

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000508-01

보안과제( ), 일반과제( ), 과제번호 107041-3

라이신 제조 폐배지를 이용한 축우용 발효 섬유질 배합  
사료(Total Mixed Ration Fermented, TMF) 생산기술  
개발에 관한 연구

(Development of TMF production method for beef cattle  
using condensed molasses solubles)

라이신발효부산물을 이용한 TMF 사양체계 개발에 관한 연구

(Development of TMF production method using condensed molasses solubles)

TMF용 유산균제제의 개발 및 TMF 품질관리기준 설정에 관한 연구

(Development of lactic acid bacteria as seed culture for TMF and establishment of  
standard for TMF quality control)

TMF용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구에 관한 연구

(Development of industrial CMS-AY-LAC fermented TMF production system)

한국방송통신대학교

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “라이신 제조 폐배지를 이용한 축우용 완전발효사료(TMf) 생산기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “라이신발효부산물을 이용한 TMf 사양체계 개발에 관한 연구”)(세부과제 “TMf용 유산균체제의 개발 및 TMf 품질관리기준 설정에 관한 연구”)(세부과제 “TMf용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 31일

주관연구기관명 : 한국방송통신대학교

주관연구책임자 : 장 종 수

세부연구책임자 : 장 종 수

연 구 원 : 송 재 용, 박 민 아, 장 연 수, 남 은 숙, 김 순 삼, 이 슬 기

협동연구기관명 : 단국대학교

협동연구책임자 : 강 대 경

연 구 원 : 채 종 표, 이 세 형, 신 유 리, 아폰 무스토파

협동연구기관명 : 선 바이오(주)

협동연구책임자 : 김 선 기

연 구 원 : 심 경 호, 김 국 조

참 여 기 업 명 : 유정영농조합법인

참여기업책임자 : 정 균 철

# 요 약 문

## I. 제 목

라이신 제조 폐배지를 이용한 축우용 발효섬유질배합사료(Total Mixed Ration Fermented, TMF) 생산기술 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목적

- 라이신 폐배지를 이용한 축우용 발효섬유질배합사료(TMf)의 개발 및 사양체계 확립
- 생균제용 균주를 이용한 발효섬유질배합사료(TMf) 제조를 통한 가축의 생산성 증진
- 산업부산물의 이용성 향상을 통한 환경오염 저감 및 원료사료의 자급율 향상

### 2. 필요성

- 섬유질 배합사료(Total Mixed Ration, TMR)의 급여방법, 제조방법에 대한 다양한 연구가 수행되어 왔으며, 현재에도 TMR의 품질향상을 위한 다양한 연구가 진행되고 있음.
- 볏짚위주의 농가부산물을 이용한 TMf가 연구되었으나, 다양한 균주를 이용한 연구는 수행되지 않았음.
- 체계적인 연구가 진행되지 않은 상태에서 자가TMR 수준의 다양한 TMf 제품이 군소업체를 통해 출하되어 TMf에 대한 신뢰도를 저하시키고 있음.
- 라이신 제조 폐배지(Condensed Molasses Solubles, CMS)를 농후사료에 첨가하여 급여한 연구는 진행되었으나, CMS를 이용한 TMf의 생산공법에 대한 연구는 전무함.
- 한우용 TMf의 성장단계별 사양체계는 정립되어 있지 않음.
- 한우 고급육 생산을 위한 TMf의 급여체계 및 사료의 배합비율은 정립되어 있지 않음

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 라이신발효부산물을 이용한 TMf 사양체계 개발에 관한 연구

가. CMS첨가 TMR의 사료가치 평가 및 CMS 첨가 TMf 균주 선발

(1) CMS 첨가수준에 따른 TMR의 사료가치 평가

- (2) 원료사료의 조건에 따른 CMS첨가 TMR의 사료가치 평가
- (3) CMS첨가 TMF용 균주 선발

나. 라이신 제조 폐배지-황국균+ 효모(CMS-AY) 및 라이신 제조 폐배지-유산균(CMS-LAC) TMF 사양체계 개발

- (1) CMS-AY TMF의 사료가치 평가 및 보관성 평가
- (2) CMS-LAC TMF의 사료가치 평가

다. 라이신 제조 폐배지-황국균+ 효모+ 유산균(CMS-AYL) TMF 실용화 방안 개발

- (1) 육성우용 CMS-AYL-TMF 사양체계 개발
- (2) 비육전기용 CMS-AYL-TMF 사양체계 개발
- (3) CMS-AYL-TMF의 경제성 분석

## 2. TMF용 유산균제제의 개발 및 TMF 품질관리기준 설정

가. TMF 제조용 유산균의 선발 및 동정

- (1) 균주의 선발 및 동정
- (2) 최종 선발된 유산균주의 항균력
- (3) 최종 선발된 유산균주의 유기산 생성능

나. CMS를 이용한 유산균의 배양조건 확립

- (1) CMS에 기초한 산업용 유산균 배지의 개발
- (2) CMS의 적정 첨가수준 결정
- (3) 균주 상호간의 길항작용 또는 성장촉진여부 조사
- (4) Pilot scale 적용 실험

다. TMF용 품질관리기준 설정

- (1) TMF 저장 중 미생물 수의 변화
- (2) TMF 저장 중 pH의 변화
- (3) TMF 저장 중 유기산 생성 변화
- (4) TMF저장 중 ethanol 생성 변화

## 3. TMF용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구에 관한 연구

가. 선발된 균주의 배양 적합성 검토

- (1) 고상 배양상태에서의 황국균(*Aspergillus oryzae*) 최적 배양조건 개발
- (2) 고상 배양상태에서의 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 최적 배양조건 개발

나. CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발 및 TMF 발효조건 설정

- (1) CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발
- (2) TMF의 발효조건 개발 및 생산기법 확립

다. CMS-AYL 산업화 시스템 확립 및 TMF 생산기법 확립

- (1) 산업용 CMS-AYL 대량 생산 시스템 개발
- (2) TMF 저장 중 일반성분의 변화
- (3) TMF 기호성 조사

## IV. 연구개발결과

### 1. 라이신발효부산물을 이용한 TMF 사양체계 개발에 관한 연구

가. CMS첨가 TMR의 사료가치 평가 및 CMS 첨가 TMF 균주 선발

(1) CMS 첨가수준에 따른 TMR의 사료가치 평가

*in vitro* 소화율시험 결과 CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 배양시간에 따른 가스 발생량은 대조구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나, TMR에 CMS의 첨가 농도를 증가시킬수록 사료의 건물소화율은 증가되는 경향을 보였다. 또한 CMS에 존재하는 용해도가 높은 비단백태 질소 화합물(NPN) 성분 중 암모니아와 아미노산 성분 그리고 미생물에 의한 분해가 빠른 탄수화물을 이용하여 미생물체 단백질의 합성이 촉진되었다. 각각의 휘발성지방산(VFA) 중 반추위 발효과정에서 생성량이 많은 acetate와 propionate의 농도 및 비율에는 대조군 및 처리군 간에 유의적인 차이가 없었다.

(2) 원료사료의 조건에 따른 CMS첨가 TMR의 사료가치 평가

TMR 배합시 원료사료의 일정부분을 CMS로 대체하여 *in vitro* 소화율시험을 실시한 결과, 배양시 발생하는 가스의 발생량이 대조구가 CMS 처리구보다 높았으며, CMS의 농도가 증가할수록 배양과정에서 발생하는 가스의 발생량이 유의적으로 감소하였다. 또한 CMS의 대체 비율이 증가할수록 사료의 건물소화율이 건물소화율이 감소하는 경향을 보였다. 배양액에 존재하는 암모니아 농도 및 휘발성지방산의 농도는 CMS의 대체 수준이 증가할수록 증가하는 경향을 보였다.

(3) CMS첨가 TMF용 균주 선발

Strain이 다른 *Aspergillus oryzae* 균주를 CMS가 6%의 농도로 함유된 멸균 증류수에서 배양하여 비단백태질소화합물의 이용율 및 균체 생성량이 가장 높은 strain을 선발한 결과, *Aspergillus oryzae* KACC 40242 균주를 선발하였다.

#### 나. CMS-AY 및 CMS-LAC TMF 사양체계 개발

##### (1) *In vivo* 사양시험을 이용한 CMS 첨가수준에 따른 TMR 의 사료가치평가

일일 사료 섭취량은 CMS 4% 처리구에서 7.4kg으로 가장 낮았으며 0%와 8%는 7.8 kg으로 차이가 없었다. 시험기간중 총 증체량은 CMS 첨가 비율이 증가함에 따라 0,4 그리고 8% 가 각각 179, 181 그리고 183kg으로 증가하는 경향을 보였으나, 시험기간별 일당 증체량은 약 0.7 kg으로 CMS 처리에 따른 수준별 차이는 보이지 않았다. 사료효율 역시 CMS 첨가 비율에 따라 별다른 영향을 보이지 않았다.

##### (2) CMS-LAC TMF의 사료가치 평가

###### (가) *Aspergillus oryzae*를 접종하여 발효한 TMF

누룩곰팡이를 종균으로 이용하여 CMS가 함유된 발효섬유질배합사료를 제조하고, 이들을 *in vitro* 소화율시험법을 이용하여 발효양상을 비교하였다. CMS 첨가비율이 증가할수록 배양과정 동안 가스 발생량은 점차 감소하였다. 반추위내 섬유소 분해균주인 *Fibrobacter succinogenes* 와 *Ruminococcus albus* 는 배양 시간이 증가할수록 증가하였고, *Ruminococcus flavefaciens* 는 배양시간이 지나도 큰 변화가 없었다.

###### (나) *Lactobacillus* spp를 접종하여 발효한 TMF

유산균인 *Lactobacillus* spp.를 종균으로 이용하여 CMS가 함유된 발효섬유질배합사료를 제조하고, 이들을 *in vitro* 소화율시험법을 이용하여 발효양상을 비교하였다. 모든 시간대에서 CMS 첨가 수준이 낮을수록 가스의 발생량이 높은 것을 확인할 수 있다. 또한 암모니아 발생량은 가스 발생량과 역의 상관관계를 가지며 CMS 함량이 높은 처리구에서 수치가 높은 것이 확인 되었다. *Lactobacillus* spp.는 전 배양시간과 CMS 첨가수준에 큰 영향을 받지 않았으며, 반추위 미생물인 *F. succinogenes*와 *R.albus* 는 배양 시간이 증가할수록 증가하였다.

###### (다) *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 발효한 TMF

효모균인 *Saccharomyces cerevisiae*를 종균으로 이용하여 CMS가 함유된 발효섬유질배합사료를 제조하고, 이들을 *in vitro* 소화율시험법을 이용하여 발효양상을 비교하였다. 배양과정에서의 가스 발생량이 증가하면 건물 소화율이 증가하는 정의 상관관계를 보였으며, CMS 함량

이 증가함에 따라 가스의 발생량이 감소하는 경향을 보였다. 배양액의 암모니아 발생량은 가스 발생량과 건물분해율이 증가함에 따라 감소하는 역의 상관관계를 보였으며, 이는 *A. oryzae* 와 *Lactobacillus* spp. 를 첨가하여 발효시킨 사료의 시험과 같은 경향을 보였다.

### (3) 미생물을 접종한 CMS 처리 TMF의 저장성 평가

CMS 를 첨가하지 않은 처리구는 발효 온도에 따른 변화가 크지 않았다. 그러나 CMS 첨가 농도가 증가할 수록 변화온도에서 발효된 사료보다 고정(25℃)에서 발효된 사료의 pH가 소폭으로 감소하였다. 미분해 NPN함량은 12% 첨가 처리구에서 *S. cerevisiae* 접종 TMF가 가장 적은 미분해 NPN 잔량을 보였다.

## 다. CMS-AY-LAC TMF 실용화 방안 개발

### (1) 수준별로 CMS를 처리한 비지박과 버섯배지에 *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 의 접종 수준을 달리하여 발효한 사료의 특성 비교

비지박과 버섯배지에 CMS를 첨가하고 미생물을 접종할 경우 CMS를 3% 수준으로 첨가할 경우 미생물의 접종량에 상관없이 미생물이 균일하게 성장했으나, CMS를 6% 수준으로 첨가할 경우에는 미생물 접종량을 10~20% 이상으로 증가시킬 경우에만 미생물 성장을 확인할 수 있었다. 이에 따라 CMS를 6% 이상 처리하여 원료를 보관할 경우 부패를 방지할 수 있는 장점이 있으며, 필요시 종균을 접종하여 발효시켜 TMR 제조에 이용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

### (2) CMS + 비지박, 버섯배지+ *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 의 배양시간을 달리하여 발효한 사료의 특성 비교

버섯배지에 CMS를 첨가한 경우, 비지박을 이용한 실험보다 미생물의 성장량이 현저히 높았다. 또한 배양기간이 지날수록 모든 처리구에서 조단백질 함량이 증가하였다.

### (3) CMS + 비지박,버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료가 반추위내 발효성상과 특성 에 미치는 영향

발효 처리구들의 가스 발생량은 CMS처리 농도에 관계없이 동일하게 증가하는 경향을 나타냈다. 메탄 발생량은 가스 발생량과 정의 상관관계를 가지며 배양시간에 따라 증가하였다.

### (4) CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 반추위내 발효성상과 특성 에 미치는 영향

건물 분해율은 대조구에 비해 발효 처리구가 높았다. 이는 발효 처리구 내에 포함된 미생물과 반추 미생물의 상호작용에 의한 것으로 반추위내 발효성상을 긍정적으로 변화시킨다는 것을 나타낸다. 또한 pH가 CMS 를 첨가한 대조구보다 낮은 쪽으로 감소함으로써 보다 반추위내 환경을 안정적으로 유지하고 있다고 판단된다.

## 2. TMF용 유산균제제의 개발 및 TMF 품질관리기준 설정

### 가. TMF 제조용 유산균의 선발 및 동정

#### (1) 균주의 선발 및 동정

CMS를 첨가한 배지에서의 생존력이 상대적으로 우수할 뿐만 아니라 내산성도 우수한 DSB03, DSB04, DSB05 균주를 TMF 제조용 종균으로서 최종 선발하였으며, 16S rRNA 유전자 서열 분석에 기초한 분자생물학적 동정을 통하여 *L. casei* DSB03, *L. casei* DSB04, *L. plantarum* DSB05 로 각각 명명하였다.

#### (2) 최종 선발된 유산균주의 항균력

선발된 3 종의 유산균은 대장균 억제능이 우수하였는데, 이러한 억제능은 주로 유산균이 자라면서 생성되는 유기산에 의한 것으로 판단되었다.

#### (3) 최종 선발된 유산균주의 유기산 생성능

선발된 세 균주의 유기산 생성 패턴은 매우 유사하였으며, 가장 많이 생성된 유기산은 젖산 (lactic acid)으로서 배양 48시간 후에 218 ~ 313mM에 달하였다.

### 나. CMS를 이용한 유산균의 배양조건 확립

#### (1) CMS에 기초한 산업용 유산균 배지의 개발

CMS를 첨가한 산업용 배지(GYC-10 medium)를 확립하였으며, GYC-10 배지에서의 균의 증식이 우수할 뿐만 아니라 저장안정성 측면에서도 매우 안정한 것으로 나타났다. 또한 본 배지는 교반 또는 정지배양 모두 적용 가능할 것으로 판단되었다.

#### (2) CMS의 적정 첨가수준 결정

CMS 10% 첨가 배지에서의 배양 24시간 후의 유산균수는  $4.46 \times 10^9$ /ml 에 도달하였으며, 균의 증식속도 및 최고균수, 배양후기의 균 사멸속도 등을 종합적으로 판단할 때, CMS 10% 첨가가 가장 적합한 것으로 나타났다. 또한, 종균의 저장 안정성을 고려할 때, 배양시간을 stationary phase 직후인 48시간 이내로 단축하고, 배양액은 냉장상태에서 가능한 한 빨리 사용하는 것이 적합할 것으로 판단되었다.

#### (3) 균주 상호간의 길항작용 또는 성장촉진여부 조사

*L. casei* DSB03 균주보다는 *L. plantarum* DSB05 균주가 GYC 배지에 상대적으로 더 안정한 경향을 나타내었으며, 또한 *L. casei* DSB03 균주와 *L. plantarum* DSB05를 필요에 따라 혼

합배양 하더라도 GYC 배지를 사용할 경우에는 균주 상호간에 영향이 거의 없는 것으로 판단되었다.

#### (4) Pilot scale 적용 실험

2 liter 규모의 jar fermentor에서 배양 28시간 만에 성장정지기에 도달하였으며, 이 시점의 균수는  $3.5 \times 10^9/\text{ml}$  ~  $2.6 \times 10^9/\text{ml}$  수준이었다. 배양기간이 길어짐에 따라 균수 저하현상이 나타나므로, 성장정지기에 도달한 직후에 배양을 종료하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

### 다. TMF용 품질관리기준 설정

#### (1) TMF 저장 중 미생물 수의 변화

##### (가) TMF 저장 중 유산균수의 변화

4℃ 저장의 경우, CMS 10% 첨가로 인해 저장기간 중 유산균의 생장이 억제되었다.

15℃ 저장의 경우, CMS 미첨가구는 2주 만에  $10^8/\text{ml}$  수준에 도달하였으며, CMS 첨가구는 저장 3주 이후에  $10^8/\text{ml}$  수준에 도달하였다.

30℃ 저장의 경우, 모든 처리구에서 저장 3일만에 균수가 급격히 증가하여 최고  $8.3 \times 10^8/\text{ml}$  수준에 도달하였다. 한편, CMS 첨가구는 유산균수가 상대적으로 완만한 속도로 감소하는 추세를 나타내었는데, 이는 온도가 높은 여름철에 CMS 첨가가 TMF의 저장성을 높이는 효과가 있음을 시사하였다.

##### (나) TMF 저장 중 효모수의 변화

4℃ 저장의 경우, CMS 첨가 유무에 상관없이  $10^7/\text{ml}$  이하 수준에 머물렀다.

15℃ 저장의 경우, CMS 첨가 유무에 상관없이 저장 2주까지 증가추세를 나타내었으며, 이후부터 감소하는 추세를 나타내었으나 CMS 첨가구의 경우에는 감소추세가 다소 완만하였다.

30℃ 저장의 경우, CMS 첨가유무에 상관없이 저장 3일까지 급격한 증가추세를 나타내다가 이후부터 감소추세를 나타내었으며, ALY 첨가구와 LY 첨가구가 상대적으로 높은 균수를 유지하였다.

##### (다) TMF 저장 중 *Aspergillus oryzae* 균체 수의 변화

4℃ 및 15℃ 저장의 경우, CMS 첨가유무에 상관없이 저장 1~2주까지 초기 균수를 유지되다가 그 이후부터 모든 처리구에서 점진적으로 감소하는 추세를 나타내었다.

30℃ 저장의 경우, 저장초기부터 A. O. 수가 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

#### (2) TMF 저장 중 pH의 변화

4℃ 저장의 경우, 저장기간 중 pH 변화가 거의 없었다.

15℃ 저장의 경우, 저장 2주 후에 pH 4.5 (CMS 첨가구) ~ pH 4.0 (CMS 첨가구) 에 도달하였다.

30℃ 저장의 경우, 저장 1주 후에 pH 4.5 (CMS 첨가구) ~ pH 4.0 (CMS 첨가구) 에 도달하였다.

### (3) TMF 저장 중 유기산 생성 변화

#### (가) TMF 저장 중 lactic acid 생성 경향

4℃ 저장의 경우, 저장기간 동안 젖산함량이 약간 증가하거나 (CMS 무첨가구), 초기 수준을 유지하였다 (CMS 첨가구).

15℃ 저장의 경우, 젖산 함량이 점진적으로 증가하여 저장 4주후에는 1.0 ~ 1.6%에 도달하였다. 젖산 함량이 기호성에 영향을 미치는 점을 고려할 때, CMS 첨가구의 경우에는 저장 3~4주 경에 소비하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

30℃ 저장의 경우, 저장 3일 만에 젖산함량이 1.0% (CMS 무첨가구) ~ 1.5% (CMS 첨가구) 수준에 도달하였다.

#### (나) TMF 저장 중 butyric acid 생성 경향

저장 온도에 관계없이 모든 처리구에서 낙산 함량은 매우 낮은 수준을 유지하였으며, 30℃ 저장의 경우에도 최대 0.06%에 불과하였다.

#### (다) TMF 저장 중 acetic acid 생성 경향

CMS 무첨가구의 경우에는 30℃ 저장시 최대 0.7%에 도달하였으나, CMS 첨가구의 경우에는 저장 4주 후에도 0.3% 전후에 머물렀다. 이를 통해 볼 때, 특히 온도가 높은 여름철에는 TMF에 CMS를 첨가하는 것이 초산발효 억제에 유리할 것으로 판단되었다.

### (4) TMF저장 중 ethanol 생성 변화

4℃ 저장의 경우, 저장기간 동안 완만한 증가추세를 나타내었으며, 처리구 중에서 YL 첨가구 (0.5, 1%)가 에탄올 함량이 전반적으로 가장 높았다.

15℃ 저장의 경우, CMS 비첨가구는 저장 1주 후에 1.2 ~ 1.5% 수준까지 증가하였으며, CMS-TMF의 경우에는 저장 3주 후에 1% 수준 이상으로 증가하였다. 처리 미생물간의 큰 차이는 보이지 않았지만, YL(Yeast + LAB) 처리구에서 상대적으로 보다 많은 에탄올 수치를 나타내었는데, 이러한 경향은 30℃에 저장할 경우에도 동일하였다.

## 3. TMF용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구에 관한 연구

### 가. 선발된 균주의 배양 적합성 검토

(1) 고상 배양상태에서의 AO 최적 배양조건 개발하기 위해 배지원료, 온도, 배양방법 등을 설정하고, 고상배양 원료에 따른 AO의 균수 비교를 통해 최적의 조건을 확립하였다.

(2) 고상 배양상태에서의 *S. cerevisiae* 최적 배양조건 개발하기 위해서 효모균주를 분리동정하고, 균주의 효소생성능력을 조사하였으며, 선발된 *S. cerevisiae*의 액상 배지조건과 CMS 배지조성에 따른 성장패턴의 변화를 조사하여 최적의 고상배지 및 배양조건을 개발하였다.

#### 나. CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발 및 TMF 발효조건 설정

- (1) AYL혼합균주의 배양기법을 개발하기 위해서 AYL 균주의 최적 배지 배합비를 작성하였으며, 배양조건을 탐색하였다.
- (2) CMS 첨가가 산업용배지(SB-LY)에서 AYL 혼합균주의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 배합비를 작성하고, SB-LY배지에서 CMS 첨가 배양조건을 확립하였다.
- (3) AYL 혼합균주의 배양조건 탐색하기 위해 pH변화, CMS 농도에 따른 최적 *S. cerevisiae* 및 AO의 성장조건을 확인하였으며, Jar Fermenter에서 AYL 혼합균주의 배양조건 탐색하고, 배양시 AYL의 morphology를 관찰하였다.
- (4) 산업용 CMS-AYL 혼합균주를 이용한 TMF의 발효조건 개발하고 생산기법 확립하기 위해 Starter 발효과정에서 AYL의 변화를 조사하고 Lab. scale의 TMR을 제조하여 AYL을 접종하여 실온에서 발효하면서 AYL의 변화를 조사하였다.

#### 다. CMS-AYL 산업화 시스템 확립 및 TMF 생산기법 확립

- (1) 산업용 CMS-AYL 대량생산 시스템을 개발하기 위해 배양기의 종류에 따른 유산균과 효모의 배양패턴 비교하고, 냉장 보관 시 저장기간에 따른 미생물 변화를 조사하였다.
- (2) TMF에 AYL혼합균주의 적용실험을 하고자 사료공장에서 제조한 TMF 성분을 분석하였으며, TMF 발효변화를 조사하기 위해 AYL 미생물 처리한 TMF의 암모니아태 질소화합물(NH<sub>4</sub>-N), 건물 소화율, 수분 및 일반성분의 변화를 조사하였다.
- (3) TMF 발효 시 AYL 미생물 처리에 따른 None CMS-TMF와 CMS-TMF의 일반성분의 변화를 조사하였으며, 한우의 CMS-TMF의 기호성을 조사하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

국내 축우용(유우, 육우, 한우) 사료는 과거 농후사료(배합사료)와 조사료를 분리하여 급여하는 형태에서 점차 섬유질배합사료의 형태로 변화하고 있으며, 유우의 사료는 대다수의 농가가 TMR을 급여하고 있다. 사료비의 절감, 농후사료의 과다급여로 인한 대사성 질환의 예방을 위해 비육우 사육에도 TMR의 급여가 점차 증가하고 있다. 그러나 국제유가의 상승 등으로 인하여 수입사료자원의 가격이 계속적으로 상승하고 있는 국내의 현실을 고려하면 국내의 부존 자원 혹은 부산물을 이용하여 발효섬유질배합사료를 개발하고 이의 산업화에 중점을 두고 본 연구가 수행되었다.

1. 축우사료 전용 발효미생물을 개발하여 특허출원을 하고, 이를 발효섬유질배합사료 (TMF) 공장에 보급하고자 한다.
2. CMS(Concentrated Molasses Solubles)를 활용한 TMF 배합비를 축우농가가 널리 활용할 수 있도록 보급한다.
3. 본 연구사업을 통해 TMF의 발효미생물에 대한 특성을 확실하게 규명하여 이를 실제 TMF공장에 보급한다.
4. 국내 부산물 원료와 CMS의 혼합 발효 조건을 확립하여 TMF 배합시 단일 발효원료로 활용함으로써 원료 수급의 항상성을 유지한다.

## SUMMARY (영문요약문)

### I. Title

Development of TMF production method for beef cattle using condensed molasses solubles

### II. Research objective

#### 1. Objectives

- Development of TMF production method using CMS for beef cattle and feeding system.
- Increase animal production feeding TMF containing direct fed microbials.
- Decrease pollution with industrial by-product and importing feed resources by consuming CMS as feed ingredient.

#### 2. Needs

- TMR feeding system and manufacturing technologies have been scrutinized with various ways by many research teams.
- Limited numbers of research have been performed on various TMR starters.
- Less scientific TMR products have caused degrade in TMR products.
- No researches have been performed using CMS for TMR production.
- Feeding system using TMR for Hanwoo is not completely established.

### III. Contents of experiments

#### 1. Development of TMF production method using condensed molasses solubles

- Evaluation of CMS as feed for beef cattle depending upon CMS concentrations.
- Evaluation of CMS as feed for beef cattle depending upon feed ingredients.
- Screening of TMF starter microorganisms.
- Evaluation of CMS containing TMF as feed, storage length with different starter combinations.
- Development of feeding system for beef cattle using CMS containing TMF.

#### 2. Development of lactic acid bacteria as seed culture for TMF and establishment of standard for TMF quality control

- (1) Selection and identification of lactic acid bacteria for TMF manufacture
  - 1) Screening and identification of lactic acid bacteria (LAB)
  - 2) Antimicrobial activity of LAB seed culture
  - 3) Organic acids produced by LAB seed culture
  
- (2) Development of medium based on CMS and incubation conditions for LAB seed culture
  - 1) Development of large-scale medium based on CMS for LAB culture
  - 2) Optimum level of CMS in GYC medium
  - 3) Investigation on the synergistic or antagonistic effect between LAB strains.
  - 4) Pilot-scale experiment
  
- (3) Establishment of standard for TMF quality control
  - 1) Changes in microbial counts during TMF storage
    - Changes in LAB counts during TMF storage
    - Changes in yeast counts during TMF storage
    - Changes in *Aspergillus oryzae* (A. O.) counts during TMF storage
  - 2) Changes in pH during TMF storage
  - 3) Changes in contents of organic acids during TMF storage
    - Changes in content of lactic acid during TMF storage
    - Changes in content of butyric acid during TMF storage
    - Changes in content of acetic acid during TMF storage
    - Changes in content of ethanol during TMF storage

### **3. Development of industrial CMS-AY-LAC fermented TMF production system**

- (1). Investigation of cultivation suitability for strains isolates
  - 1) developing the cultivation condition of solid-state fermentation system for *A. O.(Asp. oryzae)*.
  - 2) developing the cultivation condition of solid-state fermentation system for *Saccharomyces cerevisiae*.
  
- (2). Development of CMS-AYL mixed strains cultivation system and setting the TMF fermentation conditions
  - 1) developing the CMS-AYL mixed strains cultivation system
  - 2) setting the TMF fermentation conditions and productivity increase

- (3). Setting the CMS-AYL industrialization systems and TMF producing technique
  - 1) developing the CMS-AYL mass production system for industries
  - 2) investigating the changes of TMF's components during storage
  - 3) investigating the TMF preferability

## IV. Results

### 1. Development of TMF production method using condensed molasses solubles

- (1) Evaluation of CMS containing TMR as feed for beef cattle

- 1) CMS supplementation level

No significant differences in culture head gas production and VFA production were detected among different CMS concentrations. However increase in CMS concentration caused increase in DM digestibility and microbial protein synthesis.

- 2) Feed ingredient and CMS effect on TMR feed value

Increase in CMS substitution caused decrease in gas production and DM digestibility with increase in CMS concentration. However increase in CMS concentration caused increase in ammonia and VFA production.

- 3) Selection of TMR starter microorganisms

The consumption of NPN in the medium was accomplished with *Aspergillus oryzae* KACC 40242 with 6% of CMS concentration.

- (2) Development of Feeding System using TMF fermented with mixed culture

- 1) *In vivo* feeding trial

Feed consumption was the lowest in CMS 4% treatment group, but there were no significant differences in body weight gain among treatments.

- 2) *in vitro* digestion trial

Culture head gas productions were increased with decrease in CMS supplementation and ammonia productions were increased with increase in CMS supplementation.

- (3) Development of practical application method

Microbial contamination was inhibited with more than 10% of starter inoculation under 6% of CMS concentration and prolonged incubation caused increase in true protein concentration.

## 2. Development of lactic acid bacteria as seed culture for TMF and establishment of standard for TMF quality control

### (1) Selection and identification of lactic acid bacteria for TMF manufacture

#### 1) Screening and identification of lactic acid bacteria (LAB)

Finally three strains of lactic acid bacteria as TMF seed culture were selected based on growth on the medium added CMS and acid tolerance. There were identified as *Lactobacillus casei* DSB03, *L. casei* DSB04, *L. plantarum* DSB05, respectively, based on the 16S rRNA gene sequence analysis.

#### 2) Antimicrobial activity of LAB seed culture

LAB seed culture showed good inhibitory activity against *Escherichia coli*, and it was mainly due to organic acids produced by these strains.

#### 3) Organic acids produced by LAB seed culture

Composition of organic acids produced by finally selected lactic acid bacteria was investigated and main organic acid produced by these strains was lactic acid, reached 218 ~ 313mM after 48 hrs.

### (2) Development of medium based on CMS and incubation conditions for LAB seed culture

#### 1) Development of large-scale medium based on CMS for LAB culture

Large-scale medium based on CMS (GYC-10 medium) for LAB culture was developed. LAB seed culture showed good growth and stability in GYC-10 medium.

#### 2) Optimum level of CMS in GYC medium

LAB counts in GYC-10 medium added CMS 10%  $4.5 \times 10^9$ /ml after incubation for 24 hrs, and GYC medium added 10% CMS showed better LAB growth, LAB stability than other treatments. Optimum incubation time in this medium was approx. 48 hrs which was just after stationary phase.

#### 3) Investigation on the synergistic or antagonistic effect between LAB strains.

*L. plantarum* DSB05 showed better stability than *L. casei* DSB03 in the medium. And coculture of *L. plantarum* DSB05 with *L. casei* DSB03 gave no negative effect in cell growth and stability.

#### 4) Pilot-scale experiment

LAB reached stationary phase after incubation for 28 hrs in jar fermentor, LAB count was

$3.5 \times 10^9/\text{ml} \sim 2.6 \times 10^9/\text{ml}$ . Further incubation after stationary phase caused decrease in cell number during storage.

### (3) Establishment of standard for TMF quality control

#### 1) Changes in microbial counts during TMF storage

##### - Changes in LAB counts during TMF storage

CMS and low temperature inhibited LAB growth during storage of TMF at 4°C. LAB counts reached  $10^8/\text{ml}$  after two weeks at 15°C, while it reached  $10^8/\text{ml}$  after 3 weeks in TMF added 10% CMS. In TMF-CMS stored at 30°C, LAB counts reached  $8.3 \times 10^8/\text{ml}$  after 3 days and protected rapid decrease in LAB counts, which means CMS has positive effect on the stability of TMF at high temperature..

##### - Changes in yeast counts during TMF storage

Yeast counts maintained below  $10^7/\text{ml}$  at 4°C, irrespective of CMS addition. It increased for two weeks at 15°C and three days at 30°C, and decreased after then. Addition of (LAB + yeast) or (LAB+yeast+A. O.) into TMF maintained higher level in yeast counts than other treatments.

##### - Changes in *Aspergillus oryzae* (A. O.) counts during TMF storage

A. O. counts maintained initial level during 1~2 weeks at 4°C or 15°C, irrespective of CMS addition, it decreased rapidly after then. A. O. counts decreased rapidly from immediately after storage at 30°C.

#### 2) Changes in pH during TMF storage

pH in TMF stored at 4°C was not changed during four weeks. pH in TMF stored at 15°C dropped into pH 4.5 (CMS addition) ~ pH 4.0 (CMS no addition) after two weeks, while it stored at 30°C dropped into pH 4.5 (CMS addition) ~ pH 4.0 (CMS no addition) after a week.

#### 3) Changes in contents of organic acids during TMF storage

##### - Changes in content of lactic acid during TMF storage

Lactic acid content in TMF stored at 4°C maintained initial level (CMS addition) or slightly increased (CMS no addition) during 4 weeks. On the other hand, lactic acid content in TMF stored at 15°C increased gradually and reached 1.0 ~ 1.6% after 4 weeks. Lactic acid content in TMF stored at 30°C reached 1.0% (CMS no addition) ~ 1.5% (CMS addition) after 3 days.

- Changes in content of butyric acid during TMF storage

Butyric acid maintained at very low level during 4 weeks, and it's level was maximum 0.06% at 30°C

- Changes in content of acetic acid during TMF storage

Acetic acid level in TMF (CMS no addition) stored at 30°C reached 0.7% after 4 weeks, while it added CMS maintained 0.3% after 4 weeks. It suggests that CMS gave positive effect on the inhibition of acetic acid fermentation at high temperature..

#### 4) Changes in content of ethanol during TMF storage

Ethanol content in TMF stored at 4°C increased gradually during 4 weeks. Ethanol content in TMF stored at 15°C reached 1.2 ~ 1.5% (CMS no addition) after a week, while it in TMF (CMS addition) reached 1% after 3 weeks. TMF added yeast and LAB as seed culture showed higher ethanol content compared with other treatments

### 3. Development of industrial CMS-AY-LAC fermented TMF production system

#### (1). Investigation of cultivation suitability for strains isolates

- 1) To obtain the optimum condition of *A. O.(Asp. oryzae)* in solid-state fermentation, We set up the cultivation systems(materials, temperature, conditions).
- 2) To obtain the optimum condition of Yeast(*Saccharomyces cerevisiae*) in solid-state fermentation, We isolated the yeast strains and investigate the enzymes activities and cultivation systems(materials, fomular, temperature, conditions).

#### (2). Development of CMS-AYL mixed strains cultivation system and TMF fermentation conditions.

- 1) To obtain the optimum cultivation of AYL in solid-state fermentation, We set up the cultivation systems(materials, temperature, formula, conditions).
- 2) To investigate the growth of AYL mixed culture in SB-LY broth(containing CMS), We set up the cultivation systems(materials, temperature, formula, conditions).
- 3) To investigate the growth of AYL mixed cultivation conditions, We set up the cultivation systems(materials, temperature, fomular, conditions) in jar fermentation and observed the morphology of AYL strains.

- 4) We made a lab. scale of TMR, and investigate the changes of AYL strains in process of stater fermentation for setting the cultivation systems(materials, temperature, fomular, conditions) using the of CMS-AYL strains.
- (3). Setting the CMS-AYL cultivation system and TMF processing technic for industries.
- 1) To develop the mass CMS-AYL cultivation systems, WE compare the culture pattern of LAB and Yeast according to fermentation utilities and microbial changes of their storage days.
  - 2) We analysed the components of TMF for applying the AYL mixed strains in field test, and investigated Microbial changes of A. O. and Yeast treated with AYL strains, pH, moisture in various temperatures.
  - 3) We also analysed the changes of the components of None CMS-TMF and CMS-TMF according to AYL treatments during TMF fermentation.

## V. Achievements and further plans

1. We apply the Patent of strains for ruminants feedstuff(TMf in Korea), and promote to domestic TMF factory.
2. We promote to TMF formula with CMS(Concentrated Molasses Solubles) treatment for domestic livestock farmers in practical using.
3. Through this research project, We were able to obtain the microbial strains for TMF and investigate the characteristics of them. We will try to promotion of our acquirement to industrial TMF's factories.

## 약 어 표

---

ADF	Acid Detergent Fiber	산성세제 불용해성 섬유소
ADICP	Acid Detergent Insoluble Crude Protein	산성세제 불용해성 질소
ADL	Acid Detergent Lignin	산성세제 불용해성 리그닌
AO	<i>Aspergillus oryzae</i>	황국균
AY	<i>Aspergillus</i> spp. and yeast	황국균 + 효모
AYL	<i>Aspergillus</i> spp., yeast and <i>Lactobacillus</i> spp.	황국균 + 효모 + 유산균
CMS	Condensed Molassess Solubles	라이신 제조후 폐배지
DFM	Direct Feed Microbial	생균제
LAC	<i>Lactobacillus</i> spp.	유산균
NDF	Neutral Detergent Fiber	중성세제 불용해성 섬유소
NDICP	Neutral Detergent Insoluble Crude Protein	중성세제 불용해성 질소
NFE	Nitrogen Free Extract	가용무질소물
NPN	Non Protein Nitrogen	비단백태질소 화합물
PCR	Polymerase Chain Reaction	중합연쇄측합반응
TDN	Total Digestible Nutrient	가소화 영양소 총량
TMF	Total Mixed Ration Fermentation	발효 섬유질 배합 사료
TMR	Total Mixed Ration	섬유질 배합 사료
VFA	Volatile Fatty Acid	휘발성 지방산

---

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	22
1. Object.....	22
2. Significance.....	22
3. Scope.....	24
Chapter 2. Status of research and development .....	25
Chapter 3. Results	
1. Development of TMF production method using condensed molasses solubles.....	27
2. Development of lactic acid bacteria as seed culture for TMF and establishment of standard for TMF quality control .....	106
3. Development of industrial CMS-AY-LAC fermented TMF production system.....	176
Chapter 4. Achievements and contribution	
1. Achievements.....	213
2. Research contribution.....	214
Chapter 5. Research products and further plans	
1. Research products.....	217
2. Further plans.....	218
Chapter 6. New technical and scientific information.....	219
Chapter 7. References.....	220

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	22
1절	연구개발의 목적.....	22
2절	연구개발의 필요성.....	22
3절	연구개발의 범위.....	24
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	25
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	27
1절	라이신 발효 부산물을 이용한 TMF 사양체계 개발.....	27
2절	TMF 용 유산균제제의 개발 및 TMF 품질관리기준 설정.....	106
3절	TMF용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구.....	174
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	210
1 절.	목표달성도.....	210
2 절.	관련분야에의 기여도.....	211
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	214
1 절.	연구개발 성과.....	214
2 절.	성과활용 계획.....	214
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	216
제 7 장	참고문헌.....	217

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 1절. 연구개발의 목적

1. 라이신 폐배지를 이용한 축우용 발효섬유질 배합사료(Total Mixed Ration Fermented, TMF)의 개발 및 사양체계 확립
2. 생균제용 균주를 이용한 TMF 제조를 통한 가축의 생산성 증진
3. 산업부산물의 이용성 향상을 통한 환경오염 저감 및 원료사료의 자급율 향상

### 2절. 연구개발의 필요성

가축의 생산에 있어서 사료비는 전체 생산비의 70% 이상을 차지하고 있다. 따라서 사료비의 절감은 가축의 생산비 절감과 직접적으로 관련되어 사료비 절감을 위해 농가부산물 혹은 산업부산물 등을 사료자원으로 이용하려는 다양한 노력들이 시도되어왔다. 특히 부산물은 일반적으로 사료곡물에 비하여 가격이 저렴하고, 가용성 유기물의 함량이 높기 때문에 사료곡물을 대체하여 원료사료로의 가능성을 인정받고 있으나, 유기물과 수분의 함유량이 높아 쉽게 부패되고 부피가 큰 문제점을 가지고 있다. 따라서 그러나 이러한 부산물을 이용하여 반추가축용 섬유질 배합사료(TMR, Total Mixed Ratio)를 제조할 경우 이용성을 증진시킬 수 있을 뿐 아니라, 수입되는 사료곡물의 일부를 대체할 수 있을 것이다.

TMR이란 반추동물의 영양생리적인 특성을 고려하여 조사료와 농후사료를 적정비율로 혼합한 것으로 완전혼합사료 또는 TMR로 불렸으나, 2001년 개정된 사료관리법에 의하면 반추가축용 섬유질 배합사료라고 정의하였다. 국내에는 1980년대 초반에 TMR의 개념이 소개되었으며, 1990년대 이후 대규모 낙농농가를 중심으로 보급되기 시작하여 1990년대 후반부터 한우와 같은 비육우의 사양에도 이용되기 시작하였다. 특히 TMR을 발효시킨 TMF(Total Mixed Ration Fermentation 혹은 Total Mixed Fermentation Feed, TMFF)는 농림기술지원센터의 지원을 받은 서울대학의 연구가 보고되면서(1997) 국내에서 생산되기 시작하였다. TMF의 장점으로서는 수분의 함유량이 높은 농가부산물 혹은 식품부산물을 조사료와 함께 혼합하여 배양함으로써 1)TMR의 문제점으로 지적되는 곡류사료 알곡과 조사료의 분리가 방지되며, 2)배합된 원료사료의 물리화학적 특성변화로 인하여 사료의 수분일 일정하게 유지되고, 3)미생물의 발효과정을 통해 조사료 및 곡류사료의 영양소의 소화율 증진되고, 4)미생물 발효과정에서 유기산이 생성되어 오염미생물의 생육이 억제되어 사료의 보관성이 개선되는 장점이 있다.

가축의 생산성 증진을 위한 사료첨가용 항생제의 이용이 제한되면서 가축의 생산성 증진 목적의 항생제대체제의 개발을 위하여 다양한 연구가 시도되고 있으며, 이러한 항생제대체제로 최근 많이 이용되는 사료첨가제가 DFM(Direct Fed Microbials)이라 불리는 미생물제제이다. DFM은 1) 가축의 장내에서 유해한 세균의 정착 및 증식을 억제하고, 2)미생물 발효산물이 가축의 면역능력을 자극하여 면역성이 증진되며, 3)미생물의 발효과정에서 생산된 소화효소에

의하여 영양소의 소화율이 증진되며, 4)체외로 배설된 분변의 미생물 성장을 억제함으로써 축산분뇨의 악취저감효과가 있다. 따라서 DFM은 가축의 생산성 증진효과와 함께 축산환경의 개선을 위해 그 사용량이 점차 증가하는 추세에 있다.

가축의 사료첨가제로 이용되는 라이신은 미생물의 발효를 통하여 생산되며, 연간 10만 톤 이상이 생산되고 있다. 라이신의 발효에는 당밀을 주원료로 하는 배지가 이용되며, 발효 부산물로 CMS(condensed Molasses Solubles)가 생산되고 있다. 화학적 조성을 살펴볼 경우 CMS는 조단백질이 41 - 43%, 단백질 질소화합물이 13%, 비단백태 질소화합물이 30%, 가용 무질소물이 30% 함유되어 있다. 또한 아미노산 중에는 라이신의 함량이 1.54% 이며, 광물질 중에는 황과 염소의 성분이 높게 함유되어 있다. CMS의 영양성분의 특성을 살펴보면 NPN의 함량이 높은 문제점으로 인하여 단위가축의 사료에는 그 이용성이 제한되나, 비단백태질소화합물의 이용이 가능한 반추가축의 사료에는 첨가가 가능하며, 실제 연구결과에 의하면 농후사료에 10% 수준까지 이용이 가능하다는 보고가 있다. 또한 CMS는 단백질의 함량이 높을 뿐 아니라, 당밀이 배지의 주성분이기 때문에 수용성탄수화물의 함량이 높아 반추가축의 에너지사료로도 이용될 수 있는 가능성을 갖고 있다. 그러나 NPN의 사용 기피와 당밀첨가에 따른 반추가축의 당뇨증 발생 위험으로 인하여 사료첨가제로 이용되는 양은 전체 생산량의 30% 내외이다. 따라서 국내에서 연간 2만4천톤 이상 생산되는 CMS의 70%는 사용용도가 없는 관계로 해양에 투기되어 해양생태계의 부영양화를 유발할 뿐 아니라 해양 투기에 따르는 비용의 추가로 소요되고 있다.

CMS를 반추가축의 농후사료와 혼합하여 급여할 경우 NPN의 과다급여로 인한 요소중독증이나, 과다한 단당류의 공급으로 인한 당뇨증을 유발할 수 있으나, TMR의 원료로 이용할 경우 영양소의 균형으로 인한 요소중독이나 당뇨증을 저하시킬 수 있다. 그러나 TMF의 형태로 급여할 경우에는 미생물의 발효과정에서 미생물이 NPN을 미생물체 단백질의 합성에 이용하므로 전체 조단백의 함량변화 없이 NPN의 함량을 저하시킴으로써 요소중독의 위험을 제거할 수 있을 뿐 아니라, 수용성 단당류를 분해하여 휘발성지방산을 생성함으로써 당뇨증의 위험을 제거할 수 있는 장점이 있다. 또한 TMF 발효과정에서 생성된 유기산으로 인하여 산도가 저하됨으로써 오염미생물의 성장을 억제하여 TMF의 보존성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

원료사료의 대부분을 수입하는 국내의 실정을 살펴보면, 2006년 1월부터 10월까지 10개월간 사료용으로 수입된 사료용 곡류는 대략 686만 톤이었으며, 식물성단백질은 226만 톤이었다. 또한 수입된 원료사료를 이용하여 생산된 반추가축용 배합사료의 생산량은 423만 톤이었다. 따라서 반추가축용 사료의 10%만 CMS로 대체할 경우 국내에서 라이신의 발효과정에서 발생하는 산업폐기물인 CMS를 전량 소비할 수 있을 뿐 아니라, 사용된 CMS에 상응하는 식물성단백질 사료의 수입절감효과를 유도할 수 있을 것이다. 또한 축산농가의 입장에서는 추가의 생균제 급여가 필요하지 않은 고품질의 사료를 저가로 공급받음으로써 농가의 수익성 증진에 기여할 수 있을 것이다. 더구나 CMS를 식품부산물인 비지박 등과 같은 원료와 발효시킴으로써 비단백체질소화합물을 미생물체단백질의 형태로 전환시킬 경우 반추동물에 한정적으로 사용하던 CMS를 단위동물의 사료에 이용함으로써 단위동물의 사료에 이용되는 곡물의 수입대체효과를 기대할 수 있을 것이다.

### 3절. 연구개발의 범위

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS첨가 TMR의 사료가치 평가 및 CMS첨가 TMF 균주 선발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS 첨가수준에 따른 TMR의 사료가치 평가</li> <li>○ 원료사료의 조건에 따른 CMS첨가 TMR의 사료가치 평가</li> <li>○ CMS첨가 TMF용 균주 선발</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ TMF 제조용 유산균제제의 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS 적합성 유산균 균주의 선발</li> <li>○ 선발된 균주의 생화학적 특성 조사 및 동정</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선발된 균주의 배양 적합성 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고상 배양상태에서의 황국균(AO : <i>A. oryzae</i>) 최적 배양조건 개발</li> <li>○ 고상 배양상태에서의 효모(Yeast : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 최적 배양조건 개발</li> </ul>
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS-AY 및 CMS-LAC TMF 사양체계 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS-AY TMF의 사료가치 평가 및 보관성 평가</li> <li>○ CMS-LAC TMF의 사료가치 평가</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS를 이용한 유산균 배양방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS를 이용한 유산균 배양방법 확립 및 상업용 배지의 개발</li> <li>○ 유산균주와 <i>A. oryzae</i> 또는 <i>S. cerevisiae</i>와의 혼합배양 검토</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발 및 TMF 발효조건 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발</li> <li>○ TMF의 발효조건 개발 및 생산기법 확립</li> </ul>
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS-AY-LAC TMF 실용화 방안 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 육성우용 CMS-AYL-TMF 사양체계 개발</li> <li>○ 비육전기용 CMS-AYL-TMF 사양체계 개발</li> <li>○ CMS-AYL-TMF의 경제성 분석</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 종균의 공급형태 확립 및 저장안정성 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ TMF 저장중 미생물의 경시변화 관찰</li> <li>○ TMF 저장중 유기산, flavor 및 악취발생 여부 관찰</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CMS-AYL 산업화 시스템 확립 및 TMF 생산기법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산업용 CMS-AYL 대량 생산 시스템 개발</li> <li>○ TMF 적용 실험</li> <li>○ TMF 발효변화 조사</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 본 과제 기술과 관련된 선행 연구 결과

- 라이신 폐배지 (CMS, Concentrated Molasis Soluble)를 이용한 *Aspergillus oryzae*의 배양 방법 개발 및 CMS-A. O.처리에 따른 반추위 섬유소 소화율 개선 효과: 본 연구진은 미생물을 이용하여 라이신을 합성하고 남은 폐배지를 이용하여 기존에 생균제로 이용되고 있는 *Aspergillus oryzae* 곰팡이의 배양방법을 확립하였다 ('05 농림기술관리센터 연차보고서). 또한 *Aspergillus oryzae* 중 섬유소 분해효소의 분비능력이 우수한 균주를 선발하여 CMS 배지에서 배양한 후 볏짚에 처리하였을 경우 볏짚의 *in vitro* 소화율이 개선됨을 확인하였다('06 아시아-태평양 축산학회 학술발표).
- 반추위 혐기성곰팡이 배양액 첨가에 따른 볏짚의 반추위 소화율 개선 효과: 반추위 혐기성 곰팡이 *Neocallimastix* 배양액을 농도별로 처리를 달리하여 볏짚에 첨가하였을 경우 볏짚의 *in vitro* 소화율이 개선됨을 확인하였다('03 한국동물자원과학회 학술발표).
- *Aspergillus oryzae*의 첨가에 따른 반추위 혐기성곰팡이 성장 촉진 연구: 반추위 혐기성 곰팡이 *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces*, *Caecomyces*에 *Aspergillus oryzae* 배양액의 첨가량 및 첨가조건을 달리하였을 경우 반추위 혐기성 곰팡이의 성장 촉진 및 소화율 개선 효과를 확인하였다(Applied Microbiol. Biotech: 1996년 2편, 2004년 1편, Applied Microbiology 1999년 1편).
- 자돈분변 및 사료 등에서 항균력이 우수한 유산균주들을 선발하였다. API kit 및 16S rDNA 염기서열분석을 통한 동정결과, 각각 *E. faecalis* CSII2-2, *L. fermentum* CSIII2-1 및 *L. acidophilus* PF01로 명명하였다. 분리균주 중 *E. faecalis* CSII2-2와 *L. fermentum* CSIII2-1의 배양특성을 조사한 결과, 내산성 및 내담즙성 모두 우수한 것으로 나타났다. 내산성의 경우, pH 4에서는 전혀 억제되지 않으며, pH 2에서도 4시간 후에 10% 이상 생존하였고, 또한 내담즙성의 경우에도 0.5% bile extract 존재하에서 24시간 이상 생존하였다. 한편, *L. acidophilus* PF01의 경우 장내 흡착성은 우수하였지만 주요항균물질이 유기산에 의한 것으로 나타났다. *E. faecalis* CSII2-2와 *L. fermentum* CSIII2-1의 경우, 주요항균물질은 catalase 효소처리 및 HPLC 분석 등을 통해 확인할 결과 hydrogen peroxide로 확인되었으며 자돈설사 원인균인 대장균과 살모넬라균에 대한 항균력이 매우 우수하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 정량법을 확립하였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생산 패턴을 조사한 결과 성장정지기 초기에서 최대 3.5mM의 hydrogen peroxide가 분비됨을 알 수 있었다 (Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, Jan. 2005)
- 이유전 자돈의 분변에서 분리 선발된 젖산균중 젖산균과 혼합 배양 중 *E. coli* 생장억제력, 내담즙성, 내산성이 뛰어난 균주를 선발하였다. API CHL 50을 이용한 당 발효 시험 및 API 동정 프로그램을 이용하여 분석한 결과 98.7%의 신뢰도로 *Lactobacillus acidophilus*로 판명되었다. 분리한 젖산균은 0.15% 이상의 담즙 농도에 대해 내성이 있는 것으로 나타나 장관 내에서 증식 가능성이 높은 균주라 생각되었다. 0.1N HCl로 MRS broth를 pH 2로 고정된 후 *L. acidophilus*를 20분 간격으로 2시간동안 생균수를 측정된 결과, pH 2에서도 강한 내성을 나타내는 것으로 나타났다. (Asian-Australasian Journal of

## 2절. 국내 기술현황과 문제점

- TMR의 급여방법, 제조방법에 대한 다양한 연구가 수행되어 왔으며, 현재에도 TMR의 품질향상을 위한 다양한 연구가 진행되고 있음.
- 볏짚위주의 농가부산물을 이용한 TMF가 연구되었으나, 다양한 균주를 이용한 연구는 수행되지 않았음.
- 체계적인 연구가 진행되지 않은 상태에서 자가TMR 수준의 다양한 TMF 제품이 군소업체를 통해 출하되어 TMF에 대한 신뢰도를 저하시키고 있음.
- CMS를 농후사료에 첨가하여 급여한 연구는 진행되었으나, CMS를 이용한 TMF의 생산공법에 대한 연구는 전무함.
- 한우용 TMF의 성장단계별 사양체계는 정립되어 있지 않음.
- 한우 고급육 생산을 위한 TMF의 급여체계 및 사료의 배합비율은 정립되어 있지 않음.

## 3절. 국외 기술현황과 문제점

- CMS 첨가에 따른 반추위 미생물 단백질 합성량 증진에 대한 다양한 연구가 진행되었음.
- 반추가축용 사료 첨가제로 pellet 사료의 기호성 증진 목적으로 이용되고 있음.
- CMS를 이용한 TMF의 생산에 대한 연구는 보고되지 않았음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 라이신발효부산물을 이용한 TMF 사양체계 개발

#### 1. CMS 첨가 TMR의 사료가치 평가 및 CMS 첨가 TMR 균주 선발

##### 가. CMS 첨가수준에 따른 TMR의 사료가치 평가

###### (1) 재료 및 방법

시험에 사용한 CMS의 일반성분과 아미노산 분석결과는 아래와 같다. 비육전기 한우의 영양소 요구량을 한국사양표준에 근거하여 분석한 후 농촌진흥청에서 제작한 농가자가 사료배합 프로그램을 사용하여 TMR 배합비를 작성하여 시험에 사용하였다. TMR 사료배합에 사용한 원료 사료의 성분분석은 표 1과 같다. 표 1의 원료사료 성분을 기초로 하여 CMS 첨가 TMR의 사료가치 평가 시험에 사용한 배합비는 표 2와 같다.

CMS가 농도별로 처리된 TMR의 *in vitro* 소화율을 측정하였다. 즉, 0.5g의 TMR 시료를 반추 위액이 함유된 50ml의 인공위액에 24시간 배양한 후 pH, 휘발성지방산 농도, 건물소화율, 가스 발생량, 암모니아 농도 및 미생물 성장을 분석하였다. 반추위 미생물 성장의 분석을 위해서 사용한 정량 PCR용 primer는 표 3과 같다.

CMS의 일반성분결과(%) 와 아미노산 분석 결과(g/100g)

수분	31.15
조단백질	40.68
조섬유	0.28
조회분	2.4
비단백태질소	0.02
Aspartic acid	0.55
Threonine	0.09
Serine	0.11
Glutamic acid	1.24
Proline	0.10
Glycine	0.17
Alanine	0.35
Valine	0.15
Isoleucine	0.10
Leucine	0.09
Thyrosine	0.05
Phenylalanine	0.08
Histidine	1.05
Lysine	6.78
Arginine	1.74
Cystine	0.20
Methionione	0.04
Tryptophan	0.01

표 1. TMR 원료 사료 분석

원료사료	Moisture(%)	DM(%)	CP(%)	CF(%)	Ash(%)	EE(%)
두부박	73.30	26.70	16.31	28.87	4.36	6.21
맥주박	66.28	33.72	19.05	21.35	5.48	7.40
전분박	79.23	20.77	35.46	1.90	2.90	5.91
쌀주정박	68.69	31.31	44.34	12.73	5.43	6.00
참깨묵	6.40	93.60	41.33	16.78	13.49	16.02
단백피	16.67	83.33	19.91	6.93	6.43	15.21
소맥피	11.63	88.37	17.63	7.63	2.70	13.35
옥수수후레이크	13.20	86.80	8.24	1.20	1.29	15.50
비트펠프	9.15	90.85	8.96	17.43	5.77	11.08
면실	6.36	93.64	21.77	26.53	3.41	22.68
큰싸일리지	66.24	33.76	5.33	17.35	6.58	12.06
볶음보리	8.99	91.01	11.15	0.83	2.82	12.96
맥피	7.97	92.03	11.16	17.98	4.57	11.12
버섯배지	67.25	32.75	6.57	39.18	8.54	3.12
맥근	7.05	92.95	32.59	12.18	7.73	1.52
미강	11.32	88.68	13.13	6.53	10.62	26.31
알팔파펠렛	8.64	91.36	10.97	44.01	9.52	10.01
옥수수주정박	13.13	86.87	26.09	5.72	1.69	21.94
파인애플사일리지	51.71	48.29	10.98	20.32	6.44	9.34
아마종실	0.28	99.72	21.48	7.63	3.66	30.61
전지대두	9.00	91.00	36.21	6.09	7.55	20.77
과옥쇄	12.67	87.33	7.45	1.21	1.95	13.26

표 2. CMS 첨가수준에 따른 TMR의 배합비

	대조구 (CMS 무처리)	처리1 (CMS 4%첨가구)	처리2 (CMS 8%첨가구)	처리3 (CMS 12%첨가구)
	----- % DM -----			
벼짚	9.842	9.842	9.842	9.842
두부박	20	20	20	20
전분박	2.598	2.598	2.598	2.598
쌀주정박	10.891	10.891	10.891	10.891
참깨묵	10	10	10	10
면실	5	5	5	5
콘싸일리지	5	5	5	5
버섯배지	4.323	4.323	4.323	4.323
알팔파펠렛	23.011	23.011	23.011	23.011
옥수수주정박	0.103	0.103	0.103	0.103
전지대두	4.816	4.816	4.816	4.816
CMS	0	4	8	12

표 3. 정량 PCR 용 Primer

Target bacterium	Forward primer	Reverse primer
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA
<i>Ruminococcus albus</i>	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA
<i>General anaerobic fungi</i>	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	CAATTCACAAAGGTTAGGATGATT

(2) 결과 및 고찰

CMS 를 첨가하여 배합한 TMR의 배양시간에 따른 pH의 변화는 표 4에 나타내었다. 배양 후 12시간대까지 pH가 감소하였고 12시간부터 24시간까지는 6.80대로 유지되었다. 처리2 (CMS 8% 첨가구)를 제외한 대조구와 전체 처리구에서 pH가 낮은 쪽으로 감소하였으며, 처리2 (CMS 8% 첨가구)에서만 6시간 이후 24시간 까지가 큰 폭으로 변화하였다. 처리1 (CMS 4% 첨가구)과 처리3 (CMS 12% 첨가구)은 12시간과 24시간 배양 후 측정된 pH가 대조구 (CMS 무첨가구)보다 높았다( $P<0.05$ ). 반면 24시간 배양 후 처리2 (CMS 8% 첨가구)에서 6.79로 가장 낮았다( $P<0.05$ ).

표 4. CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 pH에 미치는 영향

	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	6.88	6.86 <sup>b</sup>	6.79 <sup>c</sup>	6.80 <sup>bc</sup>
처리1	6.84	6.83 <sup>c</sup>	6.80 <sup>bc</sup>	6.82 <sup>a</sup>
처리2	6.91	6.90 <sup>a</sup>	6.83 <sup>a</sup>	6.79 <sup>c</sup>
처리3	6.91	6.86 <sup>b</sup>	6.82 <sup>ab</sup>	6.81 <sup>ab</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ ( $P<0.05$ )

CMS 를 첨가하여 배합한 TMR의 배양시간에 따른 pH의 변화는 표 5에 나타내었다. Gas 발생량은 12시간대에 처리2(CMS 8% 첨가구)에서 62ml로 가장 높았으나 처리 1(CMS 4% 첨가구)과 대조구와는 유의적이 차이를 보이지 않았다. 배양 후 3시간대 에서는 대조구가 20.43ml로 가장 높았으나( $P<0.05$ ), 6시간에는 처리3(CMS 12% 첨가구)이 29.66ml( $P<0.05$ ), 12시간에는 처리1(CMS 4% 첨가구)이 43.52ml로 각각 가장 높았다( $P<0.05$ ).

표 5. CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 Gas 발생량(ml)에 미치는 영향

	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	20.43 <sup>a</sup>	26.71 <sup>c</sup>	43.39 <sup>a</sup>	60.71 <sup>a</sup>
처리1	19.14 <sup>ab</sup>	28.25 <sup>ab</sup>	43.52 <sup>a</sup>	60.71 <sup>a</sup>
처리2	17.73 <sup>b</sup>	27.35 <sup>bc</sup>	40.70 <sup>b</sup>	62.00 <sup>a</sup>
처리3	18.50 <sup>b</sup>	29.66 <sup>a</sup>	39.29 <sup>b</sup>	58.53 <sup>b</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ ( $P<0.05$ )

CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 배양시간에 따른 사료의 건물소화율에 미치는 영향은 표 6에 나타내었다. CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 건물소화율은 모든 시간대에 있어서 CMS 첨가량이 증가함에 비례적으로 증가하였다. 배양 후 모든 시간대에서 3, 6, 12 그리고 24시간대에서 처리3 (CMS 12% 첨가구)이 각각 17.41%( $P<0.05$ ), 20.25%, 29.36% 그리고 45.33%( $P<0.05$ ) 로

가장 높았다. 이는 첨가한 CMS가 초기 배양시 빠른 속도로 해리 되면서 일부 영향을 미친 것으로 생각된다. 초기에 해리되어버린 CMS의 영향을 제거하기 위해, 0시간대 배양초기 분해율을 각 시간대의 소화율에서 제외하고 계산했을 경우, 24시간대에 대조구(CMS 무첨가구), 처리1(CMS 4% 첨가구), 처리2(CMS 8% 첨가구) 그리고 처리3(CMS 12% 첨가구) 이 각각 9.97, 12.30, 13.60 그리고 15.97로 처리3이 가장 높았다. 이는 첨가한 CMS가 초기 배양시 빠른 속도로 해리 되면서 일부 영향을 미친 것을 제외하고도 TMR에 CMS 의 첨가 농도가 높을수록 DM 소화율이 증가된다는 것을 의미한다.

표 6. CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 DM 소화율(%)에 미치는 영향

	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	9.00 <sup>b</sup>	12.61	26.77	36.74 <sup>c</sup>
처리1	10.81 <sup>b</sup>	16.87	26.13	38.43 <sup>c</sup>
처리2	15.27 <sup>a</sup>	15.46	28.17	41.77 <sup>b</sup>
처리3	17.41 <sup>a</sup>	20.25	29.36	45.33 <sup>a</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ (P<0.05)

CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 0시간대의 암모니아 발생량(표 7)은 대조구(CMS 무첨가구), 처리1(CMS 4% 첨가구), 처리2(CMS 8% 첨가구) 그리고 처리3(CMS 12% 첨가구)이 각각 3.02mM, 4.10mM, 4.88mM 그리고 6.01mM 이었다. 이렇게 CMS 첨가량이 증가할수록 암모니아 발생량이 증가한 이유는 CMS 내에 함유된 NPN 중 암모니아 성분이 빠른 속도로 해리되었기 때문으로 추정된다. 또한 0시간에서 3시간사이의 암모니아 증가량이 그 후 시간대에 비해 작은 이유는 CMS에서 빠르게 녹아나온 NPN 성분 중 암모니아와 아미노산 성분 그리고 분해가 빠른 탄수화물을 이용하여 미생물체 단백질의합성이 촉진된 것으로 생각된다.

표 7. CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 암모니아 발생량(mM)에 미치는 영향

	0시간	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	3.02 <sup>d</sup>	4.73 <sup>d</sup>	8.58 <sup>d</sup>	8.98 <sup>d</sup>	8.49 <sup>d</sup>
처리1	4.10 <sup>c</sup>	5.70 <sup>c</sup>	10.02 <sup>c</sup>	12.76 <sup>c</sup>	10.20 <sup>c</sup>
처리2	4.88 <sup>b</sup>	7.03 <sup>b</sup>	11.91 <sup>b</sup>	14.35 <sup>b</sup>	11.65 <sup>b</sup>
처리3	6.01 <sup>a</sup>	7.81 <sup>a</sup>	12.85 <sup>a</sup>	16.30 <sup>a</sup>	14.93 <sup>a</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ (P<0.05)

CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 배양시간에 따른 암모니아 발생량은 모든 시간대에서 CMS의 첨가농도가 증가할수록 높았다(P<0.05). 대조구는 0, 3, 6, 12 그리고 24시간에 각각 3.02mM, 4.73mM, 8.58mM, 8.98mM 그리고 8.49mM 로 모든 시간대에서 가장 낮았다(p<0.05). 처리구3(CMS 12% 첨가구)에서는 0, 3, 6, 12 그리고 24시간에 각각 6.01mM, 7.81mM, 12.85mM, 16.30mM 그리고 14.93mM 으로 모든 시간대에서 가장 높았다(p<0.05). 대조구를 포

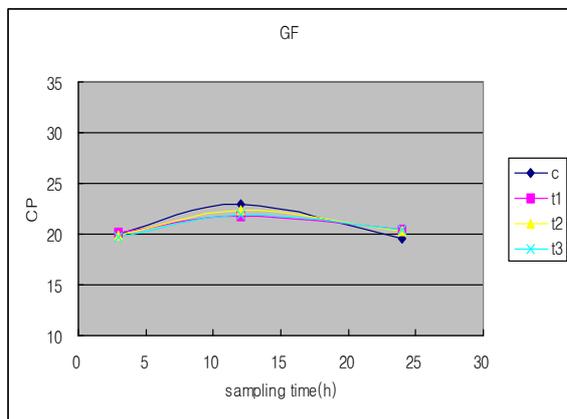
함한 모든 처리구에서 배양 후 12시간까지 암모니아 발생량이 증가하다가, 24시간째에 6시간 수준으로 감소하였다.

CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 VFA 생성량은 표 8에 나타내었다. 모든 배양시간대에서 총 VFA 생성량은 CMS 첨가수준간에 큰 차이가 없었다. 배양시간이 늘어날 수록 총 VFA 생성량은 점차 증가하였고, A/P ratio 는 감소하였다. 총 VFA 생성량이 배양시간이 늘어날 수록 증가하는 것은 pH 변화와 일치하였다. 총 VFA 생성량은 0시간에서 대조구(CMS 무첨가구)가 27.707mM, 3시간에서 처리3(CMS 12% 첨가구)이 32.473mM, 6시간에서 처리3(CMS 12% 첨가구)이 38.730mM, 12시간에서 처리1(CMS 4% 첨가구)이 49.130mM 그리고 24시간에서 대조구(CMS 무첨가구)가 58.633mM 으로 각 시간대에서 가장 높았다. 또한 A/P ratio는 0시간에서 처리1(CMS 4% 첨가구)가 4.877, 3시간에서 처리2(CMS 8% 첨가구)이 4.500, 6시간에서 대조구(CMS 무첨가구)가 4.341, 12시간에서 처리3(CMS 12% 첨가구)이 4.146 그리고 24시간에서 처리1(CMS 4% 첨가구)이 4.064 으로 각 시간대에서 가장 높았다. 각 VFA 농도의 변화를 보면, 반추위내 VFA의 많은 비율을 차지하는 acetate와 propionate의 농도는 일정한 경향이 없었다.

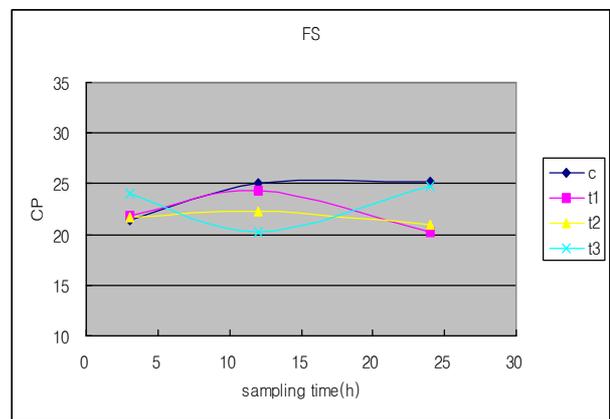
표 8. CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 소화율 시험에서 VFA(mM) 생성량에 미치는 영향

		acetate	proponate	i-butylate	butylate	ivalerate	valerate	Total	A/P
0시간	대조구	19.060	4.292	0.555	2.550	0.580	0.670	27.707	4.441
	처리1	17.422	3.572	0.211	2.032	0.273	0.186	23.696	4.877
	처리2	17.858	3.715	0.207	2.090	0.273	0.180	24.323	4.807
	처리3	17.618	3.634	0.198	2.034	0.264	0.183	23.932	4.849
3시간	대조구	23.059	5.337	0.295	2.756	0.419	0.303	32.169	4.320
	처리1	20.923	4.799	0.308	2.516	0.373	0.272	29.191	4.360
	처리2	17.455	3.879	0.380	2.059	0.299	0.210	24.282	4.500
	처리3	23.508	5.360	0.251	2.692	0.359	0.303	32.473	4.386
6시간	대조구	25.252	5.817	0.320	2.884	0.431	0.323	35.027	4.341
	처리1	25.484	5.935	0.330	3.000	0.444	0.340	35.534	4.294
	처리2	26.219	6.136	0.322	3.126	0.456	0.353	36.611	4.273
	처리3	27.780	6.492	0.324	3.306	0.460	0.367	38.730	4.279
12시간	대조구	34.860	8.525	0.393	3.787	0.564	0.452	48.580	4.089
	처리1	35.134	8.617	0.396	3.958	0.565	0.460	49.130	4.077
	처리2	32.846	7.989	0.366	3.771	0.520	0.428	45.920	4.111
	처리3	32.913	7.939	0.360	3.837	0.507	0.423	45.980	4.146
24시간	대조구	41.696	10.408	0.582	4.410	0.906	0.631	58.633	4.006
	처리1	39.571	9.736	0.540	4.265	0.850	0.593	55.554	4.064
	처리2	39.563	10.235	0.602	4.687	0.930	0.646	56.663	3.865
	처리3	39.384	10.342	0.638	4.977	0.983	0.669	56.994	3.808

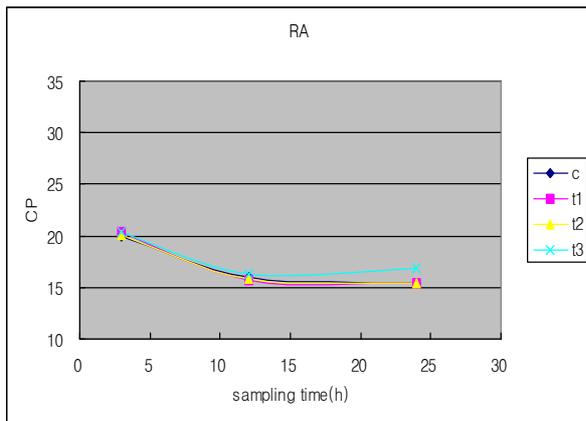
CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 미생물 성장에 미치는 영향을 real time PCR을 이용하여 분석한 결과는 그림 1과 같다. *Fibrobacter succinogenes*를 제외한 *General anaerobic fungi*, *Ruminococcus albus* 그리고 *Ruminococcus flavefaciens*의 균체수는 CMS의 첨가수준에 따른 변화가 없었다. *General anaerobic fungi* 와 *Ruminococcus flavefaciens* 는 모든 첨가수준에서 배양 3시간에서 12시간째에 증가하다가 24시간째에 다시 감소하는 경향을 보였다. *Ruminococcus albus*는 배양후 12시간까지 감소하다가 24시간째 까지 그 수준이 유지되었다. *Fibrobacter succinogenes* 는 배양시간이 길어질수록 대조구(CMS 무첨가구)에 비해 처리1(CMS 4% 첨가구)과 처리2(CMS 8% 첨가구)는 점차 낮은 수준을 유지하였고, 처리3(CMS 12% 첨가구)은 24시간째에 대조구 수준으로 증가하였다. *in vitro* 소화율시험의 결과를 CMS를 농도를 달리하여 제조한 TMR에 있어서 반추위 미생물의 조성에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.



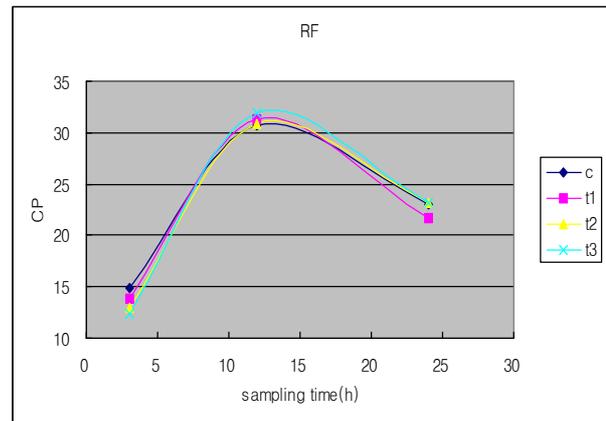
(A) General anaerobic fungi



(B) *Fibrobacter succinogenes*



(C) *Ruminococcus albus*



(D) *Ruminococcus flavefaciens*

그림 1 . CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 미생물 성장에 미치는 영향

나. 원료사료의 조건에 따른 CMS 첨가 TMR의 사료가치 평가

(1) 재료 및 방법

비육전기 한우의 영양소 요구량을 한국사양표준에 근거하여 분석한 후 농촌진흥청에서 제작한 농가자가 사료배합 프로그램을 사용하여 TMR 배합비를 작성하여 시험에 사용하였다. 표 1의 원료사료 성분을 기초로 하여 CMS 첨가 TMR의 사료가치 평가 시험에 사용한 배합비는 표 9와 같다.

TMR 제조시 원료사료의 종류 및 조건을 달리하고 부족한 에너지와 단백질의 수준을 CMS를 대체하였을 경우의 *in vitro* 소화율을 측정하였다. 즉, 0.5g의 TMR 시료를 반추위액이 함유된 50ml의 인공위액에 24시간 배양한 후 pH, 휘발성지방산 농도, 건물소화율, 가스발생량, 암모니아 농도 및 미생물 성장을 분석하였다. 반추위 미생물 성장의 분석을 위해서 사용한 정량 PCR 용 primer는 표 3과 같다.

표 9. 원료사료 조건에 따른 TMR의 배합비

	대조구 (CMS 무처리구)	처리1 (CMS 4%대체구)	처리2 (CMS 8%대체구)	처리3 (CMS 12%대체구)
	----- % DM -----			
벼짚	9.842	13.987	15.279	16.011
두부박	20	20	12.734	11.217
전분박	2.598	2.626	-	-
쌀주정박	10.891	15.898	20	20
참깨묵	10	9.443	4.632	0.051
면실	5	1.328	0.492	-
콘싸일리지	5	5	5	5
버섯배지	4.323	4.642	10	10
알팔파펠렛	23.011	22.676	23.462	25.32
옥수수주정박	0.103	-	-	-
전지대두	4.816	-	-	-
CMS	-	4	8	12

(2) 결과 및 고찰

원료사료 조건에 따른 CMS 첨가 TMR이 *in vitro* 시험에서 pH에 미치는 영향은 표 10에 나타내었다 pH는 3시간에 처리2(CMS 8% 대체구)가 6.92, 6시간에 처리2(CMS 8% 대체구)가 6.88 12시간에 처리(CMS 4% 대체구)1과 3(CMS 12% 대체구)이 6.84 그리고 24시간에 처리2(CMS 8% 대체구)가 6.82로 가장 높았다. 또한 3시간에 처리1(CMS 4% 대체구)가 6.87, 6시간에 대조구(CMS 무첨가구)가 6.86, 12시간에 대조구(CMS 무첨가구)가 6.79 그리고 24시간에

대조구(CMS 무첨가구)와 처리1(CMS 4% 대체구)가 6.80으로 가장 낮았다. 배양시간이 증가할수록 모든 첨가구에서 pH는 전체적으로 감소하였다.

