

산삼배양액 이용에 관한 반추위 미생물 대사 연구

배귀석* · 남경표* · 김혜숙* · 이상구***** · 최행석** · 민우기*** · 주종원**** ·
맹원재**** · 장문백*

중앙대학교 동물자원과학과*, (주)우수컴**, 중앙대학교 식량자원연구소***,
(주)네오바이오*****, 건국대학교 영양자원학과****

Effects of the Artificial Culture Medium of Wild Ginsengs on Rumen Fermentation Characteristics *In Vitro*

G. S. Bae*, K. P. Nam*, H. S. Kim*, S. G. Lee*****, H. S. Choi**, W. K. Min***,
J. W. Joo*****, W. J. Maeng***** and M. B. Chang*

Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University*,
OOSOO.com Inc.***, Institute of Food Resource, Chung-Ang University***, Neobio Inc.*****,
Department of Nutritional Resources, Konkuk University****

ABSTRACT

This study was conducted to determine the effects of the artificial culture medium of wild-ginsengs on *in vitro* fermentation characteristics. NH₃-N concentration was showed the highest in 3% WGM treatment among all treatments and control. In addition, microbial protein synthesis was significantly different in all treatments throughout the incubation time, and WGM 3% treatment was the highest at the 9 h incubation(I < 0.05). Protozoa numbers within rumen were decreased in all WGM treatments at 9 h incubation time, whereas WGM 3% treatment was always decreased throughout the incubation(I < 0.05). NDF and ADF digestibility were proportionally increased as the incubation time in both control and treatments. NDF digestibility showed no significantly difference between control and the 3% treatment, and ADF digestibility was similar in all. Total volatile fatty acid(VFA) concentrations of WGM treatments without 5% were significantly higher than control (I < 0.05). No differences were observed in total VFA, acetate, propionate and butyrate concentration among the WGM treatments. Acetate/Propionate ratio of WGM treatments was higher than control after 12 h incubation(I < 0.05). As a result of the artificial culture medium of wild-ginseng on rumen fermentation characteristics *in vitro*, microbial protein synthesis of WGM treatment was higher than control, and WGM 3% was the highest in all treatments(I < 0.05). The effect of saponin in artificial culture medium of wild-ginseng tended to decrease NH₃-N concentration, while it increases the microbial synthesis in early incubation. Therefore, artificial cultures medium of wild-ginseng can increase utilization of feed by microbial and anti-protozoal effects of saponin, which may enhance microbial synthesis capacity in early fermentation period in rumen.

(Key words : Artificial culture, WGM, Wild-ginseng, *in vitro*, Saponin, Microbial protein)

I 서 론

식물군의 의·약학적 중요성 및 응용 가능성이 제시되고 있으며, 특히 산삼 및 유용 균사체의 대량생산 산업이 활발히 이루어지고 있는 실정
현재 bioreactor 배양을 통한 희귀종인 Panax속

“본 연구는 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임”.

Corresponding author : M. B. Chang, Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences
Chung-Ang University, NaeRi 72-1, DaeDuk, AnSung, KyungGi. 456-756, Korea, Tel :
031-670-3029, e-mail : moonbaek@post.cau.ac.kr

에서 이에 따른 경제적인 부가가치 산업이 활성화되고 있다. 이렇게 산업적으로 생물배양기에서 배양된 상황균사체는 항암 성분인 δ -D-Glucan의 지표물질인 α -methyl-D-glucoside의 함량이 건조 중량의 28% 이상으로 나타났음이 확인되었으며, 산삼의 경우에는 genomic DNA 지문 분석법(AFLPs)에 의해 산삼과 인삼의 특이성과 차이를 명확히 입증한 상태이며, 엽록소 DNA상의 특정 유전자(rbcL과 psbD)의 존재 확인에 원래 산삼과 배양생산된 배양균의 유전적 동질성이 입증되었다. 그러나 이러한 생물배양기(bioreactor)를 이용한 배양 기술은 많은 양의 배양액이 사용되며, 유용 균사체의 성장이 경제적 가치에 도달 후 재활용 될 수 없어 폐기 처분에 따른 경제적 손실을 초래하게 된다. 그러나 배양 조건에 의해 탈락되는 산삼의 성분이 2% 정도 존재하며, 이 중 saponin의 함량이 10% 이상인 것으로 확인되었다.

Saponin은 전염병, 위장병, 관절통의 약품으로 사용되어 왔으며 암모니아를 화학적 결합에 의해 배출을 억제하여 냄새를 억제하는 urease 활성 방해 작용 기전을 가지고 있어 urea가 암모니아로 분해되는 것을 방해한다. 또한 oligosaccharide와 함께 유용 미생물의 증식을 도와 배설물 냄새를 억제하고, 또한 장내 미생물 군의 정상화에 기여하는 것으로 알려져 있다.

