

축산식품 미생물 유전체 연구를 위한 차세대 염기서열(NGS) 분석 및 활용 기술

Next-Generation Sequencing (NGS) Analysis and Application Technology for Genomic Study of Animal Food Microorganism

김유태, 권준기, 이요셉, 이주훈* (You-Tae Kim, Joon-Gi Kwon, Jo-Seph Lee, Ju-Hoon Lee*)

서울대학교 농업생명과학대학 식품동물생명공학부 및 식품바이오융합연구소

Department of Food and Animal Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology,

Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University

I. 서론

축산식품은 인류의 농경생활이 이루어지기 이전부터 수렵과 사냥으로 인간에게 중요한 영양 공급원으로 이용되어 왔다. 또한 인류가 정착생활을 하면서 가축을 다루고 가축으로부터 고기와 우유, 계란을 확보함으로써 축산식품의 발전이 시작되었다. 이러한 축산식품은 최고의 영양식품이기 때문에 인류의 발전에 따라 축산식품의 소비는 꾸준히 늘어나고, 이에 대한 산업과 유통이 계속 늘어나고 있다(백영진 외, 2005). 하지만 건강에 대한 관심과 먹거리에 대한 까다로운 입맛에, 다소 비싸더라도 좀더 맛있고, 좀더 깨끗하고 위생적인 식품을 선호하는 경향이 강하게 나타나고 있는데, 축산식품이 미생물에게 영양분을 활용할 수 있는 좋은 번식처가 되기 때문에 유통 및 제조 중에 병원성 미생물 증식으로 인한 식중독 등의 문제를 일으키기도 한다. 따라서 축산식품에 존재하는 유해균에 대한 연구는 식중독사고를 미연에 방지하거나 그 피해를 줄이기 위해 필요하다. 뿐만 아니라 유제품의 발효나 고기류의 숙성 등에서 어떠한 미생물이 축산식품 내에서 증식하고 대사하느냐에 따라 맛과 품질, 영양 및 기능성까지 달라질 수 있기 때문에 이러한 도움을 주는 유익균에 대한 연구 역시 필요하다. 이처럼 축산식품 분야에서 미생물의 역할이 매우 중요하기 때문에 이러한 미생물들의 활성과 대사 연구에 유전체를 활용하기 시작했다.

*Corresponding author: Ju-Hoon Lee

Department of Agricultural Biotechnology, Department of Food and Animal Biotechnology,
Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

Tel: +82-2-880-4854

Fax: +82-2-873-5095

Email: juhlee@snu.ac.kr

II. 본론

(1) Next-Generation Sequencing (NGS)의 개발

과거 축산식품 미생물 연구에서는 생화학적인 특성에만 의존하여 미생물을 식품에 적용하였으나, 분자생물학적 기술의 발달에 따라 생화학적 특성 이외에도 유전자 수준에서의 미생물의 특성을 확인할 수 있게 되었으며, 더 나아가 NGS (Next Generation Sequencing) 기술의 개발로 미생물의 전체 유전자를 확보하여 그 유전 정보로부터 미생물의 전반적인 활성을 예측할 수 있게 되었다.

차세대 염기서열 분석법(NGS) 이전에는 DNA 염기 서열을 확인하기 위하여 생화학적 방법을 이용하였다. 이러한 DNA sequencing은 1977년 영국의 생화학자 프레더릭 생어(Frederick Sanger)가 최초로 개발한 방법에서 시작되었다(Sanger et al, 1977). Sanger 염기서열 분석법(Sanger sequencing)은 분석할 DNA의 단일 가닥을 주형(template)으로 DNA 중합효소(DNA polymerase) 반응을 통해 DNA를 복제하여 서열을 분석하는 방법이다. 이때 DNA 사슬의 연장을 특이적으로 종료시키는 물질인 ddNTP (di-deoxynucleotide triphosphate)를 dNTP (deoxynucleotide triphosphate)와 함께 사용하여 다양한 길이의 DNA fragment를 합성한다. dNTP는 DNA 합성에 사용되는 기본 단위로서 A, T, C, G의 base를 갖고 있고, deoxyribose의 3' 탄소에 수산화기(-OH)를 통해 DNA 사슬의 합성이 이어진다. 하지만 ddNTP는 deoxyribose의 3' 위치에 수산화기가 없고 수소기(-H)로 치환되어 있어 DNA 중합효소에 의해 DNA가 복제될 때 다음 뉴클레오타이드(nucleotide)와 인산디에스테르 결합(phosphodiester bond)을 형성할 수 없어 DNA 사슬의 합성이 종료된다. 이러한 특징을 활용하여 DNA 중합효소 반응 후 분석하고자 하는 DNA의 염기서열마다 DNA 중합효소 반응을 종료시켜 각 염기서열의 해당되

는 길이의 DNA fragment를 합성한다. 이로부터 분석하고자 하는 DNA의 염기서열을 확보하는 Sanger 염기서열 분석법은 노벨상을 수상할 만큼 검증되고, 기술적 신뢰도가 높으며, 분석 방법이 비교적 간단하다. 하지만 DNA 중합효소의 효율 문제로 얻을 수 있는 염기서열이 약 1 kb 미만으로 제한적이기 때문에 유전체와 같은 거대한 DNA를 분석하기에는 비용적인 문제와 시간이 오래 걸리는 단점을 갖는다.

