

미국산과 인도산 옥수수의 steam flaking 처리가 공정라인별 mycotoxin 함량의 변화와 *in vitro* 발효 특성에 미치는 영향

이신자[†] · 이지훈[†] · 신년학 · 한정훈 · 현종환 · 문여황¹ · 이성실*

경상대학교 응용생명과학부(BK 21), ¹진주산업대학교 동물생명과학과

Received September 1, 2008 / Accepted December 23, 2008

Effects of Steam Flaking of Corns imported from USA and India on the *in vitro* Fermentation Characteristic and the Mycotoxin Contents of Logistic Processing Line. Shin Ja Lee[†], Ji Hun Lee[†], Nyeon Hak Shin, Jung Hun Han, Jong Hwan Hyun, Yea Hwang Moon¹ and Sung Sill Lee*. *Division of Applied Life Science(BK 21 Program), Graduate School of Gyeongsang National University, ¹Department of Animal Sci. & Biotech, Jinju National University* - The objective of this study was to examine the effects of steam flaking treatment of corn grains imported from USA and India on *in vitro* gas production, microbial growth and contents of aflatoxin B₁ and ochratoxin A. Each treatment was composed of total 4 treatments including ① USCW (US corn-whole type), ② USCF (US corn-flaked type), ③ IDCW (India corn-whole type) and ④ IDCF (India orn-flaked type) with 4 replications × 6 incubation times (3, 6, 9, 12, 18 and 24 hr). Mycotoxin (aflatoxin B₁ & ochratoxin A) contents in test corns tended to increase gradually with increasing logistics periods from the harbor, hopper, silo to processing line. The contents of aflatoxin B₁ in India corn (IDCW) and US corn (USCW) were 11.71 and 1.78 ppb, respectively when measured at the hopper. After steam flaking, both contents of aflatoxin B₁ in USCW and IDCW were 0.00 ppb. It means that *Aspergillus flavus* could be decreased by steam flaking. However, this trend was not observed in ochratoxin content. The gas production rate of USA corns (USCW & USCF) was significantly ($P < 0.05$) higher than India corns (IDCW & IDCF), and that of steam flaked corns (USCF & IDCF) was higher 1.5~2% than whole corns (USCW & IDCW) after 3 hr incubation in *in vitro* experiment. pH value was optimally maintained for microbial growth during whole incubation times with the value of 6.05 to 6.54, and was not significantly different between treatments, but USCF was somewhat lower than other treatments. pH value decreased following 12 hr of incubation but gas production increased rapidly during the same period. In addition, *in vitro* microbial growth rates also increased with up to 18 hr of incubation period, thereafter experienced a decrease with extended incubation time. In conclusion, US corn was superior to India corn by origin based on the results of *in vitro* and mycotoxin contents. And steam flaking process of imported corns tended to decrease mycotoxin contents such as aflatoxin B₁ and ochratoxin A as well as improve *in vitro* gas production and microbial growth rates.

Key words : *Aspergillus flavus*, mycotoxin, aflatoxin B₁, ochratoxin A, steam-flaked corn

서 론

최근에 생산과 수송과정 중에 사람이나 동물에게 독성을 유발시키는 곰팡이독소에 관한 관심이 집중되고 있다. 곰팡이 독소를 분비하는 곰팡이에는 *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* 등이 있다[20]. 1960년 초 *Aspergillus flavus*가 오염된 브라질 수입 사료를 먹은 칠면조, 새끼오리 등 수천마리가 집단 폐사한 사고가 발생하였는데, 이것이 aflatoxin B₁ 때문이라는 사실이 밝혀짐에 따라 이에 대한 관심이 집중되었다[21]. 또한 곰팡이들은 여러 생육단계에서 작물에 감염되어 다양한 종류의 곰팡이독소를 생성한다. Aflatoxin B₁은

고온다습한 열대나 아열대 지방에서 생산된 농산물에서 그 오염이 주로 보고된다고 하였다[19]. Aflatoxin B₁은 전 세계적으로 특정지역에서 공급되는 사료와 식품에 오염되는 곰팡이의 대사산물중의 하나로 알려져 있다. 주로 *A. flavus*와 *A. parasiticus*와 같은 곰팡이에서 생성되는 aflatoxin B₁에는 여러 가지 종류의 이성체가 존재하고 있다. 한국과 같은 기후조건에서는 aflatoxin B₁의 생성에 최적이라고 할 수는 없으나, 한국인은 곡류를 주식으로 하고 있으며 곡류가공 식품이나 사료 원료로서 수입 곡류가 함유되어 돼지고기, 소고기, 닭고기 등의 형태로 인체에 식품을 매개로 하여 aflatoxin B₁에 노출될 위험성이 매우 높다고 할 수 있다. 곰팡이 독소의 생성은 작물(옥수수, 쌀, 땅콩 등)의 성장과정과 저장가공과정의 부적절한 조건에서 주로 생성된다고 알려져 있다[20].

또한 ochratoxin A는 신장염, 간의 면역작용 저해, 기형 등을 유발하는 곰팡이독소로서 WHO (세계보건기구)에서는

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5410, Fax : +82-55-751-5410

E-mail : tllswk1000@hanmail.net

[†]These authors contributed equally to this work

사람에게 발암 가능성이 있는 독성물질로 분류하고 있다. 우리나라의 경우 된장, 간장 등 일부 품목의 오염사례가 보고되고 있으며 사람의 혈청에서도 ochratoxin A가 검출된 바 있다[32]. 덴마크, 프랑스, 스웨덴, 스위스, 루마니아 등 10여 개의 국가(주로 유럽)에서 ochratoxin A의 허용기준을 설정하고 있는데, 주로 곡류에 대해 5~50 ppb의 범위로 규제하고 있다.

현재 국내의 허용기준은 aflatoxin B₁은 50 ppb이고, ochratoxin A는 200 ppb로 설정되어 있다[25].

이러한 시점에서 본 연구는 미국산과 인도산 옥수수를 공시하여 공정라인별 mycotoxin의 함량을 측정하고, 증가하고 있는 옥수수의 가격에 대응하여 steam flaking의 효과를 알아보기 위해 *in vitro* 실험을 통하여 반추가축의 발효특성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

공시재료로는 미국산 옥수수와 인도산 옥수수를 사용하여 steam flaking (증기박편) 처리가 공정처리별 mycotoxin 함량의 변화(aflatoxin B₁ 및 ochratoxin A 함량)를 측정하기 위해 부두 하역장에서 채취한 시료, 감해축산업협동조합 사료공장 입고 시 시료, 사이로 저장 2일 후의 시료, steam flake 전의 시료와 steam flake된 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 mycotoxin 함량분석을 위하여 1 mm screen이 장착된 Retsch GmbH ZM200를 이용하여 1,800 rpm으로 분쇄하였다. 또한 *in vitro* 발효성상에 미치는 영향을 구명하고자 원곡상태의 옥수수와 steam flaking 옥수수 등 총 4종을 공시하였다. 공시재료는 2 mm screen이 부착된 Wiley mill에서 분쇄한 다음, 미세한 전분입자를 제거한 후 입자가 600 µm(입자도 표현지수 MF=2.5) 이하가 되도록 처리하여 공시재료로서 사용하였다.

