

저항전분 함량이 높은 옥수수의 급여가 비글의 장내 미생물 환경 및 기능 변화에 미치는 영향

조현우, 서강민, 이민영, 천주란, 김기현*
농촌진흥청 국립축산과학원

Effects of feeding corn with high resistant starch on gut-microbiota composition and functional alteration in beagles

Hyun-Woo Cho, Kangmin Seo, Min Young Lee, Ju Lan Chun, Ki Hyun Kim*
National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

요약 저항성 전분은 소화효소에 의해 소화되지 않고 장내 미생물에 의해 발효되어 단쇄지방산과 같은 대사산물로 전환되어 다양한 기작을 통해 생체에 유익한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 저항전분 함량이 높은 옥수수를 함유하는 사료의 급여가 반려견의 장내 미생물 생태계에 어떠한 영향을 미치는 지 분석하기 위해 수행되었다. 대조구는 저항전분 함량이 낮은 쌀을 기반으로 한 사료급여구로 설계하였으며, 처리구는 가열-냉각 방법으로 저항전분의 함량을 증진시킨 옥수수를 기반으로 한 사료급여구로 설계하여 각각의 사료를 16주간 급여 했다. 장내 미생물의 다양성 변화를 확인하기 위해 alpha diversity 및 beta diversity를 분석한 결과, 대조구와 처리구간의 차이는 관찰되지 않았다. 그리고 비만 환경에서 풍부도가 증가하는 것으로 알려진 장내 미생물 중, genus 수준의 *Erysipelatoclostridium*이 대조구와 비교했을 때 처리구에서 order 수준부터 계통적으로 감소했다. 장내 미생물의 풍부도가 변화된 환경이 기능적으로 미치는 영향을 분석하기 위해 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway database를 활용하여 PICRUS2로 분석한 결과, 대조구에 비해 처리구에서 sulfur metabolism ($p < 0.001$)과 insulin signalling pathway ($p < 0.01$)의 증가 및 carbohydrate metabolism인 pentose phosphate pathway와 pentose and glucuronate interconversions가 감소했다($p < 0.01$). 상기의 결과를 토대로 종합해보면, 비글견에서 저항전분 섭취수준의 증가는 장내 미생물 환경에서 당 대사와 지질 대사에 유익한 역할을 사료된다.

Abstract Resistant starch (RS) is not broken down by digestive enzymes, but is instead, fermented by gut microbes and converted into metabolites, such as short-chain fatty acids, which have beneficial effects on the body via multiple mechanisms. This study examined the effects of feeding corn with high RS levels on the gut-microbial ecosystem in beagles. The control group was fed a rice-based diet with a low RS level, and the treatment group was fed a corn-based diet with a high RS level. After 16 weeks of feeding, the alpha- and beta-diversity were similar in the two groups. The genus *Erysipelatoclostridium*, which has higher abundance in obese individuals, was decreased from the order level in the treatment group. The function prediction by the modified gut-microbiota using the KEGG pathway database with PICRUS2 showed that the sulfur metabolism ($p < 0.001$) and insulin signaling pathway ($p < 0.01$) increased and carbohydrate metabolism pathways, including the pentose phosphate pathway and pentose and glucuronate interconversions, decreased ($p < 0.01$) in the treatment group compared with the control group. These results suggest that RS can play a beneficial role in anti-obesity, glucose, and lipid metabolism in the gut-microbial ecosystem of beagles.

Keywords : Canine, Resistant Starch, Microbiome, Metabolism, Pet Food

본 논문은 2023년도 농촌진흥청 반려동물연구사업단(PJ01398401) 연구사업의 지원에 의해 이루어진 것임. 본 연구는 2023년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

Cho, H.W. and Seo, K.M. contributed equally as a first author in this study.

*Corresponding Author : Ki Hyun Kim(National Institute of Animal Science)