NGS는 이러한 단점을 보완하기 위하여 대용량 염기서열 분석법 (High-Throughput Sequencing; HTS)을 활용하도록 개발되었다. 2004년 최초로 상용화된 454 Pyrosequencer 이후 현재까지 그 성능이 발전하고 있다. NGS 방법은 한 종류의 유전체로부터 무수히 많은 조각으로 분해하여 각 조각들의 염기서열을 동시에 읽어낸 뒤, 얻어진 염기서열 데이터를 생물정보학적 기법으로부터 조합하여 대용량의 유전체 정보를 확보하는 것이다. Sanger 염기서열 분석법은 동시에 수십 개의 DNA fragment를 분석하는 반면, NGS 장비는 수십만 개에서 수십억 개의 서로 다른 염기서열 분석이 가능해졌다. 또한 이러한 기술의 발달로 유전체 분석에 소요되는 시간과 비용까지 점차 절감하고 있다. 2001년 사람의 유전체 염기서열 분석 비용은 약 1억 달러 정도였으나, 2020년 기준 약 1,000달러 미만으로 비용이 감소하였다(그림 1).

현재까지 개발된 NGS 장비들은 454 Pyrosequencer, Illumina, SOLiD, Ion Torrent, PacBio SMRT, Oxford Nanopore 등이 있다. 이러한 장비들은 DNA 조각들의 증폭 방법 및 염기서열 검출 방식 등의 차이로 장비마다 특징이 다르고, 그에 따른 장단점을 갖는다(표 1). Roche의 454 Pyrosequencer의 경우 처음으로 출시된 NGS 분석 장비로, DNA가 증폭될 때 방출되는 pyrophosphate를 빛 에너지로 변환하여 광 검출기로 염기서열을 분석한다(Nordström et al, 2001). 분석되는 염기서열의 길이는 비교적 긴 편이나, 반응이 느리고 분석할 수 있는 염기서열의 양이 적다는 단점을 갖고 있어 현재는 상용되지 않는 장비이다.

Illumina의 장비는 2007년 Solexa를 시작으로

그림 1. 인간 유전체 분석 비용의 감소 (2001~2020년)(Wetterstrand, 2020)

