

제 3위 소화액 채취기법을 이용한 반추위 단백질 사료 분해 패턴 측정법의 고찰

최창원 · 백경훈 · 강수원 · 이병석 · 오영균 · 김경훈

농촌진흥청 축산연구소

Interpretation of Protein Feed Degradation Pattern in Ruminant Using an Omasal Digesta Sampling Technique

C. W. Choi, K. H. Baek, S. W. Kang, B. S. Lee, Y. K. Oh and K. H. Kim

National Livestock Research Institute, RDA

ABSTRACT

Present review is to introduce an omasal sampling technique in rumen proteolysis and to consider some information on the omasal sampling technique with particular emphasis on methodological aspects. Use of the omasal sampling technique provides a new opportunity for accurate estimation of rumen metabolism with overcoming limitations of previous *in vivo*, *in vitro* and/or *in situ* methods. The potential advantages of the present technique compared with post-ruminal sampling techniques include following points; 1) only rumen cannulated animals are required, 2) less endogenous nitrogen (N) is contaminated in omasal digesta and 3) omasal digesta are devoid of exposure to acid peptide hydrolysis occurring in the abomasum. Estimates of soluble non-ammonia N (SNAN) in omasal digesta indicate that the assumptions underlying the *in situ* method that rapidly degradable N fraction can be degraded at an infinite rate and only insoluble dietary N escapes the rumen may be not valid. Quantitatively higher peptide concentration rather than free amino acid and soluble protein in escapable SNAN suggests that hydrolysis of peptide to amino acid may be the rate-limiting step in rumen proteolysis.

(Key words : Omasal sampling technique, Proteolysis, Soluble non-ammonia nitrogen)

I. 서 론

반추동물의 사료분해과정은 단위동물과는 달리 서로 다른 2가지의 대사기전을 거쳐야만 한다(Van Straalen과 Tamminga, 1990; Nolan, 1993). 첫째는 반추위 내에서 일어나는 반추위 미생물에 의한 사료분해과정이며 둘째는 반추위를 제외한 나머지 소화관에서 일어나는 단위동물의 그것과 유사한 분해과정이다. 가장 이상적인 반추동물의 생산능력 발휘는 반추동물이 섭취

한 사료의 반추위 및 하부 소화기관에서의 100% 소화에서 출발될 것이다. 그러나, 반추위에서의 지나친 사료분해를 증가는 하부 소화기관에서 소화효소에 의해 분해가능한 기질인 단백질, 아미노산, 탄수화물 등 양질의 영양소마저 분해되어 사료영양소에 대한 손실이 크게 될 것이다. 반면에 너무 낮은 반추위 사료분해율은 이상적인 반추위 발효성상의 저해와 부족한 반추위 미생물 성장 및 균락형성을 가져오고 반추위를 비롯한 동물체내의 생리기능적 불

Corresponding author : C. W. Choi, National Livestock Research Institute, R.D.A., Omockchun-Dong, Kwonsun-Gu, Suwon 441-706 Korea.
Tel : 031-290-1646, E-mail : cwchoi@rda.go.kr

균형을 초래해 수의 병리학적인 문제를 야기시킨다(Van Straalen과 Tamminga, 1990; Wallace, 1991; Nolan, 1993). 따라서, 반추동물의 생리적 기능 유지와 생산력의 최대화는 어느 한쪽의 치우침없이 반추위 미생물 및 하부 소화기관에 의한 사료분해과정의 적절한 조절을 통해서 이루어 질 수 있을 것이다.

이러한 반추동물의 사료분해과정의 정확한 측정의 중요성은 지난 수십 년 동안-현재에도 많은 과학자들이 연구·진행 중이지만-반추영양, 생리학자들로 하여금 반추위내의 정확한 사료분해와 관련하여 수많은 연구를 수행하게 만들었다(Crooker 등, 1978; Ørskov와 McDonald, 1979; Broderick, 1987; Hristov와 Broderick, 1994; Licitra 등, 1996; Luchini 등, 1996). 이런 연구들에는 여러 가지 사료와 다양한 방법들이 연구실내·외에서 *in vitro*, *in vivo* 및 *in situ* 등의 접근방법으로 수행되었다. 하지만, 연구자들의 다양한 접근 방법에도 불구하고 각각의 연구는 방법학적인 제약, 실험분석상 에러 등 많은 가정과 전제조건이 요구되어 정확한 실험결과도의 도출 및 사료분해패턴의 해석에는 한계가 있었다. 따라서 본 고에서는 반추동물 사료의 반추위 분해패턴 측정과 관련한 기존 접근 방법에 대해서 고찰하고 최근 알려진 반추위 사료분해패턴 측정법인 제 3위 소화액 채취기법(omasal sampling technique, OST)을 이용한 반추위미분해용해성질소화합물(escapable soluble non-ammonia nitrogen, eSNAN) 측정에 대해서 고찰하고자 한다.

II. 반추동물 사료분해패턴 측정법

1. *In vitro* 방법

반추위 단백질 분해율과 분해량을 측정하는 *in vitro* 방법은 동물생체실험의 한계와 시간적 제약을 극복하는 점에서 널리 쓰인 방법이다. 대표적인 *in vitro* 방법에는 nitrogen (N) solubility (Crooker 등, 1978), commercial proteases(Mahadevan 등, 1987, Luchini 등, 1996), inhibitors가 첨가된 strained rumen digesta(RD) (Broderick, 1987) 등

이 있다. 그러나, N solubility를 이용한 *in vitro* 방법 (Crooker 등, 1978)은 도출된 결과가 *in vitro* 실험에 사용된 시약의 종류에 따라 크게 차이가 나타나며, 또한 이 방법은 분해단백질(degraded protein)과 미분해단백질(undegraded protein)를 구분할 수 없다는 약점이 있다(Hristov와 Broderick, 1994). Mahadevan 등(1987)은 commercial proteases를 이용한 실험에서 rumen incubation안에서의 암모니아와 아미노산이 축적이 가능하다는 결과를 발표하였다. 하지만, 이 결과는 단백질 breakdown과 미생물 단백질 합성(microbial protein synthesis, MPS)이 동시에 일어난다는 점을 고려할 때, 반추위내 단백질 분해의 잘못된 해석일 가능성이 높다. 또한 commercial proteases를 이용했을 때, 반추위 단백질 분해율(kd)이 strained RD를 이용했을 때보다 크게 낮아 이 방법은 반추위 단백질 분해측정에 부적합하다고 알려져 있다 (Luchini 등, 1996). Inhibitor가 첨가된 strained RD를 이용한 *in vitro* system (Broderick, 1987)은 4시간의 incubation을 통해 casein의 kd를 0.40/h로 발표하였다. 하지만, 이 결과는 소화생리학적 측면과 생체 실제상과 비교해서 casein 분해측정값으로는 바람직하지 못한 도출값이라고 볼 수 있다. 첫째, 실험방법 중 *in vitro* 4시간 incubation은 소화생리학적으로 현실적이지 않을 뿐 아니라, 정확한 측정을 위해선 충분하지 못한 incubation 시간이다. 또한 실험에서 제시한 4시간보다 더 긴 incubation일 경우 inhibitor가 미생물 단백질 분해를 제어할 가능성이 제기되고 있다(Siddons 등, 1982). 둘째, 이 *in vitro* 방법으로 도출된 casein의 kd 값(0.40/h)은 실제 반추위내에서 예상되는 일반적인 kd 값보다 너무 낮다. 이러한 예상은 최근 *in vivo* OST를 이용한 skimmed milk powder의 반추위 escape 계산에서 기존의 0.40/h가 극도로 과소평가된 값이라는 것을 확인하였다(Choi 등, 2002b).

