

in vitro 소화모델을 활용한 비글견에서 조단백질의 겉보기 총관소화율 예측모델의 평가

서강민, 조현우, 김기현, 이민영, 천주란
농촌진흥청 국립축산과학원
e-mail:julanchun@korea.kr

Evaluation of Prediction Model for Apparent Total Tract Digestibility of Crude Protein in Beagle Dogs Using an *in vitro* Digestion Model

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

요 약

본 연구는 반려견을 위한 조단백질 (CP) 소화율 예측모델을 구축하고 그 잠재적 활용 가능성을 평가하기 위하여 실시되었다. CP 소화율 예측모델의 구축을 위한 실험사료는 AAFCO (2016)에서 제안한 micro와 macro 영양소를 모두 충족하고 20-40% 수준의 CP를 포함하고 하도록 배합되었다. *in vitro* CP 소화율의 평가는 반려견의 위와 소장 단계의 소화 과정을 모사한 Seo 등(2022)의 *in vitro* 소화모델을 참고하였다. *in vivo* CP 소화율의 평가는 증성화된 비글견 8마리 (5 year-old, four male, four female)를 대상으로 CP의 겉보기 총 소화관 소화율(ATTD)를 평가하였다. 사료, 비소화분획 그리고 분변 내 CP 수준은 AOAC (2006)의 방법에 따라 분석하였다. 다양한 수준의 CP를 포함하는 실험사료의 *in vitro* 및 *in vivo* CP 소화율 데이터들은 CP 소화율 예측모델의 구축에 이용되었다. 닭고기와 쌀을 주원료로 제조된 extruded type의 시판사료는 CP 소화율 예측모델의 평가에 이용되었다. 모든 실험사료에서 두 실험 방법의 CP 소화율은 유사한 경향의 변화가 나타났으며, *in vitro* CP 소화율은 *in vivo* CP 보다 높게 나타났다($p < 0.05$). 게다가 *in vitro*($r=0.911$, $p=0.001$) 또는 *in vivo*($r=0.783$, $p < 0.001$) 환경에서의 평균 CP 소화율은 실험사료 내 단백질 수준과 통계적으로 유의한 양의 선형상관관계가 있는 것으로 나타났다. *in vitro*와 *in vivo* 환경에서의 20, 30, 그리고 40%의 CP를 포함하는 실험사료에 대한 평균 CP 소화율 결과는 비글 품종의 성견에서 CP의 ATTD를 추정하기 위하여 선형회귀분석에 이용되었으며, $y=2.5405x+151.8$ ($r^2=0.9925$)의 회귀방정식이 도출되었다. 이 회귀방정식의 평가에는 CP 28.02% (Analyzed value as dry based)를 포함하는 extruded dry-type (닭고기와 쌀 베이스)의 시판사료가 사용되었다. *In vitro* 소화 모델을 이용한 시판사료의 CP 소화율은 $92.82 \pm 0.09\%$ 로 나타났으며, 이 결과를 회귀방정식에 적용한 결과 예측된 *in vivo* CP 소화율은 $84.00 \pm 0.23\%$ 로 나타났다. 게다가, 비글견을 대상으로 동일한 시판사료의 CP의 ATTD는 $83.87 \pm 0.65\%$ 로 나타났다. 회귀방정식에 의하여 예측된 CP 소화율과 비글견을 대상으로 한 CP의 ATTD는 약 0.13% (similarity 100.16%)의 차이를 보여주었으며, 통계적으로 유의미한 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

1. 서론

세계적으로 반려동물을 기르는 가구 수의 증가와 함께 반려동물 사료 산업의 규모도 급격히 성장하고 있다. 게다가, 반려동물에 대한 인식의 변화의 영향으로 그들을 위한 식단의 품질에 대한 소비자의 관심이 증가하고 있다[1]. 사료 내 단백질에 대한 소화율 정보는 소비자에게 영양소의 이용 가능성에 대한 정보를 제공하므로써 사료 품질에 대한 신뢰도의 향상뿐만 아니라, 동물의 건강 그리고 복지 측면에서도 중요한 의미를 가질 수 있다[2]. 그러나 반려동물을 위한 사료(사료 원료)에 대한 영양학적 가치의 평가는 많은 시간, 경제적 투자, 그리고 동물실험이 요구된다[3]. 따라서 반려동물 산업에서 충분한 사료가치의 평가를 통한 제품의 개발, 품질 관리,

그리고 소비자를 위한 정보의 제공에 현실적 어려움이 존재한다[4].

