Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science 41(2): 119~127, 2021
https://doi.org/10.5333/KGFS.2021.41.2.119
ISSN 2287-5824 (Print)
ISSN 2287-5832 (Online)

Research Article

조사료와 농후사료의 급여 순서가 *In vitro* 반추위 발효성상, 총 가스 발생량과 메탄 발생량에 미치는 영향

이유경[1], 이성실[2], 성필남[1], 이슬[1], 백열창[1], 김기현[3], 이성대[2], 천주란[3], 지상윤[2], 김정은[1*]
[1]농촌진흥청 국립축산과학원 축산생명환경부 영양생리팀
[2]경상대학교 응용생명과학부(BK21Plus)
[3]농촌진흥청 국립축산과학원 축산생명환경부 동물복지팀

The Effects of Feeding Order of Roughages and Concentrates on *in vitro* Rumen Fermentation, Total Gas and Methane Production in Hanwoo

Yookyung Lee[1], Sungsill Lee[2], Pilnam Seong[1], Seul Lee[1], Youlchang Baek[1], Kihyun Kim[3], Sungdae Lee[4], Julan Chun[3], Sangyun Ji[2] and Jungeun Kim[1*]
[1]Animal Nutrition & Physiology Team, National Institute of Animal Science, RDA
[2]Division of Applied Life Science(BK21Plus), Gyeongsang National University
[3]Animal Welfare Research Team, National Institute of Animal Science, RDA

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate effects of feeding methods on *in vitro* ruminal fermentation, total gas and methane production in Hanwoo steers. Six Hanwoo steers fitted with rumen cannula (430 ± 21 kg of body weight) were randomly assigned to one of three feeding systems: 1) feeding forage 1 hour after concentrate, 2) feeding concentrate 1 hour after forage, 3) feeding mixed ration. Rumen fluid sampled from each animals was incubated 24 hours with maize or timothy substrates in *in vitro*. Ruminal pH was increased in feeding method 2 or maize substrate than that of other methods or timothy substrate ($P < 0.001$). The production of total volatile fatty acid, acetate, propionate, butyrate, and valerate were increased when steers fed diets using feeding method 1 or rumen fluid was incubated with maize substrate ($P < 0.001$). Increased production of total gas and methane was observed in feeding method 1 and maize substrate compared to those of other methods or timothy substrate ($P < 0.001$). Due to the inconsistent results between ruminal fermentation and gas production in this study, further research is required to estimate effects of feeding method on enteric fermentation and gas production in *in vivo*.

(**Key words**: Total mixed ration, Separate feeding, Enteric fermentation, Methane emission, Hanwoo)

Ⅰ. 서론

지난 100년간 지구온난화로 인해 지구 표면 온도가 상승함에 따라 (IPCC, 2014), IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change)는 인간의 활동이 기후변화에 미치는 영향을 평가하고 국가적 대책을 마련하기 위해 노력하고 있다. 메탄 (CH_4)은 반추가축의 장내발효로 생성되어 공기 중으로 배출되며, 지구온난화에 미치는 영향이 이산화탄소의 21배에 달한다 (IPCC, 2014). 또한 반추가축의 경우 사료로 섭취한 에너지의 2-12%가 메탄에너지로 손실되는 것으로 보고된 바 있어 (Johnson and Johnson, 1995), 반추가축에 의한 메탄저감 연구는 온실가스 감축뿐만 아니라 사료이용효율 증가라는 측면에서도 중요하다.

반추위 발효로 생산되는 메탄감축 연구는 전 세계적으로 진행되고 있다. 조사료의 종류 (Waghorn et al., 2002; Archimede et al., 2011) 및 품질 (Boadi and Wittenberg, 2002; Pinares-Patino et al., 2003), 사료 내 농후사료 비율 (Agle et al., 2010) 등 저메탄발생 사료에 대한 연구가 이루어졌다. 또한 반추가축 사료에 식물성 추출물과 오일 (Beauchemin and McGinn, 2006; Bayat et al., 2018; Garcia et al., 2020), 해조류 (Roque et al., 2019), nitrate (Van Zijderveld et al., 2011; Granja-Salcedo et al., 2019) 등을 첨가하면 메탄 감소에 효과적인 것으로 보고되고 있다. 하지만 실제 농가에서 가장 빠르고 쉽게 접근할 수 있는 방법

*Corresponding author : Jungeun Kim, 1500, Kongjwipatjwi-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, (55365) Republic of Korea,
Tel: +82-63-238-7456, Fax: +82-63-238-7497, E-mail: gksmf93@korea.kr

이 될 수 있는 농후사료와 조사료를 혼합 급여하는 섬유질배합사료 (TMR: Total mixed ration)와 분리급여 방식이 메탄 발생량에 미치는 효과에 관한 연구는 미비한 실정이다.

