

# Alcohol 사료가 *In vitro* 반추위내 pH, Ammonia, Alcohol 및 Volatile Fatty Acids 농도에 미치는 영향

신중서\* · 박병기\*\*

강원대학교 동물자원학부\*, 농촌진흥청 축산연구소\*\*

## Effects of Alcoholic Feeds on *In vitro* Ruminal pH, Ammonia, Alcohol and Volatile Fatty Acids Concentrations

J. S. Shin\* and B. K. Park\*\*

Department of Animal Resource Science, Kangwon National University\*,

National Livestock Research Institute, R.D.A. \*\*

### ABSTRACT

In this study, changes of ammonia, alcohol and volatile fatty acid(VFA) concentrations or pH in *in vitro* ruminal fluid were studied to determine the effects of alcoholic feeds on *in vitro* ruminal fermentation characteristics. To formulate the alcoholic feeds, alcohol was added to commercial formulated feed at the levels of 1, 3, and 5 %. Experiments were done with four treatment groups, control(commercial feed), AF-1(commercial feed + 1% alcohol), AF-3(commercial feed + 3% alcohol), and AF-5(commercial feed + 5% alcohol). Ammonia concentrations of AF-1 and AF-5 were significantly lower than that of control for the 12h incubation(p<0.05). Ruminal alcohol concentration was increased with the addition level of alcohol increased(p<0.05). TVFA concentrations of AF-1, AF-3 and AF-5 were significantly higher than those of control at 12h(p<0.05). Significant decrease of molar percentage of acetate was observed in control from 8 to 12h incubation, but molar percentage of acetate for AF-1, AF-3 and AF-5 was constant. Molar percentage of propionate was increased in control compared with AF-1, AF-3 and AF-5 from 8 to 12h incubation(p<0.05). Molar percentages of butyrate and valerate were higher in AF-1, AF-3 and AF-5 than in control(p<0.05). Molar percentage of caproate for AF-1, AF-3 and AF-5 was 0.05, 0.58 and 0.47M% at 8h, respectively, but that was not detected for control. Present results may indicate that the alcoholic feeds show positive effects on *in vitro* ruminal ammonia, alcohol and VFA concentrations or pH. Furthermore, the results of this study implies that the addition level of 5% could be more effective to ruminal fermentation than other addition levels.

(Key words : Alcoholic feeds, Ammonia, Alcohol, Volatile fatty acid, Hanwoo)

### I. 서 론

최근까지도 비육우에 대한 alcohol 급여는 식욕증진 및 육질개선을 위하여 일본에서 주로 진행되어 왔으며 생산성 향상을 위하여 가축

의 특수사료로 이용되어 왔다(津吉 등, 1990). Alcohol은 체내 대사 에너지원 및 반추미생물의 에너지 공급원으로 이용되어 반추미생물의 발효 pattern을 변화시켜 휘발성 지방산 비율을 변화시킬 뿐만 아니라 불포화지방산의 체내흡

이 논문은 2002년도 강원대학교 기성회 교수 국외 파견연구 지원에 의하여 연구되었음.

Corresponding author : J. S. Shin, Department of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea.

Tel : 033-250-8628, Fax : 033-244-2532, E-mail : jsshin@kangwon.ac.kr

수와 단백질 이용효율을 증가시키는 작용으로 인해(alcohol 飼料化研究委員會, 1991) alcohol의 가축사료화와 관련하여 광범위한 이용방법을 모색하기 위한 연구들이 진행되고 있으나 주로 비육우의 산육능력 및 육질에 미치는 효과에 대하여 검토되었을 뿐 alcohol이 반추동물에 이용되는 반추위내 대사기전에 대한 연구가 미미한 실정이다.

일반적으로 반추위 미생물 단독배양시 *Ruminococcus albus*(Wolin 등, 1997), *Lachnospira multiparus*(Bryant 등, 1956) 등과 같은 미생물에 의해 alcohol이 생성되지만, 이들 미생물과 다른 미생물의 혼합배양시에는 alcohol이 검출되지 않으며(牛田, 1998), 또한 인위적으로 alcohol을 투여할 경우 반추미생물에 의해 부분적으로 분해되는데(Moomaw 등, 1963) 주로 acetate로 전환된다(Czerkawski 등, 1972). 또한 Andree Durix 등(1991)은 semicontinuous culture system(RUSITEC)을 이용하여 배지에  $2\text{-}^{14}\text{C}$  alcohol을 첨가하고 반추미생물의 alcohol 이용 효율을 검토한 결과 alcohol의  $2\text{-}^{14}\text{C}$  radioactivity는 acetate, butyrate, caproate, valerate 및 propionate에서 각각 7.0~18.0, 1.2~1.3, 0.4~1.25, 0.2~0.92 및 0.2~0.35%가 검출되었으며, alcohol은 반추미생물에 의해 acetate로 가장 많이 전환되었다고 보고한 바 있다.

한편, alcohol의 급여는 반추위내 protozoa 수를 감소시키고(大槻 등, 1991) 총 미생물수를 증가시키며(Kurihara 등, 1978), 반추위내 단백질 분해율을 저하시켜 ammonia 생성량을 감소시키는 것으로 보고된 바 있다. 이외에도 alcohol의 급여는 반추위내 총휘발성지방산 생성량, acetate 및 caproate 비율을 증가시키는 반면에 butyrate 및 propionate 비율은 감소시키지만(大槻 등, 1991) pH에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고된 바 있다(이, 1999a,b; 정과 이, 1996; Andree Durix 등, 1991).

