

혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이로 제조된 synbiotics 첨가 축우용 완전혼합사료의 성분 변화 및 발효 특성에 미치는 영향

이신자 · 신년학 · 정호식 · 문여황¹ · 이상석² · 이성실*

경상대학교 응용생명과학부(BK 21), ¹진주산업대학교 동물생명과학과, ²순천대학교 동물자원과학과

Received November 5, 2008/Accepted February 17, 2009

Effects of Supplemental Synbiotics Composed of Anaerobic Bacteria, Yeast and Mold on the Change of Chemical Composition and Fermentation Characteristics of Total Mixed Ration for Cattle. Shin Ja Lee, Nyeon Hak Shin, Ho Sik Jung, Yea Hwang Moon¹, Sang Suk Lee² and Sung Sill Lee*. *Division of Applied Life Science (BK 21 Program), Graduate School Gyeongsang National University, ¹Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, ²Department of Animal Science & Biotechnology, Suncheon National University* - In order to investigate the effects of synbiotics on change of chemical composition and fermentation characteristics of total mixed ration (TMR), eight TMRs fermented by synbiotics composing the anaerobic microbes (bacteria, yeast, mold) were allotted to the experimental treatments. Treatments were composed of untreated synbiotics(US), bacterial synbiotics (BS), yeast synbiotics (YS), mold synbiotics (MS), bacterial and mold synbiotics (BMS), yeast and mold synbiotics (YMS), bacterial and yeast synbiotics (BYS), and bacterial, yeast and mold synbiotics (BYMS). After 7 days of anaerobic fermentation, fermented-TMRs were exposed to air during 1, 3, 5, 7, 14 and 21 days. One hundred forty four (8 treatments × 6 exposing days × 3 replications) fermented-TMRs were manufactured by vinyl bag sized of 43 cm by 58 cm. The results obtained were as follows. Moisture contents of the fermented TMRs anaerobically ranged from 41% to 45%, and was similar to those of basal TMRs. As results of anaerobic fermentation, the concentration of crude protein was decreased by 11.7% to 14.8% in the untreated sample, while was rather increased by 11% when the TMR was fermented with BMYS. And also BMYS treatment showed decreases by 32% for crude fiber, 15.5% for NDF and 26.1% for ADF. Internal temperature of fermented-TMRs was highest at 7 day of exposing in the air. The pH of fermented-TMR juice was significant difference between treatments after 7 day of exposing in air, and that of BMS was highest at 14 day after exposing in air (P<0.05). Acid buffering capacity was increased in proportion to the exposing day of TMR, and peaked at 7 or 14 days after exposing. Ammonia concentration of fermented-TMRs was highest at 5 day after exposing in the air. Individual volatile fatty acid of fermented-TMR juice was very low level in all treatments. Although BMYS treatment to TMR inclined to increase in crude protein and decrease in fibers, but there were no positive effects on the fermentation characteristics after exposing in the air by supplementation of anaerobic synbiotics to TMR.

Key words : Fermented TMR, bacteria, yeast, mold, silage

서 론

우리나라에서는 TMR이 1990년대에 집단적으로 보급되어, 축우의 조사료 부족 보충수단의 semi-TMR 형태였으나, 미국 영국 등에서는 옥수수 사일리지 중심의 습식 TMR 형태였다. 우리나라에서 유희농지를 활용한 조사료 생산은 기후조건 때문에 건조로 만들기가 어려워 생수분 상태로 밀봉하여 haylage로 만들어 사용하고 있다. 그러나 보관과정에서 영양적 손실이 많고, 개봉 후 변패가 빠르게 일어나므로 고수분의 silage 형태로 발효시켜 이용하는 것이 유리할 것이다. 이러한 관점에서 발효를 시킴으로써 고수분의 유기물 사료를 활용할

수 있는 TMF (Fermented-TMR; Total Mixed Fermentation Feed)는 사료자원이 부족하여 전량 수입에 의존하고 있는 우리나라 실정에 적합한 사료형태라고 볼 수 있다. 일반적으로 발효조건이 좋을 경우는 별도로 미생물을 첨가할 필요가 없으나 그렇지 않을 경우는 발효를 신속하게 일어나게 하고 변패를 방지하기 위하여 미생물을 추가 접종할 필요가 있다. Silage에 유산균을 첨가하면 pH가 신속히 떨어지고, 암모니아태 질소 농도가 감소되며, lactate : acetate 비율이 높아지며[32], proteolysis를 감소시키고, 휘발성 유기산(Volatile organic acids) 생성을 감소시킨다[21]. 반추가축에게 효모 및 효모배양물을 급여하면, 반추위내 발효 특성을 변화시키고[14], 반추위내에서 조단백질과 조섬유의 반추위내 분해율을 개선시키며[34], 체내 소화율[9]을 향상시키는 효과가 있고, 기호성과 섭취량을 증가시킨다[33]. 그러나 호기적 변패는 일반적으로

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5410, Fax : +82-55-751-5410
E-mail : tllsk1000@hanmail.net

효모에 의해 시작되고, 따라서 많은 수의 효모를 가진 사료는 공기 중에 노출되면 불안정하다[35]. 또한 곰팡이는 다양한 단백질 및 탄수화물 분해효소를 생산하므로 그 배양물 및 배양 추출물이 널리 활용되고 있는데[7], 곰팡이가 생산하는 효소는 amylase, xylanase 및 protease 등으로, 이들 효소는 기질 이용성을 증가시킴으로써 사료적 가치를 향상시키고[26], 동물 체내에서 생성되는 내인성 효소의 작용을 보충하여 영양소의 소화 및 체내 흡수를 용이하게 한다[8].

