

Fecal Microbiota Profiling of Holstein and Jersey, in South Korea : A Comparative Study

Gwangsu Ha, Ji-Won Seo, Hee Gun Yang, Se Won Park, Soo-Young Lee, Young Kyoung Park, RanHee Lee, Do-Youn Jeong and Hee-Jong Yang*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received June 7, 2023 /Revised July 10, 2023 /Accepted July 11, 2023

In light of the complex interactions between the host animal and its resident gut microbiomes, studies of these microbial communities as a means to improve cattle production are important. This study was conducted to analyze the intestinal microorganisms of Holstein (HT) and Jersey (JS), raised in Korea and to clarify the differences in microbial structures according to cattle species through next-generation sequencing. The alpha-diversity analysis revealed that most species richness and diversity indices were significantly higher in JS than in HT whereas phylogenetic diversity, which is the sum of taxonomic distances, is not significant. Microbial composition analysis showed that the intestinal microbial community structure of the two groups differed. In the both groups, a significant correlation was observed among the distribution of several microbes at the family level. In particular, a highly significant correlation ($p < 0.0001$) among a variety of microbial distributions was found in JS. Beta-diversity analysis was performed to statistically verify whether a difference exists in the intestinal microbial community structure of the two groups. Principal coordinate analysis and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering analysis showed separation between the HT and JS clusters. Meanwhile, permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) revealed that their microbial structures are significantly different ($p < 0.0001$). LEfSe biomarker analysis was performed to discover the difference microbial features between the two groups. We found that several microbes, such as Firmicutes, Bacilli, Moraxellaceae and Pseudomonadales account for most of the difference in intestinal microbial community structure between the two groups.

Key words : Fecal microbiome, Holstein, Jersey, microbiome, next-generation sequencing

서 론

우리나라 1인당 국내총생산(GDP, Gross domestic product)은 2012년 2,869만 원에서 2019년 3,711만 원으로 증가 [20]하면서 우리나라 소비자들의 소비력 증대와 더불어 인구 고령화로 인한 건강기능식품 시장의 확대와 함께 국내 유제품 시장 규모 또한 2015년 1조 968억 원에서 2018년 2조 124억 원으로 꾸준한 성장 추세에 있다[5]. 이에 따라 낙농업의 생산성 향상을 위한 축사 시스템[12], 소의 건강관리 시스템[11] 및 착유 시스템[14], 아연, 비타민과 같은 사료 첨가제의 첨가에 따른 소의 발육 및 경제성[3] 등에 대한 연구개발을 통해 안정적인 공급과 낙농업

계의 활성화를 도모하고 있다.

소의 건강과 스트레스와 같은 질병 및 번식능력은 농가의 소득과 직결되어 있으나[4, 9], 가축의 성장촉진제 및 항생제 사용이 금지된 이후 가축의 사망률이 증가하여 농가의 소득 안정에 큰 문제가 되고 있다[10]. 이에 따라 성장 촉진제 및 항생제를 대체하기 위한 DFM (Direct-fed microorganism) 등의 가축의 건강증진을 위한 생균제에 대한 연구가 활발히 지속되고 있으나[6, 19], 우리나라에서 비육하는 가축의 장내 미생물에 대한 연구는 제한적이다. 소의 반추위 및 장내 미생물 군집은 소의 건강과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며[2], 해외에서는 가축의 장내 미생물의 다양성과 가축의 건강 및 원유 생산량의 상관관계, 장내 미생물과 소의 대사성 질환과의 상관관계 등에 대한 연구가 활발히 지속되고 있다[13, 22]. 이전의 연구결과에 의하면 소의 호흡기 질환, 피부염, 유선염, 자궁내막염, 설사 및 결핵과 같은 질병의 발생에 따른 개별 장내 미생물의 증감의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다[22]. 건강한 송아지에서는 *Lactobacillus lactis*의 분포가 높은 것으로 밝혀졌으며, *Corynebacterium*,

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2036, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : godfiltss@naver.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Staphylococcus, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* 속 미생물은 장내 미생물 불균형과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 보고된 바 있다[9]. 특히 항생제의 대체제로 연구개발되고 있는 생균제 및 젖산 또는 박테리오신과 같은 항균 펩타이드는 장내 병원성 미생물 증식을 억제하고, 숙주(host)의 장내 항상성 유지, 장내막 기능성 개선에 효과가 있는 것[9]으로 알려져 있어 안정적인 가축의 비육을 위해서는 가축의 건강, 원유 생산량과 매우 밀접한 관계가 있는 장내 미생물에 대한 연구가 필수적이나 가축 장내 미생물에 대한 연구는 인간의 장내 미생물에 대한 연구와 비교하였을 때 많이 부족한 실정이다.

우리나라 낙농업의 역사는 1902년 홀스타인 종이 도입되면서 시작되었으며, 1930년대 이후 홀스타인 종 이외의 다른 품종의 젖소는 수입이 금지되어 현재 우리나라에서 사육하는 젖소의 100%에 가까운 대부분은 홀스타인(Holstein) 종이나[17], 2010년에 규정이 바뀌어 수입이 가능해지면서 저지(Jersey) 종이 국내 도입되고 있다[7]. 저지 종은 홀스타인 종에 비해 우유 생산량이 3/4 정도에 불과하지만 유지방, 유단백질 등의 고형분 함량이 높아 고형분 함량이 우수한 우유를 생산하는 품종으로 치즈와 같이 고형분의 함량에 의해 수율이 결정되는 유제품 생산에 경제성을 부여할 수 있다[7].