옥수수의 flaking 처리는 steam controller 내의 온도가 70~80°C에서 50분간 증기처리한 후, 5 kg/cm²의 압력으로 박편하여 압편두께가 3 mm 정도 되게 하였다.

공시재료의 일반성분 분석은 시료를 65°C의 건조기에서 3일간 건조시킨 후, 1.00 mm screen이 부착된 실험용 분쇄기(Wiley mill)를 이용하여 입자로 분쇄한 후 사용하였다. 일반성분 중 건물(AOAC 930.15), 조회분(AOAC 942.05), 조단백질(AOAC 984.13, model Tecator Kjeltac 1030 Analyzer), 조섬유(model Tecator Fibertec System M6)의 분석은 AOAC [1] 방법에 준하였으며, NFE는 OM함량에서 CP와 조지방 EE 그리고 CF함량을 제하여 계산하였다. 칼슘과 인의 함량은 Schwarzenbach 등[38]의 방법과 UV-vis spectrophotometer (UVmini-1240, Japan)로 분석하였다. 원산지별 공시재료 옥수수의 화학적 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Chemical composition of test corns by origin

Chemical composition	Corns ¹⁾	
	USA	India
Moisture (%)	13.75	14.54
Crude protein (% DM)	7.43	8.05
Ether extract fat (% DM)	3.58	3.38
Crude fiber (% DM)	1.21	1.38
Crude ash (% DM)	2.02	2.67
NFE ²⁾ (% DM)	72.01	69.98
Calcium (% DM)	0.02	0.02
Phosphorus (% DM)	0.22	0.29

¹⁾Corns imported from USA (US No. 3 corn) or India.

²⁾NFE: Nitrogen free extracts.

공시축 및 반추위액 준비

반추위액 공여를 위한 공여축으로 평균체중이 550 kg 되는 반추위 누관이 장착된 Holstein (평균체중 550 kg) 수소 2두를 공시하였다. 반추위액 공여축의 사양관리는 농후사료와 볏짚의 급여비율을 40:60으로 하여 체중의 3% 수준으로 1일 2회 (07:00, 19:00) 분할 급여 하였다. Mineral-vitamin block을 자유롭게 섭취토록 하였으며 물은 자유 음수토록 하였다. 급여된 사료의 조성 및 화학성분은 Table 2에서와 같다.

반추위액 공여축 2두의 반추위로부터 fistula를 통하여 공

Table 2. Ingredients and chemical composition of basal diets for rumen-cannulated Holstein bulls

Items	Formula feed	Rice straw
Ingredient, % as fed basis		
Yellow corn	58.8	
Wheat ground	5.0	
Wheat bran	15.0	
Tapioca	8.0	
Cotton seed meal	4.0	
Rapeseed meal	4.0	
Cane molasses	0.9	
Limestone	1.2	
NaCl	1.0	
Vitamin-mineral premix ¹⁾	2.1	
Chemical composition		
Dry matter, %	88.08	87.97
Crude protein, % of DM	12.72	5.12
Ether extract, % of DM	3.29	2.50
Crude ash, % of DM	5.90	17.16
Neutral detergent fiber, % of DM	28.16	82.76
Acid detergent fiber, % of DM	8.17	57.52
Calcium, % of DM	1.02	0.34
Phosphorus, % of DM	0.34	0.11

¹⁾Supplied per kilogram of premix: Vitamin A, 6,000 IU; Vitamin D3, 1,022 IU; K, 0.08%; S, 0.05%; Mg, 0.03%; Zn, 50ppm; Mn, 40 ppm; Fe, 30 ppm; Cu, 10 ppm; Co 0.5 ppm; I, 0.53 ppm; Se, 0.13 ppm.

시동물 당 1,000 ml의 위액을 채취하였다. 반추위액은 오전 사료 급여 3시간 후, *in vitro* 실험 2시간 전에 채취하여 4겹의 cheese cloth로 거른 다음, 동일 양으로 합하여 소화율 측정용 위액으로 사용하였다. 채취한 위액은 미리 보온되고 산소(O₂)가 완전히 제거된 탄산가스(CO₂)인 O₂-free CO₂ gas가 충전된 3,000 ml의 plastic용기에 담아 실험실로 운반하였다. 위액 중의 사료입자에 부착되어 있는 미생물을 분리하기 위하여 homogenizer에 넣고 O₂-free CO₂ gas를 충전하며 강하게 3분간 교반한 다음 30분~1시간 정도 정치시켜 사료입자를 상층액으로 부유시킨 후, vacuum 펌프로 부유된 사료 입자를 완전히 제거하였다. 사료입자가 완전히 제거된 투명한 반추위액과 혐기회석액[6]을 동일한 양으로 희석하여 *in vitro* 실험을 위한 미생물원으로 사용하였다.

실험 설계

옥수수의 가공형태 2 방법(whole corn과 steam flaking)과 원산지 2곳(미국산과 인도산) 총 4가지의 처리구에 처리구별 6 시간대(3, 6, 9, 12, 18 및 24 시간)의 발효시간을 두고, 각 발효시간별 3반복으로 총 72개의 시험관(serum bottle)에서 *in vitro* 실험을 수행하였다.

조사 항목 및 조사 방법

공정라인별 mycotoxin 함량 측정을 알아보기 위하여 aflatoxin B₁과 ochratoxin A 함량측정을 하였다. Aflatoxin B₁ 함량측정을 위해 Vicam사 Series-4 Fluorometer에 mycotoxin calibration standard를 이용하여 standard를 잡은 후, 공정라인별로 채취한 시료 50 g과 NaCl 5 g을 혼합 후 methanol 80 ml와 distilled water 20 ml을 1분간 교반시켜 Vicam fluted filter paper (24 cm)로 1차 여과시킨 후 증류수 40 ml를 혼합한 후 2차 여과시켜 glass syring (10 ml)에 10 ml를 취한다. 이후 aflatest wash buffer 10 ml을 통과시킨 후 distiller water 10 ml를 2회 통과시키고 cuvette에 methanol 1 ml를 aflatest에 통과시켜 모은 후 aflatest developer 1.5 ml를 합하여 series-4 Fluorometer에서 분석을 수행하였다. Ochratoxin A 함량 측정은 aflatoxin B₁ 측정과 같이 측정을 실시하며 전 처리된 시료에 ochraterst wash buffer 10 ml을 통과시킨 후 distiller water 10 ml를 두 번 통과시키고 cuvette에 ochratoxin developer 1.5 ml를 ochraterst에 통과시켜 추출한 후 Series-4 Fluorometer에 넣어 분석을 수행하였다.

