



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

락토바실러스속 유산균의 분리 및
산업용 생물소재화 연구

제주대학교 대학원

식품공학과

김 경 민

2021년 8월

락토바실러스속 유산균의 분리 및 산업용 생물소재화 연구

지도교수 고영환

김경민

이 논문을 식품공학 박사학위 논문으로 제출함

2021년 8월

김경민의 식품공학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장	박은진	印
위 원	김정섭	印
위 원	임상빈	印
위 원	현창구	印
위 원	고영환	印

제주대학교 대학원

2021년 8월

Isolation of lactobacilli and their utilization as industrial biomaterials

Kyung-Min Kim

(Supervised by professor Young Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Engineering

2021. 08.

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Eun-Jin Park, Prof. of Food Science and Engineering

Jung-Sup Kim, Prof. of Molecular Biotechnology

Sang-Bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering

Chang-Gu Hyun, Prof. of Chemistry & Cosmetics

Young Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering

August 2021

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	1
List of Tables	4
List of Figures	5
I. 서 론	8
II. 제 1장 <i>Gluconacetobacter</i> sp.를 이용한 bacterial cellulose 생산 에 초산농도 및 <i>Lactobacillus</i> 혼합배양이 미치는 영향	15
1. 재료 및 방법	16
1) 사용균주 및 전 배양액의 제조	16
2) 단독배양 및 혼합배양	16
3) 배양 균수 측정	17
4) pH 및 총산도 측정	17
5) bacterial cellulose 생성량의 측정	17
6) 통계처리	19
2. 결과 및 고찰	20
1) 유산균의 동정	20
2) 전 배양액의 균수 측정	20
3) 배양 일수 별 pH 및 bacterial cellulose 생산성 비교	20
4) 배양일 별 총산도의 변화	23
5) 배양일 별 혼합배양의 유산균 생균수 변화	26
6) 초산농도에 따른 bacterial cellulose 생산성 비교	26
3. 요약	31

Ⅲ. 제 2 장 김치에서 분리된 <i>Lactobacillus</i> 속 유산균을 활용한 청보리 발효물과 사균체의 항산화성 평가	32
1. 재료 및 방법	33
1) 원재료 및 사용 균주	33
2) 청보리 발효 및 사균체 제조방법	33
3) 유산균 복합 사균체의 나노화	36
4) 사균체의 영상 분석	37
5) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 라디칼 소거 활성	37
6) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation 라디칼 소거 활성	38
7) 통계처리	38
2. 결과 및 고찰	39
1) Microfluidizer로 나노화된 청보리 발효-유산균 사균체의 주사전자현미경 영상	39
2) 유산균 3종 활용 청보리 추출발효물의 DPPH 및 ABTS ⁺ 라디칼 소거 활성	39
3) 나노화된 복합 사균체의 ABTS ⁺ 라디칼 소거활성 평가	42
3. 요약	45

IV. 제 3장	마이크로바이옴 분석을 통한 피부유산균 조사 및 유산균 세포의 소포체의 항염 활성 평가	46
1. 재료 및 방법		47
1) 연령 및 피부타입 별 마이크로바이옴 분석		47
2) 피부유래 유산균의 분리 및 동정		47
3) 피부유래 유산균을 활용한 발효소재의 항산화성 평가		47
4) 유산균 세포의 소포체의 분리		48
5) 유산균 세포의 소포체의 항염 활성 평가		49
6) 유산균 세포의 소포체의 염증성 사이토카인 생성억제 효과		49
7) 통계처리		49
2. 결과 및 고찰		50
1) 연령 및 피부타입 별 마이크로바이옴 분석		50
2) 피부유래 유산균 동정		65
3) 유아 피부유래 유산균을 활용한 천연발효소재의 항산화성 평가		65
4) 유산균 세포의 소포체의 세포생존율 및 Nitric oxide 생성 억제 효과		76
5) 유산균 세포의 소포체의 염증성 사이토카인(IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 효과		76
3. 요약		82
V. 참고문헌		83
VI. 부록		95

Abstract

In this study, bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* were isolated and tested for their uses in bio-industry such as bacterial cellulose production and manufacture of antioxidant food or anti-inflammatory cosmetics.

Lactobacillus plantarum KC-09 (KCCM 80077) was isolated and tested for its effect on bacterial cellulose production. The effects of initial concentration of acetate and mixed culture with *L. plantarum* KC-09 (KCCM 80077) on production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 were examined. In mixed culture with 0.5% acetate added, the viable cell count increased from 2.4×10^6 CFU/ml to 1.1×10^7 CFU/ml after 14 days of culture, and total acidity was about 0.3% higher than in single culture, which implies that additional lactate was produced by *L. plantarum* KC-09 (KCCM 80077). In single culture, although bacterial cellulose productivity was higher when the initial concentration of acetate was 0.0% or 0.5%, than when it was 1.0%, there was no significant difference. However, concentration and thickness of bacterial cellulose pellicle were 37.83 ± 6.81 g/L and 10.33 ± 0.58 mm in mixed culture with 0.5% acetate added, respectively, which are significantly different from 28.40 ± 1.23 g/L and 7.50 ± 0.50 mm in single culture with 1% acetate added.

Meanwhile, lactobacillus was used as a starter for fermentation of green barley (*Hordeum vulgare* L.) extract. Three isolates of *L. paraplantarum* (AMI-1101), *L. plantarum* (AMI-1103), and *L. brevis* (AMI-1109) were cultivated in the extract of barley leaves. The resulting culture products were examined for their antioxidant activity. The antioxidant capacity of *H. vulgare* L. extract was improved through bacterial fermentation. Especially, the culture product of *L. paraplantarum* (AMI-1101) showed the highest DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activity of 55.4% and 59.1%,

respectively at a concentration 500 µg/ml. In addition, the cultured lactobacillus cells were heat-killed and split into nano-size particles with a microfluidizer in order to maximize skin penetration and efficacy. The antioxidant capacity of heat-killed lactobacilli was also improved through size conversion process. The lactobacillus cells microfluidized at 20,000 psi showed 89.9% of ABTS⁺ radical scavenging activity at a concentration of 1,000 µg/ml, which was higher than 61% of normal size cell products.

As another approach for industrial application of lactobacilli, the skin microbiome was analyzed. It was confirmed that there was a difference in the distribution of the microbiome between the testers with normal skin and acne skin. In addition, a new lactic acid bacteria (*L.rhamnosus* AMI-1301) was isolated from the skin of the only healthy infant among microbiome analysis samples, and a study was conducted to utilize it as an antioxidant and anti-inflammatory material.

First, the isolated lactic acid bacteria were cultured using green tea, centella asiatica, mandarin orange, green barley and broccoli as substrates, and the antioxidant enhancing effect of the fermented product recovered from the culture was investigated. DPPH radical scavenging activity was typically increased by 27.2% in fermented green barley, and ABTS radical scavenging activity in fermented mandarin orange increased by 17.4%.

On the other hand, the effect of lactic acid bacteria extracellular vesicles (LEVs) on cell viability and NO production was investigated. LEVs concentration up to 20 µg/mL did not affect the cell viability(%). NO production was inhibited by 61% at a concentration of 20 µg/mL, confirming the inflammatory response inhibitory effect of LEVs. In addition, the effect on the production of cytokines IL-6, IL-1β and TNF-α that regulate the inflammatory response was investigated. Although there were some changes depending on the type of these cytokines in the concentration of LEVs ranging from 10 µg/mL to 20 µg/mL, the production of those cytokines was

inhibited by 6.3-49.6%.

These results show that LEVs and nano-size lactobacillus cells can be utilized as functional ingredients of food or cosmetic products.

List of Tables

Tables 1. Medium composition for single culture and mixed culture	18
Tables 2. Effect of initial acetate added on viable cell counts of lactic acid bacteria during mixed culture	28
Tables 3. Effect of initial acetate added on cellulose production and total acidity after 14 days' single culture or mixed culture	29
Tables 4. Skin microbiome analysis at phylum rank depending on age and skin type	95
Tables 5. Skin microbiome analysis at class rank depending on age and skin type	96
Tables 6. Skin microbiome analysis at order rank depending on age and skin type	97
Tables 7. Skin microbiome analysis at family rank depending on age and skin type	98
Tables 8. Skin microbiome analysis at genus rank depending on age and skin type	99
Tables 9. Skin microbiome analysis at species rank depending on age and skin type	100

List of Figures

Fig. 1. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from <i>Lactobacillus plantarum</i> KC-09(KCCCM80077)	21
Fig. 2. Culture time-dependent changes in cellulose concentration and pH on single culture	22
Fig. 3. Culture time-dependent changes in cellulose concentration and pH on mixed culture	24
Fig. 4. Culture time-dependent changes in total acidity on single culture(SC) or mixed culture(MC)	25
Fig. 5. Comparison of bacterial cellulose pellicle thickness on single culture and mixed culture	30
Fig. 6. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from <i>Lactobacillus paraplantarum</i> AMI-1101(KCCCM12383P)	34
Fig. 7. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from <i>Lactobacillus plantarum</i> AMI-1103(KCCCM12384P)	35
Fig. 8. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from <i>Lactobacillus brevis</i> AMI-1109(KCCCM12385P)	36
Fig. 9. Scanning electron microscope images of microfluidized lactic acid bacterial cells obtained after cultivation in the extract of green barley leaves	40
Fig. 10. DPPH radical scavenging activities of the extracts of green barley leaves before and after cultivation of lactic acid bacteria	41
Fig. 11. ABTS cation radical scavenging activities of the extracts of green barley leaves before and after cultivation of lactic acid bacteria	43
Fig. 12. ABTS cation radical scavenging activities of mixtures of microfluidized <i>Lactobacillus</i> bacterial cells	44
Fig. 13. Skin microbiome analysis at phylum rank depending on age and skin type	52

Fig. 14. Principal component analysis of beta diversity at phylum rank depending on age and skin type	53
Fig. 15. Skin microbiome analysis at class rank depending on age and skin type	54
Fig. 16. Principal component analysis of beta diversity at class rank depending on age and skin type	55
Fig. 17. Skin microbiome analysis at order rank depending on age and skin type	56
Fig. 18. Principal component analysis of beta diversity at order rank depending on age and skin type	57
Fig. 19. Skin microbiome analysis at family rank depending on age and skin type	58
Fig. 20. Principal component analysis of beta diversity at family rank depending on age and skin type	59
Fig. 21. Skin microbiome analysis at genus rank depending on age and skin type	60
Fig. 22. Principal component analysis of beta diversity at genus rank depending on age and skin type	60
Fig. 23. Skin microbiome analysis at species rank depending on age and skin type	63
Fig. 24. Principal component analysis of beta diversity at species rank depending on age and skin type	64
Fig. 25. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> AMI-1301 (KCCM 80230)	66
Fig. 26. Radical scavenging activity of fermentation broth of green tea extract	67
Fig. 27. Radical scavenging activity of fermentation broth of <i>Centella asiatica</i> extract	70

Fig. 28. Radical scavenging activity of fermentation broth of Mandarin orange extract	71
Fig. 29. Radical scavenging activity of fermentation broth of green barley extract	72
Fig. 30. Radical scavenging activity of fermentation broth of broccoli extract	73
Fig. 31. Radical scavenging activity of fermentation broth of green tea extract by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strains	75
Fig. 32. Effects of extracellular vesicles from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> on cell viability and NO production	78
Fig. 33. Effects of extracellular vesicles from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> on production of cytokine IL-6	79
Fig. 34. Effects of extracellular vesicles from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> on production of cytokine IL-1 β	80
Fig. 35. Effects of extracellular vesicles from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> on production of cytokine TNF- α	81

I. 서론

유산균은 당을 이용하여 젖산을 생성하는 균으로 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 등이 있으며 유제품, 김치, 장류 등과 같은 발효 식품 제조에 대표적인 starter로 이용되고 있다(Oh *et al.*, 2020) 또한, 유산균은 젖산을 대사산물로 생성하여 장내 해로운 균의 번식을 억제하고, 유익균의 증식을 활성화하여 장 건강을 이롭게 하는 것으로 알려져 있다(Perdigon *et al.*, 1990). 이러한 유산균은 항산화 및 콜레스테롤 감소효과(Ryu *et al.*, 2020) 있음이 확인된바 있으며, 면역증진활성(Kim *et al.*, 2004), 아토피 유발인자 억제효과(Jo *et al.*, 2012), 항바이러스 및 항암효과(Jung *et al.*, 2009) 등 다양한 기능성을 나타낸다. 김치는 한국의 전통 발효식품으로 *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속, *Sterptococcus* 속, *Pediococcus* 속, *Weissella* 속 등의 유산균을 비롯한 여러 미생물들에 의해 발효가 이루어지며, 이 과정을 통해 특유의 맛과 향미를 갖게된다(Cheigh *et al.*, 1994). 관련 연구로는 김치 유산균을 스타터로 이용하여 저염김치에 활용하거나(Huang *et al.*, 2016), 쌀 가루를 이용한 쌀 유산균 발효음료(Kim *et al.*, 2011), 감 발효음료(Seo *et al.*, 2015) 등 가공제품을 개발하는 연구가 보고되고 있다. 발효는 미생물의 대사 작용에 의해 유용 물질을 생산하고 생물 전환시키는 가장 오래된 역사를 가진 생물학의 기술로, 전통적인 발효의 경우 김치, 장류, 주류, 식초, 유제품, 젓갈 등 다양한 발효 음식에서 사용되어 왔으며 최근 발효 기술은 그 생산물의 영양학적 가치와 생명 공학 등 관련 기술의 발전으로 천연물의 유산균 발효를 통한 항산화, 항염, 항균, 항노화 기능성 증진에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다(Jeon *et al.*, 2011; Jun *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2020b). 이러한 기능성 및 응용 가능성으로 인해 다양한 산업 분야에서 관심과 중요성이 높아지고 있으며, 식품, 의약품, 화장품 등 다양한 산업 분야에 적용 가능한 기술로 발전되고 있다(Park, 2012; Kim *et al.*, 2018).

본 연구에서는 *Lactobacillus*속에 해당되는 유산균을 분리 및 동정하여, 식품, 화장품 등 생물산업에 활용하고자 하였다. 이들 유산균이 섬유소의 발효 생산에 미치는 영향을 조사하고, 항산화성 또는 항염성 소재로 활용되는데 필요한 자료를 얻고자 하였다.

섬유소(cellulose)는 지구상에 가장 풍부하게 존재하는 천연 고분자이며 재생 가능 자원으로 D-glucose가 β -1,4 결합에 의하여 중합된 사슬 상의 다당류이다. 주로 식물에 의해 생성되나 일부 algae, fungi 그리고 *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*속 등 다양한 세균에서 생합성이 확인되었으며(Matthysse *et al.*, 1981; Ko *et al.*, 2000), 그 중에서도 당으로부터 초산 발효를 통해 식초를 만드는 초산균인 *Acetobacter* 속이 cellulose 생산력이 가장 우수하다고 보고된 바 있다(Ko *et al.*, 2000; Son *et al.*, 2000). Bacterial cellulose(BC)를 생성하는 초산균으로는 *A. xylinum*, *G. hansenii* 등이 알려져 있으며 특히, *Acetobacter xylinum* 의해서 생산되는 cellulose가 대표적이고 cellulose 생산력이 가장 우수한 균주로 많은 연구가 진행되어왔다(Matsuoka *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005). BC 생성균으로 *Gluconacetobacter* sp.의 분리는 비교적 최근에 연구가 진행되고 있으며 16S rRNA 염기서열을 이용하여 분자계통 분류학적으로 *Acetobacter* 속으로부터 재분류 되었다(Lee *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004). BC는 식물유래 cellulose와는 달리 lignin, hemicellulose가 전혀 포함되지 않는 순수상태로 생성되며(Klemm *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003), 강도, 보수성 및 결합성이 높아 화학적으로 안정하고 독성이 낮은 특성으로 인하여 고강도용 공업재료, 복합섬유 및 의료용 재료 등 다양한 용도로 활용이 가능하다(Jeon *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014). BC의 생산성 향상을 위해 유전적으로 안전한 미생물의 분리, 균주개량, 최적배지 및 배양조건에 관련된 연구가 보고되고 있으며(Lee *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010), pH 3 - 4의 배양액으로 30 - 35°C 정지배양이 유리하다는 점은 대체적으로 일치하고 있다(Choi *et al.*, 2004). 또한 glucose, fructose 등의 탄소원과 TCA cycle에 관여하는 lactate, pyruvate, succinate 등을 기본배지에 첨가하여 BC의 생산량을 증가시키는 연구가 보고되고 있으며(Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004), *A. xylinum*의 경우 fructose 이외에 lactate를 배지에 첨가하여 BC 생산성을 증가시켰다고 보고되었으나(Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998), *G. hansenii*의 경우에는 lactate의 농도가 높아지면 생산량을 감소시키며, succinate 또한 BC 생산에 거의 영향을 미치지 않는다는 연구가 보고되어(Jung *et al.*, 2003; Jang and Jeong, 2005) 차이를 나타내고 있다. 화장품에 사용

되는 BC는 미생물로부터 직접 합성되는 바이오폴리모로써, 화장품산업에서는 바이오셀룰로오스로 불리며, 식물유래 셀룰로오스에 비해 섬유의 높은 물리적강도, 수분 흡수 및 유지능력, 균일한 섬유 네트워크 형성 등의 다양한 장점을 가진다 (Jun *et al.*, 2018). 또한 이러한 BC는 20-50 nm의 미세섬유(Microfibril)가 수소 결합에 의해 서로 연결된 3차원 망상구조를 이루고 있고, 높은 신장강도와 탄성 계수 및 수분보유력을 가지고 있기때문에 고성능 진동판, 상처 피복제, 인공피부, 인공혈관 등으로서 잠재적 활용가치가 높은 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 2020). 무엇보다 미생물에 의해 생산된 셀룰로오스는 환경친화적 소재이기 때문에 생태학적 관점에서도 매력적인 생물소재라고 할수 있다(Lee *et al.*, 2014). 이렇듯 유산균과 BC생성균과의 혼합배양 연구는 비상품 감귤을 이용한 다양한 가공식품 개발의 일환으로 제주산 감귤 착즙액을 이용한 BC를 생산하는데 있어서 초기 초산농도에 따른 BC 생성량을 비교하여 최적 배합비를 결정하고자 하였다. 추가적으로 lactate 첨가에 따라 BC의 생산성이 증대되었다는 연구결과 (Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998)를 바탕으로 높은 산도의 환경에서도 다량의 젖산을 생성하는(Sim *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2007) 김치에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* KCCM 80077 유산균을 혼합배양(mixed culture)하여 BC 생산성에 미치는 영향을 알아보하고자 하였다.

보리(*Hordeum vulgare* L.)는 벼과(Poaceae/Gramineae)에 속하는 세계 4대 작물 중 하나이며, 특히 보리 잎에는 항산화제인 superoxide dismutase (SOD)와 폴리페놀 화합물, 비타민C, 비타민E, catechin, β -carotene 등의 다양한 생리 활성 물질이 풍부하게 들어 있다고 보고되었다(Ohkawa *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2008). 청보리는 누른빛을 띠는 일반 보리와는 달리 푸른빛을 띠는 보리를 의미하며, 보리가 완숙되기 15일 이전에 수확한 것으로 일반보리에 비해 chlorophyll 이 많을 뿐만 아니라 항산화능을 갖는다(Kim and Kim, 2015; Park *et al.*, 2019). 보리에 대한 영양학적 가치 및 다양한 생리 활성에 관한 연구는 알려져 있으나, 청보리를 활용한 발효 소재 및 사균체의 생리 활성에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 산업화에 따른 다양한 화학물의 사용과 미세먼지, 자외선, 유해 환경 등 피부를 자극하는 외부 요인이 증가하고 있다. 이에 화장품 성분을 중요하게 여기는 소비자가 많아짐에 따라 성분 트렌드도 빠르게 변화하고 있으며, 친환경적 자

연 유래의 성분에 대한 소비자의 선호도가 매우 높아 이를 활용한 연구가 활발히 수행되고 있다. 국내뿐만 아니라 세계적으로도 보다 안전한 성분과 보다 확실한 효과를 추구하는 경향에 따라 기능성과 안전을 신뢰하고 구매할 수 있는 제품들에 관심이 높아지고 있다(Lee and Kang, 2020).

사균체는 생균의 반대되는 개념으로서 발효를 통해 얻어진 생균과 대사산물들을 열처리 등에 의해 균의 성장이 일어나지 못하도록 한 형태로 세포질(cytoplasm), 세포벽(cell wall), 박테리오신(bacteriocin) 등의 항균활성물질, 다당류(polysaccharide), 유기산 등을 포함한다. 1989년 Fuller는 Probiotics를 “장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주에게 유익한 영향을 주는 생균제제”라고 정의하였고(Fuller, 1989), 살아있는 미생물로서의 정립이 이루어졌으나, 1999년 Salminen 등이 “숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 또는 미생물의 성분”으로 정의함으로써 Probiotics의 범위를 사균으로까지 확대시켰다(Salminen *et al.*, 1999). 국내에서는 항균활성을 바탕으로 하여 설사치료를 위한 원료의약품으로 주로 많이 사용되고 있으며 in vitro 및 in vivo 실험을 통해 면역조절기능(Hirose *et al.*, 2009), 독소제거(Kabak *et al.*, 2008) 등과 같은 다양한 효능을 가지고 있음을 나타낸바 있다. 또한 유산균 사균체 제품은 생균제품과 비교하여 높은 안전성과 안정성을 가지고 있으며, 특히 높은 안정성으로 인하여 보관이 용이하고 유통기간을 늘릴 수 있다는 장점을 가지고 있다(Seo *et al.*, 2010). 따라서 사균체 소재는 건강기능식품, 식품첨가제, 의약품, 동물사료 등과 같은 기존의 유산균 생균이 적용되어 온 분야 외에도 화장품 원료로도 적용이 가능하다. 또한 항생제 사용에 대한 규제가 강화되고 있기 때문에 대체제로서의 활용성이 높고 아직 사균체 제품을 국내에서 본격적으로 상용화하는 업체가 많지 않기 때문에 시장성과 성장 가능성이 높은 소재로 생각된다. 다만, 현재 국내의 유산균 사균체는 외국에 비해 연구가 부진한 상황이다(Choi *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2020a).

항산화(antioxidant)는 산화를 방지하는 효과를 말하며, 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있는 피부는 그 항산화성 방어망의 불균형이 일어나 산화 생성물 및 과산화지질 등이 축적되어 피부 노화가 촉진된다(Kim *et al.*, 2019b). 생체 내 정상적인 세포 대사 과정에서 생성되거나 여러 환경 오염 및 화학 물질의 노출 등에 의해 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide radical anion, $O_2 \cdot^-$),

과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot OH$) 등의 산소 화합물을 통틀어 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이라 하며, 세포의 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2007; Jun *et al.*, 2014). 이에 본 연구에서는 유산균을 활용하여 청보리 잎 추출물을 발효하고, Microfluidizer로 나노화된 사균체의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 및 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation ($ABTS^+$) 라디칼 소거 활성을 측정하여 항산화 효과를 확인하고, 청보리 발효물 및 사균체를 이용한 기능성 바이오 소재 개발을 위한 기초자료로 제공 및 응용하고자 한다.

마이크로바이옴(microbiome)이라는 용어는 노벨 생리의학상 수상자인 Lederberg와 McCray의 2001년 The Scientist지 기고를 통해 최초로 정의되었다. 그는 “마이크로바이옴은 인체에 존재하며 우리 몸을 함께 공유하며 살고 있지만 그 동안 건강이나 질병의 원인으로 거의 무시되어 온 상재균, 공생균, 병원균 등 모든 미생물들의 총합이라고 정의하였으며 현재는 세균(bacteriome)뿐만 아니라 바이러스(virome)와 곰팡이(mycobiome)까지 모든 미생물을 포괄하는 용어로 사용된다. 마이크로바이옴은 마이크로바이오타(microbiota)라는 용어와 혼동하여 쓰이는데 마이크로바이오타는 인체에 서식하는 미생물 군집을 유전자 수준이 아닌 개체 수준으로 한정하여 지칭할 때 쓰는 표현이며, 마이크로바이옴은 마이크로바이오타와 그들이 가진 유전정보 전체를 통칭한다(Choi *et al.*, 2016). 피부의 다양한 부위는 각기 다른 특성을 반영하여 각기 다른 미생물의 개체 수를 갖는 것으로 알려져 있다. 겨드랑이 또는 발가락 사이와 같은 습한 영역에서 나오는 에어로빅 박테리아의 군집수는 cm^2 당 10^7 개 박테리아에 이를 수 있는 반면, 팔이나 몸통과 같은 건조한 영역은 cm^2 당 10^2 개 이하의 박테리아를 포함할 수 있다. 많은 외부 요인이 피부 생태계를 변화시킬 수 있으며, 이로 인해 미생물 집단이 변화할 수 있다. 숙주 요인으로는 연령, 성별, 면역 상태, 입원 상태, 위생, 약물 사용(항생제, 스테로이드), 비누와 화장품 사용, 외상 유무 등이 있다. (David, 2001) 이러한 피부 마이크로바이옴은 태아 때부터 모체의 미생물에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 자연분만에 의해 질을 통과하여 태어난 신생아의 피부는 모체의 질 내 세균과 유사하게 *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia* 종(species)이 많이 발견되고, 제왕절개로 태어난 신생아의 피부는 모체의 피부와

비슷하게 *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* 종이 많이 발견되었다(Dominguez-Bello *et al.*, 2010). 인체에는 인간의 세포 수에 10배에 해당하는 약 10^{14} 개의 미생물이 존재하며, 숙주인 인간과 공생하며 인간의 소화 기능, 영양분의 흡수, 면역 체계 등에서 여러 중요한 역할을 맡고 있다 (The human microbiome project consortium, 2013). 최근 미생물의 배양가능 여부와 상관없이 다양한 서식환경에서 존재하는 대부분의 미생물을 차세대 유전자 분석(next generation sequencing) 방법으로 규명할 수 있는 메타게놈 분석 방법이 발달하고 이용됨에 따라 미생물 관련 분야의 연구도 폭발적으로 늘어나고 있는 추세이다(Mathieu *et al.*, 2014). 특히 이러한 기술의 발달과 분석 비용의 절감으로 인해 프로바이오틱스 균주의 기능성 검증, 식중독균 분리 및 동정시 필요한 유전체 정보 데이터베이스 구축 등과 같은 다양한 연구분야에서 NGS를 보편적으로 사용하고 있으며 또한 의료계 및 산업계에서도 활발하게 사용되고 있다 (Kwon *et al.*, 2019)

세포의 소포체(extracellular vesicles)는 모든 세포가 외부 환경으로 분비하는 지질 이중층으로 둘러싸인 나노 크기의 소포체이며 세포의 소포체의 분비는 세균(bacteria), 고생물(archaea), 진핵생물(eukarya)에 이르기까지 모든 생물계에서 진화적으로 보존된 현상이다. 모든 세포들은 다른 세포들 또는 외부환경과 정보 교환을 위해 다양한 물질들을 외부 환경으로 분비하는데, 사이토카인(cytokines), 케모카인(chemokines), 호르몬, 신경전달 물질 등과 세포의 소포체를 통한 정보 교환이 점차 주목받고 있다(Choi *et al.*, 2015). 세포의 소포체는 기원, 분비기작 및 크기 등을 기준으로 엑소솜(exosomes), 마이크로베시클(microvesicles), 엑토솜(ectosomes), 마이크로파티클(microparticles), 막소포체(membrane vesicles), 나노베시클(nanovesicles), 외막소포체(outer membrane vesicles) 등 다양한 명칭으로 불려왔다(Choi *et al.*, 2015). 세포의 소포체는 단백질, 지질, 핵산, 대사물질(metabolites) 등 생물학적 활성을 보이는 다양한 물질을 포함하고 있고, 이들이 유래하는 세포들의 상태를 반영하고 있으며 일반적인 박테리아 추출물이나 정제물 보다 더 효과적으로 세포 내 반응을 유발한다(Kim *et al.*, 2020). 특히 박테리아에서 유래한 세포의 소포체는 항생제 내성, 경쟁 박테리아 제거, 독성인자 전달, 숙주 세포 조절 등에 관여한다(Gho *et al.*, 2017).

염증 반응은 미생물 감염, 내독소, 조직 손상과 같은 위해성 자극을 정상적으로 회복하기 위한 필수적 방어 작용으로, 정상적인 염증 반응은 시간이 지남에 따라 염증 촉진성 매개체(pro-inflammatory mediators)의 생성은 감소하고 항염증성 매개체(anti-inflammatory mediators)는 증가함으로써 스스로 염증 반응 조절 과정을 가진다. 이러한 염증반응이 최근 암, 비만, 당뇨병 등 다양한 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 역할을 한다고 보고되면서 염증반응 조절을 통해 염증 관련 질환이 개선될 수 있는 가능성을 보이게 되었다(Jung *et al.*, 2016). 이러한 염증 반응에 관여하여 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 대식세포(macrophages)는 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharides(LPS)의 자극으로 활성화되며 대식세포를 LPS로 자극하면 interleukin(IL)-1, IL-6, tumor necrosis factors(TNF)- α 등과 같은 사이토카인 및 nitric oxide(NO)의 발현이 증가되므로 항염증제를 개발하는 방법으로 사이토카인 생성을 억제하는 치료제 개발이 연구되고 있다(Zhao *et al.*, 2005). 이렇듯 본 연구에서는 마이크로바이옴 분석을 통해 유아의 피부에서 유익한 프로바이오틱스 유산균을 분리하였고, 이를 바탕으로 다양한 천연물을 활용한 발효소재의 항산화효과 및 세포외 소포체의 항염증 효과를 알아봄으로써 다양한 산업에 활용될 수 있는 기초자료로서 활용하고자 하였다.

II. 제 1장

Gluconacetobacter sp.를 이용한 bacterial cellulose 생산에
초산농도 및 *Lactobacillus* 혼합배양이 미치는 영향

1. 재료 및 방법

1) 사용균주 및 전 배양액의 제조

본 연구에 사용한 bacterial cellulose(BC) 생성균은 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 분양 받은 *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2를 이용하였으며(Lee *et al.*, 2011), 균주 혼합배양 실험에 이용된 유산균은 김치에서 직접 분리한 *L. plantarum* KCCM 80077을 이용하였다. 유산균의 동정은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 위하여 27F와 1492R 2개의 primer를 사용하여 PCR을 수행하였고 결정된 염기서열은 GenBank 데이터베이스와 비교 검색하여 유사도가 가장 높은 유산균으로 동정되었다.

BC를 생성하는 gel_SEA623-2는 먼저 G10 agar (glucose 100g/L, yeast extract 10 g/L, calcium carbonate 20 g/L, agar 15 g/L)에 접종하고 30°C에서 4일간 배양하여 주변에 투명한이 생성된 colony를 전 배양액(감귤착즙액 10%, sucrose 8.8%, ethanol 1%, acetate 1%, 정제수 79.2%)에 접종하고 배양병 입구를 멸균 filter paper(HYUNDAI Micro)로 덮은 후 30°C에서 5일간 정치배양하여 본 배양을 위한 종균(seed)으로 사용하였다.

혼합배양을 위한 유산균인 *L. plantarum* KCCM 80077은 BCP(Bromocresol purple) plate count agar (yeast extract 2.5 g/L, peptone 5 g/L, dextrose 1 g/L, Tween 80 1 g/L, L-cysteine 0.1 g/L, bromocresol purple 0.04 g/L, agar 15 g/L)에 접종하고 35°C에서 2일간 배양하여 주변에 형광색 환이 생성된 colony를 MRS broth (mixed peptones 10 g/L, yeast extract 5 g/L, meat extract 10 g/L, glucose 20 g/L, potassium phosphate 2 g/L, sodium acetate 5 g/L, magnesium sulphate 0.2 g/L, magnasese sulphate 0.05 g/L, Tween 80 1.08 g/L, ammonium citrate 2 g/L)에 접종하고 35°C의 온도에서 150rpm의 속도로 24시간 동안 진탕배양하여 lactate를 생성하는 종균(seed)으로 사용하였다.

