

볏짚 조사료에 대한 효모 배양물 첨가가 반추위 소화율 및 섬유소 분해균의 군락 변화에 미치는 영향

성 하 군

상지대학교 동물자원과학과

Effects of Yeast Culture Supplementation on Rice Straw Digestibility and Cellulolytic Bacterial Community in the Rumen

Ha Guyn Sung

Dept. of Animal Science & Technology, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

ABSTRACT

In vitro and *in situ* incubation studies were conducted to determine effects of yeast culture supplements (*Saccharomyces cerevisiae*) on cellulolytic bacterial function and fiber digestion in rice straw. *In vitro* dry matter digestibility of rice straw gradually increased according to supplemental levels of yeast culture (0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0%). Digestibility of rice straw started to increase apparently when yeast culture was added more than 0.6% level ($p < 0.05$). Also, we reconfirmed that *in vitro* dry matter digestibility was significantly increased by 0.6% of yeast culture addition in 4% NaOH treated and non-treated rice straws ($p < 0.05$). When *in situ* dry matter digestibility was tested in Korean native goats fed basal diet or experimental diet which contained 1.0% of yeast culture, the yeast culture feeding improved *in situ* dry matter digestibility in both 4% NaOH treated and non-treated rice straws ($p < 0.05$). In case of real-time PCR monitoring cellulolytic bacterial function, the bacterial population attached on rice straw showed the increasing trends with higher level of yeast culture spraying on rice straw. *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* were significantly increased in accordance to spraying levels of yeast culture (0.0, 0.1 and 0.3%) at both 12 and 24 hrs of *in situ* incubation ($p < 0.05$). *R. albus* was significantly higher population in yeast culture spraying than non-spraying at 12 hrs of *in situ* incubation ($p < 0.05$). These bacterial populations were showed the increasing trends with digestibility enhancement of rice straw according to the higher levels of yeast culture supplement. Overall, these results clearly suggest that the presence of yeast culture result in noticeable increase of rice straw digestion, which is modulated via good effect on cellulolytic bacterial attachment to fiber substrates.

(Key words : Rice straw digestion, *Saccharomyces cerevisiae*, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*)

서 론

국내 조사료의 자급도는 80% 내외로 나머지는 수입으로 충당하나 환경의 온난화, 바이오에너지용 곡물 수요 증가, 해상운임 상승은 이들 수입가격을 불안정하게 하고 있다(Sung 등, 2010). 이러한 국제환경 변화 속에 국내 부존 조사료자원 생산 증대를 위한 다각적 노력이 이루어지고 있으나, 국내에서 생산되는 대표적 조사료 자원인 볏짚은 영양소 함량이 매우 낮고, 세포벽 구성 물질 중 탄수화물의 대부분이 분해가 어려운 구조 물질로 되어 있어 반추동물의 이용성과 생산능력을 발휘하는데 한계가 있다(Jackson, 1977; Devendra, 1982). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 조사료와 함께 분해가 용이한 탄수화물 및 첨가제를 보충 급여하여 반추위 발

효기능을 효율적으로 조절하여 왔다(Jouany, 1994; Jouany 등, 2000; Monsoni 등, 2007).

반추동물의 반추위 발효 조절 및 생산성 증진을 위해 사용되는 첨가제로서 효모는 오랜 기간 동안 사용되어온 대표적 생균제이다. 효모, *Saccharomyces cerevisiae*는 종류와 배양조건에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 단백질, 핵산, 그리고 비타민의 함량이 높고 지방함량이 낮아 SCP(single cell protein)로서 산업적 생산 연구가 활발히 시작 되었으며, 반추 동물에서 사료 첨가제로서 사용되어진 *Saccharomyces cerevisiae*는 그 자체의 우수한 영양적 특성과 반추위 발효 기능 개선(Rose, 1980, Lynch와 Martin, 2002; Miller-Webster 등, 2002)으로 사료의 기호성과 섭취량을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라(Phillips와 VonTungeln, 1985;

* Corresponding author : H. G. Sung, 5F Ireh-BLD, 139-1 Gasan-dong, Geumcheon-gu, Seoul, 153-801 Korea. Tel: +82-2-400-2901, Fax: +82-2-400-4901, E-mail: haguyn@hanmail.net

Weidmeier와 Arambel, 1985; Dann 등, 2000), 비육우의 생산성 향상(Adams 등, 1981; Fallon과 Earley, 2004)과 유우의 산유량, 유단백 및 유지방 함량을 증진 시키는 연구 결과가 보고되고 있다(Hoyos 등, 1987; Gunter, 1989; Dawson과 Tricarico, 2002). 특히, *Saccharomyces cerevisiae*는 반추위의 완전혐기성 박테리아의 성장을 저해 할 수 있는 용존 산소의 제거(Mathieu 등, 1996)로 반추위 혐기성 박테리아의 증식을 활성화하고(Weidmeier 등, 1987; Harrison 등, 1988), 반추위액의 pH 저하 방지(Williams 등, 1991)로 특정 반추위 미생물(섬유소 분해 박테리아)의 증식을 촉진하여(Dawson, 1987; Kumar 등, 1997; Denev 등, 2007) 섬유소(NDF 및 ADF) 분해 작용을 증대시켜 조사료의 이용 효율을 개선시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Martin, 1989; Padel, 2007; Paryad와 Rashid, 2009).

