

Hetero 발효 유산균주 첨가가 사일리지용 이탈리아 라이그라스와 총채보리의 품질에 미치는 효과

이호일¹ · 최연재¹ · 로벨리아 마무아드¹ · 김은중² · 오영균³ · 박근규⁴ · 이상석^{1*}

¹순천대학교 동물자원과학과, ²경북대학교, ³국립축산과학원, ⁴건국대학교

Effect of Heterofermentative Lactic Acid Bacteria on the Quality of Italian Ryegrass and Whole-crop Barley Silage

Ho Il Lee¹, Yeon Jae Choi¹, Lovelia Mamuad¹, Eun joong Kim², Young kyoon Oh³, Keun kyu Park⁴
and Sang Suk Lee^{1*}

¹Department of Animal Science, Sunchon National University, Suncheon 540-950, Republic of Korea,

²Kyungpook National University, Sangju 742-711, Republic of Korea,

³National Institute of Animal Science, Suwon 441-706, Republic of Korea,

⁴KunKook University, Seoul 143-701, Republic of Korea

ABSTRACT

This study was conducted to determine the quality of italian ryegrass (IRG) and whole-crop barley (WCB) silage combined with heterofermentative lactic acid bacteria (LAB) during fermentation. Six strains of LAB (*L. plantarum* IMAU 70164, *L. acidophilus* KACC 12419, *L. casei* KACC 12413, *L. reuteri* KCTC 3594, *L. buchneri* KACC 12416 and *L. diolivorans* KACC 12385) were used in this study. *L. casei* and *L. reuteri* had the highest propionic acid production and were therefore used for fermenting the forages. The forages were fermented using monoculture and co-culture of *L. casei* and *L. reuteri* for 30, 45 and 60 days of ensiling. Addition of LAB lowered the pH of the IRG silage ($p < 0.05$). Moisture content, lactic acid and acetic acid contents were higher ($p < 0.05$) after addition of LAB. Water soluble carbohydrate was significantly lower ($p < 0.05$) in WCB with a co-culture containing *L. casei* and *L. reuteri*. Propionic acid production was comparatively higher after addition of LAB to WCB on days 30, 45 and 60 while butyric acid was only detected in the IRG control on day 60. Fungi was not detected within 60 days after addition of LAB in IRG and WCB. Through this experiment, improved forage preservation was achieved using a co-culture containing *L. casei* and *L. reuteri*. WCB silage had higher propionic acid concentration and thus, it was a better forage for ensiling using co-culture of *L. casei* and *L. reuteri*.

(Key words : Heterofermentative Lactic acid bacteria, Italian ryegrass, Whole-crop barley, Silage, Co-culture)

I. 서 론

사일리지 품질은 작물의 화학적 조성과 재료 속에 들어 있는 공기의 양 또는 허용량 그리고 미생물의 활력에 의해 주로 결정된다(Kim, 1991). 특히 사일리지 제조 시 내부에 공기가 존재할 가능성이 높아 양질의 사일리지 제조에 필요한 유산균의 신속한 성장이 어려워 호기성 미생물이나 사상균의 증식이 많아질 우려가 있다(Ogawa, 2003). 이런 경우 유산균을 첨가하게 되면 유산발효가 촉진될 뿐만 아

니라 발효품질이 개선되며 건물 회수율 향상 및 호기적 변패를 억제하므로 양질의 사일리지 제조를 위해서는 미생물 첨가제의 사용이 권장되고 있다(Kim et al., 2008). 미생물 첨가제로 주로 사용되는 유산균은 품질의 저장성 향상, 건물손실률 감소 및 단백질 분해 감소(Seale, 1986) 등에 효과적이며 산도를 빠르게 낮춰 사일리지 기호성 저하와 사료섭취량 감소를 야기시키는 낙산(Buchanan-smith, 1990)과 약취의 원인이 되는 발효균의 증식을 억제하여 사료 급여 시 가축의 증체량과 유량 개선에 효과가 있는 것으로 보고

* Corresponding author : Sang Suk Lee, Ruminant Nutrition and Anaerobe Laboratory, Department of Animal Science and Technology, College of Bio-industry Science, Sunchon National University, Suncheon, Jeonnam, Republic of Korea, 540-742
Tel/Fax: +82-61-750-3237, E-mail: rumen@sncu.kr