표 10. 원료사료 조건에 따른 CMS 첨가 TMR이 *in vitro* 시험에서 pH에 미치는 영향

	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	6.88	6.86	6.79	6.80
처리1	6.87	6.87	6.84	6.80
처리2	6.92	6.88	6.82	6.82
처리3	6.89	6.87	6.84	6.81

CMS 대체 수준을 달리하여 배양했을 경우 *in vitro* 시험에서의 가스 발생량은 표 11에 제시하였다. 가스 발생량은 3시간에 대조구(CMS 무첨가구)가 20.43ml, 6시간에 대조구(CMS 무첨가구)와 처리1(CMS 4% 대체구)가 각각 26.71ml(P<0.05), 12시간에 대조구(CMS 무첨가구)가 43.39ml(P<0.05) 그리고 24시간에 처리1(CMS 4% 대체구)가 60.84ml(P<0.05)로 가장 높았다. 모든 배양시간에 걸쳐 대조구의 가스발생량이 CMS 대체수준을 달리한 처리구보다 높았으며 CMS 대체수준이 증가할수록 가스발생량이 감소하였다.

표 11. 원료사료 조건에 따른 CMS 첨가 TMR이 *in vitro* 시험에서 가스 발생량(ml)에 미치는 영향

	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	20.43	26.71 <sup>a</sup>	43.39 <sup>a</sup>	60.71 <sup>a</sup>
처리1	17.73	26.71 <sup>a</sup>	39.93 <sup>ab</sup>	60.84 <sup>a</sup>
처리2	17.86	25.17 <sup>b</sup>	36.98 <sup>b</sup>	55.32 <sup>b</sup>
처리3	18.76	24.66 <sup>b</sup>	39.54 <sup>b</sup>	53.91 <sup>b</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ (P<0.05)

CMS 대체수준에 따른 DM 소화율(표 12)은 3, 6 그리고 24시간에 처리1이 각각 12.60%, 13.82% 그리고 41.69%로 가장 높았다. 배양 12시간을 제외하고 대조구에 비해 원료사료를 CMS 로 대체한 처리구가 높았으며, CMS 대체 처리 수준이 높을수록 DM 소화율이 낮아지는 경향을 보였다.

CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 암모니아 발생량은 표 13과 같다. CMS를 첨가하여 배합한 TMR의 배양시간에 따른 암모니아 발생량은 12시간을 제외한 모든 시간대에서 CMS의 대체농도가 증가할수록 높았다(P<0.05). 처리구3(CMS 12% 대체구)에서는 0, 3, 6, 12 그리고 24시간에 각각 6.21mM, 9.00mM, 12.99mM, 16.39mM 그리고 16.77mM로 모든 시간대에서 가장 높았

다( $p < 0.05$ ). 대조구(CMS 무처리구)를 포함한 모든 처리구에서 배양 후 12시간까지 암모니아 발생량이 증가하다가, 24시간째에 감소하였다. 또한 원료사료에 CMS를 대체하여 배합한 TMR의 0시간대의 암모니아 발생량은 대조구(CMS 무첨가구), 처리1(CMS 4% 대체구), 처리2(CMS 8% 대체구) 그리고 처리3(CMS 12% 대체구) 이 각각 3.02mM, 4.61mM, 5.65mM 그리고 6.21mM 이었다. 이렇게 CMS 첨가량이 증가할수록 암모니아 발생량이 증가한 이유는 CMS 내에 함유된 NPN 중 암모니아 성분이 빠른 속도로 해리되었기 때문으로 추정된다.

표 12. 원료사료 조건에 따른 CMS 첨가 TMR이 *in vitro* 소화율시험에서 DM 소화율(%)에 미치는 영향

	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	9.00	12.61	26.77	36.74
처리1	12.60	13.82	24.82	41.69
처리2	9.76	13.77	22.82	38.61
처리3	10.36	11.91	26.11	37.59

표 13. 원료사료 조건에 따른 CMS 첨가 TMR이 *in vitro* 소화율시험에서 암모니아 발생량에 미치는 영향

	0시간	3시간	6시간	12시간	24시간
대조구	3.02 <sup>d</sup>	4.73 <sup>d</sup>	8.58 <sup>d</sup>	8.98 <sup>c</sup>	8.49 <sup>c</sup>
처리1	4.61 <sup>c</sup>	6.61 <sup>c</sup>	9.93 <sup>c</sup>	17.28 <sup>b</sup>	12.15 <sup>b</sup>
처리2	5.65 <sup>b</sup>	7.38 <sup>b</sup>	11.00 <sup>b</sup>	19.92 <sup>a</sup>	13.13 <sup>b</sup>
처리3	6.21 <sup>a</sup>	9.00 <sup>a</sup>	12.99 <sup>a</sup>	16.39 <sup>b</sup>	16.77 <sup>a</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ )

원료사료를 CMS로 대체하여 배합한 TMR의 VFA 생성량은 표 14에 나타내었다. 총휘발성지방산 생성량은 0시간에서 대조구(CMS 무첨가구)가 27.707mM, 3시간에서 처리2(CMS 8% 대체구)이 45.056mM, 6시간에서 처리2(CMS 8% 대체구)이 35.939mM, 12시간에서 대조구(CMS 무첨가구)이 48.580mM 그리고 24시간에서 대조구(CMS 무첨가구)가 58.633mM 으로 각 시간대에서 가장 높았다. 또한 acetate와 propionate의 비율(A/P ratio)은 0시간에서 처리1(CMS 4% 대체구)가 4.745, 3시간에서 처리1(CMS 4% 대체구)이 4.466, 6시간에서 처리3(CMS 12%

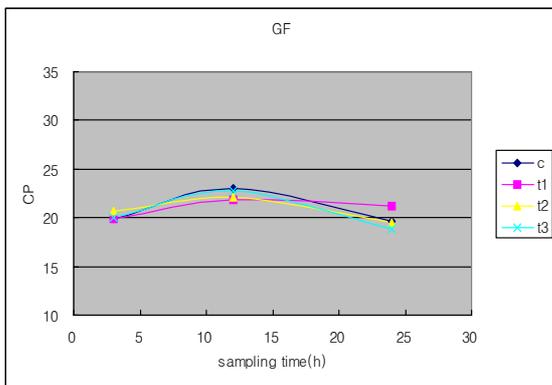
대체구)가 4.392, 12시간에서 처리2(CMS 8% 대체구)이 4.217 그리고 24시간에서 대조구(CMS 무첨가구)이 4.006 으로 각 시간대에서 가장 높았다. 모든 배양시간대에서 총 VFA 생성량은 CMS 첨가수준간에 큰 차이가 없었다. 배양시간이 늘어날수록 총 VFA 생성량은 점차 증가하였고, A/P ratio 는 감소하였다.

표 14. 원료사료 조건에 따른 CMS 첨가 TMR이 *in vitro* 시험에서 VFA 발생량에 미치는 영향

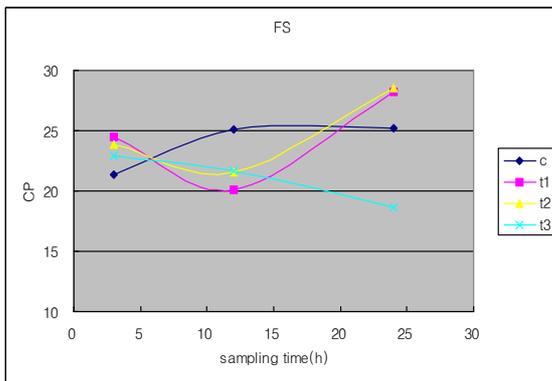
		acetate	propionate	i-butylate	butylate	ivalerate	valerate	total	A/P
0시간	대조구	19.060	4.292	0.555	2.550	0.580	0.670	27.707	4.441
	처리1	15.845	3.339	0.179	1.857	0.243	0.161	21.625	4.745
	처리2	18.778	3.982	0.214	2.209	0.286	0.191	25.660	4.716
	처리3	17.710	3.773	0.202	2.091	0.269	0.184	24.229	4.694
3시간	대조구	23.059	5.337	0.295	2.756	0.419	0.303	32.169	4.320
	처리1	21.501	4.814	0.240	2.413	0.345	0.256	29.570	4.466
	처리2	21.761	19.966	0.247	2.492	0.339	0.251	45.056	1.090
	처리3	21.716	5.015	0.256	2.557	0.341	0.250	30.134	4.330
6시간	대조구	25.252	5.817	0.320	2.884	0.431	0.323	35.027	4.341
	처리1	25.484	5.923	0.315	2.945	0.456	0.338	35.462	4.303
	처리2	25.943	5.923	0.304	3.013	0.430	0.326	35.939	4.380
	처리3	25.599	5.828	0.292	3.029	0.410	0.320	35.478	4.392
12시간	대조구	34.860	8.525	0.393	3.787	0.564	0.452	48.580	4.089
	처리1	32.591	7.909	0.372	3.615	0.523	0.410	45.421	4.121
	처리2	31.568	7.486	0.347	3.536	0.496	0.385	43.817	4.217
	처리3	31.916	7.578	0.347	3.642	0.494	0.390	44.368	4.211
24시간	대조구	41.696	10.408	0.582	4.410	0.906	0.631	58.633	4.006
	처리1	39.043	9.975	0.579	4.388	0.884	0.591	55.460	3.914
	처리2	38.193	9.688	0.560	4.422	0.866	0.651	54.380	3.942
	처리3	34.877	9.476	0.622	4.731	0.915	0.586	51.207	3.680

원료사료를 CMS로 대체하여 배합한 TMR의 대체수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 미생물성상에 미치는 영향을 real time PCR을 이용하여 분석한 결과를 그림 1에 나타내었다. *Fibrobacter*

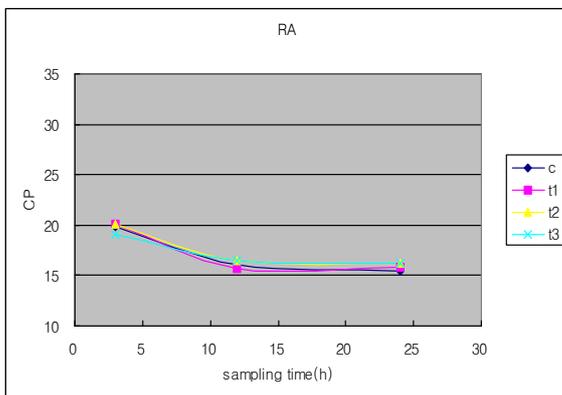
*succinogenes*를 제외한 General anaerobic fungi와 *Ruminococcus albus* 는 CMS 첨가수준에 따른 뚜렷한 변화가 없었다. General anaerobic fungi 는 모든 첨가수준에서 배양 3시간에서 12시간째에 증가하다가 24시간째에 다시 감소하였고 처리1(CMS 4% 대체구)에서 24시간째에 다른 처리보다 CP값이 높았다. *Ruminococcus albus*는 배양후 12시간까지 감소하다가 24시간째 까지 그 수준이 유지되었다. *Fibrobacter succinogenes* 는 배양시간 12시간까지 대조구(CMS 무처리구)는 CP값이 증가하다가 24시간에 12시간과 같은 수준으로 유지되었다. 이에 반해 처리1(CMS 4% 대체구)과 처리2(CMS 8% 대체구)는 12시간까지 CP값이 감소하다가 다시 24시간째 대조구보다 CP값이 높아졌다. 또한 처리3(CMS 12% 대체구)은 배양시간이 길어질 수록 CP 값이 점차 감소하여 24시간째에 가장 낮아졌다.



A: General anaerobic fungi



B: *Fibrobacter succinogenes*



C: *Ruminococcus albus*

그림 2 . CMS의 첨가수준의 차이가 *in vitro* 시험에서 미생물 성장에 미치는 영향

#### 다. CMS첨가 발효TMR용 균주 선발

##### (1) 재료 및 방법

한국방송통신대학교 농학과에서 보유하고 있는 *Aspergillus oryzae*(*A. O.*) 3가지 균주를 농도별로 CMS배지에 배양하기 위해 *A. O.* seed medium(500ml)에 접종하여 30°C 에서 48시간동안 배양하였다. CMS 배지의 농도는 0, 3, 6, 9 그리고 12%로, 물에 정해진 %별로 CMS를 섞었으며 0%는 control로써 *A. O.* seed 배지(표 15)를 이용하였다. 48시간 후 배양된 균주의 상층액에 존재하는 포자수를 세어 농도별 CMS 배지 (20ml)에 ml당 1000마리가 존재하도록 접종한 다음 30°C 에서 48시간동안 배양하였다. 모든 조건 별 배지는 3반복으로 실행하였다. CMS-AY 발효TMR 생산에 필요한 최적의 균주를 선발하기 위하여 농도별 CMS배지에서 자란 세가지 *A. O.* 균주의 배양액 pH, Cell mass, colony counting 그리고 배양액내 조단백질, NPN과 아미노산 함량을 분석하였다. 조단백질 분석은 Keltec을 사용하였고, NPN은 조단백질 분석과정중 소화과정을 제외한 이후과정을 조단백질 분석과 동일하게 분석하여 결과를 산출하였다. 아미노산은 배양액을 12% TCA로 단백질을 침전 시킨 후 상층액을 NPN 분석방법과 동일하게 수행하였다.

표 15. *Aspergillus oryzae* seed media 구성

composition	g
Yeast extract	16
Soluble starch	15
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
Citric acid monohydrate	0.43
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.17
Final volume	1000ml
pH	5.1

##### (2) 결과 및 고찰

농도별 CMS 배지에 따른 *A. O.* 배양액의 pH변화는 그림 1과 같다. 접종 전 배지의 pH가 5.1에 맞추어진 것에 반해 48시간 배양된 배지에서는 모두 pH가 증가하였다. CMS의 농도별 배지로 비교해보면, 대조구인 0% 배지보다 CMS가 3%와 6% 수준에서 함유된 배지에서 pH가 더 높았으며, 12% 정도로 CMS 농도가 증가할 경우엔 pH의 변화가 크지 않았다. 균주별로 비교해보면 KCTC 6596과 KACC 40242가 KCTC 6983보다 pH의 변화 즉 pH의 증가가 더 크며, KCTC 6983의 0%인 경우 pH가 나머지 두 균에 비해 현저히 낮게 나타났는데 이는 cell mass 결과와 연관하여 설명이 가능하다(그림 2). *A. O.* seed media에서 KCTC 6983의 cell mass 평균값이 KCTC 6596, KACC 40242의 cell mass 평균값보다 적게 나타난 것으로 보아 일정한 조건에서 KCTC 6983의 성장률이 다른 두

균에 비해 낮았고 그에 따라 pH 변화도 크지 않았다고 추정할 수 있다. 하지만 CMS에 첨가된 배지에서는 pH 변화만큼 cell mass 양이 증가하지 않았다. 선행연구 결과에 따르면, *A. O.* seed media에 배양한 것보다 CMS 배지에서 배양하였을 때 *A. O.*의 성장곡선이 더 느려진다. 따라서 48시간 배양한 CMS 배지가 control 배지에서보다 *A. O.* 성장이 느려 상대적으로 cell mass의 양이 적다고 판단된다.

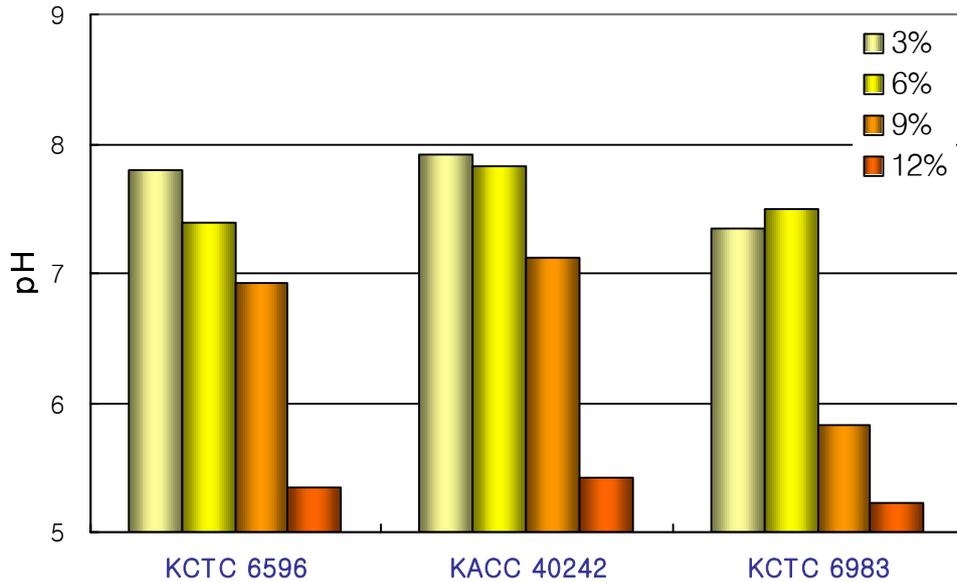


그림 3. 농도별 CMS배지에 따른 *A. O.* 배양액의 pH 변화.

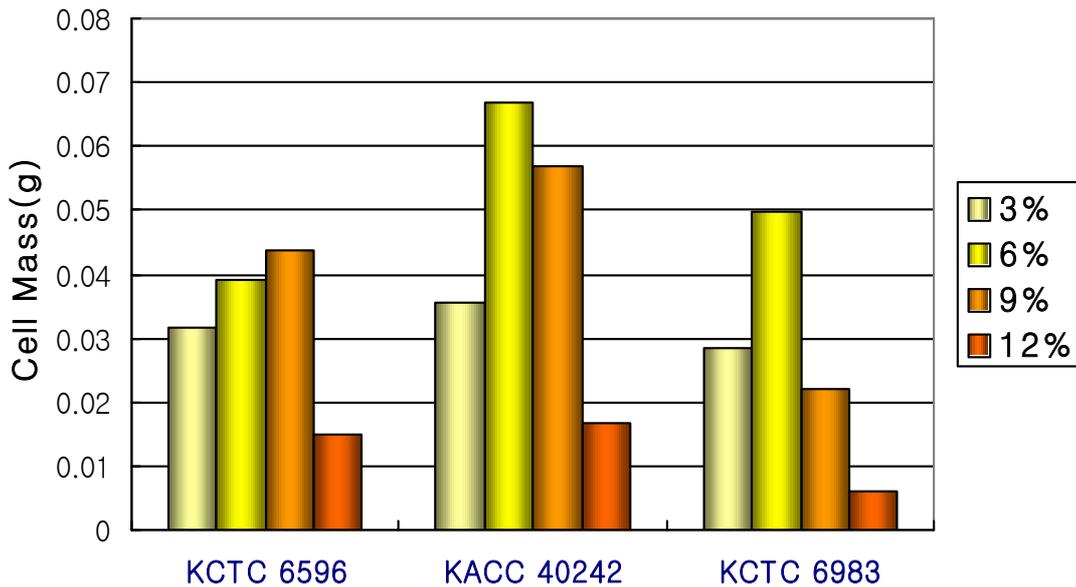


그림 4. 농도별 CMS배지에 따른 *A. O.*의 cell mass 변화.

표 16. 농도별 CMS 배지에 따른 *A. O.*의 colony 수.

	KCTC 6596	KACC 40242	KCTC 6983
3%	$1.3 \times 10^3$	$2.8 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$
6%	$3.7 \times 10^3$	$4.7 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$
9%	$1.6 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$	ND
12%	ND	$3.3 \times 10^2$	ND

CMS 수준별 농도차이에 따른 *A. O.*의 균주별 조단백질, NPN 그리고 아미노산의 이용율은 각각 표 17, 18 그리고 19에 나타내었다. 조단백질 이용율은 KCTC 6596이 CMS 3%에서 0.114%, CMS 6%에서 0.117%, CMS 9%에서 0.181% 그리고 KACC 40242가 CMS 12%에서 0.245%로 가장 높았다. CMS 배지 3%, 6% 그리고 9% 에서는 전체적으로 KCTC 6596, KACC 40242 그리고 KCTC 6983의 순으로 조단백질 이용율이 높았으며, CMS 12%에서만 KACC 40242, KCTC 6596 그리고 KCTC 6983 순으로 변화하였다.

표 17. CMS 첨가농도를 달리한 배지에서 *A. oryzae* 의 배지 내 조단백질의 이용율(%)

	CMS 3%	CMS 6%	CMS 9%	CMS 12%
KCTC 6596	0.114 <sup>C</sup>	0.117 <sup>C</sup>	0.181 <sup>B</sup>	0.175 <sup>B</sup>
KACC 40242	0.093 <sup>B</sup>	0.110 <sup>B</sup>	0.163 <sup>B</sup>	0.245
KCTC 6983	0.069 <sup>B</sup>	0.099 <sup>B</sup>	0.040 <sup>B</sup>	0.134 <sup>B</sup>

<sup>ABCDEF</sup> with a column, means with different superscripts differ (P<0.05)

표 18. CMS 첨가농도를 달리한 배지에서 *A. oryzae* 의 배지 내 NPN 이용율(%)

	CMS 3%	CMS 6%	CMS 9%	CMS 12%
KCTC 6596	9.35 <sup>B</sup>	7.00 <sup>B</sup>	7.52 <sup>aA</sup>	2.54 <sup>B</sup>
KACC 40242	4.32 <sup>B</sup>	7.67 <sup>A</sup>	5.47 <sup>aA</sup>	3.38 <sup>C</sup>
KCTC 6983	3.60 <sup>BC</sup>	5.67 <sup>A</sup>	0.91 <sup>bC</sup>	2.03 <sup>AB</sup>

<sup>abcdef</sup> with a row, means with different superscripts differ (P<0.05)

<sup>ABCDEF</sup> with a column, means with different superscripts differ (P<0.05)

표 19. CMS 첨가농도를 달리한 배지에서 *A. oryzae* 의 배지 내 아미노산 이용율(%)

	CMS 3%	CMS 6%	CMS 9%	CMS 12%
KCTC 6596	46.43 <sup>AB</sup>	-20.00 <sup>BC</sup>	-22.22 <sup>C</sup>	76.47 <sup>A</sup>
KACC 40242	64.29 <sup>A</sup>	-80.00 <sup>B</sup>	44.44 <sup>AB</sup>	ND
KCTC 6983	50.00 <sup>AB</sup>	0.00 <sup>AB</sup>	33.33 <sup>B</sup>	64.71 <sup>A</sup>

<sup>ABCDEF</sup> with a column, means with different superscripts differ (P<0.05)

NPN은 CMS 농도수준에 상관없이 모든 처리구에서 이용되었다. CMS 3%에서는 KCTC 6596 이 9.35%, CMS 6%에서는 KACC 40242가 7.67%, CMS 9%에서는 KCTC 6596이 7.52% 그리고 CM 12%에서는 KACC 40242가 3.83으로 NPN 이용율이 가장 높았다. 또한 모든 *A. O.* 균주에서 CMS 첨가 농도가 증가할 수록 NPN 이용율이 낮아지는 경향이였다.

아미노산은 CMS 12%에서 KCTC 6596이 76.47%로 이용율이 가장 높았다. 모든 균주에서 CMS 3% 첨가배지에서 아미노산 이용율이 높았으며, CMS 6%에서는 반대로 아미노산 생성량이 증가하였다.

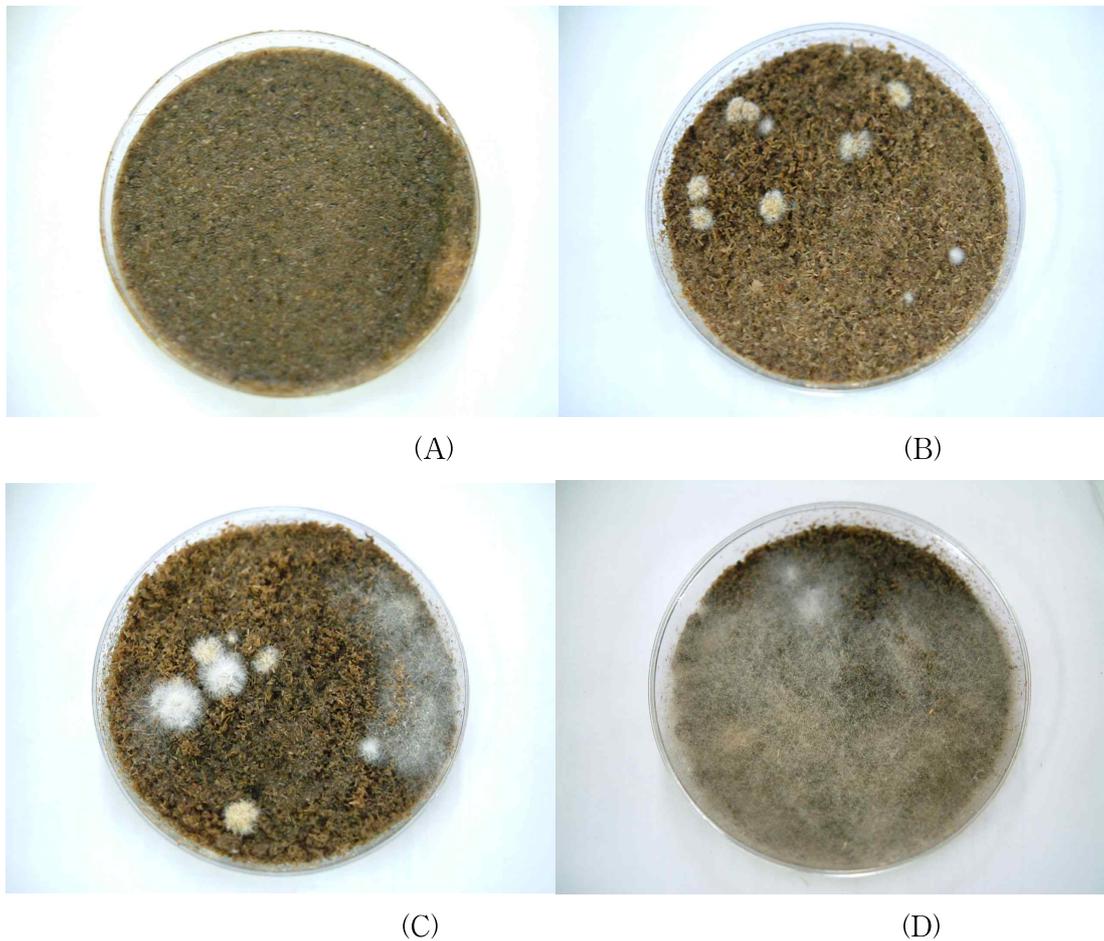


그림 5. 농도를 달리한 CMS-TMR에 *A. oryzae* 접종 후 배양 관찰

CMS가 첨가된 TMR에 *A. O.*를 접종하여 CMS-*A. O.*-TMF를 제조하기 위해 균주의 종류, CMS 농도, 배양조건을 달리하여 시험하였다. CMS가 첨가된 TMR에 *A. O.*를 접종하여 72시간 배양한 결과를 그림 5에 나타내었다.

현재 농가에서 사용하는 자가 배합 사료의 경우 *A. O.* 접종량은 0.1%의 수준이다. 본 실험에서는 적은 양의 *in vitro* 시험에서 적용하였기 때문에 *A. O.*의 접종량이 현격히 낮아 *A. O.*의 포자가 고르게 배합되는데 어려움이 있었으며, 이에 따라 *A. O.* 성장이 일어나지 않거나, 성장률이 낮게 일어났다. (그림 5 (A),(B))

또한 TMR 원료는 field 수준의 조건을 충족시키기 위해 풍건상태의 원료를 멸균시키지 않은 상태에서 CMS와 균일하게 배합하여 시험하였다. 그러나 멸균하지 않은 원료를 사용함으로써 기존에 원료에 남아있던 미지의 미생물들이 *A. O.* 보다 우점하게 됨으로써 *A. O.* 성장이 일어나지 않거나, 성장률이 낮게 일어났다 (그림 5 (C),(D)). 차후 CMS-*A. O.*-TMF의 개발을 위해 *in vitro* 상에서 실험할 경우 시험원료의 배합량을 증가시켜 *A. O.* 접종량을 상대적으로 증가 시킴으로써 더욱 균일하게 배합되도록 하고, 또한 미지의 미생물보다 빠른 시간내에 우점하도록 유도해야 할 것으로 판단된다.

## 2. CMS-AY 및 CMS-LAC 의 한우 육성용 사양 체계 개발

가. *in vivo* 시험을 이용한 CMS 첨가수준에 따른 TMR 의 사료가치평가

### (1). 재료 및 방법

#### (가)수분

미리 건조하여 항량을 구한 알미늄제 칭량컵에 시료 3g을 정확히 칭량하여 항온건조기로 10℃에서 항량이 될 때 까지 건조시켜 데시케이터내에서 30분간 방냉한 다음 무게를 달아 감량을 수분함량으로 구했다.

$$\text{수분 (\%)} = \frac{\text{건조전 중량 (칭량컵+ 시료)} - \text{건조후 중량(칭량컵+ 시료)}}{\text{시료중량}} \times 100$$

#### (나) 조단백질

시료 0.5g을 켈텍 플라스크에 취하고 분해촉진제 2정을 첨가한 후 황산 10ml을 서서히 가해서 잘 혼합하였다. 이를 가열하여 1시간 30분 분해시킨후 식혀서 켈텍장치를 이용하여 증류하였다. 증류후 0.1N 염산 용액으로 적정하여 적갈색으로 변하는 순간의 염산소요량을 기준으로 하여 다음의 계산식으로 구했다.

$$\text{조단백질(\%)} = 0.00140067 \times \text{염산용액 적정량} \times \text{염산용액 factor} \times 6.25 \times 100 / \text{시료무게}$$

(다) 조지방

여과지 No.2에 시료를 0.5g을 평량한 후 diethyl ether으로 충전된 soxhlet 장치로 지용성물질을 추출하고 남은 건조중량을 구하여 계산하였다.

$$\text{조지방(\%)} = \text{추출후 여과지 중량(시료+ 여과지)} - \text{추출전 여과지 중량} / \text{시료중량} \times 100$$

(라) 조섬유

시료 0.7g을 평량하여 Ankom 섬유소분석 시료용기에 넣은 후 Ankom 섬유소 분석기계를 사용하여 조섬유 함량을 분석하였다.

$$\text{조섬유(\%)} = \text{분해후 여과된 잔사의 건조중량} - \text{잔사를 회화한 후 남은 회분량/시료의 중량} \times 100$$

(마) 회분

600℃의 회화로에서 2시간 회화시켜 유기물을 제거한 도가니를 desiccator에서 40분간 방냉하여 평량한다. 평량된 도가니에 시료 2g을 평량하여 넣은 후 600℃에서 3시간 회화시키고 데시케이터에서 40분간 방냉한 후 평량하여 이중량에서 크루시블을 감한 것을 계산하였다.

$$\text{조회분(\%)} = \text{회화후 무게(시료+ 크루시블)} - \text{크루시블 무게} / \text{시료중량} \times 100$$

(바) Nitrogen Free Extract (NFE)

시료를 100으로 하여 여기에 수분, 조단백질, 조지방, 조섬유, 조회분 함량을 감해서 구한다.

(사) Neutral Detergent Fiber (NDF)

시료 0.7g을 평량하여 Ankom 시료봉지에 삽입한 후 중성세제가 충전된 Ankom 섬유소 분석기계를 사용하여 중성세제에 용해되는 부분을 제거하였다. NDF가 제거된 시료를 건조 후 평량하여 NDF를 분석하였다.

$$\text{NDF(\%)} = (\text{건조후 무게} - \text{여과지 무게}) / \text{시료중량} \times 100$$

(아) Acid Detergent Fiber (ADF)

시료 0.7g을 평량하여 Ankom 시료봉지에 삽입한 후 산성세제가 충전된 Ankom 섬유소 분석기계를 사용하여 산성세제에 용해되는 부분을 제거하였다. ADF가 제거된 시료를 건조 후 평량하여 ADF를 분석하였다.

$$\text{ADF(\%)} = (\text{건조후 무게} - \text{여과지 무게}) / \text{시료중량} \times 100$$

(자) Neutral Detergent Insoluble Crude Protein (NDICP)

NDF 분석후 남은 시료를 수거하여 Keltech 장비를 이용하여 조단백질의 함량을 분석하여 증성세제에 용해되지 않는 단백질의 함량을 분석하였다.

(차) Acid Detergent Insoluble Crude Protein (ADICP)

ADF 분석후 남은 시료를 수거하여 Keltech 장비를 이용하여 조단백질의 함량을 분석하여 산성세제에 용해되지 않는 단백질의 함량을 분석하였다.

(카) Acid Detergent Lignin (ADL)

ADF 분석후 남은 시료를 회수하여 평량한 후 회화로에서 회화시키고 남은 잔량을 측정함으로써 lignin 함량을 분석하였다.

위의 분석방법을 이용하여 *in vivo* 시험과 *in vitro* 시험에 사용할 원료사료의 화학적 성분을 분석하고 아래의 그림 6을 참고하여 원료사료의 진정소화율, TDN 및 에너지를 계산하여 시험에 적용하였다.

1) $tdNFC = 0.98(100 - ((NDF - NDICP) + CP + EE + ash)) * PAF$
2) $tdCPf = CP * \exp(-1.2 * (ADICP / CP))$
3) $tdCPc = (1 - (0.4 * (ADICP / CP))) * CP$
4) $tdFA = FA = EE - 1$ , Note : If $EE < 1$ , then $FA = 0$
5) $tdNDF = 0.75 * (NDFn - ADL) * (1 - (ADL / NDFn)^{0.667})$
6) $TDN_{1x}(\%) = tdNFC + tdCP + (tdFA * 2.25) + tdNDF - 7$
8) $DE_{1x}(\text{Mcal/kg}) = (tdNFC / 100) * 4.2 + (tdNDF / 100) * 4.2 + (tdCP / 100) * 5.6 + (FA / 100) * 9.4 - 0.3$
9) $ME_p(\text{Mcal/kg}) = [1.01 * (DE_p) - 0.45] + 0.0046 * (EE - 3)$ , Note : if $EE > 3\%$

그림 6. NRC dairy cattle 기반의 진정소화율, TDN 및 에너지가 산출 공식

표 20. 원료사료의 일반성분

ingredients	Moisture	DM	CP	EE	CF	ash	NFE	NDF	ADF	NDICP	ADICP	ADL	Ca	P	TDN	DE	ME	NEm	NEg
	(%)															(Mcal/kg)			
단백피	6.3	93.7	21.6	3.1	0.6	6.6	61.7	33.0	9.3	1.2	1.3	8.3	0.1	0.5	65.4	3.0	2.6	1.7	1.1
맥근	6.9	93.1	34.3	0.6	5.9	7.0	45.3	53.4	15.2	10.6	3.0	11.4	0.1	0.5	52.7	2.6	2.2	1.4	0.8
맥주박(생)	74.9	25.1	6.2	2.3	1.7	1.0	13.8	12.5	5.4	0.9	2.0	3.5	0.1	0.5	82.0	3.5	3.1	2.1	1.4
버섯배지	59.1	40.9	4.0	0.4	4.4	2.2	29.8	28.5	19.7	0.4	0.7	15.2	-	-	63.4	2.7	2.3	1.4	0.8
소맥피	13.6	86.4	20.3	3.9	3.1	5.4	53.6	38.2	10.7	3.1	1.5	8.3	0.1	1.1	66.2	3.0	2.6	1.7	1.1
맥피	12.3	87.7	15.6	1.5	2.0	5.0	63.7	53.1	24.8	1.6	0.6	17.8	0.1	1.1	48.2	2.2	1.8	1.0	0.4
면실	13.7	86.3	22.4	12.9	13.8	3.4	33.8	44.1	32.6	1.4	4.5	23.1	0.2	0.8	63.5	2.9	2.6	1.7	1.1
미강	10.1	89.9	18.7	21.2	3.8	8.4	37.7	18.8	8.6	1.8	1.0	5.5	0.0	1.9	95.3	4.2	3.9	2.8	2.0
볶음보리	13.9	86.1	19.8	2.9	1.2	1.6	60.6	12.6	3.2	2.6	2.9	1.6	0.2	0.2	84.7	3.8	3.4	2.4	1.6
비트펄프	14.0	86.0	19.1	0.5	8.1	3.2	55.2	40.8	25.4	5.2	4.8	18.2	0.7	0.1	55.6	2.6	2.1	1.3	0.7
쌀주정박	8.8	91.2	46.6	13.0	21.4	1.9	8.3	43.2	19.8	8.9	10.7	12.3	0.1	0.2	74.6	3.7	3.3	2.3	1.6
아마종실	4.3	95.7	33.0	43.6	13.2	3.5	2.4	26.8	54.0	8.1	1.6	4.9	0.1	0.6	128.4	5.8	5.6	4.1	3.0
알팔파펠렛	12.7	87.3	14.9	0.6	20.6	9.3	41.9	63.6	10.6	8.7	11.7	42.7	2.1	0.3	20.1	0.9	0.5	0.0	0.0
옥수수주정박	12.1	87.9	42.4	11.1	2.3	4.5	27.7	26.8	9.2	4.9	7.1	5.5	0.1	0.4	82.3	4.0	3.6	2.5	1.8
옥수수후레이크	15.6	84.4	12.9	3.4	5.0	1.7	66.6	10.2	3.0	0.9	1.4	0.6	0.0	0.3	87.5	3.8	3.4	2.4	1.7
전분박	11.8	88.2	35.9	16.7	4.2	6.9	24.5	4.8	4.9	1.5	2.0	0.3	0.1	0.6	101.6	4.7	4.4	3.1	2.3
전지대두	12.1	87.9	33.6	13.3	0.5	4.4	36.2	15.9	9.9	1.0	0.7	6.0	-	-	90.2	4.2	3.9	2.7	2.0

표 20. 원료사료의 일반성분 (계속)

ingredients	Moisture	DM	CP	EE	CF	ash	NFE	NDF	ADF	NDICP	ADICP	ADL	Ca	P	TDN	DE	ME	NEm	NEg
	(%)															(Mcal/kg)			
참깨묵	7.9	92.1	39.1	12.5	12.7	7.4	20.6	36.8	20.7	15.1	10.9	13.4	1.3	1.1	74.2	3.6	3.2	2.2	1.5
콩싸일리지	33.4	66.6	3.4	2.2	2.7	4.1	54.2	36.3	22.9	0.7	1.0	17.8	0.1	0.3	56.6	2.4	2.0	1.1	0.6
과인애플사일리지	10.7	89.3	8.9	5.3	10.8	6.0	58.3	53.3	39.6	2.2	5.6	18.9	-	-	46.8	2.0	1.6	0.8	0.2
대두피	10.5	89.5	31.1	3.5	1.7	4.9	48.3	27.7	19.0	0.9	1.8	16.1	0.5	0.4	64.4	3.1	2.7	1.8	1.2
보리펠렛	14.7	85.3	8.6	3.4	1.2	4.5	67.8	21.3	7.9	1.5	1.0	7.0	0.2	0.2	73.8	3.2	2.8	1.9	1.2
수수피	15.1	84.9	1.1	0.6	9.4	11.1	62.7	67.7	49.4	1.9	1.4	34.4	-	-	22.8	1.0	0.5	0.0	0.0
에뉴얼라이	10.3	89.7	5.5	0.5	6.7	4.4	72.6	68.0	43.7	1.2	1.2	36.5	-	-	27.1	1.2	0.8	0.0	0.0
연맥건초	11.2	88.8	3.1	1.3	6.7	3.2	74.5	69.7	43.6	0.7	1.4	34.8	0.3	0.3	27.8	1.2	0.7	0.0	0.0
옥수수속대	13.5	86.5	1.5	0.6	13.8	11.3	59.3	68.2	50.1	14.1	2.4	30.7	0.2	0.2	30.6	1.3	0.8	0.0	0.0
장유박	19.6	80.4	15.4	9.3	12.4	9.6	33.6	35.6	26.0	2.9	8.1	17.9	0.4	0.5	59.8	2.7	2.3	1.4	0.8
전분박(고구마)	17.4	82.6	0.1	0.2	1.7	6.9	73.7	8.7	7.5	0.6	1.4	3.6	0.4	0.3	76.9	3.2	2.8	1.9	1.2
주정박	74.6	25.4	14.6	2.6	8.6	0.6	0.0	15.1	8.5	8.2	6.4	3.0	0.0	0.7	83.7	3.7	3.3	2.2	1.6
청주박	59.6	40.4	11.1	0.8	0.2	0.4	27.9	0.7	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	89.1	3.9	3.5	2.4	1.7
클라인	10.1	89.9	7.4	1.8	5.6	7.1	68.1	65.5	36.2	3.3	0.9	29.8	-	-	31.6	1.4	1.0	0.1	0.0
탈지강	15.9	84.1	19.6	5.0	4.3	10.5	44.7	20.9	8.7	2.5	1.3	3.8	0.1	2.3	73.8	3.4	3.0	2.0	1.3
티모시	12.6	87.4	6.6	1.5	5.8	5.8	67.6	53.4	34.3	1.7	1.0	28.9	0.3	0.4	38.9	1.7	1.3	0.4	0.0
벼짚	14.1	85.9	4.1	0.7	28.0	7.9	45.1	72.2	49.7	2.6	5.4	36.2	0.4	0.1	20.0	0.8	0.4	0.0	0.0

*In vivo* 시험을 위한 CMS 첨가수준에 따른 TMR 배합비는 표 21에 제시하였다. 각각의 처리구에 CMS 함량을 0,4 그리고 8%로 달리 첨가하여 시험에 이용하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 수분은 40%, 조단백질 - 10%, NDF - 약22%, TDN - 42.89%, ME 약 1.95, DE- 약 1.75 로 설정하고 축산기술연구소에 소 제공하는 농가자가 사료배합 프로그램을 이용하여 배합비를 작성하였다. 각 시험사료와 제조단가는 참여기업인 유정 TMR에서 제공 받았으며 CMS %가 높아질 수록 0,4 그리고 8% 가 각각 188.41원, 172.28원 그리고 161.82원으로 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 시험축은 CMS 처리구별 각각 평균 195~200 kg이 되도록 구배치를 하여 시험에 적용하였고, 일일 사료 섭취량과 개시체중 최종체중을 측정하였다. 경제성 평가에서 예상되는 수입은 2009년 2월 기준 농협중앙회에서 제공하는 600kg 수소의 생체가격을 기준으로 체중 kg당 단가를 계산 하였다. 그리고 kg당 단가를 최종 생체중으로 나누어 현재 도축했을 경우의 수입을 환산하였다. 이 계산치는 인건비 및 기타 수용비는 고려하지 않았다.

표 21. *In vivo* 시험을 위한 CMS 첨가수준에 따른 TMR의 배합비

Ingredients	Cost (₩/kg)	CMS level (%)		
		0	4	8
버섯배지	50	10.00	10.00	10.00
소맥피	270		1.91	
비트펄프	430	1.49	0.50	
쌀주정박(탁주)	50	2.46		
옥수수후레이크	450	11.06	9.28	8.74
전분박	240	10.00	10.00	8.00
전지대두	500	2.00		
콘싸일리지	150	5.00	5.00	9.62
옥수수속대	150	10.00	10.00	10.00
벼짚	140		3.10	4.36
CMS	70		4.00	8.00
물		9.13	7.70	17.86
비지	60	20.00	20.00	3.96
라이그라스	300	16.15	13.19	13.71
지오라이트	200	0.71	0.73	0.74
타피오카	150	2.00	4.59	5.00
합계		100.00	100.00	100.00
TMR 제조 단가(₩/kg)		188.41	172.28	161.82

표 22. *In vivo* 시험을 위한 CMS 첨가수준에 따른 TMR의 화학적 성분분석

Ingredients	CMS level (%)		
	0	4	8
Moisture, %	40.00	40.00	40.00
DM, %	60.00	60.00	60.00
CP, %	10.10	10.00	10.10
EE, %	3.27	2.73	2.08
CF, %	12.00	12.00	12.00
NDF, %	22.71	22.56	24.38
ADF, %	10.00	10.80	12.08
Ca, %	0.40	0.40	0.40
P, %	0.20	0.20	0.18
TDN, %	42.89	42.89	42.89
ME, Mcal/kg	1.95	1.93	1.93
DE, Mcal/kg	1.75	1.73	1.73
NEg, Mcal/kg	0.83	0.82	0.81
NEm, Mcal/kg	1.35	1.35	1.35

(2) 결 과

CMS 첨가수준에 따른 TMR이 *in vivo* 시험에서 사료섭취량, 증체량 및 사료효율에 미치는 영향은 표 23에 제시하였다. 일일 사료 섭취량은 CMS 4% 처리구에서 7.4kg으로 가장 낮았으며 0%와 8%는 7.8 kg으로 차이가 없었다. 시험기간중 총 증체량은 CMS 첨가 비율이 증가함에 따라 0,4 그리고 8% 가 각각 179, 181 그리고 183으로 증가하는 경향을 보였으나, 시험기간별 일당 증체량은 약 0.7 kg으로 CMS 처리에 따른 수준별 차이는 보이지 않았다. 사료효율 역시 CMS 첨가 비율에 따라 별다른 영향을 보이지 않았다.

*In vivo* 시험에서 CMS 첨가수준에 따른 TMR의 경제성 평가는 표 24에 제시하였다. 시험기간 중 전체 사료비는 CMS 첨가 수준이 증가할 수록 26,834원, 229,153원 그리고 226,268원으로 점차 감소하였다. 또한 예측된 수입에서 사용된 사료비를 제하고 얻은 진정 수입 또한 CMS 첨가 수준이 증가할 수록 높았다.

표 23. CMS 첨가수준에 따른 TMR이 *in vivo* 시험에서 사료섭취량, 증체량 및 사료효율에 미치는 영향

Item	CMS level (%)		
	0	4	8
ADFI, kg	7.8 ± 1.1	7.4 ± 1.5	7.8 ± 1.2
Total feed intake, kg	1400.3 ± 199	1330.1 ± 265	1398.3 ± 219
Initial body weight, kg	195.1 ± 17.5	195.9 ± 21.1	206.1 ± 14.9
Final body weight, kg	374.7 ± 30.3	377.3 ± 46.5	389.2 ± 23
Total gain, kg	179.6 ± 30.2	181.4 ± 48	183.1 ± 25.5
ADG, kg	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Gain:Feed, kg	0.1	0.1	0.1

표 24. *In vivo* 시험에서 CMS 첨가수준에 따른 TMR의 경제성 평가

Item	CMS level (%)		
	0	4	8
TMR cost, ₩/head	263,834.7	229,153.6	226,268.7
Predicted income <sup>1</sup> , ₩/head	2,306,672.8	2,322,748.4	2,396,285.5
real income, ₩	2,042,838.1	2,093,594.7	2,170,016.8
Predicted income index	100.0	102.5	106.2

<sup>1</sup> Predicted incom : 2009년 2월 기준 농협중앙회에서 제공하는 600kg 수소의 생체가격을 기준으로 kg당 단가를 계산하였다. 그리고 kg당 단가에 시험축의 시험종료시점의 체중을 곱하여 산출하였다.

나. 수준별로 CMS를 처리한 TMR에 *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae* 를 접종하여 발효한 TMF의 *in vitro* 에서의 사료가치평가

(1) 재료 및 방법

(가) 공시동물 및 위역

서울대 실험목장에서 사육중인 반추위 누공이 설치된 Holstein 수소로부터 아침사료 급여 전

위액을 채취하여 4겹의 거즈로 거른 위액을 인공 buffer와 1:4로 혼합하여 시험에 이용하였다.

(나) 시험사료

표 26에 제시한 것과 같이 TDN과 기타 영양소 함량을 기준으로 Table 6과 같이 배합하였다. 이렇게 배합된 사료를 25℃에서 3일 동안 발효시킨 후 채취하여 동결건조후 0.5g 씩 serum bottle 에 나누어 담아 시험에 이용하였다. *in vitro* 배양 후 샘플은 각각 0, 12 그리고 24시간 에 채취하였다. 각 처리는 3반복으로 처리하였다.

(다) pH meter를 이용하여 pH를 측정하였다

(라) 가스 발생량은 시험실에서 자체 제작한 gas 압력 sensor를 이용하여 측정하고 psi값을 ml 로 환산하여 측정하였다.

(마) 건물소화율은 배양된 시료를 여과지로 여과하여 105℃에서 4시간 건조시킨 방냉시켜 평량 하여 중량차이를 비교함으로써 측정하였다.

(바) 암모니아는 배양액 20ul에 1ml phenol color reagent 와 1ml alkali hypochloride reagent 를 혼합하여 37℃에 15분 배양한 후 분광분석기(630nm)를 이용하여 측정하였다.

(사) VFA는 배양액 1ml을 200ul metaphosphoric acid 와 혼합하여 4℃에 30분 방치후 냉동보 관하여 HP-6890 GC를 사용하여 측정하였다.

(아) 미생물 균총은 배양된 배양액에서 고르게 1ml을 채취하여 gDNA를 CTAB 방법을 이용하여 분리하고 real time PCR 방법을 이용하여 측정하였다 primer 정보는 표 25과 같다.

표25.정량PCR용primer

Target bacterium	Forward primer	Reverse primer
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA
<i>Ruminococcus albus</i>	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA
<i>Streptococcus bovis</i>	CTAATACCGCATAACAGCAT	AGAAACTTCCTATCTCTAGG
<i>Aspergillus oryzae</i>	GGCCCTTAAATAGCCCGGT	CGGGTTTGACCAACTTTCCG
<i>Lactobacillus spp.</i>	TGACAAACCGAGGAAGGTG	CTACTTGTTACGACTTCACCCT
<i>Sacharomydes cerevisiae</i>	CGAGGAGTGCGGTTCTTTG	TCACTTACCGAGGCAAGCTACAT

표 26. *In vitro* 시험을 위한 CMS 첨가수준에 따른 TMR의 배합비

Ingredients	CMS level (%)			
	0%	4%	8%	12%
벼싹배지	10.00	10.00	10.00	10.00
미강				2.71
비트펄프	5.00			
쌀주정박	3.24	2.54	1.02	
아마종실	5.00	5.00	5.00	2.89
옥수수후레이크	10.26	5.00	5.00	5.00
전분박	5.00	4.13		
보리펠렛	5.00	5.00	5.00	5.00
옥수수속대	2.04	5.00	5.00	5.00
장유박	3.00	3.00	3.00	1.12
벼짚	1.36	1.53	2.46	5.60
CMS		4.00	8.00	12.00
배양종균 <sup>1</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30
물	8.12	12.80	11.83	21.28
oil	3.00	2.72	2.41	3.00
비지(두부박)	20.00	10.00	4.36	
라이그라스	14.57	21.99	24.18	23.95
폐분	0.38	0.42	0.41	0.43
주정액	3.74	6.57	12.05	1.73
합계	100.00	100.00	100.00	100.00
TMR 제조 단가(원/kg)	248.15	221.42	215.31	218.07

1. 배양종균 : 시험별로 *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae* 를 접종

표 27. *In vitro* 시험을 위한 CMS 첨가수준에 따른 TMF의 화학적 성분분석

Ingredients	CMS level (%)			
	0	4	8	12
Moisture, %	40.00	40.00	40.00	40.00
DM, %	60.00	60.00	60.00	60.00
CP, %	11.00	11.00	11.00	11.00
EE, %	7.83	6.99	5.81	5.43
CF, %	10.48	11.97	12.44	12.85
NDF, %	20.57	23.57	25.00	25.00
ADF, %	10.00	10.00	10.00	10.00
Ca, %	0.30	0.30	0.30	0.30
P, %	0.20	0.20	0.20	0.20
TDN, %	49.50	49.50	49.50	49.50
ME, Mcal/kg	1.99	1.96	1.94	1.90
DE, Mcal/kg	1.85	1.59	1.48	1.54
NEg, Mcal/kg	1.00	0.96	0.93	0.93
NEm, Mcal/kg	1.53	1.50	1.47	1.48

(2) 결 과

(가) 수준별로 CMS를 처리한 TMR에 *A. oryzae* 접종하여 발효한 TMF의 *in vitro* 에서의 사료가치평가

*Aspergillus oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 pH변화는 표 28에 제시하였다. pH는 배양시간이 증가할 수록 CMS 함량이 낮은 처리구에서 더욱 낮게 나타났다. 배양 초기 0시간에서는 모든 처리구에서 6.85~6.86 으로 일정하였으나 12시간에는 최고 0.08의 차이가 보였고 24시간에는 최고 0.07의 차이를 보이며 CMS 0% 첨가구에서 에서 가장 낮은 값을 CMS 12%에서 가장 높은 값을 보였다.

표 28. *A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 pH 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	6.86 ± 0.01	6.85	6.85	6.85
12	6.74	6.76	6.80	6.82 ± 0.01
24	6.71	6.72	6.75	6.78

표 29에서는 *A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 DM 소화율 (%)의 변화를 나타낸 것이다. 0시간과 24시간에서는 CMS 8% 처리구에서 가장 높은 32.17% 그리고 46.25%의 값을 보였다. 최초 0시간에는 CMS 처리농도가 높을수록 더욱 높은 분해율을 보였으나 24시간으로 갈수록 8%를 제외하고는 약 41%로 비슷한 수준을 보였다. 최초 24시간에서 0시간 배양했을 경우의 건물 분해율을 제하여 순수한 소화율로 비교해보았을 경우는 CMS 첨가사료 0,4,8 그리고 12%가 각각 24.34, 16.69, 14.08 그리고 13.5%로 차이가 있는 것을 볼수 있다. 이는 최초 CMS가 함유된 사료에서 CMS가 녹아져 나와 초기 분해율이 높게 평가된 것 외에도 발효시 CMS를 첨가했을 경우 배양 전 가용성 영양소로 많은부분이 분해되어 있음을 미루어 알 수 있다.

표 29. *A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 DM 소화율(%) 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	17.06 ± 0.88	25.17 ± 2.86	32.17 ± 1.27	27.87 ± 0.18
12	34.16 ± 1.56	35.95 ± 2.81	37.97 ± 0.56	38.12 ± 1.53
24	40.41 ± 0.81	41.86 ± 0.66	46.25 ± 0.08	41.37 ± 1.05

*A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 가스 발생량은 표 30에 나타내었다. 배양시간이 지날수록 CMS 함량이 적은 처리구에서 높은 수준의 가스 발생량이 측정되었다. 배양 12시간에는 CMS 0% 함유 처리구가 53.40으로 가장 높았고, 12% 처리구가 42.62로 가장 낮았다. 24시간 역시 CMS 0% 처리구가 80.15로 가장 높았고, 12% 처리구가 65.72로 가장 낮았다.

표 30. *Aspergillus oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 gas 생성량(ml)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	53.40 ± 3.85	51.09 ± 1.15	48.40 ± 0.77	42.62 ± 0.38
24	80.15 ± 0.58	69.95 ± 2.31	70.91 ± 0.19	65.72 ± 1.92

*A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 NH<sub>3</sub>N(mg/100ml) 변화는 표 31과 같다. 12시간을 제외한 0시간 24시간에는 CMS 첨가 12% 처리구가 9.85 와 13.13으로 가장 높았으며 모든시간에서 CMS 0% 처리구가 가장 낮은 값을 보였다. 이처럼 암모니아 발생량이 CMS 처리농도가 높은 처리구로 갈수록 높아지는 것은 최초 CMS 에 함유되어 있는 암모니아의 함량이 높았기 때문으로 사료된다.

표 31. *A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 NH<sub>3</sub>N(mg/100ml) 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	3.89 ± 1.70	5.65 ± 1.32	7.65 ± 1.27	9.85 ± 2.79
12	2.90 ± 0.86	7.07 ± 2.09	10.25 ± 2.67	9.60 ± 0.41
24	4.13 ± 0.68	7.54 ± 0.38	11.69 ± 0.65	13.13 ± 0.61

*A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 미생물균총(Ct)의 변화는 표 32에 제시하였다. *A. oryzae*는 8%를 제외하고 배양시간이 길어질수록 감소하는 경향이있다. 이는 발효를 위해 첨가된 *A. oryzae*가 배양 중에도 계속 위액 내에서 성장한다는 것을 간접적으로 나타내며 그 기능을 수행한다고 미루어 짐작할 수 있다. 섬유소 분해균주인 *F. succinogenes*와 *R.albus* 는 배양 시간이 증가할수록 증가하였고 CMS 첨가 함량이 증가함에 따라 소폭으로 증가하는 경향을 보였다. 또한 섬유소 분해균주인 *R. flavefaciens*는 *F. succinogenes*와 *R.albus* 와는 달리 배양시간이 지나도 큰 변화가 없었으며 26~27 정도의 수준을 유지하였다. 또한 단백질 분해 균주인 *S. bovis*는 CMS 함량이 증가할수록 소폭으로 감소하는 경향을 보였으며 배양시간에는 많은 영향을 받지 않았다.

표 32. *A. oryzae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 microbial population (Ct) 변화

strain	time	CMS level (%)			
		0	4	8	12
<i>A. oryzae</i>	0	27.76	29.11	31.24	27.20
	12	32.05	27.00	27.56	28.70
	24	31.60	34.15	28.18	30.45
<i>F. succinogenes</i>	12	16.78	16.27	16.24	16.00
	24	14.80	14.53	14.75	15.55
<i>R. albus</i>	12	22.19	21.94	22.53	22.03
	24	19.55	20.02	19.76	20.29
<i>R. flavefaciens</i>	12	26.64	27.02	26.69	26.68
	24	27.26	26.44	25.96	26.05
<i>S. bovis</i>	12	15.41	15.10	16.00	16.91
	24	16.34	17.42	17.72	17.53

(나) 수준별로 CMS를 처리한 TMR에 *Lactobacillus* spp.를 접종하여 발효한 TMF의 *in vitro* 에서의 사료가치평가

*Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 pH 변화는 표 33에 제시하였다. 초기 pH는 CMS 첨가 처리구 0%를 제외하고 4, 8 그리고 12%가 약 6.9로 높은 값을 보였다. 배양 시간이 증가하면서 CMS 첨가 0% 처리구가 6.74 그리고 12% 처리구가 6.83으로 CMS 첨가량이 증가함에 따라 pH가 더욱 높은 값을 보였다.

표 33. *Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 pH 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	6.85	6.94 ± 0.01	6.92	6.92
12	6.77 ± 0.01	6.81	6.83 ± 0.01	6.87 ± 0.01
24	6.74	6.78	6.81	6.83

*Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 배양조건에서의 건물 분해율의 변화는 표 34에서 보는 바와 같다. 배양 0시간째에 CMS 첨가 0% 처리구를 제외하고

그 외 4, 8, 12%는 약 25~26%의 분해율을 보였으며 12시간 배양에서는 약 37%로 비슷한 수준이었다. 배양 24시간째에는 CMS 첨가 8% 수준에서 45.41%로 가장 높은 값을 보였으며 0%에서 41.55%로 가장 낮은 값을 보였다. 최초 24시간에서 0시간 배양했을 경우 건물 분해율을 제함으로써 순수한 소화율로 비교해보았을 경우는 CMS 첨가사료 0,4,8 그리고 12% 가 각각 25.11, 18.44, 19.17 그리고 18.51로 CMS 첨가 0% 처리구가 가장 높은 수치를 보였고 그 외에는 큰 차이가 없는 것을 볼 수 있다. 이는 최초 CMS 가 함유된 사료에서 CMS 가 녹아져 나와 초기 분해율이 높게 평가된 것 외에도 발효 시 CMS를 첨가했을 경우 배양 전 가용성 영양소로 많은 부분이 분해되어 있음을 짐작 할 수 있다

표 34. *Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 DM 소화율(%)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	16.44 ± 1.11	25.44 ± 0.07	26.24 ± 0.60	25.15 ± 4.39
12	37.71 ± 0.46	37.52 ± 1.04	36.48 ± 0.10	36.42 ± 0.06
24	41.55 ± 1.52	43.88 ± 0.29	45.41 ± 0.77	43.66 ± 0.49

*Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 가스발생량의 변화와 암모니아 발생량은 표 35과 36에서 보는 바와 같다. 가스발생량은 모든 시간대에서 CMS 첨가 수준이 낮을수록 발생량이 높은 것을 확인할 수 있다. 또한 암모니아 발생량은 가스 발생량과 역의 상관관계를 가지며 CMS 함량이 높은 처리구에서 수치가 높은 것이 확인되었다. 이처럼 암모니아 발생량이 CMS 처리농도가 높은 처리구로 갈수록 높아지는 것은 최초 CMS 에 함유되어 있는 암모니아의 함량이 높았기 때문으로 사료된다. 이는 최초 24시간에서 0시간 배양했을 경우의 암모니아를 제하여 순수한 암모니아 발생량으로 비교해보았을 경우는 CMS 첨가사료 0,4,8 그리고 12% 가 각각 1.64, 2.36, 2.71 그리고 3.55로 CMS에서 유래한 암모니아의 양 외에도 발효산물에서 유래한 암모니아의 양이 증가한 것을 짐작할 수 있다.

표 35. *Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 Gas 발생량(ml)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	56.29 ± 0.58	49.94 ± 0.38	45.12 ± 0.19	43.78 ± 1.15
24	82.08 ± 0.58	71.68 ± 2.50	70.14 ± 0.58	65.72 ± 0.77

표 36. *Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 암모니아 생산량(mg/100ml)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	3.77 ± 0.63	6.33 ± 1.70	9.09 ± 3.14	10.34 ± 3.12
12	1.79 ± 0.34	4.73 ± 0.42	8.34 ± 0.20	8.57 ± 0.63
24	5.41 ± 0.38	8.69 ± 0.34	11.80 ± 0.44	13.89 ± 1.96

*Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 microbial population의 변화는 표 37에 나타내었다. *Lactobacillus* spp.는 전 배양시간과 CMS 첨가수준에 큰 영향을 받지 않았으며 *A. oryzae* 보다 성장률이 높은 것을 알 수 있다. 섬유소 분해균주인 *F. succinogenes*와 *R. albus* 는 배양 시간이 증가할수록 증가하였고 CMS 첨가 함량이 증가함에 따라 소폭으로 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 섬유소 분해균주인 *R. flavefaciens*는 *F. succinogenes*와 *R. albus*와는 달리 배양시간이 지나도 큰 변화가 없었으며 26~27 정도의 수준을 유지하였다. 또한 단백질 분해 균주인 *S. bovis*는 CMS 함량이 증가할수록 소폭으로 감소하는 경향을 보였으며 배양시간에는 많은 영향을 받지 않았다. 이는 *A. oryzae*를 이용한 발효사료와 비슷한 경향이였다.

표 37. *Lactobacillus* spp.를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 microbial population(Ct)의 변화

strain	time	CMS level (%)			
		0	4	8	12
<i>Lactobacillus</i> spp.	0	15.51	ND	ND	ND
	12	15.69	ND	14.97	ND
	24	15.43	15.86	ND	15.51
<i>F. succinogenes</i>	12	16.14	15.74	16.26	16.46
	24	14.61	14.51	14.46	14.3
<i>R. albus</i>	12	22.58	21.21	21.55	21.94
	24	19.13	20.02	19.52	20.05
<i>R. flavefaciens</i>	12	26.47	26.18	25.86	26.24
	24	25.72	26.22	25.94	26.26
<i>S. bovis</i>	12	15.44	16.51	15.88	16.68
	24	16.03	16.93	17.69	18.16

(다) 수준별로 CMS를 처리한 TMR에 *S. cerevisiae*를 접종하여 발효한 TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 사료가치평가

*S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 pH의 변화는 표 38에 나타내었다. *A. oryzae* 와 *Lactobacillus* spp.를 배양균으로 사용한 시험에서와 같이 배양시간이 길어질 수록 CMS 첨가 농도가 감소함에 따라 pH가 낮았다. 24시간 배양 시 CMS를 첨가하지 않은 처리구에서 6.7로 가장 높았고, 12% 첨가구에서 6.79로 가장 낮았다.

표 38. *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 pH 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	6.94	6.97 ± 0.02	6.96	6.94
12	6.74 ± 0.01	6.78 ± 0.01	6.81	6.81
24	6.70	6.72 ± 0.01	6.76	6.79

*S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 건물분해율의 변화는 표 39에 제시하였다. 배양 0시간 후에는 CMS 12% 첨가구가 27.17로 가장 높았으나 배양시간 24시간에는 CMS를 첨가하지 않은 처리구가 44.63으로 가장 높았다. 최초 24시간에서 0시간 배양했을 경우의 건물 분해율을 제하여 순수한 소화율로 비교해보았을 경우는 CMS 첨가사료 0,4,8 그리고 12% 가 각각 26.17, 19.29, 19.03 그리고 15.75로 CMS 를 처리하지 않은 처리구가 가장 높았다. 이는 *A. oryzae* 와 *Lactobacillus* spp. 를 첨가하여 발효시킨 사료의 시험과 일치하였다. *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 가스생성량의 변화는 표 40에 제시하였다. 가스 생성량 또한 건물 분해율과 정의 상관관계를 보이며 CMS 함량이 증가함에 따라 발생량이 감소하였다. 24시간 배양시 CMS 를 처리하지 않은 처리구에서 80.15로 가스 발생량이 가장 높았으며, 12% 처리구가 64.56으로 가장 낮았다. 암모니아 발생량 역시 CMS 첨가 8% 처리구(16.22)를 제외 하고는 위의 *A. oryzae* 와 *Lactobacillus* spp. 를 첨가하여 발효시킨 사료의 시험과 같은 경향으로 가스발생량과 건물 분해율과는 역의 상관관계를 보였다.

표 39. *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 DM 소화율(%)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	18.46 ± 0.98	23.45 ± 0.98	26.23 ± 1.11	27.17 ± 0.46
12	32.93 ± 2.24	32.92 ± 1.49	35.15 ± 0.17	36.62 ± 0.05
24	44.63 ± 0.12	42.74 ± 2.18	45.26 ± 0.60	42.92 ± 1.10

표 40. *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 gas 생산량(ml)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	54.94 ± 1.54	52.25	24.15 ± 1.86	45.12 ± 1.35
24	80.15 ± 0.58	72.84 ± 0.58	68.80 ± 0.38	64.56 ± 1.54

표 41. *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 소화율시험에서의 암모니아 농도(mg/100ml)의 변화

Time	CMS level (%)			
	0	4	8	12
0	3.67 ± 0.58	5.17 ± 0.26	8.33 ± 1.93	9.90 ± 3.83
12	1.64 ± 0.43	3.78 ± 0.49	7.27 ± 1.87	7.84 ± 0.85
24	5.04 ± 0.33	12.85 ± 4.13	16.22 ± 4.78	13.89 ± 1.37

*S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 microbial population의 변화는 표 42와 같다. *S. crevisiae*의 균수는 배양 12시간대에서 모든 CMS 첨가 처리구에서 감소하다가 24시간대에 다시 0시간대의 수준으로 회복되었다. 이는 *A. oryzae*의 평균 (28~30) 보다는 높은 수준이었고 *Lactobacillus* spp. 의 평균(15)보다는 낮은 수준이었다. *F. succinogenes*와 *R. albus* 는 배양 시간이 증가할 수록 증가하였고, 섬유소 분해균주인 *R. flavefaciens*는 *F. succinogenes*와 *R. albus*와는 달리 배양시간이 지나도 큰 변화가 없었으며 24~27 정도의 수준을 유지하였다. 또한 단백질 분해 균주인 *S. bovis*는 CMS 함량이 증가할 수록 소폭으로 감소하는 경향을 보였으며 배양시간에는 많은 영향을 받지 않았다. 이는 *A. oryzae*와 *Lactobacillus* spp.를 이용한 발효사료와 비슷한 경향이었다.

표 42. *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 *in vitro* 에서의 microbial population(Ct)의 변화

strain	time	CMS level (%)			
		0	4	8	12
<i>S.cerevisiae</i>	0	24.86	25.16	25.63	28.14
	12	21.13	27.54	26.46	25.69
	24	26.85	26.76	24.91	28.19
<i>F. succinogenes</i>	12	17.92	16.69	16.66	17.53
	24	14.57	15	14.67	14.55
<i>R. albus</i>	12	23.55	22.83	21.57	21.97
	24	18.72	19.68	20.59	19.17
<i>R. flavefaciens</i>	12	27.60	26.42	26.73	26.92
	24	24.43	27.16	27.00	24.96
<i>S. bovis</i>	12	15.07	14.47	15.21	14.96
	24	16.35	17.29	17.13	17.56

라. 수준별로 CMS를 처리한 TMR에 *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae* 를 접종하여 발효한 TMF의 저장성 평가

### (1) 재료 및 방법

표 26에 제시한 것과 같이 TDN과 기타 영양소 함량을 기준으로 표 25과 같이 배합하였다. 이렇게 배합된 사료를 고정온도(25℃)와 변화온도(4~20℃ : field 기준)으로 5일동안 발효시킨 후 채취하여 분석에 이용하였다. pH와 사료의 발효 온도, 외부적 성상 그리고 각 발효 균주의 NPN 이용성을 분석하였다.

### (2) 결 과

*A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 pH 변화는 표 43에 보는 바와 같다. CMS 를 첨가하지 않은 처리구는 발효 온도에 따른 변화가 크지 않았다. 그러나 CMS 첨가 농도가 증가할 수록 변화온도에서 발효된 사료보다 고정(25℃)에서 발효된 사료의 pH가 소폭으로 감소하였다. *A. oryzae*를 발효균주로 사용한 경우, CMS 첨가 12%에서 변화온도는 4.58 고정온도는 4.44로 고정온도에서의 pH가 낮았다. 또한 *Lactobacillus* spp. 는 CMS 첨가 8% 처리구에서 4.60(변화온도)과 4.32(고정온도)로 차이가 있었으며, *S. cerevisiae*의 경우는 CMS 첨가 15%의 처리구에서 4.84(변화온도), 4.49(고정온도)로 고정온도에서의 pH가 더욱 낮게 나타났다.

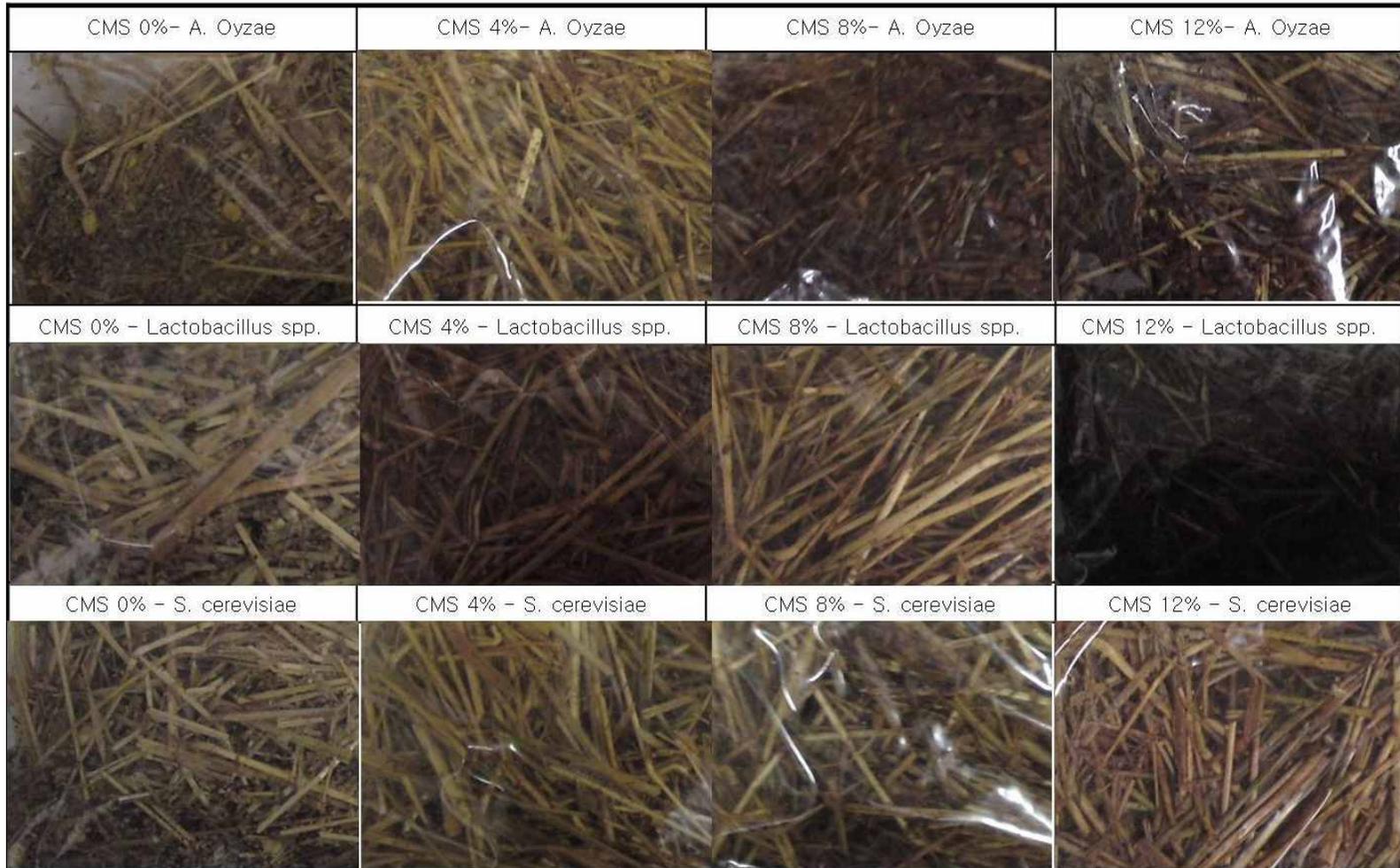
*A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 온도 변화는 표 44에 제시하였다. 온도변화는 pH 만큼 큰 폭의 변화는 관찰할 수 없었다. 변화온도의 경우는 모든 처리구에서 평균 9.6 정도의 수치를 보였으며 고정온도에서는 CMS 첨가 농도가 증가할수록 발효온도가 소폭으로 증가하는 경향을 보였다.

*A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 미분해 NPN함량은 표 45에 나타내었다. 이는 사료에서 NPN을 물로 씻어낸 후 켈텍장치를 이용해 증류함으로써 CMS 첨가 사료의 발효전 사료와 발효후의 차로 계산하였다. CMS 첨가 8%의 처리구를 제외한 모든 4%, 8% 처리구에서 NPN 남아있지 않았으며 12% 첨가 처리구에서는 고정온도에서 *S. cerevisiae* 가 가장 적은 미분해 NPN 잔량을 보였다.

