

Research Article

옥수수 사일리지에서 미생물 첨가제와 저장기간이 발효 품질과 미생물 군집에 미치는 영향

정승민¹, 박형수¹, 우제훈¹, 김지혜², 김동현³, 최보람^{1,*}, 오미래^{1,*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 초지사료과, ²국립축산과학원 기획조정과, ³국립축산과학원 낙농과

Changes in Fermentation Characteristics and Microbial Community According to Microbial Additives and Storage Periods on Corn Silage

Seung Min Jeong¹, Hyung Soo Park¹, Jae Hoon Woo¹, Ji Hye Kim², Dong Hyun Kim³,
Bo Ram Choi¹ and Mirae Oh¹

¹Grassland and Forage Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 31000, Korea

²Planning and Coordination Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanju, 55365, Korea

³Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 31000, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to find a way to improve quality by observing changes in quality and microbial communities according to whether corn silage was treated with additives and the storage period, and to utilize them as basic research results. The experimental design was performed by 2×4 factor design, and the untreated (CON), and the additive inoculated (ADD) silage were stored and fermented for 30 (TH), 60 (ST), 90 (NT), and 120 (OHT) days, with each condition repeated 3 times. There was no change in the nutrient content of corn silage according to additive treatment and storage period ($p>0.05$). However, the change in DM and the increase in the relative proportions of lactic acid content and *Lactobacillales* according to the storage period ($p<0.05$) indicate that continuous fermentation progressed until OHT days of fermentation. *Enterobacteriales* (33.0%), *Flavobacteriales* (14.4%), *Sphingobacteriales* (12.7%), *Burkholderiales* (9.28%) and *Pseudomonadales* (6.18%) dominated before fermentation of corn silage, but after fermentation, the diversity of microorganisms decreased sharply due to the dominance of *Lactobacillales* (69.4%) and *Bacillales* (11.5%), *Eubacteriales* (7.59%). Therefore, silage maintained good fermentation quality with or without microbial additives throughout all fermentation periods, but considering the persistence of fermentation even in long-term storage and the aerobic stability, it would be advantageous to use microbial additives.

(Key words: Corn silage, Microbial community, Fermentation characteristics)

I. 서론

국내 축산업의 조사료 자급률은 80%를 넘을 정도이나, 볏짚과 같은 저질 풀사료의 비율이 높은 점은 여전히 해결해야 하는 과제로 남아 있다. 이를 해결하기 위한 양질 조사료 수급방안은 꾸준히 연구되고 있으며, 동계 사료작물인 이탈리아안 라이그라스와 청보리 등을 재배하고 난 이후 하계 사료작물의 재배를 통한 조사료 연중 생산 방안이 대두되고 있다. 이러한 하계 사료작물 중 옥수수는 단위면적당 높은 생산량과 영양소 함량에 대한 이점으로 전 세계에서 많이 재배되고 있다. 배수가 잘 되는 밭에서 재배

가 쉬운 옥수수는 국내에서는 다른 밭작물에 비해 낮은 소득으로 인해 재배면적이 하락하고 있는 추세이다(Go et al., 2022). 반면에, 최근 쌀 수요 감소로 논에 타 작물 재배에 대해 관심이 증가하고, 논 타작물 재배지원사업(MAFRA, 2024)으로 인해 논에서의 옥수수 재배 면적은 확대될 것으로 기대된다.

과거에 낙농가를 중심으로 이용되던 옥수수는 수확 및 원형곤포 사일리지 제조용 기계의 보급으로 인해 일반 농가에서도 이용이 증가되고 있다. 옥수수는 높은 당 함량으로 인해 사일리지 제조에 매우 유리한 사료작물이지만, 제조방법에 따라 품질이 다양하게 나타난다. 일반적인 사일리지의 품질은 수분함량, 미생물 집

*Corresponding author: Bo Ram Choi, Grassland and Forage Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 31000, Korea
Tel: +82-41-580-6751, E-mail: qaz8715@korea.kr
Mirae Oh, Grassland and Forage Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 31000, Korea
Tel: +82-41-580-6751, E-mail: miraeoh@korea.kr

중, 절단 길이, 밀도, 발효기간, 저장방법 등 다양한 요인의 영향을 받는다(Mohd-Setapar et al., 2012; Cho et al., 2014). 국내에서 첨가제를 이용한 옥수수 사일리지의 연구는 일부 수행되었으나(Kim et al., 2010), 저장기간에 따른 옥수수 사일리지의 품질 변화에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 옥수수 사일리지의 첨가제 처리 여부와 저장기간에 따른 품질 및 미생물 군집의 변화를 검토하여 양질 조사료 공급을 위한 조사료 품질 향상 기술을 개발하기 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사일리지 제조