따라서 본 연구는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)가 조사료의 반추위 미생물 분해 및 섬유소 분해 박테리아의 기능에 미치는 관계를 여러 각도에서 검증하고자 생효모 배양물 첨가 및 급여가 볏짚의 소화율에 미치는 영향을 *in vitro* 및 *in situ* 실험을 통해 측정하였고, 볏짚 분해시 반추위 미생물의 군락에 미치는 영향을 평가하고자 볏짚 표면에 부착한 섬유소 박테리아 군집의 변화를 real-time PCR 방법을 이용하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 생효모 배양물 배양

시험에 사용된 생효모 배양물의 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* 이었으며, 생효모 배양물의 생산을 위하여 1.5 L 회전식 발효조(Kobiotech, Korea)에서 공기를 분주시키고, 호기상태를 유지하였으며 배양하였다. 회전식 발효조 배양을 위하여 균주를 50 mL yeast culture media(YM 배지, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose, pH 6.0)가 들어 있는 삼각 플라스크에서 두 번 계대배양(30°C, 24시간)하고, 계대배양액 5 mL을 새로 준비한 50 mL YM 배지에 접종하여 30°C에서 6시간 배양한 것을 접종액으로 사용하였다. 준비된 접종액은 1.5 L YM 배지가 든 회전식 발효조에 접종하여 180 rpm의 impella 회전과 함께 24시간 배양하였다.

2. 공시축 및 사양관리

공시축으로는 rumen fistula가 장착된 평균체중 31.5 kg의 한국 재래산양 6두를 선발하여 전 실험 기간 동안 대사에서 사육하였다. 그리고 새로운 시험 사육 환경과 사료의 적응을 위하여 4주간의 적응사양 후에 본 시험의 공시축으로 사용하였다. 공시축 사료로 기초사료(Table 1)를 준비하여 1일 2회(08:00, 20:00) 건물기준으로 기초사료(300 g)와 볏짚(200 g)을 급여 하였다. 그리고 물은 자유 채식하도록 하였다.

Table 1. Formula of basal diets

Ingredient	Concentration (%, as fed basis)
Yellow corn	37.0
Wheat	28.0
Soybean meal	6.5
Cotton seed meal	5.0
Linseed meal	3.0
Wheat bran	8.0
Molasses	3.0
Potassium chloride	0.5
Calcium carbonate	1.0
Salt	0.5
Calcium phosphate	6.0
Vit.-mineral supplements	1.5
Total	100.0

^a Contains vitamin (2,000,000 I.U.), vitamin D₃ (400,000 I.U.), vitamin E (1,000 I.U.), Fe (6,000 mg), Mn (6,000 mg), Zn (12,000 mg), Cu (12,000 mg), I (120 mg), Co (120 mg), Mg (6,000 mg) per kg, respectively.

3. 생효모 배양물 첨가 *in vitro* 소화율 실험

In vitro 실험은 생효모 배양물의 첨가 수준에 따른 소화율의 차이를 평가하기 위하여 수행되었다. 생효모 배양물의 첨가는 *in vitro* 배양액의 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0%가 되도록 각각의 serum bottle에 첨가하여 처리 수준별 3반복을 통하여 볏짚의 소화율을 비교하였다. 기초사료를 급여한 한국재래산양으로부터 수거한 반추위액은 4겹의 cheese cloth로 거른 후 혼합한 위액과 McDougall Buffer(McDogall, 1948)을 1:4(v/v)로 혼합하여 *in vitro*용 배양액을 준비하였다. 그리고 혼합배양액은 60 ml씩 0.5 g의 분쇄된 볏짚과 각각의 생효모 배양물이 들어있는 125 ml serum bottle에 분주하여 배양을 준비하였다. 각각의 준비된 *in vitro* culture는 39°C 120 rpm의 shaking incubator에서 48시간 배양되었다. 그리고 건물 소화율을 분석하기 위해 filter paper(Whatman No. 4)를 사용하여 미분해 잔여물을 수거하였다. 그리고 수거된 미분해 잔여 시료는 65°C에서 72시간 건조시켜 측정하였다.

4. 생효모 배양물 급여 *in situ* 소화율 실험

효모 배양물 급여가 섬유소 소화율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시험축 6두를 3두씩 나누어 생효모 배양물을 급여한 시험군과 생효모 배양물을 급여하지 않는 대조군에 *in situ* 소화율을 실시하여 비교 평가하였다. 따라서 시험군은 생효모 배양물을 기초사

료에 1.0% 혼합한 시험 사료를 준비하여 급여하였고, 대조군은 기초사료를 급여하였다. 그리고 섬유소 소화율 평가를 위한 시료는 무처리 볏짚과 4% NaOH를 처리한 볏짚을 사용하였다. *In situ* 소화율 시험은 nylon bag technique (Mehrez와 Orskov, 1977)을 개량하여 100 mesh (0.149 mm) 나일론 천을 9×15 cm 크기로 제작한 nylon bag에 4.0g 정도의 시료를 넣고 입구를 봉하여 준비하였다. 그리고 준비된 nylon bag 시료는 공시축의 rumen fistula를 통하여 반추위 후부 깊숙이 넣어 24 및 48시간 방치하였다. 시간대별 회수한 nylon bag은 흐르는 수돗물에 맑은 물이 나올 때까지 세척 후 65℃에서 72시간 건조시켜 측정 하였다.

5. 생효모 배양물 처리 볏짚의 섬유소 박테리아 부착 시험

생효모 배양물 처리가 반추위내 섬유소 박테리아의 군집 변화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 생효모 배양물 처리 볏짚을 *in situ* 시험 실시 후 섬유소 분해 박테리아의 볏짚 표면 부착 정도와 섬유소 소화율을 비교 분석하였다. 생효모 배양물 처리 볏짚은 효모 배양물을 0.1 및 0.3% 수준으로 볏짚 샘플량에 비례하여 분무 처리 후 실온 건조하여 준비하였다. 그리고 처리한 볏짚을 *in situ* 소화율 시험과 동일한 방법으로 기초사료를 급여한 시험축을 사용하여 반추위내에 12 및 24시간 방치한다. 시간대별 회수한 nylon bag은 부드럽게 멸균수에 맑은 물이 나올 때까지 세척 후 냉동 건조하고 미분해 잔여물을 측정하였으며, 볏짚의 표면에 부착한 섬유소분해 박테리아는 real-time PCR 기법을 이용 정량 분석하였다.

