

# 반려견을 위한 정적 *in vitro* 소화모델에서 pH가 조단백질 및 지방 소화율에 미치는 영향

서강민\*, 조현우\*, 이민영\*, 김기현\*, 전중환\*, 김찬호\*, 임세진\*, 정소희\*, 천주란\*

\*농촌진흥청, 국립축산과학원

e-mail:julanchun@korea.kr

## Effects of pH on Crude Protein and Fat Digestibility of Dog Food in Static *in vitro* Digestion Model for Adult Dog

Kangmin Seo\*, Hyun-WooCho\*, Min Young Lee\*, Kihyun Kim\*, Jung-Hwan Jeon\*, Chan Ho  
Kim\*, Sejin Lim\*, Sohee Jeong\*, Ju Lan Chun\*

\*National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

### 요약

본 연구에서는 반려견을 위한 정적 *in vitro* 소화모델 (Static *in vitro* digestion model)의 구축을 목적으로 소장단계의 소화에서 pH가 단백질과 지방의 소화에 미치는 영향을 확인하고자 실시되었다. 정적 *in vitro* 소화 모델은 Seo등 (2022)와 Biagi등 (2016)이 제안한 반려견을 위한 *in vitro* 소화모델을 참고하여 실시하였다. *in vitro* 소화는 위장과 소장에서의 소화 과정을 모사하여 실시되었다. 먼저, 사료는 pepsin (100 mg)을 포함하는 위 소화액(pH 2.0)과 함께 8시간 동안 소화되었다. 그리고 이어서 소장 소화과정에서는 pancreatin(12.5 g)과 bile salt(2.5 g/L)를 포함하는 소장 소화액 (pH 6.8 또는 7.5)을 첨가하고 16 시간동안 소화되었다. 소화 후 비소화 분획을 분리 및 건조한 후 건물(Dry matter; DM), 조단백질(Crude protein; CP) 그리고 조지방(Extract content; EE)을 AOAC (2006)의 방법에 따라 측정하였다. 소장 소화단계에서 pH 6.8로 조절한 그룹보다 pH 7.5 그룹이 DM, CP의 소화율이 크게 증가하는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 하지만, EE 소화율은 두 그룹 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다( $p > 0.05$ ). 우리의 결과는 소장단계의 소화 과정에서 pH 6.8 보다 pH 7.5 수준에서 효과적인 DM, CP 소화율을 보여주었다. 이와 같은 결과는 소화과정에서 변화하는 pH가 소화효소들의 활성에 영향을 미쳤을 가능성을 시사한다. 특히, DM과 CP 소화율의 변화는 지방을 제외한 조성분의 소화와 관련하여 효소의 영향으로 사료된다.

## 1. 서론

생체의 소화 과정을 시험관 내에서 모사하기 위한 정적 *in vitro* 소화모델(Static *in vitro* digestion model)은 재현성과 제어된 조건의 선택 등의 장점을 바탕으로 영양소 및 비영양소의 생물학적 접근성 또는 영양소 (예: 지질, 단백질 및 탄수화물 등)의 소화율 분석이 가능하고 새로운 가설을 스크리닝하고 구축하는데 적합한 것으로 알려져 있다. 게다가, 최근에는 윤리적으로 논쟁의 여지가 있는 동물실험을 보완하기 위한 대안으로써 식품 및 영양학 분야에서 주목받고 있다. 한편, 이와 같은 실험방법은 구강, 위, 소장 및 대장의 생리적 조건을 선택적으로 모방하기 때문에 각 소화단계의 생리적 조건(소화 효소 및 농도, pH 및 소화 시간 등)의 매개변수들이 신중히 고려되어야 한다[1]. 한편, 일부 컴퓨터화된 정교한 *in vitro* 소화모델은 소화된 음식의 이동, 실시간 효소 농도 및 pH 변화와 같은 생리적 또는 물리적 측면까지 모사가 가능하다[2]. 하지만, 정적 *in vitro* 소화모델은 소화과정 동안 변화

하는 조건의 유지가 불가능하다는 단점이 존재한다. 따라서 이와 같은 단점을 보완하기 위한 노력이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 반려견을 위한 효과적인 정적 *in vitro* 소화모델의 구축을 목적으로 소장단계의 소화에서 pH가 단백질과 지방의 소화에 미치는 영향을 확인하고자 실시되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험사료

실험에 사용된 사료는 익스트루전 타입의 시판 반려견용 사료가 사용되었다(표 1). 실험 사료는 분쇄 후 sieve shaker (> 1.00 mm)를 이용하여 1 mm 이하의 입자 크기만 분리 하였고, dryoven (65°C)에서 일정한 중량이 될 때까지 건조하여 사용되었다.

### 2.2 정적 *in vitro* 소화모델

체의 위장관 소화는 Seo등(2022)[3]가 제안한 반려견을 위한 체외 위장관 소화모델을 참고하여 위와 소장 단계의 소화 과

정을 모사하여 실시되었다. 실험사료 10 g, 0.1 M phosphate buffer (pH= 6.0) 250 ml 그리고 0.2 M HCl 100 ml를 삼각플라스크에 첨가한 후, 0.1 M HCl를 이용하여 pH 2.0으로 조절하였다. 이어서, pepsin 용액(100 mg/ml; #P7000, ≥250 units/mg, Sigma-Aldrich) 1 ml, 그리고, Chloramphenicol 용액(25 mg/ml EtOH; #C-0378, Sigma-Aldrich) 1 ml을 첨가 후 진탕항온수조에서 6시간 동안 39°C, 120 rpm 조건을 유지하였다. 체외 위장 소화 후 소장의 생리적 환경의 시뮬레이션을 위하여 소화액이 담긴 삼각플라스크에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8) 100 ml 그리고 0.6 M NaOH 50 ml를 혼합한 후 0.1 M NaOH를 이용하여 pH 6.8 또는 7.5로 조절하였다. 이어서, Bile salts (25 g/L; #13805, Merck Millipore) 12.5 g, Pancreatin (10 g/L; #P7545, 8 × USP specifications, Sigma-Aldrich) 2.5 g을 첨가 후 진탕항온수조에서 18시간 동안 39°C, 150 rpm 조건을 유지하였다. 모든 소화가 종료된 후 비소화 분획은 진공여과장치 (pore size 0.22 μm, PES membranes, TPP)을 이용하여 비소화물을 수집하였으며, 65°C에서 건조 후 무게를 측정하였다.

