

인산분해효소 첨가에 따른 1주령 육계의 맹장 내 에너지 대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향

채한화¹, 최현지¹, 홍의철², 차지혜¹, 임다정¹, 박원철^{1*}

¹국립축산과학원 동물유전체과, ²국립축산과학원 기금연구소

Effects of Phytase addition on Energy Metabolism-Related Gene Expression in the Cecum of 1-week-old Broiler Chickens

Han-Ha Chai¹, Hyunji Choi¹, Eui-Chul Hong²,
Jihye Cha¹, Dajeong Lim¹, Woncheoul Park^{1*}

¹Division of Animal Genomics and Bioinformatics, National Institute of Animal Science

²Poultry Research Institute, National Institute of Animal Science

요약 육계 사료 내 영양성분(조단백질, 인산분해효소)의 과잉 공급은 사료효율을 감소시키고 분뇨 내 질소와 인의 배설을 증가시킨다. 이로 인해 환경부하가 증가된다. 육계의 성장단계에 적합한 사료원료의 함량으로 영양소 이용률을 높여 질소와 인의 배설로 인한 환경부하를 줄이기 위해 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 1주령 육계 36수를 대상으로 사료 내 조단백질과 인산분해효소 첨가에 따라 유의미한 차등발현 유전자의 발현양상과 반응경로를 분석하였다. 이는 전사체(RNA-seq, edge-R) 및 기능적 연구로 분석되었다. 그 결과, 1주령 육계의 맹장에서 사료 내 인산분해효소의 첨가량(1,000ppm에서 500ppm)이 감소함에 따라 에너지 대사와 관련된 131개 차등발현 유전자를 발굴하였다. 이 차등발현 유전자는 인산가수분해반응의 역반응인 인산화효소에 의해 활성화된 1) 단백질 자가인산화, 2) 산화적인산화 반응 등으로 ATP 에너지 생성과 관련 기능을 한다. 또한, 인산화효소에 의한 당류(과당이나 만노스)의 인산화를 통해 포도당 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가하였다. 이번 연구의 결과는 1주령 육계의 사료 내 인산분해효소 첨가 수준에 따라 에너지 대사 기능이 어떻게 조절되고 영양분 사용이 성장에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 정보를 제공할 것이다.

Abstract An oversupply of nutrients (crude protein and phytase) in broiler diets reduces the feed efficiency and increases nitrogen and phosphorus excretion in manure. Therefore, the environmental load is increased. A study was conducted to reduce the environmental load due to the excretion of nitrogen and phosphorus by increasing the nutrient utilization rate with the content of feed ingredients suitable for the growth stage of broilers. In this study, the gene expression patterns and response pathways of significantly differentially expressed genes (DEGs) according to the addition of crude protein and phytase in the feed for 36 broiler chickens at one week of age were analyzed by transcriptome (RNA-seq, edge-R) and a functional study. The expression of 131 DEGs related to the energy metabolism decreased in the cecum of one-week-old broilers as the amount of phytase (from 1000ppm to 500ppm) added to the feed was increased. These DEGs help generate ATP energy through 1) protein autophosphorylation and 2) oxidative phosphorylation by kinase, which is the reverse reaction of phytase. In addition, gene expression was activated in the glucose synthesis pathway through 3) the phosphorylation of monosaccharides (fructose or mannose) by kinase. These results will provide information on how the function of energy metabolism is regulated and how the growth is affected by the use of nutrients according to the level of phytase addition in the feed of one-week-old broilers.

Keywords : 1-week-old-broilers, Cecum, Phytase, Differentially expressed genes, Energy metabolism

본 논문은 2023년 국립축산과학원 고유사업(세부과제번호:PJ01681201, 육계분변 내 마이크로바이옴 기반 질소 배출관련 네트워크 탐색)의 지원에 의해 수행됨.

*Corresponding Author : Woncheoul Park(National Institute of Animal Science)

email: wcpark1982@korea.kr

Received May 8, 2023

Revised June 1, 2023

Accepted June 2, 2023

Published June 30, 2023

1. 서론

육계의 사료비용은 사육비용에서 70%를 차지한다[1]. 사료섭취를 통한 주령별 성장은 증체량 단위로 측정되는 사료효율(efficiency in feed intake)과 연관성이 있다. 이때 사료효율은 성장에 따른 체중 증가와 영양분의 이용 효율과 같은 표현형 이외에도 개체별 유전적인 요인이 존재한다. 동일한 주령에서 암컷과 수컷 체중의 유전 가능성에 대한 추정치는 0.31-0.37범위에 있다[2]. 체중의 유전적 변이는 암컷보다는 수컷에서 더 높다. 이는 수컷과 암컷의 호르몬 조절과 성장대사 차이로 인해, 성별에 따라 생리적 환경에 대하여 유전자가 다르게 반응하기 때문이다. 그 결과, 주령별 체중에 작용하는 유전자의 효과는 암컷과 수컷에 따라 증가하거나 감소할 수 있다.

유전적 요인 이외에 영양소의 이용률 개선을 통하여 사료효율을 높이고자 한다면, 주령별 요구되는 영양성분 및 함량을 정확하게 측정하는 것이 필수이다. 육계 사료 내 영양성분의 함량 중 20%를 차지하는 단백질 요구량보다 과잉 공급되면, 소화기관(소장, 회장 등)의 기능이 줄어들고 생체 내 단백질, 아미노산, 질소의 이용률이 감소된다[3]. 이로 인해, 분뇨 내 질소 배설이 증가한다. 사료효율을 개선하기 위하여 인산분해효소를 첨가하거나 조단백질의 대체원료(아미노산 제제 등)를 사용한다. 이를 통해 사료 내 단백질 함량을 줄이고 에너지 대사 효율을 증가시켜 분뇨 내 질소의 배설을 감소시킨다[4]. 예를 들어, 주요 아미노산 제제는 메티오닌, 라이신, 트레오닌, 트립토판, 히스티딘 및 발린 등으로 구성되어 있다. 이와 같이 조단백질의 대체원료들이 사용되고 있으나, 대체원료에 대한 생체 내 대사 프로파일(metabolism profile) 정보와 생리적 기능연구는 매우 제한적이다. 따라서 육계의 성장단계에 따라 증체량에 영향을 주지 않는 대체원료의 필수 요구량을 측정해야 한다.

부하 후, 1주령 이전 병아리는 소화기관의 미발달과 소화효소의 분비 부족으로 사료 영양소의 소화-흡수 및 이용률이 낮은 편이다[3,4]. 점차적으로 사료 섭취량이 증가 하면서, 소화기관(전위, 근위와 소장 등)의 최대성장기 병아리 1주령이후 일어난다[5,6]. 일령이 증가함에 따라 회장에서 용모당 장세포의 숫자는 증가한다. 한편, 장세포 밀도는 십이지장이나 회장에서 거의 변화가 없지만 공장에서는 일령에 따라 약간 증가하는 경향이 있다[5-7]. 영양소 섭취 후, 소장에서 영양물질을 가수분해하는 효소(아밀라아제, 리파아제, 트립신 등)에 의해 전분, 중성지방, 단백질이 소화된다[8,9]. 특히, 소장에서 질소

가 포함된 영양분(단백질, 아미노산 등)의 소화율은 4일령 때 78%에서 21일령에는 92%까지 증가한다[3,10]. 반면에 전분과 지방산의 소화율은 4일령부터 21일령까지 83~89%로 거의 변화가 없다. 육계 사료로 옥수수의 전분, 기름, 단백질 및 항영양소(피트산염, 효소억제제 및 저항성 전분)등의 조성고 영양적 가치는 가변적 이다 [9]. 그러나 옥수수-대두박 위주의 육계사료에 복합 효소제(아밀라아제, 프로테아제, 자일리아제)를 첨가하면 영양소의 소화율과 증체성적이 개선된다[11].

인산분해효소(phytase)는 곡물에서 발견되는 소화 불가능한 유기 인(P) 형태 피틴산(phytic acid)의 가수분해를 촉진시킨다. 이때, 인산분해효소는 분자량이 40~70kDa 단량체 효소로 작용한다. 이 효소의 기능은 피틴산(myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, IP₆)에 결합되어 있는 6개 인산염 그룹(phosphate groups)을 단계적 가수분해하여 최종생성물 미오-이노시톨(myo-inositol)을 생성한다[12]. 이 최종생성물은 식물 종자 및 꽃가루에서 인의 주요 저장 형태이다. 인산분해효소는 식물, 동물의 소화기관에 있는 미생물, 반추위 동물에 존재한다[13]. 다만, 기질 특이성, 최적 pH(예. 산성 인산분해효소 pH5/염기성 인산분해효소 pH8) 및 가수분해 특성이 다르다[14,15]. 사람을 포함하여 돼지, 닭과 같은 단위동물들의 소화기관에는 인산분해효소가 분비[16]되지 않기 때문에 피틴산에 결합되어 있는 인(유기인)을 이용할 수 없다. 유기 인이 생체 내에서 분해되지 않고 분변으로 배설된다. 이로 인해 물에 인과 질소 같은 영양분이 과잉 공급되는 환경부하를 초래할 수 있다. 단위동물의 소화기관에서 흡수-생체 이용 가능한 형태인 무기 인(P)으로 전환 시키는 외인성 인산분해효소(phytase)를 사료에 첨가해주면, 돼지와 닭에서 배출되는 유기 인을 50% 정도까지 줄일 수 있다[17]. 물론, 인의 소화율은 사료원료의 변동, 유전 인자, 일령, 체중 및 칼슘 대 인(Ca:P) 비율 등의 여러 인자에 영향을 받는다. 외인성 인산분해효소 공급의 주요 역할은 피틴산에 결합된 인의 가용성을 증가(20±45%범위) 시키는 것이다. 또한, 사료 내 인산분해효소의 첨가는 지방, 단백질 및 전분의 소화율을 높인다[17,18]. 인산분해효소의 보충은 아미노산의 전체 소화율을 5% 이상 더 증가시킨다. 예를 들어, 라이신은 4.5%, 트레오닌은 11.4% 소화율이 증가된다. 게다가, 사료효율을 증가시켜 분변 내 질소와 인의 배출을 감소시킨다. 만일 과잉으로 인산분해효소가 사료 내 첨가된다면, 아미노산 소화율과 동시에 항영양 인자 피틴산의 가수분해가 증가 되어 단백질-피틴산 복

합체의 생성이 증가된다. 이는 부정적인 효과(소화율 감소, 질소·인 배설증가 등)도 유발한다[19,20].