미국 Cornell 대학에서 제시한 Cornell Net Carbohydrate and Protein System(CNCPS) (Sniffen 등, 1992; Licitra 등, 1996)은 단백질의 N 분해를 여러 가지 화학적 용액에서의 단백질 solubility에 의해 5단계(A, B1, B2, B3 및 C)로 구분함

으로써 좀더 쉽게 단백질 사료평가를 시도하였다. CNCPS의 5가지 N fraction을 살펴보면, A는 비단백태질소화합물(NPN), B1은 용해성 진정단백질, B2는 중성세제 용해성 단백질, B3는 중성세제 불용성·산성세제 용해성 단백질, C는 산성세제 불용성 단백질이다. 하지만, 이 CNCPS 역시 여러 가지 단점을 안고 있는데, 특히 N 분획시 기본적으로 반추위내의 소화가 고려되지 않았다는 치명적인 단점과 CNCPS에서 추천되어진 화학적 용액을 사용함에도 불구하고 분석된 동일한 단백질의 N 분획이 크게 다르다는 점에서 지속적인 연구가 요구되고 있다 (예; NPN 정량에 있어서 TCA와 tungstic acid 사용, Licitra 등, 1996).

2. *In vivo* 방법

In vivo 방법을 이용한 반추위내 단백질 분해 측정은 소화액을 직접 채취하여 소화와 분해를 측정한다는 점에서 비교적 정확한 평가를 할 수 있는 방법으로 인식하게 된다. 하지만, 이 *in vivo* 방법은 기본적으로 반추위 캐놀라와 제 4위나 십이지장 캐놀라의 설치가 필요하므로 수술 후 비교적 긴 회복기간이 요구되고, 특히 제 4위나 십이지장 캐놀라의 경우 그 캐놀라 설치에 따른 스트레스는 물론 그 캐놀라의 설치 위치에 따라 단백질 분해측정에 영향을 미칠 수 있다는 점에서 제약이 있다(Huhtanen 등, 1997). 제 4위나 십이지장 캐놀라를 통해 채취한 소화액에서의 undegraded N은 total N flow와 microbial N flow의 차이로 측정되는데 (Siddons 등, 1982; Broderick과 Merchen, 1992; Ahvenjärvi 등, 1999), 이 간접적인 측정 방법으로 인해 제 4위나 십이지장에서 분비되는 endogenous N과 소화액 채취 및 분석상의 예러는 모두 미분해 사료 N으로 포함되는 오류가 발생하게 된다(Van Straalen과 Tamminga, 1990). 이 방법은 또한 digesta sampling의 비대표성, 사료성과 미생물성 단백질의 정확한 구분의 어려움이 존재하는 등의 여러 가지 제약이 따른다(Van Straalen과 Tamminga, 1990). 특히, 제 4위나 십이지장 캐놀라를 통해 채취된 소화액은

이미 제 4위나 십이지장에서 소화효소에 의해 사료 단백질의 전체 또는 일부가 이미 분해를 시작한 후의 소화액을 감안할 때 정확한 사료 단백질의 반추위 발효패턴을 측정하기에는 부적절하다고 사료된다(Choi, 2002). 본 고에서 다룰 제 3위 소화액 액상내 eSNAN의 정량과 비교할 수 있는 *in vivo* 실험결과는 반추위 캐놀라가 장착된 실험동물을 이용한 반추위 소화액 액상내 SNAN의 농도인데, 젓소를 이용한 실험결과에서 124.5 mg N/l(Robinson과 McQueen, 1994) 및 103.0 mg N/l(Robinson 등, 1998)이라고 발표된 바 있다. 그러나, 이러한 방법을 이용한 결과 역시 digesta sampling site에 따라 농도의 차이가 존재할 수 있다는 단점이 있고 또한 사료섭취 후 시간대별 반추위 미분해 단백질을 측정하여 분해패턴 분석 시 소화액 채취 직후 그 대표성을 포함한 반추위액이 하부소화기관으로의 유입 여부가 불확실하므로 정확한 반추위 사료분해패턴 분석을 위해서는 분석값의 보정이나 다른 기법의 개발이 요구된다.

3. *In situ* 방법(Nylon bag technique)

앞에서 논한 *in vitro*와 *in vivo* 방법 등의 여러 가지 단점과 한계를 보완하고, 보다 간편하고 정확한 반추위내 단백질 분해 측정을 위해 나일론 백을 이용한 *in situ* 방법 중 하나인 nylon bag technique이 제시되었다(Ørskov와 McDonald, 1979). 이 nylon bag technique은 반추위 캐놀라를 설치한 실험동물만이 필요한 비교적 간편하고 방법학적으로 직접적 접근방식일 뿐만 아니라 적은 비용으로 수행 가능하여 세계적으로 수십 년간 계속적으로 발전되며 널리 이용되어 온 방법이다 (Varvikko와 Lindberg, 1985, Volden과 Harstad, 1995, NRC, 2001). 또한, 이 nylon bag technique은 각 사료별 단백질 분해측정이 가능한 거의 유일한 방법이라 할 수 있다. 하지만, 기존의 *in vitro*나 *in vivo* 방법들과 마찬가지로 이 nylon bag technique 역시 여러 가지 방법학적 한계를 나타내고 있다. 예를 들면, bag porosity(Nocek, 1988; Michalet-Doreau와 Ould-Bah, 1992), 사료샘플 입자도(Lindberg, 1985; Varvikko

와 Lindberg, 1985), bag 표면적당 사료샘플량(Michalet-Doreau와 Ould-Bah, 1992), 미생물 오염(Varvikko와 Lindberg, 1985), bag washing procedure(Nocek, 1988), 사료입자 손실율(Van Straalen과 Tamminga, 1990), 반추위액과 비교시 bag 내의 낮은 미생물 작용(Huhtanen 등, 1998) 등의 제약으로 인해 사료내 단백질 분해측정이 달라진다. 특히 이 nylon bag technique은 그 방법학적인 측면에서 ‘사료의 soluble N은 반추위에서 모두 분해되며 따라서 하부소화기관 (즉, 4위나 십이지장, 소장)으로 내려가는 것은 모두 insoluble 단백질이다’ 라는 전제조건이 요구된다(Uden, 2000; Choi, 2002). 이 전제조건은 방법학적인 심각한 오류라고 지적되었으나(Dhanoa 등, 1999; Volden 등, 2002), *in vivo* 방법 등 다른 방법에 의해 확실히 증명할 수 있는 방법이 없어 그대로 사용되어 왔다.

