

## *In vitro* 발효에서 Prebiotics와 Probiotics가 돼지 장내미생물과 발효산물에 미치는 영향

김동운<sup>1\*</sup> · 채수진<sup>1</sup> · 김영화<sup>1</sup> · 정현정<sup>1</sup> · 이성대<sup>1</sup> · 박준철<sup>1</sup> · 조규호<sup>1</sup> · 사수진<sup>1</sup> · 김인철<sup>1</sup> · 김인호<sup>2</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원

<sup>2</sup>단국대학교 동물자원학과

### Effects of Prebiotics and Probiotics on Swine Intestinal Microflora and Fermentation Products *In Vitro* Fermentation

Dong-Woon Kim<sup>1\*</sup>, Su-Jin Chae<sup>1</sup>, Young-Hwa Kim<sup>1</sup>, Hyun-Jung Jung<sup>1</sup>, Sung-Dae Lee<sup>1</sup>,  
Jun-Cheol Park<sup>1</sup>, Kyu-Ho Cho<sup>1</sup>, Soo-Jin Sa<sup>1</sup>, In-Cheul Kim<sup>1</sup>, and In-Ho Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, R.D.A., Seonghwan 331-308, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Resource and Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

(Received August 27, 2012 / Accepted December 27, 2012)

In the present study, the effects of prebiotics and prebiotics+probiotics on intestinal microflora and fermentation products were evaluated in a pig *in vitro* fermentation model. The substrates used in this study were iso-malto oligosaccharide (IMO), partially digested chicory-inulin (CI), raffinose (RA), and cyclodextrin (CD) as prebiotics and *Lactobacillus reuteri* as probiotics. For a pig *in vitro* fermentation, the experimental diet for growing pigs was predigested using digestive enzymes secreted by small intestine and this hydrolyzed diet was mixed with a buffer solution containing 5% fresh swine feces. The mixture was then incubated with either prebiotics or prebiotics+probiotics for 24 h. Samples were taken at 24 h, and viable counts of microflora, gas, pH, volatile organic compounds (VOCs) and short-chain fatty acid (SCFA) were analyzed. The viable count of *Enterobacteriaceae* was significantly decreased ( $p < 0.001$ ) in all treatments containing prebiotics and prebiotics+probiotics when compared to the control. However, the number of lactic acid bacteria increased in the prebiotics and prebiotics+probiotics treatment. The pH values in the fermentation fluid decreased in all treatments when compared to the control, and their effects were greater in the prebiotics+probiotics group than prebiotics group. Fermentation with prebiotics resulted in a reduction in malodorous compounds such as ammonia, hydrogen sulfide and skatole when compared to the prebiotics+probiotics group. Short-chain fatty acid production was also higher for treatment with prebiotics+probiotics than treatment with prebiotics. In conclusion, the results of this study demonstrated that fermentation with prebiotics was effective in reducing the formation of malodorous compounds and prebiotics+probiotics was effective in increasing lactic acid bacteria and SCFA and reducing the pH. Moreover, further studies will be needed to determine whether the results observed in the *in vitro* model would occur in pigs that ingest these prebiotics or probiotics.

**Keywords:** *in vitro* fermentation, prebiotics, probiotics, short-chain fatty acid

Probiotics는 살아있는 유익미생물이며 섭취에 의하여 숙주동물의 장내세균총을 변화시켜 건강에 유익한 작용을 한다(Havenaar and Huis in't Veld, 1992). Prebiotics는 대장에 존재하는 미생물 총 중에서 비피도박테리아와 락토바실러스의 성장을 선택적으로 자극한다(Schrezenmeir and de Vrese, 1999). 비피도박테리아는 락토바실러스속 미생물과 함께 건강증진작용을 하는 probiotic이다. 비피도박테리아는 대장균과 같은 병원성균을 억제한다고

