

발간등록번호

11-1543000-004025-01

# 농식품 소재 미생물 군집, 메타유전체 및 메타대사체 정보 분석

2022. 04. 04

주관연구기관 / 경희대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 건국대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 연세대학교 산학협력단

2021

농식품 소재 미생물군집, 메타유전체 및 메타대사체 정보 분석

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농식품 소재 미생물 균집, 메타유전체 및 메타대사체 정보 분석”(개발기간 : 2018.04.25 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 04

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (김윤혁) (인)  
협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (송창선) (인)  
협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단 (김지현) (인)

주관연구책임자 : 배진우  
협동연구책임자 : 이충환  
협동연구책임자 : 송주연



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

<첨부2> 최종보고서 표지 및 요약서(관리기준 별지 제 17호 참조)

최종보고서										보안등급 일반[ ], 보안[ ]	
중앙행정기관명				사업명		사업명					
전문기관명 (해당 시 작성)				내역사업명 (해당 시 작성)							
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호						918011-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0204	30%	LB0704	20%	LB0710		20%			
	농림식품과학기술 분류	CA0302	30%	RB0104 수위미생 물·기생생물		20%		RB0201 동물질병관리		20%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문		영문							
연구개발과제명		국문		영문		농식품 소재 미생물 군집, 메타유전체 및 메타대사체 정보 분석 Metagenomics and Metabolomics for Agricultural Microbiome					
주관연구개발기관		기관명		주소		사업자등록번호		법인등록번호			
연구책임자		성명		배진우		직위		교수			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					
연구개발기간		전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31( 3년 9개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD( 년 개월)					
				n단계		YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD( 년 개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발 비의 지원금	
		현금		현금		지방자치 단체		기타( )			
총계		1,890,500						현금		현물	
1단계		1년차		375,000				1,890,500		1,890,500	
		2년차		500,000				375,000		375,000	
n단계		3년차		507,000				500,000		500,000	
		4년차		508,500				507,000		507,000	
								508,500		508,500	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
공동연구개발기관		건국대학교		이충환		교수				비고	
		연세대학교		송주연		연구교수				역할	
위탁연구개발기관		중앙대학교		전체옥		교수				기관유형	
연구개발기관 외 기 관										공동 대학	
										위탁 대학	
연구개발담당자 실무담당자		성명		김현식		직위		연구원			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					

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

2022 년 02 월 10 일

연구책임자:

배진우 (직인)

주관연구개발기관의 장:

김문혁 (직인)

공동연구개발기관의 장:

송창선 (직인)

공동연구개발기관의 장:

김지현 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 권한



## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0204	30 %	LB0704	20 %	LB0710	20%
	농림식품 과학기술분류	CA0302 농생물정보	30 %	RB0104 수의미생물· 기생생물	20 %	RB0201 동물질병관리	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		농식품 소재 미생물 군집, 메타유전체 및 메타대사체 정보 분석					
전체 연구개발기간		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31					
총 연구개발비		총 1,890,500 천원 (정부지원연구개발비: 1,890,500천원, 기관부담연구개발비: 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[√] 응용[ ] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농축산식품 분야 환경을 대상으로 메타유전체 분석을 통해 핵심 마이크로바이옴 및 특이 유전자 세트를 분석, 수집하여 메타유전체 및 시스템생물학 측면에서 국내 농축산업 환경 및 전통식품 특성을 이해하고 농식품 유용 미생물 정보 산업화·실용화 지원</li> <li>○ 메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석</li> <li>○ 대변무리이식 (fecal microbiota transplantation)을 통한 송아지 설사 완화 연구</li> <li>○ 국산 및 중국산 상품 김치의 원산지에 따른 김치 내 세균/바이러스 군집 구조 분석</li> <li>○ 전통발효식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스 군집변화 비교분석</li> <li>○ 메타메타볼로믹스 기반 농축산식품 분야 미생물 자원의 대사체 분석을 통한 기능성 대사산물 발굴 및 메커니즘 해석</li> <li>○ 메타대사체-유전체 상관관계 분석을 통한 미생물 상호작용 대사네트워크 규명</li> <li>○ 농축산식품 분야 미생물 자원 관련 대사체 데이터 베이스 확장 구축</li> <li>○ 대용량 메타유전체 정보 분석 및 이를 활용한 농식품 환경 내 미생물 자원 탐색</li> <li>○ 메타유전체 정보 분석 기반 핵심 미생물의 기능 분석 및 미생물-작물 상호작용의 이해</li> <li>○ 미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원</li> <li>○ 고효율 신규 유전자를 대량으로 탐색하여 확보할 수 있는 대용량 유전자 발굴 파이프라인의 구축 및 유용효소 개발</li> </ul>					

	<p>전체 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 타겟 샘플에서 농축식품 유용 메타유전체 분석 후보 미생물 확보 및 분석대상 타겟 균주 선정 방안 마련</li> <li>○ 농축식품 대상의 메타유전체 연구를 위한 환경 선정 및 실험 조건 설계       <ul style="list-style-type: none"> <li>- 메타유전체 분석 환경 선정과 적정 분석 기법 선정 및 메타정보 확보</li> </ul> </li> <li>○ 분석대상 환경의 미생물 군집 구조 프로파일링 및 핵심 대사 예측</li> <li>○ 대규모 메타유전체 염기서열 해독 및 정보 분석       <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 군집 구조 분석 및 NGS 기반 대규모 메타유전체 염기서열 해독</li> <li>- 대용량 염기서열의 조립 및 유전자 정보 분석</li> </ul> </li> <li>○ 머신러닝 기술을 이용한 메타유전체 빅데이터 분석을 통한 대사 및 기능 예측</li> <li>○ 메타유전체 정보 기반 산업화·실용화 조기성과 창출 및 부처공동 연구 지원</li> <li>○ 설사 송아지와 건강한 송아지의 분변 내 메타지놈, 메타전사체, 메타볼롬 군집을 각각 규명하여 설사 유발 과정에서 형성되는 숙주-박테리아-바이러스의 metagenomic/transcriptomic/metabolomic interaction map을 제시하여 송아지 설사의 근본적인 원인을 규명함</li> <li>○ 건강한 송아지의 분변을 채집하여 설사 증세 송아지에게 이식시켜 줌으로써 설사 증세 완화 효과를 제시함</li> <li>○ 분변 공여 송아지의 선별조건을 확립하고 송아지의 설사 증세 완화 효과를 나타내는 후보 미생물을 분리/동정하여 미생물 조성, 배양 방법 및 이식 방법 등에 대한 지식재산권을 확보함</li> <li>○ 원료 및 발효 조건이 명확히 정의된 국산 및 중국산 상품 김치 내 세균 및 바이러스 군집구조를 차세대염기서열기법 기반으로 분석하여 국산 및 중국산 상품김치를 판별할 수 있는 정확하고 과학적인 김치 원산지 판별 분석법의 기초자료로 활용</li> <li>○ 전통발효식품의 발효과정에 주된 역할을 하는 세균과 바이러스의 상호관계를 비롯하여 식품내의 바이러스의 생태학적 역할과 기능을 이해할 수 있고는 과학적인 기초자료로 활용</li> <li>○ 농축산식품 환경 내 유용 미생물 자원(Aspergillus, Bacillus, Tetragenococcus, Zygosaccharomyces 등)의 개별 대사 메커니즘 해석</li> <li>○ 환경 요인에 따라 기여하는 미생물들의 co-culture상황에서의 신호 전달 및 기능대사체(Oxylipin, Amino acid, Organic acid, Isoflavone, Soyasaponin 등)의 메타메타볼롬 해석</li> <li>○ 메타오믹스(대사체-유전체) 통합 분석을 통한 미생물 상호작용 및 관련 핵심인자 발굴 및 대사 경로 확립</li> <li>○ 농식품 환경의 대용량 전 메타유전체 정보 분석</li> <li>○ 메타유전체 분석을 통한 핵심/특이 마이크로바이옴 도출 및 환경 내 미생물 대사 예측</li> <li>○ 작물 근권 메타유전체 분석 기반의 후보 미생물의 확보</li> <li>○ 메타오믹스 통합 분석을 통한 핵심 미생물의 기능 및 작물-미생물 상호작용의 이해</li> <li>○ 메타유전체 해독 염기서열을 이용한 향토 발효음식 마이크로바이옴 분석 및 특성 이해</li> </ul>
--	--------------	---

		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 마이크로바이옴 정보를 기반으로 향토 발효음식 유래 유용 미생물 자원 발굴</li> <li>○ 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining) 파이프라인 구축</li> <li>○ 구축된 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining) 파이프라인을 이용하여 고성능·고효율의 유용 효소의 발굴</li> <li>○ 숙주 시스템에서의 효소 발현 조건 최적화 및 최적 효소 활성 분석</li> </ul>				
	1단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td>목표</td> <td></td> </tr> <tr> <td>내용</td> <td></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						
	n단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td>목표</td> <td></td> </tr> <tr> <td>내용</td> <td></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고품질의 경제동물 생산을 위한 근육 내 지방축적 효능이 있는 후보 미생물을 발굴함</li> <li>○ 항생제 비의존적인 분변이식법이 송아지 설사 치료를 통한 경제동물의 생산성 증대에 기여하고, 항생제 오남용 문제를 해결할 수 있음</li> <li>○ 설사 치료효과가 95%에 이르고, 생후 20개월 이상의 비육단계에 이르러서는 농가 수익과 직결된 체중 및 근내지방 증가와 같은 도축성적이 향상되었음</li> <li>○ 4 단계에 걸친 스크리닝으로 까다로운 건강한 분변 공여 송아지 선별 조건을 확립하였으며, 이를 통해 축산업 분야에도 마이크로바이옴 기반 치료법이 활발히 도입될 수 있는 기준이 마련되었음</li> <li>○ 농축산식품 분야 유용 미생물 자원의 대사체 분석을 위한 추출방법 확립 및 GC-MS 및 LC-MS 기반 분석 기법 표준화 확립에 따른 핵심 기술 확보</li> <li>○ 발효 미생물 <i>Tetragenococcus</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Bacillus</i> 프로파일링에 따른 surfactin, oxylipin 에 대한 기능성 대사체 소재화를 하였음</li> <li>○ 발효 미생물 <i>Aspergillus</i>, <i>Bacillus</i>에 대한 신규 연구 방법인 Metabolite cross feeding (MCF) 적용에 따른 고부가가치 대사체인 surfactin, oxylipin 고부가가치 소재를 개발함</li> <li>○ 토마토 풋마름병 저항성 품종 및 감수성 품종의 근권 메타유전체 분석을 통해 기주-미생물 상호작용 및 식물 기능성 미생물 자원 발굴 등에 활용할 마이크로바이옴 정보를 재구성함</li> <li>○ 병저항성 관련 미생물 확보를 위한 culture collection 구축하고 병저항성 근권 유래의 다양한 미생물군의 균주들을 확보하고, 메타유전체 정보 분석을 활용하여 병저항성 관련 기능성을 분석함</li> <li>○ 향토 발효식품 유래 미생물 자원의 다양성 탐색 및 기능성 발굴을 위한 표적 미생물 균주들의 유전체 정보 확보</li>   <li>○ 전략 미생물 해독 3건, 표준 유전체 해독 11건, 유용 유전 자원 확보 7건, 메타 유전체 분석 303건, 유전체 분석 기술 개발 3건, NABIC 등록 327건</li>   <li>○ 국내외 논문 게재 성과 23건, 학술 발표 34건, 전문 연구 인력 양성 16건, 특허 출원 3건, 특허 등록 2건, 홍보 전시 및 수상 실적 13건</li> </ul>
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 숙주의 환경 적합성을 높여주는 gut microbiota를 적용하여, 사료첨가제로 가능한 농/산업 미생물 개발 및 전문기업의 육성으로 국내 친환경 고품질 농산물 생산 촉진 및 경제동물의 수출시장 개척가능으로 국가의 경제적 이익 창출 효과가 극대화될 수 있음</li> <li>○ 정확하고 과학적인 김치 원산지 판별을 통하여 국산 김치에 대한 소비자의 불신 해소, 생산업계와 소비자의 피해 예방 및 유통질서 확립을 기대할 수 있음</li> <li>○ 식품 내의 바이러스는 발효 관련 미생물의 사멸을 직접적으로 관여하여 결과적으로</li> </ul>

식품 발효의 성공여부와 맛과 영양, 안정성 등의 품질에 영향을 미치게 되기 때문에 산업적으로 활용 가능한 연구 결과가 될 수 있음

- 농축산식품 분야 유용 미생물 자원의 대사체 분석결과는 메타유전체 분석결과와 통합 분석을 통해 미생물 자원의 통합 대사 경로 구축 가능
- 또한 이를 통해 고부가가치 기능성 대사산물 발굴 및 원천기술 확보에 따른 노하우 축적이 가능함
- 농축산식품 분야 미생물 자원의 메타메타볼롬 통합적 프로파일링을 통한 발효 표준화 관련 지표물질 선정 및 주요성분 분석기술 등에 대한 지적 소유권 확보
- 본 연구에서 얻어진 원천기술을 다양한 농축산식품 미생물 자원에 적용가능
- 유용 미생물자원의 메타메타볼롬 프로파일링 연구를 통한 기능대사체 소재화를 통한 국내 농축산식품시장 확대
- 신규 농축산식품 미생물자원의 고부가가치 소재 개발을 통한 산업화 지원
- 농식품 환경 내의 메타유전체 분석 기술 및 정보 활용을 통해 미생물 유용 자원을 탐색 및 발굴함으로써 신규 바이오 소재의 개발 기반 구축 기대
- 작물 근권 마이크로바이옴 기반 분석 및 시스템생물학적 접근 방법 등을 통한 작물과 미생물의 상호관계에 대한 메커니즘 이해
- 식물병방제의 이론적 기반을 마련하고, 활용 가능성을 제시함으로써 다양한 식물에 대해서도 학문, 기술면에서 응용 가능
- 전 메타유전체 분석 분야의 신기술 및 연구 방법론의 지속적인 선제 도입을 통해 연구 역량을 높이고, 이를 활용하여 국내 미생물 연구 개발 및 응용 가능한 분야에 분석 기술 제시
- 사업단 연구 네트워크를 활용하여 농식품 각 분야의 전문가들과의 협력 연구 추진 및 협력 연구를 통해 메타유전체 분석을 지원함으로써 다양한 미생물 자원의 개발과 산업적 활용 가능성 기대 및 산업적 경쟁력 제고에 기여 예상
- 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining)의 구축으로 유용 유전자의 탐색 및 발굴 범위를 효소 적용 산업 전반으로 확대하여 효소 산업분야의 경쟁력 향상
- 국내 효소 산업의 경쟁력 제고 및 이를 통한 고부가가치 창출

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	22	2										
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	농축산식품			메타유전체		메타볼롬		미생물 군집 조절		대용량 유전자 발굴		
영문핵심어 (5개 이내)	Agricultural foods			Metagenome		Metabolome		Microbial community modulation		High-throughput gene screening		

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	10
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용.....	23
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	185
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	231
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 .....	232
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	233
별첨 자료 (참고 문헌 등) .....	234

# 1. 연구개발과제의 개요

○ 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 299만 7천 마리가 사육되고 있으며 (2017년 4/4분기 가축동향조사, 통계청), 국민 소득 및 식생활의 변화에 따라 산업규모 (4조원 이상)가 꾸준히 증가하고 있는 추세임.

○ 한우 산업에서 송아지 설사 (calf diarrhea)는 송아지 폐사의 주요 원인으로 알려져 있음. 꾸준히 상승하는 국내 송아지 거래 가격 (표 1; 출처: 2017년 한우산업 수급 기초자료, 한우자조금관리위원회)을 고려할 때 설사로 인한 사양관리 비용의 증가 및 송아지 손실은 결과적으로 농가 소득의 감소를 초래함.

표 1. 최근 10년 간 국내 수송아지 거래 가격

<수송아지(6~7개월령)> (단위: 천원)

년\월	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	평균
2008	2,468	2,488	2,447	2,321	2,185	2,210	1,944	1,838	1,978	1,924	1,989	2,047	2,137
2009	1,787	1,890	1,964	2,187	2,324	2,498	2,549	2,656	2,724	2,642	2,574	2,602	2,438
2010	2,578	-	2,669	2,766	-	2,815	2,707	2,632	2,613	2,511	2,228	-	2,610
2011	-	-	-	2,179	1,989	1,879	1,933	1,928	1,890	1,826	1,591	1,372	1,796
2012	1,579	1,703	1,825	1,807	1,920	1,867	1,791	1,653	1,716	1,643	1,587	1,523	1,713
2013	1,664	1,665	1,676	1,763	1,814	1,811	1,827	1,914	2,061	1,988	2,001	2,026	1,845
2014	2,253	2,215	2,196	2,401	2,492	2,619	2,766	2,704	2,737	2,512	2,462	2,267	2,494
2015	2,311	2,283	2,407	2,619	2,763	3,009	3,161	3,240	3,455	3,357	3,147	3,050	2,925
2016	3,231	3,271	3,415	3,631	3,866	4,018	3,979	3,911	3,850	3,643	3,156	3,021	3,583

자료 : 농업축산정보센터 → 유통 정보 → 월별가격동향 → 월별산지가격동향

○ 2011년 12월 미국 농무부 조사 자료 (Cattle and Calves Nonpredator Death Loss in the United States)에 의하면 소화기 질환 (digestive problems) 및 호흡기 질환 (respiratory problems)이 육우 (beef) 및 젖소 (dairy) 송아지 폐사 원인 중 가장 높은 비율을 차지함. 송아지 설사가 주를 이루는 소화기 질환이 육우 전체 폐사의 10.4%를 차지하며, 젖소의 경우 전체 폐사의 30.6%를 차지함 (그림 1).

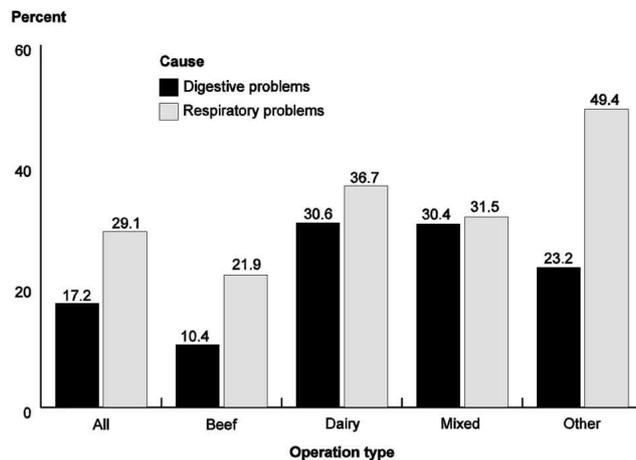


그림 1. 육우 및 젖소 송아지 폐사 중 송아지 설사 비율 (미 농무부, 2012)

○ 국내의 경우 미국과 비교하여 소화기 질환에 의한 송아지 폐사 비율이 매우 높음. 국내 대규

모 한우 번식 목장 (국립축산과학원 한우연구소, 강원도 대관령에 위치)에서 지난 10년 동안 태어난 송아지 2,362 개체를 대상으로 폐사율을 조사한 결과 한우 송아지 평균 폐사율은 5.7%로 집계되었으며, 질환 별 폐사 원인은 소화기 질환 (68.7%), 호흡기 질환 (20.9%), 사고 관련 (6.0%), 기타 원인 (2.2%) 순으로 보고됨 (표 2; 출처: Korean native calf mortality: the causes of calf death in a large breeding farm over a 10-year period (2015), *Korean J Vet Res*).

표 2. 국내 한우 송아지 폐사 원인

Diseases	Age of calves (wk)														Total (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13~18	19~24	
Digestive	5	20	7	4	6	12	9	5	8	5	4	3	4		92 (68.7)
Enteritis	5	12	3	1	6	10	5	2	6	2	1	2	2		57 (42.5)
Rumen indigestion		1	1	2		2	2	1	1	2	1		1		14 (10.4)
Intestinal obstruction		4	2								1				7 (5.2)
Intestinal rupture		1	1					1					1		4 (3.0)
Abomasal ulcer								1		1	1	1			4 (3.0)
Abomasal gastritis		1													1 (0.7)
Intussusceptions							2								2 (1.5)
Rumen gastritis									1						1 (0.7)
Omphalitis		1													1 (0.7)
Peritonitis				1											1 (0.7)
Respiratory		2	2		1		2	2	2	1	5	1	7	3	28 (20.9)
Pneumonia		2	2		1		2	2	2	1	5	1	7	3	28 (20.9)
Accidents	4	1	1		2								1	1	10 (6.0)
Suffocation	1												1	1	3 (2.2)
Liver rupture	2	1													3 (2.2)
Dislocation			1		1										2 (1.5)
Lung rupture					1										1 (0.7)
Fracture	1														1 (0.7)
Other known	1					2							1		4 (1.5)
Renal insufficiency						1									1 (0.7)
Renal bleeding													1		1 (0.7)
Shock						1									1 (0.7)
Aortic rupture	1														1 (0.7)
Total	10	23	10	4	9	14	11	7	10	6	9	4	13	4	134
%	7.5	17.2	7.5	3.0	6.7	10.4	8.2	5.2	7.5	4.5	6.7	3.0	9.7	3.0	100

- 송아지 설사는 원인이 매우 다양한 다인성 질병 (multifactorial etiology of the disease)으로 알려져 있음. 축사의 청결상태, 어미소의 유질, 온도, 습도 등 다양한 환경적 요인과 더불어 바이러스 (예: bovine viral diarrhea virus, bovine coronavirus, and group A rotavirus), 박테리아 (예: Salmonella sp., and Clostridium perfringens), 원충 (예: Eimeria zuernii) 등에 의한 감염 등이 송아지 설사의 원인으로 지목됨. 하지만 반추동물을 포함한 포유동물의 신생아 설사 (neonatal diarrhea)를 대상으로 한 최근 연구 결과에 의하면 앞서 언급된 병원성 미생물의 감염은 설사 증세와 관계 없이 건강한 개체에서도 빈번히 관찰되며 (Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea (2013), *Vet microbiol*), 반대로 설사 증세가 심한 개체에서 설사 유발 병원성 미생물의 감염이 전혀 발견되지 않음이 보고됨 (Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery (2008), *PLoS Pathogens*).
- 갓 태어난 송아지의 장내미생물 군집 형성 과정을 살펴 보면, 출생 초기 어미소로부터 유래한 장내미생물 군집 중 Proteobacteria와 같은 호기성 미생물 (aerobic microbes)이 우점하며,

이들이 장내 환경의 산소를 소진하며 혐기성 미생물 (anaerobic microbes)이 정착할 수 있는 환경을 조성함 (Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota (2015), *Trends Biotechnol*) 이와 같은 초기 장내미생물 군집 형성 과정은 장내 환경에 정착 저항성 (colonization resistance)를 부여하여 외부에서 유래된 병원성 미생물 (allochthonous enteric pathogens)의 감염을 감소시키는 것으로 알려져 있음. 따라서 갓 태어난 송아지의 불완전한 초기 장내미생물 군집 형성 및 이에 따른 송아지의 장내미생물 군집 불균형 (gut microbial dysbiosis)는 설사를 비롯한 다양한 장질환의 원인으로 작용할 수 있음.

- 아래 표 (표 3)에 제시된 바와 같이 대부분의 갓 태어난 송아지 (85.7%)는 생후 3-4주 이내에 설사 증세로 인해 1번 이상 항생제 치료를 받게 되며, 설사 증세가 나타나지 않아 항생제 치료를 받지 않은 송아지는 전체 송아지 개체 중 5.7% 만 차지함 (출처: The 2012 National Animal Health Monitoring System for U.S. dairy). 즉, 앞서 제시한 송아지 설사에 의한 높은 폐사율과 함께 송아지 설사는 치료비용 증가로 인한 사양비용 증가, 성장 지연 및 항생제 남용에 의한 환경오염 등의 2차 피해 등 축산 농가의 경제적 손실을 유발하는 가장 큰 요소 중 하나로 작용함.

표 3. 전체 송아지 중 설사로 인한 항생제 치료 송아지 비율 (미 농무부, 2012)

Primary antibiotics used	Diarrhea <sup>1</sup>		Respiratory		Navel infection		Lameness/ injury	
	Pct.	Std. error	Pct.	Std. error	Pct.	Std. error	Pct.	Std. error
Aminocyclitol	4.3	(2.4)	2.9	(2.0)	0.0	(—)	0.0	(—)
Aminoglycoside	14.3	(4.2)	1.4	(1.4)	0.0	(—)	0.0	(—)
Noncephalosporin beta-lactam	22.9	(5.0)	4.3	(2.4)	50.0	(6.0)	14.3	(4.2)
Cephalosporin	21.4	(4.9)	12.9	(4.0)	4.3	(2.4)	4.3	(2.4)
Florfenicol	4.3	(2.4)	42.9	(5.9)	4.3	(2.4)	2.9	(2.0)
Lincosamide	0.0	(—)	0.0	(—)	0.0	(—)	0.0	(—)
Macrolide	2.9	(2.0)	48.6	(6.0)	2.9	(2.0)	2.9	(2.0)
Sulfonamide	14.3	(4.2)	2.9	(2.0)	1.4	(1.4)	1.4	(1.4)
Tetracycline	5.7	(2.8)	12.9	(4.0)	4.3	(2.4)	5.7	(2.8)
Fluoroquinolone <sup>2</sup>			34.3	(5.7)				
Other/unknown	21.4	(4.9)	10.0	(3.6)	5.7	(2.8)	4.3	(2.4)
Any antibiotic	85.7	(4.2)	88.6	(3.8)	60.0	(5.9)	28.6	(5.4)
No treatment but disease	8.6	(3.4)	0.0	(—)	2.9	(2.0)	7.1	(3.1)
No disease or disorder	5.7	(2.8)	11.4	(3.8)	37.1	(5.8)	64.3	(5.7)
Total	100.0		100.0		100.0		100.0	

- 설사 송아지의 항생제 치료는 잠시 설사 증세를 멈출 수 있지만 많은 개체에서 이른 시간 안

에 설사가 재발되며, 설사 재발 송아지의 경우 증세가 더욱 악화되는 특징을 나타내며, 반복되는 항생제 투여에도 치료효과를 볼 수 없는 항생제 내성 현상이 나타남. 이와 같은 현상에 대한 원인은 아직 규명되지 않았지만 최근 설치류 모델을 통해 제시된 장내미생물 군집 불균형 연구를 통해 그 원인을 유추해 볼 수 있음. 즉, 항생제 투여 등에 의해 야기된 숙주의 장내미생물 군집 불균형은 숙주의 면역 반응을 활성화 시키며, 이에 따라 염증반응 (inflammatory responses) 및 장 운동 운동 (gut motility) 등이 함께 증가하여 설사의 원인으로 작용할 것으로 추정할 수 있음 (그림2, 출처: Colonization resistnace (2013), *PLoS Pathogens*).

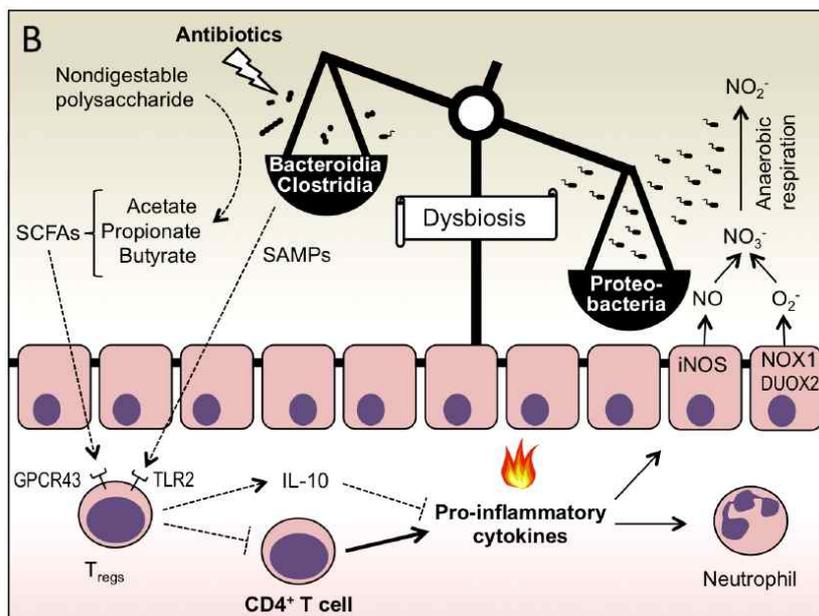


그림 2. 장내미생물 군집 불균형에 의한 송아지 설사 원인 예측 모델

- 나아가 장기화된 장내미생물 군집 불균형은 장내 환경의 정착 저항성을 약화시켜 외부 병원성 미생물이 정착하기 쉬운 환경이 조성되며, 장 상피세포의 에너지 생산 패턴 변화를 통한 lactate 및 nitrate 생산/분비 증가로 인해 장 환경에 정착된 외부 병원성 미생물이 성장 및 성장할 수 있는 충분한 조건을 제공할 수 있을 것으로 예상됨 (그림 3, 출처: Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella (2016), *Cell Host Microbes*).

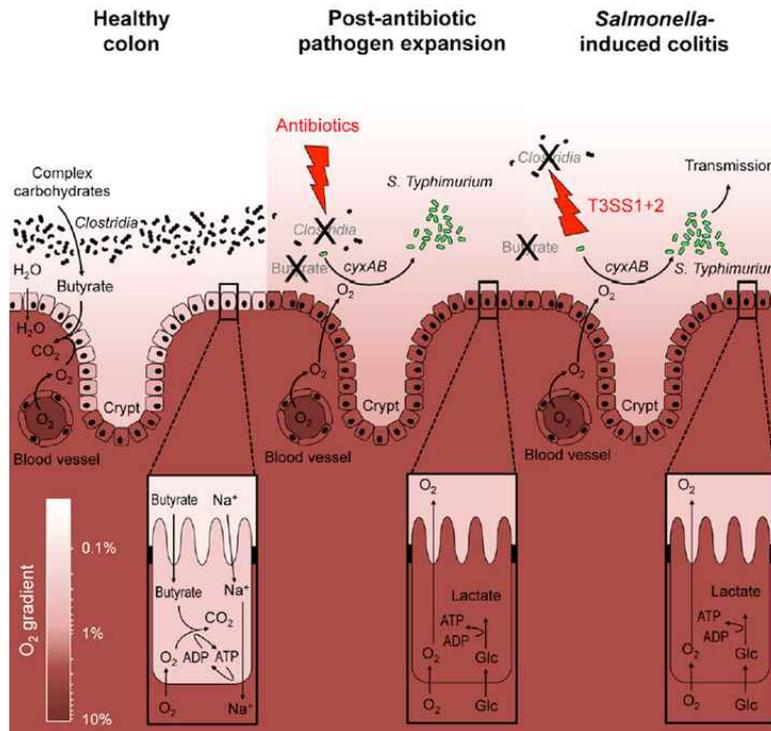


그림 3. 항생제 치료 이후 장내미생물 군집 불균형에 의한 외부 병원성 미생물 감염 예측 모델

- 각종 질병으로부터 경제동물을 보호하고 농가의 소득을 향상시키기 위한 노력의 일환으로 질병 저항성 및 생산성 향상에 기여하기 위한 장내미생물 군집 조절 연구가 활발히 진행되고 있음. 특히 인체 및 실험동물 모델을 통한 장내미생물 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 면역 증강 및 담즙산 대사 등 숙주 동물의 전반적인 대사 과정에 직접적인 영향을 주고받고 있는 것으로 알려져 있음. 하지만, 인간의 장기와는 구조와 영양 흡수 형태가 전혀 다른 소, 돼지, 닭, 어류나 곤충 등의 경제 동물에 대한 장내미생물의 역할에 대한 연구가 매우 미진하므로 경제동물의 건강 증진, 면역력 증대, 질병 치료를 위한 연구가 필요함.
- 본 연구팀은 설사 송아지와 정상 송아지를 대상으로 장내미생물 군집을 구성하는 박테리아 및 바이러스 군집의 시/공간적 특성 변화 및 숙주의 대사/면역 반응을 비교 분석하여 송아지 설사의 근본적인 원인을 규명하고자 함. 나아가 설사 송아지의 장내미생물 군집을 인위적으로 조절하기 위한 목적으로 대변무리이식 (fecal microbiota transplantation, FMT) 기술 확립 및 맞춤형 미생물 제제 개발 등의 접근 방법으로 송아지의 설사 빈도를 줄임으로써 농가의 사양관리 비용 감소, 생산성/소득 증대 및 동물 복지에 기여하고자 함.
- 지구상에는 약  $10^{31}$ 의 바이러스가 존재한다고 알려져 있음. 평균 박테리아의 수보다 5-10배, 많게는 100배 이상 많이 존재하는 것으로 추정되고 있으며, 그 다양성도 어마어마한 것으로

알려지고 있음. 바이러스는 일반적으로 숙주인 세균이나 조류(algae) 등의 세포를 파괴시켜서 생태계에 막대한 영향을 미치고 있음. 뿐만 아니라 바이러스는 세포의 유전자를 삽입, 변형시키며, 다른 개체에 전달하는 Horizontal gene transfer 기능을 통해 다른 생물체의 진화에도 큰 영향을 미치는 것으로 알려짐(Metagenomic Approaches to Assess Bacteriophages in Various Environmental Niches (2017) *Viruses*).

- 바이러스는 배양법을 통한 접근이 어려우며, 세균과는 다르게 16S rRNA gene과 같은 biomarker의 부재가 동반되고 있기 때문에 군집 분석에 어려움이 있음. 바이러스 군집을 배양법 기반으로 연구한다면, 바이러스 숙주의 배양이 선행되어야만하며, 현재까지 전체 미생물의 10% 미만의 미생물만이 배양된다는 점을 고려했을 때, 바이러스 군집을 포함한 미생물 군집의 변화를 체계적으로 연구하기는 거의 불가능함.
- 따라서 최근에는 생태계 내 존재하는 바이러스를 분리, 배양 및 동정을 거치지 않고 시료로부터 바이러스를 직접 분리하고, 유전체(DNA와 RNA)를 추출, 분석하는 메타유전체(metagenomics) 기법을 통해 바이러스 다양성을 조사할 수 있게 되었으며 이로부터 다양한 정보가 얻어지고 있음(Diversity of the human intestinal microbial flora (2005) *Science*, Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome (2006) *Science*). 최근 들어 대규모 서열 분석 기술이 발전하고 서열 분석 비용이 저렴해짐에 따라, 해수, 담수, 고염 환경, 산호초, 어류, 위장관, 곤충에 이르기 까지 미생물체가 존재하는 주요 환경의 바이러스 생태 연구가 진행되었음(Functional metagenomic profiling of nine biomes (2008) *Nature*).
- 전 세계적으로 메타유전체 기반의 미생물 군집 연구가 매우 활발함에도 불구하고, 국내외에서 식품의 발효 과정 중 바이러스 군집의 변화에 관한 연구는 전무한 실정임. 특히 발효 식품과 관련된 연구는 발효 식품을 제조하는 방법과 기능성 성분에 대한 것이 대부분이며, 미생물학적으로는 유산균의 특성에 대한 연구나 배양법을 기반으로 새로운 미생물을 분리하고 동정하여 보고하는 것이 대부분임. 따라서 우리나라 대표 채소 발효식품인 김치 내 바이러스 군집구조를 차세대염기서열기법 기반으로 분석하고자 함.
- 2005년 중국산 김치에서의 납 성분 및 기생충 알 검출 파동으로 중국산 김치의 품질 및 위생 상태에 대한 소비자 불신이 심화되고, 이후 값싸고 비위생적인 중국산 김치가 국산으로 둔갑되면서 국산 김치에 대한 소비자들의 불신도 더욱 가중되고 있으며, 또한 소비자 불신으로 인한 업계의 매출 감소와 채소 가격 급등에 의해 국산 김치 생산 유통업계의 어려움이 가중되고 있음.
- 따라서 값싸고 비위생적인 중국산 배추김치가 국산 김치로 둔갑되어 유통됨으로써 발생하는 생산농가와 소비자의 피해 예방 및 유통질서 확립을 위하여 원산지 판별 기술 개발이 시급하며, 김치 내의 세균 및 바이러스 군집의 분석을 통한 국산 김치와 중국산 김치의 원산지를 정

확하고 과학적으로 판별할 수 있다면 소비자의 불신을 해소하고 생산업계와 소비자의 피해 예방 및 유통질서를 확립하는데 도움이 될 것임.

- 중국산 김치는 국산 김치와는 원료 및 발효 조건이 상이 할 것으로 판단되며, 이는 김치 내의 세균 및 바이러스 군집에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상함. 따라서 김치 내의 세균 및 바이러스 군집을 비교 분석하여 국산 김치와 중국산 김치를 판별할 수 있는 정확한 과학적 김치 원산지 판별 분석법의 기초자료로 활용하고자 함.
- 식품의 발효 과정 중에는 젖산, 알코올, 향미 성분 등을 생성하는 세균, 효모, 곰팡이 등의 발효 관련 미생물이 필수적임. 특히 발효식품에서 바이러스는 발효 미생물과의 상호작용을 통해 발효과정과 식품의 품질에 직접적인 영향을 미칠 수 있음. 예를 들면 유산균 발효 음료를 제조할 때, 유산균을 사멸시키는 바이러스에 의해 발효가 실패하고 부패하는 결과를 초래할 수 있음.
- 발효 식품을 인간이 섭취했을 때, 바이러스 군집은 인체 장내미생물을 숙주로서 감염하여 사멸시키거나 수평적 유전자 전달(horizontal gene transfer)을 통해서 장내미생물 군집의 변화를 초래하여 건강에 영향을 미칠 가능성이 있기 때문에 체계적이고 과학적인 연구가 필요함.
- 본 연구기관에서는 선행 연구를 통하여 김치를 비롯한 발효식품 내의 다양한 바이러스가 존재함을 메타유전체 분석법을 이용하여 최초로 확인하였고 김치와 사우어크라우트, 젓갈의 바이러스 군집 비교에서 김치 내 존재하는 바이러스의 대부분(약 97%)가 박테리오파아지인 것을 확인함. 일반적으로 환경에 존재하는 박테리오파아지의 군집분포를 토대로 그 환경의 박테리아 군집분포를 유추할 수 있으나, 본 선행 연구에서는 시료 채취 단계에서 우점종으로 존재하는 박테리아 군집구조와 바이러스 간의 상관관계를 확인할 수 없었음. 따라서 발효 과정 중의 세균 군집과 바이러스 군집의 변화에 의한 상관관계에 대해 좀 더 포괄적인 분석이 필요할 것으로 판단됨.
- 메타볼로믹스 정의 및 적용분야
  - 메타볼로믹스는 지노믹스, 트랜스크립토믹스, 프로테오믹스와 더불어 오믹스의 한 분야로, 다양한 유전적, 생리적, 병리적, 환경적인 조건에서 변화하는 저분자 화합물 (분자량 100-1,000)들을 다양한 기기분석장치(LC/MS, GC/MS, NMR 등)를 이용하여 직접 분석함으로써, 대사 과정 및 대사적 특징과 관련된 바이오마커를 동정하여 그에 따른 매커니즘을 밝히는 중요한 연구 분야 중 하나임.
- 메타메타볼로믹스 해석 기반 기술의 필요성
  - 메타메타볼로믹스는 단일 균주, 식물 등 하나의 생체만을 대상으로 한정하지 않고, 환경이나 기타 요인에 의해 변화되는 총체적 대사체들의 변화를 확인하고 해석하는 학문임. 복잡한 발

효 과정에서 오는 다양한 대사체들의 변화를 다변량 통계분석 및 대사 네트워크 해석을 통한 시스템 레벨에서의 대사 메커니즘 규명이 가능함.

○ 메타메타볼로믹스 농축산식품 미생물 발효 연구의 필요성

- 농축산식품분야의 미생물 자원은 중점적으로 연구해야 할 중요한 소재로 미생물 대사체 연구는 생물소재에 대한 학문적, 산업적 기반기술임. 그러나 발효 중, 환경별 복합 미생물 상호작용과 기능성에 대한 체계적 통합 연구가 미흡함.
- 발효는 미생물과 기질 및 다양한 발효 환경에 의한 복잡한 일련의 과정을 거침. 원료가 가지고 있는 다양한 대사체들이 미생물들에 의해 발효 되면서 분해 또는 이용이 되고, 여러 발효 환경에 따라 다른 대사과정을 나타냄. 기존의 단일기기 의존적인 메타볼로믹스적 접근법은 복잡한 발효 과정의 해석에 한계를 보임. 따라서, 복잡한 발효 과정에 기여하는 1차 및 2차 대사체를 통합적으로 해석할 수 있는 메타메타볼로믹스 분석이 필요함.
- 현재 전 세계적으로 전체의 대사체를 한 번에 분석할 수 있는 연구방법이 미개발 상태임. 기질 및 발효 미생물의 총체적 1, 2차 대사체를 해석하기 위해서는 각각의 이온화 영역이 상이한 최소 4 종류 이상의 mass spectrometry를 기반으로 한 메타메타볼로믹스 분석이 필수적임 (그림 4).

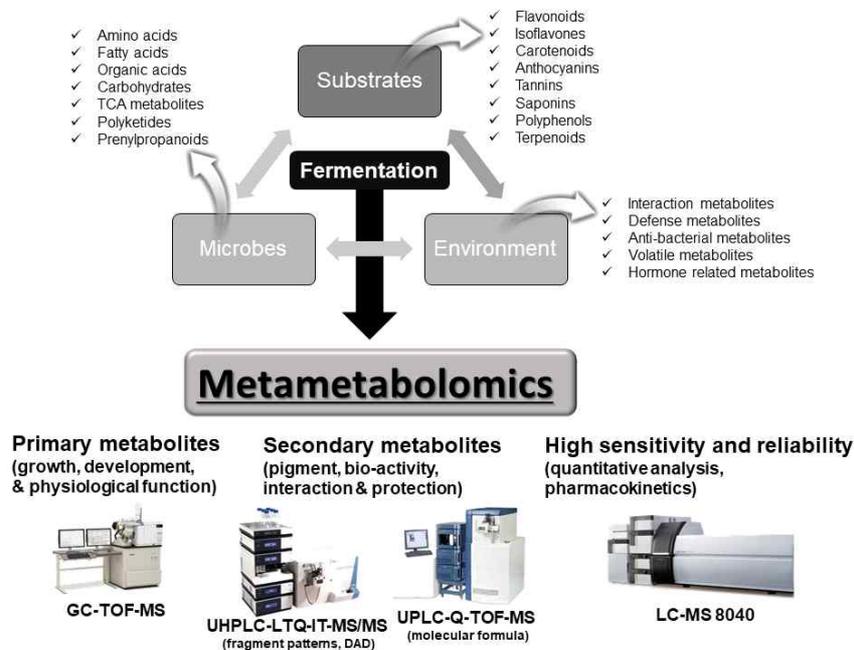


그림 4. 발효 환경 내 메타메타볼로믹스 연구 모식도

- 본 연구는 메타메타볼로믹스적 접근을 통해 발효기작을 해석 하고자 함. 도출한 대사체 데이터를 오믹스 연계 분석을 통해 통합 해석함으로써 대사 네트워크 전체를 규명하고자 함. 통합적 해석을 위한 방법으로, 통합적 오믹스(메타대사체-유전체) 연구에 대한 수요가 급증하고 있음. 메타게놈은 주어진 어떤 환경에 존재하는 모든 미생물의 유전체의 집합으로 정의되며, 신물질 또는 효소의 탐색의 유용성을 인정받아 각광받고 있음.

- 또한, 통합 대사 네트워크 해석 결과를 바탕으로 발효식품 내 미생물 상호작용/천이 조절 및 발효 환경에 따른 신호 물질 및 기능대사체의 변화를 총체적으로 해석하고자 함 (그림 5).

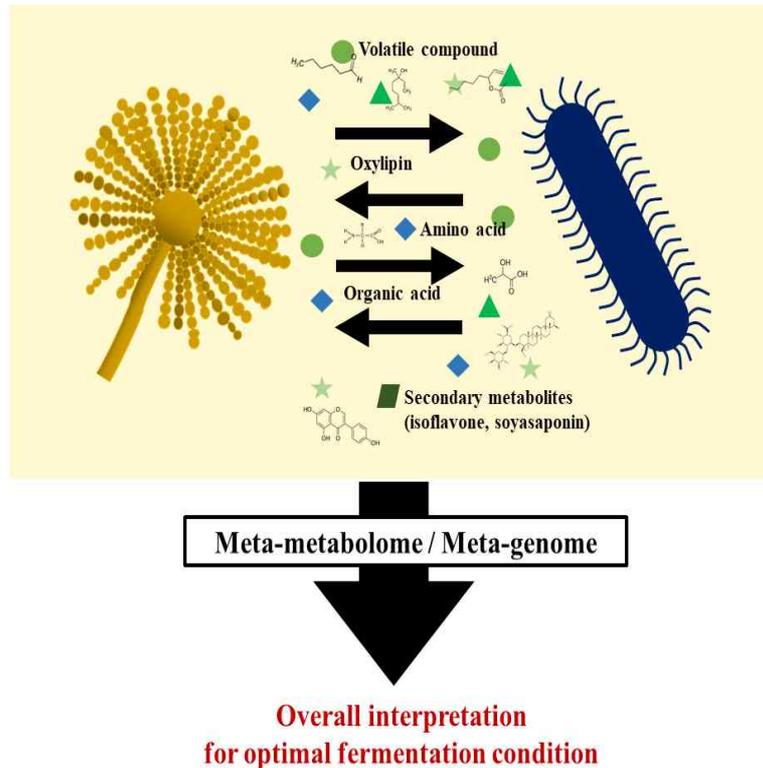


그림 5. 메타-메타볼로믹스 및 메타게놈 기반 미생물 발효 최적화 및 상호작용 연구 모식도

- 대용량 메타유전체 정보 분석 및 이를 활용한 농식품 환경 내 미생물 자원 탐색
  - 농작물 및 발효식품 환경 내 미생물들을 파악하기 위해 미생물 군집 구조 분석과 전 메타유전체의 염기서열 분석을 통해 마이크로바이옴(microbiome) 연구 접근 방법이 이용되고 있으며, 이러한 두 가지 메타유전체 분석 방법을 통해 환경 내 미생물 군집 구조 프로파일링 및 전 유전체 서열 단위의 정보를 확보할 수 있음. 본 연구에서는 작물 및 발효 식품 환경을 대상으로 대용량 메타유전체 서열을 해독·분석하여 해당 환경 내 미생물 생명정보를 수집하고자 함. 발효음식에 대한 연구는 우리나라 고유의 향토 발효음식을 대상으로 연구를 진행할 것이며, 그동안 많이 연구되지 않았던 지역 고유의 향토 발효음식으로 선정 및 연구를 시행을 목표로 진행 할 것임. 농식품 환경들의 비교메타유전체 분석을 통해 핵심 마이크로바이옴 및 특이 유전자 세트를 도출함으로써 환경 조건에 따른 주요 미생물군의 파악, 핵심 대사 유전자 예측, 환경-미생물 또는 기주-미생물 간의 상호작용 유추, 기능성 미생물 자원 수집 등을 위한 기반 정보로 활용하고자 함.
- 메타유전체 정보 분석 기반 핵심 미생물의 기능 분석 및 미생물-작물 상호작용의 이해
  - 농작물의 근권 메타유전체 분석을 통해 핵심·특이 마이크로바이옴 정보를 활용하여 작물병 또는 기주 식물과 관련된 후보 미생물군 수집을 통해 minimal community를 구축함. 구성된 미

생물군 또는 개별 미생물들의 작물 근권 내에서의 작용 및 역할을 파악하기 위한 실험을 설계하고, 이들에 대해 메타유전체 및 메타오믹스 정보를 통합 분석하고자 함. 발효음식 마이크로바이옴 연구의 경우, 발효식품 환경 내 미생물의 특성을 이해하고 연구과정에서 발굴 가능한 기능성 미생물을 찾는 기술 개발이 핵심 목표라고 볼 수 있음. 나아가 이러한 과정을 통해 향후 발효음식의 우수성을 설명하는 미생물학적 근거를 확립할 수 있는 것으로 생각됨. 또한 다양한 시스템생물학적 접근 방법을 통해 작물병에 대한 저항성 관련 균주의 작용 메커니즘을 분석함으로써 미생물-작물간의 상호작용을 이해함으로써 작물병 방제에 대한 방안을 제시하고자 함.

○ 미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원

- 미생물유전체전략연구사업단에서 1단계 연구개발을 수행 중이거나 1단계 사업에 선정된 초기 성과 창출, 연구역량 강화, 기주-미생물 상호작용 분야의 연구과제들과 협력·연계 네트워크를 구성하여 연구책임자의 전문 분야인 메타유전체 연구 및 생물정보 빅데이터 처리·분석 수요에 대해 공동연구를 추진하고 분석 서비스를 제공하며, 매년 메타유전체 분석 대상 공모 및 선정 위원회 심의를 통해 신규 메타유전체 분석 소재를 검토·발굴하고 농식품 분야 전문 연구팀과의 연구 협력 또는 긴밀한 협의를 통해 농식품의 주요 소재들에 대해 신규 메타유전체의 분석 연구 또는 분석 지원을 수행함. 또한 최근 연구 개발에 따른 전 메타유전체 분석 신기술 및 연구 방법론의 선제 도입을 통해 연구역량을 높여 수월성 있는 연구 및 분석 지원을 통해 농식품 환경 내 마이크로바이옴을 이해하거나 신규 유용 미생물 자원을 탐색 및 발굴하고자 함.

○ 미생물은 그 크기가 매우 작지만 지구상 생태계의 60 % 이상을 차지하고 다양한 생태 환경에서 생존하여 미생물을 대상으로 하는 생물소재는 고부가가치 창출이 가능한 핵심 생물소재로 활용 가치가 높은 것으로 평가되며 이들이 가진 생물소재 활용 기술 개발 필요성이 대두됨.

○ 전 세계적으로 미생물의 분리 배양 및 확보가 지속적으로 이루어지고 있으나 지구상 미생물의 1%만이 분리 배양되어 있어 배양이 어려운 난배양성 미생물 등 다양한 환경에 존재하는 미생물의 유용자원을 이용하고자 하는 노력이 이루어지고 있음.

○ 특히 경제적, 산업적 관점에서 농업, 제약, 화학 분야에 적용 가능한 미생물 유래 효소자원의 확보는 바이오경제 시대의 경쟁력을 갖추는데 중요한 요소중 하나로 인식되어 유용 효소 유전자의 발굴 및 이용은 중요한 분야로 인식되고 있음.

○ 그동안의 미생물 유용효소 탐색은 환경에서 분리된 미생물로부터 효소 활성의 스크리닝 등을 이용하는 배양학적 방법을 기반으로 이루어져 왔음 (그림 7). 그러나 환경내 미생물의 대부분은 분리배양이 거의 불가능하여 발굴 가능한 유용 효소 유전자의 한계가 있음.

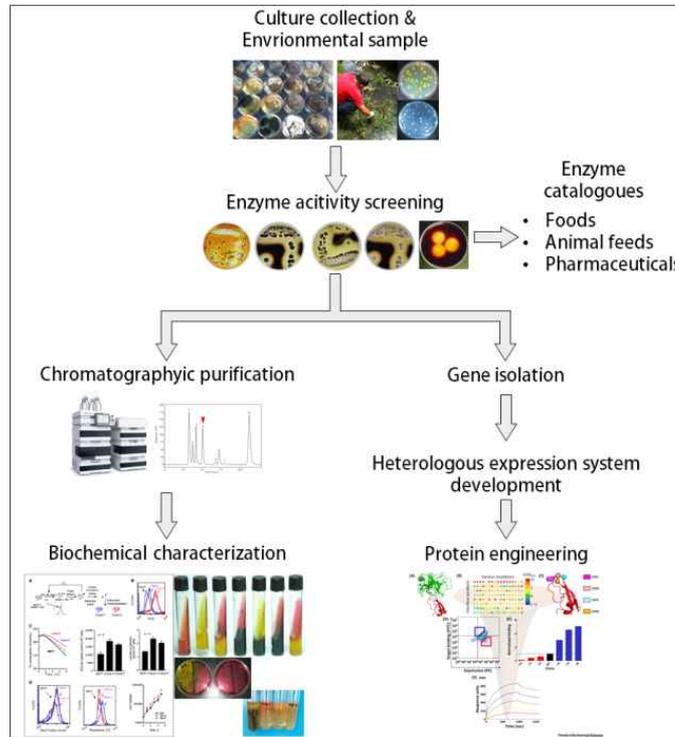


그림 6. 미생물 배양학적 기반의 효소 탐색 및 개발과정

- 메타지놈(metagenome) 분석은 환경 시료내의 미생물의 총 유전체를 분석하는 것으로서 환경 시료 내미생물의 존재와 그 잠재적 기능성에 대한 정보를 비배양적 방법으로 제공할 수 있는 장점으로 미생물 유전체 분야에서 사용이 지속적으로 증가하고 있음.
- 메타지놈 분석은 비배양적 방법으로 극한환경 서식 미생물, 연구실에서 배양하기 어려운 난 배양 미생물등의 밝혀지지 않은 환경 내 미생물 유전체의 분석이 가능하여 고기능성·고효율의 효소 발굴의 가능성이 높은 방법으로 지속적으로 각광받고 있음.
- 최근까지 메타지놈으로 부터 미생물의 유용자원을 탐색하고 이용하는 방법은 시료로부터 추출한 메타지놈 유전자를 라이브러리화 하여 E. coli나 B. subtilis와 같은 숙주에 클로닝(cloning) 후 발현하여 효소 기능을 스크리닝하는 방법을 이용해왔으나 이러한 방법은 숙주에서의 낮은 발현 효율과 탐색 시스템의 한계로 많은 시간과 노동력, 비용이 발생하는 제한점을 지니고 있음 (그림 8).

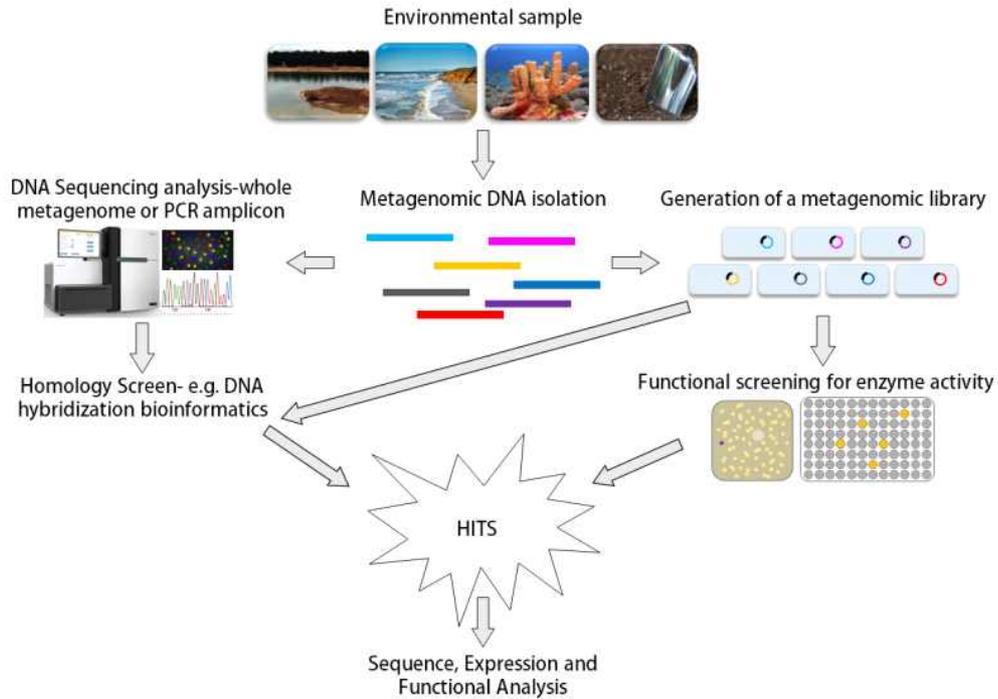


그림 7. 일반적인 메타지놈 이용 효소 탐색 및 개발 과정

- 최근 차세대 유전자 분석기술(NGS) 및 단세포 유전체 분석기술(single cell genomics)의 발달로 인해 다양한 환경에서 유래한 엄청난 양의 유전체 정보가 공용 데이터베이스에 등록되고 있음(그림 9).

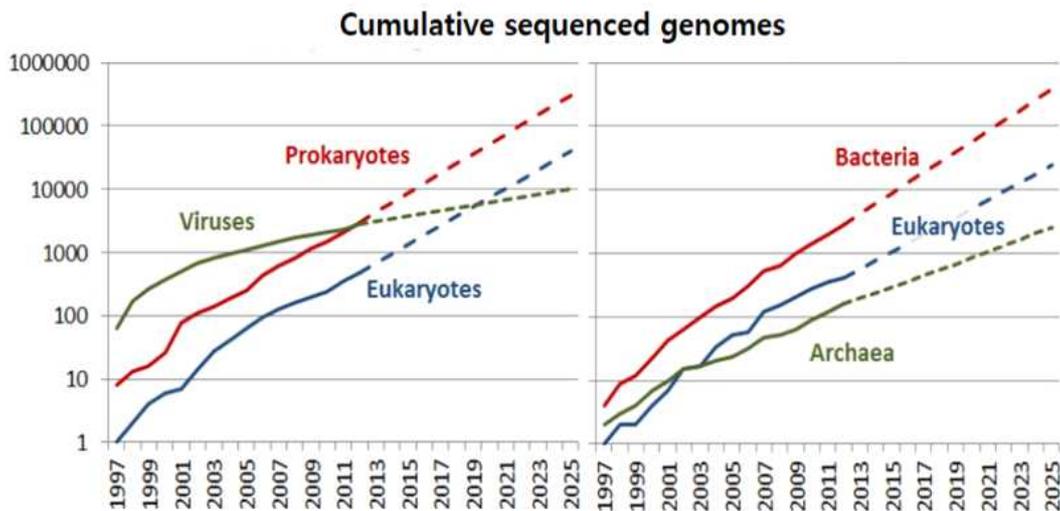


그림 8. 공용 데이터베이스 GenBank에 등록된 유전체 정보 추이

- 특히 2008년 이후 누적 메타지놈 정보의 수가 약 7천건으로 지속적으로 증가하는 추세에 있음. 특히 그동안 연구가 어려웠던 열수구, 심해, 온천, 극지방, 염전해수 등 극한 환경으로부터 생산된 메타지놈 데이터의 수 역시 2008년 이후 꾸준히 증가하고 있어 2017년 1천여건의 메타지놈 정보가 누적되어 있음(그림 10).



그림 9. 공용 데이터 베이스(IMG) 내 등록된 메타지놈 정보 추이

- 미생물은 해저 열수구, 심해, 온천, 극지방, 염전해수 등 극한 환경에서도 생존하며 이러한 극한 환경 조건에서도 활성을 보이는 특이 효소들을 가지고 있어 극한 환경의 미생물의 기능성에 대한 연구자들의 관심이 높음. 그러나 이러한 극한 환경의 미생물은 분리·배양이 어려워 비배양적으로 유용한 기능성 유전체에 대한 분석이 증가하며 이에 대한 메타지놈 정보 역시 지속적으로 증가할 것으로 예상됨.
- 지속적으로 그 수가 증가하는 유전체 및 메타지놈 정보를 바탕으로 고성능·고효율의 특이 신규효소를 탐색하고 개발하는 연구가 반드시 필요함. 본 연구에서는 대용량 유전자 발굴 파이프라인의 구축으로 공용데이터베이스의 유전체 및 메타지놈 정보로부터 극한조건(고온, 고염, 저온, 혐기성 조건 등)에서 작용할 수 있는 고효율 신규효소를 탐색하고자 함 (그림 11).

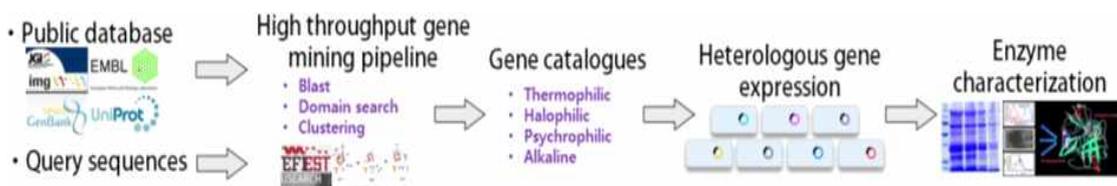


그림 10. 공용 데이터베이스로부터 신규효소 탐색과 특성 분석 과정

- 효소의 산업적 이용은 치즈 제조 시 응유효소인 레닛(rennet)을 송아지의 위에서 추출하여 사용하던 것에서 시작하였으며 효소를 산업용으로 활용하는 것은 매우 친환경적으로 물질을 전환시키며 에너지를 적게 요구함. 그리고 적은 비용으로 원하는 물질을 생산할 수 있어 생산 원가를 절감할 수 있는 장점을 갖고 있음.
- 효소가 갖는 초정밀성, 특이성, 선택성 및 고효율성 등의 특징들로 인해 오늘날 식품, 의약품, 화학공업 등의 분야에서 널리 이용되고 있음. 그리고 효소 및 미생물/발효대사공학 기술의 발달로 인해 산업 분야에서의 효소 이용은 지속적으로 증가하고 있음.

- 다양한 산업 분야에 효소를 적용 시킬 때 효소 반응시 발생하는 열, 반응물의 농도, 산성도 등이 효소의 안정성 및 활성의 감소를 일으켜 생산성과 경제성을 떨어트리는 주요 요소로 지적됨.
- 고온, 고염, 저온 등과 같이 효소 활성을 불활성화 시킬 수 있는 조건에서 고성능과 고효율을 유지하는 효소를 발굴하는 것은 산업용 효소 연구에서 가장 중요한 요소임.
- 최근 메타지놈 라이브러리의 이용과 효소 스크리닝 시스템의 자동화로 인해 효소의 발굴이 용이해졌다고는 할 수 있으나 고성능과 고효율을 갖는 효소의 발굴은 여전히 낮은 가능성을 가지고 있어 좀 더 효율적이며 가능성이 높은 접근하는 방법이 요구됨.
- 이러한 배경으로 본 연구에서는 고용 데이터베이스의 유전체 정보를 이용할 수 있는 대용량 유전자 발굴 파이프라인을 구축하고 이를 이용하여 유용 효소 유전자원을 발굴하고 개발하고자 함.

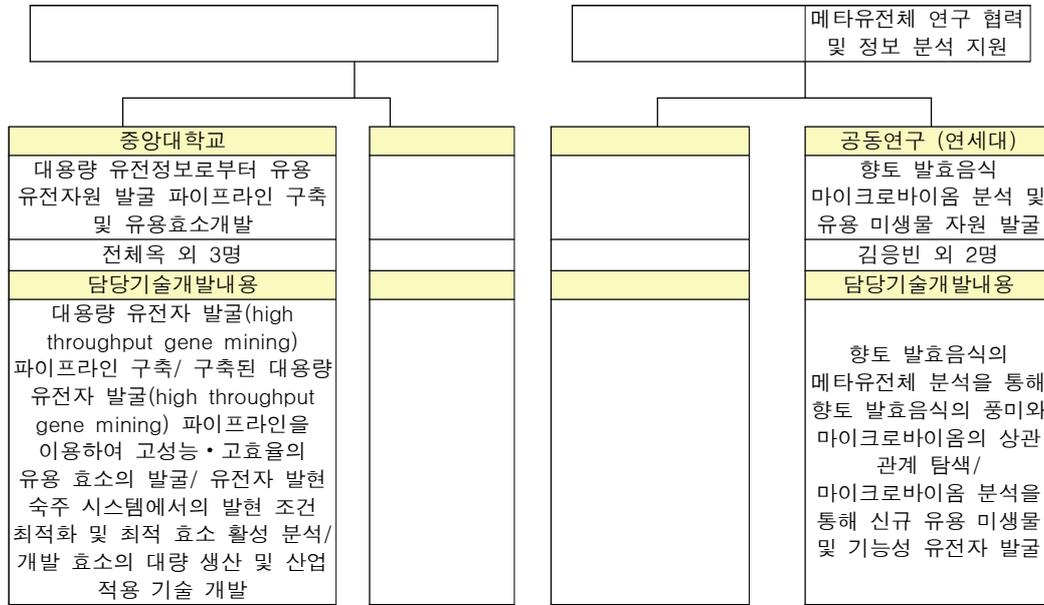
## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 가. 연구개발 추진전략

연구개발과제		총 참여 연구원	
과제명	농식품 소재 미생물 군집 및 메타유전체 정보 분석	단위연구책임자 배진우 외 총 29명	
기 관 별 참 여 현 황			
구 분	연구기관수	참여연구원수	
대 기 업			
중견기업			
중소기업			
대 학	4	30	
국공립(연)			
출 연 (연)			
기 타			

경희대학교	건국대학교	연세대학교
농식품 소재 미생물 군집 및 메타유전체 정보 분석	농축산식품 환경별 미생물간 메타대사체-유전체 상관관계 규명을 통한 발효 최적화	농작물 및 발효식품 환경의 메타유전체 정보 및 시스템 분석
배진우 외 12명	이충환 외 5명	송주연 외 2명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
메타오믹스 기반 송아지 설사 원인 연구/ 대변무리이식을 통한 송아지 설사 치료/ 발효식품 원산지 판별법 제시/ 발효과정 중 바이러스 생태계 특성규명	메타메타볼로믹스 기법 활용한 농축산식품 유래 미생물 특성 규명/ 메타오믹스 기반 농축산식품 유용 미생물 군집의 기능대사체 탐색/ 메타오믹스 기반 미생물 상호작용 대사 네트워크 확립	대용량 메타유전체 정보 분석 및 이를 활용한 농식품 환경 내 미생물 자원 탐색/ 메타유전체 정보 분석 기반 핵심 미생물의 기능 분석 및 미생물-작물 상호작용의 이해/ 미생물 연구개발 네트워크를 활용한



나. 연구개발 추진 일정

1차년도															연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	건강 & 설사 송아지 장내미생물 군집 분석	■	■	■	■	■	■								25,000	배진우 (경희대)
2	건강/설사 반복되는 송아지 대상 분변 채집 및 장내미생물 군집 분석			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	배진우 (경희대)
3	건강 & 설사 송아지 장내 메타전사체 군집 분석							■	■	■	■	■	■	■	25,000	배진우 (경희대)
4	건강 & 설사 송아지 숙주 전사체 및 바이러스 전사체 군집 분석							■	■	■	■	■	■	■	20,000	배진우 (경희대)
5	원산지별 김치 시료 확보	■	■	■	■										5,000	배진우 (경희대)
6	김치 시료로부터 세균 메타유전체 추출, 16S rRNA gene 증폭 및 시퀀싱				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15,000	배진우 (경희대)
7	생물정보학 기반의 세균 염기서열 분석 및 통계 분석						■	■	■	■	■	■	■	■	5,000	배진우 (경희대)
8	메타메타볼로믹스 기법을 활용한 농축산식 유용 미생물 자원의 복합 배양환경별	■	■	■											25,000	이충환 (건국대)













	유전체 해독																			(연세대)
18	미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원																		30,000	송주연 (연세대)
19	개발 효소의 대량 생산 및 산업 적용 기술 개발																		15,000	전체옥 (중앙대)
20	개발된 효소의 안전성 연구																		10,000	전체옥 (중앙대)
21	산업 적용에 적합한 한 배지 및 효소 생산과정의 최적화																		20,000	전체옥 (중앙대)

**다. 연구개발 방법**

○ 본 연구팀은 송아지 설사 원인을 근본적으로 규명하기 위해 직장 내용물 (rectal luminal content)를 채집하여 박테리아 군집 (16S rRNA gene) 및 전사체 군집 (host transcriptome + bacterial metatranscriptome + viral transcriptome) 분석 파이프라인을 구축하였음 (그림 25).

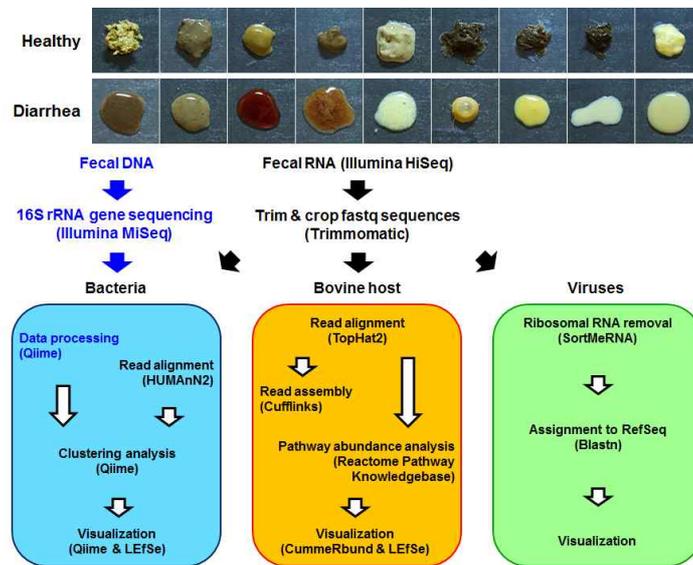


그림 11. 송아지 설사 원인 규명을 위한 장내 메타유전체 & 메타전사체 분석 파이프라인

○ 본 연구팀은 송아지 설사 치료를 위한 대변무리이식 연구에서 가장 중요한 건강한 송아지의 선별 기준을 적립하였음. 건강한 송아지의 선별 조건은 외형적 조건 (예: 건강 상태, 최근 1달 동안 항생제 투여 여부 및 분변의 수분 함량) 기준 및 분자적 진단 조건 기준 (병원성 박테리아 및 바이러스 진단용 diagnostic multiplex PCR)을 모두 충족해야 함 (그림 26).

<b>Total 83.74g</b>	
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

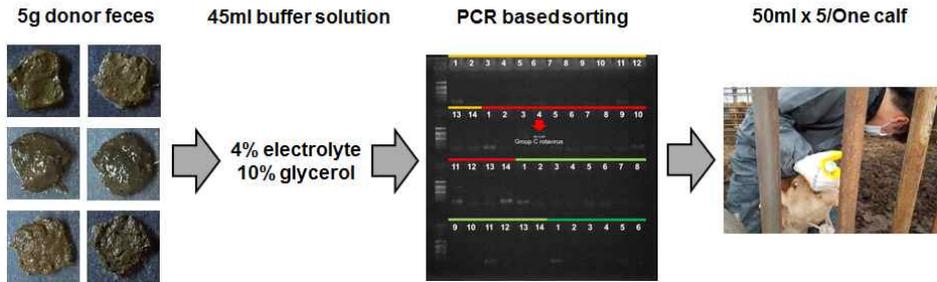


그림 12. 대변무리이식 기술을 위한 분변 공여 송아지 선별 조건 확립

- 설사 송아지의 대변무리이식 기술 이후 분변 이식 송아지의 설사 증세 개선, 장내미생물 군집 변화 및 대변무리이식 기술이 개체의 성장/발달에 미치는 영향 등을 종합적으로 평가하기 위한 시스템을 구축함 (그림 27). 이를 위해 연간 60-80 개체의 송아지가 생산되는 경상북도 의성군 비안면 초원목장 (한우 전체 사육두수 1,000 개체 이상)에서 안정적으로 연구 활동을 유지할 수 있는 환경을 조성하였음.

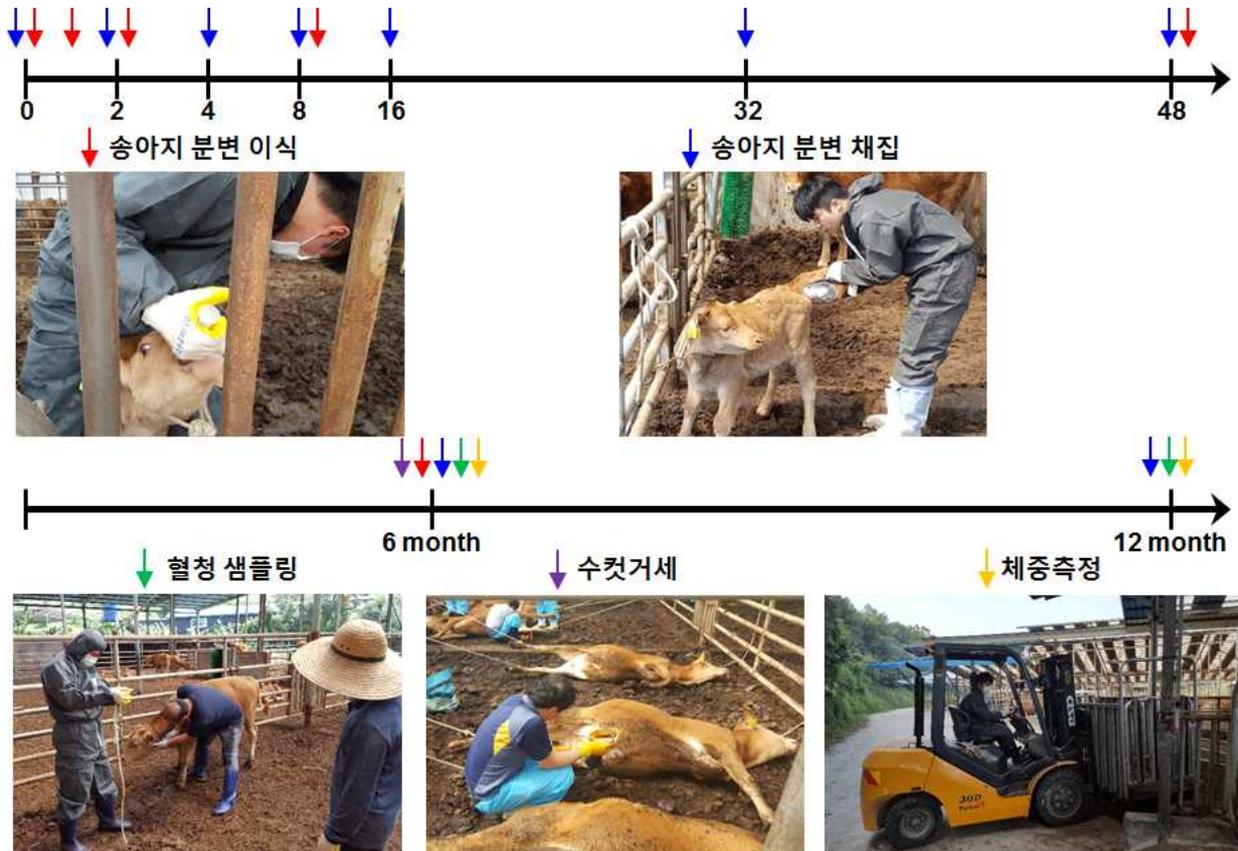


그림 13. 대변무리이식 시술 이후 분변 이식 송아지의 종합적인 성장 및 발달 상황 모니터링 시스템 구축

- 본 연구에서 사용한 경제동물은 국내, 국외를 포함한 전세계적으로 이용 빈도수가 높으며, 특히 질병 노출 및 피해가 많은 경제동물인 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 illumina 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. 나아가 본 연구팀이 보유하고 있는 고성능의 워크스테이션으로 대용량의 유전정보 분석이 가능하며, 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.
- 본 연구팀은 자연 환경 또는 어업 환경 하에서 확인된 숙주와 장내 미생물간의 상호 관계를 보다 제한적인 실험실 환경에서 재현하여 상호 관계의 명확한 규명이 가능하며, 무균 동물 제작 노하우 기술을 이용하여 장내미생물의 유무로 인한 경제 동물의 형태생리학적 차이를 확인할 수 있음.

- 선행 연구를 통하여 다양한 환경 시료와 식품 시료의 바이러스 메타지놈을 확보하고 분석하는 기술을 확립하였기 때문에 식품 내 바이러스 메타지놈 분석에 있어서 기술적인 난관은 대부분 해결되었다고 할 수 있음 (그림 28).

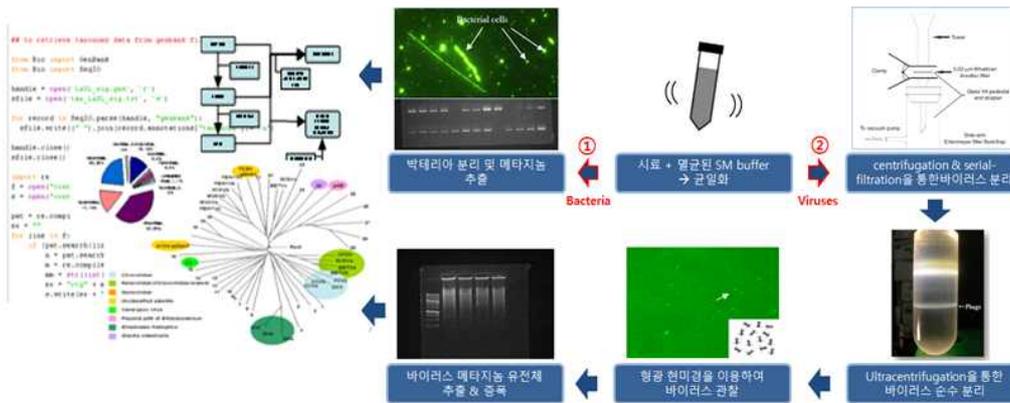


그림 14. 바이러스 메타유전체 분석 방법

- 또한 메타지โนม릭스 기반 식품의 바이러스 군집 분석과 원산지 판별 및 바이러스-숙주 상호관계 분석에 있어서 Linux 기반 bioinformatic tools와 FDR(false discovery rate)로 보정한 Kruskal-Wallis test, 주작표분석(PCoA), 순열적 다변량 분산분석 (PERMANOVA), 상관관계분석(Pearson's 상관계수 값) 및 선형회기분석 등의 통계적 분석 결과를 바탕으로 과학적이고 정확하게 식품 내 바이러스 생태계의 특성을 규명하고자 함.

○ 미생물 및 발효 식품 유래 시료 전처리 및 추출법 표준화

- 가. - 본 연구팀은 다년간의 미생물 및 발효 대사체 분석을 통한 최적 효율 추출법을 정립하였으며, 이를 통해 대사체 분석에서 올 수 있는 다양한 오류를 최소화 하고 실험의 재현성 및 정확성을 확보하여 미생물 및 발효 관련 시료 전처리 표준화를 실시하고자 함.
- 미생물 시료는 고체/액체 발효 등 환경에 따라 추출 전처리 표준화 과정이 진행됨.
- 발효식품 시료의 경우 상이한 수분 함량 및 점성 등을 고려하여 동결건조기를 사용하여 시료의 표준화를 적용함.
- 동결건조된 시료를 유기용매(메탄올, 에탄올, 또는 혼합용매)를 이용하여 초음파 및 Mixer mill 을 통하여 주요성분을 3회 반복 추출함.
- 주성분 및 기능성 성분의 효율적인 추출을 위하여 극성도 또는 분자량에 따른 2차 추출, 분리 등의 전처리 과정을 수행할 수 있음.
- 원심분리 후, 얻은 상등액을 speed vacuum을 통하여 농축시킴. 후에 시료의 농도를 맞추어 MS분석 수행.

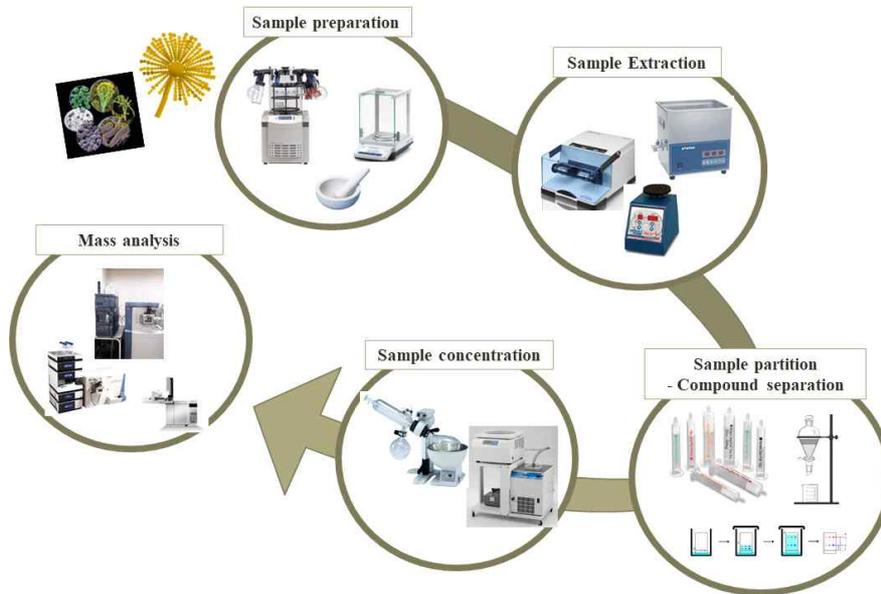
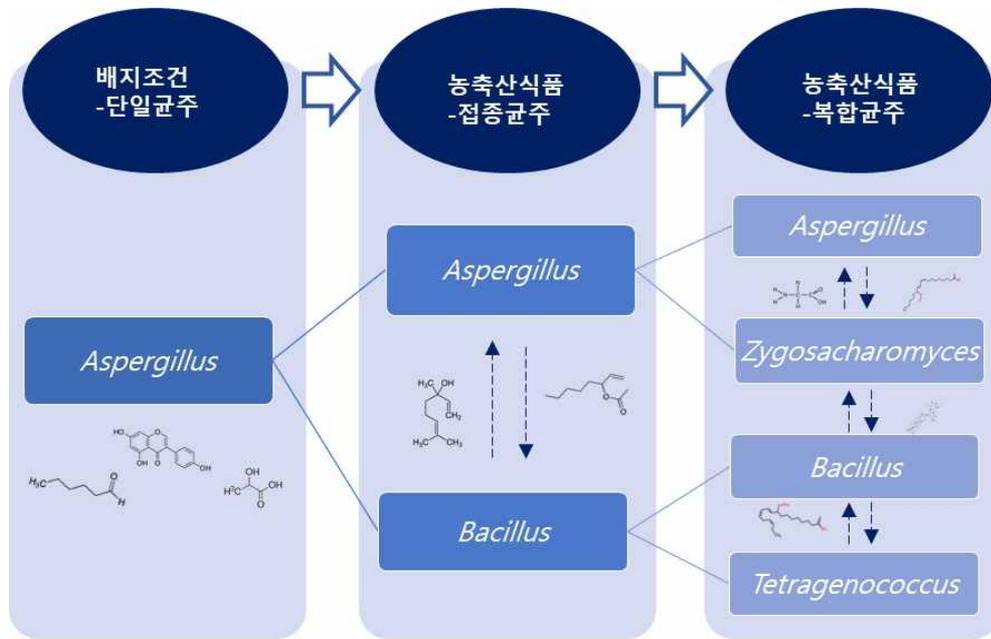


그림 15. 농축산식품 미생물 발효 시료 표준화를 위한 추출의 예

○ 미생물 상호작용 및 발효 환경에 따른 대사체 규명을 위한 메타메타볼로믹스 기법 적용

- 나. - 미생물은 수많은 유전자와 전사체, 단백질 및 대사체들의 복잡한 연계를 통한 끊임없는 상호작용을 하는 하나의 유기적인 시스템임.
- 다. - 메타메타볼로믹스란 환경이나 기타 요인에 의해 변화되는 다양한 대사체들의 변화를 확인하고 해석하는 학문임. 다양한 대사체들을 동정하고 다변량 통계분석 및 메타볼로믹스적 해석법을 통한 시스템 레벨에서의 대사 메커니즘 규명이 가능함. 이를 위해서는 다양한 MS 기반의 분석 및 정확한 대사체 동정이 필수임.



라.

**미생물 상호작용 및 발효 환경에 따른 대사체 규명을 위한  
메타메타볼로믹스 기법 적용**

그림 16. 농축산식품 발효 환경 별 미생물 상호작용 분석

마. - 실험실 배양조건에서 배양한 미생물의 효소 발현 또는 특정 대사체의 생산 증감 확인 등을 수행한 기존연구 방식은 실제 산업적 조건인 다양한 배양환경에서는 반영하지 못하여 실제로 적용하는 것에 문제점이 있었음. 따라서 복합적 배양환경 조건 및 실제 완제품의 미생물 상호작용 분석을 통하여 산업에 실질적으로 응용할 수 있는 프로세스 구축이 필요함.

- 배양환경조건(배지, 단일조건, 완제품)변화에 따른 농축산식품 유용 미생물 균주의 화학적 분류 및 비교.
- 미생물 균주의 유전체 분석을 통한 신규 기능대사체 생산을 위한 잠재 가능성 확인.
- 오믹스 연계분석을 통한 미생물 균주의 최적 배양 조건 및 최적 균주 선정.
- 실제 식품산업에서의 효율적인 적용을 위해 미생물 균주 사용 전통발효식품의 원료 및 공정에 따른 기능대사체 해석 시스템 구축.

바. - 본 연구진은 MS/MS spectral library 시스템 구축 (Lee et al., Rapid Commun. Mass Spectrom, 2005, 인용 57회) 이후, 약 6,000개 이상의 천연물, 미생물, 발효 기반 In house library DB를 보유함으로써 독보적 연구 경쟁력을 확보하였음.

○ 발효 최적화를 위한 메타오믹스 기법 적용을 통한 대사네트워크 구축

사. - 메타메타볼로믹스 분석을 통한 미생물 상호작용 및 발효 환경관련 주요 인자를 규명하고, 관련 유전자 및 전사체 발현을 확인하여 단편적 연구의 수준을 넘어 시스템 레벨에서의 해석을 위한 통합적 대사네트워크를 구축하고자 함.

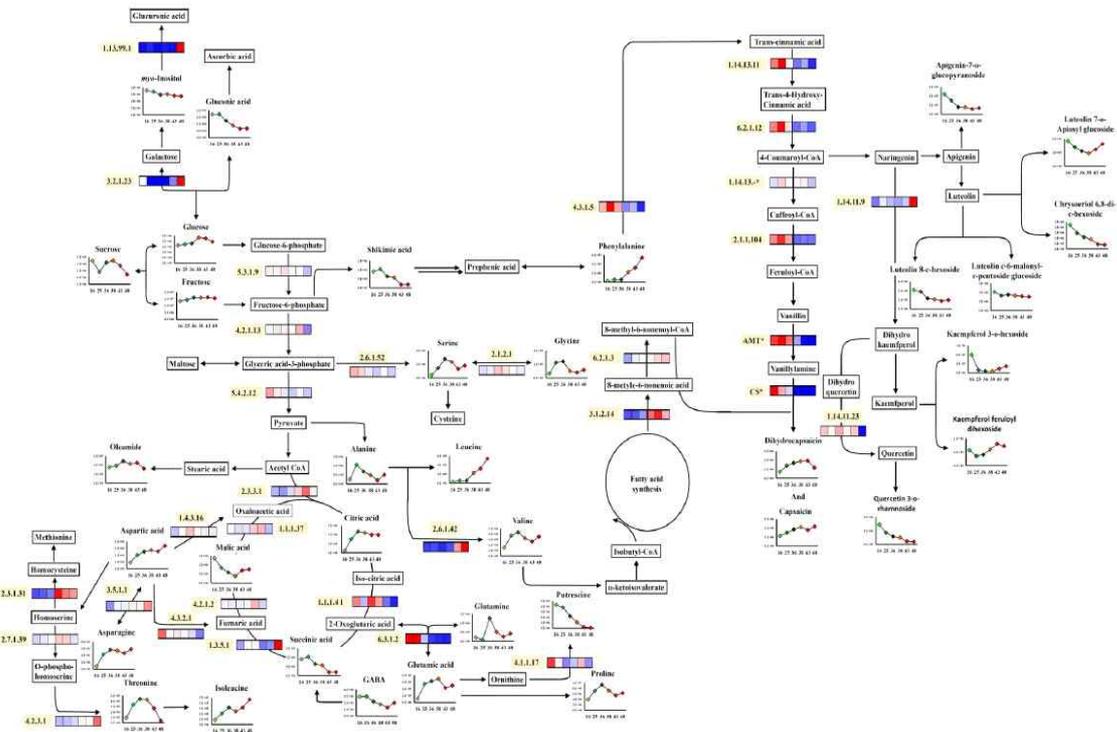


그림 17. 대사체-유전체 네트워크 분석을 이용한 메커니즘 분석의 예

아. - 구축된 네트워크를 통한 발효 환경에 따른 유전체의 발현으로부터 최종 대사산물의 생성 까지 미생물 상호작용에 관한 관계를 연구함으로써 복잡한 발효 공정의 총체적 해석 및 예측이 가능함.

○ 작물 근권 마이크로바이옴 분석 기반 및 minimal community의 구축

- 작물 근권 마이크로바이옴 분석을 위해 기존에 동아대 이선우 교수님 연구팀과 협력 연구를 통해 확보한 토마토 풋마름병 저항성 품종(Hawaii 7996)과 감수성 품종(Moneymaker)의 마이크로바이오타, 전 메타유전체 염기서열 해독 결과로부터 미생물 군집 구조 심화 분석을 수행함. 16S rRNA를 PCR 증폭하여 454 pyrosequencer를 이용하여 amplicon sequencing 서열을 생산하였던 데이터들을 가지고 Mothur, Qiime 등 미생물 군집 구조를 분석할 수 있도록 정립된 생물정보학적 도구들을 이용하여 재분석을 수행함. 현재까지 도출한 데이터는 종 (species) 단위의 수준까지 분석되어 있지 않으므로, 메타유전체 기반의 minimal community를 구축하기 위해서는 재분석을 수행하여 종 단위의 군집 분석을 수행하고, 이를 미생물 분리 대상을 선정 데이터로 사용할 필요가 있음.
- 근권 전 메타게놈 서열로부터 군집 구조의 재분석을 수행하기 위해서는 해독 염기서열의 단편 (read)들을 16S rRNA 등의 마커 유전자를 포함하는 Silva database 및 GenBank의 균주별 대표 참조유전체 database를 활용하여 mapping을 통해 abundance를 구하여 재분석을 수행함. 또한 그 외에 전 메타유전체로부터 taxonomy annotation이 가능한 marker gene set 기반의 Amphora, PhyloSift, Metaphlan 또는 k-mer를 활용한 Kraken, Kaiju 프로그램들을 활용하여 기존 군집 구조 분석 결과 및 16S rRNA amplicon sequencing 결과와 비교하여,

minimal community를 구성하기 위한 자료로 활용하고자 함 .

- 도출된 taxonomy annotation 결과를 이용하여 토마토 풋마름병의 병저항성 또는 유도와 관련된 미생물 군으로부터 주요 미생물군 또는 군주를 확보하여 minimal community를 구성, 구축하고자 함. 이를 위해 풋마름병 저항성 품종과 감수성 품종에서 다른 비율을 나타내며, 품종에 따라 출현하는 미생물들의 상관관계를 파악하여, 핵심/특이 마이크로바이오타를 분석함. 이러한 결과를 토대로, 토마토 풋마름병에 대한 저항성 및 감수성에 관련될 것으로 예상되는 유의미한 미생물군을 선정하고, 미생물 군에 따라 배양 조건을 선정함. 미생물 군주 동정 문헌 자료를 활용하여, 같은 genus 또는 species의 성장 특성을 파악하여 배지 선정을 검토, 선별 배지를 제작하고, 그 외 온도, pH 등을 고려하여 배양 조건을 설계함.
- minimal community에 포함될 미생물군 또는 군주를 screening하기 위해 선별 배지 외에 특이적 프라이머를 제작하여 이를 확인할 수 있도록 함. 특이적 프라이머를 제작하기 위해서는 16s rRNA 서열을 활용하여 근연관계에 있는 군주들과 sequence alignment하여 다양성이 나타나는 군주 특이적 부위를 선별하고 이에 대해 프라이머를 고안하여 제작, PCR 증폭 후 확인하여 군주를 일차 선별하는데 이용함.

#### ○ 메타유전체 분석 기반의 미생물 근권 내 기능 및 메커니즘 분석

- 선행 연구에서 확보하였던 병저항성 기여 군주 TRM1 군주 및 본 연구를 통해 도출하고자 하는 병저항성 및 병유도에 관련된, minimal community를 통해 확보한 미생물의 기능 및 기주-미생물 상호작용을 이해하기 위해 분석 연구를 수행함.
- 메타유전체 분석을 기반으로 minimal community 분석을 수행하기 위해 in vivo 실험을 수행하고자 함. 이러한 분석들을 수행하기 위한 토마토 품종 및 미생물 생장의 최적화를 위한 실험 조건 및 방법을 설계하고, 설계된 조건하에 토마토 품종, 미생물 성장 등에 대한 실험 계획 및 방법을 수립함.
- 병저항성 기여 군주 및 구축된 minimal community의 근권 내 역할을 이해하고자 분리 군주들의 근권 내 정착 빈도 및 군집 천이를 확인하기 위해 population 분석 또는 메타유전체 분석을 수행함. 미생물 군집 분석을 위해 16S rRNA amplicon sequencing을 해독하고 Qiime 또는 Mothur 프로그램을 이용하여 군집을 분석하고 비교함. 또한 전 메타유전체 분석을 수행할 경우, Illumina HiSeq 시퀀싱 플랫폼을 이용하여 전 메타유전체를 해독하여 서열을 생산하고, long read의 서열이 필요할 경우, PacBio RSII 및 Nanopore의 Minlon 시스템을 활용하여 서열을 생산할 수 있음. 전 메타유전체 염기서열 해독, 생산 이후, 마커 유전자에 포함되는 read를 확보하고 이에 대한 군집 구조 분석을 수행하거나, 서열을 de novo assembly, binning 방법을 이용하여 염기서열 조립 및 메타유전체 서열을 결정함. 또한 유전자 예측 후, 유전자 기능 목록화 및 대사유전자 분석을 수행함.
- 기주-미생물 상호작용을 이해하기 위해 기주 exudate 또는 미생물 대사체를 대상으로 메타대사체 분석을 수행하는 등, 메타오믹스 분석을 통해 메타유전체 서열과의 통합하여 분석하고자 함. 또한 그 외, NGS 활용 기반의 유전적 기능성 라이브러리 구축 및 in vivo 실험, 그리고 형광마커를 도입한 군주를 활용하여 미생물-기주 상호작용을 시각적으로 모니터링 하는 등 병저항성 기여 군주의 작용 메커니즘을 분석하고자 함.