되고 있다(Muck and Kung, 1997). 최근 이상발효(Heterofermentation) 유산균은 단지 젖산만을 생성하는 정산발효 젖산균(homeofermentative bacteri)에 비해 ethanol, lactate, acetate 및 propionate 등을 생성하여 병원성미생물 및 진균류를 억제하는 효과가 높고 공기중에 노출시 사일리지의 변패를 방지하는 효과뿐만 아니라 사일리지용으로 안정성이 뛰어나며 가축의 사일리지 소화율을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Nsereko et al., 2008; Huisden et al., 2009; Edson et al., 2013). 본 연구에서는 국내 재배가 크게 활성화되고 있는 월동 사료작물인 이탈리아 라이그라스(IRG)와 총채보리(WCB) 사일리지의 사료 가치 및 품질향상을 위해 hetero 발효 유산균을 선발하고 본 균주의 접종이 사일리지의 품질에 미치는 영향을 알아보고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시균주의 능력 평가 및 선발

사일리지 첨가 미생물로서 유산균 6종의 발효 특성을 조사하였다. *L. plantarum* IMAU 70164, *L. acidophilus* KACC 12419, *L. casei* KACC 12413, *L. reuteri* KCTC 3594, *L. buchneri* KACC 12416 및 *L. doilivorans* KACC 12385를 MRS broth (Difco, USA)를 사용하여 37°C에서 24시간 배양 후, 유기산 함량과 흡광도(OD)를 측정하였다. 유기산 측정은 HPLC(Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 분석하였고, 흡광도는 Spectrophotometer(manufactured by Biochrom Ltd, CB40FJ, England)를 사용하여 630 nm에서 측정하였다. 측정된 값을 기초로 하여 접종균주로 *Lactobacillus casei* KACC 12413 및 *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594를 선발하여 사일리지 제조에 이용하였다.

2. 시험재료 및 사일리지 제조

본 연구는 조생종 이탈리아 라이그라스인 코윈어리와 총채보리(유호보리)를 각각 전남 장흥과 전남 강진에서 4월 하순에 수확하여 사일리지를 제조하였으며 수확한 조사료의 성분은 Table 1과 같다. 이탈리아 라이그라스와 총채보리를 약 10시간 예건 한 후 5~10 cm로 세절하여 1.0 kg씩 비닐백에 담고 1×10^8 cfu/ml의 수준의 *L. casei* KACC 12413과 *L. reuteri* KCTC 3594를 10% 접종하여 사일리지를 제조하였다. 시험군은 미생물을 첨가하지 않은 대조군,

Table 1. Chemical (DM basis) and microbiological analyses of the fresh forages

Items	IRG ¹⁾	WCB ²⁾
Moisture (%)	61.50	62.40
NDF ³⁾ (%)	65.66	62.33
ADF ⁴⁾ (%)	41.92	40.91
WSC ⁵⁾ (%)	2.98	5.47
pH	5.15	5.16
NH ₃ -N (mM/L)	10.64	3.20
Total bacteria (log cfu/g)	7.76	8.08
Lactic acid bacteria (log cfu/g)	4.87	5.48
Yeast (log CFU/g)	6.65	5.54
Fungi (log CFU/g)	ND ⁶⁾	ND

¹⁾ IRG, Italian ryegrass, ²⁾ WCB, whole crop barley, ³⁾ NDF, neutral detergent fiber, ⁴⁾ ADF, acid detergent fiber ⁵⁾ WSC, water soluble carbohydrate, ⁶⁾ ND, not detected.

L. casei 첨가구(T1), *L. reuteri* 첨가구(T2) 및 *L. casei*와 *L. reuteri*를 혼합한 첨가구(T3)로 처리당 3반복으로 하였다. 제조된 사일리지는 공기를 제거한 후 5L 플라스틱 사일리로 포장하여 실온(~22°C)에 30일, 45일 및 60일 동안 보관 한 후 개봉하여 사료가치를 평가하였다.

3. 사료가치 분석

사일리지 사료가치를 분석하기 위해 30일, 45일 및 60일의 저장기간 및 첨가구별로 제조된 시료를 분석에 이용하였다. 수분 측정은 시료를 1 mm로 분쇄한 후 수분 측정기(MB23; OHAUS, USA)를 사용하여 측정 하였다. 수용성 탄수화물 함량(WSC, water soluble carbohydrate)은 Anthrone 방법을 이용하여 정량 분석하였다(Thomas, 1997). Glucose를 표준으로 하여 사일리지를 2.5N HCl로 가수분해한 후 Anthrone 시약에 8분간 발색 반응시킨 후 spectrophotometer(Manufactured by Biochrom Ltd, CB40FJ, England)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. NDF 및 ADF 함량은 Van Soest와 Wine(1967)의 방법을 기초로 한 ANKOM 220 Fiber Analyzer(AnkomTechnology, USA)를 사용하였고 buffer 조성은 Ankom Technology 방법에 따라 실시하였다.

