

TECHNICAL NOTE

동애등에 사료 급여가 반려견의 분변내 미생물에 미치는 영향

최인학 · 박관호¹⁾ · 최성업 · 정연우 · 김산²⁾ · 박찬영²⁾ · 정태호*

중부대학교 애완동물자원학전공, ¹⁾농촌진흥청국립농업과학원, ²⁾비알디코리아

Effects of Dietary *Ptecticus tenebrifer* on the Fecal Microbiomes of Bichon Frise

In-Hag Choi, Kwan-Ho Park¹⁾, Sung-Up Choi, Yeon-Woo Jung, San Kim²⁾,
Chan-Yeong Park²⁾, Tae-Ho Chung*

Department of Companion Animal & Animal Resources Science, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

¹⁾National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeongu 55365, Korea

²⁾Microbiome Interaction Laboratory, BRD Korea Institute, Hwaseong 18471, Korea.

Abstract

This study aimed to investigate the effects of dietary *Ptecticus tenebrifer* on the fecal microbiomes of bichon frise. A total of 16 bichon frise dogs (average weight, 2 kg) were randomly allotted to 4 dietary treatments (4 dogs/group): general pet food, two types of domestic pet food containing *Ptecticus tenebrifer*, and one imported pet food containing *Ptecticus tenebrifer*. In the controls, *Firmicutes* accounted for the highest proportion (82%) at the phylum level in the fecal microbiomes. The Tax4Fun2's functional prediction program indicated that the control groups showed a relatively high amount of obesity-related microorganisms; the pathways included three types of carbohydrate metabolism. Among the treatments, *Firmicutes* abundances was the least in the treatments with the two types of domestic pet food containing *Ptecticus tenebrifer*; this did not affect the functional prediction of Tax4Fun2. In conclusion, the two types of domestic feed with *Ptecticus tenebrifer* were healthy and suitable for bichon frise; they could be beneficial in terms of obesity.

Key words : Bichon frise, Obesity, Fecal microbiomes, *Firmicutes*, *Ptecticus tenebrifer*

1. 서론

최근 반려동물의 급격한 증가는 우리 나라 인구고령화와 1인 1가구 중심의 사회구조적 변화 때문이며 이 과정에서 반려동물과 인간사이에는 상호 의존적인 책임감을 부여하여 강력한 유대관계가 형성이 되어 반려동물

은 가족의 구성원으로 인식하게 되었다(Grześkowiak et al., 2015; Choi and Hong, 2020). 또한 2020년 기준으로 반려동물 인구는 약 1400만 명, 반려견은 600만 마리로 조사 보고되어 과거에 비해 증가 추세에 있음을 보여주고 있다(Choi and Hong, 2020). 그러나, 반려동물과 인간의 공존은 여러 장점을 제공한다 할지라도 반려동물인

Received 6 May, 2022; Revised 7 June, 2022;

Accepted 7 June, 2022

*Corresponding author: Tae-Ho Chung, Department of Companion Animal & Animal Resources Science, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

Phone : +82-41-750-6283

E-mail : taehochung@daum.net

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© 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.