2) 단독배양 및 혼합배양

BC를 생성하는 최적조건을 알아보기 위한 단독배양(single culture)은 전 배양액과 동일하게 10%의 감귤착즙액, 1%의 ethanol 및 10% 농도(w/w)의 설탕물

88 - 89% 비율로 제조하여 이용하였다. 본 배양액 조성에 있어 초기 초산 농도에 따른 BC 생산성 차이를 비교하기 위해 초산을 0.5 - 1.5% 비율로 첨가하였고, cellulose 생산을 위한 전 배양액을 각각 1%(v/v)씩 접종하여 30°C의 온도에서 14일 동안 배양하면서 BC 생성량을 비교하였다. 대조군은 분양 받은 gel_SEA623-2로서 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 BC를 제조하는 배합비를 기준으로 결정되었으며, 초산이 1% 첨가된 단독배양이다.

또한 혼합배양(mixed culture)은 단독배양(single culture)와 동일한 배합비를 바탕으로 내산성이 강한 유산균인 *L. plantarum* KCCM 80077를 추가로 1%(v/v)씩 접종하여 배양하였으며, 균주의 혼합배양을 통해 추가적으로 BC 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 초기 초산 농도에 따른 단독배양 및 혼합배양의 배합비율은 **Table 1**에 나타내었다.

3) 배양 균수 측정

Gluconacetobacter sp. gel_SEA623-2 전 배양액의 세포수는 hemacytometer (Marienfeld)를 이용한 세포 계수법을 활용하여 측정하였으며 *L. plantarum* KCCM 80077 전 배양액과 배양 일수에 따른 본 배양액의 생균수는 십진희석법을 이용한 표준평판배양법을 토대로 BCP plate count agar를 이용하여 35°C의 온도에서 48시간 배양 후 형광색 환을 형성하는 colony의 수를 계수하였다.

4) pH 및 총산도 측정

배양액의 pH는 pH meter (Starter3000, OHAUS)를 이용하였다. 배양액 중에 유기산 함량은 AOAC법(1990)에 따라 측정하였으며 100 ml 비이커에 배양액 시료 10 ml을 취한 후 phenolphthalein 용액을 2 - 3 방울을 가하고 0.1 N-NaOH 표준 용액으로 적정하여 소비된 양을 토대로 total acidity (%)를 산출하였다.

5) bacterial cellulose 생성량의 측정

BC 생성량은 먼저 배양액 상층에 형성된 균개(pellicle)의 두께(thickness)를 기준으로 평가하였으며, 가장 두꺼운 부분과 가장 얇은 부분 두 곳을 측정하여 평균값으로 나타내었고, 배양일에 따라 mm 단위로 측정하였다.

Table 1. Medium composition for single culture and mixed culture

	Acetate (%)	Citrus juice (%)	Ethanol (%)	10% Sugar solution (%)
SC ¹⁾	1.0	10.0	1.0	88.0
	0.5	10.0	1.0	88.5
	0.0	10.0	1.0	89.0
MC ²⁾	1.0	10.0	1.0	88.0
	0.5	10.0	1.0	88.5
	0.0	10.0	1.0	89.0

¹⁾SC : single culture(inoculated with 1% preculture : *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2)

²⁾MC : mixed culture(inoculated with 1% preculture : *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 and *Lactobacillus plantarum* KC-09)

또한 생성된 BC의 건조중량(dry weight)을 측정하기 위해 세척 후 건조기 (OF-22, 팜스웰바이오)에 넣고 60°C의 온도에서 24시간 건조하여 남은 건조체의 중량을 기준으로 미세저울(FX-300i, AND)을 이용하여 소수점 둘째 자리까지 측정하였다.

6) 통계처리

실험 결과는 SPSS 12.0 통계분석 프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였으며, 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여 $P < 0.05$ 수준에서 BC 건조중량과 두께의 유의적 차이를 검증하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 유산균의 동정

김치로부터 분리된 유산균은 16S rRNA 염기서열분석을 통해 **Fig. 1**과 같은 염기서열 및 Clustal omega의 다중서열정렬(multiple sequence alignment, MSA) 분석을 통한 계통수(phylogenetic tree) 분석결과를 확인하였다. 상동성을 비교한 결과 *L. plantarum*과 99.8%의 상동성을 보인 최종 균주로서 한국미생물보존센터에 기탁 후 *L. plantarum* KC-09(KCCM 80077)로 명명하였다.

2) 전 배양액의 균수 측정

BC 생산을 위한 gel_SEA623-2 전 배양액의 총 균수는 hemacytometer (Marienfeld)를 이용한 세포 계수법을 토대로 측정하였으며 2.5×10^7 CFU/ml의 균수가 확인되었다. 또한 유산균 혼합배양에 따른 BC 생산성 비교를 위해 *L. plantarum* KC-09(KCCM 80077) 배양액의 생균수는 표준평판배양법을 이용하여 계수하였고 2.9×10^8 CFU/ml의 생균수가 확인되었다.

3) 배양 일수 별 pH 및 bacterial cellulose 생산성 비교

단독배양액(SC)에서 초기 초산농도에 따른 배양일 별 pH와 건조중량으로 측정된 BC 생산성을 **Fig. 2**에 나타내었다. 배양 초기 초산을 첨가하지 않은 단독배양액(SC-0.0)의 pH는 3.91에서 배양 7일 후 2.90으로 감소하였으며 배양 종료시점인 14일 이후에는 2.45까지 감소하였다. 초산을 0.5% 및 1.0% 첨가한 단독배양액은 각각 배양초기(0일) 3.20과 3.04에서 시작하여 배양중기(7일)에는 각각 2.74, 2.72로 감소하고 종료시점(14일)에는 각각 2.35와 2.63까지 감소하였다. 이는 pH가 3.66 - 3.86에서 배양 14일 후 2.26 - 2.74까지 감소하였다는 보고(Choi *et al.*, 2004)와 비슷한 경향을 보였으며, BC를 생성함과 동시에 호기적인 조건에서 초산이 생성됨에 따라 pH가 낮아지는 것으로 보였다. 또한 BC의 건조중량(DW)을 토대로 생산성을 비교한 결과에서는 배양 7일 후 초산을 첨가하지 않은 배양액(SC-0.0)의 BC가 28.10 ± 1.60 (g/L)의 생성량으로 가장 많은 생산성을 보인 반면, 배양종료시점인 14일 후에는 초산을 첨가하지 않은 배양액(SC-0.0)과 0.5% 첨가

(A)

```
GTCACCTTAG GCGGCTGGTT CCTAAAAGGT TACCCACCG ACTTTGGGTG TTACAAACTC
TCATGGTGTG ACGGGCGGTG TGTACAAGGC CCGGGAACGT ATTCACCGCG GCATGCTGAT
CCGCGATTAC TAGCGATTCC GACTTCATGT AGGCGAGTTG CAGCCTACAA TCCGAACTGA
GAATGGCTTT AAGAGATTAG CTTACTCTCG CGAGTTCGCA ACTCGTTGTA CCATCCATTG
TAGCACGTGT GTAGCCCAGG TCATAAGGGG CATGATGATT TGACGTCATC CCCACCTTCC
TCCGGTTTGT CACCGGCAGT CTCACCAGAG TGCCCAACTT AATGCTGGCA ACTGATAATA
AGGGTTGCGC TCGTTGCGGG ACTTAACCCA ACATCTCACG ACACGAGCTG ACGACAACCA
TGCACCACCT GTATCCATGT CCCC GAAGGG AACGTCTAAT CTCTTAGATT TGCATAGTAT
GTCAAGACCT GGTAAGGTTT TTCGCGTAGC TTCGAATTAA ACCACATGCT CCACCGCTTG
TGCGGGCCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTT AGCCTTGCGG CCGTACTCCC CAGGCGGAAT
GCTTAATGCG TTAGCTGCAG CACTGAAGGG CGGAAACCCT CCAACACTTA GCATTCAATG
TTTACGGTAT GGACTACCAG GGTATCTAAT CCTGTTTGCT ACCCATACTT TCGAGCCTCA
GCGTCAGTTA CAGACCAGAC AGCCGCCTTC GCCACTGGTG TTCTTCCATA TATCTACGCA
TTTCACCGCT ACACATGGAG TTCCACTGTC CTCTTCTGCA CTCAAGTTTC CCAGTTTCCG
ATGCACTTCT TCGGTTGAGC CGAAGGCTTT CACATCAGAC TTA AAAAACC GCCTGCGCTC
GCTTTACGCC CAATAAATCC GGACAACGCT TGCCACCTAC GTATTACCGC GGCTGCTGGC
ACGTAGTTAG CCGTGACTTT CTGGTTAAAT ACCGTCAATA CCTGAACAGT TACTCTCAGA
TATGTTCTTC TTTAACAACA GAGTTTTACG AGCCGAAACC CTTCTTCACT CACGCGGCGT
TGCTCCATCA GACTTTTCGTC CATTGTGGAA GATTCCCTAC TGCTGCCTCC CGTAGGAGTT
TGGGCCGTGT CTCAGTCCCA ATGTGGCCGA TTACCCTCTC AGGTCGGCTA CGTATCATTG
CCATGGTGAG CCGTTACCNC ACCATCTAGC TAATACGCCG CGGGACCATC CAAAAGTGAT
AGCCGAAGCC ATCTTTCAA CTGCGACCAT GCGGTCCAAG TTGTTATGCG GTATTAGCAT
GCCACTCACT CAAATGTAAT TCATGATGCA AGCACCAATC AATACCAGAG TTCGTTTCGAC
TGCANTATAG CA
```

(B)

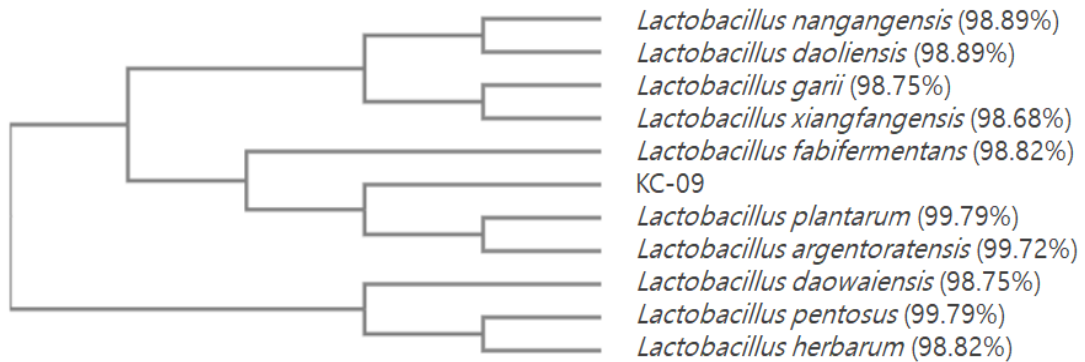


Fig. 1. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from *Lactobacillus plantarum* KC-09(KCCM80077).

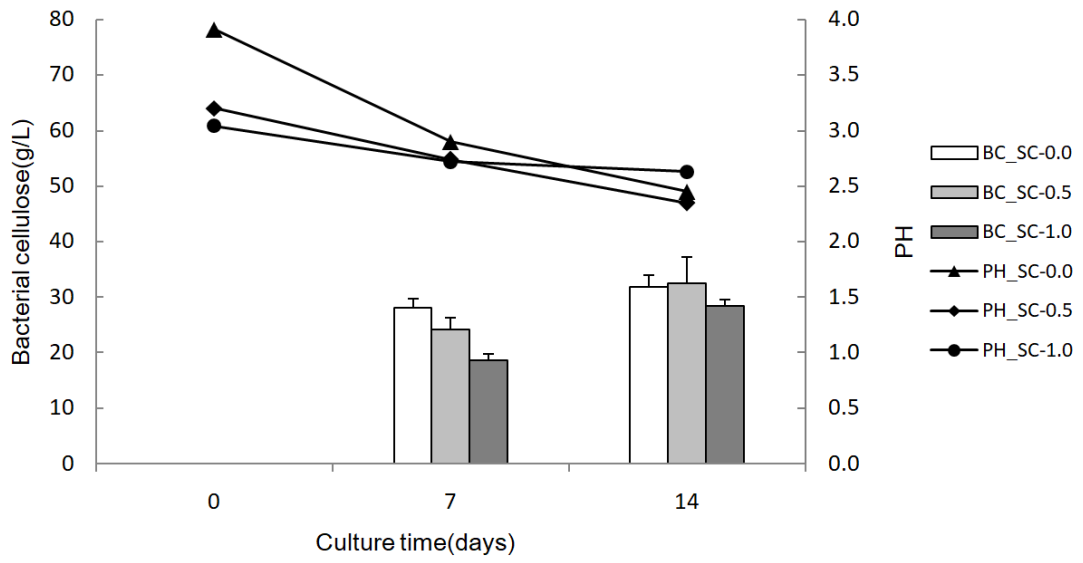


Fig. 2. Culture time-dependent changes in cellulose concentration and pH on single culture(SC, single culture).

한 배양액(SC-0.5)의 BC 생성량이 각각 31.93 ± 1.96 , 32.57 ± 4.83 (g/L)을 나타내어 큰 차이를 보이지 않았다.

혼합배양(MC)을 통해 얻어진 BC의 건조중량과 배양일 별 배양액의 pH 값은 **Fig. 3**에 나타내었으며, 배양 초기 초산을 첨가하지 않은 혼합배양액(MC-0.0)의 pH는 3.94였고 배양 최종일에는 2.42까지 감소하여 단독배양(SC)과 큰 차이를 나타내지는 않았다. 초산을 0.5% 및 1.0% 첨가한 배양액도 단독배양과 마찬가지로 배양 초기에는 초산농도에 따른 pH의 차이가 있었으나 배양 종료시점(14일)에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그리고 BC 생산성은 배양 7일 후 초산을 첨가하지 않은 배양액에서 생산된 BC가 24.20 ± 0.60 (g/L)로 가장 많은 생산성을 보였으나, 배양 14일 후에는 초산을 0.5% 첨가한 혼합배양액(MC-0.5)에서 생성된 BC가 37.8 ± 6.80 (g/L)으로 가장 높은 생산성을 나타내어 단독배양(SC) 보다 우수한 BC생산성을 보여주었다.

4) 배양일 별 총산도의 변화

단독배양(SC)을 통해 얻어진 배양액의 총산도를 배양 단계별로 측정된 결과, 초산을 첨가하지 않은 배양액은 총산도가 배양 초기(0일) 0.10%에서 배양 중기(7일 후)에는 0.40%까지 높아졌다가 배양 종료시점(14일 후)까지 0.40%로 유지되는 경향을 보였으며, 0.5%와 1.0%의 초산을 첨가한 배양액은 배양 종료시점에 산도가 일부 감소하는 경향을 보였다. 이렇듯 배양 종료시점에 산도가 일부 감소하는 것은 BC 생성균에 의해 생성된 초산이 배양일이 길어짐에 따라 과산화 된 것으로 보이며 (Jung *et al.*, 2003; Kim and Choi, 2005), 초기 산도가 높을수록 산함량이 많이 감소되는 경향을 보이고 있다.

혼합배양(MC)을 통해 얻어진 배양액의 총산도는 전체적으로 단독배양(SC) 보다 높은 결과를 보였으며, 이는 유산균에 의해 생성된 젖산의 농도가 높아짐에 따른 영향을 받은 것으로 보인다. 배양초기(0일) 초산을 첨가하지 않은 배양액은 총산도가 0.10%에서 배양 중기(7일 후)에 0.80%까지 높아졌다가 배양 종료시점(14일 후)에는 0.74%로 약간 감소하는 경향을 보였고, 단독배양액과 마찬가지로 1%의 초산을 첨가한 혼합배양액의 경우에도 배양 7일 후 최대 1.52%의 산도를 나타내었다가 배양 종료시점에는 1.10%까지 감소하는 경향을 보였다(**Fig. 4**).

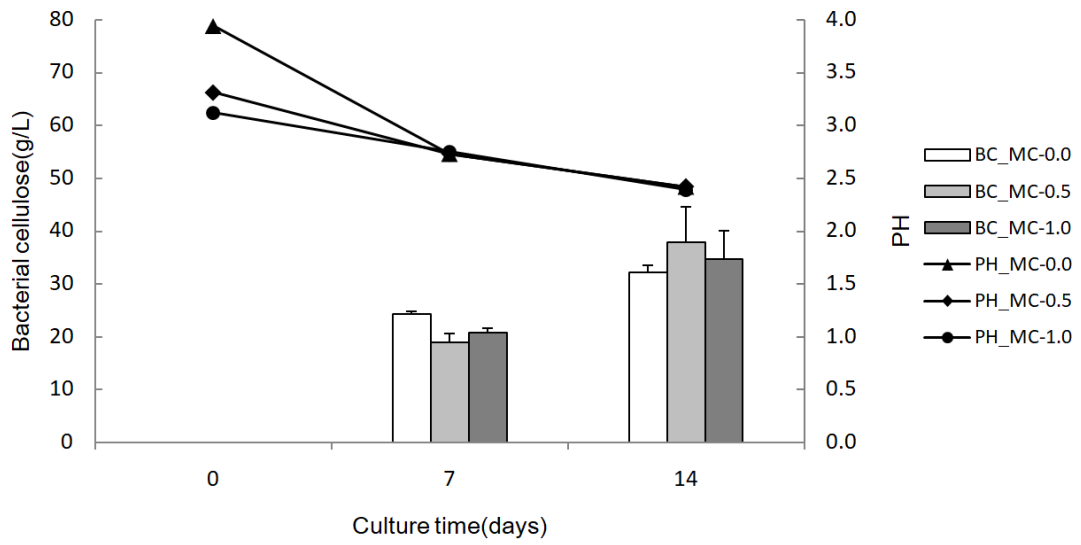


Fig. 3. Culture time-dependent changes in cellulose concentration and pH on mixed culture(MC, mixed culture).

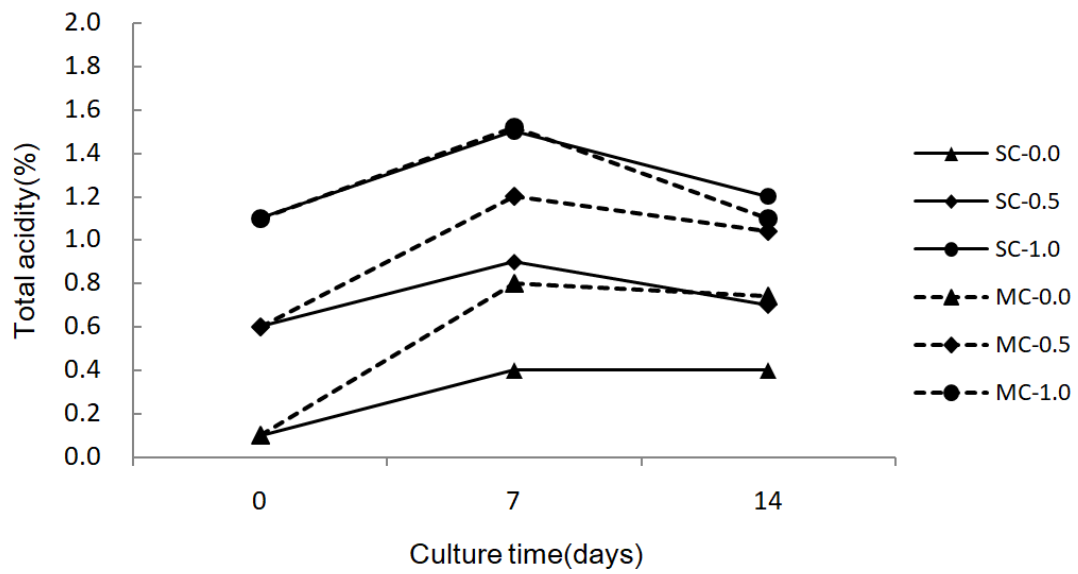


Fig. 4. Culture time-dependent changes in total acidity on single culture(SC, single culture) and mixed culture(MC, mixed culture).

5) 배양일 별 혼합배양의 유산균 생균수 변화

생균수가 2.9×10^8 CFU/ml 수준인 전 배양액을 초산 첨가량에 따른 혼합배양액에 각 1%씩 접종하여 배양 단계 별로 측정된 결과를 **Table 2**에 나타내었다. 초기 초산 첨가농도가 균주의 접종단계에 영향을 미치는지 알아보기 위해 접종 직후의 생균수를 측정하였고, $2.2 - 2.4 \times 10^6$ CFU/mL 수준의 유산균의 생균수가 확인됨에 따라 초기 산도는 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다. 1.0%의 초산을 첨가한 혼합배양액(MC)에서는 배양 중기(7일)에 생균수가 1.3×10^7 CFU/mL 수준까지 증가하였고, 배양 말기(14일)에는 0.8×10^6 CFU/mL까지 감소하여 가장 낮은 생균 활성을 나타냈다. 그리고 0.5%의 초산을 첨가한 배양액에서는 배양중기(7일) 1.6×10^7 CFU/mL까지 생균수가 최대로 증가하였고, 배양말기(14일)에 1.1×10^7 CFU/mL 수준까지 유산균 생균수가 유지됨에 따라 배양종료시점까지 가장 많은 유산균의 생균수가 유지되는 배양조건임을 확인할 수 있었다. 반면에 초산을 첨가하지 않은 배양액의 경우 배양말기(14일) 1.4×10^6 CFU/mL으로 확인되었고, 유산균의 생균수가 0.5%의 초산을 첨가한 배양액과 약 8배의 차이를 보여 배양 초기 적절한 초산농도(0.5%)가 유산균의 생육을 장기간 유지하는데 도움을 주는 것으로 판단되었다.

6) 초산농도에 따른 bacterial cellulose 생산성 비교

1% 초산을 첨가한 단독배양액(SC)을 대조구(control)로 설정하고 초산 농도의 차이와 추가로 접종한 유산균과 혼합 배양시킨 혼합배양액(MC)에서 생성된 BC의 생산성, total acidity 및 pH를 배양 종료 후 비교한 결과는 **Table 3**과 같다. 먼저 1%의 초산을 첨가한 대조구(control)는 가장 낮은 2.36 ± 0.01 의 pH와 1.16 ± 0.35 (%)의 총산도(total acidity)를 나타내었고, BC의 dry weight와 thickness는 28.40 ± 1.23 (g/L)와 7.50 ± 0.50 (mm)으로 가장 낮은 생산성을 나타내었다. 그리고 SC에서는 0.0 및 0.5%의 초산 첨가 배양액 모두 평균적으로 조금 높은 BC 생산성을 보이기는 하였으나 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지는 못하였다. 하지만 0.5%의 초산을 첨가한 MC 배양액에서는 2.42 ± 0.05 의 pH와 1.04 ± 0.35 (%)의 total acidity와 함께 BC 생산성은 37.83 ± 6.81 (g/L)의 dry weight와 10.33 ± 0.58 (mm)의 thickness로 가장 높은 값을 나타내었으며 통계학적으로

유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). **Fig. 5**는 BC의 두께(thickness)를 배양 중기인 7일과 배양 종료시점인 14일에 측정한 결과를 종합적으로 보여주고 있으며 배양 중기에는 초산을 첨가하지 않은 SC-0.0와 MC-0.0 배양액에서 높은 BC의 thickness를 나타내고 있고 SC와 MC 배양액간에 유의적인 차이를 보이지 않고 있다. 하지만 배양 14일 이후에는 그 차이가 점차 증대되고 있으며 대조군과 비교하여 MC-배양액 모두에서 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 이는 내산성이 강한 유산균이 배양 종료시점까지 생육활성을 나타냄을 본 실험을 통해 확인할 수 있었고 대조군 및 SC-배양액과 비교하여 MC-배양액에서 높은 산도를 보이는 것은 유산균이 생성한 젖산의 영향으로 판단되며 이를 통해 BC의 생산성이 증대되는 것으로 보여진다.

Table 2. Effect of initial acetate added on viable cell counts of lactic acid bacteria during mixed culture

	Acetate concentration(%)	Culture time(days)		
		0	7	14
MC-V ¹⁾ (CFU/mL)	1.0	2.2×10^6	1.3×10^7	0.8×10^6
	0.5	2.4×10^6	1.6×10^7	1.1×10^7
	0.0	2.3×10^6	3.3×10^7	1.4×10^6

¹⁾ MC-V : mixed culture viable cell count of lactic acid bacteria

Table 3. Effect of initial acetate added on cellulose production and total acidity after 14 days' single culture or mixed culture

	Acetate concentration(%)	Bacterial cellulose		Total acidity(%)	pH
		DW(g/L) ¹⁾	Thickness(mm)		
SC(Control) ²⁾	1.0	28.40±1.23 ^{a5)}	7.50±0.50 ^a	1.16±0.35	2.36±0.01
SC ³⁾	0.5	32.57±4.83 ^{ab}	8.50±1.32 ^{ab}	0.74±0.35	2.36±0.01
	0.0	31.93±1.96 ^{ab}	9.00±1.00 ^{abc}	0.42±0.00	2.45±0.02
MC ⁴⁾	1.0	34.73±5.44 ^{ab}	9.67±1.15 ^{bc}	1.10±0.35	2.39±0.03
	0.5	37.83±6.81 ^b	10.33±0.58 ^c	1.04±0.35	2.42±0.05
	0.0	32.27±1.17 ^{ab}	9.33±0.58 ^{bc}	0.74±0.35	2.42±0.01

¹⁾DW : dry weight

²⁾Control : single culture solution contained in acetate of 1.0 %

³⁾SC : single culture(*Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2)

⁴⁾MC : mixed culture(*Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 and *Lactobacillus plantarum* KC-09)

⁵⁾Values are mean±SD and those with different subscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

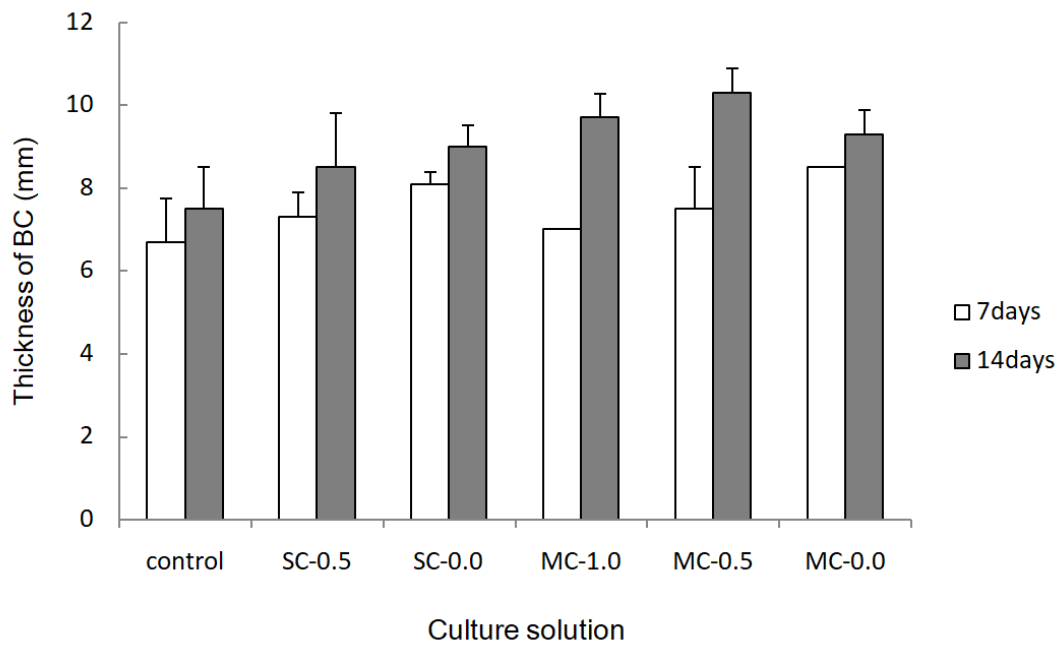


Fig. 5. Comparison of bacterial cellulose pellicle thickness on SC(single culture) and MC(mixed culture). (Control : single culture in medium containing 1.0% acetate initially.)

3. 요약

본 연구에서는 BC를 생성하는 gel_SEA623-2를 이용하여 배양 초기 초산농도와 *L. plantarum* KCCM 80077 유산균의 혼합배양을 통해 얻어지는 BC 생산량을 dry weight과 thickness를 기준으로 평가하였다. 단독배양(single culture)에서 초기 초산농도가 0.0 및 0.5%일 때 1.0%와 비교하여 상대적으로 높은 BC 생산량을 나타내었으며 이때 초기 pH는 3.91과 3.20였고 BC 생성의 배양 초기 최적 pH가 3.0 - 4.0으로 확인되었다는(Choi *et al.*, 2004) 연구결과와 비슷한 결과를 나타내었다. 혼합배양(mixed culture)의 경우 유산균의 생균수가 배양 종료시점에 1.1×10^7 CFU/ml 수준까지 가장 많이 유지된 0.5% 초산 첨가구(MC-0.5)에서 가장 높은 BC 생산성을 보였으며 이는 BC 생성단계에 lactate를 첨가한 실험구에서 높은 생산성을 보였다는(Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998)결과와 일치하고 있으며 총산도가 단독배양액(SC)에서는 0.74 ± 0.34 로 측정되었으나 혼합배양액(MC)에서는 1.04 ± 0.35 로 측정된 바로 미루어보아 유산균에 의한 추가적인 lactate 생성이 BC 생산성에 영향을 미친 것으로 판단된다. 이렇듯 본 연구를 통해 lactate를 생성하는 *L. plantarum* KC-09(KCCM 80077)이 배양 단계에 초산에 대한 내성을 유지할 수 있다면 BC 생산성 향상에 도움이 될 수 있다는 것을 확인 할 수 있었으며 차후 다른 종의 유산균을 이용한 혼합배양 실험과 BC의 물성특성에 관한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 보인다.

Ⅲ. 제 2장

김치에서 분리된 *Lactobacillus* 속 유산균을 활용한 청보리
발효물과 사균체의 항산화성 평가

1. 재료 및 방법

1) 원재료 및 사용 균주

본 실험에 사용한 청보리(*Hordeum vulgare* L.)는 묘종을 재배대에 옮겨 심은 후 4주간 재배된 익지 않은 청보리를 (주)만나 CEA(Korea)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 사용된 유산균은 김치로부터 분리 및 동정된 *Lactobacillus paraplantarum* AMI-1101(LPP), *Lactobacillus plantarum* AMI-1103 (LP), *Lactobacillus brevis* AMI-1109 (LB) 유산균을 실험에 사용하였으며, Clustal omega의 다중서열정렬(multiple sequence alignment, MSA) 분석을 통한 계통수(phylogenetic tree) 분석결과를 확인하였다(Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8). 또한 2018년 11월 12일부로 한국 미생물 보존 센터(KCCM)에 국제 기탁하였고 KCCM12383P, KCCM12384P, KCCM12385P의 기탁번호를 부여받았다.

2) 청보리 발효 및 사균체 제조방법

뿌리를 제거 후 정제수로 세척하고 건조시킨 청보리 잎을 조분쇄하여 20배의 추출 용매(정제수)로 121°C, 15분간 고압열수 추출을 하였다. 발효를 위한 종균은 멸균된 유산균 배양 배지(*Lactobacillus* MRS Broth, Difco)에서 배양된 유산균 LPP, LP 및 LB를 사용하였으며 배양이 완료된 후 균체만 회수하여 1×10^7 CFU/ml 농도로 청보리 추출물에 접종하였다. 발효는 발효조를 이용하여 LPP는 35°C로 1일간, LP는 35°C로 2일간, LB는 30°C로 2일간 유지하며 진행하였고, 발효가 완료된 청보리 추출 발효물은 0.2 µm 여과지를 이용하여 필터에 남은 균체를 분리하였다. 필터 표면에 남겨진 균체를 정제수로 씻어내어 회수한 후, 원심분리기를 이용하여 침전된 균체만을 회수하였다. 상기 발효 균체를 121°C에서 15분간 가열하여 사멸시킨 후, 멸균하여 동결 건조 분말화하였다. LPP, LP, LB 3가지 균주를 활용한 복합 발효물을 기반으로 사균체를 제조하여 Microfluidizer(M110EH, Mfic)로 나노화된 압력별 사균체에 대한 항산화능을 평가하였다.

