

Research Article

## 젖산균과 효소제 처리에 의한 동계사료작물 발효성상, *In vitro* 반추위 발효 및 소화율에 미치는 영향 연구

이아름<sup>1\*\*</sup> · 신수진<sup>2\*\*</sup> · 양진호<sup>2</sup> · 조상범<sup>3</sup> · 최낙진<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>NSF 코리아, <sup>2</sup>전북대학교 동물자원과학과, <sup>3</sup>㈜칼스

## Effect of Lactic acid bacteria and Enzyme Supplementation on Fermentative Patterns of Ensiling Silages, Their *In vitro* Ruminal Fermentation, and Digestibility

A-Leum Lee<sup>1\*\*</sup>, Su-Jin Shin<sup>2\*\*</sup>, Jinho Yang<sup>2</sup>, Sangbueom Cho<sup>3</sup> and Nag-Jin Choi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Product Assessment Center, NSF Korea LLC, CJ Food Safety Hall B/D, Seoul, 02841, Korea,

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea,

<sup>3</sup>CALS Co., Ltd., Seongnam, 463-741, Korea

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of bacterial inoculation (*Lactobacillus plantarum* or combo inoculant mixed with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*) and addition of fibrolytic enzyme on chemical compositions and fermentation characteristics of whole crop barley (WCB) and triticale (TRT) silage, their ruminal *in vitro* fermentation, and digestibility. In TRT silage, enzyme addition significantly ( $p < 0.01$ ) decreased NDF content compared to no enzyme addition treatment. Organic acids such as lactate and acetate contents in WCB and TRT silages were significantly ( $p < 0.01$ ) higher compared to those in the control. Particularly, lactate content was the highest in *L. plantarum* treatment. Fibrolytic enzyme treatment on both silages had relatively higher lactic acid bacteria content, while mold content was lower in both treatments compared to that in the control. *In vitro* dry matter digestibility was generally improved in WCB silages. It was higher ( $p < 0.01$ ) in TRT with mixed treatment of *L. plantarum*, *L. buchneri*, and enzyme compared to others. *In vitro* ruminal acetate production was relatively higher in treatments with both enzyme and inoculant additions compared to that in the control. Therefore, the quality of silage and rumen fermentation could be improved by inoculants (*L. plantarum* and *L. buchneri*) regardless whether whole crop barley (WCB) or triticale (TRT) silage was used. Although it was found that fibrolytic enzyme addition to both silages had various quality and rumen fermentation values, further study is needed.

(Key words : Whole crop barley, Triticale, Silage, Inoculants, Fibrolytic enzyme)

### I. 서 론

청보리와 트리티케일과 같은 양질의 조사료 공급은 반추가축의 생산성 향상 및 반추위 기능 유지에 중요한 역할을 담당한다 (Shinekhoo et al., 2009). 이러한 조사료 자원의 사료 이용 효율 증진을 위한 방안으로 사일리지 제조를 들 수 있고, 많은 농가에서 이용되고 있으며, 사일리지 품질 향상을 위한 다양한 방법들이 연구되고 있다. 특히 이들 중에서 젖산균과 같은 미생물의 적용에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Ahn et al., 2003; Ok et al., 2006; Kim

et al., 2009). 사일리지 발효에 사용되는 젖산균 (LAB, lactic acid bacteria)은 발효 산물로 생성되는 유기산들의 종류에 따라 homofermentative LAB와 heterofermentative LAB로 구분된다. Homofermentative LAB는 주로 젖산을 그 발효 대사산물로 생성하고 빠른 pH 하강을 유도하여 사일리지 숙성과정의 발효 안정에 도움을 준다. 반면에 Heterofermentative LAB는 젖산 뿐만 아니라 초산 및 프로피온산과 같은 다양한 유기산을 생성하고, 사일리지 개봉 후 보존성을 향상에 효과가 우수한 것으로 보고된 바 있다 (Cho et al., 2014). 이러한 젖산균의 적용 외에 다른 발효

\* Corresponding author : Prof. Nag-Jin Choi, Department of Animal Science, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea, Tel: +82-63-270-2579, Fax: +82-63-270-2612, E-mail: nagjin@jbnu.ac.kr

\*\* A-Leum Lee and Su-Jin Shin were equally contributed as first authors.

