최 종
연구보고서

미생물 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상방안 개발

Developments of microbial attachment technique for enhancement of roughage utilization

연구기간

서울대학교 농업생명과학대학
한국방송통신대학교 농학과

농 림 부

제 출 문

농림부 장과 귀하

본 보고서를 “미생물 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상방안 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5월 25일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 하 종 규
연 구 원 : 이 찬 희
연 구 원 : 김 민 석
연 구 원 : 윤 륭 현
연 구 원 : 송 재 용
연 구 원 : 손 진 혁
협동연구기관명 : 방송통신대학교
협동연구책임자 : 장 종 수

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미생물 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상방안 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 반추가축용 조사료 생산기반은 매우 취약한 형편이며, 이러한 여건 속에서 국내 축우사양은 대부분 농후사료와 볏짚에 의존하고 있으며, 양질의 조사료 생산체계가 미약하여 이에 따른 가축의 영양소 불균형이 심화되고 있다. 따라서 국내여건을 볼 때 조사료자원의 이용효율을 극대화하기 위한 다양한 방법들이 요구되며, 특히 반추가축의 주요 사료원으로 사용되는 조사료자원의 이용성을 높이기 위한 방안들이 마련되어야 한다.

따라서 본 연구의 목표는 국내외 조사료원의 이용성을 높이기 위한 방안으로 분자생물학적 기법을 이용하여 반추위 부착 박테리아 분석방법을 확립하고, 이를 활용한 최적 박테리아 부착강화기술을 개발하고자 한다. 이와 함께 조사료내 미생물의 부착능력을 향상시키고 사료분해율을 개선하기 위한 방안으로 곰팡이의 물리적, 생물학적 특성을 이용하여 섬유소 분해율을 향상시키는 방법을 개발함으로서 조사료의 이용성 향상방안을 마련하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 혐기박테리아 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상 기술 개발

가. 분자생물학적 기법을 이용한 반추위내 부착 미생물의 정성, 정량 분석방법 개발

1) 반추위 미생물용 Real-Time PCR 및 Competitive PCR용 primer 제작 (cPCR을 위한 Internal control 제작)

2) 반추배양 방법을 이용한 부착 박테리아 조사 (cPCR 방법 이용)
3) Real-Time PCR 방법을 이용한 미생물 정량방법 구축

나. 미생물 부착강화방법 개발을 위한 물리적, 화학적, 생물학적 처리방법 조사

1) 효소 및 생균제 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가
2) 물리적 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가
3) 화학적 처리 방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

다. *In vivo* 실험을 통한 최적 미생물 부착 강화 방안 검증 및 경제성분석

1) Non-ionic surfactant의 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가
2) Non-ionic surfactant와 효소의 혼합처리가 부착미생물에 미치는 영향 평가
3) In vivo 실험을 통한 Non-ionic surfactant와 효소의 혼합처리가 부착 미생물과 소화율에 미치는 영향 평가

2. 곰팡이를 이용한 조사료이용성 향상방법 개발

가. 섬유소 분해 촉진을 위한 곰팡이 균주 선발

1) 부착 능력과 섬유소 분해능이 우수한 혐기성 곰팡이 선발
2) 호기성 곰팡이의 선발

나. 효소 및 미생물 제제 역가 검증

1) 효소제용 혐기성곰팡이 최적 배양조건 확립
2) 세포내 단백질 발현 분석
3) 효소제 및 생균제 대량 생산법 개발

다. 사양시험을 통한 실증시험

1) 유우 사양시험을 통한 미생물 부착 강화기술의 실증시험

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 혐기박테리아 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상 기술 개발

가. 분자생물학적 기법을 이용한 반추위내 부착 미생물의 정성, 정량 분석방법 개발

1) 반추위 미생물용 Real-Time PCR 및 Competitive PCR용 primer 제작 (cPCR을 위한 Internal control 제작)

가) *Fibrobacter succinogenes*와 *Streptococcus bovis*에 대하여 cPCR 용 Internal control을 성공적으로 제작하였다.

나) *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*에 대하여 Real-Time PCR 용 Plasmid standard을 성공적으로 제작하였다.

2) 반추배양 방법을 이용한 부착 박테리아 조사 (cPCR 방법 이용)

가) 고조사료 환경에서 *F. succinogenes*의 군집이 높아졌으며, 고농후사료 환경에서는 *S. bovis*의 군집이 높아졌다.

나) pH가 5.8일때 *F. succinogens*의 부착률이 점점 떨어지는데 반하여 pH 6.8일때에는 부착률이 계속 유지되었다.

3) Real-Time PCR 방법을 이용한 미생물 정량방법 구축

가) pH를 6.7, 6.2일때 pH 5.7때와는 달리 섬유소 분해 박테리아의 부착률이 높은 수준으로 유지됨을 정량하여 관찰하였다.

나) 부착되어있는 섬유소분해 박테리아를 pH 6.7, 6.2, 5.7의 buffer로 세척한 결과 pH 5.7의 buffer로 세척하였을 때 가장 많은 박테리아가 탈락됨을 정량하여 관찰하였다.

나. 미생물 부착강화방법 개발을 위한 물리적, 화학적, 생물학적 처리방법 조사

1) 효소 및 생균제 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가) 효소제는 cellulase와 xylanase를 혼합처리 하였을 때 섬유소분해 효과가 가장 좋았다.

나) 생균제인 *Saccharomyces cerevisiae*는 섬유소 분해 박테리아의 부착을 높여 timothy 소실율을 높일 수 있었다.

2) 물리적 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가) 볏짚이 낮은 온도에서 처리 될수록 DM 소실율이 높았으나 미생물부착은 일관된 경향을 볼 수 없었다.

3) 화학적 처리 방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가) Ca, Mg의 처리는 소화율과 미생물 부착에 일관된 경향을 찾을 수 없었다.

나) NaOH, H_2O_2, ammonia 처리는 볏짚의 소실율 증진에 매우 탁월하였고, 그에 따른 섬유소 분해 미생물 군집도 다소 높일 수 있었다.

다) pH가 높을수록 볏짚의 소실율도 더욱 높았으며, 섬유소 분해 박테리아 부착과 군집도 높은 수준을 유지하였다.

다. *In vivo* 실험을 통한 최적 미생물 부착 강화 방안 검증 및 경제성분석

1) Non-ionic surfactant의 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가) Tween 80의 처리는 볏짚의 소화율을 유의적으로 높였다.

나) Tween 80의 처리는 초기 섬유소 분해 미생물의 부착을 떨어뜨린다.

2) Non-ionic surfactant와 효소의 혼합처리가 부착미생물에 미치는 영향 평가

가) 효소제의 처리는 timothy DM 소실율을 높일 뿐 아니라 섬유소분해미생물의 량도 늘렸다.

나) 효소제와 Tween80의 혼합처리는 timothy 소실율을 높였으나, 섬유소 분해 미생물의 부착은 대조구와 비슷한 정도를 유지하였다.

3) *In vivo* 실험을 통한 Non-ionic surfactant와 효소의 혼합처리가 부착 미생물과 소화율에 미치는 영향 평가

가) 혼합처리는 건물, 조단백질, 조지방의 소화율을 유의적으로 높였으나 NDF, ADF의 소화율은 수치적으로 높였다.

나) VFA 생산량, CMCase와 xylanase 은 혼합처리 시 수치적으로 높으나 유의적인 관계는 없었다.

다) 혼합처리 하였을때 초기 time 섬유소 박테리아의 부착이 일어나지 않았다.

2. 곰팡이를 이용한 조사료 이용성 향상 방법 개발

가. 부착 능력이 우수한 혐기성 곰팡이 선발

1) 혐기성 곰팡이의 분리 및 선발

가) 반추위 내용물로부터 500개의 colony를 분리하여 40개의 colony를 1차 선발하였다.

나) 최종적으로 섬유소 분해능력이 우수한 혐기곰팡이 *Neocallimastix frontalis* PMA03를 선발하였다.

2) 분자생물학적 방법에 의한 분류

가) rITS1 gene 특이 primer 제작 및 PCR 조건을 확립하였다.

나) rITS1 gene을 이용한 균 분리방법을 확립하여 *N. frontalis* PMA03를 동정하였다.

3) 조사료에 부착되어있는 *N. frontalis*의 DNA 추출방법을 확립하였다.

가) Bead beating 방법을 이용한 DNA 추출방법을 확립하였다.

나) CTAB buffer를 이용한 DNA 추출방법을 확립하였다.

4) *N. frontalis* 정량 PCR 조건 확립 및 실증시험

가) 정량 PCR용 primer 제작하여, 정량 PCR 조건 확립하고, 정량 분석을 위한 검량선을 완성하였다.

다) 배양시간 별 볏짚에 부착되어 있는 N. front 함량을 분석하였다.

나. 선발된 혐기성 곰팡이의 단백질 발현특성 및 실용화 방안 연구

1) 기질의 종류에 따른 섬유소분해효소 분비 특성

가) Xylan을 기질로 하는 배지에서 cellulase의 분비가 가장 높았다.

나) 섬유소 배지와 filter paper 배지에서는 100 kDa이상의 분자량을 갖는 단백질이 검출되었다.

2) 단백질 이차원 전기영동

가) Cellulose, filter paper, glucose, 및 xylan에 대한 이차원 전기영동을 실시하였다.

나) 20개의 단백질을 MALDI-TOF를 이용하여 분석한 결과 malate dehydrogenase, succinyl-CoA ligase, enlase 및 malic enzyme을 동정하였다.

3) 볏짚의 실용화 가능성 탐구

가) 전체 혐기곰팡이 배지에 4% 수준까지 볏짚의 첨가가 가능하였다.

나) 볏짚의 함량이 증가할수록 기질로 이용된 볏짚의 분해율은 감소하고, CMCase의 생성량은 증가하였다.

다. 생균제 제조를 위한 우수한 능력의 호기성 곰팡이 선발 및 배양조건 확립

1) 생균제로 이용한 A. oryzae의 선발

가) 섬유소의 분해능력이 우수한 A. oryzae KCTC6909를 선발하였다.

나) 성장속도가 빠른 A. oryzae KACC 40242를 선발하였다.

2) A. oryzae 배양 최적 pH 및 최적 접종량 확인

가) A. oryzae 배양에 적합한 pH는 5 - 5.5임을 확인할 수 있었다.

나) 접종농도가 증가하면 균체의 크기가 감소하고, 접종농도가 감소하면 배양액내 포자수가 증가하였다.

라. Nitrogen stress를 이용한 A. oryzae의 항균물질 유도

1) A. oryzae 발효 추출용매 및 농도결정

가) A. oryzae가 생산하는 항균물질은 methanol 및 ethyl acetate로 추출되었다.

나) 항균활력은 50μl 수준에서 B. subtilis의 성장을 억제하였다.

2) Nitrogen stress 조건에서 탄소원의 종류에 따른 항균물질 생산

가) 탄소원의 종류에 관계없이 A. oryzae에 nitrogen stress가 가해질 경우 항균물질이 생성되었다.

나) 질소원의 종류와 관계없이 A. oryzae에 nitrogen stress가 가해질 경우 항균물질이 생성되었다.

마. 효소제 및 생균제 대량 생산법 개발

1) CMS 농도에 따른 AO 배양물의 pH 및 건물중량 변화

가) 배양물의 pH는 배양이 진행됨에 따라 증가하였다.

나) 배양물의 건조중량은 배양이 진행됨에 따라 증가하였다.

2) Aspergillus oryzae KCTC6909의 균체생성량 및 효소활력 비교

가) 균체생성량은 CMS 10 - 15% 처리구에서 높았다.

나) CMCase 및 xylanase의 생성량은 CMC 5 - 10% 처리구에서 높았다.

다) 생균제용 A. oryzae를 위한 CMS의 농도는 5% 수준이 적정하였다.

바. 사양시험을 통한 실증시험

1) CMS-AO 0.02% 첨가시 볏짚의 *in vitro* 소화율이 증진되었다.

2) 유우의 사양시험에서는 CMS-*A. oryzae* 처리구는 유량 및 유성분에 영향을 주지 않았다.

3) Tween80, cellulase 그리고 xylanase를 혼합한 처리구의 유량과 유지방 함량이 증진되었다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Developments of microbial attachment technique for enhancement of roughage utilization

Ⅱ. Objectives and importance of the study

Korea does not produce sufficient amount of roughages, and most of farmers are dependant on concentrates and low quality forage such as rice straw. As a result, ruminants are exposed to various diseases due to feeding too much concentrates. Therefore, much of efforts have been put to increase of utilization of feeds for ruminants and especially, it is needed to develope proper methods for efficient utilization of forage as main feed for ruminants.

The first objective of this study was to develop methods for efficient forage utilization for ruminants through increased microbial attachment and design methodology for measuring ruminal bacteria attachment using molecular technique, to develop for enhancing bacterial attachment to forage and the second objective was to find out method to use ruminal fungi for improving fiber digestibility and animal performances.

Ⅲ. Contents and Scope of the Study

A. Development of methods for enhancing forage utilization using anaerobic bacterial attachment technique

1. Development of methods for measuring bacterial attachment

qualitatively and quantitatively using molecular technique

a. Manufacturing primer, internal control and plasmid standard of rumen bacteria for Real-Time PCR and Competitive PCR
b. Investigation of bacterial attachment through rumen fermentation technique (cPCR)
c. Measuring amounts of bacteria quantitatively using Real-Time PCR.

2. Physical, chemical and biological treatment for enhancing bacterial attachment.

a. Evaluation for the effect of enzymes and DFM treatment on bacterial attachment
b. Evaluation for the effect of physical treatment on bacterial attachment
c. Evaluation for the effect of chemical treatment on bacterial attachment

3. Verification of the methods for enhancing optimal bacterial attachment through *in vivo* experiment

a. Evaluation for the effect of non-ionic surfactant treatment on bacterial attachment
b. Evaluation for the effect of the mixture of surfactant and enzymes treatment on bacterial attachment
c. Evaluation for the effect the mixture of surfactant and enzymes treatment on total track digestibility and bacterial attachment.

B. Development of technique for roughage utilitzation by using fungi

1. Screening of fungi for improvement of cellulose digestion

a. Screening of anaerobic fungi for higher fiber attachment and cellulose

digestion

b. Screening of anerobic fungi for direct fed microbials

2. Bioassay of enzymes and direct fed microbials

a. Establishment of optimum culture condition for enzyme production using anaerobic fungi

b. Fungal proteome analysis

c. Development of mass production process for enzyme and direct fed microbials

Ⅳ. Results

A. Development of methods for enhancing forage utilization using anaerobic bacterial attachment technique

1. Development of methods for measuring bacterial attachment qualitatively and quantitatively using molecular technique

a. Manufacturing primer, internal control and plasmid standard of rumen bacteria for Real-Time PCR and Competitive PCR

1) Internal control was sucessfully prepared for cPCR of *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis.*

2) Successful plasmid standard preparation was achieved for Real-Time PCR of *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens.*

b. Investigation of bacterial attachment through rumen fermentation technique (cPCR)

1) It was successful to detect increased number of *F. succinogenes* in high forage environment and increased number of *S. bovis* in high concentrate environment by using 체CR technique.

2) *F. sccinogenes* attachment rate was low at low pH and high attachment rate was maintained at high pH.

c. Measuring amounts of bacteria quantitatively using Real-Time PCR.

1) It was observed quantitatively that cellulolytic bacterial attachment was dependent on ruminal pH (highest at 6.7 and lowest at 5.7).

2) Dettachment was acceralated when the attached cellulolytic bacteria was washed by pH 5.7 solution.

2. Physical, chemical and biological treatment methods for enhancing bacterial attachment.

a. Evaluation for the effect of enzymes and DFM treatment on bacterial attachment

1) Enzyme treatment gave the best effects on forage digestibility when cellulase and xylanase were mixed and pre-treated in advance.

2) There were possibilities of improving DM disappearance through increased microbial attachment.

b. Evaluation for the effect of physical treatment on bacterial attachment

1) Low temperature treatment induced rice straw disappearance, but there was no consistent effects on bacterial attachment.

c. Evaluation for the effect of chemical treatment on bacterial attachment

1) There were no consistency for Ca, Mg treatment on rice straw DM disappearance and bacterial attachment.

2) Alkali treatment (NaOH, H_2O_2, Ammonia) increased rice straw DM disappearance and bacterial attachment.

3) High pH environment induced high rice straw DM digestibility and high level of bacterial attachment.

3. Verification of the methods for enhancing optimal bacterial attachment through *in vivo* experiment

a. Evaluation for the effect of non-ionic surfactant treatment on bacterial attachment

1) Pre-treatment of Tween 80 enhanced timothy DM disappearance significantly.

2) Pre-treatment of Tween 80 inhibited initial cellulolytic bacterial attachment.

b. Evaluation for the effect of the mixture of surfactant and enzymes treatment on bacterial attachment

1) Enzyme treatment increased not only timothy DM disappearance hut also amount of cellulolytic bacterial attachment significantly.

2) The mixture of enzyme and Tween 80 increased timothy DM disappearance, but cellulolytic bacterial attachment rate was similar with control

c. Evaluation for the effect the mixture of surfactant and enzymes treatment on total track digestibility and bacterial attachment

1) The mixture treatment increased dry matter, crude protein and crude fat digestibility significantly, but increased NDF and NDF digestibility numerically.

2) The mixture treatment increased VFA production, CMCase and xylanase acitvity numerically.

3) The mixture treatment did not increase initial attachment of cellulolytic bactera.

B. Development of technique for roughage utilitzation by using fungi

1. Screening of anaerobic fungi depending upon cellulose attachment

a. Isolation and screening of anaerobic fungi

1) Isolated 500 colonies from rumen contents and screened 40 colonies for primary screening.

2) *Neocallimastix frontalis* PMA03 was finally selected for its high cellulose digestibility.

b. Molecular identification

1) *N. frontalis* rITS1 specific primer and PCR reaction condition was successfullu prepared.

2) Identification method was developed by using PCR and identified of *N. frontalis* PMA03.

c. Establishment of microbial DNA extraction from forage

1) DNA extraction method using bead beater was established.

2) DNA extraction method using CTAB buffer system was established.

d. Set up real time PCR method for quantification of *N. frontalis*

1) Designed rITS1 primer for real time PCR, set up real time PCR protocol and established PCR standard curve for quantification

2) Quantified of *N. frontalis* attached to rice straw during fermentation

2. Studies on selected fungal protein expression and their application

a. Studies on characteristics of fibrolytic enzyme secretion under different substrate conditions

1) Cellulase secretion was the highest in the culture of xylan medium

2) Large proteins with more than 100 kDa molecular size were detected froth the cultures of cellulose and filter paper medium

b. 2D-Gel electrophoresis

1) 2D-GE were performed with the proteins from the cultures of cellulose, filter paper, glucose, and xylan media

2) 20 protein spots were analyzed with MALDI-TOF and malate dehydrogenase, succinyl-CoA ligase, enolase and malic enzyme were identified

c. Possible use of rice straw as substrate for anaerobic fungi

1) Rice straw was used up to 4% (wt/v) for anaerobic fungal medium
2) Degradability of rice straw was decreased and CMCase secretion was increased with increased amount of rice straw

3. Screening of Aspergillus oryzae and establishment of culture condition for direct fed microbials production

a. Screening of A. oryzae for direct fed microbials

1) Selected A. oryzae KCTC6909 with its high cellulose digestibility
2) Selected A. oryzae KACC40242 with its high growth rate

b. Establishment of optimum pH and inoculation dose for A. oryzae

1) Optimum pH for A. oryzae ranged from 5 - 5.5
2) Colony size was increased with increased inoculation dose and zoospore number was increased with decreased inoculation dose.

4. Induction of antimicrobial compounds from A. oryzae with nitrogen stress

a. Selection of solvents for extraction from A. oryzae culture and dose for antimicrobial test.

1) Antimicrobial compounds from A. oryzae culture were extracted with methanol and ethyl acetate.
2) The growth of B. subtilis was inhibited with 50 μl dose

b. Induction of antimicrobial compounds from A. oryzae culture with various carbohydrate media conditions under nitrogen stress

1) Antimicrobial compounds were produced under nitrogen stress condition regardless of carbohydrate sources.
2) Antimicrobial compounds were produced under nitrogen stress condition regardless of nitrogen sources during 1st stage.

5. Development of mass production method for enzyme and direct fed

microbials

a. Effects of CMS concentration on culture pH and fungal mass

1) Culture pH was increased during incubation

2) Fungal mass was increased during incubation

b. Effects of CMS concentration on fungal mass and enzyme secretion

1) Fungal mass production was high in CMS 10 -15% concentration group

2) CMCase and xylanase activity was high in CMS 5 - 10% concentration group

3) Optimum CMS concnetration for A. oryzae production was 5% level.

6. Animal trial for final products

a. *in vitro* digestibility was the highest with 0.02% of CMS-*A. oryzae* supplement

b. No supplementary effects were on Milk yields and composition of TMR supplemented CMS-*A. oryzae* during lactating dairy cow trial

c. Milk yields and composition of TMR supplemented Tween80, cellulase and xylanase was increased during lactating dairy cow trial

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ---------- 19

Chapter 2. Trends of the Study ---------- 23

Chapter 3. Contents and Results of the Study ---------- 26

1. Development of methods for enhancing forage utilization using anaerobic bacterial attachment technique ---------- 26

2. Development of enhancing technique for rough utility using fungi ---- 125

Chapter 4. Achievement of the Study and its Contribution ------- 197

1. Development of methods for enhancing forage utilization using anaerobic bacterial attachment technique ---------- 197

2. Development of enhancing technique for rough utility using fungi ---- 198

Chapter 5. Application ---------- 201

Chapter 6. Related information ---------- 203

Chapter 7. References ---------- 206

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- 19

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 23

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 26

제 1 절 협기박테리아 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상 기술개발 ---------- 26

제 2 절 곰팡이를 이용한 조사료이용성 향상방법 개발 ---------- 125

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 197

제 1 절 협기박테리아 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상 기술개발 ---------- 197

제 2 절 곰팡이를 이용한 조사료이용성 향상방법 개발 ---------- 198

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ---------- 201

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ---------- 203

제 7 장 참고문헌 ---------- 206

제 1 장 연구개발과제의 개요

현재 우리나라의 조사료 생산은 많은 취약점을 안고 있다. 2000년 이후 조사료 소요량은 연간 약 3,000~ 4,000천톤 수준이지만 양질의 조사료 생산량은 약 1,000~1,200천톤으로서 총 소요량의 30%에 불과하고, 볏짚이 2,200천톤 내외로 전체의 60%정도를 점유함으로서 이에 따른 수입 조사료 물량은 계속적인 증가추세를 보이고 있다. 특히 축우 사육에 필요한 조사료의 수입량은 1990년도에 60,000톤이었지만 2000년도에는 600,000톤으로 수입 조사료의 물량은 계속하여 증가하는 추세에 있다(서성, 2001). 이러한 여건 속에서 국내 축우사양은 대부분 농후사료와 볏짚에 의존하고 있으며, 양질의 조사료 생산체계가 미약하여 이에 따른 가축의 영양소 불균형이 심화되고 있다. 특히 주 조사료원인 볏짚 가격은 kg당 200원 정도로 배합사료 kg당 가격인 260원과 비슷하게 높아지고 있고 수입 조사료의 가격상승과 사료 검역, 위생기준강화 및 2003년의 경우 태풍피해에 의한 생산량 감소 등으로 조사료의 부족현상이 더욱 심화되고 있으며, 이에 더하여 조사료 수입물량이 쿼터제로 되어 있어 조사료 전체 수요량의 16%인 600,000톤만이 수입되었다. 따라서 국내여건을 볼 때 조사료자원의 이용효율을 극대화하기 위한 다양한 방법들이 요구되며, 특히 반추가축의 주요 사료원으로 사용되는 조사료자원의 이용성을 높이기 위한 방안들이 마련되어야 한다.

반추동물의 주요대사는 반추위내 미생물에 의해 이루어진다. 조사료는 반추가축의 생산에 필요한 중요한 사료자원으로 미생물에 의해 분해되어 에너지, 단백질, 무기질, 비타민과 같은 영양성분의 주요 공급원으로 이용되며, 반추위 기능을 정상으로 유지시키며 완충효과도 가지고 있다. 반추위내 존재하는 주요 미생물은 박테리아, 프로토조아, 곰팡이로서 이 중 박테리아가 가장 많이 우점하고 있다. 반추위 박테리아는 현재까지 22속 63종으로 분류되었으며 반추위액 1ml당 10^{10}~10^{11}정도 존재한다.

반추위내 서식하고 있는 박테리아는 크게 5가지로 구분할 수 있다. 1) 반추위액에 부유되어 있는 박테리아 2) 사료입자에 약하게 붙어있는 박테리아 3) 사료입자에 강하게 붙어있는 박테리아 4) 반추위 상피세포에 존재하는 박테리아 5) 프로토조아와 곰팡이표면에 붙어있는 박테리아로 나눌 수 있다(Cheng and Costerton, 1980; McAllister 등., 1994). 일반적인 사양시스템에서는 위액에 부유

하고 있는 박테리아는 약 20~30%정도이며, 사료입자에 부착되어 있는 박테리아가 전체 미생물내 75%를 차지한다. 이들 부착박테리아는 반추위내 미생물에 의한 ATP생산량의 75%를 담당하고 있으며, 전체 효소중 약 88~91%의 endoglucanase와 xylanase, 75%의 단백질 분해효소를 분비한다(Minato 등, 1993; Williams & Strachan, 1984). 반추위내 상피세포와 프로토조아, 곰팡이에 부착된 박테리아는 1% 미만으로 사료의 소화에 큰 영향을 주지 않으며, 사료입자에 부착된 미생물이 사료소화에 중추적인 역할을 하는 것으로 보고 되었다.

지금까지의 연구보고에 의하면 반추위내 부착과정은 4단계를 통해서 이루어진다(Pell and Schofield, 1993). 초기단계는 박테리아가 섬유소원으로 이동하는 과정, 2단계로는 박테리아가 기질의 적절한 비특정부위에 이동하여 부착하는 과정, 3단계로는 박테리아가 파손된 특정소화부위에 부착하여 분해를 시작하고 마지막 단계로서 식물조직의 특정부위에 부착 박테리아가 많이 증가함에 따라 군체를 형성하고 분해가 이루어진다.

조사료의 소화가 이루어지기 위해서는 미생물의 부착이 반드시 필요하다는 것이 전제조건이다(Cheng 등, 1991; Flint and Forsberg, 1995). 이들 부착 미생물은 섬유소를 분해하는 *F.succinogenes, R. flavefaciens, R. albus, Eubacterium cellulosolvens* 과 전분분해박테리아인 *R. amylophilus, P.ruminicola, Bifidobacterium thermophilum, Bifidobacterium sp.* 및 비섬유소 박테리아인 *M. elsdenii, Veillonella parvula* 등이 반추위미생물중에서 우점하고 있다. 또한 이들 박테리아는 위액에 포함되어 있는 부유박테리아에 비해서 반추위내 retention time이 높고, 프로토조아에 의해 쉽게 소화되지 않아 조사료를 효과적으로 분해하며, 미생물로부터 유래하는 영양소함량과 질이 훨씬 나은 것으로 알려져 있다(Minato and Suto, 1979; Merry and McAllan, 1983). 또한 사료입자내의 부착박테리아의 수가 많을수록 CMCase와 xylanase의 역가가 높으며 섬유소소화율이 증가한다고 하였다 (Pan et al., 2003).

부착 미생물의 수를 증가시키고 부착능력을 높이는 것이 조사료의 이용성을 향상시키는 가장 기본적이고 효과적인 방법으로 볼 수 있다. 그러나 조사료 이용성 향상을 위한 미생물 부착에 영향을 미치는 연구는 대부분 기초단계에 머무르고 있다. 부착에 관한 연구는 대부분 분자생물학적 단계에서 부착기전 설명 또는 소화향상을 설명하기 위한 가설 정도이고 아직까지 정확한 부분까지 입증된 적이 없다. 지금까지 알려진 기초연구에 따르면 미생물의부착에 관여하는 요인들

로는 1) 박테리아의 성장과 세포의 당질층(glycocalyx)에 영향을 미치는 여러 요인들, 미생물간의 경합 2) 사료의 표피층, 표면, 수화작용, 이온변화에 영향을 주는 요인 3) pH, 온도, 양이온의 존재유무, 수용성 탄수화물 등과 같은 환경적인 요인들에 의해 영향을 받는다 (Gong and Forsberg, 1989; Minato 등, 1993; Roger 등, 1990).

이와같은 부착과 관련된 요인들은 대부분 일반 호기미생물을 대상으로 연구된 것들이어서 실제 반추미생물의 부착이 소화율에 미치는 영향이나 부착을 강화하여 소화율을 향상시키고자 하는 시도는 실시된 바 없다. 반추미생물의 부착과 조사료의 소화율과의 관계에 관한 연구가 가설적인 상태에 머물러 있는 것은 사료에 부착된 미생물의 종류나 수를 정확하게 측정할 수 있는 적절한 방법이 없었기 때문이다. 지금까지 반추위내 미생물의 종류 및 수는 간접적인 측정방법을 이용하여 조사하였다. 대부분의 반추위내 미생물은 산소에 민감하고 배양조건이 호기성미생물보다 배양조건이 복잡하여 미생물을 분리하거나 측정하기가 쉽지 않기 때문에 지금까지 사용하고 있는 반추위 미생물 측정법으로 혐기적 측정방법인 Hungate의 Roll tube(1966) 방법이 가장 보편화되어 사용되고 있으며, 기타 현미경적 방법과 MPN(most probable number)방법(Koch, 1981)이 이용되고 있다. 이들 방법은 간접적으로 총박테리아수를 측정하는 방법이기 때문에 정확성이 떨어지고 반추위 부착 미생물을 측정하기 어렵다. 또한 순수 화합물을 기질로 사용하는 MPN방법도 간접 측정방법으로 특정 미생물종류의 측정이 불가능할 뿐만 아니라 정확성이 떨어지는 단점이 있다. 반추위 미생물의 정확한 측정방법의 부재로 미생물 성장에 필요한 에너지 공급량을 정확히 측정할 수 없고 제 1위내 탄수화물 및 단백질의 동기화, 반전율(turn over rate), 소장으로의 통과율을 정확히 측정할 수 없는 문제를 유발하게 된다. 이와 같은 문제점을 보완하기 위해 최근 분자생물학적 기법을 이용한 새로운 측정방법이 대두되고 있으며 이는 미생물의 종류와 수를 측정하는데 지금까지 사용해온 간접측정방법보다 용이한 것으로 보고 되었다(Tajima 등, 2001). 분자생물학적 측정방법은 특정 미생물을 확인하는데 용이하며, 미생물을 정량분석하기에 용이하기 때문에 최근 여러 분야에서 활용하고 있다. 따라서 반추위내 부착박테리아를 측정하는데 분자생물학적 기법을 이용한 방법을 활용하는 것은 간접적으로 이용된 측정방법이 넘지 못하는 한계성을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 조사료의 이용성 향상을 위한 기술적 개발 및 연구에도 막대한 도움을 줄 것으로 보인다.

한편 bacteria의 섬유소 부착단계 중 3단계인 파손된 식물체의 특정부위에 박테리아가 부착하여 분해를 시작하는데 이러한 식물체의 손상에 영향하는 동물체내의 물리·화학적 요인으로는 반추동물의 저작과 반추위내 존재하는 혐기성 곰팡이의 섬유소 분해 작용을 들 수 있다. 즉, 혐기성 곰팡이의 rhizoid와 rhizomycelia가 리그닌화된 식물체의 세포벽안으로 침투하여 식물체 조직을 파괴하거나 (Wubah 등, 1993), 연맥과 같이 견고한 조직의 연화된 부분으로 침투하거나 (Akin 등 , 1989) 혹은 소량이나 lignin에 존재하는 phenol 성분을 분해함으로써 식물체 조직 내에 침투한다 (Oprin과 Joblin, 1988). 곰팡이의 rhizoid는 그 형태적 특성에 따라 bulbous rhizoid와 filamentous rhizoid로 구별되는데 특히 bulbous rhizoid는 식물 입자를 물리적으로 파괴시키거나 섬유소를 가늘게 하는 작용이 매우 뛰어나다. 한 예로 *Sphaeromonas*속은 고도로 리그닌화된 사료입자를 매우 잘 분해하는 것으로 알려져 있는데 이는 bulbous rhizoid를 가지고 있어서 각질화된 줄기부위를 잘 이용할 수 있기 때문이라고 하였다. 또한 식물체의 cuticle층과 같이 분해되지 않는 부분도 혐기성 곰팡이의 rhizoid에 의해 물리적으로 파괴된 후 곰팡이의 섬유소 분해효소에 의해 화학적인 분해가 수행된다. Bacteria와는 달리 혐기성 곰팡이는 다양한 종류의 탄수화물 분해효소를 분비할 뿐만 아니라 protease 및 esterase와 같은 다양한 종류의 효소를 다량으로 분비하여 (Selinger 등, 1995) 식물체 조직에 대한 박테리아의 부착을 용이하게 한다. 따라서 곰팡이의 물리적 특성을 이용하여 사료의 분해율을 높이는 방안은 양질의 조사료뿐만 아니라 저질 조사료의 이용성을 높이는데도 많은 도움이 된다. 더불어 곰팡이와 박테리아을 함께 배양하였을 때 더욱 더 많은 양의 hemicellulose를 효과적으로 분해할 수 있고 반추위 곰팡이는 보다 더 경화되거나 각질화된 섬유소까지 분해할 수 있음으로 조사료의 분해 시 많은 상승효과를 발휘하여 조사료의 분해 및 생산성 증가에도 매우 중요한 역할을 담당할 것으로 보인다.

따라서 본 연구의 목표는 첫째, 국내외 조사료원의 이용성을 높이기 위한 방안으로 분자생물학적 기법을 이용하여 반추위 부착 박테리아 분석방법을 확립하고, 이를 활용한 최적 박테리아 부착강화기술을 개발하는데 있다. 둘째로, 이와 함께 조사료내 미생물의 부착능력을 향상시키고 사료 분해율을 개선하기 위한 방안으로 곰팡이의 물리적, 생물학적 특성을 이용하여 섬유소 분해율을 향상시키는 방법을 개발함으로서 조사료의 이용성 향상방안을 마련하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술 현황과 문제점

가. 반추위 미생물의 부착을 기초로 한 조사료의 이용성을 높이기 위한 기술개발은 거의 전무한 상태이다.

나. 현재까지 조사료 부착정도는 전자현미경을 이용한 관찰 또는 MPN, roll tube 측정법과 같은 간접적인 측정방법에 의해 측정하였다. 이러한 측정방법은 부착정도 또는 부착 미생물의 종류 및 수를 파악하기에 정확하지 않다.

다. 조사료에 미생물이 부착하는 요인으로서는 조사료의 화학, 물리, 생물학적 처리 및 여러 요인들에 의해 많은 영향을 받는다. 그러나 현재까지 미생물 부착에 영향을 미치는 요인들에 관한 국내연구 자료는 거의 없는 실정이다.

라. 본 연구의 제안자는 분자생물학적 기법을 이용한 primer을 제작하여 반추위내 우점 섬유소분해 미생물인 *Fibrobacter succinogenes S85*의 수와 양을 측정하는 방법을 보고한 바 있으나(김 등,2003), 좀 더 정확하고 손쉬운 방법의 개발이 필요하다.

마. 반추위 bacteria의 섬유소 분해능력 증진이 가축의 생산성을 향상시키나, bacteria의 섬유소 부착능력 증진이 가축의 생산성과 연계되어 있다는 실증시험 결과는 전무한 실정이며 (김 등, 2003), 추후 보다 연구가 필요함을 절감하고 있다.

바. 한우 및 재래산양에서 분리되어 국내·외 공인기관에 등록된 혐기성 곰팡이는 전무한 상태이다.

사. 혐기성 곰팡이는 bacteria의 부착에 영향을 미치나, 혐기성 곰팡이 혹은 혐기성 곰팡이 효소 첨가와 bacteria의 부착과의 상관관계에 대한 연구는 국내에 자료가 전무한 실정 이다.

아. *Saccaromyces* 및 *Aspergillus*를 이용한 생균제 첨가로 가축의 생산성이 증진되었다고 보고되고 있으며, 현재 다양한 종류의 생균제가 시판되고 있다. 그러나 특정 미생물 균주에 작용하여 반추위 bacteria의 섬유소 분해능력 촉

진 및 사료이용성 증진을 목적으로 개발된 생균제는 국내에서 시도 되진 않았다.

2. 국외 기술 현황 및 문제점

가. Latham 등 (1978)에 의하면 섬유소분해미생물인 *F. succinogenes*와 *Ruminococcus flavefaciens*가 연맥에 부착한 후 소화가 이루어진다는 것이 밝혀졌다.

나. 사료 입자에 부착하는 박테리아가 전체 박테리아의 75%를 차지하며 반추위내 섬유소 분해효소의 90%를 분비하고 전분분해효소, 단백질 분해효소의 75%가 이들에 의해 분비된다. Rusitec(rumen simulation technique)을 이용한 연구에서도 사료내 부착 미생물이 전체 70~80%를 차지하며 이들 미생물이 반추위내 조사료 분해의 대부분을 차지한다고 보고하였다(Craig 등, 1987).

다. 현재까지 부착 미생물의 농도 및 수는 간접적인 측정방법을 이용하여 조사하고 있다. 최근 분자생물학적 기법을 이용한 새로운 측정방법이 대두되고 있으며 이는 반추위내 미생물의 종류와 수를 측정하는데 지금까지 사용해온 간접측정방법보다 용이한 것으로 보고되었다 (Tajima 등, 2001).

라. 세포벽이 분해가 되기 위해서는 부착이 매우 중요하며 섬유소 박테리아를 중심으로 부착능력향상과 기질내에 수용체 형성에 관한 연구가 미국, 캐나다를 중심으로 연구되고 있다(Gong and Forsberg, 1989; Miron 등., 1998; Miron 과 Forsberg, 1998, 1999; Reddy 와 Morrison, 1998; Stewart 등, 1990).

마. 조사료의 표면의 손상이 심할수록 섬유소박테리아가 더 쉽게 부착할 수 있다(Pond et al., 1984). Pan 등(2003)은 반추위 미생물에 의한 섬유소 가수분해, 미생물의 부착향상, 군체형성을 위해 물리적 파괴, 사료입자의 감소, 사료의 표면적 증가가 필요하다고 보고하였다.

바. 최근 15년간 반추위내 섬유소 분해 박테리아가 사료의 소화에 미치는 영향 및 부착기전에 관한 연구가 진행되고 있다 (Gong and Forsberg, 1989; McAllister 등, 1994; Miron 등, 2001). 섬유소 박테리아외의 비 섬유소박테리아에 의한 부착가능성에 관한 연구는 현재 이루어지지 않고 있다.

사. 섬유소 분해 박테리아중에서 *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens, Butyrivibrio fibrisolvens* 가 우점하여 섬유소를 분해하는 것으로 알려져 있다 (Dehority, 1993; Miron 과 Ben-Ghedalia, 1993). 그러나 그 외의 부착미생물에 의한 소화 및 기전에 관한 연구보고는 미비하다.

아. *Fibrobacter succinogenes*은 부분적으로 파괴된 조사료의 모서리에 우점적으로 부착하나 일부는 손상되지 않은 mesophyll(엽육), epidermis(표피), phloem(체관부) cell wall(세포벽) 표면에도 부착한다. 이에 반하여 *Ruminococcus flavefaciens*는 손상되지 않은 epidermis, phloem, schlerenchyma(유조직) 표면에 우점하여 부착한다. 이와 같이 미생물에 따라 부착하는 장소가 차이가 있으며 어떠한 미생물이 사료의 종류에 따라 우점적으로 작용하는지 정확하지 않다.

자. Morrison(1990)은 섬유소분해박테리아의 조사료내 colonization를 증가시키기 위해 3-phenylpropanoic acid를 사용하였으며 특정 부착정도가 증가하였다고 보고하였다. 이 외에 여러 화학적 처리에 의한 부착효과를 높이려는 연구들이 계속적으로 추진되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 혐기박테리아 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상 기술개발

1. 반추위 미생물용 Real-Time PCR 및 Competitive PCR용 primer 제작 (cPCR을 위한 Internal control 제작)

가. 연구의 세부목표

반추동물의 반추위내 서식하고 있는 미생물 중 섬유소를 분해하는데 주도적인 역할을 하는 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* 그리고 전분 분해 박테리아인 *Streptococcus bovis*를 detection 할 수 있도록 Real-Time PCR 및 Competitive PCR 용 primer 및 plasmid standard, internal control를 제작 하고자 한다.