○ 향토 발효음식 마이크로바이옴 분석 및 유용 미생물 자원 발굴

- 향토 발효음식 선정 후, 선정 향토 음식의 메타유전체 추출 및 마이크로바이옴 분석함
- 마이크로바이옴 해독 염기서열 정보를 이용하여 향토 발효음식의 미생물 군집 조성을 파악함. 군집 구조 결과를 바탕으로 향토 발효음식의 고유한 풍미와 마이크로바이옴의 상관관계, 향토 발효음식의 우수성을 연구함.
- 수집된 향토 발효음식들의 마이크로바이옴을 비교, 분석하고, 신규 후보 유용 미생물을 선정하고 이를 분리, 배양하도록 함. 신규 미생물의 배양을 위한 배양 기술 확보함
- 발굴된 신규 미생물의 특성 연구를 통해 기능성을 확인하고, 표적 미생물에 대해 유전체 해독, 분석 수행 후, 유용 유전자 발굴함.

○ 미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원

- 미생물전략연구사업단 내 조기성과창출, 연구역량강화, 기주-미생물 상호작용 과제를 수행하고 있는 농식품 분야의 전문 연구팀과의 연구 협력을 통해 농식품의 주요 소재들을 대상으로 신규 메타유전체의 분석 수행 또는 분석 연구를 지원하고자 함. 사업단 내 메타유전체 연구 지원을 위한 전 메타유전체 연구 대상 자료 수집 및 검토하고, 긴밀한 연구 협의를 통해 마이크로바이옴 분석 대상을 선정하거나 실험을 설계함.
- 전 메타유전체 분석 연구 기법 및 시스템의 지속적인 도입을 수행하고 이를 기반으로 메타유전체 분석 지원 및 협력 연구를 수행하고자 함. 즉, 전 메타유전체 분석을 위해 구축되어온 메타유전체 서열 해독 이후의 군집 분석, 서열 조립, 유전자 분석, 기능성 유전자 분석 지원 등 뿐 아니라, 그 외 최근 전 메타유전체 분야의 연구 동향 및 기술들을 선제 도입하여 메타유전체 데이터로부터 의미있는 결과를 도출할 수 있도록 함.

**라. 수행 내용**

○ 메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석

**1. 설사/건강 송아지의 장내미생물 군집 규명**

- 경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 증세 송아지 44개체와 건강한 송아지 44개체를 선별하여 직장 내 분변 샘플을 확보하고, Illumina MiSeq을 이용하여 채집된 시료의 미생물 군집을 확인하였음 (그림 18).

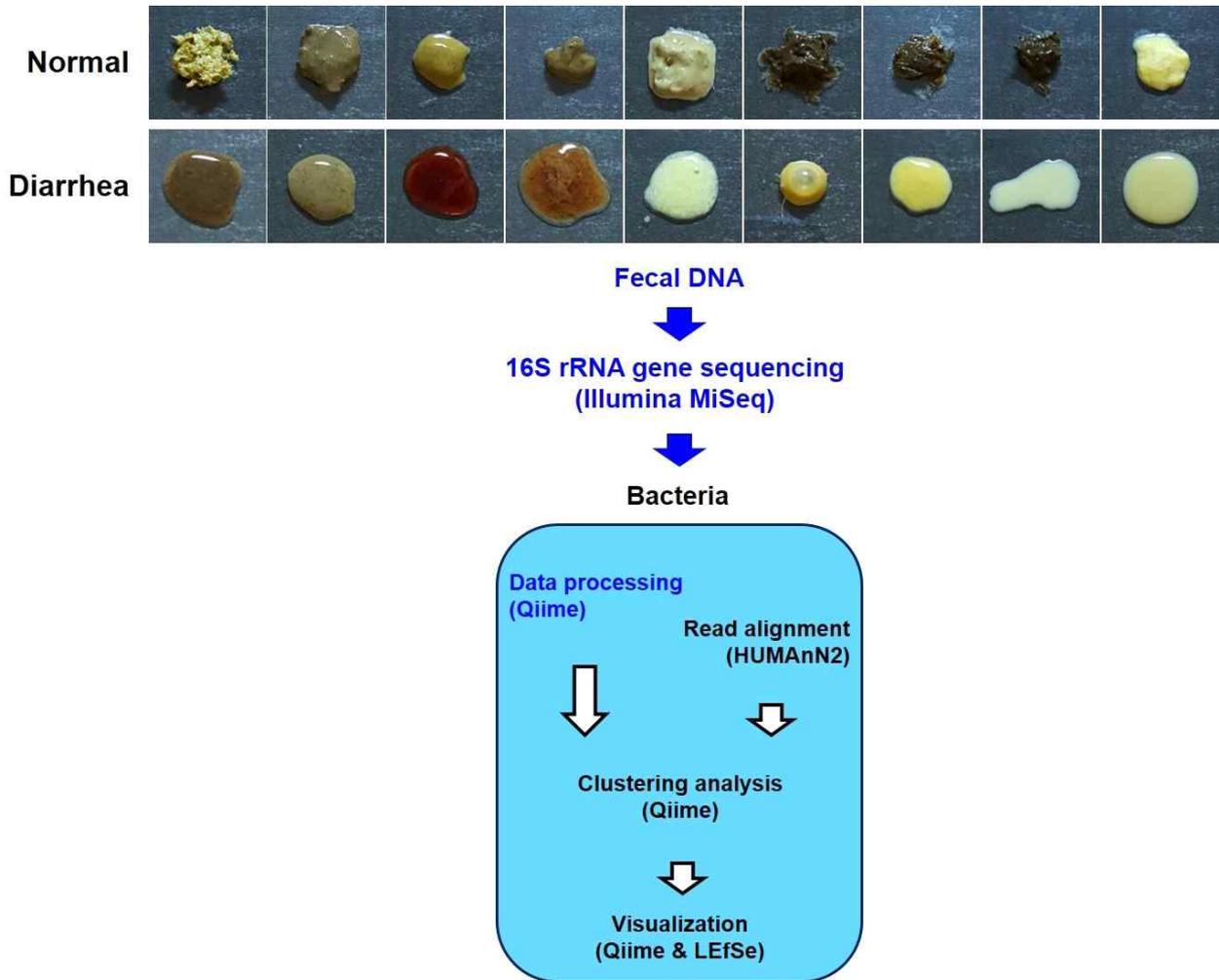


그림 18. 송아지 분변 채집 및 미생물 군집 분석 방법

- 대용량 염기서열 (Illumina Miseq) 분석법을 이용하여 bacterial 16S rRNA gene을 타겟으로 시퀀싱을 진행하였음. 최신의 QIIME2/DADA2 pipeline을 적용하여 설사증세를 보이는 송아지의 장내미생물 군집을 확인 (그림 19, 표 4).

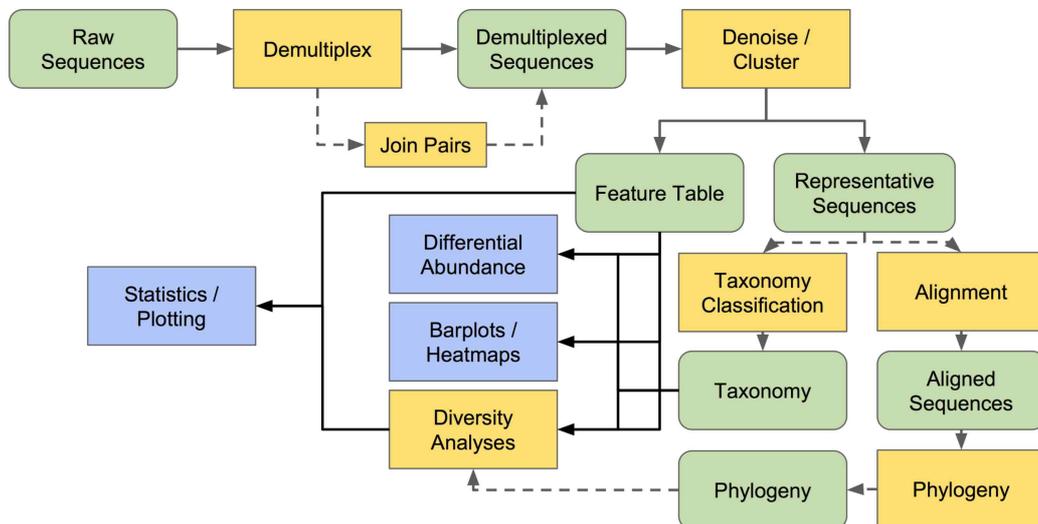


그림 19. QIIME2 분석의 개념적 개요

표 4. Miseq을 사용하여 생성된 16S rRNA 데이터

Sample	QIIME2					
	Input	Filtered	Denois ed	Merged	Non-chimer ic	Sub-sampled
N1	160 102	69 302	63 518	50 905	24 388	21 542
N2	164 163	89 366	87 575	83 958	71 423	21 542
N3	138 714	75 880	72 795	63 623	32 103	21 542
N4	165 489	87 402	81 090	72 434	61 176	21 542
N5	157 466	81 808	70 577	53 132	27 517	21 542
N6	129 516	65 465	58 855	46 361	21 586	21 542
N7	157 356	81 299	76 485	64 063	27 381	21 542
N8	159 046	81 546	74 031	62 077	33 513	21 542
N9	162 502	84 414	82 031	78 906	67 043	21 542
N10	265 266	201 396	194 024	175 465	97 843	21 542
N11	268 294	199 653	191 788	172 626	104 764	21 542
N12	205 841	154 187	148 818	135 114	107 956	21 542
N13	155 842	116 065	109 056	95 187	68 461	21 542
N14	113 823	82 130	72 572	56 959	45 229	21 542
N15	258 489	187 983	174 568	145 853	101 862	21 542
N16	254 557	187 417	181 764	170 861	155 297	21 542
N17	119 791	92 538	89 093	81 930	63 350	21 542
N18	176 806	125 156	118 842	106 725	79 954	21 542
N19	120 963	89 719	80 284	66 735	56 307	21 542
N20	193 287	142 484	137 001	125 630	101 487	21 542
N21	106 983	79 631	74 081	63 486	50 075	21 542
N22	186 753	139 928	135 094	123 561	83 402	21 542
N23	211 454	159 965	152 985	136 453	92 238	21 542
N24	109 614	82 729	78 558	70 968	53 514	21 542
N25	181 138	136 368	128 228	107 608	62 429	21 542
N26	100 641	72 492	66 116	55 859	39 967	21 542
N27	130 109	97 363	94 944	90 436	86 710	21 542
N28	101 463	76 351	72 663	64 709	48 485	21 542
N29	128 437	96 421	92 681	87 063	80 992	21 542
N30	92 008	70 339	66 643	59 462	47 344	21 542
N31	223 526	167 526	161 478	143 318	99 831	21 542
N32	231 045	174 537	166 418	147 435	110 154	21 542
N33	164 285	123 148	117 566	104 984	64 799	21 542
N34	194 413	146 327	134 886	112 543	89 358	21 542
N35	191 994	136 181	134 253	130 969	127 775	21 542
N36	158 440	117 495	116 338	114 794	108 446	21 542
N37	185 277	135 692	133 936	130 375	123 616	21 542
N38	259 677	191 539	186 061	174 125	141 981	21 542
N39	146 689	110 248	105 293	97 930	89 530	21 542
N40	157 615	116 903	110 256	99 037	91 591	21 542
N41	251 974	193 111	183 453	160 132	91 707	21 542
N42	112 404	84 085	80 428	69 649	44 337	21 542
N43	150 783	112 658	109 692	105 241	98 444	21 542
N44	112 360	84 093	79 608	71 325	55 401	21 542
N45	142 132	108 036	104 491	98 198	92 189	21 542
N46	136 170	100 502	96 546	88 901	79 400	21 542
N47	275 125	205 214	202 838	197 148	176 953	21 542
N48	248 604	177 913	175 317	168 796	144 309	21 542
N49	286 450	207 608	197 749	174 833	132 555	21 542
N50	135 735	102 025	98 061	88 969	81 447	21 542
N51	119 069	88 165	81 835	72 359	65 691	21 542
N52	109 072	81 661	77 334	69 051	52 471	21 542
N53	258 847	188 262	182 008	171 184	146 712	21 542
D1	164 307	81 220	66 501	50 857	31 453	21 542
D2	159 733	77 911	71 864	64 637	57 023	21 542
D3	184 339	88 986	86 193	80 101	55 476	21 542

D4	159 354	83 302	78 274	67 572	37 742	21 542
D5	150 085	78 513	77 365	75 988	61 780	21 542
D6	165 826	86 789	84 514	79 633	55 039	21 542
D7	149 640	77 932	75 327	70 292	55 570	21 542
D8	168 278	88 237	84 455	76 625	48 980	21 542
D9	136 687	77 171	76 040	73 841	63 613	21 542
D10	221 265	155 940	155 064	153 393	124 595	21 542
D11	118 339	91 688	91 297	90 503	80 247	21 542
D12	188 208	137 316	136 186	131 717	91 408	21 542
D13	286 201	221 667	220 964	218 161	172 672	21 542
D14	271 607	210 362	208 764	203 709	171 223	21 542
D15	224 247	169 331	166 477	157 831	121 390	21 542
D16	322 057	237 876	236 655	234 552	212 864	21 542
D17	142 607	110 298	108 881	103 428	86 322	21 542
D18	176 886	133 902	132 956	129 827	116 703	21 542
D19	258 046	157 850	156 807	153 329	119 341	21 542
D20	127 539	100 547	100 149	99 487	92 394	21 542
D21	155 211	116 271	115 770	110 356	91 860	21 542
D22	169 091	127 191	123 268	114 947	80 006	21 542
D23	240 457	181 700	179 695	173 305	133 504	21 542
D24	363 185	270 295	268 984	263 959	200 714	21 542
D25	129 496	98 320	95 961	91 805	83 008	21 542
D26	151 853	109 070	108 141	105 927	83 828	21 542
D27	298 787	220 031	218 067	212 535	138 627	21 542
D28	298 852	210 614	208 363	201 169	140 277	21 542
D29	175 911	131 514	130 531	125 984	84 579	21 542
D30	128 217	98 583	97 742	96 030	81 479	21 542
D31	298 999	222 273	218 056	212 507	159 461	21 542
D32	163 883	119 422	118 661	113 746	97 071	21 542
D33	185 864	143 459	142 646	140 397	90 258	21 542
D34	170 349	131 430	130 946	129 814	105 618	21 542
D35	203 293	155 101	151 090	137 366	82 125	21 542
D36	144 864	100 389	99 843	98 367	93 224	21 542
D37	166 076	125 924	125 027	123 676	112 212	21 542
D38	108 246	82 368	81 110	78 468	67 081	21 542
D39	137 103	105 822	104 748	102 228	88 438	21 542
D40	141 552	107 806	107 358	106 629	94 136	21 542
D41	146 670	113 434	111 076	107 511	97 192	21 542
D42	122 656	96 059	95 561	94 297	76 028	21 542
D43	175 094	130 526	129 976	122 887	113 321	21 542
D44	139 764	105 757	101 551	90 896	52 119	21 542
D45	114 939	89 813	89 221	87 844	74 326	21 542
D46	129 596	97 746	96 508	94 502	92 310	21 542
D47	154 979	116 149	114 746	112 161	101 357	21 542
D48	196 965	146 500	145 749	144 655	138 871	21 542
D49	205 969	150 197	149 186	145 913	117 700	21 542
D50	148 458	113 879	112 775	111 113	103 388	21 542
D51	106 406	80 786	79 956	77 978	59 758	21 542
D52	196 113	141 103	139 737	136 335	99 309	21 542
D53	192 674	146 147	144 371	139 797	83 690	21 542

- 설사 여부에 따라 확연히 구분되는 송아지의 장내미생물 군집 구조를 PCoA 분석법을 이용하여 확인함 (그림 20).

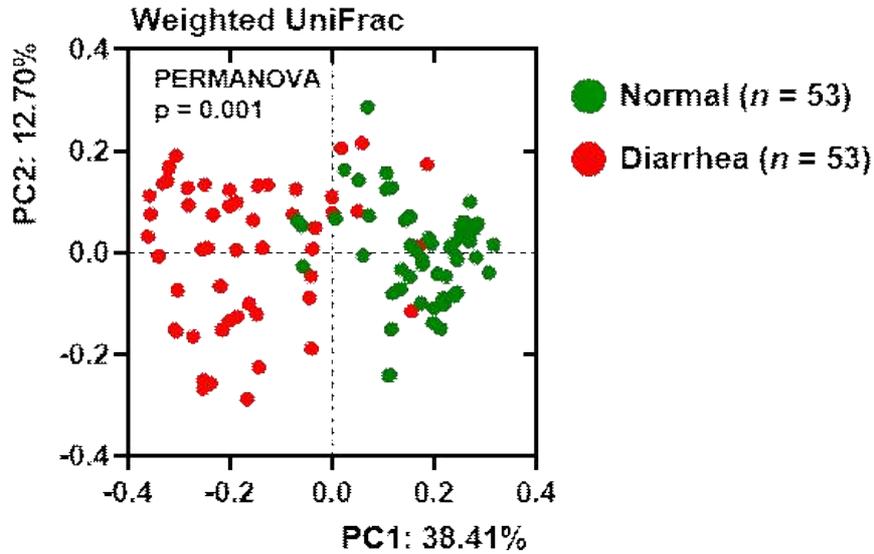


그림 20. 설사 증세 송아지와 건강한 송아지의 장내미생물 군집 비교

- 설사 증세 송아지 53개체와 건강한 송아지 53개체의 직장 내 미생물 군집 중 통계적 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 나타내는 미생물 그룹을 linear discriminant analysis effect size(LEfSe) method를 이용하여 확인함 (그림 21).

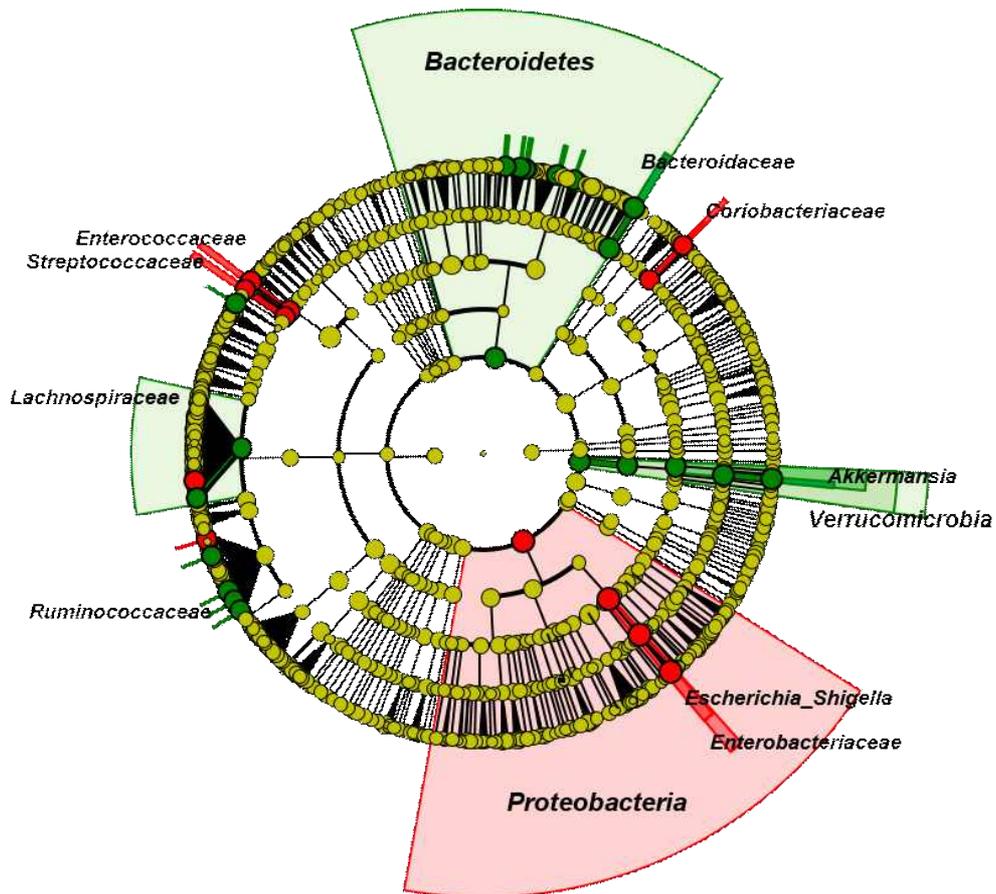


그림 21. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 LEfSe 분석 결과

- LEfSe에서 제시한 taxa를 relative abundance를 ASVs (Amplicon Sequence Variants)

table에서 확인한 결과 통계적으로 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 보였음 (그림 22).

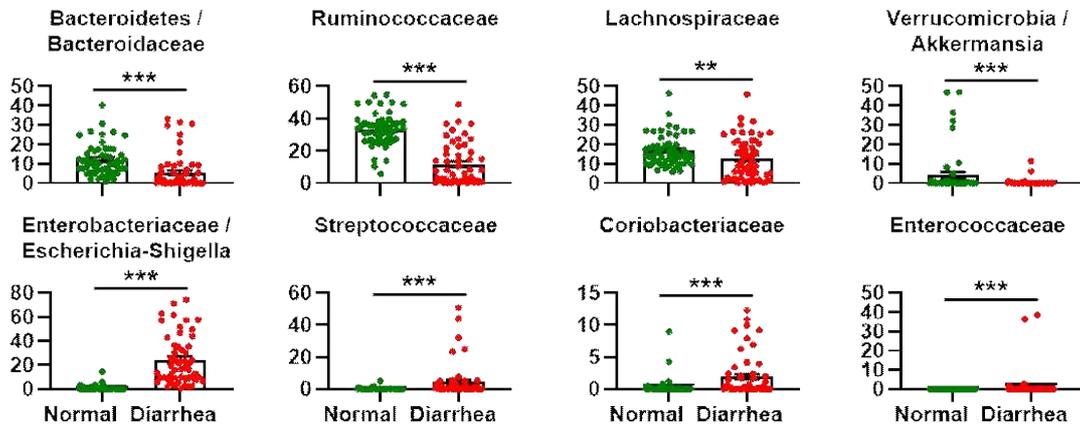


그림 22. Discriminant taxa의 relative abundance(%)

- 설사 증세 송아지와 건강한 송아지의 직장 내 미생물 군집을 the phylum, family and genus level에서 확인함. 특히 phylum Proteobacteria, family *Enterobacteriaceae*, genus *Escherichia coli*가 설사 송아지의 미생물 군집에서 건강한 송아지의 미생물 군집과 비교해서 상대적으로 높을 확인함 (그림 23).

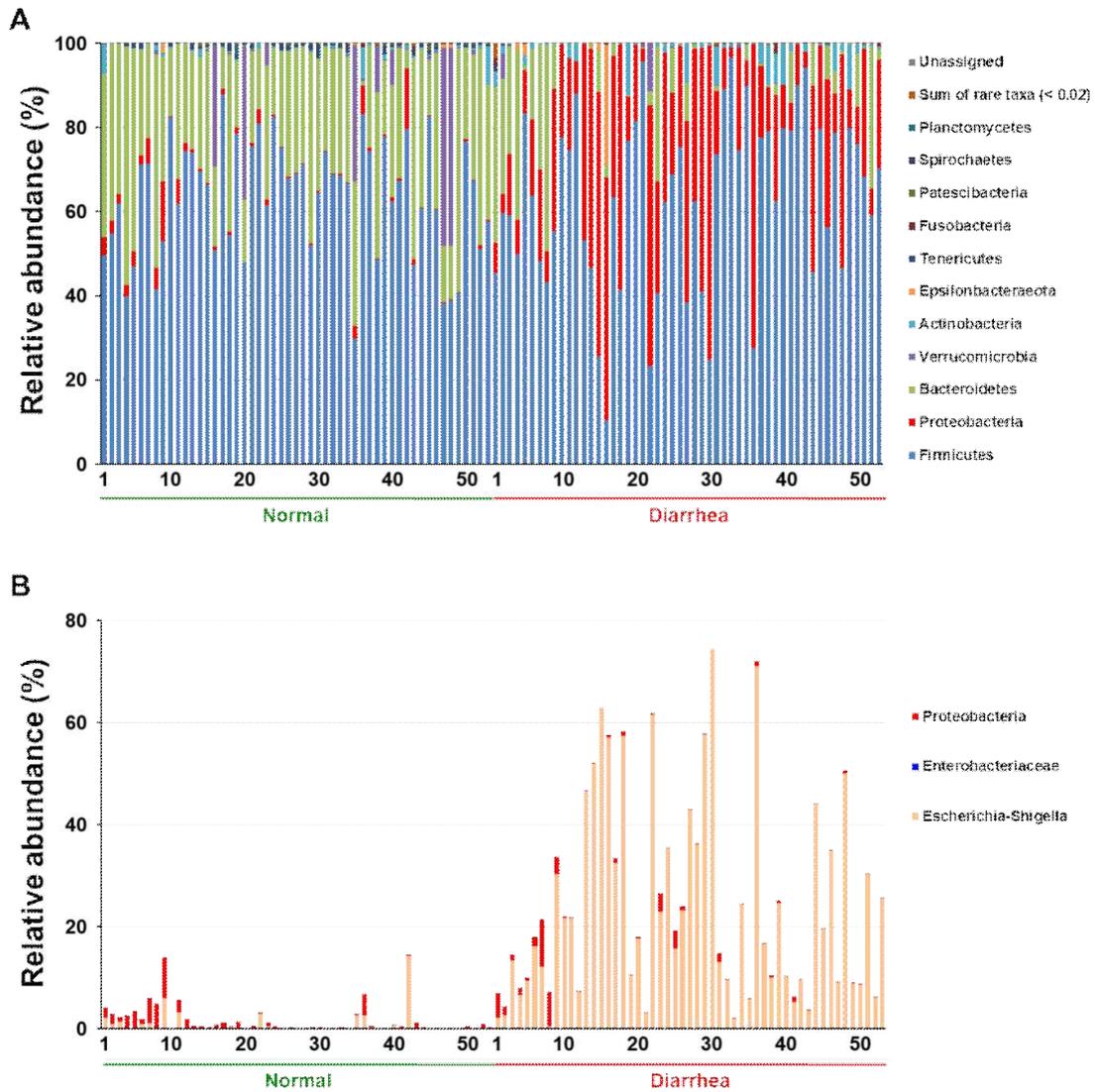


그림 23. 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 중 family *Enterobacteriaceae*의 relative abundance(%)

- 최신의 머신러닝 기법을 적용하여 장내미생물 군집 정보만으로 설사 송아지와 건강한 송아지를 구분하게 트레이닝 시킨 결과 the family *Enterobacteriaceae*가 설사 송아지와 정상 송아지의 장내미생물 군집 특성을 구분 짓는 주된 미생물 그룹임을 확인함 (그림 25).

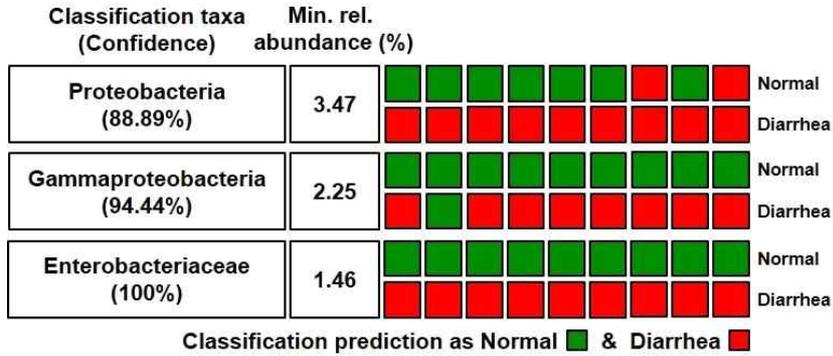


그림 25. 머신러닝을 이용한 설사 증세 및 건강한 송아지의 장내미생물 군집 특성 예측

## 2. 송아지 설사를 유발하는 병원균 모니터링

- 송아지 설사를 유발하는 RNA viruses(Group A rotavirus, group B rotavirus, group C rotavirus, bovine coronavirus, bovine torovirus, bovine norovirus, bovine enteric Nebraska-like calicivirus, bovine nebovirus and bovine viral diarrhea virus)와 pathogenic bacteria(*Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica* Typhimurium, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Shigatoxigenic *Escherichia coli* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*)의 감염여부를 설사 증세 및 건강한 송아지의 분변 샘플에서 diagnostic PCR 기법을 적용하여 확인하였음. 설사 증세 및 건강한 송아지의 분변 샘플에서의 특정 바이러스 및 병원균의 쓸림 현상은 확인되지 않음 (표 5).

표 5. Diagnostic PCR기법을 적용한 RNA viruses & pathogenic bacteria 감염 여부 확인

Host	Target gene	Normal									Diarrhea								
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Viruses	Group A rotavirus																		
	Group A rotavirus	VP7																	
	Group B rotavirus	VP7																	
	Group C rotavirus	VP6							+			+	+				+	+	
	Bovine coronavirus	N																	
	Bovine coronavirus	S																	
	Bovine torovirus	M																	
	Bovine torovirus	N																	
	Bovine norovirus	RdRp																	+
	Bovine enteric Nebraska-like calicivirus	RdRpMCP	+																+
	Bovine nebovirus	Capsid																	+
	Bovine viral diarrhea virus																		+
	Bovine viral diarrhea virus																		+
	Bovine viral diarrhea virus	Polyprotein																	+
Bacteria	<i>Clostridium perfringens</i>	16S rRNA gene			+		+	+	+	+									+
	<i>Clostridium perfringens</i>	alphatoxin genes			+								+			+			+
	<i>Salmonella enterica</i>	sefb																	
	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	rfbJ																	
	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	K99																	
	Shigatoxigenic <i>Escherichia coli</i>	stx1																	
	Shigatoxigenic <i>Escherichia coli</i>	stx2	+		+			+					+	+		+		+	
	Shigatoxigenic <i>Escherichia coli</i>	eaeA	+		+	+		+					+	+	+		+		
	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	hlyA	+		+	+	+	+	+				+	+	+				+

### 3. 설사/건강 송아지의 환경 내 *E. coli* 양적 차이 확인

- Quantitative PCR 기법을 적용하여 Shiga toxin type 2 (*stx2*), enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7-specific intimin (*eaeA*), and plasmid-encoded enterohemolysin (*hlyA*)의 양적인 차이를 확인한 결과 설사 증세 및 건강한 송아지의 분변 샘플에서 통계적으로 유의성이 확인되지 않았음 (그림 26).

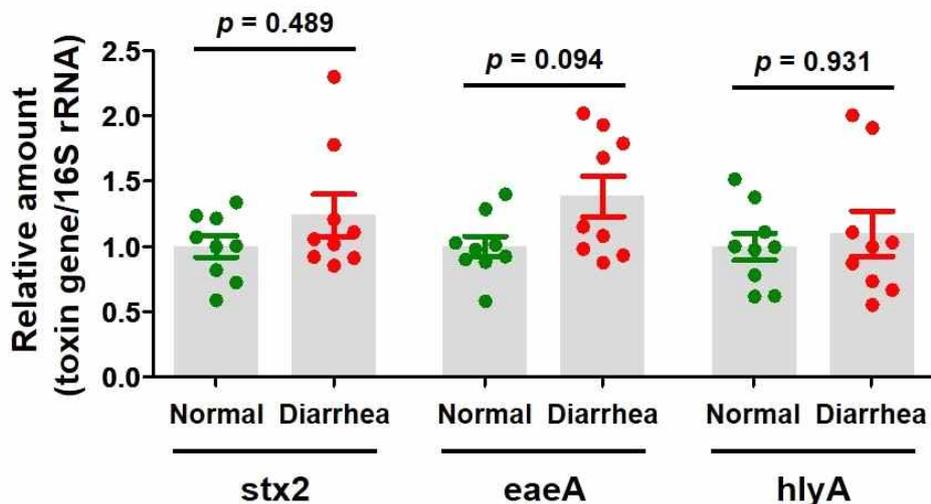


그림 26. qPCR 기법을 적용한 *E. coli*의 양적 차이 확인

- 건강/설사 송아지 각각 5 마리를 대상으로 송아지의 분변 (feces), 사료 (feed pellet), 물 (water), 톱밥 (bedding), 모유 (maternal milk), 어미 분변 (maternal feces)을 샘플링하였음 (그림 27).



그림 27. 송아지 사육환경 샘플링

- Quantitative PCR 기법을 적용하여 Shiga toxin type 2 (*stx2*), enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7-specific intimin (*eaeA*), and plasmid-encoded enterohemolysin (*hlyA*)의 양적인 차이를 확인한 결과 설사 증세 및 건강한 송아지의 환경적 요인에 의한 미생물 전달이 송아지 설사를 유발하는 직접적인 요인이 아님을 확인하였음. (그림 28).

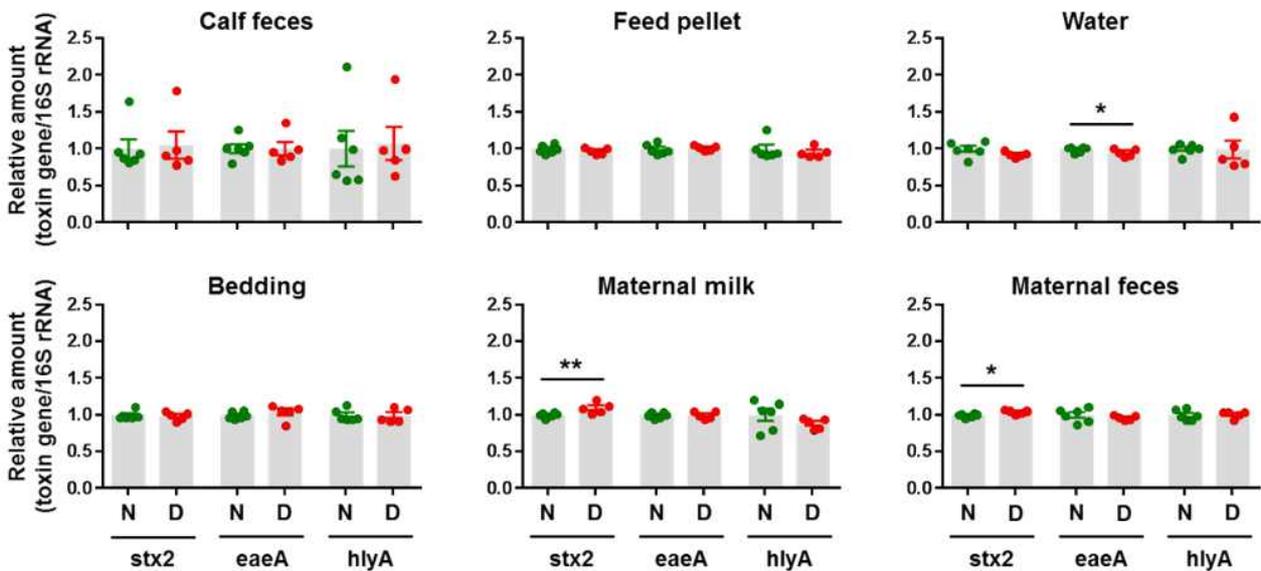


그림 28. qPCR 기법을 적용한 *E. coli*의 양적 차이 확인

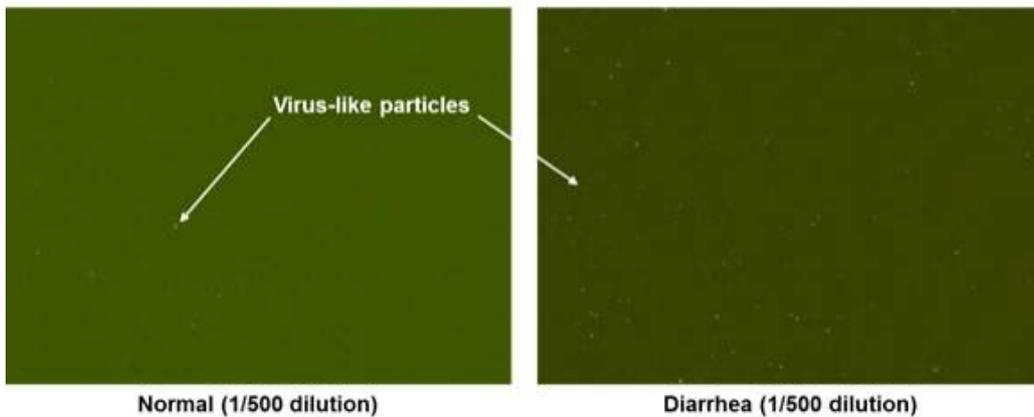
#### 4. 설사/건강 송아지 대상 gut virus particle 분리/대용량염기서열 분석

- 설사 및 건강한 송아지의 분변에서 total RNA를 추출하여 Illumina Hiseq을 이용해 RNA-seq을 수행함. RNA 바이러스 분석을 위해 본 연구팀에서 구축한 최적의 파이프라인 (Trimmomatic-Ribosomal RNA removal(SortMeRNA)-Assignment to Refseq(Blastn))을 이용해서 바이러스 전사체 군집 분석을 수행하여 Bacteriophage 관련 유전자를 제시함 (그림 29).



그림 29. 설사 및 건강 송아지의 분변 Bacteriophage 관련 유전자 패턴

- Virus-like particles (VLPs)를 광학현미경을 이용해서 계수한 결과 설사 송아지의 분변 샘플에서 VLPs의 양적 증가를 확인함 (그림 30).



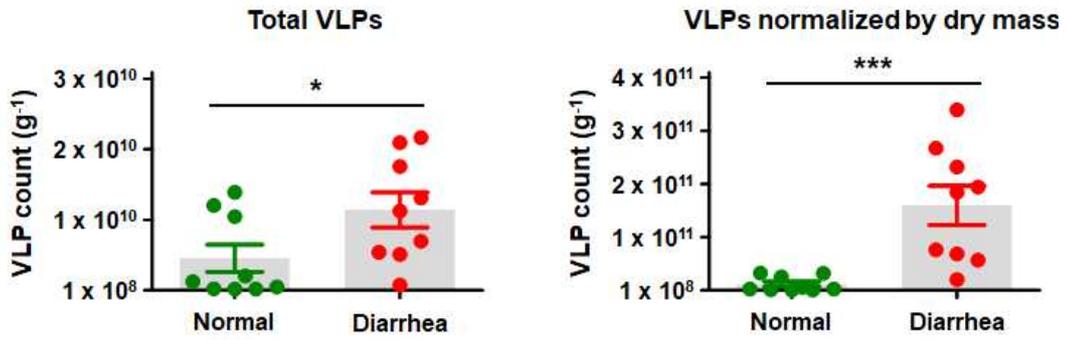


그림 30. VLPs 계수 결과

- 숙주(bovine) 전사체 분석을 수행함. 설사/건강 송아지의 서로 다른 패턴의 전사체 군집을 확인함 (그림 31).

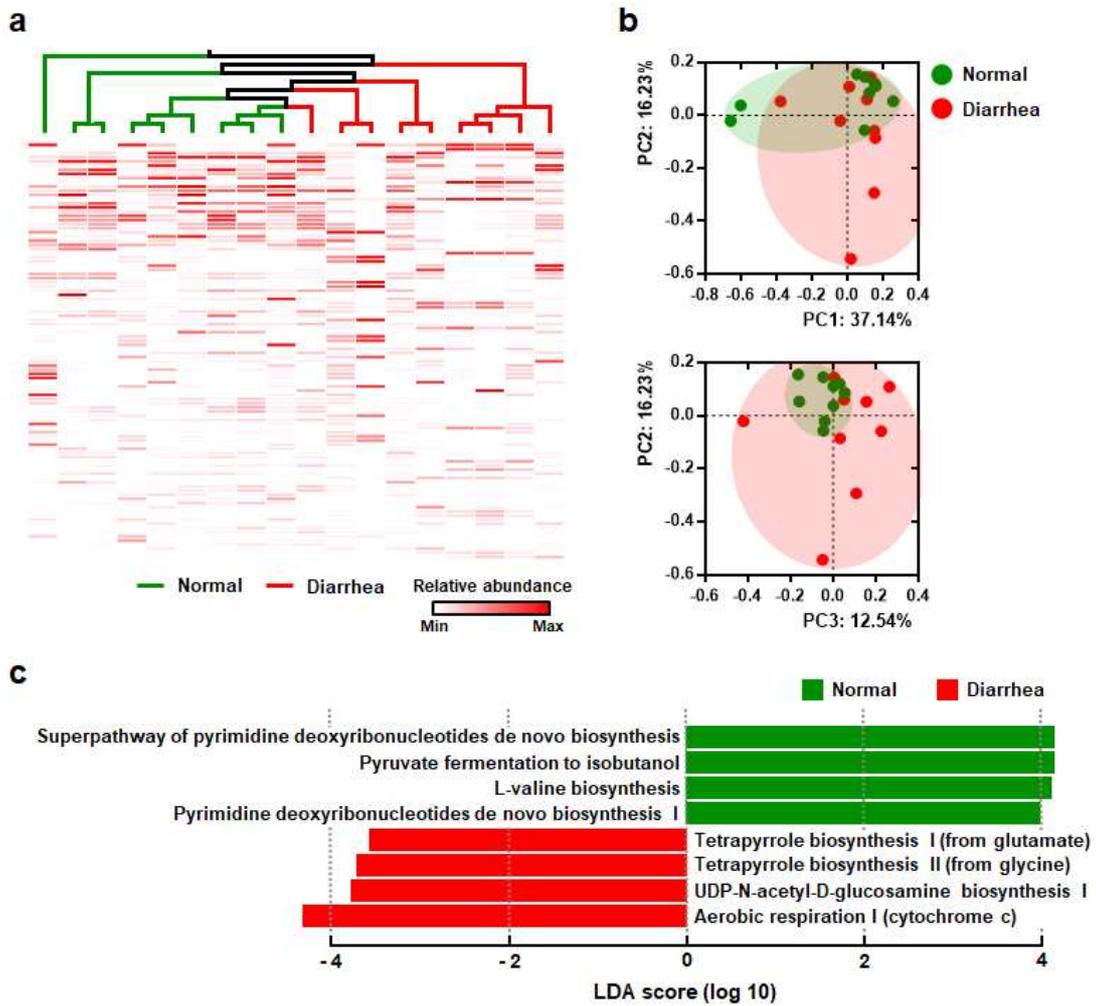


그림 31. Bovine 숙주의 전사체 군집

- Bacteria의 메타전사체 군집 분석을 수행함. 미생물의 대사 및 면역반응과 관련된 pathway가 설사 그룹에서 높음을 확인함 (그림 32).

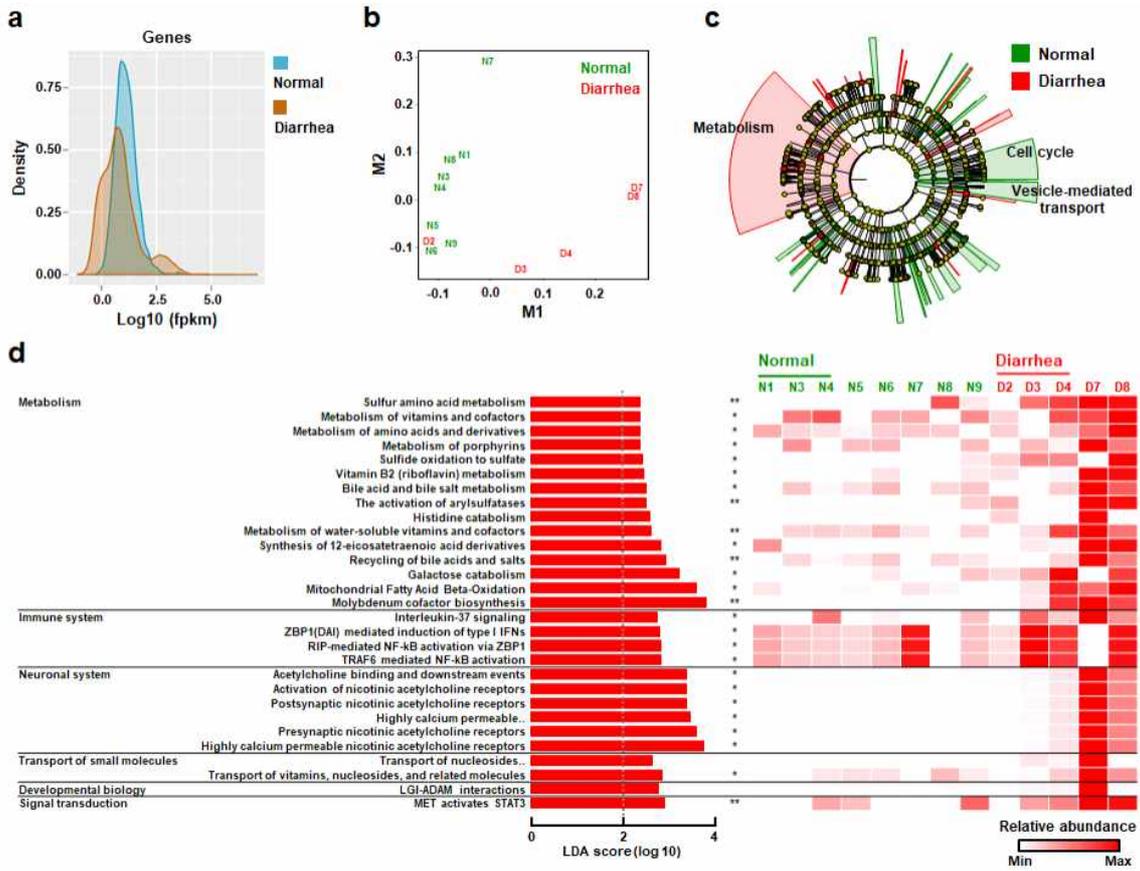
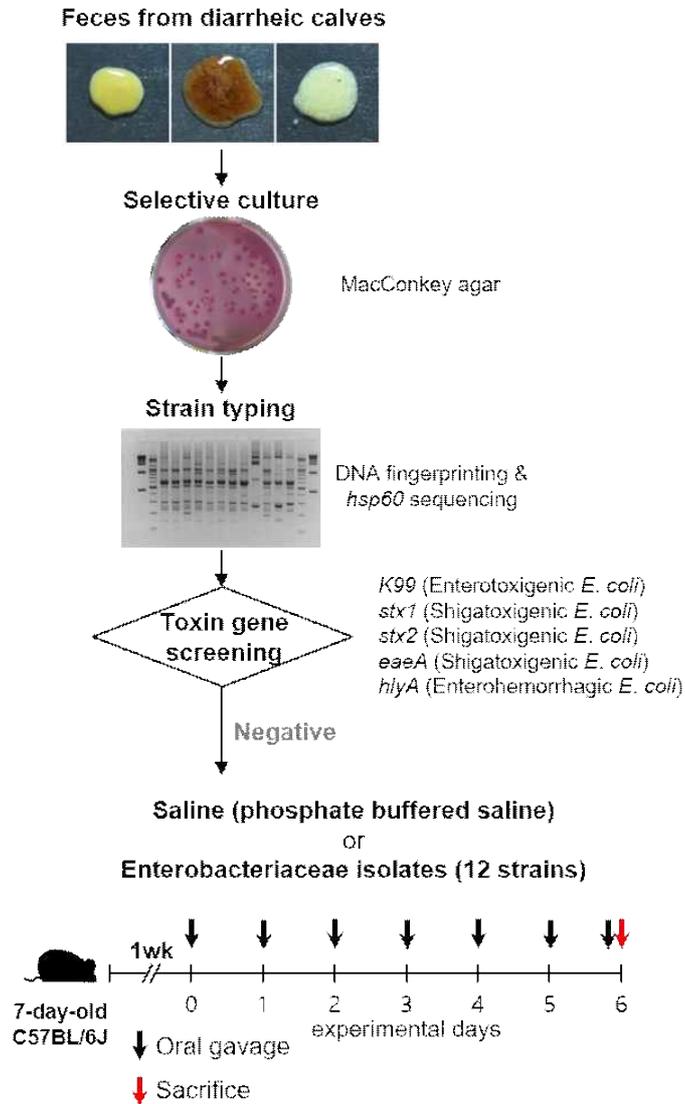


그림 32. 미생물 메타전사체 군집 분석

## 5. 송아지 설사 원인 규명을 위한 인과관계 증명

- 송아지 설사의 원인이 *Enterobacteriaceae*의 bloom에 의한 것인지 인과관계를 증명하기 위해 마우스모델을 구축하였음 (그림 33).



**그림 33. 송아지 설사 원인 규명을 위한 인과관계 증명을 위한 마우스모델 구축**

- 설사 송아지의 분변을 MacConkey agar plate에 접종하여 67 *Enterobacteriaceae* isolates를 혐기조건에서 순수분리배양하였음. 16S rRNA gene sequence를 이용하여 identification을 진행한 결과 모든 strains이 *Escherichia fergusonii* or *Shigella flexneri*으로 판명됨.
- Toxin gene screening을 통해 non-toxigenic *Enterobacteriaceae* 31 strains을 확보함 (그림 34A). Housekeeping gene (*hsp60*) sequence and ERIC PCR을 동시에 진행하여 strain typing을 수행한 결과 최종적으로 12 strains이 서로 다름을 확인하였음 (그림 34B).

**A**

#ID	Label	Isolated condition	Taxonomy (similarity)	Toxin gene PCR	Status
1	Entero_1	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.34%)	N	Enterobacteriaceae mixture
2	Entero_2	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (98.96%)	N	Enterobacteriaceae mixture
3	Entero_3	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.93%)	N	Enterobacteriaceae mixture
4	Entero_4	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.59%)	P (stx1 and stx2)	Excluded (toxin gene positive)
5	Entero_5	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.93%)	N	Excluded (duplicated strain)
6	Entero_6	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.80%)	N	Enterobacteriaceae mixture
7	Entero_7	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.18%)	N	Enterobacteriaceae mixture
8	Entero_8	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.93%)	P (stx1, stx2, and hlyA)	Excluded (toxin gene positive)
9	Entero_9	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.93%)	N	Enterobacteriaceae mixture
10	Entero_10	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.38%)	N	Enterobacteriaceae mixture
11	Entero_11	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.66%)	N	Enterobacteriaceae mixture
12	Entero_12	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i>	N	Excluded (duplicated strain)
13	Entero_13	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i>	N	Excluded (duplicated strain)
14	Entero_14	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.73%)	N	Excluded (duplicated strain)
15	Entero_15	Aerobic	<i>Escherichia marmotae</i> (99.09%)	N	Excluded (duplicated strain)
16	Entero_16	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.61%)	N	Excluded (duplicated strain)
17	Entero_17	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (98.20%)	N	Excluded (duplicated strain)
18	Entero_18	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.71%)	N	Excluded (duplicated strain)
19	Entero_19	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.88%)	N	Excluded (duplicated strain)
20	Entero_20	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.36%)	N	Excluded (duplicated strain)
21	Entero_21	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (98.95%)	N	Excluded (duplicated strain)
22	Entero_22	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.61%)	N	Excluded (duplicated strain)
23	Entero_23	Aerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.49%)	N	Excluded (duplicated strain)
24	Entero_24	Aerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.11%)	N	Excluded (duplicated strain)
25	Entero_25	Anaerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.73%)	P (stx1, stx2, and hlyA)	Excluded (toxin gene positive)
26	Entero_26	Anaerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.93%)	P (stx1 and stx2)	Excluded (toxin gene positive)
27	Entero_27	Anaerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.93%)	N	Enterobacteriaceae mixture
28	Entero_28	Anaerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.93%)	N	Enterobacteriaceae mixture
29	Entero_29	Anaerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.93%)	N	Enterobacteriaceae mixture
30	Entero_30	Anaerobic	<i>Shigella flexneri</i> (99.32%)	N	Excluded (duplicated strain)
31	Entero_31	Anaerobic	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.59%)	N	Enterobacteriaceae mixture

**B**

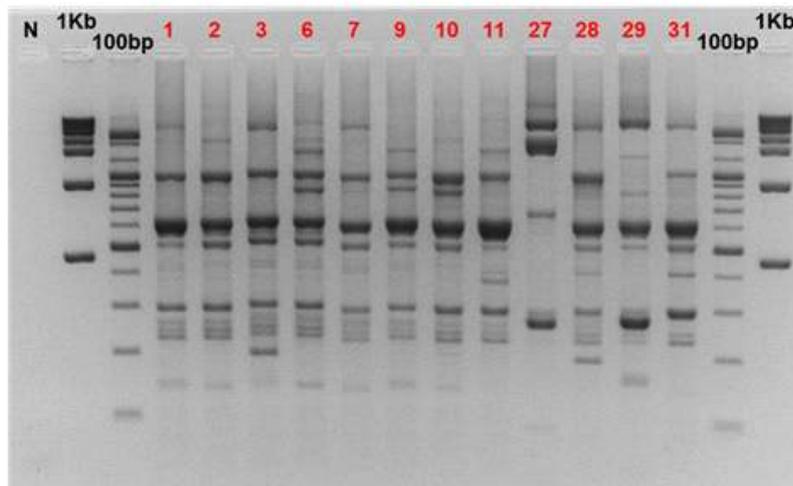


그림 34. 혐기순수분리배양을 통해 확보한 non-toxicogenic *Enterobacteriaceae* strains

- Non-toxicogenic *E. coli* 12 strains을 건강한 7-day-old C57BL/6J mice에 경구를 통해 투여하여 설사 유발여부를 확인함. 29마리의 마우스를 대상으로 14마리는 saline buffer를 15마리는 *Enterobacteriaceae* mixture를 경구로 투여하였음. *Enterobacteriaceae* mixture를 투여받는 마우스그룹에서 체중의 감소 (그림 35B)와 함께 설사 (그림 35C)가 나타남이 확인되었음 (그림 35).

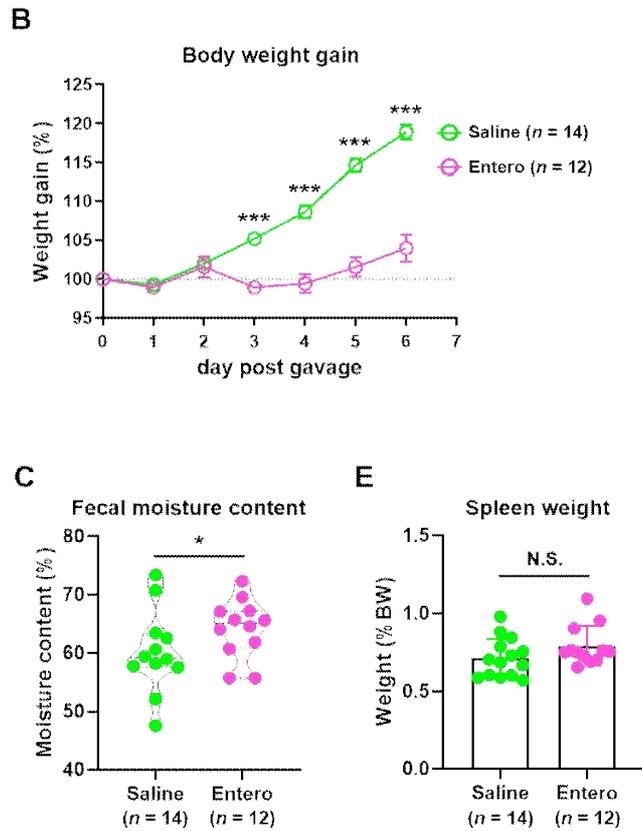


그림 35. 마우스 체중 변화 및 분변 내 수분함량

- 또한 대장의 길이도 *Enterobacteriaceae* mixture를 투여받는 마우스그룹에서 짧아지는 현상이 관찰되었음 (그림 36).

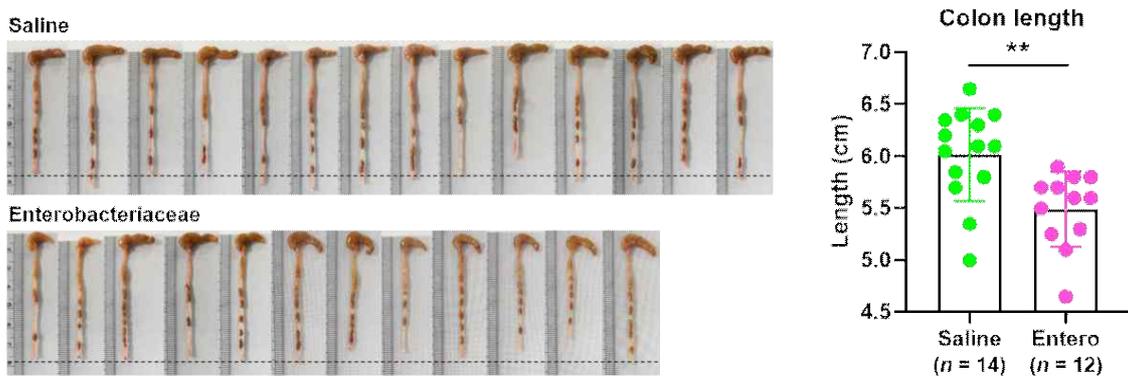


그림 36. 마우스 대장 길이

- 위 연구를 통해 2021년 3월 mSystems(2020IF=6.496)저널에 설사 송아지의 숙주 전사체, 장내 박테리아 전사체, 장내 박테리아 군집을 분석하여 장내 *Enterobacteriaceae* family 및 lytic bacteriophages의 증가가 송아지 설사의 원인임을 새롭게 제시하였음.

○ 대변무리이식을 통한 송아지 설사 완화 연구

1. 우수한 분변 공여 송아지 선별 및 대변 용액 준비

- 경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 송아지 대상 건강한 송아지 대변무

리이식(fecal microbiota transplantation, FMT) 시술을 위해 설사 증세를 나타내지 않는 건강한 대변 공여(fecal donor) 송아지를 선별함. 우수한 분변 공여 송아지를 선별하기 위해 3단계에 걸친 심사를 실시하였음. 송아지의 질병 유무, 외형, 성격을 토대로 우수한 송아지를 1차로 선별함. 생후 3주 이상의 송아지를 우선적으로 선별하였으며, 생후 3주 이하 혹은 2개월 이상의 송아지는 제외함. 가축전염병, 설사, 호흡기와 같은 질병에 노출되지 않은 송아지를 선별함. 또한 코, 입 주변, 귀, 털, 엉덩이, 꼬리, 영양상태가 우수한 송아지를 선발함. 항생제를 투여 받은 경험이 있는 송아지는 제외하였음 (그림 37).



그림37. 1차 분변 공여 송아지 선별과정

- 우수한 분변 공여 송아지를 선별하기 위해 2차 심사를 실시하였음. 송아지의 직장 내 분변을 채집하여 fecal consistency score를 토대로 score 3-4에 해당하지 않는 송아지들은 후보군에서 제외하였음 (그림 38).

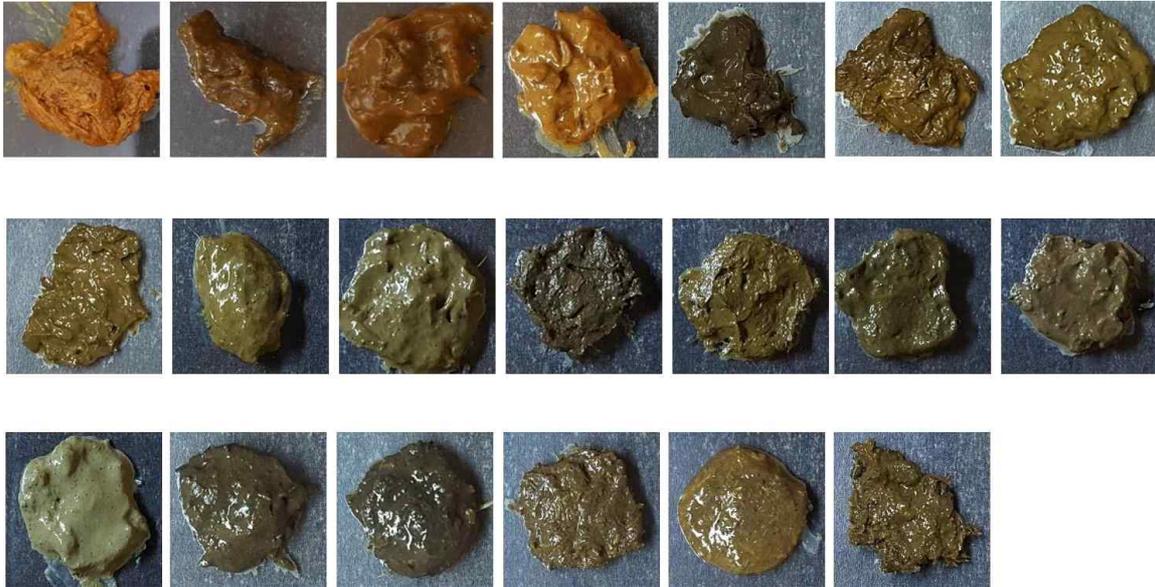


그림 38. Fecal consistency score를 기반으로 한 2차 선별

- 우수한 분변 공여 송아지를 선별하기 위해 3차 심사를 실시하였음. 2단계에서 선별된 분변 샘플에서 diagnostic PCR 기법을 적용하여 설사를 유발하는 RNA viruses & pathogenic bacteria의 감염 여부를 확인하고, 감염된 분변은 모두 폐기하였음. 3단계에 걸친 심사를 통해서 최종적으로 5마리의 분변 공여 송아지를 확보하였음 (그림 39).

Number	Target virus	Target gene	
1	Group A rotavirus		Virus
2	Group A rotavirus	VP7	
3	Group B rotavirus	VP7	
4	Group C rotavirus	VP6	
5	Bovine coronavirus	N	
6	Bovine coronavirus	S	
7	Bovine torovirus	M	
8	Bovine torovirus	N	
9	Bovine norovirus	RdRp	
10	Bovine enteric Nebraska-like calicivirus	RdRp-MCP	Bacteria
11	Bovine nebovirus	Capsid	
12	Bovine viral diarrhea virus		
13	Bovine viral diarrhea virus		
14	Bovine viral diarrhea virus	Polyprotein	
15	<i>Clostridium perfringens</i>	16S rRNA gene	
16	<i>Clostridium perfringens</i>	alpha-toxin genes	
17	<i>Cryptosporidium parvum</i>		
18	<i>Salmonella enterica</i>	sefb	
19	<i>Salmonella Typhimurium</i>	rfbJ	

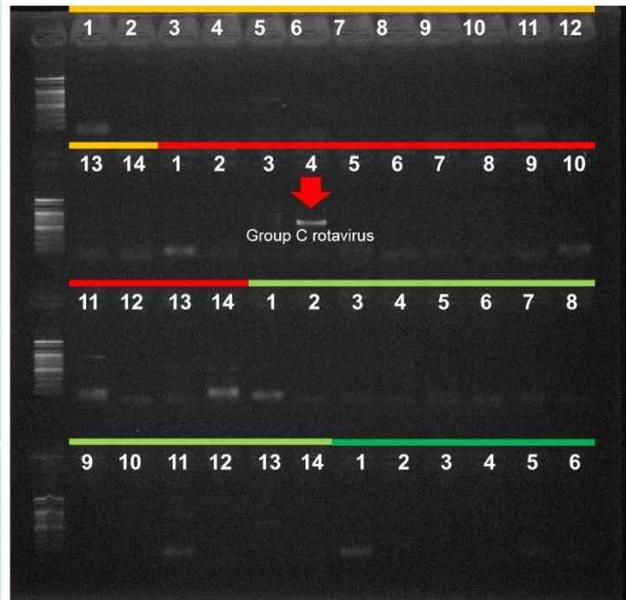


그림 39. Diagnostic PCR 기법을 활용한 3차 선별

- 대변무리이식 시술은 4% 전해질, 10%의 glycerol이 포함된 용액에 10%의 선별된 분변을 현탁하여 농장에 비치된 냉동고에 보관하고, 시술 한 시간 전에 물중탕을 이용해서 녹인 후 설사 송아지의 경구를 통해서 총 5번에 걸쳐서 시행됨 (그림 40).

<b>Total 83.74g</b>	
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

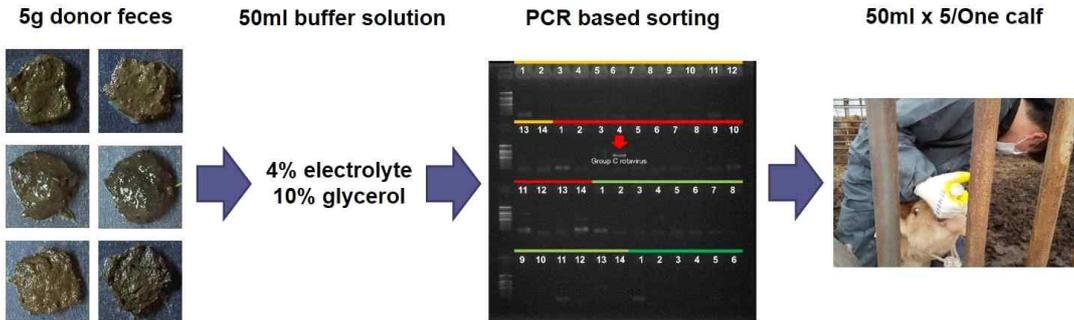


그림 40. 분변 이식을 위한 준비과정

## 2. 설사 송아지 대상 대변무리이식 효능 평가

- 경상북도 의성군 비안면에 위치한 초원농장에서 설사 송아지 대상 건강한 송아지 대변무리이식(fecal microbiota transplantation, FMT) 시술을 위해 생후 이유 전 설사하는 송아지 73마리를 대상으로 분변이식(32)/전해질 투여(18)/항생제 투여(23) 그룹으로 나누어 각각의 시술을 진행하였음 (그림 41).

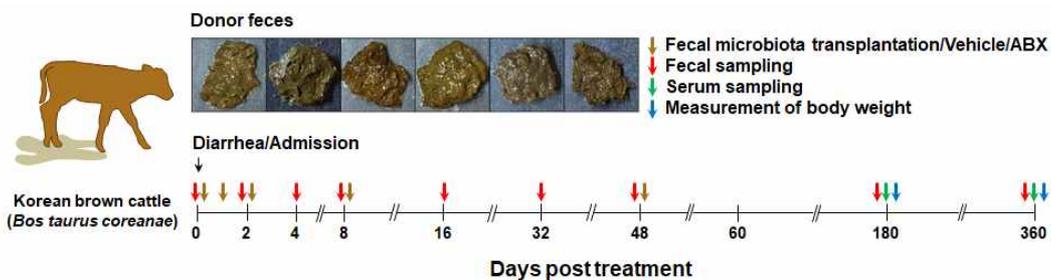


그림 41. 설사 송아지 대상 대변무리이식 연구 계획

- 시술 후 송아지들의 분변을 채집하여 시간의 경과에 따른 분변의 상태를 모니터링 함으로써 송아지 설사 증세가 개선되는지를 평가함. 대변무리이식 시술 전과 비교하여 대변무리이식 시술 8 일차 경과 시점부터 분변의 상태가 호전되었지만(E) 전해질(C)/항생제(D) 투여 대조군 송아지에서는 설사 증세의 개선이 없었음 (그림 42).

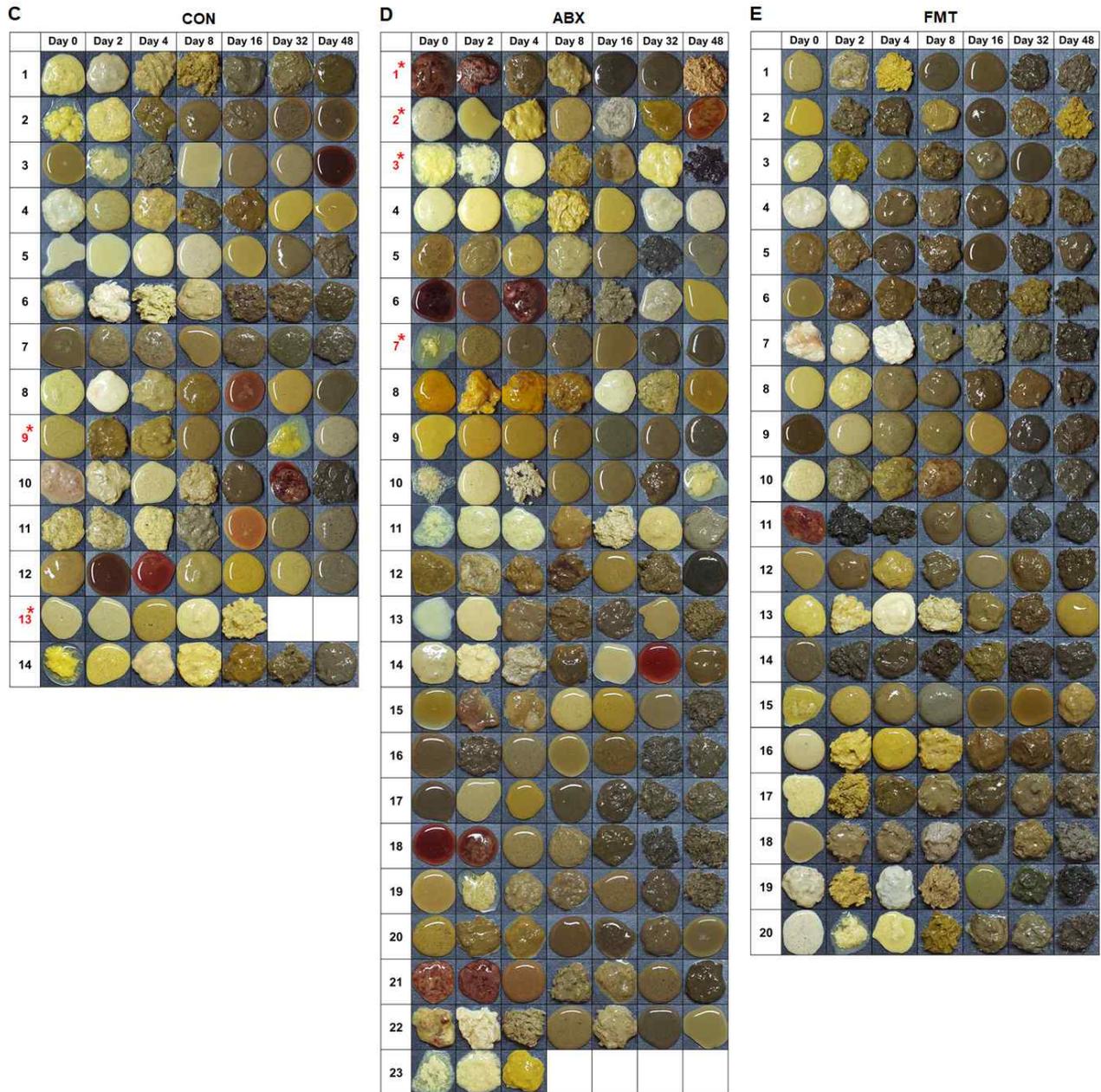


그림 42. 시간에 따른 송아지 분변 모니터링

- Bristol stool scale를 통해 분변의 상태를 1-7단계로 수치화하여 평가한 결과 분변이식송아지 그룹에서 대변무리이식 이후 통계적으로 유의한 수치로 분변 내 수분 함량이 감소함을 확인하였음 (그림 43).

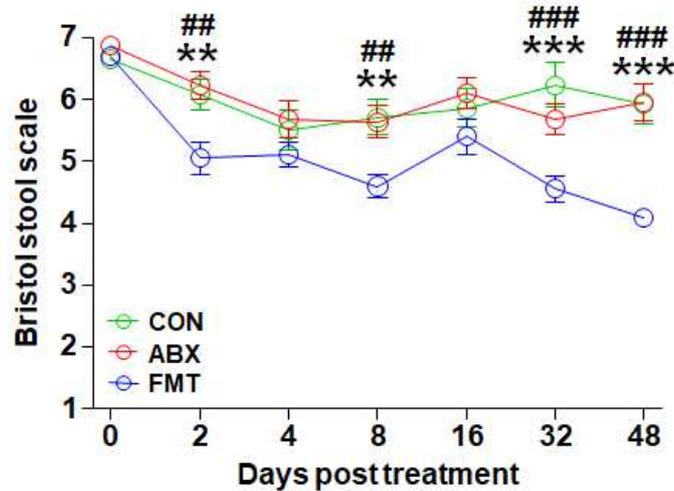


그림 43. Bristol stool scale

- 전해질 투여 송아지그룹과 항생제 투여 송아지그룹의 경우 각각 14.3% (2/14), 17.4% (4/23)에 해당하는 개체가 폐사하였지만 대변이식 송아지그룹은 폐사개체가 없었음 (표 6). 투여 후 48일차에 설사 증세의 개선비율을 수치화 한 결과 전해질 투여 (35.7%) 및 항생제 투여 (26.1%) 송아지그룹과 비교해서 월등히 높은 개체 (95%)에서 설사 증세의 완전한 개선이 나타남.

표 6. 설사 송아지 폐사율 및 완치율

CON	% Percentage (n)
Mortality rate	14.3% (2/14)
Complete remission rate	35.7% (5/14)
ABX	% Percentage (n)
Mortality rate	17.4% (4/23)
Complete remission rate	26.1% (6/23)
FMT	% Percentage (n)
Mortality rate	0% (0/20)
Complete remission rate	95.0% (19/20)

### 3. 대변무리이식/전해질/항생제 투여 송아지의 장내미생물 군집 변화 확인

- 분변이식(32)/전해질 투여(18)/항생제 투여(23) 그룹 송아지의 투여 전, 투여 후 2, 4, 8, 16, 32, 48일차의 직장 내 분변을 샘플링하여 최종적으로 400개의 송아지 분변 샘플을 확보하고, Illumina MiSeq을 이용하여 채집된 시료의 미생물 군집을 확인하였음. 400 샘플을 대상으로 총 20.2G의 메타유전체 시퀀스를 확보하였음 (표 7).

표 7. 16S rRNA gene를 타겟으로 한 송아지의 분변 메타 유전체 확보

Samples	Days	Raw reads (F+R)	Joined reads	Filtered reads	Chimera removed	Singleton removed	Sub-sampled
CON 1	Day 0	249280	96613	94117	77044	74669	35000
CON 2		219392	95322	93368	68090	65894	35000
CON 3		152842	75124	72798	67017	66516	35000

CON 4		247938	92956	90691	68570	66006	35000
CON 5		239097	94951	91831	86748	85636	35000
CON 6		193736	97234	94481	83219	80774	35000
CON 7		189582	80559	77924	65147	64128	35000
CON 8		207642	84433	81882	58385	54947	35000
CON 9		204918	86726	84908	59856	54321	35000
CON 10		209846	90374	87658	65945	63238	35000
CON 11		198984	74649	72022	61458	60192	35000
CON 12		245680	106283	103556	63260	64781	35000
CON 13		228938	93073	90908	67013	60807	35000
CON 14		219650	84142	81225	54472	51122	35000
CON 1	Day 2	234768	83528	81373	61079	58034	35000
CON 2		224788	95987	93792	70025	67817	35000
CON 3		200906	72883	70382	59983	59212	35000
CON 4		277813	105749	103010	74212	71456	35000
CON 5		218658	83932	81475	70132	68854	35000
CON 6		298305	100274	97201	84099	81223	35000
CON 7		201058	85499	82782	67905	66620	35000
CON 8		249828	98028	94861	64094	59195	35000
CON 9		214864	92824	90630	61357	56531	35000
CON 10		170064	73828	71764	57897	55921	35000
CON 11		178568	81632	78470	70082	69938	35000
CON 12		234782	100167	97386	60038	69068	35000
CON 13		231200	98233	95958	70566	56128	35000
CON 14		232358	90401	87205	53241	49078	35000
CON 1	Day 4	218555	84095	82234	62169	59452	35000
CON 2		204808	88886	86919	67670	67331	35000
CON 3		249682	87512	85491	67677	66348	35000
CON 4		197222	76670	74683	47448	44999	35000
CON 5		232487	86753	84639	70207	69138	35000
CON 6		228502	85402	82867	73000	70774	35000
CON 7		192058	78683	76600	61116	59369	35000
CON 8		168925	74345	72112	46594	43131	35000
CON 9		366512	157271	153956	113238	105192	35000
CON 10		197382	90961	88176	72121	70312	35000
CON 11		177852	64599	62206	53754	52631	35000
CON 12		227056	96333	94222	56558	73687	35000
CON 13		205530	87678	85799	75073	53527	35000
CON 14		235258	92571	89432	56720	52763	35000
CON 1	Day 8	167875	64114	62193	38901	36350	35000
CON 2		204564	84285	82583	60567	58914	35000
CON 3		232358	96583	94397	64874	62090	35000
CON 4		198846	81454	79512	63749	61858	35000
CON 5		306058	102212	99468	80812	79352	35000
CON 6		197958	84855	82488	64862	62320	35000
CON 7		236985	94516	91424	71886	68992	35000
CON 8		198535	82333	80122	53844	51425	35000
CON 9		221030	94133	92008	64384	60809	35000
CON 10		198228	79282	76864	58068	55794	35000
CON 11		235809	89138	86508	63982	61245	35000
CON 12		194428	78891	77086	59268	43439	35000
CON 13		225088	95265	93250	55620	45452	35000
CON 14		179826	78819	76406	49289	45113	35000
CON 1	Day 16	189358	80708	78637	49427	46440	35000
CON 2		183172	76270	74732	56514	55031	35000
CON 3		197853	77851	76018	54882	51560	35000
CON 4		201548	81873	79667	52376	49642	35000
CON 5		241459	93996	91361	63558	61023	35000
CON 6		300062	100056	97306	65316	63081	35000
CON 7		389851	156820	153407	98665	87893	35000
CON 8		155652	52304	50624	42541	39814	35000
CON 9		223102	95145	92836	56839	49269	35000
CON 10		218051	71518	69447	48453	46053	35000
CON 11		279638	87779	85048	61517	58678	35000
CON 12		227134	98400	96438	76226	67987	35000
CON 13		262924	109637	107362	73144	69793	35000
CON 14		278514	89445	86735	54867	51676	35000
CON 1	Day 32	277148	96044	93760	62504	57922	35000
CON 2		198984	85219	83162	53899	50747	35000
CON 3		283695	103136	100399	64729	59864	35000
CON 4		238758	90089	88072	56684	52330	35000
CON 5		242415	94052	91660	76414	64499	35000
CON 6		190085	83561	81460	52920	49566	35000
CON 7		183852	75984	73818	52904	48371	35000
CON 8		290058	100138	97240	78993	77313	35000
CON 9		223240	95175	93362	55568	46632	35000
CON 10		231554	81668	79270	61680	59806	35000
CON 11		235961	80534	77839	49131	45482	35000
CON 12		196402	85187	83377	50361	46740	35000

CON 14		205485	77059	75293	54268	52402	35000
CON 1	Day 48	205682	77278	75368	48746	44693	35000
CON 2		232214	98982	97107	66021	62836	35000
CON 3		250283	90061	87959	56992	52383	35000
CON 4		244542	89164	86977	57254	53565	35000
CON 5		248558	90089	87072	55684	40744	35000
CON 6		223698	82286	79898	45131	39698	35000
CON 7		203625	74547	72225	46466	35290	35000
CON 8		200748	74244	71803	67716	41036	35000
CON 9		368688	142300	141140	83193	70241	35000
CON 10		191925	81632	78470	70494	43200	35000
CON 11		169875	76801	74501	46342	40603	35000
CON 12		174032	74876	73092	43983	45527	35000
CON 14		168580	73759	71804	48175	43868	35000
ABX 1	Day 0	170251	68062	66557	49312	46424	35000
ABX 2		253852	98284	96665	82764	81747	35000
ABX 3		277785	105021	102912	91629	90611	35000
ABX 4		236302	103393	102253	73045	71657	35000
ABX 5		264536	99241	97733	84579	82733	35000
ABX 6		179514	79917	78534	65583	64582	35000
ABX 7		168944	76639	75678	57118	55330	35000
ABX 8		201268	91450	90008	70431	69224	35000
ABX 9		275682	100637	99508	68284	65426	35000
ABX 10		294790	167775	166333	106468	95777	35000
ABX 11		209256	90925	89818	58985	54524	35000
ABX 12		181932	80006	79097	51461	48333	35000
ABX 13		236996	103734	102631	72905	71083	35000
ABX 14		188830	84223	83008	49490	45928	35000
ABX 15		201570	90919	89552	63392	61189	35000
ABX 16		296300	93558	92007	67510	63357	35000
ABX 17		112640	50822	50084	38271	37908	35000
ABX 18		283675	102420	101190	77416	74532	35000
ABX 19		237951	92993	91625	79956	78762	35000
ABX 20		250052	101954	100610	77049	74841	35000
ABX 21		199583	86228	84633	77162	76067	35000
ABX 22		210748	84244	79803	59744	57716	35000
ABX 23		342338	131466	130335	92732	86895	35000
ABX 1	Day 2	297868	103697	101945	71233	65329	35000
ABX 2		286920	88452	87031	72504	71177	35000
ABX 3		246005	82189	80457	73778	73013	35000
ABX 4		198130	79482	78528	56173	55015	35000
ABX 5		293572	103088	101573	79716	76872	35000
ABX 6		204584	92488	91131	77163	76390	35000
ABX 7		193382	86781	85479	72697	71540	35000
ABX 8		241662	109808	108226	77486	75192	35000
ABX 9		186962	79367	78483	55665	53925	35000
ABX 10		183548	82726	81693	51002	46671	35000
ABX 11		198556	87340	86306	54245	51325	35000
ABX 12		184406	81610	80656	55834	53245	35000
ABX 13		202016	86760	85736	53767	52400	35000
ABX 14		184080	83088	81852	41492	37264	35000
ABX 15		201484	91393	90274	59742	57102	35000
ABX 16		265824	88061	86863	63653	59511	35000
ABX 17		222214	75118	74563	50944	49506	35000
ABX 18		240953	94396	93231	68348	64295	35000
ABX 19		208594	76292	75082	65930	64840	35000
ABX 20		212739	85949	84997	63809	61157	35000
ABX 21		251957	92135	90662	75731	74357	35000
ABX 22		244052	111954	100515	87049	84841	35000
ABX 23		234108	96311	95449	73294	71395	35000
ABX 1	Day 4	185220	81458	80408	61741	57452	35000
ABX 2		170598	78160	77020	58229	55815	35000
ABX 3		190542	92802	91133	76032	74020	35000
ABX 4		179554	77659	76617	51667	50263	35000
ABX 5		199372	99825	97901	90429	89032	35000
ABX 6		228896	103682	102362	72656	70350	35000
ABX 7		181792	82457	81390	58772	56580	35000
ABX 8		203440	92249	91147	61465	59322	35000
ABX 9		193572	85932	85036	64448	62807	35000
ABX 10		192298	85757	84591	58896	54925	35000
ABX 11		193764	85346	84273	58840	56602	35000
ABX 12		184006	82434	81429	48457	45049	35000
ABX 13		211820	92351	91153	57377	55637	35000
ABX 14		204312	91883	90823	65898	63110	35000
ABX 15		219172	86258	85443	54098	49188	35000
ABX 16		290758	100943	99578	78606	75016	35000
ABX 17		234210	94716	93983	67046	64454	35000
ABX 18		200950	84790	83782	55986	51533	35000
ABX 19		181050	76059	74583	62043	61100	35000

ABX 20		190682	82136	81006	56618	52874	35000
ABX 21		187575	77081	75925	60404	58775	35000
ABX 22		230953	96391	92231	67348	63295	35000
ABX 23		412520	168298	166952	117145	112589	35000
ABX 1	Day 8	200985	88301	86794	62239	58684	35000
ABX 2		266654	106835	105271	81648	78584	35000
ABX 3		183575	87530	86239	66042	64195	35000
ABX 4		183514	82431	81264	48580	45473	35000
ABX 5		301928	123581	121993	108597	104628	35000
ABX 6		180488	80713	79708	51594	49290	35000
ABX 7		205284	90750	89751	57966	55482	35000
ABX 8		258964	98201	97254	74517	71920	35000
ABX 9		169130	76253	75376	49424	46995	35000
ABX 10		186954	84059	82965	56121	52726	35000
ABX 11		183442	83596	82452	50077	46392	35000
ABX 12		172364	76542	75616	48007	45129	35000
ABX 13		171756	77457	76478	53512	49460	35000
ABX 14		164322	66289	65742	38772	35564	35000
ABX 15		248946	87601	86465	61643	58113	35000
ABX 16		228724	98136	97240	58414	54879	35000
ABX 17		298465	90856	89537	64627	60983	35000
ABX 18		296555	93122	91663	78309	77156	35000
ABX 19		247465	85955	84787	56399	52929	35000
ABX 20		289652	101081	99552	70469	67841	35000
ABX 21		221829	95351	92153	56887	54637	35000
ABX 22		182002	83681	82616	62733	60565	35000
ABX 1	Day 16	210951	88480	87093	57718	52946	35000
ABX 2		255231	94678	93490	68438	63851	35000
ABX 3		258471	92583	91257	64461	61529	35000
ABX 4		163754	73295	72312	41655	38819	35000
ABX 5		251872	103606	102366	81266	78715	35000
ABX 6		199256	88886	86919	65939	65578	35000
ABX 7		190036	83918	82981	56270	53080	35000
ABX 8		198758	89776	88590	58712	54266	35000
ABX 9		225216	88625	87991	63284	58443	35000
ABX 10		181262	82008	81027	56037	49807	35000
ABX 11		343576	143512	142246	91516	85318	35000
ABX 12		212760	94620	93364	58294	54564	35000
ABX 13		187408	85585	84643	58083	53778	35000
ABX 14		272678	90546	89964	60981	57132	35000
ABX 15		190825	81152	80080	55134	51476	35000
ABX 16		257796	101688	100981	63010	59462	35000
ABX 17		237682	99059	97797	70761	66662	35000
ABX 18		222384	95302	93938	69627	67681	35000
ABX 19		193582	88999	87628	59529	56134	35000
ABX 20		189657	83472	82287	55758	53076	35000
ABX 21		251862	104646	100316	82266	75715	35000
ABX 22		208890	93155	91735	58699	56782	35000
ABX 1	Day 32	251452	82903	81811	60631	56527	35000
ABX 2		285342	100542	99148	77101	75849	35000
ABX 3		200568	99422	98048	79127	76985	35000
ABX 4		166054	71517	70548	44856	43485	35000
ABX 5		274852	82666	81724	68970	66943	35000
ABX 6		218460	94600	93041	78013	77400	35000
ABX 7		206372	92190	90968	59538	56064	35000
ABX 8		300154	101914	100730	67707	62721	35000
ABX 9		183594	80920	80032	52254	48454	35000
ABX 10		237334	106175	104850	64254	57294	35000
ABX 11		162738	73107	72333	43308	37776	35000
ABX 12		212280	94526	93400	63034	57934	35000
ABX 13		212378	93859	92322	59331	56721	35000
ABX 14		245460	83319	82617	52609	46649	35000
ABX 15		297585	97826	96595	75894	72338	35000
ABX 16		181330	71738	61391	44094	41209	35000
ABX 17		273542	89360	87866	54944	52018	35000
ABX 18		279845	87414	86232	59905	56656	35000
ABX 19		285712	97416	96092	64763	60021	35000
ABX 20		239582	75401	74246	45958	41503	35000
ABX 21		251552	103616	102111	80266	77715	35000
ABX 22		202456	91419	90077	56700	54107	35000
ABX 1	Day 48	246895	82302	81188	58262	53709	35000
ABX 2		289344	102574	101292	77809	75421	35000
ABX 3		189998	89057	102253	58054	55157	35000
ABX 4		182080	81619	80640	50012	45958	35000
ABX 5		257474	94880	93652	72042	69706	35000
ABX 6		186314	83853	82799	49992	45950	35000
ABX 7		183970	82050	81114	45459	38599	35000
ABX 8		312958	109411	108207	79184	73668	35000
ABX 9		195748	86136	85076	49975	43225	35000

ABX 10		247378	109875	108536	64638	55478	35000
ABX 11		233222	105557	104298	62633	54887	35000
ABX 12		170220	75671	74777	46679	41286	35000
ABX 13		184824	84138	83096	55451	52421	35000
ABX 14		240336	96823	95931	63544	55606	35000
ABX 15		255098	86521	85504	65655	62916	35000
ABX 16		223112	97264	96491	61777	57873	35000
ABX 17		241853	77565	76381	53275	50131	35000
ABX 18		302258	105802	104330	58928	54245	35000
ABX 19		301985	95907	94551	59730	54004	35000
ABX 20		300654	106389	104908	87319	85341	35000
ABX 21		218410	94601	93048	78016	76411	35000
ABX 22		192924	86571	85339	50700	46997	35000
Donor 1	-	300548	162670	161436	130752	136628	35000
Donor 2		515689	210753	207013	117741	116480	35000
Donor 3		500253	197380	194221	137213	122078	35000
Donor 4		386858	132433	129798	80097	55749	35000
Donor 5		437758	185182	181705	121953	91310	35000
Donor 6		300245	91645	88902	62485	54033	35000
FMT 1	Day 0	229842	70984	69571	56809	54894	35000
FMT 2		250932	97608	95492	72055	68837	35000
FMT 3		309008	96146	94271	78451	76519	35000
FMT 4		224196	75769	74664	52977	50383	35000
FMT 5		299878	95624	94076	77361	75843	35000
FMT 6		201542	65826	64124	53399	52448	35000
FMT 7		233638	70888	69782	48573	46758	35000
FMT 8		223624	73271	71633	61191	59735	35000
FMT 9		313568	103412	101588	82452	80178	35000
FMT 10		239341	88631	77751	61560	58023	35000
FMT 11		275845	83081	81373	66897	63686	35000
FMT 12		301572	100357	98427	65886	59783	35000
FMT 13		259594	87569	86214	55148	51148	35000
FMT 14		273386	88525	86908	67251	64992	35000
FMT 15		316952	107933	106280	71438	67713	35000
FMT 16		261140	86053	84675	59896	57593	35000
FMT 17		194160	66437	65401	52241	50187	35000
FMT 18		249686	87728	85831	72958	71398	35000
FMT 19		242416	80581	78860	69592	68386	35000
FMT 20		259272	84880	83437	59891	58057	35000
FMT 1	Day 2	297422	111713	109567	87038	84588	35000
FMT 2		199360	78355	76825	63084	60559	35000
FMT 3		266158	77607	76027	63145	61729	35000
FMT 4		239390	78631	77253	51560	48033	35000
FMT 5		299915	101793	100289	81626	80105	35000
FMT 6		239638	71579	70126	50560	48597	35000
FMT 7		238242	75877	74837	51883	49409	35000
FMT 8		231472	72467	71011	53565	51353	35000
FMT 9		253792	88226	86141	73529	71899	35000
FMT 10		228543	90382	82975	70352	65121	35000
FMT 11		257476	83913	82028	68782	66438	35000
FMT 12		287531	100016	98489	72091	67177	35000
FMT 13		257010	80619	79533	56145	52636	35000
FMT 14		242282	80896	79707	59255	57841	35000
FMT 15		268046	90702	89229	60413	57456	35000
FMT 16		266316	91942	90532	64273	61181	35000
FMT 17		255028	88732	87402	60121	56309	35000
FMT 18		244541	83039	80859	69982	68540	35000
FMT 19		240380	81783	80350	58367	57188	35000
FMT 20		236866	82666	81491	55540	53894	35000
FMT 1	Day 4	248740	97187	95392	73141	70420	35000
FMT 2		187764	76118	74519	60856	58682	35000
FMT 3		241278	89865	88233	59930	58258	35000
FMT 4		244562	81445	80183	50487	45952	35000
FMT 5		285853	104981	102912	69676	65823	35000
FMT 6		237585	93051	91137	59733	54302	35000
FMT 7		229116	75599	74395	53612	51098	35000
FMT 8		254875	68364	66740	47887	44853	35000
FMT 9		298235	95002	93085	74780	72713	35000
FMT 10		266835	98299	94196	76753	71863	35000
FMT 11		214654	66667	65395	47039	44374	35000
FMT 12		283756	81709	80001	49338	46480	35000
FMT 13		260418	72638	71708	51639	48327	35000
FMT 14		443818	187827	185843	105445	98067	35000
FMT 15		280842	94844	93541	60652	57096	35000
FMT 16		276454	92888	91403	66682	63660	35000
FMT 17		424366	163767	162518	110217	102831	35000
FMT 18		256358	88448	86741	62097	59844	35000
FMT 19		265082	87751	85921	73408	71973	35000

FMT 20		262956	83970	82237	66728	65490	35000
FMT 1	Day 8	202754	82112	80300	62350	59402	35000
FMT 2		228626	95133	93440	69020	65871	35000
FMT 3		284092	111479	109222	75116	70677	35000
FMT 4		236744	75361	74101	47483	43920	35000
FMT 5		293615	98504	96323	63991	59262	35000
FMT 6		289789	98341	96444	63692	58008	35000
FMT 7		497012	196557	194809	120579	114922	35000
FMT 8		231548	77531	75814	54700	51580	35000
FMT 9		265894	83767	82087	61051	57938	35000
FMT 10		237354	82118	71140	54324	50182	35000
FMT 11		288485	98588	96453	63382	58848	35000
FMT 12		276835	97299	95196	66753	61863	35000
FMT 13		249442	85312	83907	54092	50798	35000
FMT 14		246802	82570	81407	53839	48956	35000
FMT 15		308578	100247	98859	66146	63532	35000
FMT 16		249426	87204	85980	59858	56499	35000
FMT 17		227236	72372	71321	50450	47646	35000
FMT 18		301579	103991	101930	76482	71776	35000
FMT 19		280526	89797	88309	62523	60207	35000
FMT 20		322684	109209	107495	58761	55148	35000
FMT 1	Day 16	258490	102882	100911	70189	66006	35000
FMT 2		276964	111612	109549	78479	74628	35000
FMT 3		287200	114999	112914	72200	67288	35000
FMT 4		227354	72118	71140	44324	40182	35000
FMT 5		293985	97904	95936	72288	67470	35000
FMT 6		244689	89286	87467	54135	49074	35000
FMT 7		289682	97579	96008	58939	55032	35000
FMT 8		501236	215735	211163	146166	135146	35000
FMT 9		212539	79889	78431	53038	47932	35000
FMT 10		266885	96814	91121	67772	63580	35000
FMT 11		171524	58045	56983	36240	35545	35000
FMT 12		293156	109497	107237	71856	66968	35000
FMT 13		222518	60126	59428	46855	45498	35000
FMT 14		427232	169524	168102	104757	93261	35000
FMT 15		267056	88675	87327	57196	52522	35000
FMT 16		535634	200746	199021	137530	124064	35000
FMT 17		266698	80080	79050	53760	50839	35000
FMT 18		293754	109546	107356	69589	62478	35000
FMT 19		227124	77552	76071	52152	49552	35000
FMT 20		216010	69736	68409	41667	39843	35000
FMT 1	Day 32	258586	97394	95678	66389	61921	35000
FMT 2		272970	108984	107017	74094	69249	35000
FMT 3		296502	116657	114123	71898	66058	35000
FMT 4		243960	79519	78336	44931	39747	35000
FMT 5		242528	79467	78144	58666	57632	35000
FMT 6		202568	66572	65242	40255	35734	35000
FMT 7		260276	89820	88440	57805	52873	35000
FMT 8		277885	97854	96121	67832	63880	35000
FMT 9		223663	73357	72031	46573	42588	35000
FMT 10		268194	105683	102258	71996	68232	35000
FMT 11		284535	87264	85554	52413	47649	35000
FMT 12		212768	78700	77211	46729	39888	35000
FMT 13		250298	85447	84102	53931	48250	35000
FMT 14		451616	187645	186059	126524	117916	35000
FMT 15		551754	234605	232263	142846	131718	35000
FMT 16		327434	103835	102228	70414	64820	35000
FMT 17		258512	91300	89985	64910	60841	35000
FMT 18		273589	92887	91125	61723	54757	35000
FMT 19		241368	80132	78849	50960	47845	35000
FMT 20		621618	216113	214723	116490	99363	35000
FMT 1	Day 48	274252	98189	96439	67451	63934	35000
FMT 2		282396	105216	103573	77260	74800	35000
FMT 3		288194	105983	103958	72996	67232	35000
FMT 4		324006	102780	101365	69390	65764	35000
FMT 5		251215	96394	94703	62538	56247	35000
FMT 6		233690	83656	82016	52710	48583	35000
FMT 7		257824	87654	86334	54315	49719	35000
FMT 8		267444	91451	89569	57968	53058	35000
FMT 9		291228	93539	91522	59069	52227	35000
FMT 10		260271	99820	88455	67805	52843	35000
FMT 11		292954	95770	93827	59684	54075	35000
FMT 12		196865	79467	78144	59701	58456	35000
FMT 13		233092	70042	68985	46661	43185	35000
FMT 14		272502	79393	78480	61125	58861	35000
FMT 15		246174	82102	80766	52910	49097	35000
FMT 16		244770	78898	77551	48862	44264	35000
FMT 17		444628	179004	177662	121122	110397	35000
FMT 18		283134	104054	102237	56089	46943	35000

FMT 19	245688	84340	82992	54580	50402	35000
FMT 20	255628	81916	80644	42621	39380	35000

- 송아지의 장내미생물 군집 구조를 PCoA 분석법을 이용하여 확인함. 전해질 투여 송아지의 경우 전해질 투여 이후 시간이 경과함에 따라서 대변 공여 송아지 (Donor)의 장내미생물과 상이하지만 0일차에 분산된 형태의 장내미생물 군집 구조에서 48일차로 갈수록 점차 집중된 형태의 장내미생물 군집 구조를 형성하였음 (그림 44).