본 연구에서는 현재 우리나라에서 사육중인 홀스타인 종과 국내 도입 단계에 있는 저지 종의 대변 시료를 수집하여 차세대염기서열분석(NGS, Next-generation sequencing) 플랫폼을 이용한 장내 미생물 군집 분석을 수행하였으며, 젖소의 종에 따른 미생물 군집 구조와 장내 미생물 간의 상관관계를 규명하여 우리나라에서 사육되고 있는 젖소의 장내 미생물 생태에 대한 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

소의 대변 수집 및 장내 미생물 genomic DNA 추출

젖소의 장내 미생물 분석을 수행하기 위한 대변 시료는 전라북도 전주 지역에 위치한 3곳의 낙농가로부터 수집하였으며, 홀스타인 종 대변 18종과 저지 종 대변 18 종의 총 36종의 대변 시료를 확보하였다. 수집한 시료로부터 total DNA는 QIAGEN 사의 QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 사용자 매뉴얼에 따라 시료당 250 mg의 대변으로부터 추출하였다. 추출된 각 total DNA의 분절(fragmentation) 정도를 확인하기 위해 0.8% agarose gel 전기영동을 수행하였으며, 정확한 dsDNA 농도를 측정하기 위해 Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) 형광측정장비를 이용하였다. 순도 분석에는 Nanodrop One (Thermoscientific, Waltham, Massachusetts, USA) 분광광도계를 이용하여 Abs_{260nm}/Abs_{230nm} , $Abs_{260nm}/$

Abs_{230nm} ratio를 측정하여 metagenomic library를 제작하기 위한 DNA의 품질검사를 수행하였다.

16S rRNA 유전자 library 제작

본변 시료의 마이크로바이옴 분석을 위한 16S rRNA metagenomic library 제작의 모든 과정은 Illumina사에서 제공하는 16S metagenomic sequencing library preparation guide [8]에 따라 제작되었다. 본변 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 16S rRNA 유전자의 V3-V4 부위를 증폭시키기 위한 universal primer 서열(forward : 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3', reverse : 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CT A ATC C-3', N; A or C or G or T, W; A or T, H; A or C or T, V; A or C or G)을 이용하였다. 시료에서 추출된 DNA 2.5 μ l, 각 forward, reverse primer 5 μ l (1 μ M), 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Basel, Switzerland) 12.5 μ l를 혼합하여 총 25 μ l의 혼합액을 25 cycle의 1차 PCR을 수행하였으며, 1차 PCR 이후 혼합액은 Ampure XP bead (Beckman Coulter, Brea, California, USA)를 이용하여 증폭 산물 이외의 모든 불순물을 제거하였다. 각 library에서 생산되는 read들을 구분하기 위한 index로는 Nextera XT index Kit V2 set A (Illumina)를 사용하였으며, 1차 PCR 증폭 산물 5 μ l, 각 index primer (N7XX, S5XX) 5 μ l, 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix 25 μ l와 증류수 10 μ l를 혼합하여 총 50 μ l의 혼합액을 8 cycle의 2차 PCR을 수행하였다. 2차 PCR 종료 후 Ampure XP bead를 이용하여 증폭산물을 제외한 모든 불순물을 제거하였다. 증폭산물의 분절 정도를 확인하기 위해 1.5% agarose gel 전기영동을 수행하였으며, 정확한 dsDNA 농도를 측정하기 위해 Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) 형광측정장비를 이용하였다. 순도 분석에는 Nanodrop One (Thermoscientific, Waltham, Massachusetts, USA) 분광광도계를 이용하여 Abs_{260nm}/Abs_{230nm} , Abs_{260nm}/Abs_{230nm} ratio를 측정하여 최종 metagenomic library의 품질검사를 수행하였다.

MiSeq platform을 이용한 염기서열 분석

품질검사가 완료된 각 시료의 library를 모두 4 nM의 동일한 농도로 희석하여 모든 시료의 library를 정규화하였으며, HT1 buffer (Illumina)를 이용하여 최종적으로 7 pM의 metagenomic library를 제작하였다. Illumina 사 가이드에 따라 library와 동일한 농도의 PhiX control v3 (Illumina)를 metagenomic library와 혼합하였으며, MiSeq Reagent kit v3 (Illumina)와 MiSeq 장비를 이용하여 2×301회의 염기서열 분석을 수행하였다.

미생물 군집과 다양성 분석

미생물 군집과 다양성 분석에는 EzBiocloud 16S-based microbiome taxonomic profiling (MTP) pipeline이 사용되었으며, 분석된 미생물의 분류와 동정을 위한 reference database로는 PKSSU 4.0 version이 사용되었다[23]. Low quality, non target, chimeric amplicon을 제거하여 미생물 군집과 다양성 분석을 위한 최종 유효 염기서열을 얻었다. 홀스타인 종과 저지 종 두 그룹의 장내 미생물의 분포는 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family) 수준에서 분석하여 평균값을 산출하였으며, 각 두 그룹의 장내 미생물 중 우점 미생물의 분포 상관관계를 분석하기 위해 Pearson correlation coefficient를 산출하였다. 두 그룹의 장내 미생물 다양성을 분석하기 위해 ACE, CHAO, Jackknife, Shannon, Simpson, phylogenetic diversity 지수를 분석하였다. 두 그룹 간의 미생물 군집 다양성 분석을 위한 beta-diversity 분석은 generalized UniFrac dissimilarity metric을 기반으로 분석되었으며, principal coordinate analysis (PCoA), unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering을 통해 시각화하였다. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) 분석[21]을 통해 두 그룹 간 장내 미생물 군집 구조에 차이가 있는지 통계학적으로 검증하였으며, linear discriminant analysis effect size (LEfSe) 분석을 통해 LDA (Logarithmic discriminant

analysis) effect size를 산출하여 두 그룹의 장내 미생물 군집 구조 차이에 큰 영향을 미치는 미생물(biomarker)을 확인하였다[18].