6. 조사항목 및 분석방법

In vitro 및 *in situ* 소화율은 *in vitro* 및 *in situ* 실험에서 수거한 각각의 샘플들을 시험에 따라 65℃에서 72시간 또는 냉동 건조 후 샘플의 무게를 측정하여 시험 초기 무게(투입 시료량)에서 감소한 양을 측정하여 백분율로 산정하였다.

볏짚의 표면에 부착한 주요 섬유소분해 박테리아(*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*)의 정량 분석은 Quantitative real-time PCR을 이용하여 실시되었다(Sung 등, 2009). Real-time PCR은 iCycler iQ real-time PCR system (Bio-Rad Inc. USA)에서 iQ Syber Green Supermix Supermix (Bio-Rad Inc. USA)를 가지고 메뉴얼에 따라 수행되었다. Total DNA는 *in situ* 실험에서 미분해된 잔여 볏짚을 냉동 건조한 샘플로부터 0.5 g을 채취하여 Purdy 등(1996)의 방법에 따라 추출하였다. 그리고 섬유소분해 박테리아 즉, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*과 *R. albus*를 증폭하기 위한 species-specific primer는 각각 Fs219f(5'-GGT ATG GGA TGA GCT TGC-3')와 Fs654r(5'-GCC TGC CCC TGA ACT ATC-3'), Rf154f(5'-TCT GGA AAC GGA TGG TA-3')와 Rf425r(5'-CCT TTA AGA CAG GAG TTT ACA A-3'), 그리고 Ra1281f

(5'-CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G-3')와 Ra1439r(5'-CCT CCT TGC GGT TAG AAC A-3')를 사용하였다(Koike and Kobayashi, 2001). Real-time PCR의 조건은 Tajima 등(2001)의 방법을 개량한 94℃에서 30초 동안 변성(denaturation), 60℃에서 30초 동안 결합(annealing), 72℃에서 30초 동안 신장(extension) 순으로 48 cycles 실시하였고, 최초 cycle에서는 9분 동안 denaturation, 마지막 cycle에서는 10분 동안 extension 시켰다. 각 섬유소 박테리아의 정량은 16S rDNA의 copy No의 log값(Log copy No)로 표기하였으며, 이 값은 control plasmid를 사용하여 만들어진 표준곡선으로부터 계산하였다. Control plasmid는 pGEM-T와 pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)를 사용하여 메뉴얼에 따라 각각 섬유소 박테리아의 species-specific primer로 증폭한 specific 16S rDNA 절편을 삽입하여 만들었다. 그리고 표준곡선은 control plasmid의 희석 배수에 따른 threshold cycle (Ct) 값과의 상관관계에 만들어 졌다.

7. 통계처리

각각 시험을 통해 얻어진 연구 결과는 실험기간동안 누적 정리되었고, 모든 자료에 대한 통계분석은 SAS (Statistical Analysis System, 1996)의 General Linear Model procedure를 이용하였으며, 처리 평균치 간의 유의성 분석은 Duncan (1955)의 Multiple Range Test에 의거하여 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 효모 배양물 첨가가 *in vitro* 소화율에 미치는 영향

반추동물의 효율적 반추위 발효 조절 및 생산성 증진을 위해 사용되는 첨가제로서 효모는 오랜 기간 동안 사용되어온 대표적 생균제이나, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 종류와 사용 방법에 따라 긍정적 좋은 결과를 주기도 하지만(Williams, 1991; Lee 등, 1997), 기대 효과를 주지 못하는 경우도 보고되고 있다(Adams, 1981; Dawson 등, 1990). 따라서 본 저자가 선행 조사를 통하여 선별한 *Saccharomyces cerevisiae*가 볏짚의 소화율 증진을 위한 가치를 검증하고자 실시하였다.

본 연구에 사용된 생효모 배양물의 첨가 수준에 따른 소화율의 차이를 평가하기 위하여 *in vitro* 시험을 수행하였을 때 그 결과는 Fig. 1과 같다. 생효모 배양물의 첨가는 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0%의 다양한 농도로 첨가하여 분쇄한 볏짚의 건물 소화율을 비교 하였을 때 무첨가의 38.55% 보다 모든 첨가구에서 소화율이 증가 되었으며, 첨가 수준이 증가 할수록 소화율도 점진적으로 높아 졌다. 특히, 생효모 배양물의 0.2% 첨가에서는 소화율이 39.65%로 무첨가에 비하여 유의적 증가는 보이지 못하였지만, 0.4% 첨가에서는 소화율이 42.02%로 유의적 증가를 나타냈다

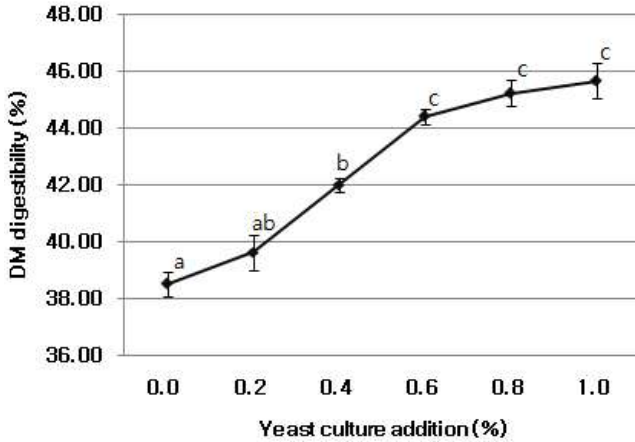


Fig. 1. Effects of different levels of yeast culture addition on the *in vitro* dry matter digestibility of rice straw. Different letters in the graphs indicate statistical significance at $p < 0.05$.