In vitro 실험은 Tilley와 Terry [44] 방법을 Moore [27]가 수정한 방법에 따라 수행되었다. 이 방법에서 완충액(buffer solution)은 artificial saliva [23]를 대신하여 Bryant와 Burkey [6]가 사용한 혐기 회석액을 사용하였고 혐기 배양액(anaerobic medium)은 Dehority [7]가 사용한 배양액에서 탄소를 제거하고 사용하였다. *In vitro* 미생물 배양은 4종류의 실험사료 0.5 g을 각각 혐기 배양액 10 ml가 들어 있는 50

ml용 serum bottle에 첨가한 다음, 24 시간 동안 39°C의 shaking incubator에서 실시하였다. 배양액은 배양을 시작한 후 3, 6, 9, 18 및 24 시간째에 incubator로부터 꺼내어 즉시 가스발생량을 측정한다. 분석을 위한 시료로 사용하였다.

가스 발생량(Gas production)측정은 각 발효시간별로 serum bottle을 shaking incubator (120 rpm)에서 꺼낸 후, 온도에 따른 변화를 감안하여 상온에서 20분간 방치한 다음, 총 가스발생량은 serum bottle내의 head space에 축적된 가스를 water displacement apparatus에 부착된 주사기로 흡입하여 burette내의 물을 밀어 올리는 양(가스압, ml)을 가스 발생량으로 하였다[11].

pH 측정은 가스발생량 측정을 완료한 즉시 Weaton de-capper를 이용하여 serum bottle의 stopper를 제거한 다음 배양액의 pH를 pH meter (Mettler Toledo, MP230)로 측정하였다.

반추위 혼합 미생물에 의한 *in vitro* 발효에 있어서 배양액 중의 미생물 성장률은 각 발효시간대별(3, 6, 9, 12, 18 및 24 시간)로 시험관으로부터 발효액 1.5 ml를 Eppendorf tube에 취하고, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 사료 입자를 제거하고, 상층액을 취하여 14,000 rpm에서 3분간 재 원심분리 하여 미생물 pellet을 침전시킨 다음, 상층액은 제거하고 침전물에 sodium phosphate buffer pH (6.5)를 첨가하여 교반하여 현탁 시켰다. 이 과정을 3회 반복한 후에 spectrophotometer (BIO-RAD Model 680)를 이용하여 550 nm에서 OD (optical density) 값을 비교하여 미생물 성장률을 구하였다.

통계 처리

실험 결과는 SAS package program [37]의 General Linear Mode (GLM) procedure에 따라 처리되었으며, 각 처리구간의 유의성 검증을 위하여 분산분석을 실시한 후, Duncan's multiple range test [10]로 유의성을 검정하였다(P<0.05).

결과 및 고찰

공정라인별 mycotoxin 함량 측정

미국산과 인도산 옥수수의 공정라인별로 aflatoxin B₁과 ochratoxin A 함량을 측정된 결과는 Table 3에 보는 것과 같다. 미국산 옥수수와 인도산 옥수수가 수입되어 부산항에 도착하여 하역작업이 끝난 후의 곰팡이 독소함량을 보면, aflatoxin B₁은 미국산에서는 검출되지 않았으나 인도산에서는 9.95 ppb 수준으로 검출되었다. 그러나 ochratoxin A는 aflatoxin B₁에서와는 달리 미국산에서는 5.81 ppb 수준으로 검출되었으나 인도산에서는 거의 검출되지 않았다. Aflatoxin B₁은 고온다습한 열대나 아열대 지방에서 생산된 농산물에서 그 오염이 주로 보고되고[19] 있는데 본 연구에서도 미국산보다 인도산에서 허용기준치에 육박하는 aflatoxin B₁이 검

Table 3. Mycotoxin including of aflatoxin B₁ and ochratoxin A contents in test corns produced from USA and India sampled in the line of logistics or processing

Sampling spot	Treatments ¹⁾			
	USCW	USCF	IDCW	IDCF
 ppb			
At the harbor	0.00±0.00 ^{CC}	5.81±0.05 ^{BC}	9.95±0.05 ^{AC}	0.01±0.01 ^C
At the intake hopper	1.78±0.01 ^{CB}	5.88±0.03 ^{BC}	11.71±0.07 ^{AA}	0.06±0.01 ^D
2days after stored in silo	1.54±0.25 ^{CB}	5.90±0.01 ^{BC}	10.55±0.05 ^{AB}	0.00±0.00 ^D
Before steam flake	2.62±0.01 ^{CA}	7.73±0.12 ^{BB}	9.46±0.01 ^{AD}	0.07±0.02 ^D
After steam flaked	0.00±0.00 ^{BC}	8.97±0.03 ^{AA}	0.00±0.00 ^{BE}	0.08±0.07 ^B

¹⁾Abbreviated USCW: US corn-Whole type, USCF: US corn-Flaked type, IDCW: India corn-Whole type, IDCF: India corn-Flaked type.

^{a,b}Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different ($P<0.05$).

출되었다.

Aflatoxin B₁의 국가별 허용 기준을 보면, 미국은 모든 식품과 사료에 대해 aflatoxin B₁총량으로서 20 ppb로 제한하고 있으며 유럽연합(The European Union, EU)은 사료에 대한 허용기준만 설정하는데 동물에 따라 5~200 ppb로 되어 있다. 특히 아르헨티나·오스트리아·독일·프랑스 등에서는 유아용 식품에 대해 별도의 기준을 설정, 일반 식품에 비해 더 엄격한 기준을 적용하고 있다. 우리나라는 곡류·두류·땅콩·견과류에 대해 10 ppb로 설정하고 있으며 사료에 대해서도 원료 사료는 50 ppb, 배합사료는 10~20 ppb로 규정하고 있다. Ochratoxin A의 국가별 허용기준을 보면, 덴마크·프랑스·스웨덴 등 주로 EU국가에서 규제하고 있다. 식품은 주로 쌀·보리 등 곡류에 대해 5~50 ppb의 범위로 규제하고 있으며 사료는 이스라엘·스웨덴 등에서 5~30 ppb의 기준을 설정하여 규제하고 있다. EU는 아직 허용기준이 제시되지 않았으나 4~5 ppb 정도로 논의되고 있다. 우리나라는 ochratoxin A에 대한 허용기준 200 ppb로 다른 나라들에 비해 다소 높았다[25].

위에서 언급한 국가별 mycotoxin의 허용 기준을 고려하였을 경우 인도산 옥수수가 항구에 하역될 때 aflatoxin B₁ 함량은 9.95 ppb로 허용기준 이하로 평가되었으나 인도산 옥수수의 aflatoxin B₁ 함량은 허용기준치에 근접하는 아주 높은 수준일 뿐만 아니라 곰팡이는 온도와 습도가 적당하면 급격히 번식하기 때문에 우리나라에서의 운송, 보관, 가공처리, 사료 배합, 배합사료의 유통 기간 중에 곰팡이 독소의 증가는 피할 수 없이 일어날 수 있으므로 대책을 강구하여야 한다. 특히, 미국산 수입 옥수수의 ochratoxin A 함량 5.81 ppb 수준은 EU가 허용기준으로 고려하고 있는 4~5 ppb 수준보다 높은 것으로 이 부분에 대한 정밀한 재검사와 특단의 조치가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

호퍼에 입고되었을 때의 미국산 옥수수의 aflatoxin B₁ 함량은 1.78 ppb, ochratoxin A는 5.88 ppb, 인도산 옥수수의

aflatoxin B₁ 함량은 11.71 ppb, ochratoxin A 함량은 0.06 ppb로서 하역되었을 때보다 소폭 증가하였다. 김해축산업협동조합 사료공장의 silo에서 2일간 저장한 후에 mycotoxin 함량은 호퍼에 입고되었을 때와 큰 차이가 없었다.