단백질의 경우, 육계 일령에 따른 사료 섭취량의 증가로 인해 장내 사료의 통과속도가 느려짐에 따라 효소의 분비가 늦어 분해속도도 느려진다. 위 장관에서 피틴산에 의해 단백질 소화와 아미노산 흡수가 방해받을 수 있다[19]. 이는 낮은 pH 수준에서 음이온 피틴산과 양전하를 가진 단백질 사이의 정전기적 인력에 의해 단백질-피틴산 복합체가 형성되어 펩신 소화효소에 반응하지 않기 때문이다. 이로 인해 단백질 소화 과정이 방해받고 내인성 아미노산 흐름을 증가시켜 위액 과분비와 보호용 점액 분비를 자극한다. 소장의 pH는 단백질 분해효소의 활성이 더 유리하기 때문에, 단백질-피틴산 복합체가 분해되거나 인산분해효소가 비활성화 될 가능성이 있다[20].

결과적으로, 육계용 사료에 보충되는 인산분해효소는 항영양 인자(피틴산염)와 관련된 기능적 역할도 있지만, 영양소(조단백질 등) 소화율을 증가시키고 증체량 증가와 같은 이점이 더 우세하게 존재한다[20]. 동시에 인산분해효소(phytase)는 육계의 장내 미생물군집 변화를 조절하여 장내 산화적 손상을 줄이는 작용도 한다[11-15,20].

육계의 대장은 맹장, 회장, 배설강과 연결된 직장으로 구성되어 있다. 특히, 맹장은 영양성분의 소화 및 아미노산 대사, 물의 흡수, 면역글로블린 및 항체 생산을 담당한다. 더 나아가서, 맹장 내 미생물도 영양성분(조단백질 등) 소화에 작용한다. 본 연구를 통해서 1주령 육계 수컷 36수의 맹장에서 외인성 인산분해효소 첨가량에 따른 조단백질의 생체이용 효과와 관련된 차등발현 유전자를 발굴하고, 그 기능을 살펴보고자 한다. 이로부터 사료 내 조단백질과 인산분해효소의 첨가량에 따라 활성화 되는 에너지 대사과정(산화적 인산화 반응으로 ATP 합성과정, 아르기닌 생합성 등)을 이해하고자 한다. 최종적으로 2050 「농식품 탄소중립전략(농림축산식품부, 2021.12.27.)」의 이행계획에 따라, 사료 내 조단백질의 함량을 2% 감축하였을 때 육계의 성장, 분뇨 내 질소 배설 관련 주요 영향인자(유전자 등)를 규명하고자 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

1주령 육계 수컷 36수의 맹장 시료 수집은 동물실험 위원회 운영규정에 따라 동물실험 계획승인 심사를 받아 실행하였다(동물실험승인번호: 2022-548). 육계 1주령

36수에 대하여 사료 내 조단백질과 인산분해효소 첨가 농도에 따른 영양수준을 고려하여 3개 그룹(대조군/2개 처리군, 각 그룹별 12수)의 맹장 시료를 수집하였다(Fig. 1).

각 개체별 맹장 시료로부터 RNA를 추출해서 Illumina Truseq™ RNA sample preparation kit(Illumina San Diego, CA)를 사용하여 cDNA를 합성 후, RNA-seq 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 Illumina HiSeq 2000 플랫폼을 사용하여 paired end 2x150bp로 RNA 시퀀싱 하였다. 이때, 육계 1주령 36수의 각 맹장 샘플마다 6.0Gb 이상(닭 유전체 1.2Gb의 5배), 총 216Gb의 RNA-seq raw data를 생성하여 전장 전사체 서열분석을 수행하였다.

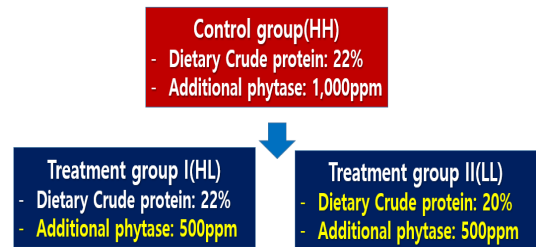


Fig. 1. A control group HH and two treatment groups of HL and LL according to the nutritional level in the feed for 1-week-old 36 broiler chicks (12 chicks in each group)

2.2 RNA-seq 데이터 전처리 및 분석방법

전장 전사체 서열분석에 의하여 생성된 RNA-seq read의 전처리과정으로 FASTAQC version 0.11.8 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc), Trimmomatic 프로그램(version 0.39)을 사용하여 trimming 수행을 하였다. 전처리 과정을 통과한 cleaned read를 HISAT2(version 2.1.0)[21]를 통해 닭 참조서열(Gallus gallus 6.0)에 정렬(mapping) 하였다. 정렬된 read는 samtools 프로그램(version 1.9)과 FeatureCounts(version 2.0.0)를 통해 유전자 발현을 정량적으로 수치화 하였다(Fig. 2). 다음단계로, 사료 내 영양수준에 따른 3개 그룹(Fig. 1)에 대해 맹장에서 유전자 발현 정도를 TMM(Trimmed means of M values) 방법을 통해 정량화 및 정규화(normalization) 하였다[22].

edge R(version 3.26.8)을 이용하여 그룹 간의 유전자 발현차이(log fold change, log counts per million, Likelihood ratios, p-value, False Discovery rate)를 계산하였다. 각각의 처리군 2개 그룹(HL and LL)을 대

조군 그룹(HH)과 비교하여 통계적으로 의미가 있는 (p -value < 0.05) 차등발현 유전자를 선별하였다. 그 후, 각 그룹간의 차등발현 유전자의 발현변화에 대한 비교결과를 ggplot2(version 3.3.6)와 R(version 3.6.0)을 이용하여 시각화 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 분석 순서도에 따라 분석을 진행하였다.

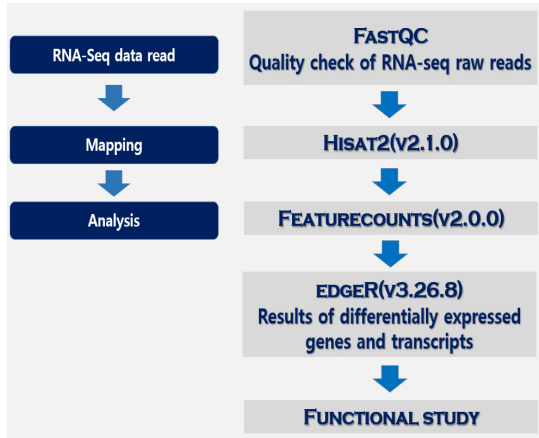


Fig. 2. Program process used for differentially expressed genes analysis using RNA-seq data.

2.3 유의한 차등발현 유전자 기능분석

차등발현 유전자의 기능에 대한 정보를 얻기 위해서 DAVID(database for annotation visualization and integrated discovery) 데이터베이스(<http://DAVID.ncicrf.gov/>)를 통해 생물학적 반응경로(BP) 및 KEGG pathway를 분석하였다[23]. 차등발현 유전자의 기능분석을 할 때, EASE(Expression Analysis Systematic Explorer)의 유의성에 대한 기준 값으로, 생물학적 반응경로(BP)는 p -value < 0.1 기준, KEGG pathway는 p -value < 0.1로 설정하여 수행하였다[24].

