

Research Article

에너지 수준별 사료 급여가 임신마의 혈액과 미생물 성상 및 자마의 생시체중에 미치는 영향

황원욱, 박남건, 최재영, 유지현, 조인철, 우제훈*
농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산연구소

Change on Blood Parameter, Fecal Microorganism and Physiological of Neonatal Foal by Different Digestible Energy Level on Pregnant Mares

Won-Uk Hwang, Nam Geon Park, Jae Young Choi, Ji hyun Yoo, In Cheol Cho and Jae Hoon Woo*
National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the optimal digestible energy levels on pregnancy mares. Physical changes and fecal microorganism in pregnant horse and changes in birth characteristics of neonatal foals were investigated. The experiment was conducted by 18 mares (Jeju crossed bred, older than 36 months) into three treatment groups. The experimental diet consisted of 80%, 100%, 120% digestible energy levels based on NRC. The average daily intake was lower in the 120% (8.75±1.01) than the 100% (9.34±0.92), 80% (9.14±0.88) and there was significant difference ($p<0.05$). The feed efficiency was lower in the 120% than 80%, 100% ($p<0.05$). Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride was higher in 120% than others ($p<0.05$). However there were no health problem and there was no difference between the treatment groups in the birth characteristics of neonatal foals. At the phylum level, *Fibrobactres* was difference by digestible energy levels, 80% (8.53%) was higher than 100%, 120%. At the genus level, *Bacteroides* and *Kineothrix* increased in fecal proportions with increasing digestible energy levels ($p<0.05$). *Fibrobacter* showed higher composition at 80% than 100% and 120% ($p<0.05$).

(Key words: Pregnancy Mare, Neonatal Foal, Digestible Energy Level)

I. 서론

2019년 기준으로 국내 말 사육두수는 27,246두로 2013년 24,467두에 비교해 점차 증가하고 있으며, 그에 따라 산업 규모도 커지고 있다. 용도별로 분류하면 승용마가 11,915두로 가장 많으며, 경주용이 8,129두, 번식용이 4,530두로 이용된다 (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2020). 품종으로는 교잡마가 국내 말 전체 사육두수의 34%에 해당하는 9,436두가 사육되고 있어 더러브렛 11,814두에 이어 두번째로 많이 사육되고 있다. 그러나 현재 국내에선 교잡마의 적정 영양소 수준에 관한 연구가 이루어지지 않고 있다. 특히 농가의 수익과 직결되는 임신마의 관리 방법에 대한 연구가 우선적으로 필요한 실정이다. 말의 임신기간은 약 330~345일이며 자마의 성장은 분만 전 1~3개월 전에 급격하게 일어난다. 암말의 번식, 생리학적 상태에 따라 영양소 요구량이 변화하는데 (Morley and

Murray, 2014.), 임신 후기 말의 에너지 요구량은 말의 유지 에너지 요구량에서 20~50%가 증가한다. 이 시기에 적절한 영양소가 공급되지 않을 경우, 분만 자마 및 산유량에 영향을 미칠 수도 있다. 그래서 임신기간, 특히 임신 후기 임신마의 적절한 영양소의 공급은 말 사양에 있어서 중요한 요소이다. 임신마 영양소 급여에 대한 선행연구로는 BCS (Body condition score)가 평균 6인 임신한 더러브렛에게 분만 60일전 NRC 영양소 급여 기준인 22.0 Mcal보다 높은 23.0 Mcal 급여했을 경우, 임신마의 증체량은 차이가 없었고 자마는 정상적으로 분만하였다고 보고되었다 (Kowalski et al., 1990). 그리고 임신마의 분만 전 90일 동안 에너지 급여량을 제한했을 때 평균 임신기간은 350일이었으며, 모든 임신마의 체중은 감소하였으나 특이적인 차이는 없었고, 정상적인 자마를 생산했다고 보고되었다 (Banach and Evans, 1981). 이처럼 국내의 연구 상황 등을 고려했을 때, 임신 교잡마의 건강과 자마의 생산성을 고려한 임신후기 고에너지 사료 급여에 대한

*Corresponding author: Jae-Hoon Woo, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea.
Tel: +82-64-754-5722, E-mail: delpire@korea.kr

연구가 필요하다. 하지만 말은 기본적으로 비반추 초식동물이므로 소화생리를 고려했을 때 많은 양의 조사료를 기초로 곡류의 급여를 통해 에너지 요구량을 충족시켜야한다 (Oliveira et al., 2003). 따라서 본 연구에서는 한라마 임신마의 적정 가소화 에너지 수준을 설정하기 위하여 가소화에너지를 급여수준에 따른 한라마 임신마의 체중, 체형, 혈액, 분변 미생물의 변화와 신생 자마의 생시체중과 체형을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

본 시험은 한라마 (제주마×더러브렛) 자연 교배로 임신한 한라마 암말 18두를 이용하였으며, 평균체중은 388.67 ± 33.74 kg 이었다. 모든 공시동물은 콘크리트 마사(4.2×27.8 m²)에서 집단 관리하였다.

