



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

MASTER'S THESIS

**Investigation of Tylosin-induced Gut Microbiota Shifts
in Swine at Various Growth Stages**

Jungman Kim

Department of Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2016

MASTER'S THESIS

**Investigation of Tylosin-induced Gut Microbiota Shifts
in Swine at Various Growth Stages**

Jungman Kim

(Supervised by Professor Tatsuya Unno)

Department of Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2016

**Investigation of Tylosin-induced Gut Microbiota Shifts
in Swine at Various Growth Stages**

Jungman Kim

(Supervised by Professor Tatsuya Unno)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement

for the degree for Master of Science

February, 2016

This thesis has been examined and approved by



Dong-Sun Lee, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University



Dong- Kee Jeong, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University



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

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

CONTENT

CONTENT.....	I
LIST OF FIGURES.....	II
LIST OF TABLES.....	IV
ABSTRACT.....	1
INTRODUCTION.....	4
MATERIALS AND METHODS.....	7
돼지사육 및 사료 처리.....	7
사료 채취 및 성장속도 측정.....	7
DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 시퀀싱.....	8
시퀀싱 데이터 프로세싱 및 분석.....	9
장내미생물생태 비교 분석.....	10
장내미생물의 풍부도 및 다양성.....	11
공유되는 OTUs 를 이용한 분석.....	11
통계 분석.....	12
RESULTS AND DISCUSSION.....	13
생태학적 지수(Ecological indices)와 체중 간 상관관계 분석.....	13
장내미생물 군집에 타이로신이 미치는 효과.....	19
OTUs 기반의 장내미생물생태 비교분석.....	25
SUMMARY.....	34
REFERENCES.....	36
ACKNOWLEDGEMENT.....	42

LIST OF FIGURES

Figure 1. Weight gain during this study. Black circles (●) and triangles (▲) indicated control and tylosin groups, respectively	14
Figure 2. Ecological diversity indices comparison between control and tylosin group gut microbial communities. Chao index (A) and (C). Shannon index (B) and (D).....	15
Figure 3. The correlation analysis between weight and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in control (A) and tylosin group (B).....	21
Figure 4. Abundance of Bacteroidetes (A) and Firmicutes (B) according to increasing of weight during this study. Black circles (●) and triangles (▲) indicated control and tylosin group, respectively	22
Figure 5. Significant correlation ($p < 0.001$) based on consensus OTUs between read abundance and host weight among the family level. Abundance of Lachnospiraceae in control group (A), Abundance of Ruminococcaceae in tylosin group (B)	24
Figure 6. OTUs distribution of control and tylosin groups using LEFSE ($p < 0.05$). Differentially abundant OTUs (A), taxonomic composition of Cluster I -A (B), I-B (C) and Cluster II (D) in the phylum level.....	26
Figure 7. Cluster analysis based on the distribution of operation taxonomic units calculated according to the theta coefficient	30

Figure 8. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot. Biplot arrows indicate families with significant correlation against plots ($P < 0.05$) with abundance $> 0.1\%$31

Figure 9. Network analysis based on operational taxonomic units using consensus OTUs 33

LIST OF TABLES

Table 1. Number of reads and ecological diversity indices obtained in this study. Sample names were shown for individual animal indicating feeding condition (C1-3: control, T1-3: tylosin-fed) followed by week (W0-10: 10 weeks)17

ABSTRACT

Antibiotics had been used for prevention from pathogenic bacterial infections as well as common growth promoters in livestock industry. Excessive usage of antibiotics growth promoters (AGPs) not only caused environmental antibiotic resistance gene dissemination, but also caused problems with residual antibiotics in meat products. These problems could be directly associated with human health. For these reasons, many countries including South Korea banned the use of AGPs, which, on the other hand, led to increase piglet mortality rate. Although a number of studies have reported development of AGP-alternatives in recent years, mechanisms by which antibiotics enhance growth of livestock animals have not been cleared.

In this study, we investigated the effects of AGP, tylosin, on swine gut microbiota. Although the use of tylosin didn't increase weight gain, tylosin fed swine showed constant increase of *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, which was previously referred to as an obese type microbiota. While relative abundance of *Firmicutes* was constant, the use of tylosin gradually reduced relative abundance of *Bacteroidetes* as host grew. In addition, significantly different gut microbiota was observed between control and tylosin-treated pigs during finisher growth stage ($p < 0.05$). Our results suggested that the use of tylosin may not cause weight increase, but shifts swine gut microbiota to higher *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, a preferable microbiota for weight gain, during later growth stage.

ABSTRACT

항생제는 축산업에서 병원성미생물 감염에 의한 질병으로부터 예방 및 치료의 목적으로 사용했을 뿐만 아니라 성장을 촉진 시키기 위해 사용되어왔다. 성장촉진제로써 항생제의 사용은 환경에 항생제 내성 유전자 오염을 야기시키고, 또한 판매가 되고 있는 육류에 항생제가 잔류하는 등의 문제를 야기시켰다. 이러한 문제들은 인간의 건강에 직접적인 영향을 미치기 때문에 한국을 포함한 여러 나라에서 성장촉진제로써 항생제 사용을 금지시켰다. 그러나 이에 따라 새끼 돼지의 폐사율이 증가하는 2 차적인 문제가 발생하여, 해결책으로써 항생제를 대체 할 수 있는 제제를 개발하고 있으나 항생제에 의한 성장촉진 메커니즘이 명확하게 규명되지 않아 사실상 어려운 실정이다.

본 연구에서는 항생제계열의 성장촉진제로써 타이로신을 사료첨가제로 사용하여 성장속도 및 돼지 장내미생물생태에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 타이로신에 의해 성장속도는 증가하지 않았으나, 비만 장내미생물생태의 지표로 보고되고 있는 *Firmicutes/Bacteroidetes* 의 비율이 상대적으로 증가하는 것을 확인하였다. 타이로신 처리는 성장함에 따라 *Firmicutes* 보다 상대적으로 *Bacteroidetes* 를 더 감소시키는 것으로 확인되었다. 또한 타이로신 처리군 및 비처리군 간에 장내미생물생태가 비육돈(60kg 이후)

성장단계부터 유의적으로 달라지는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$). 본 연구결과는 타이로신에 의해 성장속도는 증가하지는 않지만, 후반기 성장단계에서 나타나는 높은 *Firmicutes/Bacteroidetes* 비율, 즉 성장속도를 증가시킬 수 있는 장내미생물생태로 변화시킨다는 것을 나타낸다.

INTRODUCTION

항생제는 축산산업에서 병원성미생물에 의한 질병감염 예방 및 치료의 목적으로 일반적으로 사료에 배합하여 먹여왔으며, 또한 가축동물의 성장속도를 증가 시키기 위해 항생제 성장촉진제 (Antibiotics Growth Promoters, AGPs)로 사용되어왔다. 이러한 목적으로 몇 십년간 지속된 항생제의 사용은 판매가 되고 있는 고기에 항생제가 잔류하고 (Prats, El Korchi, Francesch, Arboix, & Pérez, 2002), 분변에 항생제 저항성 유전자를 지니고 있는 미생물들이 존재하여 환경에 노출되는 경우 항생제 내성 유전자 오염이라는 결과를 초래하여 인간에게 직접적으로 영향을 미친다고 보고 되었다 (Holman & Chénier, 2013; Juntunen, Heiska, Olkkola, Myllyniemi, & Hanninen, 2010). 이와 같은 항생제 사용에 의한 많은 부작용으로 인해 유럽 연합국가 및 미국을 포함한 여러 선진국가에서 AGPs 로써 항생제를 사료에 배합하여 사용하는 것을 금지 시켰으며, 이에 따라 한국에서도 2013 년 07 월부터 항생제 사용을 전면금지 하였다.

항생제 사용금지는 어린 돼지의 병원성미생물로부터 감염에 따른 폐사율 증가라는 2 차적인 문제를 발생시켰으며, 이는 생산성 감소로 이어져 항생제를 대체 할 수 있는 제제를 개발하는 것이 시급한 실정이다. 현재 양돈산업에서는 면역 글로불린 항체 (Marquardt et al., 1999), 산화 아연 (Jay Y. Jacela et al., 2010), 프로바이오틱스 (Gaggia, Mattarelli, & Biavati, 2010) 등이 항생제 대체제로 개발되어 면역증진 및 성장촉진제로 사용되고 있다. 하지만 이러한 항생제 대체제들을 이용한 많은 연구에서 서로 상반된 결과가 보고되고 있으며 (Thacker, 2013), 그 예로써 식물성

오일은 강한 항균성의 갖고 있어 항생제를 대체 할 수 있다는 보고가 되었지만 (Si et al., 2006), 돼지사료와 배합하여 먹었을 때는 효과가 미미하다는 보고가 있다 (de Lange, Pluske, Gong, & Nyachoti, 2010). 이러한 문제들은 아직까지도 항생제에 의한 성장메커니즘이 명확하게 밝혀지지 않았기 때문에 사실상 대체제를 개발하고 연구하는 것은 어려운 실정이라 말 할 수 있다.

타이로신 (Tylosin)은 마크로라이드계 항생제 중 하나로써, 광범위한 그람양성균에 대한 항균효과를 갖고 있으며, 그람음성균에 대해서는 좁은 범위의 항균효과를 갖고 있다. 닭을 이용한 실험에서는 타이로신이 그람양성균에 포함되는 병원성미생물을 감소시킨다는 보고가 있지만 (Collier, van der Klis, Deplancke, Anderson, & Gaskins, 2003), 그와 대조적으로 그람음성균에 속하는 병원성미생물의 경우에는 증가를 시킨다는 보고가 있었다 (Poole et al., 2003). 하지만, 타이로신을 돼지에 처리하였을 때 그람양성균으로 분류되어 있는 E. coli O157:H7 등을 포함하는 병원성미생물을 억제하는 효과를 나타냈다고 한다. 타이로신을 쥐에 투여하였을 때 병원성미생물에 의한 질병감염으로부터 보호해줄 뿐만 아니라 성장촉진효과를 나타냈다고 보고되었지만 (Patterson, Chapman, Hegedus, Barchia, & Chin, 2005), 돼지에서는 성장촉진효과가 없었다 (Van Lunen, 2003). 일반적으로 많이 사용하던 테트라사이클린과 같은 다른 항생제를 이용한 실험에서도 성장촉진효과를 나타내지 않았다 (Holman & Chénier, 2013; Unno, Kim, Guevarra, & Nguyen, 2015). 타이로신은 돼지 장내미생물생태를 변화시킨다고 보고 되었으나 (H. B. Kim et al., 2012), 장내미생물생태 변화에 따른 그람음성균에 대한 억제 및 성장촉진효과 등은 현재까지도

명확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 타이로신에 의한 돼지의 장내미생물생태 변화와 그에 따른 성장속도를 조사하기 위하여 MiSeq 기반의 16S rRNA 유전자 분석을 수행하였다. 본 연구를 수행함에 있어 집단사육에 의한 영향 및 다른 돼지 분변에 의한 장내미생물생태변화를 최소화 시키기 위해 개별사육으로 사양관리를 하였으며 (Pajarillo, Chae, Kim, Kim, & Kang, 2015; Thompson, Wang, & Holmes, 2008), 이를 통해 성장촉진제으로써 타이로신이 돼지 장내미생물생태에 미치는 영향에 대한 기본적인 정보를 제공하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

돼지사육 및 사료 처리

공시축은 제주도 내 농가에서 일반적으로 사육되고 있는 생후 약 100 일이 지난 3 원 교잡종 돼지 6 두를 본 실험을 수행하며 사육하였으며, 대조군 (n=3)과 실험군 (n=3)으로 나누어 사육하였다. 본 실험에서 집단사육에 의한 장내미생물생태 변화를 배제시키기 위해 돈방 하나에 한 마리의 돼지를 키울 수 있도록 개별사육으로 수행되었다. 모든 돼지들은 일반적으로 시판되어 농가에 보급되고 있는 사료 (Farmsco Inc., Republic of Korea)를 동일하게 급여하였으며, 또한 물과 함께 무한 급이형태로 급여하였다. 실험군은 사료 1kg 당 45mg 의 타이로신 (Sigma Inc., USA)이 첨가되도록 배합하여 사료를 급여하고, 대조군은 일반 사료를 급여하였다. 본 사료 처리로 10 주동안 급여하며 사육하였고, 또한 본 실험을 수행하기 위하여 제주대학교 동물실험윤리위원회로부터 IRB 승인번호 (2015-0002)를 부여 받았다.