3. 실험결과 및 고찰

3.1 육계에서 영양수준에 따른 유전자 발현비교

1주령 육계 수컷 36수에서 영양수준(조단백질과 인산분해효소 함량)에 따라 대조군(HH)과 2개 처리군(HL, LL)로 나눠 연구를 수행하였다. 이때, 각 그룹은 수컷 12수 개체들로 구성되었다(Fig. 1). 대조군에 급여된 사료 내 조단백질 함량(CP, Crude Protein)은 22% 이고 인산분해효소 함량은 1,000ppm이다. 대조군의 경우 육계 1주령 사양표준과 영양소 요구량(사료 성분표)에 맞춘 영양수준이다. 이에 반해, 처리군 1(HL)은 조단백질 함량 22%를 유지하되, 인산분해효소 첨가량을 500ppm으로 낮췄다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 다른 처리군 2(LL)는 조단백질과 인산분해효소 함량이 감소한 사료(조단백질 함량 22%에서 20%로 총 2%감소, 인산분해효소 1,000ppm에서 500ppm으로 총 500ppm 감소)를 섭취 하였다. 1주령 육계 수컷 36수의 맹장에서 추출한 RNA를 이용하여 전사체 데이터(RNA-seq)를 생성하였다. 이때, 각 개체의 맹장 샘플마다 6Gb 이상, 36수에서 총 216Gb의 paired end transcript reads를 생산하였다. 전처리 과정(Quality control 와 Trimming)을 진행 후, 육계의 전장 전사체(Transcriptome) 서열을 닭 참조서열(Galgal6)에 맵핑한 결과 86.7%~96.0%로 정렬되었다(Table 1). 전체적으로 영양수준별 90%이상에 해당하는 전사체 data를 확보하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이, 단계별 분석프로그램을 사용하여 Fig. 3의 순서대로 연구를 진행 하였다. 닭 참조 유전체 서열(Galgal6)과 유전자 주석정보(gene annotation)로 부터 맵핑된 개체들의 데이터를 유전자, 엑손의 전사체 단위로 어셈블리 하여 유전자 발현을 정량화(quantification) 하였다(Fig. 3). 다음단계로 전사체 (transcript)를 정규화(normalization) 하였다. 이때, 주어진 read count를

Table 1. Summary of RNA-seq reads mapped to the reference chicken transcriptome (Galgal6)

Group	Mapped reads											
	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4	Sample5	Sample6	Sample7	Sample8	Sample9	Sample10	Sample11	Sample12
HH	94.72%	87.96%	91.84%	92.62%	95.31%	95.48%	86.66%	95.58%	95.70%	90.04%	95.08%	95.21%
HL	95.88%	94.13%	95.65%	94.96%	95.20%	94.58%	94.23%	94.31%	94.95%	94.55%	92.84%	95.98%
LL	95.58%	94.69%	95.25%	94.52%	94.64%	94.79%	94.01%	95.32%	94.55%	95.14%	94.62%	88.39%

Note: A control group of HH(dietary crude protein 22%, added phytase 1,000ppm) and two treatment groups of HL(dietary crude protein 22%, added phytase 500ppm) and LL(dietary crude protein 20%, added phytase 500ppm) according to the nutritional level in the feed as Fig. 1.

각 샘플의 total count 로 나눠서 일차적으로 Eq. (1)과 같이 유전자 발현측정을 정규화 하였다.

$$\text{normalization} = \ln[1+(\text{gene expression} \times 10^4) / \text{total expression}] \quad (1)$$

이번 연구에서 육계 1주령 맹장샘플 36개에 포함된 RNA 개수(S_k)는 샘플k에서 실제 유전자(g)의 전사체 개수 U_{gk} (발현수준을 나타냄)와 유전자의 길이(L_g)정보를 이용하여 Eq. (2)과 같이 그룹별 총 RNA 개수를 계산하였다.

$$S_k = \sum_{g=1}^G U_{gk} L_g \quad (2)$$

맵핑된 육계 1주령 RNA-seq reads 서열과 유전자 주석정보(gene annotation)로 부터 전체 유전자 영역에서 22,893개 전사체를 선별하였다. 이는 육계 1주령 36수 맹장에서 영양수준에 따른 유전자 발현과 관련된 22,893개 전사체이다.

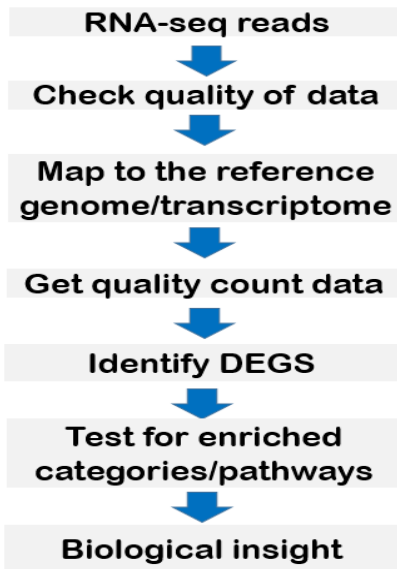


Fig. 3. RNA-seq data analysis workflow in the study.

선별한 전사체에 대해 TMM(Trimmed mean of M-value) 방법으로 데이터를 보정 하였다[25]. TMM 방법의 정규화 인자를 Eq. (3)~Eq. (4)로부터 Eq. (5)를 통해 적용하였다.

$$M^r_{gk} = \log_2 \left(\frac{y_{gk}/N_k}{y_{gr}/N_r} \right) \quad (3)$$

여기서 M^r_{gk} 는 샘플 k와 r에서 유전자 발현수준을 \log_2 단위로 변환한 것이다. 다음에 가중치(W^r_{gk})를 계산 하였다. 이때 가중치는 발현이 작은 유전자가 왜곡되지 않도록 유전자 발현의 역수를 적용하여 가중치를 크게 하였다.

$$W^r_{gk} = \left(\frac{1}{Y_{gk}} - \frac{1}{N_k} \right) + \left(\frac{1}{Y_{gr}} - \frac{1}{N_r} \right) \quad (4)$$

따라서, TMM 방법의 정규화 인자는 Eq. (5)과 같다.

$$\log_2 = (TMMk^{(r)}) = \frac{\sum_{g=1}^G W^r_{gk} M^r_{gk}}{\sum_{g=1}^G EG^* W^r_{gk}} \quad (5)$$

최종적으로 정규화한 유전자 발현양은 RPKM (read x 10^9 /total read x gene length)/scaling 척도로 측정 된다.

2차원 공간으로 육계 1주령 각 개체의 전사체를 표현한 결과, 사료 내 조단백질 함량 22%이고, 인산분해효소의 함량이 1,000ppm에서 500ppm로 감소함에 따라 대조군(HH) vs 처리군1(HL)이 명확하게 그룹화 되지 않았다. 다만, 각 그룹 내 12수 개체들의 전사체가 근접해있는 경향은 확인되었다(Fig. 4(a)).

이러한 경향은 조단백질의 함량(22%에서 20%, 2% 감소)과 인산분해효소의 함량(1,000ppm에서 500ppm)이 감소되었을 때도 대조군(HH)에 속한 12수 개체들의 전사체와 처리군2(LL)가 명확하게 구분되지 않았지만(아웃라인 개체 존재), 대부분 그룹 내 2 개체들의 전사체는 근접영역에서 위치해 있다(Fig. 4(b)).

이를 통해 대조군(HH)과 처리군별(HL, LL)로 영양수준에 따라 개체들의 전사체 샘플과 batch effect 확인을 위해 재현가능성(Reproducibility)을 측정하였다. 실험조건별(사료 내 조단백질과 인산분해효소 첨가량) 유전자 발현의 차이가 있었고, 같은 조건의 biological replicate가 전사체 형태로 다차원적도법(MDS) 분석에서 특정 방향으로 편향되어(한쪽으로 치우침) 나타났다(Fig. 4).

3.2 육계 맹장 내 에너지대사 관련 유전자 발현

1주령 육계 맹장에서 대조군(HH) 대비 처리군1(HL) 영양수준(인산분해효소 함량 1000ppm에서 500ppm 감소)에 따라 통계적으로 유의적인(p-value<0.05) 4,367개 차등발현 유전자를 발굴하였다. 이때, 대조군(HH) 대비 3,293개 유전자의 발현이 증가하였지만, 1,074개 유전자의 발현이 감소했다(Fig. 5(a)).

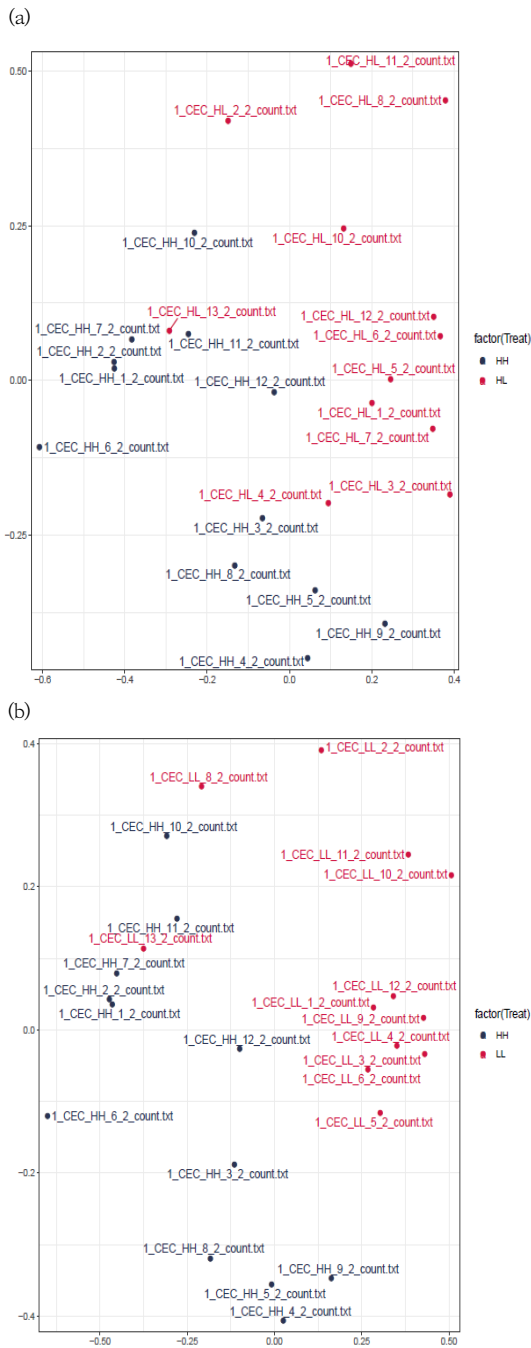


Fig. 4. Multidimensional scaling (MDS) plot according to the difference about decreasing (a) phytase(from 1,000ppm to 500ppm) content of control group HH vs treatment HL and (b) crude protein(from 22% to 20%) and phytase (from 1,000ppm to 500ppm) contents of control group HH vs treatment LL in cecum.

