

Research Article

말 분변을 이용한 주스박의 *in vitro* 발효 특성

황원욱¹, 김겸현¹, 임정호¹, 우제훈², 박남건², 김수기^{1*}

¹건국대학교 동물자원학과

²농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장

In vitro Fermentation Characteristics of Juice Pomaces Using Equine Fecal Inoculum

Won-Uk Hwang¹, Gyeom-Heon Kim¹, Joung-Ho Lim¹, Jae-Hoon Woo², Nam-Geon Park² and Soo-Ki Kim^{1*}

¹Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea.

²National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the changes of pH, dry matter digestibility (DMD), NH₃-N concentrate, gas production and volatile fatty acid (VFA) through *in vitro* fermentation by adding horse feces to various juice pomaces fermented with *Bacillus*, yeast and lactic acid bacteria. The pH range of fermented fluid with juice pomaces was 6.4-7.1, indicating that the digestion by microbial fermentation was normal. Juice pomaces adopted will be helpfully used to assist with digestion by microbes in intestines because approximately 10⁹ CFU/ml microbes were grown after 48 hours in fermented fluid. DMD rate gradually increased from 12 hours. It was 39.19% in pomaces of apple, 38.22% in grape, 37.02% in carrot, 36.2% in citrus and 34.35% in mixture respectively after 48 hours. NH₃-N concentrate was not changed significantly as it was maintained at 1.5 mg/100ml level in the entire treatment group from beginning of fermentation until 12 hours, but increased rapidly from 24 hours. Amount of gas produced was lowest in the mixture and increased rapidly after 12 hours. Total VFA increased from 24 hours and was highest at 48 hours. It was suggested that dry matter digestion was processed while fermented juice pomaces kept proper pH during *in vitro* digestion, and cellulose degrading microorganisms could act actively in the caecum and colon of horses.

(Key words : Juice pomaces, *In vitro* digestibility, Equine feces, Fermentation)

I. 서론

과일 주스 제조 과정에서 원료의 약 20~30%가 주스박으로 생성된다. 과일과 야채 주스박은 식이섬유, 비타민, 미네랄, 플라보노이드 그리고 라이코펜과 같은 생리활성 물질들이 함유되어 있어 일부는 식품소재로 이용되기도 하지만 원활한 처리에 따라 환경적인 측면에서 문제를 야기시킬 수도 있다 (O'Shea et al., 2012). 주스박의 영양소 함량 측면에서는 가축 사료로서의 충분한 가치를 가지고 있는데 사료 원료의 안정적인 공급이 요구된다. 식품산업통계정보 (2015)에 따르면 국내에서 사과박 20,933톤, 당근박 16,289톤, 포도박 3,851톤 그리고 감귤박 83,702톤 생산된다. 이중 생산량이 가장 많은 사과박의 영양학적 특징으로는 섬유소와 폴리페놀 함량이 높고

(Figuerola et al., 2005; Sudha et al., 2007), 조단백 함량은 낮지만 펙틴과 같은 비구조 탄수화물 함량이 높아 가축의 기호성이 우수하다 (Rahmat et al., 1995). 콜레스테롤 3g/kg을 급여하는 쥐 실험에서 사과박을 10% 첨가급여 하였을 때 혈중 내 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 트리글리세라이드, 총 인지질, HDL-인지질 그리고 간의 총 콜레스테롤을 억제하는 효과를 보였다 (Leontowicz et al., 2001). 당근박은 비타민 B 계열과 베타카로틴이 풍부하며, 카로티노이드의 섭취는 암을 예방 할 수 있다고 하였다 (Sharma et al., 2012; Walde et al., 1992). 과일과 야채의 식이섬유소에는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 및 펙틴 성분이 함유되어 있으며, 사과박과 당근박은 리그닌 함량이 적으나 펙틴은 비교적 높은 편이다 (Nawirska and Kwaśniewska, 2005). 포도박은 폴리페놀 성분

* Corresponding author : Soo-Ki Kim, Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea, Tel: +82-2-450-3728, Fax: +82-2-458-3728, E-mail: sookikim@konkuk.ac.kr

이 강한 항산화 활성을 가지고 있는데, 닭에 급여하면 간에서 알파-토코페놀의 함량이 높아지고 계육의 지질 산화를 억제한다고 하였다 (Goni et al., 2007). 항산화 활성을 가진 플라보노이드 함유 감귤부산물을 제주 흑돼지에 급여하였을 때 등심육의 콜레스테롤 함량이 낮아지고 풍미가 유의적으로 개선되었다 (Yang et al., 2006; Yang et al., 2011). 또한 말에게 소맥피의 일부를 건조 감귤박으로 대체하여도 비육 사료로 가능하다고 하였으며 (Chae et al., 2013; Moreira et al., 2015), 조사료와 농후사료의 비율을 60:40으로 하면서 우산잔디 건조 (Coast-cross hay) 대신에 감귤박으로 대체하였을 경우 28%까지 사용 가능하다고 하였다 (Brandi et al., 2014).

이와 같이 야채 및 과일의 주스박은 다양한 생리활성과 영양적인 부분은 사료로서 충분한 가치가 있으며 주스박을 말용 사료로 사용하기 위하여 *in vitro* 실험 및 급여 사양실험을 통해 사료가치 평가를 할 필요가 있다. 말은 맹장 전후로 소화기관이 크게 나누어지며, 소장에서 분비 효소로 소화된 이후 전체 소화기관 부피의 16%를 차지하는 맹장에서 미생물에 의한 발효과정이 이루어진다 (Pond et al., 1995). 주스박이 가지고 있는 섬유소는 이러한 발효과정을 통하여 에너지원으로 사용될 수 있다 (Manzano et al., 1999). Abdouli와 Attia (2007)는 말의 소화기관을 고려하여 맹장 이전에서 이루어지는 효소에 의한 소화과정과 후장에서 이루어지는 발효 과정을 고려하여 2 단계 *in vitro* 실험을 보고하였다.

