

조사료 자원의 단백질 분획 및 Buffer 추출이 *In Vitro* 발효 성장, 분해율 및 Gas 생성량에 미치는 효과

김광림¹ · Judder Shinekhuu¹ · Wei-ze Qin¹ · 김종규¹ · 주종관¹ · 서성원² · 송만강¹

Effect of Protein Fractionation and Buffer Solubility of Forage Sources on *In Vitro* Fermentation Characteristics, Degradability and Gas Production

Guang Lin Jin¹, Judder Shinekhuu¹, Wei-ze Qin¹, Jong Kyu Kim¹, Jong Kwan Ju¹,
Seong-won Suh² and Man Kang Song¹

ABSTRACT

Buffer solubility and protein fractionation were evaluated from the hays (timothy, alfalfa and klein) and straws (tall fescue and rice), and *in vitro* trial was conducted to examine the effect of buffer extraction on fermentation characteristics, degradability and gas (CO₂ and CH₄) production. Buffer soluble protein (SP) content and A fraction in total protein were highest in alfalfa hay as 61% and 41.77%, respectively while lowest in rice straw (42.8% and 19.78%, respectively). No difference was observed in B1 fraction among forages but B2 fraction was slightly increased in klein hay (12.34%) and tall fescue straw (10.05%) compared with other forages (6.34~8.85%). B3 fraction of tall fescue was highest as 38.49% without difference among other forages while C fraction was highest in rice straw. pH in incubation solution was higher in all forages after extraction than before extraction at 3h (P<0.01) and 6h (P<0.05), and pH from hays of timothy and alfalfa was higher than the other forages at 6h (P<0.05) and 12h (P<0.001). Regardless of extraction, ammonia-N concentration from alfalfa hay was increased at all incubation times and extraction effect was appeared only at 3h incubation time (P<0.01). Total VFA concentration from alfalfa hay was highest up to 24h incubation while those from tall fescue straw and rice straw were lowest. Buffer extraction decreased (P<0.01~P<0.001) the total VFA concentration. Acetic acid proportion was increased (P<0.001) before extraction of forages but no difference was found between forages. Propionic acid (C₃) proportion was also increased (P<0.001) before extraction in all forages than in straws at 3h, 24h and 48h incubations, and C₃ from hays were mostly higher (P<0.05) than from straws. Butyric acid proportion, however, was not affected by extraction at most incubation times. Parameter 'a' regarding to the dry matter (DM) degradation was increase (P<0.001) in all forages before extraction, and was decreased (P<0.05) in tall fescue straw and rice straw compared with hays. Parameter 'b' was also increased (P<0.001) before extraction but no difference was found between forages. Effective degradability of DM (EDDM) was higher (P<0.001) before extraction in most forages except for rice straw. Buffer extraction

¹ 충북대학교 농업생명환경대학 축산학과 (Department of Animal Science, Chungbuk National University, 361-763, Korea)

² 충남대학교 동물바이오시스템학과 (Department of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

Corresponding author : Man Kang Song, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea. Tel: +82-43-261-2544; E-mail: mksong@cbnu.ac.kr

decreased ($P<0.05$) all parameters (a, b, and c) regarding to the crude protein (CP) degradation but no difference was found between forages. Effective degradation of CP (EDCP) was lower ($P<0.05$) in straws than in hays. Parameters 'a' and 'b' regarding to the NDF degradation ($P<0.01$) and effective degradability of NDF (EDNDF, $P<0.001$) were also higher in forages before extraction than after extraction but no difference was found between forages. Buffer extraction reduced ($P<0.05$ ~ $P<0.001$) CO_2 production from all the forages up to 24h incubation and its production was greater ($P<0.05$ ~ $P<0.01$) from hays than straws. Methane (CH_4) production was also greater ($P<0.01$ ~ $P<0.001$) in all forages at all incubation times, and its production was greater ($P<0.05$) from hays than from straws at most incubation times. Based on the results of the current study, it can be concluded that buffer solubility and CP fractionation might be closely related with *in vitro* VFA concentration, degradability and gas (CO_2 and CH_4) production. Thus, measurement of buffer solubility and protein fractionation of forages might be useful to improve TMR availability in the ruminants.

(Key words : Forages, Buffer solubility, Protein fractionation, Fermentation, Gas production, *In vitro* degradation)

I. 서 론

국제 곡물가격의 지속적인 증가 및 소 값 하락은 소 사육 농가의 생산비 절감의 필요성을 한층 더 높이고 있다. 이에 따라 곡류사료 중심의 배합사료를 일부 대체할 수 있는 양질 조사료의 생산과 이용기술 개발의 중요성도 크게 부각되고 있다. 주지하는 바와 같이, 오랫동안 국내에서 주요 조사료 원료로 이용되어온 벼짚은 소화율이나 영양소 함량은 물론 이용률이 낮아 섬유질 사료로서의 기능을 충분히 발휘하지 못했다 (Lee, 2000). 이러한 이유로 동계사료 작물과 같은 국내산 양질 조사료의 생산과 이용률 개선을 통한 사료비 절감과 생산성 향상을 추구하고 있지만 여전히 다양한 종류의 수입 건초가 소 사육농가에 보급되고 있는 실정이다.

한편, 소에서의 조사료 이용성은 각종 필요한 영양소의 함량뿐만 아니라 조사료를 구성하는 성분의 체내 이용률과 관련이 있다고 하겠다. 특히, 조사료 내 단백질의 경우 건초 또는 사일리지 조제 과정 중 일부가 체내에서 이용되지 못하거나 비단백질태 질소화합물 (non-protein nitrogen, NPN)로 전환되어 체내에서의 단백질 이용률이 현저히 감소될 수 있다 (사료 자원핸드북, 2011). 이에, Cornell net carbohydrate and protein system (CNCPS, Licitra et al., 1996)을 통하여 사료 내 단백질의 buffer 용

해도를 조사하고 아울러 화학적 특성에 따라 단백질 분획 (fractionation) 함으로서 소의 소화기관 내 단백질 소화율을 예측하기에 이르렀다. 당시 CNCPS 연구를 위해 청예작물과 사일리지 그리고 단백질 사료 등이 이용되었으며, 그 이후 실시되었던 시험 결과가 NRC 젖소 사양표준 (2001)에서 사료 내 단백질 이용효율 개선을 위한 프로그램으로 제시되기도 했다. 국내에서도 Shinekhuu 등 (2009)이 각종 사료작물 사일리지를 대상으로 단백질을 분획하고 borate-phosphate 추출 유무가 사일리지의 발효성상, 가스 생성 및 분해율에 미치는 효과를 조사한 바 있다.

그동안 국내에서 수행된 조사료 자원에 관한 연구는 주로 조사료 생산과 성분 (Yoon and Kazuo, 2000; Park et al., 2008; Kim et al., 2003), 소화율 (Lee and Lee, 2006; Ji et al., 2010) 그리고 TMR 형태의 이용성 (Seo et al., 2005; Cho et al., 2008; Qin et al., 2010) 등에 중점을 두어온 만큼 건초 중심의 조사료 자원에 대한 단백질 특성과 이에 관련된 발효 특성 등에 관해서는 연구가 거의 실시된 바 없다. 특히, 조사료 자원 역시 반추위에서 단백질의 일부가 매우 빠르게 분해되어 체내에서 거의 이용되지 않는 암모니아로 전변될 수 있기 때문에 향후 조사료를 이용한 TMR 조제 시 단백질의 체내 이용효율을 높이는 전략이 필요하며, 이를 위한 기초자료의 확보가 요구된다.

따라서 본 연구는 다양한 종류의 건초 및 질료를 대상으로 CNCPS 방법에 의해 단백질을 분획하였으며, buffer 가용성 물질 추출이 반추 위미생물에 의한 발효 성장, 분해율 및 가스 생성량에 미치는 효과를 조사하고자 *in vitro* 시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 사료 및 단백질 분획

본 실험을 위해 3종류의 건초(티모시, timothy; 알팔파, alfalfa 및 클라인, Klein)와 2종류의 질료(톨페스큐짚, tall fescue straw 및 벚짚, rice straw)를 이용하였다. 조사료 내 buffer 가용성 단백질(soluble protein, SP)과 중성세제 불용성 단백질(neutral detergent insoluble protein, NDIP)과 산성세제 불용성단백질(acid detergent insoluble protein, ADIP), 그리고 비단백질태 질소화합물(non-protein nitrogen, NPN) 함량 등은 Licitra 등(1996)의 방법에 따라 분석하였다. 본 시험에 이용된 조사료의 주요 성분 함량은 Table 1에서와 같다.

