Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science 36(4) : 309~317, 2016
http://dx.doi.org/10.5333/KGFS.2016.36.4.309
ISSN 2287-5824 (Print)
ISSN 2287-5832 (Online)

Research Article

미생물제 처리에 의한 이탈리안 라이그라스 사일리지의 *In vitro* 및 *In situ* 반추위 발효특성에 미치는 영향

임동현* · 기광석 · 최순호 · 김태일

농촌진흥청 국립축산과학원

Effects of Different Microbial Culture Supplements on *In vitro* and *In situ* Ruminal Fermentation Characteristics of Italian ryegrass Silage

D. H. Lim*, K. S. Ki, S. H. Choi and T. I. Kim

National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan, 31000, Korea

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effects of microbial culture supplements on ruminal fermentation and fermentative quality of Italian ryegrass silage (IRGS) both *in vitro* and *in situ*. Three species of microbes (*Lactobacillus casei* (LC), *Bacillus subtilis* (BS), and *Saccharomyces cerevisiae* (SC)) were used in this study. They were applied to IRGS at 30 days after silage manufacture. Various items were measured using *in vitro* and *in situ* incubation technique after each microbial supplement was inoculated into IRGS at 0.5×10^4 CFU/g. In the first experiment, *in vitro* ruminal fermentation characteristics of IRGS were evaluated at 0, 12, 24, 48, and 72 hours after microbes were inoculated into IRGS. In the second experiment, *in situ* fermentation characteristics were investigated at 0, 1, 3, and 5 days after the inoculation of each microbial supplement. *In vitro* ruminal NH_3-N content was significantly ($p<0.05$) increased in LC-, BS-, and SC-IRGS at 12 hrs post incubation compared to that in control IRGS. *In vitro* ruminal total VFA concentration and dry matter digestibility (DMD) of IRGS were not significantly difference among LC-, BS-, and SC-IRGS, although they were numerically increased in LC-IRGS than those of the other IRGS. In addition, this study evaluated the fermentation characteristics and *in situ* DMD of IRGS with the lapse of incubation time up to 5 days. Throughout the incubation times from 1 day to 5 days, the pH value was significantly ($p<0.05$) lower in BS-, LC-, and SC-IRGS than that in control IRGS. Lactate was significantly ($p<0.05$) higher, and significantly ($p<0.05$) butyrate was lower in LC-IRGS than that in other treatments at 0 day. It was higher ($p<0.05$) in control IRGS than that of BS-, LC-, and SC-IRGS at 1-5 days. *In situ* DMD tended to increase in BS-, LC-, and SC-IRGS compared to that in control IRGS. Especially, DMD was higher in SC-IRGS than that in other treatments at 0 day. It tended to be higher in LC-IRGS at all incubation time. Taken together, these results suggest that it might be useful to select a microorganism by considering the feeding time of IRGS to ruminants because organic acids and DMD of IRGS were affected by the incubation time of each microorganism with IRG silage, especially for *L. casei* decreased the content of acetate and butyrate in IRGS.

(**Key words :** Italian ryegrass silage, *Lactobacillus casei, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae*)

Ⅰ. 서 론

최근 축산분야에서 미생물 첨가제는 동물사료의 보충제 또는 축산환경의 개선제 등으로 활용되고 있는데, 양축 농가나 많은 연구자들은 긍정적인 효과가 있는 것으로 보고하고 있다 (Nocek and Kautz, 2006; Qiao et al., 2010; Moon et al., 2011; Cho et al., 2014).

젖산균 (*Lactobacillus*)은 양질의 사일리지 제조를 위해 사용되는 미생물로, 사일리지의 저장성을 향상시킬 뿐만 아니라 건물 소실률 및 단백질 분해율을 감소시키며 (Seale, 1986), 또한 낙산의 생성을 감소시켜 가축의 증체량과 산유량 개선에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Buchanan-Smith, 1990; Muck and Kung, 1997). 고초균 (*Bacillus sp.*)은 자연계에 널리 분포하는 균종으로서, 단백질, 지방 및 탄수화물에 대하여 분해활성이 높은 것으로 알려져 있는데 (Kalogridou-Vassiliadou, 1992), Qiao et al. (2010)은 사료첨

* Corresponding author : Dong Hyun Lim, National Institute of Animal Science, 114, Sinbang 1-gil, Seonghwan-eup, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, 31000, Korea, Tel: +82-41-580-3384, Fax: +82-41-580-3419, E-mail: idh1974@korea.kr

가제로써 *B. subtilis*의 첨가수준에 따라 젖소에서 반추위 발효특성, 영양소 소화율, 유단백 및 유량에 상당한 변이가 있는 것으로 보고하였다. 반추동물에서 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 반추위 발효 조절 및 생산성 증진에 대해 많은 연구가 진행되었으며(Rose, 1980; Weidmeier et al., 1987; Lynch and Martin, 2002; Dawson and Tricarico, 2002), 특히 Desnoyers et al.(2009)은 젖소에서 반추위 pH를 안정시키고, 휘발성 지방산(volatile fatty acids, VFA)의 농도를 증가시킬 뿐만 아니라 사료 섭취량 및 유량을 증가시키는 것으로 보고하였다. 또한, 반추동물에서 급여하는 사료의 종류 및 그 조성에 따라 미생물제의 급여 효과는 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다(Kleinschmit and Kung Jr, 2006; Desnoyer et al., 2009; Amanllah et al., 2014; Cho et al., 2014).