개는 식생활에서 탄수화물이 풍부한 사료와 음식으로 인해 비만, 관절염 및 면역체계와 관련된 다양한 질병에 노출되었다. 예를 들면, 비정상적 식이(diets)는 장내 미생물의 변화로 군집 형성에 부정적인 영향을 미치고 대사 산물이 비정상적으로 형성되어 비만과 전신 면역에 변화를 초래한다(Choi et al., 2018). 일반적으로 개는 반려동물로서 건강을 유지하기 위해서는 균형된 에너지 요구량과 안정적인 장내 미생물(gut microbiomes) 변화가 필수적이다. 특히, 장내 미생물은 병원성 미생물 정착을 억제하여 소화와 면역에 중요한 역할을 한다(Swanson et al., 2011). 최근 보고에 의하면, 면역, 소화 등과 관련된 유전자가 곤충에서 발견되어 장내 세균 동정과정을 통해 16S rDNA 서열 기반 메타게놈 방식으로 연구한 결과 아메리카동애 등애(Black soldier fly, *Hermetia illucens*) 소화관에서 유용한 기능을 하는 세균이 함유 되어있다고 하였다(Park et al., 2013; Kim et al., 2014). 특히, 아메리카동애등애 유충은 음식물 쓰레기와 축분을 분해할 수 있는 능력과 동물사료의 식이재료로 사용될 수 있는 이점을 가지고 있다(Surendra et al., 2016). 더욱이 동애등애 종인 *Ptecticus tenebrierfer*로 알려진 유충을 반려견 사료로 만들어 급여하여 분변내 미생물균총에 미치는 영향에 대한 자료와 정보는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 시중에 판매되고 있는 펫푸드 중 곤충원료가 들어가지 않은 일반 펫푸드와 동애등애(*Ptecticus tenebrierfer*) 원료를 사용하여 상용화된 국내산 펫푸드 2종, 그리고 독일산 동애등애 원료 펫푸드를 사용하였다. 이를 국내에서 가장 많이 사육되는 반려견 중 하나인 비송프리지제(Bichon frise)에 급여하여 분변내 미생물균총에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에 이용된 반려견 품종은 평균 체중이 2 kg인 비송프리지제 총 16마리였다. 사양시험은 중부대학교 반려동물학부 부설 행복한강아지연구소에서 실시하였고 중부대학교 동물생명윤리기준에 준거하여 수행하였다. 사료는 오전·오후 하루에 40 g 씩 총 80 g을 급여하였으며 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 항생제는 cephalixin 30 mg/kg, PO, BID로 5일간 투약하여 장내 미생물균총을 제거하였다. 6일차부터 시중에 판매되고 있는 일반 펫푸드

드와 동애등애를 함유한 국내산 2종류의 펫푸드(라포그, 푸디웜과 포리스트/엔토모), 그리고 수입 동애등애 펫푸드인 요세라를 다음과 같이 4처리구로 구분하였다.

Control = 일반 펫푸드(standard diets),

T1 = 동애등애 원료 국내산 펫푸드(domestic insect diets),

T2 = 동애등애 원료 국내산 펫푸드(domestic insect diets),

T3 = 동애등애 원료 수입 펫푸드(import insect diets)

또한, 항생제 처치를 통해 장내 미생물총을 제거한 후 각 처리구 사료에 종합유산균(락토핏, 종근당 건강) 0.2 g을 하루에 두번 3일간 투여하였다. 사양시험 마지막날, 각 처리구로부터 외부 미생물군집의 오염을 방지하기 위해 완벽히 멸균된 장비와 양압 시설에서 적절한 양의 분변을 채취하였으며, 추가 분석을 위해 -80℃의 deep freezer에 보관하였다. 장내 미생물군집 분석을 위해 채취한 견분 0.18 g을 비드튜브로 옮겼으며 게놈 DNA 추출은 QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 수행하였다. 세균 16S rRNA 유전자는 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 표적으로 하는 범용 세균 프라이머세트(341f: cctacgggmgcgwgcag, 805r: gactacnvgggtatctaat)를 사용하여 증폭하였다. 1차 PCR의 모든 오버행 프라이머는 Illumina miseq로 설계되었다. 2차 PCR은 모든 서열에 대한 바코드를 부착한 인덱스 프라이머로 수행하였다(Amplicon PCR, 2013). 차세대 염기서열분석(NGS)은 DNA를 양쪽 끝에서 시퀀싱하는 방법으로 수행하였고 MiSeq(BRDKOREA Corporation, Gyeonggi, South Korea)를 사용하여 시퀀싱 하였다. 차세대 염기서열 분석원데이터는 “DADA2” 패키지로 처리 되었으며 앰플리콘 서열 변이체(ASV)는 R의 pipeline tutorial 1.8을 이용하여 얻었다(Callahan et al., 2016). 또한 박테리아 분류를 지정하기 위해 SILVA v138.1(April, 2022)이 적용되었다(Quast et al., 2012). 추가 분석을 위해 ASV 데이터 매트릭스부터 모든 ASV를 정규화하여 미생물군집 구성을 추정하였고 상대 존재비 값(relative abundance values)은 excel의 피벗기능으로 표시하였다. 마지막으로 alpha-diversity는 R 소프트웨어에서 “vegan” 패키지의 새년