결과 및 고찰

홀스타인 종과 저지 종의 미생물 분포 분석

홀스타인 종과 저지 종의 장내 미생물 분포를 생물학적 분류 수준에 따라 문, 강, 목, 과 수준에서 분석하였다. 문 수준에서 두 그룹의 장내 미생물 분포를 분석한 결과 홀스타인 종에서는 Firmicutes가 55.38% 차지하여 가장 우점하였으나, 저지 종에서는 Proteobacteria가 57.91% 차지하여 가장 우점하는 것으로 나타났으며, 강 수준에서 분석한 결과 홀스타인 종에서는 Bacilli가 34.79%를 차지하여 가장 우점하였으나, 저지 종에서는 Gammaproteobacteria가 57.85% 차지하여 가장 우점하였다. 목 수준에서는 두 그룹에서 공통적으로 Pseudomonadales가 가장 우점하는 미생물로 나타났으며, 홀스타인 종에서는 25.01%, 저지 종에서는 57.84% 차지하는 것으로 나타났다. 과 수준에서는 두 그룹에서 공통적으로 Moraxellaceae가 가장 우점하는 것으로 나타났으며, 홀스타인 종에서는 24.69%, 저지 종에서는 57.82% 차지하는 것으로 나타나 두 그룹간의 장내 미생물 분포가 생물학적 수준에 따라 차이가 있

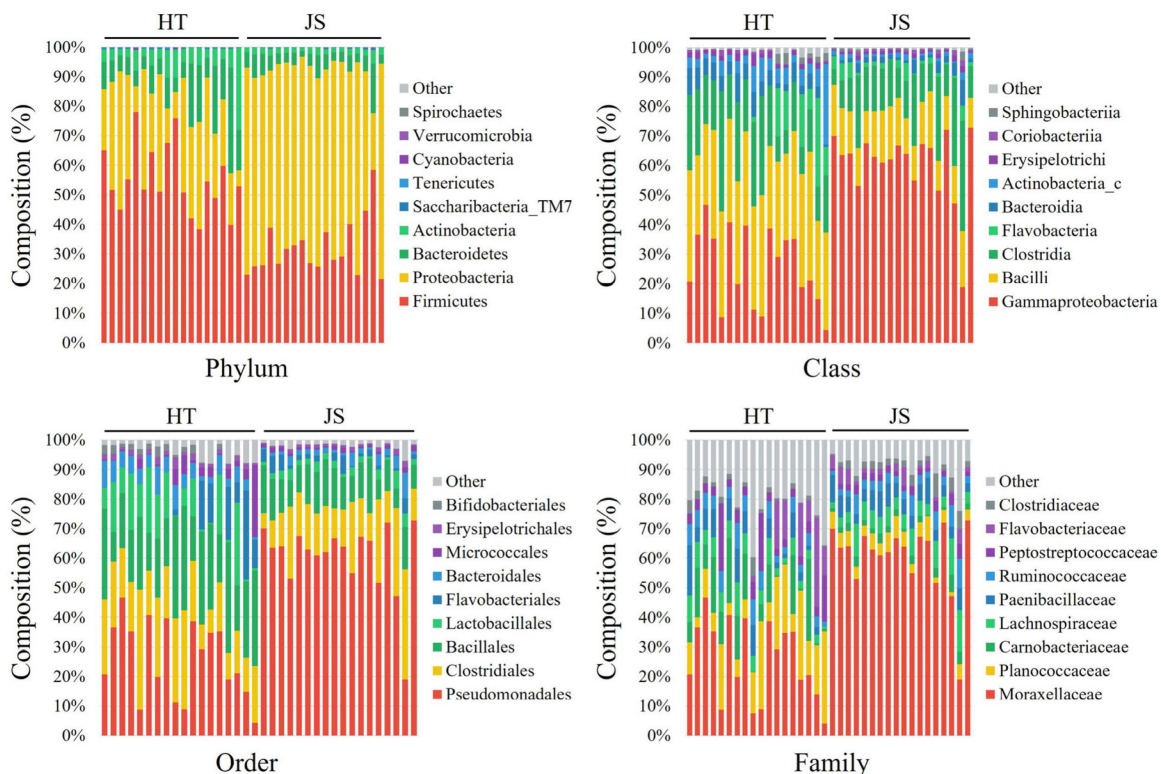


Fig. 1. Comparison of microbial composition at the phylum, class, order and family levels. Composition less than 1% were grouped into others.

Table 1. Relative abundance of the most preponderant fecal microbial communities at the taxonomic level

Taxonomic level	Taxa	HT (%)	JS (%)
Phylum	Firmicutes	55.38	34.08
	Proteobacteria	25.91	57.91
	Bacteroidetes	12.43	5.59
	Actinobacteria	5.71	2.02
	Others	0.57	0.40
Class	Gammaproteobacteria	25.01	57.85
	Bacilli	34.79	16.39
	Clostridia	18.86	16.68
	Flavobacteria	6.25	2.32
	Others	15.08	6.76
Order	Pseudomonadales	25.01	57.84
	Bacillales	24.56	13.80
	Clostridiales	18.85	16.67
	Lactobacillales	10.17	2.57
	Others	21.41	9.12
Family	Moraxellaceae	24.69	57.82
	Planococcaceae	15.81	5.27
	Paenibacillaceae	5.40	7.08
	Carnobacteriaceae	10.03	2.44
	Others	44.08	27.38

는 것으로 나타났다(Fig. 1, Table 1). Nguyen 등의 연구 결과[15]에 의하면 유지방 및 유단백질의 함량이 높은 저지 종의 원유에서 Pseudomonadales, Moraxellaceae의 분포가 높은 것으로 밝힌 바 있어 저지 종의 장내 Pseudomonadales, Moraxellaceae의 분포가 홀스타인 종보다 높은 것으로 나타난 본 연구 결과와 유사하여 Pseudomonadales 및 Moraxellaceae (*g. Acinetobacter*)가 젖소가 생산하는 원유의 유단백질 및 유지방의 함량에 영향을 미치는 것으로 예상된다. 이전의 연구결과[13]에 의하면 홀스타인 종과 저지 종의 대변 미생물 중 Firmicutes와 Bacteroidetes, Proteobacteria 등의 미생물이 공통적으로 우점한다 보고한 바 있어 본 연구결과와 유사하였으나, 미생물의 분포에는 차이가 있는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 홀스타인 종과 저지 종의 위장 및 대변 미생물의 분포는 젖소의 품종과 식이, 잔여 사료 섭취[16] 및 계절[15], 이유(weaning), 항생제 및 사료 첨가제 사용[2] 등 다양한 외부 요인에 의해 영향을 받는다는 보고된 바 있어 우리나라의