사일리지의 pH, 암모니아 및 유기산 분석을 위해서 시료 50 g을 멸균 증류수 500 ml에 넣은 후 4°C에서 24시간 동안 정치한 후 추출된 추출물을 사용하여 pH, 유기산 및 암모니아 분석에 사용하였다. pH는 pH meter(Pinnacle series,

530P; Nova analytics Corp, Woburn, MA, USA)를 사용하여 측정하였고, 유기산(Organic acid) 분석은 HPLC (Agilent Technologies 1200 series, Germany)를 사용하였다. 검출기는 UV detector (Agilent Technologies 1200, Germany)를 사용하였으며, 210 nm와 220 nm에서 분석하였다. 시료의 주입량은 20 ul이었다. 이동상은 0.0085N H₂SO₄을 사용하였으며, 유속은 0.6 ml/min이었다. 컬럼은 METACARB87H (Varian, Germany)를 사용하였으며, 컬럼의 사용온도는 35℃였다. 정량 분석은 intergrator (Agilent Technologies 1200, Germany)를 이용하여 피크의 면적을 측정하여 실시하였다. 암모니아 농도는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 준하여 spectrophotometer (Manufactured by Biochrom Ltd, CB40FJ, England)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

미생물 조사는 사일리지 시료 5 g을 생리식염수 45 ml에 넣고 30분동안 shaking 하여 생균수를 측정하였다. 생균수 측정은 멸균 생리식염수 9 ml에 시료 1 g을 넣고 10배 희석한 후 유산균은 Lactobacilli MRS (Difco, USA), 효모와 곰팡이는 Potato dextrose agar (Difco, USA)에 chloramphenicol 0.2%를 첨가하여 제조한 평판배지에 도포하여 37℃에서 48 시간 배양하여 계수하였다.

4. 통계 분석

본 연구에서 얻어진 결과는 SAS package program의 GLM (General Linear Model)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며(SAS, 2003), 처리평균간 차이는 Duncan 다중검정법 (1955)에 의해 처리구간 유의성 (p<0.05)을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 공시균주의 능력 평가 및 선발

유산균 6종의 흡광도와 유기산(Organic acid) 생성량은

Table 2와 같다. 균주의 성장속도를 알 수 있는 흡광도 (Optical Density) 값은 *L. reuteri*가 가장 높았으며, 젖산의 생성량은 *L. casei*, *L. diolivorans*, *L. reuteri* 순으로 높았다. 한편 *L. reuteri*는 *L. diolivorans* 보다 lactate와 acetate 생성량이 낮았으나 항균작용 능력이 가장 좋은 propionate 생성량과 흡광도 값이 높았다. 알려진 바로는 *L. casei*는 성장속도와 유기산 함량이 높아 pH를 빠르게 낮춤으로서 호기적 변패를 억제 할 수 있고, *L. reuteri*는 성장속도가 빠르고 propionate 생성량이 높아 효모, 곰팡이 및 병원성미생물의 성장을 억제시키는 항균 작용에 효과적이며, 본 연구에서는 젖산생성량이 높은 *L. casei* KACC 12413와 프로피온산 생성량이 높은 *L. reuteri* KCTC3594를 단일 및 혼합하여 접종함으로써 사일리지의 품질 안정성을 평가하였다.

2. IRG 및 WCB 사일리지 품질 안정성 및 화학적 특성

(1) pH, 수분함량, 수용성 탄수화물 및 암모니아 변화

사일리지의 pH, 수분함량, 수용성 탄수화물 및 암모니아 변화는 Table 3과 같다. IRG 사일리지의 pH는 발효 30일 및 45일에 유산균 첨가구가 대조구에 비해 pH가 감소되었고 (p<0.05), WCB 사일리지의 pH는 발효 30일에 처리구의 유의적인 차이가 없었다. Choi et al. (2011a, b)은 원형근포 사일리지 제조시 유산균 첨가 유무에 관계없이 pH는 유사하다고 보고하였으나, 본 연구에서는 IRG 사일리지 유산균 첨가구가 대조구보다 pH가 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다 (p<0.05). 사일리지의 수분함량은 모든 첨가구에서 60~70% 수준이고 대조구에 비해 모든 유산균 첨가구는 수분함량이 약 4~6% 정도 높은 것으로 나타났다 (p<0.05). 사일리지의 적정 수분 함량은 60~70% 내외로 (Vetter and Von Glan, 1978) IRG 사일리지의 경우 유산균 첨가구에서 다소 높았으나, WCB 사일리지는 적정 수분함량을 유지하였다. 수용성탄수화물 함량은 발효 30일 IRG 사일리지에서 대조구에 비해 유산균 첨가구가 유의적으로 낮았으며

