



Differences in fecal and cecal microbiota in C57BL/6J mice fed normal and high fat diet

Sunwoo Lee¹ · Singh Vineet² · Tatsuya Unno^{1,3}

고지방 식이 조절에 따른 C57BL/6J 마우스의 분변과 맹장에서 나타나는 미생물생태 차이

이선우¹ · 싱그 비니트² · 윤노 타쯔야^{1,3}

Received: 27 September 2021 / Accepted: 22 October 2021 / Published Online: 31 December 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract A number of studies have been conducted to prevent obesity due to the worldwide increasing rate of obesity and its adverse effects on our health. Recently, a relationship between obesity and gut microbiome has been reported. Fecal and cecal microbiota are generally targeted for examining the gut microbiome during dietary interventions. There is, however, no common understanding on which microbiota and how results elucidated from the data would differ. In this study, we conducted dietary induced obesity study and compared fecal and cecal microbiota affected by dietary interventions. Normal Diet and high fat diet were fed to 6 weeks old mice for 12 weeks, and 16 S rRNA genes amplified from fecal and cecal DNA were sequenced using MiSeq. Our results show that the α -diversity showed significant differences between the dietary interventions as well as cecal and fecal microbiota. The difference in the

taxonomic compositions between cecal and fecal microbiota had become clearer at the family and genus level. At the genus level, *Faecalibaculum* and *Lactobacillus* were more abundant in the cecal and fecal microbiota, respectively. In general dietary intervention studies, dietary effects are more significant than type difference. However, the microbiota analysis results should be interpreted carefully, considering both diet and samples (feces/caecum).

Keywords Cecal microbiota · Fecal microbiota · Gut microbiota · Obesity

서 론

장내미생물이 건강과 밀접하게 연관되어 있다는 수많은 연구들이 보고되었다. 많은 연구들은 고지방-저섬유질 식단과 같은 건강에 해로운 음식의 지속적인 섭취가 장내 불균형(gut dysbiosis)을 유발하는 것을 보여준다[1]. 이러한 장내 불균형은 더 나아가 숙주의 신진대사, 면역체계, 심지어 행동조절까지 영향을 준다[2-4]. 단쇄지방산(Short chain fatty acid, SCFA)의 감소는 장내 불균형의 기능적 손실을 나타내는 주요 지표로 사용되고 있다[5]. 장내미생물과 비만의 연관성에 대해서는 연구가 잘 되어 있지만, 사용하는 방법론적 접근법은 연구마다 다르다[6]. 예를 들어, 마우스의 장내미생물생태와 인간의 장내미생물생태에서 일치하는 현상이 관찰되지만(*Firmicutes/Bacteroidetes* ratio의 증가와 SCFA생성균 감소), 마우스와 인간의 장내미생물생태 차이에 대해서 많은 보고가 되었다[7]. 장내미생물생태 분석 결과는

Tatsuya Unno (✉)
E-mail: tatsu@jejunu.ac.kr

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Department of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

³Subtropical/tropical Organism Gene Bank Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

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.

실험동물의 종의 선택이나 동물실험 시설 내 환경 등에 의해 영향을 받는다[8]. 장내미생물생태 분석에는 16S rRNA 유전자의 Variable region을 사용한다[9]. MiSeq reagent kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA) 시약이 개발되었을 때는 V4 region을 주로 분석하였고, MiSeq reagent kit V3 (Illumina) 시약이 개발되었을 때는 V3-4 또는 V4-5 영역을 주로 사용했다. Variable region의 선택에 따라서 미생물생태 분석 결과가 다르게 나타났다[10]. 이러한 연구결과가 있음에도 불구하고 흥미롭게도 장내미생물에 관한 연구들이 어떠한 샘플을 이용하여 수행하였는지에 대한 의문은 제기하지 않았으며, 샘플 종류에 따라서 미생물생태 분석결과가 달라질 수 있다. Stanley 등은 닭의 분변과 맹장의 미생물생태는 비슷하지만 양적으로는 차이가 있다고 보고하였다[11]. 또한, Panasevich 등은 돼지의 맹장과 분변에서의 미생물이 식단변화에 비슷한 반응을 보여서 밀접한 연관성을 가지고 있다고 보고하였다[12].

