

조사료 대용 산업부산물을 이용한 알코올 발효사료가 *In vitro* 반추위내 발효특성 및 NDF 분해율에 미치는 영향

김병완* · 임광철** · 박병기*** · 김종덕**** · 신중서*

The Effect of Alcohol Fermented Feedstuff Made of Byproducts on *In vitro* Fermentation Characteristics and NDF Disappearance in the Rumen

Byong Wan Kim*, Guang Zhe Lin**, Byung Ki Park***, Jong Duk Kim****
and Jong Suh Shin*

ABSTRACT

An *in vitro* study was conducted to examine the influence of alcohol-fermented feedstuff formulated with byproducts on the fermentation characteristics and NDF disappearance in the rumen. Dietary treatments were either a soybean curd-based alcohol-fermented feedstuff (AFS) or brewery grain-based alcohol-fermented feedstuff (AFB). The AFS and AFB are composed of 50% commercial beef cattle feed, 50% soybean curd dreg, 5% molasses and 0.5% yeast, and 25% commercial beef cattle feed, 25% brewery grain, 25% soybean curd dreg, 25% corn grit, 5% molasses and 0.5% yeast, respectively. The change of ammonia, pH alcohol, volatile fatty acids, and NDF disappearance were measured at 0, 2, 4, 8 and 12 hr after *in vitro* incubation in the rumen. After 2 hr incubation, higher ammonia concentrations were resulted in AFS (12.47 mg/dl) and AFB (12.85 mg/dl) compared to control (11.84 mg/dl) ($p < 0.05$). Ruminal pH of AFS and AFB were significantly higher than control during 1 to 6 hr fermentation, but the pH of AFS and AFB were decreased after 6 hr. At 12 hr fermentation, the alcohol concentration of AFS and AFB was significantly increased by 43.9% and 48.0%, respectively. The acetate concentration was rapidly decreased in control, while the concentration was slowly decreased in AFS and AFB with increasing the fermentation time. Lower concentrations propionate and butyrate were observed in AFS and AFB during every fermentation time ($p < 0.05$). The NDF disappearance was significantly lower in AFS and AFB after 4 hr fermentation. These results suggest that alcohol fermented feedstuff can control the fermentation pattern in the rumen.

(Key words : NDF, pH, Ammonia, Alcohol, Acetic acid)

* 강원대학교 동물생명과학대학(College of Animal Life Science, Kangwon National University, Korea)

** College of Life Science, Linyi Normal University. Linyi, Shandong, China

*** 농촌진흥청 축산과학원 (National Livestock Research Institute, RDA, Korea)

**** 천안연암대학 (Cheonan Yonam College, Sunghwan, Cheonan 330-709, Korea)

Corresponding author: Jong Suh Shin, Division of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea.

Tel : +82-33-250-8628, Fax : +82-33-250-2532, E-mail : jsshin@kangwon.ac.kr

I. 서 론

반추동물에 있어서 Alcohol은 체내 대사 및 반추 미생물들의 에너지 공급원으로 이용되고 있으며, 반추위내 발효양상을 변화하여 휘발성 지방산 등의 발효산물의 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다(신과 박, 2006). 지금까지 알코올 및 알코올 발효사료가 반추위 미생물의 발효 pattern에 미치는 영향에 대한 연구보고를 살펴보면 알코올은 반추위내에서 protozoa수를 감소시키고(大槻 등, 1991) 총 미생물수는 증가시킨다는 보고(Kurihara 등, 1978), 반추위내 총 휘발성 지방산의 생성량, acetate 및 caproate 비율을 증가시키고, butyrate 및 propionate 비율은 감소시키나 pH에는 영향을 미치지 않는다는 보고(이, 1999a,b; 정 등, 1996; Andree Durix 등, 1991), 반추위내 단백질 분해율을 저하시켜 ammonia 생성량을 감소시킨다는 보고(日野 등, 1991) 등이 있다. 그리고 川西 등(1989)은 비지박과 beet plup, barley 등을 혼합하여 제조한 발효사료를 비육우에게 급여할 경우 반추위내 acetate 생성량이 감소하고 propionate 생성량이 증가하며, 반추위내 protozoa 수는 급격히 감소한다고 보고하였다.

한편, 임 등(2001)과 신 등(2005)은 미생물을 이용하여 제조하는 발효사료는 알코올 외에도 젖산, ammonia 및 yeast균을 함유하고 있다고 보고한바 있다. 또한, 엄(2002)은 알코올 발효사료 급여는 반추위내 pH 및 ammonia 농도를 감소시키고 총 휘발성 지방산 농도를 증가시키며 그 중 acetate 비율은 감소하고 propionate 비율은 증가한다고 보고하였다. 따라서 발효사료는 제조조건, 접종하는 미생물 종류 등에 따라 반추위 미생물의 발효 pattern에 미치는 영향은 다양할 것이며, 발효과정 중에 생성되는 발효산물이나 그 함량 등에 변화가 다양할 것

으로 판단된다. 즉, 미생물을 이용하여 제조하는 알코올 발효사료는 원료사료의 종류에 따라 발효과정 중에 생성되는 발효대사산물의 변화가 달리 나타날 수 있을 것이다. 이와같이 상기의 연구결과들을 토대로 볼 때 미생물을 이용하여 제조하는 알코올 발효사료는 제조조건, 원료사료, 미생물 종류 등에 따라 반추위내 발효산물에 변화가 있을 것으로 추정되나 이에 대한 연구가 매우 미흡한 실정에 있다. 특히, 알코올 발효사료는 원료사료에 따라 반추위내에서 발효특성이 차이가 클 것으로 판단되나 이에 대한 연구보고는 없는 실정이다.