반추위의 발효를 개선하려는 친환경적 수단으로 식물체 내에 존재하는 2차적인 물질의 특성에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다. 또한 식물은 곰팡이, 박테리아, 식물유해곤충 그리고 포식체로부터 자신을 보호하려는 다양한 2차적 구성 물질을 포함하고 있으며, 이러한 작용으로 잘 알려진 구성 물질들은 반추 가축의 사료에 널리 분포하는 saponins(Makkar와 Becker 1996), tannins(Pell 등, 2000)과, 사료 소화율에 영향을 주는 화학적 구성물인 lignin 등이 있다(Kovács 등, 1998). 비록 반추위 내 발효 조건을 개선하는 잠재적인 효과는 많지만, 이런 화합물이 높은 수준으로 공급되면 반추 미생물 합성을 저해(Wang 등, 1994) 할 뿐 아니라, 반추 가축 생리에 악영향을 미치기도 한다(Makkar 등, 1995). 예를 들어, 이러한 화합물

은 미생물에 의한 요소분해의 억제와 사료 단백질과 복합물을 형성(Makkar 등, 1993), 암모니아의 흡수와 단백질분해 효소의 활성 억제를 통한 반추위 단백질 소화율을 감소 시킴으로써 반추 동물의 암모니아 배출을 감소 시킨다. 이런 효과는 우회 단백질의 구성 요소가 소장에서 이용 유·소에 따라 반추 가축에게 유용하거나 해가 될 수 있다. 그러나 이러한 물질들은 가축의 분뇨를 통한 질소와 암모니아의 방출을 감소시키며(Hill과 Learer, 1991; Wang 등, 1996), 특히 saponin은 *in vitro*상에서 메탄생성 감소에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나(Wang 등, 1998), 이와 같은 많은 연구들은 saponin, tannin 구성물질과 lignin의 구조 다양성 때문에 일관성이 없이 진행되고 있는 것이 사실이다. 반추위에서 합성된 미생물 단백질은 반추동물의 소장에 유입하는 단백질원의 많은 부분을 차지하고 있으며, 반추위에서 형성된 미생물 단백질의 상당 부분이 암모니아를 이용하여 생성된다(Wallace 등, 1994). *In vitro* 방법에 의한 연구에서 프로토조아에 의한 박테리아의 포식관계는 반추위에 미생물단백질 합성량을 조절하는 주요 원인이 되므로 (Wallace와 McPherson, 1987), 반추위의 내에서의 protozoa 제거는 미생물단백질 합성량을 극대화시킬 수 있는 방법이라 할 수 있다(Bird 등, 1979; Demeyer와 Van Nevel, 1979). 이러한 관점에서 프로토조아 억제효과를 가지고 있는 물질로써 미생물 단백질 이용성을 개선하려는 시도가 행해져 왔으나, 독성과 관계된 문제로 많은 사용이 이루어지지 않았다. 그러나 반추 가축에게 스테로이드계 saponin의 급여 시 반추위 내에서 프로토조아 성장 억제에 의한 반추위 발효 조건 증진 효과, 성장율과 유생산 증대에 영향을 미쳤으며, 반추 가축의 배설물 내에 암모니아 함량 감소로 인한 친환경적 물질의 특성을 가지고 있다(Makkar 등, 1988).

따라서 본 실험은 bioreactor 배양에 의한 산삼 대량생산을 위한 과정에서 배양 후 폐기되는 산삼 배양액과 배양액 내에 다소 존재하는 배양 산삼이 *in vitro* 시험에서 반추위 미생물 합성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시되었다.

II 재료 및 방법

1. 시험 설계

본 실험은 산삼 인공배양 후 부산물로 얻어지는 배양액을 이용하여 수준별 첨가에 따른 반추위 미생물 발효 특성을 관찰하기 위하여 실시 되었다. 처리구는 각각 산삼 배양액 1, 3, 5%씩 3처리구로 serum bottle을 이용한 방법으로 실시하였고, 배양시간은 0, 3, 6, 9, 12 시간 대 별로 3반복하여 완전임의 배치법으로 실시 하였다.

2. 산삼 배양

(1) 산삼 배양

국내 자연산 산삼(삼령 70~120년, 약 50cm, 채취 시 동면 상태)의 주근을 제외한 나머지 부분은 유전자 분석과 물질 분석을 위해 저온 저장하고 실험 재료는 주근을 사용하였다. 산삼 배양은 먼저 기관분화 유도단계로, 재료를 소독 멸균처리하고, modified wood plant medium(WPM) (Lloyd와 McCown, 1980; Owen과 Miller, 1992)을 기본 배지(Table 1)에 설탕 30g/l, 한천 7g/l를 첨가한 후 기관 분화를 유도 하기 위해 식물생장 조절물질 IAA(3-indole acetic acid)를 1~5ppm을 첨가하고 Petri dish에서 40~60일간 배양하였다(pH 5.8, 25°C dark room). 다음 단계로 산삼 배양근의 소형생물 배양기에서의 배양 및 대형생물 배양기 배양을 통한 대량생산은 WPM을 이용하여 산삼 세균을 무균상태로 계대, 이송하여 배양하였다.

