(옆면)

918015-2

과제명 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및 유전체 분석

최종보고서 (견고딕 14p)

2019 (견고딕13p)

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원 (견고딕 17p)

(앞면)

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

포스트게놈다부처유전체사업 2019년도 최종보고서(견고딕 13p)

발간등록번호
11-1543000-003099-01

(견고딕31p)

과제명 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및 유전체 분석

최종보고서

2019. 12. 31.

(견고딕15p)

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
단위연구기관 / 건국대학교 산학협력단

(견고딕 15.5p)

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(견고딕 20p)

뒷면지

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.

210㎜×297㎜[백상지(80g/㎡) 또는 중질지(80g/㎡)]

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및 유전체 분석' (연구개발 기간 : 2018. 04. 25. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2019. 12. 31.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 송 창 선 (인)
단위연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 송 창 선 (인)

주관연구기관책임자: 건국대학교 김 동 현
협동연구기관책임자:
참여기관책임자:

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>918015-2</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2차년도</td><td>단 계 구 분</td><td>2차년도/
2차년도</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">포스트게놈다부처유전체사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및
유전체 분석</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">김 동 현</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 2 명
내부: 2 명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 56,000천원
민간: 0천원
계: 56,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 3 명
내부: 3 명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 98,000천원
민간: 천원
계: 98,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">건국대학교 산학협력단</td><td colspan="2">참여기업명</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

105페이지

○ 본 연구팀은 과제를 수행하며 특허 출원 5건, 기술이전 1건, SCI급 논문 4건, 학술발표 5건, NABIC 메타지놈 및 유전체 기탁 5건, 미생물일반기탁 6건, 미생물특허기탁 2건 등의 성과를 창출하며 **당초 정량 성과 목표를 전 항목에서 초과 달성**하였다.

○ 우리나라 자연발효식품으로부터 초산균만을 선택적으로 분리해내기 위한 신규 배양 배지를 개발하여 JCR 기준 상위 Impact factor 상위 10% 이내 저널인 Food control지에 논문을 게재하고 (Kim et al. 2019, Food Control, 106, 106707), 이에 대한 지적 재산권을 확보하고 (출원번호: 10-2018-0112985), 이를 산업체에 기술이전하였다 (유상이전, 통상실시권).

○ 또한, 식품 기질로부터 신속하게 초산균 군집을 스크리닝할 수 있는 프로브 검출법에 대해서도 상위 10% 이내 저널인 Food control지에 논문을 게재할 뿐 아니라 (Kim et al. 2019, Food Control, 100, 78-82.) 특허를 출원했다. (출원번호: 10-2018-0135252).

○ 한편, NGS 기술을 활용하여 자연발효식품인 케피어 발효유의 미생물총을 분석하고, 이로부터 유용 초산균을 발굴한 결과를 SCI저널 Journal of Food Safety지에 게재하였다 (Kim et al. 2019).

○ 또한, 자연발효식품 케피어 발효유로부터 분리한 *Kluyveromyces marxianus* A5 효모의 양계 산업용 프로바이오틱스 기능성을 평가하여 균주 특허 기탁을 실시하고 (KCCM12598P), 해당 발명 내용을 특허 출원하였다 (출원번호: 10-2019-0139483)

○ 마지막으로, 자연발효식초에서 분리한 초산균 *Acetobacter pasteurianus* MGLV의 프로바이오틱스로의 개발 가능성을 확인하여 본 균주에 대한 국제 균주 특허 기탁(KCCM12600P)을 실시하고 해당 균주에 대한 지적 재산권을 확보하였다 (출원번호: 10-2019-0139484).

○ 상기 연구 과정에서 분리한 초산균의 유전체 및 자연발효식품들의 메타지놈 시컨스 데이터를 iGEM 데이터베이스에 총 5건 업로드하였다.

<요약문>

연구의 목적 및 내용	❖ **최종 연구 목표** ○ NGS 분석기술을 활용하여 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 군집을 효율적으로 프로파일링하고, 농축산분야 유용 probiotics 자원을 탐색 및 발굴하고자 함 ❖ **연구 세부 목표** 1. 우리나라 자연발효식품 수집 2. 효모 및 초산균 군집 스크리닝 및 프로파일링 3. 유용 효모 및 초산균 분리 및 확보 4. 신규 유용 효모 및 초산균 자원의 probiotic function 확인 5. 신규 유용 효모 및 초산균 자원의 Whole genome sequencing 분석을 통한 genome mapping 및 comparative genomic analysis 5. 국내외 미생물자원 기탁 및 지적재산권 확보를 통한 국내 고유종 생물자원 확보
연구개발성과	○ 본 연구팀은 과제를 수행하며 특허 출원 5건, 기술이전 1건, SCI급 논문 4건, 학술발표 5건, NABIC 메타지놈 및 유전체 기탁 5건, 미생물일반기탁 6건, 미생물 특허기탁 2건 등의 성과를 창출하며 **당초 정량 성과 목표를 전 항목에서 초과달성**하였다. ○ 우리나라 자연발효식품으로부터 초산균만을 선택적으로 분리해내기 위한 신규 배양 배지를 개발하여 JCR 기준 상위 Impact factor 상위 10% 이내 저널인 Food control지에 논문을 게재하고 (Kim et al. 2019, Food Control, 106, 106707), 이에 대한 지적 재산권을 확보하고 (출원번호: 10-2018-0112985), 이를 산업체에 기술이전하였다 (유상이전, 통상실시권). ○ 또한, 식품 기질로부터 신속하게 초산균 군집을 스크리닝할 수 있는 프로브 검출법에 대해서도 상위 10% 이내 저널인 Food control지에 논문을 게재할 뿐 아니라 (Kim et al. 2019, Food Control, 100, 78-82.) 특허를 출원했다. (출원번호: 10-2018-0135252). ○ 한편, NGS 기술을 활용하여 자연발효식품인 케피어 발효유의 미생물총을 분석하고, 이로부터 유용 초산균을 발굴한 결과를 SCI저널 Journal of Food Safety지에 게재하였다 (Kim et al. 2019). ○ 또한, 자연발효식품 케피어 발효유로부터 분리한 *Kluyveromyces marxianus* A5 효모의 양계 산업용 프로바이오틱스 기능성을 평가하여 균주 특허 기탁을 실시하고 (KCCM12598P), 해당 발명 내용을 특허 출원하였다 (출원번호: 10-2019-0139483) ○ 마지막으로, 자연발효식초에서 분리한 초산균 *Acetobacter pasteurianus* MGLV의 프로바이오틱스로의 개발 가능성을 확인하여 본 균주에 대한 국제 균주 특허 기탁(KCCM12600P)을 실시하고 해당 균주에 대한 지적 재산권을 확보하였다 (출원번호: 10-2019-0139484). ○ 상기 연구 과정에서 분리한 초산균의 유전체 및 자연발효식품들의 메타지놈 시컨스 데이터를 iGEM 데이터베이스에 총 5건 업로드하였다.
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 국제적 관심이 높아지고 있는 자연발효식품 유래 신규 유용 미생물 자원 (효모 및 초산균) 선제적 확보를 통한 국제 산업 경쟁력 확보 ○ 우리나라 자연발효식품 유래 유용 효모 및 초산균 확보를 통한 국내 농축산 분야 산업화 및 산업 원천 자원 확보 ○ 첨단 기술을 적용한 신규 유용 미생물 발굴 프로토콜 제시를 통한 관련 학술분야 선도 ○ 신규 기능성 미생물 유전체 정보 등록을 통한 표준화된 고품질 참조유전체 정보 제시

국문핵심어 (5개 이내)	자연발효식품	효모	초산균	군집분석	생물자원확보
영문핵심어 (5개 이내)	Natural fermented food	Yeast	Acetic acid bacteria	Community analysis	Bioresource

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 6
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 20
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 95
4. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 102
붙임. 참고 문헌 ····· 103

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

2-1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 최종목표

○ 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 군집 프로파일링

○ 유용 효모 및 초산균 등 국내 고유종 자원을 효율적으로 발굴 및 지적 재산권 확보

나. 세부목표

○ 우리나라 자연발효식품 내 효모 및 초산균 군집 프로파일링

○ 발효공정을 통한 발효식품 내 효모 및 초산균 군집 극대화

○ 우리나라 고유의 유용 효모 및 초산균 분리 및 확보

○ 신규 유용 효모 및 초산균 자원의 Whole genome sequencing 분석을 통한 genome mapping

○ 신규 유용 효모 및 초산균 자원의 건강 기능성 확인

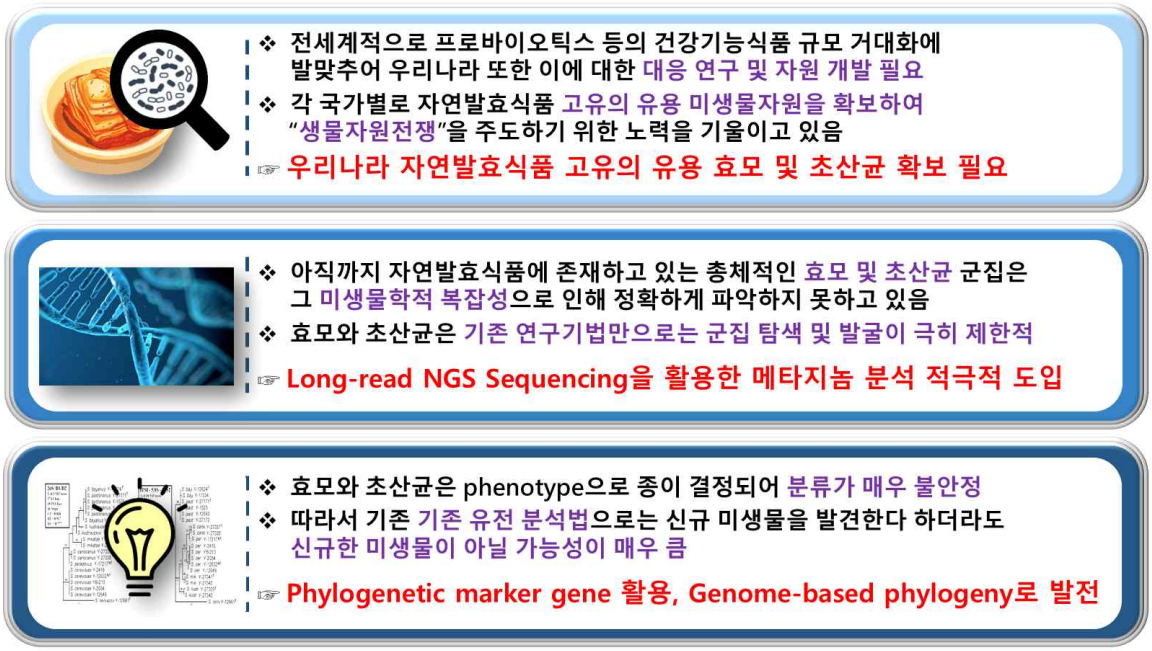
○ 국내외 미생물자원 기탁 및 지적재산권 확보를 통한 국내 고유종 생물자원 확보

1-2. 연구개발의 필요성

❖ **연구의 필요성 요약**

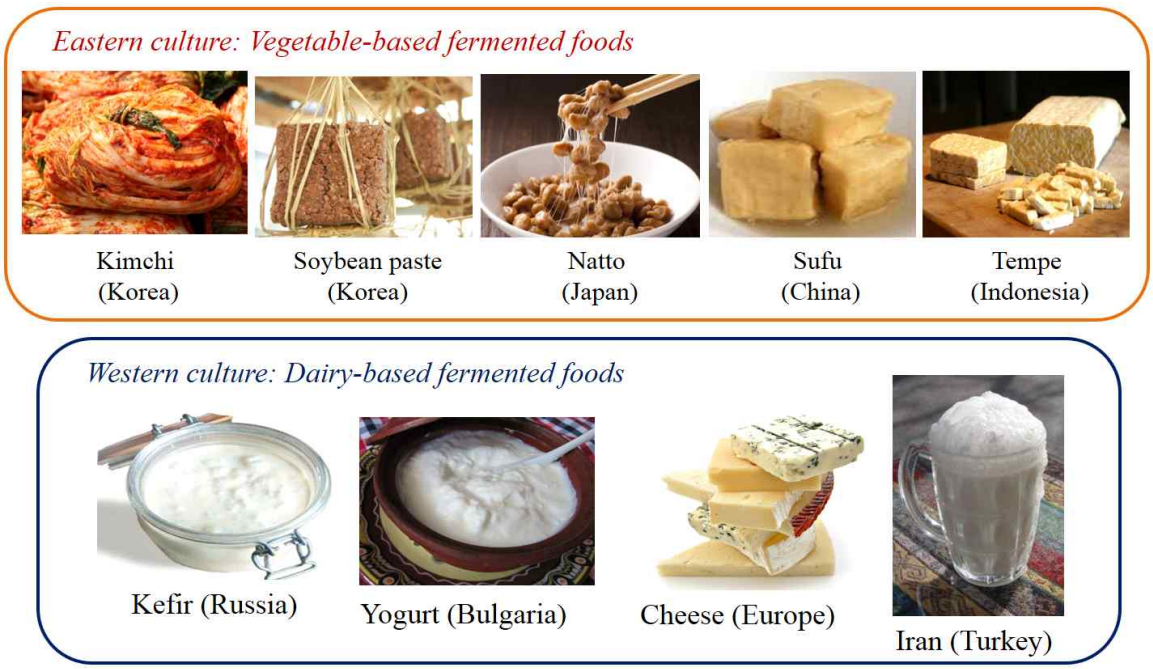
- ❍ 자연발효식품이란 유산균-효모-초산균 등 다양한 종류의 미생물이 자연적으로 공생하며 이들의 발효를 통해 제조되는 식품을 의미함. 우리나라에 존재하는 대표적인 자연발효식품의 예로 김치, 장류, 젓갈, 식초, 발효유, 케피어 등이 있음
- ❍ 본 연구팀은 50종 이상의 유산균-효모-초산균 자연발효식품의 대표적 예인 케피어를 이용하여 지난 5년간 선행연구를 실시하였음. 본 팀은 이미 NGS-Probe PCR-coupled isolation platform을 활용하여 발굴이 어려운 효모 및 세균을 케피어로부터 분리하여 국제특허기탁하고 특허등록을 함으로써 미생물자원과 지적재산권을 확보한 경력이 있음
- ❍ 선행 연구 결과, 다양한 발효식품들과 비교하여 케피어의 상대적 우수한 건강기능성을 밝혀내어 국제 저명 학술지에 논문을 다수 게재하였으며, 이는 유산균 단독 발효물이 아닌 효모와 초산균의 자연 발효 산물의 생리작용에서 기인한다는 과학적 증거를 지속적으로 제시하였음
- ❍ 이러한 자연발효식품들 내에서 배양법 및 전통적 분자생물학적 기법을 통하여 분석한 결과 효모와 초산균은 최소 30종 이상일 것이라고 추정하고 있으나, 아직까지 실험법의 한계, 분류학적 한계로 인하여 정확한 효모 및 초산균 군집을 파악하지 못하고 있음
- ❍ 유산균의 경우 효모 및 초산균에 비하여 선택적 배양법 및 분자생물학적 기법이 매우 앞서있어 이들만을 활용하더라도 충분한 미생물총 정보를 얻을 수 있는 반면, 효모와 초산균은 기존 연구기법만으로는 군집 탐색 및 발굴이 극히 제한적임. 이는 케피어 등 자연발효식품의 미생물총이 상당히 복잡하기 때문임.
- ❍ 오늘날 우리나라에서도 수많은 프로바이오틱 유산균종을 기확보하고 있으나, 이에 비하여 프로바이오틱 효모나 초산균은 분리 및 확보한 수준이 현재까지 매우 미비함
- ❍ 특히 2018년 8월부터 우리나라도 나고야 의정서(Nagoya protocol)발효에 따른 생물다양성협약에 따른 국가별 고유의 생물학적 자원에 대한 데이터베이스 확립 및 유용 자원 확보를 통해 경쟁력 제고가 필요함
- ❍ 따라서, 본 연구에서는 메타지노믹스를 활용한 비선택적 군집분석을 활용하여 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 군집을 프로파일링하고, 이를 바탕으로 선택적 메타지놈 분석기술을 활용하여 유용 효모 및 초산균(국내 고유종)을 효율적으로 탐색 및 발굴하고자 함

〈연구개발의 필요성 요약〉



1. 국내 자연발효식품으로부터 우리 고유의 유용 균주 분리 필요성

○ 자연발효식품이란 자연적으로 존재하는 여러 미생물, 특히 유산균을 비롯한 효모, 초산균 등의 발효 작용을 통해 숙성시킨 식품을 의미함



〈국내외 자연발효식품들. 자연발효식품이란 유산균, 효모, 초산균 등 다종의 미생물이 자연적으로 존재하며 각각 유산 발효, 알코올 발효, 초산 발효 등을 동시-복합적으로 진행하며 제조되는 식품을 의미함〉

○ 우리나라에 존재하는 자연발효식품에는 대표적으로 김치류, 케피어, 장류, 식초류, 젓갈류, 발효유류 등이 있음. 그 세부 종류는 100가지가 넘으며 지역, 기후, 제조자, 재료 등에 따라서 다양한 미생물 군집을 가짐

○ 이러한 복합발효식품 내의 미생물들이 형성하고 있는 microbiota/mycobiota는 숙주에게 섭취되면 장내미생물총의 변화를 통해 건강에 유익한 효과를 일으키는 것으로 알려져있음

○ 즉, 복합발효식품을 구성하는 미생물 중 상당수는 프로바이오틱스이며, 이미 복합발효식품 유래 미생물자원 발굴을 통한 프로바이오틱스 제품 개발 산업은 2010년도 이후 세계적으로 호황을 보임

○ 이는 2000년 이후 건강 및 의료의 패러다임이 질병의 치료보다 예방 및 관리로 이동했기 때문으로, 전세계적으로 프로바이오틱스 등의 건강기능식품에 대한 연구 및 시장 규모 거대화에 발맞추어 우리나라 또한 이에 대한 대응 연구 및 자원 개발이 절실히 요구되는 실정임

○ 아래 표와 같이 전세계의 각 국가별로 유산균-효모-초산균의 자연발효식품이 50가지 이상 존재하며, 각 국가별로 자연발효식품 유래 유용 미생물자원을 확보하기 위한 노력을 기울이고 있음

<전세계의 자연발효식품들, Perspectives on global fermented foods, Soni *et al*,. 2014>

분류	발효식품명	지역	원료	식품 내 미생물
Fermented non-alcoholic cereal-based foods of Africa	*Ogi*	나이지리아, 베닌	옥수수, 수수,	*Lactobacillus* sp. and Yeast
	Koko and kenkey	가나	옥수수, 수수	*Lactobacillus* sp. and Yeast
	Mahewu (magou)	남아프리카	옥수수, 수수	*Lactobacillus delbrueckii Lactobacillus bulgaricus*
	Mawe	베닌	옥수수	*Lactococcus lactis Lactobacillus plantarum Pediococcus pentsaceus*
Most common indigenous cereal and cereal-legumebased fermented foods and non-alcoholic beverages of Asia	*Bhallae*	인도	렌틸콩(Black gram)	LAB, Yeast
	Kekap	인도네시아	대두, 밀	LAB, Yeast
	Khanomjeen	태국	쌀	*Lactobacillus*, *Streptococcus*
	Khaman	인도	벵갈녹두(Bengal gram)	LAB
	Me	베트남	쌀	LAB
	Tarhana	터키	반숙밀, 요구르트	LAB
	Wari	인도	렌틸콩(Black gram)	LAB, Yeast
Fermented vegetable products	*Burongmatsala*	필리핀	겨자	LAB
	Dhamuoi	베트남	양배추	LAB

	Fu- tsai *Suan- tsai*	대만	겨자	LAB
	김치	한국	배추, 무	LAB, Yeast
	Suan- cai	중국	야채	LAB
	Sunki	일본	순무	LAB
	Sauerkraut	유럽, 미국, 캐나다	양배추	LAB
	오이피클	미국, 캐나다	오이	LAB
Fermented animal products	버터우유	인도, 뉴질랜드, 호주, 미국, 캐나다	우유	LAB
	Koumiss/kumiss	중국, 몽골, 러시아, 스칸디나비아	마유, 낙타우유	LAB, Yeast
	요구르트	일본	우유	*Lactobacillus casei* *Bifidobacterium brevis*
	Bordia, *Gnuchi,* *Hentak,* *Karati*	인도	생선	LAB, Yeast
	치즈	유럽, 중동	우유	LAB, Yeast, Mold
	Kefir/kefyr	러시아, 유럽, 중동	양유, 우유, 케피어 스타터	LAB, Yeast
	Viili	핀란드	우유	LAB, Yeast
	Kochsalami	독일	소고기, 돼지고기	LAB, *Micrococci*
	Salsiccia, *Soppressata*	이탈리아	돼지고기	LAB, Yeast, *Micrococci* *Staphylococci*

2. 효모 및 초산균의 미생물자원으로의 잠재적 가치

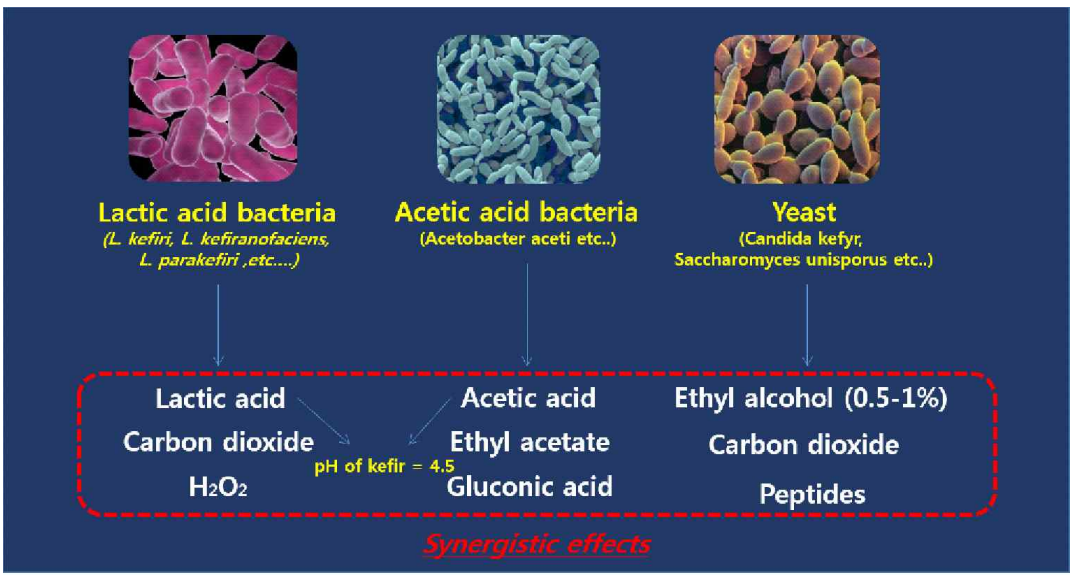
○ 본 연구팀은 유산균-효모-초산균의 자연발효식품의 대표적 예인 케피어를 이용하여 지난 5년간 선행연구를 실시하였음

○ 케피어는 동물의 젖을 기질로 하는 발효식품으로 50종 이상의 유산균, 초산균, 효모를 함유하고 있다고 추정됨

<유산균-초산균-효모를 함유하는 자연발효식품인 케피어>

○ 다양한 발효식품들과 비교하였을 때, 케피어는 항비만・항간경변・항산화・항알러지・항종양・항염증・콜레스테롤 저하・ 변비 완화 및 항생 특성 등을 포함한 상대적으로 우수한 건강기능성을 나타내며 이는 유산균과 더불어 존재하는 효모와 초산균의 복합 발효 산물의 생리작용에서 기인한다는 과학적 증거가 지속적으로 제시되었음

○ 또한 자연발효식품 그 자체의 건강기능성뿐만 아니라, 위와 같은 유산균-효모-초산균의 발효 산물은 특히 발효식품에 풍미와 냄새 등과 같은 기호성을 부여해 식품을 제조할 때 산업적인 면에서 중요시 되고 있으며, 이는 아래와 같은 상호작용에 의해 다양한 미생물에 의해서 유도된다는 사실을 밝혀냄



<복합발효 미생물들의 발효 산물들과 그 상호작용 (본 연구팀의 선행연구)>

○ 본 연구팀에서 뿐만 아니라, 미국과 일본 등 다양한 선진국에서는 이미 유용 효모와 초산균의 기능성에 대해 일찍이 주목하고 자원 개발을 시작하고 있는 실정임

○ 따라서, 본 연구에서는 효모와 초산균의 유용 미생물 자원으로서의 잠재 가능성에 주목하여 우리나라의 자연발효식품들로부터 해당 신규 미생물 자원을 확보하고자 함

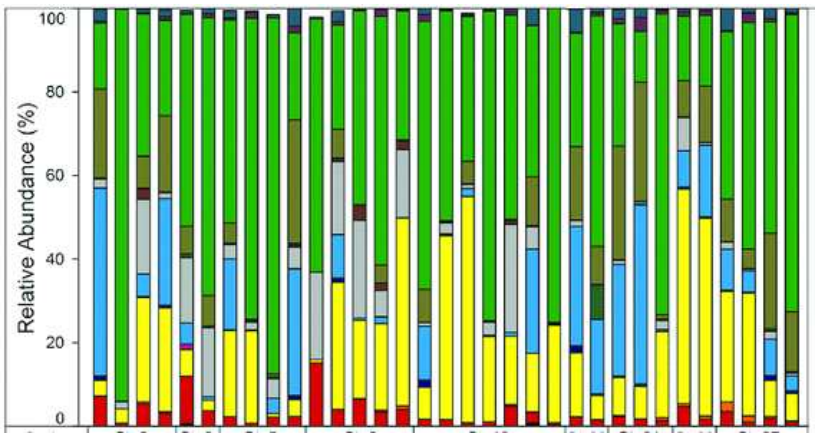
3. 자연발효식품에서 신규 미생물 분리의 어려움: NGS 분석법 적용을 통한 극복

○ 배양법 및 전통적 분자생물학적 기법을 통하여 다양한 자연발효식품 내에 존재하는 효모와 초산균은 최소 30종 이상일 것이라고 추정하고 있으나, 아직까지 총체적인 효모 및 초산균 군집을 정확하게 파악하지 못하고 있음

○ 유산균의 경우 효모 및 초산균에 비하여 선택적 배양법 및 분자생물학적 기법이 매우 앞서있어 이들만을 활용하더라도 충분한 미생물총 정보를 얻을 수 있는 반면, 효모와 초산균은 기존 연구기법만으로는 군집 탐색 및 발굴이 극히 제한적임. 이는 케피어 등 자연발효식품의 미생물총이 상당히 복잡하기 때문임

<본 연구팀의 자연발효식품의 배양법을 통한 신균주 검출 연구 예시: 배양배지 상에서 모든 효모(좌) 및 모든 초산균(우)의 집락 형태가 거의 동일하게 나타나기 때문에 전통적 분리방식만을 활용해서는 신균주를 발굴하기 매우 어려움>

○ 이러한 한계점은 NGS 분석법을 이용, long-read sequencing를 활용한 메타지놈 분석을 비롯한 기확보된 복합 발효 공학 데이터 베이스를 적극적으로 활용하여 극복하고자 함



<자연발효식품의 NGS community 분석 예시. NGS platform을 활용한 non-targeted metagenomic community analysis를 실시할 경우 자연발효식품 내에 존재하는 미지의 미생물까지도 프로파일링 할 수 있음: 신규 미생물의 신속한 탐색이 가능함>

○ 우리나라에서도 수많은 프로바이오틱 유산균종을 기확보하고 있으나, 이에 비하여 프로바이오틱 효모나 초산균은 그 수준이 미비함

○ 발굴 미생물 자원의 whole-genome sequencing을 통한 phylogenetic gene marker를 통해 신규 종, 아종을 발굴해내서 현재 부족한 미생물 자원 연구 역량의 개선을 꾀하고자 함

○ 따라서, 본 연구에서는 메타지놈을 활용한 비선택적 군집분석을 활용하여 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 군집을 프로파일링하고, 이를 바탕으로 선택적 메타지놈 분석기술을 활용하여 유용 효모 및 초산균 자원을 효율적으로 탐색 및 발굴하고자 함

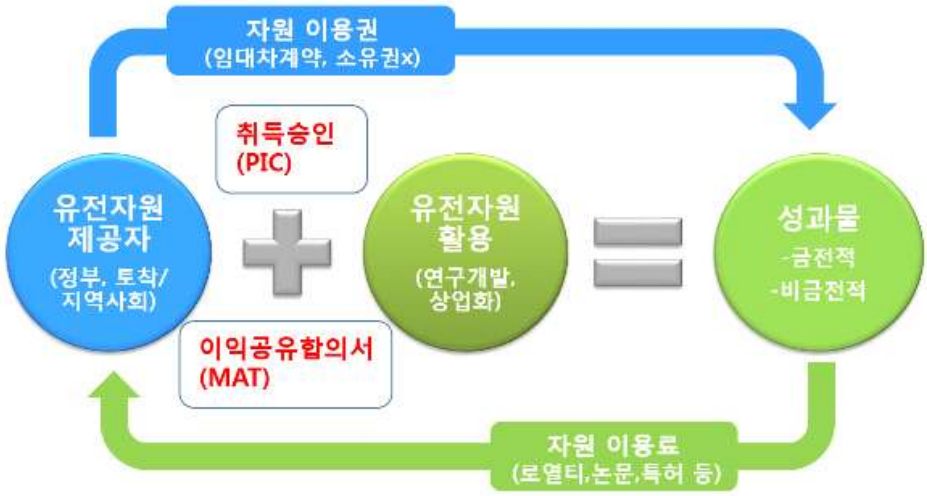
4. 국제적 상황: 나고야 의정서 발효에 대응하기 위한 국내 고유 유용 미생물 분리 확보 중요성

○ 나고야 의정서란 유전자원 이용으로 발생한 이익을 제공국과 공유케 함으로써 생물 다양성 보전과 지속 가능한 이용에 기여하고자 2010년 일본 나고야에서 개최된 제 10차 CBD 당사국총회에서 채택, 2014년 7월 14일 50개국이 비준함으로써 국제적 발효 요건이 갖추어진 국제 협약임

<생물다양성협약에 대한 나고야 의정서 개요 (출처:한국 ABS연구센터)>

○ 우리나라도 2017년 8월 나고야의정서에 비준함으로서 2018년 8월부터 효력이 발생하게 되어 식품, 의약품, 화장품 등 해외 유전자원을 사용하는 각계 산업에 막대한 영향력을 줄 것으로 추측하고 있음

○ 나고야 의정서의 발효로 인해서 기업은 생물자원을 들여올 때 원산지 국가에 미리 통보해 승인을 얻어야 하며, 또 생물자원을 이용해 발생하는 금전적·비금전적 이익을 상호 합의한 계약 조건에 따라 배분하게 됨



<나고야의정서 이행체계도(출처:한국 ABS연구센터)>

○ 나고야 의정서 발효로 인해서 전 세계는 오늘날 “생물자원전쟁”의 서막을 지나고 있다고 해도 과언이 아니며. 우리나라도 이에 발맞추어 국내 고유 생물종 확보를 위한 노력이나 수출국과 협력 강화 등 적극적으로 대처를 준비하고 있음

○ 즉, 국내 고유 미생물을 활용하여 사업화를 추진할 경우 이러한 국제 협약의 규제에서 자유로울 수 있으며, 해외 시장에서는 본 미생물에 대하여 향후 유전자원 이용에 대한 로열티를 얻을 수 있는 등 막대한 산업적 이익을 기대할 수 있음

○ 따라서, 본 연구 과제에서 제시하는 목표와 같이 국내 자연발효식품으로부터 국내 고유 생물종을 확보하는 것은 단순히 관련업계 내수산업 발전에만 도움을 주는 것이 아니라, 우리나라 고유 생물 유전자원 대한 선제적 발굴을 통해서 국제적 생물자원전쟁에서 살아남기 위한 필수 전략이라고 할 수 있음

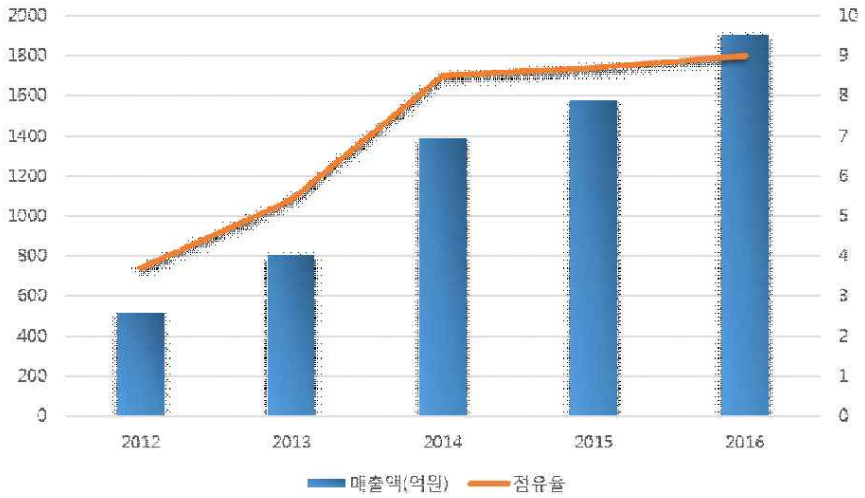
1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 국내는 현재 프로바이오틱 유산균 및 효모를 활용한 제품은 시판되고 있으나 효모를 이용한 기능성 소재를 비롯해 프로바이오틱 초산균을 활용한 바이오의약품 및 식품첨가물은 전무함

○ 케피어 내에 존재하는 일부 효모균의 분리는 본 연구팀에서 그 기술력을 확보하고 있는 상태이나 그 수가 여전히 부족한 실정이며 특히 현재 국내에 등록된 프로바이오틱 효모 및 초산균에 대한 지식재산권 및 유효특허 항목은 전무함

○ 국내 프로바이오틱 시장은 점차 커지는 추세임에도 불구하고 효모나 초산균에 초점을 맞춘 연구 수는 부족한 상황임



<2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 식품의약품안전처>

○ 한국 생물자원센터(KCTC)에 기탁된 세균수는 그 수가 많으나 효모와 초산균은 그에 비해 수가 매우 적은 상황이며 해외 생물학 자원 은행(ATCC)과 비교해서도 그 수가 현저히 부족한 실정임

생물자원센터 Korean Collection for Type Cultrues	
항목	**등록수**
세균	7,035
효모	1,565
초산균	13

○ 또한, 우리나라에는 효모나 초산균을 활용한 건강기능식품은 유산균을 이용한 제품에 비하여 개발이 매우 미진함

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

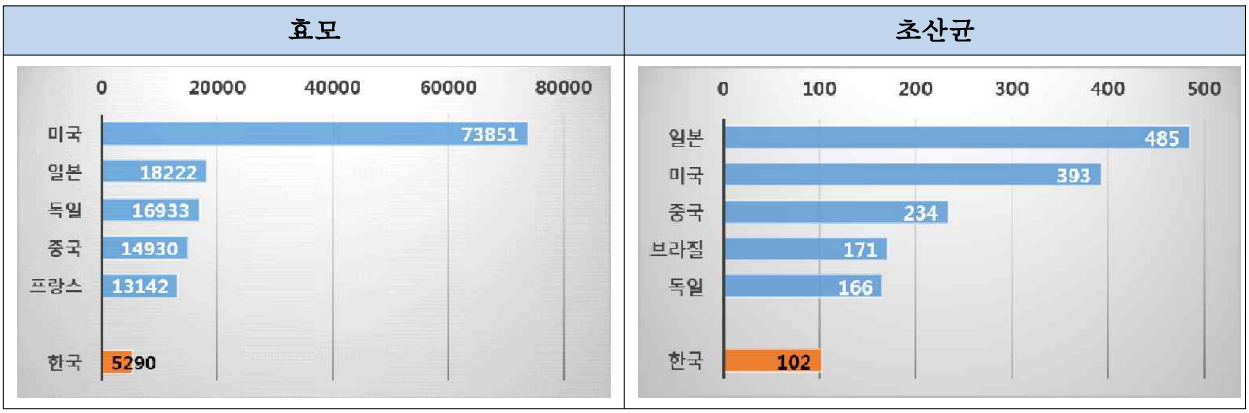
○ 전세계 케피어 산업은 2016년 12억 3,360만 달러로 집계되었으며 2025년 까지 매년 8.35%씩 성장해 25억 달러 수준으로 성장할 것으로 예측됨

○ 프로바이오틱 미생물 자원에 대한 국제적 관심이 증가함에 따라 현재 효모 및 초산균에 대한 연구가 증가하는 추세임

○ 생물학 자원 은행(ATCC)에 등록된 미생물주는 국내와 다르게 오히려 세균보다 효모균을 더 많이 보유하고 있으며, 초산균 또한 그 수가 국내보다 많음

ATCC THE ESSENTIALS OF LIFE SCIENCE RESEARCH GLOBALLY DELIVERED™	
항목	**등록수**
세균	16,831
효모	28,033
초산균	96

○ Web of Science를 통한 효모와 초산균에 대한 통계를 보면 효모 연구는 미국을 선도로 일본, 독일, 중국, 프랑스 순으로, 초산균은 일본을 선도로 미국, 중국, 브라질, 독일 순으로 연구가 활발히 진행되고 있음

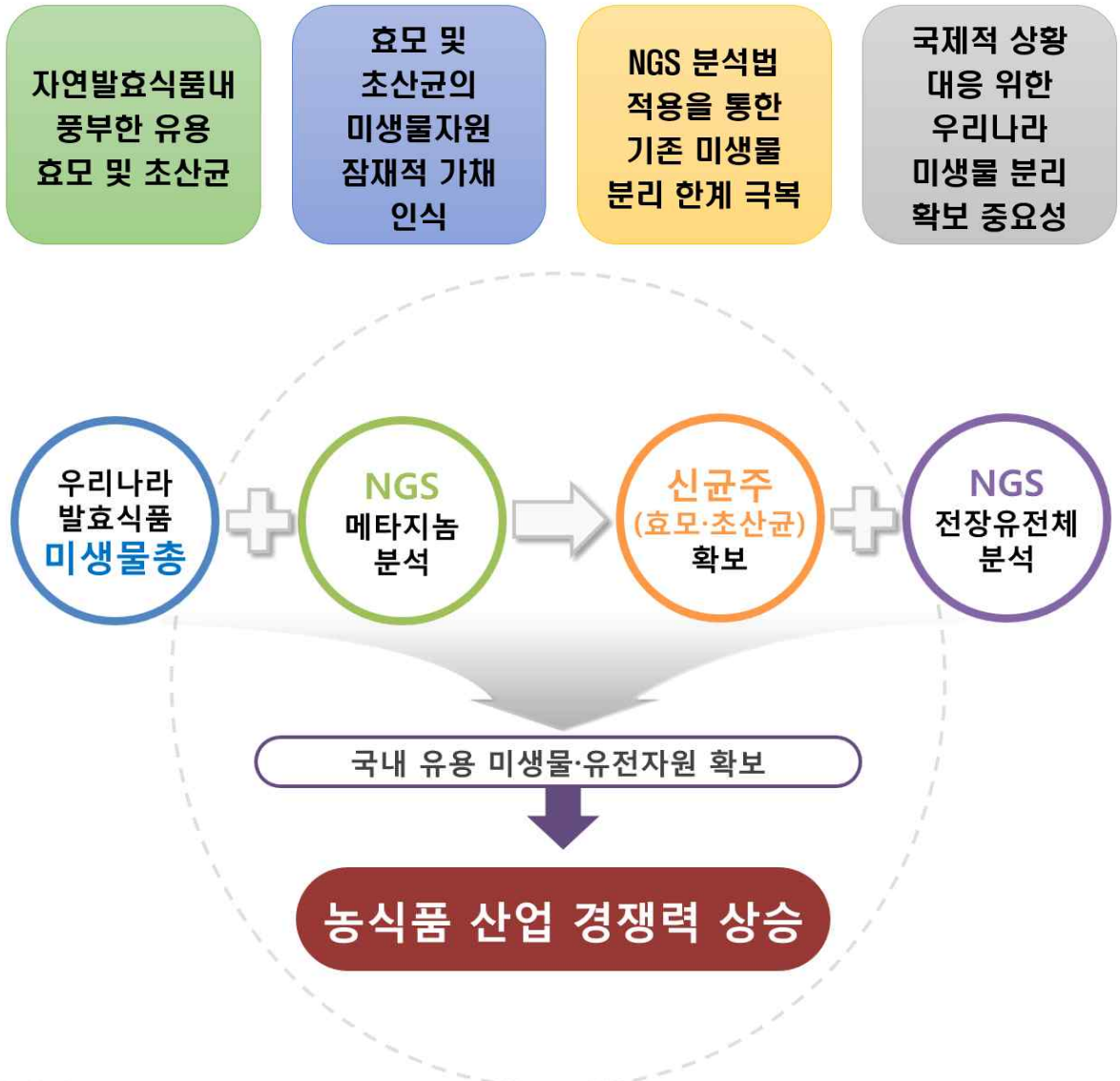


<효모와 초산균 연구 기록 수, Web of Science>

○ 또한 선진국들에서는 유용 효모와 초산균을 활용한 다양한 제품이 실제 시장에 출시되고 있음

1-3. 연구개발의 중요성

<본 연구의 중요성 요약>



○ 최근 전세계적으로 프로바이오틱스 등의 건강기능식품에 대한 관심과 시장이 커지면서 우리나라 또한 이에 대한 경쟁력을 확보하기 위한 선도 연구가 필요함

○ 특히 그 중에서도 유산균-효모-초산균의 자연발효식품이 각광받고 있으나 발효에 있어서 유산균에 비하여 효모, 초산균에 대한 연구는 부족한 실정임

○ 해외에선 미국, 일본을 필두로 하여 이러한 효모, 초산균에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 국내에선 현재 유산균에 대부분의 초점이 맞추어져 있어 효모, 초산균의 분리법, 분류법, 배양법, 특성분석, 건강 기능성 등에 대한 정보가 극히 미비함

○ 국내에서도 수많은 프로바이오틱 유산균종을 기확보하고 있으나, 이에 비해 기확보된 효모나 초산균은 그 수준이 미비함

○ 일반적으로 전통적 분자생물학적 기법을 통한 효모 및 초산균의 분리 및 분류는 그 미생물학적 복잡성으로 인해 극히 제한적이며 그에 따른 한계점이 존재함

