Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio. 2016;4(2):29-37
ISSN 2287-852X 2016.4.2.29

프로바이오틱 유산균과 락툴로스를 급여한 돼지의 분변균총 변화

오주경† · 에드워드 파자릴로† · 채종표 · 강대경*

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Changes in the Faecal Microbiota of Pigs Fed Probiotic Enterococci and Lactulose

Ju Kyoung Oh†, Edward Alain B. Pajarillo†, Jong Pyo Chae and Dae-Kyung Kang*

Dept. of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

Abstract

Demand for the development of non-antibiotic growth promoters (AGP) in animal production surged in recent years. However, elucidating the specific mechanisms and action of prebiotics, probiotics, and synbiotics as non-AGP in animals is still in progress. This work investigated and compared faecal microbiotas of weaned piglets under the administration of a basal diet (CON) and with prebiotic lactulose (LAC), probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 (PRO), or their synbiotic combination (SYN). Although prebiotics and/or probiotics in the diet significantly increased alpha-diversity compared with CON values, no differences were detected in richness and diversity values among the treatment groups (LAC, PRO, and SYN). At phylum level, the Firmicutes to Bacteroidetes ratio increased in the treatment groups in comparison to the CON group, and the lowest abundance of Proteobacteria was found in LAC group. At family level, Enterobacteriaceae decreased in all treatments, especially more than 10-fold reduction in LAC group compared with CON group. At genus level, the highest abundance of *Oscillibacter* was detected in PRO group, the highest *Clostridium* in LAC group, and the highest *Lactobacillus* in SYN group; the abundance of *Escherichia* was lowest in LAC group. Clustering in the DAPC plots illustrated distinct separation of the feeding groups (CON, LAC, PRO, and SYN) from one another, showing that microbial communities had different compositions according to different feed additives. Effects of LAC and PRO treatments on the faecal microbiota suggest independent mechanisms; nonetheless, the impact of SYN might also be distinct from that when each are administered singly as LAC or PRO.

Keywords

faecal microbiota, pig, 16S rRNA gene, synbiotic, pyrosequencing

Received: Dec 10, 2016
Revised: Dec 15, 2016
Accepted: Dec 22, 2016

†Both authors contributed equally to this study.
* Corresponding author : Dae-Kyung Kang, Ph.D.
Dept. of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea.
Tel: +82-41-550-3655,
E-mail: dkkang@dankook.ac.kr

서 론

장관 내 서식하는 균총은 인간뿐만 아니라, 동물의 건강에도 영향을 미치는 주요 요인 중의 하나로 인식되고 있다(Valeria and Francesco, 2015; Coreen and James, 2012; O'Connor *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2014; Lallès *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2011). 즉, 장관에 존재하는 미생물이 장내환경을 안정하게 유지함으로써, 숙주의 대사 활성 및 면역을 조절하고(Hemarajata and Versalovic,

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.

Copyright © Korean Society for Lactic Acid Bacteria. All rights reserved.

2012), 병원균의 침투를 방어하며(O'Connor *et al.*, 2014), 숙주의 생리와 생산성에 영향을 주는 것으로도 알려져 있다(Richards *et al.*, 2011). 또한, 최근의 연구결과에 의하면 연령(Kim *et al.*, 2011), 식이(Yan *et al.*, 2013), 이유(Pajarillo *et al.*, 2014a) 및 항생제(Unno *et al.*, 2015)를 포함한 다양한 요인들이 숙주의 장내 균총에 영향을 주는 것으로 확인된 바 있다. 이러한 연구결과들은 인간뿐만 아니라, 동물의 질병 예방 및 생산성 향상과 관련하여 매우 중요한 주제로 부각되고 있다.

돼지는 성장하는 동안에 끊임없이 각종 스트레스에 시달리게 되며(Lallès *et al.*, 2007; Pluske *et al.*, 2009; Bomba *et al.*, 2014), 특히 자돈의 이유 전후에 장내 균총이 급격한 변화를 나타내는 것으로 알려진 바 있다(Lallès *et al.*, 2007; Pajarillo *et al.*, 2014a). 이유 이후에도 사료 등 다양한 요인에 의해 장내균총의 변화가 일어나며, 이것이 돼지의 건강 및 생산성에 영향을 주게 된다. 따라서, 장내 균총을 돼지의 건강에 긍정적인 방향으로 유도하기 위해 다양한 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 소재들이 연구되어 왔으며, 이를 통해 장내 융모의 길이 증가, 병원성 세균 억제, 면역력 향상 등을 통하여 돼지의 질병 저항성 강화 및 생산성 증대에 관한 효과들이 보고되었다(Hemarajata and Versalovic, 2012; Kim and Isaacson, 2015; Konstantinov *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Guerra-Ordaz *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2014).