한편, 축산업에서 가축경영비 중 사료비의 비중이 증가하면서 생산성 위주의 배합사료 중심 급여체계를 대체할 수 있는 양질의 조사료 자원의 생산과 이용기술 개발이 무엇보다 중요시 되고 있다. 우리나라 답리작에서 많이 재배되고 있는 이탈리안 라이그라스(Italian ryegrass, IRG)는 가축의 기호성과 사료가치가 우수하기 때문에 배합사료 중심의 급여체계를 대체할 수 있는 중요한 조사료 자원의 하나이다. 그러나 이탈리안 라이그라스를 포함하여 국내에서 생산되는 대부분의 조사료는 사일리지 형태로 이용하고 있으나, 고 수분, 2차 발효에 의한 부패, 그리고 이물질 혼입 등의 문제로 인해 실제 농가에서 사용에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 일부 지방자치단체에서 보급하고 있는 미생물의 활용성을 제고하고, 젖소에서 IRG 사일리지의 이용성을 증진하기 위해 다양한 미생물(*L. casei* (LC), *B. subtilis* (BS) 및 *S. cerevisiae* (SC))의 첨가가 IRG 사일리지의 *in vitro* 반추위 발효특성 및 소화율에 미치는 영향을 조사하였으며, 미생물의 접종 후 배양시간이 경과함에 따라 IRG 사일리지의 품질 및 *in situ* 반추위 소화율에 미치는 영향을 분석하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용한 IRG 사일리지용 시험재료는 2013년 10월부터 2014년 4월까지 천안지역에서 재배하였으며, 수확 시 세절 길이(Theoretical length of cut, TLC)는 30 cm가 되도록 절단하였다. 사일리지 제조 시 *Lactobacillus plantarum* (1×10^{10} CFU/g)을 물(0.5 g/ℓ)에 희석한 후 첨가하여 약 500 kg의 원형 곤포로 제조하였으며, 숙성완료 후 30일이 경과한 사일리지를 이용하여 분석하였다. *In vitro* 및 *in situ* 실험을 위한 IRG 사일리지는 60℃의 dry oven (OF-02GW, JEIO TECH, Korea)에서 48시간 건조 후, 1 mm screen이 장착된 wiley mill로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 또한 IRG 사일리지의 품질 및 소화율 개선을 위해 미생물제로 *L. casei* (LC), *B. subtilis* (BS) 및 *S. cerevisiae* (SC) (2×10^7 CFU/㎖)를 사용하였다.

2. IRG 사일리지의 화학적 조성 및 사료가치 분석

공시재료의 일반성분은 AOAC법(1995)으로 분석하였으며, NDF(neutral detergent fiber)와 ADF(acid detergent fiber)는 Van Soeat et al.(1991)의 방법으로 분석하였다. 실험에 사용된 IRG 사일리지의 사료가치 조성은 Table 1과 같으며, 미생물 처리 후 배양시간의 경과에 따른 IRG 사일리지의 사료가치 변화를 측정하였다. IRG 사일리지의 pH는 각 시험사료 1 g을 증류수 10 ㎖에 넣어 진탕한 후 여과지로 걸러 pH 미터측정기(HI 8424 Micro-computer pH meter, HANNA Instruments, Italy)로 측정하였다. 또한 암모니아태 질소(NH_3-N) 함량 분석을 위해서 각 시료 1 g을 증류수 10 ㎖에 넣고 0~4℃에서 24시간 진탕한 후 여과지로 걸러 −20℃에서 보관하고 분석 시 해동하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 그리고 Chaney and Marbach (1962)의 방법에 따라 phenol 용액으로 상층액 중의 암모니

Table 1. Chemical composition of experimental Italian ryegrass silage (% of DM)

Chemical compositions	Italian ryegrass silage
Moisture, %	59.00
Crude protein, % of DM	9.63
Crude fat, % of DM	3.09
Crude fiber, % of DM	40.30
Crude ash, % of DM	8.29
Neutral detergent fiber, % of DM	68.38
Acid detergent fiber, % of DM	42.34
pH	4.51
NH_3-N, mg/dL	12.06
Lactate, % of DM	7.14
Acetate, % of DM	1.33
Butyrate, % of DM	0.80
Flieg's score	91.6

아를 발색시킨 후 spectrophotometer (UV-1201, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 630 nm로 흡광도 (Optical density, OD)를 측정하였다.