($p < 0.05$). 또한 생효모 배양물의 0.6% 이상 첨가되었을 때 소화율이 44.42% 이상을 나타냈으며, 0.0, 0.2 및 0.4% 첨가보다도 유의적으로 높은 소화율을 나타냈다 ($p < 0.05$).

이상의 연구 결과를 토대로 효모 배양물 첨가로 볏짚 소화율의 향상을 재검증하기 위해 효모배양물의 0.6% 첨가를 4% NaOH 처리 볏짚 및 NaOH 무처리 볏짚에 적용하여 소화율을 비교분석을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. NaOH 무처리 볏짚에 효모배양물 0.6% 첨가, 4% NaOH 처리 볏짚에 효모배양물 0.6% 첨가 및 무첨가를 비교하였을 때 대조구(NaOH 무처리 볏짚에 효모배양물 무첨가)의 소화율(39.60%)에 비하여 다른 처리구의 소화율이 모두 향상되었고, 본 연구의 선행 시험 결과(Fig. 1)와 같이 볏짚에 효모배양물 0.6% 첨가시 볏짚 소화율이 대조구보다 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 그리고 효모배양물 0.6% 첨가한 NaOH 처리 볏짚의 소화율은 48.97%로 효모배양물 무처리 NaOH 처리 볏짚의 소화율(45.35%) 보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 따라서 본 연구의 Fig. 1과 2의 결과는 *Saccharomyces cerevisiae*의 활용으로 볏짚의 소화율을 향상 시킬 수 있음을 충분히 시사한다.

Harrison 등(1988)은 효모 및 효모배양물은 반추위내 발효특성을 변화 시키고, Williams (1991)는 조단백질과 조섬유의 반추위내 분해율을 개선시킨다고 보고하였다. 그리고 Dawson과 Hopkins (1991)은 본 연구 결과와 같이 *in vitro* 시험에서 생효모 첨가로 인하여 섬유소 분해에 영향을 주어 총건물 소화율이 증가되었다고 보고하였다. 또한 Mpofo와 Ndlovu(1994)도 조사료의 NDF *in vitro* 소화율이 효모 처리에 의하여 유의적으로 증가하였다고 본 연구와 유사한 연구 결과를 보고한바 있다. 이와같은 *Saccharomyces cerevisiae* 첨가로 조사료의 소화율 증진은 효모 배양물이 반추위내 용존 산소 및 유기산과 친화력이 강하고 buffer 기능이 있어 반추위 환경 개선으로 반추위 박테리아의 증식을 활성화하고(Mathieu 등, 1996, Williams 등, 1991; Weidmeier 등, 1987;

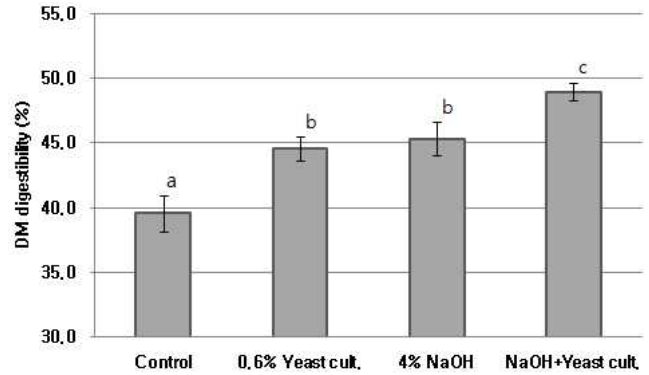


Fig. 2. Effects of yeast culture addition on the *in vitro* dry matter digestibility of Non- and NaOH-treatment rice straw. Different letters in the graphs indicate statistical significance at $p < 0.05$.

Harrison 등, 1988), 섬유소 분해 박테리아의 활성을 증진하여 섬유소 분해 작용을 촉진시켜 조사료의 소화율을 개선시킬 수 있는 것으로 사료된다(Martin, 1989; Padel, 2007; Denev 등, 2007; Paryad와 Rashid, 2009).

2. 효모 배양물 급여 *in situ* 소화율에 미치는 영향

공시축은 한국재래산양으로 생효모 배양물을 급여한 시험군과 생효모 배양물을 급여하지 않는 대조군에 무처리 볏짚과 4% NaOH 처리 볏짚을 *in situ* 시험을 실시하여 비교한 결과는 Table 2와 같다.

In situ 건물소화율을 24 및 48 시간 후에 관측하였을 때 공히 NaOH 무처리 볏짚의 효모배양물 비급여구의 소화율이 가장 낮았고, NaOH 무처리 볏짚의 효모배양물 급여구, 4% NaOH 처리 볏짚의 효모배양물 비급여구, 그리고 4% NaOH 처리 볏짚의 효모배양물 급여구 순으로 소화율이 유의적으로 각각 증가하였다 ($p < 0.05$). 본 시험을 통하여 NaOH 무처리 볏짚 및 4% NaOH 처리 볏짚 모두에서 생효모 비급여 대조구에 비하여 생효모 배양물 급여구의 건물 소화율이 유의적으로 증가되었음을 발견하였다 ($p < 0.05$). 이와 같은 생효모 배양물 활용으로 볏짚 소화율 증가는 선행 *in vitro* 시험의 결과와 동일한 결과로 효모의 활용이 조사료의 이용 증대를 위해 충분한 가치가 있음을 본 연구가 입증한다고 사료된다. 특히, NaOH 처리 볏짚의 효모배양물 급여구의 24 및 48 시간 소화율이 26.06% 및 40.40%으로 NaOH 무처리 볏짚의 효모배양물 비급여구의 21.29% 및 33.22% 보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 반추 동물에 효모 활용과 조사료 가공 방법의 조화는 조사료 이용 증진을 위한 시너지 효과를 발휘 할 수 있음을 시사한다.