나. 연구 방법

1) 공시축

벗짚과 농후사료를 6:4의 비율로, 체중의 2%(풍건물 기준)를 섭취시킨 반추위 fistula가 장착된 홀스타인 수소를 공시했다.

2) 미생물 배양 및 primer, internal control (cPCR), plasmid standard (Real time PCR) 제작

가) 미생물 배양 : 반추위 우점 미생물 중 *F. succinogenes*과 *S. bovis*는 cPCR 실험을 위해, 그리고 *F. succinogenes*, *R. albus*과 *R. flavefaciens*는 Real-Time PCR을 위하여 GCM배지에서 순수배양 하였다.

나) Genomic DNA 추출 : 순수 배양한 박테리아는 bead-beating 방법(Reilly 등., 1998)으로 G-spin column(iNtRON)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Total DNA는 UV/VIS spectrophotometer을 사용하여 농도를 측정하였다.

다) Primer 제작 : *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 및 *S. bovis*의 16S rDNA regions를 조사하여 각각의 specific forward와 reverse primer를 제작하였다.

라) cPCR을 위한 Internal control 제작 및 cPCR 작업 : 선정된 2개 균주의 cPCR를 위한 competitor 제작은 각각의 specific primer와 함께 증폭되어진 단편을 TA plasmid vector(Promega)를 이용하여 cloning을 하였다. Internal control은 제한효소처리와 ligation 반응을 통해 만든 후, gel purification을 통해 얻었다(Figure 1). 정제된 Internal control을 농도별로 희석한 후 PCR(PC801, ASTEC)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel를 사용하여 확인하였다.

마) Real time PCR을 위한 standard plasmid 제작 및 Real-Time PCR 작업 : 선정된 3개 균주의 Real time PCR를 위한 standard plasmid 제작은 각각의 specific primer와 함께 증폭되어진 단편을 TA plasmid vector (Promega)를 이용 cloning하였다. 준비된 standard plasmid는 10배씩 희석하여 각각의 specific primer와 함께 iQ SYBR Green Supermix(BIO- RAD)를 이용 Biorad Cycler system(BIO-RAD)에서 Real-Time PCR를 실시하였다.

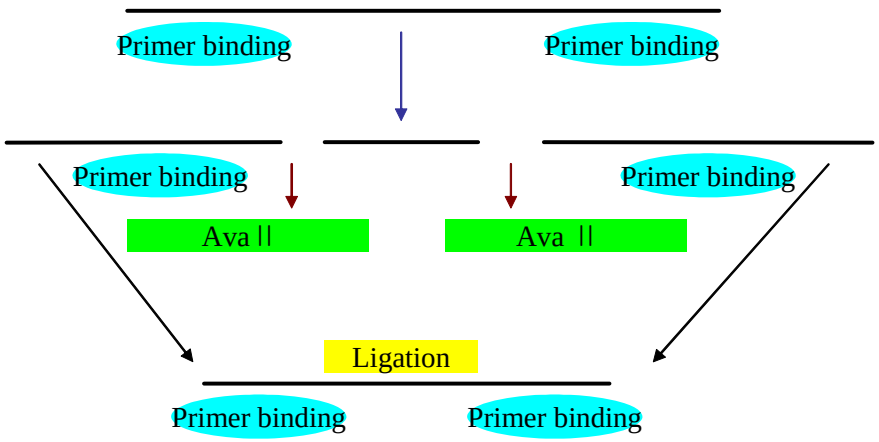


Figure 1. Procedure of internal control construction for cPCR.

다. 연구결과

본 연구 과제를 수행하기 위하여 반추위 내 미생물 중 대표적인 섬유소 박테리아, *F. succinogenes*, *R. albus*과 *R. flavefaciens*를 선정하고 이외에 중요한 반추 미생물인 *S. bovis*를 확보하여 냉동보관 하였다. 그리고 이들 미생물을 다른 반추 미생물과 식별하기 위한 16S rDNA의 특이성은 기존 여러 문헌과 유전자정보은행인 NCBI을 이용하여 얻은 염기 서열의 상동성을 기초로 하였다. 그리고 이를 토대로 Conpetitive PCR과 Real-Time PCR를 이용 각각의 생태계를 추적할 수 있는 specific primer를 제작 확보하였다(Table 1과 2).

cPCR기법을 활용하기 위하여 선정한 두 균주 *F. succinogenes*과 *S. bovis*의 specific primer를 제작하여 확인 실험 후 최종적으로 선정된 primer은 Table 1에서와 같다. 제작되어진 두 균주의 internal control은 각각 241과 750 bp의 크기로 pGEM-T Easy Vector(Promega)를 이용 DH5α에 cloning하여 냉동 보관하였다. Real-Time PCR기법을 활용하기 위하여 선정한 세 균주 *F. succinogenes, R. albus*과 *R. flavefaciens*의 specific promer은 Table 2와 같다. 그리고 제작되어진 3 균주의 plasmid standard는 각각 3461, 3190과 3310의 크기로 pGEM-T Easy Vector (Promega)를 이용 DH5α에 cloning하여 냉동 보관하였다.

Table 1. Specific primers of 16S rDNA for competitive PCR

Target bacterium	Primer (5'- 3')	Annealing temp(℃)	Product size(bp)	Internal control size(bp)
Fibrobacter succinogenes	Fs219f: GGTATGGGATGAGCTTGC Fs654r: GCCTGCCCCTGAACTATC	60	445	241
Streptococcus bovis	16S[f]: CTAATACCGCATAACAGCAT 16S[r]: AGAAACTTCCTATCTCTAGG	57	869	750

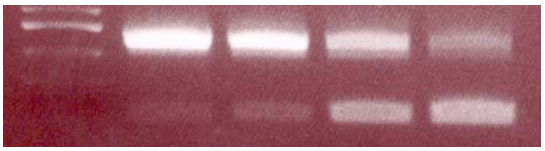
Table 2. Specific primers of 16S rDNA for Real-Time PCR

Target bacterium	Primer (5'- 3')	Annealing temp(℃)	Product size(bp)	Plasmid standard size(bp
Fibrobacter succinogenes	Fs219f: GGTATGGGATGAGCTTGC Fs654r: GCCTGCCCCTGAACTATC	60	445	3461
Ruminococcus flavefaciens	Rf154f: TCTGGAAACGGATGGTA Rf425r: CCTTTA AGACAGGAGTTTACA A	55	295	3310
Ruminococcus albus	Ra1281[f]: CCCTAA AAGCAGTCTTAGTTCG Ra1439[r]: CCTCCTTGCGGTTAGAACA	55	175	3190

Table 1의 specific primer와 internal control를 사용하여 cPCR용 표준곡선을 만들기 위하여 균수(CFU)를 아는 *F. succinogenes*과 *S. bovis*에서 추출한 genomic DNA을 정확히 정량하였다. 그리고 각각의 genomic DNA를 균일하게 희석하여 각각의 internal control과 함께 cPCR를 수행하였을 때 *F. succinogenes*은 26 pg 그리고 *S. bovis*는 110 pg의 량으로 internal control을 사용하였을 때 좋은 DNA 증폭을 얻었다(Figure 2A와 3A). 이때 DNA의 량과 bacteria cell 수의 관계를 나타내는 standard curve는 각각 Figure 2B와 3B과 같으며 모두 r^2값이 0.99이상인 회귀식을 얻었다.

Table 2의 specific primer와 standard plasmid를 사용하여 Real-Time PCR용 표준곡선을 만들기 위하여 냉동 보관 중인 *F. succinogenes, R. albus*과 *R. flavefaciens*용 E-coli에서 Plasmid DNA를 추출하여 정확히 정량하고 각각의 plasmid copy number를 계산하였다. 그리고 각각의 plasmid DNA를 균일하게 희석하여 각각의 specific primer와 함께 Real-Time PCR를 수행하였을 때 *F. succinogenes, R. flavefaciens*과 *R. albus*의 DNA증폭은 Figure 4A, 5A 그리고 6A와 같았다. 또한 이들 균주들의 standard plasmid copy number와 threshold cycle(Ct)값과의 상관관계는 각각 Figure 4B, 5B 그리고 6B와 같았다. 결론적으로 과제 수행 즉, 다음 실험에 사용하기 위하여 plasmid copy No의 log값이 *F. succinogenes*는 3-7, *R. flavefaciens*는 4-9, 그리고 *R. albus*는 3-8의 범위에서 형성되어진 표준곡선을 엄선하여 각각의 회귀식을 구하였다.

(A)



(B)

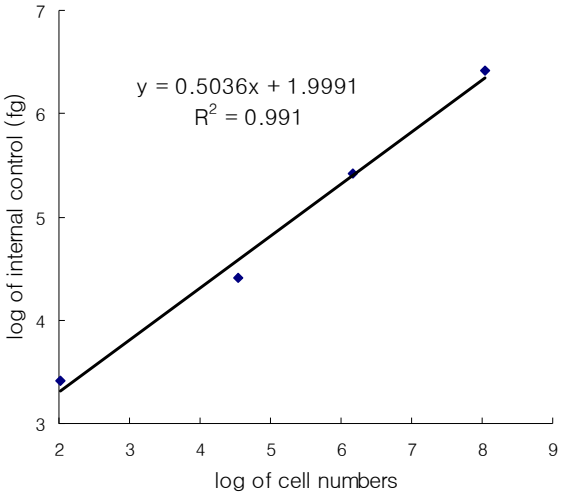
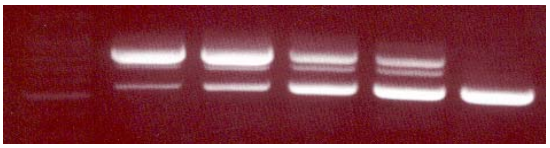


Figure 2. Construction of cPCR Standard curve for *F. succinogenes*. DNA extracted from *F. succinogenes* cells was serially diluted and coamplified with 26 pg of internal control (A). Ratios of the intensities of internal control to target DNA were quantitated by scanning densitometry of negative images of Polaroid photographs of ethidium bromide-stained gels (B).

(A)



(B)

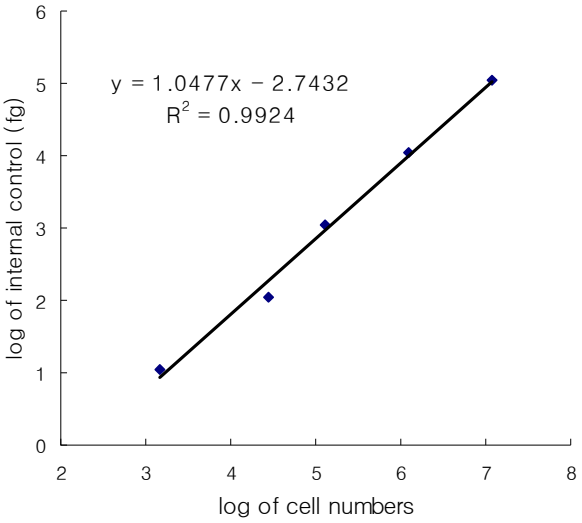
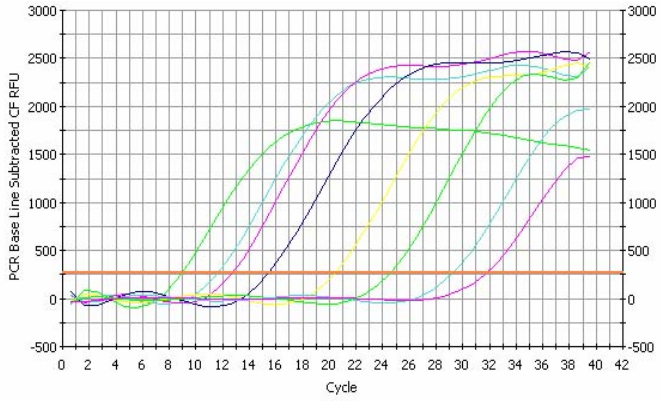


Figure 3. Construction of cPCR standard curve for *S. bovis*. DNA extracted from *S. bovis* cells was serially diluted and coamplified with 110 pg of internal control (A). Ratios of the intensities of internal control to target DNA were quantitated by scanning densitometry of negative images of Polaroid photographs of ethidium bromide-stained gels (B).

(A)



(B)

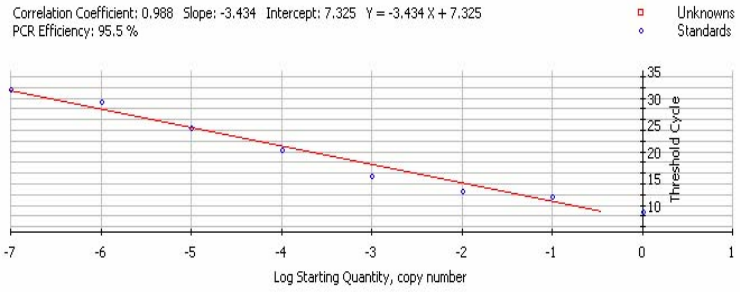
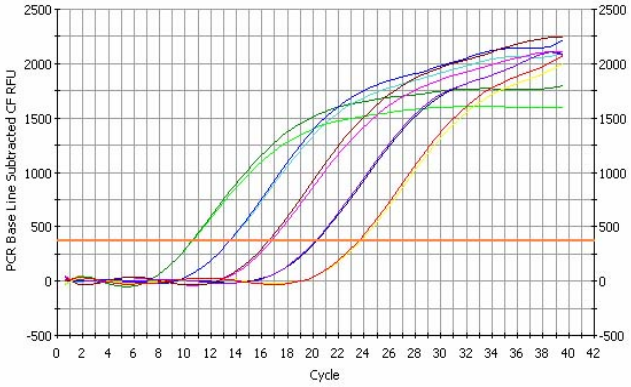


Figure 4. Construction of Real-Time PCR standard curve for *F. succinogenes*. Cycle graph showed procedure of amplification of plasmid DNA which was serially diluted (A). Standard curve showing relationship between threshold cycle and copy number(B).

(A)



(B)

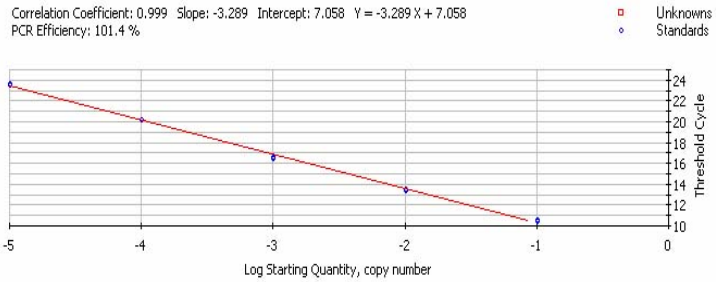
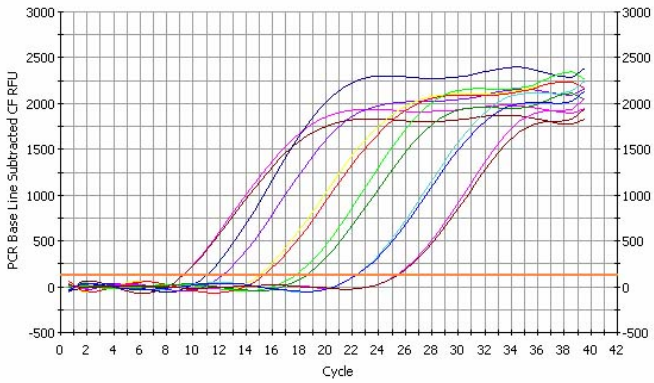


Figure 5. Construction of Real-Time PCR standard curve for *R. flavefaciens*. Cycle graph showed procedure of amplification of plasmid DNA which was serially diluted (A). Standard curve showing relationship between threshold cycle and copy number(B).

(A)



(B)

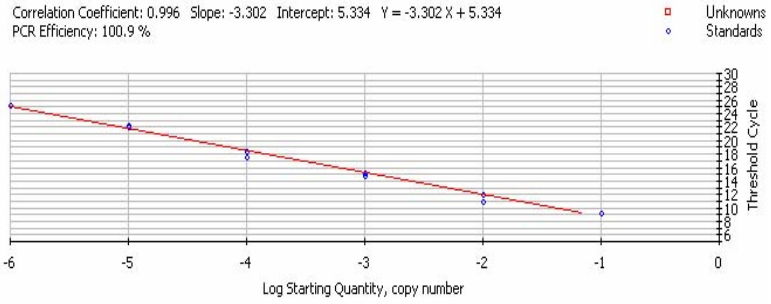


Figure 6. Construction of Real-Time PCR standard curve for *R. albus*. Cycle graph showed procedure of amplification of plasmid DNA which was serially diluted (A). Standard curve showing relationship between threshold cycle and copy number(B).

2. cPCR 방법을 이용한 부착 박테리아 정량방법 구축

가. 연구의 세부목표

Competitive PCR을 이용하여 다른 환경에서의 반추위내 우점 미생물 분포와

섬유소 분해 미생물의 부착정도를 조사하고자 하였다.

나. 연구방법

1) 조 ㅡ 농비에 따른 반추위내 미생물 분포 비교

가) 시험 동물 및 시험 설계 : 누관이 장착된 체중 500 kg의 Holstein 비육우 4두를 switch back design에 의해 각각 2두씩 두개의 시험구로 나누어 농후사료와 조사료를 3:7과 7:3비율로 2주간 급여하였다. 두 시험구간 반추미생물의 분포를 비교분석하기 위하여 사료급여 2시간 후에 반추위액을 채취하여 4겹의 cheesecloth로 여과한 후 전체 위액을 수집하였다.

나) Genomic DNA 추출 및 cPCR : Total DNA 추출은 샘플 1 ml을 이용하여 실험 1에서와 같이 bead-beating 방법(Koike 등, 2003)으로 이용하여 추출 하였으며, *F. succinogenes*과 *S. bovis*의 수는 cPCR로 측정하였는데 이를 위해 각각의 specific primer를 이용하여 internal control과 함께 16S rDNA PCR(PC801, ASTEC)에서 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel를 사용하여 전기영동을 하였으며, 형성된 밴드의 강도는 Gel Doc 1000(BIO-RAD)을 사용하여 분석하였다.

다) 분석항목 : 두 시험구간 *F. succinogenes*과 *S. bovis*의 분포를 비교하였다.

2) pH의 변화가 cellulose 부착 *Fibrobacter succinogenes*의 수에 미치는 영향

가) 시험 설계 및 *Fibrobacter succinogenes* 배양 : 배양액의 pH 조건을 pH 5.8, 6.2와 6.8로 달리하여 F. succinogenes를 불용해성 cellolose와 48시간 배양하였으며, Cellulose에 부착한 *F. succinogenes*을 분석하기 위하여 배양 후 0, 10분, 2, 4, 8, 12, 24 그리고 48 시간째에 샘플링을 하였다. 박테리아 배양을 위하여 McDougall Buffer (McDogall, 1948)와 반추위액을 2:1(v/v)로 혼합하여 CO_2로 환원한 후 60ml를 0.5g의 cellulose(Sigma)가 들어있는 125ml serum bottle에 분주하여 배양액을 준비하였으며, 각각의 준비된 배양액에 *F. succinogenes*을 접종 후 39 ℃에서 배양하였다.

나) Genomic DNA 추출과 cPCR : 각각 시간대에서 수집된 샘플은 3,000 rpm에서 15분 원심분리하고 진공냉동건조 한 후 실험 1에서와 같은 방법으로 DNA을 추출하여 cPCR를 실시하였다.

다) 분석항목 : 각각의 처리구별 시간대 마다 건물 소화율, pH 및 cellulose에 부착된 *F. succinogenes*의 분포변화를 조사하였다.

다. 연구결과

1) 조 ㅡ 농비에 따른 반추위내 미생물 분포 비교 (동물시험)

실험 1에서 정립한 cPCR 기법을 활용하여 반추위액내 미생물의 분포를 성공적으로 측정할 수 있었다. 조사료와 농우사료의 배합비를 3:7과 7:3으로 하여 2주간 급여 후 두 시험구간 *F. succinogenes*과 *S. bovis*의 분포를 cPCR 기법을 이용한 결과는 Figure 7과 같았다. *F. succinogenes*의 cell number은 고비율의 조사료를 급여하였을 때 5.36 x 10^7로 고비율의 농후사료를 급여였을 때 3.41 x 10^7 보다 높은 군집 분포를 보였다. 그러나 *S. bovis*의 경우에는 고조사료(2.03 x 10^7)에 비하여 고농후사료(4.47 x 10^7)에서 군집분포가 더 높았다. 따라서 두 균주 중 cellulolytic bacteria인 *F. succinogenes*은 조사료를 풍부히 먹이는 사양시스템에서 우세한 생태분포를 갖고, 반면에 amylolytic bacteria인 *S. bovis*는 고농우사료 사양시스템에서 더 우세한 생태계를 형성하였다.

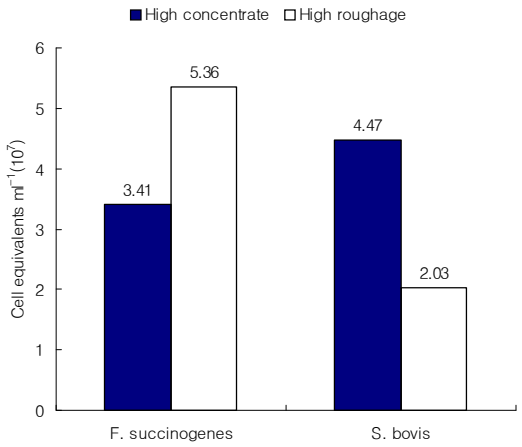


Figure 7. cPCR-aided enumeration of *F. succinogenes* and *S. bovis* on roughage and concentrate diet.

2) pH의 변화가 cellulose 부착 *Fibrobacter succinogenes*의 수에 미치는 영향

실험 1에서 정립한 cPCR 기법을 활용하여 *Fibrobacter succinogenes*을 cellulose와 순수 배양하여 cellulose 부착 박테리아를 모니터링 하는데 성공하였다. 균주의 배양 pH 조건을 5.8, 6.2 그리고 6.8로 다르게 하여 48시간 배양하였을 때 pH는 *Fibrobacter succinogenes*의 발효 및 부착 박테리아에 현저한 영향을 주었다. Cellulose 분해의 경우, 배양시간이 진행됨에 따라 cellulose는 *F. succinogenes*에 의해 분해가 가속화 되었으며, 분해 정도는 pH가 증가함에 따라 증가 하였다(Figure 8). 배양 종료 시 pH 5.8, 6.2와 6.8의 건물 소화율은 각각 9.7, 28.11과 39.22%로 pH 6.8에서 가장 높았다. 또한 배양액의 pH는 발효과정이 진행됨에 따라 전체적으로 낮아지는 현상을 보였다(Figure 9). 부착 박테리아의 분포변화는 Figure 10에서와 같이 *F. succinogenes*는 pH 변화에 민감하였으며, pH 5.8에서는 cellulose 건물 g당 부착 균주의 수가 감소하였다. 이는 낮은 pH로 인하여 초기 부착한 *F. succinogenes*의 탈락과 활력 감소에 그 원인이 있는 것으로 보인다. 반면에 pH가 6.8과 6.2일 때의 부착 *F. succinogenes*의 분포는 발효 초기에 증가하다 잠시 감소추세를 보였으나 (배양 4-8시간) 다시 회복하여 배양 48시간까지 계속 증가하였다. 따라서 발효과정 전 기간동안 pH 6.8과 6.2에서는 pH5.6에서 보다 높은 수준으로 부착 군집을 유지하였다.

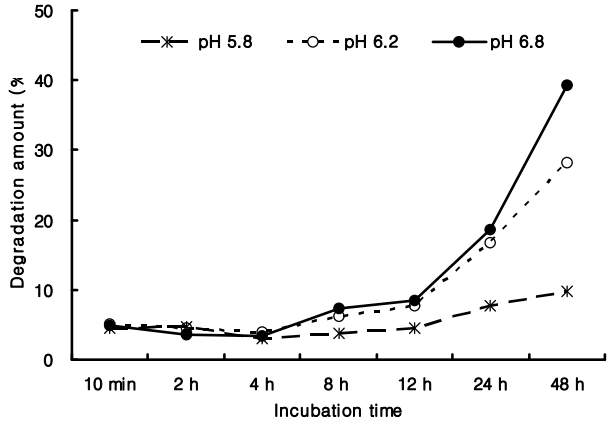


Figure 8. In vitro DM digestibility(%) as influenced by initial medium pH.

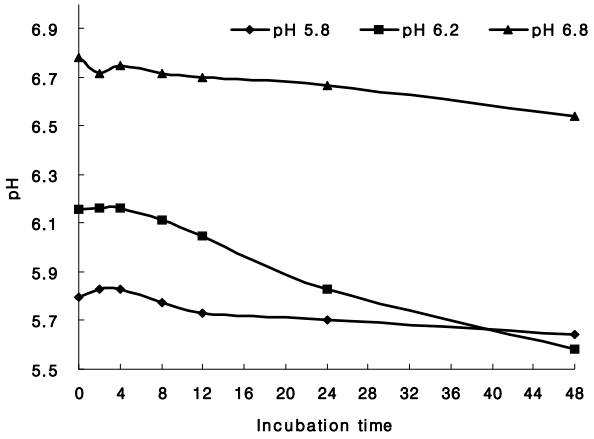


Figure 9. pH of incubation medium as influenced by initial pH level.

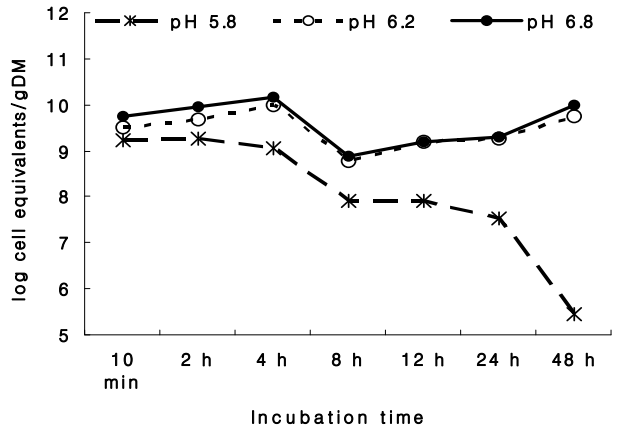


Figure 10. Cellulose-associated cell numbers of *F. succinogenes* as influenced by initial pH.

3. Real-Time PCR 방법을 이용한 미생물 정량방법 구축

가. 연구의 세부목표

Real-Time PCR을 이용하여 섬유소 분해 미생물을 정량함으로써 pH의 변화와 이에 따른 미생물들의 부착정도를 확인하고자 하였다.

나. 연구 방법

1) *In vitro* 반추발효 초기 pH가 섬유소 부착 반추미생물에 미치는 영향 (*In vitro* 실험)

가) 시험 동물 및 시험 설계 : 누관이 장착된 체중 500 kg의 Holstein 거세우로부터 수거한 반추위액과 McDougall Buffer(McDogall, 1948)을 1:2(v/v)로 혼합하여 *in vitro*용 혼합배양액을 준비하였다. 그리고 혼합배양액은 각각 pH를 5.7, 6.2 그리고 6.7로 조정하여 60 ml씩 0.5 g의 분쇄 볏짚이 들어있는 125 ml serum bottle에 분주여 배양을 준비하였다. 각각의 준비된 culture는 39 ℃ 120 rpm의 shaking incubator에서 48 시간 배양하였다. 볏짚에 부착한 주요 반추 미생물의 분포를 분석하기 위하여 배양 후 0, 10분, 2, 4, 8, 12, 24 그리고 48 시간째에 샘플링을 하였다

나) Genomic DNA 추출과 Real-Time PCR : 수거한 샘플은 160 x g에서 10분간 원심분리 후 상등액과 침전물로 나누어 수거하였다. 부착미생물 분석을 위하여 침전물 0.2 g(건물) 그리고 미부착 미생물 분석을 위하여 상등액 2ml를 사용하여 Total DNA 추출하였다. Total DNA는 bead-beating 방법(Koike 등, 2003)을 이용하여 gel-spin column(Q-BIO gene)과 Micro spin S-200 HR column (Amersham Bioscience)를 사용하며 추출하였다. *F. succinogenes, R. albus*과 *R. flavefaciens*를 측정하기 위한 Real-Time PCR 각각의 specific primer와 함께 iQ SYBR Green Supermix(BIO-RAD)를 이용하여 Biorad Cycler system(BIO-RAD)에서 Real-Time PCR를 실시하였다.

다) 분석 항목 : 각각의 처리구별(pH 5.7, 6.2, 6.7)로 0, 10 분, 2, 4, 8, 12, 24, 48 시간마다 건물 소화율, pH 및 볏짚에 부착된 *F. succinogenes, R. albus*과 *R. flavefaciens*의 분포변화를 조사하였다.

다. 연구 결과

1) *In vitro* 반추발효 초기 pH가 섬유소 부착 반추미생물에 미치는 영향 (*In vitro* 실험)

실험 1에서 정립한 Real-Time PCR 기법을 이용하여 *in vitro* 반추 발효가 진행되는 동안 섬유소(볏짚) 부착 박테리아의 군집밀도의 변화를 성공적으로 측정할 수 있었다.

In vitro 반추발효를 위한 배양액의 pH환경을 5.7, 6.2 그리고 6.7로 다르게 하여 48시간 동안 배양하였을 때 초기 pH 환경이 배양액 pH의 변화, 볏짚 소화율 및 부착 박테리아(*F. succinogenes, R. flavefaciens*와 *R. albus*)의 군집 밀도에 현저한 영향을 주었다.

배양시간이 진행됨에 따라 pH 6.7과 6.2의 *in vitro* 배양에서는 뚜렷한 pH 감소를 보였으나 pH 5.7에서는 큰 변화가 없었다(Figure 11). 이러한 결과는 pH 5.7보다는 높은 pH에서 더 활발한 미생물 발효가 일어난 것으로 보이며, 이는 볏짚 소화율 결과에서도 알 수 있다. Figure 12와 같이 볏짚의 소화율은 pH 6.7에서 가장 높았으며, pH5.7에서 가장 낮았다.

부착 박테리아의 경우, 세 균주 모두 pH에 따라 각각의 다른 특성을 보이며 배양 초기에 왕성한 부착력을 보였다(Figure 13, 14와 15). pH가 6.2와 6.7일 때 *F. succinogenes*은 배양 12 시간째 그리고 *R. flavefaciens*와 *R. albus*는 24시간째에 최고의 부착밀도를 보였고 그 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 pH 5.7에서는 세 균주 모두 배양 8시간 전까지는 볏짚에 부착하는 경향을 보이다 배양이 진행됨에 따라 계속 감소하였다. *F. succinogenes*의 경우, 전 배양 기간 동안 pH 5.7, 6.2 그리고 6.7순으로 부착 밀도가 높았는데, pH 6.2와 6.7 간에는 큰 차이를 보이지 않았지만, pH 5.7과는 현저한 차이를 나타냈다. *R. flavefaciens*와 *R. albus*의 경우, pH 6.2와 6.7에서 부착 밀도가 pH 5.7보다 현저히 높았다. pH 6.2와 6.7간에 큰 차이는 없었으나 *R. flavefaciens*는 배양 24 시간째 이후, 그리고 *R. albus*는 48 시간째에 pH 6.2의 부착 밀도가 다소 높았다.

pH환경, 섬유소 소화율 그리고 박테리아의 부착율과의 관계를 고찰하기 위하여 박테리아 부착과 볏짚 소화가 가장 왕성했던 시기(배양 0-24시간)의 결과를 가지고 Figure 16과 같이 도식 하였다. Figure 16에서 같이 섬유소 소화와 cellulolytic bacteria의 섬유소 부착은 고도의 밀접한 상관관계가 있었으며, 발효

환경요인 중 하나인 pH는 섬유소 소화와 cellulolytic bacteria의 부착에 현저한 영향을 주었다. 그리고 이들 cellulolytic bacteria 중에 섬유소 소화를 위한 섬유소 부착 박테리아로 가장 우점을 이루는 것은 *F. succinogenes* 이었다.

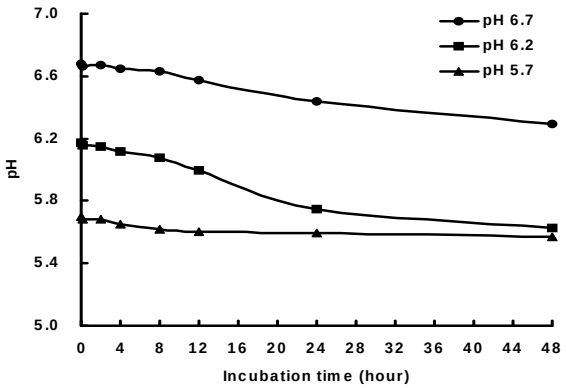


Figure 11. pH change during the *in vitro* rumen fermentation.

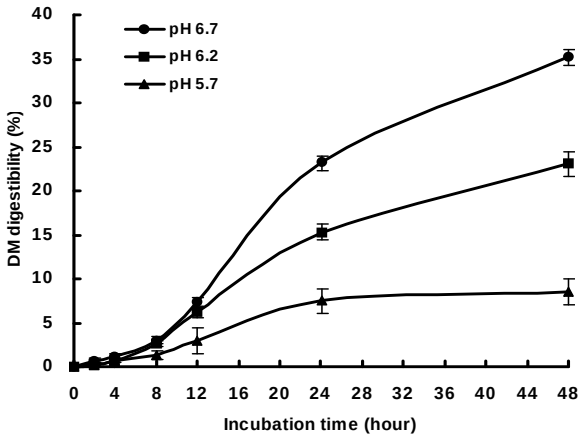


Figure 12. Dry matter digestibility of rice straw during the *in vitro* rumen fermentation.

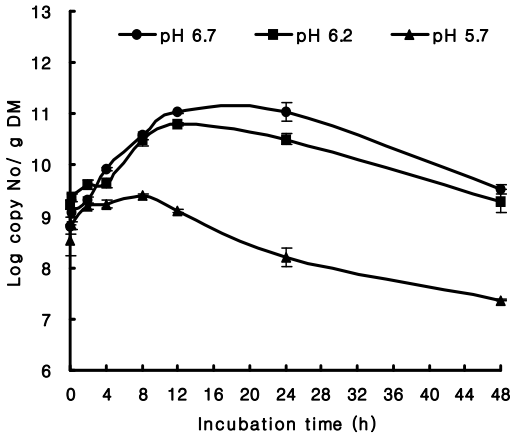


Figure 13. *Fibrobacter Succinogenes* attached on rice straw during the *in vitro* rumen fermentation.

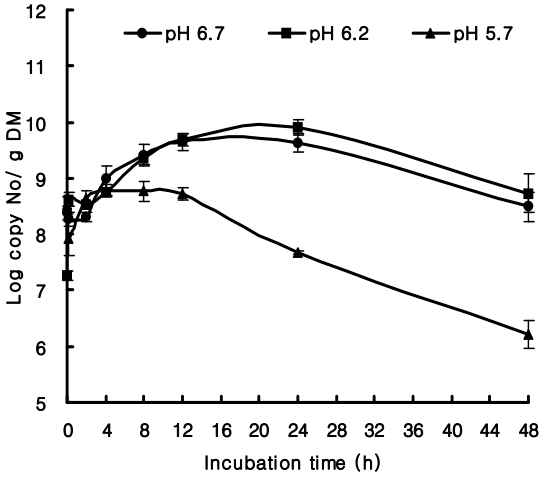


Figure 14. *Ruminococcus flavefaciens* attached on rice straw during the **in vitro** rumen fermentation.

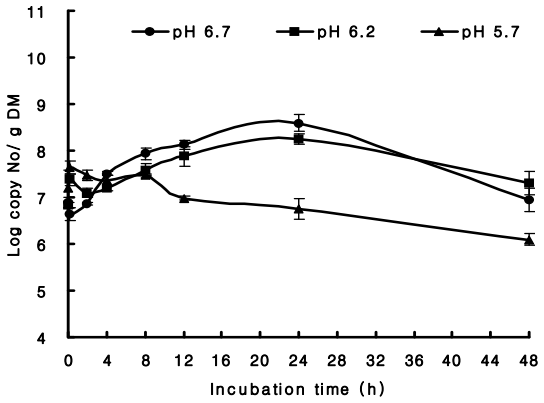


Figure 15. *Ruminococcus albus* attached on rice straw during the *in vitro* rumen fermentation.

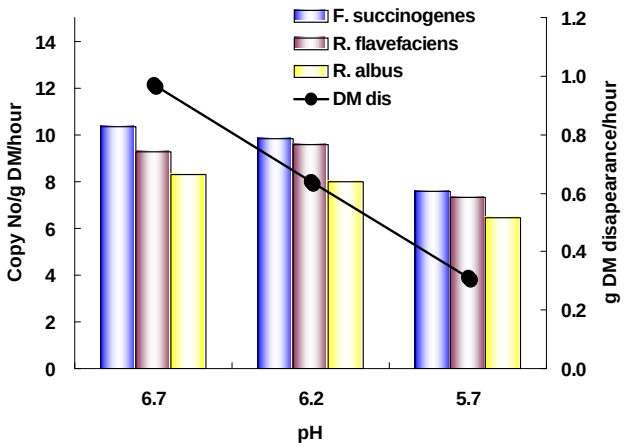


Figure 16. Rate of bacterial attachment and DM digestion as influenced by initial medium pH after 24hr incubation.

2) 세척용 용액의 pH가 섬유소 부착 반추 미생물의 탈락에 미치는 영향(*In situ* 실험)

pH가 이미 부착된 박테리아의 탈락에 미치는 영향을 보기 위하여 filter paper에 부착된 박테리아는 서로 다른 pH 용액으로 세척한 후 cwksfb 박테리아의 수를 Real-Time PCR로 측정하였다.

In situ 방법을 통하여 filter paper에 반추위 박테리아를 부착한 후 pH 5.2, 5.7, 6.2 그리고 6.7인 용액으로 세척을하고 잔존하는 *F. succinogenes, R. flavefaciens*와 *R. albus*의 군집분포를 비교하였다(Figure 17). 세 균주 모두 pH가 6.7에서 5.2로 낮아지면서 잔존하는 박테리아가 감소하였다. 전반적으로 모든 pH에서 *F. succinogenes*가 *R. flavefaciens*와 *R. albus*에 비하여 높은 군집 밀도를 보였으나, 세척용액의 pH에 의한 탈락은 *R. flavefaciens*이 다른 박테리아에 비하여 더 민감한 반응을 보여 가장 많이 탈락되었다.

이러한 결과로 보아 반추위액의 pH는 주요 섬유소 박테리아가 실물 표면에 부착하는 단계뿐아니라 기존에 부착된 박테리아가 탈락하는 데에도 기여하는 것으로 보이며, 이러한 현상이 조사료의 소화율을 감소시키는 주된 요인인 것으로 보인다.

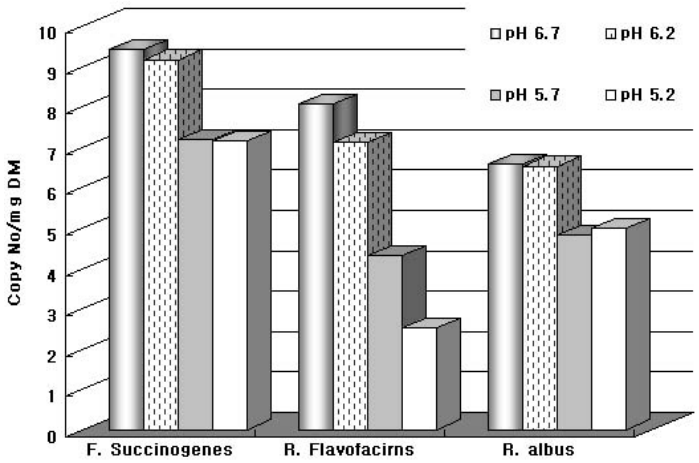


Figure 17. Detachment of rumen bacteria associated to filter paper by washing solution of different pH.