표 43. *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 pH 변화

Temp. °C	strain	CMS level (%)			
		0	4	8	12
Various	<i>A. oryzae</i>	3.97 ± 0.08	4.02 ± 0.02	4.25 ± 0.04	4.58 ± 0.02
	<i>Lactobacillus</i> spp.	3.93 ± 0.04	4.03 ± 0.04	4.60 ± 0.32	4.48 ± 0.06
	<i>S.cerevisiae</i>	3.96 ± 0.05	4.02 ± 0.09	4.34 ± 0.02	4.84 ± 0.23
Constant , 25°C	<i>A. oryzae</i>	3.92 ± 0.03	4.03 ± 0.01	4.27 ± 0.06	4.44 ± 0.05
	<i>Lactobacillus</i> spp.	3.97 ± 0.02	4.02 ± 0.01	4.32 ± 0.02	4.52 ± 0.04
	<i>S.cerevisiae</i>	3.96 ± 0.02	4.07 ± 0.06	4.28 ± 0.03	4.49 ± 0.04

그림 7. *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 외관적 성상



\*

표 44. *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 온도(°C) 변화

Temp. °C	strain	CMS level (%)			
		0	4	8	12
Various	<i>A. oryzae</i>	9.67 ± 1.08	9.83 ± 1.41	9.83 ± 0.47	9.67 ± 0.85
	<i>Lactobacillus</i> spp.	10.00 ± 0.41	9.67 ± 0.62	9.67 ± 0.47	9.83 ± 0.24
	<i>S. cerevisiae</i>	9.67 ± 0.24	9.83 ± 0.24	9.83	9.67 ± 0.24
Constant , 25°C	<i>A. oryzae</i>	20.50 ± 0.24	21.00 ± 0.24	21.33 ± 0.24	22.17 ± 0.24
	<i>Lactobacillus</i> spp.	22.00	22.33 ± 0.24	22.67 ± 0.24	22.83 ± 0.24
	<i>S. cerevisiae</i>	21.33 ± 0.24	22.67 ± 0.24	22.50 ± 0.24	21.83 ± 0.24

표 46. *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp. 그리고 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효한 수준별 CMS-TMF의 미분해 NPN함량 (%)

Temp. °C	strain	CMS (%)		
		4	8	12
Various	<i>A. oryzae</i>	0.00	0.07	0.14
	<i>Lactobacillus</i> spp.	0.00	0.00	0.21
	<i>S. cerevisiae</i>	0.00	0.00	0.14
Constant , 25°C	<i>A. oryzae</i>	0.00	0.00	0.21
	<i>Lactobacillus</i> spp.	0.00	0.00	0.21
	<i>S. cerevisiae</i>	0.00	0.00	0.14

### 3. CMS-AY-LAC · TMF 실용화 방안 개발

가. 수준별로 CMS를 처리한 비지박에 *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 의 접종 수준을 달리하여 발효한 사료의 특성 비교

#### (1) 재료 및 방법

비지박에 CMS를 각각 3%와 6%를 혼합한 후 *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*를 5%에서 20% 까지 수준별로 접종하여 배양에 이용하였다. 각각의 CMS 혼합량은 비지를 TMR에 20% 사용하였을 경우를 기준으로 최종 TMR에 CMS가 3%, 6% 되도록 혼합하였다. 따라서 비지박에 처리된 CMS는 비지박을 기준으로 환산했을 경우 3%는 15%로 6%는 30%로 계산할 수 있다. CMS 0%는 CMS 대신 증류수를 처리하였다. 비지박은 원물의 보관상 부패가 우려되어 동결건조 후 냉장보관 하였고, 실험개시 시점에서 원물의 수분함량을 고려하여 증류수를 원물수준으로 보충하여 실험에 이용하였다. *A. oryzae* 는 seed culture(0.3g DM/10ml)를 1L에 20ml을 접종하여 2일 동안 30℃ 에서 배양하여 사용하였다. *Bacillus subtilis* 는 seed culture( $8 \times 10^8$  CFU) 1L에 10ml을 접종하여 1일 동안 30℃ 에서 배양하여 사용하였다. CMS와 비지의 혼합물에 미생물을 접종 후 30℃에서 2일 동안 배양한 후 샘플을 취하여 분석에 이용하였다. 각 처리는 3반복으로 수행하였으며 sampling 후 건조하여 조단백질함량과 NPN 분석에 이용하였다.

#### (가). 조단백질함량 분석

사료를 건조 분쇄한 다음 0.5g 씩 취하여 촉매제(Kjeltabs S/3.5, FOSS) 와 sulfuric acid 12ml 을 digestion tube에 첨가한 후 420℃에서 1시간 동안 태웠다. 그 후 Kjeltec 2200 장치를 이용하여 자동화 분석을 한 후 0.1N HCl 로 적정하여 질소 함량 분석을 하였다.

표 46. 수준별 CMS 처리량 및 균주 접종량

접종량		sample No.		
<i>A. oryzae</i>	B.subtilis	CMS 0%	CMS 3%	CMS 6%
5%	5%	S1	S10	S19
5%	10%	S2	s11	S20
5%	20%	S3	s12	s21
10%	5%	S4	S13	S22
10%	10%	S5	S14	S23
10%	20%	S6	S15	S24
20%	5%	S7	s16	S25
20%	10%	S8	S17	S26
20%	20%	S9	S18	S27

(2) 실험 결과



S1	S2	S3
S4	S5	S6
S7	S8	S9

그림 8. CMS 0% 가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

*A. oryzae* 의 접종량이 증가할 수록 균체의 성장과 발효가 높은 결과를 보였다. 또한 *Bacillus subtilis* 의 첨가량이 증가할 수록 발효취가 강하게 나타났으며 *A. oryzae*의 성장도 높게 관찰되었다.



S10	S11	S12
S13	S14	S15
S16	S17	S18

그림 9. CMS 3% 가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

CMS 의 혼합 수준이 3%일 경우 전체적인 성장이 CMS 가 함유되지 않은 대조구에 비해 미생물의 성장과 발효취가 적게 나타났으나 사료 전체에 걸쳐 균일하게 성장하는 균체를 관찰할 수 있었다. 이는 2일 이상의 발효 시간이 주어졌을 경우 비지박 내에 CMS의 이용성과 균체 성장율을 높일 수 있을 것으로 판단되어진다.

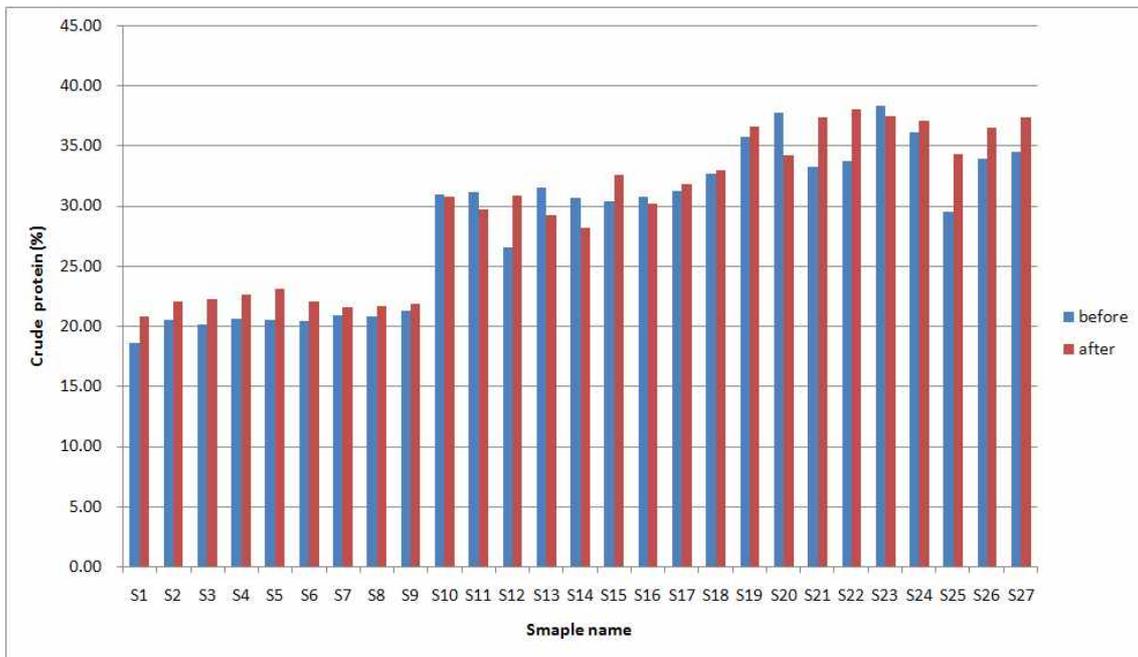


S19	S20	S21
S22	S23	S24
S25	S26	S127

그림 10. CMS 6% 가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

CMS 6% 혼합처리의 경우 *A. oryzae*를 5%, 10% 접종한 처리구에서는 발효취와 미생물 성장이 관찰되지 않았으며, *A. oryzae* 20% 접종한 처리구에서만 미생물 성장이 관찰되었다. 또한 *B. subtilis* 의 접종량이 증가할수록 *A. oryzae*의 성장도 증가하였다. 이는 *A. oryzae* 와 *B. subtilis* 를 함께 접종했을 경우 상호간의 Positive interaction을 통해 CMS를 더욱 효과적으로 이용할 수 있다고 볼 수 있다.

그림 11. CMS 6% 가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 조단백질 변화(%)



대조구와 처리구 둘다 전체적으로 2일 배양후 조단백질 함량이 증가하는 경향을 보였다. 이는 발효 후 미생물의 증식에 따라 미생물 균체 단백질이 증가한 것으로 판단된다. 또한 *B. subtilis* 와 *A. oryzae*의 접종량이 증가 할수록 조단백질 함량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 초기 접종량이 많았기 때문에 성장량이 더욱 증가한 것으로 볼 수 있으며 *B. subtilis* 와 *A. oryzae* 가 서로 상호보완적으로 작용한다고 미루어 짐작할 수 있다.

나. 수준별로 CMS를 처리한 벼싯배지에 *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 의 접종 수준을 달리하여 발효한 사료의 특성 비교

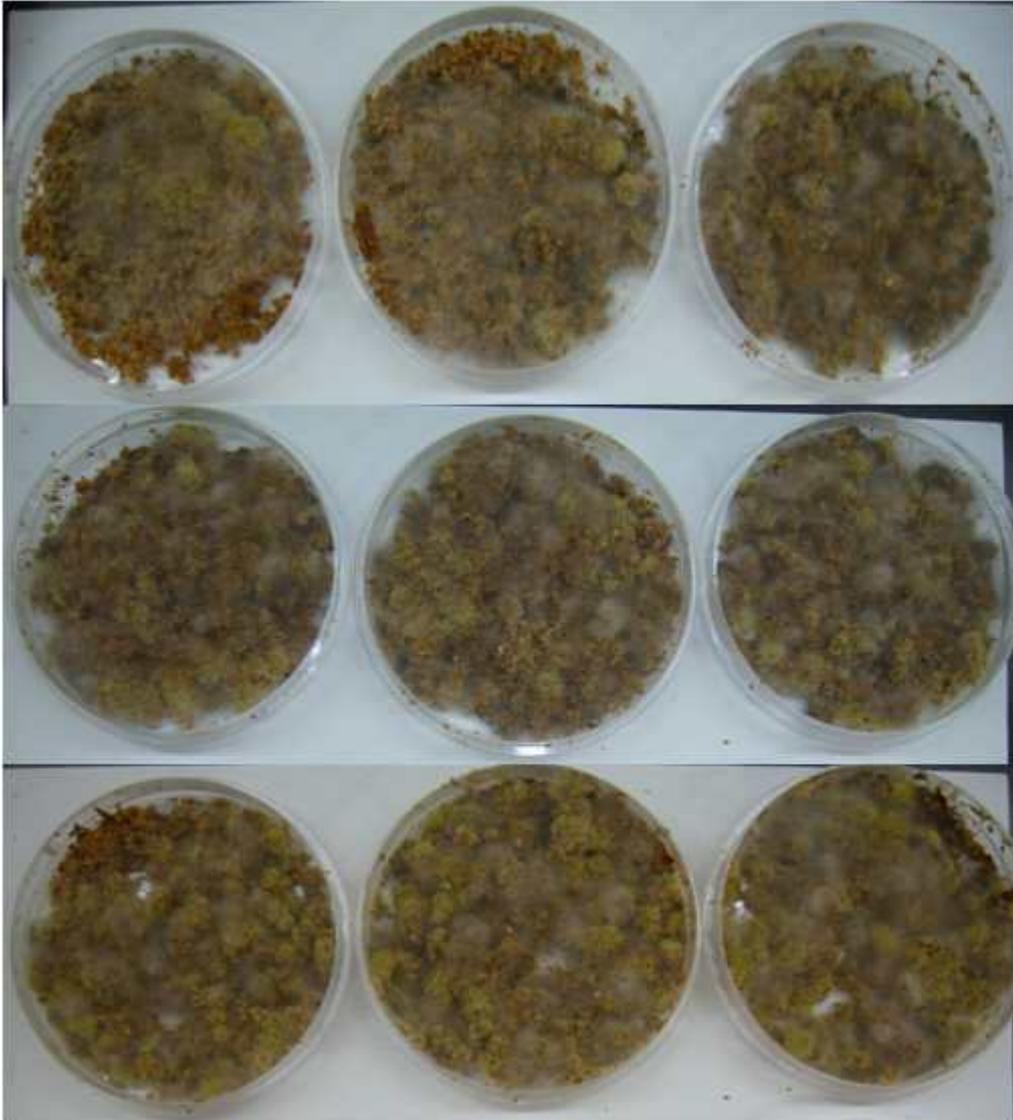
(1) 재료 및 방법

기질로 벼싯배지를 사용한 부분을 제외하고 모든 실험 방법은 비지박을 이용한 실험 1과 동일함.

표 47. 수준별 CMS 처리량 및 균주 접종량

접종량		sample No.		
<i>A. oryzae</i>	<i>B. subtilis</i>	CMS 0%	CMS 3%	CMS 6%
5%	5%	M1	M10	M19
5%	10%	M2	M11	M20
5%	20%	M3	M12	M21
10%	5%	M4	M13	M22
10%	10%	M5	M14	M23
10%	20%	M6	M15	M24
20%	5%	M7	M16	M25
20%	10%	M8	M17	M26
20%	20%	M9	M18	M27

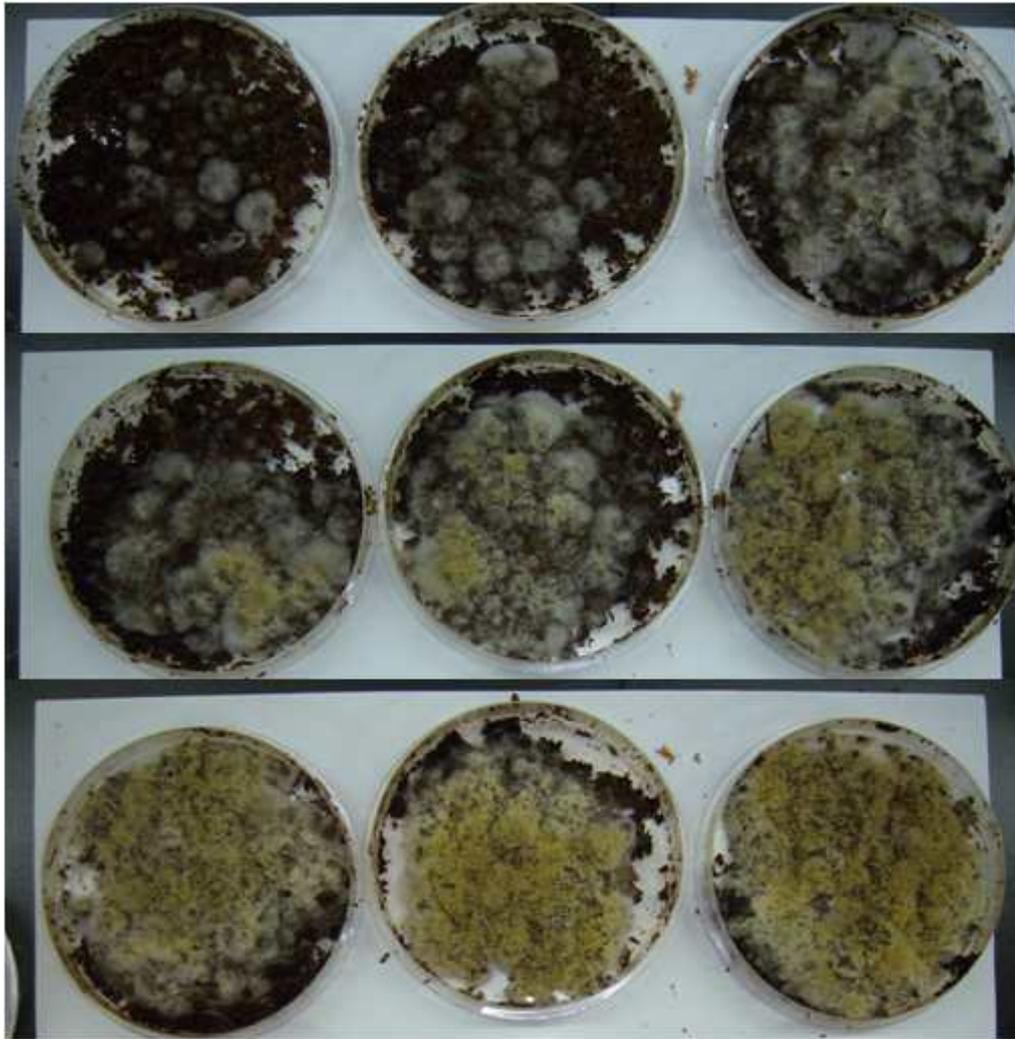
(2) 실험 결과



M1	M2	M3
M4	M5	M6
M7	M8	M9

그림 12. CMS 0% 가 혼합된 벼싹배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

CMS 0% 처리구의 겨우 전체 처리구에서 비지박과는 달리 미생물의 높은 성장을 관찰할 수 있었다. 또한 *A. oryzae* 접종량이 증가할수록 *A. oryzae*의 성장율이 증가했을 뿐 아니라 *B. subtilis*의 접종량이 증가함에 따라 더욱 높은 성장을 보였다. 발효취 역시 접종량과 양의 상관 관계를 가지며 증가하였고 경시적으로 관찰되는 오염을 보이지 않았다.



M10	M11	M12
M13	M14	M15
M16	M17	M18

그림 13. CMS 3% 가 혼합된 벼싯배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

비지박의 실험과 동일하게 3% CMS 처리구가 대조구보다 낮은 미생물 성장을 보였다. 또한 *A. oryzae*와 *B. subtilis* 는 양의 상관관계를 보였고, 접종량이 증가할수록 발효취와 미생물 성장이 높게 나타났다.



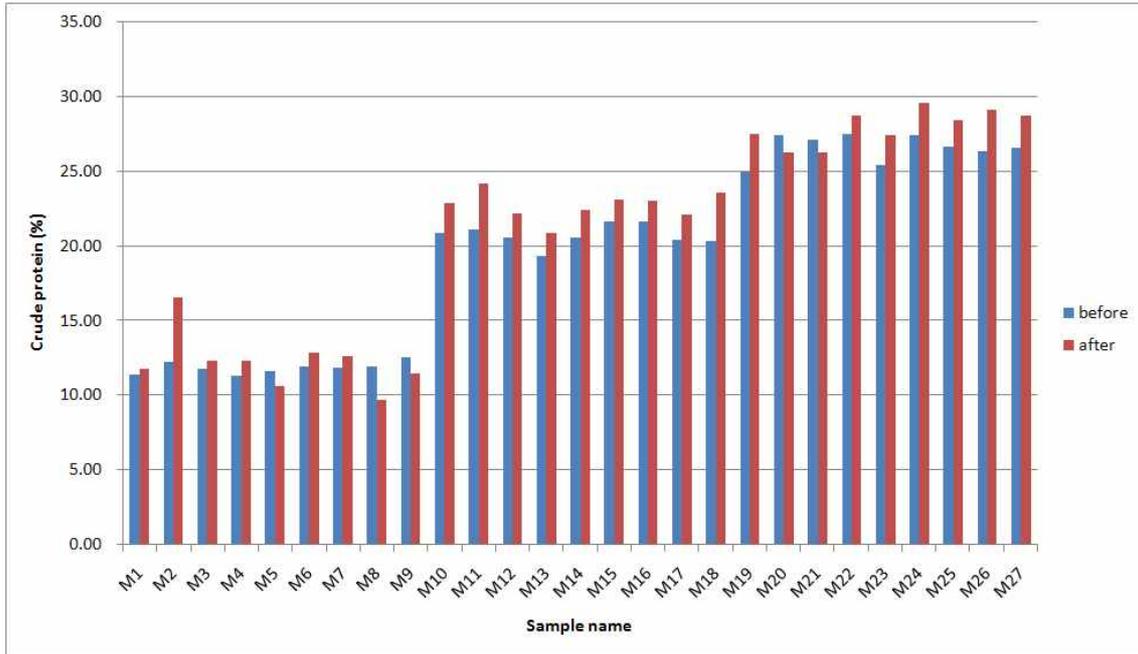
M19	M20	M21
M22	M23	M24
M25	M26	M127

그림 14. CMS 6% 가 혼합된 벼싹배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

CMS 6% 처리구에서는 *A. oryzae* 를 20% 접종한 처리구에서만 미생물 성장이 관찰되었다. *A. oryzae* 20%, *B. subtilis* 10%에서 가장 높은 성장을 보였다.

이상의 결과에서 비지박 보다는 벼싹배지가 *A. oryzae*의 성장에 유리하다고 판단된다. 또한 CMS 함량이 증가할 수록 미생물의 성장이 억제된다는 점을 다시 한 번 확인할 수 있었다. *A. oryzae*를 단일 배양했을 경우 보다 *B. subtilis* 와 혼합 배양할 경우 오염이 전혀 관찰 되지 않았을 뿐 아니라 균주간의 positive interaction에 의해 성장율이 증가하였다.

그림 15. CMS 6% 가 혼합된 버섯배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 조단백질 변화 (%)



버섯배지 + CMS + 미생물의 경우도 비지박을 사용한 실험의 결과와 같이 미생물 접종량이 증가할 수록 조단백질 함량이 증가했으며, CMS를 6% 이상 첨가했을 경우 *A. oryzae*의 접종량이 10% 이상일 경우에 조단백질이 증가하는 경향을 보였다. 이는 CMS 처리 농도가 높을 경우 곰팡이의 성장에 영양적 방해요인 때문에 적정수준 이상의 미생물이 존재해야함을 나타낸다.

위의 실험에서 비지박과 버섯배지에 CMS를 첨가하고 미생물을 접종할 경우 CMS를 3% 접종한 경우는 접종량에 상관없이 미생물이 균일하게 성장했으나 6% 접종했을 경우 미생물 접종량을 10~20% 이상으로 증가시킬 경우에만 성장이 원활하게 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 비지박이나 버섯배지의 경우 수분 함량이 다른 TMR 원료에 비해 높고 장기보관의 어려움 및 부패의 단점으로 TMR에 항시적으로 적용하기에 문제가 제기되고 있다. 위의 실험의 결과에 따라 CMS를 6% 이상 처리하여 원료를 보관할 경우 부패를 방지할 수 있는 장점이 있으며, 필요시 종균을 접종하여 발효시켜 TMR 제조에 이용할 수 있는 가능성을 제시할 수 있다.

다. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 의 배양시간을 달리하여 발효한 사료의 특성 비교

(1) 재료 및 방법

실험 1에서 선발된 3가지 조건 (S15, S24, S27) 의 사료를 위의 재료 및 방법과 동일하게 처리 분석하였다.

	CMS(%)	<i>A. oryzae</i>	<i>B.subtilis</i>
S15	3	10	20
S24	6	10	20
S27	6	20	20

위의 처리 방법에 따라 0일 2일 4일 동안 발효 시켜 시료를 채취하여 분석에 이용하였다.

(가). NPN 분석

사료내 NPN 분석은 사료를 건조 분쇄한 다음 0.5g 을 취하여 125ml 삼각플라스크에 넣고 여기에 증류수 50ml을 더했다. 그 후 8ml의 10% 의 sodium tungstic acid 용액을 넣은 다음 25~30℃ 에서 30분간 방치한 후 10ml의 0.5M sulfuric acid 를 첨가하여 용액의 pH를 2로 조정한다. 다음 overnight 시켰다. 그런 다음 Watman #541 filter paper 로 여과하였다. 남은 시료는 증류수로 세척한 후 60℃에서 48시간 동안 건조 후 무게를 측정하고 질소함량을 분석하였다. 질소함량 분석은 위의 CP 분석과 동일하다.

(2) 실험 결과

S15를 2일 배양한 처리의 경우 처리사료의 전체에 걸쳐 균일하게 *A. oryzae*가 성장하는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 그러나 4일 배양한 처리의 경우 일부분만 대량으로 성장 하였으나 나머지 부분에는 균주의 성장을 관찰할 수 없었다. 이는 배양기에서 수분공급이 제한되어 성장하지 않은 부분의 사료가 미생물이 성장할 수 있는 정도의 수분이 남아있지 않았기 때문으로 판단된다. 실제 TMR에 사용할 사료를 만들 경우 일정량의 수분을 공급해 준다면 더욱 높은 수준의 미생물 성장을 기대할 수 있을 것이다. S24 와 27의 경우 2일 배양에서는 극소량의 미생물의 성장을 관찰할 수 있었으며 이는 CMS 6% 첨가에 따른 영양적 방해요소가 많았기 때문으로 판단된다. 그러나 4일 까지 배양한 경우 미생물이 균일하게 성장하는 것을 관찰할 수 있었다. S15를 4일 배양한 처리와는 다르게 미생물이 균일하게 자라는 것은 CMS가 수분 함유 능력이 높기 때문으로 판단된다.



S15- 2day	S24- 2day	S27- 2day
S15- 4day	S24- 4day	S27- 4day

그림 16. CMS 3%와 6 %가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

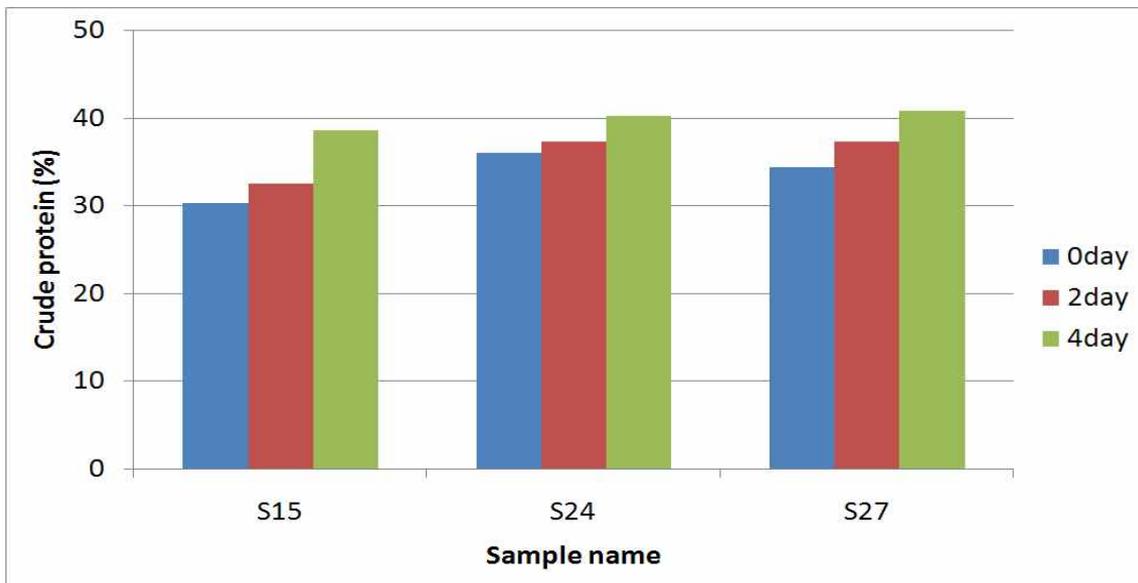


그림 17. CMS 3%와 6 %가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 조단백질 변화 (%)

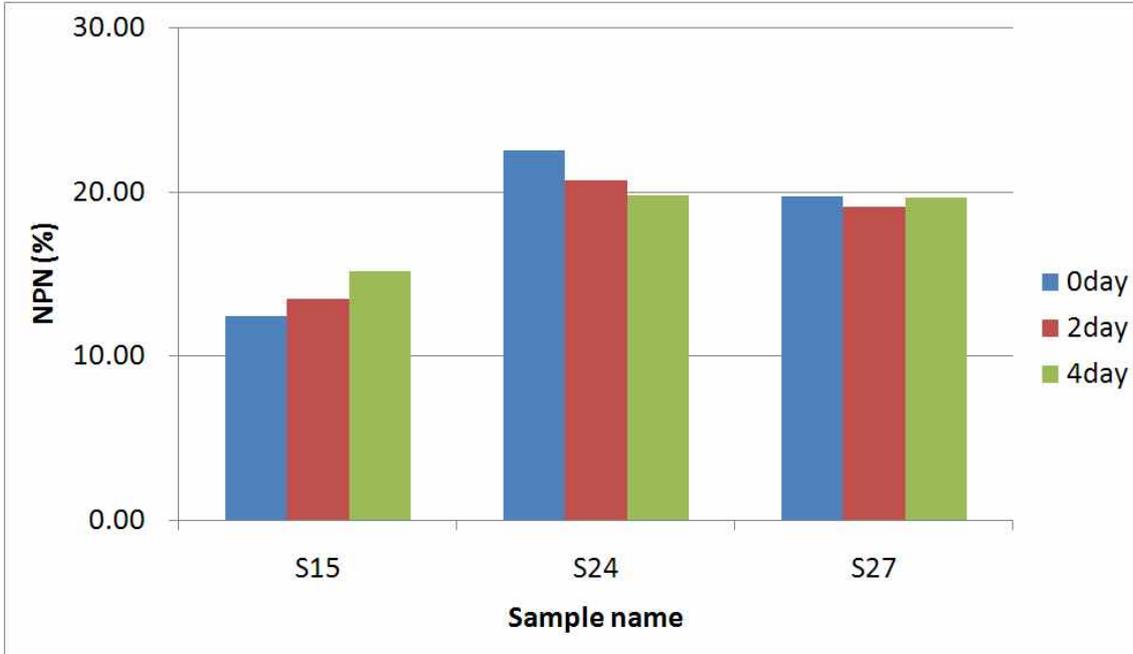


그림 18. CMS 3%와 6 %가 혼합된 비지박에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 NPN 변화 (%)

실험 1의 경향과 동일하게 4일 배양 후에도 미생물의 성장이 증가하는 만큼 조단백질의 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. NPN 함량은 S24 처리는 감소하고 S15 처리는 배양기간이 증가함에 따라 점차 증가하였다. S15 처리구의 경우 미생물이 CMS보다 비지박의 단백질을 이용하여 미생물체 단백질을 합성한 것으로 판단되어진다. 따라서 미생물이 비지박의 단백질을 분해하여 이용하고 남은 아미노산과 저분자 펩타이드 성분이 함께 분석되어짐으로써 NPN 함량이 증가한 것으로 판단된다. S24 (CMS 6%, *A. oryzae* 10%, *B.subtilis* 20%)의 경우 두종의 미생물이 서로 positive interaction 에 의해 CMS에 포함된 NPN을 효과적으로 이용하여 배양기간이 지남에 따라 NPN 함량을 감소시킨 것으로 사료된다.

다. CMS + 벼첫배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 의 배양시간을 달리하여 발효한 사료의 특성 비교

(1) 재료 및 방법

실험 2에서 선발된 3가지 조건의 사료를 위의 재료 및 방법과 동일하게 처리 분석하였다.

	CMS(%)	<i>A. oryzae</i>	<i>B.subtilis</i>
M16	3	20	5
M18	3	20	20
M26	6	20	10

(2) 실험 결과

버섯배지+ CMS + 미생물을 배양한 경우 2일 배양시에는 CMS 가 3% 포함된 처리구에서만 미생물 성장을 육안으로 관찰할 수 있었다. 4일 배양후에는 모든 처리구에서 미생물 성장을 관찰할 수 있었으며, CMS 3%첨가한 처리구가 6% 첨가구보다 높은 성장률을 보였다. 실험4의 경우 버섯배지에 CMS를 첨가한 경우, 실험 3에서 비지박을 이용한 실험보다 미생물의 성장량이 현저히 높은 것을 확인할 수 있다. 이는 버섯의 성장과정에서 발생하는 가용성 탄수화물이 미생물생장에 에너지원으로 사용되고, CMS에 포함된 높은 함량의 NPN이 미생물체 단백질을 이루는 단백질원으로 사용됨으로써 성장에 positive effect로 작용했다고 판단된다.



M16- 2day	M18- 2day	M26- 2day
M16- 4day	M18- 4day	M26- 4day

그림 19. CMS 3%와 6% 가 혼합된 버섯배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 경시적 변화

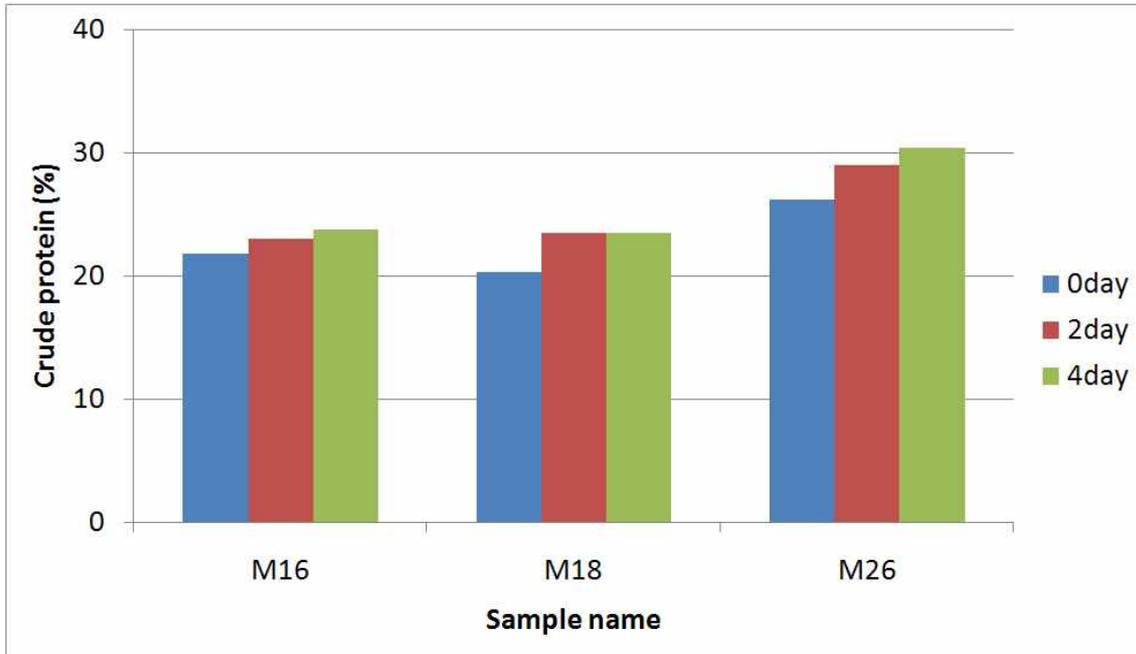


그림 20. CMS 3%와 6% 가 혼합된 벼싹배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 조단백질(%) 변화

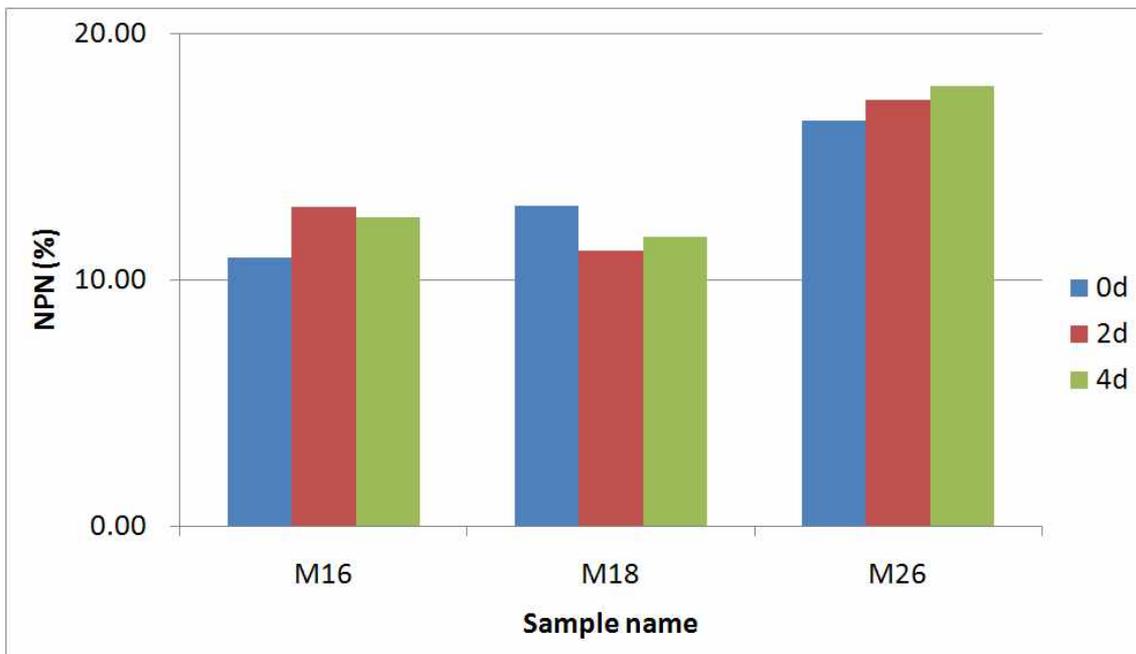


그림 21. CMS 3%와 6% 가 혼합된 벼싹배지에 미생물을 접종하여 발효시킨 사료의 NPN (%) 변화

배양기간이 지날 수록 모든 처리구에서 조단백질 함량이 증가하였다. M26 (CMS 6%, *A. oryzae* 20%, *B. subtilis* 10%) 처리구의 경우 2일 배양시 육안으로는 미생물의 변화를 관찰할 수 없었으나 단백질 함량이 가장 크게 증가하였다. 이는 *A. oryzae* 의 경우 높은 함량의 CMS 에서 성장할 수 없는 반면 *B. subtilis* 의 경우 CMS 함량이 높은 경우에도 성장할 수 있다는

결과를 간접적으로 보여준다. 이를 통해 버섯배지에 CMS를 처리할 경우 초기 배양에는 *B. subtilis* 를 이용해 발효 시킨 후 후기 배양에 *A. oryzae* 를 이용한 방법을 사용한다면 접종한 미생물의 성장율을 더욱 높일 수 있을 것으로 판단된다. 이런 방법으로 *B. subtilis* 와 *A. oryzae* 를 적정 비율로 접종하여 사용한다면 CMS 사용량을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다. 배양후 NPN 함량변화는 *B. subtilis* 접종량이 많은 처리구에서 초기 배양단계에서 감소하는 경향을 보였으며 *A. oryzae* 의 성장이 높게 이루어진 경우 다시 증가하는 경향을 보였다. 이는 *A. oryzae* 보다 *B. subtilis* 가 CMS의 NPN을 더욱 잘 이용하여 미생물체 단백질을 합성한다고 사료되어진다. 또한 *A. oryzae* 가 성장하는 단계에서는 CMS의 NPN 보다 원료사료에 함유된 단백질을 저분자 peptide로 분해하여 이용하는 비율이 증가함으로써 NPN 함량이 증가한다고 판단된다.

마. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료가 반추위내 발효성상과 특성에 미치는 영향

(1) 재료 및 방법

실험 3에서 선발된 S15의 2일 배양한 샘플과 S27을 4일 배양한 샘플에 대한 반추위 발효 성상 및 특성을 비교하였다.

SBC	negative control
SBC + CMS	positive control
ferment-1	S15 - 2day incubation (CMS 3%, <i>A. oryzae</i> 10%, <i>B.subtilis</i> 20%)
fermen-2	S27 - 4day incubation (CMS 6%, <i>A. oryzae</i> 20%, <i>B.subtilis</i> 20%)

(가) 공시동물 및 위액

서울대 수원목장에서 사육중인 홀스테인 수소에서 아침사료 급여 전 위액을 고르게 채취하여 서울로 이동 후 4겹의 거즈로 거른 위액을 인공 buffer와 1:4로 혼합하여 시험에 이용하였다.

(나) 시험사료

실험 3에서 선발된 원료를 채취하여 건조오븐 (50℃)에서 1일 동안 건조한 후 0.5g 씩 serum bottle 에 나누어 담아 시험에 이용하였다. 무처리 대조구로써 비지박을 이용하였고 CMS 처리 대조구로 CMS 6% + 비지박을 사용하였다. *in vitro* 배양 후 샘플은 각각 0, 12 그리고 24시간 에 채취하였다. 각 처리는 3반복으로 처리하였다.

(다) pH meter를 이용하여 pH를 측정하였다

(라) 가스 발생량은 시험실에서 자체 제작한 유리 주사기를 이용하여 측정하였다. 측정후 가스는 자체 제작한 gas sample bag에 충전하여 39℃ 배양기에 보관하여 추후 분석에 이용하였다.

(마) 건물소화율은 배양된 시료를 여과지(#541)을 이용하여 거르고 105℃에서 4시간 건조 후 방냉하여 측정하였다.

(바) 배양액에 존재하는 암모니아의 농도는 배양액 20ul에 1ml phenol color reagent 와 1ml alkali hypochloride reagent 를 혼합하여 37℃에 15분 배양 후 분광분석기를 이용하여 측정하

였다.

(사) 메탄가스 분석은 HP-6890 GC를 사용하여 측정하였다. 분석 조건은 다음과 같다.

<p>OVEN</p> <p>Initial temp: 90 'C (On)    Maximum temp: 260 'C Initial time: 8.00 min    Equilibration time: 3.00 min Post temp: 100 'C    Post time: 1.00 min    Run time: 8.00 min</p>
<p>FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)</p> <p>Mode: Split    Initial temp: 250 'C (On) Pressure: 14.36 psi (On)    Split ratio: 125:1 Split flow: 174.9 mL/min    Total flow: 179.3 mL/min Gas saver: Off    Gas type: Helium</p>
<p>COLUMN 1</p> <p>Capillary Column    Model Number: J&amp;W 113-4362 GS-GASPRO_Methane    Max temperature: 260 'C Nominal length: 60.0 m    Nominal diameter: 320.00 um Nominal film thickness: 0.00 um    Mode: constant flow Initial flow: 1.4 mL/min    Nominal init pressure: 14.37 psi Average velocity: 23 cm/sec    Inlet: Front Inlet Outlet: Front Detector    Outlet pressure: ambient</p>
<p>FRONT DETECTOR (FID)</p> <p>Temperature: 260 'C (On)    Hydrogen flow: 35.0 mL/min (On) Air flow: 350.0 mL/min (On)    Mode: Constant makeup flow Makeup flow: 25.0 mL/min (On)    Makeup Gas Type: Helium Flame: On    Electrometer: On    Lit offset: 2.0</p>

(아) VFA는 배양액 1ml를 200ul의 metaphosphoric acid와 혼합하여 4℃에 30분 방치한 후 HP-6890 GC를 사용하여 측정하였다.

OVEN

Initial temp: 100 'C (On) Initial time: 0.00 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	8.00	190	5.00
2	0.0(Off)		

Post temp: 190 'C Post time: 3.00 min Run time: 16.25 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS) Mode: Split

Initial temp: 220 'C (On) Pressure: 12.23 psi (On)

Split ratio: 1:1 Split flow: 0.8 mL/min Total flow: 4.6 mL/min

Gas saver: Off Gas type: Helium

COLUMN 1

Capillary Column Model Number: supelco 24107 nukol

Max temperature: 200 'C Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 250.00 um Nominal film thickness: 0.25 um

Mode: constant flow Initial flow: 0.8 mL/min

Nominal init pressure: 12.23 psi Average velocity: 23 cm/sec

Inlet: Front Inlet Outlet: Front Detector

Outlet pressure: ambient

FRONT DETECTOR (FID)

Temperature: 220 'C (On) Hydrogen flow: 35.0 mL/min (On)

Air flow: 350.0 mL/min (On) Mode: Constant makeup flow

Makeup flow: 25.0 mL/min (On) Makeup Gas Type: Helium

Flame: On Electrometer: On Lit offset: 2.0

(2) 실험 결과

모든 처리구의 pH가 배양시간이 지남에 따라 감소하였다. 특히 CMS 무첨가 비지박 대조구의 경우 현저히 감소하였으며, 초기 0시간의 pH가 다른 처리구 보다 pH가 높게 측정되었다. 이는 CMS가 배양 초기 배양액으로 녹아나왔기 때문으로 사료된다.

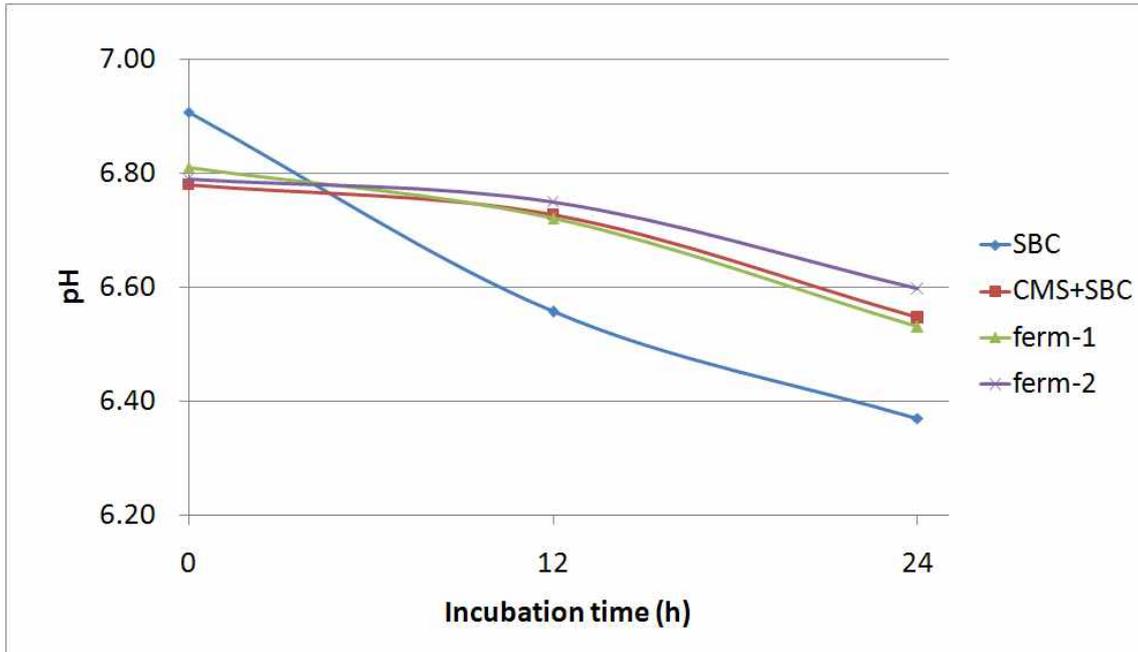


그림 22. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 pH 변화

초기 0시간 배양시 건물 분해율은 CMS 첨가구에서 높게 나타났으며 이는 배양 초기 CMS가 배양액으로 녹아나왔기 때문이다. 또한 ferm-1 처리구가 다른 처리구 보다 0시간 건물분해율이 낮은 이유는 CMS 함유량이 3%로 다른 처리구에 비해 낮았기 때문이다. 0시간에 배양액으로 분해되어 나오는 부분은 반추미생물에 의해 분해되는 것으로 볼 수 없기 때문에 0시간의 분해량을 고려하여 보정해 보면 대조구가 시간이 지남에 따라 가장 높은 분해율을 보였다. 또한 다른 처리구에서는 CMS 함유량과는 건물 분해율은 반비례하는 경향을 나타냈다.

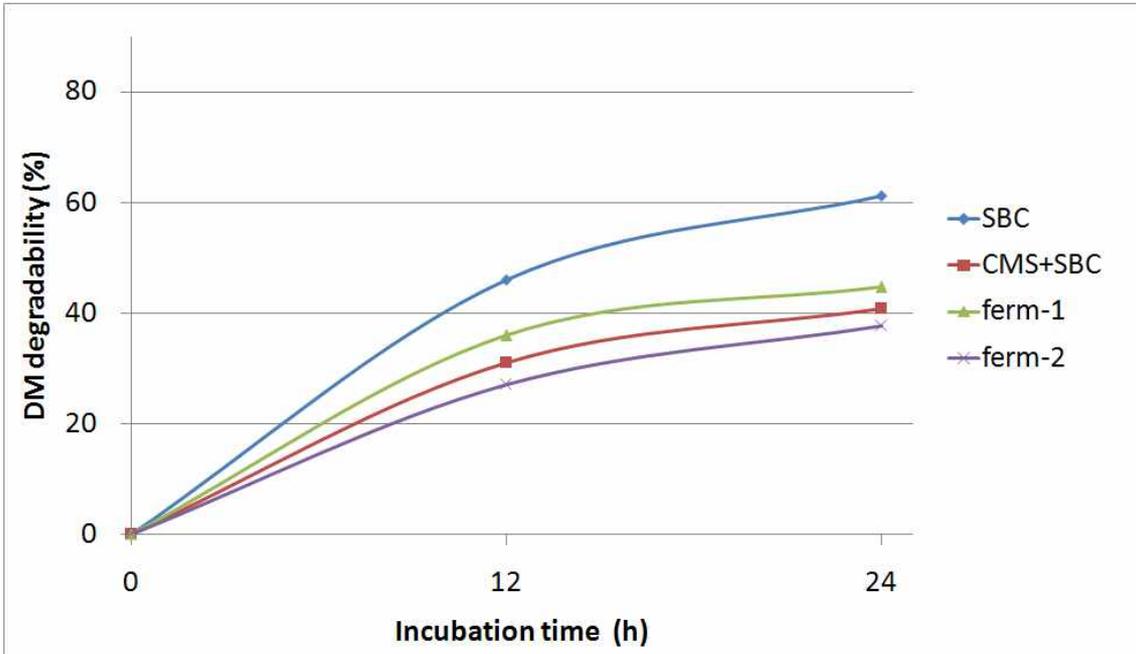
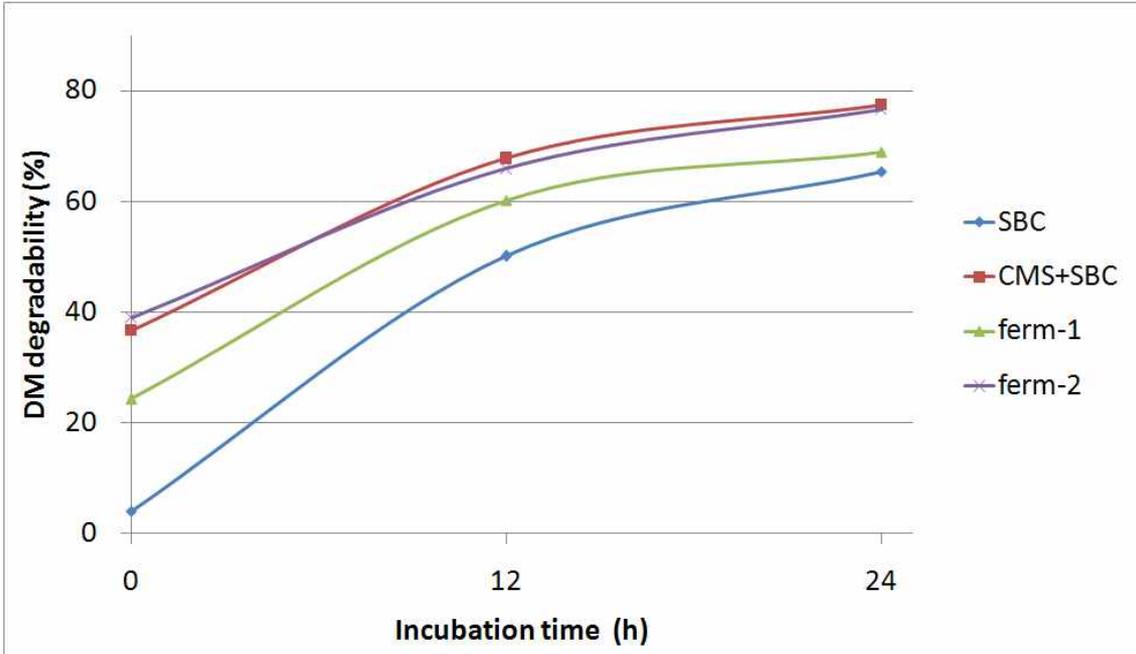


그림 23. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 건물분해율

CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 가스생성량은 제시한 바와 같다. 건물 분해율과 마찬가지로 대조구에서 가장 많은 가스가 발생되었으며, CMS가 6%로 가장 많이 함유되어 있고 발효시킨 ferm-2 처리구가 모든 시간대에서 가장 낮게 측정되었다. 또한 메탄 가스 생성량도 총 가스 생성량과 정의 상관관계를 보였다.

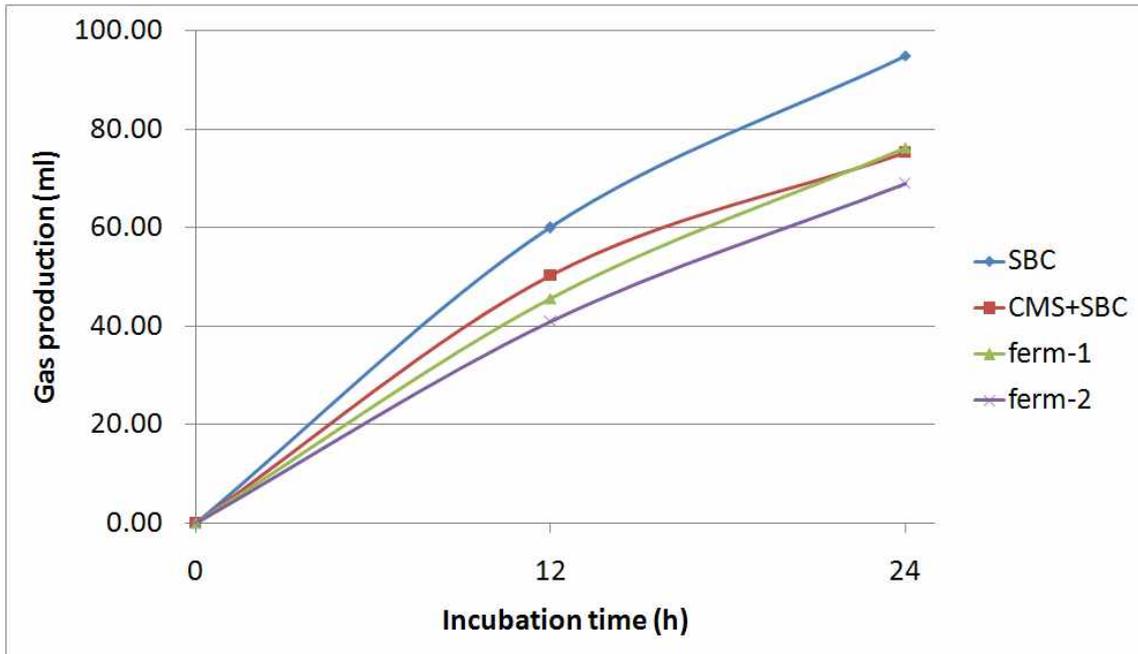


그림 24. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 가스생성량

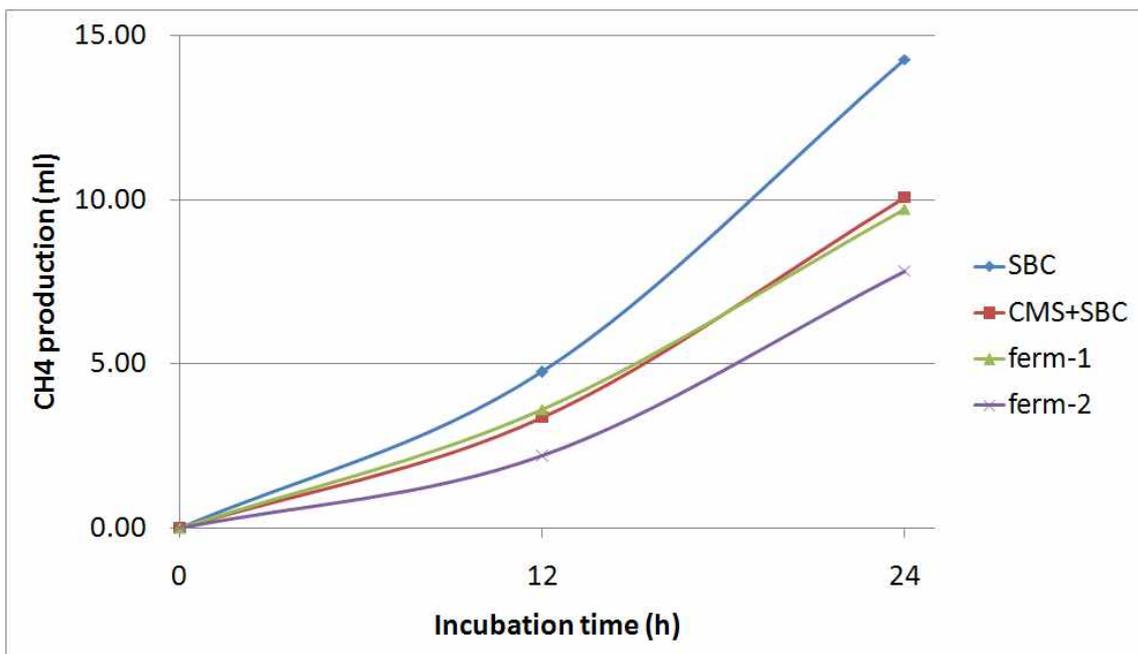


그림 25. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 methane 가스 생성량

모든 처리구에 비해 대조구의 총 휘발성 지방산 생성량이 가장 높았다. A:P ratio는 모든 처리

구에서 12시간에 감소하다가 24시간에 다시 증가하는 경향을 보였다.

표 48. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 휘발성 지방산 생성량

	SBC	CMS+SBC	ferm-1	ferm-2
Acetate				
0h	10.04	11.22	10.53	11.07
12h	45.27	40.67	35.89	27.54
24h	42.85	41.15	35.95	40.39
Propionate				
0h	5.26	5.60	5.22	5.64
12h	36.23	31.41	26.65	20.32
24h	33.14	30.03	24.81	27.85
Butyrate				
0h	0.41	0.40	0.39	0.41
12h	1.66	1.17	0.97	0.85
24h	1.94	1.16	1.25	1.47
Valerate				
0h	5.86	6.06	5.76	5.95
12h	15.53	16.89	14.90	11.54
24h	14.62	17.85	14.66	16.96
A:P ratio				
0h	1.91	2.00	2.02	1.96
12h	1.25	1.29	1.35	1.36
24h	1.29	1.37	1.45	1.45

배양 0시간에서 처리구의 암모니아 생성량이 높은 것은 초기 CMS가 배양액으로 녹아나왔기 때문이며, 실질적인 암모니아 발생량을 비교하기 위해 0시간 측정치를 감하여 보정하였다. ferm-1 처리구 를 제외하고 모든 처리구 및 대조구에서 증가하는 경향을 보였다. ferm-1 처리구에서 배양후 12시간에 미생물 합성량이 증가하여 암모니아 이용율이 증가함으로써 감소추세

를 보였다고 사료된다. 이는 ferm-1 처리구의 건물 분해율이 다른 처리구에 비해 높은 것으로 연관지어 생각할 수 있다.

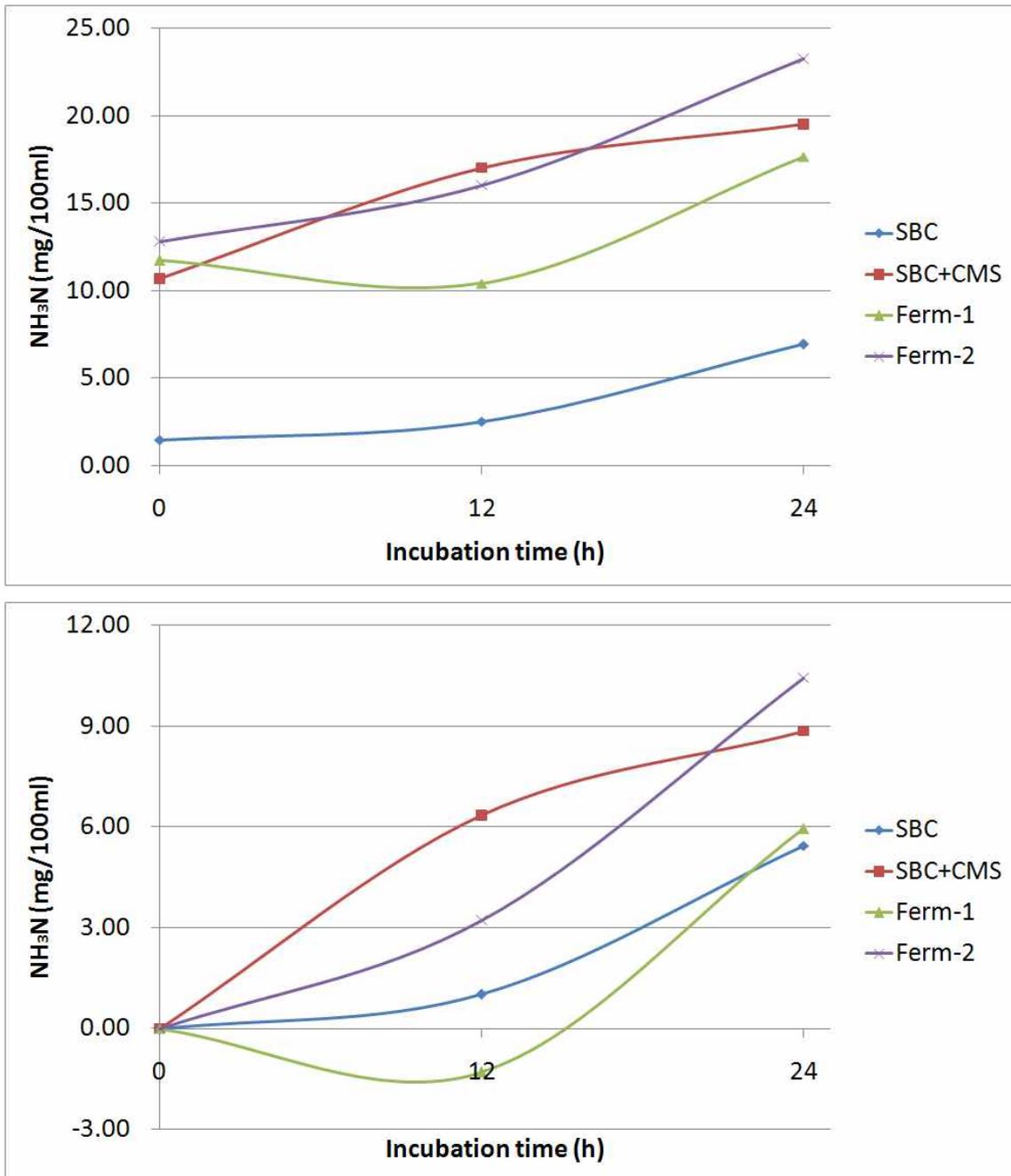


그림 26. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 암모니아 생성량

바. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료가 반추위내 발효성상과 특성에 미치는 영향

(1) 재료 및 방법

실험 3 에서 선발된 S15의 2일 배양한 샘플과 S27을 4일 배양한 샘플에 대한 반추위 발효 성상 및 특성을 비교하였다.

Mush	negative control
Mush + CMS	positive control
ferm-1	M16 - 2day incubation (CMS 3%, <i>A. oryzae</i> 20%, <i>B.subtilis</i> 5%)
ferm-2	S26 - 4day incubation (CMS 6%, <i>A. oryzae</i> 20%, <i>B.subtilis</i> 10%)

분석방법은 실험 4의 방법과 같다.

(2) 실험 결과

건물 분해율은 CMS 함량과 부의 상관관계를 가지는 것으로 측정되었다. 배양 12시간 까지 CMS 3% 첨가 처리구와 대조구는 직선형태의 분해율을 보이는 반면 CMS 6% 첨가구는 12시간 까지 천천히 분해되다가 12시간 이후 24시간 까지 분해속도가 빠르게 증가하는 경향을 보였다.

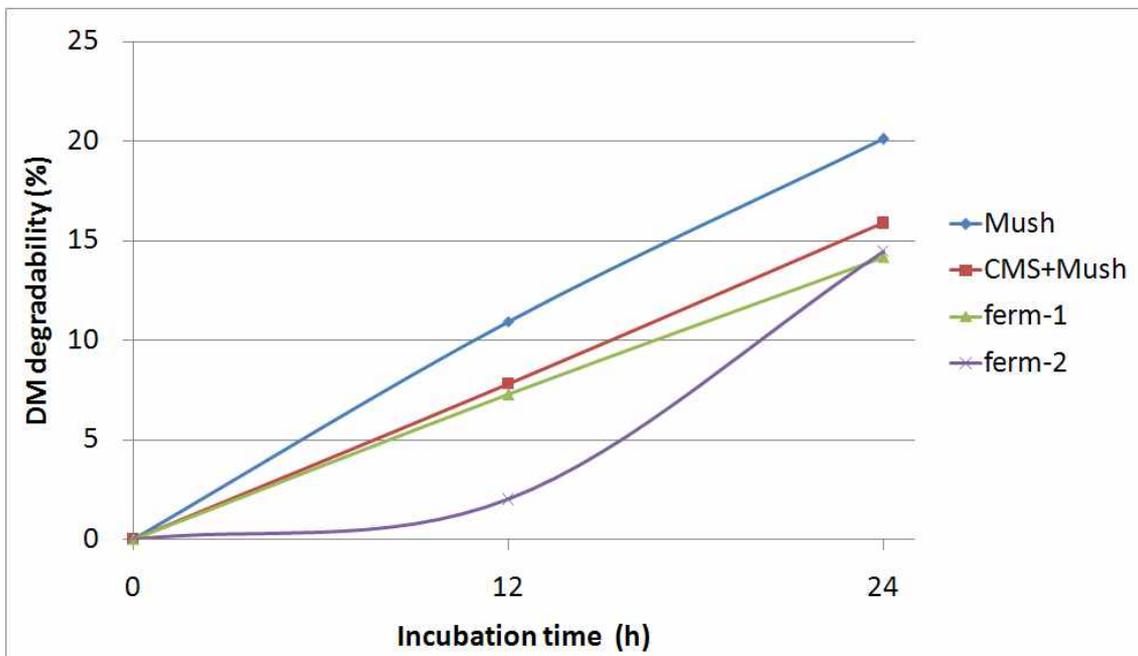
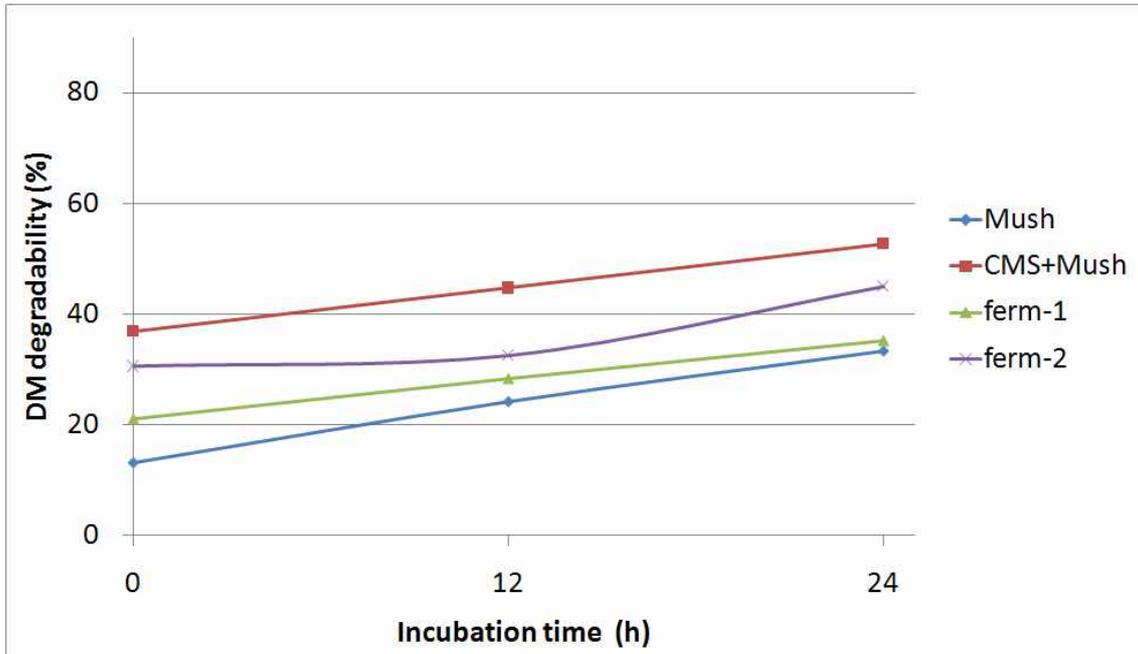


그림 27. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 건물분해율

가스발생량은 버섯배지만 배양한 대조구와 CMS 처리 대조구가 배양시간에 따라 계속 증가하는 동일한 경향을 보였다. 발효 처리구들은 CMS처리 농도에 관계없이 동일하게 증가하는 경향을 나타냈다. 메탄 발생량은 가스 발생량 과 정의 상관관계를 가지며 배양시간에 따라 증가하였다.

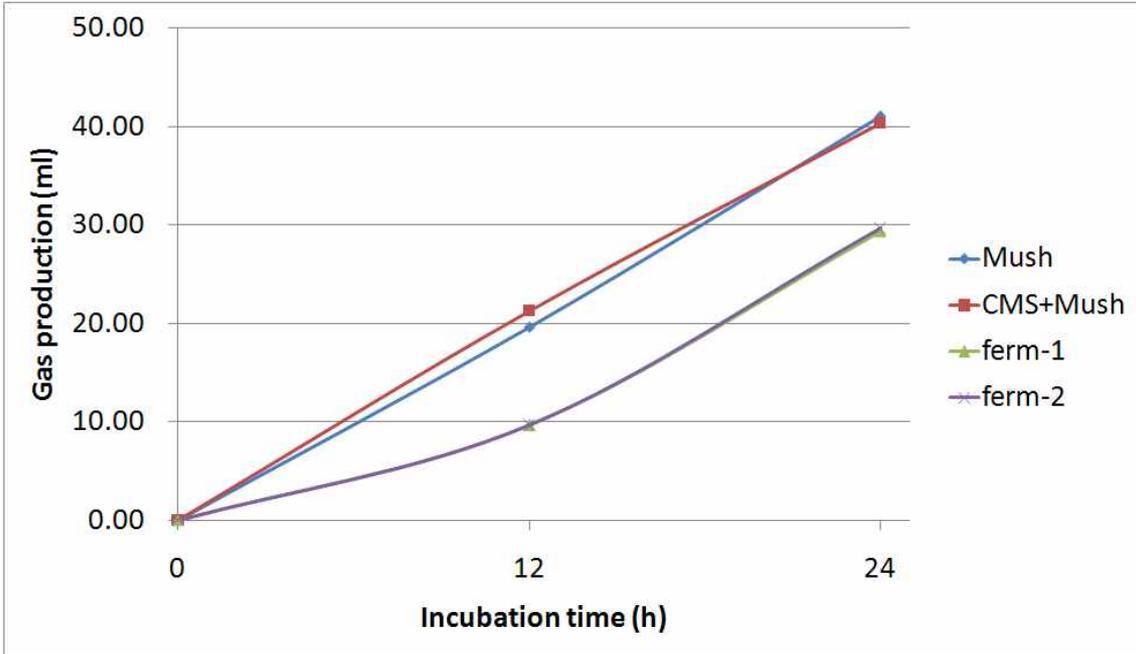


그림 28. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 가스발생량

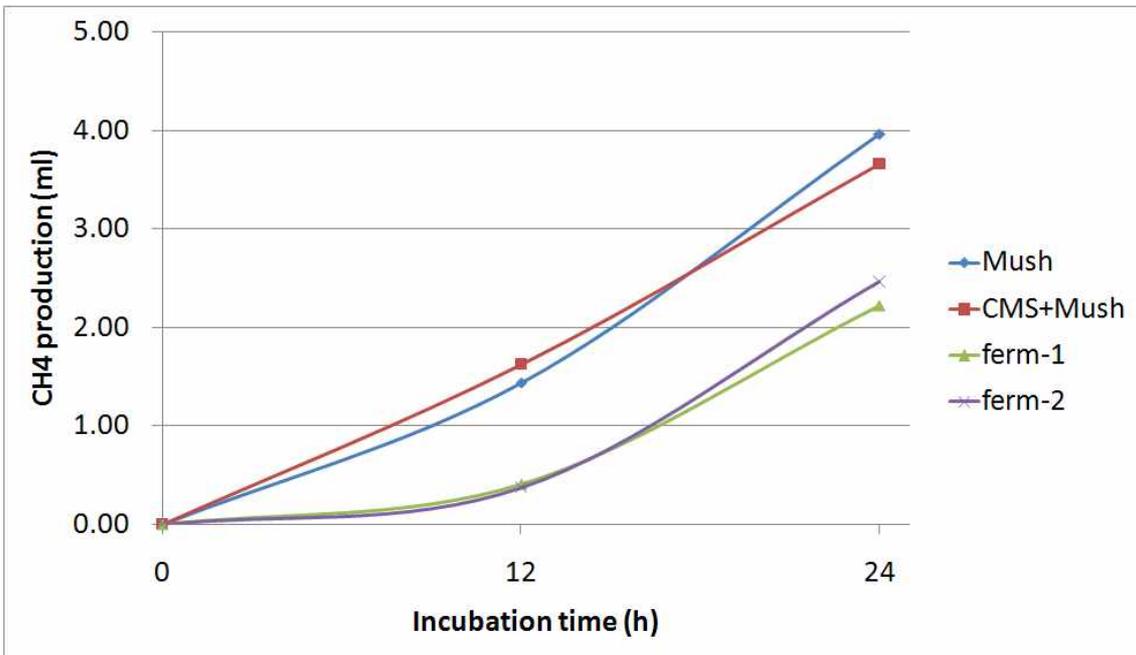


그림 29. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 methane 가스 생성량

표 49. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 휘발성 지방산 생성량

	Mush	CMS+Mush	ferm-1	ferm-2
		Acetate		
0h	10.36	10.33	10.91	10.57
12h	20.20	19.91	15.14	16.87
24h	21.76	28.57	26.60	25.25
		Propionate		
0h	5.10	5.15	5.28	5.27
12h	12.43	13.02	7.91	9.37
24h	13.48	17.61	14.34	13.86
		Butyrate		
0h	0.32	0.29	0.30	0.33
12h	0.94	0.70	0.50	0.47
24h	0.61	0.69	0.76	0.65
		Valerate		
0h	5.70	5.49	5.89	5.61
12h	9.70	11.07	8.05	8.81
24h	9.49	14.27	12.20	11.99
		A:P ratio		
0h	2.03	2.01	2.07	2.01
12h	1.63	1.53	1.91	1.80
24h	1.61	1.62	1.85	1.82

암모니아 생성량은 모든 처리구 및 대조구에서 배양시간에 따라 증가하였다. 특히 CMS 를 첨가한 대조구가 가장 높은 수준의 증가량을 보였으며 12시간 이후 대조구에 비해 CMS 첨가 발효 처리구가 대조구 보다 더욱 높은 생성량을 나타냈다.