본 시험에서는 이러한 기능을 가지고 있는 미생물 중에서도 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이를 조합한 synbiotic 제제를 TMR에 접종하였을 때, 영양소 함량 변화 및 개봉 후 기간의 경과에 따른 발효특성을 밝혀보고자 수행되었다.

재료 및 방법

시험 설계

본 시험은 기초 TMR사료에 대조구와 7 종류의 미생물 제제를 첨가하여 발효시킨 총 8 처리구를 두었다. 시험설계는 기본 TMR사료에 synbiotic 제제를 첨가하지 않은 US구(Untreated Synbiotics), 혐기성 박테리아와 prebiotics로 만든 BS구(Bacterial Synbiotics; bacterial probiotics + prebiotics), 혐기성 효모와 prebiotics로 구성된 YS구(Yeast Synbiotics; yeast probiotics + prebiotics), 혐기성 곰팡이와 prebiotics로 구성된 MS구(Mold Synbiotics; mold probiotics + prebiotics), 혐기성 박테리아와 효모 복합물 및 prebiotics로 구성된 BYSG구(Bacterial+Yeast Synbiotics; bacterial and yeast probiotics + prebiotics), 혐기성 박테리아 및 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 BMS구(Bacterial + Mold Synbiotics; bacterial and mold probiotics + prebiotics), 혐기성 효모 및 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 YMS구(Yeast+Mold Synbiotics; Yeast and Mold probiotics + prebiotics), 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 BYMS구(Bacterial + Yeast+Mold Synbiotics; bacterial, yeast and mold probiotics + prebiotics)로 나누었다. US구를 제외한 모든 처리구에서의 prebiotics는 mannan oligosaccharide, lactose, sodium acetate 및 ammonium citrate로 구성되었다. Probiotics란 항생물질(antibiotics)에 상대되는 개념으로 생균제라고도 하며 장내의 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주인 동물에게 유익한 효과를 발휘하는 살아있는 미생물 제제[5,12]로서 장관내에서 병원균의 집락 형성을 막아주는 효과를 발휘하는 것이다[22]. Prebiotics란 장내의 유용균을 증식시키는 인자로 장관환경 개선과 숙주의 건강개선에 유의적인 작용을 하는 것으로[6] 올리고당, 식이섬유, 글루콘산 등이 있다. Probiotics와 prebiotics를 포함시킨 것을 synbiotics라고 한다.

각각의 구체적인 미생물명과 Prebiotics의 종류와 함량 및 delivery system은 특허 관련상의 문제로 본 논문에서 생략

하고자 한다. 발효 TMR 사료의 제조에 사용된 Probiotics 균주는 TMF 사료의 물리적·화학적 특성과 최종 TMF 사료의 온도 및 산소 그리고 성장물 등을 고려하여 선발하였다. 선발된 곰팡이는 Difco™ Potato Dextrose Broth 배지에 30°C에서 배양하였고, 박테리아는 Difco™ Lactobacilli MRS Broth 배지에 37°C에서 배양하였으며, 효모는 Difco™ YM Broth 배지를 이용하여 30°C에서 배양하였다. 곰팡이와 효모는 3일에 1회씩 계대 배양 하였고 박테리아는 2일에 1회씩 계대 배양하였다. 모든 배양은 혐기상태에서 이루어 졌으며 혐기 배양장치는 Holdman 등[10], Ogimoto와 Imai [24] 및 Mitsuoka [20]의 방법에 준하여 제작하였다. 8 처리구에 대해 개봉 후 노출기간(1, 3, 5, 7, 14, 및 21일)별 3 반복으로 총 144개(8 처리 × 6 노출시간 × 3 반복)의 TMR bag을 제조하여 처리구에 배치하였다.

시험 사료의 제조 및 시료 채취

기본 사료는 옥수수 flake, 맥주박, 대두피, 파쇄보리, 전지 면실, 벧짚, 페레니얼라이그라스 등 총 18종류의 단미사료 및 첨가제로 구성되어 있는 비육후기용 습식 TMR을 이용하였다. 시험 사료는 기본 사료인 TMR을 vinyl bag 가로 43 cm × 세로 58 cm)에 먼저 1.5 kg을 다져 넣은 후, 공시된 균주액(무 처리구에는 증류수) 100 ml을 고르게 접종하고, 상부에 1.5 kg을 채워 넣고, 잘 섞은 다음, 진공 포장기[AZ-450, (주)인트라즈, Korea]를 이용하여 공기를 배제한 후, heat sealing하여 실온에서 7일 동안 발효시켜 제조하였다. 발효기간은 일반 발효사료의 경우, 약 7일간의 유통기간임을 감안하여 설정하였다. 공시균주의 접종액은 각 미생물이 최대 성장률을 나타내는 시간대로서 박테리아와 효모는 24시간대, 곰팡이는 36시간 계대배양액을 사용하였다.

시료채취는 synbiotic 제제 첨가 7일 후에 bag의 가로 상단부를 개봉하여 1, 3, 5, 7, 14 및 21일 동안 실내에서 노출시켰다. 사료 내 영양소 함량 및 발효 특성을 위한 시료채취는 bag의 개봉 표면 5 cm까지 부분을 제외한 중심부위에서 약 200 g씩 3반복으로 채취하여 대표시료로 하였다.

