

최 종
연구보고서

GOVP1200608866

혐기 미생물을 이용한 볏짚의 사료가치 증진 연구
Studies on the Improvement of Feed Values of
Rice Straw using Anaerobic Microbes

연구기관
경상대학교 · 한경대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**혐기 미생물을 이용한 볏짚의 사료가치 증진 연구**”에 관한 과제
제 1세부과제: 볏짚의 물리적 문제점 해결을 위한 “**섬유소 분해 혐기·내산성
곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발**”,
제 2세부과제: 볏짚의 영양적 문제점 해결을 위한 “**유기산 이용 단백질 합성
혐기·내산성 SCP생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발**”,
제 3세부과제: 볏짚의 화학적 문제점 해결을 위한 “**Esterase 분비 transgenic
미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발**”,
협동연구과제: 볏짚의 보존성과 운반성 확보를 위한 “**볏짚 사료가치 증진용
미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구**
의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

주관연구기관명 : 경상대학교
총괄연구책임자 : 이 성 실
세부연구책임자 : 이 성 실
 □□ : 안 병 홍
 □□ : 최 충 국
연 구 원 : 김 상 범
 □□ : 이 상 민
 □□ : 이 신 자
 □□ : 문 종 엽
 □□ : 정 희 영
 □□ : 임 정 화
 □□ : 강 태 원
 □□ : 옥 지 운
협동연구기관명 : 한경대학교
협동연구책임자 : 김 장 현
연 구 원 : 안 종 호
 □□ : 민 관 식
 □□ : 이 왕 식

요 약 문

I. 제 목

혐기 미생물을 이용한 볏짚의 사료가치 증진 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

볏짚의 사료가치 증진을 위한 볏짚 사일리지용 미생물 첨가제의 개발

2. 연구의 필요성

가. 볏짚은 물리적으로 각질화가 완료되어 사료로 이용하기에는 소화율이 너무 떨어지므로 이를 극복하기 위한 방안이 필요함

나. 볏짚은 화학적으로 리그닌과 결합하고 있는 영양소의 함량이 너무 높으며 이들과 결합되어 있는 영양소는 이용이 불가능하므로 이 결합을 끊어줄 수 있는 기술 개발이 필요함

다. 볏짚은 영양학적으로 동물에게 필요한 단백질과 비타민 등의 함량은 매우 낮고 불필요한 섬유소의 함량은 너무 높기 때문에 영양학적 문제점을 극복하기 위한 방안이 필요함

라. 볏짚은 계절 생산성 때문에 운반성과 보존성의 확보가 필요하며 이를 위해 볏짚 사일리지의 개발이 필요하며 볏짚의 물리적, 화학적 영양학적 문제점을 극복하기 위한 사일리지용 첨가제의 개발이 절실히 요구됨

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 볏짚의 물리적 문제점 극복을 위한

섬유소 분해 혐기내산성 곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발

가. 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발

나. 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제 개발

다. 곰팡이(제1세부), 효모(제2세부) 및 transgenic 미생물(제3세부)을 종합한 최종 발효제의 개발

2. 볏짚의 영양학적 문제점 극복을 위한

유기산 이용 단백질 합성 혐기내산성 SCP 생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발

가. 단백질을 합성하는 혐기 내산성 SCP 생산용 효모의 탐색과 선발

나. 선발 효모의 특성 구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발

다. *In vitro* 시험을 통한 개발품의 효과 검증시험

3. 볏짚의 화학적 문제점 극복을 위한

Esterase 분비 transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발

가. 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase) 분비 미생물의 분리·동정 및 선발

나. 해당 유전자 sequencing, 유전자특성 분석 및 유전자 cloning

다. Esterase 분비 transgenic 미생물을 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발

4. 볏짚의 보존성과 운반성 확보를 위한

볏짚 사료가치 증진용 미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구

가. 발효제의 효과 구명을 위한 볏짚 곤포 사일리지 제조 시험

나. 대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증 시험과 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 섬유소 분해 혐기내산성 곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발

가. 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발

1) 혐기생태계로부터 내산·섬유소 분해 곰팡이 분리

가) 반추동물의 십이지장 및 흰개미의 장내에서 혐기성 곰팡이 분리

(1) 한우 십이지장에서부터 40종의 혐기성 곰팡이 분리

(2) 흰개미의 장액에서부터 15종의 혐기성 곰팡이 분리

나) 분리 곰팡이의 screening

(1) 효소역가 및 소화율의 측정

(2) 오염도 조사 및 발효산물 측정

(3) 최종적으로 한우 십이지장으로부터 18종 그리고 흰개미의 장액으로 9종 등 총 27종을 screening

다) 동정 균주의 특성조사 및 균주 동정

(1) SEM 촬영에 의한 미세구조의 관찰

(2) 27종에 대한 동정작업 완료

나. 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제 개발

1) 섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명

가) 공시미생물 : 8종의 혐기성 곰팡이

(1) 한우 십이지장으로부터 분리한 혐기성 곰팡이 4종

(2) 흰개미의 장액으로부터 분리한 혐기성 곰팡이 4종

나) 조사항목

(1) 볏짚의 소화율

(2) 섬유소분해효소(cellulase, avicelase 그리고 xylanase)의 역가

다) 결과요약

(1) 혐기성 곰팡이 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10를 배양 하였을 때, extracellular cellulase, xylanase 및 avicelase activities가 가장 높았음

(2) 혐기성 곰팡이에 의한 볏짚의 소화율 역시 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10를 배양 하였을 때 8종의 곰팡이중에서 가장 높았음

2) 간이 사일리지 제조 시험 (미생물 성장률 조사)

가) 공시미생물 : 3종의 혐기성 곰팡이 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10

나) 조사항목 : 사일리지 저장기간별(10, 30, 60, 90 및 120일)로 조사

(1) 사일리지내 pH 및 $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 변화

(2) 볏짚의 화학적 함량(단백질, NDF 및 ADF) 변화

(3) 접종한 곰팡이 수의 변화

다) 결과요약

(1) 혐기성 곰팡이를 접종하였을 때, 사일리지의 저장기간이 길어질수록 사일리지내의 단백질 함량이 증가됨

(2) 접종한 혐기성 곰팡이는 저장 30일간은 사일리지 내에서 많이 발견 되었으나 그 이후에는 급격히 감소됨

(3) 볏짚 사일리지내에 혐기성 곰팡이를 접종하므로써 사일리지의 질이 크게 향상됨

3) 볏짚 사료가치 증진에 미치는 영향 조사

- 가) 공시재료 : 30일 동안 발효된 볏짚 사일리지 4종
 - (1) 무처리 볏짚 사일리지 1종
 - (2) 곰팡이 GSRI-13 처리 볏짚 사일리지
 - (3) 곰팡이 GSMI-01 처리 볏짚 사일리지
 - (4) 곰팡이 GSMI-10 처리 볏짚 사일리지
- 나) 조사항목 : 사일리지 저장기간별(10, 30, 60, 90 및 120일)로 조사
 - (1) In situ (Nylon bag) 소화율

- 다) 결과요약
 - (1) 무처리, GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 처리 사일리지의 반추위 발효시간을 평균한 소화율은 각각 34.30, 38.93, 38.31 및 41.20%로서 곰팡이 처리구의 소화율이 높았음
 - (2) 볏짚 사일리지에 혐기성 섬유소분해 곰팡이 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10를 처리하므로써 볏짚의 소화율이 각각 12%, 10% 및 17% 정도 개선되었음

다. 곰팡이(제1세부), 효모(제2세부) 및 transgenic 미생물(제3세부)을 종합한 최종 발효제의 개발

- 1) *In vitro* 시험을 통한 미생물간 상호작용 구명
 - 가) 공시미생물 : 3종의 혐기성 미생물
 - (1) 곰팡이 : 제 1세부과제에서 확보한 GSMI-10
 - (2) 효모 : 제 2세부과제에서 확보한 KCTC-6694
 - (3) 박테리아 : 제 3세부과제에서 확보한 ATCC-19169
 - 나) 조사항목
 - (1) 혼합배양한 후 미생물 수의 측정
 - (2) 12, 24, 48 그리고 72시간 후에 각각의 미생물 수를 측정
 - 다) 결과요약
 - (1) 공시한 곰팡이, 효모 그리고 박테리아를 혐기적으로 혼합 배양하였을 경우 박테리아만 우점하여 생존함
 - (2) 혐기성 곰팡이는 혼합배지에서 전혀 성장이 이루어지지 않음
 - (3) 미생물제재의 산업화를 위하여 delivery system 개발이 요구됨
- 2) 적정 부형제 및 delivery system의 개발
 - 가) 보조첨가제
 - (1) 글루코만난올리고 당(Bio-Mos)과벤토나이트 보조 첨가제로 선정
 - (2) 첨가수준은 부형제의 0.05% 수준으로 결정

나) 부형제

- (1) 밀기울을 선정
- (2) 첨가수준은 부형제의 0.45% 수준으로 혼합 미생물첨가

다) Delivery system

- (1) Delivery system은 각각의 미생물을 대량으로 액상 배양한 다음,
- (2) 동결 건조하여 동결 건조한 미생물을 적정수준의 부형제와 보조첨가제로 혼합하여 분말화하여 유통이 가능케 함.

3) 최종 발효제의 보존성 및 효과 검증 시험

가) 공시 발효제의 제조

2)항에 따라 제조한 다음 진공포장되어 20일간 보존된 최종발효제

나) 최종 발효제의 보존성 시험과 효과 검증 시험

다) 조사항목 : 사일리지 저장기간별(10, 30, 60, 90일)

- (1) pH와 발효온도
- (2) 볏짚 사일리지중의 단백질 함량변화
- (3) 볏짚 사일리지의 *in vitro* 72시간 소화율
- (4) 접종한 미생물 수의 변화

라) 결과 요약

- (1) 최종발효제의 저장 기간이 20, 40, 60 그리고 80일이 경과하여도 개발제품내의 미생물 수는 줄어들지 않는 것으로 조사되어 보존성이 매우 높았음
- (2) 첨가제를 투여시켜 발효된 볏짚 사일리지의 *in vitro* 소화율이 무첨가 볏짚 사일리지 보다 증가됨

2. 유기산 이용 단백질 합성 혐기내산성 SCP 생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발

가. 유기산 이용 단백질을 합성하는 혐기 내산성 SCP 생산용 효모의 탐색과 선발

- 1) SCP 생산을 위한 효모균의 Web과 문헌을 통한 탐색
: NRRL, ATCC, BCCM, CBS, KCTC, DSMZ, IMI, JCM 및 WDC
- 2) 혐기조건에서의 성장능력, 생육 적은, optimum pH, 성장률 등을 고려하여 최종적으로 효모균을 선발
- 3) 선발된 미생물의 구입
: 5 strains(2 strains of bacteria and 3 strains of yeast)

4) 구입 미생물의 특성조사 및 원종균주 선발

- : 산성 배지와 중성배지에서 구입 미생물의 성장률 조사
- : 산성 배지와 중성배지에서 구입 미생물의 효소 분비 능력 조사
- : 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 능력 조사
- : 1년차에서 *Bacillus circulanse*, *Lactobacillus plantarum*, *Candida utilis* 그리고 *Candida sp.*을 발효제 개발의 원종균주로 선발함

나. 선발 효모의 특성 구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발

1) 유기산 이용성과 단백질 합성량에 미치는 영향

가) 공시미생물

- (1) KCTC 7219 : *Candida glabrata/Torulopsis glabrata*
- (2) KTCT 6694 : *Candida glabrata* var *thermoidea*
- (3) KCTC 7137 : *Pichia jadinii*
- (4) KCTC 7120 : *Candida robusta*
- (5) ATCC 9950 : *Candida utilis* (Henneberg)
- (6) ATCC 18790 : *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph

나) 조사항목

- (1) 질소원으로 요소와 암모니아가 첨가된 배양액중에서 pH 변화
- (2) 질소원으로 요소와 암모니아가 첨가된 배양액중에서 점종 미생물의 성장률
- (3) 미생물 체(효모 체) 단백질의 합성량

다) 주요결과

- (1) 질소원으로 암모니아가 첨가되었을 때가 요소가 첨가된 경우보다 효모들의 성장률이 빠르고 높았음
- (2) 효모 체단백질의 합성량은 공시한 6종의 효모중에서 KTCT 6694가 가장 높게 나타났음
- (3) 공시한 효모들중에서 KCTC 7219(*Candida glabrata/Torulopsis glabrata*), KTCT 6694 (*Candida glabrata*) 그리고 ATCC 18790 (*Saccharomyces cerevisiae*)가 미생물의 성장률과 단백질 합성량이 대체적으로 높은 경향이었음

2) 최적 첨가량 및 사용조건의 구명

가) 공시미생물

- (1) KCTC 7219(A): *Candida glabrata/Torulopsis glabrata*
- (2) KTCT 6694(B): *Candida glabrata* var *thermoidea*
- (3) ATCC 18790(C): *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph

나) 조사항목

- (1) 단독 배양시 미생물의 성장률
- (2) 혼합배양시(A+B, A+C, B+C 및 A+B+C) 미생물의 성장률

다) 결과 요약

- (1) 공시한 효모들의 단독 배양시 성장률을 측정한 결과, OD 값으로 측정한 성장률은 KTCT 6694 종이 생균수(cell-forming unit)를 측정하였을 경우에는 KCTC 7219종의 성장률이 가장 높게 측정되었음
- (2) 혼합 배양에 있어서 KCTC 7219종의 효모는 혼합배양 균주의 성장을 저해시키는 것으로 조사되었음
- (3) 따라서 KTCT 6694종이 미생물 발효제(첨가제) 개발을 위한 원종 균주로 선발되었음

3) 발효제가 사일리지 품질에 미치는 영향

가) 공시 미생물

- (1) KCTC 7219(A): *Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*
- (2) KTCT 6694(B): *Candida glabrata* var *thermoidea*
- (3) ATCC 18790(C): *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph

나) 조사항목

- (1) 효모의 접종이 벗짚 사일리지의 저장 기간별 pH 변화에 미치는 영향
- (2) 효모의 접종이 벗짚 사일리지의 저장 기간별 조단백질 함량(%) 변화에 미치는 영향
- (3) 15일간 저장된 벗짚 사일리지 1g중에 분포하는 미생물 수(박테리아와 효모의 수)의 측정

다) 결과요약

- (1) 미생물을 접종한 벗짚 사일리지의 pH가 미생물을 접종하지 않은 벗짚 사일리지의 pH보다 낮았음
- (2) KTCT 6694, 효모를 접종한 벗짚 사일리지의 조단백질 함량이 다른 처리구 보다 유의적으로 높았음
- (3) 따라서 KTCT 6694종이 미생물 발효제(첨가제) 개발을 위한 원종 균주로 가장 적합하였음

다. *In vitro* 시험을 통한 개발품의 효과 검증시험

1) 공시미생물: 3종의 혐기성 미생물

가) 곰팡이 : 제 1세부과제 확보된 GSMI-10

나) 효모 : 제 2세부과제 확보된 KCTC-6694

- 다) 박테리아 : 제 3세부과제에서 확보된 ATCC-19169
- 2) 배양조건
 - 가) 단독배양 : 박테리아, 효모 그리고 곰팡이
 - 나) 혼합배양 : 박테리아+효모, 박테리아+곰팡이, 효모+곰팡이
 - 다) 연속배양
 - (1) 곰팡이(1d) + 효모(1d) + 박테리아 접종(2d 후)
 - (2) 곰팡이(2d) + 효모(1d) + 박테리아 접종(3d 후)
 - (3) 곰팡이(3d) + 효모(1d) + 박테리아 접종(4d 후)
- 3) 조사항목
 - 가) 혐기 배양액 중에서의 pH 변화
 - 나) 혐기 배양액 중에서의 접종 미생물 수(곰팡이, 효모, 그리고 박테리아의 수)의 변화
 - 다) 혐기 배양액 중에서의 CMCCase와 xylanase의 활력변화
 - 라) 혐기 배양액 중에서의 질소 농도($\mu\text{mol/mL}$)의 변화
- 4) 결과요약
 - 가) 단독 배양시, 곰팡이가 접종된 혐기 배양액 중에서의 pH가 가장 높았으며 효모가 접종된 혐기 배양액 중에서의 pH가 가장 낮았음
 - 나) 곰팡이, 효모 그리고 박테리아 단독 배양시 미생물 상호간의 교차 오염이 발생하지 않았으며, 박테리아(ATCC 19169)와 효모 (KCTC-6694) 또는 곰팡이(GSMI-10)를 혼합 배양하였을 경우에는 박테리아만 성장이 가능하였음
 - 다) 혐기성 곰팡이는 박테리아나 효모와 혹은 이를 혼합하여 혼합 배양하였을 경우에 전혀 성장하지 않는 것으로 조사되었음
 - 라) 배양액중의 효소 CMCCase와 xylanase의 활력은 혐기성 곰팡이를 1일 (initial stage of growth, lag phase), 2일 혹은 3일(late stage of growth, stationary phase)간 배양한 다음, 연속하여 효모를 재접종한 다음 24시간 뒤 박테리아를 다시 접종한 배양액, 즉 연속 배양하였을 경우에 단독배양이나 혼합배양시 보다 아주 높았음

3. Esterase 분비 transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발

- 가. 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase) 분비 미생물의 분리·동정 및 선발
 - 1) 한우의 반추위에서 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase)를 분비하는 곰

팡이 8종(GSRR-1, GSRR-2, GSRR-3, GSRR-4, GSRR-5, GSRR-6, GSRR-7 and GSRR-8)을 분리함.

- 2) 분리된 8종의 곰팡이; GSRR-1, GSRR-2, GSRR-3, GSRR-4, GSRR-5, GSRR-6, GSRR-7 그리고 GSRR-8은 곰팡이의 미세구조와 성장형태에 근거하여 각각 *Neocallimastix*, *Anaeromyces*, *Piromyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Neocallimastix*, *Piromyces* 및 *Orpinomyces*로 동정됨
- 3) 분리한 곰팡이 GSRR-1(*Neocallimastix*)와 GSRR-4(*Piromyces*)가 xylan esterase의 분비능력이 가장 높아 delignification의 능력이 가장 우수한 것으로 조사됨

나. 해당 유전자 sequencing, 유전자특성 분석 및 유전자 cloning

- 1) *Fibrobacter succinogenes* S85 박테리아 코로모솜내에 근접하게 연속적으로 위치하고 있는 acetyl화된 xylan을 분해하는 esterase axe6A와 axe6B를 분리하고 cloning 하였음
- 2) Cloning된 두 유전자는 똑같은 구조를 가지고 있고, N-terminal 쪽에의 1-30번 아미노산 부분은 signal peptide이고 그 뒤쪽에 이어서 carbohydrate esterase family 6의 catalytic domain이 위치하고 있으며, 마지막으로 C-terminal 부분에 섬유소 결합 domain이 존재하며 효소활성부위와 섬유소 결합부위 사이에 proline-rich linker로 예상되는 염기서열이 존재(family 6 carbohydrate binding module) 하는 전형적이고도 완벽한 유전자의 모습을 갖추고 있었음
- 3) CDs와 CBMs의 아미노산 염기서열 각각 52%와 40%의 유전적 유사성이 있었다. CDs는 반추위 혐기성 곰팡이 *Orpinomyces* sp.와 *Neocallimastix patriciarum*에서 각각 분리된 acetylxylan esterases AxeA와 acetylxylan esterases BnaA와 아주 유사하였음
- 4) Axe6A와 Axe6B는 중성 pH에서 최적활성을 나타내었고 Km치가 각각 0.084와 0.056 mM로 매우 낮았으며 Vmax값은 각각 105.3와 31.2 였음

다. Esterase 분비 transgenic 미생물을 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발

- 1) Axe6A와 Axe6B는 불용성 섬유소와 xylan 그리고 가용성 arabinoxylan과 결합하는 것으로 조사됨
- 2) *F. succinogenes*로 분리한 xylan 분해효소 XynE를 첨가하던 첨가하지 않던 초기에는 Axe6A가 acetylated xylan으로부터 deacetylation 반응을 독립적으로 나타내지만 acetylated xylan에 작용하는 xylanase의 작용은

Axe6A의 초기작용과는 종속적으로 일어났음

- 3) 효소 xylanase 단독에 의한 acetylated xylan의 가수분해산물은 주로 xylotriiose이거나 이것 보다 조금 더 긴 xylooligosaccharides였지만 acetyl xylan esterase 효소가 존재하면 주요 가수분해 산물은 xylotriiose, xylobiose 그리고 xylose였음
- 4) 효소 acetyl xylan esterases가 식물세포벽에 부착하는 능력과 섬유소에 *F. succinogenes* 부착하는 능력 등은 독립적으로 일어남

4. 볏짚 사료가치 증진용 미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구

가. 발효제의 효과 구명을 위한 볏짚 곤포 사일리지 제조 시험

1) 발효제가 사일리지의 품질에 미치는 영향

가) 발효제가 사일리지의 화학성분과 발효특성에 미치는 영향

- (1) 실험재료: 본 연구에서 개발된 발효제
- (2) 첨가수준: 사일리지 건물량의 0.0, 0.1 및 0.5% 수준으로 발효제 첨가
- (3) 조사항목

(가) 발효제의 첨가 수준이 볏짚 사일리지의 저장 기간별 pH, NH₃-N, lactate acid, acetate 함량에 미치는 영향

(나) 발효제의 첨가 수준이 볏짚 사일리지의 저장 기간별 영양소의 함량 변화에 미치는 영향

(다) 발효제의 첨가 수준이 볏짚 사일리지의 저장 기간별 buffering capacity (meq of NaOH/100g DM) 변화에 미치는 영향

(4) 결과요약

(가) 발효제의 첨가로 인하여 사일리지내의 pH는 감소하는 경향을 보였으며 첨가수준이 증가할수록 이러한 경향은 더욱 뚜렷이 나타남

(나) 볏짚 사일리지중의 조단백질 함량은 발효제의 첨가로 인하여 빠르게 증가하였고 첨가제의 첨가 수준이 증가할수록 사일리지내의 조단백질 함량도 함께 증가하였음

(다) 볏짚 사일리지의 완충력(buffering capacity, meq of NaOH/ 100g DM)은 발효 30일을 기준으로 첨가제 0.1% 첨가구에서 가장 낮았고 0.5% 첨가구에서 가장 높았음

2) 발효제가 볏짚 사일리지 *in vitro* 및 *in situ* 소화율에 미치는 영향

가) 실험재료: 본 연구에서 개발된 발효제

나) 첨가수준: 사일리지 건물량의 0.0, 0.1 및 0.5% 수준으로 발효제 첨가

다) 공시동물: 반추위 누관이 설치된 Holstein 착유우

라) 조사항목

(1) 볏짚 사일리지의 *in situ* 건물소화율

(2) 볏짚 사일리지의 *in vitro* 건물소화율

마) 결과요약

(1) 발효제를 처리수준별로 0.0, 0.1 그리고 0.5% 처리하여 제조한 볏짚 사일리지의 *in situ* 건물 소화율중에서 반추위내에서 소화가능한 부분인 a+b fraction의 값이 각각 30.1%, 33.8% 그리고 48.5%로서 미생물 발효제의 첨가 수준이 높아 질수록 a+b fraction 증가하였음

(2) 발효제 0.0, 0.1 그리고 0.5% 처리수준별 *in vitro* 48시간 건물 소실율은 각각 42.36, 43.06 그리고 47.79%로서 미생물 발효제의 첨가 수준이 증가할 수록 소화율이 함께 증가하였음

나. 대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증 시험과 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구

1) 개발 발효제가 한우의 *in vivo* 대사반응에 미치는 영향 구명

가) 공시재료: 발효제 처리 볏짚 사일리지

나) 공시동물: 반추위 누관이 설치된 한우 4두 (체중 450kg)

다) 조사항목

(1) 볏짚과 발효제가 첨가된 볏짚 사일리지를 급여한 한우의 반추위내 pH, NH₃-N, Total VFA, 그리고 개별 지방산(acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid, isobutyric acid, isovaleric acid) 함량의 측정

(2) 볏짚 사일리지의 *in vitro* 건물 소화율

(3) 볏짚과 발효제가 첨가된 볏짚 사일리지를 급여한 한우의 건물 섭취량 (kg/d) 및 영양소 소화율(% , DM basis) 조사

라) 결과요약

(1) 반추위내의 pH와 암모니아(NH₃-N) 농도는 발효제가 처리된 볏짚 사일리지의 급여에 영향을 받지 않았음

(2) 한우의 반추위내 총 휘발성지방산(total VFA)과 개별지방산 중에서 acetic acid 농도는 발효제가 처리된 볏짚 사일리지의 급여로 크게 증가하는 경향이었음

(3) 볏짚의 *in vitro* 72시간 건물 분해율 볏짚 급여구와 발효제처리 볏짚

사일리지구에서 각각 37.7%와 43.5%로 측정됨

(4) 발효제가 처리된 볏짚 사일리지의 건물섭취량(kg/일)이 볏짚 처리구에 비해 크게 증가됨

(5) 조단백질과 조섬유 소화율 역시 발효제가 처리된 볏짚 사일리지의 급여구가 볏짚 급여구 보다 매우 높았음

2) 개발 발효제가 한우의 *in vivo* 사양성적에 미치는 영향 구명

가) 공시동물 : 한우 거세우 24두, 개시시 평균체중 489.9±24.5kg

나) 조사항목

(1) 한우의 증체량

(2) 사료효율

(3) 도체성적

다) 결과요약

(1) 볏짚 급여 한우군과 발효제 처리 볏짚 사일리지 급여군에서의 일당 증체량은 각각 759.8g/d 와 778.8g/d 으로 계산되어, 발효제 처리 볏짚 사일리지 급여로 인하여 증체량이 향상됨

(2) 볏짚 급여 한우군과 발효제 처리 볏짚 사일리지 급여군에서의 건물 섭취량은 각각 8.98kg/d와 9.52kg/d로서 유의적인 차이는 없었지만 발효제 처리 볏짚 사일리지 급여로 인하여 건물섭취량이 증가하는 경향이었음

(3) 사료효율(feed conversion rate) 역시 발효제 처리 볏짚 사일리지 급여로 인하여 개선되었음

3) 발효제에 대한 산업화 방안

SUMMARY

I . Project Title

Studies on the Improvement of Feed Values of Rice Straw using Anaerobic Microbes

II. Objectives and Necessities of the Research and Development

1. Objectives of the project

- A. Development of microbial additives (composed with the mixtures of anaerobic acid-tolerant bacteria, yeast and fungi) for improving feed values of rice straw

2. Necessities of the project

- A. Improvement digestibility of rice straw to overcome physical problems of rice straw (cutin and silica in the out layer of rice straw as a barrier to microbial attachment)
- B. Improvement digestibility and increasing nutrients with use in rice straw to overcome chemical problems of rice straw (most of nutrients linked with lignin complex)
- C. Improvement nutrients such as crude protein and vitamin in rice straw to overcome nutritional problems of rice straw (lower protein and vitamin, but higher CWC such as cellulose and hemicellulose)
- D. Improvement preservation ability and packing system for industrializing to overcome logistical problems of rice straw (produced seasonal and regional with high cost)

III. The Contents and Scope of the Project

1. The development of fungal additives using anaerobic acid-tolerant fungi had highly cellulolysis activity(to overcome physical problems of rice straw)
 - A. Isolation and identification of anaero-cellulolytic acid-tolerant fungi
 - B. Development of fungal additives
 - C. Development of microbial additives for rice straw silage using fungus (from first sub-project), yeast(from second sub-project) and trans-genic bacteria (from third sub-project)

2. The development of microbial additives using anaerobic acid-tolerant yeast produced microbial single cell protein using organic acid (to overcome chemical problems of rice straw)
 - A. Searching and selection of anaerobic acid-tolerant yeast produced microbial single cell protein using organic acid
 - B. Characterization of selected yeast and development of yeast additives using characterized yeast
 - C. *In vitro* test to verify yeast additives developed in the project

3. The development of microbial additives using transgenic bacteria produced esterase had delignification activity(to overcome nutritional problems of rice straw)
 - A. Isolation and identification of microbes produced esterase had delignifi-cation activity.
 - B. Sequencing, Cloning and characterization of esterase genes
 - C. Development of microbial(bacterial) additives using esterase gene trans-genic bacteria

4. Industrialization study and *in vivo* trial using developed microbial additives for improving feed values of rice straw(to overcome logistical problems of rice straw)
 - A. Making of rice straw silage to verify effects of microbial additives developed in the projects
 - B. Verification study of developed additives in the project using *in vivo* metabolic and feeding trials and their industrial applications

IV. Suggestion on Application of the Results

1. The development of microbial(fungal) additives using anaerobic acid-tolerant fungi had highly cellulolysis activity

A. Isolation and identification of anaerobic cellulolytic acid-tolerant fungi

1) Isolation of cellulolytic acid-tolerant fungi from anaerobic ecosystems

A) Isolation of cellulolytic fungi from ruminant animals and termites

(1) 40 fungal species were isolated from the duodenum segment in the digestive tracts of Korean native bulls(Hanwoo)

(2) 15 fungal species were isolated from the digesta fluids of termites

B) Screening of isolated fungi

(1) Enzyme activities and DM digestibilities

(2) Check of contamination and fermentation products

(3) Finally, 27 fungal species were screened; 18 species of them from the duodenum segment in the digestive tracts of Hanwoo, Others (9 species) were from termites.

C) Characteristics and identification of screened fungi

(1) Identified by fine structure of fungi through SEM imagination

(2) Finished identification of 27 fungal species

B. Development of fungal additives using anaerobic fungi

1) Effects of fungi additions on DM digestibility and enzymes activities

A) Microorganism : 8 species of anaerobic fungi

(1) 4 fungal species were from Hanwoo

(2) 4 fungal species were from termites

B) Investigated items

(1) Digestibility of rice straw

(2) Enzymes(cellulase, xylanase and avicelase) activities

C) Obtained results

(1) DM digestibilities of RS were increased by the addition of GS RI-13, GS MI-01 and GS MI-10 fungi compared to other fungi.

(2) Enzymes (cellulase, xylanase and avicelase) activities were also higher in the the group of GSRI-13, GS MI-01 and GS MI-10 fungi

than others

- 2) Silage manufacture test of rice straw using Lab-scaled wrapping technique
 - A) Microorganism : 3 species of anaerobic fungi
 - (1) GSRI-13, GSMI-01 and GSMI-10
 - B) Investigated items
 - (1) pH and NH₃-N concentrations in rice straw silage
 - (2) Changes in chemical contents(protein, NDF and ADF) of rice straw silage
 - (3) Changes in inoculated fungal populations in rice straw silage
 - C) Results obtained
 - (1) The protein contents(%) in rice straw silage was increased by the addition of fungal inoculation.
 - (2) The population of fungus inoculated in the rice straw silage was very highly colonized within 30days ensiled.
 - (3) The quality of rice straw silage was improved by the inoculation of fungi.

- 3) The effects of fungal additives on the quality of rice straw silage
 - A) Materials : Rice straw silage fermented for 30days
 - (1) Rice straw silage (untreated)
 - (2) Rice straw silage added fungal(GSRI-13) additives
 - (3) Rice straw silage added fungal(GSMI-01) additives
 - (4) Rice straw silage added fungal(GSMI-10) additives
 - B) Investigated items
 - (1) *In situ*(Nylon bag) digestibility
 - C) Results obtained
 - (1) *In situ* DM digestibility of un-treated, GSRI-13, GSMI-01 or GSMI-10 treated rice straw silage was 34.30, 38.93, 38.31 or 41.20%, respectively.
 - (2) *In situ* DM digestibility was improved with the value of 12, 10 or 17% by the addition of fungal additives manufactured with GSRI-13, GSMI-01 or GSMI-10, respectively

C. Development of microbial additives for rice straw silage using fungus (from first sub-project), yeast(from second sub-project) and trans-genic bacteria (from third sub-project)

1) Studies on the interactions between fungus, yeast and bacteria in *in vitro* trials

A) Microorganism : 3 species of anaerobic microbes

(1) Fungus : GSMI-10 obtained from first sub-project

(2) Yeast : KCTC-6694 obtained from second sub-project

(3) Bacteria : ATCC-19169 obtained from third sub-project

B) Investigated items

(1) Microbial populations in the medium of co-cultured test-tube after 12, 24, 48 and 72h incubation.

C) Result obtained

(1) Only bacterial specie(Fibrobacter succinogense S85) can grow vigorously in co-cultured medium with bacterial specie (*F. succinogense* S85), yeast strain (KCTC-6694) and fungal strain (GSMI-10 isolated from the digesta juices of termites).

(2) Anaerobic fungi can not grow in co-cultured medium with bacteria and/or yeast.

(3) Delivery system was required for industrial application of microbial(bacterial, yeast and fungal mixture) additives

2) Selection of micro-additives and development of delivery system

A) Selection of micro-additives

(1) Selected glucomannan-oligosaccharide(Bio-Mos) and bentonite for as a micro-additive

(2) Addition level of micro-additives (the mixture of Bio-Mos and bentonite as a same volume) to adjuvants (carrier materials) was decided as a level of 0.05%.

B) Adjuvants (carrier materials)

(1) Selected weat bran as a adjuvant

(2) Addition level of microbial additives to adjuvants was 0.45%

C) Delivery system

- (1) Large-scale cultures of individual microbe for harvesting of microbes
 - (2) cultured materials were centrifuged and then freezer dried
 - (3) freezer dried microbes(bacterium, yeast and fungus) were mixed with same volume
 - (4) Mixed microbes were remixed with micro-additives & adjuvants as a carrier.
- 3) Preservation ability and real effect of microbial additives developed in the research
- A) Microbial additives:
Microbial additives were manufactured according to the "delivery system" described above.
 - B) Preservation ability of microbial additives were checked by the counting of microbes inoculated (bacteria, yeast and fungi) in the 20-days old microbial additives manufactured as the same manner of "delivery system" according to the preservation days; 20, 40, 60 and 80days.
 - C) Investigated items
 - Preservation periods of RS silage: 10, 30, 60 and 90days
 - (1) pH and fermentation temperature(°C)
 - (2) Changes of protein contents(%) in RS silage
 - (3) In vitro 72h digestibility of RS silage
 - (4) Changes of microbial populations inoculated in RS silage
 - D) Results obtained
 - (1) Microbial populations(bacterium, yeast and fungus) inoculated in the microbial additives manufactured as the same manner of "delivery system". The result means the preservation ability was high and enough to industrialize.
 - (2) pH and fermentation temperature(°C) in the silages did not affected by the addition of microbial additives developed in the project.
 - (3) Protein contents(%) and microbial populations were quiet higher compared to untreated RS silage in early fermentative stage (before 30days).

(4) In vitro 72h digestibility of RS silage was increased by the addition of microbial additives developed.

2. The development of microbial additives using anaerobic acid-tolerant yeast produced microbial single cell protein using organic acid

A. Searching and selection of anaerobic acid-tolerant yeast produced microbial single cell protein using organic acid

1) Searching yeast species utilizing SCP production process on the web and literature

: NRRL, ATCC, BCCM, CBS, KCTC, DSMZ, IMI, JCM and WDCM

2) Selecting of yeast species by growth ability in anaerobic conditions, optimum temperature, optimum pH growth rate, etc.

3) Purchased 5 strains(2 strains of bacteria and 3 strains of yeast) selected

4) Selection and characterization of microbes purchased

: Growth rate of microbes purchased in acidic or neutral medium

: Enzymes activity of microbes purchased in acidic or neutral medium

: Protein conversion rate using organic acid

: *Bacillus circulans*, *Lactobacillus plantarum*, *Candida utilis* and *Candida* sp. were finally selected as seed microbes for developing probiotics.

B. Characterization of selected yeast and development of yeast additives using characterized yeast

1) Protein synthesis rate of yeast by using organic acid

A) Microorganisms

(1) KCTC 7219 : *Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*

(2) KTCT 6694 : *Candida glabrata* var *thermoidea*

(3) KCTC 7137 : *Pichia jadinii*

(4) KCTC 7120 : *Candida robusta*

(5) ATCC 9950 : *Candida utilis* (Henneberg)

(6) ATCC 18790 : *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph

B) Investigated items

(1) pH value in the supernatant of medium containing urea or ammonia as nitrogen sources

(2) Growth rate in the medium containing urea or ammonia as nitrogen sources

- (3) Protein concentration derived from yeast.
- C) Result obtained
- (1) Growth rate of yeast strains used was higher in the medium containing ammonia than in the medium containing urea as nitrogen sources.
 - (2) Protein concentration derived from yeast, KTCT 6694 was the highest in all strains tested.
 - (3) Growth rate and protein concentration derived from yeast were generally higher in strains of KCTC 7219(*Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*), KTCT 6694 (*Candida glabrata*) ATCC 18790(*Saccharomyces cerevisiae*).
- 2) Establishment of optimal additive level
- A) Microorganisms
- (1) KCTC 7219(A): *Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*
 - (2) KTCT 6694(B): *Candida glabrata* var thermoidea
 - (3) ATCC 18790(C): *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph
- B) Investigated items
- (1) Growth rate in mono-cultures
 - (2) Growth rate in co-cultures with A+B, A+C, B+C and A+B+C.
- C) Result obtained
- (1) Growth rate of yeast strains, KTCT 6694 and KCTC 7219 was the highest in the OD value evaluation and cell-forming unit, respectively when mono-cultured.
 - (2) Growth rate of yeast strains was depressed by the co-culture with KCTC 7219.
 - (3) Therefore, yeast strains, KTCT 6694 was evaluated as the best strain for developing microbial probiotics.
- 3) The effect of yeast additives on the quality of rice straw silage
- A) Microorganisms
- (1) KCTC 7219(A): *Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*
 - (2) KTCT 6694(B): *Candida glabrata* var thermoidea
 - (3) ATCC 18790(C): *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph

B) Investigated items

- (1) Effect of yeast inoculants on pH values during the ensiling procedure of rice straw silage
- (2) Effect of yeast inoculants on crude protein levels(%) during the ensiling procedure of rice straw silage
- (3) Microbial populations (bacterial and yeast) in the 1g of rice straw ensiled for 15 days.

C) Result obtained

- (1) pH value in RS silage inoculated yeast strains was lower than the RS silage un-inoculated yeast strains.
- (2) Crude protein levels(%) was the highest in RS silage inoculated yeast strain, KTCT 6694.
- (3) Therefore, yeast KTCT 6694 strain was evaluated as the best strain for developing microbial probiotics.

C. *In vitro* test to verify yeast additives developed in the project

1) Microorganism : 3 species of anaerobic microbes

- A) Fungus : GSMI-10 obtained from first sub-project
- B) Yeast : KCTC-6694 obtained from second sub-project
- C) Bacteria : ATCC-19169 obtained from third sub-project

2) Culture type

- A) Mono- culture: *Bacterium*, *Yeast* and *Fungus*
- B) Co- culture: *Bacterium+Yeast*, *Bacterium+Fungus*, *Yeast+Fungus*
- C) Sequential- culture:

- (1) *Fungus(1d)* + *yeast(1d)* and then bacteria inoculation
- (2) *Fungus(2d)* + *yeast(1d)* and then bacteria inoculation
- (3) *Fungus(3d)* + *yeast(1d)* and then bacteria inoculation

3) Investigated items

- A) pH value in the supernatant of anaerobic medium
- B) Microbial(bacterial, yeast & fungal) populations in the supernatant of anaerobic medium
- C) CMCase and xylanase activity(IU) in the supernatants of medium
- D) Nitrogen concentration($\mu\text{mol/mL}$) in the supernatant of medium

4) Result obtained

- A) pH value in the supernatant of anaerobic medium was the highest in fungal culture and the lowest in yeast culture, when mono-cultured.
- B) There was no contamination in mono-cultured medium, only bacterial species(ATCC 19169) can grow vigorously in co-cultured medium with yeast strain (KCTC-6694) or fungal strain (GSMI-10).
- C) Anaerobic fungi can not grow in co-cultured medium with bacteria and/or yeast.
- D) CMCase and xylanase activity(IU) in the supernatants of medium were significantly increased when sequentially inoculate fungal cultures that had been grown in rice straw for 1d (initial stage of growth, lag phase), 2d and 3d (late stage of growth, stationary phase) with mixed yeast for 1d and then finally inoculated bacteria.

3. The development of microbial additives using transgenic bacteria produced esterase had delignification activity.

- A. Isolation and identification of microbes produced esterase had delignification activity.
 - 1) Isolated 8 strains (GSRR-1, GSRR-2, GSRR-3, GSRR-4, GSRR-5, GSRR-6, GSRR-7 and GSRR-8) of rumen anaerobic fungi produced esterase had delignification activity.
 - 2) Isolated 8 strains; GSRR-1, GSRR-2, GSRR-3, GSRR-4, GSRR-5, GSRR-6, GSRR-7 and GSRR-8 were identified as a *Neocallimastix*, *Anaeromyces*, *Piromyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Neocallimastix*, *Piromyces* and *Orpinomyces*, respectively.
 - 3) GSRR-1(*Neocallimastix*) & GSRR-4(*Piromyces*) had higher activity for delignification among 8 strains isolated.
- B. Sequencing, Cloning and characterization of esterase genes
 - 1) Acetyl xylan esterases axe6A and axe6B located adjacent to one another on the *Fibrobacter succinogenes* chromosome have been separately cloned and their properties characterized.

- 2) Both esterases contain an N-terminal carbohydrate esterase family six catalytic domain (CD) and a C-terminal family six carbohydrate binding module (CBM).
 - 3) The amino acid sequences of the respective CDs and CBMs exhibited 52 and 40% amino acid similarity. The CDs of the two esterases exhibited the highest similarity to acetyl xylan esterases AxeA and BnaA from the ruminal fungi *Orpinomyces* sp. and *Neocallimastix patriciarum*, respectively.
 - 4) Axe6A and Axe6B were optimally active at neutral pH and had low Km values of 0.084 and 0.056 mM, respectively.
- C. Development of microbial (bacterial) additives using esterase gene-transgenic bacteria
- 1) Axe6A and Axe6B were shown to bind to insoluble cellulose and xylan and to soluble arabinoxylan.
 - 2) Axe6A deacetylated acetylated xylan at the same initial rate in the presence and absence of added XynE xylanase from *F. succinogenes*, but action of the xylanase on acetylated xylan was dependent upon the initial activity of Axe6A.
 - 3) The products of hydrolysis of acetylated xylan by xylanase alone was primarily xylotriose and longer chain xylooligosaccharides, however, in the presence of acetyl xylan esterase the major hydrolysis products were xylotriose, xylobiose and xylose.
 - 4) The capacity of the acetyl xylan esterases to bind to plant cell wall polymers and independent deacetylate xylan enable xylanase to release hydrolysis products documents the central role acetyl xylan esterases to improve access of *F. succinogenes* to cellulose

4. Industrialization study and *In vivo* trials using developed microbial additives for improving feed values of rice straw

- A. Making of rice straw silage to verify effects of microbial additives developed in the projects
- 1) Effects of microbial additives on the quality of rice straw silage
 - A) Effects of microbial additives on the chemical contents and fermentation

characteristics of rice straw silage

- (1) Experimental materials : Microbial additives developed in the project.
 - (2) Addition levels of microbial additives : 0.0, 0.1 and 0.5% of rice straw silage (as DM basis)
 - (3) Investigated items
 - (A) Effects of different levels of microbial additives on pH, NH₃-N, lactate acid acetate composition of rice straw silage during different ensiling period
 - (B) Effects of different levels of microbial additives on chemical composition of rice straw silage during different ensiling period
 - (C) Effects of different levels of additives on buffering capacity (meq of NaOH/100g DM) of rice straw silage during different ensiling period
 - (4) Results obtained
 - (A) pH was decreased by the addition of microbial additives developed, and the trend was more noticed as the level of addition was increased
 - (B) Crude protein content(%) DM in the rice straw silage during different ensiling period was quickly increased by the addition of microbial additives, and the trend was more noticed as the level of addition was increased
 - (C) Buffering capacity (meq of NaOH/100g DM) of rice straw silage during different ensiling period was lowest in 0.1% supplementation level of additives, and highest in 0.5% supplementation levels, when observed in 30 days of ensiling.
- 2) Effects of microbial additives on the in vitro and in situ digestibility of rice straw silage
- A) Experimental materials : Microbial additives developed in the project.
 - B) Addition levels of microbial additives : 0.0, 0.1 and 0.5% of rice straw silage (as DM basis)
 - C) Animal : Rumen fistulated Holstein dairy cows
 - D) Investigated items
 - (1) *In situ* dry matter(DM) disappearance rate of rice straw silage
 - (2) *In vitro* dry matter degradation(DMD) rate of rice straw silage

E) Results obtained

- (1) a+b fraction derived from *In situ* DMD rate(%) of rice straw silage was 30.1%, 33.8% and 48.5% when supplemented microbial additives with the levels of 0.0, 0.1 and 0.5%, respectively
- (2) *In vitro* 48h dry matter degradation rate(%) of rice straw silage was 42.36, 43.06 and 47.79%, when supplemented microbial additives with the levels of 0.0, 0.1 and 0.5%, respectively.

B. Verification study of developed additives in the project using *in vivo* metabolic and feeding trials and their industrial applications

1) The effects of microbial additives developed in the project on the *in vivo* metabolic response of Hanwoo steer

A) Experimental materials : Microbial additives developed in the project.

B) Animal : 4 heads of rumen cannulated Korean native steers(BW, 450kg)

C) Investigated items

- (1) pH, NH₃-N, Total VFA, and individual VFA (acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid, isobutyric acid, isovaleric acid in the rumen fluids obtained from Hanwoo steers fed diets containing concentrate and rice straw or rice straw silage treated with an additive.
- (2) *In vitro* dry matter degradation(DMD) rate of rice straw silage
- (3) Dry matter intake(kg/d) and the nutrient digestibility(%, DM basis) of Hanwoo steers fed diets containing rice straw or rice straw silage treated with microbial additives developed in the project.