그동안 probiotics와 prebiotics가 장내 균총에 미치는 영향을 연구하기 위해 culture-dependent가 주로 사용되어 왔으며, 이외에도 quantitative PCR과 denaturing gradient gel electrophoresis 방법 등을 이용하여 연구되고 있다(Lee *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2012; Guerra-Ordaz *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2014; Pajarillo *et al.*, 2015a). 그러나 이러한 연구방법들은 장내 균총의 극히 일부분만 알 수 있기 때문에, 차세대 염기서열분석방법인 16S rRNA gene pyrosequencing과 bioinformatics 기법을 혼용한다면 장내 균총을 전반적으로 분석할 수 있으므로, 더욱 효율적으로 장내 균총에 관한 연구가 가능해질 것이다.

본 연구에서는 프로바이오틱 특성을 가진 *Enterococcus faecium* NCIMB 11181과 prebiotic lactulose를 급여한 이유자돈의 분변을 채취한 후에, 균총의 분포도 및 다양성을 차세대 염기서열분석방법인 pyrosequencing 기법으로 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험용 돼지 및 사육환경

출생일과 이유시기(4주령)가 동일한 총 79마리의 돼지를 사용하였으며, 각각 펜(pen)에 자유롭게 배치한 뒤 2주 동안은 각 개체간의 장내 균총 차이가 발생하지 않도록 어떠한 사료 첨가제나 항생제를 첨가하지 않은 기본 사료를 동일하게 급여하였다. 그 후, 각 그룹은 control 그룹(CON; n=15), prebiotic(lactulose) 그룹(LAC; n=15)(Chae *et al.*, 2015), probiotic(*Enterococcus faecium* NCIMB 11181) 그룹(PRO; n=20) (Pajarillo *et al.*, 2015a), synbiotic(lactulose+*E. faecium* NCIMB 11181) 그룹(SYN; n=29)으로 나누어 2주간 급여실험을 진행하였다. Probiotic 균주인 *E. faecium* NCIMB 11181 (Lactiferm®; Chr. Hansen, Nienburg, Germany)은 1.0×10^9 colony forming units(CFU)/사료 kg 수준으로 급여하였고, prebiotic으로 사용된 lactulose의 경우 5 g/사료 kg 수준으로 급여하였다. 돈사 온도 및 습도는 각각 25℃, 60%로 유지하였다.

분변시료의 채취

자돈의 분변시료 채취는 총 2회(0주와 2주) 실시하였으며, 2주간 기초사료, lactulose 또는 *E. faecium* NCIMB 11181을 첨가한 사료를 급여한 이유자돈의 항문을 자극하여 분변을 채취하였다. 채취한 분변은 곧바로 아이스박스에 넣어 10℃ 이하 저온상태를 유지하였으며, 가능한 빠른 시간 내에 다음 실험에 사용하였다.

Metagenomic DNA의 분리

채취한 이유자돈의 분변에서 원래의 군집 조성을 그대로 반영할 수 있는 DNA를 얻기 위해 분변 채취 후 한 시간 이내에 UltraClean® Fecal DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 분변 내 미생물의 metagenomic DNA를 추출하였다(Pajarillo *et al.*, 2014a, b). 분변에서 추출한 metagenomic DNA를 UV/Vis spectrophotometer(Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 농도와 순도를 확인하였으며, 추출한 metagenomic DNA는 1.5% (w/v) agarose gel에 전기영동을 통하여 DNA의 상태를 검증하였다. 16S rRNA 유전자 PCR을 통해 DNA내 PCR 저해물질의 유무를 확인하였다.

분변내 균총의 16S rRNA 유전자서열 분석

분변내 균총 분석을 위해 16S rRNA 유전자의 high-throughput 분석기법인 pyrosequencing 기술을 이용하였다. 16S rRNA 유전자의 hypervariable region인 V1-V3 region을 타겟으로 증폭하여 Roche 454 GS FLX Titanium 장비(454 Life Sciences, Branford, CT, USA)를 이용하여 분변 내 균총을 분석하였다

(Jeon *et al.*, 2013).

분변내 미생물 군집 분석

Roche 454-pyrosequencer를 통해 분석된 각 시료의 DNA 서열 중에서 quality checking을 통해 300bp 이하인 시퀀스와 바코드를 제거하였다. 또한, chimera 시퀀스를 데이터 분석 프로그램인 Mothur의 Bellrophon 방법으로 제거한 후에 (Schloss *et al.*, 2009), 최종적으로 평균 477bp 정도의 시퀀스들을 확보하고 분석에 사용하였다. Operational taxonomic units(OTUs)는 97% identity threshold로 cd-hit program을 사용하여 분석하였다 (Li and Godzik, 2006). Taxonomic ranking과 classification은 EzTaxon-e database를 이용하여 cut-off value {(species(x ≥ 97%), genus (97% > x ≥ 94%), family (94% > x ≥ 90%), order (90% > x ≥ 85%), class (85% > x ≥ 80%), and phylum (80% > x ≥ 75%)} 기준에 따라 분류하였다(Chun *et al.*, 2007).