지수(shannon index)를 사용하여 추정하였다. NGS 데이터 베이스를 기반으로 하는 미생물군집의 기능적 잠재력을 연구하기 위해 R 소프트웨어의 “tax4fun2” 패키지를 사용하여 16S rRNA 유전자 서열을 기반으로 특화된 기능 및 기능 중복성을 예측 할 수 있는 Tax4Fun2 프로그램을 이용하였다(Wemheuer et al., 2020). 간단히 말하면, 16S rRNA 분류법과 NCBI 데이터 베이스에 주석이 달린 앰플리콘 서열 데이터 사이에 유사성이 높은 것을 선택하였다. 마지막으로 NCBI에서 선택된 분류로 전체 게놈 서열데이터를 다운로드하고 이 데이터를 KEGG 데이터 베이스에 주석으로 추가하였다. 이 기능 데이터의 시각화는 R 소프트웨어의 “stats”, “gplots” 및 “RColorBrewer” 패키지의 히트맵으로 수행하였으며 계층적 클러스터링 알고리즘은 “Euclidean” 및 “ward.D” 방법으로 분석하였다(Murtah and Legendre, 2014).

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 분변내 미생물의 군집 구성을 문 단위(phylum level, A)와 상위 10% 과 단위(class level, B)를 정리한 결과이다. 4처리구에서의 주요 문은 *Firmicutes*로 분석되었다. *Firmicutes*는 대조구가 82%로 가장 높은 비율을 보여주었다. 동애등에 3 종류의 사료 처리구의 *Firmicutes* 비율은 T1(67%) > T3(65%) > T2 (45%) 순이었다. 특히, 대조구의 *Firmicutes* 비율이 다른 처리구보다 높은 점은 비만(obesity)과의 관련성을 가지고 있다는 점에서 주목할 만하다(Sze and Schloss, 2016). 이 점은 비만과 장내 미생물군에 변화가 연관이 있다는 Ley et al.(2005) 연구에 의해 최초로 입증했다. 예를 들면, 유전자 조작을 통해 만든 비만 쥐에서 비만할수록 장내 미생물군총 중 *Firmicutes*가 증가되고 *Bacteroidetes*가 감소된다고 하였다(Ley et al., 2005). 그리고 동애등에 처리구는 분변내 미생물군총 중 *Firmicutes*이 감소되어 비송의 비만을 감소시키는데 효과적이었으며 T2(forust diets) 처리구가 큰 역할을 하였다. 다른 문 단위의 결과는 다른 처리구보다 T2의 경우 *Bacteroidota*의 비율이 높았다. 그 밖에는 4 처리구 모두 *Proteobacteria*, *Fusobacteriota* 등 다양한 문 단위의 비율을 보여주었다. *Campylobactrota*, *Desulfobacterota*, *Spirochaetota* 및 *Acidobacteriota*의 비율은 4처리구에서 상대적으로

