

11-15430
00-00234
5-01

발간등록번호
11-1543000-002345-01

농축산식품

환경

미생물의

메타유전체정보분석

최종보고서

2018

농림축산식품부

포스트게놈
다부처
유전체
사업
R&D
Report

농축산식품 환경 미생물의
메타유전체 정보분석
최종보고서

2018. 11. 09.

주관연구기관 / 경희대학교
협동연구기관 / 연세대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농축산식품 환경 미생물의 메타유전체 정보 분석”(개발기간 : 2014.08.23 ~ 2018.08.22.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 09.

주관연구기관명 :	경희대학교 (배진우)
협동연구기관명 :	연세대학교 (송주연)
참여기관명 :	건국대학교 (이충환)
	중앙대학교 (설우준)



주관연구책임자 : 배진우
협동연구책임자 : 송주연
참여기관책임자 : 이충환
설우준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	914006-4	해 당 단 계 연 구 기 간	2014. 08. 23 - 2018. 08. 22 (48개월)	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	포스트게놈 다부처 유전체사업			
	사 업 명	농림축산식품 미생물 유전체 전략연구 사업			
연구과제명	대 과 제 명	농축산식품 환경 미생물의 메타유전체 정보 분석			
	세부 과제명	경제동물의 메타유전체 정보 분석 농식품 유용미생물의 메타유전체 정보 및 대사네트워크 분석			
연구책임자	배진우	해당단계 참여연구원 수	총: 56 명 내부: 18 명 외부: 38 명	해당단계 연구개발비	정부:1,350,000천원 민간: 0 천원 계:1,350,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 56 명 내부: 18 명 외부: 38 명	총 연구개발비	정부:1,350,000천원 민간: 0 천원 계:1,350,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 이과대학 생물학과 연세대학교 생명시스템대학 시스템생물학과			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 건국대학교, 중앙대학교			연구책임자: 이충환, 설우준	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	연구에 따른 결과를 다른 연구자들의 연구에 도움이 될 수 있도록 과제를 일반과제로 결정.
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	회합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정 보	실 물
등록·기 탁 번호	10.1093/femsle/f nv058							NN-1817	KCTC 42724		
	10.1016/j.margen .2015.03.012							NN-1818	KCTC 33844		
	10.5713/ajas.15. 0026							NN-1819	KCTC 33833		
	10.1016/j.tibtech. 2015.06.011							NN-2589	KCTC 33832		
	10.1099/ijsem.0. 000965							NN-2590	KCTC 52452		
	10.1099/ijsem.0. 001002							NN-2591			
	10.1038/srep308 87							NU-0614			
	10.1016/j.foodres .2016.01.019							NU-0615			
	10.1016/j.jbiotec. 2015.12.028							NN-3804			
	10.1016/j.jbiotec. 2016.02.027							NN-3771			
	10.1099/ijsem.0. 001731							NG-0811			
	10.1099/ijsem.0. 001887							NN-3775			
	10.1099/ijsem.0. 001921							NN-3776			
	10.1016/j.syapm. 2016.07.004							NN-3777			
	10.1099/ijsem.0. 002170							NN-3778			
	10.1038/s41598 -018-19860-7							NN-3756			
	10.4014/jmb.171 1.11005							NN-3767			
	10.1016/j.margen .2017.11.002							NN-3772			
	10.1038/s41396 -018-0061-9							NN-3773			
	10.1186/s40793 -018-0324-0							NN-4970			
10.1038/nbt.423 2							NN-4971				
							NN-4972				
							NN-4974				
							NN-4973				

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

국내외 논문 게재 성과 21건, 메타지놈 분석 23건, 그에 해당하는 NABIC 등록 24건, 학술 발표 43건, 전문 연구 인력 양성 16건이 있으며 그 외 추가적으로 생물 자원 5건 기탁, 병원체 미생물 정보완성 5건, 전략 미생물 해독 1건, 타 연구 개발사업에의 활용 2건의 성과가 발생하였음.

보고서 면수: 1-213

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농식품 환경의 메타유전체 분석을 통한 기능성 미생물 탐색 및 농식품 분야 유용 미생물 후보군 발굴 ○ 경제동물의 장내미생물 메타유전체 및 메타볼롬 분석, 미생물 자원 발굴 및 유전자원 데이터베이스 구축 ○ 메타유전체 비교 분석을 통한 미생물 군집의 기능 및 농식품 분야 유용성 분석 ○ 첨단 생명공학기법(메타유전체/메타볼롬)을 이용한 경제동물의 장내 미생물체 정보 대량 분석 ○ 메타유전체/메타볼롬 분석을 통해 얻어진 정보 바탕으로 경제 동물의 유용 미생물 후보 발굴 ○ 식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스 군집 다양성과 변화 비교분석 ○ 농식품적 활용 가치가 높은 환경의 미생물의 미생물 군집 구조 비교 분석을 통한 메타유전체 서열 결정 환경 선정 및 참조유전체 분석 미생물 분리 및 유전체 서열 결정 ○ 메타유전체 서열 분석 데이터로부터 농식품 산업에 활용 가능한 신규 및 기능성 유전자 발굴 ○ 미생물 메타유전체 서열로부터 미생물 군집 구조 및 유전자 구성, 대사 경로 파악 방법 구축 및 프로그램 개발 ○ 농식품 현안 미생물 유전체 전략적 분석 대응
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 경제동물 한우 장내 메타유전체 염기서열과 메타볼롬 분석을 통한 한우 장내 미생물체 정보 확보 ○ 메타유전체/메타볼롬 네트워크 분석을 통한 경제동물의 건강 증진 조건에 해당되는 장내미생물체 규명을 통해 환경오염방지, 질병예방, 친환경 농축수산물 공급으로 농가소득 증대, 소비자 신뢰 강화, 수출시장 개척으로 국가의 경제적 이익 창출 극대화 및 국제 경쟁력 강화 ○ 발효식품의 발효단계별 세균 군집 변화 분석 및 바이러스 유전체 확보 ○ 발효 식품 누룩에서의 전 메타유전체 DNA를 추출 방법 구축

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 식품 소재인 누룩의 미생물 메타유전체 염기서열 해독 및 미생물 군집 구조 파악 ○ 배화상병 원인 미생물 5개 균주의 유전체 비교 및 유전체학적 유연관계 분석 ○ 토마토 세균성 풋마름병 저항성에 기여할 수 있는 신규 미생물 균주 확보 ○ 메타유전체학적 접근 방법을 이용한 비교 메타유전체 서열 및 유전자 분석 ○ 데이터베이스 및 생물정보학적 도구 수집, 시험, 활용을 통하여 전 메타유전체 염기서열 분석 기반 확보 ○ 미생물유전체전략연구사업단 내의 전문가들과 연구 네트워크를 구축하여 공동연구 및 상호간의 정보 교류 체제 활성화를 통한 사업화 지원 및 농축수산업에 필요한 원천 기술 확보 				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전 세계적으로 주목 받고 있는 미생물 메타유전체의 데이터 분석 기반 정립 및 그 분석 결과를 실제 농식품 산업에 활용함으로써 해당 연구분야의 국내 위상을 높일 수 있음 ○ 메타유전체 분석 방법을 통해 특정 환경에 실제로 존재하는 기능성 유전자를 밝히고 이를 농식품 산업의 발전에 활용함으로써 최신 생명공학 기법을 이용한 농식품 산업의 발전에 기여 할 수 있을 뿐만 아니라 유용 유전자의 발굴 및 활용의 성공 가능성을 높일 수 있음 ○ 유전적 결함으로 인하여 발생하는 장내미생물의 군집변화 및 장내미생물의 군집변화에 따라 수반되는 숙주의 대사 관련 질환 연구는 현재 명확한 원인을 알 수 없는 대사 관련 질병 (예: 비만, 당뇨병, 염증성 장질환)의 원인을 찾고, 치료법을 모색하는 기반 지식 창출 가능. 이러한 지식정보를 기반으로 관련 분야 연구 경쟁력을 확보하며, 향후 관련 연구를 추가적으로 수행하거나 타 연구 사업에 정보를 제공하여 농축수산업에 필요한 원천 기술을 확보할 수 있음. ○ 농식품 환경의 메타유전체 분석을 위한 파이프라인 및 시스템을 구축하는데 있어, 기존 서버시스템을 최대한 활용하여 메타유전체와 같은 빅데이터를 효율적으로 분석할 수 있는 파이프라인을 구축함으로써 본 연구 과제 및 사업단 연구 네트워크를 통한 메타유전체 연구에 좋은 예를 제시하고 공동연구 및 협업을 통한 연구 성과 및 연구역량 강화에 기여하는 데에 활용될 수 있음 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	경제동물	미생물 및 유전자원	대사체 프로파일	메타유전체	대사네트워크
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	economic animals	microbes and gene resources	metabolomic profile	metagenome	metabolic network

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 1 절 연구개발 목적	8
제 2 절 연구개발의 필요성	8
1. 연구개발의 개요	8
2. 국내·외 연구개발 현황/문제점/전망	13
3. 국내 연구개발의 필요성 및 중요성	26
제 3 절 연구개발 범위	27
제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과	29
제 1 절 연구개발의 추진전략, 방법 및 추진체계	29
1. 연구개발 추진전략	29
2. 연구개발 방법	30
3. 추진체계	32
제 2 절 연구 내용 및 결과	33
1. 메타지노믹스 기반 꿀벌의 유용미생물 후보 발굴	33
2. 메타지노믹스 및 기반 한우 육질등급 별 반추위 내 미생물 & 바이러스 군집 연구	56
3. 메타지노믹스 기반 식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스군집 다양성과 변화 비교분석	109
4. 질량분석기기 기반 농업유용미생물의 메타볼롬 해석	118
5. 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 프로파일링	125
6. 농축산식품 환경 미생물의 메타유전체 정보 분석	137
7. 메타유전체 및 메타볼롬 종합 정보분석을 위한 네트워크 파이프라인 구성	179
제 3 절 연구개발성과	188
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	196
제 1 절 목표	196
제 2 절 목표달성여부	199
제 3 절 목표 미달성 시 원인 및 차후대책	208
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	209
붙임. 참고문헌	211

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

- 농식품 환경의 메타유전체 분석을 통한 기능성 미생물 탐색 및 농식품 분야 유용 미생물 후보군 발굴
- 농식품 환경의 메타유전체 분석을 위한 NGS 기반의 메타유전체 빅데이터 분석기반 확보 및 분석 파이프라인 구축
- 경제동물의 장내미생물 메타유전체 및 메타볼롬 분석, 미생물 자원 발굴 및 유전자원 데이터베이스 구축
- 메타유전체 비교 분석을 통한 미생물 군집의 기능 및 농식품 분야 유용성 분석
- 식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스 군집 다양성과 변화 비교분석
- 미생물유전체전략연구사업단 내의 타 연구팀 (조기성과 창출형 과제 및 연구역량 강화형 과제)의 전문가들과 연구 네트워크를 구축하여 공동연구 및 상호간의 정보 교류 체제 활성화를 통한 사업화 지원

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

- 산업화 이후 전 세계적인 인구 증가에 따른 식량 수요 증가는 농식품 산업에 큰 변화를 가져왔음. 급격히 늘어난 식량 수요 증가는 농생산물 생산의 기하급수적인 증가를 요구하였고 그에 따른 농산물의 질병 예방을 위하여 화학 비료, 농약 등의 사용 또한 급증하였음. 하지만 최근 식량의 수요가 충족되고 인류의 삶의 질이 향상됨에 따라 농산물 재배에 있어 화학 비료, 화학 농약의 사용보다는 친환경 생물 비료, 생물 농약의 사용에 대한 관심과 수요가 높아지고 있음.
- 현재 화학 비료 및 농약을 사용하지 않는 친환경 농산물 및 식품 생산 증가의 세계적 추세 변화에 발맞추어(그림 1), 국내에서도 화학 비료 및 농약을 사용하지 않거나 매우 저용량의 화학 농약의 사용을 허용하여 생산한 친환경 농산물, 친환경 식품의 시장 규모는 점점 증가하고 있음(그림 2).

단위: 백만\$									
지역	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2010	성장률(%)
미국	211	218	226	242	278	317	352	445	7.8
캐나다	5	5	6	6	7	8	9	13	9.2
유럽	66	68	73	82	402	125	150	259	14.6
아시아	55	57	61	68	80	95	111	171	11.9
남미	43	44	45	48	53	58	63	74	5.7
기타	7	7	7	8	9	10	12	19	9.3
계	387	399	418	454	531	613	697	979	9.7

자료: Biopesticides- a global strategic business report, GIA, 2006, 김달수, 2007B, "생물농약의 개발현황과 전망(2) 산업으로서의 현황 및 발전방향." 『생활과 농약』 제28권 제3호 통권226호, 한국작물보호협회지에서 재인용

그림 1. 세계 생물농약 시장의 매출액 동향 및 전망 (출처 : 한국농자재신문)

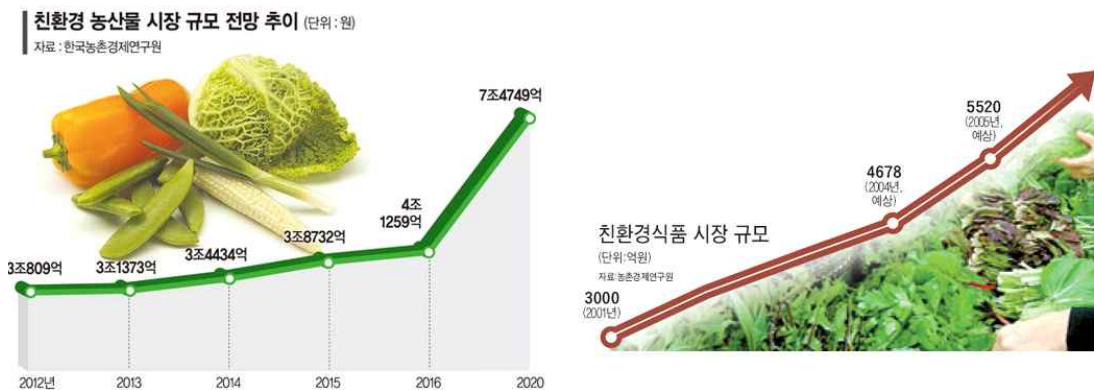


그림 2. 친환경 농산물, 친환경 식품 시장 규모 전망 (출처: 한국농촌경제연구원)

- 또한 화학비료, 화학농약을 사용하지 않거나 용량을 줄여 생산한 친환경 농산물 외에도 미생물 비료 등 생물 소재를 이용한 친환경 생물 비료, 생물 농약의 시장 규모가 증가하고 있고 2018년경에는 생물농약 시장이 화학농약 시장 규모보다 더 커질 것으로 전망하고 있음(그림 3).

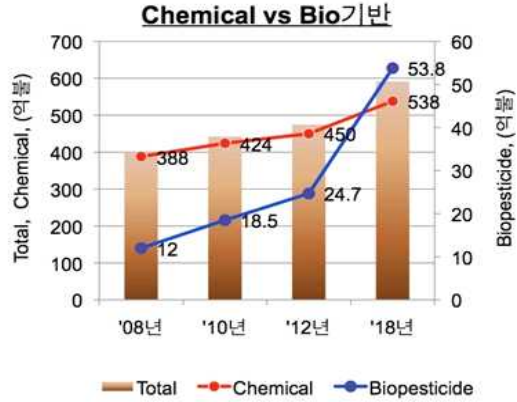


그림 3. 작물 보호제 시장 성장 전망
(출처 : 농업축산신문)

- 화학 비료 및 화학 농약의 사용을 줄이고 생물 비료, 생물 농약 등을 사용한 친환경 농산물의 생산 증가가 요구되는 세계적 추세에 맞춰 실제 농작물 생산 환경으로부터 작물 생장 유용 미생물 및 기능성 유전자를 발굴하여 농식품 산업에 응용함으로써 친환경 작물 생산의 증가, 환경 보호 및 농식품에 의해 가장 큰 타격을 받을 수 있는 경제 동물의 건강 증진에도 기여할 수 있음.
- 1950년대부터 전 세계적으로 성장촉진 및 질병 예방 목적으로 사료 내 항생제가 사용되었으나, 남용으로 인한 항생제 내성균의 급격한 출현 및 인수공통질병의 지속적인 증가 등의 문제점이 제기되었기에, 1986년 스웨덴을 시작으로 유럽 국가들의 사료 내 항생제 사용이 금지되었고, 국내에서도 2011년 7월 1일부터 배합사료 내 항생제 사용 전면 금지가 시행됨. 따라서 농장 내 질병 증가와 생산성 저하가 우려되기 때문에, 경제 동물의 건강에 유익한 미생물이 사료 첨가제로 사용이 권장되어 이와 관련되어 **농업 및 축산업 미생물 관련 연구가 2000년부터 급격히 늘어나고 있음** (그림 4, 5 출처: 농수축산용 미생물산업육성지원센터 설립 방안에 대한 연구, 2011).

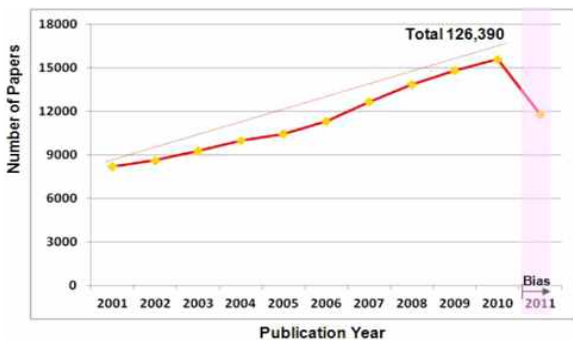


그림 4. 농업 미생물 관련 논문의 연도별 발표 수

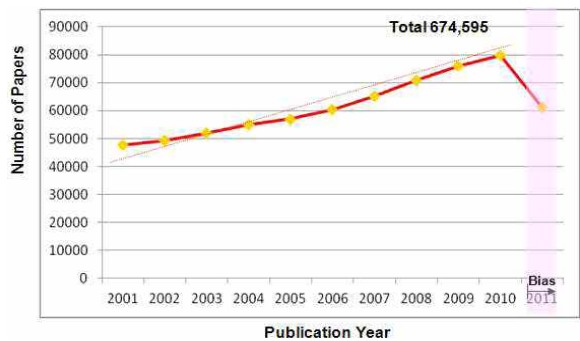


그림 5. 축산업 미생물 관련 논문의 연도별 발표 수

- 세계 농업에서 2,150억 달러의 경제적 가치를 지닌 경제 동물인 꿀벌의 경우(Gallai et al. 2009), 2006년 미국에서 처음 지목된 ‘**군집 붕괴 현상(Colony collapse disorder (CCD))**’ 이 최근 몇 년 사이에 전세계적으로 확산됨에 따라, 수분 매개자로서의 꿀벌에 대한 의존도가 강한 농업에 막대한 손실을 가져오고 있음. 국내에서도 양봉 산업은 약 6조원의 가치를 지니고 있으며, 그 중 약 60%가 꿀 생산에 치중하고 있으나 최근 몇 년 새, 꿀 생산량이 급격히 줄어들고 있어 그 원인을 **농약과 살충제, 영양실조, 기상악화, 각종 병원성 미생물로** 예측하고 있음(그림, 6, 7).

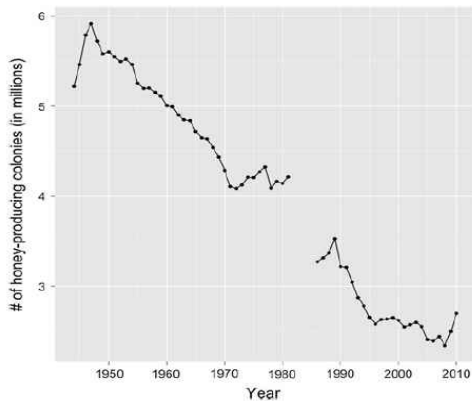


그림 6. 미국 내 꿀벌 수의 감소

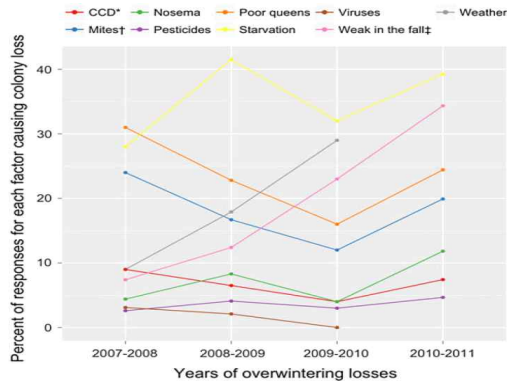


그림 7. 2007년-2011년 미국 내 꿀벌의 동면기 손실 그래프

- 국내의 농업 총 생산액 중 1/3 이상 (38.3%, 2009년도)을 축산업이 차지하며 농산물 생산액 상위 10개 품목 중 6개가 축산 관련 분야임. 이 중 한우는 현재 전국적으로 271만 1천 마리가 사육되고 있으며 (2014년 1/4분기 가축동향조사, 통계청), 국민 소득 및 식생활의 변화에 따라 산업규모 (4조원 이상)가 꾸준히 증가하고 있는 추세임.
- 1993년 축산법 제 43조에 의한 축산물 등급화 거래법에 따라 축산물 등급제가 적용되었고, 2001년 쇠고기 수입개방에 대응 “한우산업 발전대책”을 마련하여 2002년 축산물의 소비촉진 등에 관한 법률을 도입하였으며, 동년 8월부터 계란 품질등급제 (4개 등급: 1+, 1, 2, 3)를 실시함. 쇠고기의 경우 소비자의 선택 기준으로 육질등급 (5개 등급: 1++, 1+, 1, 2, 3)과 유통과정에서의 거래지표로 육량등급 (3개 등급: A, B, C)로 등급을 표시하며 모든 국내산 쇠고기는 등급판정 후에 유통이 가능함. 쇠고기 등급판정사업은 한우의 품질경쟁력을 세계적 수준으로 끌어 올리는데 기여하였으며, 등급제도 시행으로 한우산업에서 연간 2,138억원의 소득증대 효과가 발생함 (축산물품질평가원).
- 2013년 기준으로 전국 한우 축산농가의 최상위 육질등급 (1++) 출현 비율은 전체

959,751두 중 88,772두이며 (9.2%, 표 1), 축산농가 소득과 밀접한 관련이 있는 등급별 경락단가의 편차가 쇠고기의 육질 등급에 따라 매우 크게 발생함 (표 2).

표 1. 한우 육질 및 육량 등급 출현율 (출처: 축산물품질평가원)

시도:전국, 조회기간:2013.01.01~2013.12.31

종별		한 우				
성별		암 (두)	수 (두)	거세 (두)	계 (두)	출현율 (%)
육 질	1++	16,486	13	72,273	88,772	9.2
	1+	64,063	77	137,795	201,935	21
	1	154,130	651	142,732	297,513	31
	2	191,304	5,493	63,268	260,065	27.1
	3	81,598	21,234	5,028	107,860	11.2
	D	3,003	235	368	3,606	0.4
육 량	A	152,452	23,962	123,506	299,920	31.2
	B	270,747	3,223	186,440	460,410	48
	C	84,382	283	111,150	195,815	20.4
소계		510,584	27,703	421,464	959,751	100

표 2. 쇠고기 등급 별 경락단가 (출처: 축산물품질평가원)

도매시장, 품종, 성별: 전체

구분	등급				
	1++A	1+A	1A	2A	3A
2012년	17,957 (9,764)	15,950 (18,286)	14,308 (26,471)	11,239 (30,909)	8,690 (17,699)
2014년	18,241 (3,504)	16,135 (8,613)	14,436 (14,562)	12,401 (14,045)	10,602 (5,101)
2011년	17,325 (8,651)	15,218 (17,033)	13,774 (21,916)	11,003 (21,491)	8,218 (12,595)
2010년	20,906 (6,528)	18,549 (14,139)	16,852 (17,756)	14,173 (17,598)	12,218 (8,327)
2013년	17,665 (12,047)	15,177 (26,679)	13,473 (40,658)	10,971 (42,183)	8,894 (15,662)
소계	18,231 (40,494)	16,012 (84,750)	14,326 (121,363)	11,662 (126,226)	9,308 (59,384)

경락단가(경락두수): 도매시장 및 공판장에서 상장된 낙찰된 경락가격(두수)

- 육류의 품질은 육류가 가지고 있는 수많은 질적 또는 상품적 특성에 의해 결정됨. 지방이 적은 살코기가 올바른 단백질 식품으로 인식되지만 식육은 식품으로서 영양적 가치가 높아도 맛을 결정짓는 식감이 나쁘면 그 가치가 반감됨 (그림 8). 그러므로 식육은 맛과 관

련이 큰 근육 내 지방 함량이 절대적으로 요구되며 근육 내 지방 축적은 고급육을 위한 한우/육우 비육 단계에서 핵심 목표임.

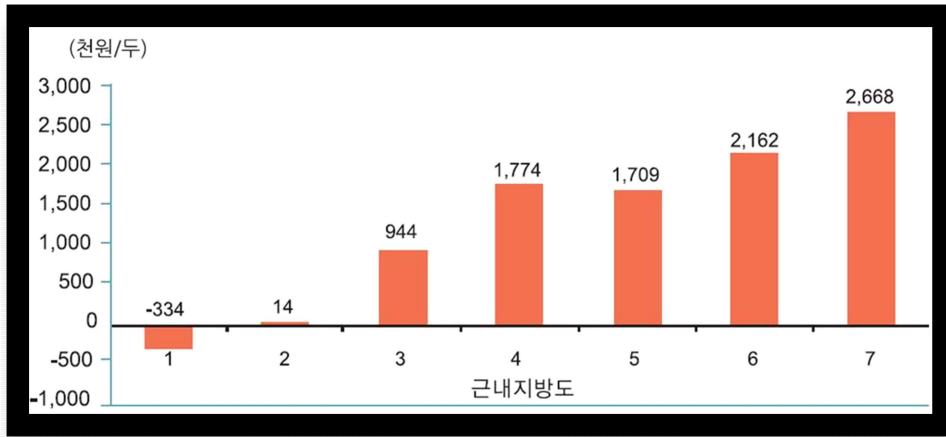


그림 8. 근내지방도와 축산농가 소득변화 (출처: 국립축산과학원)

- 식육의 육질을 결정짓는 근육 내 지방 축적은 사료 섭취 후 체내 흡수되는 탄수화물, 지방 등의 영양소가 각 조직부위에서 대사작용에 의해 이용 및 축적되는데 동일 사양관리 조건에서 동일 사료를 급여하였을 경우라도 개체 간 지방 축적 정도, 지방산 조성 및 함량 등에서 차이가 발생함. 경제적 가치가 높은 가축의 표현형은 DNA 염기서열의 차이에서 기인하는 표현형을 포함하여 영양, 환경 조건 및 장내미생물과의 복합적인 상호작용에 의한 결과이므로 이러한 차이를 이해하고 경제성과 효율성을 고려하여 사양관리 조건에 반영하려는 노력이 수반되어야 함.
- 각종 질병으로부터 경제 동물을 보호하기 위한 노력으로 질병 저항성 및 생산성 향상에 기여할 수 있는 방법으로서 미생물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있음. 특히 인체 장내 미생물 연구로부터 축적된 지식으로서, 각종 경제동물의 장내미생물도 병원성 세균의 침범 억제, 장 표피세포의 손상 방지, 지방 축적 조절, 동물 스스로 소화하지 못하는 영양분을 분해하여 흡수 가능한 형태로 전환, 비타민 K의 생산과 철분 흡수, 장 점막의 면역증강 및 담즙산 대사 등 숙주 동물의 전반적인 대사 과정에 직접적인 영향을 주고받고 있는 것으로 알려져 있음. 허나, 인간의 장기와는 구조와 영양 흡수 형태가 전혀 다른 소, 돼지, 닭, 어류나 곤충 등의 경제 동물에 대한 장내미생물의 역할에 대한 연구가 매우 미진함. 따라서 인간처럼 다른 동물의 면역활성화에도 장내미생물의 중요성이 예측되고 있는 바 경제동물의 건강 및 면역력 증대 관련 물질 및 미생물 개발이 필요함.

2. 국내·외 연구개발 현황/문제점/전망

- 전세계적으로 농축수산업에서 미생물의 이용에 대해 관심이 증가하고 있음에도 불구하고, 한국 논문 수는 농업 분야 14위(2.06%), 축산업분야 12위(2.83%)로 농업 선진국에 비

해 낮은 수준의 연구력을 보임(그림 9, 10 출처: 농수축산용 미생물산업육성지원센터 설립 방안에 대한 연구, 2011). 유용 미생물 및 메타지놈 확보를 통해 농업분야의 과학선진화를 위한 정보 데이터베이스 구축을 위한 전략이 필요함.

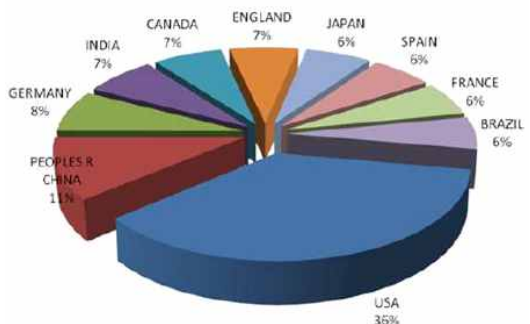


그림 9. 농업미생물 관련 논문의 최다 배출 국가

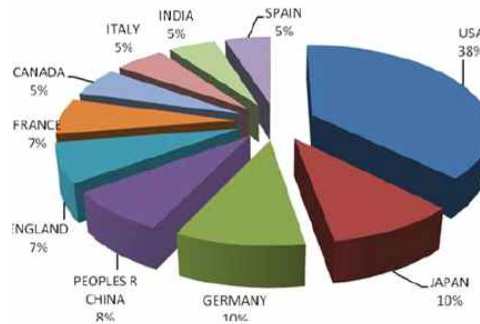


그림 10. 축산업 미생물 관련 논문의 최다 배출 국가

- 불과 십년 전까지의 특정 환경의 미생물 연구는 미생물을 분리하여 연구하거나, cloning 을 이용한 균집분석 방법으로 연구가 이루어졌으나, 최근 몇 년간 여러 동물군의 장내 미생물 균집에 대한 연구에 집중되고 있는 것은, 2005년도부터 Next-Generation Sequencing (NGS)에 기반을 두고 있는 획기적인 대용량 염기서열 분석 방법이 등장하면서 미생물 생태학 분야에 적용되어 메타유전체연구가 비약적으로 발전하였기 때문임.
- 메타유전체 연구는 미생물의 16S rRNA 유전자의 서열 결정과 분석을 통한 균집 분석과 미생물의 전체 기능유전자의 서열을 결정하고 분석하는 크게 두 가지로 나눌 수 있음(그림 11). 하지만 현재까지의 메타유전체 연구는 특정 환경에 어떤 미생물이 존재하고 있는 지만 조사하여, 그 역할을 추측하는 것이 주된 내용이었음. 하지만 해당 환경을 보다 완벽히 이해하고 활용하기 위해서는 미생물 균집 구조뿐만 아니라 실제 해당 환경에서 발현하는 유전자가 무엇이고 어떤 역할을 하는지가 중요함.

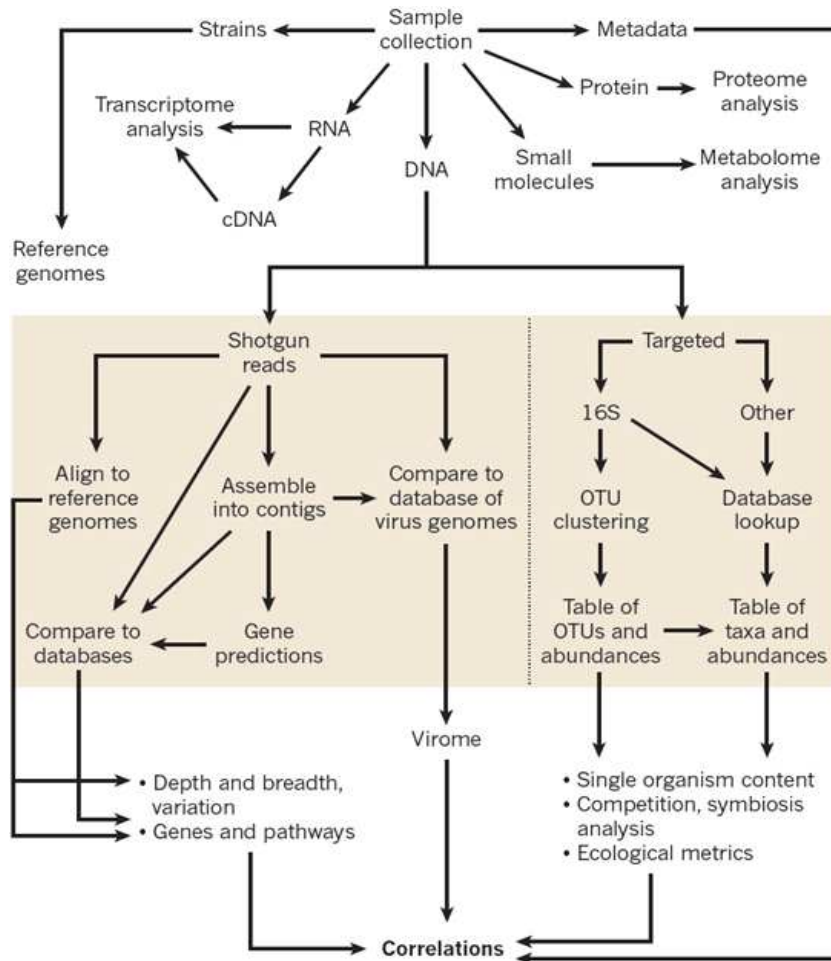


그림 11. 미생물 메타유전체 분석 (출처 : Nature 489:250-256 (2012))

○ 미국은 2007년 NIH의 메인로드맵 과제로 인체 미생물체의 메타지노믹스 연구(Human Microbiome Project)가 선정되었으며, 프랑스, 독일, 영국, 스페인, 이탈리아, 덴마크, 네덜란드 등의 7개 나라가 컨소시엄을 구성한 유럽 연합은 3000만 달러의 사업비로 Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT)을 시작하였음. 일본의 경우에서도 2007년에 Human Metagenome Consortium, Japan (HMGJ)을 구성하여 16개의 주요한 장내 미생물의 게놈을 해독하고 있으며 중국 또한 유럽과의 공동사업과 함께 Meta-GUT Project를 진행하고 있음. 이외에 캐나다 (Canadian Microbiome Initiative), 호주 (Australian Urogenital Microbiome Consortium), 싱가포르 (Human Gastric Microbiome) 등, 최신의 생명공학 및 NGS 기술을 총동원하여 장내 미생물의 군집구조와 기능적 특성을 밝히고 인간의 질병과 건강에 대한 그들의 역할을 규명하기 위해 선진국을 중심으로 인체 미생물체를 분석하고 연구하려는 초대형 프로젝트가 출범되어 진행되고 있음. 이러한 연구를 기반으로 세계경제포럼에서 2014년 10대 기술로 Human Microbiome Therapeutics가 선정되어 미생물의 중요성이 대두되고 있음. 하지만 이런 미생물 메타유전체에 대한 연구는 대부분 인간과 마우스 연구에 초점이 맞춰져 있는 실정임.

○ 대표적인 경제 동물로 알려진 서양 꿀벌 *Apis mellifera*의 경우, 유럽, 북미, 호주, 아프

리카 아시아 등 여러 나라의 연구에서 8 phylotype의 특정 미생물이 이들의 장내에 분포되어 있는 것으로 알려짐. Maria Apella Lab.을 비롯한 다수의 연구에서 꿀벌의 장내에서 분리한 미생물 *Lactobacillus spp.*를 이용하여 American Foulbrood의 원인균인 *Paenibacillus larvae*와 병원균으로 유명한 *Listeria monocytogenes*를 억제하는 것을 밝혔고 장내 미생물의 대사산물인 lactic acid 숙주 동물의 병원균에 대한 저항성을 장내 미생물이 증진시키는 것으로 예측하였으며, 2006년 BMC Ecology에 보고된 Evans의 연구에서는 꿀벌의 장내에서 분리한 여러 균주를 유충의 병원균인 *Paenibacillus larvae*에 대한 inhibition assay를 통해 분리된 균주의 30% 이상의 균주가 *P. larvae*를 막는 결과를 보임. 최근 Nancy Moran lab 에서 보고된 연구에서 꿀벌의 hindgut에서 추출된 메타유전체를 illumina를 이용한 sequence 증폭을 통해, gut microbiota 구성원인 *Snodgrassella* 와 *Gilliamella*의 기능을 biofilm 형성과 Carbohydrate의 운송과 분해, 또한 화분과 nectar를 주식으로 하는 honey bee가 pollen 벽을 깨뜨릴 수 있도록 Pectin을 분해하는 효소를 갖고 있음을 유추한바 있음 (Engal *et al.*, 2013, 그림 12). 하지만 이러한 연구의 대부분은 미국 및 선진국 연구팀에 의해서 도출된 것들이며 그 연구도 상당히 부족한 실정임. 따라서 메타유전체를 이용한 gut microbiota의 역할을 유추하는 연구는 경제 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 중요한 토대가 될 것임.

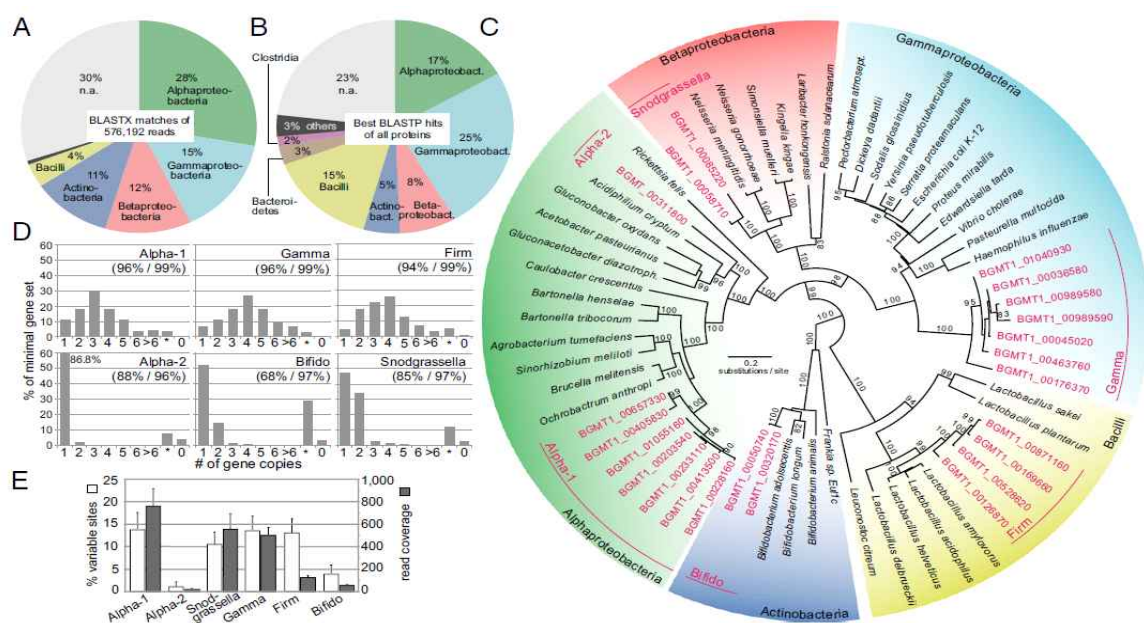


그림 12. Metagenomic를 이용한 꿀벌의 장내 미생물 군집

- 국내에서는 벌 장내 미생물 연구는 농진청의 원향연 박사 연구팀의 한봉벌 (*Apis cerana*) 과 양봉벌 (*A. mellifera*)의 장내 미생물을 비교한 연구가 보고되었으며 (Journal of Microbiology). 본 연구팀은 국내 여러 지역에서 채집한 양봉벌의 장내 미생물의 군집을 파악한 바 있음 (*in revision*). 하지만 미생물 역할까지 파악할 수 있는 메타지노믹스 연구

는 전무한 실정이며, 몇몇 연구자들을 제외하고는 장내 미생물 다양성 연구도 거의 이루어지지 않고 있음.

- NGS 방법은 소, 돼지, 닭 등의 경제 동물의 위장관내 미생물 군집 연구에 활발히 적용되고 있음. 홀스테인 종의 반추위의 미생물 군집을 조사한 연구에서 phylum (문, 門)인 Firmicutes에 속하는 박테리아 그룹이 크게 우점하며, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria에 속하는 박테리아 그룹이 차례로 우점하고 있음이 보고됨 (Berg Miller M. E. *et al.*, (2012) *Environ. Microbiol.*, 14(1): 207-227; 그림 13).

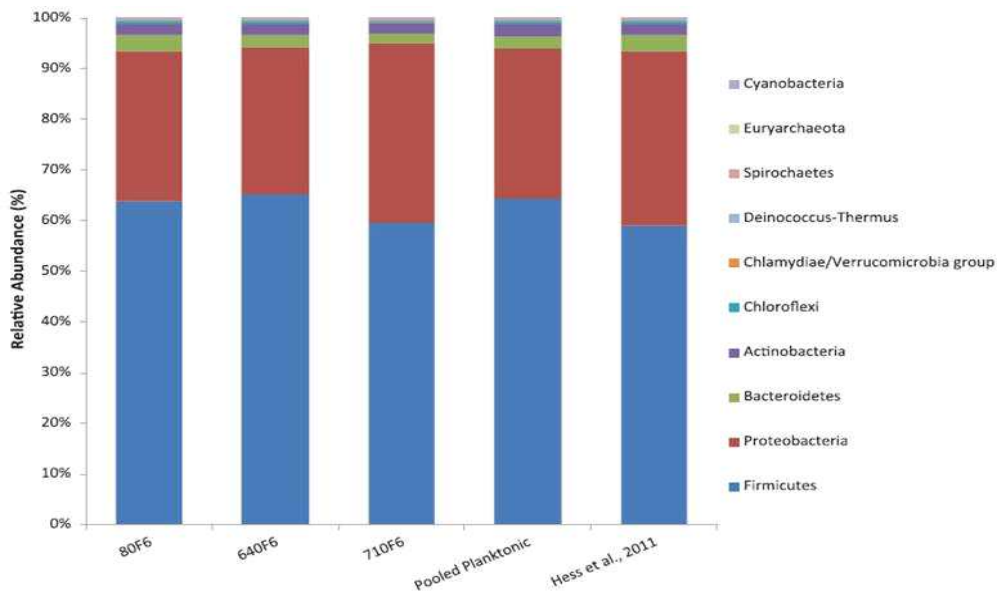


그림 13. 홀스테인 종의 반추위 내 미생물 군집 조사

- 홀스테인 종의 반추위 내 미생물 군집을 조사한 다른 연구에서 섬유질 배합을 달리한 사료 (표 3 왼 쪽)를 급여하였을 때 조사료의 배합 비율이 높은 실험군의 경우 Firmicutes에 속하는 박테리아 그룹이 크게 우점하는 반면, 농후사료의 배합 비율이 높은 실험군에서 Bacteroidetes에 속하는 박테리아 그룹이 크게 우점하는 결과를 나타냄 (Thoetkiattikul H *et al.*, (2013) *Curr. Microbiol.*, 67: 130-137; 표 3 오른 쪽). 즉, 사료의 배합 비율 따라 반추위의 미생물 군집 간 상당한 차이가 있으므로 **고품질 한우**에서 최상의 사료 배합 비율과 반추위 내 미생물 군집의 상관성을 통계적인 지표와 함께 꾸준히 모니터링하여 생산성을 높이려는 노력이 필요함.

표 3. 사료 배합 비율 (왼 쪽)에 따른 홀스테인 종의 장내 미생물 군집 변화 (오른 쪽)

Ingredients (%)	G1	G2	G3	Phylum	Cow rumen		
					G1	G2	G3
Soybean	4.0	4.8	4.9	Acidobacteria	0.01	0.00	0.01
Corn kernels	2.5	3.0	2.5	Actinobacteria	0.06	0.02	0.20
Rice bran	1.2	1.4	2.7	Bacteroidetes	51.78	70.37	72.32
Dried cassava skin	0.4	1.9	3.5	Fibrobacteres	1.37	0.97	0.32
Cassava	1.6	7.5	17.3	Firmicutes	37.23	22.33	19.32
Sugar	1.0	2.3	2.3	Proteobacteria	4.97	3.93	5.28
Urea	0.2	0.4	0.6	Spirochaetes	0.88	0.33	1.04
Palm	1.2	2.4	8.3	Tenericutes	1.19	0.54	0.14
Mineral premix	0.1	0.1	0.1	Other	2.51	1.52	1.39
Salt	0.2	0.2	0.3	Total	100.00	100.00	100.00
Purple guinea grass	87.6	76.0	57.5				
Total	100	100	100				

- 최근 들어 설치류 및 인간을 대상으로 한 비만 연구에서 과체중 및 비만을 나타내는 그룹의 장내미생물 군집이 정상 그룹과 비교하여 확연히 구분되는 결과를 나타냄. 이러한 결과는 장내미생물에 의한 숙주의 대사작용 변화에 기인한 것으로 밝혀졌으며, 숙주의 대사작용에 영향을 미칠 수 있는 미생물의 유전자들에 대한 연구가 활발함 (Ray K., (2013) Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., 10:442; Shin N.-R. *et al.*, (2013) Gut, 63(5):727-35; Tremaroli V. & Bäckhed F., (2012) Nature, 489(7415):242-9; 그림 14). 설치류를 비롯한 실험동물 비만 모델에서 장내미생물 군집 연구는 최근 그 자체가 질병으로 받아들여지고 있는 인간의 비만을 치료하는데 궁극적인 목표를 두고 있지만 관련된 연구가 경제동물에 적용된다면 경제동물의 장내 미생물 군집 조성을 조절함으로써 보다 저렴한 사양 비용으로 단기간 동안 건강하게 살찌우는 고품질 경제동물을 생산할 수 있을 것으로 기대됨.

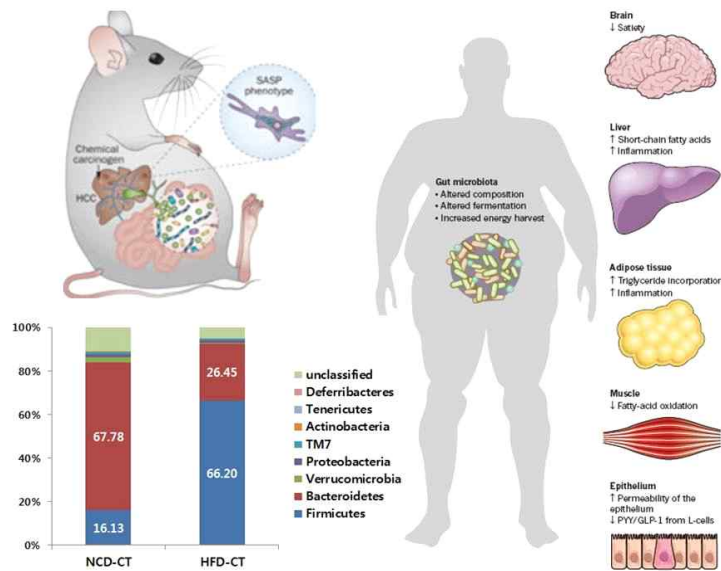


그림 14. 장내미생물 군집과 과체중/비만의 상관관계 연구

○ 장내미생물 군집 변화는 장관 내 상피세포층의 결합력 (gut integrity)을 약화시키고 침투성 (gut permeability)을 증가시켜 장내미생물로부터 유래한 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)의 상피세포층 투과력을 증가시킴. 상피세포층을 빠져나온 리포폴리사카라이드는 순환계를 타고 간, 지방조직, 근육 등으로 전달되어 지방전구세포의 분화를 촉진시켜 개체의 체지방이 증가하고 증체량이 증가할 것으로 추정됨 (Gravitz L., (2012) Nature, 485(7398):S12-3; 그림 15). 이러한 가설은 현재 장내미생물과 비만의 상관관계를 다루는 연구자들 사이에서 가장 신뢰도가 높은 가설로 받아들여지고 있음.

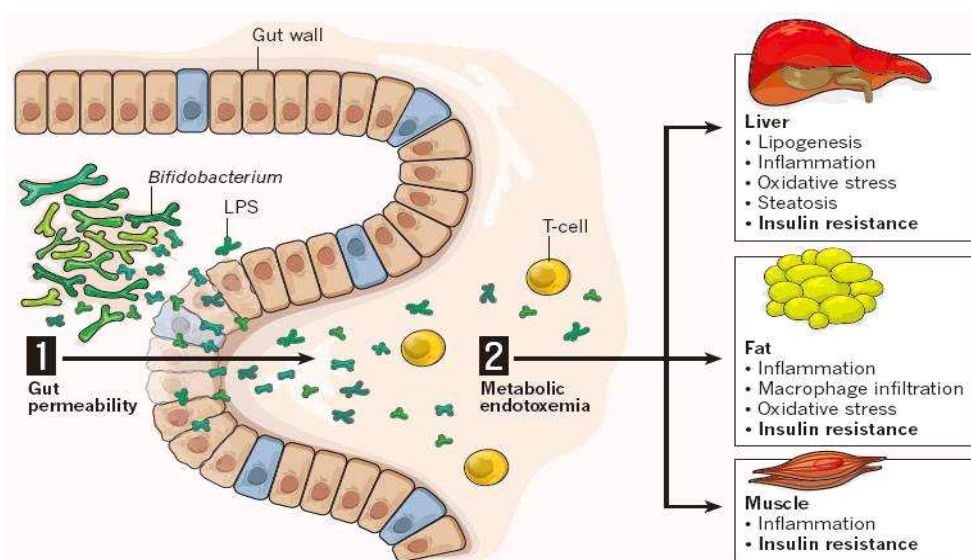


그림 15. 장내미생물에 의한 지방조직 발달과정

○ 뉴욕대학의 Martin J. Blaser 박사팀이 설치류를 대상으로 성장기 실험쥐의 저농도 항생제 급여가 지방조직 발달에 미치는 영향을 연구한 결과, 항생제 처리에 의해 변화된 장내 미생물 군집이 실험쥐의 단쇄지방산 (short-chain fatty acids) 생산과 관련된 대사활동을 증가시켜 간의 지방질 생합성 (hepatic lipogenesis)을 유도하여 지방조직이 증가함을 보고함 (Cho I. *et al.*, (2012) Nature, 488(7413): 621-6; 그림 16). 이러한 연구 결과는 육류의 생산성을 높이기 위한 경제동물의 항생제 급여가 항생제의 직접적인 효과가 아닌 장내미생물 군집 변화에 의해 지방조직이 발달하고 개체의 증체량이 증가함을 알 수 있게 함. 경제동물의 항생제 급여는 잔존하는 항생물질이 육류소비자에게 전달될 수 있으므로 친환경축산을 선호하는 축산 농가에서 점차 기피되는 사양방법임. 항생제를 사용하지 않고 고품질 경제동물을 생산할 수 있는 최적화된 장내미생물 군집에 대한 지속적인 모니터링과 데이터 축적이 요구됨.

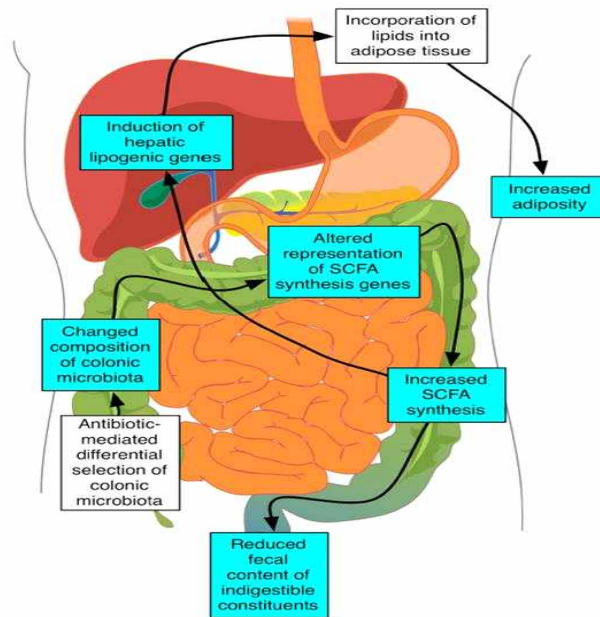


그림 16. 성장기 실험쥐의 저농도 항생제 급여가 지방조직 발달에 미치는 영향

○ 한국식품연구원 임성일 박사팀이 최근 한우의 증체량 증가를 목적으로 개발한 복합미생물 생균제를 급여한 실험군이 생균제를 섭취하지 않은 일반사료섭취군과 비교하여 사육기간이 4개월가량 단축됨을 보고하였으며 사료비 절감효과에 따른 축산농가의 경제적 어려움을 해소할 수 있는 방안을 제시함 (그림 17). 고품질 한우 생산을 위해 복합미생물 생균제를 구성하는 각각의 단일미생물이 한우의 증체량에 미치는 영향에 관한 연구가 수반되어야 함. 나아가 차세대 염기서열 분석법으로 축적된 데이터와 미생물의 광범위한 분리/동정 기술을 교접하여 증체량의 증가 및 감소와 연관성을 가지는 미생물을 종 (種)단위에서 연구하고자 하는 노력이 필요함.

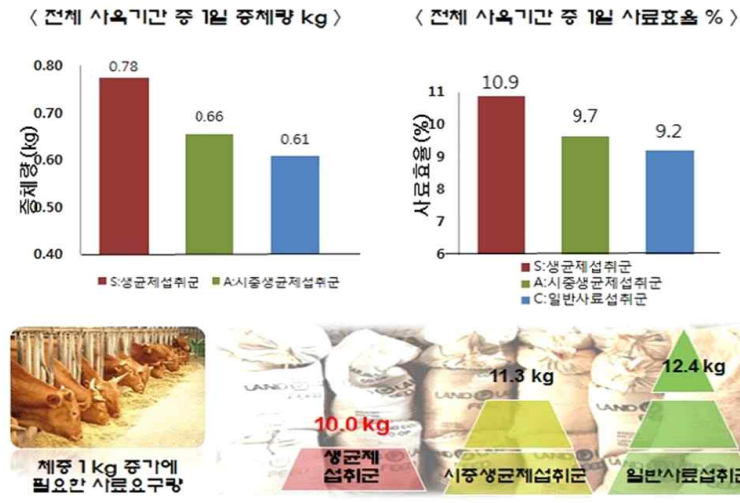


그림 17. 복합미생물 생균제의 한우 증체량 증가 효과
(출처: 주식회사 건농 홈페이지, <http://ks50.co.kr/>)

- 최근 연구에 의하면 과체중과 정상체중을 나타내는 쌍둥이 자매의 장내미생물 군집을 무균설치류의 장관 내로 이식 후 고지방/고섬유질사료를 급여할 경우 과체중 개체에서 유래한 장내미생물이 이식된 실험군의 경우 지방조직이 크게 증가하며 과체중 표현형을 나타내는 반면, 마른 개체에서 유래한 장내미생물이 이식된 실험군의 경우 동일한 사료를 급여하였음에도 저체중 표현형을 나타냄 (Ridaura V. K. *et al.*, (2013) *Science*, 341(6150):1241214; Walker A. W. & Parkhill J. (2013) *Science*, 341(6150):1069-70; 그림 18). 이와 같은 연구결과는 과체중 표현형/우수 형질 한우의 장내 미생물 군집을 다른 개체에 이식할 경우 근육 내 지방축적 및 증체량 증가를 기대할 수 있게 함. 한우 (경산암소 기준)의 비육기간은 개시체중 450kg 미만 8-10개월, 이상 6-8개월이며 보통 4개월 비육 후 초음파 육질진단에 따라 출하시기를 결정하므로 과체중 표현형/우수 형질 한우의 장내 미생물 군집을 송아지 때 이식할 경우 비육 전 개시체중에 빨리 도달해 사양비용 절감 효과가 발생할 것으로 예측됨.

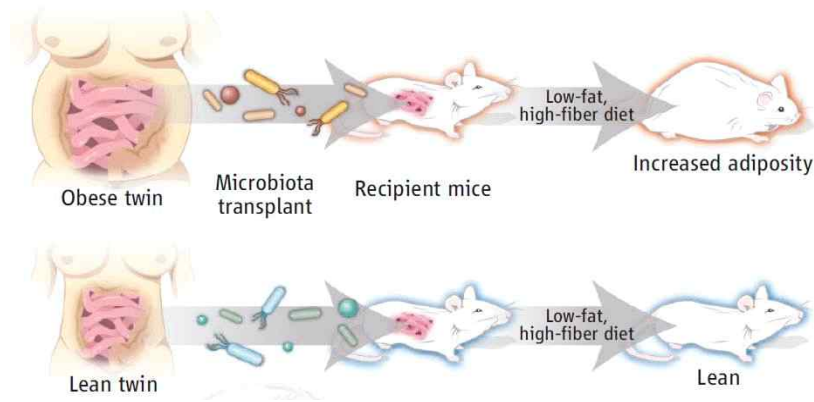


그림 18. 지방조직 발달 및 과체중 표현형을 유도하는 장내 미생물 군집 연구

- 차세대 염기서열 분석법이 바이러스연구에 적용되면서 현재까지 200편 이상의 바이러스 메타지노믹스 관련 연구가 Science, Nature, PNAS를 포함하는 상위저널에 출간되었고, 그 결과 대기, 해수, 인간의 장내, 발효식품, 토양 등 지구상의 거의 모든 환경에 다양하고 복잡한 바이러스 군집 (viral population, virome)이 존재함이 알려짐 (Kim M.-S. *et al.*, (2013) Genomics Inform., 11(3):121-128; 그림 19).

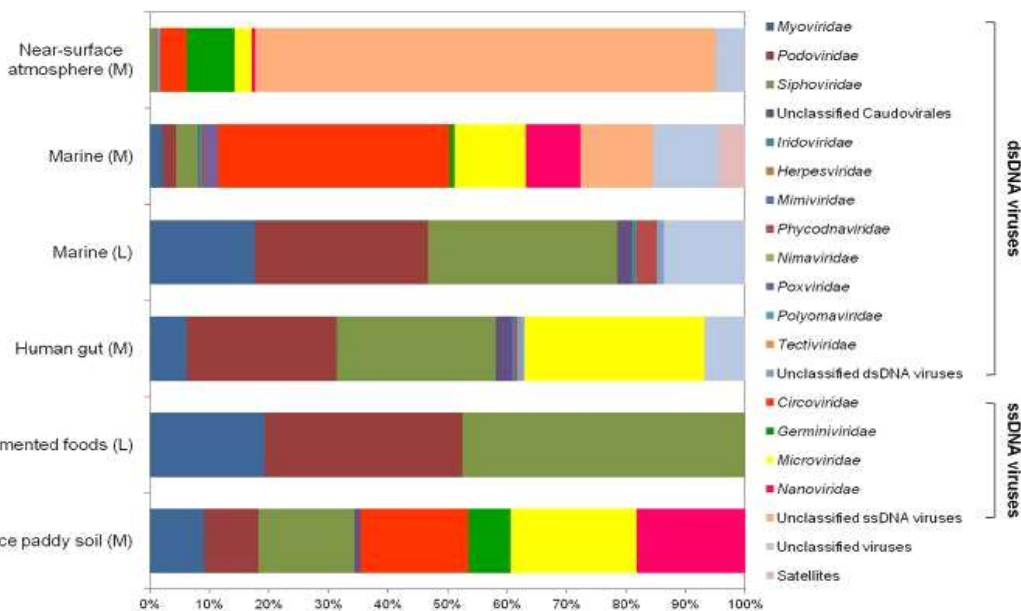


그림 19. 다양한 환경에 존재하는 바이러스 군집

- 위장관 내 바이러스 군집 중 특히 박테리오파지 (bacteriophage)는 위장관 내 박테리아 군집을 변화시키는 조절자로 알려져 있음 (De Paepe M. *et al.*, (2014) Front. Cell Infect. Microbiol., 4:39; 그림 21). 반추동물의 반추위는 박테리아뿐만 아니라 진핵생물, 고세균 및 바이러스가 다양하고 복잡한 군집을 형성함. 박테리아, 진핵생물 및 고세균 연

구와 비교하여 반추위 내 바이러스 군집 (rumen virome)에 대한 연구는 이제 시작 단계이며 특히 반추위 내 박테리오파지 그룹의 시/공간적 변화 및 그들에 의해 조절되는 박테리아 군집 조성, 나아가 반추동물 개체의 생리적 특성 변화에 대한 이해 및 관련 연구가 필요함.

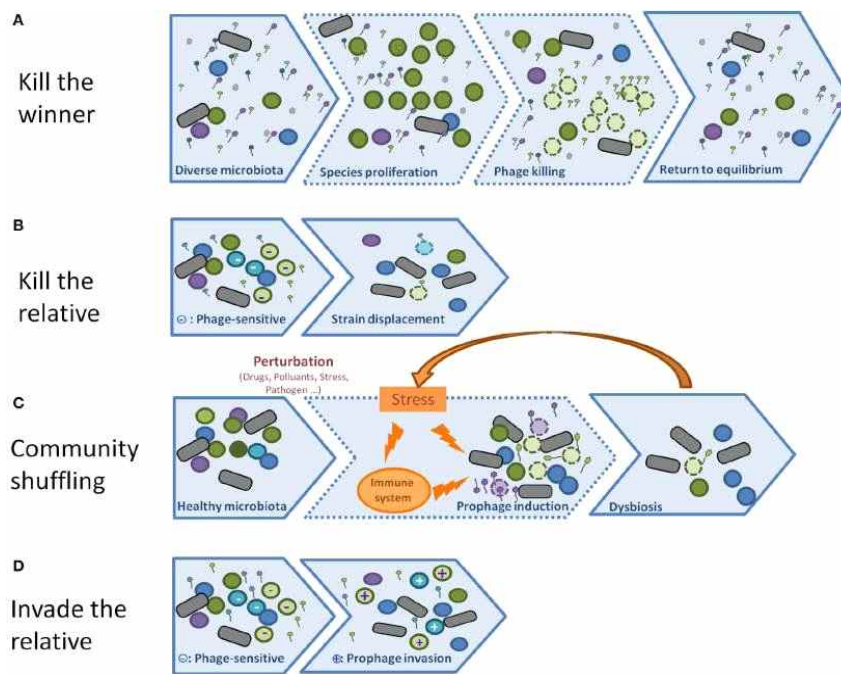


그림 20. 위장관 내 박테리오파지에 의한 박테리아 군집 조절

- 홀스테인 종의 반추위 내 바이러스 군집을 조사한 연구에서 Family (과, 科)인 미오바이러스 과 (Myoviridae)와 시포바이러스 과 (Shphoviridae)가 우점하고 있음이 밝혀짐 (Berg Miller M. E. *et al.*, (2012) Environ. Microbiol., 14(1): 207-227; 그림 22). 미오바이러스와 시포바이러스 과에 속하는 박테리오파지는 박테리아 phylum (문, 門)인 Firmicutes, Proteobacteria 및 Cyanobacteria가 주로 그들의 숙주로 알려져 있음.

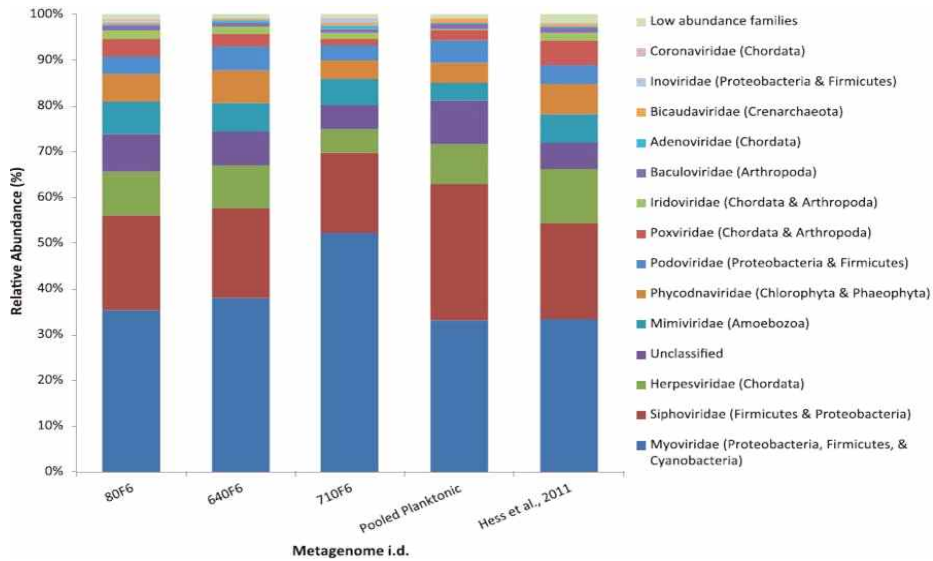


그림 21. 홀스테인 종의 반추위 내 박테리오파지 군집

- 박테리아의 크리스퍼 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)는 박테리오파지 지놈 시퀀스의 일부분이 박테리아의 지놈 안에 잘 정돈된 형태로 삽입되어 있는 부분이며 박테리오파지의 감염을 피하기 위한 박테리아의 적응면역 (acquired immunity)의 한 형태임. 홀스테인 종의 반추위에서 분리된 박테리아 14종의 유전체 정보를 분석한 결과 대부분의 박테리아 유전체에서 크리스퍼 관련 시퀀스가 발견됨 (Berg Miller M. E. *et al.*, (2012) *Environ. Microbiol.*, 14(1): 207-227; 그림 23). 이는 반추위 내에서 박테리아와 박테리오파지가 함께 공진화 (Co-evolution)하고 있는 증거이므로 **박테리오파지 군집 - 박테리아 군집 - 반추동물 개체의 생리적 특성 간 형성되는 3자 관계에 대한 종합적인 이해 및 관련 연구가 필요함.**

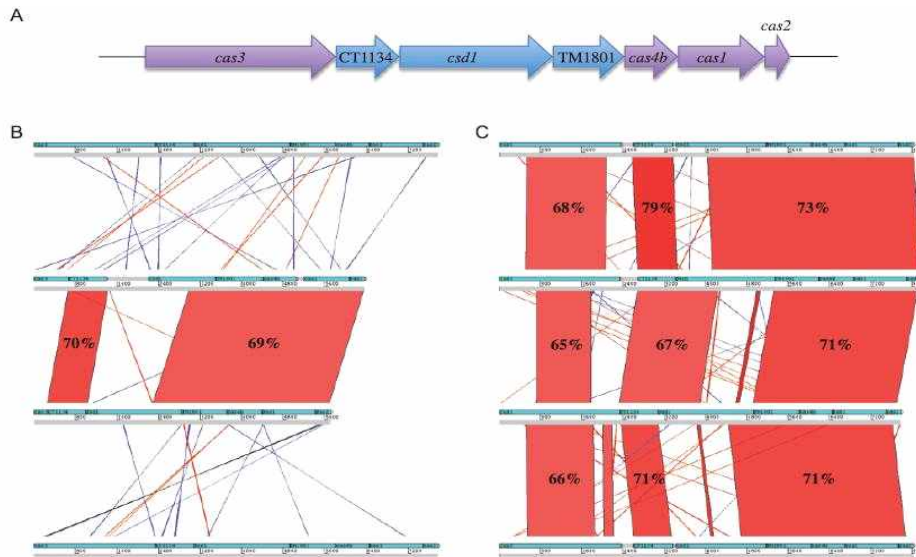


그림 22. 홀스테인 중의 반추위에서 분리된 박테리아의 크리스퍼 관련 유전자 (CRSPR associated (Cas) gene) 연구

- 최근 Roche에서 향후 454 pyrosequencing의 개발 종료로 선언함으로써 기존의 pyrosequencing 기반의 16S rRNA 유전자 서열 결정 및 분석이 Illumina MiSeq 등과 같은 다른 플랫폼의 차세대 염기서열 분석 기술을 이용하는 방향으로 전환되고 있음. 또한 차세대 염기서열 분석 기술의 데이터 생산량이 기하급수적으로 증가함으로써 비교적 저렴한 비용으로 16S rRNA 유전자 서열뿐만 아니라 메타유전체 전체의 서열 결정이 가능해짐으로 미생물 군집 분석을 위해 16S rRNA 유전자 뿐 만아니라 메타유전체 서열도 함께 결정 및 분석하는 방향으로 연구 패러다임이 전환되고 있음.
- 국내에서도 발효식품이나 몇몇 환경 시료 뿐만 아니라 비만 등 질병과 관련된 장내 미생물 군집 구조 등 미생물 군집 구조에 대한 연구가 이루어져 왔음(Roh *et al.* 2010 ISME J; Jung *et al.* 2011 AEM; Chun *et al.* 2012 J Microbiol; Shin *et al.* 2014 Gut). 그러나 메타유전체 해독이나 메타볼롬을 통해 유전자 구성을 분석한 연구는 몇몇 실험실에서 진행되고 있으나 아직 논문으로는 보고된 바 없음.
- 현재 국내에서 메타유전체 연구가 제대로 추진되지 못하고 있는 것은 메타유전체 서열 분석 방법이 아직 정립되지 않았고 또한 KOBIC이나 NABIC과 같은 국가적 생물 연구 정보센터 외에는 메타유전체 서열 데이터를 효율적으로 분석할 수 있는 서버 시스템이 구축되어 있는 연구실이 전무하기 때문임. 이를 해결하기 위해서 메타유전체 분석 방법의 정립 및 체계적인 분석뿐만 아니라 개별 연구실에서도 메타유전체 정보를 효율적으로 다룰 수 있는 서버 시스템의 구축이 이루어져야 함.

- 따라서 본 연구팀은 선행연구능력과 사업단 내 타 연구팀과의 협력을 근거로 한 농림, 축산, 식품적 활용 가치가 높은 미생물 군집의 메타유전체 및 미생물의 확보를 통해 대량의 메타유전체, 메타전사체, 대사체 프로파일링의 오믹스 연계 네트워크 분석을 통해 유용 유전자, 유용 미생물 자원 및 기능성 바이오 소재 발수를 통해 연구 경쟁적 제고 및 목적 지향적 바이오 산업 응용에 활용 예정임.

3. 국내 연구개발의 필요성 및 중요성

- **장내 미생물의 발굴 및 유용물질 확보:** 대다수의 스크리닝을 통한 미생물의 확보와 메타 유전체 정보의 확보는 미생물과 숙주의 상호작용을 이해와 더불어, 산업화 기반 확립을 위한 토대가 될 것임. 최근 개발된 차세대 염기서열 분석법 및 메타유전체 (metagenomics) 분석 기술을 이용하여 경제동물 장내 미생물 군집을 분석하고 관련 미생물 군과 장내미생물 유래 유용 물질을 폭넓게 확보할 수 있는 정보를 제공하고 있음. 특히 메타유전체 서열 정보로부터 유용 유전자를 발굴하는 것은 미생물의 배양과 효소 활성 테스트 등의 방법을 통해 환경에서 유용한 유전자를 발굴하는데 드는 노력을 줄여 줄 수 있음. 또한 메타유전체로부터 예측된 유전자 정보와 해당 환경의 대사체 (metabolome) 정보를 비교 분석하여 신규 기능성 유전자 및 미생물을 발굴하는데 기여 할 수 있음.
- **숙주와 장내미생물 간 상호작용 이해 :** 장내 미생물과 경제동물간의 긴밀한 상호 작용은 대사물질에 따른 화학적 시그널이 관여하고 있으며, 여러 가지 대사관련 질환을 유발한다는 연구결과들이 발표되면서, 세계적으로 연구주체의 추세는 동물 숙주와 장내 미생물의 다양성 및 동물-미생물-환경의 상호작용 연구가 기하급수적으로 증가하고 있음 또한 장내 미생물의 다양성과 관련하여 장내 미생물의 역할을 유전체학을 기반으로 한 연구가 계속적으로 증가하고 있는 것으로 보아, 이 두 가지 연구 방향을 접목시키는 것이 새로운 연구로서의 가치를 높힐 수 있음.
- **메타유전체 연구 분야의 국내 위상 강화 :** 아직 분석 방법이 정립되지 않은 메타유전체 분석법을 개발, 정립 할 경우 유전체 서열 연구 부분에서 국제적 위상을 높일 수 있을 뿐만 아니라 더 나아가 전 세계적으로 선도 그룹이 될 수 있음

제 3 절 연구개발 범위

1. 메타지노믹스 기반 경제동물의 유용 미생물 후보 발굴

- 경제 동물 꿀벌(*Apis mellifera*)의 시료 확보
- 경제 동물 꿀벌(*Apis mellifera*)의 장내 미생물 수
- 경제 동물 꿀벌(*Apis mellifera*)의 장내 미생물 군집
- 꿀벌 장내 유용 미생물 분리 및 동정
- 꿀벌 장내 유용 미생물의 생리활성 탐구

2. 메타지노믹스 및 기반 한우 육질등급 별 반추위 내 미생물 & 바이러스 군집 연구

- 한우 장내 유용미생물 분리 및 동정
- 한우 장내 유용미생물의 생리활성 탐구
- 한우의 육질등급 별 소화기관 내용물 샘플링
- 한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집 정보 획득
- 한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집과 대사체 군집의 상관관계 비교
- 한우 거세에 의한 장내미생물 군집과 혈중, 분변, 근육 내 대사체 군집의 상관관계 분석
- 설사 송아지의 장내미생물 군집 및 장내 바이롬 분석
- 설사 송아지 대상 건강한 송아지의 대변무리이식 연구
- 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴
- 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 및 혈장 내인성 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴
- 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 근육조직 내 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴
- 농업유용미생물의 분류 (Chemotaxonomy) 및 2차 대사체 분석
- 메타볼로믹스를 이용한 식품에서의 메타볼롬 (metabolome) 분석

3. 식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스 군집 다양성과 변화 비교분석

- 발효식품의 발효단계별 바이러스 군집 변화 분석을 위한 발효식품 선정 및 한국형 표준 발효 (3반복 이상)
- 발효 단계별 세균의 군집 변화 분석
- 발효 단계별 바이러스의 유전체 대량 분석을 위한 바이러스 유전체 확보

4. 농식품 유용미생물의 메타유전체 정보 및 대사네트워크 분석

- 농식품적 활용 가치가 높은 환경의 미생물의 미생물 군집 구조 비교 분석을 통한 메타유전체 서열 결정 환경 선정 및 참조유전체 분석 미생물 분리 및 유전체 서열 결정

- 미생물 메타유전체 서열로부터 유전자 구성 및 대사 경로 파악
- 메타유전체 서열 분석 데이터로부터 농식품 산업에 활용 가능한 신규 및 기능성 유전자 발굴
- 미생물 메타유전체 서열로부터 미생물 군집 구조 및 유전자 구성, 대사경로 파악 방법 구축 및 프로그램 개발

5. 메타유전체 및 메타볼롬 종합 정보분석을 위한 네트워크 파이프라인 구성

- 연구분석을 위한 샘플 선정
- 표준 메타 데이터 목록 작성 및 샘플링 제시
- 한우 장내 미생물 메타유전체 분석을 위한 hybrid assembly 방법 구축
- 환경메타데이터와 미생물 군집, 메타유전체와 메타볼롬 상관관계 분석

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 추진전략, 방법 및 추진체계

1. 연구개발 추진전략

□ 연구 결과를 활용한 연구 네트워크 구축

○ 선행연구 능력을 바탕으로 한 메타유전체 정보 분석

- 본 연구팀은 유전체 분석을 활용한 전통 발효식품의 기능성 표준화 연구 과제를 통해 국내 전통생활문화자원인 전통발효식품의 미생물 군집 분석을 통하여 그 특성을 표준화하여 전통발효식품의 과학화·체계화에 기여하고, 이를 이용하여 산업적 이용가치를 높이고자 하였음 (총 29편의 논문을 국내외 학술지에 보고 완료함).
- 본 연구 팀은 토양, 해수, 공기, 전통발효식품, 슬러지, 마우스, 사람 분변, 곤충 및 어패류 의 장 등 대다수의 환경 샘플에서 장내 미생물의 군집을 확인한 경험이 풍부하여, 환경 미생물을 연구하는데 국내 최고의 실력을 갖추었음. 또한 꿀벌의 장내 군집 분석을 수행, 발표한 바 있어 본 연구에 기본적인 바탕을 제공할 수 있음. 특히 본 연구실 내에 무균 초파리를 배양 가능한 시스템이 구축되어 있어 꿀벌의 무균화에 적용할 수 있을 것으로 사료됨.
- 본 연구팀은 대기, 인간의 장내, 발효식품, 해수 및 토양과 같은 다양한 자연환경에 존재하는 바이러스 군집 및 그들의 핵심적인 역할을 규명하기 위해 국내 최초로 메타지노믹스 기술을 바이러스 분야에 적용하여 Journal of Virology와 Appl. Environ. Microbiol. 저널 등 총 5편의 논문을 게재하였음. 그 중 미생물학 분야 최고 저널인 ISME저널에 발표된 7 종류의 젓갈 내의 세균 및 고세균 군집 구조를 454 pyrosequencing을 이용한 주제(Seong Woon Roh *et al.*, 2010)와 세계 최초로 대기 환경에 존재하는 바이러스 군집의 지역/계절 별 모니터링 연구는 메타지노믹스 기술을 이용하여 대기에 존재하는 DNA 바이러스 군집 (airborne DNA viral community)을 보고한 연구 (Tae Woong Whon *et al.*, 2012) 두 편이 국가지정 생물학연구정보센터(BRIC)의 ‘한국을 빛내는 사람들(한빛사)’ 과 'Faculty of 1000'에 선정되었음
- 따라서 본 연구팀은 선행연구 수행 능력을 바탕으로 농림·축산·식품적 활용가치가 높은 메타유전체의 소재를 확보하여 미생물 자원 확보, 미생물 군집 분석 및 대량의 metagenome과 metatranscriptome, 대사체 프로파일링 등의 오믹스 연계 네트워크 분석을 통한 유용 유전자, 유용 미생물 자원 및 기능성바이오소재 발굴을 통하여 연구 경쟁력 제고 및 목적 지향적 바이오산업 응용에 활용할 계획임.