축진 제제로서 효소제를 들 수 있다. 다양한 효소제들 중에서 특히 섬유소분해 효소의 경우 사료작물 내에서 강하게 결합되어 있는 구조탄수화물의 결합을 약화시키고 젖산균과 같은 미생물이 이를 쉽게 이용할 수 있으며 일부는 리그닌과 구조탄수화물 사이의 결합을 끊어 소화율과 영양적 가치를 증진시키는 것으로 알려져 있다 (Krueger and Adesogan, 2008; Addah et al., 2012). 사일리지 제작에서 효소제의 적용은 사일리지 품질 향상뿐만 아니라, 반추동물의 이용성에도 그 영향을 미친다. 즉 반추동물 사료에서 cellulase와 xylanase로 구성된 섬유소 분해 효소의 적용은 가축의 소화율을 증진시키고 가스화에너지의 섭취량을 높이며 (Beauchemin et al., 2003), 건초에 이를 이용하였을 때 섬유소 소화율이 증진된다는 연구결과가 보고되었다 (Beauchemin et al., 1995; Eun and Beauchemin, 2007). Beauchemin 등 (1995)은 조사료 위주로 사료에 섬유소 분해효소를 첨가하여 거세우에게 급여할 때 성장을 효율적으로 증진시킬 수 있다고 하였다. 또한 반추동물의 사료 내 섬유소 소화율은 약 60% 미만으로, 사료에서 섬유소 소화율을 증진시키는 것이 가축의 생산성을 증가시키고 농가의 소득 증대에 기여할 수 있다는 결과를 보여주었다 (Beauchemin et al., 2003). 사일리지 발효과정에서 효소제 및 젖산균의 적용은 사일리지 품질향상에 큰 도움이 되며, 반추위 소화율에도 그 영향을 미칠 수 있다. 그러나 이러한 모든 작용들이 생물학적 특성에 기초하기 때문에 발효 조건과 같은 다양한 요인들에 의해 그 품질향상 효율성에 대한 차이를 나타낼 수 있다 (Feng et al., 1996; Colombatto et al., 2003; Dean et al., 2008). 따라서 본 연구는 청보리와 트리티케일을 이용한 사일리지 제작에 있어 섬유소 분해효소와 젖산균의 효과 및 젖산균 균주별 효과를 비교 조사하기 위하여 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사료작물, 사일리지 제조 및 실험설계

본 실험의 공시시료로 사용된 청보리 (영양)와 트리티케일 (신영)은 2014년 봄철 (2014년 6월 6일)에 수확되었으며, 농촌진흥청 국립식량과학원에서 제공받아 실시하였다. 시료의 건물, 유기물, 조단백질, 조지방, NDF 및 ADF의 함량은 청보리 (g/kg DM)가 329.2, 933.1, 112.7, 34.2, 503.4 및 264.7, 트리티케일 (g/kg DM)이 336.0, 947.2, 87.3, 31.3, 506.6 및 284.1으로 조사되었다. 사일리지 제조에 사용된 젖산균들로 *Lactobacillus plantarum* (CMbio, Korea), *Lactobacillus*

*plantarum* KCCM 11322과 *Lactobacillus buchneri* KCCM 40982 균주를 사용하였다. 또한 효소제로서는 cellulase와 xylanase로 구성된 섬유소 분해효소 복합제 (CMZYME, CMbio, Korea)을 사용하였다. 사료작물의 1 kg을 진공압축 팩에 넣어 처리구별 3 반복으로 사일리지를 제조하였고, 40 일 동안 실온 (24~28°C)에서 발효를 진행하였다.

본 실험은 facultative homofermentative 균주인 *L. plantarum* 과 strictly heterofermentative 균주인 *L. buchneri* 혼합 사용 그리고 섬유소 분해 효소와의 혼합사용 등의 효과를 알아보기 위한 목적으로 초종별 총 5개의 시험구를 구성하였다. 아무런 첨가제를 혼합하지 않은 대조구 (CON), 젖산균 *L. plantarum* 단독 처리구 (TL), *L. plantarum*과 *L. buchneri*를 혼합한 복합처리구 (TLB), *L. plantarum*과 효소제를 혼합한 처리구 (TLE) 그리고 복합젖산균과 효소제를 혼합한 처리구 (TLBE)로 실험을 설계하였다. 젖산균의 처리 수준은 혼합 후 최종 균체 농도가  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/g (fresh weight) 이 되도록 하였다.

### 2. 사일리지 품질평가

사일리지의 화학적 성분을 조사하기 위해 발효 40일 후 각 처리구 당 약 500 g을 취하여 60°C 열풍건조기에서 48 시간 동안 건조 후 건물함량을 조사하였고, 2 mm sieve가 장착 된 실험실용 분쇄기 (Cutter mill, IKA MF10.1, Staufen, Germany)로 분쇄하여 사용하였다. 조단백질, 조지방 및 조회분 함량은 AOAC (1995) 방법에 따라 분석하였으며, NDF와 ADF는 Van Soest 등 (1991)법으로 분석하였다.

발효가 완료된 사일리지 10 g과 증류수 90 mL를 혼합하여 stomacher (Wisemix®, Daihan, Korea)에서 2분간 균질하였고, 원심분리 (2,300 × g, 4°C, 20 min)를 통하여 상층액을 취한 후 pH 및 암모니아태 질소 함량 조사에 이용하였다. 사일리지 pH는 pH meter (Seven easy, Mettler Toledo®)를 이용하여 분석하였고, 암모니아태 질소 함량은 Chaney와 Marbach (1962)에 따라 상등액 20 uL에 phenol color reagent 1 mL와 alkali hypochlorite reagent 1 mL을 혼합하여 37°C에서 15분간 반응 후 분광광도계 (Optizen UV2120, Mecasis, Korea)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 발효가 완료된 사일리지 10 g을 90 mL 펌톤수 (Difco, USA)와 혼합하여, stomacher (Wisemix®, Daihan, Korea)를 이용해 2분간 균질한 후에 유기산 분석에 사용하였다. 사일리지의 유기산 함량은 C18 column과 UV/VIS detector가 장착된 HPLC (High Performance Liquid Chromatography,

Prostar, Varian, USA)를 이용하여 분석하였다.