III. 제 3위 소화액 채취기법

1. Omasal sampling technique의 원리 및 구성

전술한 *in vitro*, *in vivo* 및 *in situ* 등 여러 방법들의 제약 또는 어려움 때문에 그 대안으로 제시된 방법이 Omasal sampling technique(OST)이다. Huhtanen 등(1997)에 의해 제시되고 그 연구팀(Ahvenjärvi 등, 1999, Choi 등, 2002a, 2002b, 2002c, 2003)에 의해 보완·개발된 OST의 사용 원리(그림 1)와 시스템의 구성(그림 2)은 그림에서 보는 바와 같다. OST를 이용한 제 3위 소화액 채취는 반추위 캐놀라를 통과한 소화액 채취용 플라스틱 tube의 device 부분(갈고리형태의 구부러진 부분)을 제 3위에 장착시키고 외부에서 약한 진공과 압축상태를 자동변환 반복하는 채취용 펌프를 이용, 제 3위 소화액을 채취하는 원리이다. OST 시스템의 구성은 크게 세 가지로 나눌 수 있는데, 제 3위에 장착되는 device 부분, 외부에서 작동되는 채취용 펌프 부분 그리고 device와 펌프를 연결하여 소화액을 채취할 수 있는 tube 부분이 그것이다.

Omasal sampling system

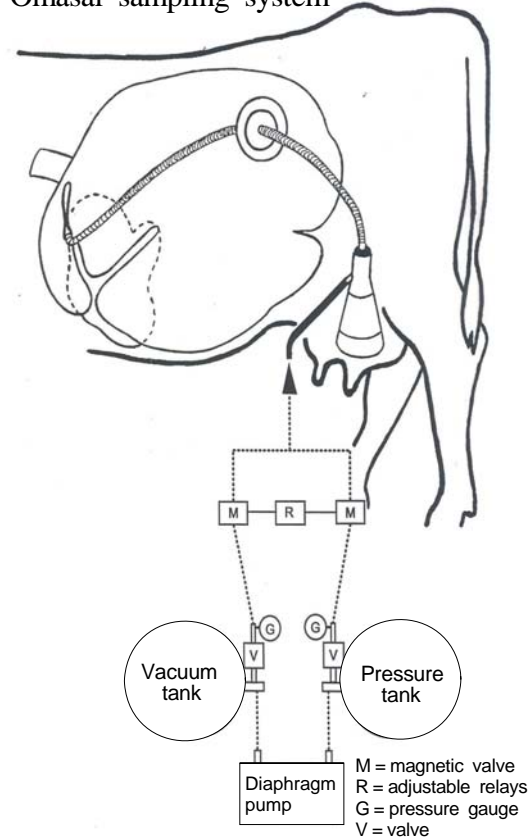
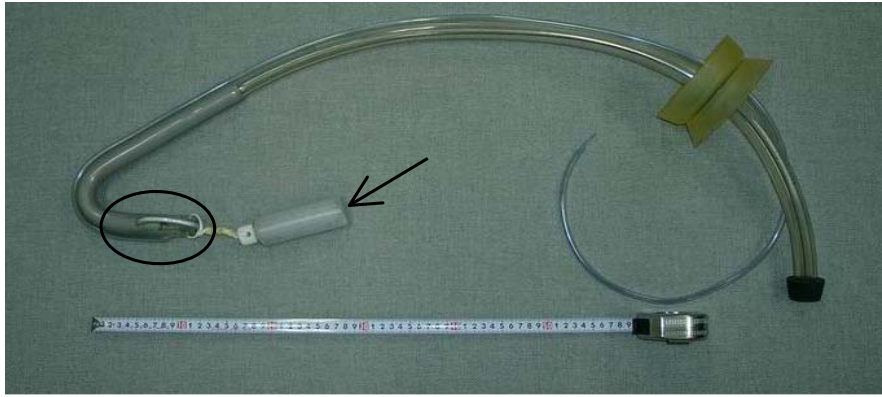


Fig. 1. Principle of omasal sampling system.

제 3위 소화액 채취용 tube의 길이는 실험축 개체간 반추위 용적 차이에 의해 변할 수 있으나, 약 1.2 m tube를 사용(600 kg 젖소기준)하면 무난하다. 그러나, 젖소와 비교 시, 한육우는 동일한 체중의 개체라 하더라도 체장대비 흉폭이 커서 반추위 캐놀라로부터 제 3위까지 거리가 짧으므로 tube의 길이는 약간 줄여 1 m 내외로 사용할 것을 권장한다. 채취용 tube는 일반적으로 착유우사에서 사용하는 착유용 plastic tube를 사용하되, 외·내측 직경이 23 및 14 mm tube가 추천된다. 제 3위에 장착될 tube 끝부분인 device(그림 2-a; 원 표시부분)에는 직경 23 mm의 구멍을 양쪽에 뚫고 tube의 끝부분은 실리콘이나 접착제로 막음처리를 한다. 반추위 캐놀라와 연결되는 부분은 일반적인 반추위 캐놀라 두께(직경 100 mm, Diamond사, 미



(a)



(b)



(c)

Fig. 2. Equipments of omasal sampling system [Each represents a sampling tool consisting of a device, a tube and a plug of ruminal cannula(a), a single compressor/vacuum pump(b) and internal structure of a control box on the pump(c), respectively].

국)을 중앙에 채취용 tube를 연결하여 제 3위 소화액 채취 기간에는 기존의 반추위에 장착된 캐놀라의 두껍을 대체하여 사용한다. 제 3위 소화액의 채취는 tube의 외부 연결 부분인 진공과 압축상태 자동변환 펌프(그림 2-b와 c)를 이용하여 수행한다. 채취용 device에는 쇠구슬 등을 넣은 플라스틱 병(500~600g)을 nylon string으로 연결·부착(그림 2-a; 화살표)하여 device 장착 시 제 4위에 삽입하여 device의 제 3위내 장착이 유지되도록 한다.