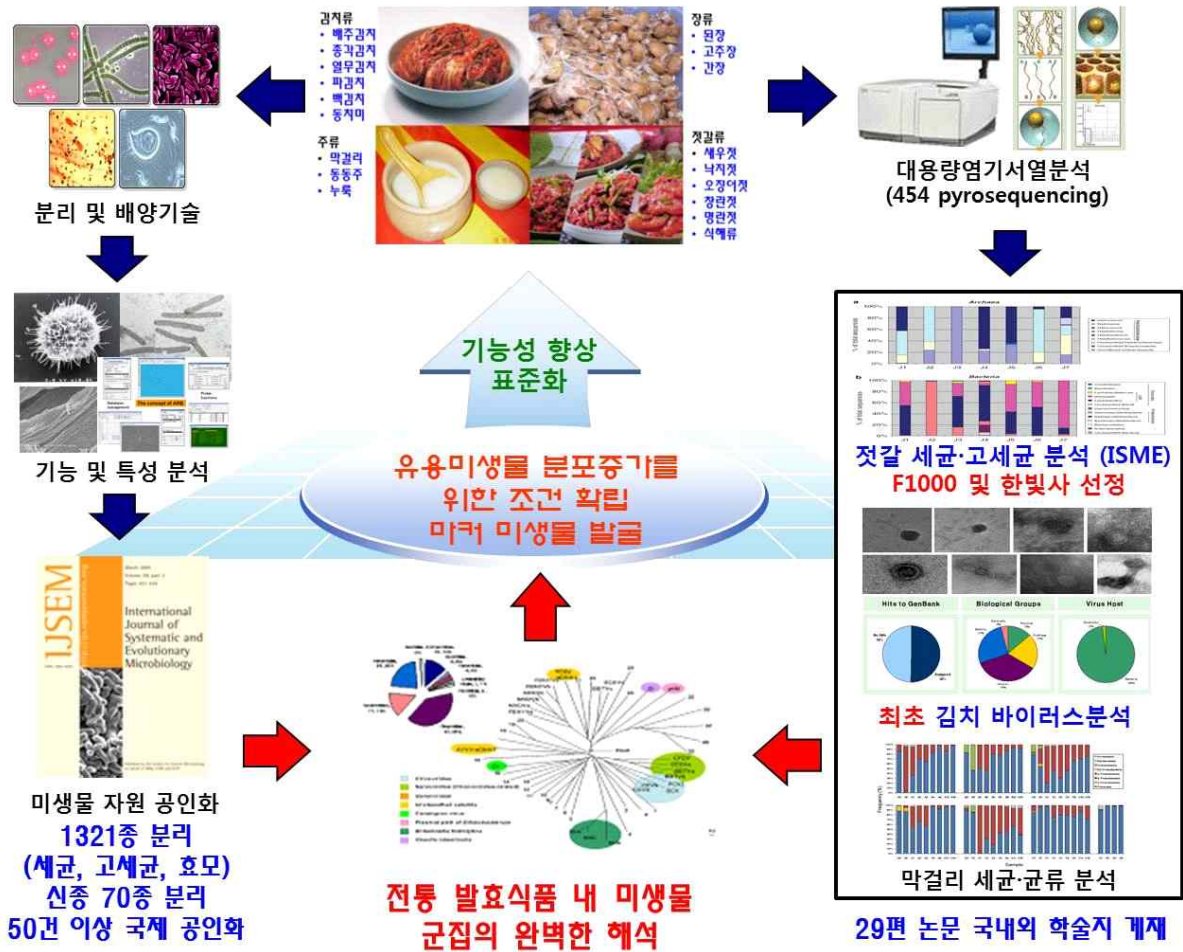


그림 23. 추진전략

2. 연구개발 방법

○ 사업단 내 타 연구팀과의 공동연구 진행 및 연구 네트워크 구축

- 미생물유전체전략연구사업단 내의 타 연구팀의 전문가들, 농축산 현장 관계자들과 연구 네트워크를 구축하여 공동연구 및 상호간의 정보 교류 체제를 구축하고 활성화 할 계획임.
- ‘14년 선정 조기성과 창출형 과제 (김치·주류·생물비료·사료첨가제분야 미생물 유전체 연구)의 주관연구기관으로부터 시료를 전달받아 분석을 지원하며, 특히 사료첨가제분야 미생물 유전체 연구팀과의 공동연구를 통해서 최종적으로 경제동물의 질병 예방, 소화율 향상을 위한 사료첨가제용 미생물 후보를 함께 발굴할 계획임.
- ‘14년 선정 연구역량 강화형 과제 중, 농업 유용미생물의 참조유전체 정보 분석 과제의 주관연구기관과 협력하여 본 연구에서 창출된 메타지놈 분석을 통해 참조유전체 대상 선정에 근거를 제시할 것이며, 농업생물정보 처리기술 개발 과제의 주관연구기관과

정보분석 기술연구를 공동으로 진행할 계획임.

○ 광범위한 경제 동물의 장내 미생물 군집 분석

- 본 연구에서 사용될 경제 동물은 국내, 국외를 포함한 전세계적으로 이용 빈도수가 높으며, 특히 질병 노출 및 피해가 많은 경제동물인 꿀벌과 한우를 대상으로 함.
- 선정된 경제 동물은 병증 유무, 지역, 성장단계를 정확히 파악하여 노출된 환경을 기술하여 경제 동물의 장내미생물에 대한 정보 인프라 구축, 맞춤형 분석 솔루션 시스템을 구축함.
- 대규모 서열 분석을 위해서 GS-FLX, Solexa 등을 이용하여 현재 국내에서 가장 활발하게 대규모 서열 분석을 수행하고 있는 기업과 접촉하여 서열 분석을 수행한 경험이 다수이므로, 연구가 진행될 경우에는 협의를 통하여 최대의 효율로 대규모 서열 분석을 수행할 수 있도록 하고자 함.
- 본 연구팀이 보유하고 있는 고성능의 워크스테이션으로 대용량의 유전정보 분석
- 선행 연구를 통하여 토양 및 해양, 사람, 쥐 분변 시료의 미생물 군집 분석을 하는 기술을 확립하였기에 다른 연구 팀에 비해 정확한 미생물 군집의 분석이 가능함.

○ 상호 반복적인 실험의 재현 가능

- 자연 환경 또는 농축산업 환경 하에서 확인된 숙주와 장내 미생물간의 상호 관계를 보다 제한적인 실험실 환경에서 재현하여 상호 관계의 명확한 규명이 가능함.
- 무균 경제 동물의 제작으로 장내 미생물의 유무로 인한 경제 동물의 형태생리학적인 차이를 확인할 수 있음.

3. 추진체계

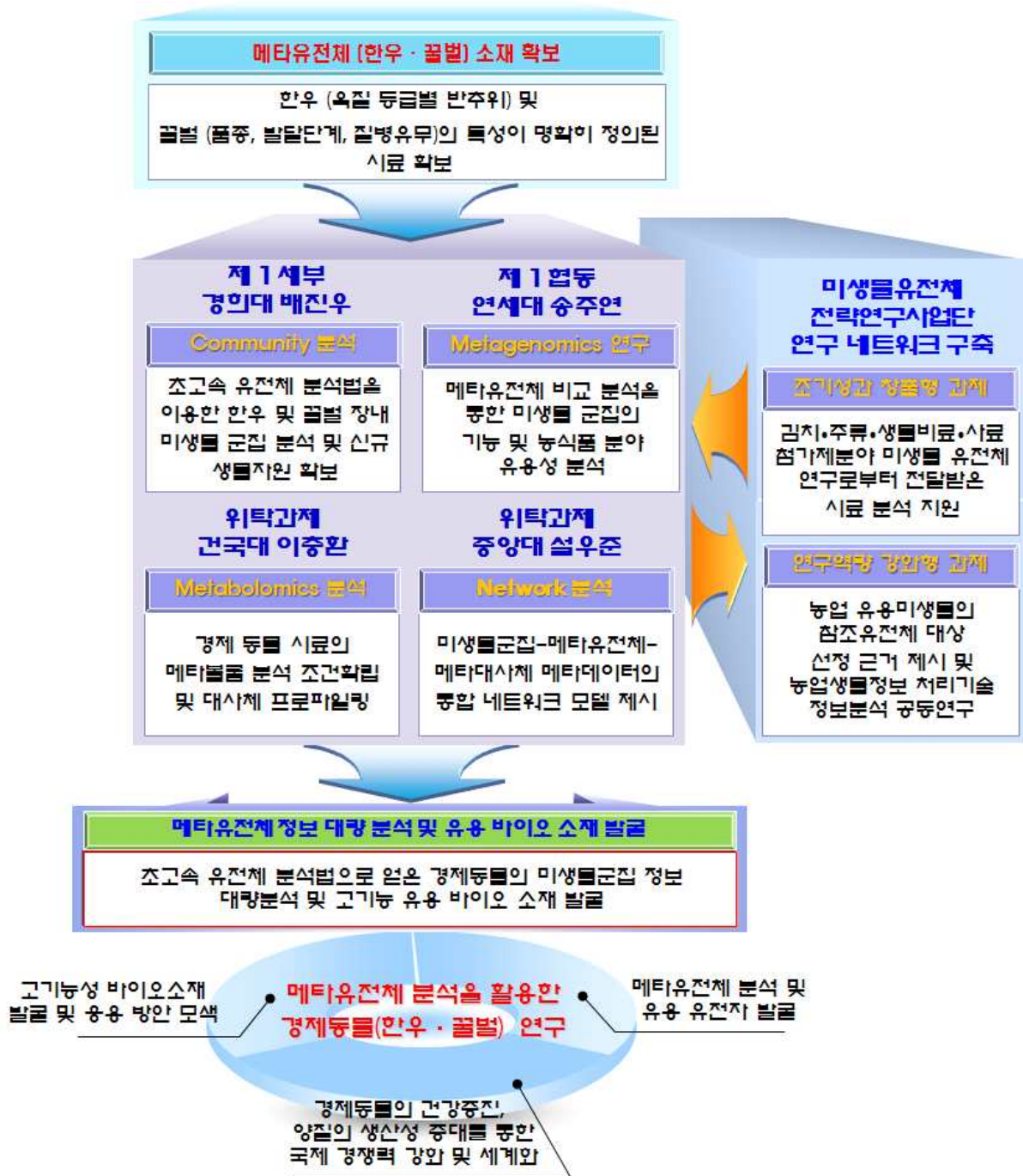


그림 24. 추진체계

제 2 절 연구 내용 및 결과

1. 메타지노믹스 기반 꿀벌의 유용미생물 후보 발굴

가. 경제 동물 꿀벌(*Apis mellifera*)의 시료 확보

- 꿀벌의 시료는 금방 우화한 벌(new emerged bee), 내역봉(nurse bee), 외역봉(forager), 산란여왕, 처녀여왕 등의 계급에 따라 채집을 하였으며, 꿀벌 외역봉은 전국 4개 (충청남도 서산시, 전라북도 진안군, 경상북도 칠곡군, 강원도 원주시) 지역의 야외에서 채집하였고, 나머지 벌은 경기도 진접과 충청북도 괴산군의 양봉업자에게 제공 받음.
- 채집된 외역봉의 18S rRNA를 이용한 종내 변이 확인 결과, 유전자의 변이를 확인하지 못하였으며, *Apis mellifera*의 18S rRNA 는 *Bombus*의 18S rRNA와 다른 염기서열을 갖고 있음을 확인(그림 25).

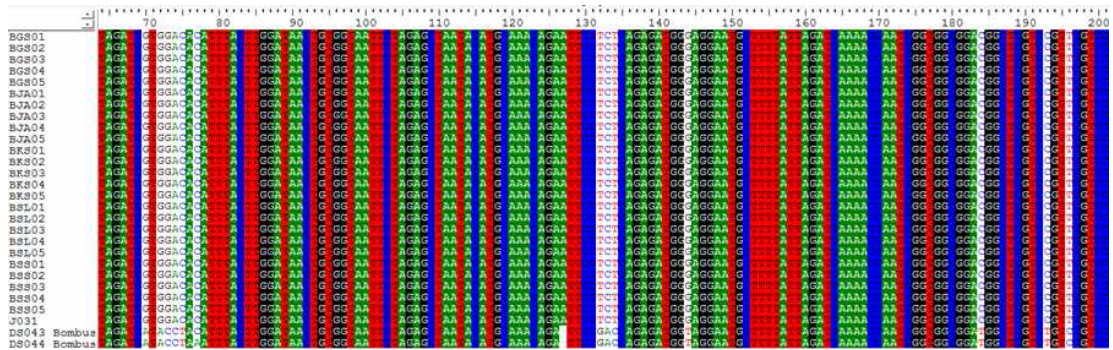


그림 25. *Apis mellifera*와 근연종인 *Bombus* spp.의 18S rRNA 염기서열 alignment 결과

- 채집된 꿀벌은 100% 에탄올 2번, DW 2번으로 표면을 세척 한 후, 멸균된 집게로 장을 뽑아(그림 26), bead와 Phenol을 이용한 방법으로 gDNA를 뽑았고, QIAGEN purification kit로 정제하였음.

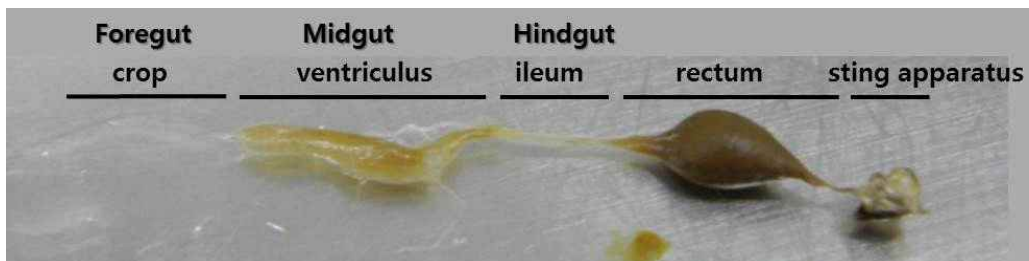


그림 26. *Apis mellifera*의 whole intestine

나. 경제 동물 꿀벌(*Apis mellifera*)의 장내 미생물 수

○ 꿀벌에 정착하고 있는 미생물 군집의 양을 확인하기 위해 quantitative real-time PCR을 이용한 gene copy number 측정방법을 사용하였음. Fungi number는 ITS2 region (primer GC58A2F과 NLB4)를, bacteria number는 16S rRNA V1-2 region (primer 8F와 338R)을 증폭한 후, standard curve의 계산식을 근거로 계산하였으며, standard curve는 각각 *Candida albicans*와 *Escherichia coli* K12를 이용함. gene copy수를 이용한 꿀벌 장내 미생물의 수는 내역봉(new emerged bee, nurse bee)과 외역봉(forager) 모두 bacteria는 개체 당 10^8-10^9 로 존재하였고, fungi보다 10^2 에서 10^4 까지 많이 존재함. 외역봉보다 내역봉의 fungi 수가 $10-10^2$ 더 존재하는 것으로 나타남 (그림 28).

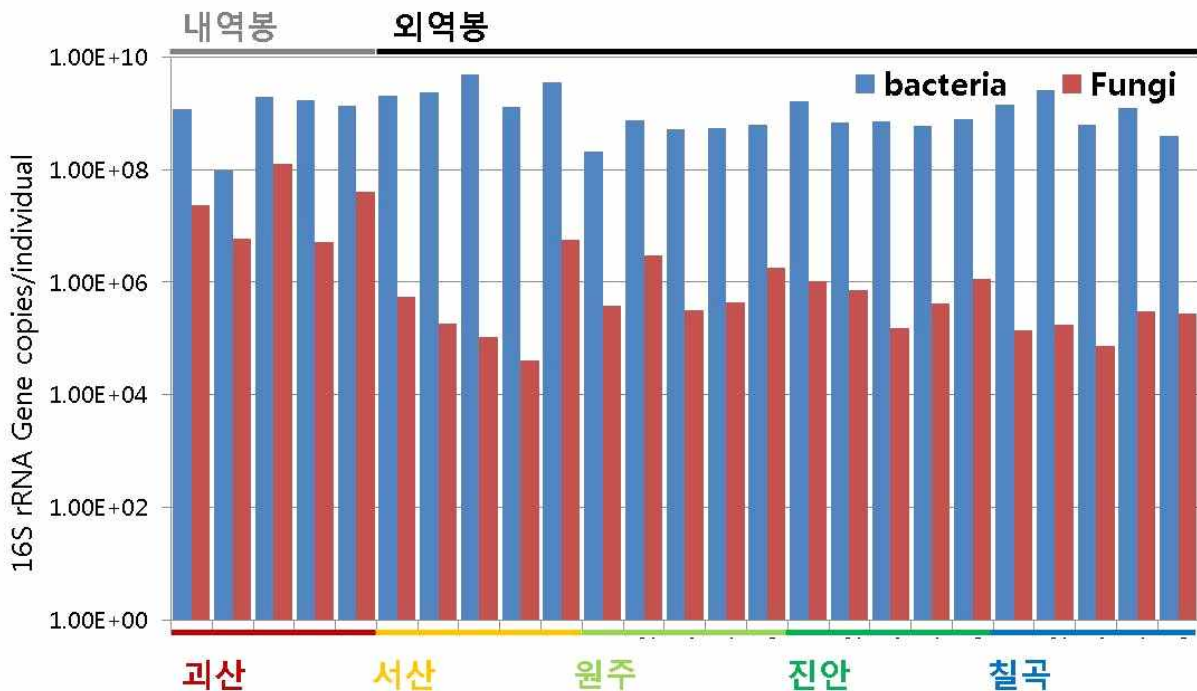


그림 27. *Apis mellifera*의 장내 미생물 gene copy number

다. 경제 동물 꿀벌(*Apis mellifera*)의 장내 미생물 군집

○ 외역봉의 장내 bacteria community는 8가지 phylotype이 90%이상 차지하고 있다고 보고된 바, 장내 fungi 를 확인하기 위해, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 이용하였음. ITS 2 region (GC58A2F과 NLB4)를 증폭하였고, DGGE nad profile은 예상했던 것보다 단순한 것으로 확인됨. unique band를 잘라 증폭결과, 41 band 중 13 band (31%) 만 증폭이 되어, 나머지는 non-specific band로 확인함. 13 band의 시퀀싱 결과, 10band가 fungi 유래 시퀀스로 확인되었음 (그림 28, 표 4). 대부분의 개체에서 *Cladosporium* spp.에 해당하는 염기서열이 확인

되었고, 꿀벌의 병원균인 것으로 알려진 *Ascospaera apis*도 확인되었음.

서산(외역봉) 원주(외역봉) 괴산(내역봉) 진안(외역봉) 칠곡 (외역봉)

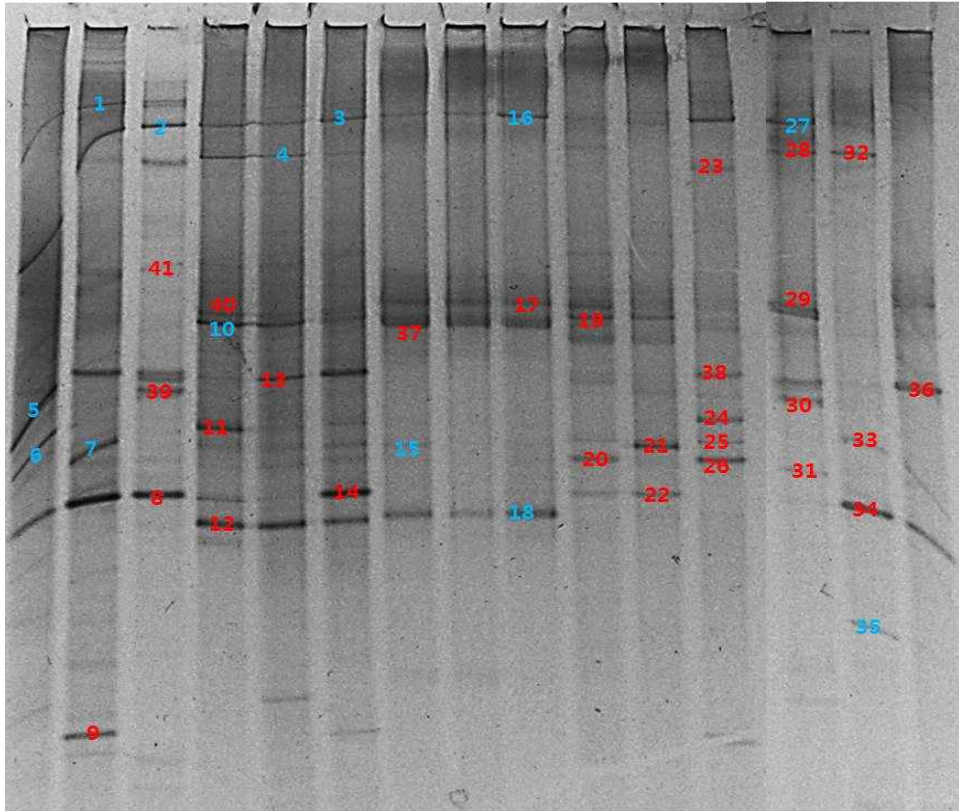


그림 28. *Apis mellifera*의 장내 fungi 군집 DGGE profile

표 4. 그림 4의 DGGE band의 blast결과

Band no. (그림 29)	NCBI Blastn match	origin
1up	Uncultured <i>Trebouxia photobiont</i>	algae
1dw	Uncultured <i>Cladosporium</i> clone KL_2w_H11	fungi
2	Uncultured <i>Cladosporium</i> clone KL_2w_H11	fungi
3	Uncultured <i>Cladosporium</i> clone KL_2w_H11	fungi
4	<i>Nephrochlamys subsolitaria</i>	algae
5	<i>Parastagonospora nodorum</i>	fungi
6	<i>Strelitziana africana</i>	fungi
7	<i>Phaeophyscia exornatula</i>	fungi
10	<i>Scenedesmus armatus</i> var. <i>subalternans</i>	algae
15	<i>Ascosphaera apis</i> strain 7406	fungi
16	Uncultured <i>Cladosporium</i> clone KL_2w_H11	fungi
18	<i>Penicillium corylophilum</i>	fungi
27up	Uncultured <i>Cladosporium</i> clone KL_2w_H11	fungi
27dw	<i>Azteca beltii</i> voucher EGP253	ant
35	No hits found	-

- 454 pyrosequencing을 이용하여 꿀벌 장내 fungi와 bacteria의 diversity와 abundance를 확인하였음. bacteria는 16S rRNA v1-v2 region(8F와 338R)을 fungi는 ITS 2 region (58A2F과 NLB4)을 증폭하여 macrogen에 pyrosequencing을 의뢰함. raw sequences는 mothur를 통해 denosing, chimera 제거 등의 pre-processing을 거쳐 sequence의 0.03 dissimilarity를 기준으로 OTU를 생성후 OTU 단위에서의 분석을 수행하였음.
- 박테리아는 greengene database를, 기준으로 classification 한 결과, 15개의 phylum 이 확인되었음. 그 중 Proteobacteria와 Firmicutes가 95%이상을 차지하는 것으로 확인되었음(그림 5). 외역봉과 내역봉에서 이 두 phylum의 abundance 비율의 차이가 있음이 확인되었고, 내역봉은 외역봉에 비해 Firmicutes가 높고 Proteobacteria의 비율이 낮았음(그림 5a). genus level에서는 내역봉의 외역봉에 비해 *Lactobacillus* spp.의 비율이 높음을 볼 수 있음(그림 29b). Queen의 장내 박테리아는 virgin queen과 산란 queen의 박테리아 비율이 전혀 다르게 나타나, 산란행동으로 인한 생체 내 호르몬의 변화가 장내 미생물 군집에 영향을 미칠 것으로 예상.

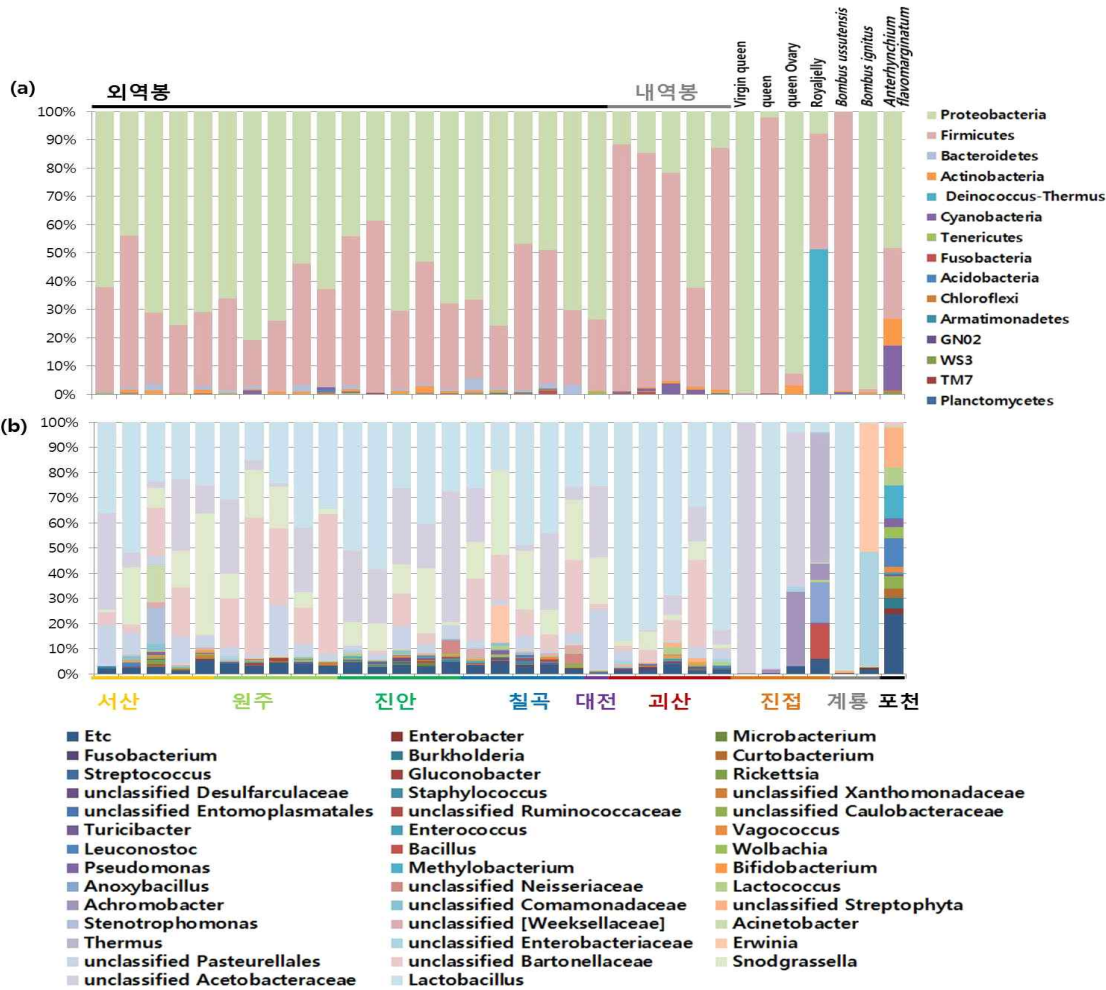


그림 29. 꿀벌 장내 박테리아 군집의 relative abundance. (a) phylum level (b) genus level

- 박테리아의 군집은 Principal Coordinate Analysis(PCoA) 분석 결과, unweighted PCoA에서는 내역봉과 외역봉이 같이 묶이고 여왕과 로얄젤리 그리고 다른 대조구 별 샘플이 같이 묶여 나뉘져 plotting 되었지만(그림 30a), weighted PCoA에서는 외역봉과 다른 샘플(내역봉, 로얄젤리, 여왕, Bombus spp.) 로 갈라지는 것을 확인 할 수 있음(그림 30b).

(a) unweighted

(b) weighted

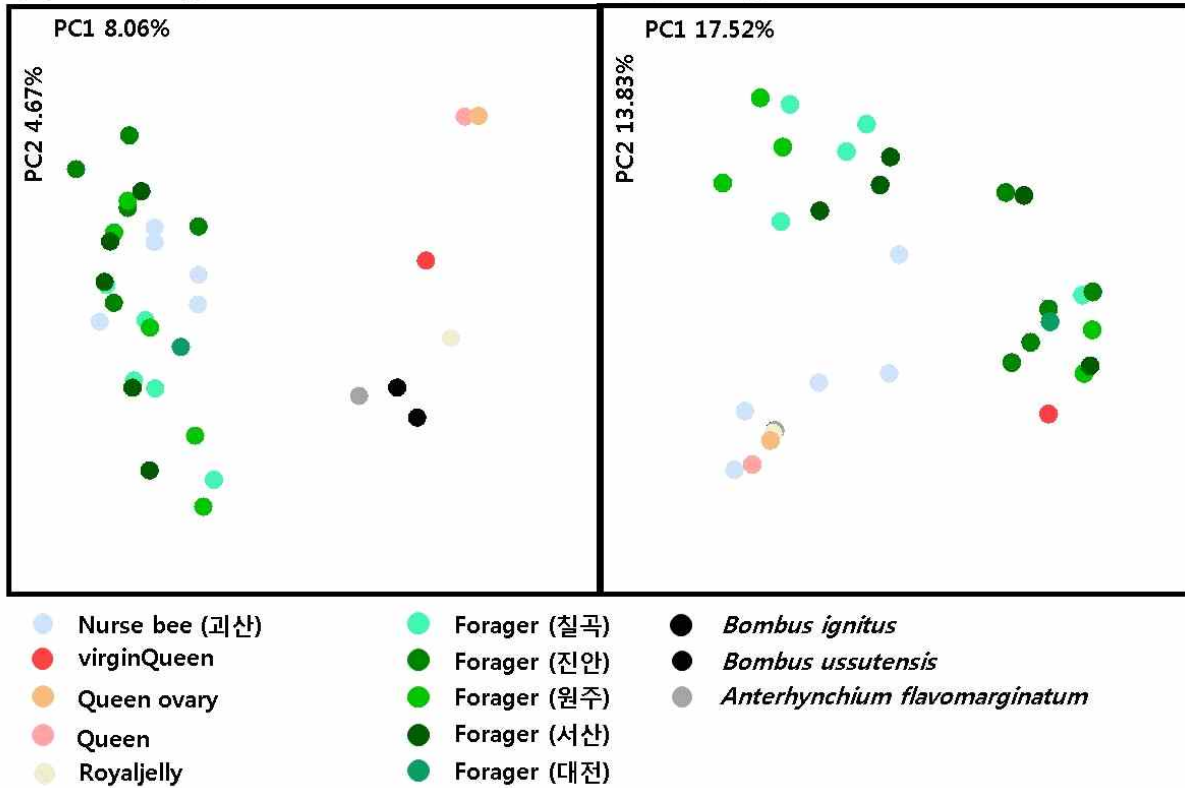


그림 30. Apis mellifera의 박테리아 군집 PCoA 분석

- LDA Effect Size (LEfSe) 알고리즘을 통해 외역봉과 내역봉에서 유의적으로 차이나는 박테리아 군집을 확인함(그림 31). LDA score 3.0을 기준으로 내역봉에서는 Firmicutes에 해당하는 Bacilli 특히 Lactobacillales가, 외역봉에서는 Proteobacteria에 해당하는 alpha, beta-proteobacteria, *Snodgrassella*, Bacteroidetes의 *Flavobacteri*a가 유의적으로 높은 값으로 존재함.

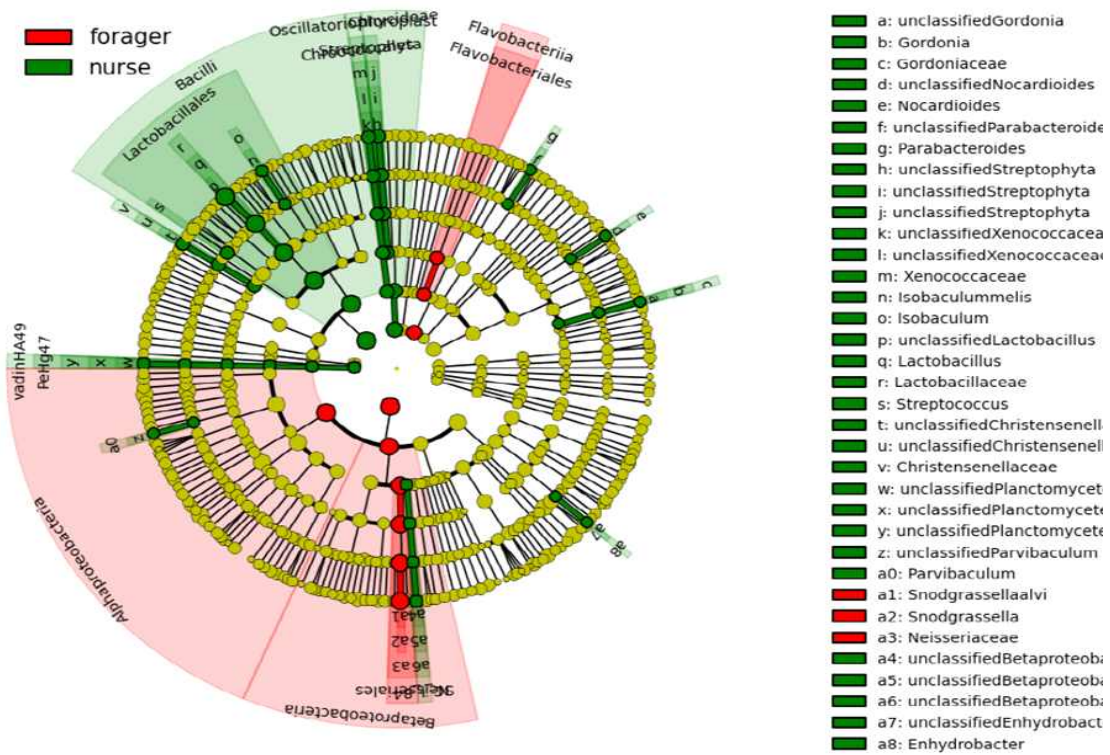


그림 31. 외역봉과 내역봉에서 유의적인 차이로 존재하는 장내 박테리아의 cladogram

○ Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUST)를 통해 내역봉과 외역봉에 존재하는 박테리아의 기능의 차이를 LEfSe 알고리즘으로 확인함. LDA score 3.0을 기준으로 하였을 때, 내역봉의 박테리아 군집의 역할은 nutrient metabolism 관련 기능이 유의적으로 높게 나타나, 내역봉의 역할 중 하나인 여왕과 애벌레를 위한 nutrient 제공과 장내 미생물이 관련 있음을 예측할 수 있었음 (그림 32).

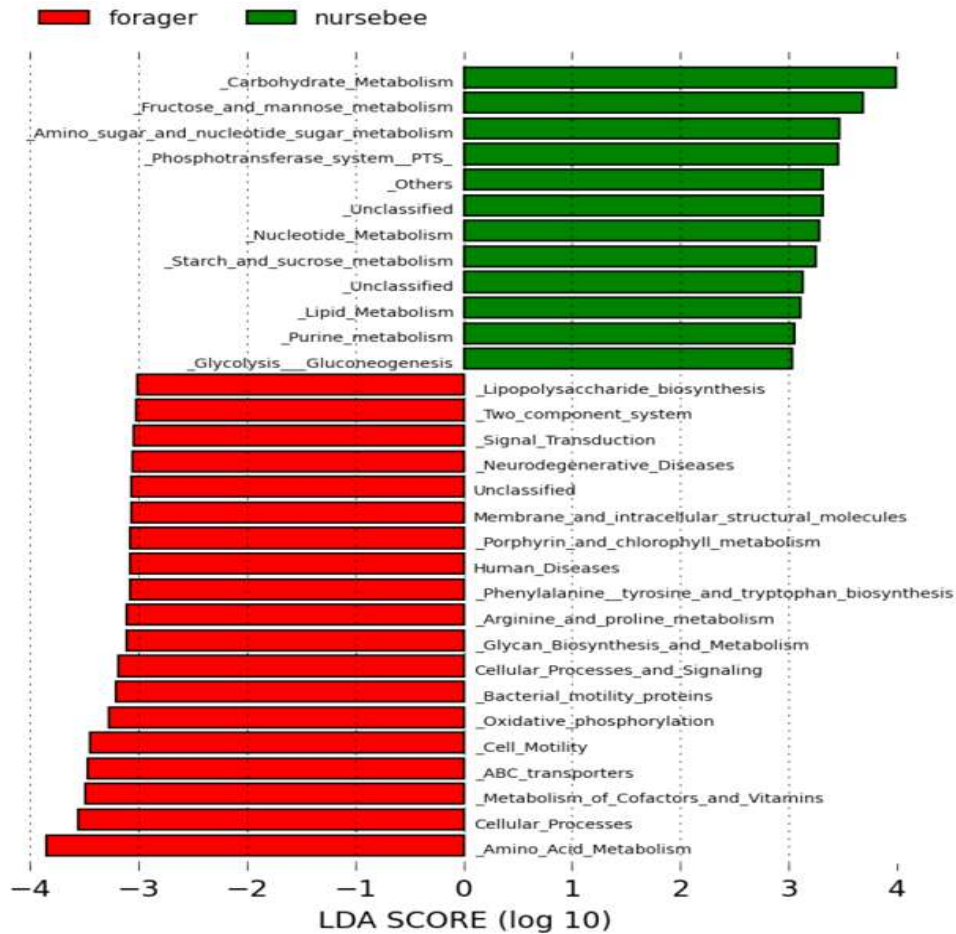


그림 32. 외역봉과 내역봉 장내 박테리아의 기능적 차이 (LDA score 3.0 기준)

- Fungi는 일반적인 alignment tool을 이용하지 못하기 때문에, CD-HIT을 이용하여 OTU를 결정하였고, UNITE database를 이용하여 taxonomy를 결정하였음. 전체적으로 5개의 phylum이 있음을 확인하였고, 그 외에 fungi로 확인은 되지만 알려진 phylum level로 묶이지 않은 그룹이 있음을 확인하여 fungi database가 bacteria database보다 정립이 덜 되었거나 꿀벌 장내에 novel fungi가 있음을 확인함(그림 33a). 대부분이 Ascomycota에 해당하였고 외역봉 장내에 내역봉보다 다양한 fungi가 있음을 확인. Genus level로 확인하였을 때 역시 내역봉은 대부분 Saccaromyces에 해당하는 fungi를 갖고 있었으며, 외역봉은 특정 fungi가 아닌 다양한 fungi가 존재하였음(그림 33b).

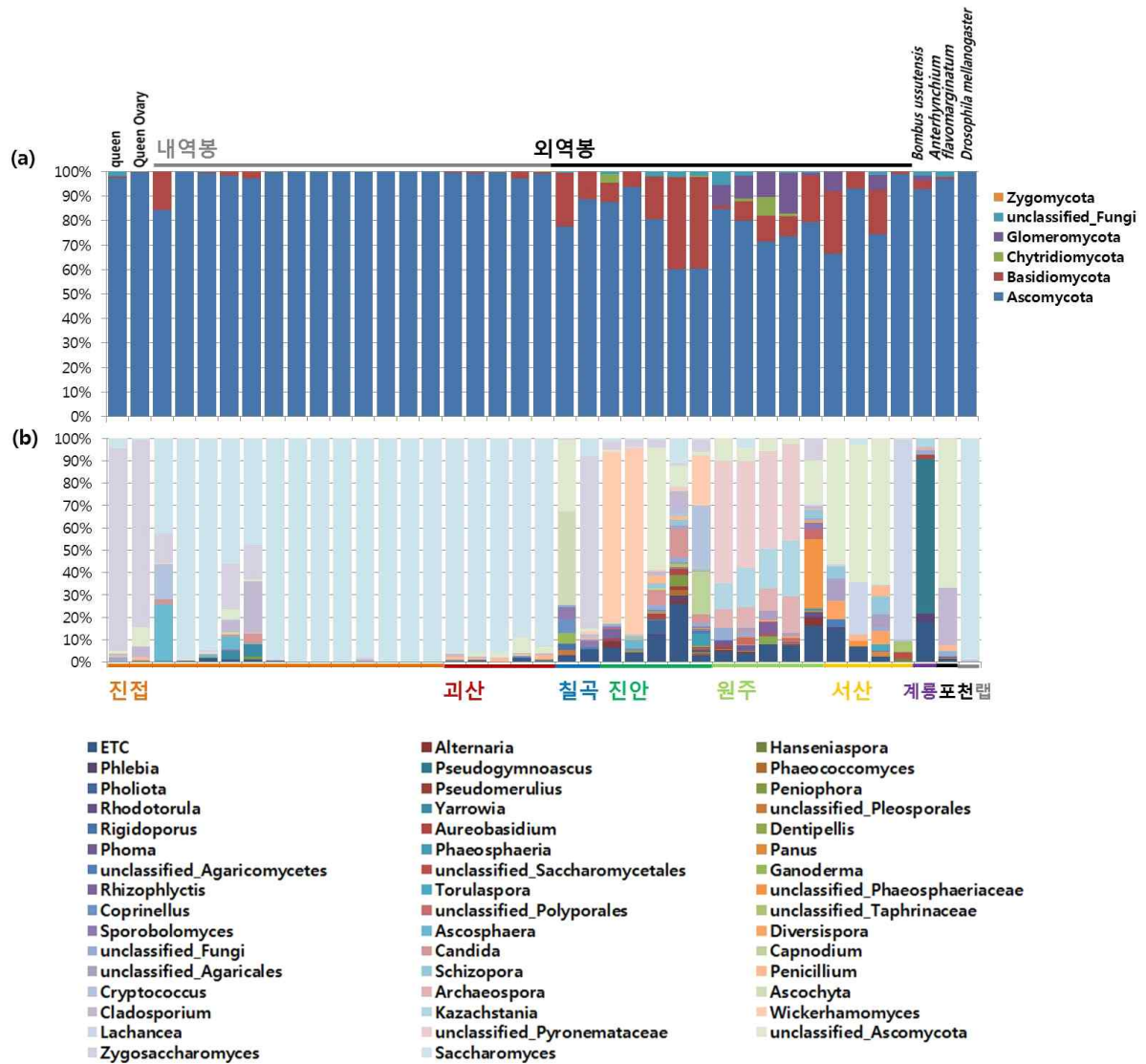


그림 33. 꿀벌 장내 fungi 군집의 relative abundance. (a) phylum level (b) genus level.

○ 꿀벌의 장내 fungi PCoA 분석 결과 unweighted와 weighted 방법 모두 내역봉과 외역봉으로 나뉘는 결과를 보여, 박테리아의 PCoA보다 확실한 군집 차이를 보임(그림 34).

(a) unweighted

(b) weighted

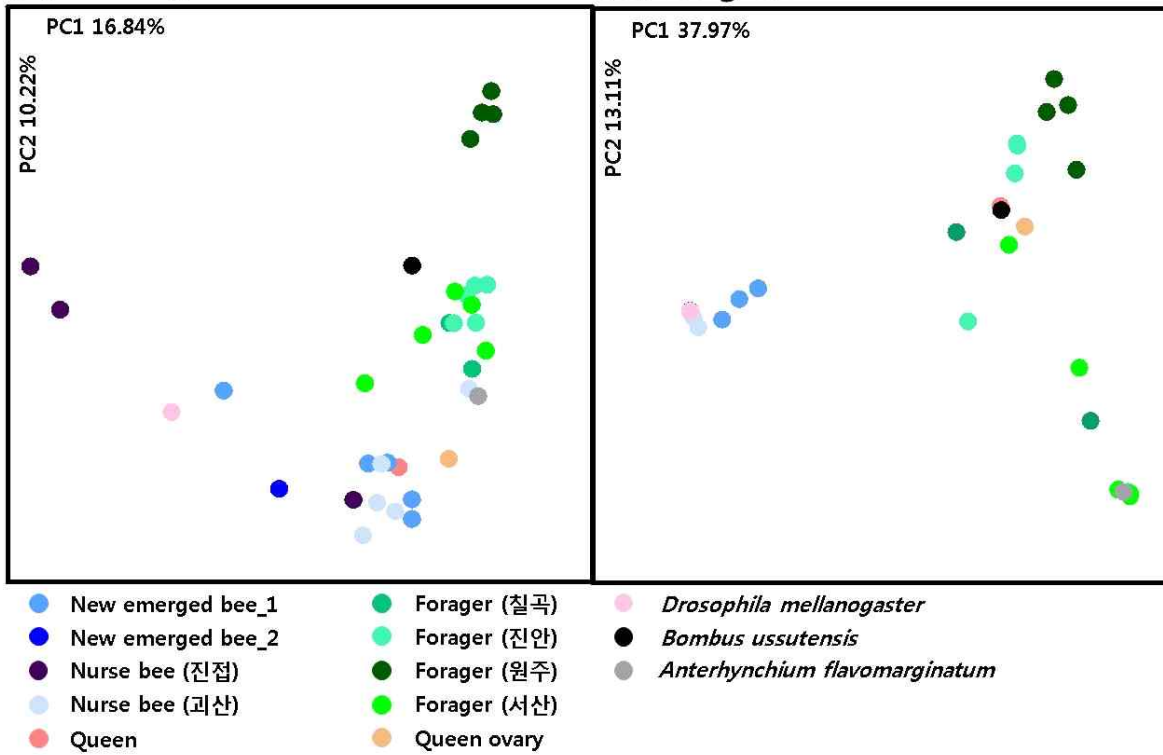


그림 34. Apis mellifera의 fungi 군집 PCoA 분석

○ LEfSe 분석에서 LDA score 4.0을 기준으로 내역봉은 Saccharomycetes 중 Saccharomyces가 외역봉에서는 Agaricomycetes, Dothideomycetes, Pezizomycetes, Glomeromycetes가 유의적으로 높은 값으로 존재함(그림 35).

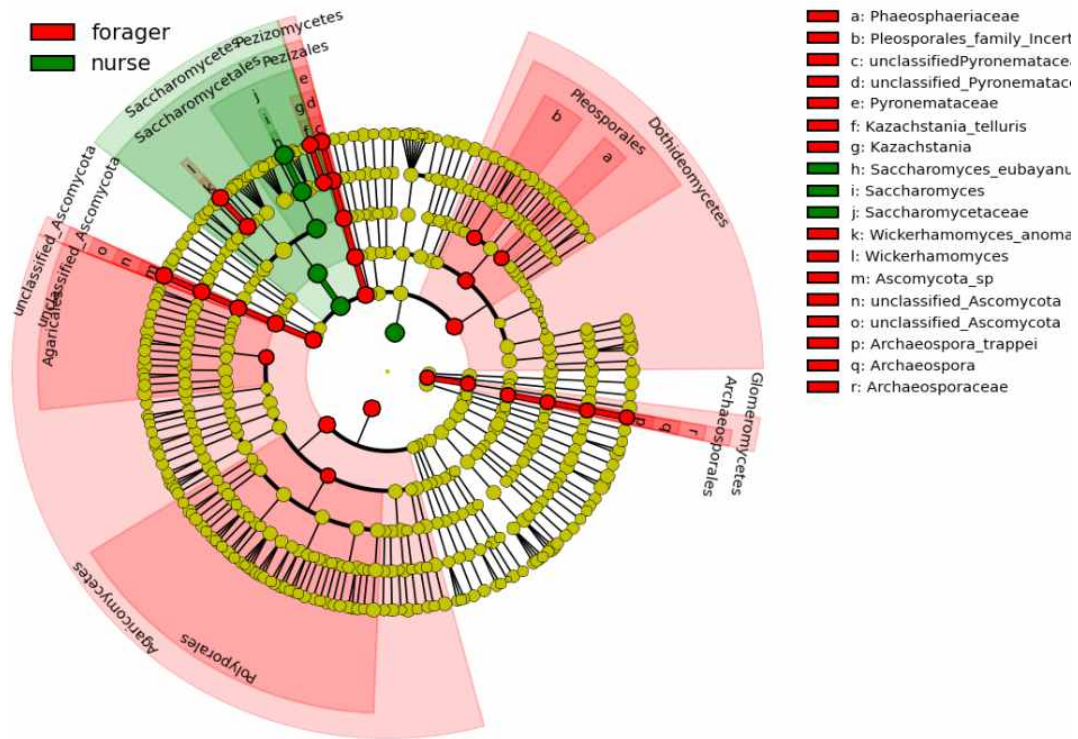


그림 35. 외역봉과 내역봉에서 유의적인 차이로 존재하는 장내 fungi의 cladogram

라. 꿀벌 장내 유용 미생물 분리 및 동정

- 5마리의 foraging bee를 foregut(crop), midgut, hindgut으로 나눠 각각의 부위를 pooling함. pooling한 장을 PBS에 희석 후 다양한 배지를 이용하여 5% CO₂와 30℃의 온도 조건에서 유용 미생물 분리를 시도함. 배지 종류는 다음과 같음. LA (Luria Bertani Agar Base, BD), BHIA (Brain Heart Infusion Agar; BD), BHIA containing 0.1mg/ml thiamine hydrochloride (BHIAT), CA (Columbia agar; BD) containing 5% sheep blood (CB), TSA (Trypticase™ Soy Agar; BD) containing 5% sheep blood (TSAB), MRSA (Lactobacilli MRS Agar; BD), Mannitol agar (MA) and Acetic acid medium agar (AAMA).
- 전체 197 colony를 얻었고 그 중 14 genera에 해당하는 171 isolates의 16S rRNA sequence를 얻을 수 있었음. crop에서 11 균주, midgut에서 43 균주, hindgut에서는 117 균주를 얻었음(표 5).

표 5. 배양 조건에 따른 꿀벌 장내 분리균주의 수

Medium	foregut	midgut	hindgut
TSA + blood 5%	1	6	18
Columbia agar +blood5%	1	10	25
BHIA + 0.1mg/ml thiaminehydrochloride	5	7	10
BHIA	–	6	16
Mannitol agar	2	3	13
Acetic acid medium agar	1	1	1
MRSA	1	4	9
LBA	–	6	25

- 16S rRNA에 따라 균주는 Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria 세 phyla에 속하였음.
- 기존의 알려진 꿀벌 장내 주요 세균은 culture-dependent approach 결과 23 균주가 분리되었음: *Bartonella* (10/171), *Bombella* (5/171), *Snodgrassella* (2/171), *Gilliamella* (3/171), *Bifidobacterium* (2/171), firm-5 (1/171) (표 6).

표 6. 꿀벌 장내 주요 미생물에 해당하는 균주의 수

Phylum	Dominant taxa	strain no.
Alpha proteobacteria	<i>Bartonella</i>	10
	<i>Bombella</i>	5
Beta proteobacteria	<i>Snodgrassella</i>	2
Gamma proteobacteria	<i>Gilliamella</i>	3
	<i>Frischella</i>	–
Actionobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	2
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i> Firm4	–
	<i>Lactobacillus</i> Firm5	1

- 분리된 균주의 대부분이 *Bacillus* (90/171) and *Paenibacillus* (20/171)로 확인됨.

- 획득한 171균주 중 4 균주가 신종 미생물로 판명됨. 그 중 2 균주는 같은 종의 다른 아종으로 보여짐 (표 7).

표 7. 꿀벌 장내 신종 미생물 분리 목록

Strain	Closest taxa	Pairwise similarity (%)	Diff/Total nt
CBM1	<i>Paenibacillus puldeungensis</i> CAU 9324	97.49	35/1394
CBH23	<i>Paenibacillus puldeungensis</i> CAU 9324	97.1	37/1274
MRM1	<i>Bombella intestini</i> LMG28161	98.79	17/1406
LAH16	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NRRL NRS-290	98.34	24/1442

- 확보된 4종의 꿀벌 장내 미생물에 대해 계통분류학적 위치를 확인하고자 각 균주와 근연관계에 있는 미생물의 16S rRNA를 이용하여, MEGA 프로그램을 이용하여 phylogenetic analysis를 실시함 (그림 36-38).

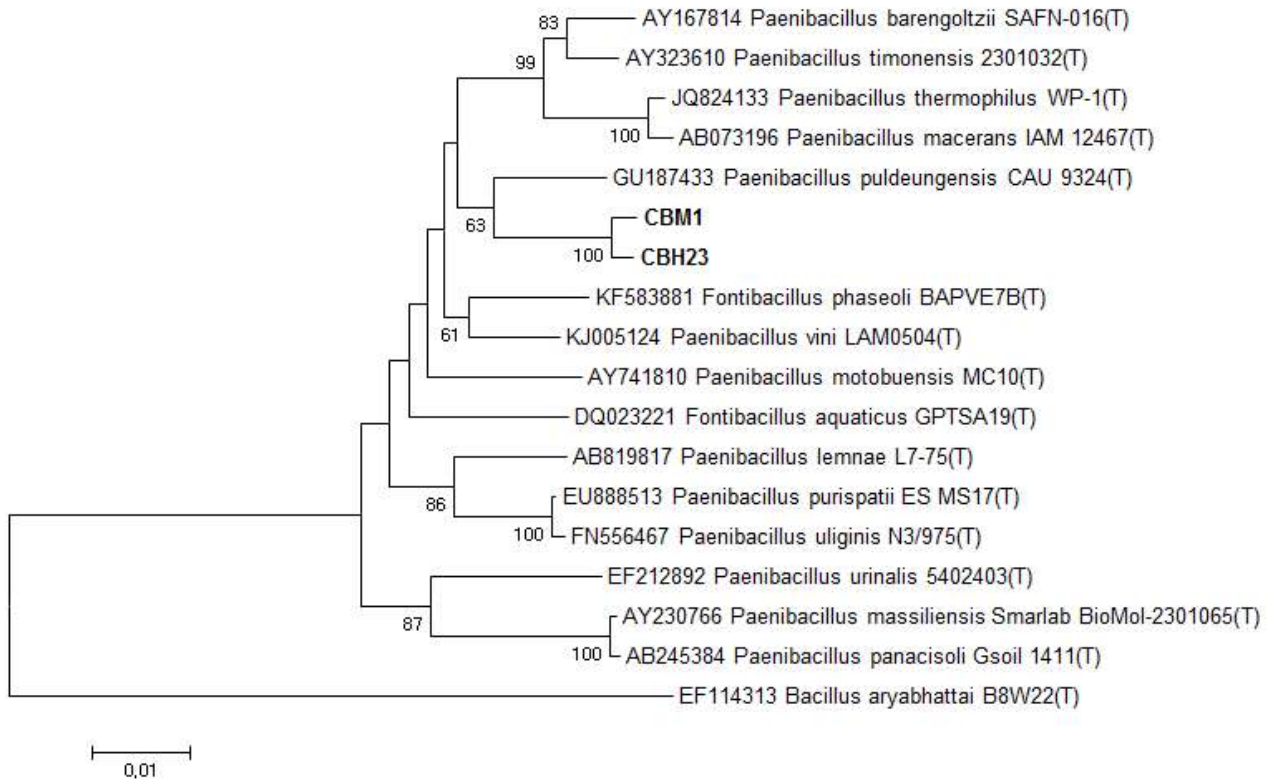


그림 36. CBM1과 CBH23의 16S rRNA 유전자 계통 분류도

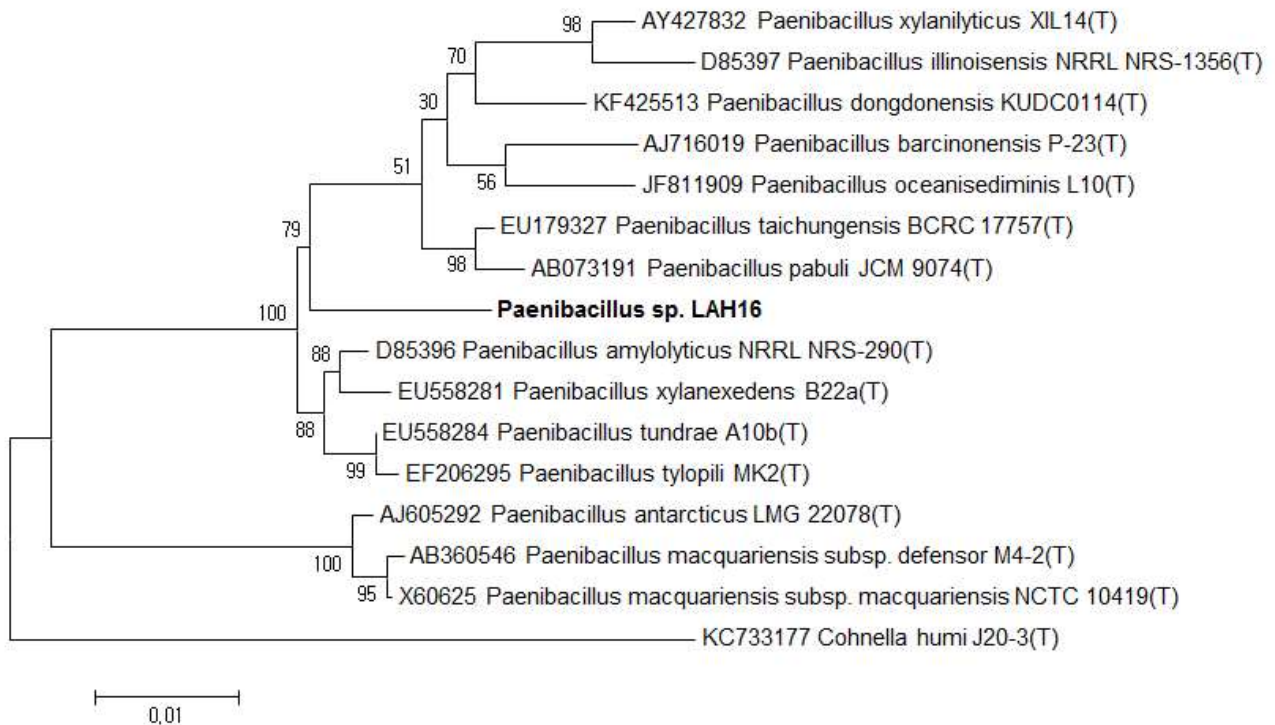


그림 37. LHA16의 16S rRNA 유전자 계통 분류도

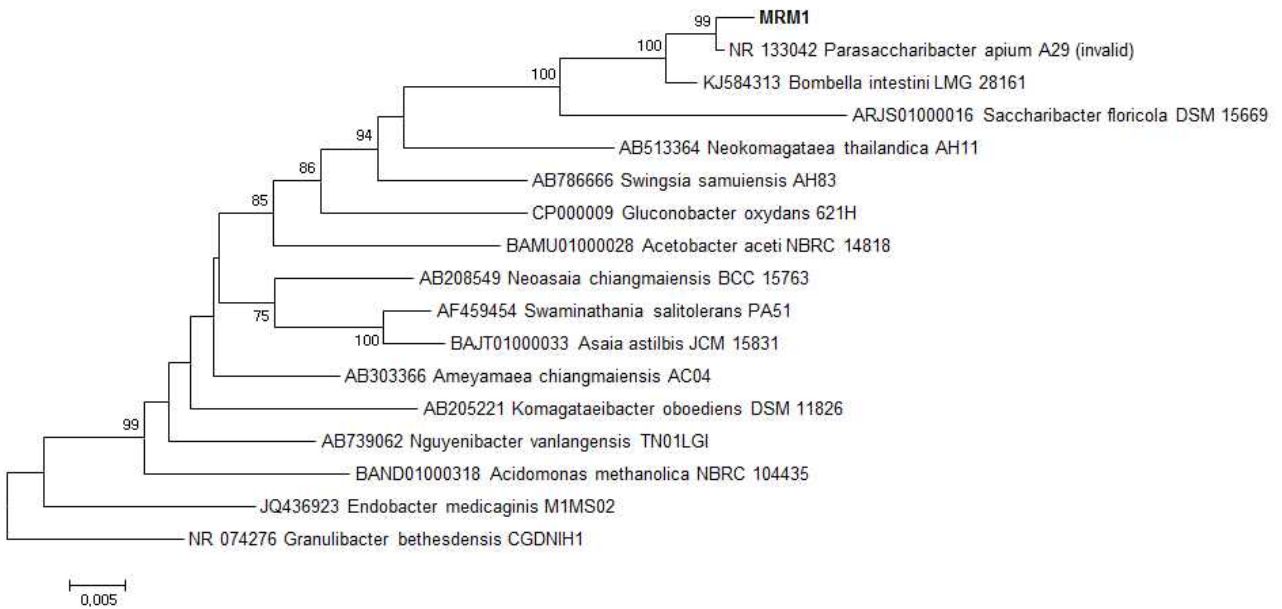


그림 38. MRM1의 16S rRNA 유전자 계통 분류도

마. 꿀벌 장내 유용 미생물의 생리활성 연구

(1) *Paenibacillus* sp. CBM1와 CBH23

- *Paenibacillus* sp. CBM1와 CBH23 균주는 각각 midgut과 hindgut에서 분리되었음.
- *Paenibacillus* sp. CBM1와 CBH23 균주의 Gram-staining을 통해 Gram-negative의 0.5 μ m이와 1-2 μ m 크기의 rod 형태임을 확인함 (그림 39-40).

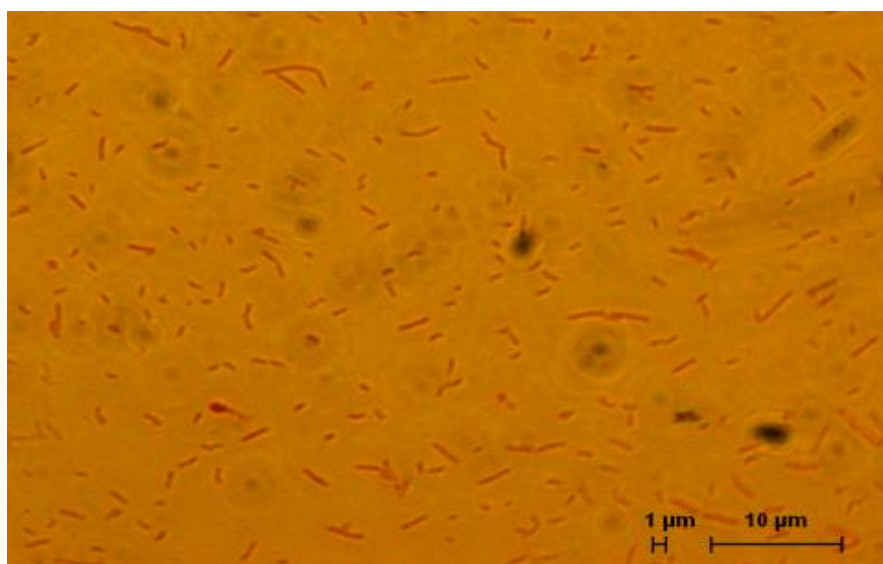


그림 39. CBM1의 gram staining과 morphology

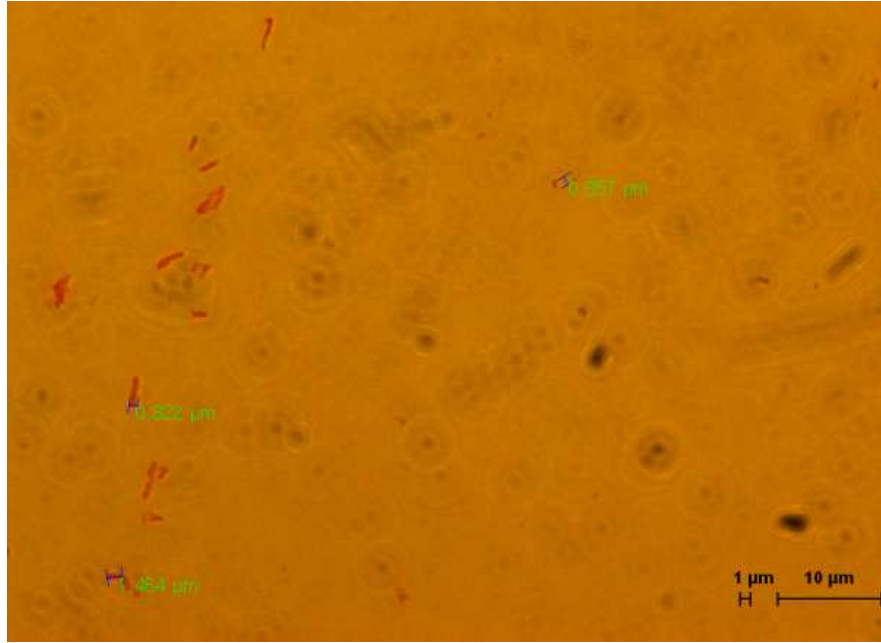


그림 40. CBH23의 gram staining과 morphology

- Motile, catalase positive와 oxidase positive한 특성을 보였으며, anaerobic chamber에서 growth를 보이는 facultative anaerobe임을 확인함.
- *Paenibacillus* sp. CBM1와 CBH23의 G+C content는 각각 48.9mol%, 48.94%을 보임.
- CBM1과 CBH23의 균주의 최적 성장 조건을 확인하기 위해 다양한 온도 (4℃-6 5℃), 염정도 (0-19%), 산,염기(pH3-pH12) 조건에서 배양 실험을 수행한 경과 15℃-37℃, 0-5%, pH6-9 에서 균주의 생장이 관찰되었으며 25-37℃, 0-2%, pH6-8에서 최적 성장 조건임을 확인함 (그림 41).

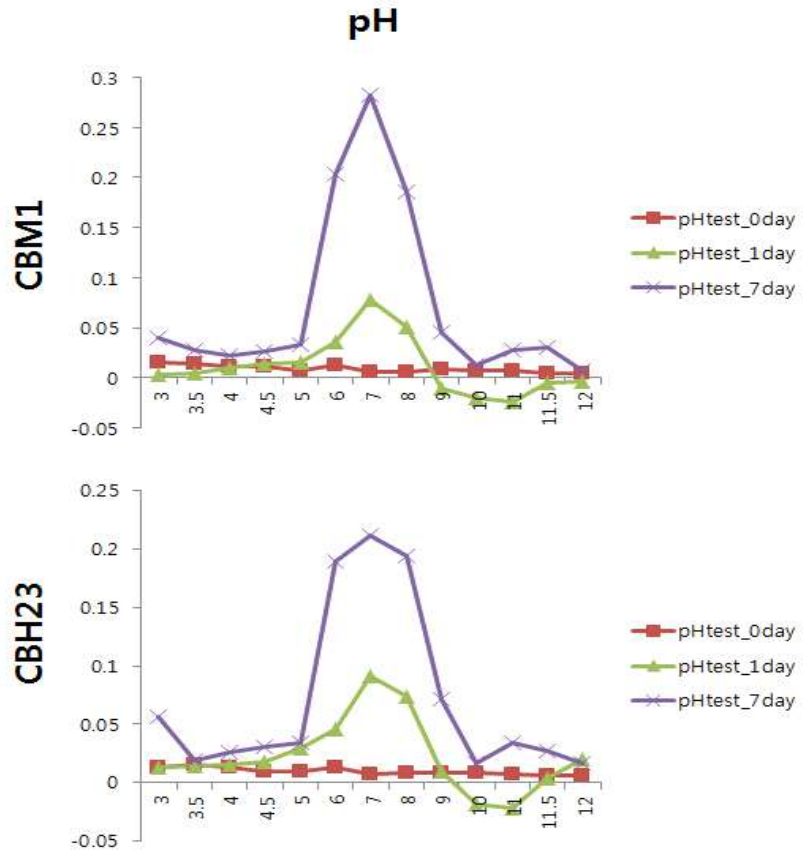


그림 41. CBM1과 CBH23균주의 pH 수준에 따른 성장곡선

- CBM1과 CBH23의 predominant fatty acid는 C_{16:0}과 anteiso-C_{15:0}였으며 가장 가까운 근연종인 *Paenibacillus puldeungensis* CAU9324^T과 다소 다른 결과를 보임 (표 8).

표 8. CBM1, CBH23과 closely related species의 cellular fatty acid compositions (%). -, Not detected.

Fatty acid	CBM1	CBH23	<i>Paenibacillus puldeungensis</i> CAU9324 ^T
iso-C _{14:0}	-	-	8.76
C _{14:0}	3.37	-	1.46
iso-C _{15:0}	3.88	4.92	3.33
anteiso-C _{15:0}	16.67	21.75	53.42
iso-C _{16:0}	3.45	4.03	18.95
C _{16:1} ω 7c	1.65	2.01	-
C _{16:0}	29.70	26.76	7.34
iso-C _{17:0}	1.13	1.03	-
anteiso-C _{17:0}	1.32	1.39	2.66
C _{17:0}	1.075	2.23	-
C _{18:1} ω 7c	15.83	12.96	-
C _{18:0}	2.44	1.62	-
C _{19:0} cyclo ω 8c	16.19	9.71	-

- bioMerieuxTM APITM 50CH를 이용한 Carbon assimilation 확인결과, CBM1과 CBH23은 같은 기질 (Methyl- β -D-xyloside, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, L-Rhamnose, D-Mannitol, Methyl- α -D-glucoside, N-acetylglucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, D-Cellobiose, D-Maltose, D-Lactose, D-Melibiose, Sucrose, D-Trehalose, Inulin, D-Raffinose, Starch, Glycogen, Gentiobiose, D-Turanose, D-Lyxose, 5-ketogluconate)을 carbon source로 사용하는 것으로 확인 (그림 42).



그림 42. CBM1의 substrate assimilation screening
 그림 44. CBH23의 substrate assimilation screening

(2) *Paenibacillus* sp. LAH16

- *Paenibacillus* sp. LAH16 균주는 hindgut에서 분리되었음.
- *Paenibacillus* sp. LAH16 균주의 Gram-staining을 통해 Gram-negative의 0.5 μ m 이와 1-1.5 μ m 크기의 rod 형태임을 확인함 (그림 43).

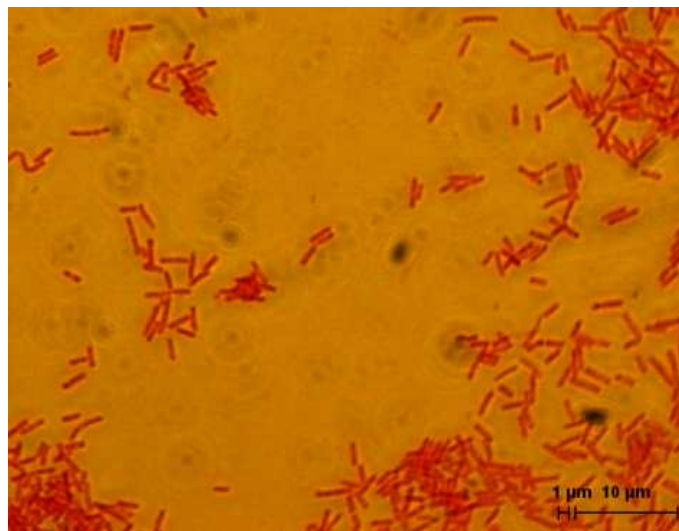


그림 43. LAH16의 gram staining과 morphology

- Motile, catalase positive와 oxidase positive한 특성을 보였으며, anaerobic chamber에서 growth를 보이는 facultative anaerobe임을 확인함.

- *Paenibacillus* sp. LAH16의 G+C content는 각각 49.0mol%를 보임.
- LAH16 균주의 최적 성장 조건을 확인하기 위해 다양한 온도 (4℃-65℃), 염정도 (0-19%), 산,염기(pH3 - pH12) 조건에서 배양 실험을 수행한 결과 10℃-37℃, 0-6%, pH5-9에서 균주의 생장이 관찰되었으며 20-37℃, 0-3%, pH6-8에서 최적 성장 조건임을 확인함 (그림 44).

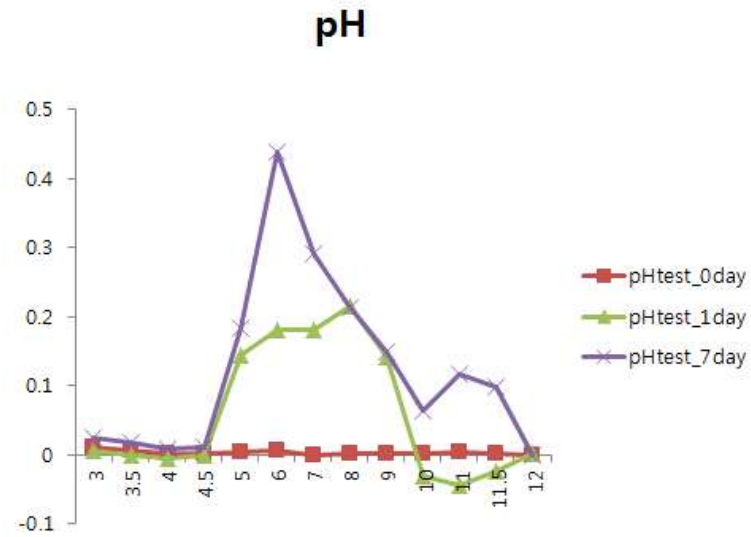


그림 44. LAH16의 pH 수준에 따른 성장곡선

- LAH16의 predominant fatty acid는 anteiso-C_{15:0}였고 가까운 근연종들과 같은 결과를 보임 (표 9).

표 9. LAH16와 closely related species의 cellular fatty acid compositions (%). Strains: 1, LAH16; 2, *Paenibacillus amylolyticus* NRRL NRS-290^T 3, *P. barcinonensis* BP-23^T 4, *P. oceanisediminis* L10^T 5, *P. pabuli* JCM 9074^T 6, *P. tundrae* A10b^T 7, *P. taichungensis* BCRC 17757^T 8, *P. tylopili* MK2^T 9, *P. xylanexedens* B22a^T. -, Not detected.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9
iso-C _{14:0}	-	14.18	13.80	8.93	7.71	9.84	10.59	9.85	16.66
C _{14:0}	3.90	4.83	3.77	2.32	1.83	2.07	2.29	2.05	5.05
iso-C _{15:0}	2.69	2.56	4.09	2.28	3.75	3.67	2.51	2.75	3.46
anteiso-C _{15:0}	46.39	49.48	42.49	44.45	54.38	56.69	54.03	55.92	49.07
iso-C _{16:0}	18.10	12.43	16.27	20.07	14.87	14.46	15.56	15.03	10.81
C _{16:1} <i>ω</i> 11 <i>c</i>	2.94	0.94	1.50	2.71	0.59	0.65	0.14	-	1.82
C _{16:0}	11.55	9.16	9.63	9.38	7.78	6.89	8.21	7.70	7.27
iso-C _{17:0}	0.86	0.39	0.87	0.86	1.28	0.76	0.69	1.09	0.40
anteiso-C _{17:0}	7.41	1.75	5.19	4.34	4.55	2.71	3.00	3.96	1.35
C _{18:0}	0.82	0.88	0.34	1.21	0.98	0.54	0.56	0.48	0.69

○ 분리 균주 *Paenibacillus* sp. LAH16은 Glycerol, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Ribose, D-Xylose, Methyl- β -D-xyloside, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, L-Rhamnose, D-Mannitol, Methyl- α -D-glucoside, N-acetylglucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, D-Cellobiose, D-Maltose, D-Lactose, D-Melibiose, Sucrose, D-Trehalose, D-Melezitose, D-Raffinose, Starch, Glycogen, Gentiobiose, D-Turanose, L-Fucose, Gluconate을 carbon source로 사용하는 것을 bioMerieuxTM APITM 50 CH이용하여 확인 함 (그림 45).



그림 45. LHA16의 substrate assimilation screening

(3) *Bombella* sp. MRM1

- *Bombella* sp. MRM1 균주는 midgut에서 분리되었음.
- *Bombella* sp. MRM1 균주의 Gram-staining을 통해 Gram-negative의 0.5넓이와 1-2.5 μm 크기의 rod 형태임을 확인함.
- non-motile, catalase positive와 oxidase positive한 특성을 보였으며, anaerobic chamber에서 growth를 보이지 않아 obligative aerobe임을 확인함 (그림 46).

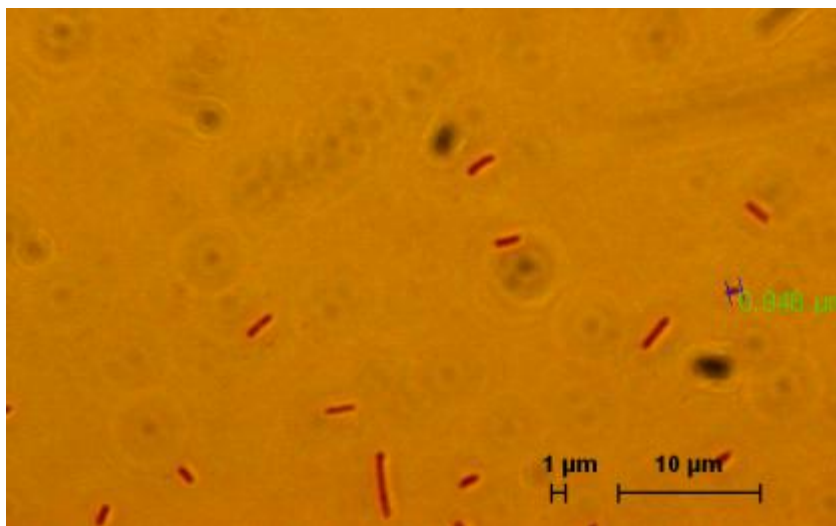


그림 46. MRM1의 gram staining과 morphology

- MRM1 균주의 최적 성장 조건을 확인하기 위해 다양한 온도 (4°C–65°C), 염정도 (0–21%), 산, 염기(pH3.5 – pH11) 조건에서 배양 실험을 수행한 결과 25°C–37°C, 0–1%, pH6–9에서 균주의 생장이 관찰되었으며 30–37°C, 0–1%, pH6–8.5에서 최적 성장 조건임을 확인함.

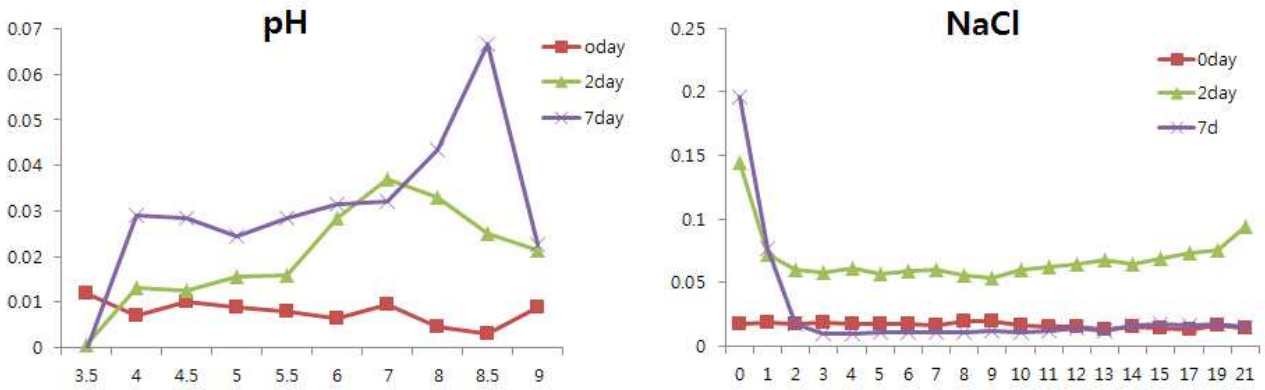


그림 47. MRM1의 pH 수준과 염정도에 따른 성장곡선

- MRM1의 predominant fatty acid는 $C_{18:1} \omega 7c$, $C_{16:0}$, $C_{18:1} \omega 9c$, $C_{19:0} \text{cyclo } \omega 8c$ 였으며 가장 가까운 근연종인 *Bombella intestini* LMG28161^T과 predominant fatty acid의 종류는 같았지만 그 abundance 정도에서 다소 다른 결과를 보임 (표 10).

표 10. MRM1과 closely related species의 cellular fatty acid compositions (%). –, Not detected.

Fatty acid	MRM1	<i>Bombella intestini</i> LMG28161 ^T
$C_{14:0}$	6.67	4.01
$C_{14:0}2OH$	3.73	6.24
$C_{16:0}$	18.82	14.93
$C_{16:0}2OH$	3.38	4.13
$C_{16:0}3OH$	1.06	1.19
$C_{18:1} \omega 9c$	11.625	13.41
$C_{18:1} \omega 7c$	19.13	35.56
$C_{18:0}$	2.76	2.04
$C_{19:0} \text{cyclo } \omega 8c$	28.19	14.19

- Biolog GN2 MicroPlate를 이용한 carbon assimilation screening 결과, *Bombella* sp. MRM1과 근연종인 *Bombella intestini* LMG 28161^T는 carbon source로서

D-Fructose, α -D-Glucose, L-Proline을 같은 기질을 이용하는 것을 확인함 (그림 48).

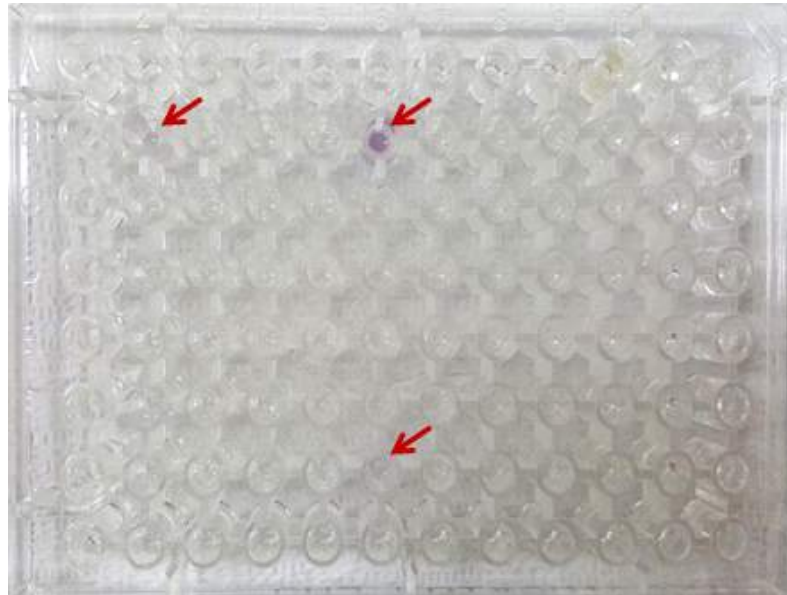


그림 48. Biolog GN2 MicroPlate을 이용한 *Bombella* sp. MRM1의 carbon source screening

2. 메타지노믹스 및 기반 한우 육질등급 별 반추위 내 미생물 & 바이러스 군집 연구

가. 한우 장내 유용미생물 분리 및 동정

- 경상북도 의성군에 위치한 초원농장에서 1++ 등급에 해당하는 한우의 반추위, 십이지장, 소장, 대장 및 분변 시료를 확보하여 다양한 배지 조건 (R2A, MRSA, BHIA and 10% BHIA)에서 유용 미생물 분리를 실시하여 총 189개의 bacterial colony를 획득함 (표 11).