생균수 측정은 Miller와 Wolin (1974) 방법에 따라 조사하였다. LAB는 MRS (Difco, USA)를 이용하여 37±1°C 조건의 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였고, Yeast와 mold는 malt chloramphenicol 배지를 이용하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 평판배지에 형성된 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다.

### 3. *In vitro* 반추위 발효 패턴 및 소화율

전라북도 진안 소재의 전라북도 축산위생연구소 한우시험장에서 반추위 케놀라가 장착된 거세 한우 (체중 450±30 kg) 2두를 공시하였으며, 반추위 발효 시험을 위한 위액을 채취하였다. 반추위액은 시험당일 오전 사료급여 전에 채취하였으며, 4겹의 cheese cloth로 여과 후 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>가 충전된 2 L bottle에 산소의 침입을 차단하여 혐기적 조건을 유지하였다. 배양개시 30분 전 반추위액을 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 bubbling하여 pH를 6.5로 보정하고 McDougall's buffer solution과 반추위액을 4:1로 혼합하여 rumen inoculum으로 사용하였다. 실험은 Tilley와 Terry (1963)의 방법에 따라 3반복하여 실시하였다. 반추위 발효조건으로는 시험사료 0.5 g과 rumen inoculum 50 mL를 혼합하여 125 mL 용량의 유리병에 담고, aluminum cap seal를 이용하여 밀봉한 후에 39°C 조건으로서 24시간동안 발효를 진행하였다. 반추위 발효 가스 생성량은 실험용 유리주사기를 이용하여 배양병 내 가스 생성량을 측정하였고, 반추위 발효 pH는 pH meter (Seven easy, Mettler Toledo®)를 이용하여 측정하였다. 암모니아태 질소 함량은 사일리지 품질 평가에서 제시한 방법과 동일하게 진행하였다. 휘발성지방산은 Erwin 등 (1961)의 방법에 따라 분석하였다. 사료입자가 제거된 상등액 1 mL에 200 uL의 25% meta- phosphoric acid를 첨가 후, 30 분 동안 정치하여 13,000 rpm에서 원심 분리 하는 전처리 과정을 거친 시료를 Nukol™, fused silica capillary column (0.25 mm i.d. × 0.25 um film × 30 m length, SUPELCO, USA)이 장착된 Gas Chromatography (HP7890, Agilent, CA, USA)로 분석하였다. 이때 oven, injector 및 detector 온도는 각 180°C, 220°C 및 200°C로 설정하였다. *In vitro* 건물소화율은 Moore (1970)의 방법에 따라 수행하였으며, 배양이 완료된 샘플을 filter paper (Whatman, No. 541)에 여과 후 60°C에서 48시간 건조하여 건물소화율을 계산하였다. 반추위 발효실험에 사용된 사일리지 건물과 발효 후 잔류하는 사일리지 건물의 차이를 이

용하여 반추위 건물소화율을 측정하였다.

### 4. 통계분석

본 실험에서 얻어낸 결과는 처리구 (n=10) 및 반복수 (n=3)를 이용하여 분산분석하였다. 그리고 대조구 데이터를 제외한 섬유소 분해효소 (n=2), 접종원 (n=2), 상호작용 및 반복수 (n=6)를 순차적 배열하여 분산분석을 실시하였다. 시험구들 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple comparison 방법을 통하여 5% 유의수준으로 검정하였다. 모든 통계분석은 SAS statistical program (SAS, 2002)의 PROC MIXED를 이용하여 수행하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 사일리지 화학적 성분 분석

사일리지의 화학적 성분 분석 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 청보리와 트리티케일 사일리지의 건물함량은 전반적으로 청보리 사일리지가 높게 조사 되었으며, 특히 청보리 사일리지 대조구, TLE 및 TLB가 유의적으로 높게 조사되었다 (p<0.01). 반면에 트리티케일 사일리지가 대조구에서 가장 낮은 건물함량을 나타내었다. TL 및 TLBE의 청보리 사일리지가 트리티케일 사일리지의 건물함량과 유사하게 조사된 것으로 미루어 볼 때, 균주 및 효소의 첨가가 트리티케일 사일리지의 품질에 긍정적인 영향을 준 것으로 판단된다. 유기물 함량은 청보리 사일리지에서 916.5~933.1 g/kg DM, 트리티케일은 924.3~941.9 g/kg DM으로 조사되었다. 조단백질 함량은 청보리 사일리지가 트리티케일 사일리지에 비해 유의적으로 높게 조사되었으며 (p<0.01), 청보리 사일리지의 경우 TLB 처리구가 가장 높게 나타났다. 사료 내 NDF와 ADF 함량은 소화율 및 섭취량과 상관관계를 가져 사료의 영양학적 품질을 평가하는데 중요하게 작용한다 (Marten et al., 1975). NDF 및 ADF의 함량은 청보리 사일리지에 비해 트리티케일 사일리지에서 유의적으로 높게 조사되었는데 (p<0.01), 특히 트리티케일 사일리지에서는 효소제가 첨가된 모든 처리구들에서 대조구에 비해 NDF 함량이 유의적으로 낮게 조사되었다 (p<0.01). 반면 청보리 사일리지에서 효소제 첨가에 따른 NDF 함량의 차이는 나타나지 않았다. 이 결과는 섬유소 분해효소가 트리티케일의 섬유소 분해에 영향을 미친 것으로 판단된다.