Table 2. Organic acid concentration of lactic acid bacteria

Strain	Optical Density	Lactate (mM/1.0 OD)	Acetate (mM/1.0 OD)	Propionate (mM/1.0 OD)
<i>L. plantarum</i> IMAU 70164	1.89	141.32	66.93	4.93
<i>L. acidophilus</i> KACC 12419	2.18	158.33	66.49	6.22
<i>L. casei</i> KACC 12413	2.65	324.02	81.50	11.97
<i>L. reuteri</i> KCTC 3594	2.67	196.60	77.42	16.93
<i>L. buchneri</i> KACC 12416	2.21	147.00	73.31	7.94
<i>L. diolivorans</i> KACC 12385	2.31	229.13	80.95	9.95

Table 3. Change of pH, moisture, water soluble carbohydrate and NH₃-N concentration on silage of Italian ryegrass and Whole crop barley

Items	IRG ¹⁾				WCB ²⁾			
	Con	T1 ⁴⁾	T2 ⁵⁾	T3 ⁶⁾	Con	T1	T2	T3
30 day								
pH	4.74 ^a	4.13 ^c	4.44 ^b	4.51 ^b	4.44 ^{ab}	4.26 ^{ab}	4.45 ^a	4.24 ^b
Moisture (%)	65.50 ^c	72.80 ^b	73.60 ^{ab}	73.85 ^a	64.70 ^c	69.25 ^a	69.85 ^a	68.00 ^b
WSC ³⁾ (%)	2.61 ^a	2.23 ^{ab}	1.87 ^{bc}	1.39 ^c	4.93	4.33	4.38	5.29
NH ₃ -N (mM)	14.43 ^a	8.52 ^d	11.80 ^b	10.05 ^c	4.42	4.31	4.53	4.19
45 day								
pH	4.59 ^a	4.12 ^c	4.15 ^c	4.34 ^b	4.55	4.34	4.59	4.50
Moisture (%)	66.00 ^b	70.70 ^a	70.20 ^a	70.20 ^a	64.30 ^c	70.05 ^{ab}	70.10 ^a	70.35 ^b
WSC ³⁾ (%)	2.82	2.25	2.40	3.21	4.60	3.99	4.09	4.69
NH ₃ -N (mM)	12.92 ^a	6.66 ^c	8.20 ^b	7.72 ^{bc}	3.85 ^a	3.32 ^b	3.68 ^{ab}	3.48 ^{ab}
60 day								
pH	4.66 ^a	4.52 ^a	4.11 ^b	4.51 ^a	4.47	4.44	4.52	4.37
Moisture (%)	65.35 ^c	73.90 ^a	72.70 ^b	73.10 ^{ab}	64.15 ^c	68.30 ^b	69.95 ^a	68.10 ^b
WSC ³⁾ (%)	2.71	2.47	2.43	2.31	4.72	4.70	4.84	5.64
NH ₃ -N (mM)	13.81 ^a	7.10 ^b	7.89 ^b	7.75 ^b	4.49 ^a	3.48 ^b	3.97 ^{ab}	3.84 ^{ab}

¹⁾ IRG, Italian ryegrass, ²⁾ WCB, whole crop barley, ³⁾ WSC, water soluble carbohydrate, ⁴⁾ T1, *Lactobacillus casei*, ⁵⁾ T2, *Lactobacillus reuteri*, ⁶⁾ T3, *Lactobacillus casei* + *Lactobacillus reuteri*,

^{a-d} Within a column and forage type means followed by different letter differ significantly ($p < 0.05$).

($p < 0.05$), IRG 사일리지처리구에 비해 WCB 사일리지에서 수용성탄수화물 함량이 높은 경향을 보였다. 사일리지 제조시, 발효 과정 동안 원료의 건물함량이 감소되는데 이는 수용성 탄수화물이 감소하고 유기산이 생성되는 등 다양한 변화가 일어나기 때문인 것으로 알려져 있다(Contreras-Govea et al., 2011; Henderson, 1993). 암모니아 농도는 발효 30일 WCB 사일리지를 제외한 모든 첨가구가 대조구에 비해 낮았고 ($p < 0.05$), 첨가구중 T1과 T3 처리구에서 암모니아 농도가 낮은 경향을 보였다. 본 연구에서 나타난 암모니아 농도는 사일리지에 첨가된 유산균 발효로 pH를 신속히 떨어뜨려 단백질의 분해를 억제시킨 결과로 사료되며 Haigh(1996)가 보고한 양질의 사일리지 기준이 되는 건물함량 중 암모니아 함량이 10% 이하로 낮은 결과를 나타내었다.