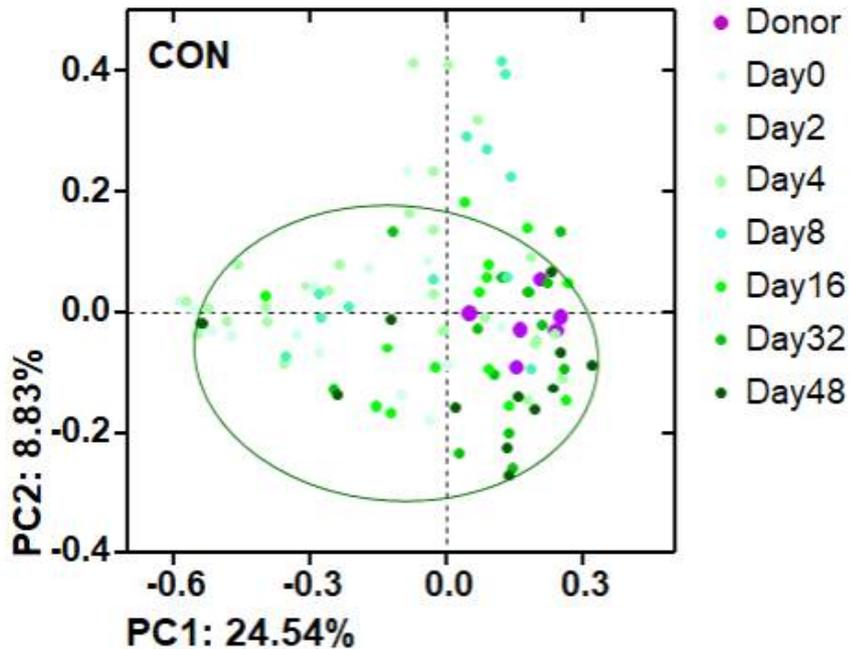


그림 44. 시간에 따른 전해질 투여 송아지 장내미생물 군집 변화

- 항생제 투여 송아지의 경우 항생제 투여 이후 시간이 경과함에 따라서 대변 공여 송아지 (Donor)의 장내미생물과 상이하고, 0일차에 분산된 형태의 장내미생물 군집 구조가 48일차에도 변함없이 형성되었음 (그림 45).

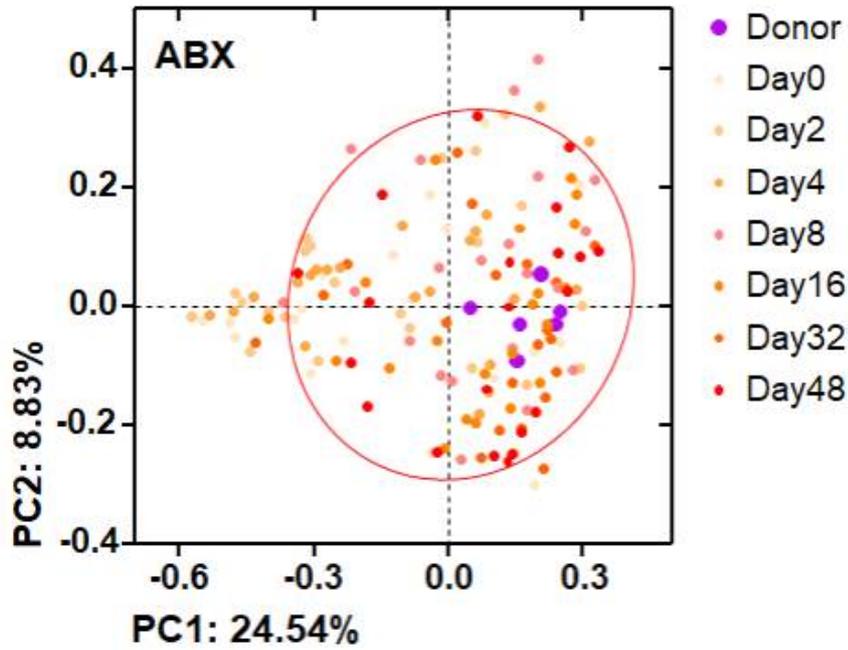


그림 45. 시간에 따른 항생제 투여 송아지 장내미생물 군집 변화

- 대변이식 송아지의 경우 대변무리이식 시술 이후 시간이 경과함에 따라서 대변 공여 송아지 (Donor)의 장내미생물과 유사한 장내미생물 군집 구조를 형성해 가는 과정을 확인함 (그림 46).

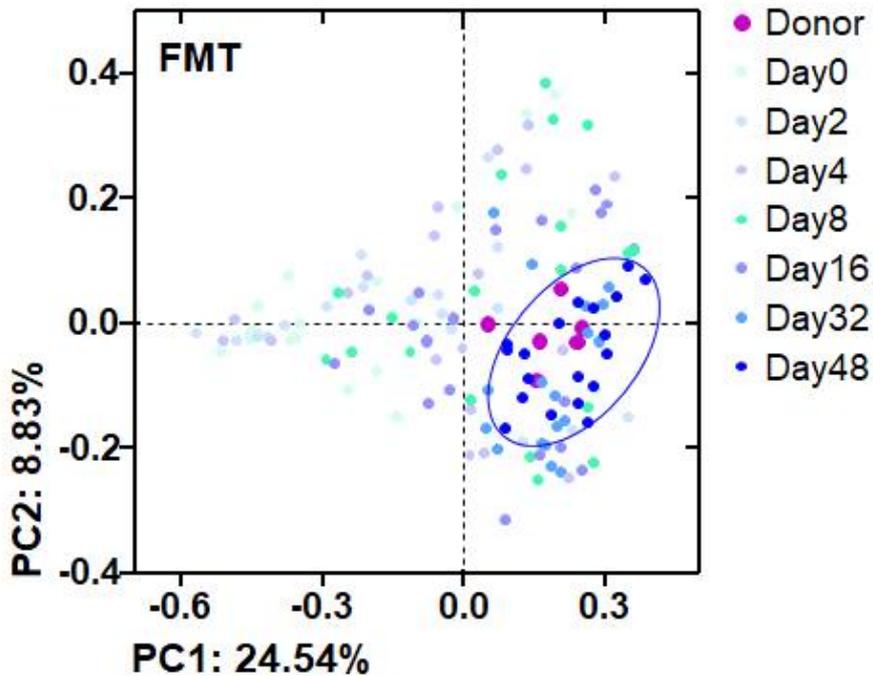


그림 46. 시간에 따른 대변이식 송아지 장내미생물 군집 변화

- Unifrac distance matrix를 이용해서 시간 변화에 따른 송아지 장내미생물 군집 계통 발생 거리를 계산에 포함시켜 그룹 내의 상대적 관련성에 대한 정보 유사도를 평가하였음 (그림 47). 전해질 투여 송아지 (CON, I), 항생제 투여 송아지 (ABX, J)와는 다르게 대변이식 송아

지의 경우 초기 (0일차) 개체 간의 장내미생물 군집의 유사도는 낮았지만 (distance 높음) 시간이 지나면서 점차 개체 간의 유사도가 높아짐을 확인할 수 있었음 (distance 낮음). 이는 대변이식을 통해서 설사 형질이 강하게 나타났던 개체간의 상이한 장내미생물 군집 (0일차)이 설사가 완화되는 장내미생물 군집으로 유사하게 점차 변화함을 의미함 (그림 47).

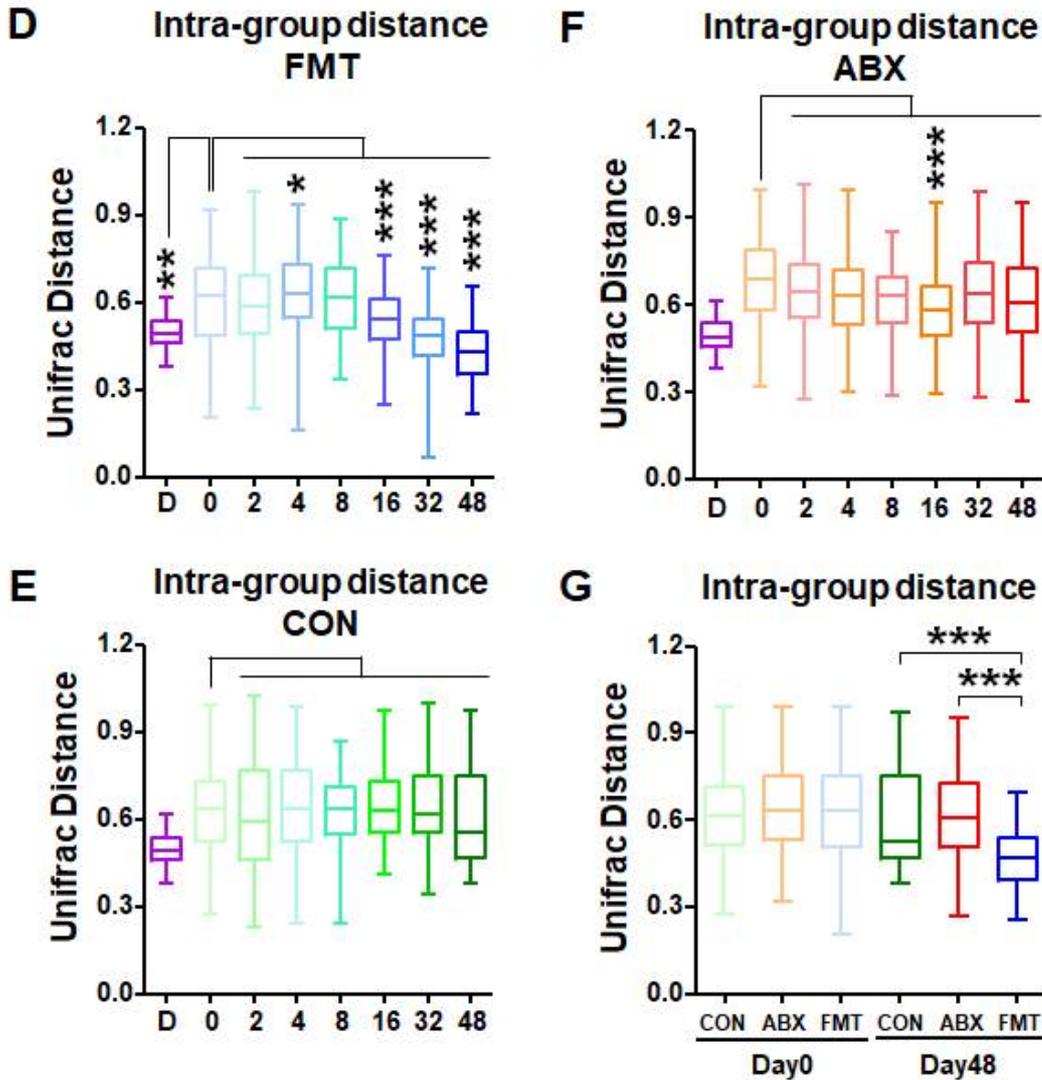


그림 47. 그룹 내 개체간의 Unifrac distance

- Unifrac distance matrix를 이용해서 시간 변화에 따른 송아지 장내미생물 군집과 건강한 분변 공여 송아지의 장내미생물 군집의 계통 발생 거리를 계산에 포함시켜 그룹 간의 상대적 관련성에 대한 정보 유사도를 평가하였음. 이를 통해서 그룹 간 변화하는 장내미생물 군집 유사도를 확인하였음 (그림 48). 전해질 투여 송아지 (CON, E), 항생제 투여 송아지 (ABX, F)와는 다르게 대변이식 송아지의 경우 초기 (0일차) 대변 공여 송아지 (D)의 장내미생물 군집과의 유사도가 낮았지만 시간이 지나면서 점차 유사도가 높아짐을 확인할 수 있었음. 이는 대변이식을 통해서 건강한 대변 공여 송아지의 장내미생물 군집이 잘 전달되었음을 의미하며, 전해질 투여 혹은 항생제 투여가 건강한 송아지의 장내미생물 군집 구조 형성에는 기여하지 않음을 의미함 (그림 48).

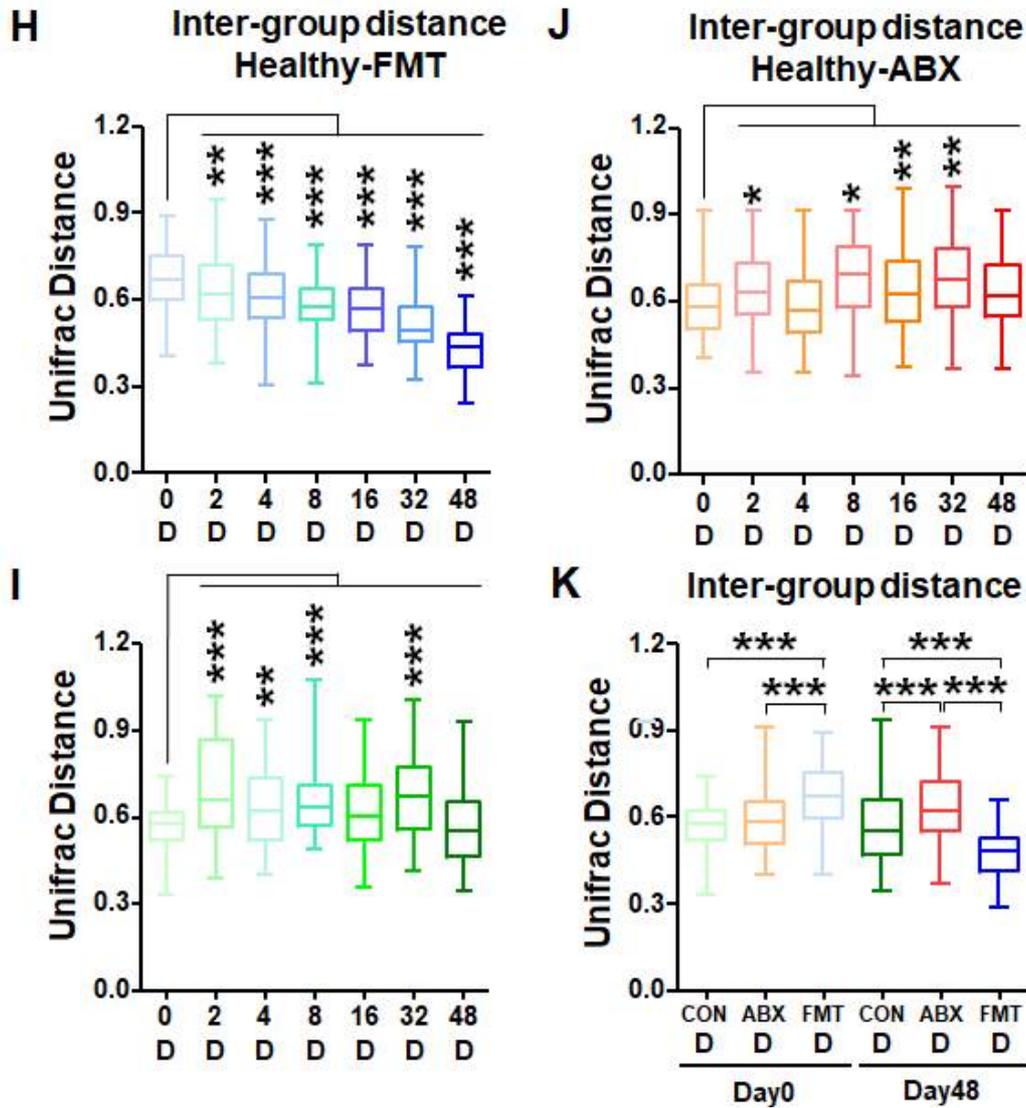


그림 48. 그룹 간 Unifrac distance

#### 4. 설사유발/설사완화 효과 후보 미생물 규명

- 전해질 투여(18)/항생제 투여(23) 그룹 송아지와는 다르게 분변이식(32) 그룹 송아지의 경우 투여 후 8일차부터 분변 상으로 나타나는 설사 증세가 일부 완화되는 개체가 나타났으며, 48일차에는 전체 개체 중 95%에 해당하는 개체들에서 완전한 설사증의 치료효과가 나타난 바 있음. 위의 결과를 참고하여 48일 차에 나타나는 전해질/항생제/분변이식 송아지의 장내미생물 군집을 결정짓는 discriminatory taxa를 규명하여 설사증의 완화 효과가 있는 미생물 후보를 발굴하고자 통계적 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 나타내는 미생물 그룹을 linear discriminant analysis effect size (LEfSe) method를 이용하여 확인함 (그림 49).

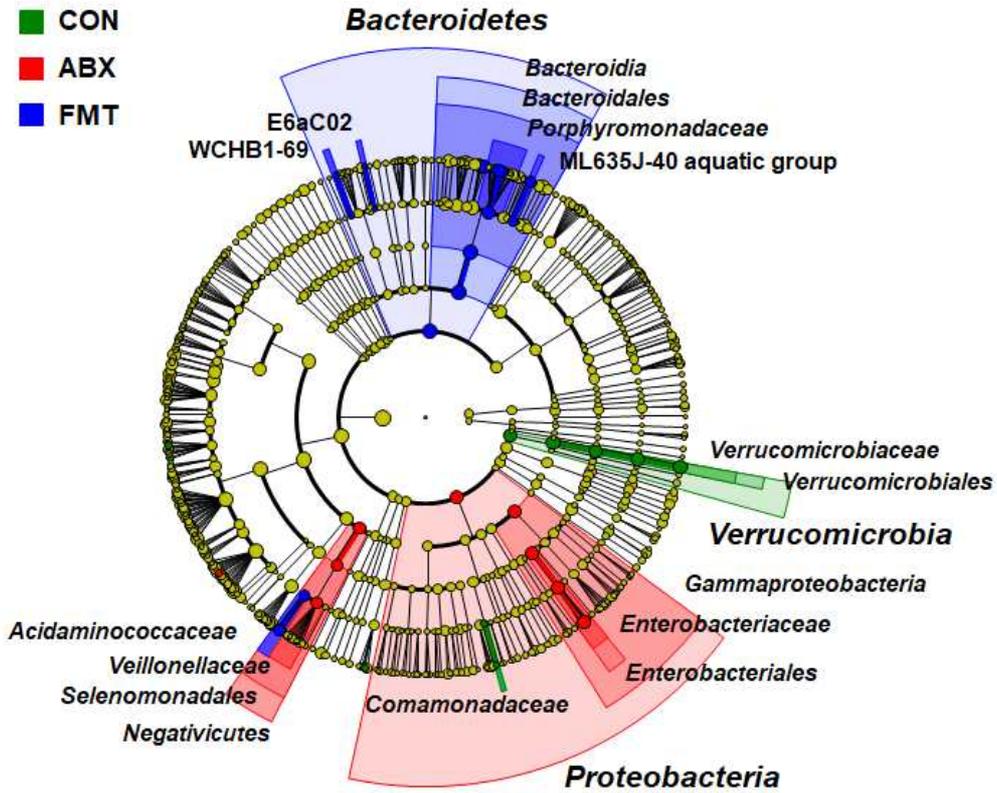


그림 49. 전해질/항생제/대변이식 송아지 장내미생물 군집 LEfSe 분석

- 전해질(CON)/항생제(ABX)/분변이식(FMT) 그룹 송아지의 직장 내 미생물 군집을 투여 후 시간의 변화에 따라 확인하기 위해 the family level에서의 relative abundance를 각각 확인 하였음 (그림 50-52). 전해질 투여 초기에는 Enterobacteriaceae, 후기에는 Verrucomicrobiaceae가 우점함 (그림 50).

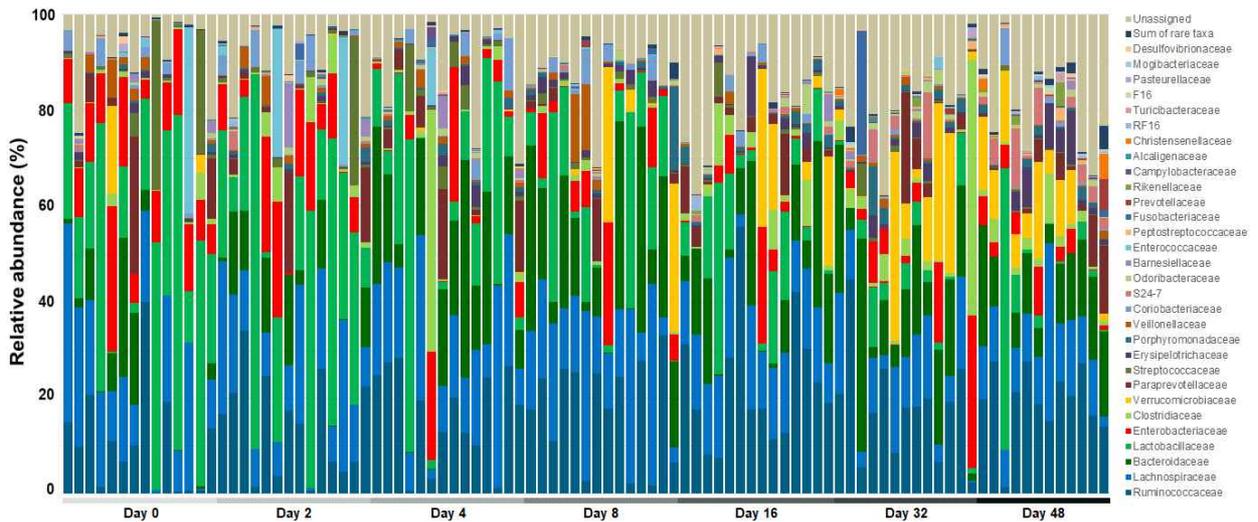


그림 50. 전해질 투여 송아지 그룹의 장내미생물 변화

- 항생제 투여 초기에는 우점하던 Enterobacteriaceae가 후기에 다시 bloom하였음 (그림 51).

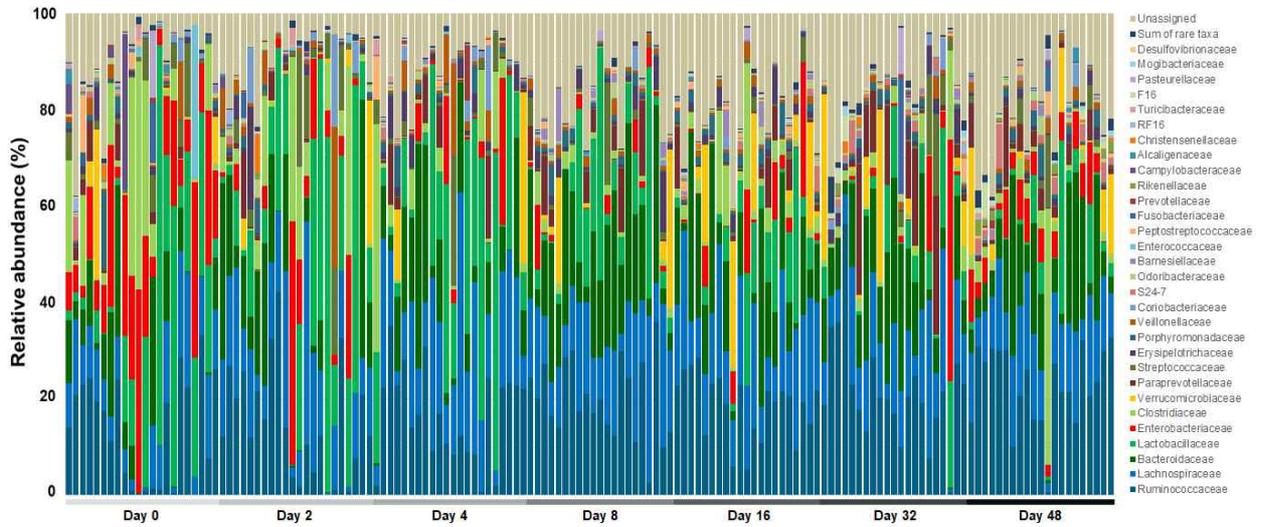


그림 51. 항생제 투여 송아지 그룹의 장내미생물 변화

- 대변이식 후 초기에는 우점하던 Enterobacteriaceae가 점차 감소하였음 (그림 52).

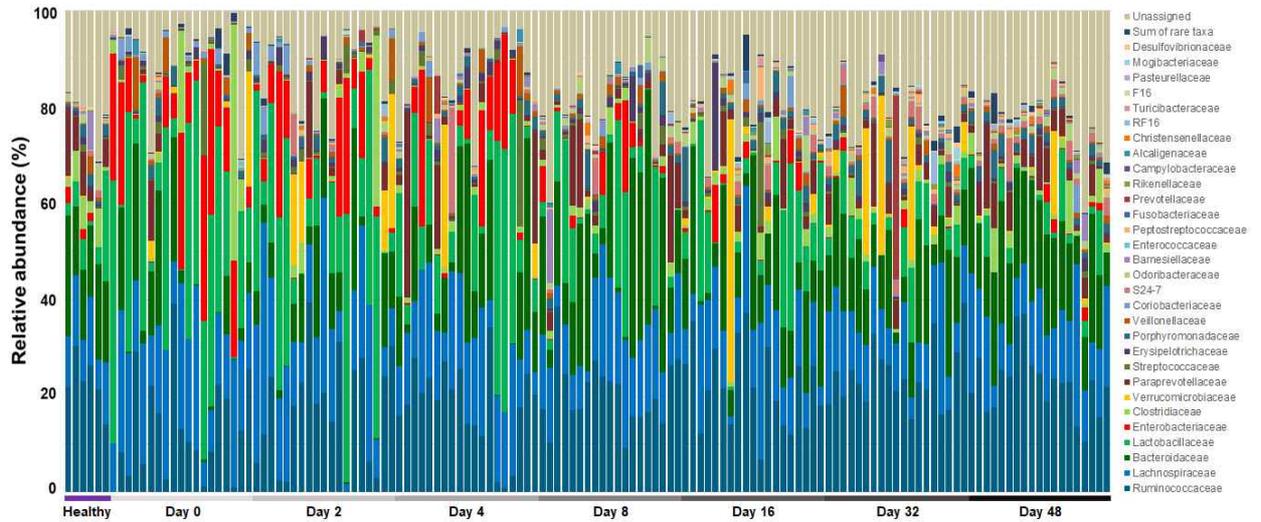


그림 52. 대변이식 송아지 그룹의 장내미생물 변화

- 전해질(CON)/항생제(ABX)/분변이식(FMT) 그룹 송아지의 직장 내 미생물 군집 중 LEfSe 에서 제시한 taxa를 relative abundance를 OTU table에서 확인한 결과 통계적으로 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 보였음 (그림 53). 전해질(CON) 그룹 송아지는 the family Verrucomicrobiaceae, 항생제(ABX) 그룹 송아지는 Enterobacteriaceae and Veillonellaceae, 분변이식(FMT) 그룹 송아지는 Porphyromonadaceae, Acidaminococcaceae and ML635J-40 aquatic group이 직장 내 미생물 군집 중 통계적 유의성을 갖는 수준에서 높은 양적 차이를 나타냄 (그림 53).

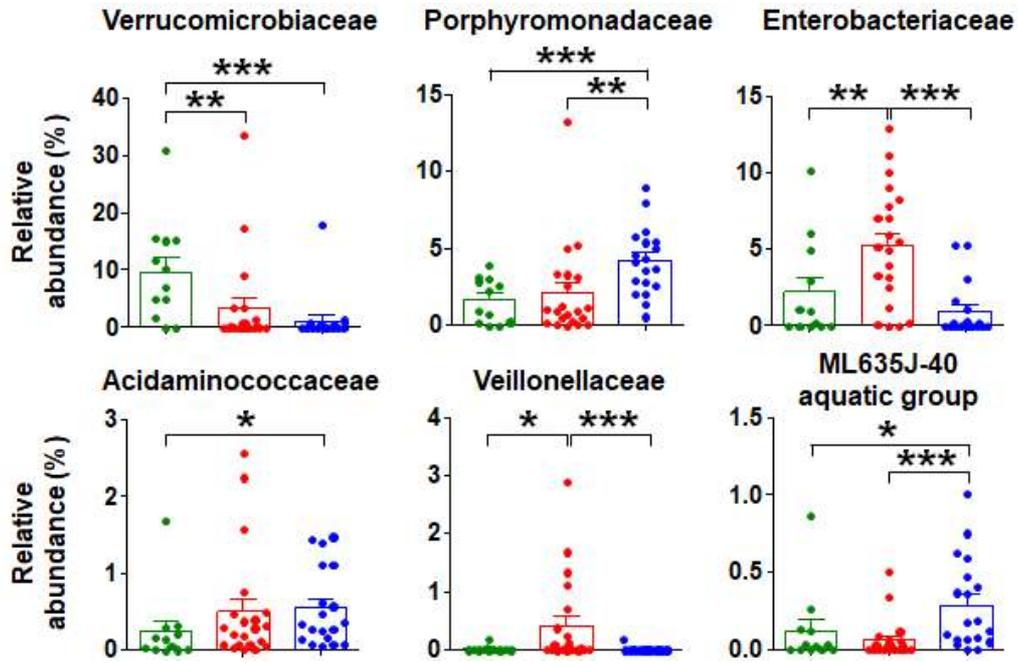


그림 53. Discriminant taxa의 relative abundance (%)

- 절대 혐기성미생물로 알려진 Bacteroidetes, 조건부 혐기성미생물로 알려진 Proteobacteria의 시간적 변화에 따른 dynamics를 the phylum level에서 확인하였음 (그림 54).

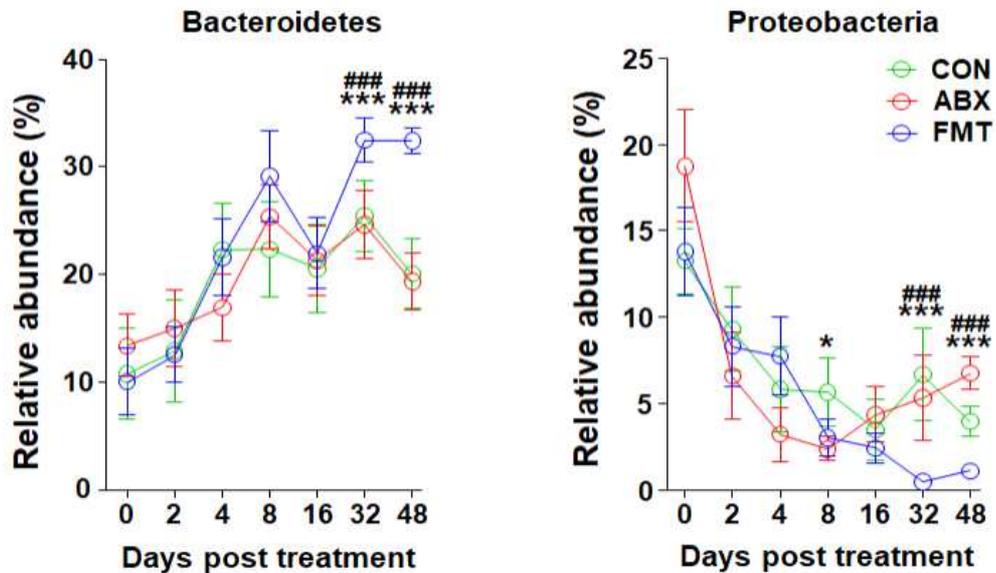


그림 54. Bacteroidetes/Proteobacteria 양적 변화

- 절대 혐기성미생물로 알려진 Bacteroidetes에 속해있는 Porphyromonadaceae, 조건부 혐기성미생물로 알려진 Proteobacteria에 속해있는 Enterobacteriaceae의 시간적 변화에 따른 dynamics를 the family level에서 확인하였음 (그림 55).

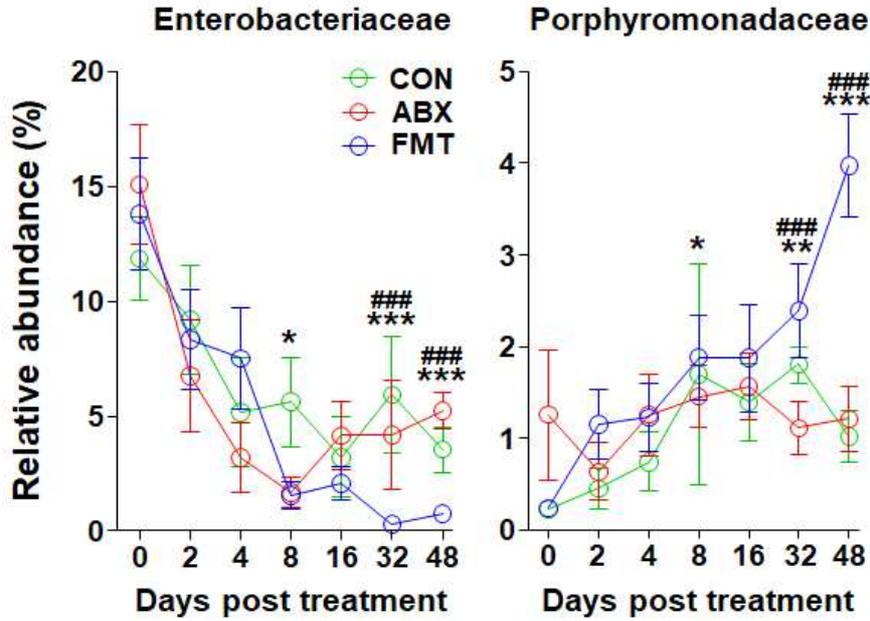


그림 55. Enterobacteriaceae/Porphyromonadaceae 양적 변화

- 대변이식 후 시간에 따른 양적 변화가 나타났던 Enterobacteriaceae/Porphyromonadaceae가 실제 송아지 설사 증세의 유발 및 완화와 관련성이 있는지를 평가하기 위해 전해질/항생제/대변이식 송아지의 시간에 따른 BSS (Bristol stool scale)와 Enterobacteriaceae 또는 Porphyromonadaceae 양적 변화간의 Pearson correlation coefficient (피어슨 상관계수)를 적용하여 개체별 상관계수를 도출함 (표 8).

표 8. BSS-Enterobacteriaceae/Porphyromonadaceae 간의 개체별 피어슨 상관계수 분석

	Enterobacteriaceae		Porphyromonadaceae		Enterobacteriaceae		Porphyromonadaceae		Enterobacteriaceae		Porphyromonadaceae			
	Pearson $r^2$	p-value												
CON1	0.871	0.005	-0.735	0.030	ABX1	0.504	0.124	0.552	0.099	FMT1	0.612	0.072	-0.921	0.002
CON2	0.243	0.300	-0.922	0.002	ABX2	0.720	0.034	-0.472	0.142	FMT2	0.660	0.053	-0.759	0.024
CON3	0.379	0.201	-0.989	>0.001	ABX3	0.793	0.017	-0.522	0.115	FMT3	0.826	0.011	-0.764	0.023
CON4	0.937	0.001	0.093	0.422	ABX4	0.436	0.164	-0.380	0.201	FMT4	0.862	0.006	-0.740	0.029
CON5	0.400	0.187	-0.997	>0.001	ABX5	0.804	0.015	-0.238	0.304	FMT5	0.835	0.010	-0.615	0.071
CON6	0.308	0.251	-0.450	0.156	ABX6	0.677	0.047	-0.786	0.018	FMT6	0.561	0.095	-0.711	0.037
CON7	0.508	0.122	-0.388	0.195	ABX7	0.750	0.029	0.362	0.212	FMT7	0.511	0.121	-0.776	0.020
CON8	0.628	0.046	0.183	0.347	ABX8	0.706	0.038	0.625	0.067	FMT8	0.787	0.018	-0.749	0.026
CON9	0.626	0.046	-0.160	0.366	ABX9	0.308	0.251	0.039	0.467	FMT9	0.386	0.196	-0.746	0.027
CON10	0.376	0.203	0.424	0.172	ABX10	0.412	0.179	-0.678	0.047	FMT10	0.845	0.008	-0.628	0.065
CON11	0.748	0.027	-0.484	0.135	ABX11	0.662	0.043	0.199	0.334	FMT11	0.873	0.005	-0.479	0.138
CON12	0.622	0.048	-0.197	0.336	ABX12	0.520	0.113	-0.710	0.037	FMT12	0.273	0.277	-0.818	0.012
CON13	0.722	0.033	-0.917	0.002	ABX13	0.849	0.008	0.438	0.163	FMT13	0.505	0.124	-0.631	0.064
CON14	0.779	0.040	-0.687	0.100	ABX14	0.483	0.136	-0.917	0.002	FMT14	0.980	>0.001	-0.553	0.099
					ABX15	0.424	0.172	-0.076	0.436	FMT15	0.576	0.088	-0.866	0.006
					ABX16	0.576	0.048	-0.482	0.137	FMT16	0.975	>0.001	-0.524	0.113
					ABX17	0.826	0.011	-0.078	0.434	FMT17	0.851	0.008	-0.701	0.040
					ABX18	0.619	0.049	0.680	0.047	FMT18	0.984	>0.001	-0.639	0.061
					ABX19	0.884	0.004	-0.451	0.155	FMT19	0.901	0.003	-0.623	0.068
					ABX20	0.559	0.086	0.235	0.306	FMT20	0.982	>0.001	-0.834	0.010
					ABX21	0.653	0.041	-0.570	0.056					
					ABX22	0.792	0.017	-0.860	0.006					
					ABX23	0.874	0.016	-0.866	0.167					
Overall	0.781	0.019	-0.396	0.189	Overall	0.932	0.001	-0.633	0.066	Overall	0.890	0.004	-0.847	0.008

- 전해질/항생제/대변이식 송아지의 시간에 따른 BSS (Bristol stool scale)와 Enterobacteriaceae 또는 Porphyromonadaceae 양적 변화간의 전해질/항생제/대변이식 그룹 별로 Pearson correlation coefficient (피어슨 상관계수)를 적용함 (그림 56). BSS와

Enterobacteriaceae간에는 모든 그룹에서 공통적으로 강한 양의 상관관계가 나타났으며, BSS와 Porphyromonadaceae간에는 대변이식 그룹에서 강한 음의 상관관계가 나타났음.

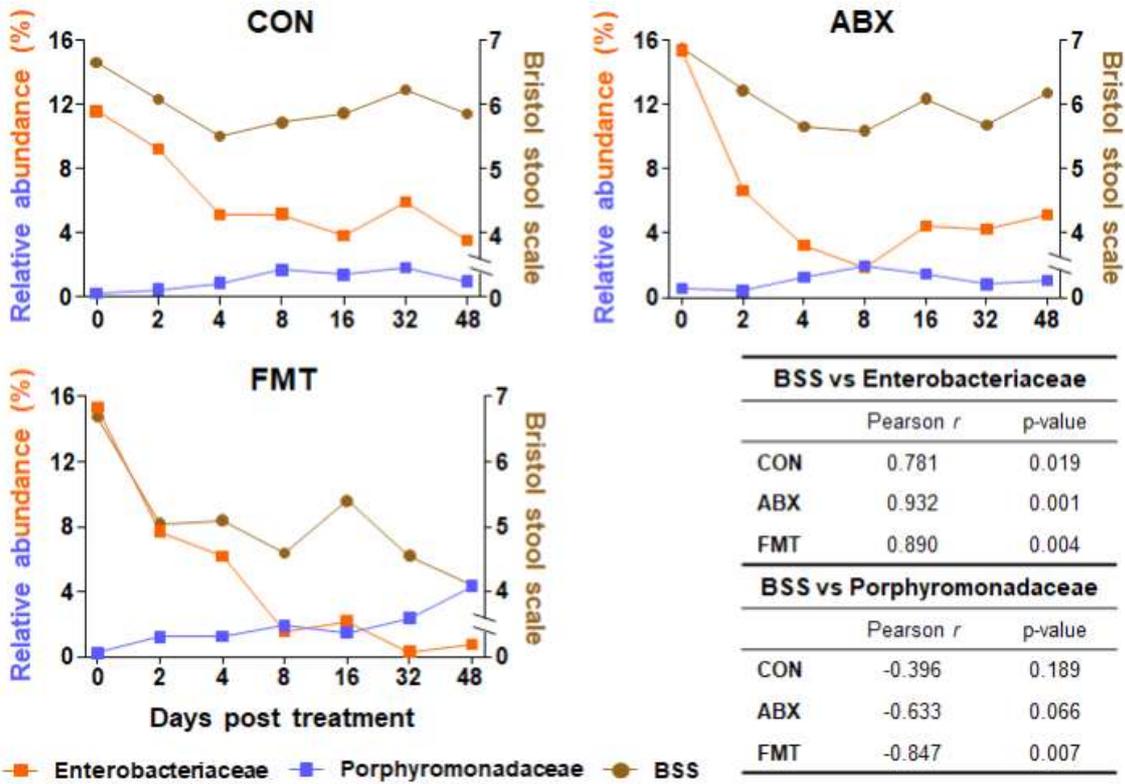


그림 56. BSS-Enterobacteriaceae/Porphyromonadaceae 간의 그룹별 피어슨 상관계수 분석

### 5. 대변무리이식을 통한 송아지 증체량 증가 및 관련 장내미생물 군집 확인

- 전해질/항생제/대변이식 송아지의 6개월, 12개월 차에 체중을 각각 측정하여 대변이식에 따른 성장효과를 확인하였음 (그림 57). 6개월 송아지의 경우 암/수 공통적으로 그룹 간 체중의 유의미한 차이를 발견하지 못함 (그림 57A). 12개월 암송아지의 경우 대변이식 송아지의 체중이 각각 항생제 투여 송아지 보다 높았으며, 수송아지의 경우 대변이식 송아지의 체중이 전해질 투여 송아지 보다 높음을 확인함 (그림 57B). 이를 통해서 6개월에서 12개월까지의 증체량을 산출한 결과 대변이식 그룹에서 가장 높았음 (그림 57C).

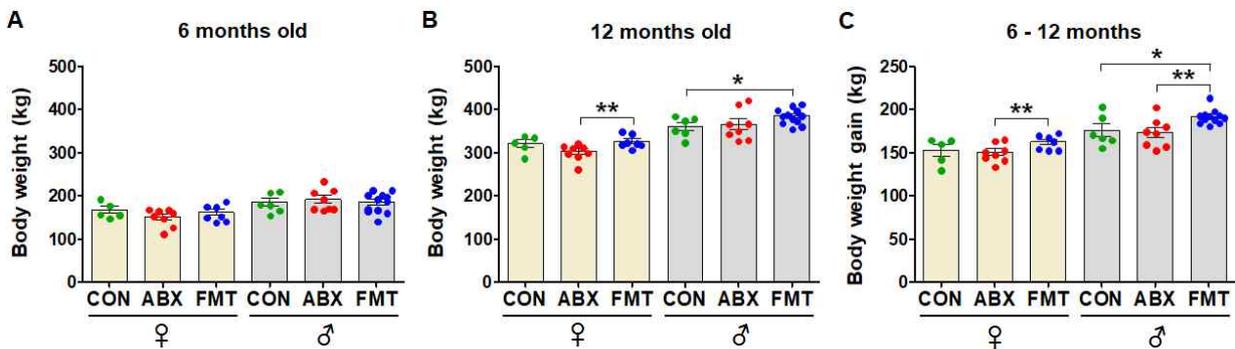


그림 57. 6개월 및 12개월 체중 측정결과

- 전해질(12)/항생제(19)/대변이식(20) 송아지의 12개월 차 직장 내 분변을 샘플링하여 최종

적으로 51개의 송아지 분변 샘플을 확보하고, Illumina MiSeq을 이용하여 채집된 시료의 미생물 군집을 확인하였음. 51 샘플을 대상으로 총 3.4G의 메타유전체 시퀀스를 확보하였음 (표 9).

표 9. 16S rRNA gene을 타겟으로 한 송아지 분변 메타유전체 확보

Sample	Raw reads (F+R)	Joined reads	Filtered reads	Chimera removed	Singleton removed	Sub-sampled
CON 1	241294	101822	99646	55995	46587	40000
CON 2	214730	90771	88808	52592	43896	40000
CON 3	225074	94181	92081	54509	46137	40000
CON 4	224706	95583	93583	57901	49796	40000
CON 5	199246	84684	82783	50123	42852	40000
CON 6	239602	103692	101670	58746	49166	40000
CON 7	210322	89217	87283	51445	43463	40000
CON 8	537572	221316	219686	123940	108078	40000
CON 10	221910	92861	90921	48906	40557	40000
CON 11	225490	96381	94467	52279	42537	40000
CON 12	220652	94539	92488	54348	45511	40000
CON 14	210837	90278	86466	54110	48814	40000
ABX 4	511850	177782	176642	113819	97692	40000
ABX 5	222838	92165	87256	53978	47800	40000
ABX 6	224644	95687	93842	58827	50452	40000
ABX 8	204854	87414	85618	51307	42543	40000
ABX 9	311122	129122	126417	78177	63867	40000
ABX 10	212264	91001	89161	57068	48579	40000
ABX 11	222514	94138	92343	59049	50527	40000
ABX 12	220620	92336	90388	54078	45483	40000
ABX 13	542754	194133	192847	113939	96232	40000
ABX 14	209080	89406	87483	52087	43662	40000
ABX 15	221928	93527	91705	54725	45353	40000
ABX 16	223176	93300	91327	53135	43702	40000
ABX 17	209020	88395	86586	54625	45806	40000
ABX 18	564210	216821	215358	127003	105433	40000
ABX 19	235174	93221	90081	48701	44187	40000
ABX 20	240730	101065	98925	55062	43768	40000
ABX 21	238314	100603	98443	62949	53250	40000
ABX 22	231968	91007	89005	48802	46354	40000
ABX 23	211096	89257	87311	54442	45225	40000
FMT 1	403784	174788	173438	103824	88191	40000
FMT 2	554498	193335	192051	106754	91762	40000
FMT 3	189834	79312	77579	50974	46167	40000
FMT 4	484736	187044	185846	110285	92307	40000
FMT 5	199476	83327	81588	50660	44212	40000
FMT 6	360182	122144	121269	73605	59801	40000
FMT 7	196070	82282	80542	51632	44727	40000
FMT 8	194512	82987	81257	48867	40043	40000
FMT 9	570406	230530	228929	128645	107831	40000
FMT 10	209476	88325	81408	62298	54212	40000
FMT 11	211838	90175	88456	54200	47834	40000
FMT 12	219236	93095	91121	55954	49024	40000
FMT 13	219214	93304	91565	50334	41660	40000
FMT 14	183444	77001	75276	48739	43247	40000
FMT 15	514634	192485	191164	101690	83184	40000
FMT 16	331306	141049	139870	71335	59251	40000
FMT 17	558224	207070	205614	126321	109277	40000
FMT 18	575654	230825	229171	134498	112749	40000
FMT 19	491130	205820	204293	127790	110837	40000
FMT 20	478634	188870	187520	103363	86464	40000

- 12개월 차 송아지의 장내미생물 군집 구조를 PCoA 분석법을 이용하여 확인함. 대변이식 송아지 그룹이 확연히 구분되는 장내미생물 군집 구조를 나타냄 (그림 58).

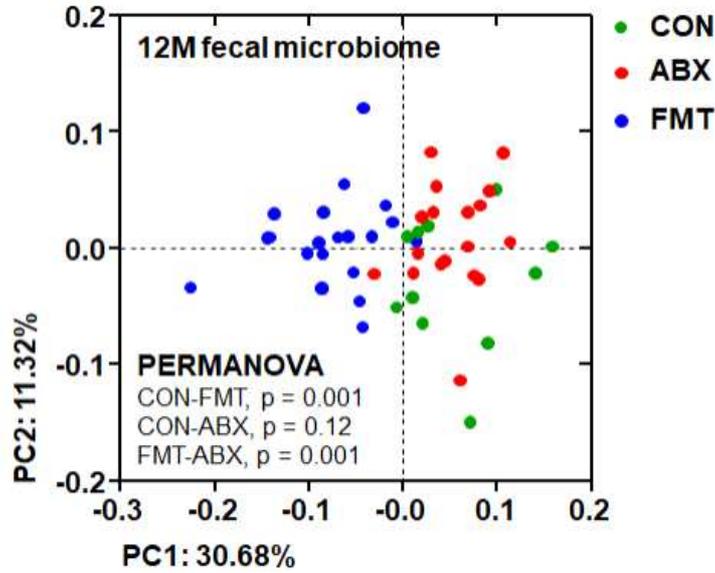


그림 58. 12개월 차 송아지의 장내미생물 군집 비교

- 12개월 차 송아지의 직장 내 장내미생물 군집을 the family level에서 확인함 (그림 59).

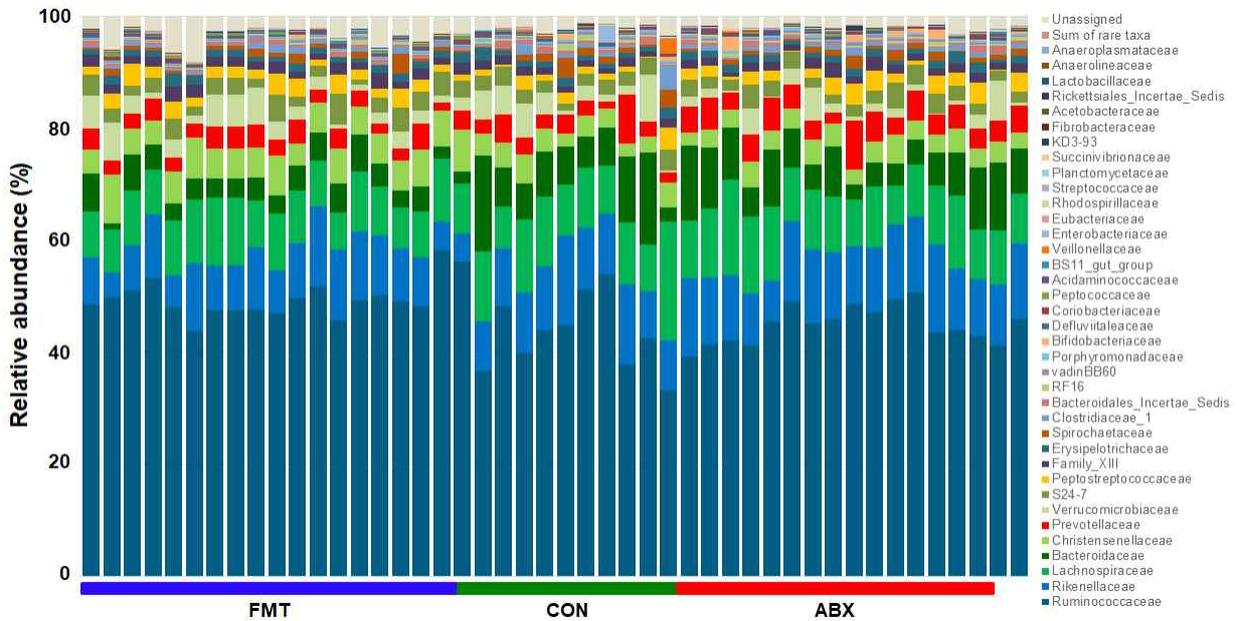


그림 59. 12개월 차 송아지의 장내미생물 군집 비교 (the family level)

- 12개월 차 송아지 직장 내 미생물 군집 중 통계적 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 나타내는 미생물 그룹을 linear discriminant analysis effect size(LEfSe) method를 이용하여 확인함 (그림 60).

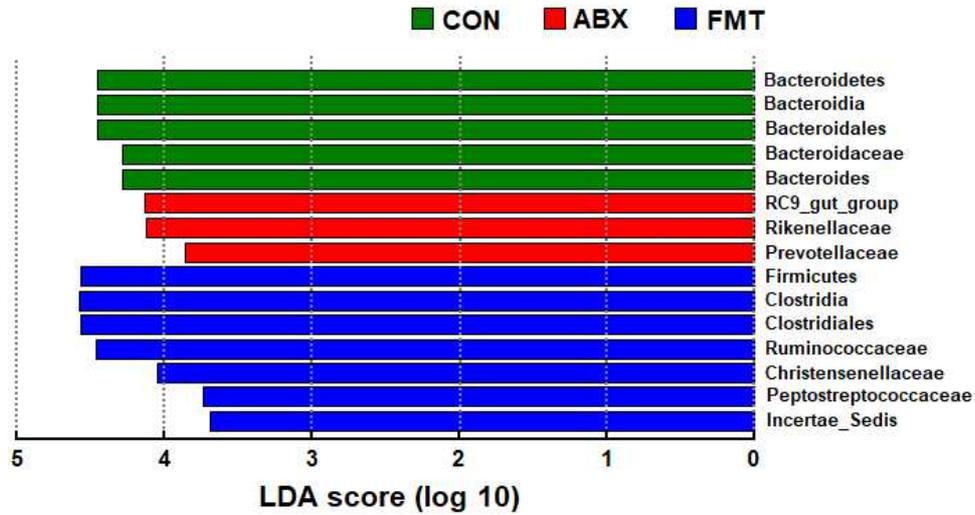


그림 60. 12개월 차 송아지의 장내미생물 군집 LefSe 분석 결과 (LDA)

- 전해질(CON)/항생제(ABX)/분변이식(FMT) 그룹 송아지의 12개월 차 직장 내 미생물 군집 중 LefSe에서 제시한 taxa를 relative abundance를 OTU table에서 확인한 결과 통계적으로 유의성을 갖는 수준에서 양적 차이를 보였음 (그림 61). 대변이식 후 12개월이 흘렀음에도 불구하고 고유의 장내미생물 군집 구조가 나타났으며, Ruminococcaceae, Christensenellaceae, Peptostreptococcaceae의 relative abundance가 가장 높았음.

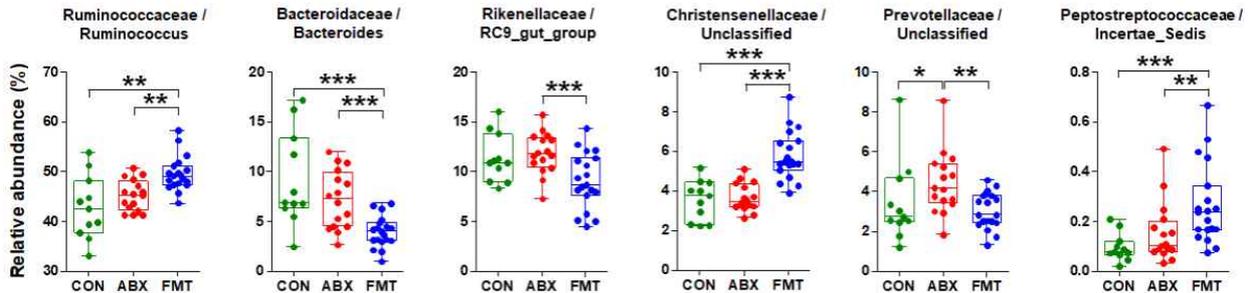


그림 61. Discriminant taxa의 relative abundance (%)

## 6. 대변무리이식을 통한 증체량 및 도축성적 향상 확인

- 6개월 (그림 62a), 12개월 (그림 62b), 24개월 (그림 62c), 30개월 (그림 62d) 전해질/항생제/대변이식 개체의 체중을 측정된 결과 대변이식 그룹의 증체량이 가장 우수하였음.

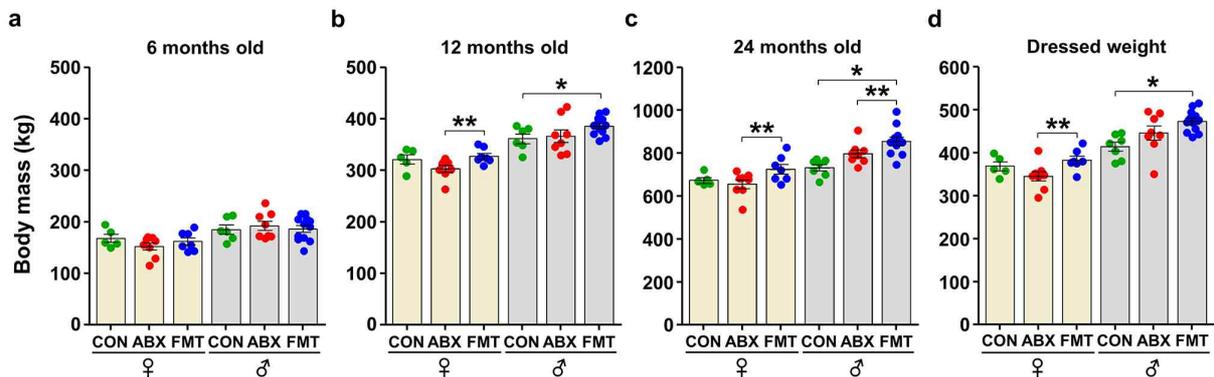


그림 62. 6, 12, 24, 30개월령 체중 측정 결과 및 도축성적

- 실험에 이용된 모든 개체들을 충청북도 청주에 위치한 팜스토리 한국냉장 LPC 도축장에서 도축한 뒤 생체중, 도체중(dressed weight), 근내지방등급(intramuscular fat), 육량등급, 등심단면적(sirloin area) 등을 산출하였음. 도체중은 도축된 소의 머리, 다리, 우피, 지방, 내장 등 부산물을 제외한 무게를 의미하며, 도체를 해체 정형 후 0℃-5℃의 냉장조건에서 하룻밤(12시간 이상) 냉장되어 측정 시 측정부위 중심온도가 10℃ 이하인 좌, 우 도체의 지육 중량의 합을 뜻함. 등심단면적은 도축된 소의 등심 단면의 크기를 측정한 수치를 의미하며, 도축된 소의 등심단면적의 수치가 높을수록 고가에 거래됨.
- 도체중, 등심단면적, 근내지방 등급의 경우 성별에 관계없이 분변이식을 받은 그룹에서 전해질/항생제 투여 대조군 그룹과 비교하여 가장 우수함을 확인하였음 (그림 63).

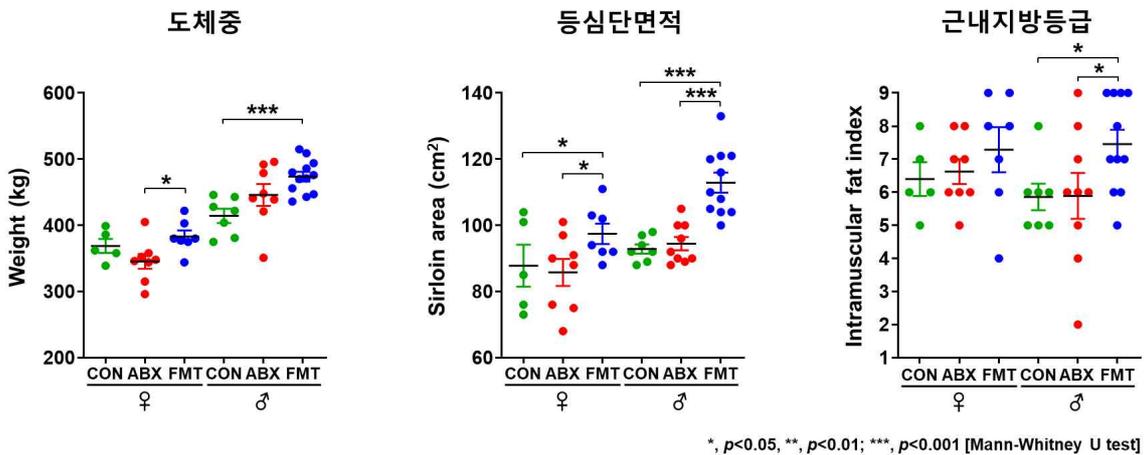


그림 63. 그룹 별 도축성적

- 본 연구의 핵심은 장내미생물 불균형에 의해 유발된 송아지 설사 이후 FMT를 통해서 단순히 미생물을 죽이는 것이 아닌 경쟁들 통해서 유익균들이 장내에 정상적으로 자리 잡도록 도움으로써 숙주에 대사, 면역, 발생, 생리 전반에 걸쳐 다양한 역할을 하는 미생물 군총을 잃어버리지 않도록 하여 송아지가 육성기 및 비육기에 도달하였을 때 항생제 투여 및 전해질 투여 대조군 그룹과 비교하여 체중증가의 효과가 있다는 점임. 위의 결과들을 통해 설사하는 송아지에 대변무리이식으로 건강한 송아지의 장내미생물 군집을 이식해줄 경우 육성기(12개월), 비육기(24개월) 단계에서 증체효과를 확인하였으며, 도축 이후 도체중, 등심면적 및 근내지방 등급을 평가한 결과에서도 대조군 그룹과 비교하여 도축성적이 향상됨을 확인한 결과임.

- 이러한 연구결과를 기반으로 대변무리이식 (fecal microbiota transplantation)을 수행하여 설사 송아지의 인위적인 장내 미생물 군집 조절을 통해 병증을 완화시키고 송아지 폐사 비율을 감소시킴을 확인한 결과로 Multidisciplinary Sciences 분야 상위 6% 저널인 Nature Communications (2020IF=14.919)에 2021년 1월 발표하였음.

- 위 연구의 경우 향후 대변 미생물총을 포함하는 가축 증체용 사료 첨가제 개발을 위한 특허출원을 완료하였음 (출원번호: 특허-2021-0140179).

○ 수컷 거세에 의한 장내미생물 군집변화/육질 향상 기작 규명

1. 수컷 거세에 의한 장내미생물/지방 대사 변화를 확인하기 위한 수컷 거세 마우스 모델 구축

- 선행 연구를 통해서 한우 수컷 거세에 의한 호르몬 변화(웅성호르몬 감소)-소장 내 장내 미생물 군집 변화(*Peptostreptococcaceae* 증가)-BCAAs 증가-근내지방 축적 모델을 규명하였음. 수컷 거세에 의한 장내미생물/지방 대사 변화 메커니즘을 규명하기 위해 수컷의 정소를 외과적 시술을 통해서 제거한 물리적 거세 마우스 모델을 구축하였음 (그림 64).

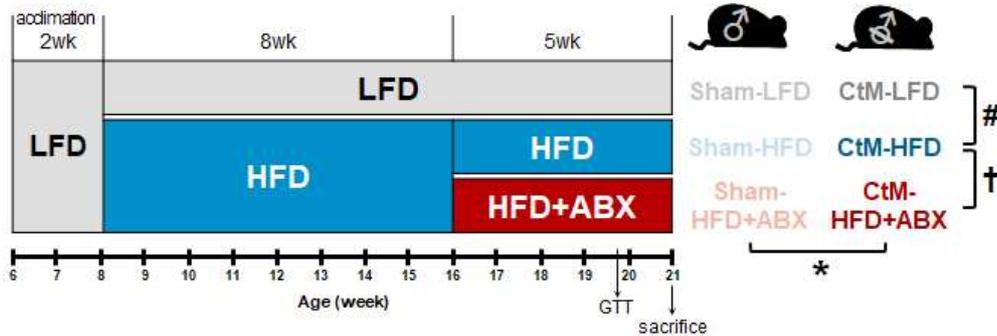


그림 64. 물리적 거세 마우스 모델 구축

- 수컷 거세에 의한 장내미생물 군집 변화가 지방 대사 변화를 이끌어내는 핵심 메커니즘임을 증명하기 위해 대변이식을 이용한 수컷 거세 유사 마우스 표현형이 재연되는지 확인하고자 마우스 모델을 구축하였음 (그림 65).

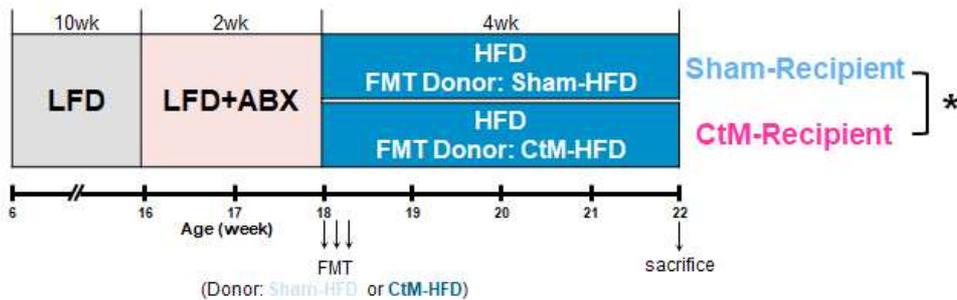


그림 65. 대변이식 마우스 모델 구축

2. 마우스 모델을 통해 거세-호르몬 변화에 의한 장내미생물 변화 확인

- 수컷 거세 마우스 모델을 통해 호르몬 변화에 의한 장내미생물 군집 및 지방대사 변화 확인함. 수컷 거세 마우스에서 혈중 웅성호르몬 (testosterone)의 양이 통계적으로 유의하게 감소함을 확인함 (그림 66).

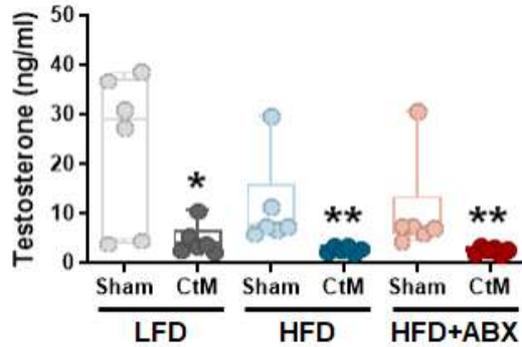


그림 66. 혈중 응성호르몬

- 마우스 소장 및 대장 내용물에서 bacterial DNA를 추출한 뒤 대용량 염기서열 (Illumina Miseq) 분석법을 이용하여 bacterial 16S rRNA gene을 타겟으로 시퀀싱을 진행하였음. 최신의 QIIME2/DADA2 pipeline을 적용하여 거세 여부/장 부위별 장내미생물 군집을 확인함. 소장 및 대장에 따라 미생물 군집이 크게 나뉘고 (그림 67, 왼쪽), 거세 여부에 따라서 미생물 군집이 상이함을 확인하였음 (그림 67, 중간). 하지만 항생제를 처리할 경우 거세 여부/장 부위별 미생물 군집의 차이가 사라짐 (그림 67, 오른쪽).

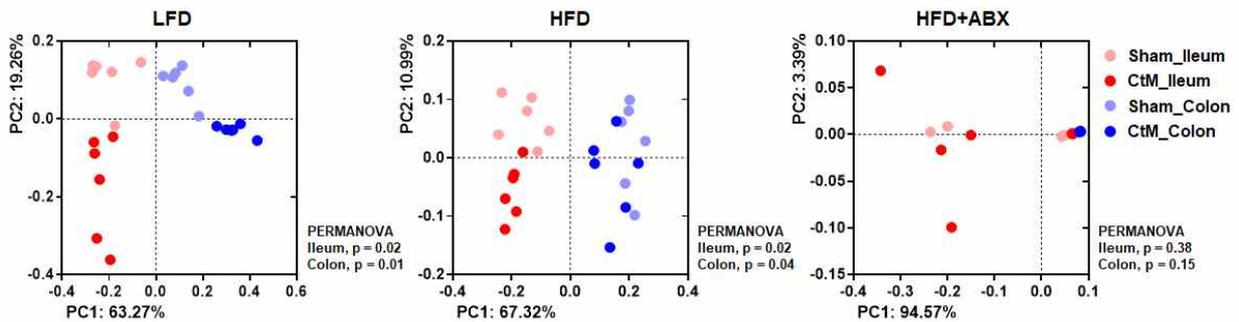


그림 67. 수컷 거세에 의한 장내미생물 군집 비교

- 본 연구팀에서 주목하고 있는 소장 내 *Peptostreptococcaceae*의 abundance가 거세 마우스 (CtM)에서 높지만 항생제 처리에 의해 감소하였음 (그림 68).

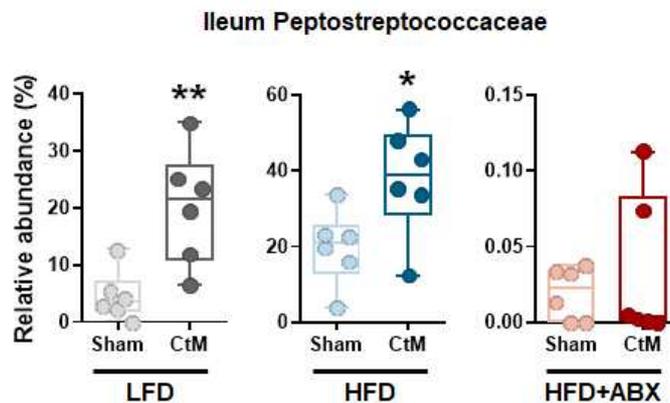


그림 68. 소장 내 *Peptostreptococcaceae*

- 수컷 거세에 의해 체중 증가가 나타나고, 지방의 축적이 확인되었음 (그림 69).

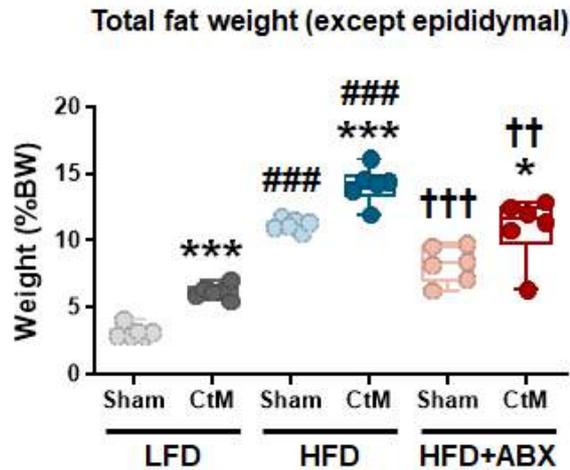


그림 69. 마우스 체중 대비 지방 무게

- Enzymetic BCAAs assay kit을 이용해서 혈중 BCAAs의 농도를 측정함. 수컷 거세에 의해 혈중 BCAAs (Branched-chain amino acids)의 양이 증가하고, 항생제 처리에 의해서 감소함이 확인됨 (그림 70). 위 결과는 거세에 의해 변화된 장내미생물 군집이 혈중 BCAAs의 양적 변화에 영향을 준다고 이해할 수 있음.

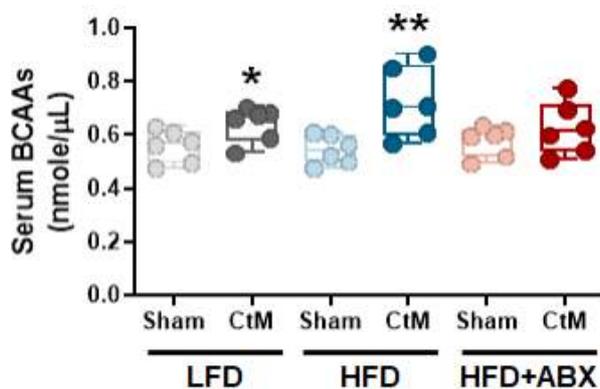


그림 70. 혈중 BCAAs 농도

- FMT를 통해서 거세에 의한 장내미생물 군집변화, 지방축적의 전달 확인함. 수컷 거세 마우스의 분변을 채취하여 일반 마우스에게 경구투여하였음 (CtM-R). 대조군으로 sham-surgery 마우스 분변을 채취하여 일반 마우스에게 경구투여하였음 (Sham-R). 마우스의 소장 및 대장 내용물을 샘플링하여 bacterial DNA를 추출한 뒤 대용량 염기서열 (Illumina Miseq) 분석법을 이용하여 bacterial 16S rRNA gene을 타겟으로 시퀀싱을 진행하였음. 최신의 QIIME2/DADA2 pipeline을 적용하여 장내미생물 군집을 확인함. 소장 및 대장에 따라 미생물 군집이 크게 나뉘고, 분변 공여 마우스의 거세 여부에 따라서 수여 마우스의 장내 미생물 군집이 상이함을 확인하였음 (그림 71C). 또한 소장 내 *Peptostreptococcaceae*가 거세 마우스의 분변을 투여 받은 마우스에서 증가하였음 (그림 71D,E).

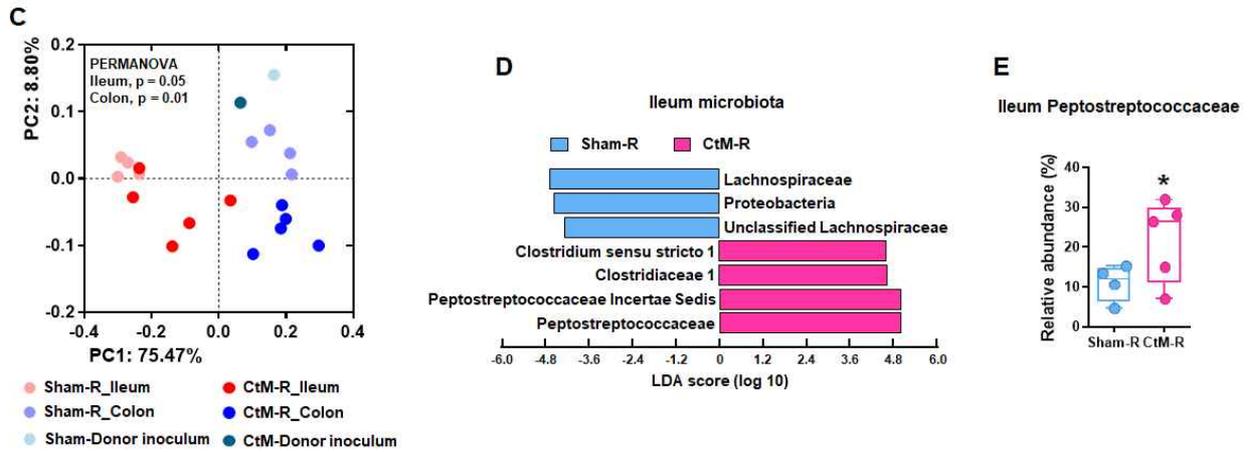


그림 71. 분변이식을 통한 마우스 장내미생물 군집 변화

- CtM-R 마우스의 지방량이 증가함 (그림 72). 아래 결과를 통해서 수컷 마우스 거세를 통한 장내미생물 군집 변화가 FMT를 통해 전달될 수 있으며, 성공적으로 전달된 미생물에 의해 CtM-R 그룹의 지방축적을 확인하였음.

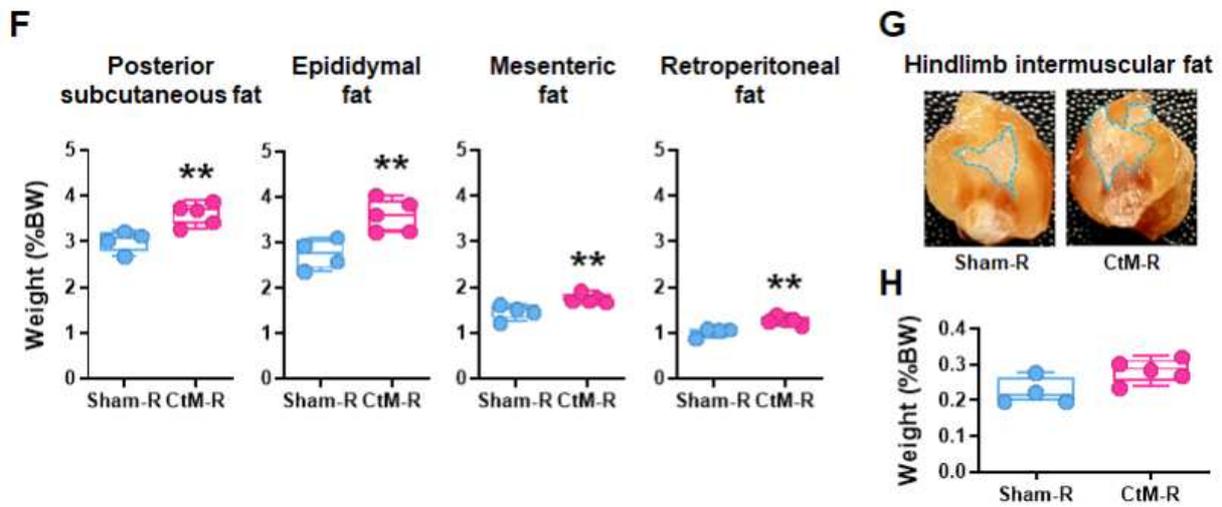


그림 72. 분변이식 마우스의 지방 무게 변화

### 3. 마우스 모델을 통해 BCAAs 급여 효과 확인

- BCAA증가에 의한 근내 지방 축적 매커니즘을 규명하기 위해 BCAA 급여 마우스 모델을 구축하였음 (그림 73).

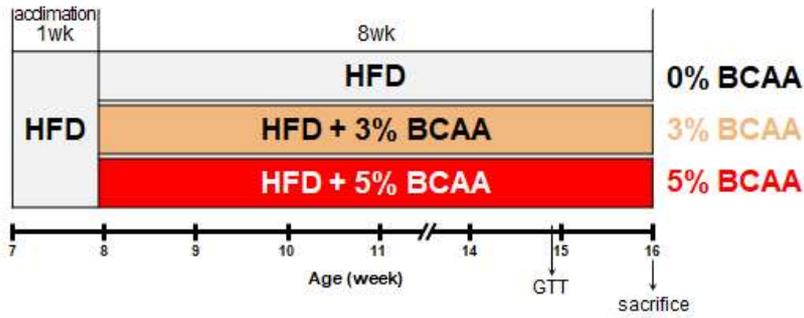


그림 73. Dietary BCAAs 급여 마우스 모델 구축

- BCAAs 급여를 통해 거세-장내미생물-지방대사 간의 상관관계 규명실험을 수행함. 선행 연구결과를 통해서 웅성호르몬 감소할 경우 소장 장내미생물 군집 변화가 발생하고, 혈청 내 BCAAs의 증가와 함께 몸 전반에 걸친 지방의 축적이 관찰되었음. 이에 BCAAs의 증가와 지방 저장 간에 선후관계를 파악하기 위해 본 마우스 실험을 계획하였음. 3%, 5% BCAAs를 사료에 첨가하여 급여할 경우 체중 증가가 발생하고, total fat weight이 증가함을 확인하였음 (그림 74).

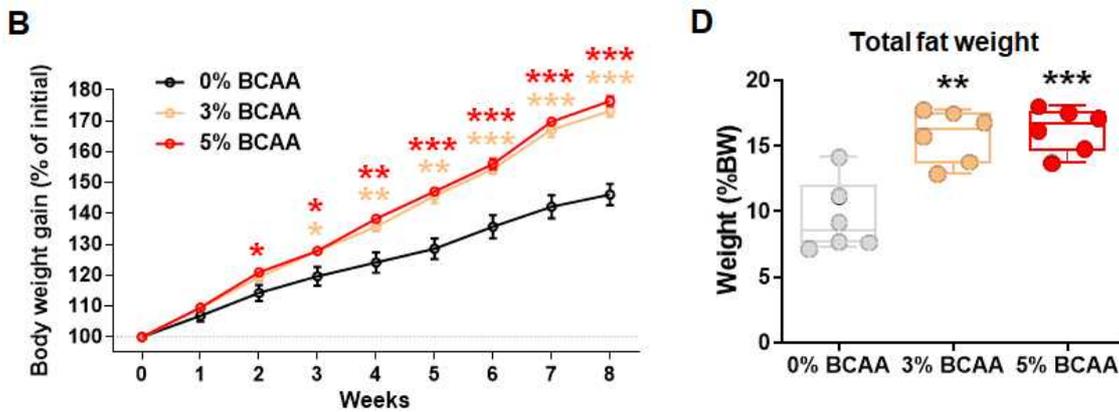


그림 74. BCAAs 급여를 통한 체중 및 지방 무게

- 마우스의 소장 및 대장 내용물을 샘플링하여 bacterial DNA를 추출한 뒤 대용량 염기서열 (Illumina Miseq) 분석법을 이용하여 bacterial 16S rRNA gene을 타겟으로 시퀀싱을 진행하였음. 최신의 QIIME2/DADA2 pipeline을 적용하여 장내미생물 군집을 확인함. PCoA를 장내미생물 군집이 BCAAs의 급여와는 상관없이 소장 및 대장에 따라 나뉘음을 확인하였음 (그림 75).

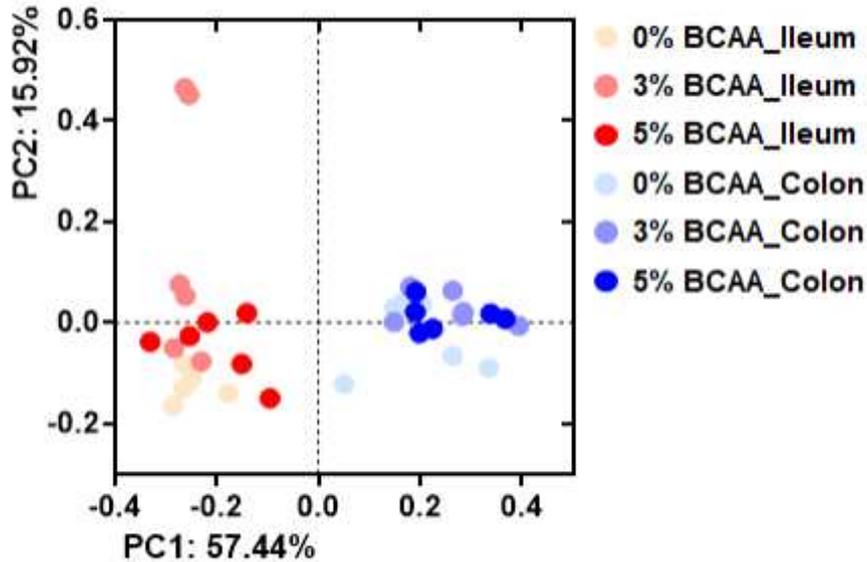


그림 75. BCAAs 급여 마우스의 소장 및 대장 장내미생물 군집 비교

#### 4. 반추동물 모델에서 BCAAs 급여 시 도축성적 향상 효과 확인

- 위의 실험 결과를 통해 장내미생물 군집 변화가 혈청 내 BCAAs의 증가를 유발하고, 이를 통해 지방의 증가가 발생함을 확인할 수 있음. BCAAs의 급여가 실제로 한우를 포함하는 경제동물의 생산성을 증가시키고, 농가소득 증대에 기여할 수 있는지 평가함. 이를 위해 한우를 대상으로 BCAAs를 급여하여 증체효과 및 도축성적에 미치는 영향을 평가하고자 하였음. BCAAs에 의한 효과를 확인하기 위해 모든 개체의 유전적 차이 외에는 먹이(사료 및 물) 및 사육환경(계절, 농장, 축사, 관리인, 톱밥, 채광 등)을 포함하는 모든 변인을 통제하여 실험하였으며 BCAAs을 급여하는 개체의 경우 분말형태의 조성물을 매일 100g씩 사료(농후사료, concentrated feed)와 함께 급여하였음. 한우 57마리를 (1) BCAAs 비급여 그룹(13마리), (2) BCAAs 1개월 급여 그룹(14마리), (3) BCAAs 2개월 급여 그룹(14마리), (4) BCAAs 3개월 급여 그룹(14마리)으로 총 4그룹으로 나누어 급여하였음.
- BCAAs 2개월 급여 그룹 및 BCAAs 3개월 급여 그룹에서 BCAAs 비급여 그룹 및 BCAAs 1개월 급여 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증체량이 높았음(그림 76). 또한 BCAAs 3개월 급여 그룹에서 BCAAs 2개월 급여 그룹과 비교하여서도 통계적으로 유의하게 증체량이 높았음. 실험기간 동안 증체량을 일 수로 나누어 일당 증체량을 산출한 결과에서도 BCAAs 2개월 급여 그룹 및 BCAAs 3개월 급여 그룹에서 BCAAs 비급여 그룹 및 BCAAs 1개월 급여 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 일당 증체량이 높았음(그림 76).
- 실험에 이용된 57마리의 한우를 경기도 안성시 일죽면의 도드람 LPC(도축·판매 복합시설) 도축장에서 도축한 뒤 도체중(dressed weight), 등심단면적(sirloin area), 근내지방등급(intramuscular fat)을 산출함.
- 도체중은 도축된 소의 머리, 다리, 우피, 지방, 내장 등 부산물을 제외한 무게를 의미하며, 도체를 해체 정형 후 0℃-5℃의 냉장조건에서 하룻밤(12시간 이상) 냉장되어 측정 시 측정부위 중심온도가 10℃ 이하인 좌, 우 도체의 지육중량의 합을 뜻함. 등심단면적은 도축된 소의 등심 단면의 크기를 측정한 수치를 의미하며, 도축된 소의 등심단면적의 수치가 높

을수록 고가에 거래됨.

- 30개월령에 도축하여 도축성적을 평가하였음. 도체중(dressed weight)의 경우 BCAAs 2개월 급여 그룹 및 3개월 급여 그룹에서 비급여 그룹 및 1개월 급여 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 도체중이 높았음 (그림 77). 특히 BCAAs 3개월 급여 그룹의 경우 비급여 그룹 및 1개월 급여 그룹과 비교하여 각각 14%, 10%의 도체중량 향상 효과를 확인하였음. 축산물품질평가원 기준 2021년 동일기간 전국에서 도축된 한우 311,358마리를 대상으로 비교한 결과 BCAAs 3개월 급여 그룹의 경우 평균 도체중 461kg으로 전국 평균 출하 도체중인 452kg보다 2% 향상된 성적으로 우수함을 확인하였음.

- 등심단면적(sirloin area)의 경우 BCAAs 3개월 급여 그룹에서 비급여 그룹 및 1개월 급여 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 넓었음 (그림 77). 특히 BCAAs 3개월 급여 그룹의 경우 비급여 그룹 및 1개월 급여 그룹과 비교하여 각각 12%, 11%의 등심단면적 증대 효과를 확인하였음. 축산물품질평가원 기준 2021년 동일기간 전국에서 도축된 한우 311,358마리를 대상으로 비교한 결과 BCAAs 3개월 급여 그룹의 경우 평균 등심단면적 103.9cm<sup>2</sup>으로 전국 평균 등심단면적인 도체중인 95.3cm<sup>2</sup>보다 9% 향상된 성적을 확인하였음.

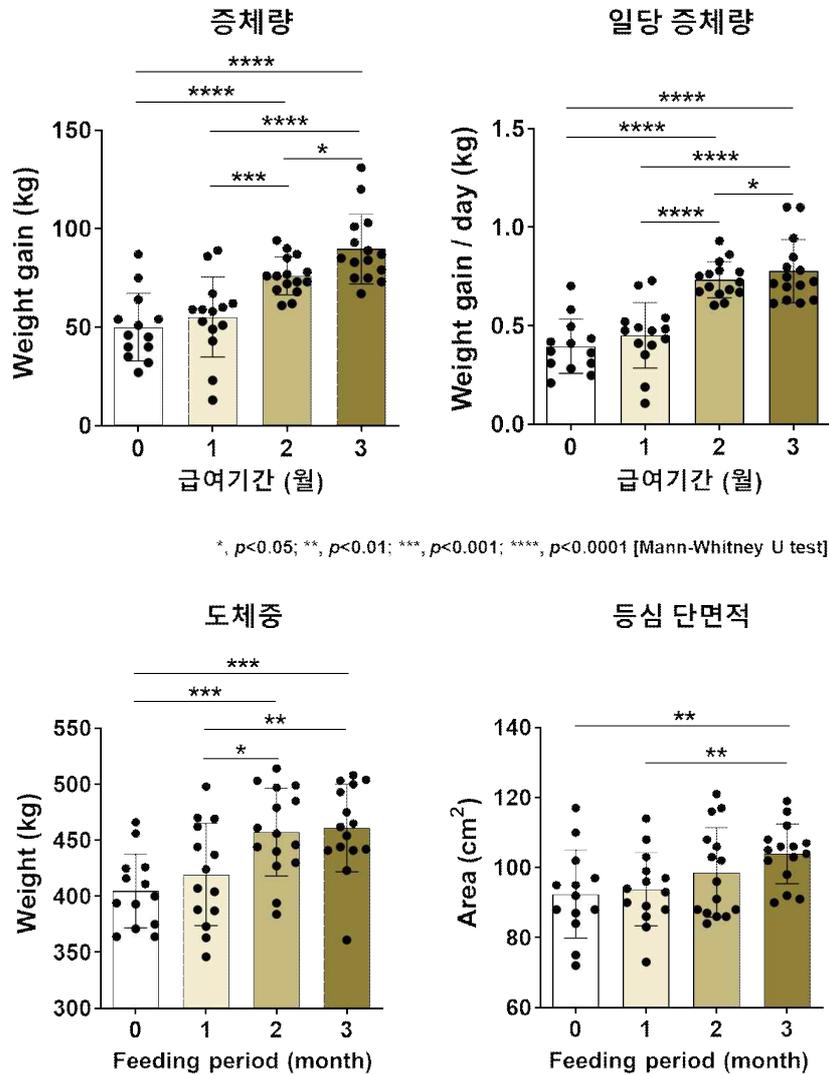


그림 76. BCAAs 급여에 따른 증체량 및 도축성적 향상

- 네 그룹의 지육가격을 토대로 한우 두 당 평균수익을 비교한 결과 BCAAs 비급여, 1개월 급여, 2개월 급여, 3개월 급여 그룹 순으로 각각 11,012,655원, 11,353,684원, 12,039,580원, 12,711,497원으로 BCAAs의 급여에 따른 수익증대 효과가 크게 발생하였음(그림 77). BCAAs 3개월 급여 그룹의 경우 비급여 그룹, 1개월 급여 그룹 및 2개월 급여 그룹과 비교하여 각각 15%, 12%, 5%의 수익 증대 효과를 확인하였음. BCAAs 2개월 급여 그룹의 경우 비급여 그룹 및 1개월 급여 그룹과 비교하여 각각 9%, 6%의 수익 증대 효과를 확인하였음. 축산물품질평가원 기준 2021년 동일기간 전국에서 도축된 한우 311,358마리를 대상으로 비교한 결과 BCAAs 3개월 급여 그룹의 경우 두 당 평균수익 12,711,497원으로 전국 평균수익인 10,258,170원 보다 24% 향상된 한우 두 당 평균 2,453,000원의 수익 증대 발생을 확인하였음.