Steam flake 처리를 하였을 때 미국산 옥수수와 인도산 옥수수의 aflatoxin B₁ 수치가 0 ppb로 낮아진 것을 볼 수 있었으며 ochratoxin A 수치는 7.73에서 8.97 ppb (미국산) 0.07에서 0.08 ppb (인도산)로 나타났다. Aflatoxin B₁의 중요한 특징 중의 하나는 높은 열 저항성으로 280~300°C에서 분해된다고 보고되고[41] 있지만 본 연구에서는 aflatoxin B₁의 열 저항성에도 불구하고 steam flake 처리로 인하여 aflatoxin B₁ 함량이 거의 검출되지 않은 이유에 대해서는 보다 깊이 있는 연구가 필요하다고 생각된다. 또한, aflatoxin B₁에서와는 달리 ochratoxin A 함량은 steam flaking에 의하여 전혀 영향을 받지 않고 오히려 증가하는 경향이였다.

가스 발생량(Gas production)

옥수수의 원산지와 steam flaking처리가 *in vitro* 가스 발생량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4에서와 같다. *In vitro* 배양 6 시간대를 기준으로 USCW, USCF, IDCW 및 IDCF 처리구의 가스 발생량은 각각 옥수수 1 g당 9.75, 9.97, 9.28 및 9.75 mL로서 원산지별로는 미국산(USCW구와 USCF구) 옥수수가 인도산(IDCW구와 IDCF구) 옥수수보다 가스발생량이 높았으며 가공처리별로는 steam flaking 처리(USCF구와 IDCF구)구와 처리하지 않은 구(USCW구와 IDCW구)에서 차이를 나타내지는 않았다($P<0.05$). 이러한 현상은 모든 반추위 배양시간에서 동일하게 나타나지는 않았으며 반추위 배양 12 시간대에서는 통계적인 차이는 아니지만 위의 결과와는 반대의 경향을 보여 원산지별로는 인도산 옥수수가 미국산 옥수수보다 가스발생량이 높았으며 가공처리하지 않은 옥수수가 steam flaking 처리한 옥수수보다 가스 발생량이 높았다. 옥수수의 원산지와 steam flaking 처리에 관계없이

Table 4. Effects of origins and steam flaking processing of corns on gas production rate in *in vitro* trial

Incubation time (hr)	Treatments ¹⁾			
	USCW	USCF	IDCW	IDCF
	ml/g corn			
3	7.58±1.00 ^{bC}	9.48±0.05 ^{aCD}	9.30±0.14 ^{aC}	9.05±0.29 ^{abd}
6	9.75±0.62 ^{aB}	9.97±0.15 ^{aCD}	9.28±0.59 ^{aC}	9.75±0.15 ^{aCD}
9	11.00±0.25 ^{aB}	10.75±0.38 ^{aC}	11.25±0.05 ^{aB}	10.35±0.44 ^{aC}
12	9.98±0.21 ^{aB}	9.00±0.36 ^{bD}	10.40±0.28 ^{aBC}	9.55±0.23 ^{abCD}
18	11.85±0.93 ^{aB}	12.38±0.33 ^{aB}	10.90±0.64 ^{aB}	11.63±0.33 ^{aB}
24	11.48±0.54 ^{bA}	13.13±0.68 ^{aA}	12.08±0.56 ^{aA}	13.55±0.52 ^{aA}

¹⁾Abbreviated USCW: US corn-Whole type, USCF: US corn-Flaked type, IDCW: India corn-Whole type, IDCF: India corn-Flaked type.

^{a,b}Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different ($P<0.05$).

가스 발생량은 배양 9 시간까지는 급속히 증가하는 추세를 보이다 12 시간대부터는 가스발생량이 적게 나타나는 경향을 보였다. 이러한 현상은 *in vitro* 배양에 있어서 옥수수는 배양 9시간까지 급속하게 분해가 이루어진다는 것을 의미하는 것이다.

Son 등[42]은 옥수수 가공방법이 *in vitro* 건물소화에 미치는 영향을 구명하는 실험에서 two stage 법에 의한 *in vitro* 건물 소화율은 1.5 mm flake 및 분쇄 옥수수(92.3 및 91.2%)가 가장 높았고, 그 다음으로는 2.8 mm 및 3.8 mm flake (83.9 및 83.4%) 처리한 옥수수가 높았고, 가공 처리하지 않은 통 옥수수 L (옥수수 density가 660 g/l인 밀도가 낮은 것, whole corn L)과 H (옥수수 density가 740 g/l인 밀도가 높은 것, whole corn H) (59.5 및 27.2%)는 분쇄하거나 flaking 처리한 옥수수에 비하여 낮았다고 하였다. 그러나 본 연구의 결과에서는 옥수수의 steam flaking 처리에 의하여 가스 발생량이 증가하지 않았다. 이러한 이유는 처리하지 않은 미국산 옥수수(USCW)와 인도산 옥수수(IDCW)를 *in vitro* 실험을 위하여 2 mm screen이 부착된 Wiley mill에서 분쇄한 다음, 미세한 전분입자를 제거한 후 입자가 600 µm(입자도 표현지수 MF=2.5) 이하가 되도록 처리하여 사용하였기 때문이라고 생각된다.

Galyean 등[12]은 반추위내 소화율은 사료입자의 표면적이 넓어질수록 증가한다고 하였는데, 이는 가공처리에 의해 반추위내 미생물이 접촉할 수 있는 면적이 넓어짐으로써 소화율이 증가되기 때문이라고 하였다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험을 위한 시료의 분쇄에 의해 반추위 미생물이 접촉할 수 있는 충분한 공간이 제공됨으로써 flaking 처리의 효과가 상대적으로 인정되지 않은 결과를 초래하였다. 실제로 Son 등[42]은 옥수수 가공방법이 *in vitro* 건물소화에 미치는 영향을 구명하는 실험에서 1.5 mm flaking 옥수수와 분쇄 옥수수 *in vitro* 건물 소화율은 각각 92.3%와 91.2%로서 차이가 없었다.

일반적으로 가스 발생량과 옥수수의 gelatin 함량 그리고 옥수수의 소화율 사이에는 상호 높은 상관관계가 있어 젤라틴 정도가 높을수록 가스 발생량과 소화율이 높는데[4,18,26,40] 이는 steam flaking 처리에 의하여 옥수수의 표면적이 증가함으로써 미생물이 더욱더 잘 공격할 수 있기 때문이다. 또한, 소화율이 증가하면 methane 가스 발생량은 오히려 30% 이상 감소한다[5,18,49,50,51].