또한, alcohol은 반추미생물의 에너지원으로 이용되나 그 이용율은 전체 첨가량의 9~22% 전후에 불과하므로(Andree Durix 등, 1991) 반추미생물의 alcohol 이용은 어떤 미지의 대사기전에 의해 조절되는 것으로 생각되며, 이러한

대사적 조절 역시 alcohol 첨가 수준에 따라 변화될 것으로 추정되지만 이에 대한 연구 결과를 찾아보기 어려운 실정이다.

따라서 본 실험은 batch *in vitro* 배양법에 따라 alcohol 사료의 처리가 반추위액 중 ammonia 농도, pH, alcohol 농도 및 VFA 농도 변화에 미치는 영향을 비교 검토하여 alcohol 사료의 처리에 따른 반추위내 발효 pattern의 변화를 조사하기 위해 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 사양관리

본 시험에서는 반추위 cannula가 장착된 한우 암소 2두(400 및 420 kg)를 공시하여 실시하였는데, 각 실험은 14일 사료 적응기간을 거친 후 마지막 15일에 위액을 채취하여 본 실험을 수행하였으며, 동일한 실험을 3회 실시하였다. 사료급여는 일일 2회(9:00 a.m. 및 6:00 p.m.) 공시축 체중의 1.5%(건물기준)로 급여하였으며, 급여사료로는 시판 배합사료와 호밀 건초를 이용하였으며, 시험사료의 조농비율은 50:50으로 하였다. 물과 미네랄 블록은 항상 이용가능토록 하였다. 시험사료의 일반화학 성분은 Table 1과 같다.

### 2. 시험사료 제조

본 시험에 사용된 alcohol 사료(alcoholic feed; AF)의 제조는 95% alcohol 0, 1, 3 및 5g를 각각 10 ml의 증류수에 희석한 후 90g의 배합사

Table 1. Chemical composition of experimental diets

Items	Commercial formulated feed	Rye straw
Dry matter (%)	91.56 ± 0.09	91.84 ± 0.22
Crude protein (%)	15.22 ± 0.76	9.29 ± 0.19
Ether extract (%)	2.56 ± 0.06	1.93 ± 0.06
Crude ash (%)	8.34 ± 0.17	6.05 ± 0.56
NDF (%)	34.51 ± 1.58	72.08 ± 0.20
ADF (%)	14.33 ± 0.47	45.68 ± 0.56

료에 혼합하여 제조하였는데, 혼합된 사료는 밀폐된 용기에 담아 4℃ 냉장고에서 48시간 방치하여 alcohol이 사료에 충분히 흡착되도록 하였으며, glucose analyzer(YSI2700, USA)를 이용하여 시료중의 alcohol 농도를 재확인한 후 본 시험에 이용하였다.

한편, 본 시험에 이용된 시험사료의 일반 화학성분은 AOAC(1995) 방법에 준하여 분석하였다. 또한 시험사료의 pH 및 alcohol 농도를 측정하기 위해 각 시험사료를 1g을 3차 증류수를 이용하여 5배 희석하여 vortex mixer로 15분간 혼합한 후 4℃에서 30분간 정치하고, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후 pH 및 alcohol 농도를 측정하였다. pH는 pH

meter(Corning 445, USA)를 이용하여 측정하였으며, alcohol 농도는 glucose analyzer(YSI 2700, USA)를 이용하여 조사하였다. 시험사료의 화학성분은 Table 2와 같다.

### 3. 시험구 배치

*In vitro* 소화시험은 DAISY<sup>II</sup> incubator(Ankom, USA)를 이용하여 실시하였는데, 시험기간 동안 incubator의 온도는 항상  $39.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 4개의 jar에 배합사료 7g(DM), 볏짚 2g(DM) 및 sudangrass silage 2g(DM)을 건조 후 분쇄기를 이용하여 입자크기를 1mm로 분쇄하여 미생물의 기초 영양소로 동일하게 첨가한 후 배합사

Table 2. Chemical components of experimental diets for *in vitro* trials

Items	CFF <sup>1)</sup>	AF-1 <sup>2)</sup>	AF-3 <sup>3)</sup>	AF-5 <sup>4)</sup>	SGS <sup>5)</sup>	RS <sup>6)</sup>
DM (%)	87.8	80.8	81.2	81.5	38.3	83.1
..... % of Dry matter .....						
Crude Protein (%)	15.3	15.0	15.1	15.1	7.5	5.1
Ether extract (%)	4.2	3.7	3.8	3.7	2.2	4.2
Crude fiber (%)	3.0	2.8	2.9	2.7	30.0	30.4
Crude ash (%)	7.7	7.5	7.6	7.4	12.1	6.5
Alcohol (%)	—	0.82	2.7	5.7	—	—
pH	5.2	5.1	5.0	4.96	4.5	—

<sup>1)</sup> CFF : commercial formulated feed; <sup>2)</sup> AF - 1 : alcohol was added into commercial feed at 1% level;

<sup>3)</sup> AF - 3 : alcohol was added into commercial feed at 3% level;

<sup>4)</sup> AF - 5 : alcohol was added into commercial feed at 5% level; <sup>5)</sup> SGS : sudan grass silage; <sup>6)</sup> RS : rice straw.