효모 배양물 첨가가 소화율에 좋은 영향을 나타낸 본 연구 결과와 같이 여러 연구소의 연구보고에서도 생효모배양물(live yeast culture) 공급이 반추위내 소화과정에 영향을 줄 수 있음을 확실히

Table 2. Effects of yeast culture feeding on the *in situ* DM digestibility (%) of Non- and NaOH-treated rice straw in Korean native goat

Item	Incubation time (hrs)	
	24	48
0% NaOH treatment		
Control	17.37±1.53 ^a	28.74±1.08 ^a
Yeast culture fed	21.29±1.24 ^b	33.22±1.99 ^b
4% NaOH treatment		
Control	24.18±1.68 ^c	38.66±0.88 ^c
Yeast culture fed	26.06±2.04 ^d	40.40±1.33 ^d

^{a-d} Means in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

입증하여 왔다(Dawson, 1992; Newbold 등, 1996; Chevaux와 Fabre, 2007). 이들 연구는 건물 소화율을 총체적 및 직접적 변화를 일으키지는 않지만 사료에 첨가한 효모는 소화과정 초기에 손쉽게 영향을 준다고 하였다. 이와 같은 생효모배양물 첨가로 인한 특성은 *in vitro* (Dawson과 Hopkins, 1991) 및 *in vivo* (Smith 등, 1993; Kumar 등, 1997)에서 검증되어 왔다. Plata 등(1994)는 귀리 짚을 기초사료로 급여한 시험에서 섬유소 소화율의 증가를 보고하였으며, Mpfu와 Ndlovu (1994)는 목건초와 효모를 같이 급여한 시험에서 섬유소 소화율의 증진 결과를 보고하였다. 그러나 Dawson과 Hopkins (1991)은 50여 종의 효모 중에서 7종의 효모만이 반추위내 섬유소 박테리아 성장을 촉진시킨다고 보고한바 있고, 본 연구의 NaOH 처리 볏짚에 효모 첨가 결과를 볼 때 어떤 효모를 어떻게 사용하는 것이 효율적인지를 보여준다고 사료된다.

3. 효모 배양물이 섬유소 박테리아 군집에 미치는 영향

F. succinogenes, *R. albus*와 *R. flavefaciens*는 반추위 섬유소 분해의 주요 역할을 담당하는 대표적 섬유소 박테리아로 잘 알려져 있으며 (Forsberg 등 1997), 반추위내 조사료 분해는 우선적으로 이들 섬유소 분해 박테리아의 부착이 이루어지고, 그 후 부착된 박테리아들의 증식과 함께 섬유소 소화는 가속화 된다(McAllister 등, 1994). 따라서 효모 배양물 이용이 반추위내 섬유소 분해 증진과 함께 섬유소 박테리아 군집 변화에 미치는 상관성을 관찰하기 위하여 본 시험이 실시되었다.

두 가지 농도의 효모배양물을 볏짚에 분무 처리하여 처리 농도에 따른 볏짚의 *in situ* 소화율과 볏짚 표면 부착 섬유소 박테리아의 군집 변화를 측정한 결과는 Fig. 3 그리고 4와 같다. 볏짚의 소화율은 앞에서 실시한 *in vitro* 및 *in situ*에서의와 같이 효모 사용에 의하여 증진되었고 (Fig. 3), 이들의 소화율 증진효과는 효모배양물

처리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 그리고 반추위 섬유소 분해 박테리아 즉, *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B)와 *R. albus* (C)의 볏짚 표면 부착 군집도 볏짚 소화율 증가와 마찬가지로 효모배양물의 처리 농도 증가에 따라 증가 하였다 (Fig. 4). 효모 처리에 의한 볏짚 표면 부착 섬유소 분해 박테리아의 증가 정도는 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus* 종간 다른 특성을 나타냈다. *F. succinogenes*과 *R. flavefaciens*는 배양 12 및 24 시간 모두 처리농도에 따라 군락의 수가 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 그리고 *R. albus*도 배양 12 시간에 처리농도에 따라 군락의 수가 유의적으로 증가하였고 ($p < 0.05$), 24시간도 처리농도에 따라 증가 경향을 나타냈다.

여러 연구 (Williams와 Newbold, 1990; Dawson, 1992; Fallon과 Earley, 2004; Denev 등, 2007)에서 효모가 반추위 발효와 미생물 군집에 유익한 변화를 일으킨다고 보고하고 있다. 예로 반추위 혐기성 박테리아 총균수의 증가 (Dawson 등, 1990; Newbold 등, 1995)와 섬유소분해 박테리아의 성장 촉진 (Girard, 1997; Jouany, 2001)에 대하여 보고되고 있다. 또한 Chaucheyras-Durand와 Fonty(2001, 2002)는 목초급여 어린양에서 효모 급여에 의하여 섬유소 박테리아의 반추위 군집형성 및 섬유소분해 역가가 증진됨을 보고하였다. 그리고 Mosoni 등 (2007)은 PCR 방법을 이용하여 면양의 반추위내 *R. albus*와 *R. flavefaciens*를 계수하였을 때 본 연구의 결과와 같이 *S. cerevisiae* 첨가에 의하여 유의적으로 증가한 결과를 보고하였다. 따라서 본 연구는 효모 첨가가 반추위내 섬유소 박테리아 증식과 조사료 소화율을 증대 시키는데 명확히 기여함을 보여주었다. 특히, 이러한 조사료의 소화율 향상은 효모 첨가가 조사료 표면 부착 섬유소분해 박테리아의 군락 형성 증가에 기인함을 본 연구가 보여준다.