본 실험은 충청남도 천안시 국립축산과학원 축산자원개발부 사료작물 재배지에서 수행되었다. 옥수수 공시 품종은 국내에서 육성된 광평옥이었으며, 2020년 8월 황숙기에 수확하여 시험구 당 5 kg씩 20 L 미니 버킷 사일리지 제조에 이용하였다. 실험 설계는 2×4 factorial design으로 첨가제가 접종되지 않은 무처리구(CON)과, 첨가제가 접종된 접종구(ADD) 각각 3반복씩 30 (TH), 60 (ST), 90 (NT) 및 120 (OHT)일간 저장 및 발효시켰다. 시험에 이용된 사일리지용 첨가제(Top silage, JungnongBio Inc., korea)는 ton당 2 g을 기준으로 증류수에 증류하여 접종하였으며, 무처리구에도 동일하게 증류수를 첨가하였다.

2. 사료가치 및 발효특성 분석

채취된 시료는 사료가치 분석을 위해 68℃의 열풍건조기에서 72시간 건조 후 분쇄하여 1 mm screen을 통과시켰다. 모든 사료가치 분석은 AOAC법(1990)에 의해 분석하였다. 조단백질(Crude protein, CP) 함량은 원소분석기(Vario MAX cube, Elementar, Langensfeld, Germany)를 사용하여 Dumas의 방법(AAAS, 1884)에 따라 측정하였다. 중성세제불용성섬유(Neutral detergent fiber, NDF), 산성세제불용성섬유(Acid detergent fiber, ADF)는 Goering and Van Soest (1970)에 의해 Ankom²⁰⁰ fiber analyzer (Ankom Technology, Macedon, NY, USA)를 이용하여 분석하였다. 사일리지 개봉 즉시 채취한 샘플 10 g을 증류수 100 mL에 넣고 4℃에서 주기적으로 교반하면서 24시간 보관한 후 4 중 거르로 1차 여과 후 여과지(Whatman No. 6)를 통과한 추출액을 pH와 유기산 분석에 사용하였다. pH는 추출액을 pH meter (HI 9024, HANNA Instrument Inc., UK)로 분석하였다. 유기산 분석을 위해 추출액을 0.22 μm 실린지 필터를 사용하여 여과시킨 다음 젖산(Lactic acid) 함량은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC, HP1100, Agilent Co., USA)로 분

석하고, 초산(Acetic acid)과 낙산(Butyric acid) 함량은 Gas Chromatography (GC, GC-450, Varian Co., USA)로 분석하였다.

3. 미생물상 분석

사일리지 내 미생물 군총 분석을 위해 채취한 사일리지를 powderMax soil DNA Isolation Kit (MO Bio Inc., USA)를 이용하여 추출 후 DNA 농도와 품질을 분석하였다. 추출된 DNA는 16SrRNA 유전자의 V3-V4 영역을 표적으로 하는 정방향 프라이머 F (CCTACGGGNGGCWGCAG) 및 역방향 프라이머 R (GACTACHVGGGTATCTAATCC)을 사용하여 PCR로 증폭되었다. DNA 샘플은 HiSeqTM platform (Illumina, USA)을 이용한 Metagenome 분석을 마크로젠(MacroGen Inc., Korea)에 의뢰하여 목 단위의 미생물 군집 분석을 실시하였다.

4. 통계 분석

통계처리는 PROC ANOVA SAS program (v. 9.4 program, 2013)을 이용하여 Tukey test ($p < 0.05$)로 첨가제 및 저장기간에 따른 유의성 검정을 실시하였다. 또한, PROC GLM PROCEDURE를 이용하여 첨가제 및 저장기간에 따른 요인분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 사일리지의 사료가치