조사료 내의 가용성 단백질 추출을 위한 borate-phosphate buffer는 Sniffen 등(1992)의 방법에 따라 monosodium phosphate($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 12.2 g과 sodium tetraborate($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 8.91 g 그리고 tertiary butyl alcohol 100 ml를 혼합한 다음 증류수를 첨가하여 1 L가 되도록 준비하였다. Borate-phosphate buffer를 이용한 가용성 단백질 추출 과정은 다음과 같다. 먼저, 여러 종류의 조사료를 1 mm의 크기로 분쇄한 후 0.5 g을 취하여 125 ml 삼각플라스크에 넣고, 여기에 40 ml borate-phosphate buffer (pH 6.8) 및 1 ml의 10% azide solution을 넣은 후 실온에서 약 3시간 동안 shaking하여 가용성 단백질을 추출하였다. 그런 다음 Whatman #54 filter paper로 여과하였으며, 남은 시료는 증류수로 깨끗이 세척한 후 60°C의 forced air

drying oven에서 48시간 건조한 다음 시료의 무게를 측정하였다. 그 후 추출된 용액과 여과 후의 잔사 내 buffer 불용성 단백질(insoluble protein, IP) 함량은 Kjeldahl 방법(AOAC, 1991)에 의하여 분석하였다. 조사료의 NDIP 함량은 Van Soest 등(1991)의 방법에 준하되 Licitra 등(1996)이 제안한 방법에 따라 sodium sulfide가 포함되지 않은 neutral detergent fiber(NDF) 용액으로 분석하였다. 조사료 내 ADIP 함량은 Van Soest 등(1991)의 방법에 준하여 분석하였다.

조사료의 NPN 함량은 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 즉, 앞에서와 같이 여러 종류의 분쇄된 조사료 0.5 g을 취하여 125 ml 삼각플라스크에 넣고 여기에 증류수 50 ml를 더했다. 그 후 8 ml의 10% sodium tungstic acid 용액을 넣은 다음 25~30°C에서 30분간 방치한 후 10 ml의 0.5 M sulfuric acid를 첨가하여 용액의 pH를 2로 조정하여 다음 overnight 시켰다. 그런 다음 Whatman #54 filter paper로 여과하였으며, 남은 시료는 증류수로 깨끗이 세척한 후 60°C의 forced air drying oven에서 48시간 건조한 다음 시료의 무게를 측정하고 질소(N) 함량을 분석하였다. 조사료의 NPN 함량은 총 질소 함량에서 여과시킨 후 남은 시료의 질소 함량을 감하여 계산하였는데, 이 때 여과시킨 후의 시료에는 sodium tungstic acid 용액에 의해 침전된 순단백질(true protein, TP)이 포함된 것으로 간주하였다(Licitra et al., 1996).

Borate-phosphate buffer를 이용한 SP 조사와 NDIP 및 ADIP 함량 분석, 그리고 sodium tungstic acid 용액에 의한 NPN 함량 측정을 통하여 조사료 내 단백질을 분획(%)은 Licitra 등(1996)의 방법에 따라 다음과 같이 계산하였다.

A fraction = buffer 가용성 단백질 (SP)

B₁ fraction = SP-NPN,

B₂ fraction = 100-(SP+NDIP),

B₃ fraction = NDIP-ADIP,

C fraction = ADIP

조사료의 borate buffer 추출 및 단백질 분획

은 각 회당 2반복으로 동일한 조건에서 2회 걸쳐 조사되었다.

2. 시험 사료의 *in vitro* 분해율 조사

In vitro 배양을 위해 반추위 누관이 장착된 Holstein 암소 2두에서 아침 사료 급여 2시간 후에 반추위 내용물을 채취하였다. 사료는 1일 8 kg (건물기준)의 젖소 건유기용 시판 배합사료와 세절한 볏짚을 60:40의 비율 (건물 기준)로 혼합한 다음 4 kg씩 동일한 양으로 나누어 아침 (08:00)과 저녁 (18:00)에 급여하였다. 배합사료의 조단백질, 조지방 및 TDN 함량은 각각 13.8, 4.02 및 72%였고 볏짚의 경우 조단백질, 조지방, 및 NDF 함량은 각각 3.79, 2.81 및 72.6%였다 (건물 기준). 2두의 소로부터 채취된 반추위 내용물을 동일한 무게 비율로 혼합한 후 4겹의 거즈로 거른 다음, 다시 반추위 내용물과 분리된 위액을 1:2의 비율로 혼합하고 사료에 부착된 미생물을 분리시키기 위해 Waring blender (Fisher 14-509-1)로 3분간 blending 하였다. 이후, 반추위 내용물을 6겹의 거즈로 걸러 배양을 위한 반추위액으로 이용하였으며, 준비된 반추위액은 30초간 고순도의 CO₂ gas로 충전한 다음 항온수조에서 39°C 온도를 유지하였다.

여과한 반추위액과 L 당 2.0 g NaCl, 0.5 g (NH₄)₂SO₄, 1.0g K₂HPO₄, 1.0 g KH₂PO₄, 0.265 g CaCl₂ · 2H₂O 및 0.409 g MgSO₄ · 7H₂O이 포함된 인공 타액 (McDougall, 1948)를 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 배양액으로 이용하였으며, 배양이 시작될 때까지 항온수조를 이용하여 39°C로 유지시켰다. Borate-phosphate buffer 추출 전·후의 조사료를 1 mm 크기로 분쇄한 다음 약 1.5 g을 nylon bag (5 × 5 cm; pore size, 40 um)에 넣고 아울러 배양액의 하반부에 bag이 위치하도록 무게가 1.5 g인 bead를 bag에 넣었다. 그 후 120 ml 배양병 내에 준비된 bag과 80 ml의 배양액을 넣은 다음 3-way stopcock와 연결된 알미늄 cap으로 배양병의 마개를 덮고 39

°C의 진탕배양기 (VS-8480SR)에서 48시간까지 배양하였다. 배양기간 동안 진탕속도는 분당 135회전을 유지하였다. 건초의 *in vitro* 분해율은 동일한 조건에서 총 3회에 걸쳐 조사되었다.

3. 시료의 채취 및 분석

발효특성을 조사하기 위해 배양 개시 후 3, 6, 12, 24 및 종료 시 (48 시간)에 배양기로부터 배양병을 꺼낸 다음 즉시 pH를 측정하였다. 또한 암모니아 농도 분석을 위해 micro-centrifuge 용 vial에 1 ml의 배양액을 옮겨 담았으며, 휘발성지방산 (volatile fatty acid, VFA) 분석을 위해 0.8 ml 배양액을 채취하여 0.2 ml의 25% phosphoric acid를 첨가한 다음 분석 시까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 시험사료 (조사료)의 일반성분은 AOAC (1991) 방법에 따라 분석하였으며, NDF 함량은 Van Soest 등 (1991)이 제시한 방법에 따라 분석하였다.

배양액의 ammonia-N의 농도는 Faweett과 Scott (1960)의 방법을 이용하여 분광광도계 (Berkman, DU-650)로 분석하였다. 또한 휘발성지방산 (volatile fatty acid, VFA)은 냉동 보관된 시료를 해동한 다음 internal standard로 0.2 ml의 2% pivalic acid를 넣어 잘 혼합하고 12,000 × g에서 15분간 원심분리 한 후, 상층액을 취하여 30 m capillary column (NUKOL™, 0.25 mm I.d., Supelco Co.)이 장착된 gas chromatograph (GC, HP5890 series II, Hewlett Packard Co.)로 분석하였다. 이동상으로는 헬륨 (He) 가스가 이용되었으며, injector와 FID 검출기의 온도는 모두 200°C로 유지되었고 split ratio는 1:50으로 하였다.

