

패스틴® 첨가가 단백질 분해율과 반추위 발효 및 영양소 소화율에 미치는 영향

최유지* · 최낙진* · 박성호* · 송재용* · 엄재상** · 고종열*** · 하종규*

서울대학교 농생명공학부*, (주)은진인터내셔널**, 농협사료***

Effects of Passtein® Supplements on Protein Degradability, Ruminal Fermentation and Nutrient Digestibility

Y. J. Choi*, N. J. Choi*, S. H. Park*, J. Y. Song*, J. S. Um**, J. Y. Ko*** and J. K. Ha*

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University*,

EUNJIN International, Co., Ltd.**, Nonghyup Feed INC.***

ABSTRACT

This study, including two *in vitro* experiments and an *in vivo* experiment were conducted to evaluate effects of Passtein® on crude protein degradability, ruminal fermentation characteristics and nutrient digestibility. In *in vitro* experiment protein degradability was examined using borate-phosphate buffer and neutral detergent, and using protease from *Stroptomyces griseus* at 39°C for 0, 2, 4, 8, 12, and 48 h. In addition, an *in vivo* experiment was conducted in a switch back design and ruminal fermentation and nutrient digestibility were determined. Four ruminal-fistulated Holstein cows weighing 300kg in mean body weight randomly allotted to 2 treatments (control and Passtein® supplementation). Although there was no significant difference on protein fraction between treatments, it appears that Passtein® supplementation decreased buffer soluble protein fraction compared to control. Protein degradability was not affected by Passtein® from 0 h to 4 h, but decreased at 12 h and 48 h compared to control. Degradation of immediately degradable fraction was higher in Passtein® treatment, but degradation of fermentable fraction was lower in Passtein® treatment compared to control. The pH and NH₃-N concentration tended to increase in Passtein® treatment, but VFA production, microbial counts and enzyme activity tended to decrease in Passtein® treatment compared to control. In addition, nutrient digestibility in the total tract tended to increase in Passtein® treatment compared to control.

(Key words : By-pass, Passtein®, Protein, Degradability, Nutrient digestibility, Ruminal fermentation characteristics)

I. 서 론

반추동물이 섭취하는 사료에는 true protein과 non protein nitrogen(NPN)이 포함되어 있다. 급여되는 사료의 종류에 따라 큰 차이가 있지만

섭취된 true protein 중 평균 60% 정도는 RDP(rumen degradable protein)로서 반추위 내 미생물에 의하여 분해되어 microbial protein 합성의 원료로 사용되며, 나머지 40% 정도의 RUP(rumen undegradable protein)는 반추위 내

Corresponding author : Ha, Jong Kyu, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suweon, 441-744. Tel) 031-290-2348, E-mail : Jongha@snu.ac.kr

미생물에 의해 분해되지 않고 반추위를 통과하여 4위와 소장에서 소화 효소들에 의하여 분해 이용된다. 반면에 NPN은 반추위 내에서 암모니아로 전변되어 미생물 단백질 합성에 이용되거나 일부는 체내로 흡수된 후 오줌을 통해 배설된다.

반추동물의 체중과 유생산 능력이 증가하면 단백질 요구량이 따라서 증가하여, 필요한 RUP(rumen undegradable protein) 요구량을 충족시키기 위해서는 반추위 내에서 잘 분해되지 않으면서 소장 내에서 소화, 흡수, 이용될 수 있는 단백질 사료의 추가공급이 필수적이다. 즉, 고능력우의 단백질 요구량을 충족시키기 위해서는 반추위 내에서 분해율이 낮은 동물성 단백질 즉 혈분, 어분, 우모분, 육분 등을 사용하거나 혹은 단백질 분해율이 높은 사료의 경우에는 적당한 열처리를 통하여 가공하거나 (Bergen과 Owens, 1985), formaldehyde, acetic acid, 및 tannins과 같은 화학적 처리(Chalupa, 1980), 아미노산 코팅(Papas 등, 1974), 지방처리(Palmquist, 1984), 이온운반체 첨가(Casper 등, 1987)를 하여 반추위 내 분해율을 낮추는데 사용되어져 왔다.

따라서, 본 연구에서는 열처리된 단백질(대두박)과 복합 광물질들로 합성된 제재인 패스틴®을 사용하여, by-pass 단백질 함량을 증가시키고, 광물질 공급에 의해 반추위 내에서 단백질과 결합한 후 단백질이 천천히 분해되도록 유도함으로써 단백질의 by-pass 율을 높여 단백질 이용효과를 극대화 시켜줄 것으로 예상 하였다. 또한 패스틴® 내에 존재하는 미생물제제는 적정 pH와 이상적인 반추위 환경을 제공하며 단백질과 에너지의 발효 동기화가 이루어져 생산성을 최적화 시켜줄 것으로 예상하였다. 이러한 가설을 근거하여, 본 시험에서는 *in vitro* 실험과 *in vivo* 대사실험을 실시하였다. *In vitro* 실험에서는 단백질의 by-pass 율을 조사하기 위해 단백질 fraction의 변화와 소화율을 관찰하였으며, *in vivo* 대사실험에서는 패스틴®을 첨가하였을 때 나타나는 반추위 발효성상, 미생물 군집, 암모니아태 질소 농도 및 영양소 소화율 등의 변화를 관찰함으로써 반추위 발효에

미치는 영향과 기작을 구명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 1 : 패스틴® 첨가가 단백질 fraction pool size에 미치는 영향

(1) 실험 설계

1mm로 분쇄된 대두박을 기질로 하여 대조구와 패스틴®(㈜은진인터내셔널)을 각각 0.2%, 1%, 2%를 첨가한 시험구를 4반복하여 실험을 수행하였으며, 그 중 2 반복은 borate-phosphate buffer에서, 그리고 2 반복은 중성세제에서의 조단백질 분해율을 측정하였다.

