

조사료 자원의 소화를 향상을 위한 효소의 이용방안

하 종 규 교수

서울대학교 농생명공학부

연 사 약 력

- 1967-1976 서울대학교 축산학과(학사, 석사)
- 1977-1981 미국 South Dakota State Univ. 반추가축영양학(박사)
- 1984-현재 서울대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과 교수
- 1993-1998 제8회 세계축산학회 서울대회 조직위원회 조직위원장
- 1996-2000 Animal Feed Science and Technology 편집위원
- 1999-2001 Livestock Production Science 편집위원
- 1999-현재 한국과학기술 한림원 중신회원
- 2000-2002 사단법인 한국동물자원과학회 영양사료연구회장
- 2000-2005 AAAP(Asian-Australasian Association of Animal Production Societies) 사무총장
- 2000-2005 아세아태평양축산학회 편집위원장
- 2001-2003 재단법인 애그리브랜드푸리나 문화재단 기술자문위원
- 2001-2003 서울대학교 농업생명과학대학 학생부학장

조사료 자원의 소화율 향상을 위한 효소의 이용방안

하 종 규 / 서울대학교 농생명공학부 교수

이 상 석 / 서울대학교 농생명공학부 박사

I. 머리말

최적의 조사료 자원 이용은 반추 동물의 생산성 향상을 위한 마지막 과제일지도 모른다. 특히 우리나라의 실정상 대부분 조사료가 수입에 의존하고 있는 실정에서 조사료 자원의 이용 효율을 높이는 것은 가축의 생산성 증진 및 축산 농가의 경제적 이익을 가져올 수 있다. 지금까지 조사료 자원의 소화율 향상을 위한 여러 가지 방법이 간구되어 왔다. 조사료 원의 물리·화학적 처리 및 보조사료의 사용이 그 대표적인 방법이다. 이러한 방법은 사료의 가치를 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라 반추위 내 미생물에 의한 소화가 쉽게 일어날 수 있도록 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.

지난 수십 년 동안 사료 이용 효율을 높이기 위해 보조사료로서 효소제에 대한 많은 연구가 진행되었다. 비 반추 동물산업의 경우 사료의 섬유소 분해 효율을 높이기 위해 섬유소 분해 효소를 첨가하여 왔다. 그러나 이와는 대조적으로 반추동물의 사료에는 반추위 내 미생물에 의해 분비되는 섬유소 분해 효소가 조사료의 분해에 작용하기 때문에 효소제의 첨가는 실용성을 거두지 못하였다. 더불어 효소 첨가에 따른 경제적인 추가 비용, 일정치 않은 첨가 효과, 새로운 사료 가공 기술은 반추 동물에 효소 첨가에 대한 관심이 낮아지는 요인이 되었다. 그러나 최근 효소의 첨가가 반추 동물의 생산 효율을 높인다는 많은 연구 결과는 효소제의 이용이 반추 동물의 사료에 접목시킬 수 있다는 긍정적인 평가를 가지게 되었다.

따라서 본 장에서는 조사료 자원의 소화율 향상을 위한 효소 첨가 효과와 반추위 내

미치는 영향을 알아보고자 그 기초를 이루는 효소의 종류, 작용 기전, 효소 첨가에 의한 미생물 다양성 및 사료원에 따른 효소의 이용 효과 등을 검토하고자 한다.

II. 조사료소화와 미생물

1. 식물세포의 조성 및 구조

식물세포는 크게 세포 내용물 (cell contents)과 세포벽 (cell wall)으로 구분할 수 있다. 세포내용물은 원형질막 (plasmamembrane)에 의해 둘러싸여 있으며 당(sugar), 전분 (starch), 유기산(organic acids), 단백질을 포함하고 있다. 이들 구성 물질은 대부분 반추위내에서 쉽게 용해되어 반추위내 미생물에 의해 빠르게 소화된다. 식물 세포벽은 원형질막과 얽은 층(lamella) 사이에 위치해 있으며 두 개의 세포벽으로 구성되어 있다. 1차 세포벽은 헤미셀룰로스(hemicellulose), 당단백질(glycoprotein), 펙틴이 주 성분이며 단단한 섬유소 골격 형태를 띠고 있으며 2차 세포벽은 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스 및 리그닌이 주 성분으로 매우 견고하고 압착된 형태의 층으로 만들어져 있다. 이들 세포벽은 분석 방법에 따라 크게 cellulose, hemicellulose와 펙틴(pectins)으로 나눌 수 있다. 셀룰로스는 약 1000~10,000개의 직선의 β -D-1,4 glucose 결합으로 이루어진 중합체로서, 세포벽의 20~30%를 차지하며 세포벽의 주성분이다. 헤미셀룰로스(hemicellulose)는 xylan이 주 성분이며 β -1,4-xylose 잔기에 acetic acid, arabinose, coumaric acid, ferulic acid, glucuronic acid, 4-O-methylglucuronic acid가 결합된 상태로 존재한다. 세포벽을 이루고 있는 셀룰로스와 헤미셀룰로스의 비율은 약 0.8:1~1.6:1로 조사료의 종류에 따라 차이가 있다. 펙틴은 α -1,4- D-galacturonate 결합으로 1차 세포벽에 존재한다.