통계분석

분변 내에 존재하는 미생물의 다양성과 풍부도는 Mothur(v. 1.32.1) 프로그램을 이용하여 > 97% 상동성을 기준으로 측정하였다. 각 그룹간의 미생물 다양성(Simpson과 Shannon 지수)과 풍부도(Chao1과 ACE 지수)의 유의성 분석은 Kruskal-Wallis test (kruskal.test {stats}) 방법을 사용하여 실시하였다(p<0.05).

한편, 통계분석은 R software(v. 3.1.0)를 이용하여 실시하였으며, 각 그룹간의 상대적 비율에 대한 유의성 분석은 One-way analysis of variance (aov{car}), post-hoc 분석은 Tukey's test(TukeyHSD {car}) 방법을 사용하였다. 상대적인 평균 분포가 0.1% 이상인 미생물 속을 선발하고, square root (sqrt {base}) 방법을 이용하여 normalization 시킨 후에, 샘플간 클러스터링 분석시에는 Bray-Curtis dissimilarity와 Euclidean distance를 (vegdist {vegan}), 계층적 군집분석에는 'average' 알고리즘 (hclust {stats})을 사용하였다. Heatmap plot은 (heatmap {vegan}) 을 이용하여 나타내었다.

또한, Adegenet 패키지를 이용하여 미생물 속과 미생물 OTU(95% identity cut-off)의 다변량 분석을 실시하였고(Jombart and Ahmed, 2011), 다변량 분석 결과는 DAPC plot(scatter {ade4})과 canonical loading plot(loadingplot {adegenet}으로 나타내었다.

결과

Pyrosequencing을 위한 metagenomic DNA의 분리

분변 샘플로부터 추출한 metagenomic DNA를 agarose gel 전기영동을 통하여 DNA의 상태를 검증하였으며(data now shown), pyroseqencing용 DNA로부터 16S rRNA 유전자의 증폭이 가능한 지 여부를 PCR 방법으로 사전에 확인함으로써(Fig. 1), pyrosequencing을 위한 PCR 저해물질이 존재하지 않음을 검증하였다.

Pyrosequencing한 DNA read수

이유자돈 분변에서 분리한 각 DNA 시료를 pyrosequencing한 결과, 각 그룹의 평균 read 수는 CON그룹 5,350, LAC그룹 6,678, PRO그룹 4,907, SYN그룹 7,195개로서 (Table 1), 통계분석에 충분한 숫자인 것으로 판단하였다.

미생물 다양성지수 분석

미생물 군집의 다양성 지수를 비교 분석하기 위하여 alpha-diversity를 측정하였다(Table 1). 본 시퀀싱 데이터가 실험 개체들의 미생물 군집을 대변할 수 있는지를 판단하기 위해, 97% 상동

Table 1. Pyrosequencing data and diversity indices of the faecal microbiota of each group of pigs.

	Total number of reads	Number of OTU[1)3)]	Chao1[3)]	ACE[2)3)]	Shannon[3)]	Simpson (1-D)[3)]
CON (n=15)	80,251	669	810	1,067	4.51 (4.02, 5.15)	0.958 (0.890, 0.985)
LAC (n=15)	100,172	735	1,472	1,992	5.06 (4.24, 5.57)	0.977 (0.958, 0.989)
PRO (n=20)	98,156	853	1,376	1,744	5.21 (4.09, 5.68)	0.980 (0.922, 0.990)
SYN (n=29)	208,660	897	1,335	1,740	5.23 (3.74, 5.73)	0.979 (0.893, 0.991)

This table was modified from the data of Chae *et al.* (2016).

1) OTU, operational taxonomic units.

2) ACE, abundance-based coverage estimator.

3) Calculations were generated using CD-HIT with an OTU definition between 97% and 100% identity cut-off. The median values represent non-parametric statistical measurements. All parentheses depict the range of values from lowest to highest in each group.

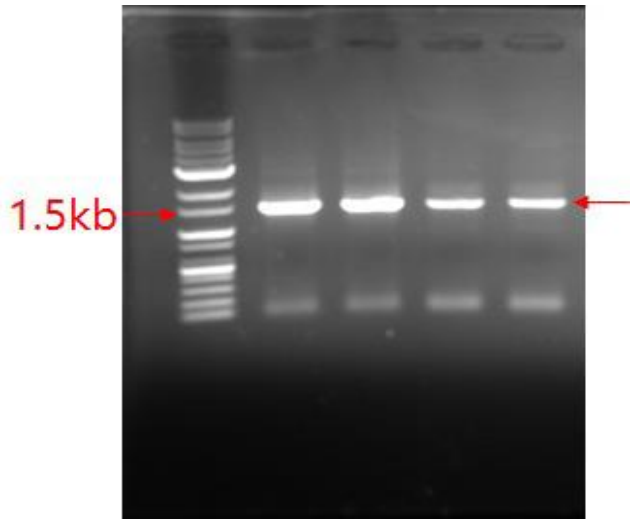

Fig. 1. 16S rRNA gene amplified from metagenomic DNA.