다른 미생물군총에 비해 미미하였다. 4처리구로부터 분변내 미생물군총의 상위 10% 과 단위(class level)는 문 단위의 결과와 비슷한 패턴이었으며 *Clostridia*가 높은 비율을 차지하였다. 대조군의 *Clostridia* 비율은 64%, T1의 경우 63%, T2에서는 45%, 마지막으로 T3은 53%로 나타났다. 특히 이 부분은 최근 연구보고에 의해 그 가능성을 간접적으로 확인할 수 있다(Hsiao et al., 2013). Hsiao et al.(2013) 연구에 의하면 정상적인 쥐보다 사람의 자폐증의 유형을 보여주는 쥐에게서 *Clostridia*와 *Bacteroidia* 두 박테리아 비율이 높아 항염증제 성분이 함유된 미생물(*Bacteroides fragilis*)을 투여하면 이 두 박테리아 수도 정상쥐의 수준으로 감소되며 자폐증 증상도 완화된다고 하였다. 대조구와 비교할 때 3처리구에서 *Clostridia* 비율 감소는 동애등에에 함유된 성분이 이 군 총에 영향을 준 것으로 보인다. 그 다음은 *Bacteroidia*, *Gammaproteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacilli* 등 다양한 과 단위의 미생물군총을 나타내었다. *Negativicutes*, *Campylobacteria*, *Desulfobacterota*가 4처리구 모두 상대적으로 낮은 비율이었다. 장내 바실리균(*Bacilli*)들은 일반적으로 장 건강을 보호하는 좋은 기능을 한다고 알려져 있다(Ilinskaya et al., 2017). 본 연구에서는 3처리구보다 대조구의 결과가 높아 이 차이는 장내와 분변내 미생물군총의 변화 즉 선택성으로 보여진다.

Fig. 2는 처리구 별 분변내 미생물군집의 Shannon 지표(A)와 *Bifidobacterium*(B) 비율을 나타내었다. Shannon 지표는 미생물 생태에 대한 다양성과 풍부도 조사를 위해 사용하는 유용한 도구로서 대조구가 가장 낮은 지표를 보였다. 동애등에 사료를 급여한 3처리구를 비교하면 Shannon 지표는 T3(4.7) > T2(3.9) > T1(3.5) 순으로 곤충급여 사료가 장내 미생물군총과 분변내 미생물군총의 다양성을 풍부하게 하는데 도움을 줄 수 있음을 알 수 있다. 추가적으로 항암효과, 설사방지, 염증성장질환억제, 노화억제, 비만치료 그리고 건강한 장내 미생물군에서 풍부한 미생물은 *Bifidobacterium*, *Akkermansiamuciniphila* 등으로 알려져 있다(Ishinashi and Shimamura, 1993; Everard et al., 2013). 이 중 *Bifidobacterium*는 T2 > T1 > T3 순으로 나타났으며, 일반 견사료를 급여한 대조구에는 존재하지 않았다. 특히, *Bifidobacterium* 역할은 장내에서 lactic acid와 acetic acid를 분비하여 장내