비록 세포벽의 조성이 잘 알려져 있으나 개개의 구성 성분이 어떤 구조를 이루고 있는지에 대한 모델은 현재까지 확실하지 않다. 이는 다당류, 리그닌, 단백질 등이 이온 결합, 수소 결합, 공유 결합 형태로 복합적으로 교차 결합되어 3차원 형태로 존재하기 때문이다. 따라서 세포벽을 이루는 다당류의 가수분해는 단지 가수분해 효소의 작용뿐만 아니

라, 이처럼 교차 결합된 부분의 분해가 세포벽의 분해에 중요한 열쇠가 될 수 있다. 또한 표피 (cuticle)를 이루는 에피큐티클밀납 (epicuticular wax)의 외층은 탈수를 방지하고 식물 병원체의 공격을 막는 작용을 한다. 더불어 두과 식물, 화본과 식물 및 곡류의 표피는 반추 미생물에 의한 공격을 막는 방어막으로 작용한다. 그러나 반추 동물에 의한 사료의 저작과 곡류 사료의 전처리 과정을 통하여 소화를 저해하는 표피층의 기작을 최소화시킬 수 있다.

이와 같이 식물 세포의 조성 및 구조로 볼 때 적절한 소화를 위해서는 먼저 식물 세포벽의 분해가 우선적으로 이루어져야 한다. 그러나 식물 세포벽의 복잡한 구조와 조성은 반추위내에서 발생하는 조사료의 소화 효율을 결정하는 주된 요인이므로 세포벽 분해에 필요한 접근방법이 요구된다.

2. 식물 세포벽의 소화를 위한 미생물적 접근

반추 동물의 특성상 상당량의 에너지 섭취가 식물 세포벽을 구성하는 섬유소의 분해를 통하여 이루어진다. 식물 세포벽의 분해는 반추위내에 존재하는 박테리아, 프로토조아, 곰팡이의 복합적인 작용에 의해 분해한다 (표 1). 이들 반추위 미생물중 박테리아와 곰팡이에 의해 80%가 분해되고, 나머지 20%는 프로토조아에 의해 분해가 이루어진다. 식물 세포벽의 분해에 참여하는 대표적인 섬유소분해 박테리아는 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*이다. 이들 세 종류의 박테리아는 2차적 섬유소분해 박테리아(*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium longisporium*, *Clostridium locheadii*)와는 달리 섬유소에 글리코칼릭스(glycocalyx)을 이용하여 다량 부착하여 세포 표면에 섬유소 분해효소를 분비한다. 특히 *Fibrobacter succinogenes*는 사료의 종류에 따라 총 박테리아의 5~20%를 차지하고, 섬유소 분해력이 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 박테리아에 비해 곰팡이에 의한 조사료의 분해는 최근 들어 많은 주목을 받고 있다. 반추위 혐기성 곰팡이는 조사료를 물리적으로 파괴할 뿐만 아니라, 박테리아에 의해 분비한 효소보다 훨씬 강한 섬유소분해 효소를 가지고 있기 때문에 단단한 조직으로 이루어진 세포벽의 분해에 효과적으로 작용한다. 조사료에 부착한 곰팡이는 가근(rhizoid)을 성장시키고 사료

표 1. 반추위미생물이 분비한 세포벽 분해 효소의 종류

미 생 물	효소의 종류		
	Cellulolytic	Hemicellulolytic	Pectinolytic
Bacteria			
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	*	*	*
<i>Ruminococcus albus</i>	*	*	*
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	*	*	*
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	*		*
<i>Eubacterium cellosolvans</i>	*		*
<i>Clostridium locheadi</i>			*
<i>Prevotella ruminantium</i>		*	*
<i>Eubacterium xylanophilum</i>		*	
<i>Ruminobacter amylophilus</i>		*	
<i>Succinivibrio detrinolvens</i>		*	
<i>Selenomonas lactilytica</i>		*	
<i>Lachnospira multiparus</i>		*	
<i>Streptococcus bovis</i>		*	
<i>Megasphaera elsdenii</i>		*	
Protozoa			
<i>Eudiplodinium maggii</i>	*	*	*
<i>Ostracodinium dilobum</i>	*	*	*
<i>Epidinium caudatum</i>	*	*	
<i>Metadinium affine</i>	*		*
<i>Endoploplastron triloricatum</i>	*		
<i>Entodinium caudatum</i>	*	*	
<i>Isotricha intestinalis</i>	*	*	*
Fungi			
<i>Neocallimastix frontalis</i>	*	*	*
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	*	*	*
<i>Neocallimastix joyonii</i>	*	*	
<i>Caecomyces communis</i>	*	*	*
<i>Piromyces communis</i>	*	*	*
<i>Orpinomyces bovis</i>	*	*	
<i>Ruminomyces elegans</i>	*	*	

<Dehority, 1993>

입자에 침투하여 그 결과 입자를 파괴함으로써 사료의 물리적 분해 효과를 가져온다. 더불어 가근은 식물 표면의 큐틴막과 리그닌화되어 있는 세포벽의 파괴에도 작용한다. 그러나 박테리아에 비해 성장이 늦기 때문에 식물세포벽의 제한된 부분에 부착하여 성장한다. 프로토조아(protozoa)도 식물 세포벽의 소화에 매우 큰 기여를 한다. 현재까지 섬유소 분해에 작용하는 대부분 효소가 프로토조아에서 검출되었으며 반추위내에서 프로토조아를 제거시 섬유소 소화에 부의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 프로토조아의 배양이 타 미생물에 비해 어렵기 때문에 지속적인 연구가 어려운 형편이다.