Table 3. Experimental design for *in vitro* trials

Items	Control	AF-1	AF-3	AF-5
Basal diets				
Commercial feed (g)	7.0	7.0	7.0	7.0
Sudan grass silage (g)	2.0	2.0	2.0	2.0
Rice straw (g)	2.0	2.0	2.0	2.0
Experimental diets				
CF (g)	7.0	—	—	—
AF - 1 (g)	—	7.0	—	—
AF - 3 (g)	—	—	7.0	—
AF - 5 (g)	—	—	—	7.0
Alcohol (%)	—	0.82 ± 0.02	2.7 ± 0.04	5.7 ± 0.02
pH	5.5 ± 0.01	5.1 ± 0.01	5.0 ± 0.01	5.0 ± 0.01
Total dry matter (g)	18.0 ± 0.1	18.0 ± 0.1	18.0 ± 0.1	18.0 ± 0.1
Total protein (g)	2.4 ± 0.04	2.4 ± 0.04	2.4 ± 0.04	2.4 ± 0.04

료 처리구(control), 배합사료와 1% alcohol 사료 처리구(AF-1), 3% alcohol 사료 처리구(AF-3) 및 5% alcohol 사료 처리구(AF-5)로 구분하여 실시하였다. 기초사료의 첨가량 및 각 시험사료의 첨가량과 영양소 수준은 Table 3과 같다.

#### 4. 실험 방법 및 조사항목

반추위액의 채취는 반추위 cannula가 장착된 한우 암소에서 오전사료 급여전에 채취하여 4겹의 cheese cloth로 여과한 후 미리 예열된 39℃ 보온병에 담고, O<sub>2</sub> free-CO<sub>2</sub> gas를 30초간 주입하여 보온병내의 공기를 제거한 후 30분내로 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다.

*In vitro* 배양액은 반추위액 400 ml를 미리 제조한 인공타액(buffer solution A와 B) 1,600 ml와 첨가하여 제조하였는데, 인공타액은 Table 4의 비율로 buffer solution A와 B로 구분하여 제조한 후 buffer solution A 1,330 ml과 buffer solution B 266 ml를 동시에 배양 jar에 넣어 혼합한 후 pH가 6.8이 되도록 조정하였으며, 39℃까지 예열시켰다. 인공타액에 반추위액의 첨가 즉시 O<sub>2</sub> free-CO<sub>2</sub> gas를 30초간 주입하여 배양 jar내의 공기를 배제하였으며, 그 후 39℃에서 1시간 동안 안정시킨 후 본 실험에 이용하였다.

*In vitro* 배양 0, 2, 4, 6, 8 및 12시간별로 각각 배양액을 채취하는 즉시 pH meter(Corning 445, USA)로 pH를 측정하고, 3,000 rpm(0℃)에

Table 4. Components of buffer solutions

Components	Amount	Unit
Buffer solution A:		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	g
NaCl	0.5	g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1	g
Urea	0.5	g
Distilled water	1000	ml
Buffer solution B :		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15.0	g
Na <sub>2</sub> S · 9H <sub>2</sub> O	1.0	g
Distilled water	1000	ml

서 5분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 alcohol 및 ammonia 농도 측정에 이용하였다. Alcohol 농도는 glucose analyzer(YSI 2700, USA)를 이용하여 분석하였으며, ammonia 농도는 자동분석기(Quikchem 8000, USA)를 이용하여 측정하였다.

한편, *in vitro* 배양액의 휘발성 지방산의 농도를 분석하기 위해 0, 2, 4, 6, 8 및 12시간대 별로 5 ml의 배양액을 채취한 후 20%의 HPO<sub>3</sub> 1 ml 및 포화 HgCl<sub>2</sub> 0.5 ml를 첨가하고 4,000 × g(4℃)에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취한 후 gas chromatography(Shimadzu Model GC-17A Ver. 3, Japan)을 이용하여 휘발성 지방산 농도 측정하였다.

#### 5. 통계분석

본 실험에서 배양액 중의 ammonia, pH, alcohol 및 휘발성지방산 농도의 결과들은 SAS package (1999)를 이용하여 분산분석 및 Duncan의 multiple range test를 실시하여 처리구간의 유의성(p<0.05)을 검증하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Ammonia, pH 및 alcohol

Alcohol 사료의 alcohol 첨가 수준에 따른 *in vitro* 배양과정 중 ammonia 농도, pH 및 alcohol 농도 변화를 조사한 결과는 Table 5와 같다.

*In vitro* 배양액의 ammonia 농도는 배양 2시간에 대조구 및 AF-3구가 각각 11.84 및 11.63 mg/dl로 0시간에 비해 각각 1.40 및 1.19 mg/dl 증가하였으며, AF-1구 및 AF-5구는 11.09 및 10.73 mg/dl로 나타나 0시간에 비해 각각 0.65 및 0.29 mg/dl 증가하였다. 따라서 ammonia 생성 속도는 AF-1구 및 AF-5구가 대조구 및 AF-3구보다 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05). 이러한 결과는 大槻 등(1991)과 이(1999a)가 농후사료 다급 조건에서 alcohol의 첨가 급여는 반추위내 단백질 분해율을 억제하고 ammonia 농도를 감소시킨다는 결과와 유사하나 AF-3구는 오히려

Table 5. Changes in ammonia, pH and alcohol during *in vitro* incubation with different level of alcohol mixture