알려져 있고, 이러한 기능은 초산, 유산과 같은 물질 생성으로 pH를 낮추거나 박테리오킨과 같은 항균물질을 생산함으로써 가능하다(Makras and Vuyst, 2006). 최근의 연구에서 probiotics는 돼지의 성장에 긍정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 비피도박테리아, 락토바실러스, 바실러스 및 효모와 같은 유익미생물이 가축의 성장을 증진시킨다고 보고되었다(Danek *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 1995; Mathew *et al.*, 1998; Alexopoulos *et al.*, 2004a, 2004b). Stewart 등(1993)의 보고에 의하면 prebiotics는 병원성균의 억제, 효소반응 촉진 및 암모니아와 페놀의 생산량을 감소시키는 효과를 보인다는 연구결과가 보고된 바 있다. 특히

\*For correspondence. E-mail: dwkim9405@korea.kr; Tel.: +82-41-580-6704; Fax: +82-41-580-6719

**Table 1.** Composition of the diets used during *in vitro* fermentation

Ingredients	%
Corn	70.45
Soy bean meal	17.91
Wheat	8.09
Soy bean oil	1.00
Limestone	0.97
Dicalcium phosphate	0.61
Vitamin/mineral premix <sup>a</sup>	0.35
L-lysine HCL	0.27
Salt	0.25

<sup>a</sup> Provided per kg diet: 20,000 IU of vitamin A, 4,000 IU of vitamin D<sub>3</sub>, 80 IU of vitamin E, 16 mg of vitamin K<sub>3</sub>, 4 mg of thiamine, 20 mg riboflavin, 6 mg of pyridoxine, 0.08 mg of vitamin B<sub>12</sub>, 20 mg niacin, 50 mg of Ca-pantothenate, 2 mg of folic acid and 0.08 mg biotin, 140 mg of Cu, 179 mg of Zn, 12.5 mg of Mn, 0.5 mg of I, 0.25 mg of Co and 0.4 mg Se.

nonstarch polysaccharides (NSP)는 분으로 배설되는 악취물질의 감소에 효과 있다고 보고 되었다(Mroz *et al.*, 2000). Nemcová 등(1999)의 보고에 의하면 fructo-oligosaccharide와 락토바실러스를 어린 돼지에 급여한 결과 락토바실러스, 비피도박테리아, 총 혐기성균 및 호기성균이 증가하였다고 하였다. 그러나 Mikkelsen 등(2003)은 fructo-oligosaccharide 급여하더라도 분변 박테리아수에 영향을 끼치지 않았다고 보고하였다. 따라서 이러한 개념은 아직 명확하지 않아 규명되어야 할 필요가 있으며, 결장의 미생물총을 유익한 미생물이 우점하도록 조절하는 probiotics와 prebiotics의 효과에 관한 연구자들의 관심이 높아지고 있다. Synbiotics, 즉 probiotics와 prebiotics의 조합은 장내미생물을 유익한 미생물총으로 변화시켜 숙주동물의 장 건강을 증진시킬 수 있다는 개념이다(Collins and Gibson, 1999). 특히 본 실험에서 사용하는 prebiotics 중에서 사이클로덱스트린은 난소화성 다당이며 돼지 장내 발효에 미치는 효과를 검토 함으로서 향후 prebiotics로서 사용 가능성에 대한 기초자료가 될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구는 돼지 *in vitro* 모델을 이용하여 장내 미생물과 발효산물 변화에 대한 4종류의 prebiotics와 1종류의 probiotics를 단독, 조합 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### Probiotics와 prebiotics

본 실험에서 사용한 prebiotics는 이소말토-올리고당(IMO), 부분분해 치커리이눌린(CI), 라피노스(RA), 사이클로덱스트린(CD)을 사용하였으며 probiotics는 *Lactobacillus reuteri*를 사용하였다.

### 소장조건에 의한 사료의 가수분해율 제조

육성돈(growing pig) 사료(Table 1)를 Boisen and Fernandez (1995)의 방법으로 미리 소장의 조건으로 가수분해 하였다. 1 g의 사료를 25 ml의 phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0)을 잘 혼합한 후, 1 M HCl을 사용하여 pH 2로 조정하였다. 이 혼합물에 pepsin (Sigma)을 0.04%를 첨가하고 37°C에서 4시간 shaking water bath에서 배양하였다. 두번째 단계에서는 10 ml의

phosphate buffer (0.2 M, pH 6.8)와 5 ml의 0.6 M NaOH 용액을 첨가하였다. 그리고 1 M HCl 또는 1 M NaOH 용액을 사용하여 pH 6.8로 조정하였다. Pancreatin (Sigma)을 0.14%를 첨가하고 shaking water bath에서 37°C, 18시간 배양하였다. 효소반응이 끝난 후 80°C에서 15분간 열처리하여 동결건조 하였다. 가수분해물은 소장에서 미리 소화된 사료로서 *in vitro* 발효시험에 사용되었다.