4. 효소 및 생균제 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가. 연구의 세부 목표

효소 및 생균제 처리가 조사료의 cell wall content에 물리적 변화를 일으키거나 이 물질들이 반추위내에서 섬유소 분해 미생물의 활력을 증가 시 킬 것이라는 가설로 조사료의 소화율과 미생물 부착과의 관계를 규명하고자 하였다.

나. 연구 방법

1) 조사료 처리를 위한 스프레이 처리용액 양의 결정

가) 기질 : 0.5cm로 세절한 rice straw stem을 이용하였다.

나) 처리 : 준비된 rice straw stem 20g에 용액을 붉은 잉크로 5, 10, 15, 20 ml 씩 spray 하여 가장 적절히 혼합되는 정도를 살펴보았다.

2) 효소처리가 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

가) 효소의 적정 처리수준의 결정

⑴ 효소의 종류 : cellulase, xylanase, enzyme mix (cellulase + xylanase)

⑵ 기질 : 1cm로 세절한 timothy stem을 사용하였다.

⑶ 효소의 처리 : 효소는 Table 3과 같이 각각 초기 농도의 5, 10, 20배로 하여 spray 처리 후 27℃에 12시간 방치하였다.

⑷ 배양 : 반추미생물의 조사료 부착과 소화율 측정을 위해 처리한 조사료를 *in situ* 방법으로 12시간 반추위 내에서 배양하였다.

㈎ 물을 처리한 대조구 timothy와 enzyme이 처리된 timothy를 1.5g 씩 nylon bag (5X12cm; pore size, 53um)에 넣어 아침 사료급여 직전에 cannula를 통해 넣은 후 배양을 시작하였다.

㈏ 12시간 후 반추위에서 bag을 제거하고 바로 39℃ 증류수에 깨끗한 물이 나올 때까지 mild하게 씻어준다. 이는 부착되어 있는 박테리아에 damage를 주지 않기 위함이었다.

⑸ 분석 항목

㈎ DM disappearance : 배양 후의 nylon bag을 freezer dryer를 이용하여 dry 한 후 배양 전과 후의 무게차이로 소실율을 구하였다.

㈏ NDF disappearance : Van Soest et al. (1991) 법에 따라 중성세제(ND solution)와 시료를 60분간 끓인 다음 filter paper로 여과하여 남는 부분을 dry한 후 처음 기질의 무게와의 차로 구하였다.

㈐ Cellulolytic bacterial attachment : *in situ* 배양 후 sample을 실험 1과 동일한 방법으로 gDNA를 추출한 후 Real-Time PCR을 이용하여 측정하였다.

Table 1. The level of enzyme treatment (units/g timothy)

Treatment[1]	Cellulase[2]	Xylanase[3]	Mixture	
			cellulase	xylanase
T				
C1 (1X)	0.065			
C2 (5x)	0.325			
C3 (10x)	0.65			
C4 (20x)	1.3			
X1 (1X)		0.0533		
X2 (5x)		0.2665		
X3 (10x)		0.533		
X4 (20x)		1.066		
M1 (1X)			0.0325	0.02665
M2 (5x)			0.1625	0.13325
M3 (10x)			0.325	0.2665
M4 (20x)			0.65	0.533

[1]T: Untreated timothy, C: cellulase treated timothy, X: xylanase treated timothy, M: Enzyme mixture treated timothy.

[2]Cellulase from *Aspergillus niger* (0.3 units/mg solid), one unit will liberate 1.0 umole of glucose from cellulose in 1h at pH 5.0 at 37℃.

[3]Xylanase from *Trichoderma viride* (100-300 units/mg protein), one unit will liberate 1 umole of reducing sugar measured as xylose equivalents from xylan per min at pH 4.5 at 30℃.

나) Enzyme mixture의 처리가 조사료의 소화에 미치는 영향

⑴ 효소의 종류 : enzyme mix (cellulse + xylanase)

⑵ 기질 : 1cm로 세절한 timothy stem

⑶ 처리 수준 : Table 4와 같이 1cm로 세절된 timothy stem에 처리

⑷ 배양 : 배양 시간(0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48)을 제외하고는 실험 가)와 동일 하였음.

⑸ 분석 항목 : 실험 가)와 동일

Table 2. The levels of enzyme activities applied to timothy hay

Treatments	Enzyme activities[c]
Control	Non
Cellulase[a]	0.325 units/g DM
Xylanase[b]	1.003 units/g DMe
Enzyme mixture: celluase xylanase	0.65 units/g DM 0.50 units/g DM

[a] Originated from *Aspergillus niger*(0.3 units/mg solid).

[b] Originated from *Trichoderma viride* (100-300 units/mg protein).

[c] One unit was defined as 1.0 μmole of reducing sugar from cellulose per hour at pH 5.0 and at 37℃ for cellulose, and 1 μmole of reducing sugar from xylan per min at pH 4.5 at 30℃.

3) 생균제 처리가 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

가) 생균제 : *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30049, 30068

나) 처리수준 : 기질(g)의 0, 0.05, 0.1, 0.5%

다) 기질 : 0.5cm로 세절된 볏짚

라) 처리 : 2 종의 *S.cerevisiae*를 키워서 OD 측정한 결과 exponential phase 중 stationary phase로 접어들기 직전의 배양물을 선택하여 기질(g)에 0, 0.02, 0.1, 0.5% 처리하여 overnight 시킴.

마) 배양 : 배양 시간(12, 24시간)을 제외하고 실험 2와 동일 하였음.

바) 분석 항목 : 실험 2와 동일하게 DM disappearance 와 섬유소 분해 미생물의 부착을 측정하였음.

다. 연구 결과

1) 조사료 처리를 위한 스프레이 처리용액 양의 결정

조사료는 0.5 cm로 세절한 rice straw stem을 사용하였다. 준비된 각각의 rice straw stem 20g에 용액을 5, 10, 15, 20 ml씩 spray하였을 때 조사료의 상태는 Figure 18과 같았다. 용액 5 ml은 20g의 rice straw stem을 처리하기에는 너무 부족한 양이었으며(그림 B), 10 ml의 용액 량은 샘플이 균일하고 충분히 젖게 하기에 부족하였다(그림 C). 그리고 20 ml의 용액량은 샘플이 수용하기에는 너무 많아 샘플 주위로 손실되는 용액이 발생하였다(그림 E). 그러나 15 ml의 용액은 20g의 rice straw stem을 균일하고 충분히 적시고 잉여 용액의 손실을 방지하며 spray 할 수 있었다(그림 D). 즉, 이는 0.5 cm로 세절한 rice straw stem의 약 75%에 해당하는 용액의 양이었다.

따라서 다음에 수행된 연구에서는 rice straw stem의 생물학적 처리(과제1) 및 화학적 처리(과제3)시 본 실험의 결과를 응용하여 20g의 샘플에 15 ml 용액(약 70% 수준)의 량을 적용하여 spray 하였다.

Figure 18. Photograph of rice straw stem sprayed with the different amounts of liquid supplement. Rice straw stem (20 g) was applied by red color solution of 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) and 20 (E) ml, respectively.

2) 효소처리가 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

Cellulase의 농도를 달리하여 처리한 경우 반추위 박테리아의 부착과 NDF 소실율은 Figure 19와 같다. Cellulase 처리에 의하여 *F. succinoenes*의 부착이 처

리하지 않은 티모시에 비하여 증가하였다. 특히 0.065 units/g 수준으로 cellulase를 처리한 티모시의 부착 미생물 군락이 대조구보다 유의적으로 높았고 ($p<0.05$), 처리구 중에서도 가장 높은 부착 박테리아 군락을 형성하였다. NDF 소실율은 cellulase 0.065 units/g과 이의 5배의 수준(5X)으로 티모시를 처리하였을 때 대조구에 비하여 증가하였으나, 다른 수준으로 처리한 경우에는 감소하였다. 그리고 박테리아 부착의 경우와 같이 NDF 소실율이 0.065units/g 의 수준으로 cellulase를 처리한 티모시에서 가장 높게 나타났다 ($p<0.05$). 따라서 이상의 결과는 섬유소 분해 효소(cellulase)의 조사료 처리는 반추미생물의 조사료 표면 부착 및 조사료의 분해에 영향을 준다는 사실을 입증하였고, 본 연구에서는 0.065 units/g 수준으로 cellulase를 처리하였을 때 가장 좋았다.

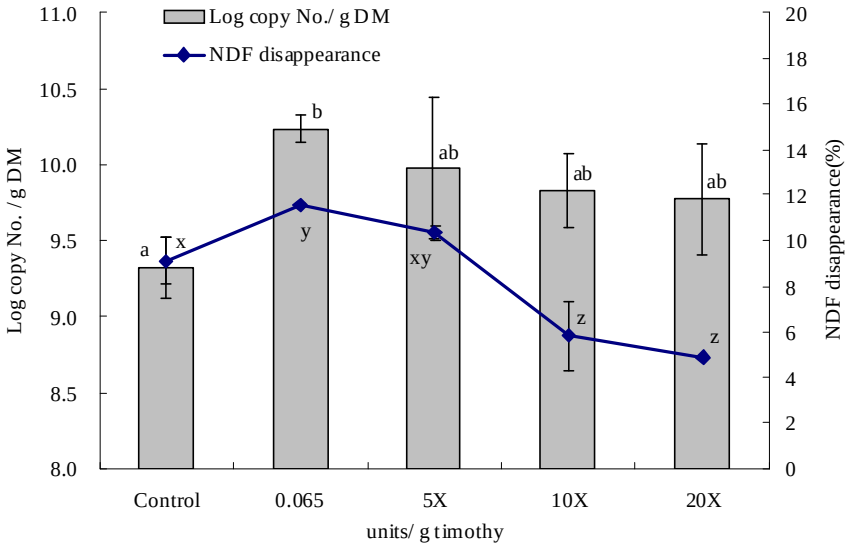


Figure 19. *F. succinogenes* adhesion and NDF disappearance as influenced by cellulase pre-treatment (Log copy number / g timothy DM, 12h incubation).

ab: means within the bacterial adhesions with different superscripts differ ($p<0.05$).

xyz: means within the NDF disappearance with different superscripts differ ($p<0.05$).

Xylanase의 농도를 달리하여 처리한 경우 반추위 박테리아의 부착과 NDF 소실율은 Figure 20과 같다. *F. succinoenes*의 부착은 xylanase를 0.053 unit/g과 이의 5배(5X)의 수준으로 처리하였을 때에는 비처리구에 비하여 낮았으나 0.533 unit/g xylanase, 즉 10배(10X)와 20배(20X)에서는 처리 수준이 증가함에 따라 더 높은 군락을 형성하였다($p<0.05$). 조사료 소실율은 박테리아 부착의 경우와 유사한 경향으로 xylanase를 10배(10X)와 20배(20X)의 수준으로 처리하였을 때 대조구보다 더 높은 NDF 소실율을 보였다. 따라서 섬유소 분해 효소(xylanase)의 조사료 처리는 반추미생물의 조사료 표면 부착 및 조사료의 분해에 영향을 준다는 사실을 입증하였고, xylanase는 1.066 unit/g 수준으로 처리하였을 때 박테리아의 부착과 티모시 NDF의 소실율이 가장 높게 나타났다. 그리고. xylanase의 처리(Figure 20)과 cellulase 처리(Figure 19)에 따른 미생물 부착과 NDF 분해에 대한 효과을 비교하여보면 1.066 unit/g xylanase 처리가 0.065 unit/g cellulase 처리시에 비해 더 높은 효과를 보였다.

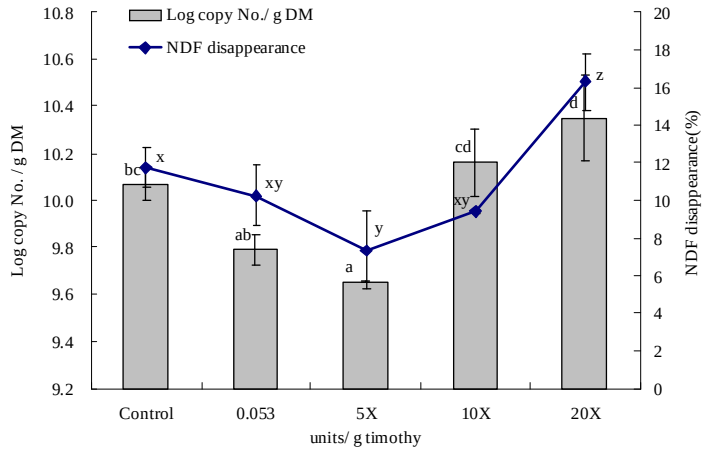


Figure 20. *F. succinogenes* adhesion and NDF disappearance as influenced by xylanase pre-treatment (Log copy number / g timothy DM, 12h incubation).

ab: means within the bacterial adhesions with different superscripts differ ($p<0.05$).

xyz: means within the NDF disappearance with different superscripts differ ($p<0.05$).

Cellulase와 xylanase를 혼합한 효소혼합제의 처리 수준에 따른 반추위 박테리아의 부착과 NDF 소실율은 Figure 21과 같다. 효소혼합제 첨가 수준에 따른 부착 *F. succinogenes*의 큰 변화는 없었으나 초기 처리 수준의 10배 (0.325 unit/g cellulas + 0.2665 unit/g xylanase)로 티모시를 처리하였을 때 처리구 중 가장 높은 부착 박테리아 군집을 형성하였다. 그리고 NDF *in situ* 소실율은 부착 박테리아의 경향과는 다르게 10배 수준으로 처리한 것이 가장 낮았고, 20배의 수준(0.65 unit/g cellulas + 0.533 unit/g xylanase)에서 증가하였다. 그러나 Figure 22의 결과를 함께 고찰하여 볼 때 조사료의 세포별 물질인 NDF의 분해는 *in situ* 실험을 실시하기 전 효소 처리과정에서도 상당량이 분해됨을 볼 수 있다. 특히, celluase나 xylamase와 같이 단일 효소 처리보다 효소혼합 처리를 함으로서 신너지 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서 효소 처리과장과 *in situ*에 의한 총 NDF 소실율을 고려 할 때 혼합효소를 10배와 20배로 티모시를 처리하였을 때 자장 높은 결과를 가져왔다.

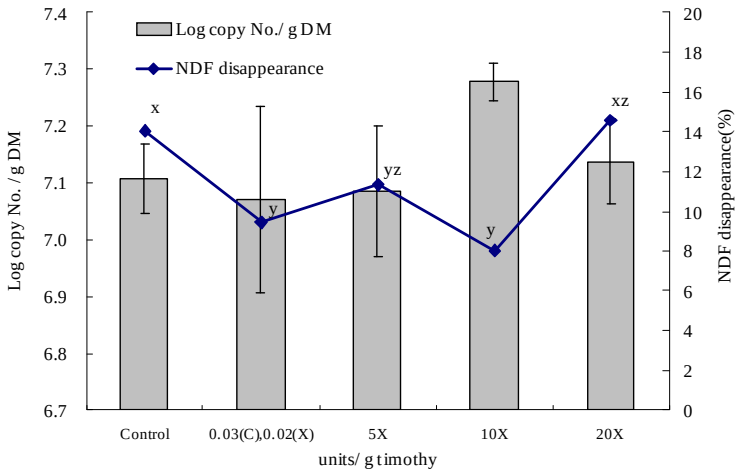


Figure 21. *F. succinogenes* adhesion and NDF disappearance as influenced by enzyme mixture pre-treatment (Log copy number / g timothy DM, 12h incubation).

xyz: means within the NDF disappearance with different superscripts differ ($p<0.05$).

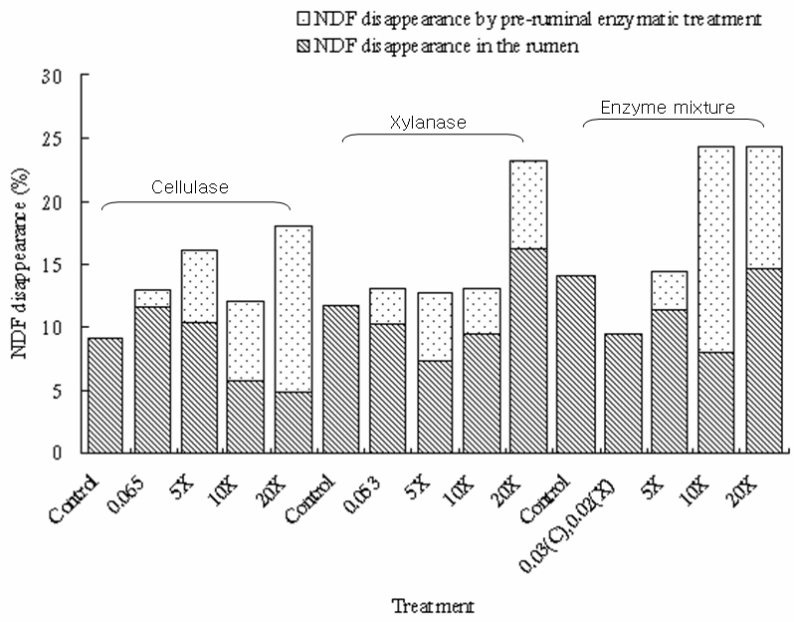


Figure 22. The value of NDF degradation (%) by enzymatic hydrolysis during the enzyme treatment and by rumen microbes during the in situ fermentation.

결론적으로 효소 즉, cellulase, xylanase 그리고 두 효소의 mixture 처리는 반추위내 박테리아, *F. succinogenes*의 티모시 표면 부착과 반추위내 섬유소 분해에 영향을 주었으며, cellulase는 0.065 units/g, xylanase는 1.066 units/g에서 미생물 부착과 in situ NDF 소실율이 가장 높았다. 그리고 효소혼합제는 0.65 units/g의 cellulase와 0.533 units/g의 xylanase을 혼합하여 처리한 티모시에서 미생물 부착이 가장 높았고, 총 NDF 분해율 (enzymatic degradation + *in situ* disappearance)도 가장 좋았다.

따라서 이상의 결과를 토대로 효소 수준을 결정하여 반추위내 배양 시간에 따른 반추위 박테리아의 조사료 부착과 소화율에 대한 실험을 다음과 같이 실시하였다. 최종 효소처리 수준은 Table 4와 같이하여 1 cm로 세절한 timothy stem을 처리하였으며, 반추위내 소화율(건물과 NDF) 그리고 반추위 박테리아 부착 (*F. succinogenes*와 *R. albus*)을 *in situ* 방법을 이용하여 반추위내 배양 0.5, 1, 2. 4, 8, 12, 24, 48 시간에 관찰한 결과는 Figure 23, 24, 25, 26과 같았다.

반추위내 배양 시간에 따른 *in situ* 조사료 소화율 즉, 건물 소화율과 NDF 소화율은 각각 Figure 23 그리고 24와 같다. *In situ* 배양 시간이 진행됨에 따라 이들 소화율은 점진적으로 증가하였으며, 전반적으로 효소 처리에 의한 소화율 향상 현상이 관찰되었다. 배양기간 동안 증가 경향은 enzyme mixture (cellulase+ xylanase)를 처리한 볏짚에서 가장 높았고 다음으로 cellulase 그리고 xylanase이었으며, control이 가장 낮았다. 그러나 cellualse 처리와 무처리 사이의 소화율은 다른 처리구간에 비하여 큰 차이가 없었다.

또한 *in situ* 배양이 진행되는 동안 *F. succinogenes*와 *R. albus*의 부착군락의 변화는 Figure 25 그리고 26과 같다. 두 균주의 부착 정도는 볏짚 처리 방법에 따라 그리고 균주 종류에 따라 다른 특성을 나타냈다. *F. succinogenes*의 부착(Figure 25)은 배양 2-8 시간 사이에 크게 높아졌고, enzyme mixture 처리는 배양 2시간째, 그리고 다른 처리구는 배양 4시간째 부착군락이 최대 정점을 형성하였다. 배양 초기 동안의 부착박테리아 군락은 enzyme mixture 처리와 cellulase 처리에 의해 더 높아졌다. *R. albus*의 군락(Figure 26)은 배양 2-8 시간 사이에 크게 높아졌고, enzyme mixture 처리와 cellulase 처리는 배양 8시간째 그리고 xylanase는 배양 12시간째 부착군락이 최대 정점을 형성하였다. 그리고 이 시기의 두 균주의 부착은 cellulase, xylanas와 enzyme mixture 처리구 모두에 의해 증가하였다. 따라서 이상의 결과에 의하면 조사료의 효소 처리는 섬유소분해 박테리아의 부착을 향상시키고 조사료 분해 효율을 증진시켰다. 특히, 단일 순수효소 보다는 혼합 효소에 의한 처리가 더 좋은 효과를 나타내었다.

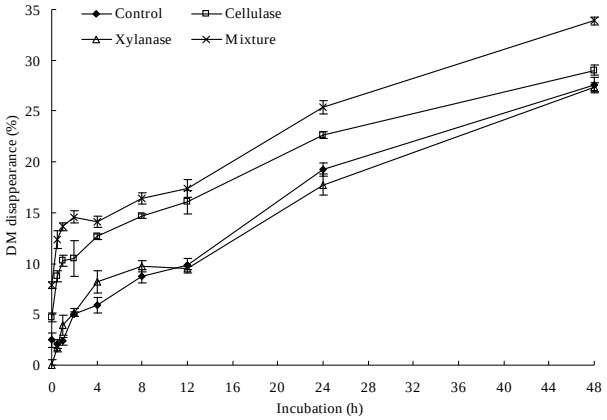


Figure 23. DM disappearances as influenced by cellulolytic enzyme treatments.

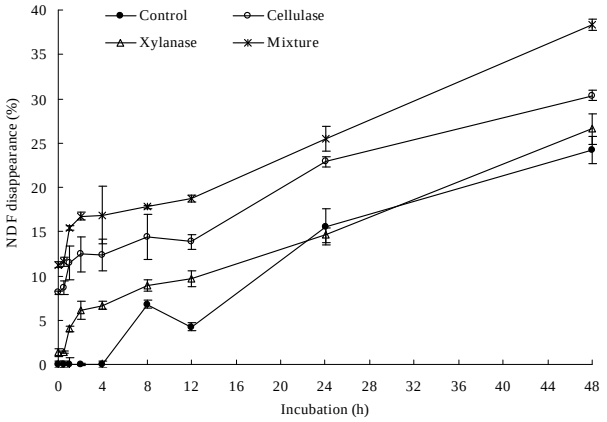


Figure 24. NDF disappearances as influenced by cellulolytic enzyme treatments.

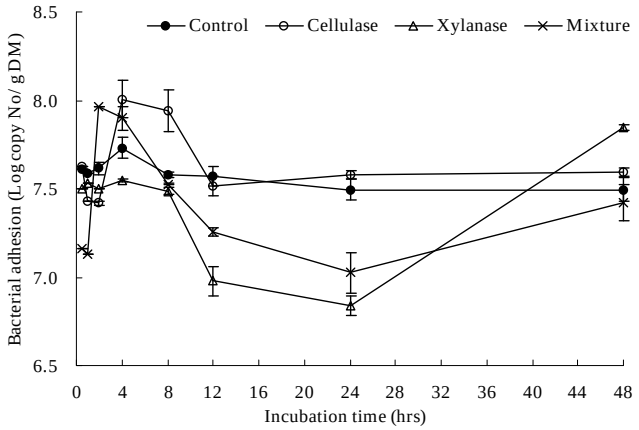


Figure 25. *F. succinogenes* adhesion (Log copy number / g DM) as influenced by cellulolytic enzyme treatments.

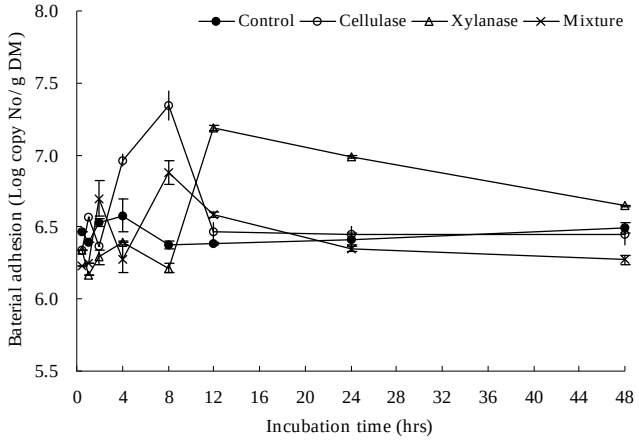


Figure 26. *R. albus* adhesion (Log copy number / g DM) as influenced by cellulolytic enzyme treatments.

3) 생균제 처리가 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

Figure 27과 같이 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30049로 볏짚을 처리함으로써 소화율이 비처리구에 비하여 향상되었고, 24시간 배양 후에는 0.02와 0.1% 처리가 0.5% 처리보다 더 소화율이 높았다.

Figure 28 와 같이 처리 수준과 배양 시간에 따른 부착 F. succiongenes의 분포를 산정하기 위한 각 샘플 DNA의 Real-Time PCR 증폭(A)과 Ct 값과 표준곡선을 이용한 copy number 계산(B)을 보여주고 있고, F. succiongenes의 부착(C)은 소화율의 증가 경향과 유사하게 증가하였다. 그리고 R. flavefaciens의 부착은 배양 12시간째에는 모든 생균제 처리에서 비처리구 보다 높았으나 배양 24 시간째에는 0.1% 처리에서만 높았다(Fugure 29). *R. albus*의 경우에도 F. succiongenes과 R. flavefaciens의 경우와 같이 생균제 처리에 의해 부착 군락이 증가 하였다(Figure 30). 따라서 이상의 결과는 생균제의 조사료 처리는 반추위 섬유소 분해 박테리아의 조사료 부착은 향상 시킬 수 있음을 시사한다.

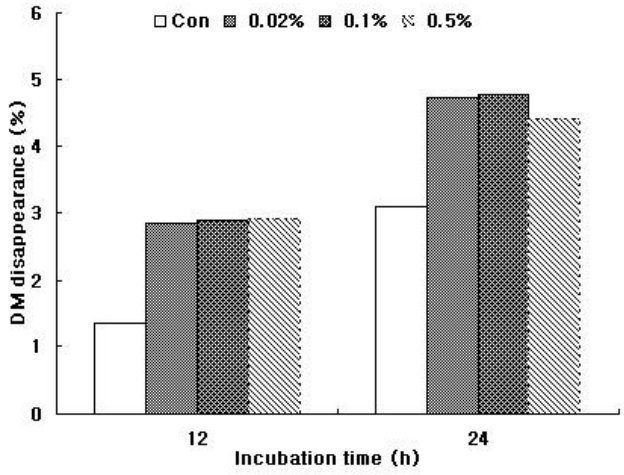
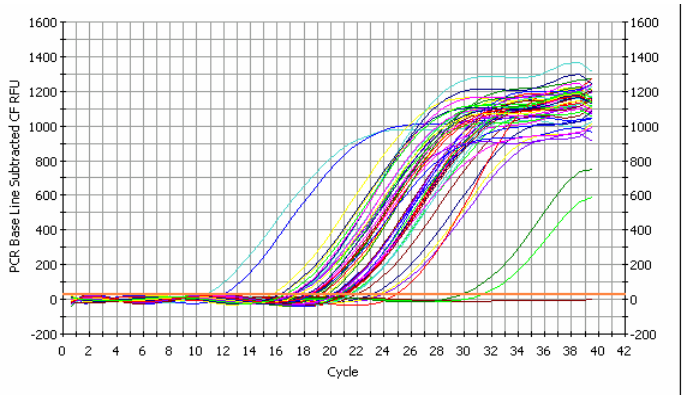
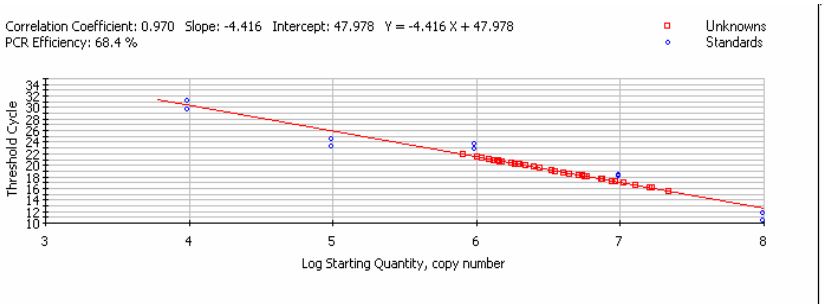


Figure 27. Dry matter disappearance of rice straw stem corrected by 0 time disappearance as influenced by treatment levels of *Saccharomyces cerevisiae* 30049.

(A)



(B)



(C)

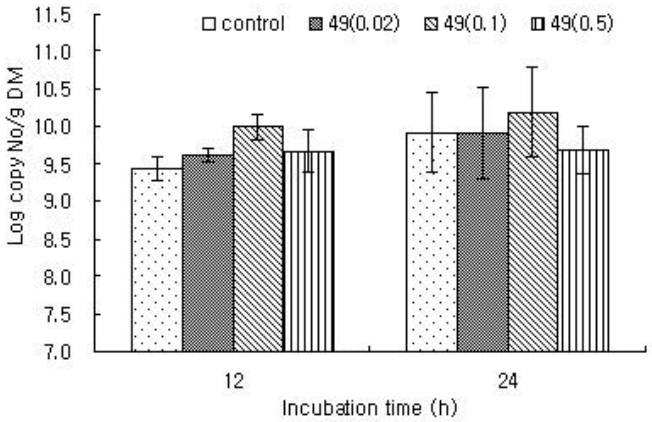
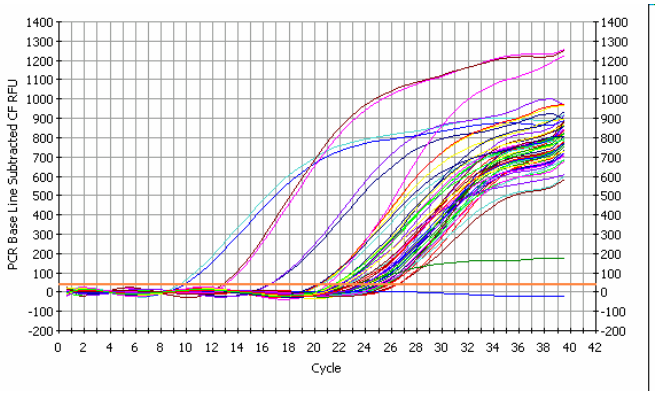


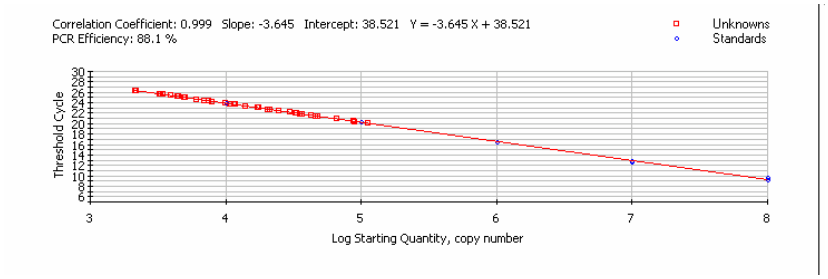
Figure 28. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *F. succinogenes* on rice straw stem as influenced by treatment levels of *Saccharomyces cerevisiae* 30049.

49 : *Saccharomyces cerevisiae* 30049; (0.02), (0.1), (0.5) : treatment level(%)

(A)



(B)



(C)

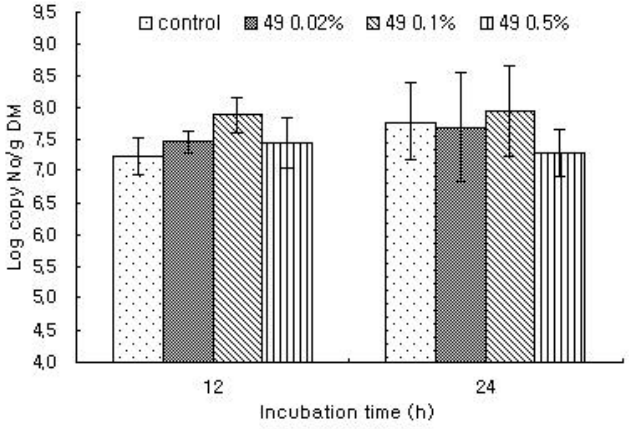
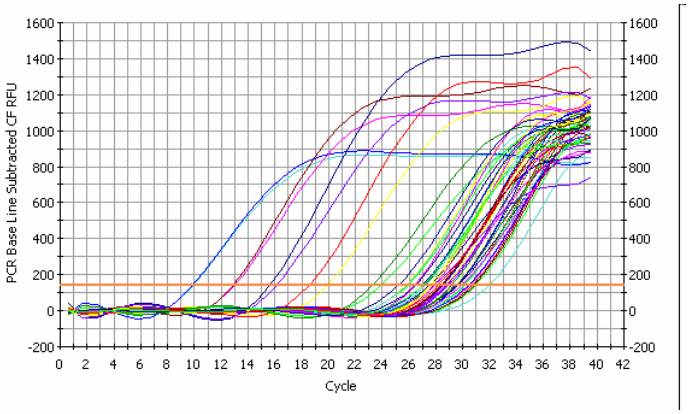


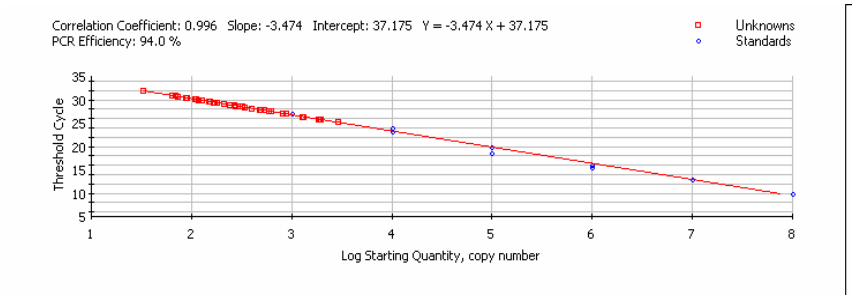
Figure 29. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *R. flavefaciens* on rice straw stem as influenced by treatment levels of *Saccharomyces cerevisiae* 30049.

49 : *Saccharomyces cerevisiae* 30049.

(A)



(B)



(C)

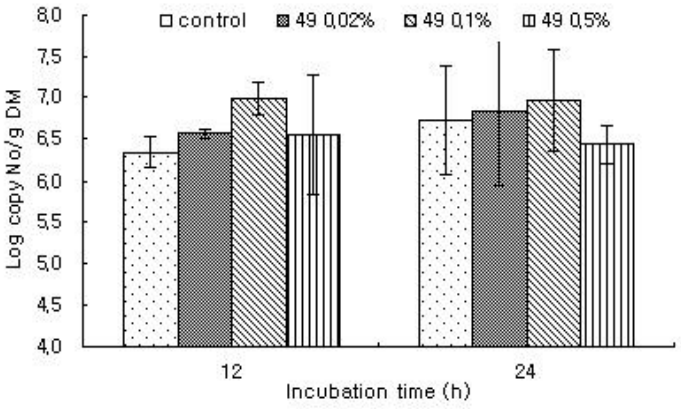


Figure 30. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *R. albus* on rice straw stem as influenced by treatment levels of *Saccharomyces cerevisiae* 30049.

49 : *Saccharomyces cerevisiae* 30049.

Saccharomyces cerevisiae KACC 30068의 조사료 처리는 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30049 처리에서와 같이 반추위 미생물의 부착과 조사료 소화를 향상 시켰다(Figure 31, 32).

반추 미생물에 의한 세절한 볏짚의 분해율는 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30068의 처리 농도가 증가함에 따라 증가하였다(Figure 31). 이는 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30049 처리에 의한 증가 경향과는 다른 증가 특색이었다. 따라서 0.5% 처리구의 소화율이 배양 12 및 24 시간째 모두 다른 처리구에 비하여 높았다.

Figure 32에서와 같이 반추위 섬유소 분해 박테리아 즉, *F. succiongenes* (A), *R. flavefaciens* (B)와 *R. albus* (C)의 부착도 볏짚 소화율 증가와 마찬 가지로 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30068의 처리 농도 증가에 따라 증가하였다. 이들 부착의 증가는 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30049 처리에 의한 증가와는 다른 경향적 특색이 있었다. 또한 생균제 처리에 의한 증가 정도는 *F. succiongenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus* 종간 다른 특성을 나타냈다. 따라서 이상의 결과는 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 30049에서 나타난 현상을 재입증함으로서 생균제의 반추위내 효능과 조사료 처리는 반추위 섬유소 분해 박테리아의 조사료 부착은 향상 시킬 수 있음을 재확인하였다.

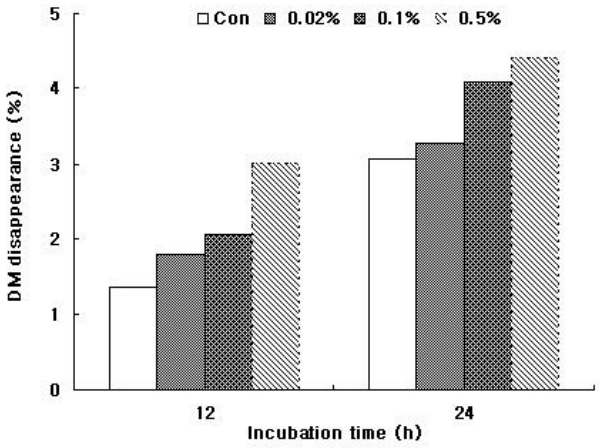


Figure 31. Dry matter disappearance of rice straw stem corrected by 0 time disappearance as influenced by treatment levels of *Saccharomyces cerevisiae*

30068.

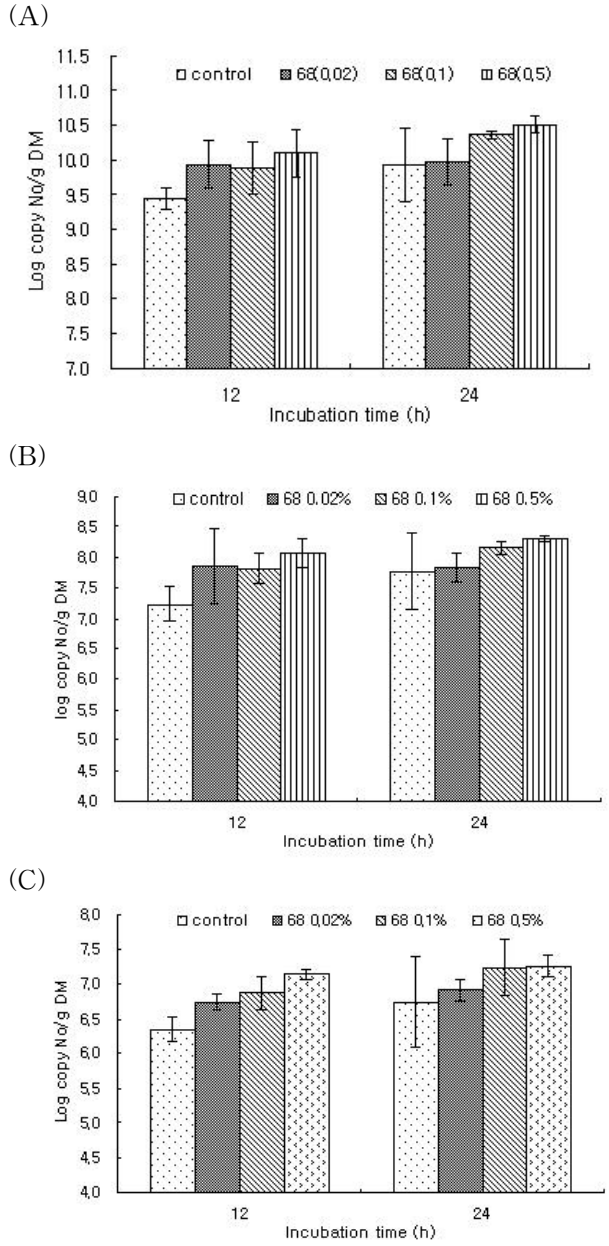


Figure 32. Attachments of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B). *R. albus* (C) on rice straw stem as influenced by treatment levels of *Saccharomyces cerevisiae* 30068.

68 : *Saccharomyces cerevisiae* 30068

5. 물리적 처리방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가. 연구의 세부목표

여러 온도의 열처리가 조사료의 cell wall content의 파괴를 유도할 것이라는 가정 하에 반추위내에서 배양됐을 시 조사료의 소화율과 섬유소 분해 박테리아의 부착의 관계에 대하여 규명하고자 하였다.