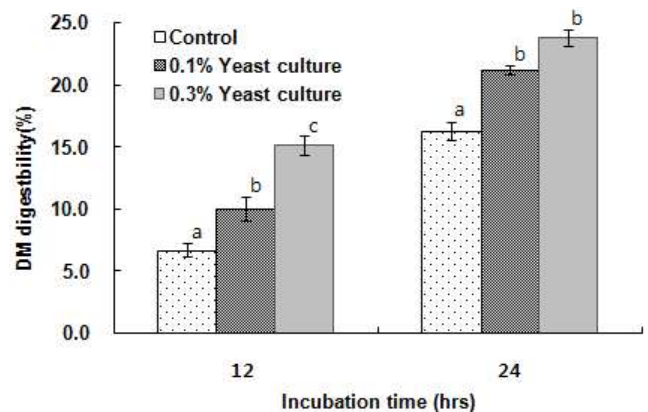


Fig. 3. *In situ* dry matter disappearance of rice straw as influenced by spraying treatment of yeast culture. Different letters in the graphs indicate statistical significance at $p < 0.05$.

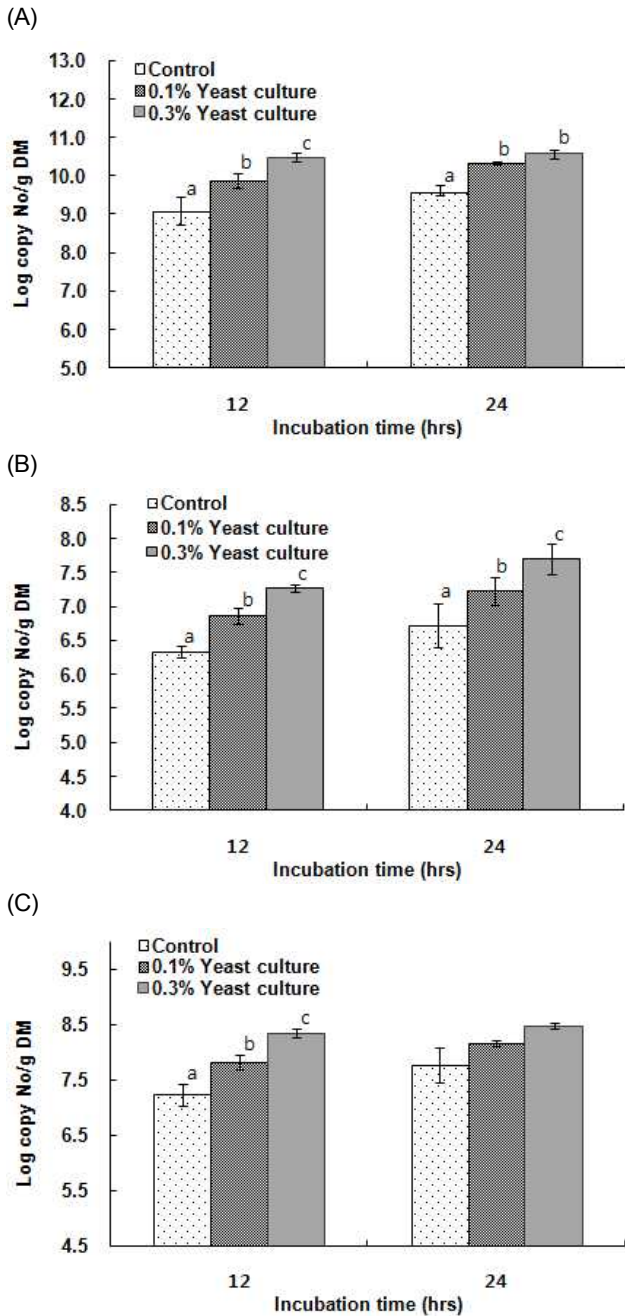


Fig. 4. Attachments of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B), *R. albus* (C) on the rice straw as influenced by yeast culture spraying treatment. Different letters in the graphs indicate statistical significance at $p < 0.05$.

요 약

본 연구는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)가 조사료의 반추위 미생물 분해 및 섬유소 분해 박테리아의 군집 변화에 미치는 관계를 검증하고자, 생효모 배양물 첨가 및 급여가 볏짚 소화율에 미치