본 연구는 다양한 발효 주스박에 대하여 말 분변을 첨가한 *in vitro* 소화 실험을 통하여 사료원료로서의 가치를 평가하고자 하였다. 사과박, 포도박, 당근박, 감귤박 및 혼합 주스박이 건물분해율, pH, 암모니아성 질소, 휘발성 지방산, 가스 발생 등의 발효 특성에 미치는 영향을 통해 말 사료로서의 이용성을 알아보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 발효 주스박의 제조

사과박, 포도박, 당근박, 감귤박의 각각을 대두박과 중량비로 4:6으로 혼합하여 수분을 60%로 맞춘 후 발효를 시켰다. 혼합주스박은 이들 주스박을 각각 같은 중량비로 혼합한 후 대두박과 중량비로 4:6으로 혼합하여 동일한 조건에서 발효를 시켰다. 이 때 접종한 균주는 말 분변에서 분리한 *Bacillus subtilis* SK3889, 실험실 보유 중인 *Saccharomyces cerevisiae* SK3587, 주스박에서 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum*

SK3873, *Lactobacillus plantarum* SK3893, *Weissella cibaria* SK3880으로 3단계 접종을 실시하였다 (Hwang et al., 2017). 즉 발효 초기에는 *Bacillus subtilis* SK3889, 12시간에는 *Saccharomyces cerevisiae*, 24시간에 상기 3종의 유산균들을 접종하여 48시간 동안 배양하여 발효 주스박을 제조하였다.

2. 효소를 이용한 소화 전처리

효소 처리는 Pepsin (Porcine pepsin, 2000 FIP u/g, MERCK 71901)을 0.1 M HCl에 1.25 g/L의 비율로 용해시켜 pH를 2±0.05으로 조절하였다. 용액에 각 주스박을 0.05% 비율로 넣은 후 39°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 0.1 M phosphate buffer를 이용하여 pH를 6.8로 조정하였다. Amylase (*Bacillus subtilis*, 165,000 u/g, INC 100447) 10 g을 0.1 M phosphate buffer 1 L에 용해시킨 후 pH를 6.8±0.1로 조절한 것을 0.02%로 주스박에 첨가 후 39°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 거르기로 거르고 96% ethanol로 2번 세척한 후 증류수를 이용하여 다시 세척하였다. 이러한 소화 과정을 거친 주스박은 105°C의 건조기 (WFO-600SD, EYELA, Japan) 에서 24시간 동안 건조시켜 시료로 이용하였다.

3. 주스박과 말분변을 이용한 *in vitro* 발효

자유채식을 해온 방목 제주산마 (더러브렛×제주마, 321kg±26.31)의 9~12세인 세 마리의 분변을 직장에서 바로 채취 후 혐기상태로 밀봉하여 실험실로 운송하였다. 말 분변을 McDougall's buffer (Tilley and Terry, 1963)에 접종한 후 6겹의 cheesecloth를 이용하여 여과하였다. 배양액을 거르는 과정에서는 O₂ free CO₂가스를 주입하며 혐기 상태를 유지하며 CO₂를 이용하여 최종 pH 7.0으로 조절하였다. 배양액 100 ml를 시료가 1 g씩 들어있는 배양병에 각각 분주한 후 혐기상태로 밀봉하였다. 밀봉된 126개의 배양병은 (5 Treatment, 3 Blank, 7 Times, Triplication) 40°C의 항온배양기 (BF-60SIRL, Biofree, Korea) 에서 발효를 진행하였으며 샘플 채취는 0, 3, 6, 9, 12, 24 및 48 시간에 각각 배양병을 수거하여 진행하였다.

pH 변화는 배양 후 50 ml conical tube에 옮긴 후, pH/ISE meter 735P (Istek, Korea)를 이용하여 측정하였다. 생균수는 Hartman (2011)의 방법에 따라 각 시간대별 샘플과 멸균증류수를 1:9의 비율로 순차적으로 희석하여 측정하였다. 희석한 상등액 100 µl를 MRS, LB, YM 평판배지 (Difco, USA)에 각각 분주하여 MRS, LB는 35°C, YM은 30°C 항온 배양기에서 24시간동안 배양한 후 colony 수를 log₁₀CFU/ml로 계산하였

다. 건물분해율은 Tilley와 Terry (1963)의 방법에 의해 각 시간 별로 배양된 말 분변액에서 시료를 꺼내어 흐르는 물에 세척한 뒤 105°C의 건조기 (WFO-600SD, EYELA, Japan)에서 24시간 동안 건조 후 계산하였다. 암모니아성 질소의 농도는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 페놀 용액을 이용하여 반추위액의 암모니아를 발색시킨 후 분광광도계 (CM-3500d, Hanseunge & I, Korea)로 630 nm에서 흡광도를 측정 후 계산하였다. 총 가스 생산량은 배양기에서 샘플병을 꺼내어 유리주사기를 이용하여 병 내의 가스 생산량을 측정하였다 (Beuvink and Spoelstra, 1992).

휘발성지방산 (VFA)의 측정은 배양이 완료 된 배양병을 열어 배양액을 채취하여 2000 rpm, 4°C 에서 15분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액 1 ml에 HPO₃ 0.2 ml을 넣어 정치시켰으며 Erwin et al. (1961)의 방법에 따라 gas chromatography (Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, USA)로 DB-FFAP column (Agilent, USA)을 이용하였으며, injection 180°C, detection 250°C, injection volume 1 µl의 조건으로 실시하였다.

4. 통계분석

자료 분석은 SAS (Statistical Analysis System, Version 9.1, USA, 2003) program package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 각 평균간 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법 (Multiple range test)에 의하여 실시하였다 (Duncan, 1955).