표 11. 한우 장내 유용미생물 분리 조건

Medium	Small intestine	Large intestine	Rumen	Duodenum
R2A	12	10	24	6
MRSA	2	12	21	3
BHIA	10	7	24	4
10% BHIA	10	20	24	6

- 획득한 colony 중 152 균주에 대하여 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 실시한 결과 10개의 균주 (*Paenibacillus thailandensis* S3-4A, 92.81%; *Paenibacillus vulneris*

CCUG 53270, 93.64%; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, 96.3%; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* NCC725, 95.99%; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, 96.1%; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii* YIT 11211, 96.77%; *Saccharopolyspora rectivirgula* ATCC 33515, 98.89%; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* NCC725, 96.16%; *Kocuria koreensis* P31, 97.73%; *Paenibacillus xylanexedens* B22a, 98.69%)가 신종 미생물로 판명됨 (표 12).

표 12. 한우 장내 신종 미생물 분리 목록

Name	The closest strain	Accession	Similarity (%)	Diff/Total nt
bW303(3)	<i>Paenibacillus thailandensis</i> S3-4A(T)	AB265205	92.81	106/1474
BW304(4)	<i>Paenibacillus vulneris</i> CCUG 53270(T)	HE649498	93.64	92/1447
MW401(4)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842(T)	CR954253	96.3	56/1515
BW403(5)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i> NCC725(T)	AY421720	95.99	60/1497
BW404(5)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842(T)	CR954253	96.1	59/1511
MW503(4)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> YIT 11211(T)	AB641833	96.77	47/1453
BS304(5)	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> ATCC 33515(T)	X53194	98.89	15/1355
MW409(6)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i> NCC725(T)	AY421720	96.16	57/1485
BT3(01)	<i>Kocuria koreensis</i> P31(T)	FJ607312	97.73	32/1411
bD5(06)	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> B22a(T)	EU558281	98.69	18/1375

- 확보된 10종의 한우 장내 신종 미생물의 계통분류학적 특성을 파악하기 위해 EzTaxon-e database 프로그램 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하여 각 균주와 근연관계에 있는 참조 미생물의 16S rRNA 유전자 정보를 수집한 뒤, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 프로그램을 이용하여 계통분류도 (phylogenetic tree)를 작성함 (그림 49-58).

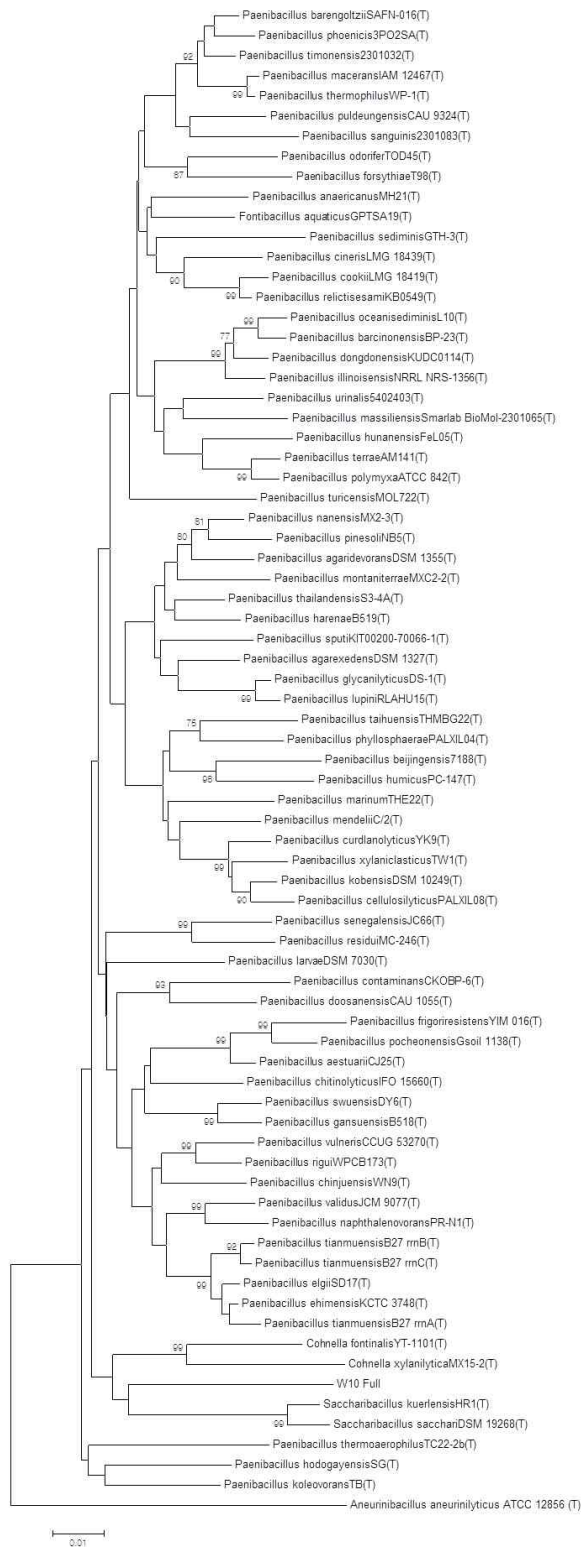


그림 49. bW303(3)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

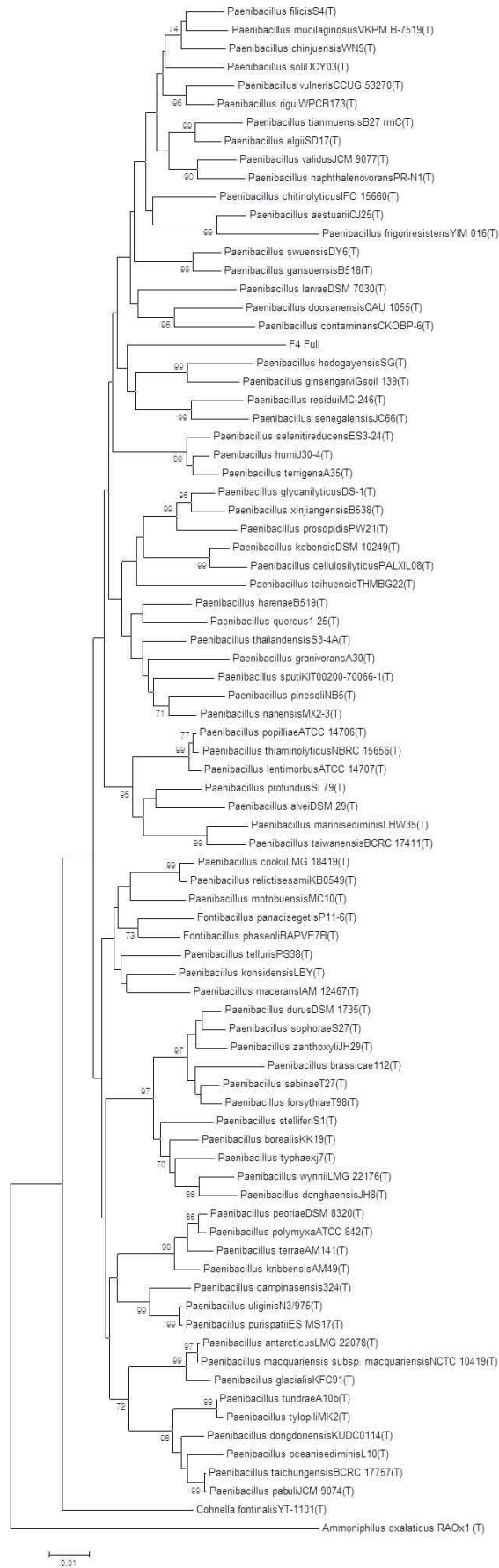


그림 50. BW304(4)의 16S rDNA 유전자 계통분류도

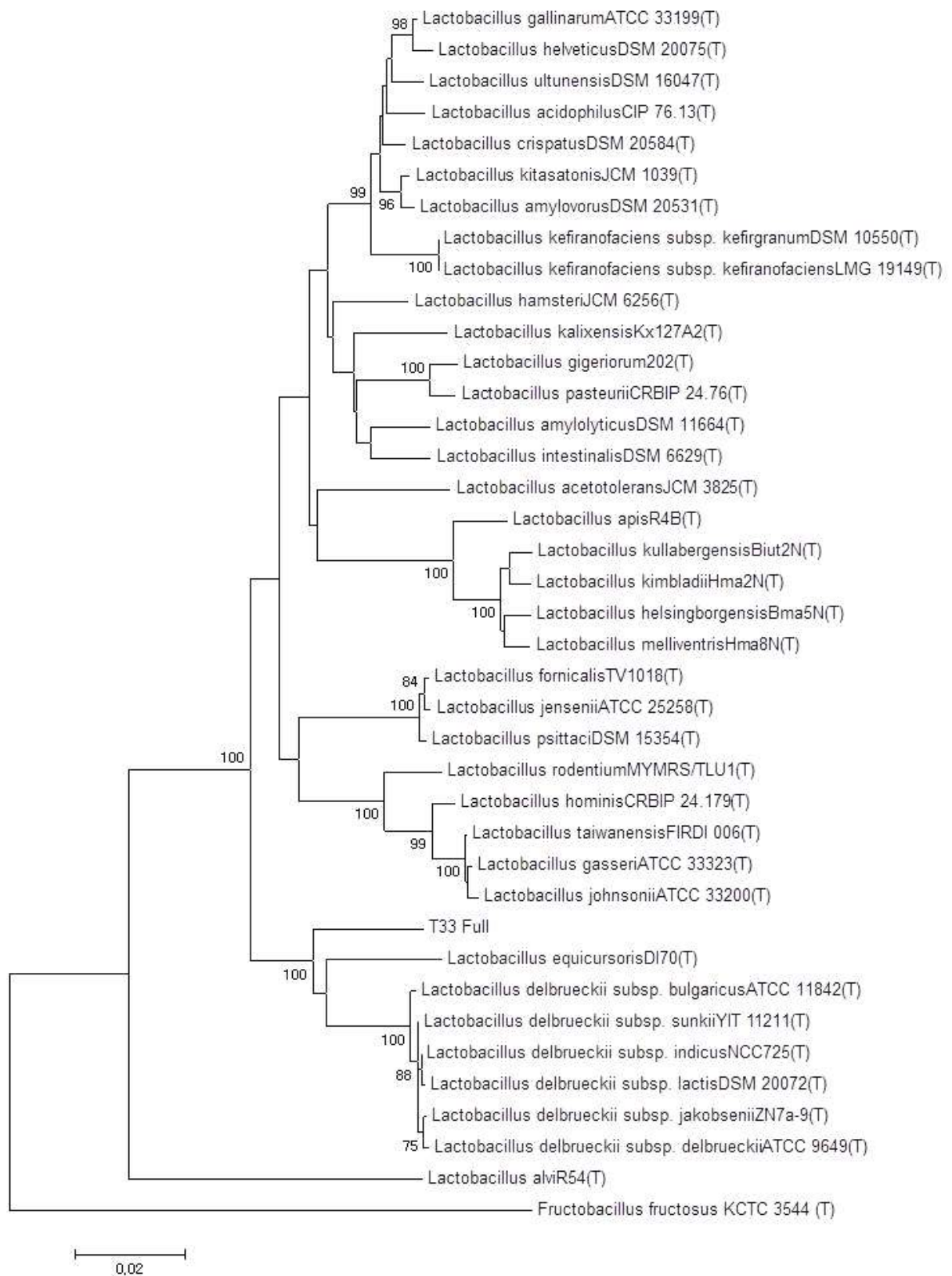


그림 51. MW401(4)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

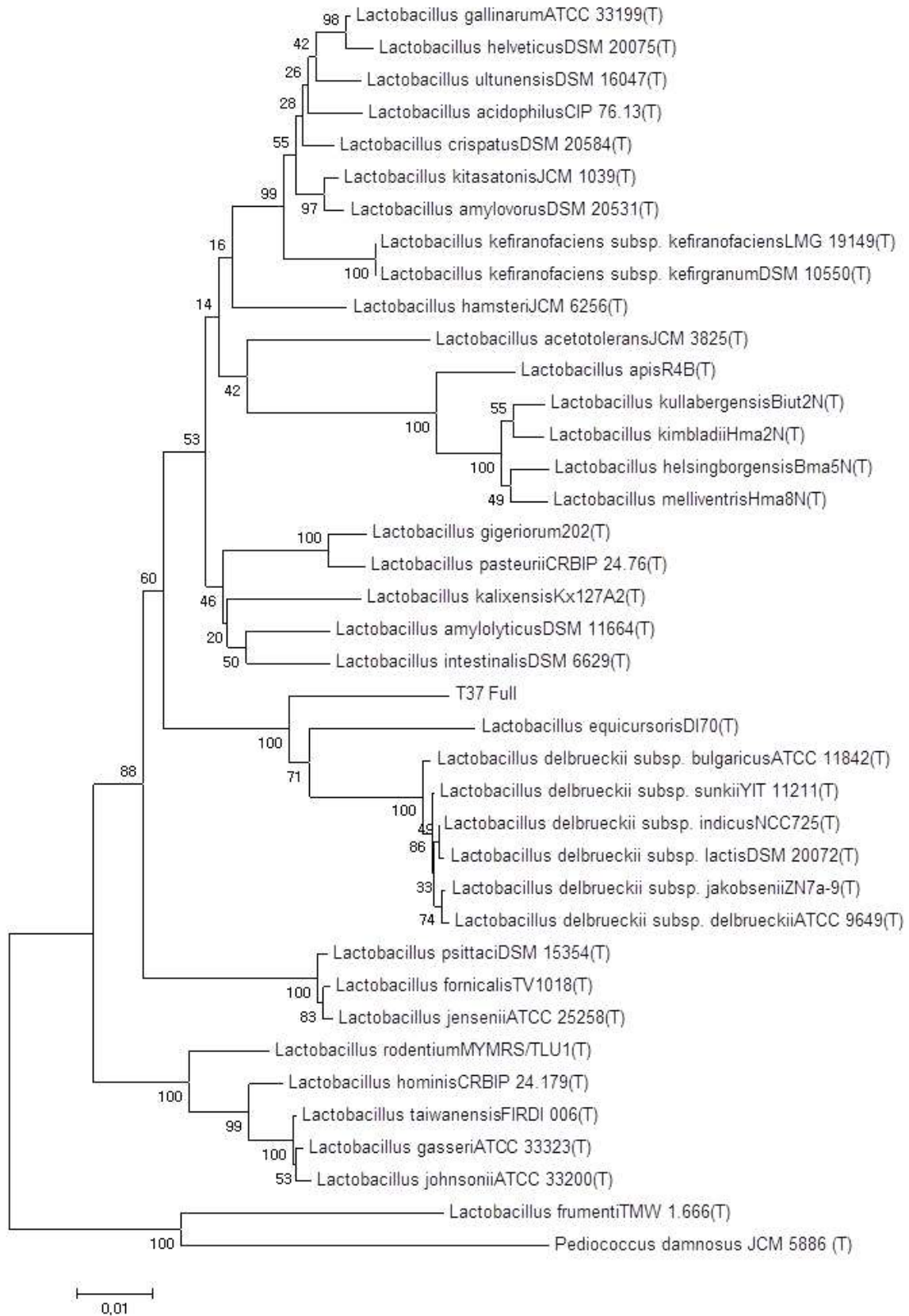


그림 52. BW403(5)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

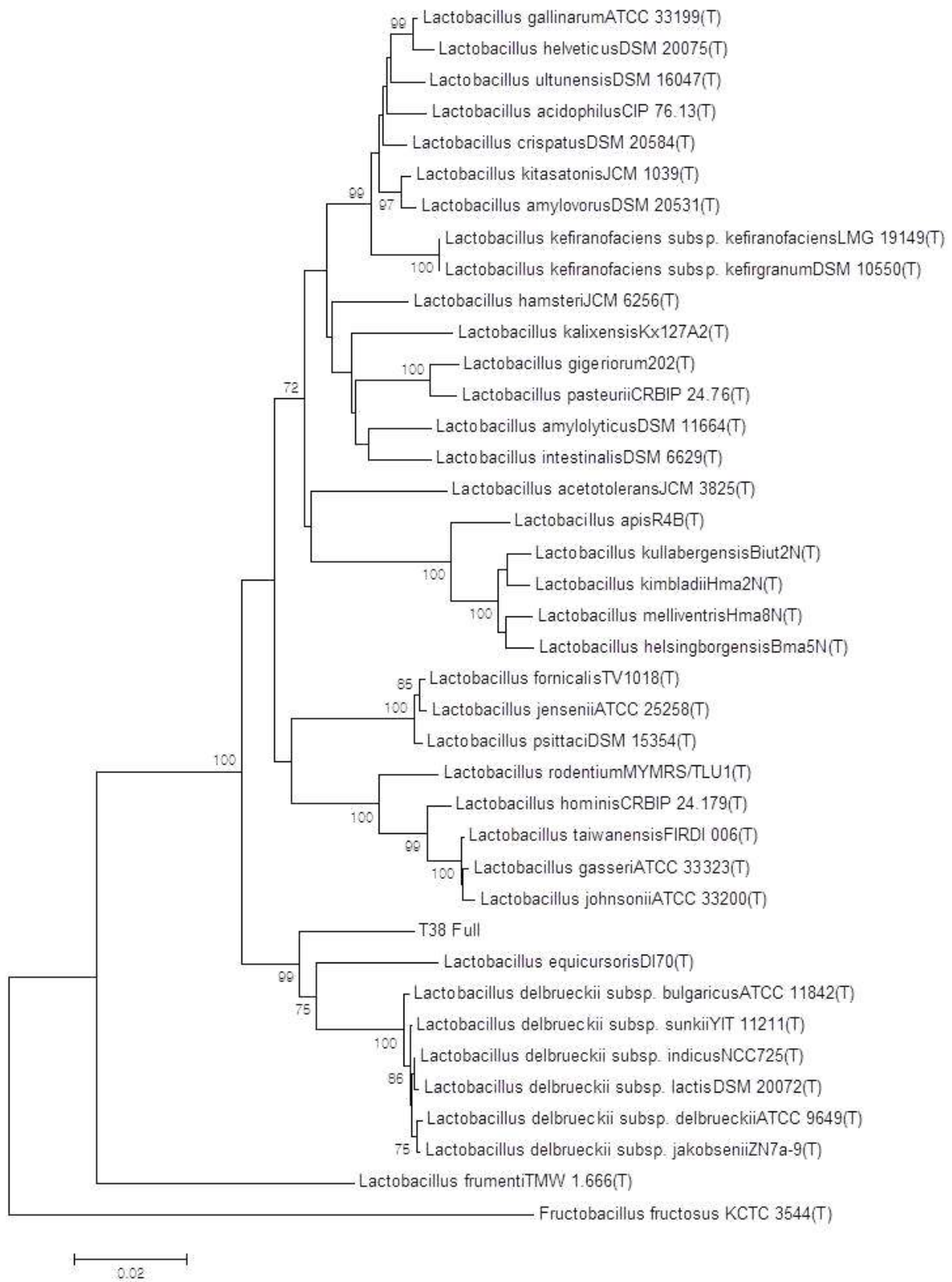


그림 53. BW404(5)의 16S rDNA 유전자 계통분류도

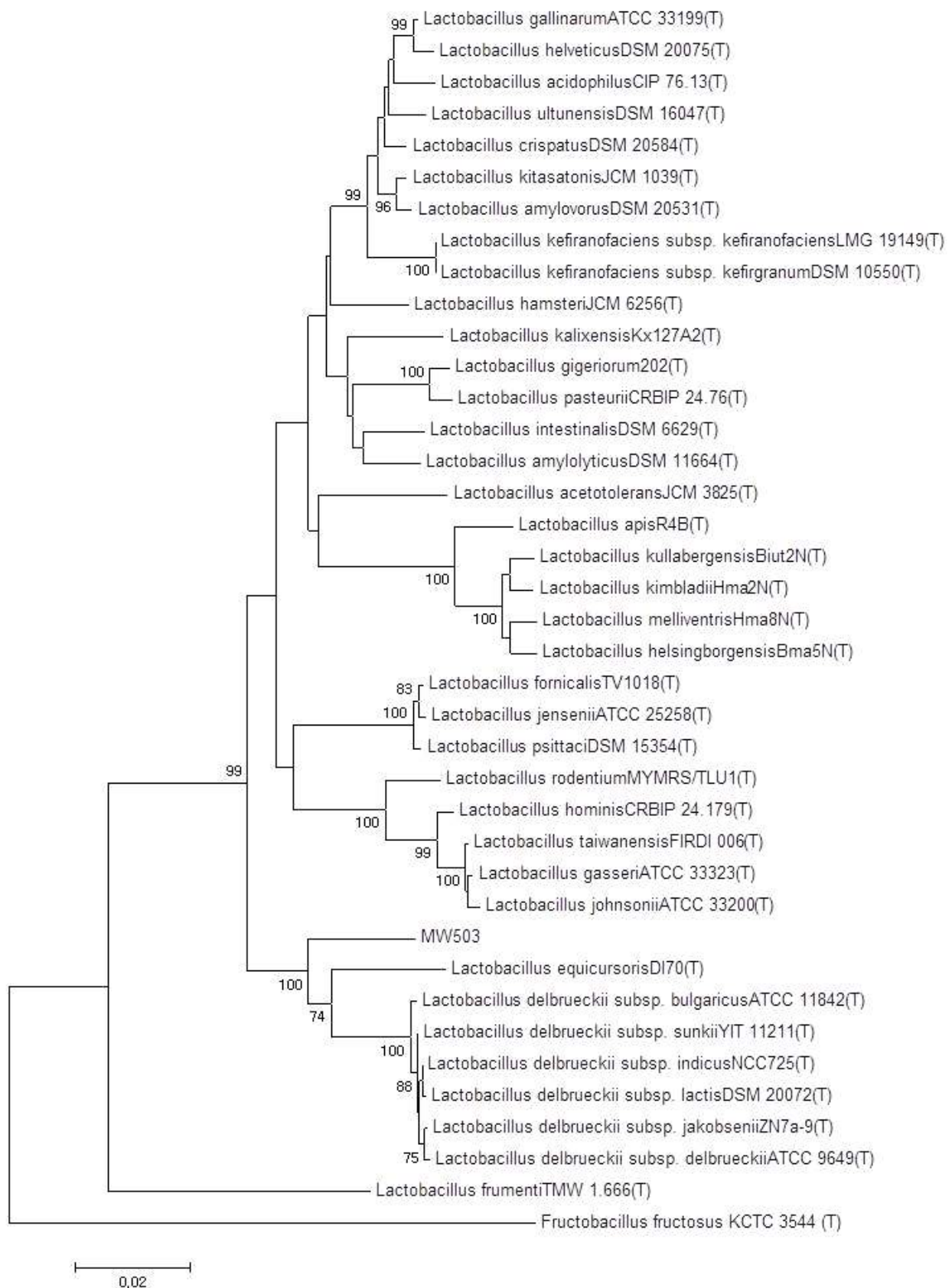


그림 54. MW503(4)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

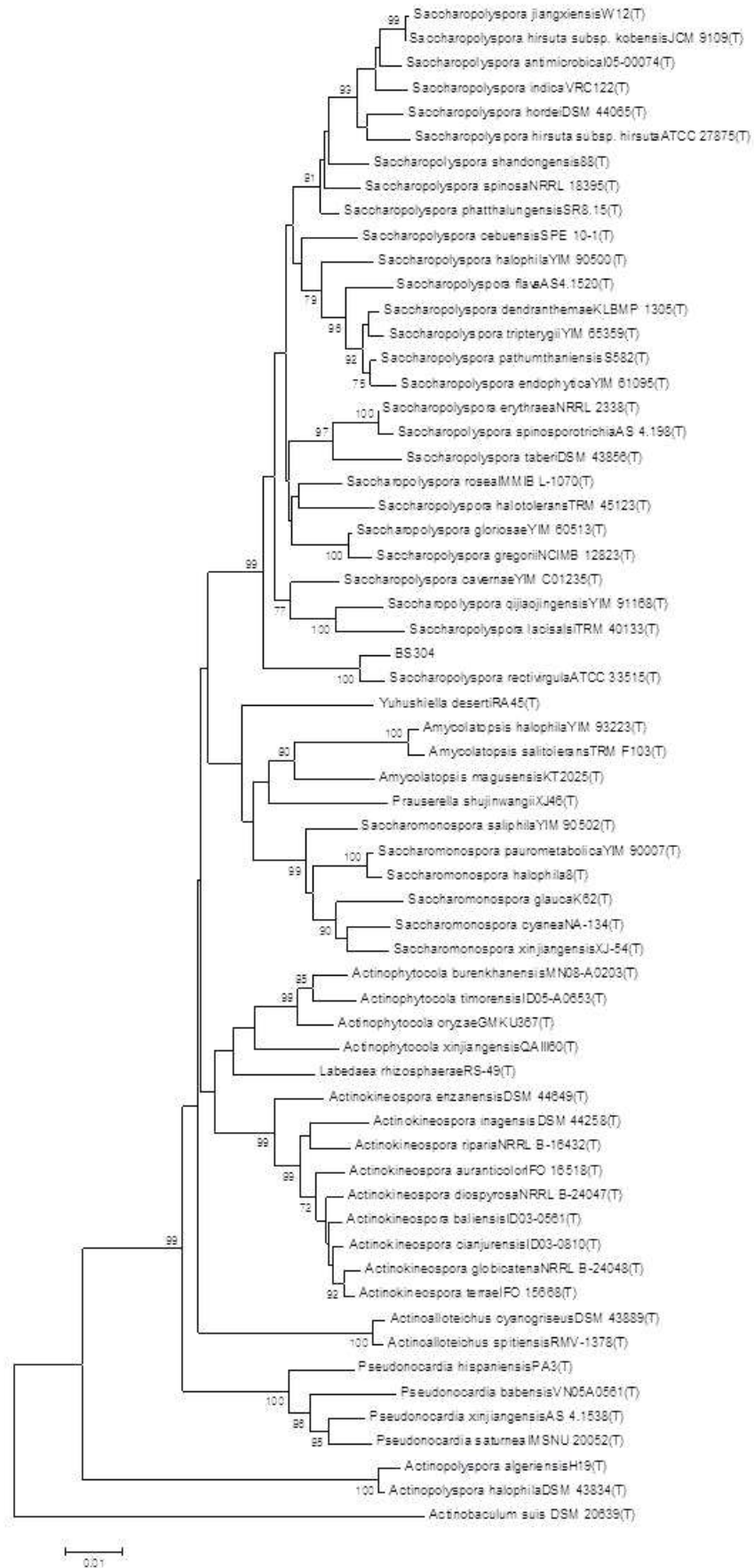


그림 55. BS304(5)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

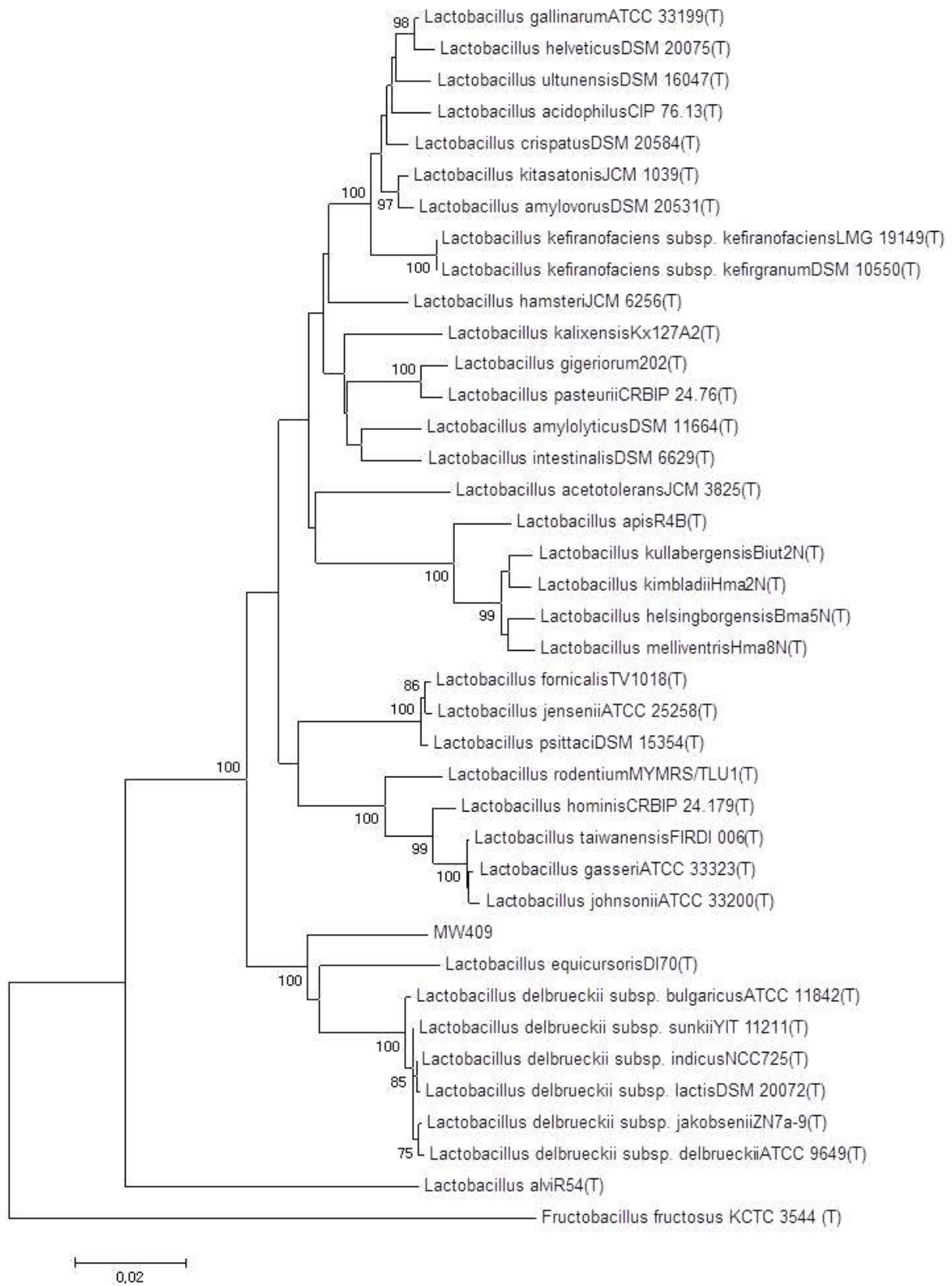


그림 56. MW409(6)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

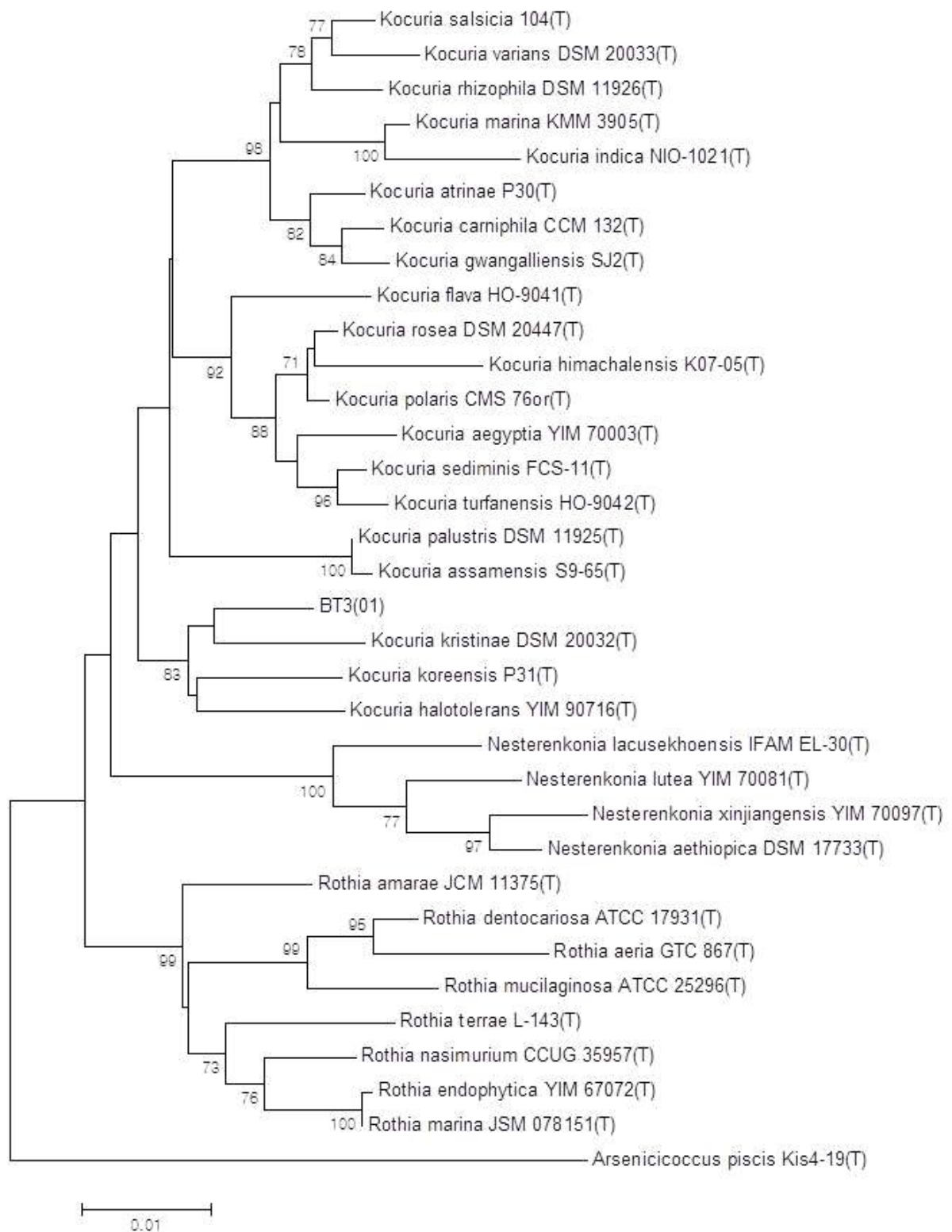


그림 57. BT3(01)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

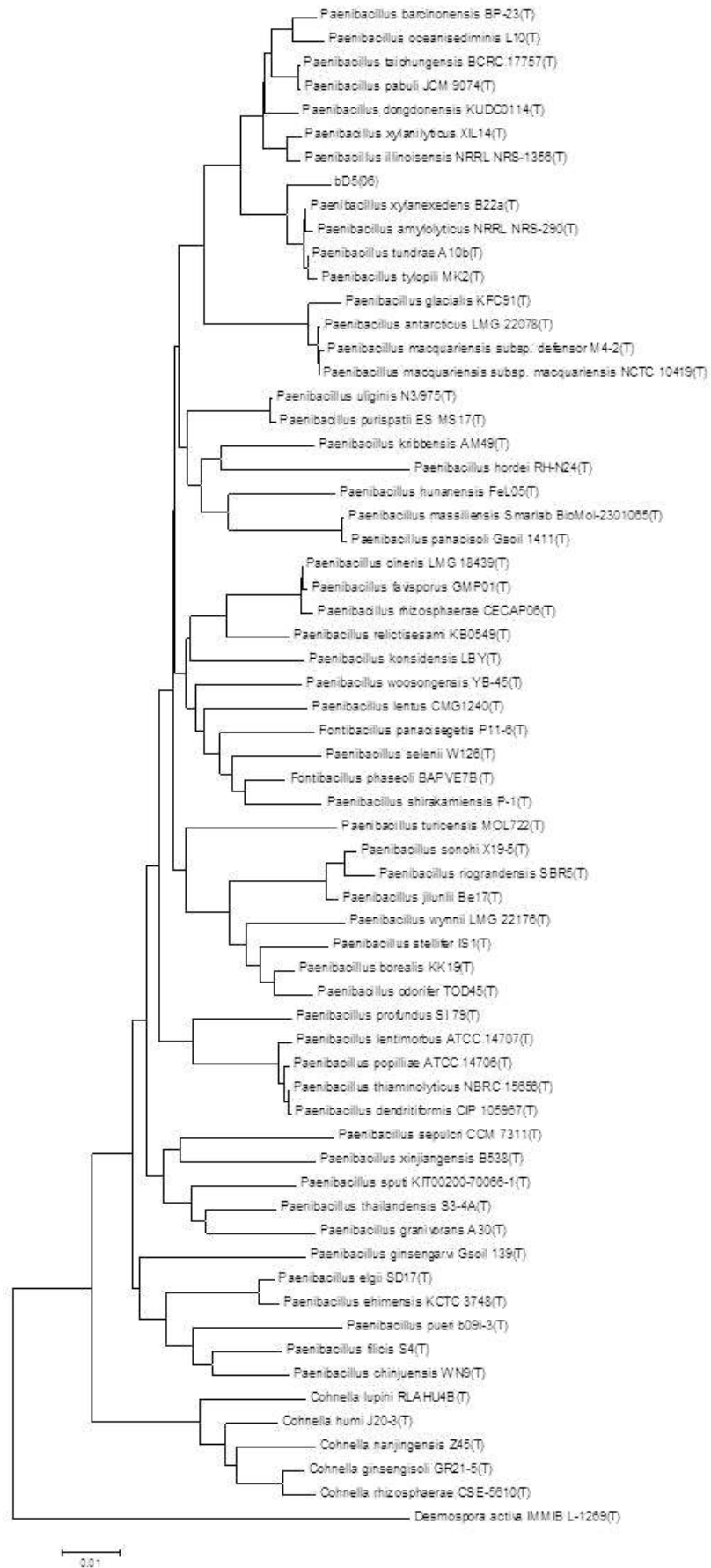


그림 58. bD5(06)의 16S rRNA 유전자 계통분류도

나. 한우 장내 유용미생물의 생리활성 탐구

- 경상북도 의성군에 위치한 초원농장에서 1++ 등급에 해당하는 한우의 장내 내용물 및 분변 시료에서 획득한 189개의 bacterial colony 중 152 균주에 대하여 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 실시한 결과 10개의 균주가 신종 미생물로 판명되었고, 이 중 *Kocuria* sp. BT301 균주에 대해 genomic & chemotaxonomic analysis를 수행하여 근연종 (closely related species)과 구분되는 novel species 여부를 테스트 함.
- *Kocuria* sp. BT301 균주의 최적화된 생리활성 조건을 조사하기 위해 다양한 온도 조건 (4°C–65°C)에서 배양 실험을 수행한 결과 10°C–37°C 조건에서 균주의 생장이 관찰되었으며 37°C에서 최적화된 성장 조건 (optimal growth condition)을 확인 함 (그림 59).

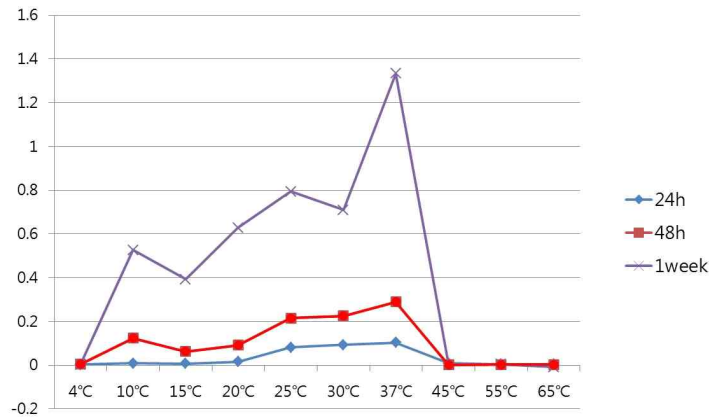


그림 59. *Kocuria* sp. BT301 균주의 최적화된 성장 온도

- *Kocuria* sp. BT301 균주의 최적화된 생리활성 조건을 조사하기 위해 다양한 염도 조건 (0.5%–15.5%)에서 배양 실험을 수행한 결과 0.5%–10.5% 조건에서 균주의 생장이 관찰되었으며 3.5%에서 최적화된 성장 조건 (optimal growth condition)을 확인함 (그림 60).

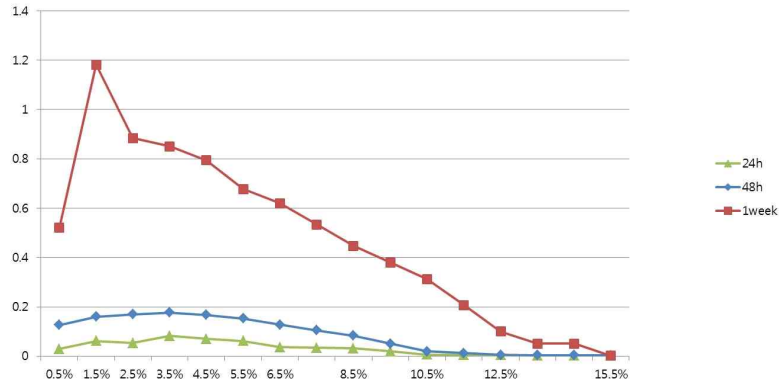


그림 60. Kocuria sp. BT301 균주의 최적화된 성장 온도

- Kocuria sp. BT301 균주의 최적화된 생리활성 조건을 조사하기 위해 다양한 pH 조건 (pH4-pH11)에서 배양 실험을 수행한 결과 pH5-pH9 조건에서 균주의 생장이 관찰되었으며 pH7에서 최적화된 성장 조건 (optimal growth condition)을 확인함 (그림 61).

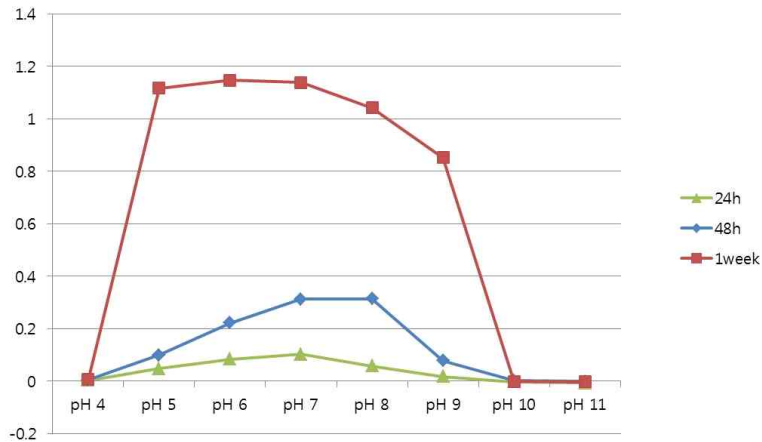
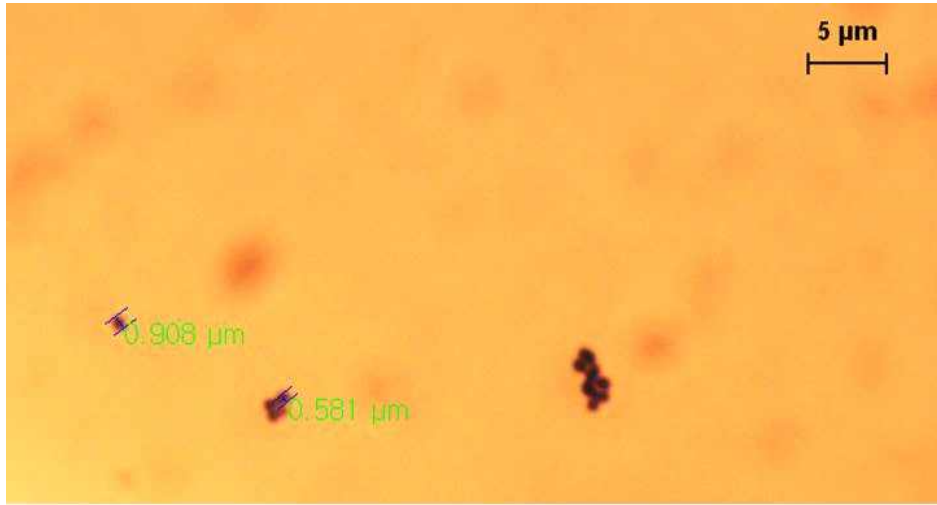


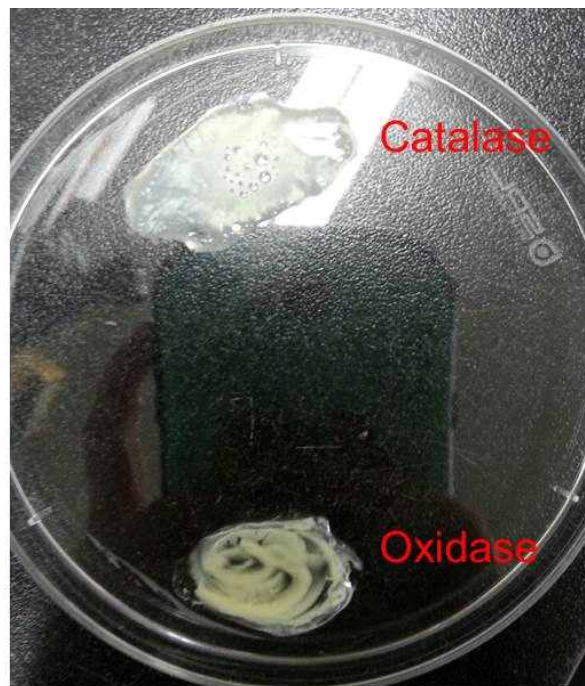
그림 61. Kocuria sp. BT301 균주의 최적화된 성장 pH

- Kocuria sp. BT301 균주의 Gram-staining & morphological analyses를 수행하여 Gram-positive, non-motile, catalase positive와 oxidase netative한 특성을 확인하였으며, 0.5-1 μm diameter 크기의 coccid 형태임을 확인함 (그림 62-64).



Gram staining	Gram positive
Motility	Non-motile
Cell size	Cells are coccoid.(0.5-1 μm diameter)

그림 62. *Kocuria* sp. BT301 균주의 Gram-staining & morphology



Catalase	+
Oxidase	-

그림 63 *Kocuria* sp. BT301 균주의 catalase & oxidase 활성



<BT301> ; Non-Motile



<Negative control>



<Positive control>

그림 64. Kocuria sp. BT301 균주의 motility test

- Kocuria sp. BT301 균주의 효소활성을 검사하기 위해 API ZYM 테스트를 수행하여 Esterase(C4), Esterase Lipase(C8), Leucine arylamidase, Acid phosphatase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase와 Beta-glucosidase에 대한 효소활성을 확인함 (표 13).

표 13. Kocuria sp. BT301 균주의 효소활성


Enzyme	BT301	<i>K. kristinae</i>	<i>K. koreensis</i>	<i>K. halotolerans</i>
Alkaline phosphatase	-	-	-	-
Esterase(C4)	+	-	w	-
Esterase Lipase(C8)	+	-	w	-
Lipase(C14)	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	w
Valine arylamidase	-	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	-	-
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+
α -galactosidase	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-
α -glucosidase	-	+	-	+
β -glucosidase	+	+	+	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-
α -mannosidase	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-



- Kocuria sp. BT301 균주의 반응 산물 생성을 검사하기 위해 API 20NE 테스트를 수행하여 Reduction of nitrates to nitrites, Urease, Beta-glucosidase와 Beta-galactosidase에 대한 반응 산물 생성을 확인함 (표 14).

표 14. Kocuria sp. BT301 균주의 반응 산물 생성

Reactions/Enzyme	BT301	<i>K. kristinae</i>	<i>K. koreensis</i>	<i>K. halotolerans</i>
Reduction of nitrates to nitrites	+	-	-	+
Reduction of nitrates to nitrogen		-	-	
L-tryptophane(indole production)	-	-	-	-
D-glucose(fermentation)	-	+	-	-
L-arginine(arginine dihydrolase)	-	-	-	-
Urease	+	-	-	-
β -glucosidase	+	+	+	+
Protease	-	+	+	-
β -galactosidase	w	-	w	-



- Kocuria sp. BT301 균주의 당류 (carbohydrates) 산화, 발효 및 assimilation을 검사하기 위해 API 50CH 테스트를 수행하여 Glycerol, Erythritol, D-Adonitol, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Inositol, D-Mannitol, N-Acetylglucosamine, Arbutin, Esculin/ferric citrate, Salicin, D-Trehalose, Xylitol 및 D-Arabitol에 대하여 산화, 발효 및 assimilation 반응을 확인함 (표 15).

표 15. *Kocuria* sp. BT301 균주의 당류 산화, 발효 및 assimilation

Reactions/Enzyme	BT301	<i>K. kristinae</i>	<i>K. koreensis</i>	<i>K. halotolerans</i>
Glycerol	+	+	+	+
Erythritol	+	-	+	+
D-Arabinose	-	-	+	-
L-Arabinose	-	-	-	+
D-Ribose	-	+	+	+
D-Xylose	-	+	W	+
L-Xylose	-	-	-	+
D-Adonitol	+	-	+	+
D-Galactose	+	-	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
L-Sorbose	-	W	-	-
L-Rhamnose	-	W	+	-
Inositol	+	+	+	+
D-Mannitol	+	-	+	+
D-Sorbitol	-	+	-	+
Methyl- α D-Mannopyranoside	-	-	+	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-	+	W	+
N-Acetylglucosamine	+	-	+	+
Amygdalin	-	-	+	-
Arbutin	+	+	+	+
Esculin/ferric citrate	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
D-Cellobiose	-	+	+	-
D-Maltose	-	+	-	+
D-Saccharose	-	+	+	-
D-Trehalose	+	+	+	-
D-Melezitose	-	+	-	+
Amidon	-	+	+	-
Xylitol	+	-	+	+
D-Turanose	-	+	W	+
D-Lyxose	-	-	W	-
D-Tagatose	-	+	W	+
D-Arabitol	+	-	+	+
L-Arabitol	-	-	-	+
Potassium gluconate	-	-	-	+
Potassium 5-Ketogluconate	-	+	+	+

- *Kocuria* sp. BT301 균주의 대사 작용 (metabolism)을 검사하기 위해 Biolog 테스트를 수행하여 D-Fructose, α -D-glucose, D-mannose, D- Psicose, L-lactic acid, Glycerol, L-Glutamic acid, D-mannitol, Salicin, D-Arabitol, D-galactose, m-inositol, Methyl Pyruvate, Mono-methyl Succinate, Putrescine, N-acetyl-D-glucosamine 및 Succinic Acid에 대하여 대사 반응을 확인함 (표 16).

표 16. *Kocuria* sp. BT301 균주의 metabolic fingerprint

Reactions/Enzyme	BT301	<i>K. kristinae</i>	<i>K. koreensis</i>	<i>K. halotolerans</i>
Tween40	-	w	+	+
Tween80	-	w	+	-
Pyruvic acid	-	+	+	+
Dextrin	-	+	w	w
Arbutin	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
α -D-glucose	+	+	+	+
maltose	-	+	-	-
Maltotriose	-	+	-	-
D-mannose	+	+	+	+
D-melezitose	-	+	-	-
β -methyl-D-glucoside	-	+	w	+
D- Psicose	w	+	+	+
D-Solbitol	-	+	-	-
Sucrose	-	+	+	-
D-Trehalose	-	+	-	-
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	+	w	-
L-lactic acid	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+
β -Hydroxybutyric acid	-	-	+	-
L-Alanine	-	-	w	-
L-Asparagine	-	-	+	-
L-Glutamic acid	+	-	-	w
L-Serine	-	-	+	-
L-Arabinose	-	-	-	+
D-mannitol	+	-	+	+
Salicin	+	-	+	+
D-Arabitol	+	-	+	+
D-galactose	+	-	+	-
m-inositol	+	-	+	+
α -Hydroxy Butyric acid	-	-	+	w
Methyl Pyruvate	w	-	+	+
D-Glucinic acid	-	-	-	+
D-Ribose	-	-	+	+
D-Tagalose	-	-	-	+
Xylitol	-	-	+	+
Mono-methyl Succinate	w	-	-	+
Putrescine	w	-	+	+
Adenosine	-	-	-	+
Thymidine	-	-	-	+
N-acetyl-D-glucosamine	w	-	+	-
Succinic Acid	+	-	w	w
N-acetyl-D-Mannosamine	-	-	w	-
Turanose	-	-	w	-
p-hydroxy phenyl Acetic acid	-	-	+	-
L-Malic Acid	-	-	w	-

- *Kocuria* sp. BT301 균주의 지방산 (fatty acids) 분석 결과 C15:0 anteiso 및 C17:0 anteiso가 major fatty acids 임을 확인함 (표 17).

표 17. *Kocuria* sp. BT301 균주의 지방산 분석

Fatty acid	BT301	<i>K. kristinae</i>	<i>K. koreensis</i>	<i>K. halotolerans</i>
Saturated acids				
C16:0	2.90	2.12	4.01	4.29
Branched acids				
C14:0 iso	tr	1.90	tr	tr
C15:0 iso	1.38	1.35	1.00	tr
C16:0 iso	9.18	16.44	16.17	9.73
C15:0 anteiso	61.00	50.81	44.51	52.43
C17:0 anteiso	24.01	25.63	31.33	30.69

○ *Kocuria* sp. BT301 균주의 퀴논 (quinone) 분석 결과 Menaquinone MK-7 및 MK-8이 major quinone 임을 확인함 (그림 65).

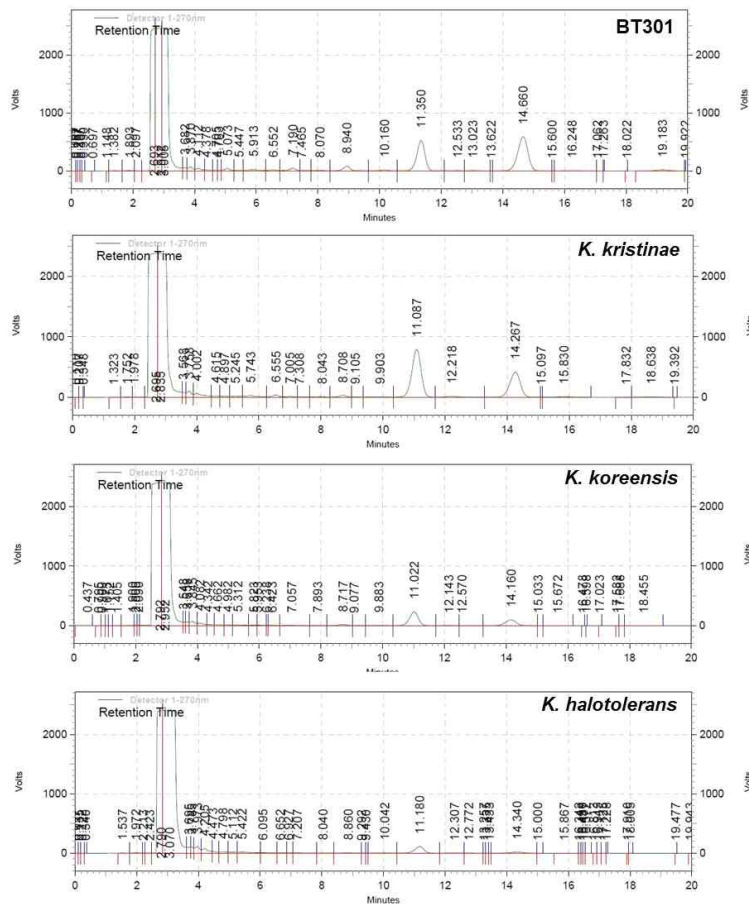


그림 65. *Kocuria* sp. BT301 균주의 퀴논 분석

○ *Kocuria* sp. BT301 균주와 근연종 (closely related species) 간 유전자 상동성 검사 (DNA-DNA hybridization)를 통해 *Kocuria* sp. BT301는 근연종과 유전적으로 구분되는 noble species 임을 확인함 (그림 66).

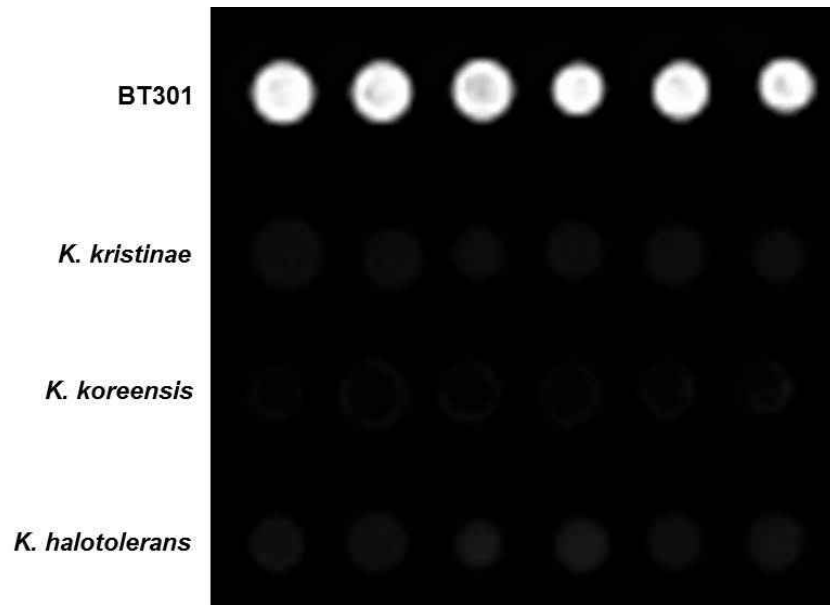


그림 66. *Kocuria* sp. BT301 균주의 DNA-DNA hybridization

다. 한우의 육질등급 별 소화기관 내용물 샘플링

- 경상북도 군위군에 위치한 민속 LPC에서 상위 등급 한우 10마리의 소화기관 (Jejunum, cecum, and Colon), 조직, 지방 (Liver, subcutaneous fat, and visceral fat) 및 혈청을 채집하였음 (그림 67).



그림 67. 한우의 소화기관, 조직, 지방 및 혈청 샘플링

- 샘플링 대상 상위 등급 한우 10마리는 모두 거세한 수컷이며, 도체 등급판정 결과 상

위 육질등급 (1등급, 1+등급 및 1++등급)임을 확인함 (표 18).

표 18. 한우 도체 등급판정 결과

소도체 등급판정결과

주소 : 경상북도 의성군 산재1길 245
판정일자 : 2015-03-16

출하자명 : 김홍길
작업장명 : (주)민속엘피씨

순번	작업장	판정		종별	육량					육질					결함	최종등급	경락단가 원/kg	바코드			
		월	일		도체번호	등지방 두께 (mm)	등심 면적 (cm ²)	도체중 (kg)	육량 지수	등급 보정	육량 등급	근내지방 (번호)	육색 (번호)	지방색 (번호)					조직감 (번호)	성숙도 (번호)	육질등급
1	(주)민속엘피씨	3	16	1	한우	거	11	94	481	65.21		B	8	5	3	1	3	1++	1++B	2301325939	
2	(주)민속엘피씨	3	16	2	한우	거	7	117	559	68.83		A	8	5	3	1	3	1++	1++A	2300349976	
3	(주)민속엘피씨	3	16	3	한우	거	12	106	517	65.28	상향	B	9	5	3	1	3	1++	1++A	2077579454	
4	(주)민속엘피씨	3	16	4	한우	거	8	89	520	65.5	상향	B	5	4	3	1	3	1	1A	2301320365	
5	(주)민속엘피씨	3	16	5	한우	거	25	107	590	55.53		C	8	5	3	1	3	1++	1++C	2072349788	
6	(주)민속엘피씨	3	16	6	한우	거	11	93	445	65.94	상향	B	6	5	3	1	3	1+	1+A	2301319223	
7	(주)민속엘피씨	3	16	7	한우	거	6	98	437	69.91		A	8	4	3	1	3	1++	1++A	2080421157	
8	(주)민속엘피씨	3	16	8	한우	거	12	105	442	66.95	상향	B	9	5	3	1	3	1++	1++A	2079683900	
9	(주)민속엘피씨	3	16	9	한우	거	9	97	426	68.17		A	8	5	3	1	3	1++	1++A	2074674816	
10	(주)민속엘피씨	3	16	10	한우	거	7	87	421	68.24		A	8	5	3	1	3	1++	1++A	2081632367	
평균					한우	거	11	99	484	66			7	5	3	1	3				

축산물등급판정소(www.kormeat.com) Tel:(031)390-5572 Fax:(031)390-5598

○ 샘플링 대상 상위 등급 한우 10마리의 식이 조성을 확인 한 결과 비육기간 동안 모두 동일한 식이가 급여된 것을 확인함 (표 19).

표 19. 샘플링 대상 한우의 식이 조성

원료명	번식우				육성우			비육전기			비육후기		
	단가	중량	금액	배합비	중량	금액	배합비	중량	금액	배합비	중량	금액	배합비
큰소중기가루	425.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	450.00	191,250.00	15.00	450.00	191,250.00	15.00
육성가루	416.00	0.00	0.00	0.00	450.00	187,200.00	15.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
번식가루	331.00	600.00	198,600.00	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
옥수수F	340.00	90.00	30,600.00	3.00	180.00	61,200.00	6.00	540.00	183,600.00	18.00	750.00	255,000.00	25.00
연맥	380.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	60.00	22,800.00	2.00	0.00	0.00	0.00
티모시	590.00	0.00	0.00	0.00	360.00	212,400.00	12.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
알팔파	500.00	0.00	0.00	0.00	120.00	60,000.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
볏짚	200.00	480.00	96,000.00	16.00	0.00	0.00	0.00	150.00	30,000.00	5.00	240.00	48,000.00	8.00
수단그라스	200.00	450.00	90,000.00	15.00	300.00	60,000.00	10.00	240.00	48,000.00	8.00	150.00	30,000.00	5.00
소맥피	310.00	300.00	93,000.00	10.00	330.00	102,300.00	11.00	330.00	102,300.00	11.00	300.00	93,000.00	10.00
갯목	220.00	120.00	26,400.00	4.00	180.00	39,600.00	6.00	120.00	26,400.00	4.00	0.00	0.00	0.00
발효사료	200.00	690.00	138,000.00	23.00	630.00	126,000.00	21.00	630.00	126,000.00	21.00	630.00	126,000.00	21.00
가수	0.00	264.00	0.00	8.80	444.00	0.00	14.80	477.00	0.00	15.90	477.00	0.00	15.90
비타민(PK-BV3)	2,300.00	6.00	13,800.00	0.20	6.00	13,800.00	0.20	3.00	6,900.00	0.10	3.00	6,900.00	0.10
		3,000.00	696,400.00	100.00	3,000.00	862,500.00	100.00	3,000.00	737,250.00	100.00	3,000.00	750,150.00	100.00
원재료비			228.80			287.50			245.75			250.05	
수분(%)			38.00			36.00			36.00			35	

라. 한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집 정보 획득

○ Repeated bead beating (RBB) 방법을 이용하여 한우의 소화기관 (Jejunum, cecum, and Colon) 샘플에서 박테리아 유전체 추출을 수행함 (표 20).

표 20. 한우의 소화기관에서 추출한 박테리아 유전체

Sample name	DNA Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
1번 소장	341.3	ng/μl	6.83	3.67	1.86	1.96
1번 맹장	188.4	ng/μl	3.77	2.04	1.85	1.61
1번 대장	164.4	ng/μl	3.29	1.81	1.81	1.52
2번 소장	545	ng/μl	10.90	5.80	1.88	2.21
2번 맹장	104.6	ng/μl	2.09	1.15	1.82	1.38
2번 대장	120.7	ng/μl	2.41	1.33	1.82	1.60
3번 소장	490	ng/μl	9.80	5.25	1.87	1.98
3번 맹장	964.1	ng/μl	19.28	9.18	2.10	2.20
3번 대장	225.5	ng/μl	4.51	2.42	1.86	2.23
4번 소장	181.5	ng/μl	3.63	1.97	1.84	2.04
4번 맹장	478.1	ng/μl	9.56	4.73	2.02	1.97
4번 대장	727.3	ng/μl	14.55	7.05	2.06	2.11
5번 소장	98.2	ng/μl	1.96	1.08	1.82	1.87
5번 대장	56.8	ng/μl	1.14	0.67	1.70	1.13
6번 소장	240.6	ng/μl	4.81	2.59	1.86	2.08
6번 맹장	520.6	ng/μl	10.41	5.08	2.05	2.04
6번 대장	141.8	ng/μl	2.84	1.58	1.80	1.46
7번 소장	1291.2	ng/μl	25.82	13.86	1.86	2.20
7번 맹장	181.4	ng/μl	3.63	2.08	1.75	1.27
7번 대장	128.4	ng/μl	2.57	1.57	1.64	1.09
8번 소장	228	ng/μl	4.56	2.43	1.87	2.06
8번 맹장	158.4	ng/μl	3.17	1.78	1.78	1.50
9번 소장	246.8	ng/μl	4.94	2.68	1.84	2.01
9번 맹장	117.1	ng/μl	2.34	1.32	1.77	1.39
9번 대장	163.6	ng/μl	3.27	1.73	1.89	1.62
10번 소장	507.7	ng/μl	10.15	5.43	1.87	2.08
10번 맹장	193.4	ng/μl	3.87	2.09	1.85	1.53
10번 대장	422.4	ng/μl	8.45	4.18	2.02	1.99

○ 한우의 소화기관 (Jejunum, cecum, and Colon) 샘플에서 추출된 박테리아 유전체를 대상으로 barcoded primers (8F & 338R)를 이용하여 PCR을 수행한 후 마크로젠 사이에 대용량염기서열 분석을 의뢰함 (그림 68).

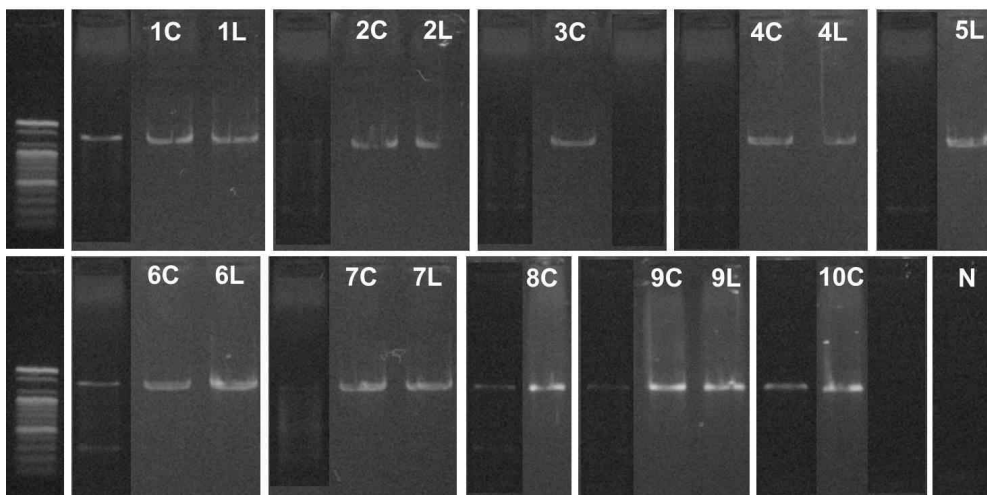


그림 68. 한우 소화기관 내 박테리아 유전체의 PCR 결과

마. 한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집 정보 획득

- 454 FLX titanium을 이용하여 상위 육질등급을 나타내는 거세 한우의 장내미생물 군집을 부위 (소장, 맹장, 대장) 별로 확인함. 분석 전반은 QIIME을 이용하였고 taxonomy classification의 경우 Mothur (Silva database)를 이용하여 분석한 결과 비교적 적은 inter-individual variation을 확인함 (그림 69).

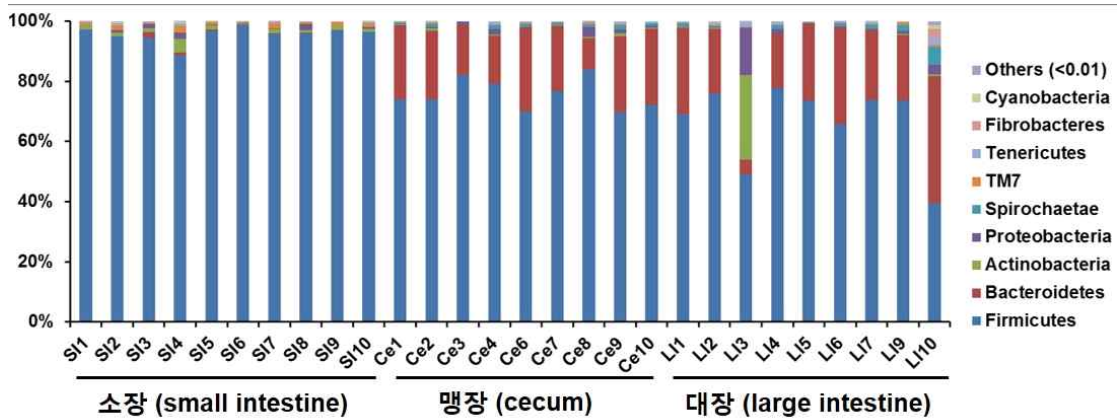


그림 69. 상위 육질등급 한우 소화기관 내 박테리아 군집

- LEfSe의 cladogram analysis를 통해 소장 샘플은 Firmicutes가 우점하며, 맹장 및 대장 샘플은 Firmicutes & Bacteroidetes가 우점함을 확인함. 3번 소의 경우 소장, 맹장, 대장 모두 다른 개체와 유사하지 않은 미생물 군집 특성을 나타냄 (그림 70).

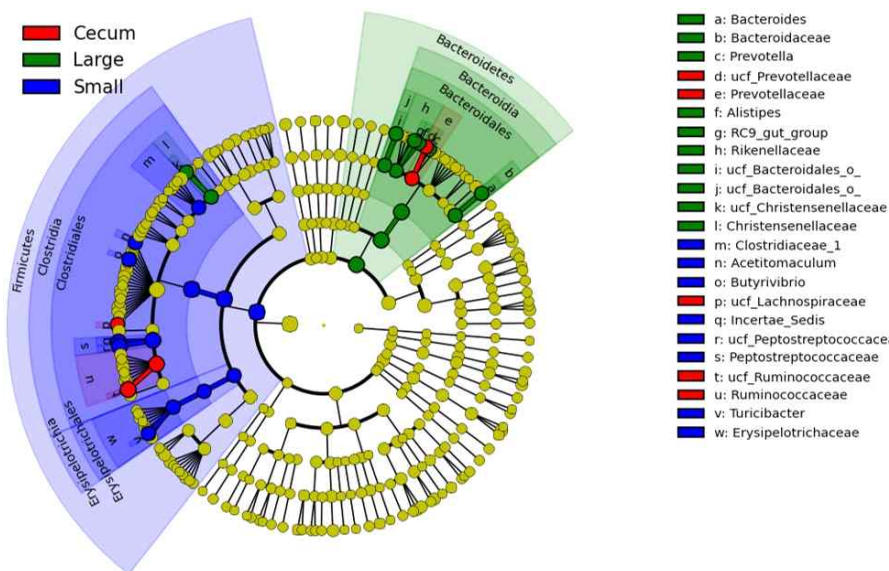


그림 70. 한우 소화기관 별 박테리아 군집 비교

- 상위 육질등급 한우의 장내 부위 별 미생물 군집을 clustering analysis (PCoA)를

통해 그룹화 할 경우 대장 및 맹장 샘플이 함께 그룹화 되며 경우 소장 샘플이 독립적으로 clustering 되는 경향성을 확인함 (그림 71).

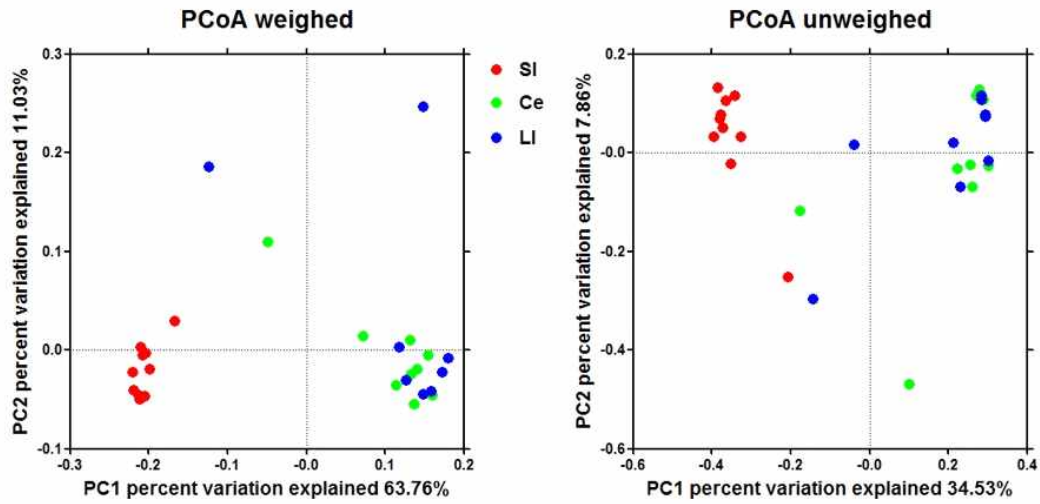


그림 71. 한우 소화기관 별 박테리아 군집의 clustering analysis

바. 한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집과 대사체 군집의 상관관계 비교

- 상위 육질등급 한우의 장 내용물에서 미생물에 의해 생산되는 대사체 군집 (제1세부 위탁, 건국대학교 이충환)을 확인한 결과 장내 미생물 군집에서 나타난 그룹화 패턴과 유사하게 소장 샘플을 제외한 대장 및 맹장 샘플에서 유래한 대사체의 clustering을 확인함 (그림 72).

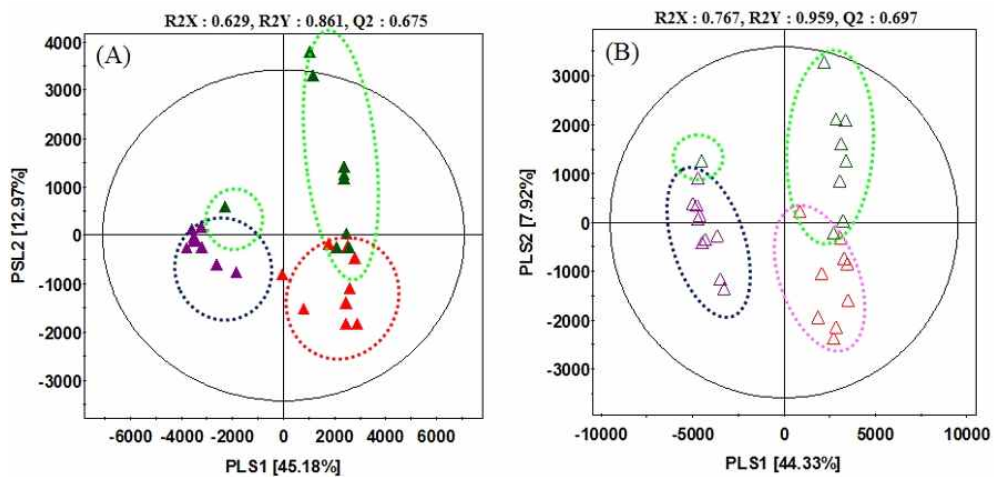


그림 72. 한우 소화기관 별 박테리아 군집의 cluster

- LEfSe의 plot analysis를 통해 한우 장내 부위 별 미생물 군집 distance를 결정 짓는 candidate taxa를 선정하여 metabolome profiling data와 correlation analysis

를 수행함. 소장 샘플의 경우 amino acid metabolism과 관련된 대사체가 우점하며, 맹장 및 대장 샘플의 경우 sugars & sugar alcohols 및 fatty acids 생산과 관련된 대사체 생산이 높음을 확인함 (그림 73).

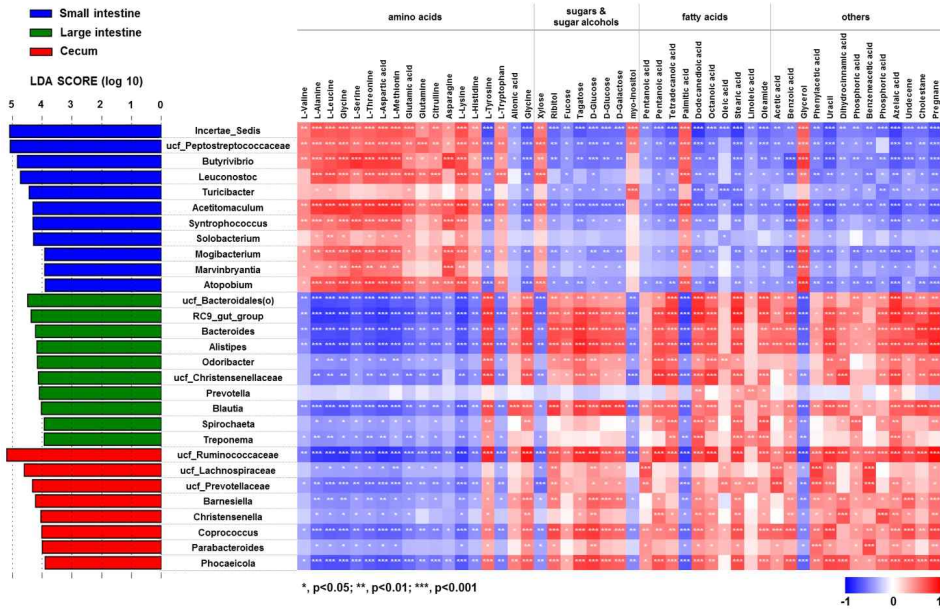


그림 73. 한우 소화기관 별 박테리아 군집

사. 거세에 의한 한우 및 젖소의 장내미생물 군집 변화 모니터링

- 반추동물의 호르몬 분비와 장내미생물 군집 조성 간 상관관계 조사를 위해 충남 아산시 음봉면에 위치한 한우 농장에서 평균 11.9개월령의 거세 숫소, 비거세 숫소 및 암소를 대상으로 분변 및 혈청 샘플링을 진행함. 혈중 옹성호르몬의 양은 거세 숫소, 비거세 숫소 및 암소에서 큰 차이를 나타내지 않았으며, 장내미생물 군집 역시 그룹 간 큰 차이를 나타내지 않음 (그림 74).

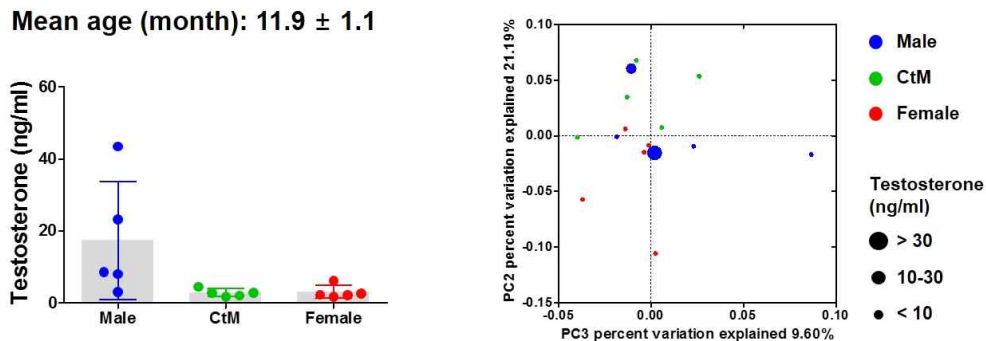


그림 74. 평균 11.9개월 한우의 혈중 옹성호르몬과 장내미생물 군집

- 반추동물의 호르몬 분비와 장내미생물 군집 조성 간 상관관계 조사를 위해 경북 의성

시 비암면에 위치한 한우 농장에서 평균 19.3개월령의 거세 숫소, 비거세 숫소 및 암소를 대상으로 분변 및 혈청 샘플링을 진행함. 비거세 수소의 혈중 옹성호르몬 양이 통계적으로 유의미한 수준에서 높게 관찰됨을 확인하였고, 비거세 수소의 장내미생물 군집이 다른 그룹과 비교하여 독립적으로 그룹화 됨을 확인함. 이는 거세에 의해 감소한 옹성호르몬에 의해 거세우의 장내미생물 군집이 암소의 장내미생물 군집과 유사해짐을 의미함 (그림 75).

