



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

A Thesis for the Degree of Master

**Antiobesity and Intestinal Function Improvement Effect
of Soybean Fermented with *Bacillus subtilis* in Rats with
Dysbiosis by High Fat/Low Fiber Diet**

Jiyeon Kim

(Supervised by Professor Tatsuya Unno)

Department of Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Dec, 2020

**Antiobesity and Intestinal Function Improvement Effect
of Soybean Fermented with *Bacillus subtilis* in Rats with
Dysbiosis by High Fat/Low Fiber Diet**

Jiyeon Kim

(Supervised by Professor Tatsuya Unno)


**A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree for Master**

Dec, 4th, 2020


This thesis has been examined and approved by

이호연 

Hyo-Yeon Lee, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Tatsuya Unno 

Tatsuya Unno, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

최재호 

Jae Ho Choi, Ph.D., Subtropical/tropical Organism Gene Bank, Jeju National University

**Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

CONTENT

LIST OF FIGURES	2
LIST OF TABLES	3
ABASRACT	4
INTRODUCTION	5
METERIALS AND METHODS	7
Material and regent	7
Fermentation of soybean	7
Animal experiment	9
Fecal collection and SD rat sacrifice	11
Prepare miseq library	12
Miseq data analysis	12
Microbial network analysis	13
Quantitative analysis of short chain fatty acids	14
Statistical analysis	15
RESULTS	16
Effect of suppressing obesity induced by feeding high fat/low fiber diet	16
Comparison of the content of short chain fatty acids in the cecum	20
Analysis of microbiome in the cecum	22
Cecum microbiome network analysis	35
DISCUSSION	42
REFERENCES	46

LIST OF FIGURES

Figure 1. Diet content	10
Figure 2. Effect of fermented soybeans on high fat/low fiber diet-induced body and subcutaneous fat weight in rats.	17
Figure 3. Effect of fermented soybeans on high fat/low fiber diet-induced blood glucose concentration in rats.	18
Figure 4. Effect of fermented soybeans on high fat/low fiber diet-induced changes of fecal number and fecal moisture in rats.	19
Figure 5. Content of Short chain fatty acids in cecum(μM). Values are presented as means\pmSD.	21
Figure 6. Rarefaction curve of cecum miseq data	23
Figure 7. α-Diversity analysis of bacterial communities. Chao Diversity, Shannon Diversity are shown for each group.	24
Figure 8. Phylogenetic tree	25
Figure 9. Abundance of each treatments in Family level.	27
Figure 10. Abundance of Bacteroides spp. and Prevotella spp	29
Figure 11. Abundance of Lactobacillus spp. and Bacillus spp.	30
Figure 12. Gut microbiota comparison between HFD group and sample treatment group.	34
Figure 13. Cecum microbiome network.	40

LIST OF TABLES

Table 1. Fermented strains used to manufacture Cheonggukjang.....	8
Table 2. Schedule of animal experiment and used diet.....	11
Table 3. LEFSE result between Cheonggukjang group	35
Table 4. Centrality analysis including degree and betweenness of the constructed network (the main connected component) via ModuLand.....	41

ABASRACT

현대인의 간소화된 식단은 식이섬유의 충분하지 못한 섭취로 이어져 장내미생물 군집의 구성원을 변화시킬 수 있다. 장내미생물 군집의 특정 미생물이 정상적 범주를 넘어 비율이 역전되는 장내미생물 불균형은 장내 대사 패턴의 변화를 야기하고 염증을 일으키는 등 건강상의 문제를 일으키며 당뇨, 비만, 변비 등 기능성 대사 질환과 밀접한 관련이 있다. 본 연구에서는 지방 함량이 높으며 식이섬유 함량이 낮은 식단으로 인해 유발된 장내미생물 불균형 위에 청국장의 섭취로 인한 비만과 장기능에 대한 영향을 확인하고자 한다. 고지방/저식이섬유 사료의 급여는 체중, 지방의 중량, 혈당이 증가하였다. 또한 맹장 내 미생물의 *Bacteroidese/Prevotella* 의 비가 증가함으로써 역전되었으며 비만과 관련이 있다고 알려진 *Lachnospiraceae* family, *Ruminococcus* family 에 속하는 Operational taxonomic unit 이 증가하는 반면, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacteria spp.*와 같은 유익균이 감소한 것을 확인하여 Dysbiosis 가 유발되었다. 반면, C12512 청국장의 급여는 *Lactobacillus spp.* 및 Butyrate 생성균의 증가가 일부 관찰되었으며 전통 발효식품에서 분리한 발효균으로 발효된 청국장의 급여 그룹은 *Bacillus spp.* 의 증가가 발견되었다. 맹장 내 미생물 간의 Correlation 이 Betweenness centrality 을 기반으로 예측된 “Hub” 미생물을 중심으로 연결된 OTU 가 많은 Network 를 나타내는 C12512, C574 청국장 섭취 그룹에서 맹장 내 Butyrate 의 생성량이 비교적 높은 것을 확인하였다. 이러한 결과는 장내미생물 불균형 상태에서 청국장의 급여가 장 기능 개선에 미치는 영향에 대한 증거를 제시하였으며 전통 발효식품을 통해 프로바이오틱스 섭취가 가능함을 확인하였다.

INTRODUCTION

인간의 장에는 약 1,000종 이상의 미생물이 군집을 이루고 있으며 인간 유전자의 약 100배 이상의 유전정보를 바탕으로 활발한 대사가 이루어지고 있다. 이들의 광범위한 잠재력은 신체의 대부분의 생리기능에 직간접적으로 영향을 주며 숙주의 소화와 영양흡수에 필수적인 역할을 한다(Maccaferri, Biagi, and Brigidi 2011). 사람의 효소로 소화가 불가능한 섬유질 및 기타 영양소를 미생물의 대사활동으로 인해 흡수가 가능해진 대사산물로 변환되기 때문에 숙주의 식습관은 장내 미생물 군집의 구성과 대사 활동의 주요 원인으로 작용한다. 이들이 생성하는 대표적인 생리활성 물질은 1~6개의 탄소로 구성된 포화 지방족 유기산인 Short chain fatty acids (SCFAs)은 장 내에 Acetate (C2), Propionate (C3), Butyrate (C4)의 형태로 풍부하게 존재하며 장 점막 세포의 중요한 에너지원으로 작용한다(Cook and Sellin 1998). 하지만 장내 미생물 군집의 주요 에너지원인 식이섬유가 결여되어 있는 식단은 장까지 도달하는 영양성분이 희박해지며 고지방 및 고탄수화물로 인한 높은 에너지의 축적으로 지방 조직을 증가시키고 대사 및 심혈질환과 비만의 증가로 이어지고 있다(Hill 2006). 또한 동물성 단백질, 정제된 당 및 지방이 풍부하지만 섬유질이 적은 현대인의 간소화된 식단은 비만, 당뇨병과 같은 대사질환과 염증성 질환의 증가와 관련이 있다(Thorburn, Macia, and Mackay 2014). 즉, 고지방이며 저식이섬유인 식단은 소화관에 빠르게 흡수되어 미생물이 이용할 수 있는 에너지를 희박하게 만들며 결과적으로 미생물 군집의 불균형을 일으켜 숙주의 건강에 개입한다. 최근 연구에 따르면 장내 미생물 군집의 불균형은 변비에 영향을 미치고 변비환자와 건강한 대조군의 장내미생물 군집의 구성이 다르다는 것이 알려져 있으며(Wang, Chen, et al. 2019) 고지방 사료를 급여한 실험동물을 통한 연구에서 변비가 유발되었다는 것이 보고되어 있다(Mukai et al. 2020). 또한 변비와 같은 장 질환과 제한된 식이 제공에 따른 장내미생물 군집에 대하여 실험동물 기반의 연구가 진행되어 있지만 장 내의 환경을 완전히 반영하지 못하는 부분

유래의 미생물의 위주로 연구되어 있다. 하지만 실험에서 맹장은 내용물 내의 미생물이 이전의 소화기관에서 분해되지 않은 대부분의 탄수화물을 발효하며 대사 산물인 Short chain fatty acids 의 대부분이 축적되어 있다. 또한 분변 미생물과 맹장 및 장 점막의 미생물 군집은 구성에 차이가 있는 것으로 보고되어 있으므로 장 기능 및 관련 질환과 맹장 내 미생물 군집의 관계에 대한 연구가 필요하다(Wang, Chen, et al. 2019; Mao et al. 2016). 한편, 변비는 환자의 생활방식에 따른 다인성일 가능성이 높기 때문에 병의 증상에 따라 약이 처방되고 있다(Klaschik, Nauck, and Ostgathe 2003; Zhao and Yu 2016). 또한 장내 미생물 군집의 구성원 중 *Bifidobacterium spp.* 및 *Lactobacillus spp.*의 감소와 관련이 있어 일부 변비환자의 경우 Probiotics 의 처방이 예방 및 치료에 효과가 있다고 알려져 있으며(Wang, Chen, et al. 2019; Nakamura et al. 2001) Probiotics 가 신체에 주는 유익한 효과들이 밝혀짐과 동시에 또한 유익균인 Probiotics 가 정상적으로 기능하기 위한 에너지원인 Prebiotics 의 인식이 높아지면서 두 가지 모두를 효율적으로 섭취할 수 있는 발효식품의 잠재성이 주목받고 있다(Morelli and Capurso 2012). 특히 콩과 식물은 변비의 원인인 미생물 군집의 불균형 개선에 유용하다는 보고가 되어있으며(Zhou et al. 2014; ZHANG et al. 2013) 본 연구에서 사용된 발효식품은 콩을 단기간 발효한 청국장으로, 품질 재현성을 위해 선별된 *Bacillus spp.* 단일균을 사용하여 발효되었다. 이 전통 발효식품은 한국인의 식단에 흔히 발견되며 번거로움 없이 장 기능 개선 식품을 섭취할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구는 고지방/저식이섬유로 제한된 식단을 섭취한 쥐의 장에 장내 미생물 군집의 불균형과 이에 따른 장기능의 저하를 유발하여 동일한 식단 내에서 청국장의 추가 섭취로 인한 장 기능 개선 효과를 장내 미생물 군집의 구성과 기능의 관점으로 확인하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

Material and reagent

Bisacodyl(Sigma Aldrich, B1390)은 1% Sodium-carboxymethylcellulose 와 0.2% Tween-80을 함유하는 생리식염수(0.9% NaCl)에 혼합하여 투여액을 제조하였으며 개체의 체중에 따라 10mg/kg 의 양으로 경구투여 하였다. Short chain fatty acids 정량은 Butyrate, Propionate, Acetate 를 구입하여 Methanol 을 용매로 20, 40, 200, 400uM 의 농도로 희석 후 External standard 로 사용하였다.

Fermentation of soybean

청국장 제조에 사용된 대두는 전북 순창군에서 수확되는 백태를 사용하였으며 전통 발효식품에서 분리된 *Bacillus amyloliquefaciens* SCGB1, *B.subtilis* SCDB291, *B.subtilis* SCGB574, *B.subtilis* sub. *Natto* KCCM12512 균주(Table 1)를 tryptone soya broth (TSB, Oxoid LTD., England)배지 (Pancreatic digest of casein 17%, Enzymatic digest of soya bean 3%, Sodium chloride 5%, Di-potassium hydrogen phosphate 2.5%, Glucose 2.5%)에서 30°C, 24시간의 조건으로 배양하여 멸균수로 균체를 세척한 후 이용하였다. 청국장은 백태 3.5kg을 24시간 동안 침지하여 충분히 불린 후 체로 걸러 물기를 제거하여 autoclave에서 121°C 로 30분간 증자하였다. 증자된 백태를 40°C 이하로 냉각시켜 배양하였던 *Bacillus* 균주를 백태 전 무게의 0.5%(v/w)를 접종 및 혼합하였다. 발효는 항온항습기를 이용하여 37°C 에서 80% 습도로 36시간 동안 시행하여 청국장을 제조하였다. 또한 SB 샘플은 발효균주로 인한 발효의 효과가 아닌 콩으로 인한 효과를 배제하기 위하여 균주를 첨가하지 않고 36시간동안 방치하였다. 이후 청국장을 60°C 에서 24시간 건조한 후 분쇄하여 분말 형태로 제조하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Fermented strains used to manufacture Cheonggukjang

No.	Sample	Strain	Source
1	C1	<i>B.amyloliquefaciens</i> SCGB1	고추장
2	C291	<i>B.subtilis</i> SCDB291	된장
3	C574	<i>B.Subtilis</i> SCGB574	고추장
4	C12512	<i>B.subtilis</i> sub. <i>Natto</i> KCCM12512	Natto
5	SB	Fermented soybean without strain	-

Animal experiment

본 연구의 동물실험은 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻어 진행하였다 (승인번호: 2020-0027: 저식이섬유/고지방 식이에 의한 변비 동물모델에서 청국장을 활용한 장 기능 개선 활성 평가). 실험동물은 6주령의 수컷 Sprague Dawley rat (170~190g, n=82)를 (주)대한바이오링크 (DBL co., Ltd.)에서 구입하였다. 고지방/저식이섬유 사료는 두엘바이오텍사에 의뢰하여 TD.06414 (Adjusted calories diet, 60kcal)를 변형하였으며 청국장 시료의 경우 동일한 고지방/저식이섬유 사료와 배합하여 사용하였다. Control diet 는 (주)오리엔트 바이오사의 LabDiet 5L79모델 (Envigo)을 구입하여 사용하였다(Figure 1). 실험동물 사육실은 제주대학교 실험동물 센터이며 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 5\%$, 명암주기 조명은 12시간 주기로 조절된다. 실험동물의 사육장 도착 후 1주간 물과 일반 사료를 자율 급여하여 적응기간을 거쳤다. 2주차부터 식단의 변환을 위해 각 개체의 무게 및 표준편차가 균일하도록 모든 사육장에서 무작위 선별하여 고지방/저식이섬유 사료 섭취로 인한 Dysbiosis 유발군(n=72)과 일반사료(CD, n=10)급여군을 분류하였다. 식단분리는 4주간 진행되었으며 매일 일정한 시간에 동일한 양의 사료를 급여하였으며 물을 무제한 공급하였다. 이후 Dysbiosis 유발군 중 고지방/저식이섬유 사료 급여군(HFD, n=12)을 제외하고 Bisacodyl 투여군(BSC, n=10), *B.amyloliquefaciens* SCGB1 발효 청국장 급여군(C1, n=10), *B.subtilis* SCDB291 발효 청국장 급여군(C291, n=10), *B.subtilis* SCGB574 발효 청국장 급여군(C574, n=10), *Bacillus subtilis* sub. *Natto* KCCM12512 발효 청국장 (C12512, n=10)으로 나누어 공급 식단을 고지방/저식이섬유 사료와 청국장을 배합한 사료 공급 및 Bisacodyl 투여를 6주간 진행하였다. BSC 그룹은 고지방/저식이섬유 사료를 급여하며 제조한 Bisacodyl 투여액을 6주간 경구투여 하였으며 다른 그룹은 동일 기간 동안 생리식염수(0.9% NaCl)를 경구투여하였다(Table 2).