(A)

```
GTGGGAAACC TGCCCAGAAG CGGGGGATAA CACCTGGAAA CAGATGCTAA TACCGCATAA
CAACTTGGAC CGCATGGTCC GAGTTTAAAA GATGGCTTCG GCTATCACTT TTGGATGGTC
CCGCGGCGTA TTAGCTAGAT GGTGAGGTAA CGGCTCACCA TGGCAATGAT ACGTAGCCGA
CCTGAGAGGG TAATCGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAAACCTCT ACGGGAGGCA
GCAGTAGGGA ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG
AAGGGTTTCG GCTCGTAAAA CTCTGTTGTT AAAGAAGAAC ATATCTGAGA GTAACGTGTC
AGGTATTGAC GGTATTTAAC CAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGTAA
TACGTAGGTG GCAAGCGTTG TCCGGATTTA TTGGGCGTAA AGCGAGCGCA GGCGGTTTTT
TAAGTCTGAT GTGAAAGCCT TCGGCTCAAC CGAAGAAGTG CATCGGAAAC TGGGGAACTT
GAGTGCAGAA GAGGACAGTG GAACTCCATG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG ATATATGGAA
GAACACCAAG GCGGAAGGCG GCTGTCTGGT CTGTAACCTG CGCTGAGGCT CGAAAGTATG
GGTAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCATACCGT AAACGATGAA TGCTAAGTGT
TGGAGGGTTT CCGCCCTTCA GTGCTGCAGC TAACGCATTA AGCATTCCGC CTGGGGAGTA
CGGCCGCAAG GCTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT
GGTTTAATTC GAAGCTACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT GACATACTAT GCAAATCTAA
GAGATTAGAC GTTCCCTTCG GGGACATGGA TACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG
TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGBAA CGAGCGCAAC CCTTATTATC AGTTGCCAGC
ATTAAGTTGG GCACTCTGGT GAGACTGCCG GTGACAAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG
TCAAATCATC ATGCCCTTA TGACCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGA TGGTACAACG
AGTTGCGAAC TCGCGAGAGT AAGCTAATCT CTAAAGCCA TTCTCAGTTC GGATTGTAGG
CTGCAACTCG CCTACATGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG CGGATCAGCA TGCCGCGGTG
AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA TGAGAGTTTG TAACACCCAA
AGTCGGTGGG GTAACCTTTT AGGAACCAGC CGCCTAAGGT GGGACAGATG ATTAGGGTGA
AGTCGTCAAA GG
```

(B)

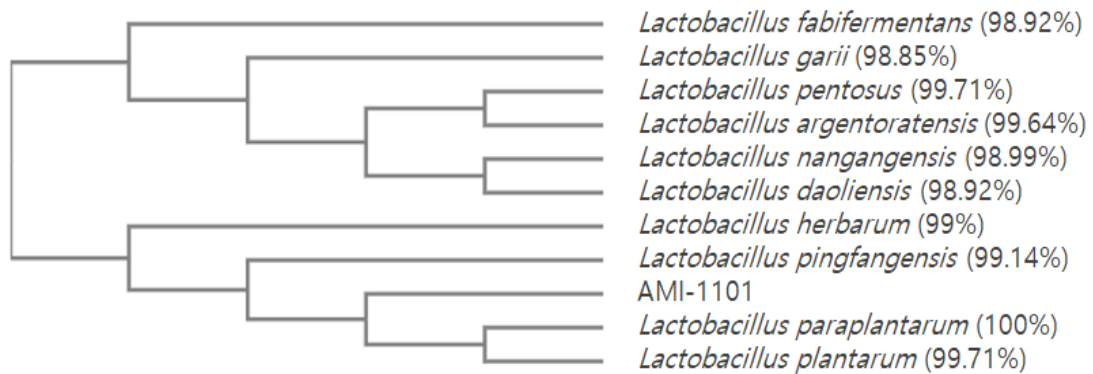


Fig. 6. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from *Lactobacillus paraplantarum* AMI-1101(KCCM12383P).

(A)

```
ATAGAGGTGT TTTCTTCCTC GTCAGACGAA CGCTGGCGGC GTGCCTAATA CATGCAAGTC
GAACGAACTC TGGTATTGAT TGGTGCTTGC ATCATGATTT ACATTTGAGT GAGTGGCGAA
CTGGTGAGTA ACACGTGGGA AACCTGCCCA GAAGCGGGGG ATAACACCTG GAAACAGATG
CTAATACCGC ATAACAACCTT GGACCGCATG GTCCGAGCTT GAAAGATGGC TTCGGCTATC
ACTTTTGGAT GGTCCCGCGG CGTATTAGCT AGATGGTGGG GTAACGGCTC ACCATGGCAA
TGATACGTAG CCGACCTGAG AGGGTAATCG GCCACATTGG GACTGAGACA CGGCCCAAAC
TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAACTCTC CACAATGGAC GAAAGTCTGA TGGAGCAACG
CCGCGTGAGT GAAGAAGGGT TTCGGCTCGT AAAACTCTGT TGTAAAGAA GAACATATCT
GAGAGTAACT GTTCAGGTAT TGACGGTATT TAACCAGAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC
AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA TTTATTGGGC GTAAAGCGAG
CGCAGGCGGT TTTTAAAGTC TGATGTGAAA GCCTTCGGCT CAACCGAAGA AGTGCATCGG
AAACTGGGAA ACTTGAGTGC AGAAGAGGAC AGTGGAATC CATGTGTAGC GGTGAAATGC
GTAGATATAT GGAAGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTGTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA
GGCTCGAAAG TATGGGTAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCATA CCGTAAACGA
TGAATGCTAA GTGTTGGAGG GTTTCCGCC TTCAGTGCTG CAGCTAACGC ATTAAGCATT
CCGCTGGGG AGTACGGCCG CAAGGCTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA
GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCAAGCT ACGCGAAGAA CTTACCAGG TCTTGACATA
CTATGCAAAT CTAAGAGATT AGACGTTCCC TTCGGGGACA TGGATACAGG TGGTGCATGG
TTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCCTAT
TATCAGTTGC CAGCATTAAG TTGGGCACTC TGGTGAGACT GCCGGTGACA AACCGGAGGA
AGGTGGGGAT GACGTCAAAT CATCATGCC CTTATGACCT GGGCTACACA CGTGCTACAA
TGGATGGTAC AACGAGTTGC GAACTCGCGA GAGTAAGCTA ATCTCTTAAA GCCATTCTCA
GTTTCGATTG TAGGCTGCAA CTCGCCTACA TGAAGTCGGA ATCGTAGTA ATCGCGGATC
AGCATGCCGC GGTTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA
GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC CTTTTAGGAA CCAGCCGCCT AAGGTG
```

(B)

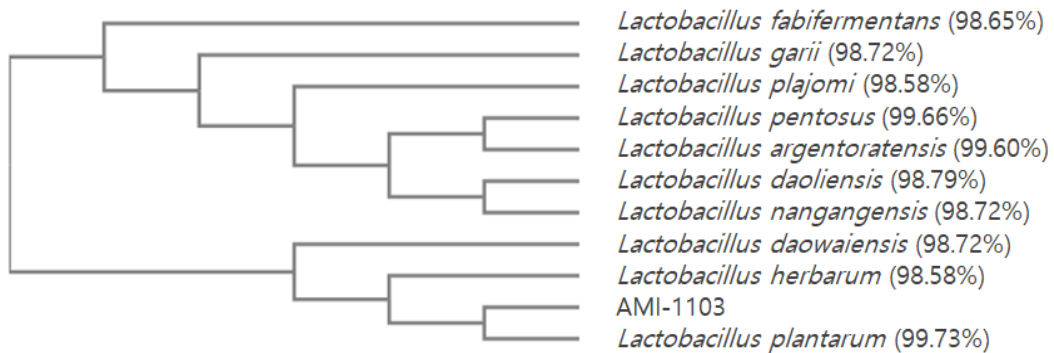


Fig. 7. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from *Lactobacillus plantarum* AMI-1103(KCCM12384P).

(A)

```
TTTTTTTTTT TCGTCAGACG AACGCTGGCG GCATGCCTAA TACATGCAAG TCGAACGAGC
TTCCGTTGAA TGACGTGCTT GCACTGATTT CAACAATGAA GCGAGTGGCG AACTGGTGAG
TAACACGTGG GAAATCTGCC CAGAAGCAGG GGATAACACT TGGAAACAGG TGCTAATACC
GTATAACAAC AAAATCCGCA TGGATTTTGT TTGAAAGGTG GCTTCGGCTA TCACTTCTGG
ATGATCCCGC GCGGTATTAG TTAGTTGGTG AGGTAAAGGC CCACCAAGAC GATGATACGT
AGCCGACCTG AGAGGGTAAT CGGCCACATT GGGACTGAGA CACGGCCCAA ACTCCTACGG
GAGGCAGCAG TAGGGAATCT TCCACAATGG ACGAAAGTCT GATGGAGCAA TGCCGCGTGA
GTGAAGAAGG GTTTCGGCTC GTAAAACCTCT GTTGTTAAAG AAGAACACCT TTGAGAGTAA
CTGTTCAAGG GTTGACGGTA TTTAACCAGA AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG
CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GATTTATTGG GCGTAAAGCG AGCGCAGGCG
GTTTTTTAAG TCTGATGTGA AAGCCTTCGG CTTAACCGGA GAAGTGCATC GGAAACTGGG
AGACTTGAGT GCAGAAGAGG ACAGTGGAAC TCCATGTGTA GCGGTGGAAT GCGTAGATAT
ATGGAAGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGGCTG TCTAGTCTGT AACTGACGCT GAGGCTCGAA
AGCATGGGTA GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA TGCCGTAAAC GATGAGTGCT
AAGTGTGGA GGGTTTCCGC CCTTCAGTGC TGCAGCTAAC GCATTAAGCA CTCCGCCTGG
GGAGTACGAC CGCAAGGTTG AACTCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA
GCATGTGGTT TAATTCGAAG CTACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCTTCTGCCA
ATCTTAGAGA TAAGACGTTT CCTTCGGGGA CAGAATGACA GGTGGTGCAT GGTTGTGCGT
AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT ATTATCAGTT
GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTGGTGAGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG
ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGACGGT
ACAACGAGTC CGGAAGTCGT GAGGCTAAGC TAATCTCTTA AAGCCGTTCT CAGTTCGGAT
TGTAAGGCTG AACTCGCCTA CATGAAGTTG GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGCATGCC
GCGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGACAC ACCGCCGTC ACACCATGAG AGTTTGTAAC
ACCCAAAGCC GGTGAGATAA CCTTCGGGAG TCAGCCGTCT AAGGTGGGAC AGATGA
```

(B)

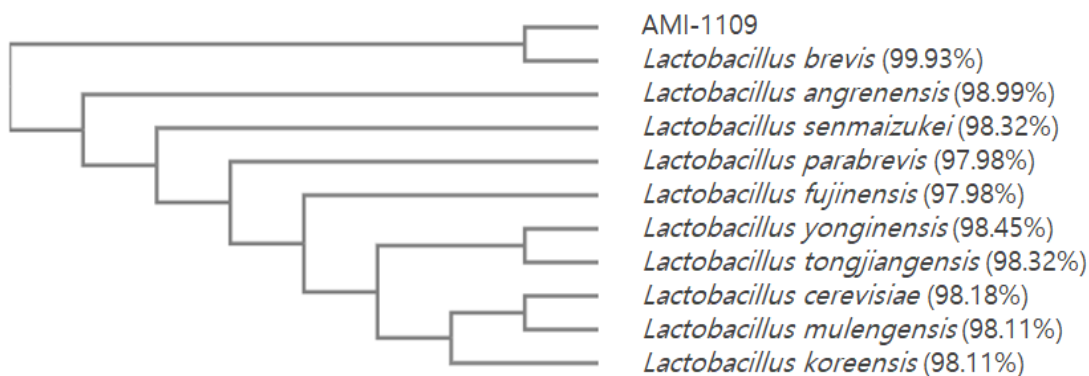


Fig. 8. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from *Lactobacillus brevis* AMI-1109(KCCM12385P).

3) 유산균 복합 사균체의 나노화

동결건조 사균체 파우더를 70% ethanol 용액에 0.1%로 혼합하여 준비된 시료를 Microfluidizer(M110EH, Mfic)를 이용하여 10,000, 15,000 및 20,000 psi의 압력별로 각 3회씩 반복하여 균질화 후 회수하였다. 그리고 회수한 유산균 사균체를 40°C 저온 진공 농축한 후, 동결 건조하여 분말화 하였다.

4) 사균체의 영상 분석

Microfluidizer로 나노화된 사균체의 모습을 확인하기 위해, 방출 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, TESCAN, MIRA3)을 이용하여 나노화된 사균체의 크기 및 모양을 분석하였다.

5) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 라디칼 소거 활성

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법 (Brand-williams *et al.*, 1995)을 응용하여 다음과 같이 실행하였다. 먼저 시료를 1 mg/ml 농도로 만든 후, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/ml 농도로 희석하였다. DPPH 시약은 DMSO를 사용하여 2mM 농도로 녹여준 뒤 이를 ethanol에 0.2 mM로 희석하여 사용하였다. 이 후 농도별로 희석한 시료 용액을 96 well plate에 각각 20 µl씩 넣고 multi pipette을 사용하여 0.2 mM DPPH 180 µl를 넣어 상온에서 10분간 반응시키고, ELISA reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정 하였다. DPPH 라디칼 소거율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left\{ 1 - \frac{B-C}{A} \right\} \times 100$$

A : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

B : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

C : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

6) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation 라디칼 소거 활성

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) cation 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법(Re *et al.*, 1999)을 응용하였고, 실험은 다음과 같이 진행하였다. 7.0 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 16시간 이상 차광 상태에서 반응을 시켜 ABTS⁺ 라디칼을 만들었다. 이 ABTS⁺ 라디칼 용액을 에탄올에 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.002가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다. 이 후 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 각각 20 µl와 ABTS⁺ 라디칼 용액 180 µl를 혼합하여 15분간 차광 상태에서 반응시키고, ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS⁺ 라디칼 소거율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left\{ 1 - \frac{B-C}{A} \right\} \times 100$$

A : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

B : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

C : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

7) 통계처리

모든 시료의 통계처리 분석은 모두 3번 반복 수행하여, 평균치와 표준편차 (Mean ± SD)값으로 표시하였다. 통계 분석은 Excel software (version 2007, Microsoft Corp.) 프로그램으로 student's t-test를 실시해 통계처리 하였고, 시료가 포함되지 않은 대조구와 비교하여 유의성 검정을 실시하였으며, p value가 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.)

2. 결과 및 고찰

1) Microfluidizer로 나노화된 청보리 발효-유산균 사균체의 주사전자현미경 영상

청보리 잎을 LPP, LP 및 LB 유산균을 활용하여 발효 후 이를 기반으로 혼합사균체를 제조하였으며, 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscope)을 이용하여 나노화된 사균체의 크기를 확인하였다. 사균체의 길이를 기준으로 압력 처리를 하지 않은 일반 사균체는 평균 $1,368 \pm 24 \text{nm}$ 길이를 보인 반면, 10,000 psi의 압력을 처리한 사균체는 $1,046 \pm 33 \text{nm}$, 15,000 psi의 압력을 처리한 사균체는 $985 \pm 276 \text{nm}$ 의 길이를 나타내었고, 20,000 psi의 높은 압력을 처리한 사균체는 $861 \pm 115 \text{nm}$ 의 길이로 크기가 줄어드는 경향을 보였다. 결론적으로 주사전자현미경 관찰을 통해 Microfluidizer의 압력이 최대 20,000 psi로 높아질수록 세포의 원래 형태를 유지하지 못하고 높은 압력에 의해 파괴된 결과를 보여주었으며 그에 따라 유산균의 크기도 작아짐을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

2) 유산균 3종 활용 청보리 추출발효물의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

DPPH는 분자 내 라디칼을 함유하고 있어서, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 및 방향족 아민류인 항산화제에 의해 환원 시 라디칼이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는 정도를 항산화 물질의 전자 공여 능력으로 측정하는 방법이며, DPPH 분자의 움직임은 하이드록실 라디칼과 유사하여 free radical 소거실험에 활용된다고 한다. 또한, ABTS⁺ 라디칼 소거 활성측정은 potassium persulfate와 반응하여 생성된 ABTS⁺ 라디칼이 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용해 항산화 능력을 측정하는 방법이다(Kim *et al.*, 2019a). 청보리 추출 발효물의 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성에 대한 실험 결과는 Figs. 10, 11에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능을 평가 결과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 청보리 추출물의 경우 35.8% 소거능을 보였으나, 청보리 추출 발효물에서 53.7%의 소거능을 나타내며 발효 후 소거능이 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 10). ABTS 라디칼 소거능을 평가한 결과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의

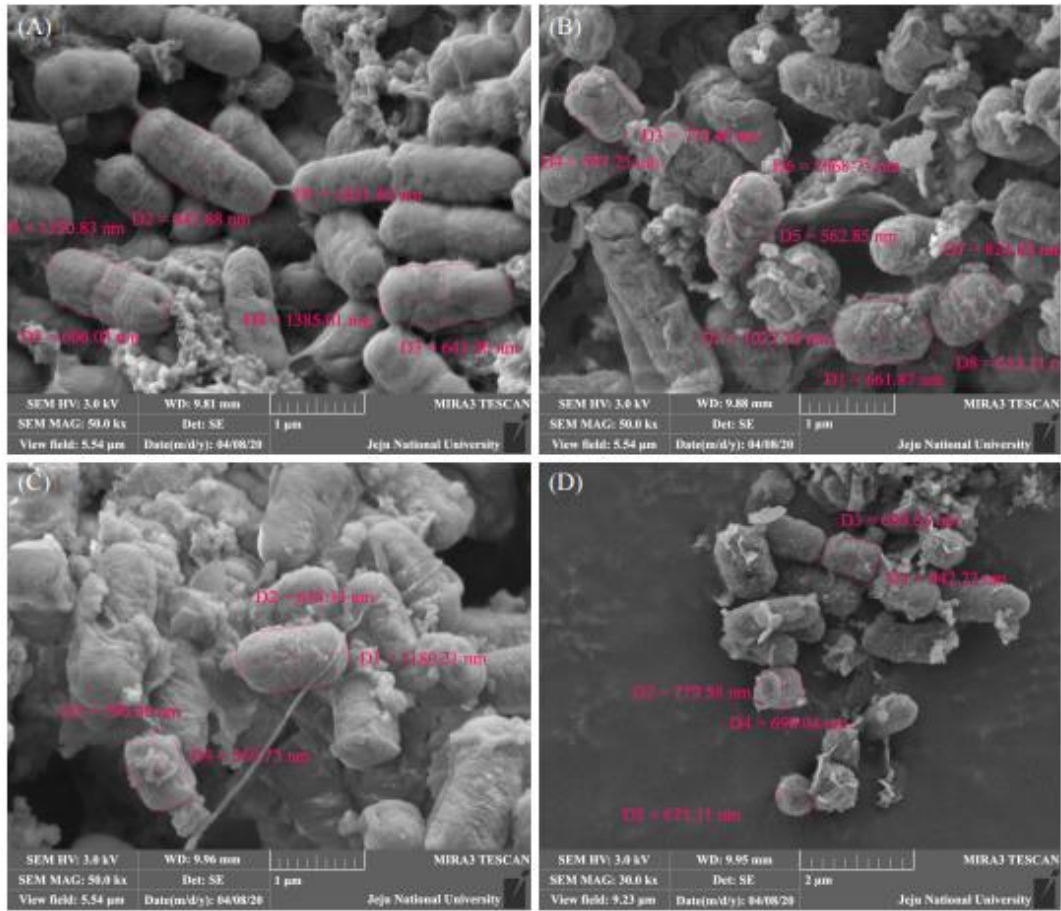


Fig. 9. Scanning electron microscope images of microfluidized lactic acid bacterial cells obtained after cultivation in the extract of green barley leaves. (A) Control (not treated), (B) Microfluidized at 10,000 psi, (C) Microfluidized at 15,000 psi, (D) Microfluidized at 20,000 psi.

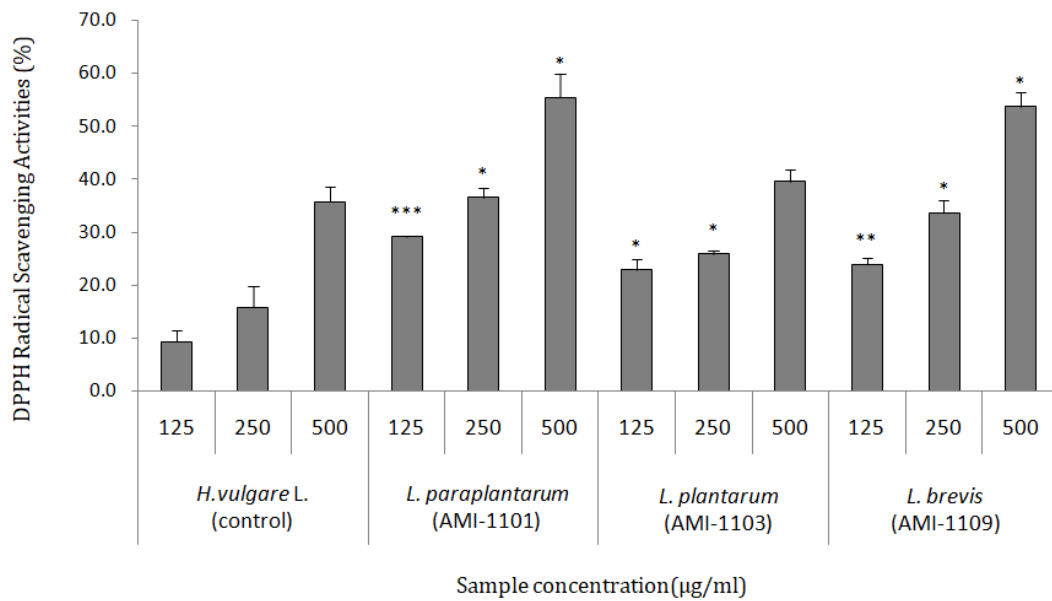


Fig. 10. DPPH radical scavenging activities of the extracts of green barley leaves before and after cultivation of lactic acid bacteria. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's t-test).

농도에서 청보리 추출물의 경우 40.3% 소거능을 보였으나, 청보리 추출 발효물에서 59.1%의 소거능을 나타내며 발효 후 소거능이 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 11). 이를 통해 발효 전 대비 발효 후 농도 의존적으로 DPPH 및 ABTS 라디칼을 소거능이 증가하는 것이 확인되었다.

3) 나노화된 복합 사균체의 ABTS⁺ 라디칼 소거활성 평가

Microfluidizer로 나노화된 3종 복합 사균체의 항산화능을 평가하였다. 1,000 μ g/mL의 농도에서 일반 사균체의 경우 61% 소거능을 나타내었으나, 10,000 psi에서 나노화된 사균체는 75.1%, 15,000 psi에서 나노화된 사균체는 73.2%, 20,000 psi에서 나노화된 사균체는 89.9%의 소거능을 보였다. 압력처리를 통한 나노화 과정을 통하여 사균체의 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 증가하였고, 20,000 psi에서 처리된 균체의 항산화 효과가 최대치를 나타냈다(Fig. 12).

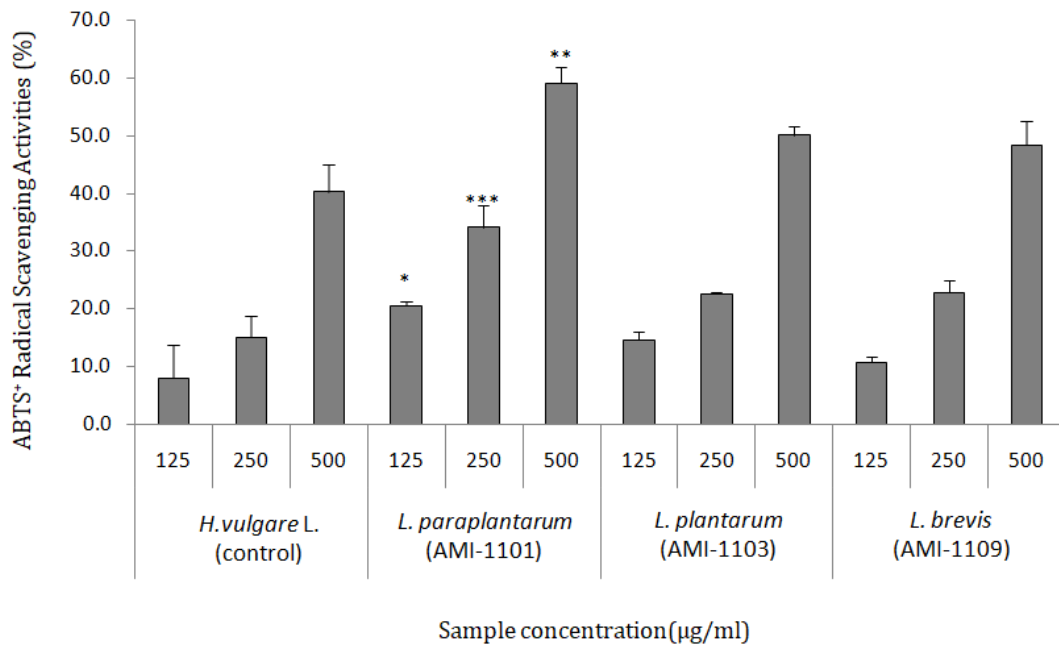


Fig. 11. ABTS cation radical scavenging activities of the extracts of green barley leaves before and after cultivation of lactic acid bacteria. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

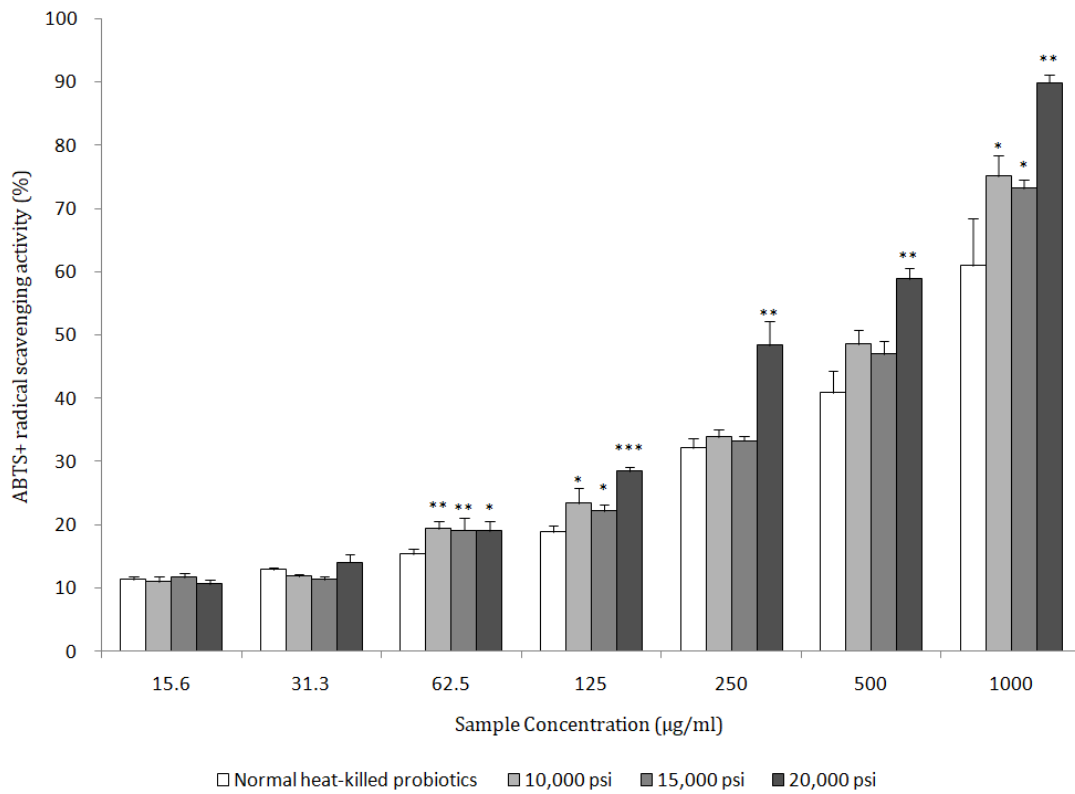


Fig. 12. ABTS+ cation radical scavenging activities of mixtures of microfluidized *Lactobacillus* bacterial cells. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t -test).

3. 요약

본 연구는 청보리 추출 발효물 및 청보리 발효-유산균의 사균체의 항산화 활성 효과에 대한 연구를 수행한 결과이다. 청보리 잎을 김치에서 분리한 *L. paraplantarum* (AMI-1101), *L. plantarum*(AMI-1103), *L. brevis*(AMI-1109)를 활용하여 발효하였고, 사균체는 피부 침투율 및 효능을 극대화하기 위해 Microfluidizer로 나노화 하였는데 10,000, 15,000 및 20,000 psi의 압력별로 사균체의 전자주사현미경을 통해 세포의 형태학적 변화정도를 관찰하였고 항산화 효능을 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거활성평가를 통해 확인하였다. Microfluidizer로 나노화된 유산균 사균체 소재의 전자주사현미경 이미지 측정 결과, 압력이 20,000psi로 높아질수록 세포의 원래형태를 유지하지 못하고 압력에 의해 파괴된 상태를 보여주었으며 그에 따라 유산균의 크기도 작아짐을 확인할 수 있었다. 청보리 추출 발효물의 항산화 평가 결과, 500µg/ml의 농도에서 55.4% DPPH 라디칼 소거활성 및 59.1%의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 나타내며 발효 전 대비 라디칼 소거능이 향상됨을 확인하였다. 사균체의 항산화 평가 결과, 1,000 µg/ml의 농도에서 일반 사균체의 경우 61%, 20,000 psi 사균체가 89.9%의 소거능을 나타냄으로써, 일반 사균체에 비해 나노화된 사균체의 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해서, 청보리 추출 발효물과 사균체는 항산화 활성을 가지는 식품 및 천연 화장품 소재로의 활용이 가능할 것이라 생각된다.

IV. 제 3장

마이크로바이옴 분석을 통한 피부유산균 조사 및 유산균 세포외 소포체의 항염 활성 평가

1. 재료 및 방법

1) 연령 및 피부타입별 마이크로바이옴 분석

연령 및 피부타입별 피부상재균의 분포도를 확인하기 위해 정상피부를 갖는 유아, 10대, 20대, 30대, 40대, 50대 및 60대의 남/여 대상자 14명과 여드름성 피부를 갖고 있는 남/여 대상자 4명을 포함한 총 18명을 대상으로 조사하였다. 기상 후 오전 세안 직전에 SWAP(ST-25 PBS, Elmex, Japan)으로 이마와 코 주변의 표면미생물을 채취하여, (주)MD헬스케어(Korea)에 마이크로바이옴 분석을 의뢰하였다.

2) 피부유래 유산균의 분리 및 동정

마이크로바이옴 분석을 위해 채취한 5세 유아 피부의 표면 미생물 시료 200 μ L를 Lactobacilli MRS broth(BD difco, USA) 20mL에 넣고, 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 혐기조건에서 배양하여 호기성균의 사멸과 혐기성균의 증식을 유도하였다. 선택배양액을 BCP agar(BD difco, USA)에 희석도말하여 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였고, 그로부터 노란색 환을 가진 독립군락을 선별하여 MRS agar에 계대 배양하였다. 최종적으로 순수 분리된 세균을 동정하기 위하여 (주)솔젠트(Korea)에 16s rRNA 유전자 분석을 의뢰하였다. 2개의 primer 27F와 1492R를 사용하여 양방향으로 유전자를 증폭시켜 염기서열을 분석하였다. 16s rRNA 유전자의 염기서열을 기준으로 분리균주는 유산균(*Lactobacillus rhamnosus* AMI-1301)으로 동정되었다.