3. 공시축 및 사양관리

공시축으로는 반추위 캐뉼라가 장착된 홀스타인종 공태우 3두 (평균 체중 711±42.5 kg)를 사용하였다. 본 시험은 적응기간 14일와 실험기간 5일로 진행되었으며, 충청북도 천안시에 위치한 국립축산과학원의 실험목장에서 실시하였다. 실험 1일차에 *in vitro* 반추위 발효특성 분석을 위해 반추위액을 채취하였으며, 실험 3일부터 *in situ* 반추위 실험을 시작하여 72시간 후 종료하였으며, 전체 시험기간 동안 농후사료 (2 kg/일)는 1일 2회 (09:00, 17:00)로 나누어 급여하고, 건초, 음수와 미네랄 블록은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

4. *In vitro* 반추위 발효특성 분석

In vitro 실험은 미생물의 종류에 따른 IRG 사일리지의 반추위 내 발효특성을 평가하기 위해 수행하였다. 분쇄된 IRG 사일리지를 각각의 35 ㎖ serum bottle에 0.2 g씩 넣고, LC, BS 및 SC가 각각 0.5×10^4 cfu/g가 되도록 첨가하여 3반복으로 IRG 사일리지의 발효특성을 비교하였다. 위액 채취는 실험당일 오전 농후사료를 급여하기 전에 채취하였으며, 채취한 위액은 4겹의 거즈로 여과한 후 2 ℓ 보온병 (39℃)에 head space가 없도록 담아 용기 내 산소의 침입을 차단하였다. 배양 전 반추위액을 CO_2로 bubbling하면서 pH를 6.5로 조정하고 McDougall's buffer solution (Troelsen and Donna, 1966)과 반추위액을 4:1 (v/v)로 혼합하여 반추위 배양액으로 사용하였다. 각 serum bottle에 반추위 배양액을 20 ㎖씩 분주한 다음 39℃로 설정된 항온 배양기 (IB-05G, JEIO TECH, Korea)에서 12, 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다.

Williams et al. (1996)과 Beuvink et al. (1992)의 방법에 따라 가스 생성량을 측정하고, 원심분리하여 그 상층액의 pH를 측정한 다음, 상층액은 암모니아태 질소와 VFA 농도의 분석을 위해 각각 분주하고, 잔유물은 filter paper (Whatman No. 4)로 여과한 후 60℃의 dry oven에서 72시간 건조하여 건물분해율을 측정하였다. 배양액 내의 암모니아태 질소 (NH_3-N) 함량은 Chaney and Mabach (1962)의 방법에 따라 분석하였으며, 휘발성 지방산 (volatile fatty acid, VFA)은 Erwin et al. (1961)의 방법으로 수행한 후 gas chromatography (GC-14A, Shimadzu, Japan)로 측정하였다.

5. *In situ* 반추위 실험

미생물의 종류별 배양시간의 경과에 따른 IRG 사일리지의 사료가치 변화를 평가한 후 nylon bag을 이용하여 *in situ* 반추위 내 소화율을 분석하였다. 뚜껑이 달린 삼각플라스크에 분쇄한 IRG 사일리지을 넣고, 각각의 미생물을 0.5×10^4 cfu/g이 되도록 골고루 spray하고, 대조구는 동량의 증류수를 spray한 다음 30℃에서 0, 1, 3 및 5일간 배양하였다. 각 시간대별로 배양시간이 경과한 다음 IRG 사일리지 10 g을 증류수 100 ㎖에 넣고 4℃의 냉장고에서 주기적으로 흔들어 주면서 24시간 보관 후 filter paper (Whatman No. 4)로 여과한 후 pH를 측정한 다음 유기산 (organic acids)은 HPLC (Varian prostar, USA)으로 분석하였다. Column은 SUPELCOGEL C-610H을 장착하고, 30℃에서 0.1% phosphoric acid을 분당 1.0 ㎖으로 흘려주면서 실시하였다. 시료는 20 ㎕을 주입하고, 210 nm에서 UV detector로 측정하였다.

Nylon bag을 이용한 건물 분해율은 각 시료를 2 g씩 nylon bag (5×10 cm; 50 ㎛ pore size)에 담고 입구를 봉한 후 아침 사료 급여 전에 반추위 내 투입하여 48시간 동안 배양하였다. 각 시간대별 배양 후 nylon bag은 반추위 누관에서 꺼내어 얼음물에 10분간 침지시킨 후 흐르는 수돗물로 30분간 세척한 다음 60℃ dry oven에서 48시간 동안 건조하였다. 한편, 0시간대 nylon bag은 반추위 내 배양 없이 동일한 방법으로 침지 및 세척을 한 후 건조하였다. *In situ* 실험에서 건물 분해율은 48시간 건조한 후 건물 함량을 측정하여 배양기간 동안 소실된 양을 배양 전 시료의 양에 대한 백분율로 계산하였다.

6. 통계분석

분석된 모든 결과는 통계프로그램 SPSS version 17.0 software의 일반선형회귀모형 (general linear model, GLM)를 이용하여 분산분석을 실시하였다. 처리구 간의 유의성은 유의수준 0.05 이하에서 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 검정을 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. IRG 사일리지의 미생물제 첨가에 의한 *in vitro* 발효특성

IRG 사일리지의 반추위 내 소화율 개선을 위해 다양한 미생물제를 IRG 사일리지에 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효

특성에 미치는 영향을 분석한 결과 Table 2와 같다. 반추위액의 pH는 배양시간이 경과함에 따라 BS-IRGS에서 배양 12시간보다 24시간에서 pH가 높아진 후 72시간까지 감소하였으며, 다른 처리구는 배양시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으나, 처리 간 유의적 차이는 없었다. 반추위 내부 항상성을 반영하는 주요 요소인 pH는 효율적인 반추위 발효를 위해 반추위 내 pH를 안정적으로 유지하는 것이 필수적인데, 반추동물은 생리적으로 5.5~7.0의 범위에서 유지한다(Krause and Oetzel, 2006). 본 결과의 대조구와 모든 처리구에서 72시간 배양기간 동안 pH 수준은 6.42~6.59로, Stewart et al. (1997)에 의해 보고된 바와 같이 반추위 내 발효, 미생물 성장 및 섬유소 분해를 위해 적정한 범위 조건 내에서 유지되었다.