각 저장기간에 따른 옥수수 사일리지의 사료가치는 Table 1과 같다. 건물(dry matter, DM)은 CON과 ADD 시험구의 저장기간에 따라서 유의적인 차이가 나타났으며(CON, 35.9~33.2%, $p < 0.001$; ADD, 34.5~32.7%, $p < 0.001$) 첨가제와 저장기간 및 상호작용에 따른 효과가 나타났다(ADI, $p < 0.001$; PER, $p < 0.001$; ADI*PER, $p < 0.001$). 이는 지속적인 미생물 발효 과정에서 발생하는 DM 손실의 변화 때문으로 사료된다. Hu et al. (2009)에 따르면, 발효시간의 증가에 따른 수용성 탄수화물의 소비로 인해 DM 손실이 발생한다고 보고한 바, 본 결과와 유사하다. NDF (CON, 41.1~44.0%, $p = 0.245$; ADD, 41.5~43.1%, $p = 0.070$)와 ADF (CON, 23.1~25.5%, $p = 0.121$; ADD, 23.1~24.8%, $p = 0.083$)는 CON과 ADD 시험구의 저장기간에 따라서 유의적인 차이는 발견되지 않았으며, 첨가제에 의한 효과도 나타나지 않았다(ADI, $p > 0.05$). 반면에, 저장기간에 따른 효과는 NDF (PER, $p = 0.006$)와 ADF (PER, $p = 0.011$)에서 나타났다. 섬유소 함량의 변화는

Table 1. Effects of microbial additives and storage period on corn silage chemical composition

	CON				SEM	P-value	ADD				SEM	P-value
	TH	ST	NT	OHT			TH	ST	NT	OHT		
DM	35.9 ^b	36.5 ^{ab}	38.4 ^a	33.2 ^c	0.511	<0.001	34.5 ^b	34.0 ^b	37.3 ^a	32.7 ^c	0.390	<0.001
NDF	41.1	44.1	44.6	44.0	1.059	0.245	41.5	41.2	44.0	43.1	0.640	0.070
ADF	23.1	25.5	25.5	25.5	0.777	0.121	23.1	23.3	25.2	24.8	0.512	0.083
CP	9.04	9.26	9.17	8.90	0.090	0.140	9.48	9.32	9.42	9.25	0.062	0.122
				DM		NDF			ADF		CP	
ADI				<0.001		0.189			0.103		<0.001	
PER				<0.001		0.006			0.011		0.070	
ADI*PER				<0.001		0.474			0.346		0.199	

CON, control; ADD, microbial additives treatments; TH, fermented for 30 days; ST, fermented for 60 days; NT, fermented for 90 days; OHT, fermented for 120 days; DM, dry matter; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber; CP, crude protein, ADI, contrast effects of additives (CON vs. ADD); PER, contrast effects of period (TH vs. ST vs. NT vs. OHT); ADI*PER, contrast effects of additives and period. ^{a-c}Means in the row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

수용성 당이 미생물 발효에 의해 이용되어 상대적으로 증가 및 감소될 수 있다(Diepersloot et al., 2021). 따라서, NDF와 ADF에서 저장기간에 의한 효과는 미생물 발효에 이용되기 어려운 섬유소 함량이 저장기간에 따라 상대적으로 증가하여 나타난 것으로 판단된다.

2. 사일리지의 발효 특성

첨가제 및 저장기간에 따른 옥수수 사일리지의 발효 특성은 Fig. 1과 같다. CON과 ADD 시험구에서 pH는 3.8 전후로 기준의 황숙기 옥수수 사일리지의 pH로 보고된 3.66 (Choi et al.,