3) 피부유래 유산균을 활용한 발효소재의 항산화성 평가

녹차(green tea), 병풀(*Centella asiatica*), 감귤(mandarin orange), 청보리(green barley) 그리고 브로콜리(broccoli)를 40 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 풍건한 다음에 거칠게 분쇄하였다. 식물체 시료의 20배에 상당하는 정제수를 섞어서 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 열수로 추출하였다. 본 연구에서 유아 피부로부터 분리된 유산균(*L. rhamnosus* AMI-1301)와 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 균주 *L. rhamnosus* KCCM32405을 발효용 종균으로 사용하였다.

유산균을 Lactobacillus MRS Broth(Difco)에 배양한 다음에 원심분리하여 균체를 회수하여, 1×10^7 CFU/ml 농도로 각 열수추출물에 접종하였다. 35°C에서 48시간 동안 배양하여 추출물의 발효를 유도하였다. 발효물을 0.2 μm 여과지로 여과시켜 균체 및 고형분을 제거한 다음에 동결건조(Operon, Korea)하여 항산화 실험용 시료로 사용하였다.

항산화 실험 중 DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법(Brand-williams *et al.*, 1995)을 응용하여 다음과 같이 실행하였다. 먼저 발효물 시료를 1 mg/ml 농도로 만든 후, 이를 순차적으로 희석하여 최종농도 31.25, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 만들어 사용하였다. DPPH는 DMSO에 2mM 농도로 용해시킨 뒤, ethanol로 희석하여 0.2 mM로 만들어 사용하였다. 96 well plate에서 희석된 시료 20 μl 와 0.2 mM DPPH 180 μl 를 섞어서 상온에서 10분간 반응시킨 후에, ELISA reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

ABTS cation radical 소거 활성은 Re 등의 방법(Re *et al.*, 1999)을 응용하여 다음과 같이 측정하였다. 우선, 7.0 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 16시간 이상 차광 상태에서 반응을 시켜 ABTS⁺ 라디칼을 만들었다. ABTS⁺ 라디칼 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서의 흡광도가 0.78 ± 0.002 가 되도록 조절한 다음에 사용하였다. 96 well plate에 희석된 시료 20 μl 와 ABTS⁺ 라디칼 용액 180 μl 를 혼합하여 차광상태에서 15분간 반응시킨 다음에 ELISA reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 유산균 세포외 소포체의 분리

분리균주 *L. rhamnosus* AMI-1301(KCCM 80230)를 Lactobacilli MRS broth 500mL에 접종하여 37°C에서 20시간 동안 정치배양하였다. 배양액을 13,000xg에서 15분 동안 원심분리하여 균체를 제거하여 상등액을 얻었고, 배양 상등액을 0.22 μm bottle-top filter(Corning, NY, USA)로 여과하여 여액을 회수하였다(Choi *et al.*, 2020). 그리고 접선유동여과장치(TFF system, MD Healthcare, Korea)를 이용하여 여과 및 농축을 2회 수행하였고 최종적으로 37mL의 세포외 소포체를 수득하였다(Kim *et al.*, 2020).

5) 유산균 세포의 소포체의 항염활성 평가

100mm petridish에 DMEM complete media(Gibco, USA)를 넣고 37°C CO₂ incubator(BB 150, Thermo Fisher Scientific, USA)에서 배양한 Raw 264.7 cell을 사용하였다. 1xPBS(Gibco, USA)로 세포를 2번 반복 세척한 후, scraper로 떼어낸 cell을 원심분리하고 상정액을 흡입 제거하였다. DMEM complete media를 담은 새 dish에 cell을 넣고 48시간 동안 37°C에서 배양하였다. cell의 숫자는 적혈구계수기(hemocytometer)로 계수하였으며, 실험에 필요한 cell수를 계산하여 well plate에 seeding 후 배양하였다. 유산균의 세포의 소포체와 lipopolysaccharide(LPS)를 동시에 cell을 seeding한 well plate에 처리하였다. 세포를 24시간 동안 37°C에서 배양한 후에 ELISA reader(Sunrise, Austria)로 570nm에서 흡광도를 측정하여 결과값을 도출하였다. 세포생존율을 확인하는 MTT 측정은 다음과 같이 실시하였다. 세포의 소포체 시료를 농도별로 넣고 cell을 24시간 동안 배양한 후, 배양된 세포에 MTT(Amresco, USA)의 최종농도가 0.4mg/mL 되도록 처리하여 1시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 제거한 다음에 DMSO(Amresco, USA)를 well당 500 μ L씩 가하여 formazan 침전물을 용해시키고 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 유산균 세포의 소포체의 염증성 사이토카인 생성 억제효과

RAW264.6 세포를 24 well plate에 1.5 \times 10⁵ cells/mL으로 분주하여 24시간 배양 후 LPS를 1 μ g/mL로 처리하여 사이토카인의 생성을 자극하였다. cytokine 생성이 자극된 세포에 농도별로 시료를 처리하여 24시간 배양 후 상등액을 이용하여 사이토카인의 억제활성을 측정하였다. 사이토카인은 Mouse TNF- α (BD Bio-science, San Diego, USA), IL-1 β (R&D System, Minneapolis, USA), IL-6(Invitrogen, Carlsbad, USA) ELISA kit를 사용하여 450nm에서 측정하였다.

7) 통계처리

모든 시료에 대한 실험은 3번 반복하였고, 그 결과를 평균치와 표준편차 (Mean \pm SD)값으로 표시하였다. Excel software (version 2007, Microsoft Corp.) 프로그램으로 student's t-test를 실시해 통계처리하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 연령 및 피부타입별 마이크로바이옴 분석결과

마이크로바이옴분석을 통해 연령 및 피부타입별 피부상재균의 분포도를 조사하여, 생물의 분류체계인 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family), 속(genus) 종(species)순으로 제시하였다.

문(phylum) 수준에서 연령 및 피부타입별 기준으로 보면 여드름성 피부를 갖고 있는 남성에서 *Firmicutes* 분포도가 평균 56.3%로 가장 넓게 나타났으며, *Actinobacteria*의 경우에는 여드름성 피부를 갖고 있는 여성에서 분포도가 평균 48.06%로 가장 넓게 나타났다(Fig. 13). 이는 피지를 분비하는 피부부위인 이마, 코, 등, 가슴 등의 부위에서 phylum 수준에서 *Actinobacter*가 56%이상의 분포도를 나타냈다는 연구결과(Chen *et al.*, 2013)와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 변수간의 상관관계를 보여주는 주성분 분석(Prinsipal component analysis)에서는 10대, 60대 및 여드름성 피부를 갖고 있는 사람에게서 유사한 형태의 분포도를 나타내었다(Fig. 14).

강(class)을 기준으로 분류하였을 때 연령 및 피부타입별 기준으로 보면, *Firmicutes*(56.3%)에 속하는 *Bacilli*가 여드름성 피부를 갖고 있는 남성에서 평균 55.08%의 분포도로 가장 넓게 나타내었다. 이는 피부에 존재하는 *Bacilli*가 *Firmicutes*의 대부분(92.5%)을 차지한다는 연구(Chen *et al.*, 2013)와 유사한 결과를 나타내었으며, *Actinobacteria*는 여드름성 피부를 갖고 있는 여성에서 분포도가 평균48.03%로 가장 넓게 나타났다(Fig. 15). 또한 주성분 분석 결과에서는 20대와 30대를 제외한 나머지 사람들에게서 유사한 분포도를 갖는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 16).

목(order)을 기준으로 분류하였을 때 연령, 성별 및 피부타입별 기준으로 보면, *Bacillales*는 여드름성 피부의 남성에서 분포도가 평균 52.96%로 가장 넓게 나타났으며, *Lactobacillales*는 가장 건강한 피부를 갖고 있는 유아에서 분포도가 평균 35.16%로 가장 넓게 나타났고, 10대에서는 평균 28.44%을 분포도를 보였다(Fig. 17). 그리고 남성보다는 여성의 피부에서 상대적으로 *Lactobacillales*의 높은 분포도를 보였는데 이는 남학생 보다 여학생의 손바닥 피부에서

*Lactobacillales*의 분포도가 340%이상 높았다는 연구(Fierer *et al.*, 2008)와 유사한 결과를 나타내었으며, 이는 성별에 따라 미생물의 분포도 차이를 나타낼 수 있음을 확인한 결과로 판단된다. 또한 주성분 분석 결과에서도 마찬가지로 유아와 10대의 경우 성별에 따라 다소 분포도 차이가 있음을 확인할 수 있었고, 20대와 30대의 경우에는 미생물의 종류와 분포비율의 차이가 크게 나타남을 확인하였다(Fig. 18).

과(family)를 기준으로 분류할 경우 연령 및 피부타입별 기준으로 보면, *Staphylococcaceae*는 여드름성 피부의 남성에서 분포도가 평균 52.84%로 가장 넓게 나타났으며, *Streptococcaceae*는 가장 건강한 피부를 갖고 있는 유아에서 분포도가 평균 31.06%로 가장 넓게 나타났다(Fig. 19). 이는 피부가 성숙해지는 청소년기 이후보다 유아피부에서 *Streptococcaceae*가 상대적으로 높은 분포도를 보였다는 연구(Sanmiguel *et al.*, 2016)와 유사한 결과를 보여주었으며 청소년기 이후에는 피지샘 활성 증가 및 *Propionibacterium* sp.과 같은 미생물의 증가로 인해 미생물 분포도가 변화되는 것으로 판단된다. 또한 주성분 분석 결과에서는 20대의 경우 검출된 미생물들의 종류는 유사하나 검출비율에서 큰 차이를 보이는 결과를 나타낸 반면에 30대의 경우 남자와 여자 피부 샘플에서 전혀 다른 미생물 분포도를 보여주는 결과를 나타내었다(Fig. 20).

속(genus)을 기준으로 분류하였을 때, 연령 및 피부타입별 기준으로는 *Staphylococcus*의 경우 여드름성 피부의 남성에서 분포도가 평균 52.82%로 가장 넓게 나타났으며, 이는 아토피환자의 피부에서 *Staphylococcus*가 평균 66.2%의 비율로 나타났다는 연구(Kim *et al.*, 2017)와 유사한 결과를 보여주었다. 또한 *Streptococcus*의 경우에는 가장 건강한 피부를 갖고 있는 유아에서 분포도가 평균 31.05%로 가장 넓게 나타났다(Fig. 21). 전성분 분석결과 유아와 40대는 군집 분포도가 매우 유사하게 나타나 피부상재균의 상관성이 매우 높음을 알 수 있었고, 여드름성 피부의 경우 4명 중 3명은 매우 근접한 분포도를 나타냄으로써 실제 여드름성 피부에 피부상재균 분포도가 영향을 미칠 수 있는 요인이 될 수 있음을 확인하였다(Fig. 22).

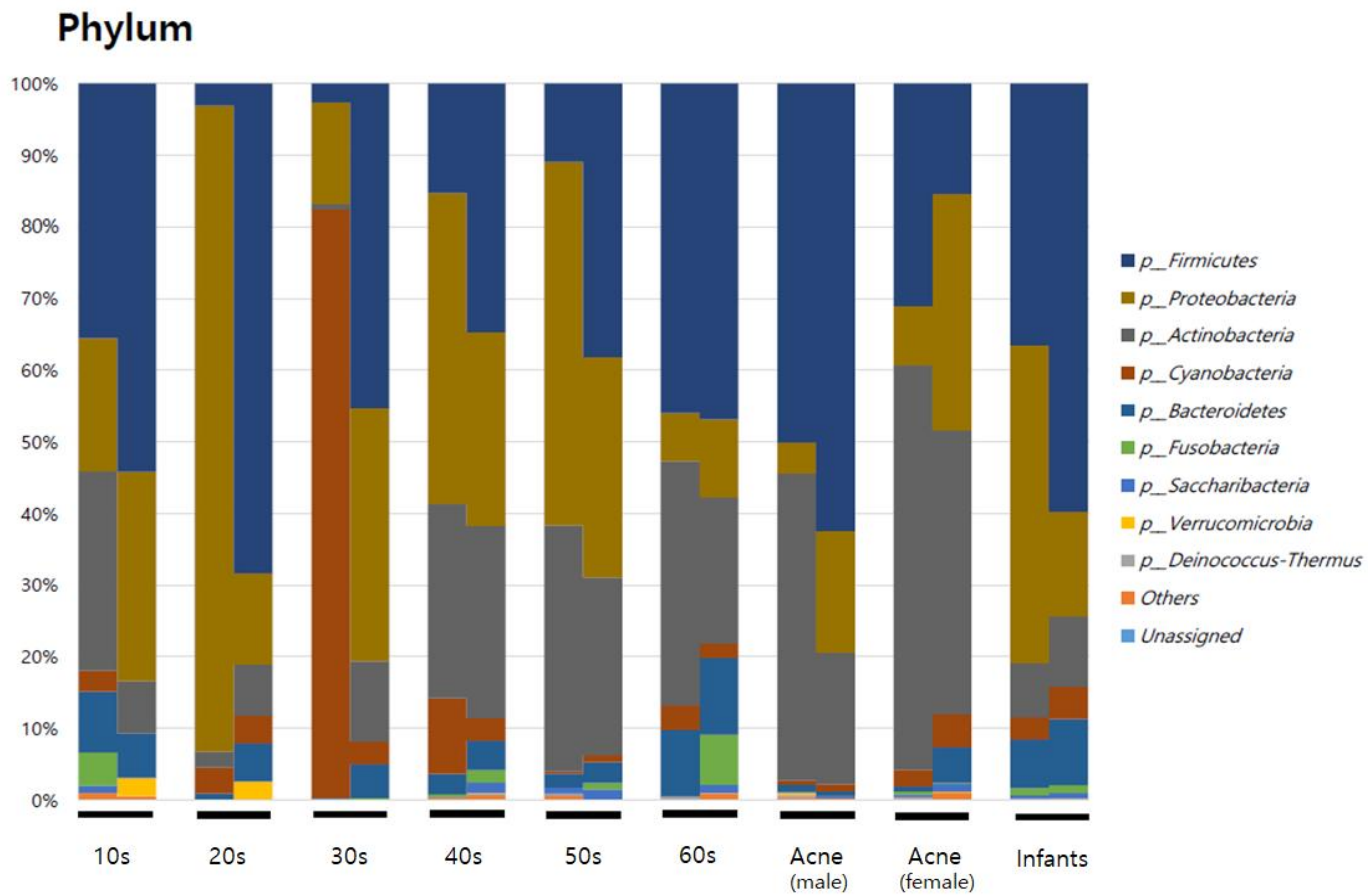


Fig. 13. Skin microbiome analysis at phylum rank depending on age and skin type.

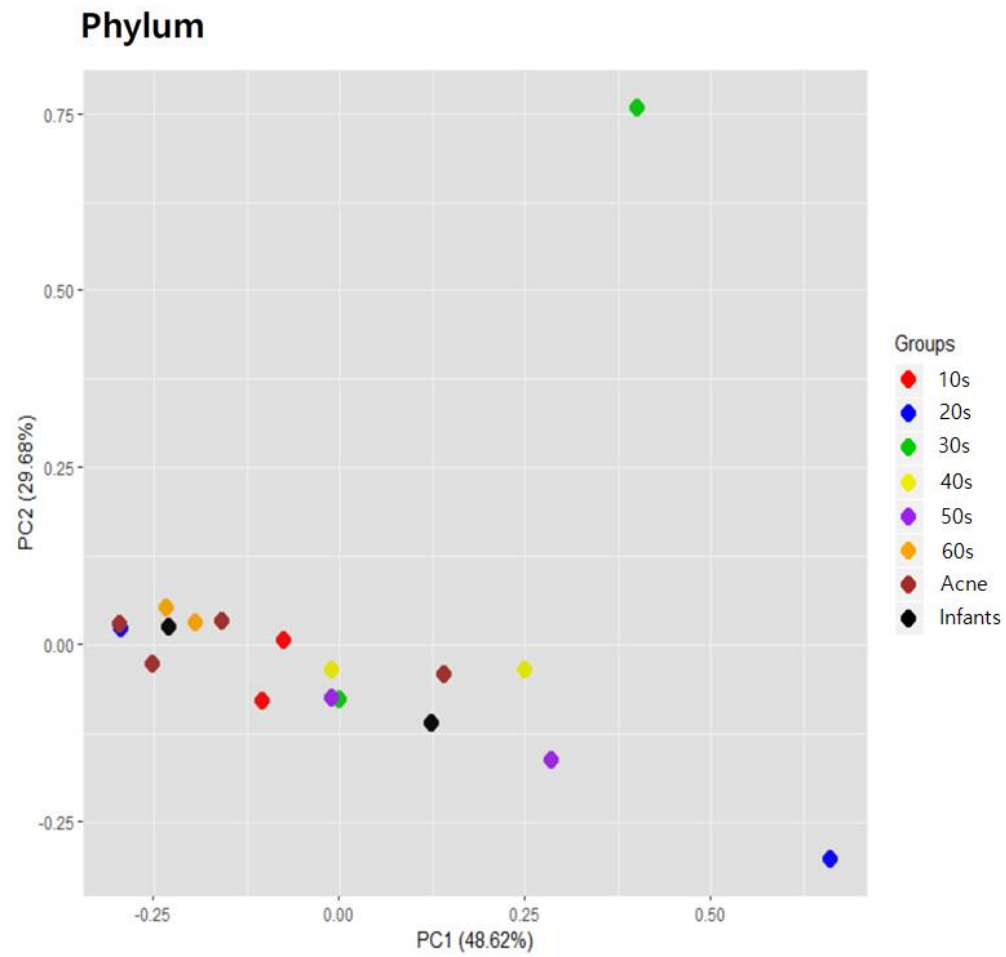


Fig. 14. Principal component analysis of beta diversity at phylum rank depending on age and skin type.

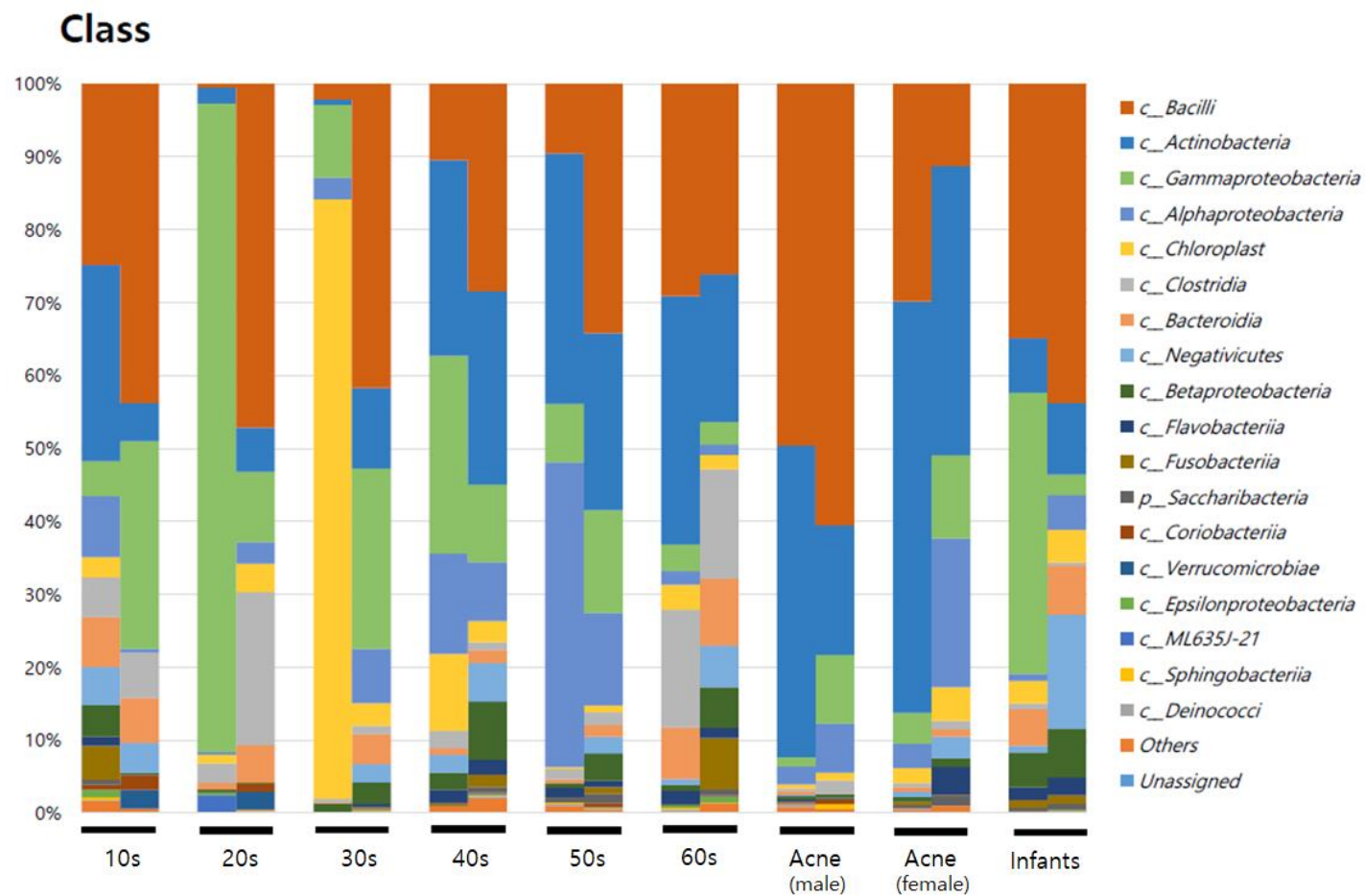


Fig. 15. Skin microbiome analysis at class rank depending on age and skin type.

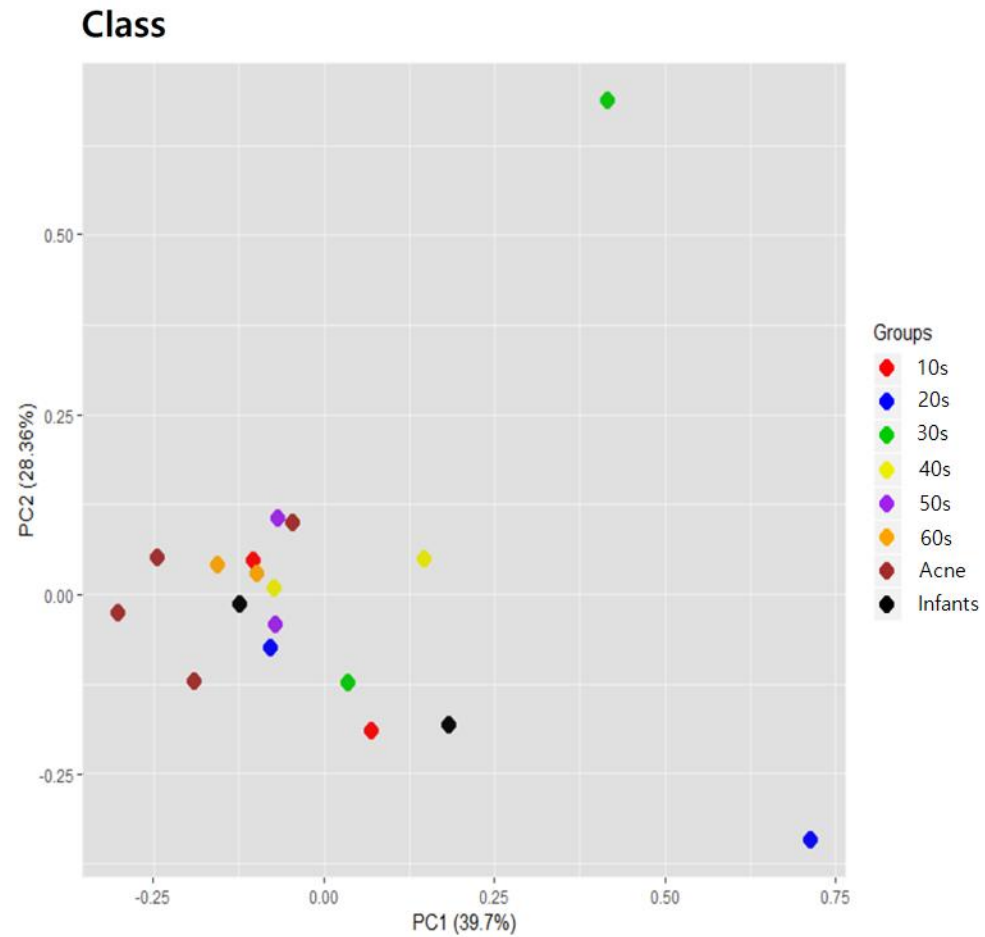


Fig. 16. Principal component analysis of beta diversity at class rank depending on age and skin type.

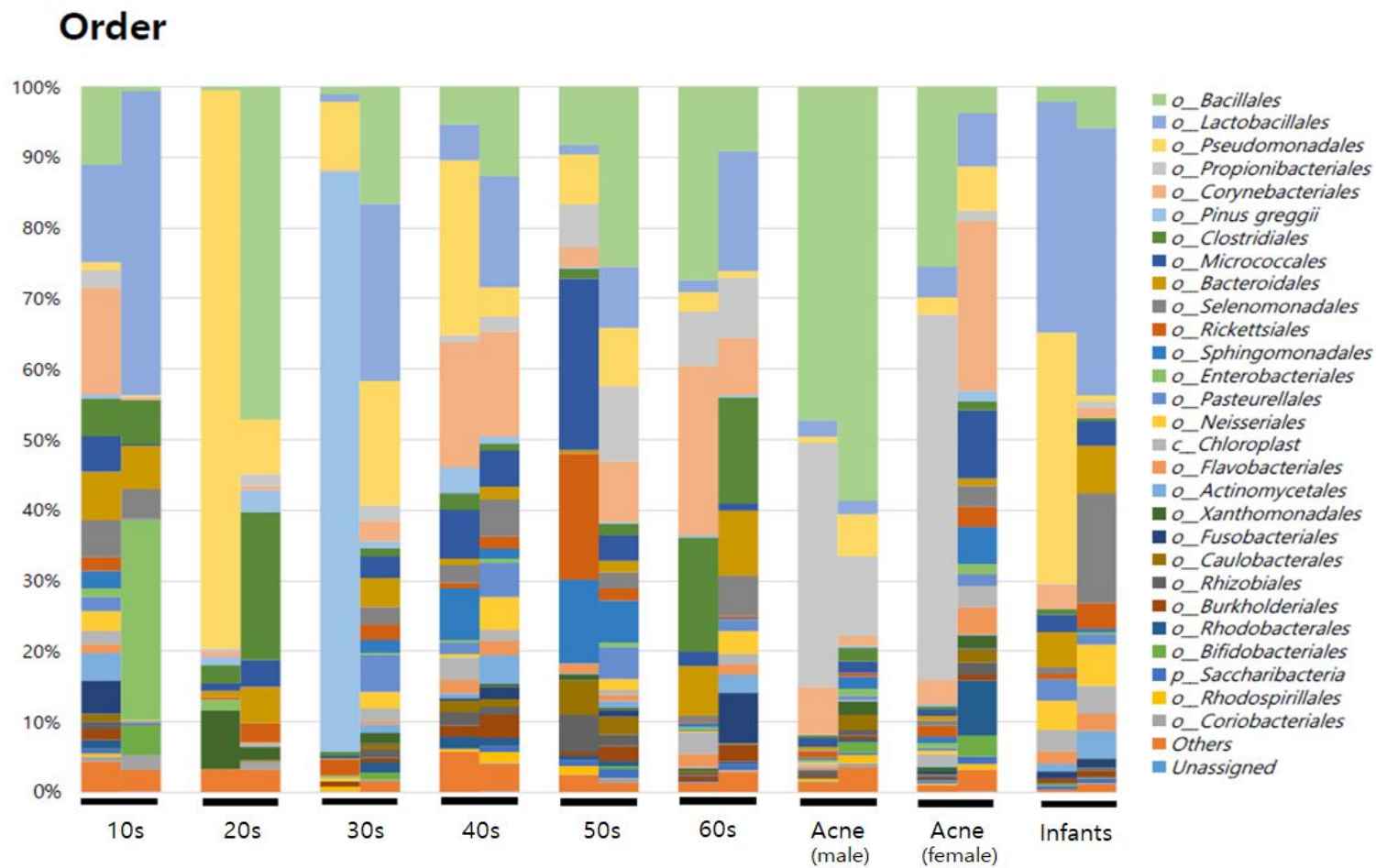


Fig. 17. Skin microbiome analysis at order rank depending on age and skin type.

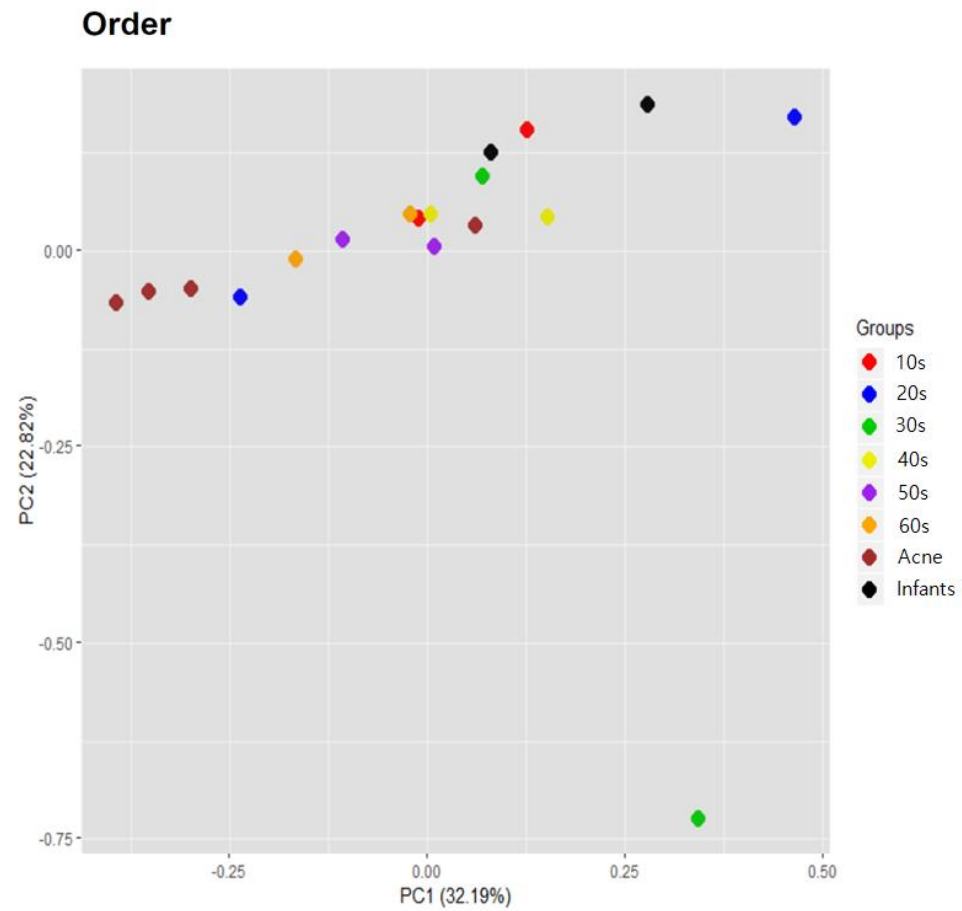


Fig. 18. Principal component analysis of beta diversity at order rank depending on age and skin type.