생체에서의 소화과정을 *in vitro* 환경에서 모방하는 *in vitro* 소화모델은 제어된 조건의 선택과 높은 재현성 등의 장점을 바탕으로 영양소 또는 비영양소의 생물학적 접근성 또는 영양소 소화율 등의 분석이 가능하다[5-7]. 이와 같은 이유에서 새로운 가설을 탐색하고 입증하는데 적합할 뿐만 아니라, 최근 윤리적으로 논쟁의 여지가 있는 동물실험을 보완하기 위한 대안으로써 식품 및 영양학 분야에서 주목받고 있다[8]. 그러나, 가축과 같은 경제동물의 소화율을 예측하기 위한 다양한 *in vitro* 소화모델이 보고된 반면, 반려견의 소화율 예측을 위한 연구는 매우 제한적이다[9-11].

따라서, 본 연구에서는 반려견을 위한 *in vitro* 소화모델을

이용하여 사료 내 단백질의 소화율 예측을 위한 선형회귀모델을 제안하고 이들의 잠재적 활용 가능성을 평가하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험사료

실험사료는 AAFCO (2016)에서 제안한 성견의 영양소 요구사항을 충족하고 조단백질(Crude protein, CP) 수준이 각각 20, 30, 그리고 40%가 되도록 배합하여[표 1], Seo et al., (2021) 의하여 보고된 절차에 따라 제조되었다[13]. 실험사료 제조에 이용된 모든 원료는 분말형태의 시판제품을 구매하여 사용하였으며 어떠한 향미제 및 방부제는 첨가되지 않았다. 실험사료는 -20℃에 보관되었으며 급여 직전에 해동하여 제공하였다. CP의 겉보기 총 소화관 소화율(Apparent total track digestibility, ATTD) 예측을 위한 선형회귀방정식의 평가는 CP 28.02 % (Analyzed value as dry based)를 포함하는 extruded dry-type (닭고기와 쌀 베이스)의 시판사료를 사용하였다.

[표 1] 실험사료

| Items | Crude protein concentration, % | | |
|------------------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|
| | 20 | 30 | 40 |
| Ingredients composition, % | | | |
| Rice flour | 43.91 | 37.04 | 30.04 |
| Chicken breast powder | 6.6 | 14 | 21.6 |
| Egg yolk powder | 8 | 8 | 7.5 |
| Lard | 1.5 | 1.3 | 1.4 |
| Seaweed (<i>Enteromorpha</i>) | 1 | 1 | 1 |
| Cabbage powder | 1 | 1 | 1 |
| Calcium phosphate | 1 | 0.8 | 0.6 |
| Calcium carbonate | 0.7 | 0.8 | 0.89 |
| Potassium citrate | 0.51 | 0.35 | 0.3 |
| Vitamin-Mineral premix ¹⁾ | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Salt | 0.33 | 0.31 | 0.27 |
| Tryptophane | 0.05 | 0 | 0 |
| Water | 35 | 35 | 35 |
| Chemical composition, % (DM basis, Calculated) | | | |
| Dry matter | 58.56 | 59.49 | 60.45 |
| Crude protein | 20.02 | 30.16 | 39.99 |
| Ether extract | 11.75 | 12.02 | 12.35 |
| Crude fiber | 0.29 | 0.28 | 0.28 |
| Crude ash | 2.19 | 2.47 | 2.68 |
| NFE | 65.75 | 55.07 | 44.7 |
| Ca | 0.81 | 0.81 | 0.8 |
| P | 0.69 | 0.68 | 0.67 |
| Ca/P ratio | 1.18 | 1.19 | 1.2 |
| ME, kcal/kg | 4,001 | 4,005 | 4,014 |

Values are calculated value as dry based. All experimental diets used chicken powder as the protein source, and each experimental diet was formulated to contain 20, 30, and 40 % crude protein. 1)Provided per kilogram of experimental diets: Vit A, 5250 IU; VitD 3,375 IU; Vit E, 37.5mg; Vit K, 0.078mg; Vit B1(Thiamine),4.2mg; Vit B2(Riboflavin), 3.9mg; Vit B6(Pyridoxine), 3mg; Vit B12, 0.021mg; Cal. D. Pantothenate, 9mg; Niacin, 45mg; Folic acid, 0.6mg; Biotin, 0.054mg;

Taurine, 1,500mg; FeSO4H2O, 66mg; MnSO4H2O, 5.7mg; ZnSO4H2O, 75mg; CuSO4H2O, 11.25mg; Na2SeO3, 0.27mg; Ca(IO3)2, 1.35mg. Abbreviations: NFE, Nitrogen free extract; ME, metabolizable energy (kcal/kg)= ((CP×3.5) + (EE×8.5) + (NFE×3.5)) × 10.