사료 채취 및 성장속도 측정

본 실험을 진행하는 10 주 동안 장내미생물생태 분석에 사용하기 위해 매주 1 회 배설된지 1~2 시간 이내의 신선한 분변을 멸균된 샘플컨테이너에 채취하였으며, 샘플전처리 과정이 이루어지기 전에 분변 미생물 생태 변화를 최소화 시키기 위해 채취한 즉시 -20°C로 보관하였다.

또한, 샘플링과 동시에 성장속도를 측정하기 위하여 대형 동물용 체중계로 생시체중을 측정하였다.

DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 시퀀싱

분변 내에 존재하는 장내미생물 DNA 은 2~3 일 동안 동결건조과정을 거쳐 가루형태로 만든 분변 약 10mg 으로부터 MOBIO Power Fecal DNA isolation kit (MOBIO Laboratories Inc., CA, USA)를 이용하여 추출하였다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 미생물과 고세균의 16S rRNA 유전자 내에 존재하는 과변부위 (Variable region) 중 V4 region 을 증폭시키기 위해 사용하였다 (Kozich, Westcott, Baxter, Highlander, & Schloss, 2013). 각 샘플로부터 추출한 DNA 2 μ l를 PCR 을 위해 사용하였으며, Maxime PCR PreMix Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Gyeonggi, Republic of Korea)를 이용하여 3 반복으로 수행하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 2 분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 20 초, 55°C에서 15 초, 72°C에서 1 분간씩 30 회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 5 분 반응시켰다. PCR 산물은 Exo-AP PCR Clean-Up Mix (DOCTOR PROTEIN Inc., Republic of Korea)로 정제하였으며, Qubit (Invitrogen Inc., USA)으로 PCR 산물의 농도를 측정하였다. 모든 샘플의 PCR 산물이 동일한 농도로 포함되도록 1.5mL 튜브에 모아 일루미나시퀀싱 (Illumina sequencing) platform 중 하나인 MiSeq 시퀀싱 수행을 위해 마크로젠 (Seoul, Republic of Korea)에 의뢰하였으며, 그러한 MiSeq 시퀀싱 결과를 fastq 파일형태로 받았다. 분석한 타이로신 처리 유무에 따른 장내미생물생태

MiSeq 시퀀스는 미국 국립생물정보센터 (NCBI)에서 운영하는 Sequence Read Archive (SRA)에 등록하여 Bioproject 번호 PRJNA304066 을 부여 받았다.

시퀀싱 데이터 프로세싱 및 분석

MiSeq 시퀀싱으로부터 얻은 시퀀스 데이터는 Operational taxonomic unit (OTU), 분류학적 계통분류, 미생군 군집 비교, 통계분석 등의 분석을 위해서 주로 온라인 상에서 무료로 제공되고 있는 “Mothur”라는 소프트웨어를 이용한다. Paired-end 형식의 MiSeq 시퀀싱으로부터 각 샘플마다 2 개의 fastq 파일을 얻을 수 있으며, 이러한 fastq 파일은 “PEAR (Zhang, Kobert, Flouri, & Stamatakis, 2014)”라는 소프트웨어를 이용하여 Assembly 과정을 거쳐 각각 하나의 fastq 파일로 합쳐지게 하였다. Mothur 파이프라인 (Schloss et al., 2009)에 따라 fastq 파일을 분석과정에 사용 할 수 있는 fasta 파일로 변환시켜주었으며, SILVA rRNA 데이터베이스 (Quast et al., 2013)를 통해 유사한 시퀀스와 align 과정, 얼라인먼트가 되지 않는 시퀀스를 제거하는 screen 과정, 시퀀스 내에 ‘N’만 포함되어 있는 컬럼을 제거하는 filter 과정을 수행하였다. 시퀀싱 과정 중에서 인위적으로 생기는 예러 시퀀스를 제거하기 위하여 Mothur ‘pre.cluster’ 서브루틴인을 사용하였으며, 키메라 (Chimeric) 시퀀스는 UCHIME (Edgar, Haas, Clemente, Quince, & Knight, 2011)을 이용하여 제거하였다. 분류학적 계통분류는 Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009) training set version 10 을 이용하여 수행하였으며, 이를 통해 고세균 및 박테리아로 분류되지 않는 시퀀스를 제거 할 수 있도록

분류하여 Mothur 서브루틴인 'remove.lineage'를 이용하여 제거하였다. 클러스터 분석을 하기 이전에 모든 Singleton 시퀀스를 제거하는 것이 분석에 용이하다고 보고됨에 따라 같은 방법으로 Mothur 서브루틴 'split.abund'를 이용하여 수행하였다 (Degnan & Ochman, 2012). Operational taxonomic units (OTUs)은 Mothur 'cluster.split' 서브루틴을 이용하여 97% 유사성으로 계산하였으며, 전체 OTUs의 계통분류는 'classify.otu'를 이용하여 수행하였다. 체중에 따라 같은 성장단계에 속해 있는 샘플들은 타이로신 처리 유무별로 Mothur 서브루틴 'merge.groups'을 이용하여 그룹화를 하였다. 이를 타이로신 처리 유무에 따라 성장하면서 장내미생물생태 유사성이 어떻게 변하는지 Yue-Clayton theta coefficient 기반으로 그룹간 비유사성을 계산하고 Mothur 서브루틴 'tree.shared'를 이용하여 Dendrogram로 나타내었다.

장내미생물생태 비교 분석

타이로신 처리 및 성장단계에 따라 장내미생물생태 변화를 조사하기 위하여 각 샘플의 시퀀스를 97% 유사성의 OTU로 나뉘었으며, 그 OTUs 정보를 Mothur 'merge.groups', 'tree.shared' 서브루틴 순으로 처리하여 그룹간 장내미생물생태를 Dendrogram으로 나타내었고 각 그룹간 장내미생물생태 차이는 Yue-Clayton theta coefficient를 이용하여 계산하였다. Nonmetric multi-dimensional scaling (NMDS) plot은 샘플간 상관관계를 2차원적으로 확인할 수 있는데 Mothur 'dist.shared', 'nmds' 서브루틴을 이용하여 각 샘플들의 좌표를 계산하여 나타내었으며, 이렇게

계산된 좌표와 과 (Family) 수준으로 분류된 미생물의 Abundance 사이의 상관관계를 Mothur 'corr.axes' 서브루틴으로 측정하여 화살표 모양으로 R 소프트웨어 (Ihaka & Gentleman, 1996)를 이용하여 나타내었다. Mothur 'LEfSe' 서브루틴은 각 그룹간 유의적으로 높은 Abundance 를 가진 OTUs 를 선별하는데 사용하였으며, R 소프트웨어를 이용하여 Heatmap 으로 나타내었다.

장내미생물의 풍부도 및 다양성

생태학적 지표 중 종의 풍부도를 나타내는 Chao 와 다양성을 나타내는 Shannon's diversity, inverse Simpson 은 Mothur 소프트웨어를 이용하여 계산하였으며, 또한 각 샘플의 coverage (G)도 Mothur 소프트웨어를 이용하여 계산하였는데, 샘플 마다 포함하고 있는 Singleton 시퀀스 수 (n)를 샘플의 전체 시퀀스 수 (N)로 나눈 값을 1 에 빼는 방법으로 계산되었다.

$$G (\text{Coverage 값}) = 1 - n (\text{Singleton 시퀀스 수})/N (\text{전체 시퀀스 수})$$

공유되는 OTUs 를 이용한 분석

타이로신 처리 유무 및 체중 기반의 성장단계에 따라 나눈 그룹 내에 있는 모든 샘플이 포함하고 있는 OTUs 를 이용하여 분석하였는데, 이를 Consensus OTUs 라고 한다. Cytocape 소프트웨어 (Shannon et al., 2003)는 그러한 Consensus OTUs 를 네트워크 맵으로 나타내기 위하여 사용하였다.

통계 분석

돼지의 체중증가와 장내미생물의 Abundance 변화 간 상관관계를 Pearson's p-value 를 기반으로 조사하였다. 타이로신 처리에 따른 체중증가, 장내미생물생태 변화, Firmicutes 와 Bacteroidetes 비율은 T-test 로 검정하였으며, consensus OTUs 를 과 (Family) 수준으로 분류하여 그룹간 유의적으로 차이가 있는지를 조사하기 위해 Metastats (Paulson J, 2011)를 수행하였다. 생태학적 지표 비교분석은 ANOVA (analysis of variance)를 기반으로 수행하였고, 미생물생태 차이를 확인하기 위하여 Mothur 서브루틴 'amova'를 사용하여 AMOVA (analysis of molecular variance) 기반으로 유의성을 검정하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

생태학적 지수(Ecological indices)와 체중 간 상관관계 분석

본 연구에서 타이로신 처리 및 비처리 그룹 간에 체중차이는 줄어들었으나 성장속도에서 유의적인 차이를 나타나지 않았는데 (Fig 1), 이전에 타이로신 처리에 따른 성장촉진효과에 관한 보고와 같은 결과를 나타내었다 (Holman & Chénier, 2013; Van Lunen, 2003). 총 3,327,834 sequences 를 얻었으며, Mothur 파이프라인을 통한 프로세싱 후 2,422,598 sequences 가 남았다. 모든 샘플 중 최저 시퀀스 수가 23,842 reads 로, 이를 이용하여 다양한 시퀀스 수를 포함하고 있는 샘플들의 시퀀스 수를 표준화시켰다 (Table 1).

타이로신 처리 및 비처리 그룹 간에 장내미생물의 풍부도를 나타내는 Chao index 와 다양성을 나타내는 Shannon index 를 포함하는 생태학적 지수 (Ecological indices)를 비교하여 보았으나 두 그룹간에 유의적인 차이는 없었다 (Fig 2 A, B). 하지만, 체중에 따라 성장단계를 나눠 각 그룹 내에서 비교해 본 결과, 장내미생물의 풍부도에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 장내미생물의 다양성이 유의적으로 증가하는 시기가 다르다는 것을 확인하였다. 타이로신 비처리군에서는 60~80kg 에서 80~100kg 으로 넘어가는 후기 성장단계에서 장내미생물의 다양성이 유의적으로 증가 하였으나 타이로신 처리군에서는 20~40kg 에서 40~60kg 으로 넘어가는 초기

성장단계에서 유의적으로 증가하였다 (Fig 2C, D). 이는 타이로신 처리 그룹 내에서 초기에 타이로신에 의해 장내미생물의 다양성이 감소하여 나타난 결과라고 판단된다.