따라서 본 실험은 batch *in vitro* 배양법에 따라 알코올 발효사료 처리가 반추위내 알코올 농도, ammonia 농도, pH, VFA 농도 및 NDF 분해율의 변화를 비교 검토하여 알코올과 알코올 발효사료처리에 따른 반추위내 발효 pattern의 변화특성을 구명하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 시험에서는 반추위 cannula가 장착된 한우 암소 2두(400 및 420 kg)를 공시하여 실시하였다. 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.

Table 1. Chemical composition of experimental diets

Items	Commercial formulated feed	Rye straw
Dry matter (%)	91.56 ± 0.09	91.84 ± 0.22
 DM(%)	
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

2. 시험사료 제조

비지박 발효사료(alcoholic-fermented soybean curd dreg: AFS)는 비지박(DM 20.8%, 조단백질 19.5%, 조지방 4.9%, 조섬유 14.8% 및 조회분 3.2%)과 시판중인 배합사료(DM 87%)를 각각 50:50의 비율로 혼합하고 당밀 2%, yeast 0.5%를 첨가한 후 30℃에서 24시간 혐기적으로 배양하여 제조하였으며, 맥주박 발효사료(alcoholic-fermented brewery grain's: AFB)는 맥주박(DM 25.8%, 조단백질 24.3%, 조지방 8.79%, 조섬유 19.06% 및 조회분 1.3%), 비지박, 옥분 및 시판중인 배합사료를 25:25:25:25의 비율로 혼합하고 당밀 5%, yeast 0.5%를 첨가한 후 비지박

발효사료의 경우와 동일한 조건으로 발효하여 제조하였다.

한편, 본 시험에 이용된 시험사료의 일반 화학성분은 AOAC(1990) 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.

Table 2. Chemical components of experimental diets

Item	CF	AFS	AFB	SGS	RS
DM (%)	87.8	52.4	50.8	38.3	83.1
 % of dry matter				
Crude protein (%)	15.3	15.5	14.9	7.5	5.1
Ether extract (%)	4.2	3.7	3.2	2.2	4.2
Crude fiber (%)	3.0	10.0	10.2	30.0	30.4
Crude ash (%)	7.7	6.8	4.9	12.1	6.5
Alcohol (%)	—	1.7	2.3	—	—
pH	5.2	4.4	4.5	4.5	—

CF : Commercial feed, AFS : Alcoholic-fermented soybean curd dreg, AFB : Alcoholic-fermented brewery grain's, SGS : Sudan grass silage, RS : Rice straw.

3. 시험구 처리

In vitro 소화시험은 DAISY^{II} 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 배합사료, 알코올 혼합사료 및 알코올 발효 사료를 7g씩 각각 첨가하였다. 실험설계는 배합사료를 첨가하는 대조구(control)와 비지박 알코올 발효사료를 첨가하는 AFS구 및 맥주박 알코올 발효사료를 첨가하는 AFB구로 나누어 실시하였다. 기초사료의 첨가량 및 각 시험사

료의 첨가량과 영양소 수준은 Table 3과 같다.

4. *In vitro* 소화시험

(1) Rumen inoculum

반추위액의 채취는 반추위 cannula가 장착된 한우 암소에서 오전사료 급여전에 채취하여 4겹의 cheese cloth로 여과한 후 미리 예열된 39°C 보온병에 담고, O_2 free- CO_2 gas를 30초간 주입하여 보온병내의 공기를 제거한 후 30분내로 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다.

(2) *In vitro* 배양액

In vitro 배양액은 rumen inoculum 400 ml를 미리 조제된 인공타액(buffer solution A and B)

Table 3. Experimental design for *in vitro* trials

Items	Treatment		
	Control	AFS	AFB
Basal diets			
Commercial feed (g)	7	7	7
Sudan grass silage (g)	2	2	2
Rice straw (g)	2	2	2
Experimental diets			
CF	7	—	—
AF-1 (g)	—	—	—
AF-3 (g)	—	—	—
AF-5 (g)	—	—	—
AFS (g)	—	7	—
AFB (g)	—	—	7
Alcohol (%)	—	1.7 ± 0.04	2.3 ± 0.04
Lactate (%)	—	1.1 ± 0.01	1.5 ± 0.01
pH	5.5 ± 0.01	4.4 ± 0.01	4.2 ± 0.01
Total dry matter (g)	18 ± 0.1	18 ± 0.1	18 ± 0.2
Total protein (g)	2.4 ± 0.04	2.4 ± 0.04	2.4 ± 0.04

CF : Commercial feed. AFS : Alcohol-fermented soybean curd dreg, AFB : Alcohol-fermented brewery grain's, SGS : Sudan grass silage, RS : Rice straw.

