

# 비타민 A 급여가 반추위내의 발효성상 및 *Ruminococcus flavefaciens*의 섬유소 분해율에 미치는 영향

안종호 · 김보라

한경대학교 낙농생명과학과

## Effects of Supplementation of Vitamin A on Fermentation Pattern in the Rumen and Cellulose Degradability *Ruminococcus flavefaciens*

Jong Ho Ahn and Bo Ra Kim

Department of Dairy Science, Hankyong National University

### ABSTRACT

The aim of this study was to find out the effects of supplementation of vitamin A to the diets of high or low amounts of concentrates for ruminants. In the first experiment, ruminal fermentation patterns with the data of pH, VFA production and cellulose disappearance rates in the rumen *in vitro* were investigated. In the second experiment, enzyme activities, gas production and dry matter degradabilities using cellulolytic bacteria, *Ruminococcus flavefaciens* were investigated.

Ruminal pH was higher in low amounts of concentrates than in high amounts of concentrates as expected, however, no significant differences were found. Cellulose disappearance rates improved in vitamin A addition particularly in early incubation time (before 24h) and also the production of volatile fatty acids increased in vitamin A addition. These trends were more evident in diets containing high amounts of concentrates than in low amounts of concentrates and it may indicate that vitamin A is more required in the diets of high amounts of concentrates. In the second experiment, gas production, enzyme activities and dry matter degradabilities using cellulolytic bacteria, *Ruminococcus flavefaciens* were not different between vitamin A added and non-added diets. *Ruminococcus flavefaciens* may not require additional vitamin A for its own growth.

**(Key words :** Vitamin A, Ruminal fermentation, *Ruminococcus flavefaciens*, Concentrates)

### I. 서 론

비타민은 동물에게 소량으로 필요한 여러 형태의 유기물로 모든 동물세포의 정상적 대사 작용에 필수물질이며, 대부분 조효소의 역할을 하여, 가축의 생리기능을 유지하고 성장과 번식에 필수적인 영양소이다. 사료 중 비타민 A는 주로 retinyl ester 형태로서 소장 상부의 체액에 함유되어 있는 retinol ester hydrolase에 의해 가수분해 되어 retinol을 형성한 다음 흡수된다. 그 후 림프관의 chylomicron과 함께 체내에 흡수되어 비타민 A ester(주로 retinyl palmitate)로 저장되고 혈중 retinol 결합단백에 의해 조직으로 이동된다(先野, 1992). 반추가축에서의 비타민 A의 필요성에 관한 내용으로는 동물의 시력, 생식기능, 골격성장, 상피세포 유지, 상피조직내의 거대분자의 합성 및 세포유지 등 동물의 건강과 면역기능의 유지 및 질병발생

을 억제하기 위하여 필요한 영양소로 알려져 있다(McDowell, 1989).

반추동물의 반추위내 미생물은 닭, 돼지 등의 단위동물과는 달리 여러가지 수용성 비타민을 합성할 수 있는데 합성된 비타민은 반추동물에 의하여 이용될 수 있어 반추동물의 수용성 비타민의 요구량은 단위동물의 요구량보다 적다고 할 수 있다. 한편 특정 미생물의 순수 배양이나 또는 반추위 미생물의 배양에는 비타민 A, D, E 등의 지용성 비타민과 바이오틴, 콜린 등의 비타민 B군이 필수적으로 요구되는 것이 확실하나 정확한 요구량에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다.

비타민 A의 효과에 대한 일부 연구보고로서 Weiss 등(1975)은 β-carotene이 송아지의 정자 형성에 특별한 효과가 있다고 하였으며 β-carotene이 결핍된 숫소는 정자의 활력이 감소하고 기형적인 정자수가 증가하였다고 하였다.

Corresponding author : Jong Ho Ahn, Hankyong National University, Ansong, Gyonggi, 456-749, Korea. Tel: 031-670-5124, Fax: 031-670-5127, E-mail: jhahn@hknu.ac.kr

신과 백(1985)은 홀스타인 착유우 30두를 이용하여 대조구와  $\beta$ -carotene 첨가구로 나누어  $\beta$ -carotene이 번식능력에 미치는 영향을 연구한 결과  $\beta$ -carotene 첨가구가 초발정이 빠르고, 공태 기간도 현저히 단축되었다고 발표하였다. 그러나 Akordor 등(1986)은  $\beta$ -carotene의 첨가가 홀스타인의 번식능력을 향상시키지 못하였다고 하여 상반된 결과를 보고하기도 하였다. 그들은 56두의 홀스타인 젖소에 1일 400 mg의  $\beta$ -carotene이나 160,000 IU의 비타민 A를 첨가했을 때 양 처리 간에 혈장비타민 A 함량도 차이가 없었으며 ( $20.4 \pm 1.01$  vs  $20.8 \pm 1.11$ g/100ml) 유량도 차이가 없었다 ( $33.4 \pm 0.09$  vs  $33.2 \pm 0.77$ kg/일)고 하였다.