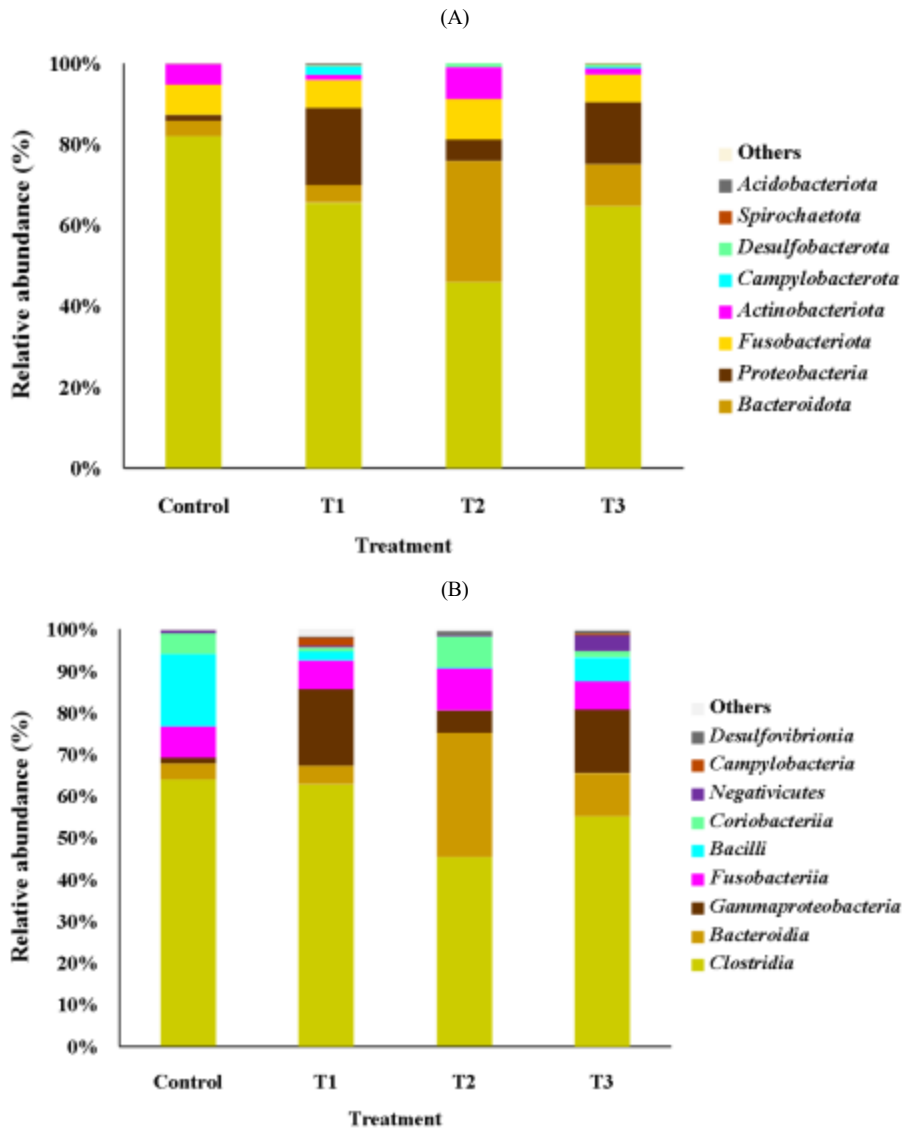


Fig. 1. Microbial taxonomic profiles from the dog stool of the four dietary treatments at the relative abundance (A) phylum levels and (B) with top 10% of class level. Treatment means Control = standard diets, T1 = domestic insect diets, T2 = domestic insect diets, and T3 = import insect diets.

병원성 유해균의 생육을 억제하는 것이 특징이다. 따라서 장내에서 유산균과 동애등에 함유된 혼합물질을 *Bifido-bacterium*이 더 많이 이용했기 때문에 분변내에서 그대로 나타났고 T2 처리구에서 두드러진 결과를 보여주었다.

Tax4Fun2 프로그램의 기능적 예측(A)과 KEGG 경로에 대한 결과는 Fig. 3에 제시하였다. 흥미롭게도 히트맵 스케일(heatmap scale)로 보면 T1과 T3 처리구는 함께 무리를 이루고 있고 T2는 단독으로 분리되는 모습을 보였다(Fig. 3A). 다시 말하면, T1과 T3 처리구는

