양돈용 발효사료의 발효조건 설정 연구

조성백 · 김동운 · 양승학 · 박규현 · 최동윤 · 유용희 · 황옥화
농촌진흥청 국립축산과학원

Establishment of Producing Conditions of Fermentation Feed for Swine

Cho, S. B., Kim, D. W., Yang, S. H., Park, K. H., Choi, D. Y., Yoo, Y. H. and Hwang, O. H.
National Institute of Animal Science, RDA. Suwon 441-706, Korea

Summary

This study was conducted to determine the effect of feed additives including probiotics, moisture and feed ingredients and the effect of fermented feed on digestibility and volatile fatty acid (VFA) level in finishing pigs. Feed was mixed with microbials including *Saccharomyces, Lactobacillus, Enterococcus* and *Pediococcus* together with different levels of probiotics, 0.25, 0.5, 1, 2, 3%. Addition of probiotics showed improved fermentation rate after 48 h incubation. To determine the optimal moisture level for fermentation, different levels of water, 30, 40, 50 and 60%, were added into the feed. Fermentation rate of feed with 40~50% moisture level was higher than that from 60% level at 60 h post-fermentation. *In vitro* fermentation rate of feed ingredients was analyzed by comparing VFA levels. Beet pulp and tapioca showed higher fermentation rate compare to other ingredients including canola meal or rapeseed meal. To determine the effect of administration of fermented feed *In vivo*, feces from finishing pigs were analyzed. Finishing pigs administrated with fermented feed showed improved digestibility and higher volatile fatty acid (VFA) level. In conclusion, results from the current study indicate that 40~50% of moisture with addition of beet pulp and tapioca in feed is optimal condition for fermentation. Furthermore, our data suggest that fermentation of feed can improve the feed quality and digestibility, thereby provide more nutrient in finishing pigs.

(**Key words :** Swine, Fermentation Feed, Probiotics, Volatile Fatty Acid)

서 론

발효사료는 소화성 또는 비소화성 원료에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료로 균체가 포함되어 있어 생균제의 기능을 가지고 있다. 양돈용 발효사료는 사료비가 절감되고 생산성이 개선되면서 주목받기 시작하였고, 현재 소화율이 낮은 조사료 및 농산부산물을

* 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, R.D.A.)
Corresponding author : Ok Hwa, Hwang, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, Korea 441-706. Tel: 031-290-1724, E-mail: hoh1027@korea.kr
2012년 7월 9일 투고, 2012년 11월 28일 심사완료, 2012년 12월 6일 게재확정

이용하여 활발히 연구되고 있다. 상당수의 양돈 농가에서는 발효사료를 직접 제조하여 사용하고 있으며, 발효사료 급여로 돼지의 생산성 향상 및 돈사 악취저감에 기여할 것으로 기대하고 있다 (Wilfart 등, 2007[19]; 송과 하, 2007[20]; 한 등, 1967[21]). 발효사료를 제조하기 위해서는 발효 미생물과 미생물 증식을 위한 원료사료의 선발이 중요하다. 현재 발효사료 제조를 위하여 많이 사용하는 미생물은 *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus oryzae,* 및 *Bacillus subtillis* 등이 있고 (Ghanem 등, 2000[4]), 대부분 혼합 미생물 제재를 사용하고 있다. 발효사료 제조를 위한 원료는 발효가 잘 되는 성분과 잘 되지 않는 성분이 적절히 혼합되어 있다 (Anugwa 등, 1989[1]; Schoenherr 등, 1989[14]; Stahly와 Cromwell, 1986[16]). 미생물은 발효과정에서 사료 내 영양분을 분해하여 증식하고, 발효산물로 생성된 유기산, 당류 및 미네랄 등은 유익한 미생물의 성장을 촉진한다 (Kim 등 2006[7]; Lee 등 2009[10]; Stronach 등 1989[17]). 이렇게 제조된 발효사료는 원료사료의 영양 성분과 발효과정에서 생성된 유용물질로 인하여 사료적 가치가 크게 개선될 수 있다. 본 논문에서는 양돈 사료에 유산균과 효모로 구성된 혼합 생균제를 첨가하여 양돈용 발효사료 제조를 위한 최적 발효조건 구명 및 발효사료 급여에 의한 돼지 장내 환경변화를 평가하고, 원료사료별 발효능을 측정하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 발효사료 제조용 기초사료의 조성