조사 항목 및 조사 방법

사료의 일반성분 함량은 AOAC [1] 법으로 측정하였으며, 세포벽구성 성분은 Van Soest 등[31]의 방법으로 분석하였다. Hemicellulose 함량은 NDF (neutral detergent fiber)와 ADF (acid detergent fiber)의 차이로 구하였으며, 세포질 구성성분은 100에서 NDF 함량을 제외하여 계산하였다. 건물손실률은 노출시기별로 70°C가 유지되는 drying oven에서 12시간 동안 건조한 다음, 중량을 측정하였다.

7일간 혐기 발효시킨 후, 개봉 1, 3, 5, 7, 14 및 21일째 되는 혐기발효-TMR 사료의 온도 변화는 vinyl bag (가로 43 cm × 세로 58 cm)에 저장된 시험사료의 중앙부위에 -50°C~150°C

까지 측정이 가능한 전자 온도계(THERMOLAB)를 넣어 일정한 시각(12:00)에 각각 측정하였다.

pH는 개봉 후, 노출기간별로 수거한 혐기발효-TMR 시료 50 g에 450 ml의 증류수(pH 7.0)를 첨가하여 homogenizer를 이용하여 1분간 혼합시키고, 4°C냉장고에서 24시간 방치시킨 후, 4겹의 cheese cloth로 여과한 용액을 pH meter (Mettler toledo, MP-230)를 이용하여 측정하였다.

완충능력은 Playne와 McDonald [27]의 방법에 의해 상기 pH 측정을 위한 침출액에 0.1 N HCl로 적정하여 pH를 4.0까지 내리는데 소요된 부피와 0.1 N NaOH로 적정하여 pH를 7.0까지 올리는데 소요된 부피로써 고유 완충능력을 측정하였다.

암모니아태 질소(NH₃-N)는 Chaney와 Marbach [2]의 방법으로 전처리한 후, spectrophotometer (BIO-RAD Model 680)를 이용하여 OD (optical density)값을 측정하여 표준용액과 비교분석하였다.

VFA (volatile fatty acid)는 Erwins 등[4]의 방법으로 다음과 같이 분석하였다. 상기 pH 측정을 위한 침출액 5 ml을 채취하여 12 ml tube에 넣고, HgCl₂ 0.05 ml, H₃PO₄ 1 ml, pivalic acid 0.2 ml을 첨가한 후, 4°C에서 30분간 정치시킨 다음, 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리 후, 상층액 2 ml을 취하여 냉장 보관하였다가 GC (VARIAN CP-3800, USA)를 이용하여 분석하였다.

통계 처리

시험결과는 SAS program의 General Linear Model (GLM) procedure [29]에 따라 처리되었으며, 각 처리구간에 유의성

검증을 위해 분산분석을 실시한 후, Duncan's multiple range test [3]로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

화학적 성분 함량 변화

7일 동안 혐기 발효된 TMR (Fermented-TMR)의 화학적 성분 함량 변화는 Table 1에서 보는 바와 같다. 기초 사료의 수분 함량은 약 41%로서 습식 TMR 이었으며, synbiotics에 의해 7일간 혐기발효과정을 거치면서 BMS구와 YS구에서 약간 증가되었으나, 타 처리구에서는 비슷한 수준에 있었다. 조단백질 함량은 무처리 대조구를 포함하여 타 처리구에서는 기초사료에 비해 약 12 ~ 16%정도 감소하였으나, BMYS 처리구에서는 약 11% 증가되었다. 조지방 함량은 처리간 차이가 없었으나, 조섬유는 BMYS구에서 약 32%나 감소되었으며, 타 처리구에서도 약 25%(US구)에서 8%(BYS구)까지 감소되었다. 조회분 함량도 synbiotics 처리에 의해 10.5%에서 32.6%까지 감소되었다. 그러나 가용무질소물(NFE) 함량에서는 BMS구를 제외하고, 약 5.5~18.2% 증가하였다. Synbiotics를 처리함으로써 기초사료에 비해 NDF 함량은 8.9~16.4% 감소되었고, ADF 함량은 3.8~26.1%까지 감소되었는데, BMYS구에서 조섬유와 더불어 NDF와 ADF의 함량이 가장 많이 저하되었다. BMYS 처리구에서는 조섬유 함량이 원 사료에 비해 약 32%, NDF 및 ADF가 각각 약 15.5% 및 26.1%가 감소되어 혐기발효 동안에 섬유소 분해균의 활성이 활발하게 일어났음을 알 수 있었다.