E) Results obtained

- (1) pH values and NH₃-N concentrations (mg/100mL) in the rumen fluids obtained from Hanwoo steers were not affected by diets containing concentrate and rice straw or rice straw silage treated with an additive.
- (2) Total VFA, and individual acetic acid concentrations were increased by the feeding of rice straw silage treated with an additive.
- (3) *In vitro* 72h DM degradation rate of rice straw and rice straw

- silage was 37.7 and 43.5%, respectively.
- (4) Dry matter intake(kg/d) was increased by the addition of microbial additives to rice straw silage.
 - (5) Crude protein and crude fiber digestibilities were also increased by the addition of microbial additives to rice straw silage.
- 2) The effects of microbial additives on the *in vivo* feeding response of Hanwoo steer
- A) Animals : 24 heads of Korean native steers(initial BW, 489.9±24.5kg)
 - B) Investigated items
 - (1) Growth response of Hanwoo steer
 - (2) Feed conversion rate
 - (3) Carcass traits of Hanwoo steer
 - C) Results obtained
 - (1) Average daily gain of Hanwoo steer fed rice straw and rice straw silage was recored as a 759.8 and 778.8g/d, respectively.
 - (2) Dry matter intake was also increased from 8.98kg/d to 9.52kg/d, without statistical differences.
 - (3) Feed conversion rate also improved by the feeding of rice straw silage.
- 3) Industrial application of microbial additives developed in the project

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the Project	23
Section 1. Necessities of the project	32
1. Technical aspect	32
2. Economic & industrial aspect	32
3. Social & cultural aspect	34
Section 2. Contents and scope of the project	35
1. Contents and scope of the project	35
2. Contents and scope by the year	36
Chapter 2. Status of the technology development in domestic and overseas	33
Section 1. Status and problems of related technology of the project in Korea and other countries	39
1. Status of related technology of the project	39
Section 2. Troubles of current state of the technology	40
Section 3. Trouble-solving schemes	41
1. Trouble-solving schemes for nutritional problems of rice straw	41
2. Trouble-solving schemes for physical problems of rice straw	41
3. Trouble-solving schemes for chemical problems of rice straw	43
4. Trouble-solving schemes for packing & logistic problems of rice straw	44
Section 4. Future research trends	45
Chapter 3. Research contents and results	64
Section 1. The development of microbial additives using anaerobic cellulolytic acid-tolerant fungi	46
1. Isolation and identification of anaerobic cellulolytic acid-tolerant fungi	46
2. Development of fungal additives	60

3. Development of microbial additives using fungus, yeast and transgenic bacteria	70
Section 2. The development of microbial additives using anaerobic acid-tolerant yeast produced microbial protein using organic acid	76
1. Searching and selection of SCP producing yeast	76
2. Development of yeast additives using characterized yeast	84
3. <i>In vitro</i> test of yeast additives developed in the project	98
Section 3. The development of microbial additives using transgenic bacteria produced esterase	104
1. Isolation and identification of microbes produced esterase	104
2. Sequencing and Cloning of esterase	113
3. Development of microbial additives using transgenic bacteria	120
4. SEM observation of yeast and fungal strains used in the study	128
Section 4. Industrialization study and <i>In vivo</i> trials using developed microbial additives for improving feed values of rice straw	132
1. Making of rice straw silage to verify effects of microbial additives	132
2. Verification study of developed additives using <i>in vivo</i> metabolic and feeding trials and their industrial applications	139
Chapter 4. Accomplishment and subsequent contributions	151
Section 1. Accomplishment	150
1. Accomplishment in general	150
2. Accomplishment evaluated by the annual plan	150
3. Accomplishment evaluated by key point of the project	154
Section 2. Subsequent contributions	155
Chapter 5. Application of the results	158
Chapter 6. References	168

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	32
제 1 절 연구개발의 필요성	32
1. 기술적 측면	32
2. 경제·산업적 측면	32
3. 사회·문화적 측면	34
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	35
1. 연구개발의 목표와 내용	35
2. 연차별 연구개발 목표와 내용	36
제 2 장 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	39
제 1 절 국내외 관련기술 현황	39
1. 국·내외 관련 기술	39
제 2 절 현 기술상태의 문제점	40
제 3 절 문제점의 해결방안	41
1. 영양적 문제점의 해결방안 (제 2세부과제에서 해결)	41
2. 물리적 문제점의 해결방안 (제 1 세부과제에서 해결)	41
3. 화학적 문제점의 해결방안 (제 3 세부과제에서 해결)	43
4. 보존성 및 운반성 문제점의 해결방안 (협동연구과제에서 해결)	44
제 4 절 앞으로의 전망	45
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	46
제 1 절 섬유소 분해 혐기·내산성 곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발	46
1. 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발	46
2. 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제 개발	60
3. 곰팡이(제1세부), 효모(제2세부) 및 transgenic 미생물(제3세부)을 종합한 최종 발효제의 개발	70

제 2 절	유기산 이용 단백질 합성 혐기·내산성 SCP 생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발	76
1.	단백질을 합성하는 혐기 내산성 SCP 생산용 효모의 탐색과 선발	76
2.	선발 효모의 특성 구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발	84
3.	<i>In vitro</i> 시험을 통한 개발품의 효과 검증시험	98
제 3 절	Esterase 분비 transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발	104
1.	리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase) 분비 미생물의 분리·동정 및 선발	104
2.	해당 유전자 sequencing, 유전자특성 분석 및 유전자 cloning	113
3.	Esterase 분비 transgenic 미생물을 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발	120
4.	SEM을 이용한 발효제용 효모와 곰팡이의 관찰	128
제 4 절	벗짚 사료가치 증진용 미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구	132
1.	발효제의 효과 구명을 위한 벗짚 곤포 사일리지 제조 시험	132
2.	대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증시험과 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구	139
제 4 장	목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	150
제 1 절	목표 달성도	150
1.	연구개발 목표 달성도	150
2.	연차별 연구개발 목표 달성도	151
3.	연구평가의 착안점에 기초한 목표 달성도	154
제 2 절	관련분야에의 기여도	155
제 5 장	연구개발 결과의 활용계획	157
제 6 장	참고문헌	158

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 우리나라는 사료의 해외 의존도가 96%에 이르고 있을 뿐만 아니라 축산 경영에서 사료비가 차지하는 비중은 80% 이상으로 매우 높은 실정이다. 또한, 소 사육 농가들의 사료이용 형태는 전체 사료중 조사료의 급여비율이 38% 수준에 불과하며 농후사료 즉, 배합사료의 공급비율이 지나치게 높아 반추동물의 영양·생리적 그리고 경영적 측면에서 매우 비정상적인 사육형태를 취하고 있다. 이의 근본적인 원인은 조사료 생산기반이 부실하거나 거의 없다는데 기인하고 있음은 잘 알고 있는 사실이다.
- 나. 이러한 문제점을 해결하고자 정부는 조사료 수급계획을 수립(1998년도)하고 현재 30% 정도의 수급율을 보이고 있는 양질 조사료의 생산 비율을 점차 확대하여 2004년까지는 56%로 증가시킬 계획으로 있었으나 단기적인 대책으로서는 볏짚과 같은 부존 조사료의 개발에 의한 조사료 수급계획이 주요 방안으로 수립되어 있다 (총 수급 조사료에 대한 볏짚, 산야초 등의 조사료의 공급비율은 2001년 49.4%, 2004년 36.6%).
- 다. 조사료 수급 대책의 근본적 방향은 목초나 사료작물과 같은 양질 조사료의 생산기반 확충이 중요하다는 데는 이론의 여지가 없다. 그러나 정부의 강력한 의지에도 불구하고 현재 한·육우 낙농가의 어려운 재정적 여건을 감안하면 집약적 생산 초지 조성이나 사료포를 신규 조성하는데 새로운 투자의 여력이 없고 기반이 정립되기 위해서는 기술적·재정적 투자가 뒷받침이 되어야 하기 때문에 장기적으로 꾸준히 일관성 있게 진행되어야 할 과제라고 생각된다. 축산 경영에서 사료비가 차지하는 비중을 줄이기 위해서는 중·단기적 수급대책으로 부존 조사료 자원의 적극 개발이 요구된다.
- 라. 국내에서 생산되는 부존사료자원의 종류는 다양하고 많으나 실제 이용할 수 있는 부산물은 극히 한정되어 있으며 또한 년중 계속 공급되는 종류는 제한되어 있고 내용물의 성분함량도 편차가 심하여 사용에 많은 애로 사항이 있으며 대표적인 부존사료자원인 볏짚은 에너지와 단백질의 함량이 낮을 뿐만 아니라 소화율도 낮아 사료로서의 질이 떨어지기 때문에 이를 해결할 수 있는 이용기술 개발이 요구되고 있다.

마. 부존사료자원으로서 대표적으로 이용되는 볏짚은 암모니아처리, 발효처리 등과 같은 화학 및 생물학적 처리를 통하여 이용성을 높여 왔지만, 볏짚은 목질화가 완성된 상태이기 때문에 위에서 언급된 처리를 통한 이용성을 획기적으로 증대시키기에는 많은 한계가 있었다. 그러나 최근에 활발하게 연구되고 있는 생물공학적인 처리 방법은 지금의 연구에서와는 달리 획기적으로 저질조사료 자원의 이용성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 기술적·산업적·경제적 파급효과는 매우 높을 것으로 생각되므로 이 분야에 대한 기술개발이 시급한 실정이다.

2. 경제·산업적 측면

가. 정부는 우리나라의 소 사육두수를 현재보다 약간 감소한 3,050 천두 내외로 유지하고 이때의 조사료 소요량 7,100 천톤 전량을 자급생산 이용한다는 목표를 세우고 있다. 이를 조사료 공급원별로 보면 양질 조사료 생산 4,000 천톤, 부존 사료자원 이용 2,600 천톤, 조사료 수입 500 천톤으로 되어 있으며, 이 계획이 차질없이 이루어질 경우 소에 대한 조사료와 농후사료의 급여비율은 현재의 33:67%(1997년)에서 60:40(2004년)으로 높아져 선진국 수준으로 개선될 전망이다.

나. 이상과 같은 조사료생산 목표를 조기에 달성하기 위해서는 볏짚 및 산야초와 같은 부존사료 자원을 최우선으로 개발 이용하는데 두고 있다. 이와 관련하여 부족되는 조사료의 완전 자급생산을 위해서는 사료작물 재배면적을 360 천 ha 이상 확보하고 볏짚을 포함한 농업 부산물의 사료화 이용율도 지금의 30%에서 60% 이상으로 높여야 한다. 또한, 우리나라에는 이용 가능한 농업 부산물이 연간 약 6,300 천톤정도 생산되고 있으며 이중 50%를 수거하여 사료화 이용시 이는 가소화 양분(TDN)기준으로 1,240 천톤에 해당되는데 이는 배합사료 1,700 천톤을 대체할 수 있는 엄청난 양이다.

다. 지금까지 문제가 되어온 부존 사료자원의 이용성을 본 연구자들이 구상하는 방향으로 획기적으로 증가시킬 수 있다면(보존성, 소화율 및 영양소 함량의 증가로 볏짚의 사료가치를 알팔파 수준으로) 외국에서 수입되는 사료원료의 많은 부분을 국내 생산 부존 사료자원으로 대체할 수 있기 때문에 축산농가의 사료비 절감은 물론 축산업의 국제 경쟁력을 높일 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

- 가. 현재 부존사료자원으로 활용 가능한 농산가공부산물은 산업폐기물로 분류되어 처리되고 있는 실정이나 이를 가축사료자원으로 활용한다면 폐기물 처리비용과 사료비를 절감하고 환경오염을 방지할 수 있다.
- 나. 현재 한국의 축산은 초유의 어려운 상황에 놓여 있다. 이러한 때에 대상그룹이 라이신 생산 및 판매권을 독일의 기업에게 팔아 넘김으로서 한국의 사료첨가제로서 필수적인 라이신의 가격조절 능력은 상실되어 버렸다. 또한 많은 양의 사료첨가제들과 원료사료는 물론 조사료까지 수입에 의존하고 있어 우리 축산업은 해외 의존도가 너무 높은 실정이다. 안밖으로 어려운 이때에 본 연구과제는 사료원가의 부담을 줄여 축산농가의 소득증대와 사료원료의 수입을 줄여 한국의 경제에 이바지 할 뿐만 아니라 사회적인 안정도 꾀하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표와 내용

본 연구과제의 궁극적인 목표는 생물 공학적 처리 방법을 통하여 우리나라의 대표적인 부존 사료자원인 볏짚의 사료가치를 양질조사료의 대명사인 알팔파 수준으로 향상시키는 기술을 개발하고 저장성과 운반성을 확보하여 산업화시키는데 있다.

구 분	연구 개발 목표 (과제명)	연구 개발의 주요 내용
제 1세부 과제	<p>볏짚의 물리적 문제점 해결을 위한</p> <p>섬유소 분해 혐기·내산성 곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기·내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발 - 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제의 개발 - 곰팡이(제1 세부), 효모(제2 세부) 및 transgenic미생물(제3 세부)을 이용한 최종 발효제의 개발
제 2세부 과제	<p>볏짚의 영양적 문제점 해결을 위한</p> <p>유기산 이용 단백질 합성 혐기·내산성 SCP생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 혐기·내산성 효모의 탐색 및 선발 - 선발 효모의 특성구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발 - 대사시험을 통한 개발품의 효과 검증시험
제 3세부 과제	<p>볏짚의 화학적 문제점 해결을 위한</p> <p>Esterase 분비 transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소 분비(esterase) 미생물의 분리·동정 및 선발 - 해당 유전자 sequencing, 특성 분석 및 유전자 cloning - Esterase분비 transgenic미생물을 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발
협동연구 과제	<p>볏짚의 보존성과 운반성 확보를 위한</p> <p>볏짚 사료가치 증진용 미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 최종발효제 검증을 위한 볏짚 곤포 사일리지의 제조 시험 - 대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증시험 및 농가 실증시험 - 최종 개발품의 산업화 연구

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

가. 제 1차 년도 (2002. 10 ~ 2003. 10)

연구 개발 목표	연구 개발 내용과 범위
<p>(제 1 세부과제) 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발</p>	<p>① 혐기생태계로부터 내산·섬유소분해 곰팡이 분리 : 반추동물의 십이지장 및 흰개미의 장내 : 목표 - 20종 이상 분리 : 반추위내 효모의 생존 유무 확인</p> <p>② 분리 곰팡이의 screening : 효소역가 및 소화율의 측정 : 내산성 test, 생육적온 test : 가근의 길이 측정</p> <p>③ 동정 균주의 특성조사 및 균주등록 : SEM 촬영에 의한 미세구조의 관찰 : 미생물자원보존센터에 특허균주 등록 (5종 이상)</p>
<p>(제 2 세부과제) 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 혐기 내산성 SCP 생산 효모의 탐색 및 선발</p>	<p>① SCP 생산을 위한 효모균의 문헌적 탐색 : NRRL, ATCC, BCCM, CBS, KCTC, DSMZ, IMI, JCM 및 WDC</p> <p>② 탐색 균주의 구입 : 5종 이상 구입</p> <p>③ 구입 균주의 특성조사 및 선발 : 성장률, acid-tolerance test, 효소역가 측정 : Doubling time 및 생육적온 조사 : 유기산 이용 단백질 합성을 측정</p>
<p>(제 3 세부과제) 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase) 분비 미생물의 분리·동정 및 선발</p>	<p>① 반추위 미생물들의 esterase 활력 측정 : 재래산양 반추위에 존재하는 미생물중 곰팡이의 esterase 활력 측정</p> <p>② Esterase 활력 우수균의 선발 및 동정</p> <p>③ 동정 균주의 특성조사 및 균주등록 : SEM 촬영에 의한 미세구조의 관찰 : 미생물자원보존센터에 특허균주 등록 (2종 이상)</p>

나. 제 2차 년도 (2003. 10 ~ 2004. 10)

연구 개발 목표	연구 개발 내용과 범위
<p>(제1 세부과제) 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제 개발</p>	<p>① 섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명 ② 간이 사일리지 제조 시험 (미생물 성장률 조사) ③ 볏짚 사료가치 증진에 미치는 영향 조사</p>
<p>(제2 세부과제) 선발 효모의 특성 구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발</p>	<p>① 유기산 이용성과 단백질 합성량에 미치는 영향 ② 최적 첨가량 및 사용조건의 구명 ③ 발효제가 사일리지 품질에 미치는 영향</p>
<p>(제3 세부과제) 해당 유전자 sequencing, 유전자특성 분석 및 유전자 cloning</p>	<p>① Genomic DNA Library 구축 ② 유전자 screening ③ 해당 유전자 sequencing 및 cloning</p>
<p>(협동연구과제) 발효제 효과 구명을 위한 볏짚 곤포 사일리지의 제조 시험</p>	<p>① 발효제가 곤포사일리지 성분에 미치는 영향 ② 발효제가 곤포사일리지 발효특성에 미치는 영향 ③ 발효제가 사일리지 품질 및 소화율에 미치는 영향</p>

다. 제 3차 년도 (2004. 10 ~ 2005. 10)

연구 개발 목표	연구 개발 내용과 범위
<p>(제1 세부과제) 곰팡이(제1세부), 효모(제2세부) 및 transgenic 미생물(제1협동)을 종합한 최종 발효제의 개발</p>	<p>① <i>in vitro</i> 시험을 통한 미생물간 상호작용 구명 ② 적정 부형제 및 delivery system의 개발 ③ 최종 발효제의 효과 검증 시험</p>
<p>(제2 세부과제) <i>In vitro</i> 시험을 통한 개발품의 효과 검증시험</p>	<p>① 발효제 구성 미생물의 생존성과 성장률 구명 ② 소화율 및 효소분비량에 미치는 영향 구명 ③ 단백질 합성량 및 사료가치에 미치는 영향 구명</p>
<p>(제3 세부과제) Esterase 분비 transgenic 미생물을 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발</p>	<p>① Transgenic 미생물의 생산 ② Transgenic 미생물의 특성 구명 ③ Transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제 개발</p>
<p>(협동연구과제) 대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증시험과 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구</p>	<p>① 발효제가 동물의 생산 반응에 미치는 영향 구명 ② 발효제 사용에 대한 경제성 분석 ③ 발효제에 대한 산업화 방안</p>

제 2 장 국내외 관련기술의 현황과 문제점

제 1 절 국내외 관련기술 현황

1. 국내 · 외 관련 기술

- 가. 부존사료자원의 이용성에 대한 중요성은 일찍부터 인식되어, 대학이나 산업체 및 연구소 등에서 이에 대한 많은 관심을 갖고 오래 전부터 연구를 수행해 왔으며 과거 20여년 동안 이러한 분야의 연구가 반추동물 영양학의 근간을 이루어 왔다. 그러나 실제로 부존 사료자원의 종류, 생산 현황, 재배, 유통경로, 사료화 가능성 등에 대한 종합적인 자료가 충분치 못한 형편이며 화학적·물리적 처리 가공 방법에 관한 매우 초보적이고 단발적인 연구에 불과했다.
- 나. 우리나라에서 부존사료자원으로서 대표적으로 이용되는 벚짚은 암모니아처리, 발효처리 등과 같은 화학 및 생물학적 처리를 통하여 이용성을 높여 왔지만, 본질적으로 벚짚은 목질화(lignification)가 완성된 상태이기 때문에 위에서 언급된 처리를 통한 이용성을 획기적으로 증대시키기에는 많은 한계가 있었다. 그러나 최근에 활발하게 연구되고 있는 생물공학적인 처리 방법은 지금의 연구와는 달리 획기적으로 저질조사료 자원의 이용성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 개발된 발효제의 기술적·산업적·경제적 파급효과는 매우 높을 것으로 생각되나 관련기술은 거의 정립되어 있지 않은 실정이다.
- 다. 섬유소 함량이 높은 부존사료자원들의 사료가치 증진 방안으로 수행된 사일리지 제조에 관한 연구들은 주로 계분, 전분, 암모니아 가스, 물, 밀기울, 포도당 등의 첨가에 따른 사료적 가치평가의 수준이거나 사일리지의 품질과 호기적 변패 방지를 위한 유기산 첨가 또는 예건의 효과 등과 같이 화학적·물리적 처리 가공이 대부분을 이루고 있다. 반면 부존사료자원이 갖는 영양적 측면과 목질화가 완성되어 나타나는 물리적·화학적 측면을 고려한 근본적 문제 해결에 대한 접근이 매우 부족한 실정이다.
- 라. 우리나라의 생태환경에서 탐색하여 섬유소 분해 미생물을 분리·동정하여 그의 역가 및 cellulose 분해능력, 검증, 생명공학 기법 (Site directed mutagenesis)을 이용한 cellulase 역가의 향상 등에 관한 연구는 매우 미미할 뿐만 아니라 제제화를 위한 기초이론 및 기술이 정립되어 있지 않다.

마. 국외에서도 70년대부터 개도국을 중심으로 간헐적으로 부존사료자원의 이용에 대한 연구가 실시된 바 있으나 아직 초보적 단계를 벗어나지 못하고 있다. 인도네시아의 경우 70년대 자국에서 생산되는 부존사료자원을 이용하여 닭, 돼지 및 소에서 이용성 시험을 실시한 바 있고 중국의 경우도 93년부터 옥수수대와 콩대를 펠렛화 하여 사양시험을 실시한 바 있다. 이 밖에도 여러 종류의 부존사료자원에 대한 이용성 및 경제성에 대한 시험이 세계 여러나라에서 이루어지고 있지만 부존사료자원들이 갖는 근본적인 문제점을 해결하려는 연구는 아직 체계적으로 수행되지 못하고 있는 실정이다.

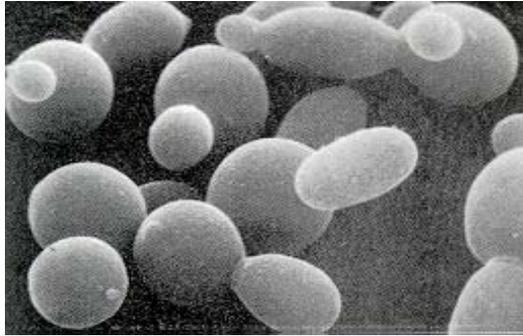
제 2 절 현 기술상태의 문제점

- 가. 야초와 같은 부존조사료자원은 수확 및 이용시 투여되는 노동력 등의 노력에 비해 가축생산성이 낮은 것으로 인식되어 왔으며, 원료의 물리·화학적 성상, 이를 효율적으로 이용방안에 대한 검토뿐만 아니라 가공 기술개발 (보존성, 발효제 및 첨가제 개발 포함)에 인식과 필요성이 매우 결여되어 있었다.
- 나. 미생물 발효 첨가제의 시장규모는 날로 증가하고 있으며 시판되고 있는 사일리지 발효제(H/MF inoculant, 제조원 Medipharm, 미국; KEM LAC 제조원 Kemin Co, 미국; Silo Guard II 제조원 International Stock Food Corp. 등)들은 대부분 외국에서 수입되어 사용되어 지고 있는 실정이며, 문제는 이들 제품들이 사일리지제조에 사용되어 지는 재료초가 연질의 목초 또는 옥수수이기 때문에 이러한 재료의 발효에 적합한 조건을 가지고 있음에도 불구하고 우리 나라에서 재료초의 화학적·물리적 성상을 고려하지 않고 무작위로 사용되고 있어 그 발효효율이 매우 낮다.
- 다. 볏짚으로 대표되는 부존사료자원의 본질적인 문제점은 (1) 영양소의 함량(에너지, 단백질, 비타민 등의 함량)이 너무 낮고(단백질 함량 : 4-5%), (2) 볏짚은 물리적으로는 각질화가 완성된 상태이고 (3) 화학적으로도 섬유소, 리그닌 및 실리카 등의 함량이 높기 때문에 소화율이 너무 낮으며(반추위 소화율: 40% 미만), (4) 또한, 대부분의 부존 사료 자원들은 지역적·계절적으로 생산되므로 지속적 급여를 위한 보존성이 결여되어 있다는 점이다.

제 3 절 문제점의 해결방안

1. 영양학적 문제점의 해결방안 (제 2세부과제에서 해결)

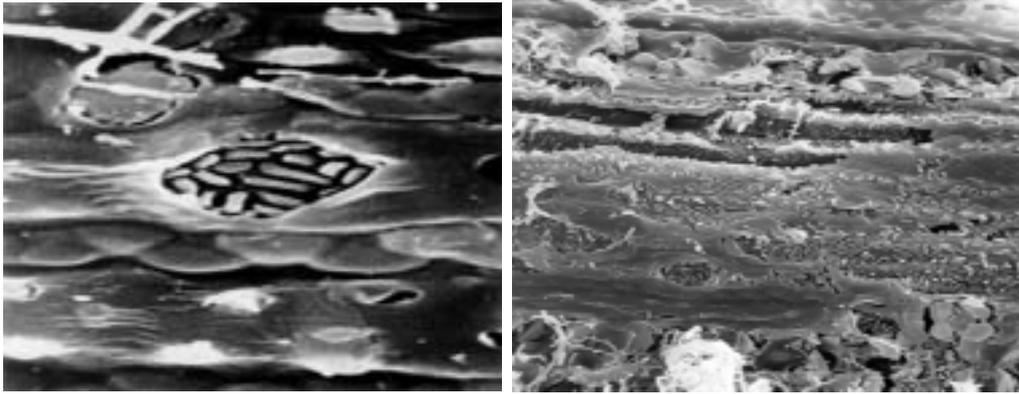
앞에서 언급하였듯이 대표적인 부존사료자원인 벚짚은 영양학적으로 필요한 에너지, 단백질, 비타민 및 미지성장 인자들의 함량은 너무 낮고 필요 없는 리그닌, 큐틴 및 실리카 등의 함량이 높아 사료로서의 가치가 매우 낮은 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 본 연구진들은 유기산을 이용해서 단백질을 합성하는 효모균을



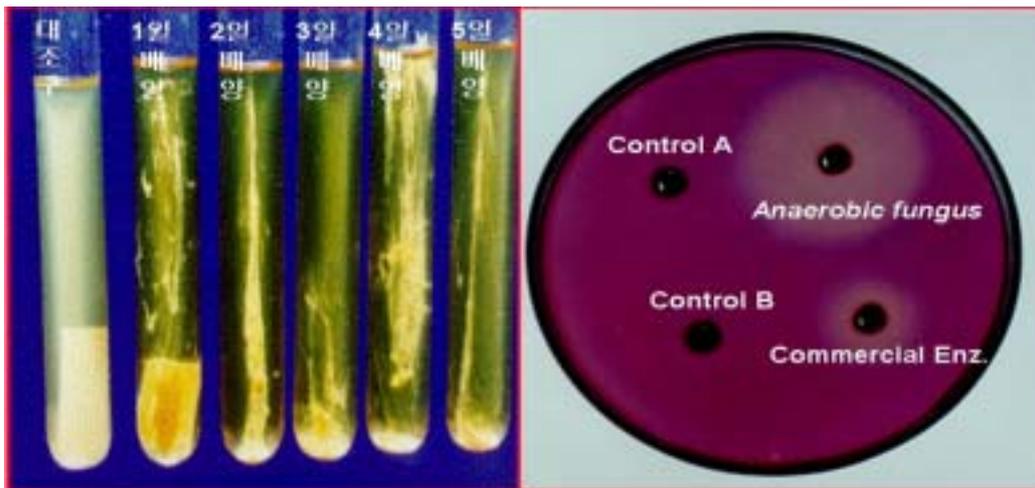
동원할 예정이다. SCP(single cell protein) 생산공정에서 주로 사용하는 효모들 중에는 혐기·내산성 미생물로서 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 효모들이 문헌적으로 많이 발견되고 있다. 예를들어 *Candida utilis* Heenneberg(ATCC Number 9550)라는 효모는 혐기성 미생물로서 생육 최적 pH 4.3이고 SCP로서 기호성이 매우 높으며 GRAS(generally reconized as Safe) 균으로서 폐 목초자원의 유기산을 이용하여 단백질을 합성해 내는 능력을 갖고 있다. 따라서 이러한 효모들을 첨가제로 개발하여 보존성 문제를 해결하기 위하여 동원한 “부존 사료자원의 곤포사일리지화”에 적용한다면 사일리지 발효시에 이 효모균들이 유기산을 이용하여 성장하므로써 단백질을 합성해낼 뿐만 아니라 효모에 많은 양으로 함유되어 있는 비타민이나 미지성장 인자들이 자연스레 사료자원에 포함될 수 있을 것이다. 따라서 낮은 영양소 문제는 자연스레 해결될 수 있을 것이다(목표치: 벚짚의 단백질 함량 4%를 12%로).

2. 물리적 문제점의 해결방안 (제 1 세부과제에서 해결)

벚짚은 물리적으로는 각질화가 완성된 상태로서 그림에서 보듯이 벚짚의 각질층(표피층)에는 미생물이 붙어 살지 못하므로 반추위 미생물 소화에서 장벽(barrier)의 역할을 하므로써 소화율을 급격히 감소시킨다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 본 연구진들은 가근을 이용해서 물리적으로 각질층을 파괴시키는 능력을 갖고 있는 혐기·내산성 곰팡이균을 동원할 예정이다. 비교적 최근에 반추위내에서 발견된 혐기성 곰팡이들은 식물상으로서 뿌리(가근)를 갖고 있다. 따라서 이들은 성장을 위해서 기질(사료)에 뿌리를 내려 영양소를 흡수해야 한다. 혐기성 곰팡이가 사료에 뿌리를 내리면 각질층은 파괴된다(아래 SEM 사진의 좌측상단과 우측하단의 흰 뿌리 참조).

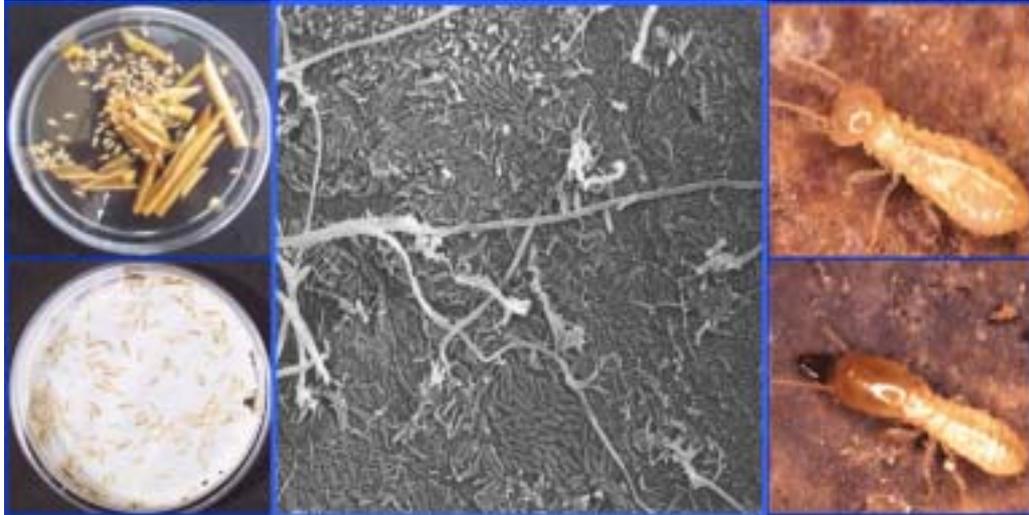


본 연구진 들이 filter paper(100% cellulose로 구성)를 기질로 곰팡이를 순수 *in vitro* 배양한 사진(아래사진 좌측)에서 보듯이 곰팡이의 긴 뿌리의 작용으로 filter paper가 길게 분해되어 있는 모습을 볼 수 있다. 또한 반추위 곰팡이가 분비하는 가수 분해 효소(CMCase)는 상업적으로 시판되고 있는 효소의 활성보다 수 십배 강하다(아래사진 우측).



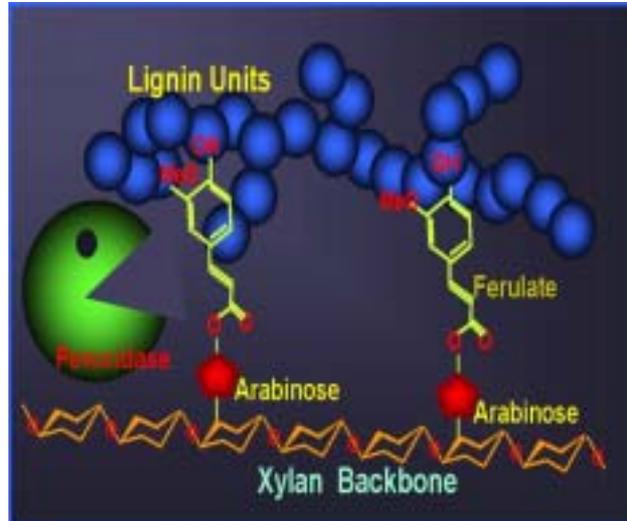
또한, 비교적 연구가 많이 수행되지 못하고 있는 혐기성 곰팡이 자원의 탐색을 위해서는 반추동물의 장은 물론이거니와 목재를 갇아먹고 사는 흰개미의 장내에서도 혐기성 곰팡이를 분리해 낼 것이다. 아직까지 흰개미의 장내에서 혐기성 곰팡이를 분리하였다는 보고는 없지만 우리 연구진들은 흰개미의 장내에 곰팡이의 가근(뿌리)이 있음을 확인 하였다(그림 중간부분). 따라서 흰개미의 장내에서도 섬유소의 분해력과

가근의 발달이 매우 왕성한 혐기성 곰팡이들을 다량으로 확보할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 이렇게 확보한 곰팡이들을 첨가제로 개발하여 곤포사일리지 제조시 적용한다면 사일리지 발효기간 중 충분히 성장하므로써 물리적으로는 각질층을 파괴시키고 화학적으로는 강력한 효소를 분비하므로써 부존사료자원의 소화율을 획기적으로 증가시킬 수 있을 것이다(목표 소화율 : 볏짚 40%을 65% 이상으로).



3. 화학적 문제점의 해결방안 (제 3 세부과제에서 해결)

볏짚은 화학적으로는 각질화 단계에서 침착된 리그닌이나 실리카의 함량이 너무 높으며 이들과 결합된 섬유소나 단백질은 미생물이 분해시키지 못하기 때문에 소화율이나 에너지의 이용효율이 너무 낮다는 것이다. 리그닌이란 오른쪽 그림에서 보듯이 3개의 xylose에 arabinose가 붙고 그 위에 ferulic acid, quamic acid 혹은 synapic acid 등이 붙어 있는 구조를 lignin unit



라고 하는데 이 구조와 연결되어 있는 모든 영양소들은 미생물의 작용을 받지 못한다. 따라서 arabinose와 여러 acids들을 끊어 주는 효소(peroxidase, esterase)에 많은 관심이 집중되었는데 아주 최근에 반추위 곰팡이가 이 효소를 분비한다고 알려지고 있다. 그러나 그 양이 많지 않은 단점이 있다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위해서 본 연구진들은 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소 esterase를 분비하는 미생물의 분리·동정하고 Genomic DNA Library를 구축한 다음, 유전자를 screening하고 해당 유전자 sequencing한 다음 transgenic 미생물(유산균에 transfer)을 만들어 첨가제를 개발해 내고자 한다. 따라서 이렇게 확보된 transgenic 미생물들을 곤포사일리지 제조시 적용한다면 부존사료자원의 소화율을 획기적으로 증가시킬 수 있을 것이다(목표 소화율: 볏짚 40%을 65% 이상으로).

4. 보존성 및 운반성 문제점의 해결방안 (협동연구과제에서 해결)

대부분의 부존 사료자원들은 지역적·계절적으로 생산되므로 효율적인 사료자원화를 위해서 지속적 급여가 가능한 보존성을 확보하여야 하며 운반성 등이 용이하여야 한다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위해서 본 연구진들이 동원한 방법은 일차적으로 “부존 사료자원의 곤포 사일리지화”이다. 곤포 사일리지 제조시에 위에서 개발된 미생물제제들(부존사료자원의 영양학적·물리적·화학적 문제점들을 해결하기 위한 미생물 첨가제들)을 투입한다면 부존사료자원의 사료가치도 획기적으로 증가시키고 보존성과 운반성도 확보될 것으로 희망한다. 따라서 본 연구과제의 궁극적인 목표는 생물 공학적 처리 방법을 통하여 우리나라의 주요 부존 사료자원인 볏짚의 사료가치를 양질조사료의 대명사인 알팔파 수준으로 향상시키는 것이다.



제 4 절 앞으로의 전망

1. 2000년 기준으로 약 25억불 상당이 사료자원도입 비용으로 막대한 외화가 지출되었다. 이의 대부분이 배합사료원료 수입에 사용되고 있으며, 조사료 생산기반이 지극히 낮은 현 실정에서 국내의 부존자원을 조사료원으로 활용하려는 노력은 가속화 될 것이다.
2. 원료사료의 가격 상승, 각 국가의 환경에 대한 규제 심화, 수입자유화 이후 자국자원의 보존 추세 등이 겹쳐 전체적인 사료가격의 앙등 및 품귀현상이 우려됨으로 대체 사료원의 개발이 시급하며 지역별·계절별 부존사료자원에 대한 정보 및 이용기술개발이 매우 필요할 것으로 전망된다.
3. BT (Biotechnology) 산업의 중요성이 강조되어지는 현 산업의 추세와 더불어 우리 생태환경에서 고부가가치의 생물자원의 개발에 대한 연구가 활발히 전개될 것이다.
4. 앞에서 언급한 본 연구과제의 기술개발이 완료되었을 때 사일리지 발효제, 사료첨가제의 개발, TMR 사료에의 응용 등 동물산업 뿐만 아니라, 섬유소가 많은 폐기성 부산물자원의 재활용 등 환경적 제반 분야에 활용 가능성이 넓혀 질 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 섬유소 분해 혐기·내산성 곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발 (제 1 세부과제)

1. 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 곰팡이의 분리·등정 및 선발

가. 연구수행 내용

1) 공시재료

혐기 내산성 생태계로부터 혐기성 곰팡이를 분리하고자 반추동물 십이지장액과 흰개미의 장액을 공시재료로 이용하였다. 십이지장액은 도살장(대화도축장: 진주시 상평동 소재)에서 채취하였고 흰개미는 밀양대학교 흰개미방제연구팀으로부터 분양 받아 사육하며 장액을 채취하였다.

2) 공시재료로부터 곰팡이의 분리

가) 섬유소 분해 곰팡이 분리를 위한 Enrichment : 공시재료로부터 섬유소분해 곰팡이를 분리하기 위하여 배지중의 탄수화물원을 ball-milled filter paper로 대체하고 항생제를 투여하여 배양액 속에서 일정기간 혐기 배양 시켜 섬유소 분해 곰팡이의 enrichment를 유도하였다.

나) 공시재료의 희석 : Enrichment 시킨 공시재료는 혐기희석액(Bryant와 Burkey, 1953) 십진희석법으로 $10^0 \sim 10^{-5}$ 까지 희석하여 순수분리를 위한 접종액으로 이용하였다(Table 1-1).

Table 1-1. Anaerobic dilution solution (Bryant & Burkey, 1953)

Component	Unit	Amount
Mineral solution I ^a	ml	7.50
Mineral solution II ^b	ml	7.50
Cystein-HCl-H ₂ O	g	0.05
Na ₂ CO ₃	g	0.30
Resazurin, 0.1% solution	ml	0.10
D-H ₂ O	ml	100.00

^a K₂HPO₄, 6g in 100.0ml of distilled water.

^b NaCl, 1.2g; (NH₄)₂SO₄, 1.2g; KH₂PO₄, 0.6g; CaCl₂, 0.12g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.25g in 100.0ml of distilled water.

다) 곰팡이의 접종 및 배양 : 탄수화물원이 750mg(절단 볏짚 6~8개)의 공시기질로 대체된 LAMF(Lowe's artificial medium for ruminal fungi, Lowe 등, 1985, Table 1-2)를 이용하였다. 접종과 배양의 전 과정은 Hungate (1966)의 방법을 응용한 anaerobic gassing system으로 혐기상태를 유지하였다.

Table 1-2. Medium compositions per 100mL of Lowe's medium for anaerobic culture of ruminal fungi

Component	Unit	Amount
Mineral solution I	mL	7.50
Macro B solution	mL	5.40
Trace B solution	mL	1.00
VFA mixture solution	mL	1.00
Hemin 0.1% solution	mL	1.00
Vitamin mixture solution	mL	1.00
Resazurine 0.1% solution	mL	1.00
Trypticase peptone	g	0.10
Yeast extracts	g	0.05
NaCO ₃ 8% solution	mL	15.00
Cystein-HCl · H ₂ O	g	0.05
Distilled water	mL	78.00

Mineral I solution: KH₂PO₄, 1.8g; (NH₄)₂SO₄, 1.8g; NaCl, 3.6g; MgSO₄·7H₂O, 0.73g; and CaCl₂·2H₂O, 0.77g

Macro B solution: KCl, 2.7g; NaCl, 2.7g; MgSO₄·7H₂O, 2.25g; CaCl₂, 0.9g; and NH₄Cl, 2.4g in 300.0ml of distilled water.

VFA mixture solution: Acetic acid, 2.05g; Propionic acid, 0.9g; butyrate, 0.54g; 2-methyl butyrate, 0.015g; Isovalerate, 0.165g; Isobutyrate, 0.14g; n-Valerate, 0.165g; and 0.2M NaOH, 210ml

Vitamin mixture solution: Pyridoxine HCl, 0.06g; Riboflavin, 0.06g; Thiamine HCl, 0.06g; Nicotinamide, 0.06g; Ca-D-Pantothenate, 0.06g; PARA, 0.003g; and Stock Solution, 0.3ml in 300mL in distilled water.

Vitamin Stock Solution: Folic acid, 0.125g; Biotin, 0.125g; and Covalamine, 0.0125g in 25mL of dH₂O.

라) Roll-tube법에 의한 섬유소 분해 곰팡이의 분리 : 희석된 공시재료 1ml을 agar가 함유된 9ml의 배지에 접종한 후, 시험관을 얼음물에서 spinning시켜 agar를 굳힌 다음 37°C에서 5~14일간 배양하며 colony를 분리하였다. 이 때 박테리아나 효모등과 같은 미생물의 성장을 방지하기 위하여 아래 Table 1-3의 항생제를 혼합하여 투여하였다.

Table 1-3. Antibacterial agent used in the experiment preventing to grow of bacteria and yeast

Component	Unit	Amount
Penicillin-G, sulfate	g	0.606
Streptomycin	g	0.132
Chloramphenicol	g	0.030
Distilled water	mL	50.00

마) Colony의 분리 및 보존 : roll tube상에 형성된 colony를 anaerobic gassing system을 이용한 Hungate (1966)와 Holdman (1977)의 방법에 의해 혐기적으로 순수분리하였다. 분리와 계대 과정중에는 박테리아의 오염을 방지하기 위하여 두종류의 항생제 (①AB₁ : benzyl penicillin, 1.7×10⁵ IU; streptomycin sulfate, 0.170 μg · mL⁻¹혼합액과 ② AB₂ : AB₁ + chloramphenicol 30μg · mL⁻¹혼합액)를 사용하였다. 분리된 곰팡이들 중에서 섬유소 분해 곰팡이를 screening하기 위하여 배양액중에 탄수화물원이 filter paper strip (whatman No.1, 20×10mm)으로 대체된 배지를 이용하였는데, 배양액에 turbidity가 나타나는 culture tube는 박테리아가 오염된 것으로 간주하였다. 순수성을 확보하기 위해 AB₂ 항생제를 사용하여 위와 같은 과정을 반복하며 곰팡이를 순수 분리하였다. 분리된 곰팡이는 순수성과 시험의 일관성을 유지하기 위하여 장기보존 배지에 보존하였는데 100ml의 증류수에 50%의 glucose와 0.001%의 resazurine을 혼합하여 환원시키고 Na₂CO₃ 0.64%와 L-cystein 0.1%를 첨가하여 혐기적으로 보존용 tube에 분주하여 멸균한 후, 곰팡이를 접종시켜 5~7일간 배양하고 나서 대부분의 배양액을 무균 · 혐기적으로 처리하여 다시 1ml의 신선한 배양액과 1ml의 glycerol을 첨가하여 냉동 (-29°C) 보존하며 3개월에 1번씩 계대 · 보존하였다.

바) 분리된 곰팡이의 섬유소 분해력 Screening

분리된 균주들의 섬유소 분해력을 신속·간편하게 screening하여 실험에 공시하고자 Congo-red법에 의한 CMC case test 등을 수행하였다.

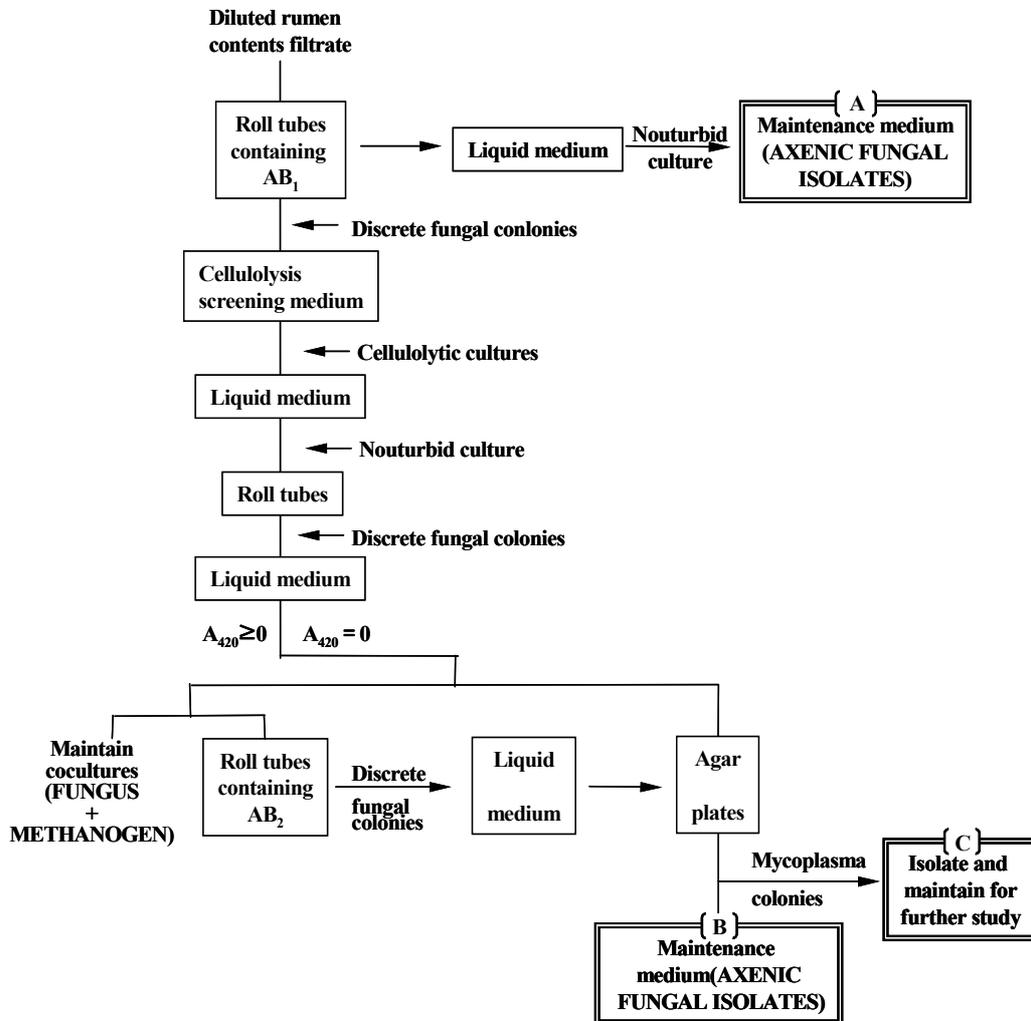


Figure 1-1. Isolation procedures of anaerobic fungi from the anaerobic ecosystems such as the duodenum segment of ruminants' digestive tract or the digesta juices from termites *etc.*

Figure 1-1에서와 같이 일반적인 곰팡이의 분리, 검사 및 배양법은 아래와 같은 순서로 진행되었다.

- (1) 반추동물의 십이지장액이나 흰개미의 장액을 채취하여
- (2) 2겹의 cheese cloth로 여과하였다.
- (3) 10^{-2} 에서 10^{-5} 까지 희석하였다.
- (4) 1ml의 시료를 roll tube에 접종하였다.
- (5) 박테리아 오염을 방지하기 위해서 benzyl penicillin, streptomycin sulfate 그리고 chloramphenicol등을 혼합한 항생제를 곰팡이 접종 전에 첨가하여 다른 박테리아나 효모 등의 오염을 방지하였다.
- (6) 39°C에서 3에서 5일간 배양하였다.
- (7) fungal colony를 취한다. Colony를 취하기 직전에 agar 배지상에 형성된 colony의 물리적 형태를 관찰하였다.
- (8) Filter paper (7×7mm)를 함유하는 Lowe's liquid fungal medium에 접종한다. 이때, filter paper는 펀치를 이용하여 천공해서 사용하면 편리하고 반드시 멸균 시켜 사용하였다.
- (9) 39°C에서 5에서 7일간 배양하였다.
- (10) glucose, cellobiose 그리고 starch가 0.15% 첨가된 liquid fungi medium에 접종하였다.
- (11) turbidity를 관찰하여 turbidity가 양성 (+)이면 bacteria가 성장한 것이므로 실험에 사용하지 않았고 즉시 멸균처리한 다음 폐기하였다.
- (12) glucose, cellobiose 그리고 starch가 0.15%씩 첨가된 roll tube에 접종하였다.
- (13) fungi colony를 취한 다음, glucose, cellobiose 그리고 starch가 0.15%씩 첨가된 liquid fungi medium에 접종하였다.
- (14) turbidity가 0이거나 수치가 적은 tube만 실험에 이용하였다.
- (15) 2겹의 cheesecloth로 여과하였다.
- (16) UV spectrophotometer를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하고 현미경 하에서 관찰하였다.
- (17) 흡광도가 0이거나 수치가 매우 낮을 때의 fungi만 분리하였다.

사) Screening된 곰팡이의 동정

균체구조가 흐트러지지 않도록 lactophenol액으로 곰팡이를 고정하여 영양기의 반추위 곰팡이 형태를 현미경으로 관찰하여 Barr(1980)의 방법에 따라 동정을 실시하였다. 동정을 위하여 filter paper disc 2개씩을 test tube에 넣고,

10ml의 Lowe's artificial medium을 anaerobic gass system을 이용하여 혐기적으로 분주한 후, 121°C에서 20분간 멸균시켰다. 멸균이 완료된 test tube에 7일간 배양한 공시균주를 1ml씩 각각 혐기적으로 접종한 다음, 72시간 동안 37°C의 incubator에서 배양하였다. 배양이 완료된 시료는 전자현미경을 이용하여 미세구조를 관찰하였다.

곰팡이 속의 동정은 광학 현미경과 전자 현미경 관찰에 의하여 나타난 thallus의 형태 (monocentric형 혹은 polycentric형), 가근의 형태 (filamentous형 혹은 bulbous형) 그리고 유주자에 부착된 편모의 수 (uniflagella형 혹은 multiflagella형) 등에 근거하여 동정하였다.

아) 전자현미경 (SEM)의 관찰

전자현미경 관찰을 위한 전 처리는 Ho 등 (1988)의 방법을 응용하였다. 진공상태에서 시료의 변형을 방지하기 위하여 0.5%와 5% glutaraldehyde 용액으로 고정한 후, cacodylic buffer로 세척하고, 유기용매 치환법으로 10, 20, 30, 50, 70, 90 및 100%의 ethyl alcohol을 차례로 30분간 통과시켜 탈수시켰다. 탈수가 끝난 시료는 임계점 건조법(critical point drying method)을 이용하여 시료를 내압 용기 중에서 액화 CO₂에 담근 다음 임계점온도(31°C, 72.8atm) 이상으로 가열하여 gas화 시켜 건조하였다. 건조된 시료를 액체 silver를 이용하여 주사형 현미경의 stub에 mounting 시킨 후, 진공증착장치에서 금(gold)을 시료표면에 분사 증착시켜 주사형 현미경(SEM: Scanning Electron Microscopy)을 이용하여 관찰하였다.

나. 연구수행 결과

1) 혐기성 곰팡이의 분리

공시한 반추동물 한우의 십이지장액과 흰개미의 장액으로부터 각각 40종과 15종의 곰팡이를 무작위로 순수 분리하였다. 무작위로 선발된 곰팡이들을 5차례에 걸쳐 계대배양하며 높은 섬유소 분해력과 오염도를 나타내지 않는 곰팡이를 순수 분리하여 한우 십이지장으로부터 18종 그리고 흰개미로부터 9종 등 총 27종을 screening 하였다. 한우와 흰개미의 장으로부터 섬유소 분해 곰팡이를 분리하는 과정 중에 나타난 균락의 특성과 성장특성은 Table 1-4와 Table 1-5에 각각 나타내었다.