### In vitro 장내 발효

멸균완충액 100 ml에 육성돈의 신선한 분변 5 g과 1 g의 가수분해물을 첨가하고 잘 혼합한 후 0.5 g의 prebiotics 또는 1 ml의 probiotics ( $1 \times 10^9$  Log CFU/ml)를 넣었다. 혼합물을 CO<sub>2</sub>로 15분간 치환한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 시료를 채취하여 즉시 미생물의 수를 측정하였고, 샘플의 일부는 -20°C에 보관한 후 VOCs 및 SVFA를 분석하였다. 완충액의 조성(McDougall, 1948)은 1 L의 증류수에 9.8 g NaHCO<sub>3</sub>, 9.3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.67 g NaCl, 0.57 g KCl, 0.12 g MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.079 g CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O를 넣고 pH 7로 조정하였다.

### 가스량과 pH 측정

Serum bottle내의 발효과정에서 생성된 가스량은 water displacement apparatus (Ferorak and Hrwdey, 1983)를 사용하여 측정하였다. 발효액의 pH는 electronic pH meter (HANNA 212, Italia)를 사용하여 측정하였다.

### 암모니아, 휘발성유기물 및 황화수소 분석

발생된 ammonium ion (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)은 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 spectrophotometer를 이용하여 630 nm의 파장에서 측정하였다.

발효과정에서 생성된 VOCs의 농도는 gas chromatography를 사용하여 분석하였다(Willing *et al.*, 2005). 발효액은 원심분리하였고 상등액 2 ml에 4 ml의 4 M NaOH와 1 ml의 chloroform을 첨가하고 혼합하였다. 이것을 3,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 DB-5ms column이 장착된 gas chromatograph (Agilent, 6890N, USA)를 이용하여 분석하였다.

황화수소는 Gastec detector tube No. 4LL을 장착한 Gastec detector (Model GV-100, Gastec, Japan)를 사용하여 측정하였다.

### 단쇄지방산과 미생물 분석

발효액의 단쇄지방산 농도는 HP-INNOW WAX column이 장착된 gas chromatograph (Agilent, 6890N, USA)에 의하여 분석하였다.

발효액을 원심분리하고 5 ml 상등액은 0.05 ml의 saturated HgCl<sub>2</sub>와 1.0 ml의 25% HPO<sub>3</sub>와 혼합하였다. 그리고 혼합물은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 0.2 mm syringe filter로 여과하여 gas chromatography 방법으로 분석하였다.

### 미생물 분석

락토바실러스 미생물의 생균수는 MRS agar를 사용하였고 엔

**Table 2.** Counts of microflora after 24 h of *in vitro* fermentation of swine feces with prebiotics and/or probiotics<sup>a</sup>

Item (Log CFU/ml)	Without probiotics					With probiotics					SE <sup>b</sup>	P-value for contrasts <sup>c</sup>	
	CON	IMO	CI	RA	CD	P	IMO	CI	RA	CD		CON vs. OTH	PRE vs. SYN
Enterobacteriaceae	7.86	7.40	6.81	6.99	6.51	6.34	6.57	6.32	6.38	6.26	0.09	0.001	0.001
Lactic acid bacteria	8.00	8.26	8.26	8.18	8.18	8.65	9.28	9.34	9.08	9.00	0.02	0.001	0.001

<sup>a</sup> CON, control; P, CON + *Lactobacillus reuteri*; IMO, CON + iso-malto oligosaccharide 0.5%; CI, CON + chicory-inulin 0.5%; RA, CON + raffinose 0.5%; CD, CON + cyclo-dextrin 0.5%