2. 시험 설계

본 시험은 영양소 수준별 사료 급여가 임신중인 한라마에게 미치는 영향을 확인하기 위해 NRC (2007)에서 제시한 에너지 수준의 80%, 100%, 120%로 시험사료를 제작하였으며(Table 1), 각 처리구당 6마리로 시험을 구성하였다. 분만 1~2달 전인 임신후기 말에게 두당 일일 사료 섭취량을 10 kg 기준으로 오전 9 시에 1회 사료를 급여하였으며, 음수는 자유급여 하였다. 시료

Table 1. Ingredients and composition of TMR mixture used in the experiments

Items	Treatment		
	80%	100%	120%
Ingredient, %			
Corn gluten feed	22.00	21.94	21.86
Molasses	2.00	1.99	1.99
Beet pulp	2.00	1.99	1.99
Corn grain (Grounded)	7.00	6.98	6.95
Alfalfa	30.00	29.92	29.80
Orchard straw	12.00	11.97	11.92
NaHCO ₃	2.00	1.99	1.99
Total mix	1.00	1.00	0.99
Water	22.00	21.94	21.86
+Soy oil, Kg	0.00	0.27	0.66
Digestible energy, Mcal	1.6	1.92	2.30
Crude protein, g	692	692	692

채취 및 조사는 임신마 분만 직후 진행되었으며 임신마의 체중, BCS, 혈액조성, 분변 미생물 성장 등을 조사하였다.

3. 체중, 섭취량, 체형 조사

임신마의 개시 체중과 분만 당일 체중 그리고 신생자마의 체중은 말 전용 체중계를 이용하여 측정하였다. 임신마의 체형은 BCS (Body condition score)를 기준으로 시험 개시일과 분만 당일의 체형을 비교하였으며, 신생자마는 분만 당일 체중, 체형, 체고 등을 측정하였다. 사료섭취량은 매일 사료의 급여량과 잔량을 빼서 계산했으며, 사료효율은 증체량을 섭취량으로 나누어 계산하였다.

4. 혈액 분석

말의 혈액은 말의 정맥에서 혈액을 채취하여 당일 분석하였다. 일반 화학성상 분석은 실리콘으로 처리된 혈청튜브 (vacutainer®, BD, UK)를 이용하여 3,000 rpm, 15분간 원심분리기(HA-12, Korea)로 혈청을 분리하여 전자동 건식 생화학분석기 (FUJI DRI-CHEM 7000i, FUJIFILM, Japan)을 이용하여 분석하였다. 말 전혈 혈구 분석 (complete blood count, CBC)은 실리콘으로 처리된 EDTA 혈액튜브 (vacutainer®, BD, UK)를 이용하여 전혈 상태로 Vet scan HM2 (qmqveterinary hematology analyzer, Hungary)를 이용하여 분석하였으며 항목은 WBC (white blood cell), RBC (red blood cell), HGB (hemoglobin), PLT (platelet) 등을 분석하였다. 콜레스테롤 및 면역 물질은 항응고제 0.11 mol/L 혹은 3.2% sodium citrate와 검체의 비율이 1:9인 튜브에 담은 후 N Latex IgE, IgG, IgM mono (Dade Behring Inc., Newark, DE, USA) 시약과 BN II system (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA)을 이용하여 면역비탁법으로 측정하였다.

5. 분변 미생물 군집 분석

분변을 말의 직장을 통하여 채취하여 0.5 g의 시료를 제조회사의 지시에 따라 PowerFecal DNA 단리 키트 (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA)로 게놈 DNA 추출을 하였다. DNA의 농도와 순도를 분광광도계 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE)를 사용하여 광학밀도로 평가하고 약 500 ng의 DNA를 PCR에 사용했다. 16S rRNA 유전자는 바코드 프라이머를 사용하여 배설물 내용물의 개별 메타 게놈 DNA 시료로부터 PCR로 증폭시켰다. 16S rRNA 유전자의 V4 초가변 영역의 증폭을 위해 범용 프라이머 쌍 (V3-F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCC TACGGGNGGCWGCAG-3', V4-R:5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGA

TGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'.) 을 이용하여 Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA; Caporaso et al., 2012)로 염기서열을 밝혔다. Earth microbiome 프로젝트 (www.earthmicrobiome.org)를 참고하여 16S rRNA 유전자의 PCR 을 위한 280개의 다른 12 bp 바코드를 사용하였다. 5'-바코드 증폭물 은 300 ng의 주형 DNA, 마스터믹스 (Lucigen, Middleton, WI) 및 각 10 μ M 프라이머를 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 PCR 조건은 94°C에서 3분간의 초기 변성 단계와 94°C에서 45초, 50°C에서 1분간 및 72°C에서 90초간의 35사이클, 72°C에서 10분 동안 신장을 하였다. QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 복제 된 앰플리콘을 정제한 다음, 서열분석 전에 0.5 mg/ml ethidium bromide로 염색된 1.2 % (wt/vol) 아카로스 젤에서 전기영동으로 시각화하였다. 염기서열 분석은 Illumina Miseq와 함께 Macrogen, Inc. (Seoul, Korea)에서 수행되었다. OTU (operational taxonomic unit, OTU) 분석은 시퀀스데이터를 SILVA 참조 데이터베이스를 사용하여 품질 조정 및 정렬을 하였다. 잠재적인 키메라 서열은 MOTHUR 에 통합된 chimera.uchime를 사용하여 확인 후 제거하였다. 서열 라이브러리는 α - 및 β - 다양성 비교를 위한 동일한 수의 서열을 포함하도록 무작위로 서브 채취되었고, 검증된 서열은 97% 유사성에 기초한 OTU에 할당되었다. Shannon diversity index(H')와 Chao1 richness estimator를 계산하였다. RDP (ribosomal database project) 파이프 라인과 분류자 기능을 사용하여 80%의 신뢰도 임계값에서 ID를 정렬하고 할당하였다. 가중치 및 가중치가 적용된 UniFrac 테스트를 적용하여 두개 이상의 커뮤니티가 동일한 구조를 유지하는지 확인하였다. 선택한 OTUs의 상대적 존재를 보여주는 히트맵은 R 버전 3.1.0 (<http://www.r-project.org/>) 패키지를 사용하였다.

6. 통계분석

통계분석은 SAS enterprise guide 9.1 (Statistical Analysis

System, USA)을 이용하여 분산분석 (ANOVA)을 실시하였다. 각 처리구간의 평균값은 Duncan의 다중검정법에 의하여 신뢰도 95% 수준으로 비교 검정하였다 (Steel and Torrie, 1980).

III. 결과 및 고찰

1. 체중, 섭취량, 사료효율의 변화

가소화 에너지 급여 수준에 따른 임신 한라마의 체중변화, 사료섭취량 및 BCS 변화는 Table 2와 같다. 가소화에너지 80%, 100%, 120% 수준 사료를 급여한 암말의 출산 후 체중은 각각 396.38 \pm 32.17 kg, 392.08 \pm 43.1 kg 402.29 \pm 50.92 kg으로 나타났고 출산 전·후 체중 변화가 각각 17.1 \pm 17.5 kg, 18.25 \pm 16.74 kg, 14.43 \pm 24.22 kg로 나타나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 처리별 일일 평균 섭취량과 사료 효율은 120% 처리구가 8.75 \pm 1.01과 1.68 \pm 0.23으로 80% 처리구에 비하여 낮은 값을 보였다 ($p < 0.05$). 말의 사료에서 식물성 기름은 사료의 에너지 함량을 증가시키기 위해 이용되며, 사료 내 2~10%의 첨가가 적당하다는 보고가 있다 (Betz et al., 1979). 그러나 사료에 콩기름의 추가는 섭취량을 저하시킬 수 있다고 보고가 있다 (de Almeida and de Godoi, 2011). 사료 섭취량이 감소한 것은 콩기름이 기호성에 악영향을 미치지 않은 것으로 판단되어지며, 120% 처리구가 가장 낮은 것은 콩 기름의 첨가로 인해 사료내 에너지 함량이 높아져 섭취량이 소량 감소한 것으로 판단된다. 그 외에 분만 후 임신마의 BCS 변화는 처리에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다.

2. 콜레스테롤 및 면역물질의 변화

가소화 에너지 급여 수준에 따른 임신 한라마의 분만 후 콜레스

Table 2. Effect of digestible energy level on the weight and BCS of pregnancy in horse before and after child birth

Items	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
Initial body weight, kg	413.5 \pm 36.61	410.33 \pm 32.17	416.71 \pm 33.17	0.94
Final body weight, kg	396.38 \pm 32.17	392.08 \pm 43.11	402.29 \pm 50.92	0.90
Body weight gain, kg	17.13 \pm 17.57	18.25 \pm 16.74	14.43 \pm 24.22	0.93
Average daily feed intake	9.14 \pm 0.88 ^{ab}	9.34 \pm 0.92 ^a	8.75 \pm 1.01 ^b	0.05
Feed efficiency	1.89 \pm 0.19 ^a	1.97 \pm 0.21 ^a	1.68 \pm 0.23 ^b	<0.01
Initial BCS	5.5 \pm 0.53	5.67 \pm 0.82	5.57 \pm 0.53	0.89
Final BCS	5.00 \pm 0.53	5.17 \pm 0.41	5.29 \pm 0.76	0.65

*Mean \pm standard deviation

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly($p < 0.05$)

테롤 및 면역 변화는 Table 3과 같다. 120% 처리구에서 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방의 농도가 각각 169.40±81.30 mg/dl, 89.60 ± 11.06 mg/dl, 28.60 ± 6.19 mg/dl, 60.00 ± 16.83 mg/dl로 다른 처리구에 비해서 높게 나타났다 ($p<0.05$). 하지만 혈중 HDL-콜레스테롤의 비율은 80%와 100%가 120%에 비하여 낮았다 ($p<0.05$). 말에게 대두유를 급여하였을 때