(2) NDF 및 ADF 변화

사초의 소화율 및 섭취량에 영향을 주는 NDF 및 ADF 함량은 Table 4와 같다. 발효 30일 후 두 초종에서 NDF와 ADF 함량이 대조구보다 유산균 첨가구에서 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 발효 45일에 IRG에 유산균을 첨가한 구와 60일 이후 WCB 사일

리지의 경우 대조구에 비해 유산균을 처리한 처리구에서 NDF 함량이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 사일리지 제조시 섬유소 변화에 관한 연구결과에 의하면 Kennedy et al. (1989)은 유산균 처리로 ADF 함량만이 감소된다고 보고하였고, 반면에 Gordon (1989) 및 Patterson et al. (1997)은 유산균 처리로 ADF 함량이 증가한다고 하였다. Keady and Murphy (1996)는 유산균 처리로 ADF 및 NDF 함량이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다고 하여 본 연구와 비슷한 결과를 보였으나, 본 연구에서는 *L. casei*와 *L. reuteri*를 혼합첨가한 처리구에서 감소되는 결과를 나타내었다. 이외에도 국립축산과학원에서 실시한 이탈리아 라이그라스 ‘코웨어리’에 정산발효 젖산균인 *L. plantarum*을 첨가하였을 때 대조구에 비해 ADF와 NDF의 함량이 40.26% 및 58.73%에서 34.36% 및 59.23%으로 약간의 변화가 있었으나 유의적인 차이는 보이지 않았다(Choi et al., 2014).

(3) 유기산(Organic acid) 함량 변화

IRG 사일리지와 WCB 사일리지의 유기산 함량은 Table 5에 나타난 바와 같다. 30일이 지난 후 개봉한 처리구간 비교결과, 대조구보다 유산균 첨가구에서 젖산 및 초산의 함량이 높은 경향을 보였으며, 특히 WCB 사일리지에서 혼

Table 4. Changes of NDF and ADF on silage of Italian ryegrass and Whole crop barley

Items	IRG ¹⁾				WCB ²⁾			
	Con	T1 ⁵⁾	T2 ⁶⁾	T3 ⁷⁾	Con	T1	T2	T3
30 day								
NDF ³⁾ (%)	66.25	66.43	62.36	64.17	60.06	60.51	62.88	63.00
ADF ⁴⁾ (%)	39.62	39.99	38.68	38.56	39.38	34.12	36.37	36.72
45 day								
NDF (%)	64.98 ^a	62.10 ^b	61.81 ^b	62.05 ^b	69.93 ^b	74.89 ^a	72.91 ^{ab}	71.77 ^{ab}
ADF (%)	40.59 ^a	38.41 ^b	38.24 ^b	38.42 ^b	41.29 ^b	44.61 ^a	43.66 ^{ab}	43.27 ^{ab}
60 day								
NDF (%)	63.26 ^b	65.88 ^a	61.04 ^b	60.67 ^b	67.22 ^a	64.43 ^b	63.64 ^b	60.72 ^c
ADF (%)	36.60 ^b	38.21 ^a	35.31 ^b	35.43 ^b	37.85 ^a	35.95 ^b	35.42 ^b	33.58 ^c

¹⁾ IRG, Italian ryegrass, ²⁾ WCB, whole crop barley, ³⁾ NDF, neutral detergent fiber, ⁴⁾ ADF, acid detergent fiber, ⁵⁾ T1, *Lactobacillus casei*, ⁶⁾ T2, *Lactobacillus reuteri*, ⁷⁾ T3, *Lactobacillus casei* + *Lactobacillus reuteri*,

^{a-d} Within a column and forage type means followed by different letter differ significantly ($p < 0.05$).