email: kihyun@korea.kr

Received May 4, 2023

Revised May 24, 2023

Accepted June 2, 2023

Published June 30, 2023

1. 서론

개는 생물 분류 체계에서 식육목 (Carnivores)의 것과 (Canidae)에 속하며, 육식동물의 특성을 지녔지만, 같은 것과인 늑대와 whole genome re-sequencing을 활용한 비교 분석을 통해 오랜 가축화 기간에 의해 진화적으로 영향을 받은 genome의 영역이 밝혀졌다. 그 중, AMY2B (Amylase alpha 2B)와 같은 전분을 소화할 수 있는 유전자의 변이가 확인됐다[1,2]. 즉, 개는 다양한 식단에 대한 소화 체계를 생존에 유리할 수 있도록 가축화 단계에서 유전적으로 진화했다. 전분은 소화가 잘되는 전분 (Rapidly digestible starch), 천천히 소화되는 전분 (Slowly digestible starch)과 저항성 전분 (Resistant starch, RS)으로 분류 할 수 있다[3]. 이 중, RS는 건강한 사람의 소장에서 흡수되지 않는 전분과 전분 분해물의 총합으로 정의된다[4]. RS의 화학적 구조 특성상 생체 내에서 분비되는 효소에 의해서는 소화가 되지 않고 위장을 통과한 후, 대장에서 여러 가지 장내 미생물에 의한 대사과정에서 발효가 되며, butyrate와 acetate, propionate와 같은 단쇄 지방산을 생성한다[5]. 그로 인한 생체에 미치는 다양한 기능 중에서, 대장에서는 항암작용의 기능을 개선시키고, 혈액 내에서는 당과 중성지방 및 콜레스테롤의 수치를 줄이는 등 건강을 개선시킬 뿐 만 아니라, 장내 미생물들의 대사 및 대사산물에 의한 기능적으로 항비만에 대한 측면이 보고됐다[5,6]. 이와 같은 RS는 옥수수, 밀, 쌀, 감자, 고구마 등 다양한 곡류 및 근과류에 함유되어 있다[7,8]. 우리는 선행연구에서 다양한 곡류 및 근과류 중에서 옥수수가 가장 높은 RS 함량을 가지며, 가열-냉각 방법에 의하여 RS의 함량이 증가되는 것을 확인하였다.

한편, 최근 반려동물 사료에서 가장 많이 사용되는 탄수화물 공급원으로는 쌀이 이용되고 있으나, 영양학적 가치 및 경제성 등을 고려하였을 때 옥수수 또한 탄수화물 공급원으로써 상업적 가치가 뛰어나 쌀 대체 원료로써 활용 가능성을 가지고 있다. 다만, 최근 반려인들의 반려동물에 대한 인식변화[9,10], 무곡물 사료(Grain free) 대한 선호도 증가, 알레르기 유발 가능성이 높다는 오해와 더불어 사료의 프리미엄화 등에 의해 사료 원료로써 옥수수에 대한 부정적 인식이 확대되고 있다[11]. 하지만 반려견의 사료 원료로써 알레르기가 유발되는 주된 항원은 옥수수가 아닌 동물성 단백질이며, 이에 따른

반려동물 사료의 탄수화물 원료로써 옥수수에 대한 이미지가 재고의 필요성이 제기되고 있다[11,12].

따라서, 본 연구는 저항전분의 함량이 증가된 옥수수를 기반으로 한 사료의 급여가 쌀을 기반으로 하는 사료를 섭취한 그룹과 비교하여 장내 미생물 군집의 변화를 확인하고 탄수화물 원료로써 옥수수를 기반으로 한 반려견의 사료가 사료로써 적합한지에 대한 검토를 위해 장내 미생물 환경의 기능적 변화를 분석했다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시동물 및 실험 설계

본 연구의 동물실험은 국립축산과학원 동물실험윤리위원회의 승인(NIAS-2021-520)을 받아 수행되었다. 공시동물은 Association of American Feed Control Official(AAFCO)[13]에서 권장하는 최소시험두수와 국립축산과학원 동물실험윤리위원회IACUC의 3R 원칙에 의거하여 10마리를 배치하였다. 10마리의 비글(2.9 ± 0.05 년)은 농촌진흥청 국립축산과학원내 온도 (22 ± 1℃)와 습도 (50 ± 10%)가 일정하게 유지되는 동일한 환경 하에서 개별 사육 (가로 170 cm × 세로 210 cm) 했다. 실험 개시 전에 모든 개체들은 동일한 사료를 섭취했다. 저항전분의 함량이 2.33%였던 옥수수는 100℃에서 30분간 스팀가열 후, 4℃에서 24시간동안 냉각해서 6.69%로 저항전분의 함량을 증진시켰다. 이후, 실험을 위한 대조구 (LRS)는 쌀을 기반으로 배합했고, 실험구 (HRS)는 가열-냉각 방법으로 저항전분의 함량을 증진시킨 옥수수를 기반으로 배합한 후에 펠릿화했다. LRS와 HRS의 시험사료는 화학적 성분과 열량이 동일하게 제조했고, 저항전분의 함량만 LRS는 1.09%, HRS는 3.12%로 차이가 있었다(Table 1).

공시동물은 LRS와 HRS에 5마리씩 성별 구분 없이 무작위로 배치했고, 사료의 급여량은 FEDIAF (European pet food industry federation)에서 제시하는 기준으로 132 × 대사 체중(체중^{0.75})으로[14] 개체별 대사 에너지 요구량이 동일하게 16주간 개체별 급여를 실시하였으며, 음수는 자유음수를 실시했다. 이후, 장내 미생물 분석을 위해 16주간 급여 후, 동일한 시점에서 분변 샘플을 채취했다.

Table 1. Information of ingredients and proximate analysis of diets for experiment.