Table 1. Chemical composition of fermented-TMRs

(% DM)

Nutrients	Basal-TMR	Fermented-TMRs							
		US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS
<i>Proximate composition</i>									
Moisture	40.65	41.69	42.43	43.39	41.64	41.03	45.11	41.51	41.90
Crude protein	9.12	7.77	8.05	7.84	8.04	7.94	7.62	7.91	10.12
Ether extracts	2.78	2.41	2.33	2.39	2.43	2.47	2.58	2.56	2.98
Crude fiber	12.28	9.18	9.99	10.38	9.22	11.34	10.86	10.33	8.34
Crude ash	6.26	4.79	5.32	5.51	4.83	5.60	5.38	5.54	4.22
NFE ¹⁾	28.91	34.16	31.88	30.49	33.84	31.62	28.45	32.15	32.44
<i>Cell wall constituents</i>									
NDF ²⁾	33.26	30.30	28.65	28.83	30.47	30.71	27.82	29.61	28.12
ADF ³⁾	15.32	12.87	14.74	13.47	12.91	13.55	14.08	13.67	11.32
Hemicellulose ⁴⁾	17.94	17.43	13.91	15.36	17.56	17.16	13.74	15.94	16.80
Cellulose	10.98	10.36	10.61	10.21	9.34	10.53	11.09	10.26	8.51
Lignin ⁵⁾	2.97	2.77	3.09	3.25	3.16	2.75	3.20	2.80	2.44
Lignin/NDF ⁶⁾	8.93	9.14	10.79	11.27	10.37	8.95	11.50	9.46	8.68
Lignin/ADF ⁷⁾	19.39	21.52	20.96	24.13	24.48	20.30	22.73	20.48	21.55

¹⁾NFE: Nitrogen-free extracts. ²⁾NDF: neutral detergent fiber. ³⁾ADF: acid detergent fiber.

⁴⁾Hemicellulose: Calculated values (NDF-ADF). ⁵⁾Potassium permanganate lignin. ⁶⁾Lignification index based on NDF.

⁷⁾Lignification index based on ADF.

온도 및 pH 변화

혐기 발효시킨 TMR (Fermented-TMR)의 개봉 후 노출기간 별 온도 변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 개봉 3일째에 MS구와 BS구에서 대조구나 타 처리구에 비해 내부온도가 유의적 ($P<0.05$)으로 높아졌는데, 이는 혐기성 곰팡이나 박테리아를 단독으로 첨가 시, 호기적 변패가 빨리 일어날 수 있음을 시사한다. 개봉 7일째는 대조구를 비롯한 전 처리구에서 높게 나타나 호기적 변패를 일으키는 균들의 활동이 활발함을 나타낸다. 개봉 후, 전 노출기간동안 평균 온도는 MS구와 BS구에서 높았다.

무처리구와 균주를 접종한 처리구의 개봉 후 노출시기별 pH 변화는 Table 3에 나타내었다. 개봉 5일까지는 pH 4.38~4.64 범위로서 처리 간에 차이가 없었으나, 개봉 7일 이후부터는 pH가 높아져 처리 간에 차이가 나타났다. BMS 처리구에서는 개봉 14일째에 pH가 6.11까지 크게 높아진 이후로 전 노출기간 동안 평균 pH가 가장 높아 변패가 빨리 진행되었음을 나타내고 있다.

박 등[25]은 효모가 pH 변화에 적응하는 능력이 낮기 때문에 pH가 높아지면 성장에 쓰일 여러 가지 성분과 효소들이 세포 밖으로 유출되어 다른 미생물이나 가축의 영양소로 이용될 수도 있지만 자신의 성장은 늦어지게 되고, 또한 효모는 유기산이나 산소와의 친화력이 강하기 때문에 pH를 상승시켜 주는 buffer제로서 작용할 수 있다고 하였다.

반추가축의 사료 첨가제로서 이용되는 미생물 배양액은 농후사료의 과다급여 시, 발생될 수 있는 반추위내 pH 저하와 섬유소분해 미생물의 활력 억제 등으로 인한 생산성 감소 현상을 방지할 수 있으며[30], 반추위 혐기성 세균의 증식을 활성화 하고[9] 반추위내 pH를 상승시키는[34] 역할을 한다. 또한 반추가축용 사료첨가제로 사용한 효모가 반추위내에 잔류하는 산소를 제거하여 혐기상태로 만들어 주고, pH를 상승시킴으로써 발효 환경을 개선시킬 수 있다[28]. 그러나 사료 내 pH는 수분함량이 높을 때는 pH 4.0 이하가 되어야 우수한 silage가 되고[17], 건물 함량이 높을 때에는 pH 4.7에서도 우수한 silage가 된다. Kizilsimsek 등[15]은 silage에 lactic acid bacteria를 첨가함으로써 pH를 낮추는 효과가 있다고 하였다. Silage의 건물함량과 pH 간에 상관관계가 있지만 반드시 pH가 낮다고 발효가 잘된 silage라고 보기는 어렵다. Doreau와 Jouany [19]는 젖소 사료에 첨가한 효모가 pH에 영향을 주지 않는다고 하였지만 사료에 전분 함량이 많거나[18] 급여 후 즉시 측정하였을 때[16]에 pH가 낮아진다고 하였다. 본 실험에서 21일까지 시기별로 pH가 높아진 것은 혐기 발효의 진행이 멈추고, 호기적 변패로 유산균 보다는 호기적 변패 미생물이 성장하여 나타난 결과로 생각된다.