일반적으로 반추동물의 반추위 내에서 각종 미생물의 성장을 보조하기 위해서 비타민 A를 추가로 필요로 하는지 정확히 인식되지 못하고 있으나, NRC에서는 기본적으로 비타민 A의 권장량을 제시하고 있으며 또한 사료 원료가 다양하게 공급되고 있는 현실을 감안하여 볼 때 비타민 A의 요구량도 급여사료의 종류에 따라 달라질 수 있다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 사료의 종류에 따른 즉, 조사료 위주의 사료 급여 체계와 농후사료 위주의 급여 체계에 따른 비타민 A의 급여 효과 차이가 반추위내 미생물의 발효 성상에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고자 하였으며 또한 제1위내에서 섬유소 분해 능력이 가장 왕성한 박테리아인 *R. flavefaciens*에서의 비타민 A 공급시 박테리아의 건물분해율, 가스생성량, 효소분해력 등을 조사하여 비타민 A가 반추동물의 반추위의 섬유소분해 박테리아에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 실험 1. 비타민 A 공급이 반추위내 발효 성상에 미치는 영향 *In vitro*

#### (1) 실험설계

본 실험은 조농비율에 따른 반추위내 비타민 A (ROVIMIX, DSM Ltd.) 급여 효과의 변화를 평가하기 위해 실시하였다. 실험 1과 2에 사용한 비타민 A 첨가량은 두 당 일일 요구량을 기준으로 (Requirement 100,000 IU/h/d, 1 IU =  $0.344 \mu\text{g}$  Vit A-acetate) 하였으며 실험 처리구는 다음과 같다. 비타민 A 첨가량은 농후사료 함량에 따라 비타민 A의 요구량이 달라질 수 있다는 전제하에 처리구별 첨가량을 달리하였으며 동물의 비타민 A 요구량 이상으로 충분하게 처리하였다.

HV: High Conc. (concentrates) ratio condition (roughage : conc. = 3 : 7)

Roughage 0.6g + Conc. 1.4g + Vit. A 0.07mg in 1 flask of rumen fluid

H: Roughage 0.6g + Conc. 1.4g + no Vitamin

LV: Low concentrates ratio condition (roughage : conc. = 7 : 3)

Roughage 1.4g + Conc. 0.6g + Vit. A 0.03mg in 1 flask of rumen fluid

L: Roughage 1.4g + Conc. 0.6g + no Vitamin

#### (2) Rumen inoculum 준비

Rumen inoculum은 경기도 천안시 성환 축산연구소에서 반추위 누관이 장착된, 조사료를 무제한 급여한 거세우 수소 Holstein에서 채취하였다. 채취한 반추위 내용물을 4겹의 Gauze로 걸러 보온병에 담아 실험실로 운반하였으며, 7겹의 Gauze로 다시 여과하였고, 배양개시 30분전 반추위 내용물과 CO<sub>2</sub> bubbling 으로 pH 7.0으로 보정하여 제조한 rumen buffer 용액과 1:1로 혼합하여 rumen inoculum으로 사용하였다. 위액의 회석 및 여과 전 과정을 O<sub>2</sub> free CO<sub>2</sub>를 분사하여 위액이 O<sub>2</sub>에 노출되지 않도록 유지하였다.

#### (3) 시험사료 및 배양방법

본 실험에 사용된 공시 사료로 농후사료는 육성우 사료 (양주축협)를 사용하였고, 조사료는 볏짚을 사용하였으며 실험 개시 전 Wiley mill로 분쇄하여 2 mm로 screening하여 사용하였다. 배양은 Tilly와 Terry (1963)의 방법에 따라 실시하였으며, 250 ml의 flask에 200 ml의 rumen inoculum을 주입하고, 준비된 사료를 rumen inoculum에 침지시켜 39°C  $\pm 0.5$ 로 설정된 항온 교반기 (Vision Co., Ltd)에서 120rpm으로 교반 배양하였으며, 배양시간을 3, 6, 12, 24, 48h로 하였다. cellulose 소화율 측정을 위하여 Filter bag F57, (ANKOM Technology Ltd.)안에 cellulose micro granular (SIGMA Ltd.)를 1g 넣은 후 각각의 삼각플라스크 안에 넣고 시간별 배양 후 꺼내어 물로 세척한 뒤 60°C drying oven에서 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

#### (4) 조사항목 및 분석방법

공시 사료의 분석은 AOAC (1990)의 방법에 준하여 사료의 조성분을 분석하였고, 반추위액의 pH 측정은 pH meter (HM-30G Japan, 2002)를 사용하여 측정하였다. VFA 분석은 상층액 5 ml과 25% metaphosphoric acid와 회석 후 vial에 넣어서 -30°C의 냉동고에 보관 후 분석 시 저온에서 서서히 해동시켜 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Gas Chromatography용 vial에 넣어 GC (HP 6890 USA, 1998)를 이용하여 분석하였다.