1,600 ml에 첨가하여 제조하였다. 인공타액은 본 실험실에서 Table 4에서와 같은 비율로 buffer solution A 및 B로 나누어 조제한 후 시험 개시 전에 A용액 1,330 ml과 B용액 266 ml를 동시에 *in vitro* 배양 jar에 넣어 혼합하고 pH가 6.8이 되도록 조정하였으며, 39℃까지 예열하여 사용하였다. Rumen inoculum 접종시에는 첨가 즉시 CO₂ gas를 30초간 주입하여 배양 jar내의 공기를 배제하였으며, 그 후 39℃에서 1시간 동안 안정시킨 후 시험에 이용하였다.

Table 4. Components of buffer solutions

Item	g/liter(D.W)
Buffer solution A:	
KH ₂ PO ₄	10.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1
Urea(regent grade)	0.5
Buffer solution B :	
Na ₂ CO ₃	15.0
Na ₂ S · 9H ₂ O	1.0

(3) 배양액의 pH, 알코올 및 ammonia 농도 측정

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℃)에서 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.

(4) 휘발성 지방산 농도

In vitro 배양액의 휘발성 지방산의 농도를

분석하기 위해 0, 2, 4, 6, 8 및 12시간대별로 5 ml의 배양액을 채취한 후 20%의 HPO₃ 1 ml 및 포화 HgCl₂ 0.5 ml를 첨가하고 4,000 × g (4℃)에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취한 후 gaschromatography (Shimadzu Model GC-17A Ver. 3, Japan)을 이용하여 휘발성 지방산 농도 측정하였다.

5. 통계분석

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

III. 결과 및 고찰

1. Ammonia 농도 및 pH 변화

알코올 발효사료의 사료종류별 *in vitro* 배양 과정 동안의 ammonia 농도변화를 조사한 결과는 Fig. 1에서 나타낸 바와 같다.

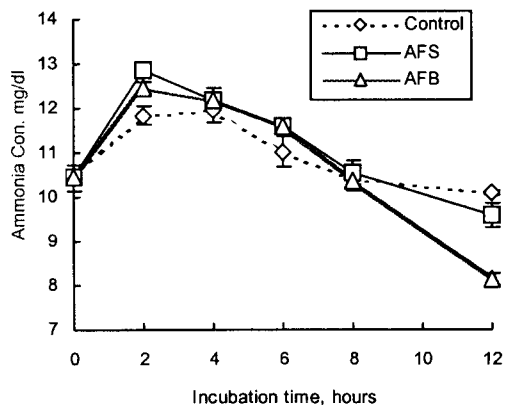


Fig. 1. Ammonia concentration changes of AFS and AFB over *in vitro* incubation time.

In vitro 배양액중의 ammonia 농도는 배양 2 시간에 AFS구 및 AFB구가 각각 12.8 mg/dl 및 12.5 mg/dl로 대조구의 11.8 mg/dl 보다 현저히 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 배양 4시간에는 대조구, AFS 및 AFB구는 각각 11.9 mg/dl, 12.2 mg/dl 및 12.3 mg/dl로 대조구가 증가하는 반면에 처리구들은 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 배양 4시간부터 12시간 사이에 대조구, AFS 및 AFB구의 ammonia 농도의 감소속도는 각각 0.19, 0.25 및 0.41 mg/dl/h로 알코올 발효 사료구들이 대조구에 비해 빠르게 나타났으며, 특히 AFB구는 배양 12시간의 ammonia 농도가 8.14 mg/dl로 대조구의 10.09 mg/dl에 비해 낮은 것으로 나타났다. 알코올 발효사료구들의 ammonia 농도는 대조구보다 비교적 배양초기 6시간까지 높게 나타났으나 배양 8시간이 경과하면서부터는 알코올 발효사료구들의 ammonia 농도가 대조구에 비해 낮은 경향을 보였다. 이러한 결과는 배양 8시간부터 알코올 발효사료구들에서 단백질 분해가 대조구보다 낮아지기 때문으로 판단된다. 따라서 알코올 발효사료는 배양초기에는 lactate 및 낮은 pH에 의해 미생물의 증식이 억제되어 ammonia 이용효율을 떨어뜨리며 배양 후기는 단백질 분해율을 저하시키는 것으로 판단된다(Andree Durix 등, 1991).

한편, 알코올 발효사료처리에 따른 *in vitro* 배양과정동안 pH 변화를 조사한 결과는 Fig. 2 와 같다.