Items	Time(hr)	Control	AF-1	AF-3	AF-5
Ammonia (mg/dl)	0	10.44 ± 0.12	10.44 ± 0.13	10.44 ± 0.16	10.44 ± 0.42
	2	11.84 ± 0.20 <sup>a</sup>	11.09 ± 0.26 <sup>b</sup>	11.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	10.73 ± 0.08 <sup>c</sup>
	4	11.97 ± 0.29 <sup>a</sup>	10.95 ± 0.21 <sup>b</sup>	11.71 ± 0.04 <sup>a</sup>	10.72 ± 0.07 <sup>b</sup>
	6	11.02 ± 0.33 <sup>a</sup>	9.72 ± 0.05 <sup>b</sup>	10.83 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.34 ± 0.11 <sup>c</sup>
	8	10.43 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.59 ± 0.54 <sup>b</sup>	9.81 ± 0.24 <sup>b</sup>	8.99 ± 0.02 <sup>c</sup>
	12	10.09 ± 0.04 <sup>a</sup>	9.30 ± 0.42 <sup>c</sup>	9.78 ± 0.54 <sup>b</sup>	9.11 ± 0.82 <sup>c</sup>
pH	0	7.00 ± 0.001 <sup>b</sup>	7.01 ± 0.001 <sup>b</sup>	7.00 ± 0.001 <sup>b</sup>	7.04 ± 0.006 <sup>a</sup>
	2	6.83 ± 0.001 <sup>b</sup>	6.84 ± 0.006 <sup>b</sup>	6.85 ± 0.001 <sup>a</sup>	6.81 ± 0.006 <sup>c</sup>
	4	6.78 ± 0.005 <sup>a</sup>	6.76 ± 0.006 <sup>b</sup>	6.78 ± 0.001 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.006 <sup>b</sup>
	6	6.74 ± 0.005 <sup>a</sup>	6.72 ± 0.005 <sup>b</sup>	6.75 ± 0.006 <sup>a</sup>	6.71 ± 0.005 <sup>c</sup>
	8	6.74 ± 0.006 <sup>a</sup>	6.68 ± 0.002 <sup>c</sup>	6.72 ± 0.001 <sup>b</sup>	6.64 ± 0.001 <sup>d</sup>
	12	6.64 ± 0.001 <sup>a</sup>	6.58 ± 0.001 <sup>b</sup>	6.59 ± 0.006 <sup>b</sup>	6.54 ± 0.006 <sup>c</sup>
Alcohol (mg/dl)	0	1.60 ± 0.10 <sup>d</sup>	3.97 ± 0.45 <sup>c</sup>	8.97 ± 0.25 <sup>b</sup>	13.60 ± 0.10 <sup>a</sup>
	2	2.50 ± 0.10 <sup>d</sup>	5.40 ± 0.10 <sup>c</sup>	12.00 ± 0.10 <sup>b</sup>	18.40 ± 0.20 <sup>a</sup>
	4	2.07 ± 0.40 <sup>d</sup>	5.40 ± 0.10 <sup>c</sup>	11.90 ± 0.20 <sup>b</sup>	17.50 ± 0.10 <sup>a</sup>
	6	2.27 ± 0.15 <sup>d</sup>	4.73 ± 0.15 <sup>c</sup>	10.57 ± 0.06 <sup>b</sup>	14.93 ± 0.12 <sup>a</sup>
	8	2.00 ± 0.10 <sup>d</sup>	4.60 ± 0.10 <sup>c</sup>	10.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	15.50 ± 0.36 <sup>a</sup>
	12	2.07 ± 0.50 <sup>d</sup>	5.63 ± 0.06 <sup>c</sup>	10.20 ± 0.10 <sup>b</sup>	15.07 ± 0.31 <sup>a</sup>

Mean ± SD.

<sup>a,b,c,d</sup> Means with different superscripts in the same row significantly differ(p<0.05).

대조구와 유사한 수준으로 나타나 ammonia 농도는 alcohol 첨가 수준에 비례적으로 감소되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 alcohol 첨가로 protozoa 수가 현저히 감소되고(大概 등, 1991) 총 미생물수가 증가되어 반추위액의 urease 활성이 증가되므로(이, 1999b; Fonty 등, 1983) 오히려 ammonia 농도가 증가될 수도 있음을 나타낸다. 또한 이(1999a)은 alcohol 첨가 수준에 따라 ammonia 농도가 유의적인 감소하지 않았다고 보고하고 있어 본 실험의 결과를 뒷받침해 주고 있다.

또한 *in vitro* 배양 2시간부터 6시간까지 배양액의 ammonia 농도의 감소 속도는 AF-1구 및 AF-5구가 0.34 및 0.35 mg/dl/h로 대조구 및 AF-3구의 0.21 및 0.2 mg/dl/h에 비해 빨랐으며, 배양 6시간부터 8시간 사이에 대조구 및 AF-3구의 감소 속도가 0.30 및 0.51 mg/dl/h로 AF-1구 및 AF-5구의 0.06 및 0.17 mg/dl/h에 비해 빠른 것으로 나타났다. 이러한 결과는 미생물

에 의한 ammonia 이용 속도는 배양 6시간까지 AF-1구 및 AF-5구가 대조구 및 AF-3구에 비해 빨랐음을 나타낸다. 또한 배양 8시간부터 12시간 사이에는 각 처리구의 ammonia 농도가 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다.

처리에 관계없이 *in vitro* 배양 과정 동안의 pH 범위는 6.54~7.04로 나타났으며, 배양시간이 경과함에 따라 모든 처리구의 배양액내 pH가 지속적으로 감소하였고, 대조구에 비해 처리구들의 pH가 낮은 경향을 보였다. 이러한 결과는 大概 등(1991)의 반추가축에 alcohol 급여는 반추위내 총 휘발성 지방산의 생성량을 증가시킨다는 보고에 근거해 볼 때 alcohol은 반추미생물에 의한 사료내 탄수화물의 발효를 촉진하여 각종 발효산물, 특히 휘발성지방산 생성량을 증가시키기 때문인 것으로 판단된다.