완충능력

산에 대한 완충능력은 Table 4에서 보는 바와 같이, 개봉

Table 2. Effects of exposing periods on the internal temperature (°C) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	25.30	25.27	25.33	25.40	25.43	25.83	25.43	25.70	0.33
3	25.30 ^c	31.00 ^b	27.53 ^c	34.23 ^a	25.23 ^c	26.07 ^c	25.53 ^c	25.57 ^c	1.29
5	27.80 ^b	28.20 ^b	25.70 ^c	30.77 ^a	25.97 ^c	25.17 ^c	25.37 ^c	25.60 ^c	0.95
7	29.63 ^{abc}	31.43 ^a	29.30 ^{bc}	30.80 ^{ab}	28.67 ^c	29.10 ^{bc}	28.37 ^c	29.07 ^{bc}	1.00
14	26.10 ^b	27.70 ^a	26.20 ^b	26.23 ^b	27.83 ^a	28.63 ^a	27.70 ^a	28.53 ^a	0.77
21	26.77 ^{ab}	27.13 ^{ab}	26.93 ^{ab}	27.33 ^{ab}	25.93 ^b	28.20 ^a	27.97 ^a	26.00 ^b	0.76
Mean	26.82	28.46	26.83	29.13	26.51	27.17	26.73	26.75	0.34

Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P<0.05$).

Table 3. Effects of exposing periods on the pH value of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	4.48	4.45	4.42	4.47	4.40	4.49	4.44	4.40	0.05
3	4.52	4.47	4.50	4.64	4.40	4.53	4.43	4.50	0.14
5	4.56	4.53	4.50	4.38	4.48	4.55	4.44	4.46	0.54
7	4.94 ^a	4.77 ^{abc}	4.55 ^{bc}	4.82 ^{ab}	4.52 ^{bc}	4.53 ^{bc}	4.45 ^c	4.58 ^{bc}	0.19
14	4.63 ^b	4.83 ^b	4.89 ^b	4.73 ^b	4.85 ^b	6.11 ^a	4.61 ^b	5.18 ^b	0.48
21	5.01 ^a	4.58 ^{ab}	4.42 ^b	4.59 ^{ab}	4.55 ^{ab}	5.02 ^a	4.66 ^{ab}	4.69 ^{ab}	0.29
Mean	4.69	4.61	4.55	4.61	4.53	4.87	4.51	4.64	0.04

Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P<0.05$).

Table 4. Effects of exposing periods on the acid buffering capacity of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (ml of 0.1N HCl)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	4.99 ^{abc}	5.49 ^{abc}	4.19 ^{bc}	5.94 ^a	4.19 ^{bc}	5.66 ^{ab}	4.56 ^{abc}	4.05 ^c	0.78
3	5.55	6.17	5.79	6.55	4.32	6.66	5.85	6.30	1.44
5	6.32	6.11	7.07	7.13	4.77	6.57	5.37	5.71	1.40
7	7.91	7.56	6.79	7.71	5.40	6.61	5.45	6.69	1.34
14	6.87 ^c	7.38 ^{bc}	7.81 ^{abc}	6.89 ^c	6.37 ^c	9.29 ^a	6.68 ^c	9.06 ^{ab}	0.93
21	9.42 ^a	6.47 ^c	6.29 ^c	7.27 ^{bc}	5.97 ^c	8.21 ^{ab}	6.25 ^c	7.73 ^{bc}	0.93
Mean	6.84	6.53	6.32	6.92	5.17	7.17	5.69	6.59	0.24

Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P < 0.05$).

후 시간이 경과함에 따라 산의 첨가량이 많아져 완충능력이 높아지는 경향으로서 대체로 개봉 7일 이후부터 시작하여 14 일째에 peak를 이루었다. 이러한 pattern은 pH의 경향과 거의 일정하게 유지되어 pH가 높을수록 산의 첨가에 따른 완충능력은 증가하였다. 따라서 평균 pH가 높았던 BMS, MS 및 대조구(US)에서 산에 대한 완충능력이 컸다.

알카리에 대한 완충능력은 Table 5에서 보는 바와 같이 개봉 후 시간의 경과에 따른 일정한 pattern을 찾을 수 없고, pH의 결과와도 무관하게 변화하였다. 전체적인 평균값은 YMS구에서 높았으며, 개봉 후 시간에 따른 최저치와 최고치간의 폭에서도 YMS (12.45~19.87 ml)와 BMS (11.70~19.05 ml)구에서 큰 것으로 나타나 노출시간에 따른 알카리 완충능력의 변화가 심하였다.

Playne과 McDonald [27]은 사료의 완충능력이 반추위내 pH 변화와 acid-base metabolism에 상당한 작용을 한다고 하였고, Jasaitis 등[11]은 화분과 목초와 옥수수에 비해 두과 목초가 완충능력이 높다고 하였다. 또한 사료 중에 단백질 함량이 많고, 조사료의 비율이 높으면 완충능력은 약 2~4배 증가한다고 하였다. 그러나 본 시험에서 나타내고 있는 완충능력은 사료 자체에 존재하는 미생물에 의한 것이므로 실제로 이들 사료를 소가 섭취하였을 때, 반추위에서 일어나는 완충능력의 차이는 다르게 나타날 수 있을 것이다.