인간의 맹장에서는 발효과정은 일어나지 않지만 마우스의 맹장에서는 일어나며, Paneth 세포(항균제가 생산되는 세포)는 인간의 맹장에는 분포하고 있지만, 마우스의 맹장에는 분포하지 않는다[13,14]. 이와 더불어, 다른 포유류와 다르게 마우스는 맹장에 독특한 장내미생물이 있을 것으로 예상된다[15]. Kozik 등은 대장염을 유발한 마우스에서 분변, 맹장, 접액 간 미생물생태에 대한 뚜렷한 차이가 나타났다고 보고했다[16]. 또한, 마우스의 분변 및 맹장 미생물생태를 분석했을 때 기능적 및 대사적 차이가 나타난다는 것이 밝혀졌다[17]. 논의의 비만이 ‘치료하기 힘든’ 질병 중 하나로 인식되면서 항비만에 대한 연구가 많이 수행되고 있다[18]. 이러한 연구들은 다수가 ‘장내’ 미생물생태분석을 포함하고 있지만 이를 위해 어떤 종류의 샘플로 미생물을 조사해야 하는지에 대한 기준은 없는 실정이다. 본 연구는 위와 같은 분변 미생물생태와 맹장 미생물생태 연구결과가 같지 않다는 것을 시사한다. 또한, 많은 요인들이 연구 결과에 영향을 줄 수 있지만, 비만과 관련된 장내미생물 연구에서 구분없이 사용되고 있는 분변과 맹장에 초점을 두어 분석하였다. 따라서, 본 연구에서는 일반 식이 또는 고지방 식이를 섭취한 마우스의 다른 종류의 샘플(분변 및 맹장)을 이용한 장내미생물생태 분석을 통해 얻은 결과에 대해 집중적으로 논의하고자 한다.

재료 및 방법

동물실험 디자인

C57BL/6J 마우스는 6주령 수컷으로 다물 사이언스(Deajeon, Korea)에서 구매하였다. 제주대학교 실험동물센터에서 사육을 진행하였으며, 음용수는 자유롭게 공급하였다. 온도 22±2 °C, 상대습도 50±5% 및 밤낮이 12시간 간격으로 조절되는 사육환경에서 1주일 동안 적응기간을 가졌다. 순화과정을 마친 마우스는 무작위적으로 두 그룹으로 나누어 사육하였다: (1) 정상 식이 섭취 그룹(n=7) (Normal Diet, ND), (2) 고지방 식이 섭취 그룹(n=7) (High Fat Diet, HFD). 고지방식단 사료(HFD)는 DooYeol Biotech (Seoul, Korea)에서 구매하였으며, 12주간 사육하였다. 분변샘플은 동물을 희생시키기 직전에 채취했으며, 실험 종료 후 맹장을 적출하여 분변과 함께 DNA 추출 전까지 -80 °C에 보관하였다. 본 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원

회로부터 승인을 받아 수행하였으며(승인번호: 2018-0018), 제주대학교 동물실험윤리위원회 규칙 및 규정(실험동물에 관한 법률 제15944호)에 따라 수행되었다.

DNA 추출 및 16S rRNA gene sequencing dsDNA는 장내 미생물생태 분석을 위해 맹장과 분변 각각 100-250 mg으로부터 QIAamp Power Fecal Pro DNA Kit (QIAGEN, Frederick, MD, USA)를 이용하여 추출하였다. 모든 샘플의 DNA농도는 5 ng/μL로 맞추었으며, 농도를 균일하게 맞춘 DNA는 16S rRNA 유전자의 가변부위(Variable region) 중 V3-4를 증폭하기 위해 341F와 806R primer set을 이용하여 2 step PCR로 시행되었다[19,20]. Illumina MiSeq (Illumina) 라이브러리 제작을 제조사의 프로토콜을 통해 수행하였으며, 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 시퀀싱을 수행하였다.

위 과정을 통해 얻은 16s rRNA 유전체 데이터는 Mothur을 이용하여 분석하였다[21]. Mothur 내 ‘make.contigs’ 서브루틴은 pair-end 형태의 유전체 데이터에 포함된 염기서열을 합치는데 사용하였으며, ‘align.seqs’ 서브루틴은 SILVA database version 138을 기반으로 alignment를 수행하기 위하여 사용하였다[22]. 오류로 인하여 생성된 염기서열을 수정 및 보완하기 위해서 ‘pre.cluster’ 서브루틴을 사용했으며 ‘chimera.vsearch’ 서브루틴을 이용하여 chimeric sequences를 선별하였다. Taxonomic classification은 RDP database를 이용하여 수행하였다[23]. ‘summary.single’ 서브루틴을 이용하여 α-diversity를 나타내기 위해 Chao I를 통해 풍부도(species richness), Shannon을 통해 균등도(species evenness)를 계산하였다. β-diversity는 ‘dist.shared’ 서브루틴을 이용하여 Bray-Curtis distance 기반으로 비교하였으며, 이를 non-metric multidimensional scaling (NMDS)를 이용하여 2차원적 그래프로 나타냈다.