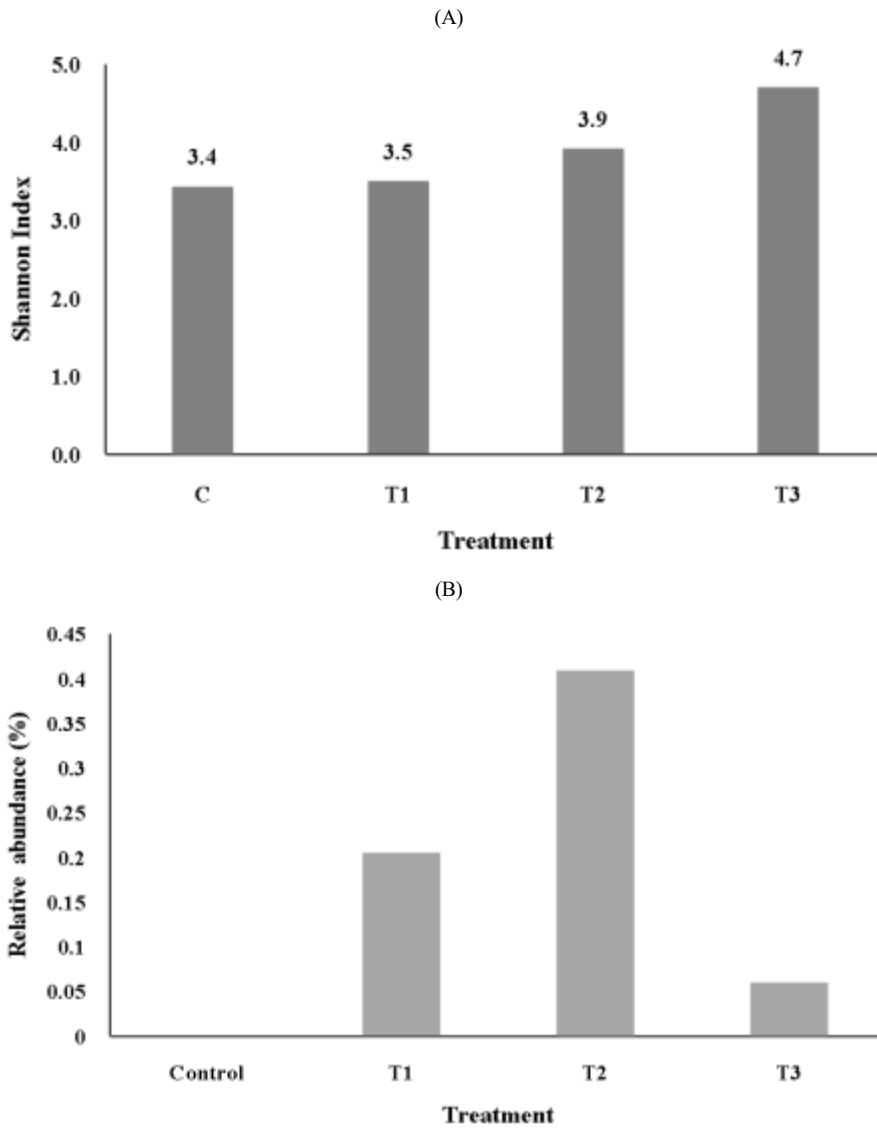


Fig. 2. Shannon index (A) and *Bifidobacterium* (B) for the dog stools of the four dietary treatments. Treatment means Control = standard diets, T1 = domestic insect diets, T2 = domestic insect diets, and T3 = import insect diets.

기능적 예측이 유사한 경향을 가지고 있으며 T2 처리구는 대조구보다 독립적인 패턴을 갖고 있음을 의미한다. 그러나 대조구는 미생물군집에 관계없이 다른 처리구보다 red box 경로 목록의 높은 값을 나타내었다. 이 경로는 3가지 유형의 탄수화물 대사를 포함하고 있는데(Fig.

3B), 대조구는 처리구 샘플보다 비만 관련 미생물과 박테리아양이 상대적으로 많았음을 보여준다. 마찬가지로 이러한 결과는 분변내 미생물의 군집구성을 문 단위(phylum level)로 조성한 자료인 Fig. 1A와 일치한다.