발효사료 제조를 위한 기초사료는 NRC (1988)[11] 사양표준에서 권장하고 있는 비육돈 (50~80 kg) 용 영양소 요구량에 기준하여 배합하였다. 배합사료 조성은 에너지, 단백질 및 광물질이 풍부하여 미생물이 증식하는데 필요한 기질을 충분히 제공할 수 있을 것으로 기대한다 (Table 1).

Table 1. Composition of basial diet

Ingredients	Total (%)
Corn, yellow	46.35
Corn gluten feed	15.00
Soybean feed	15.00
Wheat bran	20.00
Sugar	3.00
Vitamin mixture[1)]	0.20
Mineral mixture[2)]	0.20
Salt	0.25
Total	100.00

[1)] Provided per kilogram of diet; 1,600,000 IU of vitamin A, 300,000 IU of vitamin D_3, 800 IU of vitamin E, 132 mg of vitamin K_3, 1,000 mg of vitamin B_2, 1,200 mg of vitamin B_{12}

[2)] Provided per kilogram of diet; 2,000 mg of niacin, 60 mg of folic acid, 35,000 mg of choline chloride, 800 mg of pantothenic calcium, 9,000 mg of Zn, 12,000 mg of Mn, 4,000 mg of Fe, 500 mg of Cu, 6,000 mg of I, and 100 mg of Co.

2. 발효사료 제조용 생균제의 조성

발효사료를 제조하기 위하여 사용된 생균제는 원료사료를 호기발효와 혐기발효 할 수 있도록 효모와 유산균이 함유된 혼합제재로서 시중에서 구입하였다. 혼합제재는 효모로 *Saccharomyces cerevisiae* 균주가 이용되었고, 유산균은 *Lactobacillus* 종중에서 *plantarum, latis, brevis,* 그리고 *Enterococcus* 종중에서 *faecium* 및 *Pediococcus* 종중에서 *acidilactici* 가 이용되었다 (Gilliland, 1979[5]).

3. 생균제의 첨가수준과 사료의 수분함량

생균제의 첨가수준을 결정하기 위하여 수분함량이 45%인 기초사료에 6.53×10^8 cfu/mL인 유산균과 7.83×10^5 cfu/mL인 효모가 혼합된 생균제를 사료의 0.25, 0.5, 1, 2, 3% 씩 혼합한 후 37℃ 배양기에서 48시간 배양하였다. 발효사료의 적정 수분함량을 설정하기 위하여 기초사료에 물을 넣어 수분함량이 30, 40, 50, 60% 함유되도록 하였다. 이때 발효용 생균제를 사료에 3% 혼합하고, 37℃ 조건에서 60시간 배양하였다.

4. 미생물 균수측정

멸균된 Saline (0.85% NaCl) 용액 9 ml에 발효사료 1 g을 넣고 혼합한 다음, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}으로 10진 희석하여 분석시료를 준비하였다. 희석된 시료는 MRS 고체배지에 각 100 ㎕씩 도말한 후 37℃에서 28시간 동안 혐기 배양하였다. 호기 조건에서 48시간 더 배양한 후 군집수를 측정하였다. 총 미생물 균수는 측정된 군집수에 10을 곱하여 계산하였다.