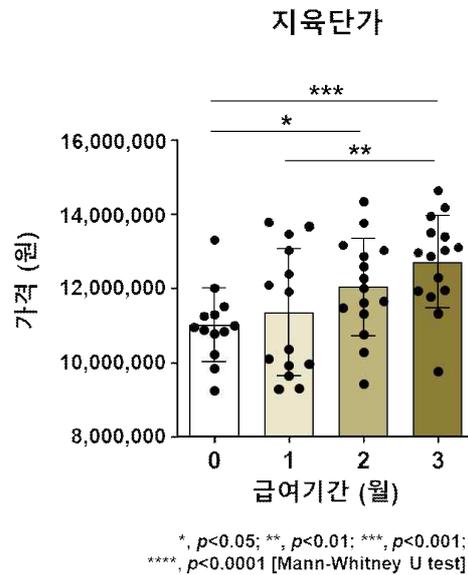


그림 77. BCAAs 급여에 따른 지육단가

- 위 내용의 경우 향후 동물용 지방/체중 증가용 사료 첨가제 개발을 위한 특허출원을 완료하였으며 (출원번호: 특허-2021-0159706), 최대효능을 이끌어 내기 위해 다양한 급여 시기 및 급여 기간에 대한 연구를 수행중임.
- 위 연구를 통해 2021년 1월 EMBO Reports(2020IF=8.807)저널에 수컷의 거세를 통한 웅성 호르몬의 변화가 소장 내 미생물 군집의 변화를 유발하고, 변화된 미생물 군집이 체내 분지쇄 아미노산 (Branched-chain amino acids, BCAAs)의 축적을 통해 근육 내 지방 축적에 기여할 수 있음을 제시하였음.

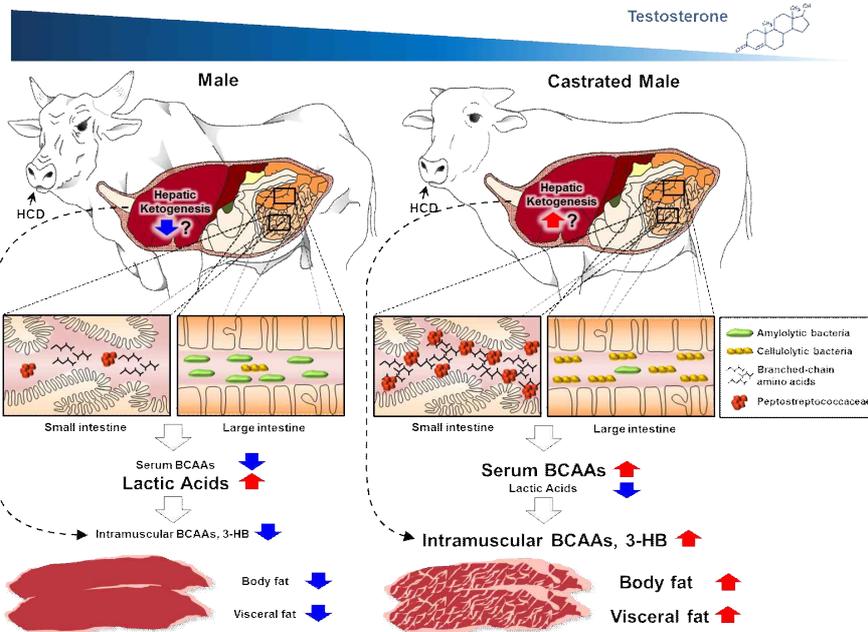


그림 78. 근육 내 지방축적 매커니즘

### 3. 한우의 소화기관 내 유용미생물 분리 및 유전적 특성 확인

- 경상북도 의성군에 위치한 초원농장에서 사육된 1++ 등급에 해당하는 거세 한우의 소장 시료를 확보하여 다양한 배지 조건(BHIA and 10% BHIA)에서 유용 미생물 분리를 실시하여 총 34개의 bacterial colony를 획득함. 획득한 colonies 중 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 실시한 결과 2개의 균주가 *Kocuria rhizophila* and *Humibacter aquilariae* 각각 계통학적으로 가장 가까운 것으로 확인됨. 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 79-80).

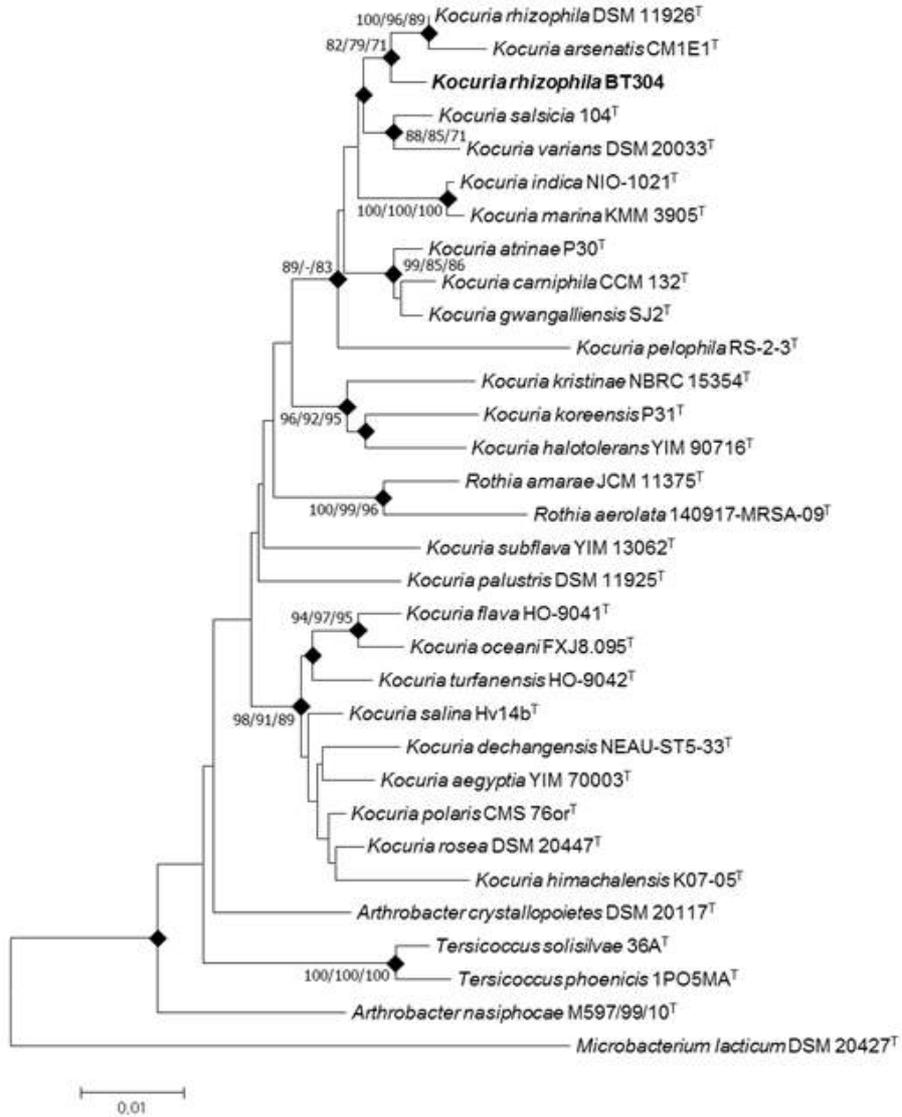


그림 79. BT304의 16S rRNA 유전자 계통분류도

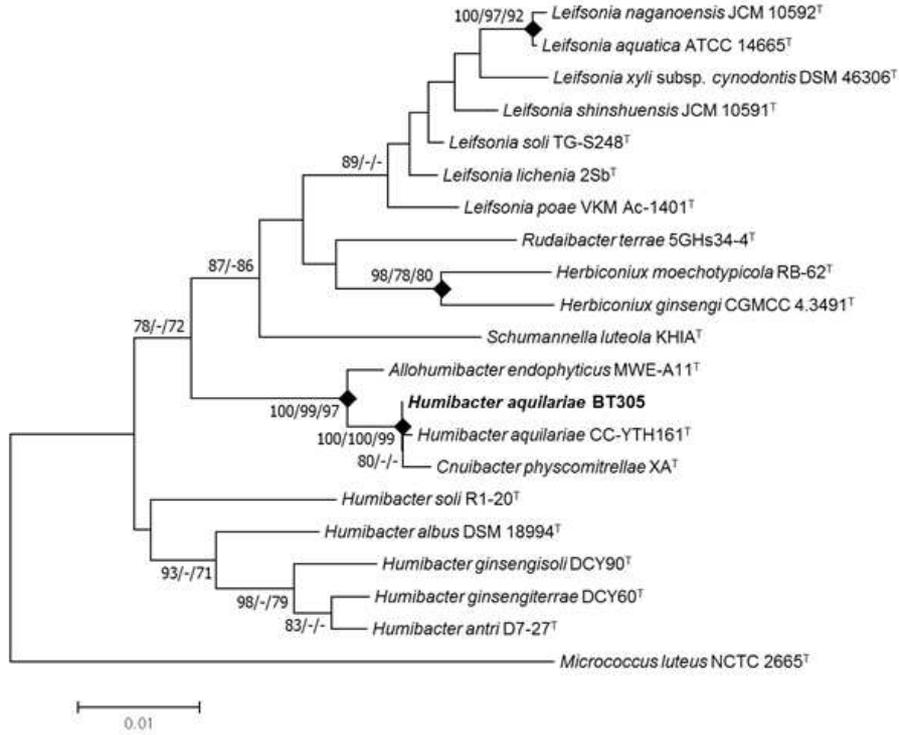


그림 80. BT305의 16S rRNA 유전자 계통분류도

- 한우 소장 내 유용미생물의 유전적 특성을 확인하기 위해 genomic DNAs를 PacBio RS II and Illumina HiSeq4000를 이용해서 whole genome 시퀀싱을 수행함. BT304의 경우 원형의 genome을 가지고 있으며, 2,763,150bp의 genome size를 보유하고, 2359개의 코딩 시퀀스가 있음을 확인하였음. BT305의 경우 원형의 genome을 가지고 있으며, 3,744,173bp의 genome size를 보유하고, 3568개의 코딩 시퀀스가 있음을 확인하였음 (그림 81-82).

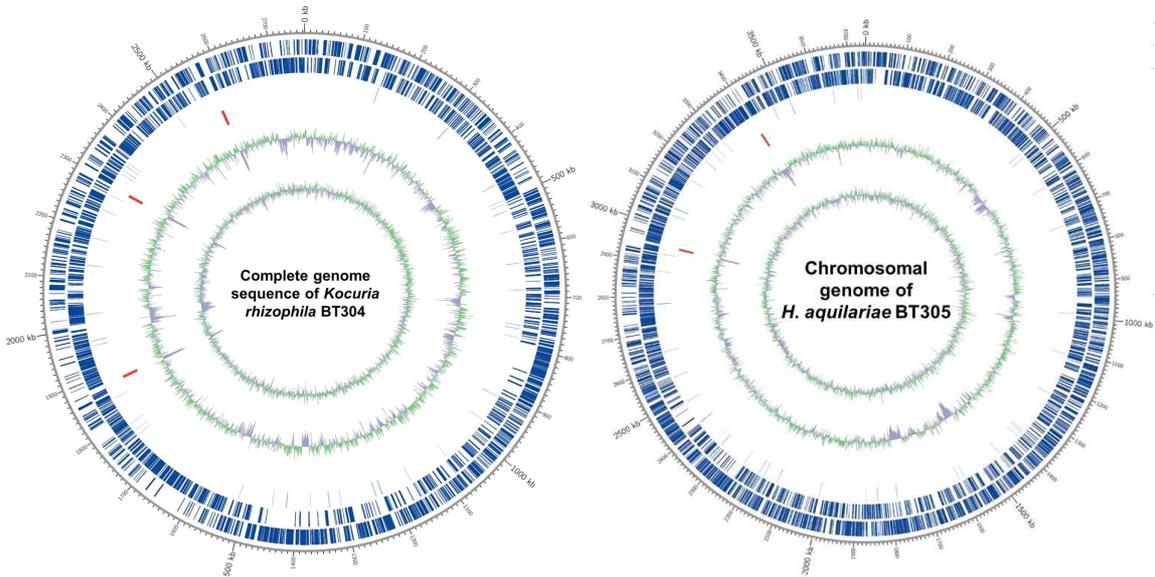


그림 82. BT304의 genome

그림 82. BT305의 genome

- 또한 두 균주의 genome에 Branched Chain Amino Acids(BCAAs)와 관련된 genes이 포함되어 있고, 이는 다양한 dietary nutrients의 대사가 일어나는 소장 내에서 BCAAs의 이용을 통해서 소장 내 아미노산의 대사에 관여하는 균주임을 의미함 (표 10-11).

표 10. 한우 소장미생물 BT304의 유전적 특성

Attributes	<i>Kocuria rhizophila</i> genomes									
	BT304	DC2201	FDAARGOS302	G2	D2	14ASP	P7-4	TPW45	RF	UMB0131
Number of contigs	1	1	1	87	34	183	54	46	90	8
Size (bp)	2,763,150	2,697,540	2,697,877	2,881,857	2,636,961	2,698,103	2,820,331	2,701,701	2,778,506	2,833,440
GC (%)	71.2	71.2	71.2	70.8	70.8	70.8	70.5	70.6	70.6	70.5
OrthoANIu (%)	-	98.92	98.80	97.89	88.14	87.97	87.96	87.92	87.90	87.83
Resource	Bovine gut	Soil	N/A	Wall in slaughterhouse	Human feces	Soil	Fish gut	Freshwater	Soil	Human urine
Virulence, disease and defense	28	28	28	29	38	46	36	32	41	31
Resistance to fluoroquinolones	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4
Resistance to vancomycin	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-
Multidrug resistance efflux pumps	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Amino acid and derivatives	345	356	356	350	322	351	318	316	323	318
BCAA biosynthesis	20	19	19	20	20	24	21	20	20	20
BCAA degradation	52	52	52	54	52	61	52	51	51	52

표 11. 한우 소장미생물 BT304의 유전적 특성

Attributes <sup>Ⓛ</sup>	BT305 <sup>Ⓛ</sup>	<i>Cnuibacter physcomitrella</i> XA <sup>T</sup> <sub>1</sub>	<i>Leifsonia xyl</i> SE134 <sup>Ⓛ</sup>	<i>Humibacter albus</i> DSM 18994 <sup>Ⓛ</sup>
Number of contigs <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>	20 <sup>Ⓛ</sup>
Size (bp) <sup>Ⓛ</sup>	3,744,173 <sup>Ⓛ</sup>	4,061,502 <sup>Ⓛ</sup>	3,596,761 <sup>Ⓛ</sup>	3,693,075 <sup>Ⓛ</sup>
GC (%) <sup>Ⓛ</sup>	70.8 <sup>Ⓛ</sup>	71.1 <sup>Ⓛ</sup>	70.2 <sup>Ⓛ</sup>	68.0 <sup>Ⓛ</sup>
OrthoANIu (%) <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>	97.22 <sup>Ⓛ</sup>	74.75 <sup>Ⓛ</sup>	73.34 <sup>Ⓛ</sup>
Resource <sup>Ⓛ</sup>	Bovine gut <sup>Ⓛ</sup>	Cultured moss <sup>Ⓛ</sup>	Soil <sup>Ⓛ</sup>	Sewage sludge compost <sup>Ⓛ</sup>
Virulence, disease, and defense <sup>Ⓛ</sup>	36 <sup>Ⓛ</sup>	32 <sup>Ⓛ</sup>	37 <sup>Ⓛ</sup>	53 <sup>Ⓛ</sup>
Copper homeostasis	5 <sup>Ⓛ</sup>	3 <sup>Ⓛ</sup>	9 <sup>Ⓛ</sup>	11 <sup>Ⓛ</sup>
Cobalt-zinc-cadmium resistance	2 <sup>Ⓛ</sup>	5 <sup>Ⓛ</sup>	7 <sup>Ⓛ</sup>	8 <sup>Ⓛ</sup>
Mercuric reductase	2 <sup>Ⓛ</sup>	2 <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>
Arsenic resistance	4 <sup>Ⓛ</sup>	3 <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>	5 <sup>Ⓛ</sup>
Resistance to fluoroquinolones	4 <sup>Ⓛ</sup>	4 <sup>Ⓛ</sup>	4 <sup>Ⓛ</sup>	4 <sup>Ⓛ</sup>
Beta-lactamase	1 <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>	3 <sup>Ⓛ</sup>
Multidrug Resistance Efflux Pumps	2 <sup>Ⓛ</sup>	2 <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>	2 <sup>Ⓛ</sup>
Resistance to chromium compounds	1 <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>
Secondary metabolism <sup>Ⓛ</sup>	4 <sup>Ⓛ</sup>	4 <sup>Ⓛ</sup>	6 <sup>Ⓛ</sup>	1 <sup>Ⓛ</sup>
Auxin biosynthesis	4 <sup>Ⓛ</sup>	4 <sup>Ⓛ</sup>	6 <sup>Ⓛ</sup>	- <sup>Ⓛ</sup>
Amino acids and derivatives <sup>Ⓛ</sup>	313 <sup>Ⓛ</sup>	276 <sup>Ⓛ</sup>	281 <sup>Ⓛ</sup>	301 <sup>Ⓛ</sup>
BCAA biosynthesis	16 <sup>Ⓛ</sup>	20 <sup>Ⓛ</sup>	15 <sup>Ⓛ</sup>	20 <sup>Ⓛ</sup>
BCAA degradation	21 <sup>Ⓛ</sup>	29 <sup>Ⓛ</sup>	38 <sup>Ⓛ</sup>	10 <sup>Ⓛ</sup>

#### 4. 성체 육질향상 및 지방증가 후보 미생물 분리/동정 및 유전체 확보

- 거세 한우의 소장 샘플에서 육질향상 및 지방증가 후보 혐기 미생물을 분리하였음 (그림 83). 해당 미생물군은 분류학적으로 family *Peptostreptococcaceae*에 속하며 (그림 84) 향후 마우스 실험을 통해 분리된 미생물을 경구투여 하여 지방대사와 관련된 효과를 입증하고자 함.



그림 83. 후보 미생물의 균락 형태

**A**

OTUID	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy
555945	<i>Romboutsia timonensis</i>	Marseille-P326(T)	99.53	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Romboutsia
628226	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	99.53	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
547714	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	98.82	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
337083	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	97.16	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
606927	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	100	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_485102	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	95.02	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_266726	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	95.26	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
350697	<i>Romboutsia maritimum</i>		98.34	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Romboutsia
denovo_265580	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	96.21	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
290375	<i>Romboutsia timonensis</i>	Marseille-P326(T)	97.39	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Romboutsia
denovo_202300	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	95.26	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_317434	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	96.92	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
551822	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	99.29	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_263707	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	94.55	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_238785	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	96.92	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_72626	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	97.87	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_475989	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	96.92	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_360153	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	96.92	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_18890	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	98.1	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium
denovo_219475	<i>Eubacterium tenue</i>	DSM 20695(T)	96.92	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococaceae; Paeniclostridium

**B**

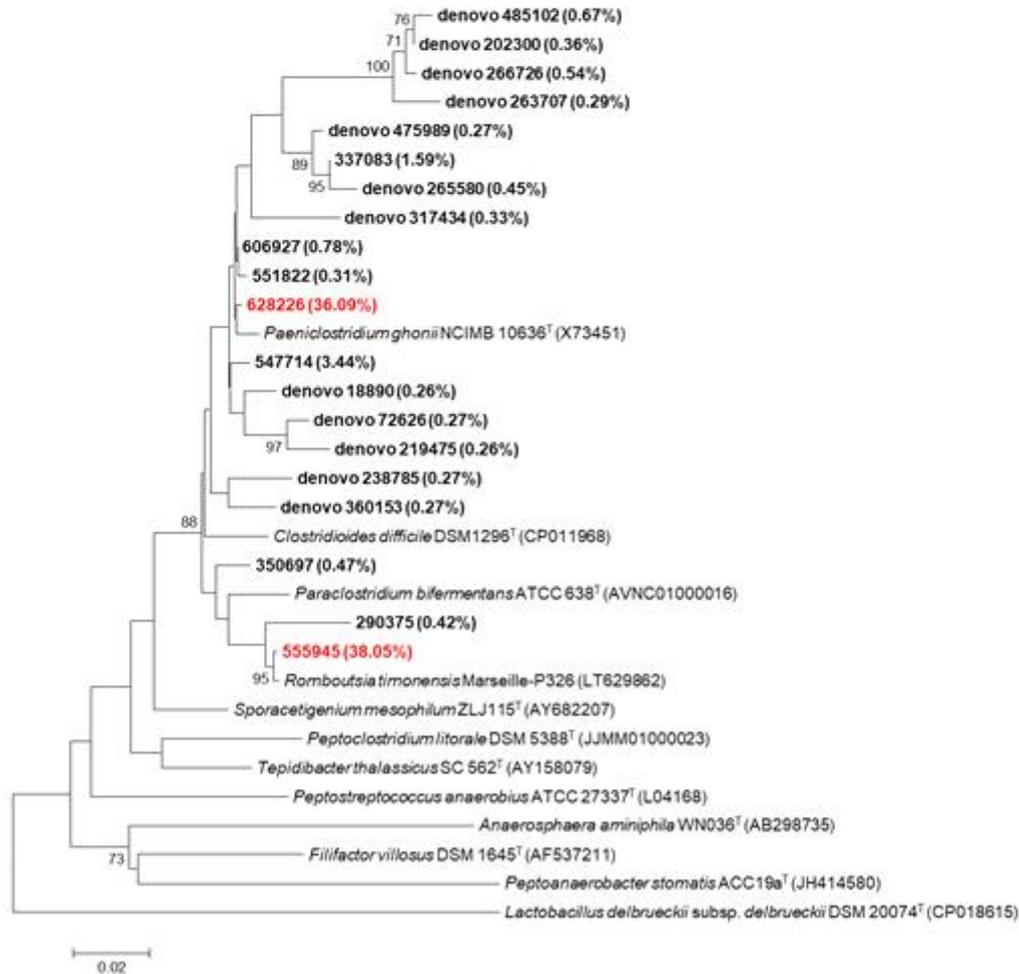


그림 84. 육질향상 및 지방증가 후보 미생물

- 후보 미생물의 가진 유전적 특성과 기능을 규명하기 위해 유전체 (genome) 데이터를 확보함. 배양한 후 이를 확보, 확보한 세포 생물량 (cell biomass)으로부터 DNA를 추출함. 겔

전기영동과 bioanalyzer (Agilent™) 를 이용해 추출한 DNA 샘플이 얼마나 깨져있는지를 확인하고 DNA 온전성 (integrity)을 정량함.

- PacBio DNA Template Prep Kit (Pacific Biosciences Inc.; PacBio®)와 PacBio DNA/Polymerase Binding Kit P6을 사용해 SMRTbell template library를 제작, PacBio RS II platform을 이용해 sequencing을 진행함. RS HGAP assembler를 이용, De novo assembly 작업을 진행함으로써 sequencing을 통해 확보된 raw read (가공되지 않은 서열파편) 들을 연결하여 상대적으로 긴 DNA 파편인 contig들을 생산함. 동일한 DNA 샘플을 Illumina HiSeq 4000 platform (Illumina Inc.)을 이용해 sequencing을 수행, Pilon이라는 assembler를 이용하여 PacBio platform으로 생산된 contig들에 Illumina sequencing으로 합성된 read를 비교대조함. 상호보완적인 부분을 검색하여 PacBio sequencing 시 발생한 오류를 찾고 최종 consensus sequence (공통 서열) 를 제작함. 이를 error correction (오류수정) 과정이라 하여 이를 통해 sequencing 과정에서 발생하는 잘못된 read 합성 오류를 찾아 고품질의 유전체 데이터를 생산해낼 수 있음. 결과적으로 총 contig 9개, 전체 유전체 길이 2,922,474 bp, sequencing depth는 295.33 배 수준의 유전체 데이터를 확보함 (그림 85).

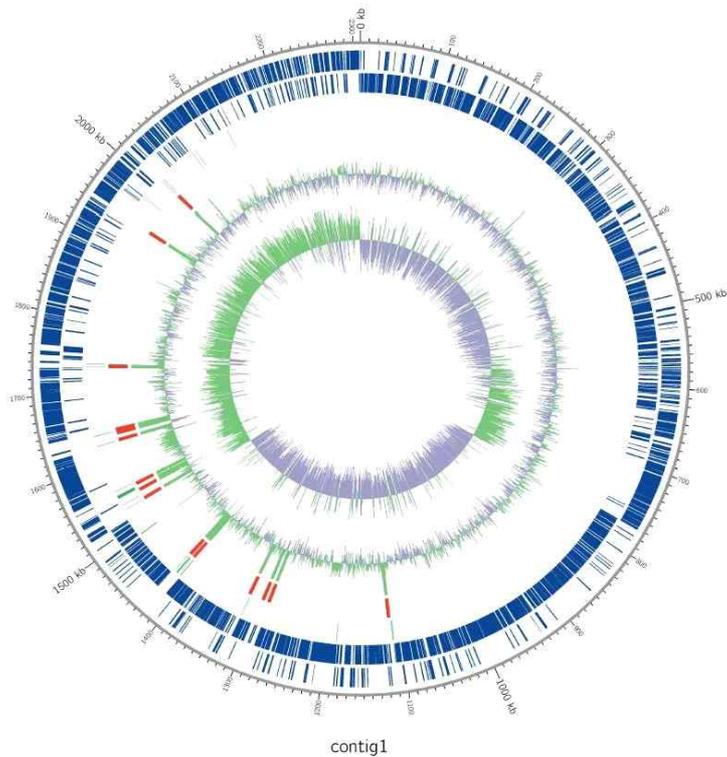


그림 85. 후보 미생물 유전체의 형태

**5. 성체 육질향상 및 지방증가 후보 미생물의 효능평가**

- 생후 7주령 수컷 생쥐를 대상으로 특허 균주의 증체 및 체지방량 증대 효과를 평가함 (그림 86). 사용한 생쥐의 유전적 배경은 C57BL/6로 모두 동일하며, 실험 과정 동안 멸균된 사료와 식수를 급여하였음. 모든 실험동물은 각각의 케이지에 개별적인 자체 환기시스템이 적용되어 외래 미생물 감염을 방지하는 개별환기 사육장치 (Individual Ventilated Cage Rack) 를 이용해 사육되었음. 생후 4주령 수컷 생쥐를 구매하여 2주간 실험실 환경에 순치시킨 후

실험에 사용함. 균주의 장내 정착을 촉진하기위해 균주 처리 전 1주간 항생제 카테일 (ampicillin (1 g/L), neomycin (1 g/L), metronidazole (1 g/L), vancomycin (0.5 g/L)) 를 식수에 섞어 1주일간 급여하여 장내 미생물량을 줄임. 장내에 남아있는 항생제는 급여 균주 의 장내 정착을 저해할 수 있기 때문에 하루 동안 일반 물을 급여하여 항생제가 배출될 수 있도록 함. 2주간의 순치 기간 및 항생제 처리 기간에는 일반식이를 급여하였고, 균주 투여 기간에는 고지방식이 (45%kcal)를 급여하였음. 실험 그룹은 총 5그룹으로, 음성대조군 그룹 으로 인산완충생리식염수 (Phosphated buffered saline, PBS) 및 장내 미생물 Bt 처리군과 실험군 후보 미생물 Pg 처리군, 후보 미생물 Pb 처리군, 후보 미생물 Rt 처리군으로 구성 됨. 각 실험군의 개체는 무작위적으로 선정되었음.

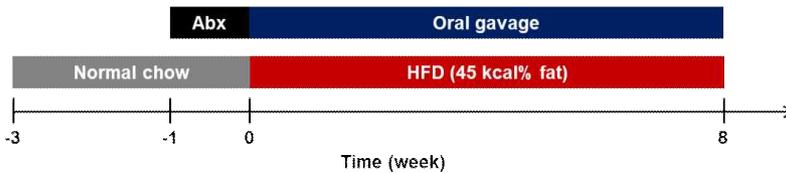


그림 86. 균주 투여 실험 모식도

- 균주 투여 전 그룹 별 체중은 유의미한 차이가 없었고, 균주 투여군과 대조군 생쥐의 식 이 섭취량 차이 관찰되지 않았음. 균주 투여군과 대조군 간 체중 증가율 (%) 비교 결과, 균 주 급여 이후 7주가 지난 시점부터 후보 미생물들을 급여한 생쥐 그룹 (Rt, Pg, and Pb)에 서 PBS 및 Bt 처리 대조군(Control)에 비해 통계적으로 유의미한 체중 증가가 관찰됨 (그림 87).

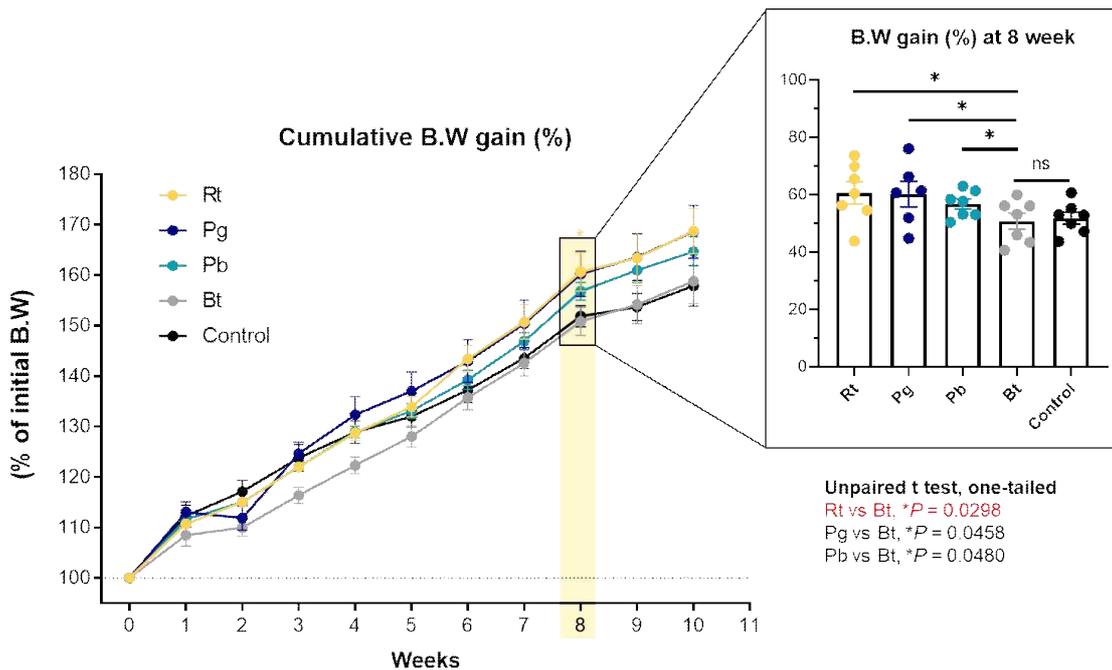


그림 87. 균주 경구 투여 처리 생쥐의 체중 증가량 비교

- 해당 균주의 경우 향후 동물용 사료첨가 프로바이오틱제 개발을 위한 특허출원을 준비 중이며, 동물의 장내 정착을 증가시킬 수 있는 조건 함양과 내산성, 담즙내성, 열 내성 테스트

트를 추가로 진행할 예정임.

○ 국산 및 중국산 상품 김치의 원산지에 따른 김치 내 세균/바이러스 군집 구조 분석

1. 원산지별 상품 김치의 선정 및 시료 확보

- 국산 및 중국산 상품 김치의 원산지에 따른 세균 및 바이러스 군집 분석을 위한 시료로서, 각 10종류의 상품 김치(배추포기김치)를 선정하였음. 각 김치는 배송되어 실험실에 도착 즉시 김치 국물을 채취하여 영하 70℃의 초저온 냉동고에 보관하고 이후 실험에 사용함. 선정된 상품김치의 목록은 다음과 같음 (표 12).

표 12. 국산 및 중국산 상품김치의 pH와 염도(%)

원산지	김치 제조 회사 정보		pH	염도(%)	
	김치명	업체명			
국산	K1	양반포기김치	(주)동원 F&B	3.96±0.01	1.95±0.03
	K2	깊은맛전라도김치포기김치	풀무원	4.62±0.01	2.23±0.00
	K3	예안촌 맛있는 포기김치 배추김치	대상(주)_종가집	4.88±0.01	1.60±0.16
	K4	포기김치	설악산김치수	4.35±0.01	1.80±0.02
	K5	오색소반 포기김치	경기농협식품조합	4.34±0.01	1.81±0.00
	K6	명품생포기김치	참미식품	5.21±0.01	2.86±0.00
	K7	약선포기김치	약선원	4.34±0.02	1.91±0.00
	K8	진심담은 전라도 포기김치	진심담은김치	5.15±0.01	2.32±0.03
	K9	화원농협 이맑은김치	황원농협	5.67±0.01	1.98±0.00
	K10	나누리포기김치	나누리식품	4.45±0.01	2.70±0.03
중국산	C1	동풍김치	순농원	5.46±0.01	1.80±0.02
	C2	동지김치	인성유통	4.59±0.02	2.12±0.03
	C3	주은농산포기김치	주은농산	4.38±0.01	1.99±0.00
	C4	생포기김치	알참마루	5.51±0.01	1.82±0.04
	C5	생포기김치	권푸드	5.36±0.01	2.20±0.05
	C6	중국산 수입김치	하나푸드	5.18±0.00	2.23±0.04
	C7	미도김치	정국푸드	5.02±0.01	2.25±0.00
	C8	포기김치	온새미로	4.44±0.01	1.98±0.05
	C9	백양초원배추김치 생포기김치	한중푸드	4.76±0.01	1.91±0.04
	C10	줄아김치	신의한수	4.47±0.02	1.99±0.00

2. 원산지별 상품 김치의 세균 군집 분석

- 김치는 즙만 취하여 이를 세균 및 바이러스 군집 확보 및 pH 측정에 사용하였으며, 군집 분석을 위한 세균 메타유전체 추출을 위하여 5,000 rfc에서 10분 원심 분리하여 그 침전물을 사용함. 각각의 김치즙에서 채취한 침전물로부터 bead-beating 방법을 이용하여 세균의 세포벽을 파쇄하고 메타유전체 DNA를 추출함. 추출한 DNA는 16S rRNA 유전자에 특이적인 60종류의 barcoded-primer로 증폭한 후 차세대염기서열 분석(pyrosequencing)을 의뢰함. 차세대염기서열 분석 결과, high quality sequence reads는 시료별로 최소 1,211 reads, 최대 3,819 reads로, 전체 평균 샘플별 2,192 reads를 획득함.

- 세균 군집의 다양성 지표들은 97% 염기서열 유사도 수준(operational taxonomic units [OTUs])에서 분석되었으며, 31-123 OTUs로 샘플당 평균 73 OTUs가 확인됨. 또한 Chao1에 의한 종 풍부도나 shannon과 simpson에 의한 다양성은 97% 유사도 수준에서 44.00-210.11, 0.87-3.71, 0.17-0.86의 범위를 각각 나타냄 (표 13-14).

표 13. 국산 상품김치의 샘플별 세균 군집 다양성 지표

Sample ID	Reads	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson
K1-1	2,128	40	87.5	0.98	0.22
K1-2	1,265	31	44	1.56	0.41
K1-3	2,122	42	94.5	1.21	0.29
K2-1	2,497	63	108.09	1.8	0.46
K2-2	1,804	56	84.11	2	0.51
K2-3	2,303	62	108.43	1.96	0.49
K3-1	2,609	37	50	1.92	0.56
K3-2	2,161	37	48.14	1.87	0.53
K3-3	3,304	50	76.25	1.91	0.55
K4-1	2,828	69	97.88	2.83	0.75
K4-2	1,783	61	126	2.86	0.76
K4-3	2,356	60	74.25	2.91	0.77
K5-1	3,224	98	153.65	3.3	0.84
K5-2	2,183	85	122.19	3.42	0.84
K5-3	2,939	101	140	3.46	0.85
K6-1	3,452	108	180.07	3.45	0.85
K6-2	2,317	102	156.05	3.54	0.85
K6-3	3,216	109	144.04	3.47	0.86
K7-1	1,551	45	91	2.21	0.67
K7-2	1,993	54	86.5	2.25	0.67
K7-3	2,473	59	134.6	2.3	0.68
K8-1	3,819	123	200.77	1.59	0.33
K8-2	2,464	66	126.55	0.87	0.17
K8-3	3,503	99	209	1.09	0.21
K9-1	1,527	62	95.83	3.26	0.83
K9-2	1,563	70	124.08	3.15	0.81
K9-3	2,547	94	123.53	3.29	0.81
K10-1	1,422	40	62.67	2.57	0.7
K10-2	2,821	70	118.33	2.61	0.69
K10-3	2,629	73	139.6	2.87	0.78

표 14. 중국산 상품김치의 샘플별 세균 군집 다양성 지표

Sample ID	Reads	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson
C1-1	1,851	52	86.5	2.55	0.69
C1-2	1,816	47	55.57	2.3	0.63
C1-3	1,894	60	110.75	2.72	0.72
C2-1	1,893	94	129.88	3.48	0.85
C2-2	2,254	106	165.37	3.56	0.86
C2-3	2,151	86	114.33	3.14	0.8
C3-1	1,871	64	101.8	2.64	0.69
C3-2	1,211	55	88.33	2.82	0.74
C3-3	2,093	79	124	2.81	0.74
C4-1	1,458	77	129.93	2.9	0.73
C4-2	1,452	48	79.63	2.41	0.68
C4-3	1,734	95	177.88	3.13	0.74
C5-1	1,520	59	152	2.34	0.65
C5-2	1,328	52	91	2.28	0.67
C5-3	1,872	111	164.71	3.71	0.84
C6-1	2,175	89	119	3.07	0.77
C6-2	2,146	72	105.21	2.96	0.78
C6-3	2,875	88	115.35	3.03	0.77
C7-1	1,933	90	127.14	2.73	0.7
C7-2	2,176	100	166.35	2.67	0.69
C7-3	2,420	120	171.11	2.47	0.52
C8-1	1,887	94	133.05	3.36	0.82
C8-2	2,022	81	96.26	3.17	0.78
C8-3	2,509	82	115	2.35	0.58
C9-1	2,047	53	78	2.06	0.59
C9-2	1,974	58	83.3	2.44	0.68
C9-3	2,252	50	73.33	1.97	0.53
C10-1	2,196	86	155.46	2.96	0.75
C10-2	1,758	54	88.5	2.06	0.53
C10-3	1,960	90	210.11	3.29	0.82

- 국산과 중국산 상품김치 내의 세균 군집사이의 종 풍부도(Chao1)의 특별한 차이는 발견되지 않았으며, 종 다양성에서는 shannon과 simpson index 모두 중국산 상품김치에서 유의적으로 높은 것으로 확인됨 (그림 88).

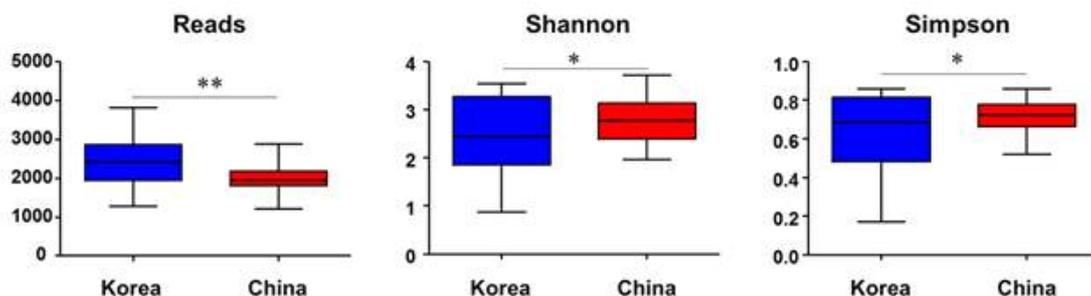


그림 88. 국산 및 중국산 상품김치의 세균 군집 다양성 지표의 차이

- 국산 및 중국산 상품김치 내의 세균 군집 구조는 phylum 수준에서는 Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, TM7 등 6개의 phyla가 확인됨. 그 중 Firmicutes가 국산은 평균 97.8%, 중국산은 평균 96.9% 우점함. Family 수준에서는

62개의 families가 확인되었으며, 그 중 order Lactobacillales에 속하는 Streptococcaceae, Enterococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae 등이 대부분을 차지하고 있음 (그림 89).

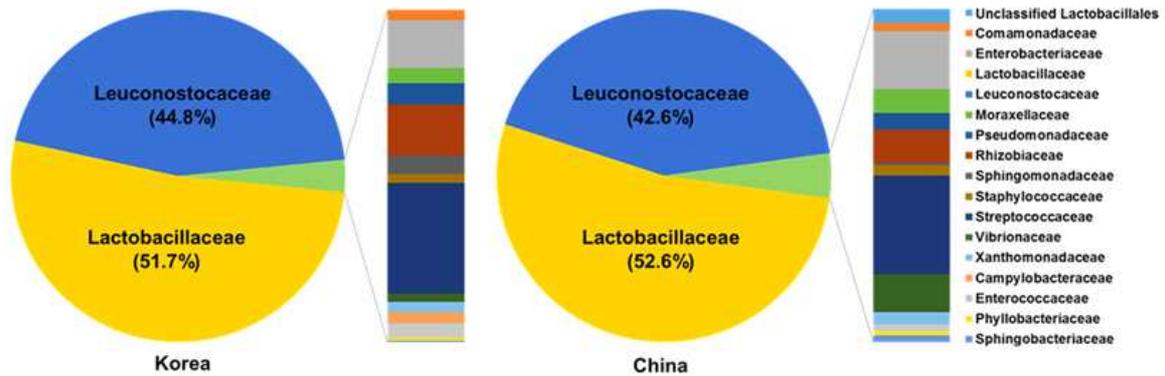


그림 89. 국산 및 중국산 상품김치의 세균 군집 구조(family level)

- Genus 수준에서는 총 101개의 genera가 확인되었으며, 국산 및 중국산 상품김치 내에 다양하게 분포하고 있음을 확인함. 그 중 *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*에 속하는 LAB(lactic acid bacteria)가 국산에서는 각각 평균 51.7%, 34.1%, 10.7%로 우점하고, 중국산에서는 각각 평균 52.6%, 29.2%, 13.4%로 우점함 (그림 90).

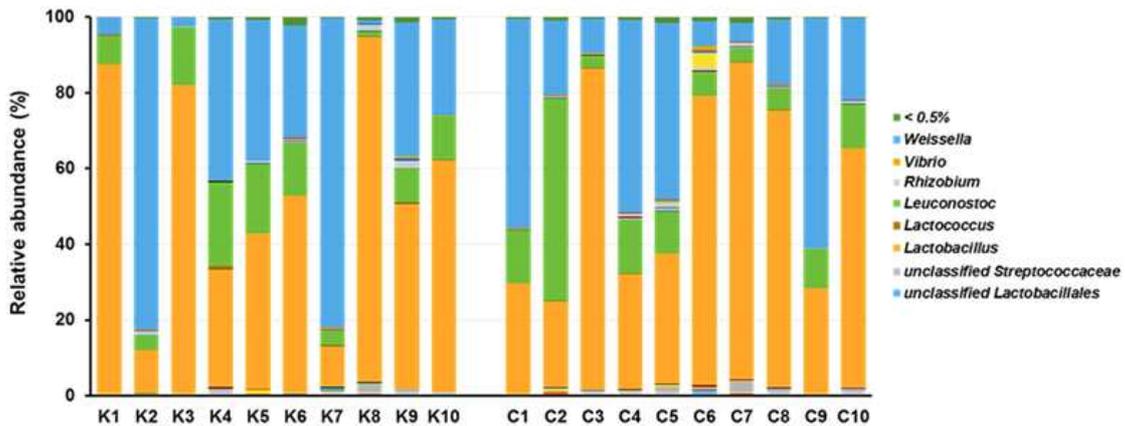


그림 90. 국산 및 중국산 상품김치의 시료별 세균 군집 구조(genus level)

- 이러한 세균 군집의 차이는 PCoA 결과에서 더욱 뚜렷하며, 원산지별로 cluster를 형성하는 것을 확인함. 이러한 국산 및 중국산 김치내의 세균 군집의 차이는 바이러스 군집 구조에 영향을 줄 가능성이 매우 큼 (그림 91-92).

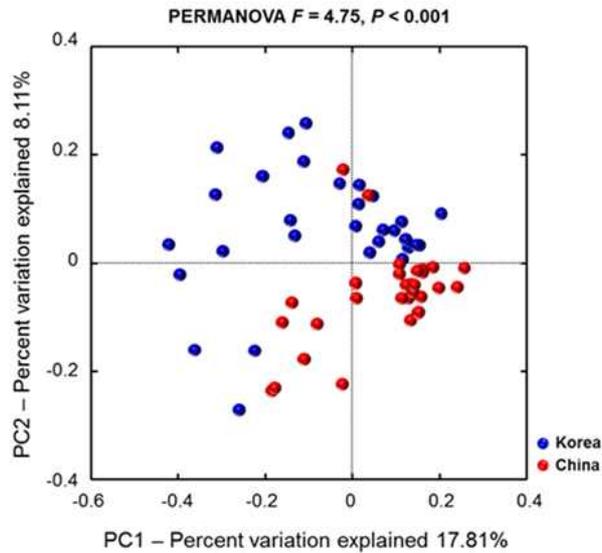


그림 91. 국산 및 중국산 상품김치의 원산지별 세균군집의 PCoA 결과

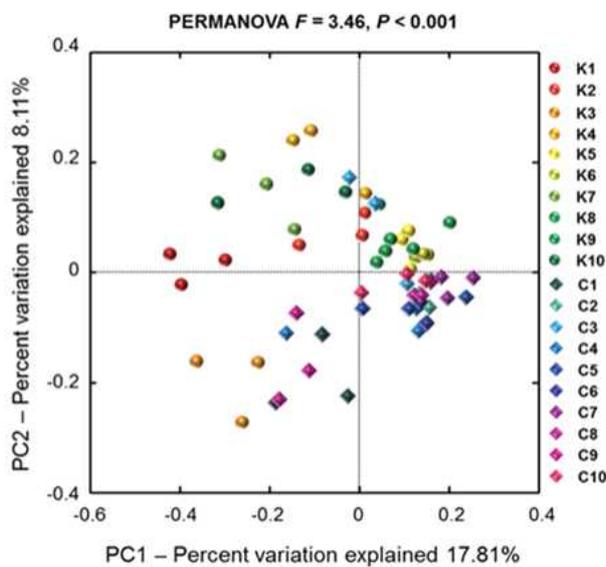


그림 92. 국산 및 중국산 상품김치의 시료별 세균군집의 PCoA 결과

### 3. 김치 내 바이러스 확보 및 관찰

가. 김치 내 바이러스 순수분리 및 농축

- 김치즙을 취하여 5,000 rfc에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 사용함.
- 김치즙의 상등액은 5um, 1.2um, 0.8um, 0.65um, 그리고 0.45 um (2회) pore size의 syringe filter를 이용하여 단계적으로 여과함으로써 세균을 제거하고 바이러스만을 순수하게 분리함.

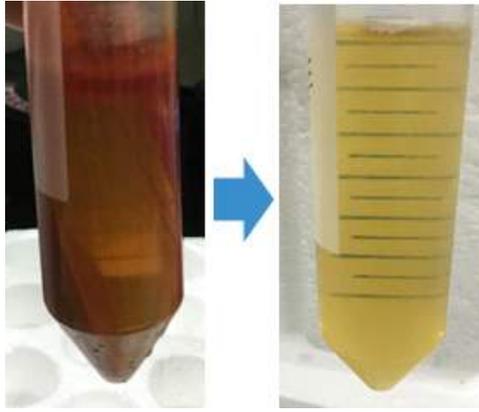


그림 93. 김치즙의 상등액을 단계적으로 여과한 시료

- 여과한 김치즙 시료를 농축하기 위해서 최종농도 10% polyethylene glycol (PEG 8000)과 1M NaCl 용액을 첨가하고 4℃에서 12시간 동안 침전시키고 8,000 rfc에서 10분간 원심분리함.

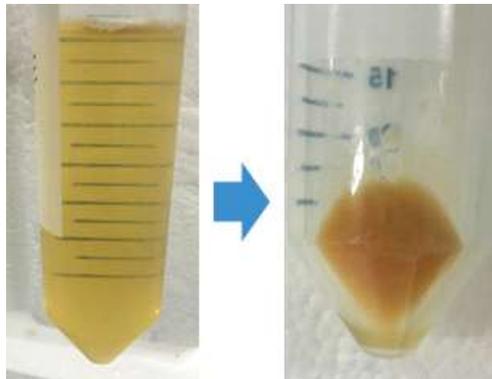


그림 94. PEG 8000을 이용하여 김치 내의 바이러스 농축

- 침전물을 PBS buffer에 재용해한 후 최종 농도 0.5 vol 3M KCl을 첨가하여 얼음에서 15분간 침전시킨 뒤, 10,000 rfc에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 취해 바이러스 계수 및 관찰, 메타 유전체 추출에 이용함.

#### 나. 김치 내 바이러스-like particles의 확인

- 바이러스만을 순수 분리한 김치즙 여과액을 초고속원심분리기를 이용하여 CsCl 밀도에 따른 분획으로 분리한 후 (60,000 rfc, 2시간), 바이러스에 해당하는 분획을 채취하였음. 이들 시료는 투석을 통해 순수한 바이러스 입자들만 수집하여 1X SYBR Gold로 염색하여 김치 내의 virus-like particle을 형광현미경으로 관찰함.

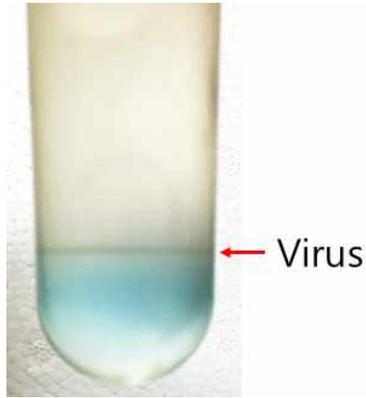


그림 95. 초고속원심분리 후 바이러스 띠의 모습

- Virus-like particle을 형광현미경으로 관찰한 결과, 김치즙 1mL에는 국산 김치는 평균  $1.27 \times 10^8$ , 중국산 김치는 평균  $2.09 \times 10^8$ 의 virus-like particle이 존재함을 확인함.

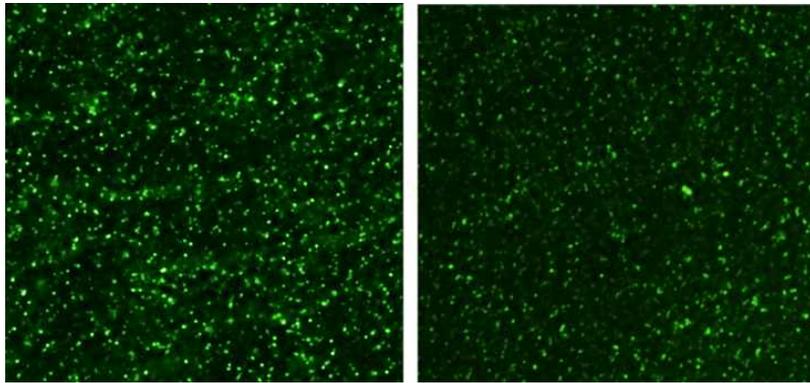


그림 96. 현미경을 이용한 김치시료 내 바이러스 탐색

#### 다. 김치 내 바이러스 형태 관찰

- 형광현미경을 통해 확인된 virus-like particle의 형태(morphology)를 관찰하고자 함. 바이러스만을 순수 분리한 김치즙 여과액을 초고속원심분리기를 이용하여 CsCl 밀도에 따른 분획으로 분리한 후 (60,000 rfc, 2시간), 바이러스에 해당하는 분획을 채취함. 이들 시료는 투석을 통해 순수한 바이러스 입자들만 수집하여 2% uranyl acetate로 염색한 후 Transmission Electron Microscopy(TEM)로 관찰함. 그 결과 head만으로 이루어진 바이러스들과 head-short tail로 구성된 바이러스 등이 관찰되어 대부분 50-100 nm의 전형적인 파아지(phage) 형태를 가지고 있음을 확인하였음.

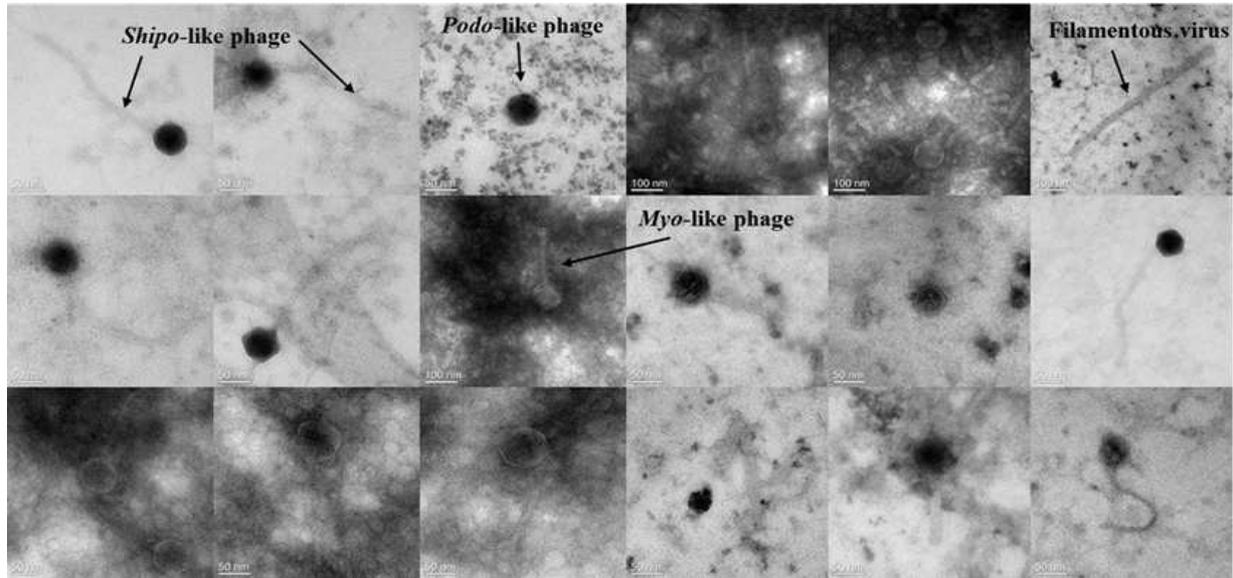


그림 97. TEM을 통한 김치 내 바이러스(virus)의 형태(morphology) 확인

#### 4. 김치 내 바이러스 메타유전체 확보 및 차세대염기서열 분석

- 국산 10종 및 중국산 10종 (각각 3반복) 상품김치로부터 순수분리된 바이러스 시료를 PEG 8000을 이용하여 농축하고 PBS buffer에 재용해하여 메타 유전체 추출에 사용함. 0.2 volume chloroform을 10분간 처리한 뒤, 8,000 rfc에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취함. 이 후 메타유전체를 증폭할 때 inhibitor로 작용하는 polysaccharides를 제거하기 위해 최종 농도 0.7M NaCl과 10% CTAB을 첨가하였음. 남아있을 세균의 유전체를 제거하기 위해 DNase I을 처리한 후에 바이러스의 capsid protein을 분해하는 proteinase K를 처리하여 바이러스 메타유전체를 추출하였음. 추출된 바이러스의 메타유전체는 MoBio kit을 사용하여 다시 정제한 뒤, MDA를 통해 유전체를 증폭하여 차세대염기서열 분석을 의뢰함.
- 국산 및 중국산 상품김치내의 바이러스 메타 유전체는 샘플별로 각각 101bp의 paired-end library를 구축하여 Illumina HiSeq 4000 system으로 염기서열 분석을 완료함.

표 15. 국산 김치 바이러스 유전체 서열분석 결과

Sample ID	#Raw read	#High-quality read	#Contig	N50	N80	Largest contig length (bp)	#Contig (>=500 bp)	Average contig length (>=500bp)
K1-1	12,449,988	11,511,326	3,040	1,635	482	43,941	1,207	983.83
K1-2	10,072,404	9,111,210	1,619	2,294	538	44,058	713	1,125.51
K1-3	16,202,752	14,624,626	3,593	1,537	450	66,841	1,320	951.35
K2-1	9,718,424	8,813,552	2,460	1,802	592	139,529	1,255	1,098.10
K2-2	9,915,306	8,846,640	1,850	1,399	488	59,204	819	949.07
K2-3	10,638,484	9,646,642	2,022	1,378	497	67,438	925	946.39
K3-1	10,127,478	8,623,254	1,037	1,197	472	21,620	432	905.90
K3-2	12,097,982	9,844,324	1,222	1,126	466	21,400	519	868.44
K3-3	12,884,732	10,721,010	1,222	1,200	472	21,620	519	894.42
K4-1	11,703,264	10,621,894	6,472	2,944	717	133,651	3,502	1,303.75
K4-2	11,260,228	10,189,082	6,205	2,877	725	133,546	3,428	1,314.07
K4-3	12,326,836	11,129,250	6,435	2,705	706	133,650	3,463	1,291.16
K5-1	10,549,494	9,609,102	3,757	2,102	611	372,023	1,836	1,163.62
K5-2	10,140,168	9,219,254	3,739	2,142	617	372,023	1,797	1,149.48
K5-3	15,282,848	13,684,996	4,709	2,428	653	372,023	2,281	1,239.67
K6-1	9,679,612	8,423,502	1,994	2,073	538	122,554	884	1,089.27
K6-2	12,779,782	10,700,472	2,875	1,812	507	122,584	1,214	1,037.32
K6-3	10,432,942	9,128,574	2,025	2,285	551	122,584	893	1,113.91
K7-1	10,613,018	9,493,268	872	5,438	822	71,890	524	1,457.84
K7-2	14,362,838	12,692,036	931	5,360	921	44,027	529	1,562.88
K7-3	15,368,072	13,675,462	1,003	5,561	929	71,822	584	1,533.91
K8-1	11,197,798	9,940,844	1,185	2,262	530	66,731	523	1,157.02
K8-2	11,767,622	10,524,674	1,250	2,267	568	38,392	503	1,180.23
K8-3	12,630,980	11,223,088	1,058	3,444	589	58,945	414	1,286.10
K9-1	10,829,662	7,496,114	2,653	1,776	593	62,356	1,396	1,098.29
K9-2	14,000,566	9,740,122	3,316	1,719	603	133,999	1,923	1,074.83
K9-3	11,348,352	8,164,598	2,704	1,719	620	127,925	1,461	1,096.47
K10-1	9,678,182	8,831,810	2,181	2,205	636	88,770	1,077	1,149.38
K10-2	13,316,416	11,909,302	2,599	2,118	564	112,126	1,129	1,088.95
K10-3	10,345,270	9,311,912	2,254	2,246	643	88,730	1,093	1,150.52

표 16. 중국산 김치 바이러스 유전체 서열분석 결과

Sample ID	#Raw read	#High-quality read	#Contig	N50	N80	Largest contig length (bp)	#Contig (>=500 bp)	Average contig length (>=500bp)
C1-1	7,774,256	6,476,950	1,646	1,070	446	8,978	689	828.79
C1-2	13,331,608	10,993,340	2,441	1,054	439	36,368	1,023	806.71
C1-3	10,582,768	9,104,534	4,155	981	415	22,852	1,629	782.85
C2-1	7,015,890	6,049,586	6,137	1,293	520	38,625	3,104	919.95
C2-2	10,506,808	9,507,486	11,289	1,309	522	126,131	5,770	930.27
C2-3	12,866,992	11,672,566	10,059	1,276	479	112,922	4,613	895.51
C3-1	8,278,758	7,361,948	8,515	1,291	499	81,586	4,040	906.89
C3-2	12,417,434	10,443,372	6,395	1,127	422	89,737	2,393	855.94
C3-3	10,805,324	9,821,228	9,498	1,341	485	82,590	4,268	916.72
C4-1	9,608,566	8,817,896	17,540	1,228	491	90,422	8,717	889.47
C4-2	12,719,762	11,291,958	12,193	1,126	463	48,246	5,620	847.11
C4-3	10,886,338	9,850,862	14,940	1,166	474	108,647	7,110	858.24
C5-1	11,737,204	10,583,256	9,035	1,092	431	99,435	3,713	822.38
C5-2	11,915,996	10,719,904	7,880	1,034	425	72,540	3,161	811.32
C5-3	10,256,556	9,351,582	8,094	1,113	436	103,089	3,373	827.26
C6-1	12,584,088	11,412,372	16,084	1,639	538	83,841	7,679	1,023.52
C6-2	10,514,880	9,652,272	14,676	1,392	511	105,802	7,018	944.65
C6-3	10,938,700	9,941,598	14,960	1,462	507	105,802	7,067	961.86
C7-1	14,660,918	13,036,044	15,674	1,289	503	81,389	7,904	921.10
C7-2	10,837,724	9,151,552	5,283	1,598	536	61,707	2,604	1,018.66
C7-3	10,577,040	9,485,290	12,907	1,389	516	83,945	6,605	947.56
C8-1	10,962,520	10,015,212	8,018	1,098	414	45,932	2,938	827.21
C8-2	10,485,830	9,469,082	7,819	1,076	402	75,322	2,806	812.89
C8-3	8,417,876	7,737,766	6,543	1,173	416	90,107	2,417	835.59
C9-1	11,884,410	10,771,228	9,773	1,113	448	82,476	4,184	829.51
C9-2	11,934,350	10,665,382	8,087	1,296	464	69,356	3,434	895.55
C9-3	9,476,912	8,532,838	7,841	1,206	471	82,476	3,524	868.38
C10-1	13,605,178	12,318,322	9,766	1,393	498	131,160	4,431	932.66
C10-2	10,657,120	9,703,802	9,049	1,532	517	101,281	4,254	968.92
C10-3	9,449,752	8,593,114	7,058	1,524	507	130,823	3,137	967.11

### 5. 원산지에 따른 김치 내 바이러스 군집의 다양성 비교분석

- 바이러스 군집의 메타유전체를 차세대 염기서열 분석법으로 분석하고 군집구조를 밝히기 위하여 Linux 기반 bioinformatic tools를 이용함 (FastQC, Trimmomatic, CD-HIT-DUP, IDBA-UD).
- 분류학적 단계에 따른 바이러스 군집의 상대적인 비율을 확인하기 위해서 바이러스 contigs의 NCBI RefSeq viral proteins database에 BLASTx search (E-value < 10<sup>-5</sup>)를 통해 taxonomic assignment를 실시하고, best-hit filtering 하여 바이러스를 확인함.
- 500bp이상의 전체 contigs 중에서 국산 71.6%와 중국산 77.9%가 바이러스로 확인됨. 그 중에서 bacteriophage의 비율이 국산은 평균 87.2%, 중국산은 평균 98.9%이며, Siphoviridae, Myoviridae, Podoviridae 등이 포함되는 Caudovirales class가 국산은 평균 84.5%, 중국산은 평균 93.2%를 차지함.

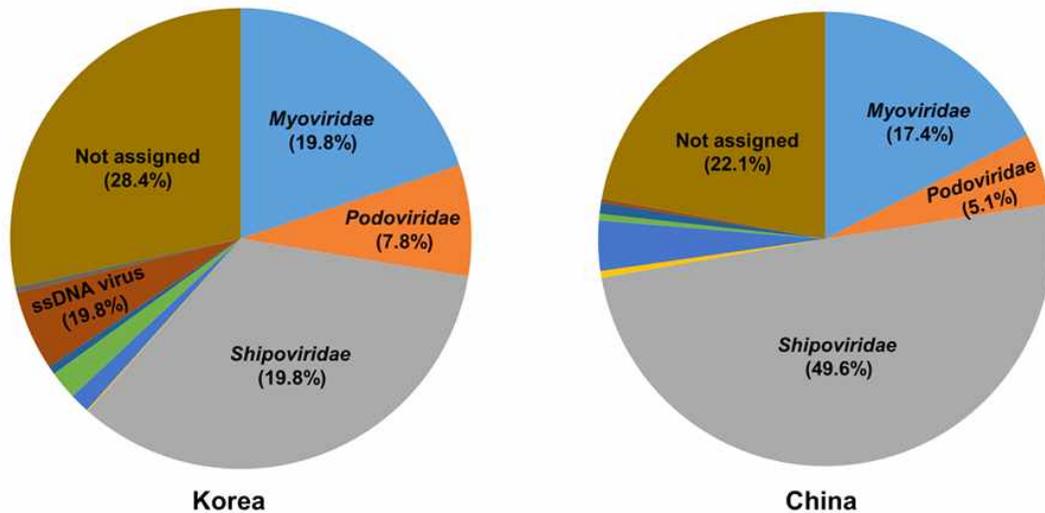


그림 98. 원산지별 바이러스 군집 구조 (family level)

- Bacteriophage의 host의 군집 분포는 Genus 수준에서 총 131개의 genera가 확인되었으며, 국산 및 중국산 상품김치 내에 다양하게 분포하고 있음을 확인함. 그 중 LAB(lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Weissella*를 host로 하는 phage의 contigs가 국산은 평균 29.3%, 중국산은 평균 37.4%로 확인됨.

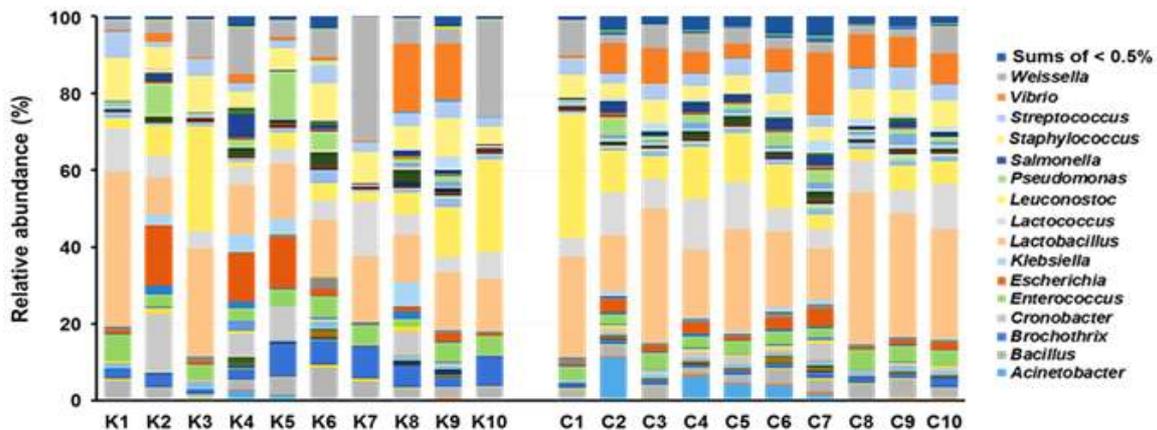


그림 99. 원산지별 박테리오파이지의 host 군집 구조 (genus level)

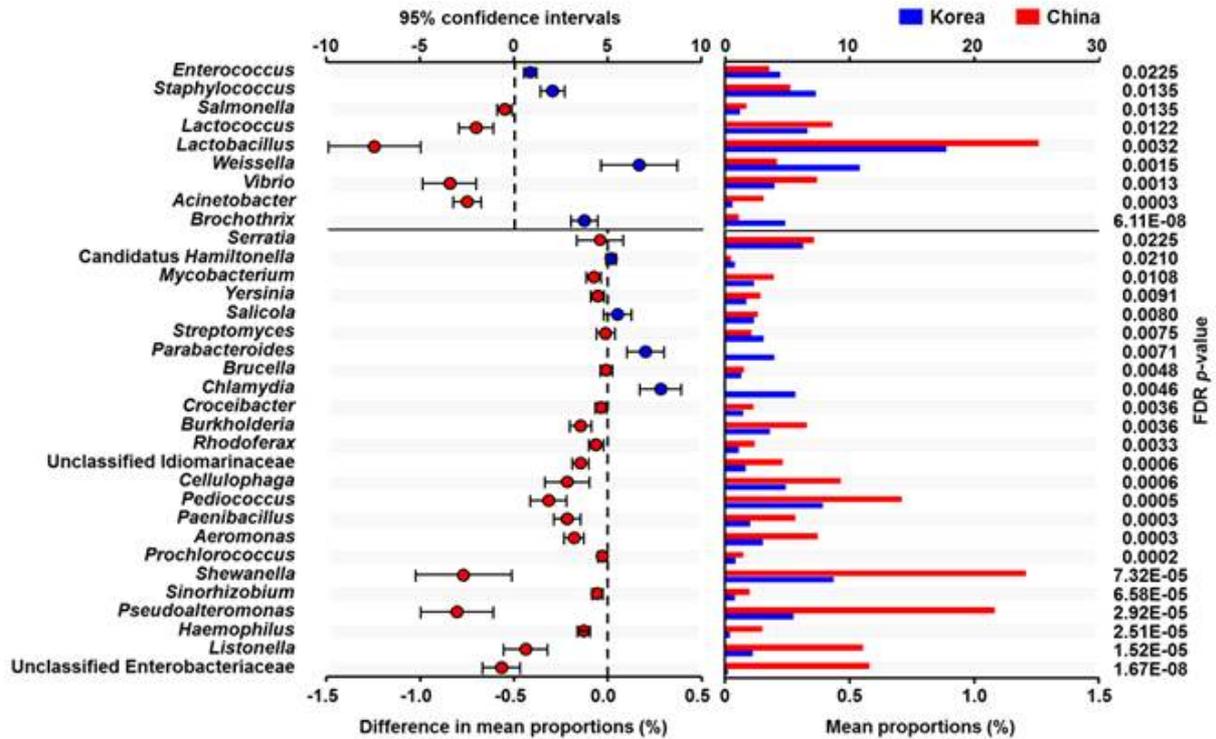
- 원산지에 따라 33 genera의 비율이 유의한 차이를 보였으며, 5% 비율 이상을 차지하는 genera 중에서 *Weissella*와 *Staphylococcus*의 bacteriophage는 국산에서, *Vibrio*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*의 bacteriophage는 중국산에서 유의적으로 높은 비율이 확인됨.

## 6. 원산지에 따른 바이러스 군집 차이 통계 분석

- 주좌표분석(PCoA, principal coordinates analysis)은 바이러스 contig-based profile을 이용하여 beta-diversity index 분석하고 binary Jaccard와 Bray-Curtis distance를 측정하여 각 샘플의 좌표를 그래프로 제시함. 원산지에 따른 binary Jaccard와 Bray-Curtis distance를 순열적 다변량 분산분석(PERMANOVA, permutational multivariate analysis of variance)

시험을 통해 통계적 차이를 분석함.

- Binary Jaccard PCoA에서 원산지에 따른 PERMANOVA F-value는 9.89 (P<0.001), 각 시료별 F-value는 6.06 (P<0.001)이며, Bray-Curtis PCoA에서 원산지에 따른 PERMANOVA F-value는 11.57 (P=0.006), 각 시료별 F-value는 28.41 (P<0.001)로 확인됨.



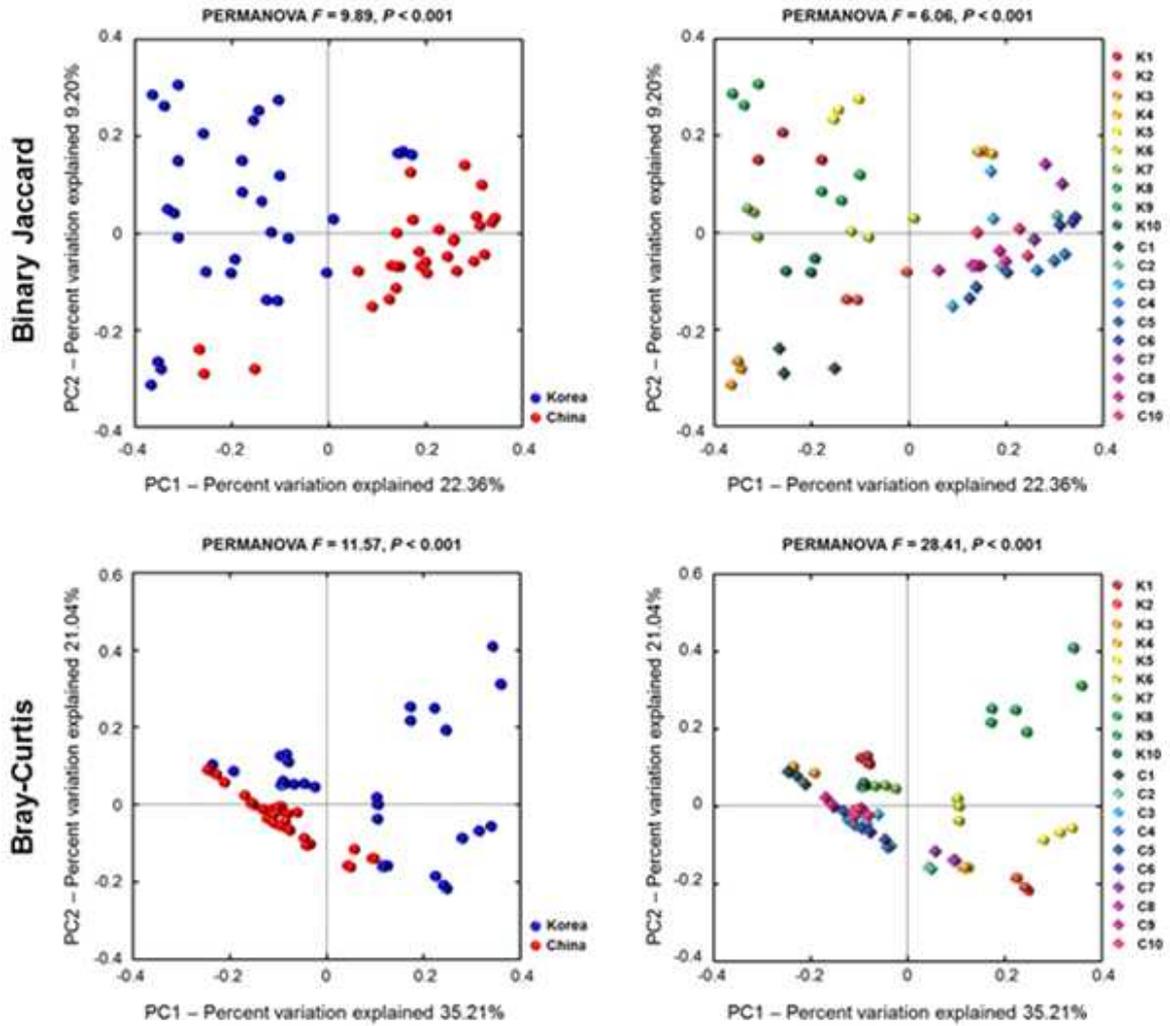


그림 100. 김치 바이러스 군집의 주좌표분석 (PCoA) 결과

- 즉, 바이러스 군집은 각 시료에 따른 차이는 물론, 원산지에 따른 유의적인 차이가 있음을 통계적으로 확인할 수 있으며, 그 통계적인 수치가 세균 군집에서의 원산지에 따른 차이보다 더 유의적으로 높다는 것을 확인함.

### 7. 박테리오파지와 세균간의 상호관계 분석

- 공통적으로 확인된 박테리오파지와 숙주 세균의 상대적인 비율 간의 Pearson's 상관계수를 계산하여 상관관계분석하여 상호배타적인 관계인지 동시발생적인 관계인지 확인하고 그에 따른 발효 식품 내에서의 생태학적 역할을 예측함.

- 공통적으로 확인된 총 25 genera의 bacteriophage와 host에서 Pearson's 상관관계의 패턴은 원산지에 따라 동일하지 않았으며, 국산은 Acinetobacter, Bacillus, Enterobacter, Klebsiella, Lactobacillus, Pectobacterium, Pseudomonas, Psychrobacter, Staphylococcus, Vibrio, Weissella를 포함하는 11 genera에서 동시발생적인 관계를 확인하였으며, 중국산은 Acinetobacter, Enterobacter, Klebsiella, Microbacterium, Rhizobium에서 동시발생적인 관계를, Enterococcus에서 상호배타적인 관계를 확인함 (P<0.05).

- 선형회기분석(linear regression analysis)과 F-test 사후검정을 통해 분석한 상호관계가 통

계적으로 유의미한 결과인지 확인한 결과, 국산은 Enterobacter, Vibrio, Weissella에서, 중국산은 Enterococcus에서의 상호관계가 통계적으로는 유의미한 결과가 아님을 확인함 (P>0.05).

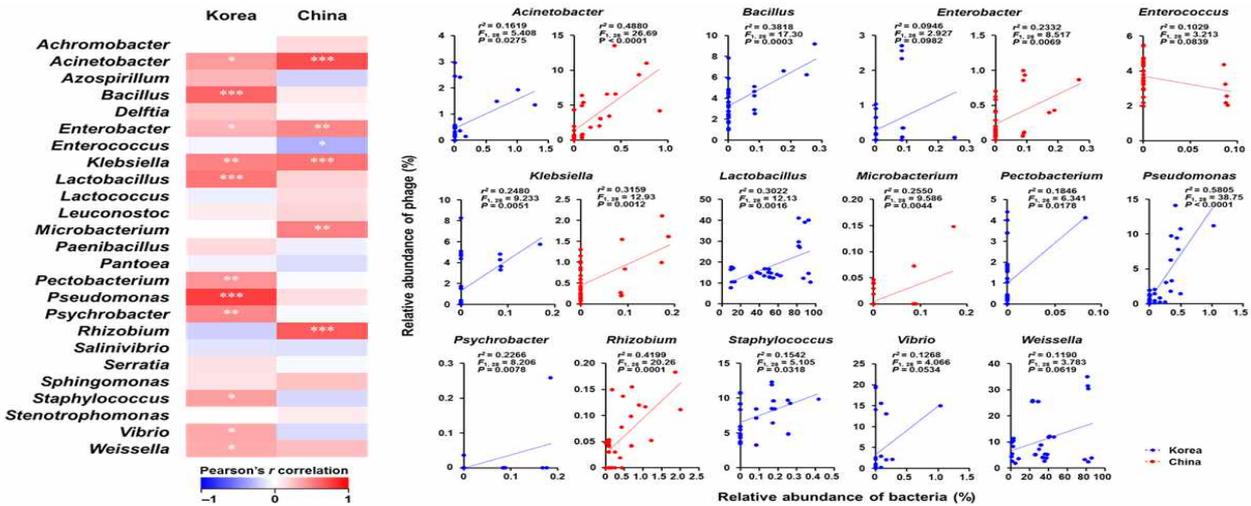


그림 101. 박테리오파지와 세균 간의 상호관계 분석 결과

### 8. 발효 단계별 바이러스 군집 변화 분석을 위해 한국형 표준 김치 대용량 발효

- 대용량의 김치를 확보하여 섭씨 4도에서 약 한달 간 발효하는 동안 발효 초기에는 하루 간격으로, 발효 후반기에는 3~5일 간격 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 18, 23, 28일)으로 500mL 이상의 충분히 혼합된 김치 국물 시료를 확보하여 다음 실험을 수행하기 전까지 초저온냉동고에 보관함.
- 확보된 발효 단계별 김치 시료에서 pH를 측정된 결과, 담금 즉시 평균 pH 5.54에서 발효 5일차까지는 pH 5.66으로 약간 상승하였다가 7일차부터 10일차까지 평균 pH가 4.53으로 급격하게 저하되었고, 이후 pH 변화는 둔화되었음. 발효 초기에 측정된 염도는 2.72% 였음.

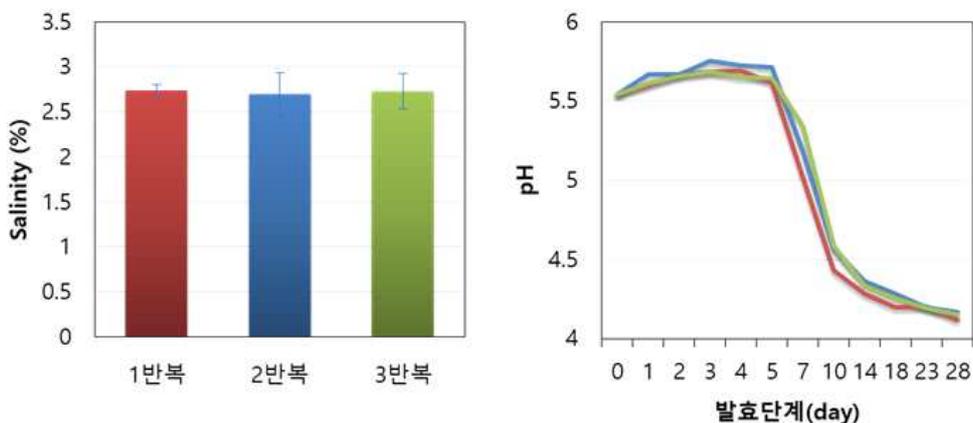


그림 102. 발효 초기 염도와 발효 단계별 pH 변화 양상

### 9. 발효식품의 발효 단계별 세균 군집 분석

- 김치는 즙만 취하여 이를 세균 및 바이러스 군집 확보 및 pH 측정에 사용하였으며, 군집 분석을 위한 세균 메타유전체 추출을 위하여 5,000 rfc에서 10분 원심 분리하여 그 침전물

을 사용함.

- 각각의 김치즙에서 채취한 침전물로부터 bead-beating 방법을 이용하여 세균의 세포벽을 파쇄하고 메타유전체 DNA를 추출함. 추출한 DNA는 16S rRNA 유전자에 특이적인 barcoded-primer로 증폭한 후 Illumina MiSeq을 이용하여 염기서열 해독함. Sequencing 결과는 QIIME pipeline을 통해 분석함. 염기서열 분석 결과, sequence reads는 시료별로 평균 444,530 reads 획득함.

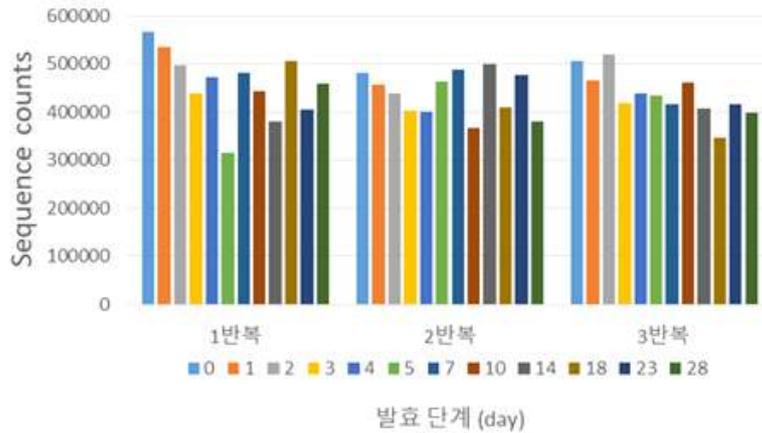


그림 103. 발효 단계별 세균 군집의 sequence reads

- 세균 군집의 다양성 지표들은 97% 염기서열 유사도 수준(operational taxonomic units [OTUs])에서 분석되었으며, 발효초기에는 평균 2,160 OTUs에서 5일차에 평균 801 OTUs로 급격히 감소하여 이후 28일차에 평균 588 OTUs로 서서히 감소하였음. 또한 Chao1에 의한 종 풍부도는 OTUs의 변화 양상과 유사하게 변화하였고, shannon과 simpson에 의한 다양성은 95일차까지는 유사하였으나 그 후 다시 증가하는 양상을 나타냄.

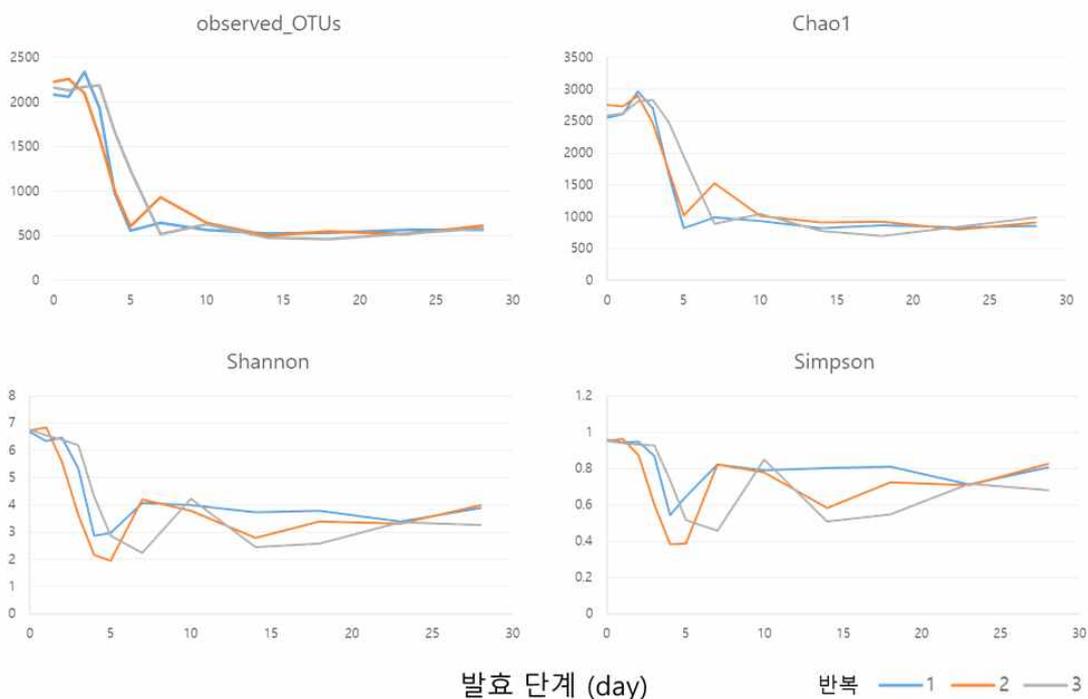


그림 104. 발효 단계별 세균 군집의 alpha-diversity 변화

- 세균의 16S rDNA 시퀀스를 97% 유사도 OTU 기반으로 SILVA database에 대조하여 genus 수준에서 총 220개의 genera (1% 비율 이상은 17 genera로 발효 초기 평균 37.1%에서 발효 후기 평균 88.2% 차지)가 확인되었으며, 발효가 진행됨에 따라 *Weissella*와 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*이 우점하며 비교적 단순한 구조를 확인함.

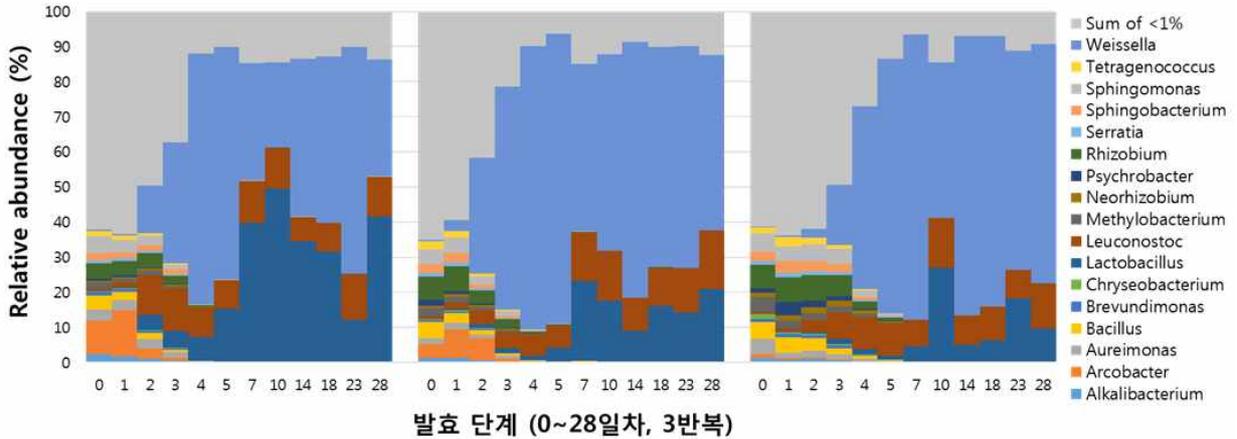


그림 105. 발효 단계별 세균 군집 구조 (Genus level)

- 발효 단계에 따라 상대적인 비율에서 유의적으로 차이가 있는 세균 종을 분석하기 위해서 FDR로 보정한 Kruskal-Wallis test를 통해 FDR p-value가 0.05 이하인 통계적으로 유의미한 차이가 있는 세균 확인함. 1% 비율 이상의 OTU level에서 26개의 OTUs가 발효 단계에 따라 유의미하게 변화하는 세균으로 확인됨.

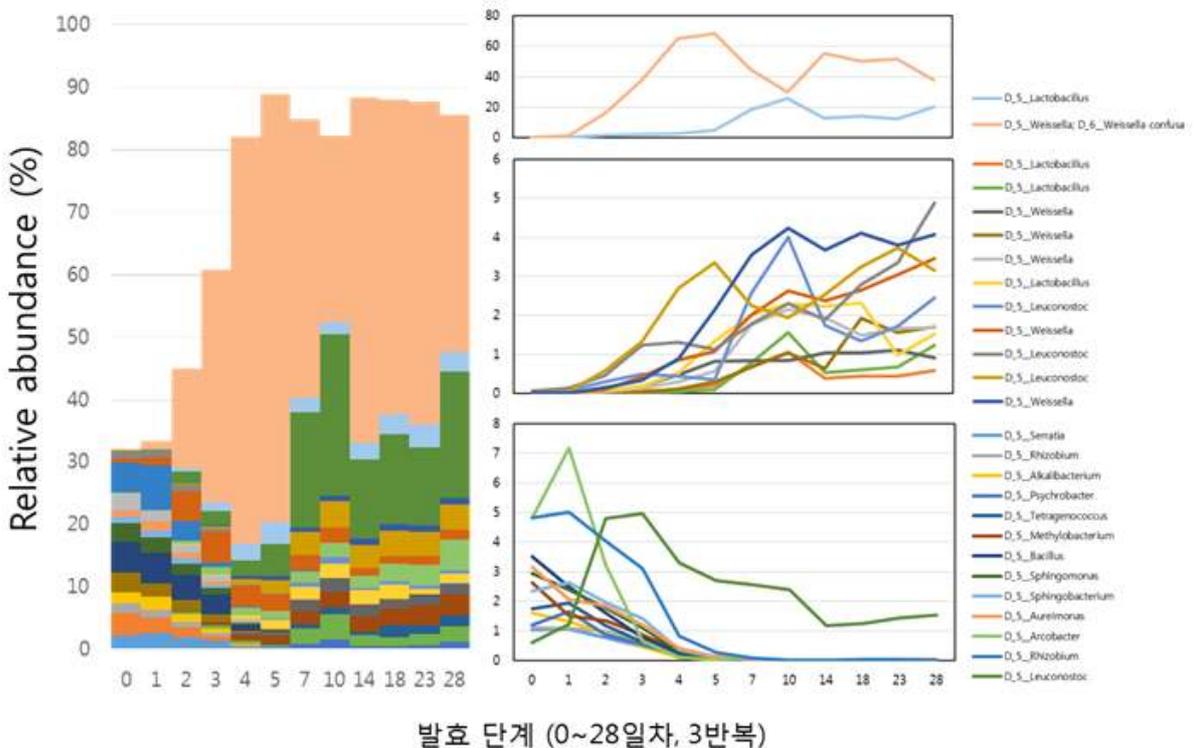


그림 106. 발효 단계에 따라 유의적으로 변화하는 세균

- 주좌표분석은 세균 16S rDNA 시퀀스의 OTU profile과 phylogenetic tree를 이용하여 beta-diversity index 분석하고 unweighted UniFrac (OTU의 유무)와 weighted UniFrac (OTU의 abundance 고려) distance를 측정하여 각 샘플의 좌표를 그래프로 제시하고 순열적 다변량 분산분석 시험을 통해 통계적 차이를 분석함.
- Unweighted UniFrac PCoA에서 발효 단계에 따른 PERMANOVA F-value는 5.12 ( $P < 0.001$ )이며, weighted UniFrac PCoA에서 PERMANOVA F-value는 22.37 ( $P < 0.001$ )로 확인됨. 즉, 세균 군집은 발효 단계에 따라 유의적인 차이가 있음을 통계적으로 확인할 수 있음. 이러한 세균 군집의 변화와 차이는 김치의 발효 과정 중의 바이러스 군집에도 뚜렷하게 영향을 미칠 것으로 판단됨.
- 김치의 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 모든 발효 단계를 바이러스 군집 분석을 위한 시료로서 선정하였음.