Table 1. Chemical composition of silages with addition of inoculants and fibrolytic enzyme (g/kg DM)

Forage <sup>1)</sup>	Isources	Treatment <sup>2)</sup>	DM	OM	CP	EE	NDF	ADF
WCB		CON	439.7 <sup>a</sup>	929.7 <sup>b</sup>	119.5 <sup>c</sup>	37.5 <sup>d</sup>	444.7 <sup>d</sup>	269.8 <sup>f</sup>
		TL	396.6 <sup>b</sup>	916.5 <sup>d</sup>	120.5 <sup>c</sup>	46.9 <sup>d</sup>	484.9 <sup>c</sup>	275.6 <sup>ef</sup>
		TLE	456.1 <sup>a</sup>	933.1 <sup>b</sup>	125.9 <sup>b</sup>	36.9 <sup>d</sup>	463.8 <sup>c</sup>	285.0 <sup>e</sup>
		TLB	457.1 <sup>a</sup>	933.1 <sup>b</sup>	141.3 <sup>a</sup>	42.6 <sup>d</sup>	429.2 <sup>d</sup>	231.3 <sup>g</sup>
		TLBE	385.7 <sup>b</sup>	921.0 <sup>c</sup>	118.5 <sup>c</sup>	43.9 <sup>d</sup>	481.0 <sup>c</sup>	313.5 <sup>d</sup>
TRT		CON	320.4 <sup>c</sup>	924.3 <sup>c</sup>	86.1 <sup>e</sup>	48.6 <sup>cd</sup>	591.8 <sup>a</sup>	368.0 <sup>a</sup>
		TL	364.4 <sup>b</sup>	929.8 <sup>b</sup>	92.3 <sup>d</sup>	65.0 <sup>bc</sup>	583.2 <sup>a</sup>	344.2 <sup>b</sup>
		TLE	377.9 <sup>b</sup>	931.1 <sup>b</sup>	86.8 <sup>e</sup>	93.5 <sup>a</sup>	544.3 <sup>b</sup>	331.4 <sup>bc</sup>
		TLB	365.6 <sup>b</sup>	938.7 <sup>a</sup>	87.0 <sup>e</sup>	65.9 <sup>b</sup>	530.7 <sup>b</sup>	330.9 <sup>bc</sup>
		TLBE	380.9 <sup>b</sup>	941.9 <sup>a</sup>	94.2 <sup>d</sup>	76.7 <sup>b</sup>	507.9 <sup>c</sup>	317.7 <sup>cd</sup>
SEM <sup>3)</sup>		0.985	0.259	0.438	0.426	1.109	0.783	
p value		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

<sup>1)</sup> WCB, whole crop barley; TRT, triticale.

<sup>2)</sup> CON, control; TL, *Lactobacillus plantarum*; TLE, *Lactobacillus plantarum* + enzyme; TLB, *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*; TLBE, *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri* + enzyme

<sup>3)</sup> SEM, standard error of the mean.

DM, dry matter; OM, organic matter; CP, crude protein; EE, ether extract; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber.

<sup>a-g</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

## 2. 사일리지의 pH, 암모니아태 질소, 유기산 및 생균수 측정

사일리지의 pH, 암모니아태 질소, 유기산 및 생균수 측정 결과는 Table 2와 같다. 트리티케일 사일리지의 pH가 청보리 사일리지에 비해 비교적 낮게 나타났다. 그리고 청보리 사일리지 TL 처리구의 pH가 4.79로 대조구 5.79에 비해 유의적으로 낮게 조사되었다 ( $p < 0.01$ ). 또한, 트리티케일 사일리지 TLE 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 pH를 나타냈다 ( $p < 0.01$ ). 본 결과는 *L. plantarum*과 같은 homefermentative LAB의 첨가가 사일리지 발효시 pH를 낮춘다는 다른 연구결과와 일치하였다 (Filya, 2003; Lee et al., 2014). 암모니아태 질소는 청보리 사일리지 TLE 처리구에서 유의적으로 높게 나타내었다 ( $p < 0.01$ ).

청보리 사일리지와 트리티케일 사일리지의 유기산의 함량은 두 초종 모두 대조구에서 유의적으로 낮은 함량을 나타내었으며 ( $p < 0.01$ ), *L. plantarum*을 접종한 청보리 사일리지 TL 처리구에서 젖산의 함량이 유의적으로 높게 나타났다 ( $p < 0.01$ ). 그러나 초산의 함량은 젖산과 달리 복합균주와 효소제를 사용한 TLBE 처리구에서 유의적으로 높았다 ( $p < 0.01$ ). *L. plantarum*은 사일리지 접종균주로 사용될 때 사일리지 내 lactate 생성량을 증가 시킬 수 있으며, 반대로 *L. buchneri*와 같은 heterofermentative LAB를 사용하면 사일리지 내 초산, 프로피온산 및 뷰틸산의 생성비율을 향상

시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 이는 *L. plantarum*과 *L. buchneri*가 혼합된 TLB 처리구가 대체적으로 높은 초산 함량을 나타낸 본 연구의 결과를 뒷받침 하였다.