통계처리

α-diversity 지표는 Wilcoxon signed-rank test 기반으로 분산 분석(analysis of variance, ANOVA)을 사용하여 비교 분석하였고, 미생물생태 간 차이는 ‘amova’ 서브루틴으로 분자 분산 분석(analysis of molecular variance, AMOVA)을 수행하여 측정하였다. 두 그룹 간 미생물의 abundance 차이는 linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 사용하여 계산하였으며, linear discriminant analysis (LDA) 값이 3.0 이상이고 p-value가 0.05 이하를 기준으로 선별하여 나타냈다. Heatmap은 R software에서 pheatmap package를 사용하여 나타냈다.

결과 및 고찰

Sequencing 결과

본 연구에서는 총 534,905 reads를 포함한 유전체 데이터를 이용하여 미생물생태 분석을 수행하였다(최대 23,412 reads, 최소 14,657 reads). 모든 샘플들은 동일한 reads 수를 포함하도록 하기 위하여 각 샘플로부터 10,000 reads를 임의적으로 선별하였으며, 이러한 선별과정은 충분한 sequencing depth를 포함하고 있는 것을 확인하였다(Fig. S1). 또한, 모든 샘플은 Good’s Coverage 분석에 대해서도 99% 이상을 나타냈다(data not shown).

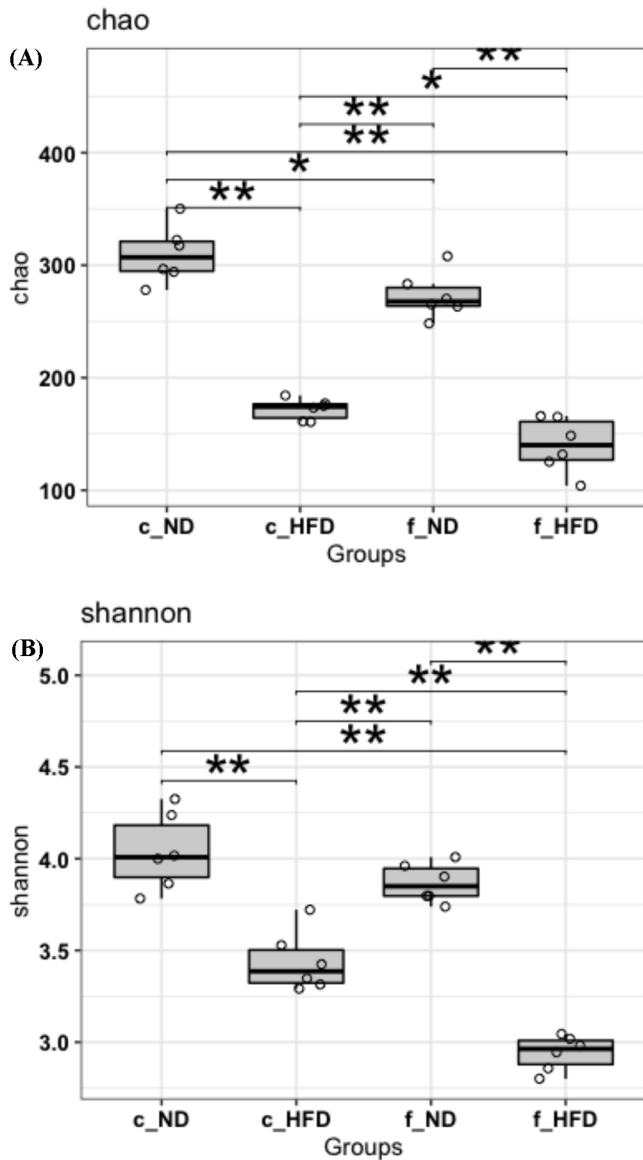


Fig. 1 Alpha-diversity comparison between groups for species richness (A) and evenness (B). * and ** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. C_ and f_ indicate cecal and fecal microbiota, respectively, while ND and HFD indicate normal diet and high fat diet, respectively