<sup>b</sup> Pooled standard error

<sup>c</sup> Effects: CON, control; OTH, other treatment; PRE, prebiotics; SYN, prebiotics + probiotics

**Table 3.** Gas production and pH value after 24 h of *in vitro* fermentation of swine feces with prebiotics, and/or probiotics<sup>a</sup>

Item	Without probiotics					With probiotics					SE <sup>b</sup>	P-value for contrasts <sup>c</sup>	
	CON	IMO	CI	RA	CD	P	IMO	CI	RA	CD		CON vs. OTH	PRE vs. SYN
Gas production	8.83	17.50	17.00	13.33	16.33	8.33	17.33	15.33	9.68	18.33	0.57	0.001	0.040
pH	6.62	6.10	6.09	6.23	6.12	6.54	6.03	5.88	5.93	5.97	0.04	0.001	0.001

<sup>a</sup> CON, control; P, CON + *Lactobacillus reuteri*; IMO, CON + iso-malto oligosaccharide 0.5%; CI, CON + chicory-inulin 0.5%; RA, CON + raffinose 0.5%; CD, CON + cyclo-dextrin 0.5%

<sup>b</sup> Pooled standard error

<sup>c</sup> Effects: CON, control; OTH, other treatment; PRE, prebiotics; SYN, prebiotics + probiotics

테로박테리아는 DHL agar를 사용하였다. MRS agar plate는 혐기적 조건에서 37°C, 48시간 배양하였고 DHL agar plates는 37°C, 24시간 배양하여 생균수를 분석하였다.

### 통계분석

모든 실험 결과에 대한 통계분석은 SAS (Statistical Analysis System)의 GLM (General Linear Model)을 이용하여 분산분석을 실시하였다. 처리구간의 대비는 대조구(CON)와 다른 처리구(OTH), 프리바이오틱스(PRE)와 신바이오틱스(SYN, Prebiotics+Probiotics)로 구분하여 95% 유의수준으로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 미생물의 변화

돼지 *in vitro* 장관조건에서 prebiotics와 probiotics를 첨가하고 24시간 배양한 후 미생물 수를 분석하였다(Table 2). 엔테로박테리아의 수는 무첨가와 비교시 prebiotics, prebiotics+probiotics 첨가시 유의적으로 감소하였다( $p < 0.001$ ). 락토바실러스의 수는 무첨가와 비교시 prebiotics, prebiotics+probiotics 첨가한 모든 처리구에서 증가하였다. 특히 prebiotics 첨가구에 비하여 prebiotics+probiotics 첨가구에서 락토바실러스 수가 증가하였다. 인간의 경우 oligofructose 첨가 후 비피도박테리아 수는 증가하였으며 급여기간 동안 총 혐기균의 비율이 3.5%에서 9.5%로 증가하였다(Wang and Gibson, 1993). 랫에 galacto-oligosaccharides의 급여 결과 비피도박테리아와 락토바실러스의 수가 유의적으로 증가하였고 엔테로박테리아는 감소하여 prebiotics로서 가능성을 보여주었다(Rowland and Tanaka, 1993). Nemcova 등(1999)은 어린 돼지에 fructo-oligosaccharides와 *Lactobacillus paracasei*를 급여한 결과 락토바실러스와 비피도박테리아가 증가하는 결과를 보고하였다. 본 실험의 결과는 올리고당과 생균제 첨가가 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 락토바실러스의 증가와 엔테로박테리아가 감소한다는 이전의 결과와 유사하였다.

#### 가스 생산과 pH 변화

가스 생산에 대한 prebiotics와 probiotics의 효과는 Table 3에 표시하였다. 대조구에 비교하여 prebiotics와 probiotics 첨가시 가스생산량이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.001$ ). H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>와 같은 장내 가스는 난소화성 올리고당의 대장발효에 기인한다고 알려져 있다(Delzenne and Roberfroid, 1994). 본 연구의 결과 prebiotics, prebiotics+probiotics의 첨가구에서 가스생산의 증가는 비피도박테리아, 락토바실러스 이외의 다른 미생물의 성장에 의하여 발생한다는 간접적인 증거가 될 수 있다. 왜냐하면 이들 유익미생물은 homolactic fermentation 동안에 가스를 생산하지 않기 때문이다.