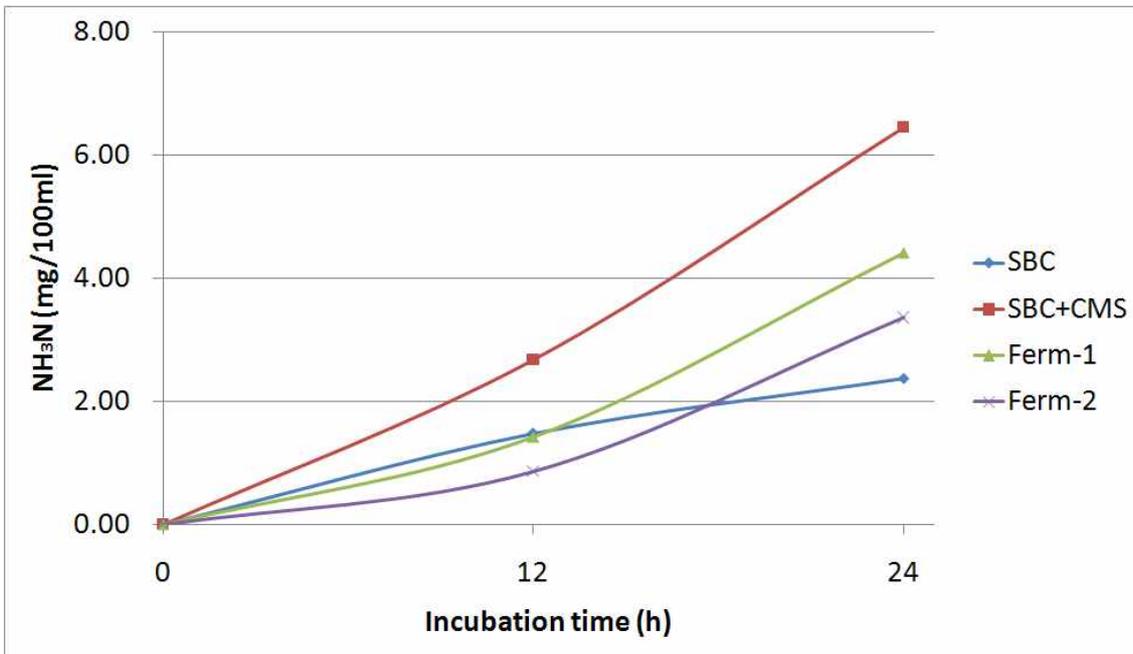
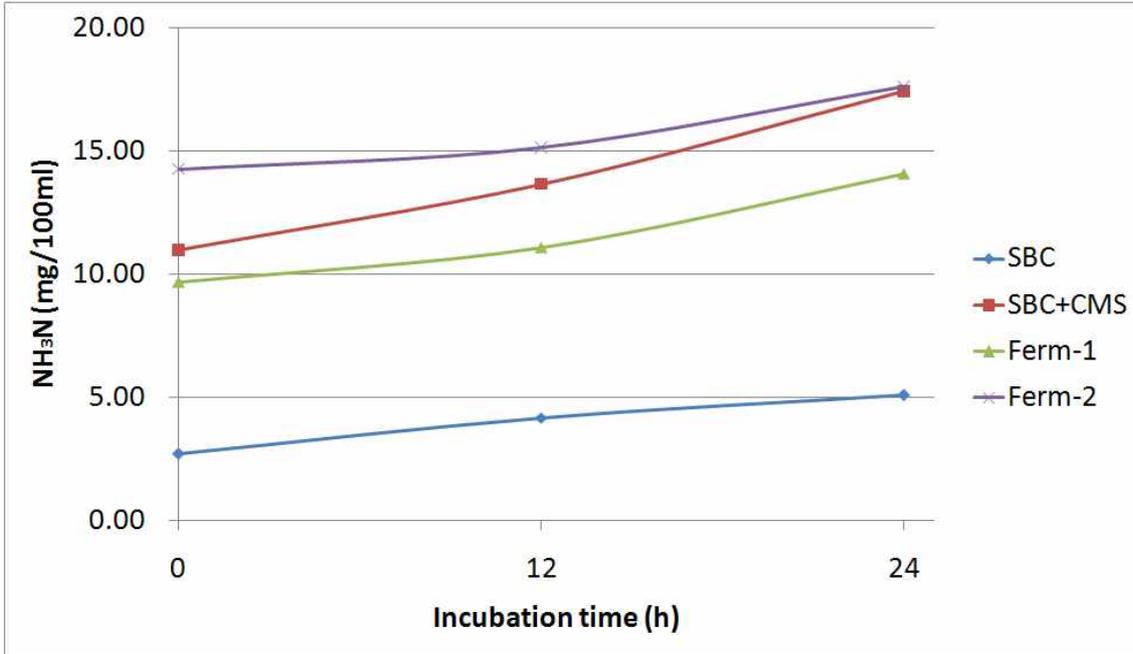


그림 30. CMS + 벼첫배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료의 암모니아 생성량

사. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 반추위 내 발효성상과 특성에 미치는 영향

(1) 재료 및 방법

SBC	negative control
SBC + CMS	positive control
ferm-1	S15 - 2day incubation (CMS 3%, <i>A. oryzae</i> 10%, <i>B.subtilis</i> 20%)
ferm-2	S27 - 4day incubation (CMS 6%, <i>A. oryzae</i> 20%, <i>B.subtilis</i> 10%)

(가) 시험사료

CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 TMR 원료로 사용할 경우 반추위 안에서의 발효성상과 특성에 미치는 영향을 평가하기 위해 아래의 표와 같이 배합하여 시험에 이용하였다. 또한 TMR의 특성상 균일한 원료의 수급이 원활하지 않기 때문에 실제 TMR을 배합하여 분석에 이용할 경우 결과 자료의 재연성 및 확인하고자 하는 발효 원료만의 효과를 입증하기 어려운 단점이 있었다. 이러한 단점을 방지하기 위해 효과를 검증하기 위한 발효원료 사료를 제외한 모든 원료는 순수물질을 사용하여 배합 및 배양하였으며 발효원료를 각각 20%씩 포함하도록 배합비를 작성하였다. 표에 나타난 배합비는 NRC 사양표준을 근거로 하여 TDN 72%, CP 8.2% ME 1.5, NDF 15%, ADF 12% 그리고 CF 9%로 설정하여 농촌진흥청 축산과학원에서 제공하는 농가 자가사료배합 프로그램을 이용하여 계산하였다.

CMS	Ingredients (%)
casein	2.374
starch	11.863
xylan	5
Sigmacell	56.763
lignin	4
samples	20
Sum	100

< 시험 배합비 >

시험분석 방법은 실험 사와 같다.

(2) 실험 결과

pH는 모든 처리구와 대조구가 동일하게 12시간째 증가하다가 12시간 이후 24시간까지 감소하였다. 배양 24시간째 발효 처리구가 다른 대조구에 비해 약간 적은 폭으로 감소하였다.

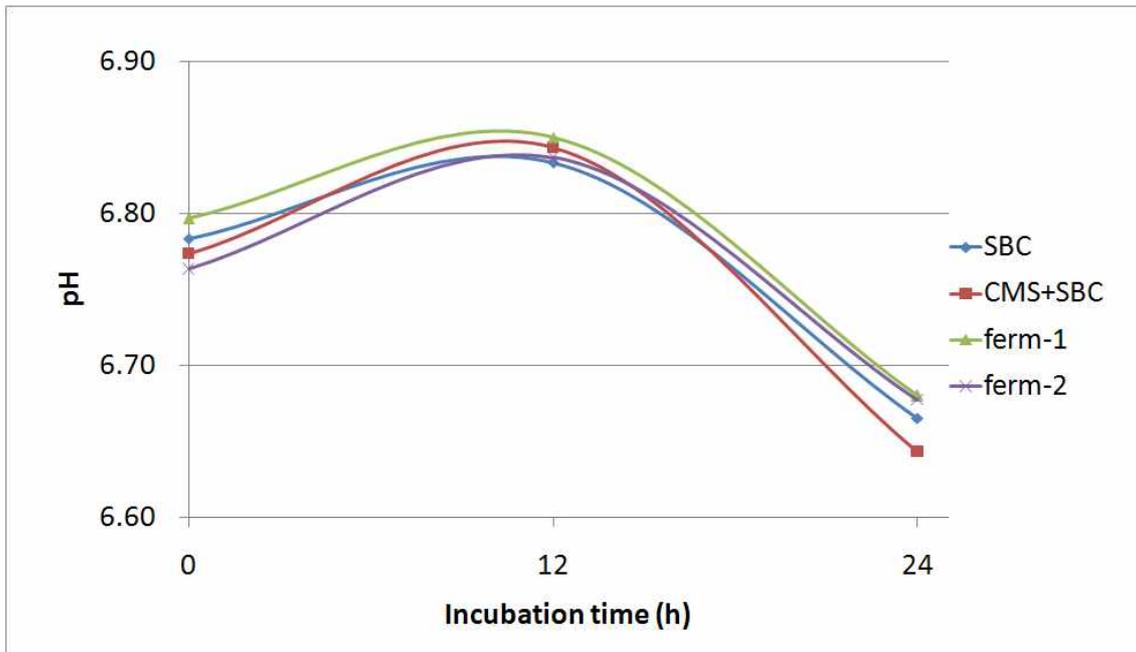


그림 31. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 pH 변화

건물 분해율은 대조구에 비해 발효 처리구가 3~6% 까지 높았다. 이는 발효 처리구 내에 포함된 미생물과 반추 미생물의 상호작용에 의한 것으로 반추위내 발효성상을 긍정적으로 변화시킨다는 것을 나타낸다. 또한 pH가 CMS 를 첨가한 대조구보다 낮은 쪽으로 감소함으로써 보다 반추위내 환경을 안정적으로 유지할 수 있다는 가능성을 제시한다.

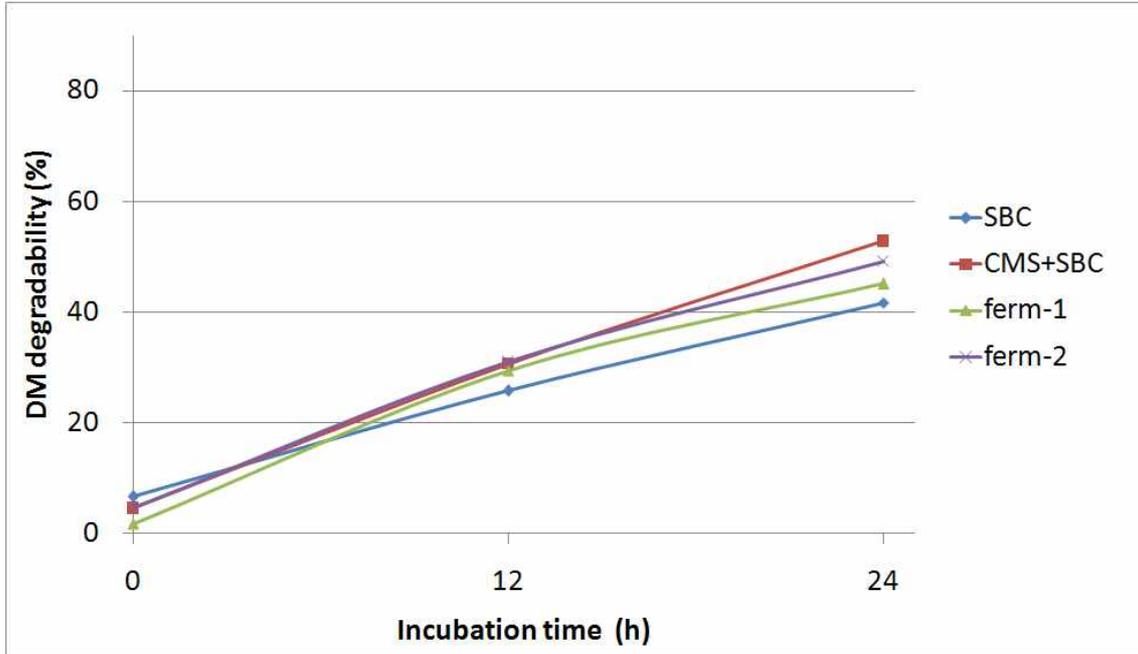


그림 32. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 건물분해율

가스 발생량 또한 건물분해율과 마찬가지로 대조구보다 2~4% 높게 나타났다. 이는 원료사료에 CMS를 첨가할 경우 반추위내 발효가 촉진된다고 설명할 수 있으며, 발효 처리구가 CMS 첨가 대조구와 가스 생성량에서 차이를 보이지 않고 동일한 경향을 보임으로써 CMS 첨가량을 더욱 증가시킬 수 있는 가능성을 제시할 수 있다. 메탄 생성량은 총 가스생성량과 동일한 경향으로 배양시간에 따라 증가하였다.

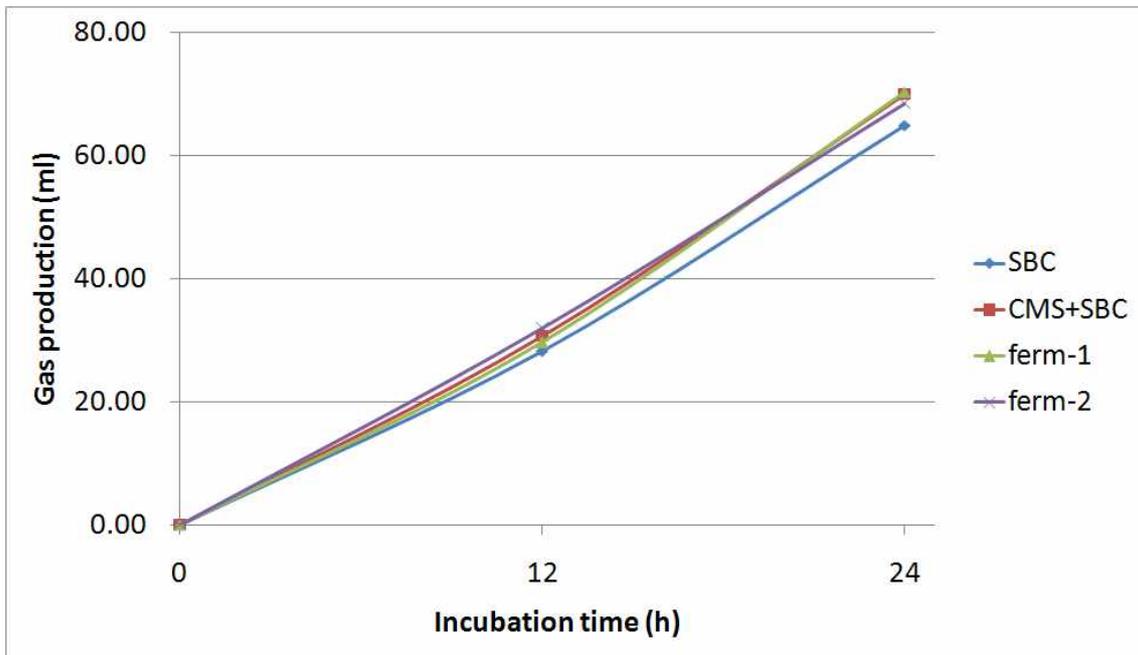


그림 33. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 가스생성량

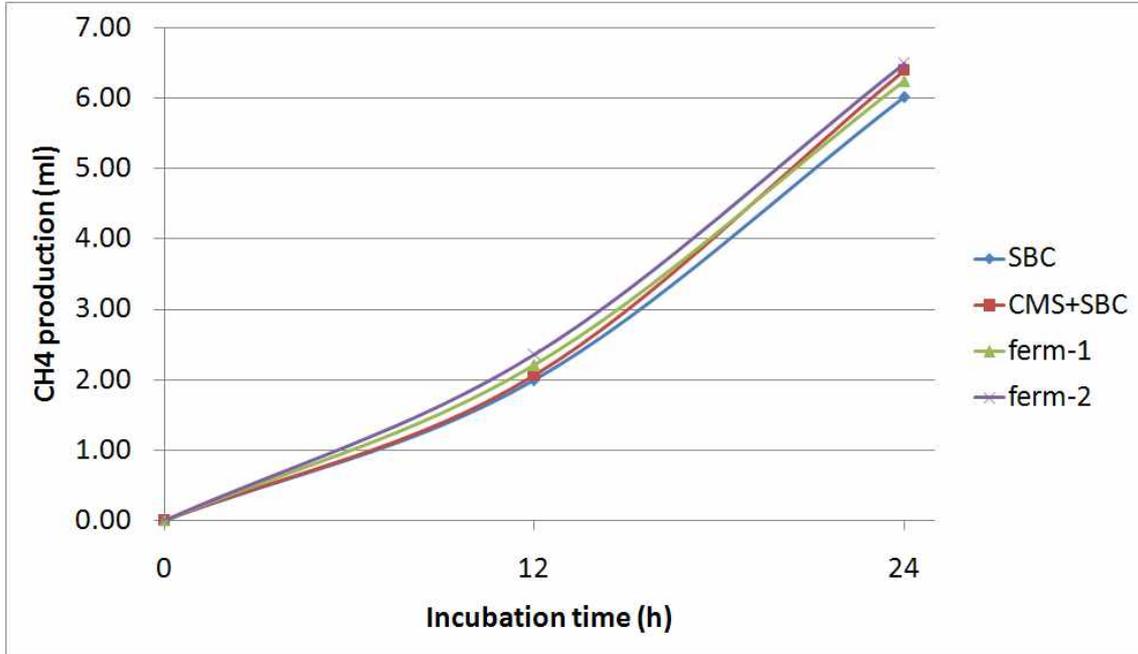


그림 34. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 methane 가스 생성량

모든 휘발성 지방산이 배양시간에 따라 증가하였다. Acetate는 모든 처리구에서 동일한 양으로 증가하는 경향이었으나, propionate는 대조구의 경우 배양 24시간째 다른 처리구에 비해 낮게 분석되었다.

표 50. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 휘발성 지방산 생성량

	SBC	CMS+SBC	ferm-1	ferm-2
		Acetate		
0h	9.74	9.58	9.41	8.67
12h	17.75	18.46	20.22	18.44
24h	31.46	32.60	30.72	30.84
		Propionate		
0h	4.54	4.68	4.38	4.16
12h	16.24	18.58	21.08	18.76
24h	33.88	38.60	34.79	37.02
		Butyrate		
0h	0.28	0.27	0.27	0.24
12h	0.87	0.61	0.00	0.27
24h	1.31	1.20	1.16	1.14
		Valerate		
0h	5.16	5.09	5.08	4.69
12h	7.68	8.85	9.73	8.65
24h	11.53	12.63	11.95	12.17
		A:P ratio		
0h	2.15	2.05	2.15	2.08
12h	1.09	0.99	0.96	0.98
24h	0.93	0.84	0.88	0.83

배양 0시간째의 암모니아 생성량은 CMS 첨가 대조구, 발효 처리구 그리고 대조구의 순으로 큰 폭의 차이를 보였으나 배양 시간에 따라 점차 감소하는 경향이였다. 또한 CMS를 첨가한 처리구에서 더욱 큰 폭으로 암모니아 생성량이 감소하는 경향을 보였는데 이는 시간이 지남에 따라 미생물체 단백질을 합성하기 위해 암모니아를 소비한것으로 사료된다. 이는 위의 건물 분해율과 가스 생성량 이 증가하는 결과와 일치한다.

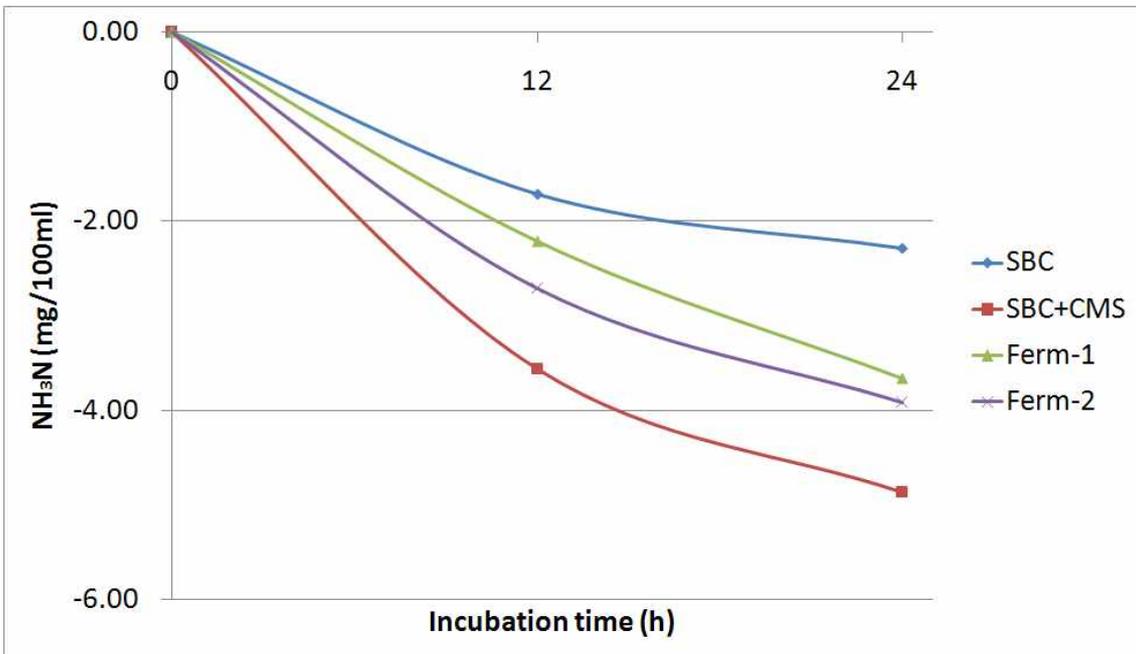
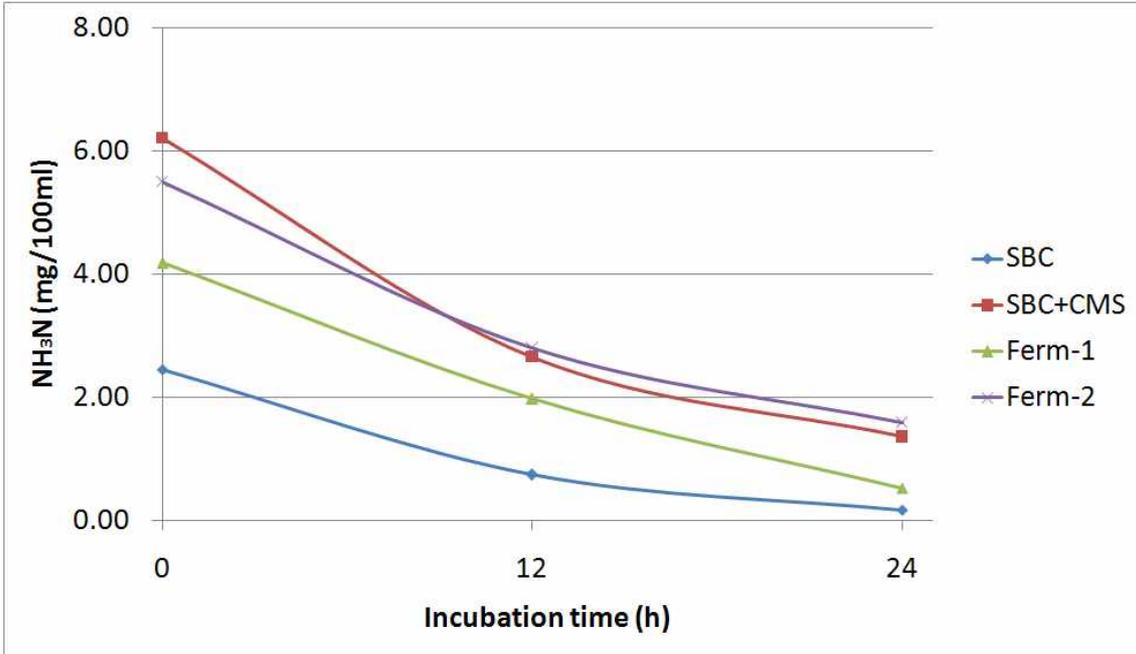


그림 35. CMS + 비지박 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 암모니아 생성량

아. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 반추 위내 발효성상과 특성에 미치는 영향

(1) 재료 및 방법

Mush	negative control
Mush + CMS	positive control
ferm-1	M16 - 2day incubation (CMS 3%, <i>A. oryzae</i> 20%, <i>B.subtilis</i> 5%)
ferm-2	S26 - 4day incubation (CMS 6%, <i>A. oryzae</i> 20%, <i>B.subtilis</i> 10%)

	Ingredients (%)
casein	6.77
starch	15
xylan	5
Sigmacell	52.903
lignin	0.327
Samples	20
Sum	100

< 시험 배합비 >

시험분석 방법은 실험 마와 같다.

(2) 실험 결과

pH는 모든 처리구와 대조구가 동일하게 12시간째 증가하다가 12시간 이후 24시간까지 감소하였다. 배양 24시간째 발효 처리구 2가 다른 대조구에 비해 약간 높은 쪽으로 감소하였다.

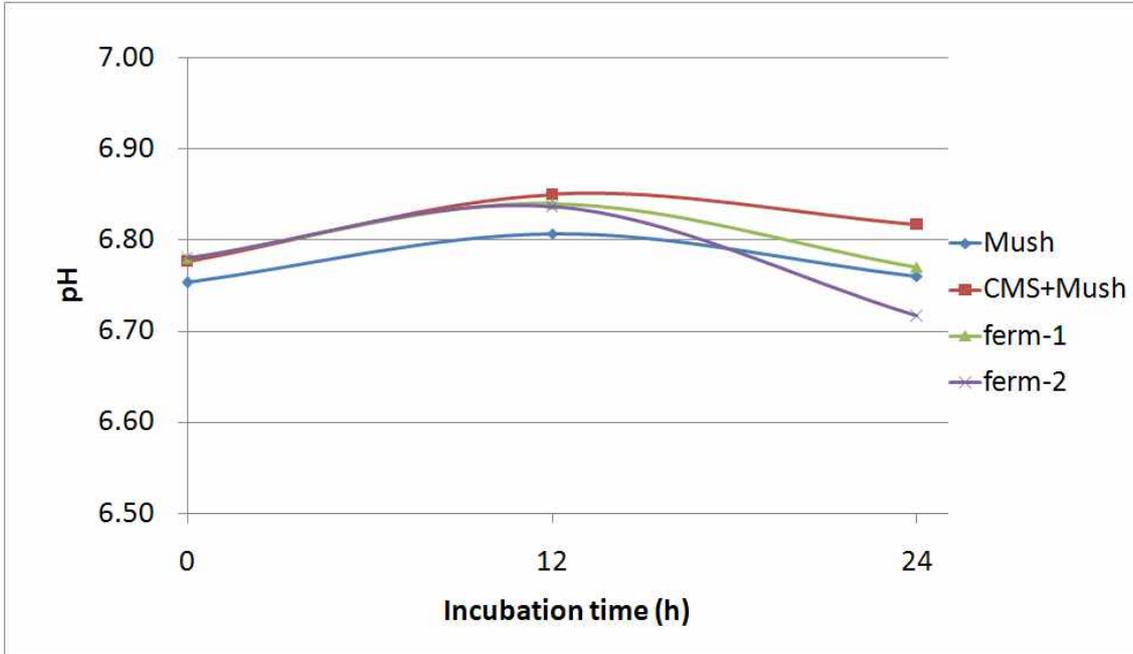


그림 36. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 pH 변화

건물 분해율은 대조구에 비해 발효 처리구가 6~10% 까지 높았다. 그러나 CMS 첨가 대조구와는 유사한 경향을 보였으며 발효 처리구 2가 배양 24시간째 55.22%로 분해율이 가장 높았다.

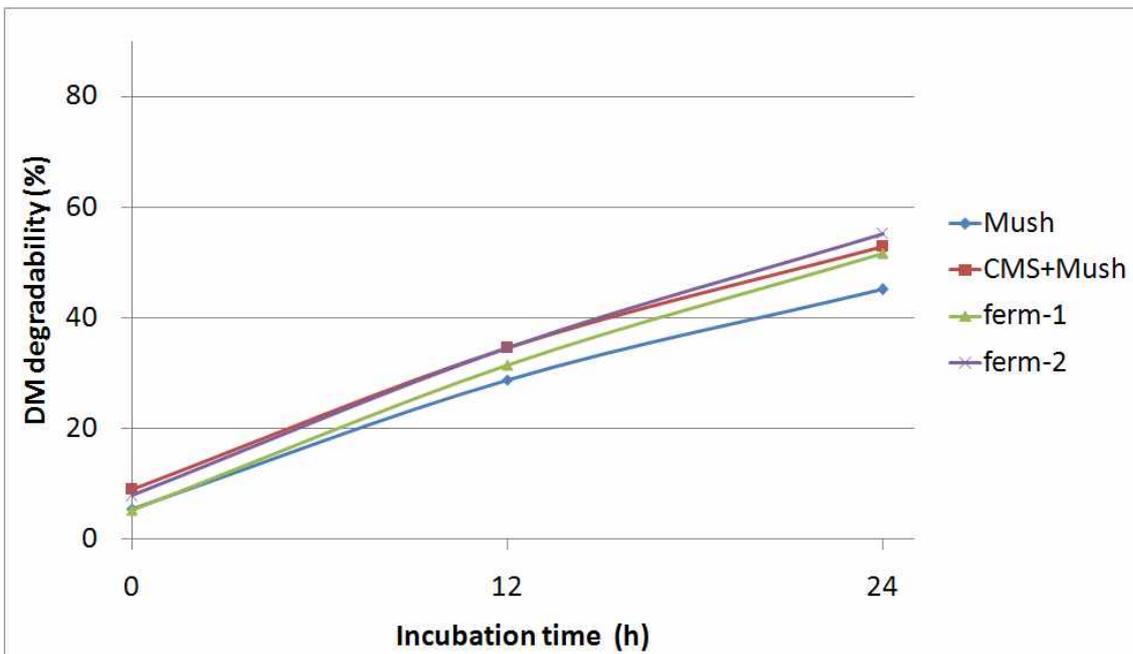


그림 37. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 건물분해율

가스 발생량 또한 건물분해율과 마찬가지로 대조구보다 3~5% 높게 나타났다. 이는 실험 7에서와 같이 원료사료에 CMS를 첨가할 경우 반추위내 발효가 촉진된다고 설명할 수 있다. CMS 첨가 대조구가 발효 24시간 쯤 74.33ml 로 가장 높은 가스 생성량을 보였다. 메탄 생성량은 총 가스생성량과 동일한 경향으로 배양시간에 따라 증가하였으나 발효 처리구 2에서 오히려 CMS 첨가 대조구보다 높은 경향을 보였다.

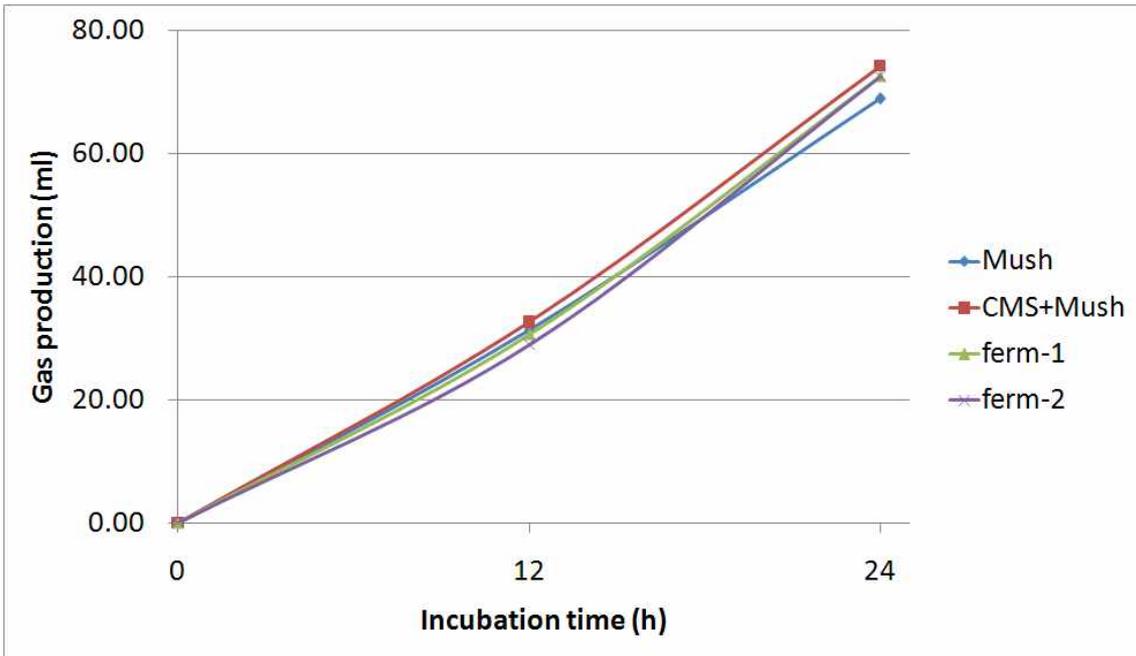


그림 38. CMS + 벼싯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 가스생성량

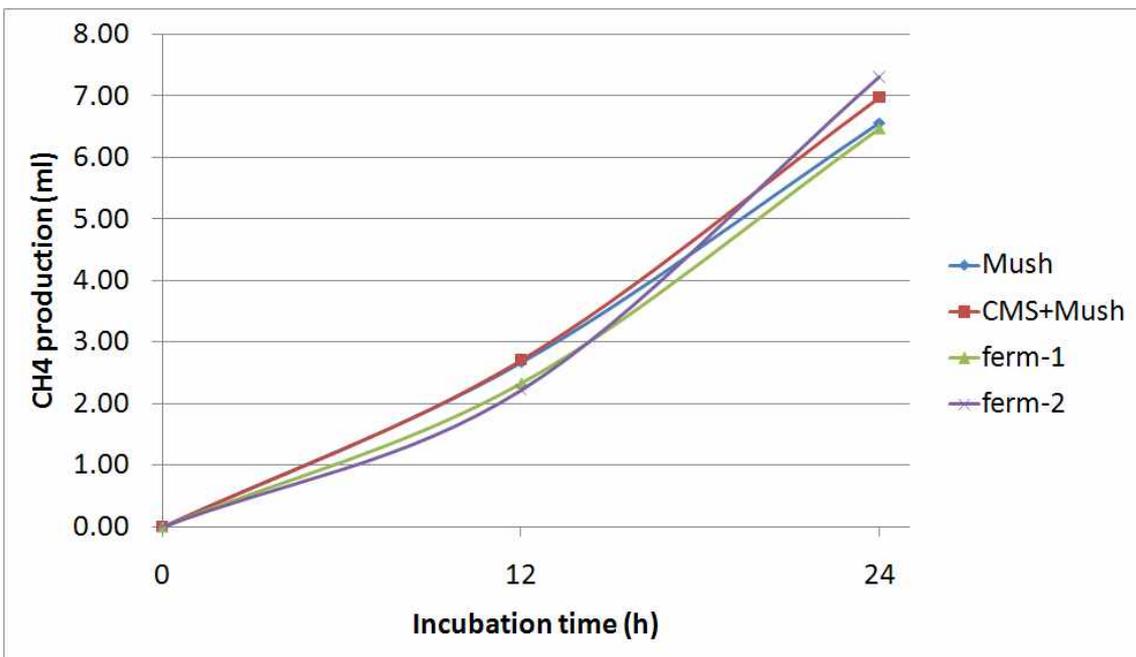


그림 39. CMS + 벼싯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의

methane 가스 생성량

모든 휘발성 지방산이 배양시간에 따라 증가하였다. Acetate, propionate 와 butyrate는 발효 처리구가 대조구에 비해 높은 경향을 나타냈으며, 이는 pH 변화와 일치한다.

표 51. CMS + 버섯배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 휘발성 지방산 생성량

	Mush	CMS+Mush	ferm-1	ferm-2
		Acetate		
0h	7.95	7.77	8.77	8.95
12h	18.55	18.78	18.78	17.00
24h	32.21	32.91	34.27	34.48
		Propionate		
0h	3.82	3.81	4.09	4.14
12h	17.73	19.12	18.51	17.19
24h	38.13	40.37	43.17	44.28
		Butyrate		
0h	0.23	0.22	0.24	0.21
12h	0.97	1.31	1.06	0.98
24h	1.58	1.54	1.71	1.69
		Valerate		
0h	4.57	4.40	4.96	4.80
12h	7.88	9.08	7.97	7.36
24h	12.42	13.29	13.21	13.58
		A:P ratio		
0h	2.08	2.04	2.15	2.16
12h	1.05	0.98	1.01	0.99
24h	0.84	0.82	0.79	0.78

배양 0시간째의 암모니아 생성량은 대조구를 제외한 CMS 첨가 대조구, 발효 처리구가 동일하게 높게 나타났으며, 모든 처리구와 대조구에서 배양 시간에 따라 점차 감소하는 경향이였다. CMS 처리구 1이 가장 큰 폭으로 암모니아 생성량이 감소하는 경향을 보였다..

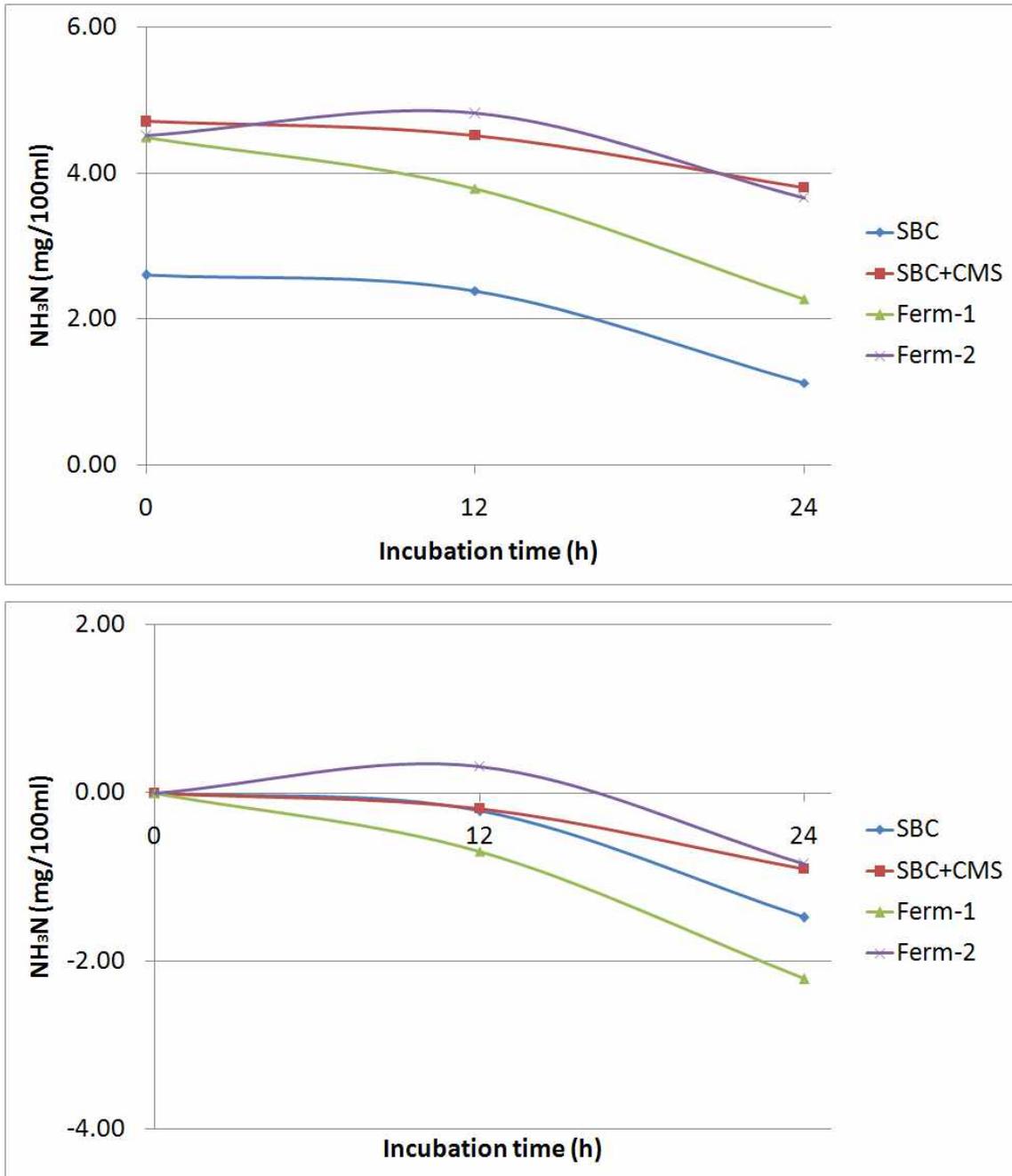


그림 40. CMS + 벼싻배지 + *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* 혼합발효사료를 이용한 인공 TMR의 암모니아 생성량

## 제 2 절 TMF 용 유산균제제의 개발 및 TMF 품질관리기준 설정

### 1. 유산균주의 선발 및 동정

#### 가. 1차 스크리닝

국내 TMF에서 흔히 사용하는 알팔파, 수단, 연맥등과 같은 조사료와 사일리지(옥수수, 수단, 보리), 축분 등을 적절히 희석하여 MRS 고체배지에 도달한 후에, 균락의 형태에 따라 100여종의 유산균을 분리하였다. 분리된 균들을 pH 4.0으로 조정된 MRS 액체배지에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음, 내산성이 상대적으로 우수한 8균주(DSB01-DSB08)를 1차 선발하였다. 선발된 균주들은 0.02% Na-azide가 함유된 MRS 액체배지에서 48시간동안 배양한 다음 6,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 버린 후 탈지유(12%) 5ml을 첨가하고 다음 실험에 사용될 때까지 냉동(-70°C) 보관하였다.

#### 나. 1차 선발된 균주(8종)의 생리학적 특성

##### (1) 재료 및 방법

##### (가) 배양학적 특성

유산균의 성장 양상을 분석하기 위해, 각 유산균 배양액을 MRS broth에서 0.1% ( $10^6/ml$ )씩 접종하여 37°C에서 배양하였으며, OD<sub>600</sub> 에서 흡광도와 pH를 측정하였다.

##### (나) 내산성 조사

유산균의 내산성 정도를 측정하기 위해, 1차 선발된 유산균 8종을 37°C에서 48시간동안 배양한 후 본 실험에 사용하였다. pH 3.0으로 조절된 MRS broth에 각 유산균 배양액을 1%씩 접종하였으며, 대조구로서 pH를 조절하지 않은 MRS broth에 각 유산균 배양액 1%씩을 접종하였다. 접종 후 0h, 3h, 6h 배양한 배양액을 희석하여 MRS agar(0.02% Na-azide 첨가)에 도달하고 37°C에서 48시간 배양한 후 유산균수를 측정하였다.

##### (다) 내담즙성 조사

1차 선발된 유산균 8종을 37°C에서 overnight 배양한 균주를 사용하였다. MRS broth에 bile salt(Sigma)를 0.3% 첨가하고 멸균한 후 내담즙성 측정에 사용하였으며, 전배양액 1%를 첨가하였으며, 대조구(control)로서는 bile salt를 첨가하지 않은 MRS broth에 전배양액 1%를 접종하였다. 접종 후 0h, 3h, 6h 배양하고 적절히 희석한 후에 MRS agar(0.02% Na-azide 첨가)에 도달하였으며, 37°C에서 48시간 배양한 후 유산균 수를 측정하였다.

(라) CMS에서의 배양 특성

CMS 존재하에서의 유산균의 성장을 조사하기 위하여, 증류수에 CMS 20%를 첨가한 후에 1차 선발한 유산균 배양액 0.1%씩 각각 접종하였다. 37°C에서 진탕배양하면서 0일, 3일, 5일, 8일, 15일 간격으로 샘플링한 후, 생균수를 측정하였다.

(2) 결과

(가) 1차 선발된 유산균의 배양학적 특성

1차 선발한 대부분의 유산균이 MRS 배지에서 전형적인 성장패턴을 보이고 있으나, 대수성장기 및 정체기의 과정은 각각의 유산균마다 차이를 나타내었다. DSB01와 DSB07의 경우, 24시간 배양 이후에 정체기에 들어가는 성장 패턴을 나타낸 반면, DSB03은 12시간 이후에 대수성장기를 나타내었으며, 40시간이후부터 정체기에 들어갔다. DSB04와 DSB05는 12-24시간 사이에 급격히 성장하는 성장패턴을 나타내었다. DSB06은 배양 12시간 이후에 정체기를 나타내어 유산균 중 가장 빠른 성장기와 정체기를 나타내었으며, DSB08은 배양 초기에 빠른 속도로 성장하였으나 그 이후부터는 완만하게 성장하는 패턴을 나타내었다. 전체적으로 볼 때, DSB05, DSB01, DSB04, DSB07 균주가 MRS 배지에서의 생장이 상대적으로 우수한 것으로 판단되었다.

유산균 배양액의 pH는 배양 초기에 급격히 감소하다가 정체기부터 완만하게 저하되는 패턴을 나타내었다. 즉, pH 6.8을 시작으로 배양시간이 길어짐에 따라 pH 4.0 부근으로 저하함을 확인할 수 있었다. DSB02를 제외한 모든 유산균 배양액이 배양 40시간 이후부터는 다른 미생물의 생육을 억제할 수 있는 수준인 pH 4 이하를 유지하였다.

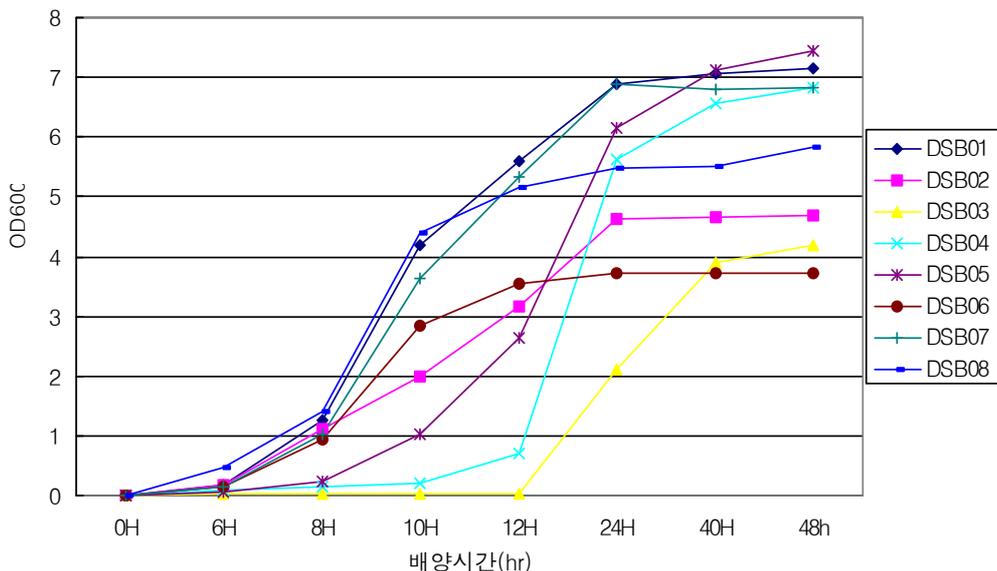


그림 41. MRS 배지에서 1차 선발된 균주의 성장곡선

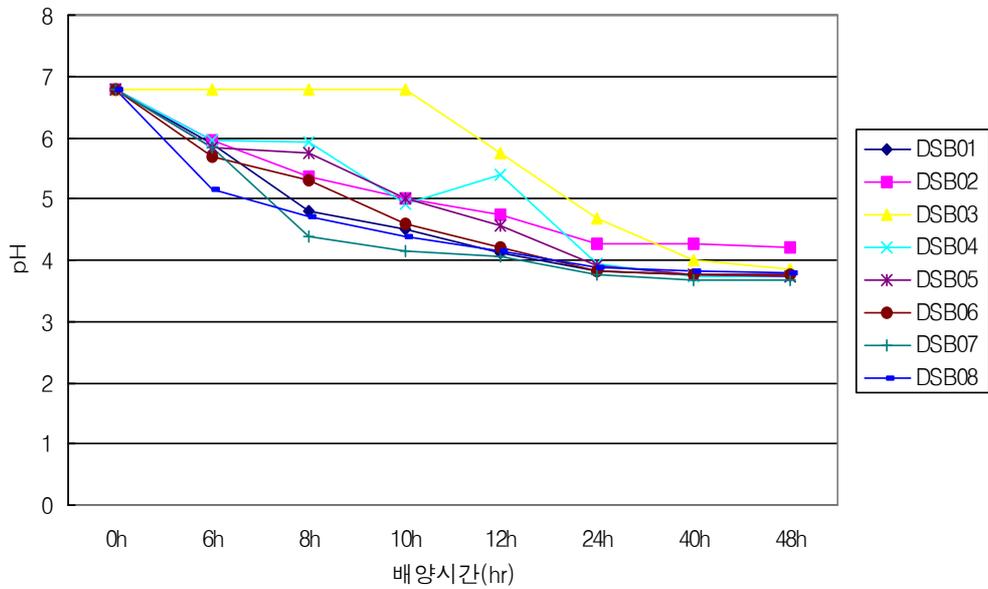
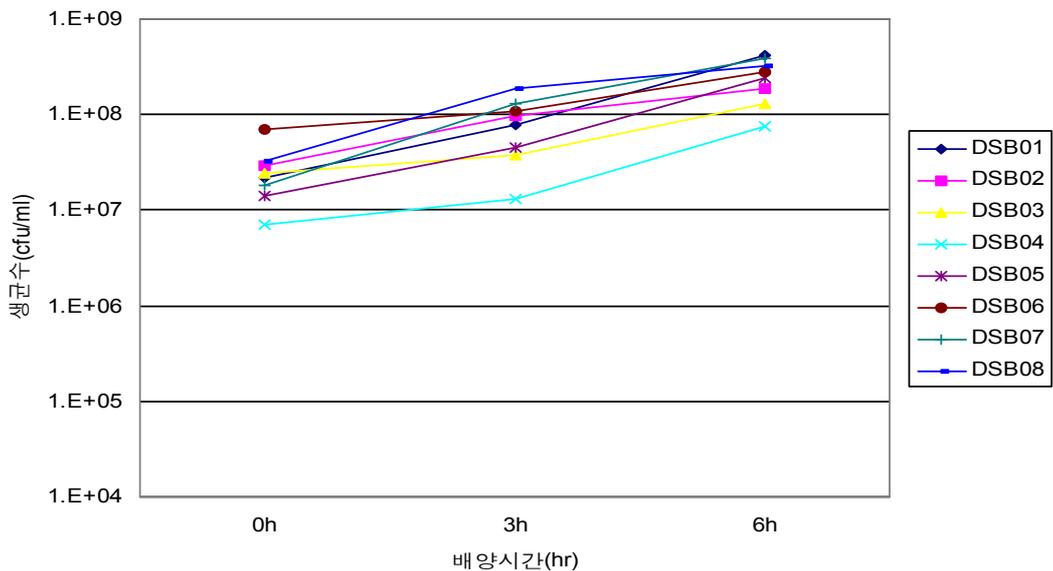


그림 42. MRS 배지에서 1차 선발된 균주의 pH 변화

(나) 1차 선발된 유산균의 내산성

Fig. 2-3(A)에서 보는 바와 같이, 대조구의 경우 대부분의 유산균이 초기  $10^7$ cfu/ml 수준에서  $10^8$  cfu/ml 수준으로 유산균 수가 증가하였다. pH 3.0으로 조절된 MRS broth에 배양할 경우, DSB01, DSB02, DSB06, DSB07, DSB08의 균수는 감소한 반면(그림 43), DSB03, DSB04, DSB05의 경우에는 생균수가 거의 감소하지 않고 유지되었다. 이와 같은 결과로부터, DSB03, DSB04, DSB05 균주가 다른 균주들보다 내산성이 상대적으로 강함을 알 수 있었다.

(A)



(B)

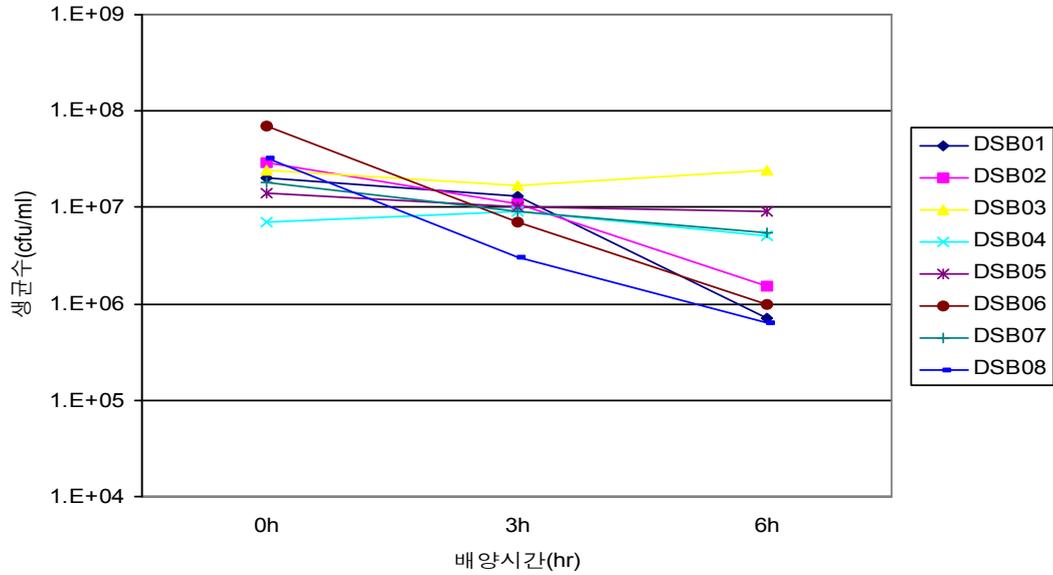


그림 43. MRS 배지에서 1차 선발된 균주의 내산성 비교 (A: Control, B: MRS broth adjusted to pH 3.0)

(다) 1차 선발된 유산균의 내담즙성

0.3% bile salt를 첨가한 MRS 배지에서의 성장 여부를 조사한 결과, SB04 균주는 담즙산염의 존재하에서도 균수가 오히려 증가함으로써 내담즙성이 매우 우수한 것으로 나타났다. 그러나, SB02 균주는 균수가 급격히 감소하는 추세를 나타냄으로써 담즙산에 약한 특성을 나타내었다. 한편, 나머지 DSB01, DSB03, DSB5, DSB06, DSB08 균주의 경우에는 담즙산염의 존재하에서도 균수가 거의 감소하지 않아(그림 44), 내담즙성이 우수한 편으로 판단되었다

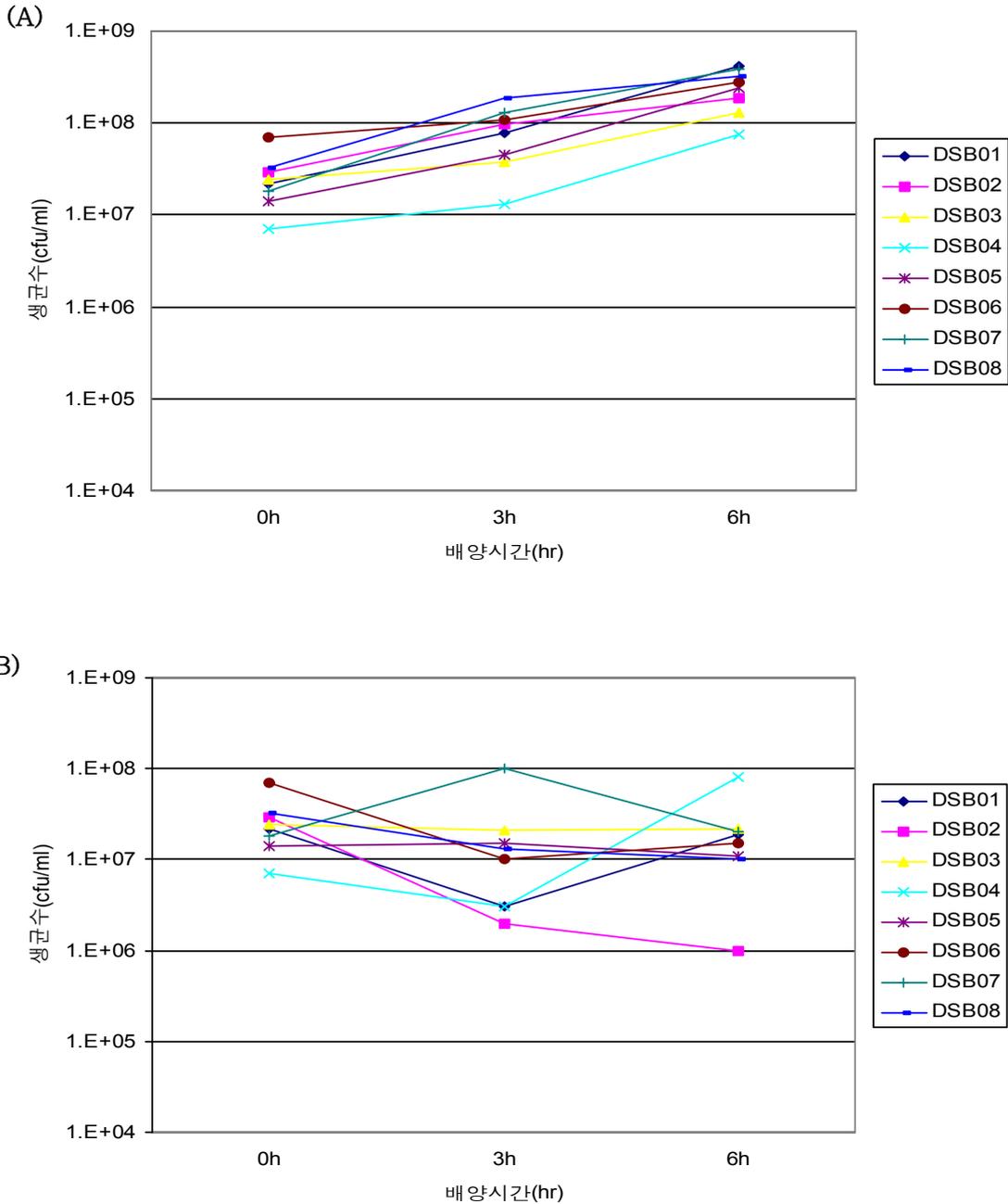


그림 44. MRS 배지에서 1차 선발된 균주의 내담증성 비교(A: Control, B: MRS broth containing 0.3% bile salts)

(라) 1차 선발된 균주의 CMS 배양 특성

CMS 존재하에서의 유산균의 생육 특성은 TMF 제조용 균주선발에 있어서 매우 중요한 지표이다. 증류수에 다른 영양성분은 일절 첨가하지 않고 CMS 20%만 첨가한 후에 1차 선발한 균주 8종을 배양하였으며, 그 결과는 그림 45에서 보는 바와 같다. DSB03과 DSB04 균주의 경우에는 8일까지 균수의 변화가 없이 유지되었으며, 8일 이후부터는 감소하는 경향을 나타내었

다. DSB4 균주의 경우에는 배양 2일까지 균수가 증가하는 추세를 나타내었으며 이후부터 8일까지는 서서히 감소하는 경향을 나타냄으로써, CMS 배지에서의 적응력이 매우 우수함을 시사하였다. DSB03 균주의 경우에는 배양 8일까지 균수가 서서히 감소하는 추세를 나타내어, CMS 배지에서의 적응력이 우수한 편으로 나타났다. 한편, 나머지 유산균의 경우에 CMS 배지에서 2일 이후부터 균수가 급격히 감소하는 추세를 나타내었으나, DSB05 균주는 나머지 균주들에 비해 상대적으로 균수 감소 추세가 완만하였다.

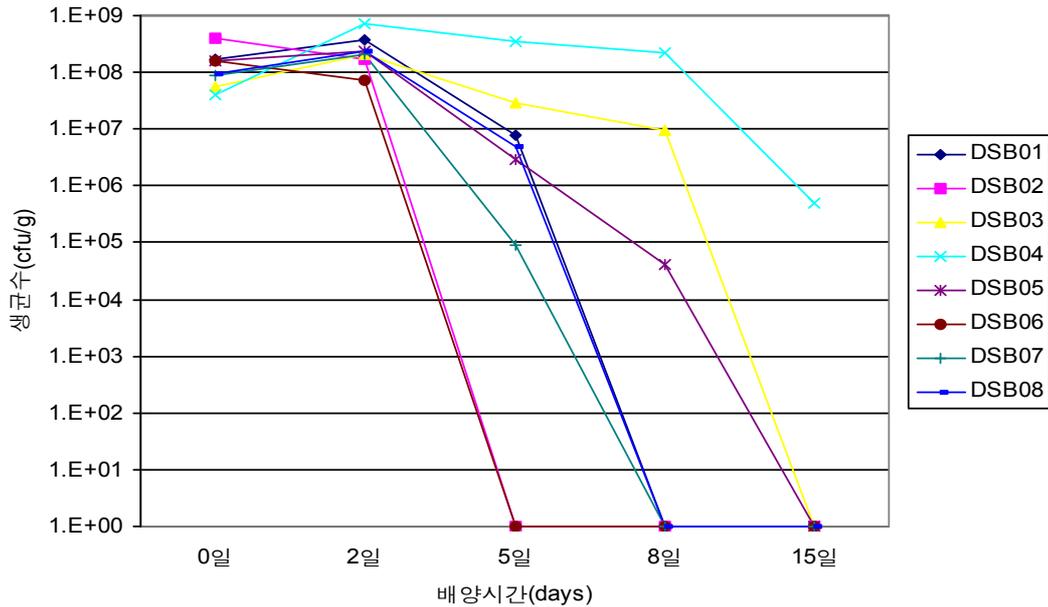


그림 45. CMS 배지에서의 *Lactobacillus* ssp. 성장곡선

CMS는 carbon source 및 일부 영양소가 부족하기 때문에 저렴한 carbon source 등을 보충하고 CMS 적응력이 우수한 유산균을 이용한다면 고가의 MRS 배지를 일부 또는 전부를 대체할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서, CMS 20%를 함유한 배지에서의 생존력이 상대적으로 우수할 뿐만 아니라 내산성도 우수한 DSB03, DSB04, DSB05 균주를 TMF 제조용 종균으로서 최종 선발하였다.

다. 최종 선발된 유산균의 생화학적 특성 및 동정

(1) 재료 및 방법

(가) 최종 선발된 균주의 형태학적 관찰

균주의 형태적 특성을 전자현미경(Scanning Electron Microscope, XL30-CP, Phillips)으로 관찰하였다. MRS agar에 배양된 균주를 취하여 filter paper로 싸고 1차 고정(1%

paraformaldehyde 및 1% aldehyde in 0.12M cacodylate buffer)하였으며, washing solution(8.6% sucrose, 0.3% calcium chloride in 0.12M phosphate buffer)으로 0~4°C에서 30분간 3회 세척하였다. 2차 고정(2% OsO4 in 0.12M PBS buffer with 8.6% sucrose and 0.3% calcium chloride)하고 washing solution으로 0~4°C에서 30분간 3회 세척하였으며, 탈수하여 건조시킨 후에 gold coating하여 관찰하였다.

(나) 선발된 유산균의 분자생물학적 동정

선발된 유산균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 비교하는 분자생물학적 동정 방법을 사용하였다. 먼저 genomic DNA extraction kit (Qiagen, Germany)으로 분리균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음, Table 1의 primer를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR 반응 mixture의 조성은 다음과 같다. 50 pmole primer, 50 ng template DNA, 10× *Taq* DNA polymerase buffer 5 µl, 2.5 mM dNTP mixture 4 µl, *Taq* DNA polymerase (Takara Bio, Japan) 1U. PCR 산물을 pSTBlue-1 (Novagen, USA) plasmid vector에 클로닝한 다음, BigDye™-terminator sequencing kit과 ABI PRISM377 sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 DNA 염기서열을 분석하였다.

표 52. 16S rDNA in *lactobacilli* primer 정보

Primer*	Sequence (5'-3')	Target site**
F1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	27
F2	GTGCCAGCAGCCGCGG	530
F3	AAACTCAAAGGAATTGACGG	926
R1	TCTACGCATTCCACCGCTAC	685
R2	GGGTTGCGCTCGTTG	1,100
R3	AAGGAGGTGATCCAGCC	1,525

\* F1, F2 and F3 : forward primers; R1, R2 and R3 : reverse primers.

\*\* According to numbering of the *E. coli* 16S rDNA.

(다) 선발된 유산균의 당 발효 특성 조사

최종 선발된 3종 (DSB03, DSB04, DSB05)을 그람염색하여 관찰한 결과, 그람 양성의 간균으로서 catalase-negative 균주임을 확인하였다 (data not shown). 따라서, API CHL50 (Biomérieux사, France) kit를 사용하여 당 발효 특성을 조사하였다. 배양된 유산균을 원심분리를 하여 균체를 얻은 다음, 균체를 0.85% NaCl 2 ml에 넣어 탁도가 진한 균액을 제조하였다. 0.85% NaCl 용액 5 ml에 균액을 n방울 떨어뜨려서 탁도를 2 McFarland로 맞춘 다음, 샘플을 스트립의 튜브에 분주하고, mineral oil로 혐기상태를 유지시켰다. 37°C에서 24시간 및 48시간 동안 반응시킨 후에, Fig. 6에서 보는 바와 같이 나타난 각각의 결과를 기록하여 api web주소

(<http://apiweb.biomerieux.com>)에 실험결과를 입력하여 해석하였다.



그림 46. 유산균 배양 후의 API strip의 색깔 변화

#### (라) 선발된 유산균의 효소물질 분비능 조사

선발된 유산균의 효소물질 분비능 여부를 조사하기 위하여 API ZYM(Biomerieux 사, France) kit를 사용하여 효소의 활성을 검사하였다. 배양된 유산균을 원심분리를 하여 균체를 얻은 다음, 균체를 0.85% NaCl 2 ml에 넣어 탁도를 5 McFarland로 맞춘 다음, 샘플을 스트립의 튜브에 분주하고, 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후에, ZYM A 시약과 ZYM B 시약을 차례대로 넣은 후 5분 뒤에 결과를 기록하였다. 색의 변화정도에 따라 0-5까지의 값으로 표시할 수 있으며, 0은 음성반응, 5는 최대 강도의 반응이고, 1, 2, 3, 4는 중간반응 값이며 3 이상이면 양성으로 판정하였다.

#### (마) 선발된 유산균의 항균력 탐색

선발된 유산균의 항균력 보유 여부를 확인하기 위하여, 지시균으로서 *E. coli* K88 를 사용하여 실험을 진행하였다. 배양된 *E. coli* K88을 soft LB agar(0.8% agar)에 100배 희석한 후 LB agar plate(1.5% agar)에 5ml씩 넣고, 균기 전에 끌고루 퍼지도록 plate를 살짝 흔들어 준 후 건조시켰다. 이와 같이 준비된 배지 위에 홈을 파고, 배양한 유산균의 상등액을 취하여 그대로 또는 pH를 중화시킨 후에 홈 안에 200ul씩 접종하였다. 30°C에서 10시간 배양한 후에 나타난 clear zone의 생성여부를 확인하였다.

#### (바) 선발된 유산균의 유기산 생성 패턴

최종 선발된 유산균 3종의 유기산 생성 패턴을 조사하였다. 각 유산균을 MRS 배지에 접종한 후에 37°C에서 진탕배양하면서, 시간별로 배양 상등액을 샘플링하여 유기산 함량을 HPLC로 분석하였다. 샘플링한 시료를 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 상등액은 HPLC로 분석하

기 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. HPLC 기기는 Agilent 1100 시스템을 사용하였으며, 측정용 detector로는 RI(refractive index)를 사용하였다. 분석에 사용한 column은 BioRad 사의 Aminex HP-87 (7.8\*300mm) 이었으며, column cabinet 온도는  $40^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 한편, HPLC eluent 는 0.01N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  용액이었고, flow rate는 0.6ml/min 이었으며, chemstation S/W를 이용하여 peak detection 및 calibration 등을 하여 최종적으로 결과를 얻었다.

## (2) 결과

### (가) 최종 선발된 균주의 형태학적 관찰

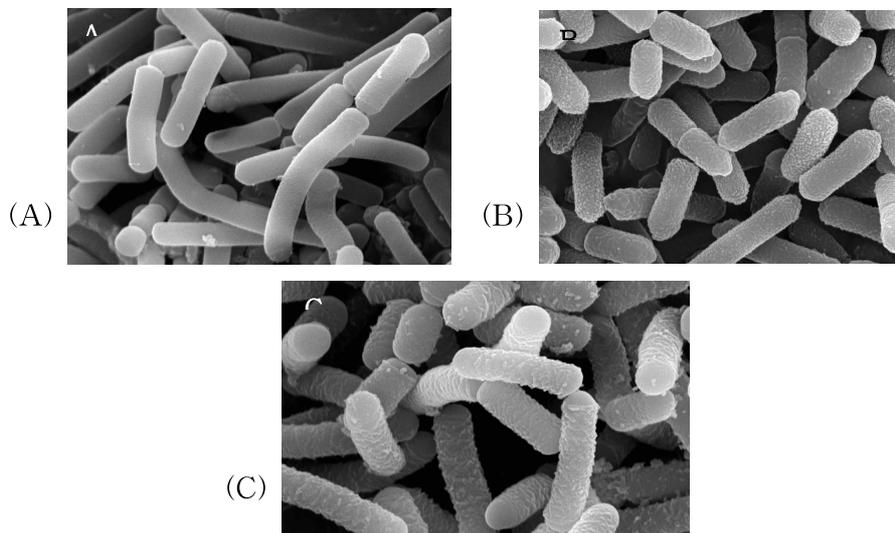


그림 47. 최종 선발된 유산균의 전자현미경(SEM) 관찰 ( $\times 20,000$ ) (A: DSB03 , B: DSB04, C: DSB05)

최종 선발된 3 균주의 성상을 전자현미경 (Scanning Electron Microscope)로 관찰하였다. 그림 47에서 보는 바와 같이, DSB03, DSB04, DSB05 공히 그림 양성의 간균임을 확인할 수 있었다.

### (나) 최종 선발된 유산균의 분자생물학적 동정

최종 선발된 균주를 동정하기 위하여, 각 균주의 16S rRNA 유전자를 PCR 방법으로 증폭한 후에 염기서열을 분석하였으며, NCBI의 BLAST search program을 이용하여 상동성을 비교하였다. DSB03 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열은 그림 48에서 보는 바와 같으며, *Lactobacillus casei* ATCC 334와 98%의 상동성을 나타내었기 때문에 *L. casei* DSB03으로 명명하였다. DSB04 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열은 그림 49에서 보는 바와 같으며, 역시 *L. casei* ATCC 334와 98%의 상동성을 나타내었기 때문에 *L. casei* DSB04로 명명하였다. 또한, DSB05 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열은 그림 50에서 보는 바와 같으며, *Lactobacillus plantarum* WCFS1와 99% 상동성을 나타내었기 때문에 *L. plantarum* DSB05로

명명하였다.

```
CTTGTTACGA CTTCACCCCTA ATCATTGTC CCACCTTAGA CGGCTCGCTC CCTAAAAGGG 60
TTACGCCACC GGCTTCGGGT GTTACAAACT CTCATGGTGT GACGGGCGGT GTGTACAAGG 120
CCCGGGAACG TATTCACCGC GGCCTGCTGA TCCGCGATTA CTAGCGATTC CGACTTCGTG 180
TAGGCGAGTT GCAGCCTACA GTCCGAACTG AGAATGGCTT TAAGAGATTA GCTTGACCTC 240
GCGGTCTCGC AACTCGTTGT ACCATCCATT GTAGCACGTG TGTAGCCAG GTCATAAGGG 300
GCATGATGAT TTGACGTCAT CCCCACCTTC CTCCGGTTTG TCACCGGCAG TCTTACTAGA 360
GTGCCCAACT AAATGCTGGC AACTAGTCAT AAGGGTTGCG CTCGTTGCGG GACTTAACCC 420
AACATCTCAC GACACGAGCT GACGACAACC ATGCACCACC TGTCATTTTG CCCCCGAAGG 480
GGAAACCTGA TCTCTCAGGT GATCAAAAAGA TGTCAAGACC TGGTAAGGTT CTTGCGTTG 540
CTTCGAATTA AACACATGC TCCACCGCTT GTGCGGGCCC CCGTCAATTC CTTTGAGTTT 600
CAACCTTGCG GTCGTAATCC CCAGGCGGAA TGCTTAATGC GTTAGCTGCG GCACTGAAGG 660
GCGGAAA-CC CTCCAACACC TAGCATTCAT CGTTTACGGC ATGGACTACC AGGGTATCTA 720
ATCCTGTTTCG CTACCC-ATG CTTTCGAGCC TCAGCGTCAG TTACAGACCA GACAGCCGCC 780
TTGCCACTG GTGTTCTTCC ATATATCTAC GCATTTACACC GCTACACATG GAGTTCCACT 840
GTCCTCTTCT GCACTCAAGT TTCCCAGTTT CCGATGCGCT TCCTCGGTTA AGCCGAGGGC 900
```

그림 48. DSB03 strain의 16S rRNA gene sequences

```
CTTGTTACGA CTTCCCCCTA ATCATTGTC CCACCTTAGA CGGCTCGCTC CCTAAAAGGG 60
TTACGCCACC GGCTTCGGGT GTTACAAACT CTCATGGTGT GACGGGCGGT GTGTACAAGG 120
CCCGGGAACG TATTCACCGC GGCCTGCTGA TCCGCGATTA CTAGCGATTC CGACTTCGTG 180
TAGGCGAGTT GCAGCCTACA GTCCGAACTG AGAATGGCTT TAAGAGATTA GCTTGACCTC 260
GCGGTCTCGC AACTCGTTGT ACCATCCATT GTAGCACGTG TGTAGCCAG GTCATAAGGG 320
GCATGATGAT TTGACGTCAT CCCCACCTTC CTCCGGTTTG TCACCGGCAG TCTTACTAGA 380
GCATGATGAT TTGACGTCAT CCCCACCTTC CTCCGGTTTG TCACCGGCAG TCTTACTAGA 440
GTGCCCAACT AAATGCTGGC AACTAGTCAT AAGGGTTGCG CTCGTTGCGG GACTTAACCC 500
AACATCTCAC GACACGAGCT GACGACAACC ATGCACCACC TGTCATTTTG CCCCCGAAGG 560
GGAAACCTGA TCTCTCAGGT GATCAAAAAGA TGTCAAGACC TGGTAAGGTT CTTCTCGTTG 620
CTTCAAATTA AACCAAATGC ACCACCGCTT GTGCGGGCCC TGGACAATTC CTTTTGAGAT 680
TTGAACGAGT GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TGCCCTTAAG TGGGGGATAA 740
CATTTGAAA CAGATGCTAA TACCGCATAA ATCCAAGAAC CGCATGGTTC TTGGCTGAAA 800
GATGGCGTAA GCTATCGCTT TTGGATGGAC CCGCGGCGTA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA 860
CGGCTCACCA AGGCAATGAT ACGTAGCCGA ACTGAGAGGT TGATCGGCCA CATTGGGACT 920
```

그림 49. DSB04 strain의 16S rRNA gene sequences

CTTGTTACGA CTTCACCCCTA ATCATCTGTC CCACCTTAGG CGGCTGGTTC CTAAAAGGTT 60  
 ACCCCACCGA CTTTGGGTGT TACAAACTCT CATGGTGTGA CGGGCGGTGT GTACAAGGCC 120  
 CGGGAACGTA TTCACCGCGG CATGCTGATC CGCGATTACT AGCGATTCCG ACTTCATGTA 180  
 GCGGAGTTGC AGCCTACAAT CCGAACTGAG AATGGCTTTA AGAGATTAGC TTAATCTCGC 240  
 GAGTTCGCAA CTCGTTGTAC CATCCATTGT AGCACGTGTG TAGCCCAGGT CATAAGGGGC 300  
 ATGATGATTT GACGTCATCC CCACCTTCCT CCGGTTTGTC ACCGGCAGTC TCACCAGAGT 360  
 GCCCAACTTA ATGCTGGCAA CTGATAATAA GGGTTGCGCT CGTTGCGGGA CTTAACCCAA 420  
 CATCTCACGA CACGAGCTGA CGACAACCAT GCACCACCTG TATCCATGTC CCCGAAGGGA 480  
 ACGTCTAATC TCTTAGATTT GCATAGTATG TCAAGACCTG GTAAGGTTCT TCGCGTAGCT 540  
 TCGAATTAAA CCACATGCTC CACCGCTTGT GCGGGCCCCC GTCAATTCCT TTGAGTTTCA 600  
 GCCTTGCGGC CGTACTCCCC AGGCGGAATG CTTAATGCGT TAGCTGCAGC ACTGAAGGGC 660  
 GGAAACCCTC CAACACTTAG CATTTCATCGT TTACGGTATG GACTACCAGG GTATCTAATC 720  
 CTGTTTGCTA CCCATACTTT CGAGCCTCAG CGTCAGTTAC AGACCAGACA GCCGCCTTCG 780  
 CCACTGGTGT TCTTCCATAT ATCTACGCAT TTCACCGCTA CACATGGAGT TCCACTGTCC 860  
 TCTTCTGCAC TCAAGTTTCC CAGTTT-CCG ATGCACTTC TTCGGTTGAGC CGAAGGCTTT 920

그림 50. DSB05 strain의 16S rRNA gene sequences

(다) 최종 선발된 유산균의 당 발효 특성

최종 선발된 3 균주의 당 발효 특성은 표 53, 표 54, 표 55에서 보는 바와 같다. *L. casei* DSB03의 경우에는 glucose, fructose, galactose, sorbitol, lactose 등을 이용할 수 있으나, raffinose, starch, xylitol 등은 이용할 수 없었다.

표 53. DSB03 strain 의 생화학적 특성

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	+
Catalase	-	Esculin	+
Control	-	Salicin	+
Glycerol	-	Celiobiose	+
Erythritol	-	Maltose	+
D-arabinose	+	Lactose	+
L-arabinose	-	Melibiose	+
Ribose D-ribose	-	Sucrose	+
D-xylose	-	Trehalose	+
L-xylose	-	Inulin	-
D-adonitol	+	Melezitose	+
Methyl-BD-xylopyranosicle	+	Raffinose	-
D-galactose	+	Starch	-
D-glucose	+	Glycogen	-
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	-	Gentiobiose	+
L-sorbose	-	D-turanose	+
Rhamnose	-	D-lyxose	-
Dulcitol	+	D-tagatose	+
Inositol	+	D-fucose	-
Mannitol	-	L-fucose	-
Sorbitol	+	D-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	+	Gluconatee	+
N-Acethyl-glucosamine	+	2-keto-Gluconate	-
Amygdalin	-	5-keto-gluconate	-

1) + : positive result, - : negative result

2) API 50CHL kit was used.

