

Research Article

단일 및 복합 미생물 접종이 곰팡이독소 오염 벯짚의 사일리지 및 *In situ* 섬유소 소화율에 미치는 영향

성하균*

상지대학교 동물자원학과

The Effect of Single and Mixed Microbial Inoculation on the *in situ* Fiber Digestibility and Silage of Rice Straw Contaminated Mycotoxins

Ha Guyn Sung

Department of Animal Science, Sangji University, Wonju 26339, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the efficacy of adding the microbial inoculants to silage for reducing mycotoxins in rice straw silage. When a single agent of *L. plantarum* and a mixed agent of *L. plantarum* and *S. cerevisiae* were added in rice straw silage contaminated mycotoxins, it had an effect on silage fermentation and fiber degradation as well as mycotoxin reduction. Among the mycotoxins, only ochratoxin A and zearalenone were found in the test sample. Ochratoxin A and zearalenone showed a decreasing trend with the addition of silage inoculants compared to the control groups (38.11±2.22 and 633.67±50.30 µg/kg), and there was a significant difference at the mixed agents; 27.78±2.28 and 392.72±25.04 µg/kg, respectively ($p<0.05$). The pH was lower in the single agent and the mixed agent compared to the control ($p<0.05$). The concentration of lactic acid was higher in the single agent (11.73±0.31 mM) than in the control group (8.18±0.93 mM), and the highest concentration was 16.01±0.88 mM in the mixed agent ($p<0.05$). Acetic acid and propionic acid were found to be significantly lowered with the addition of silage inoculants ($p<0.05$). Total VFA was also lower at the addition of silage inoculants than the control group ($p<0.05$). The rumen *in situ* dry matter degradation of NDF and ADF was maintained at the highest levels of the mixed agent during the culture period, followed by the single agent and the control group at the lowest level. NDF and ADF degradation showed a significant difference at all time points after 12 and 24 hours of culture, respectively ($p<0.05$). The study results showed that the silage inoculants had the positive effects on quality increasing of rice straw silage; fermentative characteristics, fiber degradation and mycotoxins reduction. Ochratoxin A and zearalenone were greater reduction by adding bacterial inoculants of silage. Therefore it is considered that *L. plantarum* and *S. cerevisiae* will improve the quality and stability with remediation of mycotoxin in silage.

(Key words: *L. plantarum*, *S. cerevisiae* Mycotoxin, Rice straw, Silage)

I. 서론

곰팡이독소(Mycotoxin)는 곰팡이의 2차 대사물로 농후사료, 청초, 건초, 사일리지 등 다양한 사료에 존재한다(Ogunade et al., 2018; Yanga et al., 2020). 자연적 발생 곰팡이는 500종 이상이 확인되었고, aflatoxin B1 (AFB1), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), fumonisin B1 (FB1) 등이 주로 사료원료에서 발견되고 있다(Liu et al., 2022). 이들 mycotoxin에 대하여 반추동물은 단위동물에 비하여 덜 예민할 뿐만 아니라 반추위 미생물(프로토조아 및 박테리아)은 여러 mycotoxin을 분해하고 비활

성화시킬 수 있다(Wambacq et al., 2016). 그러나 반추위 미생물에 의한 mycotoxin의 해독 능력은 사료성분 변화 또는 반추위 산중독과 같은 대사성 질병 상태에 따라 제한적이고 다양하게 나타난다(Upadhaya et al., 2010; Rodrigues, 2014). 그리고 일부 mycotoxin은 항균력을 가지고 있어 만성적으로 반추위 미생물 생태계를 파쇄하여 반추위 산중독을 일으킬 수 있으며, 사료 효율 및 생산성을 감소시킨다고 보고되었다(Fink-Gremmels, 2008; Wambacq et al., 2016). 따라서 이들 mycotoxin 오염 예방 및 제거를 위한 연구는 반추동물 연구자들에 지속적인 관심의 대상이 되어오고 있다(Ogunade et al., 2018; Liu et al., 2022).

*Corresponding author: Ha Guyn Sung, Dept. of Animal Science, Sangji University, Wonju, 26339, Korea
Tel: +82-33-730-0536, Fax: +82-33-730-0594, E-mail: haguyn@hanmail.net

조사료의 대표적 저장형태인 사일리지뿐만 아니라 사일리지 제조 전 단계에서도 mycotoxin의 오염 심각성은 세계적으로 많은 곳에서 보고되고 있다(Wambacq et al., 2016; Manni et al., 2022). 우리나라의 대표적 자급 사료 중 하나인 벯짚도 mycotoxin에 노출되어 있음이 보고된 바 있다(Sung et al., 2011; Sung, 2013). Sung et al. (2011)은 조사한 시료 중 곰팡이 독소가 두 종류 이상 검출된 샘플이 12%나 되었으며, 검출 수준은 ochratoxin A (1.0~5.8 ug/kg), deoxynivalenol (DON, 156.0~776.7 ug/kg) 및 zearalenone (ZON, 38.0~750.0 ug/kg) 이었다. 그리고 국내 생산 벯의 생육 단계, 벯짚의 보관 형태 및 지역에 상관없이 곰팡이독소 오염에 노출되어 있었다(Sung et al., 2011).