2.2 *in vivo* CP 소화율 평가

2.2.1 실험동물

실험동물은 건강한 비글견 (5 years-old; neutered 4 males and 4 females) 8마리를 대상으로 실시되었다. 모든 개들은 일정한 실내 온도(22-23℃)와 조명(16 hr light and 8 hr dark cycle)이 유지되는 개별적 공간(170 × 210cm/dog)이 제공되었다. 사료는 일일 2회 (10:00, 16:00), 음수는 무제한 제공되었다. 그리고 매일 약 3시간의 야외 활동시간이 제공되었다. 사료는 Association of American Feed Control Officials[12]에 의해 제시된 공식 (ME, kcal/d 132 × kg BW^{0.75})에 의해 추정된 maintenance energy requirements가 충족되도록 제공되었다.

2.2.2 Apparent total track digestibility (ATTD)

In vivo CP ATTD는 Total collection method를 이용하여 추정되었다. 실험기간동안 분변은 매일 수집하고 무게를 측정하였다. 분변과 사료의 수분(AOAC method 934.01), Crude protein (CP, AOAC method 984.13)의 수준은 standard association of official analytical chemist methods [14]에 따라 분석되었다.

2.3 *in vitro* CP 소화율 평가

2.3.1 Static *in vitro* digestion model

in vitro 소화는 Seo et al (2022)이 제안한 Static *in vitro* 소화모델을 참고하여 두 가지 소화 단계로 디자인되었다[15]. 소화는 위 소화단계에서 소장 소화단계로 순차적으로 실시되었다.

2.3.2 *in vitro* CP 소화율

CP와 소화율은 Association of Official Analytical Chemist methods [14]에 따라 비소화 분획과 실험사료 내 CP를 측정되었다.

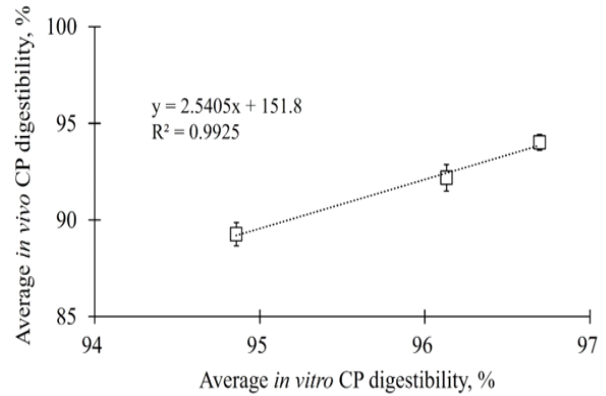
2.4. 통계분석

모든 통계 분석은 SPSS(v.17.0; SPSS Statistics, IL, USA, 2008)를 사용하여 수행되었으며 mean ± standard error of the mean (SEM)로 표기하였다. 사료 내 CP 수준의 차이에 의한 섭취량과 소화율의 변화는 one-way ANOVA를 통해 분석하였고 실험그룹들 사이의 유의한 차이는 Tukey's multiple range test로 분석되었다. *in vitro*와 *in vivo* CP 소화

을 사이의 차이는 Student's *t*-tests를 통해 분석하였다. 모든 차이는 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. CP 수준 vs. *in vitro* 또는 *in vivo* CP 소화율 사이의 상관관계는 pearson bivariate correlation analysis에 의하여 분석되었다. *in vivo* ATTD CP 소화율의 예측을 위한 선형회귀방정식은 실험사료 (CP 20-40%)에 대한 평균 *in vitro*와 *in vivo* CP 소화율 데이터를 바탕으로 결정되었다.