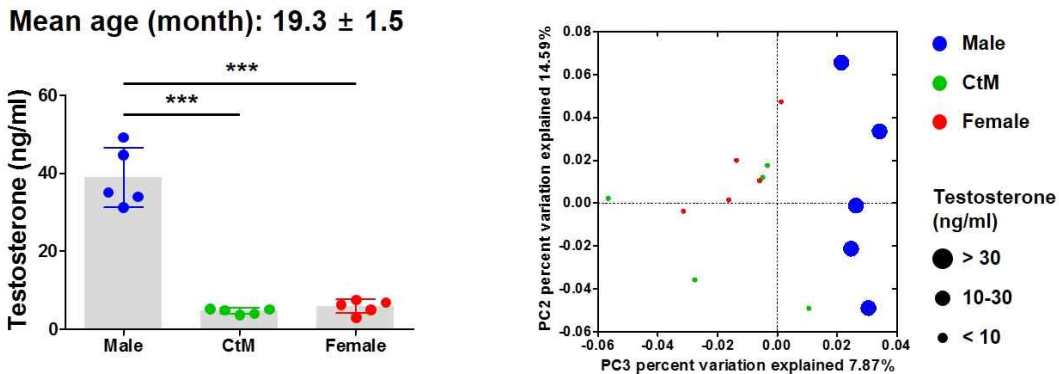


그림 75. 평균 19.3개월 한우의 혈중 옹성호르몬과 장내미생물 군집

- 혈중 에스트로겐 농도의 경우 평균 11.9개월령의 한우에서 그룹 간 차이를 나타내지 않았으며, 장내미생물 군집과의 상관관계를 나타내지 않음 (그림 76).

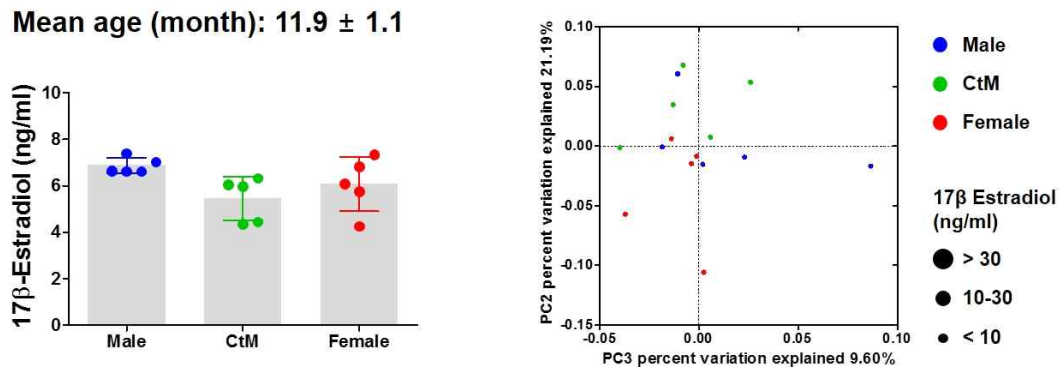


그림 76. 평균 11.9개월 한우의 혈중 에스트로겐과 장내미생물 군집

- 평균 19.3개월령의 한우에서 혈중 에스트로겐의 양은 그룹 간 차이를 나타내지 않았으며, 장내미생물 군집과의 상관관계를 나타내지 않음 (그림 77). 종합적으로 거세우, 비거세우 및 암소의 장내미생물 군집은 에스트로겐이 아닌 옹성호르몬 (테스토스테론)의 양에 의해 군집 특성이 결정됨을 의미함.

Mean age (month): 19.3 ± 1.5

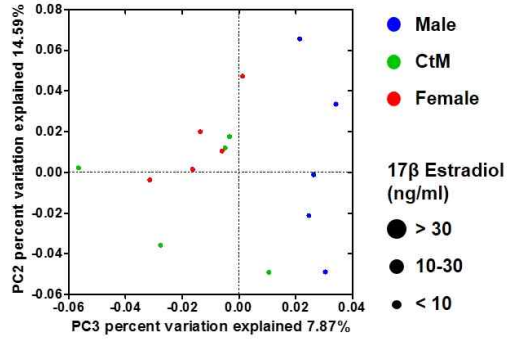
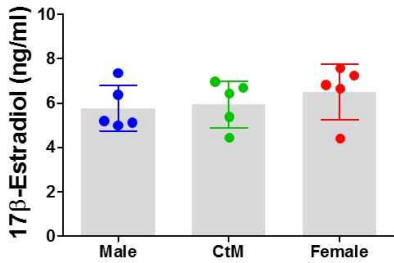


그림 77. 평균 19.3개월 한우의 혈중 에스트로겐과 장내미생물 군집

- 한우의 거세에 의한 장내미생물 군집 변화가 다른 축종 (예: 젃소)에서 관찰되는지 확인하기 위해 충남 둔포 및 아산시 신암면에 위치한 젃소 농장에서 거세, 비거세 젃소 및 암소의 혈액 및 분변 시료를 채집함. 한우의 장내미생물 군집 특성과 유사하게 거세 젃소의 장내미생물 군집 특성이 암소와 매우 유사함을 확인함 (그림 78). 이는 축종과 관계없이 거세에 의해 옹성호르몬이 감소할 경우 장내미생물 군집이 큰 영향을 받을 수 있음을 알 수 있는 연구 결과임.

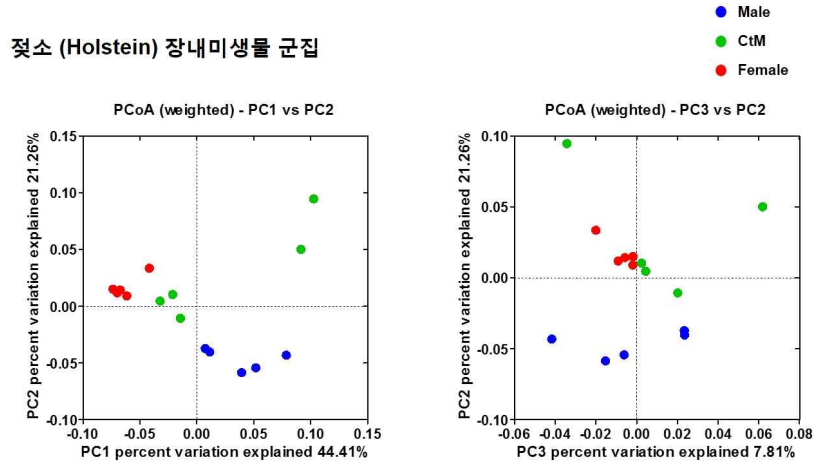


그림 78. 거세에 의한 젃소의 장내미생물 군집 변화

- 그룹 간 유의미한 옹성호르몬의 차이를 나타냈던 평균 19.3개월 령의 한우를 대상으로 거세에 의해 증가/감소하는 장내 박테리아 군집을 상세히 규명함. 옹성호르몬 레벨이 높은 비거세 한우의 경우 phylum Bacteroidetes, order Rickettsiales 및 genus Dorea의 relative abundance가 유의적으로 높음을 확인함. 반면에 옹성호르몬 레벨이 낮은 거세 한우의 경우 genus Cellulosilyticum, class Actinobacteria 및 family Clostridiaceae의 relative abundance가 유의적으로 낮음을 확인함 (그림 79).

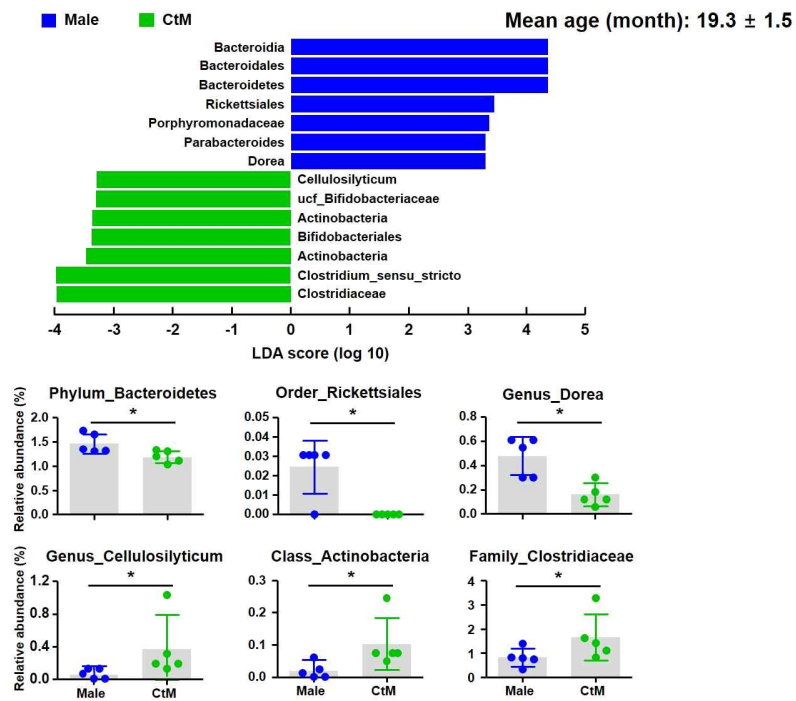


그림 79. 거세에 의해 증가/감소를 나타내는 한우의 장내미생물

- 거세 한우의 성장 시기 별 장내미생물 군집 특성을 관찰한 결과 phylum 단위에서 큰 차이가 관찰되지 않지만 family level에서 성장 시기 별 상당한 차이를 나타냄을 확인함 (그림 80).

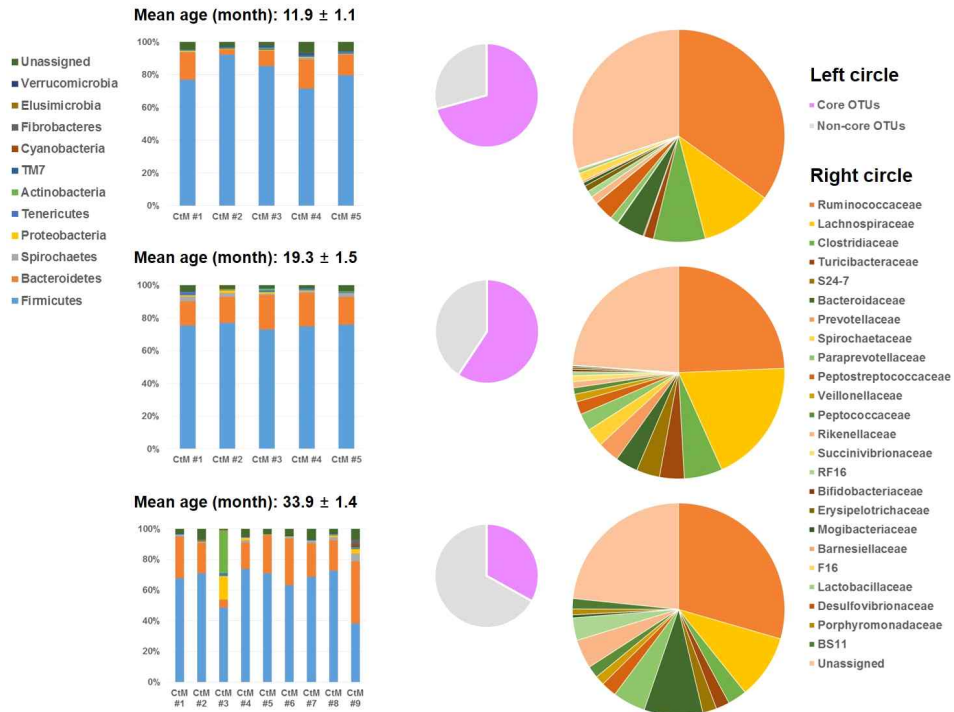


그림 80. 거세에 의해 증가/감소를 나타내는 장내미생물

아. 한우 거세에 의한 장내미생물 군집과 혈중, 분변, 근육 내 대사체 군집의 상관관계 분석

○ Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS)를 이용하여 사춘기 이후 (postpubescent) 한우의 혈중 메타볼롬 프로파일을 확인함. 거세 한우와 암소의 혈중 메타볼롬 군집이 상대적으로 유사함을 제시하였으며 (그림 1a), 거세 한우와 비거세 한우의 혈중 메타볼롬 프로파일 비교 시 거세 한우에서 상대적으로 높은 아미노산 (예: isoleucine, ornithine and proline)이 관찰됨 (그림 81b).

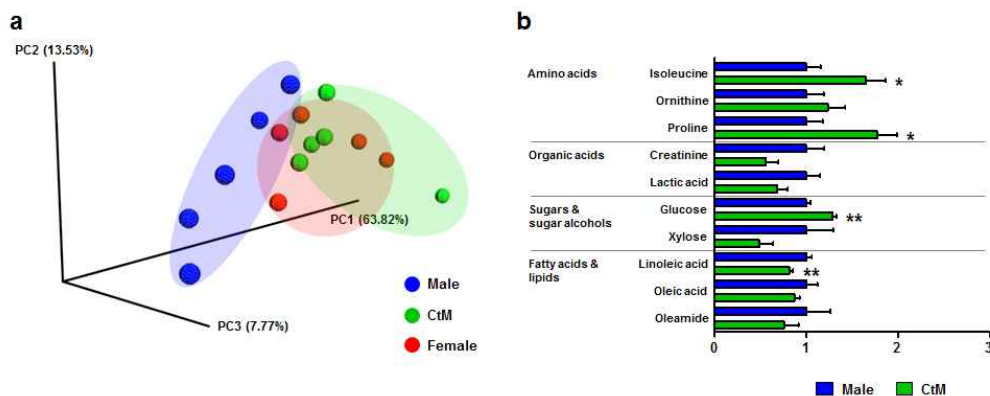


그림 81. 평균 19.3개월 한우의 혈중 대사체 군집 비교

○ Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS)를 이

용하여 사춘기 이후 (postpubescent) 젖소의 혈중 메타볼롬 프로파일을 확인함. 거세 젖소와 암소의 혈중 메타볼롬 군집이 상대적으로 유사함을 제시하였으며 (그림 2a), 거세 젖소와 비거세 젖소의 혈중 메타볼롬 프로파일 비교 시 거세 젖소에서 상대적으로 높은 아미노산 (예: isoleucine, valine, ornithine, phenylalanine and threonine)이 관찰됨 (그림 82b).

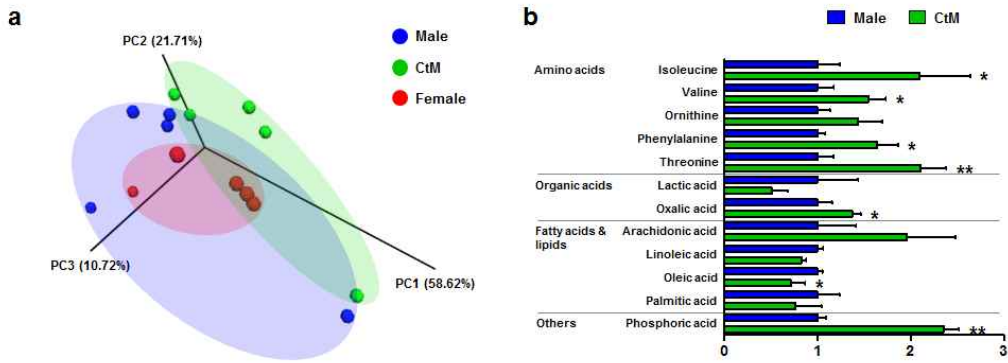


그림 82. 평균 12.1개월 젖소의 혈중 대사체 군집 비교

- 거세 한우와 거세 젖소의 혈중 메타볼롬 프로파일 결과에서 제시된 높은 수준의 isoleucine, leucine and valine은 branched chain amino acids (BCAAs) 그룹에 속하는 아미노산임. 이에 Branched Chain Amino Acid assay kit (Sigma)을 이용하여 사춘기 이전 (juvenile) 한우와 사춘기 이후 (postpubescent) 한우의 혈중 BCAAs를 정량함. 사춘기 이전 거세 한우와 비거세 한우의 혈중 BCAAs 수준은 유의적 차이를 나타내지 않지만 사춘기 이후 거세 한우와 비거세 한우의 혈중 BCAAs 수준에서 유의미한 차이를 관찰함 (그림 83).

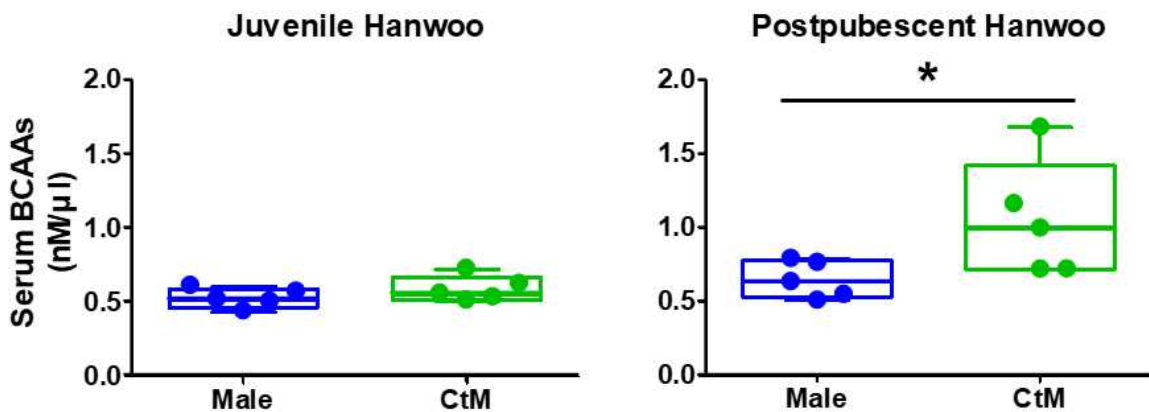


그림 83. 거세에 의한 한우 혈중 BCAAs 정량 비교

- Branched Chain Amino Acid assay kit (Sigma)을 이용하여 사춘기 이후 (postpubescent) 젖소의 혈중 BCAAs를 정량함. 사춘기 이후 거세 젖소의 혈중 BCAAs 레벨이 비거세 젖소와 비교하여 높음을 확인하였지만 통계적 유의성은 관찰 되지 않음 (그림 84).

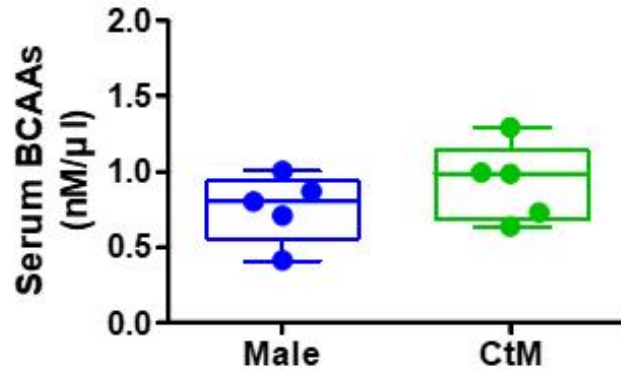


그림 84. 거세에 의한 젖소 혈중 BCAAs 정량 비교

- Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS)를 이용하여 사춘기 이후 (postpubescent) 한우 (그림 85a and b)와 젖소 (그림 85c and d)의 분변 메타볼롬 프로파일을 확인함.

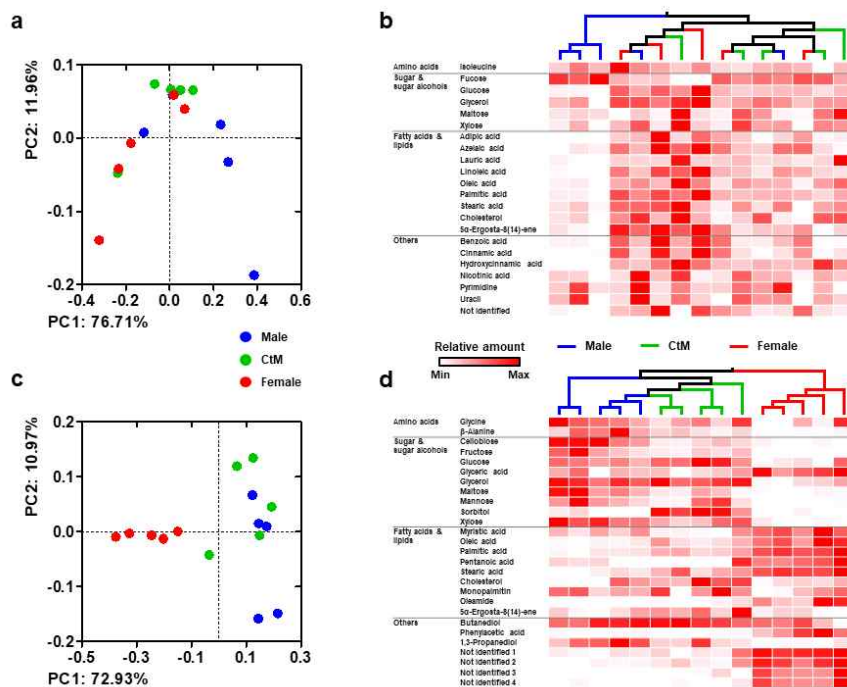


그림 85. 사춘기 이후 한우와 젖소의 분변 메타볼롬 군집 비교

- 성체 거세 한우의 장내 부위 별 장내미생물 군집 및 장내 메타볼롬 군집을 확인함.

소장 내 미생물 군집은 맹장 및 대장과 비교하여 독립적인 클러스터를 이루고 있음을 확인함 (그림 86a and b). 소장 내 메타볼롬 군집 역시 미생물 군집과 유사하게 맹장 및 대장과 비교하여 독립적인 클러스터를 이루며, 아미노산 대사작용과 관련된 메타볼롬이 우점하고 있음을 확인함 (그림 86c and d).

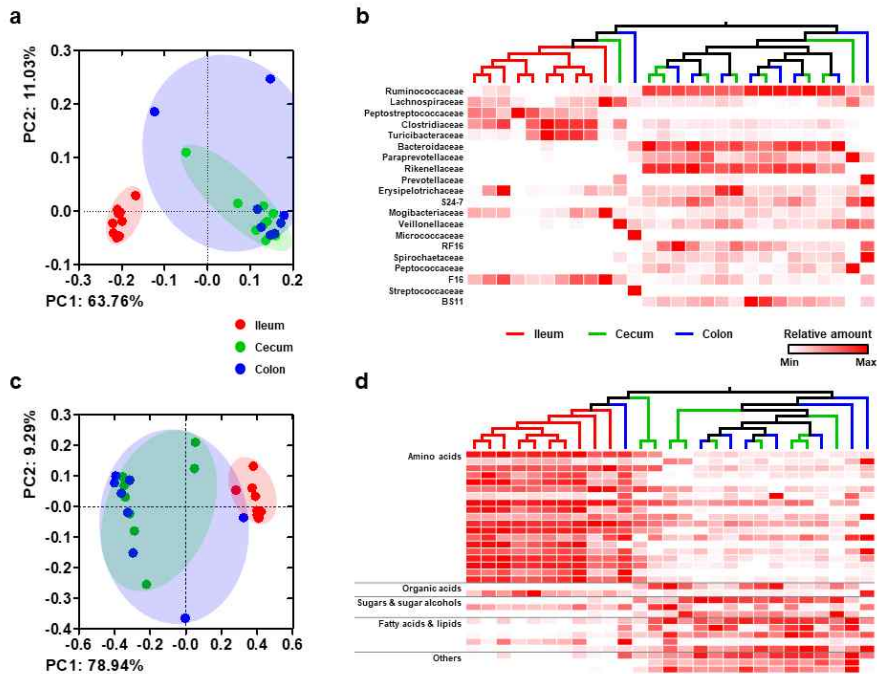


그림 86. 성체 거세 한우의 장내 부위 별 미생물 및 메타볼롬 군집 비교

- 성체 거세 및 비거세 한우의 지육에서 유래한 채끝 등심을 서울 마장동과 동대문구 내에 위치한 한살림 매장에서 구매하여 근육 내 지방 저장량을 비교함. 거세 한우에서 유래한 채끝 등심에서 비거세 한우와 비교하여 통계적 유의미성을 나타내는 수준에서 증가된 지방 저장량을 확인함 (그림 87).

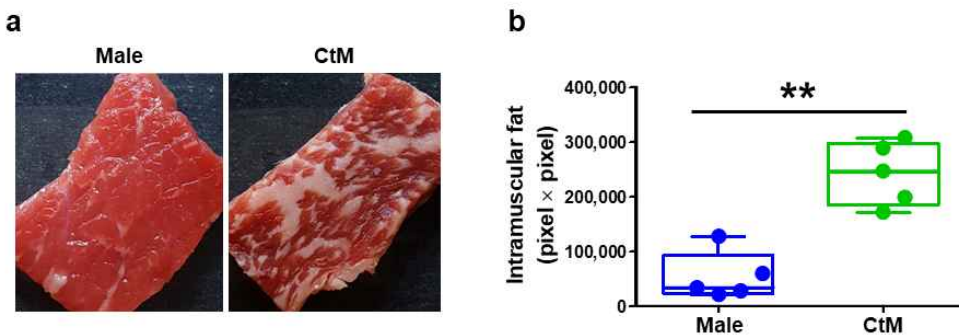


그림 87. 거세 및 비거세 한우의 근육 내 지방 저장량 비교

- 성체 거세 및 비거세 한우의 지육에서 유래한 채끝 등심을 서울 마장동과 동대문구 내에 위치한 한살림 매장에서 구매하여 근육 내 메타볼롬 군집을 비교함. 거세 한우에서 유래한 채끝 등심에서 비거세 한우와 비교하여 통계적 유의미성을 나타내는 수준에서 증가된 BCAAs (isoleucine, leucine and valine) 및 기타 아미노산 (phenylalanine, tryptophan and tyrosine) 레벨을 확인함 (그림 88).

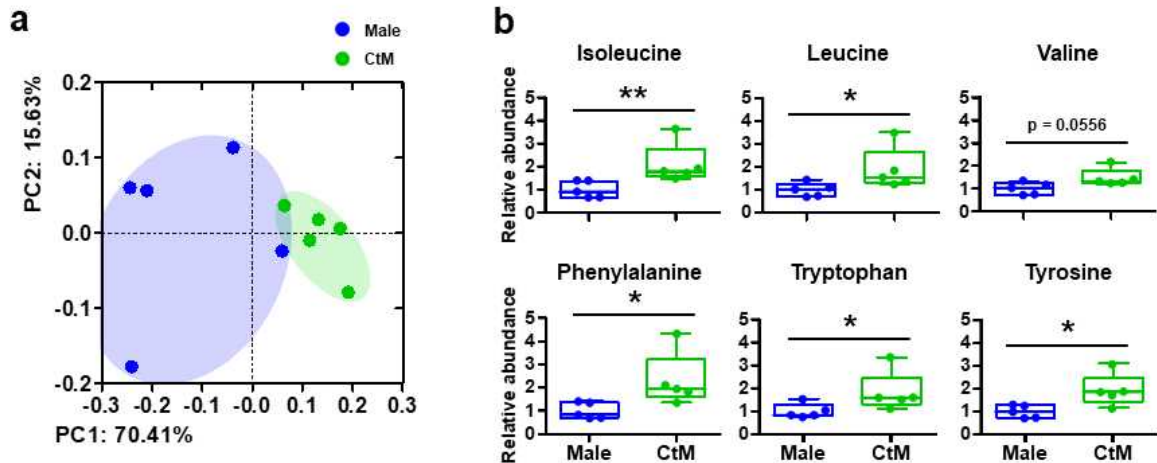


그림 88. 성체 거세 및 비거세 한우의 근육 내 메타볼롬 프로파일 비교

- 그림 8에서 관찰된 거세 한우의 채끝 등심 내 높은 수준의 아미노산 중 leucine, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine은 acetyl-CoA로 전환 가능한 ketogenic amino acids로 알려져 있음. 이에 gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS)를 이용하여 근육 내에서 ketone bodies를 측정함. 거세 한우의 채끝 등심에서 비거세 한우와 비교하여 통계적 유의성을 갖는 수준에서 높은 레벨의 ketone bodies (β -hydroxybutyrate)를 확인함 (그림 89).

β-hydroxybutyrate

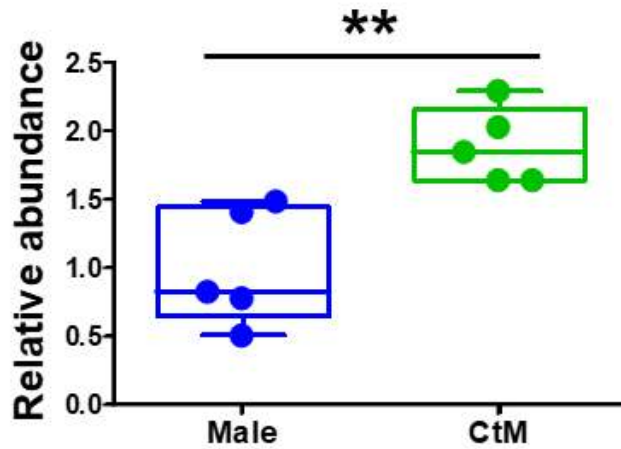


그림 89. 성체 거세 및 비거세 한우의 근육 내 ketone bodies 비교

- 한우와 젖소로 대표되는 경제 동물 모델에서 거세에 의한 장내미생물 군집 변화 및 분변, 혈중, 근육 내 대사체 변화가 숙주의 지방 저장량에 미치는 영향에 대한 모델을 제시함 (그림 90).

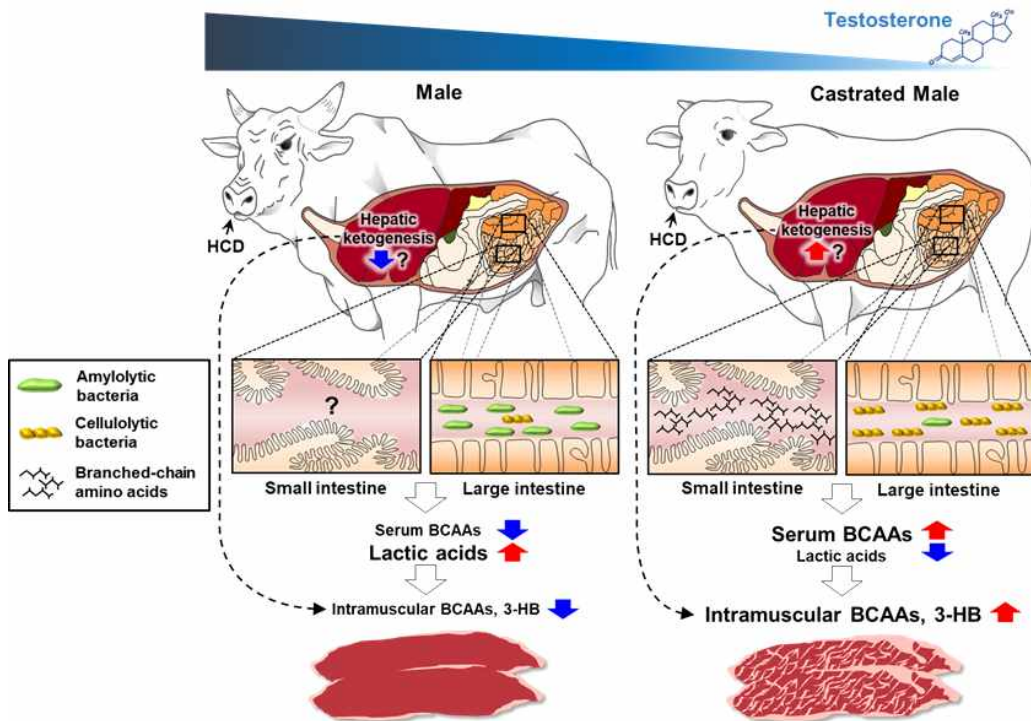


그림 90. 거세에 의한 한우의 장내미생물 변화 및 근육 내 지방 저장량 증가 모델링

자. 설사 송아지의 장내미생물 군집 및 장내 바이롬 분석

- 경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체를 선별하여 직장 내 분변 샘플을 확보함 (그림 91).



그림 91. 설사 증세 송아지와 건강한 송아지의 직장 내 분변 샘플 채집

- Illumina MiSeq을 이용하여 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 분변 샘플에서 미생물 군집을 시퀀싱하여 분석한 결과 설사 증세 송아지와 건강한 송아지의 장내미생물 군집이 그룹 별로 클러스터를 이루고 있음을 PCoA 분석법을 이용하여 확인함 (그림 92).

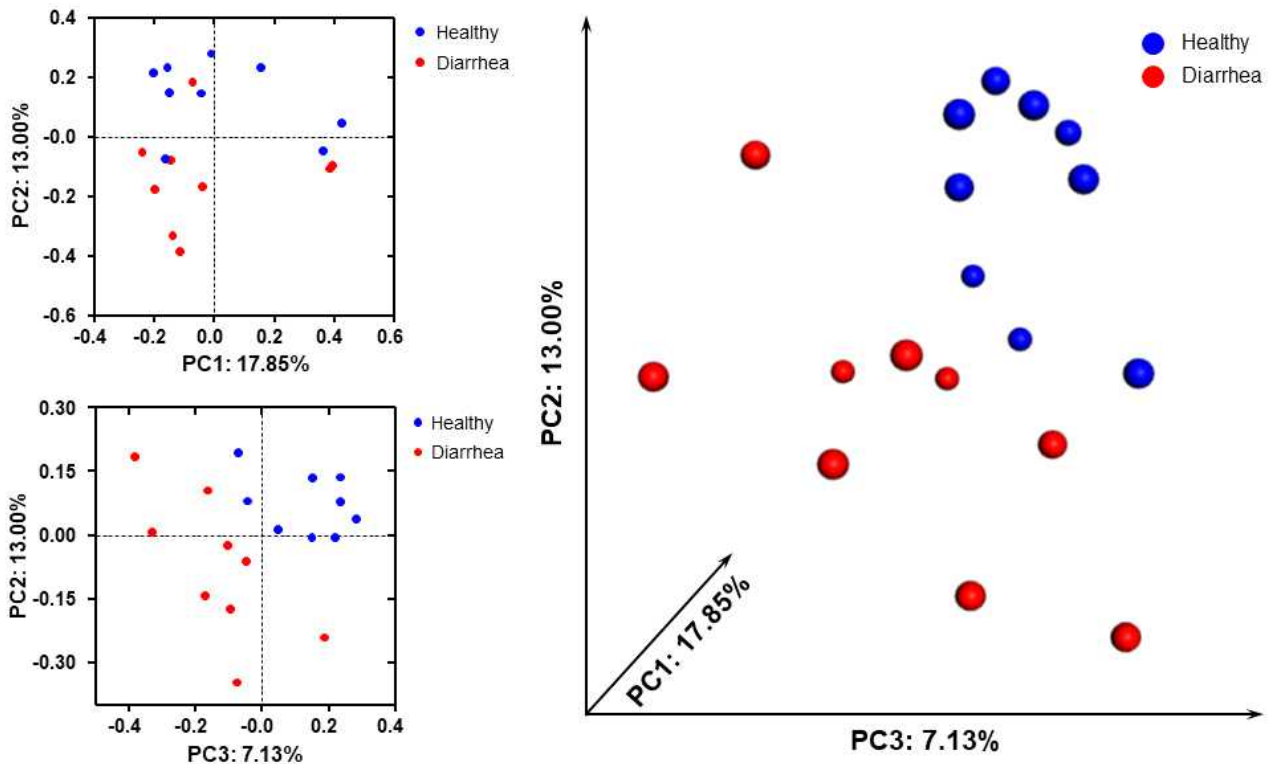


그림 92. 설사 증세 송아지와 건강한 송아지의 장내미생물 군집 비교

- 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집을 the

phylum level에서 확인함 (그림 93).

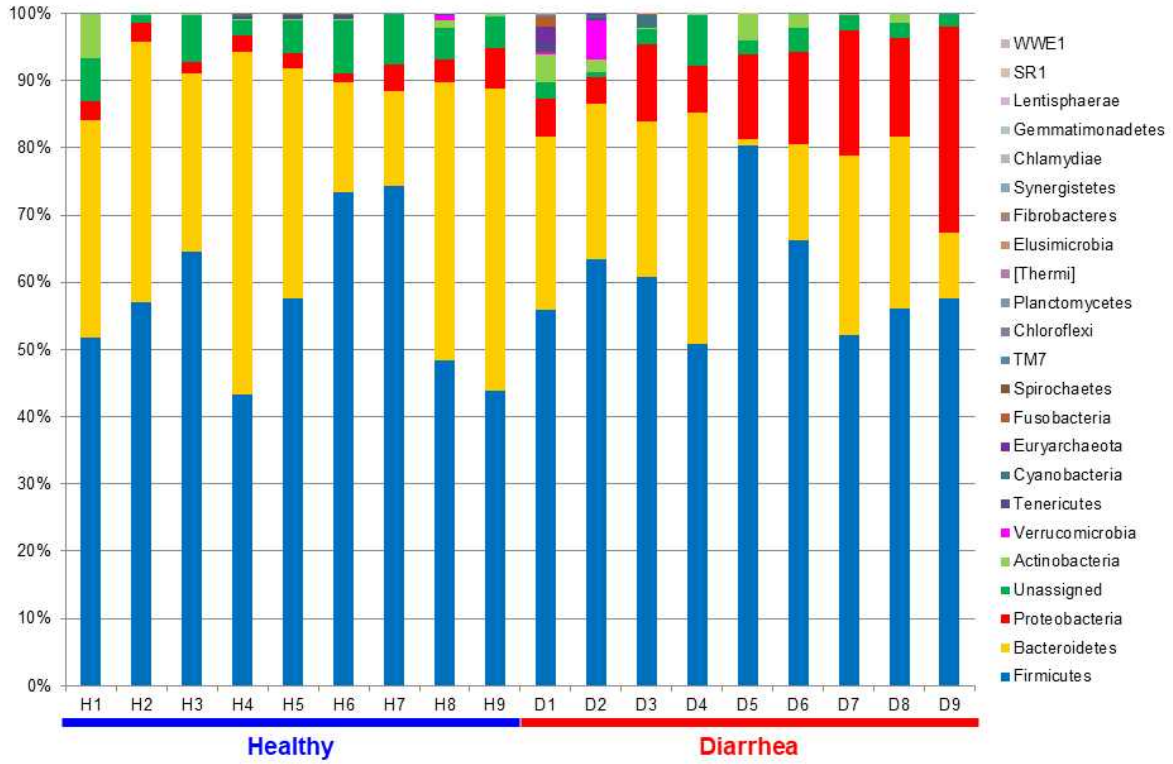


그림 93. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 비교 (the phylum level)

- 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집 중 통계적 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 나타내는 미생물을 the phylum level에서 확인함 (그림 94).

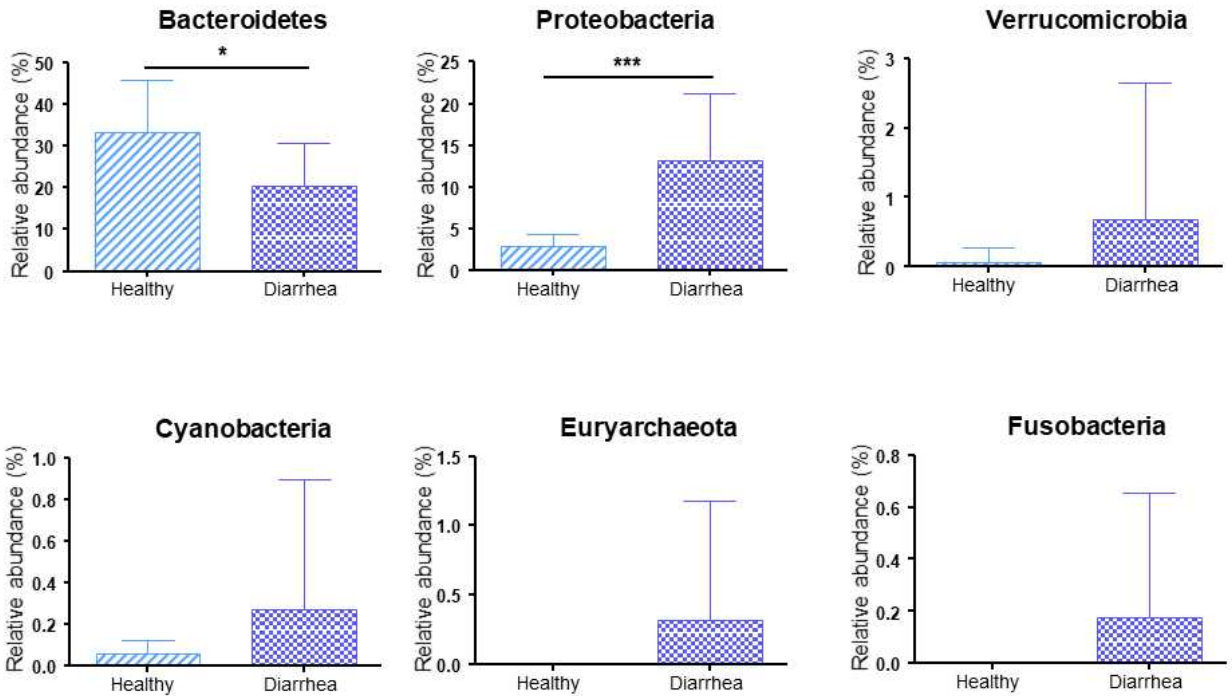


그림 94. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 양적 차이 비교 (the phylum level)

○ 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집을 the class level에서 확인함 (그림 95).

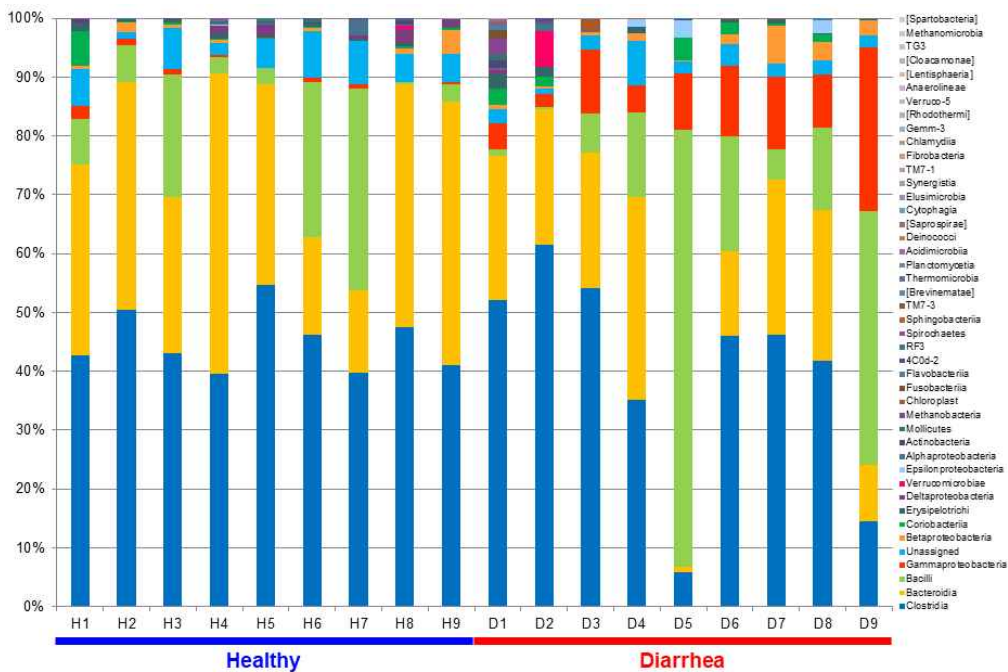


그림 95. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 비교 (the class level)

○ 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집을 the order level에서 확인함 (그림 96).

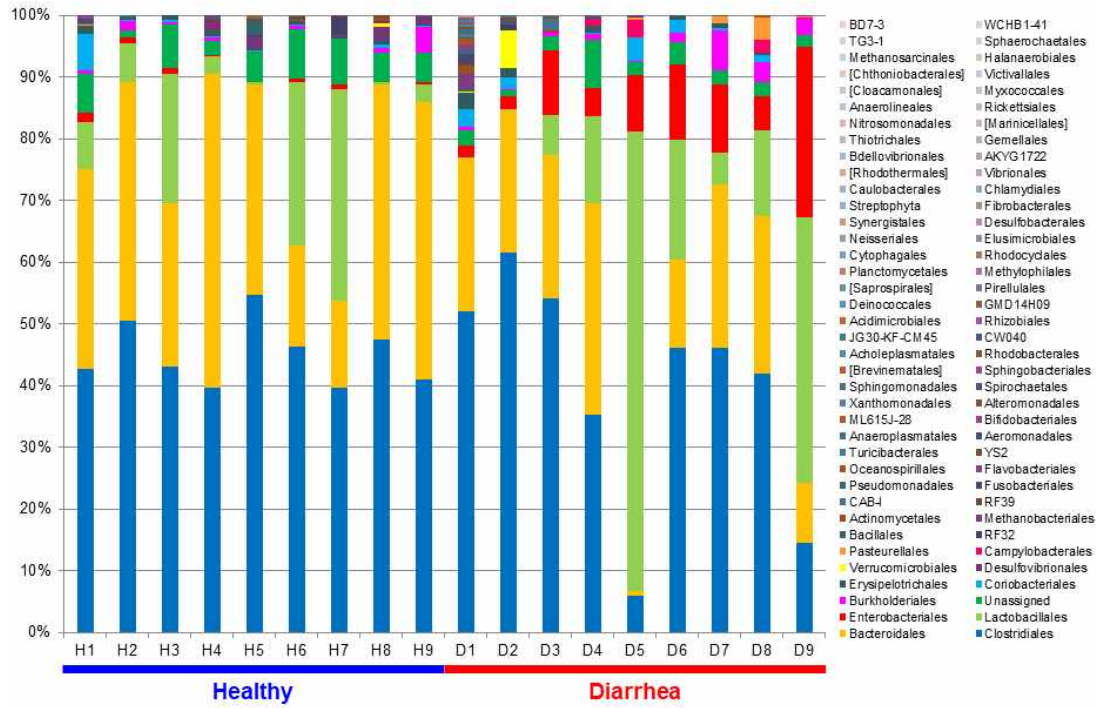


그림 96. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 비교 (the order level)

○ 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집을 the family level에서 확인함 (그림 97).

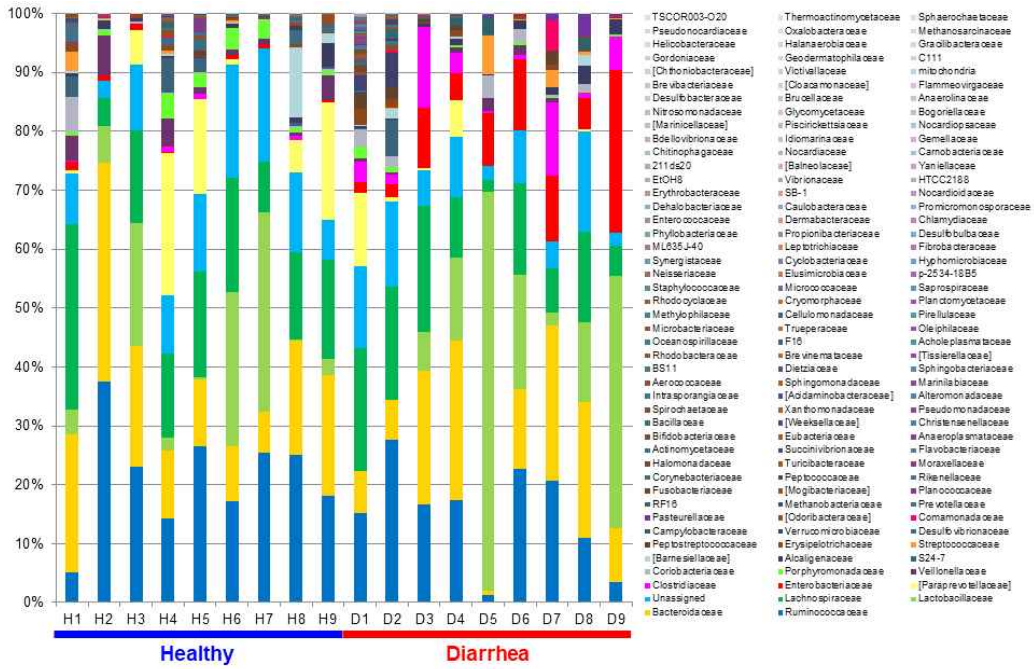


그림 97. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 비교 (the family level)

- 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집 중 통계적 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 나타내는 미생물을 the family level에서 확인함 (그림 98).

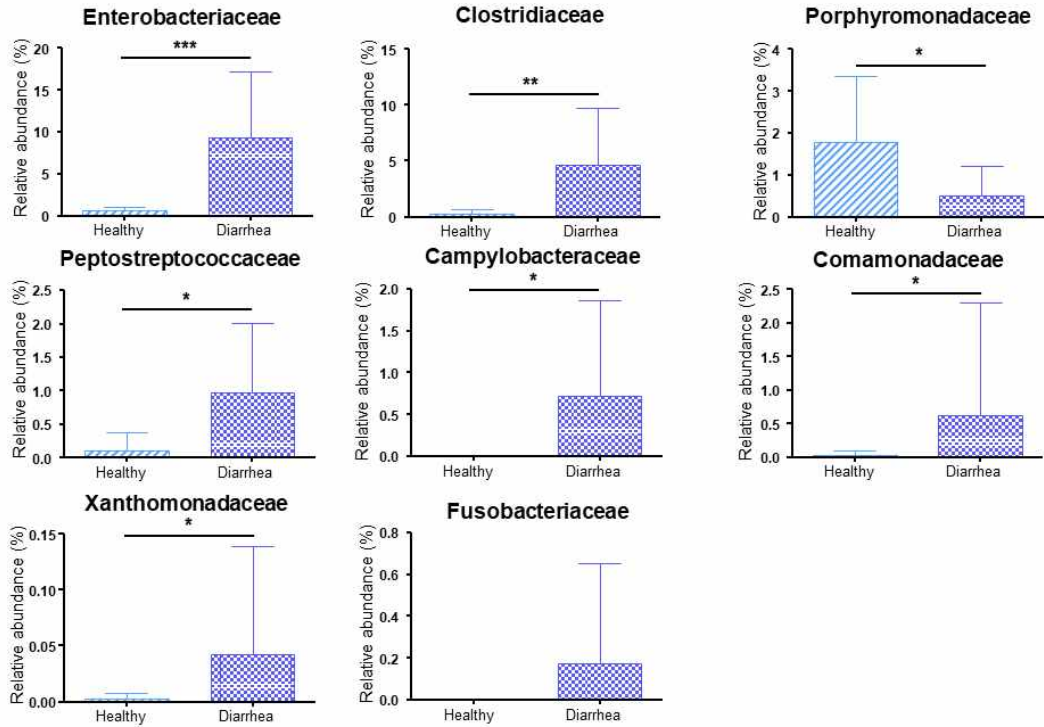


그림 98. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 양적 차이 비교 (the family level)

- 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 미생물 군집 중 통계적 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 나타내는 미생물 그룹을 linear discriminant analysis effect size (LEfSe) method를 이용하여 확인함 (그림 99).

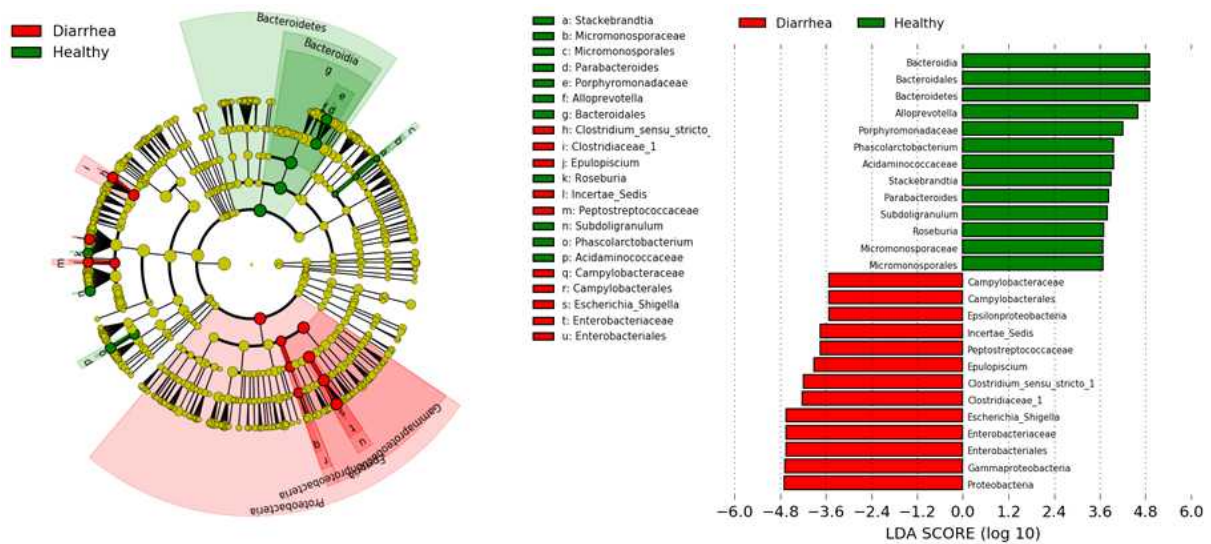


그림 99. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 LEfSe 분석

- 설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 분변 샘플을 대상으로

RNA를 추출하여 RNA-Seq을 수행함. 총 18 샘플을 대상으로 샘플 당 1G 내외의 총 51.2G의 메타전사체 시퀀스를 확보하였음 (표 21).

표 21. RNA-Seq을 이용한 설사 및 건강한 송아지의 분변 메타전사체 확보

Table 1. Raw data Stats (maximum 20 samples)

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
H1	6,263,266,685	44,632,754	51.850	48.15	97.676	94.015
H2	5,718,407,452	41,594,988	52.463	47.54	97.097	92.811
H3	6,869,072,161	49,490,752	52.525	47.48	97.300	93.142
H4	6,756,630,142	49,772,422	52.197	47.8	97.706	94.006
H5	6,810,466,459	48,330,550	52.426	47.57	97.552	93.666
H6	7,698,338,699	53,856,334	52.347	47.65	97.194	92.923
H7	5,966,141,298	42,683,558	51.929	48.07	97.245	93.067
H8	5,917,337,409	42,544,598	52.145	47.85	97.604	93.862
H9	5,567,770,752	39,492,508	51.590	48.41	97.760	94.161
D1	7,003,179,220	50,828,614	51.855	48.15	97.746	94.208
D2	8,090,448,440	57,597,110	52.372	47.63	97.435	93.488
D3	7,524,206,369	54,145,048	51.682	48.32	97.521	93.726
D4	6,699,815,341	47,156,860	52.094	47.91	96.792	92.226
D5	6,685,123,182	47,085,326	51.254	48.75	97.619	93.948
D6	6,652,595,550	48,329,740	53.435	46.56	97.493	93.664
D7	7,000,596,549	51,161,656	51.631	48.37	97.920	94.632
D8	6,789,801,809	49,222,550	51.544	48.46	97.889	94.521
D9	6,789,367,602	49,651,474	52.611	47.39	97.824	94.310

차. 설사 송아지 대상 건강한 송아지의 대변무리이식 연구

- 경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 송아지 대상 건강한 송아지 대변무리이식 (fecal microbiota transplantation, FMT) 기술을 위해 설사 증세를 나타내지 않는 건강한 대변 공여 (fecal donor) 송아지를 선별함 (그림 100).



그림 100. 설사 송아지 대변무리이식 시술을 위한 건강한 fecal donor 송아지 선별

- 대변무리이식 시술의 안전성을 테스트하기 위해 설사 증세를 나타내는 송아지와 건강한 송아지 총 7개체를 선별하여 대변무리이식 시술을 시행함 (그림 101).

Number	Sex	1st	2nd	Mother
002109573676	M	40ml	40ml	002081645547
002109573641	F	40ml	40ml	002086434236
002109573692	F	40ml	40ml	002308329495
002109573801	M			
002109171004	F	40ml	40ml	002308562308
002109573668	M	40ml	40ml	002092628607
002109573705	M	40ml	40ml	002300349933

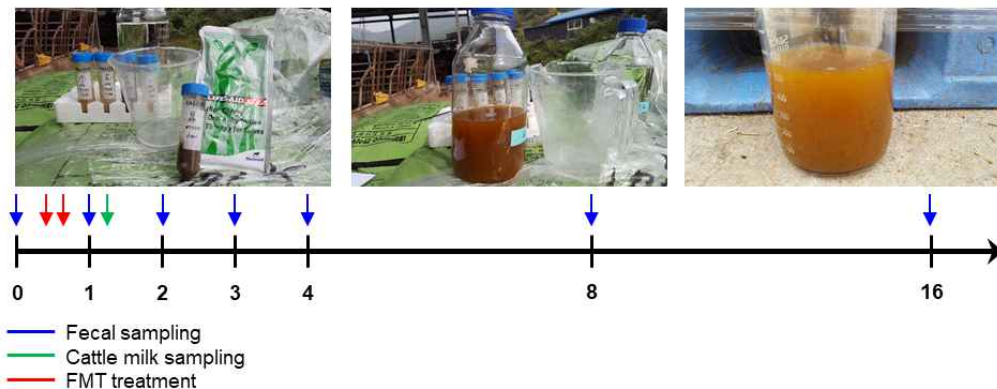


그림 101. 대변무리이식 시술 대상 송아지 정보 및 분변 샘플링 일정도

- 대변무리이식 시술은 대변 공여 송아지 분변을 전해질 용액에 현탁하여 총 2번에 걸쳐서 시행됨 (그림 102).

Total 83.74g	
Sodium citrate	4.681 % w/v
Sodium propionate	2.293 % w/v
Sodium acetate	3.917 % w/v
Sodium chloride	5.589 % w/v
Potassium chloride	3.559 % w/v
Glucose	75.237 % w/v
Sunset yellow	0.1 % w/v
Silicon dioxide	3.0 % w/v
Potassium dihydrogen orthophosphate	1.624 % w/v

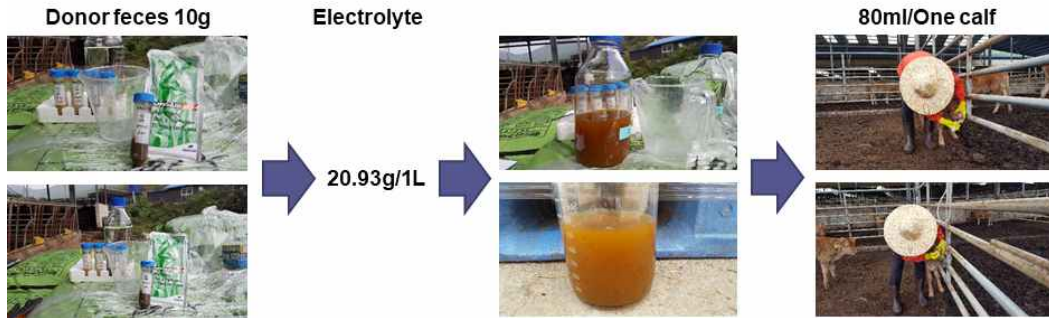


그림 102. 대변무리이식 시술 방법

- 대변무리이식 시술 이후 recipient 송아지의 분변을 채집하여 시간의 경과에 따른 분변의 상태를 모니터링 함. 대변무리이식 시술 전과 비교하여 대변무리이식 시술 16 일차 경과 시점에서 분변의 상태가 호전됨을 fecal consistency score를 통해 확인 함 (그림 103).

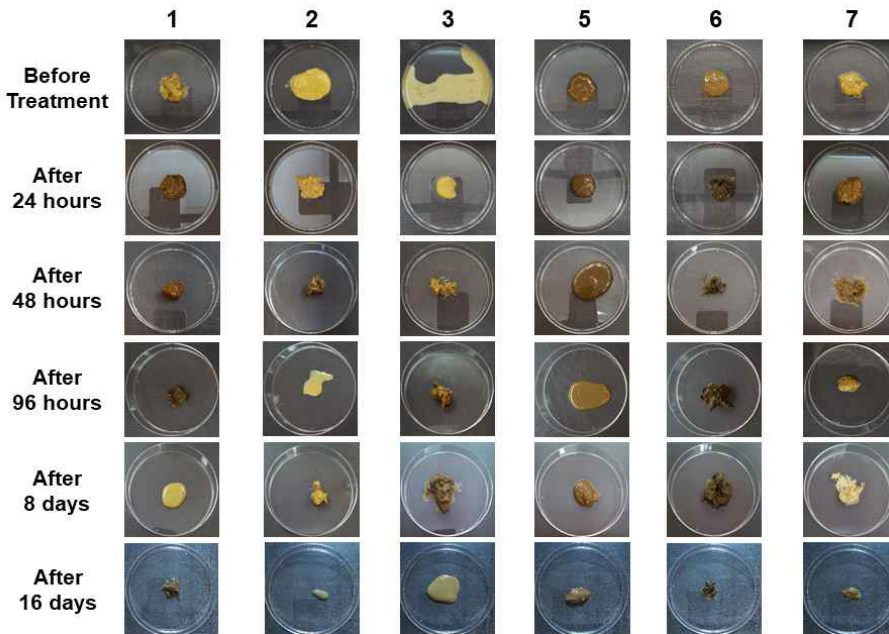


그림 103. 대변 이식 송아지의 분변 상태 모니터링

- Illumina MiSeq을 이용하여 대변 공여 송아지와 대변 이식 송아지의 분변을 대상으

로 장내미생물 군집 시퀀싱을 수행함. 대변 이식 송아지의 경우 대변무리이식 시술 이후 시간이 경과함에 따라서 대변 공여 송아지의 장내미생물과 유사한 장내미생물 군집 구조를 형성해 가는 과정을 확인함 (그림 104).

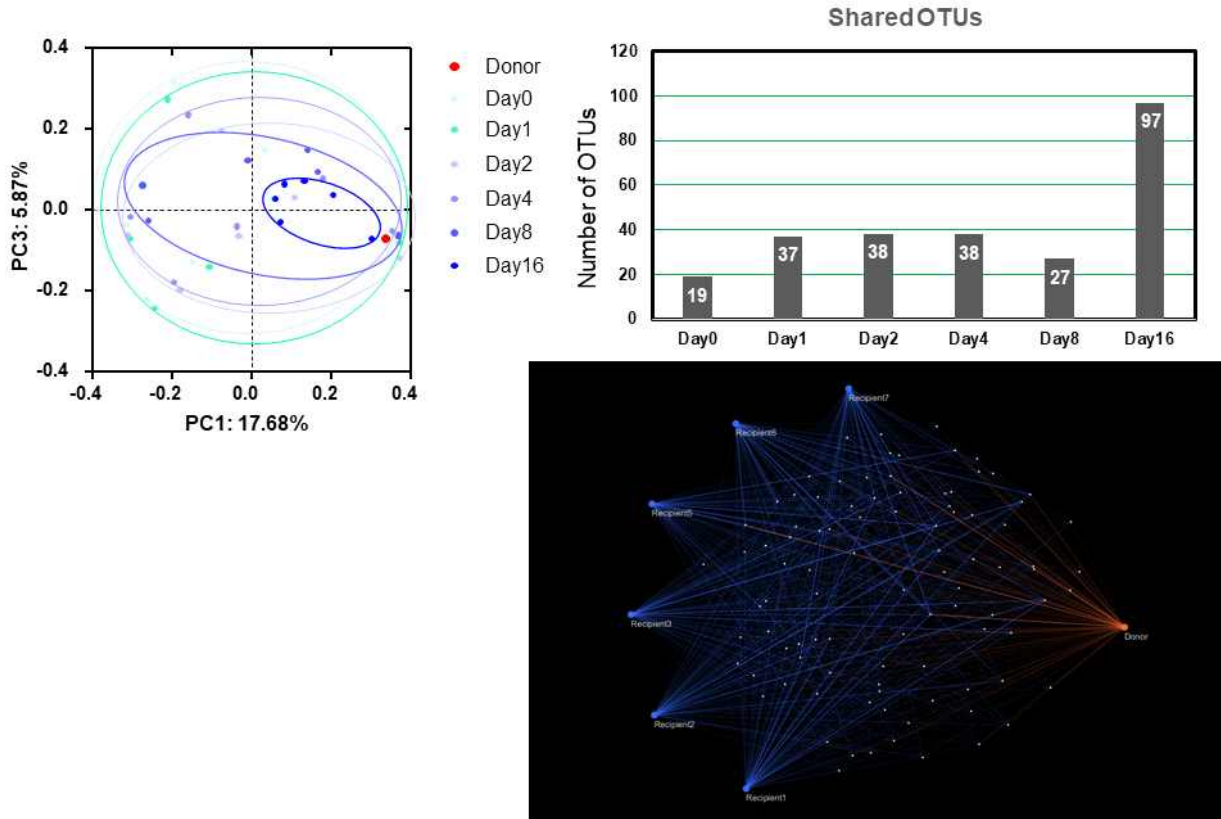


그림 104. 대변 공여 및 대변 이식 송아지의 장내미생물 군집 모니터링

- 2017년 6월 현재 경상북도 의성군 비안면 초원목장에서 대변 이식 송아지 20개체, 전해질 대조군 20개체 및 항생제 치료 대조군 20개체를 대상으로 확장 연구를 수행 중임.

카. 연구개발 성과

- 본 연구팀은 선행연구에서 반추동물을 포함하는 포유동물에서 공통적으로 장내미생물 군집 중 기회병원성 공생미생물 군집 (pathobiont)에 속하는 Proteobacteria 군집의 양적 변화와 숙주의 건강 상태 간 형성되는 밀접한 연관성을 규명하였으며, 숙주의 장내미생물 군집 형성에 영향을 미치는 다양한 환경적 요인들을 제시함 (Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota (2015), Trends Biotechnol) (Impact factor (2016) =11.126). 본 연구 결과는 보다 저렴한 사양비용으로 단기간 동안 건강하게 살찌우는 고품질 경제동물 생산에 기여할 수 있으며, 현대사회에서 급격히 변화된 식습관에 의해 증가하는 다양한 질병(비만, 당뇨, 염증성 장 질환)의 치료를

위한 장내미생물 군집 조절 연구를 통해 개인 맞춤형 미생물제제 개발의 기초 데이터로 활용될 수 있음 (그림 105).



	Relative abundance (%)					
	Soil	Plant leaf	Air	Ocean	Freshwater	Human gut
■ <i>Proteobacteria</i>	36.5	62.0	77.9	57.9	61.3	4.5
■ <i>Bacteroidetes</i>	11.2	7.0	3.9	32.8	10.8	65.4
■ <i>Firmicutes</i>	2.9	7.0	4.8	0.0	0.0	24.4
■ <i>Actinobacteria</i>	13.0	0.0	4.6	2.6	15.8	2.2
■ <i>Acidobacteria</i>	30.9	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0
■ <i>Cyanobacteria</i>	0.0	0.0	0.0	4.5	1.3	0.0
■ <i>Verrucomicrobia</i>	0.0	0.0	0.0	1.4	1.5	0.7
■ Others	5.5	4.0	8.9	0.7	9.5	2.8

그림 105. 다양한 환경에서의 Proteobacteria abundance (출처: Shin NR, Whon TW & Bae JW (2015), Trends Biotechnol, Impact factor (2016) =11.126)

- 나아가 본 연구 결과는 설사 송아지 장내미생물 군집 불균형의 원인으로 주목되는 Proteobacteria의 지속적인 양적 증가 (prolonged expansion of the phylum Proteobacteria)를 유발하는 요인을 평가할 수 있는 기초 데이터를 제공할 것이며, 장내미생물 군집 불균형 이후 나타날 수 있는 숙주의 장관계, 면역계 및 대사성 질병 예측 모델로 활용될 수 있음 (그림 106).

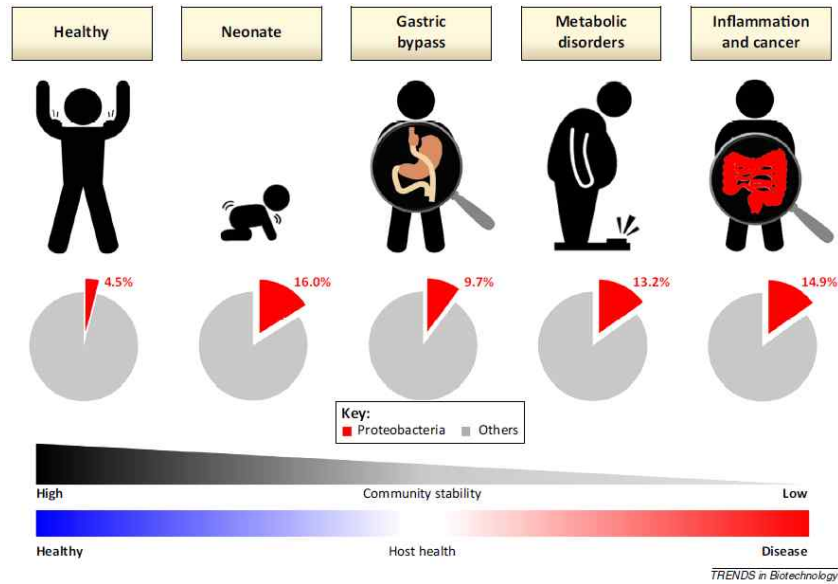


그림 106. host 상태에 따른 장내 proteobacteria의 상대적 비율 (출처: Shin NR, Whon TW & Bae JW (2015), Trends Biotechnol, Impact factor (2016) =11.126)

- 본 연구팀은 선행연구에서 포유동물의 메타유전체를 활용하여 환경에 존재하는 용원성 바이러스 (lytic viruses) 군집을 탐색할 수 있는 새로운 방법을 제시하였으며, 이를 활용하여 장내 바이러스의 유래를 밝히고, 바이러스-세균의 생태학적, 진화론적 관계를 규명함 (Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota (2016), ISME J) (Impact factor (2016) =9.664; Ecology 분야 상위 1.96%, Microbiology 분야 상위 5.6%) (그림 107).

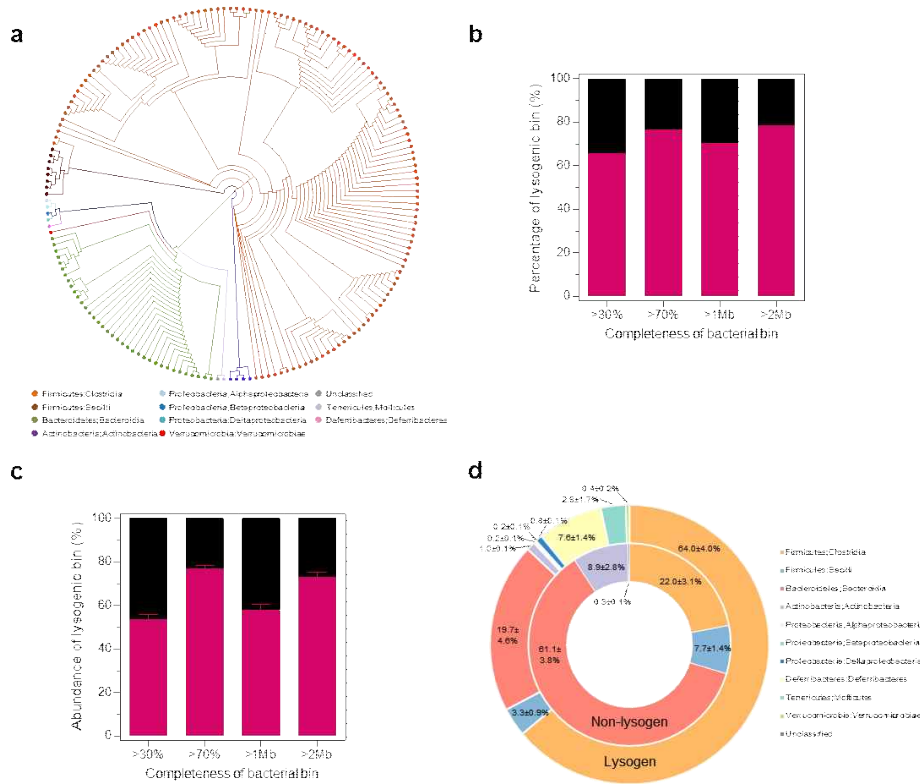


그림 107. 장내 미생물 내 용원성 세균 비율과 분포 (출처: Kim MS & Bae JW (2018), ISME J, Impact factor (2016) =9.664)

- 이와 같은 연구 결과는 경제동물의 장내 바이러스 군집 분석 및 탐색에 활용될 수 있으며, 다양한 질병(비만, 당뇨, 염증성 장 질환)의 치료를 위한 장내 바이러스 군집 조절 연구를 통해 바이러스를 통한 미생물제제 개발의 기초 연구로 활용이 가능함 (그림 107). 또한, 설사 송아지의 장내 바이러스 군집 중 Proteobacteria를 숙주로 하는 박테리오파지 (bacteriophage) 군집 특성을 규명하여 바이러스에 의해 옮겨질 수 있는 유전자 수평이동 (horizontal gene transfer, HGT) 중 항생제 내성 유전자 (antibiotics resistance genes) 및 숙주 면역 저항성 유전자 (host immune resistance genes)의 특성을 이해하는데 도움을 줄 것임.

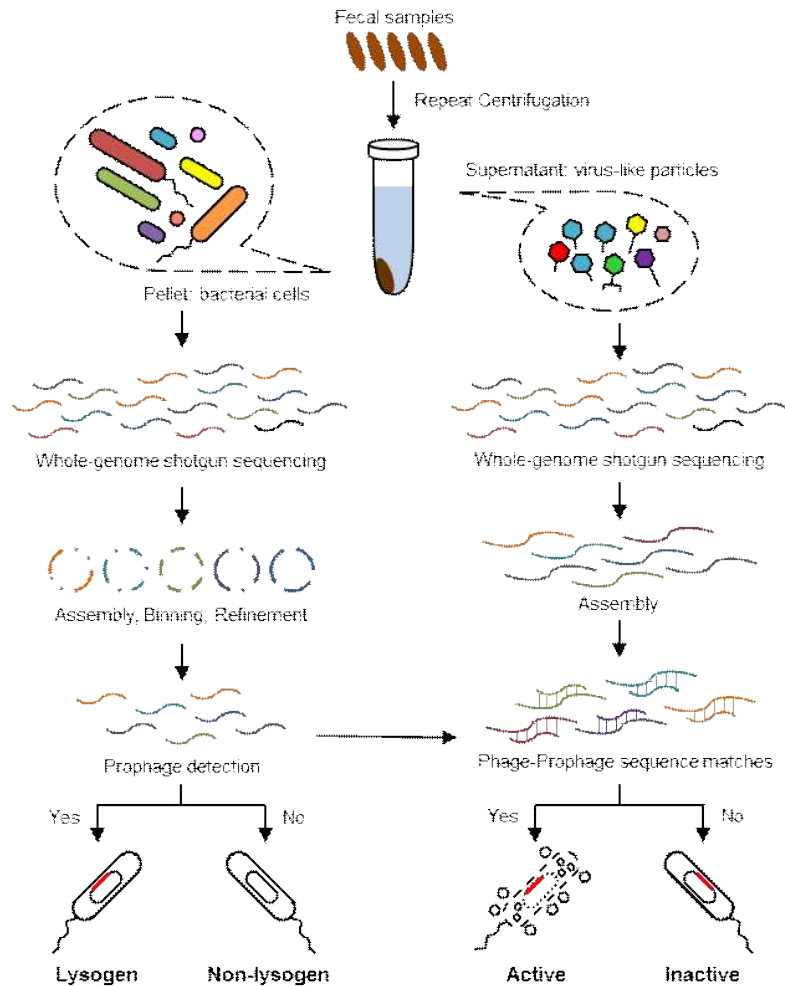


그림 107. 메타유전체를 활용한 용원성 세균 판별법 (출처: Kim MS & Bae JW (2018), ISME J, Impact factor (2016) =9.664)

- 본 연구팀은 선행연구에서 다양한 오믹스 기술을 활용하여 거세 및 비거세 한우의 장내 미생물/대사체 군집, 근육 및 혈중 대사체 군집 특성을 규명함 (그림 108). 수소의 거세에 의해 확연히 구분되는 장내미생물 군집 특성을 확인하였으며, 특히 거세우의 소장 및 근육 내 아미노산 대사체 (예: branched chain amino acids)의 비율이 유의적으로 증가하여 근육 내 지방 저장량이 증가하는 현상을 제시함. 육우 산업에서 수소의 거세는 전 세계적으로 빈번한데 거세를 통한 고급육 생산 과정에서 장내미생물의 역할을 세계 최초로 규명한 연구 결과임.

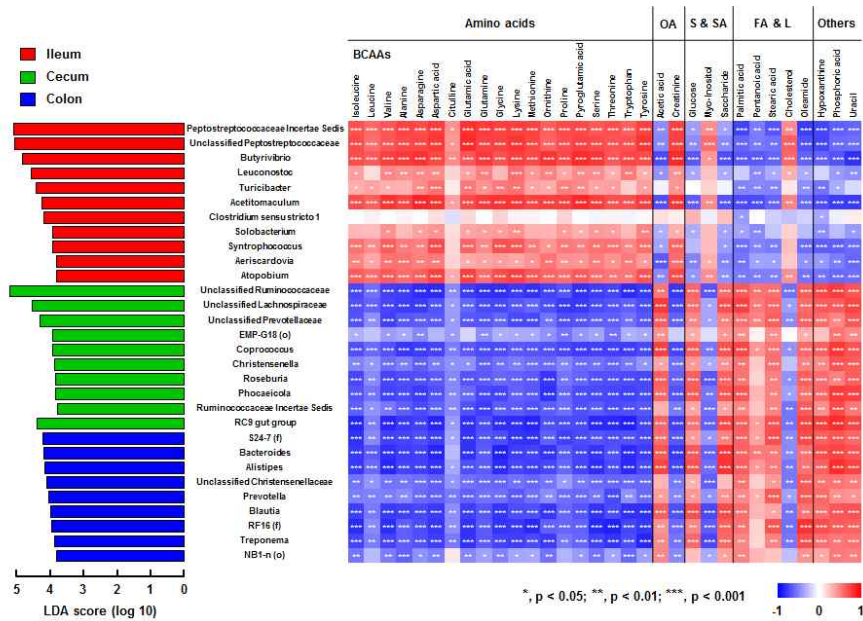


그림 108. 한우 거세에 의한 소장 내 장내미생물 군집 변화 및 숙주의 대사 형질 변화

- 본 연구 결과는 한우의 장관계 미생물 군집 (예: 반추위, 소장, 맹장 및 대장)을 포괄적으로 이해할 수 있는 기초데이터를 제공함으로써 한우 장내미생물 중 숙주의 성장/발달/건강에 도움을 주는 핵심 미생물의 후보를 선별하는데 도움을 줄 것이며, 송아지 장내미생물 형성과정에서 어미소로부터 전달되는 장내미생물 군집 특성을 이해하는데 도움을 줄 것임. 나아가 경제동물의 사육 과정에서 거세는 필연적으로 고통을 수반하므로 비거세우의 장내미생물 군집 조절 위한 기본 정보를 제공하여 거세 과정 없이 고급육 생산을 유도할 수 있음 (그림 109).

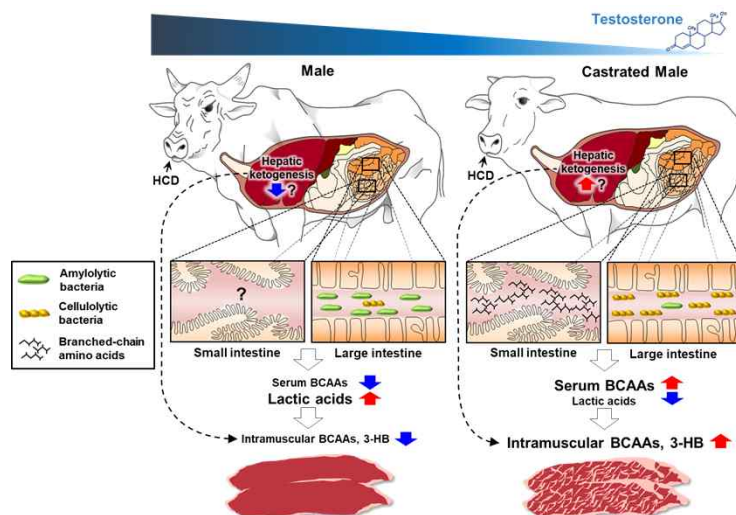


그림 109. 거세 한우의 장내미생물 군집 변화를 통한 숙주의 지방 저장량 증가 모델

- 본 연구팀은 선행연구에서 송아지 설사 원인을 근본적으로 규명하기 위해 설사 송아지와 정상 송아지를 대상으로 장내미생물 군집을 구성하는 박테리아 및 바이러스 군집의 시/공간적 특성 변화 및 숙주의 대사/면역 반응을 비교 분석하고자 하였음. 설사 송아지와 건강한 송아지의 장내미생물 군집 특성 규명을 위해 대용량염기서열 분석법 (Illumina MiSeq)을 적용하여 장내미생물 군집을 분석한 결과 두 그룹 간 확연히 구분되는 장내미생물 군집 특성을 확인하였으며, 최신의 머신러닝 기법을 적용하여 장내미생물 군집 정보만으로 설사 송아지와 건강한 송아지를 구분하게 트레이닝 시킨 결과 the family Enterobacteriaceae가 설사 송아지와 정상 송아지의 장내미생물 군집 특성을 구분 짓는 주된 미생물 그룹임을 확인함 (그림 110).