축사별 젖소 식이 및 잔여 사료 등 외부요인에 의한 장내 미생물 변화 분석이 수행된다면 명확한 젖소의 장내 미생물 군집 분석이 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

홀스타인 종과 저지 종의 장내 우점 미생물 분포의 상관관계를 과 수준에서 분석한 결과 홀스타인 종에서는 Bifidobacteriaceae와 Lachnospiraceae, AC160630_f (o_Bacteroidales)와 Ruminococcaceae, Ruminococcaceae와 Lachnospiraceae가 0.8 이상의 양의 상관관계 계수(r , Pearson correlation coefficient)를 나타냈으며, 저지 종에서는 Coriobacteriaceae와 Lachnospiraceae, Coriobacteriaceae와 Erysipelotrichaceae, Erysipelotrichaceae와 Lachnospiraceae, Coriobacteria와 Peptostreptococcaceae, AC160630_f와 Ruminococcaceae, Peptostreptococcaceae와 Lachnospiraceae, Planococcaceae와 Paenibacillaceae, Ruminococcaceae와 Lachnospira가 0.9이상의 양의 상관관계, AC160630_f와 Moraxellaceae가 -0.9488의 음의 상관관계를 나타내어 이들 미생물 간에 매우 높은 분포 상관관계가 나타났다(Fig. 2). AC160630_f와 Ruminococcaceae, Ruminococcaceae와 Lachnospiraceae는 홀스타인 종과 저지 종 모두에서 높은 상관관계를 나타냈으며, 이외의 미생물간 상관관계는 젖소의 종에 따라 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 아직까지 젖소 장내 미생물의 분포 상관관계에 대한 연구가 제한적이라 미생물간 상관관계에 대한 원인이 불분명하지만, 다양한 지역의 축사에서 젖소의 품종 및 식이 등의 다양한 변수에 따른 많은 수의 시료로부터 연구자료를 얻는다면 젖소의 장내 미생물 군집 구조에 대한 이해에 큰 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

홀스타인 종과 저지 종의 장내 미생물 다양성 분석

홀스타인 종과 저지 종의 장내 미생물 다양성 분석을 위해 trimming을 수행한 후 홀스타인 종에서는 평균 69,880.33개의 유효 염기서열을 얻었으며, 저지 종에서는 평균 74,917.22개의 유효 염기서열을 얻었다. 얻어진 valid read의 수가 미생물 다양성 분석을 위해 통계적으로 충분한지 분석하기 위해 Good's coverage를 산출하였다. 홀스타인 종에서는 평균 99.62%, 저지 종에서는 99.68%로 나타났으며, 전체시료에서 99.20% 이상임을 확인하였다 (Table 2). 홀스타인 종과 저지 종의 장내 미생물 다양성을 비교 분석하기 위해 총 6개의 종 풍부도 및 종 다양성, 종 균등성 지수를 분석하였으며, 종 간의 계통학적 차이

Table 2. Information about valid reads remained after trimming

Contents	HT	JS
The number of samples	18	18
The number of averaged read	69880.33±12384.74	74917.22±11367.08
Averaged read length (bp)	462.50±3.55	465.17±4.59
Good's coverage (%)	99.62±0.11	99.68±0.09

