

발효 미역부산물이 반추위 발효특성에 미치는 영향

홍중산¹ · 이홍구^{2*} · 이철호³ · 김영성² · 이상범² · 강한석² · 최윤재³

¹천진농학원 동물자원과학과, ²부산대학교 동물생명자원과학과, ³서울대학교 농생명공학부

Effect of Fermented Brown Seaweed Waste (FBSW) on *in vitro* Rumen Microbial Fermentation

Zhong-Shan Hong¹, Hong-Gu Lee^{2*}, Zhe-Hu Lee³, Yong-Cheng Jin³, Sang-Bum Lee², Han-Suck Kang² and Yun-Jaie Choi³

¹Department of Animal science & Technology, Tianjin Agricultural University, China

²Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang, Gyeong-nam 627-706, Korea,

³Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Gwanak-gu, Seoul 151-921, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of brown seaweed waste (BSW) fermented with DS-01 microbe on *in vitro* rumen microbial fermentation. In *in vitro* trial, three different diets supplemented with 2%, 4%, 6% BSW fermented with DS-01 either for one month or two months was tested at 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, and 24 h incubation. The chemical composition (CP, EE, CF, and ash) between brown seaweed waste (BSW) and fermented BSW (FBSW) were not different. The contamination of pathogenic microbes was not detected in FBSW. The pH value tended to be higher with 6% level of supplementation of FBSW for one month than other treatments. The pH at 24 h was significantly higher in FBSW than that of treatments without FBSW ($p < 0.05$). In FBSW for two months, the pH value in 6% FBSW at 3 h *in vitro* fermentation tended to be higher than 2% or 4% FBSW treatments ($p = 0.0540$), but there were no differences in other fermentation times. Although the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ of BSW fermented for one month was higher than control at 3 h ($p < 0.05$), the volatile fatty acid values were significantly increased in 4 and 6% FBSW fermented for one month at 6 h incubation ($p < 0.05$). In BSW fermented for two months, the volatile fatty acid values were significantly decreased in 6% treatment at 9 h ($p < 0.05$). As a result of *in vitro* trial, it was recommended that the 2~4% supplementation level of brown seaweed waste fermented with DS-01 microbe for two months could be utilized for *in vivo* trial in ruminants.

(Key words) : Fermented brown seaweed waste, *In vitro*, pH, $\text{NH}_3\text{-N}$

서 론

미역은 대표적인 갈조류로서 다당류인 알긴산이 풍부하여 콜레스테롤의 흡수를 억제(Keys 등, 1961; Tsuji 등, 1968, 1977; Kimura 등, 1996)하고 중금속을 흡착하여 배출시키며 동맥경화를 예방하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 아울러 미역중의 산성 수용성다당류인 Fucooidan은 Thrombin과 Factor Xa, u-PA (plasminogen activator)와 t-PA의 생성을 증가시켜 항 혈액응고 작용(Nishino 등, 1999, 2000), 항종양 및 항암활성(Yamamoto 등, 1984; Zhuang 등, 1995), 항산화효과(Allen 등, 2001)가 있음이 확인되었다. 아울러 미역 중에 다량 함유된 다당류의 일종인 alginates는 효소에 의해 분해되면 alginate oligomer가 되는데 이것은 면역세포에서의 cytokine 분비 증가(Iwamoto 등, 2002)와

아연의 bioavailability를 개선시킴(Yonekura and Suzuki, 2003)으로 체내 면역시스템 활성화에도 직·간접적으로 기여하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 이유로 미역은 산모에 있어서 산후조리 식품으로 널리 이용되고 있음은 물론 미역 양식 및 가공 부산물에 대한 가축의 사료로의 이용에 대한 연구 또한 꾸준히 진행 되어왔다. Lee 등(2005)과 Back 등(2004)의 젖소를 이용한 연구에서 건조 미역부산물을 일일 800 g 첨가 시 건물섭취량에는 영향을 미치지 않았으나 유생산량의 증가 및 비유관련 호르몬의 분비 개선을 가져 오는 결과를 보이는 등 젖소에 이용함에 있어서도 비유능력을 개선시키는 좋은 사료 자원이라는 것이 확인된 바 있다. 하지만 양식 및 가공 미역부산물을 사료로 이용하기 위해서는 건조 후 분말형태로 제조해야 하는데 이 경우 미역 채취시기가 2~4월에 집중되어 있기 때문에 일시에 많은 양을 건조 할 수 있는 시설이 필요하며,

* Corresponding author : Hong-Gu Lee, Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang, Gyeong-nam 627-706, Korea. Tel: 055-350-5516, E-mail: hglee66@pusan.ac.kr

