

반추위 섬유소분해 박테리아 배양액의 투여 수준에 따른 한우 반추위 발효에 미치는 영향

박중국* · 정찬성** · 박도연* · 김현철* · 이승철** · 김창현***

한경대학교 생물환경 · 정보통신전문대학원*, 경기도 축산위생연구소**,
한경대학교 동물생명환경과학부***

Effects of Increasing Inclusion Levels of Rumen Cellulolytic Bacteria Culture on *In vivo* Ruminal Fermentation Patterns in Hanwoo Heifers

Joong Kook Park*, Chan Sung Jeong**, Do Yeun Park*, Hyun Cheol Kim*, Seung Cheol Lee**
and Chang-Hyun Kim***

Graduate School of Bio-Environment and Information Technology, Hankyong National University*,
Gyeonggi Livestock Veterinary Research Institute**,
School of Animal Life and Environment Science, Hankyong National University***

ABSTRACT

This experiment was conducted to observe the effects of anaerobic cellulolytic bacteria culture (*Ruminococcus flavefaciens* H-20 and *Fibrobacter succinogenes* H-23) on *in vivo* ruminal fermentation characteristics in Hanwoo heifers. Four ruminally cannulated Hanwoo heifers (221 ± 7.5 kg) receiving a basal diet containing 3 kg of mixture hay (tall fescue and orchardgrass) and 2 kg of concentrate per day were in a 4×4 Latin square with 21-day periods. Treatments were the basal diet without the culture additive (control), the basal diet plus 50 ml/day of bacteria culture of H-20 and H-23 (1%), 150 ml/day of H-20 and H-23 (3%), and 250 ml/day of H-20 and H-23 (5%). In the whole experimental periods, ruminal pH did not differ between treatments. However, the concentration of ruminal ammonia-N was increased in the 3% treatment relative to control and the 1% treatment at 1 hr post-feeding (p<0.05). Avicelase and CMCase (carboxymethyl cellulase) activities in rumen fluid showed no significant difference among treatments. However, xylanase activity was higher in the 5% (119.49, xylose μmol/ml/min) than the 3% treatment (71.02, xylose μmol/ml/min) at 0 hr post-feeding (p<0.05). Concentrations of ruminal total VFA, acetate, propionate and valerate were unaffected by treatments, while butyrate was higher in the 3% treatment (24.48 mM) than control (15.71 mM) at 1 hr post-feeding (p<0.05). Results indicate that minimum 3% inclusion of cellulolytic bacteria cultures improved ruminal fermentation, especially ammonia-N concentration and butyric acid production.

(Key words : Cellulolytic bacteria cultures, Hanwoo heifers, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*)

I. 서 론

반추동물의 생산성을 향상시키기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이를테면 중조(sodium bicarbonate)와 같은 완충제를 사용함으로써 반추위 pH 안정화와 섬유소 소화능력을 향상시킬 수 있으며 (Santra 등, 2003), 모넨신과 같은 항생제를 이용하여 에너지 효율을 개선시킬 수 있다 (Wang 등, 2004). 그러나 완충제의 첨가는 사료의 기호성을 떨어뜨려 사료 섭취량을 감소시키고 (Muck 등, 1990), 모넨신은 유지방 감소현상을 나타내는 등 부작용이 대두되고 있는 실정이다 (Symanowski 등, 1999; Phipps 등, 2000). 또한 이러한 화학제제 및 항생제의 사용은 식품의 안정성과 건강

에 대한 소비자의 인식의 변화로 국내에서 사용이 점차 줄어들고 있으며, 새로운 천연물질을 이용한 미생물제제(direct-fed microbial agents, DFM)의 개발이 시도되고 있다.

DFM의 반추동물에 대한 급여 효과는 반추위내 영양공급과 반추위 미생물의 선택적 활성화에 있다고 볼 수 있다 (Williams와 Newbold, 1990). 현재 상업적으로 시판되는 DFM은 섬유소분해효소 (fibrolytic enzymes), 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*), 젖산균 (*Lactobacillus*) 및 효모배양액 (yeast culture extracts) 등이 사용되고 있다. 반추위내 우점하고 있는 섬유소분해 박테리아는 실질적인 섬유소 분해 미생물 군집이라고 볼 수 있다 (Windham과 Akin, 1984). *Fibrobacter succinogenes* 및