III. 결과 및 고찰

1. pH 변화

말 분변을 첨가한 *in vitro* 소화 실험에서 다양한 발효 주스 박에 대한 사료원료로서의 가치를 평가하고자 pH 변화부터 측정을 하였다. 발효 초기 pH는 7.1에서 시작하여 배양 3시간 쯤에는 처리구간 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). 6시간 배양 후에는 pH가 사과박, 포도박, 감귤박 그리고 당근박 순으로 높았으며, 9시간에는 혼합박이 6.58로 가장 낮은 수치를 보였다 ($p<0.05$). 12시간 배양에서는 포도박이 pH가 6.79로 가장 높은 수치를 보였고 ($p<0.05$), 24시간 배양에서는 혼합박이 가장 낮은 수치를 보였으며 48시간 배양에서는 사과박이 가장 낮은 경향을 보였다 ($p<0.10$). 전체적으로는 6시간까지 감소하였으며 12시간까지 유지되다 다시 감소하는 경향을 보였다.

Shirazi-Beechey (2008)의 연구에 따르면 말의 맹장과 대장에서 미생물이 섬유소를 분해하며 활성이 저하되지 않는 pH가 6.1 이상이라고 하였으며, 5.9 이하로 감소하면 산독증이 발생하여 말의 건강에 영향을 미친다고 하였다. 본 연구에서 주스박 첨가에 따른 발효액의 pH의 범위가 6.4~7.1로써 미생물 발효에 의한 소화 과정에서의 큰 문제가 없을 것으로 보인다. 배양 초기인 6시간까지 pH 변화는 급격히 감소하다가 그 이후는 완만히 감소하는 경향을 보였다. 이는 적정 pH 범위 내에서 미생물에 의한 분해 속도가 서서히 감소된 것으로 판단된다.

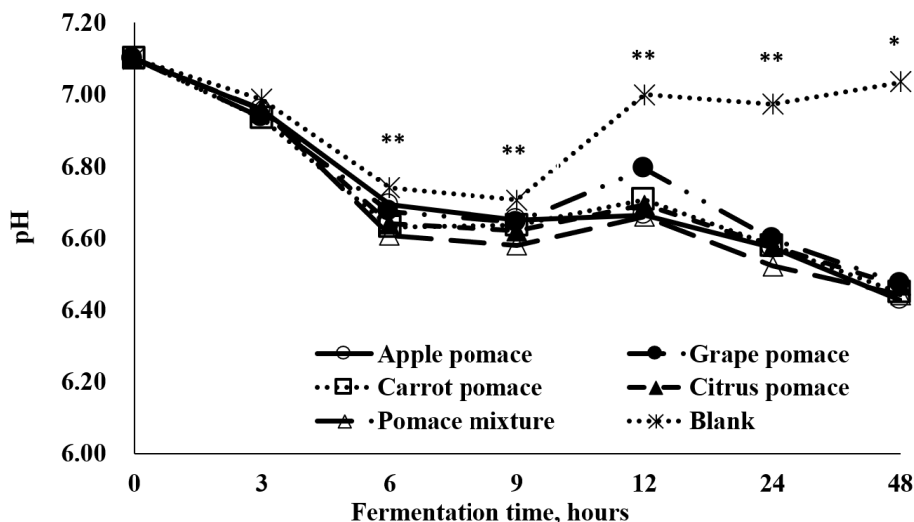


Fig. 1. Change of pH by different juice pomaces during *in vitro* fermentation using horse feces. The difference in treatment was indicated by *, $p<0.10$; **, $p<0.05$.

2. 생균수 변화

말분변을 이용한 주스박의 발효에서의 생균수의 변화는 LB와 MRS 배지에서 0시간대에 비해 24시간과 48시간에서 보다 많은 생균수를 보였다 (Fig. 2). 일반 장내 세균을 측정하기 위한 LB배지에서는 배양 48시간째에 다른 처리구에 비

해 사과박이 8.86 log₁₀ CFU/ml로 가장 적었지만 ($p<0.05$), Blank에 비해서는 모든 처리구가 높은 값을 보였다. 유산균 측정을 위한 MRS배지에서는 배양 48시간째에 처리구간 생균수의 차이를 보였는데 당근박 (9.39 log₁₀ CFU/ml)과 감귤박 (9.41 log₁₀ CFU/ml)이 다른 처리구에 비해 높았다 ($p<0.05$). 효모와 일부 곰팡이 측정을 위한 YM 배지에서는 배양시간에