생초 형태로 저장한다 하더라도 저장에 필요한 냉장시설과 전기로 등으로 인한 생산원가의 상승이 불가피한 실정이다. 아울러 생초의 저장성을 높이기 위하여 염장을 하는데 이 경우 염분의 다량함유로 인한 기호성 감소 등의 문제로 좋은 부존사료자원임에도 불구하고 가축의 사료로의 이용성이 적은 실정이다. Ahn 등(2004)은 DS-02 균 배양액 5%를 미역에 혼합해 밀봉하여 30℃, 상대습도 80%에서 1년 이상 부패 없이 미역을 저장할 수 있으며, 저장과정 중에 미역중의 알긴산염이 DS-02균 효소에 의해 저분자화 되어 12주 후 알긴산염 분자량이 처음 분자량의 약 1/10로 감소함을 보였다는 보고를 하였다. 따라서 본 연구는 Ahn 등(2004)이 보고한 알긴산 분해 능력이 뛰어난 DS-02와 동일 유래 DS-01 균주를 이용하여 미역을 저 분자화 함으로써 부패를 막고 저장기간 연장, 영양소의 손실여부, 안전성을 확인하고 최적 발효조건을 설정하여 발효 단계별 시료를 이용한 반추위 발효성상에 미치는 영향을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험 1. DS-01 균주를 이용한 미역부산물의 저장 방법 개발 및 사료화에 관한 연구

(1) DS-01 균주의 배양

DS-01균은 Ahn 등(2004)이 선행연구를 통하여 보고한 남해안 미역 양식장 해저에서 분리 동정된 알긴산 분해력이 탁월한 균주으로써 DS-02와 유사한 gamma proteobacterium group에 속한다. DS-01 균주는 항온교반기(SI-600R, Lab.companion. KOREA)를 이용하여 30℃, 150 rpm으로 회전 진탕하면서 배양하였으며 배양에 사용된 배지조성은 Table 1과 같다.

(2) 미역의 DS-01균에 의한 발효시험

발효기간은 14일, 30일, 60일로 하고 대조구는 배양액만을 접종하였으며 처리 1, 처리 2, 처리 3은 각각 5×10⁷ cfu/g, 1×10⁸ cfu/g, 2×10⁸ cfu/g 수준으로 DS-01를 접종하였으며 조사간격은 각각 0, 14, 30, 60일로 하였고 처리별 반복수는 4반복으로 하였다. 발효미역은 가공 미역부산물을 비닐백에 DS-01균 배양액과 함께 넣은 후 공기를 완전 제거하고 밀봉한 상태로 39℃ 배양기에서

Table 1. Composition of DS-01 medium (1L)

| Items | Volume |
|-----------------|--------|
| Distilled water | 250 ml |
| Sea water | 750 ml |
| Peptone | 5 g |
| Yest extract | 1 g |
| Agar* | 15 g |

* Supplemented as required to cultivate on semisolid medium.

발효시켰다.

분석항목은 발효기간에 따른 미역의 particle size의 변화(저분자화), 영양소 함량의 변화(DM, CP, EE, CF 등), 미생물 오염도(대장균수, 총 세균수, 병원성 미생물) 등을 분석하였다. 발효미역 부산물의 입자도 검사는 2.8 mm 체를 이용하여 통과하지 않고 남은 미역부산물 입자의 비율을 측정하였다.

시험 2. 발효미역부산물이 반추위 발효성상에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 시험설계

시험설계는 단계별로 발효시킨(Table 3) 발효미역부산물을 수준별로 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효성상을 조사하였다. 발효미역의

Table 2. Chemical composition of experimental diets (%)

| Items | Diets | |
|-------------------------|-------------|-------------|
| | Concentrate | Tall fescue |
| Chemical composition, % | | |
| Crude protein | 19.00 | 14.21 |
| Crude fat | 3.00 | 3.47 |
| Crude fiber | 20.00 | 26.16 |
| Crude ash | 15.00 | 6.24 |
| Ca | 0.80 | 0.14 |
| P | 0.50 | 0.02 |
| TDN ¹⁾ | 72.50 | 51.00 |

¹⁾ TDN: Total digestible nutrient.

Table 3. Effect of different concentration DS-01 supplementation in degradation of BSW after 14, 30, and 60 days¹⁾

| Degradation (%) ²⁾ | Control | | | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | Treat 1 | Treat 2 | Treat 3 | |
| Day 14 | 55.25 ^b | 69.55 ^a | 55.79 ^b | 66.70 ^{ab} |
| Day 30 | 54.49 ^d | 78.49 ^b | 67.75 ^c | 82.89 ^a |
| Day 60 | 91.89 ^b | 94.85 ^{ab} | 96.34 ^a | 97.09 ^a |

¹⁾ All values represent the mean of 6 samples;

²⁾ (Total particle-2.8 mm passed particles)/total particle×100

Control: culture media

Treat 1: 5 × 10⁷ cfu/g, DS-01

Treat 2: 1 × 10⁸ cfu/g, DS-01

Treat 3: 2 × 10⁸ cfu/g, DS-01

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

처리하는 대조구(0%), 2%, 4%, 6% FBSW 첨가 수준으로 하였으며, 기초사료는 착유우 용 배합사료(Table 2)와 건초를 각각 50:50의 비율로 혼합하여 배양기질로 이용하였다.