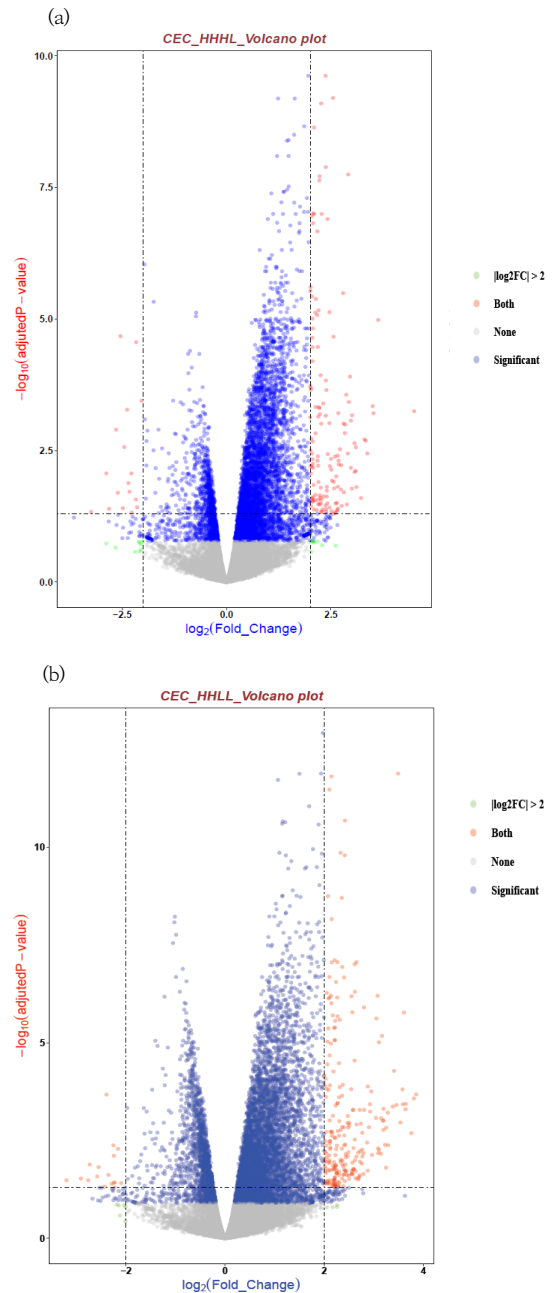


Fig. 5. A volcano plot($\log_2 |FC| > 2$ and $p\text{-value} < 0.05$) of differentially expressed genes(DEG) according to decreasing (a) phytase content (from 1,000ppm to 500ppm) and (b) crude protein (from 22% to 20%) and phytase (from 1,000ppm to 500ppm) contents in feed for cecum. When significant genes are indicated by blue dots and up & down regulated genes are indicated by red dots.

이와 다른 경향으로 대조군(HH) 대비 처리군2(LL)의 영양수준(조단백질 함량 2% 감소와 인산분해효소 첨가 500ppm감소)에 따라 유의적으로(p-value <0.05) 5,647 개 유전자의 발현차이를 확인할 수 있었다(Fig. 5(b)). 이 중에서 4,042개 유전자의 발현이 대조군 대비 증가하였고, 1,065개 유전자 발현이 감소하였다. 대조군(HH) 대비 각 처리군(HL, LL)에서 발현차이를 나타내는 유전자를 대상으로 Gene Ontology, Bioconductor, DAVID 방법을 적용하여 기능에 대한 주석정보를 추가하였다.

특히, 육계 1주령 맹장에서 대조군(HH) 대비 처리군 1(HL)의 유의적 발현차이(p-value <0.05)가 존재하는 4,367개 유전자와 대조군 대비 처리군 2(LL)의 발현차이를 갖는 5,647개 유전자간의 공통으로 존재하는 차등발현 유전자 3,566개를 확인하였다(Fig. 6).

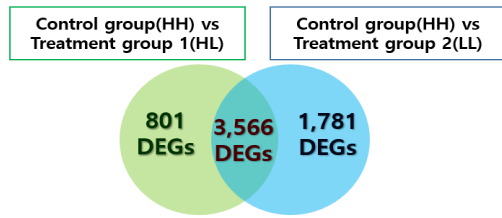


Fig. 6. Venn diagram of the number of genes with significant expressed differences (p-value <0.05) between control group (HH) and treatment groups (HL and LL).

인산분해효소의 첨가량 감소(인산분해효소 500ppm 감소)에 따른 유의적 발현차이가 나는 3,566개 유전자들의 생물학적 기능분석(EASE, Expression Analysis Systematic Explorer 기준 p-value < 0.1)을 하였다. 이와 관련된 총 60종류 생물학적 반응경로가 탐색이 되

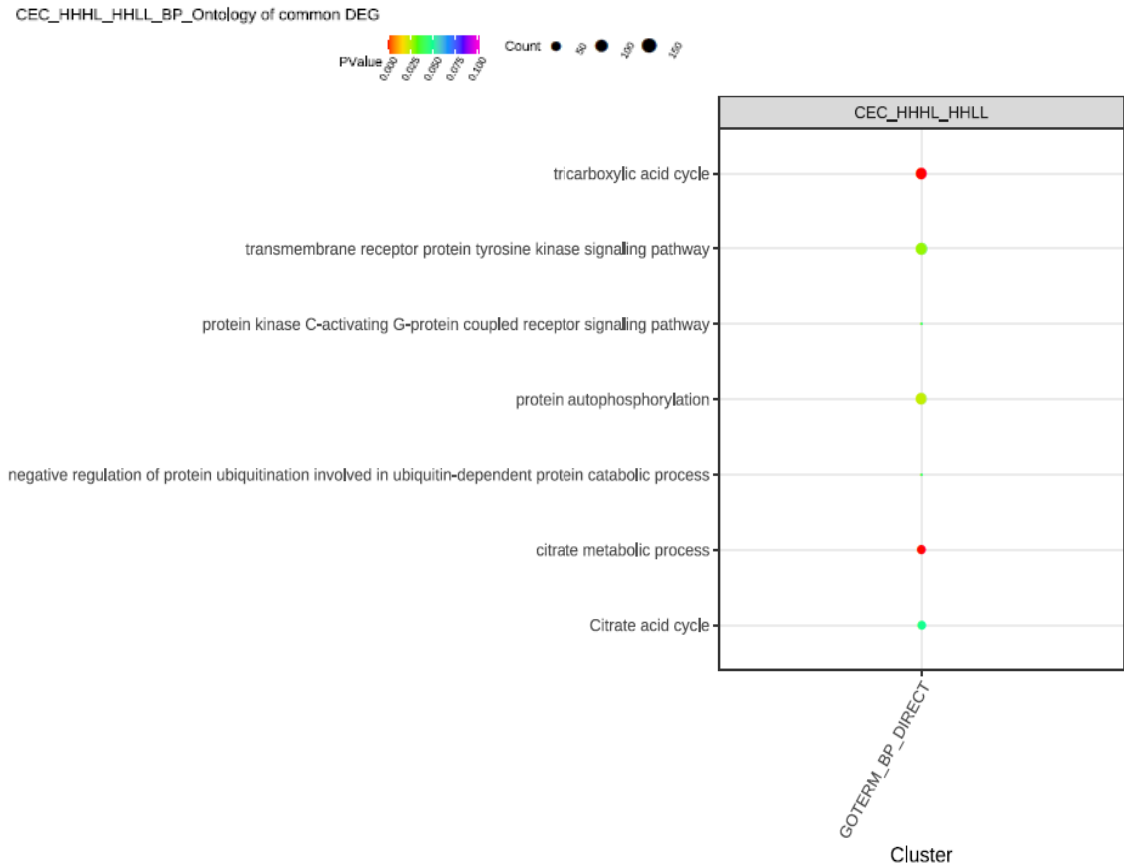


Fig. 7. The Gene ontology (GO) analysis related to energy metabolism using 3,566 common expressed genes with the decreased phytase content in treatment groups HL and LL, compared to control group(HH). Biological processes (BP) functional groups with EASE at p-value < 0.1 are reported in KEGG.