혈중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도에 영향을 미치지 않는다고 하였으며, 콜레스테롤 농도는 75 - 150 mg/dl를 유지한다고 하였다 (Kaneko et al., 1997). 이러한 결과를 토대로 본 연구에서 120% 가소화 에너지 급여구가 혈중 콜레스테롤이 대조구에 비해 높게 나타났는데 이는 대두유의 섭취 영향보다는 고에너지 사료를 급여한 영향으로 판단되어진다. 본 연구에서의

Table 3. Effect of digestible energy level on cholesterol and immunoglobulin on mares

	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
Cholesterol				
Total-Cholesterol, mg/dl	86.17±20.97 ^b	91.83±9.55 ^b	169.40±81.30 ^a	0.02
HDL-Cholesterol, mg/dl	68.50±13.07 ^b	76.50±7.29 ^{ab}	89.60±11.06 ^a	0.02
LDL-Cholesterol, mg/dl	16.67±6.86 ^b	15.50±4.51 ^b	28.60±6.19 ^a	0.01
Triglyceride, mg/dl	16.67±12.11 ^b	22.50±18.09 ^b	60.00±16.83 ^a	0.02
HDL cholesterol ratio, %	80.53±8.97 ^a	83.86±9.85 ^a	60.03±19.10 ^b	0.02
Immunoglobulin				
IgG, mg/dl	586.83±118.11	624.17±195.80	591.67±160.96	0.91
IgM, mg/dl	158.50±68.65	165.17±66.46	128.00±22.38	0.50

*Mean±standard deviation

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly($p<0.05$)

Table 4. Effect of digestible energy level on blood chemical composition on mares

Item	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
BUN, mg/dl	14.6 ± 5.5	15.0 ± 3.7	10.7 ± 4.2	0.22
Creatinine, mg/dl	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.39
Bilirubin, mg/dl	2.0 ± 0.7	2.0 ± 1.2	3.2 ± 1.6	0.16
Inorganic-phosphorus, mg/dl	2.8 ± 0.4	3.2 ± 1.0	3.9 ± 1.2	0.23
Calcium, mg/dl	12.5 ± 1.2	12.9 ± 0.5	11.8 ± 1.1	0.19
Glucose, mg/dl	102.0 ± 17.6	97.8 ± 14.5	129.3 ± 38.2	0.12
BUN:Creatinine ratio, %	13.4 ± 5.6	14.8 ± 4.9	9.2 ± 3.4	0.13
Amylase, U/l	33.2 ± 8.7	24.8 ± 5.5	63.2 ± 67.0	0.26
Lipase, U/l	30.8 ± 20.3	19.5 ± 9.5	20.3 ± 9.4	0.34
Protein, g/dl	7.9 ± 0.4 ^{ab}	8.6 ± 0.5 ^a	6.5 ± 1.8 ^b	0.02
Albumin, g/dl	3.8 ± 0.2 ^a	3.9 ± 0.2 ^a	3.3 ± 0.6 ^b	0.04
Globulin, g/dl	4.0 ± 0.4 ^{ab}	4.7 ± 0.6 ^a	3.2 ± 1.3 ^b	0.04
Albumin:Globulin ration	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.17
ALP, U/l	227.6 ± 36.9	308.8 ± 59.4	643.5 ± 513.5	0.09
GGT, U/l	21.2 ± 3.4	30.7 ± 17.6	20.2 ± 9.3	0.29
ALT, U/l	9.4 ± 4.0	9.0 ± 3.0	11.5 ± 7.7	0.70

*Mean ± standard deviation

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly($p<0.05$)

Table 5. Effect of digestible energy level on complete blood cell count (CBC) on mares

Item	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
WBC, K/ μ l	89.52 \pm 32.74	42.37 \pm 45.77	35.23 \pm 33.68	0.07
RBC, M/ μ l	7.89 \pm 0.52	8.09 \pm 1.23	8.14 \pm 0.33	0.87
HGB, g/dl	22.22 \pm 1.94	19.12 \pm 2.96	17.93 \pm 5.16	0.20
HCT, %	44.88 \pm 4.07	42.52 \pm 4.92	42.40 \pm 3.22	0.56
MCV, fL	56.84 \pm 1.60	52.88 \pm 3.40	52.18 \pm 4.60	0.10
MCH, pg	28.08 \pm 0.80	25.10 \pm 4.73	23.05 \pm 5.67	0.21
MCHC, g/L	49.50 \pm 1.87	46.66 \pm 6.65	39.78 \pm 13.27	0.22
RDW, %	16.14 \pm 1.05	17.30 \pm 2.00	20.72 \pm 7.53	0.30
RDW ratio, %	28.24 \pm 1.54	30.63 \pm 5.06	32.13 \pm 4.06	0.27
PLT, 10 ⁹ /L	550.80 \pm 200.77	428.00 \pm 209.55	298.50 \pm 206.11	0.17
LYM, 10 ⁹ /L	69.44 \pm 23.08	28.70 \pm 37.51	25.83 \pm 28.65	0.07
LYM ratio,	26.78 \pm 32.04	22.64 \pm 5.08	20.41 \pm 11.91	0.85
MON, K/ μ l	10.56 \pm 6.79	7.22 \pm 6.47	7.53 \pm 7.22	0.69
MON ratio,	11.08 \pm 6.33	10.19 \pm 3.53	8.43 \pm 5.43	0.69
NEUT, 10 ⁹ /L	13.56 \pm 13.40	8.76 \pm 6.51	8.12 \pm 2.66	0.52
NEU ratio,	61.62 \pm 34.50	66.02 \pm 7.78	72.23 \pm 7.59	0.67
EOS, K/ μ L	0.70 \pm 0.53 ^a	0.13 \pm 0.05 ^b	0.12 \pm 0.12 ^b	0.01
EOS ratio,	1.72 \pm 1.98	2.80 \pm 1.73	1.50 \pm 1.32	0.39