(2) Rumen inoculum의 준비와 배양방법

배양에 사용된 rumen inoculum은 반추위 피스톨라가 장착된 Holstein cow로부터 얻어 시험실로 운반하였다. 39°C로 유지한 보온병에 보관하여 온도를 일정하게 유지하였으며, 운반 즉시 반추위 내용물은 사료입자를 제거하기 위해 4겹 cheesecloth에 여과하였고 항온수조에 39°C로 유지하여 보관하였다. 여과된 반추위내용물은 CO₂로 bubbling한 rumen buffer 용액과 1:1로 혼합하여 이를 rumen inoculum으로 사용하였다. Rumen buffer 용액은 McDougal's buffer를 사용하였다. 기질 0.25 g을 120 ml serum bottle에 넣고 혐기상태에서 rumen inoculum 25 ml을 주입하고 bottle은 butyl-rubber stopper와 aluminum cap으로 막은 후 39°C로 설정된 항온교반기(SI-600R, Lab.companion. KOREA)에서 120 rpm으로 교반하면서 배양하였으며 배양시간은 3, 6, 9, 12, 24시간으로 하였다. 각 배양시간 경과 후 각 배양병의 배양액을 시료로 채취하고 rumen parameter인 pH, 암모니아태 질소농도 및 휘발성지방산농도를 분석하여 미역부산물의 반추위 내 발효성상을 평가하였다.

(3) 분석방법

시험에 이용된 기초사료 및 미역부산물의 영양성분은 AOAC (1995)의 방법에 따라 건물, 조단백질, 에테르추출물, 조회분, 칼슘 및 인 함량을 분석하였으며, ADF (acid detergent fiber)와 NDF (neutral detergent fiber)는 Van Soest 등(1991)의 방법에 따라 분석하였다. 미생물 오염도(대장균수, 총 세균수, 병원성 미생물)의 분석은 서울대학교 수의과대학 미생물학 실험실에 의뢰하여 분석하였다. 간단히 설명하면, 총 세균수는 샘플을 BPW (buffered peptone water)에 10⁻⁴까지 10진 희석하고 각 희석액을 3세트씩 petri dish에 1 ml 씩 분주 한 다음 준비해 놓은 plate count agar를 분주하여 충분히 균화 후 35°C에서 2일간 배양하였다. 그 후 각 petri dish의 colony를 파악하여 평균을 낸 뒤 희석배수를 감안하여 CFU/ml를 계산하였다. 대장균수는 최확수법(Most Probable Number)으로 수행하였다. 샘플을 BPW에 10진 희석하고 추가로 3번 더 10진 희석한 뒤, Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)에 35°C에서 하루 배양하고 가스가 생성된 샘플을 선택해 EC-MUG (4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)에 접종하였다. 그 후 44.5°C에서 하루 더 배양한 뒤, UV를 조사하여 형광이 관찰되면 이를 대장균으로 판정하였다. 각 배지에서 대장균 판정된 콜로니 숫자를 파악하고 MPN index (http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_Appendix_2_03.pdf)를 참고하여 CFU/ml를 추정하였다. 각 병원성 균의 분리 및 동정은 다음과 같다. *E. coli* O157:H7는 Cho 등 (2004), *Salmonella* spp.는 Kwon 등 (2000),

Listeria spp.와 *Staphylococcus* spp.는 Her 등(2004), *Enterococcus* spp.는 Cho 등(2003), *Campylobacter* spp.는 Bae 등 (2005), *Clostridium* spp.는 Yoo 등(1997)의 방법으로 분석하였다. *In vitro* 실험에서 얻어진 각 배양물은 pH meter (inoLab pH Level1, Germany)를 사용하여 pH를 측정 후 Ammonia-N 측정용은 배양물을 4°C에서 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 -20°C에 보관하여 사용하였으며 VFA (volatile fatty acid) 분석용은 배양물에 25% HPO₃을 4:1의 비율로 첨가하여 4°C에서 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 -72°C에 보관하여 사용하였다. Ammonia-N의 분석은 Chaney and Marbach (1962)의 방법에 따라 phenol과 alkali를 동량으로 발색시킨 후 spectrophotometer (Optizen 1142H, MECASYS CO., LTD, KOREA)를 이용하여 파장 630 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 휘발성지방산(VFA)은 Erwin 등(1961)의 방법에 따라 gas chromatography (VARIAN CP-3800)에 주입하여 분석하였다. 휘발성지방산분석에 사용된 column은 fused silica capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.5 μm film thickness, HP Innowax)이었고, detector는 FID (flame ionization detector)이었다.

(4) 통계분석

본 시험에 얻어진 결과는 SAS package program (2000, release. 8.1 version)의 GLM (general linear model) procedure를 이용하여 실시하였으며, Duncan 다중검정에 의해 처리구간의 유의성 (p<0.05)을 검증하였다(Steel and Torrie, 1980).