	LRS	HRS
Resistant starch content, %		
Ingredients	2.33	6.69
Experiments diet	1.09	3.12
Ingredients, %		
Rice powder	31.9	-
Corn powder	-	29.2
Chicken breast powder	15.0	17.7
York powder	12.0	12.0
Green laver	1.0	1.0
Cabbage powder	1.0	1.0
Calcium carbonate	1.0	1.0
Green laver	1.0	1.0
Lard	1.5	1.5
Potassium citrate	0.6	0.6
Vitamin and mineral premix	0.4	0.4
Salt	0.2	0.2
Water	35.0	35.0
Proximate analysis, %		
Crude protein	33.08	33.01
Crude fat	15.9	15.59
Crude ash	0.29	0.28
Crude fiber	2.49	2.38
Nitrogen-free extract	48.24	48.74
Calcium	0.83	0.81
Phosphorus	0.59	0.57
Calorie content, kcal/kg	4198	4187

LRS: group fed with a rice diet for 16 weeks, HRS: group fed with a corn diet for 16 weeks, $n = 5$ per group.

2.2 분변 샘플 내 16s rRNA의 염기서열 분석

분변샘플의 DNA는 NucleoSpin DNA Stool Kit (Macherey-Nagel, Germany)를 사용하여 추출했다. 추출한 DNA의 염기서열은 illumina MiSeq (2 x 300bp, paired-end sequencing)로 16s rRNA에서 V3-V4 영역 (341F/805R)의 특정 프라이머 (Forward: 5'-CTACG

GGNGGCWGCAG-3', Reverse: 5'-GACTACHVGG GTATCTAATCC-3')를 사용해서 염기서열을 생성했다. 생성된 V3-V4 영역의 forward read와 reverse read의 fastq파일은 QIIME2 (Quantitative insights into microbial ecology, version 2020.11)에 삽입하고 quality score를 확인 후, forward read와 reverse read의 필터 (cut-off < 20) 및 demultiplexing을 수행했다[15]. 이 후, demultiplexing된 read들의 clustering을 위해 DADA2 (Divisive amplicon denoising algorithm, 2)로 primer와 adapter를 trimming 후, denoising 및 chimera를 제거한 장내 미생물 분석에 사용될 feature 인 ASVs (amplicon sequence variants)를 생성했다 [16]. 그리고 16s rRNA의 참조 유전체 중에서 SILVA full-length (version SSU138)를 사용해서 염기서열 분석에 사용한 특정 V3-V4영역의 primer를 pre-trained 후, taxonomy classification을 분석했다[17].

2.3 장내 미생물 다양성 분석

장내 미생물 군집에 대한 다양성을 분석하기 위해 생성된 ASVs를 활용하여 QIIME2의 q2-diversity plug-in으로 분석했다. 장내 미생물의 다양성을 분석할 수 있는 지표 중, alpha diversity 분석은 Chao1 index, evenness, Shannon index, Simpson index 분석을 통해 장내미생물 다양성, 균일성 및 풍부도를 분석했다. 그리고 LRS와 HRS의 장내 미생물 군집 구성 차이를 확인하기 위한 beta diversity 분석은 Jaccard distance와 Bray-Curtis distance를 분석했다. Alpha diversity 분석에 사용된 다양성 지표들에 대한 통계분석은 plug-in에 내장된 Kruskal-Wallis로 분석했다. Beta

Table 2. Result of filtered reads by DADA2 on gut-microbiome of dogs after feeding experimental diets.

Sample-id	Group	Input reads	Filtered reads	Denoised reads	Merged reads	Non-chimeric reads
F1	HRS	390598	263359	262244	255846	212538
F3	HRS	210473	148048	147315	141776	93304
F5	LRS	327379	227361	226287	220922	174170
F7	LRS	165547	112652	111887	106779	81008
F12	HRS	155969	112252	111498	106854	82741
M7	HRS	153869	112622	112099	108426	81210
M9	LRS	412823	285182	283531	273889	224948
M10	LRS	173617	121093	120335	115818	91377
M11	LRS	225839	161883	161064	156318	127570
M12	HRS	260464	183324	182565	180489	164799

Number of non-chimeric reads were used for analysis of gut-microbiota features after running DADA2.

LRS: group fed with a rice diet for 16 weeks, HRS: group fed with a corn diet for 16 weeks, $n = 5$ per group.

diversity 분석의 통계분석은 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance)로 분석했다.

2.4 LEfSe 분석 및 기능 예측

LRS과 HRS간의 장내 미생물에서 바이오마커를 찾기 위한 분석 프로그램인 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) 분석을 위해, taxonomic rank의 genus에서 collapse했다. LEfSe분석은 cut-off (LDA score < 3.0) 및 Kruskal-Wallis로 통계분석을 실시했다[18]. 그리고 장내 미생물군의 환경 변화에 의한 미생물군의 기능적인 변화를 예측하기 위해 PICRUSt2 (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)분석을 사용했고[19], 분류된 기능들에 대한 주석을 달기 위해 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 데이터베이스를 활용했다. 분석된 데이터는 STAMP (Statistical analyses of metagenomic profiles)를 활용하여 시각화 및 Kruskal-Wallis로 $p < 0.01$ 를 통계적 유의성으로 인정했다[20].