(2) 조사항목 및 방법

Licitra 등 (1996)의 방법을 근거하여 실험을 수행 하였다. 100mL serum bottle에 기질을 0.5g 넣고, 패스틴®을 각 bottle당 0, 1mg, 5mg, 10mg 씩 첨가하여 각 처리당 4 반복 실시하였다. Borate-phosphate buffer를 50mL 첨가한 후, 상온 (25°C)에서 8시간동안 shaking (150 rpm) 하여, 각 처리구당 2개의 bottle은 그대로 vacuum에서 filtering 하고, (Whatman #541), 나머지 2개의 bottle은 중성세제 50mL와 heat-stable-amylase 0.1mL를 첨가한 후, 105°C에서 60분간 autoclave한 후 vacuum에서 filtering (Whatman #541) 하였다. 각 filter paper와 거른 시료는 60°C에서 건조한 후, 조단백질 분석을 실시하였다.

2. 실험 2 : 패스틴® 첨가가 단백질 분해에 미치는 영향

(1) 실험 설계

1mm 길이로 분쇄한 대두박을 기질로 하여 패스틴® 첨가가 단백질의 분해율에 미치는 영향을 조사하였다. 대조구와 패스틴®을 1% 첨가한 시험구를 3반복하여 protease(*Streptomyces griseus* 유래 protease) 첨가 후, 39°C에서 0, 2, 4, 8, 12, 48 시간 배양 후 조단백질 분해율을 측정하였다.

(2) 조사항목 및 방법

대조구에는 0.5g의 기질을, 처리구에는 0.5g의 기질과 5mg의 패스틴[®]을 125mL serum bottle에 넣고 pH 6.7-6.8의 borate phosphate buffer 50mL를 첨가하였다 (Krishnamoorthy 등, 1983). 시료와 buffer가 들어있는 serum bottle을 39°C incubator에 1시간동안 방치하였다. 그리고, Licitra 등 (1999)의 방법에 따라 protease 용액을 만든 후(protease는 *Streptomyces griseus*에서 유래한 것이었음, 4.6 units/mg, Sigma P5147), 0.90 units/mL 이 되도록 용액을 제조하였으며 최종 농도는 0.18 units /mL 이었음), 각 tube에 10mL의 enzyme solution을 첨가하되, 0시간 배양에는 enzyme을 첨가하지 않았다. 0, 2, 4, 8, 12, 48 시간동안 39°C incubator에서 배양한 후, Whatman #541 거름종이로 거른 후 60°C에서 건조 시켰다. 건조된 거름종이와 시료는 Kjeltac Auto 1035/1038 system (Tecator, Sweden)을 이용하여 Macro Kjeldahl 방법으로 질소 분석을 실시하고, protease에 의해 미분해된 질소는 조단백질 (질소 × 6.25)로 나타내었다.

3. 실험 3 : 패스틴[®] 첨가가 반추위 발효 및 영양소 소화율에 미치는 영향

(1) 공시축 및 사료

본 *in vivo* 대사 실험은 평균체중 300kg인 홀스타인 수소 4두에 fistula를 반추위에 설치하여 시험에 공시하였다. 시험에 사용된 사료는 조사료 및 비육우 사료를 5:5 비율로 급여하였으며, 매일 아침 08:30시와 오후 04:30시 1일 2회에 걸쳐 체중비례 2%의 사료(6kg)를 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 자유 섭취토록 하였다. 급여한 농후사료는 시판중인 비육전기사료(조단백질 11.4%, 조지방 2.56%, 조섬유 23.47%, 조회분 7.61%, NDF 48.30%, ADF 30.19%)를 사용하였으며, 조사료는 tall fescue를 급여하였다. 첨가제는 연구 의뢰 회사의 권장량에 근거하여 급여량의 0.2%로 하였다.

(2) 실험설계

실험 디자인은 switch back design으로 하였고, 10일간의 적응기간을 두었고, 12, 13일째 2일동안 분 채취를 하였으며, 14일째에는 반추위액 채취를 0, 2, 4, 6, 8h 간격으로 실시하였다. 사료 섭취량은 잔여량을 매일 측정하여 계산하였다.

(3) 조사항목 및 방법

제 1위액의 pH, NH₃-N의 농도, 휘발성 지방산의 생산량을 측정하기 위해 사료급여 전 및 사료 급여 후 2, 4, 6, 8시간 후에 위액을 채취하였다. 위액은 채취 즉시 4겹의 cheese cloth로 여과한 후 pH를 측정하였고, Bacteria와 Fungi는 희석 배지로 희석하여 준비된 roll tube용 배지에 접종하고 protozoa는 MFS 용액에 염색시켰다. 이후 원심분리를(1000×g, 4°C, 15min)하여, 상층액을 취해서 암모니아태 질소 농도, 휘발성지방산 농도 및 enzyme activity를 측정하였다.