성 기준으로 결정된 OTUs와 시퀀스 리드수를 사용하여 rarefaction curve를 나타낸 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 시퀀스 리드수가 증가할수록 그래프가 완만해지는 것을 알 수 있었다. 따라서, 본 시퀀싱 데이터는 본 실험에 사용된 돼지들의 미생물 군집을 충분히 대변할 수 있는 결과임을 알 수 있었다. 한편, 종 풍부도를 나타내는 abundance coverage estimate(ACE)와 Chao1 지수를 조사한 결과, CON 그룹에 비하여 LAC 그룹, PRO 그룹, SYN 그룹이 유의적으로 종 풍부도가 높은 것을 확인할 수 있었으며(p<0.05), 특히 LAC 그룹이 다른 그룹들에 비하여 종 풍부도(ACE, 1992; Chao1, 1472)가 가장 높은 현상을 나타내었다

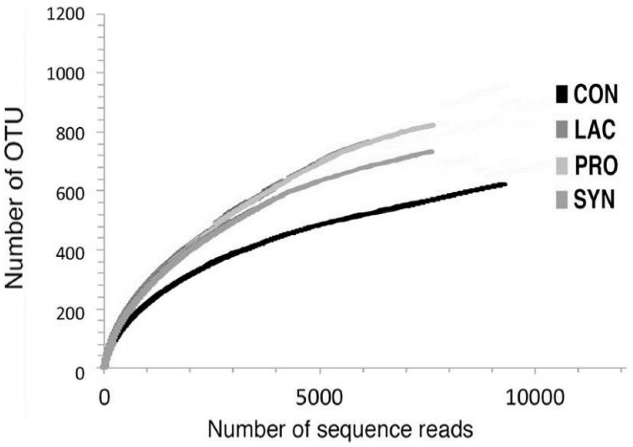

Fig. 2. Rarefaction curves of pooled pig samples with an OTU definition at 97% identity level. This figure was modified from the data of Chae *et al.* (2016).

(Table 1).

종 다양성을 나타내는 Shannon과 Simpson 지수도 LAC 그룹, PRO 그룹, SYN 그룹이 CON 그룹에 비하여 상대적으로 높은 것을 관찰할 수 있었으며(Table 1), 가장 높은 Shannon 지수와 Simpson 지수를 가지고 있는 그룹은 각각 SYN 그룹(5.23)과, PRO 그룹(0.980)이었다. Probiotic 또는 prebiotic을 급여한 그룹은 기초사료만 급여한 CON 그룹에 비하여 다양성지수(alpha-diversity)가 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었으나, CON 그룹을 제외한 세 그룹(LAC, PRO, SYN)사이에는 다양성지수의 유의적 차이는 없었다.

그룹간의 균총 분포도 비교 (Taxon 기반)

유산균 또는 락툴로스를 급여한 이유자돈 분변의 균총 분포도 변화는 EzTaxon 데이터베이스를 기준으로 분석하였다. 생물학적 분류 단계 중 Phylum(문) 단계에서 이유자돈의 분변 내 균총 분석결과에서는 그룹에 상관없이 Firmicutes 문과 Bacteroidetes 문이 90% 이상을 차지하였으며, Firmicutes : Bacteroidetes 비율은 LAC 그룹이 3.39로서 다른 세 그룹에 비하여 유의적으로 가장 높은 결과를 나타내었다. 또한, 주로 병원성균이 많이 속해 있는 Proteobacteria 문의 경우 LAC 그룹, PRO 그룹, SYN 그룹에서는 감소하는 경향을 보였으며, 특히 LAC 그룹에서 가장 낮은 상대적 분포를 나타내었다.

한편, Family(과) 단계에서 분변 내 균총분포도를 분석한 결과, 그룹에 상관없이 Ruminococcaceae 과와 Prevotellaceae 과가 약 40% 이상의 풍부도를 나타내었다. 또한, Enterobacteriaceae 과, Veillonellaceae 과, Lactobacillaceae 와, Lachnospiraceae 과가 주요 Family(과)로 존재하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 유익균을 많이 포함하는 Lactobacillaceae 과의 분포도는 LAC 그룹(9.20%), PRO 그룹(7.97%), SYN 그룹(13.8%)이 CON 그룹(5.67%)에 비하여 상대적으로 높았다(data not shown). 한편, 유해균을 많이 포함하고 있는 Enterobacteriaceae 과의 경우, CON 그룹(10.1%)이 LAC 그룹(0.99%), PRO 그룹(2.35%), SYN 그룹(3.57%)에 비하여 매우 높은 수치를 나타내었다.