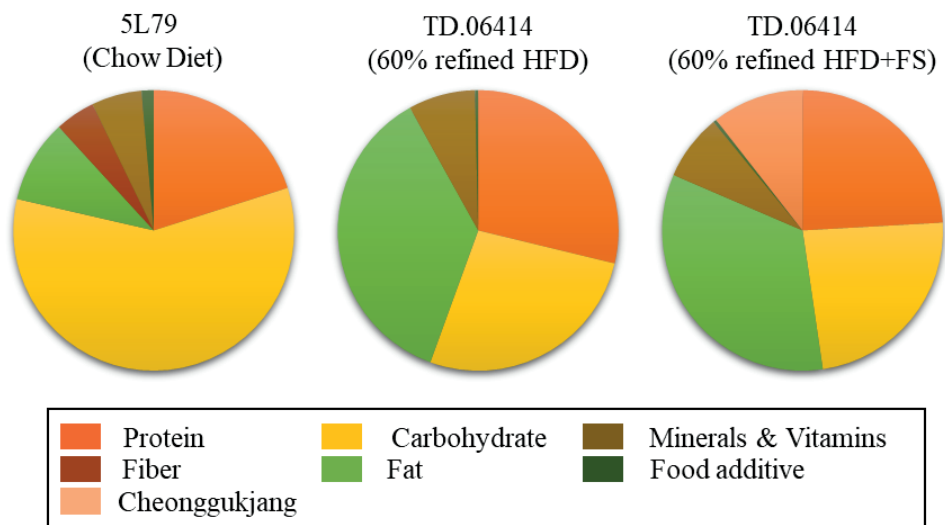


Figure 1. Diet content

Table 2. Schedule of animal experiment and used diet.

Schedule	순화기간	Dysbiosis				Treatment					
Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CD	Chow	Chow									
HFD		High fat/Low fiber Diet				High fat/Low fiber Diet					
BSC						High fat/Low fiber Diet + Bisacodyl					
C1						High fat/Low fiber Diet + C1 Cheonggukjang					
C291						High fat/Low fiber Diet + C291 Cheonggukjang					
C574						High fat/Low fiber Diet + C574 Cheonggukjang					
C12512						High fat/Low fiber Diet + C12512 Cheonggukjang					
SB						High fat/Low fiber Diet + Steamed soybean (Without fermentation strains)					

Fecal collection and SD rat sacrifice

분변 내 수분함량 확인을 위하여 그룹별로 신선한 분변을 채취하여 습/건 무게 측정을 통해 수분 함량을 계산하였다. 또한 24시간 동안 배출된 각 그룹의 분변 수를 측정하였다.

$$\text{분변 내 수분함량(\%)} = (\text{변 중량} - \text{건조 변 중량}) / \text{변 중량} * 100$$

실험 종료 12시간 전 모든 그룹의 식이 공급을 중단하였으며 실험 종료 직전 SD rat 의 체중을 측정(CAS) 후 CO₂ 가스를 통해 안락사하였다. 이후 피하지방은 미세저울(Sartorius)로 중량을 측정하였으며 맹장의 적출 즉시 액체질소를 이용하여 급속 냉동 후 -80°C 로 보관하였다. 대장의 길이는 맹장의 끝 부분부터 직장 전 부위의 길이를 측정하여 파악하였다. 혈액 내 혈당은 ACCU-CHECK Instant(Roche)를 이용하여 측정하였다.

Prepare miseq library

미생물군집 분석을 위해 맹장 내용물의 0.2g 을 dsDNA 의 추출에 사용하였고(Qiagen, PowerFecal DNA pro Kit) Qubit-iT dsDNA HS assay(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 농도 측정 후 5ng/ul 로 표준화하여 Illumina 사의 Miseq 을 위한 16S Metagenomic sequencing library pipe line 을 따라 진행하였다(Illumina 2015). Amplicon PCR 은 16S rRNA gene 의 V3-V4 hypervariable region 을 target 의 Sequence 와 Overhang adapter Sequence 를 통합한 Forward primer(5'TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG'3, Macrogen), Reverse primer(5'GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C'3, Macrogen)를 제작하여 사용 하였다. PCR 프로그램은 95°C, 3분의 Denature 과정 이후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 25회 반복한 후 75°C 에서 5분간 Final extension 을 진행하여 Amplicon PCR 산물을 생성하였다. PCR 산물의 품질 확인을 위해 1% Agarose gel 전기영동을 통해 V3-V4 primer 사용으로 예상되는 PCR 산물의 크기인 550bp 의 밴드 유무를 확인하였다. Index PCR 은 호환 가능한 primer 인 Nextera XT Index kit v5(Illumina, Inc, San Diego, CA)의 B,C set 를 사용하였으며 Index primer 부착 후 예상되는 PCR 산물의 크기인 630bp 의 밴드 유무를 확인하여 정제를 진행하였다. 각 단계에서 모든 PCR 산물은 AMPure beads(Beckman Coulter, Indianapolis, IN)를 사용하여 정제에 사용하였다. 제작된 Library 는 Qubit-iT dsDNA HS assay(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 농도 측정 후 모든 샘플을 160ng/ul 로 표준화하였다. 완성된 최종 library 는 Macrogen(Seoul, Korea)사에 Miseq 을 위탁하였다.

Miseq data analysis

실험동물의 장내미생물 군집 분석은 Miseq 에서 얻은 FASTQ 파일을 FASTA 로 변환하여 분석프로그램인 Mothur(Schloss et al. 2009)와 제공되는 표준 운영

절차(SOP)를 따라 sequencing 상의 오류가 제거되었다(Kozich et al. 2013). 각 단계는 연속적으로 이루어지며 최종 Output file 로 생성되는 fasta, count_table, taxonomy 를 이용하여 추가 분석을 진행하였다. 각 Sequence 들은 97%의 유사성을 기준으로 Operational taxonomic unit(OTU)으로 Clustering 하였으며 하나의 OTU 가 각 샘플에 존재하는 개수를 shared file 을 생성하여 알 수 있었으며 해당 OTU 에 대한 생물학적 분류는 taxonomy file 의 생성으로 파악하였다. 또한 phylotype 명령어를 통해 각 계통 분류 기준으로 요약된 shared file 을 생성하여 추가 분석에 이용하였다. Shared file 은 rarefaction curve 를 기반으로 가장 적은 sequence 인 12310을 subsample size 로 입력 후 Normalization 하였다. Subsample 된 shared file 은 개체의 미생물 군집 구성을 파악하기 위해 Abundance 를 Percentage 로 시각화 할 수 있었다. 각 샘플의 alpha-diversity 분석을 위해 군집 내 균등성은 Shannon(Hill 1973), 다양성은 Chao(O'hara 2005) 지수를 기준으로 평가되었다. 청국장 및 Bisacodyl 급여 그룹과 Control diet 급여 그룹의 특이적으로 많은 미생물을 확인하기 위해 Linear Discriminant Analysis(LDA) Effect Size(LEfSe)를 사용하여(Segata et al. 2011) HFD 그룹과 단일 비교하였으며 그룹 간의 차이를 특성화 하는 genus level 의 OTU 를 식별하였다. 각 OTU 는 LDA score 가 3이상이며 HFD 그룹과 비교하였을 때 Abundance 가 0.5% 이상 차이가 나는 것을 선별하여 Heat map 형식으로 시각화 하였다.

Microbial network analysis

각 샘플의 장내미생물 군집의 Correlation 분석을 통해 상호작용을 예측하기 위하여 mothur 를 통해 OTU association 을 수행하여 얻은 Spearman Coefficient 값을 Cytoscape V3.8.2를 통해 시각화 하였으며 Clustering 을 위해 제공되는 App 인 Modulan plug-in 을 이용하였다. ModuLand plug-in 은 Network module 결정 제품군인 LinkLand influence zone 결정 method 와 ProportionalHill module assignment 방법을 기반으로 무방향성의

Network 와 weight description 의 overlapping 되는 module 을 결정한다(Kovacs et al. 2010). 또한 hierarchical module 을 계산하여 전체 network 구조에서 하위 레벨의 module 은 상위 레벨의 meta node 가 되며 하위 레벨의 moduler overlap 은 상위 레벨의 meta edge 가중치로써 작용한다(Szalay-Beko et al. 2012). OTU association 후 output 파일에 포함된 OTU 의 abundance 가 전체 reads 의 1% 이상인 높은 상관계수를 가지는 correlation 결과(Spearman Coef>0.7, p-value<0.05)를 Cytoscape 를 통해 시각화 하였으며 ModuLand 2.0 plug in 을 통해 미생물 군집의 Network 를 Clustering 하였다. 각 nodes 와 Label 의 크기는 해당 OTU 의 abundance 를 의미하며, 양의 상관관계를 갖는 경우 파란색 edge 를, 음의 상관관계를 갖는 경우 빨간색 edge 를 사용하여 나타냈다. Nodes 의 색상은 해당 OTU 가 속한 Module 의 고유한 색상들이 중첩되어 시각화 되었다. 이후 다른 OTU 와 높은 상호작용을 하는 “Hub”미생물을 선별하여 군집 내 중요한 역할을 하는 것으로 예측하였다.

Quantitative analysis of short chain fatty acids

급속 냉동되어 보관한 맹장 내용물 0.2g 과 1ml 의 Absolute methanol(67-56-1, Sigma-aldrich, St. Louis, USA)을 혼합하여 2분간 균질화하였다. 혼합액은 4M Hydrochloric acid solution(7647-01-0, Fluka Analytical, Munich, Germany)을 이용하여 pH 를 2~3으로 조정하여 10분간 Incubation 한 후 원심분리 하였다(10min, 10,000rpm, 4°C). 분리된 상층액을 syringe filter(SC13PO45NL, Hyundai micro, Seoul, Korea)를 이용하여 여과 후 즉시 분석에 사용하였다. 정량을 위한 SCFA standard 는 모두 Sigma-aldrich(St. Louis, USA)에서 구입한 External standard 인 Acetic acid(64-19-7), Propionic acid(79-09-4), Butyric acid(107-92-6)와 Internal standard 인 2-Ethylbutyric acid(88-09-5)를 혼합하여 0 μ M, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M 의 농도로 제작하였다.

위와 같이 맹장 내용물에서 추출된 혼합액의 Short chain fatty acids 정량 분석을 위해 GC solution software(GC Real Time Analysis)를 통해 GC-2010 Plus, AOC-20i Auto Injector, AOC-20s Auto sampler(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 제어하였으며 검출기는 Flame ionization detector 를 이용하였다. 또한 사용된 Column 은 DB-FFAP silica capillary column (Length 30m, Inner Diameter 0.25mm, Film Thickness 0.25um)모델(Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.)을 사용하였다. 맹장 내용물에서 추출된 Short chain fatty acids 추출액 1ul 를 splitless 로 주입하였으며 주입부 온도는 230°C 이다. Carrier gas(He)는 pressure 100kPa, Total flow 40.2mL/min, Column Flow 1.20mL/min, Linear Velocity 29.6cm/sec, Purge flow 3.0mL/min 으로 설정하였다. 시료 내 성분 분리를 위한 column oven 의 온도 조건은 60°C 에서 3분간 머무른 이후 20°C/min 의 속도로 200°C 까지 상승 후 0.5분간 유지, 마지막으로 20°C/min 의 속도로 230°C 상승하여 1.3분간 유지하였다. 검출부 온도는 280°C 이며 Sampling rate 는 40msec 이다. 또한 Makeup gas(He)의 flow 는 40mL/min 이며 수소는 40mL/min, Air flow 는 400mL/min 으로 설정하여 진행하였다. 검출된 peak 에 대한 Quantitative analysis 는 GC solution 의 Post run analysis software 를 통해 진행하였으며 각 Target 물질에 대한 농도는 Area 값을 기반으로 도출하였다.