결과 및 고찰

시험 1. DS-01균주를 이용한 미역부산물의 저장 방법 개발 및 사료화에 관한 연구

Table 3는 DS-01 균주의 접종량과 발효 기간에 따른 DS-01 균주에 의한 미역부산물의 분해 정도를 알고자 발효미역부산물을 2.8 mm 체를 이용하여 통과하지 않고 남은 미역부산물 입자의 비율을 측정하여 얻어진 결과이다. Table 3에서 나타난 것과 같이 미역부산물에 DS-01 균주를 처리한 처리구 모두에서 대조구에 비하여 분해 정도가 14일 이후부터 차이를 보였으며, 특히 2 × 10⁸ cfu/g의 균주를 첨가한 처리 3에서 대조구에 비하여 발효 30일에 통계적으로 높은 분해력을 보였다 (p<0.05). 아울러 처리 3의 발효기간별 영양소 변화량을 조사한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 결과를 보면 발효가 진행됨에 따라 단백질 함량은 낮아졌으나, 미네랄 중 Ca와 P의 함량은 감소되지 않았다. 또한 미생물 감염여부를 조사한 Table 5의 결과에는 DS-01 첨가구에서 세균수가 대조구에 비하여 크게 감소되었다. 대조구에서 세균수가 10만 이상 검출된 것은 유입된 잡균의 증식됨으로 나타난 결과라 사료되나, DS-01 처리구에서 10만개/ml 이하 검출된 것은 DS-01 균주가 잡균의 유

Table 4. Change in chemical composition of the BSW in treat 3 during the fermentation periods

| Items | Day 0 | Day 30 | Day 60 |
|---|-------|--------|--------|
| Chemical composition ¹⁾ (% , DM basis) | | | |
| Crude protein | 11.45 | 10.40 | 8.46 |
| Acid detergent fiber | 12.62 | 12.45 | 12.60 |
| Neutral detergent fiber | 21.33 | 23.36 | 25.56 |
| Non-fibrous carbohydrate ²⁾ | 27.57 | 26.22 | 28.55 |
| Ether extract | 1.62 | 1.45 | 1.54 |
| Crude ash | 38.03 | 38.23 | 35.71 |
| Ca | 0.95 | 0.87 | 0.95 |
| P | 0.48 | 0.54 | 0.46 |

¹⁾ All values represent the mean of triplicates;
²⁾ Value calculated as follows: 100 - (crude protein + neutral detergent fiber + ether extract + crude ash).

입을 막고 있음을 간접적으로 시사하고 있다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 DS-01 균주는 미역부산물의 저분자화에 탁월한 효과가 있으며 아울러 부패세균의 증식을 억제함으로써 부패를 막는데 효과가 있음이 확인되었다.

시험 2. 발효미역부산물이 반추위 발효성상에 미치는 영향에 관한 연구

착유우용 사료와 조사료를 1:1로 배합한 기초사료에 단계별 미생물분해 미역부산물을 *in vitro* 배양장치에 수준별 (0, 2, 4, 6%)로 첨가했을 때 반추위 내 발효특성을 조사하여 반추동물에 대한 미생물 분해산물의 영양적 가치를 평가하였다.

(1) 반추위 내 pH에 대한 영향

반추위 pH에 대한 영향은 Table 6에서 나타난 바와 같다. 발효 1개월의 경우 발효 9시간 경과 후 6% FBSW 첨가구가 타 처리구에 비하여 높은 pH를 나타내는 경향이 있었으며 발효 24시간 경과 후 모든 발효미역부산물 첨가구가 대조구의 6.33 보다 높은 pH를 나타냈다 ($p < 0.05$). 발효 2개월의 경우 발효 3시간 경과 후 6% FBSW 첨가구가 6.92로 대조구와 2%, 4% BSW 첨가구보다 높은 경향($p = 0.0540$)을 나타내었으며 발효 9시간 경과 후 대조구가 6.51, 2% FBSW 6.50, 4% FBSW 6.47, 6% FBSW 6.50으로 대체로 비슷한 결과를 나타낸 것 외에 발효 6, 12, 24시간 경과 후는 미역부산물 첨가구가 대조구보다 높게 나타났다. Back 등 (2004)이 미역부산물 첨가가 *in vitro* 발효성상에 미치는 영향을 조사한 시험에서 배양기질을 완전혼합사료 (total mixed ration)와 착유우용 배합사료를 7:3으로 투여 하였을 때 곡류사료의 비중이 높아 pH의 급격한 저하현상을 보였으나 본 시험에서는 pH의 변화가 비교적 완만하였는데 이는 배양기질이 짓소용 농후사료와 톨페스큐의 비율이 50:50으로 하였기에 나타난 결과로 사료 된다. Piya 등(2001)이 본 시험과 동일한 방법으로 유카 추출물 첨가가 *in vitro* 반추위 미생물 발효에 미치는 영향을 조사한 시험에서 옥수수 및 볏짚을 기질로 하였을 때 pH 변화 양상이 본 시험과 유사하

