysis of <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MG7011 as a starter for the preparation of rice-based probiotic beverages. (A) Bar chart showing viable cell counts (CFU/ml) at 0h and 24h for various strains. (B) Bar chart showing amylase activity (IU/ml) at 0h and 24h for various strains.</p>
11	<p>frontiers Suitability analysis of <i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901 as probiotic kimchi starter with anti-inflammatory activity: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> evidence</p> <p>Hee Seo^{1,2}, Hyunbin Seong¹, Gayun Kim¹, Yu Mi Jo¹, Seong Won Cheou¹, Byung Hee Ryu², Nam Soo Han^{1,2}</p> <p>FUNDING This research was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (IPET) through Agricultural Microbiome R&D Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (918006-04-4-SB010). This work was based on the thesis submitted by the first author HS for Master's Thesis, Chungbuk National University, 2021.</p>	<p>Fig. 1 Suitability analysis of <i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901 as a probiotic kimchi starter. (A) Bar chart showing cell growth (OD₆₀₀) over time. (B) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) over time. (C) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) for different strains. (D) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) for different strains. (E) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) for different strains. (F) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) for different strains. (G) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) for different strains. (H) Bar chart showing cell viability (CFU/ml) for different strains.</p>

성과유형: 지식재산권(출원)

번호	실적증빙자료	관련내용
1	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.11.12 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2018-0138519 (잠수번호 1-1-2018-1123079-40) 출원인명칭 대상 주식회사(1-1998-001450-0) 대리인성명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1) 발명자성명 주우하 고미연 류병희 이진혁 발명의명칭 간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도</p> </div>	<p style="text-align: center;">간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도</p>
2	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2020.10.15 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2020-0131354 (잠수번호 1-4-2020-108843-12) (DAS잠금코드8064) 출원인명칭 충북대학교 산학협력단(2004-016822-0) 대리인성명 특허법인태동(9-2008-100001-5) 발명자성명 한남수 서희 발명의명칭 프로바이오틱 기능이 있는 신규의 락토바실러스 파렌틀 EFEL6800 발효 증균</p> </div>	<p style="text-align: center;">프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스파렌틀EFEL6800 발효 증균</p>
3	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2020.12.23 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2020-0182513 (잠수번호 1-1-2020-1405798-44) (DAS잠금코드102A) 출원인명칭 충북대학교 산학협력단(2004-016822-0) 대리인성명 특허법인태동(9-2008-100001-5) 발명자성명 한남수 서희 발명의명칭 프로바이오틱 기능이 있는 신규의 락토바실러스 파렌틀 EFEL6901 발효 증균</p> </div>	<p style="text-align: center;">프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스류테레리EFEL6901 발효 증균</p>
4	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2019.03.14 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 원조번호(19R100497) 출원번호 10-2019-0061497 (잠수번호 1-1-2019-0538501-84) 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3) 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8) 발명자성명 이세희 안승우 김주석 노성운 최학중 발명의명칭 클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 균주 및 이를 포함하는 조성물</p> </div>	<p style="text-align: center;">클로스트리디오이데스디피실레에 항균활성을 갖는 락토바실러스속 Wikim0110 및 이를 포함하는 조성물</p>
5	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.10.02 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 원조번호(P18R1009544) 출원번호 10-2018-0117899 (잠수번호 1-1-2018-0976171-93) 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3) 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8) 발명자성명 노성운 정만영 이세희 최학중 발명의명칭 클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0092 균주 및 이를 포함하는 조성물</p> </div>	<p style="text-align: center;">클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0092 균주 및 이를 포함하는 조성물</p>
6	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.10.02 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 원조번호(P18R1009545) 출원번호 10-2018-0117897 (잠수번호 1-1-2018-0976172-38) 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3) 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8) 발명자성명 노성운 정만영 이세희 최학중 발명의명칭 클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0093 균주 및 이를 포함하는 조성물</p> </div>	<p style="text-align: center;">클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 속 Wikim0093 균주 및 이를 포함하는 조성물</p>

지식재산권(등록)