사일리지 품질을 높이기 위하여 다양한 발효촉진 첨가물을 사용하고 있으며, 품질 개선에 대한 연구 결과가 보고되고 있다(Li et al., 2010; Oladosu et al., 2016). 사일리지 발효촉진을 위한 미생물제 사용은 사일리지의 빠른 pH 감소 및 lactic acid 증가로 사일리지 품질 유지에 도움을 준다(Weinberg and Muck, 1996). Rooke et al. (1988)와 Cho et al.(2015)의 연구에서도 발효 미생물제 첨가로 lactic acid 증가 그리고 pH, acetic acid 및 butric acid의 감소를 보고하였다. 사일리지의 저장기간 동안 유산균 발효는 pH 하강 및 혐기성 증진으로 곰팡이 성장을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Pahlow et al., 2003; Oliveira et al., 2017), 국내에서도 벯짚 사일리지에 발효촉진 미생물 첨가로 발효 및 품질 향상에 대한 효과는 여러 연구에서 보고된 바 있다(Lee et al., 2014; Kim et al., 2017). 그러나 이들 연구는 발효제 첨가로 발효 및 혐기성 증진을 통한 곰팡이 발생 및 부패 억제로 사일리지 품질 향상에 대한 결과들로 기존 곰팡이 독소가 오염된 원료의 사일리지 제조에 따른 곰팡이독소 변화에 어떠한 영향을 주었는지에 대한 내용은 발견하기가 어려운 실정이다.

따라서 사일리지 원료에 곰팡이독소가 오염되었을 경우 사일리지 발효촉진 미생물을 첨가하여 사일리지를 제조하였을 때 곰팡이독소 함량 변화를 조사하기 위하여 본 연구는 곰팡이가 오염된 벯짚에 유산균 단일제 및 유산균과 효모 복합제를 처리가 사일리지의 mycotoxin 함량, 발효 품질 및 섬유소 소화에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 곰팡이독소 오염 벯짚 준비 및 사일리지 제조

Mycotoxin을 분비하는 곰팡이로 알려진 *Fusarium sp.*와 *Aspergillus sp.*는 벯짚곤포 사일리지에서 분리되었으며, 이들 곰팡이를 각각 PDB배지에서 25℃에서 5일간 배양하여 배양물을

준비하였다(Sung, 2013). 준비된 mycotoxin 분비 곰팡이 배양물을 2.5-3.0cm로 세절한 벯짚에 2% 수준으로 분주하여 실험용 mycotoxin 오염 벯짚을 준비하였다.

실험용 벯짚 사일리지는 준비된 mycotoxin 오염 벯짚에 발효 촉진 미생물 제제로서 유산균 단일제와 유산균과 효모 혼합제를 처리하여 제조하였다. 유산균 단일제는 *L. plantarum* (1010 CFU/g, MPL, Korea)를 단독 사용하고, 유산균과 효모 혼합제는 *L. plantarum* (1010 CFU/g, MPL, Korea)과 *Saccharomyces cerevisiae* (109 CFU/g, MPL, Korea)을 1:1로 혼합하여 준비되었다. 각각의 단일제 및 혼합제는 벯짚 kg당 0.004g이 되도록 멸균된 일반수로 희석하여 분무처리 하였으며, 최종적으로 사일리지의 수분이 65%가 되도록 하였고, 각각 처리구별 3개씩 용량 20L 밀폐용 플라스틱 용기에 담압 및 밀폐하여 준비하였다. 그리고 대조구는 미생물제가 첨가되지 않고 수분함량은 동일하게 준비하였으며, 모든 처리구는 3개월 동안 저장 후 개봉하여 분석에 사용하였다.

2. 사일리지의 mycotoxin 조사

Mycotoxin 조사는 처리구별 각각의 시료를 HPLC (UltiMate™ 3000 UHPLC System, Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 aflatoxins(B1, B2, G1, G2), zearalenone, deoxynivalenol, fumonisin (B1, B2), ochratoxins A를 분석하여 처리구별 사일리지의 mycotoxin 함량 차이를 조사하였다.

건조 및 분쇄한 처리구별 사일리지 샘플을 10g씩 채취하여 20ml의 acetonitrile로 30분간 진탕 추출한 후 5분간 원심분리한 뒤 상층액 10ml을 취해 Oasis HLB SPE cartridge (200mg, 6cc)를 사용하여 추출액을 정제하고, 증류수로 세척한 후 시료를 6ml의 100% methanol을 사용하여 용출시켰다. 용출된 시료를 50℃에서 N₂ gas를 사용하여 건조하고 1 mL의 methanol/ammonium acetate(10 mmol/L)(1:1, v/v)의 혼합용매로 다시 용해시킨 후 분석에 사용하였다. 시료의 aflatoxin, ochratoxin, zearalenone 및 fumonisin 분석은 HPLC를 이용한 선행연구(Li et al., 1997; Caloni et al., 2000; Akiyama et al., 2001; Hammond et al., 2004)에서 사용한 방법을 기초로 fluorescence detector를 사용하여 측정하였다. DON은 Mateo et al. (2001) 및 Visconti and Pascales (1998)가 사용한 HPLC 방법을 기초로 UV detector를 사용하였다.