(2) 유전적 차이

본 연구를 위하여 사용한 DNA 지문 분석 방법은 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)-Silver Staining 방법(Van Der Merwe, 등)으로, 제한 효소를 처리하여 얻어진 다양한 크기의 DNA 절편에 선택적으로 DNA 연결자를 연결시킨 후 각 연결자를 포함하는 짧은 염기를 사용하여 다양한 길이의 염기 절편을 선별적으로 증폭(1차), 재 증폭(2차)시켜 얻어진 절

Table 1. Composition of the modified wood plant medium(WPM)

Lloyd and McCown (WPM) Inorganic Salt Formulation	mg/l
Macro elements	
Ammonium nitrate(NH ₄ NO ₃)	400.00
Calcium chloride(CaCl ₂ ·2H ₂ O)	96.00
Magnesium sulfate(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	370.50
Potassium sulfate(K ₂ SO ₄)	990.00
Potassium phosphate(KH ₂ PO ₄)	170.00
Calcium nitrate(Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O)	556.70
Micro elements	
Boric Acid(H ₃ BO ₃)	6.20
Na ₂ EDTA·2H ₂ O ¹⁾	37.20 ²⁾
Cupric Sulfate(CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.25
Ferrous sulfate(FeSO ₄ ·7H ₂ O)	27.80
Manganese sulfate(MnSO ₄ ·4H ₂ O) ³⁾	22.30
Zinc Sulfate(ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8.60
Sodium molybdate(Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0.25
Lloyd and McCown(WPM) Common Organic Additives	
Vitamin	
myo-Inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Agar	6.00

¹⁾ Originally printed as Na₂EDTA.

²⁾ Originally printed as 37.3mg/l anhydrous form.

³⁾ Originally printed as MnSO₄·4H₂O.

편들의 다양성을 지문화하여 polymorphism을 나타내는 증폭 산물을 기준으로 각 개체가 가지는 유전적 다양성의 지수로 표지(marking)하여 원재료 산삼과 배양 산삼의 유전적 조성이 동일함을 확인하였고, 산삼 유전자는 재배 인삼의 유전적 조성과 차별됨을 확인하였다. 또한 산삼에서만 특이적으로 증폭되는 유전자 부위는 재배 인삼과 구별되는 유전적 표지자(genetic marker)로 선발하여 활용할 수 있는 자료가 된다. 본 실험에 사용된 산삼은 (주)Neobio가 보유하고 있는 산삼 6개체(70~100년생) 및 이로부터 조직 배양하여 대량생산하고 있는

배양 산삼근 6개 cell line, 국내 재배 인삼 10개 체(4-6년생, 산지별 임의 추출)의 total DNA를 추출·정제하여 사용하였다. 최종 반응 산물을 1/2 양으로 농축하여 Polyacrylamide gel(5%)에서 분획한 후 silver staining kit(Bioneer, Korea)으로 염색하였다. 그 결과 AFLPs 방법에 따른 지문 분석은 재배 인삼과 산삼의 유전적인 조성의 차이가 있었을 뿐 아니라 원재료 산삼과 배양 산삼의 유전적 조성은 환경이나 형태가 변하더라도 유

전적 변이 없이 동일하게 나타남을 genomic DNA분석법을 통하여 확인하였다(Fig. 1).

(3) 배양산삼에서 특정유전자의 PCR을 통한 존재 확인

배양산삼의 DNA는 AFLPs 분석에서 사용한 동일한 방법으로 추출·정제하였고, PCR primer인 ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase large subunit(rbcL) 유전자와 5'-TgTCACCACAGAGACT-3'



Fig. 1. Genomic DNA finger print of WG(wild ginseng), CWG(cultured wild ginseng), and Ginseng(BaekSam) for genomic analysis.

WG showed few distinguish unique bands(especially around in 1,100bp and 500bp regions) compared to BaekSam. They are the unique characteristics for wild ginseng and CWG shares them and it demonstrate CWG are similar to WG in DNA sequences.

(A) rbcL gene from 32 lines of WGM



(B) psbD gene from 32 lines of WGM

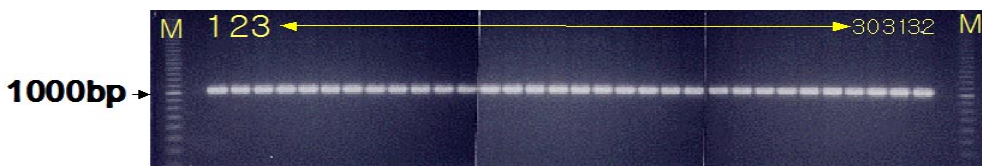


Fig. 2. Detection of rbcL and psbD genes of WGM chloroplast DNA. (A) rbcL gene(1.387 kbp), and (B) psbD gene(1.042kbp).

(Hipkins 등, 1990)와 psbD Photosystem II D2 protein(psbD) 유전자 5'-TATGACTATAGCCCTTGGTA-3' (Shinozaki 등, 1986)의 존재 여부를 엽록체 DNA에서 확인하였다(Fig. 2).