생물학적 분류 단계 중 genus(속) 단계에서 균총을 분석한 결과, 최소 99개의 미생물 속이 존재함을 확인하였다. 이 중에서 특히 *Prevotella* 속, *Lactobacillus* 속, *Oscillibacter* 속, *Clostridium* 속, *Escherichia* 속은 풍부도가 1.0% 이상으로서, 이유자돈 장내 주요 속임을 알 수 있었다. 각 그룹별로 비교한 결과, PRO 그룹에서는 *Oscillibacter* 속, LAC 그룹에서는 *Clostridium* 속, SYN 그룹에서는 *Lactobacillus* 속이 다른 그룹들에 비하여 높은 풍부도를 나타내었으며, 일반적으로 병원성 균으로 알려진 *Escherichia*

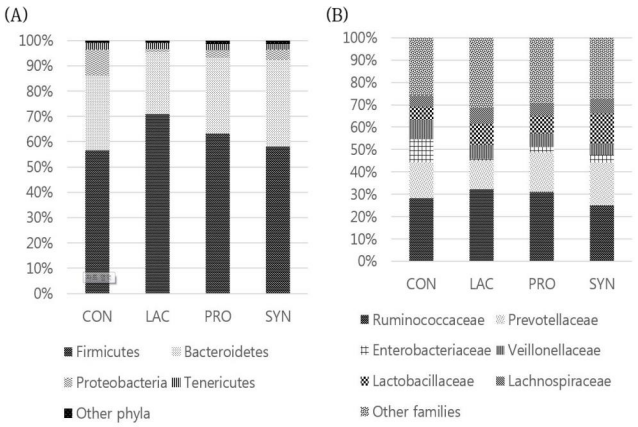

Fig. 3. The relative abundances of sequences at the phylum (A) and family (B) levels. The EzTaxon database was used to classify the taxon groups. Mean relative abundances were calculated from all samples in each group. This figure was modified from the data of Chae *et al.* (2016).

속은 CON 그룹에서 가장 많았고, LAC 그룹에서 가장 낮은 분포도를 나타내었다(Fig. 4).

한편, 그룹간의 미생물 분포도를 Discriminant analysis of principal component(DAPC) 방법으로 분석한 결과, 각 그룹별로 뚜렷하게 차별성 있게, clustering되는 것으로 보아, 유산균 또는/및 락툴로스를 급여하면 장내에서 유의적으로 서로 다른 미생물 군집을 형성하는 것으로 판단되었다(Fig. 5).

그룹간의 균총 분포도 비교 (OTU 기반)

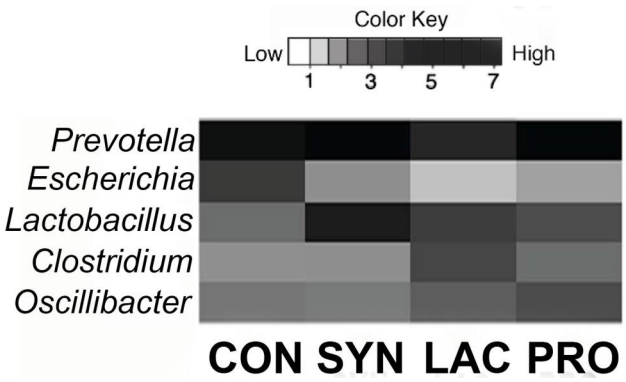

Fig. 4. Differentially abundant bacterial genera among the CON, LAC, PRO, and SYN groups. The heatmap shows the 5 abundant genera (>1% mean relative abundance) after normalisation. The normalised levels of abundance are depicted in the color key. This figure was modified from the data of Chae *et al.* (2016).

OUT에 기반하여 각 그룹의 미생물 분포도를 분석한 결과, CON 그룹, LAC 그룹, PRO 그룹 및 SYN 그룹에서 각각 253, 287, 335, 338개의 OTU가 검출되었다. 이를 벤 다이어그램을 통하여 분석한 결과, 총 397개의 OTU중 21개의 OTU가 core OTU임을 확인하였다(data not shown).

한편, 각 그룹간의 균총 분포 차이에 영향을 주는 OTU가 무엇인지를 peak의 높이로 알려주는 canonical loading plot을 이용하여 분석한 결과, DQ905455_g, AM406061_g, EU259447_g 총 3개의 미동정된 OTU가 그룹간의 균총 차이에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났으며, 그 중에서 DQ905455_g와 AM406061_g는 core OTU에서도 존재하였다. EU259447_g OTU는 LAC 그룹에서 가장 높은 비율을 나타내었다(data not shown).

고찰

Prebiotics 및 probiotics는 동물의 건강과 생산성 향상에 유익한 역할을 한다고 보고되고 있다(Krause *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2012; Guerra-Ordaz *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2014; Umu *et al.*, 2015). 본 연구에서는 lactulose 와 *E. faecium* NCIMB 11181 균주를 각각 급여하였을 때와 혼합 급여하였을 때 나타나는 돼지 분변 균총의 미생물 다양성과 분포도를 high-throughput pyrosequencing 방법을 통하여 비교하