3. 사일리지의 pH 및 유기산 조사

각 처리구별 사일리지의 pH 측정은 각 시료 25g을 증류수 125ml에 넣어 4℃ 냉장 조건에서 24시간 진탕한 후 4중 거르로 1차 거른 뒤 여과지(Whatman No. 6)를 통과한 추출액을 pH 미

터측정기(HI 9024; HANNA Instrument Inc., UK)를 이용하여 측정하였다.

유기산 분석을 위한 사일리지 추출액은 0.22um 실린지 필터를 사용하여 여과하였고, 분석에 이용할 때까지 -70℃에서 냉동 보관 관리하였다. VFA는 Gas Chromatography (6890N, Agilent Co., USA)를 이용하여 Fussell and McCalley (1987)가 제시한 80/120 mesh Carboxpack, B-DA/4% Carbowax (Supelco Inc., Bellefonte, PA, Catalog No. 1-1889) 컬럼을 이용하여 분석하였다. Lactic acid는 HPLC (UltiMate™ 3000 UHPLC System, Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 분석하였다(Megias et al., 1993; Madrid et al., 1999).

4. NDF 및 ADF의 *in situ* 분해율 분석

In situ 실험을 위하여 반추위에 캐놀라가 설치된 550 kg 거세 한우 3두를 사용하였고, NDF 및 ADF의 *in situ* 분해율을 평가하였다.

In situ 소화율 시험은 nylon bag technique (Mehrez and Orskov, 1977)을 개량하여 100 mesh (0.149 mm) 나일론 천을 9 × 15 cm 크기로 제작한 nylon bag에 4.0 g 정도의 시료를 넣고 입구를 봉하여 준비하였다. 그리고 준비된 nylon bag 시료는 공 사축의 rumen fistula를 통하여 반추위 후부 깊숙이 넣어 0, 12, 24, 48 및 72시간까지 방치하였다. 시간대별 3반복으로 회수한 nylon bag은 흐르는 멸균 증류수에 맑은 물이 나올 때까지 가볍게 세척 후 55℃에서 48시간 건조하여 분석 시료로 사용하였다.

NDF 및 ADF 분해율은 *in situ* 실시 전과 후의 시료의 NDF 및 ADF 함량 차이를 백분율로 환산하여 평가하였으며, NDF와 ADF 함량은 Van Soest et al. (1991)과 Goering and Van Soest (1970)의 방법으로 분석하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 모든 자료에 대한 통계분석은 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 2017)를 이용하여 처리 평균치 간의 유의성 분석은 one-way ANOVA에 의거하여 5% 수준에서 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 곰팡이독소 함량에 미치는 영향

사일리지 발효제로서 *L. plantarum* 단일제 및 *L. plantarum* 과 *Saccharomyces cerevisiae*의 혼합제를 곰팡이독소에 오염된 볏짚에 첨가하여 사일리지를 제조하였을 때 곰팡이독소 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다.

제조한 모든 실험구의 사일리지 시료에서 조사된 곰팡이독소 중 aflatoxin B1, B2, G1, G2, fumonisin B1, B2, deoxynivalenol은 검출되지 않았고, ochratoxin과 zearalenone만 검출되었다. 그리고 ochratoxin과 zearalenone의 함량은 발효제를 첨가하여 제조한 모든 사일리지 시료에서 감소하는 현상을 발견하였다. Ochratoxin A는 유산균 단일제와 유산균과 효모 혼합제를 첨가 제조한 사일 리지는 각각 33.41±3.39 및 27.78±2.28 ug/kg 수준으로 무첨가 대조구의 38.11±2.22 ug/kg 수준에 비하여 낮은 함량을 나타냈다 ($p<0.05$). Zearalenone에서도 유산균 단일제와 유산균과 효모 혼합제를 첨가 제조한 사일리지가 무첨가 대조구에 비하여 감소 하는 경향을 보였으며, 유산균과 효모 혼합제 첨가 사일리지 (392.72±25.04 ug/kg)가 유산균 단일제(608.66±23.12 ug/kg) 및 무첨가 대조구(633.67±50.30 ug/kg)에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 나타내었다($p<0.05$).

Table 1. The effects of single and mixed microbial inoculation on mycotoxin contents in rice straw silage contaminated mycotoxins (unit: ug/kg)

Item	Control	Single Mic.	Mixed Mic.
Aflatoxin B ¹	ND	ND	ND
Aflatoxin B ²	ND	ND	ND
Aflatoxin G ¹	ND	ND	ND
Aflatoxin G ²	ND	ND	ND
Ocharatoxin A	38.11±2.22 ^a	33.41±3.39 ^{ab}	27.78±2.28 ^b
Fumonisin B ¹	ND	ND	ND
Fumonisin B ²	ND	ND	ND
Deoxynivalenol	ND	ND	ND
Zearalenone	633.67±50.30 ^a	608.66±23.12 ^a	392.72±25.04 ^b

ND: not detected.