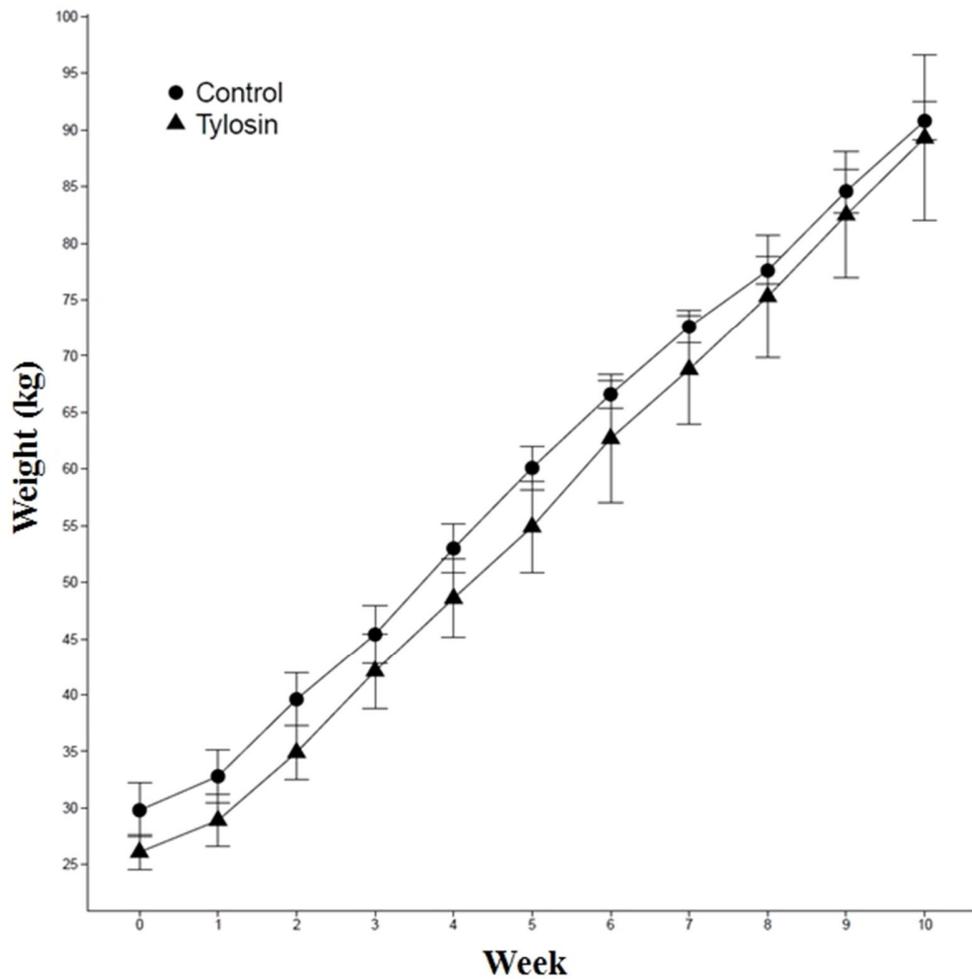
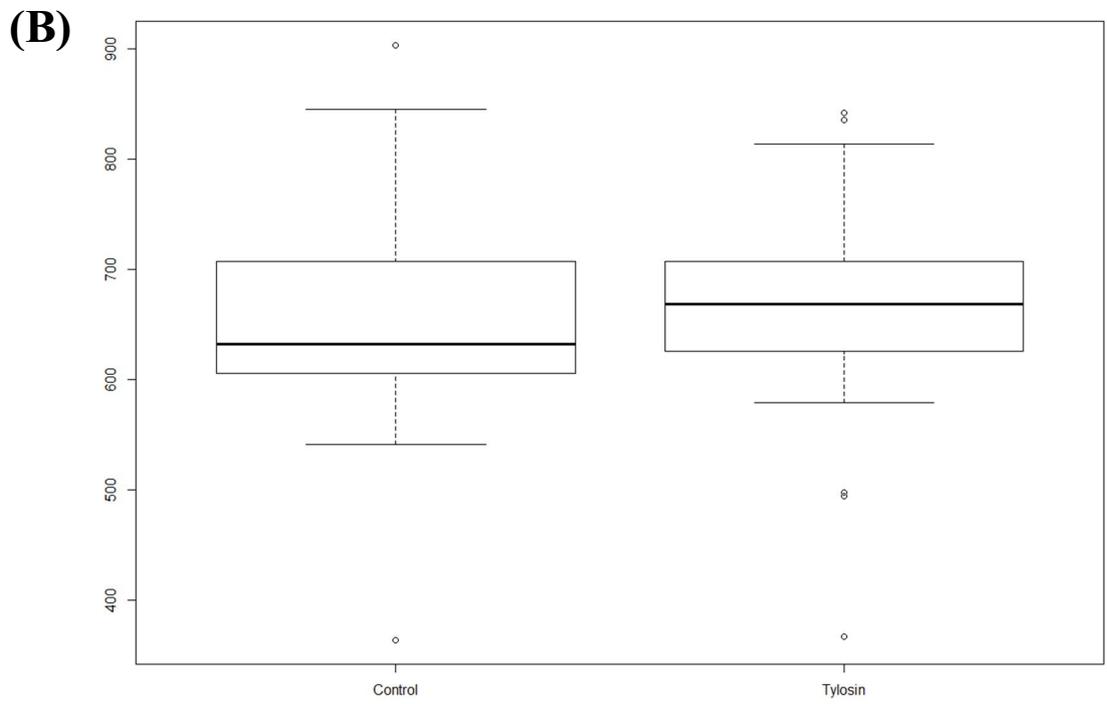
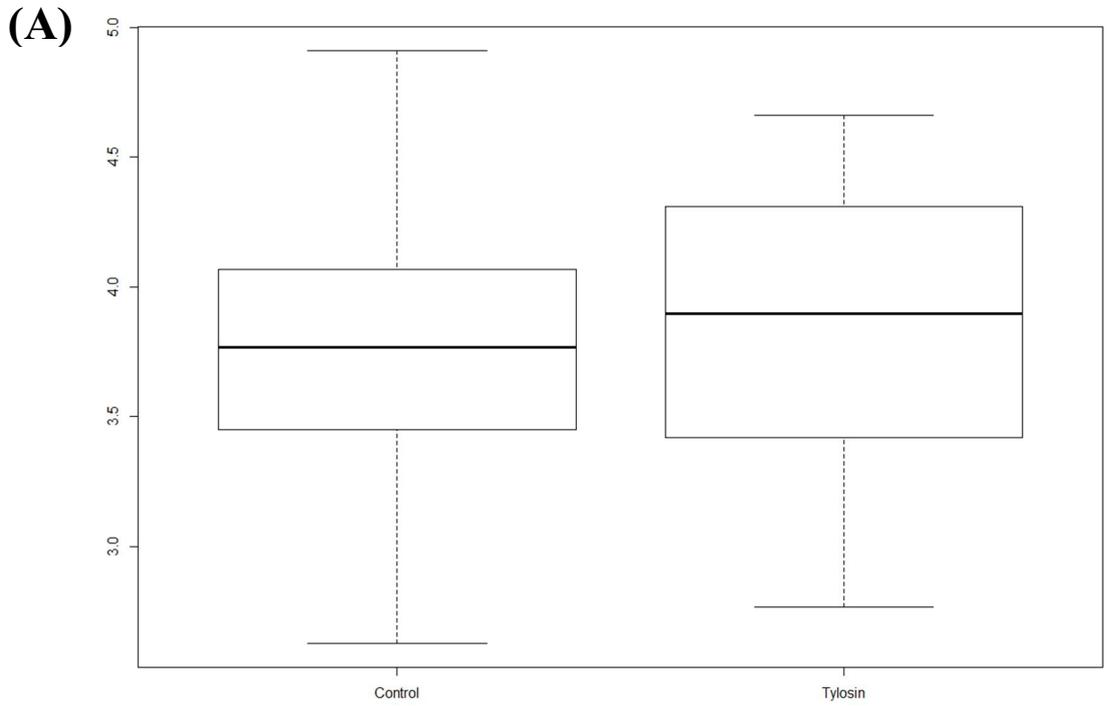


Figure 1. Weight gain during this study. Black circles (●) and triangles (▲) indicated control and tylosin groups, respectively.



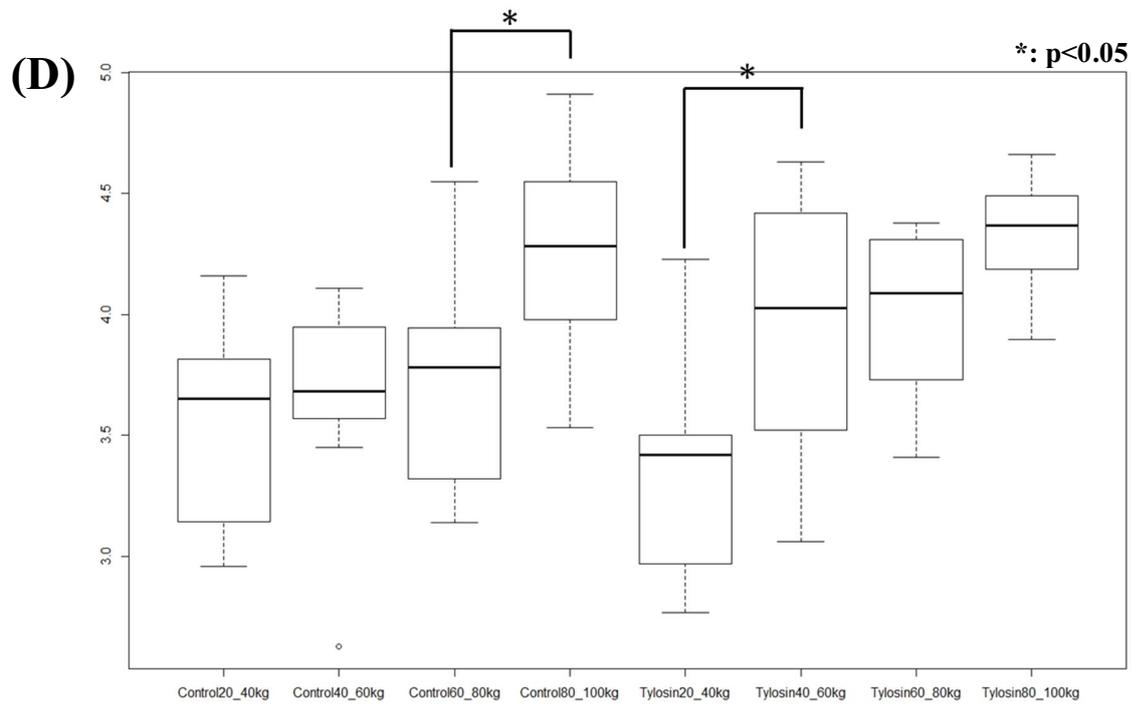
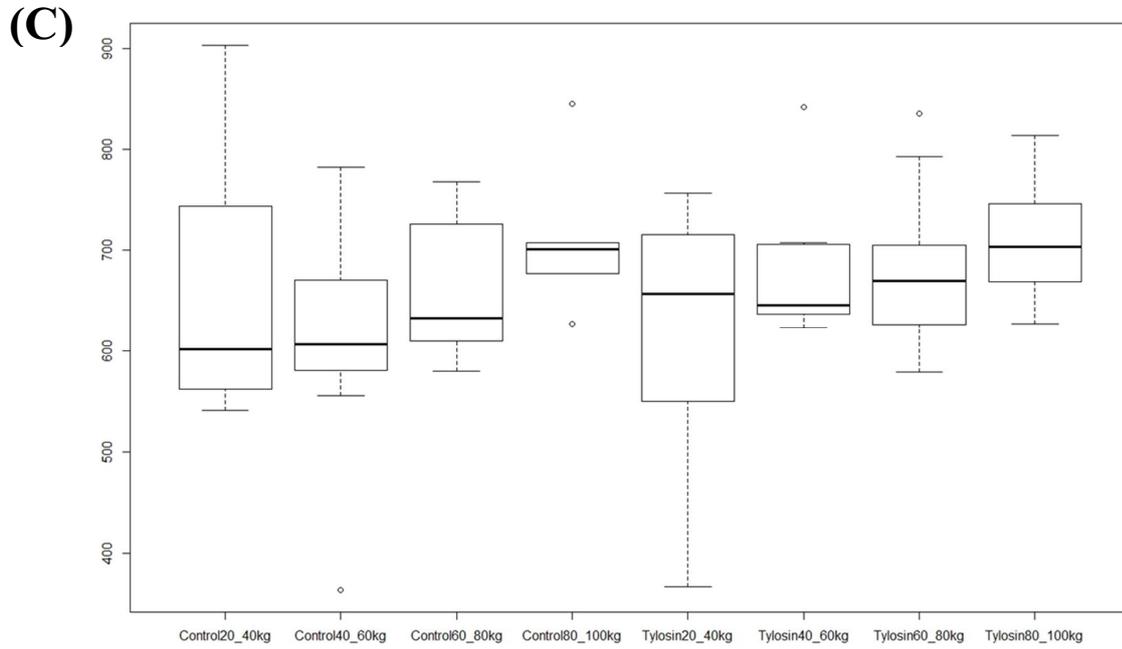


Figure 2. Ecological diversity indices comparison between control and tylosin group gut microbial communities. Chao index (A) and (C). Shannon index (B) and (D).