*Mean \pm standard deviation^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly($p < 0.05$)

Table 6. Physical characteristics of neonatal foals born by the different energy levels of mares.

Items	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
Body weight, kg	43.57 \pm 4.09	39.50 \pm 5.51	40.17 \pm 8.86	0.47
Wither length, cm	94.30 \pm 2.94	89.08 \pm 4.20	90.83 \pm 4.45	0.07
Body length, cm	65.65 \pm 3.61	63.62 \pm 2.99	65.30 \pm 6.85	0.72

*Mean \pm standard deviation

120% 급여구가 총 콜레스테롤의 함량이 169 mg/dL로 일반적인 범 위보다 약간 높아 120%의 가소화 에너지를 급여하는데 고려가 필 요하다고 판단된다. 면역 관련한 수치인 IgG와 IgM은 100%가 가 장 높은 수치를 나타내었지만 처리구간 유의적인 차이는 없었다.

3. 혈중 화학 성상 및 혈액 일반성분(CBC) 변화

Table 4와 5는 가소화 에너지 급여 수준에 따른 임신 한라마 의 분만 후 혈중 화학 성상 및 혈액 일반성분 변화를 나타내었다. 혈중 화학성상에서는 단백질, 알부민, 글로불린이 120% 처리구 에서 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 일부 임신마는 임신기 간 동안 혈중 글로불린이 약간 증가하지만, 알부민은 감소하여 혈중 총 단백질의 농도가 감소한다 (Souza et al., 2019).

혈액 내 알부민과 글로불린 수치는 면역력과 관련이 있는 것

으로 알려져 있어 이 수치가 낮으면 면역력이 떨어질 가능성이 있지만 (Pritchard et al., 2009), 수치는 정상범위 내에 있었고 실 제로 임신마에게 질병 발생 등의 문제는 나타나지 않았다.

4. 출생 자마의 생시 체중, 체고, 체장

가소화 에너지 급여 수준 별 임신 한라마가 출산한 자마의 생 시 특성은 Table 6과 같다. 생시체중은 80, 100, 120% 처리구에 서 각각 43.5 \pm 4.09, 39.5 \pm 5.51, 40.1 \pm 8.86 kg으로 처리구별 로 유의한 차이는 나타나지 않았다 ($p > 0.05$). 체고와 체장에서 도 가소화 에너지 급여에 따른 차이는 나타나지 않았다. 선행 연구 에서 임신마에게 NRC 사양표준에 맞는 영양소 급여구와 NRC 사양표준의 영양소 요구량의 85%를 급여구로 나누어 분만 전과 분만 후 임신마와 자마의 혈액 성분 및 체중 차이를 조사한 결과

두 처리구 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Sutton et al., 1977). 그리고 임신마의 마지막 임신기간 90일 동안 에너지 섭취량을 제한했을 때 평균 임신기간은 350일이었으며 씨암말의 체중 감소가 있었으나, 정상적인 자마가 생산됐다는 보고가 있었다 (Banach et al., 1981). 또한 BCS가 평균 6인 임신마에게 분만 60일전에 권장량보다 약간 높은 가소화 에너지를 급여한 경우, 임신마에게 증체량에는 차이가 없었으나 분만한 자마는 정상적이었다고 보고하였다 (Kowalski et al., 1990). 일반적으로 임신기 말의 생리적 특성을 고려할 때 더 높은 영양소 급여가 필요한 것으로 알려져 있어 본 실험에서 높은 수준의 가소화 에너지를 급여하였지만 이것이 자마의 체중 및 생식 특성에 영향을 미치는 결과를 확인하지는 못했다. 그래서 더 높은 에너지 급여가 자마의 생산성에 영향을 미치는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

5. 임신마 분변의 미생물군집의 구조 분석

임신마에게 3개 수준의 가소화에너지로 사료를 급여한 후 분변에서의 미생물 군집 변화를 조사하였다. 한라마 임신마의 분변의 다양성을 분석하기 위하여 16,224개 이상의 염기서열을 분석하였다 (Fig. 1). Alpha-diversity를 분석하기 위하여 OTU, Chao1, Shannon, Inverse Simpson의 지표를 이용하였다 (Table 7). OTU 값은 120% 처리구가 528.00으로 80% (738.00)와 100% (735.67)에 비해 높았으며, Chao1와 Shannon도 120%가 585.22와 6.38로 80%와 100%에 비해 낮은 값을 보였다 ($p < 0.05$).