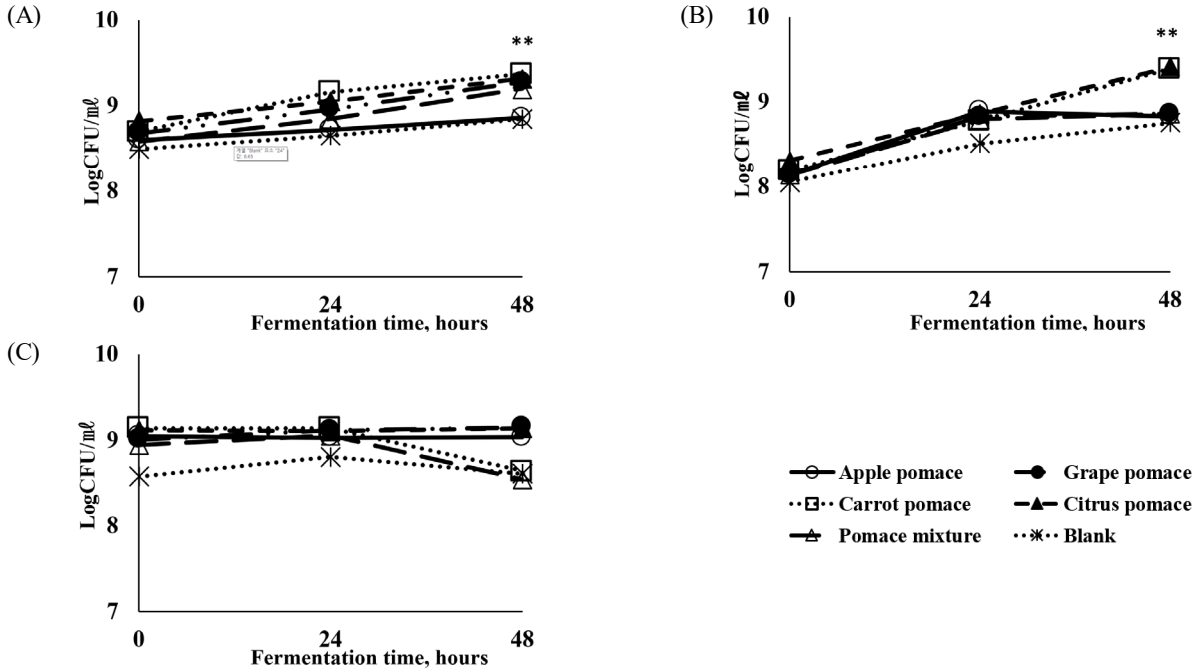


Fig. 2. Change of viable cell count by different juice pomaces *in vitro* fermentation using horse feces. (A) CFU on LB media, (B) CFU on MRS media, (C) CFU on YM media. The difference in treatment was indicated by *, $p<0.10$; **, $p<0.05$.

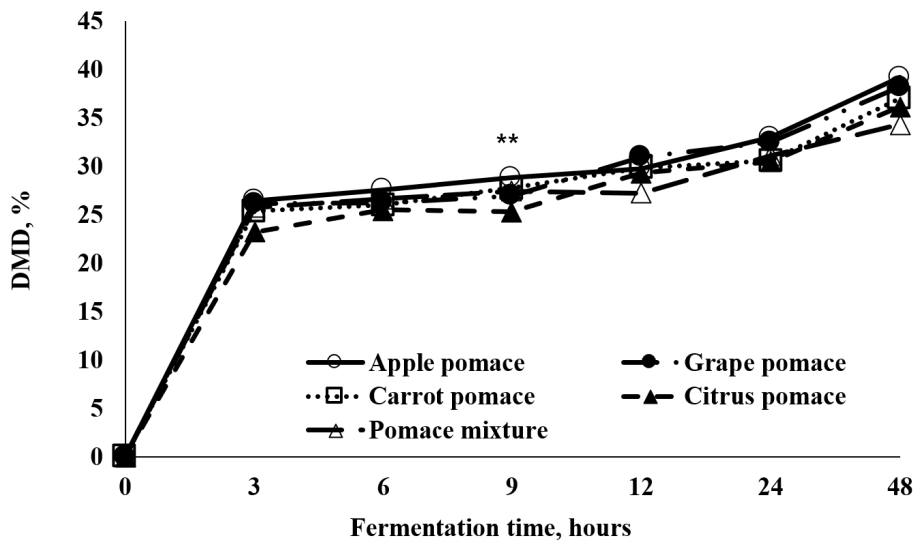


Fig. 3. Changes of DM degradability by different juice pomaces *in vitro* fermentation using horse feces. The difference in treatment was indicated by *, $p<0.10$; **, $p<0.05$.

따라 처리구별 차이를 보이지 않았다.

말은 섭취하는 사료에 따라 장내의 미생물 생태에 영향을 미치며 (Julliand et al., 2001), 미생물의 수와 활성 정도가 영양소의 소화에 영향을 미친다 (Lattimer et al., 2005). 농후사료와 조사료의 급여 수준에 따라서 전분분해 미생물과 섬유소 분해 미생물의 구성이 바뀌며 농후사료를 많이 급여 하면 전분을 이용하는 미생물균종이 증가하고 장내 pH를 감소시킨다. Kobayashi et al., (2006)은 일본 재래마 분변의 계절에 따른 총 균수를 측정 한 결과 겨울철에는 $1.2 \times 10^{10}/g$, 여름철에는 $9.2 \times 10^{10}/g$ 의 값을 나타냈다. 말 분변을 이용한 본 연구의 *in vitro* 발효실험에서는 48시간 후 $10^9 \log_{10} CFU/ml$ 정도 미생물이 증식함에 따라 사용한 주스박들이 장내 미생물에 의한 소화작용에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

3. 건물 분해율

건물 분해율은 처리구간의 차이를 보이지 않았으며 배양 3시간에서 12시간까지 약 20%였다 (Fig. 3). 배양 12시간 이후부터 증가하였으며 배양 48시간에 사과박이 39.19%, 포도박이 38.22%, 당근박이 37.02%, 감귤박이 36.2% 그리고 혼합박이 34.35%였다.

본 실험에서 초기 배양시간 때의 분해율이 낮은 이유는 주스박 샘플이 이미 효소로 전처리 되어 영양성분들이 상당히 분해되어졌기 때문이고, 말 분변을 이용한 *in vitro* 발효에서는 섬유소 분해 미생물에 의해 발효가 활발히 일어나는 것으로 보인다.

4. 암모니아성 질소 농도

배양 12시간까지는 전체 처리구에서 $1.5 \text{ mg}/100\text{ml}$ 의 수준을 유지하면서 암모니아성 질소의 발생량의 변화가 없었지만 배양 24시간부터 주스박들이 분해되면서 암모니아성 질소의 농도가 증가하였다. 특히 배양 24시간째에는 감귤박은 $4.03 \text{ mg}/100\text{ml}$ 로 다른 처리구에 비해 보다 높았다 ($p < 0.05$). 또한 배양 48시간째에는 당근박이 $3.12 \text{ mg}/100\text{ml}$ 로 낮았다. 이 결과는 배양 24시간까지 미생물에 의해 단백질 분해가 천천히 이루어졌지만 그 이후로는 급격히 분해가 진행된 것으로 판단된다 (Fig. 4).