Table 1-4. 한우 십이지장으로부터 분리한 혐기성 곰팡이 균락의 색상, 모양 및 성장특성

분리번호	분리원	분리 승수	균락의 색			균락의 모양		호기 성장
			내부	중간	외부	형태	크기	
GSRI-2	한우	10 ⁻²	황색	황색	흰색	구형	중	-
GSRI-3	한우	10 ⁻²	황색	/	흰색	난형	소	-
GSRI-5	한우	10 ⁻³	흰색	/	흰색	난형	소	-
GSRI-6	한우	10 ⁻³	흰색	황색	흰색	부정형	대	-
GSRI-7	한우	10 ⁻³	황색	황색	황색	구형	중	-
GSRI-9	한우	10 ⁻³	흰색	흰색	황색	구형	중	-
GSRI-11	한우	10 ⁻³	황색	황색	흰색	난형	대	-
GSRI-13	한우	10 ⁻⁴	흰색	/	흰색	부정형	소	-
GSRI-15	한우	10 ⁻⁴	황색	황색	흰색	난형	중	-
GSRI-16	한우	10 ⁻⁴	황색	황색	흰색	부정형	중	-
GSRI-21	한우	10 ⁻⁴	황색	황색	흰색	구형	대	-
GSRI-25	한우	10 ⁻⁴	흰색	흰색	황색	구형	대	-
GSRI-27	한우	10 ⁻⁴	황색	황색	황색	구형	중	-
GSRI-28	한우	10 ⁻⁴	황색	/	황색	구형	소	-
GSRI-29	한우	10 ⁻⁵	황색	/	흰색	난형	소	-
GSRI-31	한우	10 ⁻⁵	흰색	흰색	흰색	부정형	대	-
GSRI-34	한우	10 ⁻⁵	흰색	/	흰색	부정형	대	-
GSRI-37	한우	10 ⁻⁵	황색	황색	흰색	구형	대	-

섬유소 분해 곰팡이를 분리하는 과정중에 7일 동안 성장시킨 colony의 색은 주로 황색, 노란색 및 흰색이었는데, colony의 중앙에는 진한 황색 가운데 부분은 노란색 그리고 가장자리로 갈수록 열어져 흰색을 띠는 colony가 가장 많이 형성되었다.

그러나 성장 시기에 따라 colony의 색은 많은 변화를 보여 초기에는 흰색의 점으로 성장을 시작하여 배양 3-4일경부터 중앙부분이 황색으로 변하며 5~6일 이후 부터는 급속히 성장하여 가장자리에 흰색의 환을 형성하는데 이는 곰팡이의 가근 때문에 나타난 현상이라 생각된다. 흰개미의 경우는 한우에서와는 달리 흰색이 많이 형성되는 것 같았다.

Table 1-5. 흰개미의 장으로부터 분리한 혐기성 곰팡이 균락의 색상, 모양 및 성장특성

분리번호	분리원	분리 승수	균락의 색			균락의 모양		호기 성장
			내부	중간	외부	형태	크기	
GSMI-1	흰개미	10 ⁻²	황색	황색	흰색	구형	중	-
GSMI-4	흰개미	10 ⁻²	흰색	/	흰색	부정형	소	-
GSMI-5	흰개미	10 ⁻²	흰색	흰색	황색	구형	중	-
GSMI-7	흰개미	10 ⁻²	흰색	/	흰색	난형	소	-
GSMI-8	흰개미	10 ⁻²	황색	황색	흰색	난형	중	-
GSMI-10	흰개미	10 ⁻²	흰색	흰색	황색	구형	대	-
GSMI-13	흰개미	10 ⁻³	황색	황색	황색	부정형	중	-
GSMI-14	흰개미	10 ⁻³	황색	/	흰색	난형	소	-
GSMI-17	흰개미	10 ⁻³	흰색	흰색	흰색	부정형	대	-

Colony의 형태는 circular 형태에서 irregular 형태에 이르기까지 다양하였으나 거의 대부분이 둥근 형태였다. Colony의 크기는 직경 20mm이상(대)의 것부터 5mm 이하(소)의 것까지 다양하였으나 대부분이 10~20mm 범위의 크기를 가졌다. 호기 상태에서 성장하는 미생물은 하나도 분리되지 않았다. 또한, 한우의 십이지장에서는 10⁻³~10⁻⁵ 희석 배수에서 곰팡이가 주로 분리되었으나, 흰개미의 소화장기에서는 10⁻² 희석 배수에서 주로 분리되었다.

2) 분리 곰팡이의 발효특성과 섬유소 분해력 측정

한우의 십이지장과 흰개미의 소화장에서 분리한 곰팡이의 발효특성과 섬유소 분해력은 다음의 Table 1-6과 Table 1-7에서 보는 바와 같다.

분리한 곰팡이들의 섬유소 분해율을 구체적으로 확인하여 섬유소 분해균주를 선발하고자 0.1%의 CMC(carboxymethylcellulose) 기질로 congo-red법에 의한 cellulase activity를 측정한 결과를 빈도수로 표시하였다. 한우에서 분리한 분리번호 GSRI-9번과 GSRI-25번의 곰팡이는 clear zone을 형성하지 못하였지만 나머지는 대부분 상당한 섬유소 분해력이 있었다. 특히 흰개미에서 분리된 곰팡이들이 한우에서 분리된 곰팡이들 보다 clear zone을 넓게 형성하여 섬유소 분해율이 더 높은 것으로 평가되었다.

Table 1-6. 한우에서 분리한 혐기성 곰팡이의 발효특성과 섬유소 분해력

분리번호	pH	지방산과 젖산 생성량			배지중 성장양상			탁색도	섬유소 분해력
		Acetate	Butyrate	Lactate	색깔	점도	거품		
GSRI-2	5.83	3.49	0.76	2.49	⊙		-	++	
GSRI-3	5.45	2.35	-	0.92	⊙	⊙	⊙	-	+
GSRI-5	6.02	3.68	-	-			⊙	-	+++
GSRI-6	5.88	0.99	0.54	0.43	⊙	⊙	⊙	-	++
GSRI-7	6.17	5.02	0.32	0.18	⊙			-	+
GSRI-9	6.25	4.56	-	-			⊙	-	+/-
GSRI-11	6.41	3.80	-	-	⊙	⊙		-	++
GSRI-13	6.19	5.42	0.97	0.32	⊙			-	+++
GSRI-15	6.23	3.48	0.29	0.19		⊙	⊙	-	++
GSRI-16	5.98	3.97	0.43	0.23	⊙			-	++
GSRI-21	6.43	5.42	0.54	3.42		⊙		-	+++
GSRI-25	6.29	3.86	0.87	2.17			⊙	+	-
GSRI-27	5.57	2.87	0.28	3.85	⊙			-	++
GSRI-28	5.32	4.83	-	0.89	⊙	⊙	⊙	-	+
GSRI-29	6.07	3.97	0.51	2.17		⊙		-	+++
GSRI-31	6.29	2.45	0.18	4.78	⊙		⊙	-	++
GSRI-34	6.17	4.67	0.39	6.23		⊙		+	+
GSRI-37	6.01	3.23	0.53	3.79	⊙		⊙	-	++

Kudo 등(1990), Telmissen 등 (1991) 및 Davies 등(1993)은 혐기성 곰팡이들은 사양 체계뿐만 아니라 축종과 분리지역에 따라 서로 다른 분포를 보이며 같은 종으로 분류된 것이라 할지라도 숙주동물의 종류와 분리 부위에 따라서도 섬유소 분해력에는 상당한 차이를 나타낸다고 하였다. 또한, 한우에서 분리된 곰팡이 분리번호 GSRI-5, GSRI-13, GSRI-21 및 GSRI-29, 그리고 흰개미의 소화장에서 분리된 곰팡이 분리번호 GSMI-1, GSMI-7 및 GSMI-10는 clear zone의 지름이 25mm 이상으로 상당히 넓게 형성되어 cellulase 역가가 상당히 높은 균주일 것으로 생각되었다.

Table 1-7. 흰개미에서 분리한 혐기성 곰팡이의 발효특성과 섬유소 분해력

분리번호	pH	지방산과 젖산 생성량			배지중 성장양상			탁색도	섬유소 분해력
		Acetate	Butyrate	Lactate	색갈	점도	거품		
GSMI-1	5.34	2.54	0.17	1.68	⊙			-	+++
GSMI-4	5.82	3.43	0.25	2.43		⊙	⊙	+	++
GSMI-5	5.23	2.97	0.19	3.64	⊙		⊙	-	++
GSMI-7	5.86	3.15	-	4.92	⊙			-	+++
GSMI-8	6.07	4.87	0.36	3.12		⊙		-	++
GSMI-10	5.36	2.14	0.42	2.35	⊙	⊙		-	+++
GSMI-13	5.91	2.75	0.52	3.14		⊙	⊙	+	++
GSMI-14	6.02	3.18	0.39	4.07	⊙			-	++
GSMI-17	5.57	2.05	0.27	2.19	⊙		⊙	-	++

실제로 분리번호 GSRI-5, GSRI-13, GSRI-21, GSRI-29, GSMI-1, GSMI-7 및 GSMI-10를 벧짚을 기질로 5일간 배양하였을 경우, 벧짚의 건물 분해율이 각각 41.59, 46.54, 42.43, 55.39, 60.91, 59.43 및 61.10%로 나타났다. 이러한 벧짚의 소화율은 단일 미생물을 이용한 실험결과를 고려할 때, 매우 높은 수치였다.

Table 1-8. 한우와 흰개미에서 분리한 혐기성 곰팡이에 의한 벧짚의 건물 분해율(%)

분리번호	배양 시간 (일)					평균	표준 오차
	1	2	3	4	5		
GSRI-5	5.31	11.41	31.34	33.43	41.59	24.62	1.32
GSRI-13	9.23	19.21	30.32	37.31	46.54	28.52	1.08
GSRI-21	11.39	25.27	36.43	39.65	42.43	31.03	2.23
GSRI-29	9.21	21.32	36.21	48.29	55.39	34.08	1.87
GSMI-1	12.93	18.15	41.43	48.19	60.91	36.32	1.34
GSMI-7	15.02	19.45	45.32	48.98	59.43	37.64	0.89
GSMI-10	13.21	18.97	39.25	47.21	61.10	35.95	0.97

3) 분리 곰팡이의 형태적 특성과 분류학적 위치(동정)

분리한 곰팡이들에 대하여 광학현미경과 전자 현미경을 동원하여 형태적 특성을 관찰한 결과는 Table 1-9와 1-10에 각각 요약하였다.

Table 1-9. 한우의 십이지장에서부터 분리한 혐기성 곰팡이의 형태적 특성과 분류학적 위치

분리번호	성장양상	포자낭			유주자		가근모양	동정
		모양	크기	stalk	모양	flagella		
GSRI-2	mono	oval	35	+	oval	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRI-3	mono	globes	70	+	oval	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRI-5	poly	fusiform	115	+	globes	uni	filament	<i>Anaeromyces</i>
GSRI-6	poly	globes	60	+/-	globes	multi	filament	<i>Orpinomyces</i>
GSRI-7	mono	variable	30	+	oval	uni	filament	<i>Piromyces</i>
GSRI-9	mono	spherical	65	-	globes	uni	bulbous	<i>Caecomyces</i>
GSRI-11	mono	variable	45	+/-	oval	uni/bi	filament	<i>Piromyces</i>
GSRI-13	mono	globes	40	+	globes	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRI-15	mono	globes	35	+	oval	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRI-16	mono	globes	55	+	globes	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRI-21	mono	ellipsoidal	70	+/-	oval	uni	filament	<i>Piromyces</i>
GSRI-25	mono	oval	80	+	oval	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRI-27	poly	spherical	25	-	globes	multi	filament	<i>Orpinomyces</i>
GSRI-28	mono	spherical	40	-	oval	uni	bulbous	<i>Caecomyces</i>
GSRI-29	poly	globes	55	-	globes	multi	filament	<i>Orpinomyces</i>
GSRI-31	mono	spherical	40	-	globes	uni	filament	<i>Piromyces</i>
GSRI-34	mono	ellipsoidal	60	-	spheric	uni	filament	<i>Piromyces</i>
GSRI-37	mono	variable	80	+	oval	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>

혐기성 곰팡이는 유주자(zospore), 포자낭(sporangia) 및 가근(rhizoid)의 3가지 주요 부위로 구성되어 있으며, 이러한 구성요인들의 미세구조와 형태 및 크기는 속과 종을 분류하는데 기초자료가 된다. 또한, 성장 형태에 따라서 monocentric과 polycentric 곰팡이로 크게 구별하는데, 전자는 엽상체(Stalk)당 1개의 포자낭(sporangia)을 갖는데 반하여 후자는 다수의 포자낭을 가지며(Barr, 1988), polycentric 곰팡이는 rhizoidal system에 핵(nuclei)의 존재 여부에 따라서도 monocentric 곰팡이와 분류된다. 이와 같은 동정법에 의하여 한우의 십이지장에서 분리한 18종의 곰팡이는 Table 1-9에서와 같이 동정되었다.

Table 1-10. 흰개미의 소화장기로부터 분리한 혐기성 곰팡이의 형태적 특성

분리번호	성장 양상	포자낭			유주자		가근 모양	동정
		모양	크기	stalk	모양	flagella		
GSMI-1	mono	variable	45	+	oval	multi/bi	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-4	unknown	globes	60	+	oval	bi	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-5	poly	globes	80	+	globes	multi	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-7	unknown	fusiform	75	+	globes	uni	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-8	mono	variable	55	+	oval	uni/bi	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-10	unknown	spherical	70	+	globes	multi	unknown	<i>Unknown</i>
GSMI-13	poly	variable	70	+	oval	uni/bi	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-14	unknown	Fusiform	55	+	globes	uni	filament	<i>Unknown</i>
GSMI-17	unknown	variable	40	+	variable	multi	filament	<i>Unknown</i>

그러나 흰개미의 장내에서 분리한 곰팡이는 지금까지 문헌적으로 밝혀지고 있는 것과 매우 다른 모습을 보여 동정이 불가능하였고, 새로운 종들로 명명되어야 할 것으로 평가되었다. Cheng과 Selinger(1993)는 light microscope에 의한 속의 동정은 아주 손쉬운 방법이긴 하지만 많은 혼돈을 야기시킬 수 있기 때문에 정확한 동정을 위해서는 전자현미경적 관찰이 필수적으로 요구된다고 하였다. 따라서 전자 현미경을 동원하여 분리된 곰팡이들을 관찰하여 보았으나 광학 현미경에서와 마찬가지로 특이한 모습으로 나타났다. 성장형태가 특이하거나 사슴 뿔과 같은 모습을 하고 있는 포자낭의 모습, 고리를 연상케 하는 stalk(sporangiopore)의 괴이한 모습, stalk와 구별되지 않는 가근의 형태 등 문헌상으로 나타나지 않는 것들이 대부분이었다. 또한 지금까지는 흰개미의 장내에서 곰팡이가 분리되었다는 연구결과는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구를 통하여 흰개미의 장내에서 분리된 모든 혐기성 곰팡이들은 새로운 분류학적 위치에 포함시켜야 할 것으로 평가되었다.

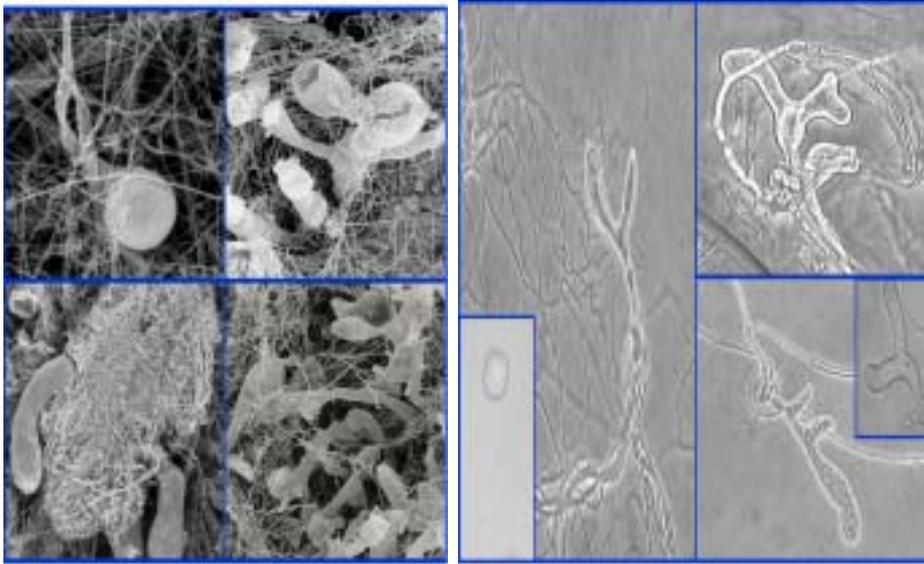


Figure 1-2. 흰개미의 장에서 분리한 혐기성 곰팡이 GSMI-7의 전자현미경(앞부분) 및 광학 현미경 (뒷부분) 사진. ^(주)성장형태와 사슴뿔과 같은 모습을 하고 있는 포자낭의 모습이 현재까지 밝혀진 혐기성 곰팡이와 많은 차이를 보임.

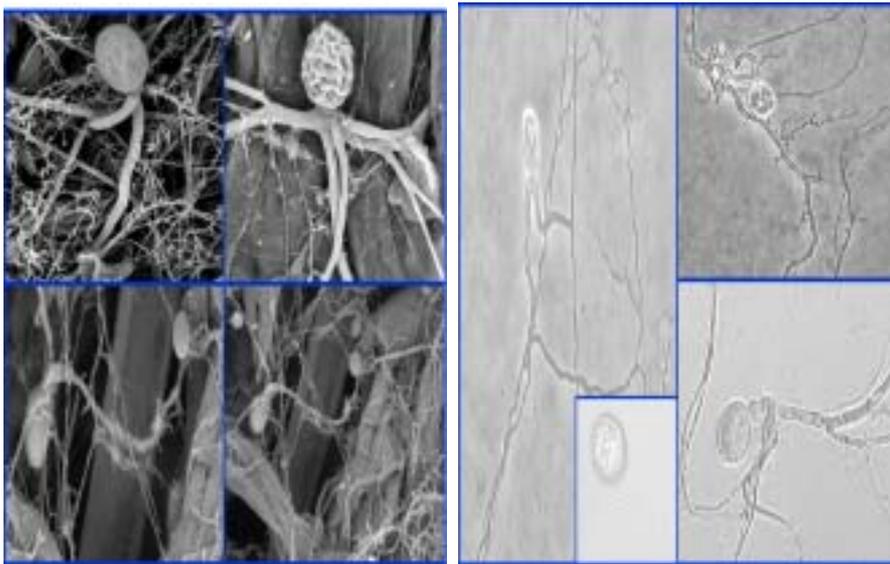


Figure 1-3. 흰개미의 장에서 분리한 혐기성 곰팡이 GSMI-10의 전자현미경(앞부분) 및 광학현미경(뒷부분) 사진. ^(주)성장형태와 stalk(sporangiopore)의 모습 그리고 가근의 형태가 현재까지 밝혀진 혐기성 곰팡이와 많은 차이를 보임.

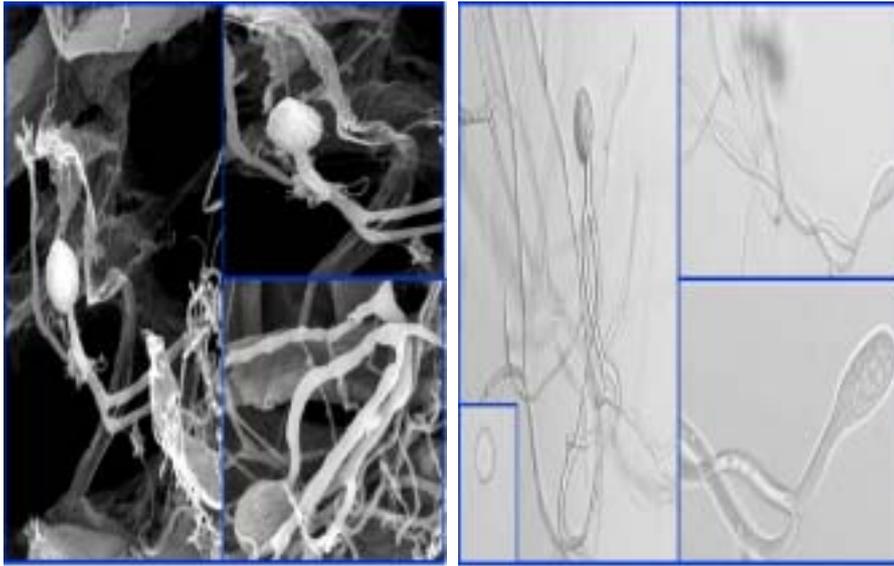


Figure 1-4. 흰개미의 장에서 분리한 혐기성 곰팡이 GSMI-14의 전자현미경(앞부분) 및 광학현미경(뒷부분) 사진. ^(주)성장형태와 stalk(sporangiopore)의 모습 그리고 가근의 형태가 현재까지 밝혀진 혐기성 곰팡이와 많은 차이를 보임.

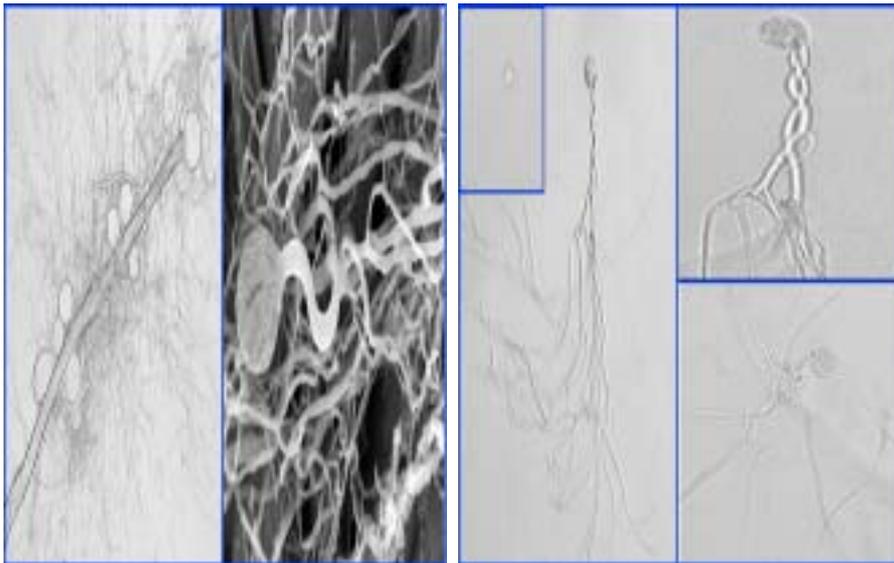


Figure 1-5. 흰개미의 장에서 분리한 혐기성 곰팡이 GSMI-17의 전자현미경(앞부분) 및 광학 현미경(뒷부분) 사진. ^(주)성장형태와 고리를 연상케 하는 stalk (sporangiopore)의 괴이한 모습 그리고 stalk와 구별이되지 않는 가근의 형태가 현재까지 밝혀진 혐기성 곰팡이와 많은 차이를 보임.

2. 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제 개발

가. 연구 수행내용

1) 섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명

가) 공시미생물: 1년차의 실험결과를 바탕으로 아래의 Table 1-11에 열거된 8종의 곰팡이를 사용하였다.

Table 1-11. 공시 미생물의 종류와 특성

분리번호	분리원	분리 승수	pH	지방산과 젖산 생성량			배지중 성장양상			탁 색 도	섬유소 분해력
				acetate	butyrate	lactate	색깔	점도	거품		
GSRI-05	한우	10 ⁻³	6.02	3.68	-	-			⊙	-	+++
GSRI-13	한우	10 ⁻⁴	6.19	5.42	0.97	0.32	⊙			-	+++
GSRI-21	한우	10 ⁻⁴	6.43	5.42	0.54	3.42		⊙		-	+++
GSRI-29	한우	10 ⁻⁵	6.07	3.97	0.51	2.17		⊙		-	+++
GSMI-01	흰개미	10 ⁻²	5.34	2.54	0.17	1.68	⊙			-	+++
GSMI-07	흰개미	10 ⁻²	5.86	3.15	-	4.92	⊙			-	+++
GSMI-10	흰개미	10 ⁻²	5.36	2.14	0.42	2.35	⊙	⊙		-	+++
GSMI-14	흰개미	10 ⁻³	6.02	3.18	0.39	4.07	⊙			-	++

나) 조사내용 : 공시한 8종의 곰팡이를 볏짚을 기질로한 발효조(*in vitro*)에 inoculation시킨 다음 발효시간의 경과에 따라 볏짚의 소화율과 발효조내의 섬유소 분해효소(cellulase, avicelase 그리고 xylanase)의 역가를 측정하였다.

다) 조사방법 : 효소역가를 측정하기 위하여 효소액(원심분리후 상층액) 0.5ml와 0.05M citrate buffer(pH 5.5)에서 1% CMC의 0.5ml과 혼합하였다. 1시간 동안 55℃에서 반응시켰으며 5분 동안 boiling하여 반응을 중지시켰다. Boiling 된 sample은 5분 동안 7,000rpm에서 원심분리 하였으며 상

층액에서 생성된 환원당은 Miller 등(1960)의 DNS(dinitrosalicylic acid) 방법을 이용하여 비색법으로 550nm에서 측정하였다. 효소활성의 one unit는 생성된 1mmol glucose을 분당 생성된 환원당과 똑같이 계산하여 효소의 양을 계산하였다. Xylanase 활성은 0.5M potassium phosphate buffer(pH 6.5)의 2% oat spelt xylan(w/v) 1ml을 이용하여 분석하였다. 구체적인 측정방법은 실험실 관행법(반추동물영양실험법, 2003, 서울대출판부; 하종규, 이성실, 고종열 저)에 따랐다.

2) 간이 사일리지 제조 시험 (미생물 성장률 조사)

- 가) 공시미생물 : “섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명” 실험결과를 바탕으로 3종의 곰팡이를 공시하였다.
- 나) 볏짚 사일리지의 제조 : 볏짚을 약 1cm 정도로 잘게 절단한 다음 수분 함량이 50% 정도 되게 멸균 증류수를 spray 하여 사일리지를 제조하였다. 세절된 볏짚은 20×50cm 크기의 비닐로 제작한 사일리지 bag에 500g씩 넣은 후 곰팡이 배양액 50mL를 접종하고 다시 500g의 볏짚을 첨가한 다음 vacuum 으로 가능한 모든 잔존 공기를 제거한 다음 heat sealing 하였다. 이 때의 접종량은 곰팡이가 최대 성장률을 나타낸 5일차 계대 배양액을 사용하였다. 또한 사일리지의 안전성을 위하여 비닐 bag을 3중으로 처리하였다.
- 다) 조사항목 : 사일리지 저장기간별(10, 30, 60, 90 및 120일) pH 및 NH₃-N의 변화, 볏짚의 화학적 함량(단백질, NDF 및 ADF) 변화 그리고 접종한 곰팡이 수의 변화 등을 조사하였다. 조사 방법은 실험실 관행법에 따랐다.
 - (1) 볏짚 사일리지내의 pH는 pH meter로 조사하였다.
 - (2) NH₃-N(암모니아태 질소) 분석: Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 phenol 용액으로 위액중의 암모니아를 발색시킨 후 spectrophotometer(Spectronics)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.
 - (3) 단백질, NDF 및 ADF 함량의 변화: 볏짚 사일리지중에 함유된 조단백질의 함량은 AOAC법(1990)에 준하여 분석하였고 NDF(neutral detergent fiber)와 ADF(acid detergent fiber) 함량은 Van Soest와 Goering(1984)의 방법에 준하여 분석하였다.

3) 볏짚 사료가치 증진에 미치는 영향 조사

가) 공시재료 : 30일 동안 발효된 볏짚 사일리지 4종 {무처리 볏짚 사일리지 1종, 곰팡이처리 (GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 곰팡이) 볏짚 사일리지 3종}을 공시하였다.

나) 조사항목 : 반추위 Fistula가 설치된 한우 2두 (진주산업대학교 부속사육장)를 이용하여 공시한 볏짚 사일리지의 *in situ* 건물 소화율을 측정하였다.

(1) Nylon bag의 규격 및 제작 방법

Nylon bag 제작용 천은 pore size 가 45 μm 인 NYTAL 25T (Swiss scree P/L Co. Ltd) 천을 사용하여 internal dimension 이 9 x 5 cm 크기로 제작 하였다.

(2) 반추위내에서의 건물 소실율의 측정

Nylon bag(NB)을 105 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 건조후 칭량한 후 분쇄한 볏짚 사일리지 시료를 약 5-6 g을 칭량하여 NB에 투입한다. NB를 Linnen 망에 넣어 39-40 $^{\circ}\text{C}$ 온수에 약 30분간 침지시킨 후 반추위에 주입한다. 그 후 배양 시간별(1, 3, 5 및 7일)로 NB를 반추위에서 회수한 다음 즉시 미생물 성장을 억제하기 위하여 얼음물에 침지한다. NB를 washing machine을 이용하여 30분간 세척하고 60 $^{\circ}\text{C}$ 의 환류 건조기에서 105 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 건조하여 칭량한 후 건물소실율을 측정 하였다.

$$\textcircled{1} \text{ 영양소 소실율(\%)} = \frac{\{\text{배양전 영양소 무게(A)} - \text{배양후 영양소 무게(B)}\}}{\text{배양전 영양소 무게(A)}} \times 100$$

나. 연구 수행 결과

1) 섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명

한우의 십이지장과 흰개미의 장내에서 분리한 8종의 곰팡이(GSRI-05, GSRI-13, GSRI-21, GSRI-29, GSMI-01, GSMI-07, GSMI-10 및 GSMI-14)를 벃짚을 기질로 한 발효조(in vitro)에 inoculation시킨 다음 발효시간의 경과에 따라 발효 조내의 cellulase 역가를 측정된 결과는 다음 Table 1-12에서와 같다.

Table 1-12. Extracellular cellulase activities(U/mL · h⁻¹) of the supernatant of medium containing rice straw as a carbon source incubated with anaerobic fungi isolated from the gut of ruminant and mites

Isolates No.	Incubation time (days)				mean	SEM
	1	3	5	7		
GSRI-05	3.70±0.27	5.47±0.54	6.73±0.49	6.84±0.33	5.69	0.42
GSRI-13	3.24±0.62	5.36±0.51	9.29±0.72	10.81±0.68	7.18	0.95
GSRI-21	3.61±0.55	6.67±0.37	8.68±0.71	8.70±0.76	6.92	0.68
GSRI-29	4.05±0.42	6.54±0.41	7.80±0.44	7.99±0.08	6.60	0.50
GSMI-01	4.31±0.31	8.21±0.49	9.73±0.29	12.52±0.60	8.69	0.91
GSMI-07	3.66±0.29	6.36±0.23	7.42±0.29	9.02±1.47	6.62	0.67
GSMI-10	4.10±0.19	6.80±0.71	10.12±0.13	14.04±1.23	8.76	1.16
GSMI-14	3.04±0.13	5.82±0.26	6.86±0.08	7.54±0.37	5.82	0.53
mean	3.71	6.41	8.33	9.68		
SEM	0.14	0.22	0.29	0.55		

배양기간중 평균 cellulase 활력이 7.0 U/mL · h⁻¹ 이상이 된 곰팡이는 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 이었다. 또한, 공시한 곰팡이 GSRI-05, GSRI-13, GSRI-21, GSRI-29, GSMI-01, GSMI-07, GSMI-10 및 GSMI-14의 배양 7일째 xylanase 효소 역가는 각각 12.18, 33.38, 17.84, 23.40, 31.33, 18.53, 32.60 및 15.99 U/mL · h⁻¹ 로서 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 곰팡이가 다소 높아 cellulase 활력에서와 비슷한 경향을 보였다(Table 1-13).

Table 1-13. Extracellular xylanase activities($U/mL \cdot h^{-1}$) of the supernatant of medium containing rice straw as a carbon source incubated with anaerobic fungi isolated from the gut of ruminant and mites

Isolates No.	Incubation time (days)				mean	SEM
	1	3	5	7		
GSRI-05	3.92±0.64	8.43±0.83	12.11±0.88	12.18±0.59	9.16	1.07
GSRI-13	7.13±0.44	28.15±0.94	35.93±8.25	33.38±2.55	26.15	3.49
GSRI-21	4.44±0.68	10.28±0.57	14.09±0.52	17.84±0.81	11.66	1.52
GSRI-29	4.98±0.52	13.43±3.95	14.04±0.80	23.40±1.44	13.96	2.17
GSMI-01	5.31±0.39	28.87±2.17	29.86±1.48	31.33±0.89	23.84	3.29
GSMI-07	4.50±0.36	9.80±0.36	13.36±0.52	18.53±4.18	11.55	1.79
GSMI-10	5.04±0.23	29.55±1.85	34.66±2.01	32.60±2.50	25.46	3.68
GSMI-14	3.74±0.16	13.45±1.60	15.66±1.86	15.99±1.18	12.21	1.61
mean	4.88	17.74	21.21	23.16		
SEM	0.25	1.91	2.06	1.73		

그러나 avicelase의 역가는 곰팡이 상호간에 뚜렷한 차이점이 없었지만 배양기간에 따라서는 배양 3일후부터 avicelase 효소 활성이 크게 증가하기 시작하였다. 배양 7 일째를 기준으로 보면, 공시한 8종의 곰팡이, GSRI-05, GSRI-13, GSRI-21, GSRI-29, GSMI-01, GSMI-07, GSMI-10, 그리고 GSMI-14가 분비하는 avicelase의 역가(extracellular avicelase activities($U/mL \cdot h^{-1}$))는 각각 4.29±0.31, 4.51±0.23, 4.99±0.18, 4.98±0.28, 5.92±0.27, 4.73±0.18, 5.36±0.31 그리고 4.41±0.07 U/mL 로서 흰개미의 장내에서 분리한 분리번호 GSMI-01와 GSMI-10의 avicelase 활성이 다른 곰팡이보다 다소 높은 경향이었다(Table 1-14). 또한 반추위에서 분리한 곰팡이의 효소 활성보다 흰개미에서 분리한 곰팡이들이 분비하는 효소의 활성이 더욱 높은 경향이었다.

공시한 8종의 곰팡이, GSRI-05, GSRI-13, GSRI-21, GSRI-29, GSMI-01, GSMI-07, GSMI-10, 그리고 GSMI-14에 의한 벃짚(기질)의 소화율 각각 37.58±1.90, 60.74±0.71, 41.97±1.33, 42.37±1.35, 61.03±4.47, 42.00±1.11, 64.12±2.60, 그리고 37.85±2.06%로서 조사되었다. 곰팡이에 의한 벃짚(기질)의 소화율 역시 효소활력에서와 마찬가지로 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10를 접종하였을 때 월등히 높게 나타났다(Table 1-15).

Table 1-14. Extracellular avicelase activities($\text{U/mL} \cdot \text{h}^{-1}$) of the supernatant of medium containing rice straw as a carbon source incubated with anaerobic fungi isolated from the gut of ruminant and mites

Isolates No.	Incubation time (days)				mean	SEM
	1	3	5	7		
GSRI-05	2.52±0.19	3.53±0.35	4.10±0.20	4.29±0.31	3.61	0.24
GSRI-13	2.24±0.42	3.66±0.33	4.19±0.14	4.51±0.23	3.65	0.29
GSRI-21	2.47±0.38	4.31±0.24	4.65±0.17	4.99±0.18	4.10	0.31
GSRI-29	2.76±0.29	4.26±0.30	4.79±0.05	4.98±0.28	4.20	0.28
GSMI-01	2.94±0.21	5.46±0.33	5.51±0.09	5.92±0.27	4.96	0.37
GSMI-07	2.50±0.20	4.11±0.15	4.50±0.43	4.73±0.18	3.96	0.29
GSMI-10	2.80±0.13	4.58±0.46	4.64±0.16	5.36±0.31	4.35	0.31
GSMI-14	2.07±0.09	3.80±0.15	4.53±0.22	4.41±0.07	3.70	0.30
mean	2.54	4.21	4.61	4.90		
SEM	0.10	0.15	0.10	0.13		

Table 1-15. Dry matter digestibility (%) of rice straw incubated with anaerobic fungi isolated from the gut of ruminant and mites

Isolates No.	Incubation time (days)				mean	SEM
	1	3	5	7		
GSRI-05	15.68±2.57	23.88±2.02	33.30±0.63	37.58±1.90	27.61	2.68
GSRI-13	28.51±1.75	40.16±1.21	53.90±7.67	60.74±0.71	45.83	3.84
GSRI-21	17.78±2.71	24.99±1.37	25.47±2.21	41.97±1.33	27.55	2.80
GSRI-29	19.93±2.07	26.56±2.13	31.77±1.14	42.37±1.35	30.15	2.58
GSMI-01	21.22±1.55	37.53±2.81	54.92±0.96	61.03±4.47	43.68	4.84
GSMI-07	18.01±1.44	24.34±1.67	33.92±2.74	42.00±1.11	29.57	2.87
GSMI-10	20.17±0.94	38.42±2.41	57.45±0.98	64.12±2.60	45.04	5.24
GSMI-14	14.96±0.63	25.68±2.19	28.52±1.94	37.85±2.06	26.75	2.58
mean	19.53	30.19	39.90	48.46		
SEM	0.99	1.51	2.63	2.31		

2) 간이 사일리지 제조 시험 (미생물 성장을 조사)

상기한 “섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명”의 실험결과를 바탕으로 3종의 곰팡이(GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10)를 접종하여 간이 볏짚 사일리지를 제조한 다음, 사일리지 보존 기간에 따라서 사일리지의 pH를 측정된 결과는 Table 1-16에서와 같다. 곰팡이의 첨가로 인해 30일째 시료에서 pH가 급격히 떨어지는 현상을 관찰 하였으나 그 외의 기간에서는 pH의 변화를 관찰하지 못했다.

Table 1-16. Effects of fungal inoculations on pH values during the ensiling procedure of rice straw silage

Isolates No.	Days of ensiling					mean	SEM
	10	30	60	90	120		
Control	5.63±0.22	5.40±0.12	4.53±0.12	4.20±0.06	4.22±0.08	4.94	0.19
GSRI-13	5.57±0.18	5.10±0.12	4.37±0.12	4.13±0.12	4.21±0.07	4.79	0.18
GSMI-01	5.53±0.12	4.97±0.12	4.20±0.06	4.17±0.09	4.13±0.12	4.72	0.18
GSMI-10	5.53±0.12	4.70±0.12	4.33±0.15	4.17±0.03	4.07±0.13	4.68	0.17
mean	5.57	5.04	4.36	4.17			
SEM	0.07	0.09	0.06	0.04			

일정 기간 저장이 완료된 볏짚 사일리지를 수거하여 볏짚중의 조단백질 함량을 측정된 결과는 Table 1-17에서와 같다. 무처리 사일리지에 비하여 곰팡이를 처리한 사일리지중의 조단백질 함량이 배양 10일째 시료부터 급격히 증가하는 경향을 보였으나 그 이후의 시료에서는 무처리 볏짚에 비해 곰팡이 처리 볏짚이 다소 높은 경향이였다.

Table 1-17. Effects of fungal inoculations on crude protein levels(%) during the ensiling procedure of rice straw silage

Isolates No.	Days of ensiling					mean	SEM
	10	30	60	90	120		
Control	4.80±0.21	5.13±0.22	5.10±0.21	5.23±0.09	5.47±0.09	5.15	0.10
GSRI-13	5.20±0.06	5.37±0.18	5.87±0.18	5.07±0.09	5.47±0.15	5.39	0.11
GSMI-01	5.27±0.09	5.23±0.03	5.47±0.09	5.23±0.30	5.57±0.20	5.35	0.08
GSMI-10	5.10±0.21	5.30±0.21	5.40±0.17	5.57±0.19	5.50±0.12	5.37	0.09
mean	5.09	5.26	5.46	5.28	5.50		
SEM	0.09	0.08	0.12	0.10	0.06		

NH₃-N 농도 역시 조단백질 함량에서와 마찬가지로 배양 10일째 시료에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 그 이후의 시료에서는 처리에 관계 없이 유사하였다(Table 1-18).

Table 1-18. Effects of fungal inoculations on NH₃-N levels(mg/100mL) during the ensiling procedure of rice straw silage

Isolates No.	Days of ensiling					mean	SEM
	10	30	60	90	120		
Control	0.96±0.04	1.13±0.05	1.02±0.04	1.10±0.06	1.24±0.05	1.09	0.03
GSRI-13	1.04±0.01	1.11±0.05	1.17±0.04	1.01±0.02	1.13±0.04	1.09	0.02
GSMI-01	1.05±0.02	1.19±0.01	1.09±0.02	1.05±0.06	1.45±0.27	1.17	0.07
GSMI-10	1.02±0.04	1.26±0.03	1.08±0.03	1.11±0.04	1.18±0.06	1.13	0.03
mean	1.02	1.17	1.09	1.07	1.25		
SEM	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07		

사일리지중의 NDF 함량(Table 1-19)과 ADF 함량(Table 1-20) 역시 배양 10일째 시료에서 다소 감소하기 시작하였으나 그 이후 시간대에서는 10일째의 NDF 수준을 그대로 유지하는 경향이였다. 볏짚 사일리지 90일간의 저장기간중 평균 ADF 함량은 Control, GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 처리구에서 각각 50.41, 47.84, 46.61 및 47.59% 이였다. 볏짚 사일리지에 곰팡이를 처리하여 감소된 ADF 함량의 대부분은 곰팡이 접종후로부터 발효 10일째 까지 감소된 것이였다.

Table 1-19. Effects of fungal inoculations on NDF(neutral detergent fiber) levels(%) during the ensiling procedure of rice straw silage

Isolates No.	Days of ensiling					mean	SEM
	10	30	60	90	120		
Control	75.77±0.82	74.33±1.48	75.63±1.00	73.98±0.86	74.70±0.86	74.88	0.49
GSRI-13	72.60±1.57	72.48±1.68	72.62±1.55	72.40±0.60	72.06±0.62	72.43	0.48
GSMI-01	71.67±0.34	71.66±0.82	70.69±0.90	70.39±0.42	69.52±0.52	70.79	0.36
GSMI-10	74.33±1.28	73.01±0.78	72.55±0.39	71.61±2.26	70.99±1.22	72.50	0.66
mean	73.59	72.87	72.87	72.10	71.82		
SEM	0.67	0.61	0.62	0.67	0.68		

Table 1-20. Effects of fungal inoculations on ADF(acid detergent fiber) levels(%) during the ensiling procedure of rice straw silage

Isolates No.	Days of ensiling					mean	SEM
	10	30	60	90	120		
Control	50.77±0.82	49.71±0.26	50.81±1.02	50.33±0.62	51.26±0.67	50.58	0.34
GSRI-13	48.49±0.65	47.51±0.85	47.53±1.62	47.84±0.20	49.37±0.53	48.15	0.33
GSMI-01	47.99±0.19	46.18±0.39	45.50±0.72	46.87±0.91	48.62±1.45	47.04	0.50
GSMI-10	48.97±0.87	46.67±0.87	46.72±0.23	48.01±0.85	47.84±0.80	47.64	0.41
mean	49.05	47.52	47.64	48.39	49.27		
SEM	0.43	0.49	0.66	0.47	0.55		

저장 기간별 볏짚 사일리지중의 혐기성 곰팡이의 수를 측정 한 결과는 다음 Table 1-21에서와 같다. 사일리지 발효 10일후의 미생물 수는 무처리(control), GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 처리(접종) 사일리지에서 사일리지 1g당 각각 0.3, 52.33, 89.33 및 140.33×10²tfu의 곰팡이가 발견되었다. 발효 30일까지는 무처리 사일리지에 비해 곰팡이 첨가사일리지에서 많은 수의 곰팡이가 관찰되었으나 발효 60일 이후부터는 처리간 곰팡이의 수에 큰 차이가 없었다. 이 결과는 접종한 곰팡이들이 발효 전 기간동안 성장하지 못하고 발효 초기에 생존을 유지하다가 30일 이후부터는 접종 곰팡이가 사멸하기 때문인 것으로 생각된다. 곰팡이 수를 관찰한 결과는 앞에서 조사하였던 pH, 조단백질 함량, 암모니아 농도 및 섬유소 물질의 변화에 대한 결과치 들을 매우 잘 반영하였다.

Table 1-21. Effects of microbial inoculations on fungal populations(tfu: thallus forming unit) during the ensiling procedure of rice straw silage

Isolates No.	Days of ensiling				
	10	30	60	90	120
Control	3.00±0.58×10 ¹	3.67±0.67×10 ¹	5.33±0.88×10 ¹	2.67±0.88×10 ¹	1.25±0.76×10 ¹
GSRI-13	52.33±13.02×10 ²	9.00±1.15×10 ²	7.33±1.20×10 ¹	2.33±0.33×10 ¹	0.89±0.65×10 ¹
GSMI-01	89.33±17.13×10 ²	14.33±1.86×10 ²	4.00±1.53×10 ¹	3.00±0.58×10 ¹	1.07±0.52×10 ¹
GSMI-10	140.33±32.75×10 ²	37.33±9.96×10 ²	5.00±1.15×10 ¹	2.00±0.58×10 ¹	0.18±0.07×10 ¹

3) 볏짚 사료가치 증진에 미치는 영향 조사

30일 동안 발효된 볏짚 사일리지 4종 (무처리 볏짚 사일리지 1종, 곰팡이처리 (GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 곰팡이) 볏짚 사일리지 3종)을 공시하여 반추위 fistula가 설치된 한우의 반추위에서 nylon bag 실험을 수행하여 볏짚 사일리지의 건물 소화율을 측정 한 결과는 다음 Table 1-22에서와 같다. 반추위 배양 48시간 후의 건물 소화율은 Control, GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 처리구에서 각각 42.48, 48.51, 47.03 및 52.33%로서 곰팡이 처리에 의해 소화율이 많이 개선되었다. 반추위 발효시간을 평균한 소화율은 각각 34.30, 38.93, 38.31 및 41.20%로서 GSRI-13, GSMI-01 및 GSMI-10 처리에 의해 소화율이 각각 12%, 10% 그리고 17% 정도 개선되는 효과가 있었다. 따라서 혐기성 곰팡이를 볏짚 사일리지에 접종하여 사일리지의 품질을 높이기 위해서는 접종후 빠른 시간내에 곰팡이 균이 성장할 수 있는 조건을 확보하는 것과 접종된 곰팡이균이 사일리지내에서 생존할 수 있는 기간을 연장시키는 방법을 모색하는 것이 실험의 목적을 달성하기 위한 관건이라고 생각되었다. 앞으로 남은 연구기간동안 이러한 문제점을 해결하는데 최선을 다할 생각이다.

Table 1-22. Effects of fungal inoculations on *in situ* dry matter degradability(%) of rice straw ensiled for 30 days in the rumen of Korean native cattle

Isolates No.	Fermentation time (hours)				mean	SEM
	12	24	48	72		
Control	15.33±0.48	33.33±0.67	42.48±0.61	46.06±0.85	34.30	3.60
GSRI-13	18.13±0.75	36.51±0.49	48.51±1.87	52.55±2.00	38.93	4.06
GSMI-01	18.39±0.48	38.66±2.31	47.03±0.65	49.17±1.63	38.31	3.72
GSMI-10	17.36±0.68	38.22±0.87	52.33±0.90	56.88±0.29	41.20	4.65
mean	17.30	36.68	47.59	51.17		
SEM	0.45	0.84	1.11	1.34		

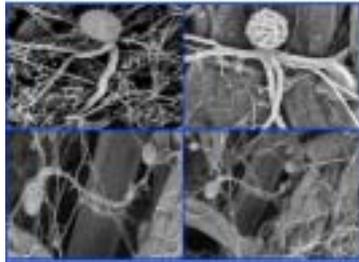
3. 곰팡이(제1세부), 효모(제2세부) 및 transgenic 미생물(제3세부)을 종합한 최종 발효제의 개발

가. 연구 수행내용

1) *In vitro* 시험을 통한 미생물간 상호작용 구명

가) 공시미생물: 제 1세부과제에서 선발된 곰팡이균 와 제 2세부과제에서 선발된 효모균, 그리고 제 3 세부과제에서 사용된 *Fibrobacter succinogenes* 세균 등 총 3종의 미생물을 공시하였다.

(1) 곰팡이 : 제 1세부과제에서 확보한 GSMI-10



(2) 효모 : 제 2세부과제에서 확보한 KCTC-6694

(3) 박테리아 : 제 3세부과제에서 확보한 ATCC-19169

나) 공시미생물을 혼합 배양한 다음, 배양 12, 24, 48 그리고 72시간 후에 각각의 미생물 수를 측정하여 미생물 상호작용을 구명하였다.

다) 배양배지는 상업용 혐기배양배지(anaerobic medium)를 이용하였고, 미생물 조작의 전체 과정들은 Hungate의 anaerobic gassing system을 이용하여 혐기상태에서 수행되었다.

라) 박테리아의 수, 효모의 수 그리고 곰팡이의 수는 이 등(1995)이 이용한 방법과 동일한 방법을 이용하여 혐기상태를 유지하며 Roll-tube법으로 측정하였다.

2) 적정 부형제 및 delivery system의 개발

- 선발 동정된 미생물의 delivery system은 각각 대량으로 액상 배양한 다음 동결건조하여 동결 건조된 미생물을 적정수준의 부형제와 보조 첨가제로 혼합한다.

- Prebiotics(보조첨가제) : 미생물 복합체가 벗짚 사일리지내에서 우점균과 부착율이 증가될 수 있고 미생물의 성장률을 최대화 할 수 있는 prebiotics를 선발한다.

- 부형제의 선발하여 이를 이용한 Delivery system을 개발한다.

3) 최종 발효제의 보존성 및 효과 검증 시험

가) 발효제의 제조

각각의 세부과제에서 선발된 미생물 3종, 박테리아, 효모 및 곰팡이를 각각 Dehority, LB 및 Lowe 배지에서 대량으로 액상 배양한 다음, 동결건조하였다. 동결 건조된 미생물들을 동량으로 혼합한 다음, 완전히 건조된 보조첨가제, 글루코만난올리고 당(Bio-Mos)과 벤토나이트(혼합수준은 부형제의 0.05%) 그리고 부형제, 밀기울(건조된 미생물을 부형제의 0.45% 수준)을 비율에 따라 혼합하여 진공포장 하였다.