사일리지 내 젖산균은 균주 및 효소의 첨가에 따라 두 초종에서 다른 결과를 나타내었다. 청보리 사일리지 TLBE 처리구에서 다른 시험구들에 비해 유의적으로 높은 젖산균 밀도를 나타내었다 ( $p < 0.01$ ). 사일리지 내 효모 밀도를 조사한 결과 모든 처리구에서 통계적인 유의차가 나타나지 않았으며 ( $p > 0.05$ ), mold는 대조구에 비해 처리구들에서 비교적 낮게 조사되었다. 또한 청보리 사일리지와 트리티케일 사일리지 모두 *L. plantarum*을 단독으로 이용한 TL 처리구들에 비해 *L. plantarum*과 *L. buchneri*가 혼합된 균주를 접종한 TLB 처리구에서 mold를 유의적으로 낮추었고, 청보리 사일리지와 같은 경우 효소제가 첨가된 처리구에서 유의적으로 낮게 조사되었다 ( $p < 0.01$ ). 이는 heterofermentative LAB의 적용이 homofermentative LAB의 적용에 비하여 항균력이 우수한 초산과 같은 유기산을 보다 많이 생성한 것에 기인하는 것으로 판단된다.

## 3. 반추위 발효 패턴 및 소화율 조사

젖산균과 효소 처리에 따른 청보리 및 트리티케일 사일리지의 *in vitro* 반추위 발효 패턴 조사 결과는 Table 3과

Table 2. Characterization of silages with addition of inoculants and fibrolytic enzyme

Forage <sup>1)</sup>	Treatment <sup>2)</sup>	pH	NH <sub>3</sub> -N, mg/kg	Organic acid <sup>3)</sup> , g/kg DM			VCC, log <sub>10</sub> CFU/g		
				L	A	B	LAB	Yeast	Mold
WCB	CON	5.75 <sup>a</sup>	12.1 <sup>b</sup>	24.0 <sup>fg</sup>	7.16 <sup>i</sup>	ND <sup>4)</sup>	6.07 <sup>c</sup>	4.61	4.74 <sup>ab</sup>
	TL	4.79 <sup>c</sup>	5.8 <sup>f</sup>	40.8 <sup>a</sup>	10.89 <sup>d</sup>	ND	6.93 <sup>b</sup>	4.73	4.62 <sup>bc</sup>
	TLE	5.29 <sup>b</sup>	18.9 <sup>a</sup>	36.5 <sup>bc</sup>	10.29 <sup>e</sup>	ND	6.79 <sup>bc</sup>	4.78	4.58 <sup>cd</sup>
	TLB	5.29 <sup>b</sup>	7.0 <sup>e</sup>	38.2 <sup>b</sup>	11.38 <sup>c</sup>	ND	6.77 <sup>bc</sup>	4.60	4.43 <sup>e</sup>
	TLBE	5.23 <sup>b</sup>	5.3 <sup>g</sup>	35.6 <sup>c</sup>	14.62 <sup>a</sup>	ND	7.46 <sup>a</sup>	4.76	4.23 <sup>f</sup>
TRT	CON	4.71 <sup>c</sup>	9.4 <sup>c</sup>	22.3 <sup>g</sup>	8.14 <sup>h</sup>	ND	6.61 <sup>c</sup>	4.65	4.83 <sup>a</sup>
	TL	4.47 <sup>d</sup>	8.0 <sup>d</sup>	30.0 <sup>d</sup>	9.36 <sup>f</sup>	ND	6.39 <sup>d</sup>	4.73	4.76 <sup>ab</sup>
	TLE	3.98 <sup>e</sup>	9.8 <sup>c</sup>	26.6 <sup>e</sup>	8.97 <sup>g</sup>	ND	6.04 <sup>e</sup>	4.83	4.69 <sup>b</sup>
	TLB	4.36 <sup>d</sup>	7.1 <sup>e</sup>	25.5 <sup>ef</sup>	12.47 <sup>b</sup>	ND	6.78 <sup>bc</sup>	4.56	4.59 <sup>cd</sup>
	TLBE	4.44 <sup>d</sup>	8.5 <sup>d</sup>	31.0 <sup>d</sup>	11.10 <sup>cd</sup>	ND	6.96 <sup>b</sup>	4.74	4.50 <sup>de</sup>
SEM <sup>5)</sup>		0.096	0.109	0.084	0.852	–	0.132	0.028	0.055
p value		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	–	<0.001	0.297	<0.001
Control omitted (p values)									
Inoculants		0.744	0.402	0.001	0.036	–	0.001	0.066	<0.001
Enzymes		0.987	0.268	0.032	0.001	–	0.368	0.031	0.038
Ino. x Enz.		0.708	0.664	0.711	0.029	–	0.010	0.372	0.508

<sup>1)</sup> WCB, whole crop barley; TRT, triticale.

<sup>2)</sup> CON, control; TL, *Lactobacillus plantarum*; TLE, *Lactobacillus plantarum* + enzyme; TLB, *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*; TLBE, *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri* + enzyme.