^{a, b} Means with different superscripts in same row differ significantly ($p<0.05$).

사일리지의 저장기간 동안 낮은 pH 및 혐기상태는 부패 및 곰팡이의 성장을 억제하고, 사일리지 내 곰팡이독소 생성을 감소시킨다(Pahlow et al., 2003). 사일리지 유산균은 사일리지의 발효와 혐기성을 증진하고 곰팡이 성장을 억제하는 역할은 잘 알려져 있으며(Ranjit and Kung, 2000; Mari et al., 2009; Oliveira et al., 2017), 이들은 유기성 곰팡이독소 바인더로서도 역할을 할 수 있다(Weinberg et al., 2003; Niderkorn et al., 2006). 본 연구에서도 이상의 연구 결과와 유사하게 유산균을 첨가한 발효 사일리지에서 pH 저하와 시료에서 검출된 곰팡이독소(Ochratoxin A, Zearalenone)의 감소를 발견할 수 있었다.

Gourama와 Bullerman (1995) 및 Ahlberg et al. (2015)은 유산균들이 *in vitro* 사일리지에서 곰팡이독소를 완화할 수 있음을 보고하였고, Niderkorn et al. (2007)은 *Lactobacillus* 및 *Leuconostoc* 균주류가 zearalenone을 α -zearalenol으로 변환시키는 것을 *in vitro* 사일리지 모델 연구에서 보고하였다. 그리고 Piotrowska and Zakowska (2000)도 *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. sanfrancisco*가 ochratoxin A를 분해함을 보고하였고, *S. cerevisiae*도 ochratoxin A를 분해함을 보고하였다. 유산균과 효모를 사용한 본 연구에서도 사일리지 발효제로서 *L. plantarum*만 사용한 단일제에서도 곰팡이독소 감소를 발견하였을 뿐만 아니라 *L. plantarum*과 *Saccharomyces cerevisiae*를 함께 사용한 혼합제를 첨가하였을 때는 곰팡이독소 감소가 더 크게 나타났다. 따라서 사일리지 내 다양한 미생물들이 곰팡이독소를 분해하는 역할에 대한 지속적 연구와 함께 이들의 활용은 사일리지의 품질 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다.

2. pH 및 유기산 함량에 미치는 영향

곰팡이독소가 오염된 볏짚에 사일리지 발효제 첨가에 따른 pH 및 유기산 함량의 변화는 Table 2와 같다. pH, lactic acid, acetic

acid, propionic acid 및 total VFA는 발효제 첨가구와 대조구간에 유의적 차이를 나타내었다. pH는 대조구(4.56±0.06)에 비하여 단일제(4.25±0.01) 및 혼합제(4.23±0.02)에서 낮게 나타났으나 ($p<0.05$), 발효제 처리 사이에는 유의적 차이가 발견되지 않았다. Lactic acid는 대조구의 8.18±0.93 mM에 비하여 발효제 처리구 모두 높은 수준을 나타내었으며, 단일제의 11.73±0.31 mM에 비하여 혼합제(16.01±0.88 mM)가 더 높은 수준을 나타내었다 ($p<0.05$). Acetic acid와 propionic acid는 대조구가 각각 2.94±0.34 및 0.48±0.07 mM의 수준이었고, 발효제 첨가에 따라 유의적으로 낮았다($p<0.05$). total VFA도 발효제 첨가구 대조구에 비하여 낮았다 ($p<0.05$).

사일리지의 발효 목적 중 하나는 pH의 신속 하강으로 4.0~4.7 수준은 발효 안정화를 이룰 수 있으며(Cho et al., 2014), 유기산 함량 비율을 기준으로 lactic acid는 70% 이상, acetic acid는 22% 이하, 및 butyric acid는 3% 미만인 우수한 품질의 사일리지로 분류될 수 있다(Mohd-Setapar et al., 2012). 그리고 사일리지 발효촉진을 위한 미생물제 사용은 사일리지의 빠른 pH 감소와 lactic acid 함량 증가 및 NH₃-N 감소에 도움을 준다고 보고하였다(Weinberg and Muck, 1996). 발효 미생물제 첨가로 lactic acid 증가와 pH, acetic acid 및 butyric acid가 감소 되었음을 여러 연구에서도 보고 되었다(Rooke et al., 1988; Choi et al., 2015). 또한 Kim et al. (2017)는 볏짚 사일리지에 여러 종의 유산균을 사용하였을 때 사일리지의 pH뿐만 아니라 acetic acid, butyric acid와 NH₃-N는 감소하였고, lactic acid는 증가하였다고 보고 하였다. 본 연구에서도 사일리지 발효제를 첨가하였을 때 pH 수준 하강뿐만 아니라 acetic acid 함량이 감소하였고, lactic acid 함량이 유의적으로 증가 하였다($p<0.05$). 이상의 결과들을 통하여 사일리지 발효제의 사용은 사일리지의 발효 품질을 효율적으로 개선할 수 있는 좋은 방법임이 확인되었고, 이러한 개선 효과는 곰팡이가 오염된 볏짚 사일리지에서도 동일하게 나타나는 것을