반추동물인 면양에게 가소화에너지를 대조구에 비해 20% 감소시켜 급여하였을 때 OTU 수가 대조구에 비해 높았다 (Cui et al., 2019). 말의 섬유질, 전분, 기름이 풍부한 사료를 급여하여 분변 미생물의 다양성을 비교한 연구에서는 섬유질이 풍부한 사료보다 전분과 기름이 풍부한 사료를 급여하였을 때 분변 미생물군의 다양성이 감소한다고 보고하였다 (Dougal et al., 2014). 앞의 두 연구들은 소화기관에 발효를 포함하고 있는 동물들의 식이 수준과 형태에 따라 미생물군에 영향을 미친다고 결론짓고 있다.

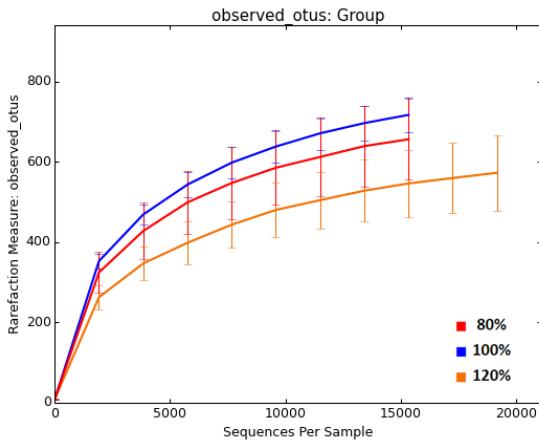


Fig. 1. Rarefaction analysis on fecal microbiota of mare on different energy level diet.

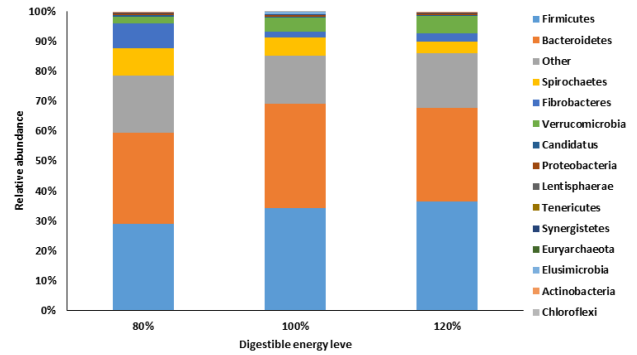


Fig. 2. Taxonomic profile on the fecal microbiota of mare on different digestible energy level diet at phylum level

Table 7. Alpha-diversity analysis on fecal microbiota of mare fed with different digestible energy level diet

Indices ¹⁾	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
OTUs	738.00	735.67	528.00	0.01
Chao1	840.25	820.05	585.22	0.01
Shannon	7.23	7.13	6.38	0.04
Inverse Simpson	0.98	0.98	0.97	0.23

¹⁾OTU (Operational Taxonomic Unit): an operational definition of a species or group of species when only DNA sequence data is available. Chao1 (Chao 1 index): the predicted number of taxa in a sample. Shannon: the index for the number and evenness of species.

Table 8. Relative abundance on the fecal microbiota of mare on difference digestible energy level diet at the genus level (>1.0%)

Item	Digestible energy level			p-value
	80%	100%	120%	
<i>Others</i>	18.95 ± 3.09	16.04 ± 2.12	18.21 ± 10.90	0.80
<i>Treponema</i>	9.03 ± 1.64	6.18 ± 4.13	3.79 ± 0.76	0.22
<i>Prevotella</i>	8.01 ± 6.52	2.08 ± 2.20	7.80 ± 2.89	0.30
<i>Bacteroides</i>	2.55 ± 0.87	3.19 ± 1.12	10.19 ± 1.32	<0.01
<i>Fibrobacter</i>	8.53 ± 3.95	1.76 ± 0.89	2.77 ± 0.84	0.05
<i>Akkermansia</i>	2.25 ± 0.87	4.81 ± 5.23	5.82 ± 2.17	0.53
<i>Oscillibacter</i>	3.35 ± 1.68	4.03 ± 0.64	4.30 ± 4.24	0.88
<i>Galbibacter</i>	1.95 ± 0.45	5.03 ± 1.57	0.99 ± 0.42	0.02
<i>Parabacteroides</i>	3.63 ± 3.38	2.71 ± 3.28	1.44 ± 0.66	0.74
<i>Parapedobacter</i>	1.17 ± 0.42	2.86 ± 2.54	2.61 ± 2.64	0.58
<i>Kineothrix</i>	1.24 ± 0.04	2.01 ± 1.01	3.65 ± 0.60	0.03
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.79 ± 0.30	1.49 ± 1.25	3.09 ± 0.29	0.18
<i>Flintibacter</i>	1.69 ± 0.34	2.47 ± 0.73	1.16 ± 0.48	0.11
<i>Intestinimonas</i>	1.58 ± 0.55	2.26 ± 0.34	1.65 ± 0.08	0.19
<i>Mediterraneibacter</i>	1.91 ± 1.30	0.95 ± 0.45	2.94 ± 1.82	0.28
<i>Anaerophaga</i>	1.92 ± 0.48	1.36 ± 0.72	1.53 ± 1.57	0.75
<i>Capnocytophaga</i>	1.55 ± 0.59	1.94 ± 0.64	1.12 ± 1.58	0.63
<i>Prevotellamassilia</i>	0.93 ± 0.51	2.49 ± 0.58	1.18 ± 0.95	0.07
<i>Paludibacter</i>	2.03 ± 1.24	1.63 ± 1.12	0.78 ± 1.09	0.54
<i>Sporobacter</i>	0.56 ± 0.21	2.71 ± 1.44	1.23 ± 0.61	0.10