나. 연구 방법

1) 열처리 방법이 반추위 박테리아부착과 소화율에 미치는 영향

가) 열 처리 : 120, 80, 60, -20, -50, -80℃

나) 기질 : 0.5cm rice straw, alfalfa, tall fescue

다) 처리 : 0.5cm rice straw를 같은 량 나누어서 120℃는 auto clave로 80℃와 60℃는 dry oven에서 그리고 -20℃는 냉동고, -50℃와 -80℃는 deep freezer로 1시간 처리 한 후 room temperature에서 다음날 실험하기 전까지 보관하였다.

라) 배양 : *in situ* 실험으로 위 실험 3)과 동일

마) 분석항목 : 위 실험 3)과 동일

다. 연구 결과

1) 열처리 방법이 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

Figure 33 그리고 34과 같이 알팔파와 톨페스큐의 열처리는 소화율 개선 측면에서 좋은 결과를 얻지 못하였다. 그러나 볏짚에서는 120 ℃를 제외한 80, 60, -20, -50, -80 ℃에서 처리하였을 때 낮은 온도에서 처리 할수록 소화율이 증진되었다 (Figure 35). *In situ* 배양이 끝난 볏짚에 부착한 *F. succiongenes, R. flavefaciens, R. albus*의 분포는 Figure 36 - 38과 같다. Figure 36의 A와 B는 각각 샘플 DNA의 Real-Time PCR 증폭과 Ct 값과 표준곡선을 이용한 copy

number 계산을 보여주고 있고, C는 *F. succiongenes*의 부착 밀도를 나타낸다. 부착 *F. succiongenes*는 배양 12 시간째 열처리에 의하여 증가하는 경향을 나타냈으나 배양 24 시간째에는 비처리 볏짚 보다 다소 낮았다. 그리고 *R. flavefaciens* (Figure 37)와 *R. albus* (Figure 38)는 처리들 간에 일관된 경향을 발견할 수 없었다.

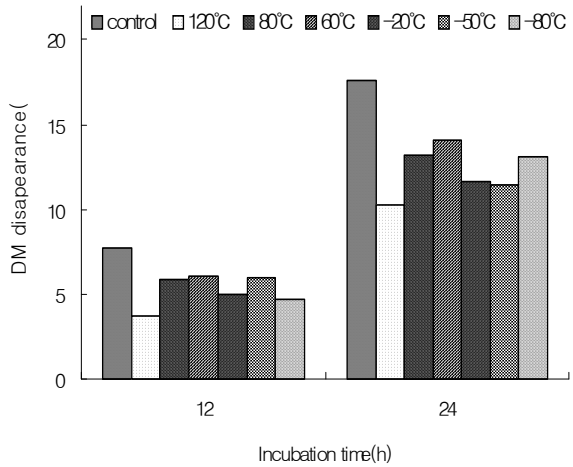


Figure 33. Dry matter disappearance of alfalfa stem corrected by 0 time disappearance as influenced by heating and cooling treatment.

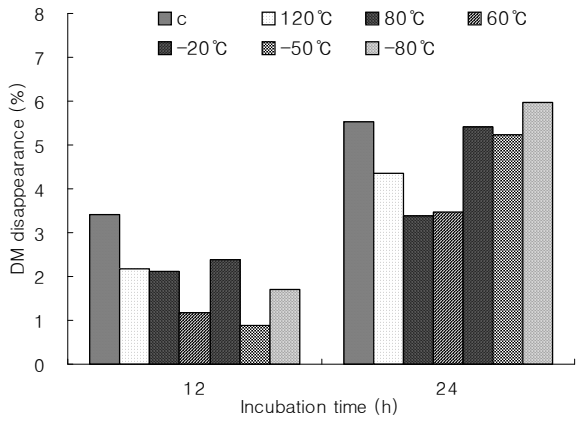


Figure 34. Dry matter disappearance of tall fescue stem corrected by 0 time disappearance as influenced by heating and cooling treatment.

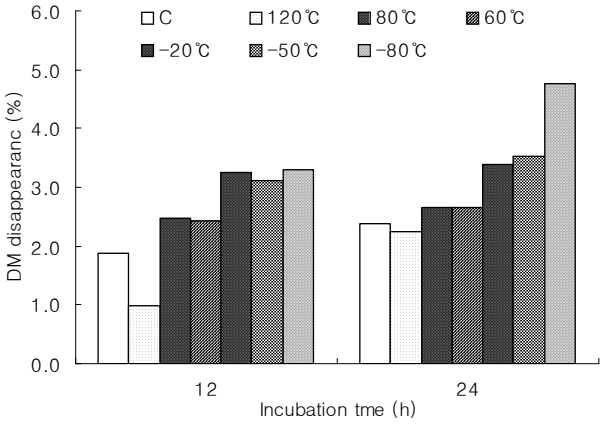
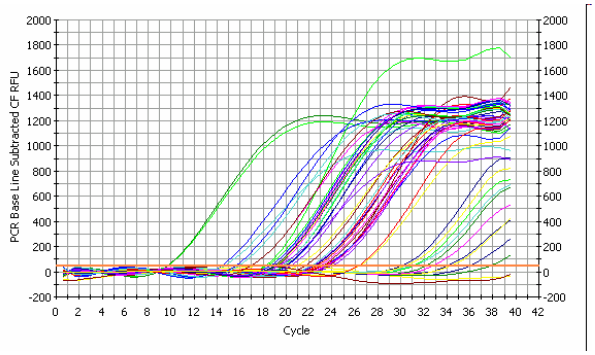
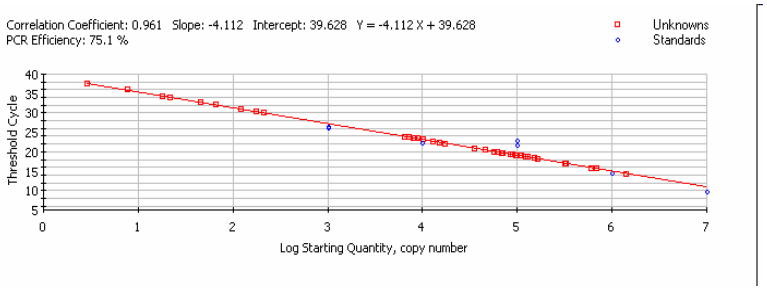


Figure 35. Dry matter disappearance of rice straw stem corrected by 0 time disappearance as influenced by heating and cooling treatment.

(A)



(B)



(C)

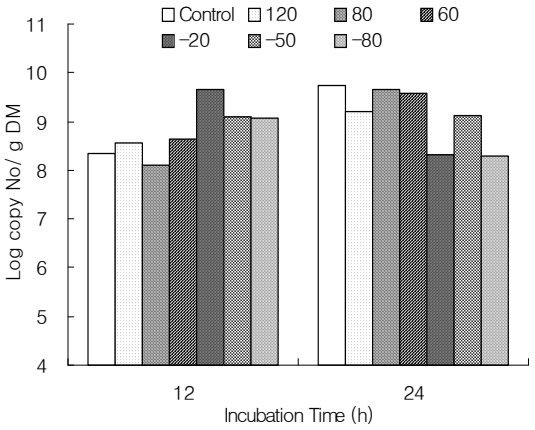


Figure 36. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *F. succinogenes* on rice straw stem as influenced by heating and cooling treatment.

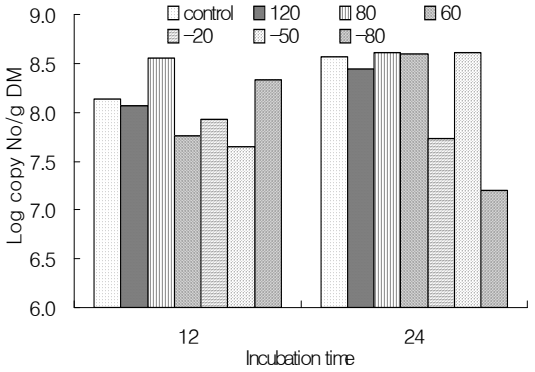


Figure 37. Attachments of R. flavefaciens on rice straw stem as influenced by heating and cooling treatment.

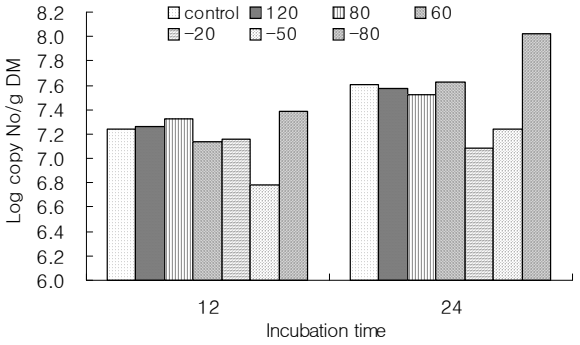


Figure 38. Attachments of R. albus on rice straw stem as influenced by heating and cooling treatment.

6. 화학적 처리 방법이 부착미생물에 미치는 영향 평가

가. 연구의 세부목표

조사료와 미생물의 표면이 띠고 있는 charge 가 (-)로 같기 때문에 +2가 이온

의 화합물을 첨가하면 박테리아가 조사료에 더 쉽게 붙을 것이라는 가설과 알칼리성의 가성소다, 수산화나트륨 그리고 암모니아 처리가 조사료의 cell wall content를 일부 제거해 주어 박테리아의 부착이 증가될 수 있을 거이라는 가설하에 다양한 화학적 처리를 실시하고 이들 처리가 미생물 부착과 소화율에 미치는 영향을 측정하였다. 그리고 반추위 발효에 영향을 미치는 화학적 환경요인 중 pH의 변화가 부착 섬유소 분해 박테리아 분포 및 섬유소 분해율에 영향을 미칠 것이라는 가설로 이들에 따른 조사료 소화율과 미생물부착에 대한 관계를 규명하고자 한다.

나. 연구방법

1) 양이온성 화합물 처리가 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

가) 양이온의 종류 : $CaCl_2(Ca^{2+})$, $MgSO_4(Mg^{2+})$

나) 처리 : $CaCl_2$, $MgSO_4$ 를 증류수에 녹여 기질의 0, 0.1, 1.0, 3% 수준으로 spray 처리 하였다.

다) 배양 : *in situ* 실험으로 위의 실험과 동일

마) 분석항목 : 위 실험과 동일

2) 가성소다, 과산화수소수 및 암모니아 처리가 반추위 박테리아 부착 및 소화율에 미치는 영향

가) 알칼리성 화학처리의 종류 : NaOH, H_2O_2, Ammonia

나) 처리 : NaOH, H_2O_2, Ammonia 증류수에 녹여 기질의 0, 2, 4, 8% 수준으로 spray 처리 하였다.

다) 배양 : *in situ* 실험으로 위의 실험과 동일

마) 분석항목 : 위 실험과 동일

3) 반추위 발효환경 pH가 부착 섬유소 분해 박테리아 분포 및 섬유소 분해 형상에 미치는 영향

가) 기질 : 0.5g ground rice straw

나) 배지 : McDougall buffer (Table 5)

Table 5. The composition of McDougall buffer

Ingredients	Amount (/L)
NaHCO3	9.80g
Na2HPO4·2H2O	4.62g
KCl	0.57g
NaCl	0.47g
MgSO4·7H2O	0.12g
4% CaCl2 solution1)	1ml

1) 4% CaCl2 solution : CaCl2 4g (/100ml d.w.)

다) 배양 시간 : 0, 2, 4, 8, 12, 24 시간

라) 분석 항목 : DM digestibility, Microbial attachment

마) 배양 방법

⑴ 60ml serum bottle에 ground rice straw 0.5g을 넣는다.

⑵ 사료 급여 전 위액을 채취하고 4겹으로 거른 후 McDougall buffer와 1:2 비율로 섞고 30분간 O_2-free CO_2로 bubbling 하였다. Medium의 pH는 5N HCl을 이용하여 6.7(high), 6.2(medium), 5.7(low)로 조절하였다.

⑶ 위액과 buffer mixture를 기질이 들은 serum bottle에 30ml씩 넣고 butyl rubber stopper 와 aluminium seal로 밀봉한 후 39℃에서 배양하였다.

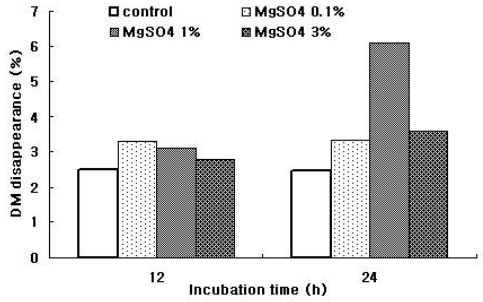
다. 연구결과

1) 양이온성 화합물 처리가 반추위 박테리아 부착과 소화율에 미치는 영향

Figure 39와 같이 볏짚의 소화율은 $MgSO_4$ 처리에 의하여 증진 되었고, 특히 배양 24시간째에는 1.0%를 처리하였을 때 현저한 증가가 있었다. 그러나 $CaCl_2$

처리의 경우 배양 12 그리고 24시간째 1.0%에서만 소화율이 증진되었다. 그리고 부착 박테리아 즉, *F. succiongenes* (Figure 40), *R. flavefaciens* (Figure 41), *R. albus* (Figure 42)의 분포는 처리 종류, 처리 수준 그리고 배양 시간에 따른 일관된 경향을 발견할 수 없었다.

(A)



(B)

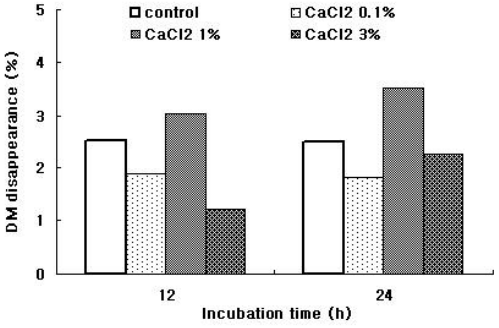
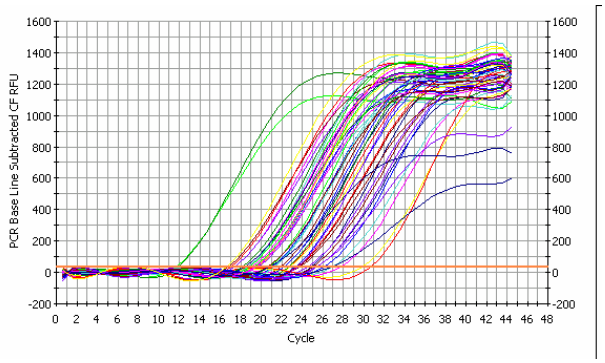
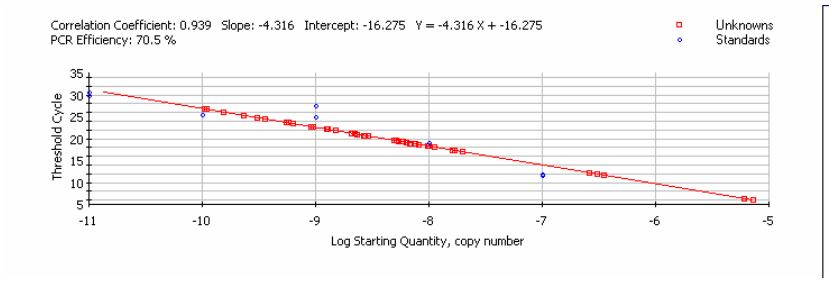


Figure 39. Dry matter disappearance of rice straw stem corrected by 0 time disappearance as influenced by MgSO4 (A) and CaCl2 (B) treatments.

(A)



(B)



(C)

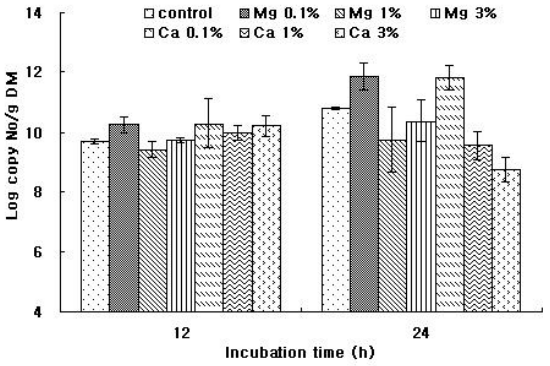
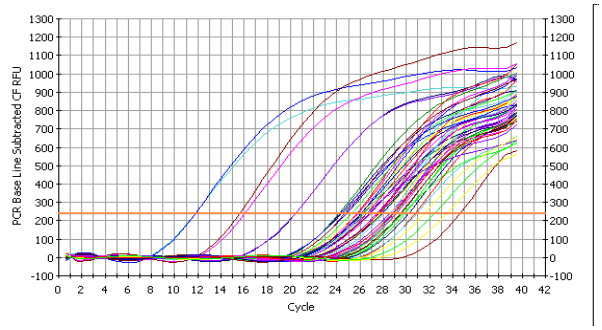
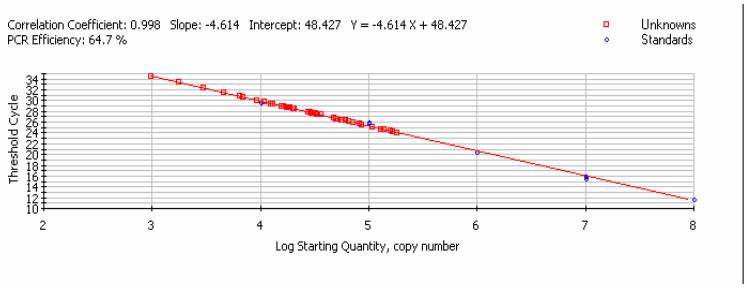


Figure 40. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *F. succinogenes* on rice straw stem as influenced by $MgSO_4$ and $CaCl_2$ treatments.

(A)



(B)



(C)

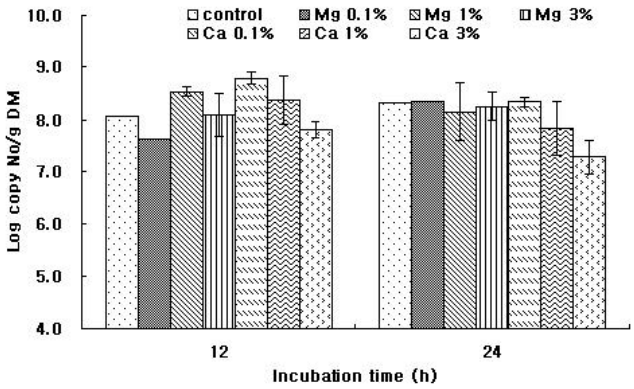
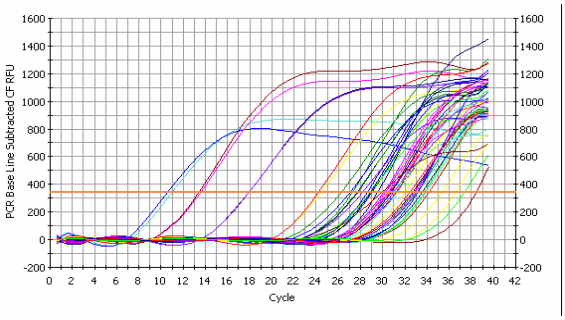
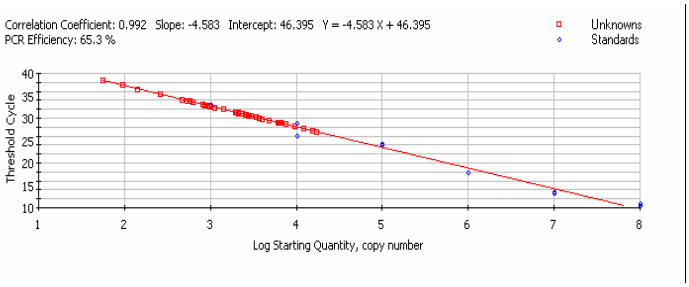


Figure 41. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *R. flavefaciens* on rice straw stem as influenced by $MgSO_4$ and $CaCl_2$ treatments.

(A)



(B)



(C)

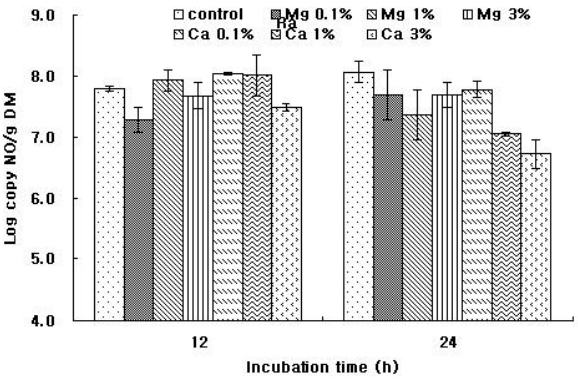


Figure 42. Real-Time PCR amplification (A), data curve analysis (B) and attachments (C) of *R. albus* on rice straw stem as influenced by $MgSO_4$ and $CaCl_2$ treatments.

2) 가성소다, 과산화수소수 및 암모니아 처리가 반추위 박테리아 부착 및 소화율에 미치는 영향

Figure 43과 같이 NaOH를 0, 2.0 4.0, 8.0% 농도로 처리하였을 때 볏짚의 소화율은 증진 되었고 4%로 처리한 볏짚이 배양 12 그리고 24시간 모두 가장 높았다. 그리고 NaOH를 처리에 따른 부착 *F. succiongenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*의 분포는 Figure 44과 같다. *F. succiongenes*의 부착 밀도(A)는 배양 12시간째에는 처리구가 비처리구보다 높았으나 배양 24시간째는 낮았다. *R. flavefaciens*의 경우(B)도 *F. succiongenes*와 유사한 경향을 보였다. 그러나 *R. albus*의 부착 밀도(C)는 처리 농도가 증가함에 따라 증가하는 현상이 배양 12 그리고 24시간 모두에서 발견되었다. 따라서 이상의 결과는 NaOH의 볏짚 처리는 섬유소 박테리아 즉, *F. succiongenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*의 부착군락 형성에 도움을 줄 뿐만 아니라 이들에 의한 소화율 증진에도 기여함을 알 수 있었다.

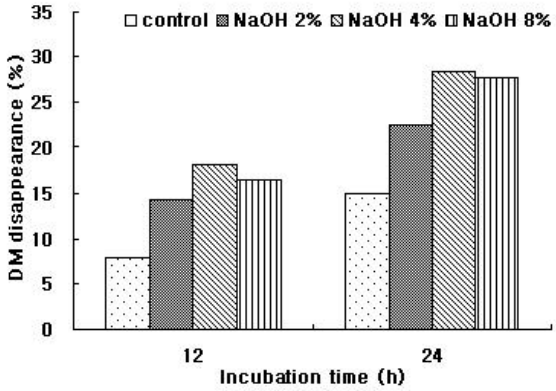
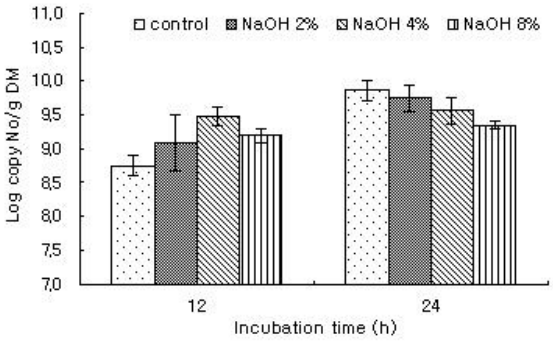
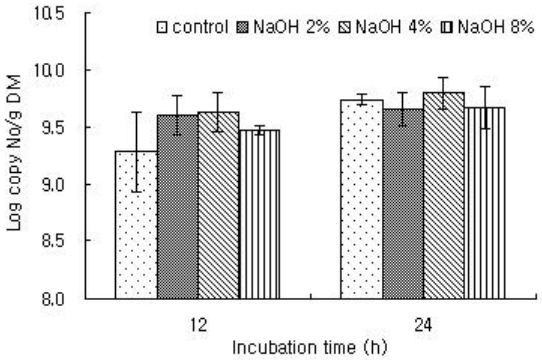


Figure 43. Dry matter disappearance of rice straw stem as influenced by NaOH treatment levels.

(A)



(B)



(C)

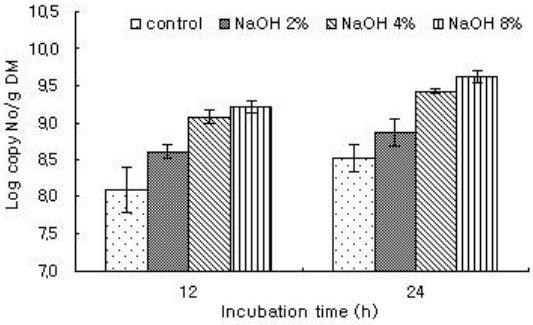


Figure 44. Attachments of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B). *R. albus* (C) on rice straw stem as influenced by NaOH treatment levels.

과산화수소수(H_2O_2) 처리 수준(0, 2.0, 4.0, 8.0%)에 따른 반추위 미생물의 부착과 조사료 소화에 미치는 영향을 평가한 결과는 Figure 45, 46과 같다.

Figure 45과 같이 볏짚의 소화율은 H_2O_2를 처리함으로서 증진 되었다. 그리고 배양 12 그리고 24시간의 증가현상은 2% 보다는 4%로 볏짚을 처리하였을 때 더 많이 증가하였고 8% 처리는 4% 처리보다 다소 낮은 증가를 하였다. 그리고 H_2O_2를 처리에 따른 부착 *F. succiongenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*의 분포는 Figure 46와 같다. *F. succiongenes*의 부착 밀도(A)는 배양 12 그리고 24 시간에 처리구가 비처리구보다 낮았으며, *R. flavefaciens*의 경우(B)도 *F. succiongenes*와 유사하게 H_2O_2를 처리에 의하여 낮은 군락을 형성하였다. 이는 다른 처리구의 소화율 증가에 따른 부착 박테리아 군락 밀도의 증가 현상과는 상이한 경향이었다. 그러나 *R. albus*의 부착 밀도(C)는 처리 농도가 증가함에 따라 증가하는 현상이 배양 12 그리고 24 시간 모두에서 발견되었다. 따라서 이상의 결과는 H_2O_2의 볏짚 처리는 섬유소 박테리아 중 *R. albus*의 부착 군락 형성을 증가시지고 조사료의 소화율 증진 효과도 있음을 알 수 있었다. 나머지 2종의 섬유소 분해 bacteria의 부착정도가 H_2O_2 처리에 의해 감소한 현상은 추후연구에 의해 구명되어야 하리라 본다.

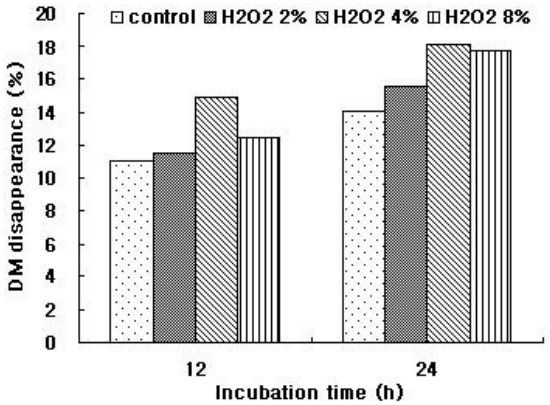
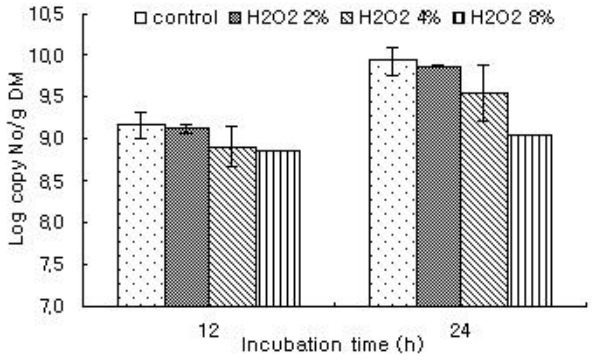
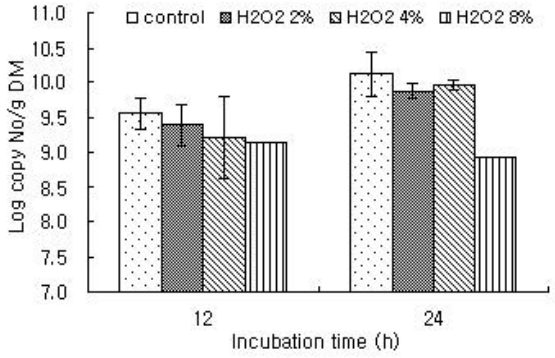


Figure 45. Dry matter disappearance of rice straw stem as influenced by H_2O_2 treatment levels.

(A)



(B)



(C)

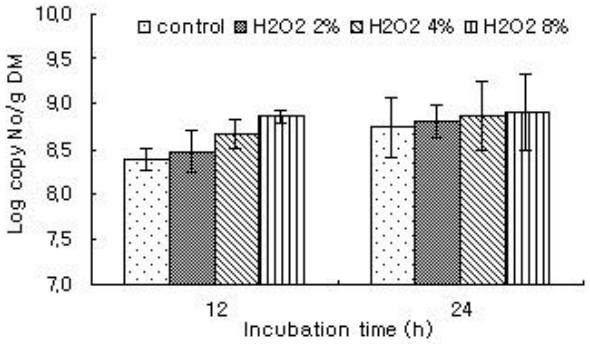


Figure 46. Attachments of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B). *R. albus* (C) on rice straw stem as influenced by H_2O_2 treatment levels.

암모니아 처리 수준(0, 1.5, 3.0, 6.0%)에 따른 반추위 미생물의 부착과 조사료 소화에 미치는 영향을 평가한 결과는 Figure 47, 48과 같다.

Figure 30과 같이 볏짚의 소화율은 암모니아를 처리함으로서 증진 되었다. 그리고 배양 12 그리고 24 시간에서의 처리효과를 비교해 보면 2% 보다는 4% 로 볏짚을 처리하였을 때 더 많이 증가하였고, 8% 처리는 4% 처리보다 다소 낮게 증가하였다. 따라서 3%의 암모니아 처리에서 볏짚의 소화율이 가장 높았다. 그리고 암모니아를 처리에 따른 부착 F. succiongenes, R. flavefaciens, R. albus의 분포는 Figure 48과 같다. *F. succiongenes*의 부착 밀도(A)는 배양 12 그리고 24 시간에 1.5% 처리구가 가장 높았으며, 3.0% 처리구는 배양 24 시간에 대조구보다 높게 나타났다. *R. flavefaciens*의 경우(B)는 전반적으로 암모니아 처리에 의하여 부착군락 형성이 증가되었으며, *F. succiongenes*와 같이 1.5% 암모니아 처리에서 가장 높았고, 다음으로 3.0% 처리에서 높았다. 그러나 *R. albus*의 부착 밀도(C)는 암모니아 처리에 의하여 증가됨이 없었다. 따라서 이상의 결과는 암모니아의 볏짚 처리는 섬유소 박테리아 중 *F. succiongenes, R. flavefaciens*의 부착 군락 형성에 기여하고, 조사료의 소화율 증진 효과도 있음을 알 수 있었다.

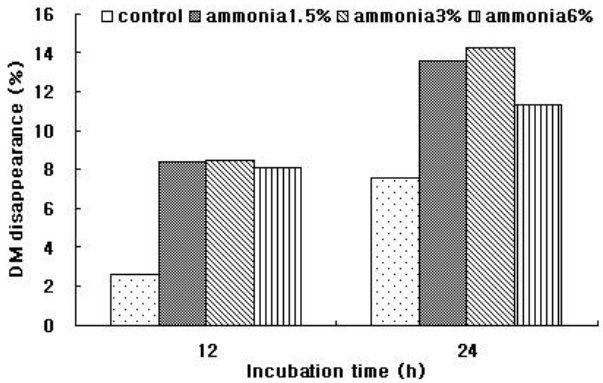
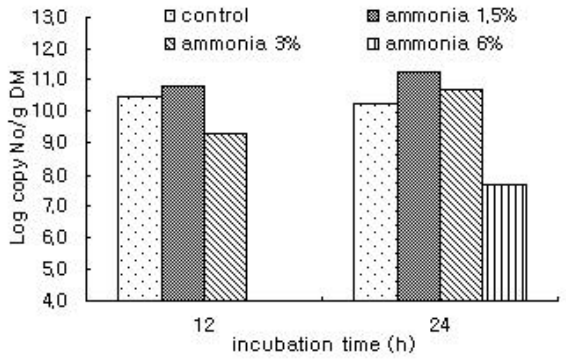
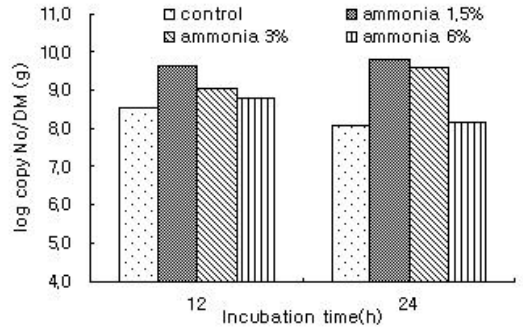


Figure 47. Dry matter disappearance of rice straw stem as influenced by ammonia treatment levels.

(A)



(B)



(C)

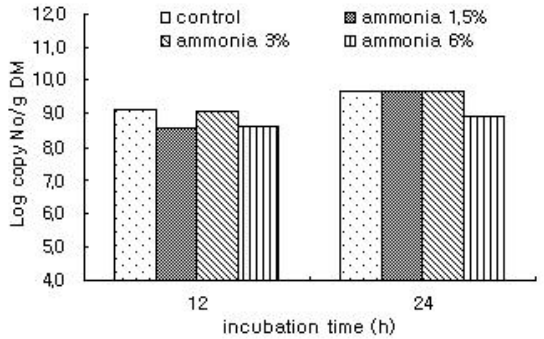


Figure 48. Attachments of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B). *R. albus* (C) on rice straw stem as influenced by ammonia treatment levels.

3) 반추위 발효환경 pH가 부착 섬유소 분해 박테리아 분포 및 섬유소 분해 형상에 미치는 영향

배양시간이 진행됨에 따라 모든 pH에서 볏짚 소화율은 증가하였으나, pH 6.7과 6.2에서는 배양 4-8시간 사이에서 가속화 되었고 pH 5.7에서는 배양 8-12시간에 가속화 되었다 (Figure 12). 따라서 배양시간이 증가함에 따라 소화율은 pH간에 현저한 차이가 나타났으며, pH 6.7에서 가장 높은 소화율을 보였다. 그리고 다음으로 pH 6.2에서 소화율이 좋았고, pH 5.7에서 소화율이 가장 낮았다. 배양시간에 따른 소화율의 차이는 pH 5.2와 6.7은 배양 8시간 후부터 통계적으로 현저한 차이가 있었다($p<0.05$). pH 5.2와 6.2는 배양 12시간 후부터 그리고 pH6.2와 6.8은 배양 24 시간 후부터 현저한 차이가 있었다($p<0.05$).

배양시간별 볏짚의 소화속도(g DM/h)는 Figure 49와 같다. 건물소화 kinetics는 배양 24시간동안 모든 시간에서 pH 6.7이 가장 높았고 pH 5.7에서 가장 낮았다. 그리고 모든 pH조건에서 건물소화 kinetics는 배양시간이 진행됨에 따라 증가하여 배양 24시간째 정점을 형성하고 이후에는 감소하는 동일한 경향을 나타냈다. 따라서 이상의 결과는 반추위내 pH환경이 반추미생물에 의한 조사료 분해에 현저한 영향을 준다는 사실을 재 입증 하였다. 그리고 반추위내 정상적 발효를 위해서 반추위내 pH는 6.0 이상 유지하여야하며, 효율적 발효는 pH6.8 내외의 수준을 유지시켜야한다는 결과도 얻었다.

그리고 이러한 pH에 따른 박테리아 발효 영향을 알기위해 주요 섬유소분해 박테리아의 군집변화에 대한 분석 결과는 Figure 50 - 57과 같다. Figure 50 - 52은 pH에 따른 *in vitro* 배양액내 총 섬유소 박테리아의 군집 변화와 기질(볏짚)에 부착한 섬유소박테리아의 총 박테리아에서 차지하는 비율(%)을 보여주고 있다. 섬유소 박테리아, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*의 총수 그리고 박테리아 부착 비율은 pH에 따라 다른 양상을 보였다.

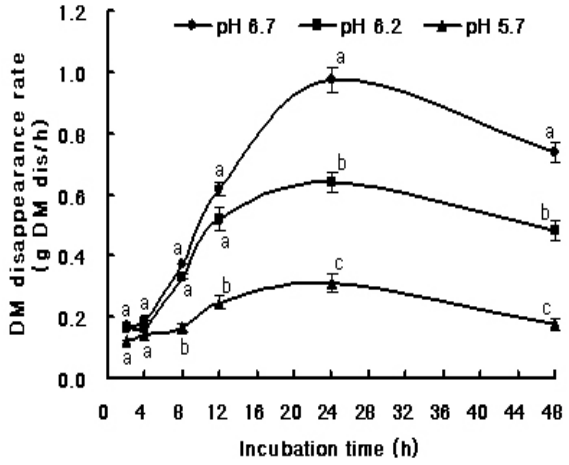


Figure 49. The kinetics of dry matter disappearance in time course of incubation.

Figure 50에서와 같이 *F. succinogenes*의 총수는 pH 6.2와 6.8에서는 서로 유사한 경향으로 증가하여 배양 12-16 시간에 정점을 형성하고 느린 감소현상을 보였으나 pH 5.7에서는 배양 8시간째 매우 미약한 정점을 형성하고 감소하는 경향을 보였다(A). *In vitro* 배양 모든 시간에서 *F. succinogenes*의 총수는 pH 6.8에서 가장 높았고 다음으로 pH 6.2가 높았으며 pH 5.7에서 가장 낮았다. 그리고 박테리아 부착 비율은 초기 배양 8 시간까지 급증하고 이후로는 24 시간까지 감소하였으며 48 시간에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 총 박테리아 수에 대한 부착 *F. succinogenes*의 비율은 pH간 큰 차이는 발견되지 않았다(B).

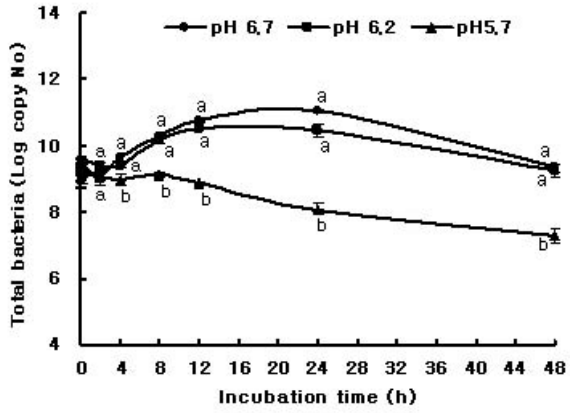
*R. flavefaciens*의 배양액내 군락 형성의 변화와 기질 부착율은 Figure 51과 같으며, 배양이 진행됨에 따른 배양액내 *R. flavefaciens* 분포 변화는 *F. succinogenes*의 경우와 유사한 경향을 보였다. *R. flavefaciens* 증식은 pH 6.2와 6.8 사이에 차이 없이 같은 경향으로 천천히 증가하여 배양 12-24 시간에 정점을 형성하고 그 후에는 느린 감소현상을 보였고, pH 5.7는 pH 6.2와 6.8보다 빠른 시점인 배양 4시간째 매우 미약한 정점을 형성하고 그 후 감소하였다(A). 배양시간동안 *R. flavefaciens*은 pH 6.8에서 가장 큰 군락을 형성하였고 다음으로 pH

6.2가 컸으며 pH 5.7에서 가장 작았다. 그리고 배양기간 동안 형성된 pH 6.8과 6.2의 박테리아 변화 곡선간 차이는 *F. succinogenes*의 경우보다 작았다. 또한 배양 시작과 함께 *R. flavefaciens* 부착율은 정점을 형성하여 12 시간까지 유지하였고, 이후 감소하였다(B). 그리고 *F. succinogenes*의 경우와 같이 pH간 *R. flavefaciens* 부착율에 차이는 발견되지 않았다.