5. 원료사료의 발효능 측정

외부에서 첨가된 미생물의 활력을 증진시키기 위하여 원료사료별 발효능을 조사하였다. 원료사료는 양돈용 단미사료를 이용하였고, 선발지표는 *In vitro* 대장발효에서 생성되는 발효산물인 휘발성지방산 농도를 이용하였다. *In vitro* 대장발효법은 Wang 등 (2004)[18]의 방법으로 수행하였고, 휘발성지방산 농도는 가스크로마토그래피 (6890N, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다. 발효산물의 농도 측정을 위한 가스크로마토그래피 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Condition of gas chromatography analysis

Injection	Injection volume	0.2㎕
Inlet	Temperature	250℃
	Split ratio	10:1
Column	HP-INNOWax	30m, 0.25mm, 0.25㎛
	Flow	1.0mL/min
Detector	Temperature	250℃

6. 발효사료 소화시험

개시체중 79.5 kg의 3원 교잡종 [(Yorkshire × Landrace) × Duroc] 비육돈을 처리 당 5두씩 대사케이지에 배치하여 17일간 시험사료를 급여하였다. 시험구는 2처리로서 비육돈 사료구와 비육돈 사료를 발효시킨 발효사료구로 하였다. 발효사료는 수분함량을 40%로 조절한 배합사료에 생균제 0.2%를 접종한 후 25℃에서 10일간 발효시켜 이용하였다. 소화시험 후 신선 분을 채취하여 건물과 조단백질 소화율 및 휘발성 지방산을 분석하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 각각 3회의 반복 실험을 수행하였다. 실험결과에 대한 통계분석은 SAS (Statistical Analysis System, 1996)[12] package GLM (General Linear Model)을 이용하여 분산분석을 실시하였고, 평균간 차이는 Duncan (1955)[3]의 다중검정법에 의해 95% 유의수준으로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 발효사료 제조 시 생균제의 첨가수준

기초사료에 생균제를 수준별로 첨가하여

48시간 배양한 후 균수를 측정한 결과 (Table 3), 유산균 수는 생균제 0.5% 첨가 시 4.53×10^9 CFU/mL로 가장 많았고 2% 첨가 시 1.06×10^9 CFU/mL로 가장 적었다. 또한 효모 수는 1% 첨가 시 2.11×10^8 CFU/mL로 가장 많았고 2%와 3% 첨가 시 3.32×10^6 CFU/mL와 1.06×10^6 CFU/mL로 가장 적었다 ($p<0.05$). 발효사료가 소화과정을 거쳐 대장에 이르게 되면 미생물 발효를 위한 기질이 감소하게 되어 대장에 서식하는 유산균이나 총 혐기미생물 수가 감소하게 된다 (Canibe 등, 2007[2]). 이렇듯 많은 미생물이 제한된 양의 발효기질을 이용하게 되면서 가용성 기질이 감소되어 유산균과 효모의 증식에 영향을 준 것으로 판단된다. Kim 등 (2001)[6]은 복합 생균제를 사료에 0.5~1.0% 첨가하면 발효가 활발히 일어나고, 가축에 급여 시 사료 요구율도 개선한다고 하였다. 본 시험 조건에서는 생균제를 사료에 0.25% 첨가하여도 발효에는 문제가 없는 것으로 판단되는데, 생균제의 첨가 수준은 발효사료 제조 시 사용된 생균제의 활성도에 따라 차이가 있을 것으로 판단된다.

2. 발효사료의 수분함량

기초사료에 생균제를 3% 혼합하고 수분함량을 30, 40, 50, 60%로 조정하여 60시간 발효한 후 균수를 측정하였다 (Table 4). 유산균 수는 수분함량 50% 수준에서 2.17×10^9 CFU/mL로 가장 많았고, 효모 수는 수분함량 30과 40% 수준에서 1.12×10^8와 1.35×10^8 CFU/mL로 가장 많았지만 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$). 효모 수의 경우 수분함량이 증가할수록 조금 감소하는 경향을 보였다. 이것은 발효사료의 수분함량이 많으면 산소가 발효사료 내부로 원활하게 들어오지 못하여 미생물 증식에 영향을 주었기 때문이다 (Lee와 Lee, 1995[9]). 따라서 발효사료 제조 시 유산균과 효모의 증식을 위한 적정 수분함량은 40~50% 수준으로 판단된다.