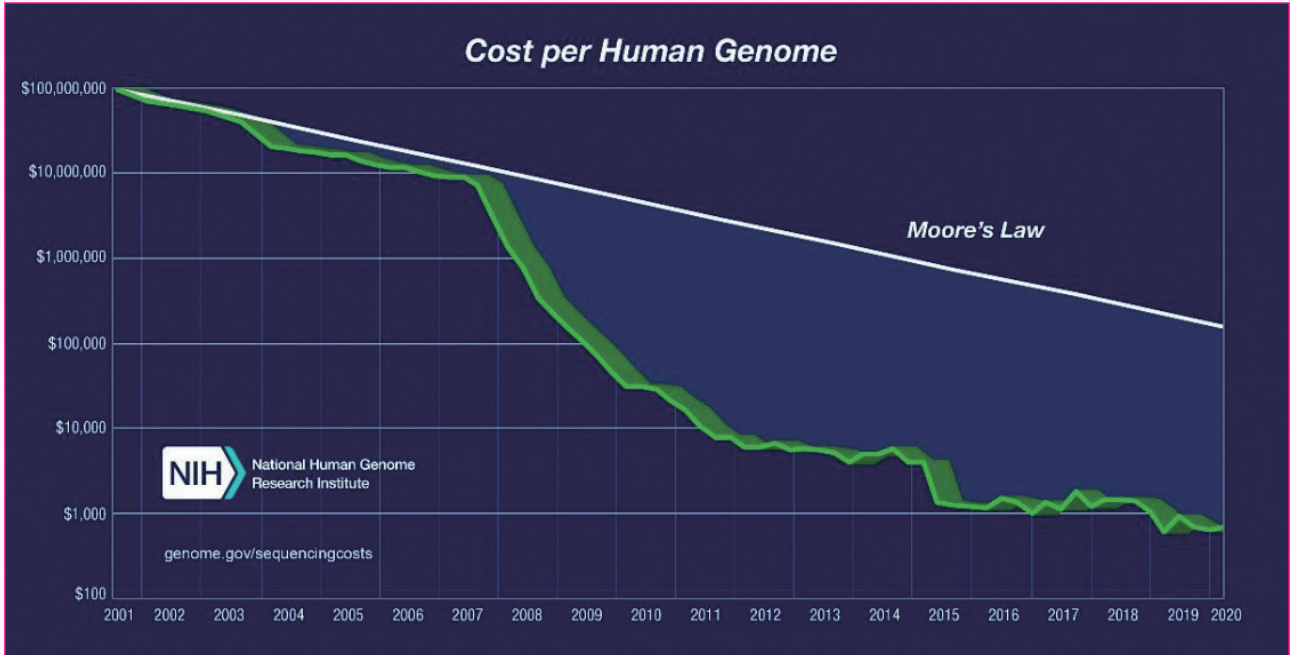


표 1. 현재까지 개발된 NGS 장비의 분석 원리 및 sequencing 길이

Platform (Company)	Amplification method	Sequencing method	Detection method	Average read length
454 pyrosequencer (Roche)	Emulsion PCR	Pyrosequencing, cleavage of released pyrophosphate	Light	700 bp
Ion Torrent / Proton (Life Technology)	Emulsion PCR	Ion semiconductor sequencing	pH	200~400 bp
SOLiD (Applied Biosystems)	Emulsion PCR	Sequencing by ligation of hybridizing labeled oligos	Light	100 bp
MiSeq, HiSeq etc. (Illumina)	Bridge PCR	Sequencing by synthesis	Light	150~300 bp
PacBio SMRT RS II / Sequel System (Pacific Biosciences)	No amplification, single-molecule sequencing	Polymerase incorporating colored NTPs	Light	10~20 kb
MinION (Oxford Nanopore)	No-amplification, single molecule nanopore sequencing	DNA molecule traverses pore	Current	>5.4 kb

NovaSeq, HiSeq, NextSeq, MiSeq, MiniSeq, iSeq 등의 분석 장비가 개발되었으며, 이들은 분석하고자 하는 유전자의 길이와 분석 후 얻어지는 데이터의 양 등의 조건에 따라 사용할 장비가 달라지기 때문에 각 장비에 따라 분석 시간과 비용이 달라진다. 이 중에서 MiSeq 장비의 경우, 가장 보편적으로 사용되며, Illumina 장비 중에서 가장 긴 염기서열(300 bp)을 분석할 수 있는 장

비이기 때문에 미생물 유전체 연구에서 저렴한 가격으로 draft genome을 분석하기 용이하다. Illumina 장비를 사용하기 위해 각 장비에서 사용할 수 있는 일정한 크기의 DNA 파편에 adapter를 붙여 library를 제작하고, flow cell에 각 DNA 파편이 adapter에 의해 고정되고, library DNA를 증폭시켜 cluster를 만든다. 각 library cluster로부터 DNA 염기서열을 빛 에너지를 이용하여

빠르게 분석하게 된다(Ravi et al, 2018). 하지만 짧은 분석 길이로 인하여 완벽한 미생물 유전체 염기서열을 분석하기 어려운 단점이 있다.

Pacific Bioscience의 경우 PacBio라는 이름으로 sequencing platform을 제공하고 있으며, 최근 Sequel II 장비가 상용화되어 있다. PacBio에서 사용하는 기술의 경우 Single Molecule Real-Time (SMRT) 방법을 통해 염기서열을 분석하고 있다. 이는 DNA library 제작 과정에서 만들어지는 원형의 single-strand DNA로부터 효소가 염기서열을 읽어나가면서 빛 에너지를 발산하여 그 정보를 축적하게 된다. 원형의 library를 이용하기 때문에 여러 번 sequencing이 이루어지게 되고, 이를 통해 error rate를 낮추고 상대적으로 긴 염기서열을 분석할 수 있게 된다(Rhoads & Au, 2015). 따라서 긴 염기서열의 library를 확보함으로써 미생물 유전체 분석에 있어 *de novo* assembly를 수행하여도 완전한 유전체 염기서열을 확보할 수 있으며, 최대한 적은 양의 유전체 조각(contig)을 얻을 수 있다. 다만 장비 가격이 매우 고가이며, 가격대비 yield가 낮기 때문에 sequencing 비용도 상대적으로 고가이다.

이밖에 Applied Biosystems (Life Technologies 인수)에서 개발한 SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)와 Life Technologies (Thermo Fisher Scientific 인수)에서 개발한 Ion Torrent도 실험실 수준에서 사용되고 있는 NGS 장비가 있다. ABI SOLiD의 경우 2006년 개발되어 bead를 이용하여 형광물질의 빛 에너지로부터 염기서열을 분석하는 장비이며, 높은 정확성을 갖고 있다(Valouev et al, 2008). 하지만 Illumina보다도 짧은 염기서열을 분석하는 단점을 갖고 있다. Ion Torrent의 경우, 다른 장비들과 다르게 광학에 의한 탐지를 이용하지 않는 최초의 NGS 장비이다. 염기서열 분석 신호 발생을 위해 형광물질을 사용하는 대신, 각 dNTP가 끼어들 때 발생하는 H⁺이온을 탐지하여 결과적으로 pH의 변화가 발생하고, 이를 염기서열 정보로 변환하는 방법으로 분석한다(Pennisi et al, 2010). 하지만 pH의 변화는 결합