가스 발생량과 유효 가스 발생량의 추정치 및 *in vitro* 가스 발생 양상은 각각 Table 5과 Fig. 1에서와 같다. USCW,

Table 5. Effects of origins and steam flaking processing of corns on gas production parameters and effective gas production rate in *in vitro* trial

Gas production parameters	Treatments ¹⁾			
	USCW	USCF	IDCW	IDCF
	ml/g corn			
a	-3.62	5.42	0.03	-2.38
b	15.86	6.03	11.12	13.47
c	0.4011	0.2780	0.6307	0.6536
EGP ²⁾ r=0.06	10.18	10.38	10.18	9.96

¹⁾Abbreviated USCW: US corn-Whole type, USCF: US corn-Flaked type, IDCW: India corn-Whole type, IDCF: India corn-Flaked type.

²⁾EGP: Effective gas production calculated with the equation of $EGP=a+b[c/(c+k)]$, where k is the rate of passage set at 0.06.

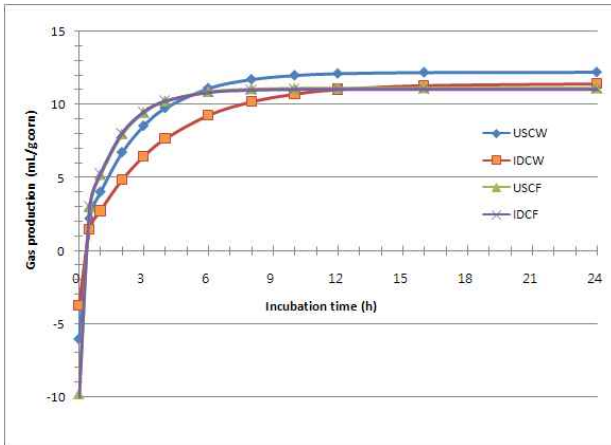


Fig. 1. Gas production rate (ml/g corn) of the test corns, USCW (◆-◆), USCF (▲-▲), IDCW (■-■) and IDCF (×-×) in *in vitro* trial.

USCF, IDCW 및 IDCF 처리구의 가스 발생량 함수는 각각 $GP_{(USCW)} = -3.62 + 15.06(1 - e^{-0.4011t})$, $GP_{(USCF)} = 5.42 + 6.03(1 - e^{-0.2780t})$, $GP_{(IDCW)} = 0.03 + 11.12(1 - e^{-0.6307t})$, $GP_{(IDCF)} = -2.38 + 13.47(1 - e^{-0.6536t})$ 이었으며 유효 가스 발생량은 옥수수 g당 각각 10.18, 10.38, 10.18 및 9.96 ml이었다. 유효 가스 발생량은 옥수수의 원산지나 가공처리방법에 따라 전혀 영향을 받지 않았지만 "a"값과 "b"값은 원산지와 처리방법에 따라 큰 차이를 보였다. USCW, USCF, IDCW 및 IDCF 처리구의 시간당 가스 발생률이 각각 40.11, 27.80, 63.07 및 65.36%로서 상당히 높았는데, 가스 발생량은 발효 9시간 전에 대부분 완료되고 발효 3~6시간대에 가스 발생량의 peak에 도달하는 것을 알 수 있다(Fig. 1).

pH 변화

각 처리구의 *in vitro* 발효시간에 따른 배양액의 pH 변화는 Table 6에서와 같이 TMR 사료의 발효 3시간대의 pH는 6.49~6.54 범위로 시작하여 발효가 진행되면서 점차 낮아지

는 경향을 타내어 발효 24시간대 pH는 6.05~6.20으로 기록되었다. 본 실험에서 보인 발효초기 시간대(발효 3~6 시간대)의 pH의 범위(6.49~6.54)는 정상적인 상태라고 생각되지만 발효후기 시간대(발효 18~24 시간대)의 pH 범위(6.05~6.29)는 매우 높았는데 이는 배양액 중에 첨가되었던 완충용액 때문에 발생한 결과라고 생각된다.

발효 초기(12시간대)에는 높은 pH를 보이다가 12시간이 경과함에 따라 pH가 떨어지는 현상을 보여 일반적인 *in vitro* 실험에서 pH가 감소하기 시작하는 시간대(3~6시간대)보다 매우 느렸다. 옥수수를 분쇄하거나 steam flaking 처리를 하면 가용성 탄수화물인 starch granule의 용해와 분해가 단시간 내에 빨리 이루어지기 때문에[45,52] 짧은 배양시간에도 pH의 감소현상이 두드러지게 나타나지만, 본 실험에서는 *in vitro* 실험 수행 시 artificial saliva [25]를 대신하여 Bryant와 Burkey [6]가 사용한 험기 희석액을 사용하였고 험기 배양액은 Dehority [7]가 사용한 배양액에서 탄소원을 제거하고 사용하였기 때문에 나타난 현상이라 생각된다. 한편, 반추위 내 적정 pH 수준은 약 6.5~6.7로서 pH가 산성이나 염기성 어느 한 쪽으로 치우치게 되면 반추위 내 미생물 활동에 영향을 미쳐 소화가 잘 되질 않게 되는데[28], 본 연구에서는 전체 발효시간에 있어서 적정수준의 pH를 유지하였다.

반추동물과 옥수수의 사료입자도 관계에서, Hart 등[14]과 Hejazi 등[16]은 분쇄옥수수나 steam flaked 옥수수를 급여하였을 경우보다 알곡의 옥수수를 급여하였을 때 안정된 반추위 pH가 유지된다고 하였다. 그러나 단위동물 폐지에 있어서는 옥수수 입자도가 작을수록 영양소 이용성이 높다는 많은 연구 결과들[7,47,48]이 있다. 다만 단위동물에서 옥수수의 고운 입자도로 인한 위궤양 발생율의 증가[15,33,47,48]와 입자도를 감소시키기 위한 에너지 소모량의 증가로 생산비용의 추가를 간과할 수 없으며 이러한 이유들로 국내외 연구진들은 적정 입자도를 찾기 위해 많은 연구를 수행하고 있는데, Behnke [3]의 보고에 의하면 육성-비육돈에서 500~700 microns를 적정 입자도라 하였으며, Wondra 등[47,48]에 의

Table 6. Effects of origins and steam flaking processing of corns on the changes of pH value in *in vitro* trial

Incubation time (hr)	Treatments ¹⁾			
	USCW	USCF	IDCW	IDCF
3	6.54±0.01 ^{aA}	6.49±0.01 ^{bA}	6.51±0.01 ^{abA}	6.51±0.01 ^{abA}
6	6.46±0.02 ^{aB}	6.48±0.00 ^{aAB}	6.49±0.02 ^{aA}	6.46±0.00 ^{aAB}
9	6.44±0.01 ^{aBC}	6.48±0.02 ^{bAB}	6.48±0.01 ^{abA}	6.47±0.01 ^{abAB}
12	6.40±0.01 ^{bC}	6.44±0.01 ^{ab}	6.45±0.00 ^{aA}	6.43±0.01 ^{ab}
18	6.23±0.05 ^{aD}	6.21±0.01 ^{aC}	6.29±0.04 ^{ab}	6.27±0.03 ^{aC}
24	6.05±0.00 ^{aE}	6.12±0.03 ^{bD}	6.20±0.03 ^{abC}	6.14±0.04 ^{abD}

¹⁾ Abbreviated USCW: US corn-Whole type, USCF: US corn-Flaked type, IDCW: India corn-Whole type, IDCF: India corn-Flaked type.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

^{A-E} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

하면 입자도 감소에 따라 영양소 소화율의 향상으로 성장효과를 기대할 수 있다고 보고하였다.