AFS 및 AFB의 *in vitro* 배양과정 동안 pH 변화를 조사한 결과 배양 2시간에 알코올 발효 사료구들이 대조구의 pH 보다 낮게 나타났던 것은 배양전 알코올 발효사료의 pH가(Table 2) 대조구 보다 낮았기 때문으로 판단된다. 그러나 배양 2시간부터 시간이 경과함에 따라 대조구의 pH가 꾸준히 저하되었으나 AFS구는 배양 2시간부터 4시간까지, AFB구는 배양 2시간부터 6시간까지 다소 증가하였다가 감소하는 경

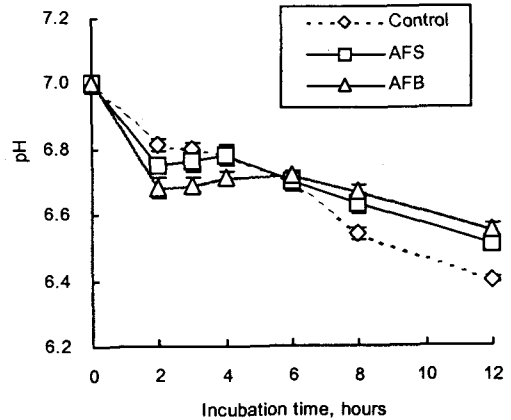


Fig. 2. The pH changes of AFS and AFB over *in vitro* incubation time.

향을 보였다. 이는 알코올 발효사료처리에 따른 반추미생물의 발효활성 저하와 밀접한 관계가 있으며, 알코올 발효사료구에 존재하는 lactate, 감소된 발효성 당 및 낮은 pH 등으로 인해 대조구보다 알코올 발효사료구들의 반추미생물의 증식이 늦어지기 때문으로 판단된다. 반면에 배양 6시간 이후부터 12시간 사이에는 배양액의 pH가 대조구보다 발효사료구들에서 높게 나타났는데($p < 0.05$), 이는 발효사료구들에서 반추미생물에 의한 발효산물의 축적이 대조구에서 보다 적은 반면, 알코올 발효사료 중에 존재하는 live yeast의 pH 조절효과(Nisbet, 1991; Chaucheyras 등, 1995) 때문인 것으로 판단된다.

2. 배양액중의 알코올 농도 변화

AFS 및 AFB구의 *in vitro* 배양과정 동안 알코올 함량변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다.

In vitro 배양액의 알코올 농도는 알코올 발효사료의 첨가로 배양 2시간에 5.0(AFS) 및 5.7 mg/dl(AFB)로 증가하였으며, 대조구는 0.7 mg/dl로 경미한 증가를 보였다. 또한 AFS 및 AFB 구는 배양 12시간에 각각 7.4 및 8.2 mg/dl로

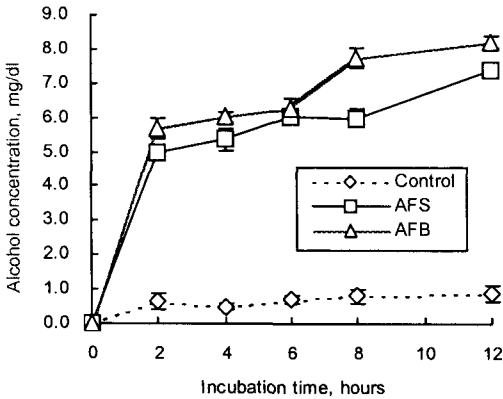


Fig. 3. Changes of alcohol concentration during *in vitro* incubation of alcohol-fermented feedstuffs.

높게 나타나 배양 2시간째보다 각각 48.0 및 43.9%씩 증가되는 결과를 보였다($p < 0.05$). 그러나 대조구는 배양 12시간에 알코올 농도가 0.9 mg/dl로 *in vitro* 배양과정에서 알코올 농도의 변화가 크지 않은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 반추미생물에 의한 알코올 이용효율은 저조한 반면에 *in vitro* 배양과정동안 알코올 발효사료 처리구에서는 알코올이 계속적으로 생성되었을 것으로 판단된다. 따라서 알코올 발효사료는 발효사료중에 존재하는 live yeast균 때문에 반추위내 알코올 생성을 가능하게 할

것으로 판단되는데, Kung 등(1997)은 반추위액을 이용한 *in vitro* 실험에서 yeast culture를 사료 10g 당 200 mg을 첨가하여 배양할 시 배양 14시간까지 live yeast균을 발견할 수 있었고 맥이즙을 첨가할경우 알코올을 생성하였다고 보고한 바 있다. 한편, Thauer 등(1983)은 반추위내에서 수소(H_2) 분압이 높을 경우 반추미생물은 발효과정에 생성되는 acetyl-CoA를 acetate로 전환시키지 못하고 ethanol로 환원시킨다고 보고하고 있어 알코올 생성은 pH 변화와도 관계된다. 본 실험의 결과에서 대조구의 pH가 배양시간이 경과하면서 알코올 발효사료 처리구에 비해 낮게 나타났음에도 불구하고 알코올 농도가 증가하지 않으므로 발효사료 처리구의 알코올 농도의 증가는 pH 저하와 관계없이 알코올 생성균에 의한 것으로 사료된다.