*L. casei* DSB04의 경우에는, glucose, galactose, fructose, lactose, sucrose 등을 이용할 수 있었으나, maltose, raffinose, mannose, glycerol 등은 이용할 수 없었다.

표 54. DSB04 strain의 생화학적 특성

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	+
Catalase	-	Esculin	-
Control	-	Salicin	+
Glycerol	-	Celiobiose	+
Erythritol	-	Maltose	-
D-arabinose	-	Lactose	+
L-arabinose	+	Melibiose	-
Ribose D-ribose	+	Sucrose	+
D-xylose	+	Trehalose	+
L-xylose	+	Inulin	-
D-adonitol	+	Melezitose	+
Methyl-BD-xylopyranosicle	+	Raffinose	-
D-galactose	+	Starch	-
D-glucose	+	Glycogen	-
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	-	Gentiobiose	+
L-sorbose	+	D-turanose	+
Rhamnose	+	D-lyxose	-
Dulcitol	+	D-tagatose	+
Inositol	+	D-fucose	-
Mannitol	+	L-fucose	-
Sorbitol	+	D-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	+	L-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	+	Gluconatee	+
N-Acethyl-glucosamine	+	2-keto-Gluconat	-
Amygdalin	-	5-keto-gluconate	-

1) + : positive result, - : negative result

2) API 50CHL kit was used.

*L. plantarum* DSB05의 경우에는, glucose, galactose, rhamnose, sucrose, lactose, raffinose 등을 이용할 수 있었으나, starch, xylose, glycerol 등은 이용할 수 없었다.

표 55. DSB05의 생화학적 특성

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	+
Catalase	-	Esculin	+
Control	-	Salicin	+
Glycerol	-	Celiobiose	+
Erythritol	-	Maltose	+
D-arabinose	-	Lactose	+
L-arabinose	+	Melibiose	+
Ribose D-ribose	+	Sucrose	+
D-xylose	-	Trehalose	+
L-xylose	-	Inulin	-
D-adonitol	-	Melezitose	+
Methyl-BD-xylopyranosicle	-	Raffinose	+
D-galactose	+	Starch	-
D-glucose	+	Glycogen	-
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	+	Gentiobiose	+
L-sorbose	+	D-turanose	+
Rhamnose	+	D-lyxose	-
Dulcitol	+	D-tagatose	+
Inositol	-	D-fucose	-
Mannitol	+	L-fucose	-
Sorbitol	+	D-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	+	L-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	+	Gluconate	+
N-Acethyl-glucosamine	+	2-keto-Gluconat	-
Amygdalin	+	5-keto-gluconate	-

1) + : positive result, - : negative result

2) API 50CHL kit was used.

(라) 최종 선발된 유산균주의 효소 분비능

최종 선발된 3 균주의 유산균주의 효소 분비능 결과는 표 56, 표 57, 표 58에서 보는 바와 같다. *L. casei* DSB03의 경우에는 leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphotol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucuronidase 및  $\alpha$ -glucosidase 효소 분비능을 가지고 있음을 알 수 있었다.

표 56. *L. casei* DSB03의 효소 특성

No.	Enzyme Assayed for	Result
1	control	-
2	Alkaline phosphatase	-
3	Esterase(C4)	-
4	Esterase Lipase(C8)	-
5	Lipase(C14)	-
6	Leucine arylamidase	+
7	Valine arylamidase	+
8	Crystine arylamidase	-
9	Trypsin	-
10	$\alpha$ -chymotrypsin	-
11	Acid phosphatase	+
12	Naphotol-AS-BI-phosphohydrolase	+
13	$\alpha$ -galactosidase	-
14	$\beta$ -glucuronidase	+
15	$\beta$ -glucosidase	-
16	$\alpha$ -glucosidase	+
17	$\beta$ -glucosidase	-
18	N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-
19	$\alpha$ -mannosidase	-
20	$\alpha$ -flucosidase	-

*L. casei* DSB04의 경우에는 alkaline phosphatase, leucine arylamidase, valine arylamidase, crystone arylamidase, acid phosphatase, naphotol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase 및  $\alpha$ -flucosidase 효소 분비능을 가지고 있음을 알 수 있었다.

표 57. *L. casei* DSB04의 효소 특성

No.	Enzyme Assayed for	Result
1	control	-
2	Alkaline phosphatase	+
3	Esterase(C4)	-
4	Esterase Lipase(C8)	-
5	Lipase(C14)	-
6	Leucine arylamidase	+
7	Valine arylamidase	+
8	Crystine arylamidase	+
9	Trypsin	-
10	$\alpha$ -chymotrypsin	-
11	Acid phosphatase	+
12	Naphotol-AS-BI-phosphohydrolase	+
13	$\alpha$ -galactosidase	-
14	$\beta$ -glucuronidase	-
15	$\beta$ -glucosidase	-
16	$\alpha$ -glucosidase	+
17	$\beta$ -glucosidase	+
18	N-actetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-
19	$\alpha$ -mannosidase	-
20	$\alpha$ -flucosidase	+

*L. plantarum* DSB05의 경우에는 leucine arylamidase, valine arylamidase, crystone arylamidase, acid phosphatase, naphotol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-actetyl- $\beta$ -glucosaminidase 효소 분비능을 가지고 있음을 알 수 있었다.

표 58. Enzyme activity of *L. plantarum* DSB05

No.	Enzyme Assayed for	Result
1	control	-
2	Alkaline phosphatase	-
3	Esterase(C4)	-
4	Esterase Lipase(C8)	-
5	Lipase(C14)	-
6	Leucine arylamidase	+
7	Valine arylamidase	+
8	Crystine arylamidase	+
9	Trypsin	-
10	$\alpha$ -chymotrypsin	-
11	Acid phosphatase	+
12	Naphotol-AS-BI-phosphohydrolase	+
13	$\alpha$ -galactosidase	-
14	$\beta$ -glucuronidase	+
15	$\beta$ -glucosidase	-
16	$\alpha$ -glucosidase	+
17	$\beta$ -glucosidase	+
18	N-actetyl- $\beta$ -glucosaminidase	+
19	$\alpha$ -mannosidase	-
20	$\alpha$ -flucosidase	-

(마) 최종 선발된 유산균주의 항균력

선발된 유산균의 대장균에 대한 항균력 보유 여부를 조사한 결과는 그림 51에서 보는 바와 같다. 배양액을 중화하지 않았을 경우에는 모든 샘플에서 *E. coli* 저해환이 나타난 반면, 배양액을 pH 7로 중화시킨 후에는 세 균주 공히 *E. coli* 억제력이 상실되었다. 이와 같은 결과로부터, 대장균 억제능은 주로 유산균이 자라면서 생성되는 유기산에 의한 것으로 판단되었다.

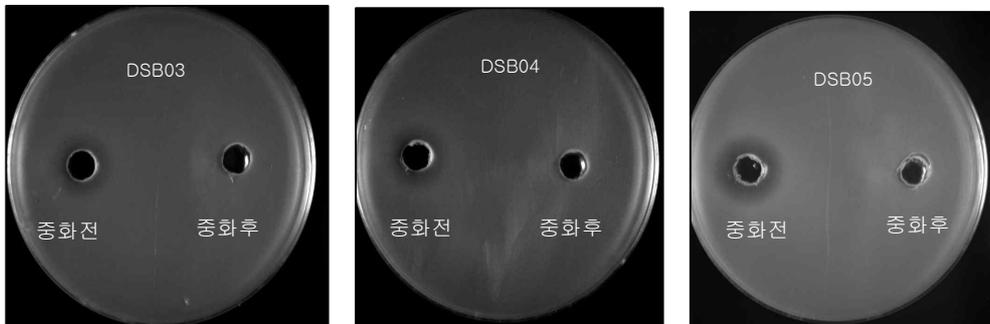


그림 51. *E. coli* K88 을 이용한 LAB cultures의 항생역가 분석

(바) 최종 선발된 유산균주의 유기산 생성패턴

최종 선발된 유산균 3종의 유기산 생성패턴을 조사하기 위하여, MRS 배지에 각 균주를 접종하고 37°C에서 진탕배양하면서 시간별로 샘플링하였다.

*L. casei* DSB03의 경우, 가장 많이 생성된 유기산은 젖산(lactic acid)으로서 배양 48시간 후에 313mM에 달하였다. Lactic acid 이외에도 pyruvic acid 및 acetic acid가 다량 생성되었으며, ethanol 및 butyric acid의 생성은 매우 미미하였다.

표 59. 배양시간에 따른 *L. casei* DSB03의 유기산 생산량

배양시간	Pyruvic acid	Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	Butyric acid
6H	11.5	83.2	98.4	7.4	0.9
9H	50.5	104.3	94.5	7.3	0.8
10H	56.0	113.5	96.7	6.4	0.8
12H	70.2	153.9	98.6	6.1	0.9
24H	142.4	212.8	100.2	7.0	1.2
40H	238.0	292.8	95.3	6.4	0.9
48H	240.0	313.0	96.5	6.2	1.0

*L. casei* DSB04의 경우, 가장 많이 생성된 유기산은 lactic acid로서 배양 48시간 후에 248mM에 달하였다. Lactic acid 이외에도 acetic acid가 다량 생성되었으며, ethanol 및 butyric acid의 생성량은 미미하였다.

표 60. 배양시간에 따른 *L. casei* DSB04의 유기산생산량

배양시간	Pyruvic acid	Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	Butyric acid
6H	45.8	11.2	94.6	7.5	0.8
9H	46.1	18.8	94.5	8.3	1.0
10H	56.1	26.2	94.3	6.8	0.9
12H	58.7	78.5	98.0	6.4	1.2
24H	19.0	206.1	101.2	8.4	1.4
40H	11.2	247.4	100.1	6.8	1.9
48H	9.5	248.2	101.8	6.2	1.8

*L. plantarum* DSB05 균주의 경우에도, 가장 많이 생성된 유기산은 lactic acid로서 배양 48시간째에 218mM에 달하였다. Lactic acid 이외에도 acetic acid가 다량 생성되었으며, ethanol 및 butyric acid 생성량은 매우 미미하였다.

표 61. 배양시간에 따른 *L. plantarum* DSB05의 유기산 생산량

배양시간	Pyruvic acid	Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	Butyric acid
6H	44.8	11.8	94.4	7.3	0.8
9H	46.4	20.8	94.7	7.7	0.9
10H	43.3	32.5	100.3	6.5	1.8
12H	41.7	61.3	99.3	6.5	1.1
24H	19.3	176.5	103.8	4.5	1.1
40H	17.4	209.4	106.6	6.1	0.9
48H	12.3	218.8	109.2	5.9	1.0

상기의 결과에서 보는 바와 같이, 선발된 세 균주의 유기산 생성 패턴은 매우 유사하였으며, 젖산, 초산의 순으로 많이 생성되었다. 한편, *L. casei* DSB03의 경우에는 pyruvic acid 생산량이 배양시간과 함께 점차적으로 증가하는 추세를 나타내었다.

## 2. CMS를 이용한 유산균 배양조건 확립

### 가. CMS에 기초한 산업용 유산균 배지의 개발

#### (1). 재료 및 방법

CMS (condensed molasses solubles)에 기초한 산업용 유산균 배지의 개발을 위해서, Table 2-11에서 보는 바와 같이 CMS를 주요 탄소원으로 한 배지(GYC-10)를 다른 탄소원을 배지와 비교실험을 실시하였다. 1차년도에서 선발된 균주 중에서 2종의 종균 (*Lactobacillus casei* DSB03, *Lactobacillus plantarum* DSB05)을 최종적으로 선택하여 실험을 진행하였다. 우선 *Lactobacillus casei* DSB03 균주를 MRS broth에서 48시간 동안 배양한 후, 표 62의 산업용 배지(SB-a, HYY, GYC-10)에 0.1%씩 접종하였다. 37℃에서 48시간 동안 교반(100rpm) 또는 정지배양하면서 생균수 및 pH 변화를 관찰하였으며, 배양이 종료된 이후에는 온도별로 배양액을 저장하면서, 균주의 저장 안정성을 조사하였다.

표 62. 유산균 배양을 위한 배지 조성

	SB-a (%)	HYY (%)	GYC-10 (%)
CSL (corn steep liquor, 옥침수)	10.00	5.00	0.00
CMS (condensed molasses solubles)	0.00	0.00	10.00
Molasses (당밀)	0.00	5.00	0.00
Glucose	2.00	2.00	2.00
Yeast extract powder	0.50	0.50	0.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50	0.00	0.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25	0.10	0.10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00	0.05	0.05
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00	0.05	0.05
Tween 80	0.00	0.00	0.00
D.W	86.75	87.30	87.30
pH 7.0			

(2) 결과

*L. casei* DSB03 균주를 SB-a, HYY, GYC-10 배지에 각각 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 교반(100rpm) 또는 정지배양하였다. 정지 배양의 경우 (그림 53), 3종의 배지에서 공히 배양 24시간 이후에 최고균수에 도달하였으며, 이 시점의 균수는 3종의 배지 공히  $2.4 \times 10^9/\text{ml} \sim 2.1 \times 10^9/\text{ml}$  수준에 도달하였다. 종균의 증식속도나 최종 균수 측면에서 볼 때 배지 간의 차이는 거의 없는 것으로 판단되었다. CMS를 첨가한 배지에서 경제성 있는 수준까지 선발된 종균의 증식이 가능함이 확인되었다. 교반배양과 정지배양을 비교한 실험 (그림 52)에서는 균의 증식 속도나 최종 균수에서 차이가 서로 미미하였기 때문에, 산업적 적용 상황에 따라 교반 또는 정지배양 모두 적용 가능할 것으로 판단되었다.

한편, 배양 중의 pH 변화를 관찰한 결과, 배양시간과 병행하여 pH가 감소하기 시작하여 SB-a 배지와 GYC-10 배지의 경우에는 배양 24시간 이후에 pH 4.5 수준으로 감소하였다. HYY 배지의 경우에는 최종 pH가 4 이하로 감소하여, 균의 저장 안정성에 나쁜 영향을 줄 수 있음을 시사하였다. 한편, 교반배양과 정지배양간의 pH 차이는 매우 미미하였다 (그림 52). *Lactobacillus plantarum* DSB05 종균의 경우에도 *Lactobacillus casei* SB03와 유사한 경향을 나타내었다 (data not shown). 이상의 결과에서 보는 바와 같이, CMS에 일부 영양소를 보충

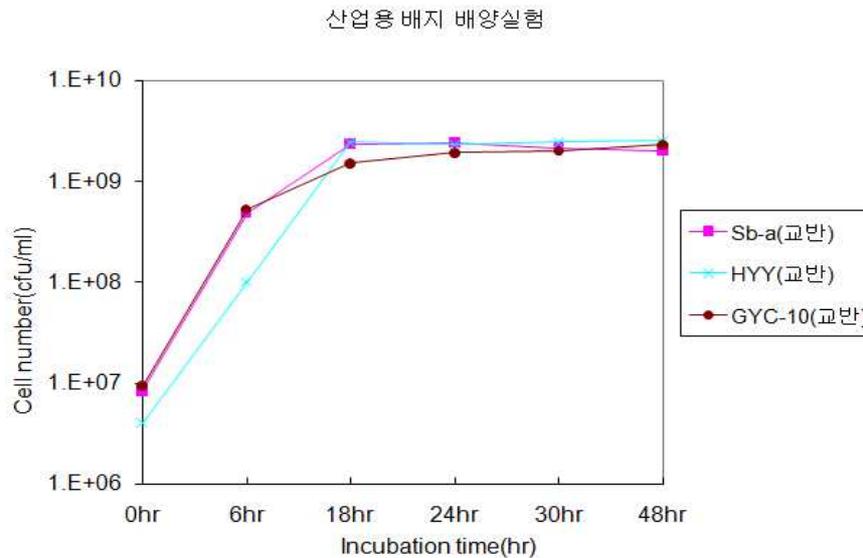
한다면 고가의 MRS 배지나 옥침수나 당밀을 기본으로 하는 배지를 대체할 수 있는 산업용 배지로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

이상의 실험을 통하여 배양한 균주가 저장 중에 어느 정도의 안정성을 가지고 있는지 조사하기 위해, 유산균 (*L. casei* DSB03) 배양액을 저온 및 상온에서 10일간 보관하면서 생균수 및 pH 변화를 관찰하였다. 4°C 저장의 경우, 정치배양액에서는 HYY 배지에서의 균수저하 현상이 가장 뚜렷한 반면, 교반배양액에서는 SB-a 배지에서의 균수저하 현상이 가장 뚜렷하였다(그림 54). 한편, GYC-10 배지에서 배양한 경우에는 정치배양액/교반배양액 공히 저장기간 동안 균수가 완만하게 감소하여, 저장 10일 후에도  $10^9$ /ml 수준을 유지하였다 (그림 54).

한편, 배양액의 저장 중 pH 변화를 관찰한 결과, 4°C 및 상온 저장 공히 pH 변화는 미미하였다 (그림 55, 그림 57). 교반배양액과 정치배양액 사이의 차이도 미미하였다. 저장 중의 pH가 낮으면 낮을수록 acid shock에 의해 균의 안정성에 역효과를 줄 수 있는 점을 감안할 때, CMS를 첨가한 GYC-10 배지의 pH가 상대적으로 높은 수준 (pH 4.3~4.4)을 유지하는 점을 감안할 때, 종균 배양액의 저장안정성 측면에서 다른 배지에 비해 유리할 것으로 사료되었다.

이상의 실험을 통해, CMS를 이용한 산업용 배지는 균의 증식이 우수할 뿐만 아니라 저장안정성 측면에서도 매우 안정한 것으로 나타났다.

(A)



(B)

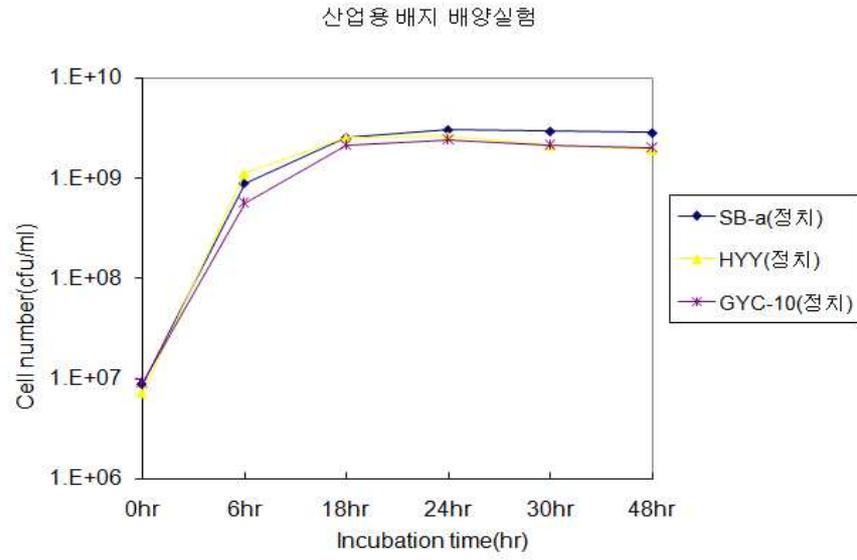
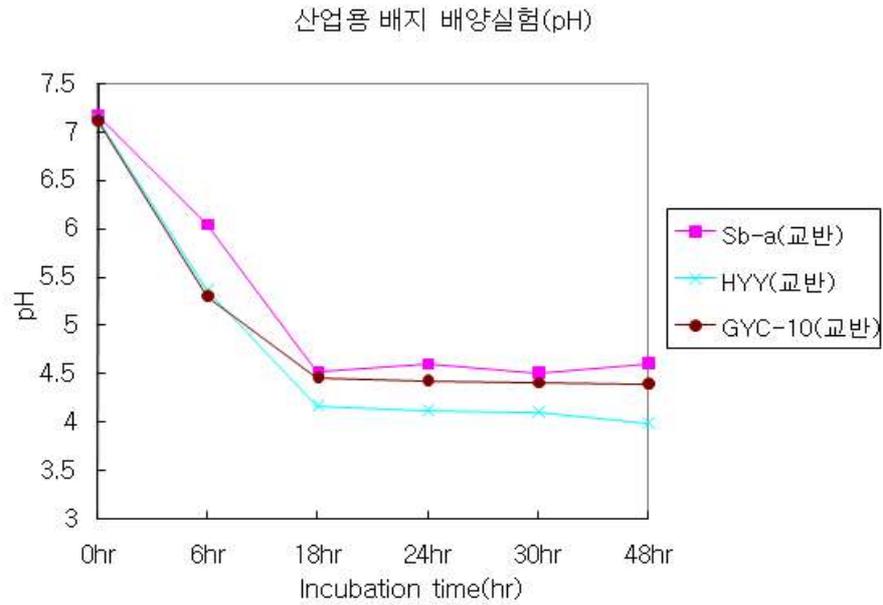


그림 52. SB-a, HYY and GYC-10 liquid medium 에서 *L. casei* DSB03 의 성장곡선  
(A) shaking incubation at 37°C, (B) Standing incubation at 37°C.

(A)



(B)

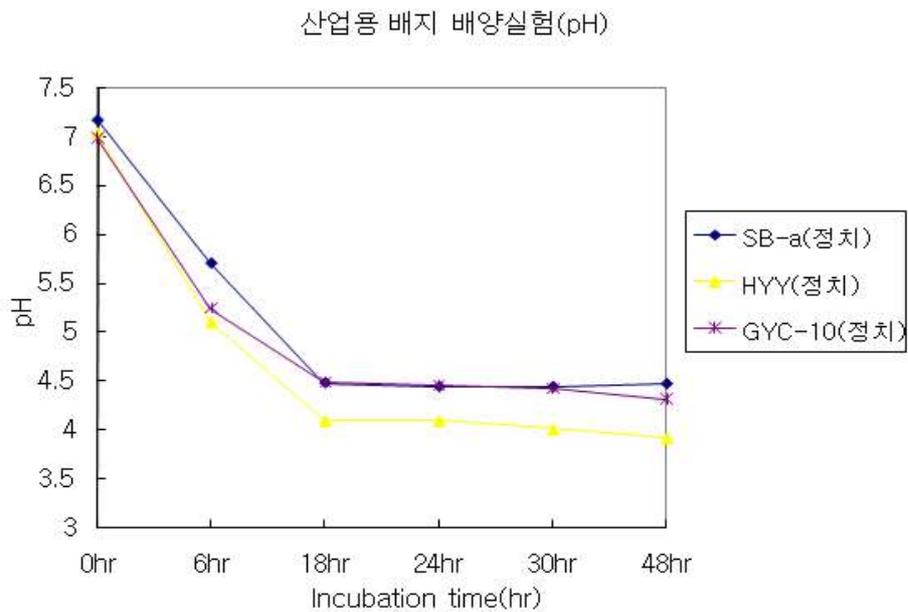
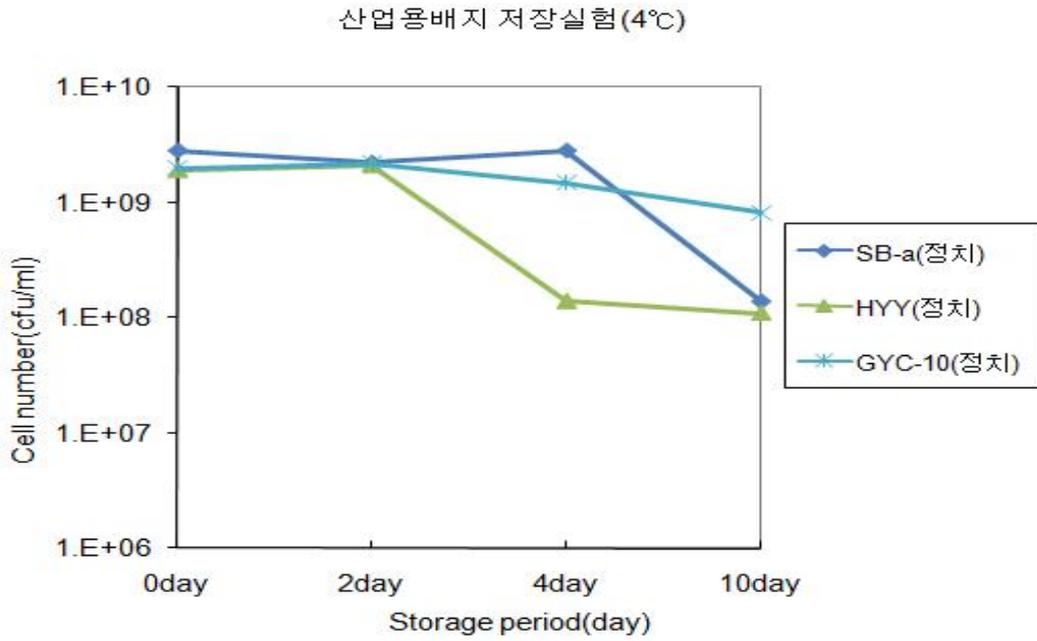


그림 53. SB-a, HYY and GYC-10 liquid medium 에서 *L. casei* DSB03 의 pH 변화. (A) shaking incubation at 37°C, (B) Standing incubation at 37°C.

(A)



(B)

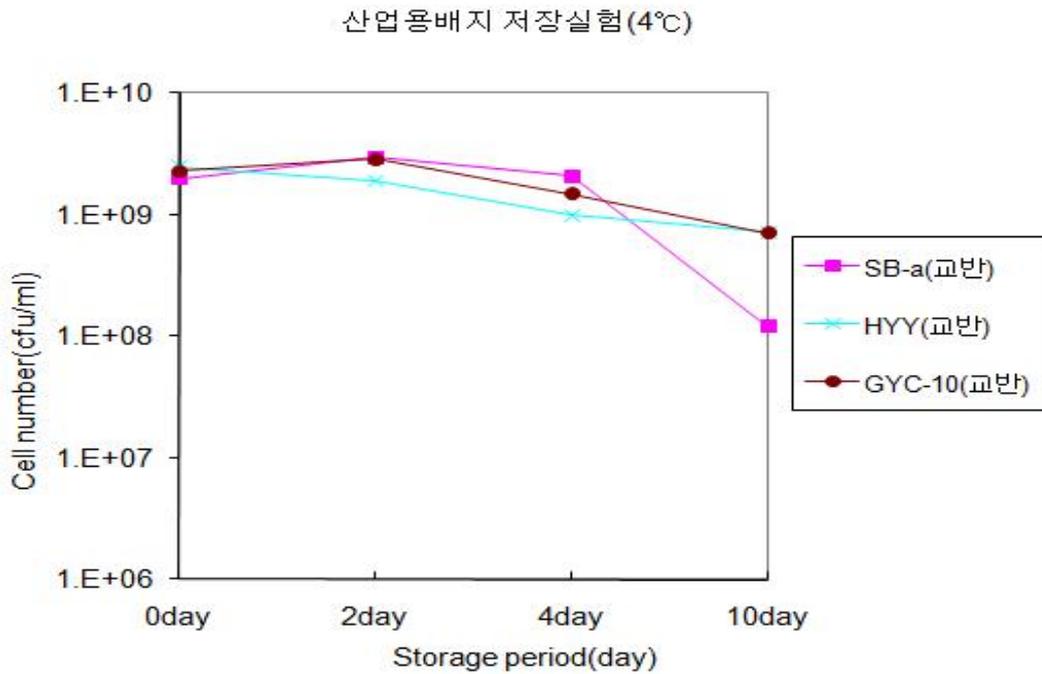
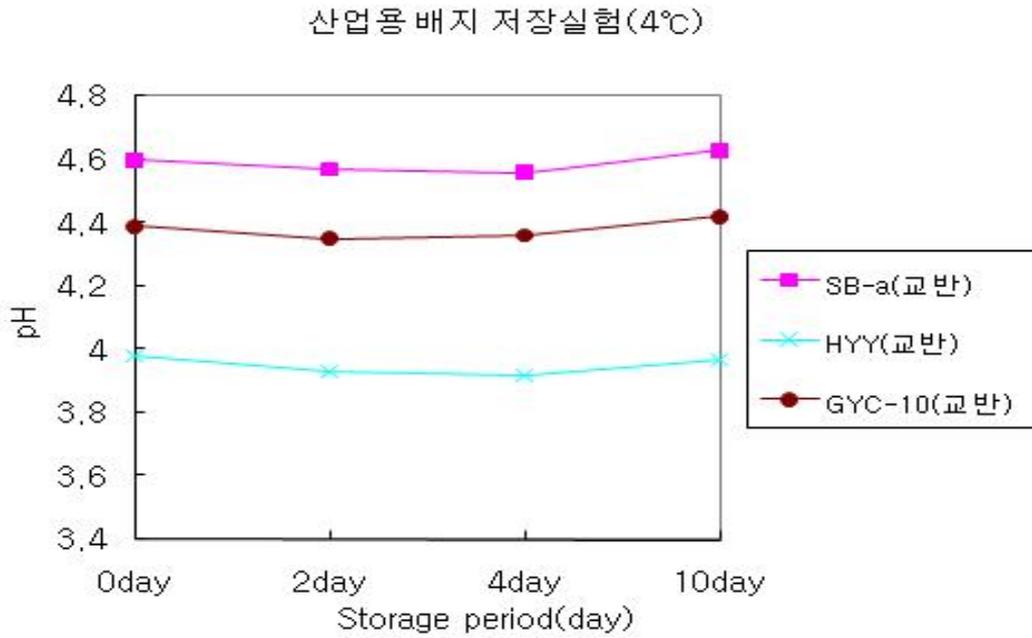


그림 54. 4°C에서 정치배양 이후 *L. casei* DSB03 의 성장곡선 (A) or shaking incubation (B) for 48 hr at 37°C

(A)



(B)

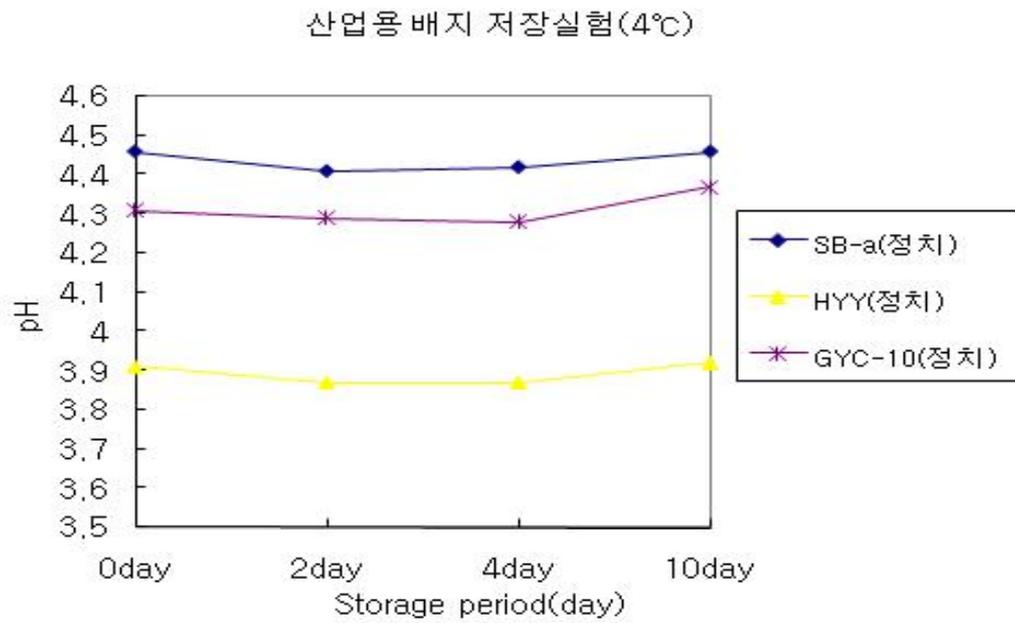
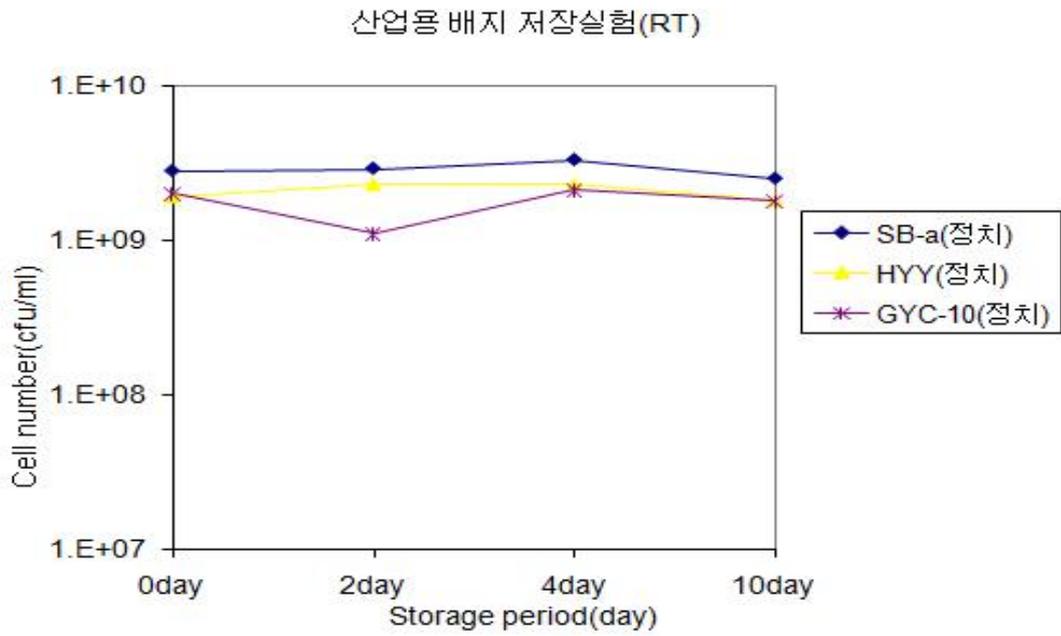


그림 55. 4°C에서 정치배양 이후 *L. casei* DSB03 의 pH 변화 (A) or shaking incubation (B) for 48 hr at 37°C

(A)



(B)

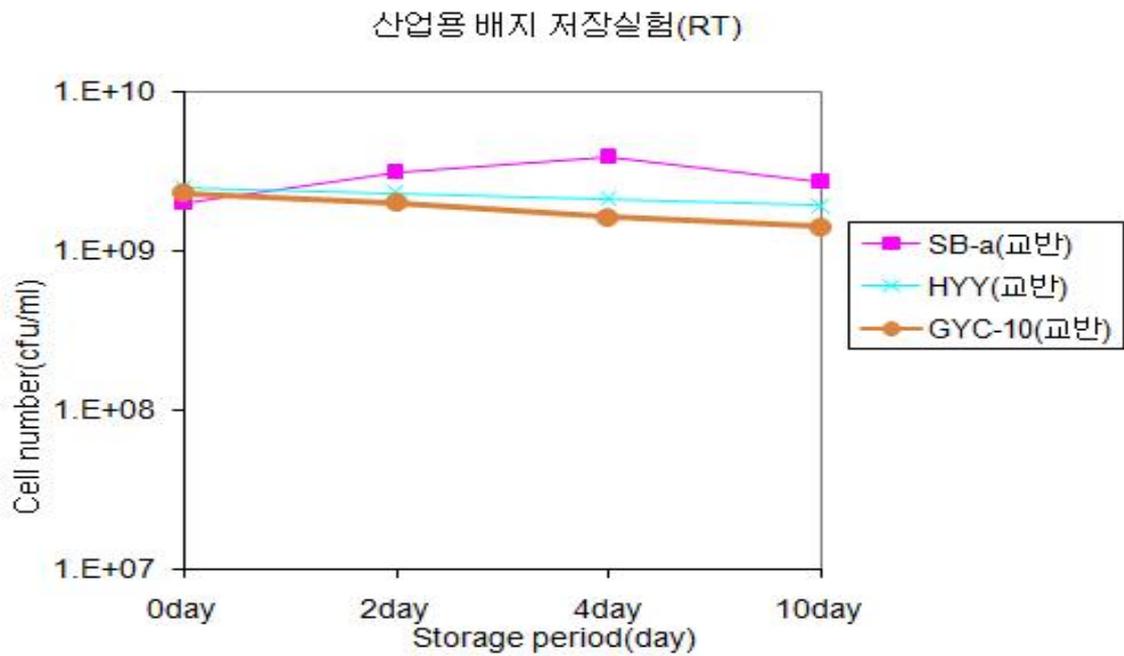
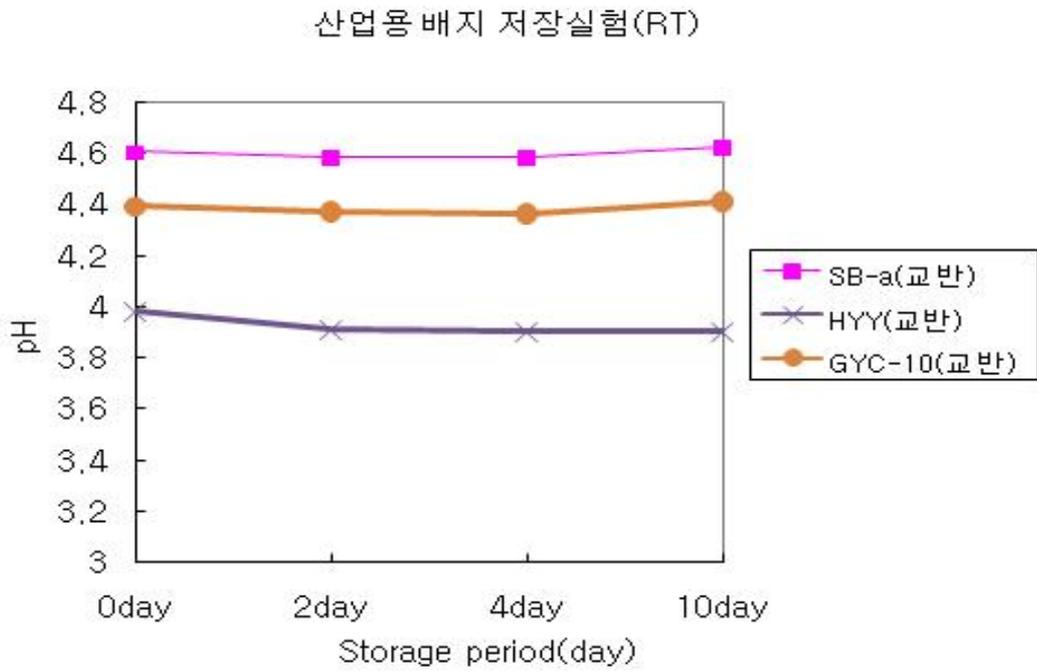


그림 56. 25℃에서 정치배양 이후 *L. casei* DSB03 의 성장곡선 (A) or shaking incubation (B) for 48 hr at 37℃

(A)



(B)

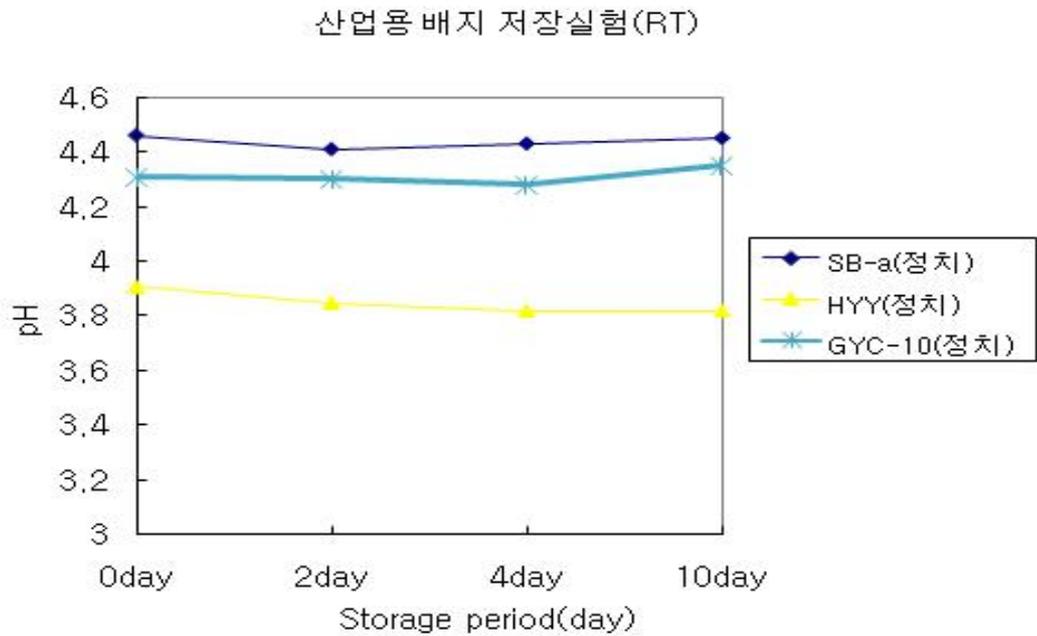


그림 57. 25°C에서 정치배양 이후 *L. casei* DSB03 의 pH 변화 (A) or shaking incubation (B) for 48 hr at 37°C

나. CMS의 적정 첨가수준 결정

(1) 재료 및 방법

CMS의 적정 첨가수준을 결정하기 위해서, GYC-10 기본 배지에 CMS 10, 20, 30%를 각각 첨가하였다 (표 63). 기 선발된 종균인 *L. casei* DSB03과 *L. plantarum* DSB05 배양액 0.1%를 각각 첨가한 후, 37°C에서 교반(130rpm)으로 72시간 배양하면서 시간별로 샘플을 채취하여 MRS 배지에 도말하여 생균수를 측정하였으며, pH 변화도 관찰하였다. 생균수의 측정을 위해, 각 시료를 희석한 후에 MRS agar(0.02% Na-azide 첨가)에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 균수를 측정하였다. 배양액의 저장 안정성을 비교하기 위해서는, 배양이 종료된 후에 냉장(4°C) 및 실온에 보관하면서 생균수 및 pH 변화를 관찰하였다.

표 63. 10-30% CMS를 첨가한 GYC medium 의 성분

	GYC-10 (10% CMS)	GYC-10 (20% CMS)	GYC-10 (30% CMS)
CMS (Condensed molasses solubles)	10.00%	20.00%	30.00%
Glucose	2.00%	2.00%	2.00%
Yeast extract powder	0.50%	0.50%	0.50%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.10%	0.10%	0.10%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05%	0.05%	0.05%
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.05%	0.05%	0.05%
D.W	87.30%	77.30%	67.30%
pH 7.0			

(2) 결과

*L. casei* DSB03 균주의 경우, CMS 30% 첨가구를 제외하고는 모두 배양 24시간 후에 stationary phase에 도달한 반면, CMS 30% 첨가구는 성장속도가 저하하여 배양 48시간 만에 stationary phase에 도달하였다 (표 58). 균수에 있어서도, CMS 10% 첨가구는  $4.46 \times 10^9$ /ml 로서, MRS 배지의 균수  $6.35 \times 10^9$ /ml 와 거의 동등한 수준인 반면, CMS 30% 첨가구의 경우에 최고 균수는  $5.7 \times 10^8$ /ml 수준에 머물렀다. *L. casei* DSB03 균주는 배지 종류와 관계없이 배양 후기까지 사멸하지 않고 안정한 상태를 유지하였다.

*L. plantarum* DSB05 균주의 경우에도, CMS 30% 첨가구를 제외하고는 모두 배양 24시간

이후에 stationary phase에 도달한 반면, CMS 30% 첨가구는 성장속도가 저하하여 배양 36시간 만에 stationary phase에 도달하였다 (표 58). CMS 20% 첨가구는 최고 균수가 가장 높고 배양 60시간 후에도  $1.62 \times 10^9$ /ml 수준을 유지하였으나 그 이후에 급격히 감소하였다. CMS 10% 첨가구에 있어서 배양 24시간 후의 균수는  $9.22 \times 10^8$ /ml 로서, MRS 배지의 균수  $6.06 \times 10^8$ /ml 와 거의 동등 수준 이상인 반면, CMS 30% 첨가구의 경우에 최고 균수는  $2.20 \times 10^7$ /ml 수준에 머물렀다. CMS 10% 첨가구는 배양 60시간 이후에도 MRS 배지에 비해 균의 저장안정성이 상대적으로 우수하였다.

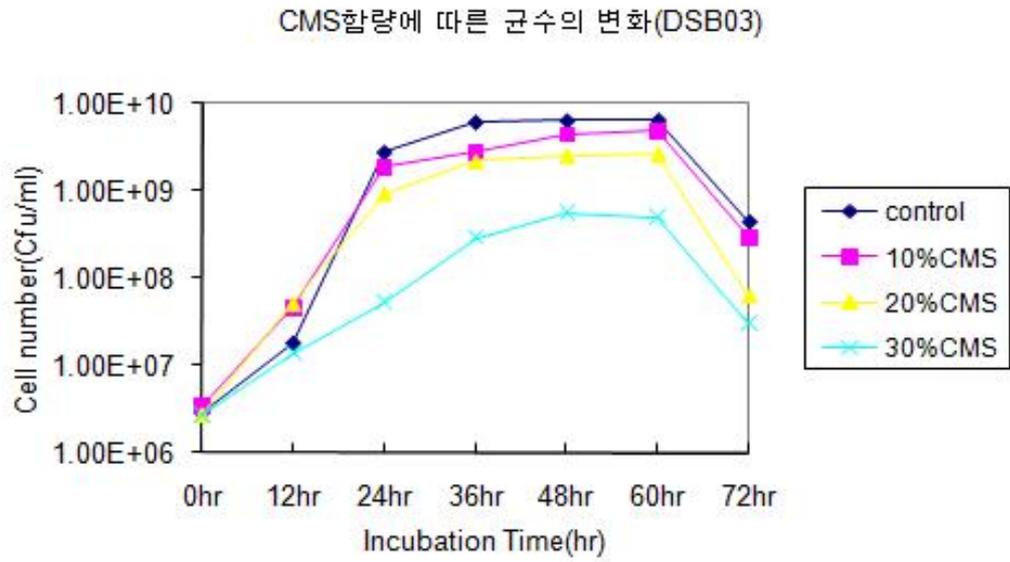
이상의 실험 결과에서 보는 바와 같이, CMS 농도가 지나치게 높으면 균의 생육을 억제하는 현상을 나타내었다. 더구나 *L. plantarum* DSB05 균주의 경우에는, CMS 10% 첨가 배지가 기존의 MRS 배지에 비해 오히려 생육 및 저장 안정성 측면에서 더욱 우수한 양상을 나타내었다. 따라서, 균의 증식속도 및 최고균수, 배양후기의 균 사멸속도 등을 종합적으로 판단하여 CMS 10% 첨가구가 산업용 배지로서 가장 적합할 것으로 사료되었다.

다음으로 상기의 배양액 중에서 유산균 배지로 적합하지 않은 것으로 판단된 CMS 30% 첨가구를 제외하고, 나머지 배양액의 저장 안정성을 조사하였다. 4°C 저장의 경우, MRS 배지, CMS 10% 및 20% 첨가 배지 모두 *L. casei* DSB03 균주의 사멸양상이 비슷한 경향을 나타내었으며, 저장기간이 경과함에 따라 생균수가 지속적으로 감소하였다 (Fig. 2-20A). 반면 *L. plantarum* DSB05 균주의 경우, 저장기간이 경과하더라도 *L. casei* DSB03 균주에 비해 상대적으로 안정한 경향을 나타내었다 (그림 60).

상온 저장의 경우도 두 균주 모두 냉장 저장과 유사한 경향을 나타내었으며, 균의 사멸속도는 냉장 저장에 비해 좀 더 빠른 경향을 나타내었다 (그림 61).

따라서, 종균의 저장 안정성을 고려할 때, 배양시간을 stationary phase 직후인 48시간 이내로 단축하고, 배양액은 냉장상태에서 가능한 한 빨리 사용하는 것이 적합할 것으로 판단되었다.

(A)



(B)

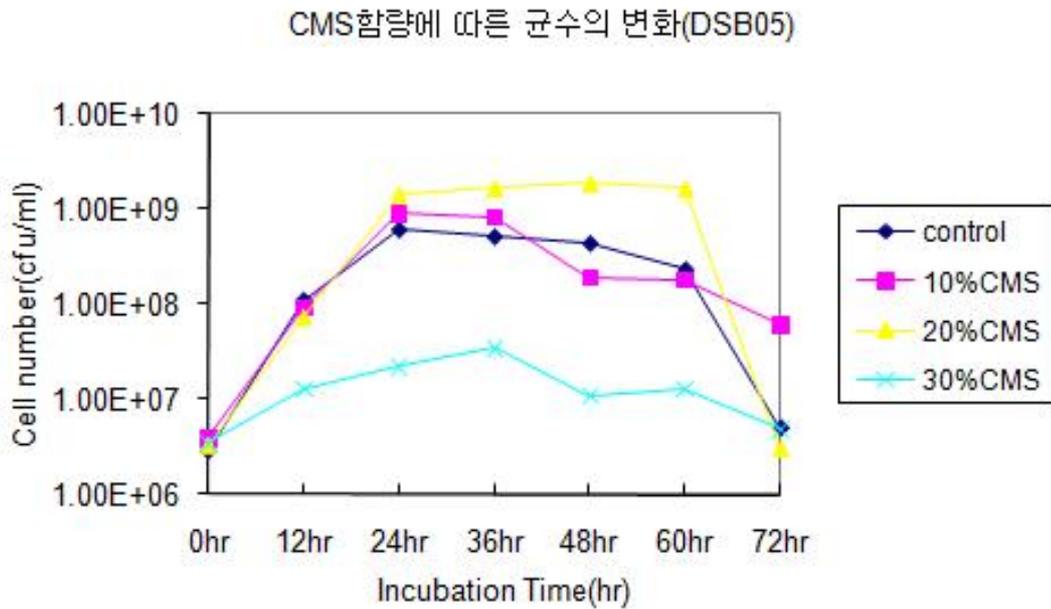
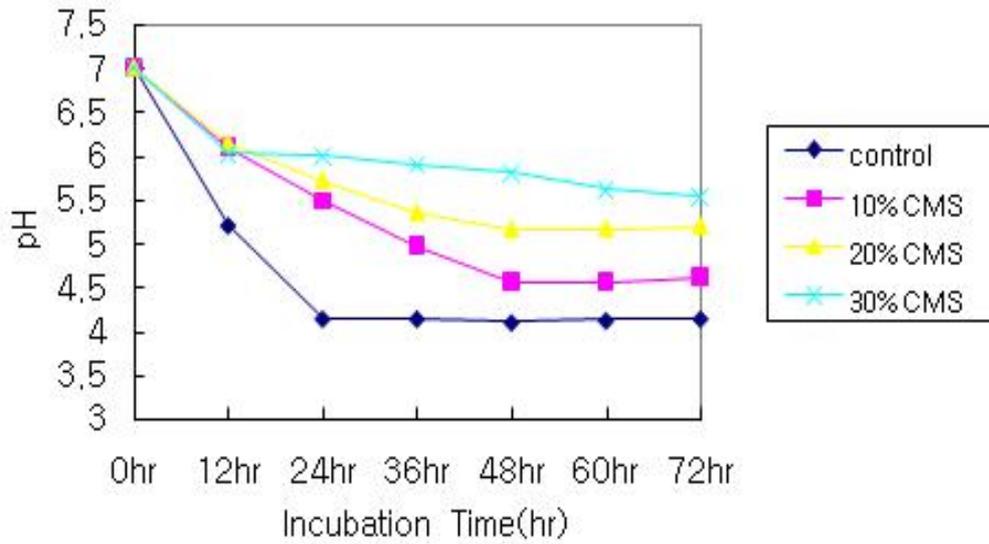


그림 58. CMS 함량에 따른 *L. casei* DSB03 의 성장곡선 (A) and *L. plantarum* DSB05 (B) according to the CMS content in GYC liquid medium. Control; MRS medium.

(A)

CMS함량에 따른 pH의 변화(DSB03)



(B)

CMS함량에 따른 pH의 변화(DSB05)

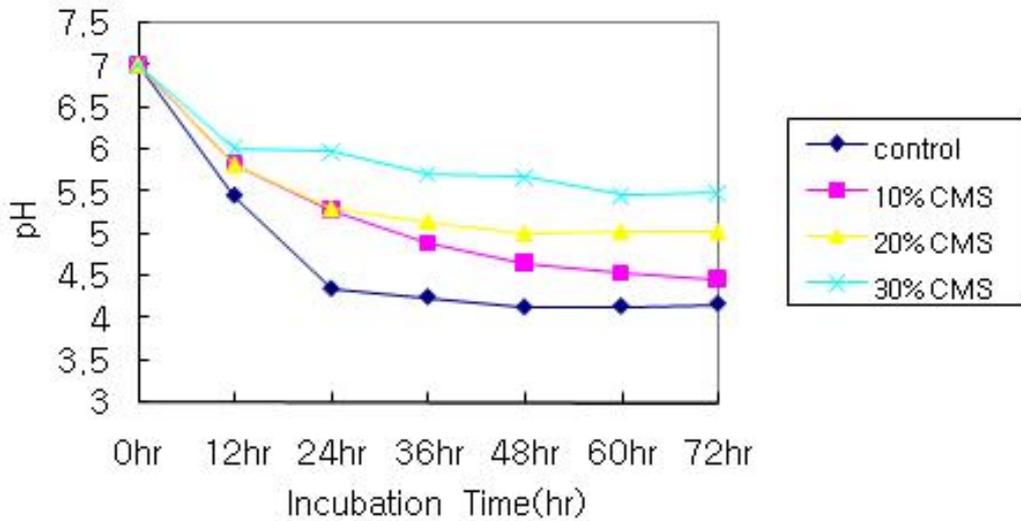
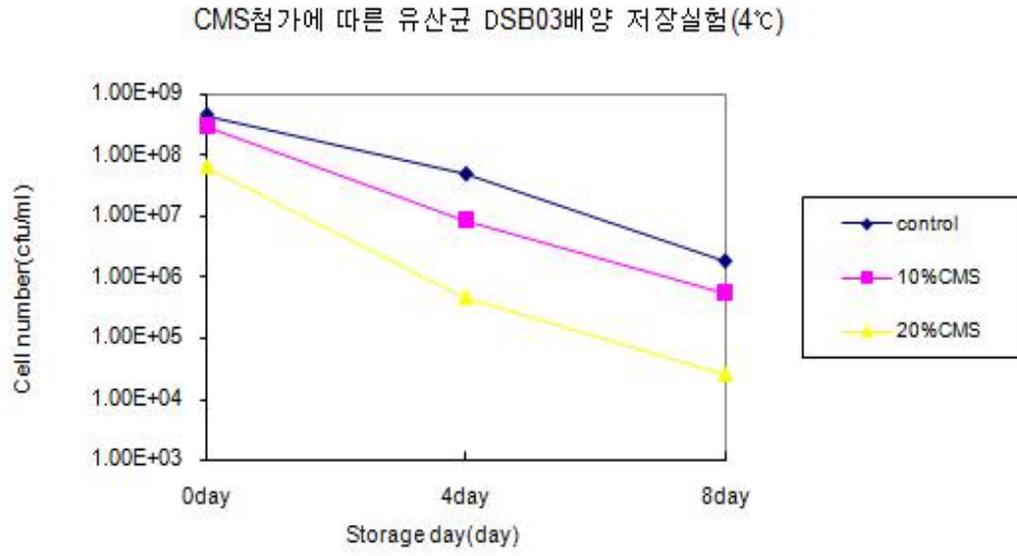


그림 59. CMS 함량에 따른 *L. casei* DSB03 의 pH (A) and *L. plantarum* DSB05 (B) according to the CMS content in GYC liquid medium. Control; MRS medium.

(A)



(B)

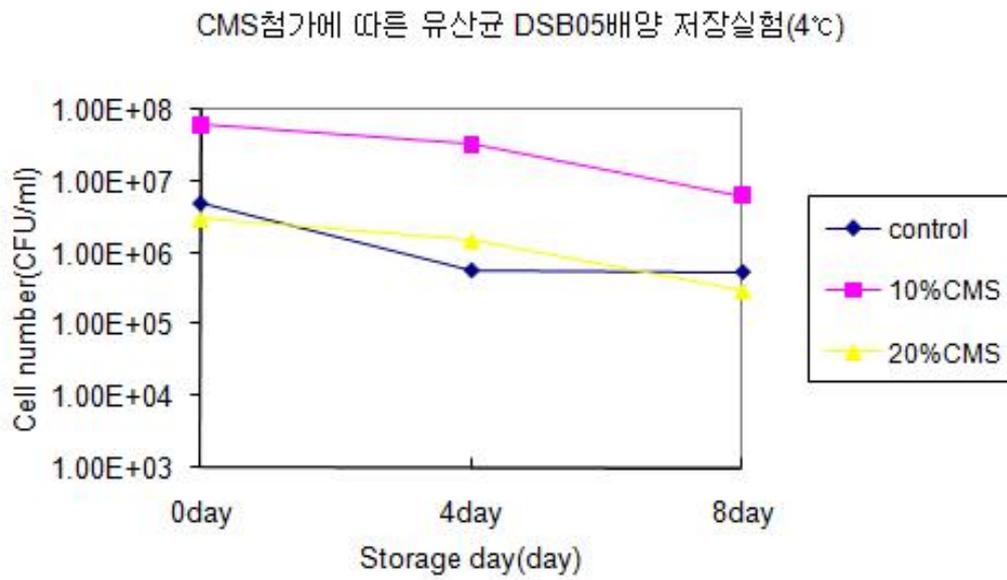
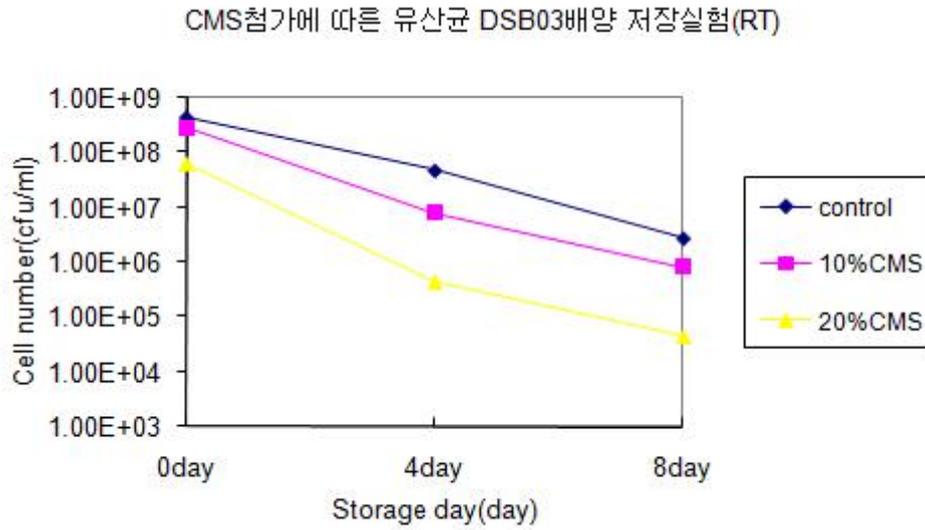


그림 60. 4℃에서 정치배양후 *L. casei* DSB03 (A) and *L. plantarum* DSB05 (B) 의 성장곡선

(A)



(B)

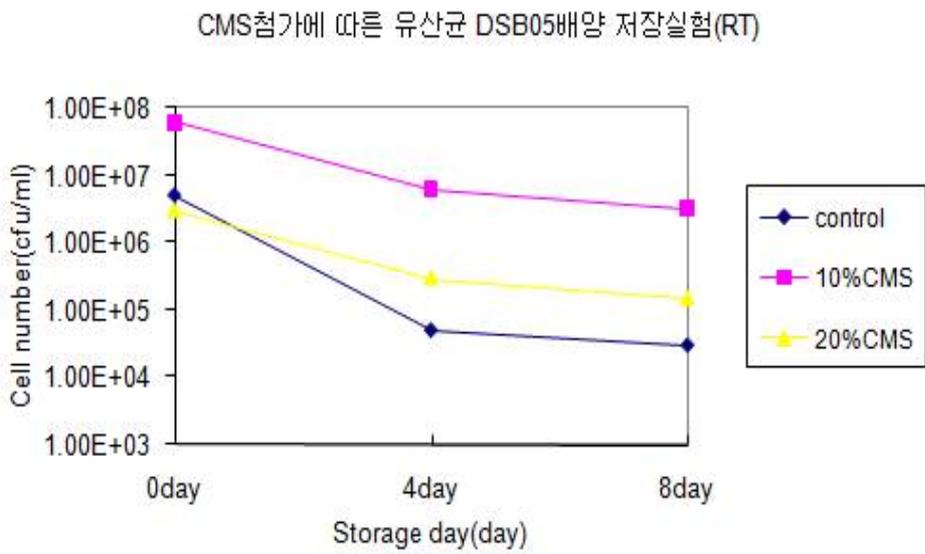


그림 61 25°C에서 정치배양후 *L. casei* DSB03 (A) and *L. plantarum* DSB05 (B)의 성장곡선

## 다. 균주 상호간의 길항작용 또는 성장촉진여부 조사

### (1) 재료 및 방법

최종 선발된 유산균(*L. casei* DSB03, *L. plantarum* DSB05)의 종균으로 활용시에 편의상 혼합배양으로 진행할 필요성이 있을 뿐만 아니라, 실제로 TMF 제조용 종균으로 사용할 때 균주 상호간의 저해작용이 일어나면 바람직하지 않다. 따라서, 최종적으로 선발된 균주간 상호 길항작용을 나타내는지의 여부를 조사하였다. *L. casei* DSB03 균주와 *L. plantarum* DSB05 균주 배양액을 GYC 배지(CMS 10%)와 MRS broth에 0.1% ( $10^6$ /ml)씩 각각 또는 함께 접종하고, 37°C에서 교반(130rpm)하면서 배양하였다. 유산균수의 측정을 위해서는 접종 후 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h 마다 샘플링하여 생리식염수로 희석한 후 MRS agar(0.02% Na-azide 첨가)에 도말하였으며, 37°C에서 48시간 배양한 후 유산균수를 측정하였다.

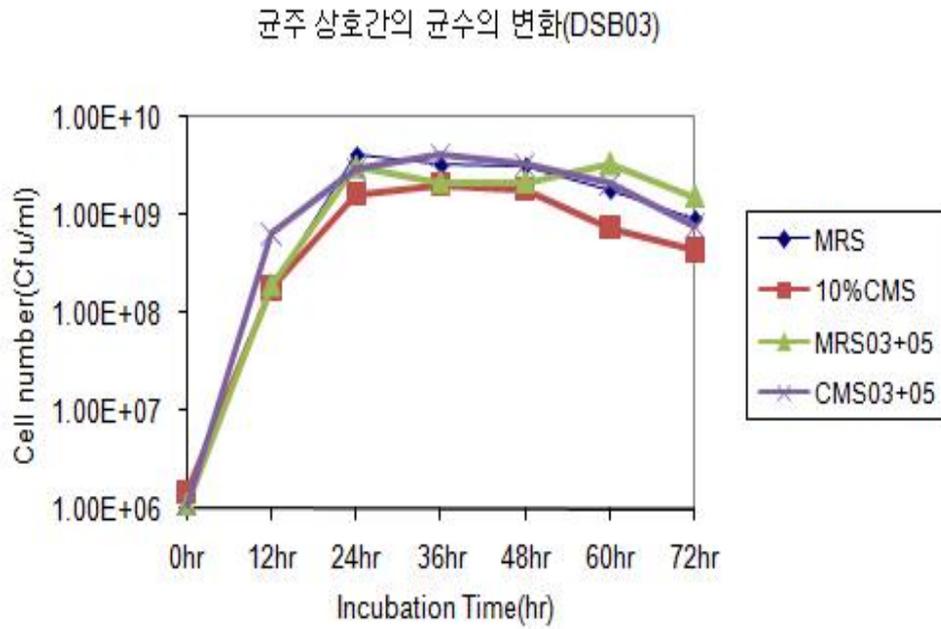
### (2) 결과

최종 선발된 *L. casei* DSB03 균주와 *L. plantarum* DSB05를 따로 배양했을 경우와 함께 배양했을 경우의 균수의 변화를 관찰한 결과는 그림 62에서 보는 바와 같다. *L. casei* DSB03 균주를 따로 배양했을 경우가 *L. plantarum* DSB05를 함께 배양했을 경우보다 균수가 약간 낮은 경향을 나타내었으며, 전체적인 성장패턴은 매우 유사하였다(그림 62A). 혼합배양에 의한 균수 증가는 MRS 배지보다는 GYC 배지에서 더 뚜렷하게 나타났다. 한편, *L. plantarum* DSB05 균주를 단독으로 배양했을 경우는 혼합배양의 경우와 매우 유사한 성장패턴을 나타내었으며, 균수의 경우에도 거의 차이가 없었다(그림 62B). 또한, MRS 배지에서 *L. plantarum* DSB05 균주를 GYC 배지에 단독 배양했을 경우에는 배양 후기에도 균수저하 현상이 거의 관찰되지 않았으나 MRS 배지에 접종하였을 경우에는 균수가 급격히 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 *L. plantarum* DSB05는 MRS 배지에서의 장기배양이 적합지 않음을 나타내었다.

상기의 혼합배양과 단독배양으로 제조한 종균의 저장 안정성에 대해 조사하였다. 종균 배양액을 냉장 상태에 보관하였을 경우, *L. casei* DSB03 균주 단독배양보다는 *L. plantarum* DSB05 균주와의 혼합배양의 경우가 저장 중의 균수 변화가 거의 없었으나, MRS 배지의 경우에는 균수의 저하현상이 뚜렷하였다(그림 63A). 한편, *L. plantarum* DSB05 균주의 경우, GYC 배지에서는 매우 안정한 경향을 나타내었으나 MRS 배지에서는 균수의 급격한 저하현상을 나타내었다(그림 63B). 이러한 현상은 상온저장시에도 유사한 경향을 나타내었다(그림 64).

이상의 실험 결과를 종합해 보면, *L. casei* DSB03 균주보다는 *L. plantarum* DSB05 균주가 GYC 배지에 상대적으로 더 안정한 경향을 나타내었으며, 또한 *L. casei* DSB03 균주와 *L. plantarum* DSB05를 필요에 따라 혼합배양 하더라도 GYC 배지를 사용할 경우에는 균주 상호간에 영향이 거의 없는 것으로 판단되었다.

(A)



(B)

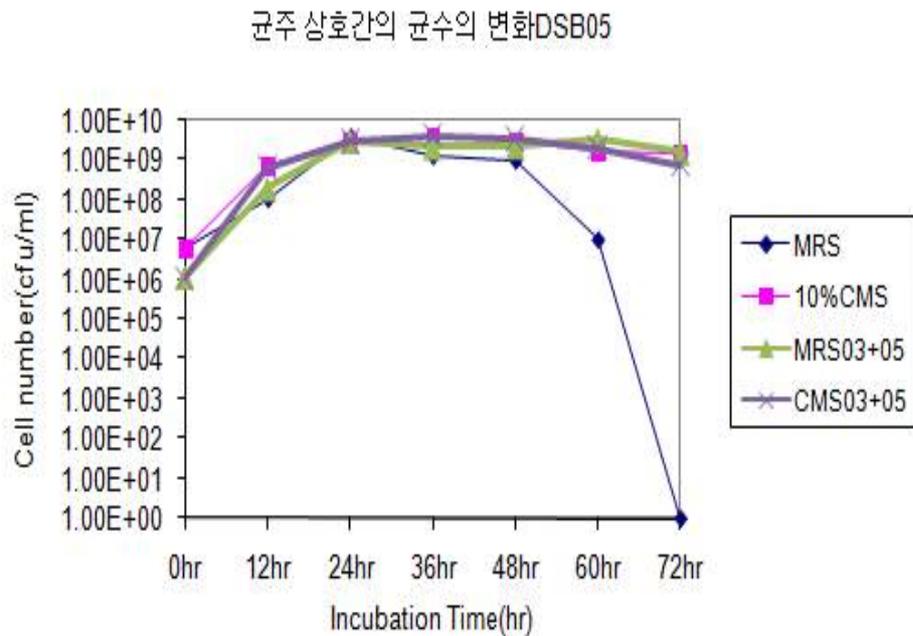
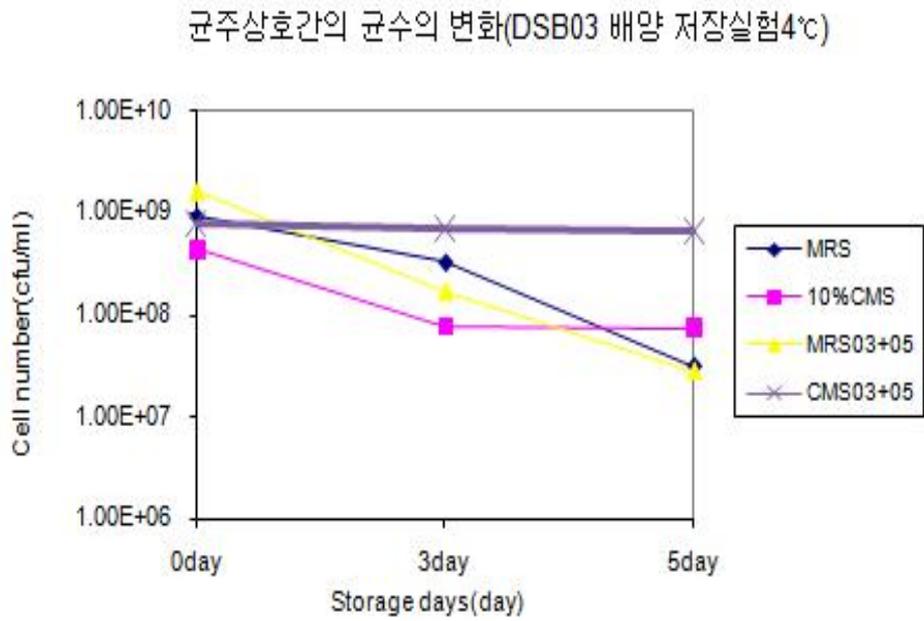


그림 62. GYC and MRS medium에서 *L. casei* DSB03 (A) and *L. plantarum* DSB05 (B) 의 단일배양과 혼합배양의 비교

(A)



(B)

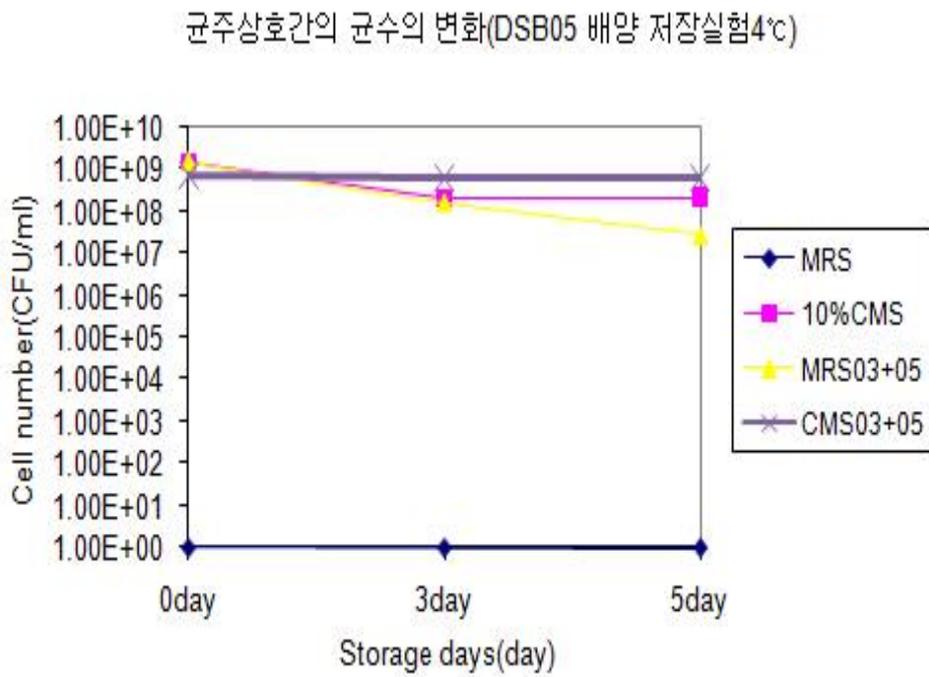
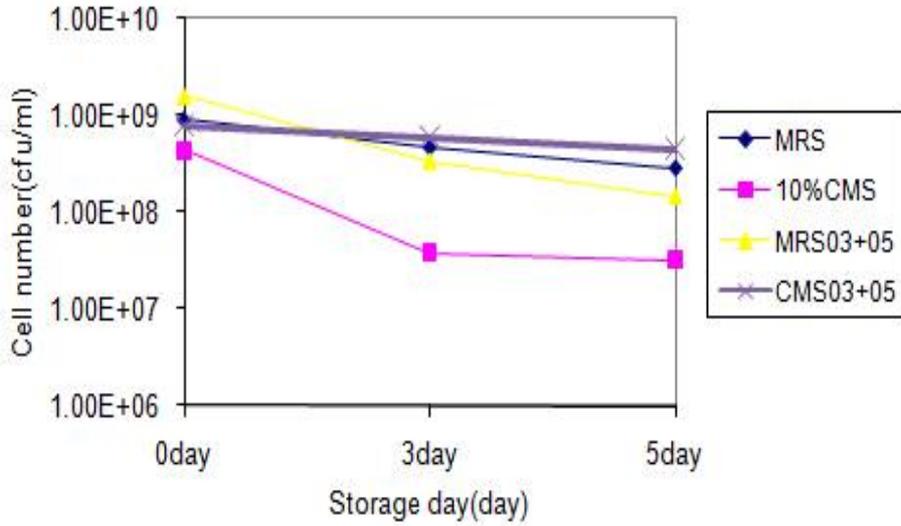


그림 63. 4℃에서 *L. casei* DSB03 (A) and *L. plantarum* DSB05 (B) 의 단일배양과 혼합배양의 비교

(A)

균주상호간의 균수의 변화(DSB03 배양 저장실험RT)



(B)

균주상호간의 균수의 변화(DSB05 배양 저장실험RT)

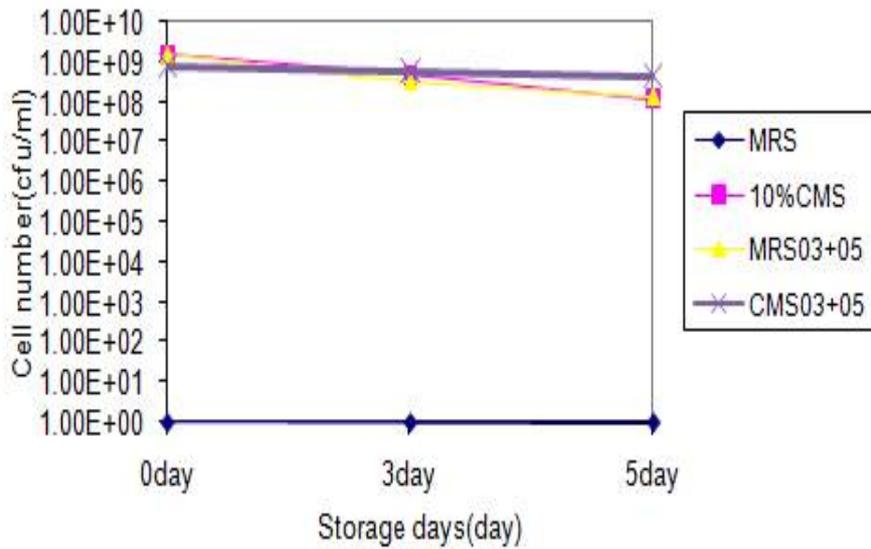


그림 64. 25°C에서 *L. casei* DSB03 (A) and *L. plantarum* DSB05 (B) 의 단일배양과 혼합배양의 비교

## 라. Pilot scale 적용 실험

### (1) 재료 및 방법

최종 선발된 유산균(*L. casei* DSB03, *L. plantarum* DSB05)을 대량생산 공정에 적용하기 위한 사전단계로서, jar fermentor 수준에서의 scale-up 실험을 실시하였다. Flask 실험을 통해 균주 상호간의 길항작용을 나타내지 않는 것으로 나타났기 때문에, 본 실험에서는 두 균주의 혼합배양을 실시하였다. *L. casei* DSB03와 *L. plantarum* DSB05 균주를 GYC 액체배지(2L)에 0.1%(v/v)씩 ( $2 \times 10^6$ /ml)씩 접종하였으며, 37°C에서 교반배양(130rpm) 및 정치배양으로 72시간 배양하였다. 유산균수의 측정을 위해 접종 후 0h, 16h, 28h, 40h, 52h, 64h, 72h마다 샘플링하여 생리식염수로 희석하였으며, MRS agar(0.02% Na-azide 첨가)에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 유산균수를 측정하였다.