Table 1. Number of reads and ecological diversity indices obtained in this study. Sample names were shown for individual animal indicating feeding condition (C1-3: control, T1-3:tylosin-fed) followed by week (W0-10: 10 weeks).

Sample	No. of raw reads	No. of trimmed reads	Coverage	No. of OTUs	Chao	Inverse Simpson	Shannon
C1-W0	113576	52469	0.990	666	903.3	22.8	4.16
C1-W1	62202	43358	0.992	616	779.5	12.68	3.86
C1-W2	38854	28662	0.995	464	555.2	10.53	3.68
C1-W3	60332	44222	0.992	581	782.9	12.19	3.76
C1-W4	37903	27910	0.994	573	679.1	14.27	3.97
C1-W5	48228	37397	0.995	492	579.8	9.5	3.47
C1-W6	93552	73673	0.993	523	706.2	9.41	3.35
C1-W7	47553	39769	0.994	504	615.5	6.22	3.14
C1-W8	41359	34813	0.995	492	608.3	5.74	3.14
C1-W9	43300	34245	0.994	544	677.2	9.43	3.53
C1-W10	42515	34208	0.994	579	700	16.92	4.14
C2-W0	43194	31809	0.993	594	707.7	11.18	3.77
C2-W1	52467	40890	0.994	465	569.5	5.99	3.07
C2-W2	43645	32615	0.995	456	540.8	5.7	3.22
C2-W3	34601	26939	0.995	531	606	13.69	3.95
C2-W4	38670	28341	0.995	541	605.6	17.02	4.11
C2-W5	65249	49905	0.997	304	364	3.82	2.63
C2-W6	44431	32183	0.994	541	632.8	19.93	4.07
C2-W7	44946	32933	0.994	584	690.9	21.06	4.12
C2-W8	37550	28057	0.995	684	746	32.87	4.55
C2-W9	34863	27023	0.995	559	626.8	14.5	3.98
C2-W10	51285	38672	0.995	642	707.3	39.88	4.55
C3-W0	88167	34041	0.994	511	601.5	10.78	3.65
C3-W1	82158	32648	0.994	448	554.1	5.59	2.96
C3-W2	44997	25956	0.994	581	670.3	8.76	3.57
C3-W3	41100	37256	0.995	516	580.8	8.85	3.65
C3-W4	39186	27253	0.994	536	633	8.5	3.45
C3-W5	57945	51228	0.992	600	767.8	13.41	3.78
C3-W6	39815	49038	0.995	533	610.7	9.95	3.8
C3-W7	53398	37906	0.993	616	754.2	11.19	3.82
C3-W8	38782	31921	0.994	495	606.1	7.32	3.29
C3-W9	51296	26401	0.993	699	845.1	61.11	4.91
C3-W10	36450	41852	0.995	623	702.1	29.33	4.43

Table 1. Continued

T1-W0	52712	38576	0.995	418	494.2	4.19	2.82
T1-W1	42028	33248	0.997	317	367.4	5.01	2.77
T1-W2	42639	31455	0.994	475	602.4	7.14	3.42
T1-W3	47710	37186	0.996	428	497.6	3.8	2.81
T1-W4	36952	28444	0.995	634	707.9	31.1	4.48
T1-W5	51814	38673	0.994	484	623.4	4.84	3.06
T1-W6	44342	32372	0.994	537	637.9	18.37	4.13
T1-W7	33470	27030	0.995	549	626.6	26.9	4.38
T1-W8	37142	27728	0.995	553	619	19.61	4.06
T1-W9	40100	29502	0.994	584	669.8	29.1	4.34
T1-W10	32023	23842	0.995	627	703.9	45.7	4.66
T2-W0	63414	43384	0.992	535	736.7	5.46	3.14
T2-W1	70751	51776	0.992	507	728.5	5.24	3.12
T2-W2	37211	27958	0.995	544	614.8	6.28	3.46
T2-W3	37350	28037	0.995	591	656.9	17.22	4.23
T2-W4	44512	34578	0.994	499	636.7	5.82	3.23
T2-W5	64835	47791	0.992	659	842.4	21.43	4.36
T2-W6	40382	30063	0.995	634	704	38.65	4.63
T2-W7	98531	76144	0.993	626	793.2	25.23	4.31
T2-W8	35719	27266	0.995	556	628.7	25.97	4.3
T2-W9	37172	31245	0.995	497	578.8	6.4	3.41
T2-W10	38184	29203	0.995	552	627.2	13.22	3.9
T3-W0	93540	50134	0.993	490	686.3	7.99	3.43
T3-W1	79359	57506	0.992	604	756.5	7.33	3.54
T3-W2	68173	48741	0.993	545	702.1	7.68	3.59
T3-W3	42069	31132	0.994	529	636.8	11.82	3.81
T3-W4	37632	29533	0.995	559	653.6	12.31	3.93
T3-W5	79613	57873	0.992	578	835.7	9.37	3.73
T3-W6	38793	28743	0.994	610	705.1	16.48	4.09
T3-W7	44360	33781	0.994	547	692.3	9.11	3.73
T3-W8	42242	32241	0.993	706	813.8	17.74	4.19
T3-W9	42581	33028	0.994	659	746	30.02	4.49
T3-W10	36910	28792	0.995	592	668.6	26.27	4.37

장내미생물 군집에 타이로신이 미치는 효과

Firmicutes/Bacteroidetes 의 비율은 이전 비만연구에서 비만을 구분할 수 있는 하나의 지표로 사용할 수 있다고 보고되었으며 (Ley, Turnbaugh, Klein, & Gordon, 2006), 그에 따라 타이로신 처리가 *Firmicutes* 와 *Bacteroidetes* 의 비율에 어떠한 변화를 야기 시키는지 조사하였다. 타이로신 비처리 그룹에서는 체중과 *Firmicutes/Bacteroidetes* 의 비율 간에 상관관계가 뚜렷하게 관찰 되지 않았으나, 타이로신 처리 그룹에서는 강한 양의 상관관계를 나타내는 것을 확인하였다 (Fig 3). 이는 타이로신에 의해 *Firmicutes/Bacteroidetes* 의 비율이 증가했다는 것을 나타내며, 이는 이전에 보고되었던 비만 장내미생물생태와 유사하다는 것을 나타낸다 (Murphy et al., 2010; Turnbaugh et al., 2006). 그러나 체중과 장내에 존재하는 *Firmicutes* 와 *Bacteroidetes* 의 비율 간에 상관관계가 없다는 보고 또한 나오고 있다 (Fernandes, Su, Rahat-Rozenbloom, Wolever, & Comelli, 2014; Hu et al., 2015).

Firmicutes 와 *Bacteroidetes* 의 비율에 관한 상반되는 연구결과가 보고되고 있는 가운데, 본 결과에서 그 비율이 *Firmicutes* 와 *Bacteroidetes* 중 어느 미생물 문 (Phylum)에 의한 영향이 더 많이 미치는지 조사하였다. 돼지의 체중증가에 따른 *Firmicutes* 및 *Bacteroidetes* 와 상관관계를 조사해 본 결과, 타이로신 처리 그룹에서 *Bacteroidetes* 가 *Firmicutes* 보다 급격하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 타이로신에 의해서 그람양성균인 *Firmicutes* 가 많이 감소 할 것이라고 예상했으나, *Bacteroidetes* 가 더 많이 감소가 됐다는 흥미로운 결과를 확인 할 수 있었다 (Fig 4). 타이로신이 그람양성균에 대한 항균성을 갖고 있다고 알려져 있으나, Suchodolski 외 연구팀에 의하면 타이로신

처리에 따라 그람음성균에 속하는 *Fusobacteria*, *Bacteroidales*, *Moraxella* 가 감소하는 경향이 나타났으며, 그람양성균에 속하는 *Enterococcus*, *Dietzia* spp.가 증가한다는 보고가 있었다 (Suchodolski et al., 2009). 본 연구에서 또한 타이로신 처리에 의하여 대부분이 그람음성균으로 구성되어 있는 *Bacteroidetes* 가 그람양성균인 *Firmicutes* 보다 많이 감소 될 수 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

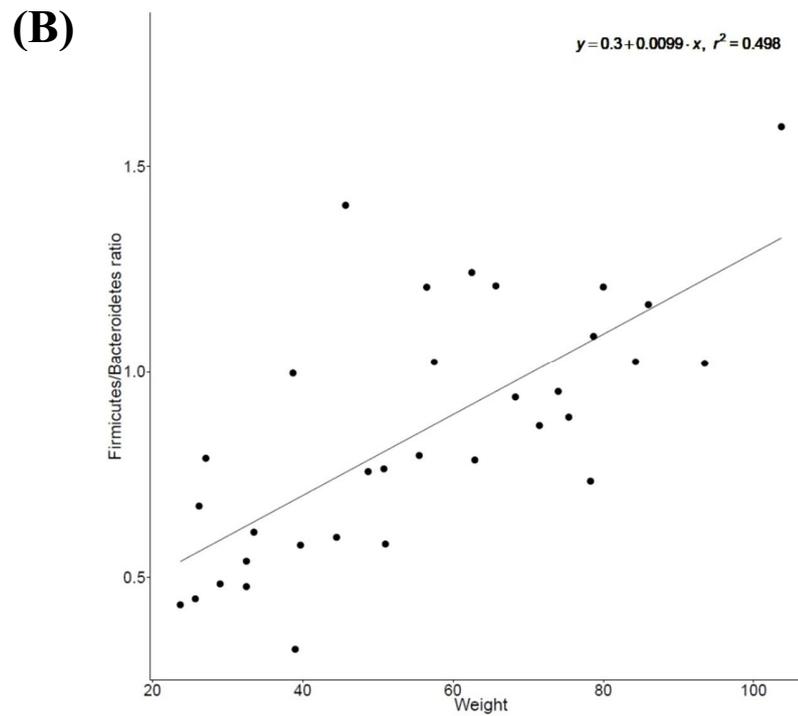
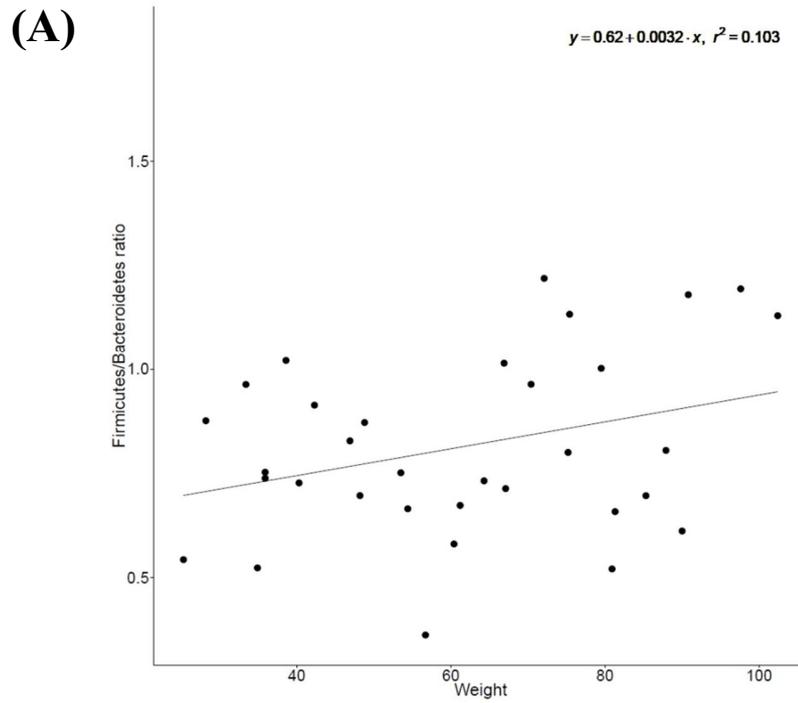
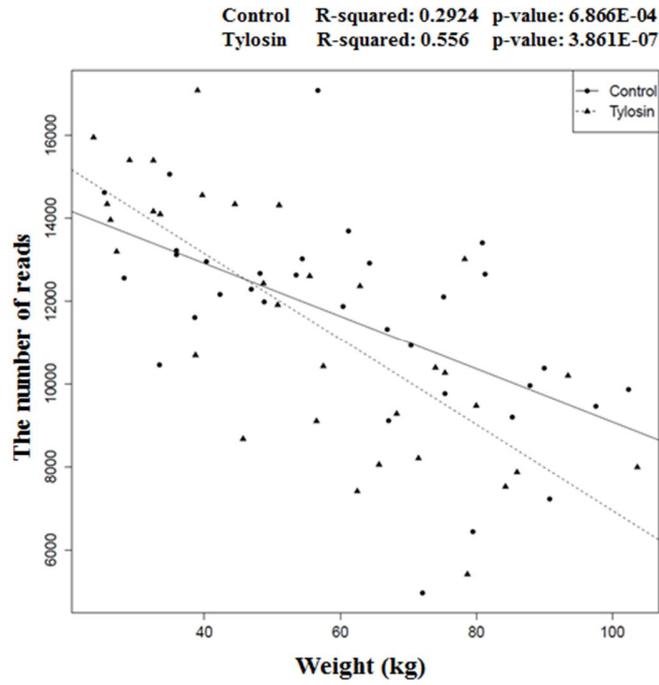