3. 섬유소 분해효소의 종류

반추위내에 존재하는 효소의 종류는 매우 다양하다. 여러 종류의 반추위내 미생물에 의해 분비되는 효소는 세포벽 분해에 작용하는 cellulase, xylanase, pectinase 외에도 amylase, protease, phytases, tannases가 존재한다. 이 중에서 섬유소 분해 효소는 세 가지로 분류한다. Endo- β -1,4-glucanase는 비결정형 섬유소, 가용성섬유소유도체, phosphoric acid-swollen cellulose, 그리고 celooligosaccharide와 같은 기질에 무작위 형태로 작용하여 cellulose chain을 감소시키며 분해산물로 celooligosaccharide의 함량을 증가시킨다. 그러나 단단한 형태의 crystalline cellulose의 가수분해에는 비효율적이다. Exoglucanase (cellobiohydrolase, 1,4- β -D-glucanocellobiohydrolase, exocellulase, exocellobiohydrolase)는 cellulose의 비환원성 말단에 작용하여 cellobiose로 가수분해하는 효소이다. 또한 부분적으로 분해된 결정형 기질과 cellodextrin을 분해할 수 있으며, endoglucanase와 공동으로 결정형 섬유소를 분해한다. β -D-glucosidase는 endo- 및 exoglucanase의 작용으로 생성된 celooligosaccharide를 가수분해하여 glucose를 생성하는데 작용한다. 식물세포벽을 구성하는 주요 중합체는 이들 효소간의 복합적인 상호작용을 통하여 효과적으로 섬유소원을 가수분해할 수 있다 (표 2).

반추위내에서 조사료 분해에 필요한 섬유소 분해효소의 작용은 두 가지 모델로 설명할 수 있다. 첫째로 효소가 효과적으로 섬유소를 가수분해하기 위하여 단독으로 혹은 다른 효소와 공동으로 작용한다 (Wood, 1992; Beguin과 Aubert, 1994). 또는 개개의 효소가 다 효소군(cellulosome)을 만들어서 기질을 분해한다 (Bayer 등, 1994). 이러한 모델은 많은 수

의 반추위내 박테리아와 곰팡이에서 관찰할 수 있으며, 효과적으로 사료 입자를 분해하기 위해서는 효소간의 조화된 활동이 요구된다.

표 2. 세포벽 분해에 필요한 반추위내 섬유소 분해효소

기 질	목표분해대상결합	효소의 종류
Cellulose	β -1,4-glucose linkage	Endo- β -1,4-glucanase
Cellulose(non-reducing end)	β -1,4-glucose linkage	Endo- β -1,4-glucanase
Cellobiose	β -1,4-glucose linkage	β -1,4-glucosidase
Soluble cellooligomers	β -1,4-glucose linkage	Cellulodextrinase
Cellulose or xylan	β -1,4-glucose linkage or xylose linkage	Xylocellulase
Xylan	β -1,4-xylose linkages	Endo- β -1,4-xylanase
Xylobiose	β -1,4-xylose linkages	β -1,4-xylosidase
Arabinoxylan	α -1,3-linkage	α -1-Arabinofuranosidase
Glucuronoxylan	α -1,3 or α -1,2 linkage	α -Glucuronidase
Acetylxylan	Acetylesther bond	O-Acetyl xylan esterase
Ferulic acid cross bridge or linkage	Feruloyester bond	Ferulic acid esterase
p-Coumaric acid cross bridge	p-coumary ester bond	p-Coumaric acid esterase
Laminarin	β -1,3-glucanase	β -1,3-hexose linkage
Lichenin	β -1,4-hexose linkage	Mixed linkage β -1,3-1,4-glucanase
Polygalacturan	α -1,4-galacturonide linkage	Pectate lyase
Pectin	α -1,4-galacturonide linkage	Pectin lyase
Pectin	Methylester bond	Pectin methylesterase

4. 미생물과 섬유소 분해

조사료원의 소화가 반추 미생물이 분비한 효소에 의하여 이루어지기 때문에 최대한 사료와 효소간의 반응이 잘 일어날 수 있도록 해야 한다. 조사료의 소화를 위해서는 우선적으로 반추미생물이 분비한 효소와 사료간의 접촉이 필수적이다. 다당류를 분해하는 효소는 사료 입자와 반응하기 전에 반추위액에 분포되어 있는 단백질 분해 효소에 의하여 활성을 잃어버릴 수 있기 때문에 미생물의 부착정도는 반추위내 미생물의 수명과 효소의

이용 효율과 밀접한 관계가 있다. 반추위미생물은 사료입자에 부착하는 정도에 따라 반추위액에 부유하는 박테리아, 사료입자에 약하게 부착되어 있는 박테리아, 사료입자에 강하게 부착되어 있는 박테리아로 나눌 수 있다 (Cheng과 McAllister, 1997). 반추위액에 부유하는 박테리아는 위액에 녹아있는 가용성 사료 성분을 이용하여 살아가며 불용성 사료 입자를 거의 소화하지 못한다. 사료입자의 부착된 박테리아는 부착 정도에 따라 사료 입자에 단단히 부착되어 있는 박테리아와 세척 시 쉽게 떨어지는 박테리아로 나눌 수 있다. 이 두 종류의 박테리아가 전체 박테리아의 70~80%를 차지한다 (Forsberg와 Lam, 1977). 사료 내 부착 미생물은 전체 endoglucanase의 80%, amylase의 70%, 75%의 protease역가를 차지하고 있다. 특히 셀룰로스과 헤미셀룰로스 분해역가는 반추위액에 부유하는 미생물에 비하여 현저히 높다.

사료 입자에 부착된 미생물은 미부착미생물에 비하여 많은 장점을 가지고 있다. 사료내 부착된 박테리아에 의하여 분비하는 효소는 대체적으로 안정화되어 있고 조사료원의 세포표면의 glycocalyx에 강한 저항성을 지니고 있다. 미생물의 부착은 사료 입자의 분해 부위에 접근하여 소화 과정 동안 많은 영양소원을 흡수한다. 더불어 사료 입자의 크기, 비중 및 사료의 감수성은 사료입자가 반추위액에서 머무르는 시간을 증가시킨다. 이러한 정체 시간의 차이는 효소와 사료간의 반응 시간이 길어지게 하며 통과 속도를 더디게 하여 곰팡이와 프로토조아의 성장에도 중요한 역할을 한다. 반추위내 프로토조아는 약 5~14시간. 곰팡이는 24~34시간의 수명을 지니고 있어 반추위의 통과 속도는 이들 미생물의 성장과도 매우 밀접한 관계를 가지고 있다.