3. 시험 사료 및 배양액의 준비

In vitro 시험을 위해 시험 사료의 배합과 성분은 Table 2에 나타내었고, 배양을 위해 1-mm screen이 장착된 Willey mill를 이용하여 균일한 입자로 분쇄하였고 3일간 건조 후 시험 사료로 이용하였다. 반추위액의 제조는 도살장에서 착유우의 반추위에서 채취한 내용물을 8겹의 cheesecloth로 거른 후 반추 위액과 McDougall's buffer(1948)를 각각 1:1로 혼합 후 건조(100% Alfalfa hay, 20g/l)와 함께 24시간 강화 배양 하고 2,500×g에서 15분간 원심 분리하여 사료 입자를 제거한 후 접종액으로 사용하였다. 배

Table 2. Ingredient and chemical composition of the TMR in the experiments

Item	DM (%)
Ingredient composition	
Alfalfa	11.07
Rice straw	7.98
Whole cotton Seed	12.98
Corn silage	8.68
Brewers grain	15.43
NaHCO ₃	0.01
Ca ₃ (PO ₄) ₂ + CaNaPO ₄	0.02
MgO	0.01
Concentrate mix ¹⁾	43.82
Chemical composition	
Dry matter	72.28
Crude protein	18.36
Soluble protein	7.54
Ether extract	7.85
NDF	38.06
ADF	22.31

¹⁾ TMR concentrate mixes contained on DM basis, 23.5% wheat, 2.44% ground corn, 20.0% soybean hulls, 19.06% canola meal, 18.73% soybean meal (39% CP), 0.07% corn gluten meal (59% CP), 10% salt, 3.23% sodium bicarbonate, 1.84% calcium supplement, 2.23% vitamin & mineral.

양은 100ml serum bottle에 각 처리구에 사료 0.5g씩과 McDougall's artificial saliva 50ml를 CO₂ gas 분주와 함께 WGM을 첨가한 후 rubber stopper와 알루미늄 뚜껑을 고정장치로 밀봉 후 주사기를 이용하여 5ml의 inoculum을 접종한 후 39℃ 항온조에서 150rpm으로 각 0, 3, 6, 9, 12 시간대별로 배양 하였다. 모든 배양 조건은 혐기상태를 유지하면서 실시되었으며 배양이 끝난 후 즉시 pH 측정하였고, 25,000×g로 15분간 원심 분리 후 상층액은 NH₃-N, VFA, 미생물 단백질 함량을 측정하기 위하여 -40℃ 분석을 위해 냉동 보관하였다

4. 분석항목 및 분석방법

시험 사료의 화학적 구성 성분은 A.O.A.C (1990)의 방법에 따라 dry matter, crude protein, soluble protein, ether extract, 건물 소화율을 분석하였고, NDF와 ADF 분석은 Van Soest 등 (1991)의 방법을 이용하였다. 각 시간대별 사료 채취 즉시 pH meter(Model 420A, Orion, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고, ammonia nitrogen (NH₃-N) 농도는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 spectrophotometer (Spectronics 21D, Milton Roy, USA)를 이용하여 630nm에서 측정하였다. 미생물 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였다. 휘발성 지방산 농도는 gas chromatography(Varian Co, Star3400, USA)로 Erwin 등 (1961)의 방법에 따라 측정하였고, protozoa numbers 측정은 5ml syringe로 샘플을 채취하여 광학현미경 (Model CHS, Olympus, Japan)을 이용하여 Ogimoto와 Soichi(1981)의 방법으로 측정하였다.

5. 통계분석

본 실험의 모든 통계처리는 SAS package program(2000)의 GLM(General Linear Model) 방법에 의해 표준오차를 구하였고, 분산분석 후 Duncan's multiple range test(Steel 등, 1981)를 통하여 처리간 평균의 유의차를 검정하였다.

III 결과 및 고찰

2. NH₃-N 농도 변화 및 미생물단백질 합성량

1. 반추위 발효성상

Table 3에서 보는 바와 같이 배양 시간에 따른 반추위 내 pH의 변화에서는 배양초기 3시간까지는 대조구와 처리구에서 차이가 없었으나, 배양 6시간 이후 WGM 3% 처리구에서 유의적으로 가장 낮았으며(I < 0.05), 12시간 이후부터는 전체 처리구에서 통계적 차이를 나타내었다(I < 0.05). 특히, 배양 6시간에는 WGM 3% 처리구에서 6.61로 다소 낮은 pH를 보였으나 배양 24시간까지 6.43을 유지하였으며, WGM 처리구 중에서 전체 배양기간 동안 가장 낮은 pH를 나타내었다. 이는 김 등(1994)이 인삼박을 알팔파 대체수준으로 급여한 실험에서도 배양 6시간 이후 급격히 감소하는 pH 변화와 같은 경향이였다.

NH₃-N 농도는 대조구보다 WGM 처리구에서 배양 9시간까지 낮은 농도를 보였으나 12시간 이후 1, 5% WGM 처리구에서 높아지는 경향을 나타내었으며, 3% 처리구와 대조구는 낮아지는 경향을 나타내었다. 배양 24시간부터 WGM 3% 처리구에서 0.10mg/100ml로 가장 낮은 NH₃-N 농도를 보였으나(I < 0.05), WGM 5% 처리구에서 3.50 mg/100ml로 가장 높았다(I < 0.05). 반추위 미생물 성장에 있어서 NH₃-N은 중요한 질소원이며 반추위 미생물 단백질의 약 80%는 NH₃-N으로부터 유래하고(Bryant와 Robinson, 1963), 최적 미생물 성장에 필요한 적정 NH₃-N 농도는 일정치 않으나 *in vitro*에서 5~8 mg/100ml (Allison, 1970), *in vivo*의 경우 21~42 mg/100ml (Hespel 등, 1979) 수준인데 시험기간 중 NH₃-N 함량은 전체적으로 WGM 처리구에서 수준보다 다소 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는