*In vitro* 배양액 중의 alcohol 농도는 배양 2시간까지는 alcohol 첨가 수준에 비례하여 높게 나타났지만, 대조구 및 AF-1구의 경우에는 배

양 2시간 이후에는 alcohol 농도가 큰 변화를 나타내지 않았으나 배양 12시간에 AF-3구 및 AF-5구의 alcohol 농도는 배양 2시간에 비해 각각 15.0% 및 18.1%씩 감소하는 결과를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 이와 같은 결과는 Andree Durix 등 (1991)이 *in vitro* 실험에서 alcohol 4~8 g/L 일 첨가시 첨가한 alcohol의 9~22%가 휘발성지방산으로 전환된다고 보고하고 있어 본 실험에서도 alcohol이 부분적으로 VFA로 전환된 것으로 사료된다. 또한 alcohol 첨가 수준이 증가할수록 반추위내 alcohol 감소율이 높았던 것은 alcohol 첨가로 alcohol 이용균이 선택적으로 증식되었기 때문으로 판단되지만 alcohol 이용균들에 의한 alcohol 이용 효율은 저조하기 때문에(15.0~18.1%) 생체 조건에서는 대부분의 alcohol이 반추위벽을 통해 흡수되어(Burning과 Yokoyama, 1988) 직접 체내 대사에 관여할 것으로 판단된다. 한편, 板橋 등(1989)이 사료에 5%의 alcohol을 첨가한 실험 결과를 보면 alcohol은 반추위액에 희석되거나 반추위벽으로 흡수되어 반추위액 중의 alcohol 농도는 0.1%밖에 되지 않는다고 보고한 바 있다.

## 2. 휘발성지방산

Alcohol 처리 사료의 alcohol 첨가 수준에 따른 *in vitro* 배양액의 total-VFA 생성량 및 acetate 비율 변화는 Figure 1과 같다.

배양액 중의 총휘발성지방산(total volatile fatty acid; TVFA) 농도는 처리에 관계없이 배양시간이 경과함에 따라 증가하였는데, 배양 2시간에 대조구, AF-1구, AF-3구 및 AF-5구의 TVFA 농도는 각각 20.4, 22.7, 21.7 및 22.0 mM로 대조구에 비해 alcohol 처리구들에서 높았으며 ( $p < 0.05$ ), 배양 8시간에 AF-3구 및 AF-5구가 각각 36.8 및 39.4mM로 대조구의 34.2 mM에 비해 현저히 증가하여 alcohol 첨가 수준이 3% 및 5%에서 TVFA 생성량이 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 배양 12시간에 대조구, AF-1구, AF-3구 및 AF-5구의 TVFA 농도는 37.0, 42.9, 46.2 및 43.1 mM로 나타나 대조구에 비해 처리구들이 높았으며( $p < 0.05$ ), 특히 AF-3구가 가장 높았다. 이러한 결과는 alcohol이 반추위내에서 protozoa의 활성을 억제하고 전분분해균의 활성을 촉진하여(大槻 등, 1991; 이, 1999a) VFA 함량을

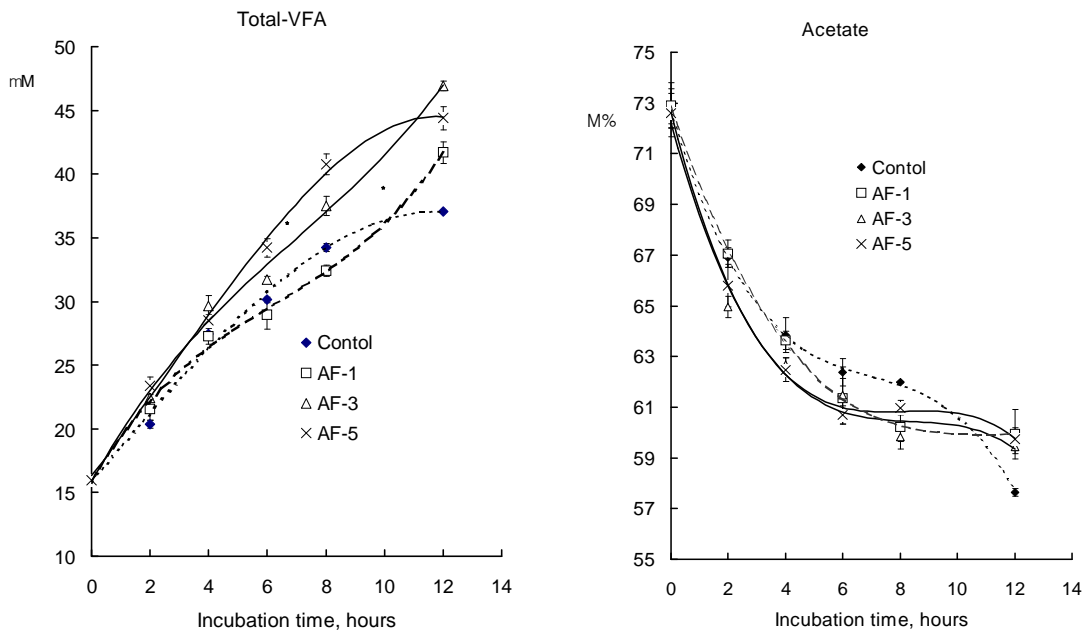


Fig. 1. Changes in molar concentration of total volatile fatty and molar percentage of acetate during *in vitro* incubation with different level of alcohol mixture.

증가시킨 것과 alcohol이 직접 VFA로 전환 (Andree Durix 등, 1991)되었기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 배양 12시간에 AF-5구가 AF-3구에 비해 TVFA 생성량이 낮아진 원인은 AF-5구의 경우 배양 초기에 AF-3구에 비해 VFA 생성량이 높았기 때문에 발효산물들이 더 많이 축적되어 반추미생물의 발효 활성을 저하시키기 때문인 것으로 판단된다.