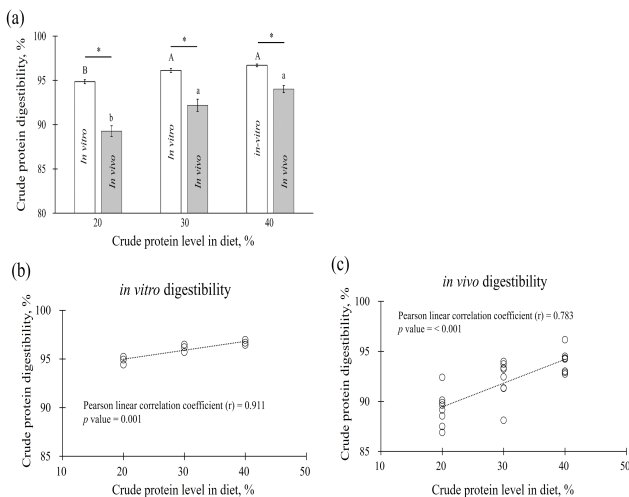
3. 결과 및 결론

모든 실험사료에서 두 실험 방법의 CP 소화율은 유사한 경향의 변화가 나타났으며, *in vitro* CP 소화율은 *in vivo* CP 보다 높게 나타났다($p < 0.05$). 게다가 *in vitro* ($r = 0.911$, $p = 0.001$) 또는 *in vivo* ($r = 0.783$, $p < 0.001$) 환경에서의 평균 CP 소화율은 실험사료 내 CP 수준과 통계적으로 유의한 양의 선형상관관계가 있는 것으로 나타났다[그림 1b, c]. *in vitro*와 *in vivo* 환경에서의 20, 30, 그리고 40 %의 CP를 포함하는 실험사료에 대한 평균 CP 소화율 결과는 성견에서 CP의 ATTD를 추정하기 위하여 선형회귀분석에 이용되었으며, 선형회귀분석으로부터 $y = 2.5405x + 151.8$ ($r^2 = 0.9925$)의 회귀방정식이 도출되었다[그림 2]. 이 회귀방정식의 평가에는 CP 28.02% (Analyzed value as dry based)를 포함하는 extruded dry-type (닭고기과 쌀 베이스)의 시판사료가 사용되었다.



[그림 2] 성견의 ATTD CP 소화율 예측을 위한 선형 회귀 방정식
Relationship between average *in vivo* and *in vitro* CP digestibility for experimental diets containing 20, 30, and 40 % CP. Values are expressed as mean \pm SEM.

in vitro 소화 모델을 이용한 시판사료의 CP 소화율은 $92.82 \pm 0.09\%$ 로 나타났으며, 이 결과를 회귀방정식에 적용한 결과 예측된 *in vivo* CP 소화율은 $84.00 \pm 0.23\%$ 로 나타났다 [표 2]. 실제 비글견을 대상으로 동일한 시판사료의 CP의 ATTD는 $83.87 \pm 0.65\%$ 로 나타났다 [표 2]. 회귀방정식에 의하여 예측된 CP 소화율과 비글견을 대상으로 한 CP의 ATTD는 약 0.13% (similarity 100.16%)의 차이를 보여주었으며, 통계적으로 유의미한 차이는 나타나지 않았다[표 2] ($p > 0.05$).



[그림 1] 실험사료의 *in vitro* 및 *in vivo* CP 소화율
All experimental diets used chicken powder as the protein source, and each experimental diet was formulated to contain 20, 30, and 40% crude protein. *In vivo* CP digestibility values of experimental diets were evaluated in beagle breed dogs ($n = 8$). The values are expressed as mean \pm SEM. (a) Differences between *in vitro* and *in vivo* CP digestibility. ^{A,B}Significantly differences in CP digestibility among dog diet groups containing 20-40% CP in *in vitro* digestion ($p < 0.05$). ^{a,c}Significant differences in CP digestibility among dog diet groups containing 20-40% CP in *in vivo* digestion ($p < 0.05$). Significant differences in CP digestibility between *in vitro* and *in vivo* digestion ($p < 0.05$). Linear correlation between experimental diets of three protein levels (20-40%) and (b) *in vitro* ($n = 3$) or (c) *in vivo* ($n = 8$) CP digestibility.

[표 2] CP의 ATTD 소화율 예측을 위한 회귀방정식의 검증

| Items | Commercial diet ¹ |
|------------------------------------------------------------|------------------------------|
| | % |
| <i>in vitro</i> CP digestibility | 92.82 \pm 0.09 |
| Equation for predicting of <i>in vivo</i> CP digestibility | $y = 2.5405x - 151.8$ |
| Predicted <i>in vivo</i> CP digestibility ² (P) | 84.00 \pm 0.23 |
| Analyzed <i>in vivo</i> CP digestibility ³ (A) | 83.87 \pm 0.65 |
| Similarity ⁴ | 100.16 |
| <i>p</i> value ⁵ | 0.89 |

¹The commercial diet was used chicken and rice based adult dog diet (CP 28.02 %, Analyzed value as dry based). ²Predicted *in vivo* CP digestibility value was calculated by applying *in vitro* CP digestibility value to the equation for predicting *in vivo* CP digestibility. ³Analyzed *in vivo* CP digestibility value was evaluated for ATTD of commercial diet in beagle breed dogs ($n = 8$). Values are expressed as mean and SEM. ⁴Similarity of CP digestibility was calculated as (P)/(A) \times 100. ⁵*p* values for comparisons between the predicted *in vivo* and analyzed *in vivo* CP digestibility values.