Statistical analysis

생체 지표의 모든 결과는 평균값±표준오차로 기록되었으며 통계분석은 소프트웨어 패키지 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 각 군의 분석된 항목별 차이는 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 실시하였으며, 통계학적 유의성 평가는 ANOVA 에 의한 Tukey-Kramer 테스트를 사용하여 결정되었다. 맹장 내 미생물 데이터 간의 비교는 R software 를 통한 one-way ANOVA 를 통해 $p < 0.05$ 이하인 유의성을 확인하였으며 그룹 간 사후검정으로는 Duncan's multiple range test 및 Tukey's range test 을 이용하였다.

RESULTS

Effect of suppressing obesity induced by feeding high fat/low fiber diet

일반 사료의 급여 중단 후 고지방/저식이섬유 사료로 전환한 모든 그룹에서 체중이 증가하였다(Figure 2A). 하지만 모든 청국장 급여 그룹에서 HFD 와 비교하였을 때 유의하게 감소하는 것을 확인하였으며 지방 또한 고지방/저식이섬유 사료를 섭취한 모든 그룹이 CD 와 비교하였을 때 유의하게 증가하였지만 모든 청국장 급여 그룹은 HFD 그룹에 비하여 지방의 중량이 감소한 것을 확인하였다(Figure 2B). 혈당은 HFD 에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났지만 C1, C291, C574 및 BSC 그룹에서는 혈당이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3). 분변지표 확인을 위해 24시간동안 모인 분변을 수거하여 측정된 개수는 CD 그룹에서 250개 이상이었지만 고지방/저식이섬유 사료 급여한 모든 그룹에서 200개 이하로 감소하였다(Figure 4A). 하지만 청국장 급여 그룹(C1, C291, C574, C12512) 및 BSC 그룹에서 HFD 그룹과 비교하였을 때 유의적으로 증가함을 확인하였다. 변 중량과 건조 변 중량의 차이로 측정된 분변 내 수분량의 경우 BSC 그룹이 70% 이상으로 가장 높았으며 일반사료급여 그룹인 CD 를 비롯한 모든 고지방/저식이섬유 사료 급여 그룹은 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Figure 4B).

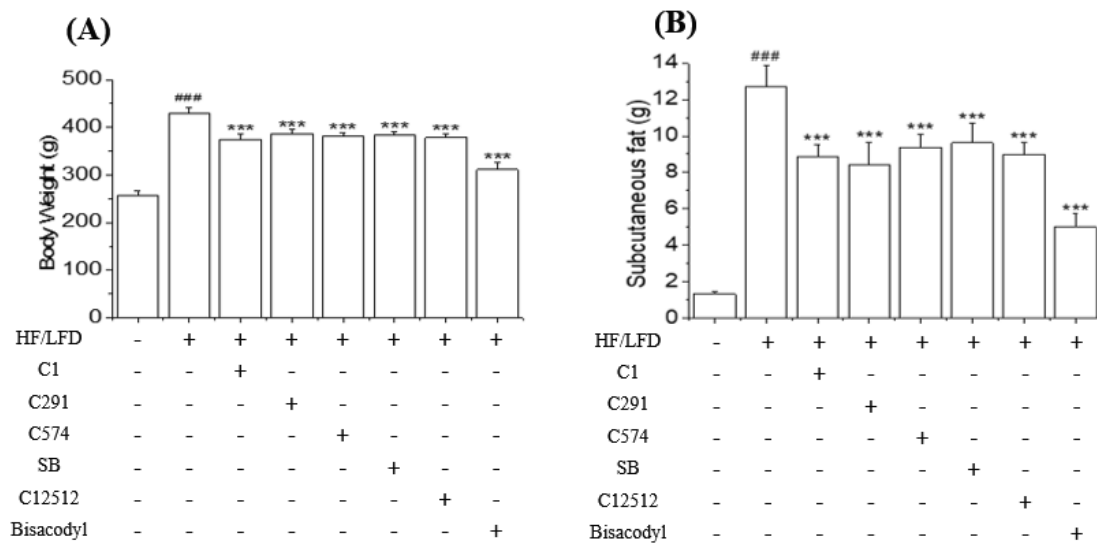


Figure 2. Effect of fermented soybeans on high fat/low fiber diet-induced body and subcutaneous fat weight in rats. HF/LFD-induced body weight and subcutaneous fat weight was measured by weighing balances on last day. Significantly different from the control group (### $p < 0.001$). Significantly different from the HF/LFD group (***) $p < 0.001$. (High fat/Low fiber diet; HF/LFD). BSC; Bisacodyl, CD; Control diget, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1 (*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291 (*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574 (*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCM12512)

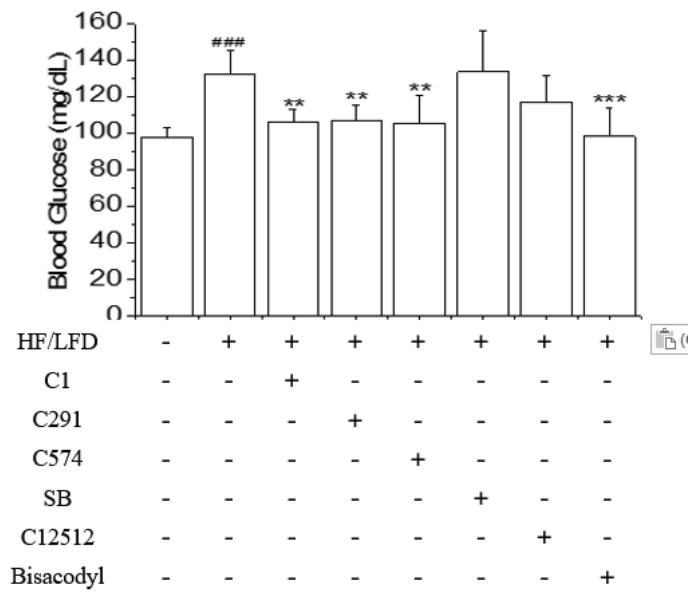


Figure 3. Effect of fermented soybeans on high fat/low fiber diet-induced blood glucose concentration in rats. HF/LFD-induced concentration of blood glucose was measured by ACCU-CHECK Instant on last day. Significantly different from the control group (### $p < 0.001$). Significantly different from the HF/LFD group (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (High fat/Low fiber diet; HF/LFD). BSC; Bisacodyl, CD; Control diget, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1(*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291(*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574(*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCM12512)

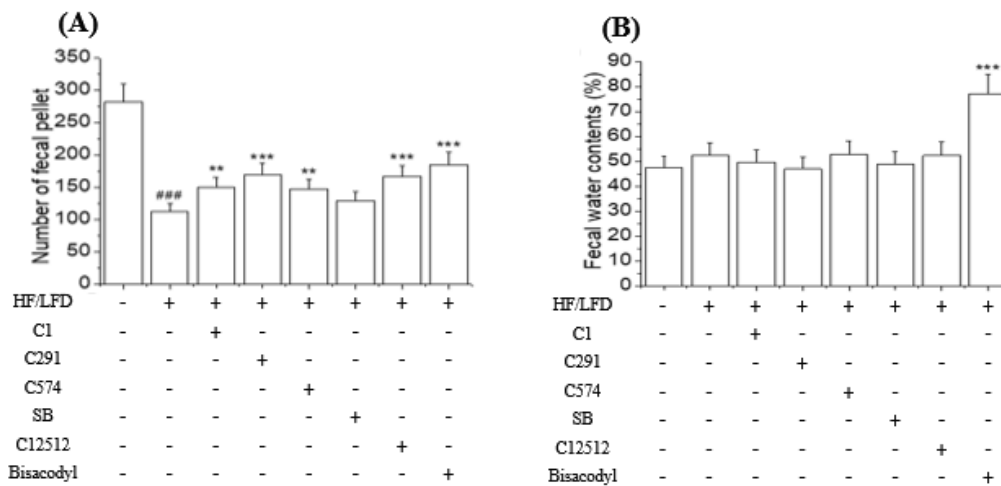


Figure 4. Effect of fermented soybeans on high fat/low fiber diet-induced changes of fecal number and fecal moisture in rats. (A) The fecal were collected from rats on last day and calculated the fecal numbers. (B) The collected fecal were dried at 70°C for 24h, and the total water content was calculated as the difference between the wet and dry weights of fecal. Significantly different from the control group (### $p < 0.001$). Significantly different from the HF/LFD group (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (High fat/Low fiber diet; HF/LFD). BSC; Bisacodyl, CD; Control diget, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1(*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291(*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574(*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCM12512)

Comparison of the content of short chain fatty acids in the cecum

Acetate 는 C574 그룹이 고지방/저식이섬유 급여군과 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. Propionate 의 경우 C12512 그룹이 유일하게 고지방/저식이섬유 급여군에 비하여 높게 나타났다. Butyrate 는 C12512, C574, SB, CD 그룹에서 유의적인 차이가 확인되었다(Figure 5).

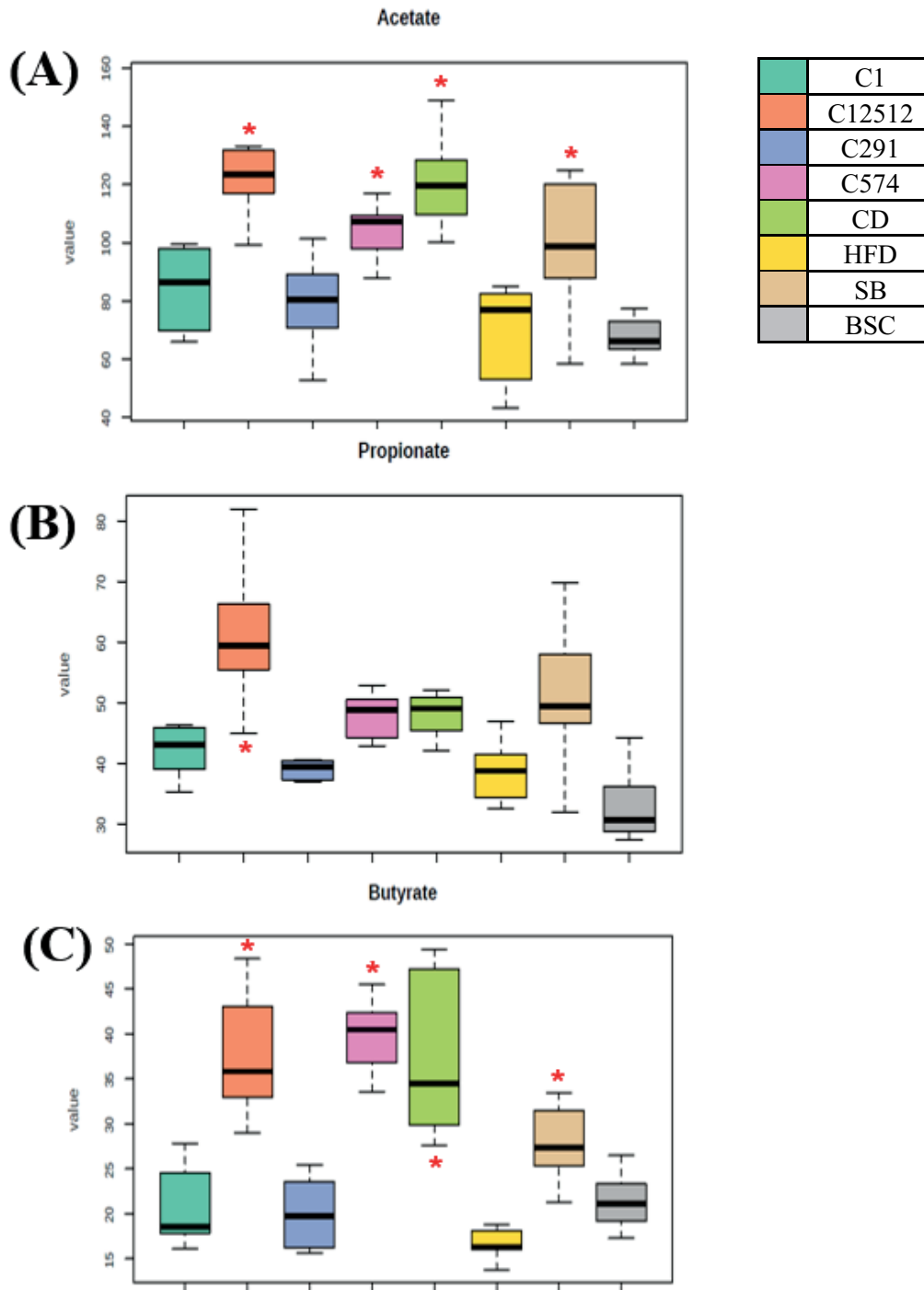


Figure 5. Content of Short chain fatty acids in cecum(μM). Values are presented as $\text{means} \pm \text{SD}$. Significantly different from the HFD group (* $p < 0.05$). (A)Acetate concentration, (B)Propionate concentration, (C)Butyrate concentration BSC;Bisacodyl, CD;Control diget, SB;Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1(*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291(*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574(*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCM12512)

Analysis of microbiome in the cecum

맹장 내 미생물 군집 분석은 77개의 raw data 를 도출하여 12310 reads 로 표준화하여 이후 분석에 사용하였다(Figure 6). 각 그룹에 대한 맹장 미생물 군집의 alpha diversity 는 Chao, Shannon 지표를 이용하여 확인하였다(Figure 7). C12512, C1 그룹에서 미생물 종의 풍부함을 나타내는 Chao 지표가 상대적으로 높음을, C574 그룹에서 낮음을 확인하였다. 또한 해당 그룹 내 존재하는 미생물의 종 간 Abundance 의 균등함을 나타내는 shannon 은 C291급여 그룹에서 상대적으로 낮아짐을 확인하였으며 이는 특정 미생물종들의 특이적인 증가 및 감소를 나타낸다. 실험동물 개체별 미생물 생태의 유사성 비교는 Operational taxonomic unit(OTU)을 기준으로 하여 phylogenetic tree 로 나타내었다(Figure 8). BSC 그룹과 일반 사료 급여 그룹의 경우 모든 개체가 하나의 Cluster 를 형성하였지만 C12512 그룹을 제외한 다른 청국장 급여그룹과 HFD 그룹 실험동물의 맹장 미생물은 명확하게 나누어지지 않았다.