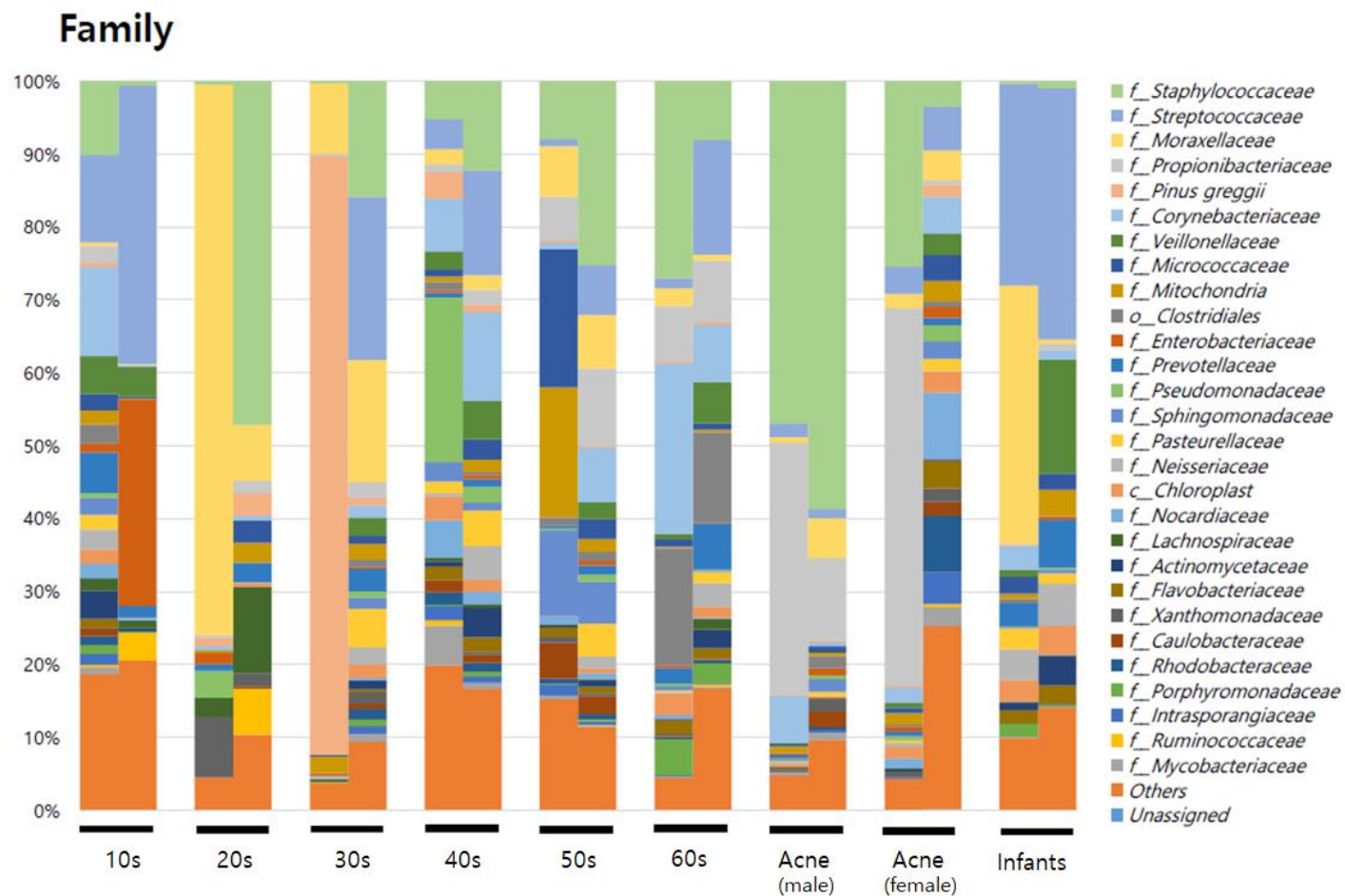


Fig. 19. Skin microbiome analysis at family rank depending on age and skin type.

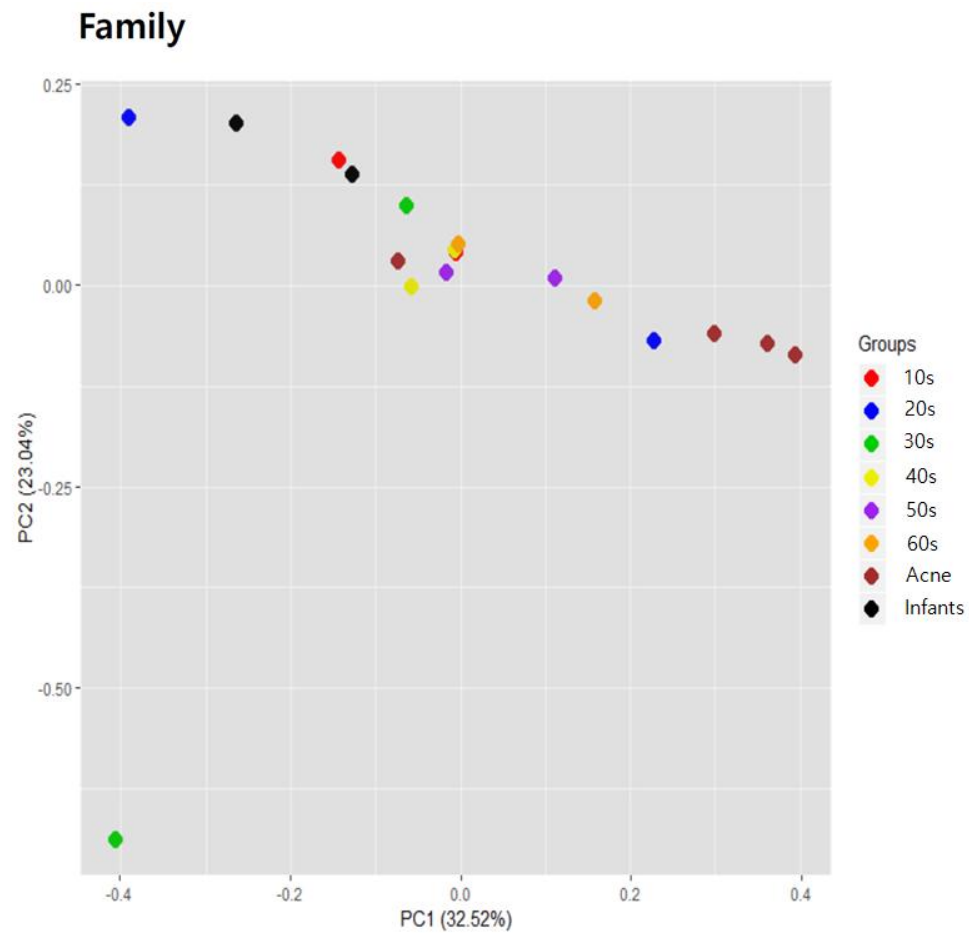


Fig. 20. Principal component analysis of beta diversity at family rank depending on age and skin type.

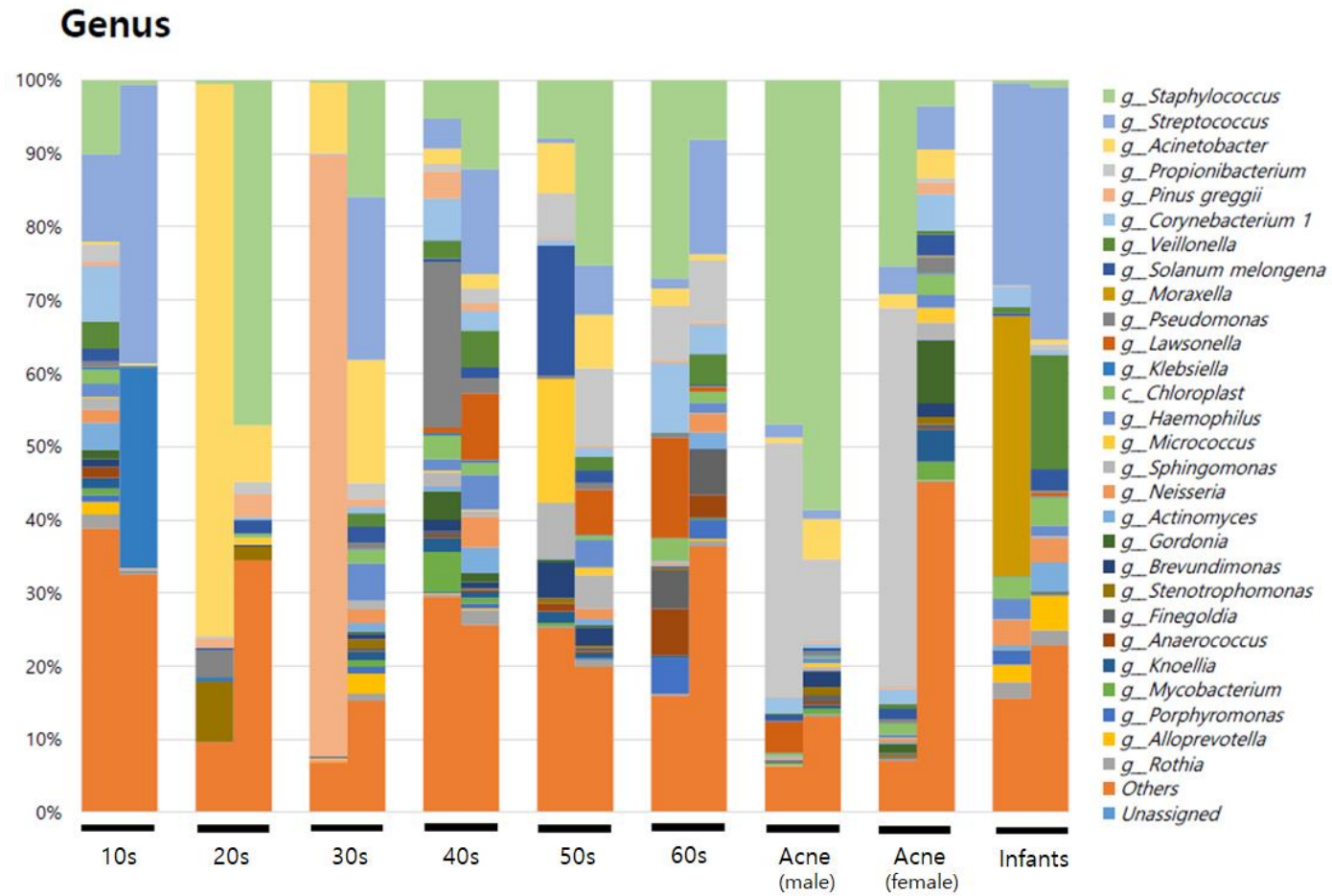


Fig. 21. Skin microbiome analysis at genus rank depending on age and skin type.

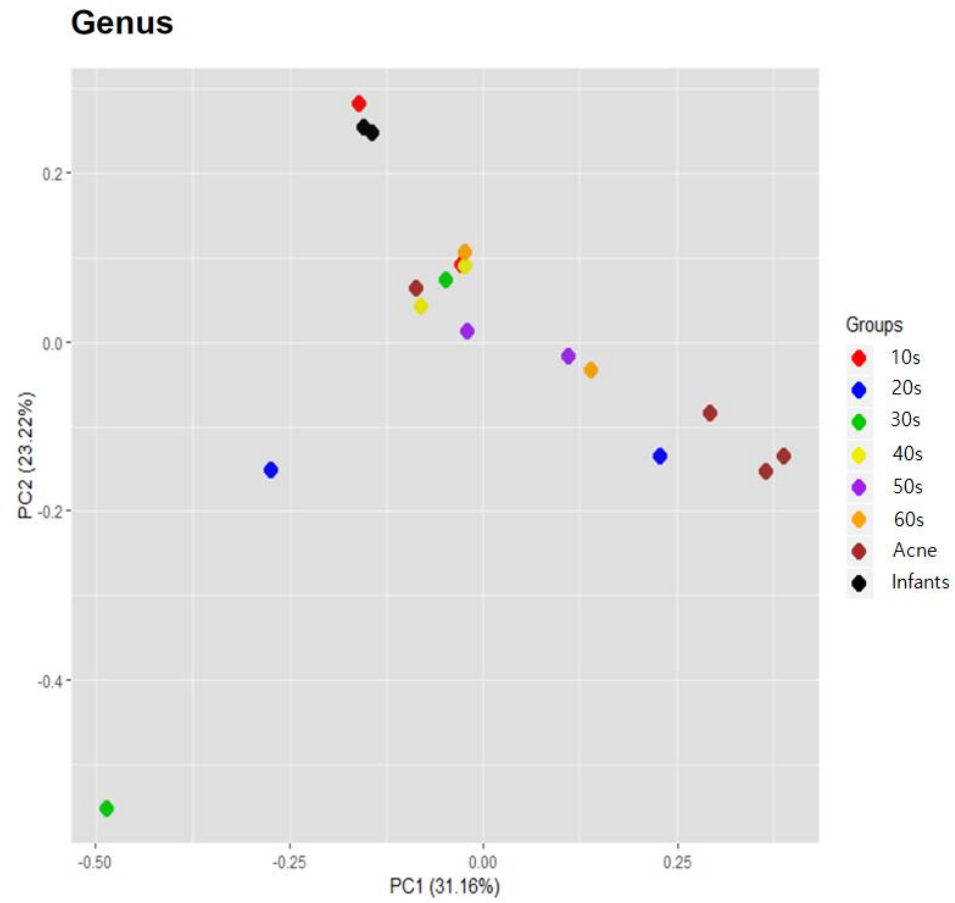


Fig. 22. Principal component analysis of beta diversity at genus rank depending on age and skin type.

종(species)을 기준으로 분류할 경우 연령 및 피부타입별 기준으로는 여드름성 피부의 남성에서 *Staphylococcus* sp.가 평균 52.79%로 분포도가 가장 넓게 나타났으며, 그 다음으로 *Propionibacterium* sp.가 평균 22.66% 수준의 높은 분포도를 나타내었다. 이는 피지가 많은 분비되는 피부부위에서 보다 높은 비율의 *Propionibacterium* sp.이 나타났다는 연구(Chen *et al.*, 2013) 및 피지모낭에서 지배적인 세균을 구성한다는 연구(Dreno *et al.*, 2020)와 유사한 결과를 보여주었다. 그리고 가장 건강한 피부를 갖고 있는 유아에서 *Streptococcus* sp.가 평균 30.65%의 가장 넓은 분포도를 나타내었고(**Fig. 23**), 이는 *Streptococcus* sp.가 유아의 건강한 피부를 유지하는데 영향을 줄 수 있는 중요한 피부상재균으로 분류할 수 있으며, 나이가 들수록 분포도가 줄어드는 결과를 보여준 만큼 이를 유지하거나 증식시킬 수 있는 응용 연구가 필요할 것으로 보인다.

그리고 종(species) 수준에서의 전성분 분석결과는 속(genus)수준의 분석결과와 마찬가지로 유아, 40대 및 여드름성 피부에서 유사한 상관성을 나타내었고, 연령 및 피부타입 간에 점 분포의 차이를 보임으로써 피부 마이크로바이옴이 나이와 피부타입에 따라 변화될 수 있음을 확인할 수 있었다(**Fig. 24**).

결론적으로 나이가 들고 여드름성 피부를 갖고 있는 사람일수록 *Streptococcus* sp.의 비율이 줄어들고 *Staphylococcus* sp.와 *Propionibacterium* sp.의 비율이 늘어나는 경향을 보였다. 본 연구를 통해 *Staphylococcus* sp.와 *Propionibacterium* sp.의 생육을 억제하고 *Streptococcus* sp.와 같은 유익한 피부 미생물들이 잘 생육할 수 있도록 환경을 만들어 줄 수 있는 마이크로바이옴 균형 개선 소재를 개발한다면 관련 산업 시장의 확대에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

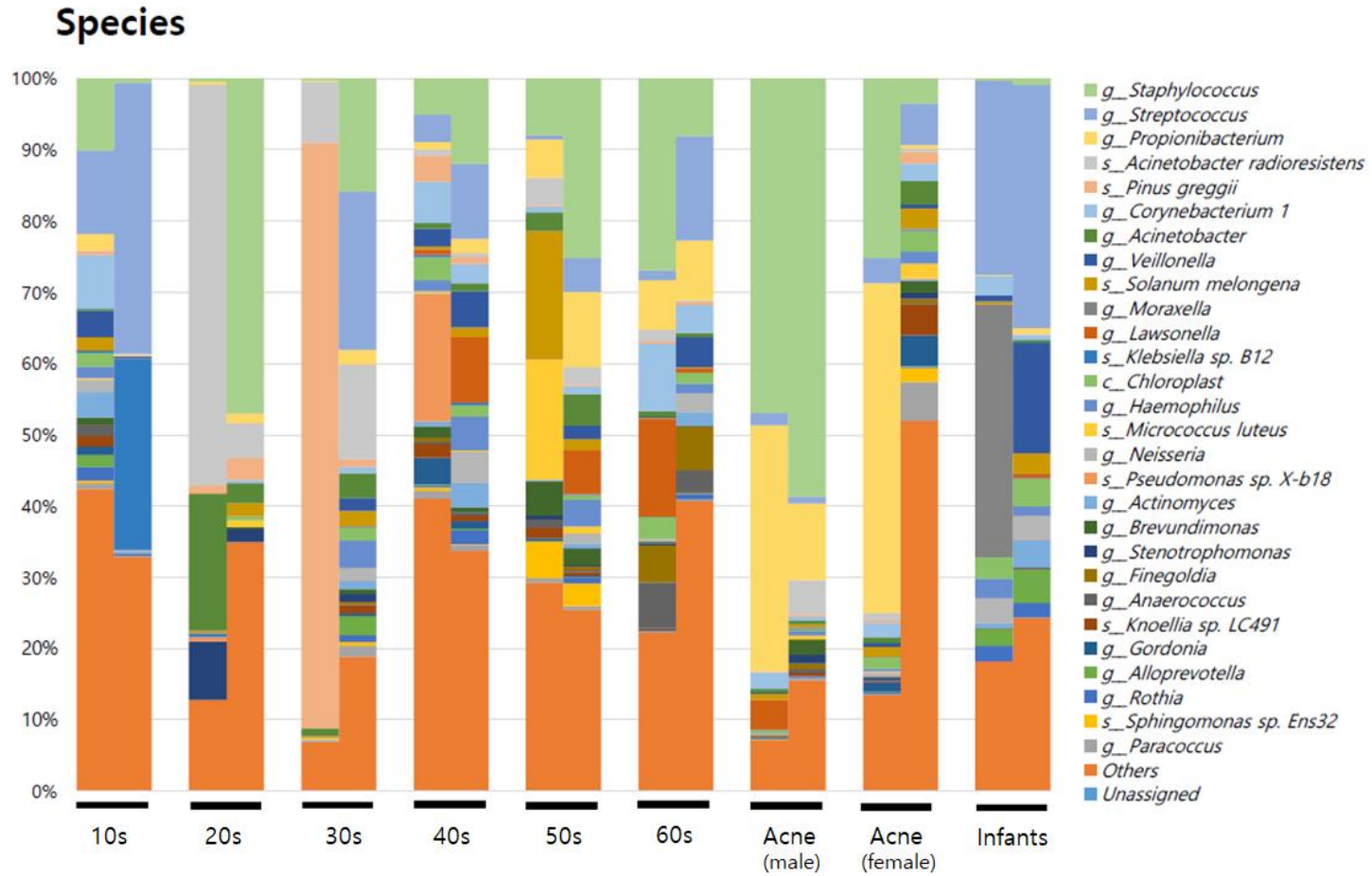


Fig. 23. Skin microbiome analysis at species rank depending on age and skin type.

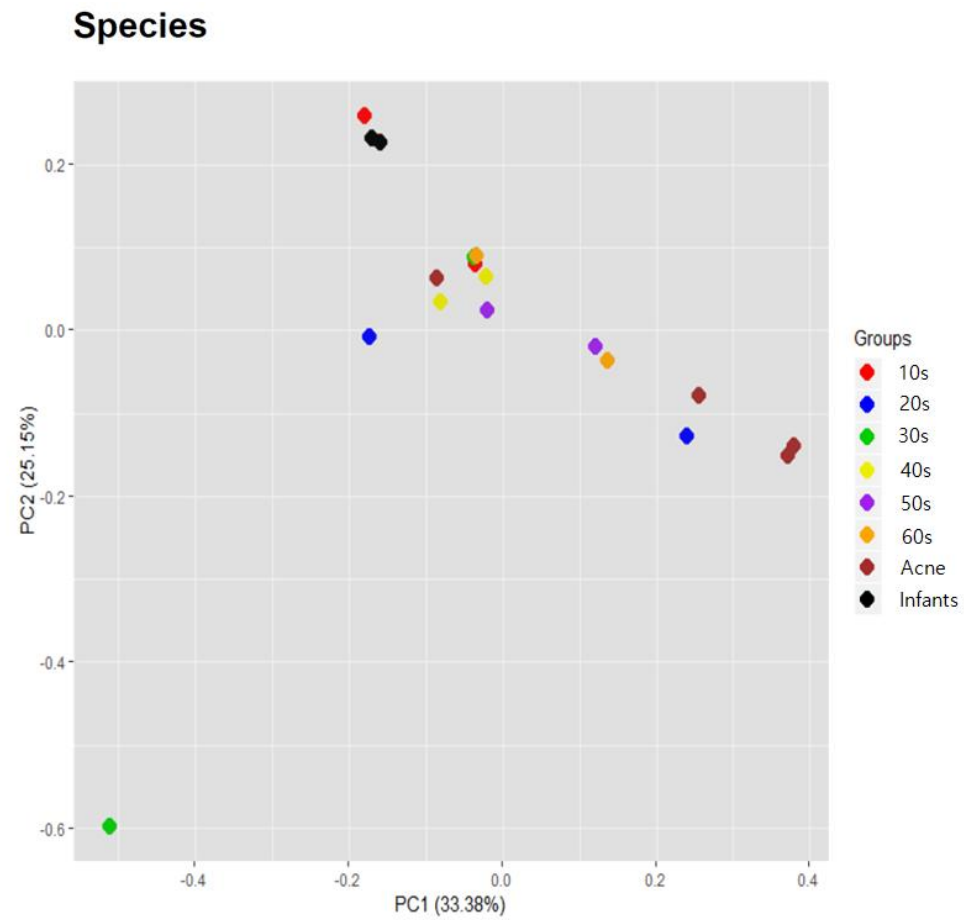


Fig. 24. Principal component analysis of beta diversity at species rank depending on age and skin type.

2) 피부유래 유산균 동정

마이크로바이옴분석을 의뢰한 연령 및 피부타입별 18명의 모든 샘플을 바탕으로 유산균을 분리하는 실험을 진행한 결과 유일하게 5세 유아 피부에서만 유산균이 분리되었고, 16S rRNA 유전자 염기서열과 Clustal omega의 다중서열정렬(multiple sequence alignment, MSA) 분석을 통한 계통수(phylogenetic tree) 분석결과를 확인하였다(Fig. 25). 분석결과 기존 균주의 유전자 염기서열과 비교를 통해 *L. rhamnosus*와 99.1%의 상동성을 보였으며, 한국미생물보존센터(KCCM)에 분리균주를 기탁후 *L. rhamnosus* AMI-1301(KCCM 80230)으로 명명하였다. 또한 본 연구에서는 건강한 피부를 갖고 있는 유아피부 표면에서 마이크로바이옴분석결과와 동일한 *Streptococcus* sp.를 분리하지는 못했지만 유일하게 *Lactobacillus rhamnosus* 유산균이 분리 및 동정 되었다. 이는 아토피 환자에는 *Lactobacillus* 속 유산균이 0%의 비율을 나타낸 반면 정상피부를 갖는 시험자에서 *Lactobacillus* 속 유산균이 2.13% 비율로 나타났다는 연구(Kim *et al.*, 2017)를 바탕으로 정상피부를 유지하는데 *Lactobacillus* 속 유산균이 피부에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

3) 유아 피부유래 유산균을 활용한 천연발효소재의 항산화성 평가

유아피부에서 분리된 유산균 *L. rhamnosus* AMI-1301를 녹차(green tea), 병풀(*Centella asiatica*), 감귤(mandarin orange), 청보리(green barley), 브로콜리(broccoli)의 열수추출물 발효에 사용하였다. 유산균이 접종되지 않은 열수추출물을 대조구로 설정하여, 이들 발효물의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성을 평가하였다.

먼저 녹차 발효물(AMI-1301)의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성 결과를 Fig. 26에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성은 농도 250 μ g/mL 이상에서는 100% 이상 소거효과가 나타남에 따라 농도를 낮추어 15.6~125 μ g/mL 범위에서 실시하였다. 농도 125 μ g/mL에서 녹차대조구(control)는 82.4 \pm 1.7%의 소거능을 보인 반면에, 녹차발효물(AMI-1301)은 88.0 \pm 0.6%의 소거능을 보여, 5.6% 정도 항산화 활성이 증가하였다. 이는 녹차가루를 첨가한 유산균 발효유의 항산화활성 평가한 연구(Yeo *et al.*, 2017)에서 발효 전보다 발효 이후에 DPPH radical 소거

(A)

GTCGAACGAG TTCTGATTAT TGAAAGGTGC TTGCATCTTG ATTTAATTTT GAACGAGTGG
CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG CCCTTAAGTG GGGGATAACA TTTGAAAACA
GATGCTAATA CCGCATAAAT CCAAGAACCG CATGGTTCTT GGCTGAAAGA TGGCGTAAGC
TATCGCTTTT GGATGGACCC GCGGGCTATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG
GCAATGATAC GTAGCCGAAC TGAGAGGTTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC
AAACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGCAAGT CTGATGGAGC
AACGCCGCGT GAGTGAAGAA GGCTTTCGGG TCGTAAACT CTGTTGTTGG AGAAGAATGG
TCGGCAGAGT AACTGTTGTC GCGGTGACGG TATCCAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG
TGCCAGCAGC CGCGTAATA CGTAGGTGGC AAGCGTTATC CGGATTTATT GGGCGTAAAG
CGAGCGCAGG CGGTTTTTTA AGTCTGATGT GAAAGCCCTC GGCTTAACCG AGGAAGTGCA
TCGGAAACTG GAAAACCTGA GTGCAGAAGA GGACAGTGGA ACTCCATGTG TAGCGGTGAA
ATGCGTAGAT ATATGGAAGA ACACCAAGTGG CGAAGGCGGC TGTCTGGTCT GTAAGTACG
CTGAGGCTCG AAAGCATGGG TAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CATGCCGTAA
ACGATGAATG CTAGGTGTTG GAGGGTTTCC GCCCTTCAGT GCCGCAGCTA ACGCATTAAG
CATTCCGCCT GGGGAGTACG ACCGCAAGGT TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC
ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACGCGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA
CATCTTTTGA TCACCTGAGA GATCAGGTTT CCCCTTCGGG GGCAAATGA CAGGTGGTGC
ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC
TTATGACTAG TTGCCAGCAT TTAGTTGGGC ACTCTAGTAA GACTGCCGGT GACAAACCGG
AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CACACGTGCT
ACAATGGATG GTACAACGAG TTGCGAGACC GCGAGGTCAA GCTAATCTCT TAAAGCCATT
CTCAGTTCGG ACTGTAGGCT GCAACTCGCC TACACGAAGT CGGAATCGCT AGTAATCGCG
GATCAGCACG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG
AGAGTTTGTG ACACCCGAAG CCGGTGGCGT AACCCTTTTA GGGAGCGAGC CGTCTAAG

(B)

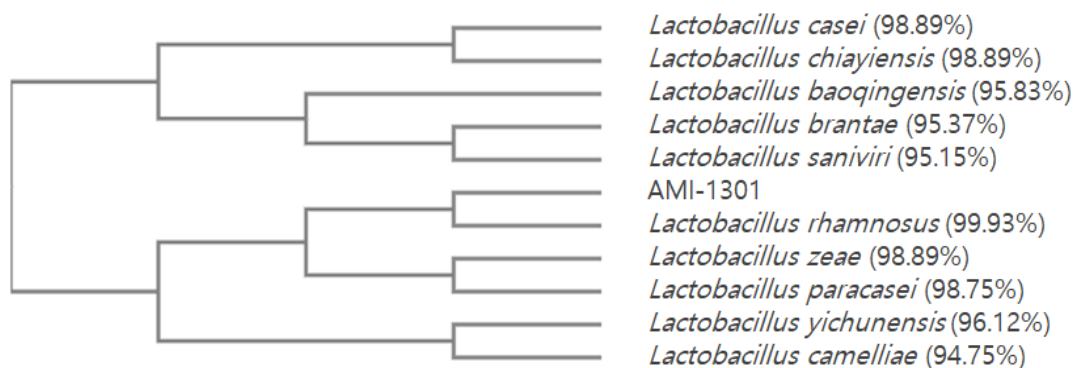
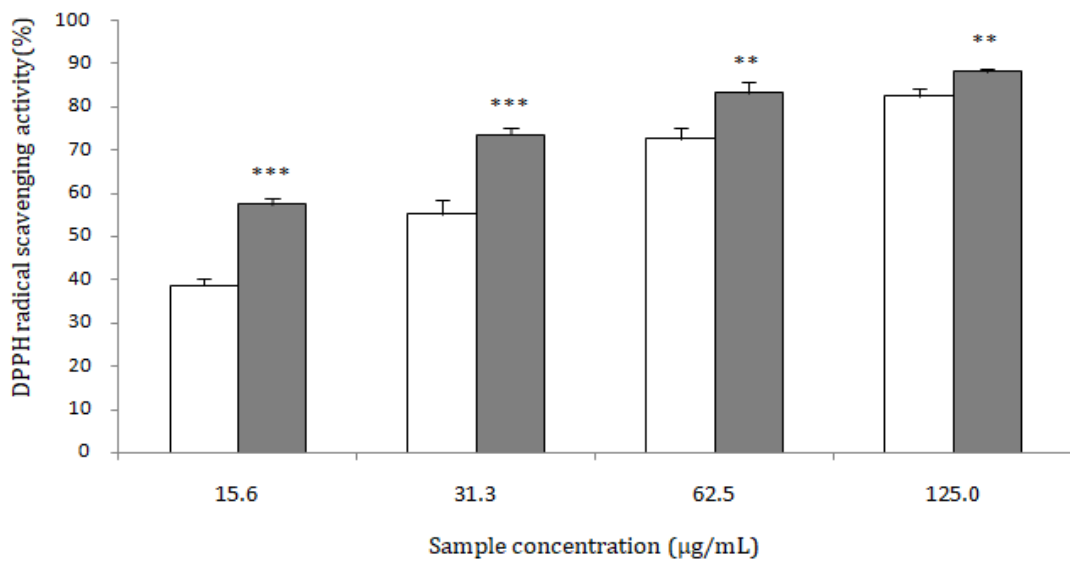
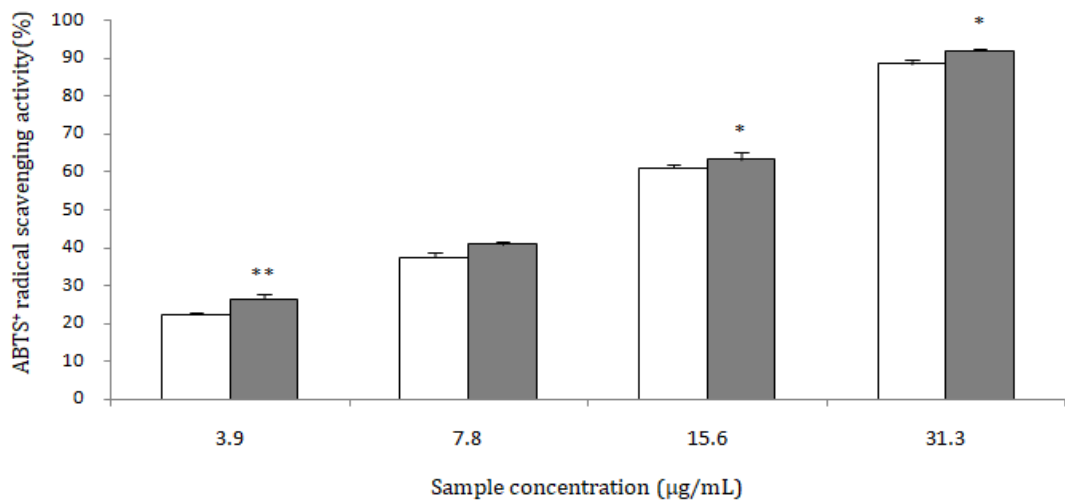


Fig. 25. Nucleotide sequences(a) and phylogenetic tree(b) of 16S rRNA gene from *Lactobacillus rhamnosus* AMI-1301 (KCCM 80230).