2. Omasal sampling technique의 방법학적 장·단점

지금까지 알려진 제 3위 소화액 채취 방법은 제 4위에 캐놀라를 설치하고 그 캐놀라를 통해 제 3위로 채취 튜브를 집어넣거나 실험자가 채취 튜브를 직접 반추위 캐놀라를 통해 집어넣은 상태에서 소화액을 채취하는 방법, 또는 제 3위에 직접 캐놀라를 설치하여 소화액을 채취하는 방법 등이 있었다(Huhtanen 등, 1997). 하

지만, *in vivo* 방법에서 이미 지적되었듯이 제 4위나 십이지장 캐놀라 설치에 따르는 어려움과 그 캐놀라 설치 후 동물의 회복기간이 실험결과에 미치는 영향, 그리고 샘플링 시간마다 직접 실험자가 관을 제 3위에 넣어 샘플링 함으로써 오는 샘플링의 어려움 등이 기존의 채취방법에 의한 제 3위 소화액 단백질 분해측정의 한계점이라고 지적되었다(Van Straalen과 Tamminga, 1990; Huhtanen 등, 1997).

본 고에서 소개한 omasal sampling device를 이용하는 OST의 이용(Huhtanen 등, 1997; Ahvenjärvi 등, 1999, Choi 등, 2002a, 2002b, 2002c, 2003)은 제 3위 소화액에서의 N 분획, 특히 soluble N 분획(free amino acid(FAA), peptides 및 용해성 단백질) 측정을 가능하게 하는 계기가 되었다. 이 OST는 제 3위를 포함한 반추위에서 분비되는 endogenous N이 제 4위나 십이지장과 비교해서 그 양이 적은 것으로 알려져 있어(Ørskov 등, 1986), 기존 *in vivo* 방법에서의 제 4위나 십이지장 소화액에서의 측정보다 더 정확하다고 할 수 있다. 또한 기존의 제 3위 소화액 채취방법과는 달리 한번의 omasal sampling device의 설치 후 지속적인 샘플이 가능하다. 무엇보다도 이 OST는 반추위에서 빠져나온 소화액을 직접 채취해서 측정할 수 있고 게다가 제 4위의 소화를 거치기 직전의 소화액에서 측정할 수 있다는 면에서 기존의 반추위 사료분해 패턴 측정방법들보다 정확한 방법으로 사료된다.

반면에, 이 omasal sampling device가 설치된 실험동물의 대사활동이 비설치 실험동물의 그것과 비교해서 약간의 부정적인 영향을 미친다는 보고가 있다. 예를 들어, Huhtanen 등(1997)은 목초 사일리지를 자유 급여한 젖소에 OST system을 장착했을 때 비설치 젖소에 비해 약간의 사료건물 섭취량 감소를 보인다고 보고하였다. 그러나, Huhtanen 등(1997)의 연구에서 OST 장착 및 비장착 젖소간의 사료건물섭취량 차이가 사료적용기간(2.2 kg/일)보다 제 3위 소화액 채취기간(1.2 kg/일)에서 낮게 나타났다. 또한, 사료섭취량 외 사료섭취행동, 영양소소화율, 반추위 및 분내 사료입자도 분포 및 우유생산량

등 생산성 측면에서는 처리구간 차이가 거의 없는 것으로 나타났다(Huhtanen 등, 1997). 이러한 결과는 보다 정확한 사료분해패턴 측정을 위한 반추위 N 대사측정에 있어서 새로운 대안법으로 제시되기에 충분하다고 사료된다(Ahvenjärvi 등, 1999; Choi, 2002).

3. 반추위 미분해 용해성 비암모니아태 질소 화합물(eSNAN)

In situ 법에서 소개했던 nylon bag technique 방법의 전제조건은 전술한 바와 같이 반추위 소화액의 용해성 비암모니아태 질소 화합물(soluble non-ammonia N, SNAN) 검량으로 방법학적 측면에서 큰 오류일 가능성이 제기되었다(Chen 등, 1987a, 1987b). 그러나, 반추위 소화액상 SNAN의 제 3위, 제 4위 등 하부소화기관으로 통과여부 및 escapable SNAN(eSNAN) 수준과 N 분획 연구는 OST가 개발되기 전까지는 실질적인 검증이 불가능하였다. 따라서, 제 3위 소화액의 eSNAN의 검증은 사료단백질의 보다 정확한 반추위 분해패턴 검증 뿐만 아니라, 기존 nylon bag technique의 보완(예; 보정지수 제시)도 가능해 반추위 사료가치평가 연구에 일익을 담당할 수 있을 것으로 사료된다.

(1) eSNAN의 분리 및 N 분획법

전술한 OST에 의해 채취된 제 3위 소화액은 eSNAN를 분리한 후, ninhydrin 분석법에 의해 각각의 N fraction, 즉 FAA, peptides 및 용해성 단백질을 분석한다. 제 3위 소화액내 eSNAN의 분리와 분석방법은 그림 3과 같다. 제 3위 소화액은 채취 즉시 10% H₂SO₄를 첨가하여 반추위 미생물 활력을 제거한 후, 4겹의 cheesecloth를 이용하여 반추위 내용물 및 큰 사료입자를 제거한다. 저속(1,000×g, 4°C, 10분) 및 고속원심분리(10,000×g, 4°C, 30분)를 이용하여 각각 작은 사료입자 및 반추위 프로토조아와 반추위 박테리아를 제거한다. 상층액에 5% trichloroacetic acid(TCA)를 처리, 정치(overnight) 및 고속원