α -diversity 비교분석

본 연구에서는 α -diversity를 기반으로 Chao index와 Shannon index를 이용하여 종의 풍부도와 균등도를 각각 조사했다. 장내 미생물생태는 식단 처리와 샘플 종류의 차이(분변 또는 맹장)에 따라 확연한 차이가 나타났다. HFD 그룹의 장내미생물생태는 샘플의 종류에 관계없이 낮은 풍부도와 균등도를 나타냈다(Fig. 1). 또한, 결과에서 분변 미생물생태의 α -diversity가 맹장 샘플의 미생물생태와 비교하여 유의하게 낮음을 확인하였다($p < 0.05$).

각 그룹의 compositional differences

Taxonomic composition은 phylum, family, genus 수준으로 나타났다. family와 genus 수준에서 분명한 차이가 나타났다.

Phylum 수준에서 비교한 결과에서는 Actinobacteria가 맹장보다 분변에서 높은 abundance를 나타냈다(Fig. 2). Family 수준에서 ND 그룹은 Muribaculaceae가 HFD 그룹에서는 Bacteroidaceae가 각각 높은 abundance를 나타냈다. 샘플 종류에 따라 비교했을 때는 Lactobacillaceae는 맹장에 비해 분변에서 상대적으로 많이 나타났다. 또한, Genus 수준에서 비교했을 때는 분변에서는 Faecalibaculum이 맹장에서는 Lactobacillus가 각각 보다 많이 존재하는 것으로 나타났다. Duncaniella는 ND 그룹에서 보다 많았고, unclassified_Bacteroidaceae는 HFD 그룹에서 보다 많음을 확인하였다. Bray-Curtis 거리 기반 β -diversity에서는 샘플 종류 보다 식이 조절 그룹 간 차이를 보다 명확하게 확인할 수 있었다(Fig. S2).

식이 조절 그룹 간 Differential abundance 분석

각 식이 투여 그룹 내에서 샘플 종류에 따라 abundance 차이를 나타내는 genera를 Table 1에 요약했다. Table 1은 식이 종류에 상관없이 맹장에서는 6 종, 분변 샘플에서는 4종의 genera가 높은 abundance를 나타내는 것을 보여준다. 그에 반하여 14종의 genera는 식이 조절에 따라 분변-맹장 간 abundance 차이를 나타냈다. ND 섭취는 맹장에서 Bacteroidaceae에 속하지만 달리 분류되지 않는 미생물의 abundance를 증가시켰으나 HFD 섭취는 분변에서 증가하는 것을 확인하였으며, Duncaniella는 그와 반대로 나타났다. 4종의 genera는 ND그룹의 분변에서만 증가하였으나 HFD 그룹의 분변에서는 증가하지 않았다. 이러한 결과와 대조적으로 HFD 그룹에서만 맹장에서 5종, 분변에서 2종의 genera가 보다 높은 abundance를 나타냈다. Table 2는 각 샘플 종류 내에서 식이 조절에 따라 abundance 차이를 나타내는 genera를 요약하였다. ND 섭취는 10종, HFD 섭취는 7종이 맹장과 분변에서 동일하게 증가했다. 반면, HFD는 Bacteroides를 맹장에서는 감소시키고 분변에서는 증가시켰다. HFD는 맹장에서 2종을 감소시키고, 분변에서 6종의 genera가 증가했다. 마찬가지로, 6종의 genera는 분변 샘플에서만 abundance 차이를 나타냈다.

많은 연구들이 분변과 맹장 샘플로 장내미생물생태를 조사했다. 본 연구에서 ND 또는 HFD를 섭취한 마우스의 분변 및 맹장 샘플을 이용하여 장내미생물생태를 비교했다. 이렇게 두 가지 샘플로부터 얻은 미생물군집은 “장내미생물”로 동일하게 간주됐으며, 이로부터 얻어진 미생물생태 분석 결과는 유사한 것으로 생각되었다. Kozik 등은 분변과 맹장 간 장내미생물이 염증 유도 후에 뚜렷하게 달라지는 것을 밝혔다[24]. 식이 조절에 의해서 abundance가 달라지는 미생물들은 종종 병리학적 특성이 있는 것으로 간주되며[25], 그 중에서도 프로바이오틱스와 SCFA를 생산하는 미생물들이라고 할 수 있다[26].