○ 이러한 한계점은 long-read sequencing 활용 메타지놈 분석을 비롯한 기확보된 자연 발

효 공학 데이터 베이스를 적극적으로 활용하여 극복하고자 함

- ❍ 또한 발굴 미생물 자원의 whole-genome sequencing을 통한 phylogenetic gene marker를 통해 신규 종, 아종을 탐색 및 확보하여 현재 부족한 국내 미생물 데이터베이스를 더욱 풍부하게 해야 할 필요성이 있음
- ❍ 원재료, 지역, 제조방법에 따라 달라지는 자연발효식품 내 미생물의 독창적인 건강 기능적 특성을 규명하여 성별, 인종, 나이, 지역, 건강상태 및 생활 식습관 별로 중점을 두어 숙주-미생물총간의 상호작용에 따른 적재적소의 미생물을 이용할 수 있을 것으로 보임
- ❍ 특히 2018년 8월부터 우리나라도 나고야 의정서(Nagoya protocol)발효에 따른 생물다양성협약에 따른 국가별 유전자원에 대한 데이터베이스 확립 및 유용 자원 확보가 시급하므로, 본 연구팀의 선행 연구경험을 바탕으로 우리나라 자연발효식품 유래 유용 미생물 자원을 다수 확보하고자 함
- ❍ 본 연구에서 명시하는 국내 고유종은 우리나라에서 제조 및 수집된 자연발효식품으로부터 분리한 미생물로서, 종(species) 혹은 아종(subspecies) 혹은 개별주(strain) 수준에서 기존에 존재하는 미생물과 차별되는 생화학적 or 유전적 or 기능적 차이가 존재하는 미생물을 의미함
- ❍ 본 연구를 통하여 자연발효식품 내 유용 효모와 초산균 확보 후 배양 및 기능성 규명을 통해 프로바이오틱 생산에 있어서의 비용, 접근성의 효율화 및 안전성 확보를 통해 국민 건강 향상을 도모할 수 있을 것으로 보임
- ❍ 결론적으로, 우리나라에서도 전 세계적으로 각광받기 시작한 유용 미생물 자원인 효모와 초산균에 초점을 맞춘 연구가 더욱 진행되어야 함

1-3. 연구개발 범위

가. 연차별 개발목표 및 내용

① 연차별 개발 목표

- 1차년도 : Long-read sequencing 활용 메타지놈 분석을 통한 자연발효식품 내 효모/초산균 군집 프로파일링 및 균주 확보
- 2차년도 : 자연발효식품 내 유용 국내 고유 유용 효모/초산균 선별 및 고품질 참조 유전체 분석 및 확보

② 개발 내용/범위 및 마일스톤별 연결성

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 총 연구 수행 내용 요약

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및 유전체 분석	국내 자연발효식품 수집 및 확보	우리나라 자연발효식품과 식품 원료 등의 시료를 중심으로 샘플링함	• 총 74개의 자연발효식품을 샘플링함 (김치 15, 과일 21, 식초 28, 젓갈 4, 절임 4, 기타 2)
			자연발효식품의 lab-scale제조를 통한 미생물 발굴	• 막걸리식초를 제조함 • 케피어발효유를 제조함
		자연발효식품 내 효모 및 초산균 군집 탐색 및 프로파일링	자연발효식품에서 Long-read NGS sequencing을 활용한 16S community analysis 실시	• 자연발효식초 메타지놈 16S community analysis data 확보
				• 케피어 메타지놈 16S 및 ITS community analysis data 확보
		효모 및 초산균 선택적 분리 플랫폼 개발을 통한 유용 균주 확보	초산균 군집 신속 탐지 기법 개발	• 초산균 군집 신속탐지를 위한 real-time PCR기법 개발
			초산균 선택적 분리배양법 개발	• 초산균 선택적 분리배양을 위한 신규 선택배지 개발
			유용 균주 확보	• 효모 12주 및 초산균 7주 확보
2차 년도 (2019)	유용 효모 및 초산균 분리 및 probiotic function screening	효모 및 초산균의 *in vitro*위장관 생존성 기반 스크리닝	Simluated GIT environment 에서의 생존성 확인	• 분리된 효모 및 초산균주의 simluated GIT environment 에서의 생존성 확인 • 효모 1주 (*Kluyveromycesmarxianus* A5) • 초산균 2주 (*Acetobacterpasteurianus* DHMV3706, *Acetobacterfabarum* DH1801) 선발

		효모 및 초산균의 *in vitro*숙주 안전성 기반 스크리닝	Hemolysis, growth on blood agar 기반숙주 안전성 스크리닝	• Hemolysis, growth on blood agar 기반 숙주 안전성 스크리닝 • 효모 및 초산균의 *in vitro* 숙주 안전성 확인
		효모 및 초산균의 *in vitro* 및 *in vivo*기능성 기반 스크리닝	*In vivo* function and safety	• *in vitro* microbial interaction (positive &negative) • *In vivo* gut microbiota modulation & safety evaluation
	유용 효모 및 초산균의 WGS 분석을 통한 genome mapping 및 comparative genomic analysis	유용 초산균의 complete genome assembly	Short- and long-read Hybrid *de novo*mapping	• Short- and long-read Hybrid *de novo*mapping • 신규 probiotic AAB 2주에 대한 고품질 참조 유전체 확보
		Comparative genomic analysis	Comparative genomics (KEGG-based functional comparison)	• Comparative genomics (KEGG-based functional comparison)
		Comparative metabolimics	대사체 프로파일링을 통한 comparative metabolimics	• 선별된 유용 초산균 1주와 기존 유산균 프로바이오틱스 1주와의 대사체 비교
	유용 효모 및 초산균 확보 및 미생물자원 기탁	유용 효모 및 초산균의 고품질 참조유전체 확립	미생물 일반기탁 미생물 국제 특허 기탁	• KCCM일반기탁5건 • KCCM 국제 특허 기탁 3건 (유산균 1건, 초산균 1건, 효모 1건)
		확보된고품질 참조 유전체의 genome DB등록	iGEM DB 업로드	• iGEM DB 업로드 5건 (CGS 2건, metagenome 2건)

1. 1차 년도 연구개발 수행 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및 유전체 분석	국내 자연발효식품 수집 및 확보	우리나라 자연발효식품과 식품 원료 등의 시료를 중심으로 샘플링함	• 총 74개의 자연발효식품을 샘플링함 (김치 15, 과일 21, 식초 28, 젓갈 4, 절임 4, 기타 2)
			자연발효식품의 lab-scale제조를 통한 미생물 발굴	• 막걸리식초를 제조함 • 케피어발효유를 제조함
		자연발효식품 내 효모 및 초산균 군집 탐색 및 프로파일링	자연발효식품에서 Long-read NGS sequencing을 활용한 16S community analysis 실시	• 자연발효식초 메타지놈 16S community analysis data 확보
				• 케피어 메타지놈 16S 및 ITS community analysis data 확보
		효모 및 초산균 선택적 분리 플랫폼 개발을 통한 유용 균주 확보	초산균 군집 신속 탐지 기법 개발	• 초산균 군집 신속탐지를 위한 real-time PCR기법 개발
			초산균 선택적 분리배양법 개발	• 초산균 선택적 분리배양을 위한 신규 선택배지 개발
			유용 균주 확보	• 효모 12주 및 초산균 7주 확보

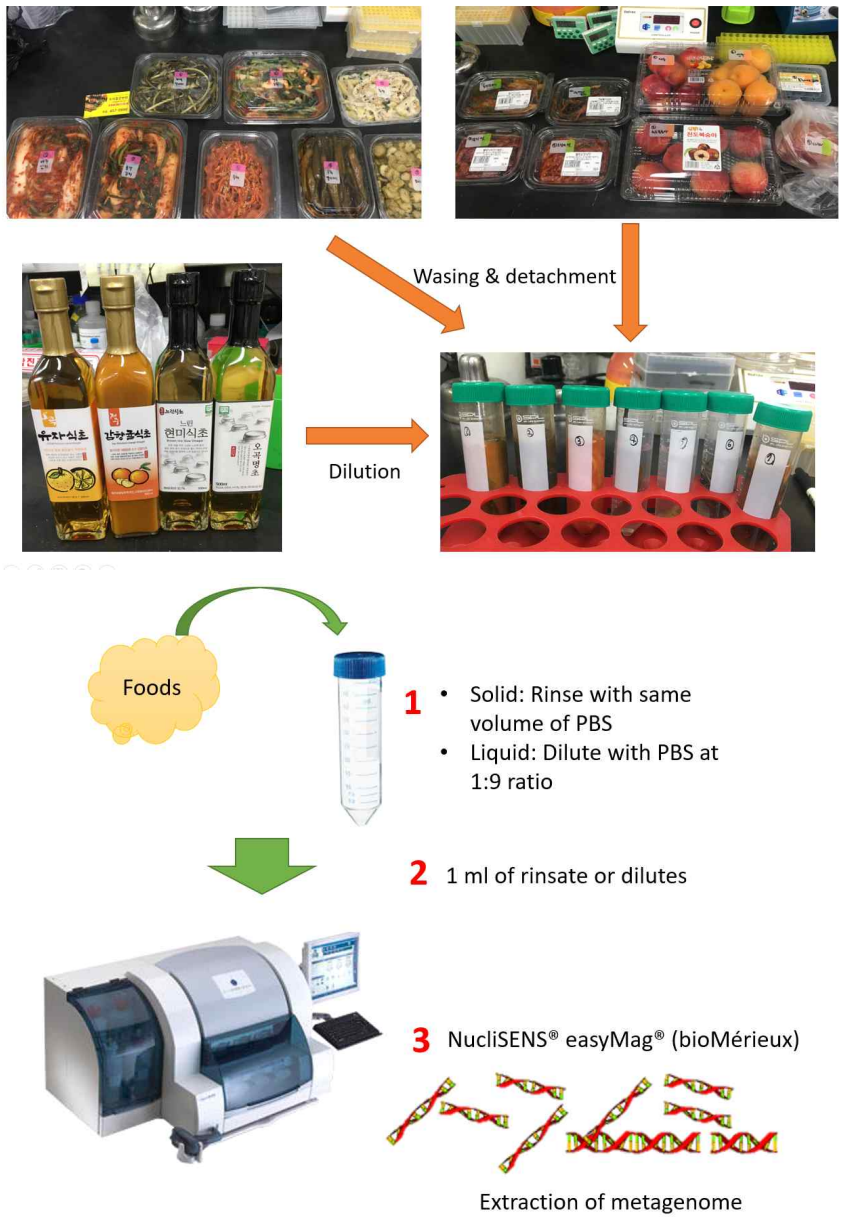
1) 우리나라의 자연발효식품 샘플링

○ 자연발효식품은 원재료, 지역, 기후, 제조자 및 발효과정 등에 따라서 같은 식품이라 할지라도 미생물총이 상이함

○ 우리나라에서 재래적으로 제조되고 있는 자연발효식품인 김치, 케피어, 자연식초, 장류, 발효유 등과 식초 제조의 원료가 되는 과일 등의 시료를 중심으로 샘플링하였음

○ 현재까지 54개의 자연 발효 식품을 샘플링하여 아래와 같이 메타지놈을 추출하였음

○ 추출된 메타지놈으로부터 초산균 및 효모의 핵산을 선택적으로 증폭하여 초산균 및 효모가 존재하는 식품만을 스크리닝 후, 해당 정보를 유용 미생물 분리에 활용하였음



<수집된 자연발효식품으로부터 EasyMag instrument를 활용한 metagenome 추출>

※ 자연발효식품의 lab-scale제조를 통한 미생물 발굴

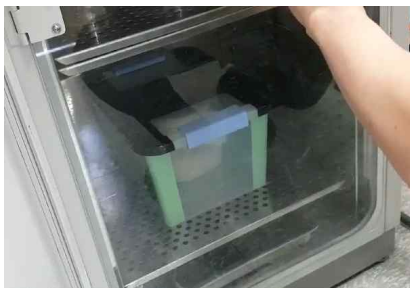
○ 본 연구팀은 생막걸리를 이용한 **자연발효식초**를 제조하여 샘플로 활용함

- 침출식초가 아니라 자연발효식초를 직접 제조하여 초산균을 자연 획득하고자 함
- 초산발효의 순서대로 원료 → 알코올 발효 → 초산발효를 거치기 위하여 생막걸리를 재래시장에서 구매하여 아래와 같이 막걸리식초를 직접 제조하여 초산균 분리에 활용함

생막걸리를 소독한 용기에 담음

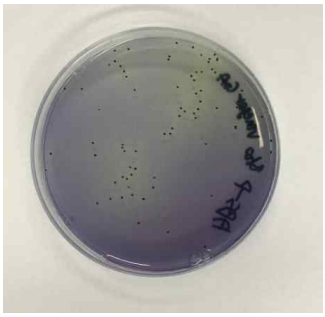
면포로 상부를 덮어주어 먼지 및 해충 유입 방지

인큐베이터에서 1주일간 발효



2일마다 초막 형성 확인 및 부드럽게 진탕

초막 형성 확인



초막으로부터 초산균 분리

○ 또한, 케피어 그레인을 이용한 **케피어 발효유**를 제조하여 샘플로 활용함

케피어 그레인 준비

시유와 혼합 후 25℃에서 24시간 동안 정치배양

케피어 발효유 완성

○ 결론적으로, 아래와 같이 총 74개의 자연발효식품을 샘플링함

<자연발효식품 샘플 목록>

종류	김치	과일	식초	젓갈	절임	기타	총
개수	15	21	28	4	4	2	74

번호	샘플링 날짜	샘플링 장소	실험 날짜	샘플명
1	201806012	재래시장	20180612	배추김치
2	201806012	재래시장	20180612	열무김치
3	201806012	재래시장	20180612	무채
4	201806012	재래시장	20180612	고추장아찌
5	201806012	재래시장	20180612	오이지
6	201806012	재래시장	20180612	취나물 장아찌
7	201806012	재래시장	20180612	총각김치
8	201806012	재래시장	20180612	죽순
9	20180626	재래시장	20180626	배추김치
10	20180626	재래시장	20180626	열무김치
11	20180626	재래시장	20180626	파김치
12	20180626	재래시장	20180626	볶음김치
13	20180626	재래시장	20180626	체리
14	20180626	재래시장	20180626	켐벨포도
15	20180626	재래시장	20180626	자두
16	20180703	대형마트	20180703	돌산갓김치
17	20180703	대형마트	20180703	고돌빼기 김치
18	20180703	대형마트	20180703	낙지젓
19	20180703	대형마트	20180703	오징어젓
20	20180703	대형마트	20180703	자두
21	20180703	대형마트	20180703	살구
22	20180703	대형마트	20180703	천도복숭아
23	20180703	대형마트	20180703	블루베리
24	20180703	대형마트	20180703	사과
25	20180706	대형마트	20180706	딸기
26	20180706	대형마트	20180706	바나나
27	20180706	대형마트	20180706	자몽
28	20180706	대형마트	20180706	레몬
29	20180706	대형마트	20180706	라임
30	20180706	대형마트	20180706	키위
31	20180706	대형마트	20180706	무말랭이
32	20180706	대형마트	20180706	무생채
33	20180709	인터넷쇼핑몰	20180709	오디식초
34	20180709	인터넷쇼핑몰	20180709	한애가
35	20180710	인터넷쇼핑몰	20180710	시샘감식초
36	20180710	인터넷쇼핑몰	20180710	아로니아발효식초
37	20180716	인터넷쇼핑몰	20180716	오행초액기스

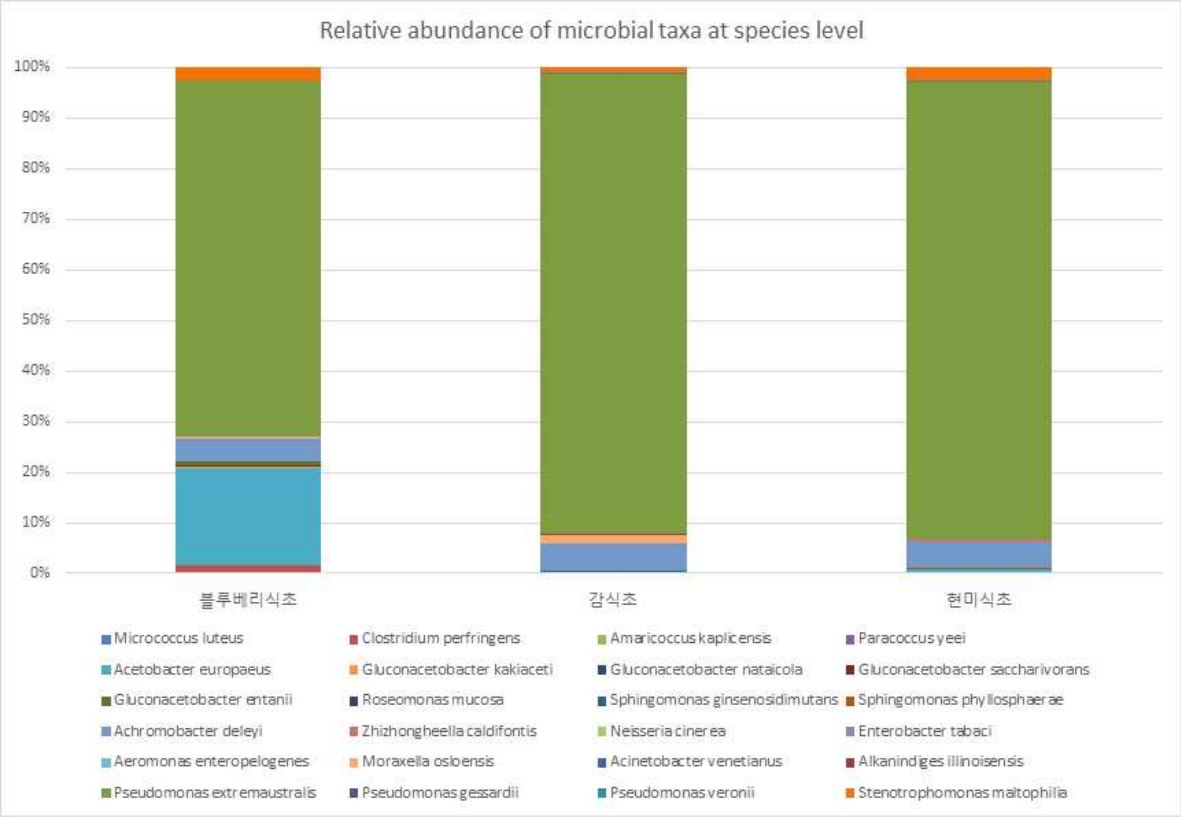
번호	샘플링 날짜	샘플링 장소	실험 날짜	샘플명
38	20180716	인터넷쇼핑몰	20180716	마늘쫑짱아찌
39	20180716	인터넷쇼핑몰	20180716	물김치
40	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	유자식초
41	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	감귤식초
42	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	느린현미식초
43	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	오곡명초
44	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	파인애플식초
45	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	현미사과식초
46	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	현미아로니아식초
47	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	현미오디식초
48	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	오미자식초
49	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	현미복분자식초
50	20180720	인터넷쇼핑몰	20180720	블루베리식초
51	20180723	인터넷쇼핑몰	20180723	현미식초
52	20180723	인터넷쇼핑몰	20180723	현미식초
53	20180723	인터넷쇼핑몰	20180723	대추식초
54	20180801	인터넷쇼핑몰	20180801	감식초
55	20180802	인터넷쇼핑몰	20180802	사과식초
56	20180802	인터넷쇼핑몰	20180802	복숭아식초
57	20180803	인터넷쇼핑몰	20180803	오곡명초
58	20180806	인터넷쇼핑몰	20180806	현미흑초
59	20180807	인터넷쇼핑몰	20180807	막걸리발효초
60	20180808	인터넷쇼핑몰	20180808	함초식초
61	20180810	재래시장	20180810	배추김치
62	20180810	재래시장	20180810	물김치
63	20180810	재래시장	20180810	열무김치
64	20180810	재래시장	20180810	오징어젓
65	20180810	재래시장	20180810	낙지젓
66	20180810	재래시장	20180810	마늘쫑짱아찌
67	20180810	재래시장	20180810	복숭아
68	20180816	재래시장	20180816	만든식초3
69	20180820	대형마트	20180820	체리
70	20180820	대형마트	20180820	바나나
71	20180822	대형마트	20180822	블루베리
72	20180822	대형마트	20180822	아로니아
73	20180822	대형마트	20180822	청포도
74	20180822	대형마트	20180822	귤

2) 자연발효식품 내 효모 및 초산균 군집 탐색 및 프로파일링

○ 본 연구팀은 세 가지 자연발효식초를 시료로 하여 long-read sequencing 기술을 활용한 full-length 16S rRNA gene targeting community analysis를 실시하여 군집 내 초산균 군집을 탐색하였음. 분석을 아래와 같이 실시함

항목	내용
Platform	PacBio RS system
Type of analysis	Metagenome Amplicon Sequencing
Software	SMRT Analysis v2.3.0
Reagent	SMRT Cell 8Pac V3, DNA Polymerase Binding Kit P6,DNA Sequencing Reagent 4.0 v2
Seqeuncing protocol	Template Preparation and Sequencing, PN 100-286-000-08

○ 분석 결과는 아래와 같음 (Microbial relative abundance at species level)

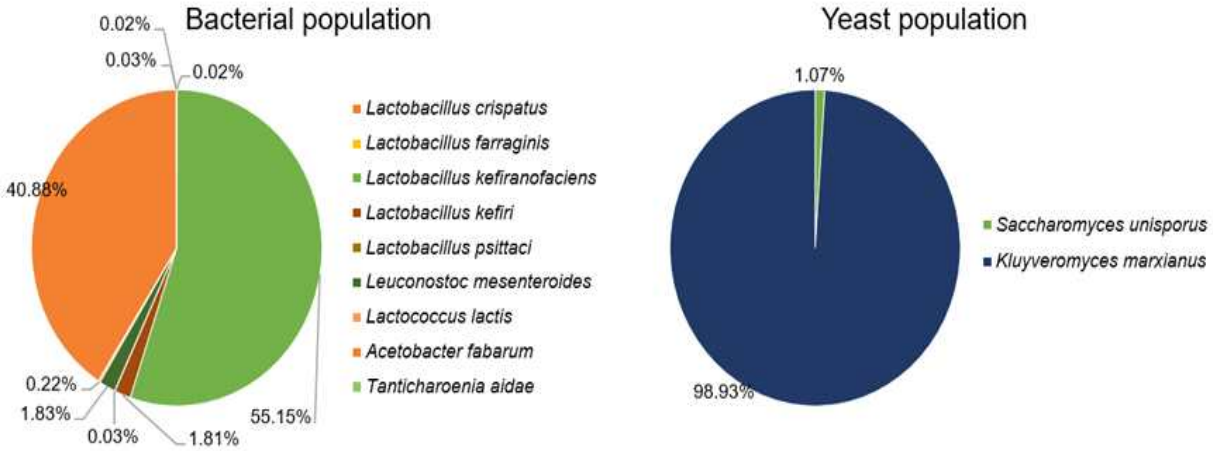


○ 상기 그림에서 볼 수 있듯 자연발효 블루베리식초, 감식초, 현미식초는 *Acetobacter europaeus, Gluconacetobacter kakiaceti, Gluconacetobacter nataicola, Gluconacetobacter saccharivorans, Gluconacetobacter entanii*등의 초산균종을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 특히 그 중에서도 *Acetobacter europaeus*를 가장 우점 초산균종으로 보유하고 있었음.

○ 또한, 직접 lab-scale로 발효시켜 제조한 케피어 발효유로부터 초산균 및 효모 군집을 아래와 같이 분석하였음

항목	내용
Platform	MiSeq sequencer (Illumina platform)
Type of read	Paired-end
Read length	301
Target region	Bacteria: 16S rRNA gene V3-4 region Yeast: internal transcribed spacer 3-4 region

○ 세균 및 효모 군집 분석 결과는 아래와 같음 (Microbial relative abundance at species level)



○ 이처럼 케피어 발효유에는 초산균인 *Acetobacter fabarum*가 단일종이나 상당히 높은 비율(40.88%)로 함유되어 있음을 알 수 있었음

○ 또한, 효모의 경우 최근 potential probiotic yeast로서 주목받고 있는 *Kluyveromyces marxianus* 효모가 약 99%의 mycobiota를 차지하고 있었으며, 1%의 *Saccharomyces unisporus* 효모도 존재함을 확인할 수 있었음

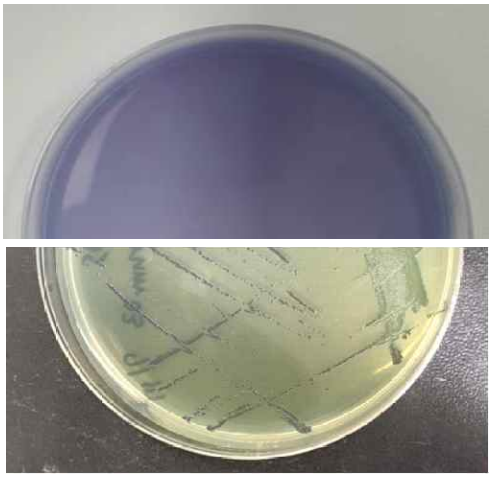
○ 추후 유용 미생물 분리 확보 단계에서 NGS데이터를 통해 얻어진 상기 미생물종에 대한 정보를 적극 활용하여 이들을 집중적으로 분리해내었음

3) 효모 및 초산균 선택적 분리 플랫폼 개발

※ 초산균의 효과적 분리를 위한 선택감별배지 개발

○ 다양한 미생물이 혼재하는 자연발효식품으로부터 초산균을 효과적으로 분리하기 위하여 아래와 같이 선택감별배지를 최초로 개발하였음

○ 본 기술에 대해서 국내 미생물 배지 생산 업체로 기술이전을 실시함 (2019년 11월)



◀ 배양 전: 파란색 바탕을 가진 고형 배지

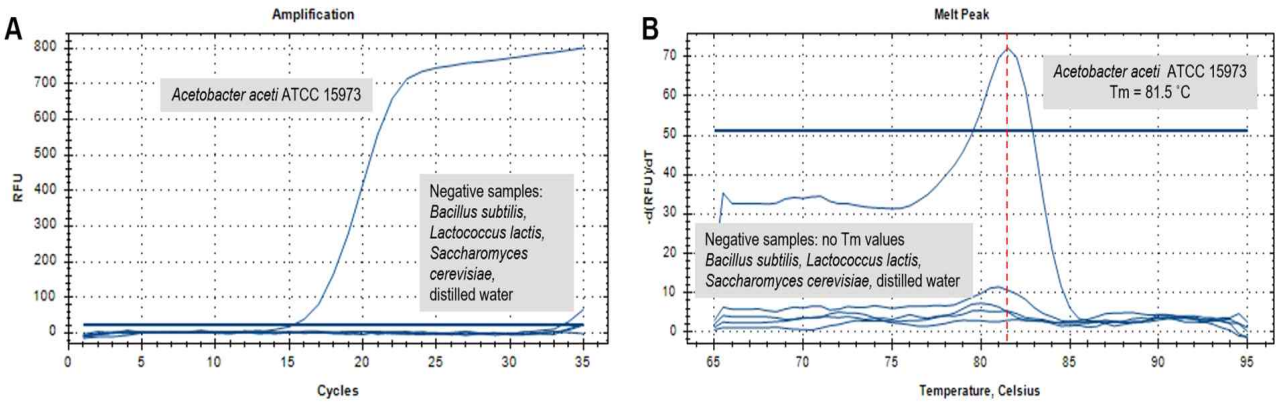
◀ 배양 후: 식품시료 희석액 또는 린스액을 획선 도말시, 좌측과 같이 초산균주만 선택적으로 녹색의 집락을 형성하게 되며, 기타 경쟁집락은 성장하지 못함

<본 연구팀에서 개발한 초산균 선택감별배지>

※ 초산균의 신속 확인을 위한 real-time PCR기법 개발

○ 또한, 본 연구팀은 초산균만을 선택적으로 신속 확인동정하기 위하여 real-time PCR기법을 개발하였음

○ 본 기법을 활용하여 다양한 시료 중 초산균이 존재하는 시료만을 특정지을 수 있었으며, 해당 시료를 이용하여 상기 선택배지에 집중적으로 배양시킴으로서 표적하는 초산균을 효율적으로 분리해낼 수 있었음



<초산균 신속 확인동정용 real-time PCR기법>

4) 자연발효식품 유래 초산균 및 효모주 확보

○ 상기한 샘플링 기법을 실시하여 현재까지 3주의 초산균주와 12주의 효모주를 아래와 같이 확보하였음

○ 특히 초산균의 경우 전통적 방법만으로는 자연발효식품 내의 존재를 확인 및 분리가 매우 까다로운 것으로 알려져 있어 3주를 신규 분리한 것이 매우 주목할만함

○ 현재까지 NABIC에도 초산균주와 관련된 genome-wide information이 전무하여 추후 참조 유전체 정보로서 매우 가치가 높을 것으로 판단됨

○ 과제 개시 이후 현재까지 구축한 플랫폼을 적극 활용하여 계속해서 균주를 분리할 예정임

○ 추후 분리 균주들을 대상으로 프로바이오틱스 기능성을 기반으로 중요도를 평가한 뒤, 학술적·산업적 가치가 높을 것으로 사료되는 균주를 대상으로 WGS 분석을 실시할 계획임 (2차 년도)

2. 2차년도 (2019)

가. 2차년도 연구 내용 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2019)	유용 효모 및 초산균 분리 및 probiotic function screening	효모 및 초산균의 *in vitro*위장관 생존성 기반 스크리닝	Simluated GIT environment 에서의 생존성 확인	• 분리된 효모 및 초산균주의 simluated GIT environment 에서의 생존성 확인 • 효모 1주 (*Kluyveromycesmarxianus* A5) • 초산균 2주 (*Acetobacterpasteurianus* DHMV3706, *Acetobacterfabarum* DH1801) 선발
		효모 및 초산균의 *in vitro*숙주 안전성 기반 스크리닝	Hemolysis, growth on blood agar 기반숙주 안전성 스크리닝	• Hemolysis, growth on blood agar 기반숙주 안전성 스크리닝 • 효모 및 초산균의 *in vitro* 숙주 안전성 확인
		효모 및 초산균의 *in vitro* 및 *in vivo* 기능성 기반 스크리닝	*In vivo* function and safety	• *in vitro* microbial interaction (positive &negative) • *In vivo* gut microbiota modulation & safety evaluation
	유용 효모 및 초산균의 WGS 분석을 통한 genome mapping 및 comparative genomic analysis	유용 초산균의 complete genome assembly	Short- and long-read Hybrid *de novo*mapping	• Short- and long-read Hybrid *de novo*mapping • 신규 probiotic AAB 2주에 대한 고품질 참조 유전체 확보
		Comparative genomic analysis	Comparative genomics (KEGG-based functional comparison)	• Comparative genomics (KEGG-based functional comparison)
		Comparative metabolimics	대사체 프로파일링을 통한 comparative metabolimics	• 선별된 유용 초산균 1주와 기존 유산균 프로바이오틱스 1주와의 대사체 비교
	유용 효모 및 초산균 확보 및 미생물자원 기탁	유용 효모 및 초산균의 고품질 참조 유전체 확립	미생물 일반기탁 미생물 국제 특허 기탁	• KCCM일반기탁5건 • KCCM 국제 특허 기탁 3건 (유산균 1건, 초산균 1건, 효모 1건)
		확보된고품질 참조 유전체의 genome DB등록	iGEM DB 업로드	• iGEM DB 업로드 5건 (CGS 2건, metagenome 2건)

<2차년도 연구 내용 요약>

유용 효모 및 초산균 자원 선발
(프로바이오틱스)
01
2차년도 목표
신규 유용 효모 및 초산균 자원의
고품질 참조 유전체 확보 및
프로바이오틱스 활용 가능 균주 발굴
02
유용 미생물 자원
유전체 분석
03
지적재산권 확보
미생물 자원 기탁

나. 2차년도 연구 결과

1) 유용 효모 및 초산균 분리 및 probiotic function screening

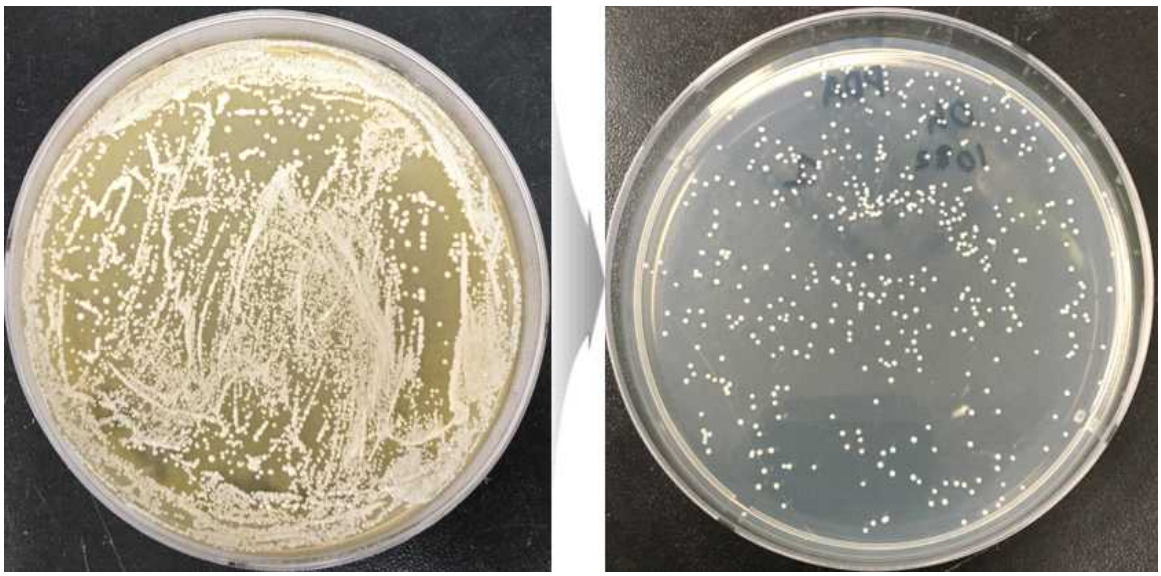
: 평가지표: 생존성, 안전성, 기능성

- **Characteristics of good probiotics**
  - 생존성 (Survivability in host GIT)
  - 안전성 (Safety in host)
  - 기능성 (Health benefits)

① 효모 및 초산균의 *in vitro* 위장관 생존성 기반 스크리닝

❖ **Simulated GIT environment에서 효모의 생존성**

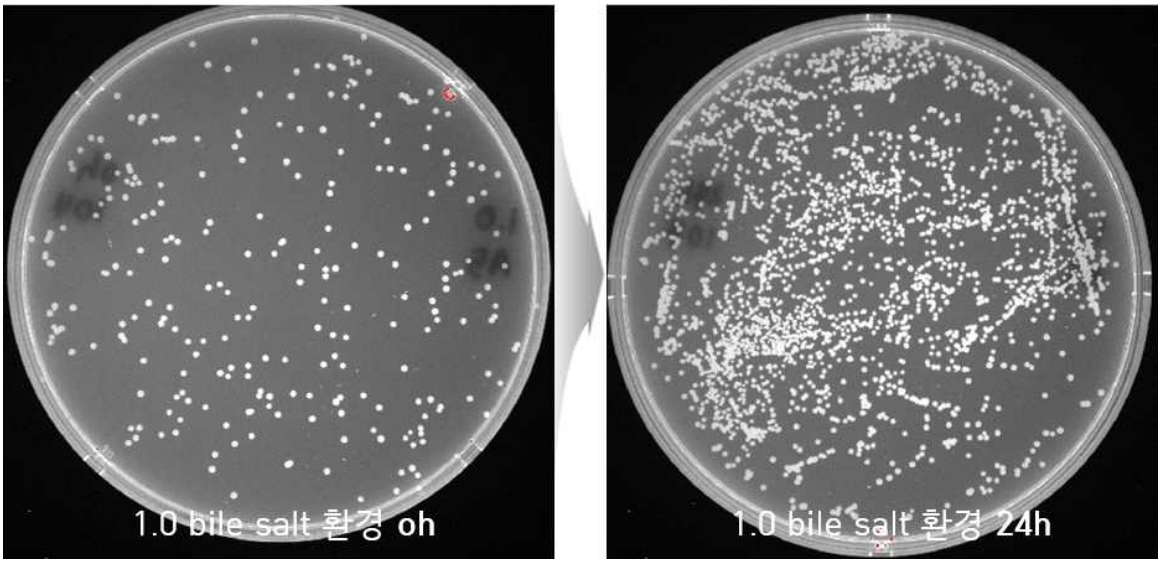
- 케피어에서 분리한 효모의 probiotics로서의 유용성을 평가해보기 위해 *K. marxianus* 16241A1, 16242A2, 16245M1, KGA, A5 효모주의 *in vitro* 위장관 생존성 실험을 진행함
- 현재 임상적으로 유일하게 승인받은 효모주인 *Saccharomyces boulardii*와 생존성을 비교하여 케피어 효모주의 생존성 기반 유용성에 대해 평가함
- PDA 배지에 효모를 배양하여 분리하였을 때 효모균의 수가 너무 많아서 단일 콜로니 분리가 어려웠으므로 생존성 확인 시 희석배수를 높여서 균의 밀도를 줄였고 위에서는 0시간과 2시간에서, 장에서는 0시간과 24시간에서 효모주의 생존성 및 성장률을 평가함

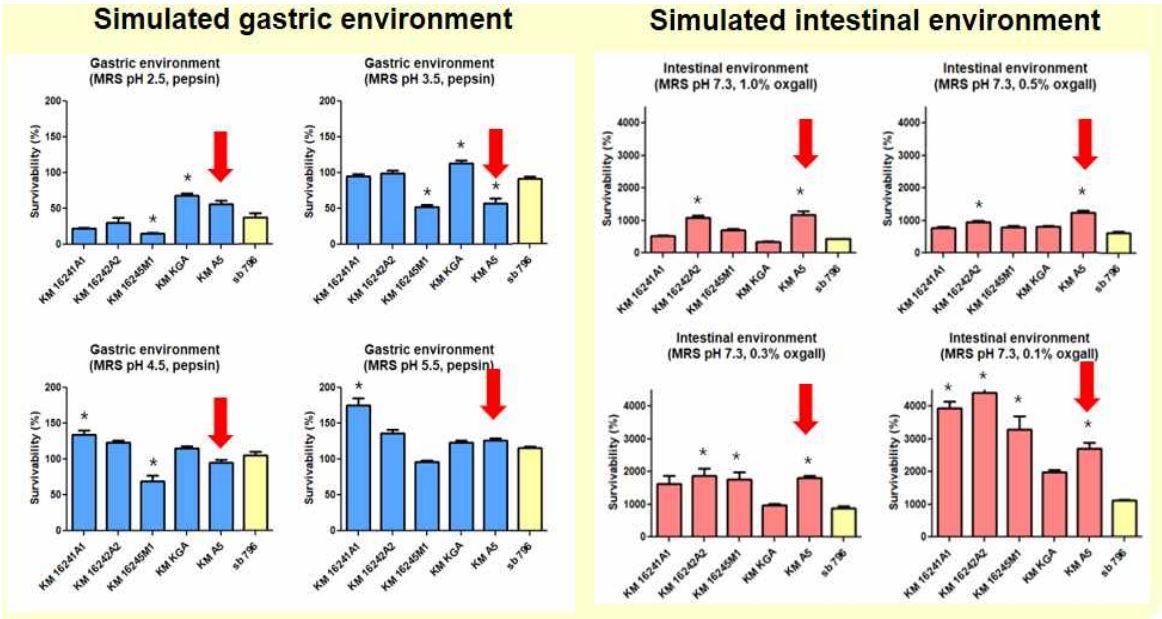


- 인공적인 위 환경에서는 pepsin과 pH 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 일반적인 사람의 소화 시간인 0시간 ~ 2시간을 맞춰 초기 효모 수와 최종 효모 수를 비교함. 인공적인 장 환경에서는 pH 7-8, bile salt를 1.0, 0.5, 0.3, 0.1%, 일반적으로 소화물이 장에 머무르는 시간인 0시간 ~ 24시간을 맞춰 초기 효모 수와 최종 효모 수를 비교함
- 결과 확인 시, 인공적인 위 환경에서는 *K. marxianus* KGA, *K. marxianus* A5 순으로 생존성이 좋게 나타났고 인공적인 장 환경에서는 *K. marxianus* A5, *K.*

marxianus A2 순으로 생존성이 좋게 나타남

- *K. marxianus* A5 효모주: 임상적으로 유일하게 승인받은 probiotic yeast인 *S. boulardii* sb796보다 pH2.5 및 0.1-1.0 bile salt 환경에서 전체적으로 우수한 생존성을 나타냄





❖ **Simulated GIT environment에서 초산균의 생존성**

- 다양한 우리나라 자연 발효식품으로부터 분리된 초산균주의 *in vitro* 위장관에서 생존성 평가를 시행함. 인공 위 환경에서는 pH 2.5, 4.5, 5.5, 6.8, 인공 장 환경에서는 bile acid 1.0, 0.5, 0.3, 0.1%로 환경 범위를 넓게 맞춰줌
- 자연 발효식품으로부터 분리된 초산균주 중 몇몇은 위장관 환경에서 성장하지 못하였으나 블루베리 식초에서 분리된 *Gluconacetobacter europaeus* DHBV3701은 pH 4.5, 5.5, 6.8 환경에서 성장하였고, 배추김치에서 분리된 *Gluconobacter frateurii* DHKC3704는 bile acid 0.1, 0.3% 환경에서 성장함
- *A. pasteurianus* MGLV, *A. fabarum* DH1801 초산균주: mild한 GIT 환경 (약산성, 저농도 담즙산염 존재)에서 성장을 나타냄