번호	실적증빙자료	관련내용
1	 <p>특허증 CERTIFICATE OF PATENT</p> <p>특허 제 10-2065180 호 Patent Number</p> <p>출원번호 제 10-2018-0117896 호 Application Number</p> <p>출원일 2018년 10월 02일 Filing Date</p> <p>등록일 2020년 01월 06일 Registration Date</p> <p>발명의 명칭 The Use of the Invention 클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 속 WkIm0092 균주 및 이를 포함하는 조성물</p> <p>특허권자 Inventor 한국식품연구원(130122-*****)</p> <p>발명자 Inventor 등록사실관계 기재</p> <p>위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.</p>  <p>2020년 01월 06일 특허청장 COMMISSIONER KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE 박원주</p>	<p>클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스속 WkIm0093 균주 및 이를 포함하는 조성물</p>
2	 <p>특허증 CERTIFICATE OF PATENT</p> <p>특허 제 10-2065181 호 Patent Number</p> <p>출원번호 제 10-2018-0117897 호 Application Number</p> <p>출원일 2018년 10월 02일 Filing Date</p> <p>등록일 2020년 01월 06일 Registration Date</p> <p>발명의 명칭 The Use of the Invention 클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스 속 WkIm0093 균주 및 이를 포함하는 조성물</p> <p>특허권자 Inventor 한국식품연구원(130122-*****)</p> <p>발명자 Inventor 등록사실관계 기재</p> <p>위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.</p>  <p>2020년 01월 06일 특허청장 COMMISSIONER KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE 박원주</p>	<p>클로스트리디오이데스 디피실레에 항균 활성을 갖는 락토바실러스속 WkIm0092 및 이를 포함하는 조성물</p>
3	 <p>등록특허 10-2121826</p> <p>(19) 대한민국특허청(KR) (45) 공개일자 2020년06월12일 (12) 등록특허공보(B1) (11) 등록번호 10-2121826 (24) 등록일자 2020년06월05일</p> <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) (72) 특허인자 C12N 1/20 (2006.01) AS2C 33/78 (2016.01) 대상 주지회사 A22C 30/744 (2018.01) A22P 1/18 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01) C12S 1/25 (2006.01) (72) 발명자 주우하 (52) CIP지분분류 C12N 1/20 (2016.01) 고미현 A22C 33/78 (2016.01) (발명계 계승) (21) 출원번호 10-2018-0138519 (74) 대리인 박희영인내법률사무소 (22) 출원일자 2018년11월12일 (65) 공개일자 2020-05-27 (43) 등록일자 2020년06월20일 (63) 실용신안출원일자 201803090182호</p> <p>【발명계 계승】 원래 청구할 수 - 총 4 명 심사관 : 이근래 (24) 발명의 명칭 간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도 (57) 요약 본 발명은 간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 간 기능 개선용 유산균은 양분을 함유하고 있으나 아세트산에 의해 발효된 상태로 활성이 높아 숙취해소 효과가 뛰어나며, 내산성 및 내담즙성이 우수하기 때문에, 발효과정 중 알코올의 제거 및 간 기능 개선용도 또는 숙취 해소 용도로 사용하기 위한 식품 등에 유용하게 활용될 수 있다. 대표도 - 도1</p>  <p>Figure 1: Bar chart showing the number of amino acid residues in various peptides. The x-axis is labeled 'Amino acid residue number' and ranges from 0 to 400. The y-axis lists peptide sequences: P12A, P12B, L80A, L80B, L80C, L12C, L12D, L12E, L12F, L12G, L12H, L12I, L12J, L12K, L12L, L12M, L12N, L12O, L12P, L12Q, L12R, L12S, L12T, L12U, L12V, L12W, L12X, L12Y, L12Z.</p>	<p>간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도</p>

성과유형: 기술이전

번호	실적증빙자료	관련내용
1	 <p style="text-align: center;">기술이전계약서</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>양도인: 충북대학교산학협력단 대표 최상문 양수인: 대상(주) 대표 임정배 Leuconostoc mesenteroides DRC 1506 종균의 특이적 유전자 바코드 개발 및 이를 이용한 김치 내 종균의 신속하고 정확한 동정(identification)과 정량(quantification) 기술 관련 노하우 계약일: 2019년 09월 01일</p> <p style="text-align: center;">충북대학교산학협력단</p>	<p><i>Leuconostocmesenteroides</i>DRC 1506 종균의 특이적 유전자 바코드 개발 및 이를 이용한 김치 내 종균의 신속하고 정확한 동정 (identification)과 정량 (quantification) 기술 관련 노하우</p>
2	 <p style="text-align: center;">기술이전계약서</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>권리권자: 충북대학교 산학협력단 대표 이영성 실시권자: 대상(주) 대표 임정배 국내출원특허 제10-2020-0182513호 (프로바이오틱 기능에 있는 신규의 락토바실러스 류테리 EFEL6901 발효 종균) 계약일: 2021년 06월 23일</p> <p style="text-align: center;">충북대학교산학협력단</p>	<p>국내출원특허 제 10-2020-0182513호 프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스류테리EFEL6901 발효 종균</p>
3	 <p style="text-align: center;">기술이전계약서</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>국내출원특허 제 10-2020-0133154호 대상기술: 프로바이오틱 기능에 있는 신규의 락토바실러스 류테리 EFEL6800 발효 종균</p> <p>양도인: 충북대학교산학협력단 대표 이영성 양수인: 주식회사 웰찬푸드 대표 강대운 계약일: 2021년 10월 25일</p> <p style="text-align: center;">충북대학교산학협력단</p>	<p>국내출원특허 제 10-2020-0133154호 프로바이오틱기능이 있는 신규의 락토바실러스류테리EFEL6800 발효 종균</p>

성과유형: 사업화(상품출시)

번호	제품사진	설명
1		<p>건강기능성 균주 <i>Lb. reuteri</i> 14 제품 적용 종가집백김치B2B</p>
2		<p>건강기능성 균주 <i>Lb. reuteri</i> 14 제품 적용 종가집백김치B2C</p>

주 의

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