

Lactiplantibacillus plantarum LM1001 배양물이 반추위 내 발효특성과 온실가스 발생량에 미치는 영향

김지윤^{1,†}, 이준희^{1,†}, 백창현¹, 최부길¹, 애린다¹, 박종진¹, 박주효², 김태락², 김삼철^{1,*}

¹경상국립대학교 응용생명과학부(BK21Four, 농업생명과학연구원), ²(주)락토메이슨

Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* LM1001 culture on fermentation characteristics and greenhouse gas emissions in the rumen

Ji Yoon Kim^{1,†}, Jun Hee Lee^{1,†}, Chang Hyun Baeg¹, Bu Gil Choi¹, Arrynda Rachma Dyasti Wardani¹, Jon Jin Park¹, Ju Hyo Park², Tae Rahk Kim², Sam Churl Kim^{1,*}

¹)Division of Applied Life Science (BK21Four, Institute of Agriculture and Life Science), Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

²)LactoMason Co., Ltd., Jinju 52840, Republic of Korea

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Sam Churl Kim

Tel: +82-55-772-1947, Fax: +82-55-772-1949, E-mail: kimsc@gnu.ac.kr

Running head: *L. plantarum* LM1001 culture in the rumen

ABSTRACT

This study aimed to estimate the effects of *Lactiplantibacillus plantarum* LM1001 culture (LPC) on fermentation characteristics and greenhouse gas emissions in the rumen. Pure starch and cellulose were mixed at a 1:1 ratio, and used as the substrate for 12 h and 24 h of rumen incubations. Rumen fluid was collected from two cannulated Hanwoo cows just before morning feeding and mixed with *Van Soest* medium at a 1:2 ratio for the rumen buffer. The substrate (0.3 g) and rumen buffer (30 mL) were placed into the incubation bottles (n=4) with the additions of 0, 10, and 20% of LPC based on the rumen buffer (v/v). After the incubation times, total gas was measured and sub-sampled for CO₂ and CH₄ analyses. Then, the bottle content was centrifuged for *in vitro* digestibilities of dry matter (IVDMD) and organic matter (IVOMD), and rumen fermentation characteristics. By increases of LPC supplementation levels, acetate content decreased (Linear, p=0.027) at 12 h of incubation time and propionate content increased (Linear, p=0.015), resulting in a decrease of the acetate to propionate ratio (Linear, p=0.035). And, total gas emission (mL/g DM) in 20% LPC was higher (p<0.05) than that in the control at 12 h incubation time, whereas CH₄ and CO₂ (mL/g DM, DMD and OMD) emissions were lower (p<0.05) than those in the control. In contrast, both greenhouse gas emissions (mL/g DM, DMD, and OMD) in LPC supplemented treatments were higher (p<0.05) than those in the control at 24 h incubation time. Therefore, this study concluded that LPC supplementation has benefits on greenhouse gas mitigation in the rumen at 12 h incubation time without adverse effects on nutrient digestibility.

Key words: Digestibility, Greenhouse gas, *Lactiplantibacillus plantarum* culture, Rumen fermentation characteristic

46 I. 서론

47 Probiotics 는 적절한 양을 투여했을 때 숙주의 건강을 증진시키는 살아있는 미생물로
48 정의되며[1], 최근에는 가축의 생산성과 건강을 개선하기 위한 사료 첨가제로 널리
49 활용되고 있다[2]. 또한 probiotics 배양물(culture filtrate)은 단순한 미생물 세포뿐만
50 아니라 펩타이드, 효소, 항균 물질 등의 발효 대사산물을 함유하고 있어 자원화 가능성이
51 높은 소재로 간주되고 있다[3]. 특히, 반추가축을 위한 섬유질배합사료(Total mixed ration,
52 TMR) 제조 시 수분 공급제로 사용되고 있지만, 대부분의 배양물은 산업 폐기물로
53 버려지고 있는 실정이다. 따라서 이들 배양물의 활용 기술은 부산물의 upcycling 과 기업의
54 ESG (Environment, Social, Governance) 경영 측면에서 큰 의미가 있다.

55 발효 배양물은 yeast culture, mannan oligosaccharides, culture filtrate 등 배양하는
56 균주에 따라 그 종류가 다양하며, 반추위 발효 촉진[4], 장 건강 개선[5], 항균 효과[3]
57 등이 있는 것으로 보고되었다. 특히, *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*)은 사람의
58 건강 증진을 목적으로 하는 대표적인 probiotics 제조 균주로 다양한 연구가 수행되었으며,
59 강력한 내산성과 내담즙성, 항병원성, 항산화 및 면역조절 효과 등이 보고되었다[6]. 이
60 종은 전통 발효식품 뿐만 아니라 사일리지 발효품질 개선을 위해서도 적용되고 있으며,
61 유럽식품안전청(EFSA)에서는 이 종의 다양한 균주들(DSM 34271, DSM 26571 등)을
62 사일리지 첨가제로 공식 승인하였다[2,7]. 이러한 *L. plantarum* 배양 부산물은 젖산, 3-
63 phenyllactic acid, 효소, 펩타이드, 항균 물질 등을 함유하고 있어서 발효 촉진과 유해균의
64 성장 억제, 저장성 향상 등의 효과가 있어서 사료 첨가제로서의 가치가 있는 것으로
65 보고되었다[8-10]. 특히, 사탕수수, 알팔파, 포도박 등의 사일리지 제조 시 *L. plantarum*
66 발효 부산물을 처리했을 때, pH 감소, 유산균(Lactic acid bacteria, LAB) 수 증가, 곰팡이
67 성장 억제 효과가 확인되었다[11,12]. 또한, *L. plantarum*은 발효품질 개선에 그치지 않고,