1) pH

채취한 반추위액의 pH를 pH meter (METTLER DELTA 340)로 측정하였다.

2) NH₃-N 농도

Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 따라 phenol 용액으로 위액중의 암모니아를 발색시킨 후 spectrophotometer (Spectronics 21D)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

3) Volatile fatty acids(VFA)

배양이 완료된 배양물을 1000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하고, 상등액 1mL를 취하여 eppendorf tube에 넣고, HPO₃ 0.2mL를 넣어 잘 혼합시킨 후 30분간 정치시켰다. 이를 -70°C deep freezer에서 분석 전까지 냉동 보관하였다. VFA의 분석은 gas chromatography(HP6890, U.S.A.)를 이용하였으며, 측정의 전 과정은 Erwin 등(1961)의 방법에 따랐다.

4) Enzyme activity

반추위 곰팡이를 배양한 배양액을 1000×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. CMCase의 활성은 기질용액을 0.1M acetate buffer (pH 5.0)에 1%(w/v) CMC 용액이 되게 하여, 조효소액 0.5mL과 CMC 기질 용액 0.5mL을 섞고, 55℃에서 1시간 반응시키고, 원심분리한 후, 상층액 0.2ml에 DNS 0.6mL을 더하고 100℃에서 5분간 진탕 반응시켜 상등액 내의 환원당의 양을 DNS(Dinitrosalicylic acid)법으로 550nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. CMCase의 1 unit는 1분 동안 1μmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Xylanase도 CMCase의 측정법과 동일한 방법으로 수행하였으며, 분석방법은 Miller(1960)의 CMCase 측정 방법과 동일하였다.

5) Protozoa count

배양액 중의 프로토조아는 Methylgreen-formalin-saline(MFS) 용액을 이용하여 고정, 염색한 후 counting하였다. 위액은 채취 직후 1mL를 MFS 용액 4mL와 혼합한 후 hematocrit를 이용하여 프로토조아의 수를 세었다.

6) Total bacteria count

1.9% agar를 첨가한 RGCA(1953) 배지 9mL를 roll tube에 혐기적으로 분주한 후, 10⁻⁹으로 희석한 위액 1mL를 anaerobic gassing system을 이용하여 혐기적으로 접종하였으며, Hungate (1966)의 방법에 따라 roll tube를 얼음물에서 spinning하여 제조하였다. 박테리아는 39℃의 incubator에서 48~72시간 배양시켰으며, 총 박테리아 수는 배양이 완료된 roll tube 상에 나타나는 colony의 수로 계산하였다.

7) Total fungi count

1.9% agar를 첨가한 Lowe(1985) 배지 9mL를 roll tube에 혐기적으로 분주한 후, 10⁻³으로 희석한 위액 1ml를 anaerobic gassing system을 이용하여 혐기적으로 접종하였으며, Hungate (1966)의 방법에 따라 roll tube를 얼음물에서 spinning하여 제조하였다. 박테리아는 39℃의

incubator에서 48~72시간 배양시켰으며, 총 곰팡이 수는 배양이 완료된 roll tube 상에 나타나는 colony의 수로 계산하였다.

8) 소화율(Digestibility, %)

각 영양소의 소화율을 구하기 위하여 각 period의 마지막 2일간 분을 채취하고 이 채취한 분을 60℃ drying oven에서 3일간 건조 후 Wiley mill로 분쇄하여 일반분석시료로 사용하였다. 영양소 소화율은 섭취한 사료 건물량에서 채취한 분 건물량을 뺀 값을 소화된 양으로 하여 섭취량에 대한 비율로 나타낸다.

4. 통계분석

같은 배양시간대의 평균값 비교는 T-test로 검정하였으며, 패스틴® 처리구별 결과치의 분석은 SAS(Statistical Analysis System, 1995) package의 GLM(General Linear Model) procedure를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 실험 1: 패스틴® 첨가가 단백질 fraction pool size에 미치는 영향

패스틴® 첨가 수준에 따른 대두 단백질 fraction의 변화를 살펴보면, Buffer soluble protein fraction(BSP)이나 Neutral detergent insoluble protein fraction (NDIP)의 변화는 표 1에 나타난 바와 같이 패스틴® 첨가 수준별로 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 그러나, 무첨가구에 비해 패스틴® 첨가구에서 BSP이 감소하는 경향을 보였으며, 다른 실험구에 비해 0.2% 첨가구에서 NDIP가 가장 높았다. 이는 패스틴® 내 광물질 성분이 단백질 또는 아미노산 입자와 결합하여 fraction에 변화를 준 것으로 사료된다.