**실험 2. Retinol 공급이 반추위내 섬유소분해박테리아의 섬유소분해능력에 미치는 영향**

**(1) 실험설계**

본 실험에는 retinol (99%; FLUKA, Japan)를 실험 재료로 사용하였다. 실험에 사용되어질 retinol 첨가량은 실험 1과 같은 조건으로 두당 일일 요구량을 기준으로 (Requirement 100,000 IU/h/d, 1 IU = 0.344 µg) 하였으며 retinol 0.375 µg /0.1 ml을 만들어 사용하였다. 실험처리구는 다음과 같다.

Control : RF 1ml + DA medium 19ml + filter paper disk 0.1g

0.1ml level : retinol 0.1ml + RF 1ml + DA medium 18.9 ml + filter paper disk 0.1g

0.2ml level : retinol 0.2ml + RF 1ml + DA medium 18.8 ml + filter paper disk 0.1g

**(2) 공시균주, 사용배지 및 공시기질**

공시균주로는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입한 *Ruminococcus flavefaciens* (ATCC NO.19208, RF))를 이용하였다. 공시기질로 filter paper (Whatman NO. 1)를 punching하여 지름 50mm로 만든 paper disk를 30ml serum bottle에 0.1g씩 첨가하여 사용하였으며 배지로는 탄수화물 공급원이 제거된 Dehority's artificial medium (DA medium) (Dehority, 1963; Table 1)을 total volume에 맞게 넣어 사용하였다.

Table 1. The composition of Dehority's artificial medium

| Component                          | 100 ml |
|------------------------------------|--------|
| Mineral I solution                 | 20 ml  |
| Mineral II solution                | 20 ml  |
| Resazurine                         | 0.1 ml |
| Rumen fluid                        | 20 ml  |
| Vitamin mixture                    | 1.0 ml |
| V.F.A solution                     | 6.7 ml |
| Casein (acid hydrolyzed casein)    | 2 g    |
| Hemin solution                     | 0.1 ml |
| 8% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 5 ml   |
| 2.5% Cystein-HCl                   | 0.1 ml |

**(3) 공시균주의 접종 및 배양**

공시균주를 배양한 후 30ml bottle에 1ml씩 각각의 DA medium에 접종하였다. Vitamin A의 첨가를 위해서 stock solution을 제조하고 0.1ml level, 0.2ml level 및 무첨가구의 세 처리구로 구분하였다. R.F 균주에 비타민을 첨가한 후 0, 12, 24, 48, 72hr 동안 39°C incubator에서 배양하였다.

**(4) 건물분해율 및 가스생성량**

건물분해율의 측정에는 배양 후 기질을 filter paper로 여과한 후 남은 잔기를 60°C drying oven에서 48시간 이상 건조한 paper disc 기질을 dessicator에서 30분간 방냉시킨 후 무게를 측정하여 배양 전과 배양 후의 무게 차에 의하여 구하였다. 가스 발생량 측정법은 Williams 등 (1996)과 Beuvinck와 Kogut (1993)의 방법을 이용하였다. 각 배양시간 대별로 배양이 끝난 후 serum bottle을 실온에서 10분정도 온도를 안정시킨 후 가스발생량을 측정하였다. 가스발생량은 Pipet을 이용하여 2개의 피펫을 스탠드에 고정시킨 후 증류수를 채우고 한쪽 끝에는 고무호스를 연결하여 주사기 바늘을 꼽은 후 샘플에 넣었을 때 기압차로 물이 내려가 높이만큼 읽어주어 측정하였다.

**(5) 효소활력**

**1) CMCCase 활력**

다당류 분해효소인 carboxymethyl cellulase (CMCase)를 분석은 Miller 등 (1960)의 방법으로 활력을 측정하였다. 각 시간대별 배양액을 채취하여 14,000rpm에서 5분 동안 원심 분리 하여 조효소로 이용하였다. 0.05M citrate buffer (pH5.5)로 용해시킨 1%의 CMC (Carboxymethyl cellulose Sigma Cat. NO C-4888)의 기질을 이용하여 각각 blank tube에 1% CMC의 0.5ml과 citrate buffer (0.05M, pH5.5)의 0.5ml를 Sample tube에 넣은 후 45°C water bath에서 1시간 동안 배양하였다. 45°C의 항온수조에서 1시간동안 반응시킨 후에 효소 반응을 중지시키기 위하여 boiling water에서 5분 동안 boiling한 후, ice water에서 5분 동안 식혀주었다. Test tube에 반응이 끝난 시료 0.2ml와 DNS (dinitrosalicylic acid) 용액 0.6ml씩 넣어준 다음, 반응을 위해 5분 동안 boiling한 후, ice water에서 5분 동안 식혀주었다. 증류수로 각각의 tube에 4.2ml씩 첨가하여 희석시킨 후 550nm에서 spectro-photometer를 이용하여 흡광도 (OD값)를 측정하여 기질로부터 유리된 환원당의 양을 glucose를 standard로 하여 µmol/min/1ml 단위로 환산하였다.