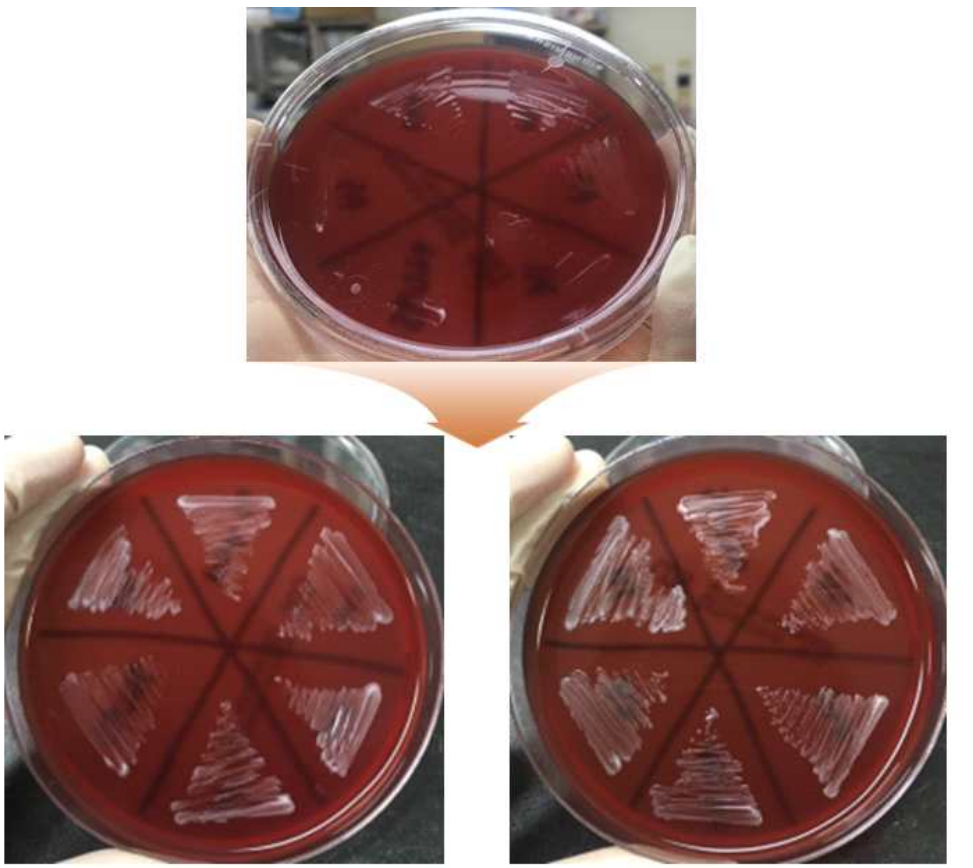
Strain	Source	Growth in 37° C at pH				Growth in 37° C at bile acid			
		6.8	5.5	4.5	2.5	0.1%	0.3%	0.5%	1.0%
Gluconacetobacter europaeus DHBV3701	블루베리식초	+	+	+	-	-	-	-	-
Gluconacetobacter europaeus DHBR3702	현미식초	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconacetobacter kakiaceti DHPV3703	감식초	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconobacter frateurii DHKC3704	배추김치	-	-	-	-	+	+	-	-
Acetobacter cibinongensis DHGJ3705	마늘짱아찌	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetobacter pasteurianus DHMV3706 (=MGLV)	막걸리식초	+	+	+	-	+	+	-	-
Acetobacter fabarum DH1801	케피어 발효유	+	+	+	-	+	-	-	-
Gluconacetobacter cerevisiae DHKM3708	케피어 발효유	-	-	-	-	-	-	-	-

② 효모 및 초산균의 *in vitro* 숙주 안전성 기반 스크리닝

❖ ***In vitro*상 효모의 안전성 평가**

- 용혈성은 나타내지 않았으나 혈액을 기질로 성장 - 추가적인 *in vivo* 검증 필요

Strain	Source	Growth on blood agar at		Hemolysis on blood agar at	
		30° C	37° C	30° C	37° C
Kluyveromyces marxianus 16241A1	케피어 발효유	+	+	-	-
Kluyveromyces marxianus 16242A2	케피어 발효유	+	+	-	-
Kluyveromyces marxianus 16245M1	케피어 발효유	+	+	-	-
Kluyveromyces marxianus KGA	케피어 발효유	+	+	-	-
Kluyveromyces marxianus A5	케피어 발효유	+	+	-	-
Saccharomyces boulardii sb796	상업 제품	+	+	-	-



<Growth on blood agar at 30° C> <Growth on blood agar at 37° C>

❖ *In vitro*상 초산균의 안전성 평가

- *In vitro* 상에서 자연 발효식품으로부터 분리된 초산균을 혈액 배지에 풀어 배양 후 성장과 용혈성을 확인함
- 초산균주 중 몇몇은 혈액 배지에서 성장하지 않았으나 배추김치에서 분리된 *Gluconobacter frateurii* DHKC3704, 마늘짱아찌에서 분리된 *Acetobacter cibinongensis* DHGJ3705, 막걸리식초에서 분리된 *Acetobacter pasteurianus* DHMV3706, 케피어 발효유에서 분리된 *Acetobacter fabarum* DH1801, *Gluconacetobacter cerevisie* DHKM3706 균주는 혈액 배지에서 성장함
- 후보 초산균주: 용혈성은 나타내지 않았으나 혈액을 기질로 성장함을 확인
- 추가적인 *in vivo* 검증 필요

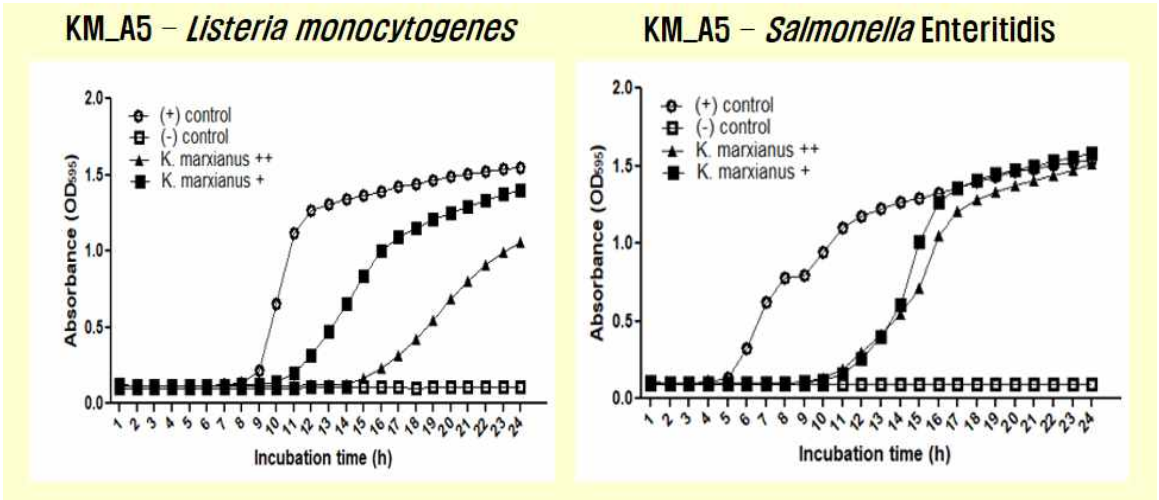
Strain	Source	Growth on blood agar at		Hemolysis on blood agar at	
		30° C	37° C	37° C	37° C
Gluconacetobacter europaeus DHBV3701	블루베리식초	-	-	-	-
Gluconacetobacter europaeus DHBR3702	현미식초	-	-	-	-
Gluconacetobacter kakiaceti DHPV3703	감식초	-	-	-	-
Gluconobacter frateurii DHKC3704	배추김치	+	+	-	-
Acetobacter cibinongensis DHGJ3705	마늘짱아찌	+	+	-	-
Acetobacter pasteurianus DHMV3706 (=MGLV)	막걸리식초	+	+	-	-
Acetobacter fabarum DH1801	케피어 발효유	+	+	-	-
Gluconacetobacter cerevisiae DHKM3708	케피어 발효유	+	+	-	-

③ 효모 및 초산균의 *in vitro* 및 *in vivo* 기능성 기반 스크리닝

❖ ***In vitro*상 효모의 기능성 평가** : microbial interaction (*in vitro*)

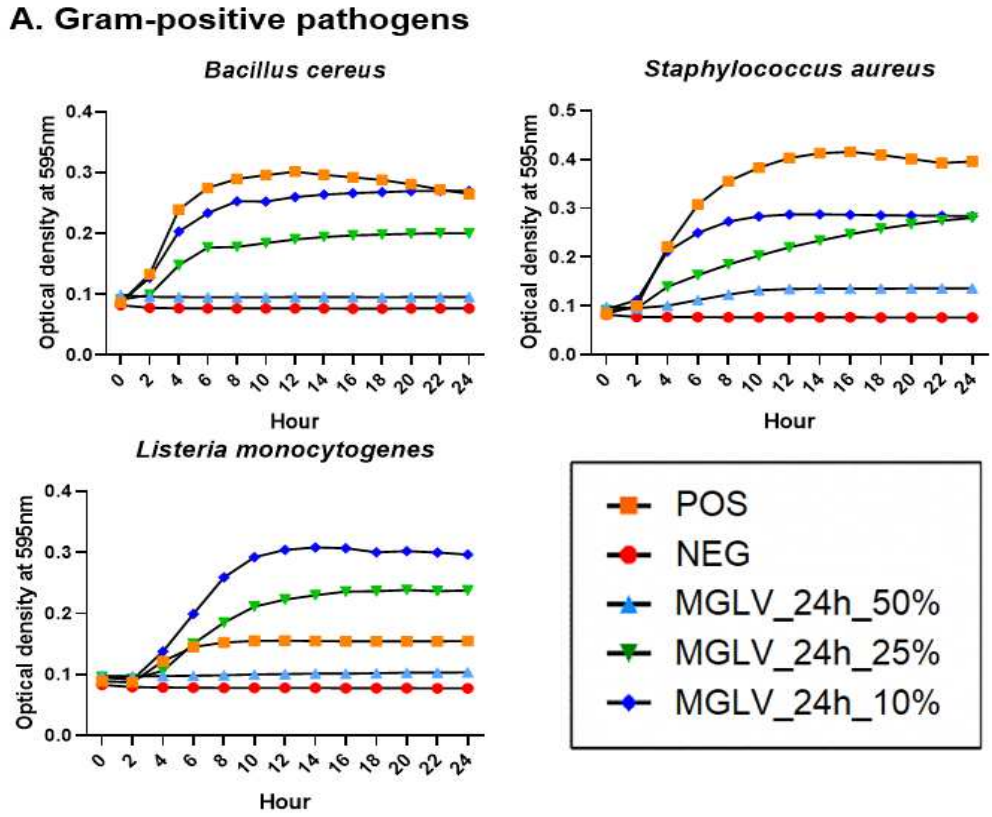
- 케피어 내 효모 균총을 우점하고 있는 *Kluyveromyces marxianus* (n=46)의 주요 식중독균에 대한 항균 효과 분석 시, 식중독균 *Salmonella* Enteritidis와 *Listeria monocytogenes*를 전체적으로 제어한 균주 수는 각각 19/46, 19/46로 항균 효과를 보여줌
- 케피어에서 분리한 효모주 *Kluyveromyces marxianus* A5을 주요 식중독균인 *Salmonella* Enteritidis와 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 효과 분석을 통해 유용 효모 probiotics로서의 기능성 평가를 수행함
- 후보 효모주 1번 (*K. marxianus* A5): *L. monocytogenes*에 대해 항균 효과를 보인 *K. marxianus*는 lag phase가 길어지고 최대 성장수준이 낮아졌으며 *S.* Enteritidis에 대한 항균 효과를 보인 *K. marxianus*는 lag phase는 길어졌으나 최대 성장수준은 비슷한 결과를 보임

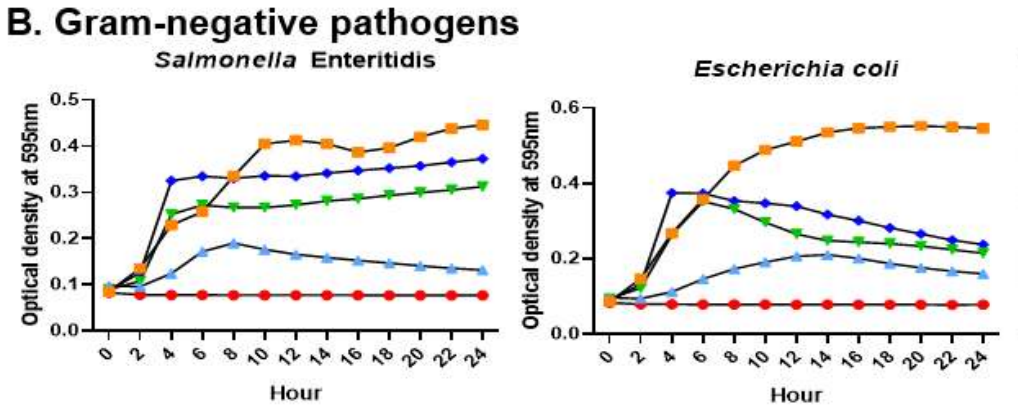
Yeast (n)	Antimicrobial Effect	Number of yeast strains in each level / number of total yeast strains	
		Salmonella Enteritidis	*Listeria monocytogenes*
Kluyveromyces marxianus (n=46)	++	19/46	19/46
	+	2/46	20/46
	-	25/46	7/46



❖ *In vitro*상 초산균의 기능성 평가 : microbial interaction (*in vitro*)

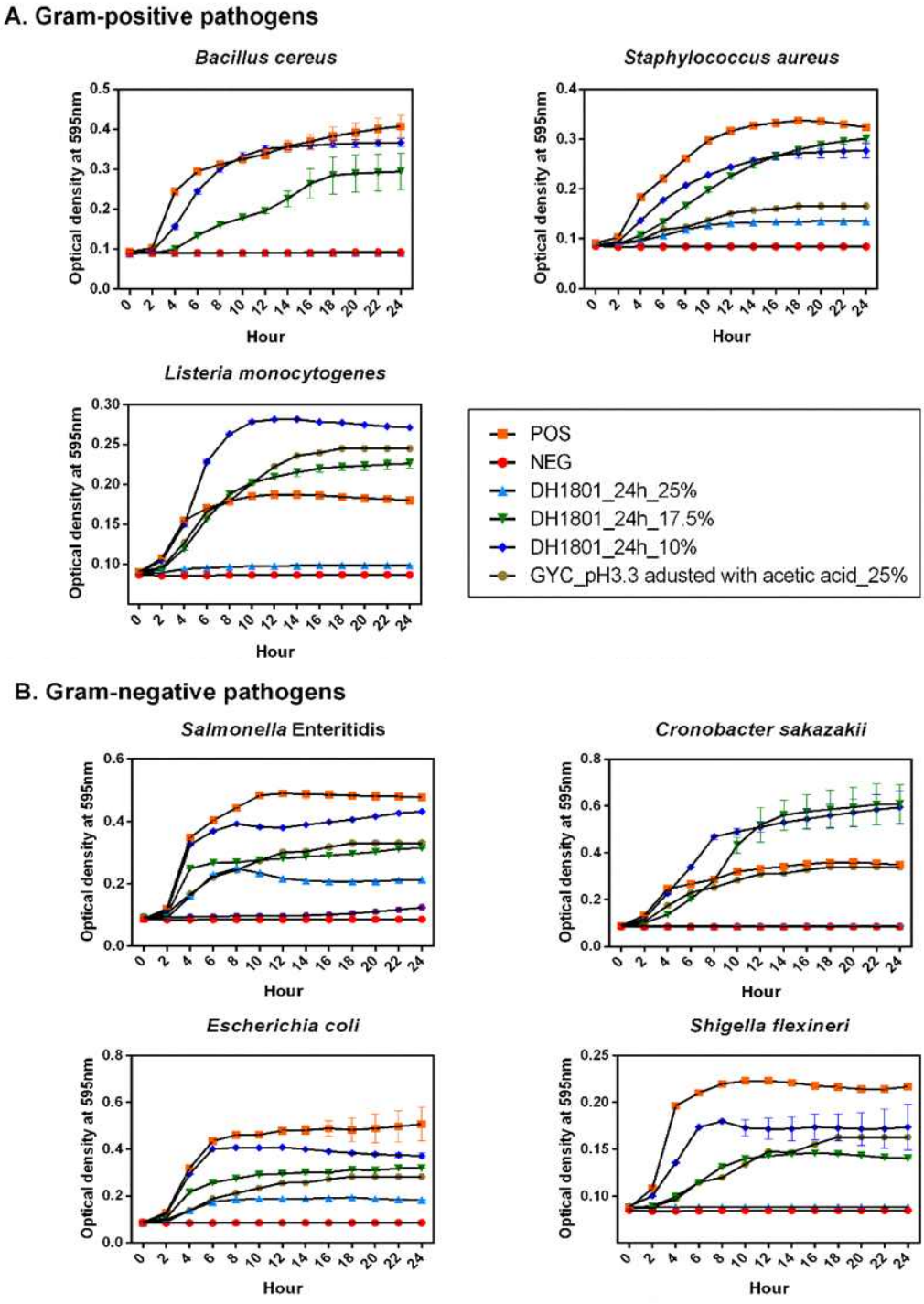
- 후보 초산균 1번 (*Acetobacter pasteurianus* MGLV)의 기능성 평가를 위해 Growth curve analysis를 통해 유해 미생물에 대한 항균 효과를 평가함
- 항균 효과 분석 결과에서 G+ pathogen인 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 대한 농도 의존적 억제 효과를 확인함
- G- pathogen인 *S.* Enteritidis와 *E. coli*에서도 병원균에 대한 초산균의 농도 의존적 억제 효과를 확인할 수 있었음. 특히, metabolite 25% 첨가 시 lag phase가 길어지고 최대 성장수준이 확연하게 낮아진다는 것을 알 수 있었음
- 결론적으로, 후보 초산균 1번은 3종의 G+, 2종의 G- 병원균에 대해서 negative interaction을 나타냄





❖ *In vitro*상 초산균의 기능성 평가 : microbial interaction (*in vitro*)

- 후보 초산균 2번 (*Acetobacter fabarum* DH1801)의 기능성 평가를 위해 Growth curve analysis를 통해 유해 미생물에 대한 항균 효과를 평가함
- G+, G- 병원균에서 초산균의 농도가 높아질수록 lag phase가 길어지고 최대 성장 수준보다 낮은 결과를 보여 병원균의 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있음
- 후보 초산균 2번은 3종의 G+, 4종의 G- 병원균에 대해서 negative interaction을 나타냄

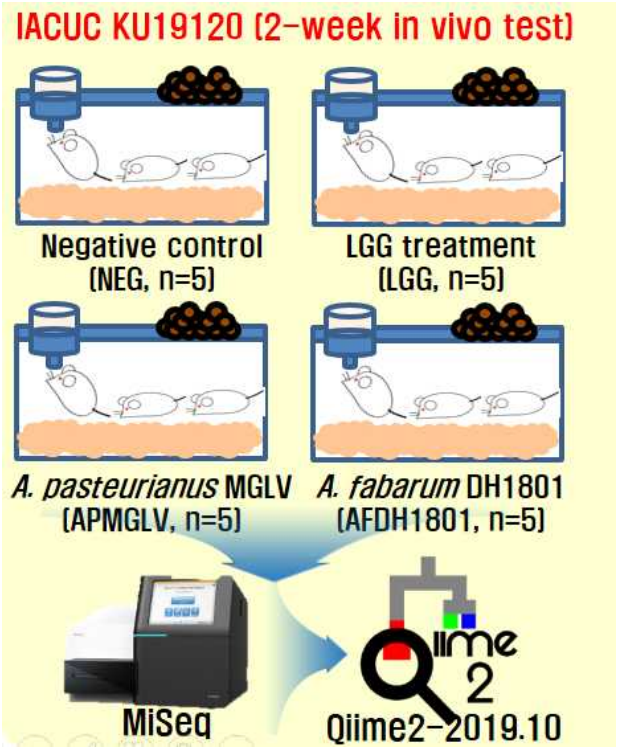


■ 후보 초산균 2 주(strain)의 *in vivo* 기능성 및 안전성 기반 스크리닝

※ Experimental description

	실험동물 정보	
종	Mouse	
계통	BALB/c	
성별/수량	암: 20	수: 0
체중/주령	16 (g)	4 주령
품질	■ SPF ☐ CL (Clean) ☐ Conventional ☐ 무확인	
구입처	Charles River Lab.(오리엔트바이오)	
사육장소	수의과대학 103호	

그룹	두수	사료	시험물질	투여경로
대조군	5	일반사료	Saline 0.2ml	경구존데투여
처치군1	5		LGG, 10^9cfu/head in saline	
처치군2	5		APMGLV, 1 10^9cfu/head in saline	
처치군3	5		AFDH1801, 10^9cfu/head in saline	



❖ Sampling and OTU saturation (Rarefaction curve analysis)

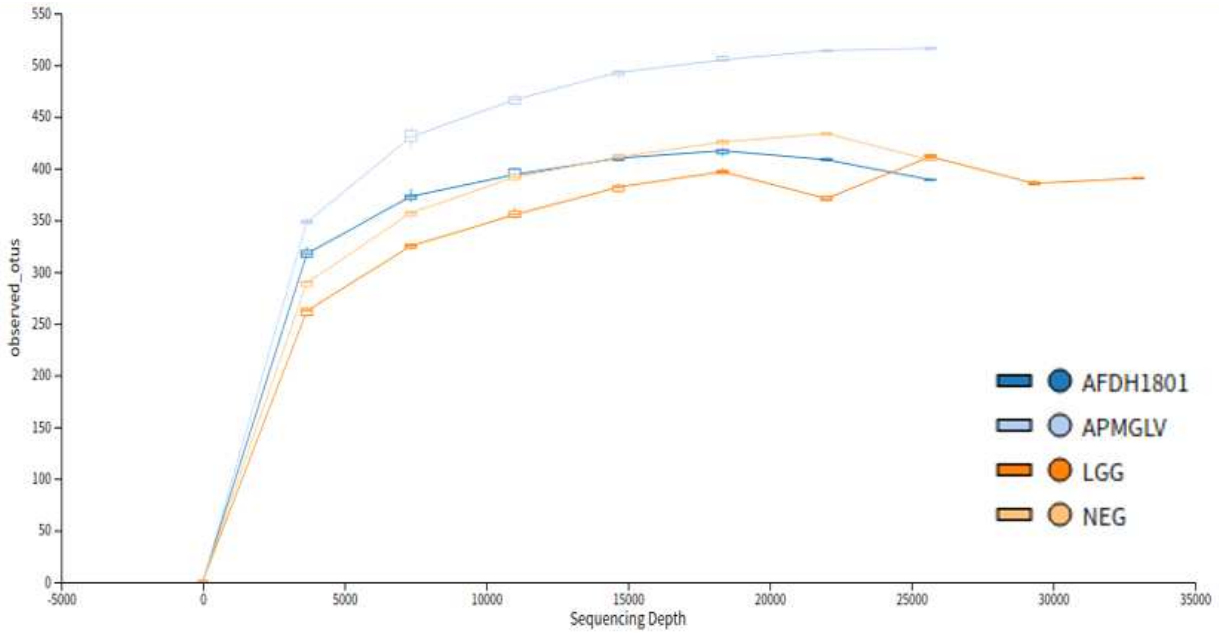
- 본 연구에서 실시한 Sequencing 표본의 모집단 대표성을 확인하기 위하여 Sampling depth - observed OTUs 분석 (rarefaction curve analysis)를 실시하였음

< Rarefaction curve analysis란 >

- 메타지놈 연구에서 샘플은 주로 다양한 미생물이 포함되어있는 환경으로부터 얻어진다. 예를 들어, 우리가 토양에 존재하는 미생물 집단을 보는 것에 관심이 있다고 하자. 이 때, 가장 이상적인 방법은 호수 전체를 표본으로 추출하는 것이지만, 이는 많은 시간과 비용이 소요되며, 무엇보다도 현실적으로 불가능하다. 그래서 대안은 토양의 일부를 샘플링하는 것이다. 즉, 토양 일부에서 미생물 군집을 샘플링하는 것이다. 하지만, 이 샘플링이 토양의 미생물 군집을 얼마나 잘 대변할지는 미지수이다. 이를 알아보기 위한 방법이 rarefaction curve analysis이다.
- Rarefaction curve analysis는 표본 수(sampling depth) 별로 종(species 혹은 OTUs)의 풍부함(richness)을 나타낸다. 이 곡선은 미생물 성장 곡선과 비슷한 형태를 띈다. 일반적으로 표본의 모든 판독값이 새로운 유기체로 식별될 가능성이 높은 곳에서 빠르게 성장하며(미생물 성장 곡선의 지수화 단계처럼), 희귀한 종들이 샘플링으로 남아 있을 때(미생물 성장 곡선의 정지 단계처럼) 서서히 고원화(plateau)되기 시작한다. 표본에 대한 희소 반응 곡선이 고원에 도달하면, 이것은 우리가 채취한 시료가 모집단의 미생물집단을 잘 반영한다는 것을 시사한다 (풍부한 종들 뿐만 아니라 희소 종들도 잘 반영되었기 때문). 이러한 측면에서, 희소종(rare species)들도 군집에서 중요한 지위를 가질 수 있기 때문에, 희소종들도 잘 반영하기 위해서는 샘플링 깊이가 증가될수록 좋다 (sampling depth가 많을수록 좋음).

- 상기 정의에서 볼 수 있듯, 급격하게 종의 수가 증가하는 구간이 지나가고 plateau가 형성되면 샘플링이 적절하게 되었다고 판단할 수 있음 (sampleing depth가 충분)
- 본 연구에서의 Sequencing도 전 그룹에서 OTUs가 saturation 될 때 까지 충분히 진행되었음

<대조군(NEG), 유산균 대조군(LGG), 초산균 투여군(APMGLV, AFDH1801)의 Rafefaction curve>



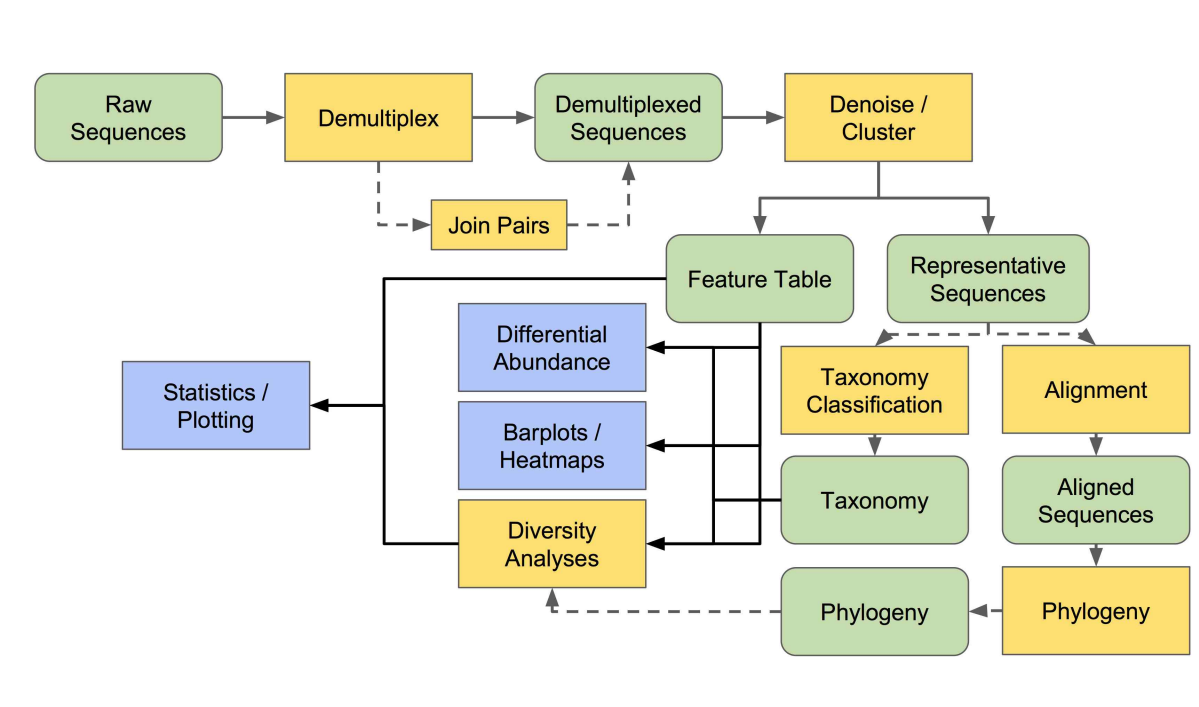
❖ **분자계통분류학적 분석 (Taxonomic assignment of samples)**

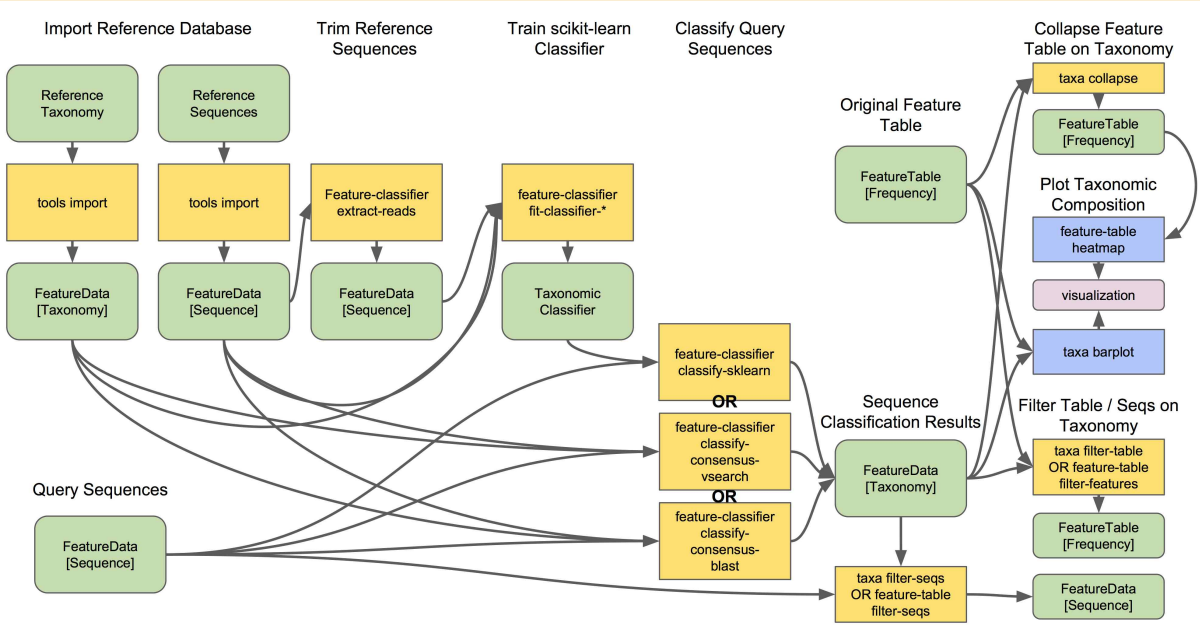
- 분자계통분류학적 분석은 QIIME2 tools을 활용하여 이루어졌음 (QIIME2-2019.10)

< Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)을 이용한 계통분류학적 분석 >

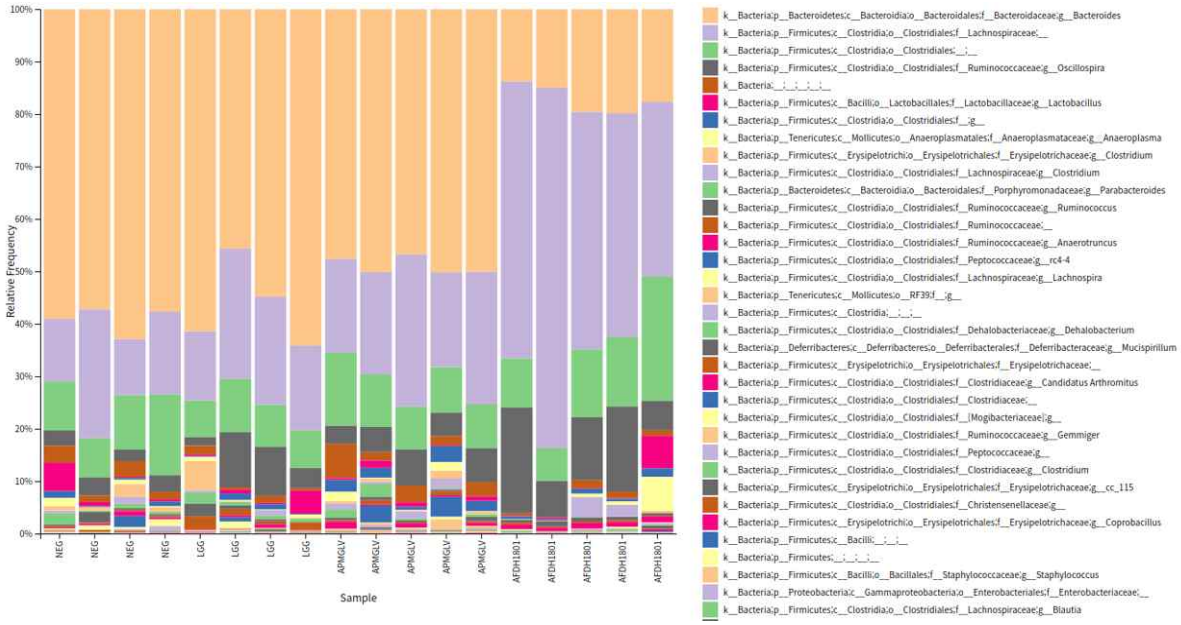
- QIIME(canonically 발음 "chime")은 미생물 집단 분석을 수행하는 소프트웨어 애플리케이션이다.
- 미생물생태학에 대한 정량적 해석 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)의 약자로, 곰팡이, 바이러스, 박테리아, 고세균류의 핵산 염기서열 데이터를 분석하고 해석하는데 사용되어 왔다.

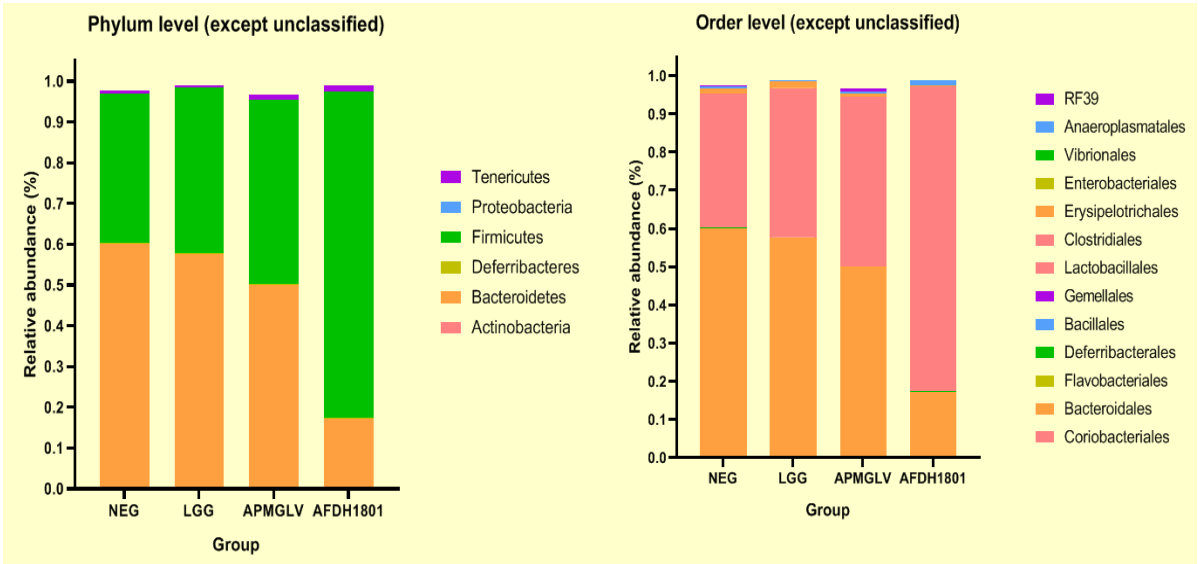
<Conceptual overview of QIIME 2 workflow, 출처: QIIME2 홈페이지>

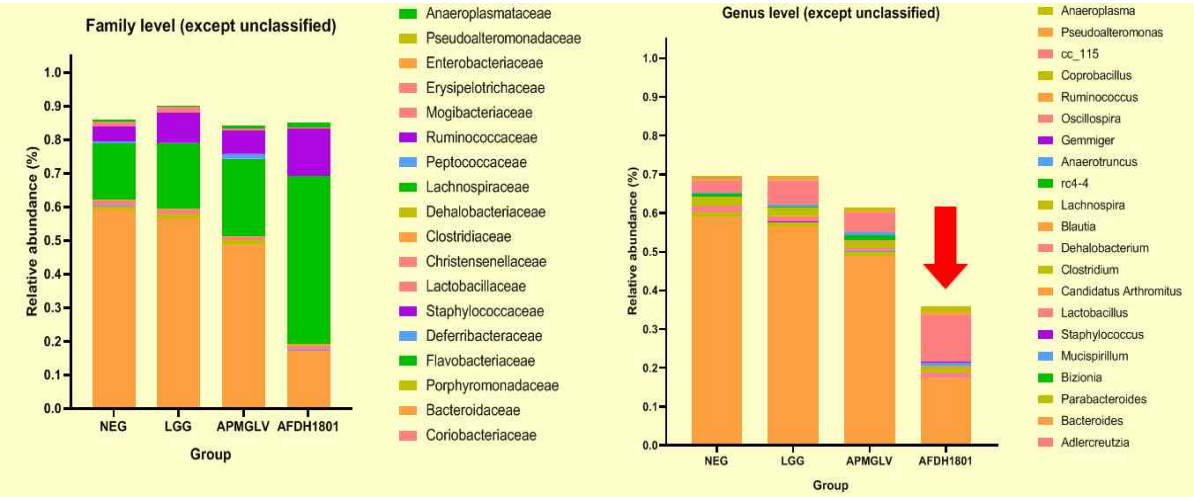




- 상기 workflow에 따라, raw sequence – demultiplex – denoise/cluster – representative sequences과정을 거쳐 taxonomic classification을 진행하였음
- 본 분석에서는 reference database로서 Greengene 13.8 database를 사용하였음
- 또한 query sequences classfication을 위해 feature-classifier classify-sklearn을 사용하였음
- 실험군별(NEG, LGG, APMGLV, AFDH1801), taxa level별 (domain, phylum, class, order, family, genus, species) 분석 실시하였음
- APMLGV 및 AFDH1801 섭취군에서 F/B ratio의 유의적 증가가 발견됨







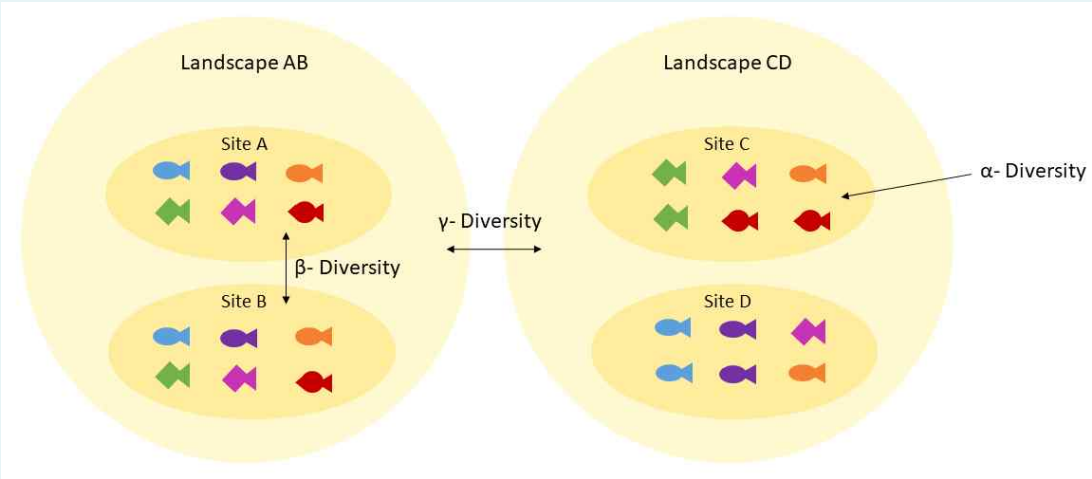
- 특징적으로 AFDH1801 섭취군에서 하위 taxa level로 갈수록 identification rate이 급격하게 감소됨을 발견함 - 붉은 화살표 (NEG 그룹 69.63%, LGG 그룹 69.72%, APMGLV 그룹 61.44%, AFDH1801 그룹, 35.89%)
- APMGLV 그룹의 경우에도 AFDH1801 그룹 만큼은 아니지만 identification rate의 감소가 발견되었음
- 이러한 사실로 미루어보아, 초산균의 단기 경구 섭취는 장관 내에서 rare taxon의 비율을 증가시키며, 해당 rare taxon에 대한 정보는 아직까지 reference library 상에 업데이트되어 있지 않을 가능성이 큼을 시사함
- 즉, 현 taxonomic classification (분류 체계)로는 cutoff value 이상의 정확도로 identification을 해내기 어려운 미생물집단들이 blooming하게 됨을 시사함
- 장내 마이크로바이옴의 dramatic change를 나타내며, 뒷 단계에서 diversity analysis를 통해 추가적으로 해당 현상을 조사해보기로 함

❖ Biodiversity analysis

- 초산균을 섭취한 마우스의 장내마이크로바이옴 다양성을 분석하기 위해 다양한 통계학적 개념들을 활용하였음

<Biodiversity 관련 주요 용어와 개념들>

<Difference between alpha, beta and gamma diversity, Source: https://en.wikiversity.org/wiki/Biodiversity/Introduction#/media/File:Biodiversity.png >



- Biodiversity란 Bio와 Diversity의 합성어로, 일반적으로 생명체의 다양성을 나타내는 개념이다. United Nations Environment Programme (UNEP)에 따르면, 생물다양성은 전형적으로 유전자, 종, 생태계 수준에서 변화를 측정한다. 생물학자들은 대부분 생물 다양성을 "지역 내 유전자, 종, 생태계의 총체"로 정의한다. 여기에는 다음이 포함된다.
  - ☑ 분류학적 다양성(taxonomic diversity, 일반적으로 종 다양성 수준에서 측정됨)
  - ☑ 생태계 다양성의 관점에서 흔히 볼 수 있는 생태학적 다양성 (ecological diversity)
  - ☑ 유전적 다양성과 분자 다양성에서 비롯되는 형태적 다양성 (morphological diversity)
  - ☑ 한 모집단 내에서 기능적으로 서로 다른 종의 수를 측정하는 기능적 다양성 (functional diversity, 예: 다른 먹이 공급 메커니즘, 다른 운동성, 포식자 대 먹이 등)

<Source: Biodiversity: Concepts, Patterns, and Measurement by Robert K. Colwell>

α, β, and γ diversity	• The species diversity (or richness) of a local community or habitat (α), the difference in diversity associated with differences in habitat or spatial scale (β), and the total diversity of a region or other spatial unit (γ) • 한 환경에 존재하는 종 다양성 (또는 풍부함) (α), 환경 차이 또는 공간적 규모와 연관성이 있는 다양성의 차이(β), 한 환경 혹은 다른 환경들의 총 다양성(γ)
Biodiversity	• The variety of life, at all levels of organization, classified both by evolutionary (phylogenetic) and ecological