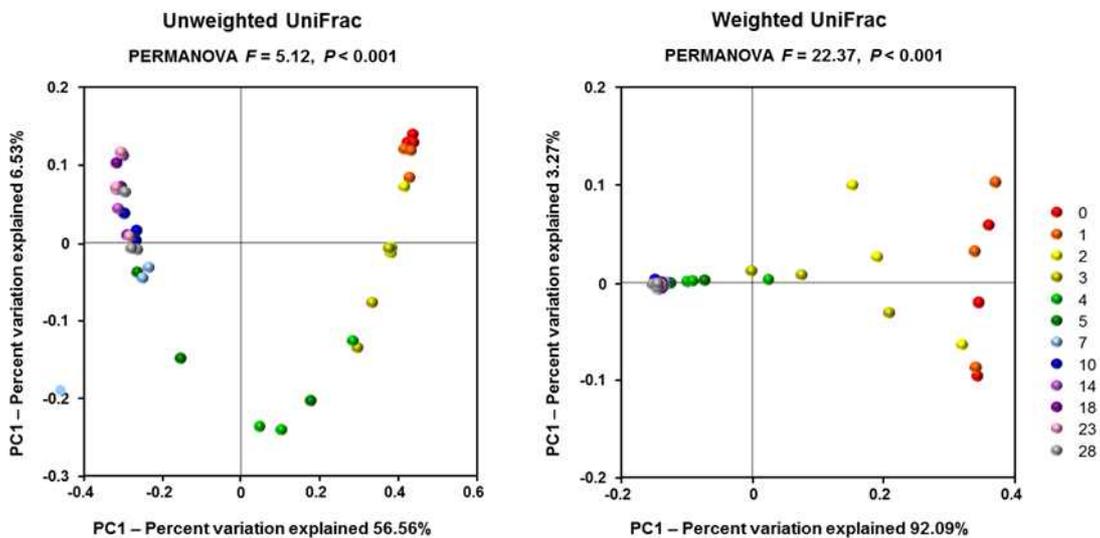


그림 107. 발효 단계별 세균 군집 PCoA

○ 메타메타볼로믹스 기법을 활용한 농축산식품 유래 발효미생물 특성 규명

1. *Aspergillus oryzae* 및 *Bacillus amyloliquefaciens*의 메커니즘 해석을 위한 곡자 대사체 비교 분석

- *A. oryzae* 및 *B. amyloliquefaciens* 발효 조건 (단독배양 또는 혼합배양)에 따라 대사체 간의 차이가 남을 확인함 (그림 108). 각 균주의 단독 배양의 사이로 혼합배양한 곡자 대사체가 그룹지어짐을 확인함.

➤ Rice Koji Final product PCA

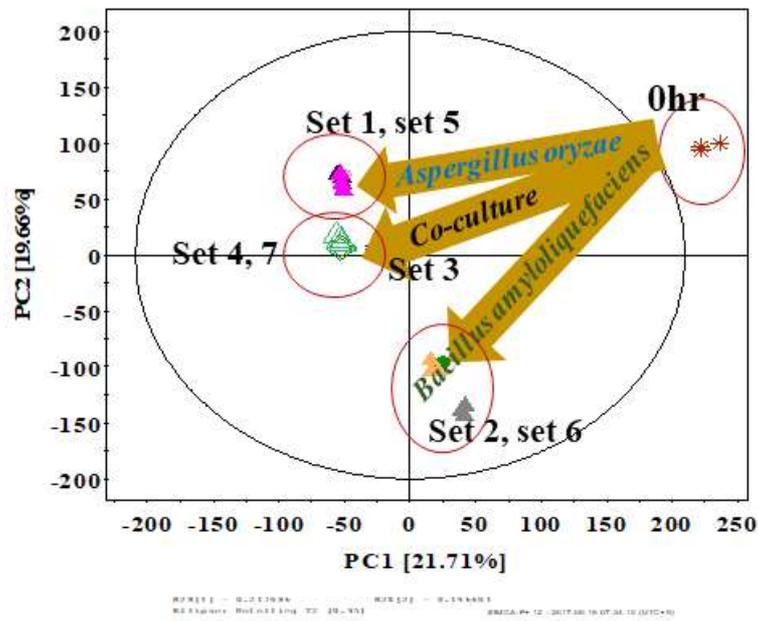


그림 108. *A. oryzae* 및 *B. amyloliquefaciens* 균주 발효곡자 다변량 통계분석 결과

- Amylase activity 효소 활성 측정 결과, *Aspergillus* 단독배양 곡자와 두 균주 혼합배양 발효한 곡자인 Set4와 Set5에서 *Bacillus* 단일배양 곡자 활성이 보다 높은 결과를 나타냄. Protease 및  $\beta$ -glucosidase 효소 활성 측정 결과 *Aspergillus* 및 *Bacillus* 단독배양 발효곡자 보다 혼합배양하여 발효한 곡자인 Set4에서 보다 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였음.

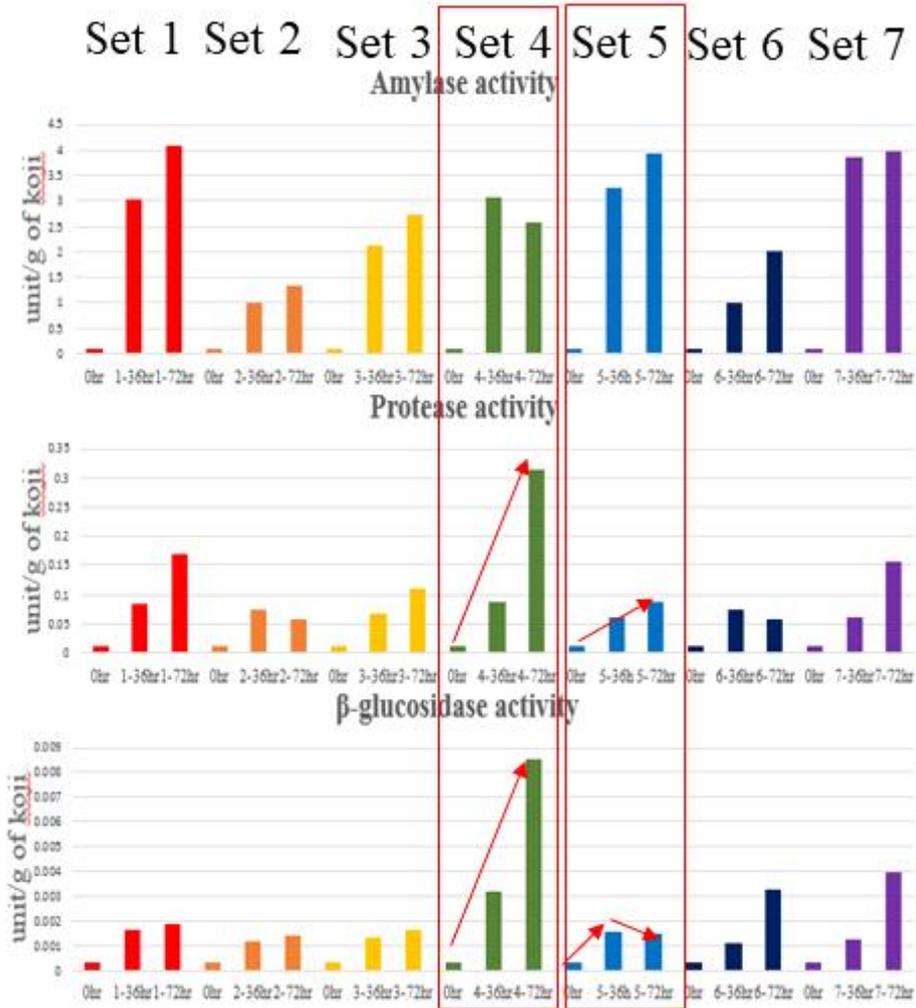


그림 109. 배양 환경(단독 또는 혼합배양)별 곡자의 효소 활성

## 2. A. oryzae 및 B. amyloliquefaciens의 상호작용 대사 메커니즘 해석

- A. oryzae 및 B. amyloliquefaciens의 최소 배지 조건(A. oryzae : CZ-medium, B. amyloliquefaciens:MMS-medium)에서의 배양시간별 생육 곡선 및 당 효소활성 비교분석을 수행함 (그림 110, 111). 생육곡선 측정 결과 최적 배양시간을 확인하였고, 생육 정도에 따른 amylase 및 protease 효소 활성을 확인하였음.

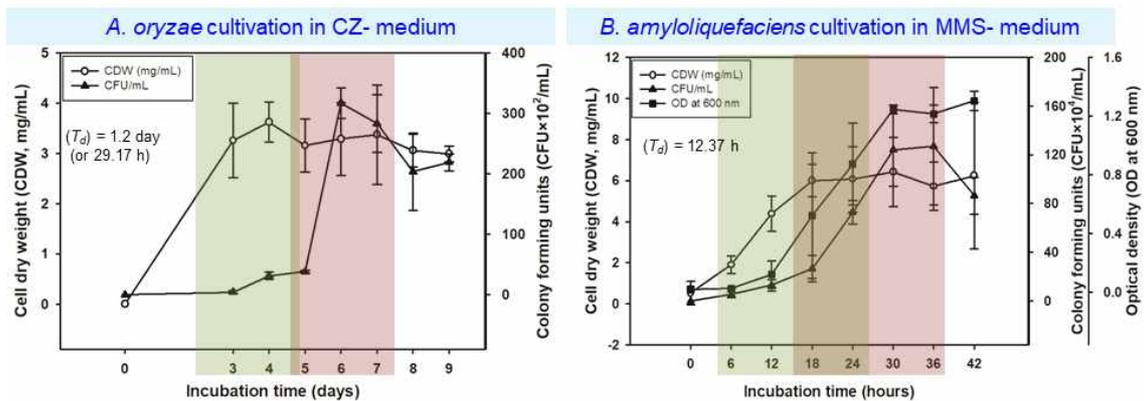


그림 110. 배양시간에 따른 A. oryzae 및 B. amyloliquefaciens의 생육지표 측정 결과

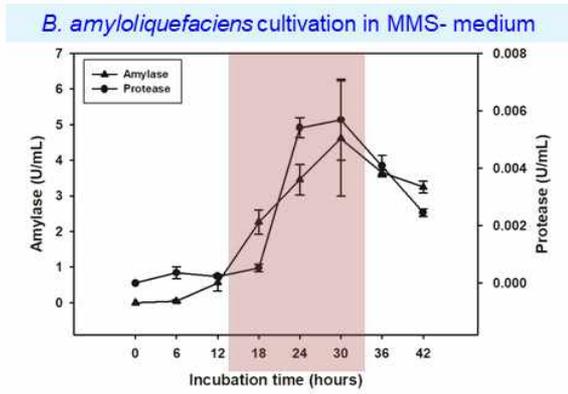
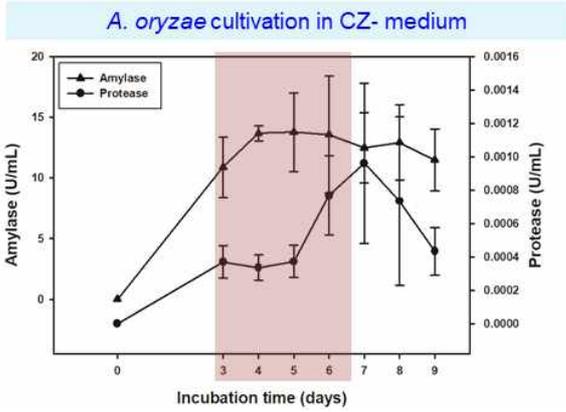


그림 111. 배양시간에 따른 *A. oryzae* 및 *B. amyloliquefaciens*의 효소 활성 측정 결과

### 3. Tetragenococcus spp.의 메커니즘 해석을 위한 대사체 비교분석

- Tetragenococcus halophilus 및 Tetragenococcus muriaticus 균주 내 대사체 프로파일링 결과 각각 처리조건(염농도) 및 시간에 따라 변화하는 양상을 보임. (그림 112, 113)

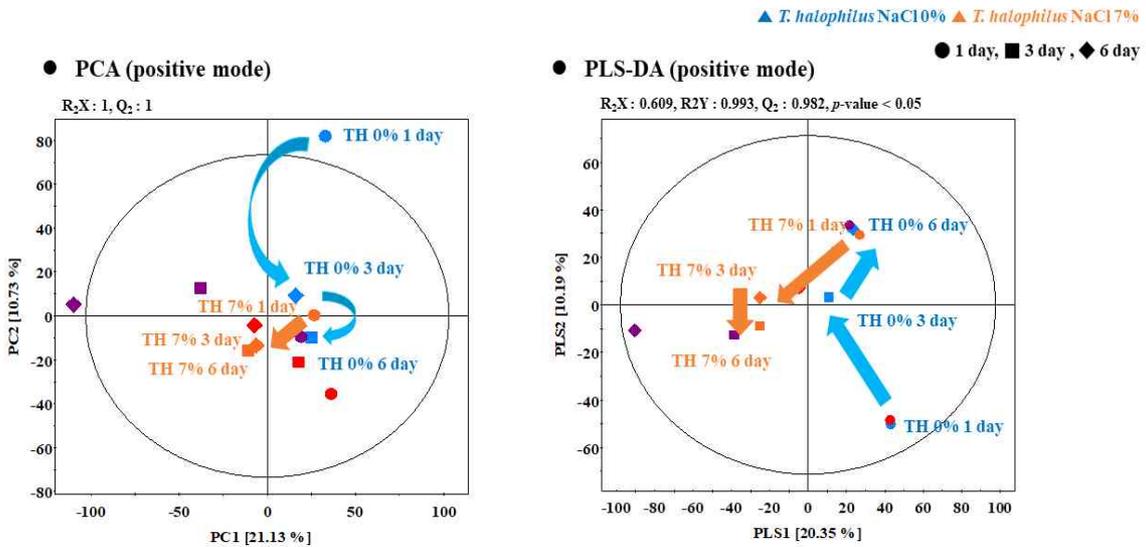


그림 112. 처리조건 별 *T. halophilus*의 균주 내 대사체 프로파일링

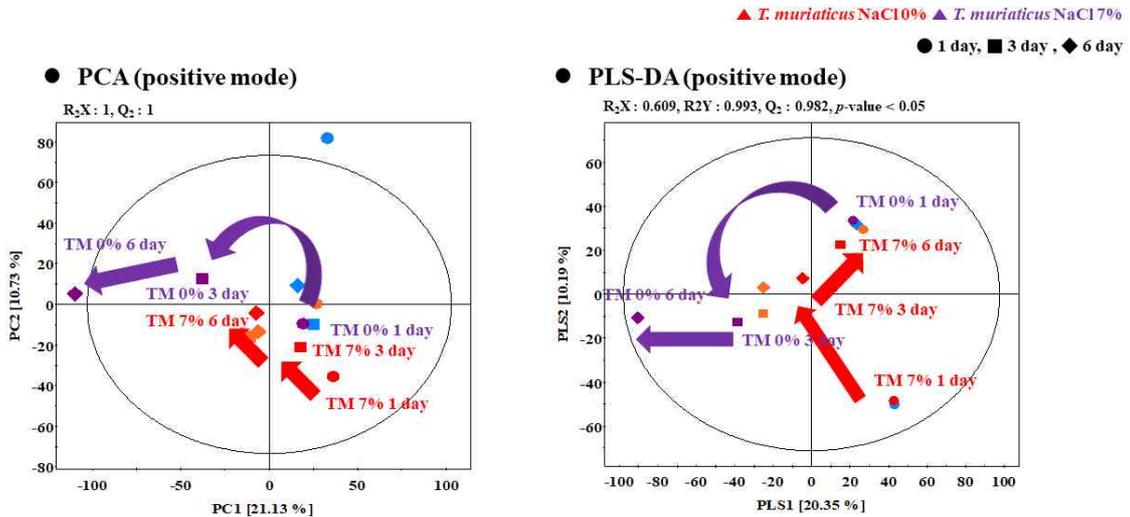


그림 113. 처리조건 별 *T. muritaticus*의 균주 내 대사체 프로파일링

○ 메타오믹스기반 농축산식품 유용 미생물 군집의 기능대사체 탐색

1. 대변이식 송아지의 분변의 대사체 변화 모니터링

- 송아지 분변 시료의 PCA분석 결과, 실험 군들이 혼재되는 양상을 보이고, 0일과 48일이 일부 구분 지어지는 양상을 보이는 것을 확인함(그림 114). PLS-DA분석 결과, 0일과 48일이 PLS1에 의하여 각각 그룹 지어졌으며, 각 일자 안에서 (A)군이 다른 군에 비해 구분되는 것을 확인함.

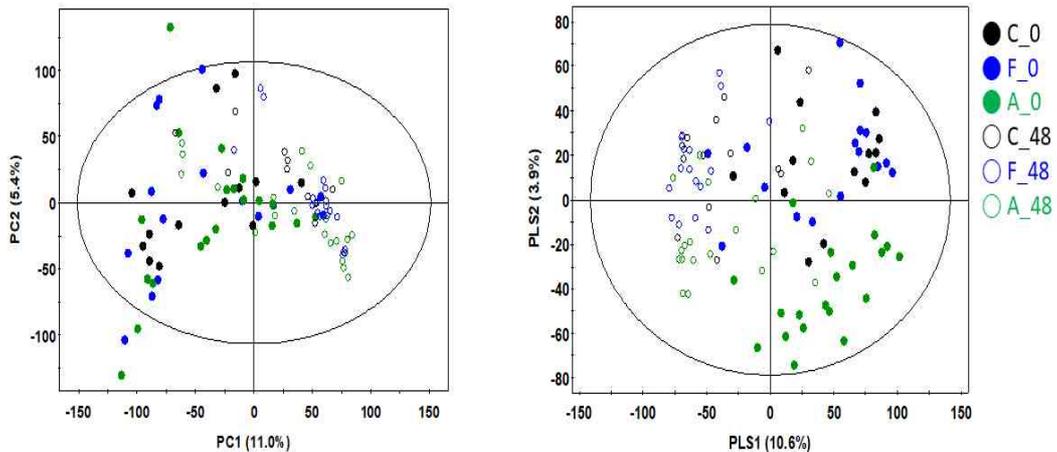


그림 114. 송아지 분변 시료 0, 48일의 다변량 통계분석 결과

- 송아지 분변 시료 0일의 PCA분석 결과, 실험 군들이 혼재되는 양상을 보임 (그림 115). OPLS-DA 분석 결과, 세군이 각각 OPLS1(4.1%), OPLS2(2.6%)에 의해 그룹화 되고 구분 지어지나, 모델 validation수치인 Q2, cross validation, p-value가 낮음을 확인함.

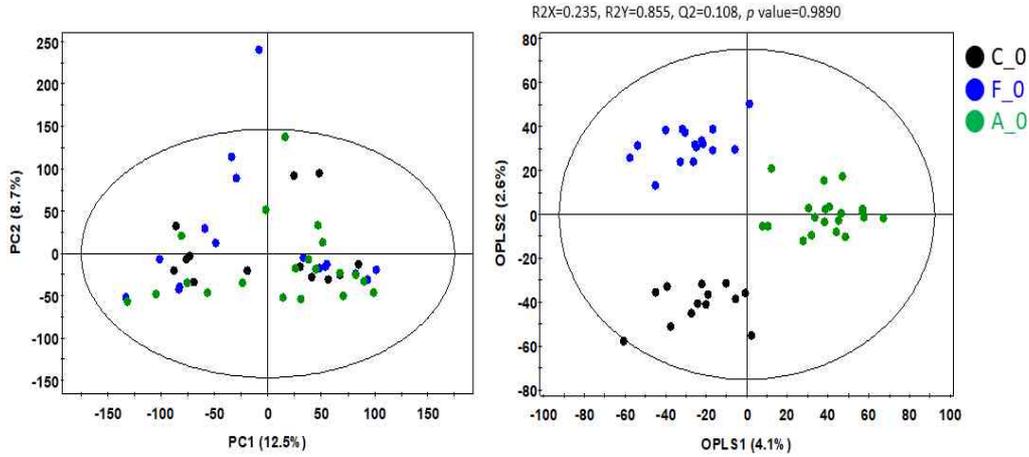


그림 115. 송아지 분변 시료 0일의 다변량 통계분석 결과

- OPLS-DA를 기반으로 분변 0일 그룹간 차이나는 대사체를 선별하여 동정하였으며, box-whisker plot분석을 통해 계열별 상대적인 함량 변화 패턴분석을 수행하였음. (그림 116)

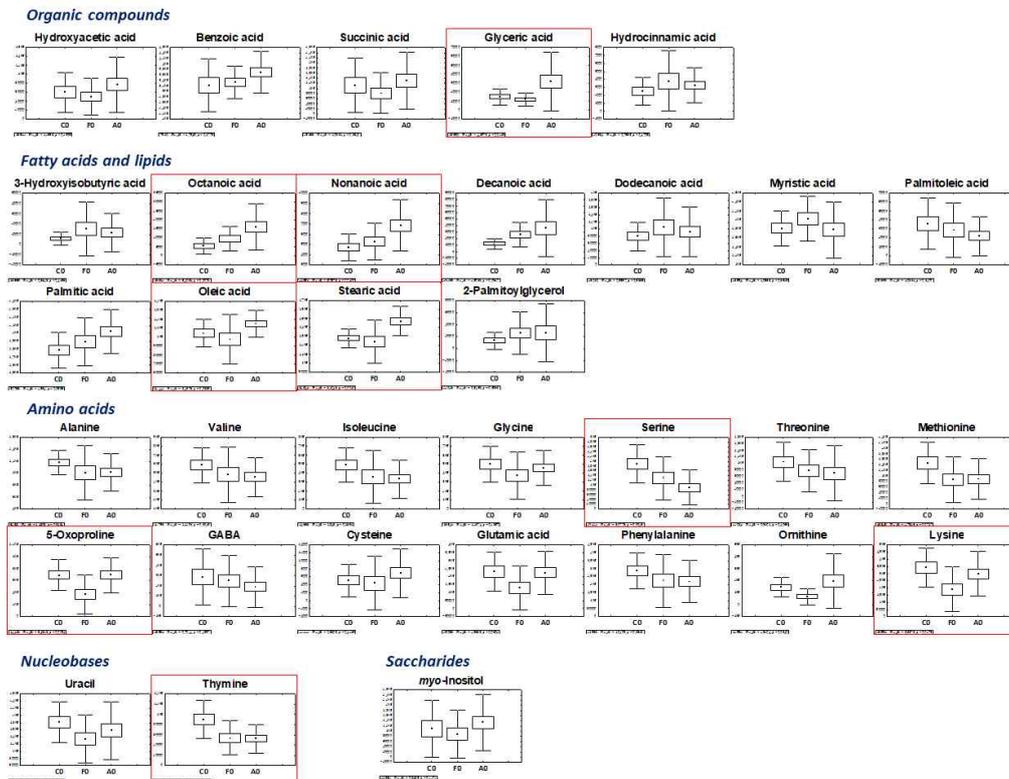


그림 116. 송아지 분변 시료 0일 그룹간 차이나는 대사체 상대적 함량

## 2. Aspergillus spp., Bacillus spp., 의 대사 메커니즘 해석을 위한 배양환경 조건(최소배지 조건, 원료 등) 대사체 프로파일링

- Fungi와 bacteria의 상호작용을 해석하기 위하여, 농식품 유래 미생물인 A. oryzae와 B. amyloliquefaciens를 선택하여 최소배지에서 배양, 이를 해석하고자 실험을 진행함 (그림 117).

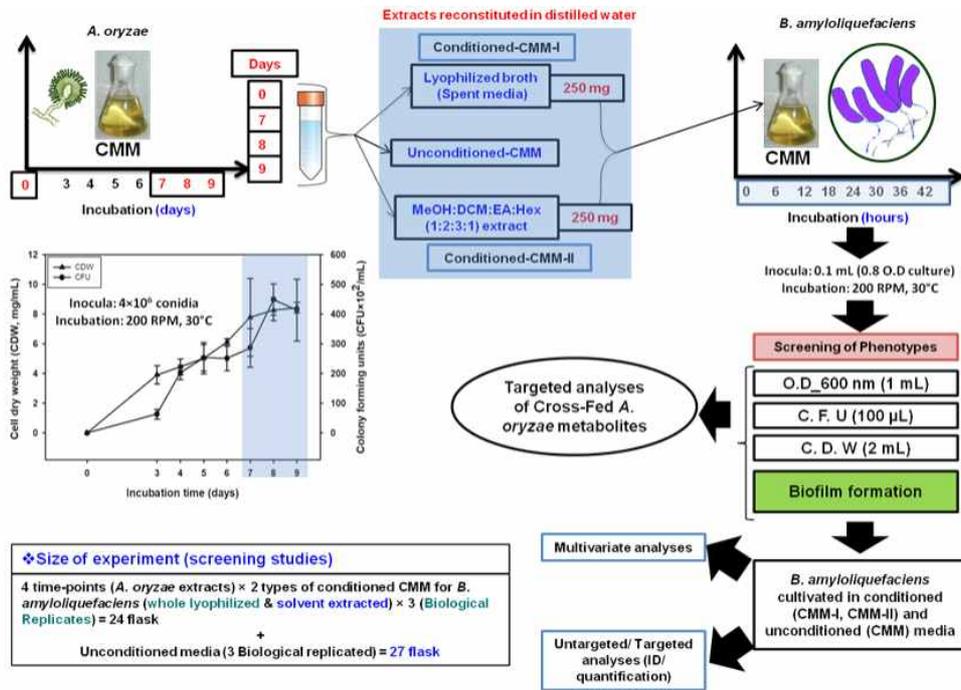


그림 117. Fungi-Bacteria 최소배지에서의 상호작용 해석을 위한 실험 모식도

- 상호작용 전 후의 *A. oryzae* 및 *B. amyloliquefaciens*의 추출물을 LC-MS 분석을 진행하여 그 바이오마커를 찾고자 함 (그림 118). PLD-DA 모델을 통해서 *B. amyloliquefaciens*를 최소배지조건과 최소배지조건에 *A. oryzae* 9일차 추출물을 섞은 혼합 배지조건에서 배양 후 차이를 규명하고자 차이 나는 대사체를 선정 및 동정하고 LC-MS 기반 크로마토 그래픽 및 스펙트럼 특징을 알아봄.

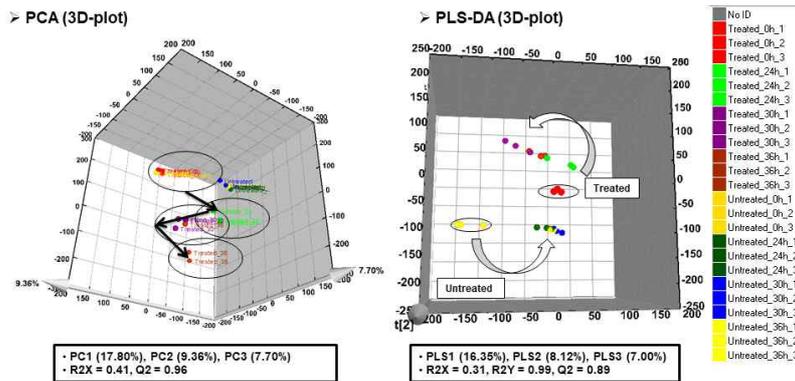


그림 118. *B. amyloliquefaciens*의 *A. oryzae* 추출물 처리 전후 이차 대사체 프로파일링

- 또한, *B. amyloliquefaciens*의 추출물을 *A. oryzae*에게 feeding 함으로써 최소 배지 조건에서 feeding을 하지 않은 대조구 그룹과의 차이를 보이는 마커를 규명하기 위해서 PLS-DA 모델을 통해서 차이 나는 대사체를 선정하고 LC-MS 기반 크로마토 그래픽 및 스펙트럼 특징을 알아봄.

○ 메타오믹스 연계 대사경로 네트워크 구축을 통한 체계적인 해석 알고리즘 확립

### 1. *Aspergillus oryzae*의 배양환경에 따른 대사체 프로파일링 및 전사체 분석 수행

- *A. oryzae*의 배양환경에 따른 차이를 확인하기 위해, 농식품 유래 미생물인 *A. oryzae*의 시간에 따른 고체 & 액체 배양의 차이나는 대사체와 전사체를 분석을 수행함. 다변량 통계 분석 결과 중 PCA (GC-TOF-MS) 분석 결과, 고체 배양과 액체 배양 PC1 (21.88 %)과 PC2 (13.46 %)에 의해 나뉘는 현상을 보임. 추가적으로 UHPLC-LTQ-IT-MS/MS 분석 기반 PCA 분석 결과는 GC-TOF-MS 분석 기반 PCA 결과와 유사하게 PC1 (19.55%)과 PC2 (9.30%)에 의해 고체 배양과 액체 배양이 나뉘는 현상을 보이며, 두 배양 모두 시간에 따라 변화하는 양상을 확인 함 (그림 119). 또한, 두 가지 기기분석 기반 PLS-DA 도 PCA 결과와 동일한 현상을 확인 함.

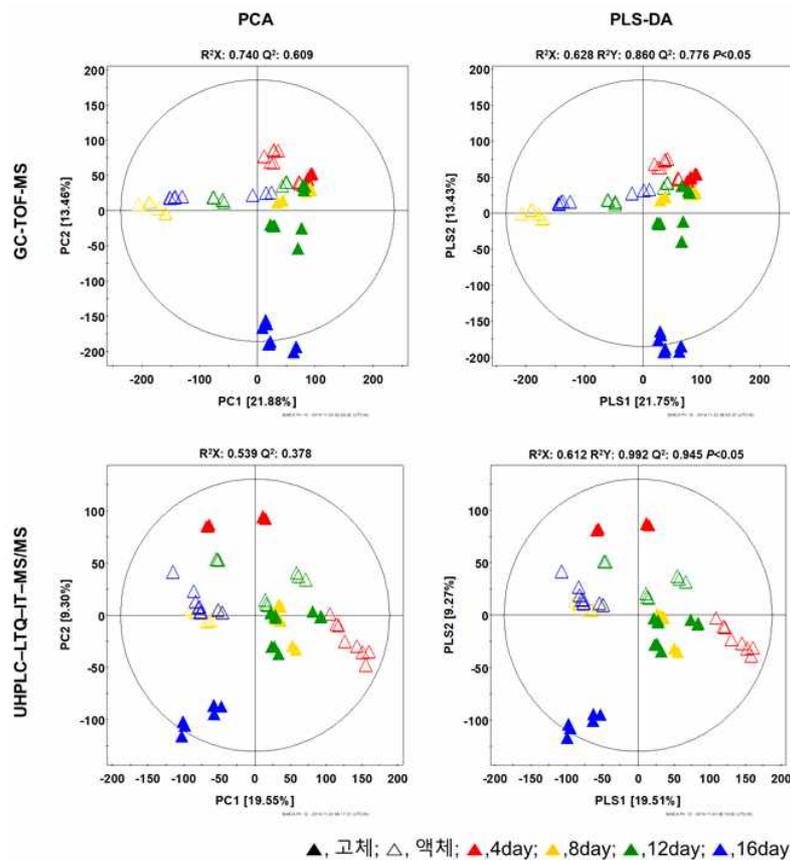


그림 119. 배양시간 별 *A. oryzae*의 고체와 액체 배양 샘플의 다변량 통계분석 결과

- 서로 다른 배양환경에 따른 *A. oryzae*의 대사체를 확인 결과, 고체 및 액체 배양에서 대사체 패턴이 서로 다른 것을 확인함 (그림 120). 고체배양의 경우, 총 72개의 차이나는 대사체를 확인 하였고, 6개의 organic acids, 13개의 amino acids, 17개의 carbohydrates, 23개의 lipids, 2개의 nucleobases, 11개의 기타 계열을 확인하였음. 액체배양의 경우, 총 71개의 차이나는 대사체를 확인하였고, 6개의 organic acids, 14개의 amino acids, 19개의 carbohydrates, 22개의 lipids, 3개의 nucleobases, 7개의 기타 계열을 확인하였음.

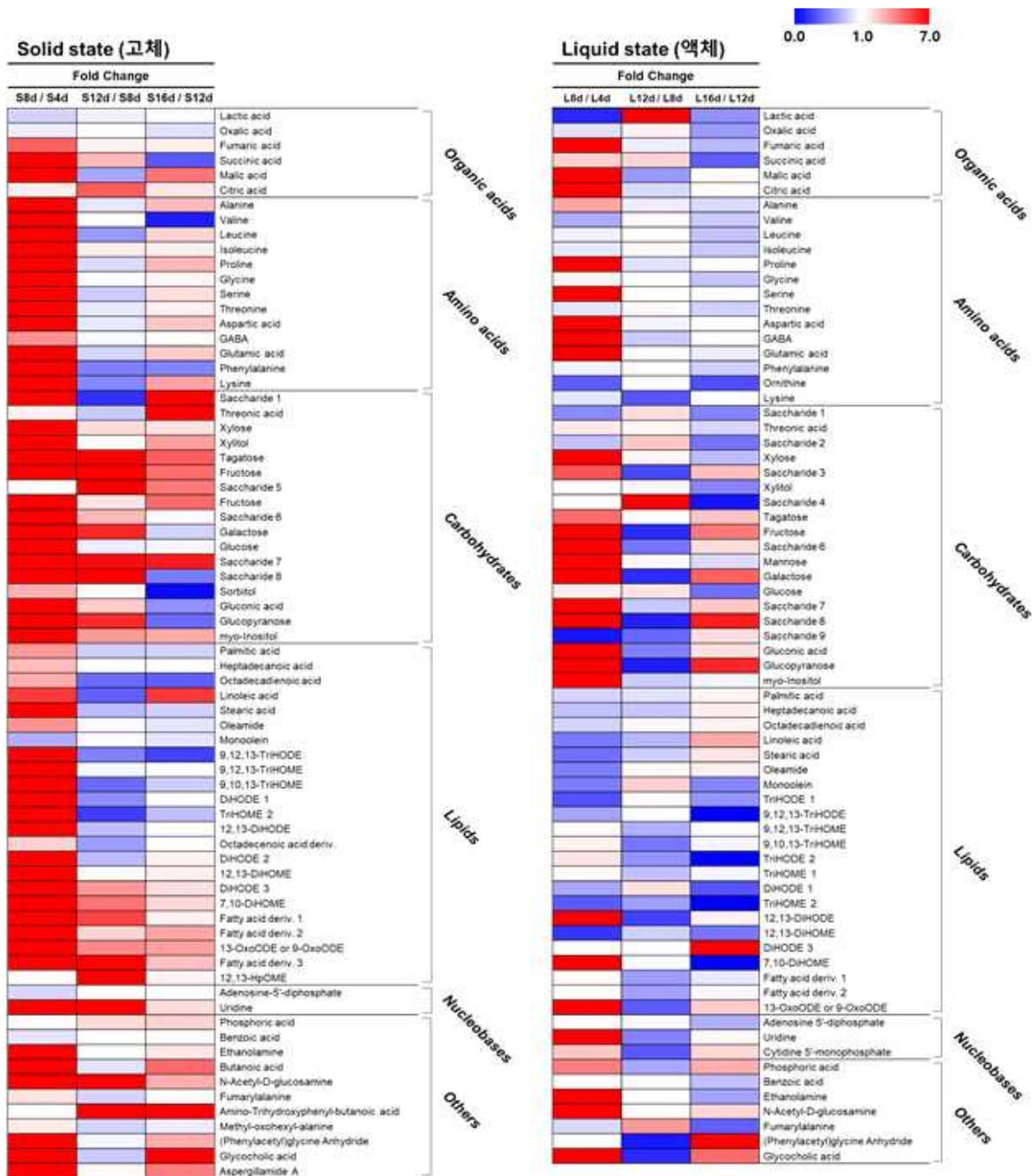
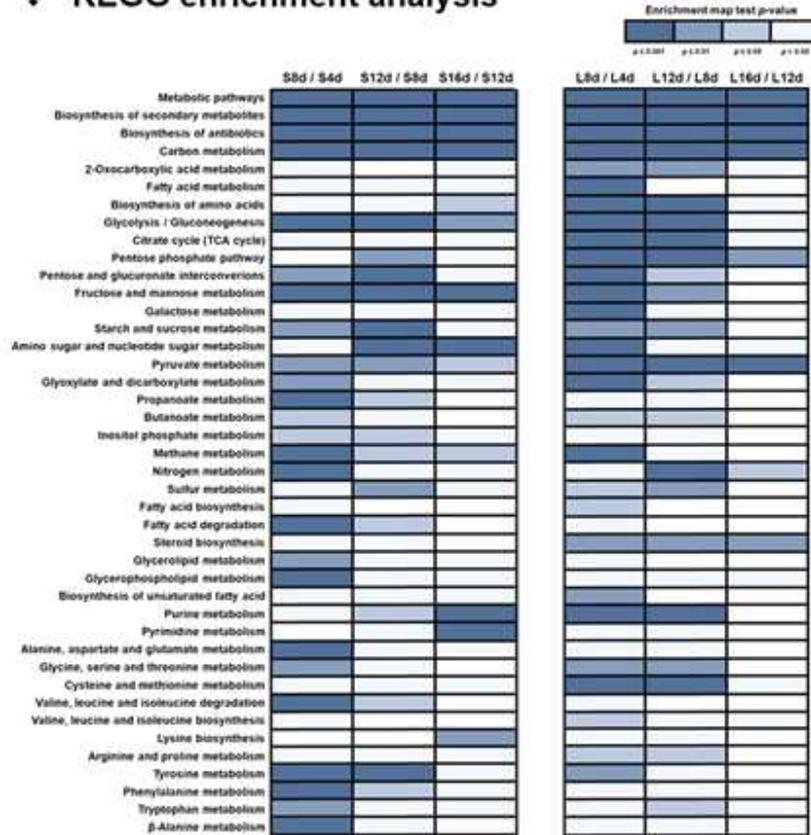


그림 120. 배양환경 (고체 & 액체)에 따른 *A. oryzae*의 1차, 2차 대사체 Heatmap 분석 결과

- 서로 다른 배양환경에 따른 *A. oryzae*의 대사체 차이를 확인 후 전사체 분석을 수행함. 서로 다른 배양환경에 따른 *A. oryzae*의 전사체 분석결과, 앞서 분석한 대사체 데이터 패턴과 유사한 패턴 양상을 보임 (그림 121).

## ❖ KEGG enrichment analysis



## ❖ Expression profiles

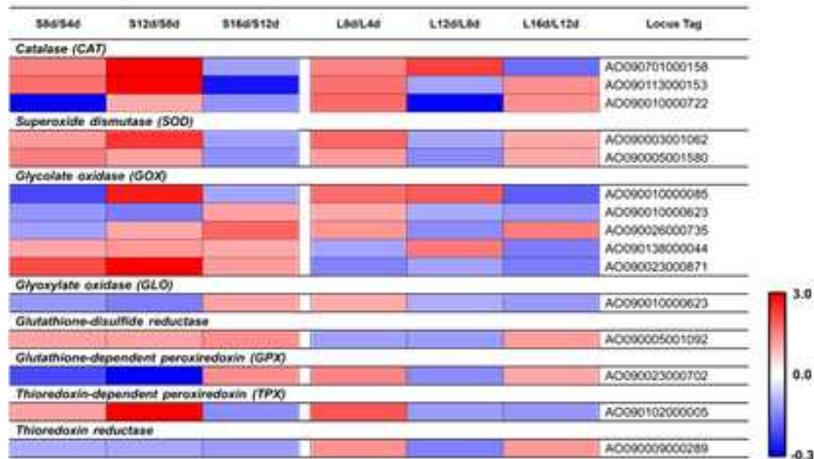


그림 121. 배양환경 (고체&액체)에 따른 *A. oryzae*의 1차, 2차 대사체 Heatmap 분석 결과

- 앞서 분석한 대사체 및 전사체 분석결과를 바탕으로 메타오믹스를 연계하여 대사경로를 해석하기 위한 체계적인 알고리즘 확립을 위하여 in silico 모델 구축을 수행 함. 구축된 in silico 모델을 기반으로 하여 flux analysis를 수행한 결과, 고체 환경의 flux와 액체 환경에서의 flux가 다른 것을 확인 할 수 있음. 또한, Flux의 차이를 화살표의 굵기, 방향 등을 통해서 배양환경의 차이를 확인하였음 (그림 122).

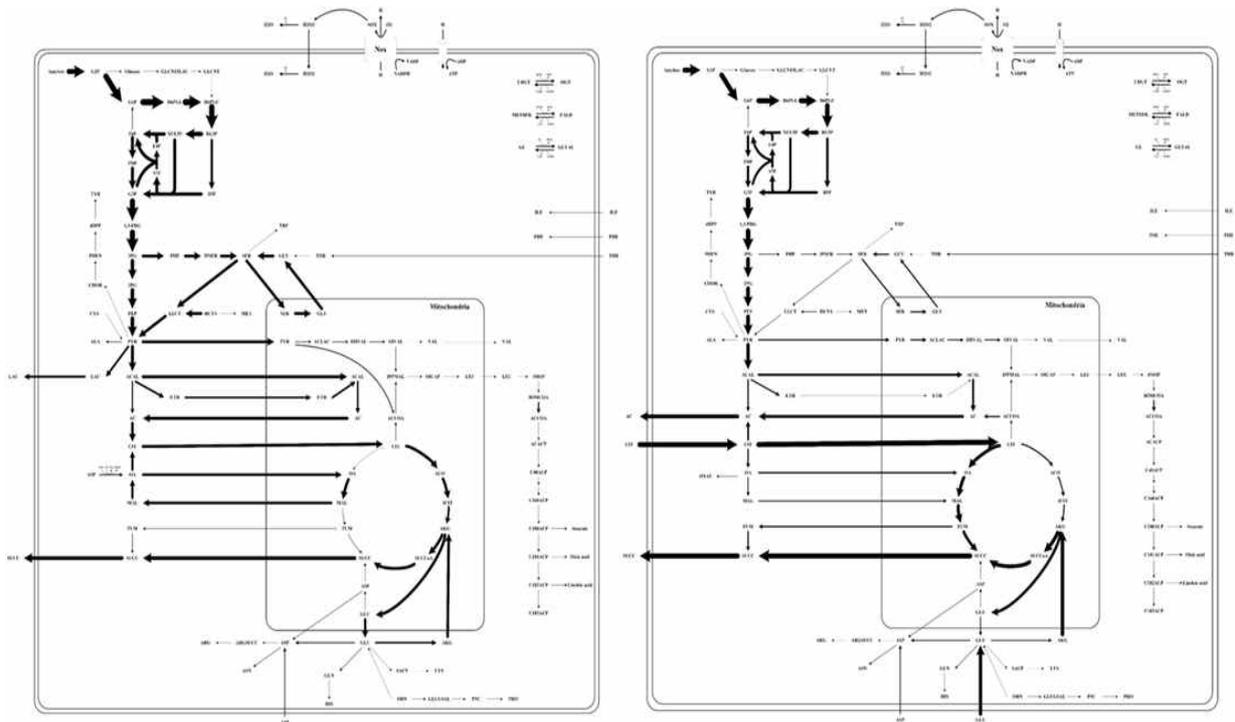


그림 122. 대사경로분석 결과 및 대사체와 전사체 기반 flux analysis 결과

## 2. Metabolite-Microbial 상호작용 규명을 통한 농축산식품 (곡자) 발효 대사체 프로파일링 및 생육지표 확인

- 대사체와 미생물간의 상호작용을 확인하기 위해 선행 실험을 수행함. 우선 9일차의 *A. oryzae* 추출물 (5 mg/ml)을 *Bacillus amyloliquefaciens*에 처리한 결과, *B. amyloliquefaciens*의 biofilm 형성에 영향을 미치는 것을 확인 함 (그림 123).

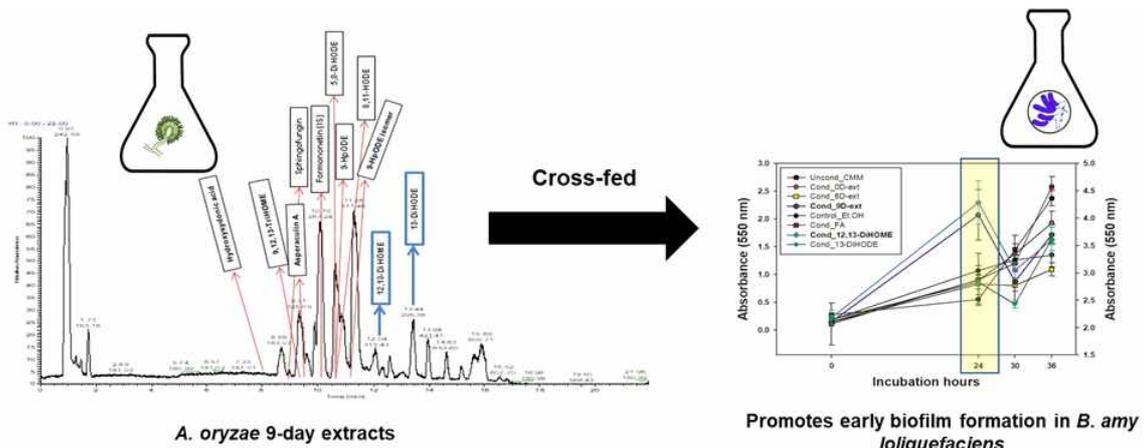


그림 123. *A. oryzae* 추출물을 crossfeeding 한 *B. amyloliquefaciens*의 LC-MS 크로마토그램 및 biofilm 형성 결과

- 9일차의 *A. oryzae* 추출물을 *B. amyloliquefaciens*에 처리한 샘플과, 처리하지 않은 샘플의 다변량 통계분석을 수행함 (그림 124). PLS-DA 분석결과, 처리한 샘플과 처리하지 않은 샘플이 PLS1 (27.8%)에 의해서 나뉘는 현상을 보이며, 시간에 따라 변화하는 패턴을 확인함.

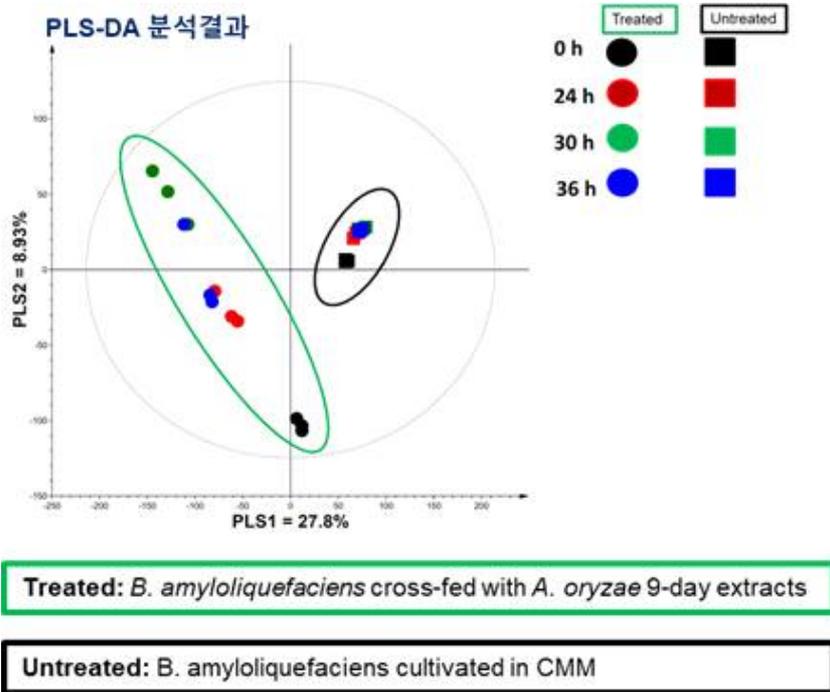


그림 124. 9일차의 *A. oryzae* 추출물을 *B. amyloliquefaciens*에 처리한 샘플과, 처리하지 않은 샘플의 다변량 통계분석결과

- 앞서 구축한 PLS-DA 모델을 기반으로 하여 차이나는 대사체 분석결과 *A. oryzae* 추출물을 *B. amyloliquefaciens*에 처리한 샘플에서 큰 대사체 변화를 확인하였고, *A. oryzae* 추출물 중 oxylipins 계열의 물질이 *B. amyloliquefaciens*에 영향을 미치는 것을 추측함. 24시간의 *B. amyloliquefaciens* 추출물을 *A. oryzae*에 처리했을 때의 변화를 확인 함 (그림 125).

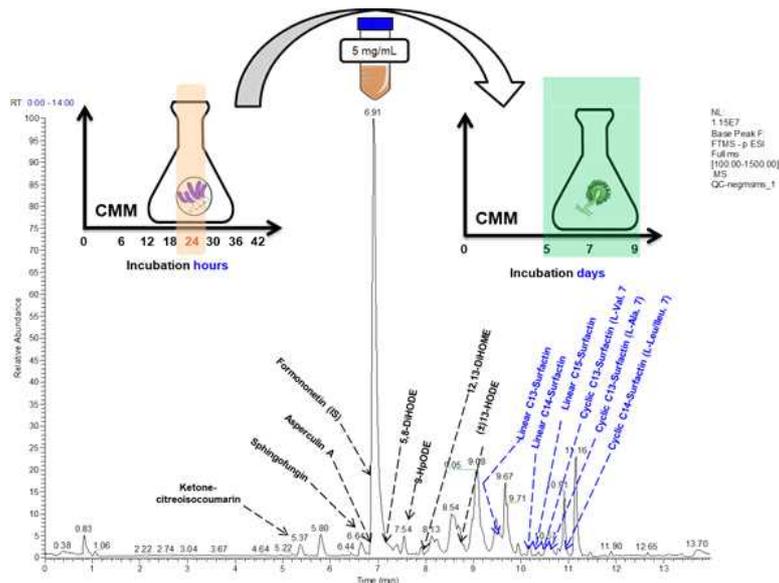


그림 125. *B. amyloliquefaciens* 추출물을 crossfeeding 한 *A. oryzae*의 LC-MS 크로마토그램

- 24시간의 *B. amyloliquefaciens* 추출물을 *A. oryzae*에 처리했을 때, 다양한 성장 지표 (biomass, media pH, sclerotia count, conidia density) 들이 변화하는 현상을 확인 함 (그림 126)

림 126).

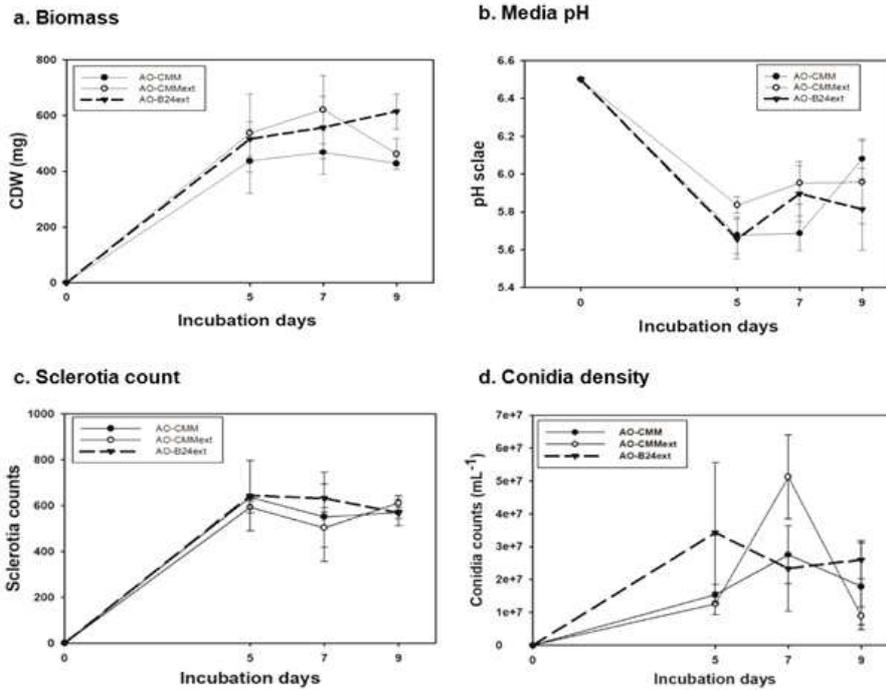


그림 126. *B. amyloliquefaciens* 추출물을 *A. oryzae*에 처리 시 *A. oryzae*의 생육지표 결과

- 24시간의 *B. amyloliquefaciens* 추출물을 *A. oryzae*에 처리한 샘플, 배지성분을 *A. oryzae*에 처리한 샘플, 그리고 아무것도 처리하지 않은 *A. oryzae* 샘플을 이용하여 다변량 통계분석을 수행함 (그림 127). 수행결과 각 샘플별로 PC1 (14.60%)과 PC2 (8.89%)에 의해서 나뉘는 현상을 보이며, PLS-DA 모델도 PCA와 동일한 현상을 보임.

***A. oryzae* Cross-fed with B24 ext.(PCA & PLS-DA)**

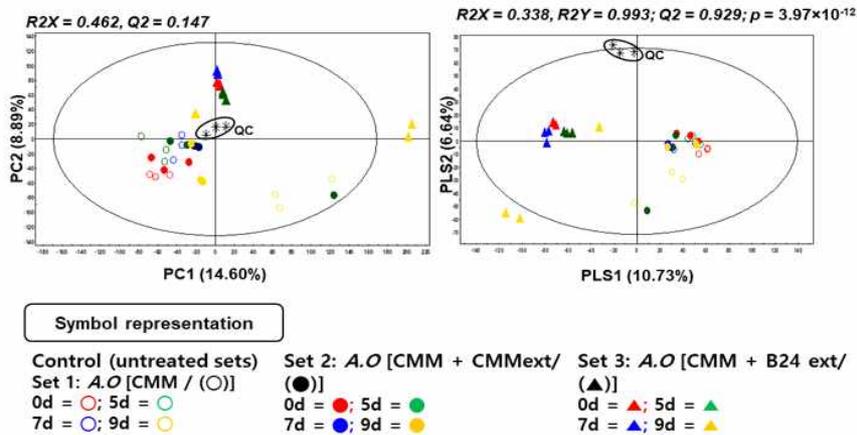


그림 127. *A. oryzae*에 24시간의 *B. amyloliquefaciens* 추출물 처리, 배지성분을 처리한 샘플, 무처리 샘플을 이용한 다변량 통계분석 결과

- PLS-DA 모델을 기반으로 하여 차이 나는 대사체를 확인하였고, 차이 나는 대사체와 성장 지표와의 상관관계분석을 수행함 (그림 128). 상관관계 분석결과, linear surfactins는 성장지

표와 positive한 상관관계를 확인하였고, 위 물질들은 *A. oryzae*의 성장에 기여하는 *B. amyloliquefaciens* 추출 물질인 것으로 추정 됨.

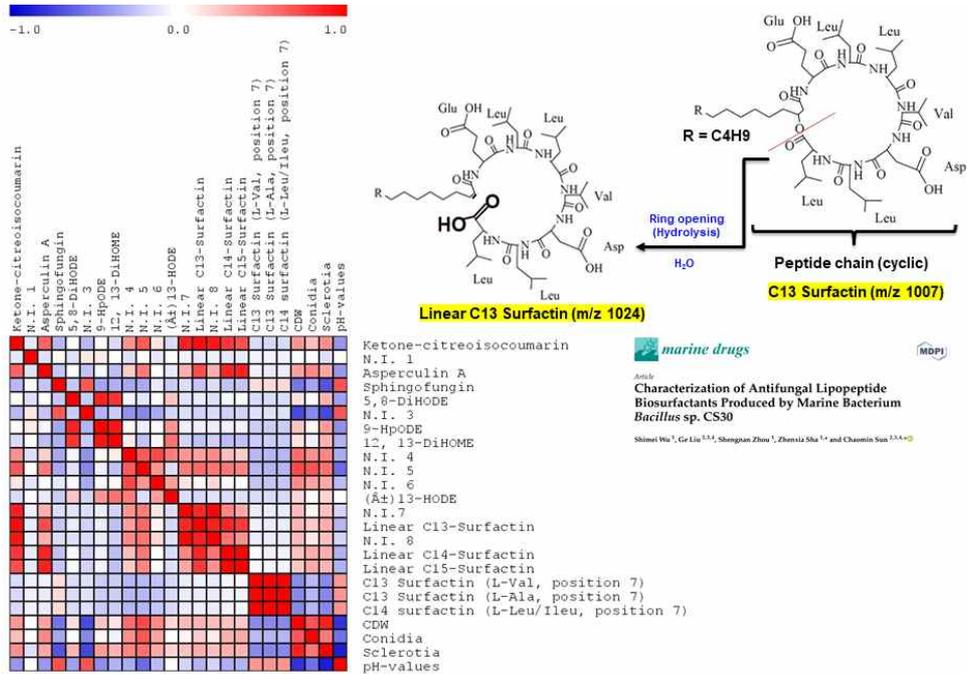


그림 128. 대사체와 성장 지표간의 상관관계 분석 및 제시된 바이오마커 구조

○ 메타오믹스 기반 기능성 대사물질 미생물 상호작용 대사 네트워크 모델 해석 및 검증

1. 농축산식품 환경 유용미생물의 환경별 변화하는 메타메타볼로믹스 분석

- 3차 년도에 수행한 *A. oryzae*의 배양환경에 따른 *in silico* 모델을 기반으로 하여 대사경로를 확인함. 고체 배양과 액체배양이 대사체 및 전사체가 차이를 보이는 것을 확인하였고, 특히 고체 배양에서 더 많은 대사체가 생산되는 것을 확인하였음. 이는 고체 배양이 산화 스트레스를 액체 배양에 비해서 상대적으로 더 많이 받아서 나타나는 현상이라고 확인함.
- 앞선 현상에 대한 검증을 위해 산화스트레스를 유도 후 변화하는 이차 대사체를 분석 수행함. 또한 옥시리핀과 상관관계를 가진다고 알려진 철 (Fe) 이온의 농도도 함께 조절하여 이차 대사체의 변화를 확인 수행함 (그림 129).

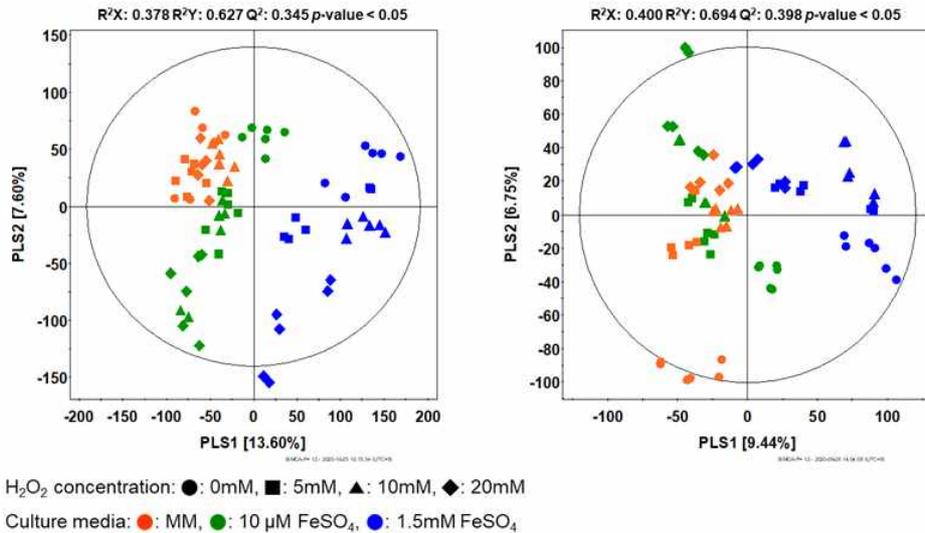


그림 129.  $H_2O_2$  농도 및  $FeSO_4$  농도 별 다변량 통계분석 결과

- in silico 모델을 통해서 Carbonic anhydrase가 크게 발현되는 것을 확인하였고, 해당 효소는  $CO_2$ 와 관계가 있다는 것을 확인함.  $CO_2$ 는 지방산 생성과 관련이 있다는 것을 확인함. 따라서,  $CO_2$  농도를 조절하여 해당 현상을 확인 수행함 (그림 130).

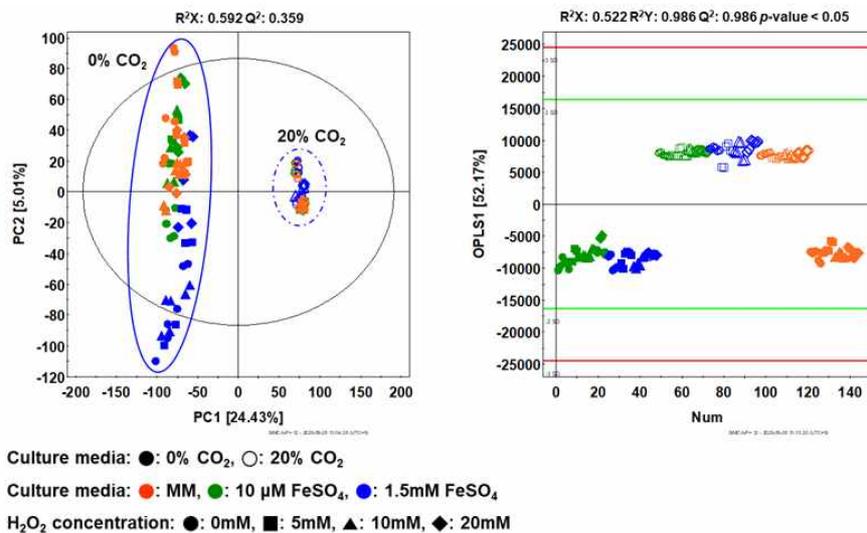


그림 130.  $CO_2$  농도 별 다변량 통계분석 결과

## 1. 메타메타볼로믹스 기법을 적용해 발효 환경에 따른 미생물 상호작용 및 대사체 규명

- Fungi와 bacteria 간 상호작용에서 이전 3차년도에 수행한 cross-feeding 실험에서 바이오마커로 제시된 *Bacillus amyloliquefaciens* 유래 surfactin의 fungi에 대한 작용, *A. oryzae* 유래 oxylipin의 bacteria에 대한 작용을 확인하기 위해서 농식품 유래 미생물인 *A. oryzae*와 *Bacillus amyloliquefaciens*를 선택하여 surfactin / oxylipin standard 물질을 상호 cross-feeding하는 실험을 진행함 (그림 131).

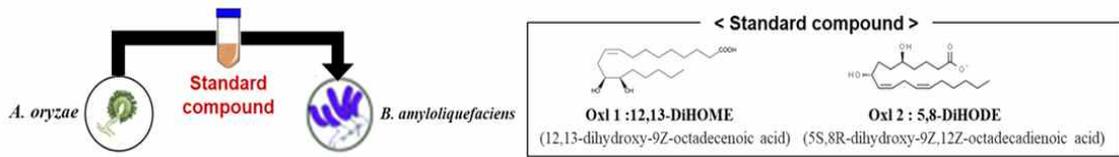


그림 131. 최소배지에서서의 Fungi-Bacteria 상호작용해석을 위한 실험 모식도

- B. amyloliquifaciens에서 생산되는 C15 surfactin standard 물질 처리 시 A. oryzae의 biomass와 conidia 생성이 감소하였으며, 다변량 통계분석 결과 C15 surfactin가 A. oryzae의 대사적 변화에 주요하게 영향을 주었음을 확인함 (그림 132).

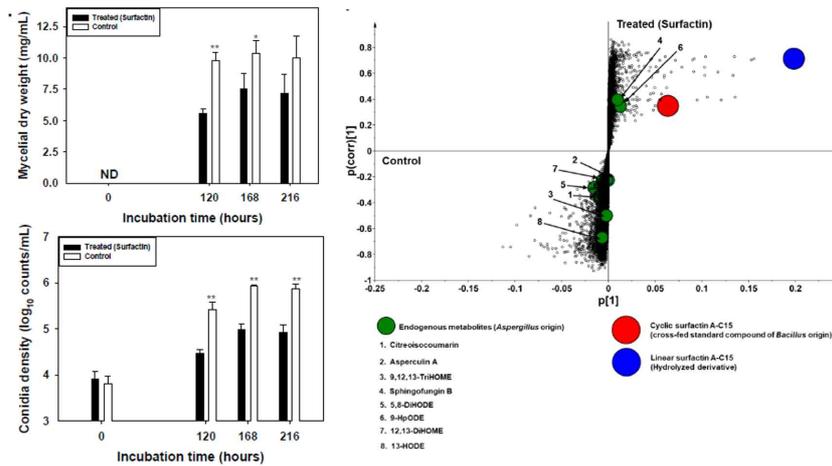


그림 132. C15 surfactin standard를 처리한 A. oryzae의 성장 척도, 다변량 통계분석 결과

- A. oryzae에서 생산되는 oxylipin standard 물질 처리 시 B. amyloliquifaciens의 cell turbidity가 감소하고, biofilm 생성이 증가하였으며, 다변량 통계분석 결과 oxylipin (12,13-DiHOME)이 B. amyloliquifaciens의 대사적 변화에 주요하게 영향을 주었음을 확인함 (그림 133).

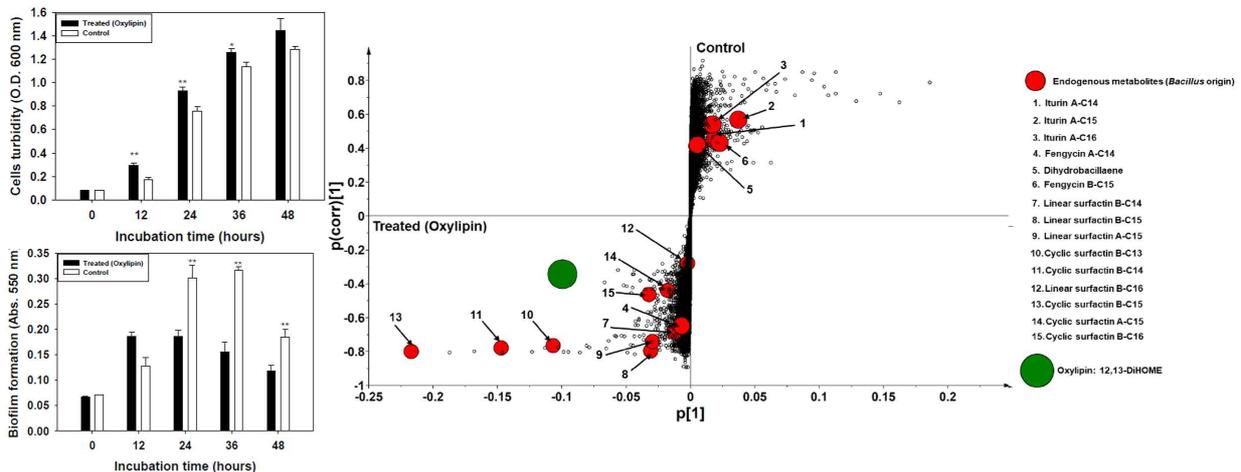


그림 133. oxylipin standard를 처리한 B. amyloliquifaciens의 성장 척도, 다변량 통계분석 결과

- A. oryzae 추출물 처리 시 B. amyloliquifaciens의 biofilm 생성이 증가하였으며, 다변량

통계분석 결과 *B. amyloliquifaciens* 이차 대사체의 변화를 확인 수행함 (그림 134).

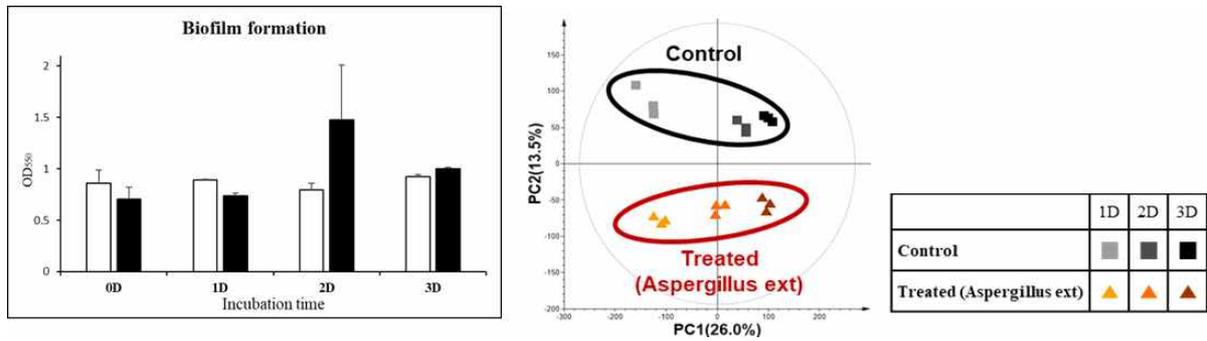


그림 134. *A. oryzae* 추출물을 처리한 *B. amyloliquifaciens* 의 성장 척도, 다변량 통계분석 결과

- 이후 *A. oryzae*에서 생산되는 oxylipin standard 물질을 처리하여 oxylipin에 의해 *B. amyloliquifaciens*의 biofilm 생성이 증가함을 규명하였으며, OPLS-DA를 통해 주요하게 변화한 *B. amyloliquifaciens* 의 이차대사체를 특정함 (그림 135).

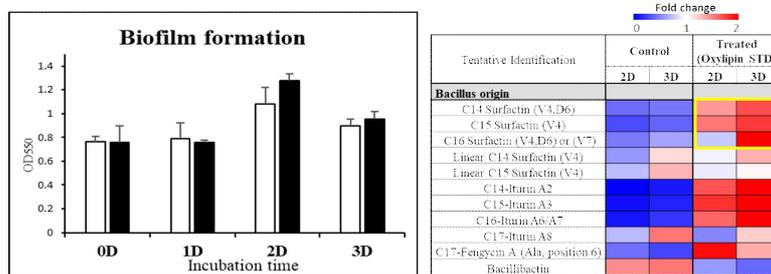


그림 135. oxylipin standard를 처리한 *B. amyloliquifaciens*의 성장 척도, heatmap 결과

- *B. amyloliquifaciens*추출물 처리 시 *A. oryzae* 의 conidia 생성이 감소하였으며, 다변량 통계분석 결과 *A. oryzae* 이차 대사체의 변화를 확인 수행함 (그림 136).

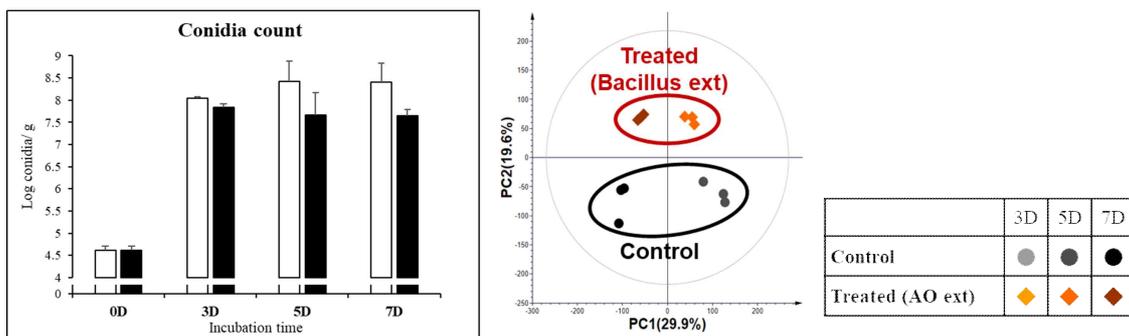


그림 136. *B. amyloliquifaciens* 추출물을 처리한 *A. oryzae* 의 성장 척도, 다변량 통계분석 결과

- 이후 *B. amyloliquifaciens*에서 생산되는 C15 surfactin standard 물질을 처리하여 oxylipin에 의해 *A. oryzae*의 conidia 생성이 감소함을 규명하였으며, OPLS-DA를 통해 주요하게 변화한 *A. oryzae* 의 이차대사체를 특정함 (그림 137).

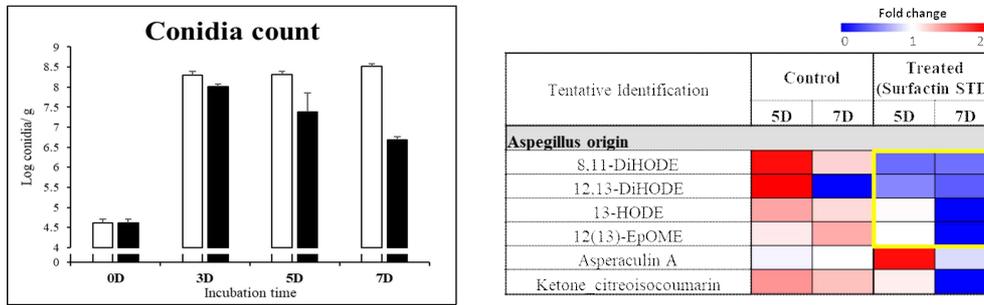


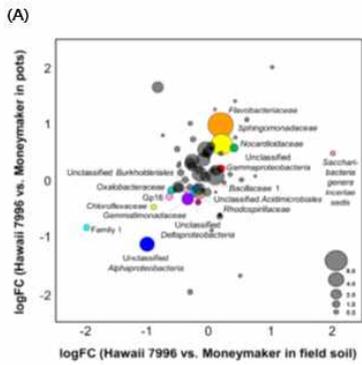
그림 137. C15 surfactin standard를 처리한 *A. oryzae* 의 성장 척도, heatmap 결과

## ○ 대용량 메타유전체 정보 분석 및 이를 활용한 농식품 환경 내 미생물 자원 탐색

### 1. 작물 근권 메타유전체 분석을 통한 기주-미생물 상호작용 관련 핵심 마이크로바이옴 정보 분석

- 작물 환경을 대상으로 메타유전체 서열로부터 미생물 생명정보를 분석하여 작물 근권의 주요 미생물군의 파악, 기주-미생물 간의 상호작용 유추, 기능성 미생물 자원 수집하고자 하였음. 이를 위해 토마토 풋마름병의 저항성 품종 및 감수성 품종 근권의 미생물 군집 구조 심화 재분석을 통한 핵심 마이크로바이옴 도출하고자 하였음. 본 연구팀에서는 선행 연구에서 작물 근권 마이크로바이옴 연구에서 토마토 풋마름병 저항성 품종(Hawaii 7996)과 감수성 품종(Moneymaker) 근권의 마이크로바이옴 데이터 분석(그림 1A)으로부터 병저항성 기여에 관여하는 *Flavobacteriaceae*에 속하는 핵심 균주 TRM1을 분리하였음(Kwak *et al.*, Nat. Biotechnol. 2018). 본 연구에서는 기존의 데이터 분석을 바탕으로 추가 핵심 마이크로바이옴 분석을 통해 TRM1과 그 외의 병저항성과 관련된 미생물들에 대해 파악, 분석하고자 함. 따라서 기존의 454 pyrosequencer를 이용하여 근권 메타유전체의 16S rDNA amplicon sequencing 되었던 데이터들을 가지고 풋마름병 저항성 품종과 감수성 품종 근권의 미생물 군집에 대해 재분석을 수행함.

- 기존 16S rDNA amplicon sequencing 데이터 중, bulk soil, Hawaii 7996, Moneymaker의 field 샘플과 pot 샘플로부터 증폭된 6개의 16S rRNA sequence read data set을 사용하였음(그림 138B). 선행 연구의 근권 미생물 군집 해독 및 분석 결과에 기반하되 미생물 자원 탐색을 위한 정보를 생산하기 위해 1차년도에는 종(species) 수준의 미생물군을 분석하고자 하였음. 이를 위해 amplicon sequence read들 가운데 200bp 이상의 read들을 선별하고 Qiime1 군집 분석 파이프라인 내의 분석 도구 및 데이터베이스를 활용하여 종(species) 단위까지 taxonomy assignment 결과를 확보함. 이후, Hawaii 7996과 Moneymaker 근권 샘플들 사이에서 유의미한 미생물 종을 파악하기 위해 differential abundance를 분석하여 923개의 taxon 목록 가운데, adjusted p-values  $10^{-5}$  이하의 taxon 목록을 일차적으로 선별할 수 있었음(표 17). 따라서 선행 연구에서 더 나아가 *Flavobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae* 등의 병저항성에 기여 또는 관련되어 있을 수 있는 세균 종 후보들을 분석하고 해당 종의 대표 sequence를 확보함으로써 후보 미생물 선정 및 근권 마이크로바이옴에 관한 기초 정보를 파악할 수 있었음.



(B) Supplementary Table 1. Read statistics of amplicon sequencing and metagenome sequencing

a. Number of reads from pyrosequencing of the 16S rRNA gene

Sequencing batch	Source	Sample	Sample ID	Before trimming	Chimeric reads	Singletons	After trimming	Average read length (bp)	
First sequencing	Field experiment	1 <sup>st</sup> Bulk soil	DAU:W1BS	31,646	5,218	6,778	18,086	381	
	Field experiment	2 <sup>nd</sup> Bulk soil	DAU:W2BS	29,607	4,297	6,811	17,030	382	
	Field experiment	1 <sup>st</sup> Korean cabbage	DAU:W1CC	27,477	5,618	4,799	15,983	386	
	Field experiment	2 <sup>nd</sup> Korean cabbage	DAU:W2CC	22,460	4,247	4,721	12,623	384	
	Field experiment	1 <sup>st</sup> Hawaii 7996	DAU:W1H7	29,034	5,314	4,920	17,753	377	
	Field experiment	2 <sup>nd</sup> Hawaii 7996	DAU:W2H7	18,901	3,690	4,610	10,491	384	
	Field experiment	1 <sup>st</sup> Moneymaker	DAU:W1MM	28,273	5,588	4,860	16,853	379	
	Field experiment	2 <sup>nd</sup> Moneymaker	DAU:W2MM	24,995	5,172	5,058	13,867	382	
	Second sequencing	Field experiment	1 <sup>st</sup> Bulk soil	DAU:BS1	23,165	1,793	4,080	9,113	413
		Field experiment	2 <sup>nd</sup> Bulk soil	DAU:BS2	27,140	1,309	4,746	11,344	330
Field experiment		1 <sup>st</sup> Hawaii 7996	DAU:H6-1	24,610	2,259	2,574	9,958	420	
Field experiment		2 <sup>nd</sup> Hawaii 7996	DAU:H6-2	13,351	1,097	2,556	6,077	333	
Field experiment		1 <sup>st</sup> Moneymaker	DAU:MM1	29,738	2,754	3,258	11,286	417	
Field experiment		2 <sup>nd</sup> Moneymaker	DAU:MM2	25,511	1,823	4,118	9,977	328	
Pot experiment		Bulk soil	DAU:BS3	19,555	1,401	3,045	8,493	419	
Pot experiment		Moneymaker	DAU:MM3	25,630	1,867	3,778	9,394	309	
Third sequencing	Pot experiment	Moneymaker	DAU:MM5	35,664	3,190	4,322	13,532	420	

BS, Bulk soil; CC, Korean cabbage; H7, Hawaii 7996; MM, Moneymaker  
 1<sup>st</sup>/W1, active growth and first flowering stage; 2<sup>nd</sup>/W2, fruiting and senescence stage

Kwak et al.(2018)

그림 138. 토마토 풋마름병 저항성 품종 (Hawaii 7996)과 감수성 품종(Moneymaker) 근권에 대한 선행 연구의 미생물 군집 내 family 분석 결과(A) 및 본 연구에서 활용한 주요 군집 해독 데이터 세트(B)

표 17. Hawaii 7996과 Moneymaker 근권 세균의 종(species) 수준에서의 differential abundance 분석 결과

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	counts in Hawaii 7996	counts in Moneymaker	p-values
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium		0.12982	0.09201	3.83E-63
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium		0.12752	0.08948	2.11E-57
Cyanobacteria	Chloroplast	Streptophyta				0.20610	0.28352	6.90E-50
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Mariniflexile	gromovii	0.03856	0.01601	1.00E-44
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae			0.03387	0.04297	2.94E-26
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes					0.01544	0.02297	1.10E-18
Chloroflexi	Ellin6529					0.01163	0.01611	3.78E-18
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Other	Other	0.01637	0.00819	1.87E-16
Gemmatimonadetes	Gemm-1					0.02218	0.02711	2.58E-16
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	mitochondria	Other	Other	0.05347	0.08923	2.64E-16
Proteobacteria	Betaproteobacteria	MND1				0.01559	0.01905	1.96E-15
Acidobacteria	Acidobacteria-6	iii1-15				0.01836	0.02316	1.04E-12
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae			0.01240	0.01520	9.57E-12
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae			0.03874	0.03336	2.08E-10
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hypnomicrobiaceae	Rhodoplanes		0.03726	0.03655	2.58E-10
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Agrobacterium		0.01508	0.00975	6.86E-10
Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae			0.01403	0.01405	1.16E-09
TM7	TM7-1					0.00887	0.00329	1.33E-09
Chloroflexi	Anaerolineae	envOPS12				0.05552	0.05259	5.69E-09
Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Saprospiraceae			0.02120	0.01807	2.76E-08
Proteobacteria	Betaproteobacteria	SC-I-84				0.00609	0.00832	3.22E-08
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces		0.01604	0.01729	4.67E-08
Chloroflexi	Anaerolineae	SBR1031	A4b			0.01975	0.01967	6.05E-08

- 토마토 근권 내 community data 및 전 메타유전체 서열로부터 strain 단위의 미생물 군주를 선정하기 위해 기존의 16s rDNA amplicon sequencing data를 이용한 마이크로바이오타 재분석과 전 메타유전체의 조립 서열을 재분석 및 재구성함. 마이크로바이오타 데이터에서는 기존의 OTU clustering 및 Qiime1 프로그램을 이용한 1차년도 분석 결과에서 더 나아가 최근 amplicon sequence variant(ASV)를 활용한 군집 분석 방법에 따라 배양을 목표하는 미생물의 정확한 정보 즉, strain 단위의 군주 정보를 확보하고자 하였음. 군집 내

sequence 분석을 수행하기 위해 두 가지 방법으로 접근하고 이를 비교하여 공통적으로 주요 미생물로 나타나는 균주들을 우선순위에 두고자 하였음. 첫 번째 방법(CA1)으로는 Qiime2를 이용하여 replicated sequence를 제거한 unique sequence를 table로 작성하고 taxonomy assignment를 수행함. 이후, 저항성 품종 근권 샘플들(H61, H65)과 감수성 품종 근권 샘플들(MM1, MM5) 내 균주들을 sequence 단위에서의 differential abundance를 구하기 위해 edgeR, 전통적인 통계 수치들을 참고하여 relative abundance를 기준으로 풋마름병 감수성 품종 Moneymaker에 비해 저항성 Hawaii 7996 품종의 field 샘플에서 2배 이상 차이가 나는 sequence들을 선별할 수 있었음(그림 139).

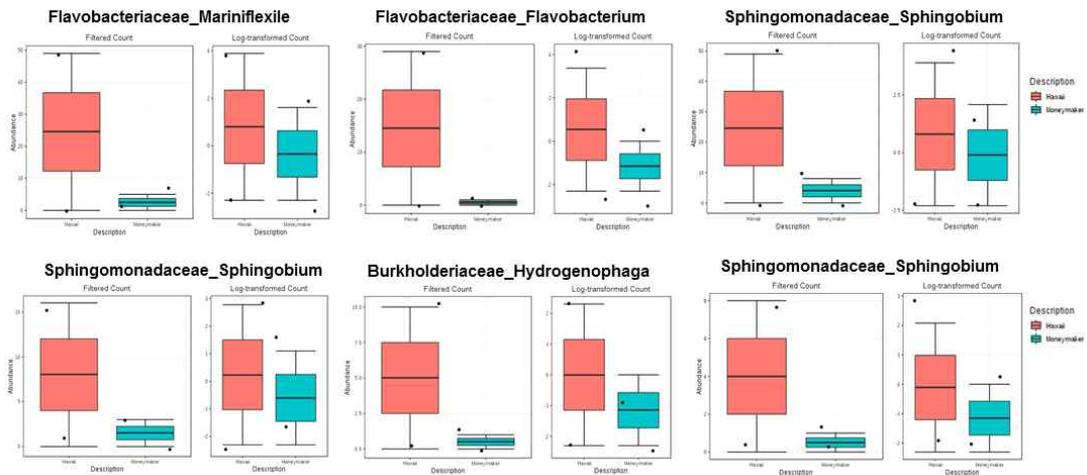


그림 139. 병저항성 품종의 근권에서 상대적으로 높게 존재하는 대표적 균주 서열들의 토마토 품종별 abundance 비교

- 또 다른 통계적 접근 방법을 이용하기 위해 군집 분석으로부터 sequence 단위의 차이는 미생물들을 분석하는 방법(CA2)으로 Mann-Whitney U test를 수행하여 Z score의 절대값이 가장 높은 값으로 나오는 샘플들을 선별하는 방법을 이용함으로써 strain 또는 sequence 수준의 variant들을 구하였음. 이 경우, read의 quality를 minimum quality 10, average quality 20, Minimum length 350 bp, maximum length 700 bp로 제한하여 고품질의 서열만 사용하도록 함. Unique sequence 분석을 위해 전체 샘플 데이터에서 0.02% 이상의 proportion을 보이는 서열들만 선택하여 수집하고 분석을 위해 샘플들 간의 데이터를 비교 분석하여 병저항성 품종과 감수성 품종에서 차이가 나는 미생물들의 후보군들을 제시함.
- 두 방법의 결과를 종합하였을 때, 선행연구 결과에서 분석하여 병저항성, 감수성 토마토 품종 근권에서 차이가 있었던 *Flavobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae* 등이 병저항성 균주에서 여전히 중요한 것으로 나타남. 특히 *Flavobacteriaceae*에 속하는 *Mariniflexile* 균주들이 strain, sequence 수준에서도 감수성에 비해 병저항성 품종 근권에서 높은 비율로 나타나는 주요 균주로 다시 확인됨.
- 전 메타유전체 분석(WM), 즉 조립된 유전체 단위에서 주요 후보 균주들의 근거들을 찾기 위하여 분석을 수행하였음. 기존의 서열 조립 결과를 개선하고 유전체 서열을 체계적으로

재구성하기 위해 *de novo* assembly, binning 등과 관련된 최근 개발된 전 메타유전체 서열 조립을 위한 방법들을 도입하여 whole metagenome shotgun sequencing 분석 체계를 재구성하였음(그림 140A). Read quality control을 위해 quality score 0.05에 최소 read 길이를 60bp 조건으로 하여 trimming 한 이후, 추가로 토마토 자체의 DNA제거를 실시한 이후 MegaHIT 프로그램을 이용하여 *de novo* assembly를 진행함에 따라 기존의 조립 서열보다 개선된 서열을 확보함. 샘플 당 depth를 알기 위해 bowtie2를 이용하여 coverage를 계산하였고 samtools를 이용하여 sorting된 bam파일을 저장한 뒤 Quast를 이용하여 조립된 DNA서열의 통계를 정리함. 조립된 contig들을 4개의 뉴클리오타이드 프리퀀시 지표(TNF)를 이용하여 binning하기 위해 jgi\_summarize\_depth 코드와 bam파일을 이용하여 contig들의 coverage 파일을 생성한 뒤 최소 contig 길이를 1000bp 기준을 두고 Metabat2를 실행하였음. 이후, Hawaii 7996 근권 샘플에서는 총 86개의 bin이 생성되었고 MoneyMaker 샘플에서는 총 71개의 bin이 생성되었음. 만들어진 bin의 시각화를 위해 각 bin의 GC contents와 coverage 정보를 추출한 후, R을 이용하여 데이터프레임을 작성하고 ggplot2 package를 이용하여 plotting, 서로 다른 bin들을 다른 종류의 색으로 시각화 함.

- 이후 각 bin들의 taxonomic assignment를 위하여 NCBI의 Reference 데이터베이스를 기반으로 Megablast를 실행하고 taxator-kt 프로그램을 이용하여 top percent를 30%, 최소 E-value를 0.01로 필터링하여 metagenome assembled genome에 대한 미생물 계통을 결정하였음(그림 140B).

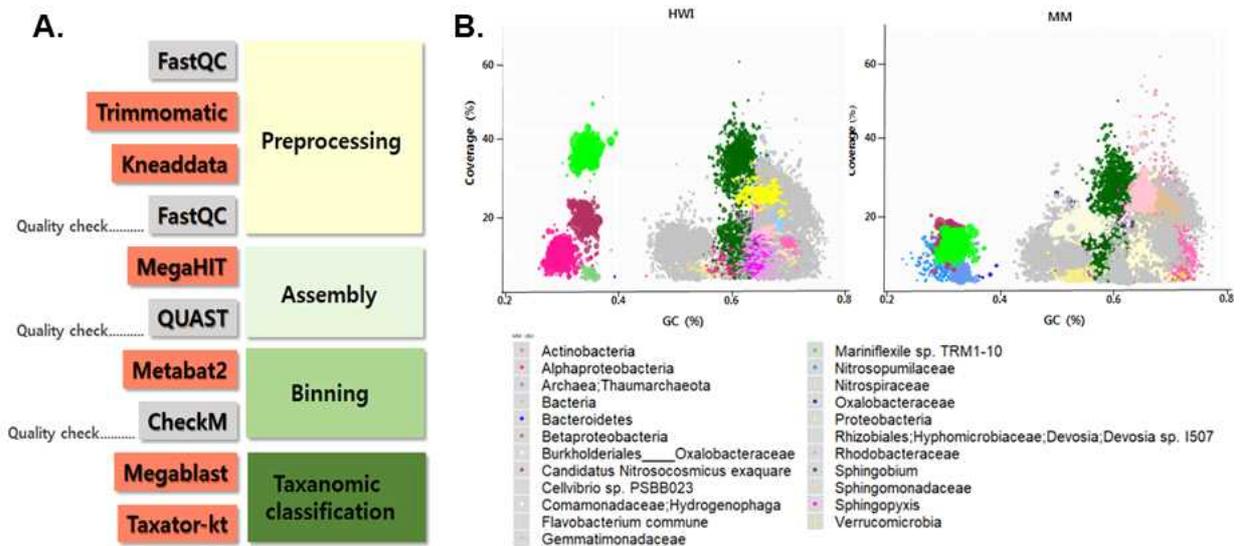


그림 140. 토마토 근권 전 메타유전체 분석을 위한 MAG(Metagenome Assembled Genome 분석 체계(A), Metabat2를 이용한 binning 및 taxonomy assignment 결과(B)

- 여러 분석 방법 및 접근법들로부터 도출된 분석 결과를 가지고 병저항성과 관련된 균주 서열들의 taxonomy assignment를 비교하였음. 세 가지 분석 방법을 종합하였을 때, 공통적으로 나타난 균주 서열들의 family, genus는 *Flavobacteriaceae*의 *Mariniflexile*, *Sphingomonadaceae*의 *Sphingobium*, *Flavobacteriaceae*의 *Flavobacterium* 등으로 나타났으며(그림 141A) 이는 선행 연구의 16S rDNA amplicon sequencing data 중 field 시료

의 추가 반복 sequencing 데이터를 재분석한 LefSe 분석 결과에서도 해당 균주들이 병저항성 토마토 품종에서 의미있게 나타나는 것으로 보아 주요 병저항성 관련 균주 후보로 분류할 수 있었음(그림 141B). 이 외에 *Hyphomicrobiaceae*의 *Hyphomicrobium*, *Comamonadaceae*의 *Hydrogenophaga* 등 두 가지 방법의 군집 분석에서 공통적으로 나오거나 한 가지 군집 서열과 전 메타유전체 조립 서열에서 공통적으로 나타남. 이러한 균주들 또한 균주 수집 상황에 따라 토마토 풋마름병 저항성 관련 후보 균주들로 분류할 수 있음

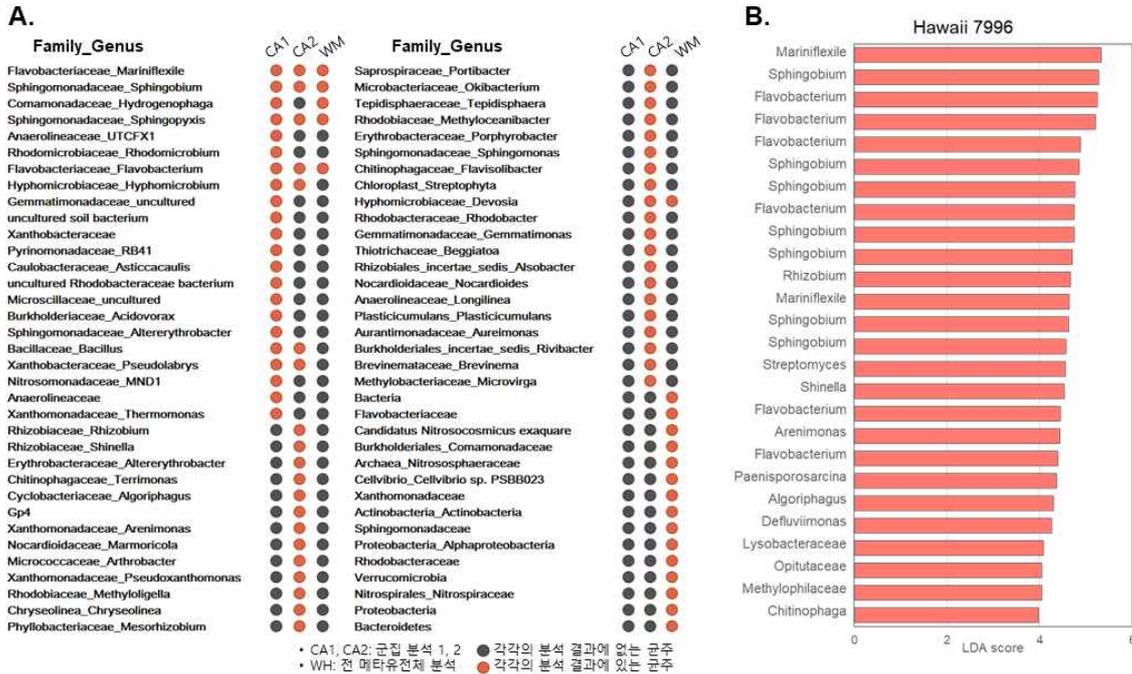


그림 141. 다양한 마이크로바이옴 분석 및 데이터 종류에 따라 병저항성 토마토 품종에 관련된 균주 목록(A) 및 미생물 군집 서열 분석에서의 LefSe 결과(B)

## 2. 전 메타유전체 분석을 통한 근권 주요 미생물군의 유전자 구성 및 대사 파악

– 토마토 풋마름병 저항성 및 감수성 품종의 근권 전 메타유전체 해독 서열 데이터를 활용하여 co-assembly를 수행하고, bin을 수집, 분류한 후, refinement 및 유전체 서열 재조립을 통해 metagenome-assembled genome(MAG)을 재구성하였음. 그 결과, 유전체 서열에 의해 taxonomy가 구분 가능한 2.1Mb ~ 5.0 Mb에 이르는 9개의 유전체 서열을 수집하였음. 선행 연구에서 발굴된 *Mariniflexile* sp. TRM1-10 유전체 외에도 Hawaii 7996 근권 MAG에서 보다 높은 비율로 존재하는 것으로 나타나는 *Verrucomicrobia*, *Sphingobium*, *Xanthomonadales*, *Flavobacterium*, *Nitrosocosmicus*, *Gemmatirosa*에 속하는 미생물 균주들과 MoneyMaker 근권 MAG에서 상대적으로 높은 *Sphingomonas*, *Oxalobacteraceae*에 속하는 미생물군들의 유전체를 분석하였음. Rast 서버 및 Subsystem DB를 이용하여 해당 균주 및 군집들의 유전체 서열로부터 유전자를 예측하고 주석화한 후, 전반적인 대사적 특성에 대해 분석하였음. 그 중 *Verrucomicrobia* sp. 경우, 같은 phylum에 속하면서 비교적 가까운 것으로 나타난 균주 *Opitutus terrae*에 비해 carbohydrate metabolism에 관여하는 유전자들을 상대적으로 많이 갖고 있는 것으로 나타났음. 이는 TRM1-10에서 carbohydrate metabolism 관련된 유전자들의 비율이 많이 발견되는 것과 같은 양상으로,

식물 근권에서의 서식 특성, 대사, 작물과의 상호작용 가능성을 기대할 수 있었음 (그림 142).