BSP에 속하는 단백질은 주로 암모니아, nitrate, 아미노산, peptide, globulin 이며 반추위 내에서 분해속도가 매우 빠르기 때문에 소장으로 이전되는 양이 극히 적다. 반면, NDIP는

Table 1. Protein fraction as influenced by supplement of Passtein®

Items	Passtein®				SEM	Significance
	0%	0.2%	1.0%	2.0%		
Buffer soluble protein fraction (% crude protein)	22.50	10.81	11.54	9.31	2.56	NS
Neutral detergent insoluble protein fraction (% crude protein)	17.03	17.80	15.25	14.57	0.82	NS

NS : not significant.

protamin과 세포벽에 포함된 단백질, 열에 의하여 변성된 단백질, lignin과 결합된 단백질이며 반추위 내에서 거의 분해되지 않고 소장으로 이전된다(Licitra 등, 1996). 따라서, 패스틴® 첨가는 단백질의 by-pass 율을 높여주어 하부장기로 유입되는 단백질의 양에 영향을 미친 것으로 사료된다.

2. 실험 2: 패스틴® 첨가가 단백질 분해에 미치는 영향

단백질 분해 효소에 의한 배양시간대별 단백질 분해율은 표 2와 같다. 배양 0 시간대에서

4 시간대까지는 처리구간 유의성이 없었지만, 12 시간대와 48 시간대에서는 패스틴® 첨가 시험구에서 단백질 분해율이 감소되었다. 이는 면양에게 ZnCl₂를 0, 2000, 4000 ppm 수준으로 첨가한 사료를 급여하였을 때, 단백질 분해효소의 활력이 감소된다는 Chung 등(1993b)의 보고와 일치한다. 이러한 결과는 패스틴® 내의 광물질 공급이 미생물이 생산하는 단백질 분해효소와 결합하여 활성을 떨어뜨려 단백질의 분해를 억제한 것으로 생각된다. 또한 Gibson과 Macfarlane (1988)은 아연 이온이 단백질의 아미노기와 결합하여 tetrahedral bond를 형성하여 단백질의 구조를 변화시키고, 그 결과 단백질

Table 2. *In vitro* enzymatic protein degradation (%) and Degradation constants as influenced by supplement of Passtein®

Incubation time	Passtein®		SEM	Significance
	0%	1%		
	Protein degradation (%)			
0 h	7.77	11.03	2.29	NS
2 h	32.54	34.25	6.54	NS
4 h	43.95	47.25	5.24	NS
12 h	71.95	58.34	3.06	**
48 h	82.67	76.56	1.64	*
	Degradation constants			
a ¹⁾	8.35	9.83	3.80	NS
b ²⁾	72.26	60.87	6.39	NS
c ³⁾	0.187	0.307	0.11	NS
a + b ⁴⁾	80.62	70.70	4.81	NS
ED ⁵⁾	63.66	60.70	1.36	NS

¹⁾ immediately degradable fraction (% CP), ²⁾ potentially degradable fraction (% CP), ³⁾ degradable rate per hour of fraction, ⁴⁾ fermentable fraction, ⁵⁾ effective degradability (ED) = a + [bc/(c+k)] (assumed rumen outflow rate (k) of 0.05 h⁻¹)

NS : not significant, *P<0.05, and **P<0.01

분해효소의 작용부위가 변화되어 단백질의 분해율을 감소시켰다고 보고하였다.

단백질 분해율 결과를 토대로 SAS의 회귀분석방법을 이용하여 fraction A, fraction B 그리고 분해율 지수율(Licitra, 1998) 구한 결과는 표 2와 같다. 용해 단백질 분해율 "a"는 패스틴® 시험구에서 경미하게 높은 수치는 나타내었다 ($p>.05$). 그러나 서서히 분해되는 부분 "b"는 무첨가구에 비해 패스틴® 첨가구에서 낮아서, 반추위내 잠재적 소화율은 패스틴® 처리구가 낮은 경향을 보였다. 반추위 내 flow rate를 시간당 5%로 가정했을 때의 단백질의 유효 분해율(effective degradability, ED)은 무첨가구에 비해 패스틴® 첨가구가 낮았다. 따라서 패스틴® 을 첨가하면 반추위내 미분해 단백질 함량이 높은 것으로 나타났다. 이것은 금속이온이 chelating agent로 작용하여 효소와 결합하여 단백질 분해율을 떨어뜨리고, 단백질과 결합하여 단백질의 용해도를 감소시키고 분해를 억제시켰기 때문으로 생각된다(Chalupa, 1980).

3. 실험 3: 패스틴® 첨가가 반추위 발효 및 영양소 소화율에 미치는 영향

패스틴® 첨가에 따른 반추위 내 pH는 각 위액 채취 시간대별로 대조구와 비교하여 유의적 차이가 없었으며(표 3), 전반적으로 패스틴® 첨가구에서 높은 경향이었다. 이러한 결과는 RUP (Rumen Undegradable Protein) 함량이 높을 때 반추위 내 pH에 영향을 끼치지 않는다는 다른 실험의 결과들과 일치하였다(Erasmus 등, 1994; McCarthy 등, 1989; Schor와 Gagliostro, 2001). McCarthy 등(1989)은 홀스타인에 단백질원으로 어분과 대두박을, 탄수화물원으로 옥수수과 보리를 급여한 시험에서, 어분을 급여한 시험구에서 pH가 가장 높았다고 보고하였다. 또한 Erasmus 등(1994)은 단백질원에 따른 반추위 발효에 미치는 영향을 알아보기 위한 시험에서 분해율이 낮은 동물성 단백질 첨가시 pH가 증가하는 경향을 보고하였으며, Waltz 등(1989)도 사료 내 혈분과 대두박을 비교한 시험에서 유사한 결과를 보고하였다. 이처럼 패스틴® 첨가시 반추위액의 pH가 증가하는 것은 RUP가 증가할수록 반추위 내 단백질 분해율이 낮아 미생물의 질소 이용성을 감소시키기 때문에 (Chung 등, 1993a), 반추위액 내 미생물의 성장이 저조하여 유기물의 분해가 낮아지고 그 결