	(functional) criteria • 진화적 (계통유전학적) 및 생태학적(기능적) 기준에 따라 분류되는, 모든 계통 수준에서의 다양성
Diversity index	• A mathematical expression that combines species richness and evenness as a measure of diversity • 다양성의 척도로 종의 풍부함과 균등성을 포괄하는 수학적 표현
Evenness	• A measure of the homogeneity of abundances in a sample or a community • 시료 또는 커뮤니티의 (종) 빈도 균질성 지표
Functional diversity	• The variety and number of species that fulfill different functional roles in a community or ecosystem • 커뮤니티나 생태계에서 다양한 (다른) 기능적 역할을 수행할 수 있는 종의 종류 및 개수
Rarefaction curve	• The statistical expectation of the number of species in a survey or collection as a function of the accumulated number of individuals or samples, based on resampling from an observed sample set • 관측된 표본집합에서, 재샘플링을 기초로 하여, 누적된 개체수 또는 표본수 대비 (x축), 조사 또는 수집된 종수에 대한 함수로써(y축), 통계적 예측 곡선
Relative abundance	• The quantitative pattern of rarity and commonness among species in a sample or a community • 표본 또는 공동체에서 종별 희귀성/보편성 등을 나타낼 수 있는 양적 패턴
Richness estimator	• A statistical estimate of the true species richness of a community or larger sampling universe, including unobserved species, based on sample data • 시료 데이터에 근거하여 미관측종을 포함하여 더 큰 시료채취 상황 혹은 실제 시료에서의 실제 종 풍부함을 나타내는 통계적 추정
Species accumulation curve	• The observed number of species in a survey or collection as a function of the accumulated number of individuals or samples • 개체 또는 시료의 누적 개수에 따른 조사 또는 수집에서 관찰된 종의 수의 관계를 나타내는 함수
Species-area relation	• The generally decelerating but ever-increasing number of species as sampling area increases • 샘플링 면적이 증가함에 따라 관찰되는 종의 수. 일반적으로 감속하지만, 지속적으로 증가하는 관계를 보이는 경우도 있다.
Species richness	• The number of species in a community, in a landscape or marinescape, or in a region • 한 커뮤니티 안에 존재하는 종의 수

❖ Biodiversity analysis - Alpha diversity analysis

- 샘플 내 미생물 군집의 다양성을 분석하기 위하여 alpha diversity analysis를 실시하였음

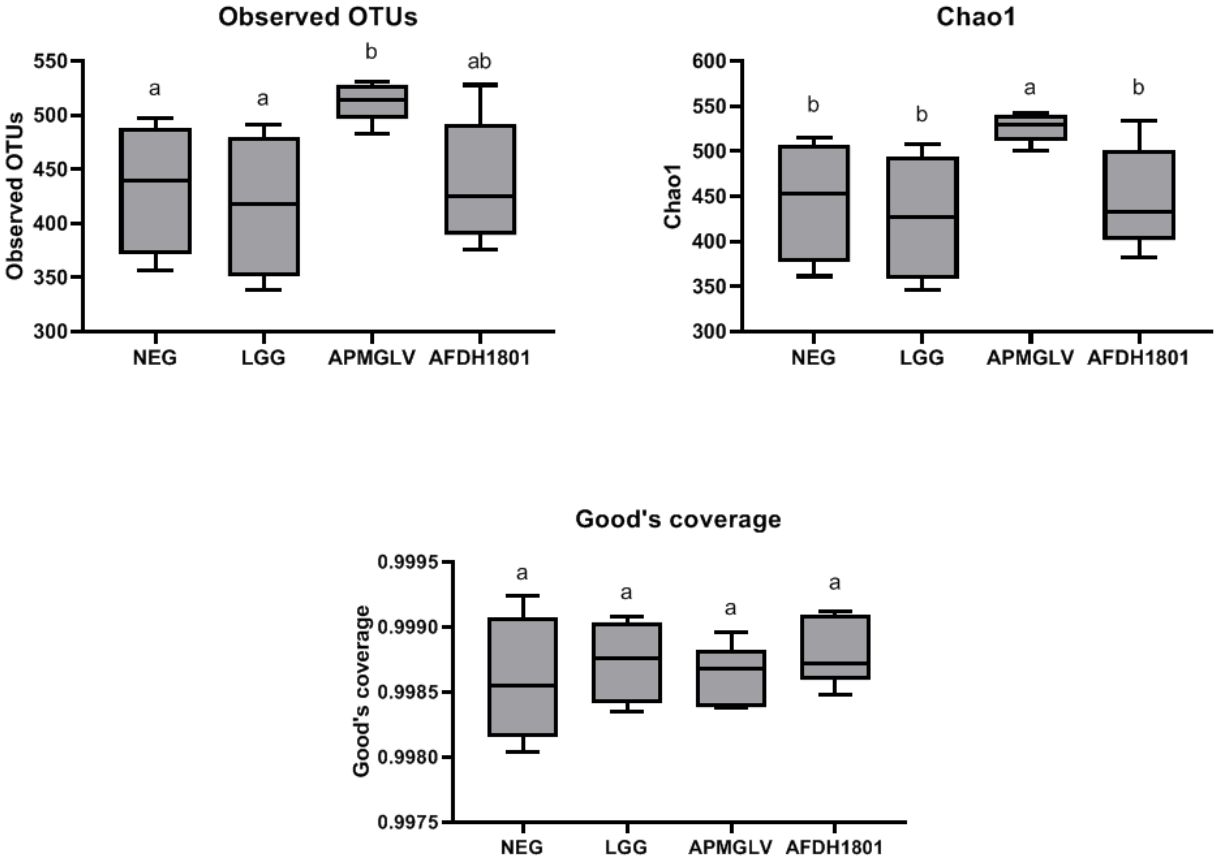
< Alpha diversity metrics>

- Alpha diversity란 샘플 혹은 커뮤니티 내 종의 빈도와 다양성을 나타내며, Rarefaction curve, Chao1 Index, Simpson index, Shannon Index등을 통해 미생물종 다양성을 다각적으로 판단할 수 있음
- Alpha diversity에서는 주로 군집 내 Species richness (얼마나 종의 수가 많은지 = 다양한 종이 있는지)와 Species evenness (각 종들이 얼마나 균등한 정도로 존재하는지 - 예, 압도적인 우점종이 있는 경우 even하지 못함)가 중요한 개념으로 사용됨
- 알파 다양성을 나타낼 수 있는 다양한 지표들은 다음과 같음

Matrix	Description
Observed OTUs	Observed OTUs in a sample
Chao1	Abundance-based estimator of species richness
Good's coverage	calculation of the coverage (%) in terms of species richness achieved in an assay, by comparing the number of observed OTUs and the Chao 1 values,
Shannon	Estimator of species richness and species evenness: more weight on species richness $H = -\sum_{i=1}^{s} p_i \ln p_i$
Simpson	Estimator of species richness and species evenness: more weight on species evenness $D = \sum_{i=1}^{s} N(N-1)/n(n-1)$
Simpson_e	Simpson's evenness measure: Diversity that account for the number of organisms and number of species $1/\Sigma\, p_i^2 \times 1/S$

- Alpha diversity anlaysis: Observed OTUs, Chao1, Good’s coverage, Shannon, Simpson, Simpson_e

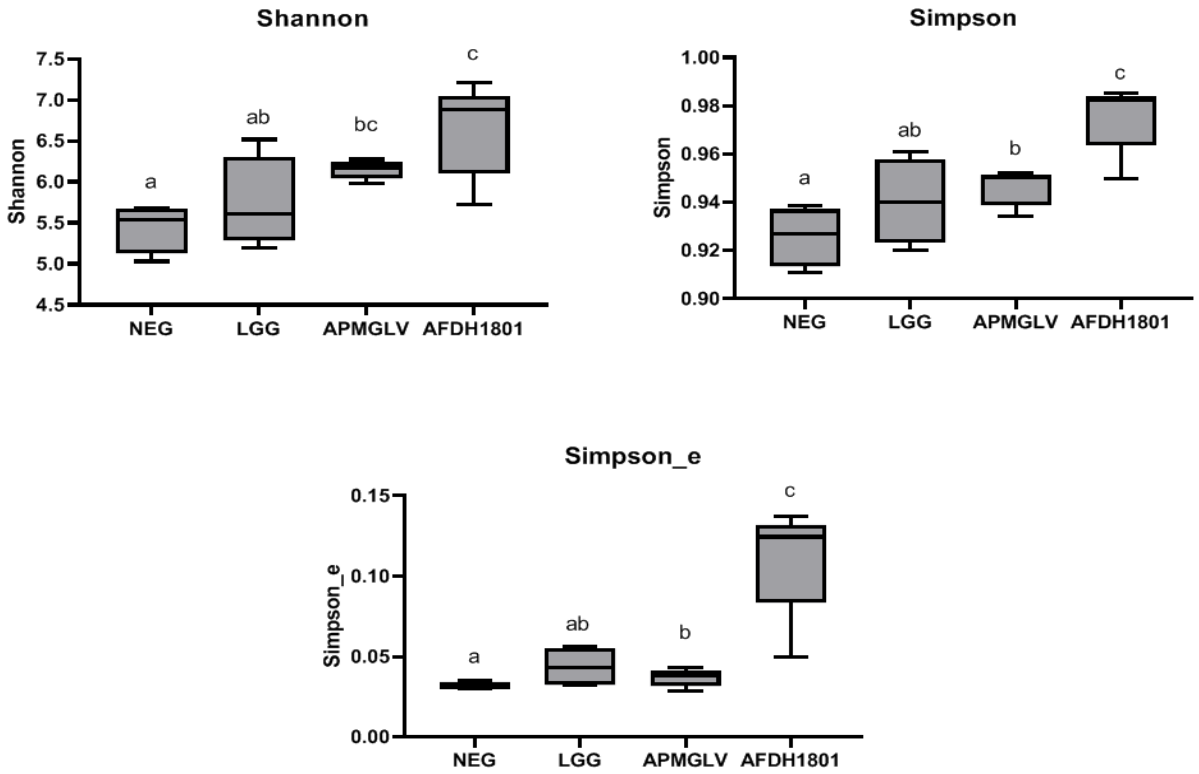
- 먼저, 종의 수를 알아보기 위하여 Observed OTUs, Chao1, Good’s coverage를 분석하였음



Different letters above the box-whisker plot mean a significant difference in Permanova-pairwise analysis, $p < 0.05$

- Observed OTUs와 Chao1를 기반으로 Good’s coverage를 산출하였음
- Observed OTUs 분석에서는 APMLGV 군이 NEG 및 LGG 그룹에 비하여 유의적으로 observed OTU가 증가한 것을 확인할 수 있었음 ($p < 0.05$, Permanova-pairwise analysis)
- Chao1의 경우에도 유사하게 APMGLV군이 나머지 세 군보다 chao1 index가 유의적으로 높음을 확인함 ($p < 0.05$, Permanova-pairwise analysis)
- Good’s coverage의 경우 네 그룹 모두 차이가 없음을 확인하여, metagenomic sampling이 적절하게 이루어졌음을 확인할 수 있었음
- 상기 결과로 미루어 보아, APMLGV 초산균의 섭취는 장내 마이크로바이옴의 종의 수를 증가시켜주는 것을 확인할 수 있었음 (Species diversity 증가)
- AFDH1801의 경우에도 종의 수를 증가시키는 경향이 있으나, 유의적이지는 않은 것으로 나타남

- 다음으로 Species evenness 및 richness를 알아보기 위하여 Shannon, Simpson, Simpson_e index를 분석하였음



Different letters above the box-whisker plot mean a significant difference in Permanova-pairwise analysis, $p < 0.05$

- Shannon analysis의 경우 APMGLV 그룹은 NEG 그룹에 비하여 Shannon index가 유의적으로 증가하였으며, AFDH1801그룹의 경우 NEG그룹 및 LGG그룹에 비하여 Shannon index가 유의적으로 증가하였음 ($p < 0.05$, Permanova-pairwise analysis)
- Shannon index의 경우 species richness에 weighted된 index이므로 두 초산균 섭취군은 NEG 그룹에 비하여 species richness가 증가했음을 알 수 있음.
- 한편, Simpson analysis의 경우에도 Shannon analysis 결과와 유사하게, APMGLV 그룹은 NEG 그룹에 비하여 Simpson index가 유의적으로 증가하였으며, AFDH1801그룹의 경우 NEG그룹, LGG그룹, APMGLV 그룹에 비하여 Simpson index가 유의적으로 증가하였음 ($p < 0.05$, Permanova-pairwise analysis)
- Simpson_e analysis의 경우에도 Simpson analysis와 통계학적으로 유사한 결과가 나타남
- 이로 미루어 보아, AFDH1801 섭취군의 경우 species richness 뿐 아니라 species evenness도 증가함을 확인하였음 (특별한 우점종 없이 여러 종들이 공존하는 환경이 됨 - 다만, 이러한 부분이 숙주의 건강에 긍정적인지 부정적인지는 아직 미지수임). 또한, Taxonomic assignment 분석에서 ID rate으로 추론한 사실이 본 분석에서도 consisent하게 나타남을 확인함
- APMLGV도 유사한 경향이 있으나, 통계적으로 AFDH1801보다는 이러한 경향이 덜함을 알 수 있음.

❖ Beta diversity analysis

- 그룹간 군집의 다양성을 분석하기 위하여 beta diversity analysis를 실시하였음
- Beta diversity analysis에 자주 사용되는 개념은 아래와 같음

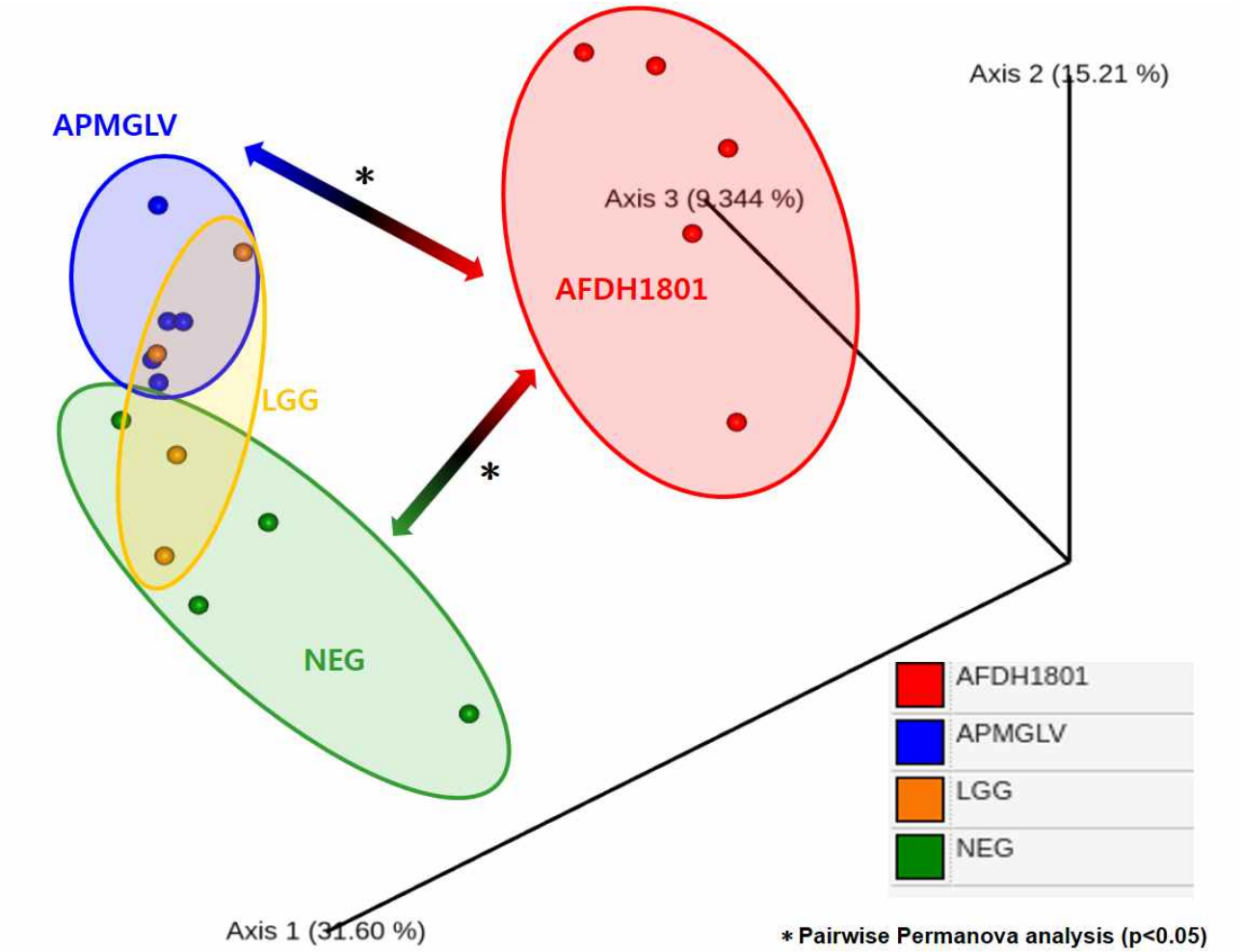
< Beta diversity analysis >

- How different is the microbial composition in one environment compared to another?
- Beta diversity shows the different between microbial communities from different environments. Main focus is on the difference in taxonomic abundance profiles from different samples.

<Features of commonly-used beta diversity analyses,
Source: http://www.metagenomics.wiki/pdf/definition/alpha-beta-diversity>

Analysis	Description
Bray-Curtis dissimilarity	**Bray – Curtis dissimilarity** ■ based on abundance or read count data ■ differences in microbial abundances between two samples (e.g., at species level) ✓ values are from 0 to 1 ✓ 0 means both samples share the same species at exact the same abundances ✓ 1 means both samples have complete different species abundances
UniFrac	**UniFrac** ■ sequence distances (phylogenetic tree) ■ based on the fraction of branch length that is shared between two samples or unique to one or the other sample ✓ unweighted UniFrac: purely based on sequence distances (does not include abundance information) ✓ weighted UniFrac: branch lengths are weighted by relative abundances (includes both sequence and abundance information)
Jaccard index	**Jaccard distance** ■ based on presence or absence of species (does not include abundance information) ■ different in microbial composition between two samples ✓ 0 means both samples share exact the same species ✓ 1 means both samples have no species in common

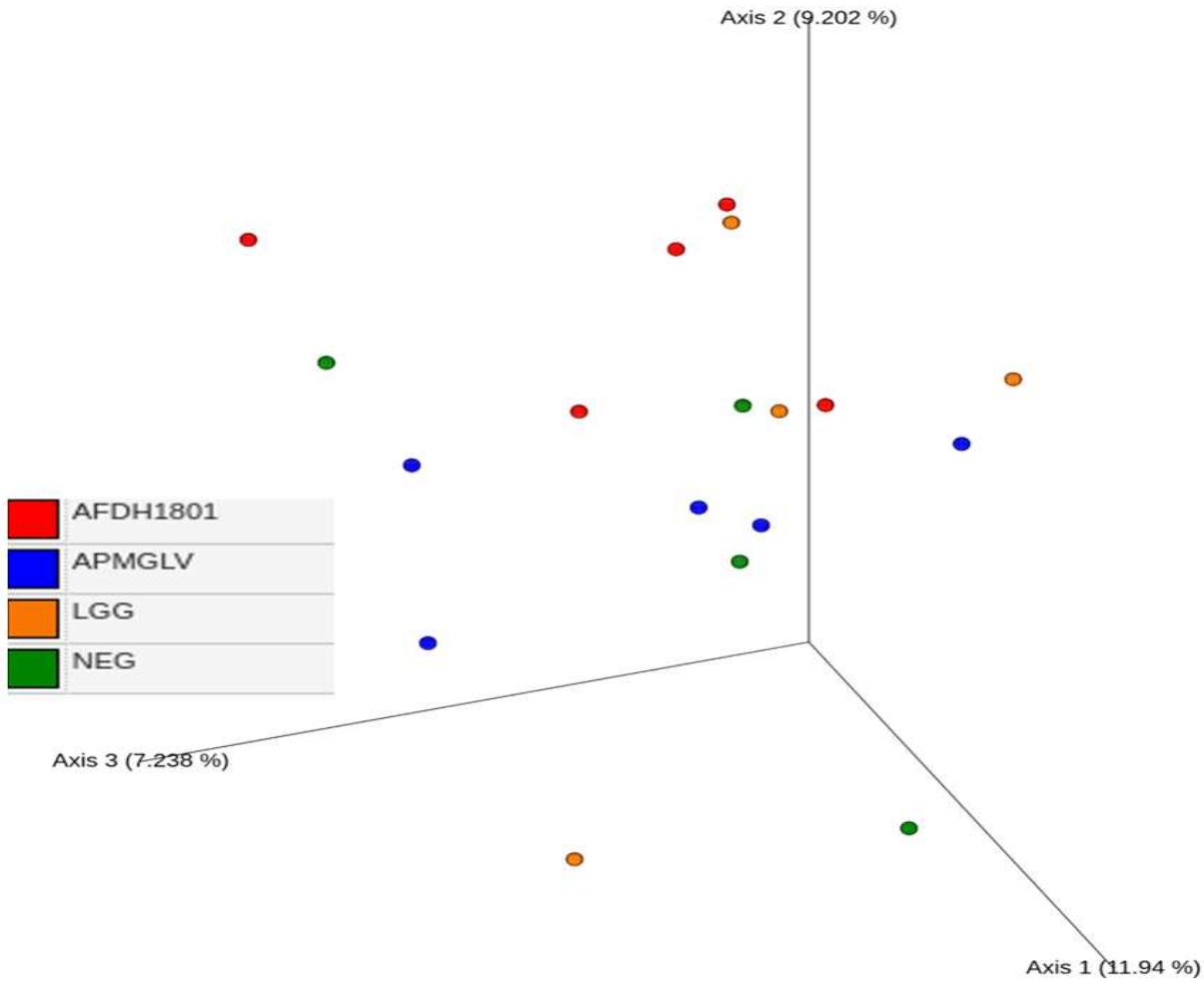
- **Bray-Curtis analysis**를 실시하였음
- Three-dimension principal coordinate analysis (3D-PCoA) plotting
- APMGLV 및 AFDH1801 섭취군 모두 NEG group과 separated clustering 됨을 확인하였음
- AFDH1801 섭취군의 경우 나머지 세 그룹과의 distance가 유의적이었으며, APMGLV - NEG 그룹간의 distance도 유의적임을 확인함 ($p < 0.05$, Permanova-pairwise analysis)



* Permanova-pairwise analysis results

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
AFDH1801	APMGLV	10	999	4.270491	0.009 *	0.018
AFDH1801	LGG	9	999	3.708203	0.009 *	0.018
AFDH1801	NEG	9	999	3.707139	0.007 *	0.018
APMGLV	LGG	9	999	1.327411	0.085	0.102
APMGLV	NEG	9	999	1.653835	0.045 *	0.075
LGG	NEG	8	999	1.208549	0.258	0.258

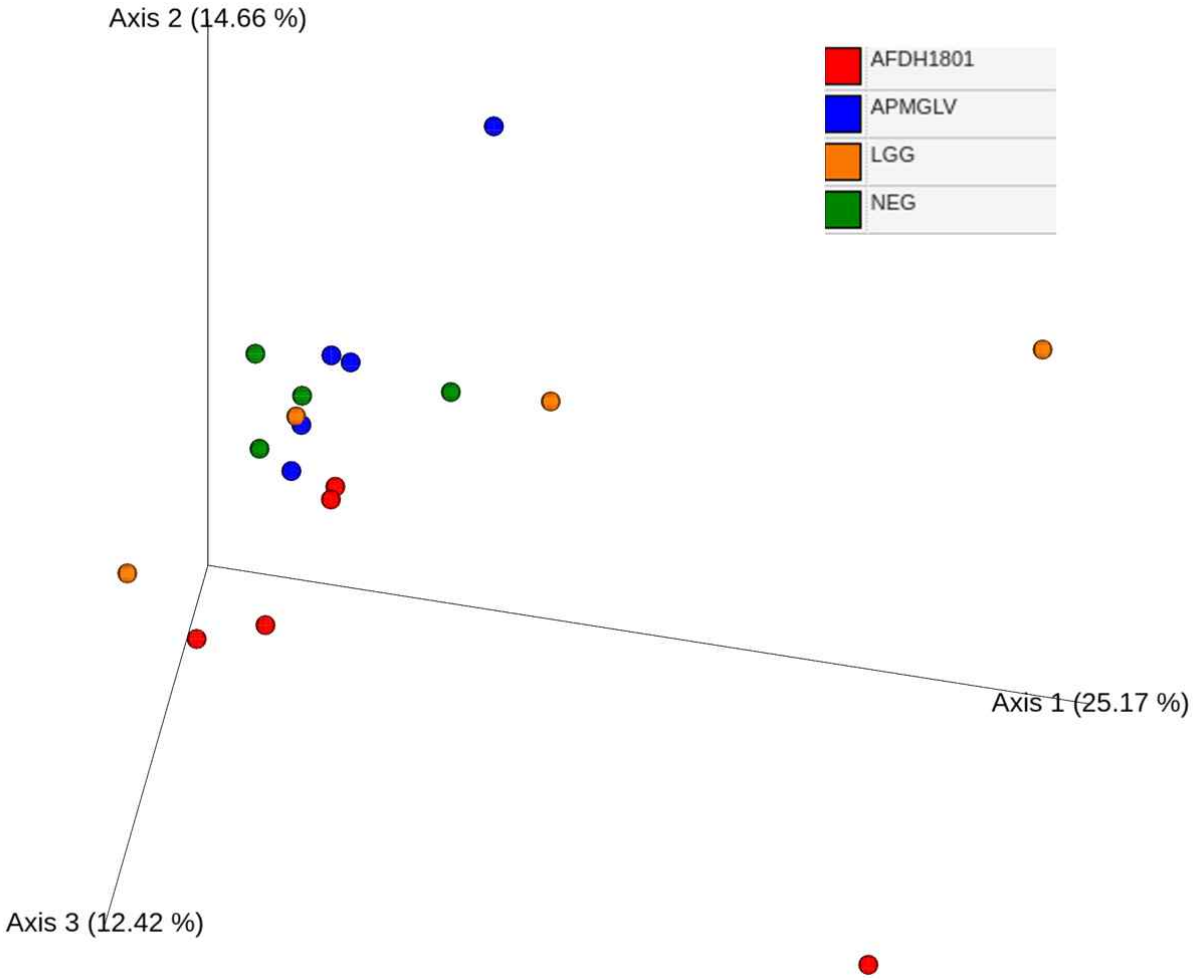
- **Jaccard distance analysis**를 실시하였음
- Three-dimension principal coordinate analysis (3D-PCoA) plotting
- AFDH1801-APMGLV 그룹간 distance가 유의적이었음 (p < 0.05, Permanova-pairwise analysis)
- APMGLV-LGG 그룹간 distance가 유의적이었음 (p < 0.05, Permanova-pairwise analysis)



* Permanova-pairwise analysis results

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
AFDH1801	APMGLV	10	999	1.322151	0.01 *	0.06
AFDH1801	LGG	9	999	1.033942	0.357	0.4284
AFDH1801	NEG	9	999	1.125802	0.201	0.3015
APMGLV	LGG	9	999	1.201978	0.029 *	0.087
APMGLV	NEG	9	999	1.121436	0.118	0.236
LGG	NEG	8	999	0.943533	0.655	0.655

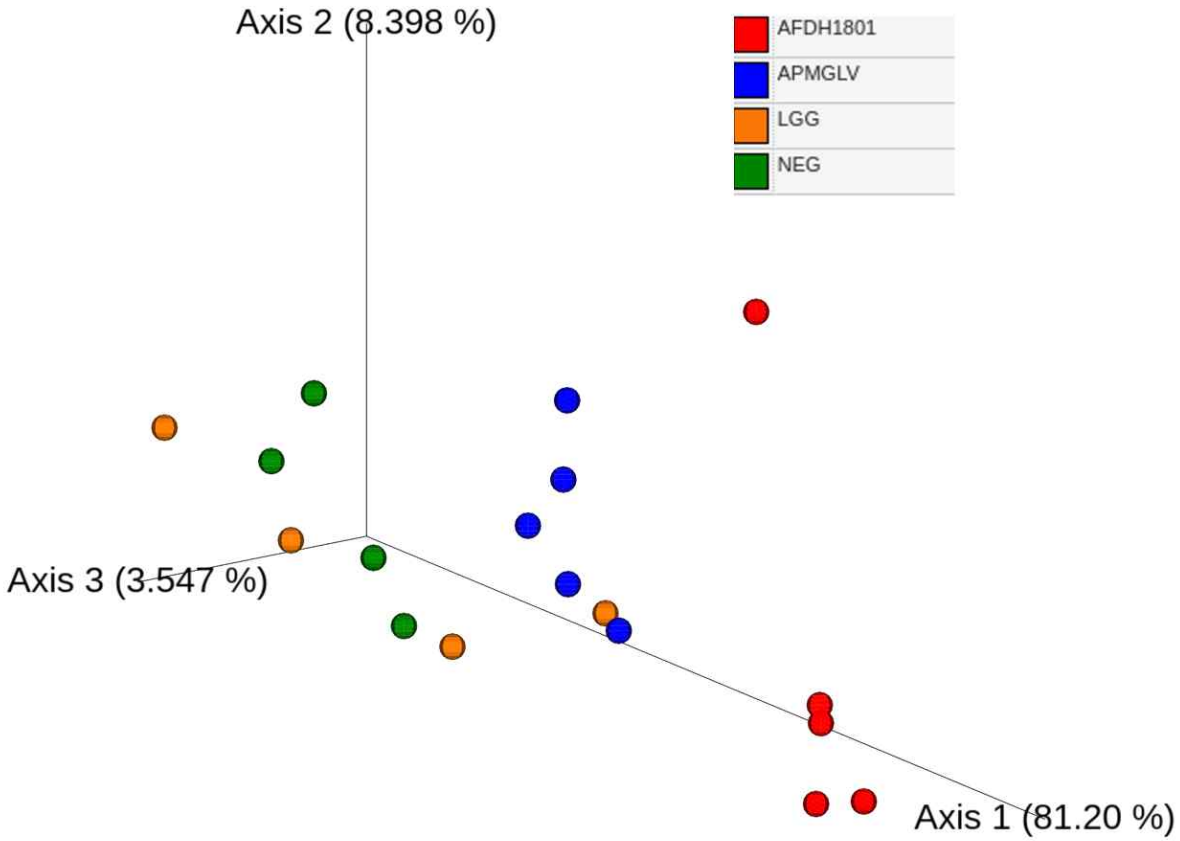
- **Unweighted-Unifrac analysis**를 실시하였음
- Three-dimension principal coordinate analysis (3D-PCoA) plotting
- AFDH1801-APMGLV 그룹간 distance가 유의적임을 확인함 ($p < 0.05$, Permanova-pairwise analysis)



* Permanova-pairwise analysis results

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
AFDH1801	APMGLV	10	999	1.529473	0.021 *	0.126
AFDH1801	LGG	9	999	1.067481	0.405	0.486
AFDH1801	NEG	9	999	1.359756	0.05	0.15
APMGLV	LGG	9	999	1.154715	0.283	0.486
APMGLV	NEG	9	999	1.00372	0.545	0.545
LGG	NEG	8	999	0.961254	0.403	0.486

- **Weighted-Unifrac analysis**를 실시하였음
- Three-dimension principal coordinate analysis (3D-PCoA) plotting
- AFDH1801-APMGLV 그룹간 distance가 유의적이었음 (p < 0.05, Permanova-pairwise analysis)
- APMGLV-LGG 그룹간 distance가 유의적이었음 (p < 0.05, Permanova-pairwise analysis)



* Permanova-pairwise analysis results

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
AFDH1801	APMGLV	10	999	26.28758	0.011 *	0.0255
AFDH1801	LGG	9	999	21.35372	0.017 *	0.0255
AFDH1801	NEG	9	999	34.23781	0.01 *	0.0255
APMGLV	LGG	9	999	2.497948	0.111	0.1332
APMGLV	NEG	9	999	6.90171	0.013 *	0.0255
LGG	NEG	8	999	0.51232	0.67	0.67

❖ Taxonomic biomarker 탐색

- Taxanomic assignment 정보를 바탕으로 실험군별 microbiome biomarker를 확인함
- Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis

<Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis, Source: Segata et al. Genome Biology 2011, 12:R60>

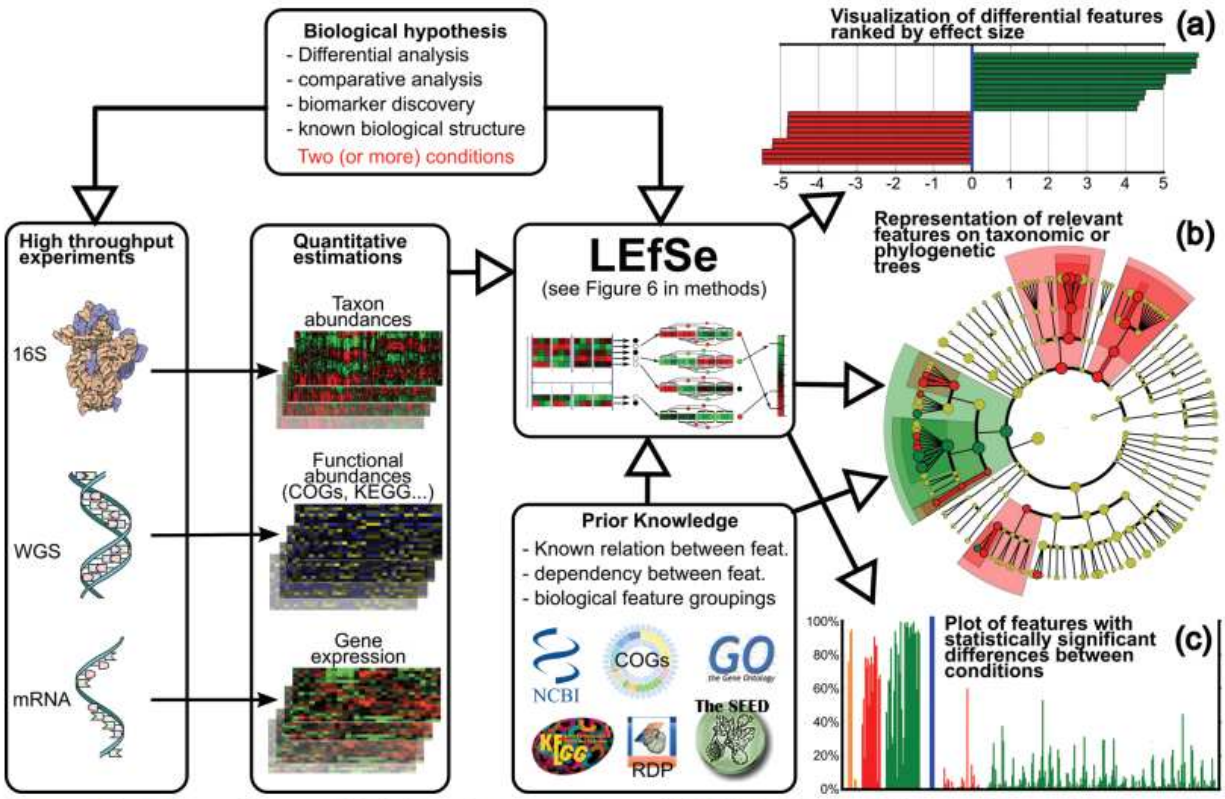
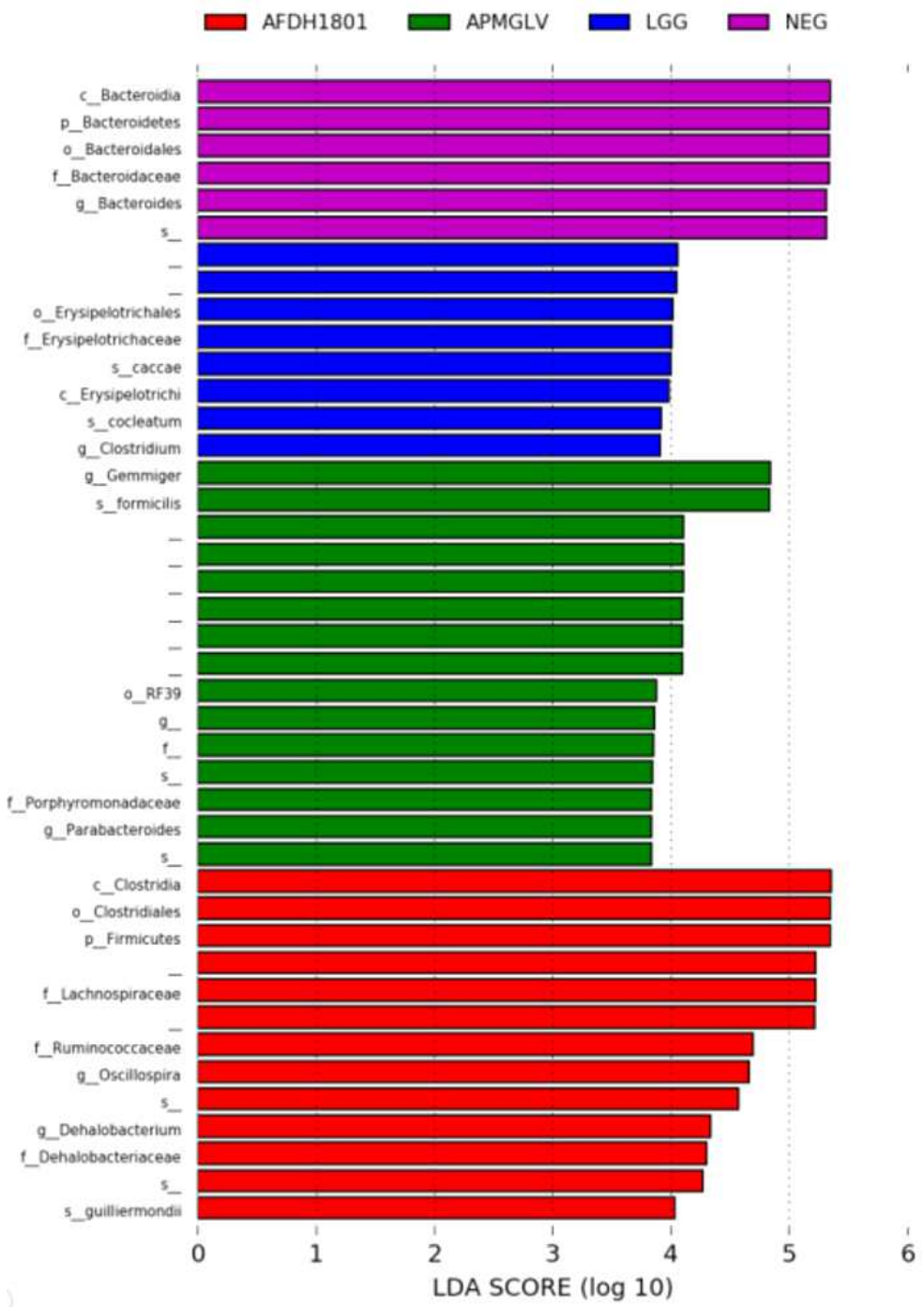
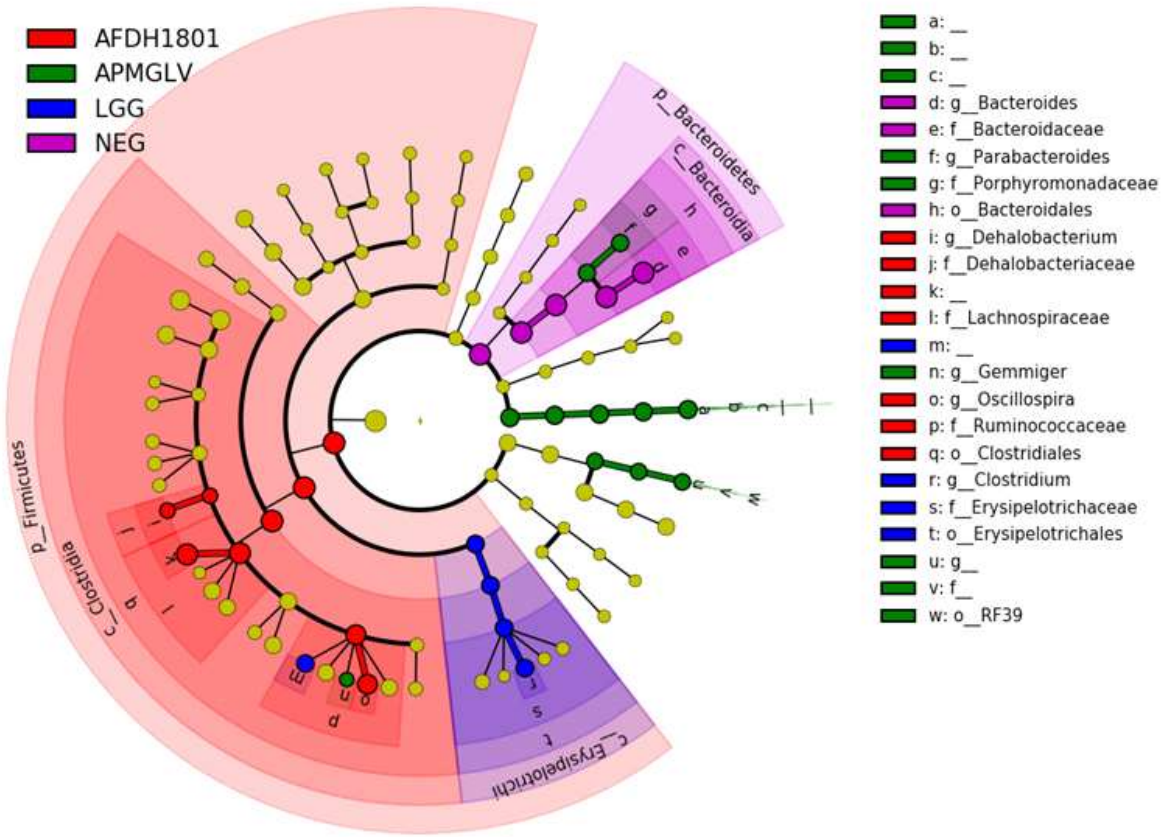


Figure 1 LEfSe mines a wide range of high-throughput genetic data to find biologically relevant features characterizing one or more experimental conditions. The inputs to the system are the specifications of the biological hypothesis under investigation (conditions and inter-condition sample groupings), the high-dimensional data obtained experimentally, and, optionally, prior knowledge from literature or databases used to define known relationships between features (used for meaningful hierarchical organization of the discovered biomarkers) or samples (used for testing biological consistency of potential biomarkers). LEfSe is a three-step algorithm (detailed in Figure 6). **(a)** LEfSe first provides the list of features that are differential among conditions of interest with statistical and biological significance, ranking them according to the effect size. **(b)** For problems with known hierarchical structure, either phylogenetic or functional, we then provide a mapping of the differences to taxonomic or functional trees. **(c)** Finally, the system produces a histogram visualizing the raw data within the specified problem structure for each relevant feature. While LEfSe has been developed primarily for metagenomic data containing taxon or gene abundances, it can be used for biomarker discovery in any setting where prior biological knowledge regarding the structure of a comparison is coupled with statistically significant differences in high-dimensional genomic features. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; WGS, whole genome shotgun.