68 반추위 내 CH_4 발생 저감 효과도 보였을 뿐만 아니라 반추위 발효 환경 개선으로
69 암모니아태 질소 발생을 감소시켰다[13,14,15].

70 따라서 본 연구는 *L. plantarum* LM1001 을 이용하여 건강기능식품용 원료로 사용되는
71 생균을 제조하는 과정에서 발생하는 배양물이 반추위 내 발효특성과 온실가스 발생에
72 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

73

74 II. 재료 및 방법

75

76 1. 배양물과 반추위 내 발효

77 경남 진주시 소재 (주)락토메이슨에서 생산된 유산균 배양물(*L. plantarum* LM1001
78 culture, LPC)을 제공받아 실험에 이용하였다. 반추위 내 발효를 위해, 경상국립대학교 동
79 물생명윤리위원회의 승인(GNU-191011-E0050)을 받아 *in vitro* 반추위 내 발효시험을
80 실시하였다[16]. 반추위액은 캐놀라가 장착된 한우 암소 2두에게 조사료와 농후사료를 4:1
81 비율로 혼합한 사료를 체중의 약 2%를 급여한 후 익일 아침 사료 급여 직전(08:00)에 채
82 취하였다. 채취한 위액은 4겹의 cheese cloth를 이용해 여과하였으며, 여과된 반추위액은
83 밀폐된 보온용기에 담고 CO_2 충진을 통해 혐기적 상태를 유지하여 실험실로 이동하였다.
84 이동한 위액은 *Van Soest* medium과 1:2 비율로 혼합하여 rumen buffer를 제조하였다. 반
85 추위 내 발효특성 조사를 위한 기초사료는 전분(Sigma-Aldrich, S4180, MO, USA)과 셀룰
86 로오스(Sigma-Aldrich, C6413, MO, USA)를 1:1로 혼합하여 사용하였다. 제조된 기초사료
87 0.3 g과 rumen buffer 30 mL을 125 mL serum bottle에 넣고($n=4$), rumen buffer를 기준
88 으로 LPC를 0(대조구), 10 및 20% 첨가한 3처리구를 설정하여 39°C CO_2 incubator에서
89 12시간과 24시간 동안 각각 배양하였다. 배양이 종료된 후에는 Digital manometer (06-

664-21 Fisher Scientific Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 total gas 발생량을 측정하였으며[18], 약 10 mL의 가스를 CH₄와 CO₂ 분석용으로 포집하였다. 또한 반추위 내용물은 4℃에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리(1248R, Labogene, Gimpo, Korea) 하여 상층과 하층을 분리하였다.

2. 반추위 내 소화율, 발효특성 및 가스 발생량

원심분리한 하층은 105℃ 열풍건조기에서 48시간 건조하여 *in vitro* 건물 소화율(*In vitro* dry matter digestibility, IVDMD)을 측정한 후 550℃ 회화로(Muffle furnace, Nabertherm, Liliental, Germany)에서 5시간 소화시켜 유기물 소화율(*In vitro* organic matter digestibility, IVOMD)을 분석하였다. 또한 원심분리한 상층은 pH, 휘발성지방산(Volatile Fatty Acid, VFA) 및 암모니아태 질소(Ammonia-N) 분석에 이용하였다. pH는 pH meter (SevenEasy, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하였으며, VFA는 auto sampler (L-2200, Hitachi, Tokyo, Japan), UV detector (L-2400, Hitachi, Tokyo, Japan) 및 column (MetaCarb 87H, Varian, CA, USA)이 장착된 HPLC를 이용하였으며[16], ammonia-N은 비색법에 준하여 분석하였다[17]. 한편, 포집된 가스는 TCD detector와 column (Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography (Agilent Technologies HP 5890, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 CH₄와 CO₂ 발생량을 분석하였다[19].

3. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 LPC 첨가수준에 의한 변화를 조사하기 위하여, PROC GLM (General linear model) SAS (Statistical analysis system) program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 polynomial contrasts (linear and quadratic effects)를 분석하였다. 또한 처리구간의 유의성 검증은 Tukey's test ($p < 0.05$)을 통해 실시하였다.