Figure 52와 같이 *in vitro* 배양시간동안 *R. albus*의 분포변화 곡선은 *F. succinogenes*와 *R. flavefaciens*과 유사한 경향을 보였으나, pH 감소에 따른 반응은 서로 다른 특성을 보였다(A). 즉, pH간 *R. albus*의 분포변화 곡선은 *F. succinogenes*와 *R. flavefaciens*보다 좁고 완만한 기울기를 형성하였다. 그리고 부착율도 F. succinogenes와 *R. flavefaciens*과는 달리 배양 4-12시간 사이에 형성되었다(B).

이상의 결과는 배양환경 pH가 배양액내 총 박테라아의 증식에 현저한 영향을 주었고, *F. succinogenes, R. flavefaciens, R. albus* 모두 낮은 pH에서 민감한 반응을 보였다. 따라서 반추위내 *F. succinogenes, R. flavefaciens, R. albus*의 원활한 증식과 발효작용을 위해서는 pH 6.0 이상의 수준을 유지하여야만 함을 시사한다. 또한 섬유소 분해를 위한 섬유소 박테리아의 부착은 박테리아 종간 차이는 있지만 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens, R. albus* 모두 배양 초기단계에서 이루어짐을 발견할 수 있었다. 그리고 부착이 왕성한 시기의 부착박테리아의 군락은 전체군락의 90% 이상을 차지하였다.

A



B

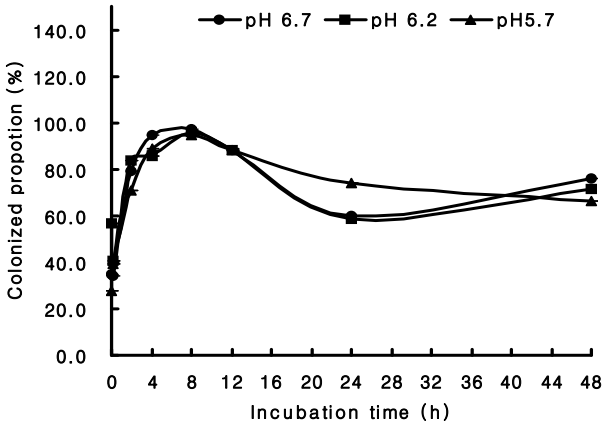
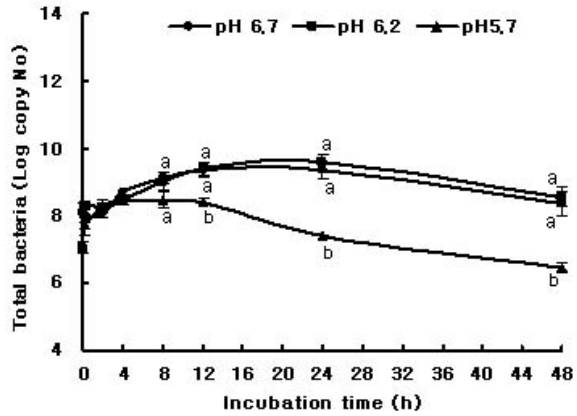


Figure 50. The total population (A) and attachment rate (B) of *F. succinogenes* in culture as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

A



B

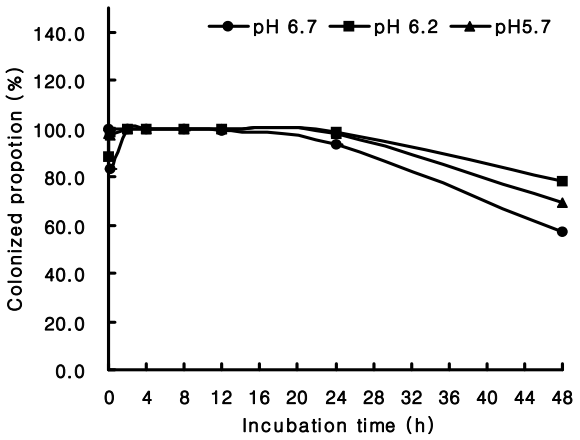


Figure 51. The total population (A) and attachment rate (B) of *R. flavefaciens* in culture as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

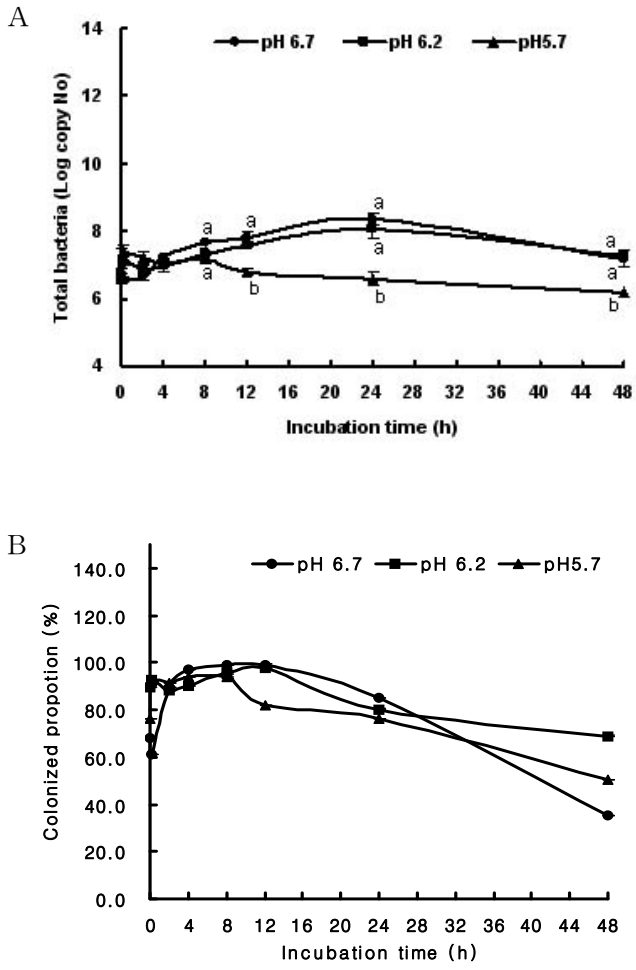


Figure 52. The total population (A) and attachment rate (B) of *R. albus* in culture as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

부착 박테리아의 경우, 세 균주 모두 pH에 따라 각각의 다른 특성을 보였으나, 배양 초기에 모든 부착 박테리아의 군락이 크게 형성되는 현상을 보였다(Figure 13, 54, 56). pH 6.2와 6.7에서 *F. succinogenes*은 배양 12 시간째 최고의 부착밀도를 보이고 서서히 감소하는 경향을 나타내었다(Figure 13). 그러나 pH

5.7에서는 배양 8시간 전에 볏짚에 부착하는 경향을 보이다 배양이 진행됨에 따라 계속 감소하였다. 전 배양기간 동안 pH 5.7, 6.2 그리고 6.7순으로 기질의 건물 g 단위당 부착 밀도가 높았는데, pH 6.2와 6.7에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, pH 5.7과는 현저한 차이를 나타냈다.

*R. flavefaciens*경우에는 *F. succinogenes*과는 달리 12, 24시간째에 최고의 부착밀도를 보이고 그 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 pH 5.7에서는 배양 4-12시간에 볏짚에 부착하는 경향을 보이다 배양이 진행됨에 따라 계속 감소하였다(Figure 54). pH 6.2와 6.7에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, pH 6.2와 6.7에서 부착 밀도가 pH 5.7보다 현저히 높았다. 그리고 배양액내 미부착 *R. flavefaciens*는 *F. succinogenes*의 경우와 유사하게 부착이 증가하는 시기에 감소하고 부착이 정점에 이르는 시기(배양 12시간)부터 증가하기 시작하여 24시간에 정점을 이루고 큰 변화 없이 48시간까지 유지되었다(Figure 55). 그러나 미부착 *R. flavefaciens*의 최저점은 *F. succinogenes*의 최저점보다 빠르게 형성되어 더 오래 지속된 후에 군집밀도가 증가되는 특이 현상이 발견되었다.

Figure 56에서와 같이 *R. albus* 경우에는 24시간째에 최고의 부착밀도를 보이고 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 pH 5.7에서는 배양 8시간에 미약한 정점을 형성하고 감소하였다. 전 배양기간 동안 전반적 경향은 *R. flavefaciens*와 *R. albus*와 유사하게 *R. albus*도 pH 5.7, 6.2 그리고 6.7순으로 기질의 건물 g 단위당 부착 밀도가 높았는데, pH 6.2와 6.7에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, pH 5.7과는 현저한 차이를 나타냈다. 그리고 Figure 57과 같이 미부착 R. albus는 12시간까지 낮은 수준을 유지하다가 배양 12시간 후부터 증가하기 시작하여 24시간에 정점을 형성하고 감소 경향을 나타냈다. 특이한 것은 배양초기 미부착 R. albus의 낮은 수준은 *F. succinogenes*과 *R. albus*의 경우보다 더 오랜 시간 지속되었다는 점이다.

따라서 이상의 결과를 통하여 *F. succinogenes, R. flavefaciens*와 *R. albus*는 pH에 따라 각각의 특성을 보였지만 pH 6.8에서 부착밀도가 가장 높았다는 사실을 알 수 있었다. 그리고 배양초기에는 부착작용이 왕성하게 이루어지는 시기로 배양액내 미부착 군락형성이 낮았다는 점도 발견하였다.

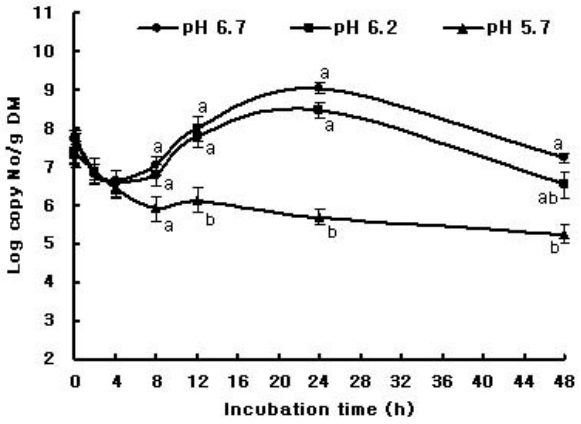


Figure 53. The unattachment of *F. succinogenes* on rice straw as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

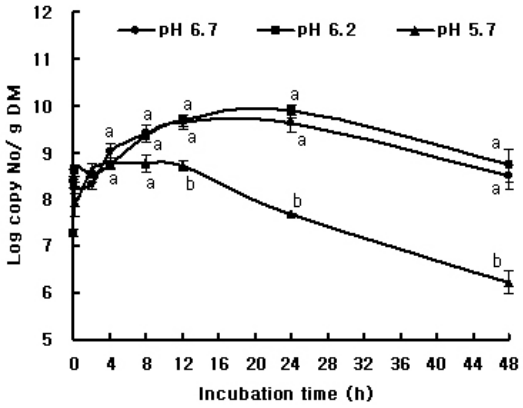


Figure 54. The attachments of *R. flavefaciens* on rice straw as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

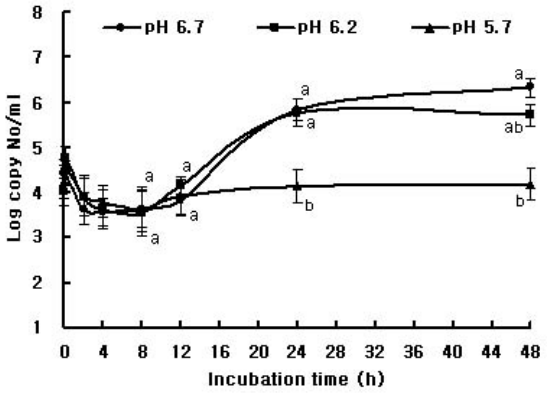


Figure 55. The unattached *R. flavefaciens* in culture fluid as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

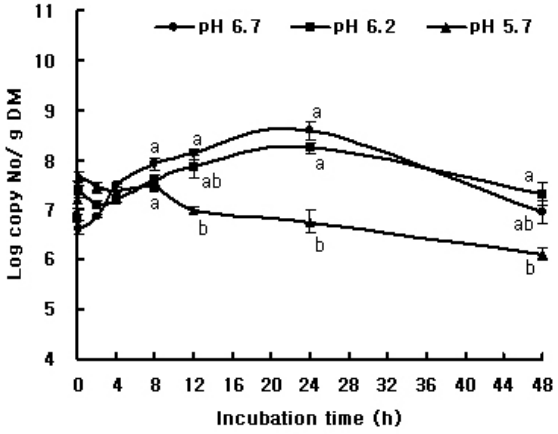


Figure 56. The attachments of *R. albus* on rice straw as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

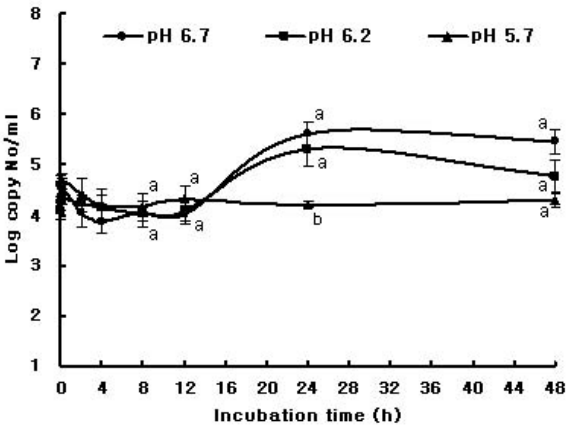


Figure 57. The unattached *R. albus* in culture fluids as influenced by different pH during the *in vitro* rumen fermentation.

7. Non-ionic surfactant인 Tween 80 와 cellulase, xylanase의 처리가 부착 미생물에 미치는 영향

가. 연구의 세부목표

Non-ionic surfactant인 Tween80는 반추위내 조사료의 소화율을 높일 수 있다는 보고와, 효소제의 처리 역시 반추위내 발효성상과 반추동물의 생산성을 높여준다는 보고를 바탕으로 이를 혼합하였을 때 조사료의 소화율이 더욱 높아질 것이며 이는 곧 미생물 부착이 이들 처리에 의해 증가되었기 때문에 나타나는 결과일 것이라는 가설을 입증하기 위함이다.

나. 연구방법

1) Non-ionic surfactant (Tween80)가 반추위내 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향

가) Non-ionic surfactant (Tween 80) 와 negative charge surfactant (SDS,

sodium dodecyl sulphate) 가 반추위내 조사료의 소실율과 미생물부착에 미치는 영향

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Tween 80 (Sigma), SDS (Sigma)

⑶ 처리방법 : Table 6에서 보는 바와 같은 수준으로 spray 처리하였으며 처리 후 손으로 섞어 주었다. 처리 volume은 timothy 1g에 2ml이 되도록 증류수와 혼합하여 처리하였고 Control은 같은 량의 증류수로만 처리하였다. 처리 후 39℃에서 24시간 안정화 시킨 다음 배양하였다.

⑷ 배양 방법 : *In situ*로써 앞의 실험과 동일하며, 6, 12, 24시간 배양하였다.

⑸ 분석 항목 : 앞의 실험과 동일하게 DM disappearance 와 24시간 미생물 부착을 측정하였다.

Table 6. The treatment levels of surfactants

Surfactant	Treatment Level(%)[1]			
Tween80	0	0.1	0.5	1
SDS	0	0.1	0.5	1

[1] The percentage of surfactant treated on rice straw (v/w).

나) Non-ionic surfactant Tween 80 의 적정 처리수준 결정

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Tween 80 (Sigma)

⑶ 처리방법 : Table 7에서 제시된 수준으로 위 실험과 동일하게 처리

⑷ 배양방법 : 배양 시간이 2, 6, 12, 24시간인 것을 제외하고는 위 실험과 동일

⑸ 분석항목 : DM disappearance

Table 7. The treatment levels of surfactants

	Treatment Level(%)[1]					
Tween80	0	0.1	0.5	1	2.5	5

[1] The percentage of surfactant treated on rice straw (v/w).

다) Non-ionic surfactant Tween 80 의 최적 처리방법 결정

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Tween 80 (Sigma)

⑶ 처리방법 : 위 실험 나)를 바탕으로 기질에 증류수 처리한 것을 대조구로, DM의 2.5%에 해당하는 Tween 80 spray 전처리 한 것을 처리구1로 배양 시작 직전 동일 량의 Tween 80을 직접 *in vitro* 배양기에 첨가한 것을 처리구2로 사용하였다.

⑷ 배양방법 (*In vitro*)

㈎ 60ml serum bottle에 대조구와 처리구1구의 timothy를 1g 첨가하고 처리구2는 Tween80를 timothy 1g에 처리하는 량 만큼 직접 첨가하였다.

㈏ 사료 급여 전 위액을 다양한 위치에서 채취하여 4겹으로 거른 후 McDougall buffer(Table 5)와 1:4 비율로 섞고 30분간 O_2-free CO_2로 bubbling 하였다. 위액과 buffer mixture를 30ml 씩 serum buttle에 분주하였고 처리구 2는 기질에 2.5%에 해당하는 Tween 80를 직접 첨가 하여 주었다.

㈐ 위액과 buffer mixture를 기질이 들은 serum bottle에 넣고 butyl rubber stopper 와 aluminium seal로 밀봉한 후 39℃에서 2, 4, 8. 12, 24, 48시간 동안 배양하였다.

⑸ 분석항목

㈎ DM digestibility : 배양액을 3,000rpm에 15분 원심분리 한 후 상층액을 먼저 filter paper (Whatman 541)로 통과 시킨 후 pellet을 filter paper로 옮겼다. Filter paper 는 60℃ drying oven에 48시간 이상 건조시키고 무게를 측정하여 배양전과 배양후의 무게 차이로 소화율을 구하였다.

㈏ Gas production : 전체 가스발생량은 serum bottle 내의 head space에 축적된 가스를 pressure transducer과 digital readout voltmeter (Laurel Electronics. USA)로 측정하였다.

㈐ pH : pH meter (Mettller Delta 340)로 측정하였다.

2) Non-ionic surfactant 와 cellulase 와 xylanase의 혼합처리가 반추위내 조사료 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향

가) Cellulase와 xylanase의 적정 처리 수준 결정

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Xylanase (Sigma), Cellulase (Sigma)

⑶ 처리방법 : Table 8에서 제시된 수준을 기질(DMg)의 2ml 수준으로 증류수에 녹여 후 spray 처리 한 후 손으로 섞어 주었다. 처리된 기질은 39℃에서 24시간 배양하였다.

⑷ 배양방법

㈎ 1.5g 처리된 기질을 nylon bag (5 X 10cm; pore size, 53um) 에 넣어 밀봉한다.

㈏ 밀봉된 nylon bag을 증류수에 맑은 물이 나올 때 까지 씻어준다.

Table 8. Levels of exogenous enzymes applied to rice straw

(Units[1]/g rice straw DM)

Treatment[2]	Xylanase[3]	Cellulase[4]
Control	0	0
T1	1	0.25
T2	5	1.25
T3	25	6.25
T4	125	31.25

[1]units : One unit will liberate 1.0 umole of glucose and xylose from cellulose and xylan respectively.

[2]Control : untreated rice straw, T1, T2, T3, and T4 : enzyme treated rice straw.

[3]Xylanase from *Thermomyces lanuginous*, powder form (2.5 unit/mg solid).

[4]Cellulase from *Trichoderma reesei* and lyophilized powder form (1 unit/mg solid).

나) Tween 80 와 exogenous enzyme 그리고 혼합처리가 반추위내 조사료 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향 (*In situ*)

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Tween 80, enyzme, mixture (Tween80 +enzyme)

⑶ 처리 방법 : 위 실험을 바탕으로 기질에 2.5% 에 해당하는 Tween 80 (v/w), 5 Units xylanase + 1.25 Units cellulase 그리고 이들의 혼합물을 처리구로 하였고 기질(DMg)에 2ml의 증류수에 녹여 spray 처리하였다. 대조구는 같은 volume의 물로 처리하였다. 처리 후 39℃에서 24시간 배양하였다.

⑷ 배양방법

㈎ nylon bag에 배양된 처리구와 대조구를 각각 1.5g 씩 넣었다.

㈏ 모든 nylon bag 은 사료급여 직전의 Holstein steer에 fistula를 통하여 배양을 시작하였다.

㈐ 1, 5, 30분, 2, 6 12, 24시간동안 배양한 후 꺼내어 증류수를 이용하여 맑은 물이 나올 때까지 mild하게 washing을 한 후 분석하기 전까지 -20℃에 냉동 보관하였다.

⑸ 분석항목

㈎ DM disappearance : 배양된 nylon bag을 freeze dryer 로 건조 시킨 후 배양 전의 무게와 배양 후의 무게의 차로 DM 소실율을 구했다.

㈏ NDF disappearance : NDF의 양은 ANKOM® NDF analyzer를 이용하여 분석하였고 DM 량을 고려하여 소실율을 계산하였다.

㈐ Microbial attachment : Real Time PCR을 이용하여 앞의 방법과 동일하게 측정하였다.

다) Tween 80 와 exogenous enzyme 그리고 이들의 혼합물의 적정 처리 방법 결정

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Tween 80, enyzme, mixture (Tween80 +enzyme)

⑶ 처리 방법 : 물처리한 것을 대조구로하고 기질 DM의 2.5%에 해당하는 Tween 80 (PT), 5 Units xylanase, 1.25 Units cellulase (PE), 이들의 혼합물 (PTE)을 spray 전처리 하였고, 배양 시작 직전 같은 량의 Tween 80 (AT), xylanase와 cellulase (AE), 이들의 혼합물 (ATE)을 직접 첨가 한 것을 처리구로 사용하였다.

⑷ 배양방법 : 위의 실험과 동일하게 배양은 0, 3, 6, 12, 24시간 실시하였다.

⑸ 분석항목 : *In vitro*로써 앞의 실험 1)과 동일하게 실시하였고 추가적으로 VFA production과 CMCase, xylanase enzyme activity를 측정하였다.

㈎ VFA production : 배양액을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액 1ml을 취하여 25% metaphosphoric acid 0.2ml과 섞어 30분간 정치시키고 분석하기 직전까지 -20℃에 보관하였다가 GC(HP 6890)을 이용하여 분석하였다.

㈏ CMCase, Xylanase : 배양액을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 분석하기 직전까지 -20℃에 보관하였다. 0.5ml 의 1% CMC와 xylan과 샘플 0.2ml 을 39℃에 1시간 반응 시킨 후 DNS 용액 0.75ml을 넣어 발색하고 5분간 끓여 반응을 멈춘다. 12,000rpm으로 10분간 원심분리한 후에 spectrophotometer를 이용하여 cellulase는 540nm, xylanase는 595nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard 로써 glucose와 xylose를 사용하였다.

3) Tween 80 와 exogenous enzyme 의 혼합처리가 반추동물의 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향

가) *In vivo* 용 commercial enzyme (cellulase, xylanase) 의 역가 측정

⑴ Enzyme : Table 9에서 보는 바와 같은 enzyme을 이용하였다.

⑵ 실험 방법 : enzyme의 역가 측정은 위 실험과 동일하게 진행하였으며, Sigma enzyme과 commercial enzyme을 동량 취하여 측정하고 계산하였다.

Table 9. Sigma enzymes and commercial enzymes

Sigma	Cellulase	Sigma C8546
	Xylanase	Sigma X3876
Commercial	Cellulase	novozymes (celluclast®)
	Xylanase	finnfeeds (porzyme®)

나) Commercial enzyme 과 Tween 80 의 처리가 반추위내 발효성상에 미치는 영향

⑴ 기질 : 0.5mm ground timothy

⑵ 처리 : Tween 80, enyzme, mixture (Tween80 +enzyme)

⑶ 처리 방법 : 물처리를 대조구로 사용하였고, 처리구로는 Table 10에서 보는 바와 같다.

⑷ 배양 방법 : 앞의 실험 1)과 동일하게 진행하였고 배양은 3, 6, 12, 24시간 동안 하였다.

⑸ 분석 항목 : *In vitro*로써 앞의 실험 1)과 동일하게 DM, pH, gas production을 분석하였다.

Table 10. Treatments

Treatment	1/2T, T, 1/2E, E, 1/2T+1/2E, 1/2T+E, T+1/2E, T+E

T : 2.5% Tween 80 / substrate DM

1/2 T : 1.25% Tween80 / substrate DM

E : 5Units xylanase, 1.25Units cellulase / substrate DM

1/2 E : 2.5Units xylanase, 0.625Units cellulase / substrate DM

다) *In vivo* 실험을 통한 Tween 80 와 commercial enzyme의 혼합 동시 전처리가 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향

⑴ 공시동물 : cannula가 장착되 Holstein 수소 4두를 공시하였다.

⑵ 처리

㈎ Control : 10 ~ 15cm 로 세절된 Timothy kg 당 200ml의 물을 spray 처리하여 24시간, 39℃에서 배양한 후 급여하였다.

㈏ 1/2T+E : 1.25% Tween 80 와 5Units xylanase, 1.25Units cellulase 를 Timothy kg 당 200ml 의 물에 녹여 spray 처리 한 후 24시간, 39℃에서 배양한 후 급여하였다.

⑶ 실험디자인 : 2 X 2 Latin square design

⑷ 공시사료 : Timothy와 농후사료를 공시사료로 사용하였으며 6:4의 비율로 체중의 2%를 하루에 2회 (0800, 1700)로 나누어 급여하였다.

⑸ 사료적응기간 : 10일

⑹ 본시험기간(시료채취) : 6일(11~16일째날)

㈎ 분 채취 : 11, 12, 13일째날 오전 사료 급여전 대사틀에 모든 분을 긁어

분통에 넣어 준 후 분통을 빼내어 무게를 측정하였다. 시험시작 전 측정해 놓은 분통의 무게를 빼어 분의 무게를 측정하였다. 측정 후 분을 사각 삽을 이용하여 고루 섞는다. 섞은 후 넓게 퍼트린 후에 10군데에서 sample을 취하여 60℃, 48시간 건조 하여 분 DM을 측정하였다. 분 sample과 급여하는 농후사료, 조사료의 일반성분을 의뢰하였다.

㈏ 위액 채취 : 14일째날 오전 사료급여 직전(0시간)과 급여 후 2, 4, 8시간 dorsal, ventral, anterior에서 100ml을 각각 취한 후 잘 섞고 다시 50ml을 sampling 하여 corning tube에 넣고 -20℃에 냉동시켰다.

㈐ *In situ* (다섯째날, 6째날)

본시험기간 둘째날 1mm로 분쇄한 timothy를 준비하여 저녁 9시에 처리하여 39도에서 24시간 배양한다. nylon bag을 건조하여 무게를 측정하였다. 본시험기간 셋째날 저녁 9시 배양을 멈추었다. 넷째날 처리별 사료를 nylon bag에 1.5g 씩 넣고 양파망에 겹치지 않게 넣어 *in situ* 배양 준비를 완료하였다. 다섯째날 사료 급여 직전 bag을 넣어 Table 11과 같이 배양을 시작하였다.

Table 11. *In situ* experiment design

Time	0, 15, 30min, 2, 6, 12, 24hr
Rep	3
Treatment	water treated timothy 1/2T+E treated timothy

1/2T+E : 1.25% Tween80 + 5Units xylanase+1.25Units cellulase / DMg

⑺ 분석 항목

㈎ 건물소화율 (DM digestibility) : 동물이 배설한 분의 양을 측정하고 분을 골고루 섞은 다음 분을 채취하였다. 채취한 분은 60℃ drying oven 에 48시간 이상 건조시킨 후 무게를 측정하여 분의 건물함량을 구하였다. 그리고 건조된 분을 Wiley mill (1mm)로 분쇄하여 분의 CP, EE, NDF, ADF를 분석하였다.

㈏ pH : 오전 사료급여전과 급여후 0, 2, 4, 8시간에 4겹의 cheese cloth로 걸

러 위액을 채취하여 바로 pH meter로 pH를 측정하였다.

㈐ VFA : pH를 측정한 후 위액을 2ml 취하여 12,000rpm 10분 원심분리 한 후 1ml을 다시 취한다. 여기에 25% metaphosphoric acid 0.2ml를 넣어 30분 정치시킨 후 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.

㈑ CMCase, Xylanase : 위액을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 분석하기 직전까지 -20℃에 보관하였다. 0.5ml 의 1% CMC와 xylan과 샘플 0.2ml 을 39℃에 1시간 반응 시킨 후 DNS 용액 0.75ml을 넣어 발색하고 5분간 끓여 반응을 멈춘다. 12,000rpm 10분 원심분리한 후에 spectrophotometer를 이용하여 cellulase는 540nm, xylanase는 595nm에서 측정한다. Standard 로써 glucose와 xylose를 이용하였다.

㈒ 시험결과에 대한 통계분석은 SAS package(1996)의 분산분석 (ANOVA or GLM)을 이용하고, 각 처리구별 유의성 검정은 T-Test, LSD를 이용하였다.

다. 연구결과

1) Non-ionic surfactant (Tween80)가 반추위내 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향

Figure 58와 59은 surfactant의 종류와 수준이 볏짚의 DM 소실율에 미치는 영향을 보여주고 있다. 24시간 *in situ* 배양 결과 Tween80의 1%처리 (29.41%)는 control (27.01%) 에 비해 볏짚의 소실율을 높였다. 그러나 다른 성격의 Surfactant 인 SDS는 DM 소실율을 낮추는 경향을 보였다 (Figure 59). 특히 24시간 배양 후에 1% SDS 처리 (23.62%) 는 control (29.13%) 에 비해 DM 소실율을 약 5%나 낮추었는데 이와 같은 결과는 Eriksson et al. (2002) 의 보고에서도 볼 수 있다. 중성이온인 Tween 80는 강한 hydrophobic interaction에 의하여 조사료의 lignin 부분을 둘러쌓게 되고 이것은 반추위내 미생물에 의하여 조사료의 cellulose 또는 hemicellulose를 분해하는데 더욱 수월하게 만들어 준다. 또한, 중성이온 Surfactant는 enzyme들이 기질에 완전히 흡수되는 것을 줄여주며, 그러므로 enzyme과 기질의 반응이 계속적되도록 유지 시켜준다 (Kim et al.

2006). 하지만 반대로, negative 이온을 띄고 있는 Surfactant 인 SDS와 같은 경우는 상대적으로 negative charge를 갖는 enzyme이나 미생물의 가질과의 반응을 방해한다 (Ericksson et al. 2002).

24시간 배양 후에 측정한 미생물 부착 정도를 보면, DM의 증가에도 불구하고 Tween 80의 1% 첨가는 비록 수치적으로는 높은 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다 (Figure 60). 반면에 SDS는 처리 수준이 높으면 높을수록 *Fibrobacter succinogenes*의 부착을 유의적으로 낮추었다(수준별 각각 11.27, 11.09, 10.84, 10.52 Log copyNO./gDM). *Ruminococcus*는 SDS 1% 첨가로 부착정도가 낮아지는 경향이었다. Tween 80와 SDS 실험에서 *Fibrobacter succinogenes* 는 다른 섬유소 분해 박테리아에 비하여 더 Surfactant에 민감한 반응을 보이고 있는 것을 알 수 있다. 하지만 반추위 미생물의 조사료 분해를 위해서는 부착이 필수적이고 그 부착은 초기에 이루어진다(Koike et al. 2003)는 것을 고려한다면 24시간 배양 후의 미생물 부착으로 섬유소 분해 미생물의 부착 정도와 성격과 조사료 분해 사이에 관계가 있다고 단정하기는 어려움이 있는 것이 사실이다.

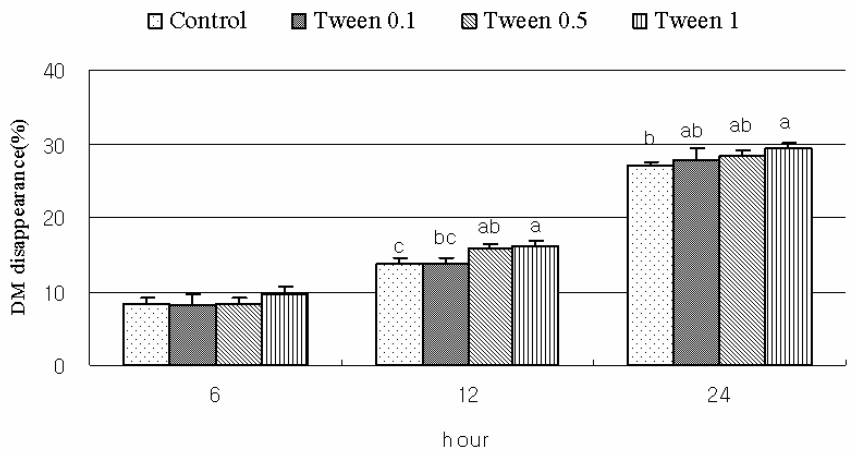


Figure 58. Effect of level of Tween80 on DM disappearance of rice straw.

Tween 0.1, 0.5 and 1 : the levels (%) of Tween80 applied to rice straw (based on gDM).

a, b : means with different letters differ ($p<0.05$).

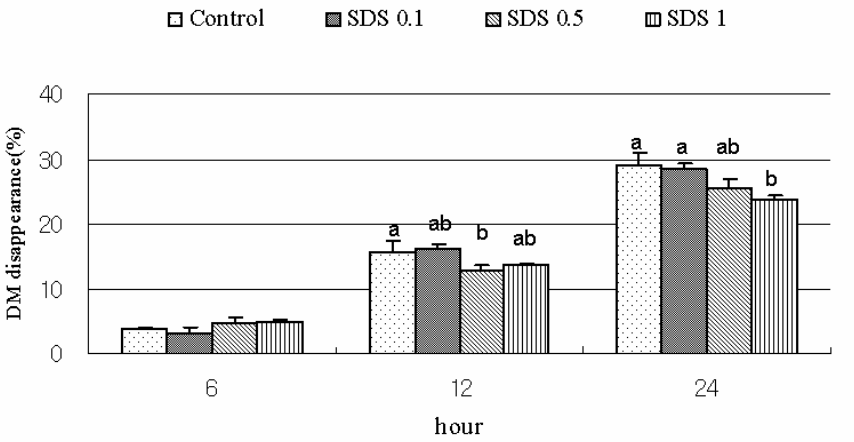


Figure 59. Effect of level of SDS on DM disappearance of rice straw.

SDS 0.1, 0.5 and 1 : the levels (%) of SDS applied to rice straw (based on gDM).

a, b : means with different letters differ ($p<0.05$).

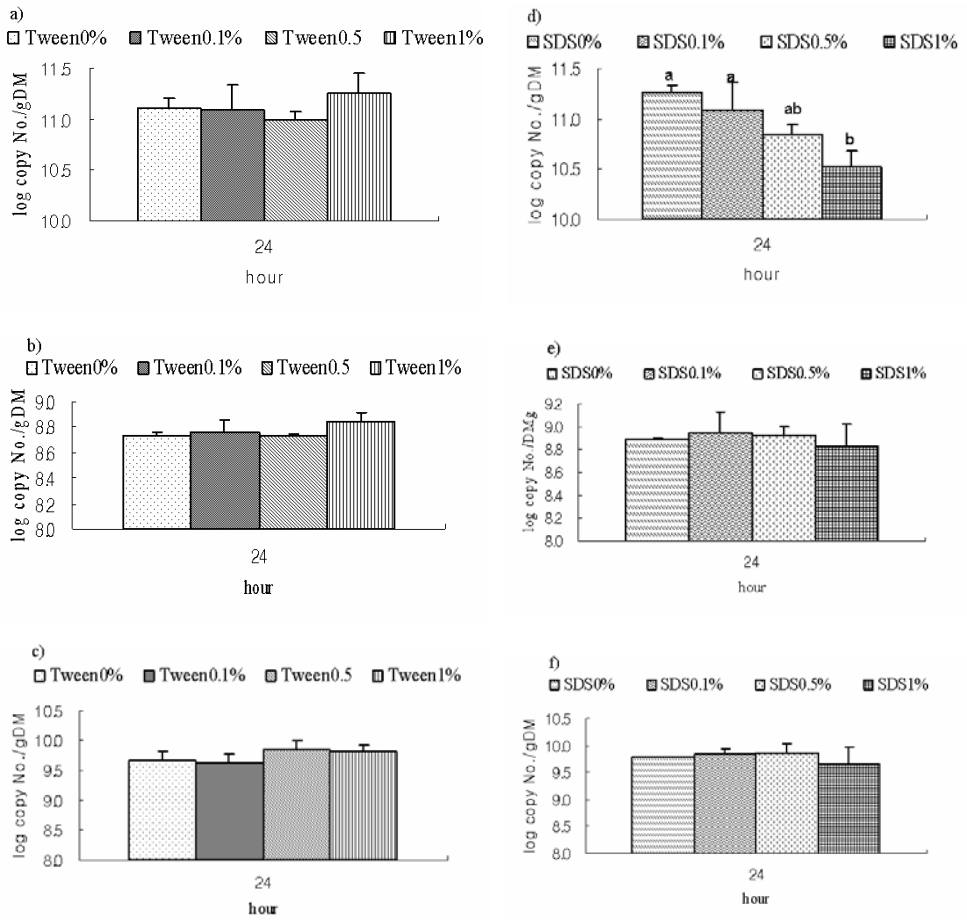


Figure 60. Cellulolytic bacterial adhesion to rice straw after 24 hours incubation.

a), b), c) : Tween80 treatment; d), e), f) : SDS treatment; a), d) : Copy numbers of *Fibrobacter succinogense*; b), e) : Copy numbers of *Ruminococcus albus*; c), f) : Copy Numbers of *Ruminococcus flavefaciens.* a, b : means with different letters differ ($p<0.05$).

위의 실험에서 Tween 80 의 전처리가 조사료의 DM 소실율을 높이는 결과를 보이고 있으나 이 차이는 매우 제한적이라고 할 수 있다. 그러므로 기질의 1%까지 처리했던 Tween 80를 2.5%, 5%까지 늘려서 처리하여 적정 처리 수준을 결정하였다. 그 결과 2.5% Tween80 (33.3%) 처리는 control (30.7%) 과 1% 처리 (30.94%) 보다 DM 소실율을 높였으며, 5% 처리된 timothy (32.8%) 와 비슷한 소실율을 나타내었다. 또한 2.5% Tween 80는 처리 조사료 다른 수준의 처리 조사료에 비해 전 배양 기간 동안 더 높은 DM 소실율을 유지하였다 (Figure 61). 그러므로 다음에 실시되는 실험에서의 Tween 80의 처리수준을 기질의 2.5%로 결정하였다.

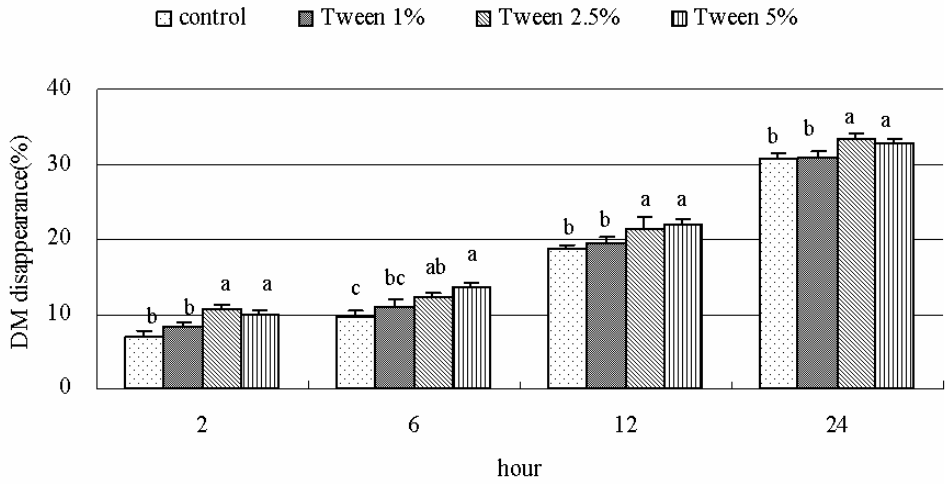


Figure 61. DM disappearance of rice straw as affected by level of Tween80.

a, b, c : means within with different letters differ ($p<0.05$)

이번 실험에서는 Tween 80의 처리 방법에 대하여 비교하는 실험을 실시하였다. 보고에 의하면, 지금까지 Tween 80의 첨가는 반추동물에 급여 직전 첨가 하는 방법 (Lee et al. 2004; Kim et al. 2006; Goto et al. 2003) 과 급여 전 사료에 전처리하여 준비하는 방법 (Kim et al. 2005) 으로 나눌 수 있다. 급여 시 사료에 top dressing 하거나 cannula를 통하여 직접 넣어 주는 방법이 더 일반적이며, 반추위 volume의 0.05, 0.1, 0.2%에 해당하는 Tween 80를 첨가하면 반추 발효

환경을 좋게 만든다고 보고된 바 있다 (Lee et al. 2004). 하지만 지금까지 처리 방법에 따른 반추위내 Tween 80의 효과를 검증한 실험이 된 바 없으며, 다음의 실험 결과는 전처리와 직접첨가가 *in vitro* 환경에서 반추위 발효환경에 미치는 영향을 보여주고 있다.