나) 최종 발효제의 보존성 시험

미생물 복합제제의 보존 안정성 조사는 저장기간별(20, 40, 60 그리고 80일간)로 진공포장된 발효제속의 미생물의 수를 조사하여 보존성을 측정하였다. 미생물 수의 측정은 “1) *In vitro* 시험을 통한 미생물간 상호작용 구명”에서와 동일한 방법으로 수행되었다.

다) 최종 발효제의 효과 검증 시험

- (1) 공시발효제 : 진공포장되어 20일간 보존된 최종발효제(위 가)항 참고}를 공시하였다.
- (2) 처리구 : 무처리구와 최종발효제 첨가구를 두어, 무처리구에는 동결 건조된 미생물 혼합물이 제외된 보조첨가제와 부형제만을 벗짚 사일리지내에 첨가하였고 최종발효제 첨가구에는 진공포장되어 20일간 보존된 최종발효제를 첨가하였다.
- (3) 벗짚 사일리지의 제조 : 벗짚을 약 1cm 정도로 잘게 절단한 다음 수분 함량이 50% 정도 되게 멸균 증류수를 spray 하여 사일리지를 제조하였다. 세절된 벗짚 1,000g과 최종발효제 100g을 20×50cm 크기의 비닐로 제작한 사일리지 bag에 혼합하여 넣은 다음, vaccum으로 가능한 모든 잔존 공기를 제거한 다음 heat sealing 하였다. 또한 사일리지의 안전성을 위하여 비닐 bag을 3중으로 처리하였다.
- (4) 조사항목 : 사일리지 저장기간별(10, 30, 60, 90일) pH, 발효온도, 벗짚 사일리지중의 단백질 함량변화, 사일리지의 *in vitro* 소화율(72시간), 그리고 접종한 미생물 수의 변화 등을 조사하였다. 예정된 저장기간이 완료되면 사일리지를 개봉하여 pH meter로 pH를 측정하고, 탐침 온도계를 이용하여 사일리지 중앙부의 온도를 측정하였다. 사일리지를 혐기글로브박스에서 멸균 증류수로 세척한 다음 세척액중의 미생물을 계수하였다. 사일리지 벗짚은 건조한 다음 AOAC(1990) 방법으로 단백질을 측정하였고, 이 시료를 기질로하여 *in vitro* 건물 소화율을 측정하였다. 구체적인 실험방법은 실험실 관행법(반추동물영양학실험법, 2002)에 따랐다.

나. 연구 수행결과

1) *In vitro* 시험을 통한 미생물간 상호작용 구명

제 1세부과제에서 흰개미의 장내로부터 분리·선발된 곰팡이균(GSMI-10), 제 2세부과제에서 선발된 효모균(ATCC-19169) 그리고 제 3 세부과제에서 확보한 박테리아(ATCC-19169), *Fibrobacter succinogenes* 등 총 3종의 미생물을 혼합 배양한 다음 배양시간의 경과에 따라 배양액중의 미생물 수를 측정된 결과는 다음 Table 1-23에서와 같다.

Table 1-23. Populations of bacteria, yeast and fungi in the supernatant of co-cultured test-tube

Microbial populations	Incubation times (h)			
	12	24	48	72
Bacteria				
cell count, cfu ¹⁾ ×10 ⁹	4.98±0.35 ^A	4.14±0.48	5.85±0.09	9.13±0.09
Yeast				
live cell, cell×10 ³	12.12±4.21	nd ³⁾	0.67±1.31	nd
Fungi				
zoospore, tfu ²⁾ ×10 ²	nd	nd	nd	nd

^AMean±standard error.

¹⁾cfu:cell forming unit. ²⁾tfu:thallus forming unit. ³⁾nd:not detected.

Table 1-23에서 보는 바와 같이, 박테리아, 효모 그리고 곰팡이를 혼합하여 혐기적으로 접종·배양한 다음, 12시간이 경과하면 박테리아만 우점하게 되고 나머지 미생물들은 액체 배지 속에서 성장하지 못한다는 사실을 알게 되었다. 따라서, 벧짚 사일리지용 미생물 복합 첨가제의 개발을 위해서는 각각의 미생물을 단독으로 대량 배양한 다음, 부형제 등을 이용하여 delivery system이 개발되어야 하는 필요성이 대두되었다.

2) 적정 부형제 및 delivery system의 개발

각각의 세부과제에서 선발된 미생물 3종에 대한 delivery system은 각각의 미생물을 대량으로 액상 배양한 다음, 동결건조하여 동결 건조한 미생물을 적정수준의 부형제와 보조첨가제로 혼합하여 분말화하여 유통이 가능하게 하였다.

보조첨가제의 선발은 미생물 복합체가 볏짚 사일리지내에서 우점균과 부착율이 증가될 수 있고 첨가 미생물의 성장률이 최대화가 될 수 있도록 현재 상업적으로 많이 이용되고 있는 글루코만난올리고 당(Bio-Mos)과 부착율을 보조하기 위한 수단으로 다공성물질인 벤토나이트를 보조 첨가제로 선정하였고 첨가수준은 부형제의 0.05% 수준으로 결정하였다. 선발된 3종 미생물의 희석비율은 미생물의 성장속도와 성장률 및 배가시간 등을 고려하여 균종 등량 혼합 희석법을 적용하였다.

미생물의 delivery system은 각각 대량으로 액상 배양한 다음, 동결건조하여 건조된 미생물을 부형제의 0.50% 수준이 되게 혼합하여 사용하였다.

부형제는 부형제의 가격, 부형제의 확보 용이성, 부형제의 흡습력, 미생물과의 희석 용이성 및 미생물의 보존성 등을 조사·분석하여 옥수수 가루, 밀기울, 쌀겨 중에서 최종적으로 밀기울을 선정하였고 첨가수준은 부형제의 0.45% 수준으로 결정하여 볏짚 사일리지용 미생물 첨가제를 개발하였다.

3) 최종 발효제의 효과 검증 시험

가) 미생물 복합제제의 보존 안정성 조사는 저장기간별로 첨가한 미생물의 생존성을 조사하여 보존성을 측정하였다. 환언하면 동결 건조된 미생물과 보조첨가제 및 부형제를 혼합한 개발 제품의 유통기한을 알아보기 위하여 저장기간별로 개발품 내의 미생물 수를 조사하였다(Table 1-24). 저장 기간이 20, 40, 60 그리고 80일이 경과하여도 개발제품내의 미생물 수는 줄어들지 않는 것으로 조사되어 보존성이 매우 높은 것으로 생각되었다.

Table 1-24. Populations of bacteria, yeast and fungi in the microbial additives for rice straw silage

Microbial populations	Preservation days (d)			
	20	40	60	80
Bacteria				
cell count, cfu ¹⁾ ×10 ⁹	5.62±0.76 ^A	6.41±0.54	4.21±0.94	7.29±0.18
Yeast				
live cell, cell×10 ⁵	3.12±0.09	2.55±0.72	3.69±0.78	1.59±0.54
Fungi				
zoospore, tfu ²⁾ ×10 ⁴	2.43±0.17	2.47±0.98	2.95±0.45	1.93±0.29

^AMean±standard error.

¹⁾cfu:cell forming unit. ²⁾tfu:thallus forming unit. ³⁾nd:not detected.

나) 최종 개발된 발효제를 첨가하여 볏짚 사일리지를 제조한 다음, 사일리지의 저장기간별(10, 30, 60, 90일)로 pH, 발효온도, 볏짚 사일리지중의 단백질 함량변화, 암모니아태 질소 함량, 볏짚 사일리지의 in vitro 72시간 소화율, 그리고 집중한 미생물 수(박테리아, 효모 그리고 곰팡이)의 변화 등을 조사함으로써 최종 발효제의 효과 검증시험을 수행한 결과는 Table 1-25에서 보는 바와 같다.

Table1-25. Effects of microbial additives on fermentation parameters during the ensiling procedure of rice straw silage

Microbial populations	Days of ensiling (d)			
	10	30	60	90
pH				
Control	5.72±0.39 ^A	5.47±0.72	4.63±0.31	4.21±0.14
Microbial	5.56±0.46	4.82±0.06	4.33±0.09	4.17±0.18
Temperature (°C)				
Control	33.12±0.03	34.27±0.04	35.21±0.12	36.25±0.04
Microbial	34.25±0.05	35.47±0.05	33.69±0.31	37.32±0.07
Protein contents (%)				
Control	4.83±0.47	4.87±0.59	5.13±0.41	4.96±1.37
Microbial	5.13±0.76	5.32±0.73	5.42±0.23	4.96±0.68
NH₃-N levels (mg/100mL)				
Control	1.16±0.02	1.64±0.07	1.03±0.04	1.87±0.13
Microbial	1.03±0.06	1.26±0.72	1.72±0.09	1.38±0.03
Bacterial population				
Control, cfu×10 ⁸	4.36±0.37	13.67±0.49	9.68±0.71	16.32±0.44
Microbial, cfu×10 ⁸	12.42±6.25	25.46±8.24	17.23±6.03	12.64±0.72
Yeast population				
Control, cfu×10 ²	nd	nd	nd	nd
Microbial, cfu×10 ²	0.25±0.76	nd	nd	nd
Fungal population				
Control, tfu×10 ²	nd	nd	nd	nd
Microbial, tfu×10 ²	0.04±0.01	nd	nd	nd
In vitro 72h digestibility (%)				
Control	43.22±0.37	44.56±0.64	47.21±0.59	46.17±0.43
Microbial	44.14±0.29	47.72±0.17	49.97±1.37	48.26±1.25

^AMean±standard error.

¹⁾cfu:cell forming unit. ²⁾tfu:thallus forming unit. ³⁾nd:not detected.

Table 1-25에서와 같이, 최종 개발된 발효제를 첨가한 볏짚 사일리지의 pH는 무첨가 볏짚 사일리지의 pH에 비해 낮았으며 발효온도는 다소 높은 경향을 보였다. 이는 발효제의 첨가로 인해 사일리지 발효가 다소 높게 일어났다는 것을 의미하는 것이다. 이와 더불어 사일리지 초기 발효시, 사일리지내의 단백질 함량 역시 발효제의 첨가로 증가하였다. 그러나 사일리지 후기 발효(사일리지 발효 60일 이후)에서는 사일리지내의 단백질 함량에 처리구간 차이가 나타나지 않았다.

한편, 최종 개발된 발효제의 첨가로 인하여 볏짚사일리지내의 박테리아 수는 증가하는 경향이었으나, 점종한 효모나 곰팡이는 발효 10일간을 제외하고는 전혀 검출(detection)되지 않았다. 이는 볏짚 사일리지가 발효되면서 단일 미생물군(homo fermentation)이 우점하였기 때문으로 생각된다. 첨가제를 투여시켜 발효된 볏짚 사일리지의 *in vitro* 소화율이 무첨가 볏짚 사일리지 보다 증가되는 경향이였다.

제 2 절 유기산 이용 단백질 합성 혐기·내산성 SCP 생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발 (제 2세부과제)

1. 단백질을 합성하는 혐기 내산성 SCP 생산용 효모의 탐색과 선발

가. 연구 수행 내용

- 1) SCP 생산을 위한 효모균의 문헌적 탐색: NRRL, ATCC, BCCM, CBS, KCTC, DSMZ, IMI, JCM 및 WDCM 등의 자료와 Internet 정보를 검색을 통하여 유기산을 이용하여 단백질을 합성하고, 내산성이며, 혐기성이고, 성장률이 높은 효모들을 탐색하였다.
- 2) 위의 자료들을 토대로 검색된 약 5종정도의 효모균이나 변종을 관련 기관으로부터 분양 받거나 구입하였다.
- 3) 확보된 미생물을 벧짚 기질로 산성과 중성의 환경에서 배양시킨 다음 발효특성을 조사하여 최종적으로 벧짚 발효제로 이용될 효모나 박테리아를 선발하였다.

나. 연구 수행 결과

1) 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물(효모)의 탐색과 선발

벧짚 곤포사일리지 제조사의 벧짚 기질의 물리적·화학적 특성과 최종 벧짚 발효제의 환경을 고려하여 온도, 수소이온 농도, 산소 및 성장률 등을 고려하여 mesophile(20~45℃), acidophile(pH 3.5~5.0), 편성혐기성(facultative aerobes) 및 성장률(growth rates)이 매우 빠른 미생물들을 아래의 Table 2-1에 나타난 문헌들을 탐색하고 인터넷 정보 검색망을 통하여 선발하였다.

Table 2-1. 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물을 선발하기 위하여 탐색한 문헌

탐색문헌
: ARS Culture Collection(NRRL),
: American Type Culture Collection(ATCC),
: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM)
: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)
: Korean Collection for Type Culture(KCTC),
: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)
: International Mycological Institute Fungi Catalogue(IMI)
: Japan Collection of Microorganisms(JCM)
: World Data Center for Microorganisms(WDCM)

2) 탐색 효모의 구입

문헌과 미생물자원 data base 검색작업을 통하여 선발된 미생물들은 미국의 미생물자원 보존 센터(ATCC; American Type Culture Collection)와 우리나라의 유전자은행(KCTC; Korean Collection for Type Cultures)에서 구입하였다. 그 종류는 ATCC 18790(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen), KCTC 6994(*Hemicola grisea* var. thermoidea) 및 KCTC 7219(*Candida glabrata*)로 3종의 효모이다(Table 2-2). 이 효모는 YPD(Barto[®] YPD., Yeast extract-Peptone-Dextrose) broth 배지를 사용하여 37°C에서 3일에 1회씩 계대 배양시켰다.

Table 2-2. Yeast strains used in the experiment

Strain No.	Scientific Name	Isolation	Optimum
		Sources	Temp.(°C)
ATCC ¹⁾ 18790	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, teleomorph, budding yeast	Grape	30
KCTC ²⁾ 6994	<i>Candida glabrata</i> var. thermoidea	Mushroom	45
KCTC ²⁾ 7219	<i>Candida glabrata</i> / <i>Torulopsis glabrata</i>	Faeces	25

¹⁾ ATCC : American Type Culture Collection.

²⁾ KCTC : Korean Collection for Type Cultures.

3) 미생물의 성장률과 발효특성 조사

문헌과 미생물자원 data base 검색작업을 통하여 선발된 박테리아 2종과 효모 3종에 대하여 배지 (박테리아는 total plate count agar 배지, 효모는 YPD agar 배지 사용)에서의 성장률을 측정하였다. 일반 배지{pH가 중성(≒ 6.5)}와 산성에서의 성장률을 측정하기 위하여 산성배지는 염산을 이용하여 pH를 5.0으로 낮췄다. 일반 배지와 산성 배지에서 미생물의 성장률을 측정한 결과는 Figure 2-1과 Figure 2-2에서 각각 보는 바와 같다.

그림에서 보듯이 일반배지에서는 YEA-3의 성장률이 가장 낮았으나 산성배지에서는 성장률이 확연히 회복되었다. 일반 배지에서는 12시간 후부터 성장이 진행되었지만 산성배지에서는 3시간 후부터 급격히 성장하는 것으로 나타났다.

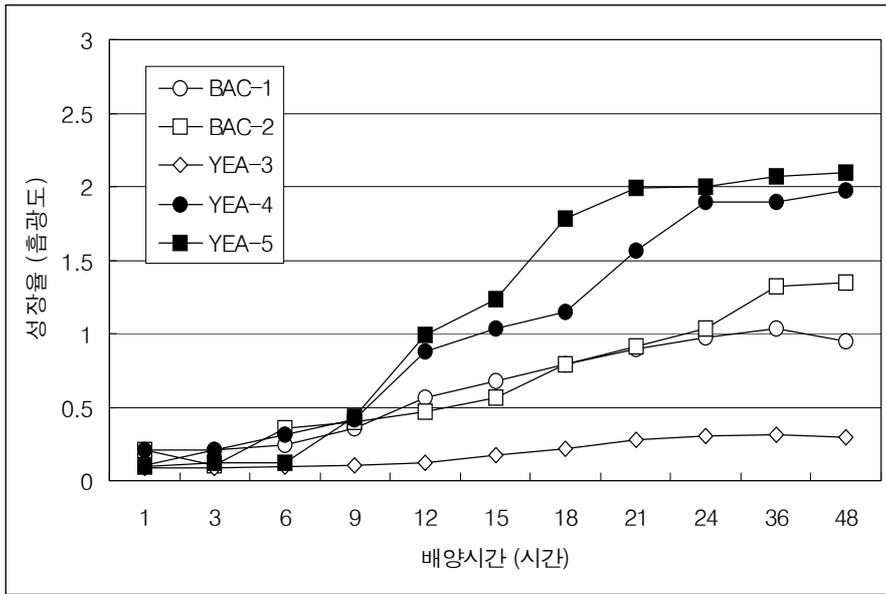


Figure 2-1. 선발된 미생물에 대한 일반 배지에서의 배양시간에 따른 성장률의 측정.

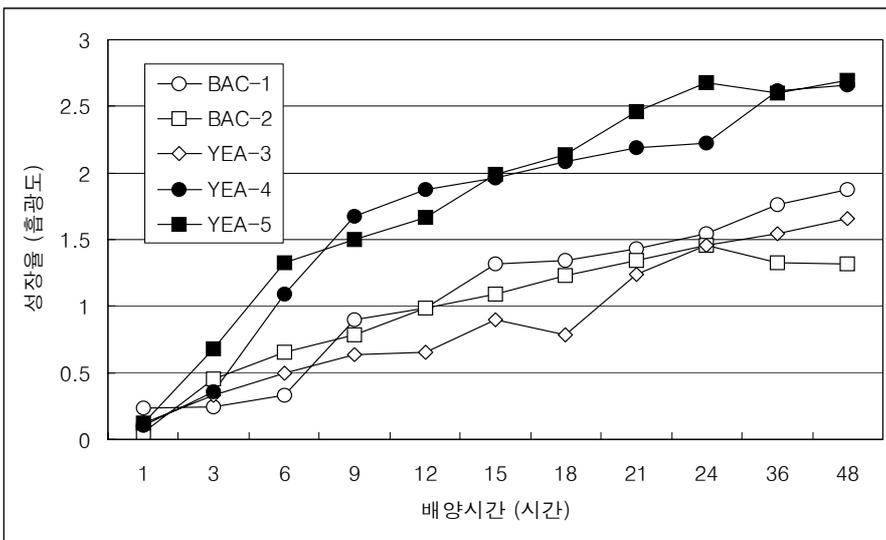


Figure 2-2. 선발된 미생물에 대한 산성 배지에서의 배양시간에 따른 성장률의 측정.

일반 배지와 산성 배지에서 구입 미생물들을 배양하였을 경우 pH의 변화는 Figure 2-3과 Figure 2-4에 각각 나타내었다. 미생물의 성장률에서와 마찬가지로 일반 배지에서는 9~12시간 후부터 pH가 급격히 감소하였으나 산성배지에서는 3시간 후부터 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 배양 2일 후의 최종 pH는 4 이하로서 산성조건하에서도 구입한 미생물들은 성장이 왕성히 이루어졌으며 이는 내산 혐기성 발효제 개발에 가능성을 충분히 보여준 결과였다. 특히, 박테리아보다 효모의 내산성이 더 강했으나 YEA-3은 pH의 감소가 거의 일어나지 않았는데 이는 이 미생물이 성장률이 매우 낮았기 때문이라고 생각된다. 따라서 YEA-3 효모는 발효제 개발의 원종 미생물로 적합하지 않다고 평가되었다.

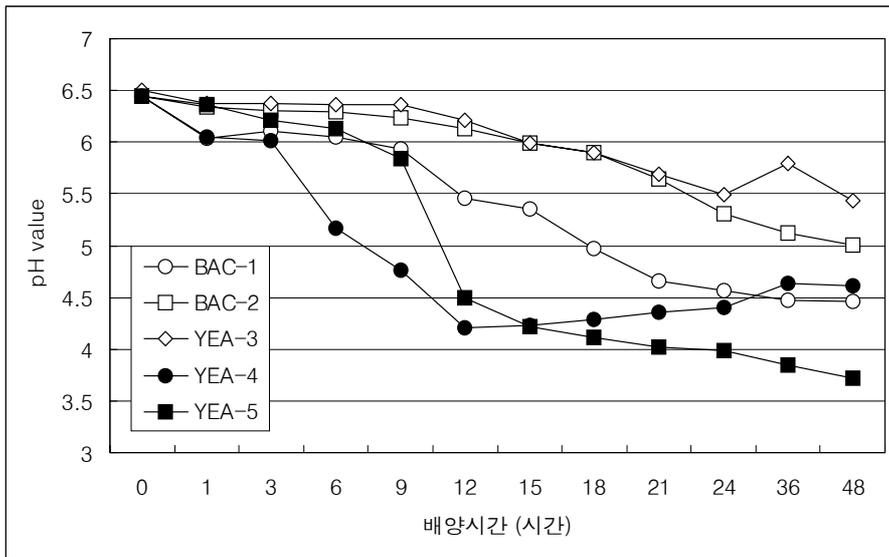


Figure 2-3. 선발된 미생물에 대한 일반 배지에서의 배양시간에 따른 pH의 변화.

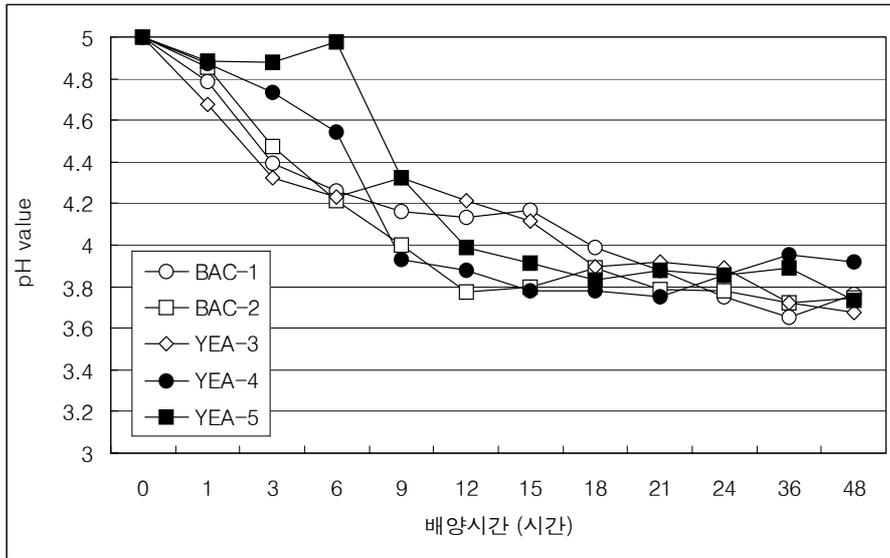


Figure 2-4. 선발된 미생물에 대한 산성 배지에서 배양시간에 따른 pH의 변화.

일반 배지와 산성 배지에서 구입 미생물들 배양한 다음 배양시간에 따라 배양액 중의 생균수를 측정된 결과는 Table 2-3과 Table 2-4에 각각 나타내었다. 초기 생균수는 박테리아가 높았으나 배양 24시간 후부터는 효모의 생균수가 높은 것으로 조사되었다. 배양 배지별로는 산성배지에서 배양했을 때보다 중성배지에 배양했을 때 높은 생균수를 보였다.

Table 2-3. 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물에 대한 일반배지에서 흡광도와 생균수의 측정

Isolation No.	Microbial Growth							
	OD values (650nm)				cfu/mL culture solution			
	6h	12h	24h	48h	6h	12h	24h	48h
BAC-1	0.246	0.567	0.978	0.945	1.2×10^6	6.7×10^7	7.5×10^{11}	5.4×10^{11}
BAC-2	0.356	0.469	1.037	1.345	2.5×10^6	5.4×10^8	2.3×10^{11}	7.2×10^{11}
YEA-3	0.980	0.126	0.305	0.298	0.6×10^5	0.3×10^9	4.6×10^{11}	7.8×10^{11}
YEA-4	0.312	0.876	1.897	1.976	2.8×10^6	3.7×10^9	7.1×10^{11}	8.3×10^{11}
YEA-5	0.124	0.987	2.003	2.098	0.1×10^6	8.4×10^9	5.4×10^{11}	6.2×10^{11}

Table 2-4. 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물에 대한 산성배지에서의 흡광도와 생균 수의 측정

Isolation No.	Microbial Growth							
	OD values (650nm)				cfu/mL culture solution			
	6h	12h	24h	48h	6h	12h	24h	48h
BAC-1	0.329	0.987	1.543	1.876	7.5×10^6	32.7×10^7	32.4×10^{11}	62.9×10^{11}
BAC-2	0.654	0.975	1.454	1.321	12.3×10^6	44.3×10^8	63.8×10^{11}	54.2×10^{11}
YEA-3	0.498	0.654	1.457	1.654	26.6×10^5	9.1×10^9	7.6×10^{11}	37.8×10^{11}
YEA-4	1.088	1.876	2.226	2.657	63.8×10^6	75.2×10^9	45.7×10^{11}	8.3×10^{11}
YEA-5	1.324	1.669	2.679	2.698	72.1×10^6	98.4×10^9	69.2×10^{11}	21.9×10^{11}

일반 배지와 산성 배지에서 구입 미생물들을 24시간 배양한 다음 배양액중에 존재하는 cellulase, xylanase, pectinase 및 amylase의 활력을 측정한 결과는 Table 2-5 와 Table 2-6에 각각 나타내었다. cellulase 효소의 활력은 박테리아에서 높았고 amylase 효소의 활력은 효모에서 높게 나타났다. 배양 배지별로 효소의 활력에는 뚜렷한 경향이 나타나지 않았다.

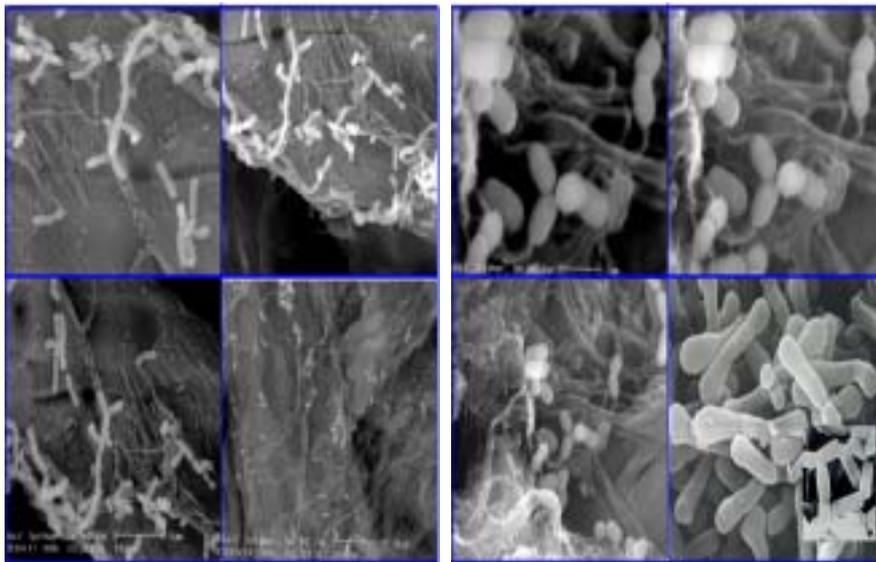
Table 2-5. 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물에 대한 중성 배지에서의 효소 활력

	중성 배양액중의 효소활력 (IU)			
	cellulase	xylanase	pectinase	amylase
BAC-1	596.7	1182.7	426.9	327.9
BAC-2	423.5	987.5	345.7	435.6
YEA-3	104.2	78.2	56.54	87.7
YEA-4	214.7	198.4	103.7	867.8
YEA-5	179.1	234.7	91.2	789.2

Table 2-6. 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물에 대한 산성 배지에서 효소 활력

	산성 배양액중의 효소활력 (IU)			
	cellulase	xylanase	pectinase	amylase
BAC-1	345.7	789.3	325.3	298.1
BAC-2	398.1	678.5	287.5	324.9
YEA-3	278.9	136.8	198.9	776.5
YEA-4	187.5	167.3	87.2	678.2
YEA-5	155.4	179.2	78.6	598.4

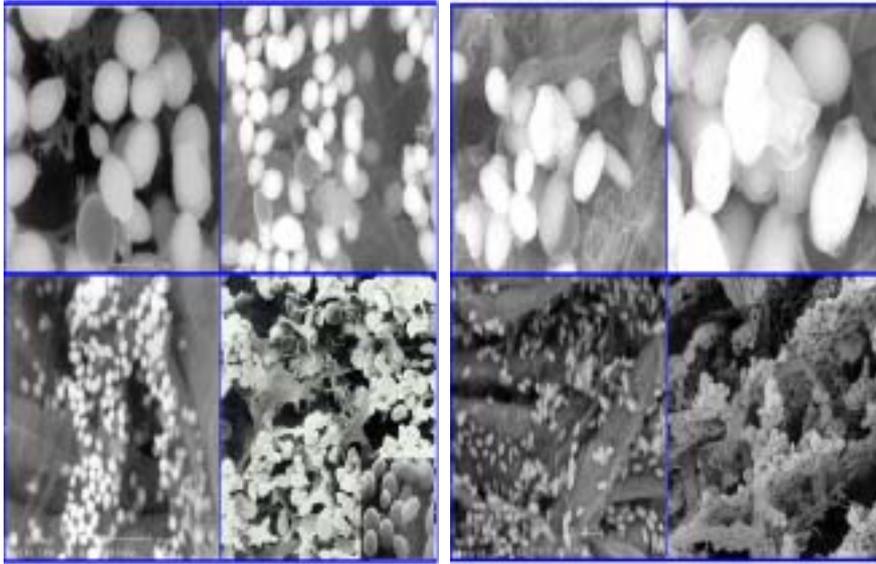
또한, 구입한 미생물중에서 성장률과 pH에서와 마찬가지로 YEA-3의 효소활력이 가장 낮게 나타났다. 미생물 발효제 개발의 원종 균주로서의 가치가 전혀 없었던 관리 번호(Maintenance number) YEA-3을 제외한 나머지 미생물들을 전자현미경으로 관찰한 모습은 다음 Figure 2-5와 2-6에 각각 나타내었다.



MS number BAC-1

MS number BAC-2

Figure 2-5. 내산성 혐기성 미생물(박테리아)의 전자현미경 사진.



MS number YEA-4

MS number YEA-5

Figure 2-6. 내산성 혐기성 미생물(효모)의 전자현미경 사진.

4) 효모균의 선발

문헌과 미생물자원 data base 검색작업을 통하여 선발된 박테리아 2종과 효모 3종을 구입하여 각각의 생육특성과 발효 특성 및 효소의 역가 등을 측정 한 결과, 관리번호(Maintenance number) YEA-3을 제외한 나머지 미생물들(BAC-1, BAC-2, YEA-4 및 YEA-5)은 볏짚 발효제 개발의 좋은 원종 균주들로 사용 가능할 것으로 평가되었다. 2년차 연구에서는 박테리아균과 효모균의 직접 비교와 볏짚 사일리지 제조 실험을 통하여 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 능력과 볏짚사일리지에서 생존성 등을 확인한 다음 최종적으로 2종의 미생물을 선발할 예정이다.

Table 2-7. 최종 혐기 내산성 SCP 생산용 미생물의 선발

관리번호	최종 선발 미생물	
	박테리아	효모(yeast)
BAC-1	<i>Bacillus circulanse</i>	-
BAC-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
YEA-4	-	<i>Candida utilis</i>
YEA-5	-	<i>Candida sp.</i>

2. 선발 효모의 특성 구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발

가. 연구 수행내용

1) 효모의 유기산 이용성과 단백질 합성량에 미치는 영향

문헌과 미생물자원 data base 검색작업을 통하여 1년차에서 선발된 박테리아 2종 (BAC-1와 BAC-2)과 효모 3종(YEA-3, YEA-4 및 YEA-5)에 대하여 배지(박테리아는 total plate count agar 배지, 효모는 YPD agar 배지 사용)에서의 성장률을 측정하였었다. 그러나 1년차 실험에서 사용된 3종의 효모 수가 최적의 효모를 선발하기에는 적다고 판단되었고 1년차의 시험결과에서 보고 하였듯이 YEA-3은 성장률이 매우 떨어져 이용가치가 없는 것이었다. 이런 문제점을 보완하기 위해서 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)로부터 KCTC7219(*Candida glabrata*), KTCT6994(*Humicola grisea* var. *thermoidea*), KCTC 7137(*Pichia jadinii*) 그리고 KCTC7120(*Candida robusta*)를 추가로 구매하여 총 6종의 효모를 동원하여 제 2차 선발실험을 추가 수행하였다(Table 2-8).

Table 2-8. Yeast strains obtained from KCTC(Korean Collection for Type Cultures) and ATCC (American Type for Cultures Collection) for the experiment

Strain No.	Strain Name
KCTC 7219	<i>Candida glabrata</i> / <i>Torulopsis glabrata</i>
KTCT 6994	<i>Candida glabrata</i> var <i>thermoidea</i>
KCTC 7137	<i>Pichia jadinii</i>
KCTC 7120	<i>Candida robusta</i>
ATCC 9950	<i>Candida utilis</i> (Henneberg)
ATCC 18790	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, teleomorph (budding yeast)

가) 유기산 이용성과 단백질 합성량 조사 : 험기배양배지(Dehority's artificial medium)에서 탄소원을 제거시키고 휘발성지방산만 첨가한 배지에다 단백질원으로는 pepton을 요소수와 암모니아수로 대체시키므로써(동일 질소량으로 대체) 이 배지에서의 효모의 성장률과 효모 유래 단백질 합량을 측정하여 효모가 유기산(휘발성 지방산으로 대체)을 이용하여 단백질을 합성하는 능력을 간접적으로 조사하였다.

나) 조사항목 및 방법 : 효모 유래 단백질 합량은 배양 후 배양액을 멸균 증류수를 이용하여 4차례 원심분리하여 효모 cell을 수거 한 다음, sonication하여 효모 cell을 파괴한 후, Bio-rad protein assay kit를 이용하여 분석하였다. 이외의 측정방법은 실험실 관행법(반추동물영양실험법, 2003, 서울대 출판부; 하종규, 이성실, 고종열 저)에 따랐다. 구체적인 실험방법은 지면관계로 생략한다.

2) 효모 발효제가 사일리지 품질에 미치는 영향

가) 공시미생물: “효모의 유기산 이용성과 성장률 및 단백질 함성량” 실험의 결과를 바탕으로 3종의 효모를 공시하였다. 효모 첨가가 볏짚 silage의 품질에 미치는 영향을 구명하고자, control(효모-무처리), ATCC 18790(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen), KCTC 6994(*Humicola grisea* var. *thermoidea*) 및 KCTC 7219(*Candida glabrata*)로 4개의 처리구를 두었고, 저장기간(1, 3, 6, 9, 15 및 20일)별 3반복으로 총 72개의 silage를 제조하였다.

나) 볏짚 사일리지의 제조 : 볏짚을 약 1cm 정도로 세절한 후 수분 함량이 50% 정도 되도록 하였으며, 증류수에 암모니아수를 0.2% 용해시켜 spray하여 silage를 제조하였다. 세절된 볏짚은 20×50cm 크기의 비닐로 제작한 silage bag에 500g씩 넣은 후 다시 공시 효모 배양물 50ml를 접종하였다. 그리고 다시 500g의 볏짚을 첨가한 다음 vaccum으로 가능한 모든 잔존 공기를 제거한 다음 heat sealing 하였다. 이 때의 접종량은 효모가 최대 성장률을 나타낸 24시간 계대 배양액을 사용하였다. 제조된 실험용 silage bag은 실내에서 약 지상 1m의 실험대 위해 보관하였으며, 실험기간 동안 온도를 20~24℃로 유지하였다.

다) 조사항목 : 사일리지 저장기간별(1, 3, 6, 9, 15 및 20일) pH 및 NH₃-N의 변화, 볏짚의 화학적(단백질, NDF 및 ADF) 함량의 변화 그리고 접종한 효모 수의 변화 등을 조사하였다. 조사 방법은 실험실 관행법에 따랐다.

(1) pH 측정 : pH의 측정은 저장 기간별로 수거하여 50g의 silage 시료를 450ml의 증류수(pH 7.0)를 부어서 1분간 homogenizer를 이용하여 분쇄시킨 후 4겹의 cheese cloth로 여과하여 pH meter(Mettler toledo, MP-230)를 통해 측정하였다.

(2) Silage의 영양소 함량 측정 : 저장 기간별로 수거한 볏짚 silage의 조단백질 함량은 A.O.A.C.방법(1995)으로 측정하였으며, 105℃의 drying oven에서 시료를 24시간 건조한 후 잘게 분쇄하여 시료 1g에 산화 촉진제(K₂SO₄ : CuSO₄ = 7 : 1) 5g과 95% H₂SO₄ 15ml을 첨가하여 420℃에서 완전 분해한 후 Auto Kjeldahl System(Tecator Co., Kjeltec auto 1030, Sweden)으로 증류 및 적정하였다. 볏짚 silage의 조단백질 함량은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{조단백질 함량(\%)} = \frac{1.401 \times (M - B) \times F \times 6.25}{\text{시료의 무게}(mg)} \times 100$$

(M : Sample의 질소 함량, B : Blank의 질소 함량 F : 0.1N HCl의 factor)

NDF(neutral detergent fiber)와 ADF(acid detergent fiber) 함량은 Van Soest와 Goering(1984)의 방법에 준하여 분석하였다.

- (3) Silage내 미생물 수 측정 : 저장 15일 후 silage를 개봉하여 1g의 벧짚을 증류수에 희석하여 YPD agar 배지에 1ml을 접종하여 24시간 후에 생성된 효모 균락(colony)을 계수하여 생균수를 측정하였다.
- (4) 전자 현미경 관찰 : SEM 관찰을 위한 전 처리는 Ho 등 (1988)의 방법을 응용하였다. 진공상태에서 시료의 변형을 방지하기 위하여 0.5%와 5% glutaraldehyde 용액으로 고정한 후, cacodylic buffer로 세척하고, 유기용매 치환법으로 10, 20, 30, 50, 70, 90 및 100%의 ethyl alcohol을 차례로 30분간 통과시켜 탈수시켰다. 탈수가 끝난 시료는 임계점 건조법(critical point drying method)을 이용하여 시료를 내압 용기중에서 액화 CO₂에 담긴 다음 임계점 온도(31°C, 72.8atm) 이상으로 가열하여 gas화 시켜 건조하였다. 건조된 시료를 액체 silver를 이용하여 주사형 현미경의 stub에 mounting 시킨 후, 진공증착장치에서 금(gold)을 시료표면에 분사 증착시켜 주사형 현미경(SEM: Scanning Electron Microscopy)을 이용하여 관찰하였다.

3) 효모의 최적 첨가량 및 사용조건의 구명

- 가) 공시미생물 : “효모의 유기산 이용성과 효모의 성장률 및 단백질 합성량” 실험 결과를 바탕으로 3종의 효모를 공시하였다.
- 나) 공시한 미생물을 3종(A, B 및 C)을 단독(A, B 및 C) 배양 그리고 혼합(A+B, B+C, A+C 그리고 ABC) 배양하여 효모의 성장률과 단백질 합성량을 측정하므로써 효모 상호간의 positive 반응과 negative 반응을 조사하므로써 최종 효모 발효제를 개발한다. 유기산의 최적 첨가량과 암모니아수의 최적 첨가량도 함께 결정하였다.
- 다) 조사방법 : 단독 및 혼합배양시의 효모의 성장률과 단백질 합성량, 그리고 각 배양 조건에서의 효소 역가(polysaccharide-degrading enzyme, hexoside-degrading enzyme 그리고 protease)를 실험실 관행법으로 분석하였다.

나. 연구 수행결과

1) 효모의 유기산 이용성과 단백질 합성량에 미치는 영향

Dehority's medium에서 탄소원을 결핍시키고 휘발성지방산만 첨가한 배지에 단백질원으로는 pepton을 요소수와 암모니아수로 대체시킨 다음 배지내의 pH를 측정된 결과는 다음 Figure 2-7에서와 같다.

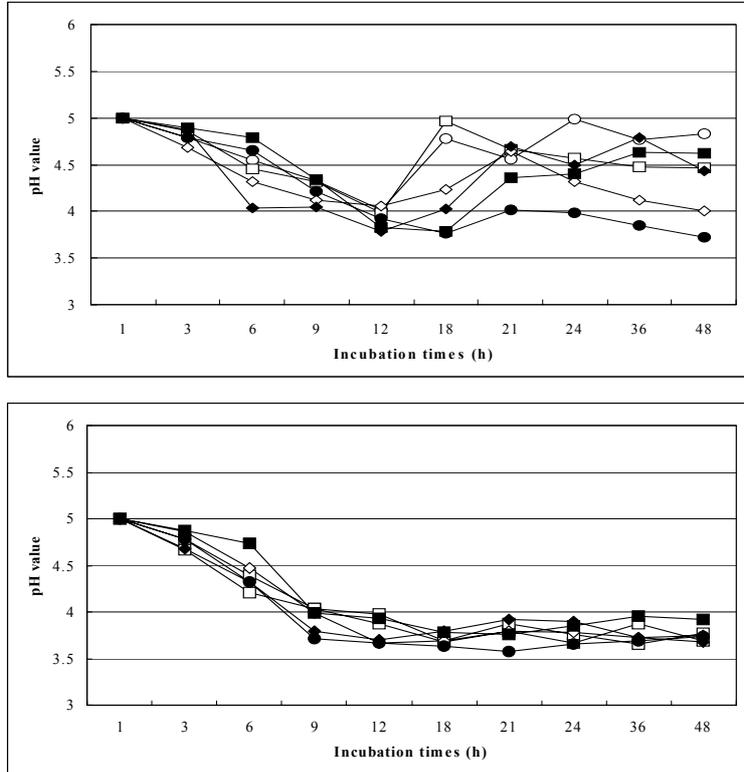


Figure 2-7. pH value in the supernatant of medium containing urea (the upside) and ammonia(the bottom) as nitrogen sources incubated with yeast, KCTC 7219(○—○), KCTC 6994(□—□), KCTC 7137(◇—◇), KCTC 7120(◆—◆), ATCC 9950(■—■) and ATCC 18790 (●—●).

KCTC 7219 (*Candida glabrata*), KCTC 6994(*Candida glabrata*), KCTC 7137(*Pichia jadinii*), KCTC 7120(*Candida robusta*), ATCC 9950(*Candida utilis* Henneberg) 및 ATCC 18790 (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) 총 6종의 효모 모두 배양 9-12시간까지 pH가 급격히 떨어졌으나 그 이후의 시간대에서는 효모들 간에 큰 차이가 없었다.

그러나 단백질원으로 urea를 첨가한 배지에서는 배양 12시간 후에 pH가 오히려 올라가는 현상이 발견되었다. 각 배양배지에서 효모들이 보인 pH를 평균한 수치를 보면 다음 Figure 2-8에서와 같다.

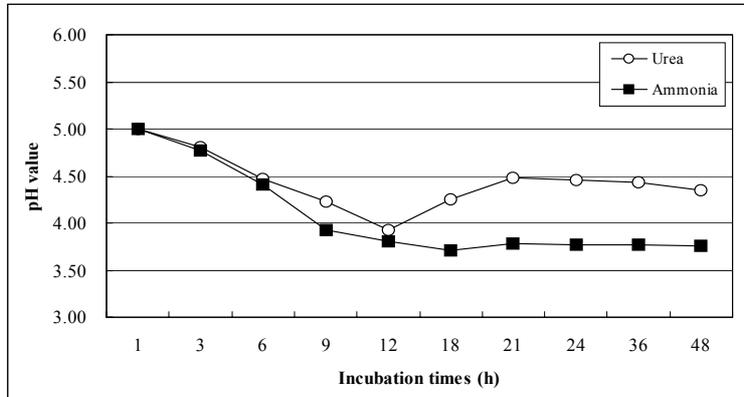


Figure 2-8. Average pH value in the supernatant of medium containing urea and ammonia as nitrogen sources incubated with yeast, KCTC 7219, KCTC 6994, KCTC 7137, KCTC 7120, ATCC 9950 and ATCC 18790.

배양배지에 탄소원으로 휘발성지방산만 첨가하여 pH가 상당히 낮았다. 따라서 모든 발효조에 0.1N NaOH를 사용하여 초기 pH를 5.0으로 보정한 다음 효모를 접종하였다. 접종후 3, 6, 9 그리고 12시간이 경과할 때까지 pH는 직선적으로 떨어지기 시작하다가 12시간 이후에는 큰 변화를 나타내지 않았다. 혐기배양배지에서 탄소원을 결핍시키고 휘발성지방산만 첨가한 배지에 단백질원으로는 pepton을 요소수와 암모니아수로 대체시키므로써(동일 질소량으로 대체) 이 배지에서의 효모의 성장률과 효모 유래 단백질 함량을 측정하므로써 효모가 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 능력을 간접적으로 조사하여 얻은 성장률의 결과를 Figure 2-9에 나타내었다.

단백질원으로 urea를 사용한 배지에서는 ATCC 18790의 성장률이 가장 높았고 ATCC 9950의 성장률이 가장 낮았으며 나머지 4종의 효모들은 큰 차이가 없었다. 또한 단백질원으로 $\text{NH}_3\text{-N}$ 을 사용한 배지에서는 배양 18시간을 기준으로 ATCC18790, KCTC6994 및 KCTC7219의 성장률이 높은 경향이었고 ATCC 9950의 성장률이 가장 낮았다. 효모의 성장률은 $\text{NH}_3\text{-N}$ 을 사용한 배지에서 높았다(Figure 2-10).

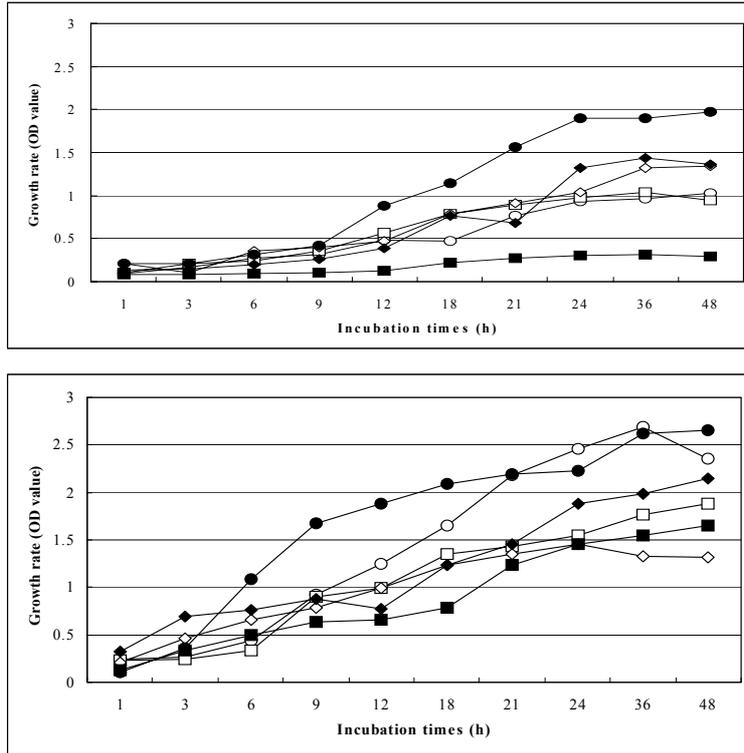


Figure 2-9. Growth rate of yeast, KCTC 7219(○—○), KCTC 6994(□—□), KCTC 7137(◇—◇), KCTC 7120(◆—◆), ATCC 9950 (■—■) and ATCC 18790 (●—●) in the medium containing urea(the upside) and ammonia(the bottom) as nitrogen sources.

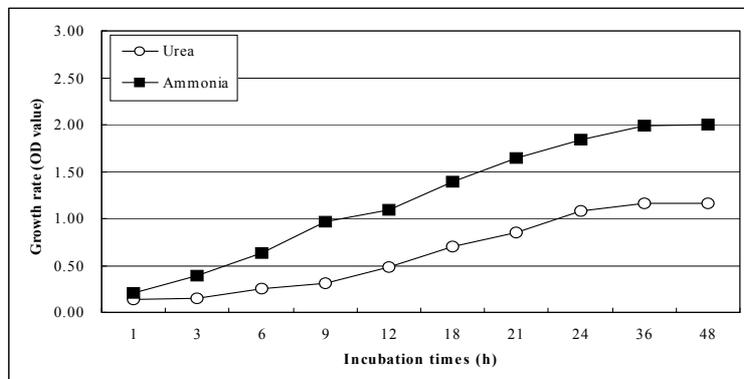


Figure 2-10. Average growth rate of yeast, KCTC 7219, KCTC 6994, KCTC 7137, KCTC 7120, ATCC 9950 and ATCC 18790, in the medium containing urea and ammonia as nitrogen sources.

효모 유래 단백질을 측정하고자 배양 후 배양액을 멸균 증류수로 원심분리하여 효모 cell을 수거 한 다음, sonication시켜 효모 cell을 파괴한 다음 단백질을 측정하는 결과는 Figure 2-11에서와 같다. 배양 12~18시간까지 단백질의 농도가 급격히 증가하다가 그 이후 시간대에서는 단백질의 함량이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 18시간대 이후에 단백질의 농도가 급격히 감소한 이유는 효모가 사멸기로 접어들어 lysis가 일어났기 때문이라고 판단된다. 단백질원으로 NH₃-N을 사용한 배지에서의 단백질 함량이 urea를 사용한 배지에서 보다 대체적으로 높았다(Figure 2-12).