- APMGLV 실험군의 경우 order RF39, species Gemmiger formicilis가 특징적인 taxa인 것으로 확인되었음
- AFDH1801 실험군의 경우 phylum Firmicutes, class Clostridia, order Clostridiales, family Lachnospiraceae, family Ruminococcaceae, family Dehalobacteriaceae, genus Oscillospira, genus Dehalobacterium, species Candida guilliermondii 등이 특징적인 taxa인 것으로 확인되었음

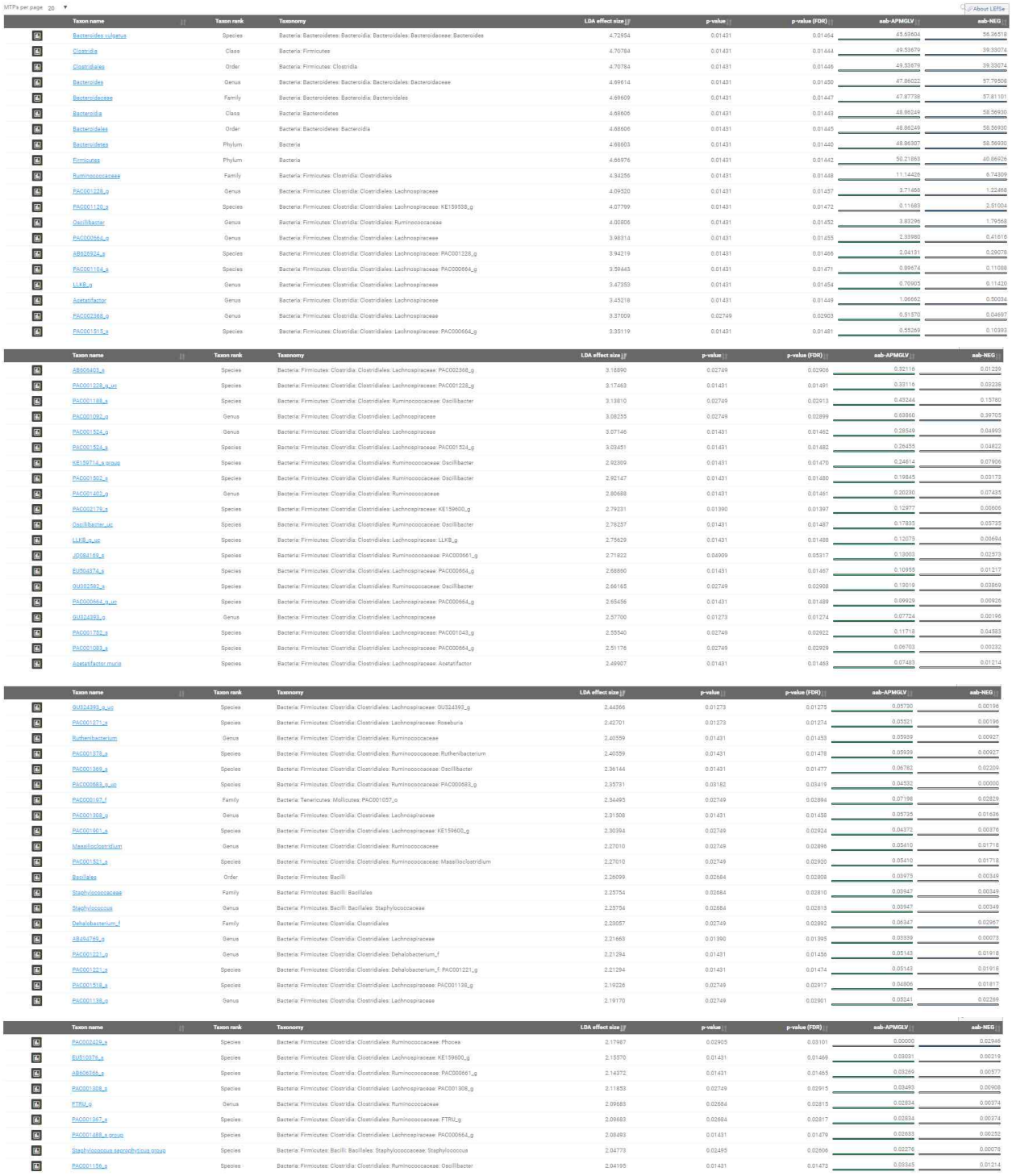


- Hierarchical classification 측면을 고려하기 위하여 LEfSe 분석 결과를 cladogram으로도 구현해 보았으며, 그 결과는 아래와 같음



- 한편, 그룹별로 NEG그룹과의 1:1 분석을 통해 taxonomic biomarker 탐색을 실시하였음
- 본 분석은 EZBioCloud - Comparative MTP analyzer를 활용하여 이루어졌음 (https://www.ezbiocloud.net/apps)

<NEG vs APMGLV (EZBioCloud > Comparative MTP > Taxonomic Biomarker > LEfSe analysis)>



Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-APMGLV	aab-NEG
Bacteroides vulgatus	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	4.72954	0.01431	0.01464	45.63604	56.36518
Clostridia	Class	Bacteria: Firmicutes	4.70784	0.01431	0.01444	49.53679	39.33074
Clostridiales	Order	Bacteria: Firmicutes: Clostridia	4.70784	0.01431	0.01446	49.53679	39.33074
Bacteroides	Genus	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae	4.69614	0.01431	0.01450	47.86022	57.79508
Bacteroidaceae	Family	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales	4.69609	0.01431	0.01447	47.87738	57.81101
Bacteroidia	Class	Bacteria: Bacteroidetes	4.68606	0.01431	0.01443	48.86249	58.56930
Bacteroidales	Order	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia	4.68606	0.01431	0.01445	48.86249	58.56930
Bacteroidetes	Phylum	Bacteria	4.68603	0.01431	0.01440	48.86307	58.56930
Firmicutes	Phylum	Bacteria	4.66976	0.01431	0.01442	50.21863	40.86926
Ruminococcaceae	Family	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales	4.34256	0.01431	0.01448	11.14426	6.74309
PAC001228_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	4.09520	0.01431	0.01457	3.71466	1.22468
PAC001120_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159538_g	4.07799	0.01431	0.01472	0.11683	2.51004
Oscillibacter	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	4.00806	0.01431	0.01452	3.83296	1.79568
PAC000664_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.98314	0.01431	0.01455	2.33980	0.41616
AB626924_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001228_g	3.94219	0.01431	0.01466	2.04191	0.29078
PAC001104_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	3.59443	0.01431	0.01471	0.09674	0.11088
LLKB_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.47353	0.01431	0.01454	0.70905	0.11420
Acetatifactor	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.45218	0.01431	0.01449	1.06662	0.50094
PAC002368_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.37009	0.02749	0.02903	0.51570	0.04697
PAC001515_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	3.35119	0.01431	0.01481	0.55269	0.10393

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-APMGLV	aab-NEG
AB606403_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC002368_g	3.18890	0.02749	0.02906	0.32116	0.01239
PAC001228_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001228_g	3.17463	0.01431	0.01491	0.33116	0.03238
PAC001188_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.13810	0.02749	0.02913	0.43244	0.15780
PAC001092_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.08255	0.02749	0.02899	0.63860	0.39705
PAC001524_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.07146	0.01431	0.01462	0.28549	0.04993
PAC001524_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001524_g	3.03451	0.01431	0.01482	0.26455	0.04802
KE159714_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.92309	0.01431	0.01470	0.24614	0.07906
PAC001502_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.92147	0.01431	0.01480	0.19845	0.03173
PAC001402_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.80688	0.01431	0.01461	0.20230	0.07495
PAC002179_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159600_g	2.79231	0.01390	0.01397	0.12977	0.00606
Oscillibacter_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.78257	0.01431	0.01487	0.17835	0.05735
LLKB_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: LLKB_g	2.75629	0.01431	0.01488	0.12075	0.00694
JQ084169_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: PAC000661_g	2.71822	0.04909	0.05317	0.13003	0.02573
EU804374_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.68860	0.01431	0.01467	0.10955	0.01217
GU902582_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.66165	0.02749	0.02908	0.13019	0.03859
PAC000664_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.65456	0.01431	0.01489	0.09929	0.00926
GU924393_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.57700	0.01273	0.01274	0.07724	0.00196
PAC001782_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001043_g	2.55540	0.02749	0.02922	0.11718	0.04383
PAC001083_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.51176	0.02749	0.02929	0.06703	0.00232
Acetatifactor muris	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	2.49907	0.01431	0.01469	0.07483	0.01214

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-APMGLV	aab-NEG
GU924393_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: GU924393_g	2.44366	0.01273	0.01275	0.05730	0.00196
PAC001271_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Roseburia	2.42701	0.01273	0.01274	0.05521	0.00196
Ruthenibacterium	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.40559	0.01431	0.01453	0.05939	0.00927
PAC001378_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Ruthenibacterium	2.40559	0.01431	0.01478	0.05939	0.00927
PAC001369_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.36144	0.01431	0.01477	0.06782	0.02209
PAC000683_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: PAC000683_g	2.35731	0.03182	0.03419	0.04592	0.00000
PAC000197_f	Family	Bacteria: Tenericutes: Mollicutes: PAC001057_o	2.34495	0.02749	0.02894	0.07198	0.02829
PAC001308_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.31508	0.01431	0.01458	0.05735	0.01626
PAC001901_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159600_g	2.30394	0.02749	0.02924	0.04372	0.00376
Massilioclostridium	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.27010	0.02749	0.02896	0.05410	0.01718
PAC001521_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Massilioclostridium	2.27010	0.02749	0.02920	0.05410	0.01718
Bacillales	Order	Bacteria: Firmicutes: Bacilli	2.26099	0.02684	0.02808	0.03975	0.00349
Staphylococcaceae	Family	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Bacillales	2.25754	0.02684	0.02810	0.03947	0.00349
Staphylococcus	Genus	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Bacillales: Staphylococcaceae	2.25754	0.02684	0.02813	0.03947	0.00349
Dehalobacterium_f	Family	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales	2.23057	0.02749	0.02892	0.06347	0.02967
AB494769_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.21663	0.01390	0.01395	0.03939	0.00073
PAC001221_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Dehalobacterium_f: PAC001221_g	2.21294	0.01431	0.01456	0.05143	0.01918
PAC001221_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Dehalobacterium_f: PAC001221_g	2.21294	0.01431	0.01474	0.05143	0.01918
PAC001518_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001138_g	2.19226	0.02749	0.02917	0.04806	0.01817
PAC001138_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.19170	0.02749	0.02901	0.05241	0.02269

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-APMGLV	aab-NEG
PAC002429_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Phocea	2.17987	0.02905	0.03101	0.00000	0.02946
EU610975_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159600_g	2.15570	0.01431	0.01469	0.03031	0.00219
AB606366_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: PAC000661_g	2.14372	0.01431	0.01465	0.03269	0.00577
PAC001308_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001308_g	2.11853	0.02749	0.02915	0.03493	0.00908
FTRU_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.09683	0.02684	0.02815	0.02834	0.00374
PAC001367_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: FTRU_g	2.09683	0.02684	0.02817	0.02834	0.00374
PAC001488_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.08493	0.01431	0.01479	0.02683	0.00252
Staphylococcus saprophyticus group	Species	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Bacillales: Staphylococcaceae: Staphylococcus	2.04773	0.02495	0.02606	0.02276	0.00078
PAC001156_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.04195	0.01431	0.01473	0.03345	0.01214

<NEG vs AFDH1801 (EZBioCloud > Comparative MTP > Taxonomic Biomarker > LEfSe analysis)>

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
Clostridia	Class	Bacteria: Firmicutes	5.35095	0.01431	0.01462	39.33074	84.20287
Clostridiales	Order	Bacteria: Firmicutes: Clostridia	5.35095	0.01431	0.01466	39.33074	84.20287
Bacteroidetes	Phylum	Bacteria	5.34836	0.01431	0.01459	58.56930	13.96420
Bacteroidia	Class	Bacteria: Bacteroidetes	5.34836	0.01431	0.01461	58.56930	13.96390
Bacteroidales	Order	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia	5.34836	0.01431	0.01464	58.56930	13.96390
Firmicutes	Phylum	Bacteria	5.34376	0.01431	0.01460	40.86926	85.00508
Bacteroidaceae	Family	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales	5.34106	0.01431	0.01468	57.81101	13.94870
Bacteroides	Genus	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae	5.34092	0.01431	0.01476	57.79508	13.94753
Bacteroides vulgatus	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	5.32816	0.01431	0.01509	56.36518	13.78702
Lachnospiraceae	Family	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales	5.27875	0.01431	0.01470	21.60712	59.60699
Ruminococcaceae	Family	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales	4.71094	0.01431	0.01472	6.74309	17.02246
Oscillibacter	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	4.59432	0.01431	0.01480	1.79368	9.65419
PAC001228_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	4.36759	0.01431	0.01500	1.22468	5.68693
PAC002027_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001228_g	4.28604	0.01431	0.01561	0.85296	4.71700
Pseudoflavonifractor	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	4.08550	0.01431	0.01483	1.92030	4.35523
PAC000664_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	4.07253	0.01431	0.01492	0.41616	2.77947
PAC001141_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Christensenellaceae	3.90255	0.01431	0.01495	2.17860	0.58085
PAC001501_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.86014	0.01431	0.01542	0.21945	1.66855
PAC001166_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.83278	0.01431	0.01529	0.26446	1.62308
Acetatifactor	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.82742	0.01431	0.01473	0.50034	1.84427

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
PAC001188_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.72339	0.01431	0.01530	0.15780	1.21539
KE159628_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.69797	0.01431	0.01488	0.50392	1.50142
PAC001092_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.66509	0.01431	0.01494	0.39705	1.32179
KE159628_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159628_g	3.64621	0.01431	0.01523	0.47507	1.36046
LLKB_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.62938	0.01431	0.01491	0.11420	0.96593
PAC000692_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.62366	0.01431	0.01493	0.25929	1.09302
PAC001372_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.61062	0.01431	0.01502	0.15849	0.97420
PAC001141_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Christensenellaceae: PAC001141_g	3.59859	0.02749	0.03098	1.02895	0.23555
PAC001372_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001372_g	3.58721	0.01431	0.01535	0.15254	0.92544
PAC001104_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	3.58038	0.01431	0.01527	0.11088	0.87171
PAC001165_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.57460	0.01431	0.01496	0.10150	0.85227
Porphyromonadaceae	Family	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales	3.57077	0.01431	0.01471	0.75829	0.01434
Parabacteroides	Genus	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Porphyromonadaceae	3.57077	0.01431	0.01481	0.75829	0.01434
Parabacteroides goldsteinii	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Porphyromonadaceae: Parabacteroides	3.57002	0.01431	0.01512	0.75673	0.01406
Clostridium_g24	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.44622	0.01431	0.01465	0.17643	0.73700
KI535319_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Pseudoflavonifractor	3.44022	0.01431	0.01526	0.20696	0.75787
Erysipelotrichi	Class	Bacteria: Firmicutes	3.39850	0.01431	0.01463	0.60184	0.10162
Erysipelotrichales	Order	Bacteria: Firmicutes: Erysipelotrichi	3.39850	0.01431	0.01467	0.60184	0.10162
Erysipelotrichaceae	Family	Bacteria: Firmicutes: Erysipelotrichi: Erysipelotrichales	3.39850	0.01431	0.01469	0.60184	0.10162
Oscillibacter_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.38306	0.01431	0.01573	0.05735	0.54027

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
Anaerotruncus	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	3.33997	0.01431	0.01475	0.27316	0.71033
Bacteroides caccae	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	3.32554	0.01431	0.01508	0.48362	0.06123
Bacteroides_uc	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	3.31498	0.01431	0.01571	0.47919	0.06716
KE159677_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Anaerotruncus	3.31118	0.01431	0.01524	0.25766	0.66675
Marvinbryantia	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	3.30437	0.01431	0.01479	0.46965	0.06708
Clostridium_g6	Genus	Bacteria: Firmicutes: Erysipelotrichi: Erysipelotrichales: Erysipelotrichaceae	3.30300	0.01390	0.01408	0.45408	0.05273
Clostridium coccleatum	Species	Bacteria: Firmicutes: Erysipelotrichi: Erysipelotrichales: Erysipelotrichaceae: Clostridium_g6	3.30300	0.01390	0.01410	0.45408	0.05279
PAC001753_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Marvinbryantia	3.28966	0.01431	0.01556	0.45390	0.06475
PAC001228_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001228_g	3.26009	0.01431	0.01586	0.03238	0.39610
KE159538_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159538_g	3.24337	0.02749	0.03124	0.28871	0.61867
Flintibacter butyricus group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Pseudoflavonifractor	3.23028	0.02749	0.03082	0.18064	0.51952
PAC001502_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.21669	0.01431	0.01543	0.03173	0.36092
PAC000692_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000692_g	3.20800	0.01431	0.01590	0.04651	0.36918
PAC001706_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.17204	0.01431	0.01552	0.20394	0.50087
PAC002004_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	3.16858	0.01431	0.01560	0.00172	0.29655
PAC001749_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	3.14485	0.01431	0.01553	0.00949	0.28842
PAC001526_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.14427	0.01431	0.01546	0.00160	0.36014
LLKB_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: LLKB_g	3.14021	0.01431	0.01578	0.00694	0.28295
DQ805799_s	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	3.06460	0.01431	0.01515	0.24978	0.01887
PAC002393_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	3.05817	0.01431	0.01564	0.00990	0.23886

Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
PAC001369_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	3.04481	0.01431	0.01534	0.02309	0.24354
PAC001165_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001165_g	3.01700	0.01431	0.01584	0.05019	0.25797
DQ799557_s	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	2.99380	0.01431	0.01514	0.20455	0.00893
PAC001552_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001043_g	2.97148	0.02749	0.03108	0.02209	0.20915
EU511112_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159600_g	2.95829	0.01431	0.01519	0.05459	0.23587
PAC001752_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001043_g	2.95515	0.01431	0.01555	0.04983	0.22992
PAC001524_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.94144	0.01431	0.01505	0.04993	0.22491
EU504974_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.92879	0.02749	0.03090	0.01217	0.18171
PAC001524_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001524_g	2.91871	0.01431	0.01545	0.04822	0.21370
AB490649_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	2.91601	0.02749	0.03087	0.01810	0.18269
Acetatifactor_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	2.90285	0.02749	0.03121	0.03601	0.19566
PAC000664_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.90274	0.01431	0.01579	0.00926	0.16883
Frisingicoccus	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.87666	0.01431	0.01478	0.06274	0.21278
Clostridium_g24	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.86985	0.01431	0.01486	0.00976	0.15761
PAC001550_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Pseudoflavonifractor	2.86697	0.01431	0.01547	0.06170	0.20843
PAC001456_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.85931	0.02749	0.03080	0.06184	0.20589
PAC001462_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.85308	0.01431	0.01504	0.07435	0.21656
PAC002042_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.84692	0.01431	0.01506	0.04784	0.18799
PAC002485_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.84468	0.01431	0.01570	0.02493	0.16387
PAC001383_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: LLKB_g	2.83258	0.02749	0.03103	0.00415	0.13978

(NEG vs AFDH1801 계속)

	Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
	PAC002042_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC002042_g	2.81299	0.01431	0.01562	0.04330	0.17462
	PAC001574_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Pseudoflavonifractor	2.78368	0.02749	0.03111	0.05070	0.17163
	PAC001719_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001092_g	2.77579	0.02749	0.03116	0.04848	0.16747
	EU771812_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.74845	0.02684	0.02990	0.01102	0.12248
	PAC001561_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: PAC001402_g	2.73351	0.01431	0.01548	0.03540	0.14303
	PAC002469_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: LLKB_g	2.70526	0.01431	0.01569	0.01579	0.11605
	PAC002456_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.70502	0.01431	0.01507	0.03121	0.13179
	PAC002454_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC002454_g	2.69544	0.01431	0.01566	0.03121	0.12956
	EF069362_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159600_g	2.68221	0.01431	0.01517	0.02808	0.12357
	Clostridium_g34_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Clostridium_g34	2.68042	0.01431	0.01575	0.00376	0.09927
	Eubacterium_g6	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.67992	0.01431	0.01487	0.02377	0.11909
	Clostridium_g24_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Clostridium_g24	2.67187	0.01431	0.01574	0.01259	0.10619
	PAC001457_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001457_g	2.66170	0.02905	0.03316	0.00146	0.00000
	GU932582_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.65645	0.02749	0.03095	0.03869	0.12885
	PAC002372_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.64047	0.01431	0.01565	0.03668	0.12371
	EF603776_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Christensenellaceae: PAC001141_g	2.63275	0.01431	0.01518	0.08648	0.00465
	PAC001668_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001092_g	2.63272	0.01431	0.01551	0.01514	0.10071
	PAC002487_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Clostridium_g24	2.61808	0.01431	0.01567	0.03819	0.12066
	PAC001271_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Roseburia	2.59335	0.02495	0.02772	0.00196	0.08007
	PAC001801_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	2.58930	0.01431	0.01559	0.01755	0.09488

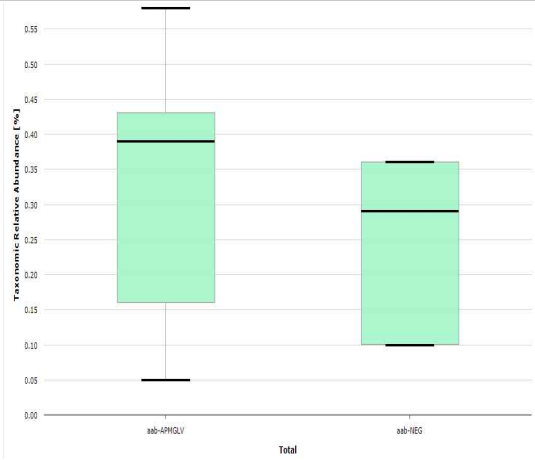
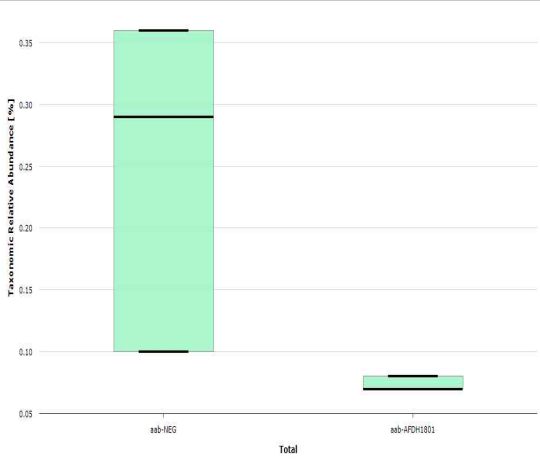
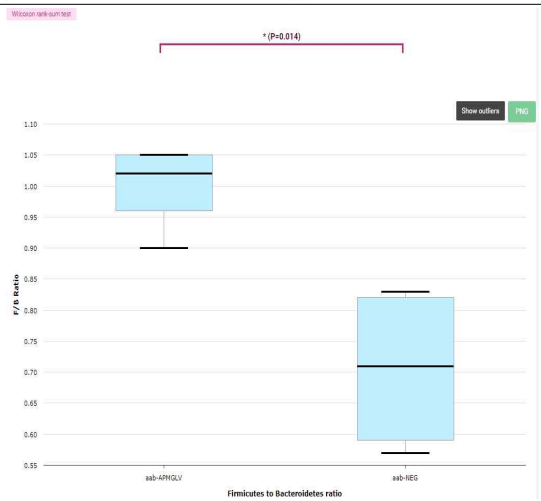
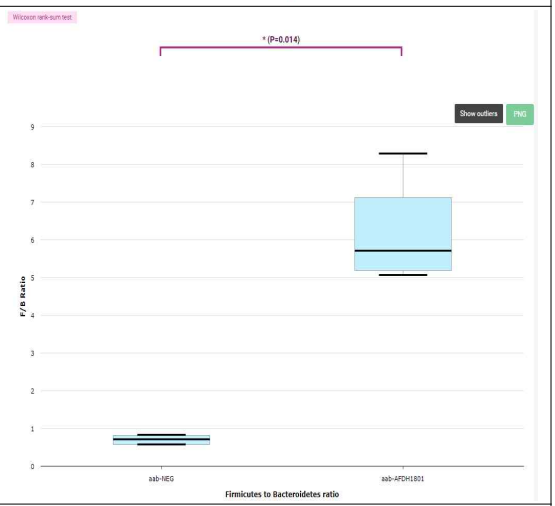
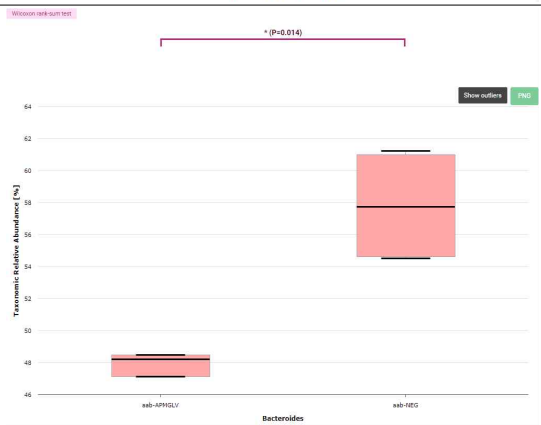
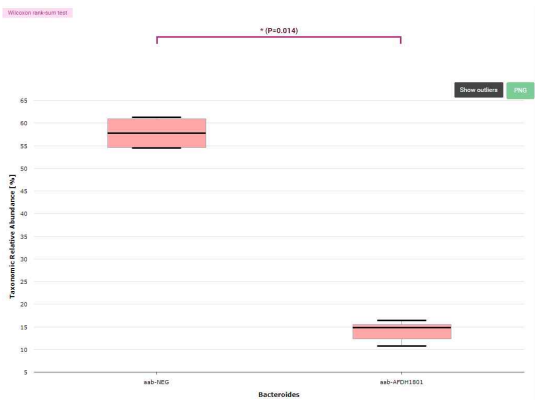
	Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
	PAC000671_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000671_g	2.58163	0.02749	0.03127	0.01798	0.09354
	EU456461_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.55806	0.04909	0.05720	0.00574	0.07783
	PAC001308_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.55045	0.01431	0.01501	0.01636	0.08710
	PAC001488_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.53337	0.01431	0.01540	0.00252	0.07057
	Dehalobacterium_f	Family	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales	2.48604	0.02749	0.03067	0.02967	0.09069
	PAC001221_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Dehalobacterium_f	2.46539	0.01431	0.01499	0.01918	0.07736
	PAC001221_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Dehalobacterium_f: PAC001221_g	2.46539	0.01431	0.01551	0.01918	0.07736
	PAC001047_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: LLKB_g	2.44032	0.01390	0.01411	0.00146	0.05550
	KE159810_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.43602	0.01431	0.01490	0.00793	0.06139
	PAC001204_s	Species	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	2.42925	0.01390	0.01412	0.00591	0.00091
	Clostridium indolis group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Clostridium_g34	2.42435	0.01431	0.01511	0.00600	0.05933
	PAC001092_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001092_g	2.38053	0.01431	0.01583	0.01241	0.05971
	KE159600_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159600_g	2.37498	0.01431	0.01576	0.00336	0.05008
	PAC001378_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	2.37206	0.01431	0.01536	0.00635	0.05388
	PAC001778_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Acetatifactor	2.36680	0.01431	0.01557	0.01504	0.05996
	PAC001091_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001091_g	2.34134	0.01431	0.01582	0.00963	0.05311
	Negletia	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.32096	0.02905	0.03310	0.00171	0.00000
	KE159810_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: KE159810_g	2.31942	0.01431	0.01525	0.00793	0.04667
	PAC001584_s group	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Oscillibacter	2.31486	0.02749	0.03113	0.01334	0.05354
	PAC001745_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000692_g	2.30242	0.03182	0.03686	0.00000	0.03967

	Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
	PAC001166_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.28359	0.01431	0.01498	0.00414	0.04211
	PAC001388_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.25203	0.02749	0.03077	0.02269	0.05810
	PAC001507_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Paludicola	2.24607	0.02749	0.03106	0.02706	0.05740
	PAC002398_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Sporobacter	2.23786	0.02749	0.03119	0.01652	0.04962
	Emergencia	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Mogibacterium_f	2.23553	0.01431	0.01477	0.03624	0.00297
	PAC001395_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Mogibacterium_f: Emergencia	2.23553	0.01431	0.01532	0.03624	0.00297
	Faecalicatena	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.21380	0.01052	0.01054	0.00000	0.03257
	Faecalicatena_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Faecalicatena	2.18930	0.01052	0.01059	0.00000	0.03057
	FJ681385_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.18830	0.04625	0.05375	0.00326	0.03348
	PAC001141_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Christensenellaceae: PAC001141_g	2.18501	0.01052	0.01053	0.02489	0.00090
	FJ681385_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: FJ681385_g	2.16772	0.04625	0.05380	0.00293	0.03174
	PAC001280_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Christensenellaceae: PAC001219_g	2.15920	0.02749	0.03100	0.05664	0.03496
	GQ451310_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001166_g	2.14753	0.01431	0.01520	0.00301	0.02846
	PAC000748_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.11320	0.00729	0.00729	0.02160	0.00000
	PAC001412_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: PAC000748_g	2.11320	0.00729	0.00730	0.02160	0.00000
	Bacteroidaceae_uc	Genus	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae	2.10576	0.04625	0.05371	0.01593	0.00116
	GU324393_g	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.10195	0.02495	0.02767	0.00196	0.02671
	Clostridium_g39	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae	2.08966	0.01273	0.01284	0.00034	0.00230
	ASDV_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Pseudoflavonifractor	2.07485	0.01431	0.01513	0.01760	0.03976
	GU324393_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: GU324393_g	2.06975	0.02495	0.02776	0.00196	0.02491

	Taxon name	Taxon rank	Taxonomy	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-AFDH1801
	EU778925_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: EU778925_g	2.04062	0.01273	0.01286	0.00039	0.00286
	PAC001590_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Anaerotruncus	2.02984	0.01431	0.01550	0.00686	0.02665
	D9990270_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: Clostridium_g24	2.02173	0.01273	0.01289	0.00039	0.02110
	Ruthenibacterium	Genus	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae	2.01996	0.01431	0.01484	0.00927	0.02768
	PAC001378_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Ruthenibacterium	2.01996	0.01431	0.01537	0.00927	0.02768
	FJ880975_s	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC000664_g	2.01843	0.02749	0.03093	0.00271	0.02315
	PAC001372_g_uc	Species	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Lachnospiraceae: PAC001372_g	2.01567	0.01273	0.01287	0.00065	0.01834

▪ 또한, 건강과 관련있는 Pre-defined group 에 대해서도 분석하였음

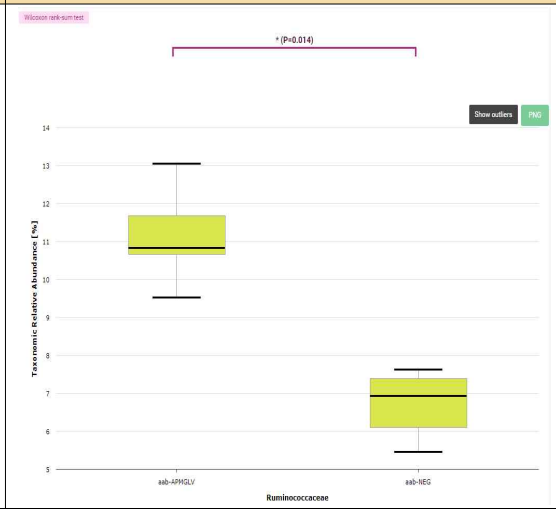
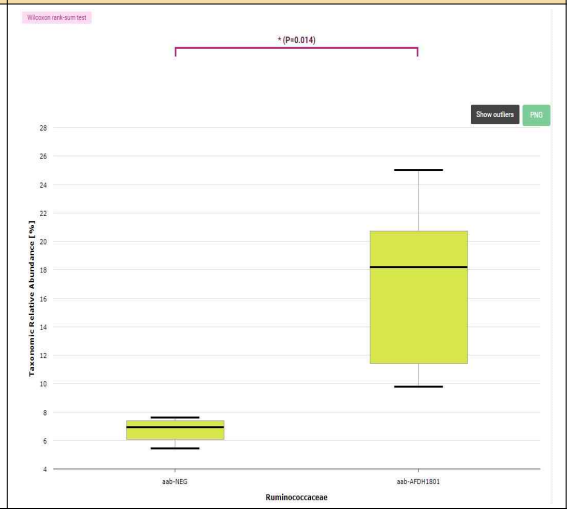
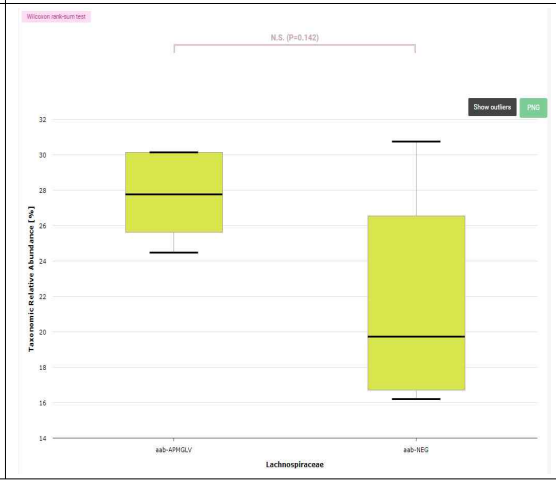
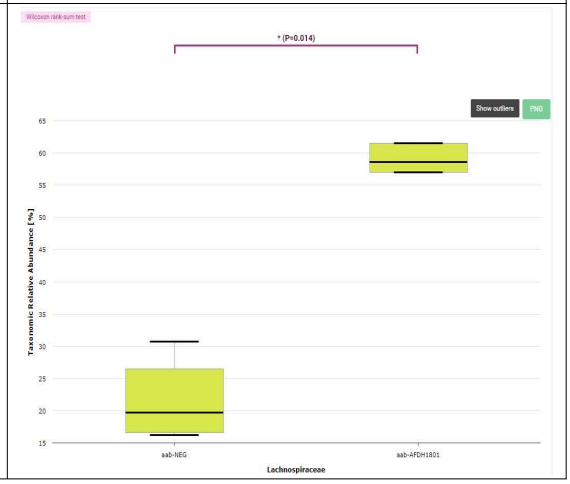
EZBioCloud > Comparative MTP > Composition > Pre-defined group > Selected taxa

Group	NEG (우측바) vs APMGLV (좌측바)	NEG (좌측바) vs AFDH1801 (우측바)
Lactic acid bacteria*		
Firmicutes to Bacteroidetes ratio **		
Bacteroides		

* Lactate-producing bacteria generally considered as probiotics, including Bifidobacterium catenulatum group, Lactobacillus gasseri group, Lactobacillus intestinalis, Lactobacillus murinus group, Lactobacillus reuteri group, and Lactococcus garvieae group.

**Related to obesity or other diseases

(Pre-defined group 분석 계속)

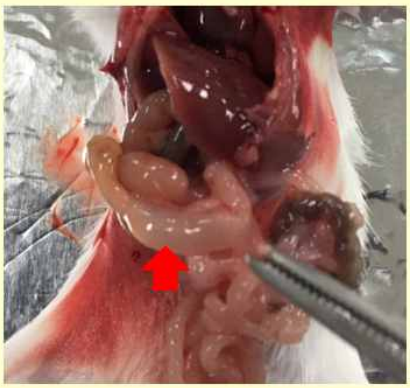
Group	NEG (우측바) vs APMGLV (좌측바)	NEG (좌측바) vs AFDH1801 (우측바)
Ruminococcaceae		
Lachnospiraceae		

- 분석결과, AFDH1801의 경우 장내 대표적인 유익균총인 lactic acid bacteria population의 유의적 감소를 일으킨다는 사실을 확인하였음 (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0.05$)
- 하지만, APMGLV의 경우 lactic acid bacteria population을 감소시키지 않았음
- 한편, 숙주의 energy harvesting 과 관련이 있는 장내 마이크로바이옴 지표인 Firmicutes to Bacteroidetes ratio의 경우 두 초산균 모두 NEG그룹에 비하여 유의적으로 증가된 것을 확인할 수 있었음 (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0.05$).

❖ in vivo safety evaluation

- APMGLV군에서는 독성 반응이 관찰되지 않았으나, AFDH1801 섭취군에서는 부검시 bloating이 관찰됨

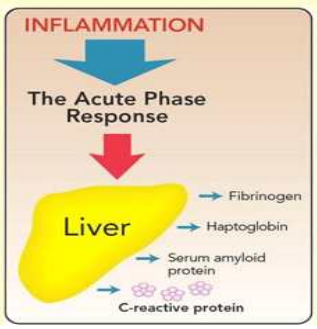
Group	NEG	LGG	APMGLV	AFDH1801
Death	0/5	0/5	0/5	0/5
Change of coat and fur	0/5	0/5	0/5	0/5
Loss of weight	0/5	0/5	0/5	0/5
Bloody feces	0/5	0/5	0/5	0/5
Diarrhea	0/5	0/5	0/5	0/5
Bloating	0/5	0/5	0/5	**2/5**



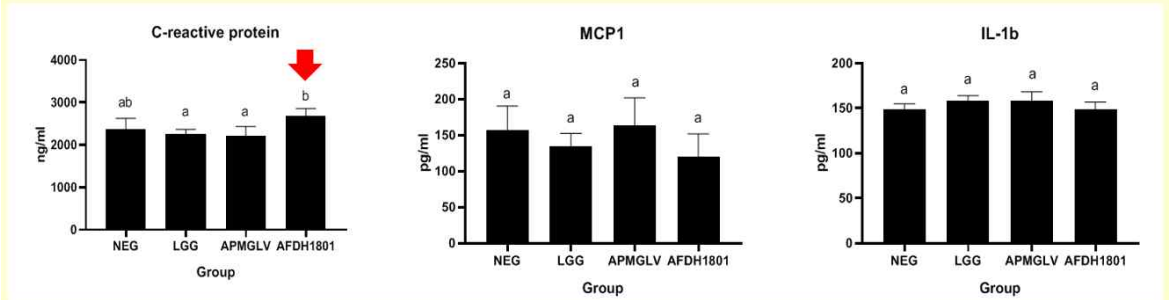
❖ 또한, cytokine 분석에서, A. fabarum DH1801 투여 그룹에서

- 2/5마리 bloating 발생
- Serum CRP의 유의적 증가
- AFDH1801 섭취군에서 선천면역반응에 의한 급성염증반응이 발생함을 확인함

→ 안전성 측면에서, DH1801이 프로바이오틱스 소재로서 적절치 않을 수 있음을 시사



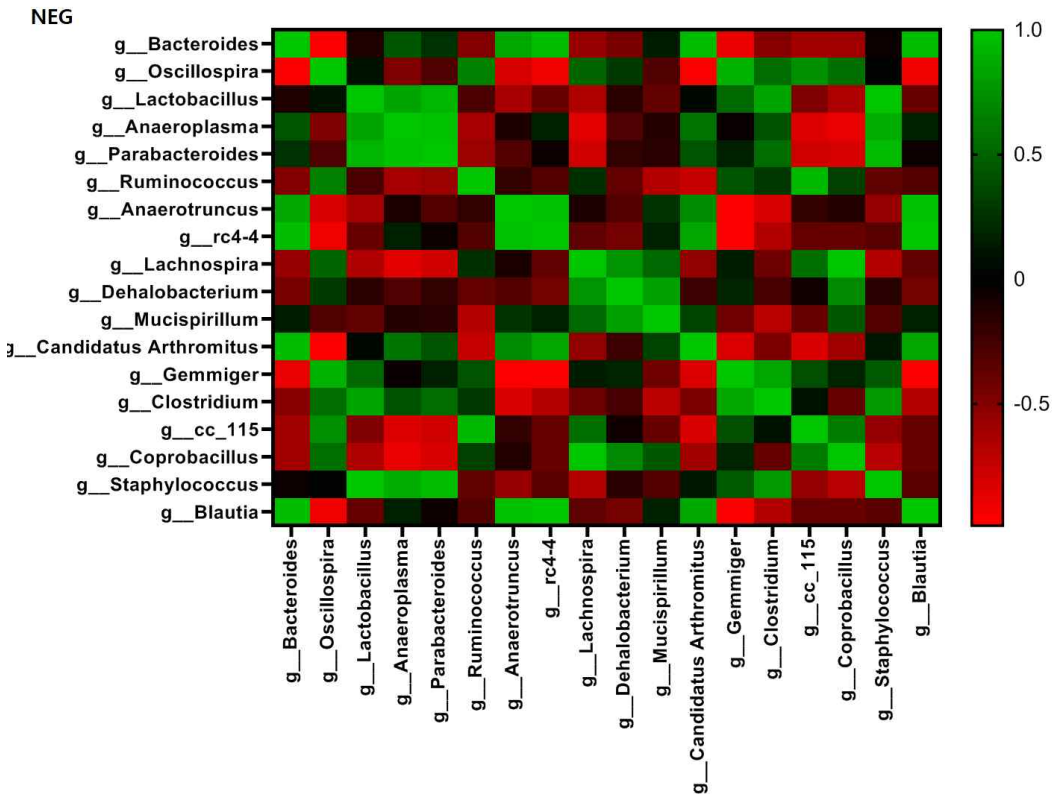
CRP is a major acute phase protein produced, mainly in the liver, in response to inflammation and the release of cytokines. Serum CRP levels correlate to both the severity and duration of the inflammatory stimuli.