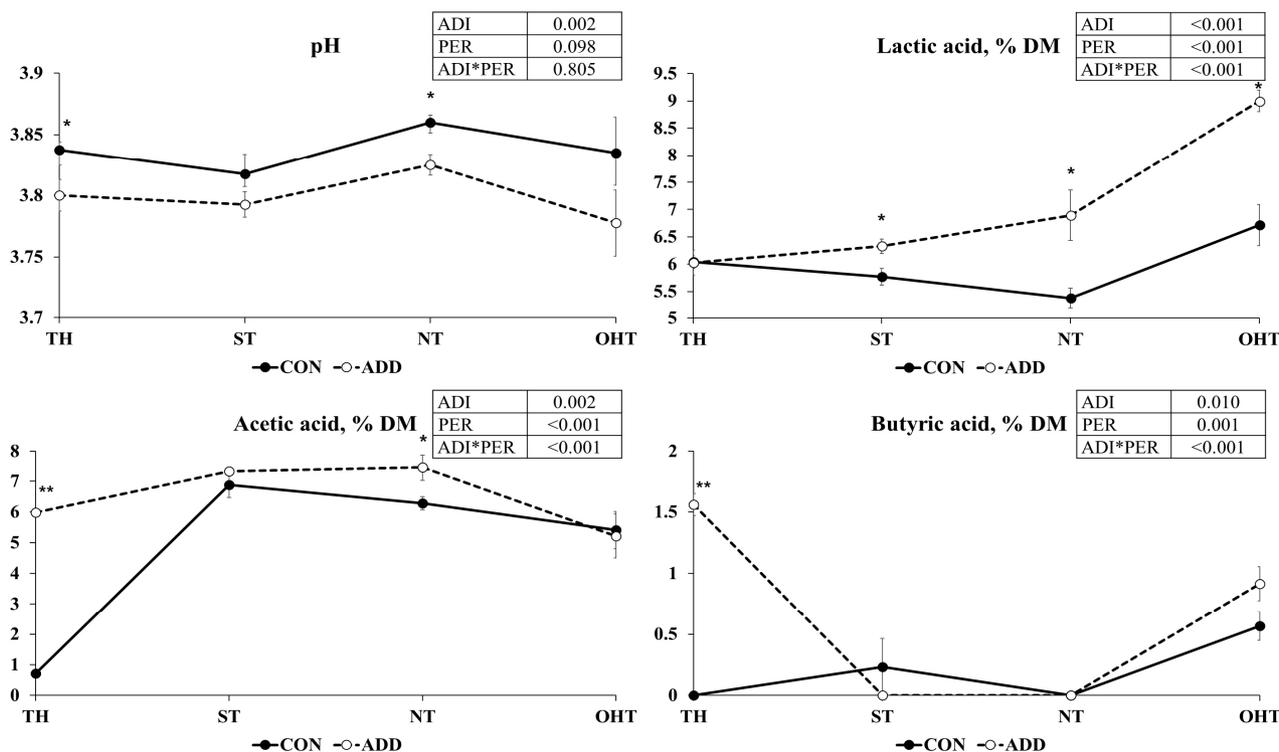


Fig. 1. Effects of microbial additive and storage period on corn silage fermentation characteristics. CON, control; ADD, microbial additives treatments; TH, fermented for 30 days; ST, fermented for 60 days; NT, fermented for 90 days; OHT, fermented for 120 days; ADI contrast effects of additives (CON vs. ADD); PER, contrast effects of period (TH vs. ST vs. NT vs. OHT); ADI*PER, contrast effects of additives and period; Values differ among control and additive treatment within same storage period * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2011)에 비해 다소 높게 나타났으나, 일반적인 옥수수 사일리지의 pH 범위(3.7~4.0)안에 속하였다(Kung and Shaver, 2001). 젖산 함량은 발효 60일부터 120일까지 ADD 시험구가 유의적으로 높게 나타났으며(ST, 5.77 vs. 6.34%, $p<0.05$; NT, 5.38 vs. 6.89%, $p<0.05$; OHT, 6.71 vs. 8.99%, $p<0.05$), 요인분석에서 첨가제 및 저장기간에 의한 효과가 있는 것으로 나타났다(ADI, $p<0.001$; PER, $p<0.001$; ADI*PER, $p<0.001$). ADD 시험구에서 젖산 함량은 저장기간에 따라 6.02~9.00%로 꾸준히 증가하였는데, 이는 ADD 시험구에 첨가된 미생물 접종제의 영향과 더불어 저장기간 동안 유산균에 의한 발효가 지속적으로 진행되었기 때문으로 사료된다. 초산은 발효 30일과 90일에서 ADD 시험구가 높게 나타났으며(TH, 0.71 vs. 5.98%, $p<0.001$; NT, 6.28 vs. 7.44%, $p<0.05$), 낙산은 발효 30일에서 ADD 시험구가 높게 나타났으며(0.00 vs. 1.56%, $p<0.001$). 요인분석에서는 초산(ADI, $p=0.002$; PER, $p<0.001$, ADI*PER, $p<0.001$)과 낙산(ADI, $p=0.010$; PER, $p=0.001$, ADI*PER, $p<0.001$) 모두 첨가제 및 저장기간에 의한 효과가 있는 것으로 나타났다. 일반적인 사일리지의 발효는 7~45일간 진행되는 것으로 알려져 있다(Pahlow et al., 2003). 그러나 총체 옥수수 사일리지에서의 발효는 180일이 넘어도 pH가 감소되고, 젖산과 초산의 함량이 증가하는 등 발효가 지속적으로 진행된다고 보고된 바 있다(Der Bedrosian et al., 2012). 이와 유사하게 본 연구에서 저장기간에 따른 젖산 및 초산 함량의 변화는 지속적인 미생물 발효가 진행되었음을 나타낸다. 이러한 지속적인 발효로 인해 첨가제 및 저장기간에 따른 효과가 나타난 것으로 판단된다.