암모니아(NH₃-N) 농도

혐기발효 후, 노출시간의 경과에 따른 발효 침출액의 NH₃-N 농도는 Table 6에서 보는 바와 같다. 1일째는 YS와 BMYS 처리구가 타 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 낮았으나, 개봉 후 3일째에는 처리 간에 차이가 없었다. 5일째는 US와 BS구에서 낮았고, 개봉 후 14일과 21일째에는 YS구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 낮았다($P < 0.05$). 발효액 중의 NH₃-N 농도는 사료 중에 포함되어 있는 조단백질이 미생물에 의해 분해되는 정도를 나타내는 것으로 본 시험에서 사료 중 조단백질 함량이 가장 높았던 BMYS구(10.12%)와 US구(9.12%)에서 NH₃-N 농도가 높지 않고, 조단백질함량이 가장 낮았던 BMS(7.62%)구에서 높게 나타났다. 이러한 현상은 첨가된 미생물이 단백질 분해에 관련하는 미생물이 아니라 섬유소 분해를 촉진시키는 작용을 주로 하는 미생물이라고 볼 수 있으나, 본 시험에서 기초사료에 synbiotics를 첨가하여 발효시킴으로써 조단백질과 섬유소 함량이 공히 낮아진 것(Table 1)으로 볼 때, 그렇게 단정 지을 수는 없고, 미생물 상호간의 작용이 처리구에 따라 다르게 나타났기 때문인 것으로 해석된다.

Nishino 등[23]은 lactic acid bacteria (LAB)를 사료에 첨가하면 yeast의 성장을 억제하고 암모니아의 생산을 억제한다고 하였는데, 본 시험에서는 각종 미생물의 단독 혹은 조합 처리

Table 5. Effects of exposing periods on the alkali buffering capacity of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (ml of 0.1N NaOH)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	15.90	18.85	15.83	18.31	16.36	16.30	16.60	16.83	2.04
3	11.87 ^d	14.85 ^b	13.34 ^{bcd}	14.49 ^{bc}	12.68 ^{cd}	14.90 ^b	16.77 ^a	13.67 ^{bcd}	0.98
5	16.57	17.43	18.27	18.43	16.94	18.19	19.87	17.46	2.59
7	14.34 ^{bc}	15.06 ^{abc}	17.55 ^{abc}	13.92 ^c	15.96 ^{abc}	19.05 ^{ab}	19.48 ^a	16.90 ^{abc}	2.52
14	16.44 ^{ab}	14.13 ^{bc}	14.30 ^{bc}	14.62 ^{bc}	13.78 ^{bc}	11.70 ^c	16.85 ^{ab}	19.03 ^a	2.16
21	15.99 ^{abc}	15.27 ^{abc}	13.75 ^{abc}	17.29 ^a	13.52 ^{bc}	16.59 ^{ab}	12.45 ^c	14.76 ^{abc}	1.87
Mean	15.19	15.93	15.51	16.18	14.87	16.12	17.00	16.44	0.24

Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P < 0.05$).

Table 6. Effects of exposing periods on the NH₃-N of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (mg/dl)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	4.19 ^{ab}	4.24 ^{ab}	3.87 ^b	4.22 ^{ab}	4.51 ^a	4.53 ^a	4.12 ^{ab}	3.97 ^b	0.23
3	4.57	4.51	4.22	4.47	4.26	4.31	4.34	4.26	0.22
5	4.28 ^b	4.30 ^b	4.88 ^{ab}	4.82 ^{ab}	4.81 ^{ab}	4.98 ^{ab}	5.08 ^a	4.93 ^{ab}	0.39
7	4.12 ^b	4.32 ^{ab}	4.38 ^{ab}	4.30 ^{ab}	4.45 ^{ab}	4.80 ^a	4.89 ^a	4.72 ^{ab}	0.33
14	3.98 ^c	4.07 ^{bc}	3.62 ^d	3.97 ^c	4.23 ^{bc}	4.30 ^{ab}	4.26 ^{abc}	4.54 ^a	0.16
21	4.18 ^{abc}	4.05 ^c	3.73 ^d	4.40 ^a	4.09 ^{bc}	4.36 ^{ab}	4.20 ^{abc}	4.06 ^c	0.15
Mean	4.22	4.25	4.12	4.36	4.39	4.55	4.48	4.41	0.05

Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P < 0.05$).

Table 7. Effects of exposing periods on the volatile fatty acids of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (mol %)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
----- Acetic acid -----									
1	1.20 ^{abcd}	1.47 ^a	1.43 ^{ab}	1.06 ^{cd}	1.36 ^{abc}	1.03 ^d	1.04 ^d	1.16 ^{bcd}	0.16
3	1.65	1.24	1.58	1.56	1.79	2.25	1.62	1.74	0.52
5	1.24 ^{ab}	1.60 ^{ab}	1.73 ^{ab}	1.42 ^{ab}	1.38 ^{ab}	2.29 ^a	1.70 ^{ab}	1.23 ^b	0.54
7	0.64 ^{cd}	0.63 ^{cd}	0.84 ^{bcd}	0.45 ^d	1.68 ^{ab}	2.22 ^{ab}	0.84 ^{bcd}	1.81 ^{ab}	0.58
14	0.92 ^{ab}	0.63 ^{ab}	0.80 ^{ab}	0.93 ^{ab}	0.31 ^b	0.64 ^{ab}	0.68 ^{ab}	1.58 ^a	0.58
21	1.70 ^a	1.29 ^a	0.50 ^b	0.25 ^b	0.17 ^b	0.21 ^b	0.16 ^b	0.10 ^b	0.27
----- Propionic acid -----									
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
3	nd	nd	nd	nd	nd	0.50	0.39	nd	0.15
5	nd	nd	nd	nd	nd	0.48	0.35	nd	0.03
7	0.33	nd	nd	nd	0.43	0.51	0.38	nd	0.10
14	0.33	0.52	nd	0.37	0.53	1.06	1.12	nd	0.29
21	0.79	0.54	0.37	nd	nd	nd	nd	nd	0.23
----- Butyric acid -----									
1	0.79 ^c	1.04 ^a	1.01 ^a	1.01 ^a	0.99 ^a	0.91 ^{abc}	0.94 ^{ab}	0.85 ^{bc}	0.08
3	0.87	0.93	0.95	0.98	0.97	0.93	0.93	0.93	0.06
5	0.84 ^{ab}	0.78 ^{ab}	0.80 ^{ab}	0.79 ^{ab}	0.61 ^b	0.96 ^a	0.96 ^a	0.62 ^b	0.13
7	1.02	1.18	1.13	0.92	0.99	1.19	1.15	1.03	0.17
14	0.84	1.13	0.95	0.90	0.99	0.83	1.02	0.99	0.20
21	0.96	1.04	1.24	nd	nd	nd	nd	nd	0.32

Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P < 0.05$).

nd: not detected.

시, 평균 NH₃-N 농도에서는 차이를 나타내지 않았다.

Martinsson [15]은 암모니아 함량이 10 mg/이 이하의 사일리지가 우수한 사일리지라고 하였는데, 본 시험에서는 전 처리구에서 4~5 mg/dl 수준으로 혐기 미생물 발효에 의한 발효조건은 우수한 것으로 사료된다.

VFA 함량

혐기발효 후, 노출시간의 경과에 따른 발효 침출액의 휘발성지방산(VFA) 함량은 Table 7에서 보는 바와 같다.

Acetic acid의 함량은 0.10 에서 2.19 mol % 범위로서 개봉

후 3일에서 5일 사이에 peak를 이루어 시간이 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구인 US구와 박테리아 단독처리구인 BS구에서는 21일 경과 시에 다시 증가하였고, 나머지 처리구에서는 극히 낮은 수준이었다. Propionic acid는 전혀 검출되지 않은 처리구가 많았으며, butyric acid 함량은 acetic acid와 거의 비슷한 수준이었으나 개봉 후 21일째에 곰팡이 synbiotic 구와 복합 미생물 synbiotic 구에서는 전혀 검출되지 않았다.

여러 가지 혐기성 균주를 축우용 TMR에 첨가하여 발효시킨 후, 개봉하여 공기에 노출시켰을 때, 영양소 함량 및 발효특성

변화를 관찰한 본 시험의 결과들을 요약해 볼 때, 미생물 첨가 시 섬유소함량은 낮아졌으며, 단백질 함량도 BMYS구를 제외하고 낮아졌으며, 공기 중 노출기간별 발효 특성에서는 혐기성 synbiotics의 첨가에 따른 영향은 없는 것으로 나타났다.

요 약

본 시험은 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이로 제조한 synbiotics를 TMR에 첨가하여 7일 동안 발효시킨 후, 성분함량의 변화 및 개봉하여 공기 중 노출시킨 기간에 따른 발효특성의 변화를 알아보기 위하여 수행되었다. 처리구는 무처리구인 US구, 혐기성 박테리아와 prebiotics로 구성된 BS구, 혐기성 효모와 prebiotics로 구성된 YS, 혐기성 곰팡이와 prebiotics로 구성된 MS구, 혐기성 박테리아와 혐기성 곰팡이 및 prebiotics를 조합한 BMS구, 혐기성 효모와 혐기성 곰팡이 그리고 prebiotics를 조합한 YMS구, 혐기성 박테리아와 혐기성 효모 그리고 prebiotics를 조합한 BYS구, 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이 복합물과 prebiotics를 조합한 BMYS구로서 총 8 처리구로 나누었다. 개봉 후 노출기간(1, 3, 5, 7, 14, 및 21일)별 3반복으로 총 144개의 bag을 공시사료로 제조하였다. 혐기 발효 TMR의 개봉 후 성분함량과 공기노출에 따른 발효특성에 대한 결과를 요약하면 다음과 같다.

혐기 발효시킨 TMR의 수분함량은 약 41~45% 범위로서 원 사료와 비슷한 수준이었다. 조단백질 함량은 기초 사료에 비해 무처리 대조구에서는 11.7~14.8% 줄어들었으나, BMYS 처리구에서는 약 11%가 증가되었다. BMYS 처리구에서는 조 섬유 함량이 기초사료에 비해 약 32% 감소되었고, NDF 및 ADF도 각각 15.5% 및 26.1%가 감소되었다. 공시사료의 내부 온도는 개봉 7일째에 전 처리구에서 높게 나타났다. 발효 TMR의 pH는 개봉 5일까지는 처리 간에 차이가 없었으나, 개봉 7일 이후부터는 높아졌고, BMS구에서 개봉 14일째에 가장 높았다($P < 0.05$). 산에 대한 완충능력은 개봉 후, 시간이 경과함에 따라 산의 첨가량이 많아져 완충능력이 높아지는 경향으로서 대체로 개봉 7일 이후부터 시작하여 14일째에 peak를 이루었다. 발효 TMR 즙액의 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도는 개봉 후 5일째에 peak를 이루었으며, 휘발성지방산 함량은 매우 낮은 수준이었다.

이상의 결과로 볼 때, BMYS 처리구에서 단백질 함량은 높아지고, 섬유소함량은 낮아졌지만, 공기 중 노출기간별 발효 특성에서는 혐기성 synbiotics의 첨가에 따른 영향은 없는 것으로 나타났다.