가스 발생량은 시험 개시 후 3, 6, 12, 24 및 48시간에 배양병의 고무마개에 연결된 3-way stopcock를 통하여 50 ml 유리주사기로 측정하였다. CH₄ 및 CO₂ 가스는 포집한 gas의 일부를 6 ml vacuum tube로 옮긴 다음 TCD detector가

장착된 gas chromatograph (YL6100GC, Younglin Co.)로 분석하였는데, 이때 injector와 detector의 온도를 각각 150℃ 및 200℃로 유지시켰다. 또한 가스 분석을 위해 30 m fused capillary column (HP-PLOT/Q, 19095P-QO4, 0.53 mm i.d. U.S.A.)을 이용하였으며, 이동상 가스로서 ultra high purity helium (He)을 분 당 30 ml로 주입하였다. 메탄가스(CH₄)와 이산화탄소(CO₂)의 생성량을 측정하기 위하여 H₂ (10%), CH₄ (30%), N₂ (20%) 및 CO₂ (40%) 등이 충전돼 있는 혼합가스를 표준가스로 사용하였다. GC로 표준가스의 여러 개의 주입량에 대응하는 피크면적을 측정하여 다음과 같은 방법으로 각 가스(CH₄와 CO₂)의 생성량을 계산하였다.

$$\begin{aligned} &\text{즉, } Y_{\text{area}} = aX_{\text{volume}} + b \quad \text{즉, } A_{(\text{CO}_2/\text{std})} = aV_{(\text{CO}_2/\text{std})} + b \\ &\rightarrow V_{(\text{CO}_2/0.1\text{ml sample})} = (A_{(\text{CO}_2/0.1\text{ml sample})} - b) / a \\ &\rightarrow (V_{(\text{CO}_2/0.1\text{ml sample})} \times 10) \times V_{\text{total gas}} \end{aligned}$$

여기에서, A_(CO₂/std)는 표준가스 중 CO₂의 피크 면적이고, V_(CO₂/std)는 표준가스 내 CO₂의 주입량을 표시하며, A_(CO₂/0.1ml sample)은 시료 0.1 ml를 주입하였을 때의 피크면적이며 V_(CO₂/0.1 ml sample)은 0.1 ml 시료 중 CO₂ 생성량이다. V_{CO₂}는 총 CO₂ 생성량이며, V는 시료의 총 가스 생성량인데, CH₄ 생성량도 CO₂의 경우와 같은 방법으로 계산하였다.

배양 개시 후 정해진 시간(3, 6, 12, 24 및 48시간)에 따라 배양병에서 각각의 nylon bag을 꺼낸 다음 흐르는 물로 씻은 후 60℃에서 72시간 동안 건조시켜 건물 함량을 측정하였

다. 배양 후 nylon bag 내에 남은 사료의 일반 성분 및 NDF는 배양 전의 조사료 시료와 동일한 방법으로 분석하였다. 시험사료의 주요 성분별 유효 분해율(ED, effective degradability)은 Ørskov와 McDonald (1979)의 방법에 따라 계산되었는데, 이때 passage rate는 0.05로 하였다.

4. 통계 분석

본 실험에서 조사된 모든 성적은 SAS (2002)의 GLM procedure를 통하여 분산분석을 실시하였고, 추출 전 후에 관계없이 시료 간 비교와 추출 effect 및 조사료 effect는 Duncan's multiple range test (1955)에 의하여 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 시험사료의 성분 함량, buffer 용해도 및 단백질 분획

본 시험에서 조사된 조사료 중 알팔파의 조단백질 함량이 15.7%로 가장 높은 반면 벚짚의 조단백질 함량이 4.3%로 가장 낮았으나 조지방의 경우 3.1% (벚짚)~3.5% (알팔파 건초)의 범위로 조사료 간 큰 차이가 없었다(Table 1). 그러나 NDF 함량의 경우 벚짚에서 65.2%로 가장 높은 반면 알팔파 건초에서 41.6%로 가장 낮은 수준을 보였다.

총 단백질 중 buffer 가용성 조단백질 역시

Table 1. Chemical composition of forages

Forages	Chemical composition (% DM basis)			
	Crude protein	Ether extract	Neutral detergent fiber	Ash
Timothy hay	11.3	3.4	60.2	6.9
Alfalfa hay	15.7	3.5	41.6	11.5
Klein hay	11.5	3.3	61.8	7.2
Tall fescue straw	5.3	3.2	65.1	10.1
Rice straw	4.3	3.1	65.2	10.3

Table 2. Solubility and fractionation of protein in forages

Forages	Buffer solubility ¹⁾ (%, DM)				Protein fraction (% of total CP) ²⁾				
	CP	SP	IP	SP/CP	A	B1	B2	B3	C
Timothy	11.3	6.37	4.93	56.4	34.57	21.82	6.70	30.55	6.36
Alfalfa	15.7	9.58	6.12	61.0	41.77	19.20	6.34	28.66	4.03
Klein	11.5	6.23	5.27	54.2	30.35	23.81	12.34	28.04	5.46
Tall fescue straw	5.3	2.37	2.93	44.7	22.03	22.63	10.05	38.49	6.80
Rice straw	4.3	1.84	2.46	42.8	19.78	22.96	8.85	33.35	15.05

¹⁾ CP, crude protein; SP, buffer soluble protein; IP, buffer insoluble protein; SP/IP, ratio of soluble protein to insoluble protein

²⁾ A, rapidly soluble in the rumen (NPN); B₁, soluble in buffer and precipitated by tungstic acid (SP-NPN); B₂, insoluble in buffer and fermented in the rumen but some escapes to the lower gut (100-SP-NPN); B₃, insoluble in buffer and slowly degraded in the rumen (NDIP-ADIP); C, insoluble in buffer and acid detergent but almost not degradable in the rumen (ADIP).

61%로 다른 조사료에 비해 알팔파 건초에서 가장 높았으며 벣짚에서 가장 낮은 (42.8%) 것으로 조사되었다 (Table 2). 총 단백질 중 A fraction 역시 알팔파 건초에서 가장 높았으며 (41.77%), 티모시 (34.57%)와 클라인 (30.35%) 건초, 톨페스큐짚 (22.03%) 및 벣짚 (19.78%) 순으로 점차 낮아졌다 (Table 2). 총단백질 중 B1 fraction은 조사된 조사료 간 유의적인 차이를 보이지 않았으나 (19.2~22.96%) B2 fraction에서는 다른 조사료 (6.34~8.85%)에 비하여 톨페스큐짚 (10.05%) 및 클라인 건초 (12.34%)에서 다소 높은 수준을 보였다. 총 단백질 중 B3 fraction이 차지하는 비율은 톨페스큐짚에서 38.49%로 가장 높았으나 다른 조사료 자원에서는 28.04~33.35%로 큰 차이를 보이지 않았다. C fraction의 경우 벣짚에서 가장 높은 비율 (15.05%)을 보였으나 그 밖의 조사료에서는 4.03~6.8% 범위에 속하였다 (Table 2).

2. 시험사료의 발효성상, 유효분해율 및 가스 생성

1) 배양액의 pH 및 암모니아 농도

전체적으로 시험사료 배양액의 pH는 배양시

간이 경과함에 따라 낮아지는 경향을 보였으며, 단지 6시간 이후에 추출 여부에 관계없이 사료 간 차이를 보였다 ($p < 0.022 \sim p < 0.001$, Table 3). 또한 모든 사료에서 배양 개시 후 3시간 ($p < 0.01$) 및 6시간 ($p < 0.05$)에서 버퍼 가용성 물질을 추출하기 전에 비해 추출 후 배양액의 pH가 증가되었으며, 각 사료의 평균치에서는 6시간 ($p < 0.05$) 및 12시간 (0.001)에서 다른 사료에 비해 티모시 건초 및 알팔파 건초로부터의 pH가 낮았으며, 24시간 ($P < 0.01$)에서는 티모시 건초로부터의 pH가 가장 낮았다.

배양액의 암모니아 농도는 배양시간이 경과함에 따라 점차 높아지는 경향을 보였는데 (Table 4), 모든 배양시간에서 가용성 물질의 추출 전·후에 다른 조사료에 비해 알팔파 건초에서 가장 높았으며, 이로 인해 사료 효과 (feed effect, EE) 역시 다른 종류의 조사료와 알팔파 건초간의 차이에서 기인된 것으로 보인다 ($p < 0.01$). 그러나 모든 사료의 추출효과는 배양 3시간 ($p < 0.01$)에서만 나타났다.

2) 배양액의 휘발성지방산 농도 및 조성

조사료의 *in vitro* 배양 시 휘발성지방산 농도 및 주요 휘발성지방산 조성은 Table 5에서

Table 3. Effects of buffer extraction of forages on pH of incubation solution

Time (h)	Before extraction					After extraction					SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾	Effect ³⁾	
	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw			EE	FE
3	6.79	6.77	6.79	6.78	6.84	6.86	6.83	6.89	6.89	6.89	0.013	0.080	**	NS
6	6.53 ^c	6.63 ^b	6.64 ^b	6.68 ^a	6.69 ^a	6.67 ^b	6.66 ^b	6.72 ^a	6.76 ^a	6.74 ^a	0.015	0.001	*	*
12	6.22 ^c	6.23 ^c	6.32 ^{abc}	6.39 ^{ab}	6.47 ^a	6.29 ^c	6.32 ^b	6.38 ^{ab}	6.46 ^a	6.48 ^a	0.022	0.001	NS	***
24	5.92 ^b	6.03 ^{ab}	5.99 ^{ab}	6.13 ^{ab}	6.17 ^{ab}	6.01 ^{ab}	6.09 ^{ab}	6.04 ^{ab}	6.20 ^a	6.22 ^a	0.024	0.022	NS	**
48	5.81 ^{dc}	5.87 ^{cdc}	5.73 ^c	5.99 ^{ab}	5.93 ^{bcd}	5.82 ^{cdc}	5.97 ^{bcd}	5.82 ^{cdc}	6.00 ^{ab}	6.07 ^a	0.025	0.001	NS	NS

¹⁾ Standard error of the means. ²⁾ Probability level.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ.