<sup>3)</sup> L, lactate; A, acetate; B, butyrate.

<sup>4)</sup> ND, not detected.

<sup>5)</sup> SEM, standard error of the mean.

<sup>a-i</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

갈다. 반추위 내 pH는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ( $p > 0.05$ ). 그러나 전체 처리구에서 나타난 pH 측정값은 반추위 발효 적정범위인 5.8~7.2 (Hiltner and Dehority, 1983) 범위 내에 속하였고, 이는 균주와 섬유소 분해효소의 처리가 반추위내 미생물 발효에 부의 영향을 없었다고 판단된다.

반추위 암모니아태 질소 생성량은 청보리 사일리지에 *L. plantarum*과 *L. buchneri*를 접종한 TLB 처리구가 유의적으로 높은 생성량을 보였으며 ( $p < 0.01$ ), 트리티케일 사일리지의 대조구가 유의적으로 낮았다 ( $p < 0.01$ ). 사일리지 화학적 성분 분석 결과를 통해 청보리 사일리지와 트리티케일 사일리지에 비해 높은 조단백질을 함유하여 반추위 미생물에 의한 단백질 분해가 더욱 활발하게 이루어 질 수 있었을 것으로 판단된다. 또한 Stiles 등(1970)의 보고에 의하면, 반추위 내 암모니아태 질소는 최소 5~8 mg/dL에서 최대 29 mg/dL이 생성되어야 한다고 하였는데, 본 연구에서 조사된 모든 처리구들은 암모니아태 질소의 농도가 적정수준에 있

는 것으로 나타났다. 반추위 발효를 표면적으로 판단할 수 있는 척도인 가스 생성량은 유의적 차이는 없었지만, 효소제의 첨가가 이를 첨가하지 않은 다른 시험구들에 비해 높은 가스 생성량을 나타내었다 ( $p = 0.003$ ).

건물소화율은 트리티케일 사일리지보다 청보리 사일리지에서 유의적으로 높은 건물소화율을 나타냈다 ( $p < 0.01$ ). 그리고 트리티케일 사일리지에서 *L. plantarum*, *L. buchneri* 및 효소제를 첨가한 TLBE 처리구가 다른 시험구들에 비해 유의적으로 높은 건물 소화율을 나타냈다 ( $p < 0.01$ ). 본 실험에 사용된 섬유소 분해효소인 효소제를 청보리에 첨가할 시 건물 소화율에 큰 변화는 없다고 판단되었다. 트리티케일의 경우 사일리지 발효에 *L. plantarum*, *L. buchneri* 및 효소제의 첨가가 반추위내 건물소화율을 증진시킬 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

반추위 내 초산 생성량은 트리티케일 사일리지에 *L. plantarum*, *L. buchneri* 및 효소제를 첨가한 TLBE 처리구가 타 처리구들에 비해 유의적으로 높게 조사되었는데

Table 3. Ruminal *in vitro* fermentation of silages after 48 h incubation

Forage <sup>1)</sup>	Treatment <sup>2)</sup>	pH	NH <sub>3</sub> -N, mg/dL	Gas production, mL	DMD, %	Volatile fatty acid <sup>3)</sup> , mM			
						A	P	B	Total
WCB	CON	6.61	13.57 <sup>b</sup>	70.0	62.0 <sup>a</sup>	35.5 <sup>c</sup>	15.9 <sup>ab</sup>	9.0 <sup>b</sup>	63.3 <sup>bc</sup>
	TL	6.62	13.24 <sup>b</sup>	66.5	61.8 <sup>a</sup>	37.7 <sup>bc</sup>	14.2 <sup>cde</sup>	6.8 <sup>cde</sup>	61.0 <sup>c</sup>
	TLE	6.58	13.07 <sup>bc</sup>	72.3	64.9 <sup>a</sup>	37.6 <sup>bc</sup>	16.6 <sup>a</sup>	8.5 <sup>b</sup>	64.9 <sup>b</sup>
	TLB	6.64	15.93 <sup>a</sup>	66.0	63.4 <sup>a</sup>	38.8 <sup>ab</sup>	16.6 <sup>a</sup>	10.3 <sup>a</sup>	70.3 <sup>a</sup>
	TLBE	6.61	13.55 <sup>b</sup>	74.0	64.0 <sup>a</sup>	38.8 <sup>ab</sup>	16.4 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>a</sup>	70.8 <sup>a</sup>
TRT	CON	6.64	8.77 <sup>c</sup>	62.3	54.6 <sup>b</sup>	35.4 <sup>c</sup>	12.6 <sup>e</sup>	6.1 <sup>e</sup>	55.8 <sup>d</sup>
	TL	6.62	11.78 <sup>d</sup>	66.3	54.8 <sup>b</sup>	39.3 <sup>ab</sup>	14.1 <sup>cde</sup>	6.9 <sup>cde</sup>	63.6 <sup>bc</sup>
	TLE	6.64	11.06 <sup>d</sup>	70.0	56.0 <sup>b</sup>	36.2 <sup>bc</sup>	13.41 <sup>de</sup>	6.3 <sup>de</sup>	62.3 <sup>bc</sup>
	TLB	6.60	11.66 <sup>d</sup>	65.6	57.4 <sup>b</sup>	38.4 <sup>ab</sup>	14.4 <sup>bcde</sup>	7.1 <sup>cd</sup>	63.0 <sup>bc</sup>
	TLBE	6.57	12.46 <sup>c</sup>	70.0	61.4 <sup>a</sup>	40.6 <sup>a</sup>	15.3 <sup>abcd</sup>	7.3 <sup>c</sup>	65.6 <sup>b</sup>
SEM <sup>4)</sup>		0.008	0.007	0.544	1.273	0.430	0.343	0.351	0.929
p value		0.321	<0.001	0.053	<0.001	0.030	0.003	<0.001	<0.001
Control omitted (p values)									
Inoculants		0.392	0.181	0.938	0.402	0.078	0.096	0.029	0.018
Enzymes		0.173	0.685	0.003	0.268	0.178	0.913	0.903	0.595
Ino. x Enz.		0.551	0.994	0.663	0.664	0.019	0.640	0.722	0.585