Table 2. The effects of single and mixed microbial inoculation on pH and organic acid in rice straw silage contaminated mycotoxins

Item	Control	Single Mic.	Mixed Mic.
pH	4.56±0.06 ^a	4.25±0.01 ^b	4.23±0.02 ^b
Lactic acid (mM)	8.18±0.93 ^c	11.73±0.31 ^b	16.01±0.88 ^a
Acetic acid (mM)	2.94±0.34 ^a	1.56±0.22 ^b	2.23±0.46 ^b
Propionic acid (mM)	0.48±0.07 ^a	0.04±0.01 ^b	0.04±0.01 ^b
Butyric acid (mM)	0.44±0.13	0.54±0.27	0.52±0.11
Total VFA (mM)	3.86±0.17 ^a	2.13±0.43 ^b	2.79±0.34 ^b
Lc/Total acid	0.68±0.02 ^b	0.85±0.03 ^b	0.85±0.01 ^a

ND: not detected.

Lc/Total: lactic acid/total acid.

VFA: volatile fatty acids.

^a, ^b, ^c means with different superscripts in same row differ significantly ($p<0.05$).

확인할 수 있었다.

3. 반추위 *in situ* NDF 및 ADF 분해에 미치는 영향

사일리지 발효제를 곰팡이독소 오염 벼짚에 첨가하여 사일리지를 제조하였을 때 NDF 및 ADF의 반추위 *in situ* 분해율은 모든 실험구에서 배양 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 발효제 첨가로 개선되는 경향을 발견하였다(Fig. 1과 2).

반추위 미생물에 의한 NDF 분해율은 사일리지 발효제 첨가구 모두가 대조구에 비하여 높은 분해율을 보이며 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*의 혼합제가 가장 높은 수준의 분해율을 유지하였고, 다음으로 *L. plantarum* 단일제가 높았으며, 대조구가 가장 낮은 수준을 유지하였다. 그리고 배양 12시간의 혼합제, 단일제 및 대조구의 NDF 분해율은 각각 4.03 ± 0.71 %, 5.53 ± 0.41 % 및 8.43 ± 0.99 % 수준으로 배양 모든 시간대에서 실험구간 유의차를 나타내었다($p < 0.05$).

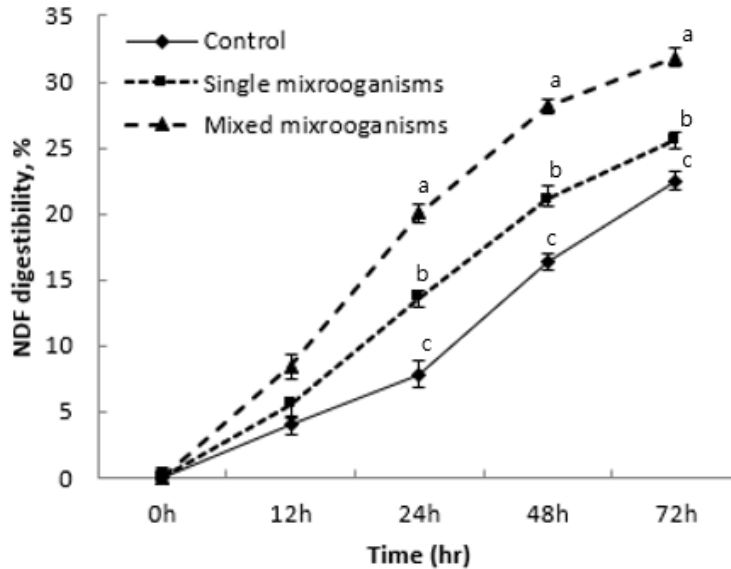


Fig. 1. The effects of single and mixed microbial inoculation on NDF degradability of rice straw silage contaminated mycotoxins by the rumen *in situ*. ^a, ^b, ^c means with different superscripts in same row differ significantly ($p < 0.05$).