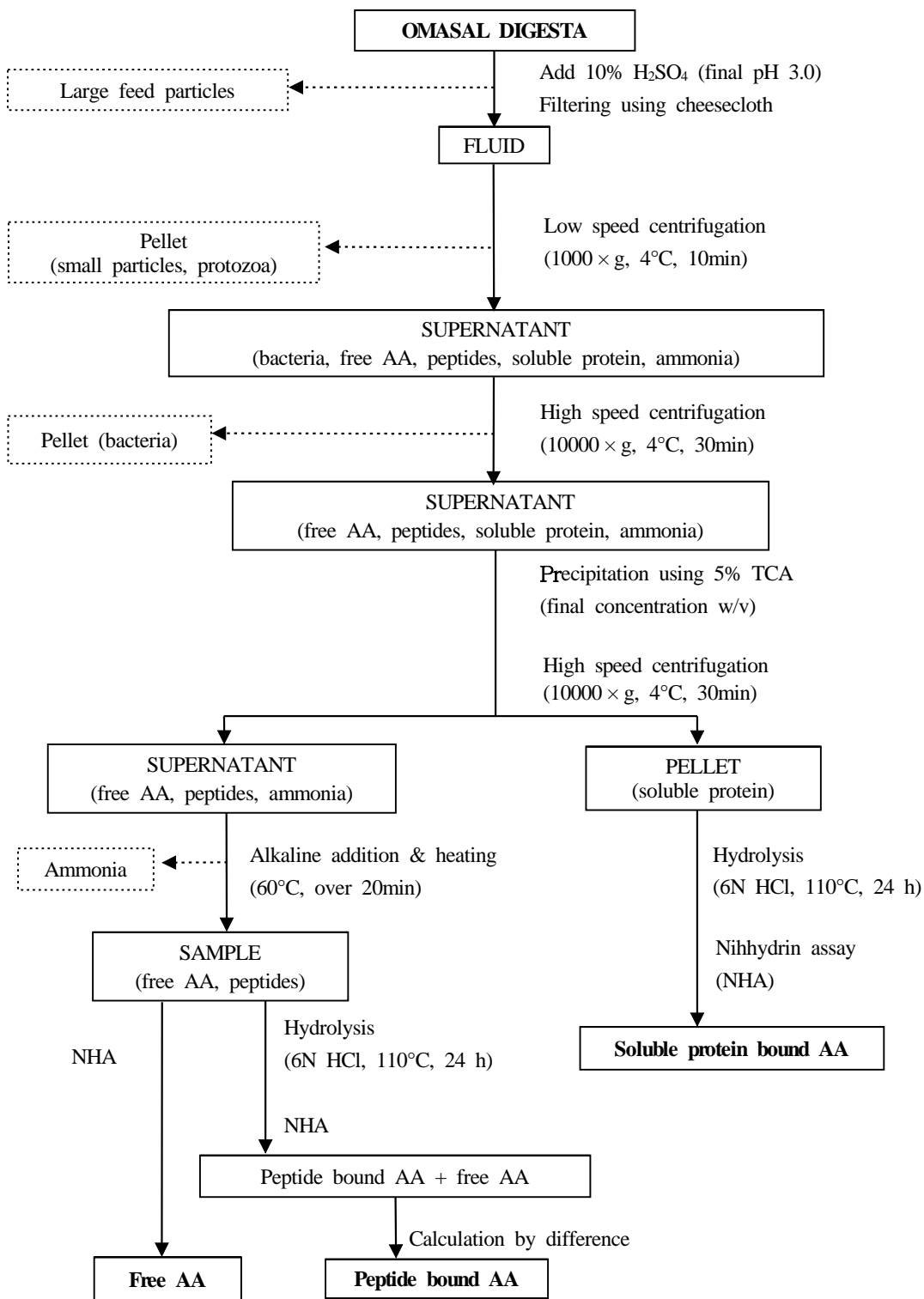


Fig. 3. Schematic for the isolation and measurement of eSNAN in omasal digesta.

심분리하여 용해성 단백질(펠렛)과 FAA 및 peptides (상층액)를 분리한다. 상층액 내 존재하는 암모니아태 질소는 alkaline-heating 처리법으로 제거한다(Chen 등, 1987a). 용해성 단백질 내에는 보정하지 않아도 될 극미량의 암모니아태 질소가 존재하므로(Choi 등, 2002a) alkaline-heating 처리는 생략한다. 펠렛(용해성 단백질)은 5% TCA를 이용, 아주 조심스럽게 세척한다. Peptides 분석을 위한 상층액과 펠렛은 6N HCl로 처리하고 45분간 질소가스로 flushing시킨 후, 110°C oven에서 24 시간동안 산가수분해한다. 산가수분해 및 비 산가수분해 샘플들은 진탕농축기를 이용하여 45°C에서 건조시킨 후, 25 mM 초산용액으로 용해시킨다.

제 3위 소화액 eSNAN의 N 분석은 ninhydrin assay(NHA; Rosen, 1957)를 이용, 다음과 같이 분석한다. 1) FAA: 산가수분해를 거치지 않은 cell-free 3위 소화액의 원심분리 상층액에서 N 측정, 2) peptides: 산가수분해 cell-free 3위 소화액의 원심분리 상층액에서의 N 측정값 - FAA, 3) 용해성 단백질: 산가수분해 cell-free 3위 소화액의 TCA처리 후 원심분리 펠렛에서 N 측정으로 분석한다.

(2) eSNAN fraction의 분획 및 의의

1) 제 3위 소화액 내 free amino acids, peptides 및 soluble protein

제 3위 소화액내 eSNAN 분획과 관련된 최근 연구(Choi 등, 2002a, 2002b, 2002c, 2003)에서 제시된 측정값은 표 1에서와 같다. 서로 다른 4가지 연구결과에서 FAA의 값은 Peptides와 비교해서 비교적 낮은 농도가 검량되었다(평균 23.9 ± 10.84 mg N/l). 이것은 반추위액내 FAA의 농도는 비교적 낮다는 기존 연구결과와(Wright와 Hungate, 1967; Broderick 등, 1991) 일치한다. 표 1에서 제시된 두 번째 연구결과(평균 38 mg N/l; Choi 등, 2002b)에서 다른 세 연구결과보다 비교적 높은 FAA의 값이 검량되었는데 이것은 다른 세 연구에서 측정된 실험동물의 사료섭취량과 비교했을 때 두 번째 연구에서의

높은 FAA 및 peptides 섭취량에서 일부 기인했을 것으로 사료된다(Choi, 2002). Volden 등(1998)은 grass silage와 혼합농후사료를 섭취하는 젖소에서 반추위에 FAA를 주입했을 때 약 20%의 FAA가 반추위 분해를 벗어나 하부소화기관으로 유입된다고 발표하였다.

사료종류 및 N 섭취량에서 차이가 있지만 반추위액 내 N을 측정한 기존 연구에서 peptides의 농도는 82-111 mg N/l(Chen 등, 1987a; Robinson과 McQueen, 1994; Robinson 등, 1998)로 표 1에서 나타난 제 3위 소화액 내 peptides의 농도(57.7-90.0 mg N/l) 보다 낮은 측정값을 보인다. 그러나, 전술한 기존 연구의 반추위액 내 peptides 측정값은 peptides와 FAA의 혼합값임을 감안할 때, 표 1의 제 3위 소화액 내 peptides와 FAA의 값, 즉 82.1-106.8 mg N/l로 기존의 연구결과와 유사한 것으로 사료된다. 본 고에 인용된 peptides fraction 값은 각각의 연구에서 서로 다른 실험동물과 서로 다른 사료 종류 및 양에서 도출된 결과임에도 불구하고 그 수준의 차이는 있을 뿐 다른 두 fractions(FAA 및 soluble protein)과 비교해서 항상 가장 높은 값을 보였다.