³⁾ EE, extraction effect; FF, feed effect. * P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001; NS, non significant.

Table 4. Effects of buffer extraction of forages on concentration (mg/100ml) of ammonia-N in incubation solution

Time (h)	Before extraction					After extraction					SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾	Effect ³⁾	
	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw			EE	FE
3	2.96 ^{ab}	3.46 ^a	2.58 ^{bc}	2.34 ^{cd}	2.38 ^{cd}	2.78 ^{ab}	2.66 ^{bc}	2.23 ^{cd}	2.34 ^{cd}	2.08 ^d	0.104	0.024	NS	**
6	2.96 ^b	3.87 ^a	2.87 ^b	2.86 ^b	2.60 ^{bc}	2.50 ^{bc}	3.40 ^{ab}	2.65 ^{bc}	2.54 ^{bc}	2.36 ^c	0.112	0.012	NS	**
12	5.29 ^b	5.91 ^a	5.21 ^b	5.02 ^{bc}	4.33 ^{bc}	4.59 ^{bc}	5.41 ^b	4.10 ^c	4.01 ^c	3.97 ^c	0.150	0.0001	**	**
24	7.86 ^{ab}	9.31 ^a	6.84 ^{bc}	6.35 ^{bc}	6.18 ^{bc}	7.00 ^{bc}	8.54 ^{ab}	6.39 ^{bc}	6.19 ^{bc}	5.60 ^c	0.280	0.011	NS	**
48	12.86 ^{ab}	13.25 ^a	11.79 ^{ab}	10.26 ^{bc}	10.08 ^{bc}	11.79 ^{ab}	12.63 ^{ab}	10.64 ^{ab}	10.14 ^{bc}	9.65 ^b	0.297	0.018	NS	**

^{1), 2) and 3)} Referred to Table 3.

** P<0.01; NS, non significant.

와 같다. Buffer 추출 전·후 조사료 모두에서 배양시간이 경과함에 따라 총 VFA 농도가 증가되었다. 또한 총 VFA 농도는 배양 24시간까지 알팔파 건초에서 가장 높았던 반면 툴페스큐짚과 벧짚에서 가장 낮은 것으로 나타났다. 모든 조사료에서 buffer 추출 전에 비하여 추출 후에 총 VFA 농도가 감소되었으며 (p<0.01~p<0.001), 사료간의 차이는 대부분 알팔파 건초와 짚 (툴페스큐짚 및 벧짚)에서 유래된 것으로 나타났다. 한편, acetic acid (C₂)의 조성 비율에서는 배양 6시간까지 추출 전에 더 높았으나 (p<0.001) 사료 간 유의적인 차이는 없었다. Propionic acid (C₃) 조성 비율 역시 배양 개시

후 3, 24 및 48시간 (p<0.001)에서 추출 전에 더 높았으며, 6 및 12시간의 배양액에서 대부분 건초 (티모시, 알팔파 및 클라인)와 짚류 (툴페스큐짚 및 벧짚) 간 차이가 있는 것으로 조사되었다 (p<0.05). 그러나 butyric acid 조성비율의 경우 단지 배양 6시간에서만 추출 전에 더 높았으며 (p<0.001) 사료 간 차이는 없었다. Propionic acid (C₃)에 대한 C₂ 비율은 모든 조사료에서 추출 전에 비해 추출 후에 더 증가되었으나 사료 간 차이는 대부분 짚류와 건초 간에 나타났다.

3) 배양액 내 조사료의 유효분해율

Table 5. Effects of buffer extraction of forages on concentration and proportion of VFA in incubation solution

Items ¹⁾	Before extraction					After extraction					SEM ²⁾		Pr>F ³⁾		Effect ⁴⁾	
	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw			EE	FE		
..... 3 h post incubation																
TVFA	47.52 ^a	49.38 ^a	47.30 ^a	43.43 ^{ab}	40.95 ^{ab}	35.50 ^{bc}	35.18 ^{bc}	33.81 ^{cd}	34.72 ^{cd}	32.16 ^d	1.565	0.009	***	*		
Molar proportion (mmoles/100mmoles) :																
C ₂	62.88 ^a	62.70 ^a	62.71 ^a	62.57 ^a	62.81 ^a	61.49 ^b	61.43 ^b	61.52 ^b	61.28 ^b	61.79 ^b	0.169	0.031	***	NS		
C ₃	19.77 ^a	19.71 ^a	19.71 ^a	19.71 ^a	19.49 ^a	18.95 ^b	19.21 ^a	18.87 ^b	18.87 ^b	18.90 ^b	0.092	0.002	***	NS		
C ₄	13.21	13.49	13.74	13.49	13.68	13.78	14.03	13.80	14.03	13.61	0.113	0.938	NS	NS		
C ₂ /C ₃	3.18	3.18	3.18	3.17	3.22	3.24	3.20	3.26	3.25	3.27	0.011	0.463	*	NS		
..... 6 h post incubation																
TVFA	56.39 ^{ab}	57.55 ^a	55.47 ^{ab}	52.68 ^{ab}	49.38 ^b	45.37 ^{bc}	48.27 ^b	46.33 ^{bc}	42.67 ^d	41.36 ^d	1.311	0.0003	***	*		
Molar proportion (mmoles/100mmoles) :																
C ₂	63.29	63.14	63.59	63.55	63.84	62.17	62.13	62.49	62.21	62.10	0.263	0.052	***	NS		
C ₃	19.39 ^a	19.37 ^a	19.37 ^a	19.02 ^a	18.83 ^b	19.18 ^{ab}	19.11 ^a	19.04 ^{ab}	18.82 ^b	18.70 ^b	0.063	0.048	NS	*		
C ₄	13.70 ^{ab}	13.83 ^{ab}	13.75 ^{ab}	13.94 ^{ab}	14.16 ^a	12.32 ^{bc}	11.89 ^c	12.55 ^{bc}	12.43 ^{bc}	12.40 ^{bc}	0.205	0.013	***	NS		
C ₂ /C ₃	3.21 ^c	3.21 ^c	3.23 ^c	3.27 ^{bc}	3.32 ^{ab}	3.30 ^{ab}	3.30 ^{ab}	3.34 ^a	3.38 ^a	3.39 ^a	0.301	0.001	**	NS		
..... 12 h post incubation																
TVFA	66.41 ^a	66.54 ^a	64.44 ^a	61.50 ^{ab}	59.13 ^{ab}	56.45 ^{bc}	58.57 ^{ab}	57.26 ^{ab}	54.43 ^c	53.26 ^c	1.205	0.043	**	*		
Molar proportion (mmoles/100mmoles) :																
C ₂	64.58	64.16	64.43	64.14	64.06	64.06	63.14	63.67	64.06	63.94	0.118	0.342	NS	NS		
C ₃	18.69 ^{ab}	18.90 ^a	18.90 ^a	18.60 ^{ab}	18.20 ^{bc}	18.55 ^{ab}	18.62 ^{ab}	18.28 ^{bc}	18.24 ^{bc}	18.02 ^c	0.074	0.017	NS	*		
C ₄	12.04	13.46	12.91	12.90	13.12	12.63	12.45	12.62	13.20	12.25	0.141	0.831	NS	NS		
C ₂ /C ₃	3.43 ^{ab}	3.34 ^b	3.41 ^a	3.44 ^{ab}	3.52 ^a	3.48 ^{ab}	3.45 ^{ab}	3.48 ^{ab}	3.52 ^a	3.54 ^a	0.015	0.038	*	NS		
..... 24 h post incubation																
TVFA	77.64 ^{ab}	82.16 ^a	78.98 ^{ab}	75.78 ^{ab}	75.06 ^{ab}	69.14 ^{bc}	70.97 ^b	69.56 ^{bc}	66.34 ^c	66.14 ^c	1.261	0.0004	***	*		
Molar proportion (mmoles/100mmoles) :																
C ₂	64.11	64.02	64.43	63.84	65.12	63.64	63.83	63.90	63.60	64.15	0.189	0.098	NS	NS		
C ₃	18.83 ^{ab}	19.27 ^a	18.88 ^{ab}	18.71 ^{ab}	18.07 ^{bc}	17.50 ^{bc}	18.93 ^a	17.71 ^{bc}	17.04 ^c	16.69 ^c	0.198	0.002	***	*		
C ₄	12.68	12.34	12.97	13.21	12.07	12.54	12.17	12.04	13.05	13.35	0.165	0.655	NS	NS		
C ₂ /C ₃	3.40 ^c	3.32 ^c	3.38 ^c	3.41 ^c	3.61 ^{ab}	3.64 ^{ab}	3.56 ^{bc}	3.64 ^{ab}	3.73 ^{ab}	3.84 ^a	0.039	0.002	**	*		
..... 48 h post incubation																
TVFA	90.79	93.89	91.24	88.78	87.80	82.15	83.21	82.51	81.49	79.15	1.387	0.189	**	NS		
Molar proportion (mmoles/100mmoles) :																
C ₂	63.78	64.05	63.47	64.14	63.68	65.07	63.44	64.23	64.21	66.64	0.284	0.345	NS	NS		
C ₃	18.43 ^{ab}	19.03 ^a	18.41 ^{ab}	18.56 ^{ab}	18.34 ^{ab}	15.82 ^{cd}	16.18 ^c	15.64 ^{cd}	15.92 ^{cd}	15.18 ^d	0.344	0.0003	***	NS		
C ₄	12.85	12.54	13.28	12.25	13.46	12.49	12.62	12.69	12.78	12.15	0.182	0.934	NS	NS		
C ₂ /C ₃	3.46 ^b	3.37 ^b	3.45 ^b	3.46 ^b	3.47 ^b	4.11 ^{ab}	3.92 ^{ab}	4.11 ^{ab}	4.03 ^{ab}	4.39 ^a	0.084	0.0001	***	NS		