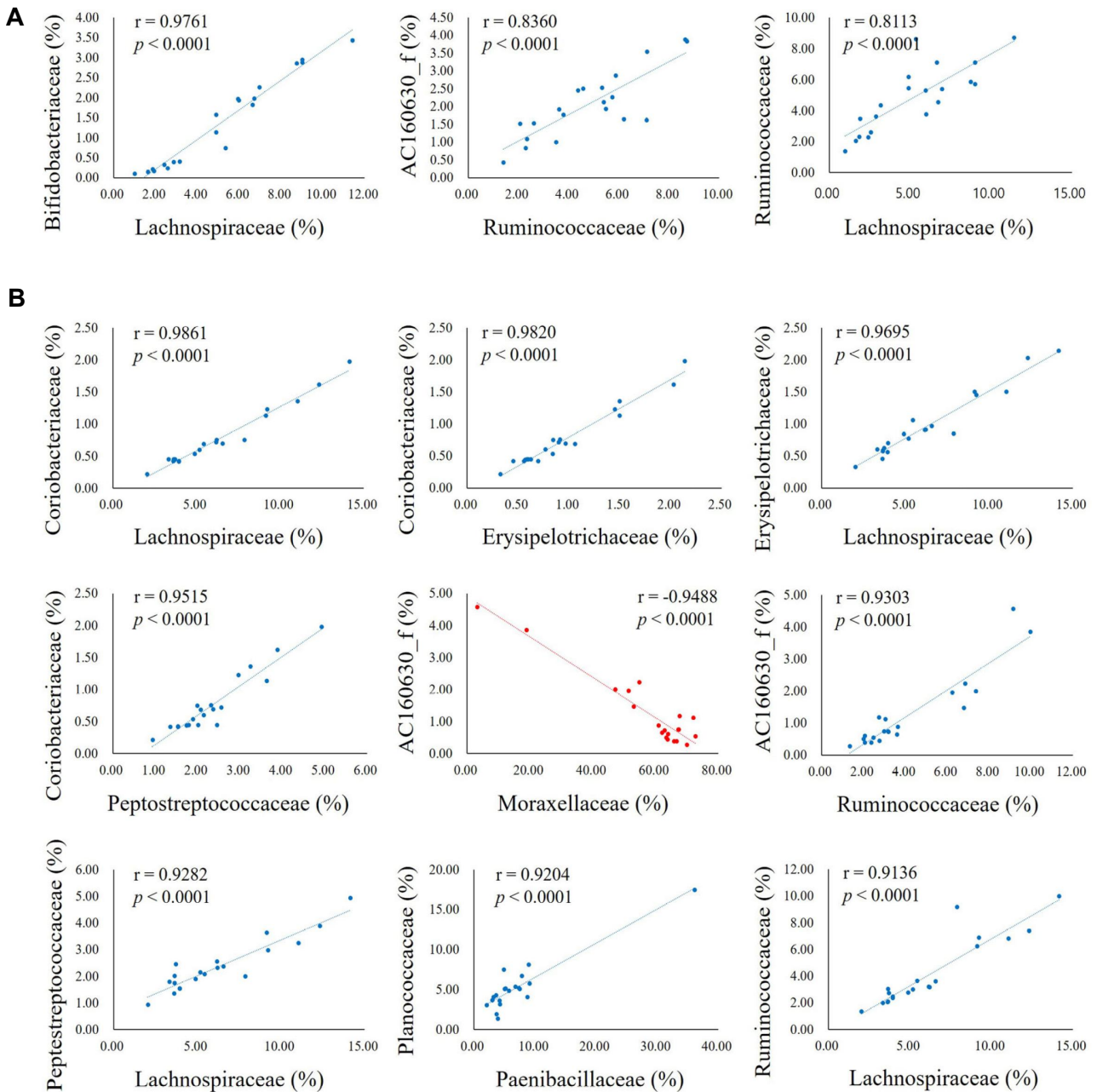


Fig. 2. Scatter plots to show the strong correlation ($r > 0.9$ or $r < -0.9$) among the fecal microbiota in two dairy cattle, Holstein (A) and Jersey (B) species.

를 수치화한 phylogenetic diversity를 제외한 5개의 지수가 저지 종에서 더 높은 것으로 나타나 저지 종의 장내 미생물 풍부도 및 다양성이 홀스타인 종보다 높은 것으로 나타났다(Fig. 4). 5개의 지수를 제외한 phylogenetic diversity 지수가 저지 종에서 더 낮은 이유는 본 연구 결과에서 저지 종의 장내 미생물에서 생물학적 분류 수준에 따른 특정 미생물(c_Gammaproteobacteria, o_Pseudomonadales, f_Moraxellaceae)의 분포가 특이적으로 높아 계통학적 차이가 낮기 때문으로 판단된다. 본 연구에서 저지 종보다

원유 생산량이 높은 홀스타인 종에서 ACE, CHAO, Shannon과 같은 alpha-diversity 지수가 낮은 것으로 나타났으며, 이전의 연구결과[13]에 의하면 원유 생산량이 높은 젖소의 위장 및 대변 미생물의 ACE, CHAO, Shannon과 같은 alpha-diversity 지수가 낮다고 보고된 바 있어 본 연구 결과와 유사하였으며, 장내 미생물의 풍부도 및 다양성과 젖소의 원유 생산량 사이에 밀접한 상관관계가 있는 것으로 판단된다.

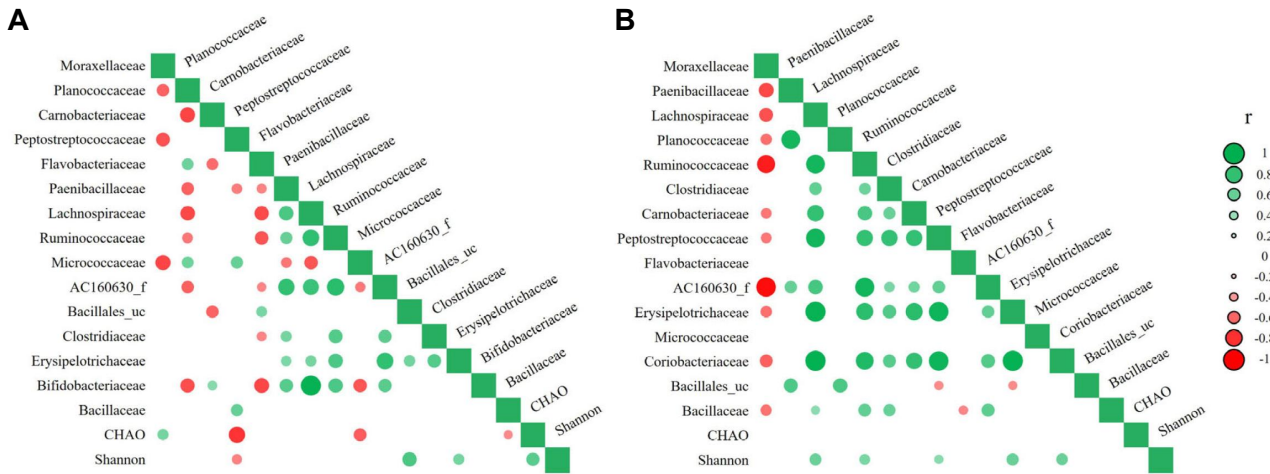


Fig. 3. Pearson correlation (r) matrix showing the relative abundance of dominant microbiota at family level in two dairy cattle, Holstein (A) and Jersey (B) species. The color is according to the Pearson correlation coefficient distribution.

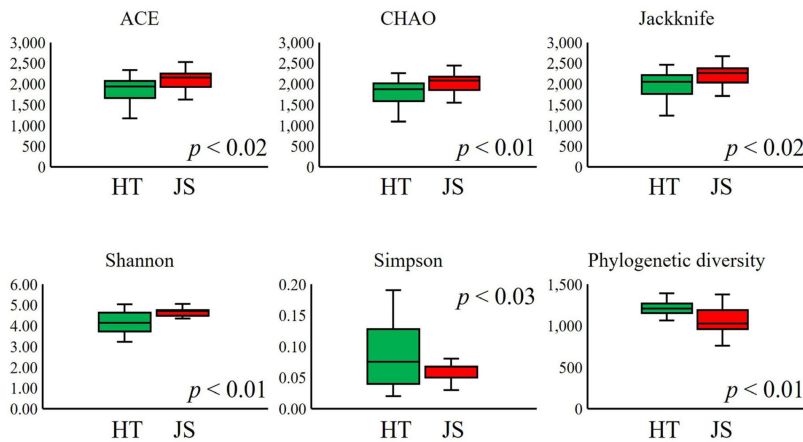


Fig. 4. Alpha-diversity assessed by richness (ACE, CHAO, Jackknife) and diversity (Shannon, Simpson, phylogenetic diversity). Boxes represent the interquartile range, lines indicate medians, and whiskers indicate the range.