그림 65. 실험에 사용한 jar fermentor (5 liter 규모)의 모습

### (2) 결과

*L. casei* DSB03와 *L. plantarum* DSB05 균주를 GYC 배지(2L)에 각각 0.1%(v/v)씩 혼합 접종한 후, 37°C에서 72시간 동안 교반(130rpm) 또는 정치배양을 실시하였다. 정치 배양의 경우 배양 28시간만에 성장정지기에 도달하였으며, 이 시점의 균수는  $3.5 \times 10^9$ /ml ~  $2.6 \times 10^9$ /ml 수준이었다. 교반배양에서도 정치배양과 매우 유사한 경향을 나타내었는데, 이는 flask 실험에서도 나타난 바와 같이 종균의 증식속도나 최종 균수 측면에서 볼 때 정치배양과 교반배양 간의 차이는 거의 없는 것으로 판단되었다(그림 66). 교반배양과 정치배양에서 균의 증식속도나 최종 균수에서 차이가 서로 미미하였기 때문에, 산업적 적용 상황에 따라 교반 또는 정치배양 모두 적용 가능할 것으로 판단되었다.

한편, 배양 중의 pH 변화를 관찰한 결과, 배양시간과 병행하여 pH가 감소하기 시작하여 정치배양의 경우에는 배양 28시간 이후에 pH 5.5 수준으로 감소하였다. 교반배양의 경우에는 최종 pH가 4.5로 감소하여, 균의 저장 안정성에 나쁜 영향을 줄 수 있음을 시사하였다. 한편, 교

반배양과 정치배양간의 pH 차이는 1 정도 차이났는데, 균의 안정성 측면에서 pH가 낮은 편이 일반적으로 불리한 점을 고려할 때, 산업적으로 적용시에는 정치배양이 더 우수할 것으로 판단되었다(그림 67). 또한, 배양기간이 길어짐에 따라 정치배양과 교반배양 공히 균수 저하현상이 나타나므로, 성장정지기에 도달한 직후에 배양을 종료하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

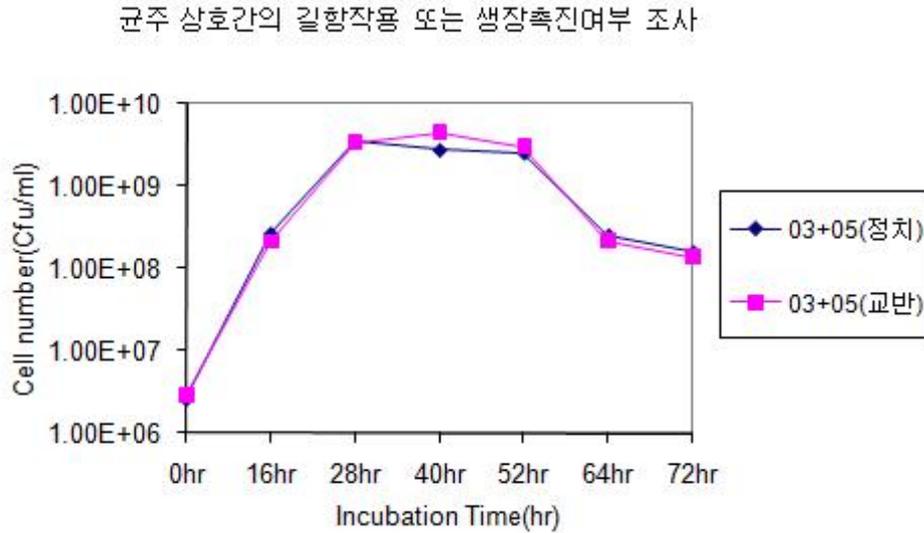


그림 66. jar fermentation에서 *L. casei* DSB03 and *L. plantarum* DSB05 의 균주 상호간의 길항작용 또는 성장촉진여부 조사(성장곡선).

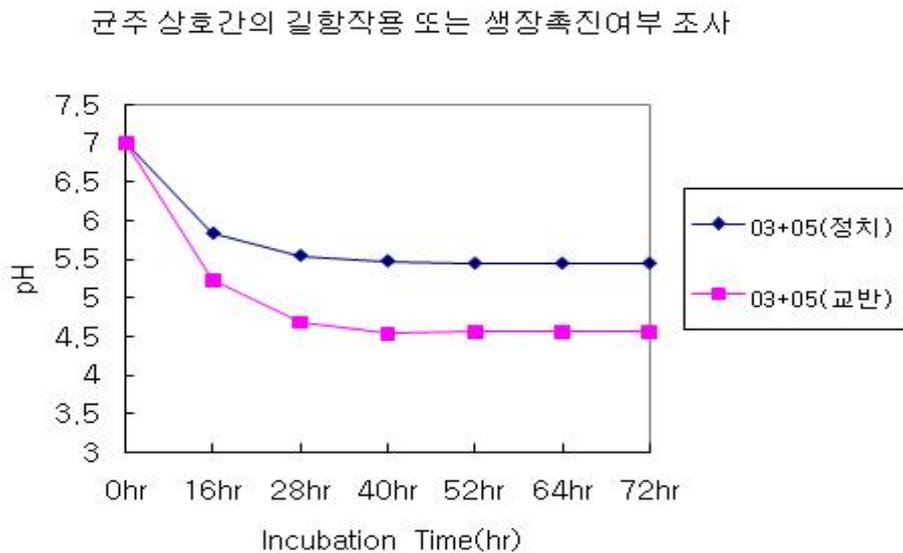


그림 67. jar fermentation에서 *L. casei* DSB03 and *L. plantarum* DSB05 의 균주 상호간의 길항작용 또는 성장촉진여부 조사(pH).

### 3. TMF용 품질관리기준 설정

TMF 품질관리기준을 설정하기 위한 기초 data를 확보하기 위해, TMF를 제조 및 저장 중의 미생물의 경시변화, pH 변화, 유기산 함량 변화, 에탄올 생성량 변화 등을 조사하였다.

#### 가. TMR 저장중 미생물의 경시변화 관찰

##### (1) 재료 및 방법

##### (가) TMR의 제조

CMS 첨가유무에 따른 TMF 저장중 미생물의 생장을 조사하기 위하여 TMR(Total Mixed Ratio)을 표 64의 배합비에 따라 제조하였다.

표 64. Total Mixed Ration (TMR) 배합비

원료	%
옥수수	10.0
flaked corn	10.0
단백피	5.8
당밀	3.0
맥주박	20.0
면실피	2.0
미강	15.0
전지면실	4.0
청취	4.0
팜박	5.0
벗집	7.0
소금	0.2
중조	0.5
석회석	0.5
D.W.	7.9
합계	100.0

컴퓨터 프로그램에 따라 자동계량 및 최종배합이 끝난 TMR(20kg/batch)을 CMS (Concentrated Molasses solubles) CMS 첨가 또는 무첨가구로 구분하였으며, 본 연구팀이 최

중 선발한 *Aspergillus oryzae*(A. O.), *Saccharomyces cerevisiae*(Yeast), *Lactobacillus* 2종 (LAB)을 종류 및 농도별로 접종하였다. 각 종균의 균수는 A. O.  $5.0 \times 10^6$ /ml, Yeast  $2.6 \times 10^8$ /ml, LAB  $8.7 \times 10^9$ /ml 이었다.

각각의 처리구는 표 65에서 보는 바와 같다. 모든 처리구의 TMF 수분 함량은 40% 수준으로 조정하였다. 완성된 TMF는 각 계절의 평균온도를 감안하여 각 온도별(4°C, 15°C, 30°C)로 저장하면서 28일간 주기적으로 sampling 하였으며, 적절히 희석한 후에 물리, 화학적 및 미생물학적 변화를 조사하였다.

표 65. 저장성 시험 배치

No.	처리구
1 (C)	무첨가구 (control)
2 (L 0.5%)	LAB 0.5%
3 (L 1%)	LAB 1.0%
4 (YL 0.5%)	LAB + yeast 0.5%
5 (YL 1%)	LAB + yeast 1%
6 (AYL 0.5%)	LAB + yeast + A. O. 0.5%
7 (AYL 1%)	LAB + yeast + A. O. 1%
8 (C-CMS)	무첨가구 (CMS 10%)
9 (L 0.5%-CMS)	LAB 0.5% (CMS 10%)
10 (L 1%-CMS)	LAB 1% (CMS 10%)
11 (YL 0.5%-CMS)	LAB + yeast 0.5% (CMS 10%)
12 (YL 1%-CMS)	LAB + yeast 1% (CMS 10%)
13 (AYL 0.5%-CMS)	LAB + yeast + A. O. 0.5% (CMS 10%)
14 (AYL 1%-CMS)	LAB + yeast + A. O. 1% (CMS 10%)

(나) 저장중 미생물 수의 변화

① Lactic acid bacteria 수 측정

저장기간 동안 sampling한 시료를 십진희석법으로 적절히 희석한 후, 0.02% Na-azide가 첨가된 MRS agar(Difco)에 도말하였으며, 37℃에서 48시간 배양한 후 균수를 측정하였다.

② Yeast 수 측정

저장기간 동안 sampling한 시료를 십진희석법으로 적절히 희석한 후, tartaric acid을 이용하여 pH 3.5로 조정된 PDA agar(Difco)에 도말하였으며, 30℃에서 24~48시간 배양한 후 균수를 측정하였다.

③ *Aspergillus oryzae* 수 측정

저장기간 동안 sampling한 시료를 십진희석법으로 적절히 희석한 후, tartaric acid을 이용하여 pH 3.5로 조정된 PDA agar(Difco)에 도말하였으며, 30℃에서 48~72시간 배양한 후 균수를 측정하였다.

(다) 저장중 pH 변화

저장기간 동안 sampling한 TMF 10g에 0.85% NaCl 90ml을 넣고 잘 혼합한 후에, pH meter(Thermo)를 사용하여 pH를 측정하였다.

(라) 저장중 유기산 및 에탄올 생성패턴 변화

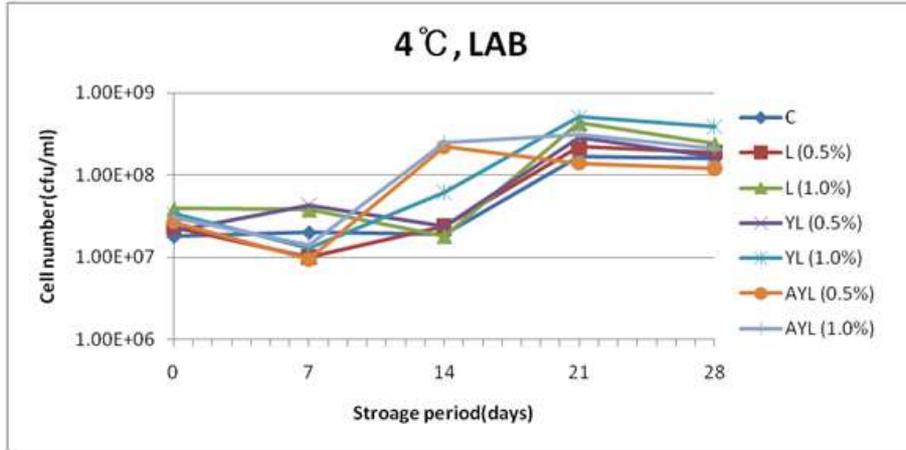
TMF 저장중 각 처리구간의 유기산 생성 패턴을 조사하였다. 저장기간 동안 주기적으로 TMF를 샘플링한 후에 유기산 함량을 HPLC로 분석하였다. 샘플링한 시료를 원심분리한 후 0.45µm syringe filter로 filtration하여 TMF와 균체를 제거한 다음, 상등액은 HPLC로 분석하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. HPLC 기기는 Agilent 1100 시스템을 사용하였으며, 측정용 detector로는 RI(refractive index)를 사용하였다. 분석에 사용한 column은 BioRad사의 Aminex HP-87 (7.8\*300mm) 이었으며, column cabinet 온도는 40℃를 유지하였다. 한편, HPLC eluent는 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액이었고 flow rate는 0.6ml/min 이었으며, Chemstation S/W를 이용하여 peak detection 및 calibration 등을 하여 최종적으로 결과를 얻었다.

(2) 결과

(가) TMF 저장 중 미생물 수의 변화

① TMF 저장 중 LAB의 변화

(A)



(B)

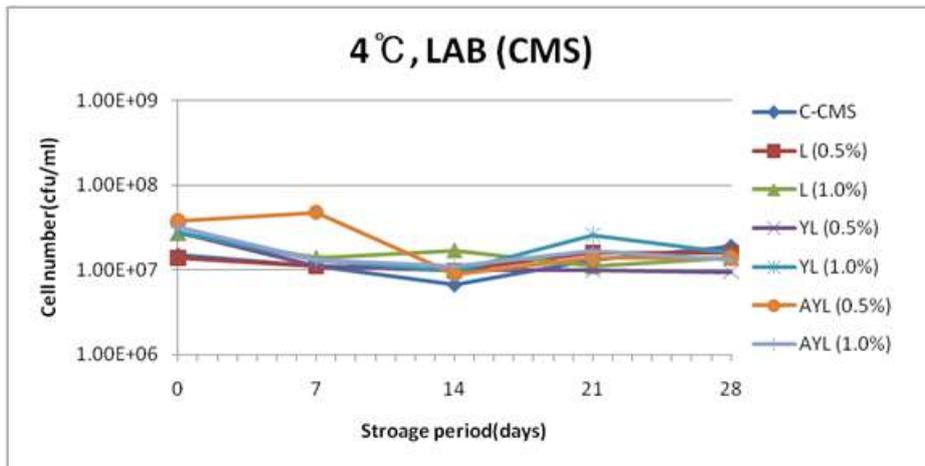
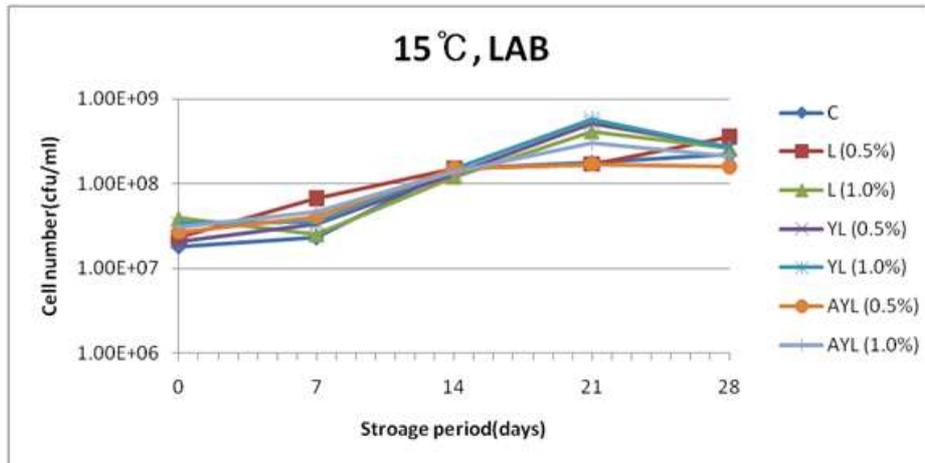


그림 68. 4°C에서 TMF 저장시 LAB counts 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 LAB 변화를 관찰한 결과는 그림 68에서 보는 바와 같다. CMS 무첨가구의 경우, 대부분의 처리구에서 저장 2주까지는 큰 변화를 나타내지 않았고 2주 이후부터 증가하는 추세를 나타내었다. Yeast와 AO첨가구의 경우에는 저장 1주 이후부터 LAB 수가 증가하는 추세를 나타내었으며, 최고 시점의 유산균수는  $5.1 \times 10^8/\text{ml} \sim 1.4 \times 10^8/\text{ml}$  수준에 도달하였다. 저장 1-2주후부터 유산균수가 증가한 것은, 저장 중 TMF 발효열에 의해 내부온도가 약간 상승함에 의한 가능성을 시사하였다.

한편 CMS-TMF의 경우, 모든 처리구에서 28일간 유산균수가 거의 변화없이 일정하게 유지되었다. 이는 CMS 10% 첨가로 인해 저장기간 중 유산균의 생장이 억제되었음을 시사하였다.

(A)



(B)

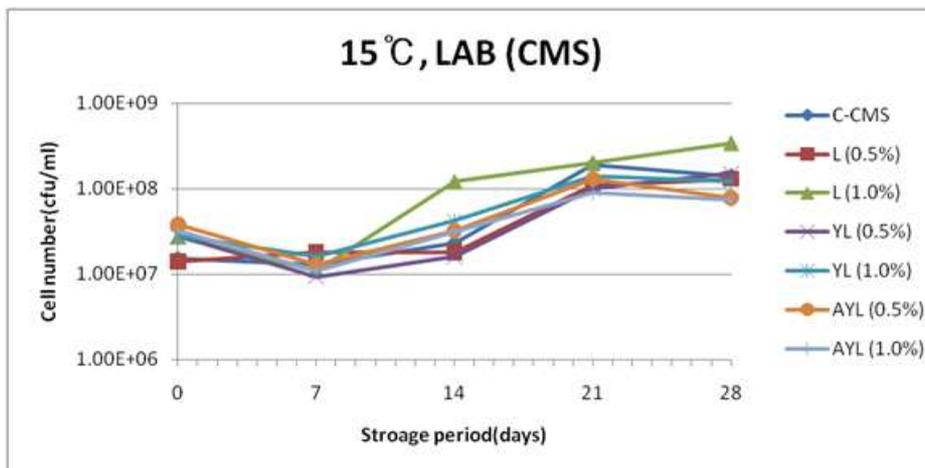
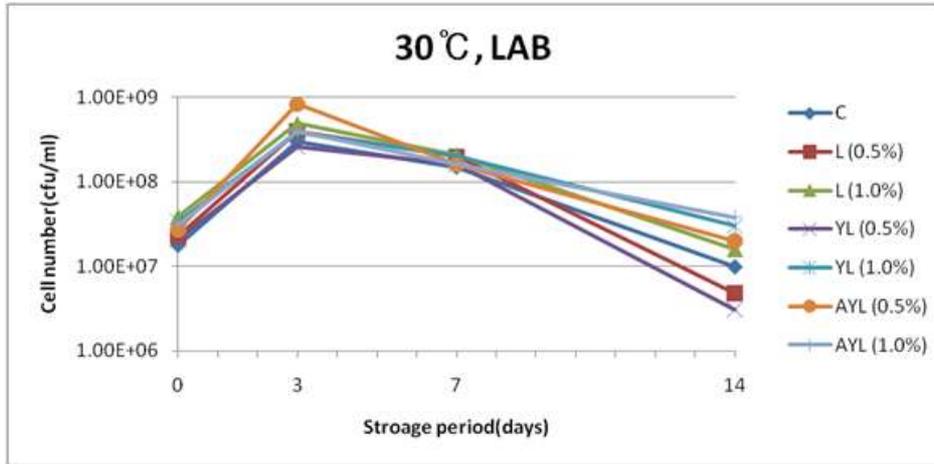


그림 69. 15°C에서 TMF 저장시 LAB counts 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 LAB 변화를 관찰한 결과는 표 69에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 초기부터 저장 3주까지 완만한 증가추세를 나타내었고, 2주 만에 모든 처리구에서 10<sup>8</sup>/ml 수준에 도달하였으며, 이후부터는 정체기에 접어들었다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 2주후부터 유산균수가 증가하는 경향을 나타내었으며, 저장 3주 이후에 거의 모든 처리구에서 10<sup>8</sup>/ml 수준에 도달하였다.

(A)



(B)

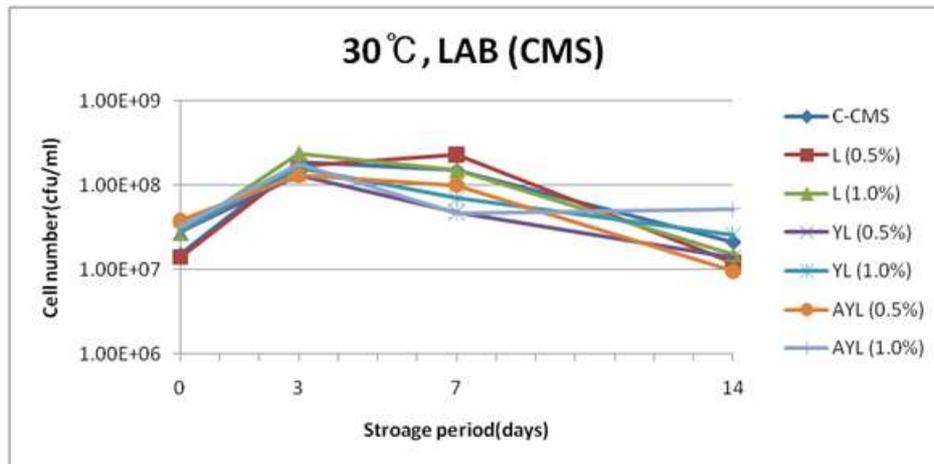


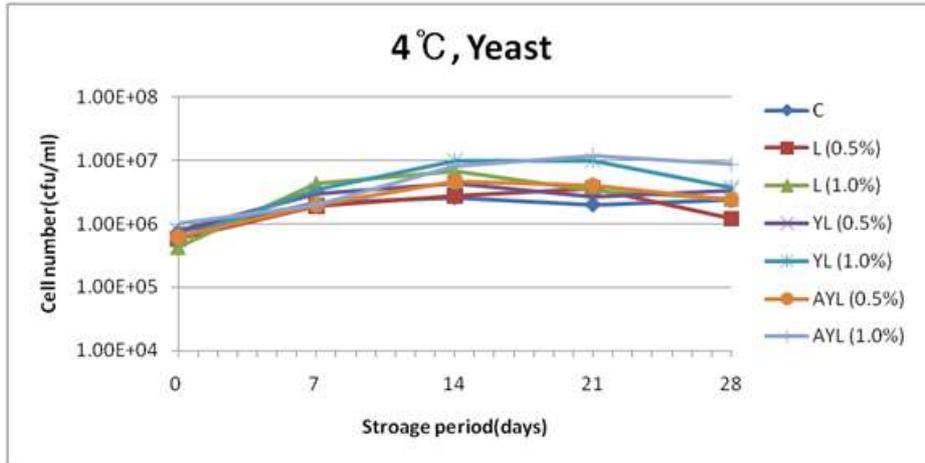
그림 70. 30°C에서 TMF 저장시 LAB counts 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 LAB 변화를 관찰한 결과는 그림 70에서 보는 바와 같다. CMS 무첨가구의 경우, 모든 처리구에서 저장 3일까지 균수가 급격히 증가하였으며, 이 시점의 균수는  $8.3 \times 10^8 / \text{ml}$  ~  $2.6 \times 10^8 / \text{ml}$  수준에 도달하여 각 저장온도 중에서 가장 높은 균수를 나타내었다. 반면, 저장 3일 이후부터는 모든 처리구에서 유산균수가 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 3일까지 균수가 급격히 증가하여  $2.9 \times 10^8 / \text{ml}$  ~  $1.3 \times 10^8 / \text{ml}$  수준에 도달하였으며, 이후부터 CMS 무첨가구에 비해 상대적으로 완만한 속도로 감소하는 추세를 나타내었다. 이는 온도가 높은 여름철에 CMS 첨가가 TMF의 저장성을 높이는 효과가 있을 것으로 판단되었다.

② TMF 저장 중 Yeast의 변화

(A)



(B)

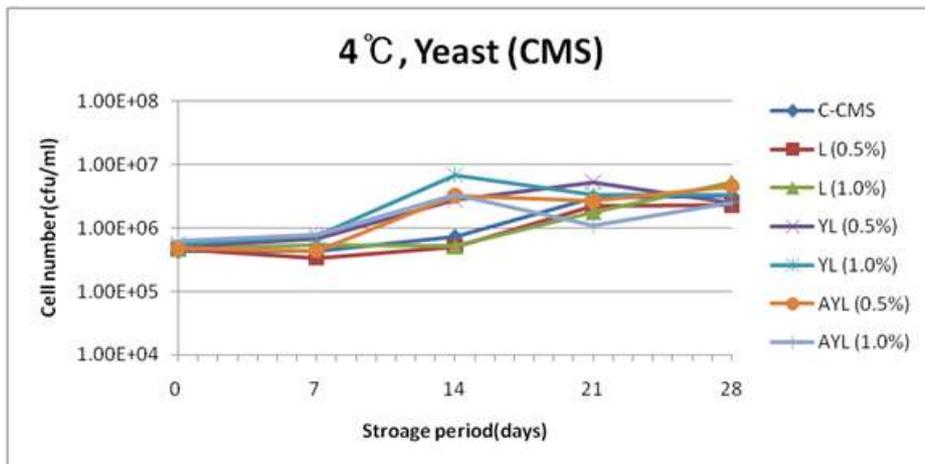
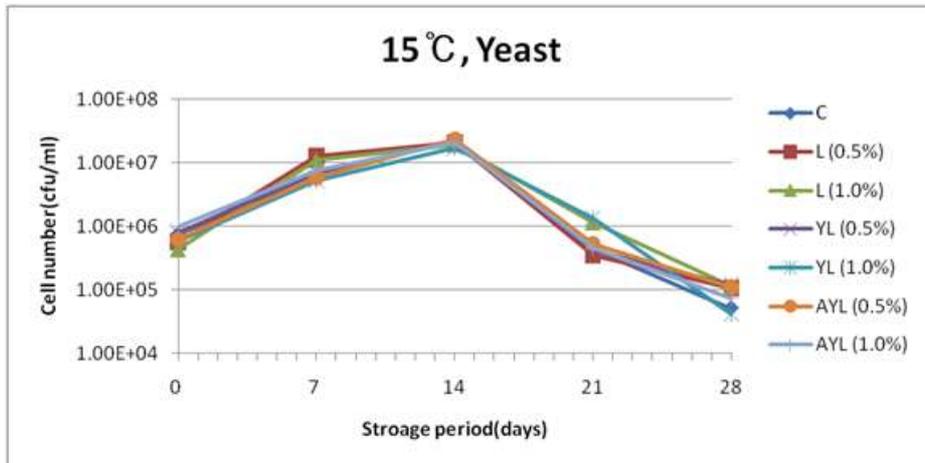


그림 71. 4°C에서 TMF 저장시 yeast count counts 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 수의 변화를 관찰한 결과는 그림 71에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 전체적으로 완만한 증가 추세를 나타내었으며, 그 중에서 AYL (1.0%) 첨가구 및 YL(1.0%) 첨가구의 효모균수가 상대적으로 가장 높은 경향을 나타내었다.

한편 CMS-TMF의 경우에도 모든 처리구에서 균수가 완만한 증가추세를 나타내었다.

(A)



(B)

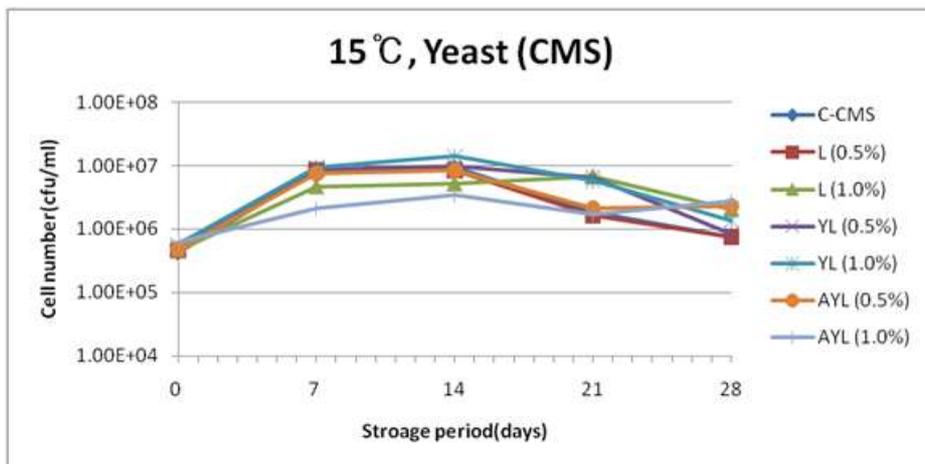
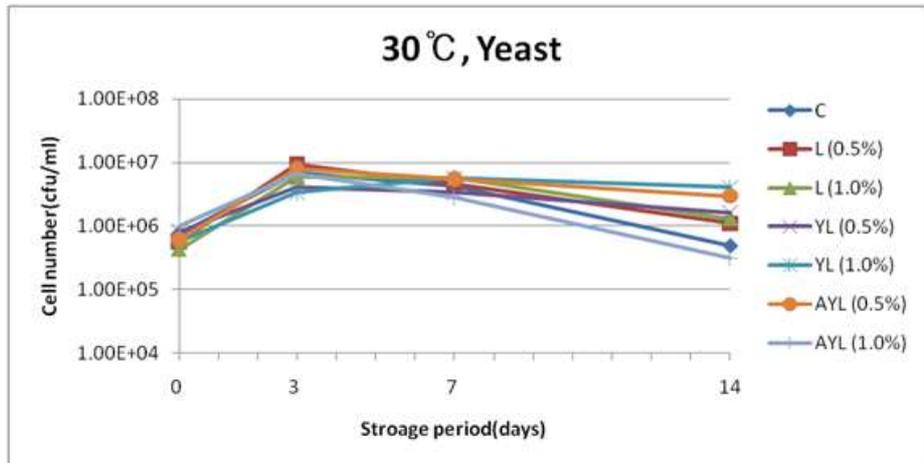


그림 72. 15°C에서 TMF 저장시 yeast count counts 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 수의 변화를 관찰한 결과는 그림 72에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 2주까지 증가추세를 나타내다가 2주 이후부터 균수가 급격히 감소하는 추세를 나타내었다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 2주까지 완만한 증가추세를 나타내었으며, 이후부터도 완만한 감소추세를 나타내어, 저장 4주후에도 거의 모든 처리구에서 10<sup>6</sup>/ml 이상을 유지하였다. 특히, AYL(1.0%) 첨가구와 YL(1.0%) 첨가구가 저장기간동안 상대적으로 높은 균수를 유지하였다. CMS 첨가가 봄, 가을의 경우에는 효모수의 유지에 긍정적인 영향을 주고 있음을 시사하였다.

(A)



(B)

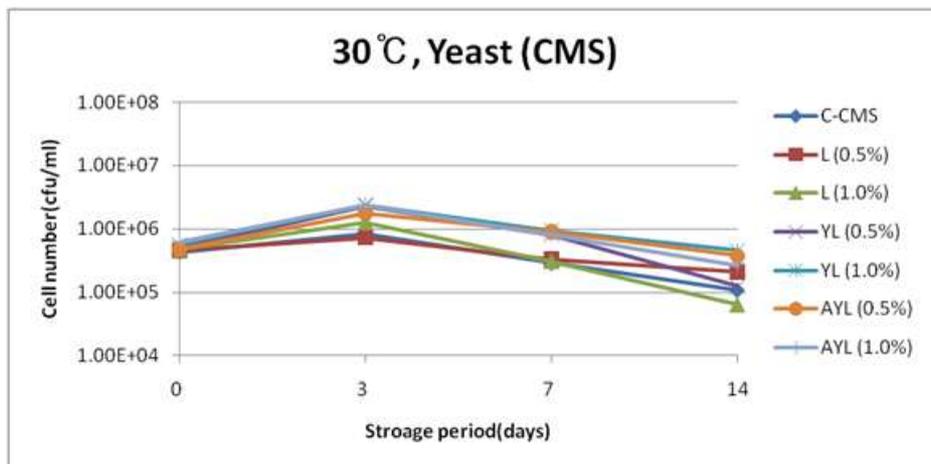


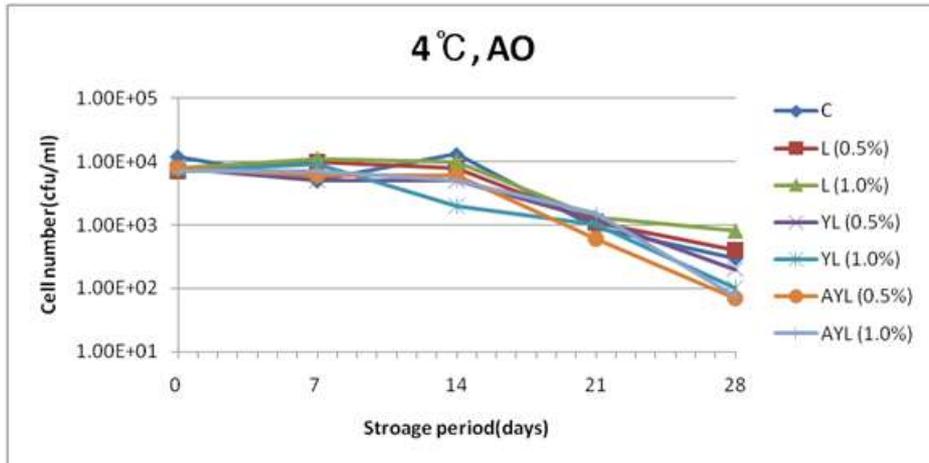
그림 73. 30°C에서 TMF 저장시 yeast count counts 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 수의 변화를 관찰한 결과는 그림 73에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 3일까지 모든 처리구에서 급격한 증가추세를 나타내었다가 이후부터 감소추세를 나타내었으며, AYL 첨가구와 LY 첨가구가 상대적으로 높은 균수를 유지하였다.

한편 CMS-TMF의 경우, 전체적인 효모성장 패턴은 CMS 비처리구와 유사하였으나, 전체적인 균수는 상대적으로 낮은 편이었다. 또한, CMS 비처리구와 마찬가지로 AYL 및 YL 처리구가 상대적으로 높은 균수를 나타내었다.

③ TMF 저장 중 *A. O.*(*Aspergillus oryzae*)의 변화

(A)



(B)

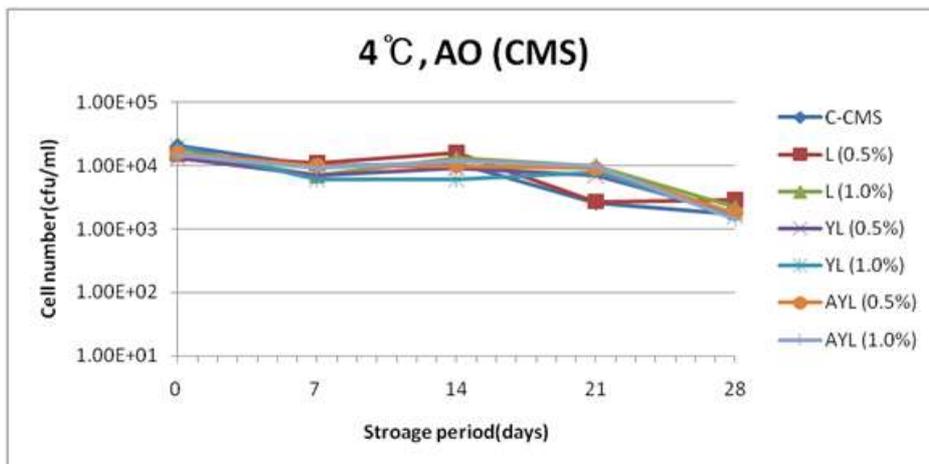
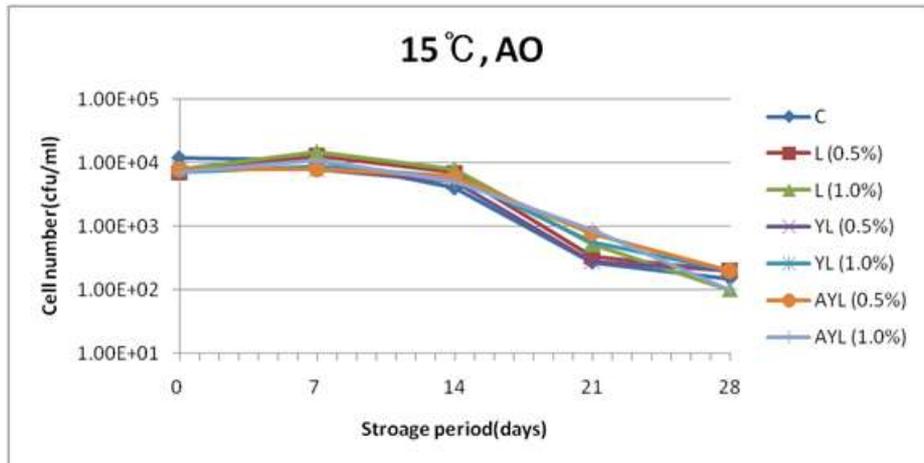


그림 74. 4°C에서 TMF 저장시 *A. oryzae* counts 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 *A. O.*(*Aspergillus oryzae*) 수의 변화를 관찰한 결과는 그림 74에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, *A. O.* 숫자는 저장 2주까지 변화없이 유지되다가 2주 이후부터 모든 처리구에서 급격히 감소하는 추세를 나타내었다.

한편 CMS-TMF의 경우, 거의 모든 처리구에서 저장기간중 *A. O.* 균수가 초기에 비해 변화없이 유지되었으며, 저장 3주 이후부터 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 CMS 처리가 *A. O.* 숫자를 유지하는데 긍정적인 영향을 준다는 것을 시사하였다.

(A)



(B)

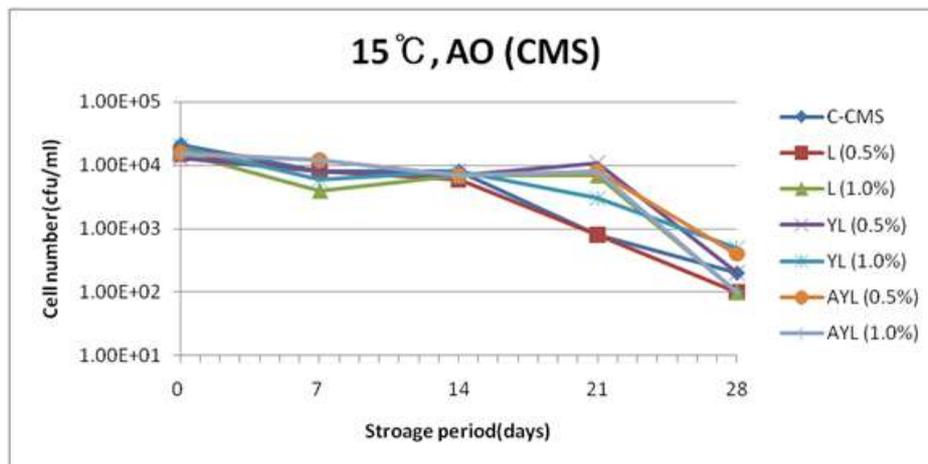
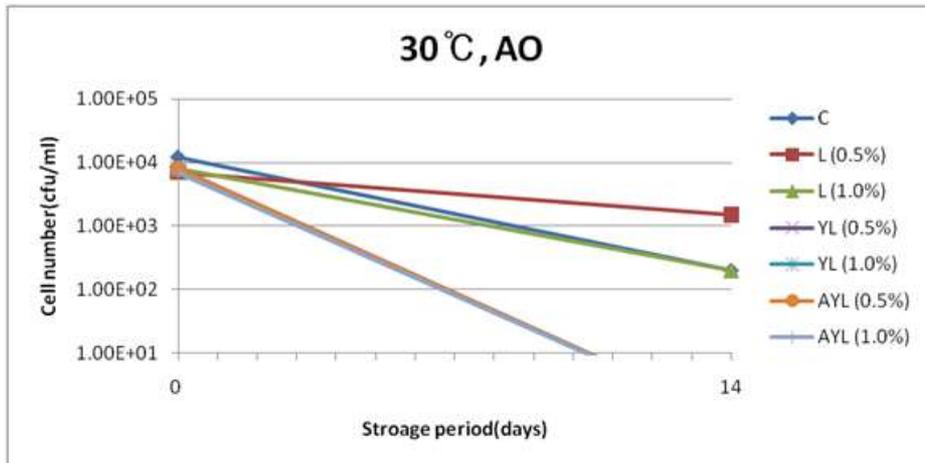


그림 75. 15°C에서 TMF 저장시 *A. oryzae* counts 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 *A. O.*(*Aspergillus oryzae*) 수의 변화를 관찰한 결과는 그림 75에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 1주까지는 균수가 변화없이 유지되다가 1주 이후부터 점진적으로 감소하는 추세를 나타내었다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 2-3주까지 균수의 변화없이 유지되다가 그 이후부터 감소하기 시작하였다. *A. O.* 감소시점이 CMS 비처리구에 비해 1주일 정도 연기되는 경향을 나타내었다. 2개 처리구 모두 *A. O.*의 증가는 기대할 수 없었는데, 이는 퇴비 부숙이나 일반적인 고상배양과는 달리 TMF에 함유된 유산균과 효모에 의해 *A. O.*가 억제되고 있음을 시사하였다.

(A)



(B)

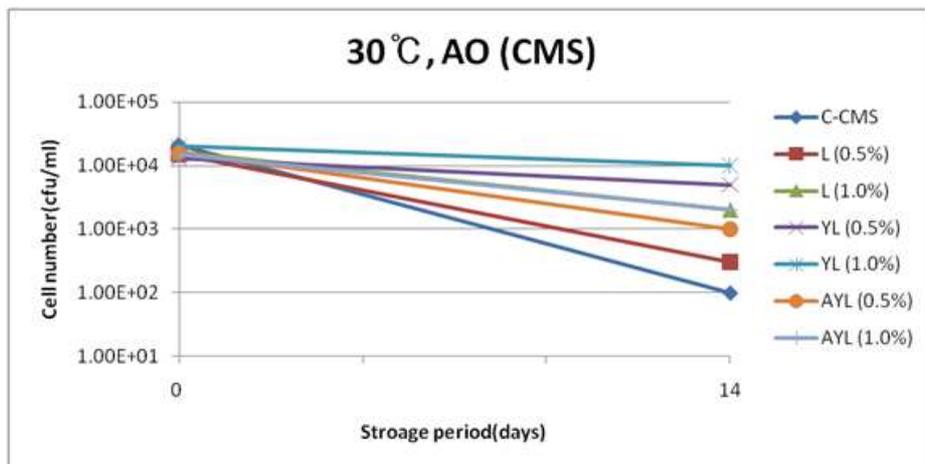
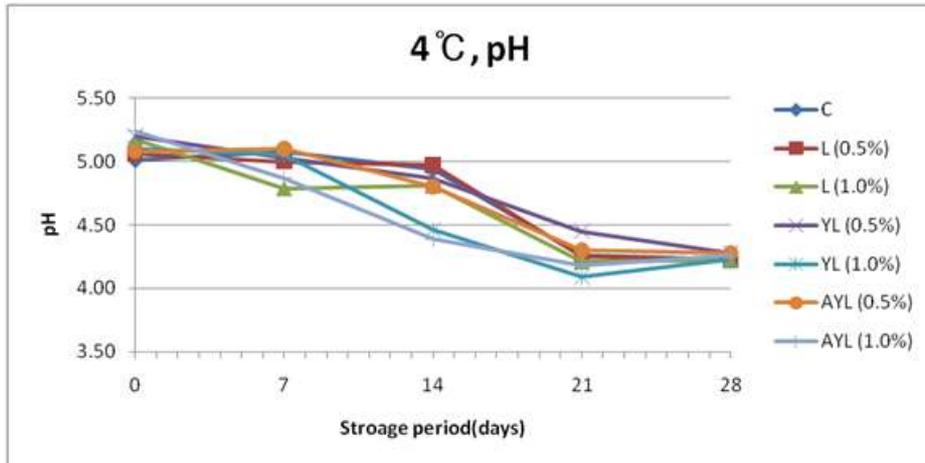


그림 76. 30°C에서 TMF 저장시 *A. oryzae* counts 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 *A. O.*(*Aspergillus oryzae*) 수의 변화를 관찰한 결과는 그림 76에서 보는 바와 같다. 30°C에서 14일간 저장 중 모든 TMF에서 *A. O.* 수가 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 15°C 저장구와 마찬가지로, 퇴비 부숙이나 일반적인 고상배양과는 달리 TMF에 함유된 유산균과 효모의 생장에 의해 *A. O.*가 억제되고 있음을 시사하였다.

(나) TMF 저장 중 pH의 변화

(A)



(B)

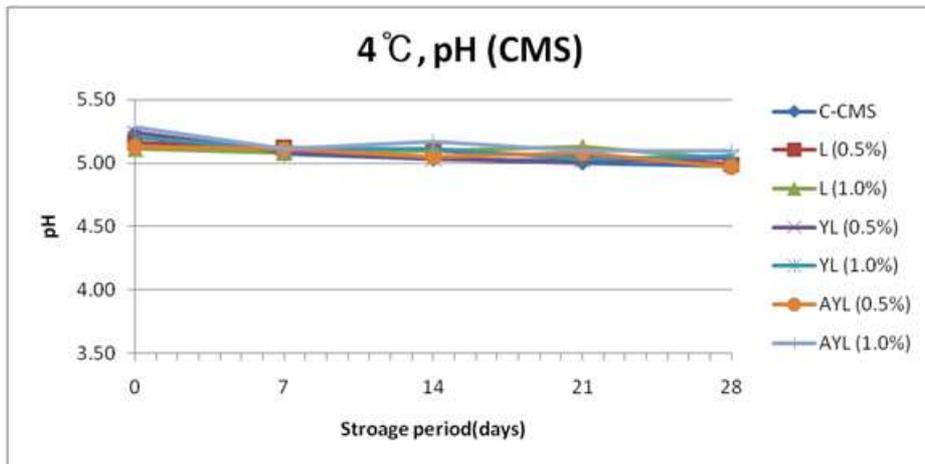
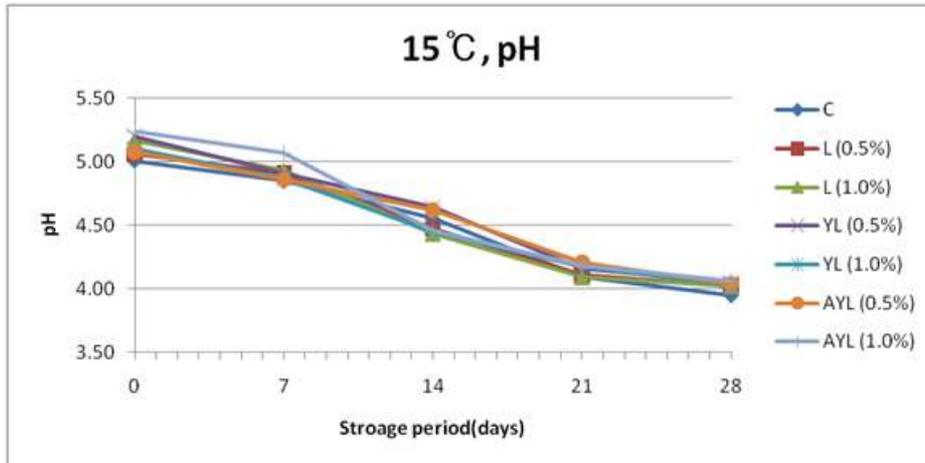


그림 77. 4°C에서 TMF 저장시 pH 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 pH 변화를 관찰한 결과는 그림 77에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 첨가된 미생물 종류에 관계없이 시간경과에 따라 서서히 감소하여 저장 3주 후에 pH 4.1~4.5 수준에 도달하였다. 이러한 경향은 유산균수의 증가패턴 (그림 78)과 유사하였는데, 저온에서 저장하더라도 발효열에 의해 내부온도가 약간 상승하였기 때문에 나타나는 것으로 추측되었다.

한편 CMS-TMF의 경우, 비처리구와는 달리 4주간 저장하여도 pH 5.0 부근을 유지하였다. 이는 CMS에 의해 미생물의 생장이 억제되어 pH가 변화없이 유지되었음을 시사하였다.

(A)



(B)

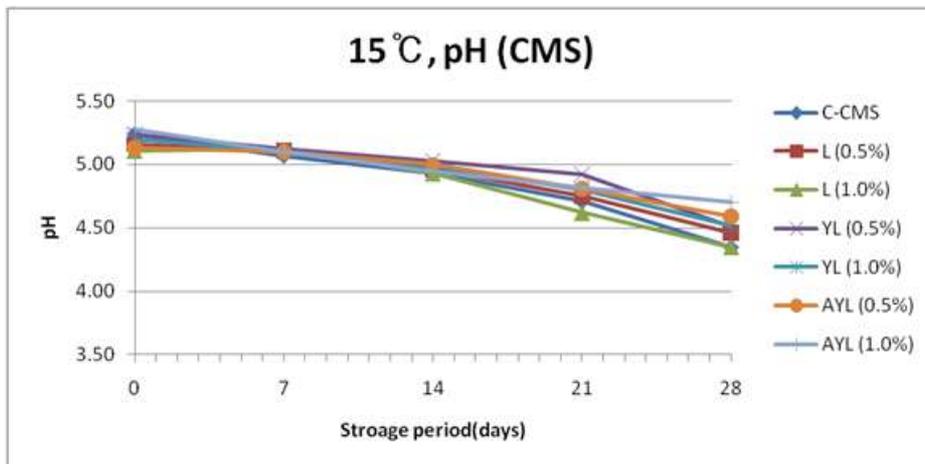
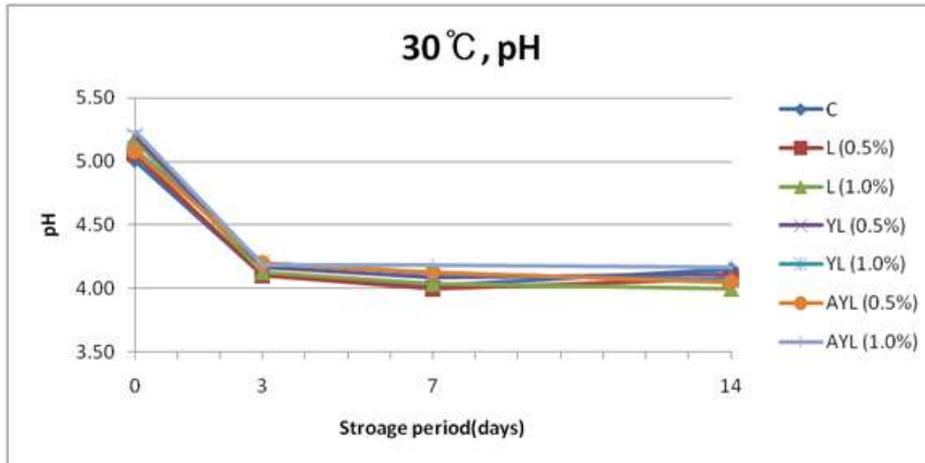


그림 78. 15°C에서 TMF 저장시 pH 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 pH 변화를 관찰한 결과는 그림 78에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 첨가된 미생물 종류에 관계없이 저장기간에 따라 점진적으로 pH가 감소하는 경향을 나타내어, 저장 2주 후에는 pH 4.5 부근, 저장 4주 후에는 pH 4.0 부근에 도달하였다.

한편 CMS-TMF의 경우, CMS 비처리구보다는 pH 감소폭이 완만하였으며, 저장 4주후에야 pH 4.5 부근에 도달하였다. 이는 CMS가 접종한 미생물의 성장을 억제하여 pH의 변화폭을 감소시킨 것으로 판단된다.

(A)



(B)

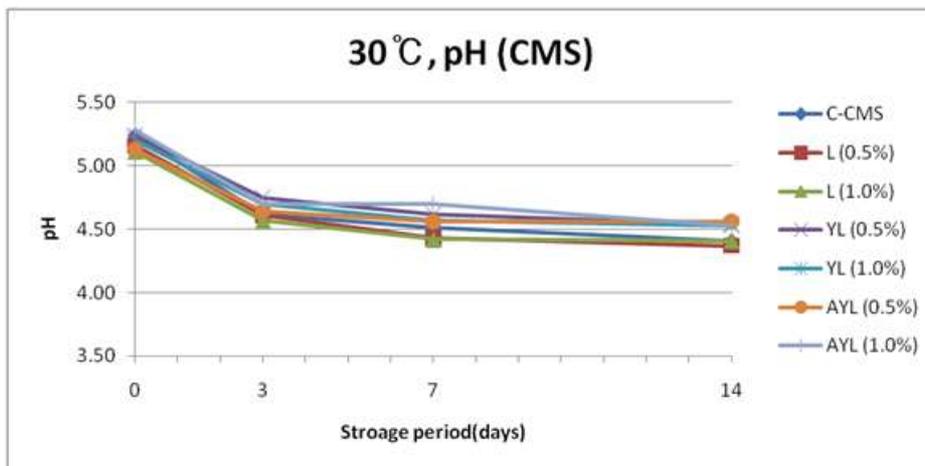


그림 79. 30°C에서 TMF 저장시 pH 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 pH 변화를 관찰한 결과는 그림 79에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 초기부터 모든 처리구에서 pH가 급격히 저하하여 pH 4.2 부근에 도달하였으며, 저장 3일 이후부터는 pH 변화는 거의 나타나지 않았다.

CMS-TMF의 경우에도 전체적인 pH 저하 양상은 비처리구와 유사하였으나, 저장 2주 후에 부터 pH 4.5수준을 유지하였다. 이는 CMS에 의해 미생물의 생장이 억제되어 CMS 무첨가구에 비해 상대적으로 높은 pH가 유지되고 있음을 나타내었다.

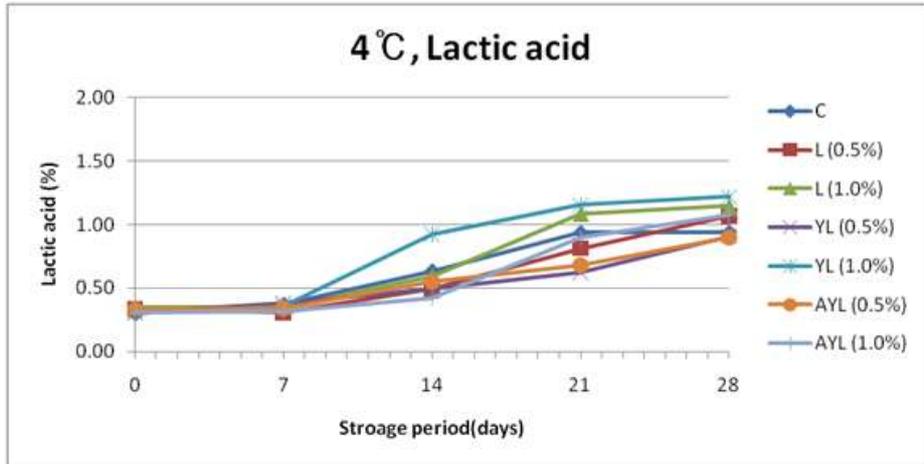
(다) TMF 저장 중 유기산 생성

① TMF 저장 중 lactic acid 생성 패턴

일반적으로 사일리지에서 발효형태에 따른 유기산 함량은 품질평가에 있어 하나의 중요한 척도가 된다. 그 중에 특히 젖산(lactic acid)과 낙산(butyric acid)은 조사료의 품질에 있어 매우 중요한 영향을 끼친다. 특히 낙산의 경우 함량이 많은 경우에는 반추가축이 산중독에 걸릴 위험이 있기 때문에 주의하여야 한다.

본 연구팀이 제조한 TMF를 온도별로 저장하면서 생성된 유기산 함량을 조사하였다. 전체적으로 TMF의 기호성과 품질에 좋은 영향을 미치는 lactic acid와 ethanol의 함량은 높은 것으로 나타났다. 반면, 불량발효의 정도를 나타내는 기준이 되는 butyric acid와 쓴맛을 내는 acetic acid의 함량은 낮은 것으로 나타났기 때문에, 제조한 TMF는 유기산 측면에서 볼 때 품질이 우수한 것으로 판단된다. 유기산 생성에 대한 자세한 실험 결과는 다음과 같다.

(A)



(B)

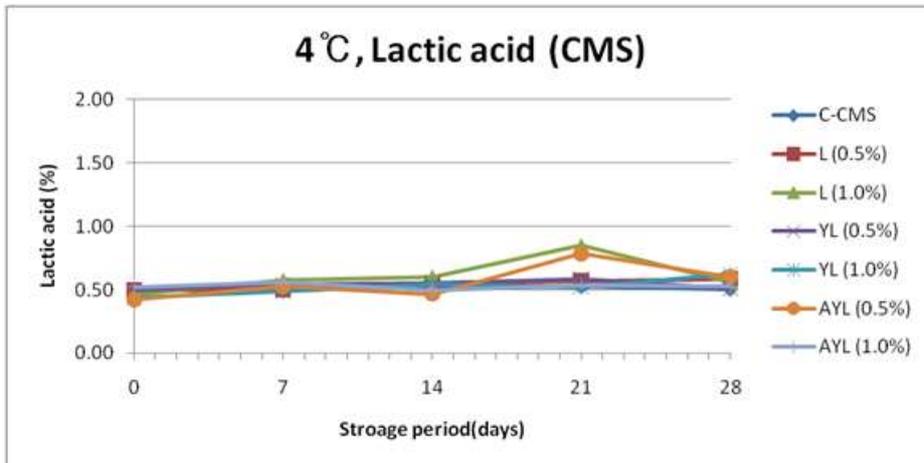


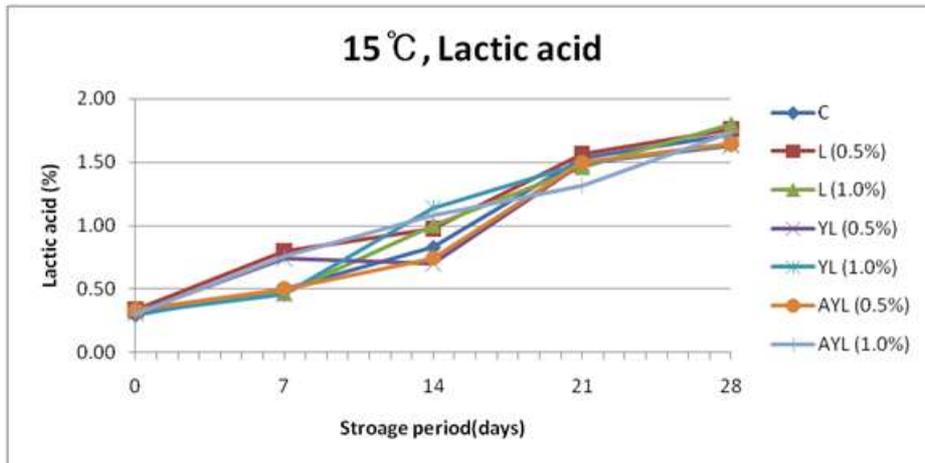
그림 80. 4°C에서 TMF 저장시 젖산 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 젖산함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 80에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 1주까지 증가하지 않다가 1주 이후부터 증가하기 시작하여 저장 4주후에는 0.9 ~ 1.2% 수준에 도달하였다. 그중에서도 L(LAB) 1.0% 첨가구와 YL(Yeast+LAB) 1.0% 첨가구에서 젖산함량이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장기간 동안 젖산함량이 증가하지 않고 일정수준을 유지하였다. 이는 CMS에 의해 LAB의 성장이 억제되었기 때문에 마찬가지로 젖산함량도 증가하지 않은 것으로 보인다.

따라서, 온도가 저온인 겨울철에는 TMF에 CMS를 첨가하지 않는 것이 젖산생성 측면에서는 유리할 것으로 판단된다.

(A)



(B)

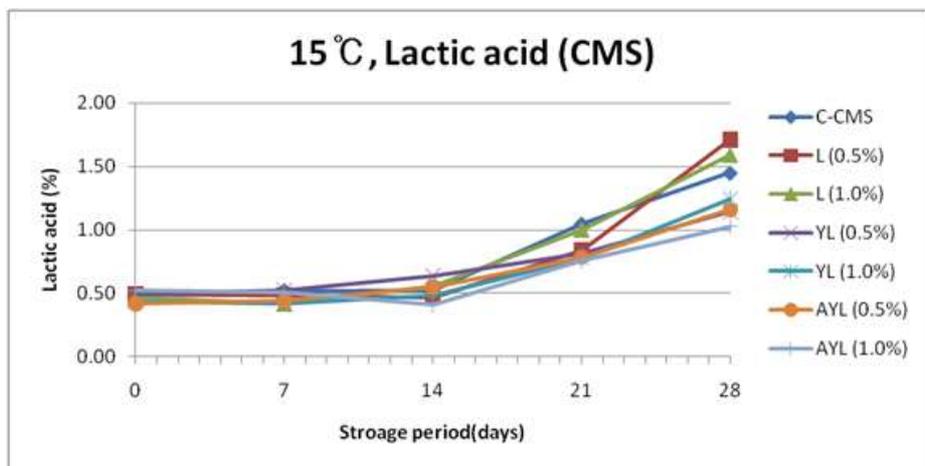


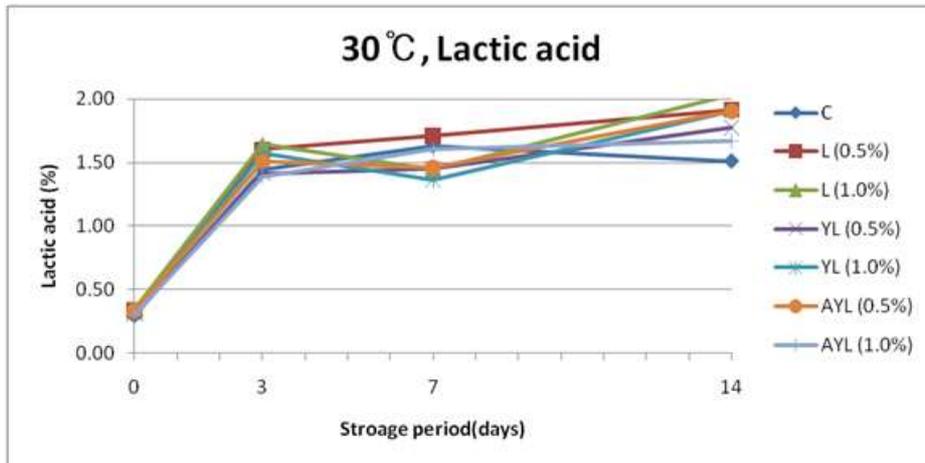
그림 81. 15°C에서 TMF 저장시 젖산 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 젖산함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 81에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 첨가된 미생물 종류에 관계없이 저장 직후부터 꾸준히 젖산 함량이 증가하는 것을 관찰할 수 있으며, 저장 4주후에는 모든 처리구에서 1.5% 이상의 젖산 함량을 생성하였다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 2주까지는 젖산함량이 증가하지 않다가 2주 이후부터 점진적으로 증가하기 시작하였으며, 저장 4주후에는 1.0 ~ 1.6%까지 젖산함량이 증가하였다.

젖산함량이 기호성에 영향을 미치는 점을 고려할 때, CMS 첨가구의 경우에는 저장 3~4주 경에 소비하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

(A)



(B)

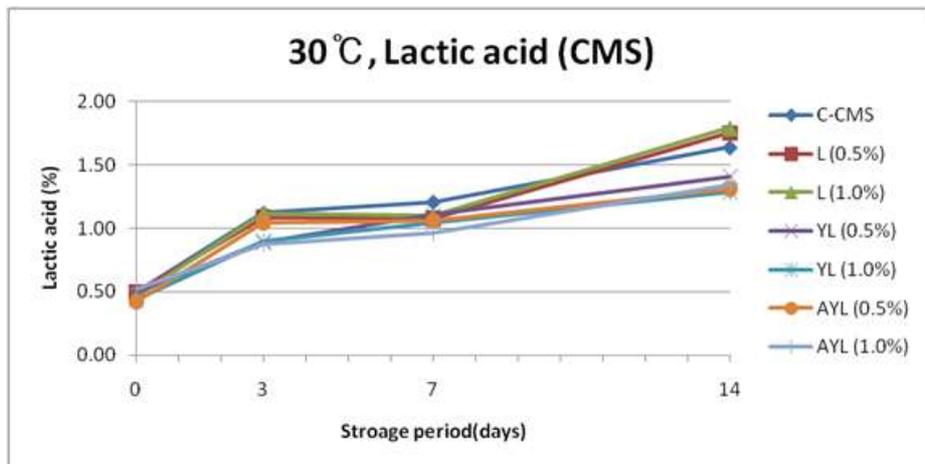


그림 82. 15°C에서 TMF 저장시 젖산 변화

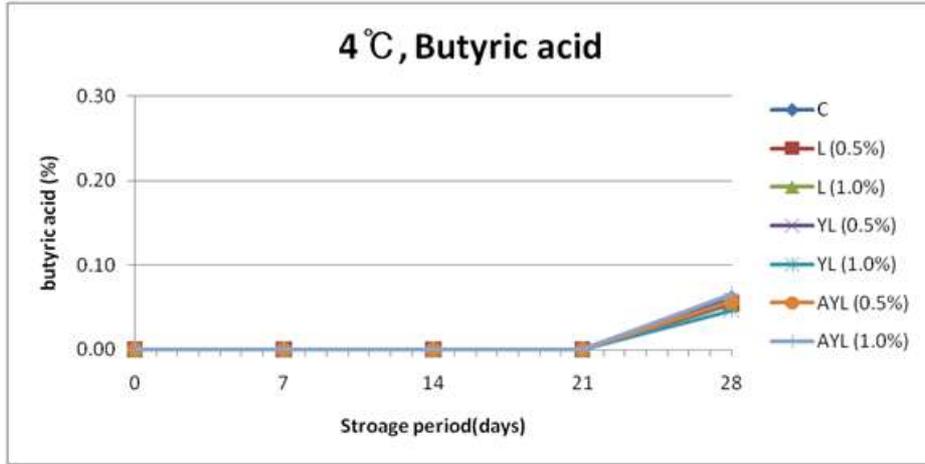
TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 젖산함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 82에서 보는 바와 같다. CMS 비처리구의 경우, 저장 3일만에 모든 처리구에서 젖산함량이 증가하여 1.5% 수준에 도달하였으며, 저장 2주 후에 L(ALB) 0.5% 및 1% 첨가구와 YL(yeast+LAB) 1% 처리구에서는 젖산함량이 1.9 ~ 2.0% 수준까지 증가하였다.

한편 CMS-TMF의 경우, 전체적인 증가추세는 CMS 비처리구와 유사하였으나 젖산함량 수치가 저장 3일까지는 1.0% 전후, 저장 2주 후에는 1.5% 전후 수준으로서 젖산함량이 CMS 무첨가구에 비해 상대적으로 적은 것으로 나타났다.

모든 저장온도에서 전체적으로 CMS에 의해 젖산 생성이 억제됨을 알 수 있었지만 30°C에서는 저장 3일만에 1.0% 수준에 도달하므로, 온도가 높은 여름철에는 CMS를 첨가하여 짧은 시간에 과도한 발효가 일어나는 것을 방지하는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

② TMF 저장 중 butyric acid 생성 패턴

(A)



(B)

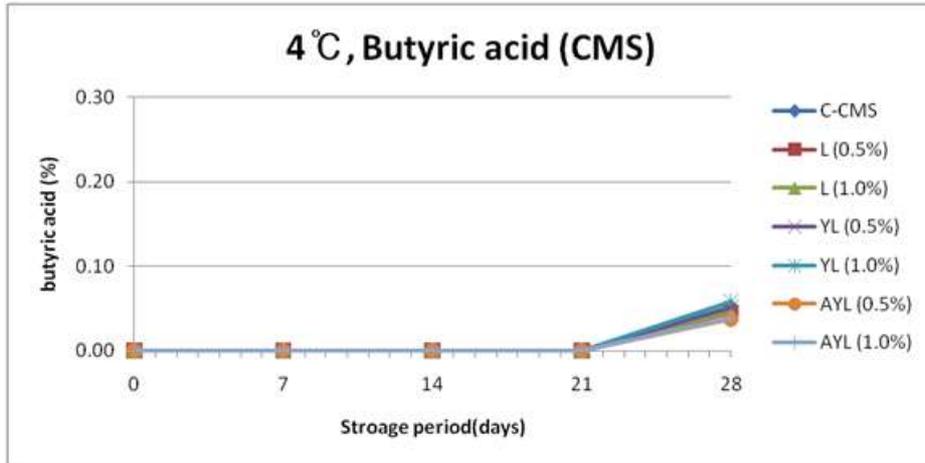
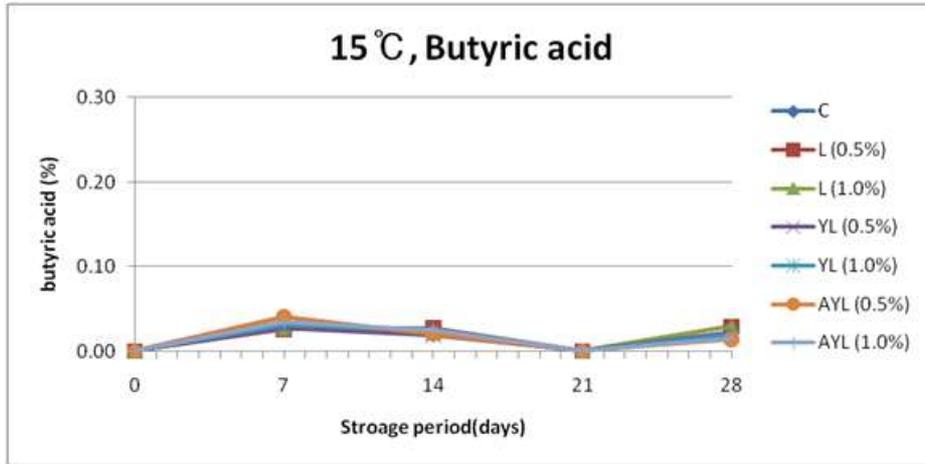


그림 83. 4°C에서 TMF 저장시 낙산 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 낙산 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 83에서 보는 바와 같다. Butyric acid는 CMS 비첨가구와 CMS-TMF 양쪽 모두에서 저장 3주까지 생성되지 않다가, 그 이후부터 생성되는 패턴을 나타내었다. 이는 낮은 온도에 의해 낙산 발효에 관여하는 미생물들의 생장이 억제되었기 때문이라고 사료된다.

(A)



(B)

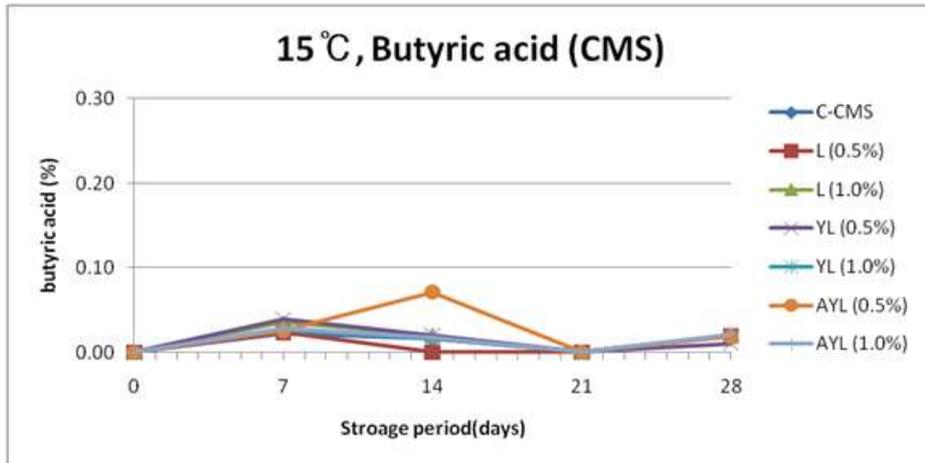
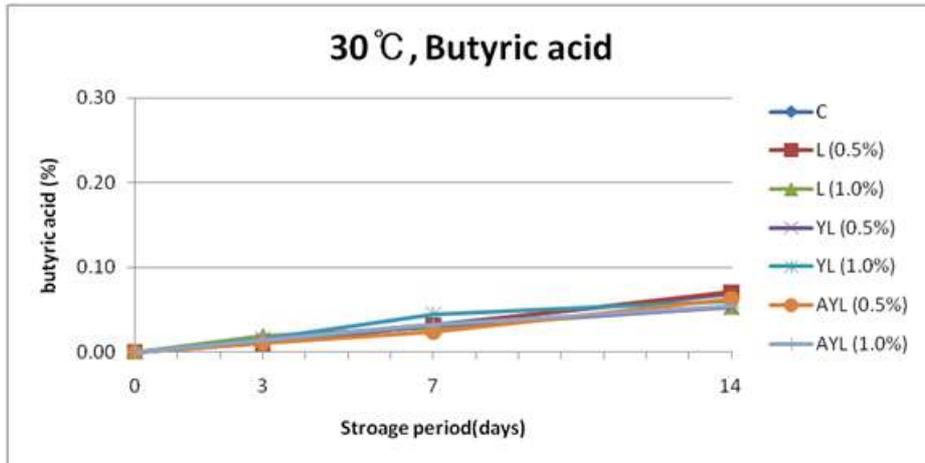


그림 84. 15°C에서 TMF 저장시 낙산 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 낙산 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 84에서 보는 바와 같다. 4°C 저장과 마찬가지로 CMS 첨가 유무, 첨가된 미생물 종류에 관계없이 모두 유사한 패턴을 나타냈으며, 저장 4주 후까지 0.02% 수준을 유지하였다. 이는 제조한 TMF의 발효시 모든 처리구에서 낙산 발효가 억제되었다고 볼 수 있으며, TMF 품질에 있어 긍정적인 측면이라고 생각될 수 있다.

(A)



(B)

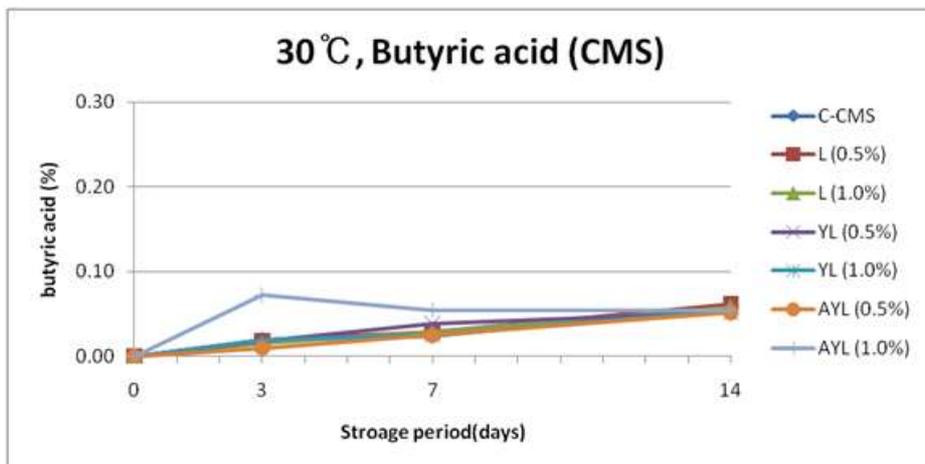
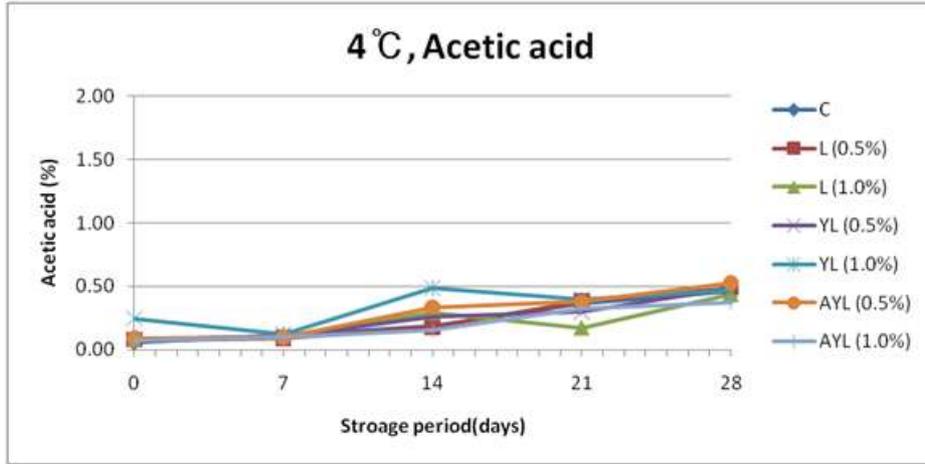


그림 85. 15°C에서 TMF 저장시 낙산 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 낙산 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 85에서 보는 바와 같다. CMS 비첨가구와 CMS-TMF 공히 저장 직후부터 저장 2주까지 낙산 함량이 서서히 증가하였으며, 4°C, 15°C에서 저장한 TMF보다 높은 0.06% 수준까지 낙산 함량이 증가하였다. 하지만 사일리지의 품질평가에 있어 낙산 함량이 0.1% 이하는 우수하다고 판단하므로, 이 점을 고려할 때 온도가 높은 여름철에도 낙산 함량에 의한 문제는 없을 것으로 사료되었다.