113

114 III. 결과 및 고찰

115

116 1. 반추위 내 소화율과 발효특성(12 h)

117 반추위 내 LPC 첨가수준을 달리하여 12시간 동안 발효시켰을 때, 영양소 소화율과 발효
118 특성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같았다. LPC 첨가수준이 건물(IVDMD)과
119 유기물(IVOMD) 소화율에는 영향을 미치지 않았다($p>0.05$). 하지만, LPC 첨가수준이 증가
120 함에 따라 반추위 내 acetate 함량(linear, $p=0.027$)은 감소하고, propionate 함량(linear,
121 $p=0.015$)은 증가하였으며, 이로 인해 A:P 비율(linear, $p=0.035$)은 감소하였다. 특히, 반
122 추위 내 acetate 함량($p<0.05$, 67.2 vs. 65.6% of M)은 대조구가 LPC 20% 첨가구에 비해
123 높았으며, propionate 함량($p<0.05$, 21.3 and 21.2 vs. 19.8% of M)은 LPC를 첨가한 모든
124 처리구가 대조구에 비해 높았다.

125 반추가축에게 유익한 균주 또는 그 배양물을 급여했을 때, 유기산, 펩타이드, 효소 등과
126 같은 유효성분으로 인해 반추위 내 소화율이 증가하는 것으로 보고되었다[11,12]. 특히, *L.*
127 *plantarum* BX62를 적용하였을 때 건물 소화율이 증가하였으며[13], Ongole 품종의 교잡우
128 에 *L. plantarum*을 급여하였을 때, 반추위 안정화로 유기물 소화율이 증가하였다고 보고되
129 었다[20]. 하지만, 본 연구에서는 LPC 첨가수준이 건물과 유기물 소화율에 영향을 미치지
130 않았는데, 이것은 반추위 내용물과 미생물, 발효시간, 기초사료 등의 차이에 기인한 것으로
131 사료된다. 한편, 박테리오신 생성 *L. plantarum*을 알팔파 사일리지 제조 시 접종하였을 때,
132 반추위 내 propionate 함량이 증가한다고 보고되었다[21]. 또한 동일한 균주를 옥수수 사
133 일리지 제조 시에 접종하였을 때, 반추위내 pH와 total VFA 농도에는 영향을 미치지 않았
134 으나, propionate 함량은 증가하고 acetate 함량은 감소한다고 보고하였는데[22], 본 연구

에서도 선행연구들과 유사한 연구결과가 확인되었다.

2. 반추위 내 가스 발생량(12 h)

반추위 내 LPC 첨가수준을 달리하여 12시간 동안 발효시켰을 때, total gas, CH₄ 및 CO₂ 발생량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figure 1과 같았다. 건물기준 total gas 발생량 (mL/g DM)은 LPC 첨가수준이 증가할수록 증가하였으며 (linear, $p=0.014$), 건물 소화율 (mL/g DMD)과 유기물 소화율 (mL/g OMD) 기준에서는 감소하였다 (quadratic, $p<0.05$). 한편 LPC 첨가수준이 증가할수록 CH₄ 발생량은 건물 (quadratic, $p<0.001$), 건물 소화율 (quadratic, $p=0.025$) 및 유기물 소화율 (quadratic, $p=0.009$) 기준 모두에서 감소하였으며, CO₂ 발생량도 건물, 건물 소화율 및 유기물 소화율 기준 모두 (quadratic, $p<0.05$)에서 감소하였다. 특히, LPC 20% 첨가구에서 CH₄와 CO₂ 발생량이 가장 낮았다 ($p<0.05$).

반추위 내 유기물 대사과정에서 발생하는 gas는 사료의 gross energy 손실을 유발하는 대표적인 예이며, 특히 CH₄ 발생은 반추위에서 탄소 손실과 에너지 손실의 주요 경로이며, 이에 관여하는 methanogens는 수소를 이용해 CH₄를 생성함으로써 발효 중 환원균의 역할을 한다 [14,22]. 한편, 박테리옌 생성 *L. plantarum*을 반추가축에 적용하였을 때, CH₄ 발생량은 감소하고, propionate 비율이 증가하였다는 선행연구들의 결과에서와 같이 [13,14,21], 본 연구에서도 LPC 20% 첨가구에서 유사한 결과를 보였다. 이와 같이, 박테리옌 생성 *L. plantarum* 적용 시, propionate 비율은 증가한 반면 acetate 비율이 감소한 것은 탄소 흐름이 CH₄ 생성과 연관된 acetate 경로에서 수소를 소비하는 propionate 경로로 이동했기 때문인 것으로 사료되며, 이는 반추위 내 CH₄ 발생량 저감과 사료의 gross energy 이용 효율 향상에 기여할 수 있을 것이다. 한편, 반추위 내 CO₂는 주로 발효 중 탈탄산 반응이나 포도당 대사의 산물로 생성되며, 본 연구에서 20%의 CO₂ 발생량이 낮았

던 것은 *L. plantarum* 배양액의 산성 조건에 의해 탈탄산 반응이 억제되었거나, 유기산 축
적으로 인해 중간 대사산물의 생성 경로가 제한되었을 것으로 사료된다[12].