제 3위 소화액 내 soluble protein 농도는 그 변이가 특히 심했는데, 표 1에서 보는 바와 같이 FAA 농도와 유사한 결과가 있는 반면(Choi 등, 2002a, 2003), 측정값의 언급이 무의미할 정도로 미미한 결과(Choi 등, 2002b, 2002c)도 있었다. 이러한 심각한 수준의 soluble protein fraction 변이 원인은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나, 몇 가지의 추측은 가능할 것으로 보인다. 첫째, 연구에서 사용된 사료 내 soluble N 급여의 큰 부분을 차지하는 grass silage의 낮은 soluble true protein의 때문으로 사료된다. 이것은 일반적으로 사용되는 grass silage의 낮은 soluble true protein 농도가 반추위 내 낮은 soluble protein 농도와 관련이 있을 수 있다는 기존의 결과와도 일치한다(Nsereke 등, 1998). 둘째, 반추위 내에서 사료 유래 soluble protein이 빠르게 분해되었거나 제 3위 소화액 내 검량된 peptides 중 일부가 사료내 insoluble protein에서 직접적으로 분해되었기 때문으로 사료된

Table 1. Fractionation of eSNAN in omasal digesta of dairy cows fed grass based diets

Reference	Diet ¹⁾		eSNAN fractions, mg N/l		
	Basal	Treatment	FAA	Peptides	Soluble protein
Choi et al., 2002a					
	GS	None	12.2	68.8	13.5
	"	barley	14.0	79.6	25.9
	"	RSM	16.9	106.3	16.3
	"	barley+RSM	20.3	108.7	26.3
Choi et al., 2002b					
	GS + barley	None	21.4	50.9	0.7
	"	SMP	45.2	63.7	1.5
	"	WDS	35.7	60.1	1.0
	"	Untreated RSM	42.4	59.9	1.3
	"	Treated RSM	43.2	53.9	1.4
Choi et al., 2002c					
	GS + barley	None	13.5	56.0	0.2
	"	FM	16.9	81.0	0.9
	"	SBM	16.8	78.4	0.3
	"	MGM	18.9	72.8	0.3
Choi et al., 2003					
	-	PGLB	22.3	68.5	24.3
	-	PGHB	26.1	62.2	22.3
	-	SGLB	21.3	54.9	24.5
	-	SGHB	19.3	53.6	21.3

¹⁾ GS = grass silage; RSM = rapeseed meal; SMP = skimmed milk powder; WDS = wet distiller's solubles; FM = fishmeal; SBM = soybean meal; MGM = maize gluten meal; PGLB = primary growth GS and low level of barley; PGHB = primary growth GS and high level of barley; SGLB = secondary growth GS silage and low level of barley; SGHB = secondary growth GS and high level of barley.

다. 이러한 추측은 제 3위 소화액 내 peptides와 FAA의 합친 값과 nylon bag technique을 이용한 사용된 사료의 'a-fraction' 섭취량과의 회귀방정식에서 양의 절편이 나온 결과와 일치한다 (Choi, 2002).

Table 1에서 제시된 제 3위 소화액 내 eSNAN

의 값은 flow(g N/d)가 아닌 concentration(mg N/l)으로 실제 반추위에서의 미분해 사료단백질의 정확한 패턴 분석을 위해서는 flow값이 필요하다. 실제 발표된 논문에서는 concentration 뿐만 아니라 triple marker 방법(France와 Siddons, 1986)을 이용하여 큰 고형물(미소화 NDF), 작

은 고형물(Yb-acetate) 및 액상 부분(LiCoEDTA)의 flow rate을 각각 측정하거나(Choi 등, 2002a, 2002c, 2003), LiCoEDTA를 single marker(Udén 등, 1980)로 이용하여 액상부분의 flow rate을 측정하여(Choi 등, 2002b) 각 제 3위 소화액 액상부분의 eSNAN flow값을 제시하였다. 그러나 이러한 제 3위 소화액내 액상부분의 eSNAN값과 비교할 수 있는 기존 연구논문의 *in vivo* 반추위 소화액내 SNAN 값이 대부분 concentration의 값만을 제시하였다(Chen 등, 1987a; Robinson과 McQueen, 1994; Robinson 등, 1998; Volden 등, 1998). 따라서 서로 다른 실험결과 비교 시 객관성을 유지하기 위하여 본 고에서는 제 3위 소화액내 eSNAN concentration 값을 기준으로 고찰하였다. 한편, flow 값으로 나타낸 제 3위 소화액내 eSNAN의 패턴은 concentration의 값으로 나타낸 패턴과 매우 유사하였다(Choi, 2002).

본 고에서 인용된 연구에서는 제 3위 소화액내 eSNAN 측정값 중 반추위 미생물에서 유래된 부분을 측정하고자 미생물 마커로 ^{15}N -ammonium sulphate를 이용하였다(Choi 등, 2002a, 2002c, 2003). 각 연구에서 총 eSNAN 중 미생물 유래 eSNAN은 약 60~70%로 계산되어졌다. 그러나, 이 측정값은 반추위액 내 총 비암모니아질소(NAN) 중 암모니아로부터 합성된 미생물 유래 NAN이 70%임(Firkins 등, 1987)을 전제로 한 측정값으로, 기 발표된 여러 연구에서 암모니아로부터 합성된 미생물 유래 NAN의 수준 변이(46~82%, Firkins 등, 1987; Hristov and Broderick, 1996)를 감안할 때 본 고에서 인용한 eSNAN 중 미생물 유래 eSNAN의 측정값은 향후 반추위액 내 암모니아로부터 합성된 미생물 유래 NAN의 정확한 추가 분석실험이 요구된다 할 것이다.

2) eSNAN 측정의 의의

반추위 내 사료분해 패턴의 정확한 측정을 위해 고찰한 OST를 이용한 제 3위 소화액 내 eSNAN의 검량 및 분획은 반추위영양 및 소화생리학적 측면에서 여러 가지 의미를 지니고 있다. 첫째, 분석방법 측면에서 eSNAN의 검량에

이용된 NHA 분석방법의 확립이다. 이 방법은 전통적으로 아미노산 정량을 위해 사용되어진 방법으로 아미노기에 대한 민감성이 높기 때문에 많이 사용되어진 방법이다. 제 3위 소화액의 eSNAN 검량에 사용되어진 NHA의 분석신뢰도를 알아보기 위해 동일한 샘플의 N에 대한 NHA와 아미노산분석기(FAA 분석) 및 Kjeldahl법(total eSNAN 분석)을 이용 분석하였다(Choi 등, 2002a). 제 3위 소화액 FAA의 분석($R^2=0.93$)과 total eSNAN의 분석($R^2=0.88$)에서, 방법간 높은 상관관계는 NHA가 소화액내 N 분석법으로서 신뢰할 수 있음을 의미하는 것이다(Choi 등, 2002a).