(A)



(B)



□ Green tea ext.(control) ■ Green tea fermentation ext.(AMI-1301)

Fig. 26. Radical scavenging activity of fermentation broth of green tea extract. (A) DPPH radical scavenging activity(%) (B) ABTS+ radical scavenging activity(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

능이 유의적으로 증가하였다는 연구 내용과 유사한 결과를 나타내었으며, 이는 유산균의 젖산발효에 의해 생성된 대사물질 및 유기산 등에 의한 작용으로 판단된다. 그리고 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 62.5 μ g/mL 농도 이상에서는 100% 이상의 소거효과가 나타남에 따라 농도를 낮추어 3.9~31.3 μ g/mL 범위에서 실시하였다. 농도 31.3 μ g/mL에서 녹차대조구(control)는 88.0 \pm 1.2%의 소거능을 보인 반면에, 녹차발효물(AMI-1301)은 92.0 \pm 1.0%의 효능을 보여, 4.0%정도 항산화 활성이 증가하였다.

이어서 병풀발효물(AMI-1301)의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성을 **Fig. 27**에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성의 경우, 농도 1,000 μ g/mL에서 병풀대조구(control)는 34.3 \pm 2.1%의 소거능을 보인 반면에, 병풀발효물(AMI-1301)은 52.1 \pm 2.0%의 효능을 보여, 17.8% 정도 항산화 활성이 증가하였다. 이는 병풀 잎을 100 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 건조시켜 차를 제조하는 방식으로 만들어진 발효차의 DPPH radical 소거활성능을 평가한 연구(Heong *et al.*, 2011)에서 항산화효과가 오히려 감소되었다는 내용과는 대조된 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 피부에서 분리된 *L.rhamnosus* 유산균을 종균으로 사용한 부분과 병풀 열수추출물을 이용하여 35 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 액상 발효시킨 제조방법에 따른 차이 때문인 것으로 판단된다. 그리고 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 농도 1,000 μ g/mL에서 병풀대조구(control)는 71.5 \pm 0.3%의 소거능을 보인 반면에, 병풀발효물(AMI-1301)은 84.8 \pm 0.3%의 효능을 보여, 13.3% 정도 항산화 활성이 증가하였다.

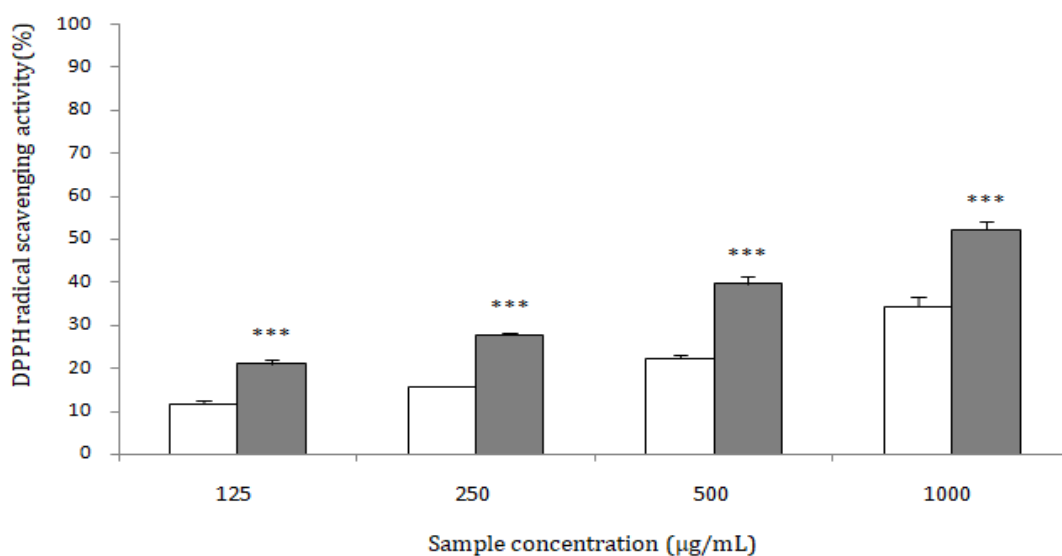
감귤발효물(AMI-1301)의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 **Fig. 28**에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성의 경우, 농도 1,000 μ g/mL에서 감귤대조구(control)는 37.9 \pm 4.3%의 소거능을 보인 반면에, 감귤발효물(AMI-1301)은 63.1 \pm 3.3%의 효능을 보여, 항산화 활성이 25.2% 정도 증가하였음을 나타내었다. 이는 감귤부산물에 *L.plantarum* 및 *L.rhamnosus* 등의 유산균을 접종하여 발효시킨 발효물에 대한 DPPH radical 소거활성능이 발효 전 대비하여 증가했다는 연구(Moon *et al.*, 2006)와 일치한 결과를 나타내었으며, 이러한 결과를 바탕으로 감귤이 유산균 발효를 통한 항산화효과 증대에 우수한 기질로 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 1,000 μ g/mL 농도에서 감귤대조구(control)는 74.6 \pm 0.6%의 소거능을 보인 반면에, 감귤발효물

(AMI-1301)은 92.0±0.2%의 효능을 보여, 17.4% 정도 항산화 활성이 증가하였다.

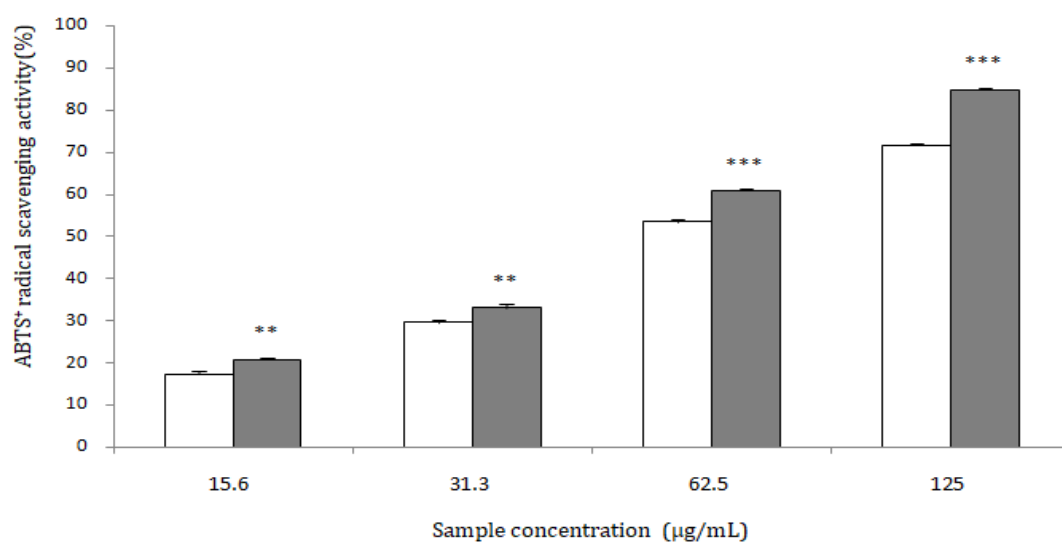
청보리발효물(AMI-1301)의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 **Fig. 29**에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성의 경우, 1,000µg/mL 농도에서 청보리 대조구(control)는 39.8±2.9%의 소거능을 보인 반면에, 청보리발효물(AMI-1301)은 67.0±4.7%의 효능을 보여, 항산화 활성이 27.2% 정도 증가하였음을 나타내었다. 이는 *L.brevis* 및 *L.paracasei* 유산균으로 발효한 보리발효물이 발효하지 않은 보리 추출물 보다 유의성 있게 항산화효과가 증대되었다는 연구결과(Lee *et al.*, 2018)와 유사한 결과를 보여 우수한 발효기질로 활용될 수 있는 천연물임을 확인할 수 있었다. 하지만, ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 농도 1,000µg/mL에서 청보리대조구(control)와 청보리발효물(AMI-1301)이 서로 비슷한 각각 99.8±0.1%와 99.3±0.2% 수준의 소거능을 보였다.

브로콜리발효물(AMI-1301)의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성을 **Fig. 30**에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성의 경우, 1,000µg/mL 농도에서 브로콜리 대조구(control)는 63.1±6.1%의 소거능을 보인 반면에 브로콜리발효물(AMI-1301)은 78.2±2.2%의 효능을 보여, 15.2% 정도 항산화 활성이 증가하였다. 반면에 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 농도 1,000µg/mL에서 브로콜리대조구(control)와 브로콜리 발효물(AMI-1301)이 서로 비슷하게 각각 99.7±0.1%와 100.0±0.3%의 소거능을 보였다. 이번 항산화 활성 증대를 위해 발효 기질로 활용된 브로콜리는 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 배추속 작물로서 녹색꽃 양배추로도 불리며 감귤과 더불어 제주지역에서 가장 많이 생산되는 대표하는 작물 중 하나이다. 이미 보고된 연구(Kim *et al.*, 2014)에서 브로콜리의 가식부인 꽃송이(floret)와 비가식부인 줄기(stalk) 모두 DPPH 및 ABTS radical 소거활성 평가를 통해 항산화 활성이 있음을 확인하였고 뿐만 아니라 항균활성 및 대장암세포 생육억제 활성도 확인된바 있다. 또한 *L.plantarum* 유산균으로 발효시킨 브로콜리 발효물에서 생균활성이 7.15 x 10⁹ CFU/mL 수준으로 매우 우수함을 확인(Yang *et al.*, 2015)하여 브로콜리가 기능성 증대를 위한 우수한 발효기질로 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

(A)



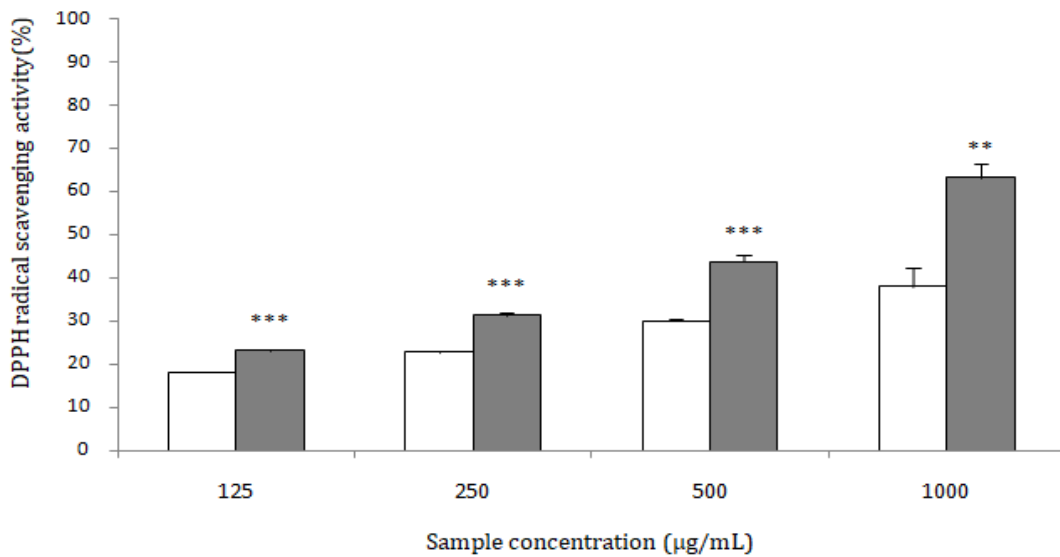
(B)



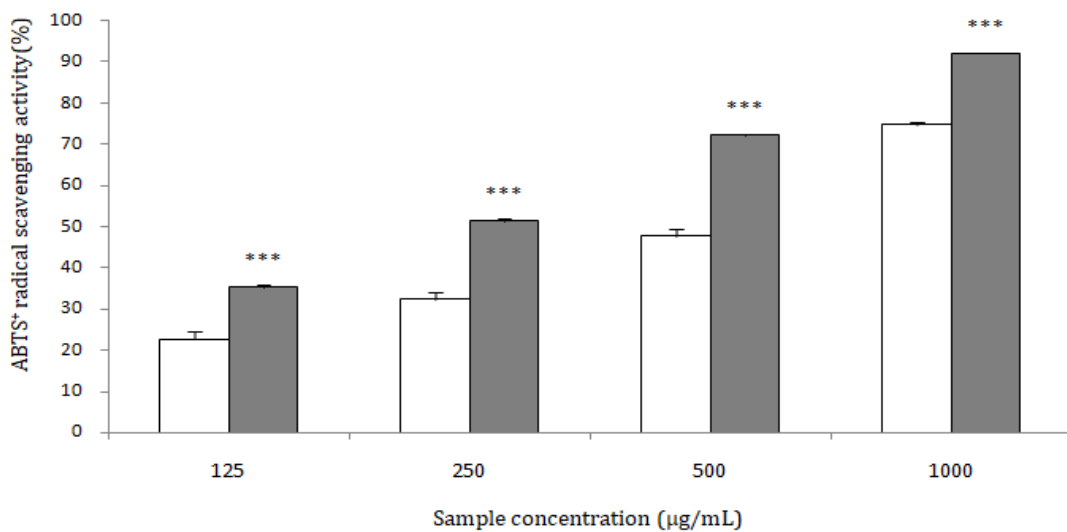
□ Centella asiatica ext. (control) ■ Centella asiatica fermentation ext. (AMI-1301)

Fig. 27. Radical scavenging activity of fermentation broth of *Centella asiatica* extract. (A) DPPH radical scavenging activity(%) (B) ABTS+ radical scavenging activity(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t -test).

(A)



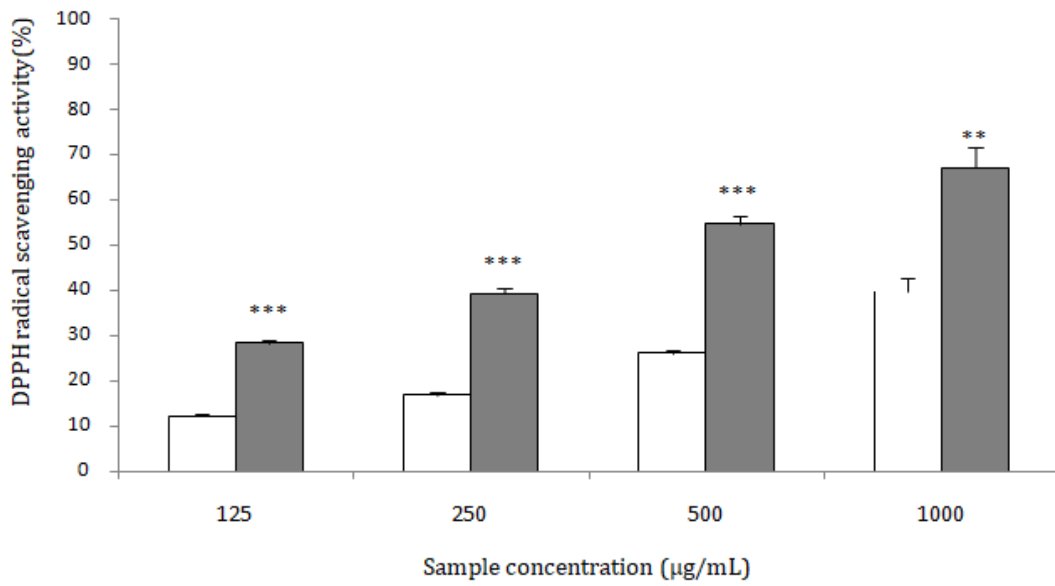
(B)



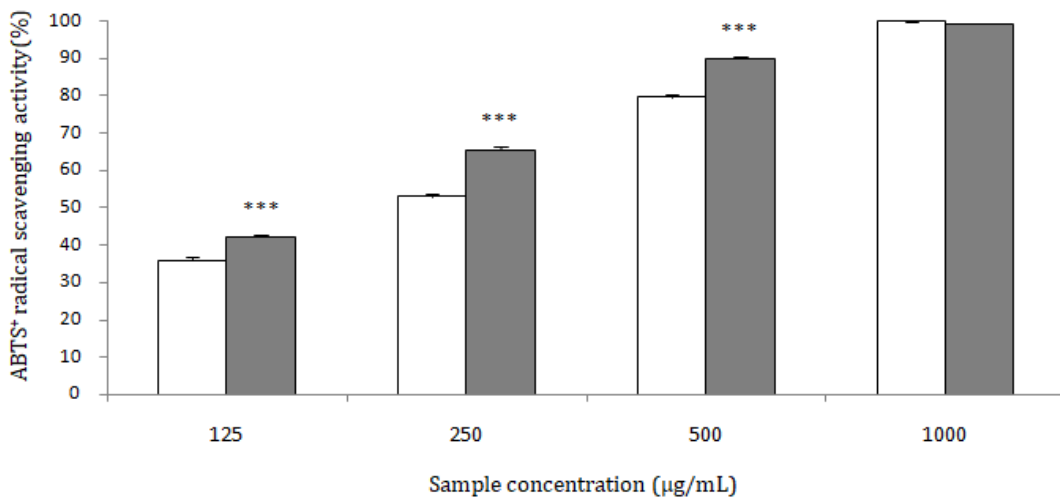
□ Mandarin orange ext.(control) ■ Mandarin orange fermentation ext.(AMI-1301)

Fig. 28. Radical scavenging activity of fermentation broth of Mandarin orange extract. (A) DPPH radical scavenging activity(%) (B) ABTS+ radical scavenging activity(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

(A)



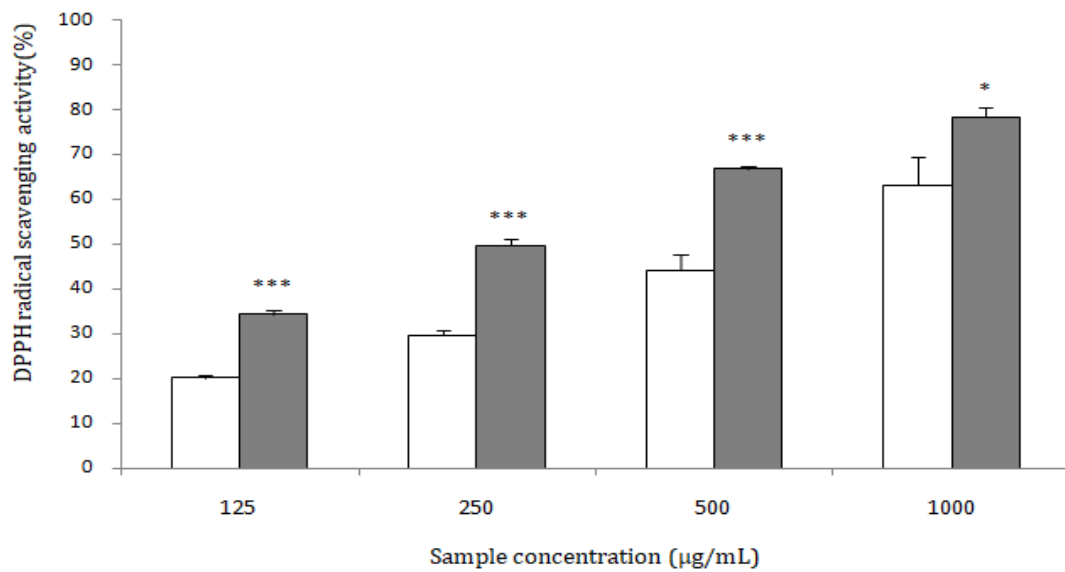
(B)



□ Green barley ext.(control) ■ Green barley fermentation ext.(AMI-1301)

Fig. 29. Radical scavenging activity of fermentation broth of green barley extract. (A) DPPH radical scavenging activity(%) (B) ABTS+ radical scavenging activity(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

(A)



(B)

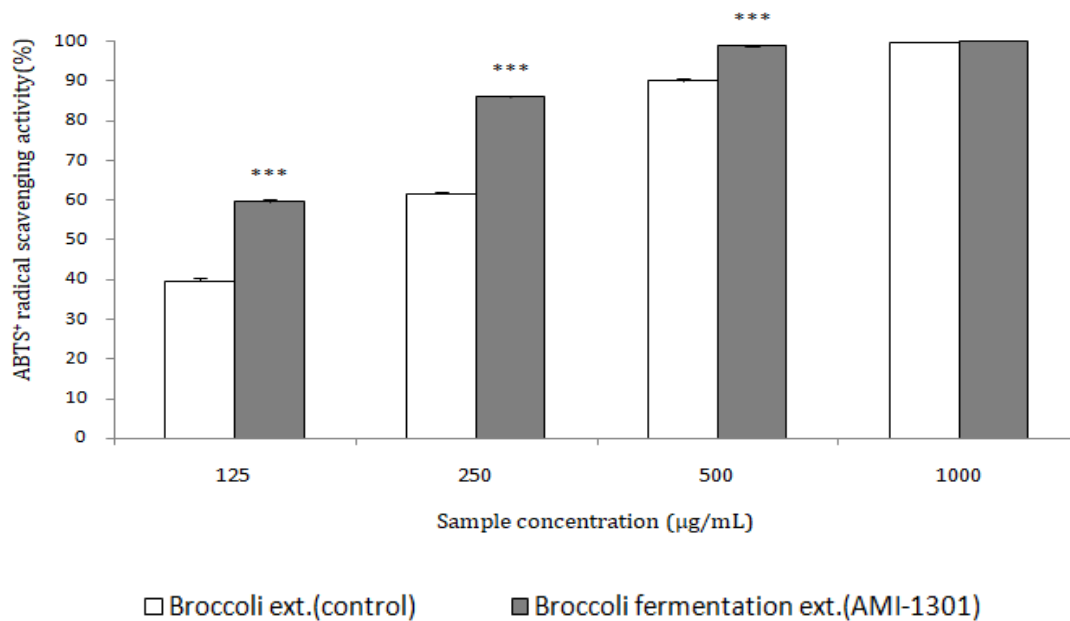


Fig. 30. Radical scavenging activity of fermentation broth of broccoli extract. (A) DPPH radical scavenging activity(%) (B) ABTS+ radical scavenging activity(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

추가적으로 유아피부에서 분리된 균주 *L. rhamnosus* AMI-1301가 항산화성 증대효과에 미치는 역할을 해석하고자, 공시균주 *L. rhamnosus* KCCM32405와 비교실험을 실시하였다. 항산화 활성이 가장 높게 나타난 녹차열수추출물을 발효기질로 사용하여 분리균주와 공시균주를 각각 배양하여 얻은 발효물의 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거활성을 조사하였다(Fig. 31). DPPH 라디칼 소거활성의 경우, 농도 62.5 μ g/mL에서 녹차대조구(control)는 76.9 \pm 5.3%, 공시균주의 녹차발효물은 84.2 \pm 2.9%, 분리균주(AMI-1301)의 녹차발효물은 88.0 \pm 0.9%로 나타났다. 즉, 분리균주가 대조구와 공시균주에 비하여 각각 11.1%, 3.8% 정도 높은 항산화효과를 나타내었다. 그리고 ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 농도 15.6 μ g/mL에서 녹차대조구(control)는 69.0 \pm 0.1%, 공시균주의 녹차발효물은 62.2 \pm 0.1%, 분리균주(AMI-1301)의 녹차발효물은 75.5 \pm 0.0%로 나타났다. 분리균주의 경우, 대조구와 공시균주에 비해서 각각 6.5%, 13.3% 정도 높은 항산화효과를 나타내었다. 이와 같이 유아피부에서 분리된 균주 *L. rhamnosus* AMI-1301를 사용한 발효물이 대조구 및 공시균주를 사용한 발효물보다 높은 항산화 효과를 보였다. 이는 김치에서 분리한 *L. rhamnosus* 유산균을 활용하여 찹쌀 발효하였을 때 DPPH 및 ABTS radical 소거활성능이 증대되었다는 연구(Kim *et al.*, 2019)와 영경귀를 발효하였을 때 DPPH radical 소거활성능이 증대하고 tyrosinase 저해활성이 증대되었다는 연구(Park *et al.*, 2019)와 유사한 결과를 보임으로써 *L. rhamnosus* 유산균이 다양한 천연물을 발효하여 기능성을 증대시키는 생물전환 starter로 산업적으로 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구를 통해서 동종의 *L. rhamnosus* 유산균이라 할지라도 분리원에 따라서 그 효능에 차이가 나타날 수 있음을 확인할 수 있었으며, 녹차추출물 이외에도 유산균이 잘 생육할 수 있는 천연물을 기질로 하여 항산화효과가 증대된 우수한 발효소재개발이 가능할 것으로 판단된다.

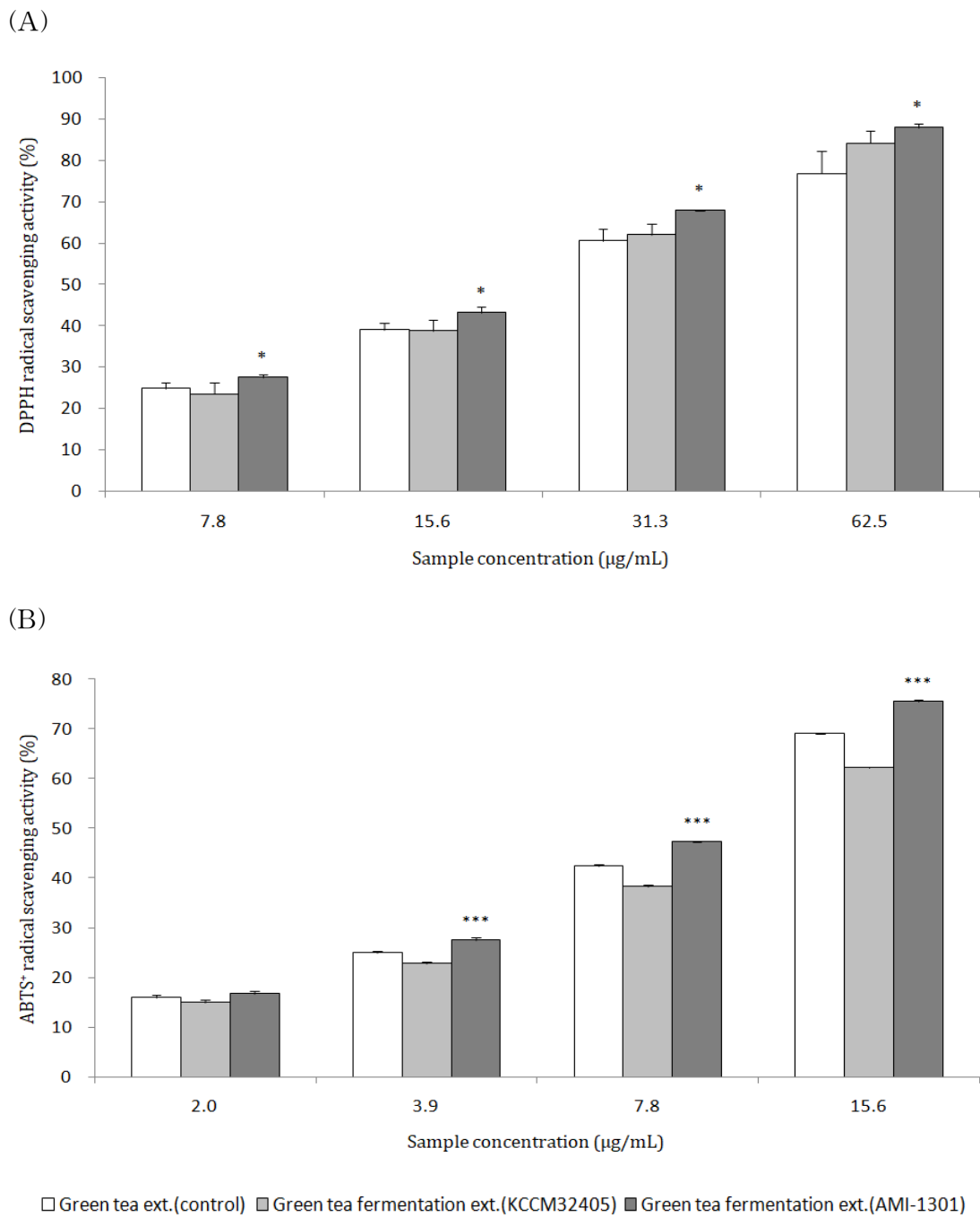


Fig. 31. Radical scavenging activity of fermentation broth of green tea extract by *Lactobacillus rhamnosus* strains. (A) DPPH radical scavenging activity(%) (B) ABTS+ radical scavenging activity(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

4) 유산균 세포외소포체의 세포생존율 및 nitric oxide 생성 억제효과

유아의 피부로부터 분리된 유산균(*L.rhamnosus* AMI-1301)의 세포외소포체가 세포생존율에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 32A). LPS(1 μ g/mL)로 자극하여 염증반응이 유도된 Raw 264.7 cell에 세포외소포체를 0.1, 1, 10 및 20 μ g/mL 농도로 처리하여 시료를 처리하지 않은 음성 대조구와 비교하였다(Fig. 32B). 그리고 nitric oxide(NO) 생성 억제효과를 평가하기 위하여 양성대조구인 2-amino-4-picoline(10 μ M)의 처리구도 함께 평가하였다. 유산균(AMI-1301) 세포외소포체를 처리한 모든 실험구와 양성 대조구(2-amino-4-picoline) 모두 100% 이상의 세포생존율을 나타내었다. 따라서 세포생존에 부정적 영향을 미치지 않는 시료농도를 최대 20 μ g/mL로 설정하여 NO 생성 억제율을 조사하였다. 유산균 세포외소포체의 항염증 효과를 NO 생성 억제율로 평가하였다. 세포외소포체 농도에 따른 NO 생성율은 음성대조구의 100%와 비교하여, 1.0 μ g/mL에서 93.4 \pm 2.5%, 10 μ g/mL에서 55.3 \pm 2.8%, 20 μ g/mL에서 39.0 \pm 4.0%로 감소하여, 각각 1.0 μ g/mL에서 6.6%, 10 μ g/mL에서 44.7%, 20 μ g/mL에서 61% 수준의 NO 생성 억제효과, 즉 염증반응 억제효과가 있음을 확인하였다.

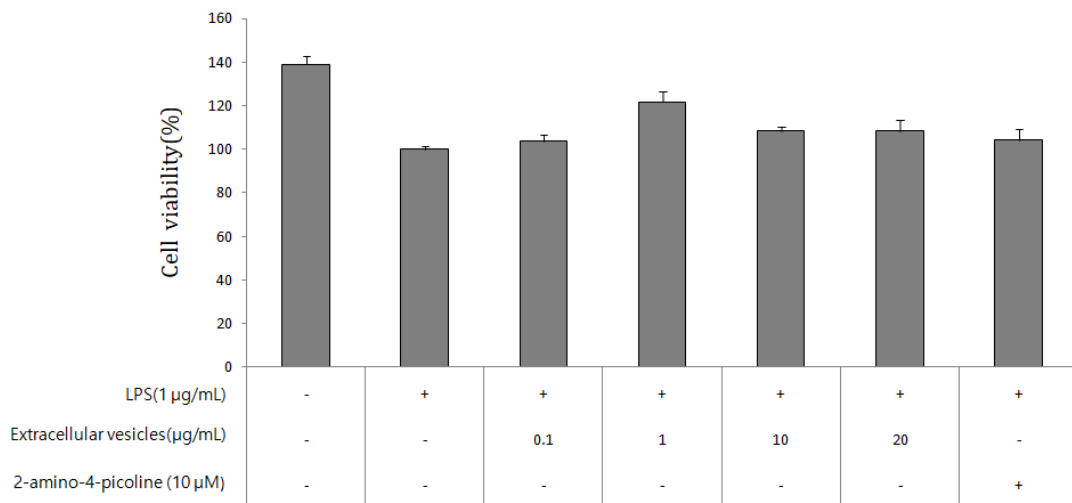
5) 유산균 세포외소포체의 염증성 사이토카인 생성 억제효과

IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 는 염증반응을 조절하는 대표적인 사이토카인으로, 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하는 인자로 알려져 있다. LPS로 염증반응이 유도된 Raw 264.7 cell에 유산균 세포외소포체를 처리하였을 때, 이들 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 변화를 조사하였다.