Table 5. Changes of organic acid on silage of Italian ryegrass and Whole crop barley (mM)

Items	IRG ¹⁾				WCB ²⁾			
	Con	T1 ³⁾	T2 ⁴⁾	T3 ⁵⁾	Con	T1	T2	T3
30 day								
Lactate	26.94 ^{ab}	38.88 ^a	36.71 ^{ab}	22.75 ^b	20.71 ^b	25.52 ^b	21.25 ^b	32.10 ^a
Acetate	17.36	17.93	21.14	28.76	12.43 ^b	14.89 ^{ab}	16.84 ^a	13.50 ^b
Propionate	ND ⁶⁾	ND	ND	ND	1.18 ^b	4.43 ^a	4.30 ^a	4.20 ^a
Butyrate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45 day								
Lactate	27.22	34.88	39.07	25.43	13.03	15.39	9.95	12.89
Acetate	15.96	15.64	15.33	20.40	10.90 ^b	14.45 ^{ab}	17.15 ^a	14.37 ^{ab}
Propionate	ND	ND	ND	ND	1.20 ^b	4.79 ^a	4.15 ^a	4.45 ^a
Butyrate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
60 day								
Lactate	31.53	20.34	34.26	21.16	19.87	11.81	11.29	15.56
Acetate	18.04	23.53	14.42	22.13	12.24	17.57	17.64	16.34
Propionate	ND	1.06	ND	2.9	2.83 ^b	6.15 ^a	5.05 ^{ab}	5.61 ^a
Butyrate	2.09	ND	ND	ND	2.85	ND	ND	ND

¹⁾ IRG, Italian ryegrass, ²⁾ WCB, whole crop barley, ³⁾ T1, *Lactobacillus casei*, ⁴⁾ T2, *Lactobacillus reuteri*, ⁵⁾ T3, *Lactobacillus casei* + *Lactobacillus reuteri*, ⁶⁾ not detected.

^{a-d} Within a column and forage type means followed by different letter differ significantly ($p < 0.05$).

합균주 처리구가 유의적으로 높은 유기산 함량을 나타내었다($p < 0.05$). 또한 초종간 유기산 함량은 *Lactobacillus casei* 를 첨가한 IRG 사일리지가 WCB 사일리지보다 높았다. 그러나 60일 경과 후 젖산과 초산의 함량은 처리간 큰 변화를 보이지 않았다. Choi et al. (2011a,b)은 유산균 첨가에 따라 lactate의 함량이 증가한다고 보고하였는데 본 연구에

서 30일과 45일이 경과한 처리구에서 비슷한 결과를 나타냈다. 그러나 일부 연구에서는 미생물을 첨가하더라도 사일리지의 산도 및 젖산의 생성량이 미비한 것으로 보고되었으나 (Filya et al., 2007), 이는 미생물의 종류 및 조사료의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 보인다 (Contreras-Govea et al., 2011). 본 연구에서는 발효 30일에

Table 6. Changes of microbes on silage of Italian ryegrass and Whole-crop barley

Items	IRG ¹⁾				WCB ²⁾			
	Con	T1 ⁴⁾	T2 ⁵⁾	T3 ⁶⁾	Con	T1	T2	T3
.....Log cfu/g.....								
30 day								
LAB ³⁾	7.79	7.78	7.88	7.69	7.79	7.78	7.88	7.69
Yeast	ND ⁷⁾	ND	ND	ND	5.88	4.04	4.88	4.23
Fungi	3.85	2.72	2.61	2.68	ND	ND	ND	ND
45 day								
LAB	6.77	6.69	6.18	6.97	7.18	7.20	7.04	6.98
Yeast	5.87	6.61	5.94	ND	6.40	6.34	6.49	6.08
Fungi	3.58	3.87	4.18	2.74	5.04	ND	ND	ND
60 day								
LAB	7.20	7.32	6.23	7.28	7.32	7.26	7.40	7.34
Yeast	6.45	5.40	6.15	6.23	5.23	5.53	4.52	6.38
Fungi	4.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾ IRG, Italian ryegrass, ²⁾ WCB, whole crop barley, ³⁾ Lactic acid bacteria, ⁴⁾ T1, *Lactobacillus casei*, ⁵⁾ T2, *Lactobacillus reuteri*, ⁶⁾ T3, *Lactobacillus casei* + *Lactobacillus reuteri*, ⁷⁾ not detected.

^{a,b,c,d} Within a column and forage type means followed by different letter differ significantly (p<0.05).

전반적으로 젖산과 초산이 증가하였으며, 저장 후 45일에는 WCB에 유산균을 접종한 처리구에서 초산이 유의적으로 증가하는 양상으로 보아 저장기간에 따른 영향이 큰 것으로 사료된다. 또한 Propionate는 총체보리 사일리지에서 측정되었으며 대조구보다 유산균 첨가구가 높은 함량을 나타냈다 (p<0.05). 사일리지 품질을 저해시키는 butyrate는 발효 60일 이후 개봉한 IRG 및 WCB 사일리지 대조구에서 측정되었고 유산균 첨가구에서는 butyrate가 생성되지 않아 사일리지 발효 품질이 개선된 것으로 사료된다.