3. 결과 및 고찰

3.1 염기서열 분석 및 장내 미생물의 다양성 분석

장내 미생물 분석을 위해 사용된 염기서열의 Phred quality score는 33이상이었다. 분석의 오류를 최소화하기 위해서 염기서열 분석에 사용된 프라이머 서열을 제거하고 각 리드들의 필터링 및 키메라를 제거한 결과, 총 10개의 염기서열 파일에서 평균 133366.5 ± 56504 개의 ASVs (Amplicon sequence variants)가 생성됐다(Table 2). 생성된 ASVs를 활용하여 저항전분의 함량이 높은 옥수수를 기반으로 한 사료가 장내 미생물의 다양성과 풍부도에 영향을 미쳤는지 확인하기 위해, alpha diversity를 분석했다(Table 3). 분석 지표는 Shannon

index, Chao1 index, species evenness 및 Simpson index를 사용했고, 모든 지표에서 LRS와 HRS간의 통계적 유의차가 없었다. Chao1은 LRS에서 125.30 ± 13.50, HRS에서 95.60 ± 13.45로 감소하는 경향이 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 장내 미생물 종들의 균일함의 정도를 측정할 수 있는 species evenness 지표에서도 LRS와 HRS에서 각각 0.57 ± 0.02, 0.58 ± 0.03으로 차이가 없었다. 또한, 미생물 종의 수와 분포정도를 고려하는 분석 지표인 Shannon 지수와 특정 종에 편중된 정도를 확인할 수 있는 Simpson 지수에서도 저항전분 함량이 상대적으로 높은 옥수수 사료의 급여에 의한 변화가 없었다.

추가적으로 시험 사료 급여에 의해 LRS와 HRS간의 장내 미생물 군집 변화를 확인하기 위해 Bray-Curtis distance와 Jaccard distance를 분석했다(Fig. 1). 그 결과, 두 지표 모두 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 종합해보면 탄수화물 원료의 차이와 저항전분 함량의 차이에 의한 장내 미생물 종의 다양성과 군집 간의 거리 차는 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 대표적인 반려견 사료의 탄수화물 원료인 쌀과 대비했을 때, 저항전분의 함량을 개선시킨 옥수수 사료는 반려견 사료의 탄수화물 원료로서 장내 미생물에 부정적인 영향이 없음을 확인했다.

3.2 장내 미생물 종의 LEfSe 분석 및 기능 예측

LRS와 HRS간의 장내 미생물 종들에 대한 변화를 특성화하기 위해서 생물 분류 단계 중, 속(Genus) 수준까지의 장내 미생물들에 대한 LEfSe를 분석했다(Fig. 2). 그 결과, metagenomics에서 분류된 문(Phylum)의 Patescibacteria와 그 하위 계통인 강(Class)의 *Saccharimonadia*, 목(Order)인 *Saccharimonadales*, 과(Family)인 *Saccharimonadaceae*, genus인 *TM7a*가 계통적으로 LRS에 비해 HRS에서 풍부도가 감소했다(Fig. 2A and 2B). Patescibacteria는 Parcubacteria, Microgenomates, Sphingibacteriia 및 *Saccharibacteria*

Table 3. Result of gut microbial alpha diversity of each group in dogs after feeding diet of rice and corn.

Alpha diversity	Group		p-value
	LRS	HRS	
Chao1 estimates ± SD	125.30 ± 13.50	95.60 ± 13.45	0.158
Evenness ± SD	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.908
Shannon's index ± SD	3.97 ± 0.14	3.75 ± 0.18	0.366
Simpson's index ± SD	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.230

LRS; group fed with a rice diet for 16 weeks, HRS; group fed with a corn diet for 16 weeks, SD; Standard deviation, n = 5 per group.