둘째, 반추위 단백질 분해율과 관련된 기존 학설 오류의 실질적 검증이다. 조사료 및 농후사료 조건이 다른 연구에서 제 3위 소화액 eSNAN 분획(FAA, peptides 및 soluble protein) 결과는 항상 peptides가 양적으로 가장 중요한 N fraction 임이 측정되었다. 이것은 반추위내 사료단백질 분해율 관련된 기존 학설인 ‘반추위 단백질 분해 대사과정에서는 단백질에서 peptides로의 분해나 아미노산에서 암모니아로의 분해가 분해를 제한요인이다’ 라는 것이 오류임을 검증하는 것이며 따라서 그 단백질 분해 대사과정은 peptides에서 아미노산으로의 분해가 분해율 제한요인이 될 수 있음을 의미하는 결과이다(Choi 등, 2002a, 2002b, 2002c, 2003).

셋째, nylon bag technique으로 대표되는 *in situ* 법 전제조건 오류 검증이다. 제 3위 소화액에서의 eSNAN 분획 성공은 기존의 nylon bag technique이 가지고 있던 전제조건을 정면으로 반박한다(Choi, 2002). 이 측정된 eSNAN flow는 반추위내 total N flow의 5~10%에 이르며, nylon bag technique으로 측정된 용해성 질소화합물 섭취량의 5~8%에 해당되었다(Choi, 2002). 이것은 향후 많은 *in vivo* 실험을 통한 eSNAN의 데이터셋업이 되어 현재보다 더 정확한 보정지수가 제시될 경우, *in vitro* 또는 *in situ* 방법에 의한 사료단백질의 N 분획만으로 정확한 제 3위 소화액 eSNAN flow의 예측이 가능함을 의미한다. 또한, 이 결과는 현재 널리 사용되고 있는 nylon bag technique에 의한 반추

위 단백질 분해 및 사양표준의 수정, 특히 사료로부터 공급되어지는 용해성 질소화합물 섭취량의 최고 10%까지는 소장에서 이용될 수 있음을 고려할 경우 단백질 급여수준의 감소가 가능하며 따라서 가축 사료비 절감 효과를 가져올 수 있다. 사료내 용해성 질소화합물 이용을 고려한 반추동물 단백질 사료의 적정요구량 등 사양표준의 재정립은 환경오염의 주원인 중 하나인 분뇨 중 N 배출 감소효과도 기대된다.

IV. 결 론

이상에서 반추동물의 사료분해패턴과 관련된 기존 측정법에 대한 고찰과 최근 새로운 반추위 사료분해패턴 측정기법으로 알려진 OST 및 이를 이용한 제 3위 소화액 eSNAN의 검량 및 분획에 대해서 살펴보았다. 기존의 여러 측정법은 반추위 사료분해패턴 측정에 있어서 각각의 방법학적인 한계를 극복하기 위해 다양한 방법으로 접근되어 왔다. 시도된 각 방법들은 반추위내 사료분해패턴을 통한 반추위 미분해 사료량의 측정 또는 하부소화기관으로의 유입량을 반추위내 소화물에 의해 측정된다는 점(*in vivo* 방법), 사료내 용해성 질소화합물은 반추위내 분해를 벗어나 하부소화기관으로 유입되지 못한다는 전제조건(*in situ* 방법)과 반추위와 상이한 조건에서 측정되며 사용된 화학적 시약에 의해 측정 변이차가 크다는 점(*in vitro* 방법) 등이 한계점으로 대두되었다. 이러한 기존 방법들의 한계를 극복하고 보다 정확한 반추위 사료분해패턴을 측정하기 위해 최근 새롭게 개발된 OST는 제 3위 소화액의 eSNAN 분획 성분 및 N 분획 중 peptides가 양적으로 가장 중요함을 밝힘으로써 기존 반추위내 사료단백질 분해율 관련된 기존 학설의 오류를 검증하고 새로운 학설을 제시하였다. 또한, 제 3위 소화액내 eSNAN이 존재함은 반추위 사료분해패턴 측정법으로 널리 이용되고 있는 nylon bag technique의 오류를 실질적으로 증명하고 향후 보정지수 등의 이용을 통해 좀더 정확한 반추위 단백질 사료분해패턴 측정이 가능할 것으로

사료된다. 끝으로 본 고에서 소개된 반추위 사료분해패턴 측정기법인 OST를 이용한 연구 결과의 축적은 향후 반추위 사료분해패턴의 정확한 해석, 용해성 단백질원 조절을 통한 사료비 절감 및 질소배출감소에 의한 환경오염 제어 등 여러 가지 학문적 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 요 약

제 3위 소화액 채취기법은 기존 반추위 영양·생리 대사 패턴 측정방법인 *in vivo*, *in vitro* 및 *in situ* 방법의 단점을 극복하고 정확한 반추위 생리대사 패턴의 측정을 할 수 있는 기회를 가진다. 이 제 3위 소화액 채취기법을 이용한 측정방법은 기존의 *post-ruminal sampling* 기법과 비교해서 다음과 같은 장점들이 존재한다. 1) 단지 반추위캐놀라가 설치된 동물만이 필요하며, 2) 제 3위 소화액에는 비교적 적은 내인성 질소가 존재하며, 3) 제 3위 소화액은 제 4위에서 시작되는 소화효소에 의한 소화를 피할 수 있는 점 등이다. 제 3위 소화액 내 반추위 미분해 용해성 질소화합물(SNAN)의 측정은 *in situ* 방법의 전제조건인 반추위에서 rapidly degradable N은 무한정 분해되며 따라서 비용해성 사료 N 만이 반추위를 벗어난다는 것이 오류임을 보여준다. 제 3위 소화액 내 SNAN 중 유리아미노산 및 용해성 단백질과 비교해서 양적으로 가장 많은 peptide는 반추위 단백질 대사과정에서 peptide에서 아미노산으로의 분해 과정이 분해율 제한요인이 될 수 있음을 시사한다.

VI. 인 용 문 헌

1. Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. and Varvikko, T. 1999. Effects of supplementation of a grass silage and barley diet with urea, rapeseed meal and heat-moisture-treated rapeseed cake on omasal digesta flow and milk production in lactating dairy cows. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 49:179-189.