Table 3. Effects of adding WGM¹⁾ to rumen microbial fermentation on pH, NH₃-N and microbial protein levels *in vitro* for 24 hours

	Incubation time (h)						SEM ²⁾
	0	3	6	9	12	24	
	pH						
Control	7.08	7.24	6.94 ^b	6.82 ^b	6.26 ^c	6.15 ^c	0.41
WGM (1%)	7.22	7.22	7.37 ^a	7.53 ^a	6.77 ^{ab}	6.30 ^b	0.41
WGM (3%)	7.14	7.14	6.61 ^c	6.34 ^c	6.48 ^b	6.43 ^{bc}	0.33
WGM (5%)	7.16	7.16	7.50 ^a	7.53 ^a	6.94 ^a	6.44 ^a	0.37
	NH ₃ -N (mg/100ml)						
Control	3.84	2.62	2.63 ^a	2.51 ^a	1.52 ^{ab}	1.39 ^b	0.81
WGM (1%)	3.92	2.19	0.99 ^b	0.79 ^b	1.28 ^b	1.73 ^b	1.05
WGM (3%)	2.69	0.67	0.40 ^{ab}	0.24 ^c	0.19 ^c	0.10 ^c	0.90
WGM (5%)	2.71	0.83	0.80 ^b	0.80 ^b	3.11 ^a	3.50 ^a	1.17
	Microbial protein (mg/100ml)						
Control	0.17 ^a	0.18 ^c	0.18 ^c	0.19 ^c	0.21 ^c	0.24 ^b	0.02
WGM (1%)	0.16 ^c	0.15 ^{bc}	0.09 ^d	0.04 ^d	0.13 ^d	0.16 ^c	0.04
WGM (3%)	0.18 ^a	0.21 ^b	0.42 ^a	0.53 ^a	0.45 ^a	0.47 ^a	0.13
WGM (5%)	0.17 ^a	0.31 ^a	0.26 ^b	0.24 ^b	0.14 ^b	0.11 ^d	0.07

¹⁾ Artificial culture medium of wild-ginseng.

²⁾ Standard error of the mean.

a, b, c, ab, bc Mean in the same column with different superscripts are significantly different(I < 0.05).

반추위 내 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도는 미생물 단백질 합성 비율과 단백질 분해율에 따라 결정되는데(Mehrez 등 1977), 본 시험에서 대조구에 비하여 5% 처리구를 제외한 WGM 처리구의 낮은 암모니아 농도를 보인 것은 WGM 처리구가 대조구의 반추위 내 단백질 소화율이 다른 기질보다 낮기 때문으로 사료되며, Goodall 등(1980)의 연구 결과에 나타난 것처럼 saponin의 작용에 의해 ammonia 농도를 낮추는데 영향을 미친 동일한 결과로 사료된다(김 등, 1994).

미생물단백질 합성량은 배양 이후 전체처리구에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$). 특히 WGM 3% 처리구에서 배양 6시간 이후 미생물단백질 합성량이 대조구과 다른 처리구에 비하여 급격히 증가하였고 배양 9시간 대에서 $0.53\text{mg}/100\text{ml}$ 으로 가장 높았으며, 이후 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 saponin 성분이 함유되어 있는 tannin 결정체와 saponin의 결합 물질을 첨가한 *in vitro* 시험에서 ^{15}N 을 이용한 반추위미생물 합성량 측정 시 배양 초기에 tannin내에 존재하는 saponin 성분에 의해 미생물들에 의한 사료 내 단백질 부족 효과에 의하여 미생물단백질 합성량이 다소 감소하였으나 배양시간이 증가할수록 반추위미생물들에 의해 생성되는 short-chain fatty acid의 이용성 증가에 의해 미생물단백질 합성량이 증가한다는 보고와 일치(Makkar 등, 1997)였는데, 이는 tannin과 saponin 결합물질이 영양물질에 대한 식물자체의 물리·화학적 변형 효과에 의한 것이라 하였다(Freeland 등, 1985; Ikedo 등, 1996).

3. Protozoa 군집의 변화

배양시간에 따른 반추위 내 protozoa 수의 변화는 대조구에 비하여 WGM 처리구에서 전반적으로 배양 9시간까지 낮아지는 경향을 보였고 전체 배양시간 동안 WGM 3% 처리구에서 가장 낮은 결과를 나타내었다(Fig. 3). 이는 steroid계 saponin을 첨가한 RUSITEC(Rumen Simulation Technique) 시험에서 반추위 미생물 단백질 합성량에는 변화가 없었으나 protozoa 수

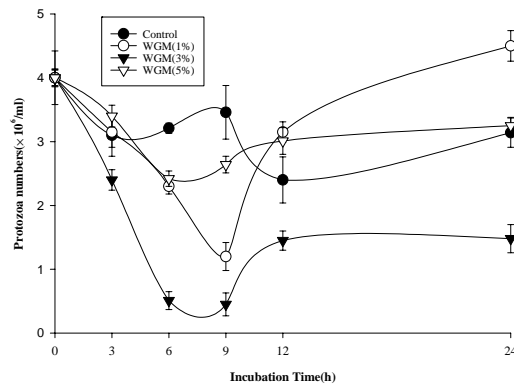


Fig. 3. Effects of adding WGM(v/w, %) to rumen microbial fermentation on change in protozoa numbers *in vitro* at 24 hours incubation time(n=3).