감사의 글

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

References

1. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis 16th edition. Association of official analytical chemists, Washington, D. C.
2. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modification reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* **8**, 130-132.
3. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* **11**, 1-42.
4. Erwin, E. S., D. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* **44**, 1768-1770.
5. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bact.* **66**, 365-378.
6. Gibson, G. R. and B. M. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
7. Gomez-Arcon, R. A., C. Dudas, and J. T. Huber. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* **73**, 703-710.
8. Graham, H., L., W. Lowgren, D. Pettersson, and P. Aman. 1988. Effect of enzyme supplementation on digestion of a barley/pollards-based pig diet. *Nutr. Rep. Inter.* **38**, 1073-1079.
9. Harrison, G. A., R. W. Henken, K. A. Dawson, R. J. Harmon, and K. B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial population. *J. Dairy Sci.* **71**, 2967-2975.
10. Holdman, L. V., E. P. Coto, and W. E. C. Moore. 1977. Anaerobic laboratory manual (4th eds.), Virginia Polytech. Inst. and State Univ. Blackburg, Virginia, USA.
11. Jasaitis, D. K., J. E. Wohlt, and J. L. Evans. 1987. Influence of fed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs *in vitro*. *J. Dairy Sci.* **70**, 1391-1403.
12. Kelly, D. 1998. Probiotics in young and newborn animals. *J. Anim. Feed Sci.* **7**, 15-23.
13. Kizilsimsek, M., R. J. Schmidt, and L. Kung Jr. 2007. Effects of a mixture of lactic acid bacteria applied as a freeze-dried or fresh culture on the fermentation of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* **90**, 5698-5705.
14. Martin, S. A. and D. J. Nisbet. 1990. Effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation extract on fermentation of amino acids; bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* **68**, 2142-2149.
15. Martinsson, K. 1991. A comparison between formic acid and an inoculant for the preservation of grass silage for dairy cows. *Swedish J. Agric. Res.* **21**, 121-130.
16. Mathieu, F., J. P. Jouany, J. Sénaud, J. Bohatier, G. Bertin, and M. Mercier. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep, protozoal and probiotic

- interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**, 271-287.
17. McDanald, P. 1981. Clostridia. In the biochemistry of siage, Jihn Wiley and Sons. p. 62. Ltd pitman Press, Bath, Englands.
 18. Michalet-Doreau, B. and D. Morand. 1996. Effect of yeast culture, *Saccharomyces cerevisiae*, on ruminal fermentation during adaptation to high-concentrate feeding. *Ann. Zootech.* **45**, 337.
 19. Michalet-Doreau, B. and J. P. Jouany. 1998. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **81**, 3214-3221.
 20. Mitsuoka, T. 1980. Zonaisaikinno Sekai. *Sobunsha* **21**, 1-34.
 21. Muck, R. E. and L. Kung Jr. 1997. Effects of silage additives on ensiling. pp. 187-199, In Silage: Field to Feedbunk. NRAES-99. Northeast Reg. Agric. Eng. Serv., Ithaca, NY.
 22. Nisbet, D. J., D. E. Corrier, C. M. Scanlan, A. G. Hollister, R. C. Beier, and J. R. Deloach. 1993. Effect of defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. *Avian Disease* **37**, 1017-1025.
 23. Nishino, N. H. Wada, M. Yoshida, and H. Shiota. 2004. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a Total Mixed Ration ensiled with and Without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactocacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* **87**, 2563-2570.
 24. Ogimoto, K. and S. Imai. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan. Scientific Societies Press. Tokyo, Japan.
 25. Park, H. S., Y. H. Yoo, B. S. Jeon, and J. O. Cha. 1996. Effect of Feeding Vianle Yeast and Lactobacillus on Milk Yield and Milk Fat Comntent. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **38**, 77-84.
 26. Pettersson, D., H. Graham, and P. Amen. 1989. Enzyme supplementation of broiler chickens. *Ani. Prod.* **51**, 399-404.
 27. Playne, M. J. and P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and silage. *J. Sci. Food Agric.* **17**, 264-268.
 28. Rose, A. H. 1980. Rent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In Skimmer, F. A., S. M. Passmore, and R. R. Danenport (eds.), Biology and Activities of yeasts. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series 9:103. Academic Press, London. UK.
 29. SAS. 1999. SAS/STAT software for PC. Release 8.01. SAS institute Inc., Cary, N. C., U.S.A.
 30. Song, M. K. and H. J. Sohn. 1997. Effect of Feeding Yeast Diets on Lactating Performance of Dairy Cows. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **38**, 184-190.
 31. Van soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lezis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch poly-saccharides in relation to animal nutrition. *J. dairy Sci.* **55**, 805-810.
 32. Weinberg, Z. G. and R. E. Muck. 1996. New trends in development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 53-68.
 33. Wiedmeier, R. D. and M. J. Arambel. 1985. Effects of supplemental *Saccharomyces cerevisiae* and/or *Aspergillus oryzae* on rumen fermentation. Proceedings, Conference on Rumen Funtion, March 23. Chicago, IL, USA.
 34. Williams, P. E. V., G. A. G. Tait, and G. M. Innes. 1991. Effects of yeast culture(*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows in milk patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* **69**, 3016-3026.
 35. Woolford, M. K. and J. E. Cook. 1978. A note on the effect on the aerobic deterioration of maize silage on the manipulation of the microflora by means of antibiotics. *Anim. Feed Sci. Technol.* **3**, 89-94.