3. 사일리지의 미생물 분포

옥수수 사일리지에서 첨가제 및 저장기간에 따른 목단위의 미생물 군집의 변화는 Fig. 2와 같다. ADD 시험구는 CON 시험구에 비해 상대적으로 미생물의 다양성이 감소하였으며, 발효 전에는 *Enterobacteriales* (33.0%), *Flavobacteriales* (14.4%), *Sphingobacteriales* (12.7%), *Burkholderiales* (9.28%), *Pseudomonadales* (6.18%)등이 우점하였으나, 발효 이후 *Lactobacillales* (CON vs. ADD; 48.3 vs. 90.8%), *Bacillales* (CON vs. ADD; 19.1 vs. 4.04%), *Eubacteriales* (CON vs. ADD; 12.9 vs. 2.24%)등이 우점하였다. CON30~120과 ADD30~120 모두에서 저장기간에 따른 *Lactobacillales*의 증가를 확인하였으며, CON 시험구에 비해 ADD 시험구에서 각 저장기간마다 *Lactobacillales*의 상대적 비율이 높게 나타났다 (CON vs. ADD; TH, 34.3 vs. 84.9%; ST, 38.4 vs. 92.0%; NT, 40.9 vs. 93.0%; OHT, 79.5 vs. 93.3%). ADD 시험구에는 발효 30일부터 *Lactobacillales*가 84.9%를 차지하였으나, CON 시험구에서는 발효 120일차에 도달해서야 79.5%를 차지하였다. 이는 ADD 시험구가 CON 시험구에 비해 발효 초기 유산균의 우점에 유리하였음을 나타낸다. *Bacillales* (CON vs. ADD; TH, 30.8 vs. 6.99%; ST, 10.8 vs. 2.42%; NT, 24.4 vs. 2.11%; OHT, 10.3 vs. 4.66%)와 *Eubacteriales* (CON vs. ADD; TH, 20.9 vs. 5.76%; ST, 13.0 vs. 1.06%; NT, 12.1 vs. 0.96%; OHT, 5.72 vs. 1.18%)는 같은 저장기간 안에서 상대적 비율이 ADD 시험구에 비해 CON 시험구가 높게 나타났다. *Bacillales*, *Eubacteriales*는 사일리지의 호기적 안정성을 악화시키는 요인으로(Shou et al., 2024), 첨가제 처리는

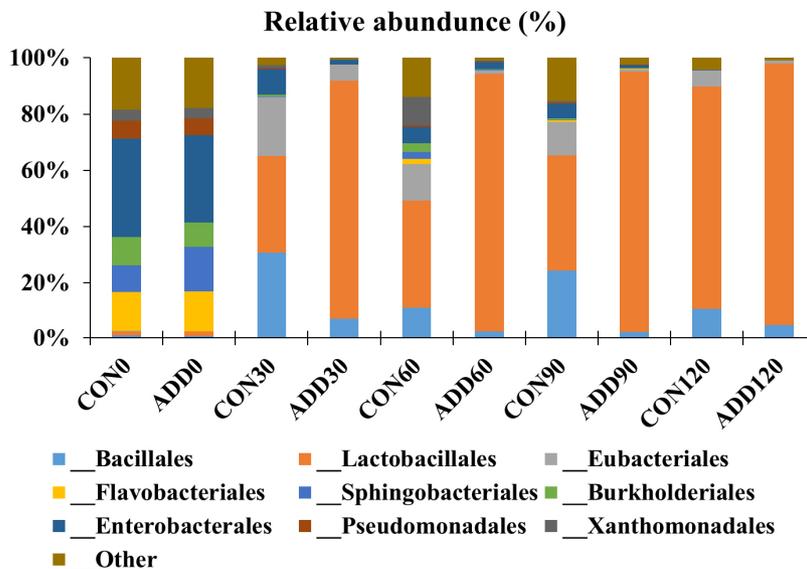


Fig. 2. Effects of microbial additive and storage period on corn silage microbial community at order level. CON, control; ADD, microbial additives treatments; 0, storage period of 0 day; 30, storage period of 30 day; 60; storage period of 60 day; 90, storage period of 90 day; 120, storage period of 120 day.