Rarefaction curve

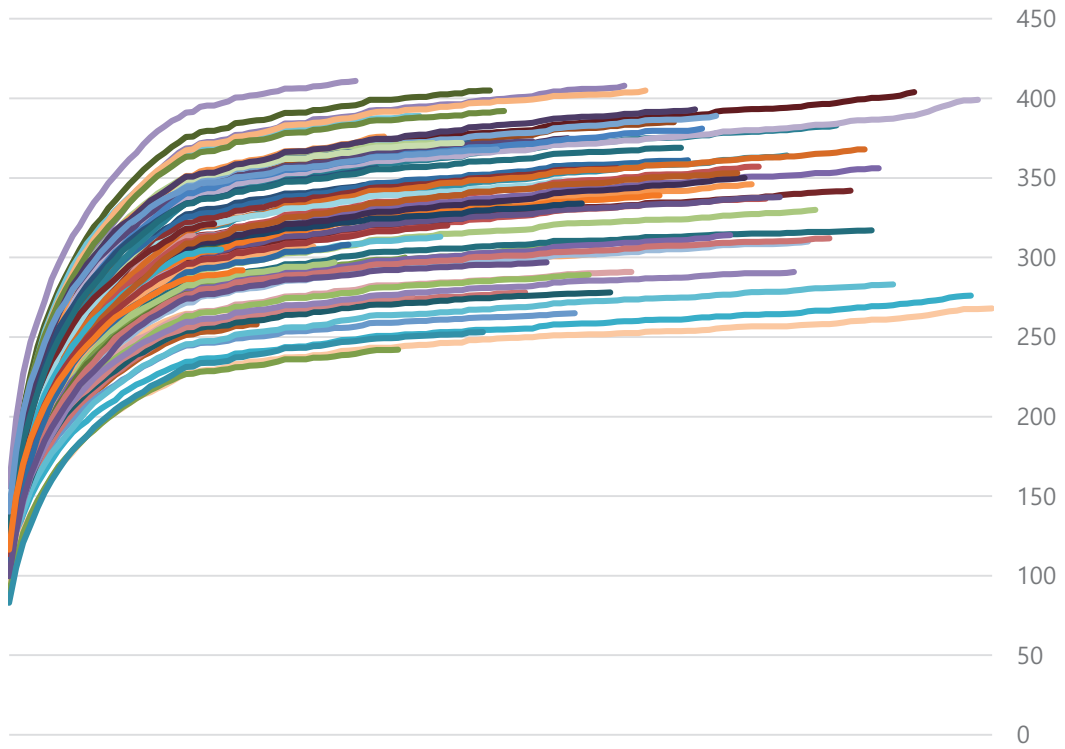


Figure 6. Rarefaction curve of cecum miseq data

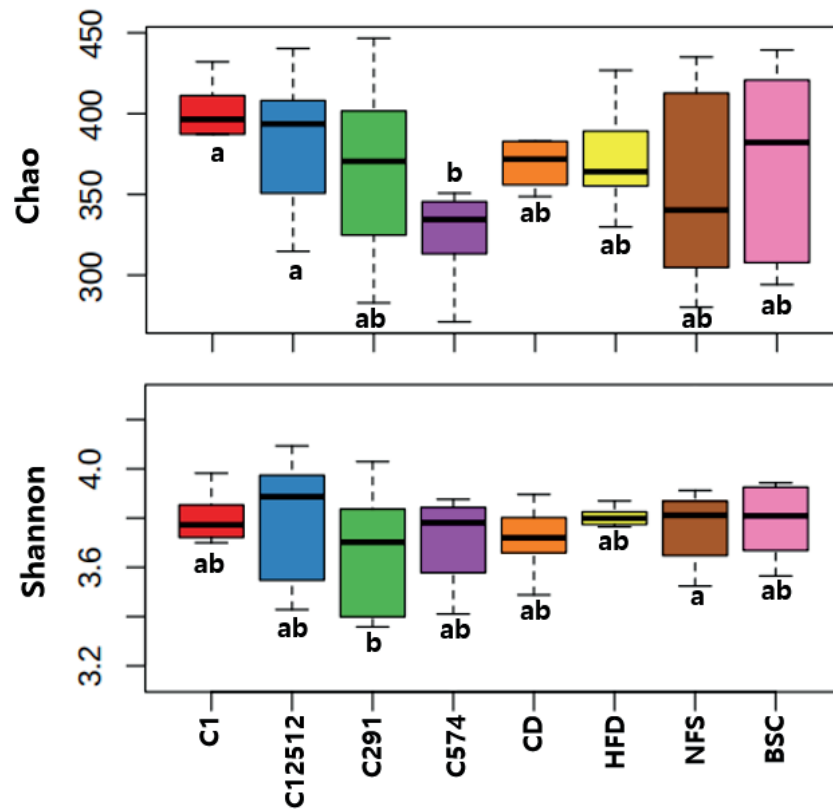


Figure 7. α -Diversity analysis of bacterial communities. Chao Diversity, Shannon Diversity are shown for each group. BSC; Bisacodyl, CD; Control digest, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1 (*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291 (*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574 (*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCM12512)

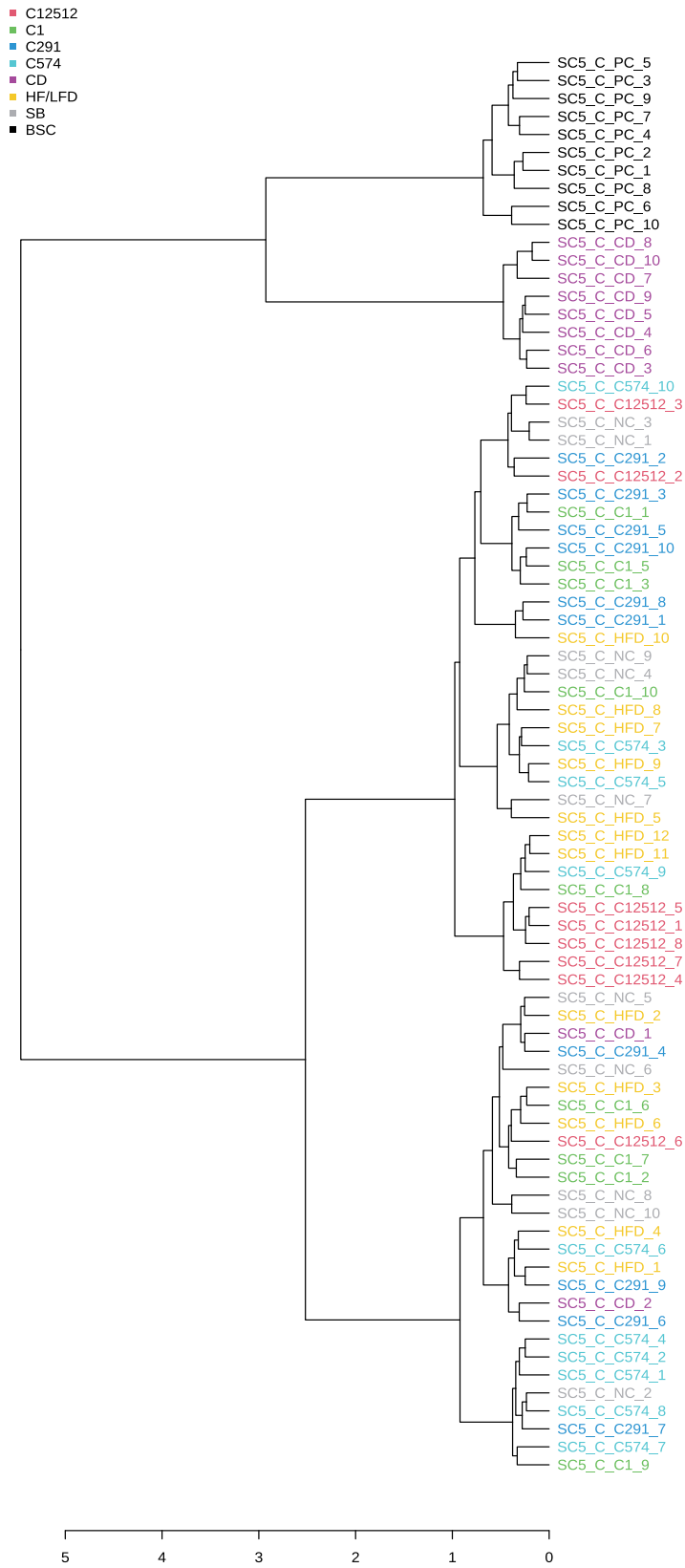


Figure 8. Phylogenetic tree

High fat/low fiber 사료로 인한 SD rats 의 맹장내미생물 군집 차이는 Family 수준에서 확인할 수 있다(Figure 9). 장에서 흔히 발견되는 미생물 중 하나인 Bacteroidaceae family 가 고지방/저식이섬유 사료를 급여한 모든 그룹에서 비율이 크게 증가하였으며 Prevotellaceae family 및 Lactobacillaceae family 의 비율이 크게 감소하였다. *Bacteroides spp.* 와 *Prevotella spp.*의 비율은 동물성 단백질 및 지방의 함량이 높은 식단과 탄수화물 및식이섬유의 함량이 높은 식단에서 차이가 있는 것으로 흔히 알려져 있고 대조군보다 높은 Bacteroidaceae family 의 수치는 소화능력의 저하 또는 변비로 인해 발생할 수 있다고 보고된 결과가 있는데, 본 연구결과에서 고지방/저식이섬유 식단을 섭취한 모든 그룹에서 *Bacteroides spp.*와 *Prevotella spp.*의 비율이 높아진 것과 일치한다. 또한 Lachnospiraceae family 가 High fat/low fiber 식단급여 그룹에서 큰 비율로 존재하는 것이 확인되었다. 반면, Bisacodyl 의 처방으로 인해 Prevotellaceae family 의 회복과 함께 Lachnospiraceae family 가 일반 사료를 급여한 그룹과 비슷한 수준으로 돌아온 것을 확인하였다.

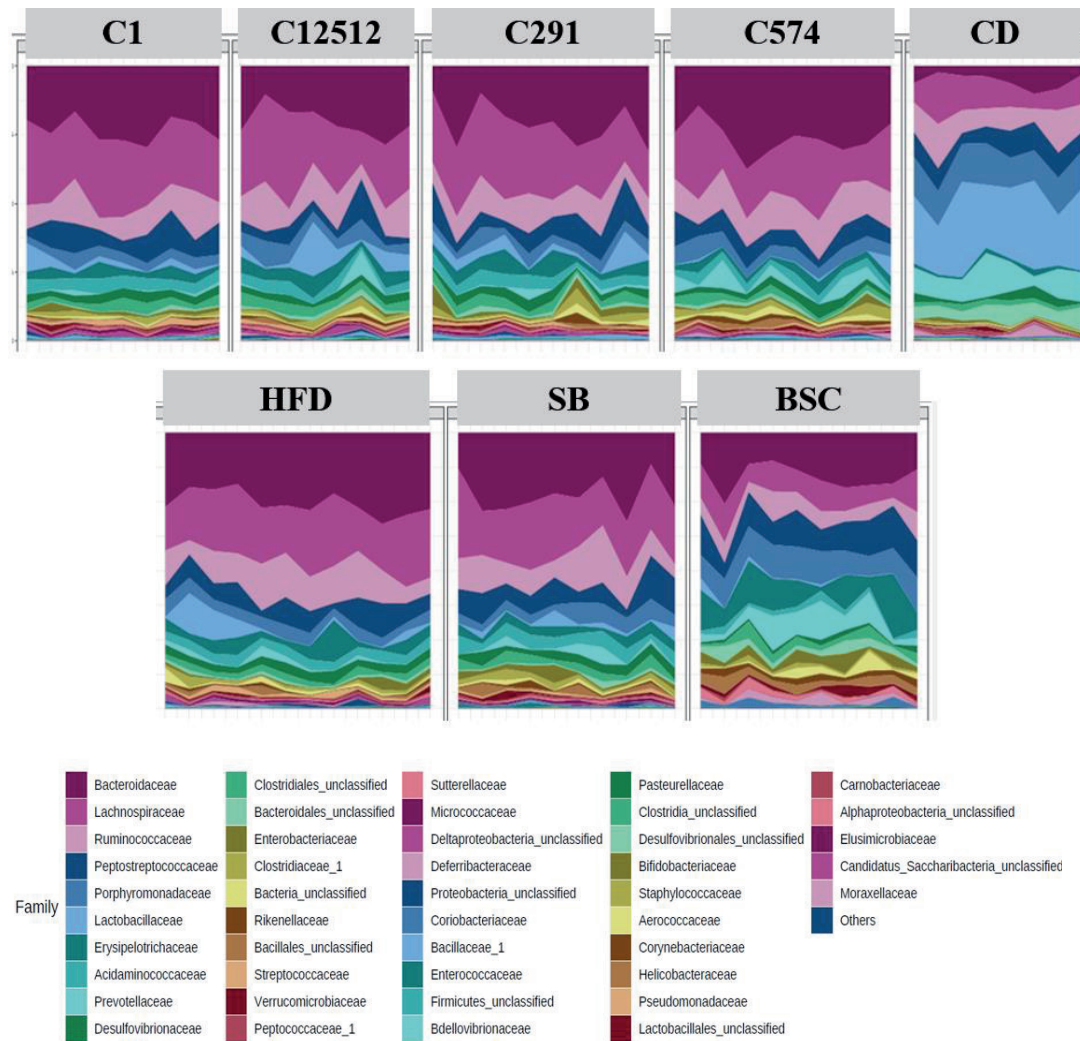


Figure 9. Abundance of each treatments in Family level. BSC; Bisacodyl, CD; Control diget, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1(B.subtilis SCGB1), C291; Cheonggukjang 291(B.subtilis SCDB291), C574; Cheonggukjang 574(B.subtilis SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (B.subtilis sub. Natto KCCM12512)