Figure 3. The correlation analysis between weight and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in control (A) and tylosin group (B)

(A)



(B)

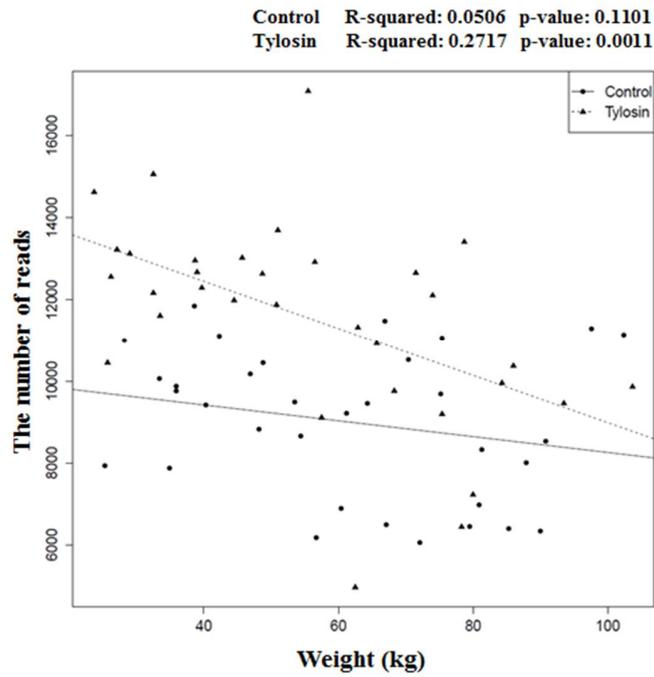


Figure 4. Abundance of *Bacteroidetes* (A) and *Firmicutes* (B) according to increasing of weight during this study. Black circles (●) and triangles (▲) indicated control and tylosin group, respectively.

타이로신 처리 및 비처리군의 체중 증가에 따른 과 (Family) 수준에서 장내미생물의 풍부함의 상관관계를 추가적으로 조사하였다. 그 결과, 타이로신 비처리군에서는 5 개의 과에서 상관관계를 나타냈는데 *Desulfovibrionaceae*, *Lachnospiraceae*, *Coribacteriaceae* 에 대해 음의 상관관계를 나타냈으며, *Sutterellaceae*, *Deferribacteraceae* 에 대해서는 양의 상관관계를 나타내었다. 타이로신 처리군에서는 *Ruminococcaceae*, *Oxalobacteraceae* 에 대해서만 양의 상관관계를 나타내었다. 체중증가와 과 (Family) 수준에서 풍부함 간의 상관관계를 보이는 7 개의 과 중 *Lachnospiraceae* 와 *Ruminococcaceae* 를 제외하고 나머지 과 (Family)들은 전체 시퀀스 수의 1%가 넘지 않았다. 전체 시퀀스의 1%가 넘지 않는 과 (Family)를 제외하고 *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* 와 체중증가 간 상관관계를 Fig 5 에 나타내었다. *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* 에 속하는 미생물은 장 건강을 유지시켜주는데 중요한 역할을 한다고 보고 되었으며 (Biddle, Stewart, Blanchard, & Leschine, 2013), 타이로신 처리군에서는 돼지가 성장함에 따라 그러한 *Ruminococcaceae* 가 증가하는 것을 나타냈으나, 비처리군에서는 *Lachnospiraceae* 가 감소하는 것으로 나타났다. 본 결과는 사료첨가제로써 타이로신이 돼지의 성장에 도움이 될 수 있도록 건강한 장내 환경을 유지시켜줌으로써 성장증진에 긍정적인 효과를 미칠 수도 있다는 것을 시사한다.

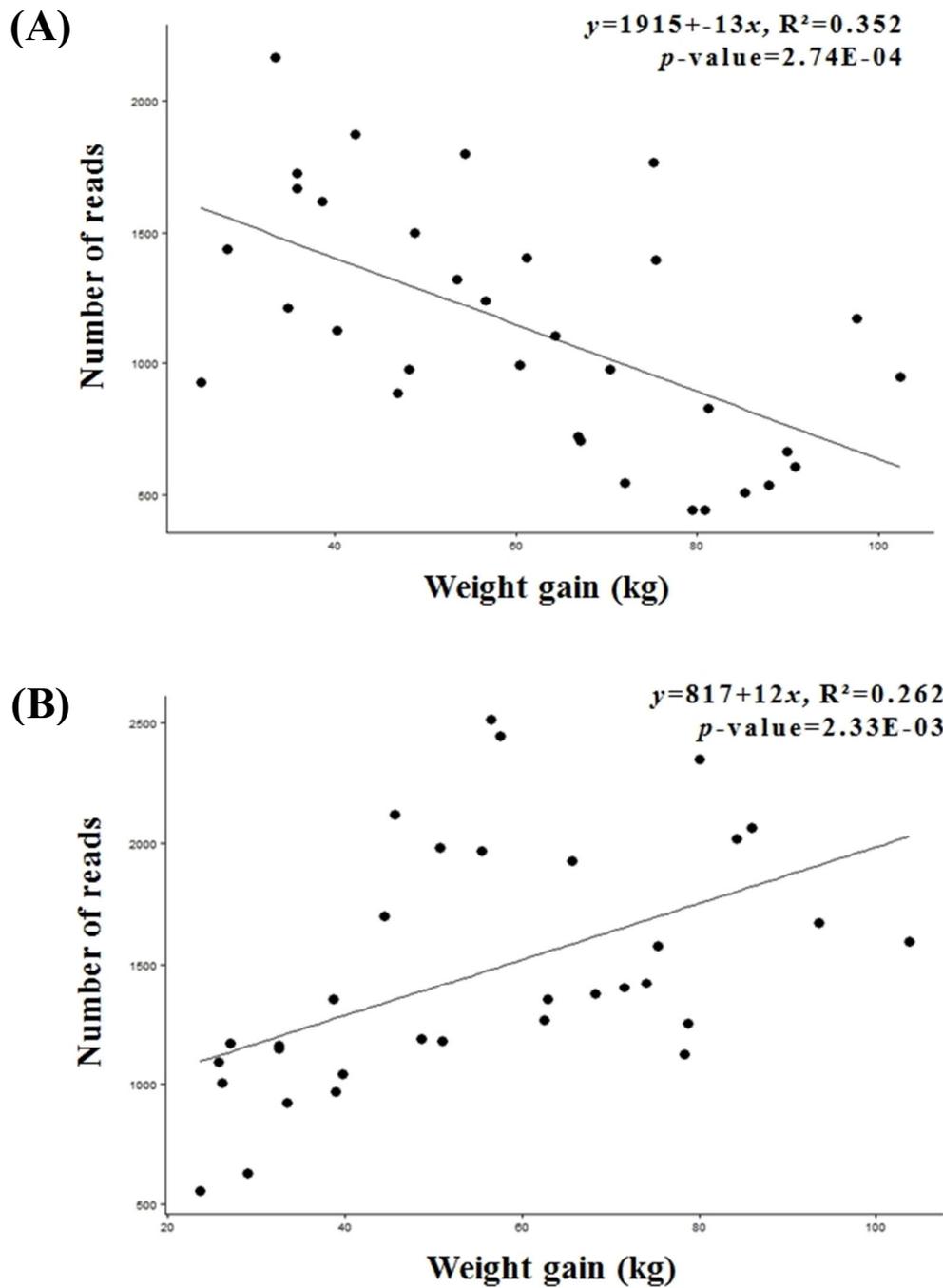


Figure 5. Significant correlation ($p < 0.001$) based on consensus OTUs between read abundance and host weight among the family level. Abundance of *Lachnospiraceae* in control group (A), Abundance of *Ruminococcaceae* in tylosin group (B)

OTUs 기반의 장내미생물생태 비교분석

타이로신 처리 유무에 따라 성장하면서 OTUs distribution 에 어떠한 영향을 미치는지 Mothur 서브루틴 “LEfSe”를 이용하여 조사하고 Figure 6 에 나타내었다 ($p < 0.05$). Heat map 으로 OTUs distribution 을 나타내 본 결과, 타이로신 처리군과 비처리군 간 성장단계별로 차이가 나는 Cluster I, II 를 포함한 두 개의 클러스터를 확인하였다 (Fig 6A). Cluster I 은 체중 80~100kg 사이에서 두 그룹간 OTUs distribution 의 차이를 보였는데, 타이로신 비처리군에서 특이적으로 많이 나타나는 Cluster I -A 와 타이로신 처리군에서 특이적으로 많이 나타나는 Cluster I -B 로 나눌 수 있었다. Cluster II 는 성장함에 따라 타이로신 처리 그룹에서 상대적으로 많은 OTUs 가 분포하는 것으로 확인 되었다. 추가적으로 각 Cluster 에 대해 Taxonomy 를 조사하였는데 타이로신 비처리 그룹에서 상대적으로 많은 OTUs distribution 을 나타낸 Cluster I -A 에서는 타이로신 처리 그룹에 비해 *Firmicutes* 는 약 2.3 배 많이 포함하고 있었지만, *Bacteroidetes* 는 약 13.4 배 많이 포함하는 것으로 나타났다 (Fig 6B). 타이로신 처리 그룹에서 많은 OTUs distribution 을 나타낸 Cluster I -B 에서는 타이로신을 처리하였을 때 *Firmicutes* ($p < 0.001$)가 *Bacteroidetes* ($p < 0.05$)보다 더 유의적으로 많이 포함하고 있음을 확인하였으며 (Fig 6C), Cluster II 에서는 체중 40kg 이후부터 타이로신 처리 그룹에서 *Firmicutes* ($p < 0.01$)가 유의적으로 많이 포함하고 있다는 것을 확인하였다 (Fig 6D). 본 결과들은 *Firmicutes/Bacteroidetes* 비율 결과와 유사하게 나타났으며 타이로신 처리에 따라 비만 장내미생물생태로 변화한다는 것을 시사한다.