암모니아성 질소의 농도는 반추위 내에서 단백질의 분해 정도를 나타내는 지표로 에너지 이용성에 밀접한 관련이 있으며 반추위 미생물의 성장에 영향을 미친다 (Satter and Slyter, 1974; Seo et al., 2005). 암모니아성 질소의 증가는 미생물에 의한 암모니아성 질소 이용효율이 낮아졌거나, 반추위내 단백질 분해효율이 향상된 것으로 판단된다 (Satter and Slyter, 1974; Hristov and Ropp, 2003). 암모니아성 질소의 증가는 위의 건물 분해와 동일한 형태로 증가하고 있는데, 이는 Erdman et al. (1986)의 보고와 같이 사료의 소화 속도가 빠를수록 반추위내 암모니아성 질소의 양이 증가한다는 결과와 일치하였다.

5. 총 가스 생산

총 가스 발생량은 3시간까지 처리구간 차이를 보이지 않았

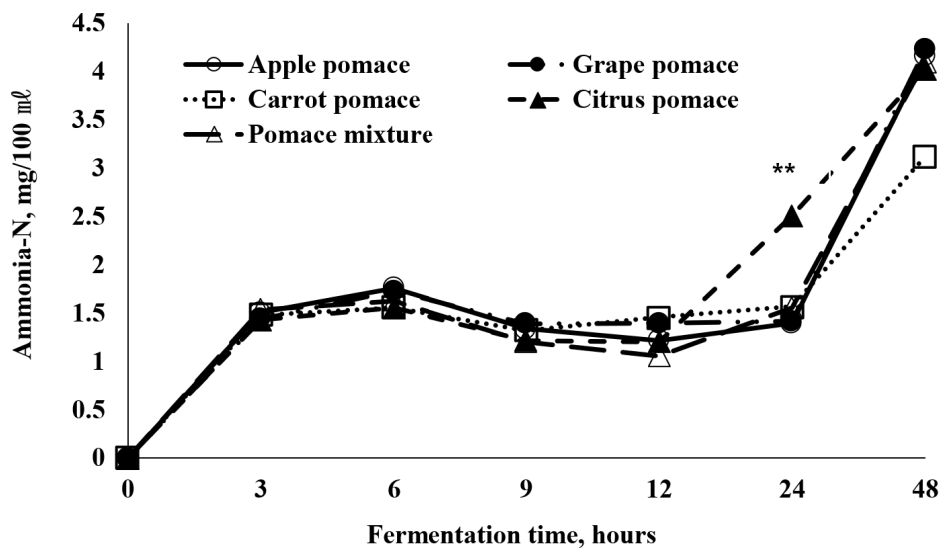


Fig. 4. Changes of $\text{NH}_3\text{-N}$ by different juice pomaces *in vitro* fermentation using horse feces. The difference in treatment was indicated by *, $p < 0.10$; **, $p < 0.05$.

다. 배양 6시간에는 감귤박이 가스 생산량이 가장 높고 그 다음으로는 혼합박, 당근박, 포도박이 높았고 사과박이 가장 낮은 경향을 보였다 ($p < 0.10$). 배양 9시간에는 혼합박이 가장 높고 사과박과 포도박이 가장 낮았다 ($p < 0.05$). 24시간에는 감귤박이 가장 낮은 가스 생산량을 보였다 ($p < 0.05$). 전반적으로 총 가스 생산량은 혼합박이 가장 낮았다 (Fig. 5).

가스의 발생량은 접종한 미생물의 발효과정에서 섬유질을 비롯한 영양성분의 분해 활동의 정도를 반영한다 (El ghandour et al., 2014; Mahala et al., 2016). 가스 생산량과 관련해 효모

를 처리한 *in vitro* 연구에서 맹장과 대장에서 미생물의 발효에 도움을 줬으며, 특히 섬유소 분해균들의 활성화에 긍정적인 영향을 미친다고 하였다 (Glade, 1991; Medina, 2002). 또한 이러한 영향은 말의 소화기 내에서 섬유소를 분해하는데 도움을 주어 말이 에너지원으로 사용할 수 있을 것이다. 위와 같이 발효 주스박의 가스 생산량은 pH변화와 건물 분해율과 같이 발효 초기에는 증가하지 않다가 배양 12시간과 24시간에서 급격히 증가하였다. pH와 가스생성량 관계는 48시간 동안의 *in vitro* 발효 동안의 미생물의 증식을 보면 상호 연관성을 시

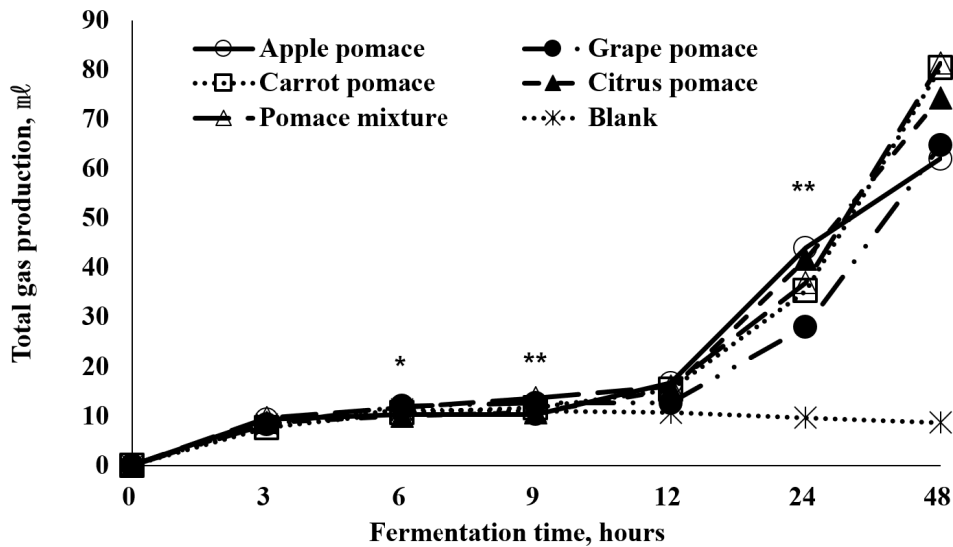


Fig. 5. Changes of total gas production by different juice pomaces *in vitro* fermentation using horse feces. The difference in treatment was indicated by *, $p < 0.10$; **, $p < 0.05$.