Family 수준에서 각 구성원들의 Abundance 가 그룹별로 변화함에 따라 하위 level 인 Genus 수준의 장내미생물 구성원의 유의적인 차이를 분석하여 *Bacteroides spp.*의 abundance 가 CD 그룹과 비교하여 HFD 그룹에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(Figure 10). 반면 *Prevotella spp.* 는 고지방/저식이섬유 사료를 섭취한 모든 그룹에서 유의적으로 감소하였다. 또한 *Lactobacillus spp.*가 CD 그룹에비하여 고지방/저식이섬유 사료를 급여한 모든 그룹에서 감소하였음을 확인하였으며(Figure 11) 이러한 유익균의 감소와 *Bacteroides spp.* 의 증가는 장내미생물 불균형이 유도되었음을 시사한다. 한편 청국장의 발효균주인 *Bacillus spp.* 가 C291, C574, C1 청국장 급여 그룹에서 유의적으로 증가하였으며 이는 해당 청국장의 발효에 사용된 균주가 장 내에 정착했을 것으로 예상된다.

Genus	Comparison group	diff	lwr	upr	p adj
<i>Bacteroides</i> spp.	SB	1613.90	377.48	2850.32	0.00
	CD	2018.15	834.37	3201.93	0.00
	HFD	1214.65	30.87	2398.43	0.04
	BSC	-2052.90	-3289.32	-816.48	0.00
	C574	-1419.00	-2655.42	-182.58	0.01
	C291	-1457.00	-2693.42	-220.58	0.01
	C1	1249.40	12.98	2485.82	0.05
	C12512	-202.30	-294.24	-110.36	0.00
	C291	-207.58	-295.61	-119.56	0.00
	SB	206.70	114.76	298.64	0.00
<i>Prevotella</i> spp.	CD	204.90	112.96	296.84	0.00
	C574	173.80	81.86	265.74	0.00
	C291	209.70	117.76	301.64	0.00
	C1	211.50	119.56	303.44	0.00
	BSC				
	SB				

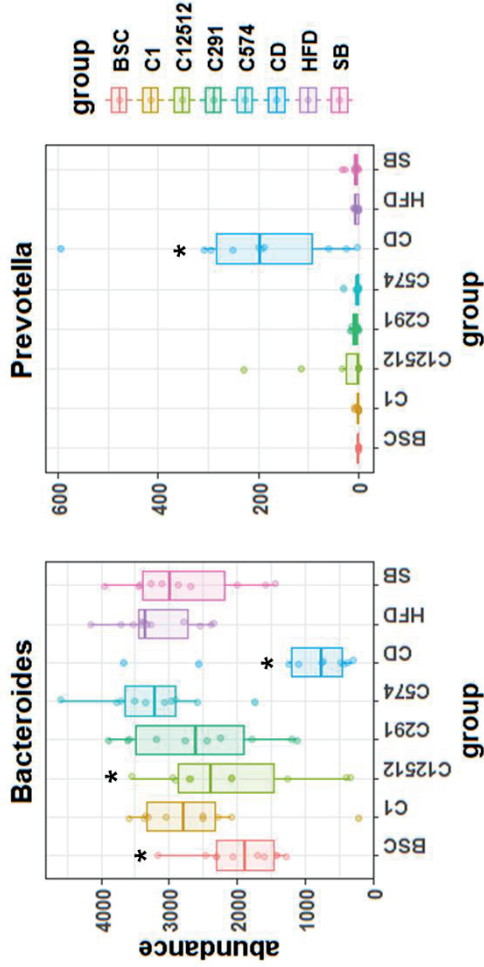


Figure 10. Abundance of *Bacteroides* spp. and *Prevotella* spp

BSC; Bisacodyl, CD; Control diet, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1 (*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291 (*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574 (*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCMI2512)

Genus	Comparison group	diff	lwr	upr	p adj
<i>Lactobacillus</i>	CD	-2302.80	-3456.27	-1149.33	0.00
	CD	-2133.02	-3237.38	-1028.65	0.00
	CD	2413.40	1259.93	3566.87	0.00
	CD	2095.30	941.83	3248.77	0.00
	CD	1190.80	37.33	2344.27	0.04
	CD	2226.40	1072.93	3379.87	0.00
	CD	2437.90	1284.43	3591.37	0.00
	C574	-1222.60	-2376.07	-69.13	0.03
	C12512	1247.10	93.63	2400.57	0.02
	SB	-92.70	-146.37	-39.03	0.00
<i>Bacillus spp.</i>	HFD	-97.05	-148.44	-45.66	0.00
	CD	-54.70	-108.37	-1.03	0.04
	CD	-106.10	-159.77	-52.43	0.00
	CD	-54.30	-107.97	-0.63	0.05
	C574	54.90	1.23	108.57	0.04
	C291	87.90	34.23	141.57	0.00
	C291	106.30	52.63	159.97	0.00
	C1	54.50	0.83	108.17	0.04

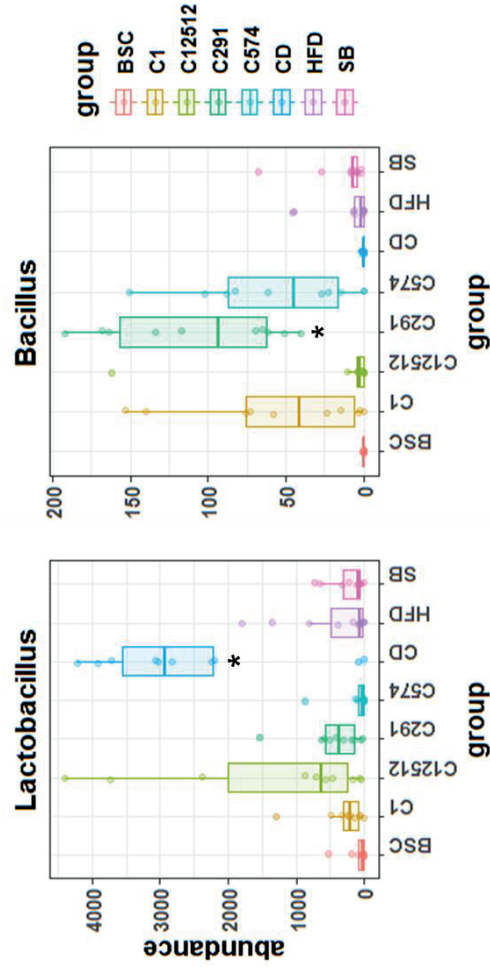


Figure 11. Abundance of *Lactobacillus* spp. and *Bacillus* spp.

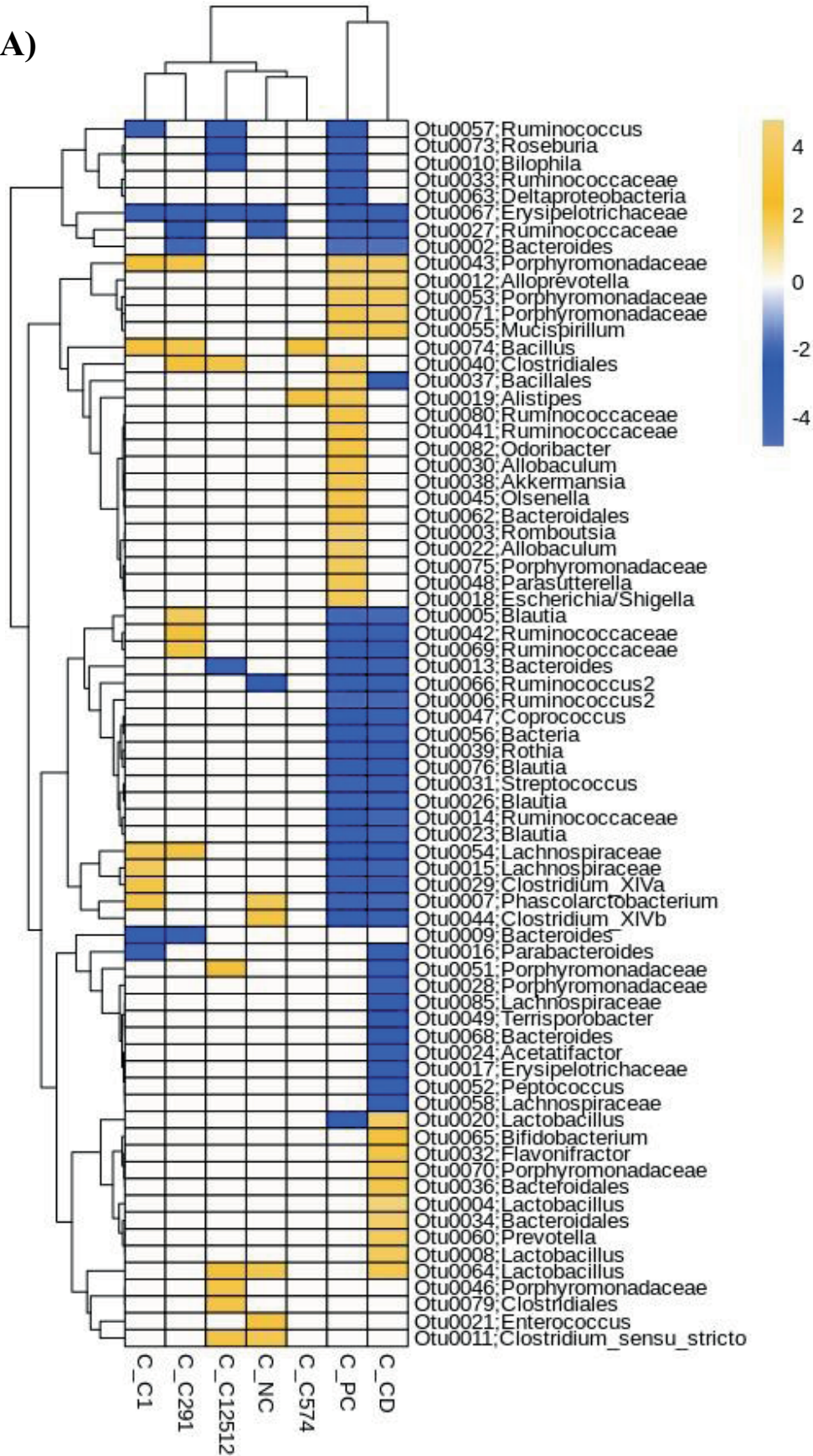
BSC;Bisacodyl, CD;Control digest, SB;Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1(*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291(*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574(*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. Natto KCCCM12512)

Genus 보다 하위 Level 인 Operational taxonomic unit(OTU) 기준으로 각 그룹을 HFD 그룹과 Lefse 분석을 진행하여 유의적인 차이가 있는 Taxonomy 의 할당된 Size 가 0.1% 이상, LDA score 가 3이상인 OTU 를 Heat map 으로 표현하였다. 값은 LDA score 를 사용하였으며 처리 그룹보다 HFD 에서 유의적으로 높은 경우 음의 값으로 표기하였다(Figure 12A). 청국장 급여 그룹의 결과는 다시 Figure 12B 에 요약하였으며 청국장 간의 유의적 차이가 있는 OTU 는 Table 3에 표기되어 있다.