Holter et al. (1977)에 따르면, TMR 급여 또는 분리급여는 비유초기 홀스타인 초산우의 메탄에너지에 영향을 미치지 않았다. Bharanidharan et al. (2018a)은 홀스타인 거세우에서 TMR 급여보다 분리급여가 일일 메탄 발생량을 20.3 L/day 감소시킨다고 보고하였으나, 급여방식에 따른 차이가 없다는 결과 또한 보고된 바 있다 (Lee et al., 2016; Bharanidharan et al., 2018b). 하지만 사료 급여방식이 국내 고유종인 한우의 메탄 발생량에 미치는 영향은 아직까지 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 한우 거세우가 혼합급여 또는 분리급여 형태로 사료를 섭취했을 때, 반추가축의 대표 사료원인 옥수수와 티모시 조건 하에서 반추위 발효성상과 총 가스 및 메탄 발생량에 미치는 영향을 *in vitro*로 평가하기 위해 수행되었다. 연구 가설은 다음과 같았다: 1) 한우 거세우에서 사료 급여 형태에 따라 반추위 환경이 변화하고, 2) 따라서 채취한 위액에 국내 대표 농후사료원인 옥수수와 조사료원인 티모시를 기질로 하여 배양하면 반추위 발효 성상에 다른 결과를 보일 것이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 공시축과 사양관리

본 연구는 국립축산과학원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다 (승인번호 NIAS20181289). 공시축으로 농촌진흥청 국립축산과학원의 반추위 캐뉼라가 시술된 거세한우 6마리 (평균체중: 430 ± 21 kg)를 사용하였다. 조사료 1.2 kg (볏짚 0.6 kg

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets

Ingredient composition	% of Dry matter	
Roughage		
Rice straw	12.50	
Timothy	12.50	
Concentrate		
Maize	30.49	
Corn gluten feed	15.56	
Wheat gluten	10.01	
Soybean meal	7.37	
Rapeseed meal	3.12	
Coconut kernel meal	3.11	
Palm kernel meal	3.11	
Limestone	1.33	
Salt	0.35	
Sodium hydrogen carbonate	0.35	
Vitamin & mineral mixture[1]	0.20	
Chemical composition	Concentrate	Roughage
Dry matter (DM), %	87.63	91.41
Crude protein, % of DM	18.37	6.85
Ether extract, % of DM	2.78	1.05
Neutral detergent fiber, % of DM	21.65	59.07
Acid detergent fiber, % of DM	9.49	38.42
Crude ash, % of DM	8.25	9.12
Gross energy, kcal/g	3.78	3.80

[1] Provided the following nutrients per kg of complete diet: vitamin A, 2,650,000 IU; vitamin D3, 530,000 IU; vitamin E, 1,050 IU; nicotinic acid, 10,000 ㎎; iron, 13,200 ㎎; manganese, 4,400 ㎎; zinc, 4,400 ㎎; copper, 2,200 ㎎; iodine, 440 ㎎; cobalt, 440 ㎎.

+ 티모시 0.6 kg)과 농후사료 3.0 kg을 하루에 두 번 (9:00 및 18:00) 나누어 급여하였고 (As-fed basis), 시험사료의 영양성분은 Table 1과 같다. 물과 미네랄 블록은 실험 기간 동안 자유 섭취토록 하였다. 실험설계는 사료 급여방법에 따라 다음의 3개로 구성되었다: 1) 농후사료 급여 1시간 후 조사료 급여, 2) 조사료 급여 1시간 후 농후사료 급여, 3) 농후사료와 조사료 동시 혼합급여 (TMR). 3×3 duplicated 라틴방각법으로 설계하여 실험을 수행하였으며, 전이효과를 피하기 위한 순서를 사용했다. 각 period는 21일 동안 수행되었고, 사료 및 대사틀 적응기 20일과 샘플 채취 1일로 구성되었다.

2. 반추위액 채취 및 *in vitro* 배양

반추위액은 시험사료 적응 21일째 오전 사료급여 1시간 후에 공시축으로부터 채취하였다. 채취 후 4겹의 cheese cloth로 여과하여 사료입자를 제거하고, 즉시 CO_2 gas가 충진된 병에 담아 실험실로 운반하였다.

반추위액과 멸균한 McDougall buffer (Table 2)를 1 : 2 비율로 혼합한 후 39℃로 가열 교반하면서 CO_2 gas를 지속적으로 주입하여 혐기상태를 유지하였다. Cyclotec 1093 meal (FOSS, Suzhou, China)를 이용하여 1 mm 크기로 분쇄한 옥수수 (M: maize)와 티모시 (T: timothy)를 기질로 이용하였으며, 기질의 영양소 성분은 Table 3과 같다. 기질 중 옥수수의 영양소 성분 분석치가 소실되어 한국가축사양표준 한우편 (RDA, 2018)의 농후사료 성분표를 참고하여 제시하였다. 배양액은 기질 0.5 g이 들어있는 125 mL serum bottle에 50 mL씩 분주한 후 39℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. *In vitro* 배양실험은 배양 기질 2가지 (M 및 T)에 사료 급여방식 3가지 (1, 2, 및 3)를 포함한 2 × 3 factorial arrangement로 진행하였다: M1, M2, M3, T1, T2, T3. 각 처리는 5회 반복 수행하였으며, 실험 단위는 각 serum bottle이었다.

3. 반추위 in vitro 발효성상 분석

24시간 배양이 끝난 후 100 mL glass syringe (top syringe compound, TRÜTH, India)를 이용하여 가스를 포집했다. 포집된 가스는 실리콘 마개 (9∅~11∅, 18 mm)로 밀봉하여 공기를 제거한 알루미늄 치어백 (85 mm × 135 mm, 9∅, 200 mL)에 옮겨 담아 GC (gas chromatograph; NL/450 GC, Bruker, USA)로 분석하였다. 가스 포집 후 serum bottle을 개봉하고 pH meter (pinnacle pH meter M540. Corning, NY, USA)를 이용하여 배양액의 pH를 측정하였다. 휘발성 지방산과 암모니아태 질소 분석을 위해 배양액을 50 mL tube에 분주하여 2,600 × g, 4℃에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 분리하였다.