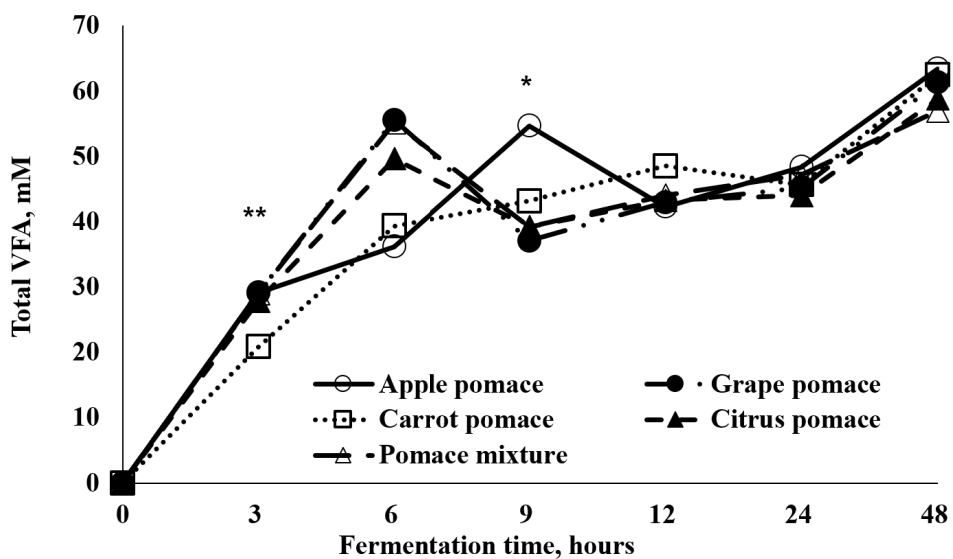


Fig. 6. Changes of total VFA by different juice pomaces *in vitro* fermentation using horse feces. The difference in treatment was indicated by *, $p < 0.10$; **, $p < 0.05$.

사한다. pH는 6시간까지 감소하였으며 12시간까지 일정 수준으로 유지되다가 그 이후 다시 크게 감소하는 경향을 보였다. 가스생성량은 발효 초기에는 서서히 증가하다가 배양 12시간 이후부터 48시간 까지 급격히 증가하였다. 이러한 변화 이유는 *in vitro* 발효 동안에 Fig. 2에서와 같이 일반세균과 유산균들이 48시간 동안 지속적으로 증식하기 때문이며, 그 결과로 pH는 저하되지만 가스생성량은 발효 후반에 급격히 증가하는 것으로 사료된다.

6. 휘발성지방산 (VFA)의 변화

Acetate의 함량은 배양 3시간에 사과박 (8.21 mM)이 가장 높은 반면 포도박 (6.82 mM)이 가장 낮았다 (Table 1). Acetate/propionate 비율은 배양 3시간에서 감귤박이 가장 높았으며 (1.43 mM) 이는 다른 처리구들보다 높았다 ($p<0.05$). Butyrate는 처리구간 차이를 보이지 않았지만 발효가 진행되면서 조금씩 증가하였다. Acetate와 butyrate는 지방합성에

Table 1. Change of VFA on juice pomaces *in vitro* fermentation using horse feces

Incubation time, hr	Apple	Carrot	Grape	Citrus	Mixture	SEM ¹⁾	P-value ²⁾
Acetate, mM							
3	8.21 ^a	7.69 ^b	6.82 ^c	7.54 ^b	7.43 ^b	0.25	0.05
6	12.82	13.63	12.27	10.40	14.09	0.35	0.31
9	16.68	15.41	14.45	15.38	16.45	0.44	0.84
12	18.40	18.74	20.68	18.87	19.31	0.24	0.30
24	21.03	20.56	20.45	19.74	21.10	0.23	0.88
48	29.69	28.54	28.92	27.60	25.88	1.15	0.96
Propionate, mM							
3	7.42	7.21	6.66	5.27	6.84	0.14	0.44
6	10.94	10.03	10.00	7.57	10.94	0.35	0.67
9	16.97	14.71	16.80	16.16	17.87	0.58	0.34
12	23.63	26.89	24.03	24.51	24.97	0.37	0.61
24	27.03	25.99	26.60	25.19	26.85	0.32	0.56
48	35.10	34.35	33.36	32.01	32.31	1.75	0.24
Butyrate, mM							
3	3.21	3.24	3.16	2.22	2.87	0.25	0.34
6	6.57	6.10	5.78	4.61	6.16	0.21	0.50
9	7.25	6.47	7.60	7.11	8.00	0.28	0.87
12	8.67	9.94	9.04	9.25	9.36	0.13	0.35
24	9.84	9.67	9.98	9.47	10.09	0.13	0.89
48	13.59	13.56	13.22	12.51	11.76	0.46	0.93
Acetate/Propionate ratio							
3	1.11 ^b	1.07 ^b	1.02 ^c	1.43 ^a	1.09 ^b	0.02	0.03
6	1.18	1.37	1.23	1.39	1.29	0.01	0.04
9	1.00	0.92	1.00	0.97	0.92	0.02	0.44
12	0.78	0.78	0.77	0.77	0.77	0.00	0.82
24	0.78	0.77	0.79	0.78	0.79	0.00	0.57
48	0.85	0.85	0.84	0.86	0.96	0.02	0.84
Total VFA, mM							
3	29.10 ^a	20.85 ^b	29.15 ^a	27.83 ^a	28.98 ^a	1.45	0.04
6	36.17	39.37	55.55	49.65	55.17	2.73	0.24
9	54.65	43.18	37.10	39.25	39.17	2.27	0.25
12	42.29	48.53	42.99	43.28	44.09	0.95	0.07
24	48.40	45.63	45.25	44.03	47.18	0.85	0.62
48	63.39	62.44	61.28	58.76	56.92	3.83	0.78