¹⁾ TVFA, total volatile fatty acid concentration; C₂, acetic acid; C₃, propionic acid; C₄, butyric acid.

^{2), 3) and 4)} Referred to Table 3.

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; NS, non significant.

Table 6. Effects of buffer extraction of forages on degradation parameters (a, b and c) and effective degradation (ED) of major components of forages (%) *in vitro*

Items ¹⁾	Before extraction					After extraction					SEM ²⁾	Pr>F ³⁾	Effect ⁴⁾	
	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw			EE	FE
Dry matter :														
a	1.42 ^a	1.50 ^a	1.34 ^a	0.81 ^b	0.85 ^b	0.52 ^c	0.55 ^c	0.43 ^c	0.28 ^d	0.27 ^d	0.110	0.003	***	*
b	52.69 ^a	54.07 ^a	51.95 ^a	49.92 ^{ab}	49.86 ^{ab}	44.77 ^b	46.56 ^{ab}	44.77 ^b	43.84 ^b	44.09 ^b	0.882	0.0001	***	NS
c	0.052	0.060	0.061	0.051	0.051	0.050	0.060	0.054	0.050	0.051	0.002	0.999	NS	NS
EDDM	28.63 ^a	30.34 ^a	28.70 ^a	26.02 ^a	23.56 ^b	23.56 ^b	24.99 ^b	23.58 ^b	22.72 ^b	22.34 ^b	0.767	0.039	***	*
Crude protein :														
a	2.58 ^a	2.10 ^{ab}	2.34 ^a	1.96 ^{ab}	1.55 ^{bc}	1.91 ^{ab}	1.83 ^{ab}	2.15 ^{ab}	1.76 ^{ab}	1.33 ^c	0.131	0.670	*	NS
b	52.08 ^{ab}	56.27 ^a	50.26 ^{ab}	47.33 ^b	45.85 ^b	42.59 ^{bc}	45.61 ^b	43.62 ^{bc}	39.78 ^{bc}	38.35 ^c	1.215	0.0001	*	NS
c	0.101	0.111	0.122	0.110	0.090	0.092	0.104	0.092	0.094	0.083	0.005	0.972	*	NS
EDCP	37.13 ^a	40.93 ^a	37.30 ^a	34.50 ^{ab}	30.74 ^b	29.40 ^b	31.70 ^b	30.15 ^b	27.73 ^{bc}	24.28 ^c	1.165	0.0004	*	NS
Neutral detergent fiber :														
a	0.60 ^{ab}	0.99 ^a	0.71 ^{ab}	0.47 ^b	0.50 ^b	-0.11 ^c	0.17 ^c	-0.12 ^c	-0.29 ^d	-0.14 ^c	0.116	0.005	**	NS
b	53.25 ^a	53.41 ^a	53.57 ^a	51.49 ^a	51.96 ^a	44.51 ^{bc}	44.91 ^{bc}	45.33 ^{bc}	42.63 ^{bc}	42.67 ^c	1.075	0.0003	**	NS
c	0.050	0.050	0.050	0.050	0.040	0.050	0.051	0.050	0.050	0.040	0.001	0.999	NS	NS
EDNDF	25.90 ^a	26.68 ^a	25.91 ^a	24.64 ^a	24.35	21.15 ^{ab}	21.80 ^{ab}	21.43 ^{ab}	20.34 ^{ab}	19.82 ^b	0.600	0.003	***	NS

¹⁾ a, rapidly soluble fraction; b, degradable fraction in the rumen at time infinity; c, degradation rate of b per time.
^{2), 3) and 4)} Referred to Table 3. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; NS, non significant.

In vitro 방법에 의한 조사료 내 주요 성분(건물, 조단백질 및 NDF)의 유효분해율 (effective degradability, ED)은 Table 6에서 보는 바와 같다.

먼저, 건물에서의 분해율 관련 parameter 중 a 값은 조사된 전체 조사료에서 buffer 추출 전이 추출 후에 비해서 높았으며 (p<0.001), 사료 효과는 다른 조사료에 비해 툴페스큐짚과 벧짚에서 크게 낮은 (p<0.05) 것으로 조사되었다. 또한 b 값의 경우 역시 추출 전에 비해 추출 후에서 현저히 낮았으나 (p<0.001) 사료 간 차이는 없었다. 그러나 c 값의 경우 추출 전·후 간 차이가 없었던 것은 물론 사료 간 차이도 없는 것으로 나타났다. 조사된 a 및 b값에 영향을 받아 벧짚을 제외한 조사료에서 추출 전

의 건물 유효분해율 (EDDM)이 더 높았다 (p<0.001). 조단백질에서의 a, b 및 c 값은 추출 전에 비해 추출 후에서 낮았으나 (p<0.05) 사료 간 차이는 없었다. 이러한 경향은 조단백질 유효분해율 (EDCP)에서도 비슷하였으며, 다른 조사료 종류에 비해 툴페스큐짚과 벧짚의 유효분해율이 낮은 (p<0.05) 것으로 조사되었다. 한편, NDF의 경우 a 값과 b 값 (p<0.01) 및 NDF 유효분해율 (EDNDF, p<0.001)은 추출 후에 비해 추출 전에 더 높았으나 (p<0.01) 사료 간 차이는 없었다.

4) 가스 생성량

반추위미생물에 의해 사료분해과정 중 생성

Table 7. Carbon dioxide (CO₂) production (ml) from incubation of forages *in vitro* by time

Time (h)	Before extraction					After extraction					SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾	Effect ³⁾	
	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw			EE	FE
0-3	4.93 ^a	3.85 ^a	3.71 ^{ab}	1.85 ^{cb}	1.76 ^c	1.98 ^c	3.09 ^b	1.41 ^{cd}	0.98	0.98 ^d	0.297	0.0001	**	*
3-6	11.67 ^a	11.79 ^a	9.19 ^{ab}	7.17 ^{bc}	6.04 ^c	5.46 ^{cd}	8.04 ^b	4.95 ^{cd}	2.84 ^c	3.47 ^c	0.682	0.0001	***	*
6-12	24.20 ^b	32.68 ^a	24.50 ^b	21.29 ^b	17.01 ^c	16.30 ^c	24.29	15.76 ^c	7.68 ^{db}	11.29 ^{cd}	1.589	0.0001	**	*
12-24	39.84 ^{bc}	52.07 ^a	43.17 ^b	34.99 ^c	31.98 ^d	33.44 ^{cd}	48.46 ^{ab}	34.81 ^{cd}	23.08 ^d	26.40 ^d	1.748	0.0001	*	**
24-48	51.75 ^b	62.21 ^a	56.75 ^{ab}	46.22 ^{bc}	45.87 ^d	43.11 ^{cd}	50.33 ^b	49.56 ^b	35.66 ^d	36.87 ^d	1.775	0.0001	NS	**
Total	123.39 ^b	162.60 ^a	137.32 ^b	111.52 ^{bc}	102.66 ^c	100.29 ^c	134.21 ^b	106.50 ^c	70.24 ^d	79.01 ^d	2.218	0.0001	**	**

1), 2) and 3) Referred to Table 3.