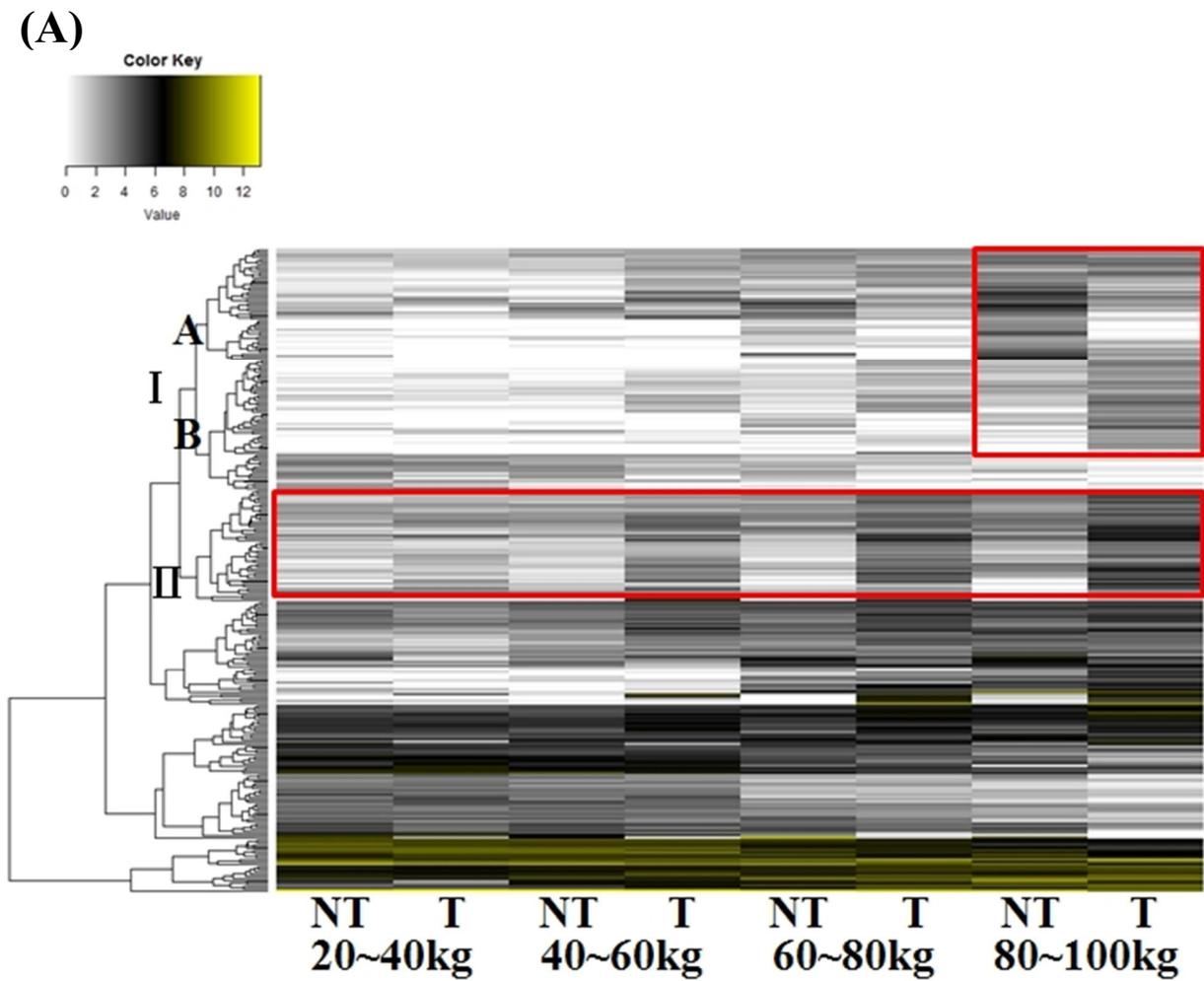


Figure 6. OTUs distribution of control and tylosin groups using LEFSE ($p < 0.05$). Differentially abundant OTUs (A), taxonomic composition of Cluster I -A (B), I-B (C) and Cluster II (D) in the phylum level.

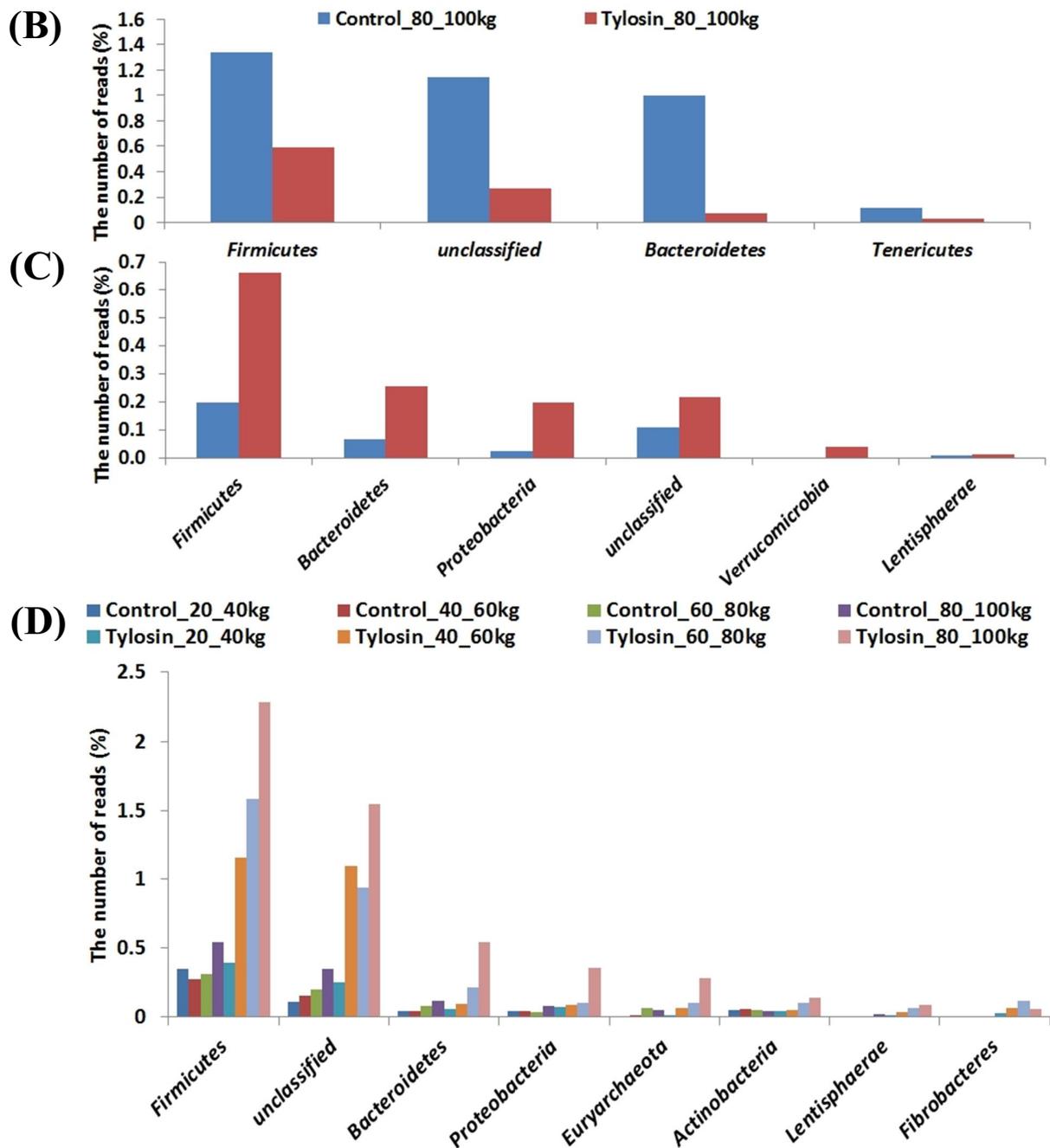


Figure 6. OTUs distribution of control and tylosin groups using LEFSE ($p < 0.05$). Differentially abundant OTUs (A), taxonomic composition of Cluster I-A (B), I-B (C) and Cluster II (D) in the phylum level.

타이로신 처리 유무에 따라 성장하면서 장내미생물생태 유사성이 어떻게 변하는지 Yue-Clayton theta coefficient 기반으로 그룹간 비유사성을 계산하고, Tree dendrogram 으로 클러스터링을 실시하여 나타내었다 (Fig 7). 타이로신 처리 유무에 상관없이 체중이 40kg 이하 있을 때에는 유사한 장내미생물생태를 가지는 것을 확인하였으며, 타이로신 처리 60~80kg 그룹이 비처리 60~80kg 그룹과 달리 80~100kg 그룹과 클러스터를 형성하는 것을 확인하였다. 이는 항생제에 의해서 보다 빠르게 후기 장내미생물생태로 변화한다는 것을 나타내며, 이러한 영향으로 인해 항생제가 성장촉진제로서 역할을 하였다고 추측 되어진다.

타이로신 처리 및 비처리군 사이에 성장속도가 유의적인 차이를 나타내지는 않았지만, *Firmicutes* 와 *Bacteroidetes* 의 비율이 변화한다는 것이 확인됨에 따라 OTUs (Operational Taxonomic Units) 기반의 장내미생물생태 변화를 조사하여 NMDS (Non-metrics Multidimensional Scaling)으로 나타내었다 (Fig 8). 자돈 및 육성돈에 속하는 체중 (20~60kg)에 있을 때에는 타이로신 처리 및 비처리 그룹 간 장내미생물생태가 차이가 없었지만, AMOVA(Analysis of molecular variance)를 통한 유의성 검정에서 비육돈에 속하는 체중 (60~100kg)에서는 유의적인 차이가 있다는 것을 확인하였다 ($p < 0.001$). 또한 타이로신 처리 및 비처리 그룹간에 60kg 이후 Bray-Curtis 비유사도 지수 (Bray-Curtis dissimilarity)가 증가하는 것을 확인하였는데, 자돈 및 육성돈의 성장단계 보다 비육돈 시기에서 타이로신 처리에 의해 장내미생물생태가 더욱 달라졌다는 것을 나타내었다. 이에 따라 과 (Family) 수준의 장내미생물 풍부함의 정도에 따른 장내미생물생태 변화를 조사하여 NMDS 내에

화살표로 나타내었다. 타이로신 처리군에서 비육돈에 속하는 성장단계에는 *Clostridiaceae_1*, *Porphyromonadaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Oligosphaeraceae* 가 장내미생물생태에 많은 영향을 미치는 것으로 확인 되었으며, 반면 타이로신 비처리군의 비육돈 성장단계에서는 *Sutterellaceae* 가 장내미생물생태 변화에 영향을 미치는 것으로 확인 되었다. 초기성장단계에 속하는 체중 20~60kg 내에서는 타이로신 처리 유무에 상관없이 *Prevotellaceae* 와 *Veillonellaceae* 가 장내미생물생태에 영향을 미치는 것으로 확인 되었다. 이전 선행연구에서 메탄생성 고세균 (Methanogenic archaea)은 섬유질 분해 미생물의 성장을 촉진시켜 지방을 축적시킨다고 보고되었으며 (Samuel & Gordon, 2006), 또한 비만타입의 돼지인 Erhualian 에서는 이러한 메탄생성 고세균이 마른타입의 돼지인 Landrace 보다 장 내에 상대적으로 많이 포함되어 있다고 보고되었다 (Luo et al., 2012). 또한 당뇨병을 유도시킨 쥐에서 *Clostridiaceae_1* 와 *Ruminococcaceae* 가 높은 비율을 차지하고 있는 반면에 당뇨병에 내성을 갖고 있는 쥐에게서는 *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* 를 높은 비율로 확인 되었는데 (Roesch et al., 2009), 이는 본 연구에서 타이로신에 의해 비만 장내미생물생태 형성에 따라 당뇨병과 관련된 몇 장내미생물들이 증가 할 수도 있다는 것을 나타낸다. *Prevotellaceae* 와 *Veillonellaceae* 는 포유돈에서 많이 포함되어있다고 보고 됨에 따라 타이로신 처리에 상관없이 초기성장단계에서 *Prevotellaceae* 와 *Veillonellaceae* 가 많은 영향을 미치는 것이라고 추측 할 수 있다 (Frese, Parker, Calvert, & Mills, 2015; J. Kim, Nguyen, Guevarra, Lee, & Unno, 2015).