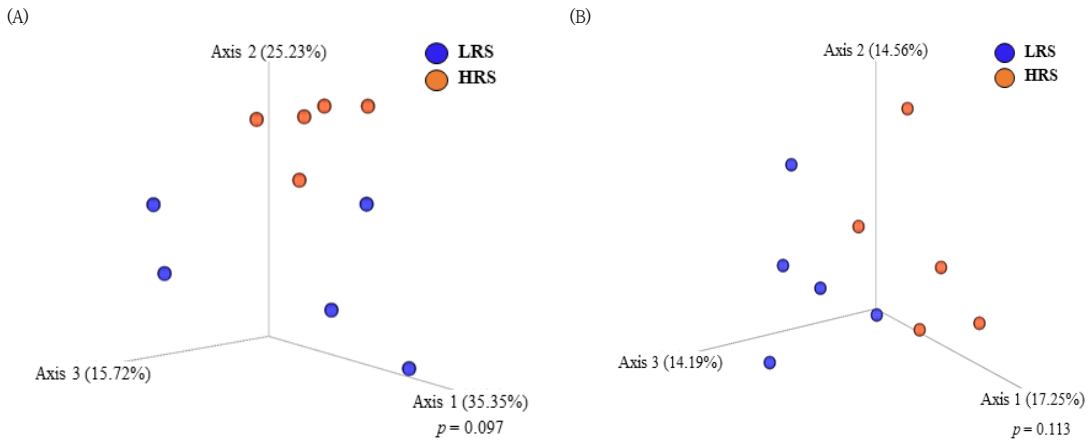


Fig. 1. Result of gut-microbial beta diversity of each group in dogs after feeding diet of rice and corn. (A) Bray-curtis distance. (B) Jaccard distance. The axes were showed component numbers of % variance. LRS; group fed with a rice diet for 16 weeks, HRS; group fed with a corn diet for 16 weeks, n = 5 per group

등 여러 가지 문(Phylum)을 포함하는 상문(Superphylum)이며, candidate phyla radiation (CPR)의 동음어로 사용된다. CPR은 *in silico*에서 분류된 초소형 박테리아로 구성되며 고유한 리보솜의 기능을 가지고 있고 *in vitro*에서 배양이 어려운 특징이 있다[21]. CPR에 속하는 여러 가지 후보 문(Phylum)중에서 완전한 계층 서열이 결정된 미생물인 *Saccharibacteria*는 *TM7*과 동음어로 그 하위계통에 강(Class)인 *Saccharimonadia* 부터 속(Genus)인 *TM7a*가 속해 있다[22,23]. *TM7a*는 *TM7*그룹에 속하고 단일세포 염기서열 분석 방법에 의해 분류됐지만[24], 완전한 배양이 어렵기 때문에 미생물의 특성 및 기능적인 면이 아직까지 알려지지 않았다. 이러한 *TM7*그룹 중에 현재까지 유일하게 배양된 *TM7x*는 사람의 구강에서 배양되었고, *in vitro*에서 안정적인 배양이 가능하다[24]. *TM7x*는 XH001과 물리적으로 붙어서 공생하며 생리적으로 세포의 스트레스 유발, 생존력 저하 및 산화 스트레스 상태와 유사한 반응을 유도 한다 [25-27]. 하지만 본 연구에서 도출된 *TM7a*의 상대적 풍부도 감소에 대한 해석은 여러 가지 여지가 남아있으며, 다양한 방향에서 장내 미생물 데이터가 축적될 필요가 있다. 그리고 *Firmicutes*의 강(Class)인 *Erysipelotrichia*의 목(Order)인 *Erysipelotrichales*, 과(Family)인 *Erysipelotrichaceae*와 속(Genus)인 *Erysipelatoclostridium*의 풍부도가 계통적으로 감소했다(Fig. 2A and 2B). Turnbaught 등에[28] 따르면 비만인의 장내 미생물 분석에서 *Erysipelotrichaceae*의 풍부도가 증가했다고 보고했다. 그리고 C57BL/6 마우스에 고지방식사와 김



Fig. 2. Analysis of the linear discriminant analysis effect size (LEfSe) of each group in dogs after feeding diet of rice and corn. (A) Cladogram. (B) Plots of the LEfSe. LDA score < 3.0, p_u, phylum; c_u, class; o_u, order; f_u, family; g_u, genus; LRS; group fed with a rice diet for 16 weeks, HRS; group fed with a corn diet for 16 weeks, n = 5 per group

치를 첨가 급여했을 때, 김치를 첨가하지 않은 고지방식이 급여 그룹에 비해 체중이 감소했고 *Erysipelatoclostridium*의 풍부도가 감소했다[29]. 또한, 고지방식을 급여한 C57BL/6J 마우스에서 50 mg/L의 볼소가 첨가된 음수는 비만의 정도가 심화될 뿐만 아니라, 장내 *Erysipelotrichaceae*의 풍부도가 크게 증가했다[30]. LEfSe 분석 결과를 종합해보면, 저항전분 함량이 상대적으로 높은 옥수수 사료의 급여는 반려견의 장내 미생물 중, 목(Order)수준에서 *Erysipelotrichales*부터 과(Family)인 *Erysipelotrichaceae*와 그것의 속(Genus)인 *Erysipelatoclostridium*을 계통적으로 감소시키며, 이는 장내 미생물의 생태계가 항비만에 긍정적인 방향으로 조성된 것일 수 있다.