<sup>1)</sup> WCB, whole crop barley; TRT, triticale.

<sup>2)</sup> CON, control; TL, *Lactobacillus plantarum*; TLE, *Lactobacillus plantarum* + enzyme; TLB, *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*; TLBE, *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri* + enzyme.

<sup>3)</sup> A, acetate; P, propionate; B, butyrate.

<sup>4)</sup> SEM, standard error of the mean.

<sup>a-c</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0.01$ ), 이는 반추위 내 건물소화율과 유사한 패턴을 나타냈다. 또한 두 초종 모두 대조구에 비해 전체 균주와 효소를 첨가한 TLBE 처리구가 유의적으로 높았다 ( $p < 0.01$ ). 청보리 사일리지 및 트리티케일 사일리지의 프로피온산의 생성량은 대조구와 처리구간의 차이가 크게 나타나지 않았다. 청보리 사일리지의 뷰틸산의 생성량은 TLBE 및 TLB 처리구에서 다른 시험구들에 비해 높았다 ( $p < 0.01$ ). 결과적으로 청보리 사일리지의 경우 *L. plantarum*의 단독 첨가보다 *L. plantarum* 및 *L. buchneri*를 혼합하여 사용할 경우 총 휘발성 지방산 생성량을 증가시킬 수 있었으며, 트리티케일 사일리지의 경우 균주 및 효소의 개별적 차이가 없는 것으로 확인되었다. 총 휘발성 지방산 결과로 미루어 볼 때, 두 초종 모두에서 섬유소 분해효소의 첨가는 총 휘발성 지방산 생성량에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

#### IV. 요약

본 연구는 청보리와 트리티케일에 *L. plantarum*, *L. plantarum*과 *L. buchneri*가 혼합된 접종원을 각각 첨가한 사일리지에 섬유소 분해효소를 첨가하여 사일리지 품질,

반추위 발효 패턴 및 소화율을 조사하였다. 두 초종의 사일리지 건물함량과 조단백질 함량은 전반적으로 청보리 사일리지에 높게 조사 되었으며 ( $p < 0.01$ ), 트리티케일 사일리지 처리구에서는 섬유소 분해효소의 첨가가 유의적으로 낮은 NDF 함량을 나타내었다 ( $p < 0.01$ ). 청보리와 트리티케일 사일리지에서 유기산 (젖산 및 초산)의 함량은 대조구에 비해 타 처리구들이 유의적으로 높았으며 ( $p < 0.01$ ), *L. plantarum*을 접종균주로 사용한 처리구에서 유의적으로 높은 젖산 함량을 나타내었다 ( $p < 0.01$ ). 사일리지 내 lactic acid bacteria는 두 초종 모두 섬유소 분해효소를 첨가한 처리구에서 높게 나타났으며, mold 생성량은 무첨가 대조구에 비해 처리구에서 낮게 조사되었다. 반추위 발효 패턴 및 소화율의 결과에서, 반추위 내 암모니아태 질소생성량은 청보리 사일리지에 *L. plantarum*과 *L. buchneri*를 혼합하여 접종한 처리구가 유의적으로 가장 높은 생성량을 나타냈다 ( $p < 0.01$ ). 총 가스 생성량은 처리구별 유의적 차이는 없었으나, 효소첨가에 의해 증가하였다 ( $p = 0.003$ ). 반추위 내 건물소화율은 청보리 사일리지 처리구에서 유의적으로 높게 조사되었으며 ( $p < 0.01$ ), 트리티케일 사일리지는 혼합균주 *L. plantarum*과 *L. buchneri*에 섬유소 분해효소의 첨가

한 처리구가 타 처리구 대비 유의적으로 높은 소화율을 보였다( $p<0.01$ ). 반추위 내 초산 생성량은 *L. plantarum*과 *L. buchneri* 를 접종한 처리구와 섬유소 분해효소를 첨가한 트리티케일 처리구에서 유의적으로 높게 조사되었다( $p<0.01$ ). 또한 총 휘발성 지방산은 청보리 사일리지 처리구의 균주 및 효소를 혼합 첨가한 처리구가 유의적으로 높았다( $p<0.01$ ).