(4) 사일리지의 미생물 변화

IRG 사일리지와 WCB 사일리지의 미생물 변화를 조사한 결과는 Table 6에 나타내었다. 모든 처리구 및 발효기간의 유산균 수는 7.7~7.9 log CFU/g의 수준으로 나타났지만 유산균 첨가에 따른 사일리지내 유산균 수가 증가하는 경향은 보이지 않았다. 또한 효모의 성장 억제력에는 유의적으로 영향을 미치지 못하였으나 IRG 사일리지 배양 60일에 유산균 첨가구에서 곰팡이를 억제하였으며, WCB 사일리지에서도 유산균 첨가구에서 곰팡이가 검출되지 않았다. 이는 유산균 첨가로 인한 유산 발효로 pH 저하 및 propionate 생성으로 곰팡이의 생육에는 결과적으로 불리한 여건을 제공하였다고 사료되며, 성장 억제로 양분손실이 최소화 되었을 것으로 판단된다. 사일리지 발효에 유산균의 첨가는 사일리지의 지속성 및 보존성을 향상시키는 유용한 수단으로 이용될 수 있음을 확인하였으며, 호기적 변

패가 여러 미생물에 의해 발생하지만 주로 효모와 곰팡이에 의해 발생 (Hara et al., 1979; Woolford, 1990)하므로 유산균을 첨가함으로써 유해균을 억제시키고 양질의 사일리지를 제조하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구에서는 hetero 발효유산균 첨가가 이탈리아 라이그라스 및 총체보리 사일리지의 사료가치 및 발효품질에 미치는 영향을 조사하였다. 사일리지 접종균주를 선별하기 위해 유산균 6종 (*L. plantarum* IMAU 70164, *L. acidophilus* KACC 12419, *L. casei* KACC 12413, *L. reuteri* KCTC 3594, *L. buchneri* KACC 12416 and *L. diolivorans* KACC 12385)을 이용하였으며, 젖산 함량이 높은 *L. casei* KACC 12416와 프로피온산 함량이 높은 *L. reuteri* KCTC 3594를 최종 선택하여 사일리지를 제조하였다. 처리구는 대조구, *L. casei* 첨가구, *L. reuteri* 첨가구 및 *L. casei*, *L. reuteri* 혼합첨가구로 하여 30일, 45일 및 60일간 저장하였다. pH는 IRG 사일리지의 경우 유산균 첨가구가 대조구에 비해 낮았으며 (p<0.05), 수분함량, 젖산 및 초산함량 또한 유산균을 첨가한 처리구에서 낮은 것으로 나타났다 (p<0.05). 수용성 탄수화물의 함량은 *L. casei* KACC 12416와 *L. reuteri* KCTC 3594를 혼합배양한 처리구에서 가장 낮았다 (p<0.05). 프로피온산은 유산균을 접종한 총체보리에서 전 기간동안 높게 나타났으며, 반면에 사일리지 품질을 저해시키는

butyrate는 발효 60일의 대조구에서 측정되었다. 사일리지의 미생물 측정결과 IRG 사일리지 배양 60일에 유산균 첨가구에서 곰팡이가 억제되었으며, WCB 사일리지는 유산균을 첨가한 처리구에서 곰팡이가 검출되지 않았다.

이상의 연구 결과들로 볼 때, 단일 균주를 접종한 사일리지에 비해 co-culture (*L. casei* + *L. reuteri*)로 접종했을 때 사일리지 저장품질 개선에 보다 효과적이었으며, 혼합배양한 처리구가 청보리 사일리지내 높은 프로피온산을 생성하며 이는 사일리지의 품질개선에 도움을 주는 것으로 조사되었다.

V. 사 사

본 연구는 2014년 농촌진흥청 연구사업 (제목 : 주류가공 부산물 특성규명 및 사료가치 증진을 통한 한우섬유질 배합사료 제조기술개발, 과제번호 : PJ 0091562014) 지원에 의해 연구되었다.