는 감소시키며(Wang 등, 1998), saponin 성분이 프로토조아 제거 효과를 가지고 있다는 시험 결과와 일치하였다(Goodall, 1980; Goodall 등, 1982; Kil 등, 1994; Makkar 등, 1988).

4. 섬유소 소화율에 미치는 영향

배양시간에 따른 반추위 내 NDF와 ADF의 소화율은 대조구와 모든 WGM 처리구에서 배양시간이 경과되면서 전체적으로 높아졌다. 이와 같은 결과는 최(1991)이 실시한 한약재 부산물의 사료가치 평가 실험에서 NDF 소화율의 결과와도 일치하는 경향을 나타내었다. 또한 NDF 소화율은 대조구와 WGM 3% 처리구에서, ADF 소화율은 전체 처리구에서 유사한 경향을 나타내었는데, Wang 등(1998)은 saponin 첨가구에서 전체 gas 생성량의 차이 없이 methane 생성량이 15% 감소하였으며, 건물 소화율에는 차이가 없었다는 결과와 일치하였다(Table 4).

5. VFA 생성량의 변화

Total VFA 생성량에서는 대조구가 WGM 처리구보다 다소 높은 생성량을 보였지만, 배양 12시간부터는 WGM 5% 처리구에서 통계적 차이 없이 높은 Total VFA 생성량을 보였다. Acetate 생성량은 배양 6시간부터 WGM 처리구

Table 4. Effects of adding WGM¹⁾ to rumen microbial fermentation on NDF and ADF digestibility (%) *in vitro* at 24 hours incubation time

Items	Incubation time (h)					SEM ²⁾
	3	6	9	12	24	
	NDF digestibility (%)					
Control	48.36 ^b	49.24 ^b	53.42 ^c	53.56 ^c	58.34 ^c	3.57
WGM (1%)	32.56 ^a	27.65 ^a	30.18 ^a	35.43 ^a	37.65 ^a	6.23
WGM (3%)	53.42 ^c	53.43 ^c	54.04 ^c	55.24 ^c	59.46 ^c	13.43
WGM (5%)	48.65 ^b	48.76 ^b	49.98 ^b	53.65 ^c	47.87 ^b	2.05
	ADF digestibility (%)					
Control	53.18 ^b	82.42 ^d	76.42 ^b	77.54	79.13	2.42
WGM (1%)	46.21 ^a	56.78 ^a	65.43 ^a	75.43	78.67	8.53
WGM (3%)	59.43 ^c	77.92 ^{cd}	77.38 ^b	78.13	80.65	5.21
WGM (5%)	55.43 ^b	55.74 ^c	77.54 ^b	79.35	81.87	10.79

¹⁾ Artificial culture medium of wild-ginseng.

²⁾ Standard error of the mean.

a, b, c, cd Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Effects of adding WGM¹⁾ to rumen microbial fermentation on total volatile fatty acid(VFA) concentration and acetate, propionate and butyrate molar proportions *in vitro* for 24 hours

Items	Incubation time						SEM ²⁾
	0	3	6	9	12	24	
	Total VFA (mmoles/100ml)						
Control	21.44	27.05	29.55 ^a	32.64 ^a	61.80	77.29	20.52
WGM (1%)	21.25	24.68	26.68 ^c	26.97 ^c	45.32	72.12	17.82
WGM (3%)	20.24	22.26	20.99 ^b	23.30 ^b	51.00	66.91	18.18
WGM (5%)	20.15	24.08	24.54 ^{ac}	27.15 ^c	60.85	79.15	22.42
	Molar proportion (mmoles/100mmoles)						
	Acetate (C ₂)						
Control	62.34	58.56	38.51 ^b	41.03 ^b	37.62	29.75 ^b	11.75
WGM (1%)	62.92	67.84	66.72 ^a	67.45 ^a	55.59	52.16	6.12
WGM (3%)	66.01	72.15	66.03 ^a	69.51 ^{ab}	56.56	46.80	8.64
WGM (5%)	70.72	68.70	73.81 ^c	55.82 ^c	51.07	37.94	12.68
	Propionate (C ₃)						
Control	16.95	28.90 ^a	34.03 ^a	30.58 ^a	24.41	23.71	5.51
WGM (1%)	17.13	18.24	17.32	19.62	33.35	36.18	7.95
WGM (3%)	17.05	13.77	13.58 ^c	15.14	33.56	42.19	11.18
WGM (5%)	17.77	17.82	16.11	11.92	30.59	35.55	8.45
	Butyrate						
Control	0.08	0.06	0.04 ^b	0.02 ^b	0.03 ^b	0.04 ^b	0.02
WGM (1%)	0.07	0.07	0.08 ^a	0.07 ^a	0.08	0.08	0.00
WGM (3%)	0.08	0.06	0.08	0.08	0.07	0.07	0.01
WGM (5%)	0.08	0.08	0.08	0.05	0.09 ^a	0.07	0.01
	C ₂ /C ₃						
Control	3.68	2.03 ^c	1.13 ^c	1.34 ^c	1.54	1.25	0.88
WGM (1%)	3.67	3.72	3.85	3.44	1.67	1.44	1.01
WGM (3%)	3.87	5.24 ^a	4.86 ^a	4.59 ^a	1.69	1.11	1.59
WGM (5%)	3.98	3.86	4.58	4.68	1.67	1.07	1.41

¹⁾ Artificial culture medium of wild-ginseng.