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; NS, non significant.

Table 8. Regression between CO₂ production and degradation of major feed components in all forages *in vitro* before extraction

Feed components	Regression equation	R ²
Before extraction :		
Dry matter	$y = -0.00004x^2 + 0.1555x - 12.002$	0.9702
Crude protein	$y = -0.0042x^2 + 1.3706x - 29.292$	0.9217
Neutral detergent fiber	$y = -0.0009x^2 + 0.5038x - 15.308$	0.8925
After extraction :		
Dry matter	$y = 0.00006x^2 + 0.1075x - 6.6892$	0.9506
Crude protein	$y = -0.0031x^2 + 1.1948x - 21.479$	0.8782
Neutral detergent fiber	$y = -0.0004x^2 + 0.3452x - 8.7088$	0.8462

되는 CO₂ 량도 24시간 배양까지는 추출 전에 더 많았으며 (p<0.05~p<0.001, Table 7), 예상된 바와 같이 톨페스큐짚과 벃짚에 비해 건초 형태의 조사료로부터의 CO₂ 생성량이 더 많았다 (p<0.05~p<0.01). 조사된 조사료 자원 중 유효 분해율이 가장 높았던 알팔과 건초에서 CO₂ 생성량도 가장 많은 것으로 나타났다. 48시간 동안의 배양 중 생성된 CO₂ 총량 역시 추출 후에 비하여 추출 전에 더 많았으며 (p<0.01), 짚류(톨페스큐 및 벃짚)에 비해 건초에서 현저히 높은 (p<0.01) 것으로 나타났다. Buffer 추출

전·후 조사료 내 주요 성분 분해율과 CO₂ 생성량과의 회귀방정식은 Table 8에서 보는 바와 같다.

메탄가스(CH₄) 모든 배양시간에서 추출 전에 비해 추출 후에 크게 감소되었으며 (p<0.01~p<0.001), 12~24시간을 제외하고는 짚류에 비해 건초에서 현저히 높은 (p<0.05) 것으로 나타났다 (Table 9). 48시간 동안의 배양 중 생성된 CH₄ 총량 역시 추출 후에 비하여 추출 전에 더 많았으며 (p<0.05), 짚류에 비해 건초에서 현저히 높았다 (p<0.01). Buffer 추출 전·후 조사

Table 9. Methane (CH₄) production (ml) from incubation of forages *in vitro* by time

Time (h)	Before extraction					After extraction					SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾	Effect ³⁾	
	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw	Timothy	Alfalfa	Klein	Tall fescue straw	Rice straw			EE	FE
0-3	2.30 ^a	1.66 ^b	1.69 ^b	0.91 ^c	1.02 ^c	1.09 ^c	1.48 ^b	0.81 ^{cd}	0.51 ^d	0.61 ^d	0.123	0.0001	**	*
3-6	5.58 ^a	5.09 ^a	4.60 ^b	3.54 ^{cb}	3.73 ^c	3.20 ^d	3.85 ^c	2.80 ^d	2.36 ^d	2.42 ^d	0.261	0.0001	***	*
6-12	12.05 ^{ab}	14.34 ^a	13.74 ^a	11.09 ^{ab}	9.76 ^b	9.08 ^b	11.94 ^a	8.41 ^{bc}	7.47 ^{bc}	7.44 ^c	0.6432	0.0001	**	*
12-24	20.73 ^{ab}	24.77 ^a	23.87 ^a	19.29 ^{ab}	18.73 ^b	17.60 ^b	19.83 ^{ab}	17.35 ^b	12.31 ^c	15.40 ^{bc}	0.774	0.0001	**	NS
24-48	28.73 ^b	34.58 ^a	33.11 ^a	26.74 ^b	26.30 ^{bc}	22.81 ^c	24.36 ^{bc}	24.97 ^{bc}	23.64 ^{bc}	23.01 ^c	0.917	0.0001	**	*
Total	69.39 ^{ab}	80.44 ^a	77.01 ^{ab}	61.57 ^b	59.54 ^b	53.78 ^{bc}	61.46 ^b	54.34 ^{bc}	46.29 ^c	48.88 ^c	1.412	0.0001	***	**

1), 2) and 3) Referred to Table 3.

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; NS, non significant.

Table 10. Regression between CH₄ production and degradation of major feed components in all forages *in vitro* before extraction

Feed components	Regression equation	R ²
Before extraction :		
Dry matter	y = 0.000001x ² +0.072x-5.8181	0.9862
Crude protein	y = -0.0031x ² +0.8206x-17.882	0.8702
Neutral detergent fiber	y = -0.0003x ² +0.2287x-7.0893	0.9310
After extraction :		
Dry matter	y = 0.00002x ² +0.0592x-3.5959	0.9669
Crude protein	y = -0.0024x ² +0.6696x-11.738	0.8737
Neutral detergent fiber	y = -0.0002x ² +0.163x-3.9027	0.8871

료 내 주요 성분 분해율과 CH₄ 생성량과의 회귀방정식은 Table 10에서 보는 바와 같다.

IV. 고찰

CNCPS는 사료 내 단백질과 탄수화물의 균형에 중점을 두고 있으며, 궁극적인 목적은 반추위미생물과 반추동물에 의한 단백질과 탄수화물의 이용성을 극대화하는 것이다(Licitra et al., 1996). 또한 CNCPS 분석을 통하여 반추위

내에서는 물론 하부 소화기관으로 이동되는 물질과 발효 산물을 양적으로 평가할 수 있는 것으로 알려져 있다(Bauchop, 1979; Coleman, 1980; Citron et al., 1987). 그러한 이유로 CNCPS는 영양소의 대량 손실 없이 미생물 단백질 생산을 극대화시킴으로서 반추동물 사료의 이용 효율을 개선토록 하는 사료 조제에 이용될 수 있는 것으로 여겨진다. 반추위 내에서의 사료 분해율과 발효산물은 가축의 생산성에 크게 영향을 미치기 때문에 (Nocek and Russell, 1988)

반추위 내 최적 발효는 물론 발효로 인한 영양소 손실이 최소화되도록 사료를 통한 균형 잡힌 영양소 공급이 요구된다. 특히, 사료 내의 단백질은 가장 값이 비싼 성분이기 때문에 반추위 내 사료 단백질의 이용 효율 개선이 매우 중요한 과제라 할 수 있다. 반추위 미생물, 특히 *bacteria*는 암모니아를 이용할 수 있으나 (Hungate, 1966) 많은 경우에 암모니아 생성율이 이용율을 초과함으로써 결과적으로 단백질의 이용효율을 감소시키게 된다.

반추위 내에서 사료가 분해되지만 일부는 분해되지 않은 채 하부로 이동되는데, 반추위에서의 사료 분해율이 체재 시간과 통과율에 의해 결정되기도 하지만 (Waldo and Smith, 1972), 기본적으로 분해율은 각 사료원료의 기본적인 특성과 밀접한 관계가 있다 (Licitra et al., 1996; Sniffen et al., 1992). 본 시험에서 여러 종류의 조사료에 대한 발효 특성과 분해율을 조사하기에 앞서 buffer 용해도를 조사하고 단백질을 분획하는 이유가 여기에 있다.

본 시험에서 3종류의 건초 (티머시, 알팔파 및 클라인)와 2종류의 짚 (톨페스큐와 벧짚)을 대상으로 사료 단백질의 buffer 용해도와 단백질 분획은 물론 발효특성과 분해율 및 가스 (CO_2 및 CH_4) 생성량을 *in vitro* 방법으로 조사하였다. 먼저, 본 연구에 사용된 조사료 중 단백질 함량에서 짚류 (톨페스큐짚 및 벧짚)에 비해 건초 (티모시, 알팔파 및 클라인)에서 현저히 높았으며 (Table 1), 총 단백질 함량 중 단백질의 buffer 용해도 (Table 2)에서도 건초에서 상대적으로 높은 경향을 보였다. 또한 총 단백질 중 건초 내 쉽게 분해될 수 있는 단백질 fraction (A) 함량이 짚류에 비해 높았고, 반추동물의 체내에서 요긴하게 이용될 수 있는 사료 단백질 fraction (B1 + B2 + B3) 함량에서 건초와 짚류 간 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다 (Table 2). 그러나 건초의 단백질 함량이 짚류에 비해 높기 때문에 전체적으로는 건초 단백질의 체내 이용량이 높을 것으로 예상되는데,

사료 내 단백질 fraction에 대한 그러한 특성은 이미 Licitra 등 (1996) 및 Sniffen 등 (1992)에 의해 발표된 바 있다.