Tween 80이 전처리는 *in vitro* 배양 기간에 상관없이 DM 소화율을 향상시켰다(Figure 62). 특히 초기 Time (4시간) 에서의 전처리의 효과 (5.51%) 는 control (1.51%, $p<0.05$)과 직접 첨가 (4.47%) 비교 했을 때 뛰어난 수준을 보이고 있었다. 또한 Tween 80의 직접 첨가 역시 control 보다 높은 소화율을 보였다 ($p<0.05$). Tween 80를 직접 첨가하면 DM 소화율이 시간이 지날 수록 control과 비슷해지는 반면, Tween 80를 전처리하면 48시간까지 더 높은 소화율을 유지하였다. 이 결과는 Goto et al. (2003)의 보고에 의하여 설명될 수 있다. Tween 80는 반취위내 박테리아 중 *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* 그리고 *Megasphaera elsdenii* 와 같은 전분분해 미생물이나 lactate 이용 미생물의 의해 분해가 될 수 있다. 즉, Tween 80는 반추위내에서 시간이 지나면 분해되어 없어진다는 것이다. 그러므로 Tween 80를 직접 첨가한 것은 시간이 지날수록 그 능력이 사라졌다고 설명할 수 있고, Tween 80의 전처리는 전처리해서 24시간 안정화 시키는 과정에서 조사료와 hydrophobic interaction으로 강하게 결합해 있기 때문에 시간이 지나도 그 효과가 크게 떨어지지 않음을 알 수 있다. 그러므로 Tween 80의 전처리가 반추위내 건물 소화율에 더 탁월하다고 말할 수 있다.

Gas production과 pH 는 Tween 80의 처리 방법에 의해 큰 영향을 받지 않았다 (Table 12, 13). 이는 물론 기질로 조사료만을 사용했기 때문일 수도 있지만, Tween 80가 반추위 발효 성상에 최소한 악영향은 미치지 않았다고 판단할 수 있다. 다시 말해서, Tween 80로 조사료를 전처리하여 급여한다면, 반추위에 나쁜 영향을 주지 않으면서 건물 소화율을 향상시키면서 나아가 생산성 (우유, 고기)을 향상시킬 것으로 기대할 수 있다.

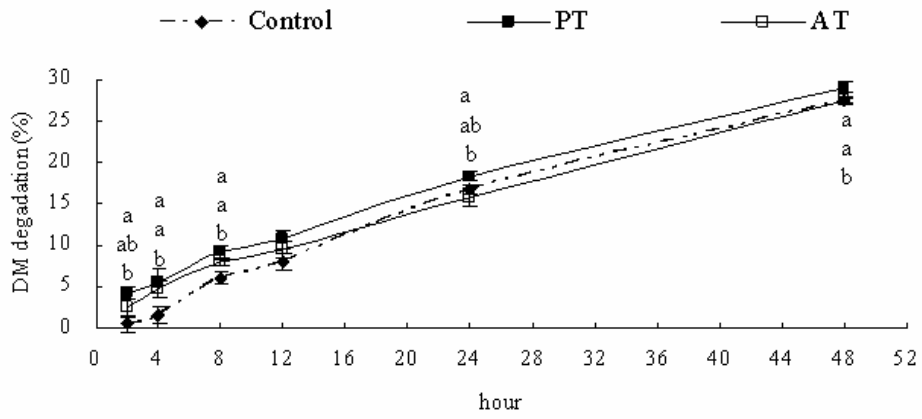


Figure 62. *In vitro* DM degradation of rice straw as affected by application method of Tween80. PT : pretreatment of 2.5% Tween80; AT : Addition of 2.5% Tween80 to medium.
a, b, c : means different letters differ ($p<0.05$).

Table 12. pH changes as influenced by application method of Tween80 to rice straw

Time	Control	PT[1]	AT	SEM[2]
0	6.74	6.73	6.74	0.003
2	6.71	6.71	6.71	0.000
4	6.71a	6.71a	6.7b	0.002
8	6.64	6.66	6.66	0.006
12	6.60	6.62	6.63	0.006
24	6.47b	6.52a	6.51a	0.008
48	6.23	6.23	6.24	0.005

ab means wthin the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).
[1]PT, pretreatment; AT, addition.
[2]SEM, standard error of means.

Table 13. Gas production (ml) as influenced by application method of Tween80 to rice straw

Time	Control	PT[1]	AT	SEM
2	4.85	6.09	5.86	0.35
4	7.91	7.79	8.44	0.16
8	16.49	15.59	15.94	0.24
12	22.05a	20.71b	20.68b	0.24
24	38.87a	37.02b	35.09c	0.58
48	63.80	63.53	58.59	1.16

ab means wthin the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).

[1]PT, pretreatment; AT, addition.

[2]SEM, standard error of means.

2) Non-ionic surfactant 와 cellulase 와 xylanase의 혼합처리가 반추위내 조사료 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향

먼저 enzyme 의 수준을 결정하기 위하여 많은 보고들을 참고 하였다 (Goto et al. 2003; Wang et al. 2003; Baah et al; 2004; Kim et al. 2004). 또한 xylanase와 cellulase의 적정 혼합 비율은 Lee et al (2004)의 보고를 기초로 하였다.

Figure 63는 enzyme의 처리 수준이 높아질 수 록 볏짚의 soluble한 부분이 많이 생기는 것을 알 수 있었다. T4에 경우 (9.96%, $p<0.05$) soluble part가 가장 많이 생겨났다. 그러나 다음 후속적인 실험들에서 T2의 수준을 선택한 것은 최소한의 enzyme으로 조사료 조직의 일부 파괴를 유도하고 그에 따른 반추미생물의 부착을 유도하기 위함이었다.

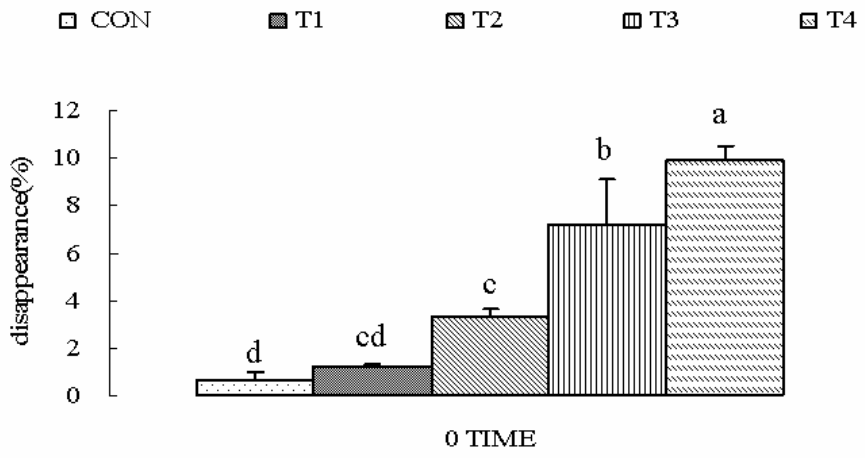


Figure 63. Solublized DM from rice straw after 24 hours pre-incubation with different levels of enzymes at 39℃. CON : control, no treatment of enzymes; T1 : xylanase 1U and cellulase 0.25U; T2 : xylanase 5U and cellulase 1.25U; T3 : xylanase 25U and cellulase 4.25U; T4 : xylanase 125U and cellulase 31.25U.
Unit : One unit will liberate 1.0 umole of glucose and xylose from cellulose and xylan, respectively.
a, b, c, d : means with different letters differ ($p<0.05$).

위 enzyme 의 수준 결정을 바탕으로 Tween 80와 enzyme 그리고 이들의 혼합처리가 미생물 부착과 조사료 소화율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *in situ* 실험이 실시되었다. 이 실험결과 enzyme의 단독 전처리가 배양시간에 상관없이 동안 가장 높은 소실율을 보였다 ($p<0.05$) (Figure 64). 특히 12시간 배양 후에는 enzyme 단독 처리 (21.44%) 가 control (17.36%) 보다 약 4%나 높았으며, Tween 80 처리와 enzyme과 Tween 80의 혼합처리 역시 control 보다 소화율이 높았다 ($p<0.05$). 이 실험에서 Tween 80와 enzyme의 혼합처리가 가장 DM 소실율이 높을 것으로 예상하였으나 결과는 이와 같지 않았다. 이 결과는 Kim et al (2004)의 보고와 비슷한 결과를 보이고 있는데, Tween 80나 Tween 80와 enzyme의 혼합처리는 DM 소화율에 영향을 주지 못했으나 enzyme 단독처리는 *in vitro* 소화율 향상에 효과가 있다고 하였다.

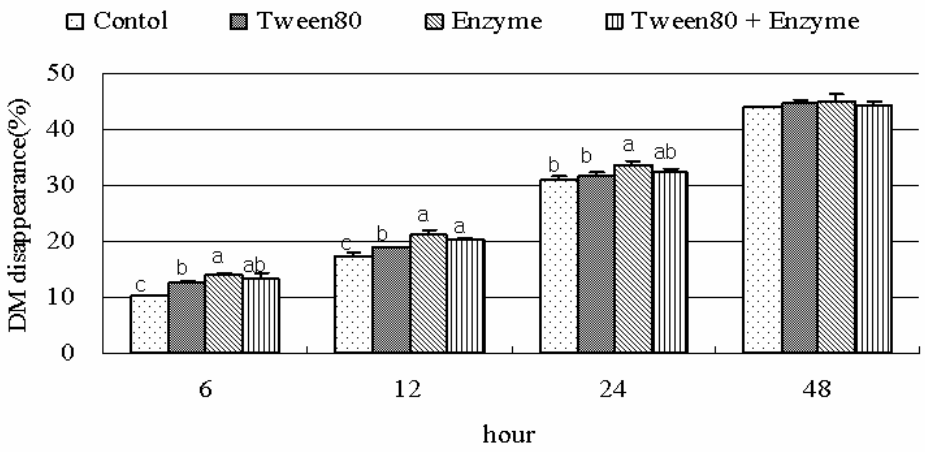


Figure 64. DM disappearance of rice straw treated as influenced by Tween80, enzyme and their mixture. Control : Water - treated rice straw; Tween80 : water and 2.5% (v/w) Tween80 - treated rice straw; Enzyme : water and enzymes (5U xylanase, 1.25U cellulase) treated rice straw; Tween80 + Enzyme : water and mixture of Tween80 and enzymes treated rice straw.

a, b, c : means with different letters differ ($p<0.05$).

NDF 소실율 역시 DM 소실율과 비슷한 경향을 보이고 있었다 (Figure 65). NDF 역시 12시간 배양시에 enzyme 의 단독 처리가 가장 높은 소실율을 나타냈다. 24시간 동안 반추위내에서 소실된 NDF 량을 비교하여 보면 Tween 80와 enzyme의 혼합처리가 enzyme만 처리한 것보다도 높은 경향이었다. 이는 24시간 배양하는 동안 Tween 80가 xylanase와 cellulase의 활력을 높였다고 설명할 수 있다. 하지만 반추위 내에서는 효과가 예상만큼 크지 않았는데 이는 앞에서 설명한 바와 같이 Tween 80를 분해할 수 있는 미생물이 반추위내에 많이 있고 또 처리된 Tween 80와 enzyme이 기질로부터 탈락될 가능성이 많이 있을 것으로 예상된다. 이로 미루어 봤을 때 *in situ* 실험으로는 혼합처리의 효과를 보기 힘들 수 있다고 판단된다.

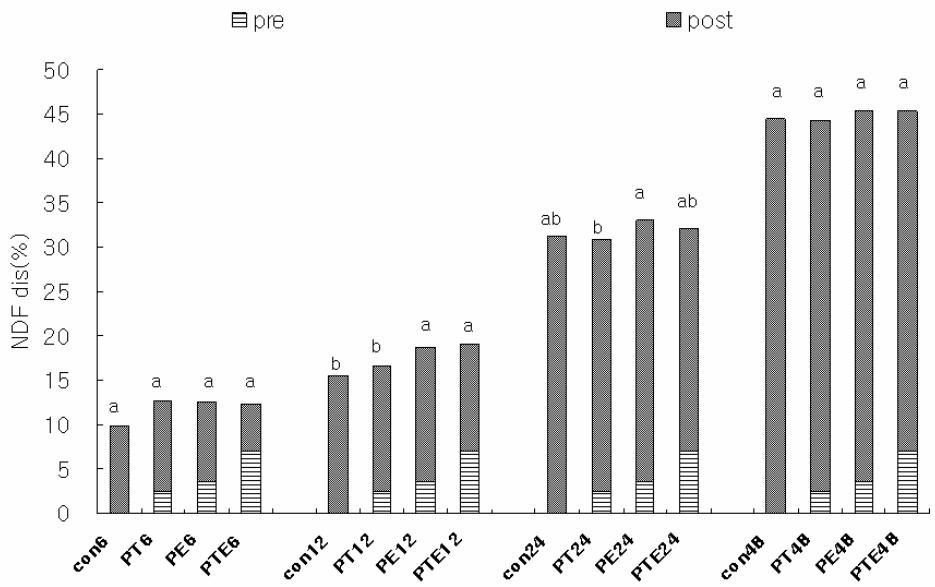


Figure 65. NDF disappearance of rice straw as influenced by Tween80, enzyme and their mixture. Pre : NDF disappearance by pre-treatment before ruminal incubation, Post :NDF disappearance during ruminal incubation. Con : control, PT : pre-treatment of Tween80, PE : pre-treatment of enzymes and PTE : pre-treatment of the mixture (Tween80 + enzyme). a, b : means with different letters differ ($p<0.05$).

위의 *in situ* 실험에서 나온 샘플을 이용하여 섬유소 분해 박테리아 (*Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens*)의 부착을 측정하였다. Koike et al (2003)에 의하면 섬유소 분해 박테리아는 10분 내에 거의 모두 부착을 마치고 6시간까지 조금씩 증가하다가 24시간이 지나면 부착이 떨어진다고 보고하고 있다. 이번 실험에서는 2시간까지 급격이 섬유소 분해 미생물이 증가하였고 12시간까지 서서히 증가하는 모습을 관찰 할 수 있었다 (Figure 67).

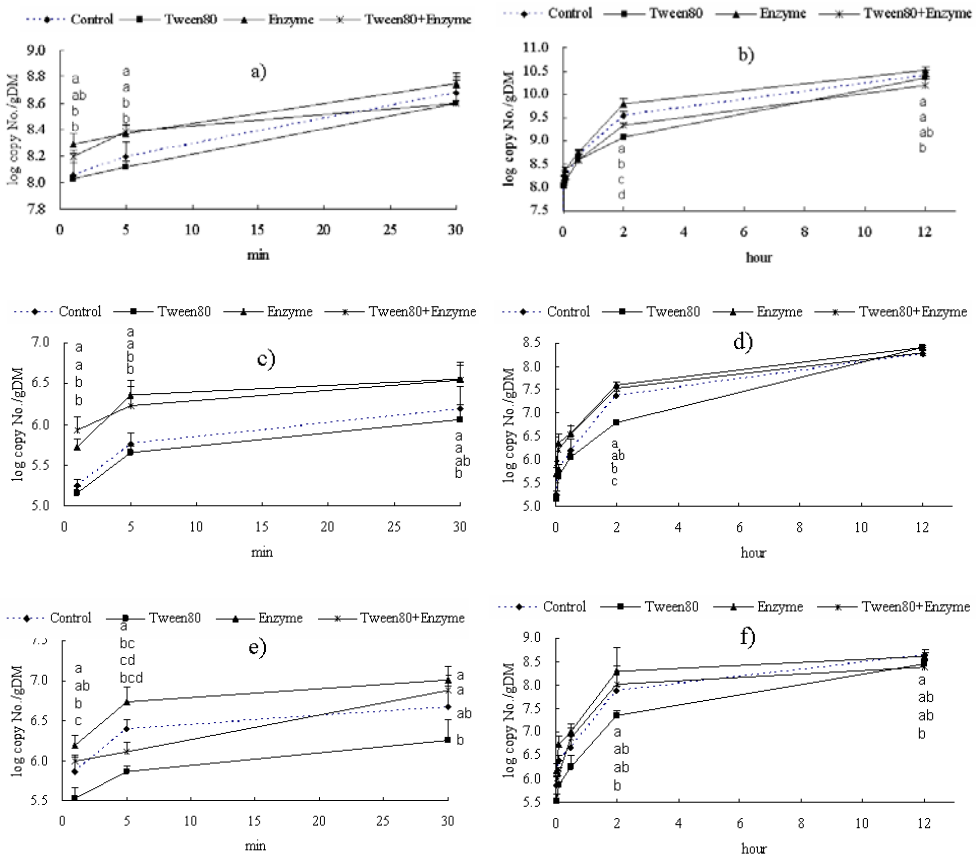


Figure 66. Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to rice straw as influenced by Tween80, enzyme and their mixture. a), b) : Adhesion of *Fibrobacter succinogenes*; c), d) : Adhesion of *Ruminococcus albus*; e), f) : *Ruminococcus flavefaciens*; a), c), e) adhesion of bacteria according to min time incubation; b), d), f) adhesion of bacteria according to hour time.
a, b, c, d : means with different letters differ ($p<0.05$)

Figure 66에서 보는 바와 같이 섬유소 분해 박테리아의 부착은 처리에 의해 영향을 크게 받았다. Enzyme 단독 처리는 섬유소 분해 박테리아 3가지 모두의 부착을 증가시켰다. 하지만 12시간 이후에는 처리에 상관없이 섬유소 분해 박테리아의 부착율은 비슷한 수준을 유지하였다. 이는 Figure 60에서 와 마찬가지로 Tween 80와 enzyme은 반추위의 계속적인 운동에 의하여 씻겨나갔을 것이며, 특

히 Tween 80의 경우 반추위내 여러 박테리아에 의하여 분해 되었고, 처리된 enzyme은 반추위내 proteolytic enzyme에 의해 그 활성을 잃었기 때문이라고 생각된다 (Goto et al. 2003; Morgave et al. 2001). 이는 다시 말해서 초기 부착시의 효과가 이 실험에서 처리한 물질에 의한 효과라 말 할 수 있다. Figure 66는 몇가지 중요한 정보를 제공해 주고 있다. 첫째로 enzyem 처리로 가장 높은 미생물의 부착을 유도할 수 있었다. 둘째로 Tween 80는 미생물의 부착을 유도하는데 실패하였다. 최근 많은 보고에서 Tween 80가 반추위 내 발효성상을 좋게 만들고, 소화율과 생산량 또한 높여준다는 보고 (Wang et al. 2003; Lee et al. 2004; Kim et al. 2006)가 있어서, Tween 80가 미생물의 부착을 높일 것이라고 추측하였다. 하지만 이번 실험에 Real-Time PCR을 이용하여 섬유소 분해 미생물을 측정한 결과 Tween 80는 섬유소 분해 미생물의 부착을 방해하는 작용을 하고 있었다. 또한 Tween 80와 enzyme의 혼합처리는 control과 비슷한 수준을 보이고 있는데 이는 enzyme의 전처리 24시간은 박테리아가 부착할 수 있도록 하였지만, Tween 80에 의하여 섬유소 분해 박테리아의 부착이 억제되었다고 해석할 수 있다. 이는 Dehority et al (1980) 가 Surfactant를 위액에 첨가하면 Total viable bacteria의 량을 증가시켰다는 내용과 의미를 같이 한다. 하지만 Tween 80는 DM과 NDF 소실율과 소화율을 향상시킨다고 앞의 여러 실험을 통해 입증한 바 있다. 그러므로 Tween 80는 미생물의 부착을 증가시키는 방법이 아닌 다른 기전을 통해 조섬유 분해를 향상킨다고 판단할 수 있다.

Table 14와 Figure 67은 Tween 80, 효소 또는 이들의 혼합물을 첨가하는 방법 (전처리 혹은 직접 급여)이 소화율에 미치는 영향을 보여주고 있는데 전처리가 직접급여방식에 비해 대체적으로 우수한 결과이었다.

Table 14. DM digestibility(%) as influenced by pre-treatment of rice straw or direct addition of Tween80, enzyme and their mixture to incubation medium

Treatment[1]	0h	3h	6h	12h	24h
Control	6.28	10.28	11.42 ab	15.43	17.37 b
PT	8.38	11.53	13.77 ab	16.18	21.02 a
PE	9.15	10.45	13.06 ab	16.14	17.66 b
PTE	9.34	12.88	14.53 a	16.88	19.73 ab
AT	7.97	9.81	10.68 b	16.47	17.92 ab
AE	7.26	9.74	11.33 ab	17.02	17.69 b
ATE	7.92	11.36	12.92 ab	14.58	17.85 ab
SEM	0.51	0.44	0.41	0.33	0.39

[1]Control : water - treated rice straw; PT : Tween80 - pretreated rice straw; PE : Enzyme - pretreated rice straw; PTE : The mixture of Tween80 and enzyme - pretreated rice straw; AT : Tween80 - directly added rice straw; AE : enzyme - directly added rice straw; ATE : The mixture of Tween80 and Enzyme - directly added rice straw.

a, b Wthin a column, means with different superscripts differ ($p<0.05$).

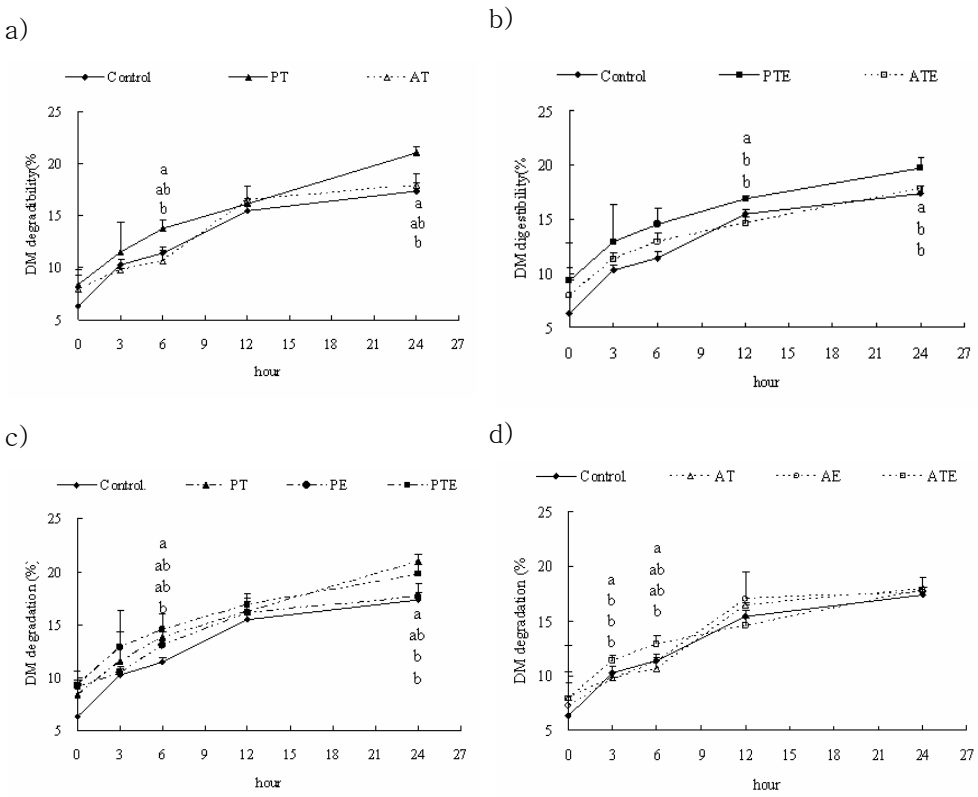


Figure 67. DM digestibility(%) as influenced by application method of Tween80, enzyme and their mixture. Control : water - treated rice straw; PT : Tween80 - pretreated rice straw; PE : enzyme - pretreated rice straw; PTE : The mixture of Tween80 and Enzyme - pretreated rice straw; AT : Tween80 - directly added rice straw; AE : enzyme - directly added rice straw; ATE : The mixture of Tween80 and enzyme - directly added rice straw. a), b) : DM digestibility on different treatment ways and same treatment material; c), d) : DM digestibility on the same treatment way and the different treatment materials.

a, b : means with different letters differ ($p<0.05$).

Figure 67에서 보는 바와 같이 Tween 80와 enzyem의 혼합 물질을 전처리하였을 때 가장 높은 DM 소화율을 보였다. 이 결과는 위 *in situ* 실험에서와 다른 경향을 보이고 있는데 이는 앞에서 설명한 바와 같이 *in vitro* 상에서는 Tween 80나 enzyme이 빠져 나가더라도 인공 반추위인 serum bottle에 계속 남아 작용을 하고 있기 때문인 것으로 추측할 수 있다. 이는 Tween 80가 같이 처리해 준 enzyme 또는 반추위 미생물의 섬유소 분해 enzyme과 어떤 interaction을 함으로써 소화율을 높였다고 생각할 수 있다. 결론적으로 *in vitro* 환경에서 Tween 80와 enzyme의 혼합 전처리가 DM 소화율에 가장 좋은 효과를 가져 온다고 말할 수 있다. 또한 직접 첨가한 Tween 80와 enzyme의 혼합물 역시 control 보다 높은 소화율을 나타냈다 ($p<0.05$).

Table 15~17에서 보는 바와 같이 Tween 80, enzyme, 이들의 혼합처리가 조사료의 소화율을 높였음에도 불구하고, pH, gas production VFA production에는 큰 영향을 미치지는 못하였다. 이는 이 물질들이 처리는 반추위의 환경에 큰 영향을 주지 않았음을 나타낸다.

Table 15. Gas production(ml) as influenced by treatments

Time	Treatment[a]							SEM
	Control	PT	PE	PTE	AT	AE	ATE	
3	5.35	5.56	7.64	8.10	6.05	5.62	4.78	0.26
6	6.68	8.38	10.01	9.54	7.55	8.86	9.23	0.25
12	15.98	17.24	17.69	16.59	15.92	17.14	14.54	0.32
24	28.76	29.59	28.40	28.73	26.48	29.98	28.28	0.33

[a]Control : water - treated rice straw; PT : Tween80 - pretreated rice straw; PE : Enzyme - pretreated rice straw; PTE : The mixture of Tween80 and Enzyme - pretreated rice straw; AT : Tween80 - directly added rice straw; AE : Enzyme - directly added rice straw; ATE : The mixture of Tween80 and Enzyme - directly added rice straw.
SEM, Standard error of means.

Table 16. pH values as influenced by treatment

Time	Treatment[a]							SEM
	Control	PT	PE	PTE	AT	AE	ATE	
3	6.84	6.84	6.83	6.81	6.84	6.85	6.85	0.003
6	6.76	6.79	6.79	6.78	6.82	6.84	6.83	0.006
12	6.69	6.70	6.72	6.73	6.74	6.75	6.75	0.005
24	6.62	6.64	6.66	6.65	6.67	6.67	6.67	0.005

[a]Control : water - treated rice straw; PT : Tween80 - pretreated rice straw; PE : enzyme - pretreated rice straw; PTE : The mixture of Tween80 and Enzyme - pretreated rice straw; AT : Tween80 - directly added rice straw; AE : Enzyme - directly added rice straw; ATE : The mixture of Tween80 and Enzyme - directly added rice straw.
SEM, Standard error of means.

Table 17. VFA production as influenced by treatments after 24 hours incubation

Treatment[a]	Acetate	Propionate	Butyrate	Total VFA
Control	30.15bc	11.42ab	4.55abc	46.12
PT	29.83c	11.14ab	4.27c	45.24
PE	30.29bc	10.85ab	4.40abc	45.54
PTE	28.99c	10.52b	4.25c	43.77
AT	30.49abc	11.06ab	4.36bc	45.90
AE	34.92a	13.02a	5.31ab	53.25
ATE	34.47ab	13.06a	5.36a	52.89
SEM	0.58	0.26	0.12	0.95

[a]Control : water - treated rice straw; PT : Tween80 - pretreated rice straw; PE : enzyme - pretreated rice straw; PTE : The mixture of Tween80 and Enzyme - pretreated rice straw; AT : Tween80 - directly added rice straw; AE : Enzyme - directly added rice straw; ATE : The mixture of Tween80 and Enzyme - directly added rice straw.

a, b, c Wthin a row, means with different superscripts differ ($p<0.05$)

SEM, Standard error of means

Table 18은 *in vitro* 배양 후 배양액의 CMCase, Xylanase의 역가를 측정한 결과이다. Tween 80 와 enzyme 그리고 이들의 혼합물의 전처리는 직접 첨가한 것과 마찬가지로 CMCase와 Xylanase의 활성을 나타냈으며 이는 전처리 하고 배양을 하더라도 24시간 전에 처리된 enzyme이 계속적으로 활성을 지닌다고 말할 수 있다. 하지만 CMCase의 경우 (Table 18, (a)), cellulase는 반추위에 들어가면 그 기능을 잃는 것을 볼 수 있으며, Tween 80의 첨가는 control과 마찬가지로 cellulase의 활성을 측정할 수 없었다. 하지만 혼합처리의 경우 enzyme만 처리한 것 보다 수치적으로 높은 수준을 유지한 것으로 보아 enzyme과 Tween 80의 interaction이 분명 있다고 판단할 수 있다. CMCase의 경우는 전처리 한 것과 직접 첨가 한 것에 대한 차이를 크게 보이지 않았다. Xylanase의 경우 (Table

18, (b)) Tween 80, enzyme, 이들의 혼합처리가 control보다 활성이 현저히 높았으며, 특히 혼합물의 처리가 가장 높은 활성을 보였다. 또한 직접 첨가 한 것 보다 전처리 했을 때 더 높은 활성을 나타냈다. 게다가 더 주목할 점은 배양이 시작되고 24시간까지 xylanase 활력이 점점 줄어드는 것을 볼 수 있으나, 혼합물을 전처리 하였을때 거의 활력이 줄어들지 않고 배양 기간 동안 높은 수준을 유지하였다. 이는 Tween 80가 미생물 부착을 방해하는데도 불구하고 조사료의 소화율을 떨어뜨리지 않는 하나의 이유로 거론 할 수 있겠다.

Table 18. Enzyme activity of cellulase and xylanase as influenced by treatment (units[1])

a)	Cellulase							
Time	Control	PT	PE	PTE	AT	AE	ATE	SEM
0	ND	ND	136.77b	137.02b	0.23c	200.84a	208.60a	19.78
3	ND	ND	1.79c	2.40c	ND	7.16b	13.85a	1.11
6	ND	ND	0.88bc	0.43bc	ND	2.22ab	3.63a	0.36
12	ND	ND	0.27ab	1.28a	ND	ND	1.51a	0.23
24	ND	0.73ab	0.85ab	1.48ab	0.43ab	0.66ab	2.18a	0.26

b)	Xylanase							
time	Control	PT	PE	PTE	AT	AE	ATE	SEM
0	2.64c	17.51c	744.76a	740.94a	51.36b	734.05a	736.27a	72.22
3	0.50b	8.97b	682.65a	695.62a	4.73b	700.59a	693.81a	76.20
6	0.99c	7.81c	466.76b	535.67a	5.73c	516.41a	543.13a	56.80
12	6.34e	24.84d	76.10c	127.97a	27.26d	108.66b	138.11a	11.18
24	39.04e	171.80b	163.62bc	228.54a	94.78d	119.31bc	113.82d	13.02

[1]Units : One unit = glucose and xylose umole/ml/min.

Control : water - treated rice straw; PT : Tween80 - pretreated rice straw; PE : enzyme - pretreated rice straw; PTE : The mixture of Tween80 and Enzyme - pretreated rice straw; AT : Tween80 - directly added rice straw; AE : Enzyme - directly added rice straw; ATE : The mixture of Tween80 and Enzyme - directly added rice straw.

a, b Wthin a row, means with different superscripts differ ($p<0.05$).

SEM, Standard error of means; ND, not detected.

앞의 실험들을 바탕으로 Tween 80와 효소제의 혼합처리는 반추동물의 조사료 이용성을 증가시킬 수 있다고 사료된다. 그러므로 Tween 80와 enzyme의 혼합처리를 이용하여 *in vivo*를 실시하였다. Table 19는 *in vivo* 수행 시 사용될 commercial cellulase와 xylanase 를 구입하여 역가를 측정 한 후, 기존의 사용된 제품과 비교한 것이다.

Table 19. Comparison of enzyme activity between Sigma and commercial enzyme (Units : amounts of released glucose or xylose mmol/min/0.1g)

	Cellulase	Xylanase
Sigma	0.949	2.10
Commercial enzyme	1.485	2.56

위의 Table 19의 결과를 바탕으로 *in vivo* 실험 전 commercial enzyme 을 이용하여 *in vitro*로 효과 검증을 실시하였다.
Table 20과 21은 *in vitro* DM digestibility와 Gas production의 결과를 보여주고 있다.

Table 20. DM digestibility (%) as influenced by different levels of Tween 80, enzyme or their mixture.

Time	Con	T	E	T,1/2E	1/2T,E	T,E	P	SEM
3	4.10c	5.43bc	7.70ab	7.60ab	8.65a	8.05a	<0.001	0.43
6	6.17b	6.67b	8.53a	9.08a	8.78a	9.93a	<0.001	0.34
12	9.84c	10.84c	13.59ab	12.70b	14.57a	14.48a	<0.001	0.46
24	10.82c	13.52bc	15.89a	14.65ab	15.69a	15.77a	<0.01	0.60

Con : Control; T : 2.5% Tween 80; 1/2 T : 1.25% Tween 80; E : 5Uxylanase, 1.25Ucellulase; 1/2E : 2.5Uxylanase, 0.625Ucellulase
a, b Wthin a row, means with different superscripts differ.
SEM, Standard error of means.

Table 21. Gas production (ml) as influenced by different levels of Tween 80, enzyme and their mixture.

Time	Con	T	E	1/2T,E	T,1/2E	T,E	P	SEM
3	8.84b	8.58b	10.60a	10.14a	8.64b	9.90a	<0.001	0.20
6	13.36b	12.05c	15.05a	14.44a	12.70bc	15.10a	<0.001	0.29
12	21.94c	22.15c	25.56ab	24.50b	25.45ab	26.21a	<0.001	0.42
24	34.73c	36.05bc	39.16a	37.75ab	38.01b	39.44a	<0.001	0.43

Con : Control; T : 2.5% Tween 80; 1/2 T : 1.25% Tween 80; E : 5Uxylanase, 1.25Ucellulase; 1/2E : 2.5Uxylanase, 0.625Ucellulase

a, b Wthin a row, means with different superscripts differ.

SEM, Standard error of means.

DM digestibility 는 *in vitro* 배양기간 동안 1/2T+E, T+E 처리구에서 가장 높았다. Gas production 역시 1/2T+E, T+E 처리구에서 가장 높았다. 그러므로 경제적으로 Tween 80를 적게 넣는 것이 합당하다 판단되어 *in vivo* 실험은 조사료에 물처리된 Control 과 1.25% Tween80 +5U xylanase, 1.25U cellulase 처리된 처리구로 나누어 2 X 2 Latin square design으로 실시하였다.

Figure 68는 total track digestibility를 보여주고 있는데. 1/2T+E 처리가 DM, Crude protein, Crude fat 소화율을 증가시켰다($p<0.05$). 그러나 NDF, ADF 소화율은 처리구가 수치적으로는 높았지만 유의적 차이는 나타나지 않았다. VFA production은 acetic acid, propionic acid, total VFA에서 처리구가 수치적으로 높은 량을 나타내었고, 또한 acetic acid 보다 상대적으로 propionic acid함량에 더 큰 영향을 주어서 결과적으로 A/P 비율이 대조구에 비해 낮아졌다 (Figure 69). 앞의 *in vitro* 실험에서 혼합물 전처리시 CMCase와 xylanase의 활성이 매우 높으며, 배양 기간 중에 그 활성을 잃지 않는 것을 관찰 한 바 있다(Table 18). 하지만 *in vivo* 환경에서는 처리구의 효소 활성이 대조구에 비해 수치적으로 높긴 하였으나 유의적인 차이는 발견할 수 없었다(Figure 70). 다시 말하자면, 처리구

의 소화율이 높아진 이유로 Tween 80로 인한 반추위 섬유소 분해 효소나 첨가된 섬유소 분해 효소의 활력 증가가 중요한 역할을 담당하고 있지는 않다고 판단된다. *In vivo* 실험 마지막에 시행된 *in situ* 실험에서의 DM disappearance는 처리구가 수치적으로 전 배양기간 동안 높은 경향이었으나 12시간 배양($p<0.05$)을 제외하고는 유의적 차이를 발견할 수 없었다(Figure 71). *In situ* 배양 후 sample에서 섬유소 분해 박테리아의 부착을 측정하였다(Figure 72). 앞의 실험(Figure 66)에서 Tween 80의 전처리는 섬유소 분해 미생물의 부착을 줄인다고 설명한 바 있다. *In vivo* 환경에서 Tween 80와 enzyme 처리는 8시간 전까지 섬유소 분해 미생물의 부착을 낮췄지만 8시간 후 부터는 Control과 비슷한 경향을 보였다. 특이한 점은 3종의 섬유소 분해 미생물은 분 타임(15, 30min)에 부착을 거의 하지 못하여 Real-Time PCR로 Detection을 할 수가 없었다. 이는 앞의 *in situ* 실험의 경우 nylon bag에 들어가는 기질만 Tween 80 처리가 되었지만, 이번 *in vivo* 실험 중 *in situ* 실험은 반추위의 환경이 Tween 80의 영향을 더욱 많이 받고 있는 상황이기 때문에 분 타임 또는 2시간의 부착이 이루어지지 않거나 매우 미비한 것으로 생각할 수 있다.

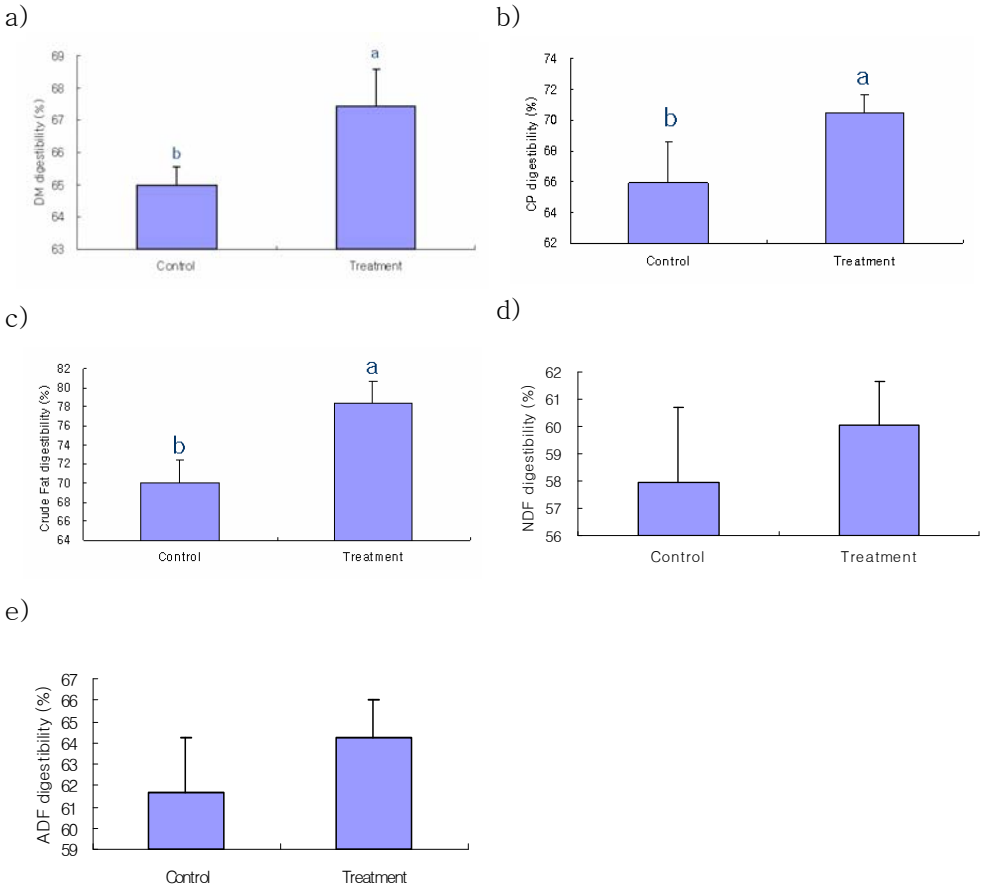


Figure 68. Total track digestibility as influenced by dietary treatment. Control : Water treated timothy; Treatment : Tween 80+Enzyme treated timothy. a) : DM digestibility; b) : Crude protein digestibility; c) : Crude fat digestibility; d) : NDF digestibility; e) ADF digestibility.

a, b : means with different letters differ ($p<0.05$).