본 식이 조절에 관한 연구는 HFD를 섭취하는 것이 맹장과 분변에서 미생물 종의 풍부도와 균등도를 모두 낮추는 것을 보여준다[27]. 장내미생물생태의 α -diversity는 식이 종류에 상관없이 분변 샘플과 비교하여 맹장 샘플에서 높은 것을 확인했다. 식이 조절은 예상과 같이 분변과 맹장의 장내미생물생태를 많이 변화시켰다[28]. 그러나, 이러한 장내미생물생태 변화는 분변과 맹장에서 서로 다른 결과를 나타냈으며, 그러한 차이는 숙주 대사 기능에 기여하는 것으로 알려진 일부 중요한 장내미생물 변화를 포함한다[29]. 예를 들어, Bifidobacterium은 HFD 그

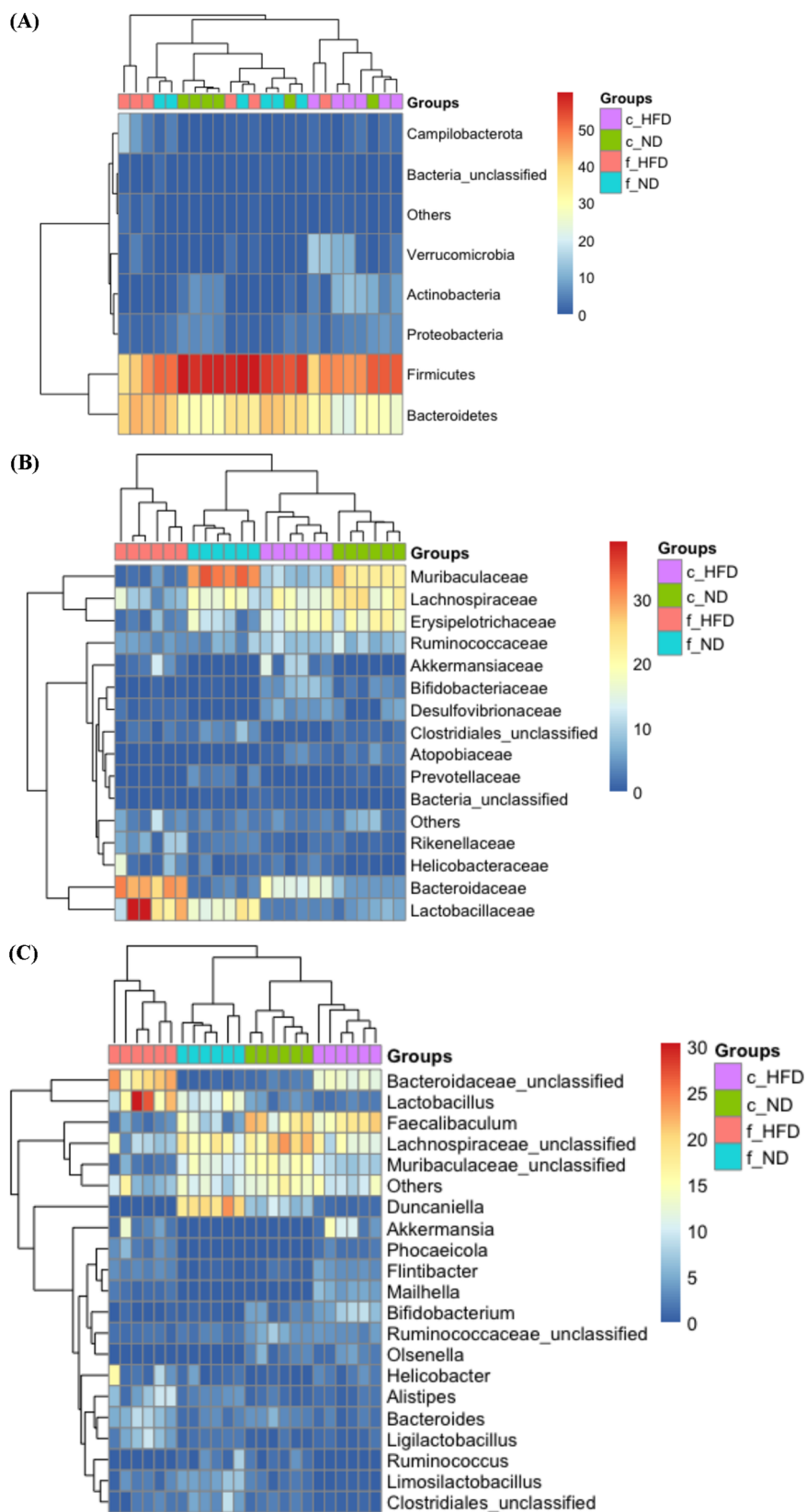


Fig. 2 Bacterial composition analysis at the phylum (A), family (B), and genus levels (C). C_ and f_ indicate cecal and fecal microbiota, respectively, while ND and HFD indicate normal diet and high fat diet, respectively