3. 휘발성 지방산의 생성량 및 조성 변화

알코올 발효사료 처리에 따른 *in vitro* 배양액 중의 총 휘발성지방산(TVFA) 농도 변화 및 각종 휘발성지방산의 조성비율의 변화는 Fig. 4, 5 및 6에서 나타낸 바와 같다.

In vitro 배양액중의 TVFA의 농도는 배양 2

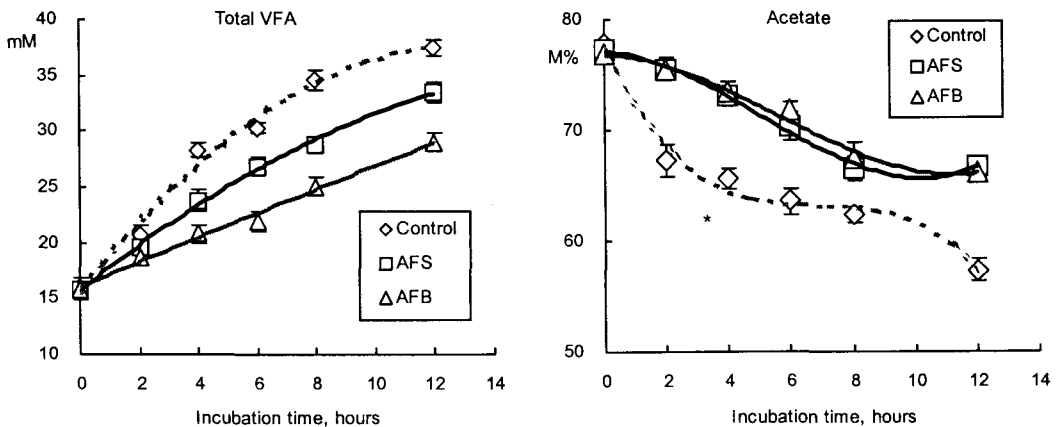


Fig. 4. Changes in molar concentration of total volatile fatty acid and molar percentage of acetic acids during *in vitro* incubation of alcohol-fermented feedstuffs.

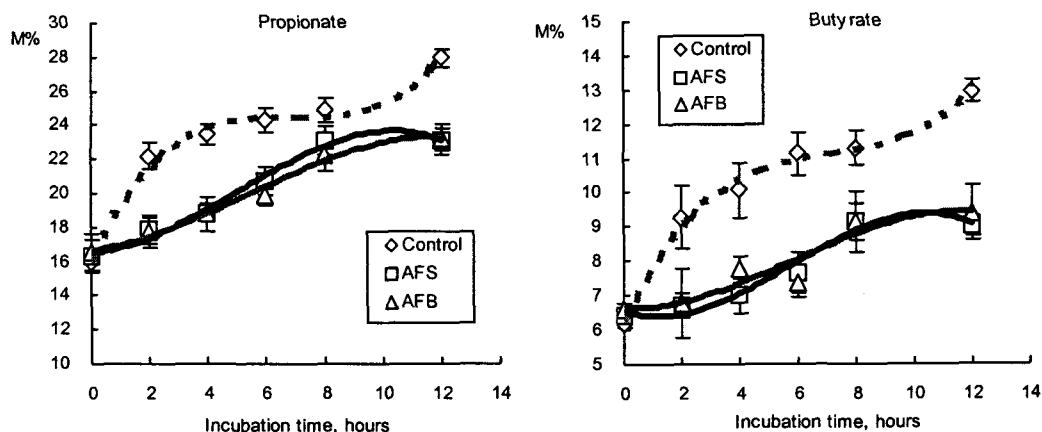


Fig. 5. Changes in molar percentage of propionic and butyric acids during *in vitro* incubation of alcohol-fermented feedstuffs.

시간까지 처리간에 유사한 수준으로 나타났으나 배양 4시간에 대조구가 28.3 mM로 나타나 AFS 및 AFB구의 23.8 및 20.8 mM 보다 높았으며, 배양 12시간에 AFS 및 AFB구가 대조구에 비해 12.5% 및 28.1% 감소하는 결과를 보였다(Fig. 4). 이러한 결과는 알코올 발효사료 발효과정에서 생성되는 대부분의 발효성 당(zymohexose)과 알코올 및 젖산발효에 이용되며, 반추미생물의 증식을 억제하는 효과가 있어(Tagg 등, 1987; Lindgren 등, 1990; 大槻 등, 1991) 반추위내 발효를 저하시키므로 VFA 생성 비율을 떨어뜨리는 것으로 판단된다. 今井 등(1996) 및 淺井 등(1991)은 비지박 발효사료를 소에게 급여시 반추위내 발효속도가 현저히 낮아진다고 보고하고 있다. 또한 AFB구의 TVAF 함량이 AFS구 보다도 낮게 나타난 것은 AFB구의 알코올 함량이 AFS구 보다 높았기(Fig. 3) 때문으로 판단된다.