3. 반추위 내 소화율 및 발효특성(24 h)

반추위 내 LPC 첨가수준을 달리하여 24시간 동안 발효시켰을 때, 영양소 소화율과 발효
특성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 반추위 LPC 첨가수준이 반추위 내
pH(quadratic, $p=0.015$)와 A:P 비율(linear, $p=0.007$)을 제외한 영양소 소화율(IVDMD와
IVOMD)과 반추위 내 발효특성에는 영향을 미치지 않았다($p>0.05$). 반추위 내
pH(quadratic, $p=0.044$)와 A:P 비율(linear, $p=0.007$)은 LPC 첨가수준이 증가함에 따라
감소하였다. 특히, 반추위 내 pH는 LPC 10% 첨가구가 LPC 20% 첨가구에 비해 높았으며
($p<0.05$, 6.47 vs. 6.37), A:P 비율은 대조구가 LPC 20% 첨가구에 비해 높았다($p<0.05$,
2.70 vs. 2.62).

박테리옌과 같은 항균물질, 소화효소 등 다양한 유용물질을 생성하는 것으로 알려진 *L.*
plantarum 균주를 반추위 내 또는 사일리지 제조 시 접종한 선행연구들에서 사일리지 발효
품질과 반추위 내 영양소 소화율 개선, 반추위 내 발효특성(ammonia-N과 VFAs) 향상 등
의 긍정적인 효과들이 보고되었다[9,12,13,20,21]. 하지만, 본 연구에서는 *L. plantarum* 배
양 부산물인 LPC를 반추위에 첨가하여 24시간 발효시켰을 때, pH와 A:P 비율을 제외한 모
든 분석값에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 균주를 직접 적용한 것이 아
니라 발효 배양물을 적용한 차이에서 기인하는 것으로 보인다. 또한, 선행연구들은 일반적
인 축우용 사료에 균주를 적용한 반면, 본 연구에서는 상대적으로 반추위 내 분해가 쉽고
빠른 정제 전분과 셀룰로오스를 기질로 사용하였기 때문에 상이한 결과를 보이는 것으로 사
료된다[25]. 반면, 본 연구에서 LPC 첨가수준이 증가함에 따라 반추위 내 pH가 quadratic

하계 감소하는 결과를 보인 것은 비록 유의적인 차이는 없었으나, *in vitro* 반추위 내 발효 시 pH에 직접적으로 영향을 미치는 ammonia-N과 total VFA 함량의 quadratic한 변화에 기인한 것으로 보인다. 또한 A:P 비율이 linear하게 감소한 결과도 유의적인 차이는 없었으나, 반추위 내 acetate 함량 감소와 propionate 함량 증가에 기인한 것으로 보인다.

4. 반추위 내 가스 발생량 (24 h)

반추위 내 LPC 첨가수준을 달리하여 24시간 동안 발효시켰을 때, total gas, CH₄ 및 CO₂ 발생량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figure 2와 같았다. 반추위 내 LPC 첨가수준이 증가할수록 건물 기준 total gas 발생량(mL/g DM)은 감소하였으나(quadratic, $p=0.007$), 건물 소화율(mL/g DMD)과 유기물 소화율(mL/g DMD) 기준으로는 증가하였다(linear, $p<0.05$). 하지만, 건물(mL/g DM), 건물 소화율(mL/g DMD) 및 유기물 소화율(mL/g OMD) 기준 CH₄와 CO₂ 발생량은 LPC 첨가수준이 증가할수록 증가하였다(linear, $p<0.01$). 특히, total gas 발생량(mL/g DM)은 LPC 10% 첨가구가 대조구와 LPC 20% 첨가구에 비해 낮은($p<0.05$) 반면, CH₄와 CO₂ 발생량은 LPC를 첨가한 모든 처리구가 대조구에 비해 높았다($p<0.05$).

LPC 첨가수준에 따른 반추위 내 온실가스 발생량은 발효 12시간과는 상이한 결과를 보였다. 특히, LPC 첨가수준이 증가함에 따라, CH₄와 CO₂ 발생량이 발효 12시간에는 감소한 반면, 24시간 이후에는 증가하는 경향을 보였으며, 이는 발효시간이 경과함에 따라 반추위 내 미생물 군집과 이들의 대사경로가 변화하였음을 시사한다[25]. *L. plantarum*을 적용한 선행연구에서 반추위 내 발효 초기에는 methanogens의 성장을 억제할 수 있었지만, 발효 시간이 경과함에 따라 반추위 내 미생물 군집과 수소 이용 경로를 변화시켜 CH₄ 발생량을 증가시킬 수 있다고 하였다[23]. 또한, *L. paraplantarum*을 옥수수 사일리지에 첨가하였을 때,