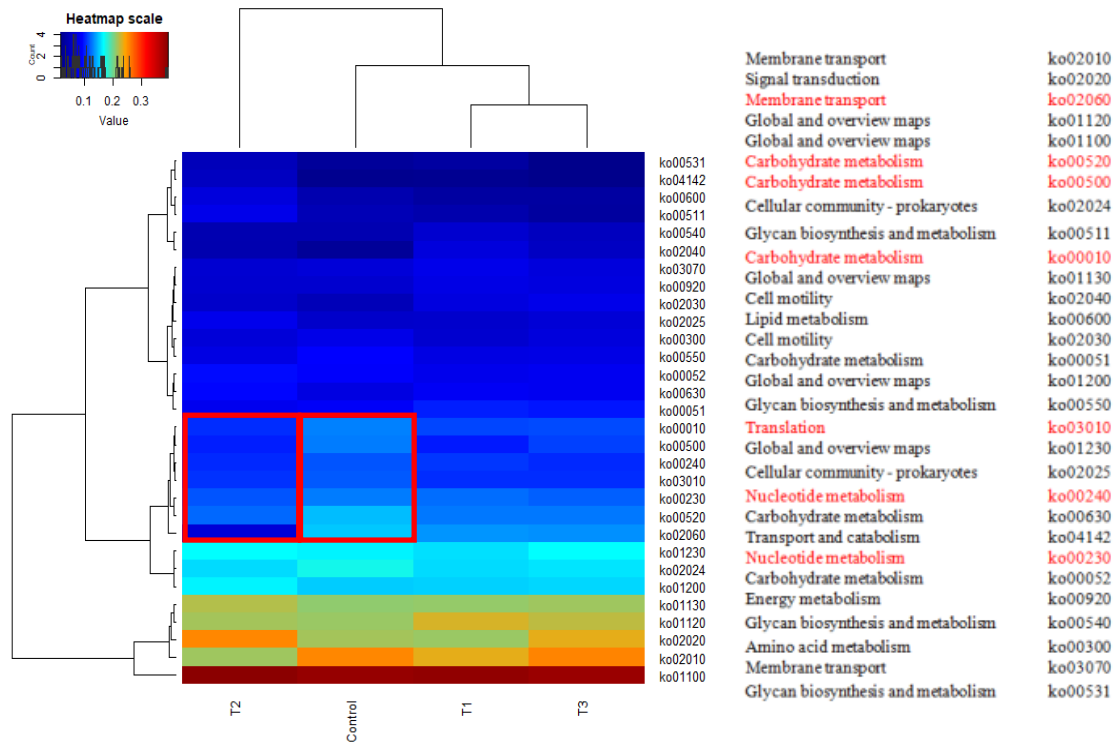


Fig. 3. Functional prediction of Tax4Fun2 program is represented with heatmap scale (A). KEGG pathway number and labels were represented as a table (B) and red letters indicate red square characters of (A). Treatment means Control = standard diets, T1 = domestic insect diets, T2 = domestic insect diets, and T3 = import insect diets.

4. 결론

본 연구에서는 일반 펫푸드와 2종류의 국내산 동애등에 원료 펫푸드, 그리고 1종류의 수입산 동애등에 원료 펫푸드를 사용하였고, 이를 반려견으로 가장 많이 사육되는 중 비송프리제에 급여하여 분변내 미생물군총에 미치는 영향을 조사하였다. 대조구는 분변내 미생물군총의 문 단위(phylum level) 미생물 중 *Firmicutes*가 82%로 가장 높은 비율을 차지하였다. Tax4Fun2의 기능적 예측 프로그램 결과에서도 대조구는 경로가 3가지 유형의 탄수화물 대사를 포함하고 있어 비만 관련 미생물양이 상대적으로 많이 나타났다. 모든 처리구 중 국내산 동애등에 사료 처리구는 *Firmicutes*가 45%로 가장 낮은 결과를 보여주었고 Tax4Fun2의 기능적 예측 프로그램 결과에서는 영향을 주지 않았다. 결론적으로 국내산 2종 사료의 비송프리제에 급여는 비만에 좋은 효과가 기대되는

건강식 펫푸드로 평가할 수 있다. 특히 기존 마이크로바이옴 연구결과에서는 장내 미생물군총 중 이른바 비만균으로 분류되는 유해한 세균들의 경우 단백질을 에너지원으로 선호하는 것으로 보고되었다. 이는 기존 마이크로바이옴 연구결과에 근거하면, 비피더스, 락토바실러스 등으로 대표되는 장내 유익균들은 당을 주요 에너지원으로 사용된다. 이번 연구에서 대체로 유익균의 정착에 더 좋은 효과를 보인 2종의 국내산 동애등에 원료 사료는 단백질의 소화 흡수율이 높아 단백질 성분이 장관내에 머무르는 시간이 짧다. 따라서 단백질을 에너지원으로 선호하는 유해균보다 당을 에너지원으로 사용하는 유익균이 우세균종으로 자리 잡을 수 있도록 도와주는 기전으로 작용한 것으로 사료된다. 국내산 2종의 동애등에 원료 펫푸드는 대조군으로 투여된 수입산 곤충사료나 일반 사료에 비교하여 유익균의 초기 정착에 도움을 주는