는 영향을 *in vitro* 및 *in situ* 실험을 통해 측정하였고, 볏짚 분해 시 볏짚 표면에 부착한 섬유소분해 박테리아 군집의 변화를 real-time PCR 방법을 이용하여 비교 분석하였다. 생효모 배양물의 첨가 수준(0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0%)에 따른 볏짚의 *in vitro* 건물 소화율을 비교 하였을 때 첨가 수준이 증가 할수록 소화율도 점진적으로 높아 졌다. 특히, 생효모 배양물의 첨가 수준을 0.6% 이상으로 하였을 때 0.0, 0.2 및 0.4% 첨가보다도 확연한 소화율 증가를 보이기 시작하였다 ($p < 0.05$). 또한 효모배양물의 0.6% 첨가를 NaOH 4% 처리 볏짚 및 무처리 볏짚에 적용하여 소화율을 재평가하였을 때 두 가지 볏짚 모두에서 효모배양물 첨가에 의하여 볏짚 소화율이 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 생효모 배양물을 한국재래산양에 실제 급여에 의한 볏짚의 *in situ* 건물소화율을 24 및 48 시간 후에 관측하였을 때 NaOH 무처리 볏짚의 효모배양물 비급여구의 소화율이 가장 낮았고, NaOH 무처리 볏짚의 효모배양물 급여구, 4% NaOH 처리 볏짚의 효모배양물 비급여구, 그리고 4% NaOH 처리 볏짚의 효모배양물 급여구 순으로 소화율이 유의적으로 각각 증가하였다 ($p < 0.05$). 이는 NaOH 무처리 볏짚 및 4% NaOH 처리 볏짚 모두에서 생효모 배양물 급여에 의하여 *in situ* 건물 소화율이 유의적으로 증가함을 보여준 것이다 ($p < 0.05$). 그리고 볏짚을 효모배양물의 두 가지 농도로 볏짚을 분무 처리하여 *in situ* 소화율과 볏짚 표면 부착 섬유소분해 박테리아(*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*)의 군집 변화를 측정하였을 때 효모배양물 처리 농도가 증가함에 따라 소화율도 유의적으로 높게 나타났고 ($p < 0.05$), 동시에 이들 박테리아의 볏짚 표면 부착 군집도 효모배양물의 처리 농도 증가에 따라 증가 하였다. *F. succinogenes*과 *R. flavefaciens*는 배양 12 및 24시간 모두 처리농도에 따라 군락의 수가 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 그리고 *R. albus*도 배양 12 시간 처리농도에 따라 군락의 수가 유의적으로 증가하였고 ($p < 0.05$), 24 시간도 처리농도에 따라 증가 경향을 나타냈다. 따라서 본 연구는 효모 첨가는 조사료 소화율을 증진에 확실히 좋은 영향을 주며, 이것은 조사료 표면 부착 섬유소분해 박테리아의 군락 형성 증가에서 기인함을 보여준다고 사료 된다.

(주제어 : 볏짚, 섬유소분해 박테리아, 한국 재래산양, 반추위)

인 용 문 헌

Adams, D. C., Galycan, M. L., Kiesling, H. E., Wallace, J. D. and Finkner, M. D. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and menensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53:780-782.

Chaucheyras-Durand, F. and Fonty, G. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lamb receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* Cncm I-1077. *Reprod. Nutr.*

- Dev. 41:57-68.
- Chaucheyras-Durand, F. and Fonty, G. 2002. Influence of a probiotic yeast (*Sccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microb. Ecol. Health Dis.* 14:30-36.
- Chevaux, E. and Fabre, M. M. 2007. Probiotic yeast in small ruminants. *Feed Mix.* 15:2809-2016.
- Dann, H. M., Drackely, J. K., McCoy, G. C., Hutjens, M. F. and Garrett, J. E. 2000. Effects of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83:123-127.
- Dawson, K. A. 1987. Mode of action of yeast cultures in rumen-natural fermentation modifiers. *Proceedings, Alltech's Third Annual Symposium. Biotechnology in the Feed Industry.* Lexington, USA.
- Dawson, K. A. 1992. Current and future role of yeast culture in animal production: A review of research over the last six years. In: *Supplement to the Proceedings of Alltech's 8th Annual Symposium.* Alltech Technical Publication, Nicholasville, KY, USA, pp45-56.
- Dawson, K. A. 1992. Current and future role of yeast culture in animal production: A review of research over the last six years. In: *Supplement to the proceedings of Alltech's 8th Annual Symposium.* Alltech Technical Publication. Nicholasville, KY, USA. pp. 45-46.
- Dawson, K. A. and Hopkins, D. M. 1991. Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 69(Suppl. 1):531.
- Dawson, K. A. and Tricarico, J. 2002. The evolution of yeast cultures-20 years of research. In: *Navigating from Niche Markets to Mainstream.* Proceeding of Alltech's European, Middle Eastern and African Lecture Tour, pp. 26-43.
- Dawson, K. A., Neuma, K. E. and Boling, J. A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392-3398.
- Denev, S. A., Peeva, Tz., Radulova, P., Stancheva, N., Staykova, G., Beev, G., Todorova, P. and Tchobanova, S. 2007. Yeast culture in ruminant nutrition. *Bulgarian J. of Agriculture Sci.* 13:357-374.
- Devandra, C. 1982. Perspectives in the utilization of untreated rice straw by ruminants in Asia. In: *The utilization of fibrous agricultural residue as animal feeds.* ed. P. T. Doyle. School of Agric. and Forestry. Univ. of Melvourne. Aust.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11:1-42.
- Fallon, R. J. and Earley, B. 2004. Effects of Yea-Sacc® 1026 inclusion on the performance of finishing bulls offered an all concentrate diet. *Proceeding of the 20th Annual Symposium "Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries"* (Suppl. 1), Lexington, KY. USA, May 24-26, pp. 75.
- Girard, I. D. 1997. Characterization of stimulatory activities of *Saccharomyces cerevisiae* 1026 on the growth and metabolism of ruminal bacteria. In: *Alltech's 13th Annual symposium Biotechnology in the Feed Industry,* Lexington, kentucky, USA. pp. 45-47.
- Gunter, K. D. 1989. Yeast cultures success under German dairy conditions. In: *Biotechnology in the Feed Industry.* Vol. 5, Alltech's Technical Publications. Nicholasville, KY. USA. pp. 38.
- Harrison, G. A., Henken, R. W., Dawson, K. A., Harmon, R. J. and Barker, K. B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2979.
- Hoyos, G., Garica, L. and Medina, F. 1987. Effects of feeding viable microbial feed additives on performance of lactating cows in a large dairy herd. *J. Dairy Sci.* 70(Suppl.):217(Abstr.).
- Jankson, M. G. 1977. The alkali treatment of straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2:105-116.
- Jouany, J. P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech.* 43:49-62.
- Jouany, J. P., Michalet-Doreau, B. and Doreau, M. 2000. Manipulation of the rumen ecosystem to support high-performance beef cattle-review. *Asian Aus. J. Anim. Sci.* 13:96-114.
- Jounany, J. P. 2001. 20 years of research and now more relevant than ever- the coming of age of yeast cultures in ruminant diets. In: *Responding to a Changing Agricultural Landscape.* Alltech's European, Middle Eastern and African Lecture Tour. pp. 44-69.
- Koike, S. and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria : *Fibrobacter succinogens, Ruminococcus albus and Ruminococcus flavefaciens.* *FEMS Microbiol. Lett.* 204. 361-366.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86:1429-1435.
- Kumar, U., Sareen, V. K. and Singh, S. 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial population and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Dci. Food Agric.* 73:231-236.
- Lee, S. S., Pack, N. H., Jung, J. K. and Won, Y. S. 1997. Effects of yeast culture supplements on growth and carcass traits in Korean