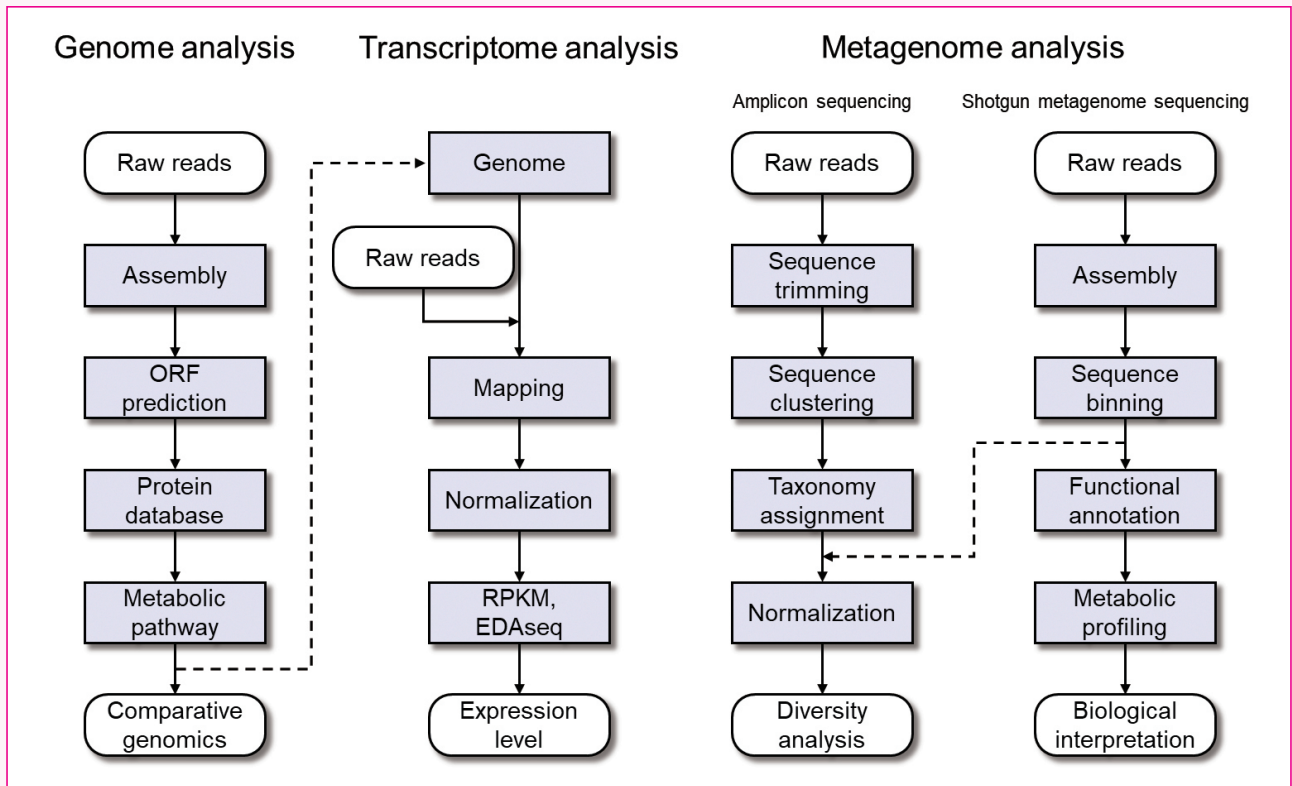
하는 염기 수에 정비례하지 않기 때문에 homopolymer (단일중합체)를 포함하는 염기서열을 분석함에 있어 정확성이 떨어지는 단점을 갖고 있다.

최근에 개발된 Nanopore 방식의 Oxford사의 MinION은 효소에 의해서 DNA의 이중 나선이 single strand로 나뉘지고, 이 single strand가 전자적으로 저항성이 있는 막 지나가게 된다. 이때 각 염기의 고유의 저항 값이 다르기 때문에 흐르는 전류를 측정하여 염기서열을 분석한다(Cao et al, 2016). MinION의 경우, 손바닥 안에 들어가는 아주 작은 크기로 휴대가 간편하며, 기본이 되는 장비의 가격이 매우 저렴하다. 하지만 염기서열 분석의 error rate가 상대적으로 높다는 단점을 가지고 있어 현재까지 계속 보완을 하고 있다.

(2) NGS 분석 기술과 Omics

오믹스(omics)는 전체를 뜻하는 말인 옴(-ome)과 학문을 뜻하는 접미사 익스(-ics)가 결합된 말로, 어떤 특정 유전자, 전사물, 대사물 등의 연구에 대한 학문과 대비되는 총체적인 개념의 데이터 세트를 바탕으로 하는 생물학 분야라고 할 수 있다. 이러한 데이터 세트는 NGS 분석을 통해 얻어지게 되며, NGS 분석은 대용량 염기서열 분석에 의한 결과물이기 때문에 이를 생물정보학적 접근으로 얻고자 하는 DNA의 염기서열을 확보할 수 있다. 대부분의 NGS 장비의 경우, 분석이 완료된 후 얻을 수 있는 파일은 염기서열 정보와 그 염기서열에 대한 quality value값을 나타내는 FASTQ 형식으로 이루어져 있다. 이로부터 신뢰할 수 있는 염기서열을 거르게 되고, 정확도 높은 염기서열로부터 컴퓨터를 활용하여 assembly를 진행하고, 가능한 긴 길이의 contig들의 염기서열 정보를 확보할 수 있다. 이를 위해 다양한 open source 프로그램을 활용하거나, BioPerl과 Biopython, BioJava와 같은 생물학에서 활용할 수 있는 프로그래밍 언어를 사용하여 염기서열 정보를 얻게 된다. 이렇게 얻어진 염기서열을 활용하여 미생물의 유전체, 메타게놈, 전사체 등의 분석을 수행하게 된다 (그림 2).