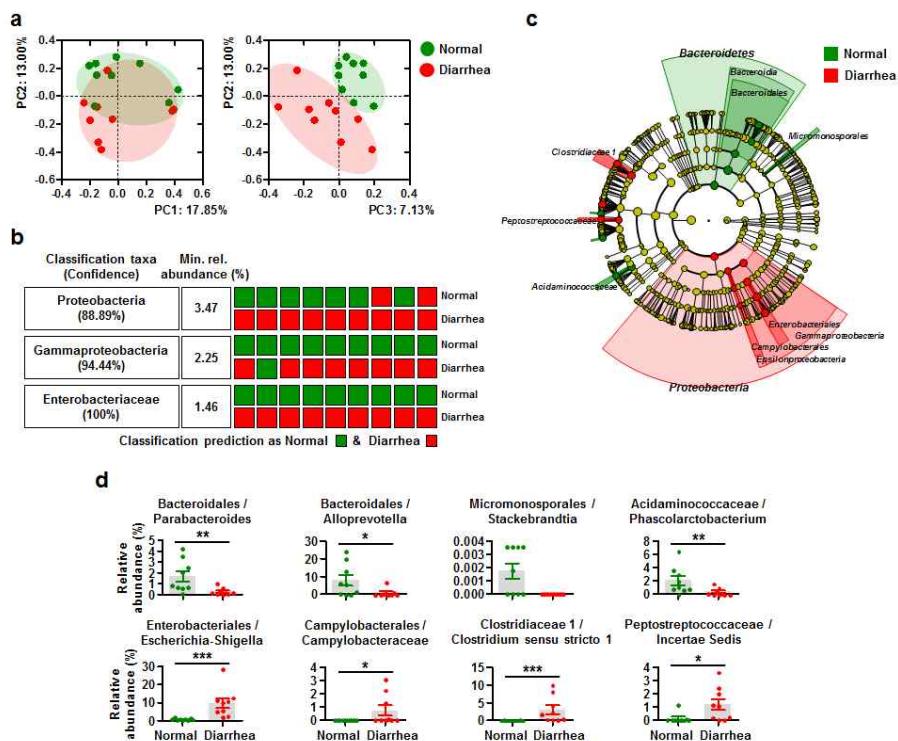


그림 110. 설사 송아지의 장내미생물 군집 특성 및 머신러닝 결과

- 설사와 건강 상태가 반복되는 송아지 (intermittently diarrheic calves) 6개체를 추가로 선별하여 대용량염기서열 분석법 (Illumina MiSeq) 적용 후 장내미생물 군집 특성을 확인한 결과 설사 송아지 장내미생물 군집 중 Proteobacteria 그룹과 설사 증세 간 형성되는 양의 상관관계 (positive correlation)를 확인하였음 (그림 111). 이는 설사 송아지의 장내미생물 불균형이 송아지 설사의 원인으로 작용할 수 있음을 뒷받침 해주는 데이터임.

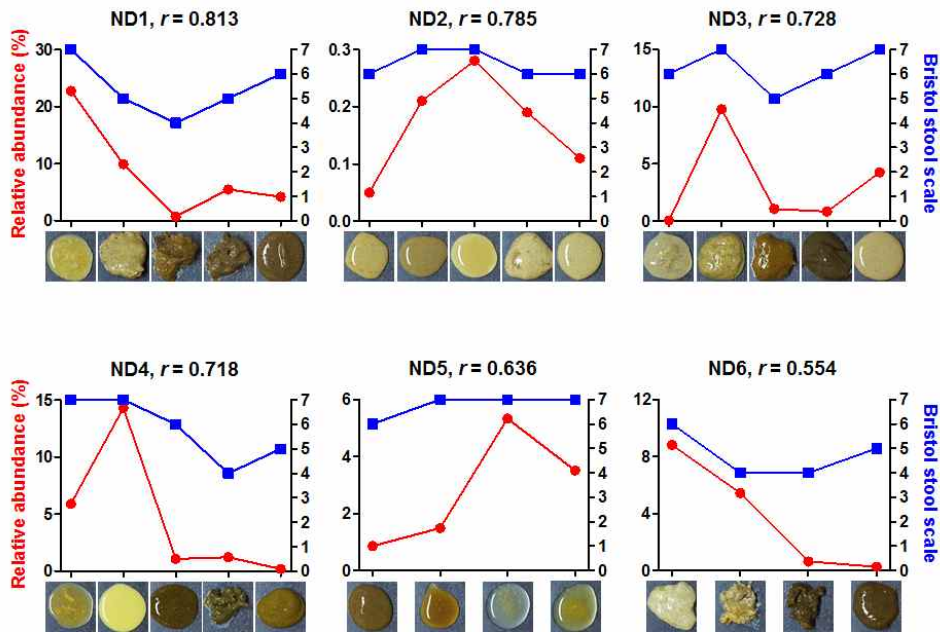


그림 111. 설사 송아지의 장내 Proteobacteria와 설사 증세 간 형성되는 양의 상관관계 규명

- 본 연구팀은 선행연구에서 송아지 설사의 근본적인 치료법으로 항생제 사용이 아닌 대변무리이식 방법을 적용함. 이를 위해 먼저 항생제 치료를 받지 않은 건강한 분변 공여 송아지를 선별함 (그림 112). 채집된 분변 공여 송아지의 분변을 경구투여 방식으로 이식하는 방법이 분변 이식 송아지의 건강에 어떤 영향을 미치는지 테스트하기 위해 7 개체의 분변 이식 대상 송아지를 선별하여 분변 이식 후 16일 간 송아지의 건강상태를 모니터링 하며 설사 증세 개선 여부, 장내미생물 군집 변화를 관찰함.



그림 112. 송아지 설사 치료 목적 대변무리이식 기술을 위한 건강한 분변 공여 송아지 선별 방법

- 대변무리이식 시술 이후 7개체의 분변 이식 송아지의 직장 내용물을 채집하여 대변 상태 변화를 모니터링 한 결과 시술 전 설사 증세를 나타내었던 개체의 대변 상태가 점차 개선됨을 확인하였고, 대변무리이식 시술이 전체 분변 이식 송아지의 건강에 악영향을 주는 징후는 발견되지 않음 (그림 113).

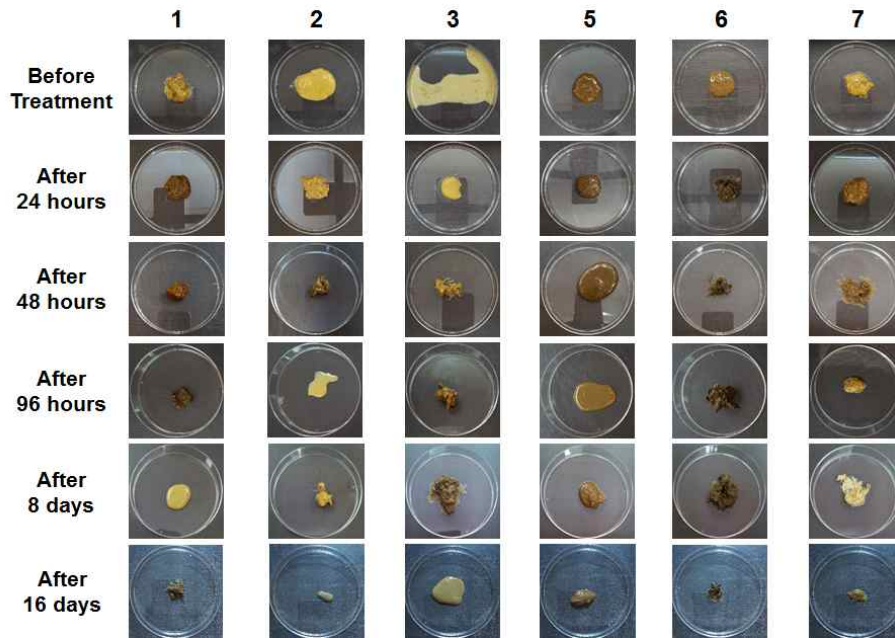


그림 113. 대변무리이식 시술 이후 분변 이식 송아지의 분변 상태 변화 모니터링

- 분변 이식 송아지 7개체의 직장 내용물을 채집하여 대용량염기서열 분석법 (Illumina MiSeq) 적용 후 장내미생물 군집 변화 패턴을 관찰한 결과 대변무리이식 시술 이후 시간이 경과함에 따라 분변 이식 송아지의 장내미생물 군집은 분변 공여 송아지의 장내미생물 군집 특성과 유사해 짐을 확인하였음 (그림 114). 이는 대변무리이식 시술 이후 분변 공여 송아지의 장내미생물 군집이 분변 이식 송아지의 장내 환경에 잘 정착됨을 보여주는 연구 결과임.

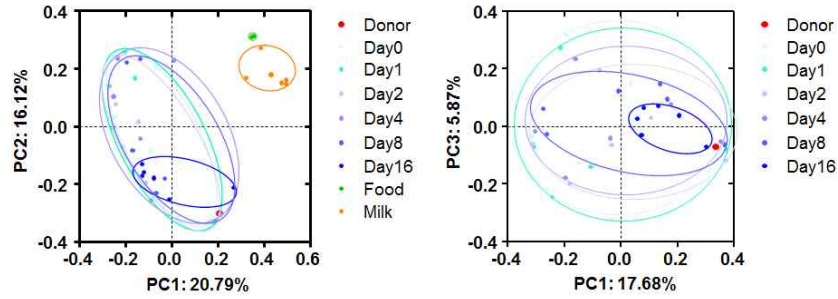


그림 114. 대변무리이식 시술 이후 분변 이식 송아지의 장내미생물 군집 변화

3. 메타지노믹스 기반 식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스군집 다양성과 변화 비교분석

가. 발효식품의 선정 및 발효 단계별 시료 확보

- 발효식품의 발효 단계별 세균 및 바이러스 군집 분석을 위한 시료로서, 전통 발효 주류인 막걸리를 선정하였음. 실험실 내에서의 막걸리 발효를 위해 전통누룩 두 가지를 선정함. 선정된 2 종류의 누룩은 각각 밀봉 포장된 상태로 구입 당일부터 막걸리를 담그기 전까지 4℃에 보관하였음. 선정된 2가지 누룩은 금정산성누룩과 송학곡자임.
- 2 종류의 누룩 시료를 사용하여 실험실 내에서 직접 막걸리를 발효함. 발효는 각 누룩마다 3반복으로 수행함. 3Kg의 고두밥과 600g의 각 누룩, 멸균된 물 6L를 멸균된 25L 병에 담아 잘 섞어준 뒤, 20℃에서 13일간 발효시키고, 0일 (담금 3시간 후), 1일부터 4일까지는 12시간 간격으로, 4일부터 13일까지는 하루의 간격으로 발효액을 채취함.

나. 막걸리의 발효 시간에 따른 pH 변화

- 확보된 발효 단계별 막걸리 시료에서 pH를 측정한 결과, 담금 즉시 평균 pH 6.17에서 발효 1일차에 평균 pH가 3.76으로 급격하게 저하되었고, 이후 pH 변화는 둔화되었음. 발효 단계별 측정한 pH는 다음과 같음(표 22).

표 22. 발효 단계별 pH 변화 양상

발효시간(일)	막걸리 종류					
	산성(A)	산성(B)	산성(C)	송학(A)	송학(B)	송학(C)
0	6.24	6.23	6.2	6.11	6.14	6.09
1	3.68	3.7	3.65	3.8	3.83	3.88
1.5	3.52	3.52	3.51	3.63	3.64	3.65
2	3.49	3.49	3.48	3.58	3.6	3.62
2.5	3.49	3.48	3.47	3.58	3.58	3.61
3	3.48	3.5	3.48	3.57	3.59	3.62
3.5	3.49	3.5	3.48	3.57	3.59	3.61
4	3.5	3.5	3.48	3.57	3.59	3.61
5	3.51	3.52	3.51	3.58	3.59	3.62
6	3.53	3.54	3.53	3.58	3.6	3.62
7	3.56	3.56	3.55	3.59	3.61	3.63
8	3.57	3.58	3.57	3.6	3.62	3.65
9	3.59	3.6	3.59	3.61	3.63	3.67
10	3.6	3.61	3.6	3.62	3.64	3.68
11	3.63	3.64	3.62	3.63	3.65	3.69
12	3.65	3.65	3.64	3.64	3.65	3.69
13	3.65	3.66	3.65	3.65	3.67	3.71

다. 발효식품의 발효 단계별 세균 군집 분석

(1) 실험 방법

- 각 발효 단계에서 바이러스 군집의 변화를 세균 군집과 비교 분석하고 바이러스 군집 분석을 위한 발효단계를 선정하기 위해서 막걸리의 세균 군집의 변화를 우선적으로 분석하기로 함. 발효 단계별로 채취한 시료를 5,000 rfc에서 10분간 원심분리하고, 침전물로부터 bead-beating 방법을 통해 메타유전체를 추출하여 세균 군집 분석을 위해 사용함. 추출한 메타유전체로부터 세균의 16S rDNA 유전자에 특이적인 primers로 증폭하여 Illumina Miseq sequencing을 진행함. Sequencing 결과는 QIIME pipeline을 통해 분석함.

(2) 실험 결과

- 각 시료당 평균 75,396 reads의 총 7,690,427 high-quality sequence reads를 분석하여 총 2,883 OTUs를 확인함.
- 산성누룩과 송학곡자를 이용하여 발효한 막걸리의 발효 과정 중 alpha-diversity를 살펴보았을 때, observed OTUs, PD whole tree, Shannon indices 모두에서 산성누룩을 사용한 막걸리에서는 발효 초기에 증가하다가 발효가 진행될수록 감소하는

경향을 보였으며, 송학곡자를 사용한 막걸리에서는 반대로 감소하다가 증가하는 양상을 보임(그림 115).

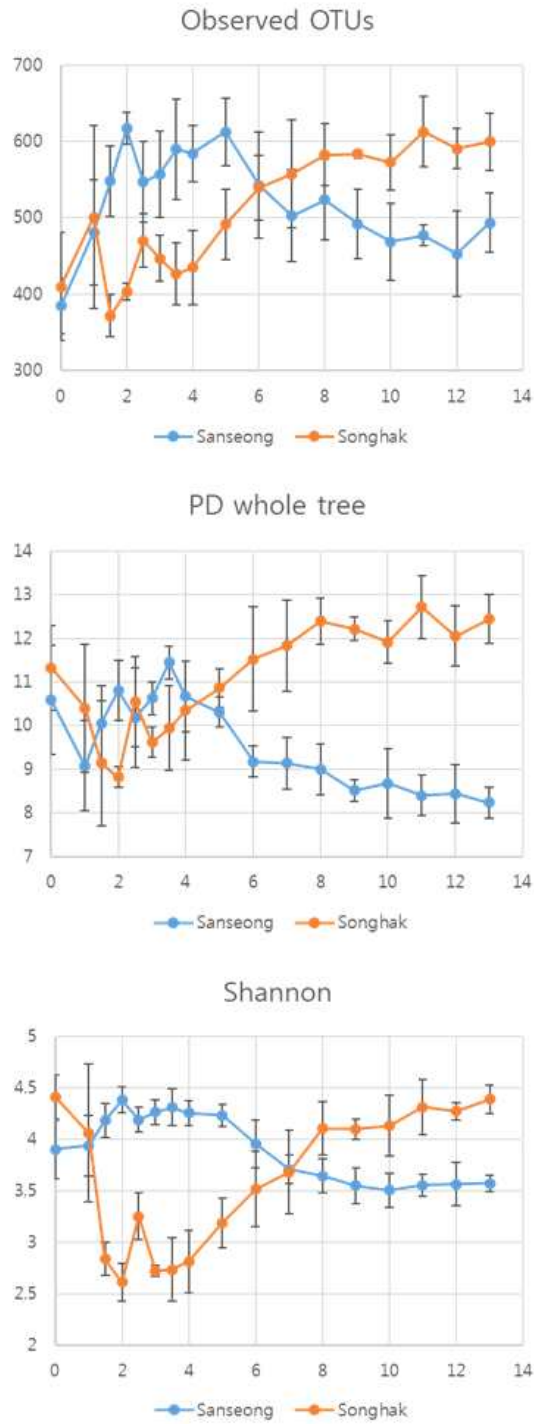


그림 115. 막걸리 발효 과정 중 세균 군집의 alpha-diversity 변화

○ Phylum level에서 두 가지 막걸리의 세균 군집은 발효 초기부터 발효 13일까지

Firmicutes가 평균 90.4%로 우점하였고, 산성막걸리 (A-C)의 경우 Proteobacteria가 발효 0일 차에 평균 10.6%로 존재하다가 발효 1일차부터 1% 미만으로 감소하는 반면에, 송학막걸리(D-F)에서는 전 발효 과정에서 평균 8.2%로 비율이 유지됨(그림 116).

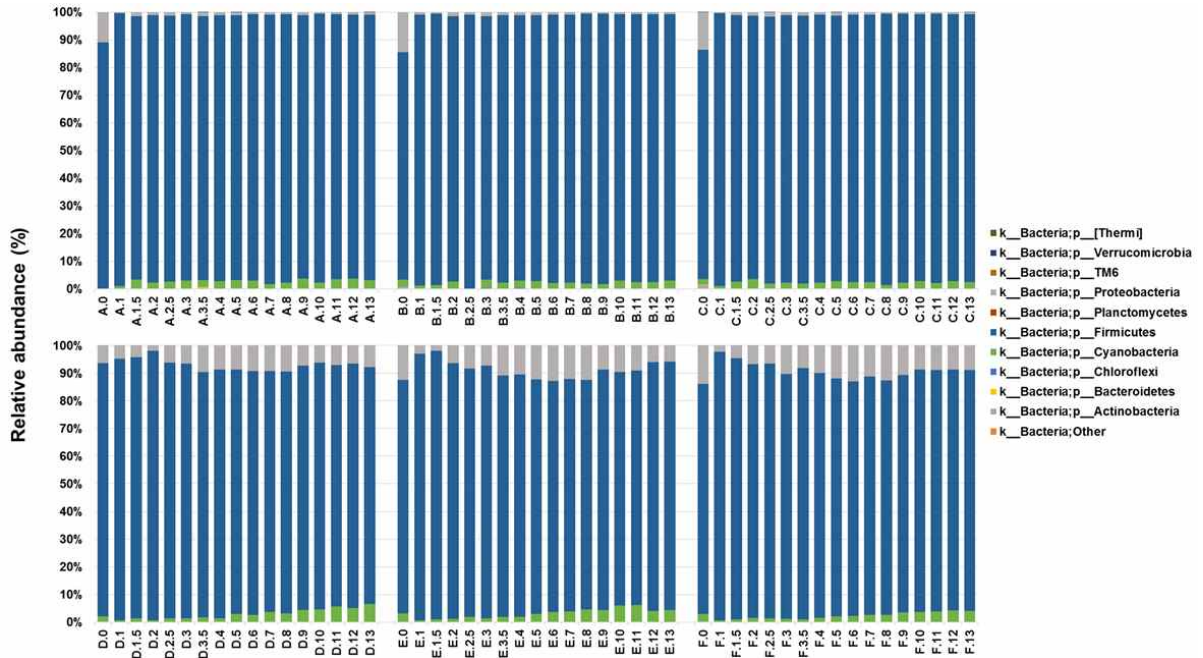


그림 116. 발효과정 중 세균 군집 변화 (Phylum level)

- Family level에서 두 가지 막걸리의 세균 군집은 발효 초기부터 발효 13일까지 Lactobacillaceae가 평균 76.1%로, Leuconostoceae가 13.7%로 우점하였고, 산성막걸리 (A-C)의 발효 0일차의 Proteobacteria는 대부분 Halomonadaceae인 반면에, 송학막걸리(D-F)에서는 Enterobacteriaceae 임을 확인함(그림 117).

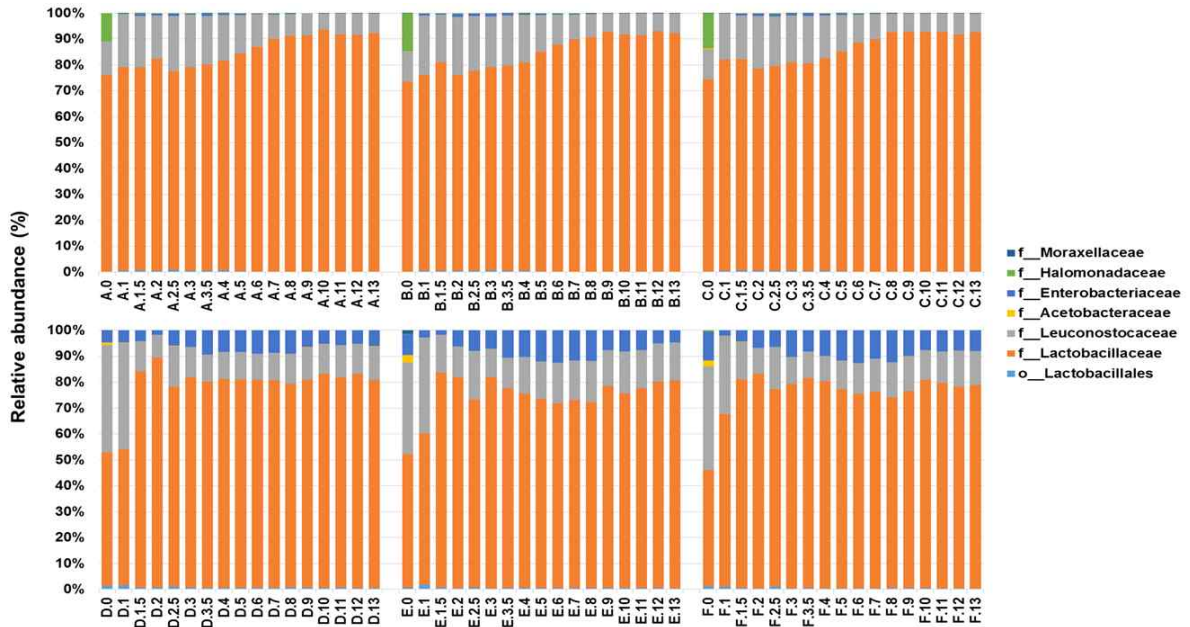


그림 117. 발효과정 중 세균 군집 변화 (Family level)

- Genus level에서 두 가지 막걸리의 세균 군집에서 산성막걸리 (A-C)는 발효 초기부터 발효 13일까지 Lactobacillaceae에 속하는 *Lactobacillus*가 70% 이상을 차지하고 있으며, Leuconostocaceae에는 *Weissella*가 대부분인 반면에, 송학막걸리(D-F)에서는 Lactobacillaceae에 속하는 *Lactobacillus*는 발효 3.5일까지 평균 33.7%에서 6.8% 까지 감소한 뒤, 다시 발효 13일까지 40.4%로 증가하였음. 또한 산성막걸리와는 다르게 Lactobacillaceae에 속하는 *Pediococcus*가 평균 51.3%로 우점하고 있음. 송학막걸리에 존재하는 Enterobacteriaceae는 대부분이 *Enterobacter*임을 확인함(그림 118).

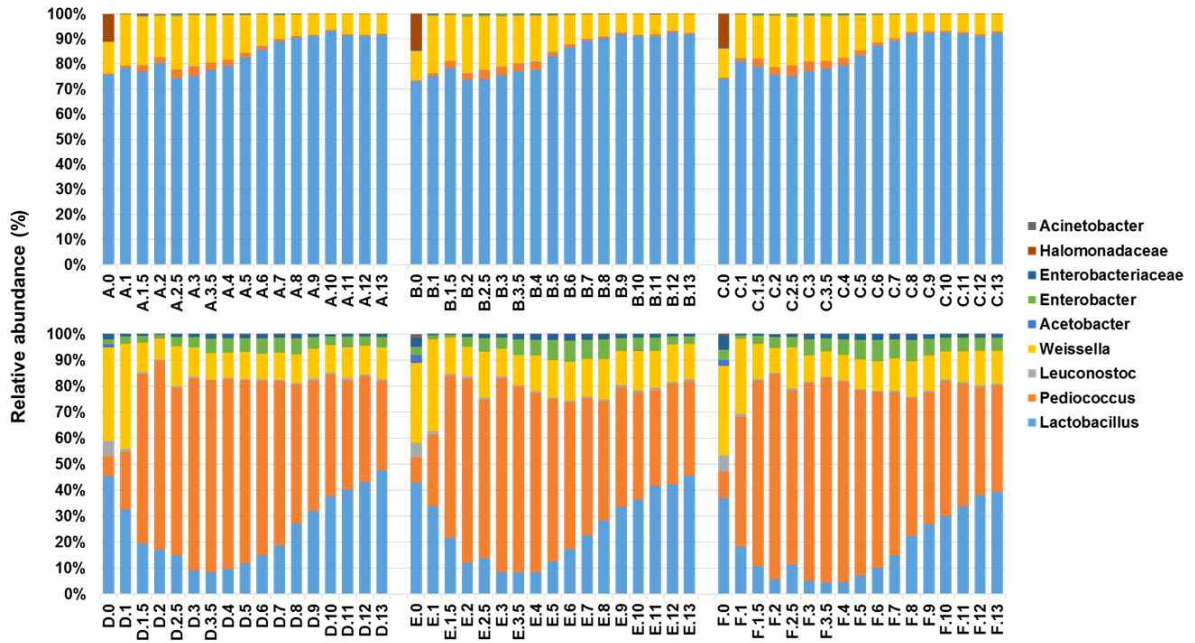


그림 118. 발효과정 중 세균 군집 변화 (Genus level)

- 이렇게 뚜렷한 막걸리 발효 과정 중의 세균 군집 변화의 차이는 unweighted 또는 weighted UniFrac distance를 이용한 PCoA에서도 확인할 수 있으며, 이러한 세균 군집의 변화와 차이는 막걸리의 발효 과정 중의 바이러스 군집에도 뚜렷하게 영향을 미칠 것으로 판단됨(그림 119-122).

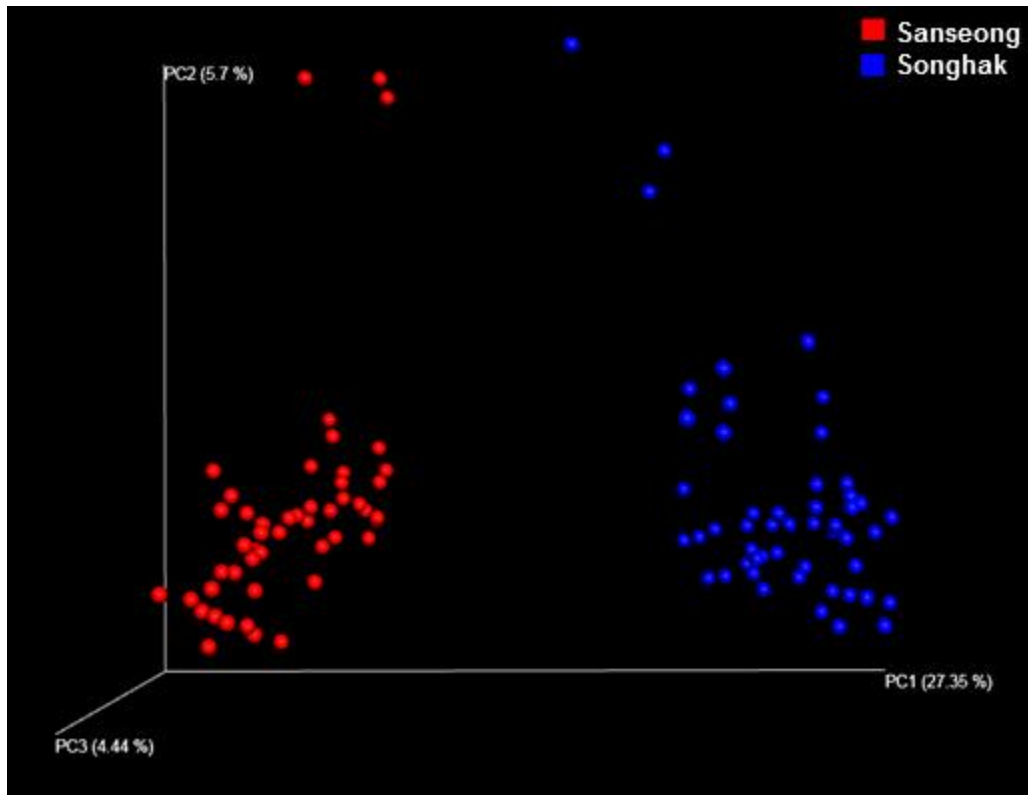


그림 119. 막걸리 종류 별 세균 군집 PCoA (unweighted UniFrac)

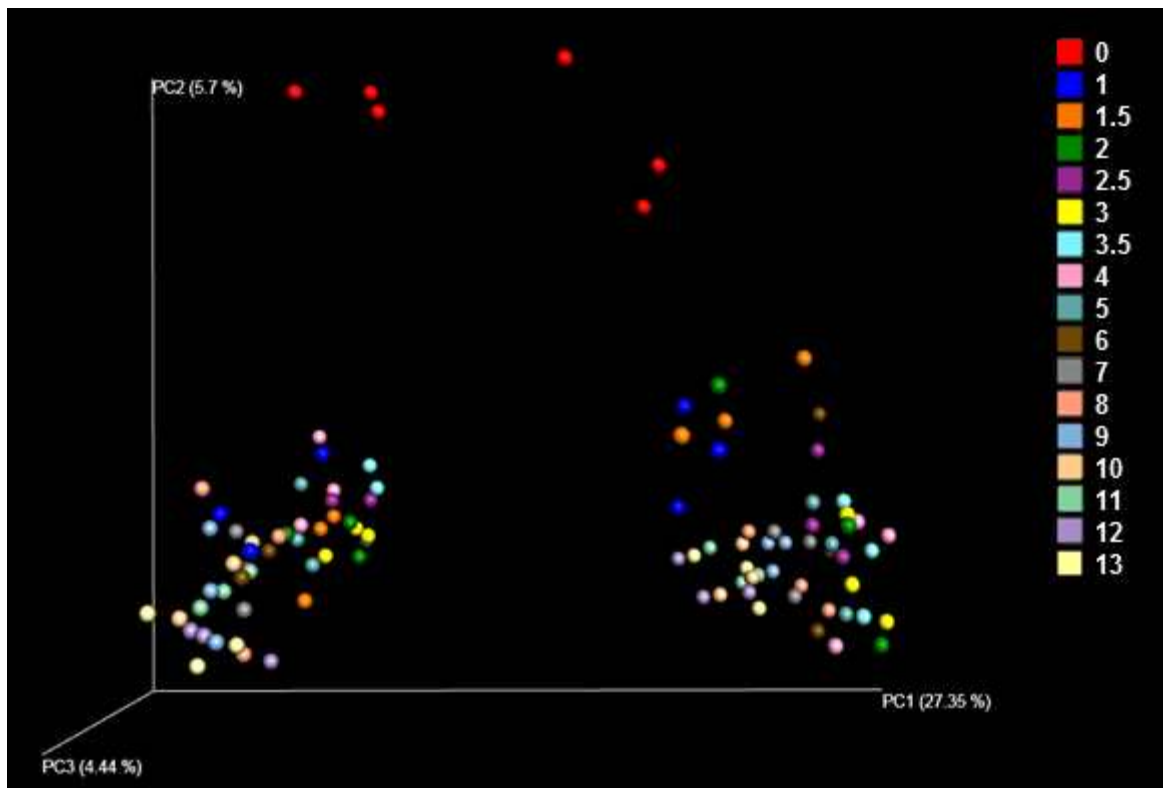


그림 120. 막걸리 발효 단계 별 세균 군집 PCoA (unweighted UniFrac)

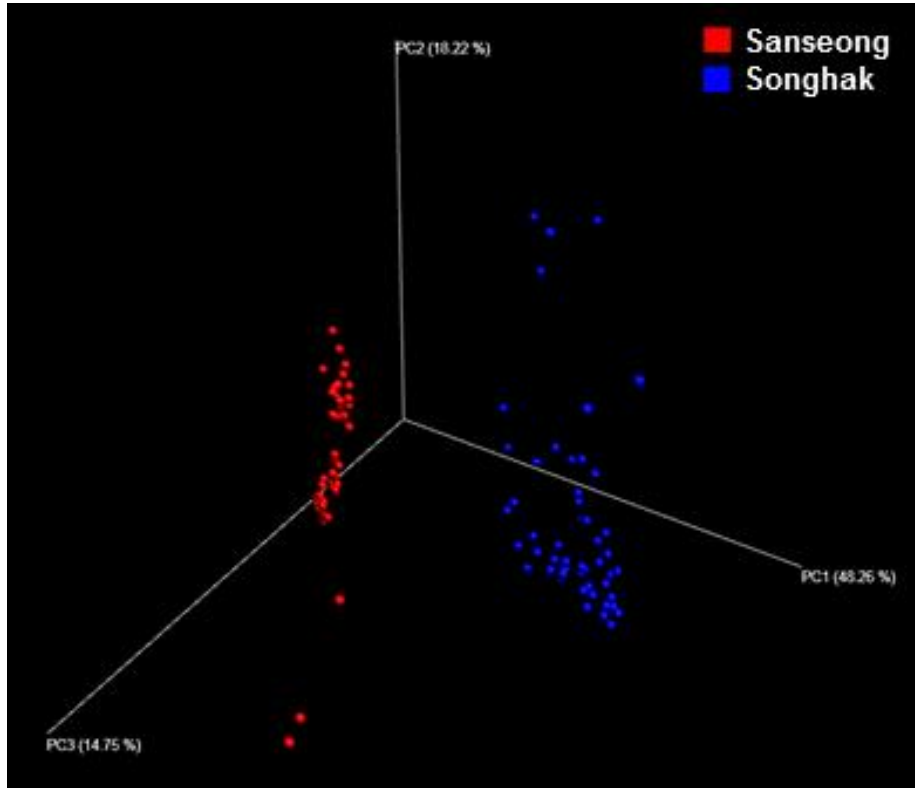


그림 121. 막걸리 종류 별 세균 군집 PCoA (weighted UniFrac)

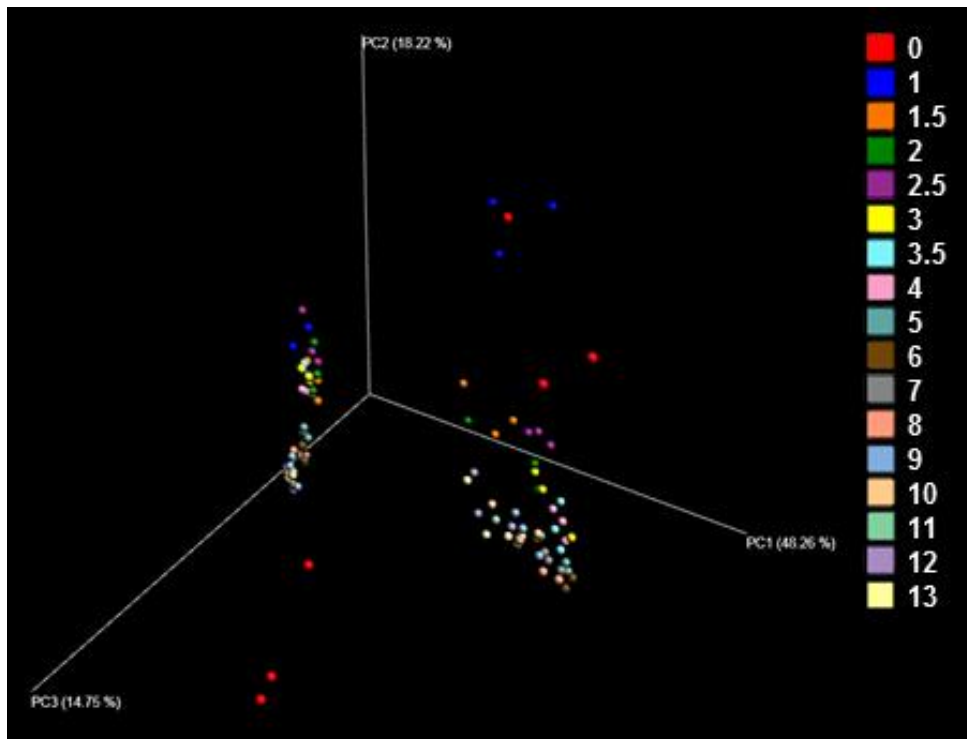


그림 122. 막걸리 발효 단계 별 세균 군집 PCoA (weighted UniFrac)

- 막걸리 발효과정 중 세균 메타유전체 분석 결과는 바이러스 군집 분석을 위한 기초데이터로써, 추후 바이러스 군집과의 상호관계 규명과 식품의 발효과정에 미치는 영향을 평가하기 위한 매우 중요한 결과임.
- PCoA와 UniFrac distance를 고려하여 0-4, 6, 8, 10, 12일 차의 발효 단계를 바이러스 군집 분석을 위한 시료로서 선정하였음.

(3) 연구개발성과

- 금정산성능룩과 송학곡자를 이용한 막걸리 발효과정 중 세균 메타유전체는 “전통누룩을 이용한 막걸리 발효과정 중 세균 군집”의 명칭으로 NABIC에 등록되었음(등록번호: NN-3771).

라. 발효식품의 발효 단계별 바이러스 군집 분석

(1) 실험 방법

- 바이러스 군집의 분석을 위해 선정된 발효 단계별 시료는 5,000 rfc에서 10분간 원심분리하여 상등액으로부터 바이러스를 순수 분리함. 상등액은 1차로 5um, 1.2um, 0.8um, 0.65um, 0.45um, 0.2um-pore size syringe filter를 통해 다단계로 여과하여 원핵세포를 제거하고, 2차로 최종농도 1M NaCl과 10% PEG 8000용액을 첨가하여 바이러스 입자들을 침전시켜서 농축함.
- 농축하여 순수분리한 바이러스 입자들에 DNase I을 처리하여 시료에 용해되어있는 DNA를 제거한 후, proteinase K의 처리를 통해 순수한 바이러스의 메타 유전체를 추출함.
- 추출된 바이러스 메타유전체로부터 Multiple Displacement Amplification (MDA) 과정을 거쳐 증폭된 DNA 바이러스 유전체를 확보하고 차세대 염기서열 분석법을 이용하여 증폭된 DNA 바이러스 유전정보를 확보함.

(2) 실험 결과

- 선정된 발효 단계별 시료의 바이러스 유전체의 확보는 완료하여 서열분석은 현재 진행 중으로 추후 바이러스 군집의 유전정보를 linux 기반의 분석 tool을 이용하여 분석할 예정이며, 2단계 포스트게놈다부처유전체사업 “농식품 소재 미생물 군집, 메타유전체 및 메타대사체 정보 분석” 과제를 통해 보고할 예정임.

4. 질량분석기 기반 농업유용미생물의 메타볼롬 해석

가. 농업유용미생물의 분류 (Chemotaxonomy) 및 2차 대사체 분석

- Streptomyces (8 species, 14 strains)의 Chemotaxonomy : UPLC-Q-TOF-MS로 분석하여 대사체 종별 hierarchical clustering analysis (HCA) 확인

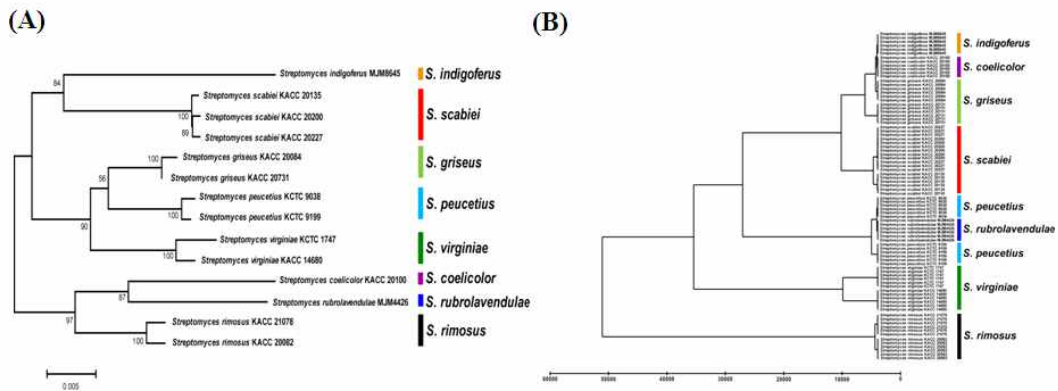


그림 123. Streptomyces 종의 (A) 16S rRNA gene sequence를 이용한 Neighbor-joining phylogenetic tree (대사체의 종별 hierarchical clustering analysis (HCA))

- Streptomyces(8 species, 14 strains)의 종별 구분 및 종을 구분하는 대사체 동정 : UPLC-Q-TOF-MS 분석을 이용하여 종을 구분하는 차이나는 대사산물 확인.

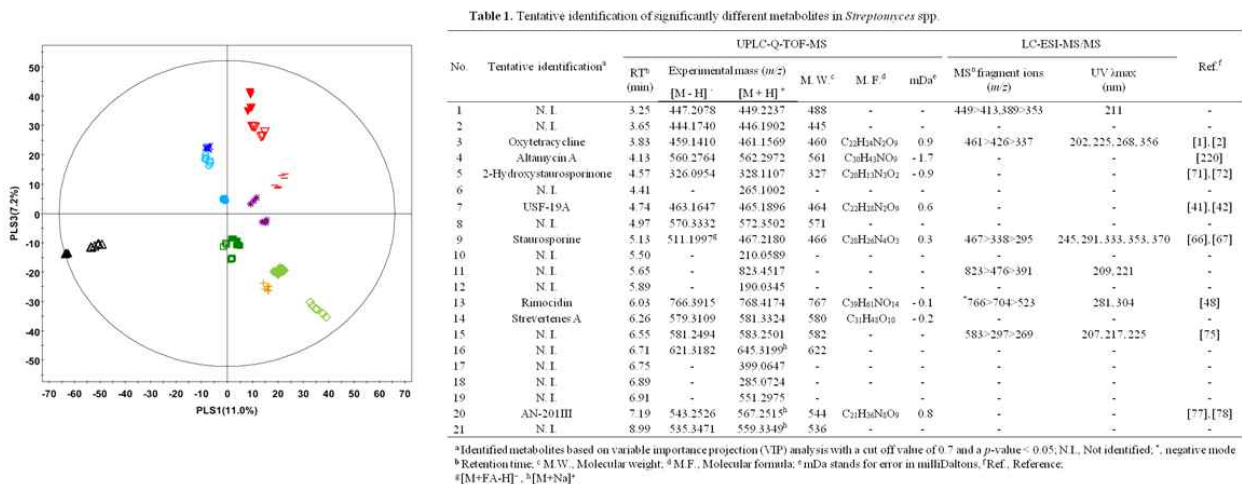


그림 124. UPLC-Q-TOF-MS 분석을 이용한 Streptomyces 종의 PLS-DA score plot 및 종을 구분하는 대사체 동정

- Streptomyces(8 species, 14 strains)의 antibacterial activity 및 active compounds

<i>Streptomyces</i> species	Strains No. ^a	Antibacterial activity of <i>Xo</i> ^c
<i>S. coelicolor</i>	KACC 20100	-
<i>S. griseus</i>	KACC 20084	-
	KACC 20731	-
<i>S. indigoferus</i>	MJM 8645	-
<i>S. peucetius</i>	KCTC 9038	-
	KCTC 9199	-
<i>S. rimosus</i>	KACC 20082	++
	KACC 21078	++
<i>S. rubrolavendulae</i>	MJM 4426	-
	KACC 20135	-
<i>S. scabiei</i>	KACC 20200	+
	KACC 20227	-
<i>S. virginiae</i>	KCTC 1747	-
	KACC 14680	-

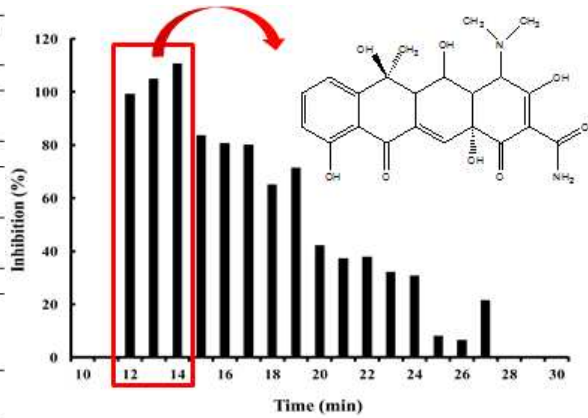


그림 125. *Streptomyces* strains used in this study and its antibacterial activity of *Xoo* and active compounds

○ 세부결과

- 농업유용미생물인 *Streptomyces*의 분류(Chemotaxonomy) 및 2차 대사체 분석 결과, 16S rRNA gene sequence 및 이차 대사체 분석을 통한 분류를 비교 진행, 종을 구분하는 대사체 21개가 선정되었음 (VIP>0.7, p<0.05).

나. 메타볼로믹스를 이용한 식품에서의 메타볼롬 (metabolome) 분석

- 소맥곡자 고추장에서의 기존 균주와 신 균주간의 구분 및 차이나는 대사산물의 동정

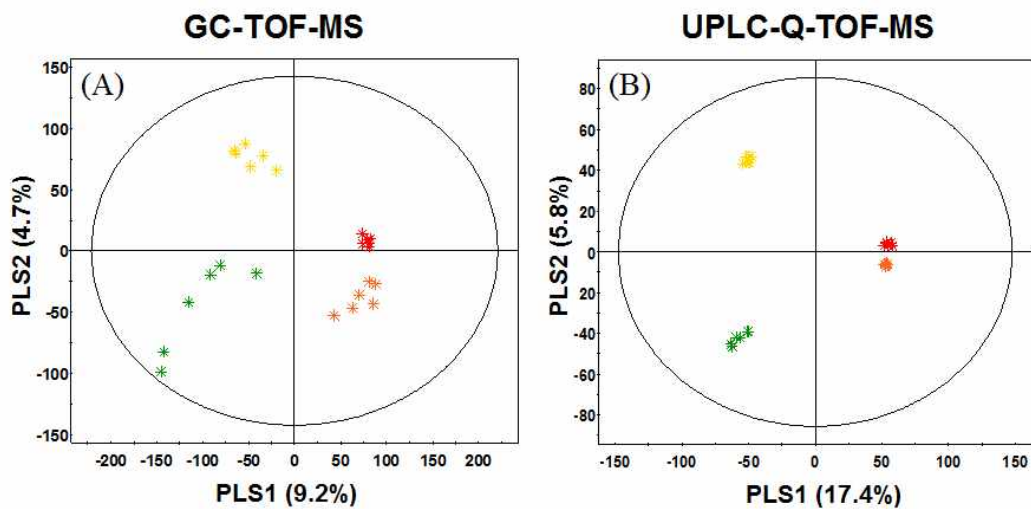
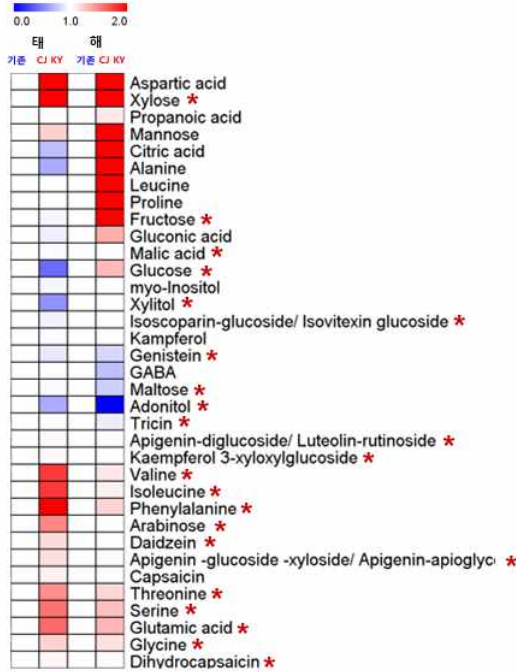


그림 126. 소맥 곡자 고추장에서의 기존 균주와 신 균주간의 PLS-DA score plot data. (A) GC-TOF-MS, (B) UPLC-Q-TOF-MS

* 태골드 (기존균주), * 태골드 (신균주, CJ KY), * 해골드 (기존균주), * 해골드 (신균주, CJ KY)

◆ 태골드/해골드 고추장 4종



기준 vs 신균주 CJ KY

◆ 유의적으로 차이 나는 물질 (P < 0.05)

Amino acids

Valine
Isoleucine
Phenylalanine
Threonine
Serine
Glutamic acid
Glycine

Sugar and sugar alcohols

Xylose
Glucose
Xylitol
Maltose
Adonitol
Arabinose

Organic acids

Malic acid

Flavonoids

Apigenin-glucoside-xyloside/Apigenin-apioglycoside
Daidzein
Genistein
Tricine
Kaempferol-3-xyloxyglucoside
Isoscoparin-glucoside/Isovitexin glucoside

그림 127. 소맥곡자 고추장에서의 기존 균주와 신 균주간의 차이 나는 물질의 함량 차이에 관한 Heat map

○ 세부결과

- 균주별 장류에서의 기기분석 (GC-TOF-MS, UPLC-Q-TOF-MS)을 통한 메타볼롬 (metabolome) 분석 및 다변량 통계분석(PLS-DA) 결과, 아미노산, 유기산, 당, 당알코올, 플라보노이드류의 대사체가 균주 별 구분하는 물질로 동정 됨. (VIP>0.7, p<0.05)

다. 식물에서의 메타볼롬 (metabolome) 차이 분석 - (충북대 이이 교수)

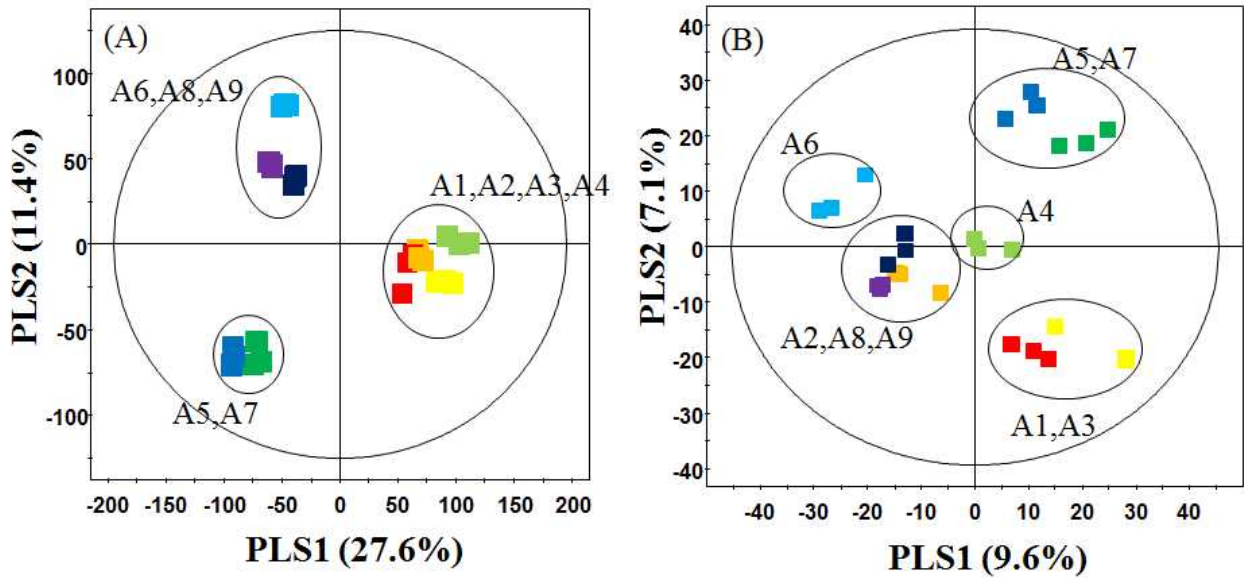


그림 128. 애기장대에서의 종별 간 메타볼롬 차이 분석 및 다변량 통계분석 결과. (A) GC-TOF-MS, (B) UPLC-Q-TOF-MS

○ 세부결과

- 애기장대 (*Arabidopsis*)에서의 기기분석 (GC-TOF-MS, UPLC-Q-TOF-MS)을 통한 종별 간 메타볼롬 (metabolome) 분석 및 다변량 통계분석(PLS-DA) 결과, GC-TOF-MS에서 PLS1과 PLS2에 의해 각각의 종별이 나뉘는 것을 확인 ($p < 0.05$). 또한 UPLC-Q-TOF-MS의 결과, 다변량 통계분석에서 각각의 종별 간 grouping이 되는 것을 확인 ($p > 0.05$).

라. 미생물 이용 (*Bacillus subtilis*) 발효 식품 청국장에서의 마늘 첨가에 따른 대사체 비교

CGJ (<i>Cheonggukjang</i>)	CGJ (<i>Cheonggukjang</i>)	● CGJ
	Garlic added <i>Cheonggukjang</i>	● G-C
G-CGJ (Garlic added <i>Cheonggukjang</i>)	Sprouted garlic added <i>Cheonggukjang</i>	● SG-C
	Fermented garlic added <i>Cheonggukjang</i>	● FG-C

그림 129. 미생물 이용 발효 식품 청국장의 샘플 정보

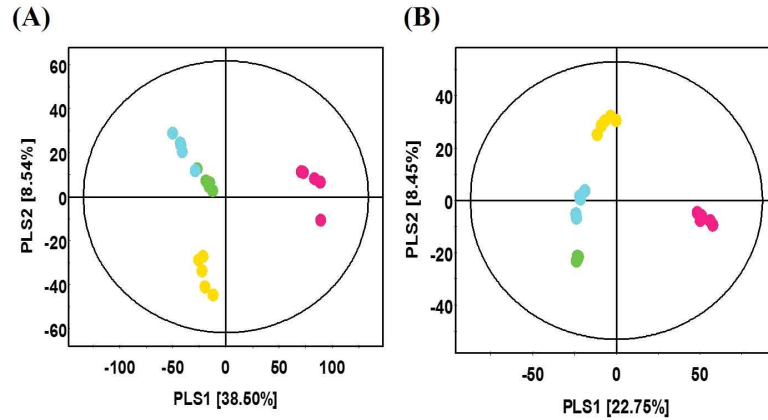


그림 130. 미생물 이용 (*Bacillus subtilis*) 발효 식품 청국장의 PLS-DA; GC-TOF-MS (A), LTQ-ESI-IT-MS/MS (B) ● CGJ, ● G-C, ● SG-C, ● FG-C

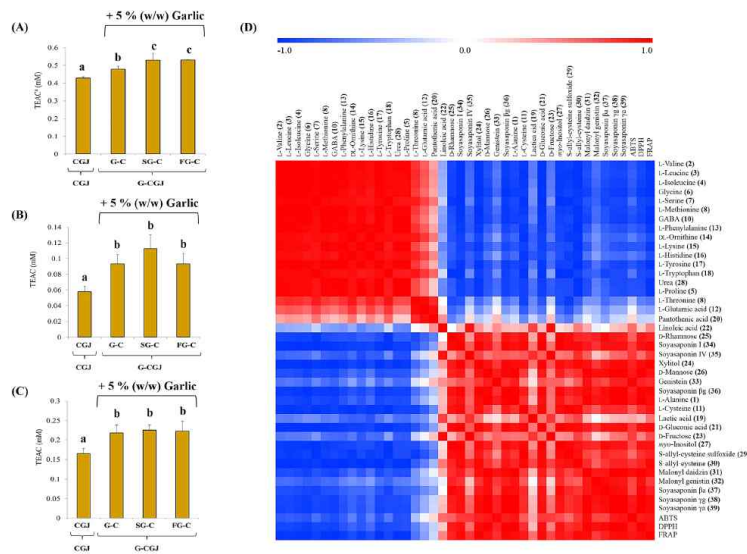


그림 131. 미생물 이용 (*Bacillus subtilis*) 발효 식품 청국장에서 마늘 첨가에 따른 항산화 측정 결과와 항산화와 대사산물의 코릴레이션 맵; ABTS (A), DPPH (B), FRAP (C), and correlation map (D)

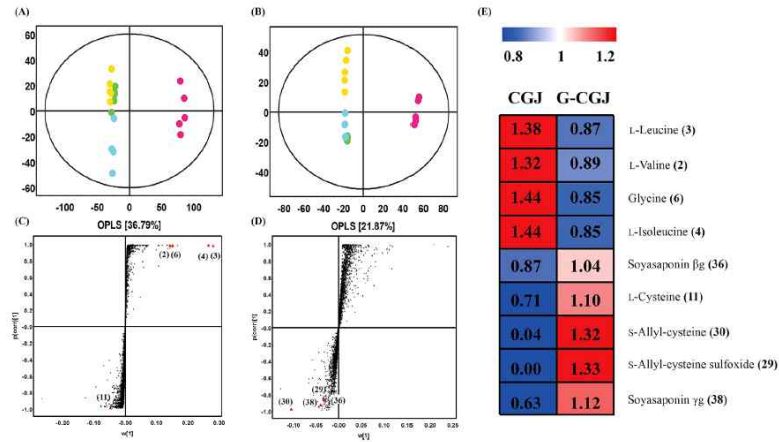


그림 132. 미생물 이용 (*Bacillus subtilis*) 발효 식품 청국장에서의 마늘 첨가에 따른 차이를 구분하는 OPLS-DA score plot 과 S-plot, 그리고 차이 나는 대사산물의 함량 차이를 나타낸 heat map; GC-TOF-MS (A and C), LTQ-ESI-IT-MS/MS (B and D), and heat map (E) > ● CGJ, ● G-C, ● SG-C, ● FG-C

○ 세부결과

- 미생물 이용 (*Bacillus subtilis*) 발효 식품 청국장에서의 마늘 첨가에 따른 차이를 구분하는 대사산물로 총 28개의 일차대사산물 (18개의 아미노산, 3개의 유기산, 1개의 지방산, 5개의 당계열, 1개의 올가닉 컴파운드)과 13개의 이차대사산물 (2개의 올가닉 컴파운드, 4개의 아이소플라본, 7개의 소야사포닌 계열)이 각 군별 차이 나는 대사산물로 동정 됨. (나) GC-MS 기기분석 기반 *Aspergillus oryzae* 단일배양, 공생배양에 따른 성장 관련 대사체 발굴 및 상관관계 규명

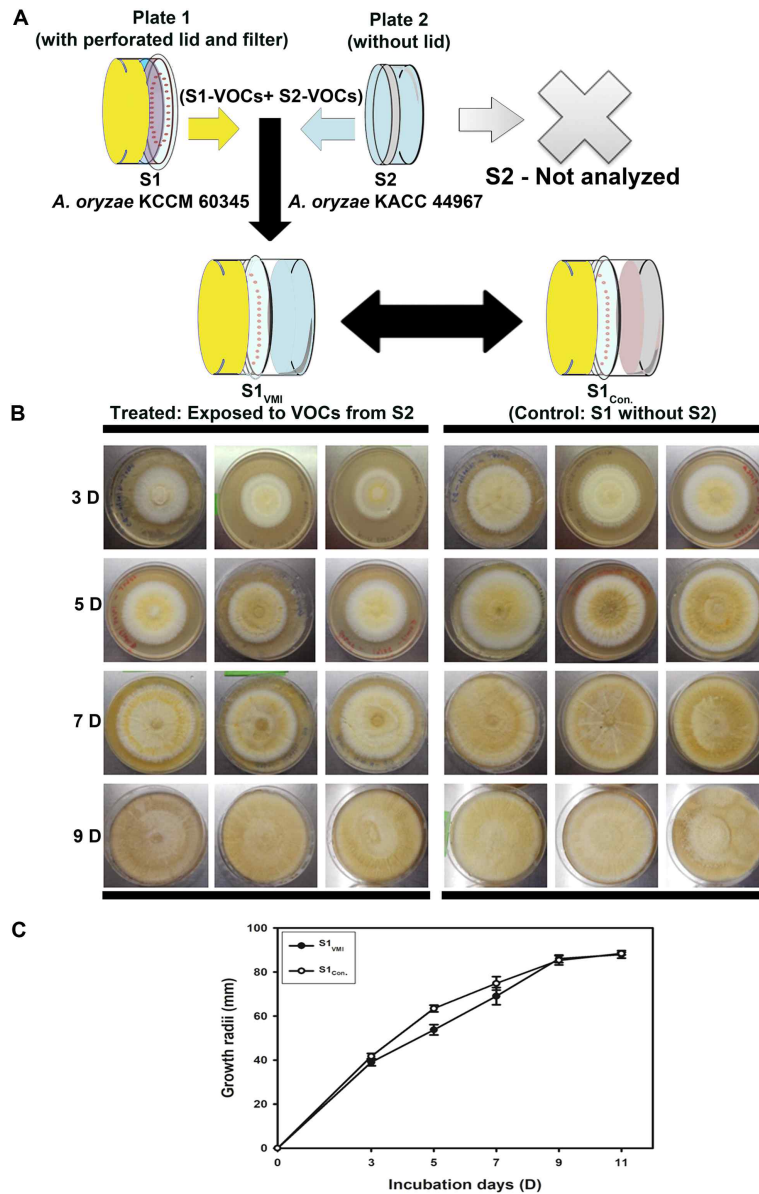


그림 133. *Aspergillus oryzae* 단일 배양, 공생배양 시간에 따라 변화하는 배양형태 및 성장곡선 그래프

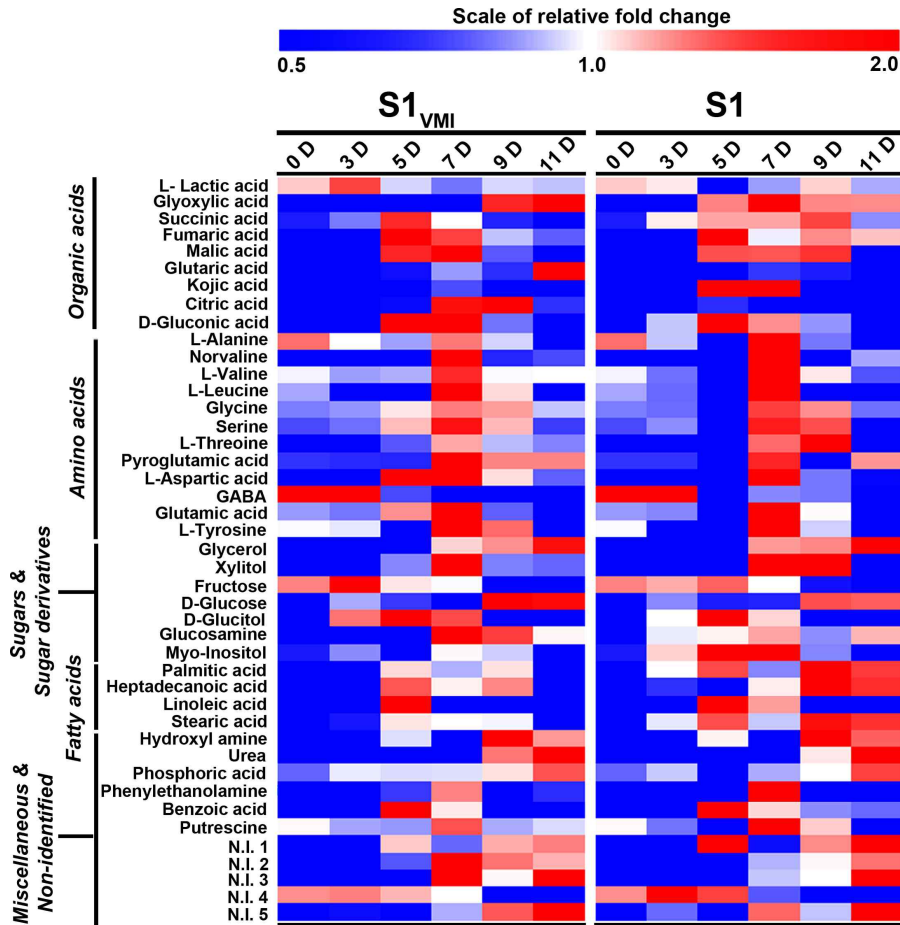


그림 134. *Aspergillus oryzae* 단일 배양, 공생배양 시간에 따라 일차 대사체 변화 heat map

○ 세부내용

- *Aspergillus oryzae* 단일배양, 공생배양에 따라 보여지는 성장 차이 관련 일차 대사산물을 대사체 프로파일링을 통해 규명하고자 함. 총 43 종의 일차 대사산물을 동정하였고, 시간에 따라 변화 하는 패턴을 단일배양과 공생배양간 비교 분석 함. 또한, 공생배양 과정에서 생산되는 휘발성 성분 4종 (1-octen-3-ol, (5Z)-octa-1,5-dien-3-ol, 3-octanone, 1-octen-3-ol acetate)을 규명함.

5. 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 프로파일링

가. 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 분석 조건 확립

(1) 한우 반추위 내 부위별 미생물 군집 메타볼롬 분석 조건 확립

- 한우 반추위 내 부위별 소장(jejunum), 맹장(cecum), 대장(colon)의 내용물의 메타볼롬 분석 조건 확립을 위해 동일 추출 용매일 때, 부위별 메타볼롬의 차이와 추출 용매를 달리 하였을 때의 메타볼롬의 차이에 대한 분석 수행.

표 23. 한우 반추위 내 부위별 내용물 정보
와 추출 용매 정보

No.	샘플 부위 (내용물)	추출 용매
1	소장, Jejunum	100% HPLC grade water and methanol
2	맹장, Cecum	
3	대장, Colon	

(2) 질량분석기기 기반 한우 반추위 내 부위별 메타볼롬 분석

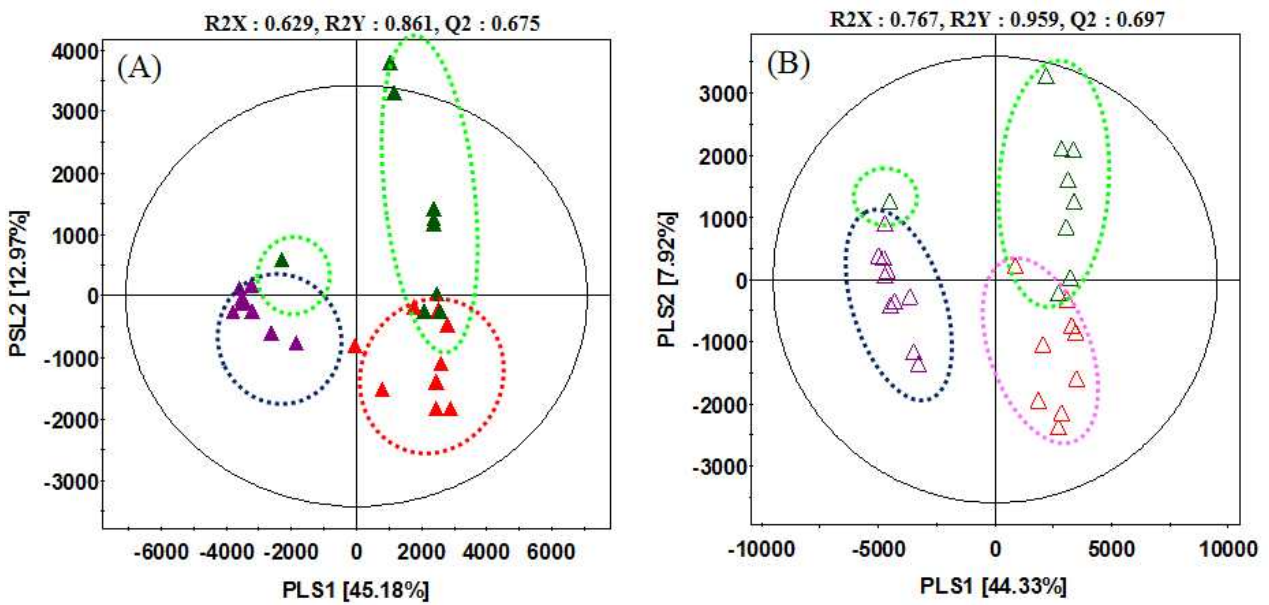


그림 135. GC-TOF-MS로 분석 한 추출 용매를 달리 하였을 때의 한우 반추위 부위별 간 메타볼롬 차이 분석 및 다변량 통계 분석 결과, (A) 100 % water를 이용하여 추출한 샘플의 다변량 통계 분석, (B) 100 % methanol을 이용하여 추출한 샘플의 다변량 통계 분석
▲ 소장 (jejunum), ▲ 맹장 (cecum), ▲ 대장 (colon)

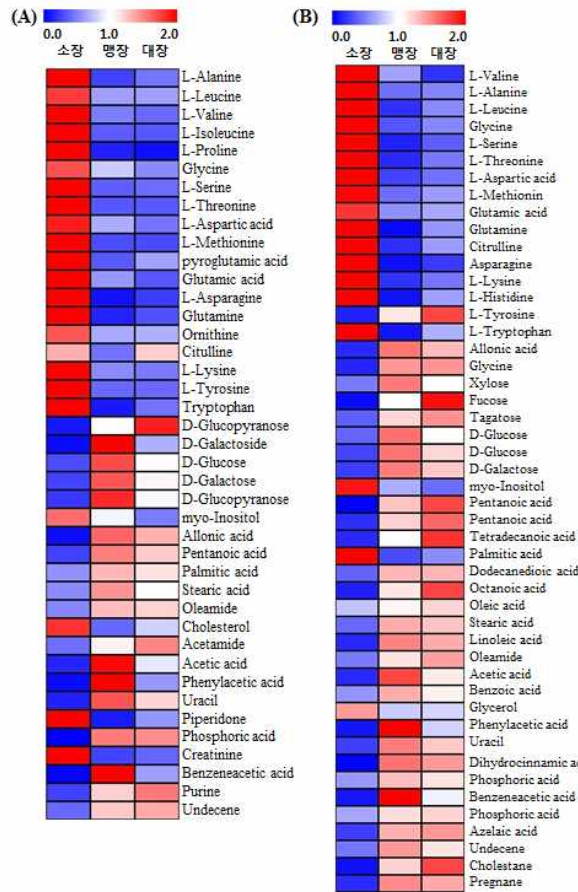


그림 136. 추출 용매를 다르게 하였을 때, 한우 반추위 내 부위별 간 차이 나는 메타볼롬의 함량 차이에 따른 heat map, (A) 100% water (B) 100% methanol

○ 세부결과

- 한우 반추위 내 부위별 내용물을 추출 용매를 달리 하였을 때, 기기분석 (GC-TOF-MS)을 통한 부위별 메타볼롬 분석 및 다변량 통계분석의 결과, PLS1에 의해 소장과 맹장, 대장이 나뉘는 것을 확인.
- 물로 추출 하였을 때, 아미노산 계열 (19개), 당 계열 (7개), 지방산 계열 (5개), 기타 (10개) 등 이 각 부위별 차이 나는 대사체로 동정. 또한 메탄올로 추출을 하였을 때, 아미노산 계열 (19개), 당 계열 (8개), 지방산 계열 (10개), 기타 (13개) 등으로 물로 추출을 하였을 때 보다 메탄올로 추출을 하였을 때, 부위별 차이 나는 대사체의 동정이 유용하다는 것을 확인.
- 아미노산의 경우 소장에서 높은 함량을 보였으며, 당은 맹장에서 그리고 지방산의 경우 대장에서 높은 잔여 함량을 보이는 것을 확인

나. 메타볼로믹스를 이용한 젓소의 거세, 비거세, 암소의 분변 내 대사체 프로파일링

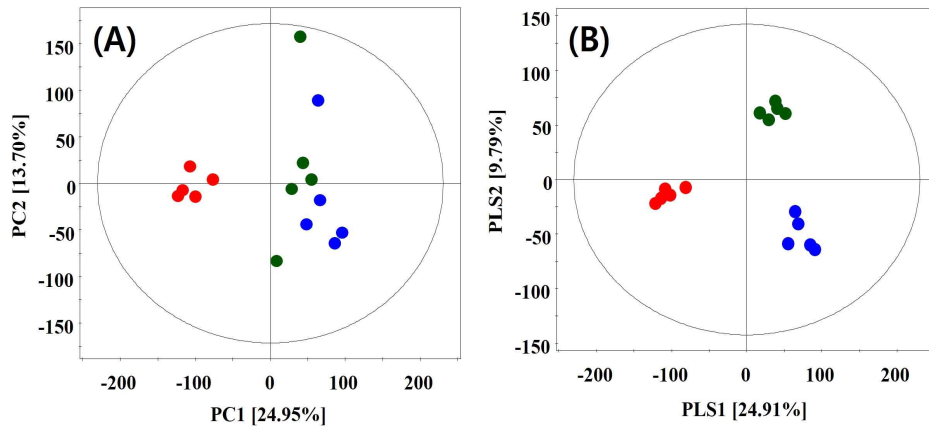


그림 137. GC-TOF-MS로 분석한 젓소의 거세, 비거세, 암소 간 분변 내 장내 미생물 대사체의 PCA (A), PLS-DA (B) score plot.

● 암소, ● 거세우, ● 비거세우

○ 세부결과

- GC-TOF-MS로 분석한 젓소의 거세, 비거세, 암소 간 분변 내 장내 미생물 군집의 차이를 구분하는 대사산물로 총 27개의 대사산물 (2개의 아미노산, 4개의 올가닉 컴파운드, 9개의 당계열, 6개의 지방산, 2개의 스테롤, 그리고 4개의 N.I)이 각 군별 차이 나는 대사산물로 동정 됨.

다. 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 및 혈장 내인성 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴

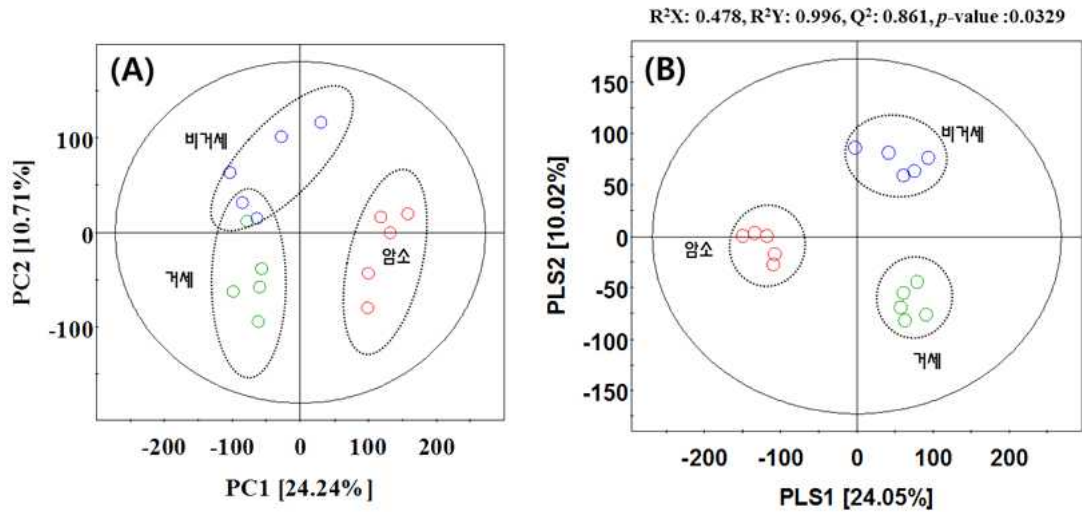


그림 138. GC-TOF-MS로 분석한 젖소의 거세, 비거세, 암소 간 분변 내 장내 미생물 대사체의 PCA (A), PLS-DA (B) score plot. ○암소, ○거세우, ○비거세우

○ 세부결과

- GC-TOF-MS로 분석한 한우의 거세, 비거세, 암소 간 분변 내 장내 미생물 군집의 차이를 구분하는 대사산물로 총 22개의 대사산물 (1개의 아미노산, 5개의 올가닉 컴파운드, 5개의 당계열, 6개의 지방산, 2개의 스테롤, 그리고 2개의 N.I)이 각 군별 차이 나는 대사산물로 동정 됨. (이중 p-value>0.05이상인 대사체로는 Fucose가 동정 됨.)

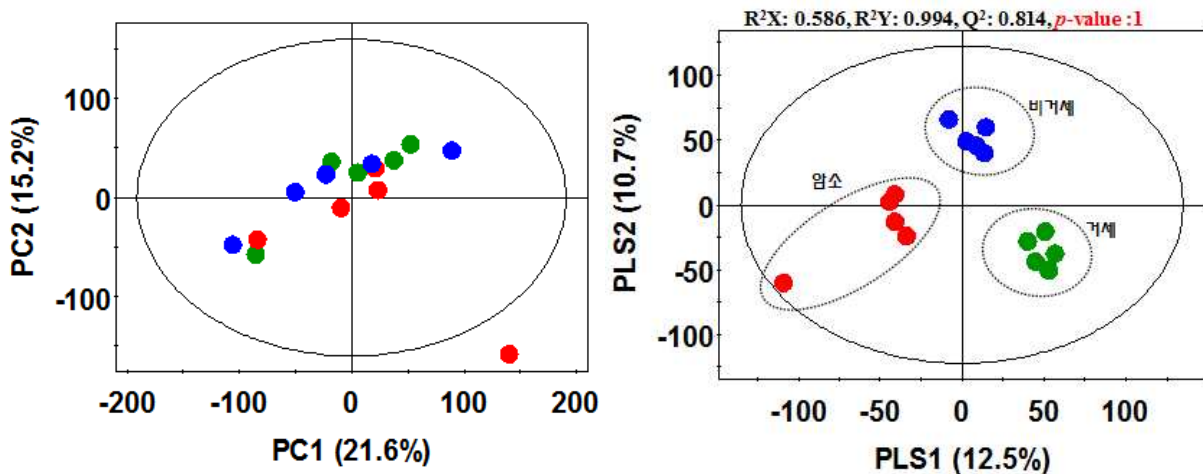


그림 139. GC-TOF-MS 기기분석 기반 젖소의 거세, 비거세, 암소간 혈청 내인성대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 ●암소, ●거세우, ●비거세우

○ 세부결과

- 젖소의 거세, 비거세, 암소간 혈청 내인성대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과, 총 25개의 그룹을 구분짓는 내인성대사체로 동정 됨 (아미노산 8종, 유기산 2종, 지방산 4종, 핵산 1종, 카복실산 3종, 당류 5종, 기타 2종). 이 중 valine, glycine, pyroglutamic acid, oleic acid, phosphoric acid가 유의적인 함량 차이를 보임.

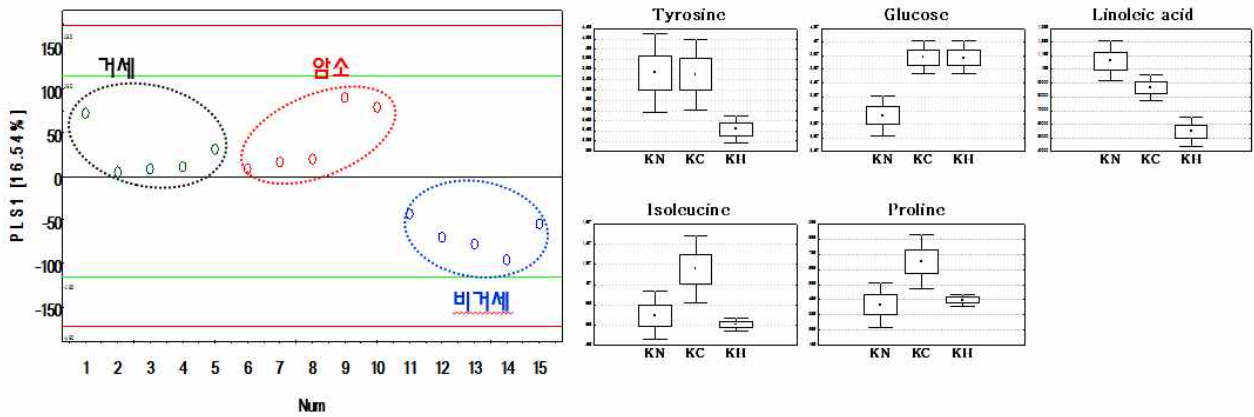


그림 140. GC-TOF-MS 기기분석 기반 한우의 거세, 비거세, 암소간 혈청 내인성대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 (○암소, ○거세우, ○비거세우) 및 유의적인 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

○ 세부결과

- 한우의 거세, 비거세, 암소간 혈청 내인성대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과, 총 21개의 내인성대사체가 그룹간 차이나는 변수로 동정 됨 (아미노산 9종, 지방산 6종, 카복실산 1종, 당류 4종, 기타 1종). 이 중 tyrosine, glucose, linoleic acid, isoleucine, proline이 유의적인 함량 차이를 보임.