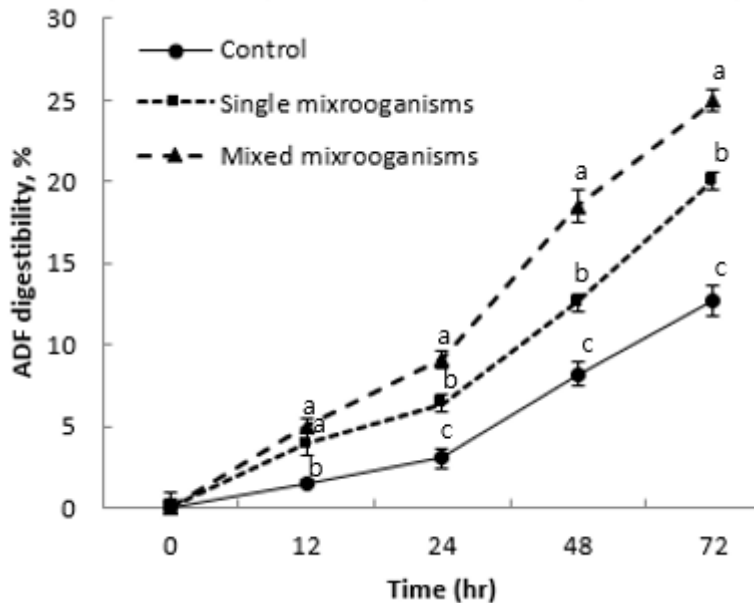


Fig. 2. The effects of single and mixed microbial inoculation on ADF degradability of rice straw silage contaminated mycotoxins by the rumen *in situ*. ^a, ^b, ^c means with different superscripts in same row differ significantly ($p < 0.05$).

ADF 분해율도 배양시간 동안 NDF 분해율과 같이 사일리지 발효제 첨가구 모두가 대조구에 비하여 높은 분해율을 보였으며, 혼합제가 가장 높은 수준의 분해율을 유지하였고, 다음으로 단일제가 높았으며, 대조구가 가장 낮은 수준을 유지하였다(Fig. 2). 배양 12시간의 대조구, 단일제 및 혼합제의 ADF 분해율은 각각 1.51 ± 0.46 %, 3.97 ± 0.93 % 및 4.98 ± 0.36 % 수준으로 모든 발효제 첨가구가 대조구에 비하여 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 첨가구 간에는 유의적인 차이는 없었다. 배양 24시간의 혼합제, 단일제 및 대조구의 NDF 분해율은 각각 9.13 ± 0.48 %, 6.38 ± 0.77 % 및 3.00 ± 0.22 % 수준으로 처리구간에 유의적인 차이를 보였으며($p < 0.05$), 48, 72시간에도 같은 경향을 나타내었다.

Kim et al. (2017)은 총체벼 사일리지 제조시 유산균을 발효 촉진제로 사용하였을 때 *in vitro* 건물 분해율 증진을 보고하였고, Aksu et al. (2004)는 옥수수 사일리지의 건물 소화율 및 NDF 소화율의 증가를 보고하였다. 본 연구에서도 NDF 및 ADF의 반추위 *in situ* 분해율이 사일리지 발효제를 첨가한 단일제뿐만 아니라 혼합제에서 크게 증진하는 것을 발견하였다($p < 0.05$). 이상과 같이 발효제를 첨가한 사일지를 급여한 육우(Keady and Steen, 1994) 그리고 유우(Mayne, 1990)에서도 분해율 증진이 보고된 바 있다. 그리고 Uyeno et al. (2016)은 사일리지 발효 공정이 *R. albus*와 *R. flavefaciens*와 같은 주요 반추위 섬유소 박테리아의 활성을 증진하여 섬유소 분해가 증진됨을 보고하였다. 본 연구에서는 사일리지 발효제로서 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*의 혼합제를 사용하여 분해율에 가장 좋은 영향을 주었고, 섬유소를 분해하는 사일리지용 미생물에 대한 지속적 연구와 이들의 활용은 사일리지의 소화율 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다.

IV. 요약

본 연구는 사일리지 발효제 첨가가 볏짚 사일리지에서 곰팡이 독소 및 *in situ* 섬유소 소화율에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다. 사일리지 발효제로 *L. plantarum* 단일제 및 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*의 혼합제를 첨가하였을 때 사일리지의 발효 및 섬유소 분해에 영향을 주었을 뿐만 아니라 곰팡이독소 감소에도 영향을 주었다.

시험 시료에서 곰팡이독소 중 ochratoxin A 및 zearalenone만 발견되었다. Ochratoxin A 및 zearalenone는 대조구에서 각각 38.11 ± 2.22 및 633.67 ± 50.30 ug/kg 수준으로 발효제 첨가로 감소 경향이 나타났고, 혼합제에서만 각각 27.78 ± 2.28 및 392.72 ± 25.04 ug/kg 수준으로 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). pH는 대조구에 비하여 단일제 및 혼합제에서 낮았고($p < 0.05$), lactic acid는 대조구(8.18 ± 0.93 mM)에 비하여 단일제(11.73 ± 0.31 mM)가 높

았고, 혼합제(16.01 ± 0.88 mM)에서 가장 높은 수준을 나타내었다($p < 0.05$). Acetic acid와 propionic acid는 발효제 첨가에 따라 유의적으로 낮아짐을 발견하였다($p < 0.05$). 그리고 total VFA도 발효제 첨가가 대조구에 비하여 낮았다($p < 0.05$). NDF 및 ADF의 반추위 *in situ* 분해율은 배양기간 동안 혼합제가 가장 높은 수준의 분해율을 유지하였고, 다음으로 단일제가 높았으며, 대조구가 가장 낮은 수준을 유지하였다. 그리고 이들 NDF 및 ADF 분해율은 각각 배양 12 및 24시간 이후 모든 시간대에서 실험구간 유의 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

이상의 연구 결과는 볏짚 사일리지 제조에서 사일리지 발효제 사용은 발효 및 섬유소 분해에 영향을 주었을 뿐만 아니라 곰팡이독소 감소에도 영향을 주었다. 그리고 곰팡이독소 감소는 *L. plantarum* 단일제보다 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae* 혼합제의 효능이 더 크게 나타났다. 따라서 사일리지 조제를 위한 발효제로 *L. plantarum*과 *L. plantarum* 첨가제의 사용은 사일리지의 품질과 안정성을 더 증진할 것으로 사료 된다.