발효초기에는 propionate 등의 유기산 함량을 증가시켰으나, 발효가 진행될수록 CH₄ 발생
량이 증가하였다고 보고하였는데[24], 이러한 연구결과들은 본 연구에서도 확인할 수 있었
다. 한편, CH₄ 생성은 반추위 내에서 수소의 주요 소비 경로 중 하나이며, 경쟁적으로 작용
하는 propionate 경로가 활성화되지 않을 경우 methanogens이 수소를 독점할 수 있다
[25]. *L. plantarum*을 첨가 시 초기 CH₄ 생성이 억제되었지만, 24시간 이후에는 유기산 축
적 및 환원반응 촉진으로 CH₄ 합성량이 다시 증가할 수 있다[20]. 본 연구에서 A:P 비율
이 감소하였으나, CH₄와 CO₂ 발생량이 동시에 증가한 것은 수소 이용경로가 CH₄ 생성 경
로로 다시 전환되었을 가능성을 시사한다.

IV. 결론

본 연구는 *L. plantarum* LM1001 균주를 이용한 probiotics 제조과정에서 생산되는
부산물인 발효 배양물(LPC)의 사료자원화 가능성을 조사하기 위해 수행하였다. 이를 위해,
LPC 첨가수준을 달리하여 반추위액과 *in vitro* incubation을 실시하였을 때, 발효 12시간과
24시간에 영양소 소화율(건물, 유기물)은 처리구간 차이가 없었다. 한편, 발효 12시간에는
LPC 첨가수준이 증가함에 따라 반추위 내 acetate 함량은 감소하였고 propionate 함량은
증가하였으며, 이로 인해 A:P 비율이 감소하였다. 특히 LPC 20% 첨가구에서는 CH₄와
CO₂ 발생량이 감소하였다. 반면, 발효 24시간에는 LPC 첨가수준이 증가함에 따라
A:P 비율은 감소하였으나, CH₄와 CO₂ 발생량은 증가시켰다. 이상의 연구결과에서, 산업적
폐기물인 LPC가 반추위 내 CH₄ 저감 효과가 있는 것으로 확인되어 사료자원으로서 활용
가능성이 있는 것으로 보이지만(12시간), 장기간 발효 시(24시간)에는 오히려 부정적인
영향을 미쳤다. 따라서, 발효기간, 첨가수준, 사료종류 등에 따른 반추위 내 LPC 첨가

효과를 추가적으로 구명한다면, 폐기되는 자원의 upcycling 기술개발과 기업의 ESG 경영에
기여할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 사사

본 연구는 경상국립대학교 LINC3.0 사업단과 농림식품축산기술기획평가원의
연구사업(과제번호: RS-2024-IP321083)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

VI. REFERENCES

1. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2001 [cited 2025 July 8]. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
2. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis V, Azimonti G, Bastos MDL, Christensen H, Durjava M, et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 34271 as a silage additive for all animal species (Lactosan GmbH & Co. KG). EFSA J. 2024;22:e8903. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8902>
3. Hu CH, Ren LQ, Zhou Y, Ye BC. Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. Food Sci Nutr. 2019;7:1997–2005. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1025>
4. Desnoyers M, Giger-Reverdin S, Bertin G, Duvaux-Ponter C, Sauvant D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J Dairy Sci. 2009;92:1620–1632. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1414>

5. Agazzi A, Perricone V, Omodei Zorini F, Sandrini S, Mariani E, Jiang XR, et al. Dietary mannan oligosaccharides modulate gut inflammatory response and improve duodenal villi height in post-weaning piglets improving feed efficiency. *Animals (Basel)*. 2020;10:1283. <https://doi.org/10.3390/ani10081283>
6. Yilmaz B, Bangar SP, Echegaray N, Suri S, Tomasevic I, Manuel Lorenzo J, et al. The impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the functional properties of fermented foods: a review of current knowledge. *Microorganisms*. 2022;10:826. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040826>
7. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis V, Azimonti G, Bastos MDL, Christensen H, Dusemund B, et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of *Lactiplantibacillus plantarum* (formerly *Lactobacillus plantarum*) DSM 26571 for all animal species (Chr. Hansen A/S). *EFSA J*. 2021;19:e06898. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6898>
8. Rocchetti MT, Russo P, Capozzi V, Drider D, Spano G, Fiocco D. Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: key factors underlying its probiotic action. *Int J Mol Sci*. 2021;22:12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>
9. Ju J, Zhang G, Xiao M, Dong C, Zhang R, Du L, et al. Effects of cellulase and *Lactiplantibacillus plantarum* on the fermentation quality, microbial diversity, gene function prediction, and in vitro rumen fermentation parameters of *Caragana korshinskii* silage. *Front Food Sci Technol*. 2023;2:1108043. <https://doi.org/10.3389/frfst.2022.1108043>
10. Chauhan N, Kumari N, Mani V, Pradhan D, Gowane GR, Kumar S, et al. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, and propionic acid on the fermentation process of sugarcane tops silages along with variations in pH, yeast and mould count after aerobic exposure. *Waste Biomass Valor*. 2024;15:2215–2230. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02280-8>
11. Zhang Y, Usman S, Li Q, Li F, Zhang X, Nussio LG, et al. Effects of antioxidant-rich *Lactiplantibacillus plantarum* inoculated alfalfa silage on rumen fermentation, antioxidant and immunity status, and

mammary gland gene expression in dairy goats. J Anim Sci Biotechnol. 2024;15:9.
<https://doi.org/10.1186/s40104-023-00977-3>