Table 2. Composition of McDogall's buffer solution for the in vitro gas production

Items	g/L of distilled water
$NaHCO_3$	9.80
$NaHPO_4 \cdot 12H_2O$	9.30
NaCl	0.47
KCl	0.57
$CaCl_2$ anhydrous	0.04
$MgCl_2$ anhydrous	0.06

Table 3. Chemical composition of substrates for incubation of ruminal fluid

Chemical composition	Maize[1]	Timothy
Dry matter (DM), %	85.57	91.80
Crude protein, % of DM	8.46	7.68
Ether extract, % of DM	4.00	2.42
Neutral detergent fiber, % of DM	2.35	64.44
Acid detergent fiber, % of DM	0.01	40.55
Crude ash, % of DM	-	5.82
Gross energy, kcal/g	-	4.09

[1] Book-value from Korean feeding standards for Hanwoo (RDA, 2018)

Table 4. Effects of feeding method on *in vitro* ruminal pH, volatile fatty acids and NH_3-N production for 24 hour incubation

Item[1]	Treatment[2]						SEM[3]	P-value		
	M1	M2	M3	T1	T2	T3		Feeding	Substrate	Interaction[4]
pH	6.22^{D}	6.46^{C}	6.25^{D}	6.71^{B}	6.91^{A}	6.76^{B}	0.02	<0.001	<0.001	0.479
Total VFA, mM	156.44^{A}	114.63^{B}	145.34^{A}	122.67^{B}	82.96^{C}	110.45^{B}	2.92	<0.001	<0.001	0.955
Acetate, mM	72.07^{A}	54.77^{B}	66.62^{A}	59.70^{B}	42.49^{C}	53.68^{B}	1.24	<0.001	<0.001	0.989
Propionate, mM	26.10^{A}	17.97^{C}	25.62^{A}	20.57^{B}	12.64^{D}	17.45^{C}	0.52	<0.001	<0.001	0.990
Butyrate, mM	21.51^{A}	13.16^{B}	19.20^{A}	15.21^{B}	7.78^{C}	12.56^{B}	0.53	<0.001	<0.001	0.793
Valerate, mM	2.03^{A}	1.05^{B}	2.06^{A}	1.93^{A}	1.04^{B}	1.83^{A}	0.07	<0.001	0.347	0.750
A:P ratio	2.77^{B}	2.75^{B}	2.60^{B}	3.32^{A}	3.36^{A}	3.20^{A}	0.04	0.116	<0.001	0.934
NH_3-N, mg/L	210.29^{B}	110.07^{C}	134.21^{C}	275.81^{A}	200.35^{B}	198.79^{B}	6.60	<0.001	<0.001	0.496

$^{A-D}$ Means with a common superscript letter in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

[1] Total VFA = total volatile fatty acids; A:P ratio = acetate:propionate ratio; NH_3-N = ammonia nitrogen.

[2] M1 = maize substrate (M) incubated with rumen fluid of steers fed forage 1 hour after concentrate (diet 1); M2 = M incubated with rumen fluid of steers fed concentrate 1 hour after forage (diet 2); M3 = M incubated with rumen fluid of steers fed mixed ration (diet 3); T1 = timothy substrate (T) incubated with rumen fluid of steers fed diet 1; T2 = T incubated with rumen fluid of steers fed diet 2; T3 = T incubated with rumen fluid of steers fed diet 3.

[3] Standard error of the mean.

[4] Interaction of feeding and substrate.

휘발성 지방산 생성량은 Erwin et al. (1961)의 방법을 응용하여 분석하였다. 배양액을 원심분리한 후 얻은 상층액 5 mL과 50% metaphosphoric acid (Wako, Japan) 500 μL를 15 mL tube에 분주하고 vortex하여 분석 전까지 -80℃에 냉동 보관하였다. 샘플은 분석 전 4℃에서 해동한 후, 미량원심분리기 (Cyro1730MR, Labogene, Korea)를 이용하여 14,000 × g, 4℃에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액 1 mL을 취하여 2-ethyl butyrate 100 mL를 첨가한 후 GC (gas chromatograph; 6890N, Agilent Technologies, USA) 분석용 유리병에 분주하여 분석하였다. 분석을 위한 표준용액은 volatile fatty acid standard solution (Catalog number. 46975-U; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 이용하였다.

암모니아태 질소의 분석은 Chaney and Marbach (1962)의 방법을 응용하여 분석하였다. 배양액을 원심분리한 후 얻은 상층액 5 mL과 25% metaphosphoric acid 500 μL를 15 mL tube에 분주하고 vortex하여 분석 전까지 -80℃에 냉동 보관하였다. 분석 시 샘플을 상온에서 충분히 용해시킨 후 14,000 × g, 4℃에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액, 암모니아 표준용액 (25, 50, 100, 200 및 400 ppm), 그리고 증류수를 각각 3개의 시험관에 20 μL씩 분주한 후 phenol color reagent (Phenol 50 g/L와 sodium nitroferricyanide 0.25 g/L)와 alkali-hypochlorite reagent (sodium hydroxide 25 g/L와 4-6% sodium hypochlorite 16.8 mL/L)를 각각 1 mL 첨가하여 혼합하였다. 혼합액은 37℃ 항온수조에서 15분간 발색하였다. 충분히 발색이 끝난 후 증류수 8 mL을 첨가하고 UV spectrophotometer (Catalog number. 168-1150; Bio-Rad Laboratories, Inc, California, USA)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플 내 암모니아태 질소의 함량은 암모니아 표준용액의 검량선과 비교하여 산정하였다.