Table 3. Microbial population (CFU/mL) in fermented diets treated with different levels of probiotics

	Probioticis (%)					
	3	2	1	0.5	0.25	SEM[1)]
Lactobacillus	1.6×10^{9c}	1.06×10^{9e}	1.38×10^{9d}	4.53×10^{9a}	3.43×10^{9b}	0.098
Saccharomyces	1.06×10^{6d}	3.32×10^{6d}	2.11×10^{8a}	1.55×10^{8b}	1.19×10^{8c}	0.005

[1)] SEM : Standard error of means.
[a-e] : Mean in the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).

Table 4. Microbial population (CFU/mL) in fermented diets treated with different levels of moisture

	Moisture (%)				
	30	40	50	60	SEM[1)]
Lactobacillus	1×10^{5c}	7.33×10^{6c}	2.17×10^{9a}	6.57×10^{8b}	0.030
Saccharomyces	1.12×10^{8ab}	1.35×10^{8a}	6.67×10^{7b}	5.63×10^{7b}	0.029

[1)] SEM : Standard error of means.
[a-c] : Mean in the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).

3. 원료사료의 발효능 평가

발효사료 제조 시 접종 미생물의 고착 및 활성증진을 위해 발효기질로서의 원료사료 효능을 평가하였다. 양돈 사료용 단미사료의 발효특성을 평가하기 위하여 *In vitro* 대장발효에 의해 생성된 발효산물인 휘발성지방산을 분석하였다 (Table 5). 그 결과 비트펄프와 타피오카가 다른 원료사료에 비해 단쇄지방산의 농도가 3516과 3197 ppm으로 많이 증가되었고, 측쇄지방산의 농도가 59와 28 ppm으로 가장 많이 감소되었다 ($p<0.05$). 이것은 미생물이 분해하기 쉬운 전분과 당류가 사료에 많아서 미생물의 증식 및 활력을 높여 발효산물의 생산을 증진시켰을 것으로 판단된다 (Scheuermann, 1993[13]). 또한 사료 내 hemicellulose와 cellulose 같은 난소화성 물질이 대장 내 미생물에 의해 분해되어 휘발성 지방산의 농도에 영향을 주었을 것이다 (Langston와 Bouma, 1960[8]). 발효능이 우수한 원료사료를 발효시켜 급여하게 되면 사료효율이 개선되고, 장내 환경에 긍정적인 영향을 주어 (Scholten 등, 1999[15]) 분뇨 유래 악취를 저감시킬 수 있을 것으로 기대된다.

Table 5. Volatile fatty acid (VFA) concentrations produced by *In vitro* fermentation of feed ingredients (ppm)[1]

	Short chain fatty acid[2]	Branched chain fatty acid[3]
Soybean meal	2786de	204^{a}
Rapeseed meal	2308^{f}	200^{a}
Canola meal	2585^{e}	−19de
Wheat bran	2769^{d}	109^{b}
Beet pulp	3197^{c}	−28de
Tapioca	3516^{b}	−59^{e}
Corn, Yellow	3322^{bc}	18^{cd}
Wheat flour	4002^{a}	68^{bc}
Feces	1293	168
SEM[4]	159	33

[1] Calculated by [(feed ingredients + feces) VFA concentration − feces VFA concentration].
[2] Short chain fatty acid : sum of acetic acid, propionic acid, butyric acid.
[3] Branched chain fatty acid : sum of I-butyric acid, I-valeric acid.
[4] SEM : Standard error of means.
[a-f] : Mean in the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).