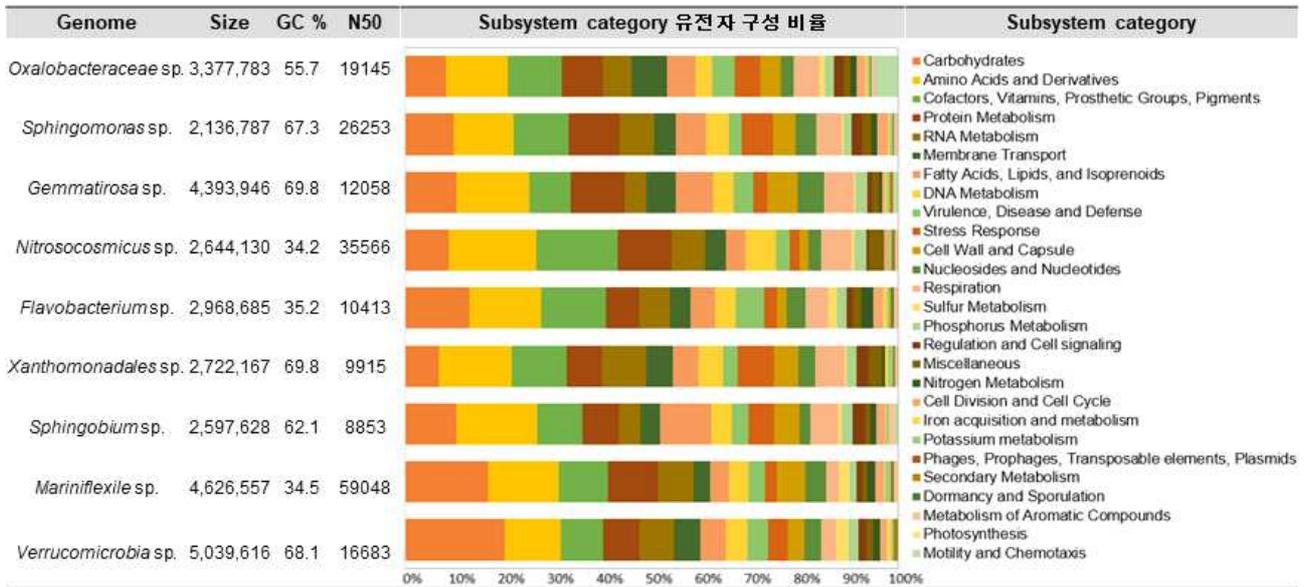


그림 142. 토마토 근권 MAG를 통해 재구성된 주요 미생물군 유전체 서열 정보 및 토마토 근권 메타유전체 조립 서열의 재구성을 통한 병저항성과 관련 가능성 있는 주요 균주들의 유전체에 존재하는 유전자 카테고리 비율 분석 결과

○ 메타유전체 정보 분석 기반 핵심 미생물의 기능 분석 및 미생물-작물 상호작용의 이해

1. 작물 근권 마이크로바이옴 연구를 위한 메타유전체 정보 기반의 미생물 균주 수집

- 풋마름병 저항성 토마토 근권 유래 주요 균주들을 분리하기 위해 선행 연구(Kwak *et al.*, 2018)에서 사용한 토양 시료(4°C에 냉장 보관 토양 시료 및 glycerol stock 상태의 -80°C 보관 토마토 병저항성 근권 시료) 두 종류를 사용함. 분리 배지로는 토양 미생물, 근권 미생물, 근권 microbial community를 제작한 문헌들을 참고하여 Tryptic Soy Agar(TSA), Marine Agar(MA), Nutrient Agar(NA)를 기본 배지로 선정하였고, 이에 대한 희석 배지 종류를 제작하여 사용하기로 함. 0.5g의 토양 샘플을 15ml의 액체 broth에 희석하여 30°C에 6시간 동안 pre-incubation 시킨 후, 이를 PBS buffer에 희석하여 TSA, MA, NA의 각각 1배, 0.5배, 0.1배로 희석한 총 9종류의 고체 배지에 도말함. Glycerol stock으로 보관되어 있던 샘플의 경우에는 0.05배로 희석한 배지를 포함하여 총 12종류의 고체 배지에 도말하였음. 이후 이들을 30°C 또는 상온에 3일(72h)간 배양하고, 도말 후 3일차, 6일차, 9일차, 12일차, 15일차, 총 5번에 걸친 colony picking 및 pure culture을 진행함. 이후 96 well plate에 같은 배양 조건의 액체 broth와 50% glycerol과 1:1 비율로 섞어서 culture collection을 제작함. colony PCR을 위해 95°C heat을 10분간 가해서 cell을 파쇄하고, universal primer인 27F, 1492R primer를 이용해서 colony PCR 함. PCR product들에 대해 sequencing을 진행하고 0.05 미만의 low quality 부분을 trimming 한 후, EzBioCloud 16S identifier를 이용하여 균주를 동정하였음(그림 143).

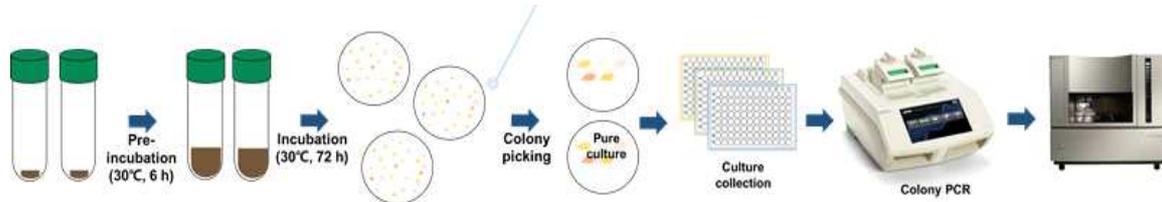


그림 143. 풋마름병 저항성 토마토 근권 유래 주요 균주 분리 과정

- 병저항성 토마토 품종 근권 시료를 선정 배지에 도말, 배양, 순수 분리를 시도하여 culture collection을 구축함. 그 결과, glycerol stock으로 보관한 토양 샘플을 배양하여 12종류의 고체 배지에서 총 4,579개의 분리 균주를 수집하였고 토양상태로 보관한 시료부터 총 355개의 균주를 분리하였음. 전체 4,934개의 분리 균주를 대상으로 16S rRNA gene sequencing을 수행하여 그 중, 1,753개의 균주를 동정함. 확보한 균주는 5 phyla, 11 class, 19 order, 33 family, 85 genus, 249 strain에 속한 것으로 확인하였고(표 18, 그림 144), 확보된 culture collection내 균주들의 분류학적 관계를 파악하였음(그림 145).

표 18. 병저항성 근권 시료로부터 분리, 동정된 균주들

Phylum	Order	Class	Family	Genus	No.	
Actinobacteria	Actinomycetia	Microbacteriales	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus</i>	71	
				<i>Homoserinimonas</i>	1	
				<i>Lacisediminihabitans</i>	2	
				<i>Microbacterium</i>	8	
				<i>Microterricola</i>	3	
		<i>Salinibacterium</i>	1			
		Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	26	
				<i>Paenarthrobacter</i>	3	
				<i>Pseudarthrobacter</i>	10	
				<i>Marmoricola</i>	1	
<i>Nocardioides</i>	7					
Propionibacteriales	Nocardioideaceae	<i>Marmoricola</i>	1			
		<i>Nocardioides</i>	7			
Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	1			
		<i>Streptomyces</i>	1			
Bacteroidetes	Chitinophagia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Chitinophaga</i>	2	
				<i>JN409117_g</i>	31	
	Cytophagia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	<i>Algoriphagus</i>	30	
				Hymenobacteraceae	<i>Adhaeribacter</i>	3
					<i>Pontibacter</i>	29
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>	18	
				<i>Arenibacter</i>	2	
				<i>Mariniflexile</i>	1	
				<i>Sediminibacter</i>	1	
				<i>Yeosuana</i>	1	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>	3	
				<i>Pedobacter</i>	3	
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	135
<i>Cytobacillus</i>					146	
<i>Fictibacillus</i>					22	
<i>Fredinandcohnia</i>					1	
<i>Mesobacillus</i>					11	
<i>Metabacillus</i>					33	
<i>Neobacillus</i>					12	
<i>Niallia</i>					1	
<i>Peribacillus</i>					12	
<i>Rossellomorea</i>					3	
<i>Sutcliffeiella</i>					1	
<i>Virgibacillus</i>				1		
Paenibacillaceae				<i>Brevibacillus</i>	1	
	<i>Paenibacillus</i>	2				

			<i>Planococcaceae</i>	<i>Lysinibacillus</i>	1
				<i>Metasolibacillus</i>	4
				<i>Paenisporosarcina</i>	5
				<i>Psychrobacillus</i>	2
				<i>Ureibacillus</i>	1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	57
		<i>Rhizobiales</i>	<i>Boseaceae</i>	<i>Bosea</i>	2
			<i>Devosiaceae</i>	<i>Devosia</i>	42
			<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Filomicrobium</i>	1
			<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Microvirga</i>	10
			<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Aliihoeflea</i>	1
				<i>Aminobacter</i>	80
				<i>Aquamicrobium</i>	1
				<i>Mesorhizobium</i>	21
		<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Nitratireductor</i>	5	
			<i>Ensifer</i>	15	
			<i>Pararhizobium</i>	12	
				<i>Rhizobium</i>	3
	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Amaricoccus</i>	1	
				<i>Defluviimonas</i>	3
	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Tsuneonella</i>	1	
		<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Parasphingopyxis</i>	1	
			<i>Sphingomonas</i>	6	
			<i>Sphingopyxis</i>	154	
				<i>Sphingosinicella</i>	17
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i>	12
				<i>Candidimonas</i>	3
				<i>Pusillimonas</i>	7
<i>Comamonadaceae</i>			<i>Acidovorax</i>	1	
			<i>Hydrogenophaga</i>	87	
			<i>Ideonella</i>	1	
			<i>Ramlibacter</i>	5	
			<i>Variovorax</i>	5	
<i>Oxalobacteraceae</i>			<i>Herbaspirillum</i>	1	
			<i>Massilia</i>	1	
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Chromatiales</i>	<i>Alishewanella_f</i>	<i>Rheinheimera</i>	47	
	<i>Lysobacterales</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Arenimonas</i>	95	
			<i>Luteimonas</i>	1	
			<i>Lysobacter</i>	79	
			<i>Panacagrionas</i>	1	
			<i>Pseudoxanthomonas</i>	38	
			<i>Thermomonas</i>	1	
		<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella</i>	1	
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	283	
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutae</i>	<i>Opitutales</i>	<i>Opitutaceae</i>	<i>Opitutus</i>
<i>Verrucomicrobiae</i>		<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Roseimicrobium</i>	1
<b>총계</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>33</b>	<b>85</b>
					<b>1753</b>

- Culture collection 내 가장 큰 분포를 갖는 family는 *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Phyllobacteriaceae*이며, 가장 큰 분포를 갖는 genus는 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingopyxis*, *Cytobacillus*, *Arenimonas*, *Hydrogenophaga*, *Lysobacter*, *Aminobacter*, *Agromyces* 그리고 *Brevundimonas*으로 확인됨.

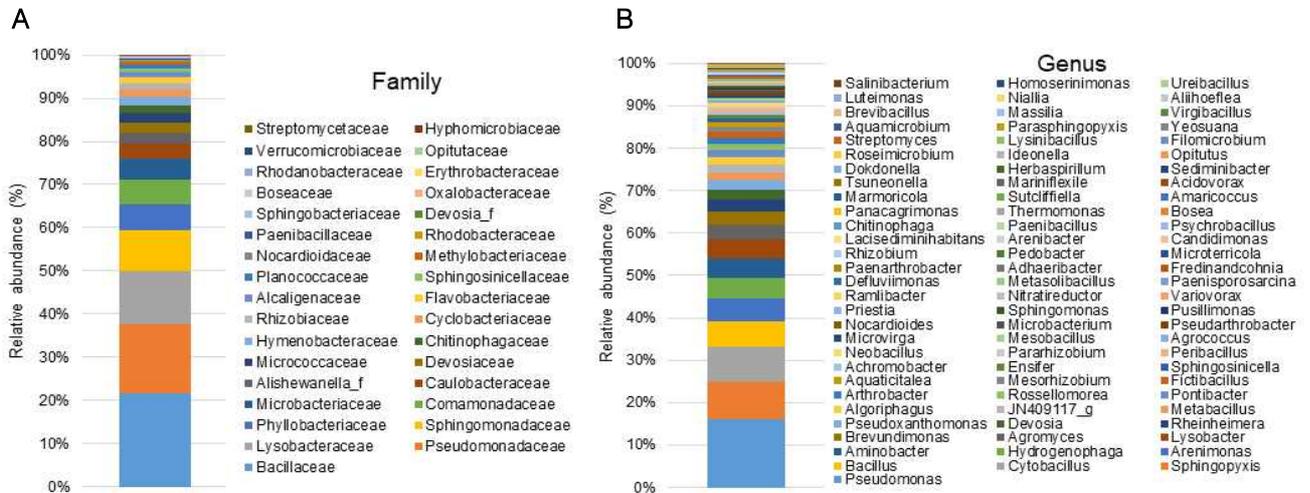


그림 144. 토마토 근권 미생물 culture collection의 미생물 분포 (A) Family 단위의 culture collection의 균주 분포 (B) Genus 단위의 culture collection의 균주 분포

- 확보, 동정한 culture collection의 family와 선행 16S rRNA amplicon sequencing으로 도출된 근권 미생물 균집을 비교하였고, 그 결과 culture collection 내 풋마름병 저항성 품종, 감수성 품종 각각에서 각 family 수준의 풍부도와 연결지어 culture collection의 기능 분석 및 미생물-상호작용 연구에 활용 가능성을 평가, 확인함(그림 146). 본 연구에서 구축한 culture collection은 다양성 및 신종 균주로 분류될 수 있는 균주들을 다수 포함하므로 신규 미생물 자원으로도 활용 가능할 것으로 예상함.

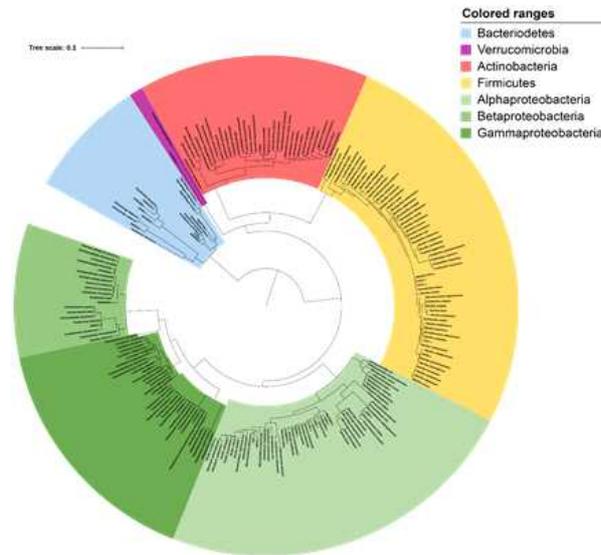


그림 145. Culture collection 균주의 16S rRNA gene sequence 기반으로 그린 phylogenetic tree

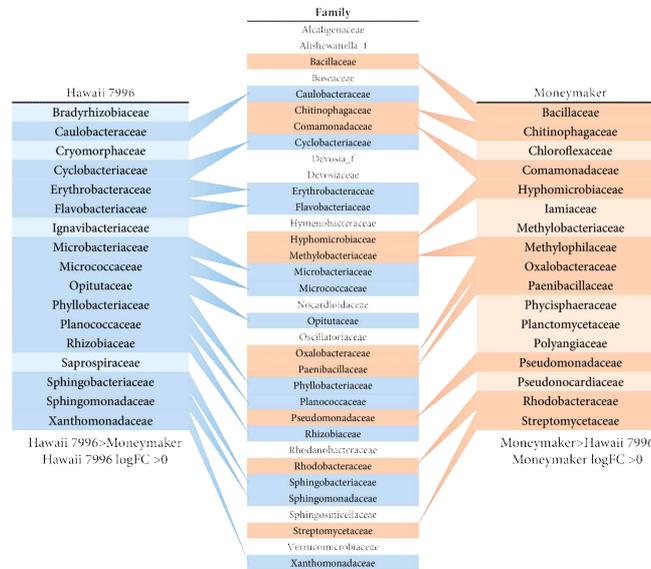


그림 146. culture collection이 포함하는 저항성 품종과 감수성 품종 각 근권에 풍부한 family

## 2. 기주-미생물 상호작용 분석을 위한 전략 및 실험 방법 설계

- 기주-미생물 상호작용 및 균주 기능성 분석을 위한 무균 *in vitro* 실험 설계: 기주-미생물 상호작용 분석 기반 구축을 위해 기주식물 토마토를 *in vitro* 배양하고 TRM1-10에 의한 세균 풋마름병에 대한 저항성 발현 여부를 관찰함. 무균 조건, 안정적인 병유도, 다수의 균주를 이용하는 다중 조건의 실험에 적합한 실험 체계를 시험함.
- 토마토를 1/2 MS(Murashige and Skoog) semi-solid media 에서 발아 후 일주일간 배양하고 뿌리쪽에 TRM1-10을  $10^7$  cfu/mL 농도로 처리 또는 대조군으로 TRM1-10의 배지만을 처리하고 일주일간 추가 배양함. *R. solanacearum* SL341을  $10^7$  cfu/mL 농도로 처리한 뒤 병징을 관찰함(그림 147A). 병징의 정도를 0-4로 나누어 비교한 결과 TRM1-10을 전처리할 경우 음성 대조군인 배지 처리구에 비해 풋마름병의 발생이 현저히 감소함(그림 147B). 식물 배지를 이용하여 기주식물을 배양하고 근권에서 미생물과 병원균의 상호작용을 관찰할 수 있는 *in vitro* system 수립함.

A.

*R. solanacearum* SL341



B.

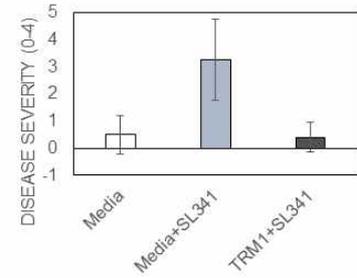


그림 147. *In vitro*에서 TRM1-10에 의한 토마토의 병저항성 관찰 (A) TRM1-10을 처리하지 않은 토마토와 TRM1-10 전 처리한 토마토의 *R. solanacearum* SL341에 의한 병 발생 사진 (B) *R. solanacearum* SL341에 의한 병 발생 그래프

### 3. 메타유전체 정보 분석 기반 선정 미생물의 작물 병저항성 관련 기능 분석

- 근권에서 분리한 토마토 풋마름병에 대한 병저항성 기여 균주 TRM1-10를 이용하여 이전 연구에서 확인된 토마토 풋마름병 저항성 품종 Hawaii 7996과 감수성 품종 Moneymaker 외에 다른 가지과 작물 또는 토마토 품종에 대한 병저항성 기여 효과를 확인하고자 하였음. 정식 후 2주령의 토마토에 TRM1-10를 관주 처리하고, 1주일 뒤 *R. solanacearum* SL341을 처리하여 2주간 풋마름병 발생을 관찰함(그림148). 풋마름병 감수성(그림 148A) 및 병저항성 품종(그림 148B)으로 파악되는 두 가지 품종에 대해 TRM1-10 균주를 처리하였을 때, TRM1-10을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 풋마름병 원인균인 *R. solanacearum* SL341에 대한 저항성 효과가 나타남을 관찰함. 따라서 Hawaii 7996, Moneymaker 토마토 품종 뿐 아니라, 여러 품종들에 대한 TRM1-10 균주의 병저항성 효과를 확인, 기대함.

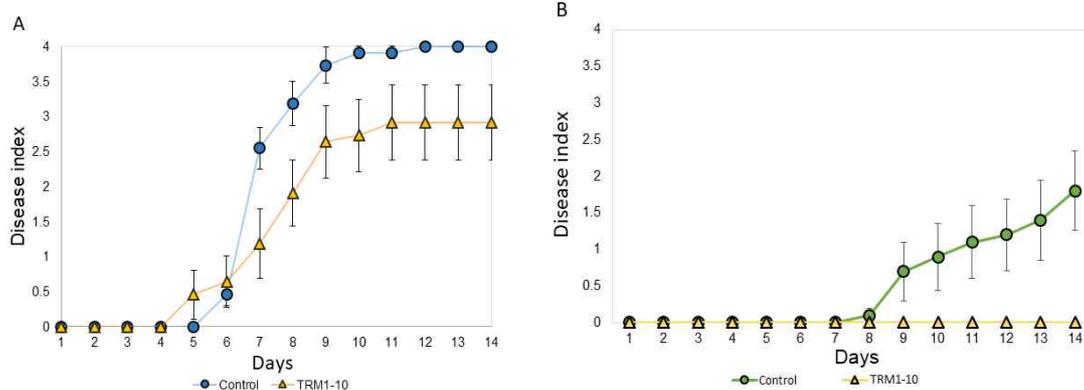


그림 148. 토마토 품종별 TRM1-10의 병저항성 기여 효과(A. 감수성 품종, B. 저항성 품종에 처리 후 풋마름병 관찰 결과)

- 메타유전체 분석 정보로부터 도출된 병저항성 관련 후보 균주 서열 정보 및 culture collection 내 미생물 자원 정보를 비교 분석하여, 병저항성 기능 분석 대상 균주들을 선정함. *Sphingomonadaceae*에 속하는 TRS1과 *Xanthomonadaceae*에 속하는 TRA1 균주를 선별하고 토마토 풋마름병에 대한 기여 효과를 확인하고자 감수성 품종인 Moneymaker에

대해 *in vitro* system과 *in vivo* system에서 풋마름병 저해 여부를 관찰함(그림 149, 150). TRS1은 *in vitro*, *in vivo* system 모두에서 Moneymaker의 풋마름병을 저해하는 것을 확인함(그림 12).

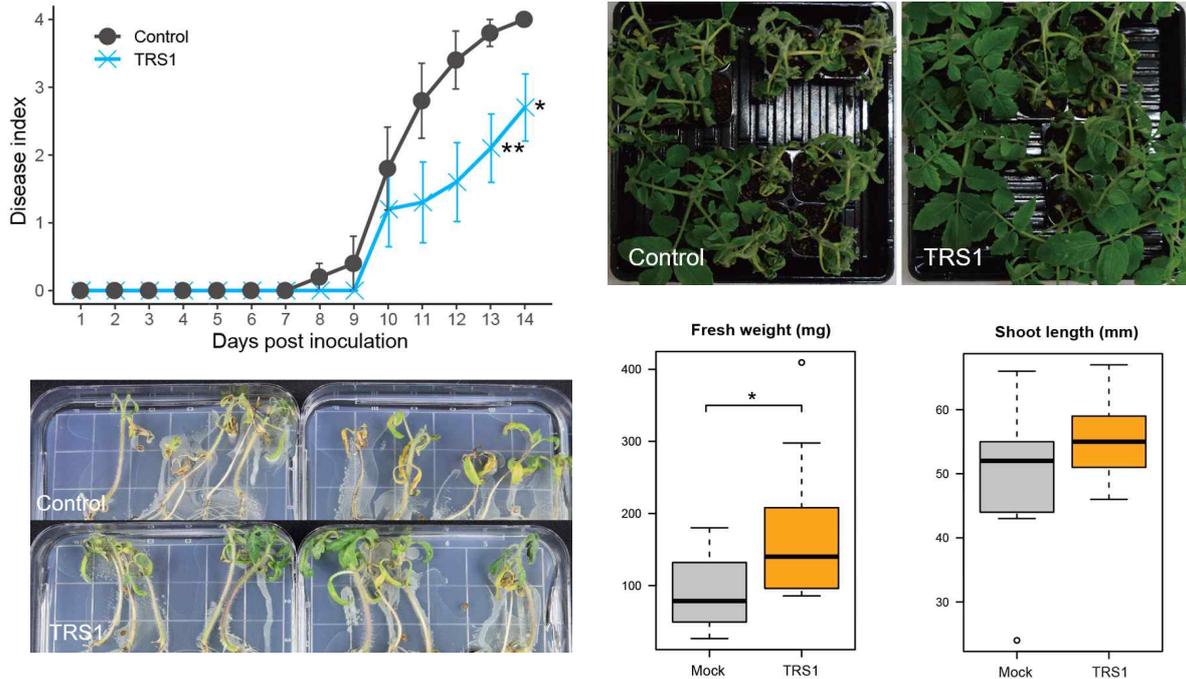


그림 149. 감수성 품종 Moneymaker에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험의 *Spingomonas* sp.의 병저항성 기여 효과성 기여 효과

- TRA1의 경우, 풋마름병 저항성 품종인 Hawaii 7996의 병저항성을 증가시키는 효과를 나타냈지만(그림 150) 감수성 품종인 Moneymaker의 경우, TRA1에 의한 병저항성 증가 효과가 나타나지 않음. TRA1은 Hawaii7996에 대한 기주 특이성을 가진 균주로 추측됨.

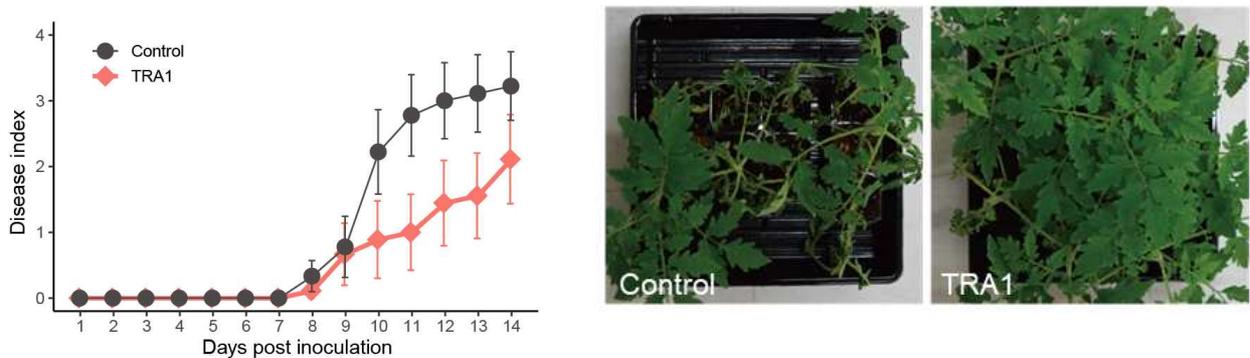


그림 150. Hawaii 7996에서 *Arenimonas* sp. TRA1의 병 저항성 기여 효과 *R. solanacearum* SL341 처리 후 14일 차(사진)

- 토마토 풋마름병 저항성에 기여균주인, TRM1-10, *Spingomonas* sp. TRS1 *Arenimonas* sp. TRA1을 조합하고 풋마름병 감수성 품종인 Moneymaker에 처리하여 병저항성 증가 효과에 더 큰 영향을 미치는지 관찰하고자 함. 이 세 균주와 더불어 이전에 Hawaii 7996 근원에서 분리된 *Flavobacterium daejeonense* RCH33을 포함하여 실험을 진행함. RCH33은 단독으로 처리했을 때 병저항성 증가 효과를 나타낸 적은 없지만 전 메타유전체 조립 및

미생물 군집 분석에서 모두 Hawaii 7996에 abundance가 높았으므로 다른 균주와 공존시 효과 또는 상호작용 가능성을 파악하기 위해 선정하였음.

- TRM1-10단독처리, TRM1-10을 포함한 두 균주 조합(TRM1+TRA1, TRM1+TRS1, TRM1+RCH33) 처리, 네 균주 모두 처리(TRM1-10+TRA1+TRS1+RCH33)후 일주일 뒤에 *R. solanacearum* SL341을 처리하고 풋마름병의 진행을 관찰한 결과 네 균주를 모두 처리한 처리구에서 병저항성 증가 효과가 가장 크게 나타났지만 TRM1-10의 단독 처리와 통계적으로 큰 차이를 나타내지는 않았음(그림 151). 근권에서 분리한 균주들의 병저항성 유도 효과를 증가시키기 위해서는 각 균주의 병저항성을 증가시키는 활성을 가지고 있더라도 병저항성 유도 활성을 증가시키기 위한 다양한 조합의 미생물 군집에 대한 분석, 군집 조합의 조건이 중요할 것으로 생각됨.

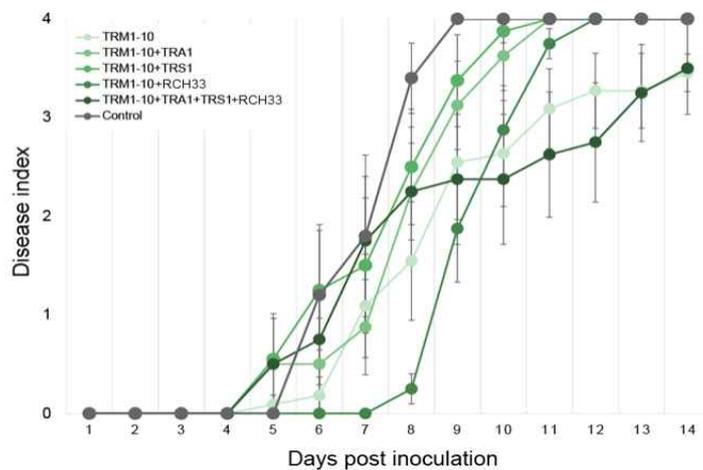


그림 151. 선별 균주 TRM1-10, TRA1, TRS1, RCH33 균주를 조합하여 처리했을 때 시간에 따른 감수성 품종 Moneymaker의 풋마름병증 관찰

#### 4. 병저항성 기여 핵심 미생물의 식물병원성 미생물과의 상호작용 분석

- 풋마름병 원인균 *Ralstonia solanacearum*에 대한 직접적인 기능성 효과를 확인하기 위한 길항력 실험: *in vitro*에서 핵심 분리 균주가 풋마름병원균인 *R. solanacearum* SL341의 생장에 주는 영향을 검증하기 위해 공배양 방법을 이용함. 균주 배양을 위해 CPG(Casein hydrate, Peptone, Glucose), Marine broth와 랄스토니아 선택배지(SMSA media)를 준비한 후, *R. solanacearum* SL341 균주와 분리 균주를 각각 CPG broth와 Marine broth에 접종하여 배양함. 각 배양액을 희석하여, SL341균주는 OD600=0.3으로 조정 한 뒤 1/10, 1/100 희석함. 분리 균주(TRM1-10의 경우, OD<sub>600nm</sub>=0.9)으로 조정 한 뒤, 1/10, 1/100 희석하여 준비하고, SL341 1/10, 1/100 희석액과 분리 균주를 각각 1:1로 혼합하여 1~2일 배양함. 대조군으로는 SL341 희석액에 Marine broth을 동량 혼합하여 배양하고, 시험 분리 균주를 공배양한 *R. solanacearum* SL341을 선택배지에 희석배수 별로 10 $\mu$ l씩 spotting하여 30 $^{\circ}$ C에서 이틀간 배양한 결과, 대조군과 비교함. TRM1-10을 처리한 샘플에서 *R. solanacearum* SL341의 생균수가 감소하였고, 이는 TRM1-10이 *R. solanacearum* SL341 생장 억제와 관련되어 있음을 파악함(그림 152).

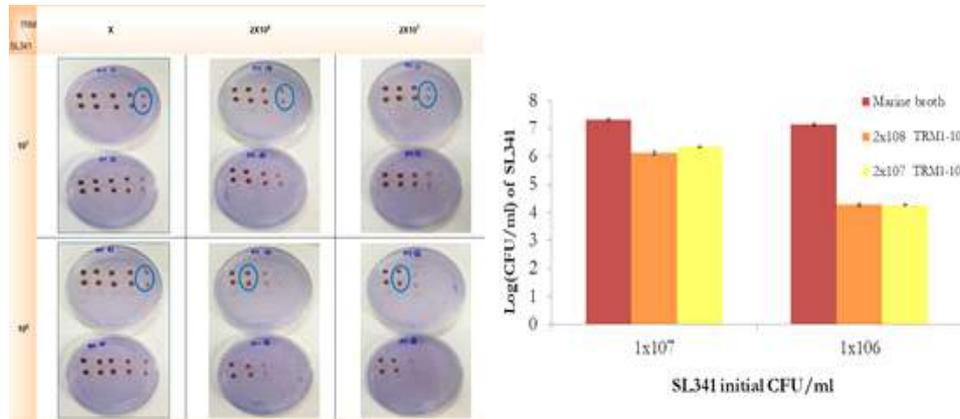


그림 152. 풋마름병 원인균 *Ralstonia solanacearum* SL341에 대한 길항력 효과

- 토마토 풋마름병 병원균과 병저항성 기어 균주의 상호작용 메커니즘 분석을 위한 실험 방법 구축: 이전 연구에서는 CPG medium에서 접종한 *R. solanacearum* SL341과 Marine broth에 접종한 근권 분리균주 TRM1-10을 직접 혼합하여 TRM1-10에 의한 *R. solanacearum* SL341 성장억제 효과를 확인하였음. 풋마름병 원인균 *R. solanacearum* SL341은 NaCl에 의해 생장에 영향을 받기 때문에, TRM1-10을 배양하는 Marine broth(1.9% NaCl)배지는 SL341의 성장을 저해함. 따라서 공배양 실험을 위해 두 균주 모두 생장이 가능한 배지 조건을 설정하기 위한 실험을 진행함. *R. solanacearum* SL341 배양용 배지인 CPG(Casein hydrate, Peptone, Glucose)와 Marine broth 배지의 성분을 비교하여, 배지 성분을 설정함. NaCl의 경우 0%부터 1%까지의 농도 조건에서 두 균주를 각각 배양하여 24시간 뒤 OD<sub>600nm</sub> 값을 측정하여, 두 균주 모두 자랄 수 있는 0.4% NaCl 농도로 modified CPG(mCPG medium)을 조성함(그림 153).

**mCPG**

Components	g/L
Peptone	10
Casein hydrolate	1
Glucose	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.9
MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.24
CaCl <sub>2</sub>	1.8
KCl	0.55
NaCl	4

pH6.35-6.4 after sterilization

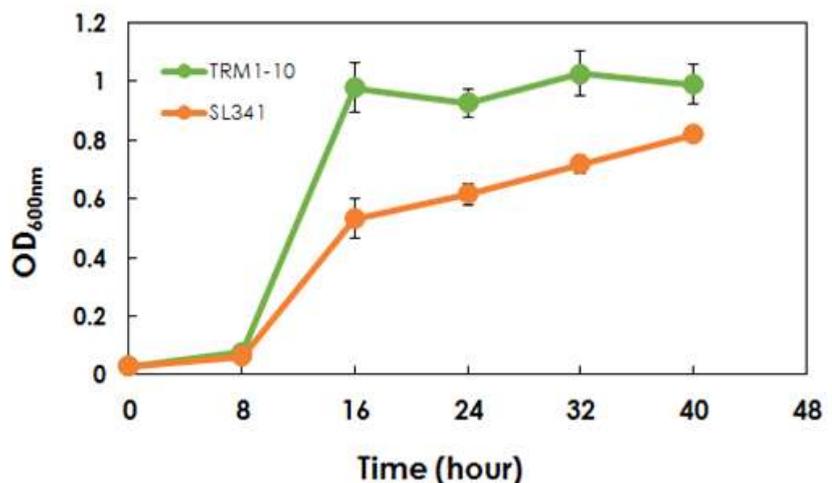


그림 153. 공배양을 위해 시험, 선정된 mCPG 조성 및 공배양시 TRM1-10과 SL341 성장 비교

- 두 균주의 modified CPG (mCPG)에서 성장을 비교하기 위해 8시간 간격으로 균의 흡광도(OD<sub>600nm</sub>)를 측정하여 성장곡선을 알아보는 실험을 진행함(그림 153). 대조군으로 CPG 배지에 접종한 *R. solanacearum* SL341의 성장을 측정하여 mCPG 배지에서 배양한 SL341의 성장곡선과 비교함. NaCl의 영향으로 *R. solanacearum* SL341은 CPG 배지에서

배양한 경우와 비교했을 때, mCPG에서의 생장이 줄어들었음. 하지만, mCPG배지에서 SL341 단독 배양한 경우와 TRM1-10과 공배양한 경우의 생장을 비교하면 공배양 시 SL341의 생장이 크게 감소함을 확인할 수 있음(그림 154).

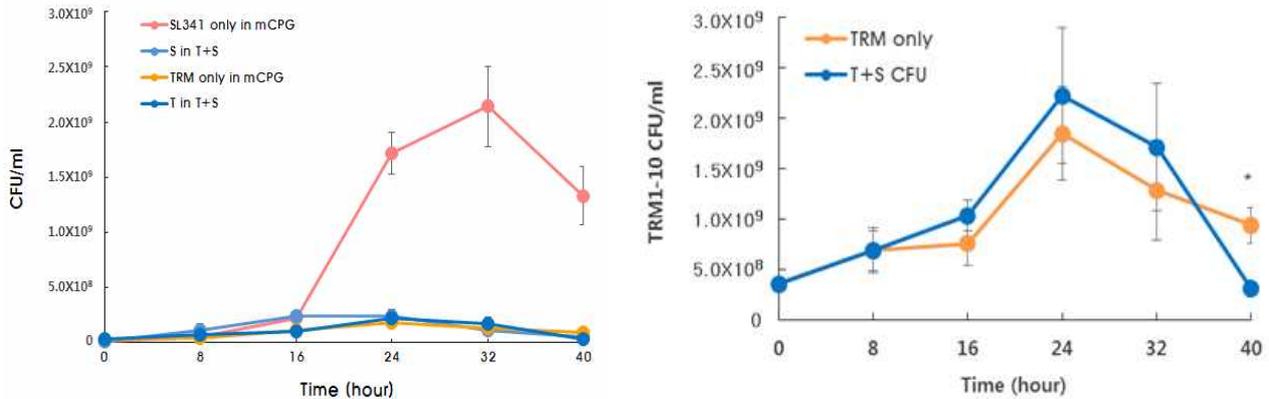


그림 154. mCPG 배지에서 단독배양 및 공배양 조건에서의 SL341과 TRM1-10 성장 비교

- mCPG에서 TRM1-10의 성장곡선은 Marine broth에서의 성장속도와 크게 차이가 없었으며, *R. solanacearum* SL341과의 공배양에 의해 생장에 영향을 받지 않는 것으로 보임(그림 154).
- 풋마름병원균 성장 억제 기능을 갖는 근권 분리균주 TRM1-10이 풋마름병원균과 공배양 시 성장억제를 나타내는 농도차이를 확인하기 위한 실험을 진행함. 미리 배양한 *R. solanacearum* SL341균주는 OD<sub>600nm</sub>=0.3으로 조정 후 1/10, 1/100 희석하고, TRM1-10은 OD<sub>600nm</sub>=0.6으로 조정 후 1/10, 1/100 희석하여 각 *R. solanacearum* SL341 희석액과 1:1로 혼합 후 30°C에서 배양함. 배양 후 24시간 후에 생균수(CFU)를 측정함.

*R. solanacearum* SL341 초기 농도가 5x10<sup>7</sup> 과 5x10<sup>6</sup> CFU/mL인 경우 TRM1-10 접종 농도가 높아짐에 따라 24시간 뒤 생균수가 줄어들음. 반면, TRM1-10은 *R. solanacearum* SL341의 접종 유무에 상관없이 생균수의 차이가 나타나지 않음(그림 155). 이는 TRM1-10이 *R. solanacearum* SL341의 성장 저해에 관여하지만 TRM1-10의 생장은 *R. solanacearum* SL341에 의해 영향받지 않는 것으로 생각됨 (그림 156).

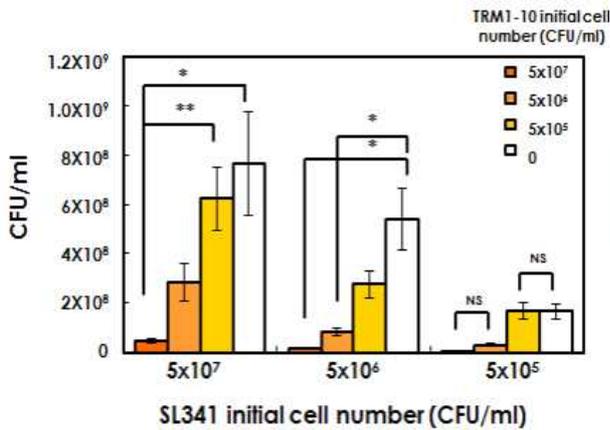


그림 155. 접종 농도에 따른 SL341 CFU 변화

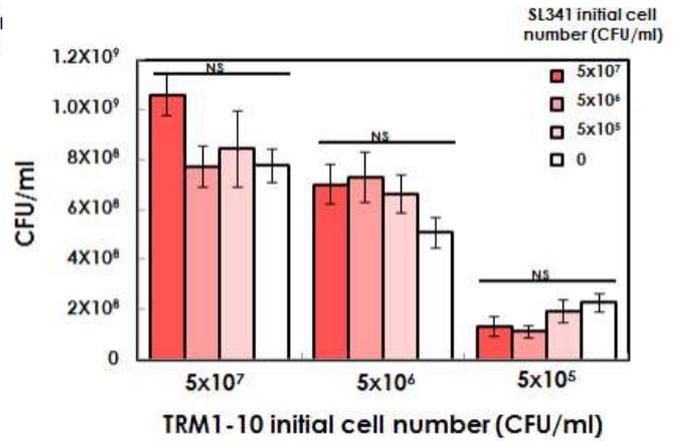


그림 156. 접종 농도에 따른 TRM1-10 CFU 변화

- TRM1-10의 대사물질에 의한 *R. solanacearum* SL341 성장 억제 여부 확인 실험: 공배양 실험을 통해 확인된 TRM1-10의 *R. solanacearum* SL341 성장 억제가 TRM1-10의 대사물질에 의한 것인지 확인하는 실험을 위해, TRM1-10의 배양여액을 시간 별로 샘플링함. 배양여액은 접종 후 8, 16, 24, 32 시간 샘플링 하고 필터로 여과하여 남은 세포를 제거 하였음. *R. solanacearum* SL341을 접종한 고체 배지 위에 세포를 제거한 TRM1-10의 배양 상등액을 떨어뜨리고 30°C에서 48시간 배양한 뒤 *R. solanacearum* SL341의 성장억제 유무를 확인함. 음성 대조군으로는 mCPG 배지, 양성 대조군으로 항생제 kanamycin을 사용하였음. 실험은 3 반복 진행하였고, mCPG와 비교하였을 때 배양 상등액에 의한 SL341 억제 효과는 없는 것으로 보임(그림 157).

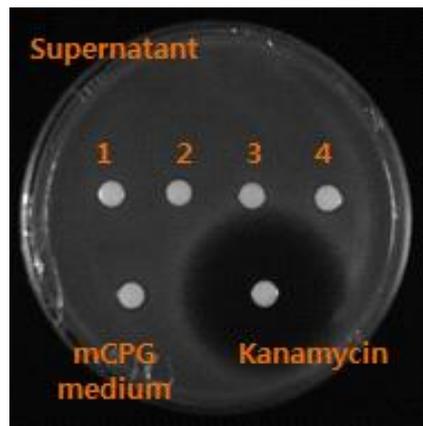


그림 157. Agar diffusion assay

- TRM1-10과의 양분 경쟁에 의한 SL341 성장 억제 여부 확인 실험: TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341 공배양 시 나타나는 *R. solanacearum* SL341의 성장 저해가 TRM1-10과의 양분에 대한 경쟁에서 기인하는지 규명하기 위해, mCPG 배지에서 TRM1-10, *R. solanacearum* SL341의 단독배양과 공배양시에 나타나는 Glucose 농도 변화를 측정하였음. Glucose 초기 농도는 500mg/dL이고, 측정 방법은 발색법을 이용하였음. *R. solanacearum* SL341 단독배양 시 Glucose 소모량은 공배양에서의 소모량보다 높는데 이는 단독배양 시 세포수가 더 많기 때문이라고 생각됨. TRM1-10의 glucose 소모량

은 *R. solanacearum* SL341이 요구하는 glucose의 양보다 많지 않으므로, *R. solanacearum* SL341의 성장억제가 TRM1-10와의 glucose에 대한 경쟁에 의한 것은 아닐 것으로 생각됨(그림 158).

- TRM1-10에 의한 *R. solanacearum* SL341 성장 억제가 다른 양분 경쟁에 의한 것인지 검증하기 위해 같은 조건에서 TRM1-10과 생장이 유사한 다른 토마토 근권 분리균 *Flavobacterium daejeonense* RCH33을 음성대조군으로 사용하여 *R. solanacearum* SL341과 공배양함. 8시간 마다 생균수를 측정 한 결과 TRM1-10과 공배양한 *R. solanacearum* SL341은 단독배양과 비교했을 때 16시간 이후부터 생장이 유의하게 감소함을 보이지만, RCH33과 공배양한 경우는 오히려 생장이 증가함이 확인됨(그림 159). 한편 TRM1-10의 경우 단독배양과 공배양의 생장이 차이가 없거나, 공배양 시 생균수가 증가함을 볼 수 있고, RCH33은 공배양에 의해 생균수가 감소함을 확인할 수 있음(그림 160, 161).

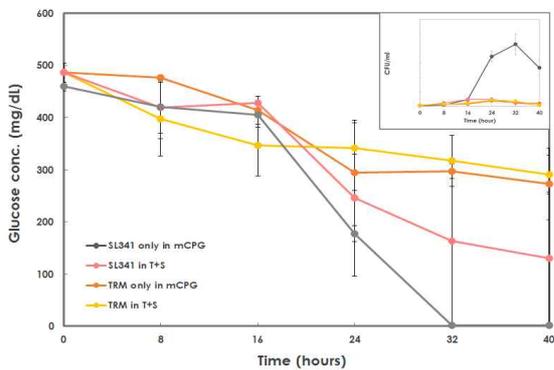


그림 158. 시간에 따른 배지 내 glucose 농도 변화

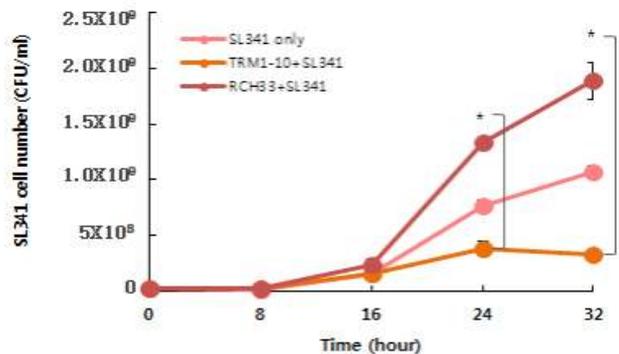


그림 159. 단독배양, 공배양 조건에서 SL341의 성장 비교

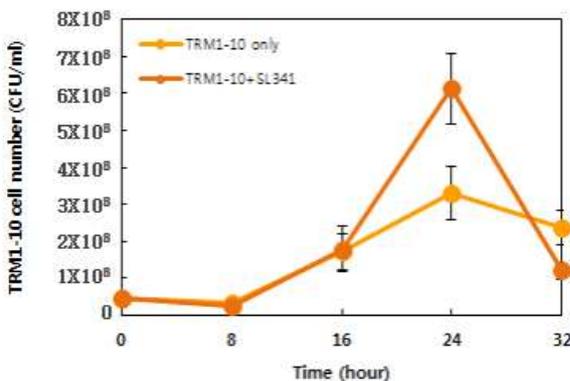


그림 160. mCPG 배지에서 단독배양 및 SL341과 공배양일 때의 TRM1-10 성장 비교

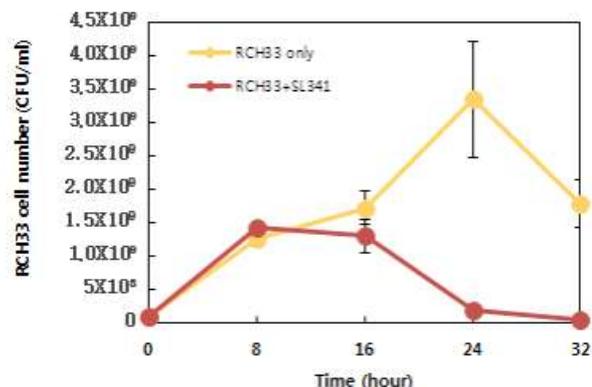


그림 161. mCPG 배지 조건에서 단독배양 및 SL341과의 공배양 조건에서 RCH33 성장 비교

- 병저항성 기여 세균 TRM1-10과 풋마름병 원인균 *R. solanacearum* SL341의 공배양시 전사체 분석 : 토마토 근권에서 분리한 TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341과의 공배양을 통해 TRM1-10의 *R. solanacearum* SL341에 대한 성장저해 활성을 확인하였고, 이때 일어나는 두 균주 간의 분자생물학적 상호작용을 이해하기 위해 공배양 동안 각 균주의 transcriptome 분석을 수행함.

- 기존의 공배양실험시 관찰 했던 생장곡선을 바탕으로 공배양 시작 후 8시간을 transcriptome 분석을 위한 최적 시각으로 결정함. TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341 각각을 배양한 것과 공배양 한 것 모두 transcriptome 변화량 통계분석을 위해 3 반복 실험을 수행함. 분석이 완료된 read를 reference genome에 mapping하기 위해 Bowtie2를 사용하였고 DEG(differentially expressed gene)는 HTSeq software를 통해 분석하였음(그림 162).

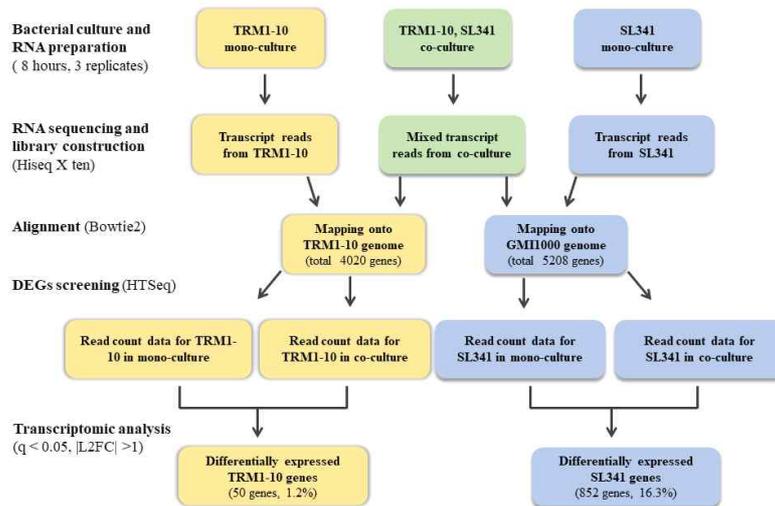


그림 162. TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341 공배양 조건의 transcriptome 분석을 위한 실험 설계

- TRM1-10을 단독배양 했을 때와 *R. solanacearum* SL341과 공배양 했을 때 TRM1-10 유전자 발현 패턴의 차이를 확인 하기 위해 PCA 분석결과 각 처리에서 유전자 발현패턴의 차이가 뚜렷하게 나타남(그림 162). TRM1-10의 경우 *R. solanacearum* SL341과 공배양 했을 때 발현량이 증가하는 유전자가 감소하는 유전자의 수 보다 많으며 TRM1-10의 총 4020개 유전자 중에서 48개의 유전자 발현이 증가했고 2개의 유전자 발현이 감소함(그림 162B, 그림 163).

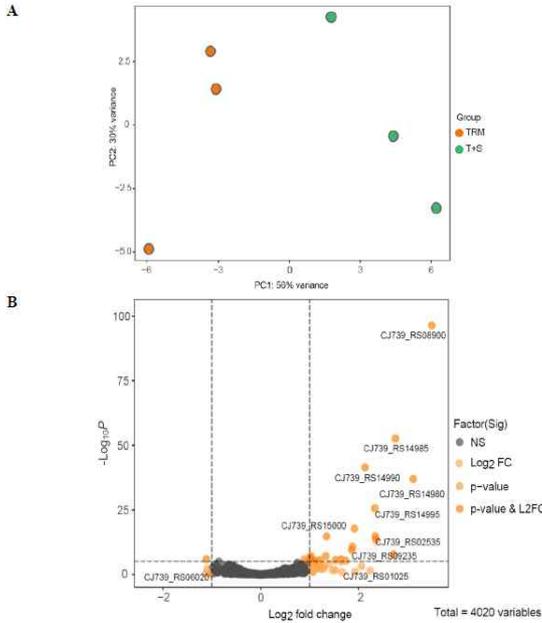


그림 162. TRM1-10 단독배양과 SL341 과의 공배양시 transcriptome 변화(A) 발현량에 차이가 있는 유전자의 PCA plot(B) 발현 레벨의 변화가 큰 유전자들의 volcano plot

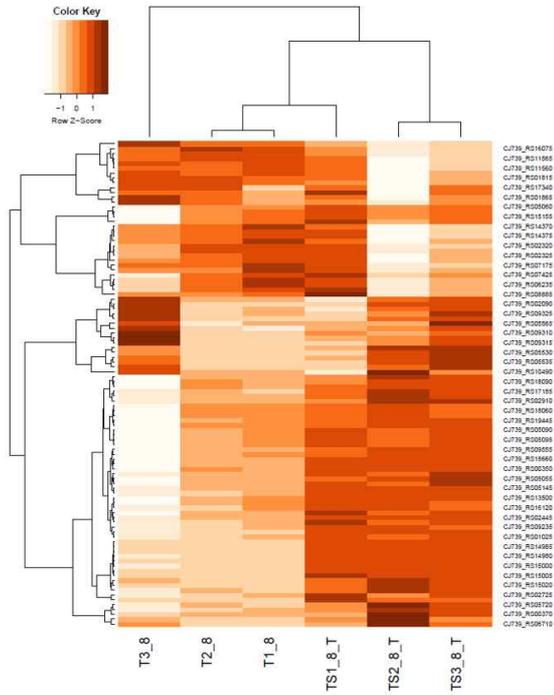


그림 163. SL341과의 공배양시, 발현량의 차이가 큰 TRM1-10 유전자 heatmap. T\_8: TRM1-10 단독배양, TS\_8\_T: 공배양

- TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341 공배양시 발현량이 증가한 유전자는 기능적으로 13 개의 그룹으로 구분 가능하며, 이는 에너지 생산 및 전환, 아미노산이나 탄수화물 또는 무기이온 material metabolism 및 transport, translation, post-translation modification 및 chaperon기능, 세포벽, 세포막 등의 biogenesis와 이차구조형성, signal transduction, intracellular trafficking 및 분비과정을 포함함(그림 164).
- 발현량이 증가한 유전자를 COG 카테고리로 나눌 경우, 대부분의 유전자가 아미노산이나 탄수화물 또는 무기이온의 material metabolism 및 transport 기능과 관계있는 그룹에 속했으며 두 번째로 많은 유전자가 속한 그룹은 chaperon system으로 나타남. 발현량이 가장 많이 감소한 유전자는 aspartokinase family에 속하는 것과 bacterial ribosomal protein bS21 family에 속하는 유전자들로 나타남.

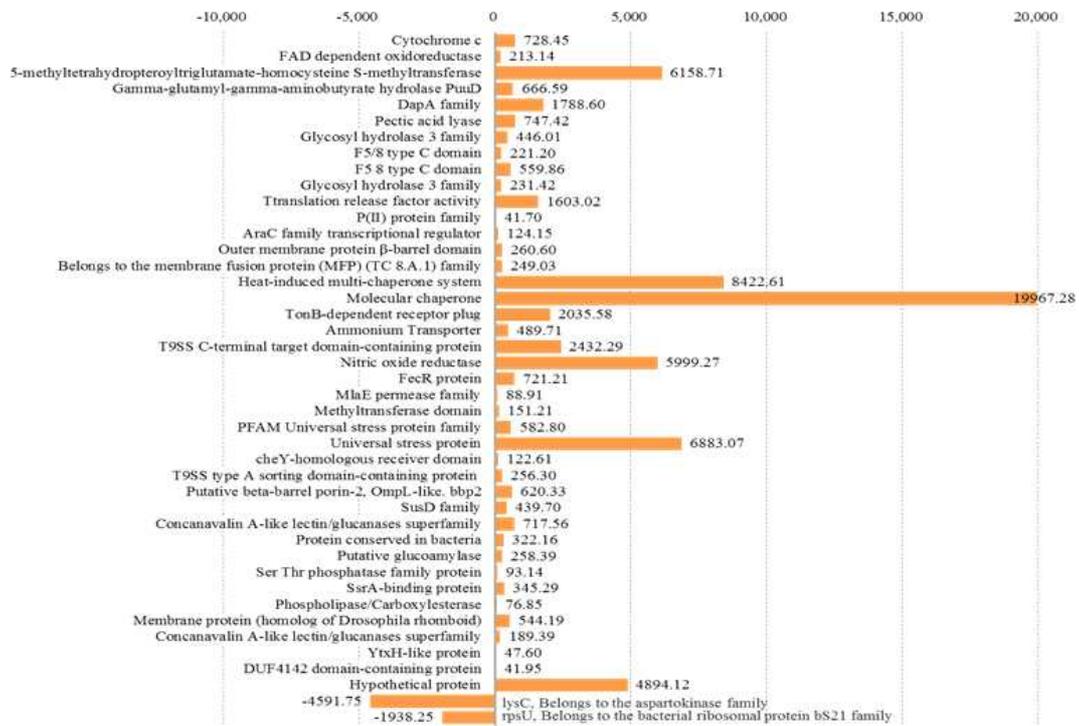


그림 164. TRM1-10과 SL341 공배양 시에 발현량이 변화한 TRM1-10 유전자들의 기능에 따른 분류

- TRM1-10과 공배양한 *R. solanacearum* SL341의 경우에도 PCA분석 결과 단독배양 했을 때와 완전히 구분되는 유전자의 발현 양상을 보이는 것으로 나타남 (그림 165A). *R. solanacearum* SL341의 전체 5208개의 유전자 중에서 TRM1-10과의 공배양에 의해 244개의 유전자가 발현량이 증가하였고 608개의 유전자의 발현이 감소함(그림 165B, 그림 166).

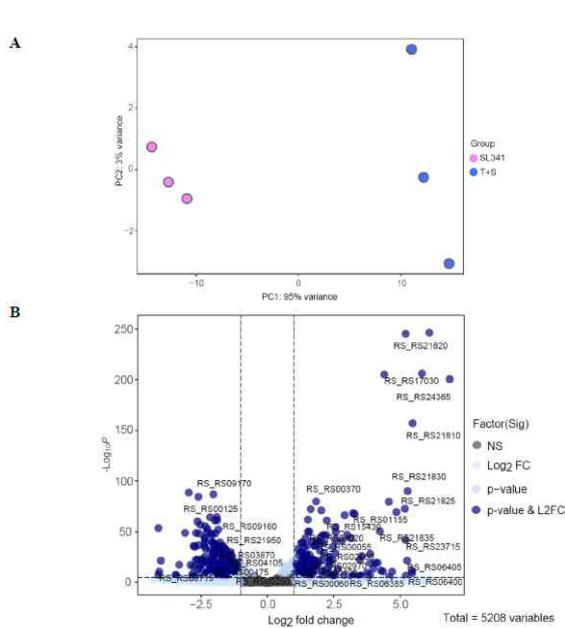


그림 165. TRM1-10과의 공배양시 SL341 transcriptome 변화(A) 발현량에 차이가 있는 유전자의 PCA plot(B) 발현 레벨의 변화가 큰 유전자들의 volcano plot

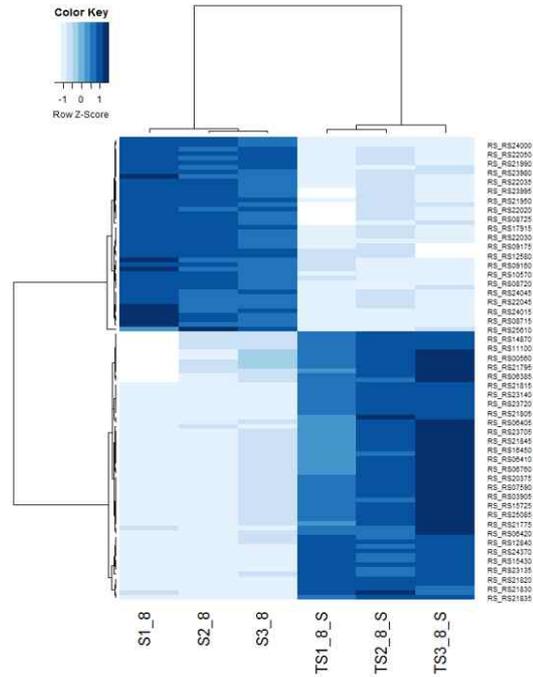


그림 166. TRM1-10과의 공배양시 발현량의 차이가 큰 SL341 유전자 heatmap. T\_8: TRM1-10 단독배양, TS\_8\_T: 공배양

- COG database를 바탕으로 공배양에 의해 변화한 *R. solanacearum* SL341 유전자군을 기능에 따라 구분한 결과 발현량이 가장 많이 증가한 유전자군은 에너지 생산과 전환에 관여하는 것으로 나타났으며 두 번째로 증가폭이 높은 유전자군은 transport와 아미노산 및 무기이온 metabolism에 관여하는 것으로 나타남 (그림 167).

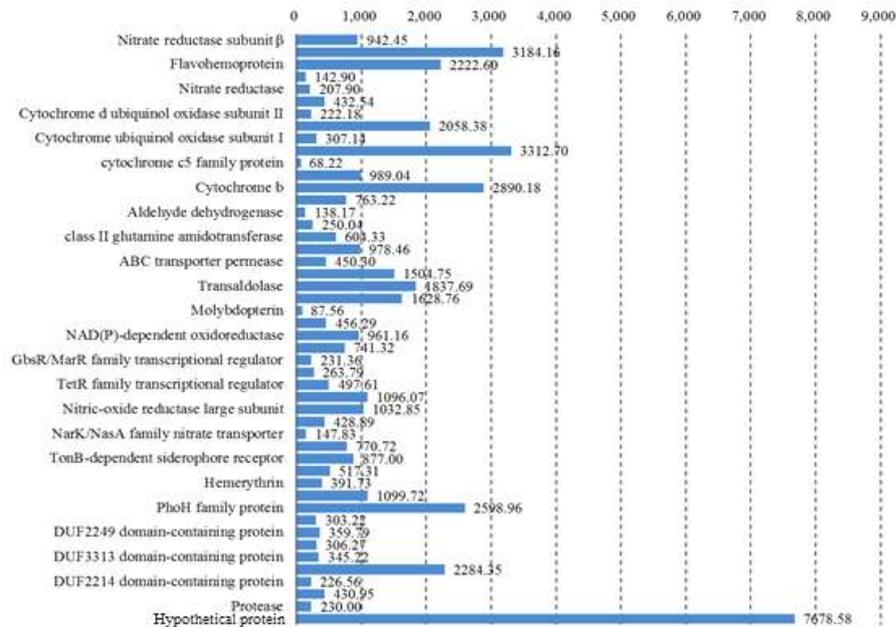


그림 167. TRM1-10과 SL341 공배양시에 발현량이 증가한 SL341 유전자들의 기능에 따른 분류

- TRM1-10과의 공배양에 따라 발현량이 감소한 *R. solanacearum* SL341의 유전자군을 기

능에 따라 분류한 결과 세포의 성장과 발달과 관계된 carbohydrate, 아미노산 및 inorganic transport 와 metabolism 그리고 cell structure biogenesis에 관여하는 유전자들이 포함되어 있음(그림 168).

- TRM1-10과의 공배양시에 발현량이 감소한 *R. solanacearum* SL341 유전자 중에는 glycosyl hydrolase ( $\beta$ -cellobiosidase)와 Hep hang repeat protein 및 EPS I polysaccharide export inner membrane protein 등의 유전자들이 포함되어 있는데 이들의 경우 식물의 세포벽을 분해하는 virulence factor로 알려져 있음.

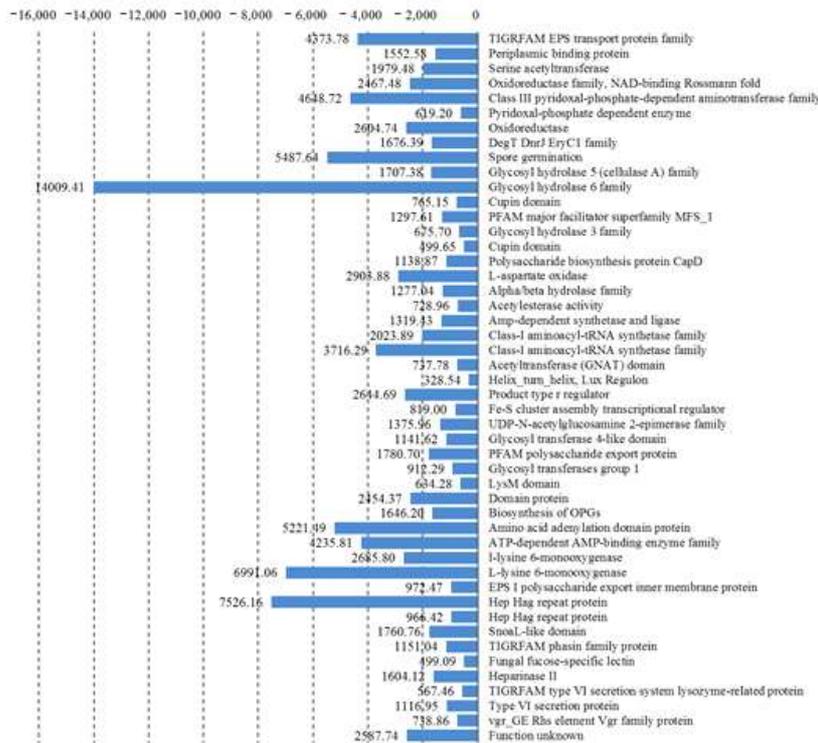


그림 168. TRM1-10과 SL341 공배양시에 발현량이 감소한 SL341 유전자들의 기능에 따른 분류

## 5. 병저항성 기여 핵심 미생물의 병원성 미생물 및 기주와의 상호작용 분석

- 병저항성 기여균주 TRM1-10 존재 여부에 따른 기주 작물 토마토의 풋마름병원균에 대한 상호작용을 이해하고자 함. 기주작물인 토마토(Moneymaker)의 TRM1-10 처리에 따라 풋마름병원균에 대한 반응을 이해하기 위해 전사체 분석을 수행함.
- 토마토의 근권에 TRM1-10을  $10^8$  CFU/mL 농도로 단독처리,  $10^8$  CFU/mL 농도의 TRM1-10과  $10^7$  CFU/mL 농도의 *R. solanacearum* SL341 혼합처리 하거나  $10^7$  CFU/mL 농도의 *R. solanacearum* SL341 단독처리 후 8시간 뒤에 토마토 뿌리의 total RNA를 분리함.
- 토마토 근권의 전사체는 TRM1-10 단독처리군에 대해 TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341의 혼합처리군 또는 *R. solanacearum* SL341 단독처리군에서의 발현량을 비교함.
- 전사체 분석 결과 TRM1-10 단독처리와 비교했을 때, *R. solanacearum* SL341과의 혼합처리군의 경우, 총 1130개의 전사체가 발현량이 증가 또는 감소하는 변화를 나타냈고 그 중에서 발현량의 변화가 통계적으로 의미있고 매우큰 유전자군을 그림 33에 붉은 원(증

가), 푸른 원(감소)으로 표시함(TRM1 vs SL341). 한편 풋마름병원균 단독처리군의 경우, TRM1-10 단독처리군과 비교할 때 약 4000여개의 전사체 발현변화를 보였으며 이 중에서 변화량이 큰 유전자군을 그림 169에 붉은 원(증가)과 푸른 원(감소)으로 표시함(TRM1 vs T+S).

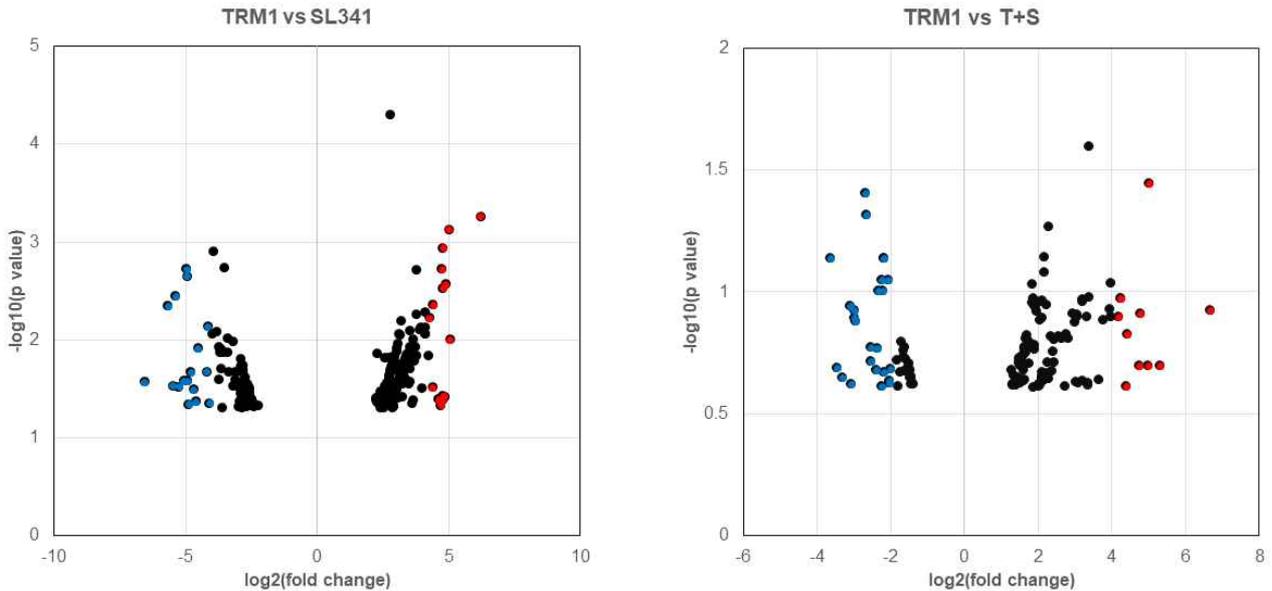


그림 169. 병저항성 기여균주 TRM1-10의 존재여부에 따른 토마토뿌리의 풋마름병원균 *R. solanacearum* SL341대한 전사체 수준에서의 반응

- 기주 식물인 토마토뿌리에서 TRM1-10 존재여부에 따라 *R. solanacearum* SL341에 대한 전사체의 변화를 분석한 결과 발현량의 변화가 큰 각 유전자를 표19-22에 나타냄.

표 19. TRM1-10 단독처리에 대해 TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341 혼합처리구에서 발현량이 증가한 유전자군

Gene ID	Gene description	log2(fold change)
LOC101261260	lignin-forming anionic peroxidase	6.6724187
LOC101263073	gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	5.3290826
CEVI-1	peroxidase precursor	5.0177726
LOC101257400	non-specific lipid-transfer protein 1	4.9813018
LOC101251962	GDSL esterase/lipase APG	4.797339
LOC109119806	dehydration-responsive element-binding protein 1A	4.7616064
LOC101265877	AT-hook motif nuclear-localized protein 10	4.427227
LOC101244080	uncharacterized protein	4.3969985
LOC101247557	proteinase inhibitor I precursor	4.2640823
LOC101265388	citrate-binding protein-like	4.2467664
LOC101244580	protein RADIALIS-like 6	4.196321

표 20. TRM1-10 단독처리에 대해 TRM1-10과 SL341 혼합처리구에서 발현량이 감소한 유전자군

Gene ID	Gene description	log2(fold change)
LOC101246495	pyruvate decarboxylase	-2.001203
LOC112940385	N/A	-2.024129
LOC101253070	N/A	-2.034139
LOC101264714	WAT1-related protein At2g39510	-2.049331
aco5	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	-2.168169
LOC101263025	uncharacterized protein	-2.171538
LOC101259235	glutamate decarboxylase 4	-2.174102
LOC101252543	uncharacterized protein	-2.213987
LOC104649665	N/A	-2.220609

LOC101263488	early nodulin-93-like	-2.222173
PR1b1	pathogenesis-related leaf protein 6 precursor	-2.317228
LOC101253603	uncharacterized protein	-2.343775
LE25	protein LE25	-2.375669
LOC101252752	uncharacterized protein	-2.525981
LOC101260814	patatin-like protein 2	-2.530766
LOC101262767	thiosulfate sulfurtransferase 18 isoform X2	-2.651909
LOC104648595	N/A	-2.6647
LOC101254595	organic cation/carnitine transporter 3	-2.932072
LOC101257623	galactinol--sucrose galactosyltransferase	-2.963897
LOC100750252	late embryogenesis abundant protein	-2.985397
LOC101246794	DNA ligase 1-like	-3.049178
LOC101253915	uncharacterized protein	-3.085726
LOC101261997	kunitz-type serine protease inhibitor DrTI-like	-3.298211
LOC101268052	desiccation-related protein clone PCC6-19	-3.44086
LOC101250228	miraculin-like	-3.616146

표 21. TRM1-10 단독처리에 대해 SL341 단독처리구에서 발현량이 증가한 유전자군

Gene ID	Gene description	log2(fold change)
LOC101258345	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23	6.2404412
LOC101248706	boron transporter 1 isoform X1	5.0689448
LOC101258632	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23	5.0332311
PDH	proline dehydrogenase	4.9149918
CEVI-1	peroxidase precursor	4.8670996
LOC101264123	amino acid transporter AVT6C	4.8121125
LOC101258926	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23	4.8110622
LOC101267799	sulfate transporter 2.1-like	4.7967512
LOC104649482	receptor-like protein kinase THESEUS 1	4.7783744
EXPB2	beta expansin precursor	4.7593507
LOC101252337	protein EXORDIUM-like 5	4.7173676
LOC101248254	protein GAST1 precursor	4.6462025
ERF3-like	ethylene response factor H.1	4.4315262
LOC101247596	cellulose synthase-like protein D3	4.4026165
SRG1	salt responsive protein 1	4.2873044
LOC101254950	proline-rich protein 4-like isoform X1	4.2512101
XTH3	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3 precursor	4.146846
aos	allene oxide synthase	4.1285739

표 22. TRM1-10 단독처리에 대해 SL341 단독처리구에서 발현량이 감소한 유전자군

Gene ID	Gene description	log2(fold change)
LOC101249975	peroxidase 10	-4.090563
ER1	ethylene-responsive proteinase inhibitor 1 precursor	-4.148841
NP24	protein NP24 precursor	-4.188436
LOC101266770	endochitinase 3-like	-4.529408
LOC101250202	probable E3 ubiquitin-protein ligase RNF217	-4.60443
ODD	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	-4.697056
LOC104647703	uncharacterized protein LOC104647703	-4.79807
ETR6	ethylene receptor ETR6 precursor	-4.88067
LOC543878	PR5-like protein precursor	-4.918295
LOC101255341	uncharacterized protein LOC101255341	-4.929489
aco5	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	-4.952651
PR-1a1	pathogenesis-related protein 1A1 precursor	-5.056152
LOC101245896	cytochrome P450 CYP72A219	-5.249787
ACO4	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 4	-5.377963
LOC109119847	proteinase inhibitor type-2-like	-5.480851
LOC100191111	PR1 protein precursor	-5.672415
LOC101246667	protein ZINC INDUCED FACILITATOR-LIKE 1-like	-6.550911

- 풋마름병 감수성 기주인 토마토 Moneymaker의 뿌리에서는 TRM1-10 단독처리군과 비교했을 때 TRM1-10, *R. solanacearum* SL341 혼합 처리에서 *R. solanacearum* SL341 단독 처리군에 비해 더 많은 수의 유전자 발현에 변화가 나타났으며 식물의 병저항성 관련 유전자 또는 스트레스 관련 유전자의 발현이 눈에 띄지 않는 반면, *R. solanacearum* SL341 단독 처리군의 경우에는 식물 병저항성 관련 유전자의 발현이 감소하고 2차 대사산물 합성경로에 관여하는 유전자의 발현이 증가한 것을 관찰함.
- TRM1-10, *R. solanacearum* SL341 혼합 처리구에서 발현량이 최대로 증가한 lignin-forming anionic peroxidase의 경우 lignin생합성 과정에 작용하며 salt stress 조건에서 발현이 유도되는 것이 보고된 바 있음(Quiroga *et al.*, 2000). 토마토 이외의 작물인 담배에서는 병원균의 MAMP에 의해 발현이 유도되어 식물의 방어기작에 역할을 하는 것이 알려져 있음(E. SZABÓ *et al.*, 2012).
- *in vitro* 연구에서 TRM1-10과 *R. solanacearum* SL341 공배양시 TRM1-10에 의해 *R. solanacearum* SL341의 glycosyl hydrolase( $\beta$ -cellobiosidase)와 Hep hang repeat protein, EPS I polysaccharide export inner membrane protein 등의 유전자를 포함한 식물 세포벽 분해에 관여하는 유전자 발현이 감소한 것을 관찰한 바 있음. 따라서 TRM1-10은 직접적으로 *R. solanacearum* SL341의 식물에 대한 virulence를 감소하는 역할을 할 것으로 추측할 수 있음. 감수성 기주식물이 존재하는 *in vivo* 환경에서 TRM1-10은 직접적으로 *R. solanacearum* SL341의 활성을 저해하는 것과 더불어 식물의 유전자 발현에 영향을 주어 *R. solanacearum* SL341에 대한 저항성을 나타나게 할 수 있을 것으로 생각됨. 다만 이에 관여하는 정확한 요소는 동일한 환경(*in vivo*)에서의 meta-transcriptome 변화 분석과 식물의 전사체 분석을 함께 연구하는 것을 통해 구체화할 수 있음.

#### ○ 메타유전체 해독 염기서열을 이용한 향토 발효음식의 마이크로바이옴 분석

- 메타유전체 분석 대상 향토 발효음식 선정: 지역의 특산품으로 유명한 음식 중, 발효 과정을 통해 생산되는 음식들을 조사한 결과, 생산 공정이 현대화되어 발효과정이 축소되었거나 발효과정을 거의 거치지 않게 된 식품들이 많았음. 향토 식품과 관련된 부서에서 일하는 관계자를 통해 전통방식으로 생산되는 음식을 찾음. 그 결과 조기 젓갈이 가장 찾는 기준에 부합하는 식품으로 판단되어 선정하였고, 2016년에 숙성 시작한 조기 젓갈을 확보함.
- 표본으로부터 메타유전체 추출 방법 최적화: 수집한 표본으로부터 메타유전체 추출시 고품질 표본의 특성상 시료 균일화를 위해 블렌더를 이용하여 분쇄함. 메타유전체 농도를 높이기 위해 추출 키트 또는 방법을 변경하고 반복 실험을 통해 추출한 메타유전체를 농축하여 미생물 군집 해독 및 분석을 진행함.
- 미생물학적 분석을 위해 2달 된 조기젓과 2년 된 조기젓에서 300ml의 액체 샘플을 직접 추출하였음. 2달 된 조기젓의 염도와 pH는 각각 2.5%와 5.7이었으며 2년 된 조기젓의 염도와 pH는 각각 28.8%와 6.6로 확인됨. 메타유전체 분석 결과, 2년 된 조기젓 359 OTUs가 있었으며 분류학적으로 2가지의 문 *Proteobacteria*(57.9%)와 *Firmicutes*(41.9%)가 OTUs의 99%이상을 차지하였음(그림 170). 전체에서 상대 존재비가 1% 이하였던 추가적

인 5가지의 문은 *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Rhodothermaeota*, *Acidobacteria*으로 확인됨. *Proteobacteria*는 대부분 *Gammaproteobacteria* (57.8%) 강으로 이루어져 있고 목, 과, 그리고 속 수준 *Oceanospirillales*(55.7%), *Halomonadaceae*(55.7%), *Halomonas*(55.5%)이었음. *Firmicutes*는 두 강 *Bacilli*(37.6%)와 *Clostridia*(4.3%)로 나뉘었음. 각 강 또한 대부분 동일한 목, 과, 그리고 속 수준 *Lactobacillales*(37.6%), *Enterococcaceae*(37.4%), *Tetragenococcus*(37.4%), *Halanaerobiales* (4.3%), *Halanaerobiaceae*(4.3%), *Halanaerobium*(4.2%)이었음. 2달 된 조기젓에서는 572 OTUs가 확인됨. 박테리아 군집의 분류학적 조사 결과 2달 된 조기젓은 4가지의 문 *Proteobacteria*(86.3%), *Firmicutes*(8.1%), *Bacteroidetes*(2.6%), *Actinobacteria*(2.1%)으로 이루어져 있었음. 전체 박테리아 군집에서 1% 이하를 차지하였던 문은 *Planctomycetes*, *Parcubacteria\_OD1*, *Rhodothermaeota*, *Acidobacteria*, *Saccharibacteria\_TM7*, *Cyanobacteria*로 확인됨. 2달 된 조기젓의 높은 박테리아의 다양성은 그림 6에 나타남. 또한, 2달 된 조기젓 샘플에 존재하는 종의 다양성을 측정하는 Shannon index는 3.153으로 2년 된 조기젓의 값(1.386)보다 두 배 이상 높았으며 이는 2달 된 조기젓의 종 다양성이 2년 된 조기젓의 종 다양성보다 높다는 것을 확인하는 것임.

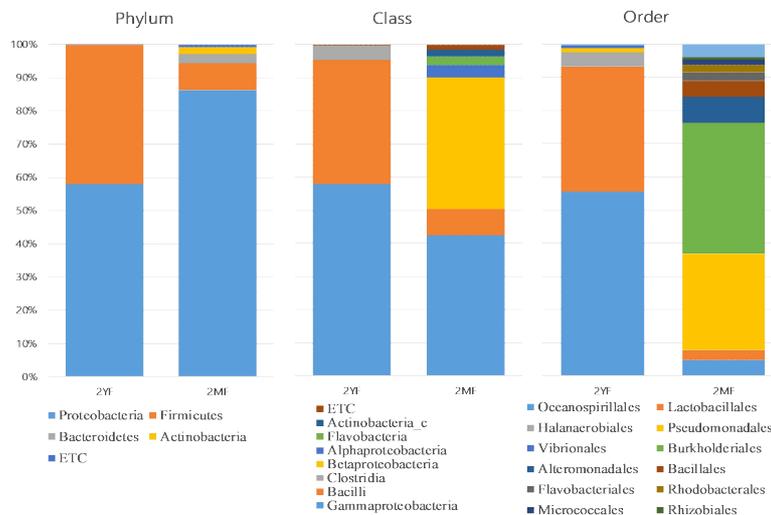


그림 170. 2YF, 2MF 조기젓의 군집 비교

- *Proteobacteria*가 2년 동안 거의 절반으로 줄어들 동안 *Firmicutes*는 5배가 증가하였음. 또한, 2년 된 샘플에서 *Acteroidetes*와 *Actinobacteria* 개체군 크기가 각각 0.14%, 0.02%로 줄었음. 발효과정에서 박테리아 군집이 *Proteobacteria*에서 흔히 젓갈의 속성에 영향을 미친다고 여겨지는 *Firmicutes*로 이동했을 것으로 추측됨. 실험 결과가 이러한 추측을 불러일으켰기에, 우리는 종의 수준에서 젓갈의 속성에 영향을 미치는 박테리아를 조사하였음. *Proteobacteria*와 *Firmicutes*의 종 수준에서의 비교는 우점종이 완전히 다르다는 것을 보여줌(표 23).

표 23. 2MF, 2YF 조기젖에서 Proteobacteria와 Firmicutes의 우점종 비교

Phylum	Class	Order	Genus	
2MF	Proteobacteria (86.3)	Pseudomonadales (29.0)	<i>Psychrobacter</i> (27.9)	
		Alteromonadales (7.9)	<i>Pseudoalteromonas</i> (6.0)	
		Oceanospirillales (4.7)	<i>Chromohalobacter</i> (4.3)	
	Firmicutes (8.1)	Betaproteobacteria (39.7)	Burkholderiales (39.6)	<i>Ralstonia</i> (37.9)
		Bacilli (7.8)	Bacillales (4.7)	<i>Alkalibacillus</i> (4.0)
			Lactobacillales (3.1)	<i>Lactobacillus</i> (1.1)
	<i>Streptococcus</i> (0.9)			
		<i>Carnobacterium</i> (0.8)		
2YF	Proteobacteria (57.9)	Gammaproteobacteria (57.8)	Oceanospirillales (55.7)	<i>Halomonas</i> (55.5)
	Firmicutes (41.9)	Bacilli (37.7)	Lactobacillales (37.7)	<i>Tetragenococcus</i> (37.4)
		Clostridia (4.3)	Halanaerobiales (4.3)	<i>Halanaerobium</i> (4.2)

\*Numbers in parentheses indicate percentage of each taxon at the corresponding taxonomic rank.

- 3가지의 종 *Halomonas*, *Tetragenococcus*, *Halanaerobium*은 2년 된 조기젖 샘플의 *Protobacteria*에서 97.1%를 차지함. 특히, 이 3가지의 종은 2달 된 샘플에서 *Halomonas*가 0.27%로 무시해도 될 정도의 비율이었으며, *Tetragenococcus*와 *Halanaerobium*는 발견할 수 없었음.
- 조기젖에 있는 박테리아는 생선 자체, 첨가한 소금, 바닷물, 또는 제조자에게서 왔을 수 있음. 박테리아의 초기 다양한 군집은 삼투압의 증가와 수분 활동의 감소에 영향을 받았으며, 이 조건은 조기젖에서 대량 서식하며 존속할 수 있는 종에 대한 여과 효과를 발휘할 것임. 젖갈의 발효과정에서 나타나는 이러한 여과 효과에 대한 보다 포괄적인 이해를 얻기 위해 2개의 다른 향토의 발효 젖갈인 2년 발효된 잡젖 및 갈치젖이 미생물 분류학적 분석을 위해 선택됨.
- 조기젖에서 사용된 방법과 동일한 방법으로 총 393, 490 OTUs가 잡젖과 갈치젖에서 확인됨. 또한, 조기젖에서 발견된 드문 문(*Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Fusobacteria* 및 *Rhodothermaeota*)과 함께 이상구균-서열군류를 가지고 있는 잡젖은 주목할 만함. 한편 갈치젖은 *Proteobacteria*(4.9%; 그림 171)가 적은 비율로 있었으며 *Firmicutes*(93.1%)이 압도적으로 지배적이었음. 표 24에 요약된 바와 같이, 이들 두 젖갈의 우세한 문과 강은 조성비가 다르더라도 조기젖과 거의 동일한 것으로 밝혀짐. 그러나 샘플들 사이의 다양성은 목의 수준에서 존재하였고, 각각의 우세한 목은 속 수준에서도 단일한 박테리아들에 의해 주로 점유되었음. 지배적인 속은 *Halomonas*, *Tetragenococcus*, *Halanaerobium*, *Pseudomonas*, *Massilia* 및 *Lentibacillus*였음. 이 속 수준의 이질성은 젖갈 안의 다양한 박테리아 패턴이 있음을 시사함.

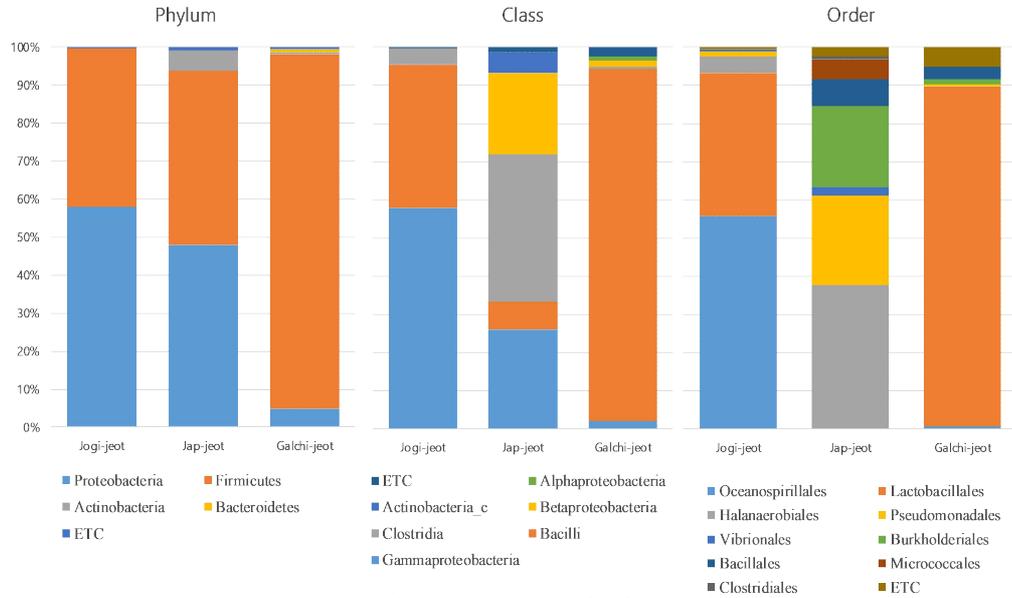


그림 171. 세 종류의 젓갈에서 세균 군집 비교

표 24. 잡젓, 갈치젓에서 *Proteobacteria*와 *Firmicutes*의 비교

	Phylum	Class – Order – Family – Genus			
		Gammaproteobacteria – Pseudomonadales – Pseudomonadaceae – <i>Pseudomonas</i> (26.1) (23.6) (23.4) (23.4)			
Jap-jeot pH 5.4 Salinity 36%	Proteobacteria (47.9)	Betaproteobacteria – Burkholderiales – Oxalobacteraceae – <i>Massilia</i> (21.4) (21.4) (21.3) (21.3)			
		Clostridia – Halanaerobiales – Halanaerobiaceae – <i>Halanaerobium</i> (38.5) (37.7) (37.7) (37.6)			
	Firmicutes (45.8)	Bacilli – Bacillales – Bacillaceae – <i>Lentibacillus</i> (7.3) (6.9) (6.9) (6.8)			
Galchi-jeot pH 5.4 Salinity 36%	Firmicutes (93.1)	Bacilli – Lactobacillales – Enterococcaceae – <i>Tetragenococcus</i> (92.2) (89.0) (88.1) (88.0)			

\*Number in parentheses indicate percentage of each taxon at the corresponding taxonomic rank.

- 최근에 젓갈은 지역별 발효 조건 하에서 다양한 해산물로부터 생산되기 때문에 새롭고 유용한 미생물의 풍부한 저장소로 여겨져 왔음. 젓갈의 유익한 속성을 이용하기 위해 자생의 박테리아를 젓갈로부터 분리하고 특성화하기 위한 노력이 이루어짐. 또한 젓갈을 생산하기 위해 적절한 종균 배양을 사용하는 것이 필요함. 이는 제품 일관성과 미생물학적 품질을 향상시킬 뿐만 아니라 발효 시간을 단축시킬 수 있기 때문임. 전통 발효 생선 제품인 젓갈은 날것의 해산물을 품질 저하로부터 보호하는 가장 좋은 보존 방법 중 하나이지만 젓갈의 냄새를 완화시키는 방법을 개발하는 것이 식품 산업적으로 중요함. 이와 관련하여 본 연구에서 관찰된 우점종들 사이의 다양성은 젓갈의 품질 및 기능성 균주 파악을 위한 정보로 제공될 수 있음.

○ 메타유전체 정보 기반 향토 발효음식 유래 미생물 자원 발굴

- 표적 미생물 선정: 전라남도 영광군에서 전통적 방식으로 생산하는 조기 젓갈을 재료로 사용하여 실험을 진행함. 조기 젓갈의 metagenome 분석 결과 호염균이 우세하였으며, 호염성이 없거나 약한 호염성을 띄는 세균은 열세하였음. 하지만 호염성을 적게 띄는 박테리아가 내생 포자를 만들어 생존할 수 있는 가능성이 있기 때문에 확인하고자 함. 이를 위해 2년 동안 숙

성된 조기 젓갈을 100 $\mu$ l씩 Marine Broth Agar에서 배양하였으며 조기 젓갈에서 박테리아 80 species를 임의로 분리하는 데 성공함. 80 species 모두 Family *Bacillaceae*로 분류되었으며 genus level에서 *Bacillus* spp., *Virgibacillus* spp., *Pontibacillus* spp., *Halobacillus* spp., *Oceanobacillus* spp., *Piscibacillus* spp., *Paraliobacillus* spp. 총 7개의 종으로 구분됨(그림 172).