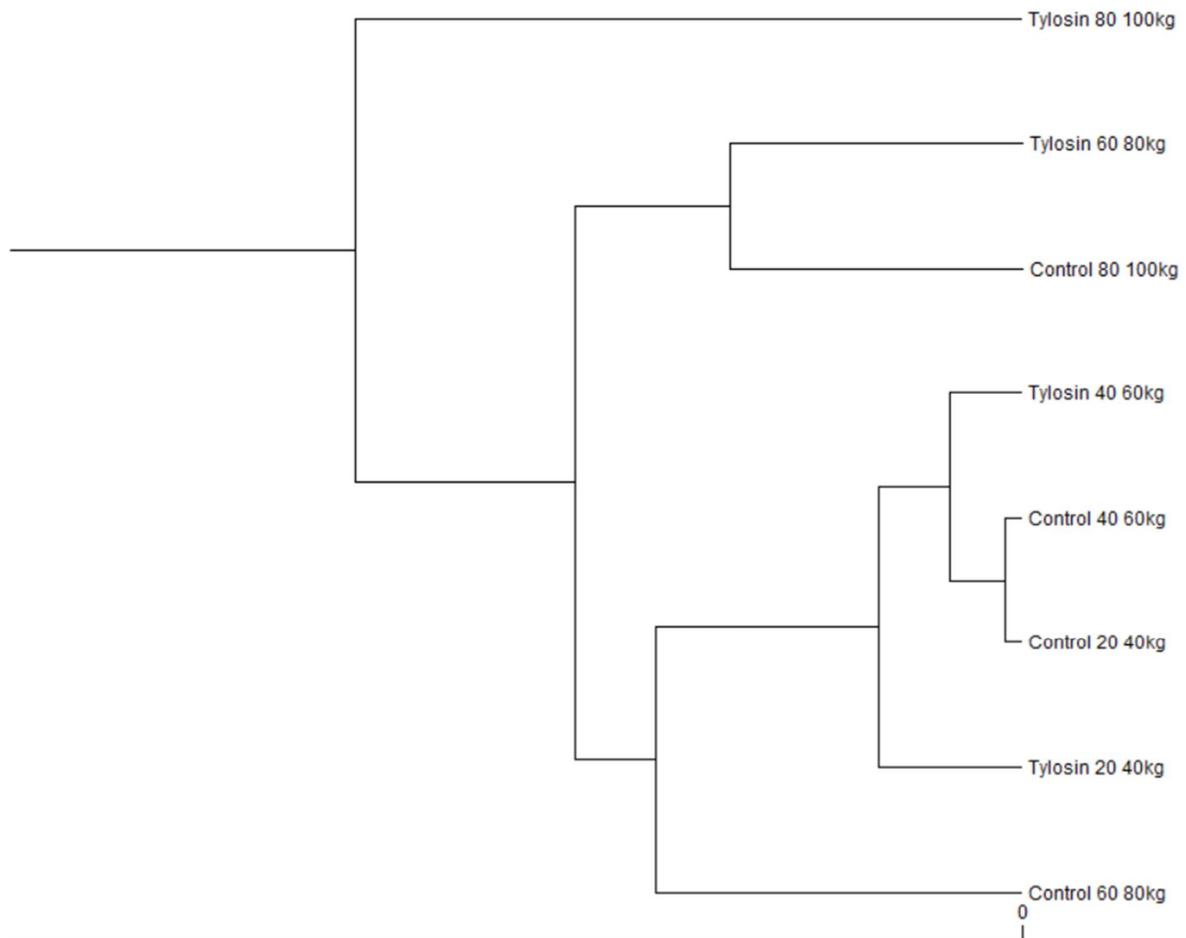


Figure 7. Cluster analysis based on the distribution of operation taxonomic units calculated according to the theta coefficient

Comparison	Bray-curtis	p-value
Control 20-60kg <= Tylosin 20-60kg	0.19	0.256
Control 60-100kg <= Tylosin 60-100kg	0.38	<0.001*

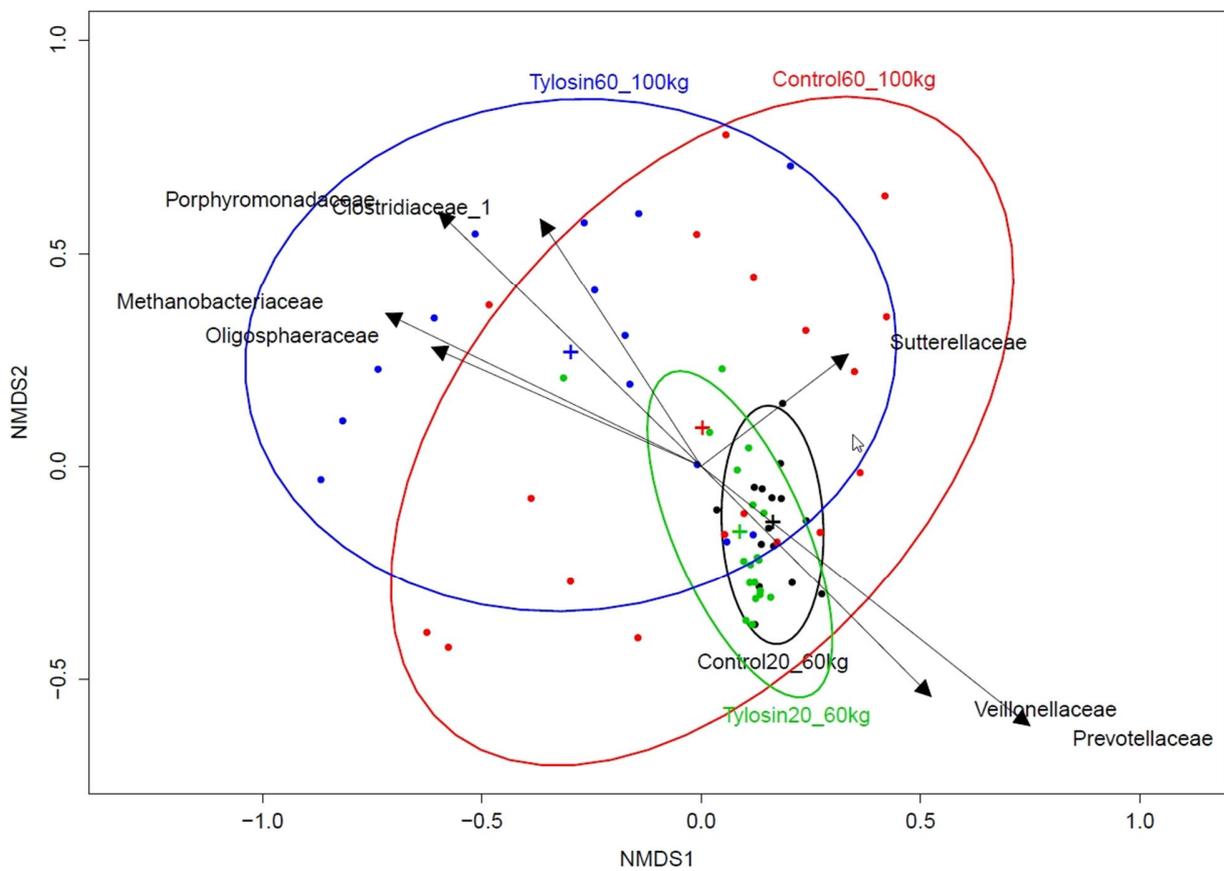


Figure 8. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot. Biplot arrows indicate families with significant correlation against plots ($P < 0.05$) with abundance $> 0.1\%$.

타이로신 처리 및 비처리 돼지의 각 그룹 내에 모든 샘플이 공통적으로 포함하고 있는 352 OTUs 를 확인하였으며, 이를 Consensus OTUs 라고 한다. Consensus OTUs 를 이용하여 네트워크 분석을 통해 공유하고 있는 OTUs 의 분포를 조사하였다 (Fig 9). 타이로신 처리 그룹 내에 20~40kg 성장단계에 있는 돼지들은 다른 샘플과 공유하고 있는 OTUs 가 현저히 적다는 것을 확인 할 수가 있었다. 어떠한 OTUs 의 차이로 인해 이러한 결과를 나타내는지에 대해 Metastats 분석 (Paulson J, 2011)을 통해 유의적으로 차이가 있는 OTUs 를 조사해본 결과, 타이로신 처리 그룹의 초기성장단계에서 *Clostridiaceae_1*, *Methanobacteriaceae*, *Spirochetaceae* 를 포함하는 미생물 3 종을 포함하고 있지 않다는 것을 확인 할 수 있었다 ($p < 0.05$). 타이로신 사용에 의해 *Clostridiaceae_1* 를 포함하는 그람양성균이 초기성장단계에서 억제되었다고 생각되며, 이후 메탄생성균에게 기질을 제공하는 미생물의 성장이 억제된 것 같다고 판단된다 (Duncan et al., 2008). 또한 타이로신은 *Spirochetaceae* 에 대한 항균성을 갖고 있다고 보고 되었으며 (Prapasarakul et al., 2003), 타이로신을 처리한 돼지의 초기성장단계에서 과 (Family) 수준의 *Clostridiaceae_1*, *Methanobacteriaceae*, *Spirochetaceae* 을 포함한 미생물 3 종이 확인 되지 않았다는 것을 뒷받침해 줄 수 있다. 40kg 이후부터 타이로신 처리 그룹과 80~100kg 의 타이로신 비처리 그룹이 매우 가까이 위치해 있는 것을 확인 할 수 있었는데, 타이로신 처리에 의해서 보다 빨리 후기 장내미생물생태로 변화 할 수 있다는 것을 시사한다.