결론적으로 다양한 수준의 CP를 포함하는 실험사료를 대상으로 측정된 *in vitro*와 *in vivo* 결과는 분명한 차이를 보여주었지만, CP 소화율의 예측을 위한 회귀방정식 모델은 반려견의 CP 소화율 예측 모델로써 잠재적 가능성을 보여주었다.

참고문헌

- [1] Hill M., Shanoyan A, Aldrich G. “Animal protein-based ingredients in pet food: Analysis of supply chain and market drivers”. Agricultural and applied economics association. No. 322509. 2022.
- [2] Case LP, Daristotle L, Hayek M.G, Raasch M.F. “Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals”. Elsevier Health Sciences. 2010.
- [3] McCusker S, Buff PR, Yu Z, Fascetti AJ. “Amino acid content of selected plant, algae and insect species: A search for alternative protein sources for use in pet foods”. Journal of nutritional science. 3: e39. 2014.
doi: 10.1017/jns.2014.33
- [4] Corsato Alvarenga IC, Aldrich CG. “The effect of increasing levels of dehulled faba beans (*Vicia faba L.*) on extrusion and product parameters for dry expanded dog food”. Foods vol. 8-26. 2019.
doi: 10.3390/foods8010026.
- [5] Biagi G, Cipollini I, Grandi M, Pinna C, Vecchiato CG, Zaghini G. “A new in vitro method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs”. Italian journal of animal science vol. 15, 617–625. 2016.
doi: 10.1080/1828051X.2016.1222242.
- [6] Vors C, Capolino P, Guérin C, Meugnier E, Pesenti S, Chauvin MA, Monteil J, Peretti N, Cansell M, Carrière F, Michalski MC. “Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions”. Food & Function. vol. 3 pp. 537-546. 2012.
doi: 10.1039/C2FO10248J
- [7] Theysgeur S, Cudenec B, Deracinois B, Perrin C, Guiller I, Lepoudère A, Flahaut C, Ravallec R. “New bioactive peptides identified from a tilapia byproduct hydrolysate exerting effects on DPP-IV activity and intestinal hormones regulation after canine gastrointestinal simulated digestion”. Molecules. vol. 26-136. 2020.
doi: 10.3390/molecules26010136
- [8] Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Brodkorb A. “A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus”. Food & Function. vol. 5, pp. 1113-1124. 2014.
doi: 10.1039/C3FO60702J
- [9] Boisen S, Fernández J. “A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feed stuffs and pig diets by in vitro analyses”. Animal Feed Science and Technology. 68(3-4), pp.277-286. 1997.
doi: 10.1016/S0377-8401(97)00058-8
- [10] Noblet J, Jaguelin-Peyraud Y. “Prediction of digestibility of organic matter and energy in the growing pig from an in vitro method”. Animal feed science and technology, vol. 134 (3-4), pp.211-222. 2007.
doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.07.008
- [11] Weurding RE, Veldman A, Veen WA, van der Aar PJ, Versteegen MW. “In vitro starch digestion correlates well with rate and extent of starch digestion in broiler chickens”. The Journal of nutrition, vol. 131(9), pp.2336-2342. 2001.
doi: 10.1093/jn/131.9.2336
- [12] Association of American Feed Control Officials (AAFCO). “Model Bill and Regulations; Association of American Feed Control Officials”. Oxford, IN, USA, pp.107–234. 2016.
- [13] Seo K, Cho HW, Chun J, Jeon J, Kim C, Kim M, Kim K. “Evaluation of fermented oat and black soldier fly larva as food ingredients in senior dog diets”. Animals, vol.11(12), 3509. 2021.
doi: 10.3390/ani11123509
- [14] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC international (18thed.) AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. 2006.
- [15] Seo K, Cho HW, Jeon JH, Kim CH, Lim S, Jeong S, Chun JL. “Influence of bile salts and pancreatin on dog food during static in vitro simulation to mimic in vivo digestion”. Animals, vol.12(20), 2734. 2022.
doi: 10.3390/ani12202734