가스 생성량에 있어서는 대조구보다 미생물제 처리구에서 높았으며, 특히 LC-IRGS에서 가장 높게 나타났지만, 처리구간의 유의적 차이는 없었다. 암모니아태 질소(NH_3-N) 농도는 대조구보다 미생물제 처리구에서 증가하는 경향이었다. 12시간 배양 시 NH_3-N 생성량이 SC-IRGS에서 가장 높았으며($p<0.05$), 48시간 배양 시 대조구와 BS-IRGS에서 높게 나타났다($p<0.05$). 반추위 내 미생물을 위한 최적의 NH_3-N 농도는 29~35 mg/dℓ의 범위로, 5 mg/dℓ 보다 낮으면 박테리아의 성장률이 감소하고, 미생물체 단백질 합성을 저해할 수 있는 반면, 과도하게 생성된 NH_3-N 수준은 미생물에 의한 NH_3-N의 이용을 제한한다(Satter and Slyter, 1974; Hristov et al., 2002). 본 결과에서 72시간 배양 후 모든 처리구의 NH_3-N 농도가 28.59~29.27 mg/dℓ의 범위로, Satter and Slyter (1974)가 제시한 최적 농도와 유사하여 미생물의 성장과 단백질 합성에 부정적 영향이 없을 것으로

Table 2. Effects of different microbial cultures addition on pH, gas production, NH_3-N, and DM degradation of *in vitro* incubation fluids for IRG silage

Incubation time	CON-IRGS	LC-IRGS	BS-IRGS	SC-IRGS	SEM[1)]	*p*-value
			pH			
12 hr	6.59	6.57	6.56	6.57	0.020	0.405
24 hr	6.54	6.52	6.57	6.53	0.044	0.665
48 hr	6.52	6.51	6.52	6.51	0.053	0.995
72 hr	6.43	6.42	6.43	6.44	0.054	0.989
			Gas production (mL/g DM)			
12 hr	27.319	29.720	29.349	31.132	1.827	0.076
24 hr	42.350	43.465	41.954	42.672	1.706	0.814
48 hr	43.762	47.328	45.867	46.238	2.649	0.512
72 hr	64.094	68.304	66.570	67.388	3.754	0.655
			NH_3-N (mg/dL)			
0 hr	12.658	13.996	13.428	13.712	0.995	0.486
12 hr	16.111^{d}	17.276^{c}	17.955^{b}	18.687^{a}	0.982	<0.001
24 hr	20.079	20.361	20.845	20.536	0.466	0.294
48 hr	26.452^{a}	26.230^{ab}	26.444^{a}	26.175^{b}	0.154	0.029
72 hr	28.593	28.723	29.270	29.233	0.504	0.295
			DM degradation (%)			
0 hr	26.026	22.992	20.925	23.932	4.697	0.706
12 hr	38.321	39.269	39.503	38.908	1.290	0.783
24 hr	41.897^{b}	42.406^{b}	41.992^{b}	45.053^{a}	1.625	0.037
48 hr	43.726	49.290	50.997	51.106	4.834	0.247
72 hr	49.228	50.047	48.794	44.736	4.488	0.576

Abbreviated CON-IRGS; control IRG silage, LC-IRGS; IRG silage treated with *L. casei*, BS-IRGS; IRG silage treated with *B. subtilis*, SC-IRGS; IRG silage treated with *S. cerevisiae*.

[1)] SEM, standard error of means.

[a, b, c, d] Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

Table 3. Effects of different microbial cultures addition on VFA concentration of *in vitro* incubation fluid of IRG silage

Incubation time	CON-IRGS	LC-IRGS	BS-IRGS	SC-IRGS	SEM[1)]	*p*-value
			Total VFA (mM)			
0 hr	16.329	17.620	16.348	17.759	0.998	0.156
12 hr	33.710	33.183	32.821	31.519	1.842	0.612
24 hr	49.115	51.671	50.644	51.170	2.992	0.821
48 hr	52.501	54.245	52.462	54.515	2.347	0.675
72 hr	58.092	58.257	57.751	57.212	3.580	0.991
			Acetate (mM)			
0 hr	11.108	11.753	11.046	11.832	0.555	0.203
12 hr	22.250	21.755	21.585	20.847	1.223	0.666
24 hr	28.913	30.397	29.739	30.030	1.890	0.864
48 hr	30.465	31.590	30.429	30.665	1.217	0.710
72 hr	37.386	37.350	37.246	36.778	2.492	0.994
			Propionate (mM)			
0 hr	2.929	3.326	3.020	3.398	0.281	0.121
12 hr	6.870	6.701	6.625	6.326	0.365	0.406
24 hr	13.753	14.452	14.142	14.279	0.890	0.864
48 hr	14.484	15.014	14.467	14.578	0.573	0.710
72 hr	11.815	11.960	11.605	11.608	0.851	0.966
			Butyrate (mM)			
0 hr	1.969	2.119	1.959	2.104	0.115	0.207
12 hr	3.226	3.205	3.205	3.117	0.143	0.794
24 hr	3.876	4.075	4.075	4.146	0.173	0.255
48 hr	4.317	4.322	4.322	6.443	1.226	0.082
72 hr	5.161	5.162	5.162	5.162	0.207	0.999
			Ratio of acetate to propionate			
0 hr	3.811	3.533	3.671	3.483	0.185	0.141
12 hr	3.237	3.246	3.257	3.295	0.037	0.294
24 hr	2.102	2.103	2.103	2.103	0.001	0.887
48 hr	2.103	2.104	2.103	2.103	0.001	0.740
72 hr	3.163	3.122	3.215	3.171	0.053	0.247