### 2.3 건물, 조단백질, 조지방 소화율

실험사료와 비소화물의 건물(Dry matter, DM) 소화율을 결정하기 위해 소화 후 각 실험그룹에서 얻은 비소화 분획의 무게를 측정하였으며 DM 소화율은 다음과 같은 계산식(1)을 통하여 산출하였다[3].

$$(1) \text{ DM digestibility}(\%) = \left( \frac{\text{food, g} - \text{undigested fraction, g}}{\text{food, g}} \right) \times 100$$

실험사료와 비소화물 분획은 AOAC 방법 (2006)[4]에 따라 조단백질 (Crude protein, CP), 조지방 (Ether extract, EE)를 측정하였고, CP와 EE 소화율은 아래와 같은 계산식(2)와 (3)을 통하여 산출하였다[3].

$$(2) \text{ CP digestibility}(\%) = \left( \frac{\text{food CP, g} - \text{Undigested fraction CP, g}}{\text{food CP, g}} \right) \times 100$$

$$(3) \text{ EE digestibility}(\%) = \left( \frac{\text{food EE, g} - \text{Undigested fraction EE, g}}{\text{food EE, g}} \right) \times 100$$

[표 1] 실험사료 화학적 조성

Items	Experimental diet
Crude Protein, %	33
Ether Extract, %	20
Crude Fiber, %	3
Crude Ash, %	13
NFE, %	19
Moisture, %	12
ME, kcal/kg	4,000

Values are calculated value and dry matter basis. NFE, Nitrogen free extract; ME, Metabolic Energy.

### 3. 결과 및 고찰

표 2는 정적 *in vitro* 소화모델에서 pH의 차이가 반려견 사료의 DM, CP 그리고 EE의 소화율에 미치는 영향을 보여준다. 소장 소화단계에서 pH 6.8로 조절한 그룹보다 pH 7.5 그룹이 DM, CP의 소화율이 크게 증가하는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 하지만, EE 소화율은 두 시험 그룹 사이에서 유의미한 차이는 나타나지 않았다( $p > 0.05$ ). 과거 동물연구는 반려견의 소장 내 pH가 약 6.2-7.8 수준으로 보고한 바 있다[5]. 또한 일부 반려견을 위한 정적 *in vitro* 소화모델 연구들은 소장단계에서 pH를 6.8 또는 7.5을 제안 한 바 있다[3, 6]. 우리의 결과는 소장단계의 소화 과정에서 pH 6.8 보다 pH 7.5 수준에서 효과적인 DM, CP 소화율을 보여주었다. 이와 같은 결과는 소화과정에서 변화하는 pH가 소화효소들의 활성에 영향을 미쳤을 가능성을 시사한다. 특히 본 연구 결과에서 보여준 DM과 CP 소화율의 변화는 지방을 제외한 조성분의 소화와 관여하는 소화효소의 영향으로 사료된다.

[표 2] Effects of pH on DM, CP and EE digestibility of dog food in static *in vitro* digestion model for adult dog.

Item	pH 6.8	pH 7.5	p value
Digestibility, %			
DM	41.12 ± 0.90	78.88 ± 0.43	0.001
CP	88.87 ± 0.17	91.70 ± 0.17	0.001
EE	91.82 ± 0.12	92.21 ± 0.26	0.177

The results were expressed as mean ± SEM. DM; Dry matter, CP; Crude protein, EE; Extract content. \*,  $p < 0.05$

### 4. 결론

우리의 결과는 반려견을 위한 정적 *in vitro* 소화 모델에서 pH의 중요한 역할을 보여준다. 이와 같은 결과는 반려견을 위한 효과적인 정적 *in vitro* 소화모델 개발을 위해 고려해야 할 사항을 제시하고 있으며, 향후 생체를 효과적으로 모사할 수 있는 수준의 *in vitro* 소화모델 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 참고문헌

- [1] Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodtkorb, A. "A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus". Food & function, 5(6), 1113-1124, 2014.
- [2] Ménard, O.; Cattenoz, T.; Guillemain, H.; Souchon, I.; Deglaire, A.; Dupont, D.; Picque, D. Validation of a New *In Vitro* Dynamic System to Simulate Infant Digestion. Food Chem. 2014, 145, 1039 - 1045.
- [3] Seo, K., Cho, H. W., Jeon, J. H., Kim, C. H., Lim, S.,

- Jeong, S., ... & Chun, J. L. (2022). Influence of Bile Salts and Pancreatin on Dog Food during Static In Vitro Simulation to Mimic In Vivo Digestion. *Animals*, 12(20), 2734.
- [4] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2006.
- [5] Kararli, T. T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 16(5), 351-380.
- [6] Kara, K. (2020). Determination of the in vitro digestibility and nutrient content of commercial premium extruded foods with different types of protein content for adult dogs. *Veterinárni medicína*, 65(6), 233-249.