었다. 이중에서 에너지대사 관련 생물학적 기능을 살펴보면, 1) 단백질 자가인산화(protein autophosphorylation) 반응에 관여 20개 유전자(0.56%), 2) 티로신 인산화효소 신호전달 경로(GO ID: GO0007169)에 관여하는 21개 유전자(0.59%)와 3) 단백질 인산화효소 C-활성화 G-단백질 결합수용체 신호경로(GO ID: GO0007205)에 5개 유전자(CISH, DGKB, HTR2B, HTR1B, DGKZ) 등이 인산분해효소의 첨가량이 감소함(1,000ppm에서 500ppm)에 따라, 유의적으로 대조군(HH)과 발현차이를 나타냈다(Fig. 7).

각 에너지 대사 관련 반응경로에 관여하는 유전자들을 Table 2에서 보는 바와 같이 목록화 했다. 놀랍게도, 단백질 자가인산화 반응은 단백질 번역(post-translation) 후, 변형의 유형으로 인산화효소(kinase)에 의해 일어난다[26]. 인산분해효소가 감소함에 따라 자가인산화 반응의 활성을 조절하기 위해 인산화 효소가 세린, 트레오닌, 티로신 아미노산 잔기에 인산기를 추가하는 방향으로 반응경로를 활성화 하였다. 또한, ATP, 뉴클레오타이드 삼인산(nucleotide triphosphate)중에 감마 인산기가 도입된다. 단백질 자가인산화 반응은 세포증식, 분화, 대사, 이동 및 생존 등 관련 세포신호전달을 조절하는 데 필수적이다. 더 나아가서, 세포내 이입과 단백질 분해에 대한 세포의 능력에 영향을 준다.

다른 측면에서 산화적 인산화반응(oxidative phosphorylation)에 관여하는 37개 유전자들의 발현차이가 나타났다(Table 2). 산화적 인산화 반응은 산소호흡을 통해 ATP를 공급하는 반응이다[27]. 진핵세포의 내부에 TCA회로(tricarboxylic acid cycle)에서 산화(탈수소)될 때 생기는 수소이온은 전자전달계를 통해 산화-환원반응으로 최종적으로 물이 되며 이때 에너지를 저장한다(Fig. 8 and Fig. 9). ADP와 인산기가 결합할 때 ATP가 생성되며 이 에너지를 이용하게 된다. 가역적인 반응인데, ATP는 물 또는 수소이온의 첨가에 의해 ADP와 인산기로 가수분해 되어 에너지를 방출할 수 있다. 포도당 1개 분자는 최대 38개 ATP를 생성할 수 있는 데, NADH 및 FADH₂와 같은 조효소(촉매작용)의 도움을 받아 ATP를 생성한다. 에너지가 필요한 경우에는 미토콘드리아에서 영양소를 태우며 에너지 소모과정에서 아세틸-CoA 과정이 관여한다(Fig. 9).

TCA회로와 함께 시트르산 주기회로(citric acid cycle)에 관여하는 12개 차등발현 유전자는 산화를 통해 저장된 에너지를 방출하는 화학반응을 한다. 탄수화물, 지방, 및 단백질로부터 파생된 아세틸-CoA주기는 혐기성, 호기성 호흡에 의해 에너지를 생성한다(Fig. 8).

Table 2. The biological processes of gene ontology (GO) analysis related to energy metabolism using 3,566 common expressed genes with the decreased phytase content in treatment groups HL and LL.

GO ID	Description	Count	Percentage(%)	P-value	Genes
GO:0046777	Protein autophosphorylation	20	0.56	0.024	MAP3K3, SRC, DYRK1A, EIF2AK3, CLK3, IGF1R, FGR, PAK1, FER, GRK5, CAMK4, STK26, MAPKAPK2, KIT, PIM3, CDK12, MAP3K13, FGFR3, EPHB1, FGFR1
GO:0046777	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	21	0.59	0.029	EPHB6, EPHA7, FLT1, MUSK, SRC, MST1R, NGF, IGF1R, FGR, FER, ERBB3, ERBB4, NTF3, ERBB2, KIT, KDR, ROR1, ROR2, FGFR3, EPHB1, FGFR1
GO:0007205	Protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	5	0.14	0.038	CISH, DGKB, HTR2B, HTRB1, DGKZ
GO:0006119	Oxidative phosphorylation	37	1.04	0.00066	ATP6V1A, COX7B, UQCRB, NDUFA12, COX4I1, NDUFB4, NDUFB3, NDUFB2, NDUFB1, ATP5C1, UQCR11, COX7A2, ATP5G3, TCIRG1, UQCR10, COX7C, UQCRFS1, ATP6V1H, NDUFA9, NDUFA8, ATP6V1G1, ATP6V1D, ATP6V0E1, NDUFV2, NDUFA5, ATP5PB, NDUFC2, SDHD, UQCRHL, ATP5J2, COX7A2L, UQCRCQ, NDUFS6, NDUFS4, UQCRC1, ATP6V1B2, ATP6V0D2
GO:0006101	Citrate acid cycle	12	0.34	0.049	CS, SUCLA2, MDH1, IDH1, OGDH, SUCLG1, SUCLG2, OGDHL, ACO1, SDHD, IDH3A, PCK2

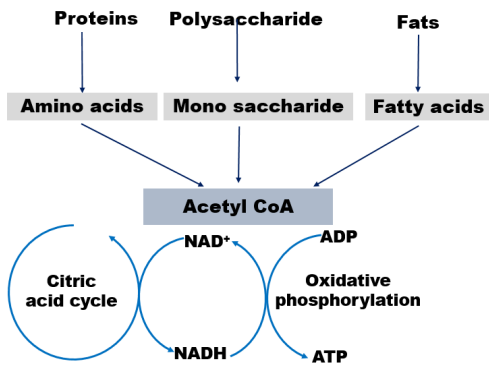


Fig. 8. Energy metabolism of oxidative phosphorylation to make ATP

이 순환은 특정 아미노산의 전구체와 다른 반응에 사용되는 환원제 NADH를 제공한다. 시트르산 회로는 아세테이트(아세틸-CoA 형태)와 물을 소비하고 NAD⁺를 NADH로 환원시켜 이산화탄소를 방출한다. 생성된 NADH는 산화적 인산화(전자수송) 경로로 공급된다. 진

핵세포에서 시트르산회로는 미토콘드리아의 기질에서 반응이 일어나고, 미토콘드리아가 없는 박테리아는 세포표면(원형질)을 가로질러 ATP생산을 세포질에서 수행한다. 당 분해에서 생긴 피루브산에 대해 3개 NADH, 1개 FADH₂, 1개 GTP가 생성된다. 최종적으로 ATP 형태로 사용가능한 화학에너지를 생성하기 위한 영양소의 산화이다.

추가적으로 대조군 대비 2배 이상 차등발현(log₂ | FC | ≥ 2, Fold Change) 하고, 유의적(p-value < 0.05) 차이가 존재하는 117개 유전자(대조군 HH 대비 처리군1 HL에서 49개, 처리군2 LL에서 68개)를 선별 하였다. 사료 내 인산분해효소의 첨가량(1,000ppm에서 500ppm) 감소(처리군1)에 따라 49개 차등발현 유전자(log₂ | FC | ≥ 2)는 세포신호전달과정(15개 유전자, 31%)에 관여하였고, 이중에서 양이온 수송과 관련된 8개 유전자들(KCNH2, WNK2, PIRT, NLGN3, CRHR1, KCIP2, CACNA1G, PRR35)의 발현이 대조군 대비 4배 이상 차이가 났다(green spots in Fig. 5(a)).

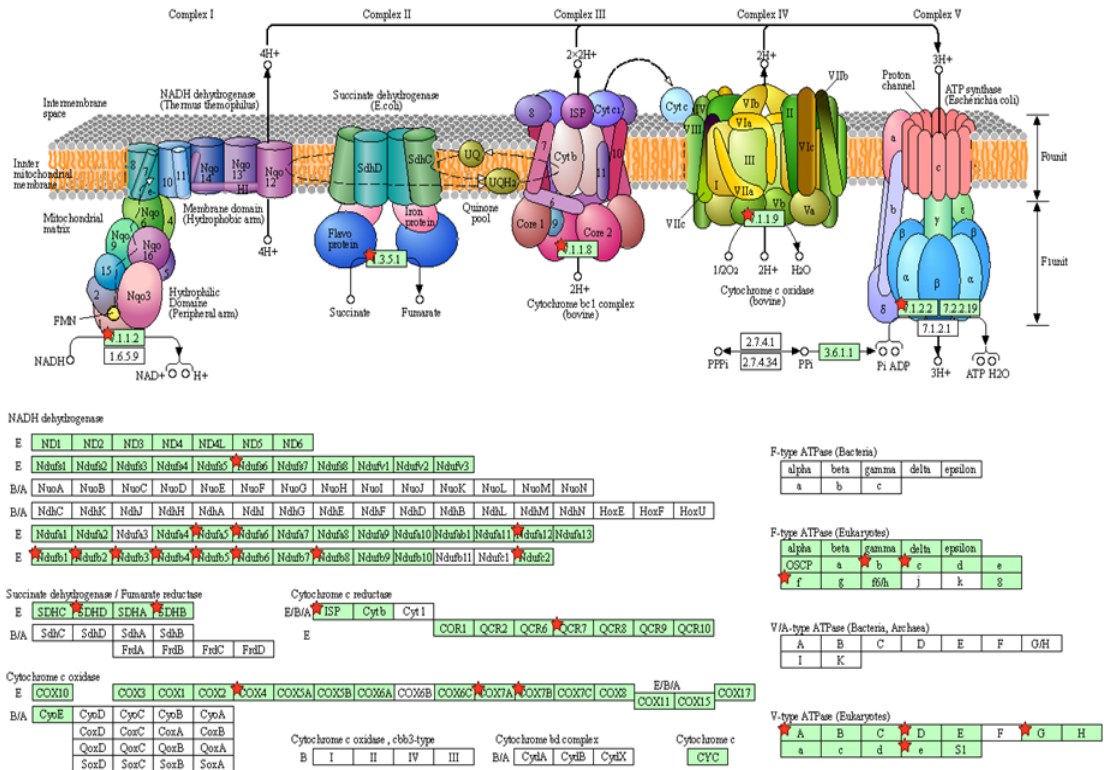


Fig. 9. The oxidative phosphorylation response of 37 common expressed genes (in Table 2) within treatment groups HL(phytase from 1,000 ppm to 500ppm) and LL(crude protein 20%, phytase 500ppm) according to the decreased phytase content in the cecum of 1-week-old broiler chickens.