*Mean ± standard deviation

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly($p < 0.05$)

Fig. 2에는 문 수준 (phylum level)에서 가소화 에너지 수준에 따른 임신마의 분변 미생물군을 비교하였다. 그 결과 세 처리구 모두 공통적으로 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*가 가장 높은 비율을 보였으며, 두 수치의 합이 59.62% ~ 69.14%로 나타났다. *Fibrobacteres*은 에너지 수준에 따른 비율 차이를 보였는데, 80%가 8.53%로 100%와 120%에 비해 높은 비율을 보였다 ($p < 0.05$). 그 외의 문에서는 통계적 차이가 없었다. 말 분변 미생물 중에서 가장 많은 분포를 차지하는 것은 *Firmicutes* 문이라고 보고되어 있으며 위, 소장, 맹장, 대장과 같은 장내기관에서도 *Firmicutes* 문이 가장 높은 비율을 차지한다고 하였다 (Dougal, 2012; Costa et al., 2015).

시험 종료 후 가소화에너지 수준별 급여에 따른 임신마의 분변 미생물을 속 수준 (genus level)에서 비교하였다 (Table 8). *Bacteroides*와 *Kineothrix*은 가소화 에너지수준이 올라 갈수록 분변 내 비율이 증가하였다 ($p < 0.05$). *Fibrobacter*는 가소화 에너지가 80% 수준일 때 100%와 120%에 비해 높은 조성을 보였

다 ($p < 0.05$). *Galbibacter*는 100% 처리구에서 가장 높은 값을 보였다 ($p < 0.05$). *Fibrobacter*은 초식동물의 반추위에서 주로 발견되는 세균으로 섬유소를 분해하는 속이며 대표적으로 *Fibrobacter succinogenes*와 *Fibrobacter intestinalis*이 알려져 있다 (Neumann et al., 2017). *Bacteroides* 속은 포유류의 장내에서 주로 발견되는 세균 속으로 대표적인 장내 미생물이며, 많은 종들이 탄수화물과 아미노산의 이용에 관련되어 있다 (Dorland, 1981). *Kineothrix*은 혐기성 미생물로 당을 분해하여 butyrate를 생산하는 미생이다 (Haas and Blanchard., 2017). *Galbibacter*는 말, 당나귀, 토끼의 분변에서 주로 분리되는 미생물로 단위동물의 분변보다 더 높은 비중을 차지한다 (O'Donnell et al., 2017). 본연구에서 에너지 수준에 따라 분변 미생물에서 차이를 보인 미생물 속들은 반추동물이나 후장발효를 하는 동물들의 장내에서 발견되는 미생물들로 급여한 사료의 식이형태가 변함에 따라 차이가 있었던 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구에서는 임신후기 암말의 영양소 급여 수준이 임신마의 생리적 변화 및 미생물 성장과 자마의 생시 특성에 미치는 영향을 조사하기 위해 분석하였다. 처리별 일일 사료 섭취량과 사료 효율은 100%, 120% 처리구에서 각각 9.3 ± 0.9 와 8.7 ± 1.0 그리고 1.97 ± 0.21 과 1.68 ± 0.23 유의적으로 나타나 가소화 에너지가 80%와 120% 수준에서 감소하는 양상을 보였다. 혈중 콜레스테롤과 관련된 항목인 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 120% 처리구에서 높은 농도로 나타났지만 건강상의 큰 문제는 나타나지 않았다. 그리고 가소화에너지 수준에 따른 자마의 생시 특성을 비교한 결과에서도 차이를 확인할 수 없었다. 장내 미생물의 문 수준에서는 *Fibrobacteres*가 에너지 수준에 따른 비율 차이를 보였는데, 80%가 8.53%로 100%와 120%에 비해 높은 비율을 보였다 ($p < 0.05$). 속 수준에서는 *Bacteroides*와 *Kineothrix*은 가소화 에너지수준이 올라 갈수록 분변 내 비율이 증가하였다 ($p < 0.05$). *Fibrobacter*는 가소화 에너지가 80% 수준 일 때 100%와 120%에 비해 높은 조성을 보였다 ($p < 0.05$).