4. 통계분석

본 연구에서 얻은 모든 결과는 SAS 프로그램 (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 general linear model (GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였다. 처리에 의한 평균간 비교는 Duncan's multiple range test를 이용해 분석하였다. $P < 0.05$에서 유의하다고 판단하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

본 연구는 국내 고유종인 한우에서 혼합급여 또는 분리급여 형태로 사료를 섭취했을 때, 반추가축의 대표 사료원인 옥수수와 티모시 조건 하에서 반추위 발효성상과 총 가스 및 메탄 발생량에 미치는 영향을 *in vitro*로 평가하기 위해 수행되었다. 연구 목적 구현을 위해 반추위 캐뉼라가 장착된 한우 거세우에게 3가지 방법으로 사료를 급여했고, 이후 채취한 위액을 2가지 기질을 사용하여 24시간 배양하였다.

사료 급여순서와 기질 조건에 따른 *in vitro* 반추위 발효성상은 Table 4에 나타내었다. 반추위액 pH는 6.22-6.91로 나타났으

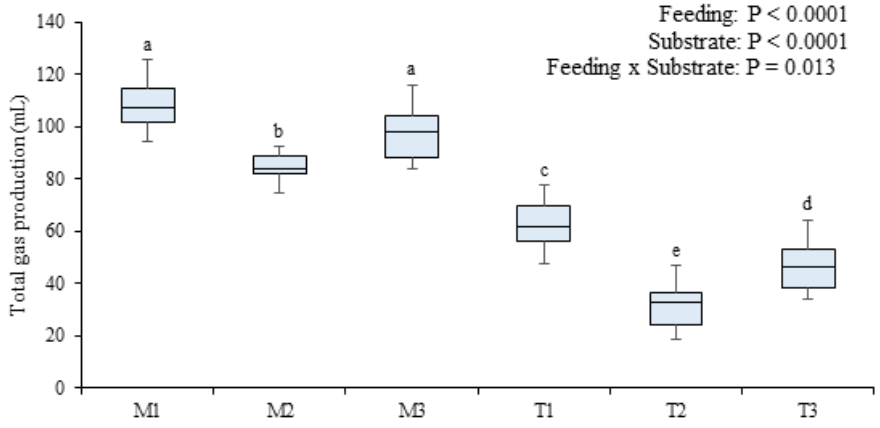

Fig. 1. Effects of feeding method on *in vitro* total gas production. Rumen fluids were sampled from Hanwoo steers fed forage 1 hour after concentrate (1), concentrate 1 hour after forage (2), or mixed ration (3), and incubated with maize (M) or timothy (T) substrates for 24 hour (n = 5). Values are presented as means ± SEM. Means with a common superscript letter are significantly different, P 〈 0.05.

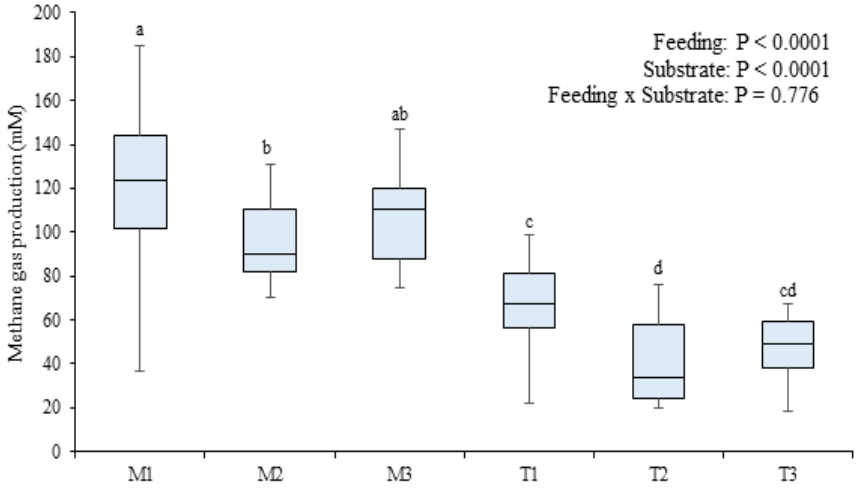

Fig. 2. Effects of feeding method on *in vitro* methane gas production. Rumen fluids were sampled from Hanwoo steers fed forage 1 hour after concentrate (1), concentrate 1 hour after forage (2), or mixed ration (3), and incubated with maize (M) or timothy (T) substrates for 24 hour (n = 5). Values are presented as means ± SEM. Means with a common superscript letter are significantly different, P 〈 0.05.