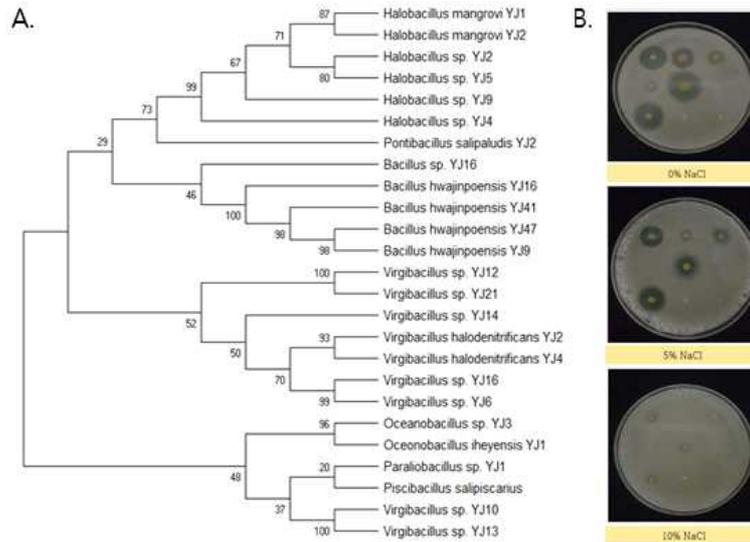


그림 172. (A) 조기 젓갈에서 분리된 세균의 계통학적 분류 및 (B) *Bacillaceae*의 protease activity

- Protease activity를 정량적으로 확인하는 과정에서 *Pontibacillus* sp.의 activity가 추가 염도 5%에서 높은 것을 확인하고 첫 번째 표적 미생물로 선정함(그림 173). 2년 숙성된 조기 젓갈의 metagenome 분석 결과로 높은 비율로 생존하는 *Tetragenococcus* sp.를 두 번째 표적 미생물로 선정함.
- 표적 미생물 분리 및 배양 기술 최적화: *Pontibacillus* sp.의 경우 Marine Broth 배지에서 각각 NaCl농도 추가 0%, 5%, 10%, 15%, 20%에서 배양한 결과 5%의 추가 NaCl 농도에서 가장 큰 cell growth와 protease activity를 보였으며 최적 배양 온도는 30 $^{\circ}$ C, 최적 pH는 6.3였음(그림 173A). *Tetragenococcus* sp.의 경우 MRS 배지에서 NaCl 농도 추가 15%에서 가장 큰 cell growth를 보임(그림 173B).

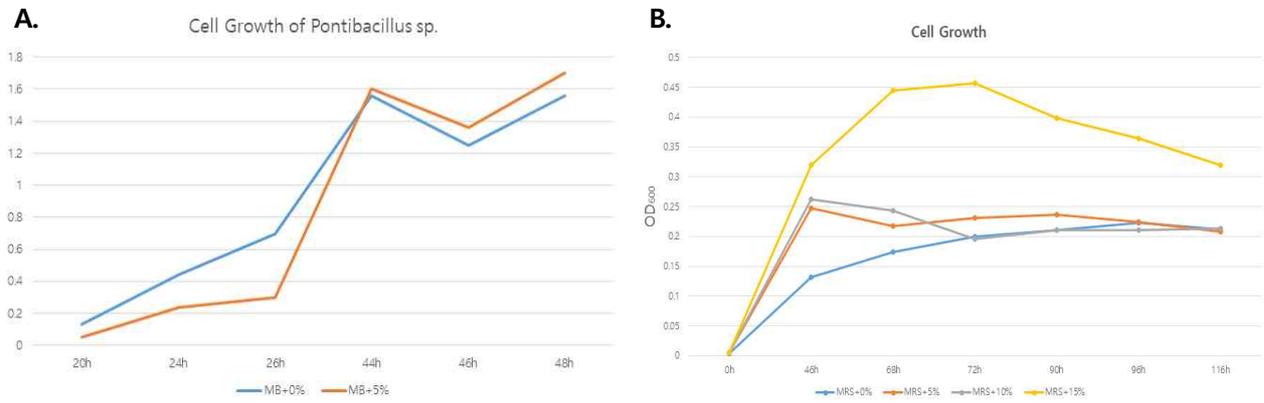


그림 173. *Pontibacillus* sp.(A)와 *Tetragenococcus* sp.(B)의 cell growth

- *Tetragenococcus*의 protease activity의 경우 추가 0% MRS+NaCl, pH 6.5 또는 9.0에서 높은 활성을 보였음(그림 174).

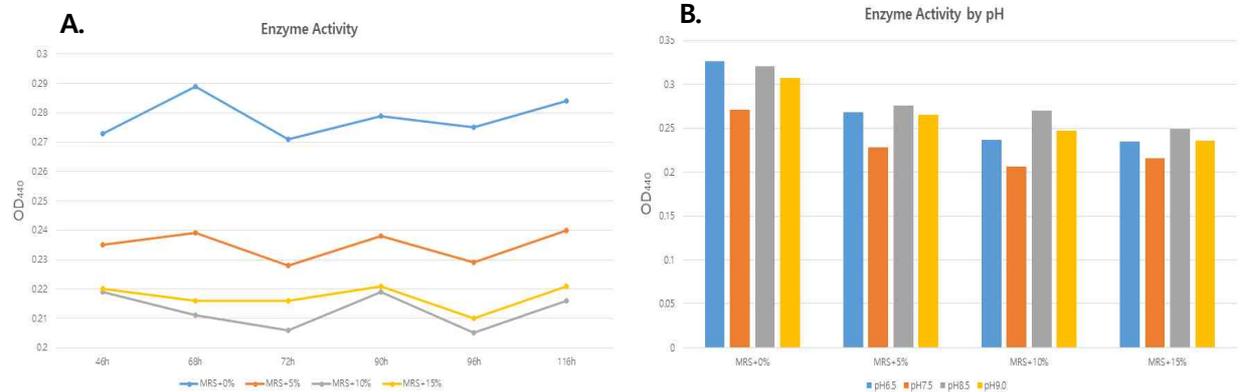


그림 174. *Tetragenococcus* sp.의 enzyme activity 및 pH별 enzyme activity

- 조기젓갈 균집 분석 내 배양 가능한 세균 종의 다양성 분석: 2차년도에 수행한 숙성된 조기 젓갈의 미생물 균집 중 배양가능한 *Bacillus*을 타겟으로 genus 내 다양성을 파악하기 위해 Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE)를 이용한 DNA fingerprinting 실험 조건 확립 및 분석 수행한 결과, *Bacillus* sp.가 약 200kb의 플라스미드를 보유함을 확인하였고(그림 175), *Bacillaceae* family 균주들에서 *Sma*I restriction enzyme을 처리하여 PFGE를 수행한 결과, 실험된 대부분의 *Bacillaceae* 균주가 여러 제한 패턴을 가지고 있음을 확인함으로써 유전적 다양성을 가진 균주들을 분리 배양, 확보함을 확인하였음(그림 176).

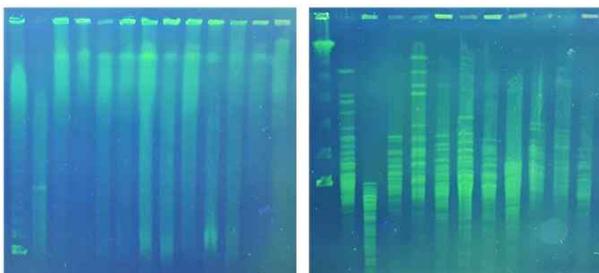


그림 175. PFGE를 이용한 metaplasmid를 보유하고 있는 *Bacillus* 균주 파악

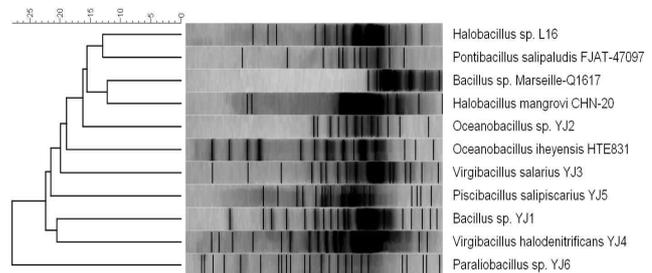


그림 176. 향토 발효식품에서 분리된 *Bacillaceae*의 RFLP 양상 분석

- 표적 미생물의 유전체 정보 분석: 여러가지 향토발효 음식 군집 분석 결과를 기반으로 배양 가능한 미생물들을 수집함으로써 극한 고염 환경에서의 미생물들을 배양하고 단백질 분해 활성 등 미생물 소재로 활용할 수 있는 균주들의 유전체적 특성을 파악하고자 유전체 서열을 해독, 분석 정보를 확보하였음(그림 177).

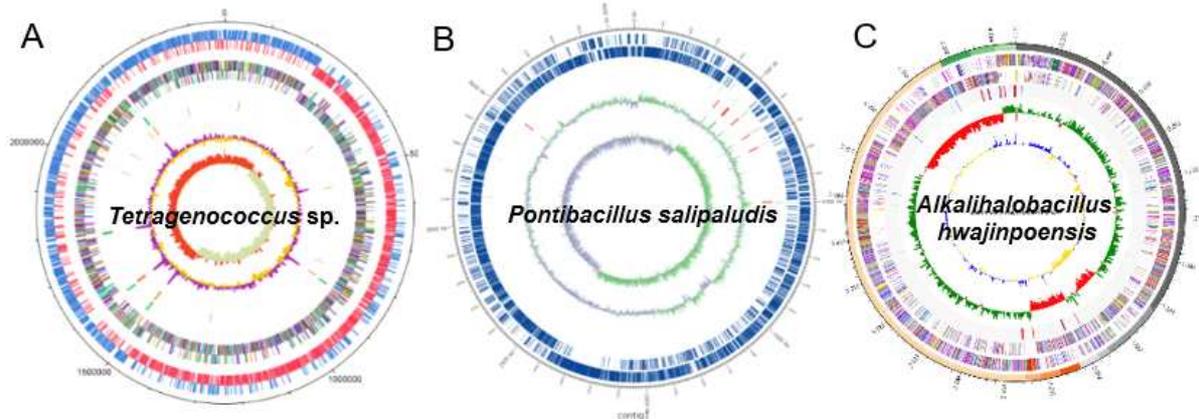


그림 177. *Tetrigenococcus* sp., *Pontibacillus salipaludis*, *Alkalihalobacillus hwajinpoensis* 균주의 전 유전체 서열 해독 및 분석

#### ○ 미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원

- 미생물유전체전략연구사업단의 메타유전체 분석 대상 추천 공모를 통해 추진된 벼 근권 토양(서울대학교 이용환 교수 연구팀(Host-Microbe Interaction 연구팀)과의 공동연구)의 전 메타유전체 해독 서열들에 대해 분석을 수행함. 벼 경작 시기 및 성장 단계에 따라 수집된 시료들을 대상으로 50Gb를 목표로 생산된 read들을 가지고 quality trimming, host DNA 제거 등을 통해 미생물 DNA read들을 준비한 후, 메타유전체 분석을 수행하였음. 근권 시료(RS)와 대조하기 위한 토양 시료(BS)들 중, 경작 전 토양 시료(0), 분얼기(48), 수잉기(76), 등숙기(106) 시료들 즉, 샘플명 BS-0, BS-48, BS-76, BS-106, RS-48, RS-76, RS-106의 read를 이용하여 taxonomy assignment를 수행 및 대사 유전자의 비율을 파악, 비교하였음. BWA 프로그램을 이용하여 read들을 16S rRNA, 18S rRNA DB에 alignment 한 후, alignment된 read들만을 추출하여 taxonomy assignment를 수행한 결과, 각각의 샘플들에 포함된 bacteria 및 fungi의 abundance가 분석되었음(그림 178). 그 결과, phylum 수준의 세균 군집을 비교하였을 때, 시기 또는 시료 간의 큰 차이를 관찰하기 어려웠으나 벼 성장 시기 중 영양 단계인 분얼기에서의 토양과 근권에서의 차이가 비교적 크게 나타났음. 진균의 경우, 토양과 근권의 차이보다는 경작 및 성장 시기별 비교적 차이가 크게 나타남.

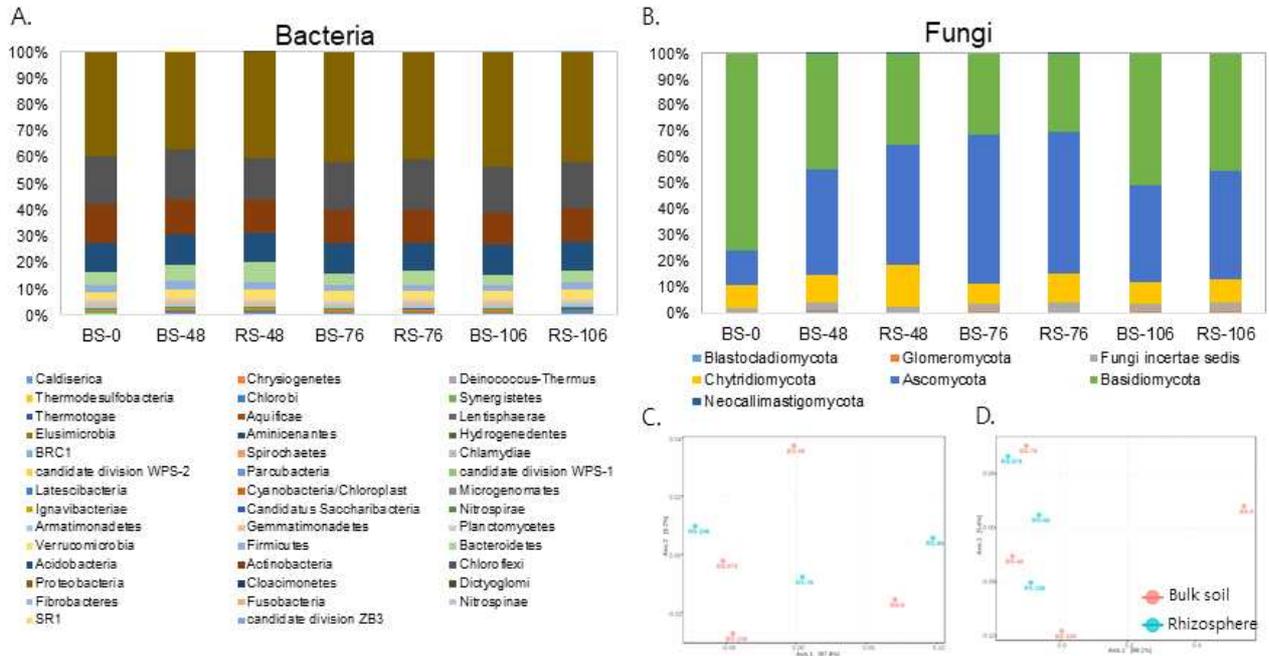


그림 178. 벼 근권 시료별 phylum 수준에서의 미생물 군집 분석 결과(A-B). 세균과 진균 군집 relative abundance 분석 결과(C-D). 세균과 진균 군집의 beta-diversity 분석 결과

- 데이터베이스 uniref90에 대해 humann2 프로그램을 실행하여 각 시료별 대사 유전자들의 빈도를 파악하고자 함. Alignment 결과에 대해 COG 및 KEGG 데이터베이스의 유전자 카테고리에 따라 재분류하고 목록화 하였음(그림 179A). 각 시료별 KEGG 유전자 목록 및 빈도를 비교한 결과, 시료들 사이의 대사 유전자들의 비율의 차이를 관찰할 수 있었고(그림 179B), 유전자 빈도들에 대해 bray-curtis index distance에 의한 ward clustering을 수행함(그림 179C). 특히, 분얼기 토양의 샘플들은 경작 전 토양, 수잉기, 등숙기의 미생물 유전자들 빈도가 다른 것으로 파악되며 특히 분얼기의 근권이 다른 시료들과 큰 차이가 있는 것으로 보임. 이러한 결과는 taxonomy assignment에서 분석된 것처럼 다른 시료들과 분얼기의 근권 미생물 군집의 차이가 나타난 점과 같은 양상으로 파악되며, 분얼기의 특이적인 미생물 군집 구조에 의한 유전체 및 유전자 구성의 차이에 따른 결과로 추측됨.

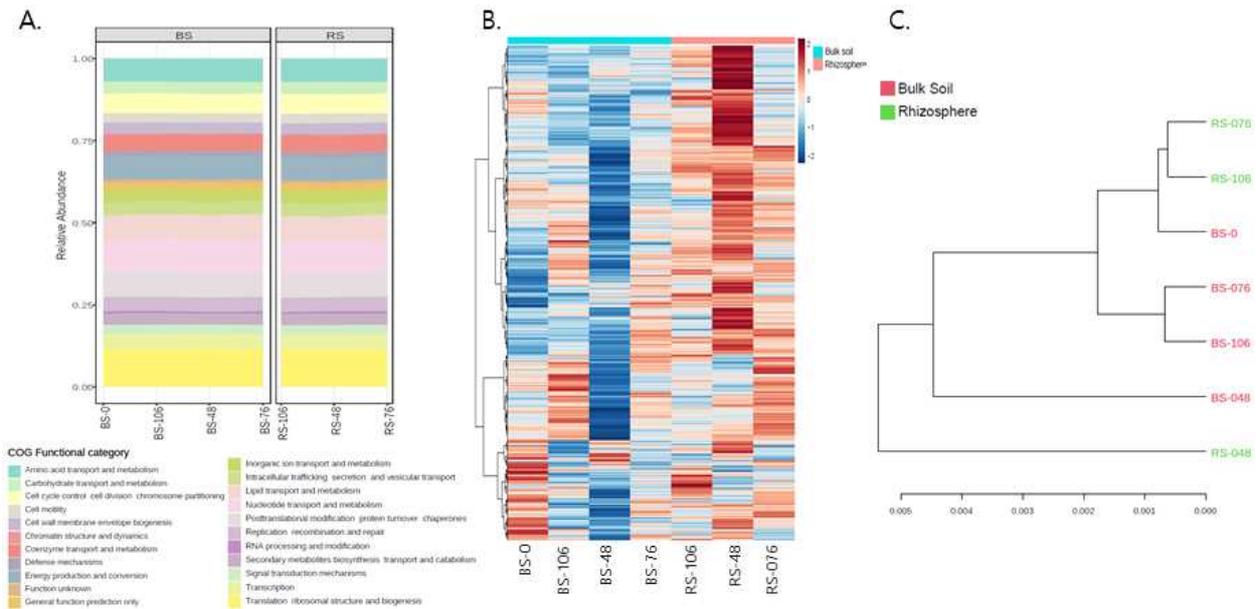


그림 179. 벼 근권 및 토양 시료 내 미생물 유전자들의 COG 데이터베이스 카테고리의 유전자 빈도 분석(A)과 KEGG pathway 분석(B) 및 이에 대한 clustering 분석 결과(C)

- 미생물유전체전략연구사업단 내 연구과제의 협력 네트워크를 통해 공동연구를 추진함으로써 농식품 관련 주요 환경 내 마이크로바이옴 정보 생산, 분석 지원하는 한편, 관련 작물 환경 내 미생물 유전체 및 생 정보들을 확보함. 이를 기반으로 작물 생육 환경과 마이크로바이옴을 거시적으로 이해하기 위한 대용량 데이터 활용 연구 추진의 기반으로 활용됨.

○ 생물정보학적 분석방법을 이용하여 대용량 유전자 발굴 파이프라인 구축

1. 분석 대상 데이터베이스 선정(Uniprot - SwissProt, Trembl\_metagenome, GenBank nr database)

- NGS 시퀀싱 방법이 보편화된 이후 미국 NIH 산하의 국립생물공학정보센터(NCBI)에서 운영하고 있는 GenBank의 refseq\_protein, 유럽 연합에서 구축한 Uniprot Swiss-prot 및 Tremble 데이터 베이스와 같은 공용데이터베이스에서는 등록되는 데이터의 양은 기하급수적으로 늘어나고 있기 때문에 미생물 유래 유용효소의 탐색을 하고자 함.
- 현재 데이터베이스에 단일 박테리아, 고세균, 균류의 단백질 서열 데이터 생산이 늘어나고 있으며 바다, 토양, 열수구 등을 포함한 여러 가지 환경 샘플로부터 유래한 메타지놈 (metagenome) 서열 데이터 역시 증가하고 있어 다양한 유래를 갖는 효소 단백질의 서열 풀(pool)을 갖추고 있음.
- GenBank에 등록된 다양한 메타지놈 핵산 서열 데이터(env\_nr)를 단백질 서열로 번역한 데이터와 GenBank의 refseq\_protein 데이터, 그리고 Uniprot의 단백질 서열 데이터베이스를 기반으로 대용량 유전자 발굴 파이프라인을 구축하고자 함.
- 메타지놈 핵산 서열 데이터를 기반으로 구축한 대용량 유전자 발굴 파이프라인을 이용한 유용효소 탐색은 메타지놈 핵산 서열 데이터에 포함된 높은 온도 조건인 해저열수구, 고염 환경 조건인 바닷물, 저온 환경 조건인 북극과 같은 극한의 환경 유래 서열으로부터 난배양성 미생물 단백질 서열을 이용할 수 있기 때문에 유용 효소의 발굴의 가능성이 높음.

- 유럽의 Uniprot 단백질 데이터베이스는 Swiss-prot, TrEMBL 두 종류의 데이터베이스로 이루어져 있음. 그 중 Swiss-prot 데이터 베이스는 논문 등을 통해서 보고되어 온 단백질의 기능에 대한 실험적 데이터를 제공함.
- Uniprot 단백질 데이터베이스의 이용 시 장점으로 단백질이 갖는 기능에 대한 추정이 용이. 단백질이 갖는 각 도메인 서열에 대한 특징, 기능적으로 중요한 서열 정보, 효소의 전환을 나타내는 Km, Vmax 값 등과 같이 효소 전반의 특징을 알 수 있어 생물정보학적 방법으로 탐색하는 효소 단백질의 기능에 대한 예측을 가능하게 함.

## 2. 검색조건 설정(검색방법 및 parameter 결정) 및 유전자 목록화 방법 확립

- 효소 단백질 데이터베이스로부터 원하는 유용 효소를 탐색하기 위해서 연구자가 탐색하고자 하는 효소의 단백질서열을 선정하여 유용 효소 단백질을 탐색에 이용하게 됨.
- 기능을 알고 있는 효소 단백질 서열을 입력할 때에 하나의 효소 단백질 서열만 이용하는 경우, 또는 여러 개의 효소 단백질 서열을 입력하는 경우로 나뉘게 됨. 이 때에 입력 서열은 아래 그림 180과 같이 정리하여 탐색에 이용하게 됨.
- 다수의 입력 서열이 존재할 때에는 그 수를 줄여 탐색과정 중의 연산 횟수를 줄이고 시간을 단축하기 위한 방법으로 다수의 입력 서열들 간에 90 %의 유사도를 기반으로 clustering을 수행하여 대표적 서열만을 이용.
- 이미 탐색하는 유용효소의 기능을 수행하고 있는 효소 단백질 서열을 이용하는 것은 유용 효소의 기능을 좀 더 높은 가능성으로 추정하기 위함임.

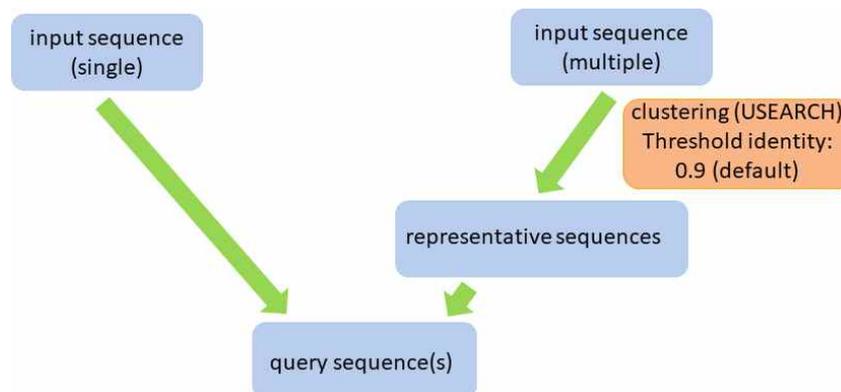


그림 180. 파이프 라인의 유용효소 탐색을 위한 최초 입력 단백질 서열 처리 모식도

## 3. Sequence-based 또는 domain-based clustering 방법 확립

- 단백질 서열 데이터베이스 내의 유용 효소를 탐색하는 과정을 수행하기 위하여 데이터베이스 내의 단백질 서열들과 전 과정에서 얻은 입력 효소 단백질 서열의 유사도를 비교하고 그룹을 구성하는 clustering방법을 이용함.
- 기능이 검증된 최초 입력 효소 단백질 서열을 중심으로 데이터베이스 내의 단백질 서열들의 서열 유사도에 맞추어 BlastP기반의 검색을 통해 입력 효소 단백질 서열을 바탕으로 이루어지는 가상의 clustering을 진행함. 단백질 서열 유사도의 기준을 50 % 이상으로 설정할 경우 나타나는 각각의 클러스터 내의 단백질들은 입력 서열과 동일한 기능을 가질 것으로 예측함. 이는 그림 181의 모식도로 나타냄.

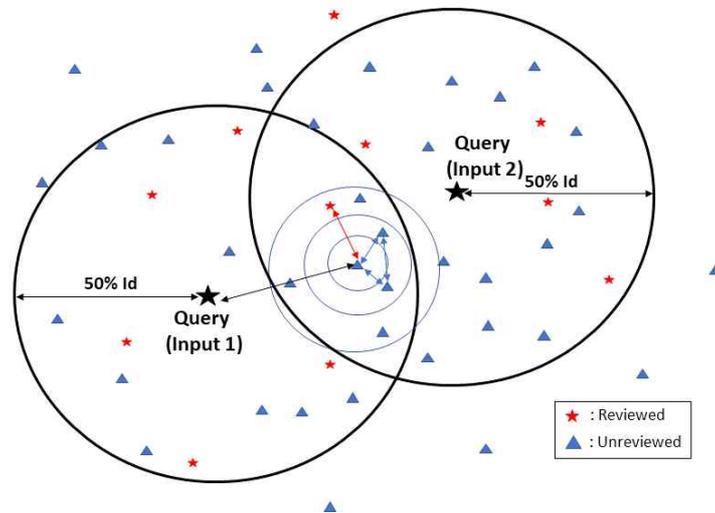


그림 181. 데이터베이스 내 단백질 서열들의 클러스터링 모식도

- Uniprot 내의 단백질 서열의 기능을 확인한 Swiss-prot (reviewed sequece) 데이터베이스의 활용으로 하나의 단위로 클러스터링 되는 단백질들의 각각의 단위 클러스터의 기능에 대한 확인이 가능함.
- 연구자에 의해 입력된 효소 단백질 서열과의 유사도를 5 % 단위로 분석하여 유사도에 따른 클러스터 단백질의 목록을 확인 가능하게 하여 형성된 클러스터 내의 단백질 서열들의 유사도를 바탕으로 각각의 클러스터 내의 단백질들에 대한 기능 예측 및 분석이 가능함.
- 데이터베이스 내 유사 효소 단백질의 클러스터링이 유사도를 다르게 조절함에 따라 달라짐이 관찰되며 이는 아미노산 서열이 유사한 단백질이라 할지라도 기능적 다양성이 존재할 수 있음을 나타냄. Uniprot내의 기능을 알고 있는 Swiss-prot 단백질 데이터와 종합하여 다양한 효소 기능을 확인할 수 있는 중요한 방법으로 이용가능 함.
- 결론적으로 입력 효소 단백질의 아미노산 서열을 기반으로 하여 클러스터링 된 데이터베이스 내 단백질 서열들은 목록화하여 한 화면에 단백질이 해당하는 클러스터의 숫자와 단백질 서열의 유사도, 단백질 서열의 포함 범위, 이미 보고되어 있는 가장 유사한 단백질 서열 정보, 5 % 유사도 단위의 clustering 결과 등의 분석 결과를 제시함 (그림 182).

No	Hit	Input_best	%id	%Cov	All_reviewed_best	%id	%Cov	In_Hit	100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	45	
1	ipt[ACL75304.1]	ACL75304.1	100.000	100.000	spjB8944 DPES_CLOCE	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	ipt[ACM22408.1]	ACM22408.1	100.000	100.000	spjQ49285 URTF_STAS1	29.524	20.166	NO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	ipt[AJ74158.1]	AJ74158.1	100.000	100.000	spjQ16831 JUPP1_HUMAN	30.769	15.606	NO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4	ipt[AKE28233.1]	AKE28233.1	100.000	100.000	spjQ49285 URTF_STAS1	29.524	20.166	NO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	ipt[ANK75276.1]	ANK75276.1	100.000	100.000	spjQ98FW0 LR3E_RHILO	32.872	97.872	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	ipt[BAA24429.1]	BAA24429.1	100.000	100.000	spjO50580 DT3E_PSECI	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7	ipt[EDP19602.1]	EDP19602.1	100.000	100.000	spjA8RG82 DPES_CLOBW	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8	ipt[EDS06411.1]	EDS06411.1	100.000	100.000	spjB8944 DPES_CLOCE	62.500	99.308	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
9	ipt[EGK07060.1]	EGK07060.1	100.000	100.000	spjB8944 DPES_CLOCE	50.704	98.270	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10	ipt[KGDPE]	KGDPE	100.000	100.000	spjQ98FW0 LR3E_RHILO	42.958	95.623	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11	ipt[NP_535228.1]	NP_535228.1	100.000	100.000	spjA9CH28 DPES_AGRFC	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
12	ipt[UniRef90_P0C182]	UniRef90_P0C182	100.000	100.000	spjP0C182 JLAE_SHIDS	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
13	ipt[UniRef90_P37679]	UniRef90_P37679	100.000	100.000	spjP37679 SGBU_ECOLI	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
14	ipt[UniRef90_P44990]	UniRef90_P44990	100.000	100.000	spjP44990 SGBU_HAEIN	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	ipt[UniRef90_P45541]	UniRef90_P45541	100.000	100.000	spjP45541 FRLC_ECOLI	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
16	ipt[UniRef90_P73599]	UniRef90_P73599	100.000	100.000	spjP73599 Y1304_SYNY3	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
17	ipt[UniRef90_P75294]	UniRef90_P75294	100.000	100.000	spjP75294 JLAE_MYCPN	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
18	ipt[UniRef90_P76044]	UniRef90_P76044	100.000	100.000	spjP76044 YJCR_ECOLI	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
19	ipt[UniRef90_Q8RMD1]	UniRef90_Q8RMD1	100.000	100.000	spjQ8RMD1 ACBQ_ACTS5	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
20	ipt[UniRef90_Q98FW0]	UniRef90_Q98FW0	100.000	100.000	spjQ98FW0 LR3E_RHILO	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
21	ipt[UniRef90_Q9WYP7]	UniRef90_Q9WYP7	100.000	100.000	spjQ9WYP7 OLO_THEMA	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
22	ipt[WP_052889376.1]	WP_052889376.1	100.000	100.000	spjQ98FW0 LR3E_RHILO	42.857	96.552	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
23	ipt[ZP_02432281.1]	ZP_02432281.1	100.000	100.000	spjO50580 DT3E_PSECI	42.907	97.627	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
24	ipt[ZP_03778576.1_fructose_allulose]	ZP_03778576.1_fructose_allulose	100.000	100.000	spjB8944 DPES_CLOCE	64.236	99.308	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
25	spjA8RG82 DPES_CLOBW	EDP19602.1	100.000	100.000	spjA8RG82 DPES_CLOBW	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
26	spjA9CH28 DPES_AGRFC	NP_535228.1	100.000	100.000	spjA9CH28 DPES_AGRFC	100.000	100.000	YES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

그림 182. 구축된 파이프라인을 통하여 생산된 결과 예시

- 입력 효소 단백질 서열을 바탕으로 단백질 서열들 간의 유사도 분석과 클러스터링을 수행한 뒤 연구자들이 각 클러스터 내 서열들을 alignment하며 클러스터 고유의 보존된 서열들을 제시함으로써 클러스터들의 특징들을 분석할 수 있음. 뿐만 아니라 보존 도메인에 관한 정보도 추가적으로 제공하여 클러스터의 기능을 파악할 수 있음. 이러한 과정들을 통해 다른 단백질들과의 차이점들을 파악하는데 용이함.

#### 4. 유전자의 환경유래 정보 목록화

- 앞서 얻어진 클러스터를 형성한 단백질 서열들의 기원, 기능, 전체서열, 도메인 등과 같은 정보를 연구자가 쉽게 알 수 있도록 정해진 형식을 바탕으로 목록화 하였고 그 중에서도 특히 난배양성 미생물에 대한 정보를 알 수 있는 단백질 서열 유래 환경 정보가 고성능·고효율의 효소 단백질을 찾아내는 데 유용한 정보가 되기 때문에 효소 단백질의 환경유래 정보들을 목록화 하여 나타내었음 (그림 183).
- 추가적으로 효소 단백질이 유래한 미생물에 대한 정보 역시 계통적 분류에 따라서 제시하여 미생물이 특이적으로 갖는 생리적 특징이 반영된 효소 단백질의 발굴을 가능하게 해줌.
- 이러한 유전자의 환경 유래 정보 목록화를 통하여 유용 효소 발굴을 하고자 하는 연구자에게 충분한 정보를 제공해 주고자 하였음.

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli (strain 55989 / EAEC)	Seawater metagenome seawater_contig51887_length_1501, whole genome shotgun sequence
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia fergusonii (strain ATCC 35469 / DSM 13668 / CDC 0568-73)	Epimerase OS=Rhizobium alkylani
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli O7:K1 (strain IA199 / EPEC)	D-psicose/D-tagatose/L-ribulose 3-epimerase OS=Tropicomonas isoalkanivorans
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli O127:H6 (strain E2348/69 / EPEC)	Putative hexulose-6-phosphate isomerase OS=Enterobacteriaceae bacterium bta3-1
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli O6:K1:H31 (strain 536 / UPEC)	D-psicose/D-tagatose/L-ribulose 3-epimerase OS=Rhizobium subbaeoni
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli (strain UT89 / UPEC)	Xylose isomerase domain-containing protein OS=Rhizobium favelkesii
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli O6:H1 (strain CF7073 / ATCC 709828 / UPEC)	D-tagatose 3-epimerase OS=Chlamydia abortus
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	hypothetical protein GOS_1597156, partial [marine metagenome]
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	Xylose 5-phosphate 3-epimerase OS=Providencia alcalifaciens
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	Putative hexulose-6-phosphate isomerase OS=Providencia alcalifaciens PAL-3
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	Uncharacterized protein OS=Baclillus muralis
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli 53638	hypothetical protein GOS_9706001, partial [marine metagenome]
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli O157:H7 str	hypothetical protein GOS_670991, partial [marine metagenome]
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	D-tagatose 3-epimerase OS=Flavobacteriales bacterium
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli 1-110-08_53_C1	hypothetical protein GOS_3792302, partial [marine metagenome]
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	Epimerase OS=Paramesorhizobium deserti
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli O157	Xylose isomerase-like TIM barrel family protein OS=Sinorhizobium sp. RAC02
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	Xylose 5-phosphate 3-epimerase OS=Providencia rettgeri
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli	Xylose 5-phosphate 3-epimerase OS=Providencia rettgeri
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Shigella; Shigella boydii	Xylose 5-phosphate 3-epimerase OS=Edwardsiella piscicida
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia albertii (strain TW07627)	Xylose isomerase domain-containing protein OS=Rhizobium tropici CIAT 899
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli M605	hypothetical protein GOS_8638404 [marine metagenome]
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Shigella; Shigella flexneri	(REVERSE SENSE) Seawater metagenome seawater_contig17677_length_2494, whole genome shotgun sequence

그림 183. 파이프라인을 통하여 탐색된 단백질의 환경정보 목록화

## 5. 상기 과정들을 하나의 일련의 파이프라인 시스템으로 구축

- 위 서술한 유용효소 발굴에 대한 과정들에 대하여 일련의 파이프라인 시스템으로 구축하여 이용에 편리함을 도모함. 이를 정리한 알고리즘은 아래 그림 184에 나타냄.

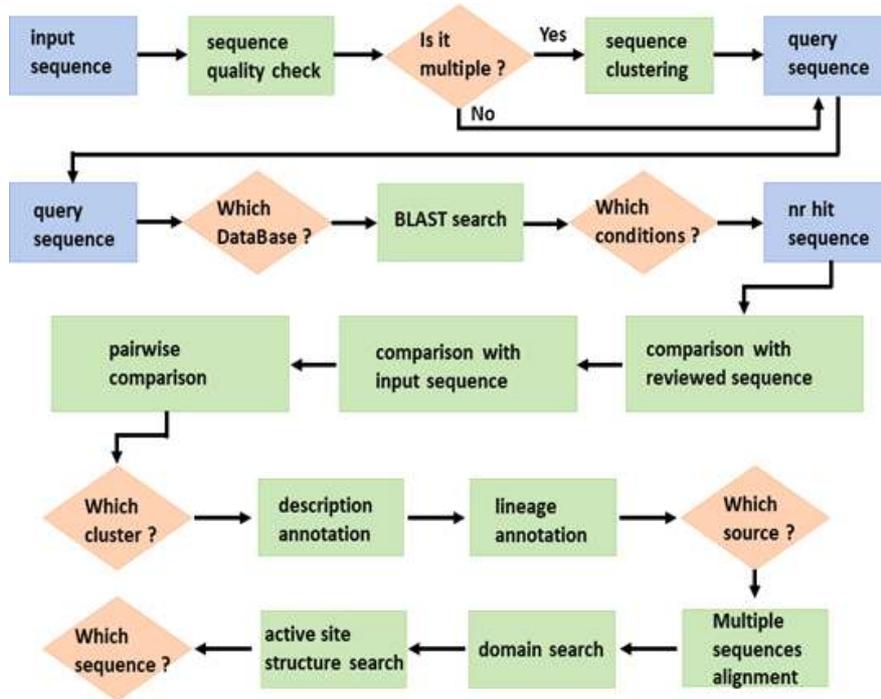


그림 184. 구축된 유전자 발굴 파이프라인의 알고리즘

- 최초 입력 효소 단백질 서열로부터 결과를 도출하고 이를 목록화 하기까지의 과정을 리눅스 서버 시스템의 perl 컴퓨터 언어로 구성함.
- 연구자의 대용량 유전자 발굴 파이프라인에 대한 접근도를 높이기 위하여 웹서버를 통한 접속을 가능하게 하여 연구자의 편의를 도모하였음.

## ○ 구축된 파이프라인을 활용한 고성능·고효율 유용효소 유전자의 발굴

### 1. 구축된 유전자 발굴 파이프라인을 이용한 효소 유전자 발굴

- 기존에 유용효소 발굴을 위해 BlastP, PfamScan, USEARCH(clustering), Sequence

Similarity Network(SSN)를 수행할 수 있게 구축한 웹기반 파이프라인을 기반으로 케톤계 육탄당(fructose, Psicose, tagatose, sorbose)을 상호간에 epimerization하는 효소의 발굴을 수행함. 구축된 파이프라인을 이용하여 데이터베이스로부터 총 8,591개의 후보 단백질 서열을 얻음.

- 실험적으로 D-tagatose 3-epimerase, D-psicose 3-epimerase 기능이 알려진 단백질 서열과 육탄당을 기질로 이용한다고 annotation이 된 단백질이 존재하는 Endonuclease IV (EC:3.1.21.2), L-rhamnose isomerase (EC:5.3.1.14), Xylose isomerase (EC:5.3.1.5), Mannonate dehydratase와 같이 당과 연관이 있는 기능이 실험적으로 증명된 단백질 서열을 참조 단백질 서열로 이용함.
- 얻어진 8,591개의 후보 단백질 서열들이 육탄당을 기질로 이용하는 효소인 D-tagatose 3-epimerase, D-psicose 3-epimerase에서 공통적으로 갖는 도메인인 Xylose isomerase-like, TIM barrel domain (IPR013022)을 포함한 epimerase의 일반적 도메인 구조를 가짐을 확인함.
- 실험적으로 당과 연관된 기능을 수행함이 증명된 단백질 서열 519개와 8,591개의 후보 단백질 서열을 이용하여 Sequence Similarity Network(SSN)를 수행함. 단백질 서열간의 SSN 결과를 아래 그림 185에 나타냄.

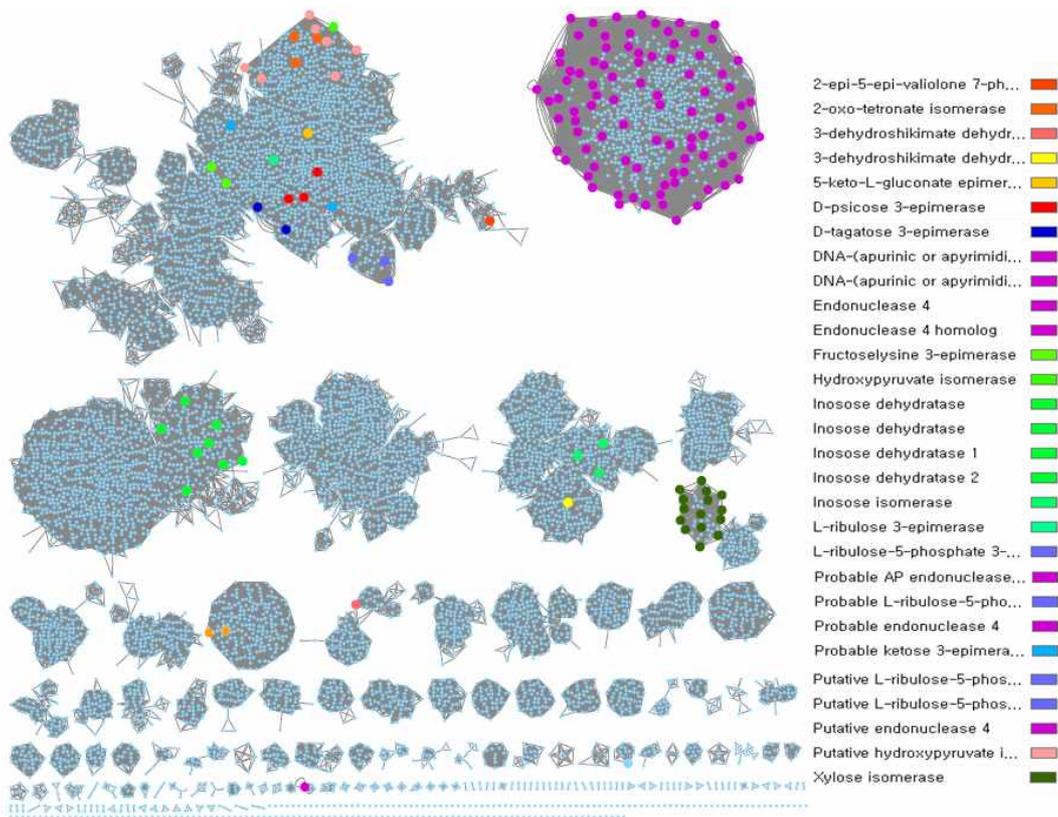


그림 185. Sequence Similarity Network(SSN) 결과

- 그림 185와 같이 얻어진 클러스터에서 대부분의 참조 단백질 서열을 포함하며 가장 많은 단백질 서열을 포함하고 있는 cluster를 선정하여 클러스터를 구성하는 단백질 서열들에 대한 Sequence Similarity Network(SSN)를 재수행함. 이를 통해 새롭게 얻어진 SSN 결과를 위 그림 186으로 나타냄.

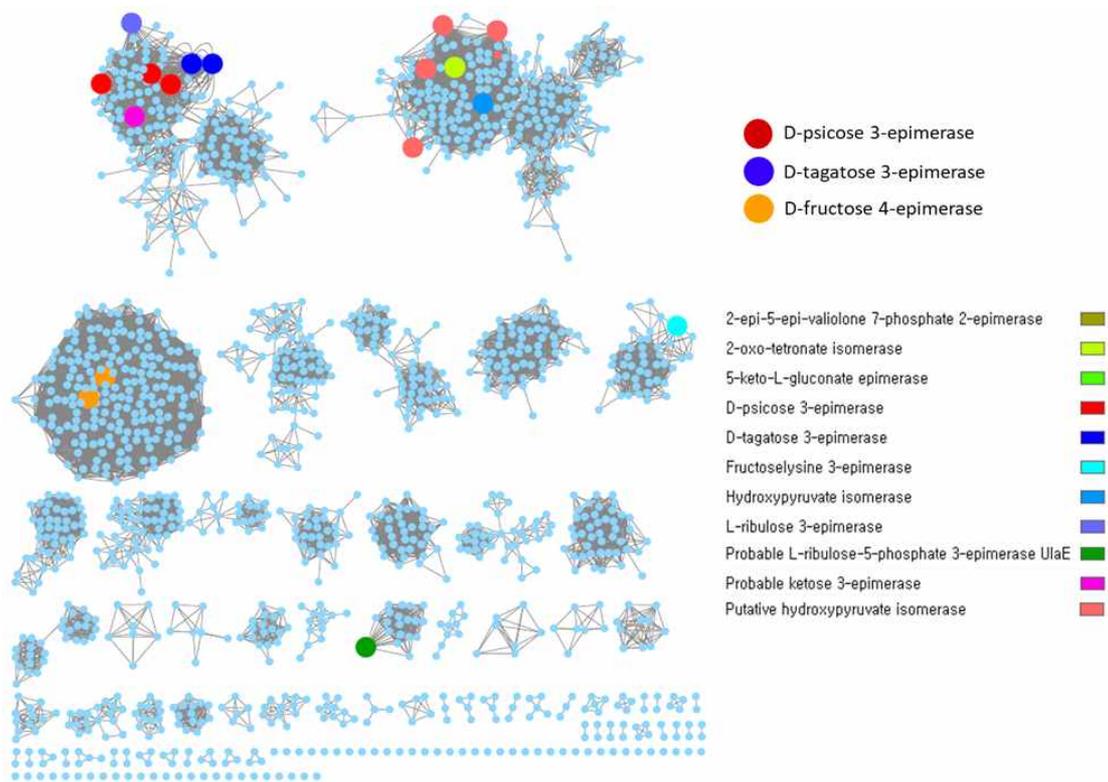


그림 186. 재수행한 Sequence Similarity Network(SSN) 결과

- 재수행한 SSN을 통해 얻은 각 클러스터에 존재하는 후보 단백질 서열의 존재량을 분석하여 그 결과를 아래 그림 187에 나타냄.

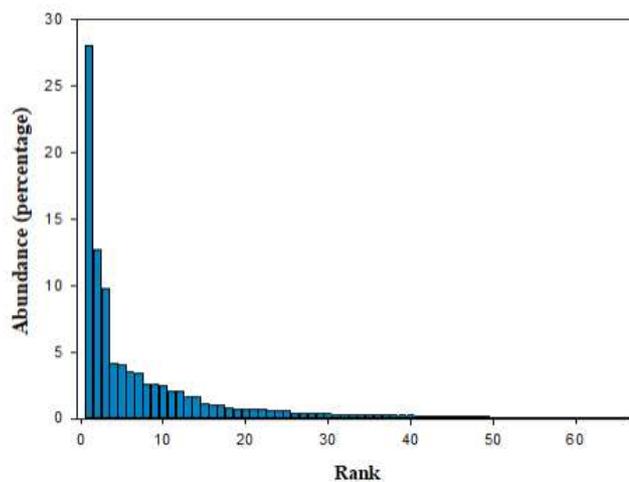


그림 187. 각 cluster에 해당하는 후보 단백질 서열의 비율

- Cluster 내에 40개 이상의 서열과 실험적으로 검증된 단백질 서열을 포함하는 cluster 중 query의 분포도가 상위를 차지하는 10개의 cluster내의 서열에서 예상 효소 후보 단백질 서열을 선정하기 위해서 Genome neighborhood network(GNN)를 기반으로 이웃하는 유전자에 BPD\_transp\_2, Peripla\_BP\_4, ABC\_tran과 같은 당의 transport 유전자 또는 대사관련 유전자가 존재하는 지를 분석함.
- 원하는 기능을 수행한다고 알려진 효소 단백질에서 가지는 이웃 유전자를 분석한 결과를

그림 188과 같이 나타내고 위와 같은 파이프라인을 통해 얻은 클러스터에서 선택한 하나의 예상 효소 후보 단백질 서열의 이웃 유전자를 분석결과를 그림 189으로 나타냄

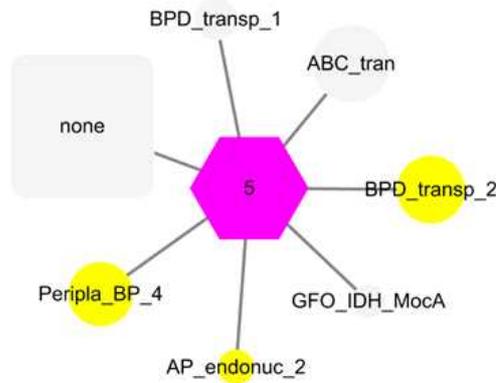


그림 188. 기존에 알려진 단백질의 genome neighborhood network의 결과



그림 189. 각 cluster를 대표하는 서열의 Genome neighborhood network의 결과

- 본 과제에서 구축한 웹 기반의 파이프라인과 그 이후 진행한 sequence similarity network, genome neighborhood network 등의 실험과정을 기반으로 작성한 모식도를 아래 그림 190 에 나타냄.

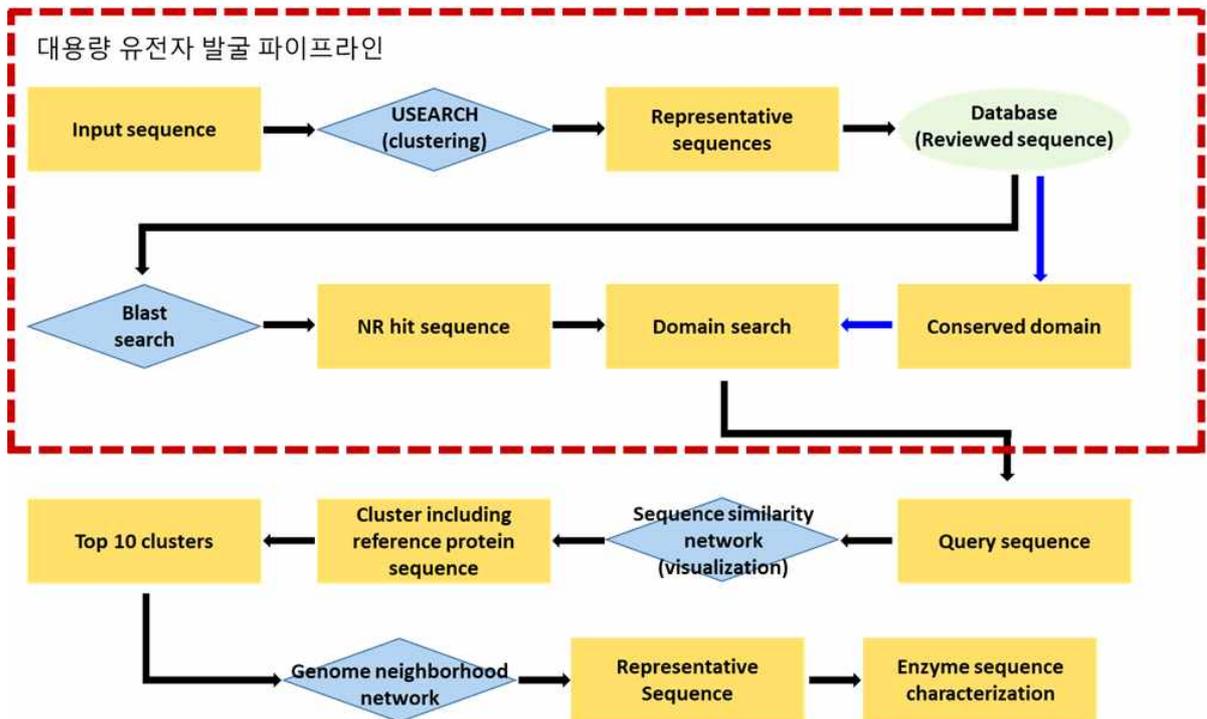


그림 190. 본 과제에서 이용한 분석방법의 모식도

- 구축한 웹 기반의 파이프라인과 Genome neighborhood network를 통해 육탄당과 무관한 cluster를 배제하고 육탄당과 연관된 cluster내에서 육탄당 epimerization 기능을 가질 것이라고 예상되는 후보 단백질 서열 13개와 기존에 기능을 한다고 알려진 유전자 2개를 이후의 발현과 활성분석에 이용함. 분석에 이용한 15개의 후보 단백질의 정보를 표 25로 나타냄.

표 25. 구축된 대용량 유전자 발굴 파이프라인과 Genome neighborhood network를 통해 선정한 후보 단백질

후보 단백질	등록번호	이름	보유 미생물	무게 (kDa)	비고
1	AKE28233.1	Hypothetical protein	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	55.63	특허
2	A0A101E5E7	Uncharacterized protein	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	56.58	
3	A0A0T5XAW1	AP endonuclease	<i>Acetomicrobium hydrogeniformans</i> ATCCBAA-1850	29.8	
4	Q7T3H9 HYI	Putative hydroxypyruvate isomerase	<i>Danio rerio</i>	31.19	
5	NP_535228.1	D-tagatose 3-epimerase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str.C58	31.57	특허
6	F7YTG2	Xylose isomerase domain-containing protein TIM barrel	<i>Pseudothermotoga thermarum</i> DSM5069	31.63	
7	A0A2Y9BKN6	Sugar phosphate isomerase/epimerase	<i>Faecalicatena orotica</i>	29.07	
8	A0A0Q8V356	Uncharacterized protein	<i>Leifsonia</i> sp. Root227	29.15	
9	A0A1Q4DEZ7	Xylose isomerase	<i>Rhizobiales</i> bacterium 64-17	29.04	

10	N2AUC0	Uncharacterized protein	<i>Clostridium</i> sp.	34.19	
11	A0A1F8PZL0	Uncharacterized protein	<i>Chloroflexi</i> bacterium RBG_16_54_18	30.71	
12	A0A1G7PJ74	Sugar phosphate isomerase/epimerase	<i>Terriglobus roseus</i>	37.53	
13	A0A2D6RZP4	Xyloseisomerase	Candidatus <i>Poribacteria</i> bacterium	29.06	
14	WP_077721022	Sugar phosphate isomerase/epimerase	<i>Novibacillus thermophilus</i>	33.03	
15	A0A133UXH1	Uncharacterized protein	Candidate divison MSBL1 archaeon SCGC-AAA259J03	33.11	

- 선정된 서열 내에는 고온 환경(*Novibacillus thermophilus*) 유래 효소와 고염 환경 (candidate divison MSBL1 archaeon SCGC-AAA259J03) 유래 효소가 포함되어 있어 고온 이나 고염 환경에서 기능을 하는 유용 효소 발굴이 기대됨.

## 2. 최적의 효소 생산을 위한 숙주의 유전자 발현 시스템에 적합한 효소 유전자 서열의 최적화

- 파이프라인을 이용한 분석으로부터 얻어진 15종의 epimerase 후보 단백질의 서열에서 기존의 미생물에서는 사용하지 않지만 숙주에서 사용하지 않는 희귀코돈과 시작코돈과 같은 요소를 유전자 발현 시스템으로 이용할 *E. coli*에 맞추기 위하여 IDT를 이용하여 *E. coli*에 맞게 코돈 최적화과정을 진행함.
- 선정된 15개의 유전자 서열의 클로닝과 과발현을 위해 최적화된 서열에 존재하지 않는 효소작용부위가 무엇인지를 확인하고 anchor 서열과 함께 유전자의 양 끝에 선정된 특정 효소작용부위 서열 XbaI(TCTAGA)-XhoI(CTCGAG), NheI(GCTAGC)-XhoI(CTCGAG)을 추가하여 단백질 합성을 위한 맞춤형 후보 유전자 서열의 합성을 진행함.
- NheI(GCTAGC) - XhoI(CTCGAG) 제한효소 세트를 이용하는 경우에는 XhoI 서열 뒤에 종결코돈을 추가하여 유전자의 앞쪽에 His-tag이 붙은 형태로 제작하였고 XbaI(TCTAGA) - XhoI(CTCGAG)이라는 제한효소 세트를 이용하는 경우에는 XhoI 서열 뒤에 붙은 His-tag를 이용하기 위해 종결코돈을 추가하지 않음.
- 합성한 후보 유전자 서열에 각 서열에 맞는 제한효소처리 후 같은 제한효소를 처리한 pTOP blunt V2 벡터에 클로닝하였고 숙주세포인 *E. coli* BL21의 competent cell에 2mm 큐벳을 이용하여 1.8kV, 25 $\mu$ F, 200 $\Omega$  조건 하에 형질전환시킴. 이 후 형질전환된 숙주세포를 50ppm의 kanamycin이 포함된 LB 액체배지에서 37 $^{\circ}$ C, 160rpm으로 배양하여 벡터를 증폭시킴.
- 앞선 과정에서 얻은 벡터를 정제하고 벡터에 제한효소를 처리하여 구축한 후보 단백질의 서열을 얻고 발현벡터인 pET 28a도 제한효소처리를 진행한 후 얻어진 후보 단백질 서열과 발현벡터를 결합효소를 이용하여 연결시킴.
- *E. coli* BL21 균주의 competent cell에 발현벡터를 2mm 큐벳을 이용하여 1.8kV, 25 $\mu$ F, 200 $\Omega$  조건 하에 형질전환을 진행한 후 얻어진 콜로니에서 벡터 내의 서열을 기반으로 구축한 프라이머를 통한 PCR로 후보 유전자 서열을 보유하는지 확인함.
- 후보 유전자 서열을 가지고 있는 *E. coli* BL21 균주를 37 $^{\circ}$ C, 160rpm으로 50ppm의

kanamycin이 포함된 LB 액체배지에서 O.D=0.6~0.7이 될 때까지 배양한 후 1mM의 IPTG를 첨가하여 후보 단백질의 발현을 유도함.

- 후보 단백질의 발현을 위하여 1mM IPTG 첨가 시에 NaCl, Triton을 각각 또는 함께 처리하고 배양 온도조건도 달리하여(16°C, 37°C) 어떤 조건에서 단백질의 발현이 나타나는지 단백질 발현 조건 확립.
- 1mM IPTG를 처리하여 단백질의 발현을 유도한 후에 16°C에서 12시간 배양하였고 얻어진 세포 pellet에 음파파쇄를 수행함. 얻어진 샘플(total lysate)과 샘플의 원심분리를 통해 얻은 상층액(supernatant)을 SDS-PAGE를 수행하여 단백질의 크기에 맞는 위치에서 과발현과 solubility 유무를 나타내는지 분석함. 그 중 No.11 효소는 IPTG와 함께 500mM의 NaCl을 함께 첨가하여 과발현을 유도하였고 이 후 과정은 동일하게 진행함.
- 얻어진 15개의 단백질 중 총 10개의 단백질의 과발현이 확인되었고 (No.1,2,5,7,9,10,11,12,14,15) 그 중 5개의 단백질의 solubility가 확인됨 (No.5,7,11,14,15). 그 중 2개의 단백질(No.14, No.15)의 SDS-PAGE 결과를 그림 191에 나타냄.

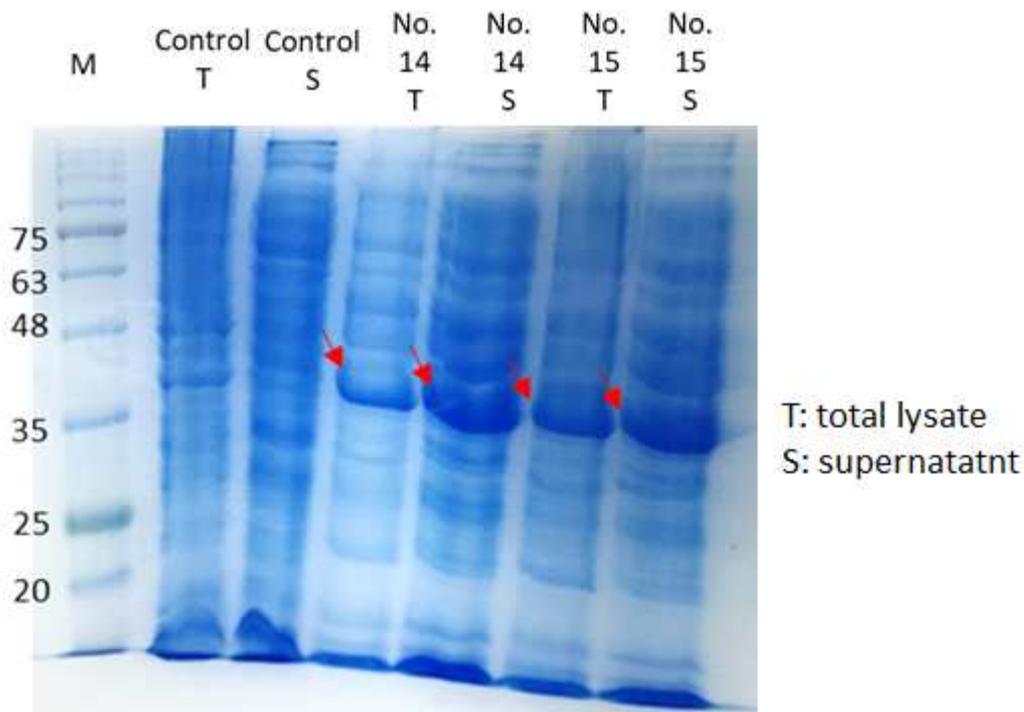


그림 191. SDS-PAGE를 이용하여 숙주시스템에서 얻은 후보 단백질의 과발현과 solubility 확인 결과

- 과발현과 solubility를 모두 나타내는 5개의 단백질을 케톤계 육탄당(과당, 타가토스, 알룰루스, 소르보스) 상호간의 epimerization 기능 수행 여부를 확인하기 위한 .HPLC 분석에 이용함.

### 3. 효소의 기능확립을 위한 효소활성 분석

- 얻어진 효소의 육탄당 epimerization 활성을 분석하기 위하여 과발현되는 효소가 포함된 플라스미드를 갖는 *E. coli*를 50ppm의 kanamycin이 포함된 LB액체배지를 이용하여 37°C,

160rpm 조건에서 배양하고 O.D=0.6~0.7에서 IPTG를 첨가하여 induction시킨 후 16℃에서 12시간 배양한 후 세포를 파쇄한 용액(cell lysate)을 얻음.

- 원하는 단백질의 과발현과 solubility 유무를 한번 더 확인한 후 파쇄 후 원심분리를 통해 얻은 상층액(supernatant)을 Ni-NTA column과 his-tag의 결합을 이용한 정제과정을 통해 순수한 단백질로 분리함.
- 순수 단백질 분리 시에 supernatant를 Ni-NTA column에 흘려주고 이 후 washing solution(50mM HEPES buffer(pH 7.5), 300mM NaCl, 10mM beta-mercaptoethanol)과 10mM의 imidazol이 포함된 washing solution을 순서대로 25ml 흘려줌. 마지막으로 300mM imidazol을 포함한 washing buffer 10ml로 단백질을 용출시킴. 단, No.5 단백질은 300mM NaCl이 포함된 용액을 이용할 경우 단백질의 변성이 일어났으므로 100mM NaCl이 첨가된 solution용액을 이용함. 각각의 과정에서 얻어진 용액을 SDS-PAGE를 걸어 순수한 단백질이 분리되었는지 확인하였고 No.14 단백질의 결과를 그림 192에 나타냄.

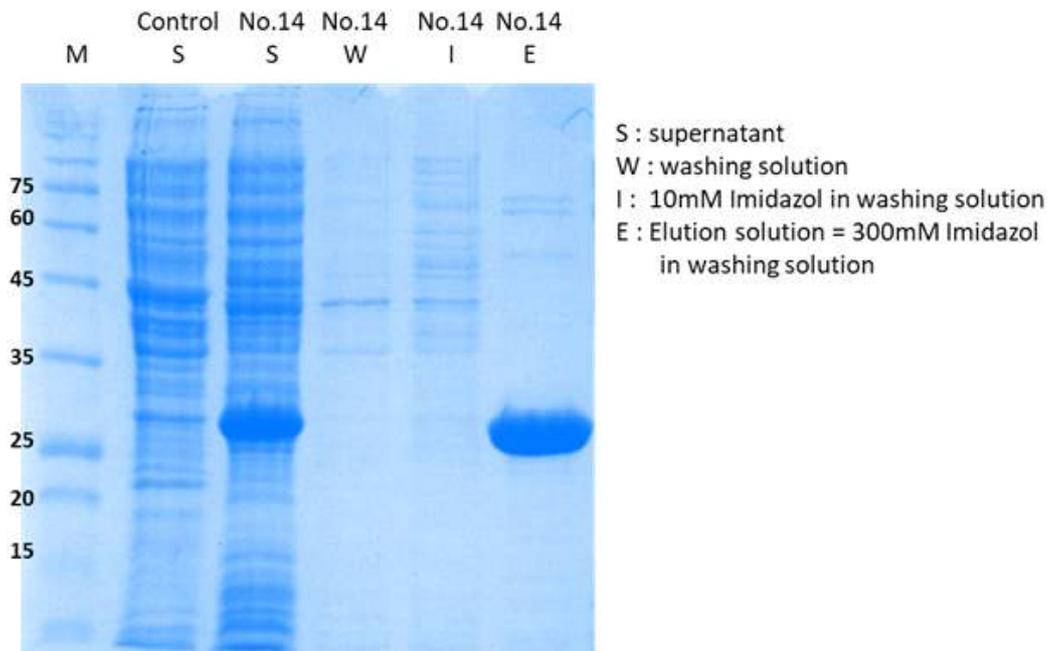


그림 192. 정제완료한 후보 단백질의 SDS-PAGE 결과

- 정제를 통해 순수분리한 단백질 각각을 50mM HEPES buffer(pH 7.5)와 10mM EDTA를 통해 만든 용액을 이용하여 4℃에서 12시간 투석을 진행하여 염이나 다른 불순물을 제거함. 이 후 50mM HEPES(pH 7.5)용액을 이용하여 투석을 한 번 더 진행한 후 얻어진 효소에 cofactor로 이용되는  $Mn^{2+}$ 을 1mM을 첨가하고 20℃에서 4시간 덩으로써 cofactor 처리를 진행함.
- 위의 용액을 다시 한 번 50mM HEPES buffer(pH 7.5) 용액으로 4℃, 12시간동안 투석을 진행하여 단백질과 결합하지 않은  $Mn^{2+}$ 을 제거하는 과정을 거침.
- 위 과정을 진행하여 얻은 순수 분리된 단백질을 이용하여 케톤계 육탄당의 epimerization 기능을 수행하는지 확인하기 위하여 HEPES buffer(pH7.5)와 100mM Fructose를 각각의 효소와 55℃에서 5분간 반응시킴.
- $Ca^{2+}$  column에 물을 용매로 이용하여 0.4ml/mL,의 flow로 흘려주었고 85℃의 오븐온도

는에서 반응시킨 샘플의 분석을 통해 효소의 활성유무를 확인함.

- 15개의 후보단백질 중 고온 환경(*Novibacillus thermophilus*) 유래 효소와 고염 환경 (candidate divison MSBL1 archaeon SCGC-AAA259J03) 유래 효소에서 과당을 알룰로스 로 전환시키는 것을 확인하였고 그 결과를 아래 그림 193에 나타냄.

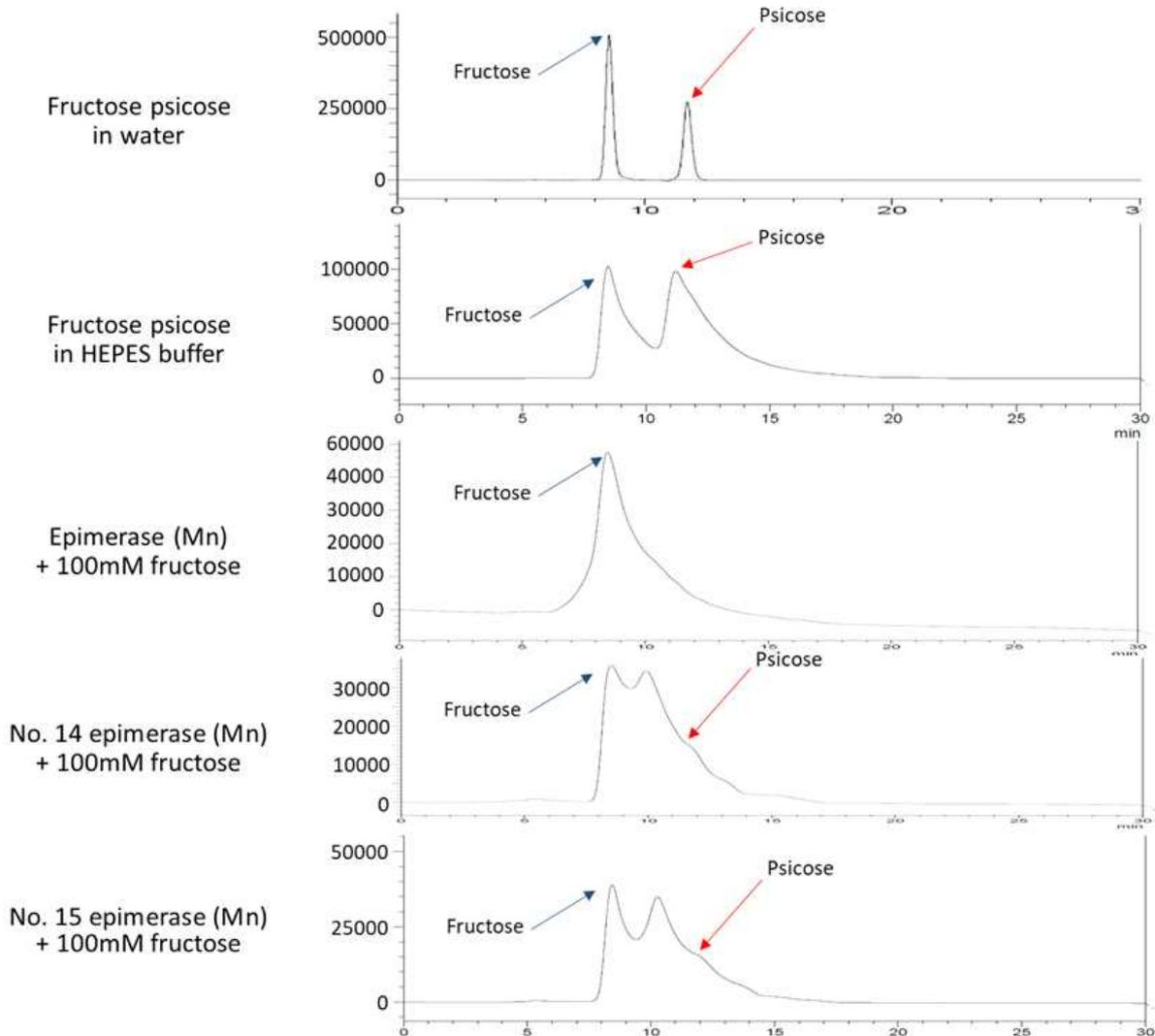


그림 193. 순수 분리 정제한 후보 효소단백질의 HPLC 결과

- 본 과제에서 구축한 파이프라인을 이용하여 케톤계 육탄당을 epimerization시키는 새로운 효소에 대한 분석을 진행한 결과 15개의 후보 유전자를 선정하였고 그 중 2개의 후보 유전자가 과당을 알룰로스 로 전환시키는 효소활성을 가지고 있는 것을 확인함.

○ 유전자 발현 숙주 시스템에서의 발현 조건 최적화 및 최적 효소 활성 분석

1. 구축된 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining) 파이프라인을 이용한 유용 유전자 발굴

- 대용량 유전자 발굴 파이프라인을 환경오염문제 해결에 이용 가능한 효소 발굴에 적용하고자 함
- 발굴 대상으로 자외선 차단제의 주요 성분 물질인 benzophenone-3 (BP-3)를 분해할 수

있는 효소를 선정함

- BP-3의 분해 효소를 찾기 위하여 생분해 예측 정보를 이용하였고 예측정보를 기반으로 대용량 유전자 발굴에 이용할 효소를 특정하여 이를 통한 분석 수행
- 자외선 차단제의 주요 성분물질인 benzophenone-3 (BP-3)의 분해는 태양광에 의한 분해만이 보고되었을 뿐, 미생물등의 생물에 의한 생분해 경로는 아직까지 규명되지 않음.
- 생분해 효소 후보군을 얻기 위하여 BP-3의 분해 경로를 생물정보학적 분석을 통하여 예측하는 EAWAG-BBD Pathway Prediction System (<http://eawag-bbd.ethz.ch/predict/>)을 통해 생분해 효소 후보를 특정하고자 하였고 예측 분해 경로를 그림 194에 나타냄.

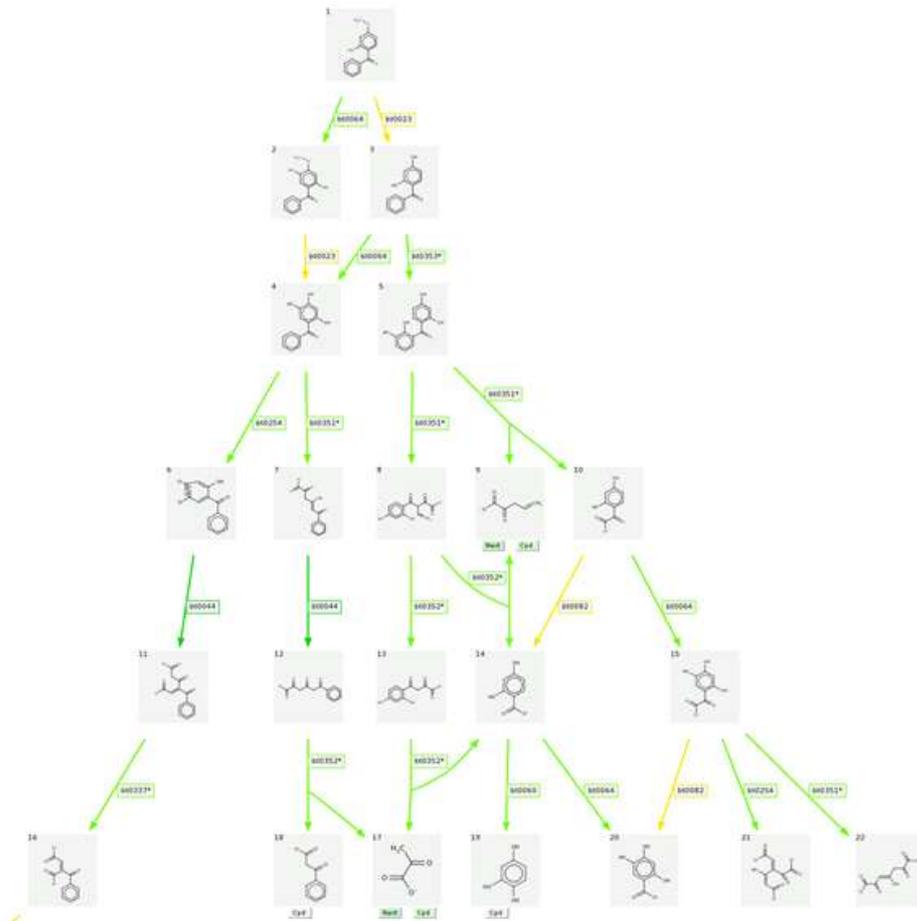


그림 194. 예측된 Benzophenone-3의 생분해 대사 경로

- BP-3의 생분해 과정에서 작용하는 효소단백질이 cytochrome P450 계열의 효소임이 예측되어 본 연구에서 1,2차년도에 구축한 대용량 유전체 발굴 파이프라인을 이용하여 UniProt 단백질 데이터베이스 내에서 cytochrome P450로 기능이 예측된 332개의 단백질을 수집하여 이를 이용한 대용량 유전체 발굴 과정을 수행하여 SSN 결과를 아래 그림 195에 나타냄.

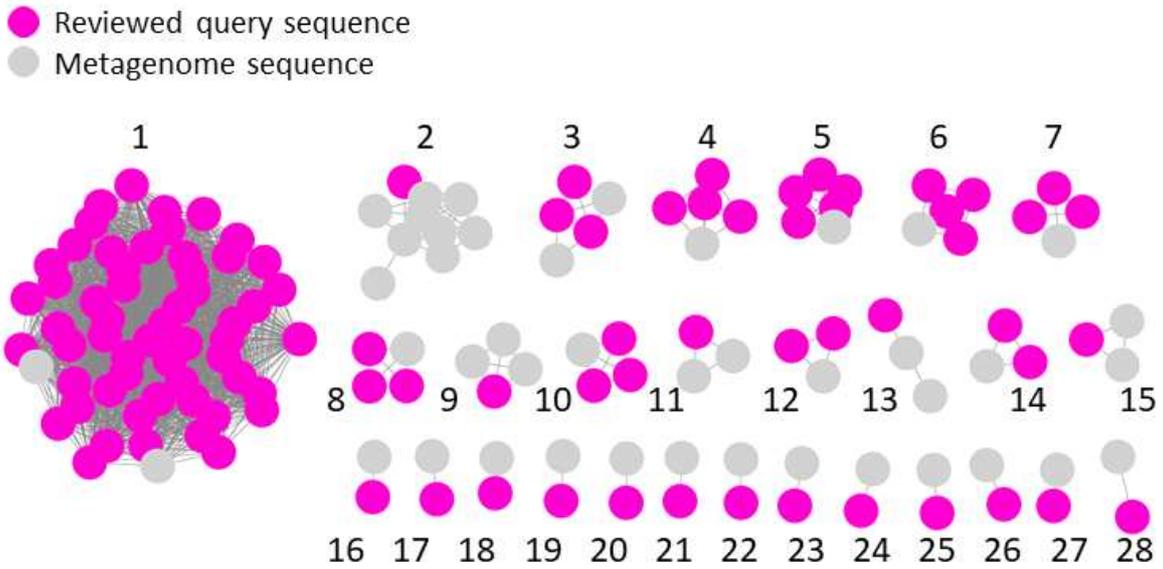


그림 195. Cytochrome P450 기능을 갖는 단백질 클러스터링 결과

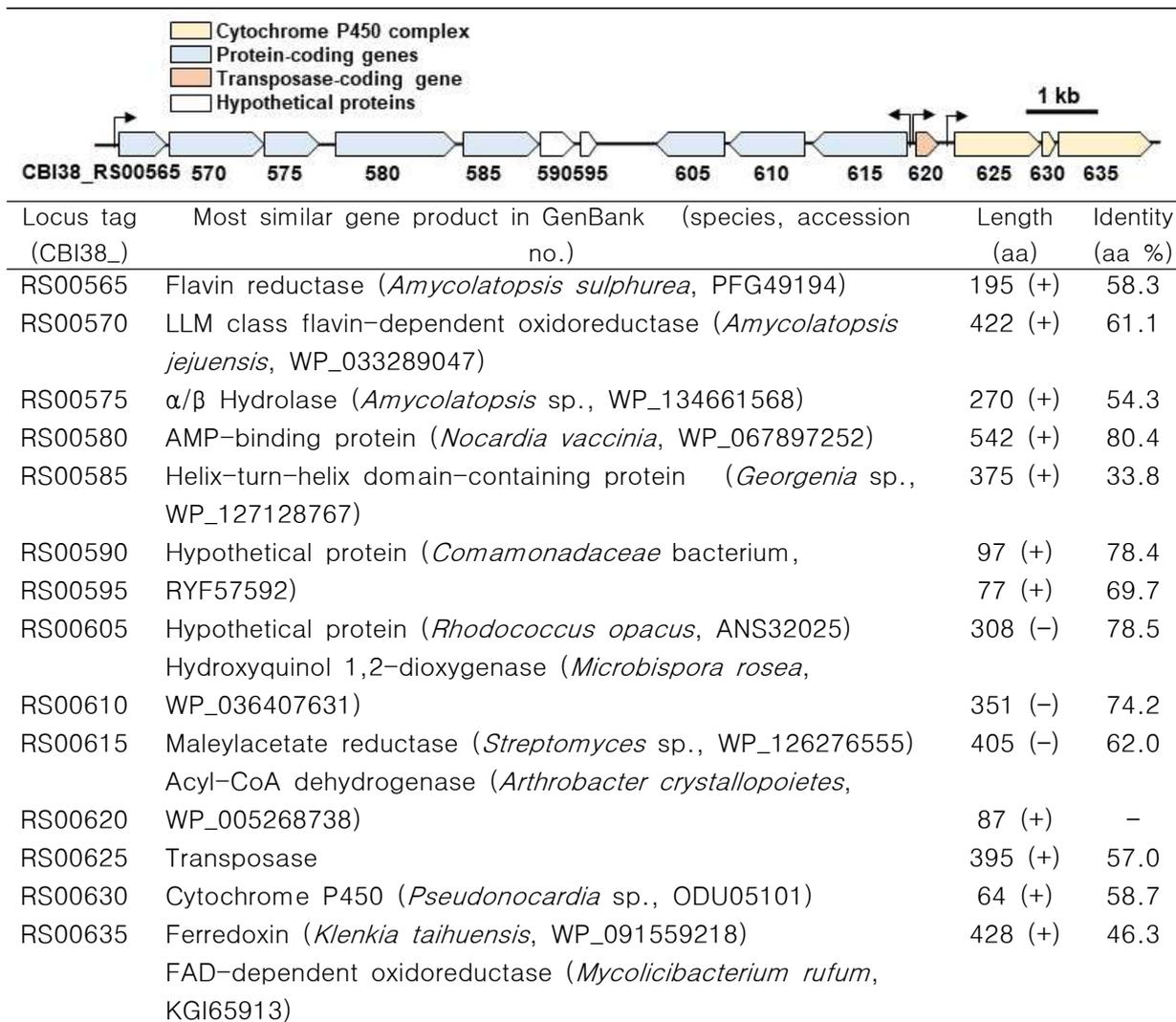
- 30% 유사도를 기준으로 단백질들을 수집하여 SSN을 이용한 클러스터링을 수행하였을 때, 총 28개의 클러스터가 형성됨.
- 모든 클러스터가 환경메타지놈의 유전자를 포함하고 있어 이들 각 클러스터의 유전자는 환경 내 고른 분포를 보여줌. 이들의 대표적인 서열을 목록을 아래 표 26와 같음.

표 26. BP-3 분해 유전자 예측을 위한 SSN 내 클러스터별 대표 유전자

Cluster No.	등록번호	이름	미생물	Sequence length (aa)
1	Q87L90	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O3:K6	623
2	Q9L9G0	Novobiocin biosynthesis protein H	<i>Streptomyces niveus</i>	600
3	G3Y419	Non-reducing polyketide synthase yanA	<i>Aspergillus niger</i>	1779
4	Q81BF4	Bifunctional cytochrome P450/NADPH--P450 reductase	<i>Bacillus cereus</i>	1065
5	Q0S7M1	SteroidC26-monooxygenase	<i>Rhodococcus jostii</i>	471
6	Q5IZM4	Lanosterol 14-alpha demethylase	<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i>	452
7	P9WPL9	Putative cytochrome P450 140	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	438
8	P9WPP5	Putative cytochrome P450 123	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	402
9	P0DPQ7	Aromatic O-demethylase, cytochrome P450 subunit	<i>Amycolatopsis</i> sp.	407
10	A0R4Q6	Steroid C26-monooxygenase	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	401
11	P43494	Rhodocoxin reductase	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	427
12	P9WPM6	Putative cytochrome P450 136	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	492
13	P0DPQ8	Aromatic O-demethylase, reductase subunit	<i>Amycolatopsis</i> sp.	334
14	P9WPN4	Cytochrome P450 130	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	405
15	P34699	DNA polymerase III subunit alpha	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	1194
15	P33006	Cytochrome P450-terp	<i>Pseudomonas</i> sp.	428
17	Q8VQF5	Cindoxin reductase	<i>Citrobacter braakii</i>	451
18	P46370	Uncharacterized protein in thcA 5'region	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	513
<b>19</b>	<b>Q6N8N2</b>	<b>Cytochrome p450 CYP199A2</b>	<b><i>Rhodopseudomonas palustris</i></b>	<b>412</b>
20	P46371	Uncharacterized GMC-type oxidoreductase	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	493
21	P46369	EPTC-inducible aldehyde dehydrogenase	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	506
22	P43484	Pup deamidase homolog	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	339
23	Q8VQF6	1,8-cineole 2-endo-monooxygenase	<i>Citrobacter braakii</i>	404
24	P16640	Putidaredoxin reductase CamA	<i>Pseudomonas putida</i>	422
25	P46372	Uncharacterized protein in thcA 5'region	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	437
26	P43462	Probable thc operon regulatory protein	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	332
27	P43492	Cytochrome P450 116	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	437
28	P00183	Camphor 5-monooxygenase	<i>Pseudomonas putida</i>	415

- SSN 분석 결과 가장 큰 클러스터는 *Vibrio*가 속한 클러스터로 그 기능이 sulfite reductase 로 예측되는 클러스임. 예측된 기능이 cytochrome P450인 클러스터에 대해서는 추가적으로 genome neighborhood network (GNN) 분석을 통하여 그 기능을 검증함.
- GNN을 통한 주변 유전자의 기능을 분석한 결과 클러스터 19번의 유전자는 예상되는 BP-3 생분해 경로와 비교하였을 때, cytochrome P450 유전자의 이웃에 존재하는 유전자 들이 그 이후의 BP-3의 대사과정에도 참여할 것으로 예측됨.
- 본 19번 클러스터에 포함되는 미생물들을 조사한 결과 이미 분리되어 지놈 시퀀싱이 완료 되어 있는 *Rhodococcus* 속(genus)의 미생물이 포함되어 있음을 확인하였고 그 균주의 GNN 분석 결과를 표 27으로 나타냄.

표 27. *Rhodococcus* 속(genus)에 포함되는 BP-3 분해 후보 미생물의 GNN 분석 결과



- 예상 BP-3 대사 경로는 최초 1번 탄소위치의 메틸기를 떼어내는 작용으로부터 시작해 산화되는 과정을 거침
- 찾아낸 첫단계의 효소 단백질의 cytochrome P450 기능을 실제로 검증하기 위하여 본 단백질의 과발현 및 효소 반응 실험을 수행함.

## 2. BP-3의 대사에 관여하는 cytochrome P450 효소 단백질의 숙주 내 발현 및 효소 특성 분석

- Benzophenone-3의 생분해 과정에 관여할 것으로 예측되는 후보 단백질 유전자 합성 및 *E. coli* 내에서의 과발현 수행함.
- 클러스터 19번에 속하는 미생물 *Rhodococcus* sp.의 cytochrome P450 유전자와 그 이웃 페레독신 유전자(CBI38\_RS00625-635)의 효소단백질 과발현을 위하여 대상 유전자를 PCR로 증폭한 뒤 증폭산물을 제한효소를 이용하여 단백질 발현용 벡터인 pET28a에 삽입하여 *E. coli* BL21 균주에 형질전환 시킴.
- LB 배지에 배양하는 형질전환 *E. coli* BL21 배양체에 IPTG를 이용하여 단백질의 과발현을 유도함.
- 후보 단백질을 과발현시킨 *E. coli* 세포를 회수한 뒤 음파파쇄하여 얻은 시료를 직접 이

용하여 BP-3의 직접적 변환을 관찰하였음.

- 후보 단백질 복합체를 과발현시킨 *E. coli*를 음파파쇄하여 얻은 시료를 LC-Q-tof-MS를 통해 BP-3 분해와 그 하위 반응을 통한 중간물질 생성 여부를 분석함
- 그림 196과 같이 *Rhodococcus* sp. BP-3 분해 유전자의 조효소로서 페레독신이 작용하는 것을 이번 후보 유전자 발현 실험을 통하여 규명 할 수 있었음.

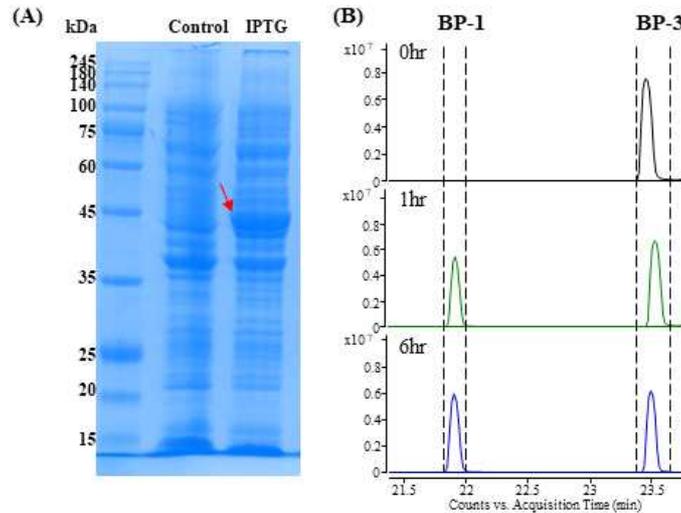


그림 196. 과발현시킨 cytochrome P450 complex와 이를 이용한 BP-3의 전환작용 확인

## ○ 개발효소의 대량 생산 및 산업 적용 기술 개발

### 1. 구축된 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining) 파이프라인을 이용한 유용 유전자 발굴

- 3차년도에서 수행한 Cytochrome P450 복합체 발굴과 동일한 방법으로 관련 유전자들의 기능을 예측하였고 dioxygenation, reduction 기능을 수행하는 유전자 발굴함.
- 미생물이 생성하여 세포벽의 합성을 저해하거나 파괴하여 그람 양성 세균의 성장을 저해하는 lantibiotics는 다환 펩타이드 항생제에 속하며 인간의 간질 환에 영향을 끼친다는 선행 연구를 기반으로 기존에 알려진 lantibiotics 유전자들을 이용하여 인체 내에서 주요하게 존재하는 lantibiotics 생성 유전자와 그에 관여하는 미생물에 대한 연구를 수행하고자 함.
- 알려진 유전자 서열을 query로 BLAST, SSN, GNN을 포함한 구축 파이프라인을 이용하여 휴먼 메타지놈 데이터에서 새로운 lantibiotics 유전자 발굴을 수행함
- 각 서열의 sequence similarity 30%를 기준으로 Type A(그림 197A.)와 Type B(그림 197B.)와 같이 두 종류의 lantibiotics 합성 유전자로 나뉘는 것을 확인함.
- 구축한 파이프라인에서 수행되는 단백질 서열들의 기원, 기능, 전체서열, 도메인 등과 같은 정보의 목록화를 기반으로 얻어진 클러스터를 형성한 서열의 유래 미생물에 대한 정보 역시 확인하였음 (그림 197).

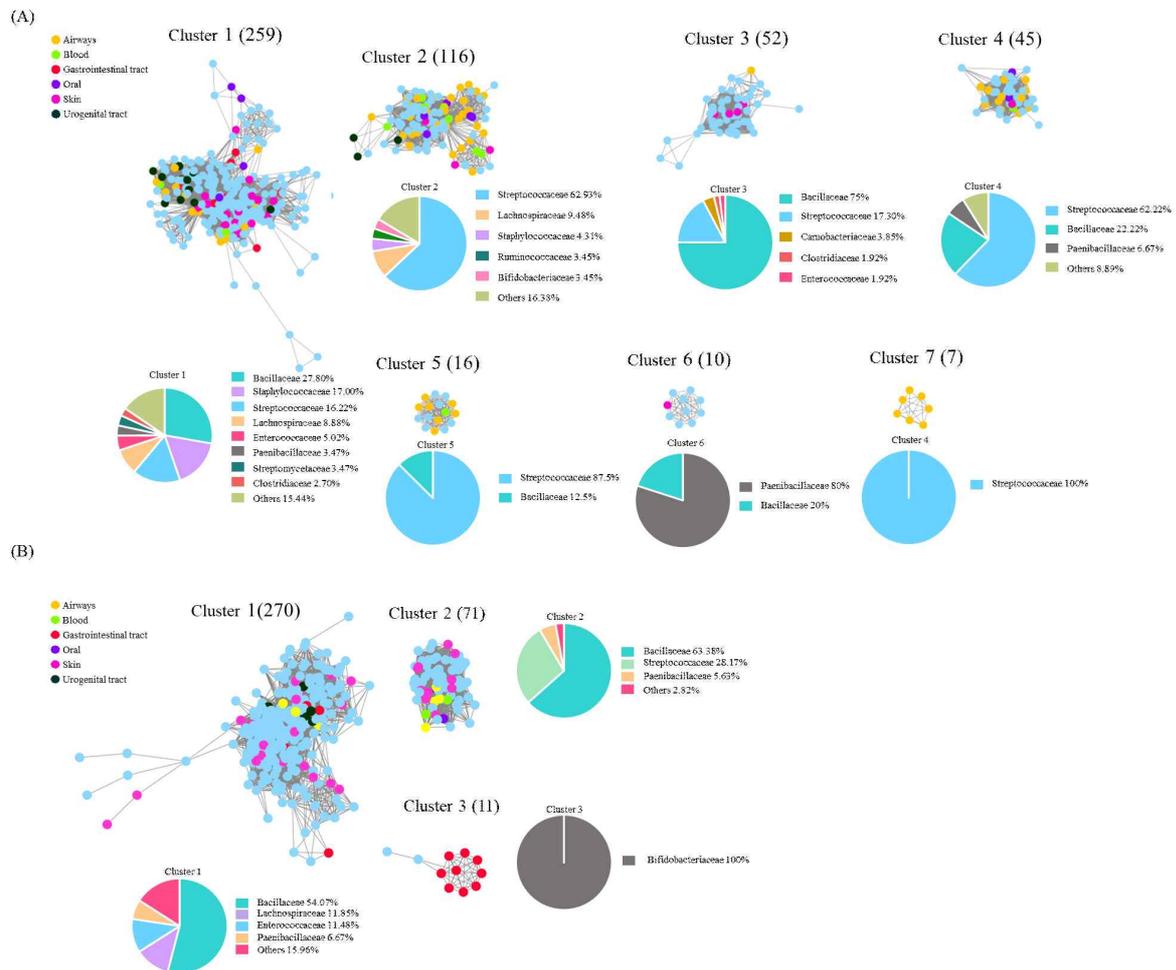


그림 197. 새로운 lantibiotics 유전자 발굴을 목적으로 파이프라인을 이용하여 query 서열을 Human metagenome data에 BLAST한 후 획득한 서열의 SSN 분석 결과 (sequence similarity >30%)

- 획득한 두 종류의 lantibiotics가 실제 간질환과 연관성이 있는 지를 확인하기 위하여 건강한 그룹과 간질환(liver cirrhosis) 그룹 내 prevalence를 비교하였고 Type A lantibiotics의 두 번째 cluster와 Type B lantibiotics의 첫 번째 cluster가 건강한 사람들과 비교하였을 때 간질환 그룹 내의 prevalence가 높게 나타남(그림 198).