Table 1 Comparison of differentially abundant genera between cecal and fecal microbiota. Letters, “C”, “F” and “-” indicate higher in the ceca, higher in feces, and not different, respectively. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis was used to detect the differentially abundant genera between cecal and fecal microbiota, that was filtered linear discriminant analysis (LDA) score >3 and *p*-value <0.05

Differentially abundant genera	Animals fed:	
	Normal diet	High fat diet
<i>Bacteroidaceae_unclassified</i>	C	F
<i>Parabacteroides</i>	C	-
<i>Duncaniella</i>	F	C
<i>Helicobacter</i>	F	-
<i>Clostridiales_unclassified</i>	F	-
<i>Parasutterella</i>	F	-
<i>Deltaproteobacteria_unclassified</i>	F	-
<i>Lachnospiraceae_unclassified</i>	-	C
<i>Mailhella</i>	-	C
<i>Acetatifactor</i>	-	C
<i>Clostridium_XIVa</i>	-	C
<i>Dysosmobacter</i>	-	C
<i>Bacteroides</i>	-	F
<i>Anaerotignum</i>	-	F
<i>Faecalibaculum</i>	C	C
<i>Muribaculaceae_unclassified</i>	C	C
<i>Bifidobacterium</i>	C	C
<i>Ruminococcaceae_unclassified</i>	C	C
<i>Olsenella</i>	C	C
<i>Desulfovibrionaceae_unclassified</i>	C	C
<i>Lactobacillus</i>	F	F
<i>Alistipes</i>	F	F
<i>Limosilactobacillus</i>	F	F
<i>Ligilactobacillus</i>	F	F

룹의 맹장 샘플에서만 증가했다. 몇몇 프로바이오틱스와 SCFA 생산 미생물은 분변과 맹장의 미생물생태에서 abundance 차이가 나타나기 때문에 이러한 미생물에 대해 식단조절이 미치는 영향은 다양할 수 있다[30]. 본 연구에서는 *Faecalibacterium*과 *Bifidobacterium*은 맹장 샘플에서 abundance가 높은 반면 *Lactobacillus*와 *Alistipes*는 분변 샘플에 보다 abundance가 높다는 것을 확인했다(Table 1). *Faecalibacterium*은 butyrate를 생성하는 균으로 가장 잘 알려져 있는데 HFD 그룹의 분변에서 감소되었으나, 맹장 미생물생태에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 반면, *Ruminococcus* 및 *Akkermansia*와 같이 잘 알려진 장내미생물들의 abundance는 식이 종류가 다르더라도 분변 및 맹장의 장내미생물생태에서 동일한 경향을 보였다(Table 2). 따라서, 식이 변화는 분변과 맹장의 미생물생태에 동일한 영향을 주지는 않는다는 결론을 내릴 수 있다. 장내미생물생태의 β -diversity 결과에서 식단이 미치는 영향은 샘플 종류의 차이(맹장 및 분변)보다 더 큰 것으로 보인다(Fig. S2). 하지만, 같은 식단을 섭취한 그룹의 분변과 맹장에서도 유의적인 차이가 나기 때문에 샘플 종류에 따른 영향을 배제할 수는 없다(Table

Table 2 Comparison of differentially abundant genera between dietary treatments. Letters, “ND”, “HFD” and “-” indicate higher in normal diet, higher in high fat diet, and no difference between diets, respectively. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis was used to detect the differentially abundant genera between dietary treatments, that was filtered linear discriminant analysis (LDA) score >3 and *p*-value <0.05