며, 그룹 간 유의성 차이를 보였다. 처리구 M1과 M3가 가장 낮은 pH를 보였으며 (6.22 및 6.25), 이후 M2 (6.46), T1과 T3 (6.71 및 6.76) 순으로 증가하여 T2 (6.91)에서 가장 높았다 (P < 0.001). 티모시 기질이 옥수수보다 높은 pH를 나타냈으며 (P < 0.001), 사료 급여방식 2가 다른 급여방식 처리구보다 높은 pH를 나타냈다 (P < 0.001). 급여되는 사료의 종류나 입자도, 가공

형태 등에 따라 다양한 반추위 발효성상과 대사산물이 나타난다. 일반적으로 농후사료의 급여는 반추위 pH를 낮추는 것으로 알려져 있다 (Lana et al., 1998; Agle et al., 2010; Hook et al., 2011). 따라서 본 연구에서 옥수수 기질 처리구가 티모시 기질 처리구보다 낮은 pH를 보인 것은 이와 일치하는 결과로 보인다. 사료 급여방식에 따른 반추위 pH 변화는 다양하게 보고되고 있다. Li et al. (2003)은 한우 거세우에게 분리급여 또는 TMR 급여를 했을 때 반추위 pH에 차이가 없었다고 보고하였으나, Kim et al. (2003)은 분리급여 처리구의 낮은 pH를 보고한 바 있다. Limousin 거세우에게 조사료 섭취 후 농후사료, 농후사료 섭취 후 조사료, TMR의 세 가지 방식으로 사료를 급여하였을 때 반추위 pH에 차이가 없었다 (Liu et al., 2016). Bharanidharan et al. (2018a)는 홀스타인 거세우의 농후사료 선택채식 행동을 방지하기 위해 분리급여 처리구에 조사료 급여 40분 후 농후사료를 급여했으나, TMR 처리구와 비교하여 반추위 pH에 차이를 보이지 않았다. 사료 급여방식이 반추위 pH에 미치는 영향에 대해서는 더 많은 자료 축적이 필요할 것으로 판단된다.

총 휘발성 지방산 (Total VFA: total volatile fatty acid), acetate, butyrate 결과는 비슷한 통계적 패턴을 보였다. 처리구 M1과 M3이 가장 높은 값을 나타냈으며, 이후 T1, M2, T3 순으로 감소하여 T2에서 가장 낮은 값을 보였다 ($P < 0.001$). Total VFA, acetate, butyrate에서 사료 급여방식 1이 가장 높은 수치를 보였고, 사료 급여방식 2에서 가장 낮았다 ($P < 0.001$). 또한 옥수수 처리구가 티모시 처리구보다 높은 농도를 보였다 ($P < 0.001$). *In vitro* 발효 후 propionate 함량은 M1 (26.1 mM)과 M3 (25.62 mM)에서 가장 높았으며, 이후 T1 (20.57 mM) > M2 (17.97 mM) 및 T3 (17.45 mM) > T2 (12.64 mM) 순으로 감소했다 ($P < 0.001$). 사료 급여방식 2는 급여방식 1과 3보다 낮은 propionate 함량을 보였으며 ($P < 0.001$), 옥수수 처리구에서 티모시 처리구보다 높은 propionate 농도를 보였다 ($P < 0.001$). 반추위액 내 valerate 함량은 M3, M1, T1, T3 처리구 (2.06, 2.03, 1.93, 1.83 mM)가 M2와 T2 처리구 (1.05 및 1.04 mM)보다 높았다 ($P < 0.001$). 사료 급여방식 2는 방식 1 및 3과 비교하여 낮은 valerate 함량을 보였고 ($P < 0.001$), 기질에 의한 효과는 나타나지 않았다 ($P = 0.347$).

반추위에서 생성되는 VFA는 농후사료 급여로 다량 생성되며, pH와 부 (Negative)의 상관관계를 가진다. 따라서 본 연구에서도 각 VFA 항목과 Total VFA는 pH와 반대되는 결과를 보였다. Van Kessel and Russell (1996)은 pH가 다른 반추위액을 얻기 위해 Holstein 젖소에게 조사료 또는 농후사료를 각각 급여했다. 반추위액 채취 결과, 위액 중 Total VFA, propionate, butyrate는 농후사료 급여구에서 증가했다. 이는 본 연구에서 옥수수 기질 처리구가 티모시 기질 처리구보다 VFA를 더 많이 생산한 결과와 일치한다. Lascano and Heinrichs (2009)는 Holstein dairy heifer에게 조사료와 농후사료 비율을 80:20, 60:40, 40:60 세 가지로 나누어 사료를 급여한 결과, 40:60 사료를 급여한 처리구에서 다른 처리구보다 유의적으로 낮은 acetate 생성량을 보였다고 보고했다. 이처럼 반추위 acetate는 섬유소 분해로 인해 생성되는 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 옥수수 기질 처리구에서 acetate가 더 많이 생성되었다. 반추위 미생물에 의한 분해속도가 농후사료보다 조사료에서 상대적으로 느리고, 본 연구에서 사용한 24시간 배양시간이 충분한 조사료 발효를 관찰하기에 짧은 시간이었기 때문에 이러한 결과가 나타난 것으로 추측된다. 사료 급여방식에 따른 반추위 VFA 생성에 대해 보고한 선행 연구들이 있지만, 일관된 결과는 보고되지 않고 있다 (Bargo et al., 2002; Li et al., 2003; Schroeder et al., 2003; Liu et al., 2016; Bharanidharan et al., 2018a). 본 연구에서 발효 후 VFA 생성량은 급여방식 2 < 3 < 1 순으로 증가했다. 이것은 pH 측정값과 반대되는 결과로, 농후사료의 급여가 가장 큰 영향을 미친 것으로 판단된다.