한편, 여과시킨 반추위액과 buffer를 50 대 50의 비율로 혼합된 배양액을 이용하여 사료의 *in vitro* 발효 성상을 조사한 바, 배양시간이 경과함에 따라 배양액의 pH (Table 3)는 점차 낮아지는 반면 암모니아 농도 (Table 4), 총 VFA 농도 (Table 5) 및 가스발생량 (Table 7 및 Table 9)은 점차 증가되는 경향을 보여 반추위 미생물의 활동이 정상적으로 이루어졌음을 알 수 있다. 또한 그러한 발효 성상 모두에서 borate-phosphate 용액에 의한 추출 유무에 의한 차이는 물론 건초와 짚류 간 차이가 현저히 나타났다. 즉, 배양 24시간까지 대체로 조사료 자원을 borate-phosphate 용액으로 추출한 후의 배양액에 비하여 추출 전 배양액의 pH가 낮았으며, 짚류에 비해 알팔파와 티머시 건초에 의한 pH가 낮았다 (Table 3). 또한 암모니아 농도의 경우 배양 24시간까지 대체로 추출 후의 배양액에 비하여 추출 전 배양액에서 높았으며 그 중 알팔파 건초와 벧짚간의 차이가 가장 큰 것으로 나타났다 (Table 4). 배양액 내 주요 VFA 조성에서는 추출 전·후 간 및 조사료 간 큰 차이가 없었으나 총 VFA 농도는 대부분의 배양 시간에서 추출 후의 배양액에 비하여 추출 전 배양액에서 높았으며, 그 중 알팔파 건초와 벧짚간의 차이가 가장 큰 것으로 조사되었다 (Table 5). Borate-phosphate buffer로 인하여 추출되는 물질이 쉽게 용해될 수 있는 단백질은 물론 탄수화물까지 포함될 수 있기 때문에 (Sniffen et al., 1992) 본 시험에서의 조사 결과로 미루어 보아 buffer 추출 전·후의 조사료 자원으로부터의 buffer 용해도와 단백질의 분획, 그리고 VFA 농도 등이 상호 밀접한 관계를 보인 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 Shinekhuu 등 (2009)에 의해 국내에서 생산된 다양한 종류의 사료작물을 대상으로 조사된 결과에서도 비슷한 양상을 보였다.

본 시험에서 조사된 발효 성상은 반추위미생물에 의한 분해율 및 가스 발생량과 크게 관련이 있는 것으로 여겨진다. 즉, 조사된 조사료 내 성분(건물, 조단백질 및 NDF)의 유효 분해율(ED)이 borate-phosphate 용액으로 추출한 후에 비하여 추출 전에 높았는데, 이는 추출 전 조사료의 경우 모든 성분에서 매우 빠르게 용해될 수 있는 a 값과 분해 반추위에서 가능한 부분(b 값)이 높았기 때문이며, 건물과 조단백질의 경우 b 부분의 시간 당 분해율 역시 높았기 때문인 것으로 여겨진다. 전체적으로는 이러한 차이가 알팔파 건초와 벧짚에서 가장 큰 것으로 조사되었다(Table 6). 특히, 벧짚의 경우 사실상 체내에서 이용이 불가능한 것으로 알려지는 C fraction이 다른 조사료에 비해 현저히 높아(15.05%, Table 2) 이용성 측면에서의 사료적 가치는 여전히 낮은 것으로 여겨진다. Han과 Garrett(1986)의 보고에 의하면, 대체로 건초에 비해 짚류의 NDF 함량이 높을 뿐만 아니라 반추위에서 거의 소화가 되지 않는 silica 및 lignin 등이 다량 함유되어 있기 때문에 이들 짚류의 건물과 NDF 분해율이 낮다고 하였다. CO₂(Table 7) 및 CH₄(Table 9) 발생량 역시 조사료의 분해율과 비슷한 경향을 보였는데, 대부분 유효 분해율이 높을수록 이들 가스 발생량도 증가되었다.

그러나 일부 건초와 짚류를 대상으로 buffer 추출이 발효특성과 분해율 및 가스 발생량에 미치는 효과를 조사한 바, 건초와 짚류 간 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 대체로 반추위 미생물 분포 및 미생물의 활성 역시 가장 높다고 여겨지는 시점인 사료 급여 후 2시간에서 반추위액을 채취함으로써 기본적으로 위액의 높은 암모니아 및 VFA 농도가 배양액을 이용한 조사료 자원의 *in vitro* 발효에 영향을 준 것으로 보인다. 아울러 *in vitro* 배양 특성상 조사료 분해율이 전체적으로 낮았기 때문에 CO₂ 및 CH₄ 생성량에서 일반 건초와 짚류와의 차이가 작았던 것으로 여겨진다.

본 시험에서 벧짚을 제외하고는 모두 수입된 조사료 자원을 이용하였다. Sniffen 등(1992)에 의해 사료 자원에 대한 CNCPS의 개념이 정립되었으며 Fox 등(1992) 및 Licitra 등(1996)에 의해 CNCPS의 반추동물에 대한 적용 가능성이 확립되었으나 당시 조사된 조사료 자원은 생산 시기(Yoon and Kazuo, 2000; Kim et al. 2003)에 따라 영양적 가치가 달라질 수 있기 때문에 본 시험에서 이용된 조사료와 직접 비교될 수는 없다. 그러나 Sniffen 등(1992)이 이용한 조사료 중 알팔파 건초와 티모시 건초에 대한 buffer 용해도와 단백질의 분획 결과는 본 시험에서의 결과와 매우 유사한 경향을 보였다. 또한 Fox 등(1992)이 CNCPS에 따른 영양소 요구량에 맞추어 사료를 조제하여 젖소 미경산우 및 경산우에 적용하고 그 결과를 NRC 영양소 요구량이 적용된 사료와 비교한 바, 사료 이용성 측면에서 보다 유리한 결과를 얻었다고 발표하였다. 그러나 국내에서는 본 시험에서와 같이 조사료 자원에 대한 CNCPS 분석은 물론 분석 결과가 반추위 미생물에 의한 발효 및 분해율에 미치는 효과 등이 조사된 바 없어 보다 다양한 종류의 조사료 자원에 대한 구체적인 연구가 요구된다 하겠다.

본 시험의 결과를 종합하면 다음과 같다. 즉, 조사료 자원에 대한 buffer 용해도와 단백질의 분획이 *in vitro* VFA 농도와 분해율 및 가스(CO₂ 및 CH₄) 발생량 간 상호 밀접한 관계를 보이는 것으로 여겨진다. 이에 따라 조사료 자원에 대한 buffer 용해도와 단백질 분획을 반추동물 TMR 조제에 접목시킬 경우 체내에서의 사료 이용 효율 개선을 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

V. 사 사

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었다.

VI. 요약

본 시험에서 건초(티머시, 알팔파 및 클라인)와 짚류(톨페스큐 및 벚짚)의 buffer 용해도와 단백질 분획이 실시되었으며, 조사료 자원의 buffer 추출이 *in vitro* 발효 정상, 분해율 및 가스(CO₂ 및 CH₄) 생성량에 미치는 효과를 조사하였다. 다른 조사료에 비해 총 단백질 중 buffer 가용성 조단백질과 A fraction은 알팔파 건초에서 각각 61% 및 41.77%로 가장 높았으며 벚짚에서 가장 낮았다(각각 42.8% 및 19.78%). 총단백질 중 B1 fraction은 조사된 조사료간 비교적 큰 차이를 보이지 않았으나 B2 fraction에서는 다른 조사료(6.34~8.85%)에 비하여 톨페스큐짚(10.05%) 및 클라인 건초(12.34%)에서 다소 높은 수준을 보였다. 총 단백질 중 B3 fraction이 차지하는 비율은 톨페스큐짚에서 38.49%로 가장 높았으나 다른 조사료 자원 간에는 큰 차이가 없었으며, C fraction의 경우 벚짚에서 가장 높은 비율(15.05%)을 보였다. 모든 사료에서 배양 개시 후 3시간(P<0.01) 및 6시간(P<0.05)에서 buffer 추출 전에 비해 추출 후 배양액의 pH가 증가되었으며, 배양 6시간(P<0.05) 및 12시간(P<0.001)에서 다른 사료에 비해 티모시 건초 및 알팔파 건초로부터의 pH가 낮았다. 배양액의 암모니아 농도는 모든 배양시간에서 가용성 물질의 추출 전·후에 다른 조사료에 비해 알팔파 건초에서 가장 높았으나 모든 사료의 추출효과는 배양 3시간(P<0.01)에서만 나타났다. 배양액의 총 VFA 농도는 배양 24시간까지 알팔파 건초에서 가장 높았던 반면 톨페스큐짚과 벚짚에서 가장 낮았다. 또한 모든 조사료에서 buffer 추출 전에 비하여 추출 후에 총 VFA 농도가 감소되었다(P<0.01~P<0.001). Acetic acid(C₂)의 조성 비율에서는 배양 6시간까지 추출 전에 더 높았으나(P<0.001) 사료 간 차이는 없었다. Propionic acid(C₃) 조