Abbreviated CON-IRGS; control IRG silage, LC-IRGS; IRG silage treated with *L. casei*, BS-IRGS; IRG silage treated with *B. subtilis*, SC-IRGS; IRG silage treated with *S. cerevisiae*.
[1)] SEM, standard error of means.

보인다. FadelElseed and Abusamra (2007)는 효모(*S. cerevisiae*) 첨가로 산양의 반추위액 내 NH_3-N 농도가 증가한다고 보고하였으며, 이러한 결과는 본 연구의 SC-IRGS에서도 확인할 수 있었다. 한편, 본 연구에서 BS-IRGS의 결과와는 달리 Wang et al. (2016)는 *B. subtilis* 첨가 시 볏짚 및 옥수숫대의 젖소 반추위액 내 NH_3-N 농도가 감소한다고 보고하였다. 이러한 NH_3-N 농도에 있어서의 차이는 사용된 발효 기질이 다르기 때문으로 판단된다.

건물 분해율은 배양 48시간까지 대조구보다 미생물제 처리구에서 증가된 경향을 보이며, 특히 배양 24시간에서 SC-IRGS에서 가장 높았으나 ($p<0.05$), 배양 72시간에서는 오히려 대조구를 포함한 다른 처리구보다 가장 낮은 경향을 나타내었다.

In vitro 반추위 내 총 휘발성 지방산 (volatile fatty acid, VFA) 농도는 LC-IRGS와 SC-IRGS에서 대조구 및 BS-IRGS 보다 증가하였으나, 통계적으로 유의적 차이는 나타나지 않았다. Acetate와 propionate 농도는 LC-IRGS에서 높고, butyrate 농도는 SC-IRGS에서 높게 나타났으나, 이들 농도에 대해 처리구 간의 유의적 차이는 없었으며, acetate : propionate의 비율 (A/P)에 있어서도 처리구 간에

차이가 나타나지 않았다.

반추위 발효 특성에 대한 *S. cerevisiae*의 영향을 평가하기 위한 많은 연구가 시도되었는데, 특히 Dawson et al. (1990)은 *in vivo* 및 *in vitro* 반추위 내 VFA 생성에는 영향이 없다고 한 반면, Mutsvangwa et al. (1992)은 acetate, 총 VFA 농도가 증가하지만 A/P 비율은 변화가 없으며, Wang et al. (2016)은 propionate 농도가 증가하지만, A/P 비율은 감소한다고 보고하였다.

2. 미생물제 첨가가 *in situ* 소화율에 미치는 영향

IRG 사일리지에 미생물을 처리하여 30℃에서 5일간 배양하면서 IRG 사일리지의 품질 및 *in situ* 소화율에 미치는 영향을 조사하였다(Table 4). IRG 사일리지는 대조구보다

Table 4. Changes of pH, NH_3-N, and organic acids on IRG silage according to incubation after different microbial cultures addition

Incubation time	CON-IRGS	LC-IRGS	BS-IRGS	SC-IRGS	SEM[1)]	*p*-value
			pH			
0 day	5.184	5.173	5.184	5.181	0.006	0.158
1 day	5.208^{a}	5.173^{b}	5.143^{c}	5.153^{c}	0.026	<0.001
3 day	5.193^{a}	5.072^{d}	5.135^{c}	5.157^{b}	0.045	<0.001
5 day	5.210^{a}	5.087^{c}	5.106^{b}	5.117^{b}	0.048	<0.001
			NH_3-N (mg/dL)			
0 day	6.810	3.521	2.655	4.386	2.006	0.053
1 day	7.503^{a}	3.694^{c}	5.598^{ab}	4.386^{b}	1.830	0.041
3 day	5.772^{ab}	7.330^{a}	4.906^{b}	5.598^{ab}	1.131	0.046
5 day	6.118^{bc}	8.888^{a}	5.598^{c}	6.984^{b}	1.477	0.014
			Lactate (mM)			
0 day	8.511^{b}	20.319^{a}	5.537^{c}	5.309^{c}	6.167	<0.001
1 day	22.633^{a}	21.785^{a}	5.561^{b}	5.185^{b}	8.438	<0.001
3 day	27.119^{a}	5.814^{b}	5.203^{b}	5.397^{b}	9.388	<0.001
5 day	29.508^{a}	5.564^{b}	5.753^{b}	4.581^{b}	10.498	<0.001
			Acetate (mM)			
0 day	1.847	0.783	1.336	1.550	0.456	0.126
1 day	0.718^{c}	1.062^{b}	1.401^{ab}	1.546^{a}	0.345	0.033
3 day	0.408^{c}	1.602^{a}	1.450^{ab}	1.292^{b}	0.486	0.015
5 day	1.094	1.585	1.560	1.248	0.268	0.253
			Butyrate (mM)			
0 day	49.713^{a}	35.554^{c}	35.440^{c}	40.961^{b}	5.856	<0.001
1 day	38.878	38.717	38.997	40.257	1.361	0.801
3 day	47.019^{a}	39.705^{d}	40.281^{c}	41.880^{b}	2.955	0.004
5 day	50.847^{a}	41.740^{c}	42.859^{b}	42.513^{bc}	3.791	0.005
			Ratio of lactate to acetate			
0 day	4.116^{b}	17.070^{a}	3.707^{b}	3.046^{b}	6.051	0.009
1 day	21.592^{a}	13.277^{b}	3.513^{c}	2.989^{c}	8.228	0.030
3 day	46.187	3.180	3.178	3.856	19.624	0.021
5 day	17.504	3.317	3.120	3.428	6.293	0.003