**2) Xylanase 분석**

본 시험은 다당류 분해효소인 xylanase를 분석하기 위하여 수행하였다 (Miller 등, 1960). 배양액을 14,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상층 액을 조효소로 이용하였다. 0.05M potassium phosphate buffer (pH 5.5)로 용해시킨 2% oat spelt xylan (Sigma)의 기질을 이용하여 각각 blank tube에 2% oat spelt xylan의 0.5ml와 potassium phosphate buffer (0.05M, pH7.0)의 0.5ml를 넣어 주었다. Sample tube에 2% oat spelt xylan의 0.5ml과 조효소 0.5ml를 넣어 45°C 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 분석방법은 앞의 CMCCase 분석방법과 같은 방법으로 분석하였으며 분석 후 기질로부터 유리된 환원당의 양을 xylose를 standard

로 하여  $\mu\text{mol}/\text{min}$  단위로 환산하였다.

### 3. 통계처리

본 실험의 결과로 얻어진 자료에 대한 통계처리는 SAS (Statistical Analysis System, 1996) package의 GLM(General Liner Model)을 이용하여 분산분석을 실시하였다. 각 처리 평균에 대하여 Duncan의 다중검정법(1955)을 이용하여 유의수준 95% 수준에서 처리간 비교하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 실험 1. 비타민 A 공급이 반추위내 발효 성상에 미치는 영향 *in vitro*

본 실험에 사용한 농후사료 및 볏짚의 성분으로 조단백

질 각각 17.07, 4.16% 이었으며 조섬유 3.10, 28.30%, 조지방 4.02, 1.54% 조회분 6.77, 11.28%, NDF 31.10, 66.50%, ADF 15.26, 47.13%이었다 (Table 2).

비타민 A 첨가시 반추위내 pH 및 cellulose 소화율의 변화는 Table 3에서 보는 바와 같다. pH는 전체적으로 실험 개시부터 종료까지 배양시간이 경과함에 따라 모두 감소하는 경향을 나타내었으나 전반적으로 일반적인 반추위내 pH보다 다소 낮은 pH를 보였다. 처리구별 및 배양시간별 pH의 변화는 고농후사료에서 전체적으로 배양시간이 지날수록 감소하였으며 저농후사료 역시 고농후사료 보다는 pH가 높은 경향으로 배양시간이 지날수록 감소하였으나 비타민 첨가와 무첨가 처리구 간에 큰 차이는 없었다. 비타민 A의 첨가와 무첨가 농후사료의 급여량에 따라 12시간 배양이후부터 배양액의 pH의 차이가 뚜렷하였다 ( $P<0.05$ ). 발효시간에 따른 반추위내 cellulose 소화율의 변화는, 배양개시 후 3hr에는 HV, H, LV 및 L 각각 8.58,

Table 2. Chemical compositions of experimental diet (*in vitro*, %, DM basis)

| Sources     | Nutrients |       |      |         |           |       |       |
|-------------|-----------|-------|------|---------|-----------|-------|-------|
|             | DM        | Ash   | E.E  | C-fiber | C-protein | NDF   | ADF   |
| Concentrate | 89.79     | 6.77  | 4.02 | 3.70    | 17.07     | 31.10 | 15.26 |
| Rice straw  | 93.28     | 11.28 | 1.54 | 28.30   | 4.16      | 66.50 | 47.13 |

DM: Dry matter, E.E.: Ether extracts, C-fiber: Crude fiber, C-protein: Crude protein, NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber.

Table 3. pH and cellulose digestibility (%) of rumen fluids given the diets supplemented with or without vitamin A