라. 메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 근육조직 내 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴

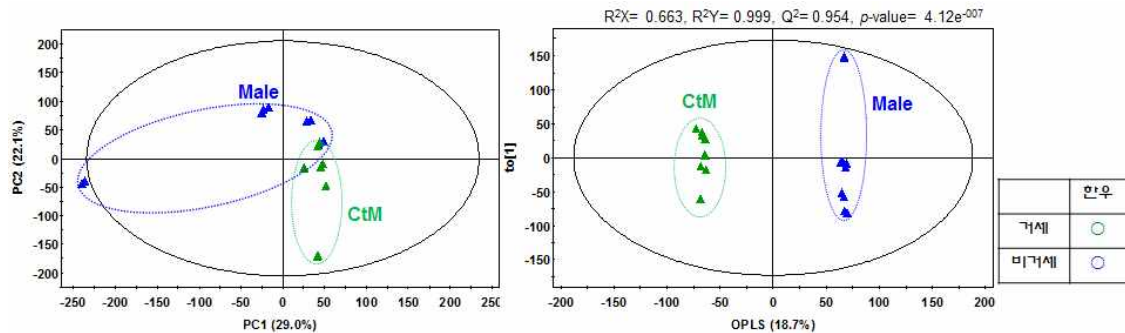


그림 141. GC-TOF-MS 기기분석 기반 한우의 거세, 비거세 근육조직 대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 (○거세우, ○비거세우)

(Male>CtM)

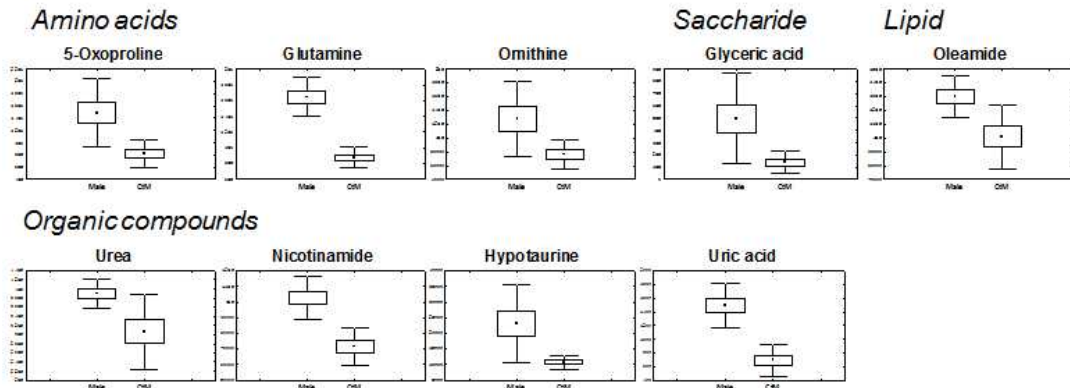


그림 142. 한우 거세, 비거세우의 근육조직 내 차이나는 대사체 중 비거세우에서 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

(Male<CtM)

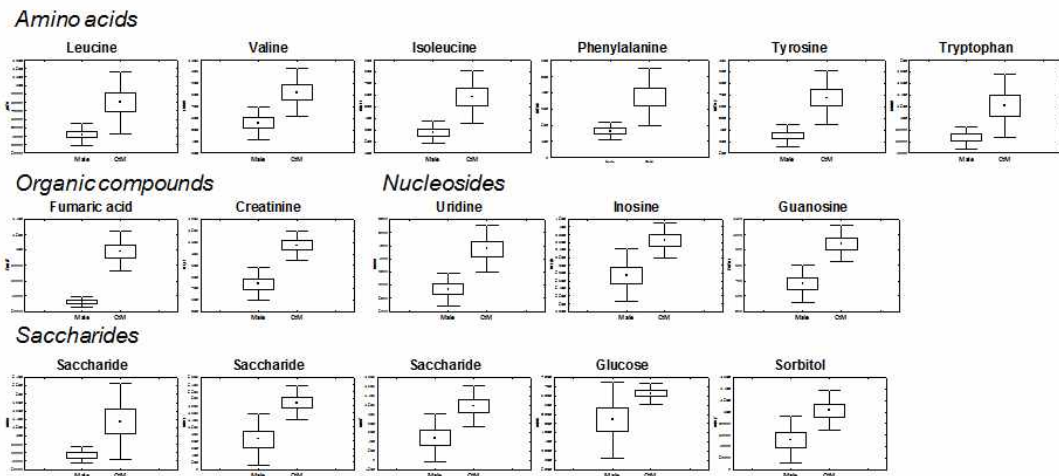


그림 143. 한우 거세, 비거세우의 근육조직 내 차이나는 대사체 중 거세우에서 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

○ 세부결과

- 근육조직 대사체 프로파일링 결과 한우 거세 비거세우 간의 유의적으로 차이나는 대사산물 총 25종이 동정 됨 (아미노산 9종, 유기물 7종, 당류 5종, 지질 1종, 핵산 3종). 이 중, 5-oxoproline, glutamine, ornithine, glyceric acid, oleamide, urea, nicotinamide, hypotaurine, uric acid의 상대적인 함량이 비거세우의 근육조직에서 높음을 확인하였음. 또한 leucine, valine, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, fumaric acid, creatinine, uridine, inosine, guanosine, glucose, sorbitol의 상대적인 함량이 거세우의 근육조직에서 높음을 확인하였음.

마. 물리적 요인에 따른 성체 한우 거세 우, 비거세 우의 4부위 (소장, 대장, 등지방, 내장

지방) 대사체 프로파일링

(1) 한우 내장지방 대사체 프로파일링

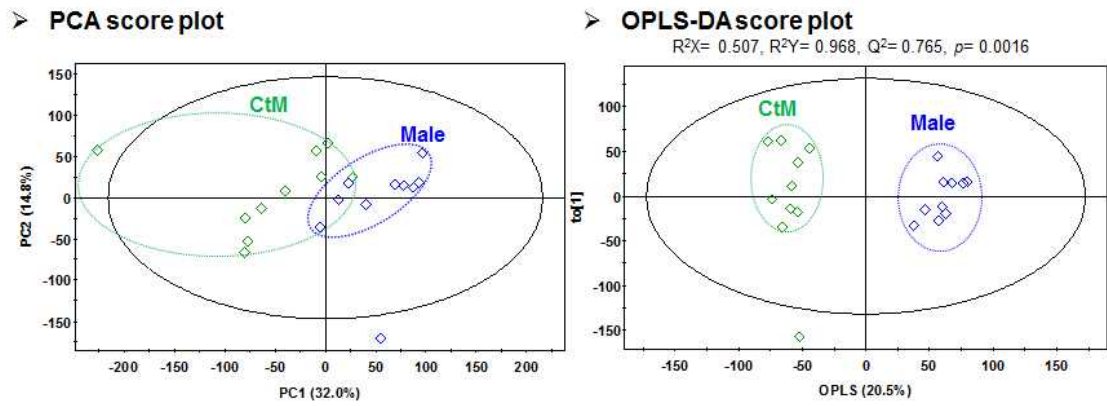


그림 144. GC-TOF-MS 기기분석 기반 한우의 거세, 비거세 내장지방 대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 (○거세우, ○비거세우)

(Male>CtM)

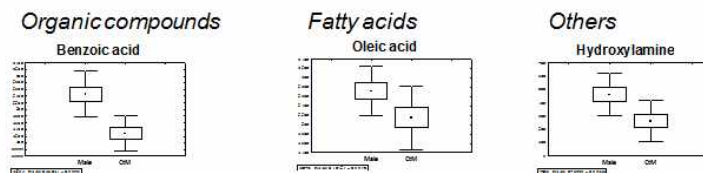
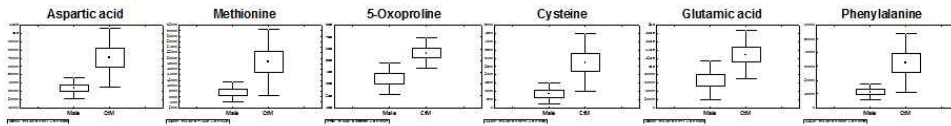


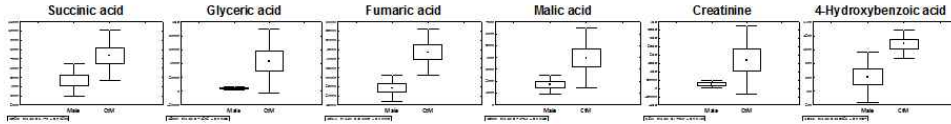
그림 145. 한우 거세, 비거세우의 내장지방 내 차이나는 대사체 중 비거세우에서 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

(Male<CtM)

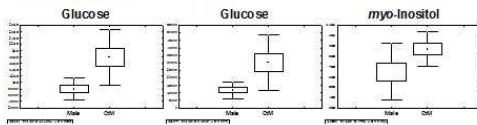
Amino acids



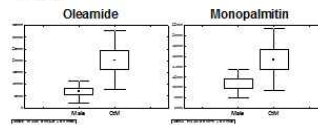
Organic compounds



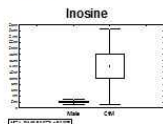
Saccharides



Lipid



Nucleosides



Fatty acids

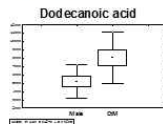


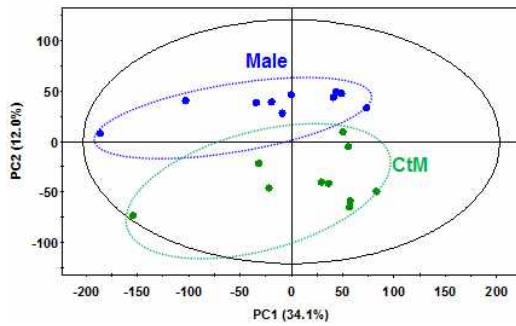
그림 146. 한우 거세, 비거세우의 내장지방 내 차이나는 대사체 중 거세우에서 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

○ 세부결과

- 성체 한우의 소장, 대장, 등지방, 내장지방의 대사체 프로파일링을 통한 거세우, 비거세우 간의 대사체 차이를 확인하고자 함. 각 부위별 효율적인 대사물질 분석 위해 추출법 및 기기분석 기법을 확립함. 성체 한우의 내장지방의 대사체 프로파일링을 통해 거세우, 비거세우 간의 대사체 차이를 확인 함. 내장지방 내 benzoic acid, oleic acid, hydroxylamine이 비거세우에서 높은 함량을 나타내었고, 6종 아미노산, 6종 유기물질, 3종 당류, 3종 지질 및 지방산, 1종 핵염기가 거세우에서 높은 함량을 나타냄.

(2) 한우 등지방 대사체 프로파일링

➤ **PCA score plot**



➤ **OPLS-DA score plot**

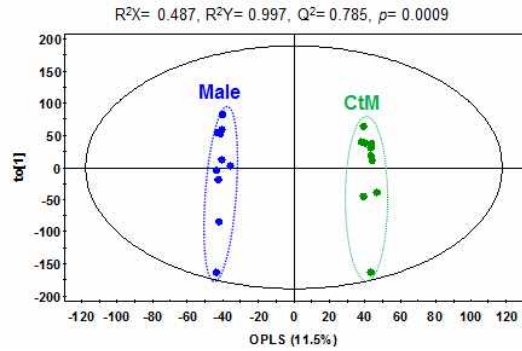
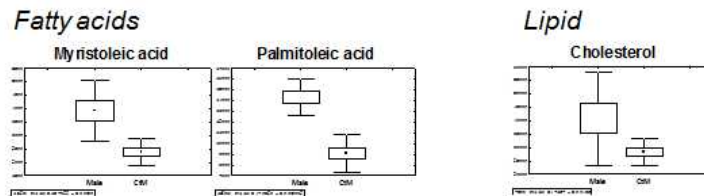


그림 147. GC-TOF-MS 기기분석 기반 한우의 거세, 비거세 등지방 대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 (○거세우, ○비거세우)

(Male>CtM)



(Male<CtM)

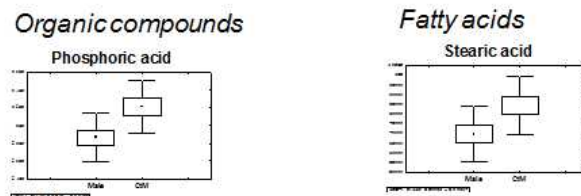


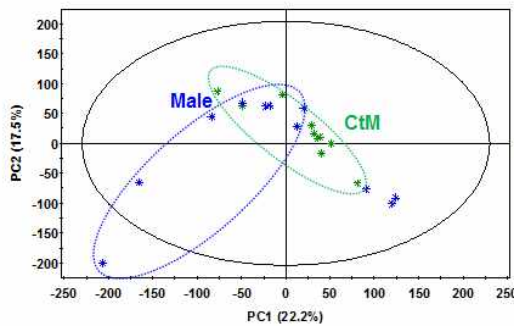
그림 148. 한우 거세, 비거세우의 등지방 내 차이 나는 대사체 중 거세우, 비거세우에서 각각 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

○ 세부결과

- 등지방 내에서 거세우 비거세우 간의 차이 나는 대사체는 내장지방에 비하여 수가 매우 적었음. 등지방 내 myristoleic acid, palmitoleic acid, cholesterol 함량은 상대적으로 비거세우에서 높았고, phosphoric acid, stearic acid 함량은 상대적으로 거세우에서 높았음.

(3) 한우 소장 대사체 프로파일링

➤ **PCA score plot**



➤ **OPLS-DA score plot**

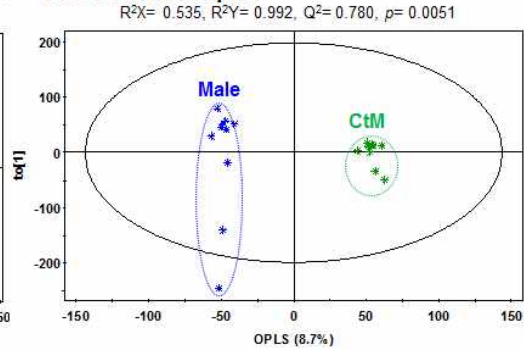
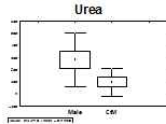


그림 149. GC-TOF-MS 기기분석 기반 한우의 거세, 비거세 소장 대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 (○거세우, ○비거세우)

(Male>CtM)

Organic compounds



(Male<CtM)

Organic compounds

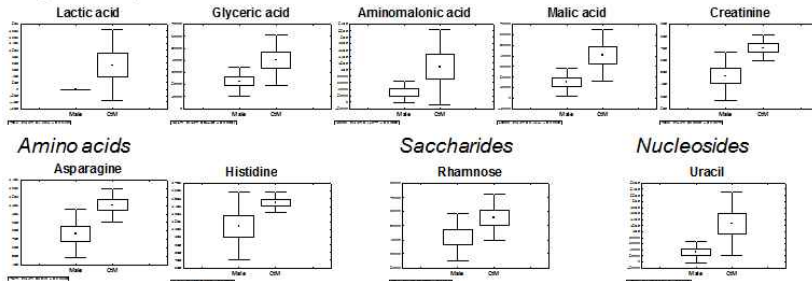


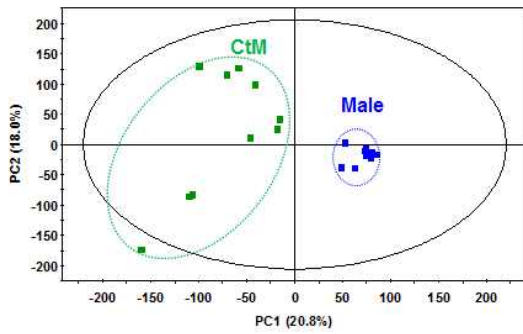
그림 150. 한우 거세, 비거세우의 소장 내 차이나는 대사체 중 거세우, 비거세우에서 각각 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

○ 세부결과

- 소장 내 urea이 비거세우에서 높은 함량을 나타내었고, lactic acid, glyceric acid, aminomalonic acid, malic acid, creatinine, asparagine, histidine, rhamnose, uracil이 거세우에서 높은 함량을 나타냄.

(4) 한우 직장 대사체 프로파일링

➤ PCA score plot



➤ OPLS-DA score plot

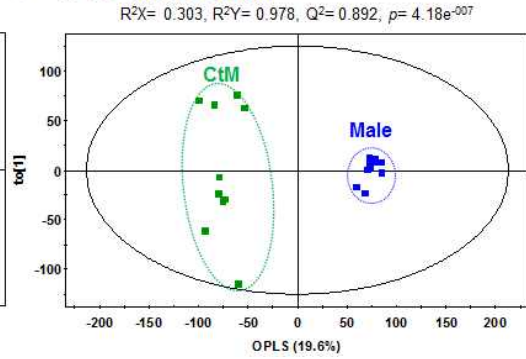
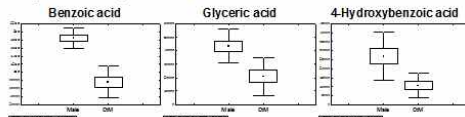


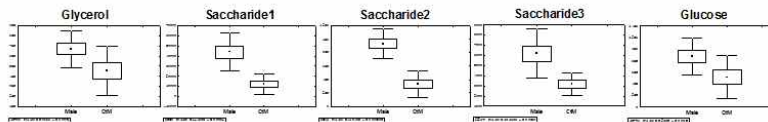
그림 151. GC-TOF-MS 기기분석 기반 한우의 거세, 비거세 직장 대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과 (○거세우, ○비거세우)

(Male>CtM)

Organic compounds



Saccharide



Fatty acids

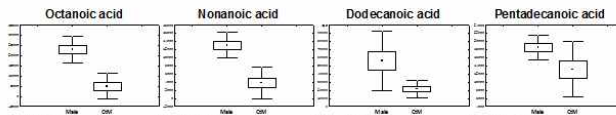


그림 152. 한우 거세, 비거세우의 직장 내 차이 나는 대사체 중 비거세우에서 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

(Male<CtM)

Amino acids

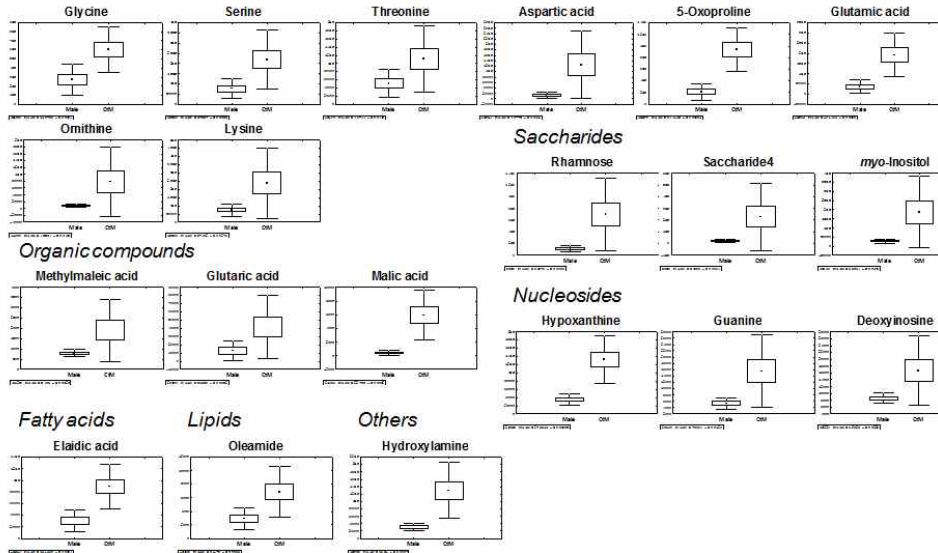


그림 153. 한우 거세, 비거세우의 직장 내 차이나는 대사체 중 거세우에서 높은 함량 차이 보이는 대사체 box&whisker plot

○ 세부결과

- 직장 내에서 benzoic acid, glyceric acid, 4-hydroxybenzoic acid, glycerol, glucose, octanoic acid, nonanoic acid, dodecanoic acid, pentadecanoic acid 함량은 상대적으로 비거세우에서 높았고, 상대적으로 많은 수의 대사체인 8종 아미노산, 3종 유기물질, 3종 당류, 3종 핵염기, 1종 지방산, 1종 지질, 1종 기타 물질 함량은 상대적으로 거세우에서 높았음.

6. 농축산식품 환경 미생물의 메타유전체 정보 분석

가. 메타유전체 연구 분석을 위한 샘플 선정 및 미생물 메타유전체 추출

(1) 메타유전체 샘플 선정

- 사업단 내 과제들과의 연구 협력을 통해 농식품적으로 중요한 환경들의 소재인 전통 발효식품 누룩 및 경제동물 한우의 장내 샘플을 전 메타유전체 분석대상으로 선정함.
- 누룩의 전 메타유전체 분석: 사업단의 참조유전체 연구팀(숭실대 서정아 교수)과의 연구협력을 통해 원료별 누룩 시료를 전 메타유전체 분석에 적용하고자 함. 국내밀과 수입밀로 제조된 전통 발효주의 향미 차이는 누룩 내 미생물의 군집 및 유전자 구성에 따른 발효 산물의 차이일 것으로 예상됨. 따라서 참조유전체 연구팀을 통해 국내 밀 및 수입밀로 제조된 누룩 최종 발효 시료를 확보하고, 메타유전체학적 분석을 수행하여 누룩 군집 비교와 발효 최종 산물에의 영향에 대해 설명하고자 함.

- 제1세부과제에서 연구 수행 중인 경제동물 한우의 장내 마이크로바이옴의 전 메타유전체를 분석대상으로 선정함. 한우의 장내 미생물의 전 메타유전체 분석을 통해 건강한 한우 장내 마이크로바이옴의 표준 분석 자료를 생산하고자 함.

(2) 메타유전체 추출

(가) 누룩 시료로부터 메타유전체 추출

- 누룩으로부터 미생물 메타유전체 DNA를 효과적으로 추출하기 위해 미생물 수집 방법 및 메타유전체 추출 방법들을 시험함. 분쇄된 누룩 시료를 PBS buffer에 넣어 2 시간동안 4°C에서 방치하여 전처리함. 이후 미생물만을 수집하기 위해 원심분리를 한 경우와 전체 누룩 시료를 그대로 수집하여 PoweFood DNA isolation Kit 및 PowerSoil DNA isolation kit를 이용, DNA를 추출하였음(그림 154a).
- 방법에 따라 추출된 DNA를 평가 및 검증하기 위해 bacterial 16s rRNA 증폭을 위한 27F-1492R primer(27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'/1492R: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')들을 사용하였고, eukaryotic 18s rRNA 증폭을 위해 TAREuk454FWD1-TAREukREV3 (5 '-CCA GCA (G/C)C(C/T) GCG GTA ATT CC-3' /5 '-ACT TTC GTT CTT GAT (C/T)(A/G)A-3 ')을 제작하여 PCR에 이용하였음. 또한 누룩의 원료 밀의 DNA 유무 및 양을 평가하기 위해 WBR11-WBR13 primer(5' -GGT AAC TTC CAA ATT CAG AGA AAC-3' /5' -TCT CTA ATT TAG AAT TAG AAG GAA-3')를 이용하여 PCR 증폭하였음(그림 154b).
- 원심분리를 한 경우, 미생물 균체 수거량이 매우 적어 전 메타유전체를 해독하기 위한 DNA 수집이 어려웠으며, bacterial cell은 수거가 잘 되는 반면, fungal cell들은 원료와 함께 pellet에 모이는 양이 많았음. 또한 밀 또는 식물 DNA에 특이적인 primer를 이용하여 PCR 한 경우, 전체 누룩을 사용한 경우와 원심분리를 통해 미생물만을 수거한 경우와 PCR 증폭양이 크게 다르지 않았음.
- PoweFood DNA isolation Kit 및 PowerSoil DNA isolation kit를 시험한 결과, PowerSoil kit보다 PowerFood kit에서 eukaryotic cell의 DNA가 잘 추출되지 않는 것을 eukaryotic specific primer를 이용한 PCR 증폭 반응을 통해 확인함.
- 결과적으로, 전체 누룩 시료를 PBS buffer에 incubation 후, PowerSoil DNA isolation kit를 사용하는 것이 전 메타유전체 염기서열 해독에 필요한 농도 및 양의 DNA를 추출할 수 있는 것으로 판단되었음.

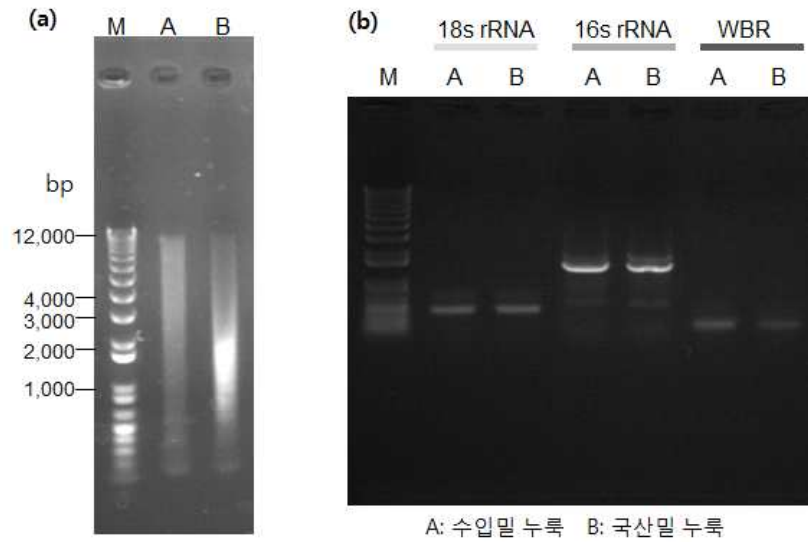


그림 154. 수입밀 및 국내밀로 제조한 누룩의 메타유전체로부터 추출된 DNA(a)와 추출 방법 및 메타유전체 DNA를 시료를 평가 검증하기 위해 PCR을 수행한 결과(b)

(나) 한우 장내 시료로부터 메타유전체 추출

- 한우의 소장, 맹장, 대장에서 채집한 장내 내용물을 제1세부과제로부터 제공받아 샘플을 각각 1g씩을 취하여 PBS buffer에 2ml씩 넣어 샘플이 충분히 폴리도록 voltexing한 후, 거즈를 통과한 시료를 가지고 Power soil DNA isolation kit를 사용하여 메타유전체 DNA를 추출함.

나. 표지 유전자 서열 분석을 통한 메타유전체 분석 샘플의 미생물 군집 구조 파악

(1) NGS 플랫폼을 이용한 전 메타유전체 염기서열 해독

- 누룩 및 한우 장내 샘플의 전 메타유전체 염기서열을 해독하기 위해 HiSeq 2500 및 MiSeq 등의 대용량 염기서열 해독기들을 이용함.
- 주류 및 장류 등 발효 식품 유래의 전 메타유전체 염기서열 분석과 관련된 해외 문헌들을 참고하였을 때, 샘플당 약 2Gb의 염기서열을 확보하여 분석하는 것으로 파악함. 누룩의 경우 원료인 밀의 비중이 높고 곰팡이 균주들이 군집 구조에 높은 비율을 차지하므로 HiSeq 2500의 1 lane을 사용하여 각각 약 12Gb의 염기서열을 충분히 확보하고자 하였음. 한편, 한우의 경우는 한우 소장, 맹장 대장 샘플로부터 추출한 DNA를 가지고 MiSeq을 이용하여 염기서열을 해독하였음.
- 수입밀 및 국내밀로 제조된 두 가지 누룩 메타유전체 DNA library는 insert size를

500~600bp로 하여 TruSeq library construction kit를 이용하여 제작되었음. HiSeq 2500으로부터 해독된 메타유전체 염기서열은 수입밀 누룩, 국내밀 누룩 샘플 별로 각각 11.27Gb, 11.47Gb로 생산되었음(표 24).

표 24. 한우 장내 샘플별 염기서열 생산량 및 trimming 후 분석 가능한 read 양

	Raw sequence data			Quality trimming		
	No. of read	Read length (bp)	Total read length (bp)	No. of read	Read length(bp)	Total read length (bp)
Jejunum	6,292,616	248.7	1,564,973,599	5,933,184	232.7	1,380,651,916
Cecum	7,190,188	247.5	1,779,571,530	6,842,554	232.7	1,592,262,316
Colon	6,003,152	248.8	1,493,584,218	5,723,277	233.5	1,336,385,180

- 생산된 염기서열들은 CLC Genomics Workbench를 이용하여 quality trimming을 수행함(parameters: ambiguous limit 0, minimum number of nucleotides in reads 80, quality limit 0.01). Quality trimming 후, 각각의 샘플 염기서열 양은 11.81Gb, 10.51Gb가 확보됨(표 25).

표 25. 누룩 샘플별 염기서열 생산량 및 trimming 후 분석 가능한 read 양

	Raw sequencing data			Quality trimm		
	No. of read	Read length(bp)	Total read length(bp)	No. of read	Read length(bp)	Total read length(bp)
수입밀 누룩	119,435,396	94.3	11,266,089,037	118,572,144	99.6	11,813,678,893
국내밀 누룩	113,826,638	100.7	11,465,028,998	105,494,696	99.6	10,506,205,080

(2) 전 메타유전체 해독 서열로부터 미생물 군집 구조 분석

- 농축산식품 환경 내에 포함되어 있는 원료 또는 기주의 유전체 서열이 NGS 해독 염기서열 내에 포함되어 있을 가능성이 큼. 따라서 미생물 메타유전체 서열만을 수집하기 위해 BMTagger 프로그램을 이용하여 원료 및 기주 유전체 서열이 포함된 read들을 제거하고자 함. 제거되는 염기서열 양 및 BMTagger의 효용성 등을 알아보기 위해 누룩 샘플별 염기서열 해독 데이터의 3Gb만을 가지고 시험하였으며 BMTagger 효용성은 16sRNA 및 18sRNA의 추출 결과로 비교함.
- 미생물 군집 구조 분석을 위해 16S rRNA 및 18S rRNA 서열이 포함된 read들을 염기서열 해독 데이터로부터 추출함. 해당 read의 추출 방법은 Silva Database의

bacteria, archaea, eukarya의 small subunit rRNA gene을 각각의 database로 만든 후, Blastn 또는 BWA 프로그램을 사용하여 database에 align되는 read들을 수집하여 RDP classifier를 사용, 군집 구조를 분석함. BWA를 이용한 read mapping 방법을 사용하여 효율적으로 read들을 추출할 수 있었음.

- 밀(*Triticum aestivum*) 염기서열을 EnsemblPlants database로부터 수집하여 BMTagger를 사용, 밀의 유전체 서열을 포함하는 read들을 제거하고 남은 read들을 가지고 군집 구조 분석을 수행함. 밀 유전체 서열 중 mitochondria, chloroplast를 포함한 경우와 포함하지 않은 경우, 그리고 bmtagger 없이 군집구조 분석을 수행한 결과들을 비교함. 그 결과, 밀 전체 서열을 이용할 경우, 대다수의 16S rRNA 및 18S rRNA에 해당하는 염기서열들이 제거됨. 이는 mitochondria 및 chloroplast 서열이 제거되면서 이들과 유사한 미생물 염기 서열들도 함께 제거가 되는 것으로 판단됨. 따라서 BMTagger를 이용하지 않고 전 메타유전체를 활용하거나 mitochondria 및 chloroplast 서열이 포함되지 않은 원료 및 기주의 유전체 서열을 사용하는 것이 효과적으로 보임(표 26).

표 26. 전 메타유전체 염기서열 분석을 위한 원료 및 환경 유전체 서열 제거 결과

BMTagger 실행 조건	분석 대상	No. of SSU reads (all)	No. of SSU reads (confidence >0.8)
<i>T.aestivum</i> 의 전 유전체 서열 제거	국내밀 누룩 내 세균	396	344
	국내밀 누룩 내 진균	132	27
	수입밀 누룩 내 세균	1,192	1,024
	수입밀 누룩 내 진균	2,640	626
<i>T.aestivum</i> 의 유전체 서열 제거(mitochondria, chloroplast 서열 제외)	국내밀 누룩 내 세균	53,156	45,789
	국내밀 누룩 내 진균	112,866	24,642
	수입밀 누룩 내 세균	59,768	50,754
	수입밀 누룩 내 진균	137,194	31,412
BMTagger 미실행	국내밀 누룩 내 세균	53,156	45,795
	국내밀 누룩 내 진균	112,866	24,637
	수입밀 누룩 내 세균	59,768	50,764
	수입밀 누룩 내 진균	137,194	31,410

- 누룩 시료의 전 메타유전체 염기서열로부터 미생물 군집 구조를 분석한 결과, 수입밀 및 국내밀 누룩의 메타유전체로부터 fungi 및 bacteria의 비율이 그림 155와 같이 나타났으며, 국내밀과 수입밀 누룩 간에 bacteria와 fungi 비율에 차이가 있는 것으

로 나타남(그림 155).

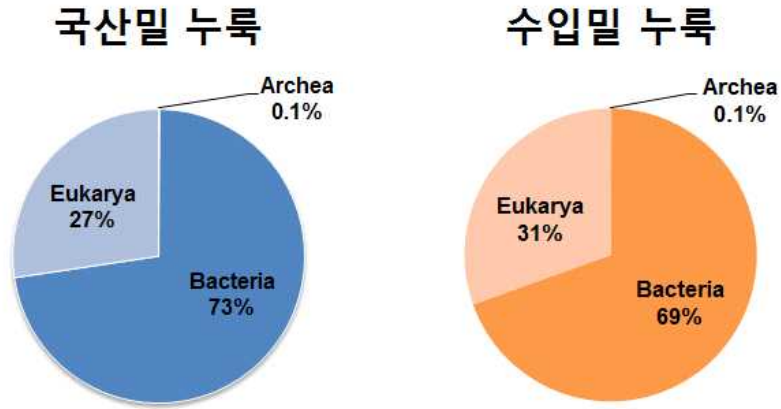


그림 155. 전 메타유전체 염기서열 해독 결과로 나타난 누룩 메타유전체의 도메인 수준에서의 군집 비율

- 국내산 밀로 제조된 누룩의 메타유전체에서는 bacteria 중 Tenericutes의 abundance가 매우 높게 나타났음. Class 수준에서는 Mollicutes 및 Gammaproteobacteria가 우점하는 것으로 보임(그림 156).
- 수입산 밀로 제조된 누룩의 메타유전체 염기서열 해독 결과에서는 bacteria의 phylum 수준에서는 Proteobacteria가 우점하였으며, Class 수준에서 살펴보았을 때 Gammaproteobacteria가 대부분 우점하는 것으로 나타남(그림 156). 따라서 국산밀과 수입밀 누룩의 bacteria의 군집 구조에서 큰 차이를 나타냄을 알 수 있었음.

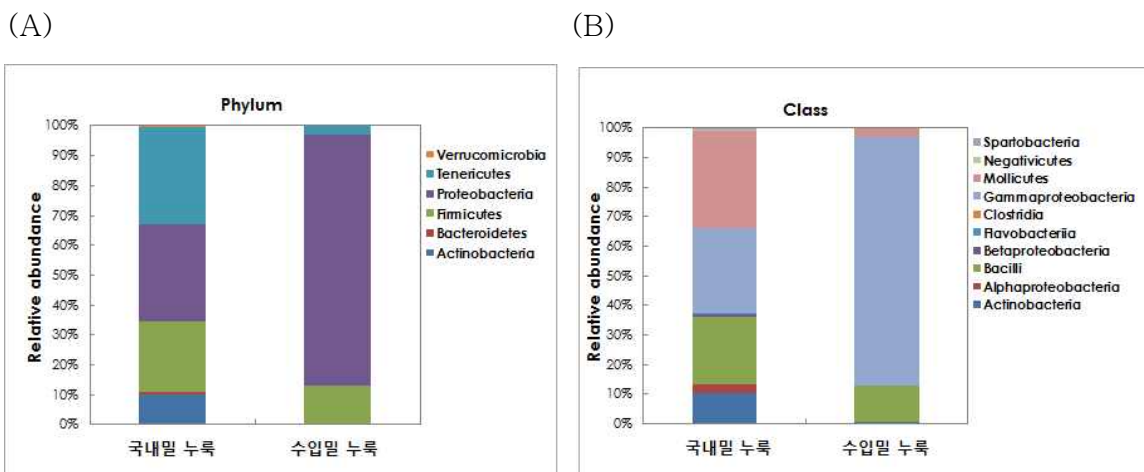


그림 156. 국내밀 및 수입밀로 제조한 누룩의 메타유전체 분석을 통한 bacteria의 phylum(A), class(B) 수준에서의 군집 분석 결과

- 수입산 밀로 제조된 누룩의 메타유전체로부터 bacteria에서는 Acidbacteria외에 비율이 높지는 않으나 Proteobacteria, Firmicutes, Bacteriodetes도 함께 detection 되었음. 또한 fungi의 경우에도 class 수준에서 비교해보았을 때 국내산 밀로 제조된 누룩의 메타유전체에서 보다 다양한 종류로 군집이 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었음(그림 156-157).
- 누룩의 주요 미생물군 분리 동정 연구는 참조유전체 연구팀에서 곰팡이 균주를 분리 증임. 군집 구조 파악 결과를 토대로 주요 미생물군을 분리 및 동정할 균주로서 세균 가운데 높은 비율로 존재하는 Acidobacteria 세균 및 수입밀과 국산밀에 다른 비율로 존재하는 Pantoea, Starphylococcus 등을 후보로 임시 선정함.
- Fungi 중에서는 phylum Ascomycota, Fungi incertae sedis, Basidiomycota, Chytridiomycota 순으로 abundance가 높게 나타남. 누룩에서의 주요 곰팡이는 *Aspergillus*로 알려져 있으며, 이는 phylum Ascomycota, class Eurotiomycetes에 속함(그림 157).

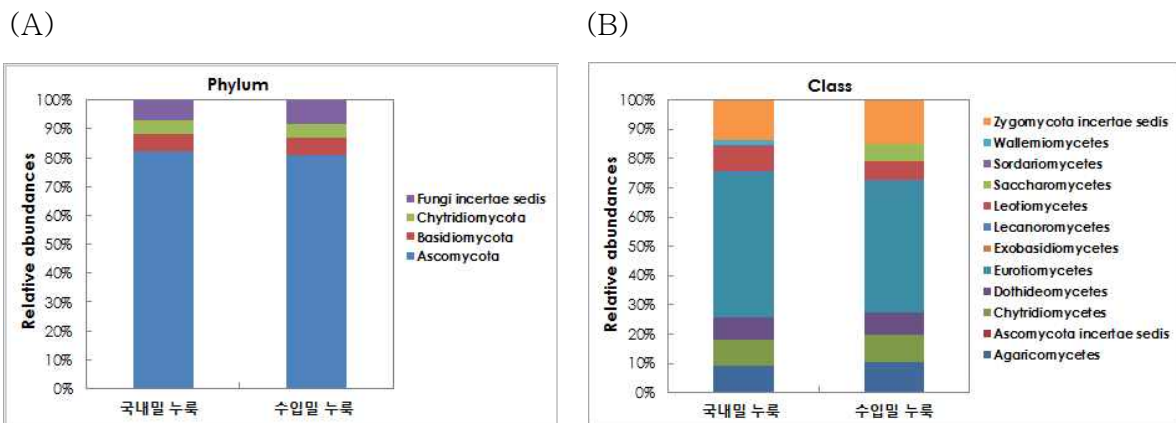


그림 157. 국내밀 및 수입밀로 제조한 누룩의 메타유전체 분석을 통한 fungi의 phylum(A), class(B) 수준에서의 군집 분석 결과

- 한우 장내 전 메타유전체 서열 분석으로부터 군집 구조 분석을 수행함. 한우 공장 (jejunum)의 경우, 한우 DNA가 대부분으로 분석이 어려움. 따라서 맹장과 대장 내 메타유전체에 대해서 분석을 수행함. 그 결과 두 가지 샘플 모두 유사한 군집 구조가 관찰되었으며(그림 158), 추후 전 메타유전체 분석에 참고 자료로 활용할 수 있음.

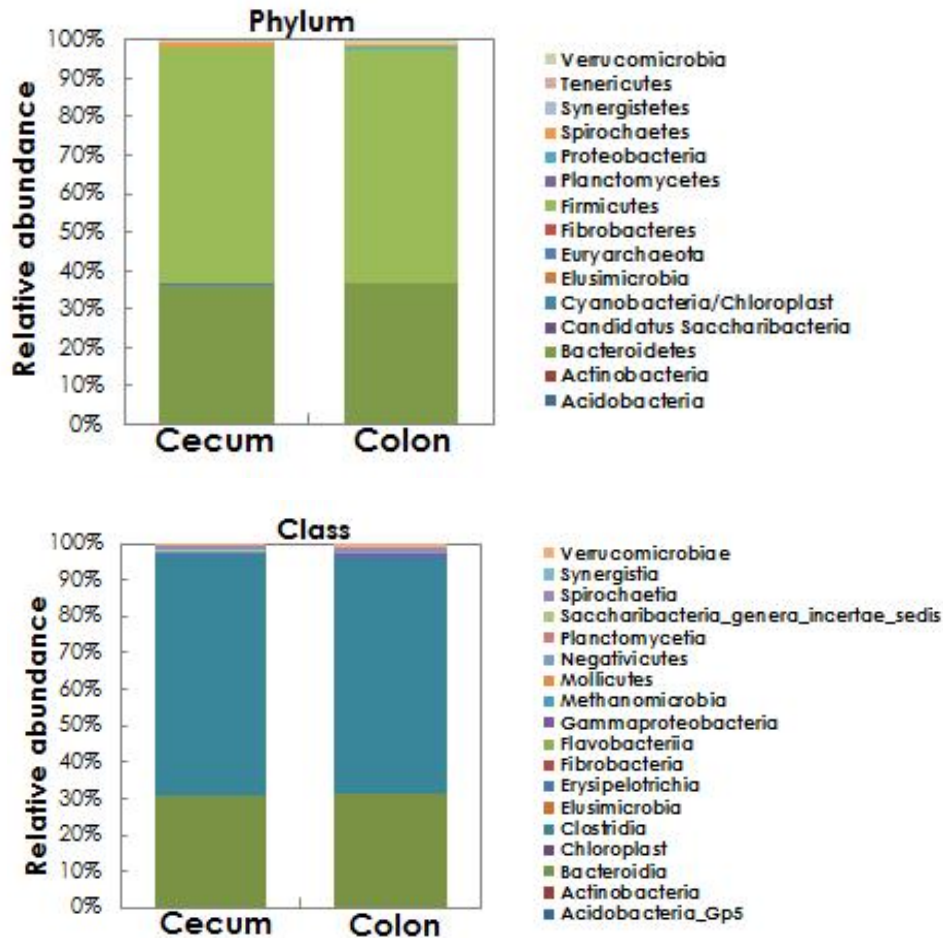


그림 158. 한우 맹장 및 대장 내 세균 군집 구조 분석

다. 전 메타유전체 분석 방법 수집 및 전 메타유전체 분석

- Quality trimming 및 원료 및 기주 유전체 서열 제거를 통해 준비된 read들을 가지고 *de novo* assembly를 수행함. *de novo* assembly 프로그램 선정 및 최적 k-mer size를 시험하기로 하고, SOAPdenovo 및 CLC Genomics Workbench를 이용하고자 하였음. 먼저 약 3Gb의 해독 염기서열 read들을 가지고 SOAPdenovo를 이용하여 k-mer size를 21부터 41까지를 검토함. 그 결과, scaffold 수, size, N50 contig size 등을 고려했을 때, 국내밀 누룩의 경우 k-mer 25, 수입밀 누룩의 경우 kmer-21가 가장 좋은 assembly 결과를 보임. BMTagger 실행 후, 밀 유전체 염기서열에 해당하는 read들이 많은 비율로 존재하는 것을 확인하고, SOAPdenovo에서 보인 kmer-21 및 25 조건을 가지고 CLC Genomics Workbench에서 *de novo* assembly를 수행한 결과, SOAPdenovo 보다 좋은 assembly 결과를 보임(표 27). 최종 scaffold 및 contig 서열을 가지고 분석을 진행함(표 28).

표 27. SOAPdenovo를 이용한 누룩 전 메타유전체 염기서열 조립

국내밀 누룩	Kmer 21	Kmer 23	Kmer 25	Kmer 27	Kmer 31	Kmer 41
Scaffold number	2,231	2,251	2,166	2,201	2,136	1,386
In-scaffold contig number	10,794	11,302	11,949	12,747	14,441	12,393
Total scaffold length	2,523,991	2,575,244	2,612,158	2,620,589	2,570,124	1,858,315
Average scaffold length	1,131	1,144	1,205	1,190	1,203	1,340
Filled gap number	314	300	286	236	219	162
Longest scaffold	76,458	56,623	57,049	57,121	63,428	21,928
Scaffold and singleton number	8,223	8,640	8,975	9,628	10,793	8,891
Scaffold and singleton length	3,255,662	3,334,894	3,401,180	3,468,062	3,497,478	2,668,517
Average length	395	385	378	360	324	300
N50	1,006	918	1,041	868	752	798
N90	105	102	98	95	88	89
수입밀 누룩	Kmer 21	Kmer 23	Kmer 25	Kmer 27	Kmer 31	Kmer 41
Scaffold number	16,391	12,704	9,262	6,508	3,010	1,257
In-scaffold contig number	41,718	36,126	31,224	27,057	21,051	11,569
Total scaffold length	13,092,384	10,121,009	7,374,405	5,661,563	3,270,055	1,976,524
Average scaffold length	798	796	796	869	1,086	1,572
Filled gap number	129	126	122	222	214	131
Longest scaffold	12,402	12,678	14,165	45,231	74,708	34,951
Scaffold and singleton number	33,195	29,153	25,611	22,170	17,118	8,489
Scaffold and singleton length	15,329,661	12,284,220	9,483,154	7,437,863	4,758,525	2,788,603
Average length	461	421	370	335	277	328
N50	625	619	614	615	639	1,141
N90	170	119	99	91	80	91

표 28. 국내밀 및 수입밀 누룩 메타유전체 서열 최종 조립 결과

	No. of scaffolds	Average length(bp)	N50 contig size(bp)	Total bases(bp)
국내밀 누룩				
Reads	3,914,546	99.49		389,454,631
Contigs	10,301	765	728	7,882,441
수입밀 누룩				
Reads	10,215,316	99.48		1,016,178,503
Contigs	26,257	2,174	21,918	57,084,556

- 최종 조립된 scaffold 염기서열을 가지고 Metagenemark 프로그램을 이용하여 gene prediction을 수행한 결과, 국산밀 누룩의 경우 6,333개, 수입밀 누룩의 경우 54,852개의 CDS가 예측되었음.
- COG analysis를 수행한 결과, 두 가지 시료의 유전자 구성 비율이 다름을 알 수 있었고, 밀의 원료에 따라 미생물 및 메타유전체의 차이가 나며 유전자 구성이 달라짐을 확인함(그림 159).

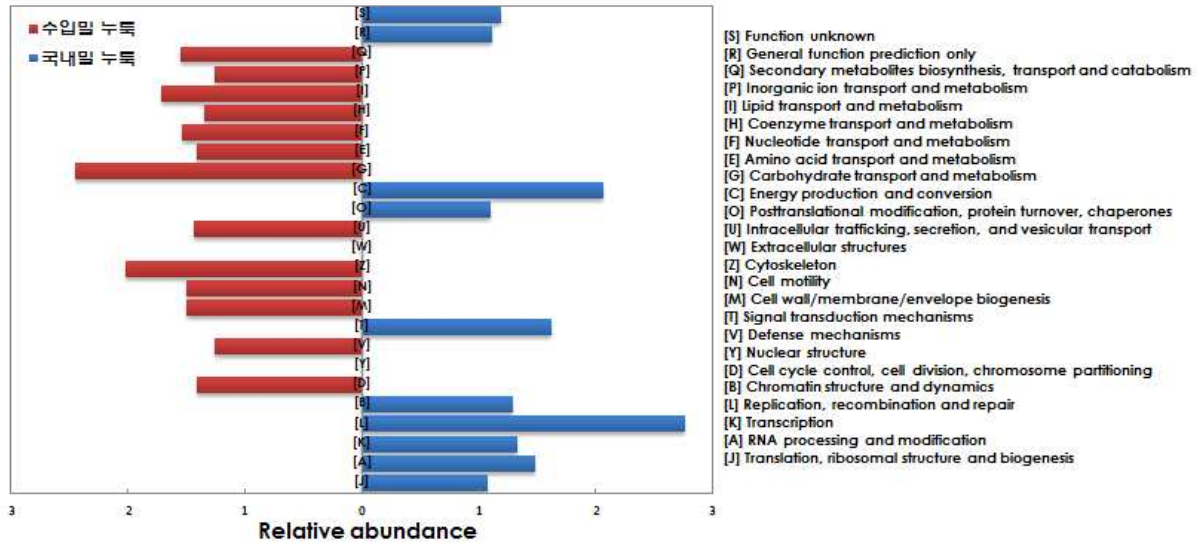


그림 159. COG analysis를 통한 국내밀 누룩과 수입밀 누룩의 메타유전체의 유전자 구성 비율 분석

- Carbohydrate 관련 metabolism 분석을 위해 CAZy database 및 dbCAN 프로그램을 이용하여 수입밀 누룩과 국내밀 누룩의 메타유전체 내 유전자들로부터 CAZy module을 분석하였음. 그 결과 두 가지 종류의 누룩에서의 carbohydrate metabolism에 관련된 유전자들의 구성 비율이 다름을 확인하였음(그림 160).

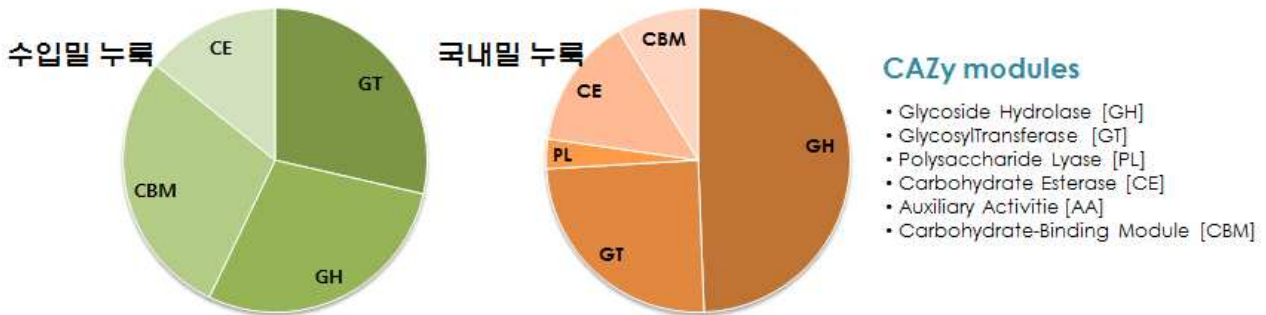


그림 160. CAZy database 및 dbCAN 프로그램을 이용한 수입밀 누룩과 국내밀 누룩의 메타유전체에서의 CAZy module 분석

- 한우 맹장 및 대장 미생물 전 메타유전체 해독 서열을 조립하고(표 29), COG database를 기반으로 유전자 기증 분류를 분석함. 두 장내 시료의 메타유전체 내 군집 구조가 매우 유사했으며 이에 따라 COG 유전자 카테고리 유전자 구성 또한 유사함을 나타내었음(그림 161). 또한 scaffold binning을 통해 한우 맹장 및 대장 내 염기서열들을 분류하여 두 환경내 미생물 유전체 서열 구성을 확인함 (그림 162).

표 29. 한우 맹장 및 대장 내 전 메타유전체 해독 서열 조립 결과

	No. of scaffolds	Average length(bp)	N25	N50	N75	Minimum	Maximum	Total bases(bp)
맹장	189,392	823	1,414	818	606	300	96,123	155,900,680
대장	158,493	817	1,330	806	609	300	96,053	129,488,003

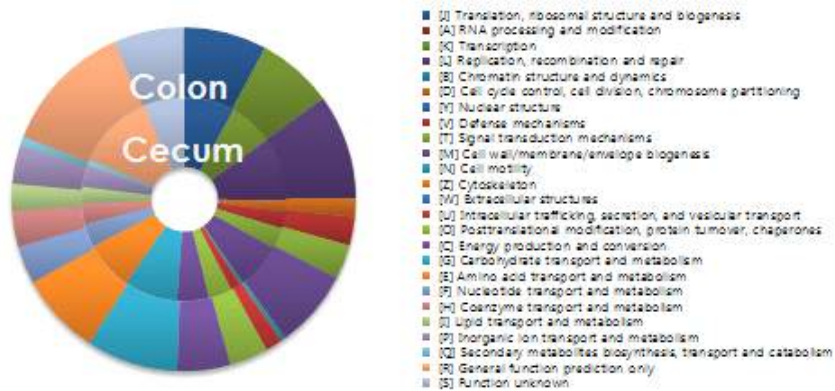


그림 161. 한우 맹장 및 공장의 전 메타유전체 조립 서열로부터 COG 기반의 유전자 기능 분류 분석

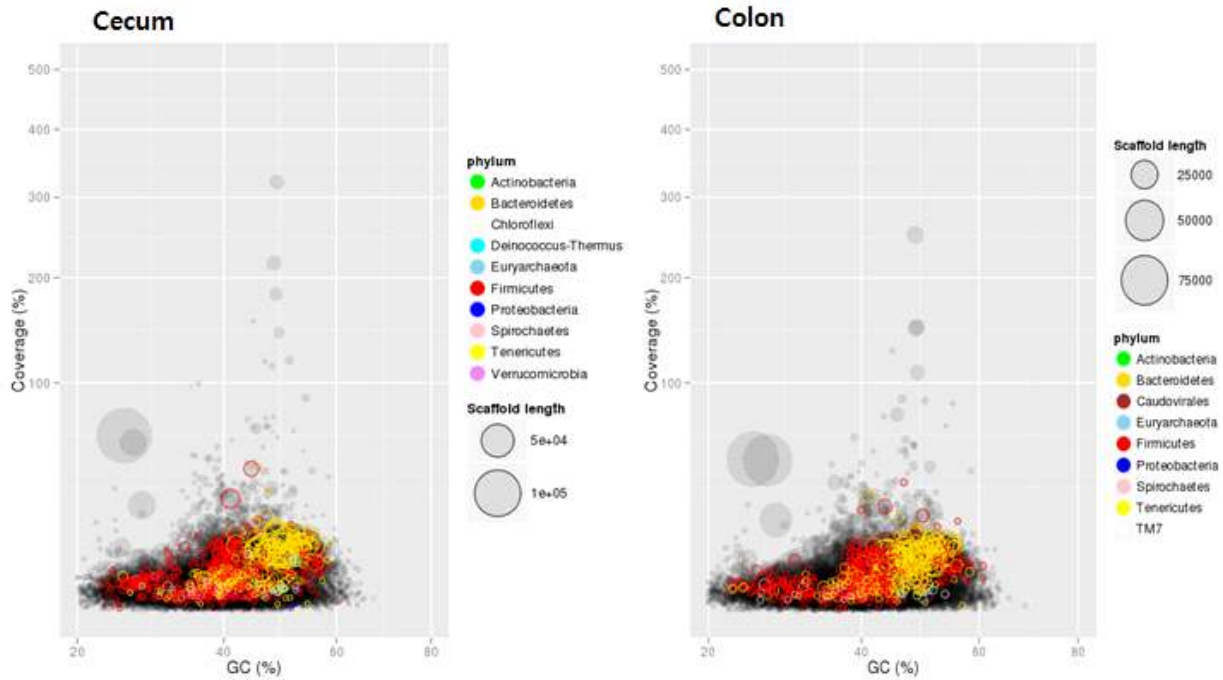


그림 162. 한우 장내 메타유전체 scaffold 염기서열들을 GC content에 따라 binning한 결과

라. 1차년도에 수행한 환경 선정 및 미생물 군집 구조 조사 결과를 토대로 미생물 메타유전체 분석 샘플 선정 및 메타 유전체 추출

◎ 누룩 시료로부터 메타유전체 추출 방법 개선

- 1차년도에 수행한 누룩 메타유전체 분석 결과를 토대로 국산밀, 수입산밀로 제조한 누룩의 발효 시간대에 따른 메타유전체 해독을 수행하여 누룩 시료의 재료별, 시간대별 비교메타유전체 분석을 수행하기로 함.
- 효율적인 전 메타유전체 해독을 위해 식품 원료의 DNA 즉, 밀 DNA를 최대한 배제된 미생물 메타유전체가 필요하므로 효과적인 메타유전체 DNA 추출을 위한 방법을 고안, 실험함.
- 누룩에 주로 많은 비중으로 존재하는 진균류 DNA를 확보하기 위해 lyticase를 처리하거나, 식품으로부터 유래된 샘플 내 파쇄된 식품 원료 DNA를 제거하기 위해 DNase를 처리하는 방법을 사용하였으며, 두 가지 enzyme들을 각각 처리하거나 동시에 처리하여 실험함(그림 163a와 b).
- 전처리를 통해 추출된 DNA를 확인하고 추출방법 시험 효과를 평가하기 위해 일차적으로 PCR 증폭을 수행함(그림 163c와 d). 그 결과, DNA quality는 전처리 과정없이 추출한 방법에 비해 다소 개선된 것으로 보였으며, 표지 유전자들의 PCR 증폭 또

한 DNase 및 lyticase 처리시에 WBR 증폭양이 다소 줄어들음을 확인함.

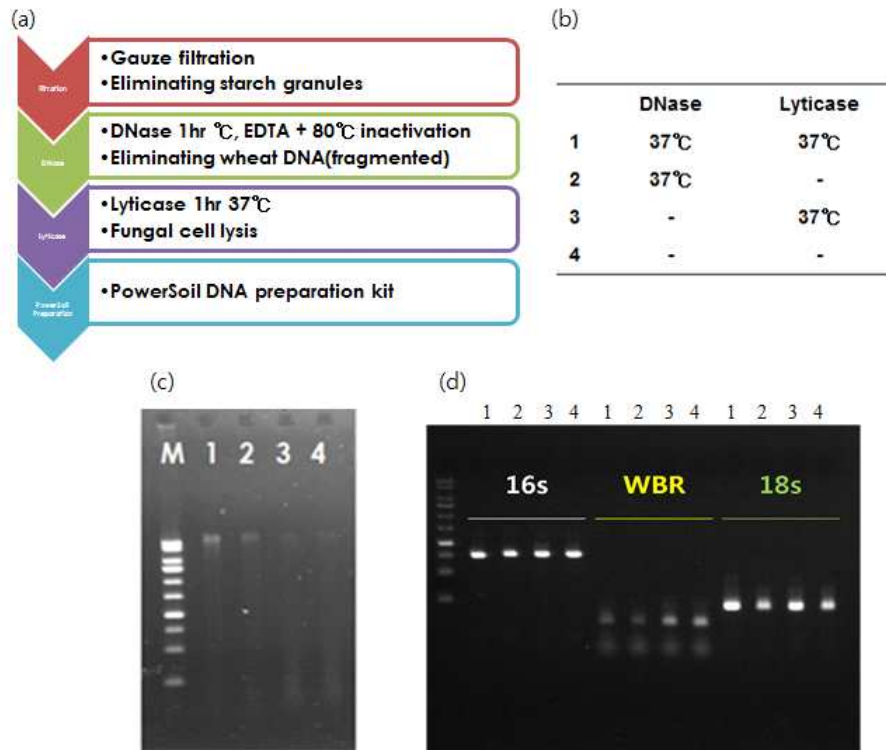


그림 163. 전 메타유전체 DNA 추출 개선을 위한 시료 전처리 실험 과정 (a) 및 조건 (b). 각각의 실험 조건으로 추출된 전 메타유전체 DNA (c)와 세균, 밀, 진균 DNA 함량을 평가하기 위한 PCR 증폭 결과

○ 전 메타유전체 염기서열 해독 효율을 평가하기 위해 추출한 DNA들을 모두 HiSeq에 적용하여 sequencing을 수행하고, 실제 식품 원료 밀 DNA 함량 및 제거비율을 비교해본 결과, DNase를 처리한 실험에서 밀 DNA 제거 효과가 크게 나타남을 확인함 (표 30, 그림 164). DNase와 lyticase를 동시에 처리한 실험에서도 효과가 좋은 것으로 나타났으나, lyticase만을 처리한 실험에서는 다소 효과가 크지 않은 것으로 보임.

표 30. 전처리에 따른 밀 DNA 제거 효과

Sample	Number of reads	No. reads after BMTagger	Removed reads(%)
1	96,650,426	93,518,624	3%
2	110,048,340	104,564,700	5%
3	108,989,108	55,733,584	49%
4	105,805,804	21,901,054	79%

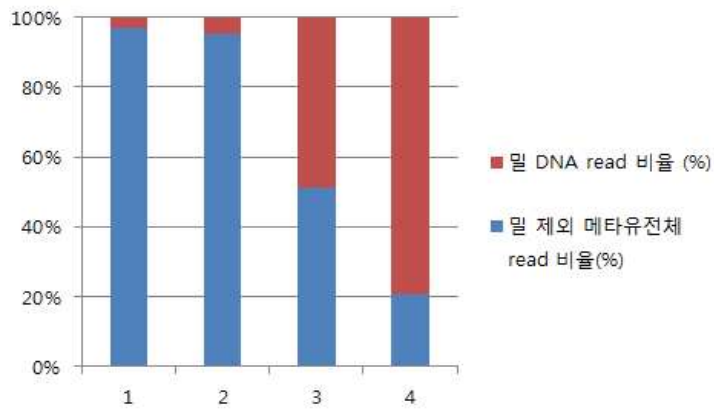


그림 164. 전처리에 따른 밀 DNA 제거 효과

- HiSeq으로 해독된 염기서열을 조립하여 조립 효율을 평가하고 조립된 서열에 대해 Blastn을 수행하여 scaffold 단위로 taxonomy를 assignment 하였음. 그 결과, assembly 효율은 기존의 무처리 샘플에 비해 모두 높은 효율을 보였고, 세균 및 진균에 해당하는 서열의 비율 구성에서 진균 비율이 높게 나타남을 확인하였음. 또한 세균과 진균 내의 군집 구성에는 큰 차이가 없는 것으로 보였음(그림 165). 전 메타유전체 DNA 추출 방법을 개선시키기 위한 방법으로 본 연구에서 수행한 시료 전처리가 효과적임을 알 수 있었고, DNase를 처리를 통해 밀 DNA를 제거하여 추가로 수행하는 전 메타유전체 분석들에 적용하기로 하였음.

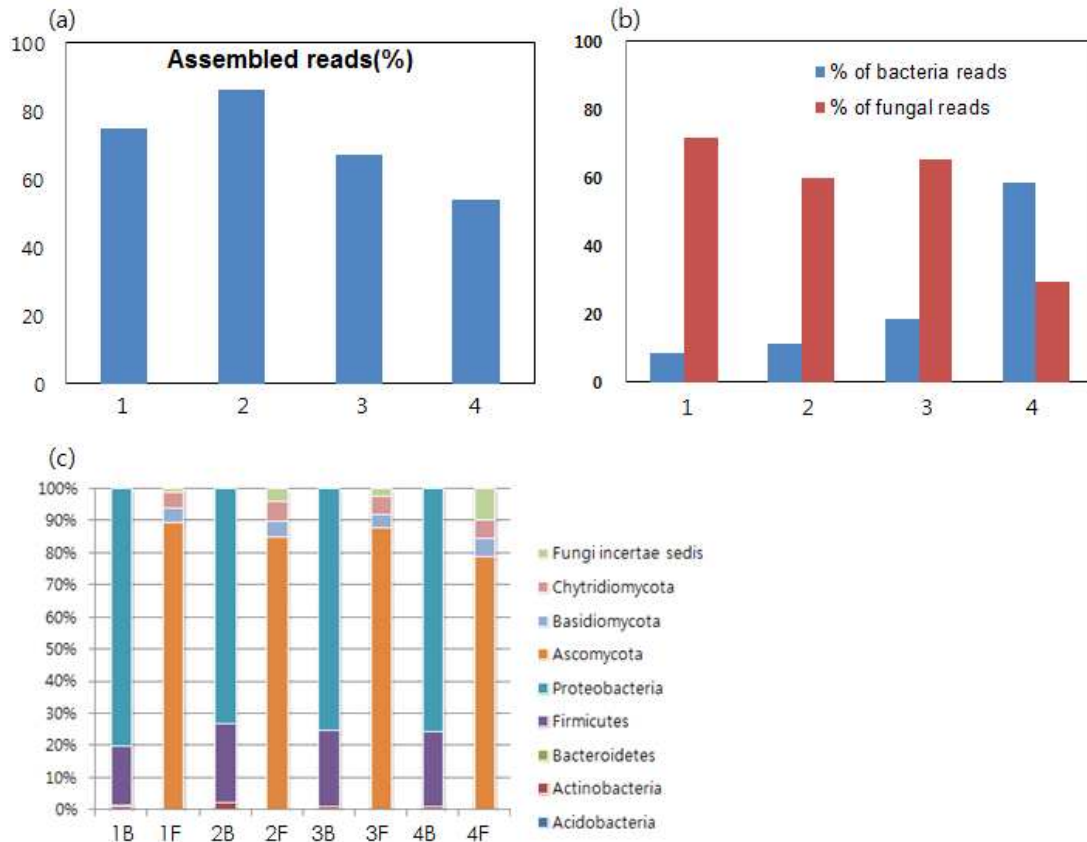


그림 165. 전 메타유전체 DNA 추출 방법에 따른 해독 서열 조립 결과

마. 선정된 환경의 미생물 메타유전체 염기서열 결정 및 데이터 분석

- 개선된 전 메타유전체 DNA 추출 방법을 이용하여 누룩 원료 종류 및 발효 시간에 따른 메타유전체를 분석함. 발효 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15일의 누룩과 5일간 건조한 20일차의 누룩 샘플에 대해 16S rRNA과 ITS amplicon sequencing read를 이용하여 Mothur 및 Qiime 등의 프로그램들을 이용하여 군집 구조를 비교하였음.
- 세균 군집의 경우, phylum 단위에서부터 매우 큰 차이를 보였고, 수입밀의 경우 Proteobacteria, 국산밀의 경우 Firmicutes가 우점하였음. Genus 단위에서 분석하였을 때, 수입밀은 *Pantoea*, 국산밀은 *Staphylococcus* 속의 세균이 많은 비중을 차지하는 것으로 보임(그림 166, 167). LEfSe 분석 결과를 통해서도 종류별, 시간대별로 유의미한 차이가 있음을 알 수 있었음(그림 168).

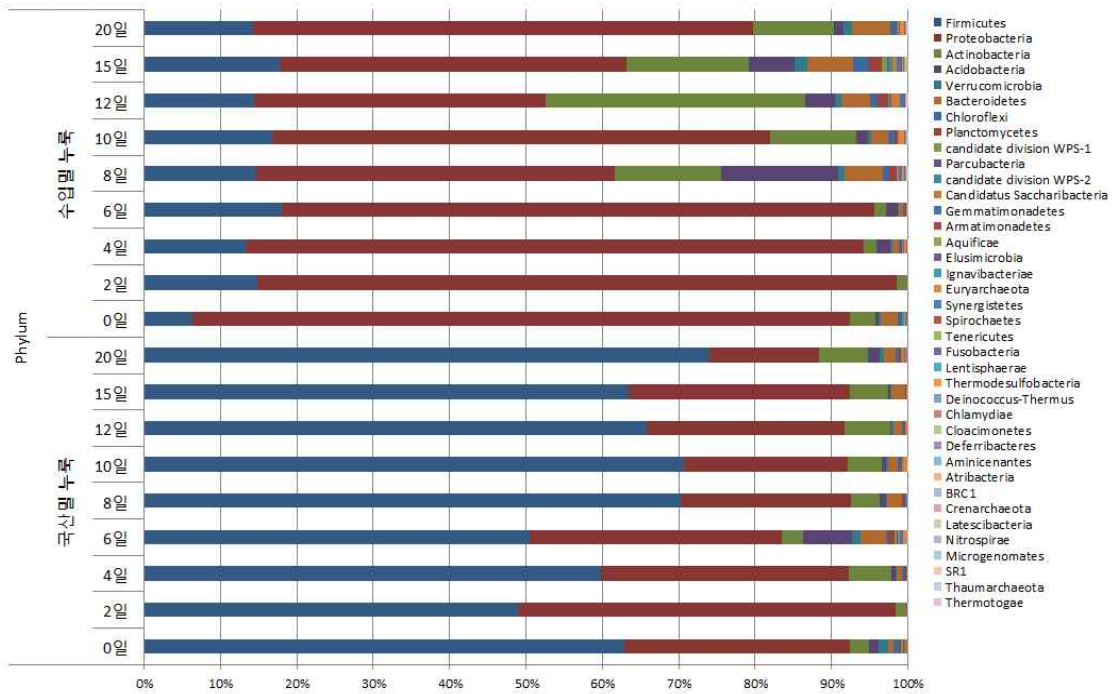


그림 166. 국산밀 누룩과 수입밀 누룩에서 발효시간에 따른 phylum 수준에서의 세균 군집 구조 비교

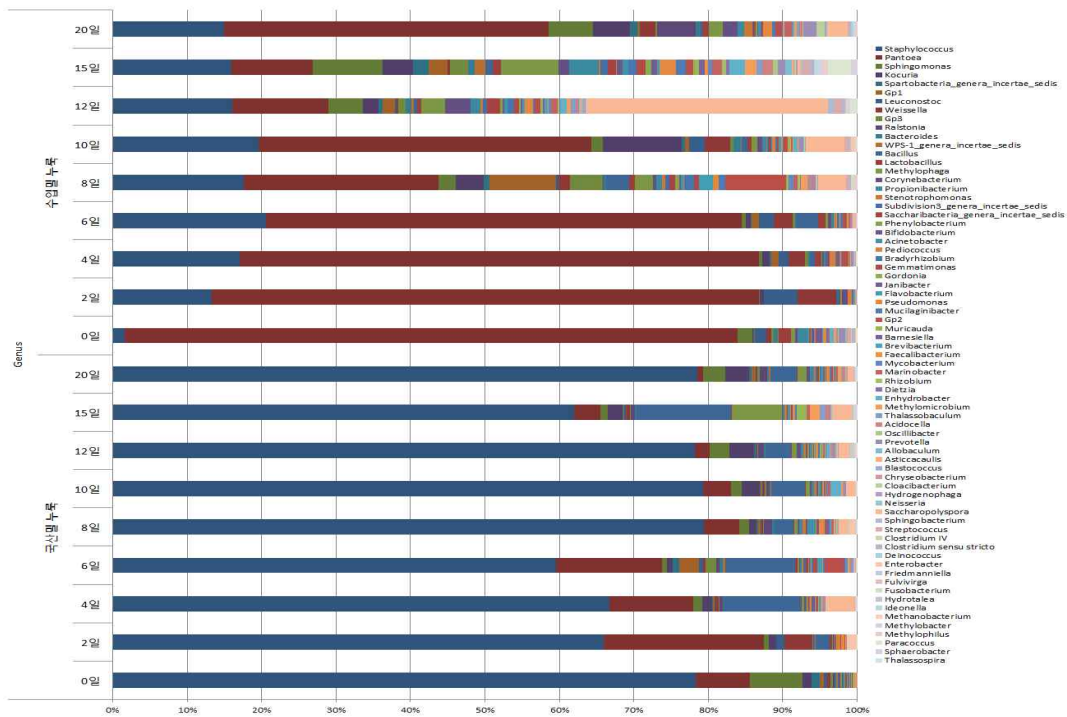


그림 167. 국산밀 누룩과 수입밀 누룩에서 발효시간에 따른 genus 수준에서의 세균 군집 구조 비교

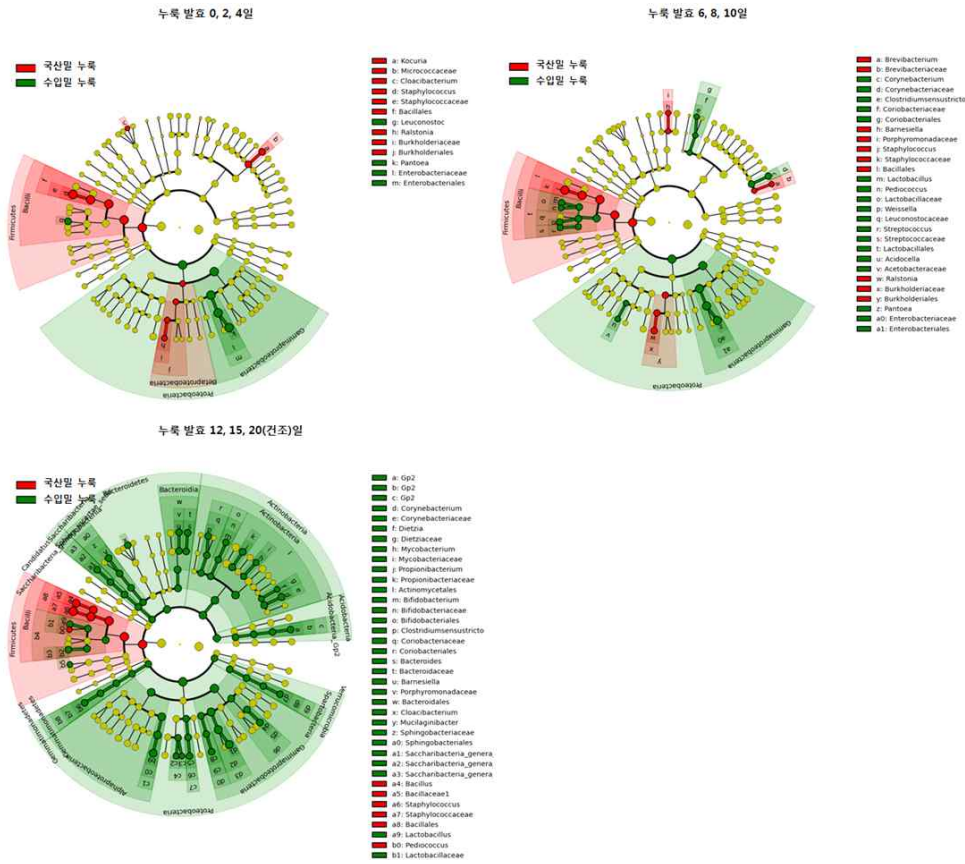


그림 168. 국산밀 및 수입밀 누룩의 발효 시간에 따라 유의적인 차이를 나타내는 세균 군집 분석

○ 진균 군집의 경우, phylum 단위에서는 Ascomycota가 시간 및 두 종류의 누룩에서 모두 우점하였으나, 하위 단위에서는 군집 구성에 차이가 있음이 관찰됨(그림 169, 170). 발효 시간에 있어서는 4일 이후에 군집 구조가 크게 달라졌으며 15일차에 *Aspergillus* 속이 국산밀, 수입밀 모두에서 가장 높은 비율로 우점하였음. 밀의 종류에 따라 누룩에 존재하는 진균류의 속의 비율에 차이가 있음을 알 수 있었는데, 대표적으로 *Rhizopus*가 발효 후기의 국산밀에 더 많은 비율로 존재하였고, 그 외에 다른 속에서도 비교적 작은 비율의 차이들이 나타남(그림 171). *Aspergillus* 나 *Rhizopus*는 대표적인 막걸리의 향미 차이를 나타내는 속으로써, 이들의 차이가 누룩에 의한 식품 발효 결과물에 차이를 나타내는 것으로 예상됨.

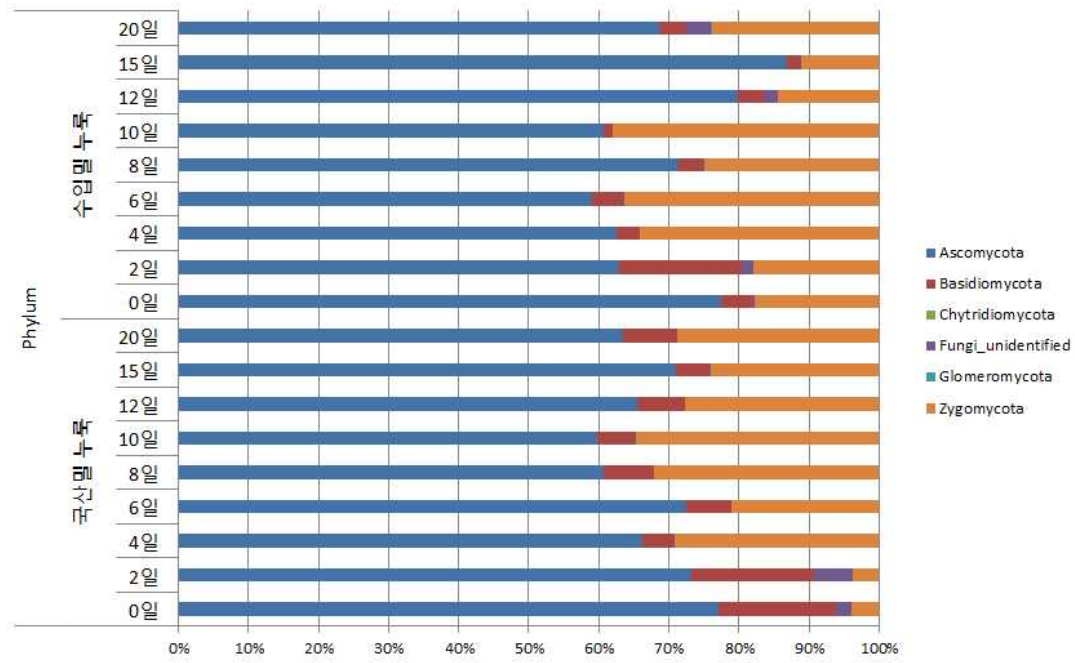


그림 169. 국산밀 누룩과 수입밀 누룩에서 발효시간에 따른 phylum 수준에서의 진균 군집 구조 비교



그림 170. 국산밀 누룩과 수입밀 누룩에서 발효시간에 따른 genus 수준에서의 진균 군집 구조 비교

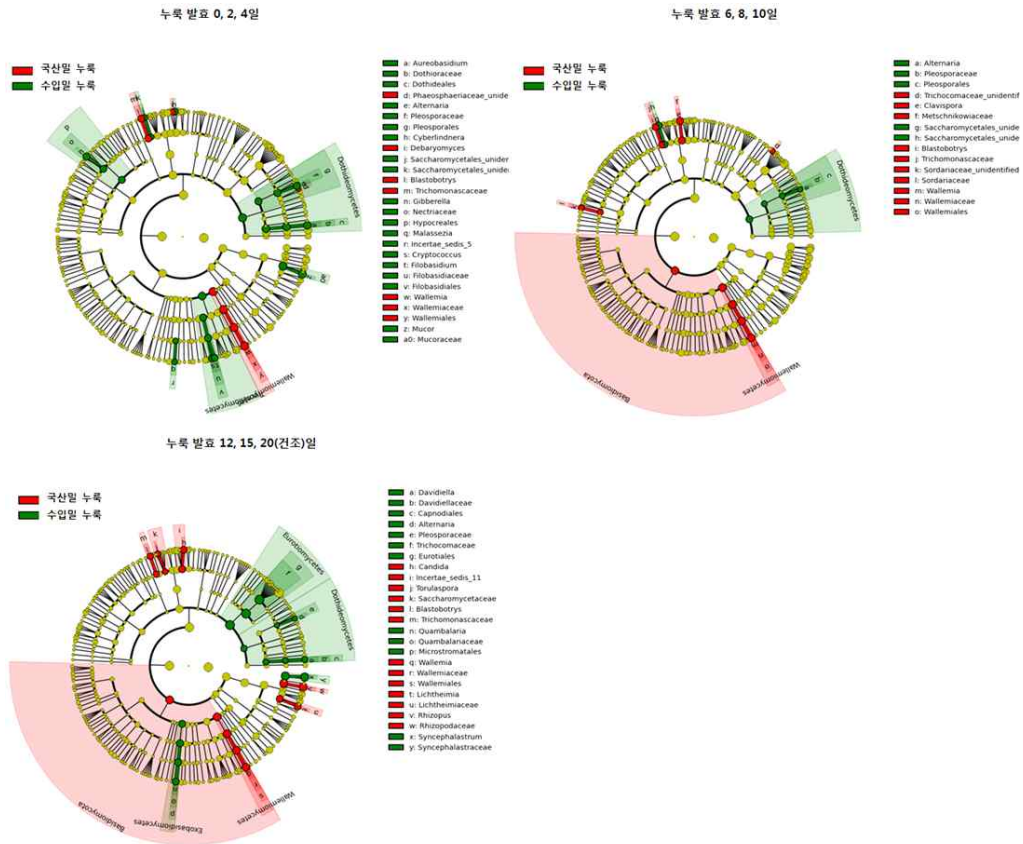


그림 171. 국산밀 및 수입밀 누룩의 발효 시간에 따라 유의적인 차이를 나타내는 진균 군집 분석

바. 미생물 전 메타유전체 서열 분석

○ 1, 2차년도에 누룩 메타유전체 추출 및 16S rRNA, ITS amplicon sequence를 이용한 community 분석을 통해 얻은 결과를 토대로 전 메타유전체 염기서열 해독을 수행하였음. amplicon sequencing을 수행하였던 수입밀 및 국산밀 누룩의 각각의 시간별 샘플(총 18개)의 결과로부터 전 메타유전체에 적용할 샘플을 4개씩 선정하였음. 누룩 전 메타유전체 분석 대상인 8 종류의 샘플(원료별, 발효시간별 0, 8, 15, 20시간)을 Illumina HiSeq 2500을 이용하여 염기서열을 해독하였음.