5. 미생물간의 공동작용(synergetic effects)과 섬유소분해

반추위 미생물에 의한 공동작용은 개개의 미생물이 사료 입자에 작용하는 것보다 더욱 효과적이다. 한 예로 메탄 생성 박테리아와 곰팡이를 함께 배양시 xylanase와 cellulase의 역가가 증가하였으며 섬유소분해 미생물인 *R. albus*와 *F. succinogenes*를 함께 배양하거나 또는 *R. albus*와 *P. ruminicola*를 함께 배양시 섬유소 소화율이 증가하였다 (Gradel과 Dehority, 1972; Mountfort 등, 1982). 이처럼 단일 미생물이 분비하는 효소에 의하여 세포

벽의 특정 부위가 가수분해되는 것보다 전체 세포벽의 효과적인 분해를 위해서는 여러 종류의 효소의 복합적인 작용이 필요하기 때문이다. 조사료의 셀룰로스 소화에는 두 가지 형태의 공동효과가 존재한다. “Unmasking”이란 어떤 특정 미생물이 접근하기 어렵게 만드는 사료내 구성성분을 우선적으로 타 미생물이 효소를 분비하여 제거함으로써 특정미생물의 기질 분해를 돕는 작용이다. 또한 반추위 곰팡이는 리그린화되어 있는 줄기 조직을 물리적으로 파손시켜 반추위미생물이 침투해 사료소화가 잘 이루어질 수 있도록 공동작용을 한다 (Dehority, 1993).

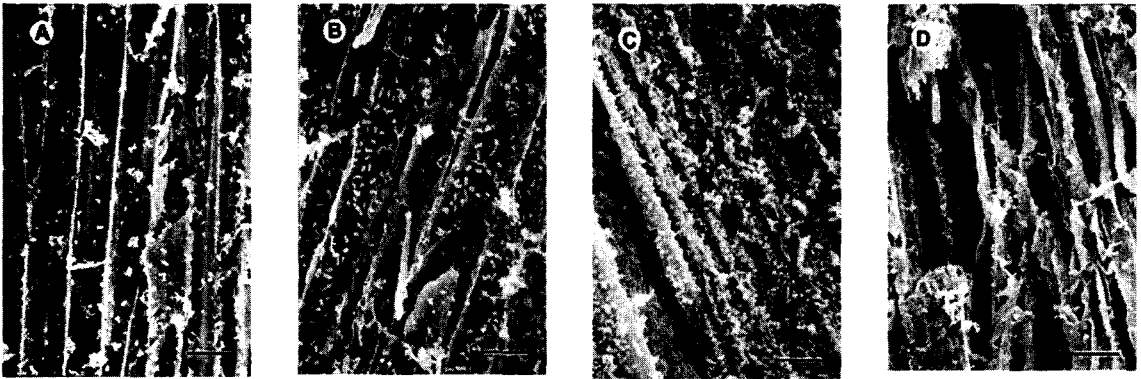


그림 1. EFE 첨가에 따른 *Ruminococcus albus*의 알팔파 건초내 부착정도 비교 :
 A) No EFE; B) 28 µg/mL β-glucanase; C) 280 µg/mL β-glucanase;
 D) 280 µg/mL xylanase. Bars = 10 µm (Wang et al. 2001b).

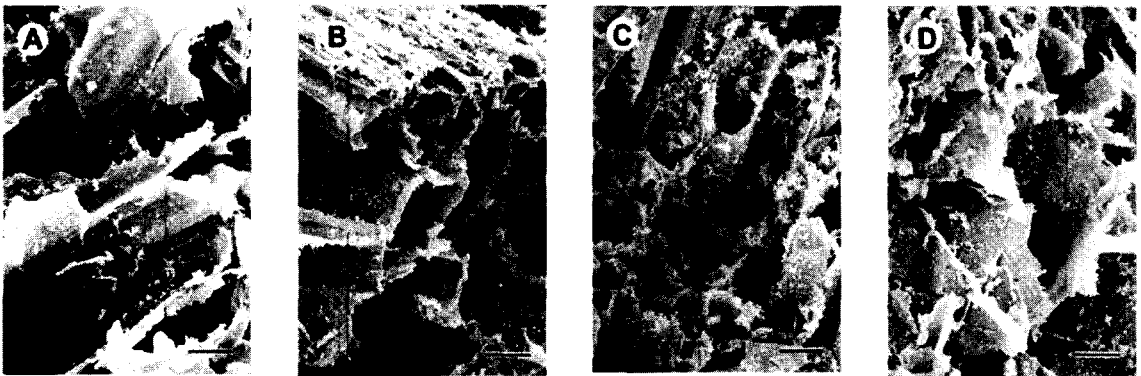


그림 2. EFE 첨가에 따른 *Ruminococcus flavefaciens*의 보리짚내 부착비교 :
 A) No EFE; B) 28 µg/mL β-glucanase; C) 280 µg/mL β-glucanase;
 D) 280 µg/mL xylanase. ; Bars = 20 µm (Wang et al. 2001b).

이와는 반대로 *R. albus*와 *R. flavefaciens* 첨가는 반추위 곰팡이에 의한 섬유소 소화를 감소시켰고, *R. albus*는 *R. flavefaciens*의 성장을 저해하였다. 반추위 미생물간의 억제효과는 사료 입자의 부착부위에 대한 상호경쟁과 박테리옌의 분비에 의한 영향으로 보인다. 그러나 대부분 미생물의 상호작용에 대한 연구결과는 *In vitro* 조건에서 실시되었기 때문에 실제 반추위내에서 동일한 사료에 대한 미생물의 상호작용이 동일한 결과를 얻을 수 있는지는 미지수이다. 특히 반추위내 다양한 미생물환경속에서 미생물간의 상호작용은 *in vitro* 배양에서 얻어진 특정 미생물간의 공동작용으로 설명하기에는 명확하지 않다. 그러나 현재까지 연구 결과를 통하여 사료소화에 관여하는 미생물간의 공동작용은 미생물의 상쇄작용(antagonistic effects)보다 크다고 볼 수 있다.