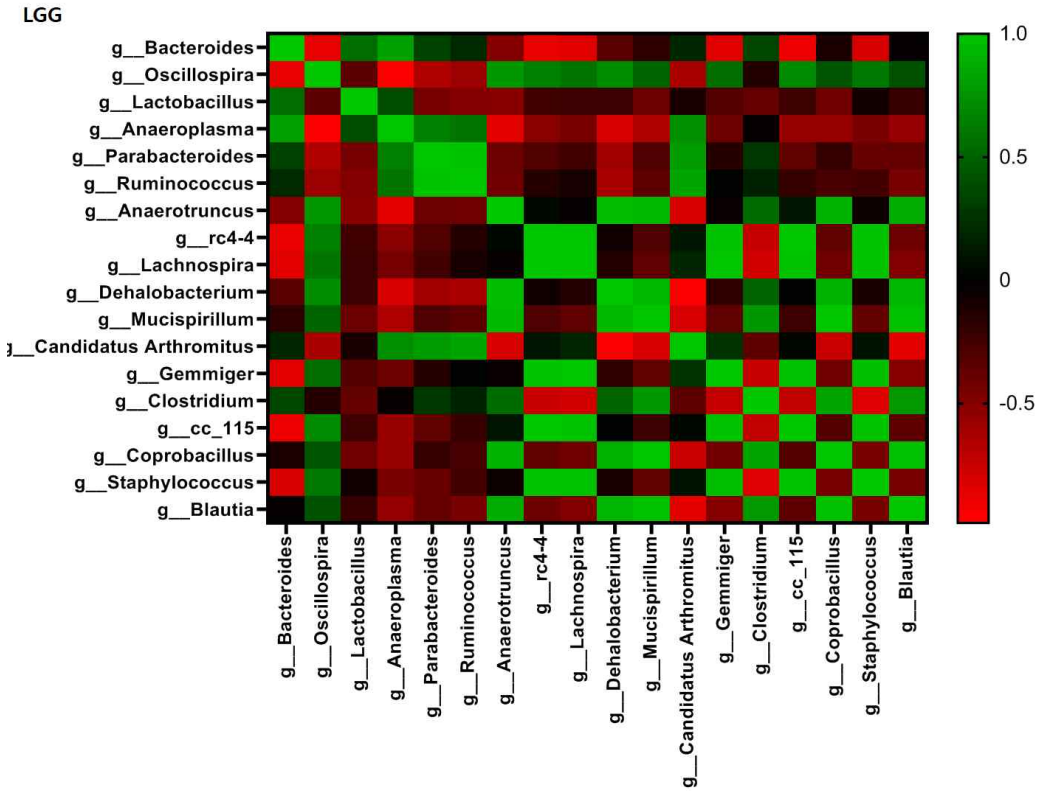
· One-way ANOVA analysis (Tukey method, $p < 0.05$)

❖ Co-occurrence (co-existence), Co-exclusion 분석

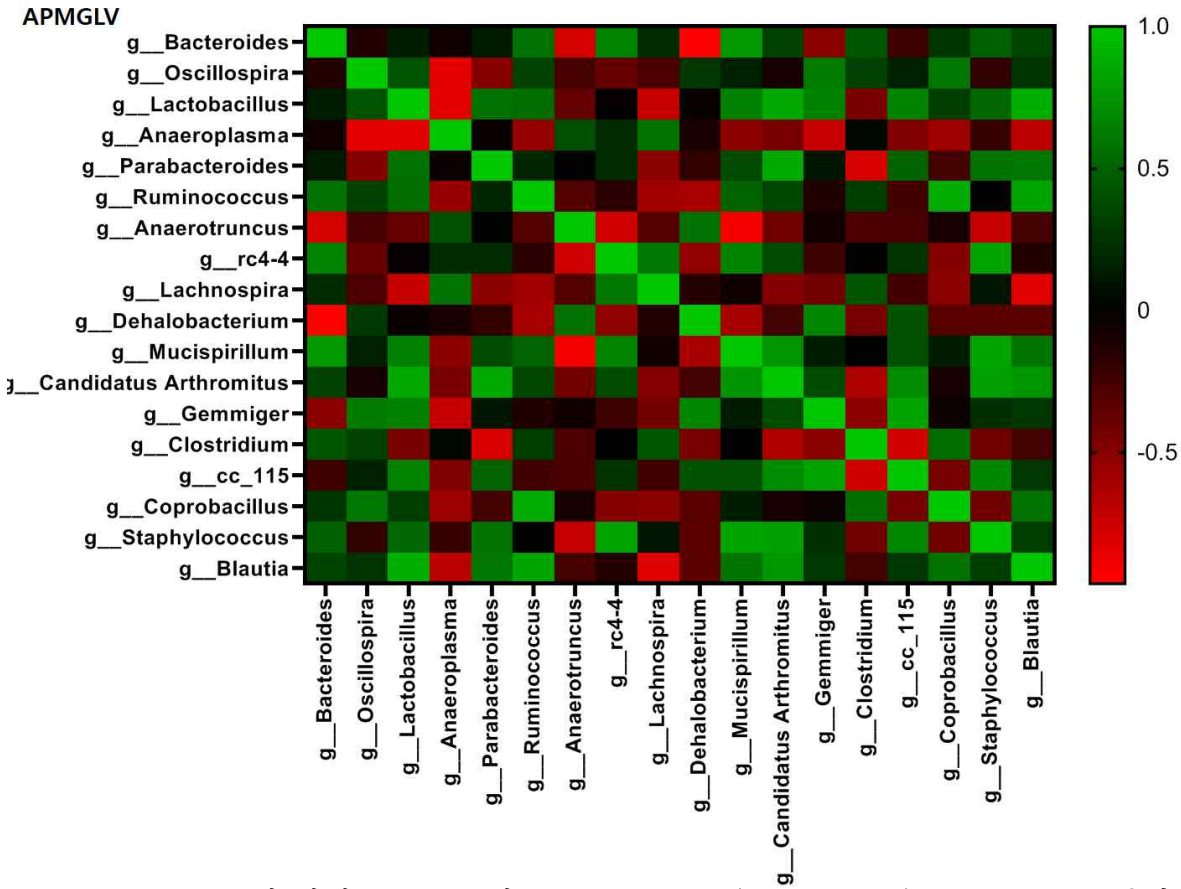
- NEG그룹의 상위 20 genus의 co-occurrence (co-existence), co-exclusion 분석



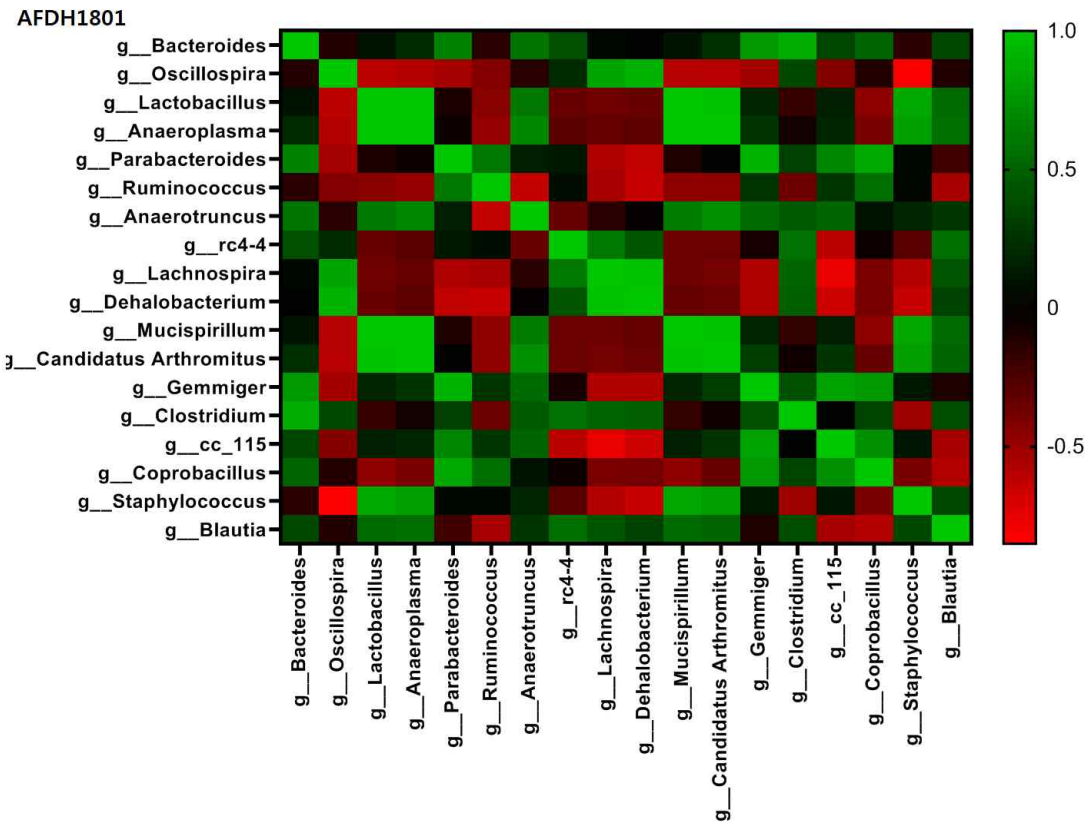
- LGG그룹의 상위 20 genus의 co-occurrence (co-existence), co-exclusion 분석



• APMGLV그룹의 상위 20 genus의 co-occurrence (co-existence), co-exclusion 분석



• AFDH1801그룹의 상위 20 genus의 co-occurrence (co-existence), co-exclusion 분석

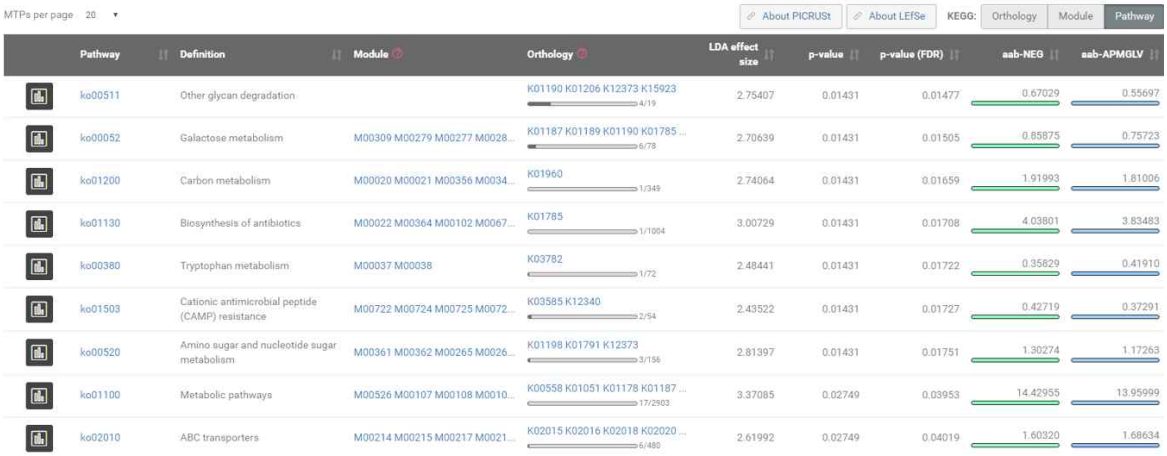


- AFDH1801 및 APMGLV의 투여는 상대빈도 상위 20개 genus간의 상호관계를 변화시킴
- 예: Neg 실험군에서는 Bacteroides가 dominent genus이며 타 genus들과 co-exclusive한 관계에 있으나, 초산균 실험군들에서는 minor genus가 되었으며 co-cooccurence 관계로 변하게 됨

❖ **마이크로바이옴 기능 예측 분석**

- Predictive function analysis - PICRUSt-LEfSe analysis
- EzBioCloud microbiome comparison tool - predictive function - 1 on 1 comparison

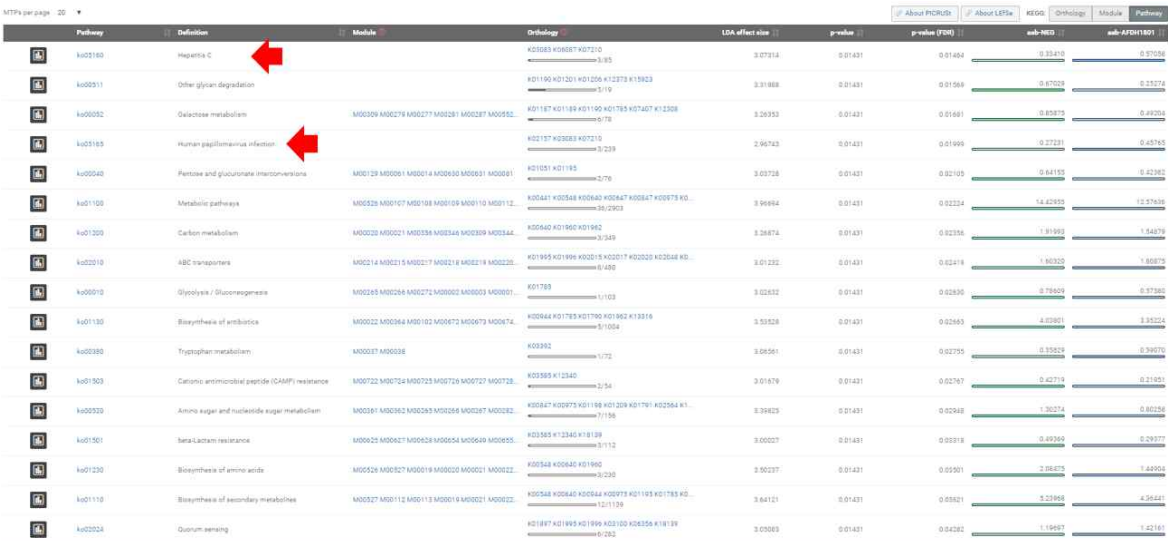
<NEG vs APMGLV>



Pathway	Definition	Module	Orthology	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-NEG	aab-APMGLV
ko00511	Other glycan degradation		K01190 K01206 K12373 K15923 4/19	2.75407	0.01431	0.01477	0.67029	0.55697
ko00052	Galactose metabolism	M00309 M00279 M00277 M0028...	K01187 K01189 K01190 K01785 ... 6/78	2.70639	0.01431	0.01505	0.85875	0.75723
ko01200	Carbon metabolism	M00020 M00021 M00356 M0034...	K01960 1/349	2.74064	0.01431	0.01659	1.91993	1.81006
ko01130	Biosynthesis of antibiotics	M00022 M00364 M00102 M0067...	K01785 1/1004	3.00729	0.01431	0.01708	4.03801	3.83483
ko00380	Tryptophan metabolism	M00037 M00038	K03782 1/72	2.48441	0.01431	0.01722	0.35829	0.41910
ko01503	Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance	M00722 M00724 M00725 M0072...	K03585 K12340 2/54	2.43522	0.01431	0.01727	0.42719	0.37291
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	M00361 M00362 M00265 M0026...	K01198 K01791 K12373 3/156	2.81397	0.01431	0.01751	1.30274	1.17263
ko01100	Metabolic pathways	M00526 M00107 M00108 M0010...	K00558 K01051 K01178 K01187 ... 17/2903	3.37085	0.02749	0.03953	14.42955	13.95999
ko02010	ABC transporters	M00214 M00215 M00217 M0021...	K02015 K02016 K02018 K02020 ... 6/480	2.61992	0.02749	0.04019	1.60320	1.68634

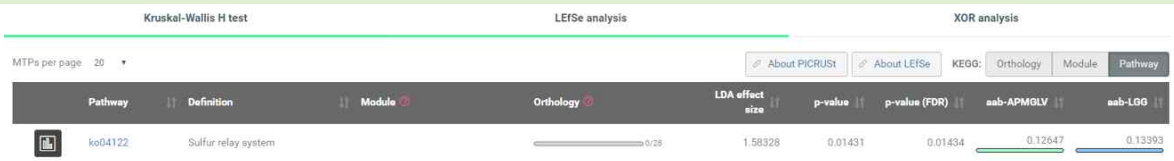
- 대조군과 APMGLV 섭취군 마이크로바이옴 사이에 주로 에너지 대사와 관련된 기능의 차이를 발견함

<NEG vs AFDH1801>



- APMGLV 섭취군은 대조군 대비 대사 차이 이외에도 바이러스 감염 민감도 증가가 발견됨

<APMGLV vs. LGG>



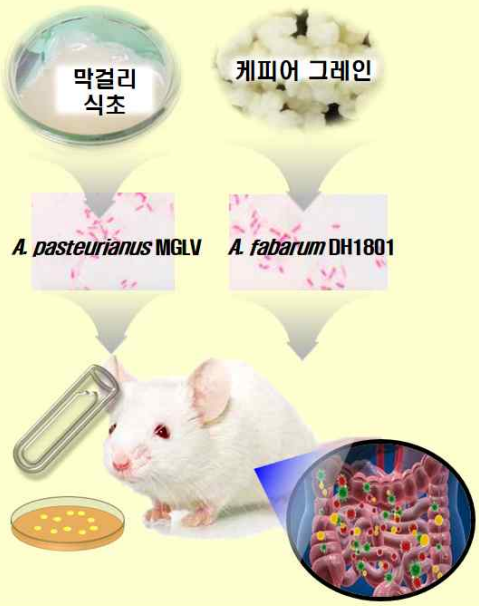
Kruskal-Wallis H test | LEfSe analysis | XOR analysis

Pathway	Definition	Module	Orthology	LDA effect size	p-value	p-value (FDR)	aab-APMGLV	aab-LGG
ko04122	Sulfur relay system		0/28	1.58328	0.01431	0.01434	0.12647	0.13393

- 한편, APMGLV의 경우 LGG 섭취군과 비교시 sulfur relay system 기능 차이만 존재하고, 특별한 기능적 차이가 없음을 확인함

❖ 자연발효식품에서 분리한 초산균 2 strains의 마우스 장내미생물총 변화 효과 요약

IACUC KU19120 (2-week in vivo test)



자연발효식품에서 분리한 초산균 2 strains의 마우스 장내미생물총 변화 효과 요약

1. 자연발효식품에서 분리한 초산균 2 strain을 2주간 건강한 마우스에 섭취시킨 결과, 장내미생물총 다양성을 증가시켰음 (유산균 대조군 보다도 더 유의적으로 증가시킴 -evenness & richness)
2. Top 20 genus간 co-occurrence, co-exclusion relationship을 변화시킴 (positive to negative or negative to positive)
3. 초산균의 투여는 LAB와는 전혀 다른 probiotic effect를 유발할 가능성을 시사함
4. 한편, AFDH1801은 부검소견, 혈중사이토카인, 마이크로바이옴 기능 예측 분석상 vilurence가 있는 것으로 예측됨
5. 따라서, 최종적으로 *A. pasteurianus* MGLV 균주를 probiotic acetic acid bacteria 로 선정함

A. pasteurianus MGLV 균주를 probiotic acetic acid bacteria 로 선정

< 유용 효모 및 초산균 분리 및 probiotic function screening 결과 요약 >

① 효모 및 초산균의 in vitro 위장관 생존성 기반 스크리닝

- K. marxianus A5 효모주: S. boulardii sb796보다 pH2.5 및 0.1-1.0 bile salt 환경에서 우수한 생존성을 나타냄
- A. pasteurianus DHMV3706, A. fabarum DH1801 초산균주: mild한 GIT 환경 (약산성, 저농도 담즙산염 존재)에서 성장을 나타냄

② 효모 및 초산균의 in vitro 숙주 안전성 기반 스크리닝

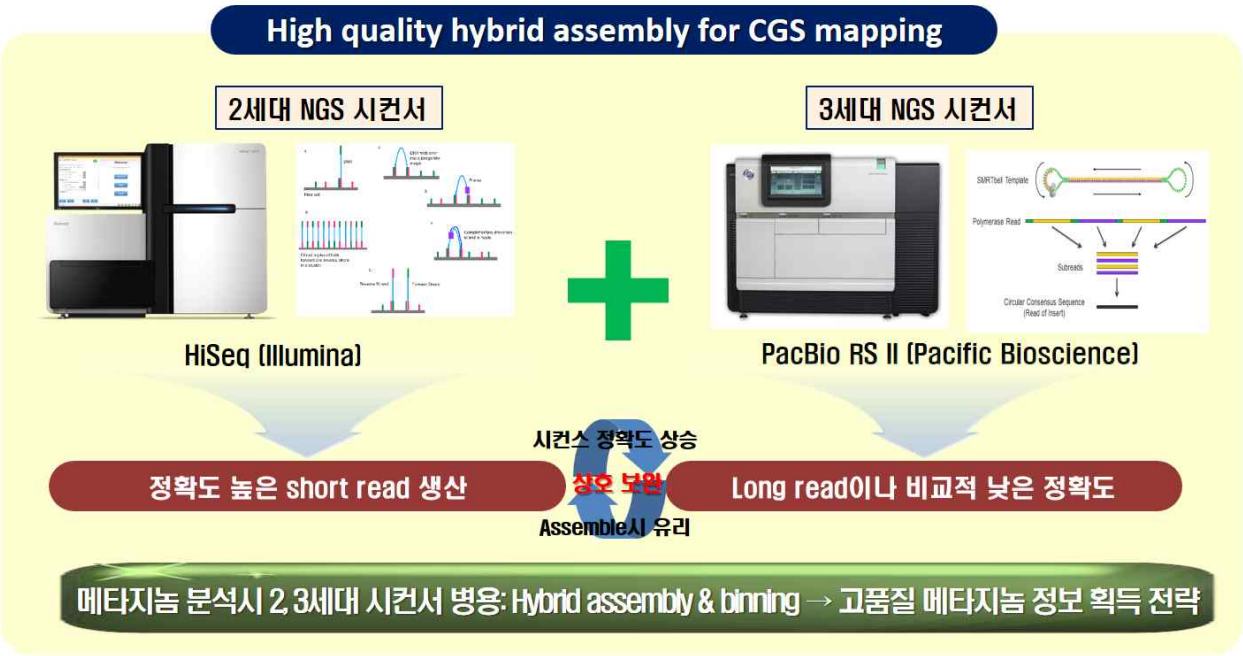
- 효모 및 초산균주 모두 용혈성은 나타내지 않았으나, 혈액을 기질로 성장은 가능하다는 사실을 확인
- In vivo에서 추가적 안전성 평가가 필요함을 시사

③ 효모 및 초산균의 in vitro 및 in vivo 기능성 기반 스크리닝

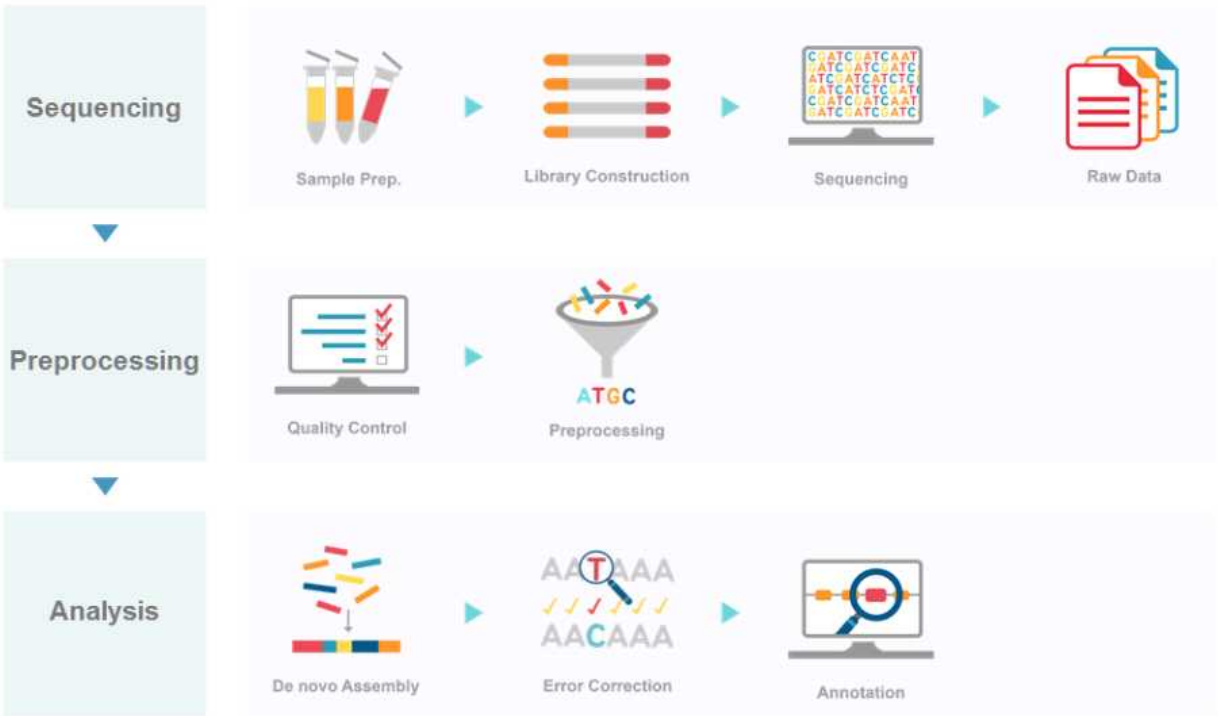
- 선발된 2주의 초산균 (A. pasteurianus DHMV3706, A. fabarum DH1801)의 대사산물이 장내 병원체들의 성장을 억제함을 확인 (negative interaction)
- 2주간의 경구투여 실험에서 건강한 마우스의 장내미생물총을 매우 유의적으로 변화시킴을 확인함

2) 유용 미생물 유전체 분석: 고품질 참조 유전체 확보

- Long-read & short-read hybrid de novo assembly를 통한 고품질 참조유전체 확보
- De novo sequencing workflow



<Workflow overview>



* Programs used in Analysis

RS HGAP Assembly (v3.0)

LINK (http://www.pacb.com/products-and-services/analytical-software/smrt-analysis/)

SMRT Portal (v2.3) allows the execution of all HGAP steps in the web-based GUI. HGAP performs high quality de novo assembly using a single PacBio library preparation. It includes pre-assembly, de novo assembly with PacBio¡fls AssembleUnitig, assembly polishing with Quiver, and a significant speed improvement for microbial assembly.

- Option Details (Default)

1. Filtering : PreAssembler Filter v1

Minimum Subread Length: 500bp
Minimum Polymerase Read Quality: 0.80
Minimum Polymerase Read Length: 100bp

2. Assembly : PreAssembler v2

Minimum Seed Read Length: 6000 bp
Number of Seed Read Chunks: 6
Alignment Candidates Per Chunk: 10
Total Alignment Candidates: 24
Minimum Coverage for Correction: 6

3. BLASR v1

Maximum Divergence (%): 30 %
Minimum Anchor Size: 12bp

* Error Correction tool

Pilon (v1.21)

LINK (https://github.com/broadinstitute/pilon/wiki)

Pilon is a software tool which can be used to automatically improve draft assemblies. It significantly improves draft genome assemblies by correcting bases, fixing mis-assemblies and filling gaps.

* Annotation tool

Prokka (v1.13)

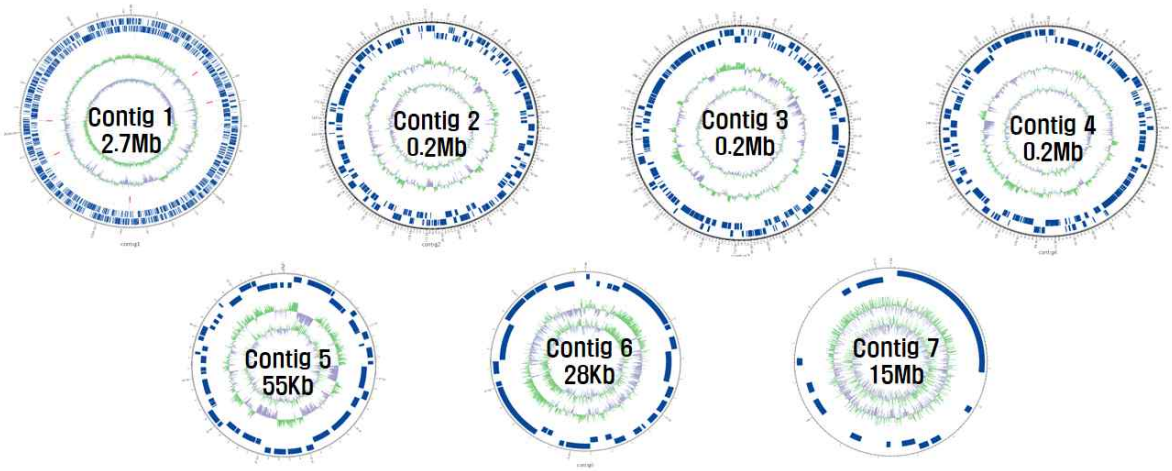
LINK (http://www.vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml)

Prokka is a pipeline that performs series of process automatically. At the end of the pipeline, It gives GBK files as well as various types of files such as GFF3, SQN.

Complete genome sequence 1. Acetobacter pasteurianus MGLV

- Result of Assembly: 7 contigs were formed.
- Result of Annotation: 3,361 CDS, 57 tRNA, 15 rRNA genes were discovered.

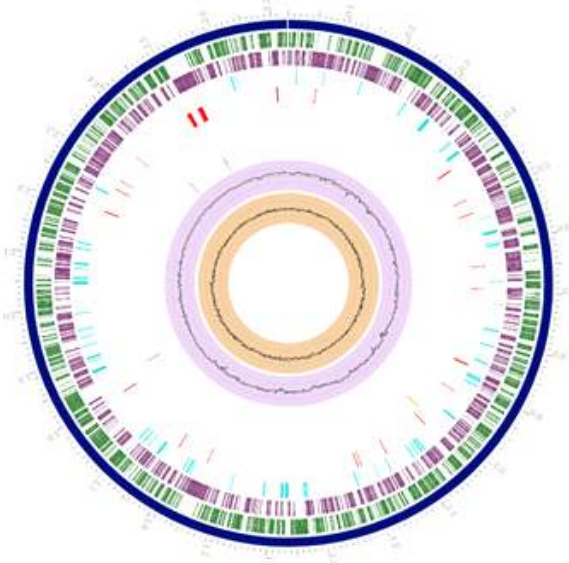
Contig Name	Length	GC %	Depth	Circular	CDS	tRNA	rRNA
contig1	2,726,594	53.2	229	YES	2,539	57	15
contig2	216,786	53.3	245	YES	273	0	0
contig3	216,682	53.3	237	YES	229	0	0
contig4	183,784	53.4	234	YES	207	0	0
contig5	55,084	49.9	220	YES	59	0	0
contig6	28,508	56.3	493	YES	37	0	0
contig7	15,365	56.3	437	YES	17	0	0
Total	3,442,803	53.19	233		3,361	57	15



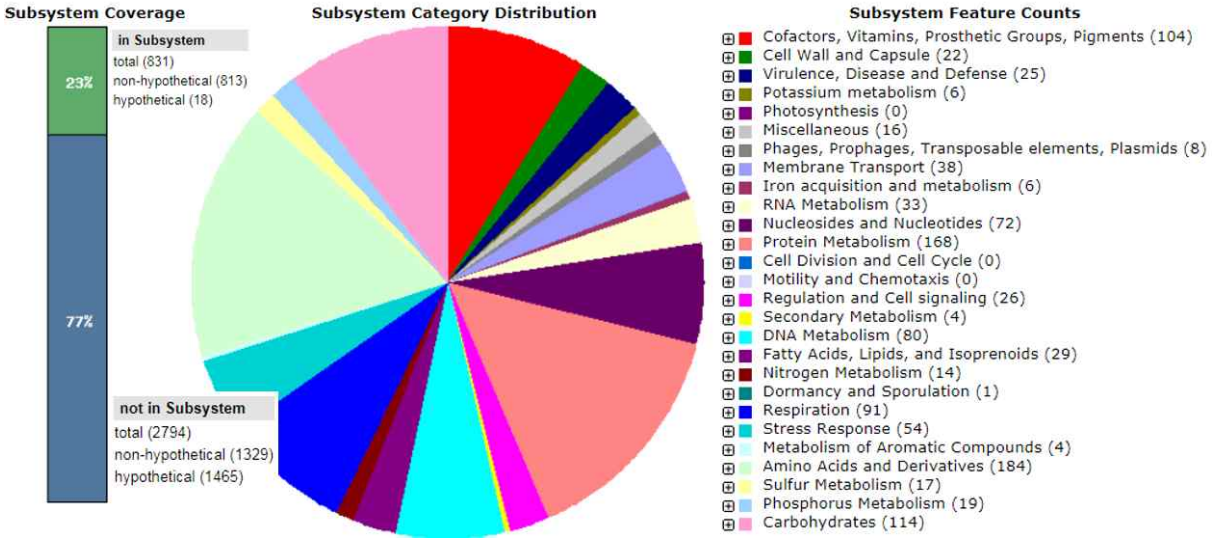
<Genome metadata>

Name	*Acetobacterpasteurianus*MGLV
Domain	Bacteria
Phylum	*Proteobacteria*
Class	*Alphaproteobacteria*
Family	*Acetobacteraceae*
Genus	*Acetobacter*
Species	*Acetobacterpasteurianus*
Genome Size	3442803
GC Content (%)	53.2
N50	2726594
L50	1
Number of Contigs (with PEGs)	7
Number of Subsystems	264
Number of Coding Sequences	3625
Number of RNAs	68

<Circular genome view: chromosome of AP_MGLV>



- Distribution of CDSs in subsystems (RAST server, SEED Viewer version 2.0, http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi)



Subsystem Feature Counts

- Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (104)
  - Biotin (9)
  - Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments - no subcategory (9)
  - Quinone cofactors (0)
  - Tetrapyrroles (24)
  - Riboflavin, FMN, FAD (12)
  - Fe-S clusters (0)
  - Mycofactocin (0)
  - Pyridoxine (10)
  - NAD and NADP (8)
  - Coenzyme B (0)
  - Folate and pterines (21)
  - Lipoic acid (0)
  - Coenzyme F420 (0)
  - Coenzyme M (0)
  - Coenzyme A (11)
- Cell Wall and Capsule (22)
  - Capsular and extracellular polysaccharides (12)
  - Gram-Negative cell wall components (1)
  - Cell Wall and Capsule - no subcategory (9)
  - Gram-Positive cell wall components (0)
  - Cell wall of Mycobacteria (0)
- Virulence, Disease and Defense (25)
  - Adhesion (0)
  - Toxins and superantigens (0)
  - Bacteriocins, ribosomally synthesized antibacterial peptides (0)
  - Resistance to antibiotics and toxic compounds (16)
  - Virulence, Disease and Defense - no subcategory (0)
  - Detection (0)
  - Invasion and intracellular resistance (9)
- Potassium metabolism (6)
  - Potassium metabolism - no subcategory (6)
- Photosynthesis (0)
  - Light-harvesting complexes (0)
  - Photosynthesis - no subcategory (0)
  - Electron transport and photophosphorylation (0)
- Miscellaneous (16)
  - Conversion of Succinyl-CoA to Propionyl-CoA (0)
  - Plant-Prokaryote DOE project (11)
  - Miscellaneous - no subcategory (5)
- Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids (8)
  - Phage family-specific subsystems (0)
  - Transposable elements (3)
  - Phages, Prophages (5)
  - Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids - no subcategory (0)
  - Pathogenicity islands (0)
  - Gene Transfer Agent (GTA) (0)
  - Plasmid related functions (0)

- Membrane Transport (38)
  - Protein secretion system, Type II (0)
  - ABC transporters (1)
  - Protein secretion system, Type VII (Chaperone/Usher pathway, CU) (0)
  - Protein translocation across cytoplasmic membrane (3)
  - Protein secretion system, Type V (0)
  - Protein secretion system, Type I (0)
  - Cation transporters (6)
  - Protein secretion system, Type III (0)
  - Uni- Sym- and Antiporters (2)
  - Membrane Transport - no subcategory (26)
  - TRAP transporters (0)
  - Sugar Phosphotransferase Systems, PTS (0)
  - Protein secretion system, Type VI (0)
  - Protein secretion system, Type VIII (Extracellular nucleation/precipitation pathway, ENP) (0)
  - Protein and nucleoprotein secretion system, Type IV (0)
- Iron acquisition and metabolism (6)
  - Siderophores (0)
  - Iron acquisition and metabolism - no subcategory (6)
  - Iron transpot (0)
- RNA Metabolism (33)
  - RNA processing and modification (14)
  - Transcription (17)
  - RNA Metabolism - no subcategory (2)
- Nucleosides and Nucleotides (72)
  - Pyrimidines (9)
  - Purines (48)
  - Nucleosides and Nucleotides - no subcategory (9)
  - Detoxification (6)
- Protein Metabolism (168)
  - Protein folding (10)
  - Selenoproteins (0)
  - Protein biosynthesis (139)
  - Protein processing and modification (2)
  - Protein degradation (17)
- Cell Division and Cell Cycle (0)
  - Checkpoint control (0)
  - Heterocyst formation (0)
  - Cell Division and Cell Cycle - no subcategory (0)
- Motility and Chemotaxis (0)
  - Magnetotaxis (0)
  - Motility and Chemotaxis - no subcategory (0)
  - Flagellar motility in Prokaryota (0)
  - Social motility and nonflagellar swimming in bacteria (0)
- Regulation and Cell signaling (26)
  - Regulation and Cell signaling - no subcategory (6)
  - Signal transduction in Eukaryotes (0)
  - Quorum sensing and biofilm formation (0)
  - Proteolytic pathway (0)
  - Regulation of virulence (0)
  - Programmed Cell Death and Toxin-antitoxin Systems (20)

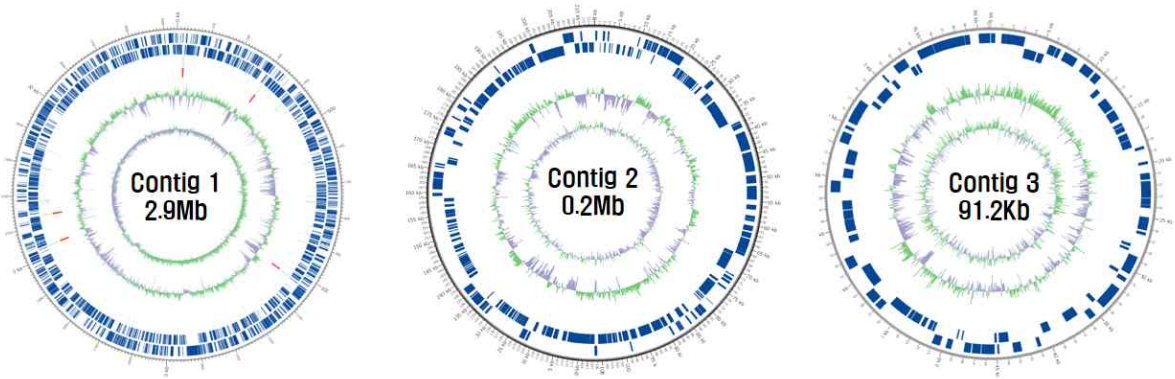
- Secondary Metabolism (4)
  - Secondary Metabolism - no subcategory (0)
  - Lipid-derived mediators (0)
  - Plant Octadecanoids (0)
  - Bacterial cytostatics, differentiation factors and antibiotics (0)
  - Biosynthesis of phenylpropanoids (0)
  - Hydrocarbons (0)
  - Aromatic amino acids and derivatives (0)
  - UV-absorbing secondary metabolites (0)
  - Plant Alkaloids (0)
  - Biologically active compounds in metazoan cell defence and differentiation (0)
  - Plant Hormones (4)
- DNA Metabolism (80)
  - DNA repair (51)
  - CRISPs (4)
  - DNA Metabolism - no subcategory (14)
  - DNA replication (9)
  - DNA recombination (0)
  - DNA uptake, competence (2)
- Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (29)
  - Phospholipids (0)
  - Triacylglycerols (1)
  - Fatty acids (11)
  - Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids - no subcategory (5)
  - Isoprenoids (12)
- Nitrogen Metabolism (14)
  - Nitrogen Metabolism - no subcategory (14)
  - Denitrification (0)
- Dormancy and Sporulation (1)
  - Spore DNA protection (0)
  - Dormancy and Sporulation - no subcategory (1)

- Respiration (91)
  - Biotin (9)
  - ATP synthases (9)
  - Electron accepting reactions (24)
  - Electron donating reactions (39)
  - Reverse electron transport (0)
  - Respiration - no subcategory (19)
  - Sodium Ion-Coupled Energetics (0)
- Stress Response (54)
  - Osmotic stress (6)
  - Dessication stress (0)
  - Acid stress (0)
  - Oxidative stress (29)
  - Cold shock (0)
  - Heat shock (10)
  - Detoxification (9)
  - Stress Response - no subcategory (2)
  - Periplasmic Stress (4)
- Metabolism of Aromatic Compounds (4)
  - Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds (4)
  - Anaerobic degradation of aromatic compounds (0)
  - Metabolism of central aromatic intermediates (0)
  - Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory (0)
- Amino Acids and Derivatives (184)
  - Glutamine, glutamate, aspartate, asparagine; ammonia assimilation (13)
  - Histidine Metabolism (8)
  - Arginine; urea cycle, polyamines (4)
  - Lysine, threonine, methionine, and cysteine (74)
  - Amino Acids and Derivatives - no subcategory (1)
  - Branched-chain amino acids (14)
  - Polyamines (0)
  - Aromatic amino acids and derivatives (29)
  - Proline and 4-hydroxyproline (7)
  - Alanine, serine, and glycine (34)
- Sulfur Metabolism (17)
  - Inorganic sulfur assimilation (13)
  - Sulfur Metabolism - no subcategory (4)
  - Organic sulfur assimilation (0)
- Phosphorus Metabolism (19)
  - Phosphorus Metabolism - no subcategory (19)
- Carbohydrates (114)
  - Central carbohydrate metabolism (66)
  - Aminosugars (2)
  - Di- and oligosaccharides (5)
  - Glycoside hydrolases (0)
  - One-carbon Metabolism (4)
  - Organic acids (9)
  - Fermentation (9)
  - CO2 fixation (0)
  - Sugar alcohols (5)
  - Carbohydrates - no subcategory (1)
  - Polysaccharides (2)
  - Monosaccharides (11)

Complete genome sequence 2. Acetobacter fabarum DH1801

- Result of Assembly: 3 contigs were formed.
- Result of Annotation: 3,173 CDS, 58 tRNA, 15 rRNA genes were discovered.