Differentially abundant genera	Microbiota in	
	Ceca	Feces
<i>Bacteroides</i>	ND	HFD
<i>Anaerotignum</i>	ND	-
<i>Kineothrix</i>	ND	-
<i>Bifidobacterium</i>	HFD	-
<i>Helicobacter</i>	HFD	-
<i>Acetatifactor</i>	HFD	-
<i>Bacteria_unclassified</i>	HFD	-
<i>Mucispirillum</i>	HFD	-
<i>Dysosmobacter</i>	HFD	-
<i>Faecalibaculum</i>	-	ND
<i>Sutterellaceae_unclassified</i>	-	ND
<i>Deltaproteobacteria_unclassified</i>	-	ND
<i>Ligilactobacillus</i>	-	HFD
<i>Bacteroidales_unclassified</i>	-	HFD
<i>Parabacteroides</i>	-	HFD
<i>Lachnospiraceae_unclassified</i>	ND	ND
<i>Muribaculaceae_unclassified</i>	ND	ND
<i>Duncaniella</i>	ND	ND
<i>Limosilactobacillus</i>	ND	ND
<i>Clostridiales_unclassified</i>	ND	ND
<i>Prevotellaceae_unclassified</i>	ND	ND
<i>Ruminococcus</i>	ND	ND
<i>Paramuribaculum</i>	ND	ND
<i>Parasutterella</i>	ND	ND
<i>Muribaculum</i>	ND	ND
<i>Bacteroidaceae_unclassified</i>	HFD	HFD
<i>Akkermansia</i>	HFD	HFD
<i>Flintibacter</i>	HFD	HFD
<i>Mailhella</i>	HFD	HFD
<i>Phocaicola</i>	HFD	HFD
<i>Clostridium_XVIII</i>	HFD	HFD
<i>Streptococcus</i>	HFD	HFD

S1). 본 연구결과를 종합해보면 미생물생태분석 결과는 식단 및 샘플 종류 모두 고려하여 수행하고, 유의하여 해석되어야 한다.

초 록

비만은 우리 건강에 악영향을 미치며, 비만율은 전 세계적으로 증가하고 있어 그에 따라 비만을 예방하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 최근, 비만과 장내미생물 간의 상관관계가 많이

보고되고 있다. 장내미생물생태를 조사하기 위한 샘플은 분변 또는 맹장을 선택하고 있는데, 샘플 유형(분변 및 맹장)에 따라 미생물생태 결과에 미치는 영향에 대한 일반적인 이해가 없는 실정이다. 본 연구에서 마우스를 고지방 식이 섭취로 비만을 유발하여 식이 조절에 따른 분변 및 맹장의 장내미생물생태를 비교했다. 일반 식단(ND) 및 고지방 식단(HFD)은 6주령 ICR 마우스가 12주 간 섭취하도록 하였으며, 분변 및 맹장 샘플로부터 추출한 DNA에서 16S rRNA 유전자를 증폭하여 MiSeq으로 시퀀싱했다. α -diversity 결과는 식이 조절과 샘플 종류에 따라 장내미생물생태가 크게 영향을 받는다는 것을 보여준다. 분변과 맹장의 장내미생물생태의 taxonomic composition의 차이는 Family, Genus 수준에서 명확하게 확인되었다. Genus 수준에서 *Faecalibaculum*과 *Lactobacillus*는 맹장과 분변 샘플에서 각각 많은 것으로 나타났다. 일반적으로, 식단의 종류는 식이 조절을 적용한 연구 모델에서 샘플의 출처보다 미생물생태 변화에 더 상당한 영향을 미친다. 그러나, 장내미생물생태 분석 결과는 식단과 샘플의 종류(분변/맹장)를 모두 고려하여 신중하게 해석되어야 한다.