Abbreviated CON-IRGS; control IRG silage, LC-IRGS; IRG silage treated with *L. casei*, BS-IRGS; IRG silage treated with *B. subtilis*, SC-IRGS; IRG silage treated with *S. cerevisiae*.

[1)] SEM, standard error of means.

[a, b, c, d] Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

미생물제 처리구에서 5일간 배양으로 pH가 감소하였으며, 배양 1일째에는 BS-IRGS에서, 3일과 5일째에는 LC-IRGS에서 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). LC-IRGS의 경우 배양 1일째에는 pH의 변화가 없었으나, 3일째에 급격히 감소하였으며, 5일째에는 다소 증가하는 경향을 보였다. IRG 사일리지의 pH는 배양시간 및 처리한 미생물의 종류에 상관없이 5.07~5.21의 범위 내에 있었다.

IRG 사일리지의 암모니아태 질소(NH_3-N) 함량은 대조구보다 미생물제 처리에 의해 배양 초기 NH_3-N 농도가 감소하였으나, BS-IRGS의 경우 배양 1일째 증가한 후 5일까지 비슷한 수준을 유지하였으며, LC-와 SC-IRGS의 경우 배양 1일 이후 지속적으로 증가하였다.

IRG 사일리지 내 젖산(lactate) 농도는 대조구에서 배양 1일째부터 5일까지 미생물제 처리구보다 유의적으로 높게 나타났으며($p<0.05$), LC-IRGS의 경우 배양 후 1일째까지 젖산 농도가 높았으나 3일째 급격히 감소하였다. 한편, BS-와 SC-IRGS의 경우 접종 및 배양시간의 경과에 따른 영향은 나타나지 않았다. 초산(acetate) 농도는 대조구에서 배양 1일째부터 3일째까지 감소한 후 5일째 다시 증가하였고, 미생물제 처리구의 경우 접종 직후 초산의 농도가 대조구보다 낮았다. IRG 사일리지의 초산 농도는 배양 1일째에는 SC-IRGS에서, 배양 3일째에는 LC-IRGS에서 가장 높았다($p<0.05$). BS-IRGS의 경우 배양시간이 경과함에 따라 증가하였으며, LC-IRGS의 경우 접종 직후 초산 농도가 가장 낮았으나, 이후 증가하였다. 낙산(butyrate) 농도는 배양 0일, 3일 및 5일째에서 대조구보다 미생물제 처리구에서 유의적으로 낮았다($p<0.05$).

사일리지의 발효과정 중 젖산, 초산 및 낙산과 같은 대사산물이 생성되는데, 일반적으로 우수한 사일리지의 경우 젖산과 초산의 비율(L/A)은 3 이상이다(Kleinschmit and Kung Jr, 2006). 본 연구결과에서 젖산은 9.46~36.38%, 초산은 0.85~3.88%, 낙산은 49.81~81.84%, 그리고 L/A은 2.99 이상으로, 총 유기산 중 낙산의 비율이 높았으나, L/A는 대부분 3 이상이었다.

사일리지 제조 시 젖산균의 첨가는 낙산과 초산의 생성을 제한하여 사일리지의 발효 품질을 개선하고, 저장성 및 개봉 후 호기적 안정성을 향상하는 것으로 많은 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Amanllah et al., 2014; Cho et al., 2014). 본 결과에서도 LC-IRGS에서 특히 배양초기에 사일리지의 pH 저하 및 배양 초기 초산과 낙산의 농도가 낮은 것을 확인할 수 있었다.

Buchanan-Smith (1990)에 의하면 사일리지 내 낙산의 농도가 과도하게 높아지면 사일리지의 기호성과 사료섭취량이 감소한다고 하였는데, *L. casei*와 *B. subtilis*를 추가적으로 이용한다면 IRG silage의 품질 저해 요소인 낙산에 의한 부정적 영향을 감소시킬 수 있을 것으로 보인다.