Table 3. Ruminal pH and NH₃-N concentrations as influenced by supplement of Passtein®

Items	Passtein®		SEM	Significance
	0%	0.2%		
pH				
0 h	6.98	7.03	0.01	NS
2 h	6.49	6.53	0.04	NS
4 h	6.43	6.40	0.04	NS
6 h	6.49	6.70	0.07	NS
8 h	6.66	6.75	0.04	NS
NH ₃ -N (mg/100ml)				
0 h	5.72	6.06	0.61	NS
2 h	6.17	6.26	0.94	NS
4 h	1.15	1.62	0.57	NS
6 h	1.06	1.04	0.34	NS
8 h	1.78	1.50	0.21	NS

NS : not significant.

과 대사 산물인 휘발성지방산의 생성량이 감소하였기 때문이라 생각된다.

패스틴®의 첨가가 암모니아태 질소의 농도에 미치는 영향은 표 3와 같다. 위액채취 6시간대 이후에 패스틴® 처리구에서 NH₃-N 농도가 낮은 것을 제외하고 다른 위액 채취시간대에는 대조구에서 NH₃-N 농도가 낮았으며, 유의적인 차이는 없었다. 전체적으로 반추위 내 NH₃-N 농도는 사료 급여 후 시간이 지날수록 감소하는 경향을 나타내었다. Maiga와 Schingoethe (1997)은 지방과 보호단백질의 수준을 달리하여 급여한 유우 시험에서, RUP 급여구보다 대조구에서 반추위 내 질소 농도가 더 높았으며, 이는 RUP 함량이 높을 때 미생물 활력을 저하하기 때문이라고 하였다. 또한 Blackwelder 등 (1998)도 단백질원으로 각각 대두박과 면실박을 급여한 유우에 RUP를 첨가하였을 때, RUP 첨가구에서 반추위 내 단백질 분해율이 낮기 때문에 암모니아 태 질소 농도가 낮았다고 하였다. Bach와 Stern (1999)은 연속배양기를 이용한 *in vitro* 실험에서 RUP 함량이 낮을 때, NH₃-N 농도가 증가한다고 하였으며, 이러한 증가는 반추위내 미생물의 N 이용 효율의 증가에 의한 것이라고 보고하였다.

Total VFA 및 각각의 VFA 농도는 대부분 시간대에서 대조구에 비해 패스틴® 처리구에서 낮았다(표 4). 본 연구 결과와 마찬가지로 대부분의 기존 연구에서도 VFA 농도는 유의적인 차이가 없었다(McCarthy, Jr. 등, 1989; Schor와 Gagliostro, 2001). McCarthy 등(1989)은 홀스타인에 단백질원으로 어분과 대두박을, 탄수화물원으로 옥수수과 보리를 급여하였을 때, RUP 공급이 VFA 농도에 영향을 미치지 않았다고 하였다. 또한 Schor와 Gagliostro (2001)는 대두박과 혈분을 급여한 젖소의 생산성에 미치는 RUP의 영향을 연구한 시험에서, 유의성은 없었으나 VFA의 감소를 보고하였다. 각 휘발성 지방산의 농도 변화를 보면 반추위액 내의 휘발성 지방산 중 많은 비율을 차지하는 acetate와 butyrate의 농도는 무첨가구에 비해 패스틴® 첨가 시에 감소하는 경향이었으나 큰 차이는 없었다. Acetate 생성량은 위액채취 2, 4

시간대를 제외하고 유의적인 차이를 보였으며 ($P<0.05$), 패스틴® 처리구에서 acetate 생성량이 낮았다. Total VFA 경우에는 위액채취 0, 6 시간대를 제외하고 처리구간 유의성은 없었으나 대조구에 비해 패스틴® 첨가시 감소하였다. Hannah 등(1986)은 열처리한 대두를 급여한 시험에서 열처리 하였을 때, 각 휘발성 지방산과 총 휘발성 지방산의 감소를 보고하였다. 또한 패스틴® 첨가에 따른 반추위액 중의 Total VFA의 감소는 Aldrich 등(1993)의 연구에서도 볼 수 있는데, 유우에 캐놀라 밀과 혈분, 통옥수수과 껍질 벗긴 옥수수를 급여하였을 때, RUP가 증가할수록 Total VFA가 감소하였다고 하였다. 이는 RUP 함량이 높을 때 미생물 활력이 저하되기 때문이라고 사료된다. A/P ratio 경우에도 처리구간 유의차가 없었고, 위액채취 0시간대를 제외하고 전반적으로 대조구에 비해 첨가구에서 감소하는 경향을 보였다. 패스틴® 첨가 시 A/P 비율의 감소는 propionate의 생성량이 증가하는 것보다 상대적으로 acetate의 생성량이 감소하므로 A/P 비율을 감소시키는 결과를 초래한 것으로 생각된다.