4. 발효사료 급여시험

발효사료가 비육돈의 장내 환경에 어떠한 영향을 주는지 평가하기 위하여 비육돈에 배합사료와 발효사료를 17일간 급여한 후 건물과 조단백질 소화율 및 분 중 휘발성 지방산의 농도를 분석하였다. 사료섭취량은 처리구간에 차이가 없었고 ($p>0.05$), 건물소화율과 조단백질 소화율은 발효사료가 배합사료보다 조금 높지만 유의적인 차이는 없었다 (Table 6). 이것은 발효사료가 위내 pH를 낮추어 간접적으로 단백질의 소화를 도우면서 소화율이 조금 높아진 것으로 추정된다 (Scholten 등, 1999[15]).

돼지가 사료 1 g을 섭취하였을 때 발생되는 휘발성지방산의 농도는 발효사료에서 단쇄지방산 중 아세트산 1,704 ppm과 측쇄지방산 417 ppm으로 일반사료보다 높았다 (Table 6). Canibe 등 (2007)[2]의 연구에서도 액상 발효사료와 건조 사료를 급여하였을 때 대장에서 생성된 단쇄지방산과 측쇄지방산의 농도가 발효사료에서 더 높았다. 발효사료는 발효산물로 휘발성 지방산을 이미 함유하고 있기 때문에 기초사료 급여 시 보다 장내 발효에 의한 휘발성 지방산의 농도가 더 높아진 것으로 판단된다 (Scholten 등, 1999[15]). 또한 측쇄지방산의 농도는 발효과정 중에 미생물

Table 6. Effect of fermented diets on nutrient digestibility and level of volatile fatty acid (VFA) from feces in finishing pigs

	non-fermented	fermented	SEM[4)]
Feed intake(kg/day)	1.42	1.43	-
DM digestibility(%)	82.89	84.05	0.98
CP digestibility(%)	81.14	83.11	1.15
Volitile fatty acid(ppm)[1)]			
Acetic acid	1,474[b]	1,704[a]	145
Propionic acid	537	659	76
Butyric acid	385	504	59
I-butyric acid	74[b]	140[a]	12
I-valeric acid	154[b]	277[a]	23
Short chain fatty acid[2)]	2,396	2,867	1.03
Branched chain fatty acid[3)]	228[b]	417[a]	1.02

[1)] VFA concentration produced by *In vitro* fermentation per feed of 1 g.
[2)] Short chain fatty acid : sum of acetic acid, propionic acid, butyric acid.
[3)] Branched chain fatty acid : sum of I-butyric acid, I-valeric acid.
[4)] SEM : Standard error of means.
[a-b] : Mean in the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).

사체가 발효되면서 높아진 것으로 추정된다.

적 요

본 연구는 유산균과 효모로 구성된 혼합 생균제를 양돈 사료에 첨가하여 양돈용 발효 사료를 제조하기 위한 최적 발효조건 구명 및 발효사료 급여에 의한 돼지 장내 환경변화를 평가하고, 원료사료별 발효능을 측정하기 위해 수행되었다.

1. 양돈 발효사료의 유산균과 효모 수를 측정하였을 때 사료 내 혼합 생균제 첨가수준은 0.25%, 수분 함량은 40~50% 정도가 적정하였다.

2. 비육돈에 발효사료를 급여하였을 때가 발효되지 않은 사료를 급여하였을 때보다 소화율은 유의적인 차이가 없었지만 분 중 휘발성지방산의 농도가 높게 나타났다.

3. 양돈용 단미사료의 발효특성을 확인하기 위하여 휘발성지방산의 농도를 측정한 결과, 비트펄프와 타피오카가 우수한 발효기질로 확인되었다.

인 용 문 헌

1. Anugwa, F. O. I., Varel, V. H., Dickson, J. S., Pond, W. G. and Krook, L. P. 1989. Effects of dietary fiber and protein concentration on growth, feed efficiency, visceral organ weights and large intestine microbial populations of swine. J. Nutr. 119:879-886.
2. Canibe, N., Højberg, O., Badsberg, J. H. and Jensen, B. B. 2007. Effect of feeding

fermented liquid feed and fermented grain on gastrointestinal ecology and growth performance in piglets. J. Anim. Sci. 85: 2959-2771.

3. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics. 11:1-42.
4. Ghanem, N. B., Yusef, H. H. and Mahrouse, H. K. 2000. Production of Aspergillus terreus xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. Bioresour. Technol. 73(2): 113-121.
5. Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interlationships between certain microorganism and humanism: Candidate microorganism for use as dietary adjuncts. J. Food Prot. 42:164-167.
6. Kim, J. H., Kim, C. H. and Ko, Y. D. 2001. Effect of dietary supplementation of hermented feed on performance of finishing pigs and fecal ammonia gas emission. Kor. J. Anim. Sci. Technol. 43:193-202.
7. Kim, H. Y., Song, Y. M., Kang, Y. S., Kim, C. H., Lee, S. D., Chowdappa, R., Ha, J. H. and Kang, S. M. 2006. The effect of fermented persimmon shell diet supplementation on the growth performance and blood parameters in finishing pigs. Anim. Sci. J. 77:314-319.
8. Langston, C. W. and Bouma, C. 1960. A study of the microorganism grass silage : Ⅱ the Lactobacill. Appl. Microbiol. 8: 23-234.
9. Lee, K. Y. and Lee, S. T. 1995. Yeast biomass production from concentrated sugar cane stillage using a thermotolerant candida rugosa. J. Microbiol. Biotechnol. 5:114-116.
10. Lee, S. W., Ham, S. N., Shin, T. S., Kim, H. K., Yeon, I. J. and Kim, K. Y. 2009. Resource of food waste using indigenous bacteria isolated from soils. J. KSEE. Kor. 31:35-41.
11. NRC. 1998. Nutrient requirement of pigs. 10th Edition. National Research council, Academy Press. Washington, D. C., USA.
12. SAS. 1996. SAS/STAT® software for PC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
13. Scheuermann, S. E. 1993. Effect of the probiotic Paciflor (CIP 5832) on energy and protein metabolism in growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 41(3):181-189.
14. Schoenherr, W. D., Stahly, T. S. and Cromwell, G. L. 1989. The effects of dietary fat or fiber addition on yield and composition of milk from sows housed in a warm or hot environment. J. Anim. Sci. 67:482-495.
15. Scholten, R. H. J., Peet-Schwering, C. M. C., Verstegen, M. W. A., Hartog, L. A., Schrama, J. W. and Vesseur, P. C. 1999. Fermented co-products and fermented compound diets for pigs: a review. Anim. Feed Sci. Technol. 82(1-2):1-19.
16. Stahly, T. S. and Cromwell, G. L. 1986. Responses to dietary additions of fiber alfalfa meal) in growing pigs housed in a cold, warm or hot thermal environment. J. Anim. Sci. 63:1870-1876.
17. Stronach, S. M., Rudd, T. and Lester, J. N. 1989. Anaerobic fermentation process in industrial wastewater treatment. Springer-erlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo.

18. Wang, J. F., Zhu, Y. H., Li, D. F., Wang, Z. and Jensen, B. B. 2004. *In vitro* fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. J. Anim. Sci. 82:2615-2622.
19. Wilfart, A., Montagne, L.P., Simmins, H., Van Milgen, J. and Noblet, J. 2007. Sites of nutrient digestion in growing pigs: Effect of dietary fiber. J. Anim. Sci. 85: 76-983.
20. 송영민, 하지희. 2007. 부산물을 이용하여 제조한 발효사료의 사료적 가치평가에 관한 연구. 농업기술연구소보. 20:153-162.
21. 한인규, 최창애, 박태진, 정숙근. 1967. 고구마 양돈사료에 관한 시험. 축산시험연구소보. 453-481.