그러나 조사료를 급여하여야 하는 반추동물에 있어서 농후사료만을 급여한 반추위 대사나 소화율에 대한 정확한 정보가 없어 지속적인 연구가 이루어지고 있다[29,31,48,50,52]. 반추동물의 사료 이용성을 향상시키기 위해 곡류를 가공하는 많은 방법들이 연구되어 왔다. 이론적으로 분쇄를 통한 사료입자도의 감소는 사료의 표면적을 증가시키며 실제 비반추동물에 있어서는 소화율 증가에 의한 생산성의 증가를 가져오나, 사료의 입자도를 작게 할수록 분쇄 가공비용은 증가하며, 또한 미세 입자에 의한 생리적 기능의 변화로 각종 부작용이 따른다[8,43,46]. Sharp 등[39]은 육우에 있어서 통옥수수가 분쇄 옥수수 보다 반추위 내에서 acetate가 propionate와 butyrate로의 전환율이 높아 반추위내 에너지 이용율이 증가하였다고 보고하였으며, Oltjen 등[30]은 비육우에 있어 조사료를 급여하지 않고 100% 농후사료만을 급여할 결과 통옥수수를 급여하였을 때 기호성과 증체율이 증가하였고, 반추위 내 VFA와 NH₃-N 함량이 낮은 반면 pH는 높아졌다고 하였다. 일반적으로 6개월령 이하의 어린 반추가축도 저작행위가 가능하므로 가공 처리된 옥수수가 소화율을 증가시킬 수 있으나, 가공비용의 상승수준 이상으로 사료적 가치 상승은 어렵다. 또한 비육우에 있어 고수준의 농후사료를 급여하는 경우 분쇄 옥수수를 급여하는 것 보다 알곡상태의 통옥수수를 급여할 때 5%의 성장률과 7%의 사료효율 개선 효과가 나타났으며, 가공비용을 감안 할 경우 통옥수수 급여구가 생산성 면에서 높았다[17,35].

본 연구에서 9시간대에 steam flaked 처리구의 pH가 증가했다가 이후 다시 감소하는 현상은 반추위 내 cellulolytic bacteria의 수의 감소 및 분해 활동 때문[36]에 일어난 것이라 생각되며 알곡 분쇄 처리구가 steam flaking 처리구에 비해 더 안정된 pH를 보였는데 이것은 원곡 처리구가 steam flaking 처리구보다 더 안정된 반추위 내 산도를 유지한다는 Lee

등[22]의 보고와 일치하였다. Hale [13]은 옥수수를 flaking 처리하면 전분입자가 젤라틴화되고, 반추위 내에서 프로피온산의 생성량을 증가시켜 A/P (acetate/propionate)비를 감소시킨다고 하였다. A/P비가 감소하면 유지율은 하락되는 반면 증체율은 개선된다. 그러므로 전분의 젤라틴화를 향상시키기 위한 flaking 등의 가공처리는 착유우 사료보다는 비육우 사료에 있어서 보다 효과적이라고 할 수 있겠다.

미생물 성장량

In vitro 배양 후 시간대별 미생물이 성장량을 측정한 결과는 Table 7에서와 같다. USCW, USCF, IDCW 및 IDCF 처리구의 발효 6시간대의 미생물 성장량은 각각 0.19, 0.20, 0.20 및 0.18 OD value로서 처리간 통계적 차이 없이 거의 동일하였다. 이러한 현상은 발효 9시간(0.17~0.18의 범위)와 발효 12시간대(0.19~0.23의 범위)에서도 동일하게 발생하였다. 발효 12시간대 까지는 별 차이를 보이지 않다가 이후 미생물의 성장량이 증가하는 것을 볼 수 있었지만 크게 증가하는 모습은 보이지 않았다. 결론적으로 *in vitro* 배양시간대별 미생물 성장량을 측정한 결과는 처리구간 차이가 발생하지 않았고 배양시간의 경과에 따라서도 뚜렷한 미생물의 증가현상을 발견할 수 없었다.

이러한 결과를 얻은 첫 번째 이유는, 실험의 외적 타당성을 높이기 위하여 통옥수수를 가축에게 급여 시 저작에 의한 통옥수수 외피의 손상으로 소실율이 증가되는 현상을 배제시키지 않기 위하여 steam flaking 처리를 한 옥수수나 처리하지 않은 옥수수 모두를 2 mm screen으로 분쇄하였기 때문에 *in vitro* 배양에서 미생물이 사료입자로 attachment 할 수 있는 충분한 공간이 마련되었기 때문이다. 일반적으로 steam flaking 처리 옥수수는 알곡 옥수수보다 배양 초기에 더 많은 양이 소화되며[34], 실제 반추동물을 통한 *in vivo* 실험에서도 steam flaking 옥수수의 섭취는 반추위 내 미생물이 attachment 할 수 있는 표면적이 증가하여 소화율을 크게 향상시

Table 7. Effects of origins and steam flaking processing of corns on the microbial growth rate in *in vitro* trial

Incubation time (hr)	Treatments ¹⁾			
	USCW	USCF	IDCW	IDCF
 OD value (550 nm)			
3	0.18±0.01 ^{aB}	0.19±0.01 ^{aAB}	0.15±0.00 ^{bC}	0.15±0.01 ^{bD}
6	0.19±0.01 ^{aB}	0.20±0.02 ^{aAB}	0.20±0.02 ^{aB}	0.18±0.00 ^{aC}
9	0.18±0.02 ^{aB}	0.17±0.02 ^{aB}	0.17±0.01 ^{aBC}	0.17±0.01 ^{aCD}
12	0.19±0.02 ^{aB}	0.22±0.00 ^{aAB}	0.19±0.01 ^{aB}	0.23±0.00 ^{aB}
18	0.22±0.01 ^{bAB}	0.26±0.00 ^{aA}	0.25±0.02 ^{abA}	0.25±0.00 ^{aA}
24	0.23±0.00 ^{aA}	0.25±0.00 ^{aAB}	0.24±0.01 ^{aB}	0.25±0.00 ^{aA}

¹⁾ Abbreviated USCW: US corn-Whole type, USCF: US corn-Flaked type, IDCW: India corn-Whole type, IDCF: India corn-Flaked type.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts are significantly different (*P*<0.05).