Table 5. Effect of DS-01 supplementation in BSW on microbial contamination after 60 days

| Treatment | <i>E. coli</i> CFU/ml | Total bacteria CFU/ml | <i>E. coli</i> O157:H7 | Sal. | Stap. | L. | Entero. | Camp. | Cl. |
|-----------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|------|-------|----|---------|-------|-----|
| Control | ND | 1.0E+08 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ND | 1.2E+08 | - | - | - | - | + | - | - |
| Treat 1 | ND | 1.3E+07 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ND | 1.8E+06 | - | - | - | - | + | - | - |
| Treat 2 | ND | 3.7E+06 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ND | 6.4E+05 | - | - | - | - | + | - | - |
| Treat 3 | ND | 2.1E+04 | - | - | - | - | + | - | - |
| | ND | 3.9E+05 | - | - | - | - | - | - | - |

ND : non-detection, +: detection, - :non-detection
 Sal.: salmonella, Stap.: staphylococcus, L.: listeria, Entero.: enterococcus, Camp.: camphlobacter, Cl.: clostridium.
 Control: culture media
 Treat 1: 5×10^7 cfu/g, DS-01
 Treat 2: 1×10^8 cfu/g, DS-01
 Treat 3: 2×10^8 cfu/g, DS-01

Table 6. Effects of dietary supplementation fermented BSW on *in vitro* pH

| Incubation time(h) | Treatments ¹⁾ | | | | SEM ²⁾ | p value |
|--------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
| | Control | 2% FBSW | 4% FBSW | 6% FBSW | | |
| 1 month | | | | | | |
| pH | | | | | | |
| 3 | 6.93 | 6.92 | 6.92 | 6.91 | 0.008 | 0.9280 |
| 6 | 6.69 | 6.72 | 6.72 | 6.70 | 0.011 | 0.9485 |
| 9 | 6.57 ^b | 6.56 ^b | 6.56 ^b | 6.60 ^a | 0.007 | 0.0619 |
| 12 | 6.44 | 6.46 | 6.46 | 6.47 | 0.006 | 0.5697 |
| 24 | 6.33 ^b | 6.34 ^a | 6.35 ^a | 6.35 ^a | 0.003 | 0.0206 |
| 2 month | | | | | | |
| pH | | | | | | |
| 3 | 6.79 ^b | 6.79 ^b | 6.76 ^b | 6.92 ^a | 0.023 | 0.0540 |
| 6 | 6.56 | 6.68 | 6.60 | 6.64 | 0.021 | 0.2947 |
| 9 | 6.51 | 6.50 | 6.47 | 6.50 | 0.008 | 0.2876 |
| 12 | 6.34 | 6.36 | 6.36 | 6.41 | 0.014 | 0.4112 |
| 24 | 6.19 | 6.23 | 6.21 | 6.22 | 0.009 | 0.5212 |

¹⁾ All values represent the mean of triplicates; ²⁾ standard error of mean.

Table 7. Effects of dietary supplementation fermented BSW on *in vitro* ammonia-N concentration

| Incubation time (h) | Treatments ¹⁾ | | | | SEM ²⁾ | p value |
|----------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------|
| | Control | 2% FBSW | 4% FBSW | 6% FBSW | | |
| 1 month | | | | | | |
| NH ₃ -N (mg/dl) | | | | | | |
| 3 | 3.71 | 4.60 | 4.53 | 4.28 | 0.254 | 0.6751 |
| 6 | 4.91 ^a | 2.79 ^b | 3.35 ^b | 3.25 ^b | 0.294 | 0.0373 |
| 9 | 4.97 | 4.02 | 4.22 | 4.28 | 0.367 | 0.8776 |
| 12 | 6.19 ^a | 5.51 ^{ab} | 5.57 ^{ab} | 4.67 ^b | 0.278 | 0.2066 |
| 24 | 14.36 | 12.67 | 14.54 | 14.37 | 0.521 | 0.5731 |
| 2 month | | | | | | |
| NH ₃ -N (mg/dl) | | | | | | |
| 3 | 6.24 ^a | 5.23 ^{ab} | 5.68 ^{ab} | 4.31 ^b | 0.299 | 0.0765 |
| 6 | 6.33 | 5.47 | 5.06 | 4.23 | 0.343 | 0.2759 |
| 9 | 7.19 | 6.33 | 7.44 | 4.25 | 0.634 | 0.2797 |
| 12 | 10.10 | 9.84 | 8.89 | 7.83 | 0.831 | 0.8367 |
| 24 | 18.44 ^{ab} | 18.08 ^{ab} | 20.46 ^a | 13.45 ^b | 1.194 | 0.1075 |

¹⁾ All values represent the mean of triplicates; ²⁾ standard error of mean.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ significantly (p < 0.05).

게 나타났다.