세 가지 사료 급여방식은 24시간 발효 후 반추위액의 A:P ratio (acetate:propionate ratio)에 영향을 미치지 않았다 ($P = 0.116$). 티모시 처리구는 옥수수 처리구보다 유의적으로 높은 A:P ratio를 보였다 ($P < 0.001$). 농후사료 급여로 인한 전분 분해는 반추위에서 propionate를 더 생산하고, 이는 A:P ratio를 낮춘다 (Lascano and Heinrichs, 2009; Agle et al., 2010). 따라서 본 연구의 옥수수 처리구에서 낮은 A:P ratio를 보였던 것으로 판단된다. Li et al. (2003)과 Liu et al. (2016)은 분리급여보다 TMR 급여 시에 더 낮은 A:P ratio를 나타냈다고 보고했다. 본 연구에서 급여방식이 A:P ratio에 통계적 유의차를 나타내지 않았지만, 선행 보고된 연구들과 비슷하게 TMR 처리구에서 A:P ratio의 수치적 감소를 보였다.

암모니아태 질소 (NH_3-N) 함량은 T1 처리구 (275.81 mg/L)에서 가장 높았으며, M3 (134.21 mg/L) 및 M2 (110.07 mg/L)에서 가장 낮았다 ($P < 0.001$). 사료 급여방식 1이 그 외 처리구들보다 NH_3-N 수치가 높았으며 ($P < 0.001$), 티모시 처리구가 옥수수 처리구보다 높은 NH_3-N을 보였다 ($P < 0.001$). 반추위 NH_3-N 함량은 사료로 섭취한 단백질의 반추위 내 박테리아의 소화과정을 통해 생성되며, 발효 탄수화물 (Fermentable carbohydrates)의 증가는 반추위 내 암모니아 생성을 감소시킨다 (Hristov et al., 2005; Agle et al., 2010). 따라서 옥수수 기질을 사용한 처리구에서 더 낮은 NH_3-N 결과가 나온 것으로 판단된다. Kim et al. (2003)과 Li et al. (2003)은 TMR을 급여한 소들에게서 분리된 사료를 먹은 소들보다 더 높은 NH_3-N가 관측되었다고 보고했지만, Liu et al. (2016)은 TMR 급여구가 오히려 낮은 NH_3-N를 보였다고 보고했다. 사료 급여형태에 따른 NH_3-N 생성량 결과는

본 연구와 선행연구들 사이에 일관된 결과를 나타내지 않으며, 관련된 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

사료 급여순서와 기질 조건에 따른 *in vitro* 반추위 발효 후 총 가스 발생량은 Figure 1에 나타내었다. 총 가스 발생량은 M1과 M3 (117.0 및 114.0 mL) 처리구에서 가장 높았으며, 이후 M2 (103.5 mL) > T1 (84.0 mL) > T3 (72.0 mL) > T2 (62.0 mL) 순으로 감소했다 ($P < 0.001$). 사료 급여방식 1에서 총 가스 발생량이 가장 높았고, 이후 급여방식 3, 급여방식 2 순으로 감소했다 ($P < 0.001$). 또한 옥수수 기질이 티모시 기질보다 더 많은 가스를 생산했다 ($P < 0.001$). 24시간 *in vitro* 발효 후 메탄가스 발생량은 Figure 2에 나타내었다. 메탄 발생량은 처리구 M1 (123.2 mM)에서 가장 높게 관측되었고, 총 가스 발생량과 비슷한 패턴으로 감소하여 처리구 T2 (33.6 mM)에서 가장 낮았다 ($P < 0.001$). 사료 급여방식 1에서 메탄가스 발생량이 가장 높게 측정되었고, 급여방식 2와 3에서 비슷하게 감소했다 ($P < 0.001$). 총 가스 발생량과 마찬가지로 옥수수 처리구에서 티모시 보다 높은 메탄 발생량이 측정되었다.

Theodorou et al. (1994)와 Beuvink et al. (1992)은 *in vitro* 반추위 배양 시 가스발생량은 사료 영양가치 평가에 사용할 수 있는 지표 중 하나이며, 건물 소화율을 간접적으로 나타내는 지표라고 하였고, Sallam et al. (2007)은 가스발생량을 평가하는 것은 반추위에서 분해되는 영양소의 소화동역학적인 결과의 해석에 활용할 수 있다고 보고하였다. 농후사료 급여로 인한 propionate의 증가는 메탄의 전구물질이 되는 수소 이용을 증가시켜서 결과적으로 메탄 생성을 감소시킨다 (Grobner et al., 1982; Irmgard, 1996; Van Kessel and Russell, 1996; Lana et al., 1998). 또한 Williams et al. (2019)는 메탄 생성이 acetate와 butyrate와는 비례하고, propionate와는 반비례함을 예측했다. 본 연구에서 반추위 Total VFA, acetate, propionate, butyrate 생성량은 모두 옥수수 기질에서 더 높았고, 총 가스 발생량과 메탄 발생량 또한 옥수수 기질에서 높았다. 따라서 VFA 생성과 마찬가지로, 티모시 기질보다 상대적으로 빠른 옥수수 기질의 발효가 가스 발생량을 증가시킨 것으로 생각된다. TMR 급여 또는 분리급여에 따른 메탄 발생량은 처리구간 변화가 없거나 (Holter et al., 1977; Lee et al., 2016; Bharanidharan et al., 2018b), TMR 급여구에서 높게 측정되었다 (Bharanidharan et al., 2018a). Bharanidharan et al. (2018a)는 Holstein 거세우의 선택채식을 막기 위해 조사료 급여 40분 후 농후사료를 급여한 분리급여구와 TMR 급여구를 비교한 후 TMR 급여구의 높은 메탄 발생량을 보고하였는데, 이는 유의적 차이는 없지만 수치적 차이를 보인 본 연구 결과와 일치한다. 반추가축의 장내발효로 인한 메탄 생성은 반추위 pH와 비례하는 것으로 알려져 있다 (Van Kessel and and Russell, 1996; Hünerberg et al., 2015). 하지만 본 연구에서 사료 급여방식 2가 1보다 높은 pH와 낮은 VFA 생성량을 보였음에도 불구하고 메탄 발생량은 감소했다. 이는 예기치 못한 기질에 의한 결과와 마찬가지로 in vitro 발효라는 특수한 상황에서 생긴 결과로 생각된다. 또한 반추위 발효에 의한 메탄 발생량은 개체 간 큰 차이를 보이기 때문에 본 연구에서의 적은 실험두수로 인한 오류일 가능성 또한 존재한다. 사료 급여방식이 메탄 발생량에 미치는 영향을 평가하기 위해 보다 장기간의 연구를 통해 비교 가능한 더 많은 자료의 축적이 필요할 것으로 예상된다.