6. 기타 요인

반추위미생물은 강력한 섬유소 분해 능력을 가지고 있다. 11종류의 조사료원을 분석한 결과 셀룰로스의 평균소화율은 *in vivo* 상태에서 64.6% 이었으며, *in vitro* 상태에서는 61.7%이었다 (Dehority, 1993). 또한 반추위내 섬유소분해 미생물에 의한 결정형 섬유소의 분해속도는 $0.05\sim 0.08\text{ h}^{-1}$ 이며 최대 분해율은 0.08 h^{-1} 이다 (Weimer, 1996). 그러나 반추위내 환경이 조사료를 소화하기에 최적의 조건을 가지고 있으나 완전히 사료를 소화할 수 없다. 왜냐하면 물리·화학적으로 단단한 세포벽 구조와 반추위내 머무르는 정체 시간이 제한적이기 때문이다. 반추 동물에게 이용되는 사료는 가축에게 필요한 영양소외에도 페놀 화합물(polyphenolics), 사포닌(saponins)과 같은 2차 화합물을 포함하고 있다. 특히 세포벽에 포함된 페놀과 실리카는 섬유소분해를 저해하는 물질로서, 반추미생물에 의한 섬유소 분해능력을 감소시킬뿐만 아니라 사료내 부착능력을 저해하는 성분이다. 그러나 세포벽의 분해를 저해하는 가장 큰 요인은 복잡하게 교차 결합된 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌 등이 미생물이 분비한 효소의 접근을 제한하기 때문이다.

반추위내 사료입자의 정체시간(retention time)도 조사료원의 소화에 중요한 요인으로 작용한다. 따라서 사료 입자가 크면 클수록 반추위내 정체시간이 길어져 분해율을 증가시킬 수 있다. 이는 반추위내 소화속도보다 사료입자의 분해 범위가 더 큰 영향을 주기 때문이다.

III. 효소첨가가 조사료 소화에 미치는 영향

EFE(exogenous fibrolytic enzyme)는 반추동물의 사료 효율을 높이기 위해 광범위하게 사용되어 온 바 있다. 반추동물에게 대한 EFE의 사용은 약 1960년 초반에 연구가 시작된 이후, 1980년 중반부터 반추동물의 생산성 향상을 위해 EFE의 사용에 대한 연구가 구체화되었다 (Judkins와 Stobart, 1988; Yang, 1999; Wang 등, 1999). 초기의 섬유소 분해 효소에 대한 연구는 실험상의 많은 제약과 실험 결과 또한 일정치 않았다. 동시에 EFE 생산가격이 비싸고 저가생산을 위한 기술이 개발되지 않아서 많은 어려움이 뒤따랐다. 그러나 분자 생물학적 기법을 응용한 EFE 생산기술의 발달과 실험 방법의 개선으로 효소 첨가가 반추동물에 생산성 향상에 미치는 영향에 대해 정확하게 규명할 수 있게 되었다. EFE는 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Streptococcus faecius spp.* 4종의 박테리아와 *A. oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae* 3종의 곰팡이에서 주로 추출한다 (Muirhead, 1996). 효소제의 역가 및 종류는 균주의 종류, 배지의 종류와 기질의 이용성에 따른 성장조건 및 생산량에 의해 결정된다. 상업적으로 사용되는 효소제는 기본적으로 식물세포벽을 분해하는 효소인 cellulase와 xylanase가 포함되어 있으며 따라서 효소제에 포함된 개개의 효소의 특성과 비율이 전체 식물세포벽의 분해정도에 영향을 준다.

1. 첨가방법

반추위내 주입된 EFE는 반추위내 미생물이 분비한 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되는 것으로 추정하였다. 실제로 곰팡이에서 추출한 섬유소 분해효소를 반추위액과 함께 배양하였을 때 배양 6시간 후에 효소 역가가 최초의 효소 역가에 비해 25% 미만으로 감소하였다(Kopecny 등, 1987). 그러나 근래의 연구 보고에서는 배양 6시간후에도 섬유소 분해 효소의 역가는 일정하게 지속되는 것으로 발표되었다 (Hristov 등, 1998; Morgavi 등, 2001). 반추위내에서 EFE 역가가 감소하는 이유는 효소의 불활성화와 반추위에서 소장으로 일부가 유출되었기 때문이라고 본다. 최근의 연구 결과들은 EFE 첨가가 반추위내 조

건에 따라 차이가 있지만, 전반적으로 섬유소 분해율을 증가시키는 것으로 나타났다 (Wiedmeier 등, 1987; Yang 등, 1999; Wang 등, 2001). 상업용으로 사용되고 있는 *Trichoderma Longibrachiatum*에서 추출한 EFE를 첨가시켰을 때 반추위내 섬유소분해 박테리아의 수를 증가시켰으며, *Aspergillus oryzae*와 *Trichoderma Longibrachiatum*에서 추출한 효소를 사용한 결과 셀룰로스와 xylan의 분해율이 증가하였다(Morgavi 등, 2000).