본 연구를 통해 homofermentative LAB 보다 heterofermentative LAB가 안정적인 사일리지 발효에 기여하는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 반추동물의 사료효율 증대를 위한 대안으로 사용된 섬유소 분해효소를 이용한 효과는 초종에 따라 다양한 결과를 가지며, 효소의 적용에 대한 연구 및 균주와 효소의 상관관계에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업 (과제명 : 비육거제한우 케나프 최적급여조건 구명 및 성장단계별 사료이용기술개발, 과제번호: PJ011682) 및 농림수산식품기술기획평가원 연구사업 (과제명: 모델링기법을 이용한 반추위내 메탄저감용 합성 및 천연화합물제제 개발 및 산업화, 과제번호: 312030-4)의 지원에 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

## VI. REFERENCES

Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Zendo, T., Hanada, K., Shibata, K. and Sonomoto, K. 2011. Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:1892-1895.

Addah, W., Baah, J., Okine, E.K. and McAllister, T.A. 2012. A third-generation esterase inoculant alters fermentation pattern and improves aerobic stability of barley silage and the efficiency of body weight gain of growing feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 90:1541-1552.

Ahn, J.H., Kim, Y.J. and Kim, H.J. 2003. Effect of fibrolytic enzyme addition on ruminal fermentation, milk yield and milk composition of dairy cows. *Journal of Animal Science and Technology*. 45: 131-142.

AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington. DC.

Beauchemin, K., Rode, L. and Sewalt, V. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry

forages. *Canadian Journal of Animal Science*. 75:641-644.

Beauchemin, K., Colombatto, D., Morgavi, D. and Yang, W. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. 81:37-47.

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

Cho, S., Kang, J.S., Cho, K.J., Lee, K.H., Kwon, C.H., Song, J., Lee, K., 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.

Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K. and Owen, E. 2003. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets: A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. *Animal Feed Science and Technology*. 107:201-209.

Dean, D., Adesogan, A., Krueger, N. and Littell, R. 2008. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 68-83.

Erwin, E., Marco, G. and Emery, E. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 44:1768-1771.

Eun, J.S. and Beauchemin, K.A. 2007. Relationship between enzymic activities and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. *Animal Feed Science and Technology*. 145:53-67.

Feng, P., Hunt, C., Pritchard, G. and Julien, D.W. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *Journal of Animal Science*. 74:1349-1357.

Filya, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*. 86:3575-3581.

Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., Goesmann, A., Grabherr, R., Schwab, H. and Pühler, A. 2012. Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *Journal of Biotechnology*. 161:153-166.

Hiltner, P. and Dehority, B. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 46:642-648.

Kim, J.G., Ham, J.S., Chung, E.S., Park, H.S., Lee, J.K., Jung, M.W., Choi, K.C., Jo, N.C. and Seo, S. 2009. Evaluation of

- fermentation ability of microbes for whole crop barley silage inoculant. *Journal of The Korean Society of Grassland and Forage Science*. 29:235-244.
- Krueger, N.A. and Adesogan, A.T. 2008. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. *Animal Feed Science and Technology*. 145:84-94.
- Lee, H.J., Kim, D.H., Amanullah, S.M., Kim, S.C., Song, Y.M. and Kim, H.Y. 2014. Effects of bacterial inoculants and cutting height on fermentation quality of barley silage. *Journal of The Korean Society of Grassland Science*. 34:163-168.
- Marten, G.C., Goodrich, R.D., Schmid, A.R., Meiske, J.C., Jordan, R.M. and Linn, J.G. 1975. Evaluation of laboratory methods for determining quality of corn and sorghum silages: II. Chemical methods for predicting *in vivo* digestibility. *Agronomy Journal*. 67:247-251.
- McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*. 43:99-109.
- Miller, T.L. and Wolin, M. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *American Society for Microbiology*. 27:985-987.
- Moore, J. 1970. Procedures for the two-stage *in vitro* digestion of forages. *Nutrition Research Techniques for Domestic and Wild Animals*. 1:5001-5003.
- Ok, J.U., Lee, S.M., Lee, S.J., Lim, J.H., Kang, T.W., Jung, H.Y., Moon, Y.H. and Lee, S.S. 2006. Effect of yeast addition in rice straw silage fermentation. *Journal of Animal Science and Technonoly*. 48:691-698.
- SAS. 2002. *Statistical Analysis System Version. 9.2*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shinekhuu, J., Kim, K.L., Ji, B.J., Xiangzi, L., Oh, Y.K., Hong, S.K. and Song, M.K. 2009. Protein fractionation of whole crop silages, and effect of borate-phosphate buffer extraction on *in vitro* fermentation characteristics, gas production and degradation. *Journal of Animal Science and Technology*. 51:369-378.
- Stiles, D., Bartley, E., Meyer, R.E., Deyoe, C. and Pfost, H. 1970. Feed processing. VII. effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (starea) on rumen metabolism in cattle and on urea toxicity 1, 2. *Journal of Dairy Science*. 53:1436-1447.
- Tilley, J. and Terry, R. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*. 18:104-111.
- Van Soest, P.V., Robertson, J. and Lewis, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3597.
- Woolford, M.K. 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (c1-c12) as potential silage additives. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 26:219-228.

(Received January 1, 2016 / Revised February 10, 2016 / Accepted February 18, 2016)