Corresponding author : Chang-Hyun Kim, School of Animal Life and Environment Science, Hankyong National University, Anseong-Si, 456-749, Korea
Tel: 031-670-5095, Fax: 031-676-5091, E-mail: kimch@hknu.ac.kr

*Ruminococcus flavefaciens*는 대표적인 반추위 섬유소 분해 박테리아로 알려져 있으며 (Hungate, 1966), 이들은 대부분 불용성 기질인 사료입자에 붙어서 존재할 뿐만 아니라 (Kudo 등, 1987) cellulase와 hemicellulase를 분비하는 기능을 가지고 있다 (Bryant, 1973; Pettipher와 Latham, 1979; Forsberg 등, 1981; Greve 등, 1984; McDermid 등, 1990). 그러나 반추동물의 장내에 서식하고 있는 혐기 박테리아를 생산성 향상 목적으로 투여한 연구는 많지 않으며, 현재까지 반추동물의 장내 미생물을 이용한 DFM의 개발은 대부분 분리·동정에 머무르고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 실험실에서 순수분리·동정한 섬유소 분해균인 *Ruminococcus flavefaciens* H-20 및 *Fibrobacter succinogenes* H-23의 혼합 배양액을 수준별로 반추동물에 적용하였을 때 반추위발효와 섬유소분해효소활성에 미치는 영향을 조사하여 반추동물의 생산성 향상에 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 액상 생균제 준비

한경대학교 동물영양학 실험실에서 젖소의 반추위로부터 분리한 섬유소 분해 박테리아 중 섬유소 분해력이 강력한 균들을 16s rDNA 분석을 통해 동정한 후, 그 중 분해력이 가장 높은 2종의 혐기성 박테리아 (*Ruminococcus flavefaciens* H-20, *Fibrobacter succinogenes* H-23)를 공시하였다. 본 실험에서 접종용으로 이용될 각 균주는 Dehority's artificial (DA) medium (Dehority, 1967)에 24시간 배양하여 평균적으로 사용하였다. 접종용 배지는 H-20과 H-23 균주에 따라 DA medium에 탄수화물 공급원으로 cellulose (S-5504, Sigma, U.S.A) 또는 starch (S-9765, Sigma, Germany)를 각각 0.2%로 사용하였으며, 질소공급원은 두 균주 모두 casein을 2%로 사용하였다. 혐기적 방법으로 멸균된 배양액을 준비하여 시험용 100 ml serum bottle에 배지를 준비하였다. 24시간 배양 시킨 배양액 1 ml씩을 미리 준비한 배지가 포함된 시험용 serum bottle에 접종 및 배양하였으며, 살아있는 균수를 Bryant와 Burkey (1953)가 사용한 anaerobic dilution solution을 사용하여 최확수법 (most probable number, MPN)으로 확인하였다. 그 결과, 본 실험에 사용된 H-20은 2.3×10^7 cfu/ml 이었고 H-23은 9.3×10^7 cfu/ml이었다.

2. 공시가축 및 사양관리

본 시험의 사양실험은 경기도 가축위생연구소 실험동물 사육실에서 실시하였으며, 기타 분석은 한경대학교 동물영양학 실험실에서 수행하였다. 공시가축은 반추위 fistula가 장착된 12개월령 한우 암소 4두 (평균

Table 1. Ingredients and chemical composition of feedstuffs fed to Hanwoo heifers

Ingredients	% of DM	
Corn flake	26.2	
Distillers dried grains with solubles	15.0	
Wet corn gluten feed	15.0	
Copra meal	11.5	
Wheat bran	8.9	
Alfalfa	8.0	
Molasses	6.0	
Rapeseed meal	5.0	
Limestone	1.85	
Soybean meal	1.2	
Salt	0.5	
Mineral/Vitamin premix ¹⁾	0.63	
Calcium phosphate	0.2	
Essential oil	0.02	
Total	100.00	
Chemical composition	Concentration	Hay mixture ²⁾
Dry matter	88.36	91.18
Crude protein	17.23	9.99
Ether extract	1.76	1.24
Crude fiber	5.72	32.59
Crude ash	6.87	9.05
Neutral detergent fiber	28.92	68.28
Acid detergent fiber	12.35	44.61

¹⁾ Contained per kg diet: vitamin A, 18,000 IU; vitamin D₃, 3,600 IU; vitamin E, 15 IU; I, 1.5 mg Fe, 120 mg; Mn, 135 mg; Zn, 135 mg; Cu, 30 mg and Co, 0.3 mg.