V. 사 사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2020R1F1A1076625). 이에 감사드립니다.

VI. REFERENCES

- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V. and Korhonen, H.J. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. International Journal of Food Microbiology. 207:87-102. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T. and Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. Journal of Chromatography. 932:153-157. doi:10.1016/s0021-9673(01)01211-0
- Caloni, F., Spotti, M., Auerbach, H., Op den Camp, H., Fonk, G.J. and Pompa, G. 2000. *In vitro* metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. Veterinary Research Communications. 24:379-387. doi:10.1023/a:1006422200226
- Cho, S., Kwon, C.H. and Kim, E.J. 2014. Effects of bacterial inoculants and organic acids on silage quality: Meta-analysis. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 34:94-102. doi:10.5333/KGFS.2014.34.2.94

Silage of Rice Straw Contaminated Mycotoxins

- Choi, K.C., Ilavenil, S., Arasu, M.V., Park, H.S. and Kim, W.H. 2015. Effect of addition of chlorella and lactic acid bacteria on nutritive value and fermentation quality of fresh rice straw silage. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*. 35:159-165. doi:10.5333/KGFS.2015.35.2.159
- Fink-Gremmels, J. 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Veterinary Journal*. 176:84-92. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.034
- Fussel, R.J. and McCalley, D.V. 1987. Determination of volatile fatty acids(C2-C5) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst*. 112:1213-1216. doi:10.1039/an9871201213
- Goering, H. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. *Agric. Handb.* 379. US Department of Agriculture, Washington, DC.
- Gourama, H. and Bullerman, L.B. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*. 58:1249-1256. doi:10.4315/0362-028X-58.11.1249
- Hammond, B.G., Campbell, K.W., Pilcher, C.D., DeGooyer, T.A., Robinson, A.E., McMillen, B.I., Spangler, S.M., Riordan, S.G., Rice, L.G. and Richard, J.L. 2004. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United State in 2000-2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:1390-1397. doi:10.1021/jf030441c
- Keady, T.W.J. and Steen, R.W.J. 1994. Effects of treating low dry-matter grass with a bacterial inoculant on the intake and performance of beef cattle and studies on its mode of action. *Grass Forage Science*. 49:438-446. doi:10.1111/j.1365-2494.1995.tb02317.x
- Kim, J.G., 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 Grassland Science*. 28:229-236. doi:10.5333/KGFS.2008.28.3.229
- Kim, J.G., Ham, J.S., Li, Y.W., Park, H.S., Huh, C.S. and Park, B.C. 2017. Development of a new lactic acid bacterial inoculant for fresh rice straw silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 30:950-956. doi:10.5713/ajas.17.0287
- Lee, S.M., Guan, L.L., Eun, J.S., Kim, C.H., Lee, S.J., Kim, E.T. and Lee, S.S. 2014. The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages. *Journal of Applied Microbiology*. 118:565-573. doi:10.1111/jam.12724
- Li, J., Shen, Y. and Cai, Y. 2010. Improvement of fermentation quality of rice straw silage by application of a bacterial inoculant and glucose. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23:901-906. doi:10.5713/ajas.2010.90403
- Li, S., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Vitti, T.G. and Crow, G. 1997. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 145:82-90. doi:10.1006/taap.1997.8155
- Liu, M., Zhao, L., Gong, G., Zhang, L., Shi, L., Dai, J., Han, Y., Wu, Y., Khalil, M.M. and Sun, L. 2022. Invited review: Remediation strategies for mycotoxin control in feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 13:1-16. doi:10.1186/s40104-021-00661-4
- Madrid, J., Martínez-Teruel, A., Hernández, F. and Megías, M.D. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:1722-1726. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1722::AID-JSFA427>3.0.CO;2-S
- Manni, K., Ramo, S., Franco, M., Rinne, M. and Huuskonen, A. 2022. Occurrence of mycotoxins in grass and whole-crop cereal silages-A farm survey. *Agriculture*. 398:1-15. doi:10.3390/agriculture12030398
- Mari, L.J., Schmidt, R.J., Nussio, L.G., Hallada, C.M. and Kung, L. 2009. Short communication: An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. *Journal of Dairy Science*. 92:1174-1176. doi:10.3168/jds.2008-1700
- Mateo, J.J., Liorens, A., Mateo, R. and Jimenez, M. 2001. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography*. 918:99-112.
- Mayne, C.S. 1990. An evaluation of an inoculant of *Lactobacillus plantarum* as an additive for grass silage for dairy cattle. *Animal Production*. 51:1-3. doi:10.1016/S0021-9673(01)00704-X
- Megias, M.D., Martinez-Teruel, A., Gallego, J.A. and Nunfiez, J.M. 1993. Chemical changes during ensiling of orange peel. *Animal Feed Science and Technology*. 43:269-274. doi:10.1016/0377-8401(93)90082-U
- Mehrez, A.A. and Orskov, E.R. 1977. A study of the artificial bac technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*. 88:645-652. doi:10.1071/AR98169
- Mohd-Setapar, S.H., Abd-Talib, N. and Aziz, R. 2012. Review on crucial parameters of silage quality. *APCBEE Procedia*. 3:99-103. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.053
- Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D. 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*. 101:849-856. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x