(2) 반추위 내 암모니아태 질소에 대한 영향

반추위 암모니아태 질소에 대한 영향은 Table 7에 나타난 바와 같다. 반추위 내 암모니아태 질소농도에서는 발효 1개월 미역부산물의 경우 3시간 경과 후는 발효미역부산물 첨가구가 대조구에 비해 높은 농도 즉 대조구, 2% FBSW, 4% FBSW, 6% FBSW가 각각 3.71, 4.60, 4.53, 4.28 mg/dl로 나타났다. Back 등 (2004)의 시험결과에서 미역부산물 내에 존재하는 단백질은 반추위 내에서

비교적 분해가 빠르게 일어나는 것으로 나타났고, 특히 배양초기에 단백질의 상당량이 분해되어 발효개시 3시간에서 9시간까지는 미역부산물의 첨가로 대조군에 비하여 암모니아가 다소 증가하는 경향과 일치하였다. 발효 2개월 미역부산물 첨가의 경우 발효 3, 6, 9, 12시간 경과 후는 처리구들이 오히려 대조구보다 낮은 암모니아태 질소 농도를 나타내었으며, 발효 24시간 경과 후도 4% FBSW를 제외한 기타 처리에서 대조구보다 낮은 암모니아태 질소 농도를 나타내었다. 특히, 전체 발효기간 동안 6% FBSW 처리구가 발효 3시간과 24시간 경과 후 타 처리구에 비하여 낮게 나타나

Table 8. Effects of dietary supplementation fermented BSW on *in vitro* VFA production

| Incubation time (h) | Treatments ¹⁾ | | | | SEM ²⁾ | p value |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------|
| | Control | 2% FBSW | 4% FBSW | 6% FBSW | | |
| VFA(mM/dl) | | | | | | |
| 1 month | | | | | | |
| 3 | 57.10 | 56.89 | 58.97 | 59.40 | 1.087 | 0.8821 |
| 6 | 66.39 ^{ab} | 62.83 ^b | 70.66 ^a | 69.78 ^a | 1.151 | 0.0528 |
| 9 | 72.09 | 72.24 | 74.18 | 70.75 | 0.789 | 0.5361 |
| 12 | 90.06 | 80.12 | 84.98 | 88.54 | 2.495 | 0.4693 |
| 24 | 104.40 | 100.76 | 104.59 | 98.85 | 1.390 | 0.5233 |
| VFA(mM/dl) ³⁾ | | | | | | |
| 2 month | | | | | | |
| 3 | 60.40 | 55.06 | 64.59 | 69.75 | 1.846 | 0.3207 |
| 6 | 70.23 | 75.98 | 77.56 | 70.61 | 2.468 | 0.7340 |
| 9 | 88.64 ^a | 91.30 ^a | 90.62 ^a | 78.75 ^b | 1.852 | 0.0409 |
| 12 | 93.71 | 96.03 | 92.35 | 90.42 | 3.145 | 0.9395 |
| 24 | 116.83 | 110.12 | 112.58 | 101.79 | 3.191 | 0.2889 |

¹⁾ All values represent the mean of triplicates; ²⁾ standard error of mean.

³⁾ VFA: volatile fatty acid

^{ab} Means in the same row with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

는 경향을 보였다.

(3) 반추위 내 휘발성지방산에 대한 영향

미역에 다량 함유되어있는 다당류는 alginic acid, fucoidan, laminaran 등 화학적으로 견고한 결합 형태로 존재하고 그 중 alginic acid는 분자량이 5만~20만의 고분자 섬유질로서 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid의 이질다당류(heteropolysaccharide)로 이루어져 있다. 이들은 미역을 포함한 갈조류 세포벽의 대부분을 차지하며(Beresford 등, 2000; Klinkenberg 등, 2001), 반추동물에서는 구조성 탄수화물로 작용하여 반추위 미생물에 의해 발효가 일어나 숙주동물에게 에너지를 공급하여 VFA 생성량의 증가에 영향을 미치게 된다(Greenwood 등, 1983a; Greenwood 등, 1983b; Beresford 등, 1999).

발효미역부산물의 첨가가 반추위 내 총 휘발성지방산(VFA)의 농도에 미치는 영향은 Table 8에서 나타났다. 발효 1개월 미역부산물의 경우 4, 6% FBSW 첨가구가 6시간 경과 후 총 VFA의 농도가 현저하게 증가하는 양상을 나타내었고(p<0.05), 발효 2개월 미역부산물의 경우 2, 4% FBSW 첨가구가 9시간 경과 후 총 VFA 농도가 6% FBSW 첨가구에 비해 현저하게 증가하는 양상을 보였다(p<0.05). 이러한 결과는 VFA 농도가 증가된 2, 4% FBSW의 같은 시간대의 암모니아태 질소의 농도가 타 처리구보다 낮게 나타난 결과와 결부시켜 볼 때 미역부산물에 의한 영향으로 사료되며, 2개월 발효 부산물의 경우 24시간 배양 후 암모니아태 질소 및 VFA의 감소결과는 미역부산물의 과다 첨가에 의한 영향으로 추측된다.