③ TMF 저장 중 acetic acid 생성 패턴

(A)



(B)

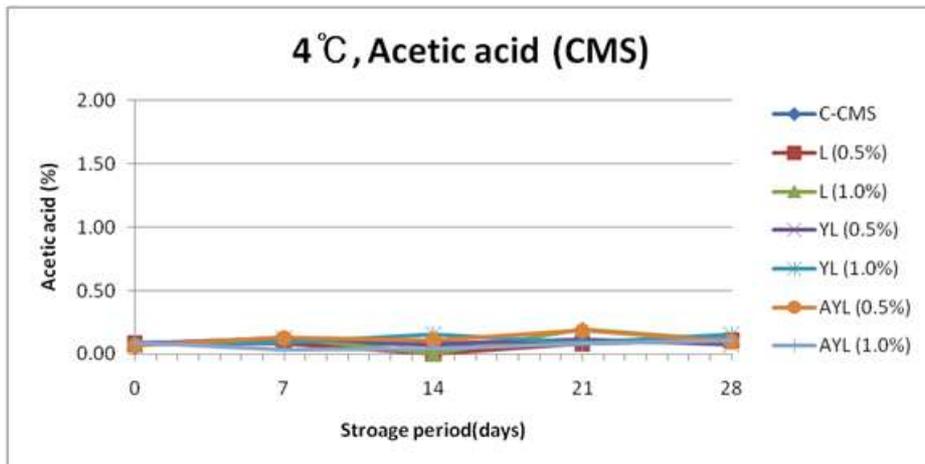
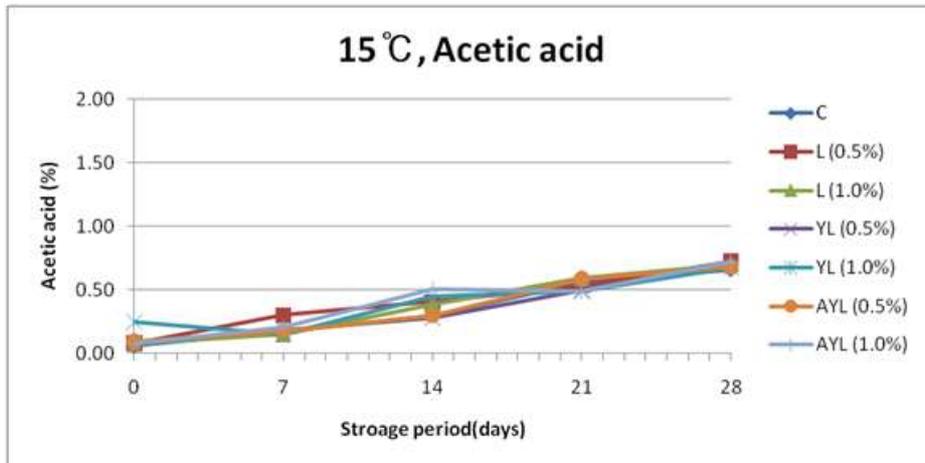


그림 86. 4°C에서 TMF 저장시 초산 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 초산 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 86에서 보는 바와 같다. CMS 비첨가구의 경우, 저장 1주 후부터 4주까지 점진적으로 증가하는 추세를 보였으며, 저장 4주후에는 첨가 미생물의 종류에 상관없이 acetic acid의 함량이 0.5% 수준으로 증가하였다.

CMS-TMF의 경우 저장 직후부터 저장 4주까지 초산함량이 0.1% 수준으로 유지되는 것을 알 수 있었다. 이는 CMS에 의해 미생물의 생장이 억제됨과 동시에 초산 발효의 진행도 함께 억제함을 시사하였다. 조사료에서 초산은 기호성에 좋지 않은 영향을 주기 때문에, CMS 첨가가 긍정적인 평가를 받을 수 있을 것으로 사료되었다.

(A)



(B)

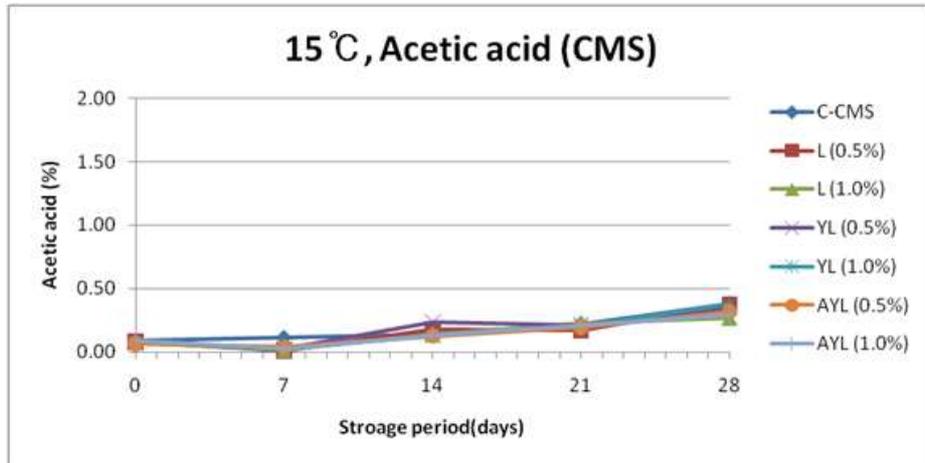
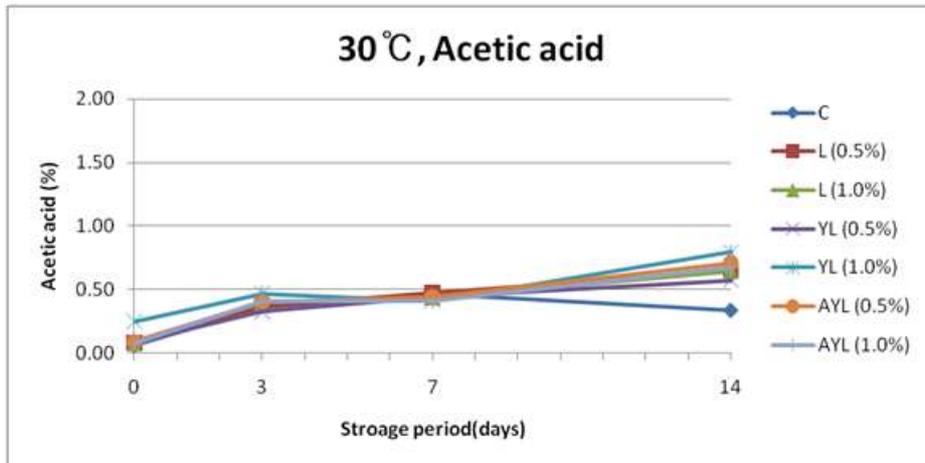


그림 87. 15°C에서 TMF 저장시 초산 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 초산 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 87에서 보는 바와 같다. CMS 비첨가구의 경우 4°C 저장과 달리 저장 직후부터 저장 4주까지 꾸준한 증가 추세를 보였으며, 최종 함량도 0.7% 수준까지 이르렀다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 1주 후부터 4주까지 점진적으로 증가하는 추세를 나타내었으나, 최고 수치는 0.5% 이하로서 그 증가 속도가 굉장히 느린 것으로 나타났다.

(A)



(B)

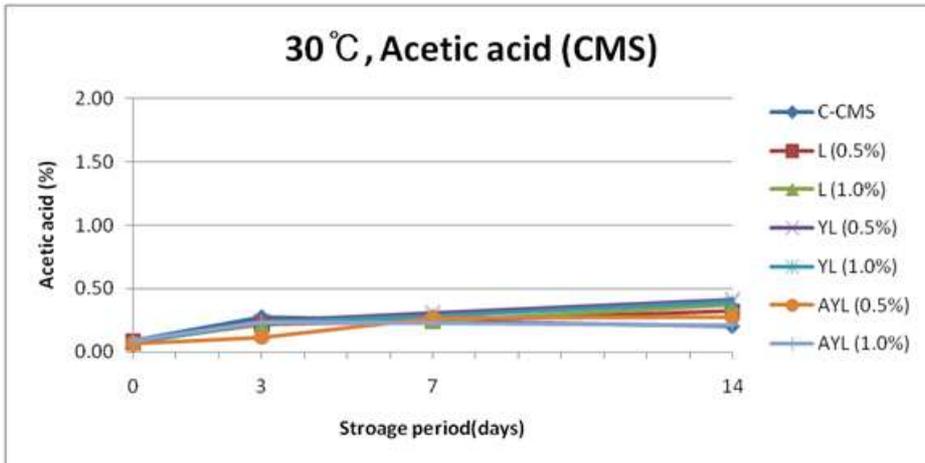
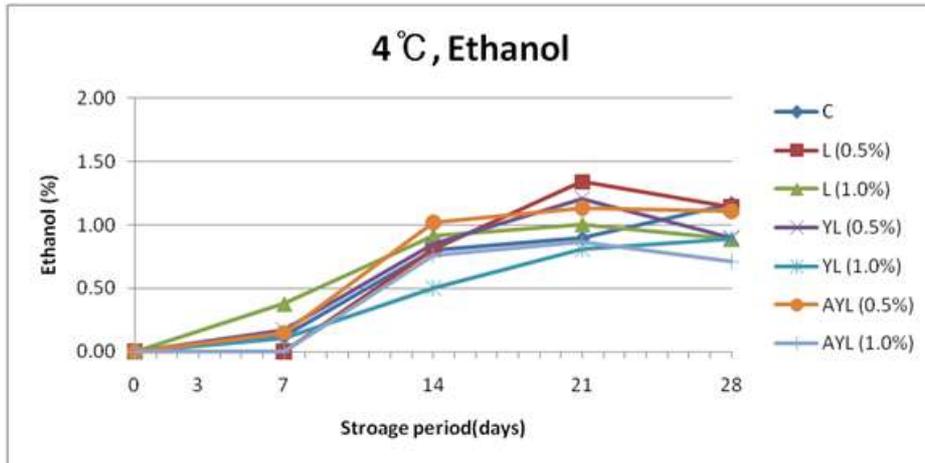


그림 88. 30°C에서 TMF 저장시 초산 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 초산함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 88에서 보는 바와 같다. CMS 비첨가구의 경우 저장 직후부터 초산 함량이 증가하기 시작하였으며, 저장 2주 후의 초산 함량은 0.5% 전후로서 타 온도에서 저장한 TMF보다 높은 수치를 나타내었다. 한편 CMS-TMF의 경우, 초산함량 증가추세가 매우 미미하여 저장 4주 후에도 0.3% 전후에 머물렀다. 이를 통해 볼 때, CMS의 초산발효의 억제능력이 뛰어난 것을 확인할 수 있었고, 특히 온도가 높은 여름철에는 TMF에 CMS를 첨가하는 것이 초산발효 억제에 유리할 것으로 판단되었다.

④ TMF저장 중 ethanol 생성 패턴

(A)



(B)

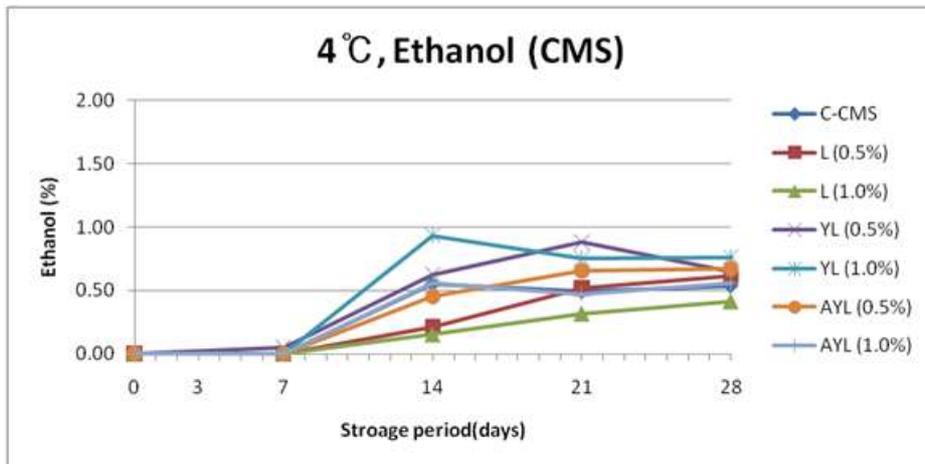
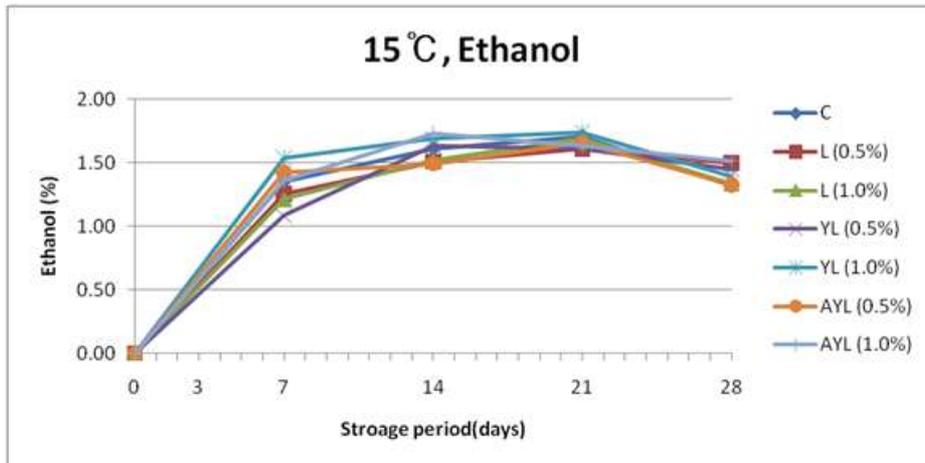


그림 89. 4°C에서 TMF 저장시 에탄올 변화

TMF를 4°C에 저장하면서 각 처리구의 에탄올 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 89에서 보는 바와 같다. 에탄올 생성패턴은 앞의 yeast 성장패턴과 매우 유사하게 나타났는데, CMS 비첨가구의 경우는 모든 처리구에서 저장 1주후부터 3주까지 에탄올 함량이 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었다.

CMS-TMF의 경우에도 마찬가지로 저장 1주 이후부터 에탄올 함량이 증가하기 시작하였으나 CMS 비첨가구에 비해 최고함량 수치가 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 이는 CMS에 의해 yeast의 생장이 억제됨으로써 생성되는 에탄올의 함량도 낮아진 것으로 판단된다. 한편, 처리구 중에서는 YL 첨가구(0.5, 1%)에서 생성된 에탄올 함량이 전반적으로 가장 높았다.

(A)



(B)

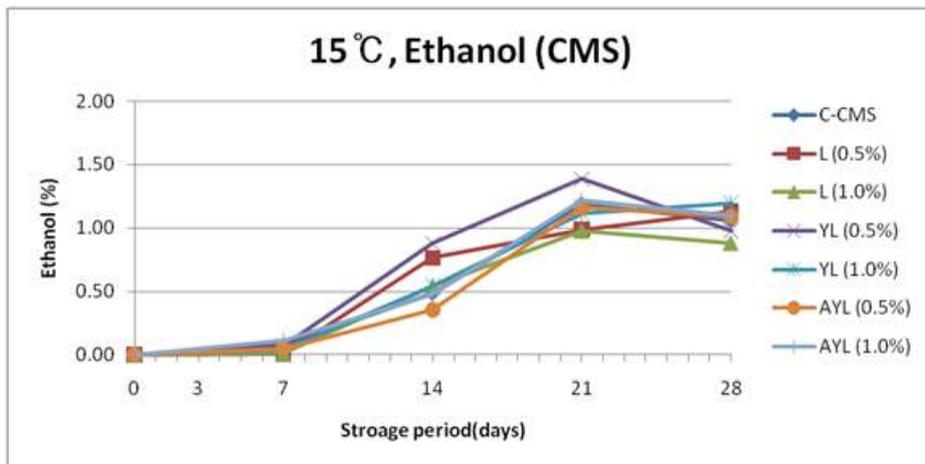
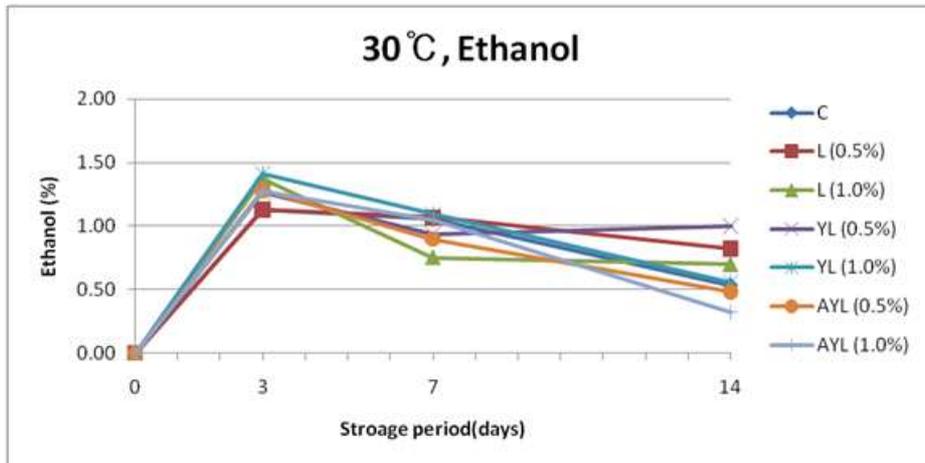


그림 90. 15°C에서 TMF 저장시 에탄올 변화

TMF를 15°C에 저장하면서 각 처리구의 에탄올 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 90에서 보는 바와 같다. CMS 비첨가구의 경우, 저장 직후부터 저장 1주까지 급격한 증가추세를 보여 에탄올 함량이 1.2 ~ 1.5% 수준까지 증가하였으며, 그 이후에는 완만한 증가추세를 나타내어 모든 처리구에서 1.5%수준 이상까지 에탄올의 함량이 증가하였다.

한편 CMS-TMF의 경우, 저장 1주까지는 변화가 거의 없다가 1주 이후부터 에탄올 함량이 지속적으로 증가하여, 저장 3주 후에는 모든처리구에서 에탄올 함량이 1%수준 이상으로 증가하였다. 처리 미생물간의 큰 차이는 보이지 않았지만, YL(Yeast + LAB) 처리구에서 상대적으로 보다 많은 에탄올 수치를 나타내었다.

(A)



(B)

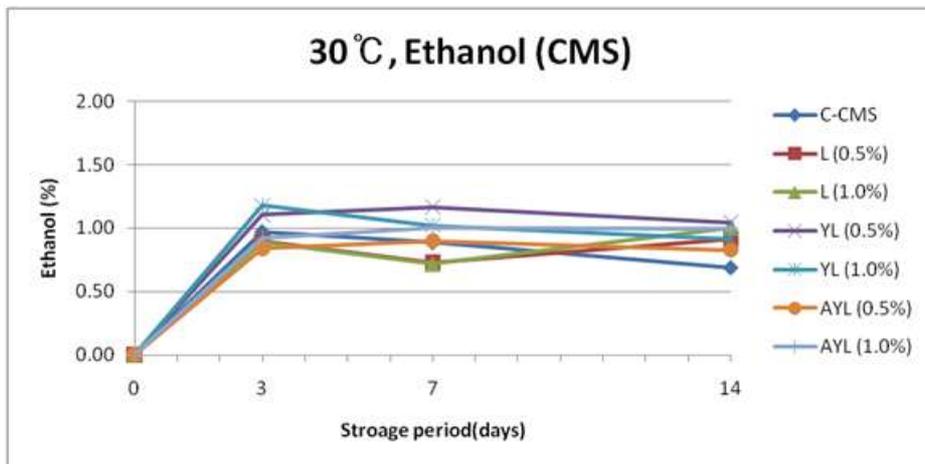


그림 91. 30°C에서 TMF 저장시 에탄올 변화

TMF를 30°C에 저장하면서 각 처리구의 에탄올 함량의 변화를 관찰한 결과는 그림 91에서 보는 바와 같다. CMS 첨가구와 비첨가구 모두 저장 직후부터 저장 3일까지 에탄올 함량이 급격히 증가하였는데, CMS 비첨가구의 경우에는 에탄올 함량 수치가 1.1 ~ 1.4% 수준으로서 CMS-TMF의 0.8 ~ 1.1% 수준보다 보다 높게 나타났다. 이는 CMS에 의한 yeast의 생장이 억제되었기 때문인 것으로 판단되었다.

30°C 저장에서도 15°C 저장구와 마찬가지로 YL 첨가구에서 가장 높은 에탄올 수치를 나타내었기 때문에, 에탄올 생성에 있어 2종의 혼합발효가 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다.

### (3) 결과 요약

상기에서 보는 바와 같이, 선발된 미생물을 첨가한 TMF의 저장중 물리화학적, 미생물학적 품질 변화를 조사하였으며, 저장실험 결과를 전체적으로 정리하면 다음과 같다.

#### ▶ 유산균 및 효모 수

- 유산균과 효모 수가 많을수록 좋을 것으로 생각되었으나, 미생물 첨가에 따른 처리구 별로 뚜렷한 차이를 보이진 않았다. 이는 종균을 접종할 TMR을 미리 살균할 수 없었기 때문에 종균을 첨가하더라도 저장기간 중에 미생물의 변화에 미치는 요인이 많아 정확한 발효패턴이 나타나기 어려웠을 것으로 판단된다.

- 하지만 종균을 접종하지 않은 경우에는, 저장 중에 이상 발효가 일어나 이상취를 나타내는 경우가 다수 있었기 때문에, 종균을 접종하는 것이 바람직할 것으로 사료되었다.

#### ▶ CMS 첨가 효과

: CMS의 첨가에 의해 TMF 내의 미생물 성장 및 발효가 전반적으로 억제되는 경향을 나타내었기 때문에, 특히 여름철에 단기간에 과발효가 일어나는 것을 억제하는 효과를 나타내었다.

#### ▶ 유기산 함량 변화

: TMF 저장기간에 따른 유기산 생성 패턴을 조사한 결과, TMF의 기호성과 품질에 좋은 영향을 미치는 lactic acid는 1.0% 이상에 이르는 반면, 이상 발효의 정도를 나타내는 기준이 되는 butyric acid와 쓴맛을 내는 acetic acid의 함량은 4주 동안 매우 낮은 수치를 나타내었기 때문에, 본 연구를 통해 제조한 TMF는 유기산 생성패턴 측면에서 볼 때 품질이 우수한 것으로 판단된다.

#### ▶ 에탄올 함량 변화

: 에탄올 취는 TMF의 기호성에 상당히 긍정적인 영향을 부여하는 인자이다. TMF 저장기간에 따른 에탄올 생성 패턴을 조사한 결과, 유산균과 효모를 종균으로 첨가하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

▶ 본 실험결과를 종합하여 균수와 유기산 함량을 기준으로 적정한 유통기한을 도출해 보면, 봄/가을 및 겨울에는 상온에서 4주까지는 유통이 가능할 것으로 보이며, 온도가 높은 여름철에는 균의 성장과 발효가 빨리 진행되기 때문에 2주 이내에 사용하는 것이 적당할 것으로 사료된다.

### 제 3 절 TMF용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구

#### 1. CMS 함유 *Aspergillus oryzae* 최적 고상배지 배합비 작성 및 배양조건 탐색.

전분분해효소원으로 오래전부터 사용이 되어 왔던 누룩은 술을 만드는 데 필수적인 효소를 갖는 누룩곰팡이를 곡류에 번식시킨 것이다. 누룩곰팡이(Genus *Aspergillus*)는 빛깔에 따라 황국균(黃麴菌)·흑국균(黑麴菌)·홍국균(紅麴菌) 등이 있는데 그중에서도 주로 이용되는 것은 황국균(*Aspergillus oryzae*)이다.

A. O. (*Aspergillus oryzae*)는 호기성균으로서 발육할 때는 영양분 외에 공기에서 산소를 필요로 하고 이산화탄소를 내는 호흡작용을 이룩하는 동시에 열과 수증기를 발생하게 된다. 이 밖에 모든 미생물은 그것이 발육하는 데 적당한 온도와 습도조건이 있는 것과 같이 황국균의 발육 한계온도는 10-45℃, 발육 적온은 32-35℃, 발아 적온은 34-38℃이며, 최적 온도 36-42℃이며, 수분은 균을 접종할 때 40% 내외의 수분을 필요로 한다.

A. O.가 발육 번식함에 따라 산소를 필요로 하고 이산화탄소를 내는 외에 열과 수증기를 발산하게 되므로 A. O. 발육에 알맞은 조건을 잘 유지하는 것은 쉬운 일이 아니다. A. O.는 amylase·protease 등 여러 가지 효소가 생겨서 전분 또는 단백질로 분해하게 되는데, 이들 효소를 이용하는 것이 목적이다.

최근 발효공업이 발달되고 액상발효를 중심으로 한 신기술들이 관련 산업분야를 이끄는 핵심기술을 이루고 있지만, 고상발효는 황국균이 주를 이루고 있는 누룩의 기능과 같은 역할을 얻고자 하는데 효과적이어서, 단순히 액상, 액침 배양기술로는 얻을 수 없는 다양한 발효산물을 생산하는데 이용된다. 전통적인 A. O. 고상발효를 이용하면 amylase,  $\beta$ -glucanase, cellulase, fungal protease의 활성이 액상발효에 비하여 월등히 높은 배양물을 얻을 수 있는 장점이 있으며, 축우용 사료 내 분해가 어려운 셀룰로스, 리그닌 등을 함유한 조사료의 영양소 가치를 높일 수 있다고 판단된다.

본 제2 협동과제는 라이신제조 폐배지 부산물인 CMS를 이용한 축우용 완전발효사료(TMf) 제조 시 스타터로 사용될 A. O. 최적 고상배지 배합비를 작성하고자 실시하였다.

#### 가. *Aspergillus oryzae* 혼합균주의 고상배양 특성

본 협동연구과제는 A. O.의 고상배양 특성을 알아보기 위해 주관기관(방통대학교)에서 *Aspergillus oryzae* KNOU6983, KNOU6596, KNOU6095 및 KNOU40242를 분양받아 스타터로 사용하였다. A. O. 배지는 밀기울, 청치, 미강을 각각 33% 씩 배합하였으며, 2시간 정도 침지한 후, 스팀으로 30분간 열처리하였다.

배지는 열처리 후 수분함량 50%, 온도 30℃정도로 냉각한 다음, A. O. 혼합균주 10%를 배지 표면에 골고루 접종하였다. 이후 배양과정은 정치배양과 포자가 보이기 시작한 다음부터 6시간 간격으로 뒤집기 실시의 2가지 방법을 적용하였으며, 그 결과는 표 1과 같다.

배양 22시간 경과 후부터 균사가 육안으로 관찰되었으며, 황색이 나타나는 32시간 경부터 뒤집기를 실시하였다. 뒤집기는 품온을 낮추기 위한 공정이지만, A. O. 배양에 있어서 뒤집기를 통하여 지속적으로 품온을 낮추는 작업을 병행하여도 온도의 차이는 1~2℃ 이내였고, 배양 46

시간 후에는 모두 품온이 40℃이상으로 상승하였다. 배양 후 측정된 A. O. 수는 정치배양이나 뒤집기 작업한 것 모두  $1.0 \times 10^8$ cfu 이상의 생균이 측정되었다.

표 66. 고상배양 조건에 따른 *A. oryzae*의 형태적 특징 변화

배양법	시간(H)	실온(℃)	품온(℃)	습도(%)	기 타
정치배양	접종	27	30	79	
	4	28	27	78	
	22	27	28	79	약간의 흰색균사가 보이기 시작함.
	26	29	33	77	전체적으로 흰색균사가 피기 시작함.
	28	30	34	77	향취가 강하게 나옴.
	32	30	36	77	노란색포자로 조금씩 변하기 시작함.
	46	28	41	82	발열이 높으며 노란포자가 거의 덮였음
	53	30	41	77	발열이 높아져 배양상자를 오픈시킴
	58	30	35	78	온도가 서서히 낮아지기 시작함.
뒤집기 실시	접종	27	29	79	
	4	28	27	78	
	22	27	30	79	약간의 흰색균사가 보이기 시작함.
	26	29	34	77	전체적으로 흰색균사가 피기 시작함.
	28	30	34	77	향취가 강하게 나옴.
	32	30	36	77	첫 번째 헤치기
	46	28	40	82	2번째 헤치기
	53	30	40	77	발열이 높아져 배양상자를 오픈시킴
	58	30	34	78	온도가 서서히 낮아지기 시작함.

나. 고상배양 원료에 따른 A. O.의 균수 비교

A. O. 배지의 타당성을 조사하기 위해 밀기울, 청취(쌀 싸래기), 미강을 주원료로 하여 3일간 고상배양을 실시한 결과는 밀기울+청취+미강 혼합처리한 배지에서 A. O. 균수가  $3.9 \times 10^8$  cfu/g로 제일 높았으며, 나머지는  $1.2 \times 10^7$  -  $6.3 \times 10^7$  cfu/g로 나타나 처리구간 큰 차이는 보이지 않았다.

7개의 처리구 모두 1g당  $10^7$ cfu 이상의 A. O.가 측정되어 TMF 스타터로서 적절한 것으로 판단되었다. 이상의 결과로 보아 원가를 낮추고 품질수준을 향상 시키는데 있어서 저렴한 배지원료인 밀기울, 미강, 청취의 혼합사용이 매우 효과적인 것으로 판단된다.

표 67. 배지 종류 및 배양방법에 따른 *A. oryzae*의 균체 수 변화

원료명	배양법	
	정치배양	뒤집기 실시
밀기울	$6.3 \times 10^7$ g/cfu	$1.3 \times 10^7$ g/cfu
청취	$2.7 \times 10^7$ g/cfu	$1.8 \times 10^7$ g/cfu
미강	$3.3 \times 10^7$ g/cfu	$1.9 \times 10^7$ g/cfu
밀기울 + 청취	$4.7 \times 10^7$ g/cfu	$2.9 \times 10^7$ g/cfu
밀기울 + 미강	$1.3 \times 10^7$ g/cfu	$1.4 \times 10^7$ g/cfu
청취 + 미강	$1.3 \times 10^7$ g/cfu	$1.2 \times 10^7$ g/cfu
청취 + 미강 + 밀기울	$2.9 \times 10^8$ g/cfu	$3.9 \times 10^8$ g/cfu



그림 93. *A. oryzae* 고상배양실



그림 94. *A. oryzae* 고상배양 예

## 2. CMS 함유 *Saccharomyces cerevisiae* 최적배지 배합비 및 최적조건 탐색.

Yeast(*Saccharomyces cerevisiae*)는 맥주 발효효모, 빵 발효효모, 보조사료(생균제) 등에 사용되는 미생물로서 탄수화물을 분해하여 알코올, 유기산 등을 생성하여 특히 대가축인 경우 기호성을 높이는데 매우 효과적이며, 또한 반추위 내에서 조사료 등 분해가 어려운 거친사료를 분해하여 영양소원의 체내 흡수를 도와주는 역할을 한다.

최근에 낙농 및 한우농가에서 TMR보다 이를 발효시킨 TMF가 보급되면서 발효제로서 Yeast 사용이 널리 보편화되었으며, 그 가치를 인정받고 있으나 국내 TMF에서 Yeast 첨가로 인한 과학적인 발효 효능이 규명되지 않고 있다.

제 2 협동과제의 1년차 연구과제로서 라이신제조 폐배지 부산물인 CMS를 이용한 축우용 완전발효사료(TMf)제조 시 스타터로 사용될 Yeast 분리 및 동정을 실시하였으며, 분리 동정한 Yeast 균주의 액상배양 배지조건에 따른 성장 능력을 조사하고, 우수한 효모균주의 고상배지 최적 배합비를 작성하고자 실시하였다.

### 가. *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 분리 동정

본 연구에 적합한 Yeast 균주 확보를 위해 맥주박, 섬유질 사료공장의 발효사료, 막걸리, 젓소 분뇨 등에서 시료를 채취하였으며 pH 내성, 내열성, 성장능력 등이 뛰어난 8개의 효모균주를 선발하였다.

선발된 Yeast의 효소물질 분비능 여부를 조사하기 위하여 API ZYM(Biomerieux, France) kit를 사용하여 효소활성을 검사하였다. 원심분리하여 농축 Yeast cell을 얻은 후, 0.85% NaCl 2ml에 넣어 탁도를 5 McFarland로 맞춘 다음, 시료를 strip tube에 분주하고, 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후에, ZYM A 시약과 ZYM B 시약을 차례대로 넣은 후 5분 뒤에 결과를 기록하였다. 색 변화정도에 따라 0은 음성, 5는 최대 강도로 정하고, 3 이상이면 양성으로 판정하였으며, 그 결과는 표 68과 같다. 8개의 효모균주 중 균주 G가 다양한 효소 spectrum을 지니고 있는 것으로 나타났으며 나머지 효모균주들의 경우 전형적인 효모가 지닌 효소 spectrum을 나타내었다.

표 68. 선발된 효모균주의 효소역가 특성

No.	Enzyme Assayed for	A	B	C	D	E	F	G	H
1	control	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Alkaline phosphatase	-	-	-	-	+	-	+	+
3	Esterase(C4)	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Esterase Lipase(C8)	-	-	-	-	+	-	-	-
5	Lipase(C14)	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Valine arylamidase	-	-	-	+	+	-	+	-
8	Cystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-
10	$\alpha$ -chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Acid phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Naphotol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+
13	$\alpha$ -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
14	$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-
15	$\beta$ -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
16	$\alpha$ -glucosidase	+	+	+	+	+	-	+	+
17	$\beta$ -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
18	N-actetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-
19	$\alpha$ -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
20	$\alpha$ -flucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-

상기 효모균주의 효소 활성을 측정하기 위해서 YM broth(1% xylan, 1% Na-CMC, 1% starch) 에 0.1% 효모를 접종하고 shaking incubator(30°C, 220rpm)에서 overnight 후, cell을 12,000rpm에서 원심분리 후 상등액을 조효소액으로 이용하였으며, cell pellet은 냉동보관하였다. 조효소액 300ul에 1M phosphate buffer(pH6.0) 50ul, 기질 500ul, D.W 150ul을 처리하고, 30°C에서 2시간 배양한 다음, DNS 환원당을 측정된 결과는 표 69와 같다. 선발한 효모균주의 효소 활성을 측정된 결과, 효모균주 A가 Xylanase와 Amylase의 activity가 제일 높았으며, CMCcase의 경우 균주 H가 제일 높았다.

표 69. 선발된 효모균의 효소 역가 특성

Yeast strains	Xylanase	CMCase	Amylase
A	55.5	39.3	1607.4
B	24.0	58.3	1424.4
C	33.6	24.0	1368.1
D	41.2	32.6	1240.4
E	10.7	53.6	912.5
F	32.6	66.9	957.3
G	34.5	66.0	946.8
H	31.6	71.7	1249.0

나. *Saccharomyces cerevisiae* 액상 배지 조건에 따른 성장패턴의 변화

선발된 Yeast 균주의 CMS 적응능력을 알아보기 위하여 10%, 20%, 30%의 CMS가 함유된 YM 배지에서 각각의 Yeast 균주 0.1%를 접종한 후 37°C에서 배양하면서 0일, 2일, 6일, 14일, 37일 간격으로 효모수를 측정하였으며, 그 결과는 그림 95, 96, 97과 같다.

10%, 20%, 30% CMS 함유 YM배지에서 대부분의 균주가 6일째 까지 증가하다가 이후 감소하는 추세를 보였으며 약 1달간 배양 중에도 A와 E 균주가 높은 수를 유지하였다.

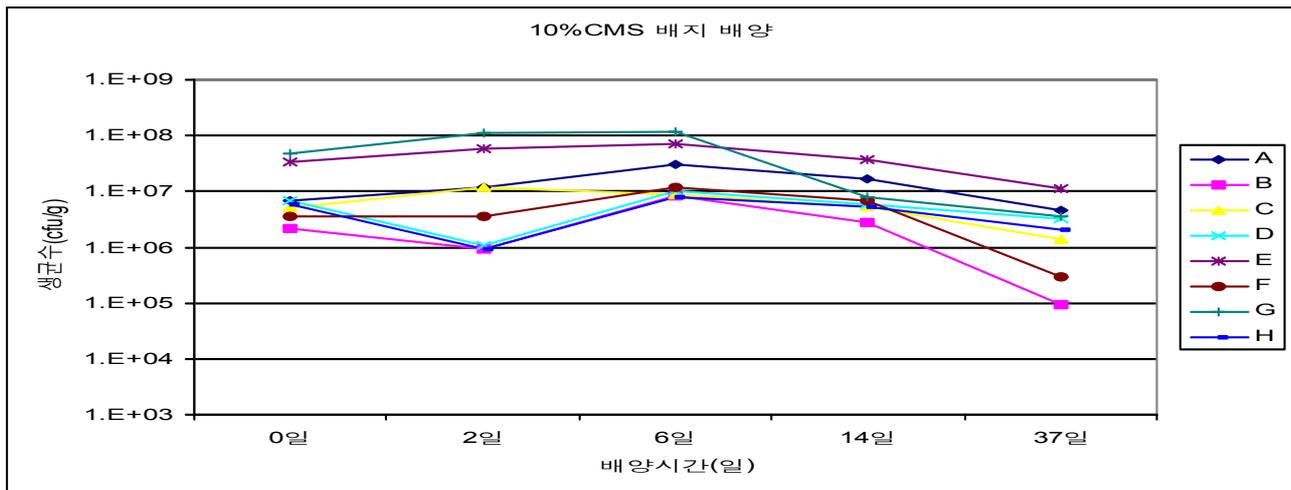


그림 95. CMS 10% 함유 YM 배지에서의 효모 성장 곡선

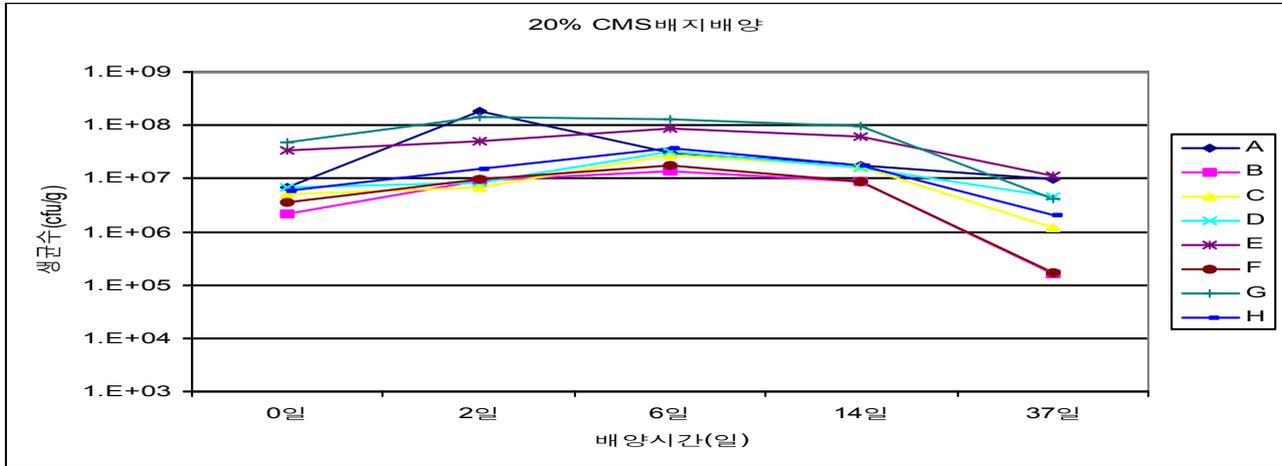


그림 96. CMS 20% 함유 YM 배지의 성장 곡선

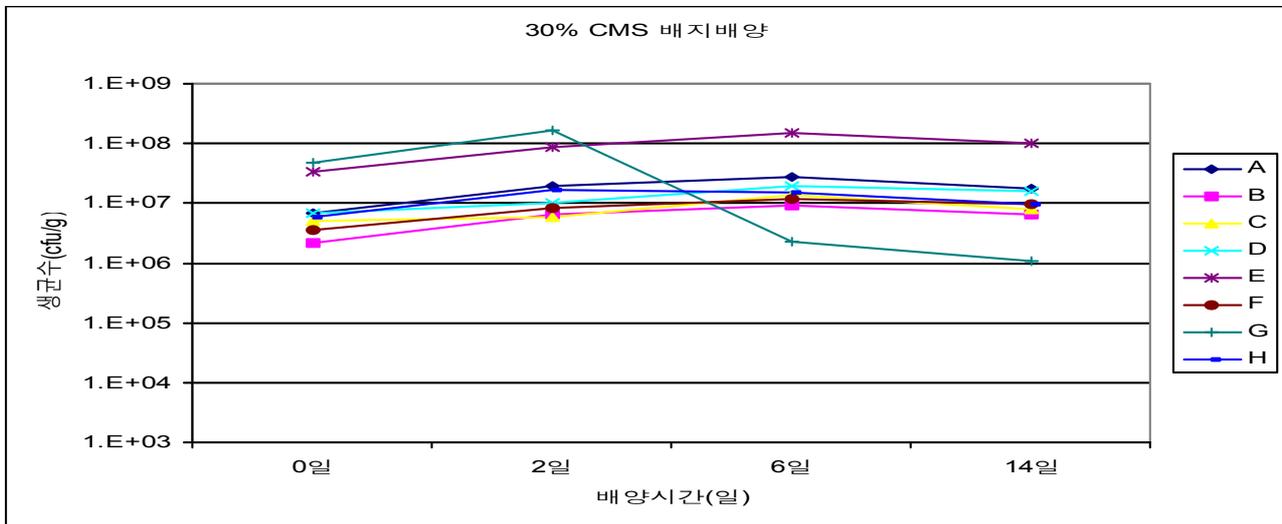


그림 97. CMS 30% 함유 YM 배지의 성장 곡선

다. 선발된 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 CMS 배지 구성에 따른 성장패턴의 변화 능력이 우수한 두 효모 균주의 CMS 함유한 배지에서 여러가지 구성에 따른 성장능력을 조사하기 위해 ① 대조구(YM Broth), ② YM에 10% CMS 첨가구, ③ YM+10% CMS 첨가구에서 Yeast Extract를 제외한 구, ④ YM+10% CMS 첨가구에서 Malt Extract를 제외한 구, ⑤ YM+10% CMS 첨가구에서 Peptone을 제외한 구, ⑥ YM+10% CMS 첨가구에서 Dextrose 제외한 구 등 6가지의 처리구로 나누어 배지를 제조하였으며 두균주 각각 1%를 접종하고 30°C에서 200rpm으로 3주간 배양하면서 효모수의 변화를 조사하였다.

두 균주 모두 YM배지에서 3주간 배양시에도 균수의 변화가 없었으며, 다양한 배지에서 성장패턴을 비교해 보면 G의 경우 대부분의 배지에서 1주일 이후부터 감소하기 시작하였으며, A의 경우 배양 4일 이후부터 감소하기 시작하였으며 대부분의 배지에서 사멸속도 매우 빠른 편이었다. 두 균주를 비교해 보면 균주 E가 다양한 배지에서 적응력이 균주 A보다 앞서지만 앞으로 실제 TMF에서의 적응력 부분을 좀더 세밀하게 조사할 예정이다.

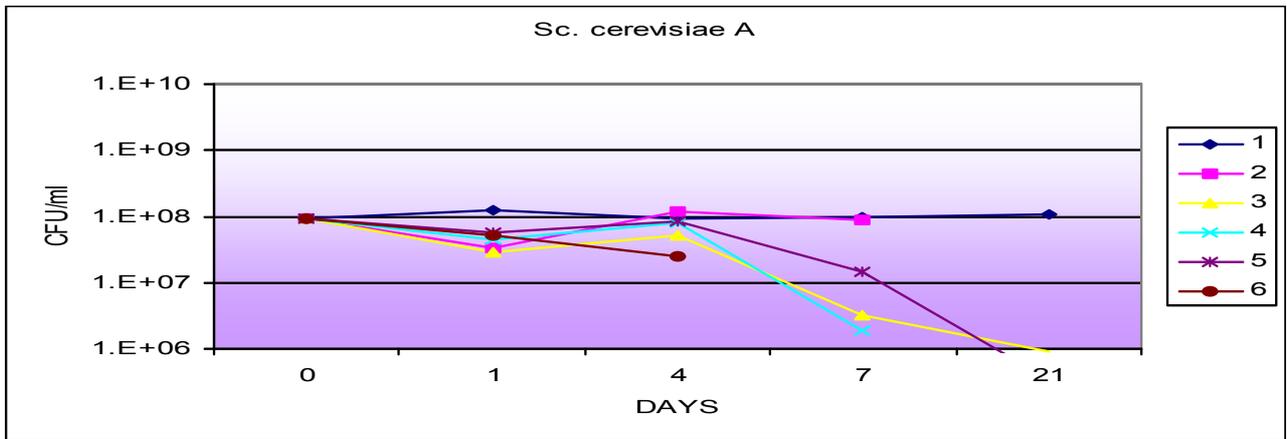


그림 98. 배지 성분변화에 따른 *S. cerevisiae* A의 성장 곡선

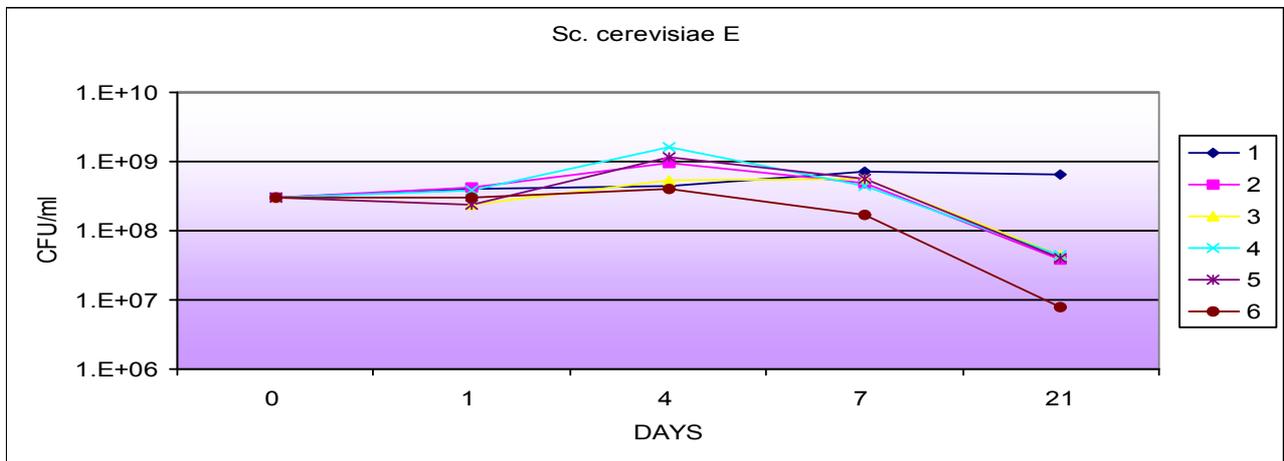


그림 99. 배지 성분변화에 따른 *S. cerevisiae* E의 성장 곡선

#### 라. *Saccharomyces cerevisiae* 액상 배지 조건에 따른 성장패턴의 변화

Yeast의 대량 액상배양을 위한 배지 선발을 위해 *Saccharomyces cerevisiae* A, E 2종의 혼합균주를 사용하였으며, 배지는 PD(Potato Dextrose broth, Difco Co.)배지, IND(산업용 배지)와 CMS 함유배지를 사용하였다(표 70). 배양은 각각의 배지를 사용하여 혼합균주를 0.1% 접종하여 shaking incubator에서 32°C, 170rpm으로 24시간동안 배양하였다.

PD, IND와 CMS배지에서 6일간 배양하면서 효모균수를 측정된 결과, PD나 IND보다 CMS 배지에서 균수가  $3.3 \times 10^8$  cfu/ml로 제일 높았으며, PD나 IND보다 높은 균수를 유지하였다. 배양 중 pH 변화는 초기에 PD보다 약간 높았지만 pH 변화는 큰 차이가 없었다. 이러한 결과로 보아 효모 연구용배지로서 가장 많이 사용하는 PD보다 2-3배 높은 균수를 지속적으로 유지한 것으로 보아 배지로서 활용가치가 높은 것으로 판단된다.

표 70. 효모 종균용 배지 조성

	PD broth	IND Media	CMS Media
Soluble Starch(Potato Starch)	(0.4%)	1.0%	1.0%
Molasses		2.0%	-
CMS		-	10.0%
YEAST EXTRACT		0.5%	0.5%
SKIM MILK POWDER		0.5%	0.5%
GLUCOSE	2.0%	2.0%	0.5%
D. W	97.6%	94.0%	87.5%

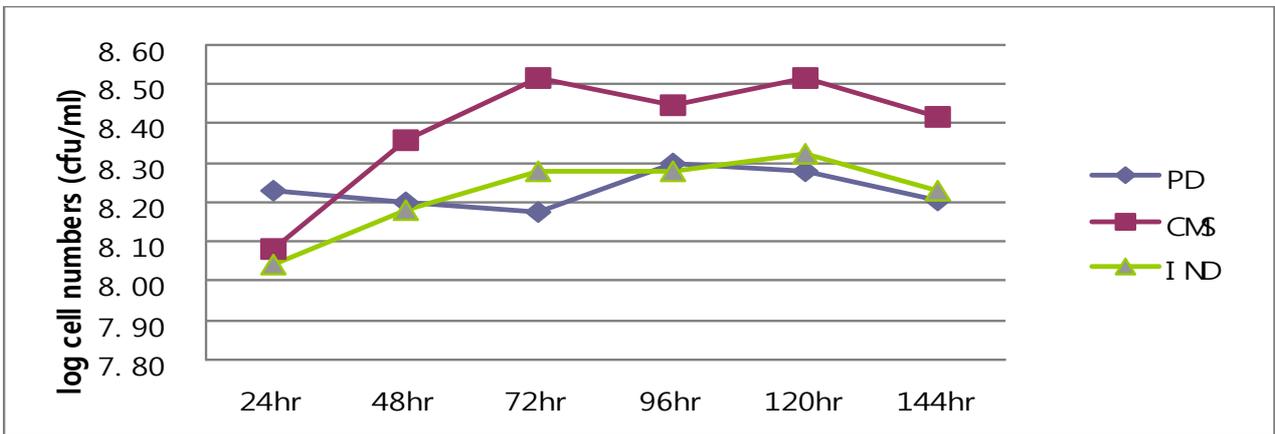


그림 100. 배지 종류에 따른 효모균의 성장 곡선

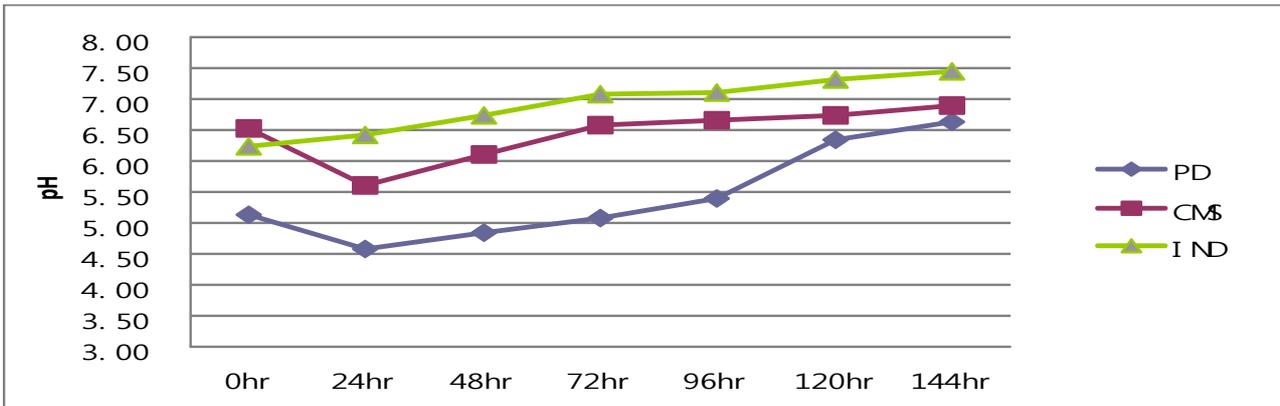


그림 101. 배지 종류에 따른 효모균 배양액의 pH 변화

표 71. 배지 종류에 따른 효모균의 성장

Cultivation time	PD	IND	CMS
24hr	$1.7 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$
48hr	$1.6 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$
72hr	$1.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$3.3 \times 10^8$
96hr	$2.0 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$
120hr	$1.9 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$3.3 \times 10^8$
144hr	$1.6 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$

### 3. *Saccharomyces cerevisiae* 최적 고상배지 개발

*Sac. cerevisiae* 고상배지 선발을 위하여 표 72과 같이 CMS의 농도를 달리하여 각각의 배지를 조제한 후 선발된 2종의 혼합균주를 시료 중량의 10%(v/w)가 되게 접종하였다. 시료는 최종 수분함량이 45%가 되도록 조절 후 비닐지대에 담아 20℃의 발효실에서 15일간 발효하면서 48시간마다 일정량을 취하여 생균수의 변화를 측정하였다.

표 72. 효모균의 고상배양용 배지 조성

구분	A	B	C	D
CMS	15	10	5	-
맥주박	30	30	15	15
옥분	20	20	20	20
CSL	-	5	5	10
당밀	-	5	5	10
대두박	15	10	10	10
미강	20	20	20	35
물				
합계	100	100	100	100

### 4. *Saccharomyces cerevisiae* 최적 고상 배양조건 개발

고상배양(Solid-state fermentation)은 다양한 곡물형태의 배지에 수분을 40-60%정도로 조절된 상태에서 미생물을 접종하여 발효과정을 거치면서 미생물의 숫적인 증가뿐만 아니라 발효과정 중에 생성되는 다양한 발효대사산물을 얻고자 하는 배양방법으로 그방법은 매우 다양하다.

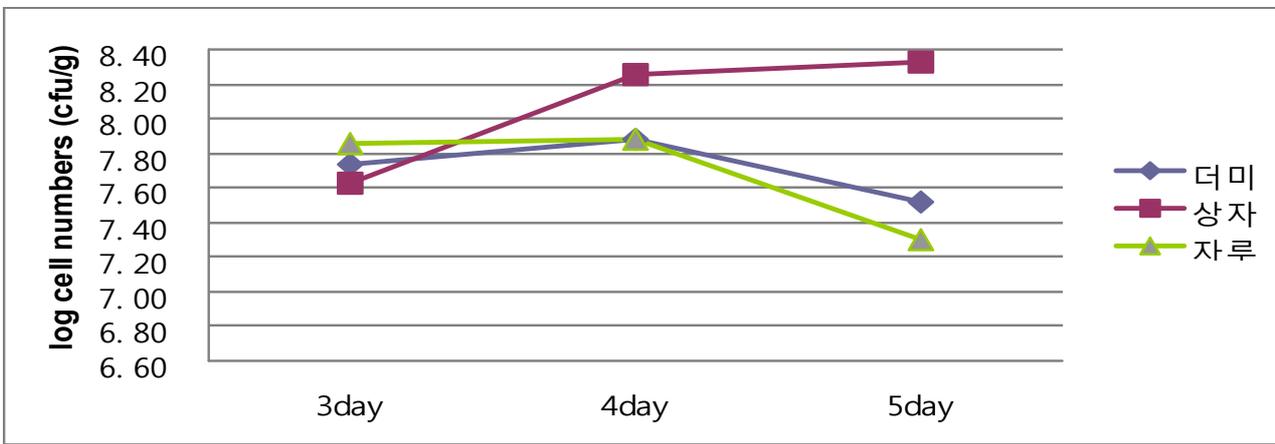
발효사료에 사용되는 고상배양은 일반적으로 1) 비닐지대에 배지를 담아서 발효시키는 방법, 2) 상자(프라스틱이나 스테인리스 스틸 tray)에 배지를 넣어서 발효시키는 방법, 3) 곡물 운송 자루(일명 톤 백)에 담아서 발효시키는 방법, 4) Bio-reactor라고 하는 발효장치 안에서 살균,

배양온도, 통풍 등을 조절하면서 배양하는 방법 등 매우 다양하다.

각각의 고상배양방법은 나름대로 장단점을 갖고 있다. 즉, Bio-reactor를 이용하면 모든 배양조건을 거의 완벽하게 조절이 가능하나 시설비가 매우 비싼 문제점이 있으며, 나머지 고상배양 방법들은 발효실의 외부 통제가 어려워 외부에서 들어오는 오염미생물의 차단이 힘들어 발효과정의 변질이 올 수 있는 단점이 있다.

본 연구에서 고상배양 처리방법은 더미, 플라스틱 상자, 자루(톤 백)의 형태로 배양하였으며, 배지는 A배지를 선택하였으며, Yeast 혼합균주를 스타터로 10%를 접종하였다. 발효실의 온도는 20℃를 유지하였으며, fan을 이용하여 공기를 유입시켰다.

배양 초기(3일째)에는  $3.3 \times 10^7$  -  $7.5 \times 10^7$  cfu/g으로 처리구 간의 차이가 크지 않았지만 5일째에는 더미나 자루배양의 경우에는 효모수 감소가 나타났으나 상자배양의 경우에는 효모수가 감소하지 않고 지속적으로 증가하는 경향을 보여 더미와 자루배양과 큰 차이를 보였다. 이는 공기의 유입량 차이에 의한 것으로 보이지만 고상배양의 경우 배양장소, 배지종류, 온도 등 주변 상황에 따른 변수가 워낙 많아 확실한 원인을 규명하기 쉽지 않다고 판단된다.



	a	b	c
3days	$5.4 \times 10^7$	$4.2 \times 10^7$	$7.2 \times 10^7$
4days	$7.5 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$	$7.5 \times 10^7$
5days	$3.3 \times 10^7$	$2.1 \times 10^8$	$2.0 \times 10^7$

a : 더미배양, b : 상자배양, c : 자루 배양

그림 102. 배양 용기의 차이에 따른 효모균의 성장률 차이



그림 103. 효모균 배양 용기 예

## 2 CMS-AYL 혼합균주 배양기법 개발 및 TMF 발효조건 설정

### 가. AYL(A. O., Yeast, LAB) 균주의 최적 배지 배합비 작성 및 배양조건 탐색.

AYL(A. O., Yeast, LAB) 균주는 축우용 완전발효사료(TMf) 제조 시 사용할 수 있는 미생물로 인정받고 있는 안전한 미생물(Generally Recommended As Safty Micoorganism)이다.

전분분해효소원으로 오래전부터 사용이 되어 왔던 누룩곰팡이(*Aspergillus* spp.)와 제빵, 제과, 맥주 등에 사용되는 효모(*Saccharomyces* spp.), 우유발효와 건강보조식품에 사용되는 유산균(Lactic acid bacteria)은 생균제(DFMs : Direct Fed Microbials)로 널리 알려진 미생물이다.

A. O.(*Aspergillus oryzae*)의 특징은 본 연구팀이 조사한 바와 같이 호기성균으로서 발육 한계온도는 10-45℃, 발육 적온은 32-35℃, 발아 적온은 34-38℃, 최적 온도 36-42℃이며, 배양 시 40% 내외의 수분을 필요로 한다. TMF, 배합사료 등의 수분이 있는 고체배지 상태에서는 A. O.가 발육 번식함에 따라 산소를 필요로 하고 이산화탄소를 내는 외에 열과 수증기를 발산하며, amylase,  $\beta$ -glucanase, cellulase, fungal protease 등의 효소를 얻을 수 있어, 축우용 사료내 분해가 어려운 셀룰로스, 리그닌 등을 함유한 조사료의 영양소 가치를 높일 수 있다고 판단된다.

효모(*Saccharomyces* spp.)는 Glutamic Acid를 생성하여 축우의 기호성을 증가시켜주고, 핵산과 아미노산과 비타민을 생성하며, 세포자체의 강한 흡수능력으로 영양소의 저장역할과 pH 완충역할을 한다. 장관 내에서 산소제거능력이 있어 반추위를 혐기상태로 만들어주어 이로 인해 반추미생물이 서식하기 좋은 형태가 된다. 또한 난분해성 물질(Cellulose, Hemi-cellulose 등) 분해미생물에 의한 발효능을 증가시키고, 장내 분변의 질소배출을 감소시키며 단백질, 섬유소의 분해능을 개선시킨다. 효모는 세포벽이 분해되면 용해성 다당류의 상태로 효모세포에

있던 MOS(Mannan Oligosaccharide)가 나오는데 MOS는 유해균을 응집하여 동물의 장 밖으로 배설시키는 작용을 한다. 또한, 풍부한 아미노산과 각종 비타민, 미네랄 및 미지성장인자(UGF)를 함유하며, 여러가지 소화효소를 생성하여 사료 영양분의 소화흡수를 활발하게 하여 동물의 정상성장과 생산성에 기여한다. 또, 단백질 이용율을 높여 분변 내 질소 함량을 낮추고 암모니아 발생량을 감소시킨다.

유산균(Lactic Acid Bacteria)은 장내 균총(Intestinal Microflora)을 구성하는 대표적인 균주로서 숙주에 대해 유해한 대사산물을 생성하지 않으며 유해세균의 증식을 억제하는 정장작용을 한다. 즉, 장내 세균의 개선과 정장작용, 장내 부패산물 억제, 암의 억제효과, 변비와 설사의 예방, 영양분의 소화흡수 증진 효과, 비타민 합성 및 이밖에도 장내에서 스테롤(sterol)물질을 성장에 이용함으로써 장으로부터 콜레스테롤 섭취를 감소시켜 순환기 계통의 건강 유지에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며, 소화기질환 치료, 유당 소화촉진, 변비 완화, 항암, 혈중 콜레스테롤 농도 감소 및 면역기능 활성화 등의 효과를 갖는다는 임상실험 보고가 있다.

DFMs(생균제)로서의 갖추어야 할 조건은 내산성 및 내담즙성이 있어 위산에서 살아남아 장까지 도달할 수 있어야 하며, 항생제 내성이 있으며, 장에 정착할 수 있어야 하고, 장내환경과 같이 통성 혐기성 조건하에서 성장이 우수해야 한다.

2차년도 협동연구과제에서는 라이신 제조 폐배지 부산물인 CMS(Concentrated Molasses Soluble) 첨가 배지를 이용하여 본 연구팀이 1차년도 연구과제에서 개발한 A. O.(*Asp. oryzae*), Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), LAB(*Lactobacillus* ssp.) 균주의 최적 배지 배합비 작성 및 배양조건 탐색 및 혼합 배양 기술을 개발하고 TMF 발효조건 설정과 TMF 생산기법을 확립할 수 있는 조건을 개발하고자 하였다.

#### (1). AYL(A. O., Yeast, LAB) 균주의 최적 배지 배합비 작성.

본 협동연구과제는 AYL 균주의 배양 특성을 알아보기 위해 *Aspergillus oryzae* 균주는 주관기관(한국방송통신대학교)에서 분양받은 균주(*Aspergillus oryzae* KNOU6983, KNOU6596, KNOU6095 및 KNOU40242)를, Yeast는 본 협동 2기관 연구팀이 개발한 균주를, 유산균은 협동 1기관인 단국대학교에서(*L. casei* DSB03, *L. plantarum* DSB05)에서 분양받아 최적 배지 배합비 작성 및 배양조건 탐색에 사용하였다. AYL의 배양을 위한 배지는 아래의 표 28.에서와 같이 연구용으로 사용되는 PD(Potato Dextrose)액상배지와 MRS(Man Rogosa, deMan) 액상배지를 대조구로 사용했으며, 본 협동연구과제팀이 개발한 산업용 액상배지 SB-L, SB-Y, SB-LY. 과 배양 비교실험을 하였다.

표 73. A. O., Yeast, LAB 혼합 균주 배지 조성

	Control	SB-L	SB-Y	SB-LY
CSL (Corn steep liquor)		6.00	-	3.00
Yeast extract powder		0.30	0.25	0.28
Skim milk powder		0.60	0.25	0.43
Glucose		2.00	0.50	1.25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.50	-	0.25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.25	-	0.13
감자전분		-	0.50	0.25
Molasses (당밀)		-	0.50	0.25
	D.W	90.35	98.00	94.16

Control : MRS broth, PD broth

(2). A. O. 혼합균주의 배양조건 탐색.

표 28의 배지를 사용하여 주관기관에서 분양받은 A. O. 혼합균주(*Aspergillus oryzae* KNOU6983, KNOU6596, KNOU6095 및 KNOU40242)를 배양하였으며, 배양온도는 32°C에서 shaking하면서 배양한 결과는 다음과 같다.

A. O.의 경우 broth 상태에서 그림 105, 106, 107처럼 bead를 형성하기 때문에 포자를 pipetting하기 매우 어려워 정확한 수를 counting하기가 매우 어려우나, 동일한 조건에서 60시간 배양 후 counting한 결과, SB-L배지가 가장 자랐으며( $1.4 \times 10^3$  spore/ml), SB-LY( $5.8 \times 10^2$  spore/ml), SB-Y( $2.5 \times 10^2$  spore/ml), PD( $2.3 \times 10^2$  spore/ml) 순으로 포자생장이 더디게 나타났다. PD 배지보다 본 연구팀에서 개발한 산업용 배지인 SB-Y 배지가 A. O.가 훨씬 잘 자라는 것으로 확인되었다.

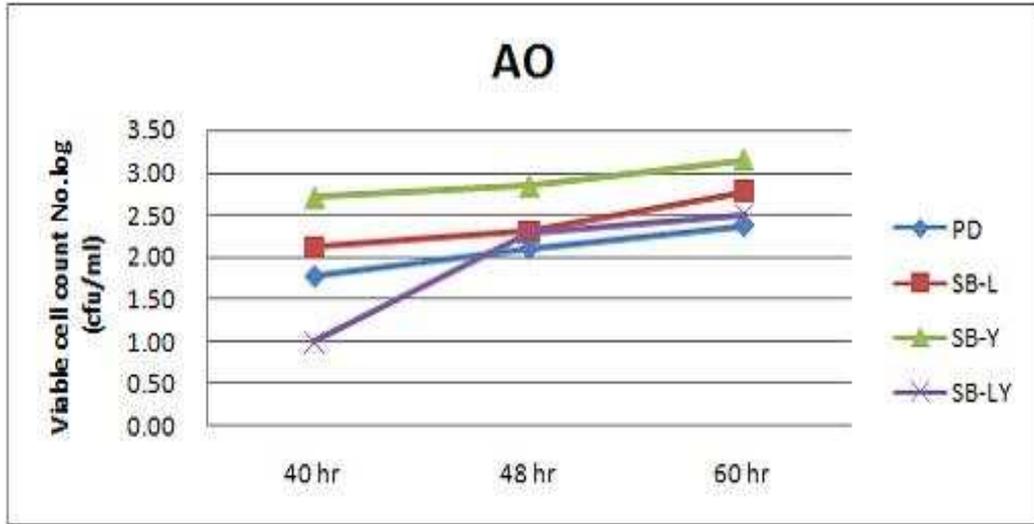


그림 104. 배지 조건에 따른 *A. oryzae* 성장 곡선



그림 105. 배지별 *A. O.* 성장 조사(1)    그림 106. 배지별 *A. O.* 성장 조사(1)    그림 107. 배지별 *A. O.* 성장 조사(1)

(3). *Saccharomyces cerevisiae* 혼합균주의 배양조건 탐색.

표 1의 배지를 사용하여 본 연구팀이 선발한 *Saccharomyces cerevisiae* SB07, SB10 혼합균주를 배양하였으며, 배양온도는 32°C에서 shaking하면서 배양한 결과는 다음과 같다.

*Saccharomyces cerevisiae*의 경우 그림 108처럼 4가지의 배지 모두 유사한 성장패턴을 보였으며 24시간에 최대 성장을 하고 이후 72시간까지 큰 감소를 보이지 않았다. 24시간 배양 후 counting 결과는, PD( $9.7 \times 10^7$  cfu/ml), SB-L배지( $9.5 \times 10^7$  cfu/ml), SB-Y( $8.1 \times 10^7$  cfu/ml), SB-LY( $6.3 \times 10^7$  cfu/ml)순으로 나타났다. *Saccharomyces cerevisiae* 혼합균주 배양에 사용한 배지는 PD배지에 비해 본 연구팀이 개발한 배지가 유사한 배양 결과를 나타내 산업적으로 가격적인 면에서 유리하다고 판단된다.

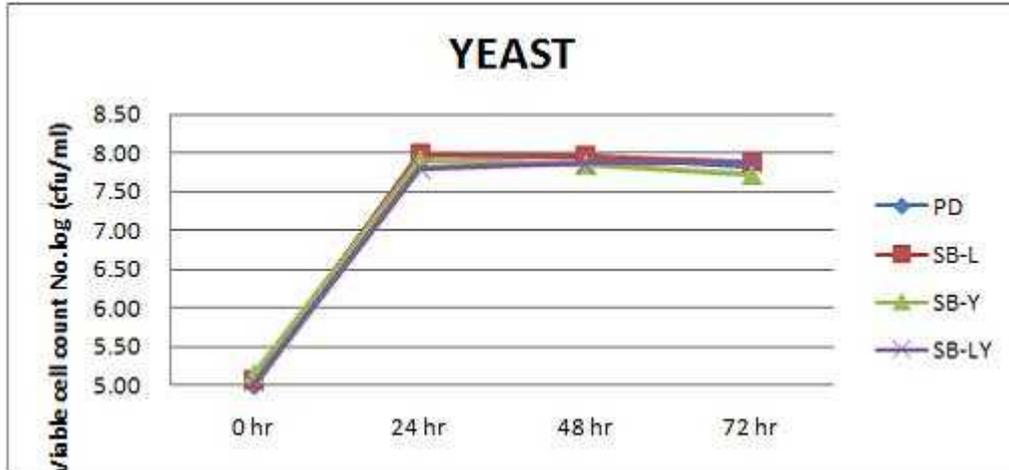


그림 108. 배지 종류에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* 성장 곡선

(4). CMS(Condensed Molasses Solubles) 첨가가 산업용배지(SB-LY)에서 AYL(A. O., Yeast, LAB)

혼합균주의 생장에 미치는 영향.

CMS 첨가에 따른 AYL 혼합균주의 배양 특성을 알아보기 위해, 제1협동기관(단국대)에서 개발한 LAB 배양조건과 본 연구팀에서 개발한 yeast 및 A. O. 혼합배양 조건을 절충하여, 아래 표 74와 같이 배합비를 작성하였다. 산업용 액상배지 SB-LY를 기초로 하여 CMS 5%, 10%, 20% 첨가한 배지에서 배양 비교실험을 하였으며, starter 균주는 AYL 혼합균주를 0.1% 접종하고, 32℃, 호기조건에서 shaking (1500 rpm) 조건에서 배양상태를 조사하였다.

그림 74. AYL 혼합 균주용 CMS 배지 조성

	SB-LY	5% CMS	10% CMS	20% CMS
CMS (Condensed molasses solubles)	-	5.00	10.00	20.00
CSL (Corn steep liquor)	3.00	3.00	3.00	3.00
Yeast extract powder	0.28	0.28	0.28	0.28
Skim milk powder	0.43	0.43	0.43	0.43
Glucose	1.25	1.25	1.25	1.25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25	0.25	0.25	0.25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.13	0.13	0.13	0.13
Soluble potato starch	0.25	0.25	0.25	0.25
Molasses (당밀)	0.25	0.25	0.25	0.25
D.W	94.16	85.35	88.00	74.16

pH : 7.0

(5). AYL(A. O., Yeast, LAB) 혼합균주의 배양조건 탐색.

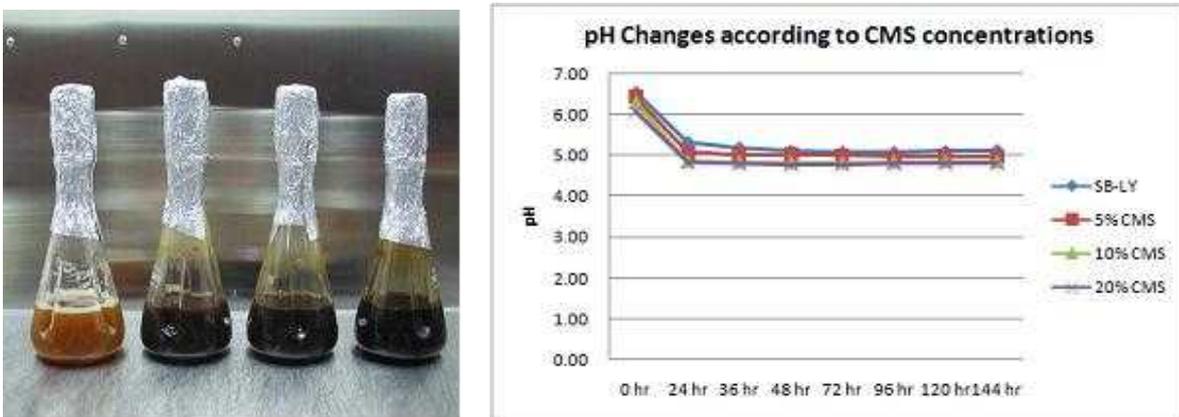


그림 109. CMS 함유 SB-LY 배지에서의 AYL 혼합균주 배양액(좌)과 pH 변화(우)

(가) pH 변화

SB-LY 배지에 CMS를 각각 5%, 10%, 20% 첨가한 배지에 pH를 7.0으로 조정 한 후 *Asp. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* ssp. 혼합 균주를 0.1% 접종한 다음 32°C에서 배양하면서 pH의 변화를 조사한 결과, Fig. 6 처럼 24시간 후에 pH가 5.0으로 떨어진 후 144시간 까지 큰 변화는 없었다.

(나) CMS 농도에 따른 LAB 성장 변화

CMS(Concentrated Molasses Soluble) 농도에 따른 LAB 성장을 조사한 결과 CMS 첨가한 경우 LAB의 생장이 훨씬 좋았으며, 24시간 이후 144시간 까지 LAB의 증감 없이 그 수준을 유지하였다 (그림 110). 144시간 배양 후 LAB 수는 CMS 농도가 20%, 10%, 5% 0% 수준에서 각각  $2.1 \times 10^9$  cfu/ml,  $1.7 \times 10^9$  cfu/ml,  $8.1 \times 10^8$  cfu/ml,  $4.0 \times 10^8$  cfu/ml을 나타내었다.

즉, CMS의 첨가로 LAB의 증가가 있음을 확인할 수 있었으며, CMS 10%와 20% 사이에는 유의성이 없었다. 연구용 유산균배지로 이용되는 배지인 MRS에서 배양 시  $10^8 \sim 10^9$  cfu/ml 정도 자라는 것이 일반적인 경향임을 감안할 때, SB-LY 배지가 LAB 산업용 배지원료로서 경제적이며 효율적인 원료임을 확인할 수 있었다.