Silage of Rice Straw Contaminated Mycotoxins

- Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Pujos, E., Tissandier, A. and Boudra, H. 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants*. 24:406-415. doi:10.1080/02652030601101110
- Ogunade, I.M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O.C.M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D. and Adesogan, A.T. 2018. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*. 101:4034-4059. doi:10.3168/jds.2017-13788
- Oladosu, Y., Mohd, Y., Rafii, L., Abdullah, N., Magaji, U., Hussin, G., Ramli, A. and Miah, G. 2016. Fermentation quality and additives: A case of rice straw silage. *BioMed Research International*. 7985167. doi:10.1155/2016/7985167
- Oliveira, A.S., Weinberg, Z.G., Ogunade, I.M., Cervantes, A.A.P., Arriola, K.G., Jiang, Y., Kim, D.H., Li, X., Goncalves, M.C.M., Vyas, D. and Adesogan, A.T. 2017. Meta-analysis of effects of homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria inoculation on silage fermentation and aerobic stability and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100:4587-4603.1176. doi:10.3168/jds.2016-11815
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O. and Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: D.R. Buxton, R.E. Muck and J.H. Harrison (Eds.), *Silage science and technology*. Madison, WI: Agron. Monogr. ASA. CSSA and SSSA. pp. 31-94.
- Piotrowska, M. and Zakowska, Z. 2000. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnology*. 17:307-310. doi:10.1016/S0921-0423(00)80085-4
- Ranjit, N.K. and Kung Jr, L. 2000. The effect of *Lactobacillus plantarum* and *L. buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*. 83:526-535. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5
- Rodrigues, I.A. 2014. A review on the effects of mycotoxins in dairy ruminants. *Animal Production Science*. 54:1155-1165. doi:10.1071/AN13492
- Rooke, J.A., Maya, F.M., Arnold, J.A. and Armstrong, D.G. 1988. The chemical composition and nutritive value of grass silage prepared with no additive or with the application of additives containing either *Lactobacillus plantarum* or formic acid. *Grass and Forage Science*. 43:87-95. First Published: March 1988. doi:10.1111/j.1365-2494.1988.tb02144.x
- SPSS. 2017. Statistical package for the social sciences. IBM SPSS Statistics 25.0. IBM Now York USA.
- Sung, H.G. 2013. The studies on real condition of mycotoxin contamination in the fields before harvest and by the storage of rice straw using as roughage in Korea. *Journal of the Korean Society of Grassland*. 33(1):21-29. doi:10.5333/KGFS.2013.33.1.21
- Sung, H.G., Lee, J.K. and Seo, S. 2011. Studies on fungi contamination and mycotoxins of rice straw round bale silage. *Journal of The Korean Society of Grassland Science*. 31:451-462. doi:10.5333/KGFS.2011.31.4.451
- Upadhaya, S.D., Park, M. and Ha, J.K. 2010. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23:1250-1260. doi:10.5713/ajas. 2010.r.06
- Uyeno, Y., Chao, W., Jayanegara, A., Kondo, M., Ban-Tokuda, T. and Matsui, H. 2016. Increase in rumen fibrolytic bacteria and the improvement of fiber degradability of ensiled total mixed ration assessed by *in vitro* rumen culture. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 4:183-186. doi:10.14737/journal.aavs/2016/4.4.183.186
- Van Soest, 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.
- Visconti, A. and Pascales, M. 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 31:133-140. doi:10.1016/s0021-9673(98)00296-9
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., Gelder, L.D. and Haesaert, G. 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96:2284-2302. doi:10.1002/jsfa.7565
- Weinberg, Z., Muck, R. and Weimer, P. 2003. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *Journal of Applied Microbiology*. 94:1066-1071. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01942.x
- Weinberg, Z.G. and Muck, R.E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*. 19:53-68. doi:10.1111/J.1574-6976.1996.TB00253.X
- Yanga, C., Songa, G. and Limb, W. 2020. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. *Journal of Hazardous Materials*. 389:1-10. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122087

(Received : August 16, 2022 | Revised : September 25, 2022 | Accepted : October 07, 2022)