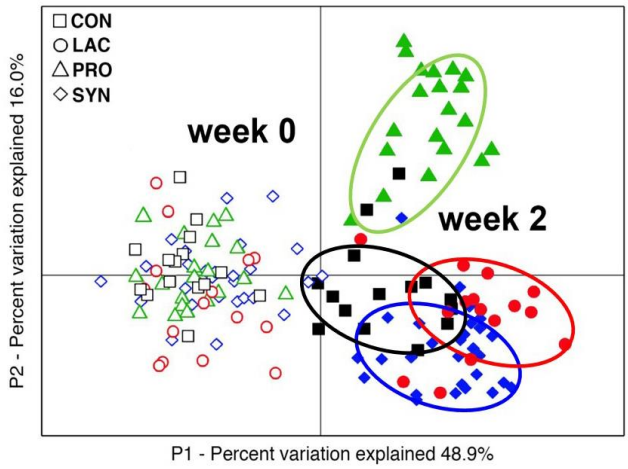

Fig. 5. Clustering of the faecal microbiota of the piglets of week 0 (hollow) and week 2 (solid) the group. The DAPC plot was created using the 33 differentially abundant bacterial genera as variables. Total 79 of samples belonging to each groups (control, CON, ■; prebiotic lactulose, LAC, ●; probiotic *E. faecium* NCIMB 11181, PRO, ▲; symbiotic, SYN, ◆) are depicted as symbols. This figure was modified from the data of Chae *et al.* (2016).

였다.

첫번째, 유산균과 lactulose를 급여하면 특정 미생물 문(phyla), 과(families), 속(genera), 그리고 OTUs의 구성과 분포도가 유의적으로 변화하였다. 특히 LAC 그룹에서 Firmicutes/Bacteroidetes 비율의 유의적 증가는 lactulose가 Firmicutes 문에 속한 일부 미생물 그룹의 증식을 촉진함으로써 복합 식물성 식단의 다양한 대사활동과 발효를 촉진할 수 있음을 시사한다 (Hooda *et al.*, 2012; Sattler *et al.*, 2014; Umu *et al.*, 2015). 이전의 연구결과에 의하면, lactulose 첨가제가 돼지 및 가금류에서 성장률, 단쇄 지방산 조성 및 미생물 수를 증가시킨다는 것이 보고된 바 있다 (Fleige *et al.*, 2007; Cho and Kim, 2013; Zheng *et al.*, 2014a; Calik and Ergün, 2015). 또한, lactulose는 장내 미생물 다양성을 증가시키고, lactobacilli 와 clostridia를 포함하여 Firmicutes 문에 속하는 많은 미생물들의 성장을 촉진하였다 (Konstantinov *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2014).

Family(과) 단계에서 분석한 결과, synbiotics 그룹에서 Lactobacillaceae 과가 가장 풍부하였다. Lactobacillaceae 과는 장내에서 단쇄지방산, 특히 acetate, propionate 및 butyrate의 수준을 증가시킨다고 보고된 바 있다 (Hooda *et al.*, 2012; Guerra-Ordaz *et al.* , 2014). 즉, *E. faecium* NCIMB 11181과 lactulose의 동시급여는 Lactobacillaceae 과의 성장을 유발하는 특정 대사산물 또는 화합물의 형성을 시사한다. 한편, 돼지의 건강에 유해한 영향을 미치는 Enterobacteriaceae 및 Veillonellaceae 과의 비율이 모든 처리구에서 감소하였는데, 이러한 경향은 동물 생산성에 긍정정인 영향을 미칠 것으로 추정된다 (Pluske *et al.*, 2009; Krause *et al.*, 2010). Veillonellaceae는 비인두 감염 및 GI 관련 질병뿐만 아니라, 간경변 및 장내 담즙산과다 분비와도 관련되어 있어 Veillonellaceae의 감소는 돼지 건강에 긍정적인 영향을 줄 수 있다 (Bajaj *et al.*, 2011; Gevers *et al.*, 2014).

Genus(속) 단계에서는, 모든 처리군에서 *Lactobacillus* 속이 증가했으며, 특히 synbiotics 그룹에서 가장 높은 비율을 나타내었다. 이는 급여한 유산균과 lactulose가 직접적 또는 간접적으로 *Lactobacillus* 속의 생장을 촉진하며, 두 가지 성분이 시너지 효과를 내는 것으로 추정되었다 (Etzold *et al.*, 2014; Johnson and Klaenhammer, 2014). 한편, 대장균의 수는 모든 처리군에서 급격히 감소하였는데, 특히 이 효과는 락툴로스 급여구에서 가장 두드러지게 나타났다. 이유 후 자돈에게 락툴로스를 급여할 경우에 장독성 및 장병원성 *E. coli* K88과 같은 *Escherichia* 가 감소한다고 보고된 이전의 연구결과들과 일치하였다 (Konstantinov *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2010; Guerra-Ordaz *et al.*, 2014). 프로바이오틱스 또는 프리바이오틱스의 급여에 의한 장내미생물 변화에 관한 이전의 연구결과들은 대부분 culture-dependent 방법에 의존함으로써 장내 소수의 미생물 군에 대한 변화만 관찰할 수 있었으나, 차세대 염기서열 분석방법에 의한 장내균총 분석방법은 장내미생물의 전반적인 동태를 관찰할 수 있게 되었다. 이러한 분석방법을 통해 그동안 알려져 있지 않던 미생물, 예를 들어 프로바이오틱스 그룹에서 가장 높은 수준으로 분포한 *Mitsuokella* 속과 같은 미생물에 대한 정보는 매우 부족하며, 추후 이러한 미생물 속이 분리되고 심도깊게 연구된다면 장내 건강에 있어서의 잠재적인 역할에 대해서도 이해할 수 있을 것이다.