한편, 대조구의 TVFA 생성 속도는 배양 2시간부터 4시간 사이에 3.88 mM/h이었으며 배양 4시간부터 8시간사이에 1.57 mM/h로 나타나 시간이 경과함에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 이는 발효과정이 발효초기에 가용성 탄수화물이 분해되고 시간이 경과함에 따라 세포벽

성분(NDF)이 분해되기 때문으로 판단된다. 또한, 배양 8시간부터 12시간 사이에 TVFA 생성속도(0.72 mM/h)가 더 한층 낮아진 결과는 NDF 분해속도의 감소와 발효산물의 축적으로 pH가 저하되었기 때문으로 판단된다. 그러나 각각의 알코올 발효사료 처리구들의 TVFA 생성속도(AFS, 1.48 mM/h; AFB, 1.10 mM/h)가 배양후기에도 저하되지 않은 것은 초기단계에 발효사료부터 유입되었던 lactate 등이 반추미생물에 의해 분해되면서 반추미생물의 증식이 서서히 회복되었기 때문으로 판단된다.

한편, 휘발성 지방산의 조성비율을 조사한 결과 acetate 생성비율은 배양 2시간에 대조구가 67.3 M%로 AFS 및 AFB의 75.45 및 75.48 M%에 비해 낮은 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 배양 8시간부터 12시간 사이에 acetate 생성비율은 대조구가 급속히 감소하지만 각각의 처리구들은 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 한편, propionate 생성 비율은 배양 2시간에 대조구에서 22.2 M%로 AFS 및 AFB구의 17.8 및 17.7 M%에 비해 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), 배양 8시간부터 12시간 사이에 대조구가 급속히 증가하였으며 각각의 처리구들은 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타

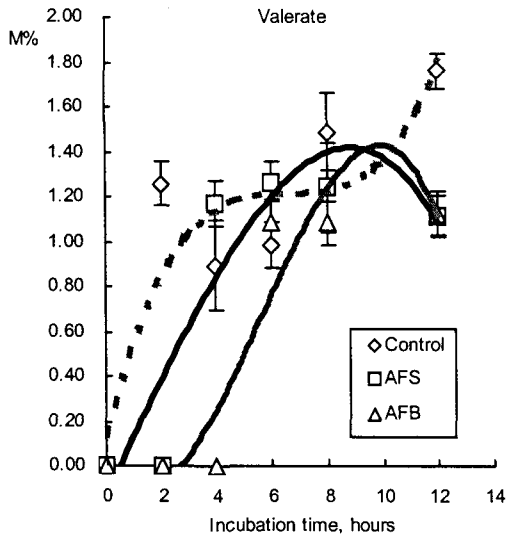


Fig. 6. Changes in molar percentage of valeric acid during *in vitro* incubation of alcohol-fermented feedstuffs.

났다(Fig. 5). 이는 배양시간이 경과하면서 대조구는 발효과정에 생성되는 대사성 수소제거를 위해 lactate-propionate 생성과정이 촉진되나(星野 등, 1981; 宮崎 등, 1989) 알코올 발효사료 처리구들은 알코올 발효사료로부터 유입되는 젖산에 의해 젖산생성과정이 억제되기 때문으로 판단된다. Butyrate 생성 비율은 배양 2시간에 대조구가 9.3 M%로 AFS 및 AFB구의 6.7 및 6.8 M%에 비해 높은 수준으로 나타났으며, 배양 8시간부터 12시간 사이에 butyrate 함량은 대조구에서 뚜렷이 증가하는 한편, 처리구들은 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 또한 lactate와 밀접한 관계가 있는 valerate는 대조구, AFS 및 AFB가 각각 배양 2, 4 및 6시간부터 생성되기 시작했으며 각 처리구의 배양액의 pH가 하향곡선을 긋는 시점과 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 2, 6). 또한, butyrate 함량은 배양 8시간부터 12시간 사이에 대조구에서 급속히 증가하였지만 각 처리구들은 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타나 알코올 발효사료 처리는 반추미생물의 발효속도를 지연

시킬 뿐 만 아니라 알코올 처리의 경우 acetate, propionate, butyrate 및 valerate 생성비율을 일정한 수준으로 유지시키는 것으로 판단된다. 그러나 caproate는 각각의 처리구들에서 전체 배양시간(12시간)동안 생성되지 않는 것으로 조사되었다.

본 실험결과에서 알코올 발효사료는 다량의 젖산과 낮은 pH로 반추위내 발효활성을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단되며, 농후사료 다급에 의한 젖산발효과정을 억제하지만 젖산 이용효율을 증가시키는 것으로 추정된다. 또한 농후사료 다급시에 대사성 수소의 제거방식은 주로 lactate→propionate→butyrate→valerate 형식의 대사과정을 경유하나, 알코올 및 알코올 발효사료처리는 acetate→butyrate→valerate→caproate 형식의 대사과정을 경유하게 되므로 이들 발효산물간에 일정한 비율로 균형을 유지시켜주는 것으로 판단된다. 알코올 및 알코올 발효사료 처리에 의한 반추위내 이러한 발효 pattern은 젖산생성을 억제하고 농후사료 다급에 의한 반추내 산성 발효를 효과적으로 조절할 것으로 판단된다.