²⁾ Standard error of the mean.

a, b, c, ac Mean in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

가 대조구보다 높은 생성량을 보였으며, 특히 WGM 3% 처리구에서 다른 처리구보다 다소 높았다. Propionate 생성량에서는 배양 12시간부터 WGM 3%와 5% 처리구가 다른 처리구들에 비해 높은 생성량을 나타내었고, butyrate 생성량에서도 마찬가지로 WGM 첨가구가 대조구에 비해 높았으며, 전체적으로 total VFA와 acetate, propionate, butyrate 함량은 수준별 WGM 함량에 의해 차이가 없었다(Wang 등, 1998). A/P 비율은 조사료원 함량이 높은 시험 사료의 배합으로 배양 초기부터 4에 가깝게 높은 수치를 유지하다가 12시간 이후부터는 급격히 낮아졌으며, A/P 비율 또한 대조구보다 WGM 처리구에서 다소 높은 비율을 유지하였고 배양 12시간대 이후로는 전체 처리구에서 차이가 없었다(Table 5).

IV 요약

본 실험은 수준별 산삼 배양액에 의한 반추위 내 미생물 발효성상에 미치는 영향에 대하여 조사하기 위해 실시되었다. 산삼 배양액의 수준에 따른 반추위 내 발효성상에 미치는 영향은 WGM을 3% 첨가한 처리구가 대조구 및 다른 WGM 수준 첨가 처리구에 비하여 미생물 단백질 합성량이 가장 높게 나타났다. 산삼 배양액 내에 존재하는 saponin의 영향으로 배양 초기 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도의 수준이 WGM를 첨가한 처리구가 대조구에 비해 낮은 경향($I < 0.05$)을 보였으나, 미생물단백질 합성량은 WGM 처리구에서 6시간 이후 급격히 증가($P < 0.05$)하는 경향을 나타내었다. 따라서 용해도가 높거나 급여 초기 사료의 이용률이 저하되는 급여 체계에서 산삼 배양액을 첨가는 초기 반추위 미생물의 이용률을 조절할 수 있을 것으로 사료된다. 반추위 내 프로토조아의 수는 WGM 처리구에서 전반적으로 배양 9시간까지 낮아졌고, 3% 처리구에서 가장 낮았는데($P < 0.05$), 프로토조아 제거효과에 의해 반추위 미생물합성량 증진시키는 효과를 나타내었다. NDF와 ADF 소화율은 대조구와 모든 처리구에서 배양시간 경과에 따라 높아졌고, NDF 소화율은 대조구와 WGM 3% 처리구에서 그리고 ADF 소화율은 처리구별 차이가

없었다. Total VFA 생성량은 처리구가 대조구에 비해 낮았고, 배양 12시간부터는 5% 처리구에서 차이가 없게 나타났다. 따라서 용해도가 높거나 급여 초기 사료의 이용률이 저하되는 급여 체계에서 산삼 배양액을 첨가는 초기 반추위 미생물의 사료 이용률 증진과 프로토조아 제거효과에 의해 반추위 미생물합성량 증진에 도움이 될 수 있을 것이다.

V 인용 문헌

- Allison, M. J. 1970. Nitrogen metabolism of ruminal micro-organisms. In Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant. Ed. A. T. Phillipson. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne. pp. 456-473.
- AOAC. 1990. Official method of analysis, 15thed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C.
- Bird, S. H., Hill, M. K. and Leng, R. A. 1979. The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. The Br. J. Nutr. 42: 81-87.
- Bryant and Robinson, 1963. Apparent incorporation on ammonia and amino acid carbon during growth of selected species of ruminal bacteria. J. of Dairy Sci. 46:150-157.
- Cheney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Biochem. 8:130-132.
- Demeyer, D. I. and Van Nevel, C. J. 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms, The Br. J. Nutr. 42:515-524.
- Erwin, E. S., Marco, S. J. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44:1768-1771.
- Freeland, W. J., Calcott, P. H. and Anderson, L. R., 1985. Tannins and saponins: interaction in herbivore diets. Biochem. Syst. Ecol. 13:189-193.
- Goodall, S. R. 1980. The effect of sarsaponin on digestion and feedlot performance of steers fed high grain diets. Feedstuffs 52(35):24-28.
- Goodall, S. R., Braddy, P., Horton, D. and Beckner, B. 1982. Steam flaked vs. high moisture content rations with and without sarsaponin for finishing steers. Proc. Ann. Meet. Amer. Soc. Anim. Sci. West. Sect. 33:45.
- Hespell, R. B. and Bryant, M. P. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: Influence of some theoretical and experimental factors on YATP. J. Anim. Sci. 49:1640-1659.
- Hill, J. and Leaver, J. D. 1991. Effect of stage of growth and urea addition on the preservation and nutritive value of whole crop wheat. Anim. Prod. 52: 606-618.
- Hipkins, V. D., Tsai C. H. and Strauss S. H. 1990. Sequence of the gene for the large subunit of ribulose