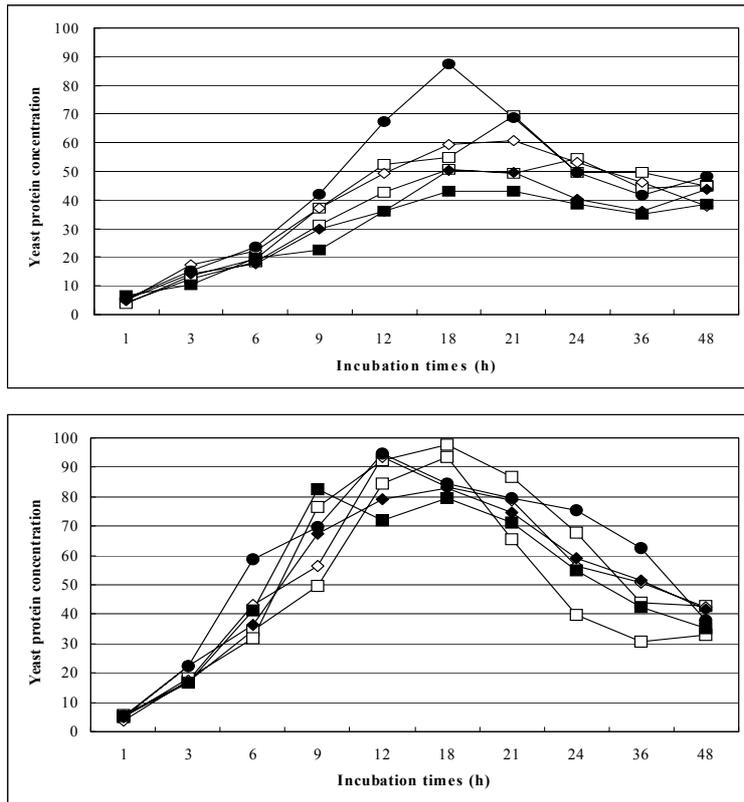


Figure 2-11. Protein concentration derived from yeast, KCTC 7219(○—○), KCTC 6994(□—□), KCTC 7137(◇—◇), KCTC 7120(◆—◆), ATCC 9950 (■—■) and ATCC 18790 (●—●), in the medium containing urea(the upside) and ammonia(the bottom) as nitrogen sources.

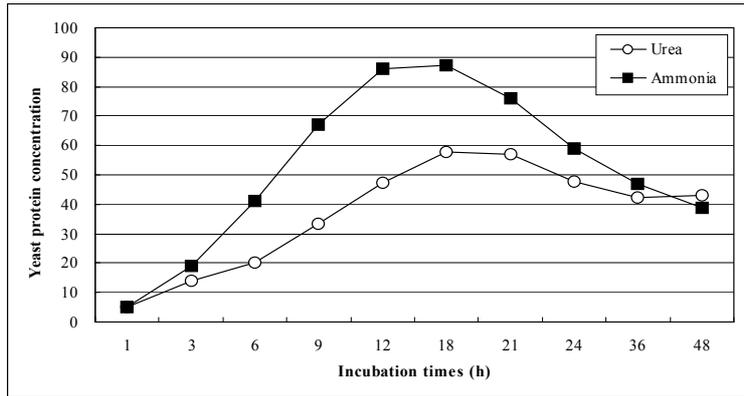


Figure 2-12. Average protein concentration derived from yeast, KCTC 7219, KTCT 6994, KCTC 7137, KCTC 7120, ATCC 9950 and ATCC 18790, in the medium containing urea and ammonia as nitrogen sources.

배양액 중의 pH, 효모의 성장률 그리고 미생물 단백질 합성량을 기준으로 공시한 6종의 효모중에서 KCTC6694, KCTC7219 및 ATCC18790이 “유기산 이용 단백질 합성 혐기·내산성 SCP생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발”을 가장 효과적인 효모로 선정되었다.

2) 효모 발효제가 사일리지 품질에 미치는 영향

“효모의 유기산 이용성과 효모의 성장률 및 단백질 합성량” 실험의 결과를 바탕으로 3종의 효모, KCTC 7219(*Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*), KTCT 6994 (*Candida glabrata* var *thermoidea*) 및 ATCC 18790(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph, budding yeast)를 집중하여 볏짚 사일리지를 제조한 다음, 사일리지의 pH 변화를 관찰한 결과는 Table 2-9에서와 같다. 효모를 첨가한 사일리지는 발효 3일째부터 pH가 내려가기 시작하였으나 무처리 사일리지는 발효 전기간 동안 pH의 변화가 없이 일정하였다.

처리구별로는 효모를 첨가한 silage는 발효 3일째부터 pH가 내려가기 시작하였고, 저장기간에 따른 pH는 무처리 silage의 경우 발효 전 기간 동안 변화 없이 일정하였다. 효모 *S. cerevisiae*의 생육 최적 pH가 4.5정도인데, pH에 적응하는 능력이 없기 때문에 pH가 높아지면 성장 속도가 늦어지고, 이에 따라 성장에 쓰여질 여러 가지 성분과 효소들이 세포 밖으로 유출되어 다른 미생물이나 가축의 영양소로 이용될 수도 있지만(박 등, 1996), *S. cerevisiae*는 유기산이나 산소와의 친화력이 강하기 때문에 pH를 상승시켜 주는 buffer제로 작용할 수 있다(Cartwright 등, 1986; Dawson, 1987; Hoyos 등, 1987)고 하였다.

송 과 손(1997)에 의하면 반추 가축의 사료 첨가제로서 이용되는 효모배양물은 농후사료의 과다급여 시 발생할 수 있는 반추위내 pH 저하와 섬유소분해 미생물의 활력 억제 등으로 인한 생산성 감소 현상을 방지할 수 있다 하였고, 이러한 연구는 효모들이 성장하기에 적당한 pH를 가지고 있으므로 해서 반추위 혐기성 세균의 증식을 활성화하여(Wiedmeier 등, 1987; Harrison 등, 1988) pH를 상승시킬 수 있으며(Williams 등, 1991), 또한 반추가축용 사료첨가제로 사용한 효모가 반추위내의 잔류 산소 제거와 pH 상승을 통하여 발효 환경을 개선시킬 수 있다(Rose, 1980)는 결과를 뒷받침할 수 있겠다.

발효 6일째부터 3종의 효모들은 control에 비하여 성장하기에 적당한 pH를 가지고 있다고 할 수 있으며, 연구 결과들에 비추어볼 때 시험에서 사용된 효모들은 반추위 혐기성 세균 증식을 활성화하여 반추위내의 pH를 상승시키고 반추위 발효 환경을 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 2-9. Effects of yeast inoculations on pH values during the ensiling procedure of rice straw silage

Maintenance No.	Days of ensiling						mean	SEM
	1	3	6	9	15	20		
Control	5.50±0.15	5.60±0.06	5.67±0.03	5.47±0.12	5.67±0.19	5.60±0.15	5.58	0.06
ATCC18790	5.67±0.03	5.37±0.18	4.37±0.48	4.13±0.12	4.10±0.12	4.13±0.12	4.63	0.20
KCTC6694	5.67±0.03	5.40±0.12	4.30±0.15	4.30±0.06	4.50±0.06	4.30±0.06	4.74	0.17
KCTC7219	5.43±0.09	5.43±0.09	4.37±0.12	4.17±0.03	4.10±0.12	4.17±0.03	4.61	0.18
mean	5.57	5.45	4.68	4.52	4.59	4.55		
SEM	0.05	0.06	0.18	0.17	0.20	0.19		

Table 2-10은 사일리지 저장기간별로 수거한 볏짚의 단백질 함량을 조사한 결과인데, 무처리 볏짚에서는 단백질의 함량이 발효 전 기간동안 5.3~5.6의 범위로 일정하였으나 효모를 처리한 볏짚의 단백질 함량은 높게는 9% 단위까지 증가하는 것으로 나타났다. 이는 접종한 미생물이 왕성하게 성장했기 때문이라 생각된다. 발효 15일째를 기준으로 하면 Control, ATCC18790, KCTC6694 및 KCTC7219 처리구의 볏짚중 단백질 함량은 각각 5.33, 8.63, 9.07 및 8.77%로서 대조구에 비해 단백질의 함량이 각각 38%, 41% 및 39% 증가한 결과이다. 이러한 결과는 본 연구 과제의 목적을 충족시킬 수 있는 아주 고무적인 결과로 받아들여지고 있다. 측정된 NH₃-N의 농도 역시 단백질에서와 유사한 경향을 보였다(결과 생략). 이는 효모가 포함된 사료에서

조단백질 함량이 다소 높은 경향이었던 보고(송과 손, 1997)와 거세우에서 효모배양물은 반추위의 단백질 분해작용을 증가시켜 조단백질의 이용성을 높여 증체가 개선된다(Wiedmeier 등, 1987; Martin과 Nisbet, 1992)는 보고와도 유사하다고 할 수 있겠다.

조단백질 함량에 있어 처리구는 발효 6일째부터 control에 비해 높은 경향을 보이고 있으며, 발효 15일째부터는 뚜렷한 경향을 보이고 있으므로 효모의 첨가가 증체를 개선함은 물론 사료효율도 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2-10. Effects of yeast inoculations on crude protein levels(%) of rice straw during the ensiling procedure of rice straw silage

Maintenance No.	Days of ensiling						mean	SEM
	1	3	6	9	15	20		
Control	5.30±0.06	5.30±0.06	5.57±0.20	5.37±0.09	5.33±0.19	5.40±0.12	5.38	0.06
ATCC18790	5.37±0.12	5.37±0.18	6.53±0.19	7.40±0.06	8.63±0.07	8.37±0.09	6.94	0.39
KCTC6694	5.20±0.06	5.40±0.12	6.93±0.15	7.37±0.26	9.07±0.09	8.43±0.15	7.07	0.43
KCTC7219	5.23±0.09	5.53±0.12	7.30±0.06	7.57±0.09	8.77±0.09	8.43±0.15	7.14	0.40
mean	5.28	5.40	6.58	6.93	7.95	7.66		
SEM	0.04	0.06	0.20	0.28	0.46	0.40		

볏짚에 효모를 처리하여 약 40%의 단백질 증가 효과를 가져올 수 있다는 믿기지 않는 결과는 ① 사일리지에 접종한 효모가 사일리지 발효기간 중 많은 양으로 성장할 수 있다는 결과(Figure 2-13)와 발효 15일후의 볏짚에는 아주 많은 효모가 붙어 있다는 SEM 사진의 결과(Figure 2-14)가 이를 뒷받침해 주고 있다. SEM 시험의 결과는 제 3 세부과제에 상세히 설명되어 있다. 기타 측정된 ADF 및 NDF 함량의 변화는 뚜렷한 경향이 없었다(결과 생략).

Figure 2-13에서와 같이, 효모 처리구의 미생물 군집이 control에 비해 유의적($P < 0.01$)으로 높았으며, 특히 ATCC 18790과 KCTC 7219에서 뚜렷한 결과를 보였다.

효모배양물 첨가로 인해 증가된 박테리아의 수는 통성미생물인 *S. cerevisiae*의 잔류산소 제거로 혐기적 조건을 제공함은(Rose, 1980) 물론 아미노산과 vitamin B군 등의 영양소를 공급하여 혐기성 미생물군을 증식시키기 때문인 것으로(Sniffen, 1986)보이며, 이는 반추동물이 효모사료를 섭취할 경우 반추위의 발효환경을 개선시

김으로서 박테리아의 성장이 촉진된다(Wiedmeier 등, 1987; Harrison 등, 1988)는 결과를 뒷받침한다.

또한 반추가축용 사료첨가제로서 효모는 섬유소 이용성 개선, 사료섭취량, 증체량 및 사료효율을 개선하는 효과가 있으며(Wang 등, 2001; Newbold 등, 1998, Wohlt 등, 1998 Williams 등, 1991; Fallon과 Harte, 1987; Panchal 등, 1984), 반추위내 혐기성 미생물의 수와 섬유소 분해 미생물의 수를 증가시킨다(Kumar 등, 1997; El Hassan 등, 1996)는 보고와도 유사하였다.

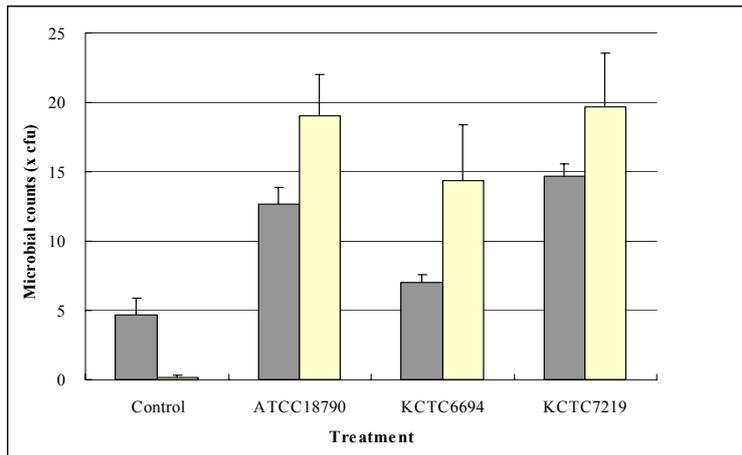


Figure 2-13. Microbial populations, total bacterial counts(■×10⁶cfu) and yeast count(□×10⁴cfu), in the 1g of rice straw ensiled for 15 days.

3종의 효모 ATCC 18790, KCTC 6994 및 KCTC 7219를 첨가하여 볏짚 silage를 제조한 다음, 15일이 경과한 silage 볏짚 표면을 전자 현미경으로 관찰한 결과를 Figure 2-14에 나타내었다. 이 그림을 통하여 수많은 효모들이 볏짚 silage에 군락을 형성하고 있음을 볼 수 있다. silage 제조 시에 첨가한 효모들이 볏짚에 부착하는 정도는 볏짚의 부위에 따라 매우 다양한 양상을 보였다. 다음 절의 Figure(4-11, 12 및 13 참고)에서 효모들이 많이 부착되어 있는 볏짚 부위(1)와 중간정도로 부착되어 있는 부위(2), 그리고 군락을 형성하고 있지 않거나 미미하게 형성하고 있는 부위(3)를 확인 할 수 있었다. 따라서 볏짚 부위와 효모의 군락의 상호 관계, 즉 효모가 선호하는 볏짚 부위를 찾아내는 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료된다.

볶짚에 효모를 처리하여 15일간 저장할 경우에 ATCC 18790, KCTC 6994 및 KCTC 7219의 처리로 무처리 볏짚에 비하여 단백질 함량이 각각 38%, 41% 및 39% 증가한 결과는 전자 현미경을 촬영한 사진으로 보아 그 원인이 뚜렷하게 효모 때문이라는 것을 알 수 있었다.

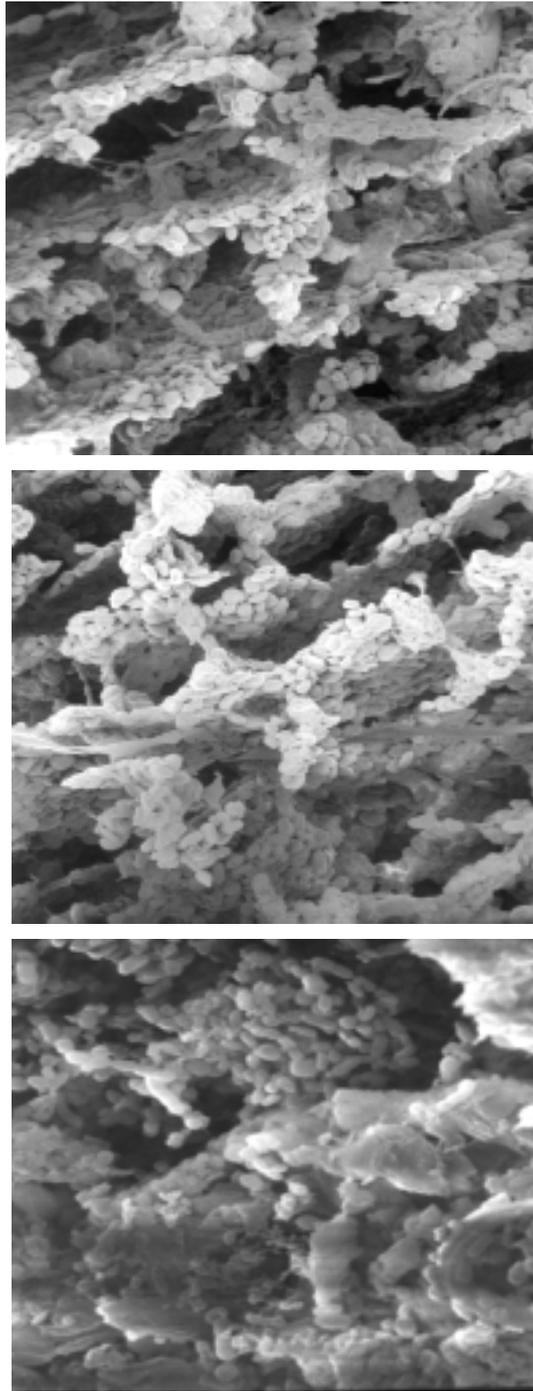


Figure 2-14. SEM observations for the rice straw ensiled for 15 days with the yeast.

3) 효모의 최적 첨가량 및 사용조건의 구명

상기의 실험 “효모 발효제가 사일리지 품질에 미치는 영향”에서 이용한 효모 3종을 단독배양(ATCC18790, KCTC6694 및 KCTC7219) 그리고 혼합배양(ATCC18790+KCTC6694, KCTC6694+KCTC7219, ATCC18790+KCTC7219 그리고 ATCC18790+KCTC6694+KCTC7219)하여 효모의 성장률과 단백질 합성량을 측정하므로써 효모 상호간의 positive 반응과 negative 반응을 조사하였다.

단독배양한 A(ATCC18790), B(KCTC6694) 그리고 C(KCTC7219)의 배양 24시간 후의 효모수는 각각 12.23, 23.18 그리고 41.54 cfu ×10⁵로서 효모 상호간 생존율에 많은 차이를 보였다. 또한, 혼합배양한 A+B, A+C, B+C 그리고 A+B+C의 배양 24시간 후의 효모수는 각각 24.59, 11.03, 32.39 그리고 38.46 cfu ×10⁵로서 단독배양시보다 혼합배양시 시험관내에서의 효모의 수가 증가하는 것으로 조사되었다. 세 종류의 효모를 모두 혼합 배양하였을 경우에 배양액중에 효모의 농도가 가장 높은 것으로 조사되었다. 이와 매우 유사한 경향들이 배양액중의 단백질 농도(단백질 합성량) 조사에서도 동일하게 나타났다(Table 2-11 참조).

Table 2-11. The growth rate of yeast in the supernatant of LB medium for yeast mono- and co- cultures with other yeasts after 24h incubation

	Growth rate		Protein concentrations
	OD value	cfu × 10 ⁵	
Mono-culture			
<i>A</i> (ATCC18790)	1.18±0.01	12.23±2.35	22.35±3.19
<i>B</i> (KCTC6694)	1.32±0.04	23.18±3.73	25.75±2.48
<i>C</i> (KCTC7219)	1.03±0.03	41.54±5.07	23.81±4.27
Co-culture			
<i>A</i> + <i>B</i>	1.26±0.03	24.59±6.27	24.15±1.43
<i>A</i> + <i>C</i>	1.08±0.04	11.03±4.11	25.17±2.66
<i>B</i> + <i>C</i>	1.21±0.06	32.39±2.85	28.44±3.13
<i>A</i> + <i>B</i> + <i>C</i>	1.49±0.03	38.46±6.32	27.22±2.78

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

단독 및 혼합배양시의 효모의 성장률과 단백질 합성량, 그리고 각 배양 조건에서의 효소 역가(polysaccharide-degrading enzyme, hexoside-degrading enzyme 그리고 protease)를 실험실 관행법으로 분석한다.

단독 배양한 *A*(ATCC18790), *B*(KCTC6694) 그리고 *C*(KCTC7219)의 배양 24시간 후의 CMCase 활력은 각각 124.6, 152.1 그리고 142.5 IU로 측정되어 효모 상호간 CMCase 활력에는 다소의 차이를 보였다. 전분분해효소(α-amylase)와 단백질분해효소(protease)의 활력은 각각 357.8, 412.5 그리고 277.1IU; 45.5, 75.2 그리고 65.5IU로 각각 측정되어 CMCase 활력에서와 마찬가지로 공시한 효모 상호간에 CMCase 활력에는 많은 차이를 보였다. 또한, 혼합배양한 *A+B*, *A+C*, *B+C* 그리고 *A+B+C*의 배양 24시간 후의 CMCase 활력은 각각 132.1, 112.7, 151.5 그리고 132.3IU로서 단독배양시와 비교하여 뚜렷한 차이점이 발견되지 않았다(Table 2-12).

Table 2-12. Enzyme activities (CMCase, xylanase, amylase and protease) in the supernatant of LB medium for yeast mono- and co- cultures with other yeasts after 24h incubation.

	Enzyme activity (IU)			
	CMCase	Xylanase	Amylase	Protease
Mono-culture				
<i>A</i> (ATCC18790)	124.6±17.9	13.8±2.7	357.8±45.3	45.5±11.3
<i>B</i> (KCTC6694)	152.1±22.4	21.5±8.2	412.5±31.2	75.2±14.7
<i>C</i> (KCTC7219)	142.5±35.5	17.9±5.7	277.1±25.5	65.5±21.9
Co-culture				
<i>A + B</i>	132.1±27.8	16.4±3.5	421.5±56.4	37.6±22.9
<i>A + C</i>	112.7±17.6	19.2±6.2	396.7±27.8	68.4±31.2
<i>B + C</i>	151.5±21.2	13.5±4.5	349.6±44.9	49.9±20.4
<i>A + B + C</i>	132.3±11.9	17.9±7.3	476.2±46.1	55.7±35.8

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures

Enzyme activities (IU) are expressed as mol reducing sugars released by 1mL of crude enzymes in min, except protease activity.

Protease activity are expressed as g azocasein hydrolyzed h⁻¹·mL of crude enzymes⁻¹.

3. *In vitro* 시험을 통한 개발품의 효과 검증시험

가. 연구 수행 내용

- 1) 공시미생물: 제 1세부과제에서 선발된 곰팡이(GSMI-10)와 제 2세부과제에서 선발된 효모(KCTC-6694), 그리고 제 3세부과제에서 사용된 세균(ATCC-19169) 등 총 3종의 미생물을 공시하였다.
- 2) 상기의 미생물 3종을 배양하기 위한 배양배지는 상업용 혐기배양배지(anaerobic medium)를 이용하였다. 미생물 조작의 전체 과정들은 Hungate의 anaerobic gassing system을 이용하여 혐기상태에서 수행되었다.
- 3) 공시기질 : 분쇄(0.1mm screen으로 분쇄함) 벚짚
- 4) 공시미생물들을 각각 단독 배양(mono-culture), 혼합 배양(co-cultures) 그리고 연속 배양(sequential-cultures)한 다음, 1, 2, 3, 5 그리고 7일간 배양한 다음 상층액과 잔존물을 조사하였다. 연속배양 방법은 곰팡이를 1, 2 그리고 3일간 배양한 다음 효모를 접종하고 다시 1일이 경과한 다음 박테리아를 접종하였다.
- 5) 조사 항목 및 방법

가) pH 변화

나) 발효제 구성 미생물의 수 측정을 통한 생존성 구명

박테리아의 수, 효모의 수 그리고 곰팡이의 수는 이 등(1995)이 이용한 방법과 동일한 방법을 이용하여 혐기상태를 유지하며 Roll-tube법으로 측정하였다.

다) 소화율 및 효소분비량에 미치는 영향 구명

- 소화율은 *in vitro* test tube내에서 공시기질인 분쇄 벚짚의 잔존량을 환산하여 측정하였다.

- 효소분비량 측정은 다음과 같이 수행하였다. 조효소액(원심분리후 상층액) 0.5ml와 0.05M citrate buffer(pH 5.5)에서 1% CMC의 0.5ml과 혼합하여 1시간 동안 55℃에서 반응시킨 다음, 5분 동안 boiling하여 반응을 중지시켰다. Boiling 된 sample은 5분 동안 7,000rpm에서 원심분리 하였으며 상층액에서 생성된 환원당은 Miller 등(1960)의 DNS(dinitrosalicylic acid)방법을 이용하여 비색법으로 550nm에서 측정하였다. 효소활성의 one unit는 생성된 1mmol glucose을 분당 생성된 환원당과 똑같이 계산하여 효소의 양을 계산하였다. Xylanase 활성은 0.5M potassium phosphate buffer(pH 6.5)의 2% oat spelt xylan(w/v) 1ml을 이용하여 분석하였다.

라) 단백질 합성량 및 사료가치에 미치는 영향 구명

상층액중의 단백질 함량은 Bio-Rad kit를 이용하여 흡광도를 측정하여 산출하였다.

나. 연구 수행 결과

제 1세부과제에서 선발된 곰팡이(GSMI-10)와 제 2세부과제에서 선발된 효모(KCTC-6694), 그리고 제 3세부과제에서 사용된 세균(ATCC-19169) 등 총 3종의 미생물을 공시하여 공시미생물들을 각각 단독 배양(mono-culture), 혼합 배양(co-cultures) 그리고 연속 배양(sequential-cultures)한 다음, 1, 2, 3, 5 그리고 7일간 배양한 다음 상등액과 잔존물을 조사하여 얻어진 결과를 Table 2-13에서 Table 2-19에 나타내었다. Table 2-13에서와 같이 배양액중의 pH는 미생물의 종류와 배양시간에 관계없이 최소 5.73에서 최대 6.72의 범위로서 pH의 변화가 심하게 일어나지 않았다. 이러한 결과는 배지중에 함유된 여러 가지 염들이 완충제의 역할을 하였기 때문으로 생각된다.

Table 2-13. The pH value in the supernatant of medium for anaerobic bacterim, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	6.63±0.01	6.61±0.01	6.44±0.01	5.96±0.00	5.97±0.01
<i>Yeast</i>	6.68±0.02	6.57±0.02	5.86±0.01	5.79±0.01	5.92±0.02
<i>Fungus</i>	6.72±0.04	6.59±0.01	6.21±0.02	6.04±0.01	6.03±0.03
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	6.61±0.04	6.67±0.07	6.58±0.04	6.12±0.05	6.13±0.05
<i>Bacterium + Fungus</i>	6.52±0.03	5.97±0.02	6.21±0.05	5.95±0.07	6.11±0.03
<i>Yeast + Fungus</i>	6.62±0.06	6.22±0.03	6.47±0.02	6.51±0.03	6.08±0.04
Sequential-culture					
<i>Fungus (1d) + yeast(1d)</i>	-	-	6.12±0.04	6.03±0.06	5.73±0.04
<i>Fungus (2d) + yeast(1d)</i>	-	-	-	5.91±0.03	5.87±0.05
<i>Fungus (3d) + yeast (1d)</i>	-	-	-	5.92±0.02	5.96±0.06

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

공시미생물들을 각각 단독 배양(mono-culture), 혼합 배양(co-cultures) 그리고 연속 배양(sequential-cultures)한 다음, 배양배지내의 미생물 수, 즉 박테리아의 수, 효모의 수 그리고 곰팡이의 수를 측정된 결과를 각각 Table 2-14, 2-15 그리고 2-16에 나타내었다. 미생물 각각의 단독배양에서는 교차오염이 전혀 발생하지 않았다. 혼합 배양 *Bacterium + Yeast*, *Bacterium + Fungus*에서는 박테리아만 detection되어 박테리아와 효모나 곰팡이를 혼합배양하면 박테리아만 우점하여 성장하는 것으로 조사되었고 *Yeast + Fungus*에서도 역시 효모만 성장하는 것으로 조사되었다. 따라서 미생물 복합체의 제조는 혼합배양으로는 불가능한 것으로 판단되었다. 곰팡이를 24시간(1d), 48시간(2d) 그리고 72시간(3d) 동안 우선 배양한 다음, 효모를 추가 접종하여 하루(1d)가 지난 후 박테리아를 각각 재 접종한 *Fungus(1d)+yeast(1d)*, *Fungus(2d)+yeast(1d)* 그리고 *Fungus(3d)+yeast(1d)* 연속 배양구에서는 박테리아가 잠시 동안 (약 1일 정도) 생존하는 것으로 조사되었다. 결론적으로 확보한 3종의 서로 다른 미생물을 이용하여 벗짚 사일리지 발효용미생물 복합체의 개발을 위해서는 미생물 단독 배양후 부형제를 이용하여 희석하는 방법밖에 없는 것으로 최종 판단되었다. 비록 연속배양방법에서 가능성이 조금 보였으나 이를 산업적으로 응용하는 데는 많은 문제점이 있을 것으로 판단되었다.

Table 2-14. Bacterial populations in the supernatant of medium for anaerobic bacterium, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	6.5±5.7	42.7±6.8	12.9±15.2	34.8±9.40	55.9±11.2
<i>Yeast</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Fungus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	12.3±6.9	37.2±19.7	17.8±9.1	42.6±19.1	36.6±17.8
<i>Bacterium + Fungus</i>	18.2±8.1	9.5±2.1	33.2±8.2	36.7±4.7	47.21±8.36
<i>Yeast + Fungus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
Sequential-culture*					
<i>Fungus (1d) + yeast(1d)</i>	-	-	13.2±5.32	0.2±0.0	nd
<i>Fungus (2d) + yeast(1d)</i>	-	-	-	8.9±5.5	0.5±0.3
<i>Fungus (3d) + yeast (1d)</i>	-	-	-	-	9.1±0.2

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

Table 2-15. Yeast populations in the supernatant of medium for anaerobic bacterim, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Yeast</i>	11.3±3.2	22.6±2.3	12.1±8.7	14.2±0.8	10.8±4.4
<i>Fungus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	9.4±2.7	nd	nd	nd	nd
<i>Bacterium + Fungus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Yeast + Fungus</i>	8.4±0.7	36.2±7.2	44.9±12.7	36.5±6.8	22.7±8.5
Sequential-culture *					
<i>Fungus (1d) + yeast(1d)</i>	-	-	5.8±0.6	11.5±1.5	7.8±0.9
<i>Fungus (2d) + yeast(1d)</i>	-	-	-	8.3±0.4	5.9±0.7
<i>Fungus (3d) + yeast (1d)</i>	-	-	-	-	13.7±1.7

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

Table 2-16. Fungal populations in the supernatant of medium for anaerobic bacterim, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Yeast</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Fungus</i>	13.7±6.5	9.7±5.4	35.6±18.2	98.7±9.4	112.8±34.9
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Bacterium + Fungus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Yeast + Fungus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
Sequential-culture *					
<i>Fungus (1d) + yeast(1d)</i>	-	-	32.2±2.9	79.6±1.5	212.4±4.8
<i>Fungus (2d) + yeast(1d)</i>	-	-	-	111.5±3.7	96.3±0.9
<i>Fungus (3d) + yeast (1d)</i>	-	-	-	-	75.7±0.7

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

공시미생물들을 각각 단독 배양, 혼합 배양 그리고 연속 배양한 다음, 배양배지내의 효소역가 즉, CMCase와 xylanase 그리고 배양배지 내의 단백질 농도를 측정된 결과는 각각 Table 2-17, 2-18 그리고 2-19에서와 같다. 미생물 각각의 단독배양에서는 CMCase와 xylanase 공히 곰팡이 배양구에서 가장 높았으나 효모 단독 배양구에서 가장 낮았다. 혼합배양 *Bacterium+Yeast*, *Bacterium+Fungus* 그리고 *Yeast+Fungus*구에서의 CMCase 역가는 11.17IU~32.79IU의 범위로 상대적으로 낮게 측정되었고 이러한 경향은 xylanase의 경우에서도 13.58IU~37.74IU의 범위로 관찰되었다. 이러한 이유는 박테리아와 효모나 곰팡이를 혼합배양하면 박테리아만 우점하여 성장하고 효모와 곰팡이를 혼합배양하면 역시 효모만 성장하기 때문에 상대적으로 CMCase와 xylanase를 많은 양으로 분비하는 곰팡이의 성장이 불가능했기 때문에 나타난 현상이라 생각된다.

Table 2-19에서와 같이, 배양액중의 단백질 농도는 단독 배양, 혼합 배양 그리고 연속 배양시에 각각 10.3~29.0 μ mol/mL, 7.7~30.3 μ mol/mL 그리고 25.7~36.3 μ mol/mL로 측정되어 연속배양배지에서의 단백질 농도가 가장 높게 나타났으며 단독배양시와 혼합배양시의 배양액중의 단백질 농도는 아주 유사한 것으로 조사되었다.

Table 2-17. The CMCase activity(IU) in the supernatants of medium for anaerobic bacterim, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	21.01±1.78	26.08±2.79	28.58±1.76	30.03±1.03	32.97±6.01
<i>Yeast</i>	15.69±0.19	16.17±0.67	15.27±0.36	14.24±0.53	13.85±0.74
<i>Fungus</i>	35.25±8.18	36.76±7.83	45.35±9.53	121.71±25.83	83.78±13.77
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	18.36±0.24	15.40±0.22	15.10±0.57	17.10±0.43	16.13±0.19
<i>Bacterium + Fungus</i>	12.17±1.19	14.12±1.73	18.25±6.56	11.17±3.82	32.79±4.12
<i>Yeast + Fungus</i>	14.41±2.17	23.74±0.89	23.33±2.89	26.78±5.82	18.67±3.19
Sequential-culture *					
<i>Fungus (1d)+ yeast(1d)</i>	-	-	121.78±33.19	147.01±42.18	126.92±22.65
<i>Fungus (2d)+yeast(1d)</i>	-	-	-	135.56±36.66	98.85±21.89
<i>Fungus (3d)+yeast (1d)</i>	-	-	-	-	123.17±29.54

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

Table 2-18. The Xylanase activity(IU) in the supernatants of medium for anaerobic bacterim, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	8.23±0.24	9.18±1.32	11.48±3.65	15.39±3.67	13.14±3.22
<i>Yeast</i>	7.16±2.16	8.31±2.62	9.23±3.44	7.33±0.59	11.34±4.72
<i>Fungus</i>	722.44±27.56	839.98±44.73	675.93±33.64	789.56±32.67	949.45±43.69
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	21.38±5.65	19.39±4.66	13.58±4.77	14.39±2.56	19.63±3.57
<i>Bacterium + Fungus</i>	32.33±9.54	37.74±13.39	22.26±16.49	17.97±12.87	21.08±6.94
<i>Yeast + Fungus</i>	17.22±4.23	19.98±7.49	29.64±5.99	19.18±7.79	21.56±4.27
Sequential-culture*					
<i>Fungus(1d)+ yeast(1d)</i>	-	-	657.26±54.17	776.34±32.97	888.68±47.99
<i>Fungus(2d)+yeast(1d)</i>	-	-	-	435.77±39.69	597.27±44.25
<i>Fungus(3d)+yeast (1d)</i>	-	-	-	-	729.57±57.35

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

Table 2-19. Nitrogen concentration($\mu\text{mol/mL}$) in the supernatant of medium for anaerobic bacterim, yeast and fungus mono-, co- and sequential- cultures

Treatments	Incubation time (day)				
	1	2	3	5	7
Mono-culture					
<i>Bacterium</i>	11.40±1.57	19.32±2.21	25.05±2.11	26.30±2.02	26.47±0.99
<i>Yeast</i>	10.27±1.03	23.89±2.81	28.56±1.81	26.41±1.63	23.22±1.41
<i>Fungus</i>	11.01±1.60	12.99±1.13	17.16±2.53	21.15±1.97	28.95±0.11
Co-culture					
<i>Bacterium + Yeast</i>	8.23±0.63	10.97±2.36	23.21±1.34	25.33±4.11	26.23±1.72
<i>Bacterium + Fungus</i>	7.72±0.63	12.11±2.56	19.97±2.11	27.27±2.38	28.22±3.56
<i>Yeast + Fungus</i>	10.21±2.36	18.23±2.69	21.32±9.25	26.44±3.45	29.56±2.37
Sequential-culture*					
<i>Fungus (1d) + yeast(1d)</i>	-	-	27.15±3.08	25.70±6.06	31.17±4.69
<i>Fungus (2d) + yeast(1d)</i>	-	-	-	31.45±4.73	36.25±1.96
<i>Fungus (3d) + yeast (1d)</i>	-	-	-	-	29.18±1.66

Each value represents the mean±standard error of triplicate cultures.

제 3 절 Esterase 분비 transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발 (제 3 세부 과제)

1. 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase) 분비 미생물의 분리·동정 및 선발

가. 연구 수행 내용

1) 공시동물로 fistula가 장착된 한우를 공시하여 반추위액을 채취한 다음, “제 1세부과제의 볏짚 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 미생물(곰팡이)의 탐색 (시험 1-1)”에서와 동일한 방법으로 곰팡이를 분리·동정한다. Esterase 효소분비 능력을 기준으로 분리된 곰팡이를 screening하였으며 screening된 곰팡이는 혐기 발효조를 이용하여 대량 배양하였다.

2) 공시재료로부터 esterase 분비 곰팡이의 분리

가) Esterase 분비 곰팡이 분리를 위한 Enrichment : 한우의 반추위액으로부터 esterase 분비 곰팡이를 분리하기 위하여 배지중의 탄수화물원을 NDF 용액으로 1차 처리한 볏짚(볏짚을 NDF solution으로 1시간 가열한 다음 세척·건조하여 사용함)으로 대체하고 항생제를 투여하여 배양액 속에서 일정기간 혐기 배양 시켜 esterase 분비 곰팡이의 enrichment를 유도하였다.

나) 공시재료의 희석 : Enrichment시킨 공시재료는 혐기희석액(Bryant와 Burkey, 1953) 십진희석법으로 $10^0 \sim 10^{-3}$ 까지 희석하여 순수분리를 위한 접종액으로 이용하였다(Table 3-1).

Table 3-1. Anaerobic dilution solution (Bryant & Burkey, 1953)

Component	Unit	Amount
Mineral solution I ^a	ml	7.50
Mineral solution II ^b	ml	7.50
Cystein-HCl·H ₂ O	g	0.05
Na ₂ CO ₃	g	0.30
Resazurin, 0.1% solution	ml	0.10
D-H ₂ O	ml	100.00

^a K₂HPO₄, 6g in 100.0ml of distilled water.

^b NaCl, 1.2g; (NH₄)₂SO₄, 1.2g; KH₂PO₄, 0.6g; CaCl₂, 0.12g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.25g in 100.0ml of distilled water.

다) 곰팡이의 접종 및 배양 : 탄수화물원이 750mg(절단 볏짚 6~8개)의 NDF 용액을 1차 처리한 볏짚으로 대체된 LAMF(Lowe's artificial medium for ruminal fungi, Lowe 등, 1985, Table 3-2)를 이용하였다. 접종과 배양의 전 과정은 Hungate (1966)의 방법을 응용한 anaerobic gassing system으로 혐기상태를 유지하였다.

Table 3-2. Medium compositions per 100mL of Lowe's medium for anaerobic culture of ruminal fungi

Component	Unit	Amount
Mineral solution I	mL	7.50
Macro B solution	mL	5.40
Trace B solution	mL	1.00
VFA mixture solution	mL	1.00
Hemin 0.1% solution	mL	1.00
Vitamin mixture solution	mL	1.00
Resazurin 0.1% solution	mL	1.00
Trypticase peptone	g	0.10
Yeast extracts	g	0.05
NaCO ₃ 8% solution	mL	15.00
Cystein-HCl · H ₂ O	g	0.05
Distilled water	mL	78.00

Mineral I solution: KH₂PO₄, 1.8g; (NH₄)₂SO₄, 1.8g; NaCl, 3.6g; MgSO₄·7H₂O, 0.73g; and CaCl₂·2H₂O, 0.77g

Macro B solution: KCl, 2.7g; NaCl, 2.7g; MgSO₄·7H₂O, 2.25g; CaCl₂, 0.9g; and NH₄Cl, 2.4g in 300.0ml of distilled water.

VFA mixture solution: Acetic acid, 2.05g; Propionic acid, 0.9g; butyrate, 0.54g; 2-methyl butyrate, 0.015g; Isovalerate, 0.165g; Isobutyrate, 0.14g; n-Valerate, 0.165g; and 0.2M NaOH, 210ml

Vitamin mixture solution: Pyridoxine HCl, 0.06g; Riboflavin, 0.06g; Thiamine HCl, 0.06g; Nicotinamide, 0.06g; Ca-D-Pantothenate, 0.06g; PARA, 0.003g; and Stock Solution, 0.3ml in 300mL in distilled water.

Vitamin Stock Solution: Folic acid, 0.125g; Biotin, 0.125g; and Covalamine, 0.0125g in 25mL of dH₂O.

라) Roll-tube법에 의한 섬유소 분해 곰팡이의 분리 : 희석된 공시재료 1ml를 agar가 함유된 9ml의 배지에 접종한 후, 시험관을 얼음물에서 spinning시켜 agar를 굳힌 다음 37℃에서 5~14일간 배양하며 colony를 분리하였다. 이 때 박테리아나 효모 등과 같은 미생물의 성장을 방지하기 위하여 아래 Table 3-3의 항생제를 혼합하여 투여하였다.

Table 3-3. Antibacterial agent used in the experiment preventing to grow of bacteria and yeast

Component	Unit	Amount
Penicillin-G, sulfate	g	0.606
Streptomycin	g	0.132
Chloramphenicol	g	0.030
Distilled water	mL	50.00

마) 이 후의 구체적인 곰팡이 분리과정이나 보존 및 계대 등의 방법들은 제 1 세부과제에서와 동일하였다.

나. 연구 수행 결과

1) Delignified esterase(branching 효소)를 분비하는 미생물의 문헌적 연구

벗짚은 화학적으로 각질화 단계에서 침착된 리그닌이나 실리카의 함량이 너무 높으며 이들과 결합된 섬유소나 단백질은 미생물이 분해시키지 못하기 때문에 소화율이나 에너지의 이용효율이 너무 낮다는 것이다.

리그닌이란 3개의 xylose에 아라비노즈가 붙고 그 위에 ferulic acid, qumalic acid 혹은 synapic acid 등이 붙어 있는 모든 구조들을 의미하는데 이 구조와 연결되어 있는 모든 영양소들은 미생물의 작용을 받지 못한다. 따라서 아라비노즈와 여러 가지 acids들을 끊어 주는 효소(peroxidase, esterase)에 많은 관심이 집중되었는데 아주 최근에 반추위 곰팡이가 이 효소를 분비한다고 알려지고 있다. 따라서 문헌적 고찰을 통하여 탈 리그닌 효소를 분비하는 미생물들을 찾아보았다. 탈 리그닌 효소인 acetyl xylan esterase를 분비하는 검색된 미생물들(Table 3-4 참조) 중에서 반추위

미생물은 *Neocallimastix patriciarum*, *Orpinomyces* sp. PC-2, *Ruminococcus flavefaciens* 17 및 *Fibrobacter succinogenes* S85 등이다.

탈 리그닌 효소인 feruloyl esterase와 cinnamoyl ester hydrolase를 분비하는 검색된 미생물(Table 3-5와 Table 3-6 참조) 중에서 반추위 미생물은 *Neocallimastix* MC-2, *Clostridium stercorarium* 및 *Orpinomyces* sp. PC-2 등이며 탈 리그닌 효소 cinnamoyl ester hydrolase를 분비하는 유일하게 검색된 *Piromyces equi*는 말의 분에서 분리한 혐기성 곰팡이이다. 따라서 탈 리그닌 효소를 분비하는 반추위 혐기성 곰팡이로는 *Neocallimastix patriciarum*, *Orpinomyces* sp. PC-2, *Neocallimastix* MC-2, 및 *Orpinomyces* sp. PC-2 등 4종이었다.

Table 3-4. 탈 리그닌 효소인 acetyl xylan esterase를 분비하는 반추 미생물의 종류

미생물명	연구자	유전자	단백질 크기 (kDa)	연구년도
<i>Bacillus pumilus</i>	G.Degrassi 등	AXE:516bp	40	1998/2000
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL-Y485	W.Shao 등		I-195 II-106	1995
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	W.W.Lorenz 등	AXE I; 963bp	32	1997
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	B.P.Dalrymple 등	BnaA,B(U66252),C		1997
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	D.L.Blum 등	AxeA939bp(AF001178)	34.845	1999
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	V.Aurilia	CesA2306bp(AJ238716)		2000
<i>Aspergillus niger</i>	J.K.Ha	AxeA1619(AF180369)		2000
	F.J.M.Kormelink A.G.J.Voragen		30.480	1993

Table 3-5. 탈 리그닌 효소인 feruloyl esterase를 분비하는 반추 미생물의 종류

미생물명	연구자	유전자	단백질 크기 (kDa)	연구년도
<i>Neocallimastix</i> MC-2	W.S. Bomeman 등	FAE I/II	69/24	1992
<i>Clostridium stercorarium</i>	J.A.Donaghy 등		33	2000
<i>Clostridium thermocellum</i>	D.L.Blum 등	FAE(XynZ)		2000
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	D.L.Blum 등	FaeA1645bp(AF164351)		2000
<i>Aspergillus niger</i>	C.B.Faulds 등	FAE-III		1997

Table 3-6. 탈 리그닌 효소인 cinnamoyl ester hydrolase를 분비하는 반추위 미생물의 종류

미생물명	연구자	유전자	단백질 크기 (kDa)	연구년도
<i>Piromyces equi</i>	L.J.Fillingham 등	EstA(AR164516)	33.34	1999

2) 반추위로부터 Delignified esterase(branching 효소)를 분비하는 미생물의 분리

반추동물의 반추위로부터 delignified esterase(branching 효소)를 분비하는 미생물을 손쉽게 빨리 분리해 내기 위하여 NDF용액과 ADF용액으로 처리하고 남은 볏짚을 기질로 사용하였다. 즉, 화학처리(NDF 및 ADF 용액 처리)로 추출된 볏짚 리그닌을 기질로 하여 무작위로 분리한 반추위 곰팡이들이 성장률을 나타낸다면 delignified esterase를 분비하는 것으로 간주하였다. 반추위로부터 70개 이상의 곰팡이를 순수 분리하여 볏짚 리그닌 기질에서 성장이 이루어진 곰팡이는 아래의 Table 3-7에서 보는 바와 같이 8종에 불과하였다. 뿐만아니라, 분리번호 GSRR-1과 GSRR-4번을 제외하고는 성장정도 역시 상당히 미미하였다(Table 3-8 참조). 탈 리그닌 효소를 분비하는 반추위 혐기성 곰팡이 균락의 색상과 모양 및 성장특성에는 일반적인 반추위 곰팡이와 특별한 차이점이 발견되지 않았다. 분리하는 과정중에 7일 동안 성장시킨 colony의 색은 주로 황색, 노란색 및 흰색이었는데, colony의 중앙에는 진한 황색 가운데 부분은 노란색 그리고 가장자리로 갈수록 열어져 흰색을 띠는 colony가 가장 많이 형성되었다. 그러나 성장 시기에 따라 colony의 색은 많은 변화를 보여 초기에는 흰색의 점으로 성장을 시작하여 배양 3-4일경부터 중앙부분이 황색으로 변하며 5~6일 이후 부터는 급속히 성장하여 가장자리에 흰색의 환을 형성하는데 이는 곰팡이의 가근 때문에 나타난 현상이라 생각된다. 흰개미의 경우는 한 우에서와는 달리 흰색이 많이 형성되는 것 같았다.

Table 3-7. 탈 리그닌 효소를 분비하는 반추위 혐기성 곰팡이 균락의 색상과 모양 및 성장 특성

분리번호	분리원	분리 승수	균락의 색			균락의 모양		호기 성장
			내부	중간	외부	형태	크기	
GSRR-1	한우반추위	10 ⁻³	흰색	황색	흰색	구형	소	-
GSRR-2	한우반추위	10 ⁻³	황색	/	흰색	부정형	중	-
GSRR-3	한우반추위	10 ⁻³	흰색	흰색	흰색	구형	소	-
GSRR-4	한우반추위	10 ⁻³	흰색	노랑	흰색	난형	중	-
GSRR-5	한우반추위	10 ⁻⁴	황색	황색	황색	구형	대	-
GSRR-6	한우반추위	10 ⁻⁴	흰색	/	흰색	구형	대	-
GSRR-7	한우반추위	10 ⁻⁴	황색	황색	흰색	부정형	대	-
GSRR-8	한우반추위	10 ⁻⁵	황색	황색	흰색	구형	소	-

Table 3-8. 한우 반추위에서 분리한 esterase 분비 곰팡이의 발효특성과 리그닌 분해력

분리번호	pH	지방산과 젖산 생성량			배지중 성장양상			탁 색 도	리그닌 분해력
		Acetate	Butyrate	Lactate	색갈	점도	거품		
GSRR-1	6.63	4.21	1.21	3.13	⊙	⊙	⊙	-	+++
GSRR-2	6.65	5.21	0.98	1.37		⊙		-	+
GSRR-3	6.32	4.56	0.63	2.45		⊙	⊙	-	++
GSRR-4	6.04	3.19	-	1.67		⊙	⊙	-	+++
GSRR-5	6.32	5.75	0.61	2.59	⊙	⊙	⊙	-	+
GSRR-6	6.54	4.15	0.87	-		⊙	⊙	-	+
GSRR-7	6.49	4.35	0.76	1.98	⊙	⊙		-	+
GSRR-8	6.78	4.78	0.29	0.19	⊙	⊙	⊙	-	++

Colony의 형태는 구형에서 부정형에 이르기까지 다양하였으나 거의 대부분이 둥근 형태였다. Colony의 크기는 직경 20mm 이상(대형)의 것부터 5mm 이하(소형)의 것까지 다양하였으나 대부분이 10~20mm 범위의 크기를 가졌다. 호기 상태에서 성장하는 미생물은 하나도 분리되지 않았다. 또한, 한우의 반추위액을 10^{-3} ~ 10^{-5} 희석하였을 경우 분리가 용이하였다.