4. NDF 분해율

비지박 및 맥주박 알코올 발효사료에 대한 *in vitro* 배양과정 동안의 NDF 분해율을 측정 한 결과는 Fig. 7에서 나타나 있다.

배양 4시간까지 대조구의 NDF 분해율은 AFS 및 AFB구보다 낮은 결과를 보였으나, 배양 4시간부터 대조구는 AFS 및 AFB구보다 NDF 분해율이 높은 결과로 나타났다. 이러한 결과는 알코올 발효사료를 급여함으로써 사료 중의 세포벽성분의 분해속도를 지연시키기 때문으로 판단된다. 발효산물(알코올 및 젖산 등)을 함유하는 알코올 발효사료는 미생물의 증식을 억제하는 효과가 있으며(Lindgren 등, 1990)

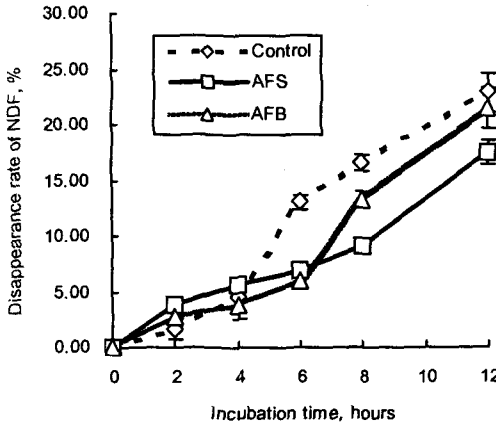


Fig. 7. NDF disappearance rates of AFS and AFB during *in vitro* incubation.

섬유소 분해균의 빠른 증식에 필요한 가용성 탄수화물의 부족으로 이들의 증식을 둔화시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 배양 12시간후의 AFB구의 NDF 분해율은 총 휘발성 지방산의 생성속도가 가장 저조했음에도 불구하고 대조구의 NDF 분해율과 유사한 수준을 보인 것은 가용성 탄수화물의 발효억제, ammonia 농도의 감소, 휘발성지방산 생성비율 및 높은 pH로 인해 섬유소 분해균의 증식이 활발하였기 때문으로 판단된다. 또한 AFB구의 알코올 농도는 AFS구의 알코올 농도보다 높았음에도 불구하고 높은 섬유소 분해율을 보인 것은 알코올 발효사료중에 존재하는 yeast균과 관련되는데, live yeast균은 섬유소 분해균의 증식을 촉진할 뿐만 아니라(Dawson 등, 1990; 이, 1999a,b), 반추미생물의 젖산이용 속도를 증진시켜(Nisbet, 1991) pH를 안정화시키므로 섬유소 분해균의 증식에 대한 알코올의 억제효과를 경감시켜주기 때문으로 판단된다.

이상의 결과로부터 알코올 발효사료는 pH가 낮고 다량의 젖산을 함유하고 있어 반추위내 발효 pattern을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 젖산은 propionate로 전환되는 과정에 대한 억제효과가 크며, acetate 생성비율

은 증가시켜주나 acetate, butyrate 및 valerate간에 일정한 비율을 유지시켜주어 반추미생물의 발효 pattern을 조절하여 주는 작용이 있는 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 실험은 알코올 발효사료 처리에 따른 *in vitro* 발효 pattern의 변화를 검토하기 위하여 반추위내 ammonia, pH, alcohol 및 volatile fatty acids 농도와 NDF 분해율에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다. 비지락 알코올 발효사료(AFS)는 비지락(DM 20%)과 시판중인 배합사료(DM 87%)를 각각 50:50의 비율로 혼합하고 당밀 5%, yeast 0.5%를 첨가한 후 30°C에서 24시간 혐기적으로 배양하여 제조하였으며, 맥주박 알코올 발효사료(AFB)는 맥주박(DM 25%), 비지락(DM 20%), 옥분 및 시판중인 배합사료를 각각 25:25:25:25의 비율로 혼합하고 당밀 5%, yeast 0.5%를 첨가한 후 제조하였다. 시험구 처리는 배합사료를 급여하는 대조구(control), 비지락 및 맥주박 알코올 발효사료(AFS구 및 AFB구)를 첨가하는 처리구를 각각 AFS 및 AFB구로 나누어 실시하였다. 조사항목은 배양 0, 2, 4, 6, 8 및 12시간별로 배양액을 채취하여 배양액의 alcohol 농도, ammonia 농도, pH, VFA 농도 및 NDF 분해율의 변화를 조사하였다. 배양액의 ammonia 농도는 배양 2시간에 대조구 11.84 mg/dl 보다 AFS구 및 AFB구에서 각각 12.47 및 12.85 mg/dl로서 높은 결과를 보였다(p<0.05). 배양 6시간까지의 pH는 대조구보다 AFS 및 AFB구가 현저히 높게 나타났으며, 배양시간이 경과하면서 AFS 및 AFB구들이 대조구에 비해 낮아지는 것으로 나타났다(p<0.05). 배양액의 알코올 농도는 AFS 및 AFB구에서 배양 12시간에 대조구보다 각각 43.9 및 48.0%씩 증가하는 것으로 나타났다