성 비율 역시 배양 개시 후 3, 24 및 48시간(P<0.001)에서 추출 전에 더 높았으며, 6 및 12시간의 배양액에서 대부분 건초(티모시, 알팔파 및 클라인)와 짚류(톨페스큐짚 및 벚짚) 간 차이가 있는 것으로 조사되었다(P<0.05). 그러나 butyric acid(C₄) 조성비율의 경우 대부분의 배양시간에서 사료 간 차이는 없었다. 건물에서의 분해율 관련 parameter 중 a 값은 조사된 전체 조사료에서 buffer 추출 전이 추출 후에 비해서 높았으며(P<0.001), 다른 조사료에 비해 톨페스큐짚과 벚짚에서 크게 낮았다(P<0.05). 또한 b 값의 경우 역시 추출 전에 비해 추출 후에서 현저히 낮았으나(P<0.001) 사료 간 차이는 없었다. 벚짚을 제외한 조사료에서 추출 후에 비해 추출 전의 건물 유효분해율(EDDM)이 더 높았다(P<0.001). 조단백질에서의 a, b 및 c 값은 추출 전에 비해 추출 후에서 현저히 낮았으나(P<0.05) 사료 간 차이는 없었다. 조단백질 유효분해율(EDCP)에서는 다른 조사료 종류에 비해 톨페스큐짚과 벚짚에서 낮았다(P<0.05). 한편, NDF의 경우 a 값과 b 값(P<0.01) 및 NDF 유효분해율(EDNDF, P<0.001)은 추출 후에 비해 추출 전에 더 높았으나(P<0.01) 사료 간 차이는 보이지 않았다. 반추위미생물에 의해 사료분해과정 중 생성되는 CO₂ 량도 24시간 배양까지는 추출 전에 더 많았으며(P<0.05~P<0.001), 톨페스큐짚과 벚짚에 비해 건초 형태의 조사료로부터의 CO₂ 생성량이 더 많았다(P<0.05~P<0.01). 메탄가스(CH₄) 생성량 역시 모든 배양시간에서 추출 전에 비해 추출 후에 크게 감소되었으며(P<0.01~P<0.001), 12~24시간을 제외하고는 짚류에 비해 건초에서 현저히 높은(P<0.05) 것으로 나타났다. 본 시험의 결과를 종합하면, 조사료 자원에 대한 buffer 용해도와 단백질의 분획이 *in vitro* VFA 농도와 분해율 및 가스(CO₂ 및 CH₄) 발생량 간 상호 밀접한 관계를 보이는 것으로 여겨진다. 이

에 따라 조사료 이용 효율 개선을 위해 조사료 자원에 대한 buffer 용해도와 단백질 분획을 반추동물 TMR 조제에 활용할 필요가 있는 것으로 여겨진다.

VI. 인 용 문 헌

1. AOAC. 1991. Official Methods of Analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
2. Bauchop, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 148-159.
3. Cho, Y.M., E.G. Kwan, S.S. Chang, T.I. Kim, B.K. Park, S.W. Kang and B.H. Baek. 2008. Effects of total mixed ration on growth performance and carcass characteristics of Hanwoo steers. *Kor. J. Anim. Sci. and Tech.* 50:363-372.
4. Citron, A., A. Breton and G. Fonty. 1987. Rumen anaerobic fungi. *Bull. Inst. Pasteur.* 85:329-346.
5. Coleman, G.S. 1980. Rumen ciliate protozoa. *Adv. Paracitol.* 18:121-134.
6. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11:1-42.
7. Fawcett, J. K. and Scott, J. E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 13:156-163.
8. Fox, D.G., C.J. Sniffen, J.D. O'Connor, J.B. Russell and P.J. Van Soest. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *J. Anim. Sci.* 70:3578-3596.
9. Han, I.K. and Garrett, W.N. 1986. Improving the dry matter digestibility and voluntary intake of low quality by various treatment : A review. *Kor. J. Anim. Sci.* 28:199-213.
10. Han, I.K., I.K. Baik, Y.J. Choi, B.K. Kim and S.W. Seo. 2011. *Feed Resources Handbook*. SNU Publishing Co.
11. Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and It's Microbes*. Academic Press. New York.
12. Ji, B.J., K.L. Jin, S. Judder, Wei-ze Qin, Y.K. Oh, Y.S. Sohn, S. Seo and M.K. Song. 2010. Estimation of availability and TDN of various silages by cattle. *Kor. Grassl. Sci.* 30:169-178.
13. Judder, S., K.L. Jin, B.J. Ji, X. Li., Y.K. Oh, S.K. Hong, M.K. Song. 2009b. Protein fractionation of whole crop silages, and effect of borate-phosphate buffer extraction on *in vitro* fermentation characteristics, gas production and degradation. *Kor. J. Anim. Sci. and Tech.* 51: 69-378.
14. Kim, W.H., S. Seo, S.H. Yoon, K.Y. Kim, Y.M. Cho, T.I. Park, J.M. Koh and G.J. Park. 2003. Selection of promising barley cultivar for silage. 2. Nutrient value and total digestible nutrient yield. *Kor. Grassl. Sci.* 23:283-288.
15. Lee, S.C. 2000. Effects of chemical treatments and ensiling on the chemical composition and degradation rate in the rumen. *Kor. Grassl. Sci.* 20:177-184.
16. Lee, I.D. and H.S. Lee. 2006. A comparative study on the dry matter yield and nutritive value from rye and hairy vetch seeding types in Daejeon area. *Kor. Grassl. Sci.* 26:249-256.
17. Licitra, G., Hernandez, T.M. and Van soest, P.J. 1996. standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:347-358.
18. McDougall, E.I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
19. Nocek, J. and J.B. ussell. 1988. Protein and carbohydrate as an integrated system. Relationship of ruminal availability to microbial contribution and milk production. *J. Daity Sci.* 71:2071-2079.
20. NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press. Washington, DC.
21. Park, H.S., K.J. Whang, N.G. Park, G.J. Choi, J.K. Lee, D.W. Cheon and M.S. Ko. 2008. Comparison of forage production and feed value of winter forage crops in Jeju. *Kor. Grassl. Sci.* 28:215-220.
22. Qin, Wei-ze, K.L. Jin, J.K. Kim, Y.K. Oh, S.C. Lee, M.K. Song. 2010. Estimation of availability of whole crop barley and rye silage TMR in the cattle. *Kor. Grassl. Sci.* 30: 343-354.
23. Ørskov, E.R. and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according

- to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 92: 99-506.
24. Russell, R.J., J.D. O'Connor, D.G. Fox, P.J. Van Soest and C.J. Sniffen. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
25. SAS. 2002. SAS Procedures Guide release 9.0 SAS institute Inc., Cary, NC. U.S.
26. Seo, I.J., M.H. Kim, D.S. Kim, S.R. Lee and W.J. Maeng. 2005. Effect of fiber sources on ruminal pH, buffering capacity and digestibility in sheep. *Kor. Grassl. Sci.* 25:177-184.
27. Sniffen, C.J., J.D. O'Connor, P.J. Van Soest, D.G. Fox and J.B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577.
28. Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
29. Waldo, D.R. and L.W. Smith. 1972. Model of cellulose disappearance from the rumen. *J. Dairy Sci.* 55:472-480.
30. Yoon, S.K. and A. Kazuo, A. 2000. Effects of maturing stages on chemical composition for feed and *in vitro* dry matter digestibility of triticale. *Kor. Grassl. Sci.* 20:227-232.

(Received February 1, 2012/Accepted March 12, 2012)