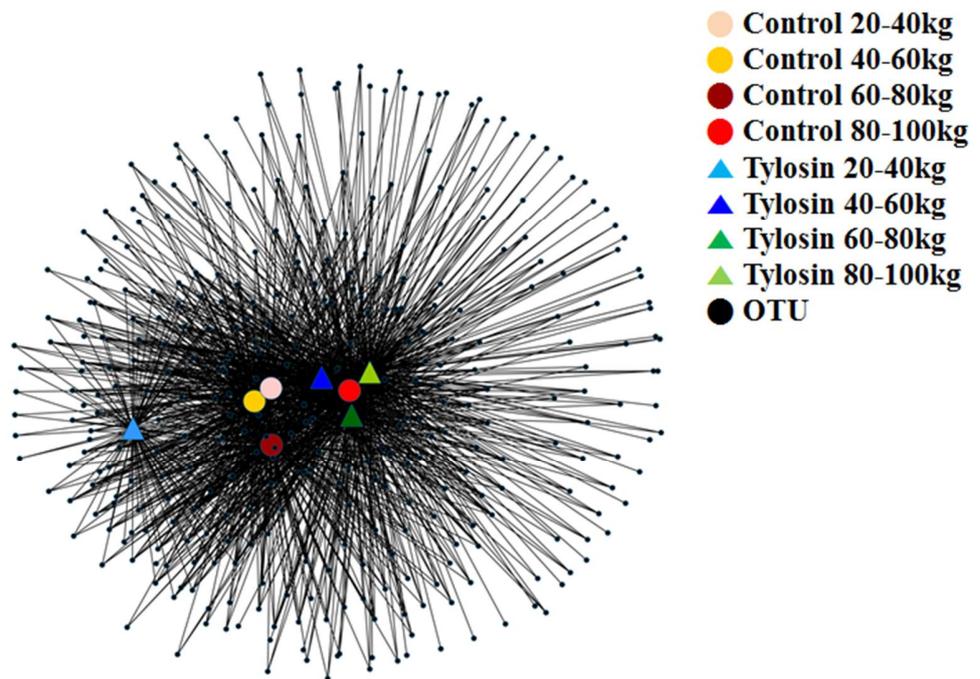


Figure 9. Network analysis based on operational taxonomic units using consensus OTUs

SUMMARY

본 연구에서는 사료첨가제로 항생제 사용이 금지가 되기 이전에 일반적으로 항생제 성장촉진제로써 사용되었던 타이로신에 의한 돼지의 성장속도 및 장내미생물생태 변화를 MiSeq sequencing 을 통한 16S rRNA 유전자 분석을 기반으로 조사하였다. 또한 집단 사육 및 다른 개체의 분변에 의한 장내미생물생태 변화를 최소화 시키기 위하여 개별사육을 통해 본 연구를 진행하였다. 타이로신에 의해서 성장속도는 유의적으로 증가하지 않았지만, 타이로신 처리군과 비처리군 간에 장내미생물생태가 60kg 이후부터 유의적으로 차이가 나타났다. 타이로신 처리군에서 *Firmicutes/Bacteroidetes* 의 비율이 비처리군에 비해 체중이 증가함에 따라 강한 양의 상관관계를 나타냈는데, 이는 비만 장내미생물생태로 보고되었던 연구결과와 일치하였다. 광범위하게 그람양성균을 억제시킨다고 알려진 타이로신에 의해서 대부분이 그람양성균으로 구성되어있는 *Firmicutes* 가 많이 감소 할 것이라는 예상과는 반대로 그람음성균인 *Bacteroidetes* 가 급격하게 감소하기 때문에 *Firmicutes/Bacteroidetes* 의 비율 차이를 나타낸다는 흥미로운 결과를 확인 할 수 있었다. 또한 Consensus OTUs 를 이용한 네트워크 분석에서는 타이로신 처리군의 20~40kg 에 해당하는 초기성장단계가 다른 성장단계와 차이가 나타나는 것은 타이로신에 의해서 *Clostridiaceae_1*, *Methanobacteriaceae*, *Spirochetaceae* 를 포함하는 3 종의 미생물이 억제되어 나타난 결과라는 것을 확인하였다. 이로부터 타이로신에 의한 체중증가는 확인하지 못하였지만, 사료첨가제로써 사용한 타이로신에 의해서 비만 장내미생물생태 형성 뿐만 아니라 보다 빠르게

후기 장내미생물생태를 형성함으로써 성장을 촉진시킬 수 있는 중요한 요인으로 가능성을 제시 할 수 있으며, 추가적으로 Metagenome 분석을 통해 항생제 처리에 의한 장 내 기능성 유전자 차이를 규명을 통해 보다 정확한 정보를 제공해 줄 수 있는 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., & Leschine, S. (2013). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*, 5(3), 627-640. doi: doi:10.3390/d5030627
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., . . . Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D141-145. doi: 10.1093/nar/gkn879
- Collier, C. T., van der Klis, J. D., Deplancke, B., Anderson, D. B., & Gaskins, H. R. (2003). Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(10), 3311-3317.
- de Lange, C. F. M., Pluske, J., Gong, J., & Nyachoti, C. M. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*, 134, 124-134. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.117
- Degnan, P. H., & Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *ISME J*, 6(1), 183-194. doi: 10.1038/ismej.2011.74
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. [Evaluation Studies Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381

- Fernandes, J., Su, W., Rahat-Rozenbloom, S., Wolever, T. M., & Comelli, E. M. (2014). Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. *Nutr Diabetes*, 4, e121. doi: 10.1038/nutd.2014.23
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., & Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3, 28. doi: 10.1186/s40168-015-0091-8
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Int J Food Microbiol*, 141 Suppl 1, S15-28. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031
- Holman, D. B., & Chénier, M. R. (2013). Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine. *FEMS Microbiology Ecology*, 85, 1-13. doi: 10.1111/1574-6941.12093
- Hu, H. J., Park, S. G., Jang, H. B., Choi, M. G., Park, K. H., Kang, J. H., . . . Cho, S. H. (2015). Obesity Alters the Microbial Community Profile in Korean Adolescents. *PLoS One*, 10(7), e0134333. doi: 10.1371/journal.pone.0134333
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(6), 299-314. doi: DOI:10.1080/10618600.1996.10474713
- Jay Y. Jacela, Joel M. DeRouchey, Mike D. Tokach, Robert D. Goodband, Jim L. Nelssen, David G. Renter, & Dritz, S. S. (2010). Feed additives for swine: fact sheets-high dietary levels of copper and zinc for young pigs, and phytase. *Journal of Swine Health and Production*, 18(2), 87-91.
- Juntunen, P., Heiska, H., Olkkola, S., Myllyniemi, A. L., & Hanninen, M. L. (2010). Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* selected by tylosin treatment at a pig farm. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vet Microbiol*, 146(1-2), 90-97. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.027
- Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., Singer, R. S., Sreevatsan, S., Tu, Z. J., & Isaacson, R. E. (2012). Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth

- promoter, tylosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(38), 15485-15490. doi: 10.1073/pnas.1205147109
- Kim, J., Nguyen, S. G., Guevarra, R. B., Lee, I., & Unno, T. (2015). Analysis of swine fecal microbiota at various growth stages. *Arch Microbiol*, 197(6), 753-759. doi: 10.1007/s00203-015-1108-1
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Appl Environ Microbiol*, 79(17), 5112-5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023. doi: 10.1038/4441022a
- Luo, Y. H., Su, Y., Wright, A. D., Zhang, L. L., Smidt, H., & Zhu, W. Y. (2012). Lean breed Landrace pigs harbor fecal methanogens at higher diversity and density than obese breed Erhualian pigs. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Archaea*, 2012, 605289. doi: 10.1155/2012/605289
- Marquardt, R. R., Jin, L. Z., Kim, J. W., Fang, L., Frohlich, A. A., & Baidoo, S. K. (1999). Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 23(4), 283-288.
- Murphy, E. F., Cotter, P. D., Healy, S., Marques, T. M., O'Sullivan, O., Fouhy, F., . . . Shanahan, F. (2010). Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Gut*, 59(12), 1635-1642. doi: 10.1136/gut.2010.215665
- Pajarillo, E. A., Chae, J. P., Kim, H. B., Kim, I. H., & Kang, D. K. (2015). Barcoded pyrosequencing-based metagenomic analysis of the faecal microbiome of three purebred pig lines after

- cohabitation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(13), 5647-5656. doi: 10.1007/s00253-015-6408-5
- Patterson, J., Chapman, T., Hegedus, E., Barchia, I., & Chin, J. (2005). Selected culturable enteric bacterial populations are modified by diet acidification and the growth promotant Tylosin. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Lett Appl Microbiol*, 41(2), 119-124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01743.x
- Paulson J, P. M., Bravo H. (2011). Metastats: an improved statistical method for analysis of metagenomic data. *Genome biology*, 12:11–17.
- Poole, T. L., Genovese, K. J., Knape, K. D., Callaway, T. R., Bischoff, K. M., & Nisbet, D. J. (2003). Effect of subtherapeutic concentrations of tylosin on the inhibitory stringency of a mixed anaerobe continuous-flow culture of chicken microflora against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*, 94(1), 73-79.
- Prats, C., El Korchi, G., Francesch, R., Arboix, M., & Pérez, B. (2002). Tylosin depletion from edible pig tissues. *Research in Veterinary Science*, 73, 323-325. doi: 10.1016/S0034-5288(02)00101-7
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., . . . Glockner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D590-596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Roesch, L. F., Lorca, G. L., Casella, G., Giongo, A., Naranjo, A., Pionzio, A. M., . . . Triplett, E. W. (2009). Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *ISME J*, 3(5), 536-548. doi: 10.1038/ismej.2009.5
- Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2006). A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26), 10011-10016. doi: 10.1073/pnas.0602187103

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., . . . Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537-7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., . . . Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. [Research Support, Non-U.S. Gov't
- Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
- Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genome Res*, 13(11), 2498-2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., . . . Du, Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J Appl Microbiol*, 100(2), 296-305. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02789.x
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Westermarck, E., Steiner, J. M., Wolcott, R. D., Spillmann, T., & Harmoinen, J. A. (2009). The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Microbiol*, 9, 210. doi: 10.1186/1471-2180-9-210
- Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J Anim Sci Biotechnol*, 4(1), 35. doi: 10.1186/2049-1891-4-35
- Thompson, C. L., Wang, B., & Holmes, A. J. (2008). The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. [Comparative Study
- Research Support, Non-U.S. Gov't]. *ISME J*, 2(7), 739-748. doi: 10.1038/ismej.2008.29

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, *444*(7122), 1027-1031. doi: 10.1038/nature05414
- Unno, T., Kim, J. M., Guevarra, R. B., & Nguyen, S. G. (2015). Effects of antibiotic growth promoter and characterization of ecological succession in Swine gut microbiota. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Microbiol Biotechnol*, *25*(4), 431-438.
- Van Lunen, T. a. (2003). Growth performance of pigs fed diets with and without tylosin phosphate supplementation and reared in a biosecure all-in all-out housing system. *Canadian Veterinary Journal*, *44*, 571-576.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Bioinformatics*, *30*(5), 614-620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593

ACKNOWLEDGEMENT

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업 (세부과제번호: PJ009782)의 지원에 의해 이루어진 것 입니다.

본 연구를 수행하기 위해 많은 조언과 도움을 주셨고 제 지도교수이신 윤노타쁘야 교수님과 부족한 졸업논문심사를 맡아주신 이동선 교수님, 정동기 교수님께 감사하다는 말씀을 드립니다. 또한 실험실에서 같이 생활하며 본 연구를 도와준 박사과정의 고기를 못 먹어 항상 회식의 불청객인 Nguyen Giang Son 과 아침이 밝아오면 잠을 자는 김민철, 상도랑 결혼할 황낙원에게 고맙다는 말을 전합니다. 그리고 실험실을 떠났지만 돼지 농장에서 많은 추억을 만들어준 김유미, 김성휘, 김태형에게도 고맙다는 말을 전합니다.

저의 뒤에서 항상 응원과 믿음으로 지켜봐주시는 할아버지 할머니 그리고 부모님께 정말 감사하다는 말씀을 드리고 싶습니다. 자랑스러운 동생으로 생각해주는 형 해병중사 김백만, 같이 자취생활을 하면서 집안 일을 맡아 저의 수고를 덜어주는 동생 우령각시 김석만에게 고맙다는 말을 전합니다. 그리고 아직까지도, 앞으로도 공부만 해야하는 저를 늘 응원해주고 이해해주는 대한민국 최고의 내조여왕! 저의

예비신부 고희진양에게 고맙고 사랑한다는 말을 전하며, 이런 예쁜 딸을 보잘 것 없는 저에게 믿고 맡겨주신 예비 처가 식구분들께 감사하다는 말씀을 드리고 싶습니다.

마지막으로 언제나 든든한 벼이 되주고 술친구가 되주는 김녕 (안성익, 김우용, 김법현, 고윤섭, 김태현, 김성효, 김상우, 김지환, 송승호), 08 학번(김균암, 박민하, 이종석, 현호봉, 현주현, 김동준), JPC 동아리(강혜진, 김엄지, 김민철, 김현석, 김승현, 김범준, 김명수, 박현우, 정우석, 이주환, 허재용) 친구들에게도 고맙다는 말을 전합니다.

모든 분들 감사하고, 사랑합니다.