추가적으로 상기의 장내 미생물 종들의 풍부도 변화 분석 결과를 토대로 기능적 변화를 분석하기 위해 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) database를 사용하여 PICRUST2 (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)로 분석했다(Fig. 3). 그 결과, HRS에서 KEGG pathway의 level 3인 황 대사(Sulfur metabolism, $p < 0.001$)과 인슐린 신호전달 경로(Insulin signaling pathway, $p < 0.01$)가 각각 증가했다. 그리고 KEGG pathway의 level 2인 탄수화물 대사(Carbohydrate metabolism)에 속하는 level 3의 오탄당 인산경로(Pentose phosphate pathway)와 펜토스 및 글루쿠로네이트 상호 전환(Pentose and glucuronate interconversions)이 각각 감소했다 ($p < 0.01$). 황은 생리적으로 중요한 아미노산인 시스테인(Cysteine)과 메티오닌(Methionine)이나 항산화 기능을 갖는 글루타치온(Glutathione)과 같은 물질의 구성원으로서, 황 대사(Sulfur metabolism)는 생체 내 주요 에너지 대사과정이다[31]. 황 대사의 주요 산물인 메티오닌(Methionine)의 섭취는 혈액 내 HDL-콜레스테롤을 증가시키고 apolipoprotein A1 유전자의

발현이 증가했다[32]. 또한, 황산염 환원(Sulphate reduction)은 혐기성 미생물의 에너지를 얻기 위해 주로 대사되며, 동화와 이화과정 모두 ATP에 의존하는 것으로 잘 알려져 있다. 동화과정에서 황산염 환원은 시스테인 또는 호모시스테인(Homocysteine)을 최종 산물로 생성하고 이러한 시스테인(Cystein)은 항산화능력이 있으며, 생체의 대사 작용에서 중추적인 역할을 한다[33]. 그리고 항산화 기능을 갖는 글루타치온(Glutathione)의 환원에 사용되는 효소인 NADPH 생성에 관여하는 오탄당 인산 경로(Pentose phosphate pathway)가 감소함으로써, 장내 미생물의 환경이 산화 스트레스에 긍정적으로 변한 것으로 생각된다. 또한, 오탄당 인산경로(Pentose phosphate pathway)와 펜토스(Pentose) 및 글루쿠로네이트(Glucuronate) 상호 전환이 감소했고, 인슐린 신호전달 경로(Insulin signaling pathway)의 증가는 저항전분의 특성에 기인했을 것으로 생각된다. 인슐린은 췌장의 랑게르한스섬에 존재하는 세포에 의해 분비되며, 분비된 단백질은 인슐린 수용체(Insulin receptor)에 결합하여 인슐린 수용체 기질(Insulin receptor substrate)의 인산화를 통해 신호를 전달한다. 상기와 같은 인슐린 기작의 대표적인 대사는 당질대사며 당뇨병의 경우 태생적으로 인슐린의 기능이 떨어지거나, 인슐린의 감수성 저하 또는 인슐린 저항성에 의해 발생하는 것으로 잘 알려져 있다. 저항전분의 섭취에 의해 이러한 인슐린 감수성이 향상된다는 연구 결과는 많은 임상 연구를 통해 보고되었다[34-36]. 또한 저항전분 섭취 시, 장에서 분비되는 호르몬인 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)과 PYY (Peptide YY)의 상향 조절에 의해 체지방의 축적이 감소한다[37]. 즉, 인슐린과 체중의 상관관계에 의한 직·간접적인 영향도 배제할 수 없다. 추가적으로 인슐린은 생체에서 당 대사를 포함하여 단백질 합성, 세포의 증식 및 분화 등의 필수적인 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다[38].

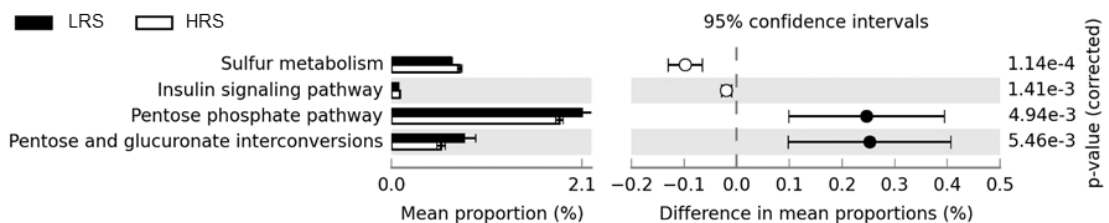


Fig. 3. Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUST2) analysis results of predicted functional kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway between the rice and corn diet in fecal microbiota. LRS; group fed with a rice diet for 16 weeks, HRS; group fed with a corn diet for 16 weeks, n = 5 per group.

따라서, 비록 분자생물학적인 추가 분석 및 검증이 필요하지만, LRS에 비해 HRS에서 반렐견의 장내 미생물 중, 비만 연관 미생물인 *Erysipelatoclostridium*이 계통적으로 감소하고 황 대사와 인슐린 신호전달 경로의 기능이 증가했다. 상기의 결과를 종합해보면, 저항전분의 함량이 개선된 옥수수 사료 섭취에 의한 반렐견의 장내 미생물 생태계의 변화는 항비만적인 환경으로 변하는 것을 확인했다.