| Incubation Time(hr)     | HV                 | H                  | LV                  | L                   | SEM   |
|-------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|
| pH                      |                    |                    |                     |                     |       |
| 3                       | 5.60               | 5.67               | 5.80                | 5.73                | 0.125 |
| 6                       | 5.33               | 5.31               | 5.52                | 5.52                | 0.112 |
| 12                      | 5.01 <sup>a</sup>  | 5.09 <sup>a</sup>  | 5.38 <sup>b</sup>   | 5.38 <sup>b</sup>   | 0.094 |
| 24                      | 4.94 <sup>a</sup>  | 4.99 <sup>a</sup>  | 5.30 <sup>b</sup>   | 5.36 <sup>b</sup>   | 0.086 |
| 48                      | 4.93 <sup>a</sup>  | 4.94 <sup>a</sup>  | 5.25 <sup>b</sup>   | 5.31 <sup>b</sup>   | 0.008 |
| cellulose digestibility |                    |                    |                     |                     |       |
| 3                       | 8.58 <sup>b</sup>  | 3.85 <sup>a</sup>  | 8.64 <sup>b</sup>   | 3.70 <sup>a</sup>   | 1.143 |
| 6                       | 9.33 <sup>b</sup>  | 7.74 <sup>b</sup>  | 10.86 <sup>c</sup>  | 5.30 <sup>a</sup>   | 1.052 |
| 12                      | 9.53 <sup>b</sup>  | 8.15 <sup>ab</sup> | 9.47 <sup>b</sup>   | 5.75 <sup>a</sup>   | 1.064 |
| 24                      | 10.09 <sup>a</sup> | 12.74 <sup>b</sup> | 11.25 <sup>ab</sup> | 12.37 <sup>b</sup>  | 3.841 |
| 48                      | 13.08 <sup>a</sup> | 13.32 <sup>a</sup> | 15.57 <sup>b</sup>  | 14.44 <sup>ab</sup> | 3.759 |

a, b, mean in the same row with different superscript differ significantly ( $P<0.05$ ).

HV: Roughage 0.6g + Conc. 1.4g + vit A 0.07mg in 1 flask of rumen fluid.

H: Roughage 0.6g + Conc. 1.4g + no vitamin.

LV: Roughage 1.4g + Conc. 0.6g + vit A 0.03mg in 1 flask of rumen fluid.

L: Roughage 1.4g + Conc. 0.6g + no vitamin.

3.85, 8.64 및 3.70%로 비타민 A를 첨가한 처리구에서 무첨가구보다 유의하게 높은 소화율을 보였다 (P<0.05). 또한 이러한 경향은 6hr 및 12hr 배양 후에도 같은 경향이었으나 24hr 이후부터는 비타민 A 첨가구와 무첨구간 차이가 없어졌다 (P>0.05). 본 실험의 결과는 반추위내 비타민 A의 공급이 배양초기에 (12시간 이내) 미생물의 성장에 영향을 주어 cellulose 소화율이 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 배양후기 (24hr 이후)의 pH가 전반적으로 너무 낮아져 섬유소분해 박테리아가 섬유소분해능력을 상실하였기 때문이라고 할 수 있으며 특히 이는 배양초기 섬유소분해박테리아의 활력이 높을 때 비타민 A의 요구량이 높다고도 추정할 수 있다.

고농후사료인 H와 HV의 total VFA 생성량이 저농후사료인 L과 LV 보다 모든 배양시간대별로 유의하게 높았다 (P<0.05). acetate 및 propionate 생성량도 고농후사료인 H와 HV에서 저농후사료인 L과 LV 보다 대부분의 배양시간대별로 대체적으로 높은 경향을 보였다. 비타민 A의 첨가 효과는 고농후사료에서는 total VFA 생성량이 6hr 및 12hr대를 제외한 3hr, 24hr 및 48hr 배양 후 무첨가구보다 유의하게 높았으며 (P<0.05) acetate, propionate 및 butyrate 생성량도 이와 같은 경향을 보였다. 저농후사료에서의 total VFA 생성은 3hr 배양 후 비타민 A 첨가구에서 무첨가구보다 유의하게 증가하였지만 나머지 배양시간인 6hr, 12hr, 24hr 및 48hr에서는 통계적인 유의차를 보이지 못하였다. Acetate 생성량은 처리구간 대부분의 배양시간에서

Table 4는 비타민 A 공급에 따른 VFA 생성량을 조사하

Table 4. Ruminal VFA concentrations (mM) given the diets supplemented with or without vitamin A, *in vitro*