휘발성 지방산 중의 acetate 비율은 처리에 관계없이 배양 4시간까지 급속히 감소하였는데, 배양 4시간에 AF-5구가 대조구 및 다른 처리구에 비해 낮은 것으로 나타났다. 또한 배양 4시간부터 8시간 사이에는 처리구들이 대조구에 비해 낮은 경향이였으나 배양 12시간에는 처리구들에 비해 대조구에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $p < 0.05$ ).

Alcohol 처리 사료의 alcohol 첨가 수준에 따른 *in vitro* 배양액의 propionate 및 butyrate 비율 변화는 Figure 2와 같다.

Propionate 비율은 처리에 관계없이 배양 4시간까지 급속히 증가되었는데, 배양 4시간에 대조구, AF-1, AF-3구 및 AF-5구의 propionate 비

율은 각각 24.4, 23.9, 23.4 및 24.4 M%로 나타나 처리간에 차이가 없었다. 또한 배양 4~8시간 사이에는 모든 처리구들에서 propionate 비율이 배양 0~4시간에 비해 둔화되었으며, 배양 8~12시간 사이에 각각의 alcohol 처리구들의 propionate 비율은 유사한 경향이였지만, 대조구의 propionate 비율은 alcohol 처리구에 비해 높았다( $p < 0.05$ ). 본 실험에서 alcohol 처리구들이 대조구에 비해 propionate 비율이 낮았던 원인은 대조구의 경우 발효 시간이 경과함에 따라 생성되는 대사성 수소의 제거를 위해 젖산이 생성되어 propionate 비율이 증가되는 것으로 판단되며(Leng, 1970; 宮崎 등, 1989), 이는 이(1999b)의 농후사료 다급시 alcohol 첨가로 propionate 비율이 현저히 감소하였다는 보고 및 Andree Durix 등(1991)이 *in vitro* 실험에서 alcohol 첨가로 propionate 비율이 현저히 감소하였다는 보고와 유사한 결과였다.

한편, 휘발성 지방산 중의 butyrate 비율은 배양 6시간까지 증가하였는데, AF-1, AF-3, AF-5구가 12.4, 12.1 및 13.1 M%로 대조구의 11.8 M%에 비해 높았는데, 이는 alcohol이 butyrate

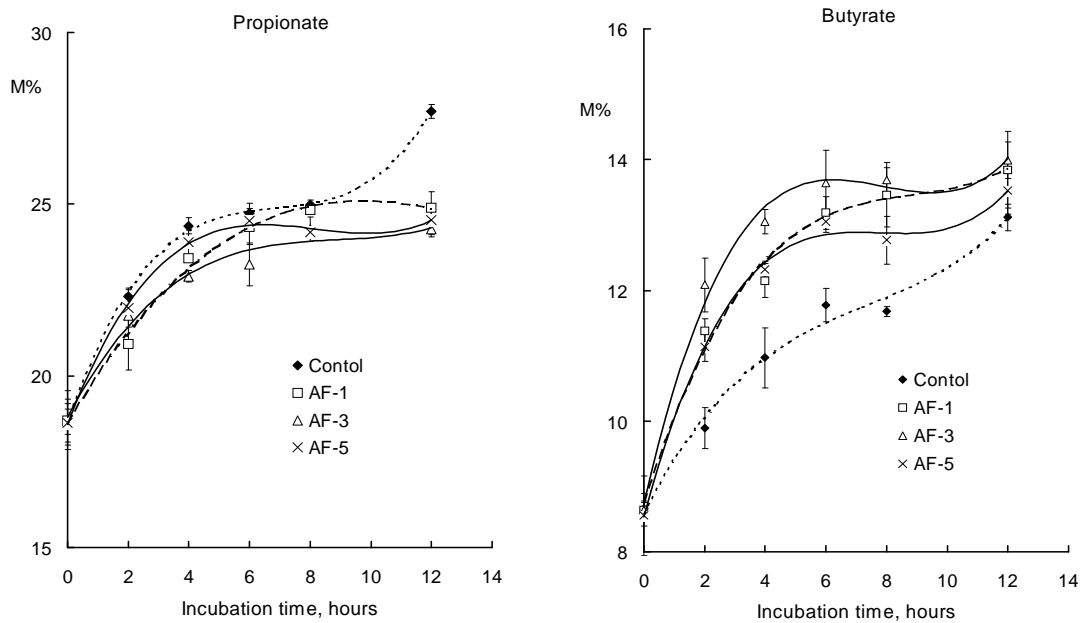


Fig. 2. Changes in molar percentage of propionate and butyrate during *in vitro* incubation with different level of alcohol mixture.

비율을 증가시키는 작용을 하는 것으로 판단되지만 정과 이(1996)의 *in vivo* 실험에서 alcohol 첨가로 butyrate 비율을 감소된다는 보고와는 상이하여 이에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험 등의 추가적인 연구가 필요하다.

Alcohol 처리 사료의 alcohol 첨가 수준에 따른 *in vitro* 배양액의 valerate 및 caproate 비율 변화는 Figure 3과 같다.

Lactate 및 propionate와 밀접한 관계가 있는 valerate의 비율은 배양 2시간에는 모든 처리구에서 유사한 수준이었으나 배양 4시간에 대조구가 0.81M%로 처리구들의 1.05~1.1M%에 비해 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 그리고 대조구는 배양 4~12시간까지 일정한 속도로 valerate 비율이 증가하였으며, AF-3구 및 AF-5구는 배양 6시간까지 일정한 속도로 증가하였으나 배양 6시간 후부터 더 이상 증가되지 않았다. 또한 AF-1구는 배양 8시간까지 증가한 후 감소하였으며, alcohol 첨가 수준이 높을수록 valerate는 일정한 비율로 빠르게 평형을 유지하는 결과를 보였다.