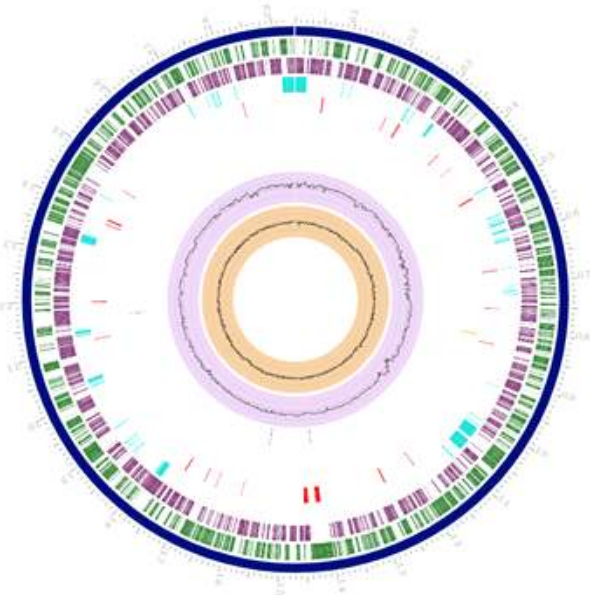
Contig Name	Length	GC %	Depth	Circular	CDS	tRNA	rRNA
contig1	2,938,921	58.0	130	NO	2,784	58	15
contig2	213,076	57.3	65	YES	285	0	0
contig3	91,169	54.3	34	YES	104	0	0
Total	3,243,166	57.83	123		3,173	58	15



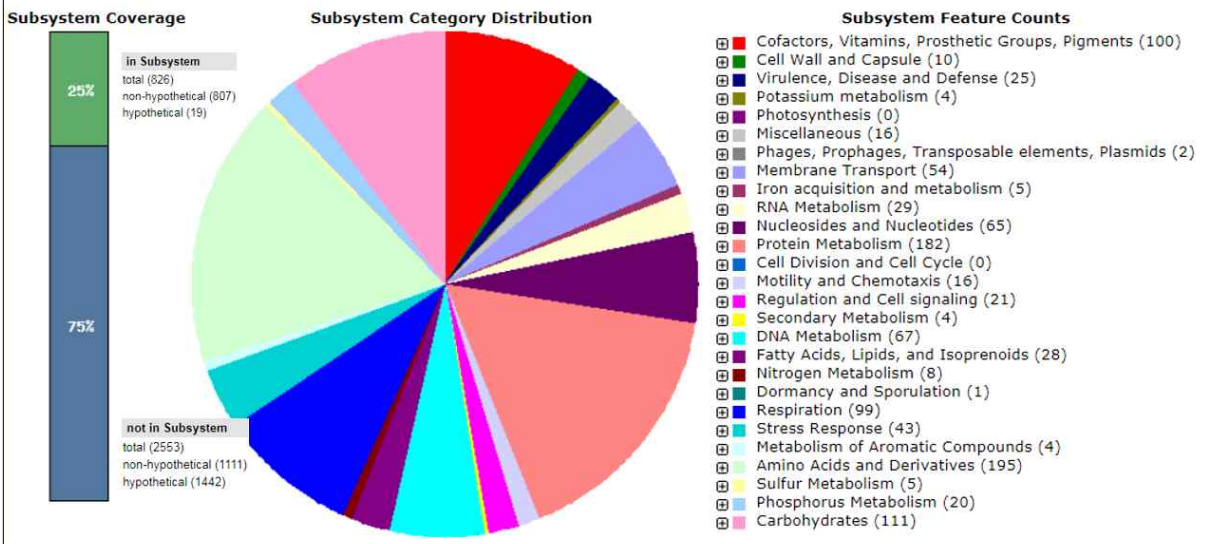
<Genome metadata>

Name	*Acetobacter fabarum* DH1801
Domain	Bacteria
Phylum	*Proteobacteria*
Class	*Alphaproteobacteria*
Family	*Acetobacteraceae*
Genus	*Acetobacter*
Species	*Acetobacterfabarum*
Genome Size	3,243,166
GC Content (%)	57.8
N50	2938921
L50	1
Number of Contigs (with PEGs)	3
Number of Subsystems	261
Number of Coding Sequences	3379
Number of RNAs	72

<Circular genome view: chromosome of AF_DH1801>



- Distribution of CDSs in subsystems (RAST server, SEED Viewer version 2.0, http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi)



Subsystem Feature Counts

- Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (100)
  - Biotin (11)
  - Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments - no subcategory (7)
  - Quinone cofactors (0)
  - Tetrapyrroles (22)
  - Riboflavin, FMN, FAD (12)
  - Fe-S clusters (0)
  - Mycofactocin (0)
  - Pyridoxine (11)
  - NAD and NADP (6)
  - Coenzyme B (0)
  - Folate and pterines (20)
  - Lipoic acid (0)
  - Coenzyme F420 (0)
  - Coenzyme M (0)
  - Coenzyme A (11)
- Cell Wall and Capsule (10)
  - Capsular and extracellular polysacchrides (0)
  - Gram-Negative cell wall components (0)
  - Cell Wall and Capsule - no subcategory (10)
  - Gram-Positive cell wall components (0)
  - Cell wall of Mycobacteria (0)
- Virulence, Disease and Defense (25)
  - Adhesion (0)
  - Toxins and superantigens (0)
  - Bacteriocins, ribosomally synthesized antibacterial peptides (0)
  - Resistance to antibiotics and toxic compounds (16)
  - Virulence, Disease and Defense - no subcategory (0)
  - Detection (0)
  - Invasion and intracellular resistance (9)
- Potassium metabolism (4)
  - Potassium metabolism - no subcategory (4)
- Photosynthesis (0)
  - Light-harvesting complexes (0)
  - Photosynthesis - no subcategory (0)
  - Electron transport and photophosphorylation (0)
- Miscellaneous (16)
  - Conversion of Succinyl-CoA to Propionyl-CoA (0)
  - Plant-Prokaryote DOE project (10)
  - Miscellaneous - no subcategory (6)
- Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids (2)
  - Phage family-specific subsystems (0)
  - Transposable elements (0)
  - Phages, Prophages (2)
  - Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids - no subcategory (0)
  - Pathogenicity islands (0)
  - Gene Transfer Agent (GTA) (0)
  - Plasmid related functions (0)
- Membrane Transport (54)
  - Protein secretion system, Type II (0)
  - ABC transporters (0)
  - Protein secretion system, Type VII (Chaperone/Usher pathway, CU) (0)
  - Protein translocation across cytoplasmic membrane (3)
  - Protein secretion system, Type V (0)
  - Protein secretion system, Type I (0)
  - Cation transporters (9)
  - Protein secretion system, Type III (0)
  - Uni- Sym- and Antiporters (0)
  - Membrane Transport - no subcategory (20)
  - TRAP transporters (0)
  - Sugar Phosphotransferase Systems, PTS (0)
  - Protein secretion system, Type VI (0)
  - Protein secretion system, Type VIII (Extracellular nucleation/precipitation pathway, ENP) (0)
  - Protein and nucleoprotein secretion system, Type IV (22)
- Iron acquisition and metabolism (5)
  - Siderophores (0)
  - Iron acquisition and metabolism - no subcategory (5)
  - Iron transpot (0)
- RNA Metabolism (29)
  - RNA processing and modification (11)
  - Transcription (17)
  - RNA Metabolism - no subcategory (1)
- Nucleosides and Nucleotides (65)
  - Pyrimidines (8)
  - Purines (45)
  - Nucleosides and Nucleotides - no subcategory (8)
  - Detoxification (4)
- Protein Metabolism (182)
  - Protein folding (10)
  - Selenoproteins (0)
  - Protein biosynthesis (144)
  - Protein processing and modification (10)
  - Protein degradation (18)
- Cell Division and Cell Cycle (0)
  - Checkpoint control (0)
  - Heterocyst formation (0)
  - Cell Division and Cell Cycle - no subcategory (0)
- Motility and Chemotaxis (16)
  - Magnetotaxis (0)
  - Motility and Chemotaxis - no subcategory (0)
  - Flagellar motility in Prokaryota (16)
  - Social motility and nonflagellar swimming in bacteria (0)
- Regulation and Cell signaling (21)
  - Regulation and Cell signaling - no subcategory (7)
  - Signal transduction in Eukaryotes (0)
  - Quorum sensing and biofilm formation (0)
  - Proteolytic pathway (0)
  - Regulation of virulence (0)
  - Programmed Cell Death and Toxin-antitoxin Systems (14)

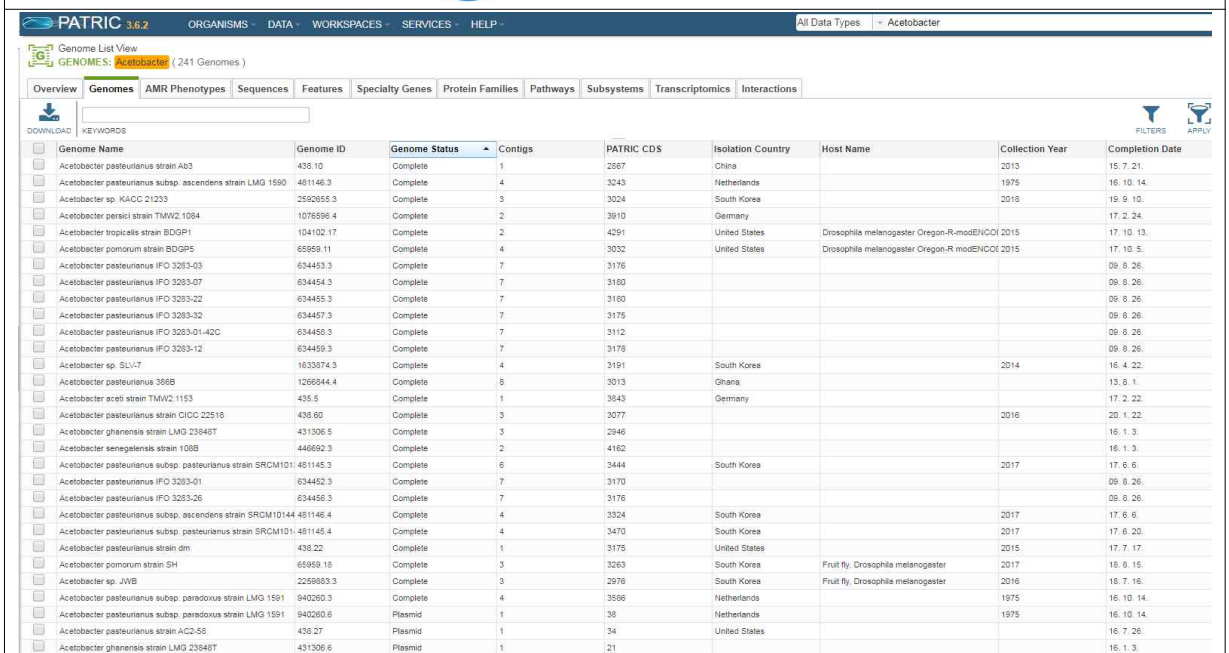
- Secondary Metabolism (4)
  - Secondary Metabolism - no subcategory (0)
  - Lipid-derived mediators (0)
  - Plant Octadecanoids (0)
  - Bacterial cytostatics, differentiation factors and antibiotics (0)
  - Biosynthesis of phenylpropanoids (0)
  - Hydrocarbons (0)
  - Aromatic amino acids and derivatives (0)
  - UV-absorbing secondary metabolites (0)
  - Plant Alkaloids (0)
  - Biologically active compounds in metazoan cell defence and differentiation (0)
  - Plant Hormones (4)
- DNA Metabolism (67)
  - DNA repair (44)
  - CRISPs (0)
  - DNA Metabolism - no subcategory (5)
  - DNA replication (16)
  - DNA recombination (0)
  - DNA uptake, competence (2)
- Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (28)
  - Phospholipids (0)
  - Triacylglycerols (0)
  - Fatty acids (11)
  - Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids - no subcategory (5)
  - Isoprenoids (12)
- Nitrogen Metabolism (8)
  - Nitrogen Metabolism - no subcategory (8)
  - Denitrification (0)
- Dormancy and Sporulation (1)
  - Spore DNA protection (0)
  - Dormancy and Sporulation - no subcategory (1)
- Respiration (99)
  - Biotin (11)
  - ATP synthases (9)
  - Electron accepting reactions (17)
  - Electron donating reactions (50)
  - Reverse electron transport (0)
  - Respiration - no subcategory (23)
  - Sodium Ion-Coupled Energetics (0)
- Stress Response (43)
  - Osmotic stress (5)
  - Dessication stress (0)
  - Acid stress (0)
  - Oxidative stress (28)
  - Cold shock (0)
  - Heat shock (0)
  - Detoxification (8)
  - Stress Response - no subcategory (2)
  - Periplasmic Stress (4)
- Metabolism of Aromatic Compounds (4)
  - Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds (4)
  - Anaerobic degradation of aromatic compounds (0)
  - Metabolism of central aromatic intermediates (0)
  - Metabolism of Aromatic Compounds - no subcategory (0)

- Amino Acids and Derivatives (195)
  - Glutamine, glutamate, aspartate, asparagine; ammonia assimilation (14)
  - Histidine Metabolism (9)
  - Arginine; urea cycle, polyamines (8)
  - Lysine, threonine, methionine, and cysteine (77)
  - Amino Acids and Derivatives - no subcategory (1)
  - Branched-chain amino acids (14)
  - Polyamines (0)
  - Aromatic amino acids and derivatives (31)
  - Proline and 4-hydroxyproline (6)
  - Alanine, serine, and glycine (35)
- Sulfur Metabolism (5)
  - Inorganic sulfur assimilation (0)
  - Sulfur Metabolism - no subcategory (5)
  - Organic sulfur assimilation (0)
- Phosphorus Metabolism (20)
  - Phosphorus Metabolism - no subcategory (20)
- Carbohydrates (111)
  - Central carbohydrate metabolism (67)
  - Aminosugars (2)
  - Di- and oligosaccharides (2)
  - Glycoside hydrolases (0)
  - One-carbon Metabolism (4)
  - Organic acids (9)
  - Fermentation (11)
  - CO2 fixation (0)
  - Sugar alcohols (5)
  - Carbohydrates - no subcategory (1)
  - Polysaccharides (0)
  - Monosaccharides (10)

나. 유용 미생물 유전체 분석: 비교유전체 분석

◎ Comparative genomic analyses 수행을 위한 Complete genome sequence 수집

- 프로바이오틱 초산균 후보로 선정된 Acetobacter fabarum DH1801 및 Acetobacter pasteurianus MGLV 균들의 complete genome을 대상으로 comparative genomic analyses를 수행하기 위해서 아래의 데이터베이스들에서 Complete genome sequence를 획득하여 연구에 활용하였음
- PATRIC 3.6.2 Database (https://www.patricbrc.org/view/Taxonomy/2)
- 초산균의 완결성 높은 전장 유전체 시컨스가 부족한 관계로, Gluconacetobacter europaeus BBV, Lactobacillus rhamnosus GG, Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01 등의 균주와 기능 비교를 실시하였음



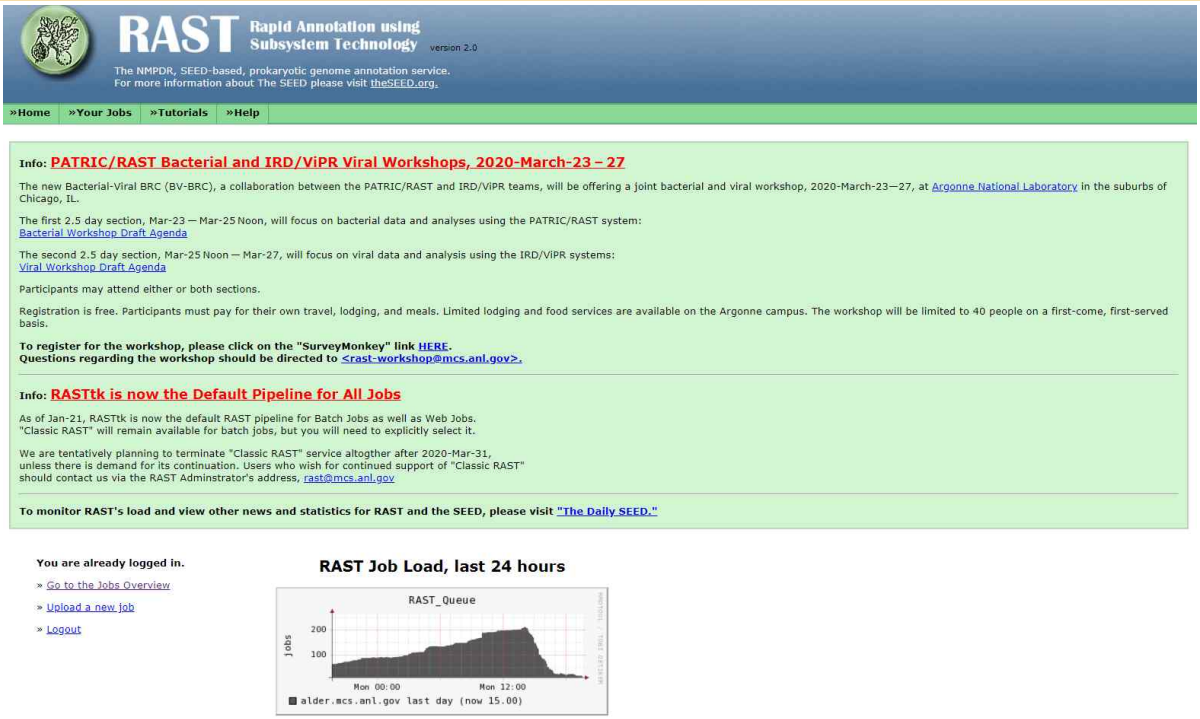
Genome Name	Genome ID	Genome Status	Contigs	PATRIC CDS	Isolation Country	Host Name	Collection Year	Completion Date
Acetobacter pasteurianus strain Ab3	438.10	Complete	1	2867	China		2013	15. 7. 21.
Acetobacter pasteurianus subsp. ascendens strain LMG 1590	481146.3	Complete	4	3243	Netherlands		1975	16. 10. 14.
Acetobacter sp. KACC 21233	2592655.3	Complete	3	3024	South Korea		2018	19. 9. 10.
Acetobacter persici strain TMW2.1084	1076596.4	Complete	2	3910	Germany			17. 2. 24.
Acetobacter tropicalis strain BDGP1	104102.17	Complete	2	4291	United States	Drosophila melanogaster Oregon-R-modENCOI	2015	17. 10. 13.
Acetobacter pomorum strain BDGP5	65959.11	Complete	4	3032	United States	Drosophila melanogaster Oregon-R modENCOI	2015	17. 10. 5.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-03	634453.3	Complete	7	3176				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-07	634454.3	Complete	7	3180				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-22	634455.3	Complete	7	3180				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-32	634457.3	Complete	7	3175				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01-42C	634458.3	Complete	7	3112				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-12	634459.3	Complete	7	3178				09. 8. 26.
Acetobacter sp. SLV-7	1633874.3	Complete	4	3191	South Korea		2014	16. 4. 22.
Acetobacter pasteurianus 386B	1266844.4	Complete	8	3013	Ghana			13. 8. 1.
Acetobacter aceti strain TMW2.1153	435.5	Complete	1	3643	Germany			17. 2. 22.
Acetobacter pasteurianus strain CICC 22516	438.60	Complete	3	3077			2016	20. 1. 22.
Acetobacter ghanensis strain LMG 23848T	431306.5	Complete	3	2946				16. 1. 3.
Acetobacter senegalensis strain 108B	446692.3	Complete	2	4162				16. 1. 3.
Acetobacter pasteurianus subsp. pasteurianus strain SRCM101	481145.3	Complete	6	3444	South Korea		2017	17. 6. 6.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01	634452.3	Complete	7	3170				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus IFO 3283-26	634456.3	Complete	7	3176				09. 8. 26.
Acetobacter pasteurianus subsp. ascendens strain SRCM10144	481146.4	Complete	4	3324	South Korea		2017	17. 6. 6.
Acetobacter pasteurianus subsp. pasteurianus strain SRCM101	481145.4	Complete	4	3470	South Korea		2017	17. 6. 20.
Acetobacter pasteurianus strain dm	438.22	Complete	1	3175	United States		2015	17. 7. 17.
Acetobacter pomorum strain SH	65959.18	Complete	3	3263	South Korea	Fruit fly, Drosophila melanogaster	2017	18. 8. 15.
Acetobacter sp. JWB	2259883.3	Complete	3	2976	South Korea	Fruit fly, Drosophila melanogaster	2016	18. 7. 16.
Acetobacter pasteurianus subsp. paradoxus strain LMG 1591	940260.3	Complete	4	3586	Netherlands		1975	16. 10. 14.
Acetobacter pasteurianus subsp. paradoxus strain LMG 1591	940260.6	Plasmid	1	38	Netherlands		1975	16. 10. 14.
Acetobacter pasteurianus strain AC2-58	438.27	Plasmid	1	34	United States			16. 7. 26.
Acetobacter ghanensis strain LMG 23848T	431306.6	Plasmid	1	21				16. 1. 3.

PATRIC database에서 조사한 결과 초산균의 서열은 241개 등록되어 있으며 그중 27개만이 complete genome sequence임. 그리고 그 26개 중에서도 17개는 A. pasteurianus 종의 CGS임.

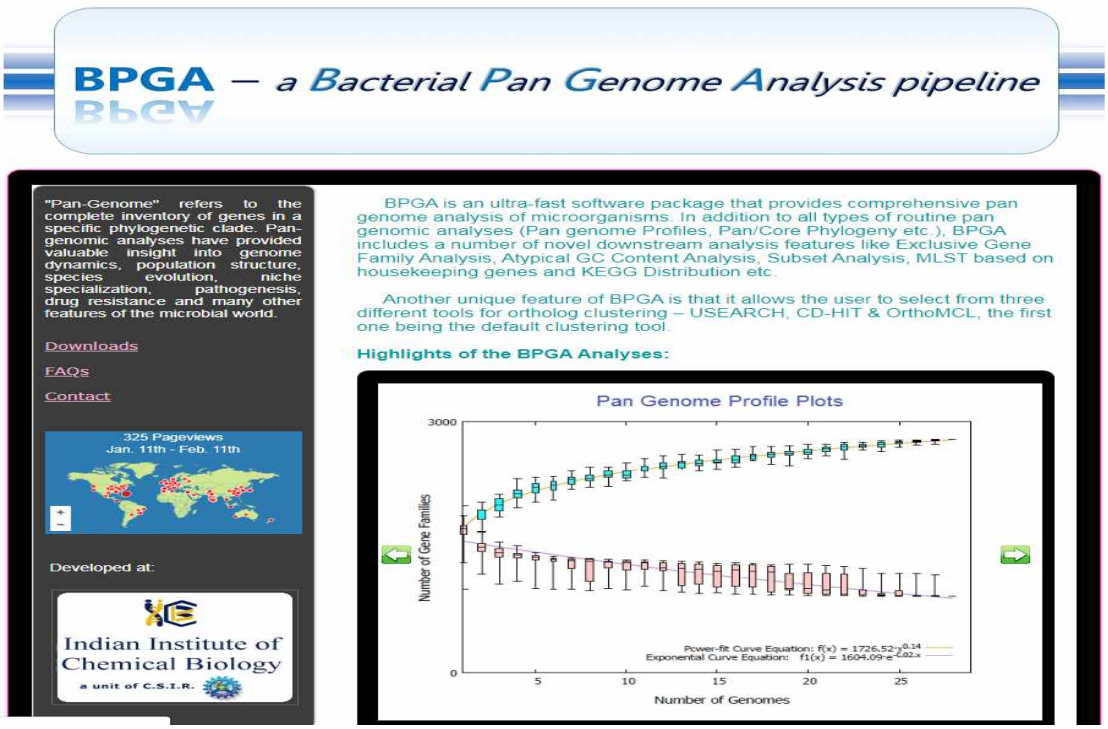
◎ Comparative genomic analyses 수행에 사용한 tool 및 databse

- 프로바이오틱 초산균 후보로 선정된 Acetobacter fabarum DH1801 및 Acetobacter pasteurianus MGLV 균들의 complete genome을 대상으로 comparative genomic analyses를 수행하기 위해서 아래의 tool 및 database를 사용하였음

<RAST server (http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi)>



BPGA tool ver 1.3 (https://iicb.res.in/bpga/index.html)>



※ Citrate cycle (TCA cycle) (From RAST using KEGG DB)

KEGG map	Distinct ECs	Acetobacter pasteurianus MGLV	Acetobacterfabarum DH1801	Gluconacetobactereuropaeus BBV	Lactobacillus rhamnosus GG	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	43	16	18	17	17	17
Arginine and proline metabolism	97	22	25	25	18	28
Ascorbate and aldarate metabolism	44	7	6	7	6	7
Citrate cycle (TCA cycle)	22	11	11	12	7	11
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	13	3	4	3	3	3
Fatty acid biosynthesis	21	8	10	8	8	8
Fatty acid elongation in mitochondria	8	0	1	0	1	0
Fatty acid metabolism	29	2	4	2	4	3
Glycolysis / Gluconeogenesis	41	18	17	20	19	18
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	58	9	10	9	10	13
Tyrosine metabolism	63	6	8	7	8	9
Valine, leucine and isoleucine degradation	34	5	5	4	5	6

※ Fatty acid metabolism (From RAST using KEGG DB)

KEGG map		Distinct ECs	Acetobacter pasteurianus MGLV	Acetobacter fabarum DH1801	Gluconacetobactereuropaeus BBV	Lactobacillus rhamnosus GG	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01
Fatty acid metabolism	Citrate cycle (TCA cycle)	22	11	11	12	7	11
	Fatty acid biosynthesis	21	8	10	8	8	8
	Fatty acid elongation in mitochondria	8	0	1	0	1	0
	Fatty acid metabolism	29	2	4	2	4	3
	Cglycerolipid metabolism	36	4	4	5	5	5
	Synthesis and degradation of ketone bodies	6	0	0	0	2	0
Fatty acid elongation	Fatty acid elongation in mitochondria	8	0	1	0	1	0
	fatty acid metabolism	29	2	4	2	4	3
fatty acid biosynthesis	Citrate cycle (TCA cycle)	22	11	11	12	7	11
	Fatty acid biosynthesis	21	8	10	8	8	8
	Fatty acid metabolism	29	2	4	2	4	3
	Pyrovate metabolism	64	20	21	20	20	23
	beta-Alanine metabolism	32	10	7	7	1	10

◎ Acetobacter genus complete genome 목록 (from PATRIC database)

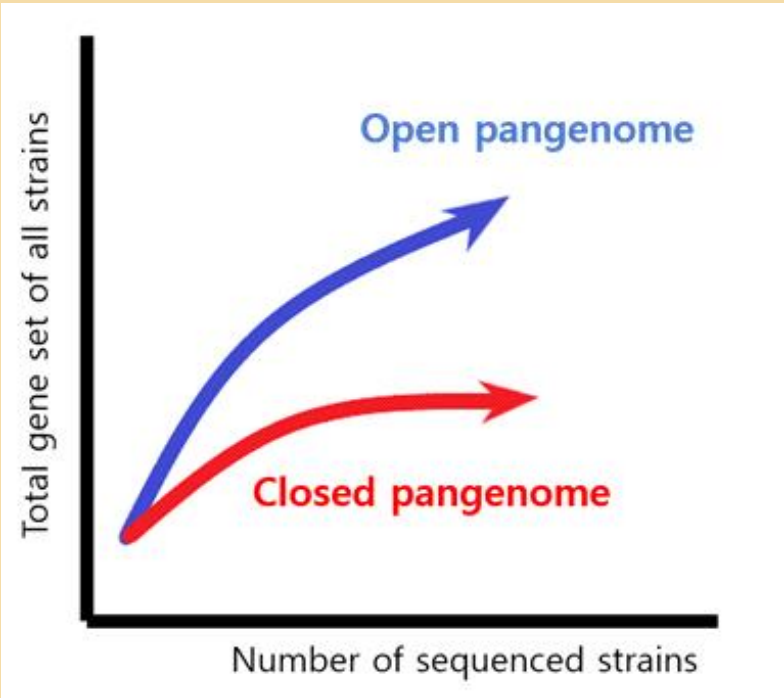
Genome ID	Genome Name	Organism Name	NCBI Taxon ID	Genome Status	Strain	Culture Collection	Type Strain	Completion Date	Publication	BioProject Accession	BioSample Accession	Assembly Accession	SRA Accession	GenBank Accessions	RefSeq Accessions
104102.2	Acetobacter tropicalis strain BDGP1		104102	Complete	BDGP1			2017-10-13T00:00:00Z		PRJNA397225	SAMN07452474	GCA_002549835.1		CP022699,CP022700	
1076596	Acetobacter persici strain TMW2.1084		1076596	Complete	TMW2.1084			2017-02-24T00:00:00Z		PRJNA311264	SAMN04396916	GCF_002006565.1		CP014687,CP014688	NZ_CP014687.1,NZ_CP014688.1
1266844	Acetobacter pasteurianus 386B	Acetobacter pasteurianus 386B	1266844	Complete	386B			2013-08-01T00:00:00Z	23902333	PRJEB1172	SAMEA3139047	GCA_000723785.1		HF677570.1,HF677575.1,HF677576.1,HF677577.1,HF677574.1,HF677572.1,HF677571.1,HF677573.1	NC_021991.1,NC_021993.1,NC_021978.1,NC_021979.1,NC_021977.1,NC_021976.1,NC_021992.1
1633874	Acetobacter sp. SLV-7		1633874	Complete	SLV-7			2016-04-22T00:00:00Z		PRJNA279108	SAMN03437041	GCF_001628715.1		CP011120,CP011121,CP011122,CP011123	NZ_CP011120.1,NZ_CP011121.1,NZ_CP011122.1,NZ_CP011123.1
2259883	Acetobacter sp. JWB		2259883	Complete	JWB			2018-07-16T00:00:00Z		PRJNA480182	SAMN09531910	GCA_003323795.1		CP030871,CP030872,CP030873	
2592655	Acetobacter sp. KACC 21233		2592655	Complete	KACC 21233	KACC: 21233		2019-09-10T00:00:00Z		PRJNA552187	SAMN12179541	GCA_008365315.1		CP043506,CP043507,CP043508	
431306.5	Acetobacter ghanensis strain LMG 23848T		431306	Complete	LMG 23848T	LMG 23848T		2016-01-03T00:00:00Z		PRJEB7123	SAMEA2738364	GCF_001499675.1		LN609302,LN609303,LN609304	
435.5	Acetobacter aceti strain TMW2.1153		435	Complete	TMW2.1153			2017-02-22T00:00:00Z		PRJNA311264	SAMN04396917	GCF_002005445.1		CP014692	NZ_CP014692.1
438.1	Acetobacter pasteurianus strain Ab3		438	Complete	Ab3	CCTCC:M2013116		2015-07-21T00:00:00Z		PRJNA242487	SAMN02709032	GCF_001183745.1		CP012111	NZ_CP012111.1
438.22	Acetobacter pasteurianus strain dm		438	Complete	dm			2017-07-17T00:00:00Z		PRJNA384998	SAMN06855882	GCA_002220195.1		CP022374	
438.6	Acetobacter pasteurianus strain CICC 22518		438	Complete	CICC 22518	CICC:22518		2020-01-22T00:00:00Z		PRJNA540194	SAMN11523864	GCA_009914215.1		CP039846,CP039845,CP039847	
446692.3	Acetobacter senegalensis strain 108B		446692	Complete	108B			2016-01-03T00:00:00Z		PRJEB7128	SAMEA2738517			LN606600,LN606601	
481145.3	Acetobacter pasteurianus subsp. pasteurianus strain SRCM101342		481145	Complete	SRCM101342			2017-06-06T00:00:00Z		PRJNA386747	SAMN07125916			CP021509,CP021510,CP021511,CP021512,CP021513,CP021514	
481145.4	Acetobacter pasteurianus subsp. pasteurianus strain SRCM101468		481145	Complete	SRCM101468			2017-06-20T00:00:00Z		PRJNA389952	SAMN07211335			CP021922,CP021923,CP021924,CP021925	
481146.3	Acetobacter pasteurianus subsp. ascendens strain LMG 1590		481146	Complete	LMG 1590	LMG:1590		2016-10-14T00:00:00Z		PRJNA317327	SAMN04605654	GCF_001766235.1		CP015164,CP015165,CP015166,CP015167	NZ_CP015164.1,NZ_CP015165.1,NZ_CP015166.1,NZ_CP015167.1
481146.4	Acetobacter pasteurianus subsp. ascendens strain SRCM101447		481146	Complete	SRCM101447			2017-06-06T00:00:00Z		PRJNA386748	SAMN07125917			CP021524,CP021525,CP021526,CP021527	
634452.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01	634452	Complete	IFO 3283-01			2009-08-26T00:00:00Z	19638423	PRJNA31129		GCA_000010825.1		AP011121,AP011122,AP011123,AP011124,AP011125,AP011126,AP011127	NC_013209,NC_013210,NC_013211,NC_013212,NC_013213,NC_013214,NC_013215
634453.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-03	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-03	634453	Complete	IFO 3283-03			2009-08-26T00:00:00Z		PRJNA31131		GCA_000010845.1		AP011128,AP011130,AP011131,AP011132,AP011133,AP011134,AP011129	NC_017100.1,NC_017101.1,NC_017118.1,NC_017119.1,NC_017142.1,NC_017120.1,NC_017109.1
634454.3	Acetobacter pasteuri	Acetobacter pasteuri	634454	Complete	IFO 3283-07			2009-08-26T00:00:00Z		PRJNA31133		GCA_000010865.1		AP011135,AP011137,AP0	NC_017121.1,NC_01714

	anus IFO 3283-07	anus IFO 3283-07								11139,AP011140,AP011141,AP011138,AP011136	3.1,NC_017122.1,NC_017110.1,NC_017123.1,NC_017144.1,NC_017124.1
634455.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-22	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-22	634455	Complete	IFO 3283-22		2009-08-26T00:00:00Z	PRJNA31135	GCA_000010885.1	AP011142,AP011144,AP011145,AP011146,AP011147,AP011148,AP011143	NC_017125.1,NC_017117.1,NC_017126.1,NC_017127.1,NC_017145.1,NC_017128.1,NC_017129.1
634456.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-26	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-26	634456	Complete	IFO 3283-26		2009-08-26T00:00:00Z	PRJNA31137	GCA_000010905.1	AP011149,AP011150,AP011151,AP011153,AP011155,AP011154,AP011152	NC_017146.1,NC_017130.1,NC_017131.1,NC_017147.1,NC_017132.1,NC_017148.1,NC_017133.1
634457.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-32	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-32	634457	Complete	IFO 3283-32		2009-08-26T00:00:00Z	PRJNA31139	GCA_000010925.1	AP011156,AP011157,AP011158,AP011159,AP011160,AP011161,AP011162	NC_017111.1,NC_017134.1,NC_017149.1,NC_017135.1,NC_017102.1,NC_017103.1,NC_017112.1
634458.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01-42C	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01-42C	634458	Complete	IFO 3283-01-42C		2009-08-26T00:00:00Z	PRJNA31141	GCA_000010945.1	AP011163,AP011164,AP011165,AP011166,AP011167,AP011168,AP011169	NC_017150.1,NC_017104.1,NC_017105.1,NC_017151.1,NC_017106.1,NC_017107.1,NC_017152.1
634459.3	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-12	Acetobacter pasteurianus IFO 3283-12	634459	Complete	IFO 3283-12		2009-08-26T00:00:00Z	PRJNA32203	GCA_000010965.1	AP011170,AP011173,AP011174,AP011175,AP011176,AP011172,AP011171	NC_017108.1,NC_017136.1,NC_017113.1,NC_017114.1,NC_017115.1,NC_017116.1,NC_017137.1
65959.11	Acetobacter pomorum strain BDGP5		65959	Complete	BDGP5		2017-10-05T00:00:00Z	PRJNA397225	SAMN07682859	GCA_002456135.1	CP023657,CP023658,CP023659,CP023660	
65959.18	Acetobacter pomorum strain SH		65959	Complete	SH		2018-08-15T00:00:00Z	PRJNA397945	SAMN07498095	GCA_003391275.1	CP023189,CP023190,CP023191	
940260.3	Acetobacter pasteurianus subsp. paradoxus strain LMG 1591		940260	Complete	LMG 1591	LMG:1591	2016-10-14T00:00:00Z	PRJNA317328	SAMN04605655	GCF_001766255.1	CP015168,CP015169,CP015170,CP015171	NZ_CP015168.1,NZ_CP015169.1,NZ_CP015170.1,NZ_CP015171.1

◎ 초산균의 Pangenome analysis 실시

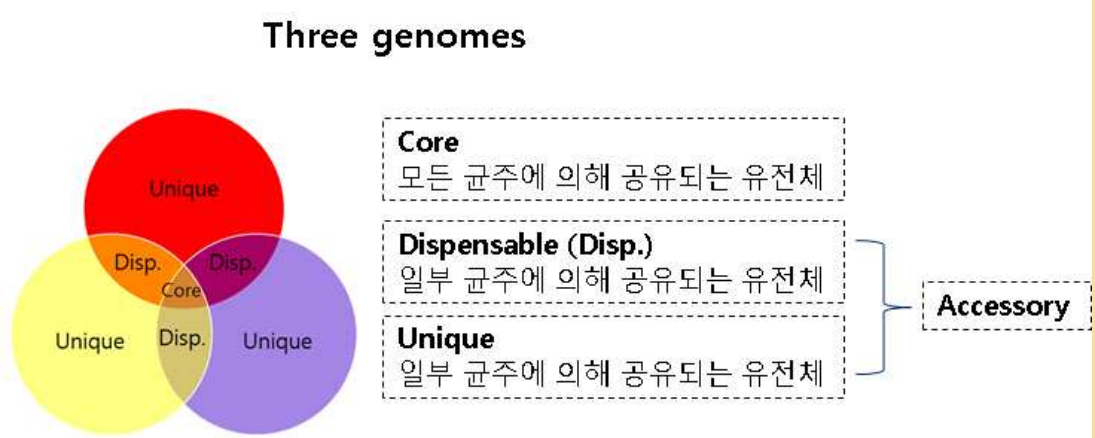
<Pangenome analysis란?>

- ❍ NGS 기술의 발달과 더불어 시퀀싱 비용 감소로 인해 discriminative power가 높은 whole genome sequencing (WGS)를 기반으로 하는 pan-genome 분석과 single nucleotide polymorphism (SNP) 분석 등을 통한 strain 동정, 병원성 분석 및 항생제 저항성 마커 분석 등의 연구들이 활발히 진행되고 있음.
- ❍ WGS 기반 분석 기술은 미생물의 일부 항원 부분 특징만을 반영하는 기존 gold-standard 분석법과 비교하여, 다양한 유전자에 대한 분석을 동시에 실시할 수 있다는 장점을 가지고 있으며, 다양한 미생물의 역학 연구와 발생 모니터링 연구에서 그 파급효과가 충분히 입증됨
- ❍ Pangenome은 Tettelin et al. (2005)에 의해 처음 개념이 발표되었으며, 한 종(species)에 속한 대부분의 개체가 보유한 총 유전체로 정의됨.
- ❍ Pan-genome은 크게 open pan-genome과 closed pan-genome으로 분류됨.
- ❍ Open pan-genome은 다양한 미생물들이 존재하는 환경에 노출된 한 미생물종이, 다른 미생물 종들로부터 새로운 유전자들을 받아들여 끊임없이 pan-genome의 수가 증가하는 경우를 의미하며, 예로 장관계에 존재하는 *E. coli*를 들 수 있음.
- ❍ Closed pan-genome은 다른 미생물종에 대한 접근이 제한된 환경에서 새로운 유전자들을 받아들이지 않고 비교적 일정한 pan-genome 수를 유지하는 경우를 의미하며, 예로는 절대혐기성균인 *B. anthracis*를 들 수 있음. (Vemikos et al., 2015)



<Open pan-genome과 closed pan-genome (Vemikos et al. 2015)>

○ Pan-genome은 species 내 모든 균주에 의해 공유되는 유전자 집합인 핵심 유전체 (core genome)과 일부 균주에 의해 공유되는 유전체 (dispensable genome) 및 특정 species에서만 확인되는 유전체 (unique genome)들의 집합인 부속 유전체 (accessory genome)으로 구성됨 (Tettelin et al. (2005).