| Incubation Time (hr) | HV                 | H                   | LV                  | L                   | SEM   |
|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| acetic acid          |                    |                     |                     |                     |       |
| 3                    | 42.76 <sup>b</sup> | 38.51 <sup>a</sup>  | 39.29 <sup>a</sup>  | 34.99 <sup>a</sup>  | 1.555 |
| 6                    | 46.17 <sup>b</sup> | 49.84 <sup>b</sup>  | 38.47 <sup>a</sup>  | 36.63 <sup>a</sup>  | 3.042 |
| 12                   | 48.56 <sup>b</sup> | 47.76 <sup>b</sup>  | 42.40 <sup>a</sup>  | 40.75 <sup>a</sup>  | 0.934 |
| 24                   | 52.72 <sup>b</sup> | 46.25 <sup>ab</sup> | 41.93 <sup>a</sup>  | 41.20 <sup>a</sup>  | 1.789 |
| 48                   | 54.91 <sup>b</sup> | 47.14 <sup>ab</sup> | 39.46 <sup>a</sup>  | 42.24 <sup>ab</sup> | 1.840 |
| propionic acid       |                    |                     |                     |                     |       |
| 3                    | 13.96 <sup>c</sup> | 12.69 <sup>b</sup>  | 12.48 <sup>b</sup>  | 11.62 <sup>a</sup>  | 0.582 |
| 6                    | 16.06 <sup>b</sup> | 17.98 <sup>b</sup>  | 12.49 <sup>a</sup>  | 12.96 <sup>a</sup>  | 0.667 |
| 12                   | 15.39 <sup>b</sup> | 16.48 <sup>b</sup>  | 13.84 <sup>ab</sup> | 12.96 <sup>a</sup>  | 0.223 |
| 24                   | 18.18 <sup>b</sup> | 16.76 <sup>b</sup>  | 13.53 <sup>a</sup>  | 12.80 <sup>a</sup>  | 0.254 |
| 48                   | 18.03 <sup>b</sup> | 17.61 <sup>b</sup>  | 12.83 <sup>a</sup>  | 13.26 <sup>a</sup>  | 0.232 |
| butyric acid         |                    |                     |                     |                     |       |
| 3                    | 9.07 <sup>b</sup>  | 7.82 <sup>a</sup>   | 7.77 <sup>a</sup>   | 7.32 <sup>a</sup>   | 1.495 |
| 6                    | 11.47 <sup>b</sup> | 10.02 <sup>b</sup>  | 8.64 <sup>a</sup>   | 8.15 <sup>a</sup>   | 1.570 |
| 12                   | 11.41 <sup>b</sup> | 12.35 <sup>c</sup>  | 10.76 <sup>a</sup>  | 10.46 <sup>a</sup>  | 0.500 |
| 24                   | 18.36 <sup>c</sup> | 13.49 <sup>b</sup>  | 11.93 <sup>a</sup>  | 11.43 <sup>a</sup>  | 3.445 |
| 48                   | 17.34 <sup>c</sup> | 15.85 <sup>b</sup>  | 12.63 <sup>a</sup>  | 12.36 <sup>a</sup>  | 1.735 |
| total VFA            |                    |                     |                     |                     |       |
| 3                    | 70.85 <sup>c</sup> | 63.70 <sup>b</sup>  | 64.36 <sup>b</sup>  | 58.45 <sup>a</sup>  | 3.755 |
| 6                    | 78.95 <sup>b</sup> | 82.55 <sup>c</sup>  | 64.44 <sup>a</sup>  | 61.59 <sup>a</sup>  | 6.039 |
| 12                   | 82.05 <sup>b</sup> | 81.48 <sup>b</sup>  | 67.73 <sup>a</sup>  | 69.18 <sup>a</sup>  | 2.381 |
| 24                   | 94.72 <sup>c</sup> | 81.12 <sup>b</sup>  | 72.15 <sup>a</sup>  | 72.86 <sup>a</sup>  | 4.715 |
| 48                   | 94.65 <sup>c</sup> | 85.73 <sup>b</sup>  | 73.18 <sup>a</sup>  | 72.79 <sup>a</sup>  | 3.654 |

a, b, mean in the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

HV: Roughage 0.6g + Conc. 1.4g + vit A 0.07 mg in 1 flask of rumen fluid.

H: Roughage 0.6g + Conc. 1.4g + no vitamin.

LV: Roughage 1.4g + Conc. 0.6g + vit A 0.03 mg in 1 flask of rumen fluid.

L: Roughage 1.4g + Conc. 0.6g + no vitamin.

유의적인 차이를 보이지 않았으나 6hr 및 12hr 배양 후에는 비타민 A 첨가구가 더 높은 경향을 보였다. Propionate 생성량도 3hr 배양 후 첨가구가 무첨가구보다 유의하게 ( $P<0.05$ ) 높았으나 나머지 배양시간대에서는 통계적인 차이를 보이지 못하였다. 결국, 본 실험에서의 비타민 A 첨

가는 저농후사료보다는 고농후사료에서 휘발성지방산 생성이 더 증가한 점으로 보아, 이는 사료내 농후사료 함량이 높을수록 비타민 A의 필요성이 더 증가한다고 할 수 있다. 또한 본 실험의 고농후사료구는 비타민 A 첨가량이 0.07 mg으로서 저농후사료구의 0.03 mg 보다 2배 이상의