2. Broderick, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *Br. J. Nutr.* 58:463-475.
3. Broderick, G. A. and Merchen, N. R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.* 75:2618-2632.
4. Broderick, G. A., Wallace, R. J. and Ørskov, E. R. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Tsuda, T., Sasaki, Y. and Kawashima, R.(Eds.) Academic Press, Tokyo, Japan. pp. 541-592.
5. Chen, G., Russell, J. B. and Sniffen, C. J. 1987a. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.* 70, 1211-1219.
6. Chen, G., Sniffen, C. J. and Russell, J. B. 1987b. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle. Effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J. Dairy. Sci.* 70: 983-992.
7. Choi, C. W. 2002. Assessment of the flow of soluble dietary non-ammonia nitrogen escaping degradation in the rumen of dairy cows fed grass silage based diets. Ph.D. Dissertation, Department of Animal Science Publications No. 66. University of Helsinki. ISBN 952-10-0855-5(nid.). 60 p. + 4 publ.
8. Choi, C. W., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Toivonen, V. and Huhtanen, P. 2002a. Quantitation of the flow of soluble non-ammonia nitrogen entering the omasal canal of dairy cows fed grass silage based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 96:203-220.
9. Choi, C. W., Vanhatalo, A., Ahvenjärvi, S. and Huhtanen, P. 2002b. Effects of several protein supplements on flow of soluble non-ammonia nitrogen from the forestomach and milk production in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102:15-33.
10. Choi, C. W., Vanhatalo, A. and Huhtanen, P. 2002c. Concentration and estimated flow of soluble non-ammonia nitrogen entering the omasum of dairy cows as influenced by different protein supplements. *Agric. Food Sci. Finl.* 11:79-91.
11. Choi, C. W., Vanhatalo, A. and Huhtanen, P. 2003. Effects of type of grass silage and level of concentrate on the flow of soluble non-ammonia nitrogen entering the omasum of dairy cows. *J. Anim. Feed. Sci.* 12:3-22.
12. Crooker, B. A., Sniffen, C. J., Hoover, W. H. and Johnson, L. L. 1978. Solvents for soluble nitrogen measurements. *J. Dairy Sci.* 61:437-447.
13. Dhanoa, M. S., France, J., López, S., Dijkstra, J., Lister, S. J., Davies, D. R. and Bannink, A. 1999. Correcting the calculation of extent of degradation to account for particulate matter loss at zero time when applying the polyester bag method. *J. Anim. Sci.* 77:3385-3391.
14. Firkins, J. L., Berger, L. L., Merchen, N. R., Fahey Jr. G. C. and Mulvaney, R. L. 1987. Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *J. Dairy Sci.* 70:2302-2311.
15. France, J. and Siddons, R. C. 1986. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. *J. Theor. Biol.* 121:105-119.
16. Hristov, A. and Broderick, G. A. 1994. *In vitro* determination of ruminal protein degradability using [¹⁵N] ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *J. Anim. Sci.* 72:1344-1354.
17. Hristov, A. and Broderick, G. A. 1996. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 79:1627-1637.
18. Huhtanen, P., Brotz, P. G. and Satter, L. D. 1997. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:1380-1392.
19. Huhtanen, P., Vanhatalo, A. and Varvikko, T. 1998. Enzyme activities of rumen particles and feed samples incubated *in situ* with differing types of cloth. *Br. J. Nutr.* 79:161-168.

20. Lindberg, J. E. 1985. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the *in sacco* technique and various *in vitro* methods: a review. *Acta Agric. Scand.*, 25 (Suppl.), 64-97.
21. Licitra, G., Hernandez, T. M. and Van Soest, P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:347-358.
22. Luchini, N. D., Broderick, G. A. and Combs, D. K. 1996. Characterization of the proteolytic activity of commercial proteases and strained ruminal fluid. *J. Anim. Sci.* 74:685-692.
23. Mahadevan, S., Erfle, J. D. and Sauer, F. D. 1987. Preparation of protease from mixed rumen microorganisms and its use for the *in vitro* determination of the degradability of true protein in feedstuffs. *Can. J. Anim. Sci.* 67:55-64.
24. Michalet-Doreau, B. and Ould-Bah, M. Y. 1992. *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40:57-86.
25. Nocek, J. E. 1988. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.
26. Nolan, J. V. 1993. Nitrogen Kinetics. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. J. M. Forbes and J. France (Eds.) CAB International Wallingford, Oxon, UK. pp. 123-143.
27. NRC. 2001. National Research Council. *Nutrient Requirement of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C. USA.
28. Nsereko, V. L., Rooke, J. A., Newbold, C. J. and Wallace, R. J. 1998. Influence of protease inhibitors on nitrogen distribution in ensiled perennial ryegrass and utilisation of silage nitrogen for growth by rumen bacteria *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:51-63.
29. Ørskov, E. R. and McDonald, P. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci., Camb.* 92: 499-503.
30. Ørskov, E. R., Macleod, N. A. and Kyle, D. J. 1986. Flow of nitrogen from the rumen and abomasum in cattle and sheep given protein-free nutrients by intragastric infusion. *Br. J. Nutr.* 56: 241-248.
31. Robinson, P. H. and McQueen, R. E. 1994. Influence of supplemental protein source and feeding frequency on rumen fermentation and performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77: 1340-1353.
32. Robinson, P. H., Veira, D. M. and Ivan, M. 1998. Influence of supplemental protein quality on rumen fermentation, rumen microbial yield, forestomach digestion, and intestinal amino acid flow in late lactation Holstein cows. *Can. J. Anim. Sci.* 78: 95-105.
33. Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67:10-15.
34. Siddons, R. C., Beever, D. E. and Nolan, J. V. 1982. A comparison of methods for the estimation of microbial nitrogen in duodenal digesta of sheep. *Br. J. Nutr.* 48:377-389.
35. Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G. and Russell, J. B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577.
36. Udén, P., Colucci, P. E. and Van Soest, P. J. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31:625-632.
37. Udén, P. 2000. Ruminal metabolism of buffer-soluble proteins, peptides and amino acids *in vitro*. In *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. J.P. McNamara, J. France and D.E. Beever. (Eds.) CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 63-71.
38. Van Straalen, W. M. and Tamminga, S. 1990. Protein degradation of ruminant diets. In *Feedstuff evaluation. 1. Livestock. Feedstuffs. Composition*. J. Wiseman and D.J.A. Cole. (Eds.) Butterworths, London, pp. 55-72.

39. Varvikko, T. and Lindberg, J. E. 1985. Estimation of microbial nitrogen in nylon-bag residues by feed ¹⁵N dilution. *Br. J. Nutr.* 54:473-481.
40. Volden, H. and Harstad, O. M. 1995. Effect of rumen incubation on the true indigestibility of feed protein in the digestive tract determined by nylon bag techniques. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 45:106-115.
41. Volden, H., Mydland, L. T. and Olaisen, V. 2002. Apparent ruminal degradation and rumen escape of soluble nitrogen fractions in grass silage administered intraruminally to lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80:2704-2716.
42. Volden, H., Velle, W., Harstad, O. M., Aulie, A. and Sjaastad, Ø. V. 1998. Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine, and threonine administered intraruminally in mixtures to high-yielding cows. *J. Anim. Sci.* 76: 1232-1240.
43. Wallace, R. J. 1991. Rumen proteolysis and its control. In *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. J. P. Jouany (Ed.) INRA Editions, Paris. pp. 131-150.
44. Wright, D. E. and Hungate, R. E. 1967. Amino acid concentrations in rumen fluid. *Appl. Microbiol.* 15:148-151.

(접수일자 : 2006. 6. 5. / 채택일자 : 2006. 7. 31.)