먼저, 사이토카인 IL-6의 생성은 음성대조구의 39.5ng/mL에 비하여, 세포외소포체 농도 10 μ g/mL에서 34.9 \pm 4.1ng/mL, 20 μ g/mL에서 28.5 \pm 3.0ng/mL로 각각 감소하였다(Fig. 33). 그리고 사이토카인 IL-1 β 의 생성은 음성대조구에서는 88.2ng/mL이었으나, 세포외소포체 농도 1.0 μ g/mL에서 51.4 \pm 4.7ng/mL, 10 μ g/mL에서 49.0 \pm 5.5ng/mL로 각각 감소하였다(Fig. 34). 마지막으로 TNF- α 사이토카인의 생성은 음성대조구의 경우 57.6 ng/mL에 비하여, 세포외소포체 농도 10 μ g/mL에서 46.2 \pm 3.1ng/mL, 20 μ g/mL에서 54.0 \pm 2.2ng/mL으로 각각 감소하였다(Fig. 35). 이는 LPS를 이용한 대식세포(Raw 264.7 cell) 염증유도 모델에서 성

체줄기세포 유래 세포외소포체가 TNF- α 와 IL-10의 생성을 억제하였다는 연구결과(Jung *et al.*, 2016)와 *L. paracasei* 유산균에서 유래한 세포외소포체가 대장암 세포(HT29 cell)에서 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 중 IL-1 β , IL-2 및 TNF- α 의 생성을 억제하였다는 연구(Choi *et al.*, 2020)와 유사한 결과를 나타내었다. 이와 같이 본 연구에서 활용된 *L.rhamnosus* 유산균에서 유래한 세포외소포체는 염증유발을 유도하는 사이토카인으로 알려진 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 생성을 억제하는 항염증 생물 소재로서 다양한 산업영역에 활용 가능성이 있음을 보여주었다.

(A)



(B)

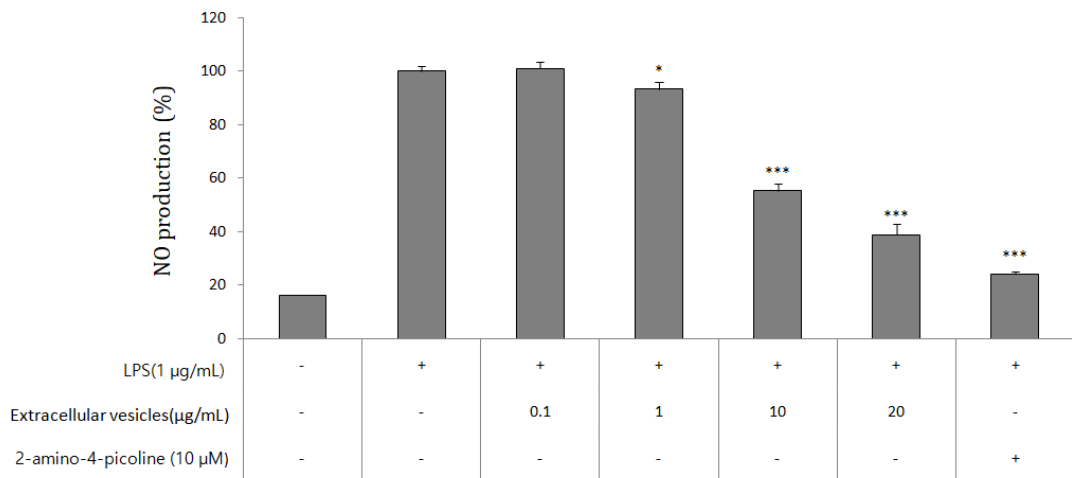


Fig. 32. Effects of extracellular vesicles from *Lactobacillus rhamnosus* AMI-1301 on cell viability and NO production. (A) Cell viability(%) (2) NO production(%). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

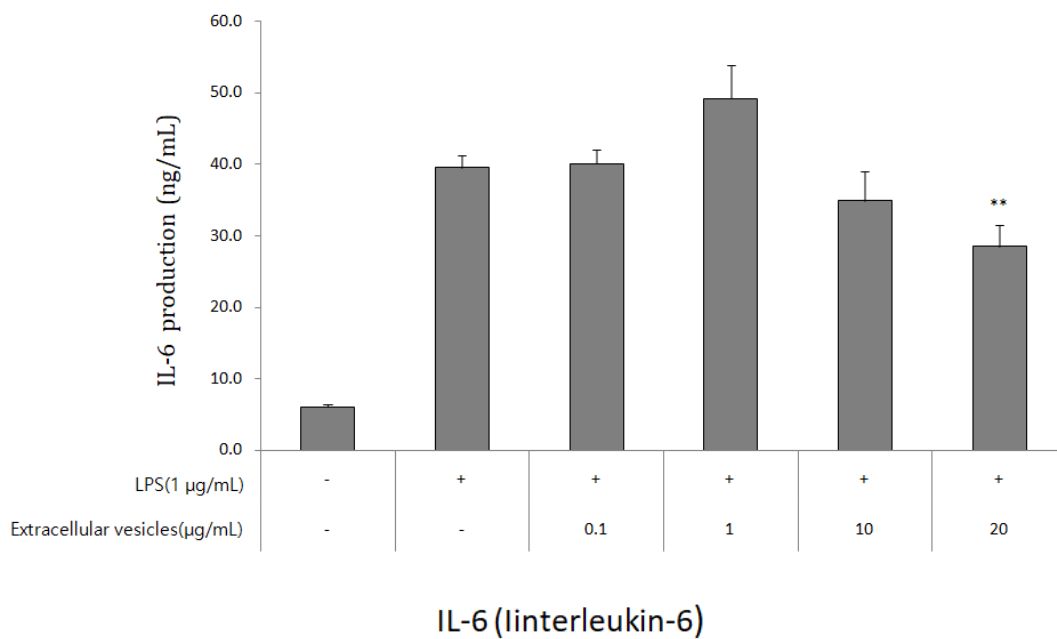


Fig. 33. Effects of extracellular vesicles from *Lactobacillus rhamnosus* AMI-1301 on production of cytokine IL-6(Interleukin-6). Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

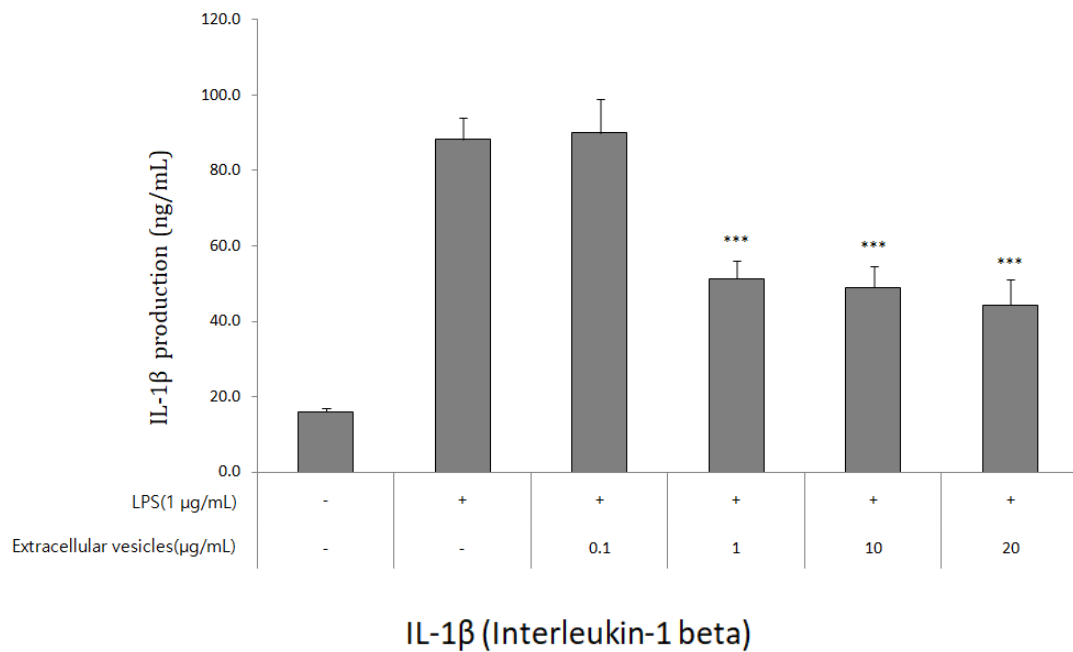
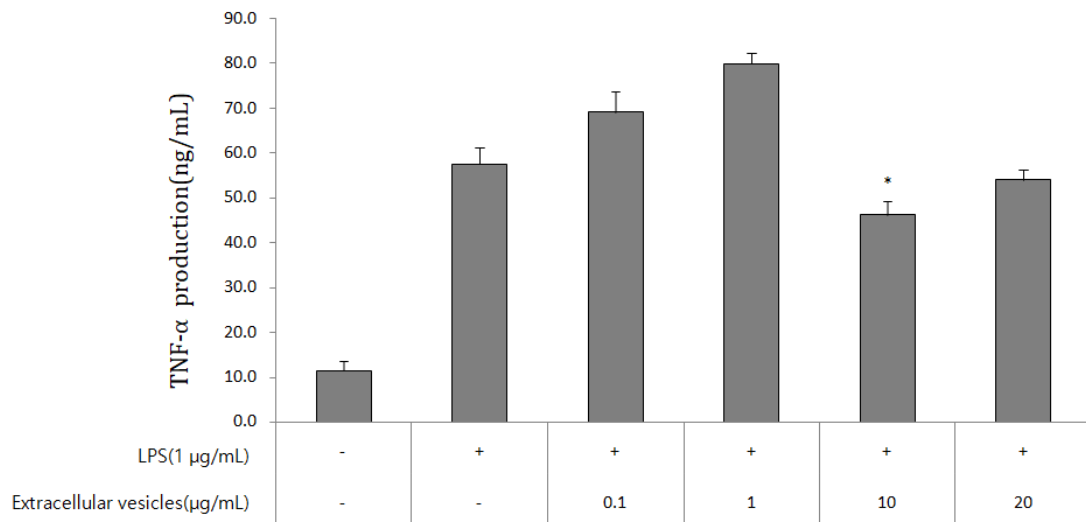


Fig. 34. Effects of extracellular vesicles from *Lactobacillus rhamnosus* AMI-1301 on production of cytokine IL-1β(Interleukin-1 beta). Data are representative of three independent experiments and are presented as means ± SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).



TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha)

Fig. 35. Effects of extracellular vesicles from *Lactobacillus rhamnosus* AMI-1301 on production of cytokine TNF-α(Tumor necrosis factor-alpha). Data are representative of three independent experiments and are presented as means ± SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. two-tailed Student's t-test).

3. 요약

본 연구에서는 연령 및 피부상태에 따른 마이크로바이옴을 분석하였으며 정상 피부와 여드름성 피부를 갖는 시험자 사이에 마이크로바이옴 분포도 차이가 있음을 확인하였다. 또한 마이크로바이옴 분석 샘플 중 유일하게 건강한 유아의 피부에서 새로운 유산균(*L.rhamnosus* AMI-1301)이 분리되었고 이를 항산화성 소재와 항염증 소재로 활용하고자 연구를 수행하였다.

우선, 녹차, 병풀, 감귤, 청보리 및 브로콜리를 기질로 사용하여 분리된 유산균을 배양하였고, 배양액으로부터 회수한 발효물의 항산화성 증대효과를 조사하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 녹차발효물의 경우 최고농도에서 대조구 대비 5.6%, 병풀발효물 17.8%, 감귤발효물 25.2%, 청보리발효물 27.2%, 브로콜리발효물 15.2%씩 각각 증가하여, 유산균 발효가 항산화성을 증대시켰다. ABTS 양이온 라디칼 소거활성은 녹차발효물의 경우 최고농도에서 대조구 대비 4.0%, 병풀발효물 13.3%, 감귤발효물 17.4%씩 각각 증가하였으나, 청보리발효물과 브로콜리발효물의 경우에는 대조구와 유사한 소거능을 보였다.

한편, 유산균 세포외소포체가 세포생존율 및 NO생성에 미치는 영향을 조사하였다. 세포외소포체 농도 최대 20 μ g/mL까지 세포생존율(%)에 영향을 미치지 않았다. NO의 생성은 농도 20 μ g/mL에서 61% 억제되어, 유산균 세포외소포체의 염증반응 억제효과를 확인하였다. 이와 더불어 염증반응을 조절하는 사이토카인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 세포외소포체 농도 10 μ g/mL-20 μ g/mL 범위에서 이들 사이토카인의 종류에 따라서 다소 변화는 있지만 6.3-49.6% 억제되었다. 이러한 결과는 유산균 세포외소포체가 염증반응 억제용 소재로서 활용될 수 있음을 보여준다.

V. 참고문헌

Brand-Williams W, Cuvelier ME, and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*. 28, 25 - 30.

Cheigh HS and Park KY. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable product). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34, 175-203.

Chen YE, Tsao H. 2013. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. *American Academy of Dermatology*. 69, 43-55

Cho JK, Li GH, Cho SJ, Yoon YC, Hwang SG, Heo KC and Choe IS. 2007. The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from kimchi. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 27, 363 - 370.

Cho KS, Lee SM, Jeong SY, Park GT, Lee HS, Hwang DY, Jung YJ and Son HJ. 2014. Static culture condition for production of bacterial cellulose, environment-friendly functional material, by acetic acid bacteria. *Journal of Environmental Science International*. 23, 895 - 902.

Choi KH, Jeong JS, Moon CH, and Kim ML. 2004. Effect of carbon source supplement on the gel production from citrus juice by *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C. *The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 33, 170 - 175.

Choi DS, Kim DK, Kim YK and Gho YS. 2015. Proteomics of extracellular

vesicles. Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews*. 34, 474-490.

Choi SM, Cho SH and Yi HN. 2016. Human microbiome studies in Korea. *Allergy Asthma & Respiratory Disease*. 4, 311-320

Choi MS, Chang SJ, Chae Y, Lee MH, Kim WJ, Iwasa M, Han KI, Kim WJ, and Kim TJ. 2018. Anti-inflammatory effect of heat-killed *Enterococcus faecalis*, EF-2001. *Journal of Life Science*. 28, 1361 - 1368.

Choi JH, Moon CM, Shin TS, Kim EK, McDowell A, Jo MK, Joo YH, Kim SE, Jung HK, Shim KN, Jung SA and Kim YK. 2020. *Lactobacillus paracasei*-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Experimental & Molecular Medicine*. 52, 423 - 437

David NF. 2001. Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. *Society for Investigative Dermatology*. 6, 167-169

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, *et al.* 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 11971-11975.

Dreno B, Dagnelie MA, Khammari A and Corvec S. 2020. The Skin Microbiome: A New Actor in Inflammatory Acne. *American Journal of Clinical Dermatology*. 21, 18-24

Fierer N, Hamady M, Lauber CL and Knight R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *The National Academy of Sciences of the USA*. 105, 17994–17999

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 365–378

Gho YS. and Lee C. 2017. Emergent properties of extracellular vesicles: a holistic approach to decode the complexity of intercellular communication networks. *Molecular BioSystems*. 13, 1291–1296.

Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF and Stanton C. 2007. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. *Biotechnology Journal*. 12, 426–434.

Heong CS, Bhupinder K, Huda N, Karim AA and Fazilah A. 2011. Effect of Fermentation on the composition of *Centella asiatica* Teas. *American Journal of Food Technology*. 6, 581–593

Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Muroyama K, Miwa Y, Fujishima A and Lynch B. 2009. Safety studies of LP20 powder produced from heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 54, 214–220

Huang Y, Lee YN and Kim MY. 2016. Fermentation Characteristics of Low-sodium Kimchi by Kimchi Lactic Acid Bacteria Starters. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 29, 801–807

Jang SY. and Jeong YJ. 2005. Effect of lactate and corn steep liquor on the

production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145. *The Food Science and Biotechnology*. 14, 561 - 565.

Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW, and Lee HS. 2011. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 32, 75 - 81.

Jeon S, Park JW and Kim HJ. 2013. Manufacturing and applications of bacterial cellulose. *KIC News*. 16, 37 - 45.

Jo YR and Kang SM. 2012. *Lactococcus lactis* culture methods for the enhanced depression of inducers in atopic diseases. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 40, 310-318

Jun DA, Cho WA, Lee JB, Jang MJ, You MS, Park JY, Kim SH, and Lee JT. 2014. Antioxidant activity of chestnut (*Castanea crenata* S. et Z.) bur fermented by *Lactobacillus casei*. *Journal of Life Science*. 24, 1193 - 1199.

Jung JY, Park YH and Park JK. 2003. Effect of medium composition on the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* PJK. *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*. 18, 94 - 99.

Jung MY, Park YH, Kim HS, Bu HY and Jang YH. 2009. Probiotic Property of *Lactobacillus pentosus* Miny-148 Isolated from Human Feces. *The Korean Journal of Microbiology*. 45, 177-184

Jung SK, Park MJ, Lee JN, Byeon JS, Gu NY, Cho IS and Cha SH. 2016. Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Microbiology and*

Biotechnology Letters. 44, 383-390

Jun SH, Kim SY, Park SG, Lee CK, Lee SH and Kang NG. 2018. Characterizations of Water-dispersed Biocellulose Nanofibers on the Skin Surface. *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 44, 89-94

Kabak B and Var I. 2008. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health*. 43, 617-624

Kang SY, Kim KH and Yook HS. 2020. Antioxidant activities of fermented *Ulva pertusa* Kjellman. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 49, 940 - 945.

Kang HJ, Kim TW, Jhoo JW, and Kim GY. 2020. Antioxidant effects of fermented milk added with *Enterococcus faecalis* EF-2001 heat-killed probiotics. *Annals of Animal Resource Sciences*. 31, 72 - 81.

Kim SY, Shin KS and Lee H. 2004. Immunopotentiating activities of cellular component of *Lactobacillus brevis* FSB-1. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 33, 1552-1559

Kim ML. and Choi KH. 2005. Sensory characteristics of citrus vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. *Korean Journal of Food and Cookery Science*. 21, 263 - 269.

Kim YC, Hong HD, Rho J, Cho CW, Rhee YK, and Yim JH. 2007. Changes of phenolic acid contents and radical scavenging activities of ginseng according to steaming times. *Journal of Ginseng Research*. 31, 230 - 236.

Kim DC and Choi JW, In MJ, 2011. Utilization of *Leuconostoc mesenteroides* 310-12 Strain in the Fermentation of a Traditional Korean Rice-based Beverage. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 54, 21-25

Kim HJ and Kim HJ. 2015. Physicochemical characteristics of Jeju barley and extracted β -glucan. *Food Engineering Progress*. 19, 132 - 138.

Kim MH, Rho M, Choi JP, Choi HL, Park HK, Song WJ, Min TK, Cho SH, Cho YJ, Kim YK, Yang SH and Pyun BY. 2017. A Metagenomic Analysis Provides a Culture-Independent Pathogen Detection for Atopic Dermatitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 9, 453-461

Kim MJ, Yu SM, Kim DY, Heo TI, Lee JW, Park JA, Park CS, and Kim YS. 2018. Physicochemical characterization of fermented *Rhododendron micranthum* Turcz. extract and its biological activity. *Journal of Life Science*. 28, 938 - 944.

Kim JE, Jo SM, and Lee NH. 2019. Anti-oxidative and anti-bacterial constituents from the extracts of *Rhododendron weyrichii* leaves. *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 45, 341 - 351.

Kim BH, Jang JO, Lee JH, Park YE, Kim JG, Yoon YC, Jeong SJ, Kwon GS, and Lee JB. 2019. Increased anti-oxidative activity and whitening effects of a *Saposhnikovia* extract following bioconversion fermentation using *Lactobacillus plantarum* BHNLAB 33. *Journal of Life Science*. 29, 1208 - 1217.

Kim WI, Lee EJ, Bae IH, Myoung KS and Kim ST. 2020. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles induce anti-inflammatory M2

macrophage polarization in vitro. *Journal of extracellular vesicles*. 9, 1794

Klemm D, Schumann D, Udhardt U and Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*. 26, 1561 - 1603.

Kwon JG, Kim SK and Lee JH, 2019. Recent next-generation sequencing and bioinformatic analysis methods for food microbiome research. *Food Science and Industry*. 52(3), 220-228

Lee OS, Jang SY and Jeong YJ. 2002. Culture conditions for the production of bacterial cellulose with *Gluconacetobacter persimmonus* KJ145. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 31, 572 - 577.

Lee OS, Jang SY and Jeong YJ. 2003. Effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32, 181 - 184.

Lee SY, Jeon JR and Yang YK. 2005. Characteristics of the physical function of biocellulose from *Acetobacter xylinum*. *Food Engineering Progress*. 9, 182 - 191.

Lee SY, Park KJ, Park SM, Kim SS and Choi YH. 2011. Production of bacterial cellulose using juice medium with *Gluconacetobacter* sp. SEA623-2. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 29, 145.

Lee KY, Buldum G, Mantalaris A and Bismarck A. 2014. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular BioScience*. 14, 10-32

Lee JH, Yoon YC, Kim JK, Park YE, Hwang HS, Kwon GS and Lee JB, 2018. Antioxidant and Whitening Effects of the Fermentation of Barley Seeds (*Hordeum vulgare* L.) Using Lactic Acid Bacteria. *Journal of Life Science*. 28, 444-453

Lee J and Kang S. 2020. Antioxidant characteristics of *Lactobacillus plantarum* heat-killing acid bacteria isolated from Kkakdugi as cosmetic material. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*. 26, 913 - 922.

Matsuoka M, Tsuchida T, Matsushita K, Adachi A and Yoshinaga F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60, 575 - 579.

Mathieu A, Vogel TM and Simonet P. 2014. The future of skin metagenomics. *Research in Microbiology*. 165, 69-76.

Matthysse AG, Holmes KV and Gurltz RH. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *Journal of Bacteriology*. 81, 583 - 595.

Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA and Gidley MJ. 2009. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC53524. *Journal of Applied Microbiology*. 107, 576 - 583.

Moon YG, Lee KJ, Kim KY, Song CB, Jeon YJ and Heo MS, 2006. Characteristics of Citrus by-product ferment using probiotics as starter. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2, 158-165

Naritomi T, Kouda T, Yano H and Yoshinaga F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85, 89 - 95.

Oh BM, Jun HI, Oh HH, J SW and Jeong DY. 2020. Quality characteristics and functional evaluation of *Sikhye* fermented by Lactic acid bacteria. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 49, 803-813

Park SJ, Lee JS, Hoe YH, Moon EY and Kang MH. 2008. Physiology activity of barley leaf using different drying methods. *ournal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 37, 1627 - 1631.

Park SM, Yoon SJ, Son HJ and Lee CY and Kim, H.S. 2010. Properties of bacterial cellulose produced in agitated culture using three kinds of medium. *Textile Science and Engineering*. 47, 266 - 271.

Park KY. 2012. Increased health functionality of fermented foods. *Food Industry Nutrition*. 17, 1 - 8.

Park CH, Park JH, Min SY, Kim K, Kim S, and Park YJ. 2019. Studies on antioxidant, anti-inflammation and whitening activities of *Hordeum vulgare* L. extracts and their fractions. *JJournal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 45, 287 - 297.

Park YE, Kwon GS, Kim BH and Lee JB. 2019. Evaluation of the Usefulness of the Fermented Thistle (*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB105 for Antioxidative and Whitening Effects. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 17, 1-13

Park SJ, Choi SH, Park MJ, Lee OM and Son HJ. 2020. Production and Characteristics of Bacterial Cellulose, an Eco-Friendly Biomaterial, using Different Carbon Sources. *Journal of Environmental Science International*. 29, 819-826

Perdigon G, Macias ME, Alvarez S, Oliver G and Holado P. 1990. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Research*, 57, 255-264

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26, 1231 - 1237.

Ryu DG, Park SK, Kang MG, Jeong MC, Jeong HJ, Kang DM, Lee JH, Kim YM and Lee MS. 2020. Antioxidant and Cholesterol-lowering Effects of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kelp *Saccharina japonica* Kimchi. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53, 351-360

Salminen S, Ouwehand A, Benno Y and Lee YK, 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*. 10, 107-110

SanMiguel A and Grice EA. 2016. Interactions between host factors and the skin microbiome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72, 1499-1515

Seo JG, Lee GS, Kim JE and Chung MJ. 2010. Development of Probiotic Products and Challenges. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 25, 303-310

Seo SY, Ahn MS, Choi SR, Song EJ, Choi MK and Yoo SM. 2015. Characteristics of Persimmon Juice fermented with *Kimchi* Lactic acid bacteria. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 28, 16 - 23

Sim JH, Oh SJ, Kim SK and Baek YJ. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic-acid-bacteria species isolated from lactic acid fermented products. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 27, 101 - 104.

Son HJ, Lee OM, Kim YG, Park YK and Lee SJ. 2000. Characteristics of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in static culture. *The Korean Society for Biotechnology And Bioengineering*. 15, 573 - 577.

The Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature*. 486, 207 - 214

Yang JW, Kim KT and Kim SS. 2015. Fermentation Characteristics and anti-*Helicobacter pylori* Activity of Aqueous Broccoli Fermented by *Lactobacillus plantarum* MG208. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 58, 89-95

Yeo SB, Yeo SH and Park HD, 2017. Quality characteristics, antioxidant activity and storage properties of fermented milk added with green tea powder. *Korean Journal of Food Preservation*. 24, 576-584

Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A and Liu Y. 2005. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory

cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *Journal of Biological Chemistry*. 280, 8101-8108.

VI. 부 록

Table 4. Skin microbiome analysis at phylum rank depending on age and skin type.

Phylum	10s		20s		30s		40s		50s		60s		Acne skin		Acne skin		Infants		Average
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	
<i>Firmicutes</i>	0.3555	0.5422	0.0311	0.6835	0.0266	0.4532	0.1528	0.3473	0.1096	0.3817	0.4599	0.4688	0.5013	0.6247	0.3105	0.1540	0.3653	0.5978	0.3648
<i>Proteobacteria</i>	0.1854	0.2920	0.9020	0.1273	0.1414	0.3532	0.4339	0.2702	0.5073	0.3079	0.0671	0.1087	0.0427	0.1699	0.0827	0.3298	0.4439	0.1459	0.2728
<i>Actinobacteria</i>	0.2786	0.0731	0.0218	0.0715	0.0073	0.1122	0.2714	0.2682	0.3437	0.2481	0.3409	0.2042	0.4292	0.1835	0.5648	0.3964	0.0753	0.0984	0.2216
<i>Cyanobacteria</i>	0.0293	0.0000	0.0362	0.0388	0.8217	0.0314	0.1058	0.0314	0.0026	0.0096	0.0344	0.0199	0.0056	0.0101	0.0232	0.0460	0.0312	0.0449	0.0735
<i>Bacteroidetes</i>	0.0849	0.0614	0.0089	0.0531	0.0014	0.0471	0.0283	0.0412	0.0195	0.0292	0.0926	0.1073	0.0099	0.0068	0.0070	0.0501	0.0679	0.0924	0.0450
<i>Fusobacteria</i>	0.0467	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0016	0.0034	0.0172	0.0000	0.0091	0.0002	0.0702	0.0012	0.0000	0.0046	0.0015	0.0100	0.0110	0.0098
<i>Saccharibacteria</i>	0.0092	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007	0.0150	0.0083	0.0132	0.0012	0.0106	0.0004	0.0028	0.0028	0.0108	0.0045	0.0076	0.0049
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0000	0.0257	0.0000	0.0251	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0000	0.0000	0.0004	0.0004	0.0028	0.0000	0.0000	0.0017	0.0000	0.0003	0.0032
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017	0.0000	0.0000	0.0023	0.0029	0.0006	0.0025	0.0006	0.0031	0.0000	0.0025	0.0000	0.0006	0.0006	0.0010
Others	0.0004	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	0.0002	0.0002
Unassigned	0.0093	0.0039	0.0000	0.0007	0.0000	0.0013	0.0037	0.0056	0.0061	0.0006	0.0008	0.0092	0.0036	0.0022	0.0018	0.0084	0.0013	0.0007	0.0033
Total	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Table 5. Skin microbiome analysis at class rank depending on age and skin type

Class	10s		20s		30s		40s		50s		60s		Acne skin		Acne skin		Infants		Average
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	male	female	female	male	female	
<i>Bacilli</i>	0.2482	0.4372	0.0046	0.4715	0.0211	0.4168	0.1042	0.2839	0.0953	0.3415	0.2908	0.2609	0.4960	0.6057	0.2981	0.1126	0.3485	0.4375	0.2930
<i>Actinobacteria</i>	0.2692	0.0525	0.0218	0.0607	0.0073	0.1107	0.2683	0.2653	0.3434	0.2428	0.3407	0.2029	0.4275	0.1773	0.5643	0.3964	0.0750	0.0981	0.2180
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.0481	0.2853	0.8897	0.0961	0.0998	0.2473	0.2714	0.1064	0.0799	0.1413	0.0364	0.0308	0.0124	0.0943	0.0427	0.1141	0.3858	0.0284	0.1672
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.0833	0.0045	0.0041	0.0298	0.0299	0.0741	0.1378	0.0809	0.4182	0.1267	0.0185	0.0140	0.0247	0.0676	0.0331	0.2040	0.0094	0.0475	0.0782
<i>Chloroplast</i>	0.0280	0.0000	0.0115	0.0388	0.8217	0.0314	0.1054	0.0293	0.0026	0.0093	0.0344	0.0194	0.0056	0.0101	0.0206	0.0460	0.0311	0.0447	0.0717
<i>Clostridia</i>	0.0543	0.0625	0.0265	0.2100	0.0054	0.0113	0.0236	0.0103	0.0143	0.0174	0.1614	0.1505	0.0036	0.0191	0.0052	0.0121	0.0078	0.0044	0.0444
<i>Bacteroidia</i>	0.0686	0.0614	0.0089	0.0515	0.0014	0.0410	0.0092	0.0181	0.0052	0.0161	0.0709	0.0919	0.0049	0.0000	0.0069	0.0103	0.0501	0.0675	0.0324
<i>Negativicutes</i>	0.0522	0.0413	0.0000	0.0000	0.0000	0.0250	0.0250	0.0528	0.0000	0.0227	0.0076	0.0569	0.0018	0.0000	0.0072	0.0292	0.0091	0.1557	0.0270
<i>Betaproteobacteria</i>	0.0434	0.0022	0.0046	0.0013	0.0117	0.0299	0.0228	0.0799	0.0063	0.0374	0.0082	0.0555	0.0053	0.0047	0.0069	0.0116	0.0479	0.0673	0.0248
<i>Flavobacteriia</i>	0.0122	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0043	0.0191	0.0203	0.0127	0.0088	0.0186	0.0143	0.0030	0.0000	0.0000	0.0386	0.0176	0.0248	0.0108
<i>Fusobacteriia</i>	0.0467	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0016	0.0034	0.0172	0.0000	0.0091	0.0002	0.0702	0.0012	0.0000	0.0046	0.0015	0.0100	0.0110	0.0098
<i>uncultured bacterium</i>	0.0064	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0071	0.0073	0.0132	0.0008	0.0086	0.0004	0.0028	0.0028	0.0108	0.0045	0.0076	0.0040
<i>Coriobacteria</i>	0.0067	0.0207	0.0000	0.0109	0.0000	0.0016	0.0002	0.0015	0.0002	0.0053	0.0000	0.0013	0.0018	0.0062	0.0006	0.0000	0.0003	0.0003	0.0032
<i>Verrucomicrobiae</i>	0.0000	0.0257	0.0000	0.0251	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	0.0000	0.0004	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017	0.0000	0.0003	0.0030
<i>Epsilonproteobacteria</i>	0.0106	0.0000	0.0036	0.0000	0.0000	0.0019	0.0004	0.0026	0.0000	0.0017	0.0036	0.0081	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007	0.0019	0.0019
<i>ML635J-21</i>	0.0000	0.0000	0.0247	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0014
<i>Sphingobacteriia</i>	0.0041	0.0000	0.0000	0.0016	0.0000	0.0009	0.0000	0.0013	0.0016	0.0010	0.0026	0.0002	0.0004	0.0068	0.0000	0.0001	0.0001	0.0002	0.0012
<i>Deinococci</i>	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017	0.0000	0.0000	0.0023	0.0029	0.0006	0.0025	0.0006	0.0031	0.0000	0.0025	0.0000	0.0006	0.0006	0.0010
Other	0.0004	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	0.0002	0.0002
Unassigned	0.0167	0.0050	0.0000	0.0028	0.0000	0.0021	0.0092	0.0193	0.0101	0.0049	0.0022	0.0134	0.0084	0.0055	0.0046	0.0096	0.0015	0.0020	0.0065
Total	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Table 6. Skin microbiome analysis at order rank depending on age and skin type