OTU에 기반한 분석방법은 아직까지 분류되지 않은 수많은 미생물 계통을 포함하여 장내 균총의 변화를 관찰할 수 있는 방법이다. 이 방법을 통해 관찰한 결과, 아직까지 분류되지 않은 세 OTUs가 돼지 그룹간 차이에 큰 영향을 끼친 것으로 나타났다. 그 중에서 EU259447_g 는 lactulose급여와 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났는데, 이 OTU는 *Eubacterium coprostanolignens*와 가까운 것으로 확인되었다(data not shown). 이 균주는 inulin, lactulose와 같은 발효성 탄수화물 분해와 높은 연관성을 가진 *Clostridium* cluster IV에 속한다(Sattler *et al.*, 2014). 프리바이오틱스 또는 프로바이오틱스 급여와 *E.coprostanolignens* 및 돼지의 장 건강과의 상관관계가 더 심도깊게 연구된다면 사료첨가제의 기능적 이점에 대한 이해도가 더욱 높아질 것이다.

결론적으로, lactulose와 *E. faecium* NCIMB 11181의 단독급여 시에도 장내균총의 변화를 긍정적으로 유도하였지만, 두 가지를 동시에 급여할 경우에 더욱 큰 변화를 유도하였다. 즉, 개별 소재 및 그 조합은 독립적 또는 협력 메커니즘을 통해 장내에서 다른 결과를 초래할 수 있다는 점을 시사하였다. 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 급여를 통해 초래되는 장내균총 변화에 대해 더 깊이 이해할 수 있다면, 동물의 건강 뿐만 아니라, 나아가 인체의 건강에도 유익한 소재의 개발에 도움이 될 것이다.

감사의 글

본 논문은 Microbial Biotechnology (9(4), 486-495, 2016; doi: 10.1111/1751-7915.12370)에 게재된 논문을 기초로 하여 작성하였으며, 자세한 내용은 원문을 참조하기 바랍니다.

References

1. Bajaj JS, Ridlon JM., Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, Sikaroodi M, and Gillevet PM. (2011)

Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **302**, G168-G175.

2. Bomba L, Minuti A, Moisá SJ, Trevisi E, Eufemi E, Lizier M, Chegdani F, Lucchini F, Rzepus M, Prandini A, Rossi F, Mazza R, Bertoni G, Loor JJ, and Ajmone-Marsan P. (2014) Gut response induced by weaning in piglet features marked changes in immune and inflammatory response. *Funct. Integr. Genomics* **14**, 657-671.
3. Chae JP, Pajarillo EAB, Oh JK, Kim HB, and Kang D-K. (2016) Revealing the combined effects of lactulose and probiotic enterococci on the swine faecal microbiota using 454 pyrosequencing. *Microbial Biotechnol.* **9**, 486-495.
4. Chae JP, Pajarillo EAB, Park C-S, and Kang D-K. (2015) Lactulose increases bacterial diveresity and modulates the swine faecal microbiota as revealed by 454-pyrosequencing. *Anim Feed Sci Tech* **209**, 157-166.
5. Cho JH, and Kim IH. (2013) Effects of lactulose supplementation on performance, blood profiles, excreta microbial shedding of *Lactobacillus* and *Escherichia coli*, relative organ weight and excreta noxious contents in broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.(Berl)* **98**, 424-430.
6. Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, and Lim YW. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2259-2261.
7. Coreen LJ, and James V. (2012) The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* **129**, 950-960
8. Etzold S, Kober OI, MacKenzie DA, Tailford LE, Gunning AP, Walshaw J, Hemmings AM, and Juge N. (2014) Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* **16**, 888-903.
9. Fleige S, Preiβinger W, Meyer HHD, and Pfaffl MW. (2007) Effect of lactulose on growth performance and intestinal morphology of pre-ruminant calves using a milk replacer containing *Enterococcus faecium*. *Animal* **1**, 367-373.
10. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA., Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C1, González A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, and Xavier RJ. (2014) The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* **15**, 382-392.
11. Guerra-Ordaz AA, González-Ortiz G, La Ragione RM, Woodward MJ, Collins JW, Pérez JF, and Martín-Orúe SM. (2014) Lactulose and *Lactobacillus plantarum*, a potential complementary synbiotic to control post-weaning colibacillosis in piglets. *Appl. Environ. Microbiol* **80**, 4879-4886.
12. Hemarajata P, and Versalovic J. (2012) Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap. Adv. Gastroenterol* **6**, 39-51.
13. Hooda S, Boler BM, Serao MC, Brulc JM, Staeger MA, Boileau TW, Dowd SE, Fahey GC Jr, and Swanson KS. (2012) 454 Pyrosequencing reveals a shift in fecal microbiota of healthy adult men consuming polydextrose or soluble corn fiber. *J. Nutr.* **142**, 1259-1265.
14. Jeon YS, Chun J, and Kim B-S. (2013) Identification of household bacterial community and analysis of species shared with human microbiome. *Curr. Microbiol.* **67**, 557-563.
15. Johnson BR, and Klaenhammer TR. (2014) Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**, 141-156.
16. Jombart T, and Ahmed I. (2011) Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* **27**, 3070-3071.
17. Kim HB, and Isaacson RE. (2015) The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet. Microbiol.* **177**, 242-251.

18. Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, and Isaacson RE. (2011) Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.* **153**, 124-133.
19. Konstantinov SR, Awati A, Smidt H, Williams BA, Akkermans ADL, and de Vos WM. (2004) Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3821-3830.
20. Krause DO, Bhandari SK, House JD, and Nyachoti CM. (2010) Response of nursery pigs to a synbiotic preparation of starch and an anti-*Escherichia coli* K88 Probiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8192-8200.
21. Lallès J-P, Bosi P, Smidt H, and Stokes CR. (2007) Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* **66**, 260-268.
22. Lee JS, Awji EG, Lee SJ, Tassew DD, Park YB, Park KS, Kim MK, Kim B, and Park SC. (2012) Effect of *Lactobacillus plantarum* CJLP243 on the growth performance and cytokine response of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia* coli. *J. Anim. Sci.* **90**, 3709-3717.
23. Mao B, Li D, Zhao J, Liu X, Gu Z, Chen YQ, Zhang H, and Chen W. (2014) *In vitro* fermentation of lactulose by human gut bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 10970-10977.
24. Martinez RC, Cardarelli HR, Borst W, Albrecht S, Schols H, Gutiérrez OP, Maathuis AJ, de Melo Franco BD, De Martinis EC, Zoetendal EG, Venema K, Saad SM, and Smidt H. (2012) Effect of galactooligosaccharides and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 on growth of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698, microbial community structure, and metabolite production in an *in vitro* colonic model set up with human or pig microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol. 84*, 110-123.
25. O'Connor EM, O'Herlihy EA, and O'Toole PW. (2014) Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects. *Proc. Nutr. Soc.* **73**, 441-451.
26. Pajarillo EAB, Chae JP, Balolong MP, Kim HB, and Kang D-K. (2014a) Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **60**, 140-146.
27. Pajarillo EAB, Chae JP, Balolong MP, Kim HB, Park C-S, and Kang D-K. (2015a) Effects of probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 administration on swine faecal microbiota diversity and composition using barcoded pyrosequencing. *Anim. Feed Sci. Tech.* **201**, 80-88.
28. Pajarillo EAB, Chae JP, Balolong MP, Kim HB, Seo K-S, and Kang D-K. (2014b) Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. *J. Microbiol.* **52**, 646-651.
29. Pluske JR, Pethick DW, Hopwood DE, and Hampson DJ. (2009) Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pig. *Nutr. Res. Rev.* **15**, 333-371.
30. Richards JD, Gong J, and de Lange CFM. (2011) The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.* **85**, 421-435.
31. Sattler VA, Bayer K, Schatzmayr G, and Klose V. (2014) Impact of a probiotic, inulin, or their combination on the piglets' microbiota at different intestinal locations. *Benef. Microbes* **1**, 1-11.
32. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR., Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, and Weber CF. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537-7541.
33. Umu ÖCO, Frank JA, Fangel JU, Oostindjer M, da Silva CS, Bolhuis EJ, Bosch G, Willats WG, Pope PB, and Diep DB. (2015) Resistant starch diet induces change in the swine microbiome and a predominance of beneficial bacterial populations. *Microbiome* **3**, 16.

34. Unno T, Kim J, Guevarra RB, and Nguyen SG. (2014) Effects of antibiotic growth promoter and characterization of ecological succession in swine gut microbiota. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 431-438.
35. Valeria D'A and Francesco S. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Cta* **451**, 97-102
36. Yan H, Potu R, Lu H, Vezzoni de Almeida V, Stewart T, Ragland D, Armstrong A, Adeola O, Nakatsu CH, and Ajuwon KM. (2013) Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig. *PLoS One* **8**, e59581.
37. Zheng W, Hou Y, and Yao W. (2014b) Lactulose increases equol production and improves liver antioxidant status in barrows treated with daidzein. *PLoS One* **9**, e93163.
38. Zheng W, Hou Y, Su Y, and Yao W. (2014a) Lactulose promotes equol production and changes the microbial community during *in vitro* fermentation of daidzein by fecal inocula of sows. *Anaerobe* **25,** 47-52.