²⁾ Contained tall fescue hay and orchardgrass hay.

체중 221 ± 7.5 kg)를 이용하였다. 시험 사료 (Table 1)의 급여는, 시관중인 육성우 농후사료 2 kg에 톨페스큐와 오차드그라스 혼합건초 3 kg을 1일 2회 (09:00, 17:00)로 나누어 균등 급여하였다. 또한 음수와 미네랄 블록은 사양시험 전 기간 동안 충분하게 제공 하였다. 전체 사료의 섭취량 및 잔량 조사의 정확성을 위해 시험사육사 stall에서 고정 사육하였으며, 기타 사양관리는 시험 목장의 관행에 준하였다.

3. 실험설계

본 시험에서는 DFM을 사용하지 않은 처리구(control), 1% (50 ml/day, H20 + H23), 3% (150 ml/day, H20 + H23) 및 5% (250 ml/day, H20 + H23) 수준의 네 처리군으로 나누어, 사료 급여시 DFM을 반추위 cannula 안으로 직접 주입하여 실시하였다. 실험구 배치는 4×4 Latin square design으로 설계하여 시험동물을 3주 동안 기초 사료에 적응시킨 후 시험을 실시하였으며, 각 period

를 21일씩으로 각 기간 동안 DFM을 처리별로 지속적으로 투여하였다.

4. 조사 항목 및 시험방법

(1) 사료성분 분석

본 시험에 사용된 농후사료 및 건초의 일반성분은 AOAC (1995) 방법에 의하여 분석하였고, NDF (neutral detergent fiber) 및 ADF (acid detergent fiber)의 함량은 Van Soest 등 (1991)의 방법에 따라 분석하였다.

(2) 시료 채취

전체 시험 기간 15주 동안 3주간의 예비 기간을 거쳐 본 실험 시작 후, 각 3주 period 마지막 일에 DFM을 주입하여 0, 1, 3 및 6시간대별로 반추위액을 채취하였다.

반추위액을 채취하기 위해 50 ml의 conical tube에 4 겹의 gauze를 이용하여 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 추가발효를 방지하기 위해 ice box를 이용해 냉장상태를 유지하며 신속히 본 대학으로 운반 후 분석을 실시하였다.

(3) 반추위 pH 측정

각 시간대별 반추위액을 채취한 즉시 pH meter (GmbH8603, Mettler-Toledo, Switzerland)를 이용하여 pH를 측정하였다.

(4) 암모니아질소

반추위액내 암모니아질소 농도 측정은 Chaney와 Mabach (1962)의 방법으로 수행 하였다. 채취한 위액을 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 얻어진 상층액과 NH₃ standard를 각각 20 µl로 20 ml 시험관에 주입 후, phenol color reagent와 alkali-hypochlorite를 1 ml씩 첨가하였다. 발색반응을 위해 37°C 항온 수조에서 15분간 배양하여 반응을 시킨 후, 증류수를 8 ml 추가하여 희석하였다. 이후 spectrophotometer (V-530, Jasco, Japan)를 이용하여 640 nm에서 흡광도 (Optimal density)를 측정하여 암모니아질소 농도를 계산하였다.

(5) 휘발성지방산 (volatile fatty acids, VFA) 분석

반추위내 VFA는 Erwin 등 (1961)의 방법에 의해 수행하였다. 각 시간대별 pH가 측정된 반추위액을 microtube (MCT-175-C, Axygen, U.S.A)에 1 ml씩 회수한 후 미생물의 작용을 정지하기 위해 0.1 ml의 포화 HgCl₂ 용액과 25% HPO₃ 용액 0.2 ml를 첨가하여 혼합 후 실온에서 30분간 정치시켰다. 실온에서 정치시킨 배양액은 분석 전까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다가 micro centrifuge (5415R, Eppendorf, Germany)를 이용하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 채취하였으며, gas chromatography (GC-2010, Shimadzu,

Japan)를 이용하여 VFA 표준용액을 기준으로 분석하였다.

(6) 위액내 가수분해 효소의 활력

1) 조효소액의 채취

생균제 투여 후 0, 1, 3 및 6시간대의 반추위액을 채취하여 기질 입자를 제거하기 위해 4°C에서 micro centrifuge (5415R, Eppendorf, Germany)를 이용하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 최종 상층액을 extra-cellular enzyme activity 분석을 위한 조효소액으로 사용하였다.