발효액의 pH는 무첨가구와 비교시 prebiotics와 probiotics 첨가한 모든 처리구에서 유의적으로 감소하였다( $p < 0.001$ ). 특히 pH 저하는 prebiotics 첨가구 보다 prebiotics+probiotics 첨가구에서 분명히 관찰되었다. Flickinger 등(2000)은 short chain fructo-oligosaccharides를 개의 분변미생물과 함께 배양하였을 때 pH가 17% 감소하였다고 보고하였다. 맹장 내용물의 pH 감소는 락토바실러스와 비피도박테리움과 같은 유산 생성 박테리아의 성장에 유리함을 보여 준다(Gottschalk, 1979; Hill, 1983). Table 3의 결과는 prebiotics, prebiotics+probiotics 첨가구에서 pH 저하 원인은 유기산생성 미생물 증가로 유산과 초산과 같은 대사산물의 증가에 기인한다고 생각된다.

#### 악취물질 생성

돼지생산과 관련하여 대표적인 악취물질로는 ammonia, hydrogen sulfide, phenol 및 skatole류의 화합물이다. 이들 악취성분 생성에 대한 prebiotics와 probiotics의 효과는 Table 4에 표시하였다.

배양과정에서 ammonia, hydrogen sulfide, 4-methyl phenol 및 skatole 화합물의 생성은 prebiotics+probiotics 처리구보다 prebiotics 처리구에서 유의적으로는 감소하는 것이 관찰되었다( $p < 0.001$ ). 특히 prebiotics 중에 CI 처리구에서 암모니아 및 황화수소 감소에 효과적이었는데 이것은 CI를 특이적으로 이용하는 미생물에 의해 cysteine desulfunase와 같은 효소를 생산하는

**Table 4.** Malodor gas emission after 24 h of *in vitro* fermentation of swine feces with prebiotics, and/or probiotics<sup>a</sup>

Item (ppm)	Without probiotics					With probiotics					SE <sup>b</sup>	P-value for contrasts <sup>c</sup>	
	CON	IMO	CI	RA	CD	P	IMO	CI	RA	CD		CON vs. OTH	PRE vs. SYN
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	270.50	64.33	16.83	74.00	31.17	304.67	161.50	102.33	188.17	120.83	4.61	0.001	0.001
H <sub>2</sub> S	26.75	39.25	6.75	20.00	17.75	21.00	74.25	13.25	55.75	41.25	0.86	0.001	0.001
4-methyl phenol	8.18	7.82	7.03	7.76	11.99	7.60	11.83	10.76	10.34	10.58	0.22	0.001	0.001
Indole	2.20	1.68	1.29	2.39	2.26	1.64	2.26	1.78	2.31	2.11	0.14	0.120	0.030
Skatole	2.14	1.71	1.63	1.62	1.64	2.29	2.19	2.42	2.47	2.60	0.02	0.001	0.001

<sup>a</sup> CON, control; P, CON + *Lactobacillus reuteri*; IMO, CON + iso-malto oligosaccharide 0.5%; CI, CON + chicory-inulin 0.5%; RA, CON + raffinose 0.5%; CD, CON + cyclo-dextrin 0.5%

<sup>b</sup> Pooled standard error.

<sup>c</sup> Effects: CON, control; OTH, other treatment; PRE, prebiotics; SYN, prebiotics + probiotics

**Table 5.** SCFA concentration after 24 h of *in vitro* fermentation of swine feces with prebiotics, and/or probiotics<sup>a</sup>