Beta-diversity 및 biomarker 분석

홀스타인 종과 저지 종의 장내 미생물 군집구조 차이를 시각화하기 위해 Generalized UniFrac dissimilarity metric 방법 기반의 PCoA와 UPGMA clustering 분석을 수행하였다. PCoA 분석 결과 두 젓소 종의 장내 미생물 cluster가 분리되는 것을 확인하였다. 저지 종의 장내 미생물 cluster가 홀스타인 종의 장내 미생물 cluster보다 cluster 중심으

로부터 산포도가 낮은 것으로 나타났으며(Fig. 5), 이는 alpha-diversity 지수에서 phylogenetic diversity가 더 낮은 것과 일치하여 저지 종의 장내 미생물 중 특정 미생물의 분포가 높기 때문으로 판단된다. 두 젓소 종의 전체 장내 미생물 군집 구조에 유의한 차이가 있는지 분석하기 위해 Beta group set-significance PERMANOVA 분석을 수행하였으며, 그 결과 p-value가 0.0001 미만으로 나타나 두 젓

Table 3. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table showing the significance in comparison with dairy cattle species on fecal microbial structures

Test	PERMANOVA
Null hypothesis (H_0)	Microbial distributions of population is same ($\mu_1=\mu_2$)
Alternative hypothesis (H_1)	Microbial distributions of population is different ($\mu_1\neq\mu_2$)
β -diversity distance metric	Generalized UniFrac
Sample size	36
Group size	2
Permutations	999
p-value	$p<0.0001$
q-value	$q<0.0001$

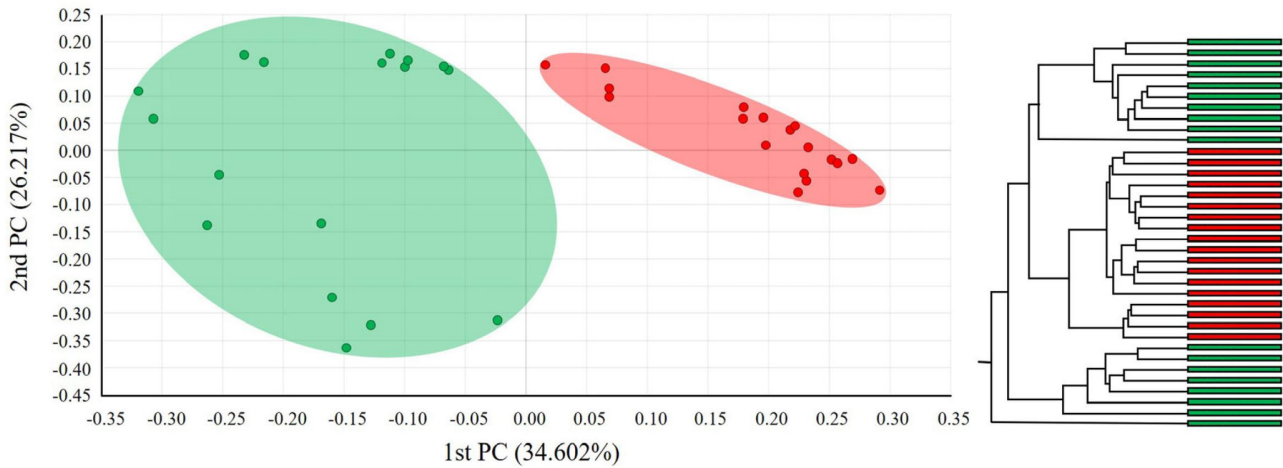


Fig. 5. Principal coordinate analysis (A) and UPGMA tree (B) showing of fecal microbial communities in Holstein (green) and Jersey (red) based on generalized UniFrac distances.