Caproate는 배양 4시간까지는 모든 처리구들

에서 검출되지 않았으나 배양 6~12시간 사이에는 alcohol 처리구들에서 검출되었으며 대조구에서는 검출되지 않았다. 배양 12시간의 caproate 비율은 AF-1, AF-3 및 AF-5구에서 각각 0.08, 0.56 및 0.57M%로 나타나 alcohol 첨가로 인해 caproate 비율이 현저히 증가되었으며( $p < 0.05$ ), 실제로 alcohol 첨가로 인해 caproate 비율이 증가하는 현상은 *in vivo* 시험에서도 입증된 바 있다(大槻 등, 1991).

이와 같이 alcohol 처리는 TVFA 생성량을 증가시키는 동시에 propionate 비율은 감소시키고 butyrate, valerate 및 caproate 비율은 증가시키며, 배양시간이 경과함에 따라 이들 휘발성 지방산들이 일정한 비율을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 농후사료 및 alcohol 사료 급여에 따라 반추위내 VFA 생성 및 비율 변화의 차이가 나타나는 것은 alcohol 처리로 반추위내 발효 pattern이 변화되기 때문으로 사료된다(정과 이, 1996). 일반적으로 반추미생물은 증식에 필요한 에너지를 획득하기 위하여 사료중의 영양소를 발효최종산물인 acetate로 전환시키려는 경향이 있는데 발효과정에 acetate의 생성과 더불어

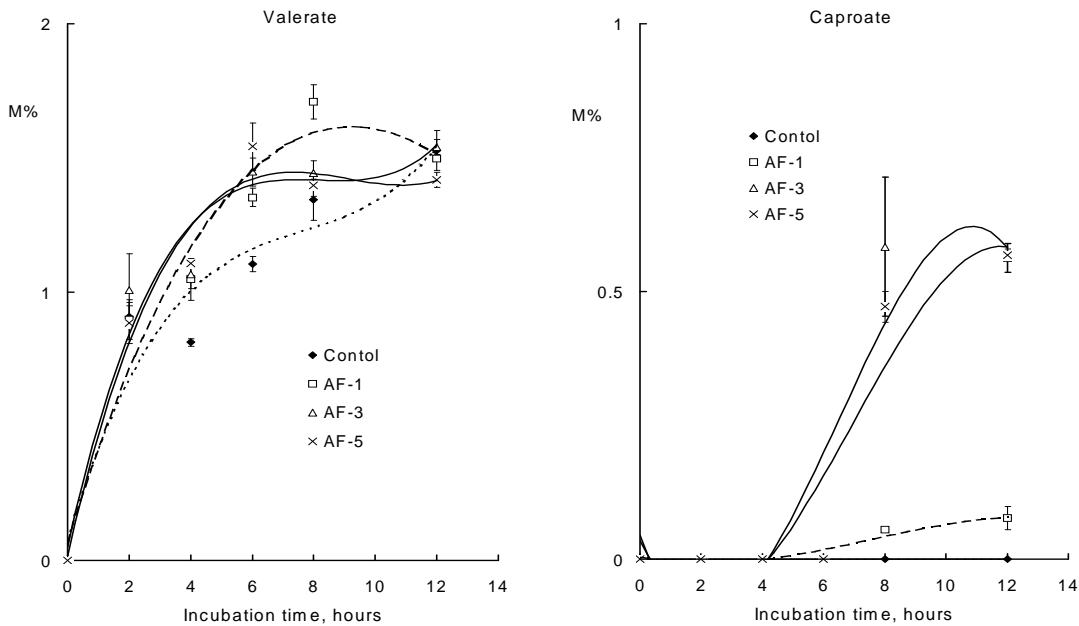


Fig. 3. Changes in molar percentage of valerate and caproate during *in vitro* incubation with different level of alcohol mixture.



대사성 수소가 축적되므로 이를 제거하고 새로운 에너지를 얻기 위해서는 lactate, propionate 및 butyrate 비율을 증가시키게 된다(Leng, 1970). 그러나 alcohol 처리는 acetyl-CoA로부터 butyrate, valerate 및 caproate의 합성 과정을 활성화 시켜 주므로 acetate 축적을 방지하는 한편, 발효에 의해 생성되는 대사성 수소는 butyrate, valerate 및 caproate 생성 과정을 통해 보다 효과적으로 제거하게 되므로 발효과정이 일정한 균형을 유지하게 되는 것으로 판단된다. 또한 Andree Durix 등(1991)은 alcohol( $2-^{14}C$ )을 이용하여 실시한 실험에서 반추미생물에 의해 alcohol의 7~18%가 acetate로 전환되고 1.2~1.3%가 butyrate로 전환되며 0.4~1.3%가 caproate로 전환된다고 보고하고 있어 반추미생물에 의해 상술한 반응경로가 형성되고 있음을 뒷받침하고 있다.

농후사료 다급시에 대사성 수소의 제거 방식은 주로 lactate → propionate → butyrate → valerate 형식의 대사과정을 경유하나, alcohol 첨가 사료의 처리는 acetate → butyrate → valerate → caproate 형식의 대사과정을 경유하게 되므로 이들 발효 산물간에 일정한 비율로 균형을 유지시켜주는 것으로 판단된다.

따라서 alcohol 사료 처리에 의한 반추위내 이러한 발효 pattern은 젖산 생성을 억제하고 농후사료 다급에 의한 반추위내 산성 발효를 효과적으로 조절하여 상대적으로 농후사료 급여량이 많은 한우 비육우의 비육기에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단되지만, 이에 대한 추가적인 사양실험이 필요할 것으로 사료된다.