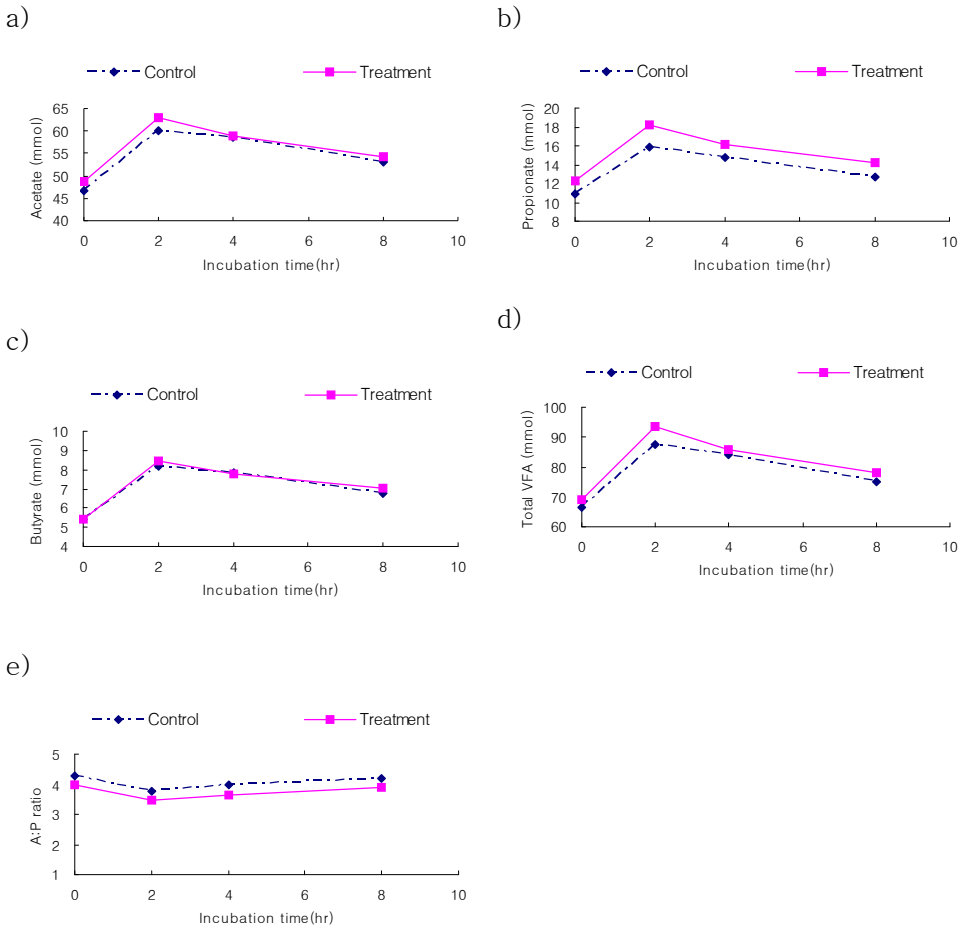
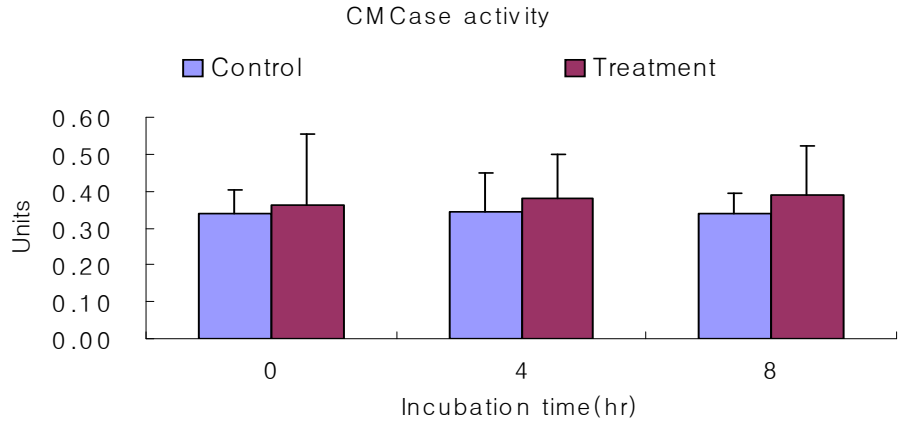


Figure 69. VFA production (mmol) as influenced by dietary treatment. Control : Water treated timothy; Treatment : Tween 80+Enzyme treated timothy. a) : acetic acid; b) : propionic acid; c) : butyric acid; d) : total VFA; e) A/P ratio.

a)



b)

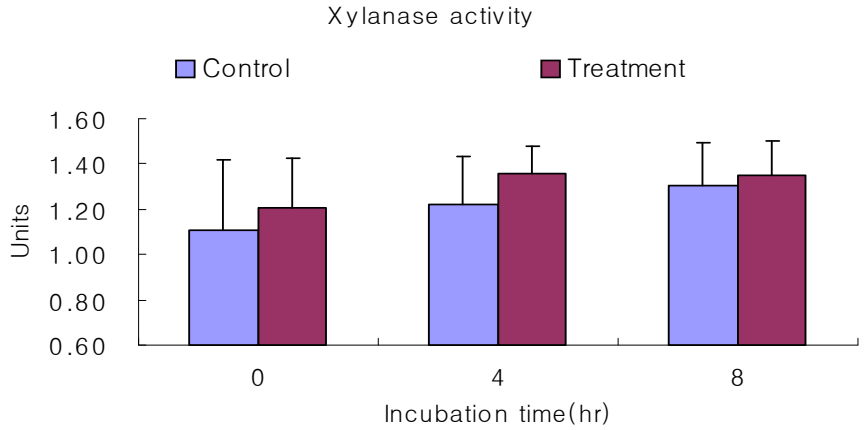


Figure 70. Enzyme activity (Unit) in the rumen fluid of steers fed different diets. Control : Water treated timothy; Treatment : Tween 80+Enzyme treated timothy. a) : CMCase activity; b) : xylanase activity. Units : amounts of released glucose or xylose / ml / min .

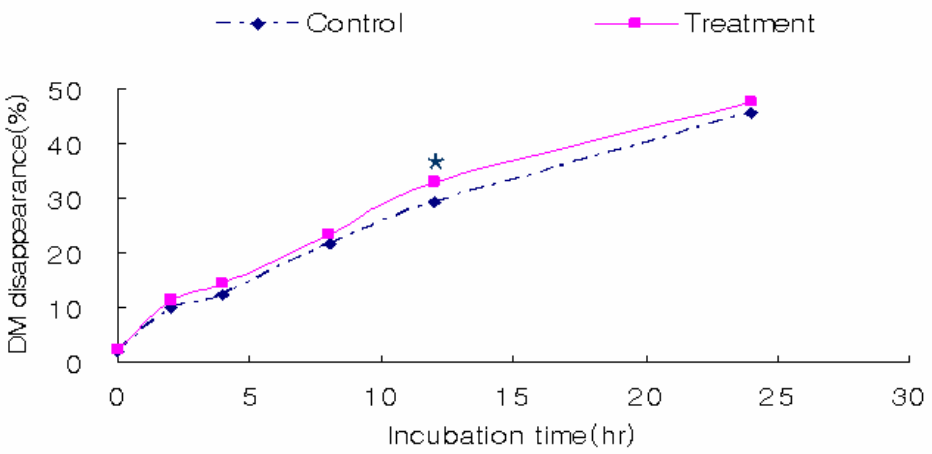
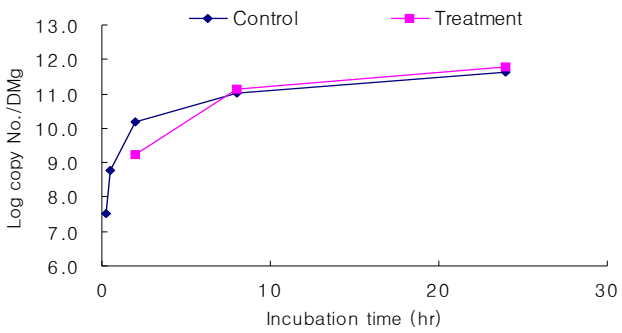


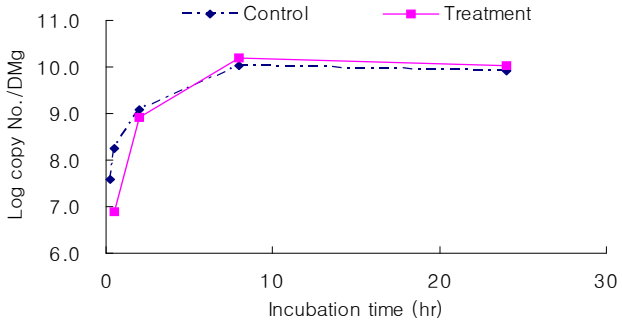
Figure 71. *In situ* DM disappearance of timothy. Control : Water treated timothy; Treatment : Tween 80+Enzyme treated timothy

★ : means with different letters differ ($p<0.05$).

a)



b)



c)

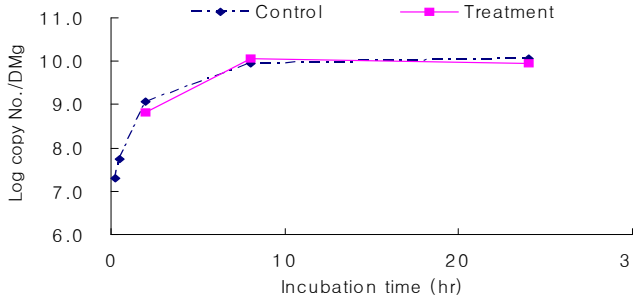


Figure 72. Cellulolytic bacterial attachment(Log copy No./timothy DMg). Control : Water treated timothy; Treatment : Tween 80+Enzyme treated timothy. a) : *Fibrobacter succinogenes*; b) : *Ruminococcus albus*; c) *Ruminococcus flavefaciens*.

2절. 곰팡이를 이용한 조사료 이용성 향상 방안 개발

1. 부착 능력이 우수한 혐기성 곰팡이 선발

가. 연구의 세부 목표

반추위에 존재하는 미생물은 900여종일 것으로 추정되나 분류된 것은 200종이며 현재 150종 정도가 배양이 가능한 것으로 보고되었다. 이 중 혐기성곰팡이는 생육의 특성상 이동성이 존재하는 zoosporic stage와 이동성이 없는 vegetative stage가 있다. 따라서 존재여부 및 분포도를 정확히 파악하는데 많은 제약이 따르고 있다. 이러한 혐기성곰팡이의 분류에서 관행적으로 사용되어온 기법으로는 광학현미경을 이용하여 형태적으로 분류하는 방법이 있으나, 최근 들어 분자생물학 기법의 발달로 rRNA ITS-1 gene의 sequence를 분석함으로써 각 각의 혐기성곰팡이의 분류를 수행하기 시작하였다(Brookman 등, 2000). 따라서 본 연구의 목적은 반추동물의 반추위내 존재하는 혐기성 곰팡이를 분자생물학적 또는 형태학적으로 분류하는 기법을 사용하여 분리, 동정함과 동시에 배양액에 존재하는 혐기곰팡이를 분자생물학적 기법을 이용하여 정량적으로 분석하는 방법을 개발함에 있다.

나. 연구 방법

1) 혐기성곰팡이의 분리 및 동정

반추위에 존재하는 혐기곰팡이의 분리 및 동정을 위해 변형된 Hungate의 roll tube 방법을 이용하였다(Hungate, 1966). 반추위 Cannula가 설치된 면양의 반추위액과 내용물을 채취하여 균질화한 후 탄수화물이 제거된 혐기배양액을 이용하여 십진 희석하였다. 십진 희석된 1ml의 위내용물을 agar가 함유된 9ml의 섬유소배지에 접종하여 39℃에서 혐기상태로 배양하였다. 이때 위내용물 및 배양액에 존재하는 bacteria의 제거를 위해 chroramphenicol, penicillin-G 및 streptomycin의 혼합물을 첨가하였다. 혐기상태로 5일간 배양된 roll tube에 존재하는 각 각의 군락(colony)를 채취하여 배지에 접종한 후 동일한 조건에서 계대한 후 roll tube

방법을 2회 반복하였다. 선발된 혐기곰팡이는 배양액에서의 형태적 특성관찰과 광학현미경을 이용한 형태적 분류에 의하여 혐기성 곰팡이는 광학현미경을 이용하여 추가적인 선발을 실시하였다. 섬유소기질의 분해능력이 우수한 균주를 최종적으로 선발하여 균주를 유지하였다.

2) 혐기성곰팡이의 초저온 냉동보관

분리된 혐기성곰팡이의 장기보관을 위하여 2일간 배양된 혐기성곰팡이 배양액 10ml에 glycerol을 함유하는 혐기배지용 동결보존액 2.5ml을 첨가하여 균질화한 후 액체질소를 이용하여 급속 동결하여 초저온(-70℃)으로 냉동보관하였다. 본 연구진의 결과에 의하면 초저온 냉동보관을 실시하여 혐기곰팡이를 보관할 경우 최소 1년 이상 장기 보관이 가능하였다.

3) ITS1 primer를 이용한 동정

혐기곰팡이의 동정에는 ribosomal ITS1 region을 비교하는 분자생물학적인 방법을 형태적인 동정방법과 동시에 수행하였다(Brookman 등, 2000). 배양된 균체를 수거하여 액체질소와 함께 유발을 이용하여 균질화 한 후 균체의 분말에 존재하는 DNA를 Trizol^{TM}(Invitrogen, USA) 용액을 이용하여 회수하였다. 회수된 DNA 50ng을 취하여 0.2μM의 rITS1 primer(ITS1-A, Brookman 등, 2000)를 혼합한 후 유전자를 증폭시켰다. 유전자의 증폭은 95℃에서 30초간 denaturation, 60℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension 시키는 반응을 30회 반복함으로써 수행하였다. 412-479bp 크기의 반응산물을 수거하여 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 분석한 후 NCBI의 GenBank 자료에 근거하여 분자생물학적 분류를 실시하였다.

4) 조사료에 부착되어있는 혐기곰팡이 DNA추출방법 확립

혐기배지에서 회수된 *Neocallimastix frontalis* 균체의 DNA를 추출하기위하여 4가지의 물리적인 방법을 이용하였다. 대조군(1)으로는 E. coli에 cloning된 *N. frontalis* ITS1gene을 mini prep kit(Quiagen, USA)을 이용하여 추출한 DNA를

이용하였다. 혐기곰팡이 배지에서 배양된 *N. frontalis* 균체를 회수하여 DNA를 추출하였다. 방법1(2)에서는 냉동시킨 막자사발에 *N. frontalis*가 부착된 볏짚을 액체질소와 함께 균질화 한 후 DNA를 추출하였다. 방법2(3)에서는 300μA로 1분간 5회 반복하여 초음파분쇄한 후 DNA를 추출하였다. 방법3(4)에서는 300μA로 2분간 5회 반복하여 초음파분쇄한 후 DNA를 추출하였다. 방법4(5)에서는 300μA로 3분간 5회 반복하여 초음파분쇄한 후 DNA를 추출하였다. DNA의 회수에 사용된 용액은 0.4% LiCl 용액(0.2M Tris-HCl(pH 9.0), 0.4M LiCl, 25mM EDTA (pH8.), 1% SDS)을 사용하였다(Sambrook and Russell, 2001). 동일한 양의 DNA template를 첨가한 후 ITS1 primer를 이용하여 상기된 방법에 의해 PCR 반응을 유도함으로써 DNA 추출방법의 효율성을 비교하였다.

조사료에 부착되어있는 *N. frontalis* DNA의 추출을 위하여 bead를 첨가한 후 voltexing을 1분씩 5회 반복(방법1), 300μA로 3분간 5회 반복하여 초음파분쇄(방법2), 및 bead beating을 1분씩 5회 반복(방법3)하여 회수되는 DNA의 함량을 비교하였다. DNA의 회수에 사용된 용액은 0.4% LiCl 용액(0.2M Tris-HCl(pH 9.0), 0.4M LiCl, 25mM EDTA (pH8.), 1% SDS)을 사용하였다. 또한 PCR 조건의 상기된 방법과 동일한 방법을 이용하였다.

조사료에 부착된 혐기곰팡이 및 혐기박테리아의 DNA를 동시에 추출할 수 있는 기법의 확립을 위해 변형된 Carlson lysis buffer 용액을 제조하여 반추위 배양액에 존재하는 미생물체 DNA를 추출하여 비교하였다. 변형된 Carlson lysis buffer는 100mM Tris-HCl(pH9.0), 20mM EDTA (pH8.0), 1.4M NaCl, 2% CTAB, 1% PEG8000, 0.2% β-mercaptoethanol로 제조되었다(Carslson 등, 1991). 시료로는 배양되지 않은 볏짚, 반추위액(상층액), 반추위 내용물, 볏짚에서 배양된 혐기곰팡이 배양물, 볏짚을 기질로한 반추위 배양물, 수용성기질에서 배양된 혐기곰팡이 및 E. coli에 삽입된 *N. frontalis* ITS1 gene을 비교하였다. 추출된 DNA를 template로 하여 *N. frontalis*의 ITS1 및 *F. succinogenes, R. flavefaciens, R. albus*의 16S DNA를 PCR로 증폭하여 이들 유전자의 검출여부를 비교하였다.

Table 22. Specific primers of ITS1 and 16S rDNA for real time PCR

Target strain	Primer set	Sequence (5′-3′)	Annealing temp(℃)	reference
N. frontalis ITS1	GM1	TGTACACACCGCCCGTC	42	Brookman et al, 2000
	GM2	CTGCGTTCTTCATCGAT		Brookman et al, 2000
	ITS1-F	TGATCCTTCGGATTGGCTAT	60	in this study
	ITS1-R	CACTCTCAATCGAGCGATATTTT		in this study
F. succinogenes	Fs219f	GGTATGGGATGAGCTTGC	60	Koike et al, 2001
	Fs654r	GCCTGCCCCTGAACTATC		Koike et al, 2001
R. albus	Ra1281f	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	55	Koike et al, 2001
	Ra1439r	CCTCCTTGCGGTTAGAACA		Koike et al, 2001
R. flavefaciens	Rf154f	TCTGGAAACGGATGGTA	55	Koike et al, 2001
	Rf425r	CCTTTAAGACAGGAGTTTACA A		Koike et al, 2001

5) *N. frontalis* 정량분석 PCR 조건 확립

동정에 이용된 ITS1 gene의 amplicon의 크기가 정량 PCR에 적합하지 않아 정량 PCR용 primer를 Whitehead Institude/MT Center for Genome Research에서 개발한 Primer3 프로그램을 이용하여 제작하였다(ITS1-F/R). 제작된 primer를 이용하여 증폭된 반응산물을 Topo vector를 이용하여 E. coli에 cloning 하였다. Cloning된 E. coli에서 DNA를 추출한 후 DNA 농도를 달리 처리하여 정량 PCR(Light Cycler, Rosche, Swiss)을 반응시켰다. 정량 PCR은 95 ℃에서 10분간 preincubation, 95℃에서 10초간 denaturation, 60℃에서 5초간 annealing, 72℃에서 6초간 extension 시키는 반응을 45회 반복한 후 melting point check와 cooling을 실시하였다. 정량 PCR 반응에는 LightCycler Sybergreen Master Mix(Rosche, Swiss)를 이용하였다. 검량선의 작성을 위해서는 PCR 반응에 첨가

된 DNA template에 존재하는 표적유전자의 질량을 계산한 후 분자량을 측정하여 copy number를 계산하고, 각 각의 copy number에 상응하는 ct value를 측정함으로써 시료에 존재하는 표적유전자의 양을 정량하였다.

6) 조사료내 *N. frontalis* 부착정도 분석

Neocallimastix frontalis PMA03을 볏짚을 함유하는 혐기곰팡이 배지에서 24, 48, 72, 96, 120시간 배양한 후 볏짚에 부착되어있는 *N. frontalis*를 정량 PCR을 이용하여 분석하였다. DNA의 추출을 위해서는 상기된 CTAB buffer와 bead beating 방법을 이용하였으며, rITS1-F/R primer를 이용하여 정량 PCR을 수행하였다. 또한 *N. frontalis* 생육의 간적적인 지표로 배양액의 pH와 culture head gas의 생성량을 측정하였다. Culture head gas의 측정을 위해서는 자체 제작한 digitalized pressure sensor system을 이용하였다. 또한 볏짚의 소화율을 측정함으로써 *N. frontalis*의 대사적 활성도를 비교하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 혐기성 곰팡이의 분리 및 선발

전체 사료 중 볏짚의 농도를 80%로 하여 급여한 한우의 위액을 채취하여 총 550개의 혐기성 곰팡이의 colony를 채취하였다. 이들을 1차 계대배양 한 결과 110개의 균주가 생존하였으며, 섬유소 배지에 생존하는 균을 선발하기 위하여 1개월간 3일 간격으로 계대배양 한 결과 40개의 균주만 생존하고 나머지 510개의 균주는 선발 및 계대과정에 도태되었다. 계대배양 과정 중의 균주의 손실을 방지하기 위하여 40개의 균주를 동결하여 보관함과 동시에 순차적인 2차 분리작업을 진행하였다.

2) 형태적 특성에 의한 곰팡이의 분류

선발된 40개의 균주를 배양액에서 자라는 양상에 의해 분류할 경우 크게 2가지의 형태로 분류되었다. 첫째의 경우는 일반적인 혐기곰팡이의 특성과 같이 배양

2일 이후에 균체를 형성하는 것이고, 둘째로 점액상태의 균체를 형성하는 특징을 보였다. 또한, 현미경적 관찰 결과에 의하며, 1) sporangium이 발달한 형태를 나타는 것, 2) sporangium이 관찰되지 않는 균체양상을 나타내는 것, 3) 균체의 구분이 어려운 것 등으로 크게 대별될 수 있으나, 3)의 경우는 항생제에 내성이 있는 박테리아로 추정되었다. 또한, 효모균으로 추정되는 다수의 균주가 발견되었으나, 현미경에 의한 형태적 분류는 수행하지 않았다.

Figure 73. The isolated strains for procedure of second isolation.

3) 분자생물학적 방법의 의한 분류

분리 후 생존한 40개 균주 중 성장 특성이 일반적인 혐기곰팡이와 같이 배양 2일 이후에 균체를 형성하는 균주를 1차 선발 하였다. 1차 선발에서 선택된 균주에서 성장률이 가장 높게 관찰되는 균주를 다시 2차 선발하여 분자생물학적 방법에 의한 분류를 실시하엿다. *Noecallimastix frontalis* NLRI003의 ITS1 염기서열을 분자생물학적으로 분석한 결과 Gene bank에 등록된 *Neocallimastix frontalis* SK 18SrRNA gene와 sequence homonolgy가 83% 일치하였다(Figure 75). 또한*Noecallimastix frontalis* PMA03 은 *Neocallimastix frontalis* SK 18SrRNA gene와 sequence homonolgy가 98% 일치하였다(Figure 76). 즉, 현재 확보된 *N. frontalis* NLRI003와 PMA 03은 기존에 보고된 *Neocallimastix frontlis*임이 확인되었고 차후 실험에는 homology 가 보다 높은 수치로 일치한 *Neocallimastix frontalis* PMA03을 이용하였다.

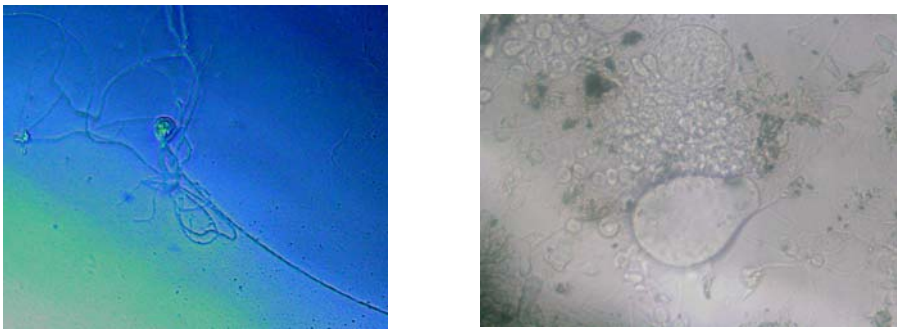


Figure 74. Light micrograph of *Neocallimastix frontalis* PMA03

```
> gb|AY070440.1|  Neocallimastix frontalis isolate SK 18S ribosomal RNA gene, partial
sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence;
and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=453

 Score =  529 bits (586),  Expect = 3e-147
 Identities = 347/418 (83%), Gaps = 6/418 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  20   anCCTTCGGANTGGCTAttttttttCTGGCAACAGAATTAAACTGCTAAAAAGTTGGGCAA  79
            | ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  24   ATCCTTCGGATTGGCTATTTTTTTCTGGCAACAGAATTAAACTGCTAAAAAGTTGGGCAA  83

Query  80   ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  139
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  84   ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  143

Query  140  GGATCATTAAAAAATATCGCTCGATTGAAAGTGATTTAATAATCATCCTACCCTTTGTGA  199
            |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  144  GGATCATTAAAAAATATCGCTCGATTGAGAGTGATTTAATAATCATCCTACCCTTTGTGA  203

Query  200  ATTTGTTGTTTGNAATAAttttttttttGACGTGGAAT--aaaaaaaaaaTTNTTTNNGGT  257
            |||||||||||| |||||||||||||||||||||||  |||||||||||| |||  |||
Sbjct  204  ATTTGTTGTTTGAAATAATTTTTTTTTTGACGTGGAATAAAAAAAAAAAAATTATTTATGGT  263

Query  258  TTTGNCTATCCCTAANTTGGTTTGNTNGNNGTaaaaaannannnGAATCNTTTNNGGAANN  317
            |||| |||||||||| |||||||| | |  | |||| |  |  ||||| |||  ||||
Sbjct  264  TTTGTCTATCCCTAAATTGGTTTGTTTGTTGCAAAAGACAAGTGAATCATTTAGGGAATA  323

Query  318  NGNTTTCCTAAATNAT---TNNTTTTTTTTCCNANGGNNTAAAAAANCTTTTTTTNAAAN  374
             | ||||||||| ||   |  |||||||||| | |   ||||| | ||||||| |||
Sbjct  324  GGCTTTCCTAAATAATTGATTTTTTTTTTTTCCAATGTCTTAAAAGACCTTTTTTT-AAAA  382

Query  375  NNAANNTTTNGNTTNNNTTNNNNNAANNTTTTTTTNAAAANNNTTNAAAAANNNNTTT  432
               ||  ||| |  |   ||     ||  |  |||| ||||   || |||||    |||
Sbjct  383  TTAAACTTTTGTATTCATTTGTCTAAAATAATTTTTAAAATAATTTAAAAACAACTTT  440
```

Figure 75. Sequence result of ITS1 resion for *Noecallimastix frontalis* NLRI003

```
Score =  417 bits (217),  Expect = 1e-113
Identities = 287/290 (98%), Gaps = 2/290 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  1    CTACCGATTGAATGGCTTAGTGAATCCTTCGGATTGGCTATTTTTTTCTGGCAACAGAAT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  5    CTACCGATTGAATGGCTTAGTGAATCCTTCGGATTGGCTATTTTTTTCTGGCAACAGAAT  64

Query  61   TAAACTGCTAAAAAGTTGGGCAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  65   TAAACTGCTAAAAAGTTGGGCAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG  124

Query  121  TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATCGCTCGATTGAGAGTGATTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  125  TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATCGCTCGATTGAGAGTGATTT  184

Query  181  AATAATCATCCTACCCTTTGTGAATTTGTTGTTTGAAATAATTTTTTTTTGACGTGGAAT  240
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  185  AATAATCATCCTACCCTTTGTGAATTTGTTGTTTGTAATAATTTTTTTTTGACGTGGAAT  244

Query  241  AAAAAAAAAAAATTATTTATGGTTTTGTCTATCCCT-AAATTGGTTTGTT  289
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  245  -AAAAAAAAAAATTATTTATGGTTTTGTCTATCCCTAAAATTGGTTTGTT  293
```

Figure 76. Sequence result of ITS1 resion for *Noecallimastix frontalis* PMA03

4) 조사료에 부착되어있는 *Neocallinastix frontalis* PMA03의 DNA추출방법 확립

정량 PCR용 primer(ITS1-F/R)를 제작하여 *Neocallinastix frontalis* PMA03 추출한 DNA와 증폭시킨후 sequencing 한 결과는 Figure 77 과 같다. 증폭된 DNA의 크기는 156bp로 반응산물을 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 homonolgy가 100%로 완전 일치함을 알 수 있었다. 따라서 정량 PCR에 사용되는 primer는 *N. frontalis*의 ITS1 gene만을 선택적으로 증폭시킴을 알 수 있었다. 또한 초음파분쇄를 3분씩 5회 반복하여 혐기배지에서 배양된 *N. frontalis*의 DNA를 추출할 경우 액체질소와 막자사발을 이용한 경우보다 DNA의 추출이 효과적임을 알 수 있었다. (Figure 78) 그러나 초음파분쇄 방법은 볏짚과 같은 조사료에 부착되어있는 혐기곰팡이의 DNA를 추출하는데 있어서 효과적이지 못함을 발견하였다.

```
 Score =  275 bits (143),  Expect = 9e-71
 Identities = 157/157 (100%), Gaps = 0/157 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  24   ATCCTTCGGATTGGCTATTTTTTTCTGGCAACAGAATTAAACTGCTAAAAAGTTGGGCAA  83
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3    ATCCTTCGGATTGGCTATTTTTTTCTGGCAACAGAATTAAACTGCTAAAAAGTTGGGCAA  62

Query  84   ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  143
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  63   ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  122

Query  144  GGATCATTAAAAAATATCGCTCGATTGAGAGTGATTT  180
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  123  GGATCATTAAAAAATATCGCTCGATTGAGAGTGATTT  159
```

Figure77. Sequence result of PCR product used to primer for real time PCR for *Noecallimastix frontalis* PMA03

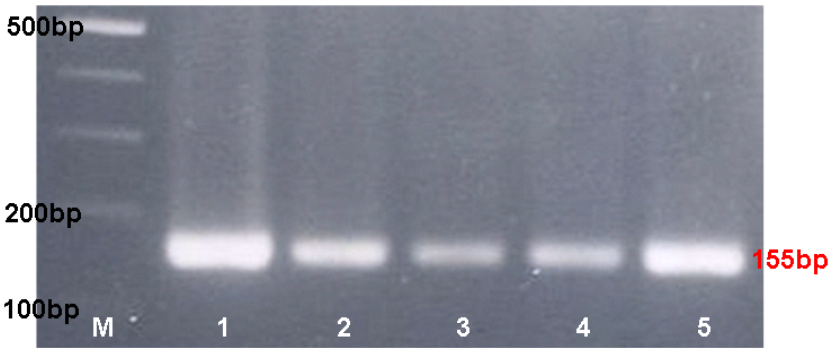


Figure 78. ITS1 of *N.frontalis* extracted with cell wall lysis for physical procedure. (DNA extraction buffer : 0.2M Tris-HCl pH 9.0, 0.4M LiCl, 25mM EDTA pH8.0, 1% SDS ; 1 : Cloning DNA of *N. frontalis* , miniprep kit (Qiagen, USA). 2 : *N. frontalis* single culture, Add extraction buffer and grinding with pestle. 3 : *N. frontalis* single culture, Add extraction buffer and sonicate at 300uA for 1min, replicate 5 times. 4 : *N. frontalis* single culture, Add extraction buffer and sonicate at 300uA for 2min, replicate 5 times. 5 : *N. frontalis* single culture, Add extraction buffer and sonicate at 300uA for 3min, replicate 5 times.)

따라서 조사료에 부착되어있는 혐기곰팡이의 DNA를 추출하기 위하여 좀더 강력한 물리적 자극이 요구되었다. 액체질소와 막자사발을 이용하여 조사료에 부착되어있는 미생물의 DNA 추출방법은 시료의 양이 많을 경우 추출에 어려움이 있을 뿐 아니라, 특정 DNA의 정량적인 분석 시 오차의 위험이 있어 새로운 방법이 요구되었다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 시료의 손실이 없는 폐쇄공간에서의 물리적 추출방법을 시도하였다. 즉 bead beater를 이용하여 DNA를 추출할 경우 물리적인 자극에 의해 조사료의 표면에 존재하는 *N. frontalis*의 DNA 추출에 효과적임을 확인할 수 있었다(Figure 79). 그러나 LiCl이 함유된 lysis buffer를 이용할 경우 DNA회수에 있어서 비효율적이었다. 따라서 이러한 문제점을 해결할 수 있는 lysis buffer가 요구되었다.

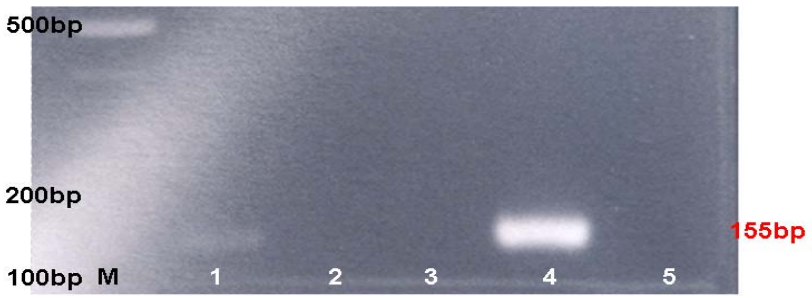


Figure79. ITS1 of *N.frontalis* extracted with cell wall lysis for physical and chemical procedure. (DNA extraction buffer : 0.2M Tris-HCl pH 9.0, 0.4M LiCl, 25mM EDTA pH8.0, 1% SDS. ; 1 : *N. frontalis* attached to rice straw that incubated on single culture, Add extraction buffer and bead beat with voltex at max speed for 1min, replicated 5 times. 2 : *N. frontalis* attached to rice straw that incubated on single culture, Add extraction buffer and sonicate at 300uA for 3min, replicated 5 times. 3 : *N. frontalis* attached to rice straw that incubated on *in vitro* with rumen fluid and buffer, Add extraction buffer and sonicate at 300uA for 3min, replicated 5 times. 4 : *N. frontalis* attached to rice straw that incubated on single culture, Add extraction buffer and bead beat at max speed for 1min, replicate 5 times. 5 : *N. frontalis* attached to rice straw that incubated on *in vitro* with rumen fluid and buffer, Add extraction buffer and bead beat at max speed for 1min, replicate 5 times.)

Carlson 등(1991)이 개발한 DNA extraction buffer(CTAB buffer)는 LiCl buffer에 비해 CTAB, β-mercaptoethanol와 같이 더욱 다양한 시약을 필요로 하는 불편함은 있으나, 조사료에 부착되어있는 미생물의 추출에 있어서 훨씬 효율적임을 보였다. 또한 CTAB buffer의 경우 *N. frontalis*(Figure 80)뿐 아니라 *F. succinognes, R. flavefaciens* 및 *R. albus*와 같은 혐기성박테리아의 DNA도 효율적으로 추출할 수 있는 장점을 보였다(Figure 81). 이러한 효율적인 추출방법을 이용할 경우 정량 PCR을 이용하여 조사료 혹은 반추위액에 존재하는 혐기미생물의 정량분석의 가능성을 시사하고 있다.

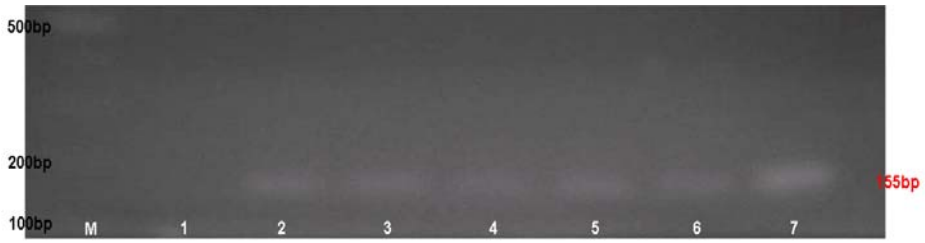


Figure 80. ITS1 of *N.frontalis* extracted with cell wall lysis for CTAB procedure for varous sample. (DNA extraction buffer : 100mM Tris-HCl (pH 9.0), 20mM EDTA (pH8.0), 1.4M NaCl, 2% CTAB, 1% PEG8000, 0.2% β-mercaptoethanol (Calson et.al, 1991). ; All sample : Add extraction buffer and bead beat at max speed for 1min, replicate 5 times. ; 1 : Raw rice straw. 2 : Supernatant of rumen fluid. 3 : Feedstuff in the rumen. 4 : *In vitro* sample incubated with Lowe's media. 5 : *In vitro* sample incubated with Mcdogall buffer. 6 : *N. frontalis* single culture. 7 : Cloning DNA of *N. frontalis*.)

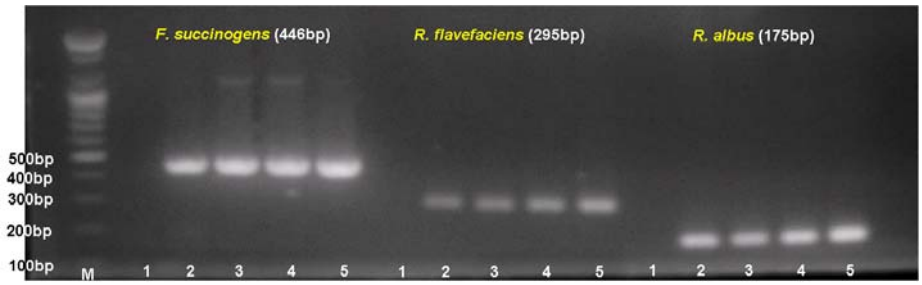


Figure 81. Specific region of 16S rDNA of rumimal cellulolytic bacteria extracted with CTAB procedure. (DNA extraction buffer : 100mM Tris-HCl (pH 9.0), 20mM EDTA (pH8.0), 1.4M NaCl, 2% CTAB, 1% PEG8000, 0.2% β-mercaptoethanol (Calson et.al, 1991). ; All sample : Add extraction buffer and bead beat at max speed for 1min, replicate 5 times. ; 1 : Raw rice straw. 2 : Supernatant of rumen fluid. 3 : Feedstuff in the rumen. 4 : *In vitro* sample incubated with Lowe's media. 5 : *In vitro* sample incubated with Mcdogall buffer.)

5) *N. frontalis* 정량 PCR 조건 확립

*Neocallimastix frontalis*의 ITS1 gene을 함유하는 DNA template를 농도별로 처리한 후 정량 PCR을 실시한 결과 첨가된 DNA의 농도에 따라 Ct value가 정비례로 증가함을 볼 수 있었으며(Figure 82), 반응산물의 melting point test를 통하여 증폭된 DNA가 순수함을 알 수 있었다. 따라서 본 결과는 조사료 혹은 배양액에 존재하는 혐기곰팡이 *N. frontalis*를 정량적으로 분석하는데 이용될 수 있음을 확인하였다.