12. De Bellis P, Maggiolino A, Albano C, De Palo P, Blando F. Ensiling grape pomace with and without addition of a *Lactiplantibacillus plantarum* strain: effect on polyphenols and microbiological characteristics, *in vitro* nutrient apparent digestibility, and gas emission. Front Vet Sci. 2022;9:808293.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.808293>

13. Zhang X, Franco M, Kharazian ZA, Khan A, Zhang J, Ding Z, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* BX62 reduces methane production, and improves antioxidant capacity and rumen fermentation *in vitro*. AFSTL. 2023;300:115655. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115655>

14. Jeong J, Yu C, Kang R, Kim M, Park T. Application of propionate-producing bacterial consortium in ruminal methanogenesis inhibited environment with bromoethanesulfonate as a methanogen direct inhibitor. Front Vet Sci. 2024;11:1422474. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1422474>

15. Liu J, Zhao M, Hao J, Yan X, Fu Z, Zhu N, et al. Effects of temperature and lactic acid bacteria additives on the quality and microbial community of wilted alfalfa silage. BMC Plant Biol. 2024;24:844.
<https://doi.org/10.1186/s12870-024-05501-x>

16. Adesogan AT, Krueger NK, Kim SC. A novel, wireless, automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization. Anim Feed Sci Technol. 2005;123-124:211–223. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.058>

17. Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin Chem. 1962;8:130–2. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>

18. Jin Q, You W, Tan X, Liu G, Zhang X, Liu X, et al. Caffeic acid modulates methane production and rumen fermentation in an opposite way with high-forage or high-concentrate substrate *in vitro*. J Sci Food Agric. 2021;101:3013-3020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10935>

19. Patra AK, Yu Z. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on *in vitro* fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98:897-905.

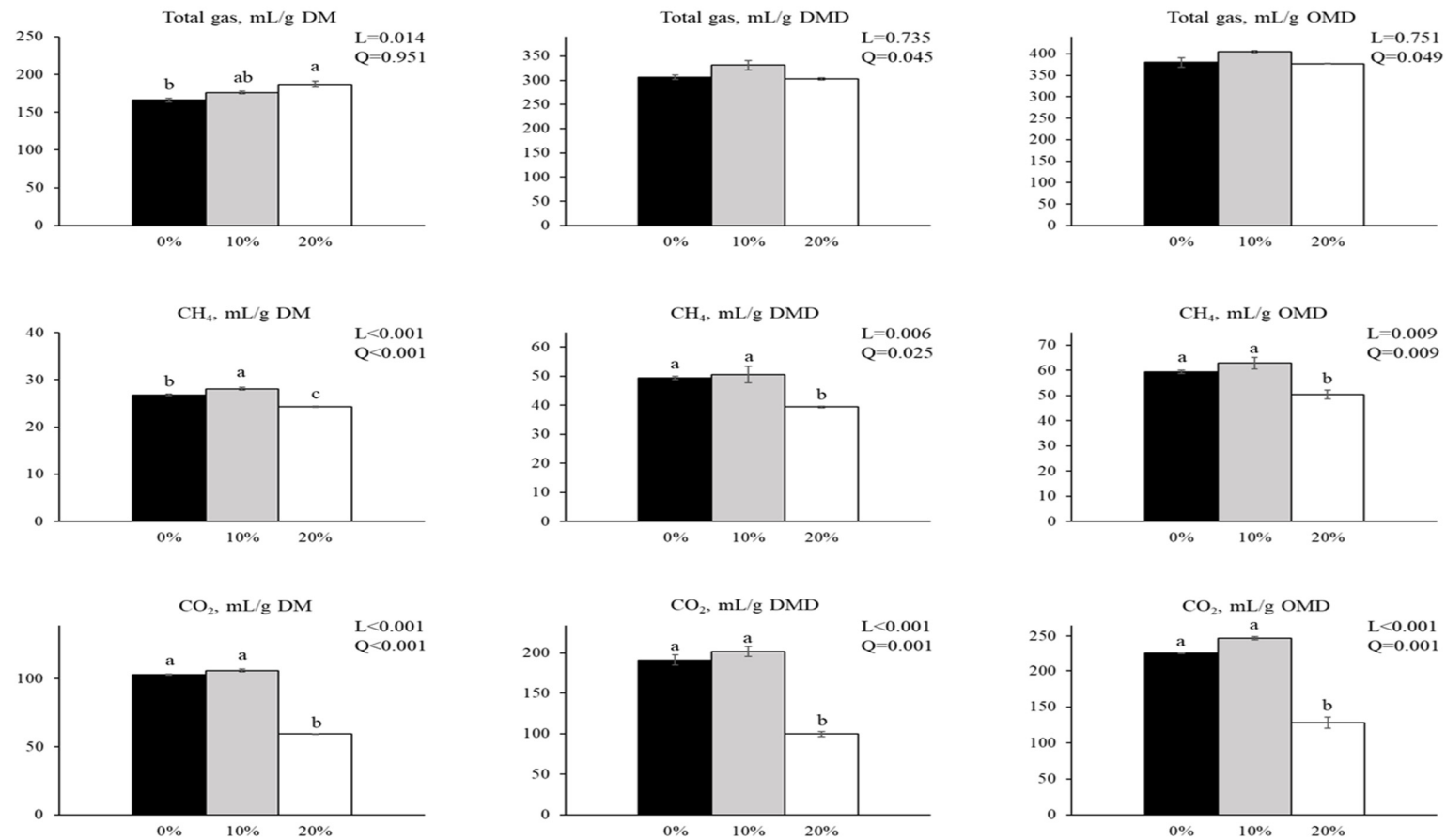
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4930-x>