그림 2. 유전체, 전사체, 메타게놈 분석을 위한 순서도



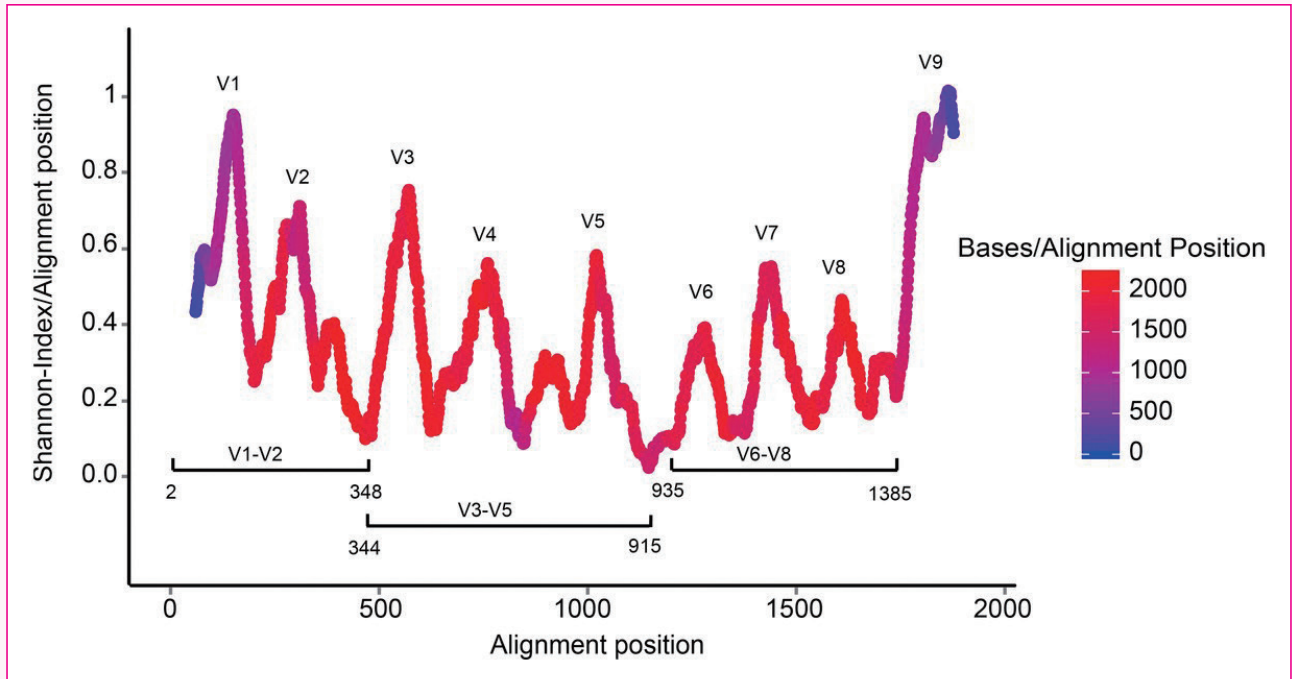
유전체 분석을 위해 유전자가 될 수 있는 ORF(Open reading frame)를 얻어진 DNA 염기서열로부터 탐색하고, 각 ORF에 대하여 단백질 정보 데이터베이스(BLAST, PANTHER, UniProt, Pfam 등)로부터 그 기능을 예측하여 정보를 확보할 수 있다. 이러한 미생물의 유전정보를 바탕으로 Pan-genome 분석, ANI(Average Nucleotide Identity) 분석 등과 같은 비교유전체분석이나 대사회로분석, 네트워크분석 등을 통한 한가지의 미생물뿐만 아니라, 여러 미생물들과의 관계와 생물학적 계통 분석에 활용할 수 있다. 유전체 정보를 활용할 경우, 생화학적 특성을 이용하여 비교분석하는 방법에 비하여 많은 노동 없이 수백, 수천 가지의 미생물과 비교가 가능하며, 배양하기 어려운 미생물의 특징을 확인할 수 있다(Forde & O'Toole, 2013).

유전체(Genome)의 경우, 한 개체가 지닌 모든 유전 정보를 나타내는 것이라면 메타게놈(Metagenome)의 경우 주어진 환경 속에 존재하는 모든 미생물의 구성과

유전체를 나타낸다. 특정 환경 속에 존재하는 미생물의 균주 조성을 확인하기 위해서 모든 미생물이 공통적으로 갖는 유전자인 16S rRNA의 염기서열을 증폭시켜 각각의 염기서열을 NGS를 사용하여 분석한다(16S rRNA amplicon sequencing). 16S rRNA는 미생물마다 다른 부분(variable region)과 다양한 미생물과 높은 유사성을 갖는 부분(conserved region)으로 구성되어 있는데, variable region을 증폭하여 염기서열을 분석할 경우, 주어진 환경에 존재하는 미생물들을 16S rRNA database(SILVA, Greengenes, EzBioCloud, RDP, NCBI 등)를 토대로 동정할 수 있으며, 확보된 염기서열의 개수로부터 그 비율을 예측할 수 있다(그림 3).