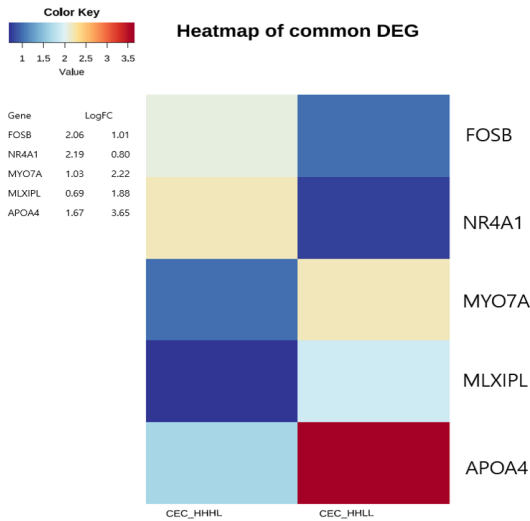


Fig. 10. A heatmap ($\log_2 FC \geq 2$) according to the 5 differentially expressed genes (DEGs) for the treatment groups (HL and LL) in the cecum.

이뿐만 아니라, 처리군2(조단백질 2% 와 인산분해효소 함량 500ppm 동시에 감소)에서는 68개 차등발현 유전자($\log_2 |FC| \geq 2$) 중에서 양이온 수송에 관련된 유전자(KCNH2, WNK2, PIRT, NLGN3, CRHR1 등) 이외에 신경계 발달에 관여하는 유전자 발현의 차이가 존재했다(green spots in Fig. 5(b)). 특히, 화학적 시냅스 전달과정에 관여하는 19개 유전자(HTR3, GRIA4, KCNK3, RIMS3, SST, NLGN3, CACNA1E, GABRG1 등)의 발현이 대조군 대비 4배 이상 증가하였다.

유의적으로 처리군 1(HL)과 2(LL)내 공통적으로 발현되는 3,566개 유전자들 중에서 대조군(HH) 대비 2배 이상 발현($\log_2 |FC| \geq 2$) 차이가 나는 5개 유전자를 확인하였다. 5개 유전자 NR4A1($\log_2 FC$ 값이 2.19 과 0.80), FOSB($\log_2 FC$ 값이 2.06 과 1.01), MYO7A($\log_2 FC$ 값이 1.03 과 2.22), MLXIPL($\log_2 FC$ 값이 0.69 과 1.88), APOA4($\log_2 FC$ 값이 1.67 과 3.65)의 발현차이가 존재하였다(Fig. 10).

맹장에서 공통적으로 발현된 5개 유전자는 모두 단백질 결합에 관여한다(False Discovery Rate, FDR < 0.05). 세포외 인산화 효소가 인산기를 특정한 ETSAP-1 기질과 세포이동에서 JUN 계열 전사인자에 전달하는 인산화 반응을 방해함으로써 조절한다(Fig. 11). 또한, 부신피질자극호르몬(CRH, Corticotropin-Releasing Hormone)반응경로(NR4A1, FOSB, JUN 계열 유전자)에 관여한다.

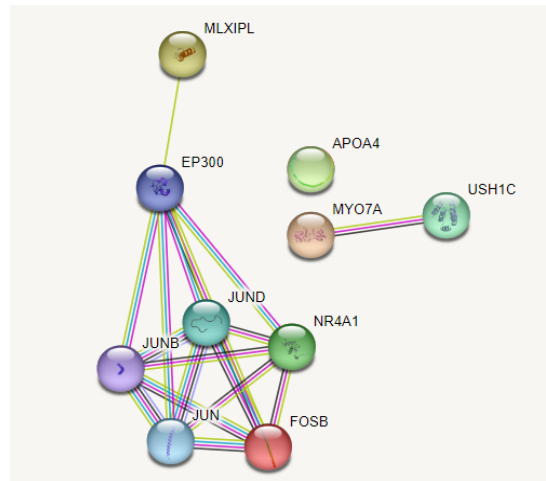


Fig. 11. An interaction network of the common DEGs with decreasing phytase content in the treatment groups (HL and LL)

이 스트레스 반응에 관여하는 펩티드 호르몬은 시상하부-뇌하수체-부신 및 시상하부 뇌 회로에서 기저 및 스트레스 활성화 반응에 대한 체액 및 행동적 반응을 조절하는 신경조절제 역할을 한다(FDR < 0.05).

육계 1주령 사료에서 인산분해효소의 첨가량(500ppm)이 감소함에 따라, 대조군(HH) 대비 처리군1(HL)에서 차등 발현 하는 861개 유전자(Fig. 6)의 작용을 살펴보았다. 이들 유전자의 대부분(106개 유전자, 12.3%)은 대사경로에 관여를 하는 데, 이중에서 단당류인 과당(fructose)과 만노스(monnose)의 분해과정(GO:0006013, p-value 0.04)에 관련된 6개 유전자가 차등 발현된다. 과당분해에서 과당은 과당인산화효소(fructokinase)에 의해 과당-1인산으로 전환되고 aldolase B에 의해 분해되어 DHAP(dihydroxyacetone phosphate) 인산과 글리세르알데히드-3인산을 통해 지방산, 포도당 합성을 유도하는 triglyceride 중간 생성물을 만든다[28]. 또한 당단백질의 소화과정에서 만노스가 생성이 되고, hexokinase 인산화효소에 의해 인산화 되어 만노스-6-인산을 생성한다. 포스포만노스 이성질화효소(phosphomannose isomerase)에 의해 과당6-인산으로 전환된 다음 간세포에서 포도당 합성경로를 통해 포도당-6-인산으로 전환된다. 단당류인 과당과 만노스의 대사과정에 6개 유전자(PFKFB4, FPGT, HKDC1, AKR1B1, FBP1, HK2)가 관여한다.

이와 다르게, 육계 1주령에서 대조군(HH) 대비 사료 내 조단백질 2% 와 인산분해효소 첨가량 500ppm이 동

시에 감소된 처리군2(LL)에서 차등발현 되는 1,781개 유전자(Fig. 6)의 기능을 비교하였다. 처리군1(HL)에서 인산분해효소만 감량 되었을 때 차등발현 유전자와 다르게 핵-세포질 수송(GO:0006913, p-value 0.02), 단백질 운반(GO:0006611, p-value 0.045), 아르기닌 생합성(GO:0006526, p-value 0.083) 과정에 관여를 한다.

핵과 세포질 사이의 단백질과 RNA 능동수송(GO:0006611, p-value 0.045)은 에너지가 필요하며, GTPase Ran에 의해 조절된다. 단백질 운반에 관여하는 8개 차등발현 유전자는 SPCS3, SPCS2, SPCS1, HSPA5, SRP54, SEC11A, SRP9, SEC11이다. 이들 유전자는 GTP 가수분해를 통해서 핵막을 가로질러 기질을 선택적으로 축적하는 데 필요한 화학에너지를 제공한다. 단백질 export는 세포질에서 세포외부로 단백질을 능동적으로 운반한다. 단백질의 핵 수송은 카리오페린(karyopherin) 수송체 계열이 매개 하고 GTPase Ran에 의해 조절된다[29].

핵과 세포질에서 수송(GO:0006913, p-value 0.02)

은 핵 기공 복합체의 특성화, 수송신호 및 수송 수용체의 식별, Ran 시스템(효율적인 운송을 위한 에너지 제공)의 구성요소들이 관여한다. 결과적으로 이 주요 조절은 유전자 발현, DNA 손상 및 복구, 노화, 세포사멸, 세포분화 등과 같은 필수적인 세포 기능에 영향을 미친다. 이때, 처리군2(LL)의 영양수준(조단백질 2%와 인산분해효소 500ppm 감소)에 따라, 차등발현 22개 유전자의 작용은 Fig. 12 에서 보는 바와 같다. 핵과 세포질에서 수송에 관여하는 22개 차등발현 유전자는 NDC1, UPF2, IPO13, NUP205, SEC13, NUP107, UBE2I, NCBP1, NUP155, CSE1L, RANGAP1, IPO7, XPO4, NUP42, NUP85, MAGOH, NUP98, KPNA2, RAE1, RAN, NUP37, KPNA1이다(red star in Fig. 12).