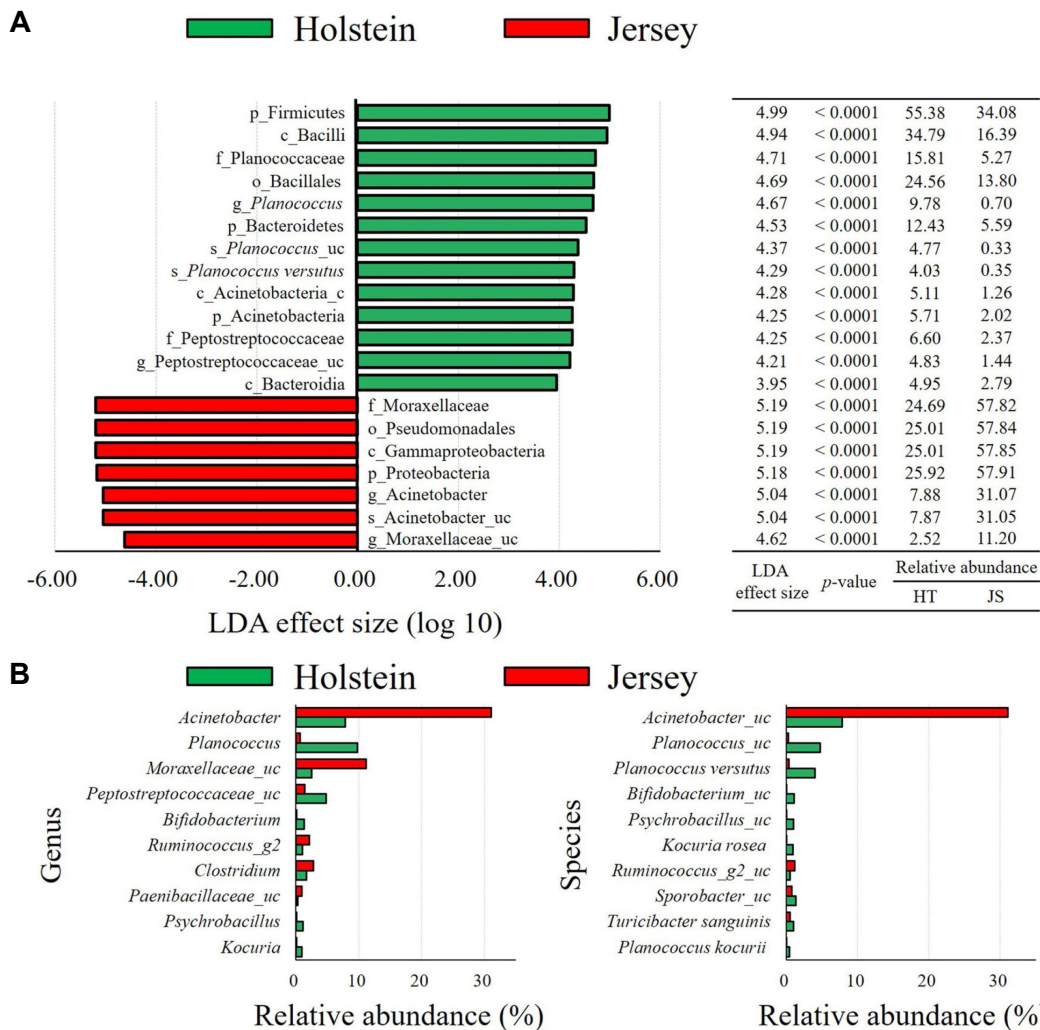


Fig. 6. LEfSe analysis revealed differences in the fecal microbiota between the Holstein and Jersey groups (A). The length of the histogram represents the size of the different microbe (LDA effect size). The relative abundance at genus and species level (B).

소 종의 장내 미생물 군집 구조가 동일하다는 귀무가설이 기각되어 두 젖소 종의 전체 장내 미생물 군집 구조가 매우 유의한 수준의 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 3). LEfSe 분석을 수행하여 두 종의 젖소 장내 미생물 군집 구조 차이에 영향을 미치는 미생물을 LDA effect size의 크기에 따라 Fig. 6에 나타내었다. 홀스타인 종에서는 *Planococcus* (f_Planococcaceae; o_Bacillales; c_Bacilli; p_Firmicutes)가 저지 종의 장내 미생물보다 상대적으로 우세하였으며, 저지 종에서는 *Acinetobacter* (f_Moraxellaceae, o_Pseudomonadales, c_Gammaproteobacteria; p_Proteobacteria)가 홀스타인 장내 미생물보다 상대적으로 우세하여 두 젖소 종의 장내 미생물 군집 차이에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 6A). 두 젖소 종의 장내 미생물 군집 차이에 큰 영향을 미치는 미생물을 속 수준과 종 수준에서 분석한 결과 홀스타인 종에서는 *Planococcus*, *Peptostreptococcaceae_uc*, *Bifidobacterium*, *Psychrobacillus*, *Kocuria*가 상대적으로 우세하였으며, 저지 종에서는 *Acinetobacter*, *Moraxellaceae_uc*, *Ruminococcus_g2*, *Clostridium*, *Paenibacillaceae_uc*가 상대적으로 우세한 것으로 나타났다(Fig. 6B). 이전의 연구결과[1]에 의하면 *Planococcus*의 분포는 *Psychrobacillus*, *Bifidobacterium*의 분포와 상관관계를 나타내며, *Moraxella*는 소의 호흡기 질환, *Ruminococcus*는 소화기능 및 ketosis와 같은 질병, *Clostridium*은 위장 산성혈증 및 설사 등과 같은 질병과 관련이 있는 것으로 알려져[9] 있어 젖소의 건강 및 생산성 증대시키기 위해 장내 미생물에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 판단된다.

해외에서는 장내 미생물과 가축 숙주의 복잡한 상호작용에 대한 연구를 통해 효율적으로 가축의 생산성을 증가시키고 환경에 미치는 영향을 줄이기 위한 노력을 지속하고 있으나, 우리나라에서 사육하고 있는 가축의 장내 미생물에 대한 연구는 매우 제한적이다. 본 연구에서는 차세대염기서열분석을 활용하여 국내에서 사육하고 있는 젖소의 종에 따른 장내 미생물 군집 구조에 대한 차이를 분석하였다. 추가적인 젖소의 생애주기 및 식이, 축사의 지역 등의 외부요인과 장내 미생물의 상관관계에 대한 연구가 확장되어야 할 필요가 있을 것으로 생각되며, 본 연구 결과는 젖소의 건강 및 생산성 증대를 위한 기초 연구자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2022년 농림축산식품부 농축산·식품 마이크로바이옴 통합 바이오뱅크구축사업의 지원에 의해 수행된 것입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Amat, S., Holman, D. B., Timsit, E., Schwinghamer, T. and Alexander, T. W. 2019. Evaluation of the Nasopharyngeal microbiota in beef cattle transported to a feedlot, with a focus on lactic acid-producing bacteria. *Front. Microbiol.* **10**, 1988.
2. Amin, N. and Seifer, J. 2020. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **19**, 989-1001.
3. Cho, W. M. and Lee, S. M. 2015. Effects of zinc, vitamin and selenium additives for improving meat quality on the growth performance, carcass characteristics and economic efficiency of holstein steers. *KJOAS.* **42**, 253-259.
4. Choe, C. Y., Son, D. S., Choi, G. C., Song, S. H., Choe, C. Y., Choi, S. H., Kim, H. J., Cho, S. R., Hur, C. G. and Kang, D. W. 2006. Survey on the incidence of reproductive disorders in Hanwoo. *Kor. J. Emb. Trans.* **21**, 331-338.
5. Choi, H. S. and Oh, N. S. Pasteurization of dairy products. *Food Sci. Ind.* **53**, 256-263.
6. Choi, N. J., Lee, G. Y., Jeong, K. H. and Kim, C. H. 2012. Isolation of anaerobic cellulolytic bacteria from the rumen of Holstein dairy cows to develop feed additives for ruminants. *Kor. J. Org. Agric.* **20**, 327-343.
7. Han, K. S. and Jeon, W. M. 2013. Nutritional value and characterization of jersey milk. *J. Agric. Life Sci.* **47**, 111-121.
8. Illumina. 2013. 16S metagenomic sequencing library preparation protocol: Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Part no. 15044233 Rev B. Illumina, San Diego, CA. http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044233-b.pdf
9. Khalil, A., Batool, A. and Arif, S. 2022. Healthy cattle microbiome and dysbiosis in diseased phenotypes. *Ruminants* **2**, 134-156.
10. Kim, J. M., Guevarra, R. B., Nguyen, S. G. and Unno, T. 2015. Differences in swine gut microbiota in southern region of republic of Korea. *Kor. J. Microbiol.* **51**, 81-85.
11. Lee, S. B., Lee, H. S., Jeong, N. K., Jeon, B. K. and Lee, S. M. 2015. Dairy cattle health-care system for stable supply of dairy products. *JKSCI.* **23**, 89-92.
12. Min, B. R., Seo, K. W., Choi, H. C. and Lee, D. W. 2009. Surveying for barn facilities of dairy cattle farms by holding scale. *J. Lives. Hours Env.* **15**, 251-262.
13. Mu, Y., Lin, X., Wang, Z., Hou, Q., Wang, Y. and Hu, Z. 2018. High-production dairy cattle exhibit different rumen and fecal bacterial community and rumen metabolite profile than low-production cattle. *Microbiologyopen* **8**,