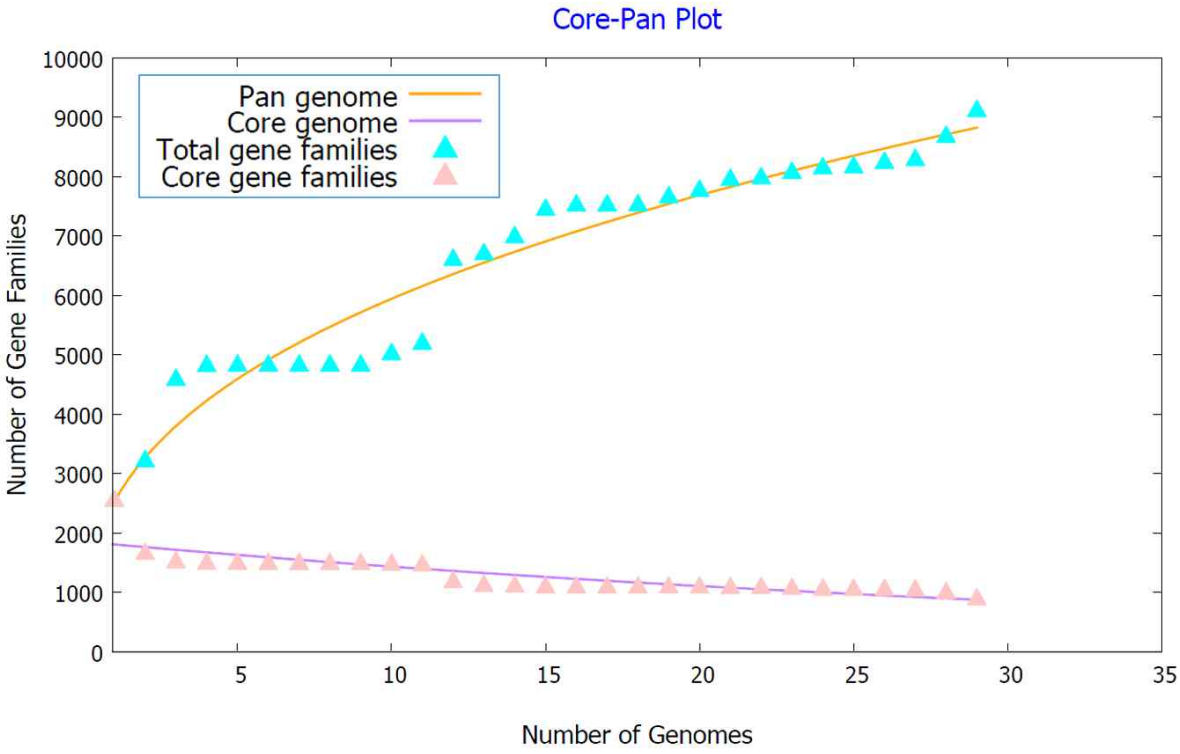


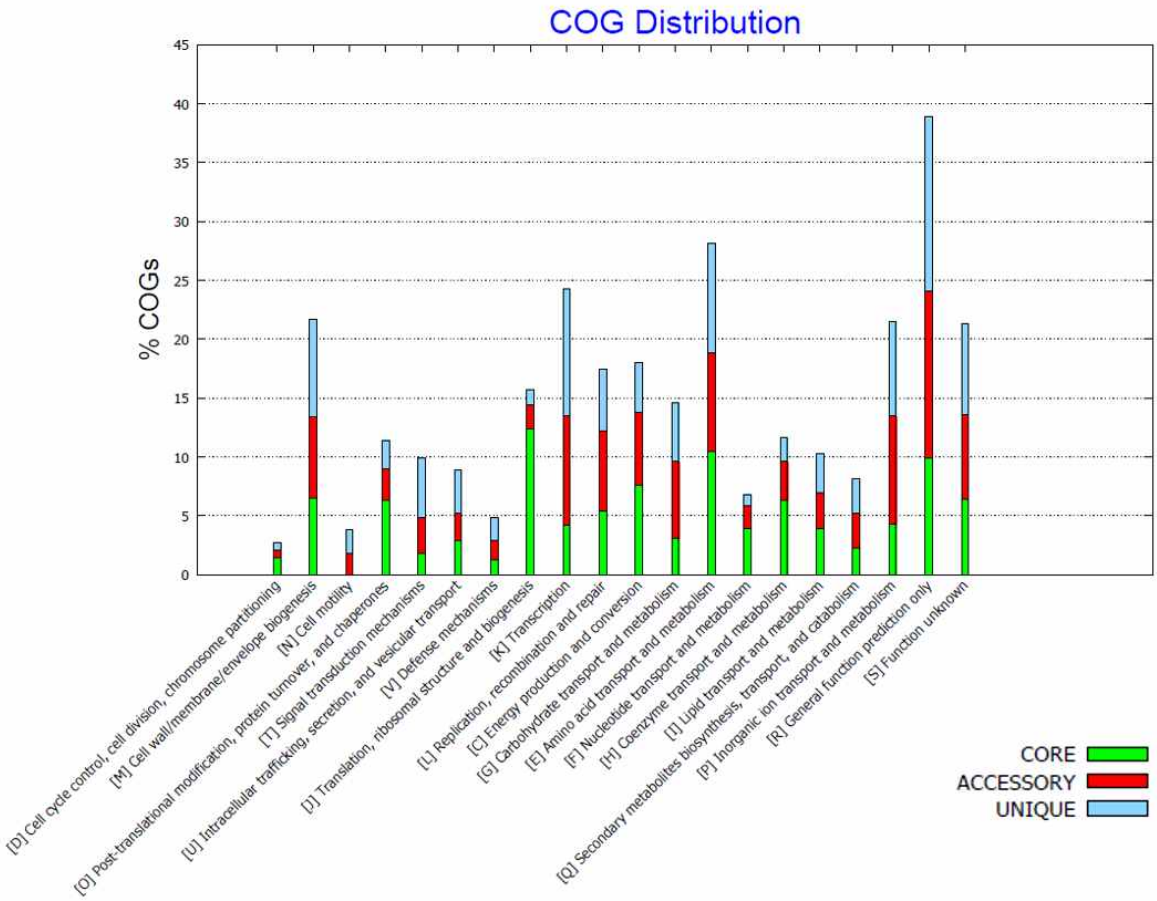
○ 일반적으로 core genome은 미생물의 기본적인 생물학적 특성과 주요 표현형 특성을 코딩하는 유전자들로 구성됨. Accessory genome은 미생물의 성장에 필수적이지는 않지만, 환경조건에서의 생존, 항생제 내성, 새로운 숙주에서의 집락화 등과 같이 생존에 영향을 줄 수 있는 부가적인 생화학적 특성을 코딩하는 유전자들로 구성됨.

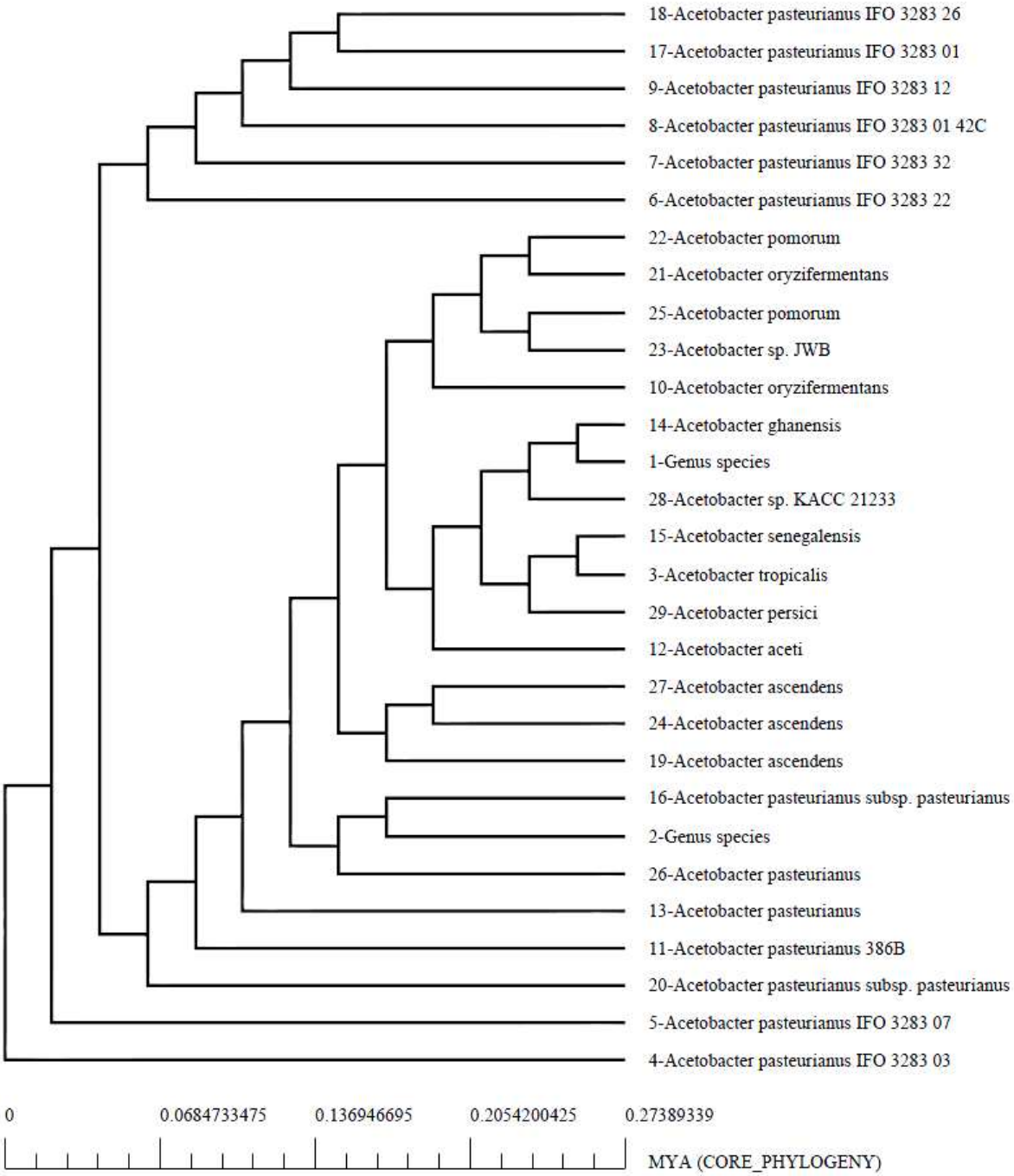
○ Accessory genome은 short repeated DNA sequence나 정상적이지 않은 G + C content로 이루어져 있는 경우가 많으며, phage나 transposon 등과 관련된 유전자 등을 포함하는 것으로 알려져 있음 (Medini et al. 2005).

○ 미생물의 다양성을 결정하는 유전체는 accessory genome로 알려짐. 따라서 Core genome에 속해있는 housekeeping gene의 variable region을 기반으로 하는 multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 분석과 multi-locus sequence typing (MLST) 분석을 이용한 미생물 혈청형 분석은, 미생물의 표면항원이나 병원성과 관련된 유전자들이 포함되어 미생물의 다양성에 영향을 미치는 accessory genome 기반 분석에 비해 혈청형 분석 정확도가 떨어지는 것이 확인됨 (Medini et al. 2005).

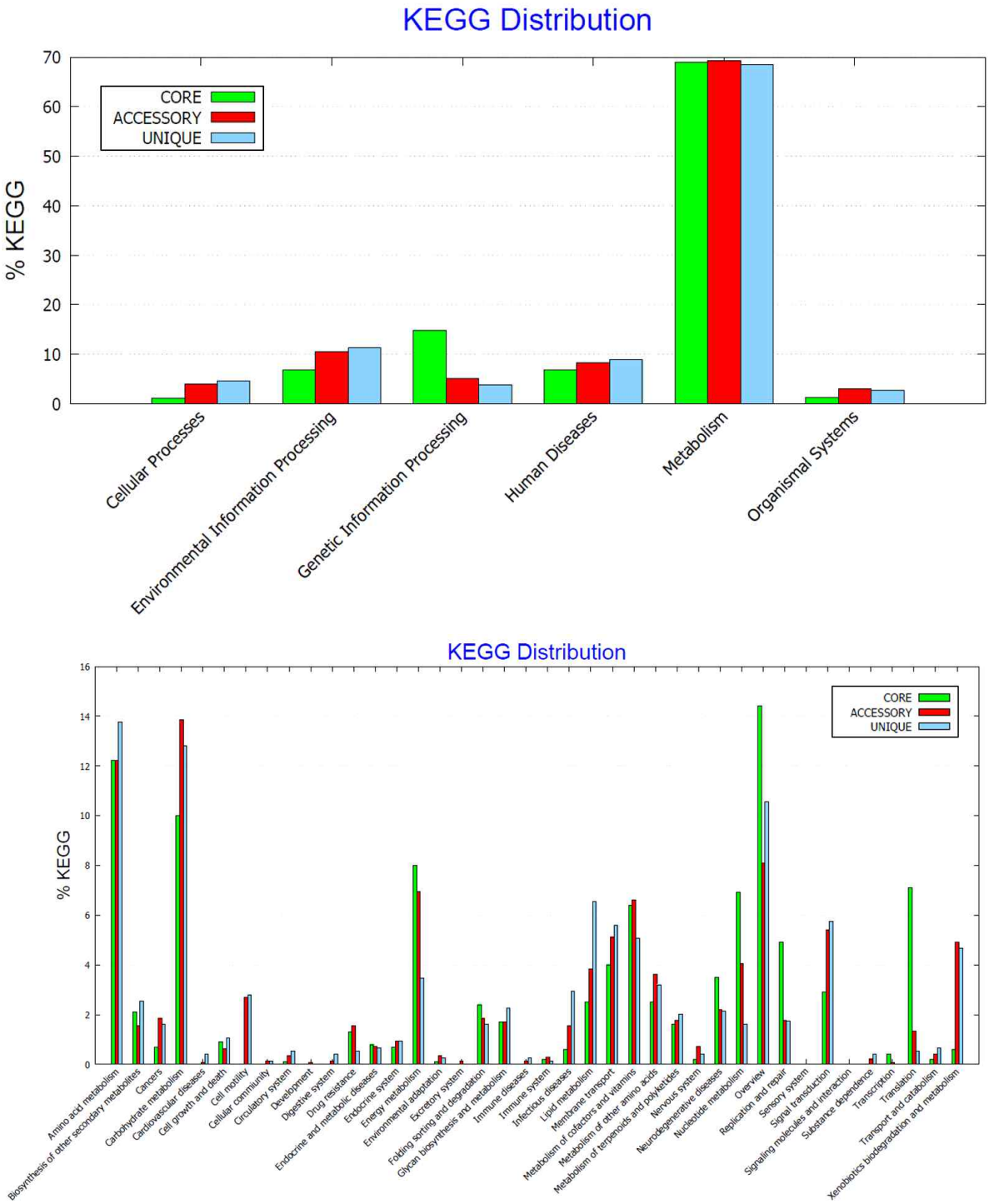
◎ Acetobacter genus의 pangenome analysis (by BPGA ver 1.3)







<Core phylogeny 로 분석한 27개의 초산균 Complete genome sequence>



<KEGG DB를 대상으로 분석한 27개의 초산균 Complete genome sequence>

◎ Acetobacter pasteurianus MGLV와 유산균주 (Lactobacillus kefiranofaciens DN1) 간의 comparative metabolomic analysis 결과 Adenine, Gluconic acid, Uridine, Uracil, Betaine, cAMP, cGMP 등의 대사체가 유산균에 비해서 더욱 풍부함을 알 수 있었음

ID	Metabolite	PubChem CID	HMDB ID	Concentration (μM)		Comparative Analysis
				Lactic acid bacteria	MGLV	MGLV vs LAB
A_0010	2-Hydroxybutyric acid	440864	HMDB0000008	N.D.	4.1	1<
A_0032	2-Oxoglutaric acid	51	HMDB0000208	72	N.D.	<1
A_0011	3-Hydroxybutyric acid	441	HMDB0000011,HMDB0000357,HMDB0000442	22	20	0.9
A_0062	3-Phosphoglyceric acid	439183	HMDB0000807	17	N.D.	<1
A_0089	6-Phosphogluconic acid	91493	HMDB0001316	N.D.	N.D.	N.A.
C_0052	Adenine	190	HMDB0000034	3.0	10	3.4
C_0114	Adenosine	60961	HMDB0000050	N.D.	255	1<
C_0009	Ala	602	HMDB0000161,HMDB0001310	4,914	5,486	1.1
A_0103	AMP	6083	HMDB0000045	14	1.5	0.11
C_0082	Arg	6322	HMDB0000517,HMDB0003416	2,488	1,224	0.5
C_0048	Asn	236	HMDB0000168,HMDB0033780	1,272	94	0.07
C_0051	Asp	424	HMDB0000191,HMDB0006483	1,367	62	0.05
C_0027	Betaine	247	HMDB0000043	1,213	1,504	1.2
A_0100	cAMP	6076	HMDB0000058	23	62	2.7
A_0102	cGMP	24316	HMDB0001314	29	47	1.6
C_0017	Choline	305	HMDB0000097	419	59	0.14
A_0051	*cis*-Aconiticacid	643757	HMDB0000072	10	7.3	0.7
A_0067	Citric acid	311	HMDB0000094	3,626	47	0.013
C_0083	Citrulline	9750	HMDB0000904	56	41	0.7

A_0098	CMP	6131	HMDB0000095	43	16	0.4
C_0045	Creatine	586	HMDB0000064	67	N.D.	<1
C_0023	Creatinine	588	HMDB0000562	183	N.D.	<1
C_0020	Cytosine	597	HMDB0000630	145	2.3	0.02
A_0045	Dihydroxyacetone phosphate	668	HMDB0001473	13	N.D.	<1
A_0097	dTMP	9700	HMDB0001227	6.6	N.D.	<1
A_0101	Fructose 1,6-diphosphate	172313	HMDB0001058	7.1	N.D.	<1
A_0085	Fructose 6-phosphate	603	HMDB0000124	51	N.D.	<1
C_0016	GABA	119	HMDB0000112	311	74	0.2
C_0061	Gln	738	HMDB0000641,HMDB0003423	314	29	0.09
C_0063	Glu	611	HMDB0000148,HMDB0003339	5,939	4,943	0.8
A_0071	Gluconic acid	10690	HMDB0000625	90	26,121	292
A_0086	Glucose 1-phosphate	65533	HMDB0001586	18	N.D.	<1
A_0087	Glucose 6-phosphate	5958	HMDB0001401	56	2.3	0.04
C_0123	Glutathione (GSSG)_divalent	65359		3.6	6.2	1.7
C_0004	Gly	750	HMDB0000123	2,854	1,900	0.7
A_0047	Glycerol 3-phosphate	439162	HMDB0000126	24	3.7	0.2
A_0003	Glycolic acid	757	HMDB0000115	178	331	1.9
A_0001	Glyoxylic acid	760	HMDB0000119	11	N.D.	<1
A_0106	GMP	6804	HMDB0001397	5.6	N.D.	<1
C_0068	Guanine	764	HMDB0000132	156	6.3	0.04
C_0069	His	773	HMDB0000177	675	365	0.5
C_0029	Homoserine	12647	HMDB0000719	22	21	0.9
C_0044	Hydroxyproline	5810	HMDB0000725	19	N.D.	<1
C_0053	Hypoxanthine	790	HMDB0000157	318	16	0.05
C_0046	Ile	791	HMDB0000172	2,242	1,996	0.9
A_0068	Isocitric acid	1198	HMDB0000193	24	N.D.	<1
A_0007	Lactic acid	612	HMDB0000190,HMDB0001311	119,565	N.D.	<1

C_0047	Leu	857	HMDB0000687	4,812	3,045	0.6
C_0062	Lys	866	HMDB0000182,HMDB0003405	3,337	2,030	0.6
A_0025	Malic acid	525	HMDB0000156,HMDB0000744	161	15	0.09
C_0067	Met	876	HMDB0000696	1,089	85	0.08
C_0050	Ornithine	389	HMDB0000214,HMDB0003374	243	195	0.8
C_0076	Phe	994	HMDB0000159	2,614	1,663	0.6
C_0025	Pro	614	HMDB0000162,HMDB0003411	1,948	536	0.3
C_0008	Putrescine	1045	HMDB0001414	4.3	N.D.	<1
A_0004	Pyruvic acid	1060	HMDB0000243	1,072	N.D.	<1
A_0080	Ribulose 5-phosphate	439184	HMDB0000618	5.4	N.D.	<1
C_0010	Sarcosine	1088	HMDB0000271	4.9	N.D.	<1
C_0018	Ser	617	HMDB0000187,HMDB0003406	3,070	2,309	0.8
C_0060	Spermidine	1102	HMDB0001257	12	3.0	0.2
C_0095	Spermine	1103	HMDB0001256	13	N.D.	<1
A_0017	Succinic acid	1110	HMDB0000254	5,984	104	0.02
C_0028	Thr	6288	HMDB0000167	2,049	1,686	0.8
C_0096	Trp	1148	HMDB0000929	508	102	0.2
C_0087	Tyr	1153	HMDB0000158	1,053	274	0.3
C_0057	Tyramine	5610	HMDB0000306	2.4	N.D.	<1
A_0099	UMP	6030	HMDB0000288	12	2.6	0.2
C_0022	Uracil	1174	HMDB0000300	49	62	1.3
C_0109	Uridine	6029	HMDB0000296	53	108	2.0
C_0026	Val	1182	HMDB0000883	3,068	2,535	0.8
C_0011	β-Ala	239	HMDB0000056	12	9.9	0.9

3) 발굴 미생물 자원의 whole genome sequencing

① 유용 효모 및 초산균의 고품질 참조유전체 확립

② 확보된 고품질 참조 유전체의 genome DB 등록

- 우수 균주의 고품질 참조유전체의 NABIC, iGEM등 DB 등록: 초산균 참조유전체 DB화

< *Acetobacter pasteurianus* MGLV >

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Dong-Hyeon Kim
Room #321-1, Dept. of Veterinary Med., Konkuk University,
120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, Republic of Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR: *Acetobacter pasteurianus* MGLV

Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12600P

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:
☐ a scientific description
☐ a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on October. 02. 2019 (date of the original deposit).[1]

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name : Korean Culture Center of Microorganisms
Address : Yurim B/D
45, Hongjenae-2ga-gil
Seodaemun-gu
SEOUL 03641
Republic of Korea

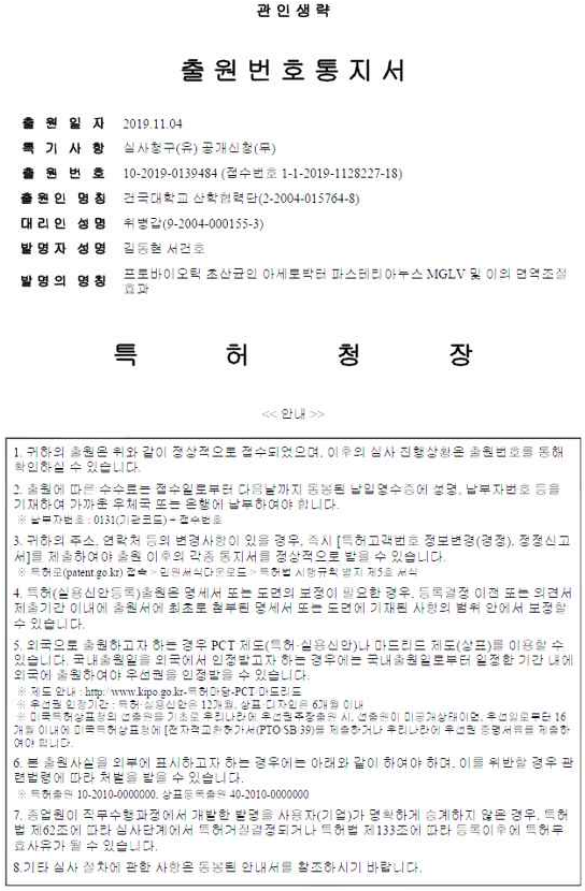
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):

Date: October. 02. 2019

[1] Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터 KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS



관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2019.11.04
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2019-0139484 (접수번호 1-1-2019-1128227-18)
출 원 인 명 칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대 리 인 성 명 위병갑(9-2004-000155-3)
발 명 자 성 명 김동현 서건호
발 명 의 명 칭 프로바이오틱 초산균인 아세토박터 파스테리아누스 MGLV 및 이의 면역조절 효과

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통지된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소 · 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 → 민원서식다운로드 → 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국어 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허/실용-PCT·마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 연출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 연출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자출원증거서(PTO-SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

< *Acetobacter fabarum* DH1801 >

작성일 19-12-13 15:58

- **Experiment 정보 [No.1400]**

Experiment 명	Whole genome sequence of Acetobacter fabarum DH1801		
대상 샘플명	Acetobacter fabarum DH180 (No.1538)		
상세 설명	PacBio platform를 이용해 얻은 Acetobacter fabarum DH1801의 whole genome sequence read		
생물정보	NGS_SRA 〉 Genome_Sequencing 〉 de novo		
성과지표	유용유전자원확보		
Platform	PacBio RS II (78)		
Experiment design	Acetobacter fabarum DH1801		
Library name	Acetobacter fabarum DH1801		
Strategy	WGS	Source	GENOMIC
Selection	RANDOM	Layout	paired_read
Insert Size			
Nomial Size	700		
Nominal Standard Deviation			
NABIC 등록번호			

< *Kluyveromyces marxianus* A5 >

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Kun-Ho Seo, Dong-Hyeon Kim
Room #504, Dept. of Veterinary Med.,
Konkuk University,
120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul,
Republic of Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

Ⅰ. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR: *Kluyveromyces marxianus* A5	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12598P

Ⅱ. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:
☐ a scientific description
☐ a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

Ⅲ. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on October. 02. 2019 (date of the original deposit).[1]

Ⅳ. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).

Ⅴ. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: October. 02. 2019.

[1] Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터
KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2019.11.04
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2019-0139483 (접수번호 1-1-2019-1128226-62)
출원인 명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인 성명 위병갑(9-2004-000155-3)
발명자 성명 김동현 서건호 배동렬
발명의 명칭 케피어 유래 프로바이오틱 효모 클루이베로미세스 막시아누스 A5 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO SB 39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.

8.기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

❖ **최종 연구 목표**

○ NGS 분석기술을 활용하여 우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 군집을 효율적으로 프로파일링하고, 농축산분야 유용 probiotics 자원을 탐색 및 발굴하고자 함

❖ **연구 세부 목표**

1. 우리나라 자연발효식품 수집
2. 효모 및 초산균 군집 스크리닝 및 프로파일링
3. 유용 효모 및 초산균 분리 및 확보
4. 신규 유용 효모 및 초산균 자원의 probiotic function 확인
5. 신규 유용 효모 및 초산균 자원의 Whole genome sequencing 분석을 통한 genome mapping 및 comparative genomic analysis
5. 국내외 미생물자원 기탁 및 지적재산권 확보를 통한 국내 고유종 생물자원 확보

3-2. 목표 달성여부 (정성적, 정량적)

<연구 목표의 정성적 달성 여부>

구분(연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
1차년도(2018)	우리나라 자연발효식품 내 유용 효모 및 초산균 발굴 및 유전체 분석	국내 자연발효식품 수집 및 확보	우리나라 자연발효식품과 식품 원료 등의 시료를 중심으로 샘플링함	• 총 74개의 자연발효식품을 샘플링함 (김치 15, 과일 21, 식초 28, 젓갈 4, 절임 4, 기타 2)	100%
			자연발효식품의 lab-scale제조를 통한 미생물 발굴	• 막걸리식초를 제조함 • 케피어발효유를 제조함	100%
		자연발효식품 내 효모 및 초산균 군집 탐색 및 프로파일링	자연발효식품에서 Long-read NGS sequencing을 활용한 16S community analysis 실시	• 자연발효식초 메타지놈 16S community analysis data 확보	100%
				• 케피어 메타지놈 16S 및 ITS community analysis data 확보	100%
		효모 및 초산균 선택적 분리 플랫폼 개발	초산균 군집 신속탐지 기법 개발	• 초산균 군집 신속탐지를 위한 real-time PCR기법 개발	100%
			초산균 선택적 분리배양법 개발	• 초산균 선택적 분리배양을 위한 신규 선택배지 개발	100%

2차 년도 (2019)	유용 효모 및 초산균 분리 및 probiotic function screening	효모 및 초산균의 *in vitro*위장관 생존성 기반 스크리닝	Simluated GIT environment 에서의 생존성 확인	• 효모 5주, 초산균 8주의 simluated GIT environment 에서의 생존성 확인 • 효모 1주 (*Kluyveromycesmarxianus* A5) • 초산균 2주 (*Acetobacterpasteurianus* DHMV3706, *Acetobacterfabarum* DH1801) 선발	100%
		효모 및 초산균의 *in vitro*숙주 안전성 기반 스크리닝	Hemolysis, growth on blood agar 기반숙주 안전성 스크리닝	• Hemolysis, growth on blood agar 기반숙주 안전성 스크리닝 • 효모 및 초산균 총 13주 중 13주 *in vitro*숙주 안전성 확인	100%
		효모 및 초산균의 *in vitro* 및 *in vivo* 기능성 기반 스크리닝	*In vivo* function and safety	• *in vitro* microbial interaction (positive &negative) • *In vivo* gut microbiota modulation	100%
	유용 효모 및 초산균의 WGS 분석을 통한 genome mapping 및 comparative genomic analysis	유용 초산균의 complete genome assembly	Short- and long-read Hybrid *de novo*mapping	• Short- and long-read Hybrid *de novo*mapping • 신규 probiotic AAB 2주에 대한 고품질 참조 유전체 확보	100%
		Comparative genomic analysis	Comparative genomics (KEGG-based functional comparison)	• Comparative genomics (KEGG-based functional comparison)	100%
		Comparative metabolimics	대사체 프로파일링을 통한 comparative metabolimics	• 선별된 유용 초산균 1주와 기존 유산균 프로바이오틱스 1주와의 대사체 비교	100%
	유용 효모 및 초산균 확보 및 미생물자원 기탁	유용 효모 및 초산균의 고품질 참조유전체 확립	미생물 일반기탁 미생물 국제 특허 기탁	• KCCM일반기탁5건 • KCCM 국제 특허 기탁 3건 (유산균 1건, 초산균 1건, 효모 1건)	100%
		확보된 고품질 참조 유전체의 genome DB등록	iGEM DB 업로드	• iGEM DB 업로드 5건 (CGS 2건, metagenome 2건)	100%

<연구 목표의 정량적 달성 여부>

가. 연구개발 성과

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보완성	미생물 병발생 기작규명	균주 기탁
1 단계 목표	1차 년도 목표		1		0		0				0
	2차 년도 목표		1		1		1				0
2 단계 목표	3차 년도 목표										
	4차 년도 목표										
최종목표			2		1		1				0
달성			3		2		5				7

◎ 유용유전자원 확보 (3건)

- ✓ 발효유로부터 분리한 Lactobacillus kefiri의 complete genome
- ✓ Whole genome sequence of Acetobacter pasteurianus MGLV
- ✓ Whole genome sequence of Acetobacter fabarum DH1801

◎ 메타지놈 분석 (2건)

- ✓ Acetobacter fabarum DH1801을 섭취한 마우스의 장내미생물총
- ✓ 자연발효식초 메타유전체

◎ NABIC 등록 (5건, iGEM등록)

- ✓ 발효유로부터 분리한 Lactobacillus kefiri의 complete genome
- ✓ Whole genome sequence of Acetobacter pasteurianus MGLV
- ✓ Whole genome sequence of Acetobacter fabarum DH1801
- ✓ Acetobacter fabarum DH1801을 섭취한 마우스의 장내미생물총
- ✓ 자연발효식초 메타유전체

◎ 균주기탁 (특허기탁 2건, 일반기탁 5건)

☑ 특허 기탁 2건

✓ Acetobacter pasteurianus MGLV KCCM12600P

✓ Kluyveromyces marxianus A5 KCCM12598P

☑ 일반 기탁 5건

✓ Gluconacetobacter europaeus DHBV3701 KCCM43323

✓ Gluconacetobacter europaeus DHBR3702 KCCM43324

✓ Gluconacetobacter kakiaceti DHPV3703 KCCM43325

✓ Gluconacetobacter frateurii DHKC3704 KCCM43326

✓ Gluconacetobacter cibinongensis DHGJ3705 KCCM43327

<연구 목표의 정량적 달성 여부 (계속)>

나. 기타 성과목표

성과목표		사업화지표											연구기반지표								
		지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		-	-		-										-	-					
1차년도	목표	0	0		0								1		1.0	1					
	실적	2	0		0								2		3.6	1					
2차년도	목표	1	0		1								1		1.0	1					
	실적	3	0		1	3							2		3.0	4					
총계	목표	1	0		1								2		1.0	2					
	실적	5	0		1	3							4		3.2	5					

◎ 지적재산권 (5건)

특허 / 산업재산권

No	출원등록명	출원등록번호	산업재산권종류	출원등록일
1	초산균의 선택 배양용 배지 조성물	10-2018-0112985	특허	2018-09-20
2	실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 초산균의...	10-2018-0135252	특허	2018-11-06
3	실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 프로바이...	10-2019-0123666	특허	2019-10-07
4	프로바이오틱 초산균인 아세토박터 파스테리...	10-2019-0139484	특허	2019-11-04
5	케피어 유래 프로바이오틱 효모 클루이베로...	10-2019-0139483	특허	2019-11-04

◎ 기술실시 (1건)

기술실시

등록

No	기술명	실시기관	기술실시일	기술실시권 유형	유무상여부	기술유형
1	초산균의 선택 배양용 배지 조성...	(주)센서젠	2019-12-03	통상실시권	유상	특허출원

◎ SCI급 논문 (4건)

논문

등록 | 이전등록자료

No	논문명	학술대회개최국	학술지 출판일자	SCI구분	검증기확인	승인여부
1	Development of a real-time PCR assay for...		2019-01-02	SCI	확인	등록
2	Development of a novel selective medium ...		2019-06-01	SCI	확인	등록
3	Biochemical characteristics, virulence t...		2019-02-01	SCI	확인	등록
4	Modulation of the intestinal microbiota ...		2019-02-01	SCI	확인	등록

◎ 학술발표 (5건)

학술대회 발표

등록

No	발표자	발표제목	발표일시	장소/국명	승인여부
1	김동현	Antimicrobial activity of Acetobacter fa...	2018-10-12	전라남도 여수	등록
2	김동현	Genome Structure of Acetic Acid Bacteria...	2019-11-07	경상북도 경주	등록
3	김동현	Evaluation of Probiotic Potential of Ace...	2019-11-07	경상북도 경주	등록
4	김동현	Antimicrobial activity of probiotic kefi...	2019-11-07	경상북도 경주	등록
5	김동현	Evaluation of Kluyveromyces marxianus st...	2019-11-07	경상북도 경주	등록

❍ 본 연구팀은 과제를 수행하며 특허 출원 5건, 기술이전 1건, SCI급 논문 4건, 학술발표 5건, NABIC 메타지놈 및 유전체 기탁 5건, 미생물일반기탁 6건, 미생물특허기탁 2건 등의 성과를 창출하며 **당초 정량 성과 목표를 전 항목에서 초과 달성**하였다.

❍ 또한, 계획한 최종 연구 내용 및 세부 연구 내용을 변경 없이 모두 성실히 수행함으로써, **정성적 측면에서도 최종 및 세부 연구 목표를 모두 충실히 달성**하였다.

❍ 우리나라 자연발효식품으로부터 초산균만을 선택적으로 분리해내기 위한 신규 배양 배지를 개발하여 JCR 기준 상위 Impact factor 상위 10% 이내 저널인 Food control지에 논문을 게재하고 (Kim et al. 2019, Food Control, 106, 106707), 이에 대한 지적 재산권을 확보하고 (출원번호: 10-2018-0112985), 이를 산업체에 기술이전하였다 (유상이전, 통상실시권).

❍ 또한, 식품 기질로부터 신속하게 초산균 군집을 스크리닝할 수 있는 프로브 검출법에 대해서도 상위 10% 이내 저널인 Food control지에 논문을 게재할 뿐 아니라 (Kim et al. 2019, Food Control, 100, 78-82.) 특허를 출원했다. (출원번호: 10-2018-0135252).

❍ 한편, NGS 기술을 활용하여 자연발효식품인 케피어 발효유의 미생물총을 분석하고, 이로부터 유용 초산균을 발굴한 결과를 SCI저널 Journal of Food Safety지에 게재하였다 (Kim et al. 2019).

❍ 또한, 자연발효식품 케피어 발효유로부터 분리한 *Kluyveromyces marxianus* A5 효모의 양계 산업용 프로바이오틱스 기능성을 평가하여 균주 특허 기탁을 실시하고 (KCCM12598P), 해당 발명 내용을 특허 출원하였다 (출원번호: 10-2019-0139483)

❍ 마지막으로, 자연발효식초에서 분리한 초산균 *Acetobacter pasteurianus* MGLV의 프로바이오틱스로의 개발 가능성을 확인하여 본 균주에 대한 국제 균주 특허 기탁 (KCCM12600P)을 실시하고 해당 균주에 대한 지적 재산권을 확보하였다 (출원번호: 10-2019-0139484).

❍ 상기 연구 과정에서 분리한 초산균의 유전체 및 자연발효식품들의 메타지놈 시컨스 데이터를 iGEM 데이터베이스에 총 5건 업로드하였다.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당사항 없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

◎ 연구성과의 활용분야 및 활용방안

- 국제적 관심이 높아지고 있는 자연발효식품 유래 신규 유용 미생물 자원 (효모 및 초산균) 선제적 확보를 통한 국제 산업 경쟁력 확보
- 우리나라 자연발효식품 유래 유용 효모 및 초산균 확보를 통한 국내 농축산 분야 산업화 및 산업 원천 자원 확보
- 첨단 기술을 적용한 신규 유용 미생물 발굴 프로토콜 제시를 통한 관련 학술 분야 선도
- 신규 기능성 미생물 유전체 정보 등록을 통한 표준화된 고품질 참조유전체 정보 제시

◎ 연구성과 활용실적 및 계획

- 본 연구팀은 과제를 수행하며 특허 출원 5건, SCI급 논문 4건, 학술발표 5건 등의 성과를 창출하였다. 이 중 1건의 특허 출원을 산업체로 기술이전하였으며, 메타지놈 데이터 및 전장참조유전체 데이터 5건을 업로드하였다.
- 향후 출원한 특허들을 등록이 되도록 출원서 보완 및 심사청구 등을 진행할 예정이다. 또한, 초산균주 프로바이오틱스 선정 연구 내용을 정리하여 논문화하고자 계획 중이다. 즉, 특허 등록 및 논문 게재 등을 통해 연구성과를 활용할 것이다.
- 또한, 초산균의 선택 배양용 배지 조성물 성과에서 유관 기업으로 기술이전을 실시 한 것과 관련하여 연구결과의 사업화와 관련하여 추가 연구(생배지 제조 및 품질 관리 기법 확립: positive and negative reference strains을 통한 성능 검증)를 계획 중이다.
- 본 연구에서 분리한 유용 균주에 대하여 기존 균주(authentic strain)와의 상동성 test 및 probiotics로서의 생존율에 대하여 GRAS균주와의 비교 연구가 이루어지면 좋을 것이다.

붙임. 참고문헌

- Rarefaction curve analysis, https://ncgas.org/Blog_Posts/Rarefaction%20curves.php
- QIIME2, https://docs.qiime2.org/2019.10/tutorials/overview/
- Difference between alpha, beta and gamma diversity, Source: https://en.wikiversity.org/wiki/Biodiversity/Introduction#/media/File:Biodiversity.png
- Colwell, R. K. (2009). Biodiversity: concepts, patterns, and measurement. The Princeton guide to ecology, 663, 257-263.
- Marzano M, Fosso B, Manzari C, Grieco F, Intranuovo M, Cozzi G, et al. (2016) Complexity and Dynamics of the Winemaking Bacterial Communities in Berries, Musts, and Wines from Apulian Grape Cultivars through Time and Space. PLoS ONE 11(6): e0157383. doi:10.1371/journal.pone.0157383
- Segata et al.: Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biology 2011 12: R60.
- Beta diversity, http://www.metagenomics.wiki/pdf/definition/alpha-beta-diversity
- EZBioCloud, Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., et al. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67, 1613-1617. doi: 10.1099/ijsem.0. 001755
- EZBioCloud homepage, https://www.ezbiocloud.net/apps
- RAST SEED viewer, Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Meyer, F. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC genomics, 9(1), 75.
- RAST server: http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi
- PATRIC 3.6.2 Database (https://www.patricbrc.org/view/Taxonomy/2)
- BPGA tool, https://iicb.res.in/bpga/index.html
- Tettelin et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: implications for the microbial “pan-genome”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005
- Vernikos et al., Ten years of pan-genome analyses, Current Opinion in Microbiology, 2015
- Medini et al. The microbial pan-genome. Current Opinion in Genetics & Development. 2005
- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., & Dutta, C. (2016). BPGA-an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. Scientific reports, 6(1), 1-10.
- Adam, A. C., M. Rubio-Texeira, and J. Polaina. 2005. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44:553-557. http://dx.doi.org/10.1080/10408690490931411.
- Cirigliano, M. C. (1982). A selective medium for the isolation and differentiation of Gluconobacter and Acetobacter. Journal of Food Science, 47(3), 1038-1039.

- Czerucka, D., T. Piche, and P. Rampal. 2007. Yeast as probiotics-Saccharomyces boulardii. Aliment. Pharmacol. Ther. 26:767-778. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., &Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of Gluconobacter strains. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(3), 233-242.
- Fonseca, G. G., E. Heinzle, C. Wittmann, and A. K. Gombert. 2008. The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79:339-354. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6.
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., &Guillamón, J. M. (2006). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. FEMS Microbiology Letters, 254(1), 123-128.
- Groeneveld, P., A. H. Stouthamer, and H. V. Westerhoff. 2009. Super life-how and why 'cell selection' leads to the fastest-growing eukaryote. FEBS J. 276:254-270. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06778.x.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., &Khosroushahi, A. Y. (2015). Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. LWT-food Science and Technology, 60(2),
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A., &Yari Khosroushahi, A. (2015). Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. International Journal of Food Science &Technology, 50(4), 1056-1064.
- Kim, D. H., D. Bae, and K. H. Seo. 2019. Probiotic yeast Kluyveromyces marxianus A5 from kefir and uses thereof. Korea Patent No. 10-2019-0139483.
- Kim, D. H., D. Jeong, I. B. Kang, H. Kim, K. Y. Song, and K. H. Seo. 2017. Dual function of Lactobacillus kefiri DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR-α in adipose tissue. Mol. Nutr. Food Res. 61:1700252. https://doi.org/10.1002/mnfr.201700252.
- Kim, D. H., D. Jeong, I. B. Kang, H. Kim, K. Y. Song, and K. H. Seo. 2017. Dual function of Lactobacillus kefiri DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR-α in adipose tissue. Mol. Nutr. Food Res. 61:1700252. https://doi.org/10.1002/mnfr.201700252.
- Lim, H. W., D. H. Kim, D. Jeong, I. B. Kang, H. Kim, and K. H. Seo. 2019. Biochemical characteristics, virulence traits and antifungal resistance of two major yeast species isolated from kefir: Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces unisporus. Int. J. Dairy Technol. 72:275-281. http://dx.doi.org/10.1111/1471-0307.12582.

- Lynch, K. M., Zannini, E., Wilkinson, S., Daenen, L., &Arendt, E. K. (2019). Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(3), 587-625.
- M. J., Mas, A., &Bartowsky, E. J. (2014). Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. International journal of food microbiology, 178, 98-106.
- Renko, S., Soni, S., &Dey, G. (2014). Perspectives on global fermented foods. British Food Journal.
- Rima, H., L. Steve, and F. Ismail. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Front. Microbiol. 3:421. https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2012.00421.
- Sengun, I. Y., &Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. Food control, 22(5), 647-656.
- Simova, E., D. Beshkova, A. Angelov, T. Hristozova, G. Frengova, and Z. Spasov. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28:1-6. http://dx.doi.org/10.1038/sj/jim/7000186.
- Song, M., Yun, B., Moon, J. H., Park, D. J., Lim, K., &Oh, S. (2015). Characterization of selected Lactobacillus strains for use as probiotics. Korean journal for food science of animal resources, 35(4), 551.
- Todd, J. M. and L. L. Powell. 2007. Xylitol intoxication associated with fulminant hepatic failure in a dog. J. Vet. Emerg. Crit. Care 17:286-289. http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00243.x
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M., &Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. Food Microbiology, 27(2), 257-265.
- You, S. J., J. K. Cho, C. G. Ha, C. H. Kim, and K. C. Heo. 2006. Probiotic properties of the Candida kefyr isolated from kefir. Journal of Animal Science and Technology. 48:307-314. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2006017459.