16S rRNA는 1.5 kb 길이의 유전자이지만, amplicon sequencing을 위해 Illumina MiSeq 장비나 Ion Torrent와 같은 짧은 염기를 분석할 수 있는 장비를 사용하고 있다. 이는 상대적으로 가격이 저렴하고 많은 양의 16S rRNA 유전정보를 확보할 수 있기 때문에 균총

그림 3. 16S rRNA 염기서열 위치에 따른 종 다양성 분포



조성에 대하여 정확도 높은 결과를 나타낼 수 있어 가장 많이 사용되고 있는 방법이다. 하지만 짧은 염기서열의 유전 정보로는 균주의 정확한 속(genus)이나 종(species)을 구분하기 어려움이 있기 때문에 최근에는 16S rRNA의 전체 염기서열(1.5 kb)을 증폭하여 해상도 높은 균주의 조성을 PacBio를 활용하여 분석하기 시작했다. 하지만 이러한 방법으로는 특정 환경에서의 균주 조성만을 확인할 수 있고, 균체의 기능적인 내용을 나타내기 어렵다. 이를 보완하기 위해 균주의 조성을 바탕으로 각 조성의 균주 유전체 정보를 연결하여 미생물 군집이 갖는 다양한 유전자의 비율을 기능별로 예측할 수 있는 프로그램(PICRUSt, Tax4Fun 등)이 고안되기도 했다(Langille et al, 2013).

메타게놈 분석에는 16S rRNA amplicon sequencing과 같이 특정 환경에서의 미생물 구성에 대한 분석 방법뿐만 아니라, 그 환경 내에 있는 모든 미생물의 DNA 염기서열을 분석하는 Shotgun Metagenomic Sequencing 분석 방법이 있다. 이 방법의 경우, 모든 DNA로부터 NGS library를 제작하고 염기서열을 분

석하여 특정 유전자의 분포나 어떠한 기능의 유전자를 갖는 미생물이 존재하는지 확인이 가능하기 때문에 앞서 16S rRNA amplicon을 기반으로 한 기능 분석 프로그램(PICRUSt, Tax4Fun 등)보다 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있다. 따라서 Shotgun Metagenomic Sequencing 분석을 위해 시료의 total DNA를 추출한 후 사용하고자 하는 NGS 분석 장비에 맞게 일정한 크기로 분쇄(shearing)하고 library를 제작하여 NGS 분석을 수행한다. 이렇게 얻어진 염기서열 정보로부터 contig를 assembly하여 해당 군집이 갖는 유전자를 분석할 수 있으며, 특정 기능을 나타내는 유전자들의 분포가 확인이 가능하고 해상도 높은 균체의 구성을 분석할 수 있다. 따라서 이러한 분석을 위해 MEGAHIT과 MetaSPAdes 등과 같은 프로그램을 사용하여 assembly를 수행할 수 있으며, MetaWatt와 SCIMM 등의 프로그램을 활용하여 assembly된 contig의 기원을 유전체 정보를 갖는 데이터베이스로부터 분석(binning contigs) 할 수 있다. 이로부터 각 contig들이 갖는 모든 ORF들을 예측하게 되고, 균체가 갖는 기능성 유전자들에 대한 분포를 확인

할 수 있다(Quince et al, 2017).

전사체 연구를 위해 이전에는 Microarray를 통해 발현되는 RNA를 정량하여 특정 환경에서 변하는 RNA의 변화량을 분석하였으나, hybridization의 오류 등으로 인한 정확성이 떨어지고, 분석하고자 하는 미생물마다 plate를 제작해야 한다는 단점을 갖는다. 하지만 NGS 장비를 활용할 경우, 다양한 미생물들로부터 total RNA의 염기서열을 분석하여 분석된 염기서열 개수(read 수)를 바탕으로 발현량을 분석할 수 있다. 따라서 NGS 분석을 위해 RNA를 cDNA(complementary DNA)로 합성하고, library를 제작하여 염기서열 정보를 확보하게 된다. 이렇게 얻어진 염기서열 정보는 유전체 정보를 바탕으로 mapping이 이루어지게 되고, 발현량 비교분석을 위해 normalization을 수행하게 된다. 이때 RPKM, TMM, EDaseq, CQN 등의 알고리즘을 활용하며, edgeR, baySeq, DESeq 등의 통계학적 모델링에 의하여 조건에 따른 유전자 발현량을 분석한다. NGS를 활용하여 하나의 미생물의 발현량뿐만 아니라, 특정 환경에서의 미생물 군체의 발현량 변화를 분석할 수 있는데, 이를 Meta-transcriptome (whole transcriptome shotgun sequencing)이라 일컫는다. 이를 통하여 특정 환경에 존재하는 미생물 군체의 실질적인 발현 수준을 정량화 하고, 수준이 서로 다른 조건에서 어떻게 변해가는지를 모니터링하는 등 특정 환경 내에서 활성 유전자의 다양성을 연구하는데 사용할 수 있다(Shakya et al, 2019).

(3) 축산식품 미생물 연구에서의 NGS 활용

NGS 기술의 발달에 따라 개별 유전 정보인 유전자만을 연구하던 시대에서 한 개체가 지닌 모든 유전정보 전체인 유전체를 연구하는 시대로의 변화에 따라 축산식품 미생물 산업에서도 미생물 유전체 연구에 비중이 쏠리고 있다. 특히 식중독균 오염을 방지하기 위해 이들의 유전체를 분석하여 DB가 구축될 경우, 식중독 사고 발생 시 동정을 위한 배양 과정 없이 식중독 균의 DNA를 추출하