4. 결론

저항전분의 함량을 개선시킨 옥수수를 기반으로 한 사료 섭취는 여러 가지 장내 미생물 중, 지방함량이 높은 식단에서 풍부도가 높은 것으로 알려진 장내 미생물인 *Erysipelatoclostridium*이 목(Order)수준의 *Erysipelotrichales*부터 계통적으로 감소했다. 그리고 변화된 장내 미생물 생태계에 의한 기능적 변화를 예측한 결과, 황 대사(Sulfur metabolism)와 인슐린 신호전달 경로(Insulin signaling pathway)가 증가했다. 이러한 결과는 반렐견의 장내 미생물 환경을 항비만에 긍정적인 방향으로 변화시킨 것으로 생각된다. 또한, 반렐견 사료의 대표적인 탄수화물 원료인 쌀을 기반으로 한 대조군과 비교했을 때, 장내 미생물의 다양성 분석에서 차이가 없었으므로, 종합해보면 옥수수를 기반으로 한 사료는 반렐견의 사료로써 가치가 있고 탄수화물 대체 원료로 적합한 것으로 생각된다.

References

- [1] E. Axelsson, et al, "The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet", *Nature*, 495.7441, 360-364, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- [2] M. Arendt, T. Fall, K. Lindblad-Toh, E. Axelsson, "Amylase activity is associated with AMY 2B copy numbers in dog: Implications for dog domestication, diet and diabetes", *Animal genetics*, 45.5, 716-722, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1111/age.12179>
- [3] H. N. Englyst, G. J. Hudson, "The classification and measurement of dietary carbohydrates", *Food chemistry*, 57.1, 15-21, 1996.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(96\)00056-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(96)00056-8)
- [4] N. G. ASP, "Resistant starch. Proceeding from the second plenary meeting of EURESTA: European FLAIR concerted action no. 11 on physiological implications of the consumption of resistant starch in man", *European Journal of Clinical Nutrition*, 46.S1, 1992.
- [5] D. L. Topping, P. M. Clifton, "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides", *Physiological reviews*, 81.3, 1031-1064, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>
- [6] E. A. de Deckere, W. J. Kloots, J. M. Van Amelsvoort, "Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats", *The Journal of nutrition*, 123.12, 2142-2151, 1993.
<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/123/12/2142/4723324>
- [7] G. Zhang, Z. Ao, B. R. Hamaker, "Slow digestion property of native cereal starches", *Biomacromolecules*, 7.11, 3252-3258, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1021/bm060342i>
- [8] H. J. Chung, Q. Liu, R. Hoover, "Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches", *Carbohydrate polymers*, 75.3, 436-447, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.006>
- [9] E. S. Son, "Awareness survey of consumers buying companion dog food through Internet", *Journal of The Korea Academia-industrial cooperation Society*, 21.6, 574-583, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2020.21.6.574>
- [10] E. O. Park, J. I. Shin, M. Y. Park, "A study on the relationship among attachment to pet, purchasing attributes of pet products, satisfaction, and behavioral intention", *Journal of the Korea Academia-industrial cooperation Society*, 20.9, 279-289, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2019.20.9.279>
- [11] I. Corsato Alvarenga, A. N. Dainton, C. G. Aldrich, "A review: Nutrition and process attributes of corn in pet foods", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62.31, 8567-8576, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1931020>
- [12] D. Laflamme, O. Izquierdo, L. Eirmann, S. Binder, "Myths and misperceptions about ingredients used in commercial pet foods", *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 44.4, 689-698, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.03.002>
- [13] AAFCO, Association of American Feed Control Officials. Official publication, Champaign, IL, USA, 2021.
- [14] FEDIAF, The European Pet Food Industry Federation. Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. Brussels, Belgium, 2020.
- [15] E. Boylen, et al, "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2", *Nature biotechnology*, 37.8, 852-857, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