2) 섬유소분해 효소활력 측정

효소활력 측정을 위해 기질로 사용한 Avicel (11365, Fulka, U.S.A), carboxymethyl cellulose (C-4888, Sigma, U.S.A) 및 oat spelt xylan (X-0627, Sigma, U.S.A)을 0.05M citrate buffer (pH 5.5) 및 potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 혼합하여 기질용액을 제조하였다. 20 ml 시험관에 각각의 기질용액 0.5 ml과 조효소액 0.5 ml를 주입 후, 45°C의 항온 수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 효소 반응을 정지시키기 위해 100°C에서 5분 동안 진탕하였으며, DNS (dinitrosalicylic acid) 용액 0.6 ml과 발색 반응시켜 spectrophotometer (V-530, Jasco, Japan)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질로부터 유리된 환원당의 양은 glucose 및 xylose를 standard로 하여 µmol/ml/min 단위로 환산하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과들은 SAS package program (2003)의 GLM (General Linear Model)을 이용하여 분산 분석을 실시하였으며, 처리평균간 차이는 Duncan 다중검정법 (1955)에 의해 95% 유의수준으로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. pH 및 암모니아질소 농도

12개월령 한우 암소에 DFM을 수준별 반추위내 투여하여 시간대별 반추위 pH 및 암모니아질소 농도 변화의 결과는 Table 2와 같다. 투여 후 시간에 따른 반추위액의 pH는 대조구와 5% 처리구에서 3시간까지 낮아지다가 6시간에 서서히 회복된 반면, 1% 및 3% 처리구는 6시간까지 감소되는 경향을 보였다. 비록 처리간 유의적 차이는 없었지만 5% 처리구에서 다른 처리구와 비교하여 3시간에 가장 낮은 pH를 나타냈다. 이 등 (2005)은 pH 감소 원인으로 액상 DFM이 분비하는 효소에 의한 기질분해로 생성된 총 휘발성지방산 생성 증가에 기인한 것으로 보고하였으며, 섬유소분해 효소를 조사료 및 TMR에 혼합하여 젖소에 급여한 실험

Table 2. Effects of the inclusion of anaerobic rumen bacteria cultures on postprandial changes of ruminal pH and ammonia-N concentration in Hanwoo heifers

Post-feeding	Inclusion level (%)				SEM ¹⁾
	0	1	3	5	
..... pH					
0 hr	6.75	6.74	6.65	6.62	0.039
1 hr	6.64	6.54	6.44	6.41	0.066
3 hr	6.37	6.32	6.33	6.17	0.066
6 hr	6.42	6.24	6.28	6.28	0.068
..... NH ₃ -N, mg/dl					
0 hr	8.20	6.03	9.33	8.47	0.791
1 hr	14.50 ^b	14.90 ^b	19.47 ^a	17.27 ^{ab}	0.825
3 hr	17.87	14.97	18.80	17.40	1.109
6 hr	6.37	8.33	10.30	9.03	0.973

¹⁾ SEM, standard error of means.

^{a-b} Means in the same row with different superscript differ significantly (p<0.05).

험에서 처리구의 반추위내 pH가 감소되었다(Kung 등, 2002). 본 실험에서도 생균제 투여에 따른 반추위내 혼합 미생물의 활성이 증가됨에 따라 사료의 발효가 반추위내에서 증가되어 pH를 다소 감소시킨 것으로 생각된다.

반추위액내 암모니아 농도의 경우 대조구, 1 및 5% 처리구에서 3시간까지 가장 높게 증가하다가 6시간에 감소하였다. DFM 투여 후 1시간에 3% 처리구에서 19.47 mg/dl로 5% 처리구의 17.27 mg/dl와 차이는 없었지만, 대조구 및 1% 처리구의 14.5 및 14.9 mg/dl와 비교하여 유의적으로 높은 농도를 보였다 (p<0.05). 이 (2006)에 의하면 반추위에서 순수 분리한 각각의 혐기성 섬유소분해 박테리아 배양액을 이용하여 *in vitro* 발효 특성을 조사한 결과, 배양 후 72시간까지 암모니아 질소 농도가 증가하였다는 결과로 보아 미생물 활성의 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