HFD 에서 유의적으로 증가한 OTU 의 대부분은 비만환자에게서 높은 비율로 존재한다고 보고된 미생물인 Lachnospiraceae family (OTU;0085, OTU;0058, OTU;0054, OTU;0015), Ruminococcaceae family (OTU;0042, OTU;0069, OTU;0014), *Rumonicoccus2 spp.* (OTU;0066, OTU;0006), *Blautia spp.* (OTU;0005, OTU;0076, OTU;0026, OTU;0023), Erysipelotrichaceae family(OTU;0067, OTU;0017) 였으며(Wang, Lam, et al. 2019) 식이섬유와 같은 다당류 분해에 기여하는 것으로 알려진 Porphyromonadaceae family (OTU;0043, OTU;0053, OTU;0071, OTU;0075, OTU;0070), *Alloprevotella spp.* (OTU;0012), *Prevotella spp.* (OTU;0060)와 장 내에서 면역 반응을 조절하고 장내 미생물 군집의 변화를 유도하는 등 신체에 유익한 기능을 하는 것으로 알려진 *Lactobacillus spp.* (OTU;0020, OTU;0004, OTU;0008, OTU;0064), *Bifidobacterium spp.* (OTU;0065)는 HFD 그룹에서 유의적으로 적은 비율로 감소하였다. BSC 그룹에서 숙주의 혈당과 혈압을 조절 하는 것에 관여한다고 보고되어 있는 *Odoribacter spp.* (OTU;0082) 증가하는 경향이 있었으며(Gomez-Arango et al. 2016) 비만과 강한 음의 상관관계가 있는 *Akkermansia spp.* (OTU;0038), *Allobaculum spp.* (OTU;0030, OTU;0022)가 유의적으로 높은 비율을 보였다(Garcia-Mazcorro et al. 2016). 이러한 결과는 일반사료에서 고지방/저식이섬유 사료로의 전환으로 인한 Rat 의 장내미생물 불균형은 비만형 미생물의 증가에 기인한 것을 알 수 있다. Bisacodyl 의 처방은 비만과 관련된

장내미생물이 개선됨을 나타내었으며 신체에 유익한 활동을 하는 미생물의 증가가 일부 관찰되었다. 특히 특이적으로 존재한 *Akkeermansia spp.* (OTU;0038)의 증가는 IBD, 비만, 당뇨억제에 관련이 있다는 증거가 있으며(Santacruz et al. 2010; Karlsson et al. 2012; Png et al. 2010; Hansen et al. 2012; Qin et al. 2012) 포도당 항상성을 제어한다고 알려져 있다(Everard et al. 2013). 한편, 청국장이 첨가된 고지방/저식이섬유 사료를 급여한 그룹 중 발효 균주로 사용된 *Bacillus spp.* (OTU;0074)가 C291, C1, C574그룹에서 증가한 비율로 존재하였으며(Figure 12B) 청국장 급여 그룹간의 비교를 통해 C291그룹이 가장 큰 증가가 있었음을 확인하였다(Table 3). C12512그룹은 *Lactobacillus spp.* (OTU;0064)의 증가가 관찰되었으며 Butyrate 생성균으로 알려진 Genus 를 다수 포함하는 Clostridiales order(OTU;0079, OTU;0040), *Clostridium sensu stricto spp.* (OTU;0011)가 유의적으로 높은 비율로 존재하였다(Pichler et al. 2020; Ferrario et al. 2014; Appert et al. 2020). 또한 항염증 신호의 중요한 매개체로 보고된 Porphyromonadaceae family(OTU;0046, OTU;0051)가 증가하였다(Zackular et al. 2013). C574 그룹은 *Alistipes spp.*(OTU;0019)가 유일하게 유의적으로 증가하였으며 다른 청국장 그룹보다 Ruminococcaceae family 가 더 높은 비율로 존재하는 것을 확인하였다. C1은 Acetate, Propionate 생성균인 *Phascolarctobacterium spp.* (OTU;0007)와 Butyrate 생성균인 Porphyromonadaceae family(OTU;0043)가 증가하였다(Zhang et al. 2015; Sakamoto et al. 2009). HFD 그룹의 Erysipelotrichaceae family 증가는 고지방 식단으로 유발된 비만모델 쥐에서 강한 연관성이 있다는 결과와 일치하며(Hui et al. 2015) C574그룹을 제외한 모든 청국장 처리 그룹에서 감소하였음을 확인하였다.

(A)



(B)

OTU	TAX	C_NC	C_C1	C_C12512	C_C291	C_C574
Otu;0002	Bacteroides spp	0	0	0	-4.22508	0
Otu;0005	Blautia spp	0	0	0	4.00379	0
Otu;0007	Phascolarctobacterium spp	3.81841	3.39452	0	0	0
Otu;0009	Bacteroides spp	0	-3.14071	0	-3.50281	0
Otu;0010	Bilophila spp	0	0	-3.48887	0	0
Otu;0011	Clostridium_sensu_stricto spp	3.64345	0	3.33888	0	0
Otu;0013	Bacteroides spp	0	0	-3.71001	0	0
Otu;0015	Lachnospiraceae family	0	3.92443	0	0	0
Otu;0016	Parabacteroides spp	0	-3.53899	0	0	0
Otu;0019	Alistipes spp	0	0	0	0	3.27719
Otu;0021	Enterococcus spp	3.23134	0	0	0	0
Otu;0027	Ruminococcaceae family	-3.90277	0	0	-3.20558	0
Otu;0029	Clostridium_XIVa spp	0	3.40328	0	0	0
Otu;0040	Clostridiales order	0	0	3.34383	3.0672	0
Otu;0042	Ruminococcaceae family	0	0	0	3.0425	0
Otu;0043	Porphyromonadaceae family	0	3.03826	0	3.34763	0
Otu;0044	Clostridium_XIVb spp	3.34354	0	0	0	0
Otu;0046	Porphyromonadaceae family	0	0	3.36134	0	0
Otu;0051	Porphyromonadaceae family	0	0	3.07651	0	0
Otu;0054	Lachnospiraceae family	0	3.71651	0	3.32108	0
Otu;0057	Ruminococcus spp	0	-3.8363	-3.7326	0	0
Otu;0064	Lactobacillus spp	3.56294	0	3.05436	0	0
Otu;0066	Ruminococcus2 spp	-3.12074	0	0	0	0
Otu;0067	Erysipelotrichaceae family	-3.50835	-3.76757	-3.59614	-3.68889	0
Otu;0069	Ruminococcaceae family	0	0	0	3.29505	0
Otu;0073	Roseburia spp	0	0	-3.20883	0	0
Otu;0074	Bacillus spp	0	3.15511	0	3.59876	3.17825
Otu;0079	Clostridiales order	0	0	3.3507	0	0

Figure 12. Gut microbiota comparison between HFD group and sample treatment group. Lefse analysis in genus level, LDA score>2.5, (A) Results of all samples, (B) Merge the results of Cheonggukjang with LDA score, BSC; Bisacodyl, CD; Control diget, SB; Steamed soybean, C1; Cheonggukjang 1(*B.subtilis* SCGB1), C291; Cheonggukjang 291(*B.subtilis* SCDB291), C574; Cheonggukjang 574(*B.subtilis* SCGB574), C12512; Cheonggukjang 12512 (*B.subtilis* sub. *Natto* KCCM12512)

Table 3. LEFSE result between Cheonggukjang group

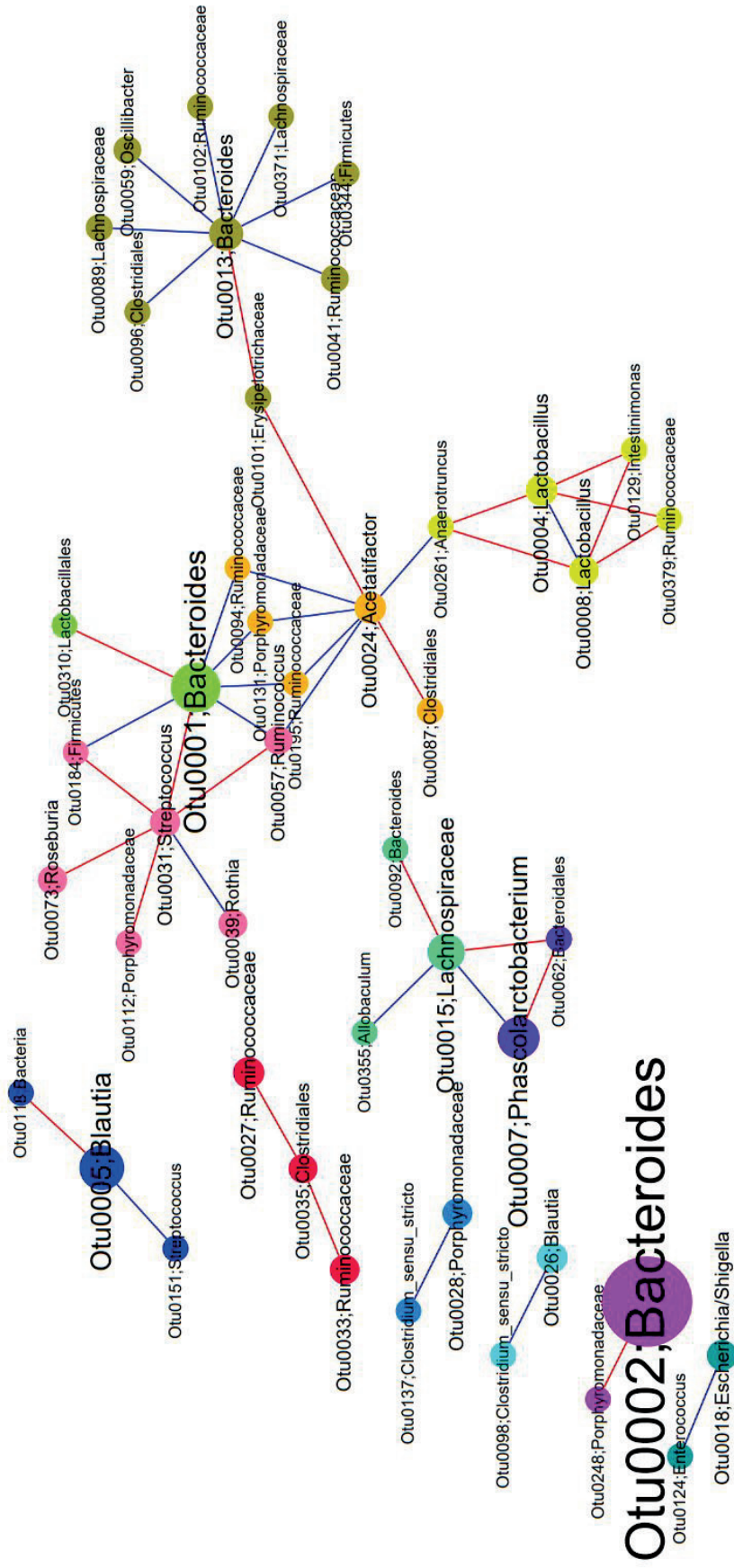
OTU	TAX	Group	LDA	Tax SIZE
Otu0044	Clostridium XIVb spp.	SB	3.4	0.3
Otu0064	Lactobacillus spp.	SB	3.8	0.2
Otu0101	Erysipelotrichaceae family	SB	3.5	0.1
Otu0009	Bacteroides spp.	C574	3.4	1.5
Otu0019	Alistipes spp.	C574	3.4	0.9
Otu0033	Ruminococcaceae family	C574	3.9	0.4
Otu0013	Bacteroides spp.	C291	4.1	1.3
Otu0018	Escherichia/Shigella spp.	C291	3.9	0.9
Otu0030	Allobaculum spp.	C291	3.3	0.5
Otu0050	Alistipes spp.	C291	3.5	0.3
Otu0054	Lachnospiraceae family	C291	3.8	0.3
Otu0074	Bacillus spp.	C291	3.5	0.2
Otu0093	Lachnospiraceae family	C291	3.1	0.1
Otu0004	Lactobacillus spp.	C12512	4.1	2.9
Otu0008	Lactobacillus spp.	C12512	4.2	1.7
Otu0016	Parabacteroides spp.	C12512	3.5	1.1
Otu0022	Allobaculum spp.	C12512	3.9	0.8
Otu0023	Blautia spp.	C12512	4.0	0.8
Otu0040	Clostridiales order	C12512	3.5	0.3
Otu0046	Porphyromonadaceae family	C12512	3.4	0.3
Otu0055	Mucispirillum spp.	C12512	3.4	0.3
Otu0062	Bacteroidales order	C12512	3.0	0.2
Otu0066	Ruminococcus2 spp.	C12512	3.4	0.2
Otu0015	Lachnospiraceae family	C1	4.1	1.2
Otu0031	Streptococcus spp.	C1	3.6	0.4
Otu0039	Rothia spp.	C1	3.6	0.4
Otu0073	Roseburia spp.	C1	3.1	0.2
Otu0087	Clostridiales order	C1	3.1	0.1

Cecum microbiome network analysis

각 청국장 처리군의 맹장 내 미생물 군집의 Network 분석을 위하여 OTU association 결과의 Spearman Coefficient 값이 0.8 이상으로 강한 상관관계를 갖는 Correlation 을 선택하여 Cytoscape 를 통해 시각화하였으며(Figure 13) Moduland Plug-in 에서 제공하는 Network 내 상위 10개 node(OTU)의 Betweenness centrality(BC)를 Table 4에 나타내었다. BC 는 맹장 내 미생물 군집의 Network 에서 Hub(Keystone) OTU 를 감지하기 위한 Index 로 사용되었다(Brandes 2001). Hub 로 간주되는 미생물은 군집 내에서 가장 영향력이 있거나 군집 안정을 위한 필수 미생물, 또는 질병의 원인인자를 제공하는 미생물일 수 있다(Layeghifard, Hwang, and Guttman 2017). Moduland plug-in 을 통한 BC Index 를 기반으로 모든 그룹의 미생물 군집의 Network 에서 “Hub”로써 작용하는 공통의 OTU 는 *Bacteroides spp.* (OTU;0001), *Lactobacillus spp.* (OTU;0004)이다. C12512그룹은 주요 *Bacteroides spp.* (OTU;0001)가 BC 지수가 높은 다른 *Lactobacillus spp.* (OTU;0020)와 음의 상관관계로 상호작용을 하는 것을 발견하였으며 이외의 다른 모든 그룹에서는 Lactobacillales order (OTU;0310)와 음의 상관관계를 나타내었다. 또한 맹장 내 Butyrate 생성량이 가장 높았던 C574, C12512그룹의 경우 *Alloprevotella spp.* (OTU;0012)가 공통 Hub 미생물이었으며 C574그룹은 Porphyromonadaceae family (OTU;0071), *Paraprevotella spp.* (OTU;0115)가, C12512 그룹은 *Lactobacillus spp.* (OTU;0008, OTU;0020), *Oscillibacter spp.* (OTU;0108), Lactospiraceae family (OTU;0311)이 군집 내에서 다른 OTU 와 높은 상호작용을 하는 Hub 미생물로써 감지되었음을 확인하였다. 또한 *Bacteroides spp.* (OTU;0013)이 C574 그룹 내에서 *Bacillus spp.* (OTU;0074)와 양의 상호작용 관계에 있는 것을 확인하였으며 C12512그룹 내에서 Porphyromonadaceae family, Ruminococcaceae family 와 관련된 OTU 와 양의 상호작용 관계에 있는 것을 확인하였다.