($p < 0.05$). Acetate 농도는 배양시간이 경과함에 따라 대조구는 빠른 속도로 감소하였으며 AFS 및 AFB구들은 다소 감소하는 결과로 나타났다. Propionate 및 Butyrate 농도는 배양 전기간 동안 대조구보다 AFS 및 AFB구에서 현저하게 낮게 나타났다($p < 0.05$). 배양 4시간까지 NDF의 분해율은 대조구에 비해 AFS 및 AFB구가 높았으나, 배양 4시간 이후부터 대조구에 비해 AFS 및 AFB구가 낮은 결과로 나타났다($p < 0.05$). 이상의 결과로부터 알코올 발효사료는 반추위 내에서 반추미생물의 발효 pattern을 조절하여 주는 작용이 있는 것으로 판단된다.

V. 사 사

본 연구는 강원대학교 동물자원공동연구소의 실험기자재를 이용하여 실험분석을 하였기에 이에 감사드립니다.

VI. 인용 문헌

1. 신종서, 박병기. 2006. Alcohol 사료가 *in vitro* 반추위내 pH, ammonia, alcohol 및 volatile fatty acids 농도에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 48(1) 91-100.
2. 신종서, 박병기, 김병완. 2005. *Aspergillus oryzae* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 첨가하여 제조한 주박 위주 발효사료의 발효 특성 및 영양학적 특성. 한국초지학회지 25(4): 297-306.
3. 엄창국, 박병기, 박재인, 김창혁, 고용균, 김종복, 홍병주, 신종서. 2002. 알코올 발효사료 급여가 반추내 발효성상 및 미생물 단백질 합성에 미치는 영향. 강원대학교 동물자원연구. 13: 207-219.
4. 이 은. 1999a. 분말알코올의 급여수준이 농후사료 다급시 한국재래산양의 제1위 내 미생물상에 미치는 영향. 한국낙농학회지 21(3):193-200.
5. 이 은. 1999b. 분말알코올의 급여수준이 농후사료 다급시 한국 재래산양의 제1위 내 발효 및 효소활성에 미치는 영향. 한국낙농학회지 21(3): 201-206.
6. 임광철, 라창식, 신종서. 2001. 알코올 발효사료

의 발효특성 및 영양소 변화특성에 관한 연구. 강원대학교 농촌개발연구. Vol 5:169-182.

7. 정유열, 이 은. 1996. 조사료 다급시 분말 알코올의 첨가가 한국재래산양의 제 1위내 미생물상과 발효양상에 미치는 영향. 한국낙농학회지. pp. 1-6.
8. Andree Durix, C., H. Jean-Blain, P. Sallmann and J.P. Jouany. 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.
9. AOAC. 1990. Official method of analysis(15th Ed.). Association of official analytical chemists, Washington, DC.
10. Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin and P. Gouet. 1995. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 61:3466.
11. Dawson, K.A., K.E. Newman and J.A. Boling. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. J. Anim. Sci. 68: 3392-3398.
12. Kung, L.JR., E.M. Kreck, R.S. Tung, A.O. Hession, A.C. Sheperd, M.A. Cohen, H.E. Swain and J.A.Z. Leedle. 1997. Effects of alive yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. J. Dairy Sci. 80:2045-2051.
13. Kurihara, Y., T. Takechi and F. Shibata. 1978. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen of sheep fed on a purified diet. J. Agric. Sci. amb. 90:373-381.
14. Lindgren, S.E. and E.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87:149-164.
15. Nisbet, D.J. and S.A. Martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *selenomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. 69:4628-4633.
16. SAS. 1999. SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute, Cary, NC, USA.
17. Tagg, J.R., A.S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1987. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bac-

- teriol. Rev. 40:722-756.
17. Thauer, R.K. and A. Kröger. 1983. Energy metabolism of two rumen bacteria with special reference to growth efficiency, *In* Herbivore nutrition in subtropics and tropics. Intern. Symp. on herbivore nutrition in the subtropic and tropics pretoria. pp. 5-9.
 18. 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.
 19. 日野常男, 家田武史, 宮崎孔志. 1991. ルーメン微生物によるトリグリセリドの加水分解とリノール酸水素添加に及ぼすエタノールの影響. 日畜會報. 62:1009.
 20. 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.
 21. 浅井貴之. 1991. 豆腐粕の飼料特性. デーリイマン.
 22. 星野貞夫. 1981. 牛の生産性とルーメン醗酵. ルリノロジー研究者のつどい. pp. 21-37.
 23. 川西隆智. 1989. 豆腐粕醗酵飼料の肉用繁殖牛への給與. 畜産の研究 第43巻 第12号. pp. 1374-1376.
 24. 今井明夫. 1996. 豆腐粕混合飼料による乳用去勢牛の低 cost 肥育法, 畜産の研究 第50巻 第4号. pp. 487-491.