○ 해독 염기서열의 quality 선별을 위해 CLC genomics workbench를 이용하여 quality trimming을 수행하여 고품질의 염기서열을 확보하고, 이후 원료인 밀로부터 유래한 DNA를 제거하기 위해 Bmtagger 프로그램을 이용하여 밀 유전체 서열을 포함하는 read들을 선별하고 나머지 read들을 수집하여 이들을 다음 분석들에 이용하였음.

○ CLC genomics workbench를 이용하여 *de novo* assembly를 수행한 결과, 296Mb ~ 13Gb에 이르는 contig sequence들을 확보하였음(표 31).

표 31. 샘플별 생산 및 확보된 sequencing read

		Read count	Average length (bp)	Total bases (bp)
국산밀 누룩 발효 0일(K0)	Reads	39,265,104	147.65	5,797,465,047
	Matched	34,658,614	147.96	5,128,136,106
	Not matched	4,606,490	145.3	669,328,941
	Contigs	118,247	976	115,511,978
	Reads in pairs	28,139,300	411.93	
	Broken paired reads	6,519,314	147.34	
국산밀 누룩 발효 8일(K08)	Reads	55,718,290	146.94	8,187,003,808
	Matched	52,339,557	147	7,694,127,031
	Not matched	3,378,733	145.88	492,876,777
	Contigs	150,614	1,746	263,012,316
	Reads in pairs	46,569,244	388.08	
	Broken paired reads	5,770,313	146.4	
국산밀 누룩 발효 15일(K15)	Reads	61,955,872	146.86	9,098,561,552
	Matched	59,386,093	146.9	8,723,752,598
	Not matched	2,569,779	145.85	374,808,954
	Contigs	105,211	2,069	217,698,347
	Reads in pairs	55,399,672	391.77	
	Broken paired reads	3,986,421	146.04	
국산밀 누룩 발효 20일(K20)	Reads	52,292,482	146.61	7,666,581,527
	Matched	49,774,075	146.67	7,300,268,929
	Not matched	2,518,407	145.45	366,312,598
	Contigs	122,447	2,089	255,913,065
	Reads in pairs	45,865,474	394.65	
	Broken paired reads	3,908,601	145.98	
수입밀 누룩 발효 0일(S0)	Reads	2,074,056	142.81	296,199,600
	Matched	448,279	142	63,655,667
	Not matched	1,625,777	143.04	232,543,933
	Contigs	14,162	485	6,874,142
	Reads in pairs	154,714	296.52	
	Broken paired reads	293,565	140.22	
수입밀 누룩 발효 8일(S08)	Reads	29,382,938	147.75	4,341,442,080
	Matched	26,236,708	147.85	3,878,996,480
	Not matched	3,146,230	146.98	462,445,600
	Contigs	111,309	1,499	166,869,401
	Reads in pairs	24,633,424	326.81	
	Broken paired reads	1,603,284	146.86	
수입밀 누룩 발효 15일(S15)	Reads	34,560,902	146.95	5,078,885,220
	Matched	32,430,482	147.06	4,769,293,844
	Not matched	2,130,420	145.32	309,591,376
	Contigs	79,623	2,217	176,600,975
	Reads in pairs	29,984,456	386.56	
	Broken paired reads	2,446,026	146.24	
수입밀 누룩 발효 20일(S20)	Reads	90,714,856	146.95	13,330,753,059
	Matched	87,542,388	146.98	12,867,130,424
	Not matched	3,172,468	146.14	463,622,635
	Contigs	79,768	2,288	182,521,063
	Reads in pairs	82,084,724	380.02	
	Broken paired reads	5,457,664	146.27	

○ 각각의 sequence data들로부터 수집한 read들을 가지고, 16S rRNA, ITS, 18S rRNA 등의 taxonomic marker 서열을 포함하는 read들을 수집하여 군집 구조를 분석하였음. 그 결과, amplicon sequencing에서 분석되었던 군집 구조의 차이가 나타났음.

특히 세균 군집 구조는 국산밀 누룩과 수입밀 누룩 시료별, 시간별 시료에 따라 큰 차이가 나타났음. 또한 진균 군집 구조도 국산밀과 수입산밀의 군집에 차이가 있었으며 발효 시간에 따른 차이도 관찰되었음(그림 172).

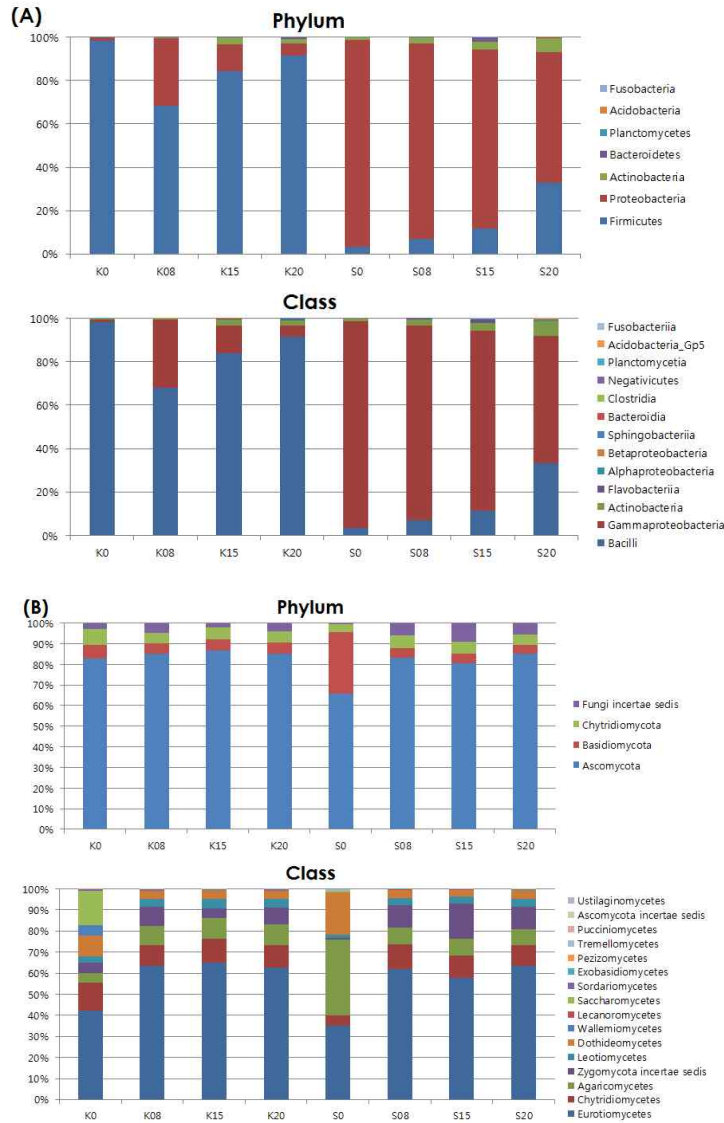


그림 172. 전 메타유전체 서열로부터 분석된 국산밀 누룩과 수입밀 누룩의 발효시간에 따른 세균 군집 구조 (A) 세균 군집 구조 (B) 진균 군집 구조

○ PCoA 분석 결과, 세균과 진균 군집이 원료의 종류에 따라 구별되었고, 발효 후기에 미생물 군집이 비교적 수렴됨을 관찰할 수 있었음(그림 173).

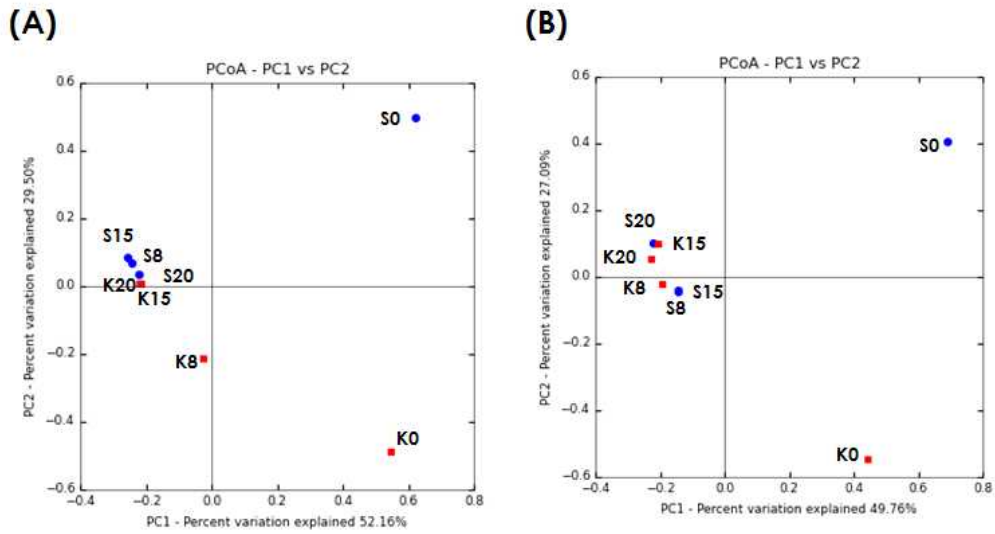


그림 173. 전 메타유전체 서열로부터 분석된 세균 군집(A)과 진균 군집(B)의 PCoA 분석 결과

- 전체 contig 서열로부터 원핵, 진핵 유전체 서열을 Megablast, DIAMOND 프로그램을 이용하여 구분한 뒤, MetaGenemark와 Genemark-ES 프로그램을 이용하여 원핵 미생물 및 진핵세포의 유전자들을 각각 예측하였음(표 32).

표 32. 유전자 예측 결과

		No. total contigs	Total length	Average length	N50 contig size	Max. contig size	No. of CDSs
국산밀 누룩 발효 0일	total contig	118,247	115,511,978	976.9	1,265	61,335	119,014
	세균+unknown	56,603	53,033,618	936.9	1,184	61,335	78,682
	진균	61,644	62,478,360	1013.5	1,326	26,953	40,332
국산밀 누룩 발효 8일	total contig	150,614	263,012,316	1746.3	4,516	244,571	206,165
	세균+unknown	84,306	81,715,736	969.3	1,236	169,831	123,397
	진균	66,308	181,296,580	2734.2	10,713	244,571	82,768
국산밀 누룩 발효 15일	total contig	105,211	217,698,347	2069.2	9,689	381,977	145,462
	세균+unknown	45,716	49,279,490	1077.9	1,485	115,057	64,230
	진균	59,495	168,418,857	2830.8	19,791	381,977	81,232
국산밀 누룩 발효 20일	total contig	122,447	255,913,065	2090	12,158	190,662	147,062
	세균+unknown	47,528	41,797,058	879.4	945	115,733	51,249
	진균	74,919	214,116,007	2858	15,552	190,662	95,813
수입밀 누룩 발효 0일	total contig	14,162	6,874,142	485.4	489	3,381	7,761
	세균+unknown	13,897	6,708,410	482.7	ND	ND	7,505
	진균	265	165,732	625.4			256
수입밀 누룩 발효 8일	total contig	111,309	166,869,401	1499.2	3,966	271,426	117,987
	세균+unknown	54,009	40,841,254	756.2	733	66,086	52,545
	진균	57,300	126,028,147	2199.4	6,896	271,426	65,442
수입밀 누룩 발효 15일	total contig	79,623	176,600,975	2218	7,996	213,274	98,088
	세균+unknown	4,369	14,250,717	3261.8	10,434	213,274	25,600
	진균	54,356	151,426,774	2785.8	1,305	77,021	72,488
수입밀 누룩 발효 20일	total contig	79,768	182,521,063	2288.1	9,602	201,573	103,416
	세균+unknown	29,558	30,405,059	1028.7	1,426	77,631	35,826
	진균	50,210	152,116,004	3029.6	13,145	201,573	67,590

○ 전체 유전자를 가지고 COG 및 KOG database에 대해 rpsblast를 이용하여 align 하고 각각의 category의 유전자 비율을 계산한 결과, 크게 원료별 유전자 비율 차이보다는 시간대별 유전자 구성 비율에 차이가 나는 것으로 보임(그림 174).

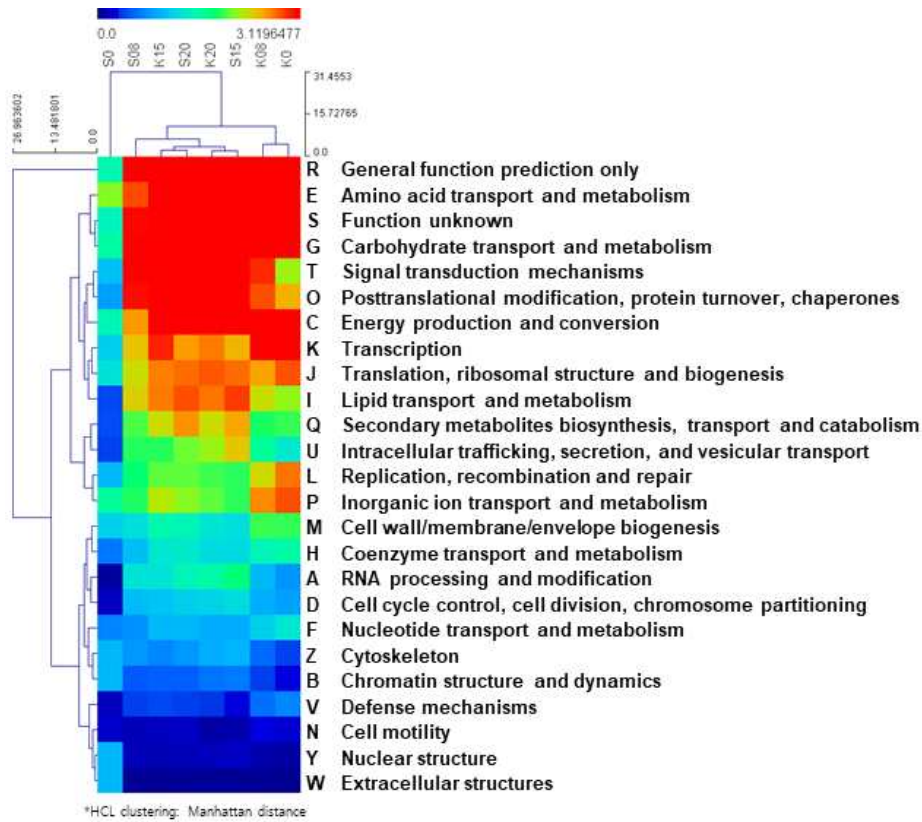


그림 174. COG, KOG 유전자 비율

- 대사경로 분석을 수행하기 위해 HuMAN2 프로그램을 이용하였고, Uniref90 database 기반의 annotation을 수행한 후, KEGG database의 ko term으로 mapping한 후, 각각의 대사 category의 비율을 도출하였음. 또한 시료간의 clustering을 수행한 결과, 시간대별로 clustering이 되었으나, 발효 후기에는 원료별로 clustering이 되는 것을 관찰 할 수 있었음(그림 175).

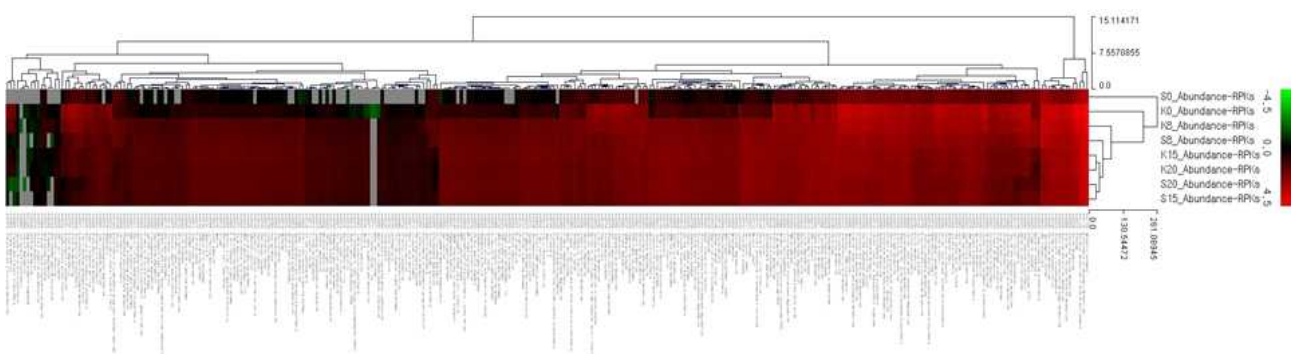


그림 175. KEGG 기반의 대사 경로 유전자 비율 비교 분석

- 315개의 KEGG 대사경로 중, 유전자 비율 구성 차이가 큰 50개의 대사경로를 비교, 탄소원, 아미노산 등 주요 대사들을 목록화 하였으며(그림 176A), 주정 발효에

starter로 이용되는 최종 누룩 산물(국산밀, 수입밀 20일 샘플)를 비교한 결과, ribosome, purine, pyruvate, carbon, citrate, PTS system 등과 관련된 대사경로들에 차이가 나타남(그림 176B).

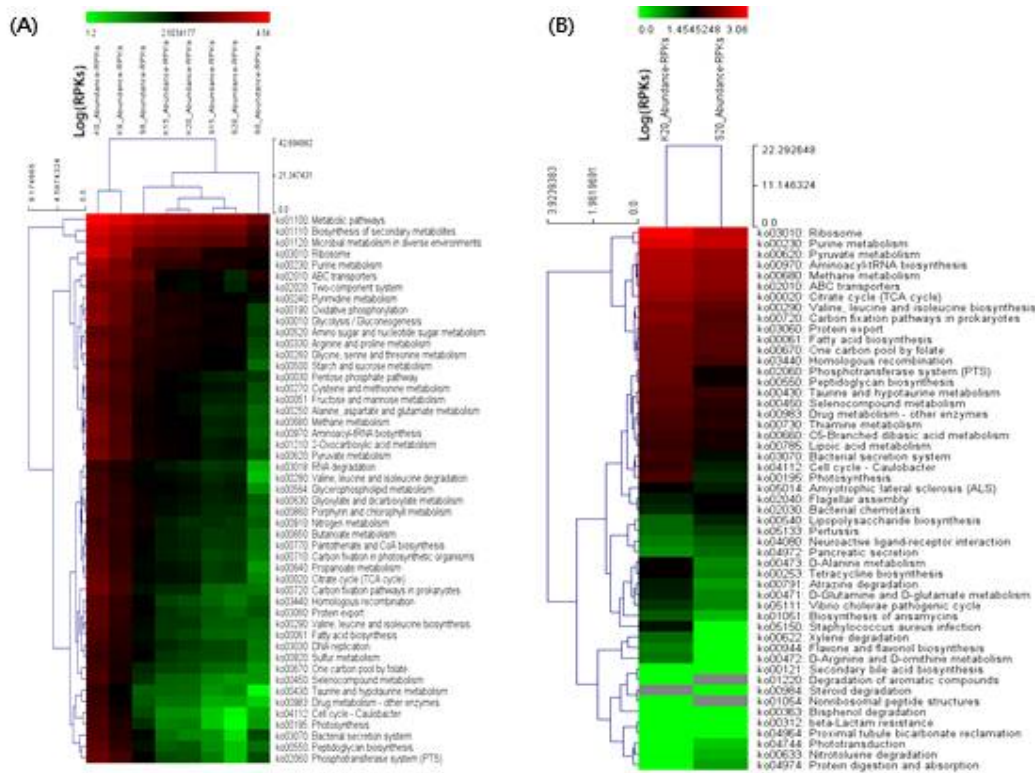


그림 176. KEGG 기반의 대사 경로 유전자 비율 비교 분석 결과 중, (A) 시료간 유전자 비율 차이가 큰 대사경로 및 (B) 최종 누룩 산물 내 대사경로 비교 결과

○ Heat-map에 나타난 결과를 ipath 프로그램을 이용, 대사경로에 맵핑하여 시료간 대사 유전자에 차이가 나는 대사 경로를 시각화하여 확인함(그림 177).

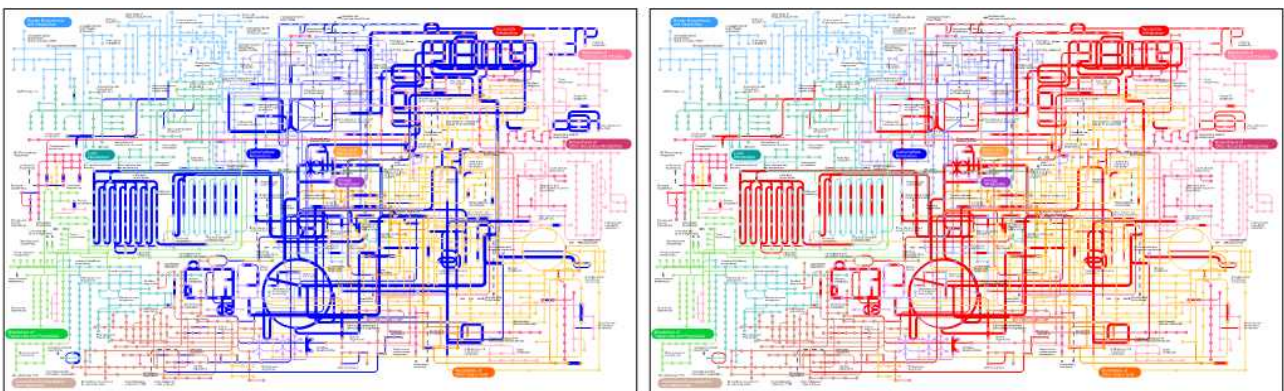


그림 177. KEGG 기반의 대사 경로 유전자 비율 비교 분석 결과

사. 농식품 환경의 메타유전체 분석을 위한 NGS 기반의 메타유전체 빅데이터 분석기반 확보 및 분석 파이프라인 구축

- 식품을 원료로 한 전 메타유전체에 비해 기존에 염기서열을 확보하였던 한우 맹장 및 대장 대장의 해독 염기서열은 Illumina MiSeq을 이용하여 해독하였으므로 평균 read length가 길고 quality가 높은 편이므로 이를 이용하여 전 메타유전체를 분석할 수 있는 생물정보학적 도구들에 적용하였음.

- 기존의 BLAST, Burrows-Wheeler Aligner 등의 alignment를 거쳐 RDP classifier를 이용하여 taxon assignment를 하는 방법 외에 또 다른 빠르고 효율적인 방법을 찾기 위해 k-mer 분석 기반의 Kraken(Wood DE et al., 2014), Kaiju(Menzel P et al., 2016)와 같은 프로그램을 이용하여 분석을 시험하였음. 그 중, Kaiju를 선정하여 한우 장내 community를 분석하고, 그 결과를 이용하여 Krona(Ondov BD et al., 2011)와 같은 visualization 도구를 통해 taxonomy classification 및 assignment를 수행함. 기존의 RDP classifier 결과와 유사하였음 (그림 178).

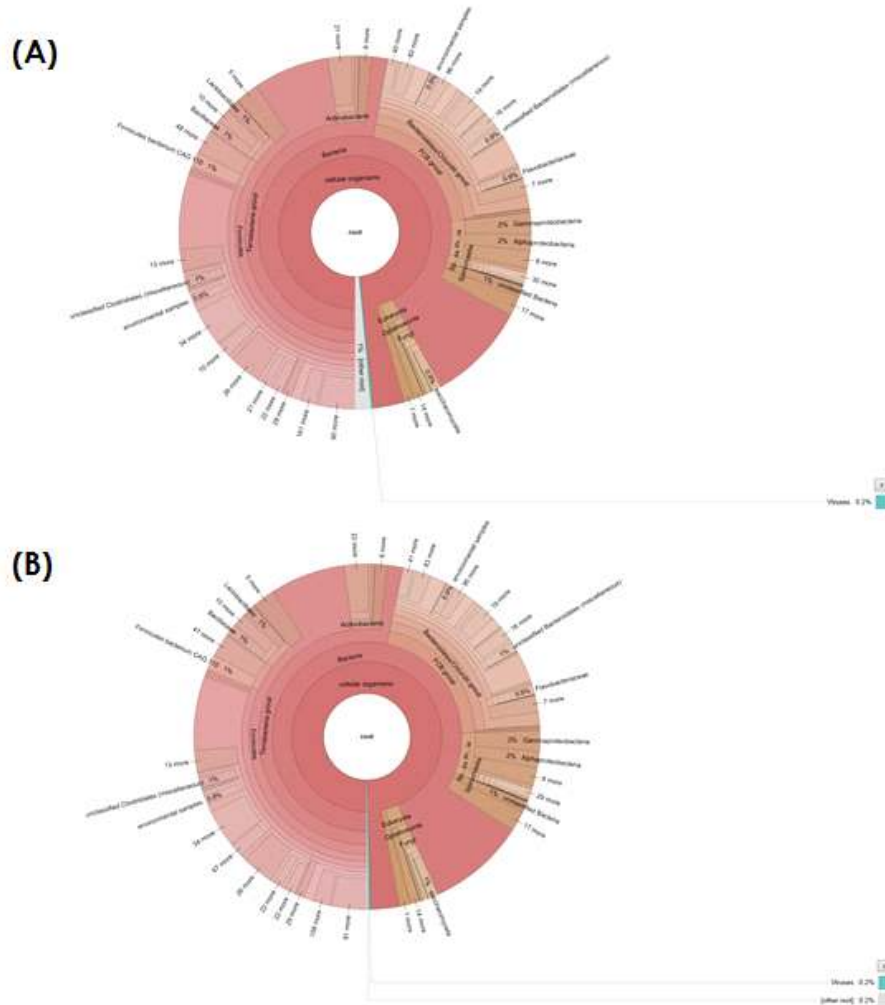


그림 178. Kraken 및 Krona 프로그램을 이용한 한우 장내 community의 taxon assignment 및 visualization (A) 한우 맹장 community (B) 한우 대장 community

- 전 메타유전체의 염기서열 read들을 가지고 HUMAnN2(Abubucker S et al., 2012) 프로그램을 적용하여 유전자 및 대사 경로를 분석을 시험함. 프로그램 실행 후, 유전자 항목을 regrouping 하고 normalize된 결과물을 가지고 KEGG database의 ko term을 이용하여 renaming함. 유전자 abundance는 log 수치로 계산하여 한우 맹장과 대장의 유전자 구성 및 대사 경로의 차이를 분석할 수 있었음(그림 179).

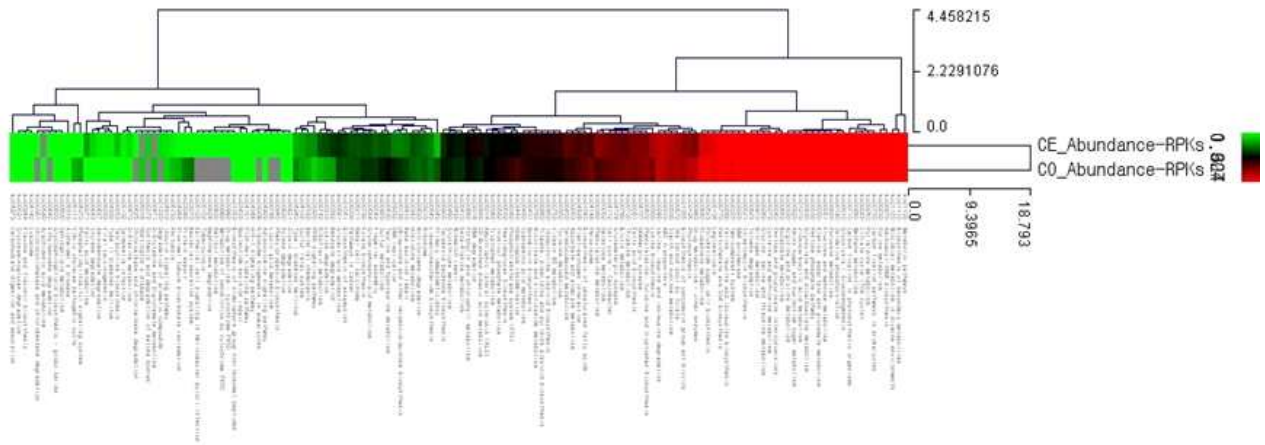


그림 179. HuMAnN2 결과를 이용하여 도출한 한우 장내 대사경로 비교 결과

- 원핵세포가 많은 환경에서의 메타유전체의 유전자 예측은 MetaGeneMark를 비롯하여 유전자 예측 프로그램들이 다수 있으나, 진핵세포가 다수 포함된 환경에서는 이에 적합한 전용 프로그램들이 적용되어야 함. 따라서 이를 위해 일종의 sequence binning을 수행하여 진핵 미생물 유전체가 포함된 contig와 세균 유전체가 포함된 contig를 나누고 각각의 전용 프로그램을 이용하여 유전자를 예측함. 메타유전체 서열은 대용량 서열을 포함하고 있으므로 효율적으로 두가지 종류의 contig를 classification하기 위해 빠른 sequence search 및 alignment 프로그램을 선정함. 또한 alignm을 위한 reference database로는 completed genome sequence의 전체 nucleotide 서열 및 amino acid 서열을 이용함. Nucleotide 전용의 Megablast를 이용하여 일차적으로 contig sequence를 classification 한 후, assign 되지 않은 contig에 대해서는 translated sequence로 search하기 위해 DIAMOND 프로그램을 사용함. 효율적인 alignment를 위해 contig 길이를 5kb로 나눈 후, contig의 일부 sequence만으로 classification을 수행하였음. 진핵 세포 유전자 예측은 AUGUSTUS 및 GeneMark-ES를 이용할 수 있는데, 전자의 경우 1개의 trained 된 특정 유전체가 필요하며 후자의 경우에는 self-training이 가능하므로 다양한 유전체가 포함되어 있는 메타유전체에서는 GeneMark-ES가 보다 적절하고 용이하다고 판단됨.
- 본 연구에서는 누룩 및 한우 메타유전체 분석과 함께 식품 및 농축산 주요 환경의 전 메타유전체 염기서열을 생산, 확보 후, 농식품 관련 메타유전체 데이터를 분석하기 위한 전 메타유전체 서열 분석용 프로그램 및 데이터베이스 등을 수집, 활용함. 따라서 농식품 환경의 시료 특성을 고려한 DNA 시료의 준비부터 전 메타유전체를 분석하기 위한 생물학적 도구 및 특정 데이터베이스 수집, 활용, 분석까지 농축산식품 환경의 메타유전체 분석에 대한 기초적인 기반을 구축함(그림 180).

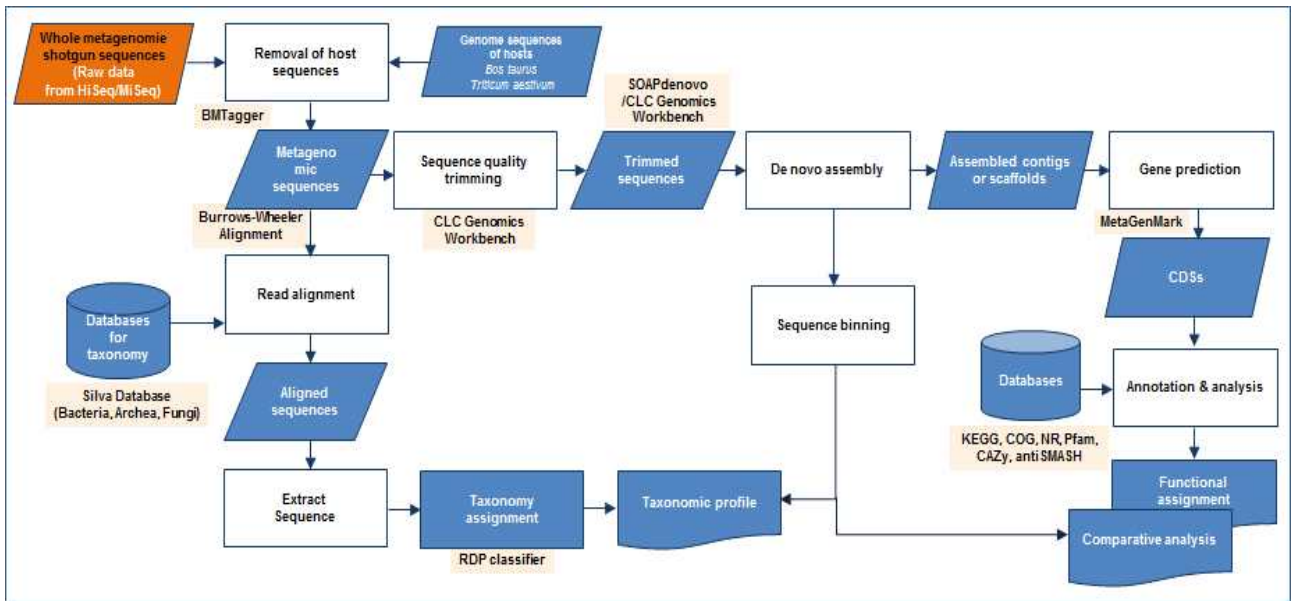


그림 180. 전 메타유전체 해독 및 분석 파이프라인 개요

아. 농식품 현안 미생물 유전체 전략적 분석 대응

- 2015년 국내에서 발생한 배화상병의 원인균 *Erwinia amylovora* 5균주(FB-20, FB-86, TS3238, FB-207, FB-307)에 대해 농림축산검역본부와 단국대 김성환 교수 연구팀과의 연구 협력을 통해 유전체 염기서열을 해독하고 분석을 수행함. PacBio 시퀀서를 이용하여 해독, 조립하여 완성된 *E. amylovora* 5균주의 유전체 해독 결과로부터 chromosome과 pEA29 plasmid 유전체 염기서열들을 확보함. 5균주 모두 3.8Mb 이상의 한 개의 chromosome과 pEA29 plasmid 1개를 보유하는 것으로 나타남(그림 181). 유전자 예측 프로그램 Critica 1.05, Glimmer 3.0, 두 가지를 이용하여 protein coding gene sequence를 예측 후, reference genome인 *E. amylovora* CFBP 1430 서열과 비교하여 manual curation을 통해 protein coding gene sequence를 수행하였음. 완전 유전체로 공개되어 있는 ATCC 49946 균주에 대해서도 annotation을 재 수행함. tRNA 유전자 및 rRNA operon을 위해 tRNAscan-SE 및 RNAmmer를 이용하여 위치 및 서열을 예측하여 annotation 수행을 완료함(표 33)

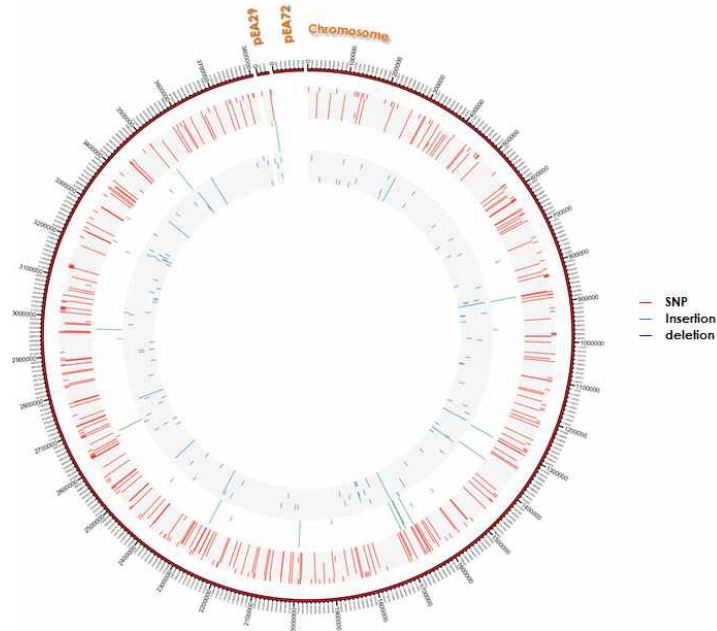


그림 181. *E. amylovora* 5균주와 참조 유전체들의 replicon 구성 및 유전체 서열 비교

표 33. 신규 해독된 국내 *E. amylovora* 5균주 및 참조 균주들의 유전체 기본 정보

<i>Erwinia amylovora</i>								
		Korean isolates					Reference strains	
		FB-20	FB-86	TS3238	FB-207	FB-307	CFBP 1430	ATCC 49946
Chromosome	Total size (bp)	3,803,579	3,804,059	3,804,041	3,804,069	3,803,847	3,805,573	3,805,874
	G + C content (%)	53.6	53.6	53.6	53.6	53.6	53.6	53.6
	No. of protein-coding genes	3,725	3,723	3,734	3,724	3,727	3,683	3,711
	No. of ribosomal RNA operons	7	7	7	7	7	7	7
	No. of transfer RNA genes	76	77	77	77	77	77	78
Plasmid [pEA29]	Total size (bp)	28,257	28,258	28,259	28,259	28,258	28,259	28,243
	G + C content (%)	50.2	50.2	50.2	50.2	50.2	50.2	50.2
	No. of protein-coding genes	29	29	29	29	29	29	29
Plasmid [pEA72]	Total size (bp)	-	-	-	-	-	-	71,487
	G + C content (%)	-	-	-	-	-	-	55.7
	No. of protein-coding genes	-	-	-	-	-	-	87

○ Jspecies 프로그램을 이용하여 GenBank에 공개되어 있는 16개의 *E. amylovora* 균주들의 유전체 서열과의 유사도를 측정함(표 34). BLAST 기반의 ANIb와 Mummer 기반의 ANIm value를 측정한 결과, 신규로 해독된 5 균주 사이의 유사도는 매우 높게 나타나고, Spiraeoideae에서 분리된 *E. amylovora*의 대부분의 유전체들과도 높은 유사도를 나타냄. 5개 신규 해독 유전체의 서열과 북미 분리 균주 유전체 서열과의

ANiB value와 유럽 분리 균주 유전체 서열과의 ANiB value를 비교해보았을 때, 북미 분리 균주 유전체 서열과의 유사도가 평균적으로 높아 보이는 하나 유의미한 차이를 찾기는 어려웠음.

표 34. *E. amylovora* 유전체의 Jspecies을 통한 ANiB 및 ANIm 분석 결과

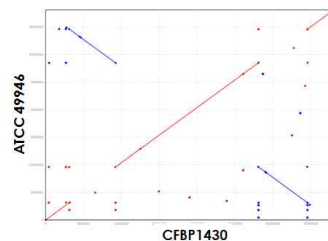
ANiB		A														E										K			
		MR1	Es644	IL-5	Es266	LA635	LA636	LA637	ATCC49946	ACW56400	CFBP1232	Es356	CFBP1430	015FRBO	UPN527	CFBP2585	NBRCL2687	FB-207	FB-20	FB-86	FB-207	TS3228							
Rubus	MR1	---	99.07	98.14	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21						
Rubus	Es644	99.07	---	98.25	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21						
Rubus	IL-5	98.14	98.15	---	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49						
Spiraeoideae	Es266	98.2	98.2	99.49	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	LA635	98.19	98.21	99.52	99.98	---	100	100	99.98	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	LA636	98.2	98.21	99.52	99.98	100	---	100	99.98	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	ATCC49946	98.16	98.16	99.49	99.98	99.97	99.97	---	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	LA637	98.19	98.2	99.52	99.98	100	100	---	99.98	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	ACW56400	98.23	98.19	99.5	99.98	99.97	99.97	99.97	---	99.98	99.98	99.98	100	100	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99						
Spiraeoideae	CFBP1232	98.19	98.2	99.51	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	---	99.99	99.99	100	100	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99						
Spiraeoideae	Es356	98.17	98.19	99.5	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	---	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99						
Spiraeoideae	CFBP1430	98.18	98.2	99.52	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	---	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99						
Spiraeoideae	015FRBO	98.2	98.22	99.5	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.99	100	99.99	99.99	100	---	100	99.99	100	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	UPN527	98.19	98.1	99.51	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	100	99.99	99.99	100	100	---	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99						
Spiraeoideae	CFBP2585	98.2	98.21	99.52	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.99	99.98	99.99	99.99	99.99	99.99	---	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99						
Spiraeoideae	NBRCL2687	98.17	98.19	99.49	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.99	100	100	99.99	99.99	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98						
Spiraeoideae	FB-207	98.2	98.2	99.5	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	100	100						
Spiraeoideae	FB-20	98.2	98.2	99.49	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	100	100						
Spiraeoideae	FB-86	98.18	98.2	99.51	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	100	100	100						
Spiraeoideae	FB-207	98.2	98.2	99.49	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	100	100						
Spiraeoideae	TS3228	98.18	98.2	99.5	99.97	99.98	99.98	99.98	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	100	100						

ANIm		A														E										K			
		Es644	IL-5	MR1	ATCC49946	Es266	LA635	LA636	LA637	015FRBO	ACW56400	CFBP1232	CFBP1430	CFBP2585	Es356	UPN527	NBRCL2687	FB-20	FB-207	FB-207	TS3228	FB-86							
Rubus	Es644	---	99.22	99.77	98.17	99.98	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21	99.21							
Rubus	IL-5	99.22	---	99.98	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53							
Rubus	MR1	99.77	99.22	---	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25	99.25							
Spiraeoideae	ATCC49946	99.26	99.52	99.25	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	Es266	99.21	99.52	99.25	99.98	---	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97							
Spiraeoideae	LA635	99.26	99.52	99.24	99.98	99.97	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	LA636	99.26	99.52	99.24	99.98	99.97	99.98	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	LA637	99.26	99.52	99.24	99.98	99.97	99.98	99.98	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	015FRBO	99.26	99.52	99.24	99.98	99.97	99.97	99.97	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	ACW56400	99.26	99.51	99.23	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	CFBP1232	99.26	99.51	99.23	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	---	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	CFBP1430	99.26	99.51	99.24	99.97	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	CFBP2585	99.21	99.51	99.23	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	Es356	99.26	99.51	99.24	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	UPN527	99.26	99.51	99.24	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	NBRCL2687	99.25	99.51	99.23	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	FB-20	99.26	99.51	99.24	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	FB-207	99.26	99.51	99.24	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	FB-207	99.26	99.51	99.23	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	TS3228	99.21	99.51	99.23	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							
Spiraeoideae	FB-86	99.26	99.51	99.24	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98							

*A(북미 분리 균주), E(Europe 분리 균주), K(한국 분리 균주)

- 완전 유전체로 공개되어 있는 유럽 분리 균주인 CFBP 1430 및 미국 분리 균주인 ATCC49946 유전체의 chromosome을 가지고 nucmer 프로그램을 이용하여 신규 해독된 5균주의 genome synteny를 비교하였음. 먼저 reference genome들과의 비교를 통해 기존에 보고된 바와 같이 두 위치에서 large inversion을 관찰하였음. 신규 해독된 5균주와 reference genome과 비교한 경우, 다른 위치에서의 large inversion이 관찰됨(그림 182).

(a)



(b)

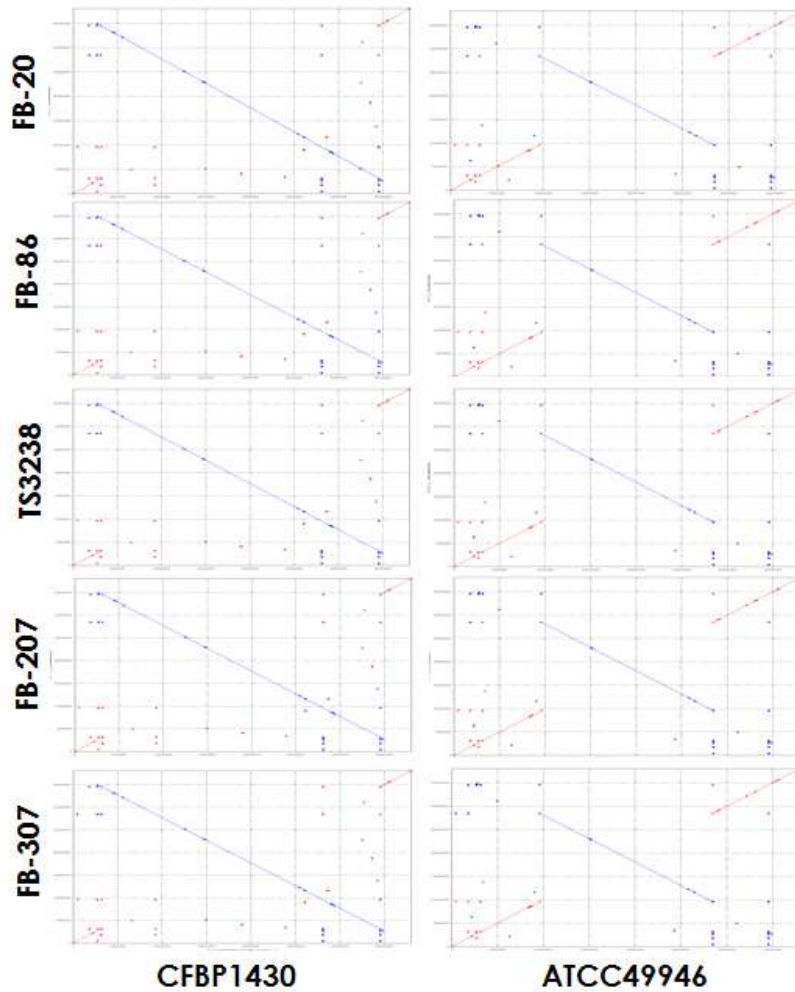
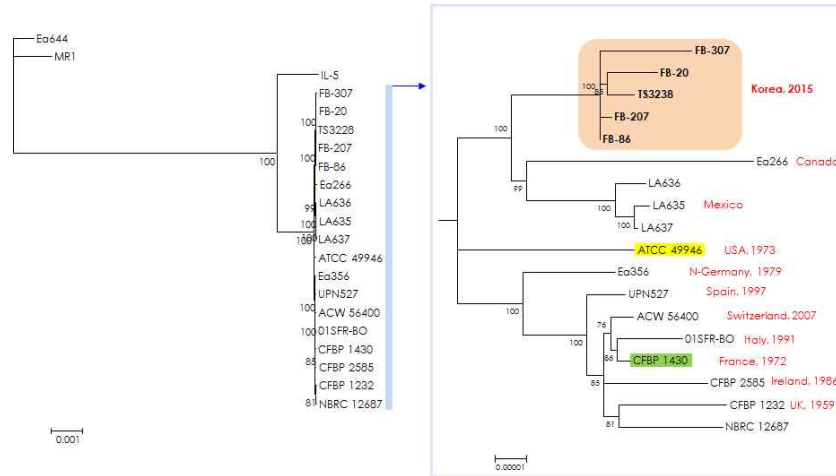


그림 182. CFBP 1430 및 ATCC49946와 신규 해독 균주의 genome synteny 비교

- orthoMCL 프로그램을 이용하여 총 21개의 *E. amylovora* 균주들의 orthologous gene(parameter: identity $\geq 85\%$, coverage $\geq 80\%$) 및 core gene set을 도출하였음. 총 2,772개의 core gene들의 DNA 및 amino acid 서열을 각각 유전자별로 ClustalW2를 alignment한 후, gap을 모두 제거하였음. Amino acid의 경우 trimAl 프로그램을 이용하여 alignment trimming을 수행한 후, PhyML 프로그램을 이용하여 maximum-likelihood 방법을 통한 phylogenomic tree를 구축하였음. Phylogenetic tree를 그리기 위한 parameter로써, DNA의 경우 HYK85 model을 이용하였고, amino acid의 경우 LG model을 이용하였으며, 두가지 tree 모두 bootstrap value 100을 가지고 PhyML을 실행하였음. 그 결과, DNA, amino acid 두 가지 phylogenomic tree 모두 비슷한 topology를 얻을 수 있었으며, *Rubus*에서 분리된 균주들(Ea644, MR1, IL5)을 제외한, Spiraeoideae 분리 균주들은 매우 가까운 유연관

계를 보였음. Spiraeoideae 분리 균주들 가운데, 북미 분리균주와 유럽 균주들은 phylogenetic tree에서 3개의 그룹으로 나뉘어짐을 관찰하였으며, 국내 균주 5개 유전체가 북미 균주 가운데 캐나다와 멕시코에서 분리된 Ea266, LA635, LA636, LA637 균주와 같은 그룹에 포함됨을 통해 유연관계를 확인할 수 있었음 (그림 183).

(a)



(b)

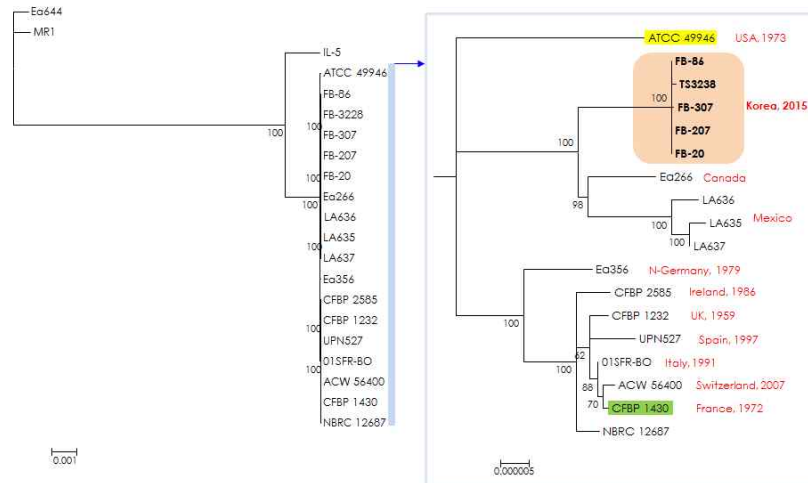


그림 183. *E. amylovora*의 core gene set을 이용한 phylogenomic tree. (a) core gene들의 DNA 서열로 작성한 phylogenetic tree (b) core gene set의 amino acid 서열로 작성한 phylogenetic tree

- Progressive Mauve 프로그램을 이용하여 21개 유전체 서열들을 alignment 및 SNP를 detection함. SNP 서열들을 alignment 하고 MEGA 5 프로그램을 이용, 최적 모델을 탐색한 후, GTR model을 선정하고, maximum likelihood tree를 작성하였음. 그 결과, core gene set으로 작성한 phylogenetic tree들과 같은 결과를 확인하였음(그

림 184).

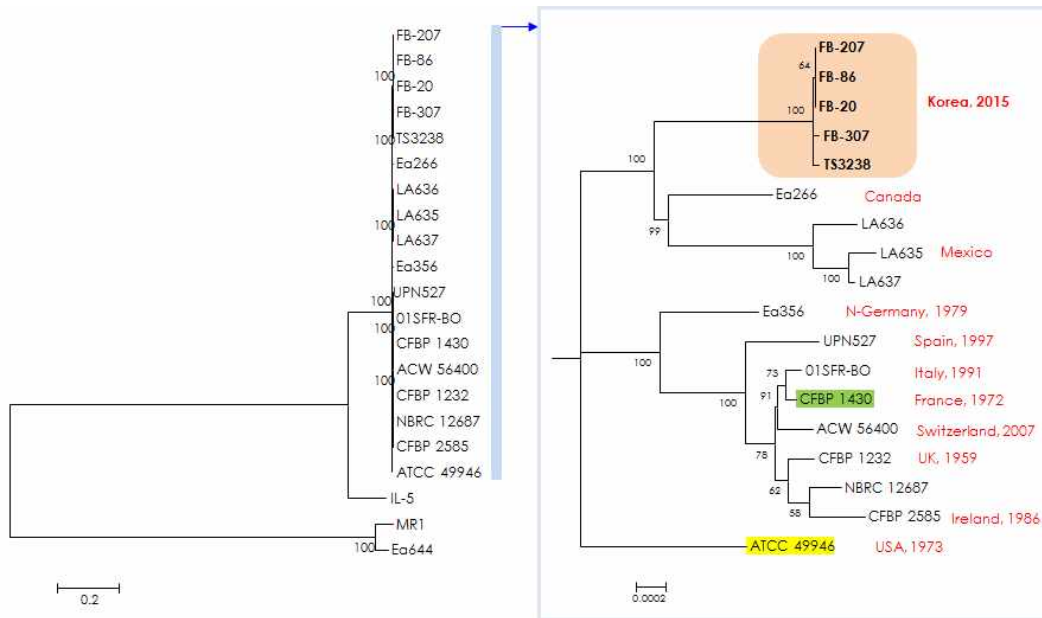


그림 184. Progressive Mauve로 검색된 *E. amylovora*의 SNP를 이용한 phylogenetic tree

- 참조 유전체와의 비교를 통해 SNP, DIP 분석 및 단백질 서열에의 영향을 분석하는 한편, 비교적 큰 insertion 및 deletion을 찾아 유전체 사이의 차이점을 비교함(그림 185, 186). 이러한 균주 간 유전체 서열 비교 분석은 추후 균주-specific marker로써 활용 가능성이 있을 것으로 예상된다.

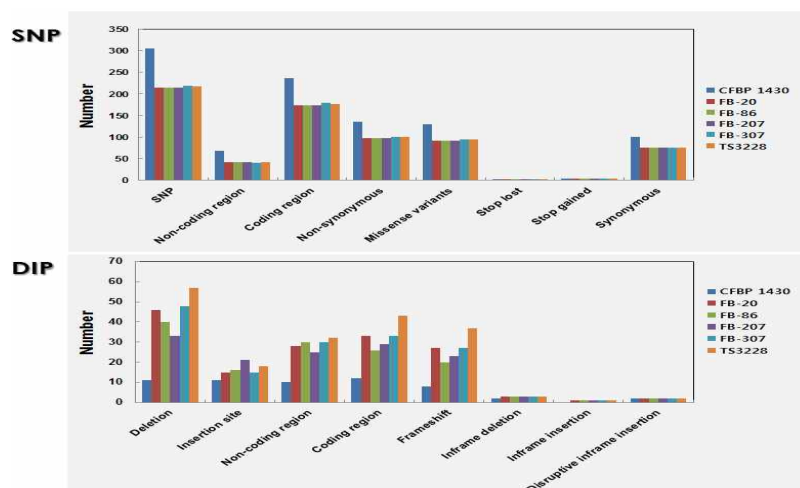


그림 185. SNP 및 DIP 검출 및 단백질 서열에의 영향 분석

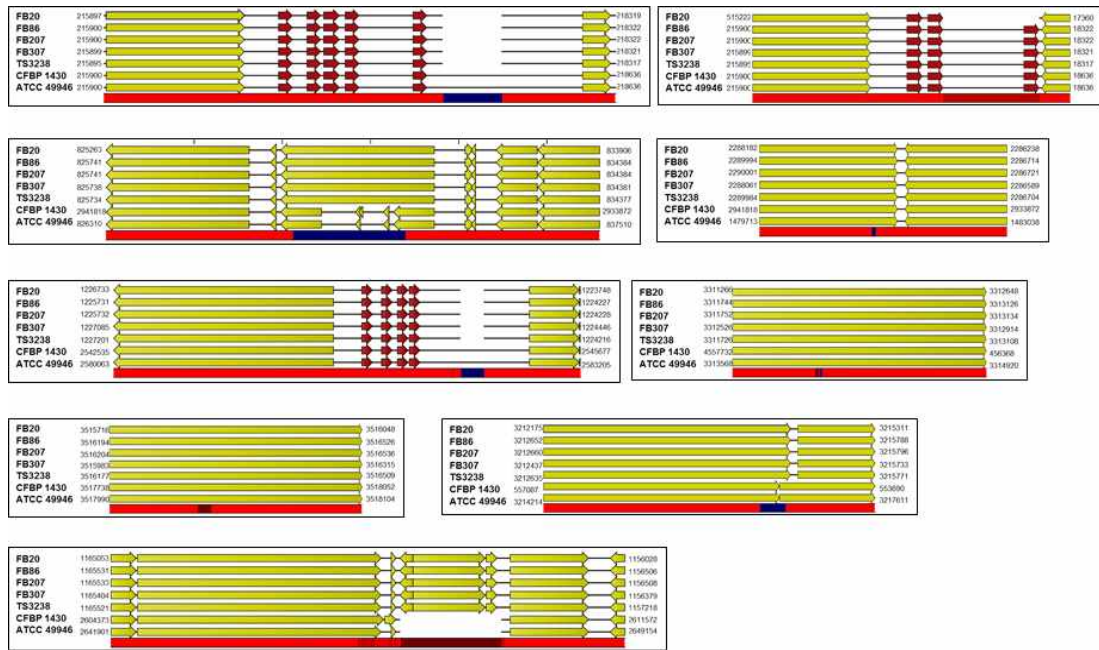


그림 186. 비교적 큰 insertion 및 deletion 영역 비교

자. 메타유전체 데이터로부터 신규 유전자/유용 유전자 발굴

- 동아대학교 이선우 교수 연구팀과의 공동연구를 통해 세균성꽃마름병 저항성 토마토 품종과 민감성 토마토 품종의 근권 메타유전체 비교 분석에 대한 선행 연구를 수행한 바 있음. 그 결과 토마토의 병저항성에 지대하게 기여할 것으로 여겨지는 플라보박테리아과 (*Flavobacteriaceae*)에 해당하는 미생물의 유전체 서열을 획득한 바 있음. 따라서 선행연구 결과를 기반으로 병저항성 기여 균주의 유전체 서열 정보를 활용하여 균주를 분리하고자 함.
- 메타게놈 서열 데이터로부터 발굴한 미생물의 유전체 정보와 토마토 재배 환경의 특성을 기반으로 근권에 있는 수만 종의 다양한 미생물들로부터 해당 미생물을 선별적으로 분리해 내기 위한 배지 조성을 구축하였음.
- 메타게놈 분석을 위해 근권 흙을 샘플링한 토양은 다른 토양보다 염도가 높았음. 또한 계통분류학적 분석을 수행한 결과 분리균주가 식물의 근권에 높은 비율로 존재함에도 불구하고 해양 유래의 플라보박테리아들과 가깝다는 것을 알 수 있었음. 또한 타겟 균주의 유전체 분석 결과 mannose나 fucose를 탄소원으로 사용할 수 있었음. 그리고 kanamycin 저항성 유전자를 가지고 있는 것을 확인하였음.
- 균주 분리를 위해 세균성꽃마름병 저항성 토마토 품종의 근권 흙 속 미생물들을 1/10 MA, 1/10 MA + mannose, 1/10 MA + fucose, ASW, ASW+mannose, ASW+fucose 등 다양한 조건의 배지에서 배양하였음.

- 타겟 균주의 선별적인 분리를 위해 메타유전체에서 재구축한 타겟 균주의 유전체 정보를 기반으로 특이적인 primer를 제작하였고 이를 colony PCR에 사용하였음.
- 타겟 균주 특이적인 유전자를 이용해, plate상의 모든 박테리아를 모으고 시간대별로 PCR을 수행하여, 1/10 MB+mannose를 분리 균주가 가장 잘 자라는 배지 조건으로 결정한 후 해당 조건에서 colony PCR을 수행하였음.
- 수만 균주의 colony PCR 결과 선별된 균주들은 추가적으로 kanamycin이 포함된 배지에서 배양하여 저항성을 가지는 균주를 최종적으로 선별함으로써 타겟 균주의 분리에 성공하였음. 총 22개의 타겟 균주들을 분리하였고(그림 187), 16S rRNA 서열들을 분석하였음.

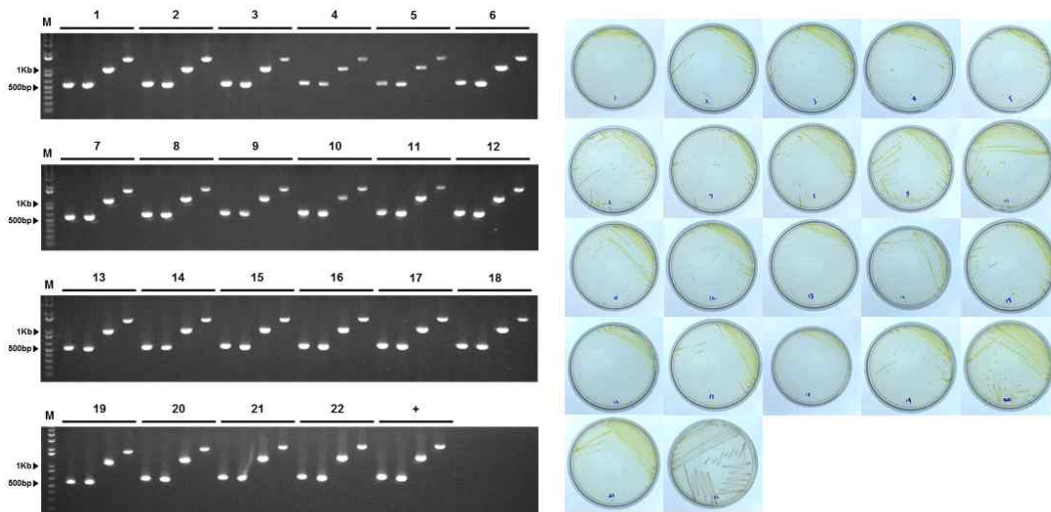


그림 187. 22개의 *Flavobacteriaceae* sp.에 속하는 균주들

- 또한 분리에 성공한 타겟 균주들을 이용해 분리 균주 그룹별로 동아대학교 이선우 교수 연구팀과 *Ralstonia solanacearum*에 의한 토마토의 세균성꽃마름병 저항성 테스트를 수행한 결과, 균주를 처리하였을 때 세균성꽃마름병 저항성 품종의 병 발생이 확연히 줄어드는 것을 확인하였음(그림 188).

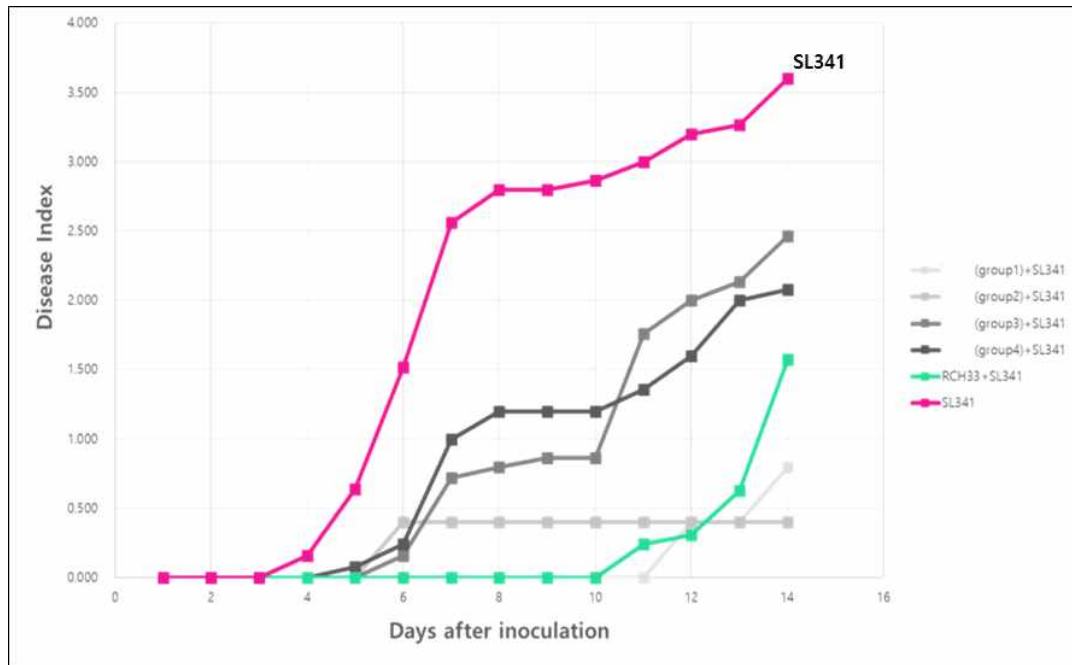


그림 188. *Flavobacteriaceae*에 속하는 분리 균주들의 그룹별 처리에 의한 토마토의 세균성꽃마름병 저항성 실험 결과(SL341, *R. solanacearum*; RCH33, *Flavobacterium daejeonensis*)

- 22개의 분리 균주들 중 토마토 병저항성 실험 결과 가장 뛰어난 효과를 보이는 균주 하나를 대표 균주로 선정하였음.
- 분리 균주의 16S rRNA 서열을 MEGA5 프로그램을 이용해 다른 *Flavobacteriaceae*에 속하는 균주들의 16S rRNA 서열들과 alignment 시킨 후 Neighbor-joining tree, maximum likelihood tree, minimum evolution tree를 작성하여 분리 균주의 계통유전학적 위치를 파악하였음(그림 189).

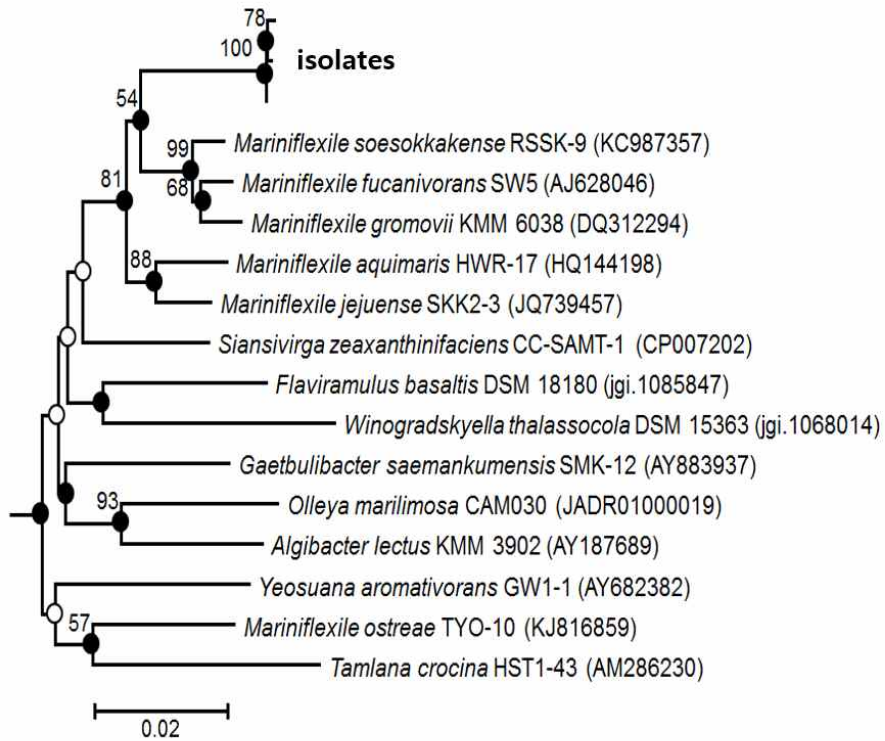


그림 189. 16S rRNA 서열을 이용하여 작성한 phylogenetic tree 상의 분리 균주의 위치

- 분리 균주 중 대표 균주의 표현형을 관찰한 결과, 0.2–0.5 x 2–5um 가량의 긴 간균으로 flagella는 없고 gliding motility를 통해 이동함(그림 190). 성장 가능한 온도는 4–40°C 이며 30°C에서 가장 활발한 생장으로 보임. 성장 가능한 NaCl 농도는 2–5% 이며 pH는 6–8임.

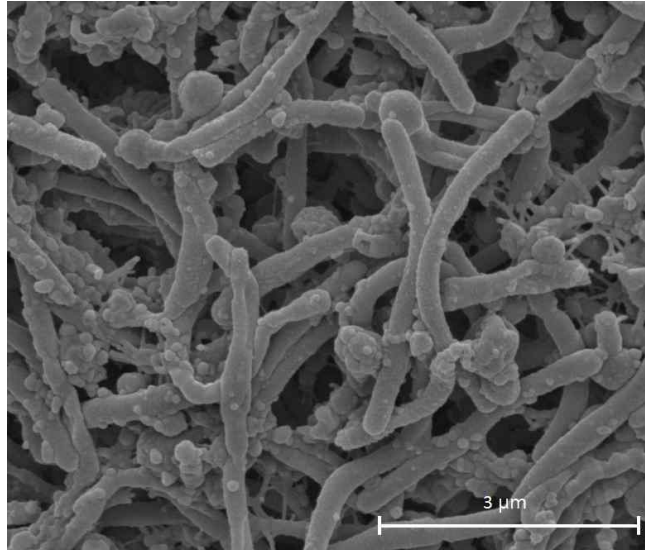


그림 190. 분리 대표 균주의 전자현미경 사진

- 항생제 저항성 테스트 결과, Ampicillin, Carbenicillin, Lincomycin, Novobiocin, Penicillin G, Rifampicin, 그리고 Tetracycline에 susceptible하고 Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Polymyxin B, Streptomycin, 그리고 Sulphamethoxazole에는 저항성을 보임.
- 분리 균주의 유전체 서열 해독을 수행하였음. DNA Link에서 10kb 라이브러리의 PacBio RSII 시스템과 HiSeq2500을 이용하여 500 bp insert size를 가지는 paired end sequencing 을 수행하였음. 유전체의 조립은 PacBio sequencing reads를 PacBio의 SMRT 시스템을 이용해 수행하였음. *De novo* assembly는 HGAP2를 이용해 수행하고 AHA를 이용해 scaffolding을 진행하였음. 또한 HiSeq2500으로부터 생성된 short reads를 이 consensus sequence에 mapping 하여 sequencing 및 assembly 에러를 제거하였음. 그 결과, 동정된 TRM1-10의 유전체 서열은 4,858,325bp (34.56% GC)의 유전체 크기를 가지고 있었음.
- 또한 선행 연구에서 확보된 메타유전체 데이터로부터 재구축한 분리 균주의 유전체 서열과 비교해본 결과, 메타유전체 서열에서 발굴한 모든 컨티그가 분리 균주의 유전체에 속해 있었고 메타유전체로부터 재구축하지 못한 유전체 서열이 본 유전체 서열 해독 결과로부터 약 700kb 정도 확보됨을 알 수 있었음(그림 191).

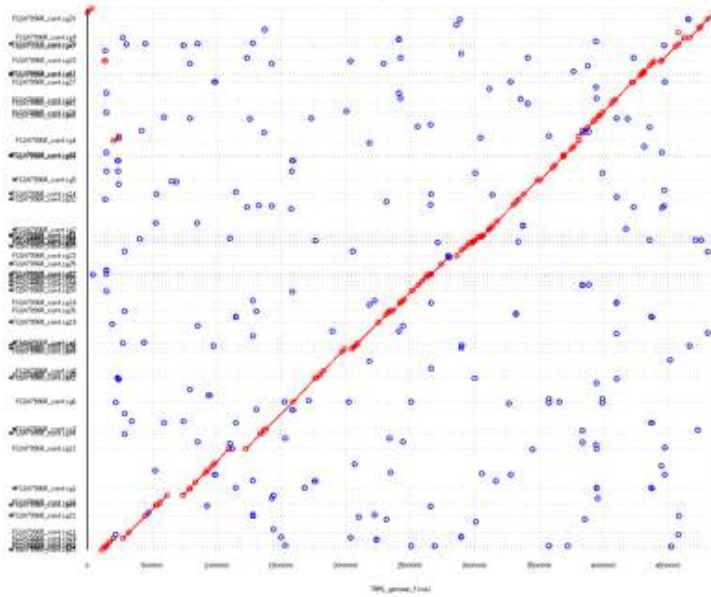


그림 191. 분리 대표 균주의 유전체 서열과 메타유전체로부터 재구축한 유전체 서열의 비교 결과

- 본 연구에서는 세균성꽃마름병 저항성 품종에서 특이적으로 높은 비율로 존재하는 미생물의 유전체를 정보를 기반으로 해당 미생물을 성공적으로 분리, 동정하여 작물 병저항성에 대한 기능을 확인하고 유전체를 해독, 서열 정보들을 확보하였음(표 35).

표 35. 유전체 염기서열 해독 분리 균주의 일반적인 유전체 특징

	Value
Size (bp)	4,858,325
G+C content (%)	34.56
Number of genes	4,071
Number of CDSs	4,023
Number of tRNA	41
Number of rRNA operons	2
Number of tmRNA	1
CDS summary	
Percentage coding	87.57
Percentage of COG assigned	61.37
Number of hypothetical proteins	1,467
GenBank accession number	CP022985

- COG 데이터베이스를 이용하여 분리 균주 및 근연 균주들의 유전체를 비교한 결과, G, Carbohydrate metabolism and transport에 해당하는 유전자들의 비율이 다른 균주

들보다 높음(그림 192).

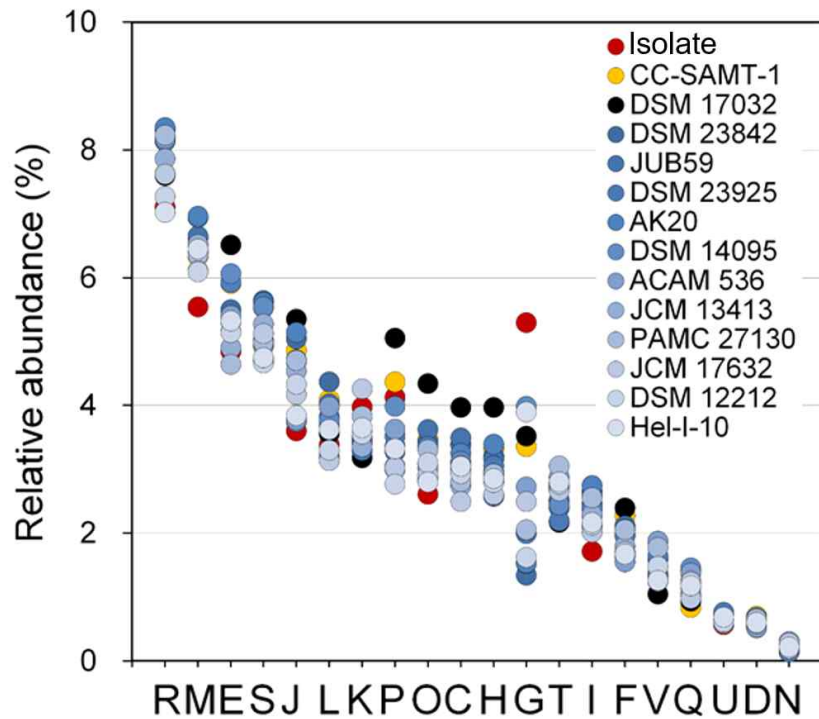


그림 192. 분리 균주 및 근연 균주들을 대상으로 COG 기반의 유전자 비교 분석

- 상동성 유전자 분석을 통해 유전체 비교 균주들 사이에서 분리균주가 균주 특이적 유전자를 보다 많이 가지고 있음을 파악하였고, 그중 hypothetical protein 및 10개의 SusD family protein, 4개의 ECF RNA polymerase sigma factor, 다수의 glycoside hydrolase family protein들이 포함되어 있었음. 이러한 유전자들 가운데 병저항성 기여에 관여하는 유전자 후보가 포함되어 있을 수 있음(그림 193).

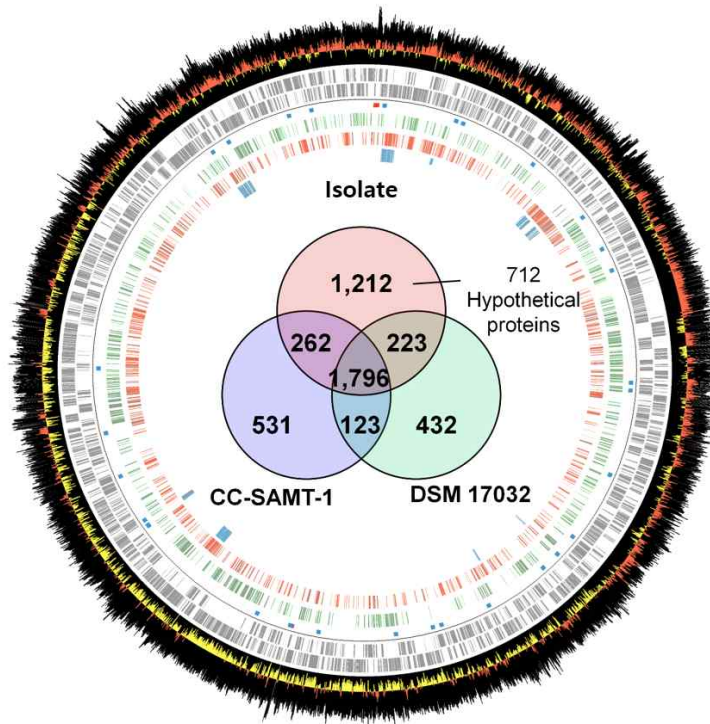


그림 193. 분리균주의 유전체 지도 및 비교 균주들 사이의 상동성 유전자수 분석 결과

- CAZyme 유전자 카테고리별 분류 및 타 유전체와의 비교 분석을 통해 glycoside hydrolase (GH) families 별로 분리균주에서 특이적으로 높은 비율로 나타나는 GH family들을 확인하였고(그림 194), arabinanase, endo- β -1,4-galactanase, glucoamylase, sialidase, xylanase, α -galactosidase, α -glucosidase, α -1-fucosidase, α -1-iduronidase, α -1-rhamnosidase, α -mannosidase, β -1,4-mannosylglucose phosphorylase, and β -xylosidase과 관련된 GH family들로 나타남. 이들은 glycan, pectin, and cellulose와 같은 당류의 hydrolysis와 관련된 효소의 기능들을 가지고 있으며 근권 정착 및 식물 뿌리로부터 영양분 획득, 병원성 미생물과의 경쟁에 관여할 수 있는 단당류의 생산 등의 역할을 할 것으로 보임. 따라서 유전체 비교 분석을 통해 분리 균주의 유전체적 특성 및 병저항성 기여 기작을 추정할 수 있었음.