- 1, 5-bisphosphate carboxylase from a gymnosperm, Douglas-fir *Plant Mol. Biol.* 15:505-507.
14. Ikedo, S., Shimoyamada, M. and Watanabe, K. 1996. Interaction between bovine serum albumin and saponin as studied by heat stability and protease digestion, *J. Agric. Food Chem.* 44:792-795.
 15. Kil, J. J., Cho, N. K., Kim, B. S., Lee, S. R. and Maeng, W. J. 1994. Effects of yucca extract addition on *in vitro* fermentation characteristics of feeds and faeces, and on the milk yields in lactating cows. *Korean J. Anim. Sci.* 36: 698-709.
 16. Kovács, P. L., Südekum, K. -H. and Stangassinger, M. 1998. Effects of intake of a mixed diet and time postfeeding on amount and fibre composition of ruminal and faecal particles and on digesta passage from the reticulo-rumen of steers, *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:325-340.
 17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, R. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 18. Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society. 30:421-427.
 19. Makkar, H. P. S., Blümmel, M., Borowy, N. K. and Becker, K., 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61:161-165.
 20. Makkar, H. P. S. and Becker, K. 1996. Notional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63:211-228.
 21. Makkar, H. P. S., Borowy, N., Becker, K. and Degen, R. 1995. Some problems in fiber determination in tannin-rich forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 67-76.
 22. Makkar, H. P. S., Blümmel, M. and Becker, K. 1997c. Application of an *in vitro* gas method to understand the effects of natural plant products on availability and partitioning of nutrients. In: Proceedings of the BSAP Occasional Meeting on *In Vitro* Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants, July 8-10, Reading, UK.
 23. Makkar, H. P. S., Singh, B. and Dawra, R. K. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak on various microbial activities of the rumen. *Br. J. Nutr.* 60: 287-296.
 24. Mehrez, A. Z., Ørskov, E. R. and McDonald, I. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
 25. McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
 26. Ogimoto, K. and Soichi, I. 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Sci. Societies Press. Tokyo. Page:161.
 27. Owen H. R. and Miller A. R. 1992. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:147-150.
 28. Pell, A. N., Woolston, T. K., Nelson, K. E. and Schofield, P. 2000. Tannins: biological activity and bacterial tolerance. In: Brooker, J. D. (Ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition. Proceedings of the International Workshop, Adelaide, Australia, May 31-June 2, 1999. ACIAR Proceedings No. 92, pp. 111-116.
 29. SAS User's Guide:Statistics, release. 8.1 version Edition, 2000. SAS Inst. Cary, NC.
 30. Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi Shinozaki, K., Ohta, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. 1986. The Complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome its gene organization and expression. *EMBO. J.* 5: 2043-2049.
 31. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1981. Principles and procedures of statistics, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
 32. Van Soest, P. J., Robertson, J. D. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary, fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
 33. Van Der Merwe, M., Winfeld, M. O., Arnold, G. M. and Parker, J. S. 2000. Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations. *Molecular Ecology* 9:379-386.
 34. Wang, Y., Waghorn, G. C., Barry, T. N. and Shelton, I. D., 1994. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on plasma metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphate by sheep. *Br. J. Nutr.* 72:923-937.
 35. Wang, Y., Douglas, G. B., Waghorn, G. C., Barry, T. N. Foote, A. G. and Purchas, R. W. 1996a. Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and Lucerne (*Medicago sativa*). *J. Agric. Sci. (Camb.)* 126:353-362.
 36. Wang, Y., McAllister, T. A., Newbold, C. J., Rode, L. M., Cheeke, P. R. and Cheng, K. -J. 1998. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:143-153.
 37. Wallace, R. J., Arthaud, L. and Newbold, C. J. 1994. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology.* 60:1762-1767.
 38. Wallace, R. J. and McPherson, C. A. 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid. *The Br. J. Nutr.* 58:313-323.
 39. 김기현, 김현진, 주종원. 1994. 건조 인삼박의 Alfalfa 대체수준이 반추위 발효성상에 미치는 영향. *한영사지* 18:481-490.
 40. 최상숙. 1991. 반추가축에 있어서 한약재 부산물의 사료가치에 관한 연구. 건국대학교 대학원 석사학위 논문.
(접수일자 : 2003. 8. 5. / 채택일자 : 2003. 10. 29.)

Incubation Time(h) Protozoa number($\times 10^6$ /ml)
5 4 3 2 1 0 0 3 6 9 12 24

Incubation Time(h) Protozoa number($\times 10^6$ /ml)
5 4 3 2 1 0 0 3 6 9 12 24

Incubation Time(h) Protozoa number($\times 10^6$ /ml)
5 4 3 2 1 0 0 3 6 9 12 24