한편, 분리한 곰팡이들에 대하여 전자현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과는 Table 3-9에 요약하였다. 혐기성 곰팡이는 유주자(zospore), 포자낭(sporangia) 및 가근(rhizoid)의 3가지 주요 부위로 구성되어 있으며, 이러한 구성요인들의 미세구조와 형태 및 크기는 속과 종을 분류하는데 기초자료가 된다. 이 구조들과 크기를 근거로 분리번호 GSRR-1, GSRR-2, GSRR-3, GSRR-4, GSRR-5, GSRR-6, GSRR-7 및 GSRR-8는 각각 *Neocallimastix*, *Anaeromyces*, *Piromyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Neocallimastix*, *Piromyces* 및 *Orpinomyces*로 동정되었다.

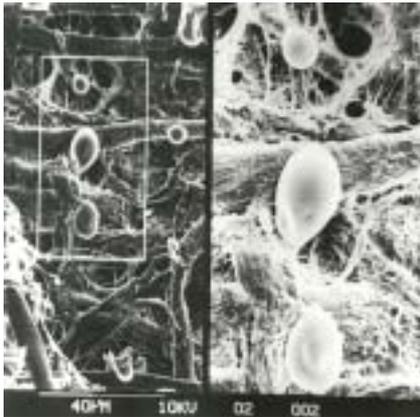
Table 3-9. 한우의 반추위에서 분리한 esterase 분비 곰팡이의 형태적 특성과 분류학적 위치

분리번호	성장양상	포자낭			유주자		가근 모양	동정
		모양	크기	stalk	모양	flagella		
GSRR-1	mono	oval	75	+	globes	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRR-2	poly	fusiform	60	+	oval	uni	filament	<i>Anaeromyces</i>
GSRR-3	mono	variable	85	+	oval	uni	filament	<i>Piromyces</i>
GSRR-4	mono	oval	45	+/-	oval	uni/bi	filament	<i>Piromyces</i>
GSRR-5	mono	globes	40	+	globes	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRR-6	mono	globes	55	+	globes	multi	filament	<i>Neocallimastix</i>
GSRR-7	mono	ellipsoidal	65	+	oval	uni	filament	<i>Piromyces</i>
GSRR-8	poly	globes	70	-	oval	multi	filament	<i>Orpinomyces</i>

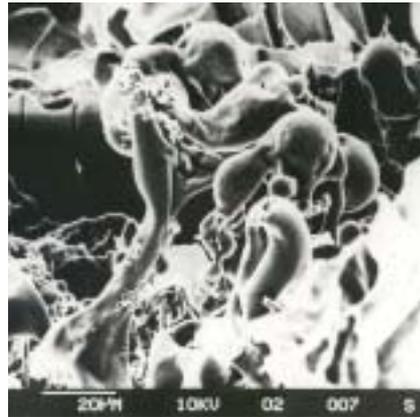
한편, 분리한 곰팡이들에 대한 전자 현미경사진은 Figure 3-1과 Figure 3-2에 각각 나타내었으며 특징점은 곰팡이들이 상당한 점성을 갖고 있다는 것과 배지 중에서 성장할 때 많은 거품을 생성하는 특이한 현상들이 관찰되었다.

3) 대량 배양 시스템의 구축

반추위로부터 분리한 delignified esterase를 분비하는 미생물을 대량 배양하기 위하여 경상대학교 종합 실험관에 보유중인 혐기 미생물 대량 배양기 (3L 용량)을 관리전환 받았으며, 혐기 미생물을 대량 배양시키기 위한 적정 배양배지의 선별, 온도, pH, 적정 배양 시간 등을 조사하므로서 혐기성 미생물 대량 배양 시스템을 구축하였다. Figure 3-1과 3-2는 lignin-matrix 기질에서 성장하는 곰팡이를 전자현미경으로 촬영한 것이다.



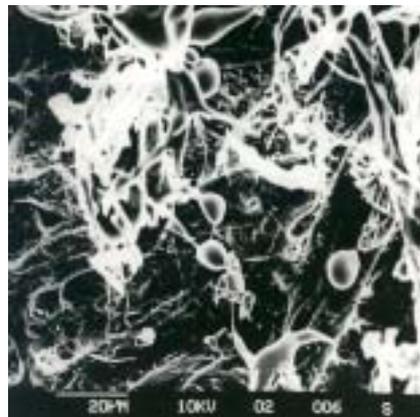
IS number GSRR-1



IS number GSRR-2



IS number GSRR-3

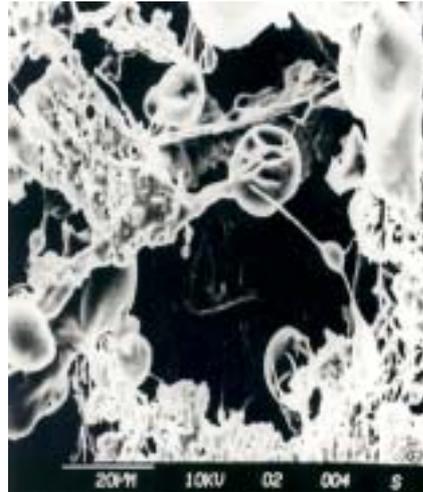


IS number GSRR-4

Figure 3-1. 반추동물 한우의 반추위로부터 분리한 lignin-matrix 기질에서 성장이 가능한 혐기성 곰팡이의 전자현미경 사진.



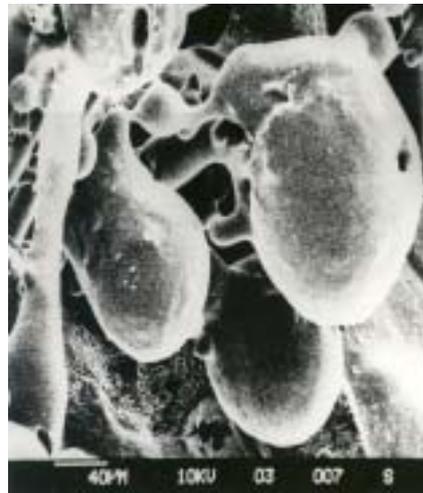
IS number GSRR-5



IS number GSRR-6



IS number GSRR-7



IS number GSRR-8

Figure 3-2. 반추동물 한우의 반추위로부터 분리한 lignin-matrix 기질에서 성장이 가능한 혐기성 곰팡이의 전자현미경 사진.

2. 해당 유전자 sequencing, 유전자특성 분석 및 유전자 cloning

가. 연구 수행 내용

1) 제 1년차 연구에서 도출된 결과(리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase)를 분비 하는 미생물을 분리·동정 및 선발)에 따라 분리번호 GSRR-1(filamentous, *Neocallimastix*)와 분리번호 GSRR-4(filamentous, *Piromyces*)를 공시하여 esterase 효소에 대한 유전자를 cloning하기 위하여 약 7개월간 각고의 노력을 하였음에도 불구하고 진핵세포인 곰팡이에 대한 경험이 없었던 관계로 유전자 cloning에 실패하였다.

2) 따라서 Esterase를 다량으로 분비하는 반추위 박테리아를 대체하여 본 연구를 진행하였다.

가) 공시균주

(1) 반추위 혐기성 박테리아 *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* strain S85 (ATCC19169; Montgomery 등, 1988).

(2) *Escherichia coli* DH5a 그리고 BL21(DE3)

나) 배양배지

(1) *Fibrobacter succinogenes*: Glucose Sloppy Agar(GSA) 배지 (Table 3-10)와 Dehority(1965) 배지 (Table 3-11) 및 rice straw 배지 (Table 3-12) 사용

(2) *Escherichia coli* : Luria-Bertani(LB) 배지

Table 3-10. Medium compositions Glucose Sloppy Agar(GSA) medium

Component	Unit	Amount
Rumen Fluid	mL	51.0
Mineral I Sol.	mL	49.5
Mineral II Sol.	mL	49.5
Resazurin	mL	0.30
Yeast Extract	g	0.30
Peptone	g	0.30
Glucose	g	0.45
Agar	g	0.30
dH2O	mL	150.0
NaHCO ₃	g	1.5
Cys-HCl	g	0.3

다) 효소활력의 측정

효소의 활력, 즉 acetyl esterase의 활력을 측정하는데 이용되는 alpha-naphthyl acetate를 기질로 이용한 assay 방법을 주로 이용하였으며, 분해된 초산을 검출하기 위해 Aminex HPX-87H 컬럼을 장착한 HPLC를 이용하였고, xylanase 활력은 Lever 방법에 의거해 분석하였다.

Table 3-11. Medium compositions per 100mL of Modified Dehority medium for incubation of rumen bacteria

Component	Unit	Amount
Mineral soln. I ¹	mL	7.50
Mineral soln. II ²	mL	7.50
Cystein-HCl · H ₂ O	g	0.05
Na ₂ CO ₃	g	0.30
0.1% resazurin	mL	0.10
Vitamin mixture solution ³	mL	1.00
VFA solution ⁴	mL	6.70
Hemin solution ⁵	mL	0.10
Glucose	g	0.50
Cellobiose	g	0.50
Soluble starch	g	0.50
NaCO ₃ 8% solution	mL	15.00
Cystein-HCl · H ₂ O	g	0.05
Distilled water	mL	78.00

¹ Mineral soln I : K₂HPO₄ 0.6 (/100 ml).

² Mineral soln II : KH₂PO₄, 0.6g; (NH₄)₂SO₄, 1.2g; NaCl, 1.2g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.25g; CaCl₂, 0.12g (/100ml).

³ Vitamin mixture : pyridoxine HCl, 0.20g; riboflavin, 0.20g; thiamine HCl, 0.20g; nicotic acid amide, 0.20g; Ca-d-pantothenate, 0.20g; para-amino benzoic acid, 0.01g; folic acid, 0.125g; biotin, 0.125g; cobalamine, 0.0125g in 1,000ml distilled water.

⁴ VFA (volatile fatty acid) solution : acetic acid, 17ml (2.9×10⁻²M); propionic acid, 6ml (8.0×10⁻³M); n-valeric acid, isovaleric acid, and DL-methylbutyric acid, 1ml each (9×10⁻⁴M), then make to 1,000ml with distilled water.

⁵ Hemin solution : dissolve 50mg hemin with 1ml 1N NaOH, then make to 100ml with distilled water.

3) *Fibrobacter succinogenes* 지놈에서 유전자를 cloning하기 위해서 Table 3-13에서와 같은 primer를 제작하여 이용하였다. 유전자들은 지놈 DNA로 부터 PCR을 통해 직접 증폭되었으며, Axe6A의 경우 pET30a백터에, Axe6B의 경우에는 pET22b+백터에 클로닝되었다.

Table 3-12. Medium compositions of rice straw medium for incubation of rumen bacteria with esterase activity

Component	Unit	Amount
Rumen Fluid	mL	51.0
Mineral I Sol.	mL	49.5
Mineral II Sol.	mL	49.5
Resazurin	mL	0.30
Yeast Extract	g	0.30
Peptone	g	0.30
Rice straw (Boiled 1h with NDF solution)	g	0.45
Agar	g	0.30
dH2O	mL	150.0
NaHCO ₃	g	1.5
Cys-HCl	g	0.3

Table 3-13. Oligonucleotide primers used for amplifying *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* strain S85 genes *axe6A* and *axe6B*

No	Amplified DNA	Primer set	
1	<i>axe6A</i>	3724-N-F; <i>Bgl</i> II 3724-N-R; <i>Xho</i> I	tta ata aga tct agg cct ctc tat gtt tgc g tat ata ctc gag ttc gaa aac gac aac ctt
2	<i>axe6B</i>	3723-G-F; <i>Sma</i> I 3723-G-R; <i>Xho</i> I	tat taa ccc ggg agc tgg gct ttc tat gtt t tat ata ctc gag atg tat cac cac ctt ttt t

나. 연구 수행 결과

Figure 3-3은 본 연구에 이용한 유전자들에 대한 개략도이다. 그림의 위 A 도표는 같은 크로모솨내에 근접하게 연속적으로 위치하고 두 효소의 DNA를 보여주고 있다. B는 두 효소의 아미노산염기서열을 기반으로 분석한 분석도이다. 두 유전자는 똑같은 구조를 가지고 있고, N-terminal 쪽에 1-30번 아미노산 부분은 signal peptide이고 그 뒤쪽에 이어서 carbohydrate esterase family 6의 catalytic domain이 위치하고 있으며, 마지막으로 C-terminal 부분에 섬유소 결합 domain이 존재하며 효소활성부위와 섬유소 결합부위 사이에 proline-rich linker로 예상되는 염기서열이 존재(family 6 carbohydrate binding module)하는 전형적이고도 완벽한 유전자의 모습을 갖추고 있다. 얻어진 유전자를 *E. coli*에 발현시켜 Axe6A와 Axe6B의 효소 유전자의 특성을 조사한 결과는 Table 3-14에서와 같다. Axe6A의 분자량은 약 59, 61 kDa이며, Axe6B는 60.5kDa 이었다. 이들 효소가 최대활력을 나타내는 pH와 온도대는 각각 중성과 40°C로써 반추위의 조건과 매우 유사하였다. Axe6A와 Axe6B의 pI 값은 각각 5.5와 5.4였고, Km값은 0.084, 0.056 이었으며, Vmax값은 105.3, 31.2로 나타났다.

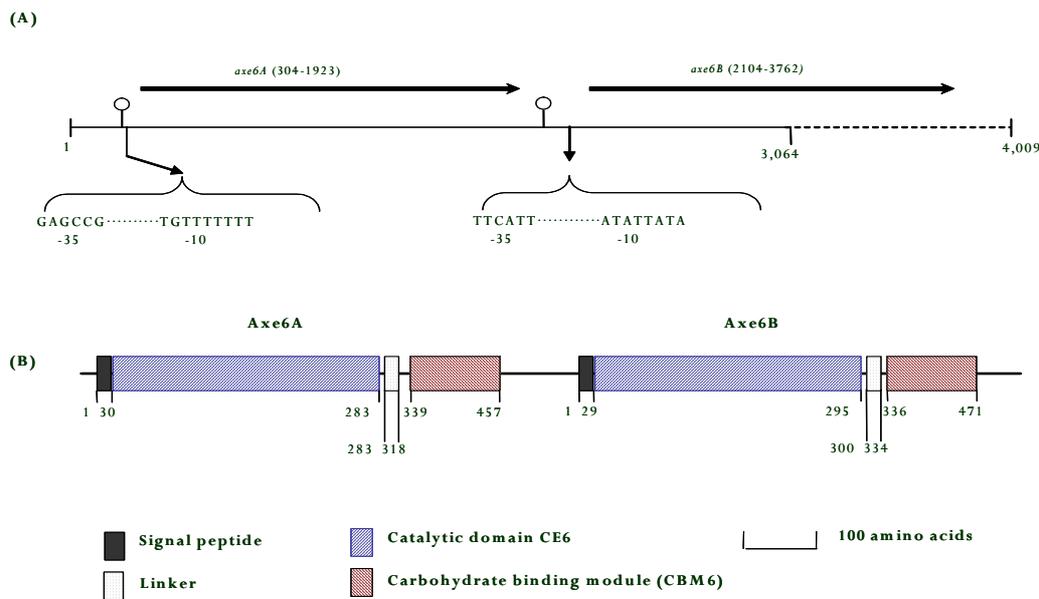


Fig. 3-3. Organization of the acetyl xylan esterase axe6A and axe6B in genomic DNA of *F. succinogens*. (A) Gene structures and (B) domain organization of the enzymes. The vertical bar with a circle in (A) indicates an inverted repeat region.

Table 3-14. Characteristics of Axe6A와 Axe6B

Enzymes	Mol. Wt. (kDa)	Maximum activity		pI*	Km (mM)	Vmax (U mg ⁻¹)
		pH	Temp. (°C)			
Axe6A	58.6	6.5 ~ 8.5	40	5.52	0.084	105.3
Axe6B	60.5	7.5	40	5.43	0.056	31.2

Note: a-Naphthyl acetate was used as a substrate. Assay results are the mean values of triplicate determinations. *Molecular masses and pI values were computed from the amino acid sequences of the mature enzymes.

그리고 acetylxyylan esterase의 섬유소 결합 domain의 아미노산 서열을 3D PSSM이라는 computer programme을 이용하여 단백질의 3차 구조 모형을 조사해본 결과 (Figure 3-4), *Celvibrio lichenase*의 섬유소 결합 domain과 유사하다는 것을 관찰 할 수 있었다.

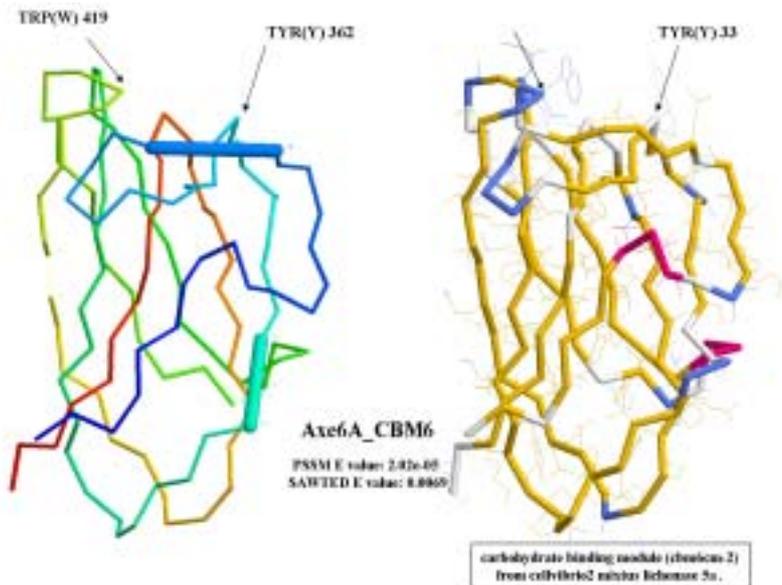


Fig. 3-4. The analysis of family 6 carbohydrate binding module (CBM) of Axe6A using the program 3D PSSM.

또한, *Fibrobacter succinogenes* 6A와 6B의 catalytic domain의 아미노산 alignment를 조사해본 결과(Figure 3-5), 아직까지 이러한 균 효소들의 conserved amino acid나 catalytic site 등은 자세히 밝혀지지 않았으나, 같은 carbohydrate esterase family에 속하는 *Orpinomyces*와 *Neocallimastix patriciarum*이 분비하는 AxeA와 BnaA와 아주 높은 연관성을 나타내었다.

```

Axe6A_Fs      MSVEMSFKKLMGIAGVAAGLSMFVAVMGANAAPDPNFHIIYIAYGQSNMEGNARNFTDVKK 60
Axe6B_Fs      MSVERNLKFKMALAGVAAGLSMFVAVG-ANAAPNPNFHIYIAYGQSNMAGNDIVPSEDQA 59
AxeA_Orp      -----MRTSVVITFLAAALTVMAKP--HAKPDPNFHIYLALGQSNMEGQG-NVEAQDRV 51
BnaA_Npat     -----MRTFAIAAFVATTL SAVSQT--FAAPDPNFHIYLAFGQSNMEGQG-PIGSQDRT 51
              :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
Axe6A_Fsuc    EHPR-VKMFATTS CP SLGRP-----TVGEMYP AVPPMPFKCGEGLSVADWFG RHMADSL 112
Axe6B_Fsuc    EAPKNFIMLASHNANASQRSGKTNQSIKTGEWYPAIPPMFHPFENLSPADYFGRAMADSL 119
AxeA_Orp      EDKR-FKLISTADE-CMGRE-----LGEWYPALPPIVNCYGNLGPVDYFGR TLTKKL 101
BnaA_Npat     VDKR-FQMI STVSG-CNGRQ-----MGNWYDAVPPLANCDGKLG PVDYFGR TLVKKL 101
              :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
Axe6A_Fsuc    P-NVTIGIIPVAQGGT S IRLFD PDDYKNYLNSAESWLKNGAKAYGDDGNAMGR IIEVAKK 171
Axe6B_Fsuc    P-GVTVGII PVAIGAVSIRAFDKDQYEAYFRGDGKDIMNWGWPKDYDNNPPGRILELAKK 178
AxeA_Orp      PKEVKVGVCAVAVAGCDIQLFEEENYKSYEIPD---WMQGRIDHYGGNPFRRLVNI AKK 157
BnaA_Npat     PQEIKVGVAVVAVAGCDIQLFEKNYRNYRLES---YMQGRVNAVYGGNPFYGR LIEVAKK 157
              * :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
Axe6A_Fsuc    AQEKGVIKGIIFHQGETDGGMSNWEQIVKKTIEYMLKQLGLNAEETPFVAGEMVDGGS- 229
Axe6B_Fsuc    AKEVGVIKGFIHQGESDGT DANWRKTVYKTYKDVIDALGLDENEVFPVAGELLQEGQN- 237
AxeA_Orp      AQQAGVIKGI LLHQGETNNGQEDWPKRIKVYERLLKELNLKAEVPL LAGEVVR EEEYEG 217
BnaA_Npat     AQQVGVIKGILLHQGETNTGQQNWPNRVKAVYEDMLKDLGLNAKDVP L LAGEV VVQSNQGG 217
              *.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
Axe6A_Fsuc    -CAGFSSRVRGLSKYIANFPGVASSKGYGSKG-DGLHFTVEGYRGMGLRYAQ QMLK LINVA 287
Axe6B_Fsuc    CCSSKNGGIIAQLKQNFKFKGLASSKGLQNGKDPYHFRAGVIELGKRYCSEMLK LID- 295
AxeA_Orp      MCSLHNTVIKKLPEVIPTAHVISAEGLDDGG-DDLHFSSASYRILGERYADKMLELL--- 273
BnaA_Npat     QCGSMNSIIQKLP S VIPTAHVIS SQGLGQQG-DGLHFSSQAYRTFGERYADEMLKIL--- 273
              *.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:

```

Fig. 3-5. Alignment of the amino acid sequences of the CDs of *F. succinogenes* AXe6A and Axe6B with carbohydrate esterase family 6 enzymes AXe6A_Fs, *Fibrobacter succinogenes* S85(Accession #AF180369); AxeA_Orp, *Orpinomyces* sp. Strain PC-2(AF001178); BnaA_Npat *Neocallimastix patriciarum*(U66251). Asterisks indicate conserved amino acids among sequences. Putative signal peptide sequences are underlined.

Figure 3-6은 family 6 carbohydrate binding module들과 얼라이먼트를 실시한 것이다. Axe6A와 B는 약 40%의 유사도를 나타내었고, 다른 CBM들과 적게는 6%에서 많게는 25%의 유사도를 보였다. Figure 3-6에서 두꺼운 글자는 conserved 사이트들을 표시하고 있다.

또한, carbohydrate binding domain은 *Fibrobacter succinogens*가 분비하는 xylan 10D, 10E 등과 *Cellvibrio mixtus*가 분비하는 Cel5a, Xyn11A 그리고 *Cellvibrio thermocellum*가 분비하는 xylanase 11A와 높은 homology를 보였다.

```

Axe6A_Fs      -----DSD---YRKDTG-----VDLYKAGDGVALGYTQTGEWLEYT---VD 37
4Axe6B_Fs    VEAEENYKGGADKAYYDLSKGNEGGKLRKNDVDIYQPNMGI VVGHHCQKSEWLKYT---VN 392
Xyn10D_Fs    -----GSD---YRKDTG-----VDLYKKATGVI VGYNSEGDWLEWT---VN 455
Xyn10E_Fs    -----GSD---YRKDTG-----ADLYKKATGVALGYNTTGDWYEY---IN 446
Xyn10B_Fs    -----GSD---YRKSDAS-----DVDIYKKATGNI VGYNTTGDWLEYS---VD 433
CmCBM6-1     -----QAES--WCQMSG-----VKTEETSDAGDGLN VGYIDGGDWMYTS---VN 39
CmCBM6-2     ---VIATIQAED--HSQQSG-----TQQETTTDTGGG KNVGYIDAGDWLSYAGTPVN 48
Xyn11A_Ct    --RSAFSKIESE--YNSLKSS-----TIQTIGTSDGGSG IGYIESGDYLVFN--KIN 47
      . . . . . * * : : : : :
Axe6A_Fs    VKADGEYNIDASVAAGNSTSAFKLYIDEKA--ITDDVSVPQT--ADNSWDTYKTISVKEK 430
Axe6B_Fs    VKADGDYGITANVAGDNATGSIVLYMDDKR--IGDEMVNE----GKGFDTFS-IVDGGK 444
Xyn10D_Fs    VKEAGDYTMFAAVAAGSTSSFQLSLDGKA--LTEKITVPAAKEGEENYDHYN--KVKGN 511
Xyn10E_Fs    IAEAGDYTAIASVATEG-TGAFTLSLDGKS--LAE-FEVT----GTSYDDFS--DVKKK 495
Xyn10B_Fs    IAEAGDYTATASVAADG-SGSFKLSIDGKS--VGE-FDVTWT---GSSWDNFI--DVKKK 484
CmCBM6-1     IPTTGTYKVSYRVAAQAGGGQLQLEKAGGSP-VYSNINVPAT---GGWQNWQ--TISHN 92
CmCBM6-2     IPSSGSYLIEYRVASQNGGSLTFEEAGGAP-VHGTIAIPAT---GGWQTWT--TIQHT 100
Xyn11A_Ct    FGNGANSFKARVASGADTPTNIQLRLGSPTGTLIGTLVAST---GGWNNYE--EKSCS 101
      . . . . . : : : : : : : :
Axe6A_Fs    VTLKAGKHVLKLEITANYVNIDWIQFSEPKK-- 461
Axe6B_Fs    VSLKAGEHELKIEIANDWIDYIEFK----- 471
Xyn10D_Fs    VTLPAGKHVLRMDVTGAWFDVDYFFVK----- 539
Xyn10E_Fs    VTLPAGKHVLRLDVTQYFDYINFVK----- 523
Xyn10B_Fs    VTLPAGKHTLRMDVTQYFDYINFTK----- 512
CmCBM6-1     VVLPAGEQLIALSAITGGFNINWLKVES----- 120
CmCBM6-2     VNLSAGSHQFGIKANAGGWNLNWIRINKTH--- 130
Xyn11A_Ct    ITNTTQHDLYLVFSG-PVNIDYFIFDSNGVNP 133
      : * : : : : : : :

```

Fig. 3-6. Alignment of the amino acid sequences of the CBMs of *F. succinogen*s AXe6A and Axe6B with CBM 6 enzymes. Xyn10D, E, and B_Fs, AF180368; CmCelB_CMB6-1, *Cellvibrio mixtus* Cel5a, Xyn11A_Ct, *C. thermocellum* xylanase 11A. The bold letters indicate the conserved residues that have been shown to be involved in ligand binding.

3. Esterase 분비 transgenic 미생물 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발

제 2년차에서 확보·분석된 두 유전자는 대장균 *E. coli*에 transgenic시킨 다음, 대량 배양한 후 배양액으로 분비된 lignin 분해효소인 Axe6A와 Axe6B를 여러 가지 컬럼 등을 이용하여 순수 정제하였다. 정제된 효소의 특징들은 Table 3-15에서 보는 바와 같다.

Table 3-15. Axe6A and Axe6B purified from the cytoplasmic fraction of *E. coli*.

Purification		Total protein(mg)	Total Units(U)	Specific activity(U/mg)	Yield (%)
Axe6A	Cell extract	1678.7	14553.7	8.7	100
	Sephadex G-75	N.D.	1258.09	N.D.	8.6
	DEAE-Sephrose	0.76	85.9	113	0.59
Axe6B	Cell extract	1194.4	3463.6	2.9	100
	GST-Elution	16.6	284	17.1	8.2
	Sephadex G-75	0.77	45.1	58.6	1.3

*Not determined.

다음 Figure 3-7은 최종적으로 정제된 후의 Axe6A와 Axe6B 그리고 Xyn10E의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

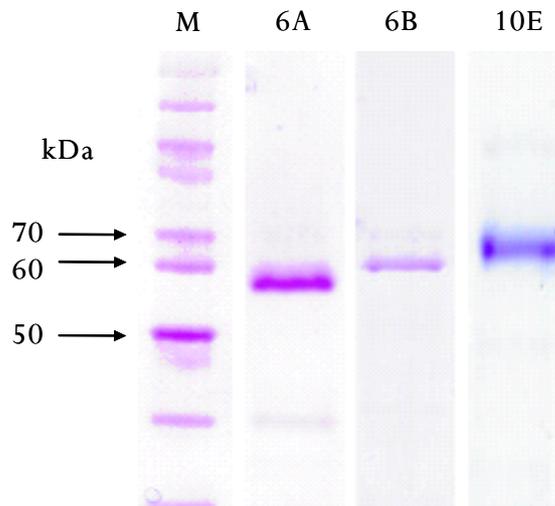


Fig. 3-7. SDS-PAGE analysis of the purified Axe6A, Axe6B and Xyn10E. Molecular weight marker(M); Axe6A(~58.6kDa), Axe6B(~60.5kDa), and Xyn10E(~66.7kDa).

Xyn10E는 시너지 효과와 여러 가지 비교 실험을 위해 정제된 효소로써, 실험실에서 이미 분리되고 분석되어 논문이 발표된 효소이다. Axe6A, Axe6B 그리고 Xyn10E의 분자량은 각각 58.6kDa, 60.5kDa 그리고 66.7kDa 정도 되는 것으로 조사되었다. Axe6A와 Axe6B의 기질 특이성을 조사하고자 α -naphthyl acetate, α -naphthyl propionate, α -naphthyl butyrate, α -naphthyl caprylate, α -naphthyl laurate, r-nitrophenyl xylopyranoside, r-nitrophenyl arabinofuranoside, acetylated birch wood xylan, xylose-tetraacetate 그리고 glucose-pentaacetate 등을 기질로 이용하여, 효소역가를 측정한 결과(Table 3-16), Axe6A와 Axe6B 효소 공히 α -naphthyl acetate 기질에 기질 특이성을 나타내었다. Table 3-17은 Avicel, IF-OSX 그리고 birch wood xylan 과 같은 불용성 탄수화물 기질에 대한 기질 특이성을 조사한 결과이다.

Table 3-16. Substrate specificities of Axe6A and Axe6B

Substrates	Axe6A		Axe6B	
	Activity	%	Activity	%
a-Naphthyl acetate	110.3±7.3*	100.0	26.0±2.5*	100.0
a-Naphthyl propionate	16.8±1.9	15.2	3.8±0.1	14.6
a-Naphthyl butyrate	0.6±0.1	0.6	0.5±0.1	1.9
a-Naphthyl caprylate	1.4±0.3	1.3	0.4±0.2	0.2
a-Naphthyl laurate	0.1±0.1	0.1	0.02±0.1	0.1
r-Nitrophenyl xylopyranoside	1.4±0.4	1.3	0.04±0.04	0.2
r-Nitrophenyl arabinofuranoside	0.3±0.02	0.3	0.0±0.01	0.0
Acetylated birchwood xylan	6.2±0.1	5.6	1.5±0.1	5.8
Xylose-tetraacetate	11.4±0.2	10.3	1.3±0.03	5.0
Glucose-pentaacetate	11.4±0.3	10.3	2.6±0.1	10.0

* Activity expressed in U/mg protein±standard error(n=3).

Table 3-17. Test for binding of Axe6A to insoluble polysaccharides.

Substrates	Activity (nmol/min mL-1)	% of activity bound
None	23.1 ± 0.9	-
Avicel	1.5 ± 0.2	93.5
IF-OSX*	11.4 ± 0.9	49.4
Beech wood xylan	1.3 ± 0.2	94.4

*IF-OSX, Insoluble fraction of Oat Spelt Xylan.

Table 3-18. Effects of various additives on binding of the Axe6A to Avicel microcrystalline cellulose

Additives	Activity (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		Activity bound (%)
	Control	Non-binding	
None	22.2 ± 0.8	0.61 ± 0.01	97.3
Glucose (0.6%)	26.1 ± 1.2	5.8 ± 0.3	77.7
Xylose (0.6%)	27.4 ± 2	5.9 ± 0.5	78.5
Cellobiose (0.6%)	31.9 ± 2.2	6.3 ± 0.1	80.3
Methylcellulose (0.8%)	52.2 ± 3	11.0 ± 1	78.9
Carboxymethylcellulose (0.8%)	23.9 ± 1.4	2.0 ± 0.1	91.6

아래의 Figure 3-8은 Axe6A가 가용성 기질, hydroxyethyl cellulose; rye arabinoxylan; starch; hydroxyethyl cellulose; arabinogalactan 그리고 barley b-glucan에 부착정도를 non-denaturing eletrophoresis 기법으로 관찰하였다. 전기영동은 50V에서 3.5 시간동안 수행하였으며 이 때의 온도는 22°C 였다. 그리고 Coomassie blue G250로 염색하여 관찰하였다. Bovine serum albumin 단백질을 reference로 이용하였다.

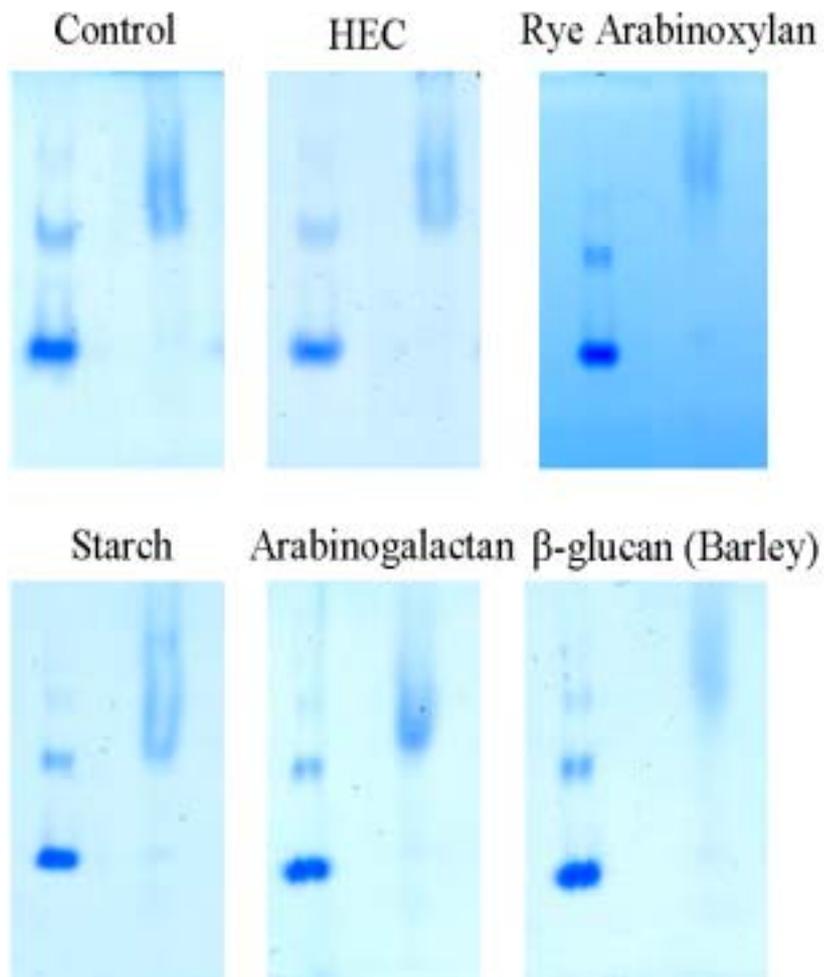


Fig. 3-8. Non-denaturing electrophoresis of bovine serum albumin and Axe6A in polyacrylamide gel containing 0.1%(w/v) of soluble polysaccharide. Polysaccharide included: No polysaccharide; Hydroxyethyl cellulose; Rye arabinoxylan; Starch; Hydroxyethyl cellulose; Arabinogalactan; Barley B-glucan. Electrophoresis at 50V for 3.5h at 22°C and staining with Coomassie blue G250. The binding study of CBM6 of Axe6A using affinity electrophoresis gel analysis (AEG)

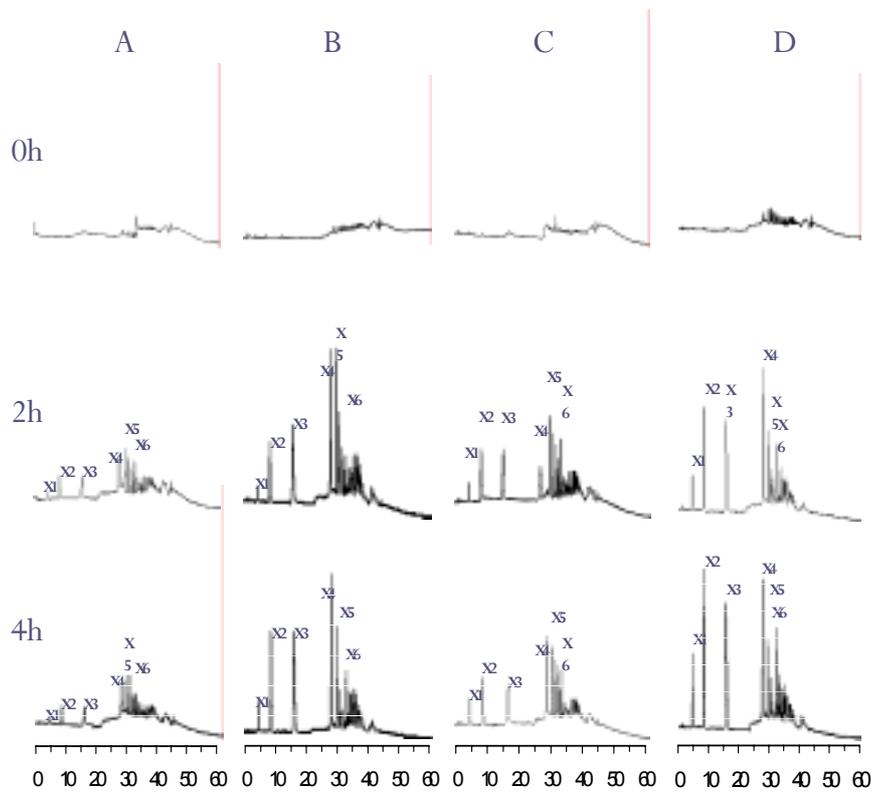


Fig. 3-9. HPLC analysis of products of hydrolysis of acetylated birchwood xylan by Xyn10E. Column A, Activity of Xyn10E on 1% (w/v) acetylated birchwood xylan; Column B, The combination of action of Xyn10E and Axe6A on acetylated birchwood xylan; Column C, Action of Xyn10E on an acetylated birchwood xylan preincubated in buffer for 10 h; Column D, Action of Xyn10E on acetylated birchwood xylan pretreated for 10 h with Axe6A. Xylose, xylobiose, xylotri-ose, xylo-tetra-ose, xylo-penta-ose, and xylo-hexa-ose were designed as X1, X2, X3, X4, X5 and X6, respectively.

마지막으로 Figure 3-10과와 3-11은 Axe6A와 XynE의 시너지 효과를 보기 위해 간단한 시험을 수행한 결과를 나타내었다. 시간별로 acetyl xylan esterase가 xylanase의 효소 활력에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지를 Lever의 환원당 측정법을 통해 조사하였다.

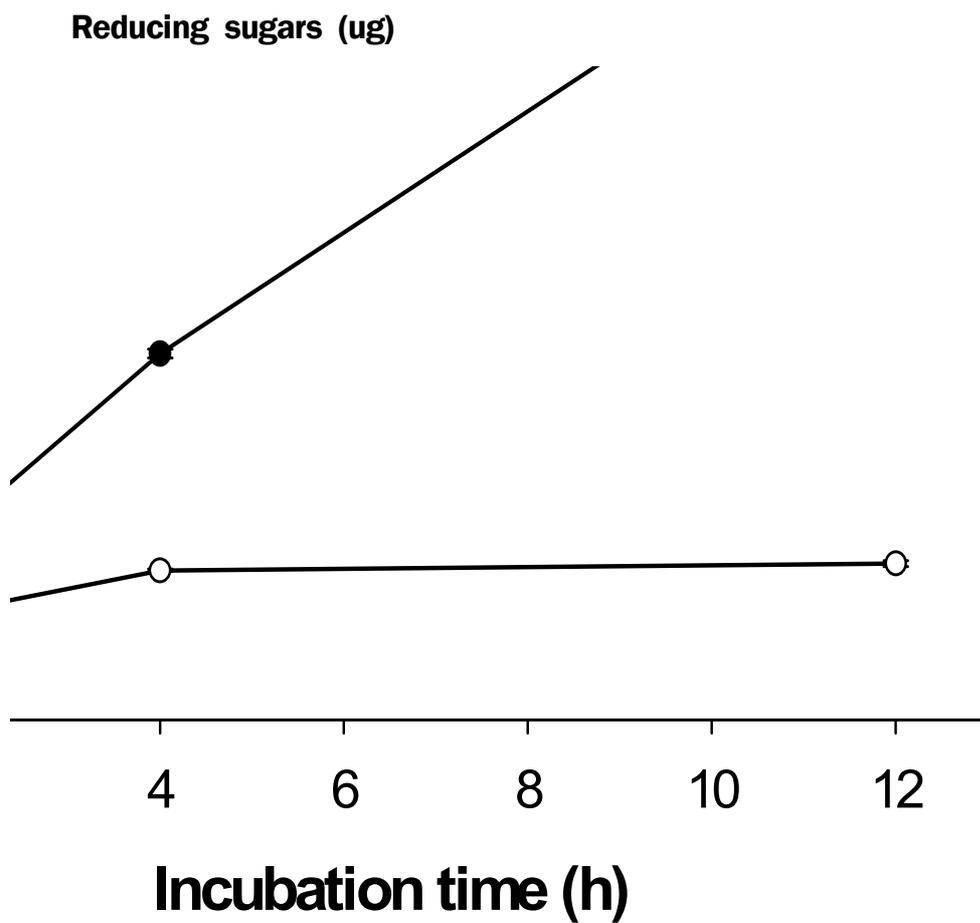


Fig. 3-10. The effect of pretreatment of acetylated birchwood xylan with acetyl xylan esterase on hydrolysis by xyn 10E. Treatment: Pretreatment with XynE for 10h prior to addition of XynE(●); XynE alone(○).

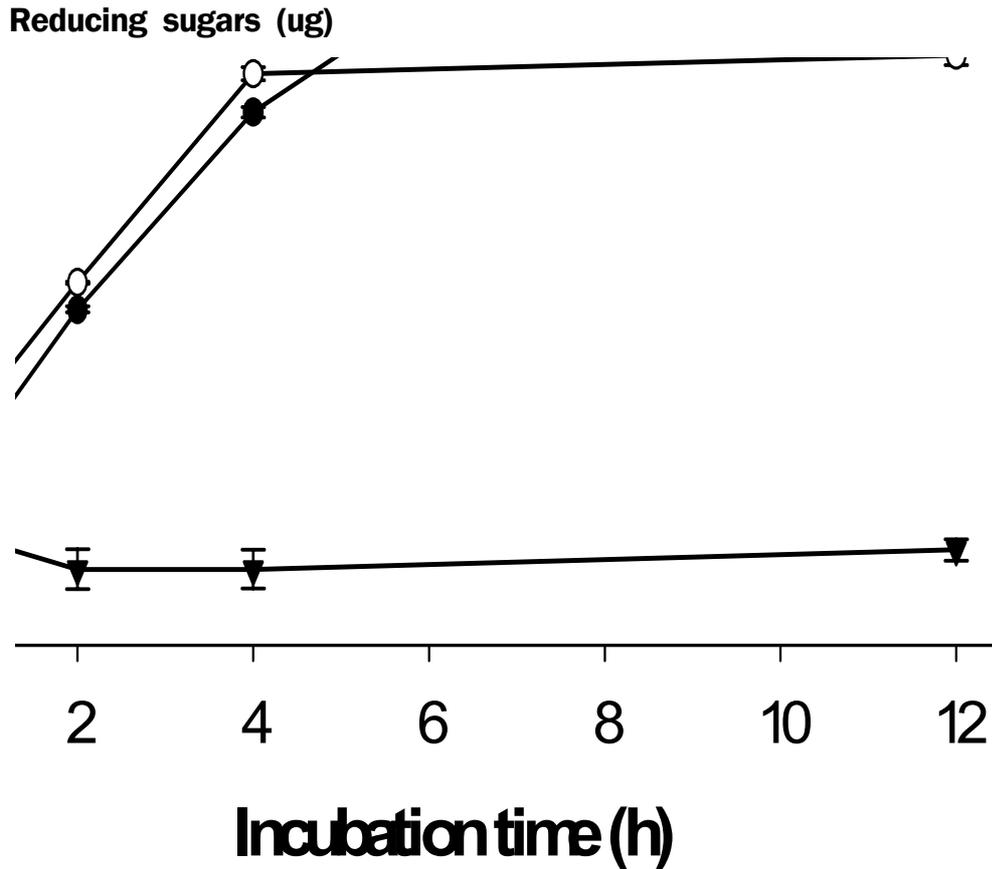


Fig. 3-11. The Effect of pretreatment of acetylated xylan with xylanase on the release of acetate by the treatment with acetyl xylan esterase. Treatment: Pretreatment with XynE for 10h followed by addition of AxeA(●); Axe6A alone(○); XynE alone(▼).

Figure 3-10과 Figure 3-11에서와 같이 xylanase만 처리한 대조구보다 Axe가 동시에 처리된 xylanase 처리구에서 환원당의 함량이 배양 12시간 후에 약 10배가량 증가하는 것을 볼 수 있었다. Acetyl xylan esterase는 xylan 구조의 곁가지를 잘라내는 역할을 함으로써, xylanase의 역가를 향상시키는 기능을 가지고 있다. 반추위 미생물이 분비하는 이 효소는 1980년도 후반부터 여러 균에서 발견되어 연구되고 있다. 하지만, 반추위 미생물에서 이러한 효소를 클로닝하고 정제하여 특성을 규명하는 실험은 많이 보고되어 있지 않다. 지금까지 반추위 곰팡이 종류는 *Orpinomyces* 종에서 분리된 AxeA와 *Neocallimastix patriciarum*에서 분리한 BnaA가 보고 되고 있

을 뿐이다. 최근 지놈연구에 의해 chromosome 단위의 연구가 진행되면서 이제는 단순한 한 개의 유전자만을 살펴보는 것이 아니라, 한 균이 지닌 비슷한 기능의 유전자 군을 동시에 관찰함으로써 효소의 진화 과정과 미생물의 특성 등을 동시에 살펴보는 방향으로 연구가 진행되고 있다. 반추위 미생물의 Axe의 경우 올해 *Ruminococcus flavefaciens*에서 멀티도메인에 있는 것이 발견되어 보고 된 적이 있다. 우리 연구진이 분리한 Axe들의 경우에도 멀티도메인에 존재하는 연속적으로 위치한 2개의 효소들이며, 반추위 박테리아에서는 처음으로 클로닝하여 분리, 구명한 경우가 되겠다.

4. SEM(scanning electron microscopy)을 이용한 발효제용 효모와 곰팡이의 관찰

(※ 본 결과는 제 3세부과제의 2년차 추가 시험분임, 결과의 흐름상 새 번호를 두어 따로 정리함)

가. 볏짚 사일리지의 제조후 발효 15일째 사일리지에 대한 전자현미경 관찰
3종의 효모, KCTC 7219(*Candida glabrata*/*Torulopsis glabrata*), KTCT 6994(*Candida glabrata* var *thermoidea*) 및 ATCC 18790(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph, budding yeast)를 첨가하여 볏짚 사일리지를 제조한 다음, 15일이 경과한 사일리지 볏짚 표면을 전자 현미경으로 관찰한 결과를 Figure 3-12에 나타내었다. 그림에서 보듯이 수많은 효모들이 볏짚 사일리지에 군락을 형성하고 있음을 볼 수 있다.

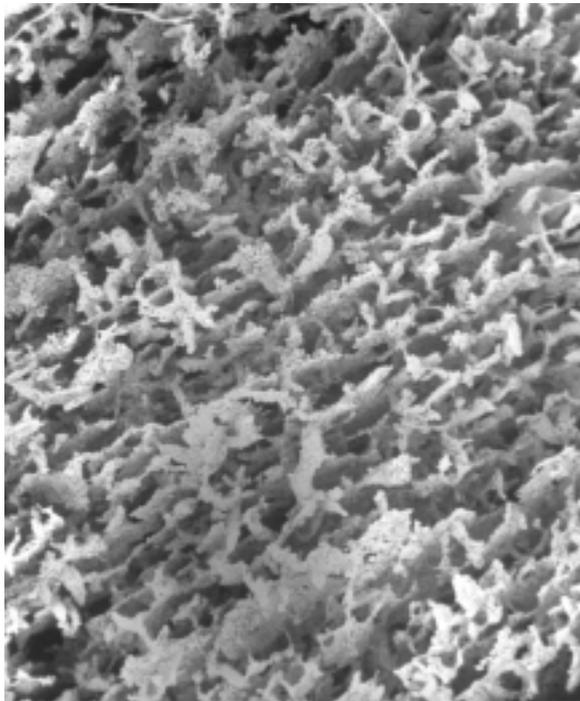


Figure 3-12. SEM observations for the rice straw ensiled for 15 days with the yeast, KCTC 7219.

사일리지 제조시에 첨가한 효모들이 볏짚에 부착하는 정도는 볏짚의 부위에 따라 매우 다양한 양상을 보였다.