Order	10s		20s		30s		40s		50s		60s		Acne skin		Acne skin		Infants		Average
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	male	female	female	male	female	
<i>Bacillales</i>	0.1104	0.0061	0.0046	0.4715	0.0098	0.1656	0.0527	0.1266	0.0816	0.2554	0.2739	0.0908	0.4727	0.5866	0.2546	0.0370	0.0211	0.0580	0.1711
<i>Lactobacillales</i>	0.1378	0.4310	0.0000	0.0000	0.0113	0.2512	0.0514	0.1573	0.0137	0.0862	0.0169	0.1701	0.0233	0.0191	0.0435	0.0756	0.3274	0.3795	0.1220
<i>Pseudomonadales</i>	0.0117	0.0011	0.7917	0.0776	0.0963	0.1766	0.2476	0.0417	0.0714	0.0831	0.0277	0.0093	0.0084	0.0599	0.0249	0.0629	0.3560	0.0089	0.1198
<i>Propionibacteriales</i>	0.0244	0.0017	0.0041	0.0169	0.0029	0.0219	0.0103	0.0212	0.0605	0.1065	0.0772	0.0855	0.3461	0.1127	0.5178	0.0146	0.0014	0.0084	0.0797
<i>Corynebacteriales</i>	0.1514	0.0039	0.0075	0.0056	0.0008	0.0286	0.1773	0.1484	0.0281	0.0856	0.2401	0.0810	0.0680	0.0144	0.0343	0.2401	0.0341	0.0144	0.0758
<i>Pinus greggii</i>	0.0054	0.0000	0.0115	0.0308	0.8217	0.0103	0.0367	0.0103	0.0025	0.0023	0.0031	0.0036	0.0011	0.0027	0.0024	0.0160	0.0005	0.0005	0.0534
<i>Clostridiales</i>	0.0543	0.0625	0.0265	0.2100	0.0054	0.0113	0.0233	0.0102	0.0143	0.0170	0.1614	0.1505	0.0036	0.0191	0.0052	0.0121	0.0078	0.0044	0.0444
<i>Micrococcales</i>	0.0501	0.0022	0.0103	0.0381	0.0034	0.0306	0.0693	0.0508	0.2428	0.0361	0.0204	0.0101	0.0122	0.0165	0.0086	0.0968	0.0244	0.0346	0.0421
<i>Bacteroidales</i>	0.0686	0.0614	0.0089	0.0515	0.0014	0.0410	0.0092	0.0181	0.0052	0.0161	0.0709	0.0919	0.0049	0.0000	0.0069	0.0103	0.0501	0.0675	0.0324
<i>Selenomonadales</i>	0.0522	0.0413	0.0000	0.0000	0.0000	0.0250	0.0250	0.0528	0.0000	0.0227	0.0076	0.0569	0.0018	0.0000	0.0072	0.0292	0.0091	0.1557	0.0270
<i>Rickettsiales</i>	0.0197	0.0006	0.0039	0.0272	0.0235	0.0215	0.0078	0.0172	0.1784	0.0175	0.0021	0.0038	0.0093	0.0048	0.0154	0.0285	0.0075	0.0361	0.0236
<i>Sphingomonadales</i>	0.0249	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0184	0.0735	0.0142	0.1195	0.0592	0.0063	0.0020	0.0025	0.0174	0.0090	0.0528	0.0013	0.0055	0.0226
<i>Enterobacteriales</i>	0.0122	0.2842	0.0153	0.0000	0.0036	0.0025	0.0036	0.0060	0.0000	0.0064	0.0039	0.0007	0.0020	0.0101	0.0069	0.0149	0.0002	0.0033	0.0209
<i>Pasteurellales</i>	0.0203	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0529	0.0160	0.0484	0.0000	0.0452	0.0019	0.0152	0.0010	0.0059	0.0042	0.0170	0.0291	0.0141	0.0151
<i>Neisseriales</i>	0.0277	0.0017	0.0000	0.0013	0.0041	0.0237	0.0043	0.0466	0.0005	0.0160	0.0019	0.0323	0.0034	0.0000	0.0052	0.0008	0.0418	0.0583	0.0150
<i>Chloroplast</i>	0.0194	0.0000	0.0000	0.0052	0.0000	0.0185	0.0325	0.0160	0.0001	0.0066	0.0301	0.0153	0.0042	0.0026	0.0157	0.0284	0.0300	0.0390	0.0146
<i>Flavobacteriales</i>	0.0122	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0043	0.0191	0.0203	0.0127	0.0088	0.0186	0.0143	0.0030	0.0000	0.0000	0.0386	0.0176	0.0248	0.0108
<i>Actinomycetales</i>	0.0387	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	0.0114	0.0069	0.0404	0.0017	0.0091	0.0018	0.0257	0.0006	0.0000	0.0022	0.0018	0.0111	0.0396	0.0108
<i>Xanthomonadales</i>	0.0004	0.0000	0.0828	0.0185	0.0000	0.0153	0.0004	0.0041	0.0084	0.0039	0.0026	0.0005	0.0002	0.0183	0.0067	0.0184	0.0000	0.0011	0.0101
<i>Fusobacteriales</i>	0.0467	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0016	0.0034	0.0172	0.0000	0.0091	0.0002	0.0702	0.0012	0.0000	0.0046	0.0015	0.0100	0.0110	0.0098
<i>Caulobacterales</i>	0.0113	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	0.0072	0.0162	0.0110	0.0490	0.0252	0.0028	0.0015	0.0012	0.0215	0.0012	0.0184	0.0003	0.0009	0.0095
<i>Rhizobiales</i>	0.0106	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0116	0.0186	0.0109	0.0522	0.0168	0.0050	0.0016	0.0075	0.0088	0.0035	0.0173	0.0002	0.0041	0.0094
<i>Burkholderiales</i>	0.0158	0.0006	0.0000	0.0000	0.0076	0.0062	0.0161	0.0332	0.0057	0.0212	0.0063	0.0232	0.0020	0.0047	0.0017	0.0080	0.0060	0.0090	0.0093
<i>Rhodobacterales</i>	0.0119	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0146	0.0167	0.0120	0.0069	0.0065	0.0019	0.0040	0.0004	0.0035	0.0015	0.0781	0.0001	0.0002	0.0089
<i>Bifidobacteriales</i>	0.0004	0.0419	0.0000	0.0000	0.0002	0.0102	0.0007	0.0007	0.0000	0.0044	0.0000	0.0000	0.0002	0.0157	0.0012	0.0301	0.0040	0.0011	0.0062
<i>Saccharibacteria</i>	0.0064	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0071	0.0073	0.0132	0.0008	0.0086	0.0004	0.0028	0.0028	0.0108	0.0045	0.0076	0.0040
<i>Rhodospirillales</i>	0.0048	0.0000	0.0002	0.0000	0.0064	0.0008	0.0033	0.0157	0.0122	0.0012	0.0005	0.0011	0.0038	0.0116	0.0025	0.0077	0.0000	0.0007	0.0040
<i>Coriobacteriales</i>	0.0067	0.0207	0.0000	0.0109	0.0000	0.0016	0.0002	0.0015	0.0002	0.0053	0.0000	0.0013	0.0018	0.0062	0.0006	0.0000	0.0003	0.0003	0.0032
Other	0.0004	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	0.0002	0.0002
Unassigned	0.0434	0.0307	0.0329	0.0321	0.0017	0.0153	0.0577	0.0393	0.0252	0.0133	0.0140	0.0289	0.0135	0.0353	0.0098	0.0309	0.0041	0.0111	0.0244
Total	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Table 7. Skin microbiome analysis at family rank depending on age and skin type

Family	10s		20s		30s		40s		50s		60s		Acne skin		Acne skin		Infants		Average
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	male	female	female	male	female	
<i>Staphylococcaceae</i>	0.1013	0.0061	0.0046	0.4708	0.0027	0.1587	0.0520	0.1222	0.0795	0.2525	0.2701	0.0806	0.4702	0.5866	0.2540	0.0351	0.0034	0.0093	0.1644
<i>Streptococcaceae</i>	0.1195	0.3814	0.0000	0.0000	0.0000	0.2232	0.0409	0.1437	0.0095	0.0680	0.0138	0.1571	0.0177	0.0126	0.0376	0.0597	0.2766	0.3446	0.1059
<i>Moraxellaceae</i>	0.0047	0.0011	0.7546	0.0776	0.0963	0.1679	0.0212	0.0203	0.0688	0.0735	0.0242	0.0081	0.0074	0.0547	0.0198	0.0409	0.3550	0.0062	0.1001
<i>Propionibacteriaceae</i>	0.0238	0.0017	0.0037	0.0169	0.0029	0.0219	0.0103	0.0200	0.0605	0.1063	0.0752	0.0851	0.3461	0.1127	0.5178	0.0063	0.0014	0.0084	0.0790
<i>Pinus greggii</i>	0.0054	0.0000	0.0115	0.0308	0.8217	0.0103	0.0367	0.0103	0.0025	0.0023	0.0031	0.0036	0.0011	0.0027	0.0024	0.0160	0.0005	0.0005	0.0534
<i>Corynebacteriaceae</i>	0.1221	0.0011	0.0059	0.0056	0.0002	0.0162	0.0718	0.1218	0.0093	0.0751	0.2345	0.0776	0.0654	0.0059	0.0207	0.0512	0.0337	0.0132	0.0517
<i>Veillonellaceae</i>	0.0522	0.0413	0.0000	0.0000	0.0000	0.0250	0.0250	0.0528	0.0000	0.0227	0.0076	0.0569	0.0018	0.0000	0.0072	0.0292	0.0091	0.1557	0.0270
<i>Micrococcaceae</i>	0.0224	0.0022	0.0000	0.0313	0.0020	0.0113	0.0095	0.0277	0.1896	0.0275	0.0100	0.0086	0.0028	0.0084	0.0072	0.0350	0.0233	0.0227	0.0245
<i>Mitochondria</i>	0.0197	0.0006	0.0039	0.0272	0.0235	0.0215	0.0078	0.0172	0.1784	0.0175	0.0021	0.0038	0.0093	0.0048	0.0154	0.0285	0.0075	0.0361	0.0236
<i>Clostridiales</i>	0.0256	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0099	0.0109	0.0039	0.0117	0.0124	0.1604	0.1246	0.0004	0.0166	0.0031	0.0075	0.0054	0.0012	0.0219
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.0122	0.2842	0.0153	0.0000	0.0036	0.0025	0.0036	0.0060	0.0000	0.0064	0.0039	0.0007	0.0020	0.0101	0.0069	0.0149	0.0002	0.0033	0.0209
<i>Prevotellaceae</i>	0.0555	0.0151	0.0089	0.0266	0.0000	0.0312	0.0064	0.0108	0.0036	0.0125	0.0212	0.0635	0.0046	0.0000	0.0060	0.0103	0.0318	0.0655	0.0208
<i>Pseudomonadaceae</i>	0.0070	0.0000	0.0371	0.0000	0.0000	0.0087	0.2264	0.0214	0.0025	0.0095	0.0035	0.0012	0.0011	0.0052	0.0052	0.0220	0.0011	0.0027	0.0197
<i>Sphingomonadaceae</i>	0.0231	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0150	0.0265	0.0110	0.1175	0.0575	0.0061	0.0014	0.0025	0.0174	0.0006	0.0239	0.0011	0.0055	0.0172
<i>Pasteurellaceae</i>	0.0203	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0529	0.0160	0.0484	0.0000	0.0452	0.0019	0.0152	0.0010	0.0059	0.0042	0.0170	0.0291	0.0141	0.0151
<i>Neisseriaceae</i>	0.0277	0.0017	0.0000	0.0013	0.0041	0.0237	0.0043	0.0466	0.0005	0.0160	0.0019	0.0323	0.0034	0.0000	0.0052	0.0008	0.0418	0.0583	0.0150
<i>uncultured bacterium</i>	0.0194	0.0000	0.0000	0.0052	0.0000	0.0185	0.0325	0.0160	0.0001	0.0066	0.0301	0.0153	0.0042	0.0026	0.0157	0.0284	0.0300	0.0390	0.0146
<i>Nocardiaceae</i>	0.0200	0.0022	0.0000	0.0000	0.0007	0.0035	0.0511	0.0169	0.0110	0.0079	0.0047	0.0013	0.0000	0.0000	0.0135	0.0914	0.0000	0.0002	0.0125
<i>Lachnospiraceae</i>	0.0167	0.0106	0.0265	0.1182	0.0041	0.0007	0.0056	0.0050	0.0026	0.0022	0.0002	0.0152	0.0006	0.0000	0.0021	0.0000	0.0009	0.0023	0.0119
<i>Actinomycetaceae</i>	0.0387	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	0.0114	0.0069	0.0404	0.0017	0.0091	0.0018	0.0257	0.0006	0.0000	0.0022	0.0018	0.0111	0.0396	0.0108
<i>Flavobacteriaceae</i>	0.0122	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0043	0.0191	0.0203	0.0127	0.0083	0.0186	0.0143	0.0030	0.0000	0.0000	0.0386	0.0176	0.0248	0.0108
<i>Xanthomonadaceae</i>	0.0004	0.0000	0.0828	0.0185	0.0000	0.0153	0.0004	0.0041	0.0084	0.0039	0.0026	0.0005	0.0002	0.0183	0.0067	0.0184	0.0000	0.0011	0.0101
<i>Caulobacteraceae</i>	0.0113	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	0.0072	0.0162	0.0110	0.0490	0.0252	0.0028	0.0015	0.0004	0.0215	0.0012	0.0184	0.0003	0.0007	0.0094
<i>Rhodobacteraceae</i>	0.0119	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0146	0.0167	0.0120	0.0069	0.0065	0.0019	0.0040	0.0004	0.0035	0.0015	0.0781	0.0001	0.0002	0.0089
<i>Porphyromonadaceae</i>	0.0122	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0093	0.0019	0.0069	0.0016	0.0031	0.0495	0.0277	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0180	0.0020	0.0074
<i>Intrasporangiaceae</i>	0.0151	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0112	0.0200	0.0085	0.0150	0.0055	0.0025	0.0008	0.0024	0.0046	0.0014	0.0436	0.0005	0.0001	0.0073
<i>Ruminococcaceae</i>	0.0035	0.0385	0.0000	0.0637	0.0014	0.0008	0.0069	0.0000	0.0000	0.0017	0.0008	0.0039	0.0009	0.0008	0.0001	0.0047	0.0014	0.0006	0.0072
<i>Mycobacteriaceae</i>	0.0093	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0089	0.0544	0.0080	0.0044	0.0008	0.0008	0.0021	0.0027	0.0085	0.0000	0.0251	0.0001	0.0009	0.0070
Other	0.0004	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	0.0002	0.0002
Unassigned	0.1865	0.2044	0.0453	0.1035	0.0371	0.0944	0.1991	0.1659	0.1526	0.1142	0.0441	0.1672	0.0481	0.0967	0.0425	0.2520	0.0992	0.1409	0.1219
Total	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Table 8. Skin microbiome analysis at genus rank depending on age and skin type

Genus	10s		20s		30s		40s		50s		60s		Acne skin		Acne skin		Infants		Average
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	male	female	female	male	female	
<i>Staphylococcus</i>	0.1012	0.0061	0.0046	0.4708	0.0027	0.1587	0.0520	0.1212	0.0795	0.2525	0.2701	0.0806	0.4698	0.5866	0.2540	0.0351	0.0034	0.0093	0.1643
<i>Streptococcus</i>	0.1189	0.3802	0.0000	0.0000	0.0000	0.2232	0.0409	0.1434	0.0058	0.0678	0.0137	0.1567	0.0177	0.0126	0.0376	0.0590	0.2766	0.3445	0.1055
<i>Acinetobacter</i>	0.0041	0.0011	0.7546	0.0776	0.0963	0.1679	0.0212	0.0197	0.0688	0.0729	0.0242	0.0081	0.0074	0.0547	0.0193	0.0391	0.0003	0.0058	0.0802
<i>Propionibacterium</i>	0.0238	0.0017	0.0037	0.0169	0.0029	0.0219	0.0103	0.0200	0.0605	0.1063	0.0752	0.0849	0.3461	0.1127	0.5178	0.0063	0.0014	0.0084	0.0789
<i>Pinus greggii</i>	0.0054	0.0000	0.0115	0.0308	0.8217	0.0103	0.0367	0.0103	0.0025	0.0023	0.0031	0.0036	0.0011	0.0027	0.0024	0.0160	0.0005	0.0005	0.0534
<i>Corynebacterium 1</i>	0.0757	0.0011	0.0000	0.0041	0.0000	0.0089	0.0577	0.0266	0.0081	0.0121	0.0948	0.0396	0.0226	0.0059	0.0203	0.0495	0.0273	0.0068	0.0256
<i>Veillonella</i>	0.0371	0.0022	0.0000	0.0000	0.0000	0.0184	0.0245	0.0505	0.0000	0.0188	0.0015	0.0422	0.0018	0.0000	0.0065	0.0057	0.0083	0.1557	0.0207
<i>Solanum melongena</i>	0.0180	0.0006	0.0039	0.0190	0.0022	0.0215	0.0040	0.0142	0.1784	0.0162	0.0013	0.0016	0.0084	0.0048	0.0138	0.0285	0.0040	0.0287	0.0205
<i>Moraxella</i>	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0018	0.3547	0.0004	0.0198
<i>Pseudomonas</i>	0.0070	0.0000	0.0371	0.0000	0.0000	0.0087	0.2264	0.0214	0.0025	0.0095	0.0035	0.0012	0.0011	0.0052	0.0052	0.0220	0.0011	0.0027	0.0197
<i>Lawsonella</i>	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0004	0.0079	0.0915	0.0011	0.0616	0.1375	0.0065	0.0424	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0055	0.0197
<i>Klebsiella</i>	0.0033	0.2730	0.0053	0.0000	0.0000	0.0010	0.0030	0.0035	0.0000	0.0011	0.0005	0.0000	0.0004	0.0020	0.0010	0.0017	0.0002	0.0008	0.0165
<i>Chloroplast</i>	0.0194	0.0000	0.0000	0.0052	0.0000	0.0185	0.0325	0.0160	0.0001	0.0066	0.0301	0.0153	0.0042	0.0026	0.0157	0.0284	0.0300	0.0390	0.0146
<i>Haemophilus</i>	0.0177	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0503	0.0155	0.0477	0.0000	0.0377	0.0015	0.0141	0.0009	0.0059	0.0042	0.0170	0.0281	0.0136	0.0141
<i>Micrococcus</i>	0.0021	0.0006	0.0000	0.0094	0.0020	0.0000	0.0026	0.0019	0.1692	0.0099	0.0010	0.0004	0.0012	0.0059	0.0011	0.0207	0.0003	0.0002	0.0127
<i>Sphingomonas</i>	0.0157	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0120	0.0180	0.0073	0.0763	0.0460	0.0040	0.0011	0.0024	0.0050	0.0005	0.0218	0.0008	0.0035	0.0119
<i>Neisseria</i>	0.0176	0.0017	0.0000	0.0000	0.0041	0.0193	0.0011	0.0424	0.0000	0.0140	0.0014	0.0249	0.0006	0.0000	0.0040	0.0008	0.0342	0.0329	0.0111
<i>Actinomyces</i>	0.0370	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	0.0114	0.0068	0.0351	0.0017	0.0088	0.0008	0.0221	0.0006	0.0000	0.0022	0.0018	0.0076	0.0396	0.0099
<i>Gordonia</i>	0.0126	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0035	0.0385	0.0120	0.0037	0.0031	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0135	0.0858	0.0000	0.0002	0.0097
<i>Brevundimonas</i>	0.0110	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	0.0072	0.0162	0.0088	0.0490	0.0244	0.0026	0.0015	0.0004	0.0215	0.0012	0.0184	0.0002	0.0005	0.0092
<i>Stenotrophomonas</i>	0.0002	0.0000	0.0828	0.0185	0.0000	0.0120	0.0001	0.0025	0.0067	0.0031	0.0024	0.0002	0.0002	0.0118	0.0038	0.0103	0.0000	0.0010	0.0086
<i>Fingoldia</i>	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0044	0.0056	0.0003	0.0000	0.0055	0.0522	0.0614	0.0003	0.0086	0.0002	0.0064	0.0003	0.0005	0.0081
<i>Anaerococcus</i>	0.0145	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0027	0.0018	0.0117	0.0022	0.0642	0.0314	0.0000	0.0047	0.0007	0.0011	0.0001	0.0007	0.0076
<i>Knoellia</i>	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0112	0.0197	0.0081	0.0150	0.0053	0.0024	0.0008	0.0024	0.0046	0.0014	0.0436	0.0004	0.0001	0.0072
<i>Mycobacterium</i>	0.0093	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0089	0.0544	0.0080	0.0044	0.0008	0.0008	0.0021	0.0027	0.0085	0.0000	0.0251	0.0001	0.0009	0.0070
<i>Porphyrromonas</i>	0.0087	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0093	0.0018	0.0064	0.0016	0.0026	0.0495	0.0254	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0179	0.0019	0.0070
<i>Alloprevotella</i>	0.0168	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0270	0.0015	0.0022	0.0007	0.0005	0.0002	0.0032	0.0011	0.0000	0.0004	0.0008	0.0238	0.0470	0.0069
<i>Rothia</i>	0.0194	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0097	0.0031	0.0206	0.0000	0.0087	0.0015	0.0075	0.0016	0.0026	0.0026	0.0019	0.0219	0.0208	0.0069
Others	0.0004	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	0.0002	0.0002
Unassigned	0.3880	0.3250	0.0964	0.3451	0.0680	0.1533	0.2952	0.2552	0.2526	0.1996	0.1600	0.3634	0.0630	0.1313	0.0707	0.4502	0.1564	0.2282	0.2223
Total	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Table 9. Skin microbiome analysis at species rank depending on age and skin type

Species	10s		20s		30s		40s		50s		60s		Acne skin		Acne skin		Infants		Average
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female	male	male	female	female	male	female	
<i>Staphylococcus</i>	0.1011	0.0061	0.0046	0.4703	0.0027	0.1587	0.0507	0.1197	0.0794	0.2522	0.2695	0.0805	0.4695	0.5863	0.2520	0.0351	0.0033	0.0093	0.1640
<i>Streptococcus</i>	0.1169	0.3802	0.0000	0.0000	0.0000	0.2221	0.0384	0.1053	0.0058	0.0471	0.0133	0.1468	0.0170	0.0100	0.0349	0.0579	0.2722	0.3409	0.1005
<i>Propionibacterium</i>	0.0237	0.0017	0.0037	0.0129	0.0019	0.0205	0.0103	0.0197	0.0537	0.1058	0.0699	0.0841	0.3454	0.1078	0.4634	0.0053	0.0013	0.0082	0.0744
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0.0006	0.0011	0.5628	0.0495	0.0853	0.1330	0.0087	0.0054	0.0385	0.0245	0.0160	0.0025	0.0012	0.0485	0.0109	0.0048	0.0000	0.0015	0.0553
<i>Pinus greggii</i>	0.0054	0.0000	0.0115	0.0308	0.8217	0.0103	0.0367	0.0103	0.0025	0.0023	0.0031	0.0036	0.0011	0.0027	0.0024	0.0160	0.0005	0.0005	0.0534
<i>Corynebacterium 1</i>	0.0752	0.0011	0.0000	0.0041	0.0000	0.0089	0.0577	0.0266	0.0081	0.0109	0.0948	0.0396	0.0226	0.0046	0.0201	0.0245	0.0270	0.0065	0.0240
<i>Acinetobacter</i>	0.0032	0.0000	0.1918	0.0281	0.0110	0.0349	0.0085	0.0116	0.0260	0.0442	0.0080	0.0056	0.0049	0.0062	0.0084	0.0329	0.0002	0.0035	0.0238
<i>Veillonella</i>	0.0371	0.0022	0.0000	0.0000	0.0000	0.0184	0.0245	0.0505	0.0000	0.0188	0.0015	0.0420	0.0017	0.0000	0.0054	0.0057	0.0083	0.1555	0.0206
<i>Solanum melongena</i>	0.0180	0.0006	0.0039	0.0190	0.0022	0.0215	0.0040	0.0142	0.1784	0.0162	0.0013	0.0016	0.0084	0.0048	0.0138	0.0285	0.0040	0.0287	0.0205
<i>Moraxella</i>	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0018	0.3547	0.0004	0.0198
<i>Lawsonella</i>	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0004	0.0079	0.0915	0.0011	0.0616	0.1375	0.0065	0.0424	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0055	0.0197
<i>Klebsiella sp. B12</i>	0.0033	0.2686	0.0053	0.0000	0.0000	0.0010	0.0030	0.0035	0.0000	0.0011	0.0005	0.0000	0.0004	0.0020	0.0010	0.0017	0.0002	0.0006	0.0162
<i>Chloroplast</i>	0.0194	0.0000	0.0000	0.0052	0.0000	0.0185	0.0325	0.0160	0.0001	0.0066	0.0301	0.0153	0.0042	0.0026	0.0157	0.0284	0.0300	0.0390	0.0146
<i>Haemophilus</i>	0.0163	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0383	0.0155	0.0476	0.0000	0.0375	0.0015	0.0141	0.0007	0.0059	0.0039	0.0170	0.0278	0.0136	0.0133
<i>Micrococcus luteus</i>	0.0021	0.0006	0.0000	0.0094	0.0020	0.0000	0.0026	0.0019	0.1692	0.0099	0.0010	0.0004	0.0012	0.0059	0.0011	0.0207	0.0003	0.0002	0.0127
<i>Neisseria</i>	0.0176	0.0017	0.0000	0.0000	0.0041	0.0178	0.0011	0.0424	0.0000	0.0140	0.0014	0.0249	0.0006	0.0000	0.0040	0.0008	0.0342	0.0324	0.0109
<i>Pseudomonas sp. X-b18</i>	0.0000	0.0000	0.0067	0.0000	0.0000	0.0005	0.1790	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008	0.0011	0.0000	0.0001	0.0105
<i>Actinomyces</i>	0.0355	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	0.0113	0.0068	0.0346	0.0017	0.0066	0.0008	0.0192	0.0006	0.0000	0.0019	0.0018	0.0072	0.0396	0.0095
<i>Brevundimonas</i>	0.0110	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	0.0072	0.0162	0.0072	0.0485	0.0236	0.0026	0.0015	0.0004	0.0215	0.0012	0.0169	0.0002	0.0004	0.0089
<i>Stenotrophomonas</i>	0.0001	0.0000	0.0817	0.0185	0.0000	0.0110	0.0000	0.0019	0.0055	0.0019	0.0024	0.0002	0.0002	0.0118	0.0038	0.0081	0.0000	0.0010	0.0082
<i>Fingoldia</i>	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0044	0.0056	0.0003	0.0000	0.0055	0.0522	0.0614	0.0003	0.0086	0.0002	0.0064	0.0003	0.0005	0.0081
<i>Anaerococcus</i>	0.0145	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0027	0.0018	0.0117	0.0022	0.0642	0.0314	0.0000	0.0047	0.0007	0.0011	0.0001	0.0007	0.0076
<i>Knoellia sp. LC491</i>	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0112	0.0197	0.0081	0.0150	0.0053	0.0024	0.0008	0.0024	0.0046	0.0014	0.0436	0.0004	0.0001	0.0072
<i>Gordonia sp.</i>	0.0126	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0035	0.0370	0.0103	0.0037	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0135	0.0432	0.0000	0.0000	0.0070
<i>Alloprevotella</i>	0.0164	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0270	0.0015	0.0022	0.0007	0.0005	0.0002	0.0009	0.0011	0.0000	0.0004	0.0008	0.0238	0.0470	0.0068
<i>Rothia;</i>	0.0191	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0096	0.0031	0.0199	0.0000	0.0087	0.0015	0.0075	0.0016	0.0026	0.0026	0.0019	0.0217	0.0208	0.0068
<i>Sphingomonas sp. Ens32</i>	0.0034	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0056	0.0053	0.0006	0.0515	0.0321	0.0001	0.0000	0.0012	0.0000	0.0000	0.0196	0.0000	0.0002	0.0066
<i>Paracoccus</i>	0.0082	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0146	0.0103	0.0087	0.0060	0.0048	0.0018	0.0027	0.0000	0.0035	0.0015	0.0548	0.0000	0.0002	0.0066
Others	0.0004	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	0.0002	0.0002
Unassigned	0.4237	0.3283	0.1279	0.3496	0.0690	0.1891	0.4106	0.3362	0.2928	0.2547	0.2226	0.4067	0.0713	0.1555	0.1352	0.5183	0.1823	0.2428	0.2620
Total	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

감사의 글

박사학위과정 동안 감사했던 사람들의 이름을 깊이 새기고자 합니다. 먼저 늦은 나이에 여러모로 부족했던 저를 이 자리에 설 수 있도록 많은 지도편달을 해주신 고영환 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 가운데도 논문심사 위원장을 맡아 세심하게 검토 및 지도하여 주신 박은진 교수님, 늘 열성적인 모습으로 귀감이 되어주신 임상빈 교수님, 심사기간 동안 다양한 학문적 지식을 공유해주신 김정섭 교수님과 늘 진심어린 조언을 아끼지 않고 실무적으로 많은 도움을 주신 현창구 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다. 이외에도 석·박사 학위과정 중에 많은 가르침을 주셨던 김현정 교수님과 지금은 퇴임하신 강영주 교수님, 하진환 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

그리고 직장생활을 하면서 본 논문 연구를 기획하고 수행하는데 있어 옆에서 많은 힘이 되어준 김정환 과장, 김수영 대리, 강지미 주임, 신소영 주임 및 강현규 사원 모두 감사드리며 함께했던 시간은 제 삶의 소중한 시간으로 늘 기억하겠습니다.

또한 제가 가진 목표를 이루기 위해 가정에 다소 소홀했음에도 불구하고 늘 따듯한 마음으로 이해해주고 할 수 있다는 자신감과 용기를 불어넣어 준 제 아내, 항상 활기차고 주변을 웃음 짓게 해주는 첫째 딸과 사소한 일에도 행복이 무엇인지 깨닫게 해준 둘째 아들에게도 항상 고맙고 사랑한다고 말을 전하고 싶습니다. 그리고 지금까지 언제나 변함없는 사랑으로 지켜봐 주시고 부족한 아들을 항상 자랑스럽게 생각해 주시는 어머니에게도 감사하고 또 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

이외에도 학위를 받는 과정에 많은 도움을 주신 모든 이들에게 작은 결실인 이 논문과 함께 진심어린 감사의 마음을 바칩니다.

2021년 07월