결과를 보였으며, 이는 국내산 동애등에 원료 사료들이 대체로 단백질 흡수율이 우수하다는 기존 연구결과와도 일치하며 추가적인 기전 연구의 필요성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청연구사업(동애등에의 동물사료 최적화 접목기술개발: PJ015818032021)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Amplicon PCR., 2013, 16s metagenomic sequencing library preparation." Illumina: San Diego, CA, USA.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., Holmes, S. P., 2016, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data., *Nat. methods.*, 13, 581-583.
- Choi, J., Lee, S., Won, J., Jin, Y., Hong, Y., Hur, T. Y., Kim, J. H., Lee, S. R., Hong, Y., 2018, Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model, *PLoS One.*, 13, e0192925.
- Choi, J. H., Hong, Y. G., 2020, The comprehension of composition, diversity, related diseases, and treatment of the gut microbiome in companion dogs: friend or foe?, *J. Life Sci.*, 30, 1021-1032.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., Cani, P. D., 2013, Cross-talk between *Akkermansiamuciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, *Proc Natl AcadSci USA.*, 110, 9066-9071.
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., 2015, Microbiota and probiotics in canine and feline welfare, *Anaerobe.*, 34, 14-23.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., Patterson, P. H., Mazmanian, S. K., 2013, Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders, *Cell.*, 155, 1451-1463.
- Ilinkaya, O. N., Ulyanova, V. V., Yarullina, D. R., Gataullin, I. G., 2017, Secretome of intestinal *Bacilli*: a natural guard against pathologies, *Front. Microbiol.*, 8, 1666.
- Ishinashi, N., Shimamura, S., 1993, Bifidobacteria: Research and development in Japan, *Food Technol.*, 6, 126-129.
- Kim, E. S., Park, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y. G., 2014, Identification and physiological characters of intestinal bacteria of the black soldier fly, *Hermetia illucens*, *Korean J. Appl. Entomol.*, 53, 15-26.
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I., 2005, Obesity alters gut microbial ecology, *Proc Natl AcadSci.*, 102, 11070-11075.
- Murtagh, F., Legendre, P., 2014, Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion?, *J. Classif.*, 31, 274-295.
- Park, J., Lee, S., Lee, H., Kim, Y., 2013, Effect of stress sound on the development of the black soldier fly, *Hermetia illucens*, *Korean J. Appl. Entomol.*, 52, 227-237.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O., 2012, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic acids Res.*, 41, D590-D596.
- Sze, M. A., Schloss, P. D., 2016, Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome, *MBio.*, 7, e01018-16.
- Surendra, K. C., Olivier, R., Tomberlin, J. K., Jha, R., Khanal, S. K., 2016, Bioconversion of organic wastes into biodiesel and animal feed via insect farming, *Renew. Energy.*, 98, 197-202.
- Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Cann, I. K. O., White, B. A., Fahey, G. C., 2011, Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice, *IMSE J.*, 5, 639-649.
- Wemheuer, F., Taylor, J. A., Daniel, R., Johnston, E., Meinicke, P., Thomas, T., Wemheuer, B., 2020, Tax4Fun2: prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences, *Environ. Microbiomes.*, 15, 1-12.

-
- Professor. In-Hag Choi
Department of Companion Animal & Animal Resources
Science, Joongbu University
wicw@chol.com
 - Dr. Kwan-Ho Park
National Institute of Agricultural Science, Rural
Development Administration
nicegano@korea.kr
 - Professor. Sung-Up Choi
Department of Companion Animal & Animal Resources
Science, Joongbu University
pxcho@gmail.com
 - Professor. Yeon-Woo Jung
Department of Companion Animal & Animal Resources
Science, Joongbu University
doctorjl@naver.com

-
- Research Director. San Kim
Microbiome interaction laboratory, BRD Korea Institute
sankim@brdc.biz
 - Researcher. Chan-Yeong Park
Microbiome interaction laboratory, BRD Korea Institute
cyscientist@naver.com
 - Professor. Tae-Ho Chung
Department of Companion Animal & Animal Resources
Science, Joongbu University
taehochung@daum.net