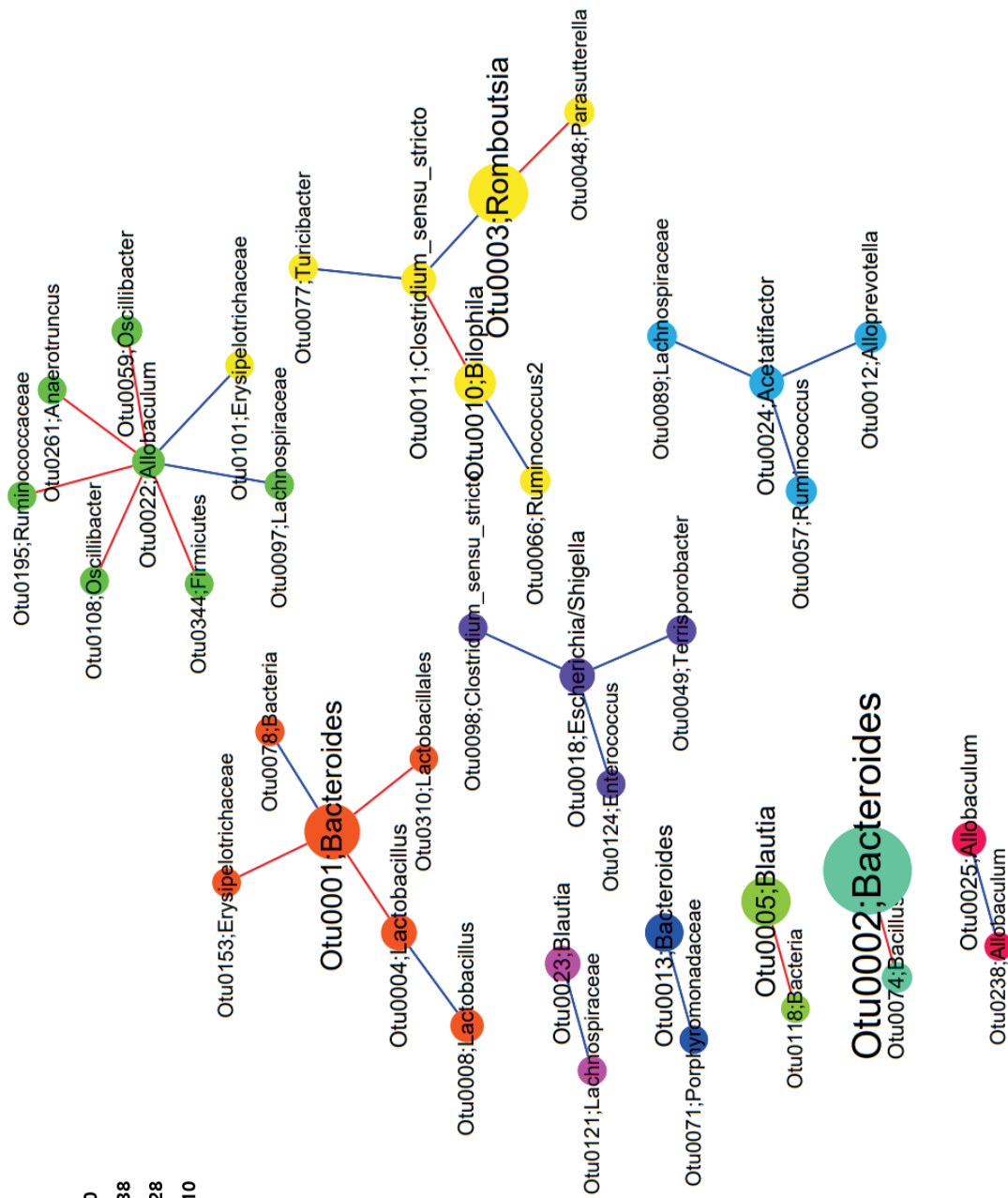
(A) C1

level : 0
 nodes on this level : 46
 links on this level : 47
 number of modules : 13



(B) C291

level : 0
 nodes on this level : 38
 links on this level : 28
 number of modules : 10



(C) C574

level : 0
 nodes on this level : 66
 links on this level : 69
 number of modules : 13

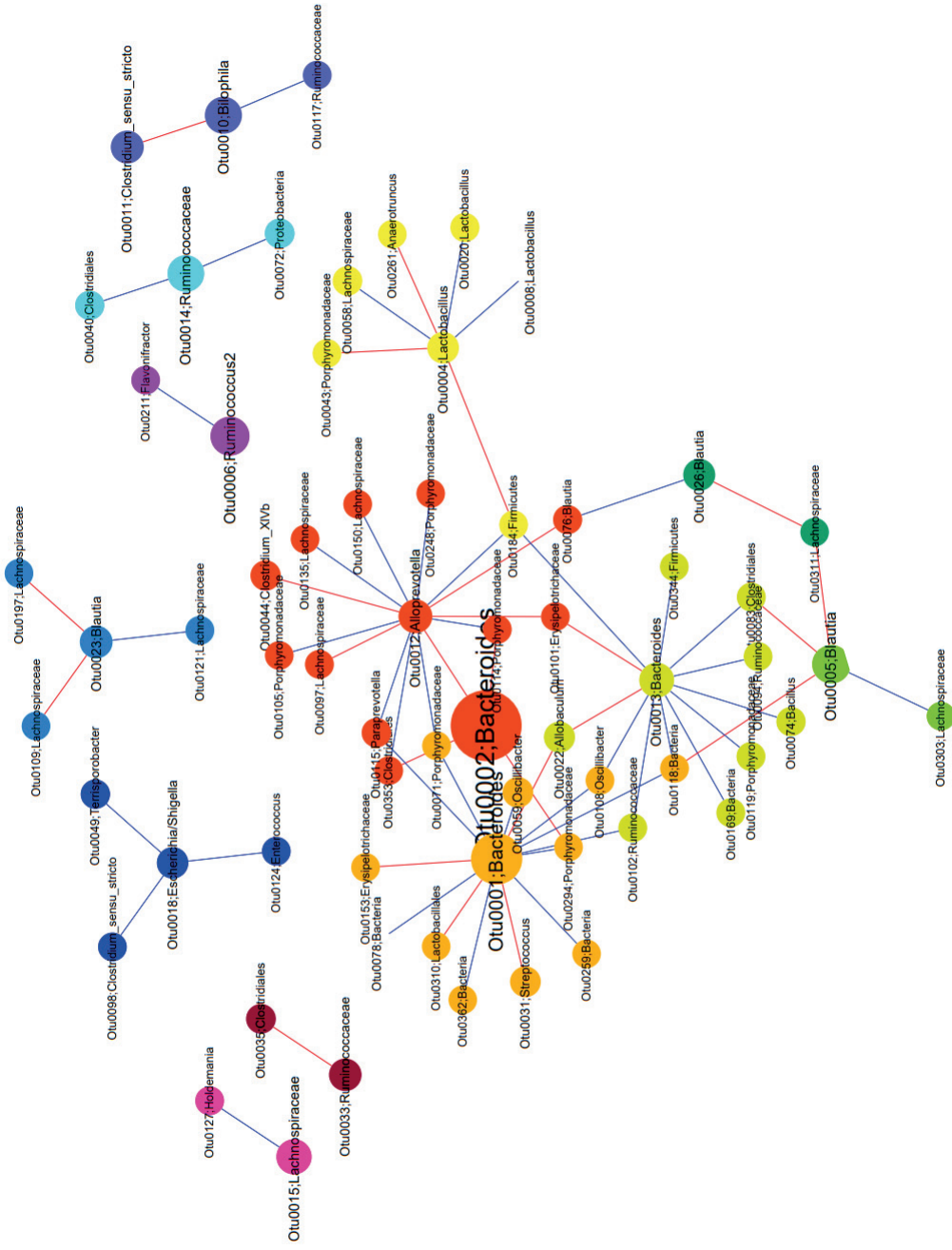


Table 4. Centrality analysis including degree and betweenness of the constructed network (the main connected component) via ModuLand

OTU;Taxonomy	C1	C291	C574	C12512
Otu;0001;Bacteroides	56.3	9.0	373.2	229.6
Otu;0003;Romboutsia	-	4.0	-	-
Otu;0004;Lactobacillus	23.5	4.0	210.0	34.0
Otu;0008;Lactobacillus	23.5	-	-	34.0
Otu;0010;Bilophila	-	4.0	-	-
Otu;0011;Clostridium_sensu_stricto	-	8.0	-	-
Otu;0012;Alloprevotella	-	-	439.9	181.9
Otu;0013;Bacteroides	154.0	-	395.4	137.9
Otu;0018;Escherichia/Shigella	-	3.0	-	-
Otu;0020;Lactobacillus	-	-	-	124.0
Otu;0022;Allobaculum	-	21.0	-	135.5
Otu;0024;Acetatifactor	227.0	3.0	-	35.5
Otu;0031;Streptococcus	75.7	-	-	-
Otu;0057;Ruminococcus	78.4	-	-	-
Otu;0071;Porphyromonadaceae	-	-	64.4	-
Otu;0101;Erysipelotrichaceae	144.0	-	59.6	-
Otu;0108;Oscillibacter	-	-	-	29.6
Otu;0115;Paraprevotella	-	-	64.4	-
Otu;0118;Bacteria	-	-	131.8	-
Otu;0184;Firmicutes	-	-	293.6	-
Otu;0261;Anaerotruncus	88.0	-	-	-
Otu;0311;Lachnospiraceae	-	-	-	14.2

DISCUSSION

고지방, 저식이섬유 식단은 SD rats 의 장내미생물을 비만형으로 전환시켰으며 대사 패턴을 변화시켜 HFD 그룹의 Short chain fatty acid 가 유의적으로 적게 존재하는 결과를 초래하였다. 본 연구결과에서 고지방/저식이섬유 식단과 청국장 첨가 급여는 장내미생물의 구성원을 크게 변화시키지 못했지만 맹장 내 축적되는 Butyric acid, Acetic acid 가 C574 청국장 급여 그룹에서 유의적으로 증가하였으며 C12512 청국장 급여 그룹은 Propionic acid 를 포함한 모든 SCFAs 가 증가하여 미생물 군집 내 대사활동이 정상화되었음을 확인하였다. 또한 C1, C291, C574 청국장 급여 그룹에서 전통식품에서 분리한 발효균주인 *Bacillus spp.*가 다른 그룹에 비해 높은 비율로 존재하는 것을 확인하였다. *Bacillus spp.*는 *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*와 같은 Probiotics 로써 항균효과, 내열성, 내담즙성 등의 안정성이 인정되었으며 섭취 시 장까지 도달 후 정착할 수 있으며 신체에 유익한 효과가 있음이 여러 연구에서 증명되었다(Lefevre et al. 2015; Chen et al. 2015; Hong et al. 2008). 또한 유전적으로 가까운 *Bacillus cereus* 으로 인한 세포독성을 억제한다는 결과가 있다(Ripert et al. 2016). 또한, *Bacillus subtilis* 의 포자는 식품 첨가물로써 잠재적 가치가 높게 평가되어 있으며 Permpoonpattana, P. 등의 연구는 235°C의 높은 온도에서도 생존하는 것을 확인하였다. 이는 Natto 와 같은 생식의 형태가 아닌 가열하여 조리식으로 섭취하여도 Probiotics 효과를 기대할 수 있음을 뒷받침한다(Permpoonpattana et al. 2012). 또한 *Lactobacillus spp.*의 생장에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 맹장 내 미생물 군집의 변화를 긍정적으로 변화시킬 수 있는 잠재력이 있음을 기대할 수 있다(Yu et al. 2019). 하지만 본 연구에서는 *Bacillus spp.*와 *Lactobacillus spp.*의 동시 증가 및 상호작용이 관찰되지 않았으므로 이는 고지방/저식이섬유 식단의 한계로 생각된다. 한편 C12512 청국장 급여 그룹은 *Lactobacillus spp.*의 회복이 유일하게 확인되었고 맹장 내 SCFAs 의 증가량 또한 가장 높았다. 또한 미생물 군집 간의 상호작용 분석에서 고지방/저식이섬유로 증가된

Bacteroides spp. (OTU;0013)의 상호작용 패턴이 C574, C12512청국장의 급여로 인해 변화하여 이를 기반으로 맹장 내 대사에 긍정적인 영향을 미쳤을 것으로 예상된다. C1과 C291 그룹은 전체 BC Index의 평균이 낮아 OTU 간 유의한 상호작용의 수가 적어 미생물 군집 내 Network가 비교적 단순하게 이루어진 것을 알 수 있다.