#### IV. 요약

본 실험은 alcohol 사료 처리에 따른 *in vitro* 발효 pattern의 변화를 검토하여 alcohol 사료 처리가 반추위내 발효 pattern에 미치는 영향을 규명코자 실시하였다. 시험구 처리는 배합사료를 첨가하는 대조구(control), 배합사료와 1, 3 및 5%의 alcohol 사료(Alcoholic feed; AF)를 첨가하는 처리구를 각각 AF-1구, AF-3구 및 AF-5구로 나누어 실시하였다. 배양 12시간 동

안 ammonia 농도는 AF-1, AF-5 구에서 대조구에 비해 낮았다( $p<0.05$ ). 배양액의 alcohol 농도는 alcohol 첨가 수준이 증가할수록 높았다( $p<0.05$ ). 배양 12시간에 TVFA 농도는 AF-1, AF-3 및 AF-5에서 대조구에 비해 현저히 높았다( $p<0.05$ ). 배양 8~12시간 사이에 acetate 비율은 대조구에서 빠른 속도로 감소하였으며, AF-1, AF-3 및 AF-5 구에서는 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. Propionate 비율은 배양 8~12시간 사이에 AF-1, AF-3 및 AF-5에 비해 대조구에서 빠른 속도로 증가하였다( $p<0.05$ ). Butyrate 및 valerate 비율은 AF-1, AF-3 및 AF-5에서 대조구에 비해 높았다( $p<0.05$ ). Caproate 비율은 배양 8시간에 AF-1구, AF-3구 및 AF-5구에서 각각 0.05, 0.58 및 0.47 M%로 나타났으나, 대조구에서는 검출되지 않았다. 본 실험의 결과에서 alcohol 사료의 처리는 *in vitro* 반추위액의 ammonia, alcohol 및 휘발성지방산 농도와 pH에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 본 실험의 결과에서는 5%의 alcohol 첨가 수준이 여타 alcohol 첨가 수준에 비해 반추위 발효에 보다 효과적인 것으로 사료된다.

#### V. 사 사

본 연구는 강원대학교 동물자원공동연구소의 실험기자재를 이용하여 실험분석을 하였기에 이에 감사드립니다.

#### VI. 인용 문헌

1. Alcohol 飼料化研究推進委員會. 1993. 飼料用 Alcohol.
2. Andree Durix, C., Jean-Blain, H., Sallmann, P. and Jouany, J. P. 1991. Use of a semicontinuous culture system(RUSSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. Can. J. Anim. Sci. 71:115-123.
3. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington D. C., USA.
4. Bryant, M. P. 1956. The characteristics of strains

- of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents. *J. Bacteriol.* 72:162-167.
5. Burning, C. L. and Yokoyama, M. T. 1988. Characteristics of live and killed Brewer's yeast slurries and intoxication by intraruminal administration to cattle. *J. Anim. Sci.* 66:585-591.
  6. Czerkawski, J. W. and Breckentidge, G. 1972. Fermentations of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. *Br. J. Nutr.* 27:131-146.
  7. Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J. P. and Senaud, J. 1983. Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen of mexenic lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129:213-223.
  8. Kurihara, Y., Takechi, T. and Shibata, F. 1978. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen of sheep fed on a purified of diet. *J. Agric. Sci. Amb.* 90:373-381.
  9. Leng, R. A. 1970. Formation and production of volatile fatty acids in the rumen, in *Physiology of digestion and metabolism in the rumen*(Phillipson, A. T., ed), Oriel Press, Newcastle upon Tyne. pp. 406-421.
  10. Moomaw, R. C. and Hungate, R. E. 1963. Ethanol conversion in the bovine rumen. *J. Bacteriol.* 85:721-722.
  11. SAS. 1999. SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.
  12. Wolin, M. J. and Miller, T. L. 1997. Microbe-Microbe interactions. In *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N. and C. S. Stewart(Eds). Blackoe Academic & Professional, London.
  13. 宮崎孔志, 日野常男, 板橋久雄. 1989. ルーメン微生物の醗酵パターンと細胞膜脂肪酸組成に及ぼすエタノールの影響, *日畜會報*, 60:776-782.
  14. 大槻和夫, 小林 剛, 松本光人, 板橋久雄. 1991. 濃厚飼料多給牛のルーメンに及ぼすエタノール添加の影響. *畜産試験場研究報* 第51巻. pp. 9-13.
  15. 牛田一成. 1998. 反芻動物の栄養生理學: 第2章ルーメン微生物の機能と役割. *農文協*. pp. 137-149.
  16. 津吉 炯, 深谷幸作, 飯原慎一, 中原信夫, 熱田眞由美, 針生程吉. 1990. 黒毛和種肥肉牛 の仕上期におけるアルコール給與がその肉質に及び肉質への効果影響. *肉用牛研究會* 第28回大會講演要旨, p. 51.
  17. 板橋久雄, 小林 剛, 松本光人. 1989. 牛のルーメン醗酵と血漿成分に及ぼすエタノール添加の影響. *畜産試験場研究報告* 第49号.
  18. 이은a. 1999. 분말알코올의 급여수준이 농후사료 다급시 한국재래산양의 제 1위내 미생물상에 미치는 영향. *한국낙농학회지*. 21:193-200.
  19. 이은b. 1999. 분말알코올의 급여수준이 농후사료 다급시 한국 재래산양의 제 1위내 발효 및 효소 활성에 미치는 영향. *한국낙농학회지*. 21:201-206.
  20. 정유열, 이은. 1996. 조사료 다급시 분말 알코올의 첨가가 한국재래산양의 제 1위내 미생물상과 발효양상에 미치는 영향. *한국낙농학회지*. 18:1-6.
- (접수일자 : 2005. 11. 7. / 채택일자 : 2006. 2. 7.)