패스틴®을 첨가하였을 때 시간에 따른 반추위액중의 CMCase, xylanase 및 amylase의 activity는 표 5에서 보는 바와 같이, 무첨가구와 비교하여 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 경향은 금속 이온과 분해 효소와의 결합이 효소 활성을 떨어뜨린 것으로 생각된다. 한편 무기태 아연 첨가시 cellulose 소화율이 감소된다는 사실은(Sala, 1957; Hubbert 등, 1958) 보고 된 바 있다.

반추위 내 서식하는 프로토조아 수는 패스틴® 처리구와 대조구간에 유의적 차이는 없었지만(표 6), 반추위액 채취시간대별 프로토조아 수는 패스틴® 처리구에서 낮았다. 반추위 내 미생물은 패스틴® 첨가시 감소하는 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. Chung 등(1993b)은 면양에게 ZnCl₂를 0, 2000, 4000 ppm 수준으로 첨가한 사료를 급여하였을 때, 아연 첨가구에서 총 균수의 감소를 보고한 바 있으며, Stokes와 Hoover (1991)는 고능력우에 높은 비율의 곡물을 급여하였을 때, 제 1위에서 분해단백질

Table 4. Ruminal VFA concentrations as influenced by supplement of Passtein®

Items	Passtein®		SEM	Significance
	0%	0.2%		
Acetate (mol/100mol)				
0 h	71.84	71.16	0.92	**
2 h	63.72	62.04	1.05	NS
4 h	67.10	64.89	1.44	NS
6 h	67.55	66.35	0.81	**
8 h	69.39	67.72	0.91	*
Propionate (mol/100mol)				
0 h	16.21	16.14	0.22	**
2 h	22.76	23.28	0.52	NS
4 h	18.97	20.05	0.34	NS
6 h	18.04	18.58	0.32	*
8 h	16.77	17.57	0.33	NS
Butyrate (mol/100mol)				
0 h	8.88	9.30	0.08	*
2 h	11.63	11.84	0.13	NS
4 h	12.18	12.30	0.12	NS
6 h	12.10	12.61	0.06	**
8 h	11.41	12.18	0.09	NS
Total VFA (mM)				
0 h	34.66	27.97	3.05	**
2 h	49.56	49.98	10.65	NS
4 h	52.03	40.30	8.17	NS
6 h	68.49	54.19	6.77	**
8 h	63.67	56.95	4.30	NS
A/P ratio				
0 h	4.49	4.51	0.11	NS
2 h	2.90	2.71	0.10	NS
4 h	3.55	3.26	0.10	NS
6 h	3.77	3.64	0.09	NS
8 h	4.21	3.89	0.13	NS

NS : not significant, *P<0.05, and **P<0.01.

(RDP)의 양은 미생물 성장 효율에 크게 영향을 끼치며, 분해단백질이 증가할수록 미생물의 성장효율이 증가한다고 하였다. 금속이온이 미생물의 성장을 억제하는 기전은 금속이온이 미생물에 독성을 미쳐 성장을 억제하는 것으로 사료되며, 또한 미생물이 생산하는 분해효소와 결합하여 활성을 떨어뜨려 영양소의 분해를 억제하여 미생물의 영양소 이용성을 감소시키기

때문으로 생각된다(Kim 등, 1996).

패스틴® 첨가시 영양소 소화율 변화는 표 7에 나타난 바와 같다. 영양소 소화율은 사료 내 패스틴® 첨가에 의해 영향을 받지 않았으나, 증가하는 경향이였다. 이는 RUP와 Methionine의 수준을 달리한 연속배양기 실험에서 RUP 공급이 NDF 소화율에 영향을 미치지 않았다는 Bach와 Stern (1999)의 *in vitro* 연구 결

Table 5. Amylase, CMCase and xylanase activity (reducing sugar, μ mol/min/ml) of rumen fluids as influenced by supplement of Passtein®

Items	Passtein®		SEM	Significance
	0%	0.2%		
Amylase				
0 h	1.68	-	1.98	NS
2 h	7.77	6.56	2.60	NS
4 h	3.88	3.27	1.39	NS
6 h	0.45	2.01	1.38	NS
8 h	2.17	5.27	2.21	NS
CMCase				
0 h	2.04	-	1.38	NS
2 h	16.82	12.90	6.18	NS
4 h	3.32	3.44	2.10	NS
6 h	4.94	4.01	1.29	NS
8 h	6.40	8.67	2.03	NS
Xylanase				
0 h	1.97	-	1.94	NS
2 h	7.97	6.16	2.69	NS
4 h	3.82	3.10	1.32	NS
6 h	0.60	2.17	1.38	NS
8 h	2.24	5.28	2.13	NS

NS : not significant.