- [16] B. J. Callahan, et al, "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data", *Nature methods*, 13.7, 581-593, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- [17] C. Quast, et al, "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools", *Nucleic acids research*, 41.D1, D590-D596, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- [18] J. N. Paulson, O. C. Stine, H. C. Bravo, M. Pop, "Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys", *Nature methods*, 10.12, 1200-1202, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>
- [19] G. M. Douglas, et al, "PICRUSt2 for prediction of metagenome functions", *Nature biotechnology*, 38.6, 685-688, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- [20] Parks. D. H, Beiko. R. G, "Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities", *Bioinformatics*, 26.6, 715-721, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq041>
- [21] C. Rinke, et al, "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter", *Nature*, 499.7459, 431-437, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- [22] P. P. Murugkar, A. J. Collins, T. Chen, F. E. Dewhirst, "Isolation and cultivation of candidate phyla radiation Saccharibacteria (TM7) bacteria in coculture with bacterial hosts", *Journal of Oral Microbiology*, 12.1, 1814666, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1814666>
- [23] B. Bor, J. K. Bedree, W. Shi, J. S. McLean, X. He, "Saccharibacteria (TM7) in the human oral microbiome", *Journal of dental research*, 98.5, 500-509, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034519831671>
- [24] Y. Marcy, "Dissecting biological "dark matter" with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104.29, 11889-11894, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0704662104>
- [25] X. He, et al, "Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112.1, 244-249, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1419038112>
- [26] N. L. Poweleit, "Using advances in electron microscopy to study microbial interactions", University of California, Los Angeles, 2016.
- [27] B. Bor, et al, "Phenotypic and physiological characterization of the epibiotic interaction between TM7x and its basibiont actinomycetes", *Microbial ecology*, 71.1, 243-255, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0711-7>
- [28] P. J. Turnbaugh, et al, "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest", *Nature*, 444.7122, 1027-1031, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- [29] S. E. Park, et al, "Intervention with kimchi microbial community ameliorates obesity by regulating gut microbiota", *Journal of Microbiology*, 58.10, 859-867, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0266-2>
- [30] G. Chen, et al, "Fluoride induced leaky gut and bloom of *Erysipelatoclostridium ramosum* mediate the exacerbation of obesity in high-fat-diet fed mice", *Journal of Advanced Research*, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.110.010>
- [31] M. E. Nimni, B. Han, F. Cordoba, "Are we getting enough sulfur in our diet?", *Nutrition & metabolism*, 4.1, 1-12, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-24>
- [32] H. Oda, "Changes in serum lipoprotein metabolism induced by dietary protein and xenobiotics", *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Japan)*, 1995.
- [33] P. Bin, R. Huang, X. Zhou, "Oxidation resistance of the sulfur amino acids: methionine and cysteine", *BioMed research international*, 9584932, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9584932>
- [34] K. L. Johnston, et al, "Resistant starch improves insulin sensitivity in metabolic syndrome", *Diabetic Medicine*, 27.4, 391-397, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.02923.x>
- [35] M. D. Robertson, J. M. Currie, L. M. Morgan, D. P. Jewell, K. N. Frayn, "Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects", *Diabetologia*, 46.5, 659-665, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1081-0>
- [36] M. D. Robertson, A. S. Bickerton, A. L. Dennis, H. Vidal, K. N. Frayn, "Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism", *The American journal of clinical nutrition*, 82.3, 559-567, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.3.559>
- [37] J. Zhou, et al, "The importance of GLP-1 and PYY in resistant starch's effect on body fat in mice", *Molecular nutrition & food research*, 59.5, 1000-1003, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400904>
- [38] S. Boura-Halfon, Y. Zick, "Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance", *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296.4, E581-E591, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90437.2008>

조 현 우(Hyun-woo Cho)

[정회원]



- 2016년 2월 : 부산대학교 동물생명과학전공 (농학박사)
- 2016년 3월 ~ 2021년 4월 : 계명대학교 의과대학 생리학 교실 연구원
- 2021년 4월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원

<관심분야>

동물복지, 마이크로바이옴

천 주 란(Ju Lan Chun)

[정회원]



- 2012년 5월 : 일로노이 주립대학교 줄기세포치료 전공 (박사)
- 2014년 10월 ~ 2018년 7월 : 충남대학교 산학협력단 계약교수
- 2019년 1월 ~ 2020년 6월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연구원

- 2020년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물복지연구, 동물대체실험

서 강 민(Kang-Min Seo)

[정회원]



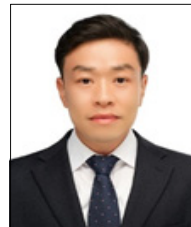
- 2013년 2월 : 국립한경대학교 동물·낙농생명과학전공 (농학석사)
- 2019년 3월 : 일본 북해도대학교 공생기반학전공 (농학박사)
- 2019년 5월 ~ 2020년 1월 : 일본 북해도대학교 박사후연구원
- 2020년 2월 ~ 현재 : 국립축산과학원 동물복지연구팀 전문연구원

<관심분야>

가축영양생리, 동물세포생리학

김 기 현(Ki Hyun Kim)

[정회원]



- 2013년 3월 : 일본 교토대학교 동물영양학 전공 (농학박사)
- 2013년 4월 ~ 2017년 2월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연구원
- 2017년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물영양학, 사료

이 민 영(Min Young Lee)

[정회원]



- 2023년 2월 : 건국대학교 동물자원과학과 (농학사)
- 2023년 3월 ~ 현재 : 충남대학교 축산학과 (석사과정)
- 2022년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물영양, 동물대체실험