결과적으로 고지방/저식이섬유 사료 섭취 중 청국장의 추가 급여는 발효균주인 *Bacillus spp.*가 장 내에 도달하여 비율이 증가하는 결과를 나타내었으며 장내미생물 불균형의 회복을 확인하지 못했지만 청국장 섭취로 인한 미생물 군집 내 상호작용의 변화에 따라 대사 패턴이 달라질 수 있으며 SCFA와 같은 생리활성 물질을 통해 신체에 긍정적 영향을 끼칠 수 있음을 보여준다. 따라서 본 연구는 전통발효 식품에서 분리된 유용미생물로 발효된 청국장이 Probiotics 및 건강기능 식품으로써 잠재력이 있음을 뒷받침하는 증거가 되며 연구에 사용된 청국장 중 *Bacillus subtilis* SCGB 574, *Bacillus subtilis* KCCM12512 균주로 발효된 청국장이 고지방/저식이섬유 사료에 따른 SD rat의 체중, 혈당 및 장 기능 개선에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

REFERENCES

- Appert, O., A. R. Garcia, R. Frei, C. Roduit, F. Constancias, V. Neuzil-Bunesova, R. Ferstl, J. Zhang, C. Akdis, R. Lauener, C. Lacroix, and C. Schwab. 2020. 'Initial butyrate producers during infant gut microbiota development are endospore formers', *Environ Microbiol*, 22: 3909-21.
- Brandes, Ulrik %J *Journal of mathematical sociology*. 2001. 'A faster algorithm for betweenness centrality', 25: 163-77.
- Chen, Z. F., L. Y. Ai, J. L. Wang, L. L. Ren, Y. N. Yu, J. Xu, H. Y. Chen, J. Yu, M. Li, W. X. Qin, X. Ma, N. Shen, Y. X. Chen, J. Hong, and J. Y. Fang. 2015. 'Probiotics *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* ameliorate intestinal tumorigenesis', *Future Microbiol*, 10: 1433-45.
- Cook, S. I., and J. H. Sellin. 1998. 'Review article: short chain fatty acids in health and disease', *Aliment Pharmacol Ther*, 12: 499-507.
- Everard, Amandine, Clara Belzer, Lucie Geurts, Janneke P Ouwwerkerk, Céline Druart, Laure B Bindels, Yves Guiot, Muriel Derrien, Giulio G Muccioli, and Nathalie M %J *Proceedings of the national academy of sciences Delzenne*. 2013. 'Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity', 110: 9066-71.
- Ferrario, Chiara, Valentina Taverniti, Christian Milani, Walter Fiore, Monica Laureati, Ivano De Noni, Milda Stuknyte, Bessem Chouaia, Patrizia Riso, and Simone %J *The Journal of nutrition Guglielmetti*. 2014. 'Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults', 144: 1787-96.
- Garcia-Mazcorro, Jose F, Ivan Ivanov, David A Mills, and Giuliana %J *PeerJ Noratto*. 2016. 'Influence of whole-wheat consumption on fecal microbial community structure of obese diabetic mice', 4: e1702.
- Gomez-Arango, Luisa F, Helen L Barrett, H David McIntyre, Leonie K Callaway, Mark Morrison, and Marloes %J *Hypertension Dekker Nitert*. 2016. 'Increased systolic and diastolic blood pressure is associated with altered gut microbiota composition and butyrate production in early pregnancy', 68: 974-81.
- Hansen, C. H., L. Krych, D. S. Nielsen, F. K. Vogensen, L. H. Hansen, S. J. Sorensen, K. Buschard, and A. K. Hansen. 2012. 'Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse', *Diabetologia*, 55: 2285-94.
- Hill, J. O. 2006. 'Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective', *Endocr Rev*, 27: 750-61.
- Hill, Mark O %J *Ecology*. 1973. 'Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences', 54: 427-32.
- Hong, H. A., J. M. Huang, R. Khaneja, L. V. Hiep, M. C. Urdaci, and S. M. Cutting. 2008. 'The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics', *J Appl Microbiol*, 105: 510-20.
- Hui, Simon T, Brian W Parks, Elin Org, Frode Norheim, Nam Che, Calvin Pan, Lawrence W Castellani, Sarada Charugundla, Darwin L Dirks, and Nikolaos %J *Life Psychogios*. 2015. 'The genetic architecture of NAFLD among inbred strains of mice', 4: e05607.
- Illumina, I. 2015. "16S metagenomic sequencing library preparation. Part# 15044223 Rev. B." In.: B.

- Karlsson, C. L., J. Onnerfalt, J. Xu, G. Molin, S. Ahrne, and K. Thorngren-Jerneck. 2012. 'The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight', *Obesity (Silver Spring)*, 20: 2257-61.
- Klaschik, E, F Nauck, and C %J Supportive care in cancer Ostgathe. 2003. 'Constipation—modern laxative therapy', 11: 679-85.
- Kovacs, I. A., R. Palotai, M. S. Szalay, and P. Csermely. 2010. 'Community landscape: an integrative approach to determine overlapping network module hierarchy, identify key nodes and predict network dynamics', *PLoS One*, 5.
- Kozich, J. J., S. L. Westcott, N. T. Baxter, S. K. Highlander, and P. D. Schloss. 2013. 'Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform', *Appl Environ Microbiol*, 79: 5112-20.
- Layeghifard, M., D. M. Hwang, and D. S. Guttman. 2017. 'Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective', *Trends Microbiol*, 25: 217-28.
- Lefevre, Marie, Silvia M Racedo, Gabrielle Ripert, Béatrice Housez, Murielle Cazaubiel, Corinne Maudet, Peter Jüsten, Philippe Marteau, Maria C %J Immunity Urdaci, and Ageing. 2015. 'Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study', 12: 1-11.
- Maccaferri, S., E. Biagi, and P. Brigidi. 2011. 'Metagenomics: key to human gut microbiota', *Dig Dis*, 29: 525-30.
- Mao, B., D. Li, C. Ai, J. Zhao, H. Zhang, and W. Chen. 2016. 'Lactulose Differently Modulates the Composition of Luminal and Mucosal Microbiota in C57BL/6J Mice', *J Agric Food Chem*, 64: 6240-7.
- Morelli, L., and L. Capurso. 2012. 'FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later', *J Clin Gastroenterol*, 46 Suppl: S1-2.
- Mukai, R., O. Handa, Y. Naito, S. Takayama, Y. Suyama, C. Ushiroda, A. Majima, Y. Hirai, K. Mizushima, T. Okayama, K. Katada, K. Kamada, K. Uchiyama, T. Ishikawa, T. Takagi, and Y. Itoh. 2020. 'High-Fat Diet Causes Constipation in Mice via Decreasing Colonic Mucus', *Dig Dis Sci*, 65: 2246-53.
- Nakamura, T., S. Nishida, M. Mizutani, and H. Iino. 2001. 'Effects of yogurt supplemented with brewer's yeast cell wall on constipation and intestinal microflora in rats', *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47: 367-72.
- O'hara, RB %J *Journal of Animal Ecology*. 2005. 'Species richness estimators: how many species can dance on the head of a pin?': 375-86.
- Permpoonpattana, P., H. A. Hong, R. Khaneja, and S. M. Cutting. 2012. 'Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient', *Benef Microbes*, 3: 127-35.
- Pichler, M. J., C. Yamada, B. Shuoker, C. Alvarez-Silva, A. Gotoh, M. L. Leth, E. Schoof, T. Katoh, M. Sakanaka, T. Katayama, C. Jin, N. G. Karlsson, M. Arumugam, S. Fushinobu, and M. Abou Hachem. 2020. 'Butyrate producing colonic Clostridiales metabolise human milk oligosaccharides and cross feed on mucin via conserved pathways', *Nat Commun*, 11: 3285.
- Png, Chin Wen, Sara K Lindén, Kristen S Gilshenan, Erwin G Zoetendal, Chris S McSweeney, Lindsay I Sly, Michael A McGuckin, and Timothy HJ %J *American Journal of Gastroenterology* Florin. 2010. 'Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria', 105: 2420-28.

- Qin, J., Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, Y. Peng, D. Zhang, Z. Jie, W. Wu, Y. Qin, W. Xue, J. Li, L. Han, D. Lu, P. Wu, Y. Dai, X. Sun, Z. Li, A. Tang, S. Zhong, X. Li, W. Chen, R. Xu, M. Wang, Q. Feng, M. Gong, J. Yu, Y. Zhang, M. Zhang, T. Hansen, G. Sanchez, J. Raes, G. Falony, S. Okuda, M. Almeida, E. LeChatelier, P. Renault, N. Pons, J. M. Batto, Z. Zhang, H. Chen, R. Yang, W. Zheng, S. Li, H. Yang, J. Wang, S. D. Ehrlich, R. Nielsen, O. Pedersen, K. Kristiansen, and J. Wang. 2012. 'A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes', *Nature*, 490: 55-60.
- Ripert, G., S. M. Racedo, A. M. Elie, C. Jacquot, P. Bressollier, and M. C. Urdaci. 2016. 'Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins', *Antimicrob Agents Chemother*, 60: 3445-54.
- Sakamoto, Mitsuo, Akiko Takagaki, Kohei Matsumoto, Yuko Kato, Keiichi Goto, Yoshimi %J International journal of systematic Benno, and evolutionary microbiology. 2009. 'Butyricimonas synergistica gen. nov., sp. nov. and *Butyricimonas virosa* sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family 'Porphyromonadaceae' isolated from rat faeces', 59: 1748-53.
- Santacruz, A., M. C. Collado, L. Garcia-Valdes, M. T. Segura, J. A. Martin-Lagos, T. Anjos, M. Marti-Romero, R. M. Lopez, J. Florido, C. Campoy, and Y. Sanz. 2010. 'Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women', *Br J Nutr*, 104: 83-92.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber. 2009. 'Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities', *Appl Environ Microbiol*, 75: 7537-41.
- Segata, N., J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miropolsky, W. S. Garrett, and C. Huttenhower. 2011. 'Metagenomic biomarker discovery and explanation', *Genome Biol*, 12: R60.
- Szalay-Beko, M., R. Palotai, B. Szappanos, I. A. Kovacs, B. Papp, and P. Csermely. 2012. 'ModuLand plug-in for Cytoscape: determination of hierarchical layers of overlapping network modules and community centrality', *Bioinformatics*, 28: 2202-4.
- Thorburn, Alison N, Laurence Macia, and Charles R %J Immunity Mackay. 2014. 'Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases', 40: 833-42.
- Wang, L., C. Chen, S. Cui, Y. K. Lee, G. Wang, J. Zhao, H. Zhang, and W. Chen. 2019. 'Adhesive *Bifidobacterium* Induced Changes in Cecal Microbiome Alleviated Constipation in Mice', *Front Microbiol*, 10: 1721.
- Wang, Z., K. L. Lam, J. Hu, S. Ge, A. Zhou, B. Zheng, S. Zeng, and S. Lin. 2019. 'Chlorogenic acid alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat-fed mice', *Food Sci Nutr*, 7: 579-88.
- Yu, Tao, Jian Kong, Li Zhang, Xinyi Gu, Mingyu Wang, and Tingting %J Scientific Reports Guo. 2019. 'New crosstalk between probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*', 9: 1-9.
- Zackular, J. P., N. T. Baxter, K. D. Iverson, W. D. Sadler, J. F. Petrosino, G. Y. Chen, and P. D. Schloss. 2013. 'The gut microbiome modulates colon tumorigenesis',

- mBio, 4: e00692-13.
- ZHANG, Li-feng, Qing-fu LIU, Hai-feng %J Science NING, and Technology of Food Industry. 2013. 'Effect of soybean oligosaccharides on intestinal flora': 79.
- Zhang, X., Y. Zhao, J. Xu, Z. Xue, M. Zhang, X. Pang, X. Zhang, and L. Zhao. 2015. 'Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats', Sci Rep, 5: 14405.
- Zhao, Ying, and Yan-Bo %J Springerplus Yu. 2016. 'Intestinal microbiota and chronic constipation', 5: 1130.
- Zhou, Xiao-Li, Xiang-Feng Kong, Guo-Qi Lian, Francois Blachier, Mei-Mei Geng, and Yu-Long %J Nutrition Research Yin. 2014. 'Dietary supplementation with soybean oligosaccharides increases short-chain fatty acids but decreases protein-derived catabolites in the intestinal luminal content of weaned Huanjiang mini-piglets', 34: 780-88.