IRG 사일리지에 미생물제를 처리하여 각 시간대별 배양(0, 1, 3 및 5일) 후 *in situ* 반추위 내에서 48시간 배양으로 건물 분해율을 분석한 결과, *in vitro* 반추위 건물 분해율과 유사하게 대조구보다 미생물제 처리구에서 향상되는 결과를 나타내었다. 배양 0일에서 SC-IRGS에서 다른 처리구보다 건물분해율이 가장 높게 나타났다($p<0.05$). 본 연구결과와 유사하게 *S. cerevisiae*에 의해 반추위 내 볏짚이나 수수 등 조사료 또는 토마토부산물의 소화율이 향상되었다고 보고된 바 있다(Padel, 2007; Paryad and Rashid, 2009; Sung, 2013). *S. cerevisiae*는 반추위 내 용존 산소를 제거하여 반추위 미생물, 특히 섬유소 분해 박테리아의 증식을 활성화시키고(Mathieu et al., 1996; Dawson et al., 1990; Weidmeier et al., 1987), 반추위에 유입된 조사료에 이들 섬유소 분해 박테리아가 우선적으로 부착하여 섬유소가 분해되지만(McAllister et al., 1994), 접종 이후 배양시간이 경과함에 따라 반추위 내에서 이와 같은 작용이 감소되어 배양 1일부터 5일까지 건물 분해율이 감소하는 것으로 판단된다. 또한, LC-IRGS와 BS-IRGS의 경우 배양기간 동안

Table 5. Effects of different microbial cultures addition on DM degradation (%) of *in situ* incubation fluids for IRG silage

Incubation time	CON-IRGS	LC-IRGS	BS-IRGS	SC-IRGS	SEM[1)]	*p*-value
0 day	56.720[b]	65.721[ab]	65.595[ab]	68.060[a]	4.816	0.003
1 day	59.240	68.393	66.134	64.462	5.288	0.220
3 day	61.151	67.523	63.594	64.518	3.704	0.258
5 day	59.827	63.927	57.422	60.880	4.295	0.397

Abbreviated CON-IRGS; control IRG silage, LC-IRGS; IRG silage treated with *L. casei*, BS-IRGS; IRG silage treated with *B. subtilis*, SC-IRGS; IRG silage treated with *S. cerevisiae*.

[1)] SEM, standard error of means.

[a, b] Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

유사한 패턴의 건물 분해율을 보이는데, 접종 직후 배양 1일째까지 건물 분해율이 증가한 후 배양 3일째에는 감소하는 경향을 나타내었다.

본 연구결과로부터 젖소에서 IRG 사일리지의 이용성을 제고하기 위해 *L. casei, B. subtilis* 및 *S. cerevisiae*의 미생물제를 활용하는 경우 IRG 사일리지의 반추위 내 소화율이 개선될 수 있으며, 특히 *L. casei*로 짧은 시간 동안 추가적으로 발효한다면 사일리지 내 유기산 중 낙산과 초산의 감소 등 IRG 사일리지의 품질 개선으로 젖소의 사료섭취량에 대한 부정적 영향 없이 소화율을 개선하는데 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅳ. 요 약

본 연구는 국내산 조사료인 IRG 사일리지의 이용성을 증진하기 위해 다양한 미생물제의 첨가 시 IRG 사일리지의 *in vitro* 반추위 발효특성 및 소화율에 미치는 영향을 조사하였으며, 미생물제의 접종 후 배양시간이 경과함에 따라 IRG 사일리지의 품질 및 *in situ* 반추위 소화율에 미치는 영향을 분석하였다. 미생물제로는 LC, BS 및 SC (2.7 $\times 10^7$ CFU/㎖)를 사용하였으며, IRG 사일리지에 0.5×10^4 CFU/g가 되도록 첨가하여 수행하였다. *In vitro* 실험 결과, 암모니아태 질소 함량은 12시간 배양 시 대조구보다 미생물제 처리구에서 높았고 ($p<0.05$), 총 VFA 농도와 건물 분해율의 경우에도 유의적 차이는 없었지만, 대조구보다 미생물제 처리구에서 증가하였으며, 특히 *L. casei*에서 높게 나타났다. 미생물제를 접종한 후 5일간 배양한 결과, IRG 사일리지의 pH는 대조구보다 미생물제 처리구에서 낮았으며 ($p<0.05$), 젖산 농도는 배양 1~5일 동안 대조구보다 미생물제 처리구에서 높았으며 ($p<0.05$), 다른 처리구보다 LC-IRGS에서 접종 직후 가장 높았다 ($p<0.05$). *In situ* 건물 분해율은 대조구보다 모든 처리구에서 증가하는 경향을 나타내었으며, 접종 직후에는 SC-IRGS에서 높았으나 이후 LC-IRGS에서 증가하였다. 본 연구결과를 보면, IRG 사일리지의 이용성을 제고하기 위해 LC, BS 및 SC을 활용한다면 IRG 사일리지의 반추위 내 소화율이 개선될 수 있으며, 특히 IRG 사일리지에 *L. casei*를 첨가하여 단시간 추가 발효하여 젖소에 급여한다면 IRG 사일리지 내 초산 및 낙산의 감소로 품질 및 소화율 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 사 사

본 성과물은 농촌진흥청연구사업 (세부과제명: 젖소 건유기 관리 최적화 연구, 세부과제번호: PJ01009601)의 지원에 의해 이루어진 것임.