- cattle. Korean J. Anim. Sci. 39:391-400.
- Lynch, H. A. and Martin, S. A. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy Sci. 85:2009-2014.
- Martin, S. A., Nisbet, D. J. and Dean, R. G. 1989. Influence of a commercial yeast supplement on the *in vitro* ruminal fermentation. Nutr. Rep. Int. 40:395-417.
- Mathieu, F., Jouany, J. P., Senaud, J., Bohatier, J., Bertin, G. and Mercier, M. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentation in the rumen of faunated and defaunated sheep. protozoal and probiotic interactions. Reprod. Nutr. Dev. 36:271-287.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A. and Cheng, K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72:3004-3018.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43:99-109.
- Mehrez, A. A. and Orskov, E. I. 1977. A study of the artificial bac technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. Agr. Sci. 88:645-652.
- Miller-Webster, T., Hoover, W. H., Holt, M. and Nocek, J. E. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. J. Dairy Sci. 85:2009-2014.
- Monsoni, P., Chaucheyras, F., Bera-Maillet, C. and Forano, E. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effects of a yeast additive. J. of Appl. Microbiol. 103:2676-2685.
- Mpofu, I. D. T. and Ndlovu, L. R. 1994. The potential of yeast and natural fungi for enhancing fibre digestibility of forage and roughages. Anim. Feed Sci. and Tech. 48:39-47.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. and McIntosh, F. M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. Brit. J. Nutr., 76:249-256.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B. and McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. J. Anim. Sci. 73:1811-1818.
- Padel, A. M. A. 2007. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on NDF digestibility and rumen fermentation of forage sorghum hay in Nubian goat's kids. J. Agric. and Biol. Sci. 3:133-137.
- Palata, F. P., Mendoza, G. D., Barcena-Gama, J. R. and Gonzalez, S. M. 1994. effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. Anim. Feed Sci. Tech. 49:203-210.
- Park, H. S., Yoo, Y. H., Jeon, B. S. and Cha, J. O. 1996. Effect of feeding viable yeast and lactobacillus on milk yield and milk fat content. Korean J. Anim. Sci. 38:77-84.
- Paryad, A. and Rashidi, M. 2009. Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on apparent digestibility and nitrogen retention of tomato pomace in sheep. Pakistan J. of Nutrition. 8:273-278.
- Phillips, W. A. and VonTungeln, D. L. 1985. The effect of yeast culture on the post stress performance of feeder calves. Nutr. Rep. Int. 32:287-296.
- Purdy, K. J., Embley, T. M., Takii, S. and Nedwell, D. B. 1996. Rapid extraction of DNA and RNA from sediments by novel hydroxyapatite spin-column method. Appl. Environ. Microbiol. 62:3905-3970.
- Rose, A. H. 1980. Rent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Skinner, F.A., Passmore, S.M. and Danenport, R.R. (ed.) Biology and Activities of Yeasts. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series. 9:103. Academic Press. London. UK.
- SAS. 1996. SAS/STAT software[®] for PC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Smith, W. A., Harris, B., Van Horn, H. H. and Wilcox, C. J. 1993. Effects of forage type on production of dairy cows supplemented with whole cottonseed, tallow and yeast. J. Dairy Sci. 76: 205-213.
- Sung, H. G., Kobayashi, Y., Chang, J., Ha, A., Hwang, I. H. and Ha, J. K. 2009. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20:200-207.
- Sung, H. G., Lee, J. K., Seo, S., Lim, D. C. and Kim, J. D. 2010. Mold growth and mycotoxin contamination of forages. J. Kor. Grassl. Forage Sci. 30:77-88.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Benno, Y. 2001. Diet-Dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl. Environ. Microb. 2766-2744.
- Van Keuren, R. W. and Heineman, W. W. 1962. Study of a nylon bag technique for *in vitro* estimation of forage disappearance rate. J. Anim. Sci. 21:340-345.
- Wallace, R. J. 1996. The mode of action of yeast culture in modifying rumen fermentation. In: Proceedings of Alltech's 12th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Nottingham University Press. Loughborough, Leics. UK. pp. 332-338.
- Weidmeier, R. D. and Arambel, M. J. 1985. Effects of supplemental *Saccharomyces cerevisiae* and/or *Aspergillus oryzae* on rumen

- fermentation. Proceedings, Conference on Rumen Function, March 23. Chicago. IL. USA.
- Weidmeier, R. D., Arambel, M. J. and Walters, J. L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2079.
- Williams, P. E. V. and Newbold, C. J. 1990. The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: *Recent Advances in Animal Nutrition 1990* (Ed. by Cole, D.J.A. and W. Haresign). Butterworths, London.
- Williams, P. E. V., Tait, C. A. G. Innes, G. M. and Newbold, C. J. 1991. Effects of the inclusion of the yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016-3025.
- (Received Jan. 22, 2013; Revised Feb. 19, 2013; Accepted Feb. 25, 2013)