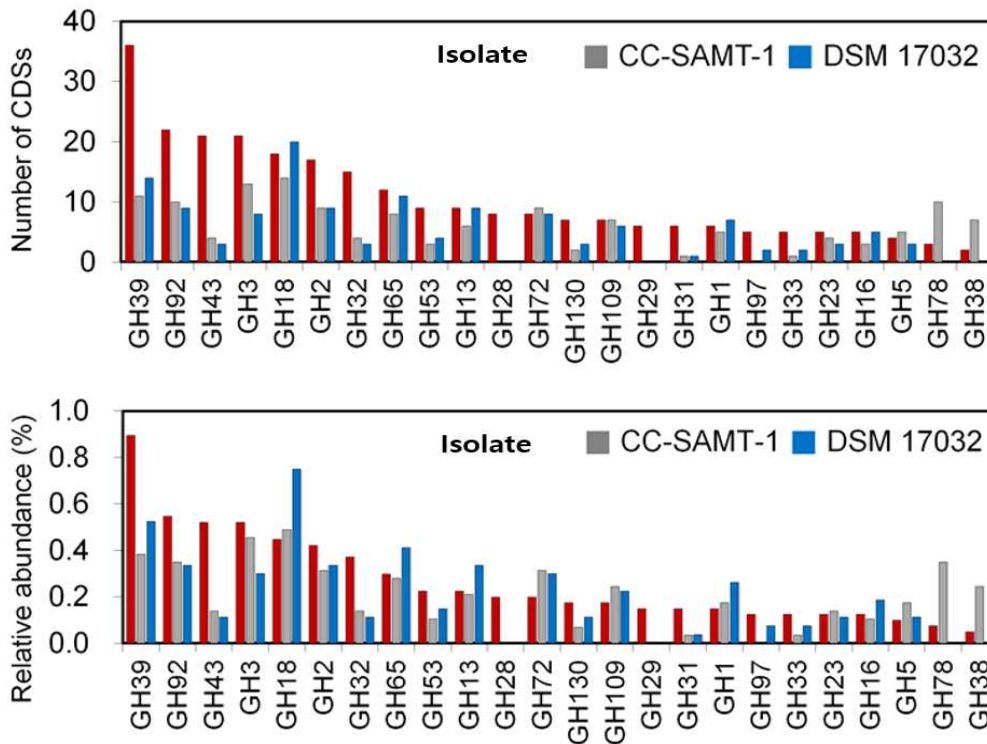


그림 194. 분리균주 및 비교균주들 사이의 CAZyme 유전자 카테고리별 분류 비교

7. 메타유전체 및 메타볼롬 종합 정보분석을 위한 네트워크 파이프라인 구성

- 미생물의 군집의 메타유전체와 환경인자 및 메타볼롬의 네트워크 구조를 이해하기 위한 기초작업으로 메타데이터 목록 확보를 수행함. Genomic Standard Consortium (GSC)의 MIxS standard 프레임 워크와 TerraGenome 같은 거대 메타 유전체 분석 Project에서 제안하는 메타 데이터 작성목록을 기반으로 농림축산식품과 관련된 한국형 메타유전체 샘플의 환경 및 기타사항의 메타 데이터 프레임(목록)을 구축하였음.
- 경제동물(한우, 한돈, 가금류)이나 주류의 미생물 메타 유전체의 환경, 숙주와의 관계를 추후 연구하기 위하여 각 분야의 각 분야의 전문가들의 자문을 얻어 메타 데이터 프레임을 구축함.

표 36. Metadata Check list	
사전 정보 입력	
<ul style="list-style-type: none"> - Report type 구분: eukaryotes, bacteria and archaea, plasmid, virus, organelle, metagenome - International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)에 genome submit : SRA(sequence Read Archives), DRA (DDBJ Sequence Read Archive), Genbank - Project name 입력 	
환경 데이터 입력	
<ul style="list-style-type: none"> - Geographic location - 위도와 경도, 깊이와 고도 - Collection date (UCT) - Environment : biome (e.g., desert, taiga), feature (e.g., cliff, lake), material (e.g., air, soil) 	
Sequence 정보	
<ul style="list-style-type: none"> - NCBI taxonomy를 통한 genetic lineage 확인 (genome) - Ploidy(e.g., allopolyploid, polyploid) - Number of replicons (e.g., bacteria : chromosomes - haploid count) - Source material identifiers - Isolation and growth conditions 	
Metagenome sequencing pipeline 구성 정보	
<ul style="list-style-type: none"> - Sampling : jejunum, cecum, colon - Nucleic acid peraration :DNA extraction, amplification - Sequencing method : Pyrosequencing, PacBio, Illumina - Quality control : FastQC, Sickle - Chimera check : UCHIME chimera removal - Assembly : SOAP de-novo, Meta velvet <p>Gene targeted metagenomics : specific primer design</p> <ul style="list-style-type: none"> - Annotation : NCBI Basic local alignment search tool - Relevant Standard Operating Procedures (SOPs) 	

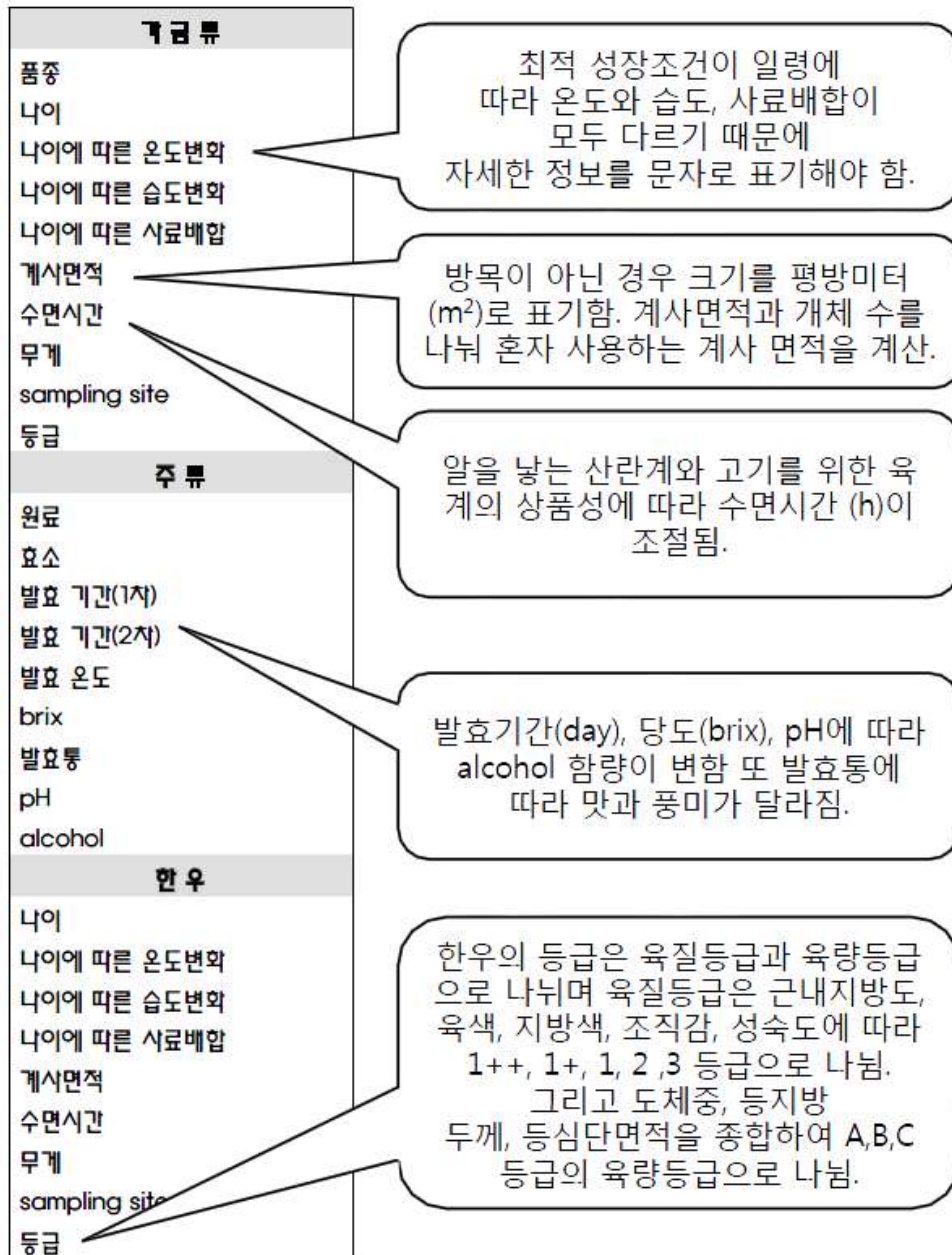


그림 195. 가금류, 한우, 주류에 필요한 환경 데이터 예시

- 각 항목별 자세한 필요 표기 사항 및 추천표기사항목록을 작성함. 또한 각 항목별 측정단위의 표준화를 전문가와의 상의를 통하여 확립하였음. 예를 들어, 가금류나 한우의 경우 목적에 따라 품종이 나뉘고 품종에 맞는 사육 방식이 다르기에 각기 다른 표준 단위가 필요함. 예로써 가금류의 나이는 일령으로 한우는 월령으로 계산하며 또 DNA extraction 단위는 μg 으로 수집 날짜는 Coordinated Universal Time (UCT)로 표준화 함.

예시) 표준유전체의 Complete genome 을 얻기 위한 표준화 및 분석방법 표준화

Violacein 생산 균주 *Massilia* sp. strain NR4-1의 complete genome sequence
 Sequencing : PacBio RS II C6 platform
 Templates libraries : 20 kb SMRTbell Templates
 Assembly : HGAP3(Chin et al., 2013)
 CDA, tRNA and rRNA annotations : Prokka (Seemann, 2014)
 Pathway analysis : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa and Goto, 2000, Kanehisa et al., 2014)
 Whole-genome project deposited : GenBank, GOLD(Genomes OnLine Database)

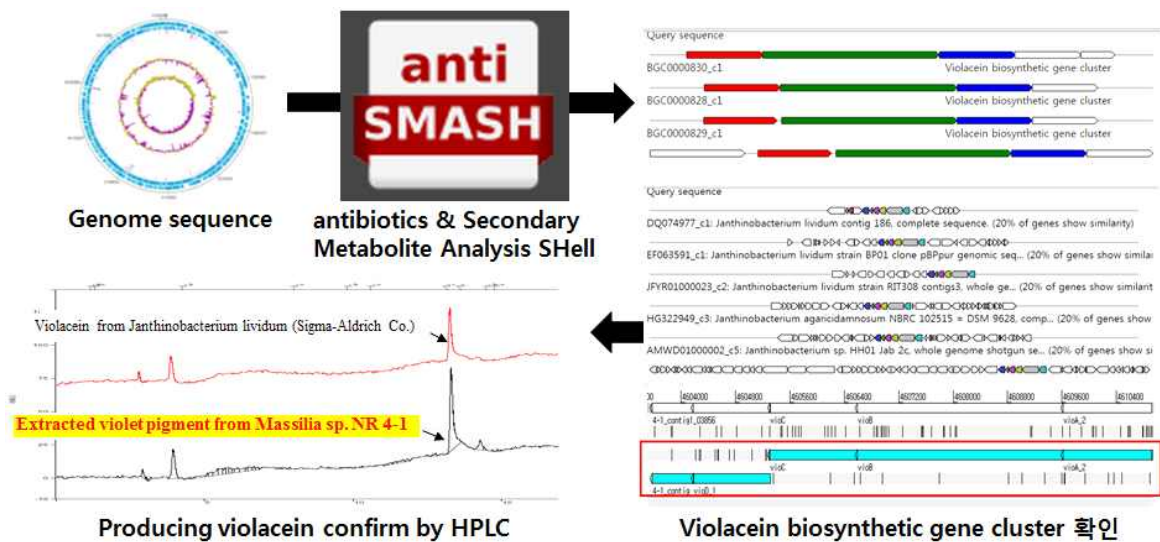


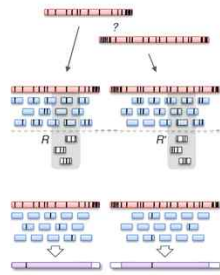
그림 198. antiSMASH를 활용한 2차 유용 대사물질 생합성경로 확인 예시

○ 한우 장내 미생물 메타유전체 분석 진행

- 한우 Cecum과 Colon의 메타 유전체 분석을 위하여 Pacbio의 long read와 MiSeq의 short read를 이용한 최적화된 hybrid assembly를 적용하였음. Pathway database인 KEGG db를 이용하여 두 환경에 따른 메타 유전체 분석을 진행함.
- 추가적으로 Antibiotics 및 Secondary Metabolite에 관련된 유전자를 찾기 위한 분석을 진행하였음.

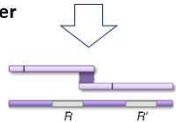
The PBcR single-molecule read correction

- Pre-process reads
- Map short to long reads
- Separate repeats
- Compute layout
- Trim at coverage gaps
- Compute consensus

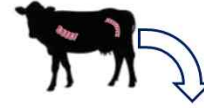


MEGAHIT – metagenomics assembler

- NGS *de novo* assembler
- Large and complex metagenomics data



Li, Dinghua, et al. "MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph." *Bioinformatics* (2015): btv033.
 Hybrid error correction and *de novo* assembly of single-molecule sequencing reads
Nature Biotechnology 30, 693-700 (2012) doi:10.1038/nbt.2280



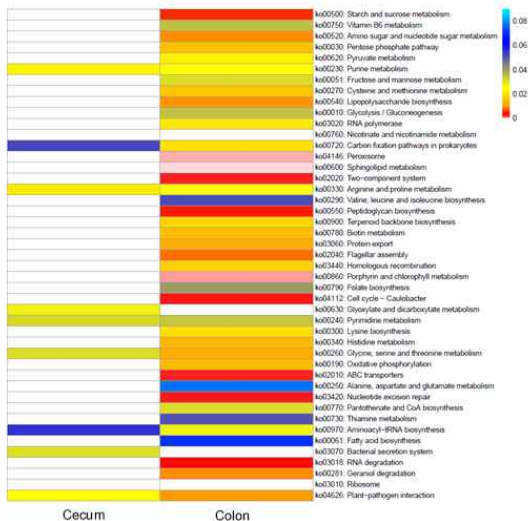
	Colon	Cecum
PacBio RSII C6	4,123,405,523 bp	1,459,058,873 bp
Illumina MiSeq	1,493,338,535 bp	1,779,536,005 bp

최적화된 hybrid assembly 방법으로 조립

N50	1,279 bp	1,407 bp
Max	121,346 bp	81,660 bp
Contigs	10,690	4,698
Total	9,559,494 bp	4,693,492 bp

그림 199. 한우 장내 대표 메타유전체 조립

KEGG pathway analysis

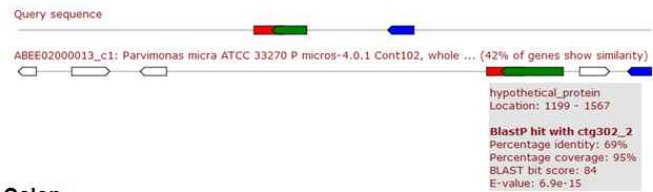


Abubucker, Sahar, et al. "Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome." *PLoS Comput Biol* 8.6 (2012): e1002358.

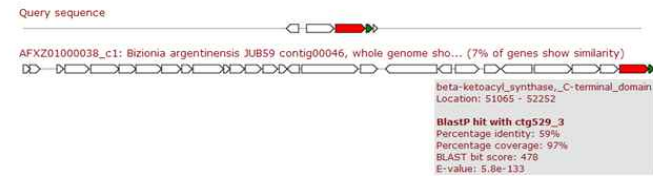
그림 200. 한우 장내 대표 메타유전체 분석

Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis

Cecum



Colon



○ PacBio corrected reads (PBcR)을 이용한 Hybrid assembly

– 최적화된 유전자 조립을 위하여 한우 장내 미생물 샘플 분석에 고 수율 서열분석 장비 (PacBio RSII)를 추가하여 기존의 MiSeq을 이용한 시퀀스와 합친 Hybrid assembly 방법을 구축하였음.

– 긴 서열의 DNA 해독이 가능한 3대 시퀀서인 SMRT 시퀀싱을 이용하였으며 한우의 Cecum (CE) 과 Colon (CO) 의 장내미생물의 메타유전체를 분석하였음. SMRT 시퀀싱을

이용한 긴 서열의 DNA에 Illumina MiSeq을 이용한 짧은 서열의 DNA를 매핑(mapping)하여 긴 서열의 error를 보완할 수 있는 PacBio corrected reads (PBcR) 파이프 라인을 이용하였음.

- 최적의 유전자 assembly 방식을 선정하기 위하여 Short-read, long-read 와 Hybrid 방법을 통한 메타 유전체 assembly 비교 하였음. Short-read (Illumina MiSeq)을 이용한 assembly는 1/4 분기에 확립한 Empowering Development of Genomics Expertise (EDGE) 파이프라인에 있는 IDBA-UD를 이용 하였으며 long-read (PacBio RSII) assembly 방법은 Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP)을 통해 진행 하였음. Seed 길이를 지정 해 유전자 조립을 진행하는 HGAP은 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb의 초기 길이를 설정하여 Assembly를 진행함. 최대 contig길이는 IDBA_UD를 이용한 방법이 CE 및 CO에서 108kb, 79kb로 가장 길게 나왔으며 assemble된 전체 contig의 크기도 172mb, 136mb로 가장 많이 나왔음. N50값은 3kb를 seed로 이용한 HGAP 방법이 가장 길게 나왔으며 이는 긴 read를 읽을 수 있는 PacBio read 특성 때문에 나온 것이므로 다른 방식의 assembly 결과와 비교하기는 어려운 점이 있음. 위에서 언급한 Hybrid assembly 방법보다 short-read를 이용한 assembly 방식이 더 나은 결과를 가져 왔지만 error correction을 거친 long-read의 contig 정보가 de novo assembly를 통한 contig보다 더 정확할 수 있기 때문에 다른 방법에서 나온 contig를 서로 매핑(mapping)하여 필터링 할 필요가 있다고 여겨짐.

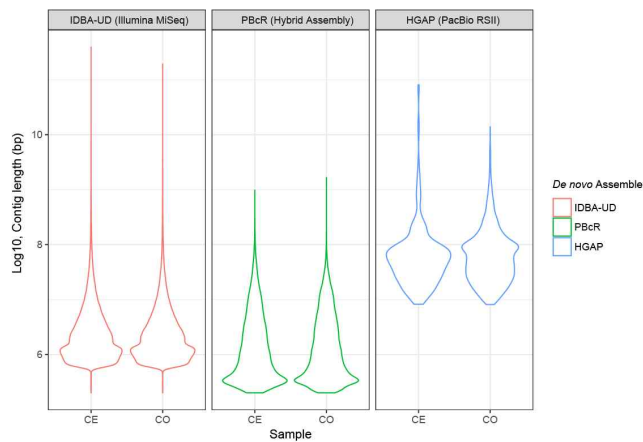


그림 201. Short-read(IDBA-UD), long-read(HGAP) 및 hybrid assembly(PBcR) 방법을 이용한 contig의 길이와 contig 수에 따른 violin plot

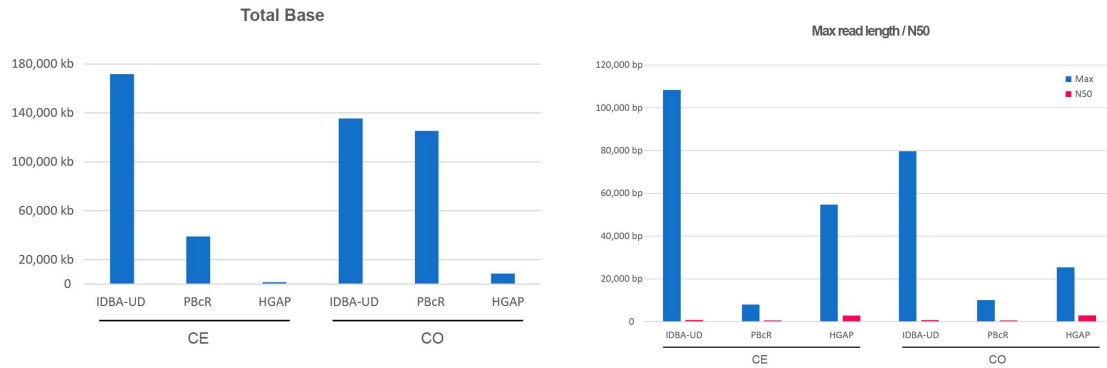


그림 202. Short-read(IDBA-UD), long-read(HGAP) 및 hybrid assembly(PBcR) 방법에 따른 최대 contig길기와 N50 및 contig의 total base 정보

○ 환경메타데이터와 미생물 군집, 메타유전체와 메타볼롬 상관관계 분석

- shotgun sequencing read들로 부터 직접 미생물 커뮤니티와 대사경로 추적을 위한 프로그램인 HUMAnN2의 방법으로 메타유전체를 분석함. 이를 이용하여 각 샘플에 존재하는 대사 경로에 관련된 유전자를 분석 및 비교 할 수 있으며 정량적인 분석 외에도 특정 대사 경로에 관여하는 유전자를 파악함으로써 대사경로 전체가 존재하는지에 대한 여부를 파악 할 수 있음. Adenosine ribonucleotides 합성 또는 aerobic respiration에 관한 대사경로는 CE 및 CO에서 모두 발견되었으며 L-rhamnose 합성이나 myo-chiro- 및 scillio-inositol의 분해와 같은 경로는 CE에서 발견되었음. 그리고 guanosine ribonucleotide의 합성에 관련된 경로들은 특이적으로 CO에서만 발견됨을 알 수 있음. 이를 미생물 군집 혹은 메타볼롬과의 상관관계를 밝히기 위하여 추가적인 파이프라인을 구축 함.
- 이를 응용하기 위해 기 구성된 건강한 성인의 구강 마이크로 바이옴과 메타볼롬 종합 네트워크 분석을 바탕으로 본 연구에 맞는 분석법을 위해 재구성 함.

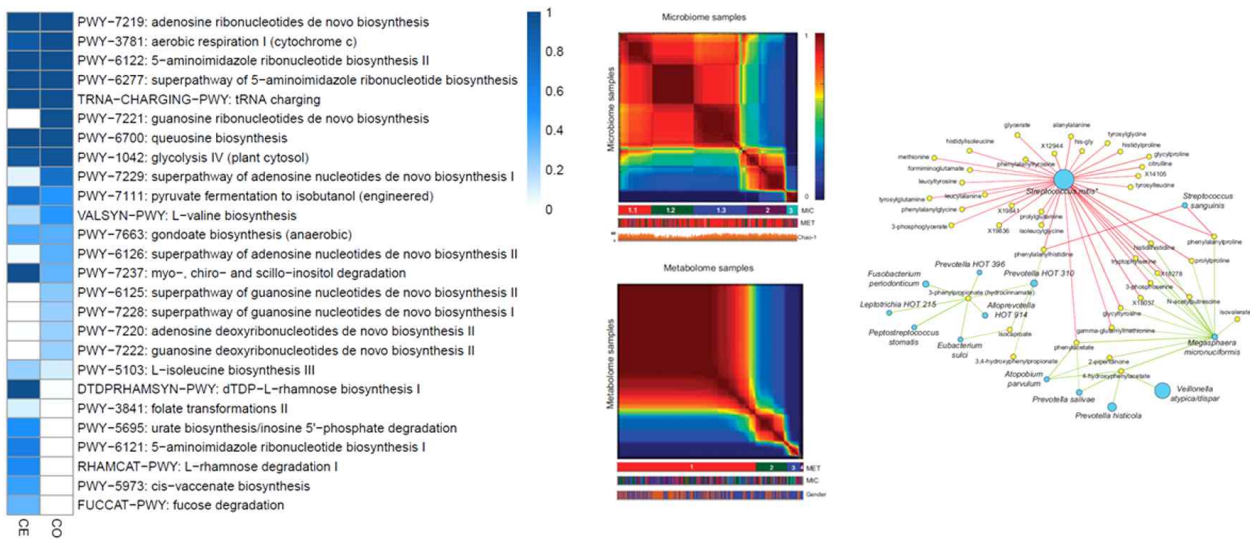


그림 203. HUMAnN2를 이용하여 각 샘플에 존재하는 대사경로 파악 및 네트워크 분석 예시

○ 한우 장내 바이러스 분석 방법

- 현재 설사를 일으키는 바이러스 혹은 소의 질병을 일으키는 바이러스 데이터베이스가 구축되어있지 않음. 직접 NCBI에서 포유류의 설사를 유발시키는 바이러스 53개를 수집함. 이는 coronavirus 42개 rotavirus 8개 및 norovirus 1개 등으로 이루어져 있음. 이를 분석하기 위해 bwa를 이용하여 mapping 후 바이러스 유전자의 coverage와 depth를 계산 하고 유전자 내에 variant가 있는지 확인하고자 함. 위 레퍼런스 유전자를 대상으로 BWA mapping 진행과 single-nucleotide polymorphism을 보기 위한 Variant Calling의 파이프라인 구축 하였음.



그림 204. 장내 바이러스 분석 파이프라인

제 3절 연구개발성과

1. 전략미생물 해독

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	<i>Kushneria konosiri</i> X49 ^T 의 genome	<i>Kushneria</i> sp. X49 ^T 의 complete genome sequence	1세부/3차년

2. 메타지놈 분석

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	HBF1 – honey bee gut fungal community	양봉별 장내 곰팡이 군집의 NGS 유전체 서열	1세부/1차년
2	수입밀로 제조된 누룩의 메타유전체	수입밀로 제조된 누룩의 메타유전체 분석을 위한 NGS 유전체 서열 해독 및 분석	1협동/1차년
3	국내밀로 제조된 누룩의 메타유전체	국내밀로 제조된 누룩의 메타유전체 분석을 위한 NGS 유전체 서열 해독 및 분석	1협동/1차년
4	Gut microbial analysis in adult castrated male cow	성체 거세 한우의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/2차년
5	Gut microbial analysis in <i>Apis mellifera</i>	양봉별의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/2차년
6	Gut microbial analysis in young cow	평균 12개월령의 거세우, 비거세우, 암소의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/2차년
7	한우 대장 내 전 메타유전체 염기서열	한우 대장 내 전 메타유전체 염기서열 분석	1협동/2차년
8	한우 맹장 내 전 메타유전체 염기서열	한우 맹장 내 전 메타유전체 염기서열 분석	1협동/2차년
9	사춘기 이후 한우 장내미생물	평균 19.3개월령의 거세우, 비거세우, 암소한우의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/3차년
10	사춘기 이후 젖소 장내미생물	평균 12.1개월령의 거세우, 비거세우, 암소젖소의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/3차년
11	설사 및 건강한 송아지 장내미생물	설사 증세 및 건강한 송아지의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/3차년
12	설사 및 건강한 송아지 장내 메타전사체	설사 증세 및 건강한 송아지의 장내 메타전사체 RNA-Seq 유전체 서열	1세부/3차년
13	분변공여 및 분변이식 송아지 장내미생물	분변공여 및 분변이식 송아지의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	1세부/3차년
14	전통누룩을 이용한 막걸리 발효과정 중 세균 군집	금정산성누룩과 송학곡자를 이용한 막걸리 발효과정 중 세균 메타유전체 분석	1세부/3차년
15	국산밀 제조 누룩 발효 0일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 0일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
16	국산밀 제조 누룩 발효 8일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 8일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
17	국산밀 제조 누룩 발효15일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 15일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년

18	국산밀 제조 누룩 발효 20일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 20일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
19	수입밀 제조 누룩의 발효 0일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩의 발효 0일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
20	수입밀 제조 누룩 발효 8일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩 발효 8일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
21	수입밀 제조 누룩 발효 15일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩 발효 15일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
22	수입밀 제조 누룩 발효 20일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩 발효 20일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	1협동/3차년
23	성체 비거세 한우 소장 및 대장 장내미생물 군집 분석	성체 비거세 한우 10개체의 소장 대장 세균 메타지놈 염기서열	1세부/4차년

3. NABIC 등록

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	HBF1- honey bee gut fungal community	양봉벌 장내 곰팡이 군집의 NGS 유전체 서열	NN-1817 /1차년
2	수입밀로 제조된 누룩의 메타유전체	수입밀로 제조된 누룩 메타유전체 분석을 위한 NGS 해독 염기서열	NN-1818 /1차년
3	국내밀로 제조된 누룩의 메타유전체	국내밀로 제조된 누룩 메타유전체 분석을 위한 NGS 해독 염기서열	NN-1819 /1차년
4	Gut microbial analysis in adult castrated male cow	성체 거세 한우의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	NN-2589 /2차년
5	Gut microbial analysis in Apis mellifera	양봉벌의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	NN-2590 /2차년
6	Gut microbial analysis in young cow	평균 12개월령의 거세우, 비거세우, 암소의 장내 박테리아 군집 NGS 유전체 서열	NN-2591 /2차년
7	한우 대장 내 전 메타유전체 염기서열	한우 대장 내 전 메타유전체 염기서열	NU-0614 /2차년
8	한우 맹장 내 전 메타유전체 염기서열	한우 맹장 내 전 메타유전체 염기서열	NU-0615 /2차년
9	설사 증세 송아지의 분변 RNA 시퀀스	설사 증세 및 건강한 송아지의 장내 메타전사체 RNA-Seq 유전체 서열	NN-3804 /3차년
10	전통누룩을 이용한 막걸리 발효과정 중 세균 군집	금정산성누룩과 송학곡자를 이용한 막걸리 발효과정 중 세균 메타유전체 분석	NN-3771 /3차년
11	Kushneria konosiri X49 ^T 의 genome	Kushneria sp. X49 ^T 의 complete genome sequence	NG-0811 /3차년
12	국산밀 제조 누룩 발효 0일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 0일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3775 /3차년
13	국산밀 제조 누룩 발효 8일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 8일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3776 /3차년
14	국산밀 제조 누룩 발효15일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 15일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3777 /3차년
15	국산밀 제조 누룩 발효 20일 전 메타유전체	국산밀 제조 누룩 발효 20일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3778 /3차년

16	수입밀 제조 누룩의 발효 0일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩의 발효 0일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3756 /3차년
17	수입밀 제조 누룩 발효 8일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩 발효 8일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3767 /3차년
18	수입밀 제조 누룩 발효 15일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩 발효 15일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3772 /3차년
19	수입밀 제조 누룩 발효 20일 전 메타유전체	수입밀 제조 누룩 발효 20일에서의 전 메타유전체 해독 염기서열	NN-3773 /3차년
20	사춘기 이후 한우 장내 미생물	사춘기 이후 (평균 19.3개월령의 거세우, 비거세우, 암소한우의 장내 박테리아 군집) 한우 장내 미생물	NN-4970/3차년
21	사춘기 이후 젖소 장내 미생물	사춘기 이후 (평균 12.1개월령의 거세우, 비거세우, 암소젖소의 장내 박테리아 군집) 젖소 장내 미생물	NN-4971/3차년
22	설사 송아지 장내 미생물	설사 및 건강한 송아지 장내미생물(설사 증세 및 건강한 송아지의 장내 박테리아 군집)	NN-4972/3차년
23	예비 분변이식 시술 송아지 장내미생물	예비 분변공여 및 분변이식 송아지 장내미생물(분변공여 및 분변이식 송아지의 장내 박테리아 군집)	NN-4974/3차년
24	성체 비거세 한우 소장 및 대장 장내 미생물 군집 분석	성체 비거세 한우 소장 및 대장 장내미생물 군집 분석	NN-4973/4차년

4. 병원성 미생물 정보 완성

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비고
1	<i>Erwinia amylovora</i> FB-20	배화상병 유전체 정보 비교 분석 및 유전체학적 유연관계 분석	2차년/농식품안전 유전체 분석 대응 현물 미생물 분석
2	<i>Erwinia amylovora</i> FB-86	배화상병 유전체 정보 비교 분석 및 유전체학적 유연관계 분석	
3	<i>Erwinia amylovora</i> FB-207	배화상병 유전체 정보 비교 분석 및 유전체학적 유연관계 분석	
4	<i>Erwinia amylovora</i> FB-307	배화상병 유전체 정보 비교 분석 및 유전체학적 유연관계 분석	
5	<i>Erwinia amylovora</i> TS3238	배화상병 유전체 정보 비교 분석 및 유전체학적 유연관계 분석	

5. 국내외 논문 게재

No	성과연차	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	1차년 (2014)	Genomic and Phenotypic Analyses of Carnobacterium jeotgali Strain MS3T, a Lactate Producing Candidate Biopreservative Bacterium Isolated from Salt-Fermented Shrimp	FEMS Microbiology Letters	원태웅, 현동욱, 배진우	362	England	Oxford University Press	SCI	2015.4	10.1093/femsle/fnv058

2	1차년 (2014)	Complete genome sequence of Haloarcula sp. CBA1115 isolated from non-purified solar salts	Marine Genomics	윤지현, 배진우	23	Netherland	Elsevier Science	SCIE	2015.4	10.1016/j.margen.2015.03.012
3	1차년 (2014)	Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens.	Asian Australasian Journal of Animal Sciences	최기영, 설우준	28	Korea	Asian-Australasian Association of Animal Production Societies	SCIE	2015.6	10.5713/ajas.15.0026
4	2차년 (2015)	Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota	Trends in Biotechnology	신나리, 원태웅, 배진우	33	Netherland	Elsevier Science	SCI	2015.9	10.1016/j.tibtech.2015.06.011
5	2차년 (2015)	Arthro bacter echini sp. nov., isolated from the gut of a purple sea urchin, Heliocidaris crassispina.	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	이준영, 현동욱, 배진우	66	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2016.04.01	10.1099/ijs.0.000965
6	2차년 (2015)	Proteus cibarius sp. nov., a swarming bacterium from Jeotgal, a traditional Korean fermented seafood, and emended description of the genus Proteus	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	현동욱, 배진우	66	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2016.6.10	10.1099/ijs.0.001002
7	2차년 (2015)	Chronic Repression of mTOR Complex 2 Induces Changes in the Gut Microbiota of Diet-induced Obese Mice	Scientific reports	정미자, 배진우	6	United Kingdom	Nature Publishing Group	SCI	2016.7.29	10.1038/sr30887
8	2차년 (2015)	Metabolomics reveals the effect of garlic on antioxidant- and protease-activities during Cheonggukjang (fermented soybean paste) fermentation	Food Research International	오동구, 장유경, 이충환	82	CANADA	ELSEVIER SCIENCE	SCI	2016.4	10.1016/j.foodres.2016.01.019
9	2차년 (2015)	Complete genome sequence of <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439, a promising cell factory for production of secondary metabolites	Journal of Biotechnology	송주연	219	Netherlands	Elsivier	SCI	2016.2	10.1016/j.jbiotec.2015.12.028
10	2차년 (2015)	Complete genome sequence of antibiotic and anticancer agent violacein producing <i>Massilia</i> sp. strain NR 4-1	Journal of Biotechnology	명누리, 설우준	223	Netherland	Elsevier	SCI	2016.02	10.1016/j.jbiotec.2016.02.027

11	3차년 (2016)	Microbulbifer echini sp. nov., isolated from the gastrointestinal tract of a purple sea urchin, <i>Heliocidaris crassispina</i>	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	이준영, 배진우	67	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2017.5.05	10.1099/ijs.0.001731
12	3차년 (2016)	Paenibacillus apis sp. nov. and Paenibacillus intestini sp. nov., isolated from the intestine of the honey bee <i>Apis mellifera</i>	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	윤지현, 배진우	67	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2017.6.14	10.1099/ijs.0.001887
13	3차년 (2016)	Bombella apis sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from the midgut of a honey bee	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	윤지현, 배진우	67	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2016.7	10.1099/ijs.0.001921
14	3차년 (2016)	Evolutionary architecture of the infant-adapted group of <i>Bifidobacterium</i> species associated with the probiotic function.	Systematic and Applied Microbiology	곽민정, 송주연	7	Germany	Elsevier	SCI	2016.10.	10.1016/j.syapm.2016.07.004
15	4차년 (2017)	Kushneria konosiri sp. nov., isolated from the Korean salt-fermented seafood Daemi-jeot	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	윤지현, 배진우	67	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2017.9	10.1099/ijs.0.002170
16	4차년 (2017)	Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee	Scientific reports	윤지현, 배진우	8	United Kingdom	Nature Publishing Group	SCI	2018.1	10.1038/s41598-018-19860-7
17	4차년 (2017)	Intraspecies Volatile Interactions Affect Growth Rates and Exometabolomes in <i>Aspergillus oryzae</i> KCCM 60345	Journal of microbiology and biotechnology	Singh, Digar, 이충환	28	Korea	Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCIE	2018.2	10.4014/jmb.1711.11005
18	4차년 (2017)	Complete genome sequence of the halophile bacterium <i>Kushneria marisflavi</i> KCCM 80003 ^T , isolated from seawater in Korea	Marine Genomics	윤지현, 배진우	37	Netherlands	Elsevier Science	SCIE	2018.2	10.1016/j.marge.2017.11.002

19	4차년 (2017)	Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota	I S M E journal	김민수, 배진우	12	United Kingdom	Nature Publishing Group	SCI	2018.4	10.1038/s41396-018-0061-9
20	4차년 (2017)	Complete genome sequence of the halophile bacterium <i>Kushneria konosiri</i> X49T, isolated from salt-fermented <i>Konosirus punctatus</i>	Standards in Genomic Sciences	윤지현, 배진우	13	United Kingdom	BioMed Central Ltd	SCIE	2018.10	10.1186/s40793-018-024-0
21	4차년 (2017)	Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato	Nature biotechnology	곽민정, 김지현	-	United Kingdom	Nature Publishing Group	SCI	2018.10	10.1038/nbt.4232

6. 국내 및 국제학술회의 발표

No	성과연차	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	1차년	2015 한국미생물생명공학회 국제학술대회	김현식	2015.6.24-6.26	경주화백컨벤션센터	대한민국
2	1차년	2015 한국미생물생명공학회 국제학술대회	이준영	2015.6.24-6.26	경주화백컨벤션센터	대한민국
3	1차년	2015 한국미생물생명공학회 국제학술대회	강우림	2015.6.24-6.26	경주화백컨벤션센터	대한민국
4	1차년	응용생명화학회	오동구	2015. 08. 17	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
5	1차년	응용생명화학회	이다은	2015. 08. 18	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
6	1차년	한국미생물생명공학회 동계심포지엄	송주연	2015.1.19-21	강원도 용평리조트	대한민국
7	1차년	American Society for Microbiology 115th General Meeting	송주연	2015.5.30-6.2	New Orleans Ernest N. Morial Convention Center	미국
8	1차년	ESF Research Conference on Symbiomes: Systems Biology of Host-Microbiome Interactions	송주연	2015.6.5-10	Polonia Castle, Pultusk near Warsaw	폴란드
9	1차년	한국미생물생명공학회 국제학술대회	명누리	2015.06.24	경주, 화백컨벤션센터	대한민국
10	1차년	한국미생물학회 국제학술대회	명누리	2015.04.16	창원	대한민국
11	1차년	한국미생물학회 국제학술대회	박재완	2015.04.16	창원	대한민국
12	2차년	2016 한국미생물학회	김현식	2016.4.20-4.22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
13	2차년	2016 한국미생물학회	이준영	2016.4.20-4.22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
14	2차년	2016 한국미생물학회	강우림	2016.4.20-4.22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
15	2차년	2016 한국미생물학회	김민수	2016.4.20-4.22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
16	2차년	2016 한국미생물학회	원태웅	2016.4.20-4.22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국

17	2차년	2016 한국대사채학회	이다은	2016. 04. 08	건국대학교	대한민국
18	2차년	한국미생물학회	윤기영 * 송주연	2016.4.20-22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
19	2차년	한국미생물학회	곽민정	2016.4.20-22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
20	2차년	한국미생물학회	이현권, 곽민정	2016.4.20-22	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
21	2차년	UKC2016(US-Korea Conference on Science, Technology, and Entrepreneurship)	송주연	2016.8.11.	델러스, Hyatt Regency DFW	미국
22	2차년	2016 한국미생물학회	이규찬	2016.04.21	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
23	2차년	2016 한국미생물학회	명누리	2016.04.21	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
24	3차년	The 8 th Asian Symposium on Microbial Ecology	배진우	2016.09.30-10.02	국립대만대학교	대만
25	3차년	The 8 th Asian Symposium on Microbial Ecology	김필수	2016.09.30-10.02	국립대만대학교	대만
26	3차년	2017 한국미생물생명공학회 동계심포지엄	윤지현	2017.01.16-01.18	강원도 용평리조트	대한민국
27	3차년	2017 한국미생물생명공학회 동계심포지엄	원태웅	2017.01.16-01.18	강원도 용평리조트	대한민국
28	3차년	2017 한국미생물생명공학회 동계심포지엄	현동욱	2017.01.16-01.18	강원도 용평리조트	대한민국
29	3차년	2017 한국미생물생명공학회 동계심포지엄	김필수	2017.01.16-01.18	강원도 용평리조트	대한민국
30	3차년	2017 한국대사채학회	이선민	2017. 04. 06	건국대학교	대한민국
31	3차년	The 25th KOGO Annual Conference 2016	송주연	2016.9.5	한국과학기술회관	대한민국
32	3차년	Phytobiomes: From Microbes to Plant Ecosystems	이지담	2016.11.11	Hilton Santa Fe Historic Plaza Hotel	미국
33	3차년	2016년 한국미생물학회연합 국제학술대회	송주연	2016.11.4	KINTEX	대한민국
34	3차년	2016 mBiome International Conference	송주연	2016.12.22	하이원리조트	대한민국
35	3차년	2017년 한국미생물학회 국제학술대회	곽민정	2017.4.26	BEXCO	대한민국
36	3차년	2017년 한국미생물학회 국제학술대회	송주연	2017.4.26	BEXCO	대한민국
37	3차년	2016 mBiome International Conference	이규찬	2016.12.21	하이원리조트	대한민국
38	4차년	2017 mBiome International Conference	송주연	2017.11.27	연세대학교	대한민국
39	4차년	농업미생물연구회 심포지엄	배진우	2017.10.25	전북대학교	대한민국
40	4차년	한국유전체학회	배진우	2018.02.05	홍천 대명리조트	대한민국
41	4차년	한국반추위 미생물 연구회	배진우	2018.02.24	경상대학교	대한민국
42	4차년	2018 한국미생물생명공학회 국제학술대회	박혜인	2018.6.29	여수엑스포컨벤션센터	대한민국

43	4차년	2018 한국미생물생명공학회 국제학술대회	국 송주연	2018.6.29	여수엑스포컨벤션센터	대한민국
----	-----	------------------------	-------	-----------	------------	------

7. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Massilia</i> sp. NR 4-1	42724	KCTC	2015/2차년
2	<i>Paenibacillus apis</i> CBM1	33844	KCTC	2016/3차년
3	<i>Paenibacillus apis</i> CBH23	33833	KCTC	2016/3차년
4	<i>Paenibacillus intestini</i> LAH16	33832	KCTC	2016/3차년
5	<i>Bombella apis</i> MRM1	52452	KCTC	2016/3차년

8. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	1세부	2014(1차년)	1		2		3		3					
2	1세부	2015(2차년)	2				2	2						
3	1협동위탁	2015(2차년)		1			1	1						
4	1세부위탁	2015(2차년)		1			1	1						
5	1세부	2016(3차년)	1		2		1	2	3					
6	1협동	2016(3차년)		2			1	1	2					
7	1세부위탁	2016(3차년)		1			1	1						
8	1협동위탁	2017(4차년)		1			1	1						
9	1세부위탁	2017(4차년)		1			1	1						
10	1세부	2017(4차년)			1		1	1						
총합			4	7	5		7	9	16					

9. 타 연구개발사업에의 활용

No	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	포스트게놈 다부처 유전체사업	유전체 정보 개방형 분석 서비스 환경 구축 - 메타게놈 데이터	김지현	미래창조과학부	2015/1차년
2	수출전략기술개발사업	수출용 신선 농식품 고품질화를 위한 냄새지문 활용 부패감지기 개발	서정아	농림축산식품부	2015/2차년

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

구분 (연도)	세부과제명	연구목표
1차년도 (2014)	제1세부: 경제 동물 의 메타유전체 정보 분석	경제 동물 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)의 시료 확보
		경제 동물 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)의 장내 미생물 밀도 분석
		경제 동물 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)의 장내 미생물 군집 분석
		한우의 소화기관 내 유용미생물 분리 및 분리된 미생물의 생리활성 연구
		한우의 육질등급 별 반추위 내용물 샘플링 및 박테리아 군집 정보 획득
		한우의 육질등급 별 반추위 내용물 샘플링 및 바이러스 (박테리오파지) 군집 정보 획득
	제 1세부 위탁: 질 량분석기기 기반 농업유용미생물의 메타볼롬 해석	Streptomyces (8 species, 14 strains)의 Chemotaxonomy를 통한 종별 구분 및 종을 구분하는 대사체 동정, antibacterial activity, active compounds 규명
		소맥곡자 고추장에서의 기존 균주와 신 균주간의 구분 및 차이는 대사산물의 동정
		메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴을 위한 분석 조건 확립
	제 1협동: 농식품 유용미생물의 메타 유전체 정보 및 대 사네트워크 분석	메타유전체 연구 분석을 위한 샘플 선정 및 미생물 메타유전체 추출
		메타유전체 분석 샘플의 메타데이터 수집
		메타유전체 분석 샘플의 메타데이터 수집
		16S rRNA 유전자 서열 분석을 통한 메타유전체 분석 샘플의 미생물 군집 구조 파악
		군집 구조 파악 결과로부터 주요 미생물 그룹 분리 및 동정
	제 1협동 위탁: 메 타유전체 및 메타 볼롬 종합 정보분 석을 위한 네트워 크 파이프라인 구 성	메타유전체 연구 분석을 위한 샘플 선정
		숙주, 미생물 군집, 환경의 메타데이터 목록 작성

2차년도 (2015)	제1세부: 경제 동물 의 메타유전체 정보 분석	꿀벌 장내 유용 미생물 분리 및 동정
		꿀벌 장내 유용 미생물의 생리활성 탐구
		한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집과 대사체 군집의 상관관계 비교
		거세에 의한 한우 및 젖소의 장내미생물 군집 변화 모니터링
	제 1세부 위탁: 질 량분석기기 기반 농업유용미생물의 메타볼롬 해석	미생물 이용 (<i>Bacillus subtilis</i>) 발효 식품 청국장에서의 마늘 첨가에 따른 대사체 비교 및 항산화능 비교
		젖소 거세, 비거세, 암소 간 장내 미생물 대사체 변화
	제 1협동: 농식품 유용미생물의 메타 유전체 정보 및 대 사네트워크 분석	1차년도에 수행한 환경 선정 및 미생물 군집 구조 조사 결과를 도대로 미생물 메타유전체 분석 샘플 선정 및 메타 유전체 추출 선정된 환경의 미생물 메타유전체 염기서열 결정 및 데이터 분 석
		미생물 메타유전체 서열 분석을 위한 분석 기반 구축
		농식품 현안 미생물 유전체 전략적 분석 대응
	제 1협동 위탁: 메 타유전체 및 메타 볼롬 종합 정보분 석을 위한 네트워 크 파이프라인 구 성	메타유전체, 커뮤니티 분석, 메타대체 데이터 자료 분석 및 상관 관계 프레임 구축
메타유전체 기반 유전자 네트워크 분석 필요한 정량적 분석		
3차년도 (2016)	제1세부: 경제 동물 의 메타유전체 정보 분석	한우 거세에 의한 장내미생물 군집과 혈중, 분변, 근육 내 대사체 군집의 상관관계 분석
		식품의 발효과정에 따른 세균 군집 다양성과 변화 비교분석
	제 1세부 위탁: 질 량분석기기 기반 농업유용미생물의 메타볼롬 해석	한우 거세, 비거세, 암소 간 장내 미생물 대사체 변화 비교
		젖소, 한우 거세, 비거세, 암소의 혈장 내인성 대사체 변화 비교
		한우 거세 비거세 우의 근육조직 내 대사체 변화 비교
	제 1협동: 농식품 유용미생물의 메타 유전체 정보 및 대 사네트워크 분석	미생물 메타유전체 서열 분석
		메타유전체 서열 분석 방법 개발 및 정립
		메타유전체 데이터로부터 신규 유전자/유용 유전자 발굴
	제 1협동 위탁: 메 타유전체 및 메타 볼롬 종합 정보분 석을 위한 네트워 크 파이프라인 구 성	메타유전체-미생물 커뮤니티 분석-메타대사체-메타데이터의 통 합적 분석 파이프라인 구축

4차년도 (2017)	제1세부: 경제 동물 의 메타유전체 정보 분석	설사 송아지의 장내미생물 군집 및 장내 바이롬 분석
		설사 송아지 대상 건강한 송아지의 대변무리이식 연구
		식품의 발효과정에 따른 바이러스 군집 다양성과 변화 비교분석
	제 1세부 위탁: 질 량분석기기 기반 농업유용미생물의 메타볼롬 해석	한우 거세, 비거세 우의 내장지방, 등지방 내 대사체 변화 비교
		한우 거세, 비거세 우의 소장, 직장 내 미생물 대사체 변화 비교
		<i>Aspergillus oryzae</i> 공생배양에 따른 성장 관련 휘발성 대사체 발굴
	제 1협동: 농식품 유용미생물의 메타 유전체 정보 및 대 사네트워크 분석	선정 환경에서의 미생물 군집의 역할 및 기작 분석
		메타유전체 서열 분석 방법 개발 및 정립
		해당 환경에서 신규 및 유용 유전자의 농식품적 응용
제 1협동 위탁: 메 타유전체 및 메타 볼롬 종합 정보분 석을 위한 네트워 크 파이프라인 구 성	메타유전체와 메타볼롬 상관관계 분석 및 유전자 정량분석법 확립 을 통한 종합적 네트워크 분석모델 확립 및 통합 네트워크 모델을 거시적 관점에서 제시	

제 2 절 목표달성여부

구분 (연도)	세부연구목표	가중 치	달성도	연구결과
1차 년도 (2014)	경제 동물 꿀벌 (A p i s mellifera)의 시료 확보	5%	100%	-꿀벌 외역봉은 전국 4개 (충청남도 서산시, 전라북도 진안군, 경상북도 칠곡군, 강원도 원주시) 지역의 야외에서 채집하였고, 나머지 벌은 경기도 진접과 충청북도 괴산군의 양봉업자에게 제공받음. -채집된 외역봉의 18S rRNA를 이용한 종내 변이 확인 결과, 유전자의 변이를 확인하지 못하였음.
	경제 동물 꿀벌 (A p i s mellifera)의 장내 미생물 밀도 분석	5%	100%	-qPCR을 이용한 bacterial and fungal density 확인 결과, bacteria는 10^8-10^9 로 존재 fungi는 10^5-10^8 으로 존재하는 것을 확인함. -박테리아는 greengene database 기준으로 classification 한 결과, 8개의 phylum이 확인되었음. 그 중 Proteobacteria와 Firmicutes가 95%이상을 차지하는 것으로 확인되었음. fungi는 대부분 Saccaromyces에 해당하는 fungi를 갖고 외역봉은 특정 fungi가 아닌 다양한 fungi가 존재하였음
	경제 동물 꿀벌 (A p i s mellifera)의 장내 미생물 군집 분석	10%	100%	
	한우의 소화기관 내 유용미생물 분리 및 분리된 미생물의 생리활성 연구	5%	100%	
	한우의 육질등급 별 반추위 내용물 샘플링 및 박테리아 군집 정보 획득	10%	100%	-한우의 소화기관에서 분리된 10종의 신종 미생물 중 Kocuria sp. 균주에 대해 genomic & chemotaxonomic analysis를 수행한 결과 근연종 (closely related species)과 구분되는 novel species임을 확인함. -경상북도 군위군에 위치한 민속 LPC에서 상위 등급 한우 10마리의 소화기관 (Jejunum, cecum, and Colon), 조직 및 지방 (Liver, subcutaneous fat, and visceral fat) 및 혈청을 채집함.
	한우의 육질등급 별 반추위 내용물 샘플링 및 바이러스 (박테리오파지) 군집 정보 획득	10%	100%	-소화기관 샘플에서 박테리아 유전체 추출 및 증폭을 완료하여 마크로젠 사에 대용량염기서열 분석을 의뢰함.
	Streptomyces	5%	100%	- 메타볼롬 분석을 기반으로 하여 HCA를 통해 14개의

(8 species, 14 strains)의 Chemotaxonomy를 통한 종별 구분 및 종을 구분하는 대사체 동정, antibacterial activity, active compounds 규명			strain이 종별로 나뉘는 것을 확인됨. - Streptomyces의 14개의 strain을 구별하는 대사체로 oxytetracycline, altamycin A, USF-19A 외 5개의 2차 대사체가 동정 됨.
소맥곡자 고추장에서의 기존 균주와 신 균주 간의 구분 및 차이는 대사산물의 동정	5%	100%	- Streptomyces의 14개의 strain 중 S. rimosus와 S. scabiei (KACC 20200)에 antibacterial activity가 있는 것을 확인함. - 균주별 장류에서의 기기분석을 통한 메타볼롬 분석 및 다변량 통계분석 결과, 아미노산, 유기산, 당, 당알코올, 플라보노이드류의 대사체가 균주 별 구분하는 물질로 동정 됨.
메타볼로믹스를 이용한 경제동물의 장내미생물 군집 대사체 프로파일링 및 지표 물질 발굴을 위한 분석 조건 확립	10%	100%	
메타유전체 연구 분석을 위한 샘플 선정 및 미생물 메타유전체 추출	5%	100%	- 농림축산식품 분야의 중요한 소재 및 환경인 전통발효식품 누룩과 경제동물 한우의 장내 환경을 전 메타유전체 분석대상으로 선정 - 선정된 농식품 주요 소재 및 환경의 유전체를 추출하여 메타유전체학적 접근을 위한 DNA 시료를 추출, 확보
메타유전체 분석 샘플의 메타데이터 수집	5%	100%	- 협력 연구팀들로부터 메타유전체 분석에 필요한 메타데이터 수집
메타유전체 분석 샘플의 메타데이터 수집	5%	100%	- 협력 연구팀들로부터 메타유전체 분석에 필요한 메타데이터 수집
16S rRNA 유전자 서열 분석	5%	100%	- MiSeq을 이용한 한우 장내(소장, 맹장, 대장) 미생물의 전 메타유전체 염기서열을 해독함

	을 통한 메타유전체 분석 샘플의 미생물 군집 구조 파악			<ul style="list-style-type: none"> - 해독된 전 메타유전체 염기서열로부터 16S rRNA 유전자 서열 추출 및 분석을 통해 한우 맹장, 대장의 미생물 군집 구조를 파악함 - 원료에 따른 누룩 종류 별로 HiSeq을 이용하여 전 메타유전체 서열을 해독하고, 그 결과로부터 16S rRNA 및 18S rRNA 유전자 서열을 추출하여 미생물 군집 구조를 분석함으로써 누룩 원료가 되는 밀의 종류(수입밀, 국산밀)에 따른 미생물 군집 차이를 확인 - 미생물 전 메타유전체 분석을 위한 생물정보학적 도구, 데이터베이스 수집 및 시험 분석
	군집 구조 파악 결과로부터 주요 미생물 그룹 분리 및 동정	5%	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 군집구조를 통해 해당 환경의 주요 분류 세균 후보 선정
	메타유전체 연구 분석을 위한 샘플 선정	5%	100%	<ul style="list-style-type: none"> -미생물 군집의 메타유전체와 환경인자 및 메타볼롬의 네트워크 구조를 이해하기 위한 기초작업으로 메타데이터 목록확보를 수행함. Genomic Standard Consortium (GSC)의 MIxS standard 프레임 워크와 TerraGenome 같은 거대 메타유전체 분석 프로젝트에서 제안하는 메타데이터 작성목록을 기반으로 농림축산식품과 관련된 한국형 메타유전체 샘플의 환경 및 기타사항의 메타데이터 프레임 (목록)을 구축하였음
	숙주, 미생물 군집, 환경의 메타데이터 목록 작성	5%	100%	<ul style="list-style-type: none"> -경제동물 (한우, 한돈, 가금류)이나 주류 미생물주류의 미생물 메타 유전체의 환경, 숙주와의 관계를 추후 연구하기 위하여 각 분야의 각 분야의 전문가들의 자문을 얻어 메타 데이터 프레임을 구축
2차 년도 (2015)	꿀벌 장내 유용 미생물 분리 및 동정	10%	100%	<ul style="list-style-type: none"> -차년도에 이루어진 장내 미생물 군집분석 및 기존에 보고된 연구를 참고하여 다양한 배지 조건 (TSA+blood 5%, Columbia agar+blood 5%, BHIA+0.1mg/ml Thiamine hydrochloride, BHIA, Mannitol agar, Acetic acid medium, MRSA, LBA)과 장의 부위 (foregut, midgut, hindgut)에 따른 꿀벌의 장내 미생물 분리를 실시하였고, 총 171개의 bacterial colony를 획득함.
	꿀벌 장내 유용 미생물의 생리활성 탐구	10%	100%	<ul style="list-style-type: none"> -16S rRNA을 이용한 Eztaxon matching 결과 3 strain에 해당하는 <i>Paenibacillus</i> sp.와 1 strain에 해당하는 <i>Bombella</i> sp.가 신종으로 예상됨. -phylogenetic analysis를 이용한 계통학적 분석 결과, 근연종과 구분되는 novel species임을 확인함. -pH, sodium, temperature 조절을 통해 growth test

				수행하여 optimal condition 확인함.
한우의 육질등급 별 소화기관 내 박테리아 군집과 대사체 군집의 상관관계 비교	10%	100%		-한우의 장 내용물에서 미생물에 의해 생산되는 대사체 군집을 확인한 결과 장내 미생물 군집에서 나타난 그룹화 패턴과 유사하게 소장 샘플을 제외한 대장 및 맹장 샘플에서 유래한 대사체의 clustering을 확인함. -비거세 수소의 혈중 옹성호르몬 양이 통계적으로 유의미한 수준에서 높게 관찰됨을 확인하였고, 비거세 수소의 장내미생물 군집이 다른 그룹과 비교하여 독립적으로 그룹화 됨을 확인함으로써 거세에 의해 감소한 옹성호르몬에 의해 거세우의 장내미생물 군집이 암소의 장내미생물 군집과 유사해짐을 제시함.
거세에 의한 한우 및 젖소의 장내미생물 군집 변화 모니터링	10%	100%		
미생물 이용 (<i>Bacillus subtilis</i>) 발효 식품 청국장에서 마늘 첨가에 따른 대사체 비교 및 항산화능 비교	5%	100%		-미생물 이용 (<i>Bacillus subtilis</i>) 발효 식품 청국장에서 마늘 첨가에 따른 차이를 구분하는 대사산물로 총 28개의 일차대사산물과 13개의 이차대사산물이 각 군별 차이나는 대사산물로 동정 됨. - 항산화 실험 (ABTS, DPPH, FRAP)를 수행하였을 때, 마늘을 첨가한 청국장이 더 높았으며, 대부분의 2차 대사산물과 positive한 코릴레이션을 보임.
젖소 거세, 비거세, 암소 간 장내 미생물 대사체 변화	10%	100%		젖소의 거세, 비거세, 암소 간 분변 내 장내 미생물 군집의 차이를 구분하는 대사산물로 총 27개의 대사산물이 각 군별 차이나는 대사산물로 동정 됨.
1차년도에 수행한 환경 선정 및 미생물 군집 구조 조사 결과를 토대로 미생물 메타유전체 분석 샘플 선정 및 메타 유전체 추출	5%	100%		- 참조유전체 연구팀과의 연구 협력을 통해 국내산 밀 및 수입산 밀로 제조한 누룩에 대해 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15일(발효), 20일(건조) 샘플, 총 18개의 샘플들을 확보 - 전 메타유전체 서열 해독을 위해 발효 식품 샘플로부터 식품 DNA의 오염이 최대된 메타유전체 추출 실험 방법 고안 및 구축
선정된 환경의 미생물 메타유전체 염기서열 결정 및 데이터 분석	10%	100%		- 누룩 내 세균 및 진균 군집 구조를 분석하기 위해 16S rRNA 및 ITS amplicon에 대해 MiSeq을 이용, 염기서열 해독 - 16S rRNA 및 ITS amplicon 서열 분석 및 비교를 통해 누룩 원료 및 원료의 품종에 따라 세균 및 진균

				<p>군집 구조 차이 확인</p> <p>- 선정된 샘플에 대한 전 메타유전체 서열 해독</p>
	미생물 메타유전체 서열 분석을 위한 분석 기반 구축	10%	100%	<p>- 누룩 및 한우 장내 미생물 전 메타유전체 분석을 위해 해당 환경 및 대사를 고려하여 생물정보학적 도구 및 데이터베이스를 수집 및 분석에 활용</p>
	농식품 현안 미생물 유전체 전략적 분석 대응	5%	100%	<p>- 국내에서 분리된 화상병 원인 미생물 5 균주의 해독 서열 주석화 및 분석 수행</p> <p>- Phylogenomic tree 작성을 통해 기존에 유전체가 공개된 <i>Erwinia amylovora</i> 균주들과의 유연관계 유추</p> <p>- SNP, DIP 검출을 통한 균주간 유전체적 차이 분석</p>
	메타유전체, 커뮤니티 분석, 메타대체 데이터 자료 분석 및 상관관계 프레임 구축	5%	100%	<p>- 한우 Cecum과 Colon의 메타 유전체 분석을 위하여 Pacbio의 long read와 MiSeq의 short read를 이용한 최적화된 hybrid assembly를 적용하였음. Pathway database인 KEGG db를 이용하여 두 환경에 따른 메타 유전체 분석을 진행</p>
	메타유전체 기반 유전자 네트워크 분석 필요한 정량적 분석	10%	100%	<p>- 추가적으로 Antibiotics 및 Secondary Metabolite에 관련된 유전자를 찾기 위한 분석을 진행</p>
3차년도 (2016)	한우 거세에 의한 장내미생물 군집과 혈중, 분변, 근육 내 대사체 군집의 상관관계 분석	20%	100%	<p>- Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS)를 이용하여 한우 (거세, 비거세, 암소) 및 젖소 (거세, 비거세, 암소)의 혈중, 분변 메타볼롬 프로파일을 확인함. 거세 이후 거세우의 혈중 메타볼롬 군집이 비거세우가 아닌 암소와 유사해 짐을 제시하였고, 특히 거세우의 혈중 메타볼롬 중 branched chain amino acids (BCAAs)의 양이 증가했음을 제시함.</p> <p>- 성체 거세 한우의 장내 부위 별 (소장, 대장, 맹장) 미생물 군집 및 메타볼롬 군집을 규명함. 소장의 경우 맹장 및 대장과 확연히 구분되는 미생물 군집 및 메타볼롬 군집을 나타내며 아미노산 관련 대사작용이 활발함을 제시함. 상관관계 분석 결과 소장의 아미노산 대사과정과 소장 미생물 (two unclassified genera from the family Peptostreptococcaceae, and the genera <i>Butyrivibrio</i>, <i>Acetitomaculum</i>, and <i>Atopobium</i>) 간 통계적 유의성을 갖는 수준에서 positive correlation을 관찰.</p> <p>- 서울시 동대문구에 위치한 마장동과 한살림 매장에서 거세우 및 비거세우에서 유래한 채끝 등심을 구매하여 지방 저장량, 근육 내 메타볼롬 군집, 케톤바디 등을 분석함. 거세우의 채끝 등심에서 비거세우와 비교하여 증가된 양</p>

				의 지방 저장과 BCAAs를 포함하는 아미노산 및 케톤바디를 확인.
식품의 발효과정에 따른 세균 군집 다양성과 변화 비교분석	10%	100%		<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 발효식품 중 막걸리를 대상으로 선정하고, 두 가지 전통 누룩을 이용하여 3반복으로 실험실 내에서 발효를 실행하여 발효 단계별 시료를 확보 (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13일) - 발효 단계별 세균 군집 분석을 위해 시료로부터 메타유전체를 추출하여 세균의 16S rDNA amplicon에 대해 Illumina MiSeq을 이용하여 염기서열 해독 - 발효 단계별 세균 군집의 변화 분석 결과를 토대로 하여 바이러스 군집 확보를 위한 발효단계 선정
한우 거세, 비거세, 암소 간 장내 미생물 대사체 변화 비교	10%	100%		한우의 거세, 비거세, 암소 간 분변 내 장내 미생물 군집의 차이를 구분하는 대사산물로 총 22개의 대사산물이 동정 됨.
젖소, 한우 거세, 비거세, 암소의 혈장 내인성 대사체 변화 비교	10%	100%		젖소와 한우의 거세, 비거세, 암소간 혈청 내인성대사체 프로파일링 다변량 통계 분석 결과, 각각 총 25개, 21개의 그룹을 구분짓는 내인성대사체를 동정 함
한우 거세 비거세 우의 근육조직 내 대사체 변화 비교	10%	100%		근육조직 대사체 프로파일링 결과 한우 거세 비거세우 간의 유의적으로 차이 나는 대사산물 총 25종이 동정 됨.
미생물 메타유전체 서열 분석	10%	100%		<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도에 수행한 누룩 시료의 16S rRNA, ITS 분석 결과로부터, 진균 및 세균 군집의 천이 양상을 고려하여 전 메타유전체 염기서열 분석에 적용할 시료 선정 (국내산 밀 누룩과 수입산 밀 누룩 각각의 0, 8, 15, 20일 발효 누룩 시료 선정) - 1, 2차년도 연구 수행으로부터 구축된 개선된 누룩 내 미생물 메타유전체 추출 방법을 이용하여 선정된 시료의 DNA 추출 - 전 메타유전체 해독을 위해 DNA 추출 실험을 반복 수행하여 DNA 시료 확보 - Illumina HiSeq 2500을 이용하여 염기서열 해독, 전 메타유전체 염기서열 생산 - 해독된 염기서열 read들로부터 trimming 및 원료 DNA sequence 제거 전처리를 통해 분석에 이용될 high-quality 염기서열 read 수집 및 확보

				<ul style="list-style-type: none"> - <i>De novo assembly</i>를 통한 전 메타유전체 조립 염기서열 생산 - 누룩 내 다량의 진균 유전체 염기서열을 고려하여 세균 유전체 서열과 진균 유전체 서열 분리하여 유전자 예측 수행 및 유전자 annotation을 통한 유전자 구성 비율 파악 - 전 메타유전체 해독 염기서열로부터 대사경로 유전자 비교 분석
메타유전체 서열 분석 방법 개발 및 정립	10%	100%		<ul style="list-style-type: none"> - 효율적인 전 메타유전체 분석을 위해 최근 개발되고 있는 분석 방법 및 생물정보학적 도구들을 수집하여 본 연구에서 수행하고 있는 농식품 유래의 전 메타유전체 분석에 시험 적용
메타유전체 데이터로부터 신규 유전자/유용 유전자 발굴	10%	100%		<ul style="list-style-type: none"> - 토마토 근권 메타유전체를 분석하였던 선행 연구 결과를 기반으로 식물 병원성 균에 대한 저항성에 기여할 것으로 예상된 Flavobacteriaceae에 속하는 속의 신규 유용 미생물 분리 - 유용 미생물 균주를 분리하기 위한 선별 primer 및 배지 조성 구축 - 토마토 세균성 풋마름병의 원인균에 대한 병 저항성 테스트를 통해 분리 균주 그룹별 병 저항성 기여 효과 관찰 - 신규 미생물 균주의 전 유전체 염기서열 해독을 통한 유전체 완성
메타유전체-미생물 커뮤니티 분석-메타대사체-메타데이터의 통합적 분석 파이프라인 구축	10%	100%		<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도에 정립한 hybrid assembly 파이프라인을 이용하여 한우 Cecum과 Colon의 장내 미생물 유전자 재조합을 수행. - Long-read, Short-read, Hybrid assembly 방법을 이용하여 수행하였으며 이를 비교, 최종 assembled contig를 획득함. - 실험을 통하여 밝혀진 대사경로 데이터베이스인 MetaCyc를 이용한 대사 경로 추적 프로그램 HUMAnN2의 방법으로 Cecum과 Colon의 장내 미생물의 functional profiling을 수행함. 대사경로에 관련된 유전자 및 유전자 그룹을 파악하였음. - 설사를 일으키는 바이러스 혹은 소의 질병을 일으키는 바이러스 데이터베이스가 구축되어 있지 않음. NCBI에서 포유류의 설사를 유발시키는 바이러스 53개를 수집, DB화 하였음.

4차 년도 (201 7)	설사 송아지의 장내미생물 군집 및 장내 바이롬 분석	15%	100%	-장내 마이크로바이옴의 유전자 양을 정량적으로 분석 할 수 있는 기반 마련 -경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 증 세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체를 선별하여 직장 내 분변 샘플을 확보. -Illumina MiSeq을 이용하여 채집된 시료의 미생물 군 집을 확인한 결과 설사 여부에 따라 확연히 구분되는 송 아지의 장내미생물 군집 구조를 확인. -설사 증세 송아지 9개체와 건강한 송아지 9개체의 직장 내 분변 샘플을 대상으로 RNA를 추출하여 RNA-Seq을 수행함. 총 18 샘플을 대상으로 샘플 당 1G 내외의 총 51.2G의 메타전사체 시퀀스를 확보. 경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 송 아지 대상 건강한 송아지 대변무리이식 (fecal microbiota transplantation, FMT) 기술을 위해 설사 증 세를 나타내지 않는 건강한 대변 공여 (fecal donor) 송 아지를 선별하였고, 설사 증세를 나타내는 송아지와 건강 한 송아지 총 7개체를 선별하여 대변무리이식 기술을 시 행함. -대변무리이식 기술 이후 recipient 송아지의 분변을 채 집하여 시간의 경과에 따른 분변의 상태를 모니터링 함. 대변무리이식 기술 전과 비교하여 대변무리이식 기술 16 일차 경과 시점에서 분변의 상태가 호전됨을 fecal consistency score를 통해 확인함. -각 그룹의 송아지 분변을 대상으로 장내미생물 군집 조 사 (Illumina MiSeq)를 수행하여 대변 이식 송아지의 경 우 대변무리이식 기술 이후 시간이 경과함에 따라서 대변 공여 송아지의 장내미생물과 유사한 장내미생물 군집 구 조를 형성해 가는 과정을 확인함.
	설사 송아지 대 상 건강한 송아 지의 대변무리이 식 연구	10%	100%	선정된 발효 단계 시료의 바이러스 군집 확보 후, 유전 체 증폭 단계에서 실험이 원활하지 않아 염기서열 분석 시기가 늦어짐. 이는 시료 내의 높은 농도의 효소활성 억제물질에 의한 것이 원인으로 추정되며, 현재는 이를 극복하여 바이러스 유전체의 염기서열을 분석 중에 있 으며, 추후 2단계 과제에서 그 결과를 보고할 예정임.
	식품의 발효과정 에 따른 바이러스 군집 다양성 과 변화 비교분 석	10%	80%	내장지방, 등지방 대사체 프로파일링 결과 한우 거세 비 거세우 간의 유의적으로 차이 나는 대사산물 총 22종, 5종이 각각 동정 됨.
	한우 거세, 비거 세 우의 내장지방, 등지 방 내 대사체 변 화 비교	10%	100%	소장, 직장 미생물 대사체 프로파일링 결과 한우 거세
	한우 거세, 비거	10%	100%	

세 우의 소장, 직장 내 미생물 대사체 변화 비교			비거세우 간의 유의적으로 차이 나는 대사산물 총 10종, 32종이 각각 동정 됨.
<i>Aspergillus oryzae</i> 공생배양에 따른 성장 관련 휘발성 대사체 발굴	5%	100%	<i>Aspergillus oryzae</i> 단일배양, 공생배양에 따른 성장 차이 관련 일차 대사산물 총 43 종을 동정하였고, 공생 배양과정에서 생산되는 휘발성 성분 4종을 규명함.
선정 환경에서의 미생물 군집의 역할 및 기작 분석	10%	100%	- 병저항성 기여 균주의 비교 유전체 분석을 통한 병저항성 기여 기작 분석
메타유전체 서열 분석 방법 개발 및 정립	10%	100%	- 농식품 환경의 전 메타유전체 분석을 위해 4차년도 까지 확보된 분석 방법 및 생물정보학적 도구 활용 정립
해당 환경에서 신규 및 유용 유전자의 농식품적 응용	10%	100%	- 신규 균주들의 병유도 농작물에 대한 처리를 통해 작물 병저항성 기여 여부 확인(3차년도) - 신규 분리 균주의 서열 정보로부터 병저항성 기여 관련 유전자 정보 확보 및 분석
메타유전체와 메타볼롬 상관관계 분석 및 유전자 정량분석법 확립을 통한 종합적 네트워크 분석모델 확립 및 통합 네트워크 모델을 거시적 관점에서 제시	10%	100%	-장내 마이크로바이옴의 유전자 양을 정량적으로 분석 할 수 있는 기반 마련 -특정 유전자 모듈 및 군집의 모니터링을 위해 맞춤형 primer를 제작하여 빠르게 정량 분석을 수행할 수 있는 대용량 qPCR인 Wafergen Biosystem의 Real-time PCR system (SmartChip) 사용 기반 마련 -본 기관에서 유치한 SmartChip을 이용하여 환경 내 항생제 내성 물질을 검출한 바가 있음 -메타유전체 분석을 통한 유전자양 정규화 및 대조군과의 비교 파이프라인 구성 -DESeq2를 이용한 유전자양 정규화를 통해 대조군에서 나타나는 유의미한 유전자 혹은 전사체 발굴 pipeline 구성 -Reactome 데이터 베이스를 이용하여 한우(host) 유전체에 관여되는 대사 경로 유추 파이프라인 구축 -한우 장내 미생물의 메타유전체, 메타대사체, 군집분석을 통한 종합 네트워크 분석 모델 구축

제 3 절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 메타 유전체와 메타볼롬 상관관계 및 종합적 네트워크 분석모델 확립 시 한정된 데이터 내에서 분석이 이루어진 점이 조금 부족하였음. 오믹스 데이터의 종합 및 Time-series 등의 샘플링을 통해 개선하고자 함.
- 식품의 발효과정에 따른 바이러스 군집 다양성과 변화 비교분석에서 선정된 발효 단계 시료의 바이러스 군집 확보 후, 유전체 증폭 단계에서 실험이 원활하지 않아 염기서열 분석 시기가 늦어짐. 이는 시료 내의 높은 농도의 효소활성 억제물질에 의한 것이 원인으로 추정되며, 현재는 다단계의 정제를 통해 이 문제를 극복하여 바이러스 유전체의 염기서열을 분석 중에 있으며, 추후 2단계 과제에서 그 결과를 보고할 예정임.
- 후속연구에서는 단위/협동/위탁 연구팀과의 적극적인 협동 연구를 통해 현재 축산농가에 막대한 경제적 피해를 주고 있는 송아지 설사 원인을 규명하고, FMT를 통한 설사 방제 효과를 확인하고, 전통발효식품의 바이러스 군집 분석을 통한 박테리오파지의 발효 조절 기능 규명 및 인체 면역 강화 효과 확인은 목적으로 하며, 작물 근권에서 식물병원균을 막을 수 있는 토양미생물 메타유전체를 분석하고, 이와 관련된 메타대사체 분석 및 유용 유전자 발굴 파이프라인을 구축하고자 함.

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

- 보다 저렴한 사양비용으로 단기간동안 건강하게 살찌우는 고품질 경제동물 생산할 수 있으며, 현대사회에서 급격히 변화된 식습관에 의해 증가하는 다양한 질병(비만, 당뇨, 염증성장질환)의 치료를 위한 장내미생물 군집 조절 연구를 통해 개인 맞춤형 미생물제제 개발의 기초 데이터로 활용될 수 있음.
- 경제동물의 장내 바이러스 군집 분석 및 탐색에 활용될 수 있으며, 다양한 질병(비만, 당뇨, 염증성장질환)의 치료를 위한 장내 바이러스 군집 조절 연구를 통해 바이러스를 통한 미생물제제 개발의 기초 연구로 활용이 가능함.
- 육우 산업에서 수소의 거세는 전 세계적으로 빈번한데 거세를 통한 고급육 생산 과정에서 장내미생물의 역할을 세계 최초로 규명한 연구 결과임. 경제동물의 사육 과정에서 거세는 필연적으로 고통을 수반하므로 비거세우의 장내미생물 군집 조절 위한 기본 정보를 제공하여 거세 과정 없이 고급육 생산을 유도할 수 있음.
- 송아지 설사 원인을 숙주와 미생물의 측면에서 종합적으로 이해할 수 있으며, 설사 송아지의 장내미생물 군집 조절을 통해 병증을 완화시키고 송아지 폐사 비율을 감소시킴으로써 축산 농가의 생산성을 향상시킬 수 있음.
- 전통발효식품의 발효과정에 주된 역할을 하는 세균과 바이러스의 상호관계를 비롯하여 식품내의 바이러스의 생태학적 역할과 기능을 이해할 수 있는 과학적인 기초자료로 활용할 수 있음.
- 식품 내의 바이러스는 발효 관련 미생물의 사멸을 직접적으로 관여하여 결과적으로 식품 발효의 성공여부와 맛과 영양, 안정성 등의 품질에 영향을 미치게 되기 때문에 산업적으로 활용 가능한 연구 결과가 될 수 있음.
- 본 연구에서는 농식품 관련 분야 중, 발효 식품의 전 메타유전체 분석 및 메타유전체 연구 기반의 작물 근권 주요 미생물의 분리에 관한 연구 등을 통해 메타유전체 분석 및 활용 연구에 대한 연구 사례들을 포함하고 있음. 따라서 농식품 분야 및 생물학 분야에서의 메타유전체 정보 활용 연구에 본 연구 사례 및 방법들을 제시할 수 있을 것임
- 본 연구과제는 연구역량 강화 분야 과제로서 사업단 내외 네트워크 연구를 통해 본 과제에서 수행한 메타유전체 분석 기반을 제공 또는 기술적으로 지원할 수 있도록 하여 메타유전

체 분석 및 활용연구를 수행하는 타연구과제에 응용, 공동 연구 등을 통해 지원, 활용할 계획

- 메타볼롬 분석을 이용한 농업 유용 미생물 유전체 상관관계 해석 및 원천 플랫폼 확립
- 농림축산식품 유용 미생물군 분석 표준화를 통해 각 연구에 적합한 메타 데이터를 수집할 수 있으며 여러 연구들의 올바른 비교 분석이 가능함.
- 농림축산에서 얻어진 SAG(single amplified genome) 및 MAG(metagenome assembled genom)에 대한 미생물 유전체와 적합한 메타데이터 수집 촉진을 기대함.
- 분석 pipeline 개발과 데이터베이스 수집을 통해 쉽게 경제동물 장내 메타 유전체 분석, 여러 연구 결과를 쉽게 비교할 수 있는 분석법 제공할 수 있음.
- 종합 네트워크 분석 및 상관관계 해석을 이용한 농림축산식품 유용 미생물군 및 대사 기능의 선별할 수 있는 원천 파이프라인 선점 구축을 통해 산업화에 적용될 수 있음.

붙임. 참고문헌

- Hayes S, Mahony J, Nauta A, van Sinderen D. Metagenomic Approaches to Assess Bacteriophages in Various Environmental Niches. *Viruses* (2017) 9: 127.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA., Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (2005) 308:1635.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE., Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* (2006) 312:1355.
- Dinsdale EA, Edwards RA, Hall D, Angly F, Breitbart M, Brulc JM, Furlan M, Desnues C, Haynes M, Li L, McDaniel L, Moran MA, Nelson KE, Nilsson C, Olson R, Paul J, Brito BR, Ruan Y, Swan BK, Stevens R, Valentine DL, Thurber RV, Wegley L, White BA, Rohwer F., Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* (2008) 452:629–32.
- Yilmaz, Pelin, et al. "Minimum information about a marker gene sequence (MIMARKS) and minimum information about any (x) sequence (MIxS) specifications." *Nature biotechnology* 29.5 (2011): 415.
- Peng, Yu, et al. "IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth." *Bioinformatics* 28.11 (2012): 1420–1428.
- Koren, Sergey, et al. "Reducing assembly complexity of microbial genomes with single-molecule sequencing." *Genome biology* 14.9 (2013): R101.
- Bashir, Ali, et al. "A hybrid approach for the automated finishing of bacterial genomes." *Nature biotechnology* 30.7 (2012): 701.
- Weber, Tilmann, et al. "antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters." *Nucleic acids research* 43.W1 (2015):

W237–W243.

- Wang, Fang, et al. "Influence of soil characteristics and proximity to antarctic research stations on abundance of antibiotic resistance genes in soils." *Environmental science & technology* 50.23 (2016): 12621–12629.
- Abubucker, Sahar, et al. "Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome." *PLoS computational biology* 8.6 (2012): e1002358.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 23:7537–41
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010 5:335–6
- Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 2012 489:250–6
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13;486(7402):207–14
- Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J.

A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 49:55–60

- Roh SW, Kim KH, Nam YD, Chang HW, Park EJ, Bae JW. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J*. 2010 1:1–16
- Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl Environ Microbiol*. 2011 7:2264–74
- Chun SC, Ahn YN, Khan SM, Chung IM, Won HY, Jhune CS, Park YJ. The microbial population in the air of cultivation facility of oyster mushrooms. *J Microbiol*. 2012 6:1053–7
- Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*. 2014 5:727–35
- Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*. 2014 3:R46
- Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun*. 2016 7:11257
- Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*. 2011 Sep 30;12:385
- Abubucker S, Segata N, Goll J, Schubert AM, Izard J, Cantarel BL, Rodriguez-Mueller B, Zucker J, Thiagarajan M, Henrissat B, White O, Kelley ST, Methé B, Schloss PD, Gevers D, Mitreva M, Huttenhower C. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput Biol*. 2012 6:e1002358

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.