20. Astuti WD, Ridwan R, Fidriyanto R, Rohmatussolihat R, Sari NF, Sarwono KA, et al. Changes in rumen fermentation and bacterial profiles after administering *Lactiplantibacillus plantarum* as a probiotic. Vet World. 2022;15:1969. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1969-1974>
21. Li Z, Li F, Kharazian ZA, Guo X. Effect of inoculating two bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* strains at ensiling on *in vitro* rumen fermentation and methane emissions of alfalfa silage with two dry matter contents. Anim. 2023;13:384. <https://doi.org/10.3390/ani13030384>
22. Li Z, Usman S, Zhang J, Zhang Y, Su R, Chen H, et al. Effects of bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* on bacterial community and fermentation profile of whole-plant corn silage and its *in vitro* ruminal fermentation, microbiota, and CH₄ emissions. J Anim Sci Biotechnol. 2024;15:107. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01065-w>
23. Xiong Y, Xu J, Guo L, Chen F, Jiang D, Lin Y, et al. Exploring the effects of different bacteria additives on fermentation quality, microbial community and *in vitro* gas production of forage oat silage. Anim. 2022;12:1122. <https://doi.org/10.3390/ani12091122>
24. Sun H, Liao C, Lu G, Zheng Y, Cheng Q, Xie Y, et al. Role of *Lactiplantibacillus paraplantarum* during anaerobic storage of ear-removed corn on biogas production. Bioresour Technol. 2022;364:128061. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128061>
25. Hobson PN, Stewart CS. The Rumen microbial ecosystem, 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional; 1997.

Table 1. Effects of LPC supplement levels on digestibility and fermentation characteristics incubated with rumen buffer for 12 h

	LPC supplement levels, %			SEM	Contrasts	
	0	10	20		Linear	Quadratic
Digestibility, % DM						
IVDMD	54.3	53.3	54.9	7.492	0.913	0.840
IVOMD	52.3	52.9	52.5	3.488	0.667	0.981
Fermentation characteristics						
pH	6.79	6.76	6.72	0.046	0.112	0.890
Ammonia–N, mg/dL	11.2	11.6	10.5	0.664	0.278	0.260
Total VFA, mM/L	84.6	84.7	82.6	1.044	0.413	0.166
Acetate, % of <i>M</i>	67.2 ^a	66.7 ^{ab}	65.6 ^b	0.586	0.027	0.561
Propionate, % of <i>M</i>	19.8 ^b	21.3 ^a	21.2 ^a	0.382	0.015	0.072
Butyrate, % of <i>M</i>	9.10	9.14	9.10	0.362	0.995	0.888
A:P ratio	3.39	3.13	3.09	0.281	0.035	0.766

LPC, *L. plantarum* LM1001 culture; A:P ratio, acetate to propionate ratio; SEM, standard error of the mean; ^{a,b}Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).



324

325 Figure 1. Effects of LPC supplement levels on total gas, CH₄, and CO₂ emissions incubated with rumen buffer for 12 h.