결론적으로 가소화 에너지 급여수준에 따라 임신마에게 가소화 에너지 수준별 TMR을 급여한 결과, 120% 급여구에서 사료 효율 및 지방수치가 높았으나 큰 문제는 나타나지 않았고 CBC 및 화학 수치를 조사한 결과, 모든 수치가 정상 범위 안에 있었다. 임신마의 사료 급여가 임신마뿐만 아니라 생시 자마의 생산성에도 큰 영향을 미치지 않았으나 임신마의 가소화 에너지 급여 수준에 따른 자마의 성장 특성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제명 : 임신 후기 한라마의 적정 영양수준 설정 연구, 과제번호 PJ01435920)의 지원 및 2020년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임

VI. REFERENCES

Banach, M.A. and Evans, J.W. 1981. The effects of energy intake during gestation and lactation on reproductive performance in mares. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Betz, N.L., Lanter, K.J., Breuer, L.H. and Steinke, F.H. 1979. U.S. Patent No. 4,166,867. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark

Office.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L. and Bauer, M. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. 6(8):1621-1624.

Costa, M.C., Silva, G., Ramos, R.V., Staempfli, H.R., Arroyo, L.G., Kim, P. and Weese, J.S. 2015. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*. 205(1):74-80.

Cui, K., Qi, M., Wang, S., Diao, Q. and Zhang, N. 2019. Dietary energy and protein levels influenced the growth performance, ruminal morphology and fermentation and microbial diversity of lambs. *Scientific Reports*. 9(1):1-10.

De Almeida, F.Q. and De Godoi, F.N. 2011. Soybean Oil in Horses' Diets. *Soybean and Nutrition*, September. doi:10.5772/21751

Dorland, W.A. 1981. *Dorland's Illustrated medical dictionary*. Saunders.

Dougal, K., De la Fuente, G., Harris, P.A., Girdwood, S.E., Pinloche, E., Geor, R.J., Nielsen, B.D., Schott II, H.C., Elzinga, S. and Newbold, C.J. 2014. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLoS One*. 9(2):e87424.

Dougal, K., Harris, P.A., Edwards, A., Pachebat, J.A., Blackmore, T.M., Worgan, H.J. and Newbold, C.J. 2012. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiology Ecology*. 82(3):642-652.

Haas, K.N. and Blanchard, J.L. 2017. *Kineothrix alysoides*, gen. nov., sp. nov., a saccharolytic butyrate-producer within the family Lachnospiraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67(2):402-410.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bluss, M.L. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals* (5th ed.). Academic Press, ISBN 9780123963055, New York, USA.

Kowalski, J., Williams, J. and Hintz, H.F. 1990. Weight gains of mares during the last trimester of gestation. *Equine Practice*. 12(7):6-10.

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2020.

Morley, S.A. and Murray, J.A. 2014. Effects of body condition score on the reproductive physiology of the broodmare: A review. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34(7):842-853.

Neumann, A.P., McCormick, C.A. and Suen, G. 2017. Fibrobacter communities in the gastrointestinal tracts of diverse hindgut-fermenting herbivores are distinct from those of the rumen. *Environmental Microbiology*. 19(9):3768-3783.

NRC. 2007. *Nutrient Requirements of Horses* (6th revolutions ed.). The National Academies Press, Washington, DC.

- O'Donnell, M.M., Harris, H.M., Ross, R.P. and O'Toole, P.W. 2017. Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *Microbiologyopen*. 6(5):e00509.
- Oliveira, C.A.D.A., Almeida, F.Q., Vieira, A.A., Lana, Â.M.Q., Macedo, R., Lopes, B.A. and Corassa, A. 2003. Kinetics of passage of digesta and water and nitrogen balance in horses fed diets with different ratios of roughage and concentrate. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(1):140-149.
- Pritchard, J.C., Burn, C.C., Barr, A.R. and Whay, H.R. 2009. Haematological and serum biochemical reference values for apparently healthy working horses in Pakistan. *Research in Veterinary Science*. 87(3):389-395.
- SAS. 2003. Statistical Analysis System, Version 9.1 USA.
- Souza, A.F., Schade, J., Ramos, A.F., Albuquerque, M.S.M., Fontequ, G.V., Costa, D., Muller, T.R. and Fontequ, J.H. 2019. Serum proteinogram of the Campeiro horse. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 71(2):363-368.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. and Dickey, D.A. 1980. Principles and procedures of statistics (2nd ed.). McGraw-Hill, New York.
- Sutton, E.I., Bowland, J.P. and Ratcliff, W.D. 1977. Influence of level of energy and nutrient intake by mares on reproductive performance and on blood serum composition of the mares and foals. *Canadian Journal of Animal Science*. 57(3):551-558.

(Received : March 15, 2021 | Revised : March 25, 2021 | Accepted : March 26, 2021)