호기적 안정성을 향상 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 옥수수 사일리지에서 첨가제 처리와 저장기간을 달리 하였을 때 사일리지의 품질 변화 및 미생물 군집 변화를 검토함으로써 품질 향상 방안을 찾기 위해 수행되었다. 각 미생물 미접종 시험구(CON)와 미생물 접종 시험구(ADD) 내에서 저장기간에 따른 옥수수 사일리지의 영양소 함량의 변화는 없었다 ($p>0.05$). 그러나 각 시험구 내에서 저장기간에 따른 건물(DM)의 감소(CON, 35.9~33.2%; ADD, 34.5~32.7%; $p<0.05$)와 젖산 함량의 증가(CON, 6.03~6.71%; ADD, 6.02~9.00%; $p<0.05$) 및 *Lactobacillales*의 상대적 비율의 증가(CON, 34.3~79.5%; ADD, 84.8~93.3%)는 발효 120일까지 지속적인 발효가 진행되었음을 나타낸다. 옥수수 사일리지의 발효 전에는 *Enterobacteriales* (33.0%), *Flavobacteriales* (14.4%), *Sphingobacteriales* (12.7%), *Burkholderiales* (9.28%), *Pseudomonadales* (6.18%) 등이 우점 하였으나, 발효 후 *Lactobacillales* (69.4%), *Bacillales* (11.5%), *Eubacteriales* (7.59%)의 우점으로 인해 미생물의 다양성이 급격히 감소하였다. 결과적으로 옥수수 사일리지는 모든 저장기간에서 첨가제 유무에 관계 없이 양호한 발효 품질을 유지하였으나, 장기간 저장에도 발효가 지속되는 점과 호기적 안정성을 고려한다면 미생물 첨가제를 이용하는 것이 유리할 것으로 사료된다.

V. 사사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제명: 국내산 풀사로 품질향상 및 평가 기술 개발, 과제번호: PJ01422401)의 지원에 의해 연구되었다.

VI. REFERENCES

- AAAS. 1884. American association for the advancement of science. Jean-Baptiste-Andre Dumas. Science. 72:750-752.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Cho, S., Kwon, C.H. and Kim, E.J. 2014. Effect of bacterial inoculants and organic acid on silage quality: Meta-analysis. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 34(2):94-102.
- Choi, K.C., Jo, N.C., Jung, M.W., Lee, K.D., Kim, J.G., Lim, Y.C., Kim, W.H., Oh, Y.G., Choi, J.H., Kim, C.M., Jeong, D.G. and Choi, J.M. 2011. Effect of harvest stage of corn on nutritive values and quality of roll baled corn silage manufactured with corn grown in paddy land. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 31(1):65-74.
- Der Bedrosian, M.C., Nestor Jr, K.E. and Kung Jr, L. 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. Journal of Dairy Science. 95(9):5115-5126.
- Diepersloot, E.C., Pupo, M.R., Ghizzi, L.G., Gusmão, J.O., Heinzen Jr, C., McCary, C.L., Wallau M.O. and Ferraretto, L.F. 2021. Effects of microbial inoculation and storage length on fermentation profile and nutrient composition of whole-plant sorghum silage of different varieties. Frontiers in Microbiology. 12:660567.
- Go, Y.S., Ha, H.Y., Bae, H.H., Son, J.H., Kang, K.M., Son, B.Y. and Jung, T.W. 2022. Comparison of growth characteristics and nutritive value of silage corn hybrids grown at paddy and upland field. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 42(4):249-257.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). US Agricultural Research Service.
- Hu, W., Schmidt, R.J., Mcdonell, E.E., Klingerman, C.M. and Kung Jr, L. 2009. The effect of *Lactobacillus buchmeri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. Journal of Dairy Science. 92:3907-3914.
- Kim, J.G., Ham, J.S., Chung, E.S., Seo, S. and Park, H.S. 2010. Evaluation of fermentation ability of microbes for corn silage inoculant. Journal of The Korean Society of Grassland and Forage Science. 30(4):333-342.
- Kung, L. and Shaver, R. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. 3(13):1-5.
- Mohd-Setapar, S.H., Abd-Talib, N. and Aziz, R. 2012. Review on crucial parameters of silage quality. APCBEE Procedia. 3:99-103.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.O. and Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. Silage Science and Technology. 42:31-93.
- Shuo, W., Peishan, H., Chao, Z., Wei, Z., Xiaoyang, C. and Qing, Z. 2024. Novel strategy to understand the aerobic deterioration of corn silage and the influence of *Neolamarckia cadamba* essential oil by multi-omics analysis. Chemical Engineering Journal. 482:148715.

(Received : June 19, 2024 | Revised : June 25, 2024 | Accepted : June 25, 2024)