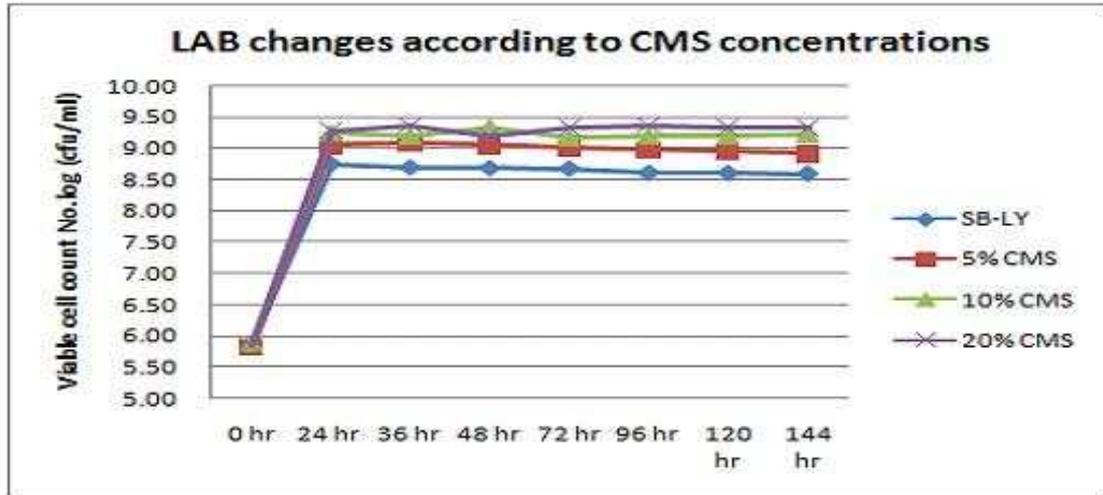


그림 110. CMS 농도를 달리한 배지에서의 유산균 성장 곡선

(다) CMS 농도에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* 성장 변화

CMS 농도에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* 성장을 조사한 결과 CMS 첨가한 경우 *Saccharomyces cerevisiae*의 생장이 CMS 첨가안한 SB-LY 배지보다 전체적으로 낮았다 (그림 111). 성장패턴은 24시간 까지 증가하다가 이후 144시간 까지 약간 감소하는 경향을 보였으나 CMS 무첨가 SB-LY 배지의 경우  $5.0 \times 10^7$  cfu/ml 수준에서 큰 변화 없이 유지하였다. 144시간 배양 후 *Saccharomyces* 수는 CMS 농도가 20%, 10%, 5% 0% 수준에서 각각  $2.2 \times 10^6$  cfu/ml,  $6.0 \times 10^6$  cfu/ml,  $3.1 \times 10^6$  cfu/ml,  $4.7 \times 10^7$  cfu/ml을 나타내었다. 즉, CMS의 첨가로 인해 오히려 *Saccharomyces*의 감소가 이루어 졌음을 확인할 수 있었다.

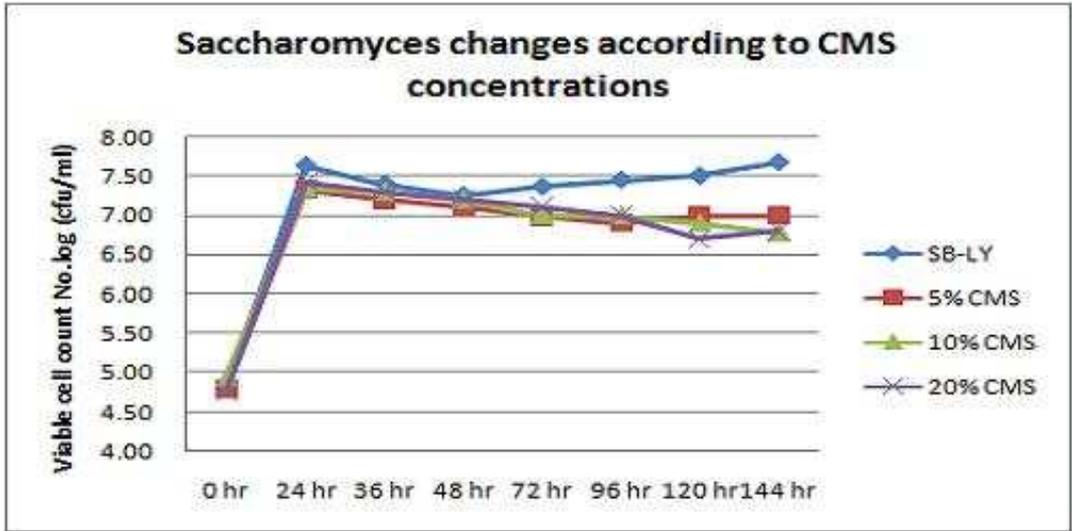


그림 111. CMS 농도를 달리한 배지에서의 효모균 성장 곡선

(라) CMS 농도에 따른 *A. O.*(*Aspergillus oryzae*) 성장 변화

CMS 농도에 따른 *A. O.*의 성장을 조사하였다. *A. O.* spore counting은 액상배지에서 포자가 bead를 형성하기 때문에 counting이 불가능하고, 그림 112와 같이 *A. O.* cell mass의 증가량으로 포자형성량을 추정하려 했지만 cell mass를 측정한 결과 오히려 감소하는 결과를 보였다. 이는 배지성분 중 포도당, 당밀, CSL 등의 탄수화물 분해가 일어나 CO<sub>2</sub> 가스 형태로 대기 중으로 달아난 결과로 추정된다. Cell mass의 감소량도 전체적으로 일정한 패턴을 보여 CMS의 첨가에 의한 유의성을 검증할 수 없었다.

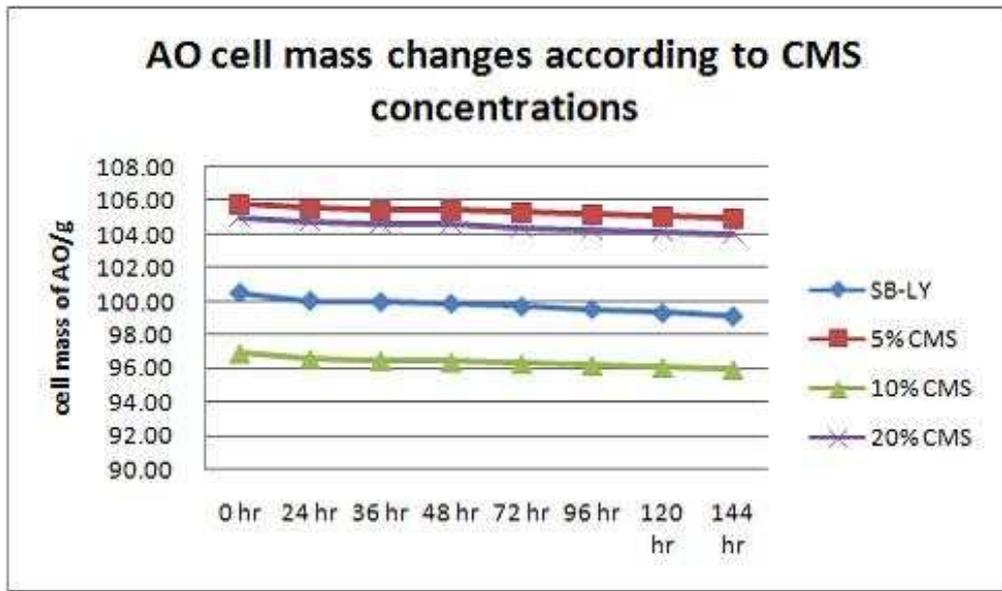


그림 112. CMS 농도를 달리한 배지에서의 *A. oryzae* 성장 곡선

(마) Jar Fermenter에서 AYL(A. O., Yeast, LAB) 혼합균주의 배양조건 탐색.

보다 정확한 AYL 혼합균주의 배양조건을 조사하기 위해 그림 113과 같이 Jar Fermenter(Ko Biotech, Model K123, Korea)에서 SB-YL에 10% CMS를 첨가한 배지를 pH 7.0로 조정 한 후 *Asp. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* ssp. 혼합균주를 0.1% 접종한 다음, 공기주입량 1.0 vvm, 32°C에서 126시간 동안 배양하면서 pH, AYL 균주의 변화를 조사하였다. pH의 변화는 초기 6.3 에서 18시간 배양 후 4.95로 낮아진 후 큰 변화는 없었 으며, 이는 Elenmyer flask에서 배양 시 pH 변화와 같음을 보였다.

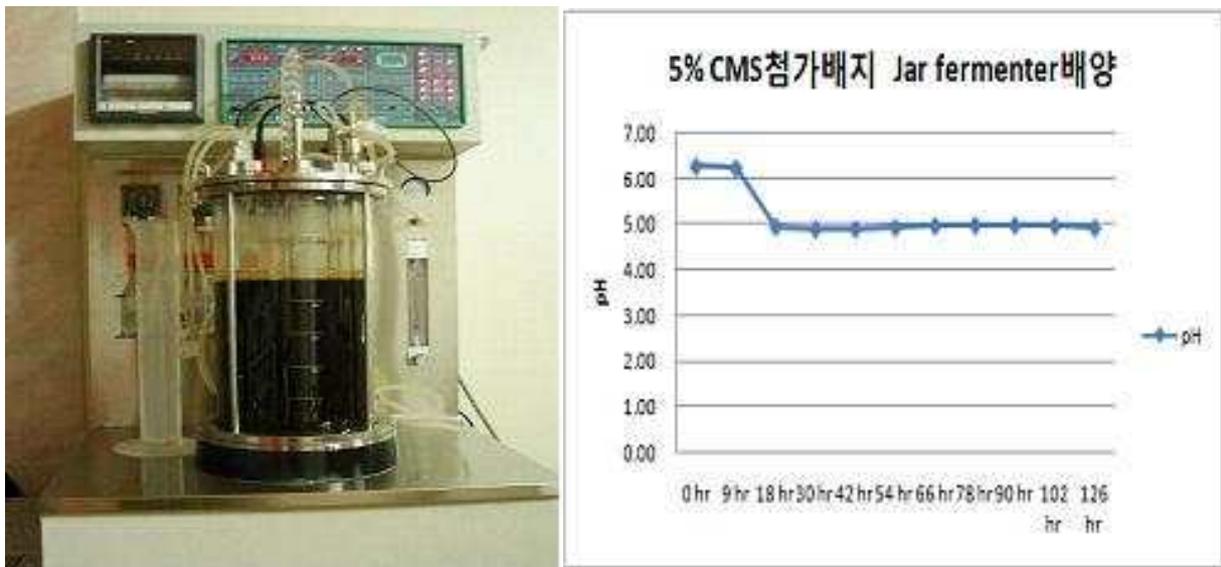


그림 113. 연속 배양 조건에서 AYL 혼합 균주 배양액의 pH 변화

Jar Fermenter에서 AYL의 변화를 조사한 결과 LAB와 *Saccharomyces cerevisiae* 18시간 이후 각각  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml,  $5.0 \times 10^7$  cfu/ml 수준을 유지하였다 (그림 114). 그러나 *Asp. oryzae* 는 약간의 포자만 관찰되었을 뿐 counting 되지 않았다. 추후의 실험을 통해 이를 정확하게 규명되어야겠지만 AYL 균주 중 A. O.와 LAB, Yeast간에 synergy가 아니라 competition이 일어난 것으로 추정된다.

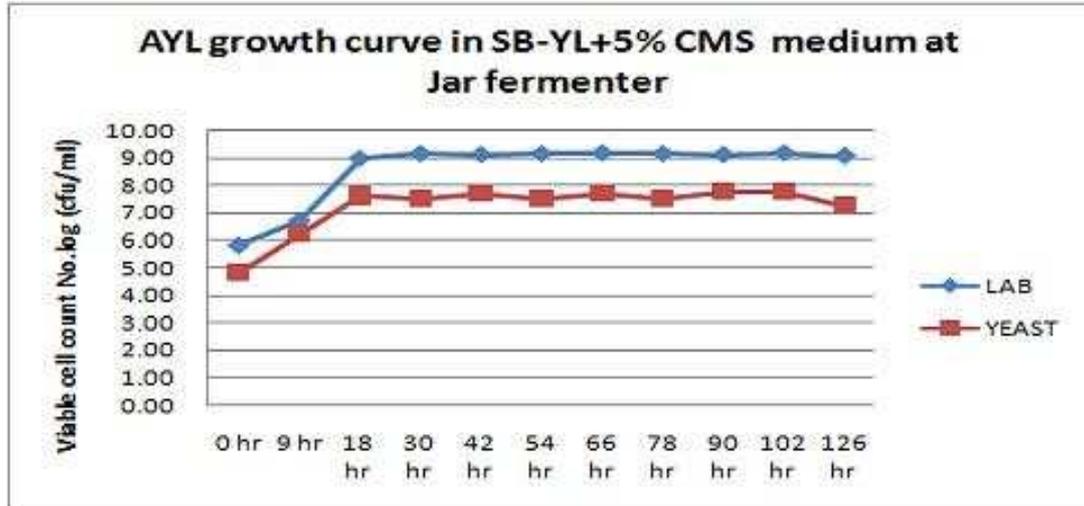


그림 115. 연속 배양 조건에서의 AYL 혼합균주의 성장곡선

(바) AYL(A. O., Yeast, LAB) 혼합균주의 배양시 morphology 관찰.

AYL(A. O., Yeast, LAB) 혼합균주가 같은 배지 내에서 함께 자랄 때 위상차 현미경(Nikon Eclips i80, Japan)을 이용하여 morphology를 관찰하였다. 단독 배양 시의 모습은 그림 116, 117, 118과 같으며, 혼합배양 시 각 균주의 모습은 그림 120과 같다.

그림과 같이 단독 배양할 때는 각각의 균주모습을 확인할 수 있었으나, 혼합 배양 시는 그림 119에서 보듯이 A. O.의 모습을 많이 관찰할 수 없음을 알 수 있었으며, LAB와 Yeast의 출현빈도도 LAB에 비해 Yeast가 훨씬 적음을 보였다. 이로 미루어 볼 때도 AYL 혼합배양 시 LAB의 비율이 제일 크고 Yeast, A. O. 순이었으며, 특히 A. O.의 관찰이 어려운 것으로 보아 AYL 혼합배양보다 AY와 따로 A. O.를 배양한 후에 TMF 제조 시 함께 접종하는 것이 TMF 발효에 유리할 것이라는 판단이 든다.



그림 116. 효모균



그림 117. *A. oryzae*



그림 118. 유산균

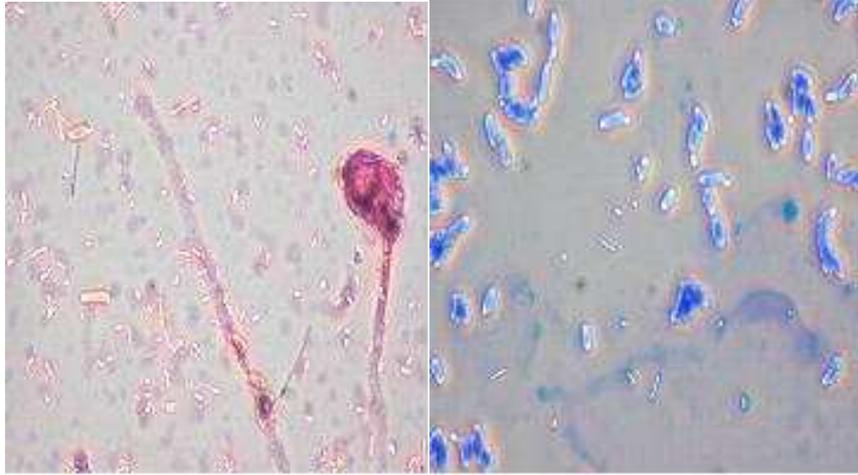


그림 119. AYL 혼합균

나. 산업용 CMS-AYL 혼합균주를 이용한 TMF의 최적 발효조건 설정.

국내 낙농가에서 TMR/TMF를 사료로 사용하는 비중이 거의 70% 이상을 점유하고 있으며, 최근에 한우농가와 비육농가들도 TMR/TMF를 사료로 사용하는 비중이 점차 증가하는 추세이다. 축우농가가 TMR/TMF를 사료로 사용하는 이유는 물론 축우의 생산성(낙농은 유량/유질 증가, 질병감소 등, 한우 및 비육은 육질등급 향상 및 기호성 증가)이 높아짐을 확인하였기 때문이다.

정부에서도 최근에 한우를 비롯한 축우농가에게 자가용 발효사료 제조기를 보급하고 발효제를 공급하는 등 TMR/TMF를 사료의 품질향상 지원에 전폭적인 지원을 하고 있는 실정이다. 자가용 발효사료 제조기를 이용하는 농가의 경우 미강, 당밀, 배합사료 등을 이용하여 starter 개념의 발효제를 제조한 다음 이를 TMF 제조에 활용하여 자가용 TMF를 만들어 축우용 TMF로 이용하고 있다.

본 연구과제도 AYL(A. O., Yeast, LAB) 혼합균주를 이용하여 starter 개념의 발효제의 발효과정에서 AYL의 변화를 조사하고, 축우용 완전발효사료(TMF ; Total Mixed Ration Fermentation) 제조 시 최적의 발효를 유도하기 위한 조건을 설정하기 위해 Lab. scale의 TMR을 제조하여 AYL을 접종하여 실온에서 발효하면서 AYL의 변화를 조사하였다.

#### (1). Starter 발효과정에서 AYL의 변화

농가에서 쉽게 구입할 수 있는 축우용 배합사료를 구입하여 수분 40%로 조절한 다음, 70℃에서 30분 열처리 후 AYL을 1.0% 접종하고 실온에서 발효하면서 AYL의 변화를 조사한 결과, LAB 와 Yeast 는 초기농도가 각각  $10^6$  cfu/g,  $10^5$  cfu/g으로 시작하여 14일 후  $5.0 \times 10^7$  cfu/g으로 증가하였다 (그림 120).

A. O.의 경우는 초기농도  $10^3$  cfu/g에서 시작하여 14일 경과 후  $4.8 \times 10^4$  cfu/g으로 증가하였다. Starter 발효의 경우, 배지를 배합사료로 사용하여 경제성을 고려하였으며, 정상적인 발효과정을 거친 것으로 판단되나 A. O.는 워낙 초기농도가  $10^3$  cfu/g으로 낮은 농도에서 시작하였기 때문에 14일 경과 후에도  $10^5$  cfu/g 이하 수준을 보인 것으로 판단된다.

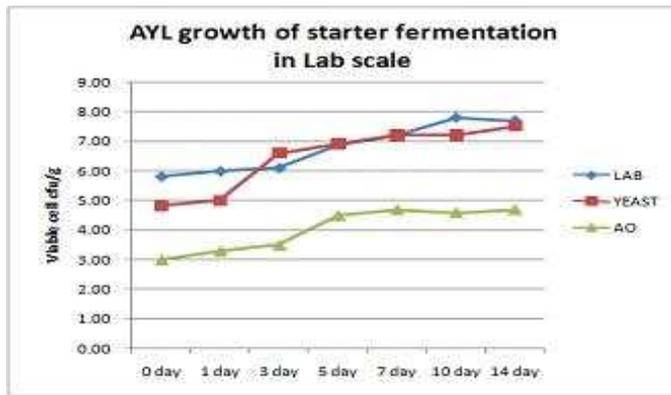


그림 120. 집종균 배양조건에서의 AYL 혼합균주 성장 곡선

### 3. CMS-AYL 균주의 산업화 시스템 연구

3차년도 제2협동연구과제는 TMF용 CMS-AYL 균주의 산업화 시스템 연구로서 라이신 제조 배지 부산물인 CMS(Concentrated Molasses Solubles) 첨가 배지를 이용하여 본 연구팀이 개발한 AYL미생물(A. O., *Asp. oryzae*), Yeast(*Saccharomyces cerevisiae*), LAB(*Lactobacillus* spp.) 균주를 이용하여 실제 TMR/TMF 사료공장에서 적용이 가능한 산업용 CMS-AYL 대량 생산시스템을 개발하고, TMF 제조, 가공 중 AYL미생물의 발효패턴 변화를 조사하여 본 연구팀이 개발한 TMF용 발효균주인 AYL미생물이 실제 현장에 적용할 때 나타날 수 있는 여러 가지 요인을 분석하여, 최적의 TMF 발효조건과 TMF 생산기법을 개발하고자 하였다.

#### 가. 산업용 CMS-AYL 대량 생산시스템 개발.

AYL(A. O., Yeast, LAB) 균주는 축우용 완전발효사료(TMf) 제조 시 사용할 수 있는 미생물로 인정받고 있는 안전한 미생물(GRAS ; Generally Recommended As Safty Micro-organisms)로서 TMF 발효미생물로 대부분 사용하고 있는 검증된 균주이다. 2차년도 연구사업에서 능력이 확인된 AYL 균주의 대량생산에 필요한 조건을 확립하기 위해서 제2협동연구팀이 보유한 산업용 Fermenter (10톤 capacity)를 이용하여 유산균, 효모, A. O. 각각에 대한 적용실험을 실시하고 액상 배양균체를 보관하기 위한 냉각장치에 보관 시 저장기간에 따른 미생물의 변화를 조사하였다.

TMF 제조 및 저장기간 동안의 미생물 변화분석은 제1협동기관(단국대)에서 진행하였으며, 본 제2 협동기관(선바이오)은 일반성분의 변화 즉, TMF 제조 및 발효에 따른 성분 변화, 발효 중의 암모니아태 질소화합물, 건물소화율, CMS 처리된 TMF의 수분 변화, 대가축 사료(한우용 TMF)로서의 기호성 등을 조사하였다.

#### (1). 배양기의 종류에 따른 유산균과 효모의 배양패턴 비교

Flask, Jar fermenter와 산업용 배양기에서 같은 조건으로 배양했을 때 실제 배양결과를 비교하기 위해 본 제1 협동연구팀(단국대학교)에서 선발한 균주 중 가장 우수하다고 판단된 *L. casei* DSB03, *L. plantarum* DSB05 균주를 다음의 조건에서 배양하였으며, 배양조건 및 배양 결과는 다음과 같다.

표 75. 배양기 종류에 따른 유산균 배양조건

배양 도구	Flask	Jar fermenter	Industrial fermenter(10ton)
살균온도/시간	120℃/15분	120℃/15분	100℃/30분
배지	SB-LY	SB-LY	SB-LY
배양 온도/시간	32℃	32℃	32℃
공기 주입량	-	1 vvm	0.5 vvm
배양 시간	24	24	24

실험실 수준의 간단한 flask 나 Jar fermenter에서 유산균 배양과 산업용 scale(10 ton capacity)의 유산균 배양을 비교하기 위해서 실험한 결과는 아래 그림 121과 같다. SB-LY 배지(5% CMS 첨가)에서 *Lactobacillus* ssp.는 24시간 배양 후 counting 결과는 flask, Jar fermenter, 산업용 배양기에서 각각  $8.7 \times 10^8$ ,  $8.75 \times 10^8$ ,  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml으로 나타나 배양기 형태에 따른 차이는 크게 없는 것으로 판단된다. pH의 변화도 큰 차이 없이 일정한 패턴으로 감소하는 경향을 보여 미생물 수와 마찬가지로 큰 차이가 없음을 보였다.

그러나, 동일한 미생물, 온도, 배지, 배양조건일지라도 실제 산업현장에서 대규모의 배양기를 이용하여 배양할 때 오염, 열처리 미숙, 공기 주입 미숙 등 예기치 못한 상황이 발생할 수 있어 세심한 주의를 해야 할 부분이라 판단된다.

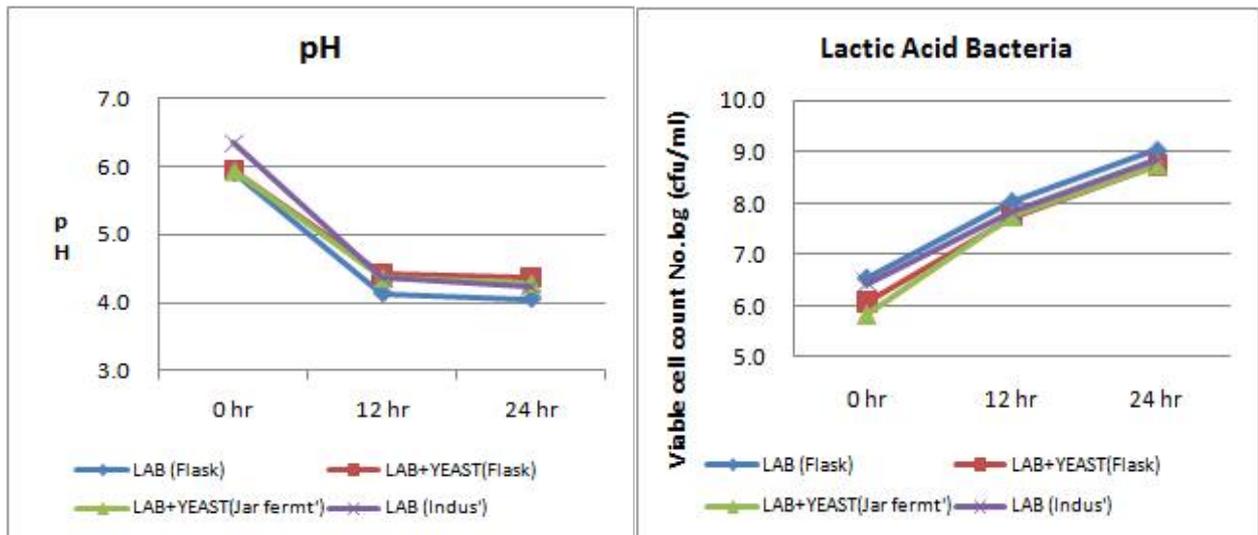
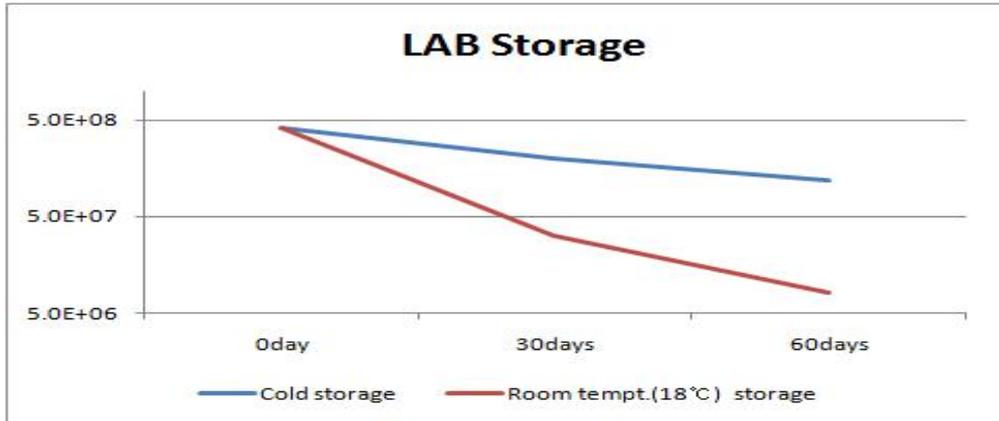


그림 121. 배양조건에 따른 배양액의 pH(좌)와 균체수(우)

나. 냉장 보관 시 저장기간에 따른 미생물 변화 조사

산업용 배양기에서 배양한 AYL 미생물을 냉장상태(4℃)에서 보관하면서 미생물 수의 변화를 조사한 결과는 다음과 같다. 유산균의 경우 2달 냉장저장 후  $4.2 \times 10^8$  cfu/ml 에서  $1.2 \times 10^7$  cfu/ml 으로 감소되어 저장에 민감하였으며 실온 저장의 경우는 같은 기간에  $8.1 \times 10^6$  cfu/ml으로 감소가 일어나 유산균의 저장은 반드시 냉장상태를 유지하여야 하며, 냉장보관도

1달은 넘기지 않는 것이 실제 사용에 적당할 것이라고 판단된다.



	0일	30일	60일
냉장저장	4.2X10 <sup>8</sup>	2.0X10 <sup>8</sup>	1.2X10 <sup>8</sup>
	100%	47.6%	28.6%
실온(18°C) 저장	4.2X10 <sup>8</sup>	3.2X10 <sup>7</sup>	8.1X10 <sup>6</sup>
	100%	7.62%	1.95%

표 122. 보관조건에 따른 미생물 균수 변화

나. TMF 저장 중 일반성분의 변화

TMR(Total Mixed Ratio)을 배합비에 따라 제조하였으며, NIR(Near Infra Red) Analyzer를 이용하여 TMF의 성분을 분석한 결과, 조단백질이 15.4%, 조섬유가 15.5%, NDF가 43.8%, ADF가 23.8%이며, 조섬유가(Roughage Factor)가 42.1%로 나타나 축우(한우비육)용 사료로서 우수한 품질을 보였다.

사료공장에서 일련의 TMR 제조과정은 그림 123과 같으며, 컴퓨터 프로그램에 따라 자동 계량 및 최종배합이 끝난 TMR에 연구원들이 직접 AYL미생물을 혼합하여 TMF적용실험에 사용하였다.

표 76. TMF 배합비

원료	%	성분	%
옥수수	10.0	정미에너지(NE)	1.71Mcal/kg
flaked corn	10.0	대사에너지(ME)	2.52Mcal/kg
단백피	5.8	조단백질(Crude Protein)	15.44
당밀	3.0	수용성단백질(SIP)	6.67
맥주박	20.0	분해단백질(DIP)	10.08
면실피	2.0	우회단백질(UIP)	5.36
미강	15.0	불용성 단백질(ADICP)	3.28
전지면실	4.0	비섬유탄수화물(NFC)	26.97
청취	4.0	총섬유소-VS(NDF)	43.83
팜박	5.0	총섬유소-CS(cNDF)	35.79
벗집	7.0	비소화섬유소-VS(ADF)	23.81
소금	0.2	비소화섬유소-CS(cADF)	19.09
중조	0.5	가소화 NDF(dif. NDF)	23.09
석회석	0.5	리그닌(Lignin)	3.75
물	7.9	조지방(Crude Fat)	5.04
합계	100.0	조섬유(Crude Fiber)	15.46
		조회분(Ash)	8.71
		칼슘(Calcium)	0.82
		인(Phosphorus)	0.45
		마그네슘(Magnesium)	0.28
		칼륨(Potassium)	1.61
		조사료가(Roughage Factor)	42.12

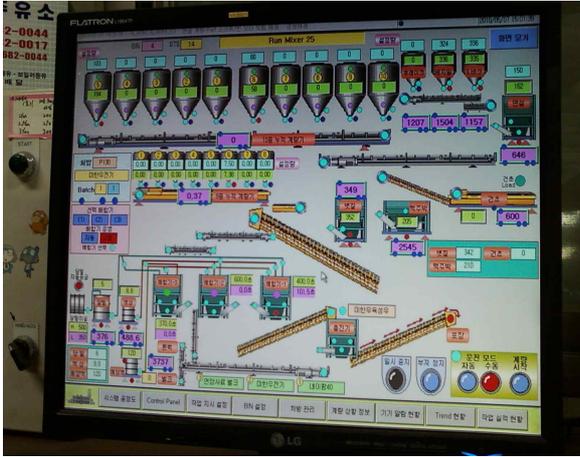


그림 123. TMR 제조 공정

(1). AYL-TMF의 저장 중 암모니아태 질소화합물(NH<sub>4</sub>-N)의 변화

일반적인 silo에 저장하는 silage, ensilage나 원형곤포 silage에서 저장이나 숙성 중 조사료나 알곡 등에 함유된 단백질이 미생물의 작용에 의해 변화가 일어나게 되며, 여러 요인 중 주로 낮은 pH, 높은 함량의 젖산, 낮은 함량의 낙산과 초산, 낮은 비율의 암모니아태 질소화합물 함량 등이 좋은 사일리지의 조건이 된다.

AYL-TMF의 저장 중 암모니아태 질소화합물의 변화를 조사하기 위해 우선 TMF 제조

시 10% CMS 처리구와 무처리구로 나누고(Negative Treat'm 와 Positive Treat'm), 저장온도를 0℃, 15℃, 30℃로 나누고, 각각의 처리구에 미생물처리를 유산균, 유산균+효모, 유산균+효모+A. O.의 세 그룹으로 나누고 미생물첨가량을 0.5%와 1.0%로 하였으며, 각각의 처리에 따른 암모니아태 질소화합물(NH<sub>4</sub>-N)의 변화를 조사한 결과는 표 76.와 같다.

표 77. AYL-TMF의 처리방법에 따른 구분

* 1. negative control(No treatment with CMS)	* 8. positive control(treatment with CMS)
2. 0.5% Lactic acid bacteria treated TMF	9. 0.5% Lactic acid bacteria treated CMS-TMF
3. 1.0% Lactic acid bacteria treated TMF	10. 1.0% Lactic acid bacteria treated CMS-TMF
4. 0.5% of LAB+Yeast treated TMF	11. 0.5% of LAB+Yeast treated TMF
5. 1.0% of LAB+Yeast treated TMF	12. 1.0% of LAB+Yeast treated TMF
6. 0.5% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF	13. 0.5% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF
7. 1.0% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF	14. 1.0% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF

CMS 무첨가구(1-7번)와 CMS처리구(8-14번)를 비교해보면, 저장온도, 저장기간이나 AYL미생물과 관계없이 암모니아태 질소화합물(NH<sub>4</sub>-N)의 함량은 평균 14.8%와 11.7%로 나타나 CMS 처리로 인해 NH<sub>4</sub>-N의 함량이 현저히 감소하여 CMS의 사료로서의 가치를 확인하였다.

AYL미생물 처리에 의한 NH<sub>4</sub>-N의 함량을 비교해 보면 CMS 무첨가구는 16.56%에서 14.8%로, CMS 첨가구는 12.95%에서 11.7%로 각각 감소하였으나, 저장온도나 AYL미생물의 종류 등에 의한 암모니아태 질소화합물 함량의 감소는 분석결과, 유의성은 없는 것으로 판단되어 AYL미생물 처리에 의한 효과를 확인할 수 있었다.

표 78. AYL-TMF의 저장 중 암모니아태 질소화합물의 변화

제조일/ 시료번호	NH <sub>4</sub> -N (%)	저장온도/ 저장기간/ 시료번호	NH <sub>4</sub> -N (%)	저장온도/ 저장기간/ 시료번호	NH <sub>4</sub> -N (%)	저장온도/ 저장기간/ 시료번호	NH <sub>4</sub> -N (%)
0일/1	16.56	30-14-1	14.33	15-28-1	15.90	0-28-1	16.27
		30-14-2	14.02	15-28-2	16.24	0-28-2	16.03
0일/3	16.56	30-14-3	15.60	15-28-3	15.63	0-28-3	15.70
		30-14-4	14.94	15-28-4	15.16	0-28-4	14.39
		30-14-5	15.17	15-28-5	14.49	0-28-5	14.31
0일/6	16.57	30-14-6	14.78	15-28-6	14.92	0-28-6	13.74
		30-14-7	14.68	15-28-7	13.58	0-28-7	13.82
<b>평균</b>	<b>16.56</b>		<b>14.87</b>		<b>15.00</b>		<b>14.67</b>
		30-14-8	11.34	15-28-8	11.74	0-28-8	11.52
		30-14-9	12.50	15-28-9	11.97	0-28-9	10.49
		30-14-10	12.51	15-28-10	12.01	0-28-10	11.77
		30-14-11	11.05	15-28-11	11.63	0-28-11	11.63
0일/12	12.95	30-14-12	10.26	15-28-12	11.07	0-28-12	11.66
		30-14-13	12.51	15-28-13	12.74	0-28-13	11.35
		30-14-14	11.55	15-28-14	12.31	0-28-14	12.24
<b>평균</b>	<b>12.95</b>		<b>11.68</b>		<b>11.93</b>		<b>11.52</b>

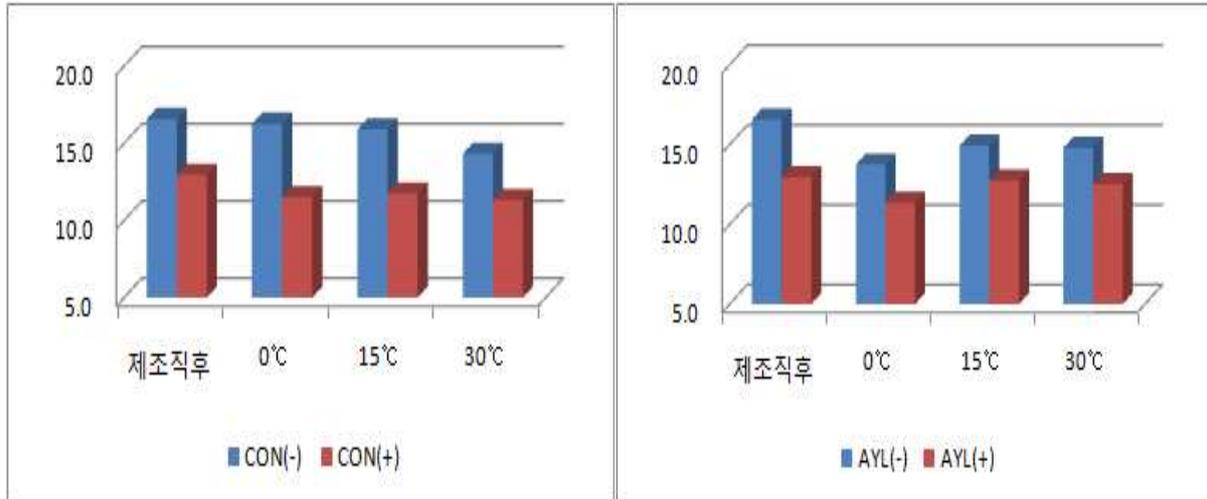


그림 124. 보관 조건에 따른 TMF내 질소 성분 변화 추이

(2). AYL-TMF의 저장 중 건물 소화율의 변화

AYL-TMF의 저장 중 건물 소화율의 변화를 조사하기 위해 '가'와 같은 방법으로 처리구를 나누고, 각각의 처리에 따른 건물 소화율의 변화를 조사한 결과는 표 76.와 같다.

CMS 무첨가구(1-7번)와 CMS처리구(8-14번)의 건물 소화율은 각각 평균 82.7%와 84.1%로 나타나 CMS 무처리구의 건물소화율이 약간 높았으나 유의성은 없었으며, 발효 전 TMF의 건물 소화율을 분석한 결과, CMS 무처리구와 CMS 처리구의 건물소화율은 각각 83.0%와 81.0%로 CMS 무처리구가 약간 소화율이 높았다.

AYL미생물 처리에 의한 건물소화율을 비교해 보면, CMS 무첨가구는 83.0%에서 82.7%로 차이가 없었으나, CMS 첨가구는 81.0%에서 83.5%로 AYL미생물 처리에 의해 건물소화율이 증가하였으며, 저장온도에 따른 건물소화율을 보면 4°C, 15°C, 30°C 각각 평균 83.3%, 83.0%, 82.9%로 나타나 4°C저장에서 건물소화율이 가장 높았다. 이는 고온발효보다 저온에서 장시간 발효하는것이 건물소화율이 높다는 의미를 지닌다. AYL미생물의 종류 등에 의한 건물소화율의 차이는 유의성이 없는 것으로 판단된다.

표 79. AYL-TMF의 저장 중 건물 소화율의 변화

시료명	시험결과 (%)	저장온도/ 저장기간/ 시료번호	시험결과 (%)	저장온도/ 저장기간/ 시료번호	시험결과 (%)	저장온도/ 저장기간/ 시료번호	시험결과 (%)
0-1	83.3	4-28-1	82.5	15-28-1	86.0	30-14-1	80.8
		4-28-2	82.0	15-28-2	83.5	30-14-2	82.2
0-3	82.5	4-28-3	81.0	15-28-3	84.9	30-14-3	79.6
		4-28-4	83.5	15-28-4	85.0	30-14-4	81.4
		4-28-5	81.6	15-28-5	81.5	30-14-5	82.4
0-6	83.3	4-28-6	86.1	15-28-6	81.1	30-14-6	81.9
		4-28-7	82.7	15-28-7	82.5	30-14-7	83.2
<b>평균</b>	<b>83.0</b>		<b>82.8</b>		<b>83.5</b>		<b>81.6</b>
		4-28-8	79.0	15-28-8	84.7	30-14-8	85.5
0-9	80.5	4-28-9	82.8	15-28-9	79.4	30-14-9	86.6
		4-28-10	88.0	15-28-10	86.8	30-14-10	84.3
0-11	78.8	4-28-11	87.3	15-28-11	81.6	30-14-11	83.0
0-12	83.7	4-28-12	79.1	15-28-12	82.6	30-14-12	81.8
		4-28-13	86.7	15-28-13	79.9	30-14-13	84.1
		4-28-14	85.9	15-28-14	85.4	30-14-14	82.5
<b>평균</b>	<b>81.0</b>		<b>83.8</b>		<b>82.5</b>		<b>84.2</b>

(3). AYL미생물 처리한 TMF의 저장 중 수분의 변화

대부분의 TMF 배합비는 수분함량 40-45%를 권장하고 있으며, 미생물 발효에도 가장 좋은 수분조건은 40-50%로 알려져 있다. 본 연구에서도 배합비의 수분을 40%로 정하였으며 그림에서 보듯이 CMS 처리유무, 저장온도(0℃, 15℃, 30℃), AYL 미생물 종류에 관계없이 수분함량에는 변화가 없음을 보여주었다.

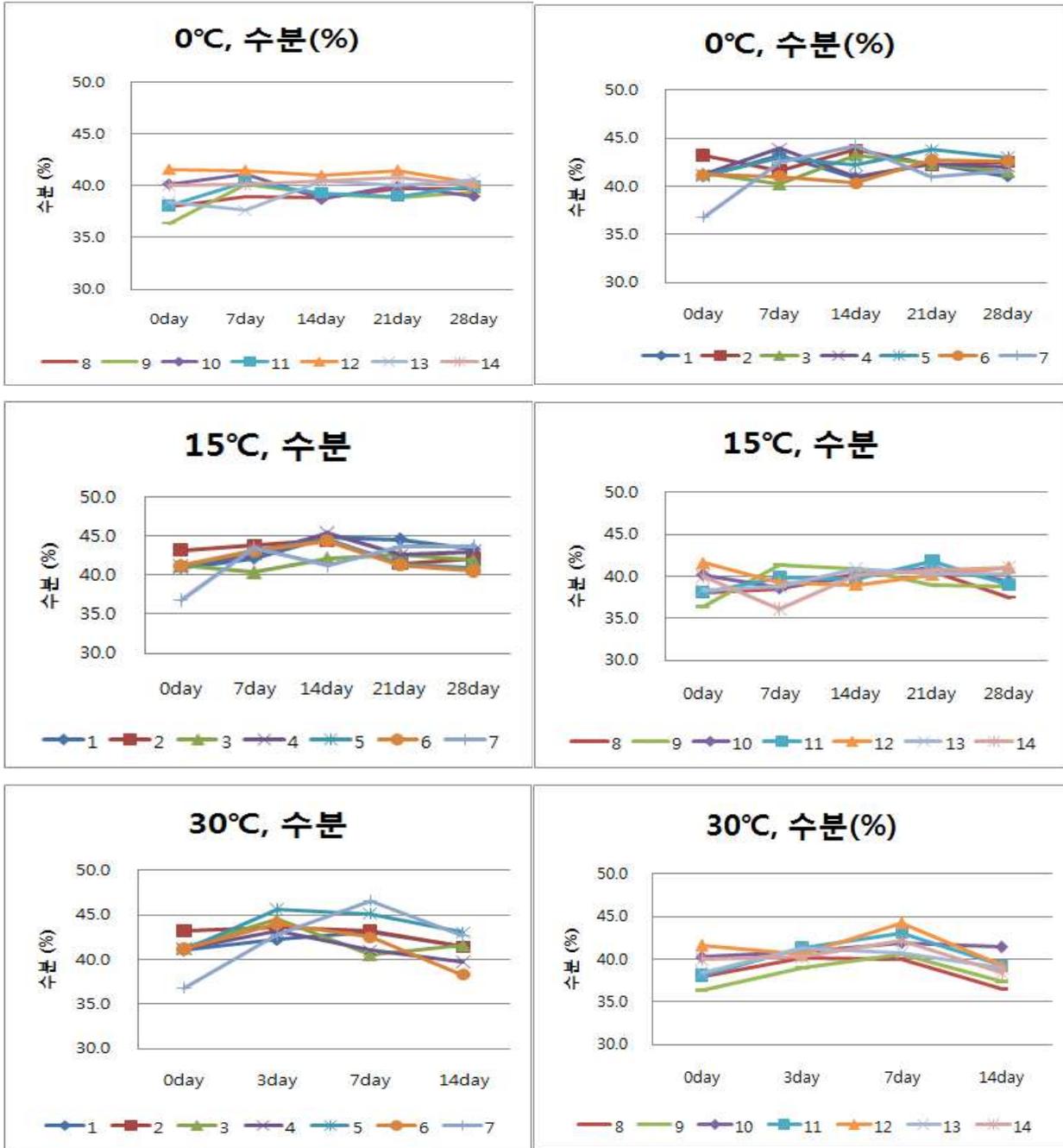


그림 125. 보관에 따른 TMF의 수분 변화

다. TMF 발효 시 일반성분의 변화

(1). AYL 미생물 처리에 따른 None CMS-TMF의 일반성분 변화

TMF 공장에서 제조된 None CMS-TMF의 일반성분 변화는 표 80과 같다. 표 80에서 보듯이 발효를 통해 정미, 대사에너지의 변화는 없었으며, 조단백을 포함한 수용성, 분해, 우회, 불용성 단백질 모두 분해가 일어나 감소하는 경향을 보였으며, 총섬유소, 비소화섬유소, 가소화 NDF 등의 감소도 보여 대부분의 단백질과 섬유소의 분해가 일어난 것을 확인할 수

있었다.

표 80. None CMS-TMF의 일반성분 변화

	1	2	3	4	5	6	7	평균
정미에너지 (Mcal/kg)	1.71	1.73	1.73	1.73	1.72	1.72	1.72	1.72
대사에너지 (Mcal/kg)	2.52	2.58	2.56	2.58	2.56	2.56	2.54	2.56
조단백질(%)	15.44	15.04	14.43	14.79	14.77	14.67	14.49	14.80
수용성단백질(%)	6.67	6.72	6.07	6.24	6.05	6.13	6.21	6.23
분해단백질(%)	10.08	9.97	9.44	9.78	10.00	9.59	9.84	9.81
우회단백질(%)	5.36	5.08	4.99	5.01	4.76	5.08	4.65	4.99
불용성 단백질(%)	3.28	2.88	2.73	2.77	2.87	2.80	2.67	2.86
비섬유탄수화물(%)	26.97	31.22	30.50	31.10	30.29	30.60	29.89	30.08
총섬유소-VS(%)	43.83	42.67	42.64	41.58	42.33	42.06	42.80	42.56
총섬유소-CS(%)	35.79	31.45	32.41	28.50	30.69	31.17	31.11	31.59
비소화섬유소 -VS(%)	23.81	22.22	21.78	20.10	20.92	20.57	21.86	21.61
비소화섬유소 -CS(%)	19.09	17.28	17.94	16.05	16.54	16.33	17.10	17.19
가소화 NDF(%)	23.09	18.70	21.45	19.76	18.66	19.40	20.36	20.20
리그닌(%)	3.75	3.24	3.53	3.12	3.50	3.41	3.39	3.42
조지방(%)	5.04	4.50	4.81	4.83	4.77	4.74	4.78	4.78
조섬유(%)	15.46	14.97	14.63	13.07	14.30	14.00	15.19	14.52
조회분(%)	8.71	6.56	7.62	7.70	7.84	7.92	8.04	7.77
칼슘(%)	0.82	0.72	0.76	0.78	0.75	0.78	0.75	0.77
인(%)	0.45	0.45	0.43	0.45	0.45	0.43	0.45	0.44
마그네슘(%)	0.28	0.24	0.23	0.23	0.23	0.24	0.22	0.24
칼륨(%)	1.61	1.24	1.32	1.25	1.28	1.26	1.32	1.33
조사료가(%)	42.12	38.36	39.64	37.55	39.52	37.73	39.96	39.27

(2). AYL 미생물 처리에 따른 CMS-TMF의 일반성분 변화

CMS-TMF의 일반성분 변화는 조단백을 포함한 수용성, 분해, 우회, 불용성 단백질 모두 성분이 약간씩 증가하여 None CMS-TMF의 경우와 다른 경향을 보였다. 총섬유소, 비소화

섬유소, 가소화 NDF 등의 감소도 보여 대부분의 단백질과 섬소의 분해가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

표 81. CMS-TMF의 일반성분 변화

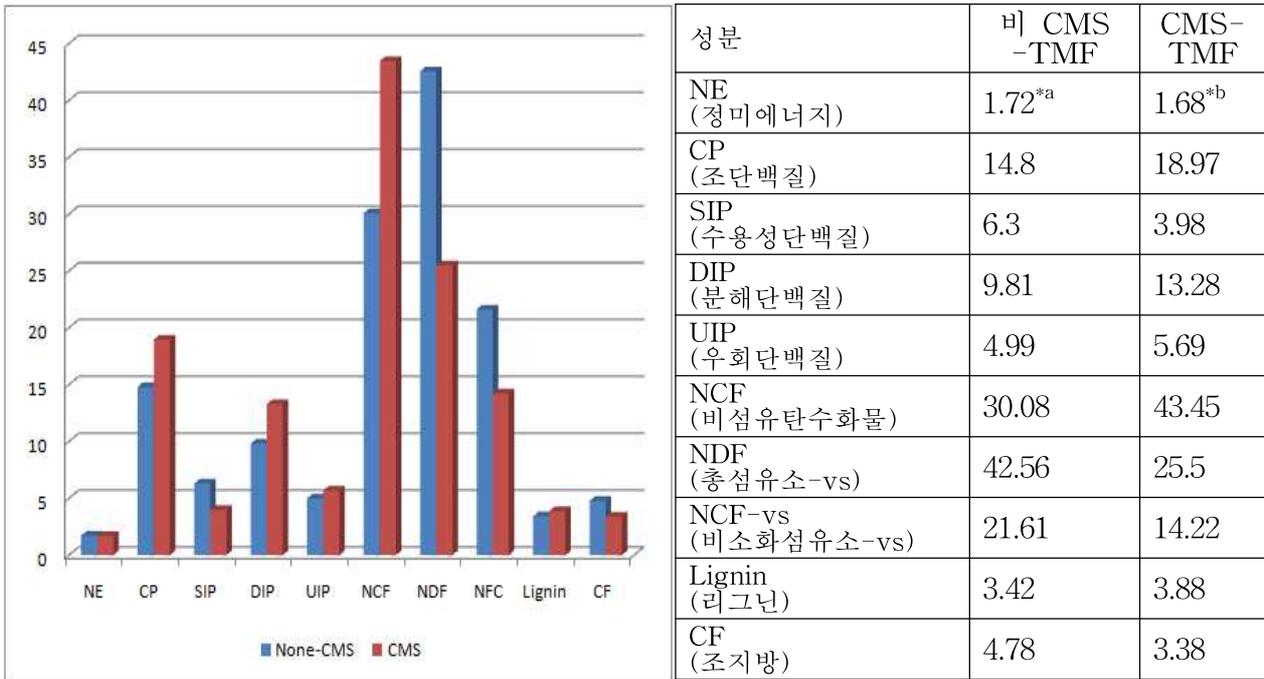
	8	9	10	11	12	13	14	평균
정미에너지 (Mcal/kg)	1.66	1.70	1.70	1.68	1.68	1.68	1.69	1.68
조단백질(%)	18.35	17.91	19.66	19.71	19.05	18.48	19.65	18.97
수용성단백질(%)	3.85	3.76	4.13	4.14	4.00	3.88	4.13	3.98
분해단백질(%)	12.85	12.54	13.76	13.80	13.34	12.94	13.76	13.28
우회단백질(%)	5.51	5.37	5.90	5.91	5.72	5.54	5.90	5.69
비섬유탄수화물(%)	38.39	44.07	47.09	42.80	44.37	43.21	44.24	43.45
총섬유소-VS(%)	30.08	25.97	21.66	25.60	24.27	26.73	24.22	25.50
비소화섬유소 -VS(%)	18.28	15.54	10.90	12.87	12.41	17.10	12.47	14.22
리그닌(%)	4.58	3.95	3.30	3.90	3.69	4.07	3.68	3.88
조지방(%)	3.43	3.61	3.26	3.38	3.41	3.29	3.31	3.38
조섬유(%)	15.58	13.25	9.29	10.96	10.58	14.58	10.63	12.12
조회분(%)	9.75	8.44	8.33	8.51	8.91	8.29	8.58	8.69

* 1. negative control(No treatment with CMS)	* 8. positive control(treatment with CMS)
2. 0.5% Lactic acid bacteria treated TMF	9. 0.5% Lactic acid bacteria treated CMS-TMF
3. 1.0% Lactic acid bacteria treated TMF	10. 1.0% Lactic acid bacteria treated CMS-TMF
4. 0.5% of LAB+Yeast treated TMF	11. 0.5% of LAB+Yeast treated TMF
5. 1.0% of LAB+Yeast treated TMF	12. 1.0% of LAB+Yeast treated TMF
6. 0.5% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF	13. 0.5% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF
7. 1.0% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF	14. 1.0% of LAB+Yeast+A. O. treated TMF

(3). AYL 미생물 처리에 따른 None CMS-TMF와 CMS-TMF의 일반성분 비교

None CMS-TMF와 CMS-TMF의 일반성분(AYL미생물 처리구를 평균한 수치임)는 그림과 표 81과 같다. 단백질류(CP, SIP, DIP, UIP), NCF와 리그닌은 CMS처리한 TMF에서 상

당히 높았으며, 섬유소와 지방은 None CMS-TMF에서 높게 나타났다. 이는 CMS 10%처리  
에 의해 단백질과 섬유소 함량이 높아진데서 기인한다고 판단된다.



<sup>\*a</sup> ; 처리 1-7의 평균치, <sup>\*b</sup> ; 처리 8-14의 평균치

그림 126. CMS 첨가 여부에 따른 사료의 화학적 조성 차이

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 목표달성도

세부 연구 목표	연구 수행 내용	목표 달성도
○ CMS첨가 TMR의 사료가치 평가 및 CMS 첨가 TMF 균주 선발	○ CMS 첨가수준에 따른 TMR의 사료가치 평가 ○ 원료사료의 조건에 따른 CMS첨가 TMR의 사료가치 평가 ○ CMS첨가 TMF용 균주 선발	100%
○ CMS-AY 및 CMS-LAC TMF 사양체계 개발	○ CMS-AY TMF의 사료가치 평가 및 보관성 평가 ○ CMS-LAC TMF의 사료가치 평가	100%
○ CMS-AY-LAC TMF 실용화 방안 개발	○ 육성우용 CMS-AYL-TMF 사양체계 개발 ○ 비육전기용 CMS-AYL-TMF 사양체계 개발 ○ CMS-AYL-TMF의 경제성 분석	70%
CMS 배지에서 생육이 우수한 유산균 선발, 동정 및 특성 조사	○ CMS 20% 함유배지에서 생육이 우수한 유산균 3종 최종 선발 ○ 최종 선발된 균주 3종의 생리학적 특성 조사 ○ 최종 선발된 균주 3종의 생화학적 특성 조사 및 동정	100%
CMS를 이용한 유산균 배양조건 확립	○ 적정 첨가수준을 10% CMS 로 결정 ○ CMS에 기초한 산업용 유산균 배지의 조성 확립 ○ 균주 상호간의 길항작용 또는 성장촉진여부 조사 ○ Pilot scale 적용 실험	100%
TMF용 품질관리기준 설정	○ TMF 저장중 미생물의 경시변화 관찰 ○ TMF 저장중 유기산, flavor 및 악취발생 여부 관찰	100%
○ 선발된 균주의 배양 적합성 검토	○ 고상 배양상태에서의 흑곡균(A. O. : <i>Asp. oryzae</i> ) 최적 배양조건 개발 ○ 고상 배양상태에서의 효모(Yeast : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 최적 배양조건 개발	100%
○ CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발 및 TMF 발효조건 설정	○ CMS-AYL 혼합 균주 배양기법 개발 ○ TMF의 발효조건 개발 및 생산기법 확립	100%
○ CMS-AYL 산업화 시스템 확립 및 TMF 생산기법 확립	○ 산업용 CMS-AYL 대량 생산 시스템 개발 ○ TMF 일반성분의 변화 ○ TMF 기호성 조사	100%

## 제 2 절. 관련분야에의 기여도

### 1. CMS 첨가 TMR의 사료가치 평가 및 CMS 첨가용 TMF 균주 선발

원료사료의 대부분을 수입하는 국내의 실정을 살펴보면, 2006년 1월부터 10월까지 10개월간 사료용으로 수입된 사료용 곡류는 대략 686만 톤이었으며, 식물성단백질은 226만 톤이었다. 또한 수입된 원료사료를 이용하여 생산된 반추가축용 배합사료의 생산량은 423만 톤이었다. 따라서 반추가축용 사료의 10%만 CMS로 대체할 경우 국내에서 라이신의 발효과정에서 발생하는 산업폐기물인 CMS를 전량 소비할 수 있을 뿐 아니라, 사용된 CMS에 상응하는 식물성단백질 사료의 수입절감효과를 유도할 수 있을 것이다. 또한 본 연구의 과정에서 개발된 비지박과 CMS를 발효시킨 사료는 발효과정을 통하여 NPN을 미생물태단백질로 전환시킴으로써 단위가축의 사료배합에 이용할 수 있는 형태로 전변시킴으로써 저가의 새로운 사료자원을 개발하는 결과를 초래했다. 이는 축산농가의 입장에서는 추가의 생균제 급여가 필요하지 않은 고품질의 사료를 저가로 공급받음으로써 농가의 수익성 증진에 기여할 수 있을 것이다.

그러나 CMS의 사용은 높은 점도로 인해 공장 기계 가동에 문제점들을 야기시킬 수 있을 뿐 아니라, 사료내 첨가량이 증가함에 따라 가축의 기호성이 떨어질 가능성이 있다.

본 연구에서는 TMF 배합에 적용가능한 CMS의 첨가형태 및 수준의 결정을 위한 실험을 수행하였다.

가. CMS에서 성장이 잘 되는 균주를 선발하기 위해 *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp, *S. cerevisiae*, 와 *Bacillus subtilis* 균주를 사용하여 배양 실험을 실시하였으며, CMS 6%에서 균체 회수율과 NPN 이용율이 가장 높은 *Aspergillus oryzae* KACC 40242 균주를 선발하였다.

나. TMR 배합에 사용되는 34개의 국내 부산물 원료의 영양소 분석을 실시하였으며, 이 결과는 차후 TMR 관련 실험에 기초 자료로 이용 가능할 것이다.

다. *A. oryzae*, *Lactobacillus* spp, *S. cerevisiae*, 와 *Bacillus subtilis* 균주를 사용하여 CMS가 첨가된 TMR을 발효시킨후 반추위 발효특성을 비교해 봄으로써 최적의 TMF 발효 조건을 확립하였다.

라. CMS가 첨가된 TMF의 저장성 평가를 통해 장기저장의 가능성을 제시하였다.

마. 비지박과 버섯배지 같이 부패가 잘 되고, 보관이 쉽지 않은 부산물 원료에 CMS를 혼합하여 미생물 발효를 통해 공급 가능한 조건을 제시하였다. 이는 CMS 첨가로 부산물 원료의 부패를 방지하고, 미생물 발효를 통해 CMS의 성분을 반추위 발효환경에 적합하게 변화시킴으로써 2차 효과를 획득할 수 있다.

## 2. TMF용 유산균제제의 개발 및 TMF 품질관리기준 설정

1년차 연구목표는 제조에 중요한 역할을 하는 유산균을 다수 분리하고 동정 및 특성을 조사하는 것으로, CMS가 함유된 배지에서 생육이 우수한 유산균을 다수 예비 선발하였다. 그 중에서 CMS 20% 함유 배지에서 생육이 상대적으로 우수하고 내산성이 우수한 유산균을 최종적으로 3종을 선발하였다. 선발된 3종의 균주의 16S rRNA 유전자 서열분석 및 생화학적 특성 분석을 통해, *L. casei* DSB03, *L. casei* DSB04, *L. plantarum* DSB05 로 각각 동정하였다. 선발된 3종의 유산균은 대장균 억제능이 우수하였는데, 이러한 억제능은 주로 유산균이 자라면서 생성되는 유기산에 의한 것으로 판단되었으며, 가장 많이 생성된 유기산은 젖산(lactic acid)으로서 배양 48시간 후에 218 ~ 313mM에 달하였다.

2년차 연구목표는 CMS를 이용한 유산균의 배양조건 확립으로서, CMS를 첨가한 산업용 배지(GYC-10 medium)를 확립하였다. CMS 10% 첨가 배지에서의 배양 24시간 후의 유산균수는  $4.5 \times 10^9$ /ml 에 도달하였으며, GYC-10 배지는 균의 증식 측면에서도 우수할 뿐만 아니라 저장 안정성 측면에서도 매우 안정한 결과를 확보하였다. 또한, 종균의 저장 안정성 측면에서 배양 시간을 stationary phase 직후로 조정하는 것이 바람직하였다. 혼합배양에서의 균주 상호간의 길항작용은 없었고, 2 liter 규모의 jar fermentor에서 혼합배양시 28시간 만에 성장정지기에 도달하였으며, 이 시점의 균수는  $3.5 \times 10^9$ /ml ~  $2.6 \times 10^9$ /ml 수준이었다. 배양기간이 길어짐에 따라 균수 저하현상이 나타나므로, 성장정지기에 도달한 직후에 배양을 종료하는 것이 바람직한 결론을 도출하였다.

3년차 연구목표는 TMF용 품질관리기준 설정으로서, 필요에 따라 제2협동기관(선바이오)와 공동으로 연구를 수행하였다. 제1협동기관(단국대)에서는 TMF 품질에 중요한 역할을 하는 미생물 수, 유기산 및 에탄올 함량의 변화를 주로 조사하였다. TMF 저장 중 유산균수의 변화를 관찰한 결과, 4°C 저장의 경우에는 CMS 10% 첨가로 인해 저장기간 중 유산균의 생장이 억제되었다. 한편, 저장기간중 CMS 첨가구의 유산균수가 상대적으로 완만한 속도로 감소하는 추세를 나타내었는데, 이는 온도가 높은 여름철에 CMS 첨가가 TMF의 유산균 감소를 억제하는 효과가 있음을 시사하였다. TMF 저장 중 효모수의 변화를 관찰한 결과, CMS 첨가 유무에 상관없이 저장 2주까지 증가추세를 나타내었으며, 이후부터 감소하는 추세를 나타내었으나 CMS 첨가구의 경우에는 감소추세가 다소 완만하였다. 30°C 저장의 경우, ALY 첨가구와 LY 첨가구에서 상대적으로 높은 유산균수를 유지하는 것을 확인할 수 있었다. TMF 저장 중 *Aspergillus oryzae* 수의 변화를 관찰한 결과, 모든 처리구에서 A. O. 균수가 감소하는 추세를 나타내었다. TMF 저장 중 pH의 변화를 관찰한 결과, 15°C 저장의 경우에는 저장 2주 후에 pH 4.5 (CMS 첨가구) ~ pH 4.0 (CMS 첨가구) 에 도달하였으며, 30°C 저장의 경우에는 저장 1주 후에 pH 4.5 (CMS 첨가구) ~ pH 4.0 (CMS 첨가구) 에 도달하였다. TMF 저장 중 젖산 생성 변화를 관찰한 결과, 15°C 저장의 경우에는 저장 4주 후에 1.0 ~ 1.6%에 도달하였는데, 젖산 함량이 기호성에 영향을 미치는 점을 고려할 때, CMS 첨가구의 경우에는 저장 3~4주 경에 소비하는 것이 적합할 것으로 사료되었다. TMF의 기호성에 악영향을 미치는 butyric acid 와 acetic acid 함량은 온도에 상관없이 낮은 수준을 유지하였다. TMF의 기호성에 긍정적인 영향을 미치는 ethanol 함량 변화를 조사한 결과, 15°C 저장의 경우에는 CMS 비첨가구에서 저

장 1주 후에 1.2 ~ 1.5% 수준까지 증가하였으며, CMS 첨가구에서는 저장 3주 후에 1% 수준 이상으로 증가하였다. 처리 미생물간의 큰 차이는 보이지 않았지만, YL(Yeast + LAB) 처리구에서 상대적으로 보다 많은 에탄올 수치를 나타내었는데, 이러한 경향은 30℃에 저장할 경우에도 동일하였다.

본 연구를 통해 TMF 제조에 중요한 역할을 하는 유산균을 확보하고 적절한 배양조건을 확립하였으며, 실제로 TMF를 제조한 후에 물리화학적, 미생물학적 변화 관찰을 통해, 적절한 제조조건과 품질관리기준을 설정하였다.

### 3. TMF용 CMS-AY-LAC 균주의 산업화 시스템 연구

가. TMF 전용 발효미생물 배양조건 확립 ;

CMS를 함유한 A. O.와 Yeast의 최적 고상배지 배합비 및 배양조건을 확립하였다.

나. AYL(A. O., Yeast, LAB) 균주의 최적 배지 배합비 작성 및 배양조건 탐색 ;

AYL 혼합균주의 배양조건과 CMS가 첨가된 산업용배지(SB-LY)를 개발하였으며, AYL균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다..

다. 산업용 CMS-AYL 혼합균주를 이용한 TMF 최적 발효조건을 설정하였다.

라. 산업용 CMS-AYL 대량 생산시스템 개발 ;

배양기의 종류에 따른 AYL 미생물의 성장패턴을 조사하고, 저장온도에 따른 AYL미생물의 변화를 조사하고, TMF 적용 실험을 통하여 대량생산 시스템을 개발하였다.

마. TMF 발효 시 일반성분의 변화와 한우에 대한 CMS-TMF 기호성을 조사하여 본 연구가 실용화, 산업화에 따른 대비를 하였다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 연구개발 성과

#### 1. 기술적 측면

- 가. TMF에 필요한 발효미생물(A. O., Yeast, LAB)을 개발하였다.
- 나. TMF 원료로서 CMS의 효용성을 입증하였다.
- 다. TMF 발효의 조건을 조사하여 TMF공장에서 실용화하도록 하였다.
- 라. CMS와 비지박과 같은 원료사료를 혼합하여 발효시킴으로써, 발효된 CMS를 단위 동물의 사료의 원료로 이용할 수 있는 방법을 개발하였다.
- 마. 생균제 및 TMF 생산용 종균으로 이용 가능한 새로운 유산균의 분리, 동정 및 실용화방안을 개발하였다.

#### 2. 경제 산업적 측면

- 가. 국내 TMF 제조 시 이용되는 농가부산물 원료로서 CMS의 가치를 개발하여 저렴한 TMF 제조가 가능하다.
- 나. TMF 전용 발효미생물(A. O., Yeast, LAB)을 개발하여 미생물 사업화가 가능하다.
- 다. 시행착오를 겪고 있는 국내 TMF공장에 정확한 발효개념을 정립할 수 있다.
- 라. 보관이 쉽지 않은 부산물 원료에 CMS를 혼합하여 미생물 발효를 통해 공급함으로써 원료의 부패를 방지하고, 미생물 발효를 통해 CMS의 성분을 반추위 발효환경에 적합하게 변화시킴으로써 2차 효과를 획득할 수 있다.
- 마. 비지박을 이용한 발효 CMS의 제조로 에너지-단백질사료자원의 수입 대체효과를 거둘 수 있다.

#### 3. 정량적 성과

특허출원	특허등록	신품중등 록 (유전자원 등 포함)	기술이전	논문		기타
				국외(SCI)	국내	
1						

### 제 2 절. 성과활용 계획

국내 축우용(한우, 낙농, 비육우) 사료는 배합사료가 아닌 TMR, TMF가 추세이며 앞으로 국내 사료자원이 감소되는 추세를 볼 때 국내 조사료 및 부존자원을 활용한 TMF를 개발하는 것

이 중요하며 본 연구사업도 산업화 및 실용화에 중점을 두고 개발하고자 하였다.

1. 축우사료 전용 발효미생물을 개발하여 특허출원을 하고, 이를 국내 섬유질 사료(TMf) 공장에 보급하고자 한다.
2. CMS를 활용한 TMf 배합비를 축우농가가 널리 활용할 수 있도록 보급한다.
3. 본 연구사업을 통해 TMf의 발효미생물에 대한 특성을 확실하게 규명하여 이를 실제 TMf공장에 보급한다.
4. 보관이 쉽지 않은 부산물 원료에 CMS를 혼합하여 미생물 발효조건을 TMf 공장에 보급한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

CMS를 반추가축의 NPN원으로 평가하기 위해 제1위 미생물에 대한 이용성을 요소와 비교실험 하였는데 요소보다 lysine 부산물 첨가시 제1위 미생물의 cellulose 이용률이 증가하였다 (Hannon 과 Trenkle, 1990)

당밀이나 원당을 발효시켜 MSG, lysine 을 생산하는 과정에서 부산물로 발생하는 CMS는 질소 황, 인등을 다량 함유하고 있기 때문에 반추가축의 다른 NPN에 비해 더 효과적이 질소 공급원으로 이용될 수 있다. (Dehaan, 1993)

CMS를 사료원료로 사용하기 위한 연구는 1980년대에서 1990년대에 걸쳐서 주로 연구 되었다. CMS의 영양적 가치 분석 및 축종별 이용가능성을 판단하기 위한 실험들이 진행되었다. 또한 국내에서도 1990년대에 서울대, 건국대, 중앙대, 성균관대와 (주)미원이 CMS와 올리고당다의 사료적 가치를 평가하는 실험을 진행하였다. 이는 농후사료에 6% 첨가가 적절하다고 보고하였다.

그러나 2000년대에 들어서는 CMS에 대한 연구가 활발히 진행 되지 않았으며 TMR 과 TMF 에 CMS를 첨가하여 진행하는 실험은 수행된 적이 없었다.

## 제 7 장   참고문헌

A. R. Hippen, D. J. Schingoethe, K. F. Kalscheur, P. L. Linke, D. R. Rennich, M. M. Abdelqader and I. Yoon. 2010. Saccharomyces cerevisiae fermentation product in dairy cow diets containing dried distillers grains plus solubles. J. Dairy Sci., 93(6):2661-9.

A. O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Arambel, M. J. and Wiedmeier, R. D. 1986. Effect of supplemental Saccharomyces cerevisiae and/or Aspergillus oryzae on rumen fermentation. J. Dairy Sci. 69(Suppl. 1):188.(Abstr.)

Arambel, M. J. and Wiedmeier, R. D. 1986. Effect of supplemental Saccharomyces cerevisiae and/or Aspergillus oryzae on rumen fermentation. J. Dairy Sci. 69(Suppl. 1):188.(Abstr.)

Beck, T . 1978. The microbiology of silage fermentation, In Fermentation of Silage a Review, edited by M. E. McCullough, pp.61- 115, National Feed Ingredients Association, Iowa, U. S. A.

Beck, T . 1978. The microbiology of silage fermentation, In Fermentation of Silage - a Review, edited by M. E. McCullough, pp.61-115, National Feed Ingredients Association, Iowa, U. S. A.

Beharka, A. A. and Nagaraja, T. G. 1991. Effects of Aspergillus oryzae extract(AMAFERM) on ruminal fibrolytic bacteria and *in vitro* fiber degradation. Page 32 in Abstracts of 21st Biennial Conference on Rumen Function. Chicago, IL.

Carro, M. D., Lebzien, P. and Rohr, K. 1992. Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage based diet. Livest. Prod. Sci. 32:219-229.

Church, D. C.1991. Livestock feeds and feeding. 3rd Ed. Prentice- Hall, Inc. U.S.A P55-100, 218- 243.

Dehaan, K 1993. For beef production. liquid feed ingredients . Feed international. 14:24

Ely, L. O., E. M. Sudweeks and N. J. Moon. 1981. Inoculation with Lactobacillus plantarum of alfalfa, corn, Sorghum and wheat silage. J. Dairy Sci. 64:2378- 2387.

Gervais, P., and P. Molin. 2003. The role of water in solid-state fermentation, Biochem Eng J. 13. pp. 85-101.

Gibson, G. R. and Fuller, R. 2000. Aspects of *in vitro* and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J. Nutr. 130:391-395.

Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interrelationships between certain micro-organisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Protect. 42:164.

Gray, W. R. and Ryan, J. P. 1988. A study of the effect of yeast culture on ruminal fermentation in sheep. Page 129 in Biotechnology in the Feed Industry. T. P. Lyons, ed. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY.

Hannon, K. and A. Trenkle. 1990 Evaluation of condensed molassess fermentation

solubles as a non protein nitrogen source for ruminants. *J. Anim. Sci.* 68:2634

Han, B.-Z., F. M. Rombouts and M.J.R. Nout. 2001. A chinese fermented soybean food, *Int. J. Food Microbiol* 65. pp. 1-10.

Henderson, A. R., & P. McDonald. 1984. The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies. *Res. Dev. Agri.* 1:171- 176.

Holker, U., M. Hofer and J. Lenz. 2004. Biotechnological advantages of laboratory- scale solid-state fermentation with fungi, *Appl Microbiol Biotechnol* 64. pp. 175-186.

Kesler, E. M., P. T . Chandler and A. E. Branding . 1967. Dry molasses product using was te paper as a base for a possible feed for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 50:1944.

Langston, C. W., C. Bouma, & R. M. Conner. 1962. Chemical and bacteriological changes in grass silage during the early stages of fermentation. II. Bacteriological changes . *J. Dairy Sci.*, 45:618- 624.

Langston, C. W., C. Bouma, & R. M. Conner. 1962. Chemical and bacteriological changes in grass silage during the early stages of fermentation. II. Bacteriological changes . *J. Dairy Sci.*, 45:618- 6249.

Lindgren, S., P. Sing vall, A. Kaspersson, A. de Dartzow and E. Rydberg. 1983. Effects of inoculants, grain, and formic acid on silage fermentation. *Swedish J. Agri. Res.*, 13:91-100.

Moon, N. J., L. C. Moon, L. O. Ely and J. A. Parker. 1981a. Lactic acid bacteria active during the fermentation of wheat silage in small scale silos . *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13:248- 250.

Ohyama, Y., T . Morichi and S. Masaki, 1975. The effect of inoculation with *Lactobacillus plantarum* and addition of glucose at ensiling on the quality of aerated silages . *J. Sci. Food Agri.*, 26:1001- 1008.

Owens , J. B., E. L. Miller and P. S. Bridge. 1971. Complete diets given ad libitum to dairy cows : the effect of straw content and of cubing the diet . *J. Ag ric. Sci.* 77:195- 202.

Seale, D. R. and A. R. Henders on. 1984. Effect of inoculation with homofermentative and getofermentation lactic acid bacteria on silage fermentation, In Seventh Silage Conference, pp. 5- 6, edited by F . J. Gordonm, and E. F . Unsworth. The Queen ' s University, Belfast.

Seale, D. R. 1986. Bacterial inoculants as silage additives . *J. Appl. Bacteriol.* 61(Suppl. No. 15) : 9 S- 26 S.

Stirling, A. C. and R. Whittenbury. 1963. Sources of lactic acid bacteria occurring in silage. *J. Appl. Bacteriol.* 26:86- 90.

Woolford, M. K. and M. K. Sawczyc. 1984a. An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection . *Grass Forage Sci.*, 39:139- 148.

Woolford, M. K. and M. K. Sawczyc. 1984a. An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection. *Grass Forage Sci.*, 39:139- 148.

Woolford, M. K. and M. K. Sawczyc. 1984b. An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 2. Use of selected strains in laboratory- scale silages . *Gras s Forage Sci.*, 39:149- 158.

Yoon, I. K. and Stern, M. D. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial

- fermentation and performance of ruminants: A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 8:533-555.
- 고영두 등. 1999. 반추가축을 위한 사일리지 제조 전략. 선진문화사. p 135-148
- 김동암 등. 1987. 초지학 총론. 선진문화사. P 359- 389.
- 김현욱. 2009. 젖산균의 과학. 서울대학교출판문화원. p 329-382
- 김종근., 김원호., 서성. 2006. 벼 대체사료작물의 재배 및 이용기술. 한국초지학회학술심포지엄 초록 '벼 대체사료작물의 재배 및 이용방안'. p73.
- 맹원재. 1991. TMR의 제조와 급여효과. 1991사료가공 단기과정. 1991. 4월. 한국영양사료학회지. pp. 291- 298.
- 박승용, 백영진, 정충일, 조진국, 김기일, 배귀석. 2006. 응용축산미생물학. 유한문화사. p 57-83
- 박진철. 2003. 전통 발효주로부터 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 분리 동정 및 최적생산. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46, 348-352
- 오상집. 1991. 사료제조 및 가공의 과거와 미래. 1991. 사료가공 단기과정. 1991. 4월. 한국영양사료학회. pp. 138- 140.
- 이상범 등. 1983. 농가부산물(채소잎) silage 조제 시험. *한축지.* 4(1):23- 27.
- 한인규. 1986. 저질 조사료의 사료가치 개선방안에 관한 연구. *한국영양사료연구회보.* 10(2):168- 200.