이상의 *in vitro* 실험 결과를 종합해 볼 때 미생물 발효미역부산

물 중 단백질은 발효초기에 빠르게 분해되는 것으로 관찰되었으며, 반추위 발효성상을 종합해 볼 때 미역부산물은 DS-01 미생물에 의해 2개월간 발효에서 암모니아태 질소는 4%, VFA에 있어서는 2%와 4% 수준의 첨가가 다른 처리구에 비하여 높은 생성량을 보이는 것으로 확인되었지만, 이후 *in vivo* 실험을 통하여 보다 정확한 발효기간과 첨가수준이 결정되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

DS-01 균주 접종에 의한 미역부산물 발효산물이 분해 정도, 영양소 변화 및 미생물오염 정도에 관한 관찰과 반추위 발효성상에 미치는 영향을 관찰하여 미역부산물의 저장성 확보와 반추동물의 사료로서의 이용가능성을 발효단계에 따라 조사하였다. DS-01 균주와 함께 배양된 미역부산물은 발효 1개월부터 현저한 분해율을 보이기 시작했다. 미역부산물중의 영양성분 함량은 발효와 함께 커다란 변화를 나타내지 않았으며 모든 처리에서 반추동물에 병원성을 가지는 미생물은 검출되지 않았다.

In vitro 실험에서는 발효시간 및 첨가농도에 따른 pH 변화, 암모니아태 질소와 휘발성지방산의 생성에 대한 영향을 조사하였다. pH의 경우 6% FBSW는 1개월 및 2개월 발효조건에서 대조구, 2% 및 4% FBSW 보다 pH 값이 증가한 것을 나타내었다. 암모니아태 질소의 생성에 미치는 영향을 보면 1개월 FBSW 경우 실험 3시간 경과 후가 대조구에 비해 높은 농도를 나타내었지만 시간이 경과에 따라 대조구보다 감소한 경향을 보인다. 2개월 FBSW의 경우 4% 첨가량만 24시간 경과 후 타 처리구에 비해 높은 농도를 나타내었다. 특히, 전 발효기간 동안 6% FBSW 처리구가 발

효 3시간과 24시간 경과 후 타 처리구에 비하여 낮게 나타나는 경향을 보였다. 휘발성지방산의 경우 발효 1개월 미역부산물 4, 6% FBSW 첨가구가 6시간 경과 후 총 VFA의 농도가 현저하게 증가하는 양상을 나타내었고($p<0.05$), 발효 2개월 미역부산물 2, 4% FBSW 첨가구가 9시간 경과 후 총 VFA 농도가 6% FBSW 첨가구에 비해 현저하게 증가하는 양상을 나타냈다($p<0.05$).
(주제어: 발효미역부산물, *in vitro*, pH, 암모니아태 질소)

사 사

이 논문은 부산대학교 자유 과제 학술 연구비(2년) 및 두뇌한국 21 (BK21) 프로그램의 지원에 의해 이루어진 것임.

아울러 DS-01균주 분양 및 실험에 협조해주신 이정식 사장님께 깊은 감사를 표한다.