Table 5. CMCase and Xylanase activities ( $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ ) of *Ruminococcus flavefaciens*

| Incubation Time (hour)                    | Control            | 1 level             | 2 level            | SEM    |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|--------|
| <i>CMCase Ruminococcus flavefaciens</i>   |                    |                     |                    |        |
| 0 hr                                      | 1.41               | 1.30                | 1.23               | 0.275  |
| 12 hr                                     | 11.2 <sup>b</sup>  | 10.75 <sup>b</sup>  | 5.74 <sup>a</sup>  | 1.071  |
| 24 hr                                     | 25.47              | 23.96               | 22.60              | 0.839  |
| 48 hr                                     | 63.40              | 63.94               | 64.91              | 1.060  |
| 72 hr                                     | 68.06              | 66.93               | 72.76              | 1.770  |
| <i>Xylanase Ruminococcus flavefaciens</i> |                    |                     |                    |        |
| 0 hr                                      | 19.28              | 21.64               | 20.89              | 0.647  |
| 12 hr                                     | 27.19              | 26.47               | 26.75              | 0.624  |
| 24 hr                                     | 37.01 <sup>b</sup> | 40.37 <sup>bc</sup> | 20.04 <sup>a</sup> | 4.144  |
| 48 hr                                     | 284.29             | 233.56              | 283.37             | 23.252 |
| 72 hr                                     | 499.14             | 542.17              | 494.00             | 14.122 |

a, b, mean in the same row with different superscript differ significantly ( $P<0.05$ )

control : no vitamin addition

1 level : vitamin(retinol stock solution) 0.1ml addition

2 level : vitamin(retinol stock solution) 0.2ml addition

Table 6. The gas production (mL/0.1g DM substrate) and dry matter degradabilities (%) of filter paper cellulose by *Ruminococcus flavefaciens*

| Incubation Time (hour)       | Control            | 1 level            | 2 level            | SEM   |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| Gas production(mL)           |                    |                    |                    |       |
| 12 hr                        | 3.70 <sup>b</sup>  | 3.43 <sup>b</sup>  | 2.77 <sup>a</sup>  | 0.087 |
| 24 hr                        | 5.23 <sup>b</sup>  | 5.27 <sup>b</sup>  | 4.00 <sup>a</sup>  | 0.049 |
| 48 hr                        | 9.37 <sup>b</sup>  | 9.27 <sup>b</sup>  | 7.47 <sup>a</sup>  | 0.143 |
| 72 hr                        | 12.87 <sup>b</sup> | 13.17 <sup>b</sup> | 11.23 <sup>a</sup> | 0.144 |
| Dry matter degradability (%) |                    |                    |                    |       |
| 0 hr                         | 3.14 <sup>a</sup>  | 4.43 <sup>a</sup>  | 5.13 <sup>b</sup>  | 0.546 |
| 12 hr                        | 4.30 <sup>a</sup>  | 4.73 <sup>a</sup>  | 7.35 <sup>b</sup>  | 0.446 |
| 24 hr                        | 6.56 <sup>b</sup>  | 6.12 <sup>a</sup>  | 7.37 <sup>b</sup>  | 1.036 |
| 48 hr                        | 25.81 <sup>b</sup> | 24.35 <sup>b</sup> | 16.85 <sup>a</sup> | 1.493 |
| 72 hr                        | 38.19 <sup>b</sup> | 35.49 <sup>b</sup> | 29.95 <sup>a</sup> | 2.794 |

a, b, mean in the same row with different superscript differ significantly ( $P<0.05$ ).

control : vitamin non addition.

0.1ml : vitamin(retinol stock solution) 0.1ml addition.

0.2ml : vitamin(retinol stock solution) 0.2ml addition.

많은 양을 사용하였는데 이것이 VFA 생성 효율 향상에 영향을 미쳤을 수도 있으리라 추정해 볼 수 있다.

**실험 2. Retinol 공급이 반추위내 섬유소분해박테리아의 섬유소분해능력에 미치는 영향**

Table 5에서는 섬유소 분해력을 가지고 있는 혐기성 박테리아의 CMCase 및 xylanase 효소의 활력을 측정하였다. CMCase 효소의 활력은 전체적으로 볼 때 대조구와 처리구 간에 비슷한 경향을 나타내었고 배양시간이 경과함에 따라 점차적으로 증가하였다. Retinol 첨가구인 1 level과 2 level에서도 비슷한 경향을 나타내었으나 72hr에 2 level에서 유의하게 증가하였다(P<0.05). Xylanase activity를 보면 대조구와 전체적으로 비슷한 경향으로 증가하였으며 대조구와 처리구간에 유의적 차이가 없었다(P<0.05). 또한 24hr 이후부터는 활발한 효소분해 활력이 나타났다. 그 이유는 배양시간이 경과됨에 따라 분해력이 증가된 것이라 볼 수 있지만 뚜렷한 비타민 첨가의 효과로는 볼 수 없다.

Table 6의 gas 발생율과 건물분해율은 전체적으로 대조구와 비슷하게 증가하는 경향을 나타내었으며 gas 발생율은 대조구와 각각 처리구간에 유의적 차이가 없었다(P>0.05). 건물분해율도 배양시간이 경과함에 따라 증가하였으나 대조구와 처리구간에는 유의적 차이가 없었다(P>0.05). 이러한 결과를 볼 때 각 섬유소분해균주별로 Vitamin A를 추가 공급할 때 gas 발생을 및 건물분해율에는 영향을 주지 않았다고 사료된다. 일반적으로 반추위 미생물은 비타민 B군을 이용하여 체합성 및 성장유지를 할 수 있기 때문에 비타민 A에 대한 추가공급 부분은 더 연구되어야 한다고 생각된다.