여 NGS를 통하여 염기서열을 분석을 하게 된다면 신속하고 정확하게 식중독균의 동정이 가능하다. 최근 미국의 경우 식품안전현대화법(Food Safety Modernization Act; FSMA) 법규의 개정과 안전한 식품을 제공하기 위한 법률 강화 작업을 통하여 실제 식중독균의 규명 방법으로 유전체학적 수준의 안전 평가법을 제시하고 있으며, 2012년 7월부터 UC Davis 대학을 중심으로 미국 FDA, 식품안전응용영양국, Agilent Technologies로 구성된 “100K Pathogen Genome Project”를 진행하고 있다. 이는 10만 건의 식중독균 유전체 정보의 축적을 목표로 하며, 다양한 식중독 유발 균체 및 바이러스의 유전체 정보를 획득하여 데이터베이스를 구축하고, 이를 분석할 수 있는 기반을 만들려는 대규모 프로젝트이다(Weimer, 2017). 또한 FDA와 CDC가 함께 출범시킨 “GenomeTrakr”는 병원성대장균, 캄필로박터, 비브리오 등 다양한 식중독균의 유전체 정보를 분석하는 연구를 진행하고 있으며, 축적된 정보를 바탕으로 식품의 안전성 확보를 위한 활용방안을 고려하고 있다(Timme et al, 2018). 국내의 경우, 식품의약품안전처 식중독균유전체연구사업단 (FORC, Food-borne pathogen Omics Research Center)은 국민 건강에 악영향을 미치는 식중독 피해를 줄이고, 예방하기 위해 2014년 3월 출범하여 식중독 다발성 식품 유래 식중독균의 유전체 정보 DB 축적과 축적된 유전체 정보를 바탕으로 유해 미생물들에 의한 지속적인 국내 식중독 발생에 신속 대처 및 예방이 가능하도록 하였다. 미생물의 유전체 분석 기술 활용은 식중독균뿐만 아니라, 원유나 발효 유제품 속의 미생물의 안전성 검사에도 사용된다.

인체 건강에 도움을 줄 수 있는 미생물인 프로바이오틱스(probiotics)는 유익하다고 널리 알려져 있지만 유해 요소를 갖고 있을 수 있기 때문에, 안전성 검사가 필수적이다. 프로바이오틱스의 유전체 정보가 확보되어 있을 경우, 염기서열 정보를 활용하여 Virulence Factor Database (VFDB)를 통한 병원성 인자 유무 확인과 Antibiotic Resistance Database (ARDB)를 통한 항생제 내성 유전자의 유무를 확인하여 유전체 수준

에서의 안전성 평가가 가능하다. 또한 분석된 유전체 염기서열을 바탕으로 기존에 분석된 정보와 비교분석을 통하여 기능성을 예측할 수 있으며, 균주의 대사 과정 또한 예측하여 대량생산을 위한 정보를 제공할 수 있다. 최근 연구에 따르면, 유제품에서 많이 발견되고 사용되는 *Lactobacillus* 종(genus)의 경우 유전체 정보를 바탕으로 250개 이상의 속(species)으로부터 밀접하게 연관된 속에 따라 25가지의 종으로 새롭게 구분하였다(Zheng et al, 2020). 즉, *Lactobacillus reuteri*의 경우 *Limosilactobacillus reuteri*로 명명되었으며, *Lactobacillus rhamnosus*의 경우 *Lacticaseibacillus rhamnosus*로 명명되었다(표 2).

이처럼 미생물 유전체 정보는 축산식품 미생물 분야에 다양한 영향을 미치고 있으며, 연구에 있어서는 기본이 되는 정보가 되었다. 미생물 유전체 정보뿐만 아니라, 유용한 미생물에 대하여 인체에 미치는 영향을 확인하기 위해 메타게놈 분석을 수행하여 사람 혹은 동물의 장내에서 어떠한 미생물 군집의 변화가 있는지와 그에 따른 숙주에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 진행되었다. 최근 연구에 따르면 우유에서 *Lactobacillus gasseri* 505와 꾸지뽕잎 추출물을 함께 발효시킨 신바이오틱스(Synbiotics)는 대장암이 유도된 동물모델에서 간 손상을 막아주는 역할을 할 뿐만 아니라, 면역 조절

효과로 항염증기능을 갖는 것으로 나타났다. 또한 이들의 장내 균총에서 *Lactobacillus* 종의 비율이 월등히 증가함을 보였으며, *Staphylococcus*와 같은 잠재적 병원성 미생물의 비율이 적어지는 것을 확인하였으며, 장내 균총의 변화와 tight junction 및 apoptosis와 관련된 인자들은 장내 균총과 밀접한 상관관계가 있음을 확인하였다(Oh et al, 2020). 따라서 미생물 기능성 연구에서는 유전체 연구와 메타게놈 분석 연구가 매우 중요한 정보를 제공해 주고 있음을 알 수 있다. 또한 최근에는 항생제 내성과 관련하여 세계적으로 문제가 되고 있기 때문에 항생제 내성 유전자의 발생에 대한 원인 분석과 조절에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 대하여 Shotgun Metagenomic Sequencing 분석 방법을 활용하여 어린 젖소 장내의 항생제 내성 유전자에 대한 분석을 수행하여 초유를 통해 항생제 내성 유전자가 이틀 만에 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 식이가 달라지면서 점차 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 어린 송아지의 식이를 조절함으로써 항생제 내성 유전자의 전파 및 발생을 최소화 시킬 수 있음을 Shotgun Metagenomic Sequencing 분석을 통해 확인할 수 있었다(Liu et al, 2019). 이러한 장내 미생물에 대한 연구뿐만 아니라, 소고기의 숙성에 있어서 미생물이 숙성되는 고기의 육질과 맛에 큰 영향을 미치는 것으로 마이크로바이옴 분석을