^{A-D} Means with different superscripts in the same column are significantly different (*P*<0.05).

킬 수 있다[2,24,51,52]. 두 번째 이유는, 본 실험에서 *in vitro* 실험 수행 시 artificial saliva [23]를 대신하여 Bryant와 Burkey [6]가 사용한 혐기 회석액을 사용하였고 혐기 배양액은 Dehority [7]가 사용한 배양액에서 탄소원을 제거하고 사용하였기 때문에 *in vitro* 상의 미생물이 성장하기에는 최적의 조건이었기 때문이다. 실제로 USCW, USCF, IDCW 및 IDCF 처리구의 발효 3시간대의 미생물 성장량은 각각 0.18, 0.19, 0.15 및 0.15 OD value로서 미국산 옥수수에서 미생물의 성장량이 인도산 옥수수에서보다 통계적으로 높았지만 ($P < 0.05$) 4처리구 모두에서 미생물 성장량은 매우 높았고 이러한 성장량은 배양 완료 시까지 지속적으로 유지되었다.

요 약

본 연구는 미국산 옥수수와 인도산 옥수수의 steam flaking 처리가 *in vitro* 가스발생량과 미생물 성장량 그리고 곰팡이 독소 aflatoxin B₁과 ochratoxin A의 농도에 미치는 영향을 구명하기 위하여 수행되었다. 실험 설계는 4개의 처리구, ① USCW (미국산 무처리 옥수수), ② USCF (미국산 steam flaking 옥수수), ③ IDCW (인도산 무처리 옥수수) 그리고 ④ IDCF (인도산 steam flaking 옥수수), 처리구당 4반복으로 6개의 발효시간대(3, 6, 9, 12, 18 및 24)를 두고 *in vitro* 실험을 수행하였다. 공시한 옥수수중 aflatoxin B₁이나 ochratoxin A와 같은 곰팡이 독소의 함량은 항구, hopper,사일로 그리고 가공 전까지 보관기간이 길어짐에 따라 증가하는 경향을 보였다. 공정라인별로 곰팡이 독소를 측정할 결과 입고 시 인도산 옥수수(IDCW)와 미국산 옥수수(USCW)의 aflatoxin B₁ 수치는 각각 11.71 ppb와 1.78 ppb로 나타났지만 steam flaking 후의 aflatoxin B₁ 함량은 USCW구와 IDCW구에서 전혀 검출되지 않아(0.00 ppb) steam flaking 처리가 곰팡이 *Aspergillus flavus*를 감소시킬 수 있는 것으로 조사되었다. 그러나 이러한 경향은 ochratoxin A 함량에서 관찰되지 않았다. *In vitro* 실험에서 gas 발생량은 원산지별로는 미국산 옥수수(USCW & USCF)가 인도산 옥수수(IDCW & IDCF) 보다 유의적으로 높았으며 가공 처리별로는 steam flaking 처리한 옥수수가 알곡 옥수수보다 발효 3시간대를 기준으로 1.5~2% 정도 높았다. 배양액 중의 pH는 6.05~6.54의 범위로서 미생물이 성장하기에 적절한 pH를 유지하였으며 처리구간에 유의적인 차이는 찾아 볼 수 없었으나 USCF구의 pH가 다른구에 비해 다소 낮았다. pH는 배양 12시간까지 감소하였으며 이 시간 중에 가스 발생량은 급격히 증가하였다. *In vitro* 미생물 성장량도 발효 18시간까지 증가하다가 그 이후 시간대에서는 성장량이 증체를 보이거나 오히려 감소하는 경향이였다. 결론적으로 원산지별로는 *in vitro* 실험결과와 곰팡이 독소 함량을 기준으로, 미국산 옥수수가 인도산 옥수수보다는 품질이 훨씬 높았으며, 수입산 옥수수의 steam

flaking 처리는 *in vitro* 가스발생량 및 미생물 성장량을 개선시킬 뿐만 아니라, aflatoxin B₁이나 ochratoxin A와 같은 곰팡이 독소를 감소시키는 역할을 하였다.

감사의 글

본 논문은 동물생명산업센터(RAIC)의 지원으로 수행되었으며, 주 연구자는 BK 21 사업단의 박사 후 연구원으로 인건비 지원을 받았습니다.

References

1. AOAC. 1995. Official methods of analytical chemists., Washington, D.C., U.S.A.
2. Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, Y. Dong, B. I. Farr, K. H. Chen, J. T. Huber, C. B. Theurer, R. S. Swingle, J. Simas, S. C. Chan, Z. Wu and J. L. Sullivan. 1994. Effect of steam flaking of corn and sorghum grains on performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* **77**, 1038-1043.
3. Behnke, K. C. 1994. Factors affecting pellet quality. Maryland Nutrition Conference. Dept. of Poultry Science and Animal Science, College of Agriculture, Univ. of Maryland, College Park.
4. Blaxter, K. L. 1989. Energy metabolism in animal and man. Cambridge University press, New York.
5. Blaxter, K. L. and J. L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* **19**, 511-522.
6. Bryant, M. P. and L. A. Burkey. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* **36**, 205-217.
7. Chae, B. J., H. I. Kang, Y. K. Chang, I. K. Han, J. K. Kim, W. T. Cho and M. S. Shim. 1998. The Effect of Corn Practice Size and Pellet Size on Growth and Carcass Traits in Growing-Finishing Pigs. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed* **22**, 81-86.
8. Cole, N. A., R. R. Johnson and F. N. Owens. 1976. Influence of roughage level and corn processing method on the site and extent of digestion by beef steers. *J. Anim. Sci.* **43**, 490-496.
9. Dehority, B. A. and H. W. Scott. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forage by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* **50**, 1136-1141.
10. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **11**, 1-42.
11. Ferorak, P. M. and S. E. Hrwdey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* **4**, 425-432.
12. Galyean, M. L., D. G. Wagner and F. N. Owens. 1979. Corn particle size and site and extent of digestion by steers. *J. Anim. Sci.* **49**, 199.
13. Hale, W. H. 1973. Influence of processing on the uti-