- e673.
14. Nam, I. S., Heo, B. M., Park, H. K., Min, T. H., Son, Y. S., Park, S. M., Kwon, E. K. and Chang, K. M. 2014. Effect of types of milking instrument and season on milk composition in Holstein-Friesian lactating cow. *J. Anim. Environ. Sci.* **20**, 97-104.
 15. Nguyen, Q. D., Tsuruta, T. and Nishino, N. 2020. Examination of milk microbiota, fecal microbiota, and blood metabolites of Jersey cows in cool and hot seasons. *Anim. Sci. J.* **91**, e13441.
 16. Noel, S. J., Olijhoek, D. W., Mclean, F., Løvendahl, P., Lund, P. and Højberg, O. 2019. Rumen and fecal microbial community structure of holstein and Jersey dairy cows as affected by breed, diet, and residual feed intake. *Animals* **9**, 498.
 17. Park, J. H. 2019. A study on the service marketing analysis and development plan. *SOSS.* **9**, 33-49.
 18. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60.
 19. Shin, S. J., Ha, G. S., Jeong, S. J., Ryu, M. S., Kim, J. W., Yang, H. J., Kwak, M. S., Sung, M. H. and Jeong, D. Y. 2020. Probiotic properties and immunomodulator-evaluation of the potential feed additive *Pediococcus acidilactici* SRCM102607. *J. Life Sci.* **30**, 896-904.
 20. Shin, J. S. 2020. A study on the change of beef consumption and recognition of aged meat. *JKAIS.* **21**, 373-379.
 21. Tang, Z. Z., Chen, G. and Alekseyenko, A. V. PERMANOVA-S: Association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatics* **32**, 2618-2625.
 22. Xu, Q., Qiao, Q., Gao, Y., Hou, J., Hu, M., Du, Y., Zhao, K. and Li, X. 2021. Gut microbiota and their role in health and metabolic disease of dairy cow. *Front. Nutr.* **8**, 701511.
 23. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S. J., Lim, J. M., Kim, Y. S., Seo, H. S. and Chun, J. S. 2017. Introducing EzBio Cloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.

초록 : 국내에서 사육되는 Holstein 젖소와 Jersey 젖소의 대변 미생물 분석 : 비교연구

하광수 · 서지원 · 양희건 · 박세원 · 이수영 · 박영경 · 이란희 · 정도연 · 양희종*

((재)발효미생물산업진흥원)

숙주 동물과 동물의 장내 미생물의 건강 또는 생산성에 대한 연구결과를 미루어 볼 때, 가축 동물의 장내 미생물에 대한 연구는 매우 중요하다. 본 연구는 국내에서 사육되는 젖소 중 홀스타인 종과 저지 종 젖소의 장내 미생물을 분석하고 차세대 염기서열 분석을 통해 젖소 종에 따른 장내 미생물 군집 구조의 차이를 규명하고자 하였다. 젖소의 원유 생산과 관련있는 것으로 알려진 종 풍부도와 종 다양성 지수 분석 결과 대부분의 풍부도 및 다양성 지수가 홀스타인 종 보다 저지 종에서 유의한 수준으로 높은 것으로 나타났으나, 종 간의 계통학적 거리를 합산하여 산출되는 phylogenetic diversity 지수는 낮은 것으로 나타났다. 미생물 분포 분석 결과 홀스타인과 저지 종의 두 집단 장내 미생물 군집 구조가 다른 것으로 나타났다. 두 종의 젖소에서 과(family) 수준의 다양한 장내 미생물간의 분포에 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 특히 저지 종의 장내 미생물은 다양한 미생물 분포 사이에 매우 유의한 수준의 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 두 종의 젖소 장내 미생물 구조에 차이가 있는지 확인하기 위해 beta-diversity 분석을 수행하였으며, PCoA 분석과 UPGMA clustering 분석 결과 두 그룹의 cluster가 명확히 분리되는 것을 시각적으로 확인하였으며, PERMANOVA 분석 결과 두 종의 장내 미생물 군집 구조가 통계적으로 매우 유의한 수준의 차이가 있는 것으로 나타났다. 두 젖소 종의 장내 미생물 군집 구조 차이에 기여하는 미생물을 확인하기 위해 LEfSe 분석을 수행하였으며, 그 결과 Firmicutes, Bacilli, Moraxellaceae, Pseudomonadales 등의 상대적인 미생물 분포 차이가 두 그룹간 장내 미생물 군집 구조 차이에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.