¹⁾ Standard error of mean

²⁾ Means within a row with no common superscripts differ according to p-value

이용될 수 있으며 propionate는 포도당 신생에 이용될 수 있다 (Kim et al., 2003). Hiroaki (1997)은 acetate/propionate 비율 변화는 반추동물의 생체 내에서 일어나는 VFA 이용 및 그 생리적 작용을 변화시켜 지방대사를 조절한다고 보고하였다. 말 맹장 *in vitro*의 효과에 대하여 *Aspergillus oryzae*의 첨가 연구에 따르면 acetate/propionate의 비율이 대조구는 2.27이었으며, 0.07 g/L 처리구에서 2.22, 0.7 g/L 처리구에서는 1.73을 나타내었다 (McDaniel et al., 1993). 섬유질 함량이 높은 사료를 섭취하였을 때 말의 맹장에서 acetate의 생산량이 많아진다고 하였다 (Medina et al., 2002).

Table 1과 Fig. 6에서와 같이 총 VFA의 변화는 배양 3시간에는 당근박이 가장 낮았고 혼합박이 가장 높았다 ($p < 0.05$). 배양 12시간까지는 VFA의 생성량이 증가하지 않지만 배양 24시간부터 VFA 생성량은 증가하지 않지만 배양 48시간에는 가장 높은 VFA 생산량을 보였다.

휘발성지방산은 말의 에너지 총중량의 60~80%를 차지하며 사료원료의 가치를 평가하는 기본적인 자료로 이용된다 (Rechkemmer et al., 1988). VFA는 가축이 이용할 수 있는 영양소원으로 가축의 생산성에 영향을 미친다. 이러한 VFA의 변화의 관찰을 통해 다양한 주스박들이 말 맹장 내에서 발효되어 가축의 에너지원 및 영양소원으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 바실러스, 효모 그리고 유산균으로 발효한 다양한 주스박들과 말 분변을 첨가한 *in vitro* 발효 시험을 통해 pH, 건물 분해율, 암모니아성 질소, 가스 발생량, 휘발성 지방산의 변화를 조사하였다. 주스박 첨가에 따른 발효액의 pH의 범위는 6.4~7.1로 미생물 발효에 의한 소화가 정상적으로 나타났다. 48시간 후 발효액에서 10^9 CFU/ml 정도 미생물이 증식함에 따라 사용한 주스박들이 장내 미생물에 의한 소화작용에 유용하게 이용될 것으로 판단되었다. 건물 분해율은 배양 12시간 이후부터 증가하여 48시간째에 사과박 39.19%, 포도박 38.22%, 당근박 37.02%, 감귤박 36.2% 그리고 혼합박 34.35%로 나타났다. 암모니아성 질소의 농도는 배양 12시간까지는 전 처리구에서 1.5 mg/100ml의 수준이었으며 배양 24시간 이후부터 급격히 증가하였다. 가스 발생량은 혼합박이 가장 낮았으며, 배양 12시간 이후부터 급격히 증가하였다. 총 VFA는 배양 24시간부터 증가하여 48시간에 가장 높았다.

본 연구결과로부터 발효 주스박은 말 *in vitro* 소화과정에

서 적정 pH를 유지하면서 건물 분해가 진행되었고 말의 맹장과 대장에서 섬유소 분해 미생물의 작용이 활발히 이루어질 수 있음을 제시하였다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업 (과제번호 PJ01190502)의 지원에 의해 수행되었습니다.

VI. REFERENCES

- Abdoul, H. and Attia, S.B. 2007. Evaluation of a two-stage *in vitro* technique for estimating digestibility of equine feeds using horse faeces as the source of microbial inoculum. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 132:155-162.
- Beuvink, J.M.W. and Spoelstra, S.F. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37:505-509.
- Brandi, R.A., Tribucci, A.M., Balieiro, J.C., Hoffman, R.M. and Bueno, I.C. 2014. Citrus pulp in concentrates for horses. *Food and Nutrition Sciences*. 5:1272.
- Chae, H.S., Kim, N.Y., Cho, I.C., Cho, S.R., Cho, W.M., Park, Y.S., Oh, S.A. and Ko, M.S. 2013. Effect of dietary supplementation of dried-citrus pulp and wheat bran on growth and meat quality in horses. *Journal of Animal Science and Technology*. 55:219-227.
- Chaney, A.L. and Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8:130-132
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. 11:1-42.
- El ghandour, M.M., Chagoyán, J.C.V., Salem, A.Z., Kholif, A.E., Castañeda, J.S.M., Camacho, L.M. and Buendía, G. 2014. *In vitro* fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34:619-625.
- Erdman, R.A., Proctor, G.H. and Vandersall, J.H. 1986. Effect of rumen ammonia concentration on in situ rate and extent of digestion of feedstuffs. *Journal of Dairy Science*. 69:2312-2320.
- Erwin, E.S., Marco, G.J. and Emery, E.M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 44:1768-1771.
- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estévez, A.M., Chiffelle, I. and Asenjo, F. 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential

- fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*. 91:395-401.
- Glade M.J. 1991. Effects of dietary yeast culture supplementation of lactating mares on the digestibility and retention of the nutrient delivered to nursing foals via milk. *Journal of Equine Veterinary Science*. 11:323-329.
- Goni, I., Brenes, A., Centeno, C., Viveros, A., Saura-Calixto, F., Rebole, A., Ariza I. and Estevez, R. 2007. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poultry Science*. 86:508-516.
- Hartman, D. 2011. Perfecting your spread plate technique. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 12:204.
- Hiroaki, S. 1997. Control of secretion and action of insulin by volatile fatty acids in ruminants. *Animal Science and Technology (Japan)*. 68:993-1002.
- Hristov, A.N. and Ropp, J.K. 2003. Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86:2416-2427.
- Hwang W.U., Kim G.H., Niu K.M., Lim J.H., Woo J.H., Chae H.S., Park N.G. and Kim S.K. 2017. Fermentation characteristics of juice pomace feed by horse feces microbes. *Journal of the Korean society of grassland and forage science*. 37:290-300.
- Julliand, V., De Fombelle, A., Drogoul, C. and Jacotot, E. 2001. Feeding and microbial disorders in horses: Part 3 – Effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science*. 21:543-546.
- Kim, K.H., Kim, K.S., Lee, S.C., Oh, G.Y. and Kim, K.J. 2003. Effects of total mixed rations on ruminal characteristics digestibility and beef production of Hanwoo steers. *Journal of Animal Science and Technology*. 45:387-396.
- Kobayashi, Y., Koike, S., Miyaji, M., Hata, H. and Tanaka, K. 2006. Hindgut microbes, fermentation and their seasonal variations in Hokkaido native horses compared to light horses. *Ecological Research*. 21:285-291.
- Korean Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. 2015. <https://www.afx.or.kr/>
- Lattimer, J.M., Cooper, S.R., Freeman, D.W. and Lalman, D.A. 2005. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* fermentation of a high concentrate or high fiber diet in horses. In Proceedings of the 19th Symposium of the Equine Science Society. Tucson, AZ. 168-173.
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Bartnikowska, E., Leontowicz, H., Kulasek, G. and Trakhtenberg, S. 2001. Sugar beet pulp and apple pomace dietary fibers improve lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Food Chemistry*. 72:73-78.
- Mahala, A.G., Elseed, F. and Nasir, A. 2016. Chemical composition and *in vitro* gas production characteristics of six fodder trees leaves and seeds.
- Manzano, A., Freitas, A.R., Esteves, S.N. and Novaes, N.J. 1999. Polpa de citros peletizada na alimentação de equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29:1327-1332.
- McDaniel, A.L., Martin, S.A., McCann, J.S. and Parks, A.H. 1993. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on *in vitro* equine cecal fermentation. *Journal of Animal Science*. 71:2164-2172.
- Medina M, Girard I.D, Jacotot E and Julliand V. 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *Journal of Animal Science*. 80:2600-2609.
- Moreira, C.G., Bueno, I., Menezes, M.L., Mota, T.P., Souza, A.D., Tavares, A.F., Augusto L.S. and Brandi, R.A. 2015. Palatability and digestibility of horse diets containing increasing levels of citrus pulp. *Revista MVZ Córdoba*. 20:4544-4555.
- Nawirska, A. and Kwaśniewska, M. 2005. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*. 91:221-225.
- O'Shea, N., Arendt, E. K. and Gallagher, E. 2012. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 16:1-10.
- Pond, W.G., Church, D.C. and Pond, K.R. 1995. Measurement of feed and nutrient utilization and requirements in animals. *Basic Animal Nutrition and Feeding*, 4th ed. (Pond, WG, Church, DC and Pond, KR eds.), John Wiley & Sons, New York. pp. 49-63.
- Rahmat, H., Hodge, R.A., Manderson, G.J. and Yu, P.L. 1995. Solid-substrate fermentation of *Kloeckera apiculata* and *Candida utilis* on apple pomace to produce an improved stock-feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11:168-170.
- Rechkemmer, G., Ronnau, K. and von Englehardt, W. 1988. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 90:563-568.
- SAS. 2003. Statistical Analysis System, Version 9.1 USA.
- Satter, L.D. and Slyter, L.L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*. 32:199-208.
- Seo, I.J., Lee, D.H. and Lee, S.H. 2005. Effects of different ratios of nonfibrous carbohydrate to ruminally degradable protein on *in vitro* fermentation and lactation performance of dairy cows. *Journal of Animal Science and Technology*. 47:625-636.
- Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S. and Attri, S. 2012. Chemical composition, functional properties and processing of carrot – a review. *Journal of Food Science and Technology*. 49:22-32.
- Shirazi-Beechey, S.P. 2008. Molecular insights into dietary induced colic in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 40:414-421.
- Sudha, M.L., Baskaran, V. and Leelavathi, K. 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the

- rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*. 104:686-692.
- Tilley, J.M. and Terry, R.A. 1963. A 2-stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*. 18:104-111.
- Walde, S.G., Math, R.G., Chakkravarthi, A. and Rao, D.G. 1992. Preservation of Carrots (*Daucus carota* L.) By Dehydration Techniques. *Indian Food Packer*. 46:37-37.
- Yang, S.J., Koh, S.M., Yang, T.I., Jung, I.C. and Moon, Y.H. 2006. Feeding effect of citrus byproduct on the quality of cross-bred black pig in Jeju island. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 35:897-902.
- Yang, X., Kang, S.M., Jeon, B.T., Kim, Y.D., Ha, J.H., Kim, Y.T. and Jeon, Y.J. 2011. Isolation and identification of an antioxidant flavonoid compound from citrus processing by product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91:1925-1927.

(Received : August 26, 2017 | Revised : November 13, 2017 | Accepted: November 13, 2017)