Item (ppm)	Without probiotics					With probiotics					SE <sup>b</sup>	P-value for contrasts <sup>c</sup>	
	CON	IMO	CI	RA	CD	P	IMO	CI	RA	CD		CON vs. OTH	PRE vs. SYN
Acetic acid	986.48	1609.47	1212.42	1368.08	1371.04	1344.10	1545.40	1708.50	1375.60	1691.90	53.74	0.001	0.001
Propionic acid	954.33	1394.31	1237.71	1514.94	1409.23	1507.40	1644.50	1854.50	1711.90	1736.70	85.91	0.001	0.001
iso-Butyric acid	42.11	27.74	21.76	25.61	29.75	47.74	36.37	35.13	30.33	40.42	0.89	0.001	0.001
Butyric acid	288.12	340.22	264.42	349.32	243.11	350.19	392.53	360.23	359.21	443.57	10.41	0.001	0.001
iso-Valeric acid	98.80	58.69	45.85	49.64	64.52	106.75	82.33	71.56	67.45	82.33	2.28	0.001	0.001
Valeric acid													

<sup>a</sup> CON: control; P: CON + *Lactobacillus reuteri*; IMO: CON + iso-malto oligosaccharide 0.5%; CI: CON + chicory-inulin 0.5%; RA: CON + raffinose 0.5%; CD: CON + cyclo-dextrin 0.5%

<sup>b</sup> Pooled standard error.

<sup>c</sup> Effects: CON, control; OTH, other treatment; PRE, prebiotics; SYN, prebiotics + probiotics

미생물의 활성이 억제 된 것으로 생각된다.

Govers 등(1999)은 결장의 입구에 들어온 비소화 전분량이 증가하게 되면 결장 말단 부위의 암모니가 농도가 낮아진다고 보고 하였다. 또한 Piva 등(1997)은 돼지에 lactitol을 급여하면 맹장 미생물에 의한 indole과 3-methylindole의 생산이 감소한다고 보고하였다. Van Heugten과 Van Kempen (2002)는 비육돈에 cellulose 급여시 분변의 p-cresol 농도가 감소함을 보고하였다. 본 연구의 결과 prebiotics, prebiotics+probiotics 처리구에서 악취물질의 감소는 lactobacilli와 같은 유산 생성 미생물의 증가와 낮은 pH 때문이라고 생각된다. 왜냐하면 낮은 pH 조건에서 indole, skatole, hydrogen sulfide, ammonia 생성을 촉매하는 tryptophanase, cystein desulfonase와 같은 효소를 생산하는 미생물의 활성을 감소시키는 것으로 사료된다.

**단쇄지방산 생성**

Prebiotics와 probiotics 첨가에 의한 단쇄지방산 생산에 대한 효과는 Table 5에 표시하였다. Prebiotics, prebiotics+probiotics 첨가구에서 acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid의 농도가 무첨가구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며(p<0.001). 특히 prebiotics 처리구와 비교시 prebiotics+probiotics 처리구 모두에서 단쇄지방산 생성이 높았다. 또한 iso-butyric acid와 iso-valeric acid 생성의 감소는 대조구와 비교하여 prebiotics, prebiotics+probiotics 처리구에서 뚜렷이 관찰되었다(p<0.001). 발효과정에서 단쇄지방산을 생산하는 미생물이 증가 하였다는 것을 의미한다.

단쇄지방산은 동물의 대사에 여러 가지 중요한 역할을 한다.

Roediger (1982)의 보고에 의하면 butyrate는 릿 결장세포의 주된 에너지원이다. 또한 단쇄지방산은 돼지 총 유지에너지 요구량의 28%를 공급한다(Imoto and Nakasima, 1978). Inulin 급여는 릿 모델에서 높은 단쇄지방산을 생산한다(Levrat et al., 1993; Younes et al., 2001). 돼지에 fructo-oligosaccharide (FOS)를 0%, 0.25%, 3% 첨가 급여시 3%에서 결장의 pH가 5.94에서 5.53으로 낮아지며 이것은 아마도 단쇄지방산의 증가 때문 일 것이라고 한다(Gibson and Roberfroid, 1995; Shim et al., 2005). 또한 3% FOS 급여는 대장 발효를 촉진시키고 단쇄지방산의 생산이 흡수력보다 빠르다는 것을 암시하였다.

FOS를 첨가하고 발효 11시간 후 단쇄지방산이 증가 했다는 Flickinger 등(2000)의 결과는 Table 5의 *in vitro* 실험과 유사하였다.