2. 효소활력

DFM의 투여수준에 따른 반추위내 섬유소분해효소 활력의 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 비록 0시간의 xylanase 농도를 제외하고 유의적인 차이가 없었지만 전체 처리구는 3종류의 기질에 대해 사료섭취 후 1시간에 효소활력이 가장 증가하였으며, 그 중 3% 처리구에서 가장 높은 활력을 보였다. crystallized cellulose 인 Avicel을 분해하는 효소인 Avicelase (β-1, 4 exoglucanase)농도는 전체 처리구에서 낮게 나타났으며 1% 처리구를 제외한 다른 처리구에서 1시간에 가장 높게 증가하였다. CMCase는 DFM 첨가 수준별 유의적 차이는 없었으며, oat spelt로부터 추출된 xylan을 기질로 하여 extracellular xylanase 활력을 조사한 결과에서는 5% 처리구에서 0시간에 119.49 μmol/ml/min로

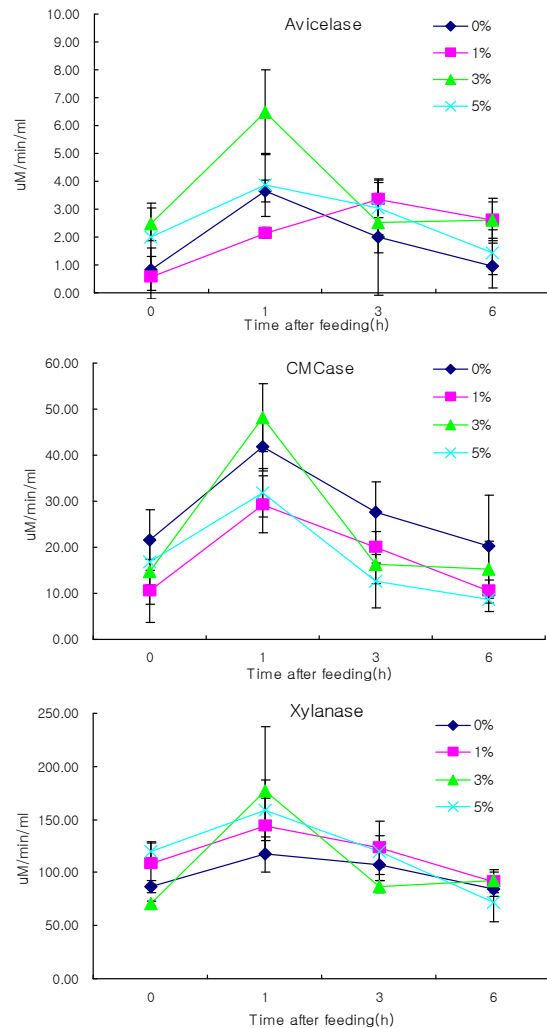


Fig. 1. Effects of the inclusion of anaerobic rumen bacteria cultures on postprandial change of ruminal enzyme activity (μmol/ml/min) in Hanwoo heifers.

3% 처리구의 72.02 $\mu\text{mol/ml/min}$ 와 비교하여 유의적으로 높은 농도를 나타냈다 ($p < 0.05$). 그러나 급여 후 시간에 따른 수준별 유의적 차이는 나타나지 않았다.

Exogenous fibrolytic enzyme을 반추동물의 사료에 첨가하여 급여하였을 때, 반추위내 섬유소분해효소 활성에 따른 사료의 소화율 향상에 기인하여 유량 및 일당증체량이 개선되는 것으로 보고되고 있다 (Beau-

chemin 등, 1995; 1997; 1999; McAllister 등, 1999; Kung 등, 2000). 그러나 Hristov 등 (2008)은 exogenous enzyme을 홀스타인 젖소에 공급시 반추위 내 amylase, CMCase 및 xylanase 활력은 증가하지 않았으며, 이는 공급한 효소의 활력이 반추위내 미생물 군집에 충분한 영향을 미치지 못했기 때문이라고 보고하였다. 비록 본 실험에서도 3종류의 섬유소 기질에서 효소활력

Table 3. Effects of the inclusion of anaerobic rumen bacteria cultures on postprandial change of ruminal volatile fatty acid production(mM) in Hanwoo heifers