- lization of grains (strach) by ruminants. *J. Anim. Sci.* **37**, 1075-1080.
14. Hart, S. P. and H. A. Glimp. 1991. Effect of diet composition and feed intake level on diet digestibility and ruminal metabolism in growing lambs. *J. Anim. Sci.* **69**, 1636-1644.
 15. Healy, B. J., J. D. Hancock, G. A. Kennedy, P. J. Bramel-Cox, K. C. Behnke and R. H. Hines. 1994. Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.* **72**, 2227-2236.
 16. Hejazi, S., F. L. Fluharty, J. E. Perley, S. C. Loerch and G. D. Lowe. 1999. Effects of corn processing and dietary fiber source on feedlot performance, visceral organ weigh, diet digestibility, and nitrogen metabolism in lambs. *J. Anim. Sci.* **77**, 507-515.
 17. Hixon, D. L., E. E. Hattied and P. E. Lamb. 1969. Comparison of whole shelled corn with cracked corn in cattle finishing diets. *J. Anim. Sci.* **29**, 161.
 18. Johnson, D. E., J. K. Matsushima and K. L. Knox. 1968. Utilization of flaked vs cracked corn by steers with observations on starch modification. *J. Anim. Sci.* **27**, 1431-1437.
 19. Kamimura, H. 1993. Problems with mycotoxin in food sanitation. pp. 10, Hyogo International Center Japan International Cooperation Agency.
 20. Kim, T. M., Y. M. Choi, Y. S. Song, M. J. Seong, J. H. Kim, S. J. Lee, C. B. Park, J. T. Hong, D. J. Kim, J. K. Kang and Y. W. Yun. 2002. Relative toxicities of aflatoxins for carcinogenic risk assessment. *The Annual Report of KNTP.* **1**, 127-143.
 21. Kinsler, T. W., E. F. Davis and M. G. Bolton. 1993. Strategies for chemoprevention against aflatoxin-induced liver cancer. pp. 281-306, *In* Eaton, D. L., J. D. Groopman (eds.), *The Toxicology of Aflatoxins*. Academic Press, New York, USA.
 22. Lee, R. W., M. L. Galyean and G. P. Lofgreen. 1982. Effects of mixing whole shelled and steam-flaked corn in finishing diets on feedlot performance and site and extent of digestion in beef steers. *J. Anim. Sci.* **55**, 475-583.
 23. MacDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep' saliva. *Biochem. J.* **43**, 99-109.
 24. McAllister, T. A., L. M. Rode, D. J. Major, K. J. Cheng and J. G. Buchan-smith. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Can. J. Anim. Sci.* **70**, 571-579.
 25. Ministry of Agriculture. 2005. pp. 222, Feed management statute book.
 26. Moe, P. W. and H. F. Tyrrell. 1979. Methane production in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* **62**, 1583-1586.
 27. Moore, J. E. 1970. Procedures for the two-stage in vitro digestion of forages. 3. pp. 5001-5003, *In* Harris, L. E. (ed.), *Nutrition research techniques for domestic and wild animals*, Vol. **1**, Utah State Univ., Logan, UT.
 28. Mould, F. L., E. R. Ørskov and S. O. Mann. 1984. Associative effects of mixed feeds. I. effects of type and lever of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* **10**, 15-30.
 29. Nocek, J. E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility, A review. *J. Dairy Sci.* **71**, 2051-2069.
 30. Oltjen, R. R., P. A. Putnam, Jr. E. E. Williams and R. E. Davis. 1966. Wheat versus corn in all concentrate cattle rations. *J. Anim. Sci.* **25**, 1000-1004.
 31. Owens, F. N., R. Y. Raney and J. C. Trembiay. 1986. Influence of lebel of feed intake and roughage on small intestinal digestion and passage in steers. *Okla. Agric. Exp. Stn. Anim. Sci. Res Rep. Mp.* **118**, 161.
 32. Park, C. H., H. Y. Oh, O. S. Heo, S. J. Sohn, E. S. Han, J. W. Kim, M. O. Eom. 1997. Safety evaluation of natural toxin. *The Annual Report of Korea Food & Drug Administration.* **1**, 431.
 33. Phillips, J. 1995. Productivity enhancer information (the smaller the pellet the bigger the pig). *Pork ontario section of Farm and Country magazine* **60**, 7.
 34. Ramirez, R. G., H. E. Kiesling, M. L. Galyean, G. P. Lofgreen and J. K. Elliott. 1985. Influence of steam-flaked, steamed-whole or whole shelled corn on performance and digestion in beef steers. *J. Anim. Sci.* **61**, 1-8.
 35. Reinhardt, C. D., Jr. R. T. Brandt, T. P. Eck and E. C. Titgemeyer. 1998. Performance, digestion, and mastication efficiency of Holstein steers fed whole or processed corn in limit- or full-fed growing-finishing systems. *J. Anim. Sci.* **76**, 1778-1788.
 36. Russell, J. B., W. M. Schcarp and R. L. Baldwin. 1979. The effect of pH on maximum bacterial growth rate and of bacterial competition in the rumen. *J. Anim. Sci.* **48**, 251-255.
 37. SAS. 1999. SAS/STAT guide for personal computers @8.01. SAS Inst., Gary., NC., USA.
 38. Schwarzenbach, R. P., P. M. Gschwend and D. M. Imboden. 1993. *Environmental Organic Chemistry*. pp. 681. John Willey & Sons, New York.
 39. Sharp, W. M., R. R. Johnson and F. N. Owen. 1982. Ruminal VFA production with steers fed whole or ground corn grain. *J. Anim. Sci.* **55**, 1505-1514.
 40. Shibata, M., F. Tereda, K. Iwasaki, M. Kurihara and T. Nishida. 1992. Methane production in heifers, sheep and goats consuming diets of various hay-concentrate ratios. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)* **3**, 1221-1227.
 41. Smith, J. E. and M. O. Moss. 1985. Mycotoxins, formation, analysis and significance. pp. 148. New York: John Wiley & Sons.
 42. Son, K. N., Y. K. Kim, S. K. Lee and H. S. Kim. The Effects of Processing Methods of Corn on *In vitro* DM Digestability and *In sacco* Degradability in the Rumen. 2003. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **45**, 433-442.
 43. Theurer, C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* **63**, 1649-1662.
 44. Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two-sage technique for the *in vitro* digesiton of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* **18**, 104-111.

45. Trej, J., W. H. Hale and B. Theurer. 1966. Influence of grain processing factors on the *in vitro* fermentation rate. pp 34. Ariz. Cattle Feeders Day, Tuscon.
46. Vance, R. D., R. L. Preston, E. W. Klosterman and V. R. Cahill. 1972. Utilization of whole shelled and crimped corn grain with varying proportions of corn silage by growing-finishing steers. *J. Anim. Sci.* **35**, 598-605.
47. Wondra, K. J., J. D. Hancock, K. C. Behnke and C. R. Stark. 1995b. Effects of mill type and particle size uniformity on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **73**, 2364-2573.
48. Wondra, K. J., J. D. Hancock, K. C. Behnke, R. H. Hines and C. R. Stark. 1995a. Effects of particle size and pelleting on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **73**, 757-763.
49. Zinn, R. A. 1987. Influence of lasalocid and monensin plus tyrosine on comparative feeding value of steam-flaked versus dry-rolled corn in diets for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* **65**, 256-266.
50. Zinn, R. A. 1990. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* **68**, 776-781.
51. Zinn, R. A., C. F. Adams and M. S. Tamayo. 1995. Interaction of feed intake level on comparative ruminal and total tract digestion of dryrolled and steam-flaked corn. *J. Anim. Sci.* **73**, 1239-1245.
52. Zinn, R. A., F. N. Owen and R. A. Ware. 2002. Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* **80**, 1145-1156.