Table 6. Rumen microbial populations(/1mL) as influenced by supplement of Passtein®

Items	Passtein®		SEM	Significance
	0%	0.2%		
Protozoa ($\times 10^3$)				
0 h	6.80	6.38	0.70	NS
2 h	3.82	3.01	0.56	NS
4 h	6.06	5.57	1.29	NS
6 h	7.12	3.16	0.95	NS
8 h	8.62	5.38	1.15	NS
Total bacteria counts ($\times 10^{10}$)				
0 h	3.61	1.55	-	-
4 h	2.58	1.90	-	-
8 h	1.82	1.59	-	-
Total fungi counts ($\times 10^6$)				
0 h	4.04	1.77	-	-
4 h	5.41	4.77	-	-
8 h	4.19	3.91	-	-

NS : not significant.

Table 7. Digestibility(%) of the diets as influenced by supplement of Passtein®

Items	Passtein®		SEM	Significance
	0%	0.2%		
Dry matter	52.38	56.44	1.43	NS
Crude protein	35.79	44.96	2.32	NS
Ether extracts	78.47	78.39	2.57	NS
Crude fiber	26.64	35.62	2.53	NS
NDF	30.35	35.70	1.67	NS
ADF	25.49	30.74	1.48	NS
Feces (kg fresh/d/animal)	11.24	10.31	0.46	NS
Feces (kg DM/d/animal)	2.41	2.20	0.12	NS

NS : not significant.

과와 일치하는 것이며, Han 등(1995)도 면양에 protected lysine을 0, 0.1, 0.2, 0.4% 첨가한 사료를 급여하였을 때, 건물, 유기물, 조단백질 및 조섬유 소화율에 일정한 경향이 없다고 하였다. 한편 McCarthy 등(1989)은 홀스타인에 단백질원으로 어분과 대두박을 급여하였을 때, 어분 급여시 NDF 소화율의 증가를 보고하였으나 건물, 유기물, ADF 소화율에는 RUP 함량이 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 또한 Ha 등(1988)은 분해율이 높은 대두박과 분해율이 낮은 옥수수글루텐 등의 혼합구의 소화시험에서 옥수수글루텐 혼합구에서 조단백질 소화율이 높았고, 사료 내 단백질 수준이 높아지면 대체적으로 영양소 소화율, 특히 단백질 소화율이 향상되었다고 보고하였다. 한편 공시축의 분 배설량을 살펴보면 비록 처리구간 통계적 유의성은 없었지만 패스틴® 시험구에서 감소하는 경향을 보였으며, 축산폐기물 감소의 환경효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

지금까지의 연구 결과를 종합하면, 패스틴® 첨가 수준별로 차이가 없었으나, 무첨가구에 비해 패스틴® 첨가구에서 단백질 분해율이 감소되었다. 또한 패스틴® 첨가로 pH와 NH₃-N 농도는 증가하는 경향이였으며 휘발성지방산, 미생물 수 및 enzyme activity는 감소하였고 영양소 소화율은 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 영향은 패스틴® 내의 광물질 공급

이 미생물이 생산하는 분해 효소와 결합하여 활성을 떨어뜨려 영양소 분해에 영향을 끼친 결과라고 생각된다.

IV. 요 약

본 시험은 패스틴®을 첨가하였을 때, *in vitro* 상에서 단백질 fraction과 분해율에 미치는 영향과, *in vivo* 상에서 반추위 성장, 미생물 군집, 암모니아태 질소 농도 및 영양소 소화율에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다. *In vitro* 실험에서는 1mm로 분쇄된 대두박을 기질로 하여 패스틴® (주은진인터내셔널)을 첨가하여 borate-phosphate buffer와 중성세제에서의 조단백질 분해율을 측정하였으며, exogenous enzyme (*Streptomyces griseus* 유래 protease)를 이용하여 39°C에서 0, 2, 4, 8, 12, 48 시간동안 배양 후 조단백질 분해율을 측정하였다. 반추위 발효성상과 영양소 소화율은 반추위 fistula가 부착된 평균체중 300kg의 홀스타인 수소 4두를 이용하여 무첨가구, 패스틴® 첨가구의 두개 처리구에 2마리씩 4마리를 배치하여 측정하였다. Buffer Soluble Protein fraction은 패스틴® 첨가 수준별로 차이가 없었으나, 무첨가구에 비해 패스틴® 첨가구에서 감소하는 경향을 보였다. 단백질 분해율은 배양 0 시간대에서 4시간대까지는 처리구간 유의성이 없었지만, 12 h과 48 h에서는

패스틴® 첨가로 시험구에서 감소되었다. 용해 단백질 분해율 “a”는 패스틴® 시험구에서 경미하게 높은 수치를 나타내었지만, 소화 가능한 단백질 분해율 “a+b”는 패스틴® 시험구에서 낮은 경향을 보였다. 패스틴® 첨가로 pH와 NH₃-N 농도는 증가하는 경향이었으며 휘발성지방산, 미생물 수 및 enzyme activity는 감소하였고 영양소 소화율은 높았으나 유의적인 차이는 없었다.