Item	Post-feeding (hr)	Treatments				SEM ¹⁾
		0%	1%	3%	5%	
Acetic acid	0	85.09	79.02	79.76	76.87	3.644
	1	96.97	103.40	106.34	101.44	5.254
	3	97.07	108.23	98.16	106.26	4.926
	6	91.57	105.31	101.73	97.96	4.594
Propionic acid	0	23.51	20.59	19.65	19.99	1.157
	1	27.52	28.53	27.68	27.27	1.529
	3	25.65	24.58	24.43	29.22	1.898
	6	21.86	27.76	26.04	26.42	1.536
Butyric acid	0	14.15	13.05	14.35	12.15	0.727
	1	15.71 ^b	21.32 ^{ab}	24.48 ^a	20.19 ^{ab}	1.271
	3	18.79	22.14	19.98	20.74	1.411
	6	17.42	21.04	21.23	18.96	1.333
Valeric acid	0	1.24	1.03	1.33	0.99	0.088
	1	1.88	2.03	2.06	1.79	0.110
	3	2.47	2.70	2.43	2.43	0.118
	6	1.58	1.94	2.03	1.74	0.135
Iso-butyric acid	0	1.77	1.60	1.51	1.41	0.089
	1	1.76	2.02	1.81	1.68	0.115
	3	1.63	1.91	1.68	1.67	0.094
	6	1.17	1.74	1.62	1.45	0.113
Iso-valeric acid	0	2.58	2.09	2.13	1.97	0.137
	1	2.65	2.86	2.67	2.40	0.156
	3	2.34	2.51	2.26	2.34	0.127
	6	1.73	2.05	1.98	1.82	0.139
Acetic acid/Propionic acid	0	3.74	3.86	4.08	3.85	0.066
	1	3.66	3.63	3.86	3.73	0.039
	3	3.37	4.63	4.09	3.70	0.250
	6	3.70	3.79	4.00	3.74	0.075
Total VFA	0	127.65	117.38	118.72	113.37	5.438
	1	145.36	160.16	165.04	154.77	7.714
	3	149.72	162.07	148.94	162.65	7.762
	6	138.39	159.83	154.62	148.34	7.639

¹⁾ SEM, standard error of means.

^{a-b} Means in the same row with different superscript differ significantly ($p < 0.05$).

이 유의한 차이는 보이지 않았지만, 3% 처리구에서 DFM 투여 후 1시간에 다른 처리구와 비교하여 수치상으로 증가하는 경향을 나타내었다.

3. 휘발성지방산

액상 DFM의 투여수준에 따른 반추위내 VFA 농도의 결과는 Table 3에 나타내었다. 전체 처리구에 걸쳐 DFM 투여 후 1시간 또는 3시간에 가장 높게 증가한 후 6시간에 감소하는 경향을 나타냈다. Total VFA 농도 및 acetic acid 농도는 1, 3 및 5% 처리구에서 0시간을 제외한 모든 시간에서 대조구와 비교하여 증가된 농도를 보였으나, 처리에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. 비록 유의적 차이는 없었지만 반추위내 증가된 acetic acid 농도는 섬유소분해박테리아 군집 증가의 결과(Harrison 등, 1988)와 일치하며, butyric acid의 농도는 1시간에 3% 처리구가 24.48 mM을 나타내어 대조구의 15.71 mM과 유의적 차이를 나타냈다 ($p < 0.05$). Hristov 등 (2000)은 탄수화물 분해효소(Exogenous polysaccharide-degrading enzyme)를 농후사료에 첨가하여 비육우에 급여한 결과, 대조구와 비교하여 반추위내 butyric acid의 농도가 증가했다고 보고하였다. Williams와 Coleman(1992)은 반추위내 protozoa에 의해서 butyric acid가 증가하거나 감소한다고 보고하였으나, 본 연구에서는 섬유소분해 박테리아 배양액의 반추위내 투여로 인해 반추위 미생물 개체군의 변화보다는 배양액내 효소들에 의한 영향에 기인했다고 생각된다. 이것은 이(2006)의 보고에서 동일한 균주 H-20과 H-23을 DA medium에서 2일간 순수 배양을 한 배양상층액의 CMCase, Avicelase 및 xylanase의 활성이 각각 73.9와 48.4 $\mu\text{mol/ml/min}$, 10.9와 10.3 $\mu\text{mol/ml/min}$, 그리고 364.3과 60.16 $\mu\text{mol/ml/min}$ 이었다고 하여 이들 효소가 반추위내 투여되었을 때 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 또한 사양 실험에 사용한 건초의 ADF 함량은 44.61%로 한국사양표준 사료성분표(농림부·농촌진흥청 축산기술연구소, 2002)의 벧짚(44.12%)과 비교하여 비슷한 수준이었다. 본 실험의 xylan을 기질로 사용한 효소활력분석 결과, 대조구와 비교하여 DFM 투여 처리구에서 분해율이 높은 경향을 보였으며 이는 DFM내 hemicellulase의 효과로 볼 수 있었다. 실험에 ADF 함량이 비교적 낮은 양질의 조사료를 사용했다면 DFM에 의한 반추위 발효에 더 큰 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 한우의 반추위 발효 효과를 향상시키기 위해서는 DFM을 투여하는 것이 긍정적 효과를 줄 수 있음을 시사하며, 건물기준 최소 3% 이상 사용하였을 때 반추위 발효에 유리할 것으로 판단된다. 반추위 섬유소분해 박테리아 배양액을 DFM으로