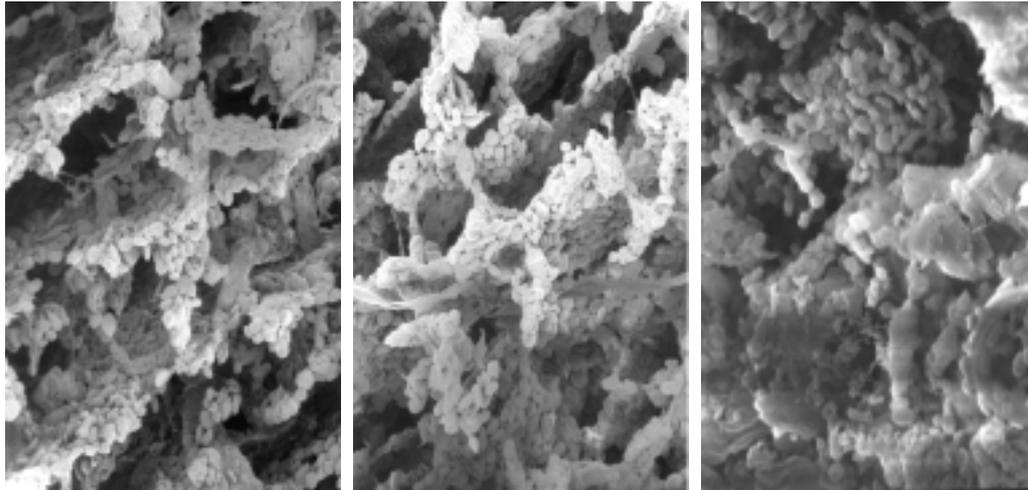


Figure 3-13. SEM observations for the highly colonized spots of the rice straw ensiled for 15 days with the yeast, KCTC 7219, KCTC 6994 and ATCC 18790.

Figure 3-13에는 효모들이 많이 부착되어 있는 부위를 나타내고 있다. Figure 3-14에는 효모들이 중간정도로 부착되어 있는 벗짚 부위이며, Figure 3-15에는 효모들이 균락을 형성하고 있지 않거나 미미하게 균락을 형성하고 있는 벗짚 부위를 나타낸다. 벗짚 부위와 효모의 균락의 상호 관계, 즉 효모가 선호하는 벗짚 부위를 찾아내는 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료된다.

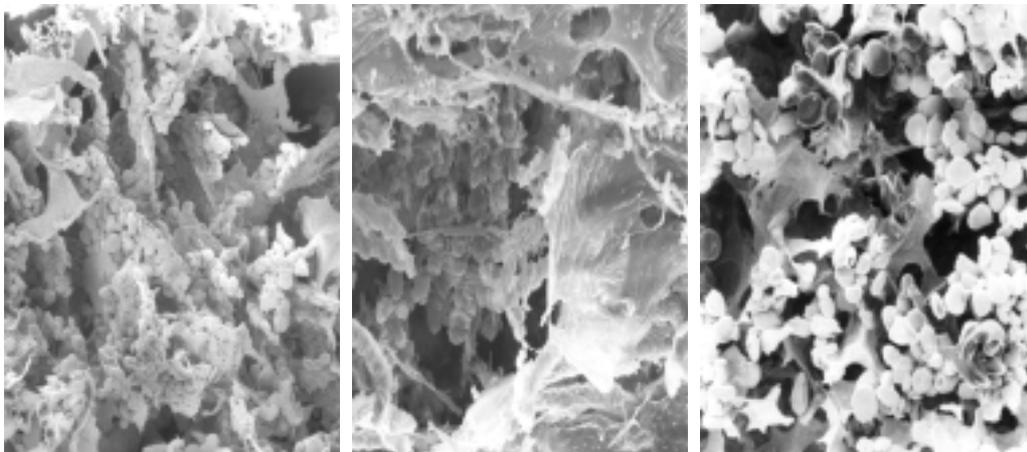


Figure 3-14. SEM observations for the moderately colonized spots of the rice straw ensiled for 15 days with the yeast, KCTC 7219, KCTC 6994 and ATCC 18790.

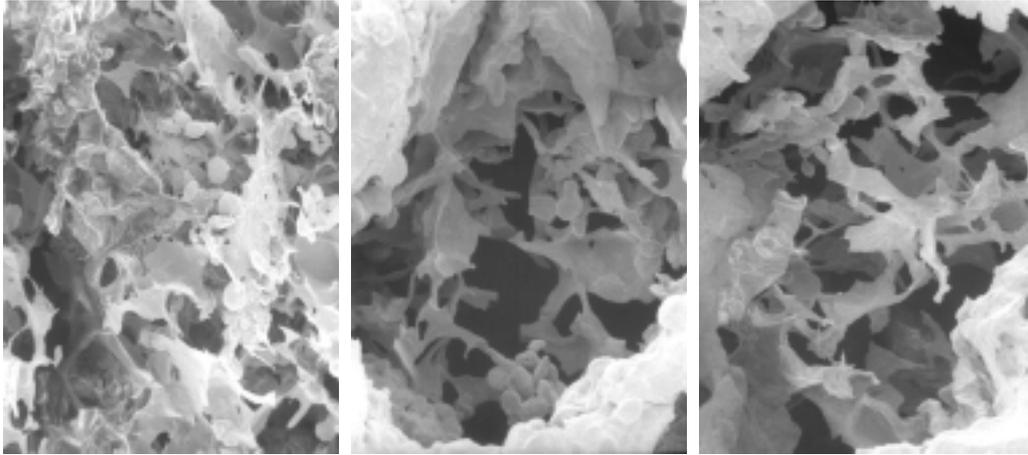


Figure 3-15. SEM observations for the poorly colonized spots of the rice straw ensiled for 15 days with the yeast, KCTC 7219, KCTC 6994 and ATCC 18790.

제 2세부과에서 볏짚에 효모를 처리하여 15일간 저장할 경우에 KCTC 7219, KCTC 6994 및 ATCC 18790 처리로 무처리 볏짚에 비하여 단백질 함량이 각각 38%, 41% 및 39% 증가한 놀랍고도 고무적인 결과는 전자 현미경을 촬영한 사진으로 보아 그 원인이 뚜렷이 효모 때문이라는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구진 들이 목표로 한 2번째의 목표는 달성한 것으로 생각된다.

나. 제 1세부과제의 곰팡이(GSMI-01)와 제 2세부과제의 효모(KTCT 6994)의 혼합 배양시 SEM관찰

아래의 Figure 3-16은 제 1세부과제에서의 흰개미의 장내로부터 분리한 혐기성 곰팡이(GSMI-01)와 제 2세부과제에서 선발된 효모(KTCT 6994)를 *in vitro* 혼합 배양한 다음 전자현미경을 관찰한 결과들이다.

Figure 3-16에서 보듯이 혼합 배양한 곰팡이와 효모들이 일정한 균락을 형성하고 있음을 알 수 있다. 이 결과들은 본 연구진들이 추구하고 있는 연구의 목표를 달성할 수 있다는 아주 고무적인 것이었다. 즉, 볏짚의 물리적인 문제점을 해결하고자 가근을 이용해서 물리적으로 각질층을 파괴시키는 능력을 갖고 있는 혐기·내산성 곰팡이균을 동원하고, 볏짚의 영양적인 문제점을 해결하고자 SCP 생산공정에서 주로 사용하는 효모들을 이용하브로서 효모에 많은 양으로 함유되어 있는 단백질, 비타민 그리고 미지성장인자들이 자연스레 볏짚자원에 포함될 수 있도록 효모를 동원하는

것이였다. 이러한 목적을 달성하기 위한 사료 첨가제의 개발에 동원된 두 미생물 즉, 곰팡이와 효모가 상호 공존할 수 있어야 하는데 본 실험의 결과는 이러한 문제점을 완전히 해결 해주는 것이였다.

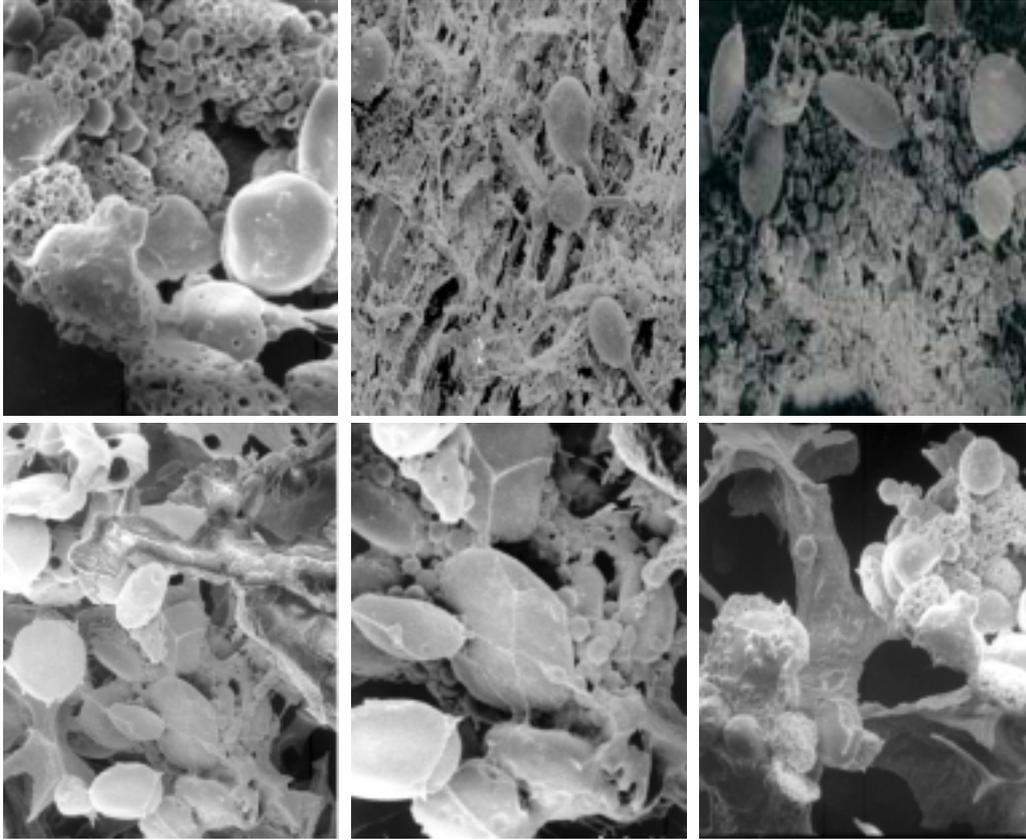


Figure 3-16. SEM observations of co-culture aspect between anaerobic fungus, GSMI-01 and yeast strain, KTCT 6994.

제 4 절 볏짚 사료가치 증진용 미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구 (협동연구과제)

1. 발효제의 효과 구명을 위한 볏짚 곤포 사일리지 제조 시험

가. 연구 수행내용

1) 발효제가 볏짚 곤포사일리지 성분 및 발효특성에 미치는 영향

가) 실험설계 : 발효제가 볏짚 사일리지의 성분에 미치는 효과를 구명하기 위하여 발효제를 사일리지의 0, 0.1 및 0.5%의 수준으로 3 반복씩 1, 2, 4, 8, 15 및 30일 차로 각 사일리지 백을 수거하여 분석하였다. ※ 본 협동과제에서 사용한 발효제는 제 1세부과제와 제 2세부과제의 결과물로서 사용한 미생물의 종류 그리고 배합비율 등은 지적재산권 문제로 상술하지 않고 그냥 “발효제”라 칭한다.

나) 사일리지의 제조 : 벼를 수확한 후 수분함량이 60%이하가 되지 않도록 하기 위하여 바로 생볏짚을 수거하여 볏짚을 3~4 cm로 절단하고 실험용 비닐 silo bag 에 500g 첨가후 발효제를 처리하고 다시 500 g을 넣어서 담압의 과정을 거쳤다. 용기 내 산소의 잔존을 배제시키기 위해 silo bag을 3겹으로 하였으며 상층부위를 봉합하기 전 진공펌프로 내부를 진공이 되도록 하여 혐기상태를 유지하였다. 제조된 실험용 사일리지 백은 실내에서 약 지상 1m의 실험대 위에 보관하였으며 실험기간 동안 온도를 20 ~ 24℃로 유지하였다.

다) 조사항목

(1) 건물 및 화학분석 : 건물함량은 forced-air oven에서 55℃로 맞춘 후 72 시간 경과후 측정하였고, 세포벽구성물질은 Goering과 Van Soest(1970)의 방법에 의해 분석하였다.

(2) pH : 50g의 시료를 450ml의 증류수를 넣어 1분간 교반시킨 후 4겹의 거즈를 통해 거른 후 pH meter를 이용하여 측정하였다.

(3) Buffering capacity : pH 측정시 사용한 추출액을 이용하여 추출액 100ml를 pH 3.0까지 0.1N HCl용액으로 낮춘 후, 다시 0.1N NaOH로 pH 4.0으로 조정하였다. pH 4.0으로 맞춰진 추출액에 0.1N NaOH 용액으로 pH 7.0까지 증가시키는데 필요한 0.1N NaOH용액의 양으로 계산하였다 (Bolsen 등, 1992).

(4) Lactic acid 와 VFA: 사일리지 추출액 30ml에 HPO₃ 5ml을 첨가하여 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액 1.5ml을 취하였다. 이렇게 취한 상층액을 다시 microcentrifuge에서 14,000 rpm으로 원심분리하여 상층액 1ml을 취하여 -20℃에서 보관후 분석시 GC를 이용하여 분석하였다. VFA도 lactic acid 분석법과 동일한 방법으로 분석하였다.

(5) 암모니아태 질소: Chaney와 Marbach (1962)에 의한 분석방법에 준하여 분석하였다.

(6) 통계처리: 통계처리는 SAS package program으로 분산분석을 실시하였고 유의성 검정은 Duncan's multiple test를 이용하였다.

2) 발효제가 볏짚 곤포사일리지의 *in vitro* 및 *in situ* 소화율에 미치는 영향

가) 공시재료 : 사일리지의 품질을 평가하기 위해 30일까지 발효가 완료된 사일리지에서 시료를 채취하였다. *In situ*와 *in vitro* 소화율을 측정하기 전에 55°C에서 72시간 건조 후 시료를 분쇄하여 사용하였다.

나) *In situ* 소화율 : 반추위 누관이 장착된 건유기 Holstein 젖소 3두(평균체중 550 kg, 혼합건초와 농후사료를 7:3으로 섭취)를 공시동물로하여 각 처리구의 반추위에 사일리지가 충전된 나일론백을 현수시켜 0, 6, 12, 24 및 48시간 배양하였다.

다) *In vitro* 소화율 : 사료섭취 전 Holstein 젖소의 반추위에서 채취한 위액을 4겹의 거즈로 여과시킨 후 30분 동안 정치후 부유한 사료입자를 제거하고 소화율 측정용 위액으로 사용하였다. 소화율은 Tilley와 Terry(1963)의 방법을 변형하여 24 및 48시간 배양후 건물 분해율을 측정하였다.

나. 연구 수행 결과

1) 발효제가 볏짚 사일리지 성분 및 발효특성에 미치는 영향

Table 4-1에서 발효제를 수준별로 처리하여 일정기간 동안 볏짚 사일리지의 pH, NH₃-N, lactate 그리고 acid acetate의 변화를 나타내었다.

볶짚 사일리지의 pH는 0시간대에 평균 6.4이었으며 Table 4-1에서처럼 모든 처리구에서 발효 1일째부터 사일리지내 미생물에 의해 pH가 감소되었다. 모든 처리구에서 발효시간이 경과할수록 pH가 감소하는 경향이였으며 특히 발효 8일째에 0.5% 첨가구에서 다른 처리구보다 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 최종 30일째 사일리지의 pH는 4.68~5.11 사이로 목초나 옥수수 사일리지에 비하여 pH가 조금 높았다. 일반 사일리지로 제조할 경우 초기 몇 시간 동안은 pH는 보통 6.5~6.0이다가 24~72시간째가 되면 5.0으로 낮아져서 약 20일 후면 4.0 수준으로 감소한다 (고, 1999). 그러나 본 시험의 결과 pH가 조금 높았으며 특히 0.5% 첨가구가 조금 더 높은 pH로 제조되었다. 이것은 일반사일리지의 주로 젖산발효에 의해 pH감소가 빠르게 일어난 반면 발효제가 첨가된 사일리지는 젖산 발효도 일어났지만 첨가제내의 효소와 미생물에 의한 발효가 일어났음을 암시한다.

Table 4-2에서 발효제를 수준별로 처리하여 일정기간 동안 화학 성분의 변화를 나

타내었다. 전체적인 볏짚 사일리지의 건물함량이 시간의 변화에 관계없이 32% 수준이었으며 이것은 수확시 수분함량이 60%이하가 되지 않도록 빨리 사일리지를 만들었기 때문에 수분함량이 많이 낮아지지 않았던 것 같다. 볏짚 사일리지의 시험 기간 동안 모든 처리구에서 건물함량의 변화가 크게 변하지 않았다. 다만 0.5%의 발효제 첨가구에서 다른 처리구와 비교하여 건물함량이 약간 감소하였다. 일반적으로 사일리지 제조시 적당한 건물함량은 30~35%로 알려져 있는데(김, 1991), 본 시험에서 제조된 사일리지도 적정수준의 건물함량을 유지하였다.

Table 4-1. Effects of different levels of additives on pH, NH₃-N, lactate acid acetate composition of rice straw silage during different ensiling period

Items	Days of ensiling					
	1	2	4	8	15	30
pH						
0.0%	6.06	6.18	5.88	5.64 ^c	5.20	4.87
0.1%	6.12	5.97	5.81	5.32 ^b	5.11	4.68
0.5%	6.04	5.92	5.65	5.15 ^a	4.94	5.11
NH₃-N (mg/100ml)						
0.0%	1.53	1.07	0.99 ^a	1.14	1.08	1.11
0.1%	1.48	1.06	1.43 ^b	1.09	1.08	1.29
0.5%	1.58	1.16	1.19 ^a	1.21	0.97	1.19
Lactic acid (% DM)						
0.0%	4.13	3.24	3.15	5.43	9.06	11.42
0.1%	4.96	3.22	4.28	5.31	7.17	12.06
0.5%	5.72	3.73	3.39	4.52	8.83	10.79
Acetic acid (% DM)						
0.0%	1.06	0.78	0.45	0.96 ^{ab}	1.01 ^a	1.39 ^a
0.1%	1.24	0.98	0.43	0.67 ^a	0.84 ^a	1.49 ^a
0.5%	1.11	1.14	0.76	1.64 ^b	1.57 ^b	2.78 ^b

^{a,b} means in the same column with different superscript are different (p<0.05).

0.5% 발효제 첨가구에서 건물함량이 낮았던 것은 발효제에 포함된 효소와 미생물들에 의한 세포벽 물질의 분해에 의한 것으로 생각된다. 유산균을 첨가한 볏짚 사일리지의 경우 효율적인 발효에 의해 건물함량의 손실을 줄여준다고 하나 본 시험에서는 발효제

의 첨가에 의해 건물함량이 크게 영향을 받지는 않아 일반 목초나 옥수수 사일리지와는 다른 벯짚의 특성이 있음을 알 수 있다. 벯짚은 사일리지 조제 전부터 건물함량이 높고 젖산 발효에 적합한 재료가 되지 못하기 때문에 벯짚에 지금까지 사용되어온 유산균 제제 보다는 본 시험에서 사용되는 세포벽물질을 쉽게 이용할 수 있는 혐기성 곰팡이를 주원료로 한 발효제가 오히려 더욱 효과가 있음을 암시하고 있다.

Table 4-2. Effects of different levels of additives on chemical composition of rice straw silage during different ensiling period

Items	Days of ensiling					
	1	2	4	8	15	30
Dry matter (%)						
0.0%	32.41	32.15	31.54	33.46	32.02	32.38
0.1%	32.27	34.31	32.33	33.97	32.01	32.78
0.5%	31.18	30.67	31.07	32.59	31.51	31.86
Crude protein (% DM)						
0.0%	4.95	4.65	5.53 ^a	5.21 ^a	5.84 ^a	5.61 ^a
0.1%	4.91	4.96	5.33 ^a	5.22 ^a	5.48 ^a	5.54 ^a
0.5%	5.04	5.32	6.41 ^b	7.33 ^b	7.60 ^b	7.53 ^b
NDF (% DM)						
0.0%	64.21	65.10	62.38	61.83 ^b	60.02	60.66 ^b
0.1%	65.03	65.42	62.13	59.57 ^{ab}	58.81	59.03 ^{ab}
0.5%	64.19	63.23	60.32	58.21 ^a	57.63	57.83 ^a
ADF (% DM)						
0.0%	38.75	39.43	36.85	36.59	37.78 ^b	36.95
0.1%	39.43	37.53	35.06	34.22	35.22 ^b	34.34
0.5%	39.18	40.35	33.76	34.31	32.28 ^a	31.76

^{a,b} means in the same column with different superscript are different (p<0.05).

본 과제의 가장 큰 목적중의 하나가 벯짚의 단백질 함량을 증가시키는 것이다. 다소 기대치에 비하여 높은 편은 아니지만 0.5% 첨가구에서 무첨가구에 비하여 31%의 조단백질 함량의 증가가 있었다. 비록 많은 증가가 있지는 않았지만 당밀+요소처리 벯짚 사일리지도 조단백질 함량이 7.22%로 높게 증가하지만 실제 50%이상이 암모니아태 질소이기 때문에 (고, 1999) 본 시험에서 증가된 조단백질은 발효제에 첨가된 효

모균에 의한 single cell protein(순단백질)이 더욱 증가되었기 때문에 사료영양적인 측면에서 더욱 의미가 있다고 생각된다.

사일리지내 NDF와 ADF의 함량도 발효시간이 경과할 수록 모든 처리구에서 감소하였다. 발효제 처리구 모두 무첨가구에 비하여 세포벽물질을 더 많이 감소시키는 경향이였다. 특히 8일 및 30일째에 0.5% 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 NDF함량이 감소하였고 발효 15일째 ADF의 함량이 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 발효제의 처리에 의해 효소에 의한 벃질의 분해가 초기에 많이 일어날 것으로 생각하였지만 처리간 유의적인 차이는 없었고 발효시간이 길어질수록 발효제 내 미생물에 의한 분해가 증가되었기 때문으로 생각된다. 또한 이러한 미생물들의 작용은 pH의 저하가 급속하게 이루어지지 않았기 때문에 더욱 미생물의 활성을 증가시켰다고 생각된다.

사일리지의 발효기간 동안 lactic acid의 농도변화를 보면 1일째 발효시 높은 함량을 보이고 그 이후 약간 줄어든후 발효후반부에서 다시 증가하는 경향이였다. 일반 사일리지의 경우 1일~3일째 젖산의 생산이 가장 많이 일어나는데 본 시험에서는 1일째보다는 발효시간이 경과할수록 증가하는 경향이였다. 이러한 것은 pH의 변화에서와 같이 젖산의 생성도 급속히 일어나지 않고 천천히 일어났음을 지시한다. Acetic acid의 양은 시험 전 기간 동안 lactic acid의 양보다 상대적으로 낮은 수준을 보였다. Acetic acid 또한 발효시간이 경과하면서 증가하였으며, 특히 8일째부터 0.5% 첨가구에서 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 이러한 결과는 lactic acid의 발생량은 뚜렷한 변화가 없던 것과 대조적으로 발효제내 혐기성 미생물에 의한 acetic acid 생성량이 증가되었기 때문이다.

Table 4-3은 벃질 사일리지 발효기간 동안 나타난 buffering capacity를 나타내었다. 사일리지에 있어서 buffering capacity는 사일리지가 pH에 견디어 낼 수 있는 정도를 의미한다. Buffering capacity가 높은 목초로 사일리지를 제조하면 사일리지의 pH가 적정한 정도까지 저하되는 데는 더 많은 lactic acid가 생산되어야 한다는 것을 의미하기 때문에 중요한 참고사항이다.

Table 4-3. Effects of different levels of additives on buffering capacity (meq of NaOH/100g DM) of rice straw silage during different ensiling period

Supplementation levels of additives	Days of ensiling					
	1	2	4	8	15	30
0.0%	18.01	10.88	11.65	16.49	26.29 ^b	24.11 ^b
0.1%	20.53	11.37	14.68	17.03	18.72 ^a	31.28 ^a
0.5%	18.32	11.24	14.00	15.73	21.21 ^b	31.53 ^a

^{a,b} means in the same column with different superscript are different ($p<0.05$).

따라서 buffering capacity가 높은 목초로 사일리지를 제조시에는 pH 저하가 느려지며, 충분한 양의 당이 함유되어 있지 않으면 사일리지의 안정되는 수준까지 pH가 떨어지지 않게 된다. 본 시험결과 볏짚 사일리지의 buffering capacity가 일반 사일리지에 비하여 낮게 측정되어 pH가 더 빨리 감소할 것으로 생각되나 일반 목초가 아닌 볏짚내 가용성 당의 함량이 적은 반면 세포벽물질이 많은 특성으로 발효속도가 늦고 lactic acid의 생산에 급격한 변화가 없었기 때문에 낮은 buffering capacity에서도 pH의 변화에는 큰 영향을 받지 않은 것으로 생각된다. 2일째 발효에서 모든 처리구에서 buffering capacity가 감소하였으며 4일 이후 증가하는 경향이였다. 4일 이후 시간이 경과함에 따라 buffering capacity가 증가하였으며 30일째 발효제 첨가구에서 대조구에 비하여 buffering capacity가 유의적으로 높았다($p<0.05$).

2) 발효제가 볏짚 곤포사일리지의 *in vitro* 및 *in situ* 소화율에 미치는 영향

사일리지의 품질을 평가하기 위해 30일까지 발효가 완료된 사일리지에서 시료를 채취하여 *in situ* 소화율을 측정할 결과는 Table 4-4에서와 같다.

Table 4-4. *In situ* dry matter disappearance rate of rice straw silage treated with different levels of additives incubated in the rumen of Holstein cows

Supplementation levels of additives	A	a	B	b	(a+b)	c	ED (k=0.08)
0.0%	17.5	17.5	12.7 ^a	12.7 ^a	30.1 ^a	0.0784 ^b	24.4 ^a
0.1%	17.3	17.5	16.5 ^a	16.3 ^a	33.8 ^a	0.0437 ^a	24.2 ^a
0.5%	20.1	20.1	28.4 ^b	28.4 ^b	48.5 ^b	0.0285 ^a	27.4 ^b

^{a,b}means in the same column with different superscript are different ($p<0.05$).

본 실험에서 반추위내 건물은 초기에 빠르게 분해되는 부분(a)이 처리구간에서 유의차가 인정되지 않았다(Table 4-4). 천천히 분해되는 부분(b)과 유효분해도에서 0.5% 발효제가 첨가되었을 때 무처리나 0.1%로 첨가구보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

이는 발효제의 첨가로 사일리지의 반추위 미생물에 의한 가용성 부분이 서서히 증가하여 시간이 갈수록 효과적으로 벚짚을 이용할 수 있었기 때문으로 생각된다. 또한 Table 4-1에서의 0.5% 첨가구의 acetic acid의 사일리지내 함량이 높았고 그와 함께 *in situ* 결과에서처럼 가용성 섬유소 함량 증가는 결과적으로 반추동물의 반추위 내 미생물의 발효성상을 변화시키고 반추위 내 미생물에 의한 acetic acid 생성량을 증가시킬 것으로 기대된다.

Table 4-5는 최종 30일째 발효된 사일리지를 채취하여 반추위액내에서 *in vitro* 배양하여 건물 분해율을 측정된 결과이다. 24시간 배양에서는 0.5% 첨가구가 가장 높았지만 유의적인 차이는 없었다. 그러나 48시간 배양시간에서는 첨가구에서 모두 건물분해율이 증가하는 경향이었고, 특히 0.5% 첨가구는 유의적으로 다른 처리구에 비해 분해율이 높았다 ($p < 0.05$). 건물분해율의 결과는 *in situ* 시험결과와 유사한 경향을 나타내었고, 발효제 처리에 의해 벚짚의 분해되기 어려운 세포벽물질들이 노출이 되고 분해되어 반추위 혼합 미생물들이 이용하기 쉽도록 생물공학적으로 제조된 첨가제가 분해율을 증가시키는 데에 효과가 있음을 나타내었다. 결국 본 연구의 결과 반추동물을 통한 대사 시험이나 사양시험에서 발효제가 첨가된 벚짚 곤포사일리지 급여시 벚짚을 먹이거나 처리되지 않은 벚짚사일리지를 급여하였을 때보다 우수한 결과를 얻을 것으로 예측되며, 또한 일반 화분과 건초를 급여하는 것보다 우수한 결과가 기대된다.

Table 4-5. *In vitro* dry matter degradation rate of rice straw silage treated with different levels of additives incubated in the rumen of Holstein cows

Incubation time	Supplementation levels of additives (%)		
	0	0.1	0.5
24	33.48	30.20	34.51
48	42.36 ^a	43.06 ^a	47.79 ^b

^{a,b} means in the same row with different superscript are different ($p < 0.05$).

2. 대사 · 사양시험을 통한 개발품의 효과 검증시험과 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구

가. 연구 수행내용

1) 한우 대사시험을 통한 최종 개발품의 효과 검증 시험

가) 공시동물 및 시험설계

반추위 cannulae가 장착된 평균체중 470 kg인 거세한우 4두를 가지고 실험을 수행하였다. 사료급여량을 가축 체중의 1.75%(풍건물기준)로 고정하여 급여하였고 농후사료와 조사료의 비율을 6:4로 하여 조사료원으로 벃짚(대조구) 또는 벃짚 발효제 첨가 사일리지(벃짚사일리지첨가구: 제 1세부과제의 결과로 제공됨)를 급여하여 2처리 2반복의 2x2 라틴방각법(turn over design)으로 수행하였다.

나) 공시동물의 사양관리

사료의 급여는 1일 2회(9:00 과 17:00)에 나누어 급여하였으며 물은 자유 음수시켰다.

다) 공시사료

한우 거세우에 대한 *in vivo* 소화시험은 자체 배합한 배합사료를 이용했으며 배합비율은 Table 4-6에서 보는 바와 같다.

Table 4-6. The formula (%) of compound feed for Hanwoo steers

Ingredients	
Yellow corn, ground	35.12
Wheat bran	28.00
Soybean meal	12.60
Fish meal	1.00
Corn gluten feed	10.00
Soybean hull	8.00
Molasses	3.00
Limestone	1.76
Salt	0.50
Lasalocid sodium	0.02

배합사료와 볏짚 및 볏짚사일리지의 일반성분 함량은 Table 4-7과 같다. 볏짚 발효제 첨가 사일리지는 벼 수확 후 건물함량이 60%이하가 되지 않도록 하기위하여 수확 직후 수거하여 약 3~4cm 정도로 잘게 절단하여 사용하였다. 세절된 볏짚 20 kg에 100g (0.5%)의 발효제를 첨가한 후 비닐 silo bag에 담아 담압의 과정을 거쳤다. 용기내의 산소의 잔존을 배제시키기 위해 실험용 비닐 silo bag을 4겹으로 하였으며 상층부위를 봉하기 전에 진공펌프로 내부의 공기를 빼는 과정을 거쳐서 혐기상태를 유지하도록 하였다. 30일 이상을 발효시킨 후 사료로 공급하기 위해 이용하였다.

Table 4-7. Chemical composition of compound feed for Hanwoo steers

	(% DM basis)		
	Compound feed	Rice straw	Straw silage
Dry matter	87.78	87.07	34.86
Crude protein	16.68	5.31	7.53
Ether extract	2.95	1.24	1.10
Crude fiber	6.62	27.72	30.32
Crude ash	5.95	13.16	10.31
NDF		65.15	62.83
ADF		38.25	36.76
pH			4.80
NH ₃ -N (mg/100ml)			1.19
lactic acid			2.79
Acetic acid			1.78

라) 조사항목 및 방법

(1) 조성분 분석

시료의 조성분은 AOAC(1984)법에 의하여 일반성분을 분석하였다. 세포벽 구성물질은 Goering과 Van Soest(1970)의 방법에 의해 분석하였다.

(2) 사일리지와 반추위 발효성상

반추위액의 발효성상을 측정하기 위하여 각 시험사료 급여전(0시간)과 급여후 1, 3, 6 및 9시간에 위액을 채취하였다. 위액은 채취 즉시 4겹의 cheese cloth로 여과한 후 pH를 측정하고 암모니아태 질소(NH₃-N) 및 휘발성 지방산(VFA)의 농도를 측정하였다. 채취한 위액의 pH는 Digital pH-meter(Wheaton 120)

를 이용하여 측정하며 $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도는 반추위액을 원심분리(6,000 xg, 15분)한 후, 상층액을 이용하여 Chany와 Marbach(1962)의 방법에 따라 전처리한 후, gas chromatography(GC)를 이용하여 분석하였다. 볏짚사일리지는 개봉후 시료를 채취하여 50g의 sample을 450ml의 증류수(pH 7.0)를 넣어 1분간 homogenization 시킨 후 4겹의 cheese cloth를 통해 거른 후 반추위액과 동일한 방법으로 pH를 측정하였다. Lactic acid, VFA 및 암모니아태 질소 또한 반추위액 조사방법과 동일하였다.

(3) 사료의 *in vitro* 소화율

처리구별로 채취한 위액을 4겹의 cheese cloth로 거른 후 동일량의 위내 고형물을 혼합하여 blender로 세게 교반하고 이를 다시 걸러 소화율 측정용 위액으로 사용한다. 소화율은 modify된 Tilley와 Terry(1963)의 방법에 따라 기질로 볏짚이 충전된 fermentation tube에 소화율 측정용 위액을 넣고 밀봉한 다음 24, 48 및 72시간 배양 후 줄어든 기질의 무게로 측정하였다.

(4) *In vivo* 소화율

공시동물을 대사실험실에 수용하여 전분 채취법으로 소화시험을 하였다. 본 시험 수행 전에 15일간의 예비기간을 두고, 5일간의 본 시험 기간 중에 분과 노를 채취하여 사료섭취량과 소화율(건물, 조단백질, 조섬유 및 세포벽 구성물질의 소화율)을 측정하였다. 단백질과 조섬유의 분석은 AOAC(1990)의 방법에 준하여 분석하고, ADF 및 NDF의 측정은 Van Soest와 Goering(1973)의 방법에 준하여 분석하였다.

마) 통계처리

통계처리는 SAS package program을 이용하여 분산분석을 실시하였고 유의성 검정은 t-test를 이용하였다.

2) 한우 사양시험을 통한 개발품의 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구

가) 공시재료

볏짚 곤포 사일리지와 제 1세부과제에서 개발된 최종 발효제를 첨가한 곤포 사일리지를 공시하였다.

나) 공시동물

한우 사육 농가에서 6개월간 한우 거세우 24두 (평균개시 체중 489.9 ± 24.5)를 공시하여 수행하였다.

다) 시험설계

시험1과 같이 대조구와 볏짚사일리지 급여구에 각각 공시축 24두를 우군당 4두씩 총 6군을 두고 처리당 3군을 완전임의 배치하였다.

라) 사양관리

시험동물은 개방식 우사에서 4두씩 군사를 시켰으며, 배합사료는 체중의 2.5%, 조사료는 체중의 0.6%를 1일 2회 급여하였고, 물과 미네랄블록은 전 사양기간 동안 자유채식시켰다(Table 4-8과 4-9).

Table 4-8. Chemical composition of compound feed for Hanwoo steers

	(% , DM basis)		
	Compound feed	Rice straw	Straw silage
Dry matter	86.71	85.70	31.86
Crude protein	10.51	3.31	5.22
Ether extract	3.71	1.27	1.78
Crude fiber	5.00	27.46	32.12
Crude ash	6.21	8.85	12.31
NDF	20.58	70.45	64.92
ADF	8.99	42.50	40.08
pH			4.70
NH ₃ -N (mg/100ml)			2.38
lactic acid			3.59
Acetic acid			1.58

마) 사일리지제조

콤바인으로 벼를 수확한 직후의 볏짚을 집초기를 이용하여 집초한 후 다음날 원형 베일러로 베일링 한 후 즉시 비닐랩으로 포장하여 보관하였다. 사용된 비닐은 폭 50cm, 두께 25 μ m, 길이 1800m인 것을 이용하였다. 라운드베일러로 베일링시 제 1세부과제에서 개발된 발효제를 골고루 살포하여 사일리지를 조제하였다.

바) 조사항목 및 방법

건물, 조단백질, 조지방, ADF, NDF, 조회분 등은 AOAC(1990) 방법에 의하여 분석하였다. 주당 3일간 매일 잔량을 측정하여 급여량에서 잔량을 뺀 값으로 사료섭취량을 측정하였다. 매일 1회 체중을 측정하여 사료섭취량과 일당증체량

으로 사료요구율을 계산하였다. 시험종료 후 출하된 시험동물의 도체 등급표를 분석하여 육량 및 육질 평가, 그리고 등급출현율을 조사하였다. 도체중은 도축 후, 0~5℃ 냉장실에서 12시간 이상 냉장되어 측정시 측정부위의 중심온도가 10℃이하인 도체를 측정하였으며, 도체등급판정 기준에 의거하여 축산물 등급판정사가 도체등급을 판정하였다.

Table 4-9. The formula (%) of compound feed for Hanwoo steers

Ingredients	
Corn grain	46.50
Wheat ground	10.00
Cane molasses	6.80
Wheat flour	5.00
Wheat bran	5.00
Corn gluten feed	1.50
Coconut meal (20.5%)	10.00
Palm meal	8.00
Mixed fiber	3.00
Capok seed (26%)	1.00
Salt	0.60
Tricalcium phosphate	0.20
Limestone	2.20
Vitamin premix ¹	0.10
Mineral premix ²	0.10
Total	100.00

¹ Vitamin premix contains following nutrients per kg: Vit. A, 6000 IU; Vit. D3, 1200IU.

² Mineral premix: K, 0.08%; S, 0.05%; Fe, 30ppm; Zn, 50ppm, Mn, 40ppm; Cu, 10ppm; Co, 0.5ppm; I, 0.53ppm; Se, 0.13ppm; Mg, 0.03% per kg.

사) 통계처리

통계처리는 SAS package program을 이용하여 분산분석을 실시하였고 유의성 검정은 t-test를 이용하였다.

나. 연구 수행결과

1) 한우 대사시험을 통한 최종 개발품의 효과 검증 시험

볏짚과 볏짚사일리지를 급여한 한우의 반추위 발효특성에 대하여 Table 4-10에 나타내었다. 본 실험에서 반추위 발효는 전반적으로 볏짚사일리지 급여에 의해 개선되었다. 비록 통계적으로 유의성은 없지만 반추위내 pH는 볏짚사일리지 급여구가 낮아지는 경향이였다. 반추위 암모니아 발생량은 8.05~8.77 mg/100ml로 Satter와 Slyter(1974)가 보고한 반추위 미생물 단백질 합성에 요구되는 5 mg/100ml의 수준보다는 높았다. Total VFA는 사일리지 급여구에서 볏짚 급여구에 비해 23.3% 유의적으로 증가하여($p < 0.05$) 반추위 미생물의 발효가 증가되었음을 나타내었다. 특히 이러한 Total VFA의 증가는 개별 VFA들 중 acetic acid의 발생량이 볏짚급여구에 비해 볏짚사일리지 급여구에서 유의적으로 증가한 것이($p < 0.05$) 원인인 듯하였다. 이러한 현상은 *in vitro* 배양시험에서 발효제를 0.5% 첨가한 볏짚 사일리지가 대조구에 비하여 acetic acid 생성량이 증가한 것과 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 acetic acid의 발생량의 증가는 발효제를 첨가하여 볏짚의 가용성 섬유소 함량 증가시켜 반추위내 미생물에 의한 acetic acid의 생성량이 증가되었던 것으로 생각된다. 비록 다른 개별 VFA들도 볏짚 급여구보다는 볏짚 사일리지 급여구가 높은 경향을 보였다.

Table 4-10. Daily mean values for ruminal fermentation variables of Hanwoo steers fed diets containing concentrate and rice straw or rice straw silage treated with an additive

	Treatment		SEM ¹
	Rice straw	Rice straw silage	
pH	6.72	6.65	0.027
NH ₃ -N (mg/100ml)	8.05	8.77	0.712
Total VFA(mmol)	72.64 ^a	89.56 ^b	2.102
Acetic acid(mmol)	51.36 ^a	57.49 ^b	1.792
Propionic acid(mmol)	11.50	10.91	0.527
Butyric acid(mmol)	6.58	7.54	1.232
Valeric acid(mmol)	1.11	1.14	0.067
Isobutyric acid(mmol)	0.75	0.87	0.025
Isovaleric acid(mmol)	1.23	1.52	0.049

¹ SEM, standard error of means.

^{a,b} Means in the same row with unlikie superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

Figure 4-1은 하루 동안의 반추위 발효변화를 나타내었다. 농후사료를 다량 섭취함으로써 가용성 탄수화물이 급속히 반추위내에서 이용되어 반추위 pH가 현재의 결과이하로 급속히 낮아지리라 예상되었지만 본 시험에서는 높은 수준을 유지하여 pH 6.5로 낮아진 경우는 볏짚 사일리지 급여구에서 3시간대를 제외하고는 모든 시간대에서 높은 pH를 유지하였다. 이러한 이유는 아마 볏짚 및 볏짚 사일리지를 섭취함으로써 높은 타액분비량에 의한 완충작용으로 pH를 높게 유지하였다고 생각된다.

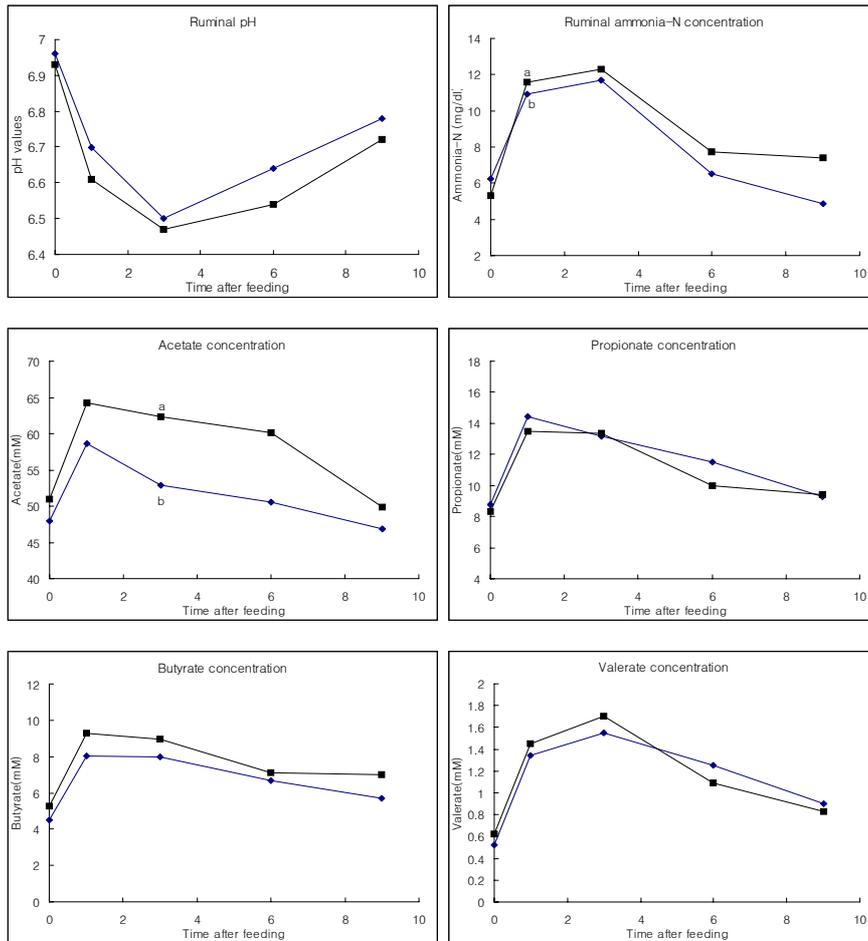


Figure 4-1. Daily pattern of variation in ruminal pH, ammonia-N and individual VFA of Hanwoo steers fed diets with rice straw (◆--◆) or rice straw silage treated with an additive (■--■). The letters indicate statistical significance; means with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Nolan과 Leng (1972)의 보고에 의하면 사료내 조사료의 비율이 증가함으로 타액의 생산량이 증가한다고 하여 즉 사료의 물리적 구조가 주요 타액생산의 영향요인이라고 하였다. 그러므로 발효제가 첨가되어 사일리지로 처리된 볏짚이 세포벽 물질이 가용성 탄수화물로 많이 변화되어 볏짚 보다 발효속도가 증가되고 더 많은 양의 휘발성 지방산을 생산하여 모든 조사시간대에서 pH가 낮게 측정되었다고 생각된다. 일변화 동안 사료급여 후 1시간대에 볏짚과 볏짚 사일리지 처리구의 각 암모니아 농도는 10.93과 11.59mg/100ml로 볏짚 사일리지 급여구에서 유의적으로 높았다 ($p<0.05$). 그러나 나머지 시간대에도 볏짚 사일리지 급여구가 높은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지 않았다. 이러한 암모니아 농도가 볏짚 사일리지 급여구에서 비교적 높았던 이유는 사일리지 특성상 암모니아의 발생량이 높았기 때문으로 생각되었다. 하지만 발효가 가장 왕성한 1시간대를 제외하고 나머지 시간대에서 유의적인 차이가 없었던 것은 사일리지 급여구에서 생산된 암모니아를 반추위 미생물들이 단백질 합성을 위해 활발히 이용하여 큰 차이를 보이지 않았던 것으로 생각되었다. 개별 VFA의 일변화를 조사한 결과 propionic acid를 제외한 모든 VFA에서 시간대 별로 사일리지 급여구가 높은 경향을 보였다. 특히 acetic acid의 생성량이 볏짚 급여구와 큰 차이가 있었지만 사료급여 후 3시간대에서만 유의적으로 볏짚 급여구에 비해 사일리지 급여구에서 높은 생성량을 나타내었다($p<0.05$). Table 4-11은 한우 거세우에 볏짚과 볏짚 사일리지를 급여시 반추위액내 *in vitro* 기질 분해율을 조사한 결과이다.

Table 4-11. *In vitro* dry matter digestion rates (%) of Hanwoo steers fed diets containing rice straw or rice straw silage treated with an additive

Incubation time (h)	Treatment		SEM ¹
	Rice straw	Rice straw silage	
24	22.18 ^b	25.05 ^a	0.591
48	33.14	35.51	0.513
72	37.66 ^b	43.48 ^a	1.013

¹ SEM, standard error of means.

^{a,b} Means in the same row with unlikie superscripts differ significantly ($p<0.05$).

Table 4-10의 반추위 발효특성에서 보았듯 볏짚 사일리지 급여구에서 in vitro 건물 분해율 또한 높음을 알 수 있었다. 24시간 및 72시간 동안 반추위 혼합 미생물을 이용하여 배양한 경우 12.9 와 15.6% 사일리지 급여구에서 유의적으로 증가하였다 ($p<0.05$). 그러나 48시간 배양시는 볏짚 급여구에 비해 볏짚 사일리지 급여구에서 높은 경향을 나타내었다. 전체적으로 72시간 동안 발효를 시켜도 최대로 43.5%이상 분해되지 않은 것이 일반적인 볏짚을 기질로 이용시 분해율에 비해 낮았다는 것이다. 이러한 이유는 이용된 볏짚 기질의 lignification이 많이 되어있어서 미생물들이 가용할 수 있는 볏짚내 세포벽 물질이 적었기 때문이라고 생각되었다.

볏짚과 볏짚 사일리지를 급여시 한우 거세우의 외관상 영양소 소화율(apparent digestibility)을 Table 4-12에 나타내었다. 건물 섭취량은 사일리지 급여구에서 일일 0.31kg 높았지만 제한급여로 인해 처리간에 차이는 없었다. 건물 소화율은 볏짚 급여구에 비해 볏짚 사일리지 급여구에서 5.19%가 증가되었고 ($p<0.05$), 조단백질 소화율도 4.37%가 증가되었다. 또한 조섬유이 소화율도 증가하였으나, NDF와 ADF 소화율은 볏짚사일리지가 볏짚 급여구에 비해 높은 경향을 나타내었다. 이러한 영양소 소화율의 증가는 반추위 발효가 볏짚 사일리지를 급여함으로써 개선되어 섬유소분해 효소, 단백질 분해효소, 전분 분해효소 등의 효소활력이 증가되었기 때문으로 생각되었다.

Table 4-12. Dry matter intake (kg/d) and the nutrient digestibility (% , DM basis) of Hanwoo steers fed diets containing rice straw or rice straw silage treated with an additive

	Treatment		SEM ¹
	Rice straw	Rice straw silage	
Dry matter intake	7.67	7.98	0.256
Digestibilities			
Dry matter	58.36 ^a	63.55 ^b	0.548
Crude protein	57.78 ^a	62.15 ^b	0.491
Ether extract	77.25	78.31	2.612
Crude fiber	45.57 ^a	51.01 ^b	0.625
Crude ash	11.24	11.65	1.241
NDF	48.59	52.68	1.670
ADF	69.85	70.47	0.563
NFE	68.29	69.07	0.384

¹ SEM, standard error of means.

^{a,b} Means in the same row with unlike superscripts differ significantly ($p<0.05$).