아르기닌 대사(GO:0006526, p-value 0.083)는 아르기닌을 기질로 이용하는 여러 효소의 발현과 아르기닌에 대사에 관여하는 특정효소간의 상호작용 또는 경쟁반응이 가역적으로 일어난다[30].

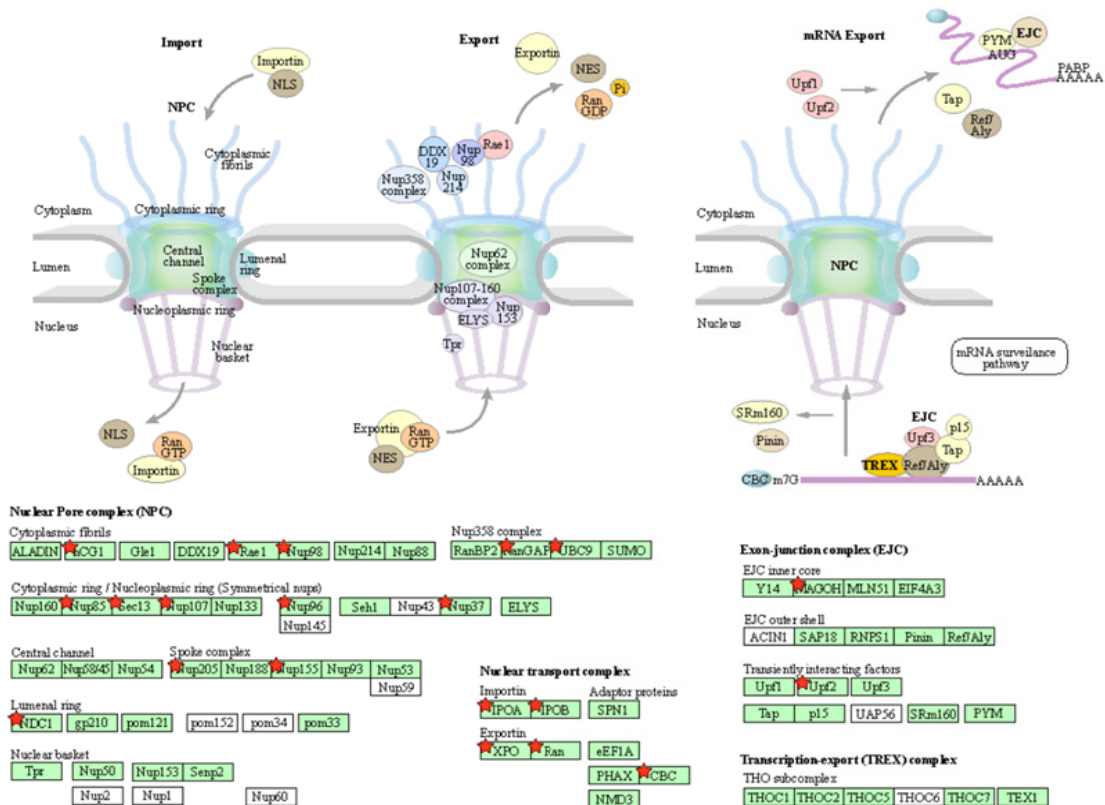


Fig. 12. Schematic overview of Ran-dependent nucleo-cytoplasmic transport and the differentially expressed genes (DEGs) within the treatment group2 (LL) according to the decreased crude protein 2% and phytase 500ppm contents in the cecum of 1-week-old broiler chickens.

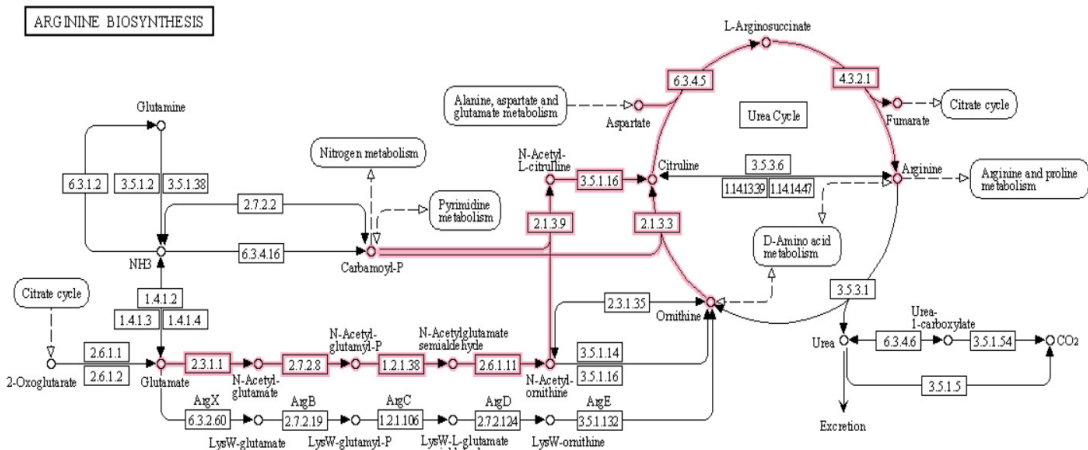


Fig. 13. Schematic overview of arginine biosynthesis with the differentially expressed genes(ARG2, GOT1, NOS2, GLS2, ASL2 and OTC) within the treatment group2 (LL) according to the decreased crude protein and phytase contents in the cecum of 1-week-old broiler chickens.

아르기닌은 세포질효소 argininosuccinate synthetase 합성효소와 argininosuccinate lyase 분해효소의 순차적인 작용에 의해 요소회로에서 시트룰린(Citrulline)로부터 합성된다. 이때 각 argininosuccinate에 대해 ATP가 AMP로 가수분해 되어 2개 인산기 소모를 통해 합성된다. 소장의 상피세포는 글루타민과 글루타메이트로부터 시트룰린을 생성하며 이는 혈류로 분비되어 신장의 근위 세뇨관 세포로 운반되고 아르기닌으로 변환하여 혈액으로 반환된다. 아르기닌 합성을 위한 세포용량은 유도성 산화질소 합성효소(NOS, Nitric Oxide Synthase) 생산이 증가할 때 증가한다(Fig. 13). 이는 산화질소 생산의 부산물인 시트룰린이 산화질소의 경로(Citrulline-NO) 또는 아르기닌-시트룰린 경로로부터 재활용되기 때문이다. 시트룰린은 산화질소 분해의 최종산물 질산염 및 아질산염과 함께 산화질소 생성 세포에 축적된다. 대사는 궁극적으로 산화질소, 요소, 크레아틴, 폴리아민, 프롤린, 글루타메이트(glutamate), 아그마틴(agate), 호모아르기닌 등을 포함한 생합성이 된다.

아르기닌, 글루타민 및 프롤린의 생산은 세포유형 및 발달단계에 많이 의존한다. 예를 들어 신생아, 새끼돼지 경우에는 아르기닌 합성을 위한 장내 프롤린이 유일한 식이 전구체이다. 이는 대조군(HH, 조단백질함량 22%, 인산분해효소 1,000ppm) 대비 사료 내 첨가된 식이 아미노산으로부터 아르기닌 생합성 반응에 관여하는 6개 유전자(ARG2, GOT1, NOS2, GLS2, ASL2, OTC)의 발현차이로 나타났다.

반면에, 메틸화 아르기닌은 아르기닌 잔기가 포함된 단백질을 분해할 때 방출된다. 아르기닌 농도의 변화는 다양한 아르기닌 센서(GCN2, mTORC1 등)를 통해 세포대사 및 기능을 조절할 수 있다. 아르기닌은 세포분열, 상처치유, 신체에서 암모니아 제거, 면역기능, 호르몬 방출에 중요한 역할을 한다. 이는 산화질소의 합성을 위한 전구체이며, 혈압조절에 중요하다. 또한, 아르기닌은 T-세포가 신체에서 면역반응을 하는 데 필요하며, 만일 고갈되면, 조절완화(deregulation)로 이어질 수 있다.

4. 결론

본 연구에서 육계 1주령 36수에 대해 사료 내 영양수준(조단백질과 인산분해효소)에 따라 맹장에서 차등발현 유전자와 대사 경로를 살펴보았다. 대조군(조단백질22%, 인산분해효소 1,000ppm) 대비 인산분해효소의 첨가량 감소(1000ppm에서 500ppm로 감소)에 따라 인산가수분해반응의 역반응인 인산화효소에 의한 1)단백질 자가인산화, 2) 산화적 인산화 반응 등으로 에너지 ATP 생성과 관련 유전자들의 발현차이가 났다. 또한 인산화효소에 의한 3) 단당류(과당이나 만노스)의 인산화를 통해 포도당 합성경로에 관여하는 유전자의 발현이 활성화 되었다.

에너지가 필요한 경우에는 영양소를 태우며 에너지 소모과정에서 4)대사경로(아세틸-CoA 회로, 시트르산 회로, 전자전달계, 해당과정 등)로부터 에너지를 방출하는

이화경로의 분해과정에 관여하는 차등발현 유전자들도 발굴하였다.