효소의 첨가방법에 따라 조사료원의 소화율에 미치는 영향은 차이가 있어서, 조사료, 농후사료 및 섬유질가공사료, 반추동물용 섬유질배합 및 자가용배합사료에 직접 분무하는 방법과 사료 표면에 균포화 (top-dressing)시키거나 반추위에 직접적으로 EFE를 주입하는 방법간에 차이가 있다. 최근 연구 결과에 따르면 사료를 급여하기 전에 EFE를 분무하여 급여하는 것이 보다 효과적이라고 알려져 있다 (표 3). 이러한 연구 결과는 효소가 사료 입자에 안정적으로 결합하거나 반추위내 반응전에 전가수 분해(pre-ruminal hydrolysis)가 발생된 까닭이라고 추측할 수 있다. 일반적으로 xylan과 pectin을 분해하는 미생물은 사료 내 부착 능력이 약하다고 알려져 있다. 따라서 사료를 배양하기 앞서 EFE를 사료에 분무하였을 때 반추위액내 xylanase의 역가가 증가하였으나 알팔파 건초에서는 차이가 없었다 (Wang 등, 2001).

반추위내 위액에 부유하는 효소의 역가는 전체 효소 역가의 30% 미만으로 사료의 소화는 대부분 사료 입자에 부착된 EFE의 분해에 의해 이루어진다. 보리와 알팔파 건초에 EFE를 분무하여 처리하였을 때 보리에 효소를 처리한 시험구에서 환원당이 증가하고 NDF 함량이 감소하였다(Wang 등, 2001). 이러한 결과는 사료의 종류에 따라 EFE 처리 효과가 차이가 있음을 보여준다. 또한 보릿짚에 EFE를 처리하였을 때 처리 방법에 따라 차이가 있으나 건물 소화율과 반추위 미생물이 사료 입자에 집락하는 부분이 증가하였다 (Wang 등, 2002). 그러나 사료내 전가수분해 범위가 넓을수록 미생물에 의한 집락은 감소한다. 이는 EFE와 반추위미생물이 기질의 반응부위에 경쟁적으로 작용하기 때문이며 효소의 작용에 의해 미생물의 집락화가 저해받기 때문이다.

사료의 수분 함량에 따라 EFE의 효율은 차이가 있다. 특히 수분 함량이 낮은 사료(dry feed)가 수분 함량이 높은 사료에 비하여 효율이 높다. 이와같은 결과는 수분 함량이 높은 사료는 상대적으로 수분 함량이 낮은 사료에 비하여 EFE 결합 능력이 떨어지기 때문이다. 이러한 가설은 EFE를 사일리지, 농후사료 및 TMR 사료에 첨가하는 데 고려해야 할

표 3. EFE (exogeneous fibrolytic enzyme) 첨가가 반추동물에 미치는 영향

효 소	첨 가 방 법	사 료	동 물	효 과
Cellulase and xylanase	Applied on silage, or introduced in rumen	Barley silage and barley	Sheep	효과 없음 (McAllister 등, 1999)
Extracts of <i>A. oryzae</i> with multienzyme	Mixed with supplement	Bromegrass	Non-lactating	미생물 수 증가 (Varel, 1994)
Extracts of <i>A. oryzae</i> with multienzyme	Mixed and Topdressed	Alfalfa hay	Non-lactating	미생물 수 및 건물소화율 증가 (Weidmeier et al., 1987)
Cellulase and xylanase	Sprayed on TMR	Barley silage	Lactating	사료섭취량 효과없음, 미생물단백질증가 (Beauchemin, 1999)
Cellulase and xylanase	Applied on forage 0 or 24h prior to feeding	Grass hay, concentrate	Beef	건물소화율 및 NDF 소화율증가 (Lewis, 1996)
Cellulase and xylanase from <i>T. longibrachiatum</i>	Applied on TMR or concentrate	Corn silage Alfalfa hay	Lactating	농후사료의 건물소화율증가 (Yang et al., 2000)
Mixture of xylanase and -glucanase form <i>T. longibrachiatum</i>	Sprayed on concentrate	Barely silage: barley grain	Cattle	증체 효과 있음 (Wang et al., 1999)
Mixture of fungal cellulose	Applied on silage	Barley grain	Cattle	일당 증체량 증가 (McAllister et al., 1999)
Enzyme(mainly xylanase) from <i>T. longibrachiatum</i>	Applied onto forage	Corn silage : alfalfa hay	Lactating cows	유생산 증가 (Kung et al., 2000)
Cellulase and xylanase	Applied onto forage	Alfalfa hay	Lactating cows	유생산 및 유지방 증가(Schingoetha et al., 1999)
Cellulase and xylanase from <i>T. longibrachiatum</i>	Applied onto TMR or concentrate	Corn silage	Lactating cows	유생산 증가 (Yang et al., 2000)

사항이다. 단, 사일리지는 농후 사료에 비해 수분 함량이 높으나 많은 수의 혐기미생물을 포함하고 있기 때문에 이들 미생물이 효소의 효율을 결정하는데 작용한다.