CD는 릿에 경구 투여시 장관 상부에서는 대사되지 않고 맹장이나 결장의 미생물에 의해 분해된다(Martin Del Valle, 2004). 흥미로운 것은 CD 첨가 시 *in vitro* 발효는 악취물질 생성의 감소와 단쇄지방산 및 유산균의 증가를 보였으며 이러한 결과는 CD가 prebiotics로서 돼지 대장에서 발효기질로 사용 가능하다는 것을 보여주고 있다.

본 연구에서 사용한 여러 종류의 prebiotics와 probiotics가 단쇄지방산을 증가시켜 장에 서식하는 다양한 미생물 중에서 유기산 및 유산을 생성하는 유산균의 성장에 도움을 줄 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 사용한 돼지 *in vitro* 발효모델은 새로운 prebiotics, probiotics들이 경구투여 시 숙주동물의 소화관 발효에 미치는 효과를 예측하는데 도움이 될 것이다.

결론적으로 본 시험 결과는 사용한 prebiotics는 악취물질 생

성을 감소시키고 prebiotics+probiotics 사용은 유산균과 단쇄지방산을 증가시키고 pH를 감소한다는 것을 보여주었다.

## 적요

본 연구는 prebiotics와 probiotics가 *in vitro* 배양조건에서 돼지 장내 미생물 및 발효산물에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. prebiotics로써 이소말토-올리고당(IMO), 부분분해 치커리 이눌린(CI), 라피노스(RA), 사이클로덱스트린(CD)을 사용하였으며 probiotics로는 *Lactobacillus reuteri*를 사용하였다. *In vitro* 발효시험은 육성돈 사료를 소화효소로 가수분해 시킨 사료와 5%의 돈분 그리고 prebiotics와 probiotics를 첨가 또는 무첨가하여 24시간 동안 배양시켰다. 배양 후 발효액 내의 미생물, 가스, pH, 암모니아, 황화수소, 단쇄지방산을 분석하였다. 엔테로박테리아는 prebiotics와 probiotics 첨가구가 대조구와 비교하여 유의적으로 감소하였으며, 락토바실러스 수는 유의적으로 증가하였다. 발효액의 pH는 대조구에 비하여 첨가구에서 낮았으며 prebiotics보다 prebiotics+probiotics 첨가구에서 더욱 낮았다. 암모니아, 황화수소 및 스카톨의 농도는 prebiotics+probiotics 구보다 prebiotics 첨가시 유의적으로 감소하였다. 단쇄지방산은 prebiotics보다 prebiotics+probiotics 구에서 유의적으로 많이 생성되었다. 본 시험의 결과 prebiotics 첨가는 암모니아, 황화수소 및 스카톨의 농도를 감소시키는데 효과가 있었으며, prebiotics+probiotics는 유산균과 단쇄지방산의 농도를 증가시키는 효과가 있었다. *In vitro*에서 얻어진 실험 결과가 실제로 돼지에 급여 시 같은 결과가 얻어질런지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