사용하여 반추동물에 급여한 연구보고는 처음이며, 추후 사료의 종류 및 배합비에 따른 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 홀스타인 젃소의 반추위에서 순수분리 및 동정된 섬유소 분해균인 *Ruminococcus flavefaciens* (H-20) 및 *Fibrobacter succinogenes* (H-23)의 혼합 배양액(DFM)을 수준별로 반추동물에 적용하였을 때 반추위발효와 섬유소분해효소 활성에 미치는 영향을 평가하였다. 대사시험은 반추위 fistula가 장착된 12개월령 한우 암소 4두를 이용하여 4×4 Latin square 방법으로 실시되었다. 모든 처리구는 기초사료로, 농후사료 2 kg에 톨페스큐와 오차드그라스의 혼합건초 3 kg을 1일 2회로 나누어 균등 급여하였으며, DFM을 사용하지 않은 처리구(control), 기초사료를 포함하여 1%(50 ml/day, H20 + H23), 3%(150 ml/day, H20 + H23) 및 5%(250 ml/day, H20 + H23) 수준의 네 처리군으로 나누어, 사료 급여시 DFM을 반추위 cannula 안으로 직접 주입하여 실시하였다. 본 실험 결과 급여 후 모든 시간에서, 처리구는 반추위액내 pH의 유의적 차이가 나타나지 않았으나, 반추위 암모니아 질소의 농도에서 DFM투여 후 1시간에 3% 처리구(19.47 mg/dl)는 5% 처리구(17.27 mg/dl)와 차이는 없었지만, 대조구 및 1% 처리구(14.5 및 14.9 mg/dl)와 비교하여 유의적으로 높은 농도를 보였다($p < 0.05$). 섬유소분해효소활력은 전체적으로 유의한 효과가 나타나지 않았으나, xylanase는 0시간에 5% 처리구(119.49 $\mu\text{mol/ml/min}$)가 3% 처리구(72.02 $\mu\text{mol/ml/min}$)와 비교하여 유의적으로 높은 농도를 보였다($p < 0.05$). VFA 농도는 butyric acid에서 급여 후 1시간에 대조구(15.71 mM)와 비교하여 3% 처리구(24.48 mM)에서 유의적으로 높은 농도를 보였다($p < 0.05$). 이러한 결과로 미루어 보아 혐기성 섬유소분해 박테리아 배양액의 공급은 최소 3% 이상에서 반추위 발효에 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

V. 사 사

본 연구는 한경대학교 2008년도 학술연구조성비의 지원에 의한 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

VI. 인용 문헌

1. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
2. Beauchemin, K. A., Rode, L. M. and Sewalt, V. J. H. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and

- growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
3. Beauchemin, K. A., Jones, S. D. M., Rode, L. M. and Sewalt, V. J. H. 1997. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:645-653.
 4. Beauchemin, K. A., Rode, L. M. and Karren, D. 1999. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. *Can. J. Anim. Sci.* 79:243-246.
 5. Bryant, M. P. and Burkey, L. A. 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.
 6. Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.* 32:1809-1813.
 7. Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Biochem.* 8:130-132.
 8. Dehority, B. A. and Scott, H. W. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forage by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 50:1136-1141.
 9. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11:1-42.
 10. Erwin, E. S., Marco, S. J. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
 11. Forsberg, C. W., Beveridge, T. J. and Hellstrom, A. 1981. Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:886-896.
 12. Greve, L. C., Labavitch, J. M. and Hungate, R. E. 1984. α -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: Purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1135-1140.
 13. Harrison, G. A., Hemken, R. W., Dawson, K. A., Harmon, R. J. and Barker, B. K. 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.
 14. Hristov, A. N., Basel, C. E., Melgar, A., Foley, A. E., Ropp, J. K., Hunt, C. W. and Tricarico, J. M. 2008. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 182-193.
 15. Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Cheng, K. J. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* 78:477-487.
 16. Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes.* Academic Press Inc. New York.
 17. Kudo, H., Cheng, K. J. and Costerton, J. W. 1987a. Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the *in vitro* degradation of straw cellulose. *Can. J. Microbiol.* 33:244-248.
 18. Kudo, H., Cheng, K. J. and Costerton, J. W. 1987b. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* 33:267-272.
 19. Kung, L., Jr., Treacher, R. J., Nauman, G. A., Smagala, A. M., Endres, K. M. and Cohen, M. A. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
 20. Kung, L., Jr., Cohen, M. A., Rode, L. M. and Treacher, R. J. 2002. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2396-2402.
 21. McAllister, T. A., Oosting, S. J., Popp, J. D., Mir, Z., Yanke, L. J., Hristov, A. N., Treacher, R. J. and Cheng, K. J. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
 22. McDermid, K., Mackenzie, C. R. and Forsberg, C. W. 1990. Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 127-132.
 23. Muck, R. E., O'kiely, P. and Moran, J. 1990. Low pH grass silage. *Teagasc Anim. Prod. Res. Rep.*, 1988-1989, pp. 77.
 24. Pettipher, G. L. and Latham, M. J. 1979. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 110:29-38.
 25. Phipps, R. H., Wilkinson, J. I. D., Jonker, L. J., Tarrant, M., Jones, A. K. and Hodge, A. 2000. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cow. *J. Dairy Sci.* 83:2789-2794.
 26. Santra, A., Chaturvedi, O. H., Tripathi, M. K., Kumar, R. and Karim, S. A. 2003. Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal population in rumen of lambs. *Small Ruminant Research* 47:203-212.
 27. SAS. 2003. SAS/STAT[®] Software for PC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
 28. Symanowski, J. T., Green, H. B., Wagner, J. R.,

- Wilkinson, J. I. D., Davies, J. S., Hirmstedt, M. R., Allen, M. S., Block, E., Brennan, J. J., Head, H. H., Kennelly, J. J., Nielsen, J. N., Nocek, J. E., Van Der List, J. J. and Whitlow, L. W. 1999. Milk production and efficiency of cows fed monensin. *J. Dairy Sci.* 82 (Suppl 1):171.(Abstr.)
29. Van Soest, P. J., Roberts, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
30. Wang, Y., Alexander, T. W. and McAllister, T. A. 2004. *In vitro* effects of Monensin and Tween 80 on ruminal fermentation of barley grain:barley silage-based diets for beef cattle. *Animal Feed Sci. and Tech.* 116:197-209.
31. Williams, A. G. and Coleman. 1992. *The Rumen Protozoa* Springer-Verlag Inc. New York, NY. pp. 441.
32. William, P. E. V. and Newbold, C. J. 1990. Rumen probiosis: The effects of novel microorganism on rumen fermentation and ruminant productivity. In: Haresign W. and Cole, F. J. A (Ed.) *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butterworths, London. pp. 211-217.
33. Windham, W. R. and Akin, D. E. 1984. Rumen fungi and forage fiber degradation. *Appl Environ Microbiol.* 48:473-476.
34. 농림부 · 농촌진흥청 축산기술연구소, 2002, 한국사양표준 (젓소). 상록사.
35. 이기영. 2006. 반추위로부터 분리된 혐기성 섬유소분해 박테리아의 혼합배양에 의한 발효 특성에 관한 연구. 한경대학교 석사학위 논문.
36. 이성훈, 서인준. 2005. 반추가축영양에 있어서 액상미생물제제의 첨가가 *In Vitro* 발효성상과 섬유소분해효소활성에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지* 47:789-804.
- (접수일자 : 2008. 7. 11. / 수정일자 : 2008. 12. 10. / 채택일자 : 2009. 2. 18.)