2. 사료 종류에 따른 EFE의 첨가 효과

사료의 화학적 구조 및 반응 조건에 따라 EFE 첨가 효과는 차이가 있다. 효소의 첨가가 모든 사료에 동일하게 효과적으로 작용할 것이라는 추측은 개선할 필요가 있다. EFE는 사료의 종류에 따라 그 효과가 다르며, 기질에 따라 효소의 종류도 다르게 하여야 한다. 조섬유 함량이 낮은 농후사료에 EFE를 첨가하였을 때 사료의 소화율이 증가하였다. 특히 곡류 사료에 EFE 첨가시 소화율이 증가하였는데 (표 4), 이러한 현상은 반추 미생물의 생존에 필요한 적정 pH가 미생물의 종류에 따라 다르기 때문이다. 반추위 섬유소분해 박테리아의 최적 성장과 섬유소 소화는 pH가 6.2 이하로 낮아질 경우 저해를 받는다. 그러나 반추위 곰팡이에 의해 분비된 섬유소 분해효소의 적정 pH는 4.0~6.0 사이로 조섬유 함량이 낮은 사료에서 높은 소화율을 보였다. 한 예로 *T. longibrachiatum*에서 추출한 효소를 첨가하였을 때 pH는 6.5에서 5.5로 낮아졌지만 가스 생성량은 증가하였다. 사료를 급여한 반추 동물의 반추위내 pH가 6.0 이하로 낮아지는 경향은 하루 중에서 많은 부분을 차지한다. 이러한 조건에서 EFE 첨가는 반추위내 섬유소 소화율을 개선시킬 수 있다. 옥수수에 비해 섬유소 함량이 높은 보리에 EFE첨가시켰을 때 비육후기에 사료 전환율이 증가되는 결과를 나타냈다 (Beauchemin 등, 1997). 조사료를 급여하였을 경우, 반추위내 pH는 섬유소 분해 효소의 역할을 감소시키는 제한 요인이 아니므로 효소와 기질사이의 적합성, 미생물에 의한 소화율 증가가 효소의 효과를 판단하는 기준이 된다.

그러나 반추 동물에 EFE를 사용하는 궁극적인 목표는 이용율이 낮은 저질 조사료자원의 소화를 증진시키기 위한 것이다. 그러나 현재까지 상업용으로 이용하고 있는 효소제제는 세포벽의 반추위내 소화율 향상을 제한적으로 돕는데 그치고 있다. 따라서 보다 효율적인 EFE의 이용방안은 사료의 질이 낮은 조사료원의 소화율을 높이는데 보다 많은 관심을 가져야 한다.

표 4. 사료의 종류에 따른 EFE 첨가 효과

효 소	동 물	사 료	효 과
Mixture of xylanase and β -glucanase from <i>T. longibrachiatum</i>	Feedlot cattle	High barley silage; low barley silage	증체효과 있음 (Wang et al., 1999)
Mixture of xylanase and cellulase from <i>T. longibrachiatum</i>	Feedlot cattle	Low barley silage: high barley grain	효과 없음
		Alfalfa diet	증체효과 (Low levels of application)
Extract of <i>Aspergillus oryzae</i>	Non-lactating beef cows	Timothy diet	증체효과 (High levels of application) (Beauchemin et al., 1995)
		Bromegrass diet	미생물 수 증가
		Alfalfa hay diet	효과 없음 (Varel, 1994)

가성 소다를 처리한 밀짚에 *T. reesei*에서 추출한 섬유소 분해 효소를 첨가한 결과 분해가 잘 이루어졌다 (Gould, 1984). 이와 같은 결과는 가성 소다를 처리한 밀짚의 리그노셀룰로오스(lignocellulose) 잔기가 분해되어 효소와 화학처리에 의한 공동효과로 인해 쉽게 분해된 것으로 보인다. 이와 비슷한 결과는 알칼리 처리 벧짚에서도 볼 수 있어서 (Ben-Ghedalia and Miron, 1981), 알칼리 처리한 벧짚을 EFE와 함께 배양하였을 때 미생물 단백질 합성량이 증가하였으며 또한 벧짚의 소화율도 증가하였다. 이는 알칼리 처리에 의해 PC-LCC(phenolic compound-mediated lignin-carbohydrate complexes) 내의 에스테르 결합이 끊어져 첨가한 효소의 접근 뿐만 아니라 반추위 미생물의 부착과 반추위 박테리아 집락이 효율적으로 이루어져 그 결과로 분해율이 향상된 것으로 볼 수 있다. 증기를 이용한 전처리(steam pre-treatment) 방법도 EFE의 가수 분해를 증진시키기 위한 방법이다.

이와 같이 사료의 물리적, 화학적 전처리는 단단한 사료의 구조를 완화시켜 효소의 작

용이 쉽게 일어날 수 있도록 돕는 역할을 한다. 국내의 저질 조사료의 이용성을 높이기 위한 방안으로 암모니아 처리 볏짚이 보편화되어 있는 상황에서 효소첨가는 저질 조사료의 소화율을 높이기 위한 방안으로 이용될 수 있다.

3. 상업용 효소제의 이용방안

상업용 효소제는 효소의 종류와 양에 따라 다양하게 반응한다. 현재 이용되고 있는 효소제는 *Bacillus* 계통의 박테리아와 *Trichoderma*, *Aspergillus* 계통의 곰팡이에서 추출하여 이용하고 있다. 반추동물에 사용하는 EFE 첨가량은 사료의 종류, 섭취량, 체중에 따라 0.01~1.0% 수준으로 급여한다. 효소 첨가량에 따라 섬유소 분해효소는 10~1,000배 정도의 섬유소 분해효소 역가를 지닐 수 있다. 그러나 지금까지의 일정하지 않은 연구 결과는 조사료의 조성, 효소의 종류, 효소 역가, 효소의 첨가 수준, 효소의 안정성 및 사용 방법의 차이에 의해서 상반된 결과를 얻었기 때문이다. 따라서 적절한 효소제의 사용을 위해서는 사료의 특성에 따라 역가가 높고 결합 능력이 높은 효소제를 선택하는 것이 필요하다. 이 외에도 반추위내에서 분해되지 않는 저항성이 강한 효소제의 개발이 우선적으로 요구된다.

한편으로 국내에서 상업용 효소제의 사용은 극히 미비하다. 그 이유는 효소가 사료와 반응하기전에 반추위 미생물에 의해 쉽게 파괴될 수 있기 때문이다. 이러한 문제점을 막기 위해 여러가지 방안이 대두되었다. 한 예로 조사료를 반추동물에 급여하기 전에 몇 시간 동안 조사료에 효소를 처리한 후에 다시 적절한 비율로 사료에 혼합하여 급여하는 것이다. 그러나 조사료의 준비, 효소처리에 필요한 노동력, 장비 및 관리에 필요한 추가 부담은 현실적으로 조사료의 이용성 향상목적으로 효소를 이용하는데 걸림돌로 작용하고 있다.