**IV. 요 약**

비타민은 필수영양소로서 가축에서도 비타민제의 사용의 필요성이 인식되고 있는 추세이나 반추동물에서는 아직 비타민의 활성기전 및 효과가 정확히 명시되어 있지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 실험 1에서 비타민 A를 조농비율을 다르게 한 사료로 첨가하여 반추위 내 공급하였을 때 반추위 내의 pH, VFA 생성 및 cellulose 소실율 등에 어떠한 영향을 미치는지를 배양시간별로 조사하였다. 실험 2에서는 반추위내 섬유소분해박테리아인 *Ruminococcus flavefaciens*를 사용하여 비타민 A의 추가 공급이 섬유소분해박테리아의 가스발생량, 효소활력 등에 영향을 미치는 지를 조사하였다.

실험 1의 결과 pH는 저농후사료구에서 고농후사료구보다 높은 경향이 있었으며 Cellulose 소화율은 전반적으로 뚜렷하지는 않았지만 배양초기에 비타민 A 첨가군에서

무첨가군보다 높았고 휘발성지방산의 생성량도 비타민 A 추가 공급시 증가하는 결과가 나타났다. 비타민 A 공급에 따른 Total VFA 생성량은 저농후사료구에서보다 고농후사료구에서 더욱 분명하게 대부분의 배양시간대별로 비타민 A 첨가구에서 유의하게 높았다. 이는 사료내 농후사료 함량이 높을수록 비타민 A의 필요성이 더 증가한다고 추정할 수 있다. 실험 2에서 섬유소분해박테리아 균별 비타민 A 첨가 효과를 보기 위하여 *Ruminococcus flavefaciens*의 Vitamin A 이용성을 가스발생량, 효소활력 등을 조사하였다. R.F는 효소활력부분이 조금 높은 경향을 보였으나 전반적으로 뚜렷하지는 않았다. 즉, R.F.는 비타민 A를 요구하지 않는다고 사료된다.

실험 1과 실험 2의 결과를 종합하여 볼 때 실험 2는 섬유소분해박테리아인 R.F. 균주는 비타민 A를 필요로 하지 않으나, 실험 1의 rumen inoculum을 이용한 *in vitro* 배양 실험 결과 농후사료 함량이 높고 비타민 A를 첨가한 HA구에서 배양초기에 cellulose 소화율 및 VFA 생성량이 높게 나타난 것으로 보아 R.F. 이외의 반추위내 다른 섬유소분해박테리아가 비타민 A를 이용하였다고 사료된다.

**V. 인 용 문 헌**

1. Akordor, F. Y., Stone, J. B., Walton, J. S., Leslie, K. E. and Buchanan-Smith, J. G. 1986. Reproductive Performance of Lactating Holstein Cows Fed Supplemental  $\beta$ -Carotene. J. Dairy Sci. 69:2173.
2. A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis (15th ed.) Association of Official Agricultural Chemists Washington, D. C. 13th ed.
3. Beuvink, J. M. W. and Kogut, J. 1993. Modelling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. Journal of Animal Science 71:1041.
4. Dehority, B. A. 1963. Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from *in vitro* fermentations. J. Dairy Sci. 46:217.
5. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and Multiple F test. Biometrics 11:1.
6. McDowell, L. R. 1989. Vitamins in Animal Nutrition. Academic Press, INC. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
7. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. Anal. Biochem. 1:127.
8. SAS User's Guide : Statistics, Version 8. Edition. 1996. SAS Inst., Inc., Cary., NC.
9. Tilly, J. M. A and Terry, R. A. 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crop. J. Brit. Grass. Soc.

- 18:104.
10. Weiss, W. P., Hogan, J. S. and Smith, K. L. 1975. Relationships among selenium, vitamin E and mammary health in commercial dairy herds. *J. Dairy. Sci.* 73:381.
  11. Williams, B. A., Chuzemi, S., Van Bruchem, S. J., Boer, H. and Tamminga, S. 1996. A comparison of ten rice straw varieties grown at two different altitudes during a wet and dry season, using the *in vitro* cumulative gas production technique. *Anim. Feed Sci. Tech.* 57:183.
  12. 矢野秀雄. 1992. 肥育牛とビタミンA. *臨床獣.* 10(11):19.
  13. 신형태, 백순용. 1985. 사료의 가공형태가 착유우의 기호성 및 생산성에 미치는 영향. *한국낙농학회지.* 20(1):33.  
(접수일자 : 2009. 7. 13. / 수정일자 : 2009. 10. 16. / 채택일자 : 2009. 10. 20.)