한우 거세우에게 세 가지 방식 (농후사료 급여 1시간 후 조사료 급여, 조사료 급여 1시간 후 농후사료 급여, TMR 급여)으로 사료 급여 후 채취한 반추위액을 옥수수 및 티모시 기질과 함께 24시간 배양한 결과, 농후사료를 먼저 급여한 사료 급여방식과 옥수수 기질에서 낮은 pH, 높은 VFA, 높은 메탄가스 발생량이 관측되었다. 반추가축에서 메탄저감 연구는 지구 온난화를 야기하는 온실가스 감축뿐만 아니라 가축의 사료이용효율 증가라는 측면에서도 중요하며, 사료 급여방식이 메탄 발생량에 미치는 영향에 대한 결론을 얻기 위해서는 보다 다각적인 형태의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅳ. 요 약

본 연구는 국내 고유종인 한우에서 1) 농후사료 급여 후 조사료 급여, 2) 조사료 급여 후 농후사료 급여, 3) TMR 급여의 총 세 가지 형태의 사료급여가 반추위 발효성상, 총 가스 및 메탄 발생량에 미치는 영향을 *in vitro*로 평가하기 위해 수행되었다. 사료 급여 형태에 따라 반추위 환경이 변화할 것으로 가설을 세우고, 옥수수 (M)와 티모시 (T)를 기질로 하여 반추위액의 24시간 *in vitro* 배양을 실시하였다. 따라서 시험 처리구는 총 6개로 구성되었다: M1, M2, M3, T1, T2, T3. 반추위 pH는 사료 급여방식 2에서 다른 처리구보다 높았고 ($P < 0.001$), 티모시 기질에서 옥수수 기질보다 높았다 ($P < 0.001$). 휘발성 지방산 (VFA; volatile fatty acid) 조사항목들 (Total VFA, acetate, propionate, butyrate, valerate)은 사료 급여방식 1에서 가장 높았고 급여방식 2에서 가장 낮았으며 ($P < 0.001$), 옥수수 기질에서 더 많이 생산되었다 ($P < 0.001$). 반추위액 내 acetate:propionate 비율은 사료 급여방식에 따른 효과는 없었으나 ($P = 0.116$), 티모시 기질이 옥수수 기질보다 더 높은 값을 나타냈다 ($P < 0.001$). 암모니아태 질소 (NH_3-N)는 사료 급여방식 1에서 다른 처리구보다 높았으며 ($P < 0.001$), 티모시 기질에서 높은 수치를 보였다 ($P < 0.001$). 총 가스 및 메탄가스 발생량은 사료 급여방식 1에서 가장 높았고 ($P < 0.001$), 옥수수 기질에서 더 많이 생산되었다 ($P < 0.001$). 메탄은 이산화탄소의 20배 이상의 지구온난화효과를 갖는 것으

로 알려져 있고, 반추가축이 섭취한 에너지의 손실로 작용하고 있어 장내발효 메탄 발생량을 저감하는 것은 매우 중요한 과제라 할 수 있다. 반추가축에서 사료급여 방식에 따른 메탄 발생량 차이에 대한 결론을 얻기 위해서는 보다 다각적인 형태의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 사 사

본 성과물 (논문)은 농촌진흥청 연구사업 (세부과제명: 한우의 메탄 생성량 저감을 위한 반추위 최적 발효조건 구명, 세부과제번호: PJ01266402)의 지원에 의해 이루어진 것임

Ⅵ. REFERENCES

Agle, M., Hristov, A.N., Zaman, S., Schneider, C., Ndegwa, P.M. and Vaddella, V.K. 2010. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. Journal of Dairy Science. 93:4211-4222.

Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Bovala, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P. and Doreau, M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. Animal Feed Science and Technology. 166-167:59-64.

Bargo, F., Muller, L.D., Varga, G.A., Delahoy, J.E. and Cassidy, T.W. 2002. Ruminal digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. Journal of Dairy Science. 85:2964-2973.

Bayat, A.R., Tapio, I., Vilkki, J., Shingfield, K.J. and Leskinen, H. 2018. Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield. Journal of Dairy Science. 101:1136-1151.

Beauchemin, K.A. and McGinn, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of rumaric acid, essential oil, and canola oil. Journal of Animal Science. 84:1489-1496.

Beuvink, J.M.W., Spoelstra, S.F. and Hogendorp, R.J. 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Netherlands Journal of Agricultural Science. 40(4):401-407.