표 2. 식품의약품안전처 고시 *Lactobacillus*의 새로운 학명

Old species name	New name
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>

통해 확인되었다. 특히 효모나 곰팡이 등의 진균류가 유해균을 억제하고 대사를 통해 근섬유 조직을 분해시키거나 지방산 및 아미노산을 생성하여 숙성을 통해 더욱 뛰어난 맛과 질의 고기를 만들 수 있음을 확인하였다(Ryu et al, 2018). 또한 안전한 먹거리를 위해 항생제 내성 유전자의 발현과 관련한 연구에서는 쥐에게 항생제 처리 후 분변의 메타게놈 분석 결과, 약 30% 쥐에서 항생제 처리 전과 장내 균총의 조성은 크게 달라진 바가 없지만, meta-transcriptome 분석 결과 항생제 내성에 대한 기능을 하는 유전자들이 많이 발현되는 것을 확인하였다(Wang et al, 2009). 이러한 연구들에서 알 수 있는 것처럼 현재 축산식품 분야에서 NGS를 활용하여 많은 연구가 진행이 되고 있으며, 이에 대한 응용이 산업적으로 이루어지고 있음을 알 수 있다.

III. 결론

NGS의 급속한 발전에 따라 미생물의 DNA 수준에서의 연구가 가능해졌으며 NGS는 유전체, 메타게놈, 전

사체 분석 활용에 광범위하게 사용되고 있다. 이에 대하여 축산식품 내 어떠한 미생물이 존재하는지에 대하여 연구가 가능하며, 이를 토대로 미생물들이 어떠한 대사를 수행하고 있는지와 이러한 대사를 통해 축산식품 내에서 어떠한 역할을 하고 있는지에 대하여 연구가 가능하다. 최근에는 이러한 정보와 함께 어떠한 대사를 통해 만들어진 유용한 물질을 찾아내고, 이를 활용하는 Metabolomics(대사체) 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 따라서 NGS와 같은 최신 분석 기술은 축산식품에 있어서 안전성과 기능성 연구를 넘어 이를 활용한 의학 적 연구에 활용이 가능하기 때문에 건강 증진을 위한 축산식품 개발에 효과적으로 이용될 것이다.

IV. 사사

본 연구는 2020년도 정부(농림축산식품부)의 재원으로 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (318090-03-HD040).

참고문헌

1. 백영진, 정충일, 박승용. 2005. 축산식품 미생물학. 유한문화사.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74:5463-5467.
3. Wetterstrand KA. 2020. DNA sequencing costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). <http://www.genome.gov/sequencingcostsdata>.
4. Nordström T, Gharizadeh B, Pourmand N, Nyren P, Ronaghi M. 2001. Method enabling fast partial sequencing of cDNA clones. Anal Biochem 292:266-271.
5. Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. 2018. MiSeq: A next generation sequencing platform for genomic analysis. Methods Mol Biol 1706:223-232.
6. Rhoads A, Au KF. 2015. PacBio sequencing and its applications. Genomics Proteomics Bioinformatics 13:278-89.

7. Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, Stuart J, Ranade S, Peckham H, Zeng K, Malek JA, Costa G, McKernan K, Sidow A, Fire A, Johnson SM. 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res* 18:1051-1063.
8. Pennisi E. 2010. Semiconductors inspire new sequencing technologies. *Science* 327:1190.
9. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJ. 2016. Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing. *Gigascience* 5:32.
10. Forde BM, O'Toole PW. 2013. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Brief Funct Genomics* 12:440-453.
11. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31:814-821.
12. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol* 35:833-844.
13. Shakya M, Lo CC, Chain PSG. 2019. Advances and challenges in metatranscriptomic analysis. *Front Genet* 10:904.
14. Weimer BC. 2017. 100K pathogen genome project. *Genome Announc* 5:e00594-17.
15. Timme RE, Rand H, Sanchez Leon M, Hoffmann M, Strain E, Allard M, Roberson D, Baugher JD. 2018. GenomeTrakr proficiency testing for foodborne pathogen surveillance: An exercise from 2015. *Microb Genom* 4:e000185.
16. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782-2858.
17. Oh NS, Lee JY, Kim YT, Kim SH, Lee JH. 2020. Cancer-protective effect of a synbiotic combination between *Lactobacillus gasser* 505 and a *Cudrania tricuspidata* leaf extract on colitis-associated colorectal cancer. *Gut Microbes* 12:1785803.
18. Liu J, Taft DH, Maldonado-Gomez MX, Johnson D, Treiber ML, Lemay DG, DePeters EJ, Mills DA. 2019. The fecal resistome of dairy cattle is associated with diet during nursing. *Nat Commun* 10:4406.
19. Ryu S, Park MR, Maburutse BE, Lee WJ, Park DJ, Cho S, Hwang I, Oh S, Kim Y. 2018. Diversity and characteristics of the meat microbiological community on dry aged beef. *J Microbiol Biotechnol* 28:105-108.
20. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57-63.