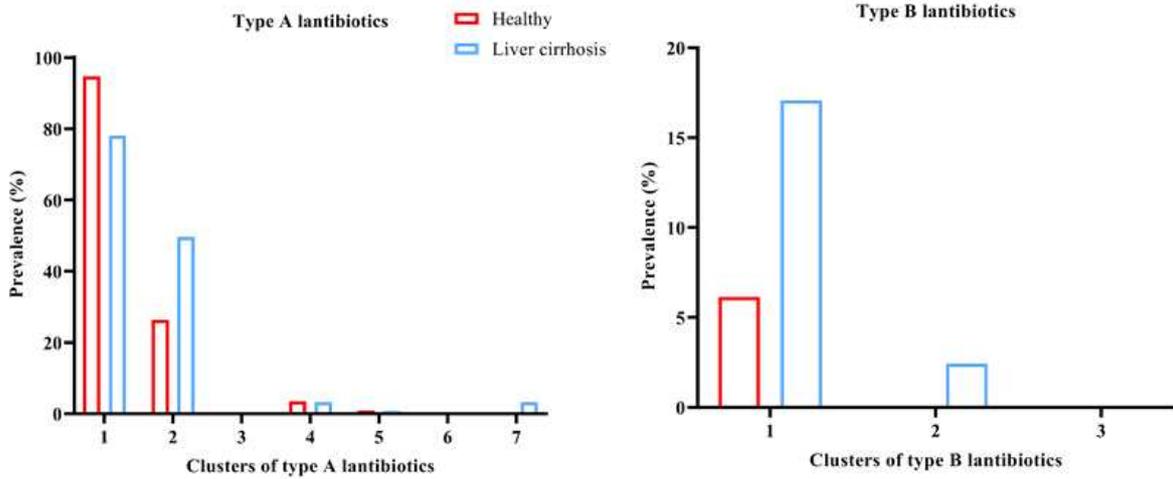


그림 198. 건강한 그룹과 간질환이 있는 그룹 내 두 종류의 lantibiotics 그룹의 prevalence 분석

- Type A lantibiotics의 두 번째 cluster와 Type B lantibiotics의 첫 번째 cluster 내의 단백질 서열들의 Genome neighborhood network(GNN) 분석을 수행하였고(그림 199) 그 중 각각 histidine kinase 와 response regulator를 암호화한 유전자 *scnK*와 *scnR*을 이웃 유전자로 갖는 *Streptococcus vestibularis* ATCC 49124(그림 199A), *Streptococcus* sp. C150(그림 199B) 두 균주의 lantibiotics 유전자를 후보 유전자로 선정함.

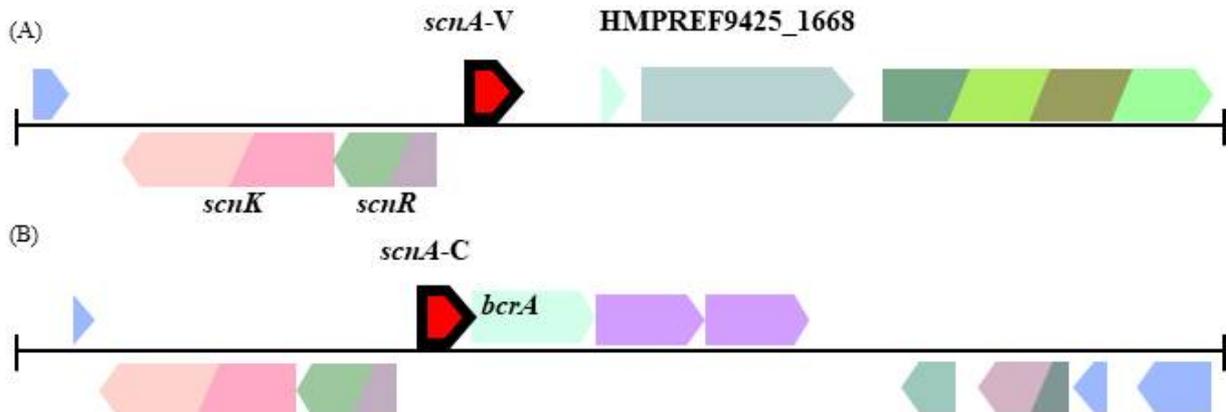


그림 199. 획득한 두 종류의 lantibiotics의 건강한 그룹과 간질환이 있는 그룹 내 prevalence 분석

- 선정된 2개의 후보 유전자가 실제 간 건강에 영향을 끼치는 지에 대한 기능적 실험을 수행하기 위하여 각 유전자의 상위 서열, 유전자의 하위 서열, 그리고 유전자 내부 서열 두 곳을 선정하여 2개의 프라이머 세트를 통해 유전자의 결실이 생긴 목표 유전자를 포함하는 플라스미드를 구축하였고 사용한 lantibiotics 유전자 결실 돌연변이 균주를 생성하는 실험 방법을 그림 200에 나타냄.

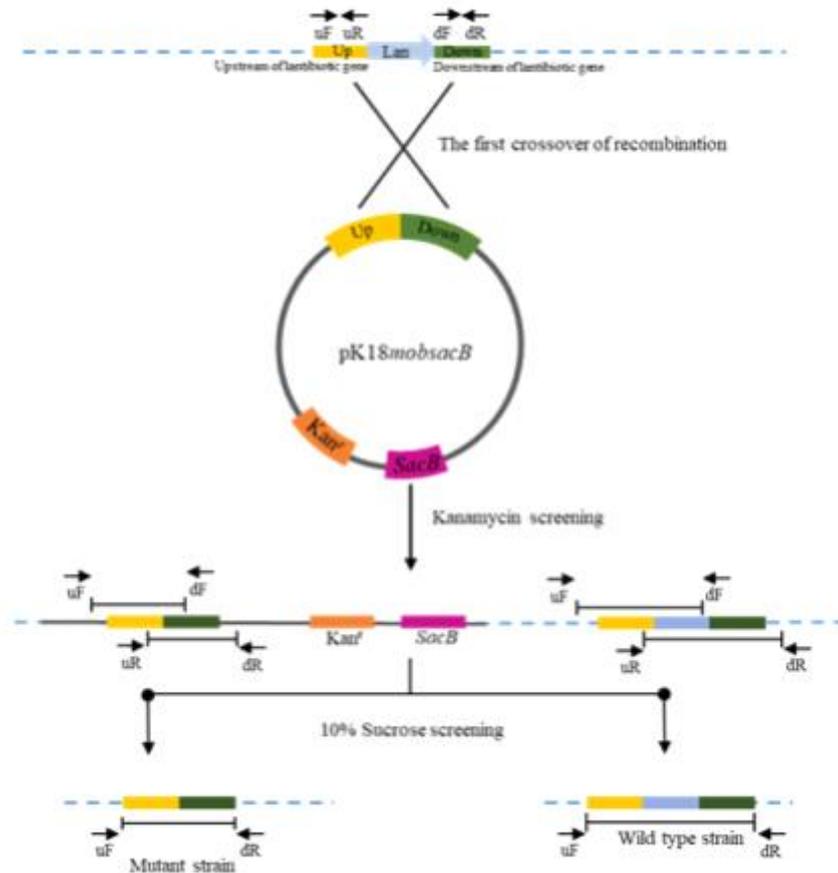


그림 200. 후보 유전자 mutant를 만들기 위한 실험 과정 모식도

- 이러한 과정을 통해 구축한 플라스미드를 전기천공법을 통해 각각 두 균주 내로 도입하여 형질전환 시켰고 lantibiotics 후보 유전자가 결실을 PCR을 통해 확인함.
- 획득한 2개의 각 lantibiotics 후보유전자 mutant 균주를 이용하여 실제 사람의 간 건강에 영향을 끼치는 지에 대한 기능을 확인해보고자 두 균주와 mutant 균주의 Huh-7.5 세포에 대한 독성 실험을 수행함.
- 필터한 지수기 균주 배양액 4개를 Huh-7.5 세포에 첨가 후 배양하였고 6시간이 지난 후 tryphan blue assay를 통해 세포독성 실험을 수행함. 2개의 각 lantibiotics 후보유전자 mutant 균주가 야생형 균주와 비교하였을 때 확연히 세포독성이 감소하는 결과를 보임(그림201)
- 위 결과를 바탕으로 구축한 파이프라인을 이용하여 2개의 lantibiotics 유전자를 발굴하였고 인간의 간세포에 독성을 나타내는 것을 확임함을 통해 인간의 건강에 직접적인 영향을 끼칠 수 있음을 시사함.

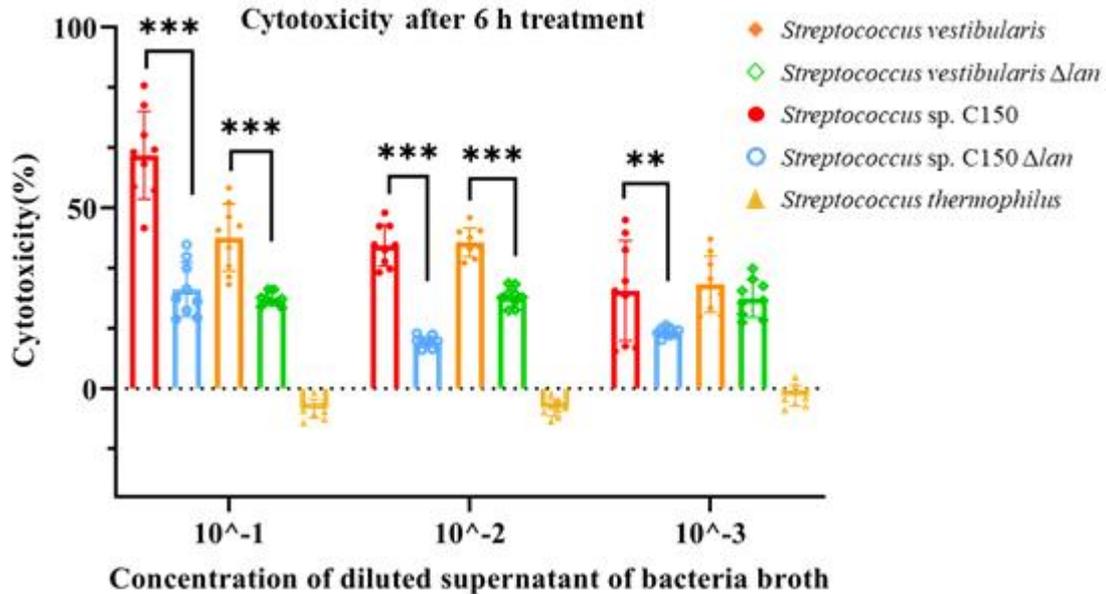


그림 201. 야생형 균주와 후보 유전자 mutant 균주의 세포 독성 실험 결과

## 2. Cytochrome P450 효소 특성 분석 및 산업 적용에 적합한 배지와 생산과정의 최적화

- 3차년도에서 페레독신을 조효소로 이용함을 확인하였고 그와 더불어 cytochrome P450 복합체에서 이용하는 환원력을 파악하기 위한 분석을 수행함
- Cytochrome P450 단백질 복합체의 기질로 이용되는 0.2 μM의 BP-3와 100 μM의 NADH 또는 NADPH를 50 mM의 Tris buffer (pH 8.0)에 첨가한 후 단백질 복합체를 과발현시킨 *E.coli*를 음파파쇄하여 얻은 crude extract와 함께 30 °C에서 반응시킨 후 생성되는 물질을 LC-Q-Tof-MS를 통해 분석함
- BP-3를 BP-1으로 전환시키는 반응을 수행하는 Cytochrome P450 복합체에서 NADPH 첨가 시 전환 반응이 나타나지 않고, NADP 첨가시에만 BP-1으로의 전환이 나타나는 것을 확인(그림 202)
- 모든 결과를 기반으로 Cytochrome P450 복합체가 유도하는 BP-3를 BP-1으로 전환시키는 반응은 조효소로 페레독신과 NADH를 이용함을 시사함.

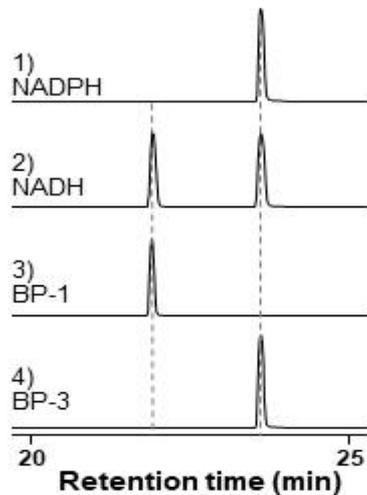


그림 202. Cytochrome P450 단백질 복합체를 과발현시킨 *E.coli*를 음파파쇄하여 얻은 crude extract를 이용하여 수행한 환원력 분석

- 효소의 substrate range를 파악하기 위하여 하위 경로에서 생산되는 BP-3와 구조적으로 유사한 물질인 BP-1에서의 전환 반응을 확인함.
- *E.coli*를 음파파쇄하여 얻은 Cytochrome P450 단백질 복합체의 crude extract와 0.2  $\mu$ M의 BP-1과 100  $\mu$ M의 NADH를 50 mM의 Tris buffer (pH 8.0)에 첨가하여 30  $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 나타나는 BP-1의 감소와 생성물을 LC-Q-ToF-MS를 통해 분석하여 BP-1 전환에 Cytochrome P450 복합체의 관여 여부를 확인함.
- BP-3의 구조적 유사체인 BP-1의 양이 감소하지 않는 것을 통해 cytochrome P450가 수행한다고 알려진 hydroxylation 또는 oxidation 등의 반응이 BP-3의 구조적 유사체인 BP-1에서는 나타나지 않음(그림 203)

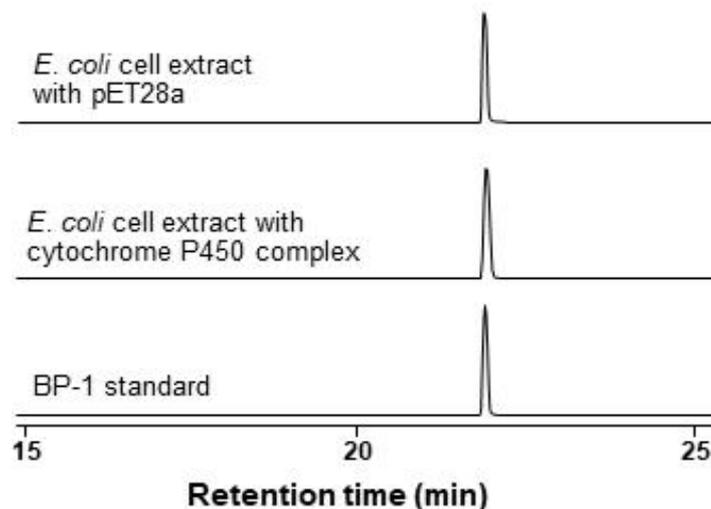


그림 203. BP-3의 demethylation을 수행하는 cytochrome P450 complex의 효소 substrate range 분석

- BP-3의 분해의 첫 단계에 작용하는 단백질 cytochrome P450의 효소 생산과정의 최적화

를 위해 *E. coli*를 숙주로 이용한 단백질 과발현에 적합한 발현 조건을 분석

- *E. coli*를 숙주로 이용한 단백질 과발현에 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 제공하는 조건(EXP1)과 1 mM IPTG, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>, 그리고 0.5mM  $\delta$ -aminolevulinic acid를 제공하는 조건(EXP2)에서의 단백질 과발현의 비교 분석 수행
- 기존의 *E. coli* 단백질 과발현 조건인 EXP1과 비교하였을 때, 새롭게 제시한 EXP2 조건에서 단백질 과발현이 증가하는 결과를 보임(그림 204)

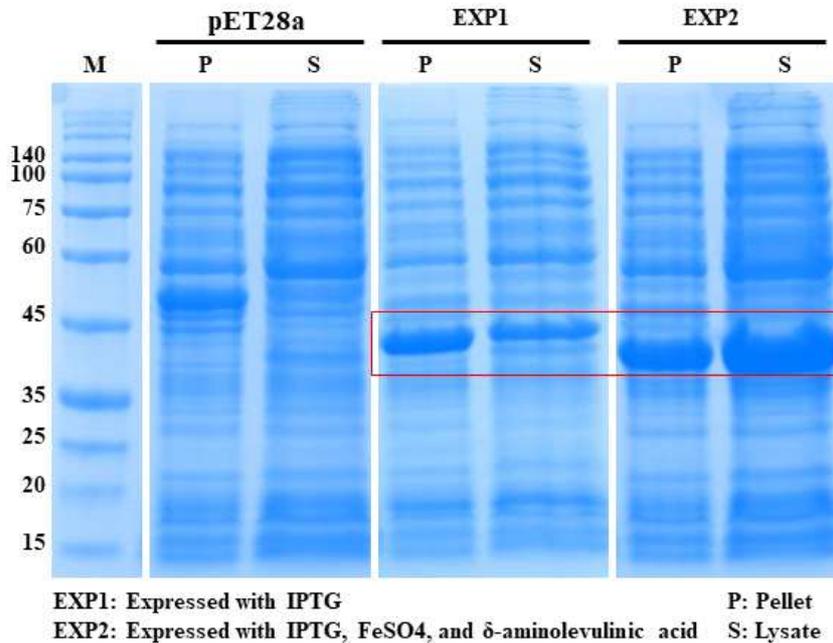


그림 204. *E. coli*를 숙주로 이용한 Cytochrome P450 단백질 과발현에 적합한 발현 조건 분석

### 3. 구축한 파이프라인을 이용한 새로운 효소 발굴 메커니즘 제시

- 최근 연구에서 같은 기능을 수행함에도 불구하고 annotation되지 않는 metagenome 내 단백질 서열을 BLAST를 통해 얻고 얻은 서열들의 기능적 검증을 통해 새로운 기능성 목표 단백질을 밝혀냄(그림 205)

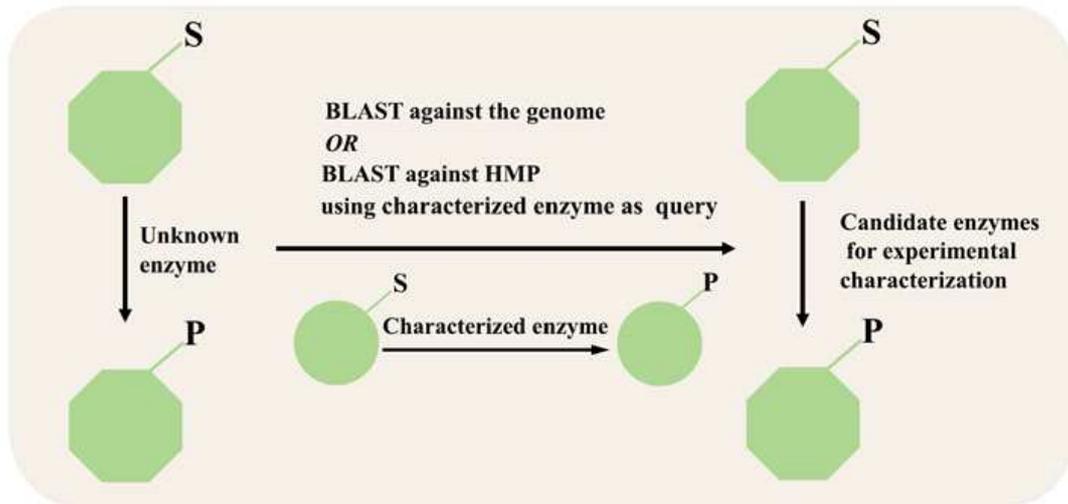


그림 205. BLAST를 통해 human metagenome data에서 새로운 기능 단백질을 찾는 방법

- 본 연구에서도 배양가능한 미생물에만 한정되어 새로운 단백질을 분리하던 기존 방법과는 달리 환경 메타지놈 데이터를 기반으로 목표 단백질을 분리하는 새로운 파이프라인을 구축함.
- BLAST를 통해 서열이 유사한 단백질을 얻음과 동시에 얻은 단백질 간의 서열 유사성, 기능 및 구조적 연관관계를 기반으로 단백질 간의 네트워크를 구축하여 같은 기능을 수행할 것으로 예상되는 서열간의 클러스터링을 수행하여 원하는 후보 단백질의 선정을 용이하게 함(그림 206A,B.).
- 단백질 서열들의 클러스터링과 더불어 목표 단백질과 이웃하는 단백질의 기능을 visualization 하여 기존의 밝혀진 단백질과 함께 클러스터링된 단백질 중 실제 기능을 할 것으로 보이는 목표 단백질의 발굴을 용이하게 함(그림 206C,D.).

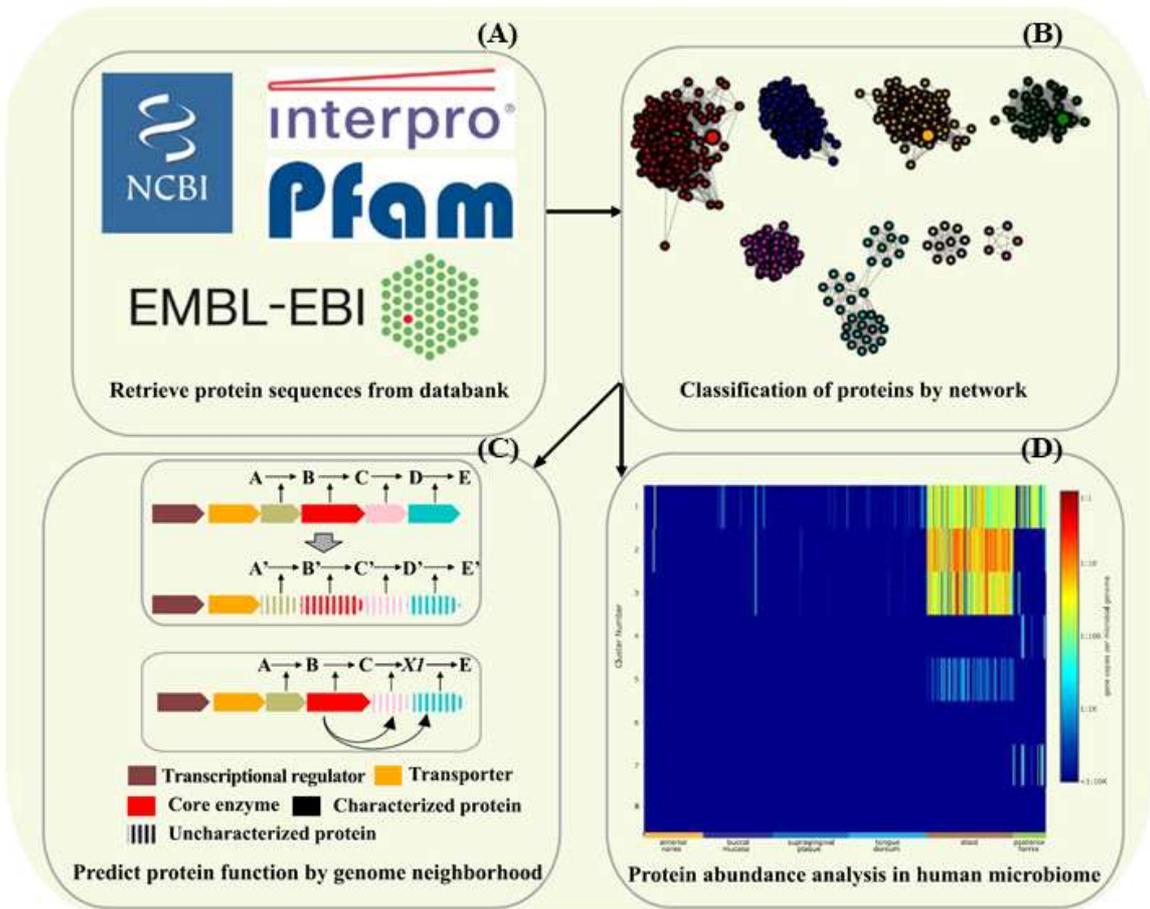


그림 206. 본 연구를 통해 구축한 파이프라인을 통해 새로운 기능을 수행하는 효소 발굴 메카니즘 제시

- 본 과제에서 구축한 방법을 통해 현재 방대하게 생성되는 환경 메타지놈 데이터 상에서의 신규 유전자를 대량으로 탐색하는 대용량 유전자 발굴 파이프라인의 구축하고 이를 산업적 공정에서 이용되는 epimerase, 환경에서 이용될 수 있는 cytochrome P450 유전자 등의 유용 효소 개발에 이용함.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

- 
- 메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석
    - : 설사 송아지의 숙주 전사체, 장내 박테리아 전사체, 장내 박테리아 군집을 차세대 염기서열 기법으로 분석하여 장내미생물 군집의 불균형 및 용혈성 박테리오파지의 증가가 송아지 설사의 원인을 밝혔음
  - 대변무리이식 (fecal microbiota transplantation)을 통한 송아지 설사 완화 연구
    - : 4 단계에 걸친 스크리닝으로 까다로운 건강한 분변 공여 송아지 선별 조건을 확립하였음
    - : 항생제 비의존적인 분변이식법의 송아지 설사 치료효과가 95%에 이르고, 생후 20개월 이상의 비육단계에 이르러서는 농가 수익과 직결된 체중 및 근내지방 증가와 같은 도축성적이 향상되었음
  - 수컷 거세에 의한 장내미생물 군집변화/육질 향상 기작 규명
    - : 설치류 및 반추동물 모델을 이용해서 수컷 거세에 의해 근육 내 지방 (마블링)증가 매커니즘을 처음 규명하였음
    - : 근육 내 지방증가에 관여하는 장내미생물 및 물질을 규명/확보하여 경제동물의 생산성 향상 목적의 프로바이오틱/사료첨가 제제 개발을 위한 원천기술을 확보하였음
  - 국산 및 중국산 상품 김치의 원산지에 따른 김치 내 세균/바이러스 군집 구조 분석
    - : 국산 및 중국산 상품 김치의 원산지에 따른 김치 내 세균/바이러스 군집 구조 분석을 통해 마이크로바이옴 기술을 기반으로 김치의 원산지 판별이 가능함
  - 대용량 메타유전체 정보 분석 및 이를 활용한 농식품 환경 내 미생물 자원 탐색
    - 작물 근권 메타유전체 분석을 통한 기주-미생물 상호작용 관련 핵심 마이크로바이옴 정보 분석
      - : 토마토 풋마름병 저항성 품종 및 감수성 품종의 근권 메타유전체 분석을 통해 기주-미생물 상호작용 및 식물 기능성 미생물 자원 발굴 등에 활용할 마이크로바이옴 정보를 재구성함
    - 메타유전체 해독 염기서열을 이용한 향토 발효음식의 마이크로바이옴 분석
      - : 향토 발효식품 젓갈 표본 선정, 수집 및 미생물 군집 구조 분석
  - 메타유전체 정보 분석 기반 핵심 미생물의 기능 분석 및 미생물-작물 상호작용의 이해
    - 작물 근권 마이크로바이옴 연구를 위한 메타유전체 정보 기반의 미생물 균주 수집
      - : 병저항성 관련 미생물 확보를 위한 culture collection 구축하고 병저항성 근권 유래의 다양한 미생물군의 균주들을 확보함
    - 메타유전체 정보 분석 기반 선정 미생물의 작물 병저항성 관련 기능 분석
      - : 메타유전체 정보 분석을 활용하여 도출된 후보 미생물들의 병저항성 관련 기능성을 분석함
    - 병저항성 기여 핵심 미생물의 식물병원성 미생물 및 기주와의 상호작용 분석
      - : 대용량 염기서열 해독 기술을 활용한 식물병 저항성 기여 균주의 병원성 미생물과 기주와의 상호작용 분석 및 파악
    - 메타유전체 정보 기반 향토 발효음식 유래 미생물 자원 발굴
      - : 향토 발효식품 유래 미생물 자원의 다양성 탐색 및 기능성 발굴을 위한 표적 미생물 균주들의 유전체 정보 확보
  - 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining) 파이프라인 구축
    - : 본 연구에서 새롭게 구축한 파이프라인을 이용하여 epimerase, 오염물질(BP-3) 생분해 개시 효소, peptide로 구성된 lantibiotics 등의 기능을 수행하는 새로운 효소 또는 유전자를 발굴하였고
-

파이프라인에서 사용하는 방법을 정리하여 새로운 유용 효소 발굴 방법을 제시하는 논문으로 게재함

- 구축된 대용량 유전자 발굴(high throughput gene mining) 파이프라인을 이용하여 고성능·고효율의 유용 효소의 발굴
  - : 고온 환경(*Novibacillus thermophilus*) 및 고염 환경(candidate divison MSBL1 archaeon SCGC-AAA259J03) 유래 D-psicose 3-epimerase를 발굴
  - : 호열성균 *Caldanaerobacter subterraneus* 유래 D-fructose-4-epimerase를 발굴
  - : 환경 오염 물질인 benzophenone-3 분해 관련 효소의 발굴
  - : 그람 양성 세균의 성장을 저해하고 인간의 간 건강에 영향을 주는 lantibiotics 2종 발굴
- 숙주 시스템에서의 효소 발현 조건 최적화 및 최적 효소 활성 분석
  - : *E.coli* 내에서의 Cytochrome P450 효소 기능 시 필요한 조효소 규명
- 개발 효소의 대량 생산 및 산업 적용 기술 개발
  - : *E.coli*를 숙주로 하여 Cytochrome P450 효소 발현 증대 조건 확립
- 메타오믹스 분석을 통한 고기능성 바이오소재 발굴 및 응용 방안 모색
  - : 유전체/메타유전체/대사체 정보 분석을 통한 유용 생물자원의 시스템적 확보
- 미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원

**(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)**

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		3	7	9	75	3	75			
1차년도	목표	0	1	0	15	1	15			
	실적	2	1	0	24	0	27			
2차년도	목표	1	2	3	20	1	20			
	실적	0	2	5	184	2	193			
3차년도	목표	1	2	3	20	1	20			
	실적	0	2	3	59	0	64			
4차년도	목표	1	2	3	20	0	20			
	실적	1	2	3	36	1	43			
계	목표	3	7	9	75	3	75			
	실적	3	7	11	303	3	327			

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표				연구기반지표				
	지식 재산권	기술 실시	사업화	기술	학술성과	교육	인력	정책 활용홍	기타

	(이전)											논문		학술발표	지도	양성	보		(타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	인증	SC I	비 SC I				논문평균 IF	정책활용		홍보전시
												건	건							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	15											10	30		20	10			
최종목표	1	1									15		5	16	8		2			
1차년도	목표										1		5	2			0			
	실적										4		5.6	6			1			
2차년도	목표										5		5	4	4		1			
	실적										4		4.1	13	7		2			
3차년도	목표	1									4		5	5	1		0			
	실적	1									5		5.5	10	3		2			
4차년도	목표		1								5		5	5	3		1			
	실적	2	2								9	1	8.0	5	6		7			
소계	목표	1	1								15	0	5	16	8		2			
	실적	3	2								22	1	6.3	34	16		12			
종료 1차년도																				
종료 2차년도																				
종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소계																				
합계																				

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Kocuria rhizophila</i> BT304	Complete genome sequence	18.10.09	NG-1039	0.00173
2	<i>Humibacter aquilariae</i> BT305	Complete genome sequence	18.10.09	NG-1040	0.00237
3	전략미생물유전체	한우 소장에서 분리한 전략 미생물 유전체 해독	21.10.21	igem-0002177	0.6915

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	고온 내성 D-psicose-3-epimerase 유전자	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	19.11.07	igem-0000975	0.379
2	고염 내성 D-psicose-3-epimerase 유전자 (candidate divison MSBL1 archaeon SCGC-AAA259J03)	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	19.11.06	igem-0000945	1.608
3	호열성균 유래 D-fructose-4-epimerase 유전자 (Caldanaerobacter subterraneus)	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	19.11.06	igem-0000947	0.429
4	Benzophenone-3 디메틸화효소	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	20.10.27	igem-0002081	0.803
5	Benzophenone-1 산화환원효소	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	20.10.27	igem-0002082	0.803
6	Benzophenone-3 의 분해 경로의 dioxygenation 기능 유전자	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	22.01.26	igem-002700	0.52
7	Benzophenone-3 의 분해 경로의 reduction 기능 유전자	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	22.01.26	igem-002701	0.57

□ 표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Paracoccus tegillarcae</i> BM15(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000780 -1	0.004
2	<i>Flammeovirga pectinis</i> L12M1(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000781 -1	0.007
3	<i>Undibacterium piscinae</i> S11R28(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000782 -1	0.005
4	<i>Jeotgalibaca ciconiae</i> H21T32(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000783	0.003
5	<i>Iodobacter ciconiae</i> H11R3(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000784 -1	0.004
6	<i>Pontibacillus salipaludis</i>	<i>Pontibacillus salipaludis</i> 유전체 분석	20.10.21	igem-0001938	0.05
7	<i>Alkalihalobacillus hwajinpoensis</i>	<i>Alkalihalobacillus hwajinpoensis</i> 유전체 분석	20.10.21	igem-0001939	0.0012
8	<i>Tetragenococcus halophilus</i> YJ1	<i>Tetragenococcus halophilus</i> YJ1 유전체 분석	20.10.21	igem-0001940	0.0004
9	표준미생물유전체1	한우 소장에서 분리한 전략 미생물 유전체 해독	2021.10.21	igem-0002178	0.8973
10	표준미생물유전체2	한우 소장에서 분리한 전략 미생물 유전체 해독	2021.10.21	igem-0002179	0.6922
11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain SiA1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain SiA1 유전체 분석	2021.12.31	igem-0002685	0.365234

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	성체 거세 한우의 반추위	성체 거세 한우의 반추위 내	18.10.29	NN-5183	0.06241

	미생물 군집_1	박테리아 NGS 유전체 서열			
2	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_2	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5184	0.09643
3	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_3	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5185	0.05966
4	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_4	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5186	0.09705
5	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_5	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5187	0.14974
6	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_6	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5188	0.1064
7	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_7	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5189	0.08802
8	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_8	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5190	0.05743
9	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_9	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5191	0.29659
10	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_10	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5192	0.11161
11	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_1	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5193	0.18527
12	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_2	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5194	0.05172
13	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_3	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5195	0.10156
14	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_4	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5196	0.134
15	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_5	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5197	0.0651
16	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_6	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5198	0.15058
17	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_7	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5199	0.0935
18	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_8	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5200	0.0622
19	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_9	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5201	0.09074
20	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_10	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5202	0.11603
21	국산 및 중국산 상품 김치의 세균군집	국산 및 중국산 김치의 metagenome에서 세균의 16S rDNA amplicon NGS 결과	18.10.01	NN-5138	0.076
22	토마토 Hawaii 7996의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	토마토 Hawaii 7996의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	18.10.27	igem-0000167	3.17
23	토마토 Moneymaker의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	토마토 Moneymaker의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	18.11.07	igem-0000190	3.07
24	상토 내 시간별 세균 군집	상토 내 시간별 세균 군집	18.11.07	igem-0000191	3.12
25	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (1)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000519	0.064
26	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (2)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000520	0.050
27	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (3)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000521	0.051
28	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (4)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000522	0.062
29	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000523	0.051

	분석 (5)				
30	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (6)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000524	0.071
31	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (7)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000525	0.056
32	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (8)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000526	0.053
33	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (9)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000527	0.042
34	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (10)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000598	0.059
35	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (11)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000599	0.048
36	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (12)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000600	0.057
37	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (13)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000601	0.047
38	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (14)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000602	0.048
39	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (15)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000603	0.043
40	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (16)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000604	0.052
41	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (17)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000605	0.049
42	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (18)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000606	0.065
43	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (19)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000607	0.060
44	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (20)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000608	0.052
45	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (21)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000609	0.064
46	메타오믹스 기반 장내	설사-건강 반복 송아지 한우의	19.10.17	igem-0000610	0.050



	분석 (38)				
63	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (39)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000627	0.044
64	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (40)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000628	0.051
65	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (41)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000629	0.043
66	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (42)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000630	0.045
67	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (43)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000631	0.042
68	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (1)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000528	0.258
69	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (3)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000529	0.209
70	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (4)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000530	0.271
71	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (5)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000531	0.272
72	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (6)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000532	0.280
73	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (7)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000533	0.287
74	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (8)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000534	0.266
75	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (9)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000535	0.278
76	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (10)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000536	0.269
77	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (11)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000537	0.257
78	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (12)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000538	0.261
79	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (15)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000539	0.170
80	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (17)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000540	0.213
81	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (18)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000541	0.284
82	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (1)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000542	0.271



	입증 항생제 대조군 실험 (23)	서열			
105	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (1)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000597	0.072
106	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (3)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000585	0.093
107	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (5)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000586	0.106
108	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (6)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000587	0.071
109	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (7)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000588	0.101
110	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (10)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000589	0.081
111	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (11)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000590	0.039
112	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (12)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000591	0.079
113	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (13)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000592	0.078
114	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (14)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000593	0.041
115	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (18)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000594	0.085
116	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (20)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000595	0.084
117	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (21)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000596	0.094
118	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (3)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000566	0.251
119	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (5)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000567	0.241
120	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (6)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000568	0.274
121	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (8)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000569	0.299
122	대변무리이식 연구를 통한 설사	분변이식 수여 송아지 한우의	19.10.17	igem-0000570	0.264

	송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (9)	분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열			
123	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (10)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000571	0.221
124	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (12)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000572	0.365
125	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (13)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000573	0.197
126	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (14)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000574	0.220
127	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (18)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000575	0.209
128	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (19)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000576	0.250
129	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (20)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000577	0.297
130	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (21)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000578	0.346
131	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (22)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000579	0.349
132	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (27)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000580	0.344
133	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (28)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000581	0.306
134	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (31)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000582	0.237
135	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (33)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000583	0.344
136	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (34)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000584	0.346
137	국산 상품김치 K1-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000851	0.700
138	국산 상품김치 K1-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000857	0.567
139	국산 상품김치 K1-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000858	0.910
140	국산 상품김치 K2-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000852	0.532
141	국산 상품김치 K2-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000859	0.539
142	국산 상품김치 K2-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000860	0.625
143	국산 상품김치 K3-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000853	0.532
144	국산 상품김치 K3-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000861	0.621
145	국산 상품김치 K3-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000862	0.670
146	국산 상품김치 K4-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000854	0.654
147	국산 상품김치 K4-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000871	0.626

148	국산 상품김치 K4-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000872	0.679
149	국산 상품김치 K5-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000856	0.588
150	국산 상품김치 K5-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000873	0.570
151	국산 상품김치 K5-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000874	0.851
152	국산 상품김치 K6-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000875	0.520
153	국산 상품김치 K6-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000876	0.674
154	국산 상품김치 K6-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000877	0.562
155	국산 상품김치 K7-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000878	0.599
156	국산 상품김치 K7-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000879	0.815
157	국산 상품김치 K7-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000880	0.870
158	국산 상품김치 K8-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000881	0.623
159	국산 상품김치 K8-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000882	0.658
160	국산 상품김치 K8-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000883	0.703
161	국산 상품김치 K9-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000884	0.491
162	국산 상품김치 K9-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000885	0.659
163	국산 상품김치 K9-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000886	0.534
164	국산 상품김치 K10-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000887	0.586
165	국산 상품김치 K10-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000888	0.745
166	국산 상품김치 K10-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000889	0.576
167	중국산 상품김치 C1-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000890	0.442
168	중국산 상품김치 C1-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000891	0.701
169	중국산 상품김치 C1-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000892	0.572
170	중국산 상품김치 C2-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000893	0.417
171	중국산 상품김치 C2-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000894	0.590
172	중국산 상품김치 C2-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000895	0.728
173	중국산 상품김치 C3-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000896	0.482
174	중국산 상품김치 C3-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000897	0.645
175	중국산 상품김치 C3-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000907	0.611
176	중국산 상품김치 C4-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000908	0.587
177	중국산 상품김치 C4-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000909	0.714
178	중국산 상품김치 C4-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000910	0.614
179	중국산 상품김치 C5-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000911	0.660
180	중국산 상품김치 C5-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000914	0.667

	바이러스 메타지놈	군집 분석			
181	중국산 상품김치 C5-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000915	0.580
182	중국산 상품김치 C6-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000916	0.712
183	중국산 상품김치 C6-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000917	0.645
184	중국산 상품김치 C6-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000919	0.626
185	중국산 상품김치 C7-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000920	0.811
186	중국산 상품김치 C7-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000921	0.560
187	중국산 상품김치 C7-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000922	0.582
188	중국산 상품김치 C8-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000923	0.618
189	중국산 상품김치 C8-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000924	0.589
190	중국산 상품김치 C8-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000925	0.508
191	중국산 상품김치 C9-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000926	0.664
192	중국산 상품김치 C9-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000927	0.672
193	중국산 상품김치 C9-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000928	0.531
194	중국산 상품김치 C10-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000929	0.756
195	중국산 상품김치 C10-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000931	0.604
196	중국산 상품김치 C10-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.04	igem-0000933	0.524
197	2달 숙성된 조기젓	2달 숙성된 조기젓의 메타지놈 서열 해독	19.11.01	igem-0000869	0.08
198	1년 숙성된 조기젓	1년 숙성된 조기젓의 메타지놈 서열 해독	19.11.01	igem-0000870	0.12
199	2년 숙성된 조기젓	2년 숙성된 조기젓의 메타지놈 서열 해독	19.10.30	igem-0000818	0.11
200	갈치젓	갈치젓의 메타지놈 서열 해독	19.10.30	igem-0000825	0.15
201	잡젓	잡젓의 메타지놈 서열 해독	19.11.01	igem-0000868	0.06
202	경작 전 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	경작 전 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.23	igem-0000735	133.62
203	분얼기 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	분얼기 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.23	igem-0000736	125.00
204	수잉기 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	수잉기 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.23	igem-0000761	124.54
205	등숙기 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	등숙기 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000763	125.31
206	분얼기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	분얼기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000764-1	133.13
207	수잉기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	수잉기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000765-1	126.00
208	등숙기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	등숙기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000766-1	124.19
209	토마토 Hawaii 7996 종자 세균 군집	토마토 Hawaii 7996 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001952	0.34
210	토마토 Moneymaker 종자 세균 군집	토마토 Moneymaker 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001953	0.38
211	토마토 주이켄 종자 세균 군집	토마토 주이켄 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001954	0.35
212	토마토 영광 종자 세균 군집	토마토 영광 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001955	0.39
213	토마토 Hawaii 7996 종자 진균 군집	토마토 Hawaii 7996 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001956	0.40

214	토마토 Moneymaker 종자 진균 군집	토마토 Moneymaker 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001957	0.37
215	토마토 주이켄 종자 진균 군집	토마토 주이켄 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001958	0.39
216	토마토 예광 종자 진균 군집	토마토 예광 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001960	0.37
217	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (1)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001581	0.029606
218	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (2)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001582	0.034414
219	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (3)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001583	0.055222
220	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (4)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001584	0.035135
221	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (5)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001585	0.031523
222	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (6)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001586	0.036713
223	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (7)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001587	0.033108
224	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (8)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001588	0.075402
225	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (9)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001589	0.035762
226	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (10)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001590	0.035655
227	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (11)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001591	0.034595
228	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (12)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001592	0.081937
229	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (1)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001593	0.079731
230	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (2)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001594	0.036713
231	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (3)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001595	0.035535

232	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (4)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001596	0.032591
233	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (5)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001597	0.050701
234	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (6)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001598	0.032947
235	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (7)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001599	0.066858
236	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (8)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001600	0.035645
237	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (9)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001601	0.034275
238	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (10)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001602	0.032479
239	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (11)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001603	0.035707
240	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (12)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001604	0.035655
241	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (13)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001605	0.032808
242	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (14)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001606	0.081761
243	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (15)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001607	0.032947
244	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (16)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001608	0.081937
245	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (17)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001609	0.037378
246	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (18)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001610	0.079731
247	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (19)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001611	0.033142
248	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아	20.10.22	igem-0001613	0.053551

	입증 실험군 실험 후 12개월차 (1)	NGS 유전체 서열			
249	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (2)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001614	0.08582
250	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (3)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001615	0.03873
251	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (4)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001616	0.070591
252	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (5)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001617	0.03207
253	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (6)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001618	0.036253
254	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (7)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001619	0.031827
255	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (8)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001620	0.030562
256	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (9)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001621	0.081703
257	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (10)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001622	0.08582
258	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (11)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001623	0.033686
259	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (12)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001624	0.083438
260	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (13)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001625	0.034645
261	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (14)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001626	0.034645
262	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (15)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001627	0.076864
263	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (16)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001628	0.045609
264	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (17)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001629	0.08264

265	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (18)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001630	0.038412
266	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (19)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001631	0.035176
267	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (20)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001632	0.070016
268	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (1)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002181	0.132174
269	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (2)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002182	0.140003
270	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (3)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002183	0.123466
271	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (4)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002184	0.140382
272	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (5)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002185	0.131216
273	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (6)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002186	0.128224
274	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (1)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002187	0.120202
275	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (2)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002188	0.114603
276	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (3)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002189	0.108918
277	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (4)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002190	0.109773
278	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (5)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002191	0.098762
279	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (6)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002192	0.099492
280	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (1)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002193	0.109260
281	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (2)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002194	0.107177
282	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (3)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002195	0.108676
283	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (4)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002196	0.115382
284	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (5)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002197	0.118221
285	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (6)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002198	0.138059

286	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (1)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002199	0.099310
287	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (2)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002200	0.104803
288	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (3)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002201	0.106591
289	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (4)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002202	0.223976
290	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (5)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002203	0.136050
291	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (6)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002204	0.114245
292	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (1)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002205	0.116884
293	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (2)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002206	0.124459
294	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (3)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002207	0.114512
295	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (4)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002208	0.128410
296	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (5)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002209	0.131478
297	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (6)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002210	0.142945
298	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (1)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002211	0.106368
299	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (2)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002212	0.140698
300	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (3)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002213	0.104995
301	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (4)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002214	0.179417
302	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (5)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002215	0.209305
303	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (6)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002216	0.194080

### □ 유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)
1	김치 바이러스 군집 분석	Linux 기반 bioinformatic tools를 이용한 김치 바이러스 군집 분석 pipeline 구축	19.11.06	igem-0000946	2.561
2	네트워크 분석을 통한 바이러스 유전체의 분류 및 동정	바이러스 메타유전체의 단백질 정보를 이용한 네트워크 형성을 활용한 분석법	19.11.07	igem-0000974	1.714
3	장내 전사체 분석	숙주 장내미생물 상호작용	21.10.21	igem-0002180	0.000004

		규명을 위한 장내 전자체 분석 기술			8
--	--	---------------------	--	--	---

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Kocuria rhizophila</i> BT304	Complete genome sequence	18.10.09	NG-1039	0.00173
2	<i>Humibacter aquilariae</i> BT305	Complete genome sequence	18.10.09	NG-1040	0.00237
3	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_1	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5183	0.06241
4	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_2	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5184	0.09643
5	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_3	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5185	0.05966
6	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_4	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5186	0.09705
7	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_5	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5187	0.14974
8	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_6	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5188	0.1064
9	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_7	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5189	0.08802
10	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_8	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5190	0.05743
11	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_9	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5191	0.29659
12	성체 거세 한우의 반추위 미생물 군집_10	성체 거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5192	0.11161
13	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_1	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5193	0.18527
14	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_2	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5194	0.05172
15	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_3	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5195	0.10156
16	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_4	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5196	0.134
17	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_5	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5197	0.0651
18	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_6	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5198	0.15058
19	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_7	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5199	0.0935
20	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_8	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5200	0.0622
21	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_9	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5201	0.09074
22	성체 비거세 한우의 반추위 미생물 군집_10	성체 비거세 한우의 반추위 내 박테리아 NGS 유전체 서열	18.10.29	NN-5202	0.11603
23	국산 및 중국산 상품 김치의 세균군집	국산 및 중국산 김치의 metagenome에서 세균의 16S rDNA amplicon NGS 결과	18.10.11	NN-5138	0.076
24	토마토 Hawaii 7996의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	토마토 Hawaii 7996의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	18.10.27	igem-0000167	3.17
25	토마토 Moneymaker의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	토마토 Moneymaker의 상토 재배 시간별 근권 세균 군집	18.11.07	igem-0000190	3.07
26	상토 내 시간별 세균 군집	상토 내 시간별 세균 군집	18.11.07	igem-0000191	3.12
27	<i>Paracoccus tegillarcae</i> BM15(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000780-1	0.004
28	<i>Flammeovirga pectinis</i> L12M1(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000781-1	0.007
29	<i>Undibacterium piscinae</i> S11R28(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000782-1	0.005
30	<i>Jeotgalibaca ciconiae</i> H21T32(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000783	0.003
31	<i>Iodobacter ciconiae</i> H11R3(T)	Complete genome sequence	19.10.24	igem-0000784	0.004

				-1	
32	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (1)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000519	0.064
33	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (2)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000520	0.050
34	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (3)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000521	0.051
35	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (4)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000522	0.062
36	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (5)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000523	0.051
37	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (6)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000524	0.071
38	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (7)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000525	0.056
39	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (8)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000526	0.053
40	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (9)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000527	0.042
41	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (10)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000598	0.059
42	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (11)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000599	0.048
43	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (12)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000600	0.057
44	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (13)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000601	0.047
45	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (14)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000602	0.048
46	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (15)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000603	0.043
47	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (16)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000604	0.052

48	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (17)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000605	0.049
49	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (18)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000606	0.065
50	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (19)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000607	0.060
51	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (20)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000608	0.052
52	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (21)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000609	0.064
53	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (22)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000610	0.050
54	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (23)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000611	0.047
55	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (24)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000612	0.061
56	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (25)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000613	0.052
57	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (26)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000614	0.062
58	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (27)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000615	0.041
59	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (28)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000616	0.070
60	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (29)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000617	0.044
61	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (30)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000618	0.061
62	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (31)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000619	0.053
63	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (32)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000620	0.044
64	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체	19.10.17	igem-0000621	0.044

	규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (33)	서열			
65	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (34)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000622	0.046
66	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (35)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000623	0.046
67	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (36)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000624	0.060
68	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (37)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000625	0.060
69	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (38)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000626	0.050
70	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (39)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000627	0.044
71	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (40)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000628	0.051
72	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (41)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000629	0.043
73	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (42)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000630	0.045
74	메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석 (43)	설사-건강 반복 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000631	0.042
75	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (1)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000528	0.258
76	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (3)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000529	0.209
77	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (4)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000530	0.271
78	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (5)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000531	0.272
79	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (6)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000532	0.280
80	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (7)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000533	0.287
81	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (8)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000534	0.266
82	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 (9)	전해질 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000535	0.278



	입증 항생제 대조군 실험 (16)	서열			
105	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (17)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000558	0.191
106	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (18)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000559	0.222
107	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (19)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000560	0.231
108	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (20)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000561	0.230
109	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (21)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000562	0.211
110	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (22)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000563	0.274
111	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 (23)	항생제 투여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000564	0.224
112	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (1)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000597	0.072
113	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (3)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000585	0.093
114	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (5)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000586	0.106
115	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (6)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000587	0.071
116	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (7)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000588	0.101
117	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (10)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000589	0.081
118	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (11)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000590	0.039
119	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (12)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000591	0.079
120	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (13)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000592	0.078
121	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (14)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000593	0.041
122	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (18)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000594	0.085

123	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (20)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000595	0.084
124	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 건강한 분변 공여 송아지 장내미생물 군집 (21)	분변 공여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000596	0.094
125	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (3)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000566	0.251
126	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (5)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000567	0.241
127	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (6)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000568	0.274
128	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (8)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000569	0.299
129	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (9)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000570	0.264
130	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (10)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000571	0.221
131	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (12)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000572	0.365
132	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (13)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000573	0.197
133	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (14)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000574	0.220
134	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (18)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000575	0.209
135	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (19)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000576	0.250
136	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (20)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000577	0.297
137	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (21)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000578	0.346
138	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (22)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000579	0.349
139	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (27)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000580	0.344
140	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (28)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000581	0.306
141	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (31)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000582	0.237
142	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (33)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000583	0.344
143	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험 (34)	분변이식 수여 송아지 한우의 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	19.10.17	igem-0000584	0.346

144	국산 상품김치 K1-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000851	0.700
145	국산 상품김치 K1-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000857	0.567
146	국산 상품김치 K1-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000858	0.910
147	국산 상품김치 K2-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000852	0.532
148	국산 상품김치 K2-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000859	0.539
149	국산 상품김치 K2-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000860	0.625
150	국산 상품김치 K3-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000853	0.532
151	국산 상품김치 K3-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000861	0.621
152	국산 상품김치 K3-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000862	0.670
153	국산 상품김치 K4-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000854	0.654
154	국산 상품김치 K4-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000871	0.626
155	국산 상품김치 K4-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000872	0.679
156	국산 상품김치 K5-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.10.31	igem-0000856	0.588
157	국산 상품김치 K5-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000873	0.570
158	국산 상품김치 K5-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000874	0.851
159	국산 상품김치 K6-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000875	0.520
160	국산 상품김치 K6-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000876	0.674
161	국산 상품김치 K6-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000877	0.562
162	국산 상품김치 K7-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000878	0.599
163	국산 상품김치 K7-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000879	0.815
164	국산 상품김치 K7-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000880	0.870
165	국산 상품김치 K8-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000881	0.623
166	국산 상품김치 K8-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000882	0.658
167	국산 상품김치 K8-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000883	0.703
168	국산 상품김치 K9-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000884	0.491
169	국산 상품김치 K9-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000885	0.659
170	국산 상품김치 K9-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000886	0.534
171	국산 상품김치 K10-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000887	0.586
172	국산 상품김치 K10-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000888	0.745
173	국산 상품김치 K10-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000889	0.576
174	중국산 상품김치 C1-1의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000890	0.442
175	중국산 상품김치 C1-2의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000891	0.701
176	중국산 상품김치 C1-3의 바이러스 메타지놈	원산지별	상품 김치의 바이러스 군집 분석	19.11.01	igem-0000892	0.572

	바이러스 메타지놈	군집 분석			
177	중국산 상품김치 C2-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.01	igem-0000893	0.417
178	중국산 상품김치 C2-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.01	igem-0000894	0.590
179	중국산 상품김치 C2-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.01	igem-0000895	0.728
180	중국산 상품김치 C3-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.01	igem-0000896	0.482
181	중국산 상품김치 C3-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.01	igem-0000897	0.645
182	중국산 상품김치 C3-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000907	0.611
183	중국산 상품김치 C4-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000908	0.587
184	중국산 상품김치 C4-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000909	0.714
185	중국산 상품김치 C4-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000910	0.614
186	중국산 상품김치 C5-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000911	0.660
187	중국산 상품김치 C5-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000914	0.667
188	중국산 상품김치 C5-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000915	0.580
189	중국산 상품김치 C6-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000916	0.712
190	중국산 상품김치 C6-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000917	0.645
191	중국산 상품김치 C6-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000919	0.626
192	중국산 상품김치 C7-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000920	0.811
193	중국산 상품김치 C7-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000921	0.560
194	중국산 상품김치 C7-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000922	0.582
195	중국산 상품김치 C8-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000923	0.618
196	중국산 상품김치 C8-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000924	0.589
197	중국산 상품김치 C8-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000925	0.508
198	중국산 상품김치 C9-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000926	0.664
199	중국산 상품김치 C9-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000927	0.672
200	중국산 상품김치 C9-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000928	0.531
201	중국산 상품김치 C10-1의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000929	0.756
202	중국산 상품김치 C10-2의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000931	0.604
203	중국산 상품김치 C10-3의 바이러스 메타지놈	원산지별 상품 김치의 군집 분석	19.11.04	igem-0000933	0.524
204	2달 숙성된 조기젓	2달 숙성된 조기젓의 메타지놈 서열 해독	19.11.01	igem-0000869	0.08
205	1년 숙성된 조기젓	1년 숙성된 조기젓의 메타지놈 서열 해독	19.11.01	igem-0000870	0.12
206	2년 숙성된 조기젓	2년 숙성된 조기젓의 메타지놈 서열 해독	19.10.30	igem-0000818	0.11
207	갈치젓	갈치젓의 메타지놈 서열 해독	19.10.30	igem-0000825	0.15
208	잡젓	잡젓의 메타지놈 서열 해독	19.11.01	igem-0000868	0.06
209	경작 전 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	경작 전 논토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.23	igem-0000735	133.62

210	분얼기 노토양의 전 메타유전체 서열 해독	분얼기 노토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.23	igem-0000736	125.00
211	수잉기 노토양의 전 메타유전체 서열 해독	수잉기 노토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.23	igem-0000761	124.54
212	등숙기 노토양의 전 메타유전체 서열 해독	등숙기 노토양의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000763	125.31
213	분얼기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	분얼기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000764-1	133.13
214	수잉기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	수잉기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000765-1	126.00
215	등숙기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	등숙기 벼 근권 시료의 전 메타유전체 서열 해독	19.10.24	igem-0000766-1	124.19
216	고온 내성 D-psicose-3-epimerase 유전자	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	19.11.07	igem-0000975	0.000379
217	고염 내성 D-psicose-3-epimerase 유전자 (candidate division MSBL1 archaeon SCGC-AAA259J03)	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	19.11.06	igem-0000945	0.001608
218	호열성균 유래 D-fructose-4-epimerase 유전자 (Caldanaerobacter subterraneus)	구축 파이프라인을 통하여 발굴해낸 유용 효소 유전자	19.11.06	igem-0000947	0.000429
219	김치 바이러스 군집 분석	Linux 기반 bioinformatic tools를 이용한 김치 바이러스 군집 분석 pipeline 구축	19.11.06	igem-0000946	2.561
220	네트워크 분석을 통한 바이러스 유전체의 분류 및 동정	바이러스 메타유전체의 단백질 정보를 이용한 네트워크 형성을 활용한 분석법	19.11.07	igem-0000974	1.714
221	토마토 Hawaii 7996 종자 세균 군집	토마토 Hawaii 7996 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001952	0.34
222	토마토 Moneymaker 종자 세균 군집	토마토 Moneymaker 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001953	0.38
223	토마토 주이켄 종자 세균 군집	토마토 주이켄 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001954	0.35
224	토마토 영광 종자 세균 군집	토마토 영광 종자 내생 세균 군집	20.10.23	igem-0001955	0.39
225	토마토 Hawaii 7996 종자 진균 군집	토마토 Hawaii 7996 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001956	0.40
226	토마토 Moneymaker 종자 진균 군집	토마토 Moneymaker 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001957	0.37
227	토마토 주이켄 종자 진균 군집	토마토 주이켄 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001958	0.39
228	토마토 영광 종자 진균 군집	토마토 영광 종자 내생 진균 군집	20.10.23	igem-0001960	0.37
229	<i>Pontibacillus salipaludis</i>	<i>Pontibacillus salipaludis</i> 유전체 분석	20.10.21	igem-0001938	0.05
230	<i>Alkalihalobacillus hwajinpoensis</i>	<i>Alkalihalobacillus hwajinpoensis</i> 유전체 분석	20.10.21	igem-0001939	0.0012
231	<i>Tetragenococcus halophilus</i> YJ1	<i>Tetragenococcus halophilus</i> YJ1 유전체 분석	20.10.21	igem-0001940	0.0004
232	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (1)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001581	0.029606
233	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (2)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001582	0.034414
234	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (3)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001583	0.055222
235	대변무리이식 연구를 통한 설사	전해질 투여 송아지 한우의	20.10.22	igem-0001584	0.035135

	송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (4)	12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열			
236	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (5)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001585	0.031523
237	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (6)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001586	0.036713
238	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (7)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001587	0.033108
239	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (8)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001588	0.075402
240	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (9)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001589	0.035762
241	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (10)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001590	0.035655
242	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (11)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001591	0.034595
243	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 전해질 대조군 실험 후 12개월차 (12)	전해질 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001592	0.081937
244	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (1)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001593	0.079731
245	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (2)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001594	0.036713
246	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (3)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001595	0.035535
247	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (4)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001596	0.032591
248	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (5)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001597	0.050701
249	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (6)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001598	0.032947
250	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (7)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001599	0.066858
251	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001600	0.035645

	12개월차 (8)				
252	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (9)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001601	0.034275
253	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (10)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001602	0.032479
254	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (11)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001603	0.035707
255	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (12)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001604	0.035655
256	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (13)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001605	0.032808
257	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (14)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001606	0.081761
258	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (15)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001607	0.032947
259	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (16)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001608	0.081937
260	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (17)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001609	0.037378
261	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (18)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001610	0.079731
262	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 항생제 대조군 실험 후 12개월차 (19)	항생제 투여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001611	0.033142
263	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (1)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001613	0.053551
264	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (2)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001614	0.08582
265	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (3)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001615	0.03873
266	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (4)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001616	0.070591
267	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (5)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001617	0.03207
268	대변무리이식 연구를 통한 설사	분변이식 수여 송아지 한우의	20.10.22	igem-0001618	0.036253

	송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (6)	12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열			
269	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (7)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001619	0.031827
270	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (8)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001620	0.030562
271	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (9)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001621	0.081703
272	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (10)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001622	0.08582
273	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (11)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001623	0.033686
274	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (12)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001624	0.083438
275	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (13)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001625	0.034645
276	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (14)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001626	0.034645
277	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (15)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001627	0.076864
278	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (16)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001628	0.045609
279	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (17)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001629	0.08264
280	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (18)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001630	0.038412
281	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (19)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001631	0.035176
282	대변무리이식 연구를 통한 설사 송아지의 설사 증세 개선 효과 입증 실험군 실험 후 12개월차 (20)	분변이식 수여 송아지 한우의 12개월차 분변 내 박테리아 NGS 유전체 서열	20.10.22	igem-0001632	0.070016
283	Benzophenone-3 디메틸화효소	Benzophenone-3 디메틸화효소 유전체 자원	20.11.02	igem-0002081	0.000000 348
284	Benzophenone-1 산화환원효소	Benzophenone-1 산화환원효소 유전체 자원	20.10.27	igem-0002082	0.000000 392
285	전략미생물유전체	한우 소장에서 분리한 전략 미생물 유전체 해독	2021.10.21	igem-0002177	0.6915
286	표준미생물유전체1	한우 소장에서 분리한 전략 미생물 유전체 해독	2021.10.21	igem-0002178	0.8973

287	표준미생물유전체2	한우 소장에서 분리한 전략 미생물 유전체 해독	2021.10.21	igem-0002179	0.6922
288	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (1)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002181	0.132174
289	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (2)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002182	0.140003
290	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (3)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002183	0.123466
291	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (4)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002184	0.140382
292	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (5)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002185	0.131216
293	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (6)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002186	0.128224
294	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (1)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002187	0.120202
295	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (2)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002188	0.114603
296	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (3)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002189	0.108918
297	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (4)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002190	0.109773
298	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (5)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002191	0.098762
299	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (6)	0% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002192	0.099492
300	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (1)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002193	0.109260
301	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (2)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002194	0.107177
302	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (3)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002195	0.108676
303	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (4)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002196	0.115382
304	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (5)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002197	0.118221
305	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (6)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002198	0.138059
306	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (1)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002199	0.099310
307	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (2)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002200	0.104803
308	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (3)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002201	0.106591

309	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (4)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002202	0.223976
310	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (5)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002203	0.136050
311	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (6)	3% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002204	0.114245
312	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (1)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002205	0.116884
313	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (2)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002206	0.124459
314	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (3)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002207	0.114512
315	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (4)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002208	0.128410
316	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (5)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002209	0.131478
317	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 (6)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 대장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002210	0.142945
318	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (1)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002211	0.106368
319	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (2)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002212	0.140698
320	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (3)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002213	0.104995
321	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (4)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002214	0.179417
322	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (5)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002215	0.209305
323	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 (6)	5% BCAA를 포함하는 먹이를 급여받은 마우스 소장내용물 내 박테리아 NGS 유전체 서열	21.10.21	igem-0002216	0.194080
324	장내 전사체 분석	숙주 장내미생물 상호작용 규명을 위한 장내 전사체 분석 기술	21.10.21	igem-0002180	0.0000048
325	Pseudoalteromonas sp. strain SiA1	Pseudoalteromonas sp. strain SiA1 유전체 분석	21.12.31	igem-0002685	0.392182414
326	Benzophenone-3 의 분해 경로의 reduction 기능 유전자	Benzophenone-3 의 분해 경로의 reduction 기능 유전자 정보	22.01.26	igem-0002701	0.000000567
327	Benzophenone-3 의 분해 경로의 dioxygenation 기능 유전자	Benzophenone-3 의 분해 경로의 dioxygenation 기능 유전자 정보	22.01.26	igem-0002700	0.000000516

#### □ 병원성미생물진단마커 개발

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

#### □ 병원성미생물 정보 완성

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

□ 미생물 병발생 기작 규명

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

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Complete genome sequence of <i>Kocuria rhizophila</i> BT304, isolated from the small intestine of castrated beef cattle	Gut Pathogens	원태웅, 김현식, 배진우	10	United Kingdom	International Society for Genomic and Evolutionary Microbiology (ISOGEM)	SCI	2018.10.27	10.1186/s13099-018-0270-9	70
2	Fathoming <i>Aspergillus oryzae</i> metabolomes in formulated growth matrices	Critical Reviews in Biotechnology	Digar Singh, Choong Hwan Lee	2018	USA	Taylor & Francis Online	SCI	2018.07.23	10.1080/07388551.2018.1490246	100
3	Untargeted metabolite profiling for koji-fermentative bioprocesses unravels the effects of varying substrate types and microbial inocula	Food Chemistry	Han Sol Seo, Choong Hwan Lee	266	England	Elsevier	SCI	2018.11.15	10.1016/j.foodchem.2018.05.048	100
4	Varying Inocula Permutations ( <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Bacillus amyloliqu</i> )	Journal of Microbiology and Biotechnology	Hye Jeong Gil, Choong Hwan Lee	12	South Korea	Korean Society of Microbiology & Biotechnology	SCI	2018.10.19	10.4014/jmb.1809.09055	100

	efaciens) affect Enzyme Activities and Metabolite Levels in Koji									
5	<i>Paracoccus tegillarcae</i> sp. nov., isolated from the gastrointestinal tract of a blood cockle ( <i>Tegillarca granosa</i> )	INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY	이준영, 배진우	9	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2019.09.01	10.1099/ijsem.0.003561	25
6	<i>Flammeovirga pectinis</i> sp. nov., isolated from the gut of the Korean scallop, <i>Patinopekten yessoensis</i>	INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY	정윤석, 강우람, 배진우	70	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2019.10.15	10.1099/ijsem.0.003783	25
7	Unraveling dynamic metabolomes underlying different maturation stages of berries harvested from <i>Panax ginseng</i>	Journal of Ginseng Research	이미연, 이충환	2019	South Korea	KSG (The Korean Society of Ginseng)	SCI(E)	2019.02.20	doi.org/10.1016/j.jgr.2019.02.002	100
8	Comparative Evaluation of Six Traditional Fermented Soybean Products in East Asia: A Metabolomics Approach	Metabolites	권용성, 이충환	9(9)	Switzerland	MDPI	SCI(E)	2019.09.13	doi.org/10.3390/metabo9090183	100
9	Critical thresholds of 1–October–3 – o l s h a p e	Scientific Reports	Digar Singh, 이충환	10	England	Nature Publishing group	SCIE	2020.07.06	doi.org/10.1038/s41598-020-68096-x	100

	inter-speci ies <i>Aspergillus</i> s interaction s modulating the growth and secondary metabolism									
10	Relationship between the gastrointestinal side effects of an anti-hypertensive medication and changes in the serum lipid metabolome	Nutrients	Yoomin Ahn, Eungbin Kim	12(1)	스위스	MDPI	SCIE	2020.01.	ISSN 2072 -6643	10
11	Metagenomic analysis of the human microbiome reveals the association between the abundance of gut bile salt hydrolases and host health	Gut Microbes	Baloei Jia, 전체옥	11	미국	Taylor & Fancis Online	SCI	2020. 9.2	1949-0984	50
12	Flagellimonas algicola sp. nov., isolated from a Marine Red Alga, <i>Asparagopsis taxiformis</i>	Curr. Microbiol.	김정은, 전체옥	77	독일	Springer	SCI	2020.2.1	0343-8651	50
13	Unraveling microbial fermentation	Applied microbiology and biotechnology	이세희, 전체옥	104	Germany	Springer	SCIE	2020.09.16	1432-0614	50

	features in kimchi: from classical to meta-omics approaches									
14	Male castration increases adiposity via small intestinal microbial alterations	EMBO reports	원태웅, 김현식, 신나리, 배진우	22	Germany	European Molecular Biology Organization	SCI	2021.01.07	1469-221X	50
15	Longitudinal evaluation of fecal microbiota transplantation for ameliorating calf diarrhea and improving growth performance	Nature Communications	김현식, 원태웅, 배진우	12	United Kingdom	Nature Research	SCI	2021.01.08	2041-1723	50
16	Calf Diarrhea Caused by Prolonged Expansion of Autochthonous Gut Enterobacteriaceae and Their Lytic Bacteriophages	mSystems	원태웅, 김현식, 신나리, 성호준, 배진우	6	USA	AMER SOC MICROBIOLOGY	SCIE	2021.03.02	2379-5077	50
17	Comprehensive Metabolite Profiling and Microbial Communities of Doenjang (Fermented Soy Paste) and Ganjang (Fermented Soy Sauce): A Comparative Study	Foods	Da Hye Song, Byung Hee Chun	10	Switzerland	MDPI	SCIE	2021.03.18	N/A (ISSN), 2304-8158 (EISSN)	100
18	Metabolic-Base	Foods	Song-Hui Soung	10	Switzerland	MDPI	SCIE	2021.06.15	N/A (ISSN), 2304-8158	100

	Comparison of Traditional and Industrial Doenjang Samples with Antioxidative Activities								(EISSN)	
19	Metabolite Profiling and Anti-Aging Activity of Rice Koji Fermented with <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Aspergillus cristatus</i> : A Comparative Study	Metabolites	Hyunji Lee, Sunmin Lee	11	Switzerland	MDPI	SCIE	2021.08.08	N/A (ISSN), 2218-1989 (EISSN)	100
20	Diet-Related Alterations of Gut Bile Salt Hydrolases Determined Using a Metagenomic Analysis of the Human Microbiome	International journal of molecular sciences	Baloei Jia, 전체옥	22	Switzerland	MDPI	SCIE	2021.04.01	N/A (ISSN), 1422-0067 (EISSN)	50
21	In situ analysis of the bacterial community associated with the Korean salty fermented seafood jeotgal	Korean Journal of Environmental Biology	김현준	39	Republic of Korea	Korean Society of Environmental Biology	비SCIE	2021.12.31	1226-9999	70
22	<i>Chitinibacter bivalviorum</i> sp. nov., isolated from the gut of the freshwater	International journal of systematic and evolutionary microbiology	최지원, 이재윤, 배진우	71	United Kingdom	Microbiology Society	SCI	2021.07.23	1466-5026	30

	mussel Anodonta arcaeformis									
23	Discovery and mining of enzymes from the human gut microbiome	Trends in Biotechnology	Baloei Jia, 전체옥	40	Netherlands	ELSEVIER SCIENCE LONDON	SCIE	2022.02.01	0167-7799	33

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 10th Asian Symposium on Microbial Ecology	김현식	2018.7.11.-7.13	Okinawa Convention Center	일본
2	The 10th Asian Symposium on Microbial Ecology	원태웅	2018.7.11.-7.13	Okinawa Convention Center	일본
3	Comprehensive Metabolite Profiling for interpretation of the Solid state and Submerged Fermentation of <i>Aspergillus oryzae</i> KCCM 12698	Su Young Son	2018. 06	Seattle	USA
4	한국식물병리학회 추계학술대회	박혜인	2018.10.25	광주, 김대중컨벤션센터	대한민국
5	International Phytobiomes Conference 2018	박혜인	2018.12.04	Le corum, Montpellier	프랑스
6	17th International Symposium on Microbial Ecology	김지현	2018.08.16	Leipzig	독일
7	The 11th Asian Symposium on Microbial Ecology	탁은정	2019.05.10.-05.15	Tunghai University	대만
8	The 11th Asian Symposium on Microbial Ecology	성호준	2019.05.10.-05.15	Tunghai University	대만
9	The 11th Asian Symposium on Microbial Ecology	이소연	2019.05.10.-05.15	Tunghai University	대만
10	한국미생물생명공학회	디가싱	2019.06	제주도	대한민국
11	한국미생물생명공학회	손수영	2019.06	제주도	대한민국
12	Metabolomics 2019	이선민	2019.06	Hague	Netherlands
13	The 15th KOGO Winter Symposium	박혜인	2019.2.12	강원도 홍천, 대명리조트 비발디파크	대한민국
14	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	박혜인	2019.4.17	ICC 제주	대한민국
15	46th Annual Meeting and International Symposium The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	박혜인	2019.6.23	ICC 제주	대한민국
16	46th Annual Meeting and International Symposium The	김수진	2019.6.23	ICC 제주	대한민국

	Korean Society for Microbiology and Biotechnology				
17	FEMS2019	송주연	2019.7.10	SEC centre	영국, 글래스고
18	The 2019 KSPP Fall International Conference & International Symposium for Smart Crop Protection	박혜인	2019.10.16	나주, 중흥 골드스파 & 리조트	대한민국
19	The 2019 KSPP Fall International Conference & International Symposium for Smart Crop Protection	김수진	2019.10.16	나주, 중흥 골드스파 & 리조트	대한민국
20	한국미생물생명공학회	Digar Singh	2020.09	e-Conference	대한민국
21	한국미생물생명공학회	손수영	2020.09	e-Conference	대한민국
22	Plant & Animal Genome XXVIII	송주연	2020.01.13	Town and Country Hotel	미국, 샌디에고
23	The 16th KOGO Winter Symposium	박혜인	2020.02.05.-2020.02.07	대명리조트	대한민국
24	The 16th KOGO Winter Symposium	김수진	2020.02.05.-2020.02.07	대명리조트	대한민국
25	한국식물병리학회	송주연	2020.10.14.-16	e-conference	대한민국
26	MSK 2020 e-conference	이지영	2020.10.07.-08	e-conference	대한민국
27	MSK 2020 e-conference	배진우	2020.10.07.-08	e-conference	대한민국
28	MSK 2020 e-conference	한정은	2020.10.07.-08	e-conference	대한민국
29	MSK 2020 e-conference	최지원	2020.10.07.-08	e-conference	대한민국
30	한국미생물생명공학회	이상희	2021.06.22	부산 벅스코	대한민국
31	한국미생물생명공학회	성송희	2021.06.22	부산 벅스코	대한민국
32	International Meeting of the Microbiological Society of Korea	박재효	2021.08.26.	창원 CECO	대한민국
33	2021 한국환경생물학회 40주년기념 정기학술대회	전규원	2021.10.28.	제주도 휘닉스 섭지코지	대한민국
34	2021 6th mBiome International Conference	송주연	2021.12.10.	서울 연세대학교	대한민국

기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	플라보박테리움 속 TCH3-2 균주를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 용도	대한민국	동아대학교 산학협력단, 연세대학교 산학협력단	2020.03.13	10-2020-0031176		동아대학교 산학협력단, 연세대학교 산학협력단	2021.12.10	10-2339765	20%	
2	아스퍼질러스 균주의 대사 조절 방법	대한민국	이충환	2019.11.13	1020190145061	1022360790000	건국대학교 산학협력단	2021.03.30	1022360790000	100%	부
3	대변 미생물총을 포함하는 가축 증체용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2021.10.20.	10-2021-0140179					100%	
4	가지사슬아미노산을 포함하는 증체용 사료 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2021.11.18	10-2021-0159706					100%	

지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
2				√						

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

국내표준

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

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

- \* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- \* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1</sup>	사업화 형태 <sup>2</sup>	지역 <sup>3</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

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

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

고용 창출

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

고용 효과

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

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

□ 법령 반영

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

□ 정책활용 내용

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

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
	학위취득	2019	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			2	3	2		3	4	7				
	학위취득	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				3				3	3				
	학위취득	2021	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			2	3	1		4	2	6				

□ 산업 기술 인력 양성

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

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	생물학연구정보센터(BRIC)	Untargeted metabolite profiling for koji-fermentative bioprocess unravels the effects of varying substrate types and microbial inocula	2018.07.30

2	기타	샘터 인문교양시리즈 아우름40	미생물에게 어울려 사는 법을 배운다-보이지 않는 것들의 보이는 매력	2019.10.22
3	기타	iMAF 공감! 소식지 제5호	생생연구현장	2019.09.30
4	중앙일간지	에너지경제신문 외	우리나라에서 발견된 과수 화상병균의 유전체 해독	2020.09.28
5	기타	전업농신문	마이크로바이옴, 한우 육질과 증체량, 폐사율 결정해	2021.01.21
6	기타	국제뉴스	마이크로바이옴, 한우 육질과 증체량, 폐사율을 결정한다	2021.01.21
7	기타	라이브팜뉴스	마이크로바이옴, 한우 육질 증체량 조절... 폐사율까지 결정	2021.01.22
8	기타	한국식품정보신문	"마이크로바이옴이 한우 육질과 증체량·폐사율 결정"	2021.01.22
9	중앙일간지	문화일보	"한우 腸內 마이크로바이옴이 마블링·육질 향상시켜"	2021.01.25
10	기타	농축산기계신문	"장내 미생물이 한우품질 좌우" 농기평, 마이크로바이옴 근내지방 매커니즘 밝혀내	2021.01.25
11	기타	한우신문	마이크로바이옴, 육질·증체량 조절...설사치료까지	2021.02.02
12	기타(신문)	더리더, 대학저널, 베리타스알파	연세대 토마토 마이크로바이옴 연구팀, 한광호 농업연구상 수상	2020.02.11.-12

### □ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	한광호농업상 농업연구상	토마토 마이크로바이옴과 식물병 사이의 관련성 입증을 통한 파이토타이옴 연구의 신기원을 개척하여 대한민국 농업 발전에 기여	토마토 마이크로바이옴 연구팀(곽민정, 공현기, 최기혁, 권순경, 송주연)	2020.1.30	재단법인 한광호 기념사업회

### [인프라 성과]

### □ 연구시설·장비

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

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

### [그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

## 고용창출

고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태	고용창출내용
김민수	충남대학교	2018-09-01	정규직	충남대학교 생명시스템과학대학 미생물분자생명과학과 조교수 임용
현동욱	경희대학교	2019-03-01	계약직	경희대학교 이과대학 생물학과 학술연구교수 임용
현동욱	씨제이제일제당(주)	2021-01-25	정규직	씨제이제일제당(주) 입사
김현식	경희대학교 산학협력단	2021-03-01	계약직	경희대학교 산학협력단 산단연구원 채용
김필수	엘지전자(주)	2021-07-12	정규직	엘지전자(주) 입사

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
○ 메타오믹스 기반 장내 숙주-박테리아-바이러스 관계 규명을 통한 송아지 설사 원인 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 설사 송아지의 숙주 전사체, 장내 박테리아 전사체, 장내 박테리아 군집을 차세대 염기서열 기법 (NGS, Next-generation sequencing)으로 분석하여 장내미생물 군집의 불균형 (dysbiosis) 및 용혈성 박테리오파지 (lytic bacteriophages)의 증가가 송아지 설사의 원인임을 밝혔음</li> </ul>	100
○ 대변무리이식을 통한 송아지 설사 완화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 단계에 걸친 스크리닝으로 까다로운 건강한 분변 공여 송아지 선별 조건을 확립하였음</li> <li>• 설사 송아지의 인위적인 장내 미생물 군집 조절을 통해 병증을 완화시키고 송아지 폐사 비율을 감소시킴</li> <li>• 생후 20개월 이상의 비육단계에 이르러서는 농가 수익과 직결된 체중 및 근내지방 증가와 같은 도축성적이 향상되었음</li> </ul>	100
○ 국산 및 중국산 상품 김치의 원산지에 따른 김치 내 세균/바이러스 군집 구조 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 김치의 원산지에 따른 김치 내 세균 및 바이러스 군집을 차세대 염기서열 기법을 적용하여 분석하였음</li> <li>• 세균 및 바이러스 군집을 기반으로 김치의 원산지 예측 및 판별이 가능함</li> </ul>	100
○ 전통발효식품의 발효과정에 따른 세균 및 바이러스 군집변화 비교분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 발효식품 중 김치를 대상으로 선정하고, 발효 단계별 세균 군집의 변화를 확인함</li> </ul>	100
○ 농축산식품 분야 유용 미생물 자원의 대사체 분석 표준화 기술 확립에 따른 핵심 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농축산식품 분야 유용 미생물 자원의 대사체 분석을 위한 추출방법 확립 및 GC-MS 및 LC-MS 기반 분석 기법 표준화 확립에 따른 핵심 기술 확보함</li> </ul>	100
○ 다양한 농축산식품 분야 미생물자원의 대사체 프로파일링 연구 통한 기능성 대사체 소재화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효 미생물 <i>Tetragenococcus</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Bacillus</i> 프로파일링에 따른 surfactin, oxylipin 에 대한 기능성 대사체 소재화를 하였음</li> </ul>	100
○ 신규 농축산식품 분야 유용 미생물 자원의 고부가가치 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효 미생물 <i>Aspergillus</i>, <i>Bacillus</i>에 대한 신규 연구 방법인 Metabolite cross feeding (MCF) 적용에 따른 고부가가치 대사체인 surfactin, oxylipin 고부가가치 소재를 개발함</li> </ul>	100
○ 대용량 메타유전체 정보 분석 및 이를 활용한 농식품 환경 내 미생물 자원 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 작물 근권 메타유전체 분석을 통한 기주-미생물 상호작용 관련 핵심 마이크로바이옴 정보 분석: 토마토 풋마름병 저항성 품종 및 감수성 품종의 근권 메타유전체 분석을 통해 기주-미생물 상호작용 및 식물 기능성 미생물 자원 발굴 등에 활용할 마이크로바이옴 정보를 재구성함</li> </ul>	100

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 메타유전체 해독 염기서열을 이용한 향토 발효음식의 마이크로바이옴 분석: 향토 발효식품 젓갈 표본 선정, 수집 및 미생물 균집 구조 분석</li> </ul>	100
○ 메타유전체 정보 분석 기반 핵심 미생물의 기능 분석 및 미생물-작물 상호작용의 이해	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 작물 근권 마이크로바이옴 연구를 위한 메타유전체 정보 기반의 미생물 균주 수집: 병저항성 관련 미생물 확보를 위한 culture collection 구축하고 병저항성 근권 유래의 다양한 미생물군의 균주들을 확보함</li> <li>• 메타유전체 정보 분석 기반 선정 미생물의 작물 병저항성 관련 기능 분석: 메타유전체 정보 분석을 활용하여 도출된 후보 미생물들의 병저항성 관련 기능성을 분석함</li> <li>• 병저항성 기여 핵심 미생물의 식물병원성 미생물 및 기주와의 상호작용 분석: 대용량 염기서열 해독 기술을 활용한 식물병 저항성 기여 균주의 병원성 미생물과 기주와의 상호작용 분석 및 파악</li> <li>• 메타유전체 정보 기반 향토 발효음식 유래 미생물 자원 발굴: 향토 발효식품 유래 미생물 자원의 다양성 탐색 및 기능성 발굴을 위한 표적 미생물 균주들의 유전체 정보 확보</li> </ul>	100
○ 미생물 연구개발 네트워크를 활용한 메타유전체 연구 협력 및 정보 분석 지원	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 미생물유전체전략연구사업단 내 연구과제들의 협력·연계 네트워크를 활용하여 전 메타유전체 연구 및 생물정보 빅데이터 처리·분석 수요에 대해 공동연구를 추진하고 분석 정보를 생산, 제공함</li> </ul>	100
○ 고효율 신규 유전자를 대량으로 탐색하여 확보할 수 있는 대용량 유전자 발굴 파이프라인을 구축 및 유용효소 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전자 발현 숙주 시스템에서의 발현 조건 최적화 및 최적 효소 활성 분석</li> </ul>	100
○ 전략 미생물 해독 3건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전략 미생물 해독 3건</li> </ul>	100
○ 유용 유전 자원 확보 7건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유용 유전 자원 확보 7건</li> </ul>	100
○ 표준 유전체 해독 9건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준 유전체 해독 11건</li> </ul>	122
○ 메타 유전체 분석 75건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 메타 유전체 분석 303건</li> </ul>	404
○ 유전체 분석 기술 개발 3건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전체 분석 기술 개발 3건</li> </ul>	100
○ NABIC 등록 75건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NABIC 등록 327건</li> </ul>	436
○ SCI(E) 논문 15편	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SCI(E) 논문 22편</li> </ul>	146
○ 논문 평균 IF 5.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 논문 평균 IF 6.3</li> </ul>	126
○ 학술 발표 16건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 학술 발표 34건</li> </ul>	212
○ 전문 연구 인력 양성 8건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전문 연구 인력 양성 16건</li> </ul>	200
○ 특허 출원 1건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특허 출원 3건</li> </ul>	300
○ 특허 등록 1건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특허 등록 2건</li> </ul>	200
○ 홍보 전시 2건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 홍보 전시 13건</li> </ul>	650

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

해당없음.

## 2) 자체 보완활동

해당없음.

## 3) 연구개발 과정의 성실성

해당없음.

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 기존에 알려진 송아지 설사 원인체(박테리아, 바이러스 또는 원충)의 감염이 근본적인 설사의 원인은 아님을 제시하여 새로운 설사 치료법의 타겟을 확인하였고, 항생제를 이용한 설사 치료가 되려 미생물 군집의 불균형을 심화시키는 독으로 작용할 수 있음을 축산업 분야에 새롭게 제시하였음
- 항생제 비의존적인 분변이식법이 송아지 설사 치료를 통한 경제동물의 생산성 증대에 기여하고, 항생제 오남용 문제를 해결할 수 있음. 설사 치료효과가 95%에 이르고, 생후 20개월 이상의 비육단계에 이르러서는 농가 수익과 직결된 체중 및 근내지방 증가와 같은 도축성적이 향상되었음. 단순한 설사치료법이 아니라 축산업 분야에 경제적인 기여도 역시 높은 연구결과임. 또한 4 단계에 걸친 스크리닝으로 까다로운 건강한 송아지 선별 조건을 확립하였으며, 이를 통해 축산업 분야에도 마이크로바이옴 기반 치료법이 활발히 도입될 수 있는 기준이 마련되었음 (Multidisciplinary Sciences 분야 상위 6% 저널인 Nature Communications (2020 IF=14.919)에 2021년 1월 발표)
- 수컷 거세에 의해 근육 내 지방(마블링)증가 매커니즘을 처음 규명한 연구로 반추동물 연구에서 전세계 대다수의 연구자들이 반추위에 주목한 반면 본 연구에서는 상대적으로 잘 알려지지 않은 소장 및 대장의 미생물 군집 변화에 주목하였음. 이번 연구에서 웅성호르몬 감소에 의해 소장에서 급격하게 증가하는 미생물 역시 아직까지 포유류에서의 기능 및 역할이 잘 알려지지 않은 종으로 밝혀짐. 본 연구를 통해 마이크로바이옴 기반의 친환경 프로바이오틱 제제를 개발하여 고품질의 경제동물을 생산할 수 있고 농가소득의 증대와 밀접한 관련이 있는 결과를 제시하였음
- 농축산식품 분야 유용 미생물 자원의 대사체 분석결과와 메타유전체 분석결과와 통합 분석을 통해 미생물 자원의 통합 대사 경로 구축에 따른 기초 연구 자료 확보
- 농축산식품 분야 미생물 자원의 메타메타볼롬 통합적 프로파일링을 통한 발효 표준화 관련 지표물질 선정 및 주요성분 분석기술 등에 대한 지적 기술력 확보
- 본 연구에서 얻어진 원천기술을 이용해 다양한 농축산식품 미생물 자원 유래 기능성 대사체 소재 확보
- 본 연구에서는 농식품 환경 마이크로바이옴 분석 및 환경 내 미생물 자원 탐색을 통해 작물 및 발효식품 유용 미생물과 미생물 유전 정보를 다수 확보함으로써 미생물의 해당 환경 내 기능 및 생태를 파악하기 위한 기반을 구축함. 특히, 본 과제의 선행 연구에서 도출된바 있는, 풋마름병 저항성, 감수성 품종의 비교 메타유전체 분석 기반의 식물 병저항성 기여 핵심 미생물 균주 발굴 연구 사례는 마이크로바이옴 연구를 통한 새로운 개념의 미생물 기능 발굴 연구 방법론을 제시함으로써 식물 병리 및 식물 미생물 등 관련 분야에서 신규성과 학문적 가치를 인정받아 Nature Biotechnology 저널에 게재되었음(Kwak *et al.*, 2018). 본 연구에서 추가로 확보한 생물정보 및 생물자원은 식물 관련 미생물의 다양한 기능성 연구, 기주-미생물 상호작용 등 식물 마이크로바이옴 연구를 위한 기반 연구 자료로서의 활용이 기대됨
- 최근 마이크로바이옴 연구를 위해 전 메타유전체 해독 분석 연구가 다수 진행되고 있으나 근권, 토양 등 생물학적 다양성이 높고 복잡한 미생물 군집을 포함하는 환경의 경우, 전 메타유전체 분석 기술 및 대용량 염기서열 분석 시스템 이용 등에 대한 접근 장벽이 높음. 따라서 근권, 발효식

---

품 등 농식품 환경의 비교 전 메타유전체 분석 경험을 가지고 있는 본 과제에서 마이크로바이옴 분석 역량을 활용, 미생물유전체전략연구사업단 내 네트워크 활용 협력 연구를 추진하여 식물 마이크로바이옴 대용량 염기서열 해독 및 마이크로바이옴 분석 정보를 생산, 제공함

---

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

- 마이크로바이옴 기반의 친환경 프로바이오틱 제제를 개발하여 비교적 적은 사양관리 비용 및 사육기간에 체중 및 육질등급이 우수한 고품질의 경제동물을 생산할 수 있고 이를 통해 농가의 수익 증대에 기여할 수 있도록 활용함
  - GC-MS 및 LC-MS 기반 분석 기법 확립에 따른 발효 미생물 (*saccharomyces*, *streptococcus*, *lactobacillus* 등)의 확장 연구를 통해 기능성 대사체를 추가 발굴
  - 본 연구에서 확립한 신규 미생물 상호작용 연구 방법인 Metabolite cross feeding (MCF) 방법을 발효 미생물 프로바이오틱스 (*Bifidobacterium*, *Lactiplantibacillus*, *Lactiplantibacillus*) 에 적용함으로써 발효 미생물 공생에 기여하는 고부가가치 대사체 소재 개발
  - 미생물 자원의 통합 대사 경로 구축에 따른 기초 연구 자료를 확보함으로써 고부가가치 기능성 대사산물 발굴 및 원천기술 확보에 따른 농축산식품 분야 기술이전 가능
  - 유용 미생물자원의 메타메타볼롬 프로파일링 연구를 통한 기능대사체 소재화를 통한 국내 농축산식품 시장 확대
  - 신규 농축산식품 미생물자원의 고부가가치 소재 개발을 통한 산업화 지원
  - 본 연구에서 분석, 수집, 도출한 농식품 환경 내 주요 미생물군의 정보와 미생물 자원은 다양한 분야의 유용 미생물 발굴 자료로 활용될 수 있음. 식물병 저항성 관련 미생물들의 역할 및 병원성 미생물에 대한 메커니즘 규명, 미생물-식물 상호작용 연구, 식물병 제어 기술 개발 등 기초 또는 응용 연구를 위한 기초 자료로 활용 가능함
  - 병저항성 품종 근원 유래의 미생물 기능 탐색 결과를 토대로 유용 미생물 균주들의 작물 생육 환경 개선, 농작물 생산성 증진, 식물병 방제, 친환경 미생물 제제 연구개발 등에 이용할 수 있음
  - 향토 발효식품으로부터 수집한 미생물 균주 자원, 유전체 정보 등 기초 연구 자료들로 제공하며 식품 미생물 및 농식품 미생물 유래 소재 개발 등을 위한 자원으로 활용 가능함
  - 전 메타유전체 분석 기술 및 연구 역량을 활용하여 농식품 환경 전 메타유전체 서열 해독을 통한 마이크로바이옴 분석 연구에 기술 지원하거나 협력 연구를 추진하여 연구 가치가 높은 환경 내 미생물의 역할 파악 연구에 활용함
-

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	0	
	비SCIE	0	
	계	0	
국내논문	SCIE	0	
	비SCIE	0	
	계	0	
특허출원	국내	0	
	국외	0	
	계	0	
특허등록	국내	0	
	국외	0	
	계	0	
인력양성	학사	0	
	석사	0	
	박사	0	
	계	0	
사업화	상품출시	0	
	기술이전	0	
	공정개발	0	
제품개발	시제품개발	0	
비임상시험 실시		0	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	0
		2상	0
		3상	0
	의료기기	0	
진료지침개발		0	
신의료기술개발		0	
성과홍보		0	
포상 및 수상실적		0	
정성적 성과 주요 내용		0	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

### 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 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.