Keywords 맹장 · 분변 · 비만 · 장내미생물

감사의 글 이 논문은 2021학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Kong C, Gao R, Yan X, Huang L, Qin H (2019) Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition* 60: 175–184. doi: 10.1016/j.nut.2018.10.002
- Larsen PE, Dai Y (2015) Metabolome of human gut microbiome is predictive of host dysbiosis. *GigaScience* 4: doi: 10.1186/s13742-015-0084-3
- Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E (2017) Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* 17: 219–232. doi: 10.1038/nri.2017.7
- Hughes HK, Rose D, Ashwood P (2018) The gut microbiota and dysbiosis in autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 18: 81. doi: 10.1007/s11910-018-0887-6
- Wang G, Yu Y, Wang YZ, Wang JJ, Guan R, Sun Y, Shi F, Gao J, Fu XL (2019) Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy. *J Cell Physiol* 234: 17023–17049. doi: 10.1002/jcp.28436
- Tilg H, Kaser A (2011) Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The J Clin Invest* 121: 2126–2132. doi: 10.1172/JCI58109
- Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J (2015) How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech* 8: 1–16. doi: 10.1242/dmm.017400
- Uzbay T (2019) Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies. *Curr Opin Pharmacol* 49: 6–10. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.016
- Derakhshani H, Tun HM, Khafipour E (2016) An extended single-index multiplexed 16S rRNA sequencing for microbial community analysis on MiSeq illumina platforms. *J Basic Microbiol* 56: 321–326. doi: 10.1002/jobm.201500420
- Willis C, Desai D, LaRoche J (2019) Influence of 16S rRNA variable region on perceived diversity of marine microbial communities of the Northern North Atlantic. *FEMS Microbiol Lett* 366: fnz152. doi: 10.1093/femsle/fnz152
- Stanley D, Geier MS, Chen H, Hughes RJ, Moore RJ (2015) Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiol* 15. doi: 10.1186/s12866-015-0388-6
- Panasevich MR, Wankhade UD, Chintapalli SV, Shankar K, Rector RS (2018) Cecal versus fecal microbiota in Ossabaw swine and implications for obesity. *Physiol. Genomics* 50: 355–368. doi: 10.1152/physiolgenomics.00110.2017
- Tremaroli V, Bäckhed F (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489: 242–249. doi: 10.1038/nature11552
- Peeters T, Vantrappen G (1975) The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut* 16: 553–558. doi: 10.1136/gut.16.7.553
- Shin J, Lee S, Go M-J, Lee SY, Kim SC, Lee C-H, Cho B-K (2016) Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Sci Rep* 6: 1–10. doi: 10.1038/srep29681
- Kozik AJ, Nakatsu CH, Chun H, Jones-Hall YL (2019) Comparison of the fecal, cecal, and mucus microbiome in male and female mice after TNBS-induced colitis. *PLoS One* 14: e0225079. doi: 10.1371/journal.pone.0225079
- Tanca A, Manghina V, Fraumene C, Palomba A, Abbondio M, Deligios M, Silverman M, Uzzau S (2017) Metaproteogenomics reveals taxonomic and functional changes between cecal and fecal microbiota in mouse. *Front Microbiol* 8: 391. doi: 10.3389/fmicb.2017.00391
- Arora T, Singh S, Sharma RK (2013) Probiotics: interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* 29: 591–596. doi: 10.1016/j.nut.2012.07.017
- Singh V, Muthuramalingam K, Kim YM, Park S, Kim SH, Lee J, Hyun C, Unno T, Cho M (2021) Synbiotic supplementation with prebiotic *Schizophyllum commune* derived β -1,3/1,6)-glucan and probiotic concoction benefits gut microbiota and its associated metabolic activities. *Appl Biol Chem* 64: 1–10. doi: 10.1186/s13765-020-00572-4
- Jeon D, Singh V, Unno T (2021) In vitro investigation of food effects on human gut microbiota. *J Appl Biol Chem* 64: 75–81. doi: 10.3839/jabc.2021.012
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, D'amato M, Bonfiglio F, McDonald D, Gonzalez A, McClure E, Dunklebarger M, Knight R, Jansson J (2017) Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* 2: 17004. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.4
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505: 559–563. doi: 10.1038/nature12820
- McKenzie C, Tan J, Macia L, Mackay CR (2017) The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunol Rev* 278: 277–295. doi: 10.1111/immr.12556
- Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H, Kim D-H (2012) High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway *PLoS One* 7(10): e47713. doi: 10.1371/journal.pone.0047713
- Neyrinck NM, Possemiers S, Verstraete W, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM (2012) Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic

- alterations induced by high-fat diet in mice. *J Nutr Biochem* 23: 51–59. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.10.008
29. Visconti A, Le Roy CI, Rosa F, Rossi N, Martin TC, Mohny RP, Li W, de Rinaldis E, Bell JT, Venter JC (2019) Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nat Commun* 10: 1–10. doi: 10.1038/s41467-019-12476-z
30. Rahim MBHA, Chilloux J, Martinez-Gili L, Neves AL, Myridakis A, Gooderham N, Dumas M-E (2019) Diet-induced metabolic changes of the human gut microbiome: importance of short-chain fatty acids, methylamines and indoles. *Acta Diabetol* 56: 493–500. doi: 10.1007/s00592-019-01312-x