더 나아가서, 인산분해효소의 첨가량(1,000ppm에서 500ppm로 총 500ppm) 감소와 함께 조단백질의 함량이 22%에서 20%로 총 2% 감소할 때 5) 핵과 세포질사이에서 단백질, RNA 능동수송, 6) 아르기닌 생합성 등으로 필요한 에너지를 보충하는 방향으로 생체반응이 진행이 되었다.

육계 주령이 증가함에 따라 성장성이 유지되면서 환경 부하를 줄일 수 있도록 적절한 급여기준을 설정하는 연구에 맞춰 다음 단계의 연구를 진행하려고 한다. 영양분 급여수준에 따른 대사산물이 이용됨에 따라 어떻게 기능이 조절이 되는지와 영양소 대사과정에 따른 에너지 동화작용(합성)과 이화작용(분해)에 대해 향상성을 유지하여 성장에 미치는 영향을 줄일 수 있는 부분을 고려하기 위함이다. 이를 통해 사료 내 과잉 영양분(조단백질 등) 첨가 대신에 적용 가능한 아미노산 대체제 개발에 노력할 것이다.

References

- [1] S. E. Aggrey, A. B. Karmuah, B. Sebastian, N. B. Anthony, "Genetic properties of feed efficiency parameters in meat-type chickens", *Genetics, Selection, Evolution*, Vol.42, No.1, pp.25, January 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-25>
- [2] W. Mebratie, P. Madsen, R. Hawken, H. Rome, D. Marois, J. Henshall, H. Bovenhuis, J. Jensen, "Genetic parameters for body weight and different definitions of residual feed intake in broiler chickens", *Genetics, Selection, Evolution*, Vol.51, No.1, pp.53, September 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0494-2>
- [3] N. Doo Seok, L. Jinyoung, K. Changsu, "Strategy to improve the productivity of broilers: Focusing on pre-starter diet", *Korean Journal of Poultry Science*, Vol.42, No.3, pp. 247-256, September 2015. DOI: <http://doi.org/10.5536/KJPS.2015.42.3.247>
- [4] M. R. Abdollahi, V. Ravindran, B. Svihus, "Influence of grain type and feed form on performance, apparent metabolisable energy and ileal digestibility of nitrogen, starch, fat, calcium and phosphorus in broiler starters", *Animal Feed Science and Technology*, Vol.186, No. 3-4, pp.193-203, December 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.10.015>
- [5] Z. Uni, A. Geyra, H. Ben-Hur, D. Sklan, "Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration", *British Poultry Science*, Vol. 41, No.5, pp.544-551, December 2000. DOI: <http://doi.org/10.1080/00071660020009054>
- [6] E. L. O'Reilly, R. J. Burchmore, N. H. Sparks, P. D. Eckersall, "The effect of microbial challenge on the intestinal proteome of broiler chickens", *Proteome Science*, Vol. 15, pp.10, May 2017. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12953-017-0118-0>
- [7] H. U. Rehman, W. Vahjen, W. A. Awad, J. Zentek, "Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens", *Archives of Animal Nutrition*, Vol. 61, No. 5, pp.319-335, October 2007.
- [8] S. Leeson, J. D. Summers, Scott's nutrition of chicken. 4th ed. University Books, Guelph, Ontario, Canada.
- [9] A. J. Cowieson, "Factors that affect the nutritional value of maize for broilers", *Animal Feed Science and Technology*, Vol.119, No.3-4, pp.293-305, April 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.017>
- [10] M. Toghyani, L. R. Mcquade, B. V. McInemey, A. F. Moss, P. H. Selle, S. Y. Liu, "Initial assessment of protein and amino acid digestive dynamics in protein-rich feedstuffs for broiler chicken", *PLoS One*, Vol. 15, No. 9, pp. e0239156, September 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239156>
- [11] R. Kalmendal, R. Tauson, "Effects of a xylanase and protease, individually or in combination and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal morphology in broiler chicken fed a wheat-soybean meal-based diet", *Poultry Science*, Vol.91, No.6, pp.1387-13893, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02064>
- [12] U. Konietzny, R. Greiner, "Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases)" *International Journal of Food science and technology*, Vol. 37, No.7, pp.791-812, September 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x>
- [13] B. A. Nakashima, T. A. McAllister, R. Sharma, L.B. Selinger, "Diversity of phytase in the ruman", *Microbial Ecology*, Vol.53, No.1, pp.82-88, December 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9147-4>
- [14] L. H. Markiewicz, J. Honke, M. Haros, D. Światecka, B. Wróblewska, "Diet shapes the ability of human intestinal microbiota to degrade phytate in vitro studies", *Journal of Applied Microbiology*, Vol.115, No.1, pp.247-259, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12204>
- [15] V. G. R. Mesina, L. V. Lagos, R. C. Sulabo, C. L. Walk, H. H. Stein, "Effects of microbial phytase on mucin synthesis, gastric protein hydrolysis and degradation of phytate along the gastrointestinal tract of growing pigs", *Journal of Animal Science*, Vol.97, No.2, pp.756-767. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/sky439>

- [16] S. P. Golovan, R. G. Meidenger, A. Ajakaiye, M. Cottrill, M. Z. Wiederkehr, D. J. Barney, C. Plante, J. W. Pollard, M. Z. Fan, M. A. Hayes, J. Laursen, J. P. Hjorth, R. P. Hacker, J. P. Phillips & C. W. Forsberg, "Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure", *Nature Biotechnology*, Vol.19, pp.741-745, August 2001
DOI: <https://doi.org/10.1038/90788>
- [17] X. G. Lei, C. H. Stahl, "Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.57, No.4, pp.474-481, November 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530100795>
- [18] V. H. C. Moita, K. Sung woo, "Nutritional and functional roles of phytase and xylanase enhancing the intestinal health and growth of nursery pigs and broiler Chickens", *Animals*, Vol.12, No.23, pp. 3322, November 2022.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12233322>
- [19] P. H. Selle, A. J. Cowieson, N. P. Cowieson, V. Ravindran, "Protein-phytate interaction in pig and poultry nutrition: a reappraisal", *Nutrition Research Reviews*, Vol.25, No. 1, pp.1-17, June 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- [20] Y. D. Li, A. Awati, H. Schulze, G. Partridge, "Phytase in non-ruminant animal nutrition. A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.95, No.5, pp.878-896, March 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- [21] D. Kim, J. M. Paggi, C. Bennett, S. L. Salzberg, "Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype", *Nature Biotechnology*, Vol. 37, No.8, pp.907-915, August 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- [22] N. Gill, B. Dhillon, "RNA-seq Data Analysis for differential expression", *Methods in Molecular Biology*, Vol.2022, No.2391, pp.45-54, October 2021.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1795-3_4
- [23] D. W. Huang, B. T. Sherman, Q. Tan, J. Kir, D. Liu, D. Bryant, Y. Guo, R. Stephens, M. W. Baseler, H. C. Lane, R. A. Lempicki, "DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists", *Nucleic Acids Research*, Vol.35(Web Server Issue), pp.W169-175, Jun 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm415>
- [24] L. Chen, Y. H. Zhang, S. Wang, Y. Zhang, T. Huang, Y. D. Cai, "Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways", *PLoS One*, Vol.12, No.9, e0184129, September 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184129>
- [25] M. D. Robinson, G. K. Smyth, "Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance", *Bioinformatics*, Vol. 23, No. 21, pp.2881-2887, November 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm453>
- [26] F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Trolano, L. Muzio, "The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)", *International Journal of Molecular Medicine*, Vol.40, pp. 271-280, June 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
- [27] S. Papa, P. L. Martino, G. Capitanio, A. Gaballo, D. De Rasmio, A. Signorile, V. Petruzzella, "The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol.942, pp.3-37, December 2011.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1
- [28] S. W. Rizkalla, "Health implications of fructose consumption: A review of recent data", *Nutrition and Metabolism*, Vol.7, pp.82, November 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-82>
- [29] B. Cautain, R. Hill, N. de Pedro, W. Link, "Comments and regulation of nuclear transport process", *Federation of European Biochemical Societies Journal*, Vol.282, No.3, pp.445-462, February 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.13163>
- [30] S. M. Morris Jr, "Arginine metabolism revisited", *Journal of Nutrition*, Vol.146, No.12, pp.2579S-2586S, December 2016.
DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.115.226621>

채 한 화(Han-Ha Chai)

[정회원]



• 2010년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물 기능유전체, 화학·생명정보 응용연구(분자모델링)

최 현 지(Hyunji Choi)

[정회원]



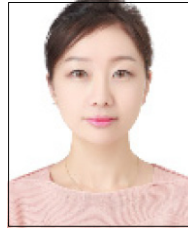
• 2021년 5월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 연구원

<관심분야>

생물정보, 가축 집단 유전체

임 다 정(Dajeong Lim)

[정회원]



• 2007년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

가축 집단 유전체, 생명정보 적용 유전자 선발

홍 의 철(Eui-Chul Hong)

[정회원]



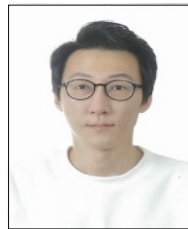
• 2019년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 연구사

<관심분야>

단위가축영양, 축산환경

박 원 철(Woncheoul Park)

[정회원]



• 2019년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

집단 유전체, 전사체, 다중-오믹스

차 지 혜(Jihye Cha)

[정회원]



• 2017년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축 집단 유전체, 유전육종