Ⅵ. REFERENCES

Amanllah, S.M., Kim, D.H., Lee, H.J., Joo, Y.H., Kim, S.B. and Kim, S.C. 2014. Effects of microbial additives on chemical composition and fermentation characteristics of barley silage. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 27:511-517.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis, 16th edn. AOAC, Arlington, VA.

Beuvink, J.M., Spoelstra, S.F. and Hogendorp, R.J. 1992. An automated method of measuring the time course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Netherlands Journal of Agriculture Science. 40:401-407.

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.

Chaney, A.L. and Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clinical Chemistry. 8:130-132.

Cho, S.B., Kang, J.S., Cho, K.J., Lee, K.H., Kwon, C.H., Song, J. Y., Lee, K.H., Kim, S.Y. and Kim, E.J. 2014. Effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on the quality and aerobic stability of silage: Meta-analysis. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 34: 247-253.

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. Journal of Animal Science. 68:3392-3398.

Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C. and Sauvant, D. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. Journal of Dairy Science. 92:1620-1632.

Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F-tests. Biometrics. 11:1-42.

Erwin, E.S., Marco, S.J. and Emery, E.M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. Journal of Dairy Science. 44:1768-1771.

FadelElseed, A.M. and Abusamra, R.M. 2007. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on NDF digestibility and rumen fermentation of forage sorghum hay in Nubian goat's kids. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 3:133-137.

Hristov, A.N., Ropp, J.K. and Hunt, C.W. 2002. Effect of barley and

its amylopectin content on ruminal fermentation and bacterial utilization of ammonia-N *in vitro*. Animal Feed Science and Technology. 99:25-36.

Kalogridou-Vassiliadou, D. 1992. Biochemical activities of Bacillus species isolated from flat sour evaporated milk. Journal of Dairy Science. 75:2681-2686.

Kleinschmit, D.H. and Kung Jr, L. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. Journal of Dairy Science. 89:4005-4013.

Krause, K.M. and Oetzel, G.R. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. Animal Feed Science and Technology. 126:215-236.

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. Journal of Dairy Science. 85:2009-2014.

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. Reproduction Nutrition Development. 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. Journal of Animal Science. 72:3004-3018.

Moon, Y.H., Lee, K.A., Kim, Y.J. and Koo, Y.M. 2011. Current Status of EM (Effective Microoragnisms) utilization. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal. 26:365-373.

Muck, R. and Kung, L.J. 1997. Effects of silage additives on ensiling. In: Field to Feedbunk North American Conference Hershey. PA. NRAES 99.

Mutsvangwa, T., Edwards, I.E., Topps, J.H. and Paterson, G.F. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food-intake and growth of intensively fed bulls. Animal Production. 55:35-40.

Nocek, J.E. and Kautz, W.P. 2006. Direct-fed microbial supplement-ation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. Journal of Dairy Science. 89:260-266.

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. Journal of Agriculture and Biological Science. 3:133-137.

Paryad, A. and Rashid, M. 2009. Effect of yest (*Saccharomyces cerevisiae*) on apparent digestibility and nitrogen retention of tomato pomace in sheep. Pakistan Journal of Nutrition. 8:273-278.

Qiao, G.H., Shan, A.S., Ma, N., Ma, Q.Q. and Sun, Z.W. 2010. Effect of supplemental Bacillus cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 94:429-436.

Rose, A.H. 1980. Rent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Skinner, F.A., Passmores, 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.

Satter, L.D. and Slyter, L.L. 1974. Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production *in vitro*. British Journal of Nutrition. 32:199-208.

Seale, D.R. 1986. Bacterial inoculants as silage additives. Journal of Applied Bacteriology. 61:9-26.

Stewart, C.S., Flint, H.J. and Bryant, M.P. 1997. The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem Ⅱ (Eds. P. N. Hobson and C.S. Stewart). Chapman and Hall, London, UK. pp. 10-72.

Sung, H.G. 2013. Effects of yeast culture supplementation on rice straw digestibility ad cellulolytic bacterial community in the rumen. Journal of Animal Science and Technology. 55:41-49.

Troelsen, J.E. and Donna, H.J. 1966. Ruminant digestion *in vitro* as affected by inoculum donor collection day, and fermentation time. Canadian Journal of Animal Science. 46:149-156.

Van Soeat, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle: Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74:3583-3597.

Wang, Z., Zhixiong, H.E., Beauchemin, K.A., Tang, S., Zhou, C., Han, X., Wang, M., Kang, J., Odongo, N.E. and Tan, Z. 2016. Comparison of two live Bacillus species as feed additives for improving *in vitro* fermentation of cereal straws. Animal Science Journal. 87:27-36.

Weidmeier, R.D., Arambel, M.J. and Wakters, J.L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. Journal of Dairy Science. 70:2063-2079.

Williams, A., Amat-Marco, M. and Collins, M.D. 1996. Pylogenetic analysis of *Butyrivibrio* strains reveals three distinct groups of species within the *Clostridium subphylum* of the Gram-positive bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 46:195-199.

(Received June 23, 2016 / Revised August 2, 2016 / Accepted August 17, 2016)