Bharanidharan, R., Arokiyaraj, S., Kim, E.B., Lee, C.H., Woo, Y.W., Na, Y., Kim, D. and Kim, K.H. 2018. Ruminal methane emissions, metabolic, and microbial profile of Holstein steers fed forage and concentrate, separately or as a total mixed ration. PLoS ONE. 13(8):e0202446.

Bharanidharan, R., Woo, Y.W., Lee, C.H., Na, Y., Kim, D.H. and Kim, K.H. 2018. Effect of feeding method on methane production per dry matter intake in Holstein steers. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 38(4):260-265.

Boadi, D.A. and Wittenberg, K.M. 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF6) tracer gas technique. Canadian Journal of Animal Science. 82:201-206.

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

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(9):1768-1771.

Garcia, F., Colombatto, D., Alejandra Brunetti, M., José Martínez, M., Valeria Moreno, M., Carolina Scorcione Turcato, M., Lucini, E., Frossasco, G. and Martínez Ferrer, J. 2020. The reduction of methane production in the in vitro ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. Animals. 10(5):786.

Granja-Salcedo, Y.T., Fernandes, R.M., Araujo, R.C., Kishi, L.T., Berchielli, T.T., Resende, F.D., Berndt, A. and Siqueira, G.R. 2019. Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. Frontiers in Microbiology. 10:614.

Grobner, M.A., Johnson, D.E., Goodall, S.R. and Benz, D.A. 1982. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. Journal of Animal Science. 33:64-66.

Holter, J.B., Urban, W.E., Hayes, H.H. and Davis, J.A. 1977. Utilization of diet components fed blended or separately to lactating cows. Journal of Dairy Science. 60:1288-1293.

Hook, S.E., Steele, M.A., Northwood, K.S., Wright, A.G. and McBride, B.W. 2011. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. Microbial Ecology. 62:94-105.

Hristov, A.N., Ropp, J.K., Grandeen, K.L., Abedi, S., Etter, R.P., Melgar, A. and Foley, A.E. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. Journal of Animal Science. 83:408-421.

Hünerberg, M., McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Entz, T., Okine, E.K., Harstad, O.M. and McAllister, T.A. 2015. Impact of ruminal pH on enteric methane emissions. Journal of Animal Science. 93(4):1760-6.

IPCC. 2014. Intergovernmental panel on climate change (IPCC) climate change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. Cambridge University Press, New York.

Irmgard, I. 1996. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. Environmental Monitoring Assessment. 42:57-72.

Johnson, K.A. and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science. 73:2483-2492.

Kim, K.H., Kim, K.S., Lee, S.C., Oh, Y.G., Chung, C.S. and Kim, K.J. 2003. Effects of total mixed rations on ruminal characteristics, digestibility and beef production of Hanwoo steers. Journal of Animal Science and Technology. 45(3):387-396.

Lana, R.P., Russell, J.B. and Van Amburgh, M.E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. Journal of Animal Science. 76:2190-2196.

Lascano, G.J. and Heinrichs, A.J. 2009. Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. Livestock Science. 124:48-57.

Lee, Y., Bharanidharana, R., Park, J., Jang, S.S., Yeo, J.M., Kim, W.Y. and Kim, K.H. 2016. Comparison of methane production of Holstein steers fed forage and concentrates separately or as a TMR. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 36(2):104-108.

Li, D.Y., Lee, S.S., Choi, N.J., Lee, S.Y., Sung, H.G., Ko, J.Y., Yun, S.G. and Ha, J.K. 2003. Effects of feeding system on rumen fermentation parameters and nutrient digestibility in Holstein steers. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 16(10):1482-1486.

Liu, Y.F., Sun, F.F., Wan, F.C., Zhao, H.B., Liu, X.M., You, W., Cheng, H.J., Liu, G.F., Tan, X.W. and Song, E.L. 2016. Effects of three feeding systems on production performance, rumen fermentation and rumen digesta particle structure of beef cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 29(5):659-665.

Pinares-Patiño, C.S., Baumont, R. and Martin, C. 2003. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. Canadian Journal of Animal Science. 83(4):769-777.

RDA. 2018. Korean feeding standards for Hanwoo.

Roque, B.M., Salwen, J.K., Kinley, R. and Kebreab, E. 2019. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. Journal of Cleaner Production. 234:132-138.

Sallam, S.M.A., Nasser, M.E.A., El-Waziry, A.M., Bueno, I.C.S. and Abdalla, A.L. 2007. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate some ruminant feedstuffs. Journal of Applied Sciences Research. 3(1):34-41.

Schroeder, G.F., Delahoy, J.E., Vidaurreta, I., Bargo, F., Gagliostro, G.A. and Muller, L.D. 2003. Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. Journal of Dairy Science. 86:3237-3248.

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology. 48(3-4):185-197.

Van Kessel, J.A.S. and Russell, J.B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiology Ecology. 20(4):205-210.

Van Zijderveld, S.M., Gerrits, W.J.J., Dijkstra, J., Newbold, J.R., Hulshof, R.B.A. and Perdok, H.B. 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. Journal of Dairy Science. 94:4028-4038.

Waghorn, G.C., Tavendale, M.H. and Woodfield, D.R. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. Proceedings of the New Zealand Grassland Association. 64:167-171.

Williams, S.R.O., Hannah, M.C., Jacobs, J.L., Wales, W.J. and Moate, P.J. 2019. Volatile fatty acids in ruminal fluid can be used to predict methane yield of dairy cows. Animals. 9(12):1006.

(Received : April 23, 2021 | Revised : June 9, 2021 | Accepted : June 18, 2021)