인 용 문 헌

- Ahn, S. J., Kim, Y. S. and Park, W. P. 2004. Storage of waste-brown seaweed and degradation of alginate using microorganism. *J. of the Environmental Sciences*. 13(3):313-318.
- Allen, V. G., Pont. K. R., Saker. K. E., Fontenot. J. P., Bagley. C. P., Ivy. R. L., Evans. R. R., Schmidt. R. E., Fike. J. H., Zhang. X., Ayad. J. Y., Brown. C. P., Miller. M. F., Montgomery. J. L., Mahan. J., Wester. D. B. and Melton. C. 2001. Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock-A review. *J. Anim. Sci.* 79(E. Suppl.):E21-E31.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Back, I. K., Maeng, W. J., Lee, S. H., Lee, H. G., Lee, S. R., Ha, J. K., Lee, S. S. and Hwang, J. H. 2004. Effects of the brown seaweed residues supplementation on *in vitro* fermentation and milk production and composition of lactating dairy cows. *Korean. J. Anim. Sci & Technol.* 46(3):373-386.
- Bae, W., Kaya, K. N., Hancock, D. D., Call, D. R., Park, Y. H. and Besser, T. E. 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan;71(1):169-74.
- Beresford, N. A., Mayes, R. W., Colgrove, P. M., Barnett, C. L., Bryce, L., Dodd, B. A. and Lamb, C. S. 2000. A comparative assessment of the potential use of alginates and dietary calcium manipulation as countermeasures to reduce the transfer of radiostrontium to the milk of dairy animals. *J. Environ. Radioactivity.* 51:321-334.
- Beresford, N. A., Mayes, R. W., MacEachem, P. J., Dodd, B. A. and Lamb, C. S. 1999. The effectiveness of Ca-alginate to reduce the transfer of radiostrontium to the goatsmilk. *J. Environ. Radioactivity.* 44:43-54.
- Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Biochem.* 8: 130-132.
- Cho, Y. S., Lee, H. S., Kim, J. M., Ryu, P. D., Park, Y. H., Yoo, H. S. and Lee, M. H. 2003. Comparison of antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant enterococci from animals and human. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 27(1):17-29.
- Erwin, E. S., Marco, S. J. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
- Greenwood, U., Hall, F. J., Orpen, C. G. and Paterson, I. W. 1983b. Microbiology of seaweed digestion in Orkney sheep. *Proc. Physiol. Soc.* 343:121.
- Greenwood, U., Orpen, C. G. and Paterson, I. W. 1983a. Digestibility of seaweed in Orkney sheep. *Proc. Physiol. Soc.* 343:120.
- Hur, J., Kim, J. M., Kwon, N. H., Park, K. T., Lim, J. Y., Jung, W. K., Hong, S. K. and Park, Y. H. 2004. Antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry carcasses in Korea. *Korea. J. Vet. Res.* 44(2):217-224.
- Iwamoto, Y., Xu, X., Tamura, T., Oda, T. and Muramatsu, T. 2002. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytokine production in human mononuclear cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67(2):258-263.
- Keys, A., Grande, F. and Anderson, J. T. 1961. Fibers and pectin in the diet and serum cholesterol concentration in man. *Proceeding of the Society of experimental biological medicine.* 106:555-558.
- Kimura, Y., Watanabe, K. and Okuda, H. 1996. Effect of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. *J. Ethnophar. macology.* 54:47-54.
- Klinkenberg, G., Lystad, K. Q., Levine, D. W. and Dyrset, N. 2001. Cell release from alginate immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactisin* Chitosan and Alginate Coated Beads. *J. Dairy. Sci.* 84:1118-1127.
- Kwon, H. J., Park, K. Y., Yoo, H. S., Park, J. Y., Park, Y. H. and Kim, S. J. 2000. Differentiation of *Salmonella entericaserotype gallinarum* biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC), *J. Microbiol. Methods.* 40(1):33-38,
- Lee, H. G., Hong, Z. S., Li, Z. H., Xu, C. X., Jin, X., Jin, M. G., Lee, H. J., Choi, N. J., Koh, T. S. and Choi, Y. J. 2005. Effect of brown seaweed waste supplementation on lactational performance and endocrine physiology in holstein lactating cows. *Korean. J. Anim. Sci & Technol.* 47(4):573-582.
- Lee, S. H., Kim, H. J., Jo, I. H., Ahn, J. H., Chang, M. B. and Maeng, W. J. 2001. Effects of soluble carbohydrate on ruminal

- fermentation and microbial growth in continuous culture. Korean. J. Anim. Sci & Technol. 43(5):695-706.
- Nishino, T., Fukuda, A., Nagumo, T., Fujihara, M. and Kaji, E. 1999. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Thrombosis Research 96:37-49.
- Nishino, T., Yamauchi, T., Horie, M., Nagumo, T. and Suzuki, H. 2000. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. Thrombosis Research 99:623-634.
- Piya, C., Hong, S. H., Choi, Y. J., Hwang, I. H., Lee, S. S. and Ha, J. K. 2001. Effect of Yucca extract on *in vitro* fermentation by mixed ruminal microorganism. Korean. J. Anim. Sci & Technol. 43(5):707-720.
- Rearte, D. H. and Santini, F. J. 1993. Rumen digestion of temperate pasture: effects on milk yield and composition. Page 562 in Proc. XVII Int. Grassl. Congr. N. Z.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics. A Biometrical approach (2nd eds). McGraw-Hill, Inc.
- Tsuji, K., Oshima, S., Tsuji-Matsusaki, E., Nakamura, A., Inami, T. and Suzuki, S. 1968. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism. Elyougaku Zasshi(in Japanese). 26:113-122.
- Tsuji, K., Tsuji, M. E. and Suzuki, S. 1977. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism. IV. Effects of various polysaccharide derivatives, lignin, and synthetic polymers on serum and liver cholesterol levels in rats. Elyougaku Zasshi (in Japanese). 35:227-234.
- Van, S. P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583-3597.
- Yamamoto, I., Takahashi, M., Suzuki, T., Seino, H. and Mori, H. 1984. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*. Jpn. J. Exp. Med. 54(4):143-151.
- Yonekura, L. and Suzuki, H. 2003. Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed a phytic acid-containing diet. Nutrition Research 23:343-355.
- Yoo, H. S., Lee, S. U., Park, K. Y. and Park, Y. H. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 35 (1):228-32.
- Zhuang, C., Itoh, H., Mizuno, T. and Ito, H. 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*). Biosci Biotechnol. Biochem. 59(4):563-567.

(Received Mar. 29, 2011; Revised Aug. 4, 2011; Accepted Aug. 9, 2011)