## 참고문헌

- Abe, F., Ishibashi, N., and Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* **78**, 2838–2846.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kritas, S.K., Siochu, A., and Kyriakis, S.C. 2004a. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **88**, 381–392.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Govaris, A., and Kyriakis, S.C. 2004b. Field evaluation of the effect of a probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance and carcass quality of grower and finisher pigs. *J. Vet. Med. A. Physiol. Clin. Med.* **51**, 306–312.
- Boisen, S. and Fernandez, J.A. 1995. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **51**, 29–43.
- Chaney, A.L. and Marbach, E.P. 1962. Modified reagent for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* **8**, 131–139.
- Collins, M.D. and Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1052S–1057S.
- Danek, P., Novak, J., Semradova, H., and Diblikova, E. 1991. Administration of the probiotics *Lactobacillus casei* CCM-4160 to sows-its effects on piglet efficiency. *Zivocisna Vryoba* **36**, 411–415.
- Delzenne, N.M. and Roberfroid, M.R. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm-Wiss. Technol.* **27**, 1–6.
- Ferorak, P.M. and Hrwdey, S.E. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* **4**, 425.
- Flickinger, E.A., Wolf, B.A., Garleb, K.A., Chow, J., Leyer, G.J., Jhons, P.W., and Fahey Jr, G.C. 2000. Glucose-based oligosaccharides exhibit different *in vitro* fermentation patterns and affect *in vivo* apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. *J. Nutr.* **130**, 1267–1273.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401–1412.
- Gottschalk, G. 1979. Bacterial Metabolism, pp. 167–224. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.
- Govers, M.J., Gannon, N.J., Dunshea, F.R., Gibson, P.R., and Muir, J.G. 1999. Wheat bran affect the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut* **45**, 840–847.
- Havenaar, R. and Huis in't Veld, M.J.H. 1992. Lactic acid bacteria in health and disease, Vol. 1, p. 125. Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam.
- Hill, M.J. 1983. Milk Intolerance and Rejection, p. 22–26. Basel Karger.
- Imoto, S. and Nakasima, S. 1978. VFA production in the pig large intestine. *J. Anim. Sci.* **47**, 467–478.
- Levrat, M.A., Remesy, C., and Demigne, C. 1993. Influence of inulin on urea and ammonia nitrogen fluxes in the rat cecum: Consequences on nitrogen excretion. *J. Nutr. Biochem.* **4**, 351–356.
- Makras, L. and Vuyst, L.D. 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int. Dairy J.* **16**, 1049–1057.
- Martin Del Valle, E.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Proc. Biochem.* **39**, 1033–1046.
- Mathew, A.G., Chattin, S.E., Robbins, C.M., and Golden, D.A. 1998. Effects of a direct fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acid, and performance of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* **76**, 2138–2145.
- McDougall, E.T. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* **43**, 99–109.
- Mikkelsen, L.L., Jakobsen, M., and Jensen, B.B. 2003. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets post-weaning. *Anim. Feed Sci. Technol.* **109**, 133–150.
- Mroz, Z., Moeser, A.J., Vreman, K., van Diepen, J.T., van Kempen, T., Canh, T.T., and Jongbloed, A.W. 2000. Effects of dietary carbohydrates and buffering capacity on nutrient digestibility and manure characteristics in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **78**, 3096–3106.
- Nemcová, R., Bomba, A., Gancarčíková, S., Herich, R., and Guba, P. 1999. Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructo-oligosaccharides on the faecal microflora in weanling piglets. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **112**, 225–228.
- Piva, A., Meola, E., Formigoni, A., Panciroli, A., Bertuzzi, T., Pietri, A., and Mordenti, A. 1997. Lactitol controls indole and 3-methylindole production by swine cecal microflora. p. 470. 7th Annu. Meet. EAAP.
- Roediger, W.E.W. 1982. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* **83**, 424–432.
- Rowland, I.R. and Tanaka, R. 1993. The effects of transgalatoylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with

- human faecal microflora. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 667–674.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M.** 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, suppl. 361–364.
- Shim, S.B., Williams, I.H., and Verstegen, M.W.A.** 2005. Effects of dietary fructo-oligosaccharide on villous height and disaccharidase activity of the small intestine, pH, VFA and ammonia concentrations in the large intestine of weaned pigs. *Acta Agriculturae Scand Section A* **55**, 91–97
- Stewart, C., Hillman, S.K., Maxwell, F., Kelly, D., and King, T.P.** 1993. Recent Advances in Animal Nutrition. pp. 197–220. *Nottingham University Press*.
- Van Heugten, E. and van Kempen, T.A.T.G.** 2002. Growth performance, carcass characteristics, nutrient digestibility and fecal odour compounds in growing-finishing pigs fed diets containing hydrolyzed feather meal. *J. Anim. Sci.* **80**, 171–178.
- Wang, X. and Gibson, G.R.** 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacter.* **75**, 378–380.
- Willing, S., Losel, D., and Claus, R.** 2005. Effect of resistant potato starch on odor emission from feces in swine production units. *Agric. Food Chem.* **53**, 1173–1178.
- Younes, H., Coudray, C., Belanger, J., Demigne, C., Rayssiguier, Y., and Remesy, C.** 2001. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br. J. Nutr.* **86**, 479–485.