2) 한우 사양시험을 개발품의 농가 실증시험 및 최종개발품의 산업화연구

비육후기에 발효제가 첨가된 볏짚사일리지의 급여효과를 Table 4-13에서 나타내었다. 최종 한우 거세우의 체중은 볏짚 사일리지 급여구에서 약 9.7 kg으로 증가하였지만 유의적인 차이가 없었다. 사일리지 급여구의 건물 사료섭취량은 1일 9.52kg으로 볏짚급여구보다 높은 경향이지만 유의적 차이가 없었다. 일당 증체량에서는 볏짚 사일리지 급여구가 볏짚 급여구에 비해 19 g/d로 높았지만 통계적 유의차가 없었다. 1kg 증체에 필요한 사료 요구량에서 볏짚 사일리지 급여구가 볏짚급여구 과 비교하여 높았지만 이러한 차이는 사일리지 급여구에서 초기 체중이 높았던 것으로 유의적 차이가 없었다.

Table 4-13. Effect of rice straw silage on Hanwoo steer growth and feed conversion

	Treatment		SEM ¹
	Rice straw	Rice straw silage	
Initial body weight (kg)	465.2	482.3	25.62
Final body weight (kg)	605.0	625.3	11.34
Average daily gain (g/d)	759.8	778.8	38.54
DM intake (kg/d)			
Concentrate	7.07	7.47	
Rice straw	1.91	-	
Straw silage	-	2.05	
Total	8.98	9.52	0.270
Feed conversion	8.35	8.17	0.455

¹SEM, standard error of means.

볏짚 사일리지 급여시 육량 및 육질 평가에 미친 영향을 Table 4-14에 나타내었다. A 및 B 등급 출현율은 볏짚 급여구가 각각 50 및 41.6% 이었으나, 볏짚 사일리지 급여구에서는 각각 66.6 및 25%로서 볏짚 사일리지 급여구에 A등급 출현율이 월등히 높았다. 육질등급에서도 1등급 이상 출현율이 58.3%로 동일하였지만 볏짚 사일리지 급여구에서는 1⁺⁺의 등급이 1마리 출현하였고 2등급에서도 볏짚 급여구가 33.3%에 비하여 볏짚 사일리지 급여구는 50%로 높아 볏짚 사일리지 급여시 육질이 개선되었다. 이러한 육질이 높은 것은 볏짚 사일리지 급여시 근내지방도와 육색이 개선되었기 때문이다.

결론적으로, 발효제가 첨가된 볏짚 사일리지 급여시 한우에 있어서 반추위의 발효개선 효과와 일부 영양소의 소화율을 개선시켰고 이것은 발효제에 의한 볏짚의 영양소 이용효율이 증가하였기 때문이다. 그러나 비육시험에서 뚜렷한 사료의 효과는 없었지만 육량 및 육질이 개선되어 볏짚 사일리지 급여에 의한 반추위 발효의 개선효과가 높았던 것으로 생각되었다.

Table 4-14. Effect of rice straw silage on carcass traits of Hanwoo steers

	Treatment		SEM ¹
	Rice straw	Rice straw silage	
Fasting weight (kg)	750.00	769.21	44.301
Dressing percentage (%)	62.74	63.12	1.592
Quality characteristics			
Marbling score	3.21	3.57	1.166
Meat color	4.67	4.77	0.501
Fat color	2.67	2.46	0.643
Grade (1 ⁺⁺ :1 ⁺ :1:2:3)	(0:1:6:4:1)	(1:1:5:6:0)	-
Quantity characteristics			
Rib-eye area (cm ²)	87.62	87.96	8.089
Back fat thickness (cm)	3.42	3.68	0.385
Grade (A:B:C)	(6:5:1)	(8:3:1)	-

¹SEM, standard error of means.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 연구개발 목표 달성도

구 분	연구 개발 목표 (과제명)	연구 개발의 주요 내용	달성도
제 1세부 과제	<p>벼짚의 물리적 문제점 해결을 위한 섬유소 분해 혐기·내산성 곰팡이를 이용한 미생물 첨가제의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기·내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발 - 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곰팡이 발효제의 개발 - 곰팡이(제1 세부), 효모(제2 세부) 및 transgenic미생물(제3 세부)을 이용한 최종 발효제의 개발 	100
제 2세부 과제	<p>벼짚의 영양적 문제점 해결을 위한 유기산 이용 단백질 합성 혐기·내산성 SCP생산 효모를 이용한 미생물첨가제의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 혐기·내산성 효모의 탐색 및 선발 - 선발 효모의 특성구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발 - 대사시험을 통한 개발품의 효과 검증시험 	100
제 3세부 과제	<p>벼짚의 화학적 문제점 해결을 위한 Esterase 분비 transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소 분비(esterase) 미생물의 분리·동정 및 선발 - 해당 유전자 sequencing, 특성 분석 및 유전자 cloning - Esterase분비 transgenic미생물 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발 	100
협동연구 과제	<p>벼짚의 보존성과 운반성 확보를 위한 벼짚 사료가치 증진용 미생물제제의 실증시험 및 산업화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 최종발효제 검증을 위한 벼짚 곤포 사 일리지의 제조 시험 - 대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증시험 및 농가 실증시험 - 최종 개발품의 산업화 연구 	100

2. 연차별 연구개발 목표 달성도

가. 제 1차 년도 (2002. 10 ~ 2003. 10)

연구 개발 목표	연구 개발 내용과 범위	달성도
<p>(제 1 세부과제) 섬유소 성분을 분해할 수 있는 혐기 내산성 곰팡이의 분리·동정 및 선발</p>	<p>① 혐기생태계로부터 내산·섬유소분해 곰팡이 분리 : 반추동물의 십이지장 및 흰개미의 장내 : 목표 - 20종 이상 분리 : 반추위내 효모의 생존 유무 확인</p> <p>② 분리 곰팡이의 screening : 효소역가 및 소화율의 측정 : 내산성 test, 생육적온 test : 가근의 길이 측정</p> <p>③ 동정 균주의 특성조사 및 균주등록 : SEM 촬영에 의한 미세구조의 관찰 : 미생물자원보존센터에 특허균주 등록 (5종 이상)</p>	100
<p>(제 2 세부과제) 유기산을 이용하여 단백질을 합성하는 혐기 내산성 SCP 생산 효모의 탐색 및 선발</p>	<p>① SCP 생산을 위한 효모균의 문헌적 탐색 : NRRL, ATCC, BCCM, CBS, KCTC, DSMZ, IMI, JCM 및 WDC</p> <p>② 탐색 균주의 구입 : 5종 이상 구입</p> <p>③ 구입 균주의 특성조사 및 선발 : 성장률, acid-tolerance test, 효소역가 측정 : Doubling time 및 생육적온 조사 : 유기산 이용 단백질 합성율 측정</p>	100
<p>(제 3 세부과제) 리그닌 matrix를 분해할 수 있는 효소(esterase) 분비 미생물의 분리·동정 및 선발</p>	<p>① 반추위 미생물들의 esterase 활력 측정 : 재래산양 반추위에 존재하는 미생물중 곰팡이의 esterase 활력 측정</p> <p>② Esterase 활력 우수균의 선발 및 동정</p> <p>③ 동정 균주의 특성조사 및 균주등록 : SEM 촬영에 의한 미세구조의 관찰 : 미생물자원보존센터에 특허균주 등록 (2종 이상)</p>	100

나. 제 2차 년도 (2003. 10 ~ 2004. 10)

연구 개발 목표	연구 개발 내용과 범위	달성도
<p>(제1 세부과제) 연속 발효조 실험을 통한 최적 첨가량과 최적 사용조건 구명 등을 통한 곱팡이 발효제 개발</p>	<p>① 섬유소 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명 ② 간이 사일리지 제조 시험 (미생물 성장률 조사) ③ 볏짚 사료가치 증진에 미치는 영향 조사</p>	100
<p>(제2 세부과제) 선발 효모의 특성 구명 및 이를 이용한 효모 발효제의 개발</p>	<p>① 유기산 이용성과 단백질 함성량에 미치는 영향 ② 최적 첨가량 및 사용조건 구명 ③ 발효제가 사일리지 품질에 미치는 영향</p>	100
<p>(제3 세부과제) 해당 유전자 sequencing, 유전자특성 분석 및 유전자 cloning</p>	<p>① Genomic DNA Library 구축 ② 유전자 screening ③ 해당 유전자 sequencing 및 cloning</p>	100
<p>(협동연구과제) 발효제 효과구명을 위한 볏짚 곤포 사일리지의 제조 시험</p>	<p>① 발효제가 곤포사일리지 성분에 미치는 영향 ② 발효제가 곤포사일리지 발효특성에 미치는 영향 ③ 발효제가 사일리지 품질 및 소화율에 미치는 영향</p>	100

다. 제 3차 년도 (2004. 10 ~ 2005. 10)

연구 개발 목표	연구 개발 내용과 범위	달성도
<p>(제1 세부과제) 곰팡이(제1세부), 효모(제2세부) 및 transgenic 미생물(제1협동)을 종합한 최종 발효제의 개발</p>	<p>① <i>In vitro</i> 시험을 통한 미생물간 상호작용 구명 ② 적정 부형제 및 delivery system의 개발 ③ 최종 발효제의 효과 검증 시험</p>	100
<p>(제2 세부과제) <i>In vitro</i> 시험을 통한 개발품의 효과 검증시험</p>	<p>① 발효제 구성 미생물의 생존성과 성장률 구명 ② 소화율 및 효소분비량에 미치는 영향 구명 ③ 단백질 합성량 및 사료가치에 미치는 영향 구명</p>	100
<p>(제3 세부과제) Esterase 분비 transgenic 미생물을 개발과 이를 이용한 미생물 첨가제의 개발</p>	<p>① Transgenic 미생물의 생산 ② Transgenic 미생물의 특성 구명 ③ Transgenic 미생물을 이용한 미생물 첨가제 개발</p>	100
<p>(협동연구과제) 대사·사양시험을 통한 개발품의 효과 검증시험과 농가 실증시험 및 최종 개발품의 산업화 연구</p>	<p>① 발효제가 동물의 생산 반응에 미치는 영향 구명 ② 발효제 사용에 대한 경제성 분석 ③ 발효제에 대한 산업화 방안</p>	100

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

3. 연구평가의 착안점에 기초한 목표 달성도

구 분	연구평가의 착안점	달성도
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구사업의 수행을 위하여 추진계획이 잘 수립되었는가? ○ 벧짚의 이용기술개발을 위한 접근방법이 타당한가? ○ 벧짚 발효제 개발을 위한 미생물과 효소제들은 잘 선발되었는가? ○ 선발 미생물들은 잘 동정되었고 특허권 등록은 가능한가? ○ 선발 미생물들의 maintenance 방법은 잘 정립되었는가? 	100
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벧짚 사료가치 증진을 위한 발효제의 개발은 잘 이루어졌는가? ○ 선발 미생물의 투여로 벧짚의 사료가치가 획기적으로 증진 되었는가? ○ 개발발효제의 실험실내 투여 실험이 성공적으로 진행되었는가? ○ 벧짚 발효제 개발을 위한 미생물과 효소제들은 잘 선발되었는가? ○ 연구과정중에 발생할 문제점에 대한 해결방안이 잘 제시되었는가? 	100
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험(대사시험과 사양시험)의 결과가 양호한가? ○ 개발된 벧짚 발효제의 사용에 대한 경제성이 충분한가? ○ 벧짚의 곤포 사일리지화는 가능한가? ○ 벧짚이 갖는 물리적, 화학적 및 영양학적 문제점이 해결되었는가? ○ 벧짚의 보존성과 운반성 등이 확보되었는가? 	100
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벧짚의 사료가치를 획기적으로 증가시킬 발효제가 개발이 성공적으로 이루어 졌으며 산업화 시켰는가? 	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 1) 본 연구가 성공적으로 수행되어 우리나라의 대표적인 부존 사료 자원인 벧짚을 이용하는데 있어서 본 과제에서 개발된 첨가제를 사용하면 벧짚의 단백질 함량이 크게 증가할 뿐만아니라 40% 밀도는 반추위 소화율도 상당히 개선되어 양질의 목초자원과 유사한 수준의 사료가치를 갖게될 수 있을 것으로 기대한다.
- 2) 본 연구를 수행하는 과정 중에 부존사료자원의 물리적 문제점 해결을 위한 혐기·내산성 곰팡이를 이용한 발효제, 화학적 문제점 해결을 위하여 접근한 esterase를 분비하는 transgenic 미생물을 이용한 발효제, 영양학적 문제점을 극복하기 위해 동원된 혐기·내산성 효모를 이용한 발효제 등 다양한 종류의 미생물제재들과 이들 조합한 저질조사료 자원의 사료 가치 향상을 위한 사료가치 증진제 등 아주 많은 기술들과 특허들이 양산되어 반추동물 영양학 발전에 상당한 기여를 한 것으로 평가된다.
- 3) 또한 이 연구를 위하여 여러 생태계에서 탐색·선발되고 또한 분리·동정된 많은 종류의 미생물들이 특허균으로 기탁될 것이 기대되며 또한 유용한 혐기 미생물 자원이 대량 확보되므로써 아직 국내에서는 운영되지 않고 있지 않지만 우리 연구진이 꿈 꾸는 혐기 미생물자원 뱅크화사업(KTACC)의 모태가 될 수 있을 것으로 기대된다.
- 4) 이용률이 저조한 벧짚을 생산현장에서 발효사료로 제조시킴으로써 부존자원의 조사료용 수거율을 최대화시키고 그 품질을 높이기 위한 방법을 개발하므로써 다른 부존 조사료 자원(산야초, 갈대, 억새 등)의 활용방안을 위한 기초적 자료를 마련한 것으로 평가된다.
- 5) 곤포로 조사료를 양적 단위로 규격화시킴으로서 매매 유통이 가능하게 되어 수급 배분상의 효율화를 기할 수 있을 것으로 기대될 뿐만아니라 부존사료자원의 문제점인 운반성과 보존성 등을 동시에 해결할 수 있는 충분한 가능성을 모색한 것으로 평가된다.

- 6) 부존 조사료원을 이용한 발효사료 (미생물제 첨가 사일리지)의 제조원리 및 기술을 농가에 이전함으로써 농가 자가조사료 가공기술의 확보를 도모하고 농가의 소득 증대에 상당히 기여할 수 있을 것으로 평가된다.
- 7) 1997년 기준으로 26억불 상당이 사료자원도입 비용으로 막대한 외화가 지출되었다. 이의 대부분이 배합사료원료 수입에 사용되는 현 실정에서 부존사료자원의 이용효율 증대에 의한 수입 원료사료의 대체효과로 사료비 절감 뿐만 아니라 2000년 현재 약 290만톤에 이르는 조사료 부족분을 보충시키는데 크게 기여할 수 있을 것이다.
- 8) 정부가 수립하고 있는 조사료 수립계획이 차질없이 진행된다 하더라도 올해 수입예정인 외국 조사료 38만 5천 톤을 포함하더라도 153만1천 톤의 조사료가 수요량에 비해 부족한 실정이다. 이와 같은 여건을 고려할 때 풍부한 부존자원을 조사료화 함으로써 사료자원의 도입에 소요되는 막대한 외화를 절감할 수 있을 것으로 기대된다.
- 9) 이 기술의 개발로 저질조사료 자원의 사료이용효율이 획기적으로 증가하므로써 조사료의 급여비율이 상대적으로 증가(조사료 급여수준 20~30%에서 30~40%수준으로 개선) 하고 배합사료비가 크게 절감될 뿐만아니라 수입사료의 대체효과로 외화가 절약되며 농가소득이 크게 증대될 것으로 기대된다.
- 10) 시판되고 있는 발효제나 사료첨가제들의 대부분은 외국에서 수입 또는 기술도입에 많은 로얄티를 지불하므로 가격이 비쌌 뿐만 아니라 생물자원의 특성이 처리하려는 재료의 물리화학적 특성에 부합되지 않아 효율이 기대보다 낮았다. 따라서 고유기술과 능력으로 개발될 제품은 수입대체 효과 및 활용효율의 극대화에 크게 기여할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 관련 기술 및 특허와 관련되지 않는 연구결과들의 논문화 (5편 이상)
2. 발효제 및 사료첨가제의 특허등록(4건 이상)
3. 도출된 기술의 산업체 기술이전 및 농가 보급
4. 우수 미생물 자원과 효소들에 대한 특허권 등록(5건 이상)
5. 확보된 미생물자원 및 유전자 자원의 Bank system 구축
6. 미생물은 동물용 소화제, 단위동물인 양돈, 양계 사료효율개선을 위한 사료첨가제로, 효소는 식품가공산업에서 식품첨가제 개발에 관한 연구로 확대한다.
7. 미생물 복합체 개발과 관련된 기술은 미생물 생산관련 기술을 산업체에 이관하여 생물산업의 발전을 도모한다.
8. 본 연구를 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 학술발표회나 세미나 농가교육 등을 통하여 양축농가에 보급한다.
9. 양축농가로 하여금 볏짚과 야초를 적극 활용하도록 함으로써 자급 조사료의 확보를 통한 낙농 육우산업의 경영비 절감과 경쟁력 제고에도 역점을 둔다.
10. 산업화 계획: 본 과제에서 개발된 볏짚 사일리지 발효용 미생물복합제제는 미생물의 대량 배양 및 생산 설비를 갖춘 기업에 기술 이전하여 산업화할 계획이다.

제 6 장 참고문헌

- Adams, D.C., M.L. Galyean, H.E. Kiesling, J.D. Wallace and M.D. Finker. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing lambs and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53:780
- Akin, D. E., F. E. Barton, II and S. W. Coleman. 1983. Structural factors affecting leaf degradation of old world blue stem and weeping love grass. *J. Anim. Sci.* 56: 1434-1446.
- Akin, D. E., N. Ames-Gottfred, R. D. Hartley, R. G. Fulcher and L. L. Rigsby. 1990. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. *Crop Sci.* 30:396-401.
- Ali, B. R. S., Zhou, L., Graves, F. M., Freedman, R. B., Black, G. W., Gilbert, H. J. and Hazlewood, J. P. 1995. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol. Lett.* 125:15-22.
- Arambel, M.J., R.D. Weidmeier and J.L. Walters. 1987. Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and(or) *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Nutr. Rep. Int.* 35:433-436.
- Arambel, M.J. and B.A. Kent. 1988. Effect of yeast culture on milk production response and apparent nutrient digestibility in early lactating cows. *J. Dairy Sci.* 71(Suppl. 1): 220(Abstr.).
- Aslan, V., S.M. Thamsborg, R.J. Jorgensen and A. Basse. 1995. Induced acute ruminal acidosis in goats treated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bicarbonate. *Acta. Vet. Scan.* 36:65-70.
- Attwood, G. T. and K. Reilly. 1995. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. *J. Appl. Bacteriol.* 79:22-29.
- Bacon, M. and W. J. Ingledew. 1989. The reductive reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulphur and selenium. *FEMS Microbiol. Lett.* 58:189-194.
- Barichievich, E. M. and R. E. Calza. 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the

- anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. Appl. Environ. Microbiol. 56:43-48.
- Barkay, T., R. R. Turner, A. Vanden Brook and C. Liebert. 1991. The relationships of Hg(II) volatilization from a freshwater pond to the abundance of *mer* genes in the gene pool of the indigenous microbial community. Microb. Ecol. 21:151-161.
- Barr, D.J.S., H.H. Kudo, K. Jakober and K.Cheng. 1989. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp, *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis*gen. nov., sp. nov. Can. J. Botany. 67:2815
- Bauchop, T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. Agric. Environ. 6:339-348.
- Bauchop, T. and D. O. Mountfort. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. Appl. Environ. Microbiol. 42:1103-1110.
- Beauchemin, K.A., L.M. Rode and V.J.H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. Can. J. Anim. Sci. 75:641
- Beharka, A. A., T. G. Nagaraja and J. L. Morrill. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. J. Dairy Sci. 74:4326- 4336.
- Beharka, A.A. and T.G. Nagaraja. 1993. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on *in vitro* fiber degradation. J. Dairy Sci. 76:812-818.
- Beharka, A.A., T.G. Nagaraja and J.L. Morrill. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. J. Dairy Sci. 74:4326
- Beldman, G., M. F. Searl-Van Leeuwen, F. M. Rombouts and F.G.J. Voragen. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. Eur. J. Biochem. 146:303-308.
- Bernalier, A., G. Fonty and P. Gouet. 1991. Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi in monoculture or in coculture with rumen bacteria. Anim. Feed Sci. Tech. 32:13136.
- Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnemoy and P. Gouet. 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. Curr. Microbiol. 25:143-148.
- Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnemoy and P. Gouet. 1993. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. J. Gen. Microbiol. 139:873
- Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnemoy and P. Gouet. 1993. Inhibition of the cellulolytic

- activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. J. Gen. Microbiol. 139:873-880.
- Boing, J.T.P. 1983. Enzyme production. In "Industrial Microbiology. 4th Ed." Ed by G. Reed, pp. 685 AVI Publ. Co., Inc., Westport, CT. USA.
- Bryant, M.P. and L.A. Burkey. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. J. Dairy Sci. 36:205
- Campbell, L. D. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme application for monogastric feeds: A review. Can. J. Anim. Sci. 72:449-466.
- Carli, T., K. S. Diker and A. Eyigor. 1995. Sulphate-reducing bacteria in bovine faeces. Lett. Appl. Microbiol. 21:228-229.
- Carro, M.D., P. Lebzein and K. Rohr. 1992. Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation (Rusitec) of diet containing variable portions of concentrates. Anim. Feed Sci. Technol. 37:209-220.
- Chadema, I. and N. W. Offer. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in sheep. Anim. Prod. 50:483-489.
- Chalupa, W., D. T. Galligan and J. D. Ferguson. 1996. Animal nutrition and management in the 21st century: dairy cattle. Anim. Feed Sci. Tech. 58:1-18.
- Chamberlain, D. G. and S. Robertson. 1989. The effects of various enzyme mixtures as silage additives on food intake and milk production of dairy cows. Brit. Grassl. Soc. Occas. Symp. 23:187-189.
- Chen, J., M. R. Stokes and C. R. Wallace. 1994. Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silages. J. Dairy Sci. 77:501-512.
- Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato and J.W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. Ed. by T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima. pp. 595-624. Academic Press, Toronto, Ont. Canada.
- Chey, D.C., N.Y. Hur, J.H. Yu and D.H. Oh. 1990. Purification of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. Kor. J. Appl. Biotech. 18:376-382.
- Chiquette, J. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. Can. J. Anim. Sci. 75:405-415.
- Choung, J. J. and D. G. Chamberlain. 1995. The effect of the addition of cell-wall degrading enzymes at ensiling on the response to post-ruminal supplementation of protein in dairy cows receiving a silage-based diet. J. Sci. Food Agric. 60:525-527.
- Clarke, R. T. J., R. W. Bailey and B. D. E. Gaillard. 1969. Growth of rumen bacteria

- on plant cell wall poly- saccharides. J. Gen. Microbiol. 56:79-84.
- Clarke, R. T. J., R.W. Bailey and B. D .E. Gaillard. 1969. Growth of rumen bacteria on plant cell wall polysaccharides. J. Gen. Microbiol. 56:79-84.
- Coleman, G. S. 1986. The distribution of carboxymethyl- cellulase between fractions from the rumen of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations. J. Agric. Sci., Camb. 106:121-127.
- Coleman, G. S. 1989. Protozoal-bacterial interaction in the rumen. In "The Roles of Protozoa and Fungi in ruminant Digestion (OECD/UNE International Seminar)" Ed. by J. V. Nolan, R. A. Leng, and D. I. Demeyer. pp. 13-26. Penambul Books, Armidale, Australia.
- Coleman, G. S. 1992. The rate of uptake and metabolism of starch grains and cellulose particles by Entodinium species, *Eudiplodinium maggii*, some other entodiniomorphid protozoa and natural protozoal populations taken from the ovine rumen. J. Appl. Bacteriol. 73:507-513.
- Coleman, M. L., D. B. Hedrick, D. R. Lovley, D. C. White and K. Pye. 1993. Reduction of Fe (III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. Nature 361:436-438.
- Collmer, A., J. L. Ried and M. S. Mount. 1988. Assay methods of pectic enzymes. In "Methods in Enzymology, Vol. 161" Ed. Wood, W. A. and S. T. Kellogg. pp. 329-334. Academic Press. San Diego, USA.
- Cowan D. 1996. Industrial enzyme technology. Trends in Biotechnol. 14:177-178.
- Craig, W. M., D. R. Brown, G. A. Broderick and D. B. Ricker. 1987a. Post-prandial compositional changes of fluid- and particle-associated ruminal microorganisms. J. Anim. Sci. 65:1042-1048.
- Craig, W. M., G. A. Broderick and D. B. Ricker. 1987b. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. J. Nutr. 117:56-62.
- Dawson, K.A., K.E. Newman and J.A. Boling. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. J. Anim. Sci. 68:3392-3398.
- Dermoun, Z. and J. P. Belaich. 1985. Microcalorimetric study of cellulose degradation by *Cellulomonas uda* ATCC 21399. Biotechnol. Bioeng. 27:1005-1009.
- Doerner, K. C. and White, B. A. 1990. Assessment of the endo-1,4-glucanase components of *Ruminococcus flavofaciens* FD-1. Appl. Environ. Microbiol. 56:1844-1850.
- Erasmus, L.J., P.M. Botha and A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. J. Dairy Sci.

75:3056-3065.

- Fedorak, P.M. and S.E. Hrwdy. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4:425
- Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, K. Dickinson and T. Moen. 1992a. Effect of enzyme additives on *in situ* and *in vitro* degradation of mature coolgrass forage. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl.): 309 (Abstr.).
- Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, S.C. Hacnny and G.T. Pritchard. 1992b. Effect of enzyme additives to coolgrass forage on voluntary intake and digestive function in mature beef steers. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl.):310 (Abstr.).
- Flint, H. J. and A. M. Thomson. 1991. The genetic manipulation of rumen bacteria with special reference to fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32:123-129.
- Flint, H. J., Zhang, J. X. and Martin, J. 1994. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Curr. Microbiol.* 29:139-143.
- Fondevila, M., C.J. Newbold, P.M. Hutton and E.R. Ørskov. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the ruminal fermentation of sheep given straw. *Anim. Prod.* 51:422-425.
- Fonty, G. and P.H. Gouet. 1994. Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. In "Microorganisms in Ruminant Nutrition" Eds by R.A. Prins and C.S. Stewart. pp. 12-28. Nottingham University Press, Nottingham.
- Forsberg, C. W. and L. Lam. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in bovine rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:528-537.
- Frazer, A. C., P. W. Coschigano and L. Y. Young. 1995. Toluene metabolism under anaerobic conditions: A review. *Anaerobe.* 1:293-303.
- Friesen, O. D., W. Guenter, R. R. Marquardt and B.A. Rotter. 1992. The effect of enzyme supplementation on the apparent metabolizable energy and nutrient digestibilities of wheat, barley, oats and rye for the young broiler chick. *Poult. Sci.* 71:1710-1721.
- Frost, A.I. and I.M. Nevison. 1989. A system for analysing the buffering system in the developing rumen of the young calf. *Anim. Prod.* 48:666(Abstr.).
- Frumholtz, P. P., C. J. Newbold and R. J. Wallace. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on *in vitro* rumen fermentation. *Anim. Prod.* 48:665(Abst.).
- Frumholtz, P.P., C.J. Newbold and R.J. Wallace. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on *in vitro* rumen fermentation. *Anim. Prod.* 48:665 (Abst.).

- Fuchs, G., M. E. S. Mohamed, U. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack, R. Brackmann, C. Lochmeyer and B. Oswald. 1994. Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds. In "Biochemistry of Microbial Degradation" Ed. by C. Ratledge. pp. 513-553. Kluwer Academic Publ. Dordrecht. The Netherlands.
- Gall, J.L. and A.V. Xavier. 1996. Review article: Anaerobes response to oxygen: The sulfate- reducing bacteria. *Anaerobe*. 2:1-9.
- Gijzen, H.J., P.J. Derikx and G.D. Vogels. 1990. Application of rumen microorganisms for a high rate anaerobic digestion of papermill sludge. *Biol. Wastes*. 32:169-179.
- Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas and J. T. Huber 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total track digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci*. 73:703-710.
- Gomez-Alarcon, R. A., J. T. Huber, G. E. Higginbotham, F. Wiersma, D. Ammon and B. Taylor. 1991. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on milk yield, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. *J. Anim. Sci*. 69:1733-1740.
- Gong, C. S. and G. T. Tsao. 1979. Cellulase biosynthesis and regulation. *Ann. Rep. Ferm. Proc*. 3:111-140.
- Gonzalez-Yanez, M., R. McGinn, D. H. Anderson, A.R. Henderson and P. Phillips. 1990. The effect of biological additives on the composition and nutritive value of silage. *Anim. Prod*. 50:586-586.
- Gorby, Y. A. and D. R. Lovley. 1992. Enzymatic uranium precipitation. *Environ. Sci. Technol*. 26:205-207.
- Gordon, G. L. R. and M. W. Phillips. 1992. Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix* sp. LM1, a rumen anaerobic fungus. *Lett. Appl. Microbiol*. 15:113-115.
- Gordon, G.L.R and M.W. Phillips. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol*. 55:1703.
- Gordon, G.L.R., S.K. Gulati and J.R. Ashes. 1983. Influence of low-sulphur straw on anaerobic fungal numbers in a sheep rumen. *Proc. Nutr. Soc. Aust*. 8:188-188.
- Gorvacheva, I.V. and N.A. Rodionove. 1977. Studies on xylan degrading enzyme (I). *Biochem. Biophys. Acta*. 484:79-93.
- Gosh, A., B. K. Gosh, H. Trimino-Vazquez, D. E. Eveleigh and B.S. Montenecourt. 1984. Cellulase secretion from hyper-cellulolytic mutant *Trichoderma viride* Rut-C30. *Arch. Microbiol*. 140:126- 133.
- Gosh, A., B.K. Gosh, H. Trimino-Vazquez, D.E. Eveleigh, and B.S. Montenecourt. 1984.

- Cellulase secretion from hyper-cellulolytic mutant *Trichoderma viride* Rut-C30. Arch. Microbiol. 140:126.
- Grenet, E., G. Fonty and P. Barry. 1989. SEM study of the degradation of maize and lucern stems in the rumen of gnotobiotic lambs harbouring only fungi as cellulolytic microorganisms. In "The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion(OECD/UNE International Seminar)" Eds by J.V. Nolan, R. A. Leng and D. I. Demeyer, pp.265-279. Penambul Books, Armidale, Australia.
- Griffin, H., F. R. Dintzis, L. Krull and F. L. Baker. 1984. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Bioeng. 26:296-300.
- Ha, J. K., C. H. Kim, S. S. Lee and Y. J. Choi. 1996. Study on the isolation and identification of rumen cellulolytic bacteria. III. Cellulose degradation rate and cellulolytic enzyme activities of cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Korean native cattle. Korean J. Anim. Nutr. Feed. 19:329-338.
- Ha, J. K., D. K. Kam, H. S. Jeon and S. S. Lee. 2000. Role of Xylan Degrading Enzymes in Fiber Digestion in Ruminants. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 13(Special Issue):149~157.
- Harrison, G.A., R.W. Hemken, K.A. Dawson, R.J. Harmon and K.B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. J. Dairy Sci., 71:2967
- Harrison, J. H., F. R. Valdez and S. C. Fransen. 1989. Effect of forage stabilizers on fermentation and digestibility of silage nutrients. J. Dairy Sci. 69:186.
- Henderson, N. 1993. Silage additives. Anim. Feed Sci. Technol. 45:35.
- Highley, T. L. 1988. Cellulolytic activity of brown-rot and white-rot fungi on solid media. Holzforschung. 42:211- 217.
- Ho, Y. W., N. Abdullah and S. Jalaludin. 1988. Colonization of guinea grass by anaerobic rumen fungi in swamp buffalo and cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 22:161-172.
- Hodgson, J. 1994. The changing bulk biocatalyst market. Bio/Technol. 12:789-790.
- Huber, J.T., G.E. Higginbotham and R. Gomez1986. Influence of feeding an *Aspergillus oryzae*culture during hot weather on performance of lactating cows. J. Dairy Sci. 69 (Supple. 1):187 (Abstr.).
- Hughes, G.M., B. Davis and I.M. Spencer. 1988. Utilization of carbon substrates during microcycle growth of *Aspergillus niger*. Trans. Biochem. Soc. 26:791
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, Inc., New York,

USA.

- Joblin, K. N., and G. E. Naylor. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 65:111.
- K. -J. Cheng, S. S. Lee, H. D. Bae and J. K. Ha. 1999. Industrial Applications of Rumen Microbes (REVIEW). AJAS 12(1):84~92.
- Kopečný, J. and B. Hodrova. 1995. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. Lett. Appl. Microbiol. 20:312-316.
- Kung, Jr., L., E.M. Kreck, R.S. Tung, A.O. Hession, A.C. Sheperd, M.A. Cohen, H.E. Swain and J.A.Z. Leedle. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. J. Dairy Sci. 80:2045-2051.
- Lam, T. B. T., K. Iiyama and B. A. Stone. 1990. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: Taxonomic and structural considerations. In: Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants. Ed. by D. E. Akin, L. G. Ljungdahl and J. R. Wilson. Elsevier Science, New York. pp.43-69.
- Lee, S. S., H. D. Kim, J. K. Ha and K. J. Cheng. 1998a. Distributions and activities of hydrolytic enzymes in the rumen compartments of Hereford bulls fed alfalfa based diets. Proc. Contributed Papers. 8th WCAP, Seoul, Korea. pp. 354-355.
- Lee, S. S., H. D. Kim, J. K. Ha, M. Goto and K. J. Cheng. 1998b. Relative contributions and interactions between bacteria, protozoa and fungi in *in vitro* degradation of orchardgrass cell walls. Proc. contributed papers. 8th WCAP, Seoul, Korea. pp. 564-565.
- Lee, S. S., J. K. Ha and K. -J. Cheng. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion. Anim. Feed. Sci. & Tech. 88:201~217.
- Lee, S. S., J. K. Ha, and Y. J. Choi. 1996. Study on the isolation and identification of rumen fungi, characterization of cellulolytic fungal enzymes, and its industrial utilization: VII. Distributions, properties and purification of cellulolytic enzymes produced by the KNGF-2 fungi isolated from the rumen of Korean native goat. Korean J. Anim. Nutr. Feed. 19:525-534.
- Lee, S. S., J. K. Ha, Y. J. and Choi. 1995. Study on the isolation and identification of rumen fungi, characterization of cellulolytic fungal enzymes, and its industrial utilization: VI. Study on the identification of KNGFS group isolated from the rumen of Korean native goat. Korean J. Anim. Nutr. Feed. 19:525-534.

- Lee, S. S., K. J. Shin, W. Y. Kim, J. K. Ha and In. K. Han. 1999. The Rumen Ecosystems: As a Fountain Source of Novel Enzymes -Review Article-. AJAS 12(6):988~1001.
- Lee, S. S., S. W. Kim, J. K. Ha and K. J. Cheng, 1997a. Influences of emulsified octadecanoic acids (C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3) on the gas production, cellulose digestion and cellulase activities by rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* RE1. unpublished data.
- Legay-Carmier, F. and D. Bauchart. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. Brit. J. Nutr. 61:725-740.
- Lowe, S.E., G.G. Griffith, A. Milne, M.K. Theodorou and A.P.J. Trinci. 1987a. The life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. J. Gen. Microbiol. 133:1815
- Lowe, S.E., M.K. Theodorou and A.P.J. Trinci. 1987b. Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. J. Gen. Microbiol. 133:1829
- Lowe, S.E., M.K. Theodorou, A.P.J. Trinci and R.B. Hespell. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semidefined media lacking rumen fluid. J. Gen. Microbiol. 131:2225
- Lynd, L. R., R. H. Wolkin and H. E. Grethlein. 1986. Continuous fermentation of Avicel and pretreated mixed hardwood by *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser. 17:265-274.
- Malburg, L. M. and C. W. Forsberg. 1993. *Fibrobacter succinogenes* possesses at least nine distinct glucanase genes. Can. J. Microbiol. 39:882-891.
- Martin, C. and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: effect of barley and buffer supplements. J. Sci. Food Agric. 67:407-413.
- McNeil, D. L., B. J. Carroll and P. M. Gresshoff. 1984. The interaction between nitrogen and carbon metabolism in nitrogen fixing soybean bacteroids. Adv. Agric. Biotechnol. 4:515-519.
- Menke, K.H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. Camb. 93:217
- Merry, R.J., M.K. Theodorou, M.G. Raurich and M.S. Dhanoa. 1991. Use of headspace gas pressure in batch cultures to assist in determination of nutritive value of silage to rumen bacteria. Presented at a Conference on Forage Conservation Towards 2000. Institute of

- Grassland and Forage Research, Federal Research Centre of Agriculture, Braunschweig Germany.
- Michel, V., G. Fonty, L. Millet, F. Bonnemoy and P. Gouet. 1993. *In vitro* study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 110:5-9.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426
- Morgavi, D. P, M. Sakurada, Y. Tomita and R. Onodera. 1994. Presence in rumen bacterial and protozoal populations of enzymes capable of degrading fungal cell walls. Microbiology. 140:631-636.
- Mountfort, D. O. and R. A. Asher. 1989a. Production of polysaccharides by the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. In: The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion (OECD/UNE International Seminar). Ed. by J. V. Nolan, R. A. Leng, and D. I. Demeyer. pp. 139-144. Penambul Books, Armidale, Australia.
- Mountfort, D. O. and R. A. Asher. 1989b. Production of xylanases by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 55:1016-1022.
- Mountfort, D.O. and R.A. Asher. 1983. Role of catabolite regulatory mechanisms in control of carbohydrate utilization by the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 46:1331
- Nadeau, E.M.G. and D.R. Buxton. 1997. Cellulase and bacterial inoculant effects on cocksfoot and lucerne ensiled at high dry matter levels. J. Sci. Food Agric., 73:369
- Newbold, C. J., Frumholtz, P. P. and Wallace, R. J. 1992. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. J. Agric. Sci. (Camb). 119: 423
- Newbold, C. J. and K. Hillman. 1990. The effect of ciliate protozoa on the turnover of bacterial and fungal protein in the rumen of sheep. Lett. Appl. Microbiol. 11:100-102.
- Newbold, C. J., P. W. Griffin and R. J. Wallace. 1989. Interactions between rumen bacteria and ciliate protozoa in their attachment to barley straw. Lett. Appl. Microbiol. 8:63-66.
- Newbold, C.J., R. Brock and R.J. Wallace. 1991. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation on the rumen simulation technique (Rusitec). J. Agric. Sci. (Camb.). 116:159
- Nisbet, D.J. and S.A. Martin. 1991. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas*

- ruminantium*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3515-3518.
- Onodera, R., K. Murakami and K. Ogawa. 1988b. Cellulose- degrading enzyme activities of mixed rumen ciliate protozoa from goats. Agric. Biol. Chem. 52:2639-2640.
- Onodera, R., N. Yamasaki and K. Murakami. 1988a. Effect of inhibition by ciliate protozoa on the digestion of fibrous materials *in vivo* in the rumen of goats and in an *in vitro* rumen microbial ecosystem. Agric. Biol. Chem. 52:2635-2637.
- Orpin, C. G. 1983/84. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Technol. 10:121-143.
- Ørskov, E. R. 1991. Manipulation of fibre digestion in the rumen. Proc. Nutr. Soc. 50:187-196.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agr. Sci. Camb. 92:499.
- Paster, B. J. and E. Canale-Parola. 1985. *Treponema saccharo- philum* sp. nov., a large pectinolytic spirochete from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 50:212-219.
- Pavlostathis, S. G., T. L. Miller and M. J. Wolin. 1988. Kinetics of insoluble cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2660-2663.
- Pearce, P. D. and T. Bauchop. 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1265-1269.
- Pettipher, G. L. and M. J. Latham. 1979a. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* rumen bacteria which degrade plant cell walls. J. Gen. Microbiol. 110:21-27.
- Pettipher, G. L. and M. J. Latham. 1979b. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture Source of energy for ruminant herbivores. J. Gen. Microbiol. 110:29-38.
- Piva, G., S. Belladonna, G. Fusconi and F. Sicbaldi. 1993. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. J. Dairy Sci. 76:2717
- Prins, R. A. 1977. Biochemical activities of gut micro- organisms. In: Microbial Ecology of the Gut. Ed. by R. T. J. Clarke and T. Bauchop. pp.73-183. Academic Press. London. UK.

- Roger, V., A. Bdrnalier, E. Grenet, G. Fonty, J. Jamot and P. Gouet. 1993. Degradation of wheat straw and maize stem by a monocentric and a polycentric rumen fungi, alone or in association with rumen cellulolytic bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 42:69-82.
- Romulo, B. H., S. H. Bird and R. A. Leng. 1986. The effects of defaunation on digestibility and rumen fungi counts in sheep fed high-fibre diets. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 16:327-330.
- Romulo, B. H., S. H. Bird and R. A. Leng. 1989. Combined effects of defaunation and protein supplement- tion on intake, digestibility, *N* retention and fungi counts in sheep fed straw based diet. In: *The Role of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion* (OECD/ UNE International Seminar) Ed. by J. V. Nolan, R. A. Leng and D. I. Demeyer. Penambul Books, Armidale, Australia. pp. 285-288.
- Roper, K. B., and D. I. Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*, pp. 357 The Williams and Wikins Co., Baltimore.
- SAS. 1996. User's Guide: Statistics, Version 6 Editions. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.
- Scott, H.W. and B.A. Dehority. 1965. Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 89:1169
- Shewale, J. G. 1982. Beta-glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose Enzymes, cellulolytic fungi, *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis*, *Sclerotium rolfsi*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Trichoderma reesei*. *Int. J. Biochem.* 14:435-443.
- Shi, Y. and P. J. Weimer. 1993. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2853-1088.
- Soetanto, H., G. L. R. Gordon, I. D. Hume and R. A, Leng. 1985. The role of protozoa and fungi in fibre digestion in the rumen of sheep. *Proc. 3rd Cong. Asian & Aust. Anim. Prod. Soc.* 2:805-807.
- Stewart, C.S. 1994. Plant-animal and microbial interactions in ruminant fiber degradation. In "Microorganisms in Ruminant Nutrition" Eds by R.A. Prins and C.S. Stewart. pp. 12-28. Nottingham University Press, Nottingham.
- Stewart, C.S., S.H. Duncan, A.J. Richardson, C. Backwell and R. Begbie. 1992. The inhibition of fungal cellulolysis by cell-free preparations from ruminococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 97:83-88.
- Szymanski, P. T. 1981. A note in the fermentation of pectin by pure strains and

- combined cultures of rumen bacteria. *Acta Microbiologica Polonica*. 30:159-163.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* 49:1615-1630.
- Teunissen, M. J. and H. J. M. Op den Camp. 1993. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63:63-76.
- Teunissen, M. J., A. A. M. Smits, H. J. M. Op den Camp, J. H. J. Huis in't Veld, and G. D. Vogels. 1991a. Fermentation of cellulose and production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and non-ruminant herbivores. *Arch. Microbiol.* 156:290.
- Teunissen, M. J., G. V. M. D. E. Kort, H. J. M. Op den Camp, and J. H. J. Huis in't Veld. 1992. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. *J. Gen. Microbiol.* 138:1657-1664.
- Teunissen, M.J., A.A.M. Smits, H.J.M. Op den Camp, J.H.J. Huis in't Veld and G.D. Vogels. 1991. Fermentation of cellulose and production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and nonherbivores. *Arch Microbiol.* 156:290
- Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa and A.B. McAllan. 1991. A new laboratory procedure for estimating kinetic parameters associated with the digestibility of forages. *International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. US Dairy Forage Research Center, USDA, Agricultural Research Service, Wisconsin, USA.
- Theodorou, M.K., D.R. David, B.B. Nielsen, M. I. G. Lawrence and A.P.J. Trinci. 1995. Determination of growth of anaerobic fungi on soluble and cellulosic substrates using a pressure transducer. *Microbiology*. 141:671
- Trinci, A. P. J., Davies, D. R., Gull, K. Lawrence, M. I., Nielsen, B. B., Rickers, A. and Theodorou, M. K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 98:129-152.
- Trinci, A.P.J., D.R. Davies, K. Gull, M.I. Lawrence, B.B. Nielsen, A. Rickers and M.K. Theodorou. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 98:129.
- Ushida, K., H. Tanuka and Y. Kojima. 1989. A Simple *in situ* method for estimating fungal population size in the rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 9:109-111.
- Van Horn, H.H., A.C. Wilkie, W.J. Powers and R.A. Nordstedt. 1994. Symposium: Dairy Manure and Waste Management: Components of dairy manure management systems. *J. Dairy Sci.* 77:2008
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber,

- neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583.
- Van Vuuren, A. M., K. Bergsma, F. Frol-Kramer, and J. A. V. Beers. 1989. Effects of additional of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass. *Grass Forage Sci.* 44:223.
- Varel, V.H., K.K. Kreikemeier, H.J.G. Jung and R.D. Hatfield. 1993. *In vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3171
- Waldrup, H.M. and S.A. Martin. 1993. Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 71:2770-2776.
- Wallace, R. J. 1985. Adsorption of soluble proteins to rumen bacteria and the role of adsorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.* 53:399.
- Wallace, R. J. and K. N. Joblin. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* 29:19- 25.
- Wallace, R. J. and M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In *The Rumen Microbial Ecosystem* pp. 217-249. Ed. by P. N. Hobson. Elsevier Applied Science, London.
- Wanderley, R.C., J.T. Huber, C.B. Theurer and M. Poore. 1985. Ruminal digestion of protein and fiber in duodenally cannulated cows treated with Vitaferm. *J. Dairy Sci.* 68:123 (Abstr.).
- Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* 79:1496-1502.
- Weimer, P.J., J.M. Lopez and A.D. French. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2421
- Weller, R.A., F.V. Gray and A.F. Pilgrim. 1958. The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* 12:421.
- Wells, J. E. and J. B. Russell. 1996. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *J. Dairy Sci.* 79:1487- 1495.
- Whistler, R. H. A and E. L. Richards. 1970. Hemicellulose. In: *The carbohydrates*. Ed. by W. Pigman and D. Horton. Academic press. New York, USA. pp. 447-469.
- Widyastuti, Y., C.J. Newbold, C.S. Stewart and E.R. Ørskov. 1995. Interactions between rumen anaerobic fungi and ciliate protozoa in the degradation of rice straw cell walls. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:61.

- Wiedmeier, R.D., M.J. Arambel and J.L. Walters. 1987. Effects of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrients digestibility. *J. Dairy Sci.*, 70:2063
- Williams, A. G. and S. E. Withers. 1991. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. *J. Appl. Microbiol.* 70:144-155.
- Williams, A.G., S.E. Withers, G.E. Naylor and K.N. Joblin. 1994. Effect of heterotrophic ruminal bacteria on xylan metabolism by the anaerobic fungus *Piromyces communis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:105-109.
- Williams, P.E.V., C.A.G. Tait, G.M. Innes and C.J. Newbold. 1991. The effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016
- Williams, P.E.V., C.J. Newbold, A. Walker and R.J. Wallace. 1990. Rumen probiosis: The effects of including yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet for sheep fed continuously or in meal fed steers. *J. Dairy Sci.* 72 (Suppl. 1):521 (Abstr.).
- Wojciechowicz, M. and A. Ziolecki. 1984. A note on the pectinolytic enzymes of *Streptococcus bovis*. *J. Appl. Bacteriol.* 56:515-518.
- Wolin, M. J. and T. L. Miller. 1988. Microbe-microbe interactions. In: *The rumen Microbial Ecosystem*. Ed. by P. N. Hobson. Elsevier, Amsterdam. pp. 361-386.
- Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52:305-317.
- Wood, T. M. 1991. Fungal cellulase. In: *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. Ed. by C. H., Haigler and P. J. Weimer. pp. 499-533. Marcel Dekker, New York, USA.
- Wood, T. M., C. A. Wilson, S. I. McCrae and K. N. Joblin. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:37-40.
- Work, E and D.L. Dewey. 1953. The distribution of α , ϵ -diaminopimelic acid among various microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 9:394.
- Work, E. 1950. A new naturally occurring amino acid. *Nature.* 165:74.
- Yamane, K. H. Suzuki and K. Nisizawa. 1970. Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. cellulosa. *J. Biochem.*

- 67:19-23.
- Yanke, L. J., Y. Dong, T. A. McAllister, H. D. Bae and K.-J. Cheng. 1993. Comparison of amylolytic and proteolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Can. J. Microbiol.* 39:817-820.
- Yaru, T., H. Nagai and H. Mori. 1993. Regulation of the heat-shock responses in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:321-350.
- Yazdi, M. T., J. R. Woodward and A. Radford. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *J. Gen. Microbiol.* 136:1313-1319.
- Yoder, R. D., A. Trenkle and W. Burroughs. 1966. Influence of rumen protozoa and bacteria upon cellulose digestion *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 25:609-612.
- Yoichi, K. 1986. Purification and properties of two endo-cellulase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* 50:2989-2995.
- Yurkova, N. A. and N. N. Lyalikova. 1991. New vanadate-reducing facultative chemolithotrophic bacteria. *Microbiol.* 59:672-677.
- 이성실 외 13인. 2001. 사료표준분석방법 (2판) 축산기술연구소. 농촌진흥청
- 이성실 외 16인. 2004. 동물영양학. 유한문화사
- 이성실 외 22명. 2003. 동물자원학. 선진문화사
- 이성실, 하종규, 강희신, K.-J. Cheng. 1997. 반추위 혐기성 곰팡이의 중요성과 산업적 이용성에 관한 고찰(Review article). *한국낙농학회지.* 19(3):249~276.
- 하종규, 이성실, 고종열. 2003. 반추동물영양학실험법. 서울대출판부
- 하종규, 이성실, 문양수, 김창현. 2005. 반추동물영양생리학. 서울대출판부
- 하종규, 이성실. 2001. 반추동물영양학실험법 (제2판). 도서출판 문운당.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.