최근에 효소 증진제 (enzyme enhancer), 자기방어 (self-protection) 기능을 가진 효소제가 개발되고 있는데 이들은 이와 같은 문제점을 보완하기 위하여 개발된 물질이다. 효소 증진제는 효소가 기질에 결합하는 능력을 높이고 상업용 효소제제의 소화능력을 향상시키는 작용을 한다. 더불어 반추위내 미생물에 의해 분비된 효소의 역가를 증진하는 기능도

가지고 있다. 효소 증진제를 젖소용 사료에 첨가한 시험에서 반추위내 미생물에 의한 사료의 소화율이 증가되었고 일일 유생산량도 대조구에 비하여 2.5~3.5kg 증가되었다 (Jim shelford, 2002). 자기방어란 반추위내 단백질 분해효소에 의한 분해를 막기 위해서 곰팡이가 자기방어를 위해 분비하는 단백질 기전을 이용한 방법이다. 이 방법을 통해 제조된 효소제는 반추위내 단백질 분해 효소에 의한 저항성이 강할 뿐만 아니라 기질 부착성도 향상시키는 장점이 있다 (Wu와 Wang, 2001).

IV. 결 론

지금까지 반추 동물의 생산성을 향상시키기 위하여 조사료 소화율을 개선하는 다양한 방안들이 모색되고 있다. 특히 생산자나 소비자가 항생제의 사용과 성장 촉진제의 사용이 식품의 안정성에 부정적인 영향을 줄 수 있다는 인식을 갖고 있어서 사료 효소제의 사용을 통하여 동물의 생산성을 증진시킬 수 있다는 사실이 받아들여 진다면 효소제의 역할이 더욱 증가할 것이라고 추측할 수 있다. 그러나 효소제의 기전에 대한 이해와 고가의 생산비용은 좀 더 해결해야 할 문제일 것이다. 또한 효소의 역가를 증진시키고 사료에 따른 효소제의 이용 방법의 개선도 필요하다. 최근 들어 분자 생물학적 기법을 이용한 효소제의 생산이 점차 증가되고 있고, 효소제의 이용 방안에 관한 연구도 활발히 진행되고 있어서 효소제의 이용에 따른 조사료의 소화율 향상과 반추 동물의 생산성을 증진시키는데 효소제의 기여가 기대된다.

V. 참 고 문 헌

1. Bayer E. A., L. M. Rode and J. V. H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
2. Beauchemin, K. A., S. D. M. Jones, L. M. Rode and V. J. H. Sewalt. 1997. Effects of

- fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:645-653.
3. Beguin, P. and J. P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:2558
 4. Cheng, K. J. and T. A. McAllister. 1997. Compartmentation in the rumen. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart). Elsevier Science Publishers Ltd., London, UK, pp. 492-522.
 5. Ben-Ghedalia, D. and J. Miron. 1981. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and *in vitro* digestion rate of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 23:823-831.
 6. Dehority, B. A. 1993. Microbial ecology of cell wall fermentation. In: *Forage Cell Wall structure and Digestibility* (Ed H. G. Jung, D. R. buxton, R. D. Hatfield and J. Ralph.) America society of Agronomy. Inc., Crop Science Society of America, Inc and Soil Science Society of America., Inc., Madison WI, pp.425-453.
 7. Forsberg, C. W. and K. Lam. 1977. Use of adenosine-5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:528.
 8. Gould, J. M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 26:46-52.
 9. Gradel, C. M. and B. A. Dehority. 1972. Fermentation of isolated pectin and pectin form intact forage by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 23:332-340.
 10. Hristov, A. N., T. A. McAllister and K. J. Cheng. 1998. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzyme in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76: 165-172.
 11. Judkins, M. B. and R. H. Stobart. 1988. Influence of two levels of enzyme preparation on ruminal fermentation, particulate and fluid passage rate and cell wall digestion in wether lambs consuming either a 10% or 25% grain diet. *J. Anim. Sci.* 66:1010-1015.
 12. Kopency, J., M. Maroun and K. Holub. 1987. Testing the suitability of the addition of *T. viride* cellulases to feed rations for ruminants. *Zivocisna vyroba* 32:587-592.

13. Morgavi, D. P., V. L. Nsereko, L. M. Rode, K. A. Beauchemin, T. A. McAllister, A. D. Lwassa, Y. Wang and W. Z. Yang. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79:1621-1630.
14. Muirhead, S. 1996. *Direct fed Microbail, Enzyme and Froage Additive Compendium*, 3rd ed. The Miller Publishing Company, Minnetonka MN. 391pp.
15. Wang, Y., T. A. McAllister, L. J. Yanke, K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, L. M. Rode and W. Yang. 2001. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on the digestion of alfalfa hay and barley straw by cellulolytic ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 79 (Suppl.):285.
16. Wang, Y., T. A. McAllister, R. E. Wilde, J. Baah, K. A. Beauchemin, L. M. Rode, J. A. Shelford and K. J. Cheng. 1999. Effects of monensin, exogenous fibrolytic enzymes and Tween 80 on performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:587(Abstr.)
17. Weidmeier, R. D., M. J. Arambel and J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus* fermentation extract on ruminal characteristic and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2068.
18. Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose fast. *J. Dairy Sci.* 79:1496-1502.
19. Wu, J. S. and R. J. Wang. 2001. Study of the effect of exogenous fibrolitic enzyme applied in dairy diet. Fibro001D1. Alltech Inc.
20. Wood, T. M. 1992. Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* 20:4653.
21. Yang, W. Z., K. A. Beauchemin and L. M. Rode. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.