(주요 단어 : by-pass, 패스틴®, 단백질, 분해율, 영양소 소화율, 반추위 발효 정상)

V. 인 용 문 헌

1. Aldrich, J. M., Muller, L. D. and Varga, G. A. 1993. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76: 1091-1105.
2. Bach, A. and Stern, M. D. 1999. Effects of different levels of methionine and ruminally undegradable protein on the amino acid profile of effluent from continuous culture fermenters. *J. Anim. Sci.* 77:3377-3384.
3. Bergen, W. C. and Owens, F. N. 1985. Manipulation of milk composition and nitrogen metabolism of ruminants. *Anim. Health Nutr.* 40: 32-35.
4. Blackwelder, J. T., Hopkins, B. A., Diaz, D. E., Whitlow, L. W. and Brownie, C. 1998. Milk production and plasma gossypol of cows fed cottonseed and oilseed meals with or without rumen-undegradable protein. *J. Dairy Sci.* 81: 2934-2941.
5. Casper, D. P., Shingoethe, D. J., Yang, C. M. J. and Mueller, C. R. 1987. Protected methionine supplementation with extruded blend of soybeans and soybean meal for dairy cow. *J. Dairy Sci.* 70:321-330.
6. Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
7. Chalupa, W. 1980. Chemical control of rumen metabolism. Ruckebusch, P. Thivend (Eds.), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, AVI Publishing, Westport, CT. pp.325-347.
8. Chung, Y. S., Ha, J. K., Lee, S. S. and Kim, C. H. 1993a. Effects of metal ions on the ruminal microbial fermentation, proteolytic enzyme activities. *Korean J. Dairy Sci.* 15:227-239.
9. Chung, Y. S., Ha, J. K. and Lee, S. S. 1993b. Effects of zinc ion on the ruminal microbial population, proteolytic enzyme activities and feed protein degradation. *Korean J. Dairy Sci.* 15: 240-250.
10. Erasmua L. J., Botha, P. M. and Meissner, H. H. 1994. Effect of protein source on ruminal fermentation and passage of amino acids to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 77: 3655-3665.
11. Erwin, E. S., Marco, J. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1779.
12. Gibson, S. A. W. and Macfarlane, G. T. 1988. Studies on the proteolytic activity of *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2231-2240.
13. Ha, J. K., Han, I. K., Koh, J. R., Baik, M. K. and Chang, J. S. 1988. Effects of protein level and source on the growth rate and digestion in Korean bulls. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 12: 209-213.
14. Han, I. K., Ha, J. K., Choi, Y. J., Lee, N. H., Ko, Y. K., Lee, S. S. and Lee, J. B. 1995. Effects of the supplemental level of protected lysine on ruminal and blood parameters and digestibility in sheep. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 19:142-151.
15. Hannah, S. M., Stern, M. D. and Ehle, F. R. 1986. Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soya bean products. *Anim. Feed Sci. Tech.* 16:51-62.
16. Hubbert, F. Jr., Cheng, E. and Burrough, W. 1958. Mineral requirement of rumen microorganisms for cellulose digestive *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 17:559-565.
17. Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press, NY.
18. Kim, B. J., Ha, J. K., Lee, S. S., Kim, H. D.,

- Lee, J. B., Kim, C. H. and Kim, W. Y. 1996. Effects of nickel and zinc ions on the growth of *prevotella ruminicola*, proteolytic enzyme activities and disappearance of soybean meal in the rumen. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 20:147-158.
19. Krishnamoorthy, U., Sniffen, Stern, C. J. M. D. and Van Soest, P. J. 1983. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and an *in vitro* simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feed stuffs. *British J. Nutrition.* 50:555-568.
20. Licitra, G., Hernandez, T. M. and Van Soest, P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 57:347-358.
21. Licitra, G., Van Soest, P. J., Schadt, I., Carpino, S. and Sniffen, C. J. 1998. Improvement of the *Streptomyces griseus* method for degradable protein in ruminant feed. *Anim. Feed Sci. Tech.* 72:1-10.
22. Maiga, H. A. and Schingoethe, D. J. 1997. Optimizing the utilization of animal fat and ruminal bypass proteins in the diets of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:343-352.
23. McCarthy, Jr. R. D., Klusmeyer, T. H., Vicini, J. L. and Clark, J. H. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
24. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 1:127-134.
25. Papas, A., Hall, G. A. B., Hatfield, E. E. and Owens, F. N. 1974. Response of lambs to oral or abomasal supplementation of methionine hydroxy analog or methionine. *J. Nutr.* 104:653-659.
26. Palmquist, D. L. 1984. Use of fats in diets for lactating cows. In: *Fats in Animal Nutrition* (Ed. J. Wiseman), Butterworth, Boston, MA.
27. Sala, T. C. 1957. The effect of trace minerals on cellulose digestion as studied in the artificial rumen. Ph. D. Dissertation. Univ. of Florida, Gainesville. Florida.
28. SAS Institute, Inc. 1995. *DAD. For Linear models: a guide to the ANOVA and GLM procedures.* SAS. Inst. Inc., Cary, NC.
29. Schor, A. and Gagliostro, G. A. 2001. Undegradable protein supplementation to early-lactation dairy cows in grazing conditions. *J. Dairy Sci.* 84:1597-1606.
30. Stokes, S. R., Hoover, W. H., Miller, T. K. and Manski, R. P. 1991. Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 74:860-870.
31. Waltz, D. M., Stern, M. D. and Illg, D. J. 1989. Effect of ruminal protein degradation of blood meal and feather meal on the intestinal amino acid supply to lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:1509-1518.
- (접수일자 : 2002. 8. 5 / 채택일자 : 2002. 9. 28)