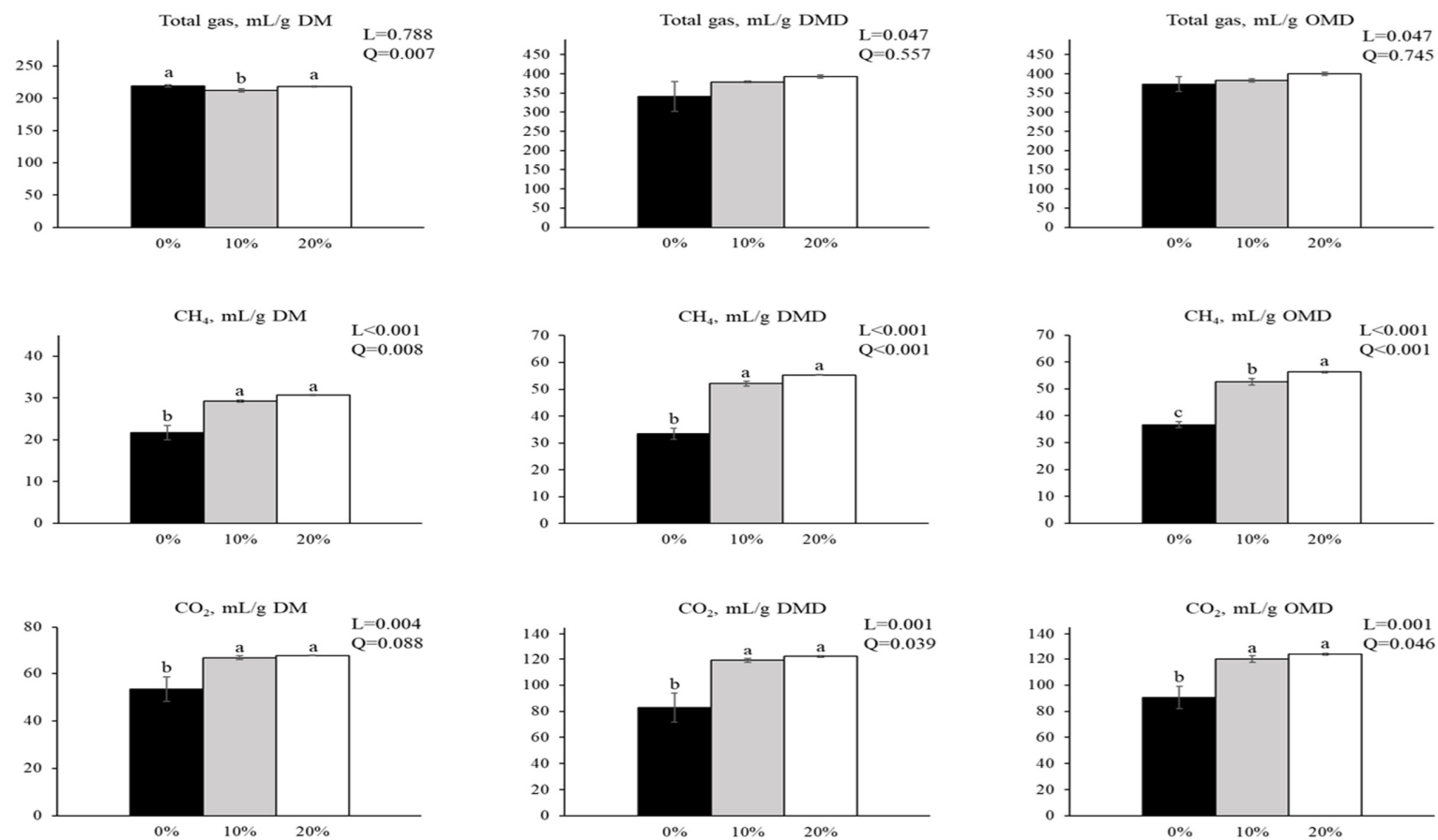
326 LPC, *L. plantarum* LM1001 culture; L, linear effect; Q, quadratic effect; ^{a~c}Means in the same row with different

327 superscripts differ significantly (p<0.05).

Table 2. Effects of LPC supplement levels on digestibility and fermentation characteristics incubated with rumen buffer for 24 h

	LPC supplement levels, %			SEM	Contrasts	
	0%	10%	20%		Linear	Quadratic
Digestibility, % DM						
IVDMD	61.7	56.5	55.2	4.585	0.119	0.406
IVOMD	56.3	56.0	54.0	2.124	0.122	0.757
Fermentation characteristics						
pH	6.42 ^{ab}	6.47 ^a	6.37 ^b	0.044	0.126	0.015
Ammonia–N, mg/dL	14.9	11.2	11.9	2.151	0.135	0.195
Total VFA, mM/L	91.9	92.9	89.8	5.454	0.122	0.190
Acetate, % of <i>M</i>	63.7	62.9	63.3	0.814	0.437	0.235
Propionate, % of <i>M</i>	23.7	23.7	24.1	0.405	0.191	0.335
Butyrate, % of <i>M</i>	10.1	10.5	10.0	0.442	0.710	0.088
A:P ratio	2.70 ^a	2.65 ^{ab}	2.62 ^b	0.035	0.007	0.478

LPC, *L. plantarum* LM1001 culture; A:P ratio, acetate to propionate ratio; SEM, standard error of the mean; ^{a,b}Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).



334

335 Figure 2. Effects of LPC supplement levels on total gas, CH₄, and CO₂ emissions incubated with rumen buffer for 24 h.

336 LPC, *L. plantarum* LM1001 culture; L, linear effect; Q, quadratic effect; ^{a~c}Means in the same row with different

337 superscripts differ significantly (p<0.05).