VI. REFERENCES

- Buchanan-Smith, J.G. 1990. An investigation into palatability as a factor responsible for reduced intake of silage by sheep. *Animal Science*. 50:253-260.
- Cai, Y. 2005. Quality improving technique of whole crop silage. NIAS International Symposium Proceedings. 103-136.
- Chaney, A.L. and Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8:130-132.
- Choi, K.C., Jo, N.C., Jung, M.W., Lee, K.D., Kim, J.G., Lim, Y.C., Kim, W.H., Oh, Y.K., Choi, J.H., Kim, C.M., Jung, D.K., Choi, J.M. and Kim, H.G. 2011a. Effect of harvest stage of corn on nutritive values and quality of roll baled corn silage manufactured with corn grown in paddy land. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*. 31:65-74.
- Choi, K.C., Jung, M.W., Kim, W.H., Kim, C.M., Yoon, S.H., Choi, E.M., K., J.G., Lee, S.M., Choi, J.M., Kim, H.G. and Lim, Y.C. 2011b. Effect of harvest stage of sorghum × sorghum hybrid (SSH) on the quality of round baled SSH silage. *Journal of the Society of Grassland and Forage Science*. 31:143-150.
- Choi, K.C., Valan Arasu, M., Ilavenil, S., Park, H.S., Jung, M.W., Kim, J.H., Jung, J.S., Hwangbo, S., Kim, W.H. and Lim, Y.C. 2014. Effect of addition of lactic acid chlorella on nutritive values and quality of italian ryegrass-hairy vetch silage. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*. 34: 39-44.
- Contreras-Govea, F.E., Muck, R.E., Mertens, D.R. and Weimer, P.J. 2011. Microbial inoculant effects on silage and *in vitro* ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmrcom, and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*. 163:2-10.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests *Biometrics*. 11:1-42.
- Edson, M.S., Carlos, H.O.M., Thiago, C.D.S. and Fleming S.C. 2013. Lactic acid bacteria in tropical grass silages. *Lactic Acid Bacteria R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. 14: 335-362.
- Filya, I., Muck, R.E., Contreras-Govea, F.E., 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *Journal of Dairy Science*. 90:5108-5114.
- Gordon, F. 1989. An evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculant as an additive for grass silage. *Grass and Forage Science*. 44:169-179.
- Haigh, P.M. 1996. The effect of dry matter content and silage additives on the fermentation of bunker-made grass silage on commercial farms in England 1984-91. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 64:249-259.
- Hara, S., Itoh, M. and Ohyama, Y. 1979. Aerobic deterioration of silages changes in temperature, gas metabolism, heat production and microflora. *Japanese Journal of Zoo Technology Science*. 50:549-556.
- Henderson, N. 1993. Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*. 45:35-56.
- Keady, T.W.J. and Murphy, J.J. 1996. Effects of inoculant treatment on ryegrass silage fermentation, digestibility, rumen fermentation, intake and performance of lactating dairy cattle. *Grass and Forage Science*. 51:232-241.
- Kennedy, S.J., Gracey, H.I., Unsworth, E.F., Steen R.W.J. and Anderson, R. 1989. Evaluation studies in the development of a commercial bacterial inoculant as an additive for grass silage. 2. Responses in finishing cattle. *Grass and Forage Science*. 44:371-380.
- Kim, H.S. 1991. Studies on the viability of lactobacillus acidophilus IFO 3205 by microencapsulation. Ph.D. thesis. Seoul. Korea.
- Kim, J.K., Ham, J.S., Chung, E.S., Yoon, S.H., Kim, M.J., Park, H. S., Lim, Y.C. and Seo, S. 2008. Evaluation of Fermentation Ability of Microbes for Whole Crop Rice Silage Inoculant. *Journal of the Korean Society of Grass and Forage Science*. 28:229-236.
- Muck, R. and Kung, L.J. 1997. Effects of silage additives on ensiling. In: *Field to Feedbunk North American Conference* Hershey. PA. NRAES 99.
- Nsereko, V.L., Smiley, B.K., Rutherford, W.M., Spielbauer, A., Forrester, K.J., Hettenger, G.H., Harman, E.K. and Harman, B.R.

2008. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. *Animal Feed Science and Technology*. 145:122-135.
- Ogawa, M. 2003. Research of whole crop rice silage utilization in Japan. *Animal Technology Research Laboratory. International Seminar Proceedings*. 25-58.
- Patterson, D.C., Mayne, C.S., Gordon, F.J. and Kilpatrick. D.J. 1997. An evaluation of an inoculant/enzyme preparation as an additive for grass silage for dairy cattle. *Grass and Forage Science*. 52:325-335.
- SAS. 2003. SAS User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Cary, NC.
- Seale, D.R. 1986. Bacterial inoculants as silage additives. *Journal of Applied Bacteriology*. 61:9-26.
- Thomas T.A. 1977. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 28:639-642.
- Van Soest, P. and Wine, R. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association Official Analytical Chemists*. 50.
- Vetter, R. and Glan, K.V. 1978. Abnormal silages and silage related disease problems. *Fermentation of Silage a Review*. 281-332.
- Woolford, M.K. 1990. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology*. 68:101-116.
- (Received October 21, 2014 / Revised December 04, 2014 / Accepted December 09, 2014)