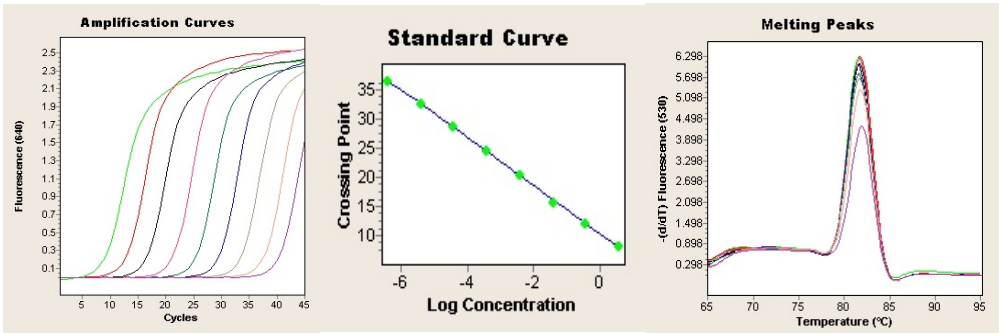


Figure 82. Real time PCR sandard curve. (Left : Change of Ct value, Middle : Standard curve, Right : Melting temperature test.)

6) 조사료내 *N. frontalis* 부착정도 분석

볏짚의 소화율과 gas의 생성량은 배양이 진행됨에 따라 지속적으로 증가하였으며(Talble 23), 배양액의 pH는 감소하였다. 이는 배양이 진행됨에 따라 *N. frontalis*에 의해 분비된 효소에 의해 볏짚이 가수분해 되어 유기산을 생성하게 되어 pH가 감소하게 되고, 최종 대사산물인 gas가 발생하기 때문이다. 그러나 특이한 사항으로는 전체 배양기간 동안 단위 중량당 볏짚에 부착되어있는 *N. frontalis*의 양이 일정하게 유지된다는 것이다. 이것은 전체 조사료 입자표면에 부착될 수 있는 *N. frontalis*의 양이 포화상태에 도달하여 전체 배양기간 동안 일정하게 유지되는 것으로 사료된다. 또한 *N. frontalis*의 life cycle을 고려하면 곰팡이가 볏짚에 가근을 뿌리내리고 다시 포자를 형성하여 퍼뜨리는 과정이 반복되면서 볏짚에 남아있는 곰팡이의 수가 배수적으로 증가하지 않은 결과라고 판단된다.

Table 23. DM degradability, pH, gas production and ITS gene expression during fermentation of rice straw by *N. frontalis* PMA03

	24h	48h	72h	96h	120h
DM degradability (%)	21.63^{e}	25.16^{d}	31.50^{c}	42.21^{b}	45.82^{a}
pH	6.72^{a}	6.56^{b}	6.15^{c}	6.02^{d}	5.96^{d}
Gas production (ml)	0.08^{d}	15.24^{c}	28.74^{b}	33.12^{a}	33.22^{a}
ITS1 gene expression (uM /mg rice straw DM)	0.264	0.185	0.268	0.206	0.264

2. 선발된 협기성 곰팡이의 단백질 발현 특성 및 실용화 방안 연구

가. 연구의 세부 목표

본 연구의 목표는 앞서 분리, 동정을 통해 선발된 곰팡이에서 생성되는 효소단백질의 특성을 규명하고, 성장조건을 조절하여 미생물 효소제로의 이용성을 극대화 시키는 데 있다. 협기성 곰팡이의 배지 제조에는 화학적으로 정제된 glucose, cellulose, starch 등의 탄수화물 공급원이 이용된다. 그러나 이러한 화학적으로 정제된 기질을 배지에 이용하여 효소를 생산할 경우 재료의 단가가 비싸 산업적으로 이용하는데 제약이 발생한다. 또한 협기성 곰팡이가 분비하는 효소는 기질의 종류에 따라 효소의 분비량이 달라지므로 복합효소를 생산함에 있어서 단일의 기질이 아닌 복합기질을 이용하여 배지를 제조하여야 하는 제한이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 glucose, cellulose와 같이 화학적으로 정제된 기질을 이용하여 협기성 곰팡이를 배양한 경우와 볏짚과 같은 복합기질을 이용하여 협기성 곰팡이를 배양하였을 경우 곰팡이의 배지에 분비되는 효소의 양을 비교함으로써 협기성 곰팡이를 이용하여 효소를 생산할 함에 있어서 볏짚의 실용화 가능성 및 실용화 방안을 강구하고자 시행되었다.

나. 연구 방법

1) 균주 및 배양조건

본 시험에 사용된 협기성 곰팡이는 면양의 반추위에서 분리된 *Neocallimastix frontalis* 를 0.75%의 glucose, starch 및 cellubiose가 함유된 Lowe′s medium에 (Lowe 등, 1985) 접종한 후 협기상태에서 39℃에서 3일간 정치배양한 후 종균으로 사용하였다. 시험에 사용된 배지는 Lowe′s medium에서 탄수화물 공급원만 서로 다르게 하여 사용하였다. 탄수화물 공급원으로는 filter paper, glucose, sigma cell 또는 xylan을 이용하여 배지의 0.75%(w/v)수준으로 처리하여 협기배지를 제조하였다. 탄수화물의 종류가 다른 500ml의 배지에 3일간 배양된 종균을 ml당 1000개 포자의 농도로 접종하여 39℃에서 72 시간 배양하여 배양 상층액과 균체를 분리하여 -70℃에 동결 보관하였다.

2) 섬유소분해효소(CMCase) 역가 분석

상층액에 존재하는 섬유소분해효소(endoglucanas, CMCase)의 역가는 carboxymethyl cellose(CMC)로부터 해리되어 나오는 환원당의 함량을 비색법으로 측정함으로써 분석하였다(Je와 Lipke, 1985). 배양액 20μl에 100μl의 1% CMC 용액을 첨가하여 후 39℃에서 15분간 배양한 후 1ml의 Tetrazolium blue 용액을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응이 종료된 배양액을 100℃에서 5분간 가열하여 발색시킨 후 spectrophotometer(Agillent, USA)를 이용하여 흡광도를 분석하였다. Glucose를 표준물질로 이용하여 검량선을 작성한 후 배양액에 존재하는 환원당의 농도를 측정하여 효소의 역가를 측정하였다.

3) 균체 및 상층액 단백질의 추출

균체단백질의 추출을 위하여 냉동된 균체를 액체질소상에서 균질화한 후 Trizol™ reagent를 이용하여 단백질을 회수하였다. 이차원전기영동을 위한 단백질 시료는 7M의 urea가 함유된 sample buffer에 용해하여 2-D Quant kit(GE Healthcare, USA)을 이용하여 단백질을 정량하였으며, 일차원전기영동을 위한 단백질 시료는 증류수를 이용하여 단백질을 용해한 후 Lowry 방법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질의 정량곡선은 BSA(Bovine Serum Albumin)을 표준단백질로 사용하여 작성하였다.

3) 일차원전기영동(SDS-PAGE)

기질의 종류에 따른 단백질 발현의 특성 분석을 위해 단백질 시료를 10%의 SDS-PAGE로 전개한 후 silver staining 방법을 이용하여 단백질의 분포를 개략적으로 비교하였다. 또한 microfluidic system (Experion, BioRad, USA)을 이용하여 기질의 조건에 따른 각 각 의 단백질의 정밀한 정량 및 정성적 분석을 실시하였다.

4) 이차원전기영동 (2-D GE)

단백질 시료 1mg을 rehydration buffer와 혼합하여 IPG strip(24cm, 3-10 NL)과 함께 15시간 동안 정치시켜둠으로써 rehydration을 실시한 후 90000vHr로 iso-electric focusing(IEF)을 실시하였다. 2단계에 걸친 equilibration 작업 후 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 실시하여 silver nitrated를 이용하여 염색하였다. 이때 over staining 방지를 위하여 염색 및 발색시간을 조절하였다. 이차원전기영동이 완료된 gel을 Image Master program을 이용하여 영상을 분석하고, TagIdent program을 이용하여 분자량과 등전위점에 따른 단백질을 추정하였다.

5) 2-D DIGE(Difference Gel Electrophoresis)

기존의 이차원전기영동의 문제점인 gel간의 재현성 결여에 따른 문제점을 보완한 새로운 기법인 2-D DIGE 기법을 이용하여 이차원전기영동을 실시하였다. 배양조건의 다른 단백질 시료 50μg을 400pmol의 Cy3 혹은 Cy5로 각기 염색하고, 이들의 혼합물을 Cy2로 염색하였다. 염색된 단백질 시료를 rehydration buffer와 함께 혼합하여 IPG strip에 15시간 동안 정치시켜 둠으로써 rehydration을 실시하였다. Rehydration 된 IPG strip을 90000vHr로 IEF를 실시한 후 두 단계에 걸친 equilibration 작업을 수행하였다. Second dimesion을 위하여 equilibration이 완료된 IPG strip을 24cm의 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 수행하였다. 형광물질의 역가 감소 방지를 위하여 상기된 작업은 빛이 차단된 상태로 작업하였다. 전기영동이 완료된 gel은 Typhoon 9400 system (GE Healthcare, USA)을 이용하여 3개의 파장으로 scanning 한 후, 영상을 수집하였다. 수집된 영상은 Decyder program(GE Healthcare, USA)을 이용하여 분석하였다.

6) 영상분석

Decyder program을 이용하여 동일한 전기영동결과 상에서 각기 달리 염색된 단백질 시료에서 발현된 단백질의 농도를 분석함으로써 기질의 종류에 따른 특정 단백질의 증감을 확인하였으며(DIA, Differential In-gel Analysis), 각기 다른 gel에 분포되어있는 단백질의 농도 또한 분석하였다(BVA, Biological Variation

Analysis).

7) Trypsin digestion 및 MALDI-TOF 분석

동정이 요구되는 단백질을 이차원전기영동 gel에서 추출하여 trypsin용액으로 가수분해 시킨 후 Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems Inc. USA)를 이용하여 peptide fragment를 분석하였다. 질량분석결과를 MASCOT program을 이용하여 mass finger printing을 실시함으로써 단백질을 추정하였다.

8) 볏짚배지의 배양조건 및 분석방법

혐기곰팡이용 배지의 기질로서 볏짚의 이용가능성을 시험하기 위하여, *Neocallimastix frontalis* PMA03을 변형된 Lowe 배지에서 72시간 배양하여 종균으로 이용하였다. 탄수화물원이 없는 혐기곰팡이 배지에 볏짚을 0.5, 1, 2, 3, 및 4%(wt/vol)로 첨가하여 볏짚배지를 제조하였다. 또한 대조구로는 3종의 탄수화물이 0.75%로 함유된 Lowe medium을 이용하였다. 볏짚배지 10ml에 종균을 접종하여39℃에서 혐기상태로 72 및 96시간 배양하였다. 배양 종료 직후 digitalized pressure sensor를 이용하여 culture head gas를 배양산물에 존재하는 건물의 함량, 볏짚의 분해율 및 상층액에 존재하는 CMCase의 역가를 분석하였다. CMCase의 역가분석은 상기된 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 기질의 종류에 따른 섬유소분해효소 분비 특성

Lowe의 배지에 기질의 종류를 달리하여 혐기곰팡이를 배양할 경우 분비되는 섬유소분해효소(CMCase)의 활성은 xylan을 기질로 하였을 경우 가장 높았다 (Figure 83). 육안을 통한 배양액의 관찰에 의하면 *N. frontalis*의 생육은 xylan배지에서 가장 저조하였으며, 상층액에 존재하는 단백질의 함량도 xylan 배지에서

낮게 검출되었다. 그러나 CMCase의 역가가 xylan 배지에서 높게 검출된 것은 특이한 현상이라 할 수 있다. 가장 높은 가능성은 xylan의 화학적 구조를 분해하는 과정에서 CMCase의 역가가 요구되는 것이 아닌가 하는 추정은 가능하나 구체적인 내용은 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그러나 본 결과에 의하면 xylan의 함량이 높은 기질을 이용하여 *N. frontalis*를 배양할 경우 xylanase 및 cellulase의 함량이 높은 배양액을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

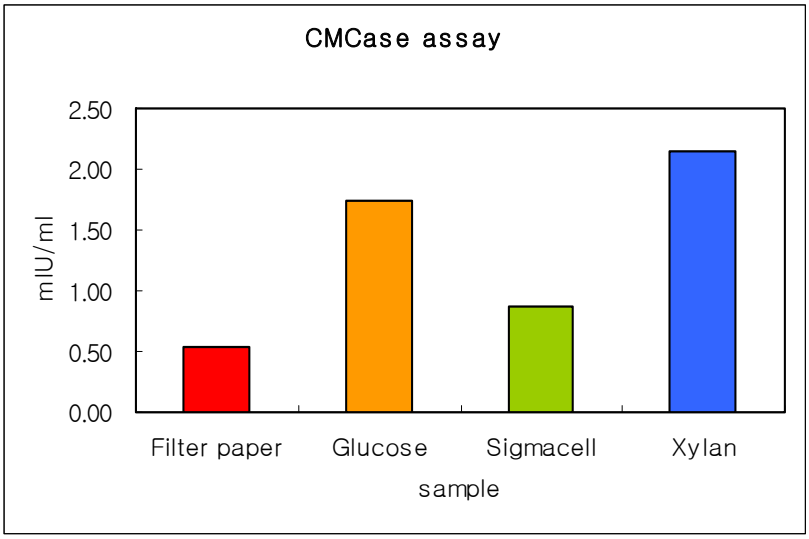


Figure 83. CMCase activity of *N. frontalis* under different substrate conditions.

2) 상층액 단백질의 일차원 전기영동

Filterr paper, glucose, cellulose 및 xylan을 기질로 하여 *N. frontalis*를 배양한 후 배양물의 상층액에 존재하는 단백질을 microfluidic system을 이용하여 1차원 전기영동을 실시하여 단백질의 분포를 비교하였다.(Figure 84). Figure 84의 상층부는 시료의 종류에 따라 시간별로 전개되는 단백질 분포의 spectrum으로 실제 측정치이다. 이 결과는 개략적인 내용을 비교할 뿐 세부적인 내용을 확인할 수 없는 특징이 있다. 따라서 computer program을 이용하여 일반적인 일차원전기영

동의 결과를 보여주는 virtual image를 재합성 하였다. 그 결과 glucose 배지의 배양액에서는 100kDa 이하의 단백질이 다량으로 발현됨을 관찰할 수 있었다. 반면에 섬유소 배지와 filter paper 배지에서는 100kDa 이상의 분자량을 갖는 단백질이 검출되었다. 특이사항으로는 xylan 배지에서 추출물은 정량과정에서 단백질의 함량이 가장 높게 나왔으나 전기영동결과 단백질함량이 가장 낮게 검출되었다. 이는 xylan 배지의 특정 물질이 단백질 정량시약과 반응하여 간섭현상을 일으키는 것으로 추정된다. 만약 xylan의 정제과정에서 과량의 detergent를 사용하였을 경우 detergent에 의한 간섭현상으로 사료된다.

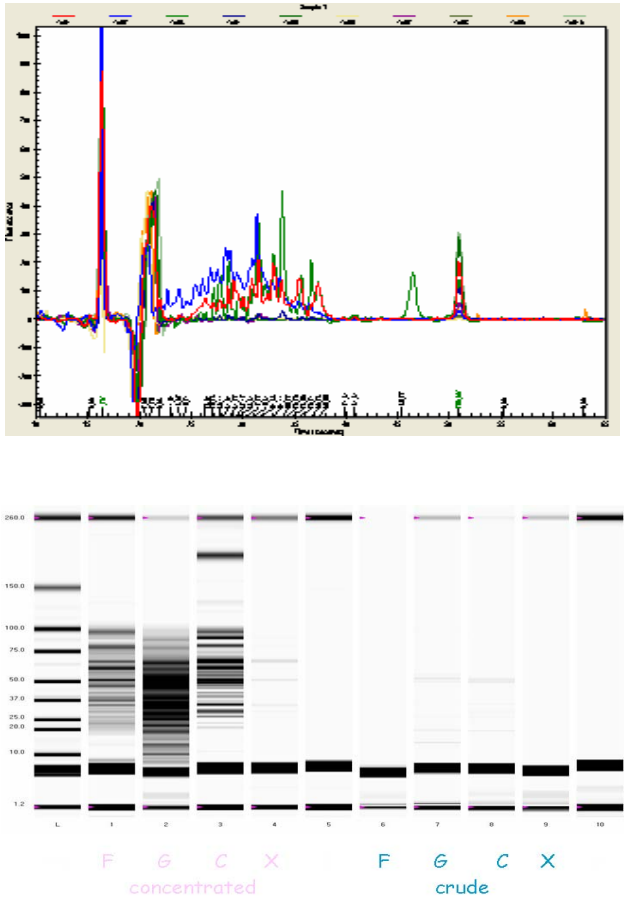


Figure 84. Electrophoresis result of *N. frontalis* culture supernatant protein using microfludic system. (Top : Spctrum of protein electrophoresis, Bottom : Virture image of protein electrophoresis)

Figure 24는 microfluidic system에 의해 도출된 각 단백질의 농도를 수치적으로 계산한 것이다. 수용성의 단당류인 glucose를 기질로 하여 *N. frontalis*를 배양할 경우 20kDa 이하의 분자량을 갖는 단백질이 18%이상 검출되었다. 그러나 filter paper나 cellulose와 같은 기질로 하여 배양할 경우 분자량이 200kDa인 단백질이 검출되었다. 또한 대다수의 섬유소 분해효소의 분자량 영역대인 60 - 200 kDa의 단백질은 filter paper나 cellulose 배지에 비하여 glucose 배지에서 상대적으로 낮게 검출되었다. 이러한 결과로 추정컨대 가용성 탄수화물의 함량이 높은 배지에서 배양할 경우 *N. frontalis*의 증식 및 전체 단백질합성량은 증가할지라도 섬유소분해와 관련된 효소단백질의 합성량은 불용성탄수화물로 하는 배지에 비하여 낮게 분비되는 것으로 사료된다. 또한 filter paper나 Sigmacell cellulose와 같은 불용성 탄수화물이라 할지라도 천연의 filter paper가 합성의 Sigmacell cellulose에 비하여 *N. frontalis*에 의한 이용성이 우수할 뿐 아니라 탄수화물분해와 관련된 효소단백질의 분비량도 증진됨이 관찰되었다. 이는 microcrystalline cellulose는 화학적 구조가 균일하여 천연물인 filter paper에 비해 미생물 효소에 의한 분해가 어려워 이용성이 낮은 것으로 사료된다. *Neocallimaxti frontalis*는 xylanase를 분비하여 xylan을 xylose로 분해하나, xylose는 cellulse의 분해물인 glucose에 비하여 세포내 이용성이 낮아 *N. frontalis*의 증식이 저조할 뿐 아니라 분비되는 단백질의 양도 적은 것으로 추정된다.

Figure 24. Supernatant protein profile of fungal culture under defferent substrate condition.

분자량 (kDa)	단백질 농도(%)			
	Filter Paper	Glucose	Cellulose	Xylan
11		2.3		
13		5.6		
15		3.7		1.2
18		7		
20	1.1	6.4	2.1	7.7
23	3.7		1.7	5.5
25	3.6	6.8	3.5	5
30	5.7	6.2	6.6	5.1
32	5.3	7.8	7.9	13.4
36		6.8		6.5
39	2.4	5.8	4	5.3
42	2.2		2.3	4.8
46	4.6	7	2.3	
50	4.1	11.1	5.7	4.5
52	12.3		10.9	13.1
55			4.3	
58	3.2		2.3	7.3
61	7.5	2.9	6.4	
67	16.1	3.8	16.2	17.2
73			2	
81	10.5	1.3	4.3	4.7
90		1.9	5.5	4.6
96			6.7	
97	14.9			
200	3.8		4.9	

3) 이차원 전기영동(2D- GE)

각 각의 기질에서 배양된 단백질을 수거하여 2차원 전기영동기법을 이용하여 단백질은 전재시킨 결과(Figure 85), 기질의 종류에 따라 배양액에 분비되는 단백질의 분포가 다름을 알 수 있었다. 그러나 각 각의 단백질에 대한 동정을 Image Master Program을 이용하여 수행하였다. 그러나 표준단백질에 대한 정확한 정보를 확보할 수 없을 뿐 아니라, Swiss prot에 존재하는 data base에 혐기곰팡이에 대한 정보가 극히 제한적으로 제공되어서 computer program을 이용한 동정에는 한계가 있었다. 또한 각기 다른 기질조건하에서 발현되는 단백질을 정확하게 비교하기 위해서는 두 개 이상의 gel image를 overlapping 한 후 차이나는 단백질을 비교하여 발현정도를 비교하여 통계분석을 실시하여야 했다. 그러나 기준점으로 삼을 단백질의 분자량과 등전위점의 확보에 제한이 있어 개략적인 확인만이 가능하였다. 이러한 문제점의 해결방안인 2D-DIGE의 방법을 시도하여 분석하였으나 12장의 gel을 염색하기위하여 필요한 염색약의 가격이 900만원인 관계로 본 연구에서는 1회 시도하였다. 그러나 민감한 장비와 시약 및 고도의 기술을 요하는 실험기법이라 본 연구에서는 해석이 가능한 결과를 얻지 못 하였다.
기존의 Swiss prot의 TagIdnt program을 이용하여 전기영동 gel image 상의 단백질을 동정함에 있어서 예측되는 단백질의 분자량 및 내용을 확인하기 위하여 각 각의 단백질을 trypsin으로 가수분해 한 후 MALDI-TOF를 이용하여 peptide fragment를 분석하였다. 구해진 peptide fragment 정보를 Web Data Base Search Program인 MS-FIT을 이용하여 단백질에 대한 정보를 분석하였다(Figure 86). 총 20개의 단백질을 분석한 결과 6개의 단백질에 대한 동정이 가능하였으며, 14개 단백질에 대한 정보는 data base에서 구할 수 없었다. 더구나 확인된 6개의 단백질 중 3개는 분자량은 동일하나 등전위점이 다른 isozyme이었다. TagIdent와 같은 gel image에 근거한 분석방법과 MS-FIT과 같은 peptide fragment의 질량분석에 근거한 방법 공히 반추위 혐기곰팡이에 대한 정보(Data Base)의 제한으로 만족할 만한 결과를 도출하기 어려운 제약사항을 갖고 있다. 따라서 고도의 기술 및 고가의 분석비용이 요구되는 proteomics 기법의 이용성을 증진시키기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

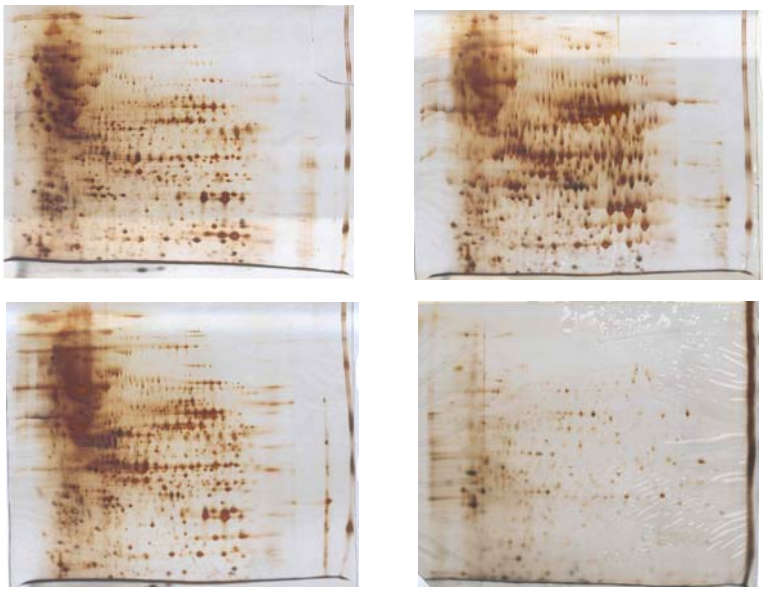


Figure 85. Fungal proteome analyses under different carbohydrate conditions. (Top left: Supernatant protein in glucose medium, Top right: Supernatant protein in cellulose medium, Bottom left: Supernatant protein in filter paper medium, Bottom right: Supernatnat protein in xylan medium)

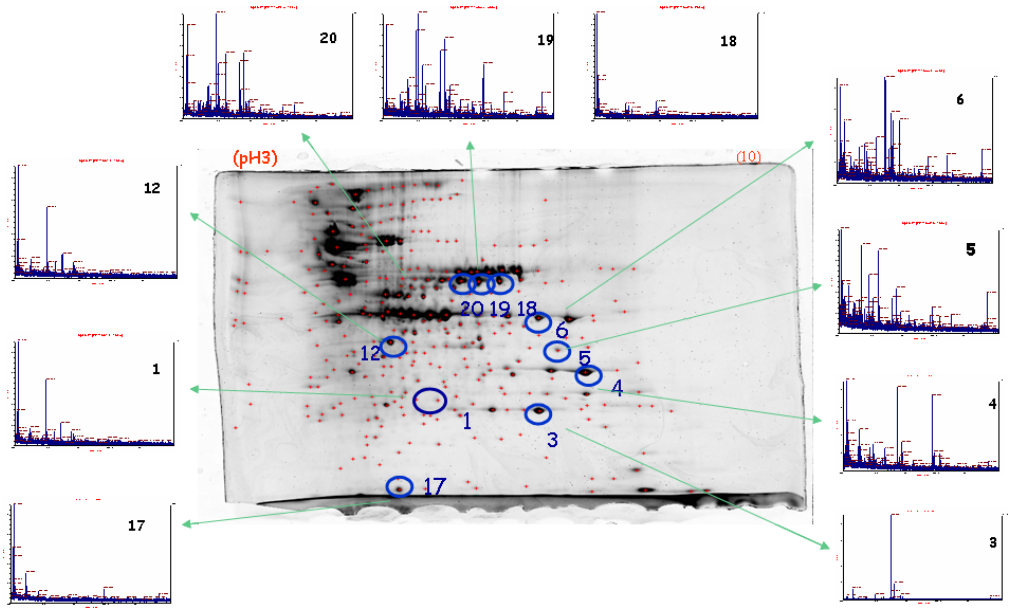


Figure 86. Fungal proteome analysis using 2D-GE and subsequent MALDI-TOF. (3: Malate dehydrogenase, 4: Succinyl-CoA ligase, 12: enolase, 18, 19, 20: Malic enzyme, others: Unidentified)

4) 볏짚의 실용화 가능성

볏짚을 1, 2, 3, 4% 수준으로 탄수화물이 제거된 배지에 첨가하여 혐기곰팡이의 생육의 간접적인 지표가 될 수 있는 gas의 발생량을 측정한 결과, 대조구에 비하여 유의적으로 낮았다(Figure 87). 비록 간접적인 지표라 할지라도 가스 발생량이 낮은 이유는 *N. frontalis*에 의해 볏짚이 분해되어 이용될 수 있는 정도가 낮음을 의미한다.

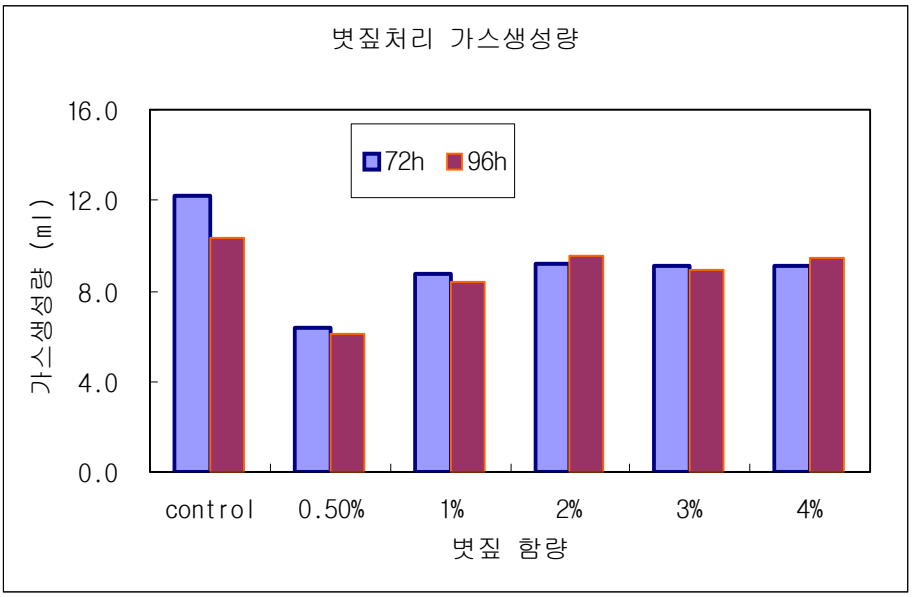


Figure 87. Culture head gas production of *N. frontalis* in rice straw medium with different rice straw concentration.

배양 후 볏짚배지에 존재하는 건물의 함량은 볏짚의 농도가 높을수록 증가하였다(Figure 88). 이는 예측되었던 결과로 볏짚이 *N. frontlais*에 의해 96시간 배양 동안 완전히 수용성물질로 분해될 수 없기 때문이다. 배양조건에 따른 볏짚의 소화율을 계산한 결과 볏짚의 농도가 증가함에 따라 소화율이 감소함을 알 수 있었다(Figure 89). 볏짚의 소화율은 배양시간이 경과함에 따라 증가하였으나, 볏짚의 첨가량이 낮을수록 볏짚의 소화율이 증가하였다. 이는 가용성 탄수화물의 함량이 낮은 볏짚의 경우, 볏짚의 함량이 증가할수록 *N. frontalis* 총량 대비 건물의 함량이 높기 때문인 것으로 추정된다. 일반적으로 *N. frontalis*의 생장은 가용성 탄수화물의 함량이 2%를 초과할 경우 억제된다고 보고되었으나, 볏짚의 경우 볏짚의 함량이 증가하여도 *N. frontalis*의 생육이 저하되지 않음을 알 수 있었다.

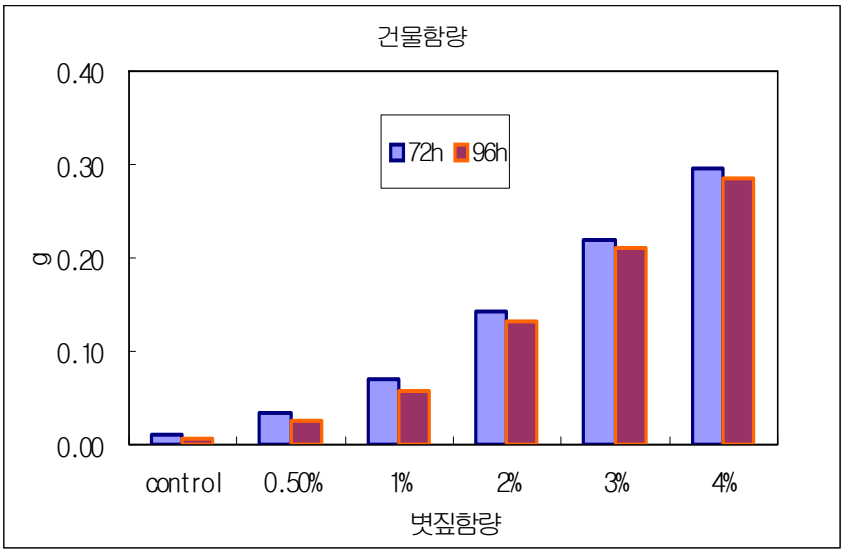


Figure 88. Residual rice straw concnetration in the culture of *N. frontalis* in rice straw medium with different rice straw concentration.

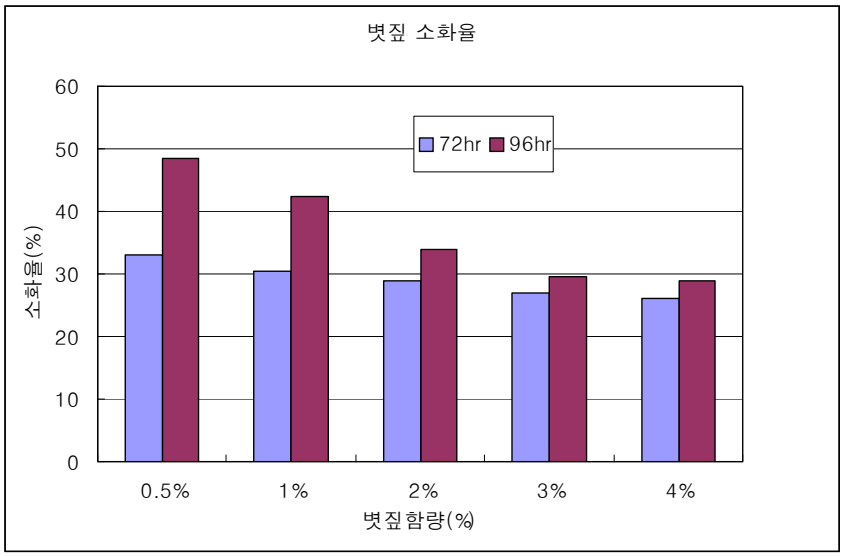


Figure 89. Digestibility of rice straw in the culture of *N. frontalis* in rice straw medium with different rice straw concnetration.

배지내 볏짚의 함량이 증가할수록 분비되는 섬유소 분해효소의 양이 증가하였다 (Figure 90). 섬유소 분해효소의 생성량은 볏짚함량 4%인 배지에서 72시간 배양할 경우와 볏짚함량 3%인 배지에서 96시간 배양할 경우 높았다. 경제적인 측면과 효소의 특성을 고려할 경우, 볏짚함량 4%인 배지에서 72시간 배양하는 것이 *N. frontalis*를 이용하여 섬유소분해효소를 효율적으로 생산하는 방법으로 추정된다. 다만, 배양초기 생육을 촉진시키기 위해서는 일정량의 가용성 탄수화물을 추가로 배지에 첨가하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

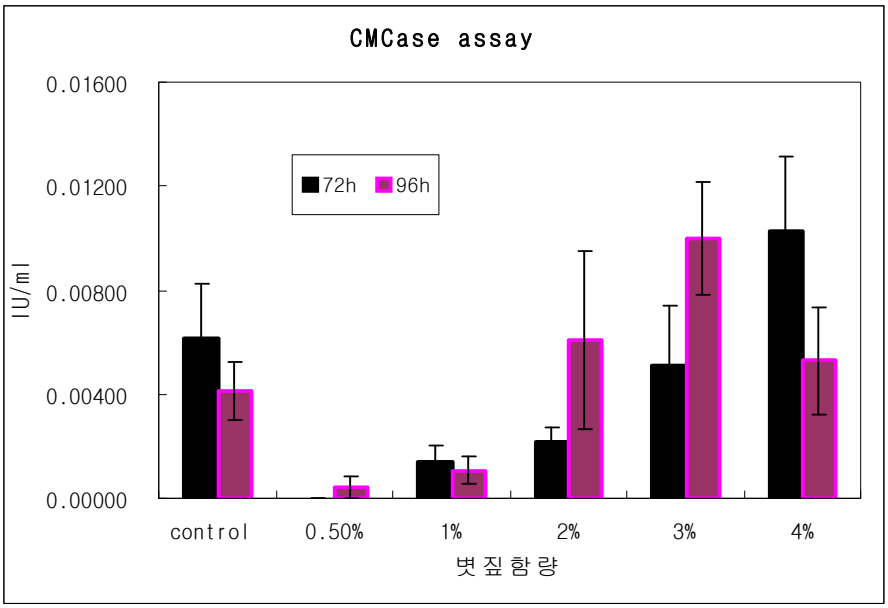


Figure 90. CMCase activity in the culture of *N. frontalis* with different concentraions of rice straw as substrate.

3. 생균제 제조를 위한 우수한 능력을 가진 호기성 곰팡이 선발 및 배양조건 확립

가.연구의세부목표

Aspergillus niger, Aspergillus oryzae 의 곰팡이균은 전통적으로 장류 발효나 효소생산을 목적으로 사용된 균이다. 전통적으로 메주를 발효할 때 볏짚을 사용하여 *Bacillus* 와 *Aspergillus* 속 곰팡이의 접종효과를 얻었었다. 이들 곰팡이는 전분분해능력과 섬유소 분해능력이 뛰어나며, 이들에서 생성되는 효소는 pH가 낮은 조건에서도 효소활성을 유지하는 특성이 있다. 또한 *Aspergillus*균 배양물은 반추위에서 효소활성을 보이며 곰팡이 균체는 반추미생물의 단백질 급여원으로 작용할 수 있다. 이에 따라 본 연구의 목표는 생균제로 이용할 때 그 효과를 가장 높일 수 있는 호기성 곰팡이를 선발하고, 최적의 배양 조건을 확립하는 데 있다.

나.연구방법

1) 균주

한국 생명공학연구원 생물자원 센터에서 *Aspergillus oryzae* KCTC 6095, 6291, 6292, 6377, 6595, 6596, 6909 그리고 6983까지 8개 균주와 농촌진흥청 농용미생물보존센터에서 KACC 40242와 40234까지 2개의 균주를 분양받았다. 변형된 Kimura (1997)의 xylan 배지에 1%수준(v/v)으로 종균을 접종하여 배양하였다. 항균활력을 조사하기 위하여 사용된 균주로는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021이었으며, 이 균주는 대표적인 Gram positive bacteria로써 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양받아 Nutrient agar 배지에서 배양하여 사용하였다.

2) 배양조건

본 시험에서 사용된 배양배지는 Kimura (1997)의 방법을 변형한 것으로서

xylan 배지를 증류수 1000mL 당 Yeast extract 16g, Soluble starch 10g, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ 0.5g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g을 용해시킨 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 그리고 citric acid와 sodium phospate가 첨가된 배지를 미리 seed배지로 사용하여 1%수준(v/v)으로 접종하였다. *Aspergillus oryzae*는 300mL baffle flask에 액체배지를 100mL 넣고 30℃에서 200rpm의 호기 shaking incubator에서 배양되었다. *Bacillus subtilis*는 39℃, 150rpm의 호기 Shaking incubator에서 12시간 배양하여 Nutrient agar(Difco. Inc. U.S.A.) 배지로 옮겨서 배양 후 항균활력을 검증 하였다.

4) 생균제로 이용할 *Aspergillus oryzae* 의 선발

생균제로 이용할 균주를 선발하기 위해 100ml의 변형된 Kimura (1997)배지에 분양받은 10개의 균주를 10,000 spore/ml 로 배양한 seed 균주를 접종하였다. 각각 균주의 성장률을 측정하기 위해 48, 72 그리고 96시간에 cell을 회수하여 건조하여 cell mass를 측정하였으며, 96시간 배양 후 1ml의 상층액을 회수하여 xylanase와 CMCase의 활성을 측정하였다. 각각의 enzyme 활성 측정은 각각 2%의 xylan과 CMC가 함유된 agar plate에 회수된 상층액을 5ul와 10ul loading 한 후 39℃에서 12시간 배양 후 congo red 로 염색하여 생성되는 환의 크기를 측정하였다.

3) *Aspergillus oryzae* 의 최적 pH

Aspergillus oryzae 의 최적 성장 pH 범위(Optimum pH range)를 조사하기 위하여 pH를 각각 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 및 6.5로 0.5N HCl과 0.5N N*A. oryzae*H를 사용하여 인위적으로 설정하였다. 6개 처리구를 5반복씩 96시간 동안 배양하면서 0, 24, 36, 48, 60, 72 및 96시간에 시료를 채취하였다. 각 배양 시간대별로 시료는 filter paper (Watman No. 1) 와 0.2㎛ membrane filter를 이용하여 균체를 회수하여 protein lysis buffer로 용해한 후 단백질 농도를 Lowry법(Bio-rad. Hercules, CA, U.S.A.)에 의거하여 측정하였다. 단백질 표준품으로 bovine serum albumin 을 이용하여 단백질 검량선을 작성하였다.

4) *Aspergillus oryzae* 의 최적 접종량

Aspergillus oryzae 의 최적 접종량 (Optimum inoculation dosage)을 구하기 위하여 nitric acid 와 sodium phosphate가 첨가된 seed 배지에서 배양한 포자를 각각 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 % (v/v) 수준으로 접종한 처리구를 3반복으로 120시간 배양하고, 시간대별로 (0, 24, 48, 72, 96, 120h) 시료를 채취하여 십진희석 한 후 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco. Inc. U.S.A.)배지에 도말하여 32℃에서 24시간 배양하여 포자의 수를 측정하였다. 또한 72시간 배양하였을 때 균체크기를 육안으로 측정하였다.

5) *Aspergillus oryzae* 의 최적 배양시간

Aspergillus oryzae 의 최적 배양시간(Optimum incubation time)을 구하기 위하여 nitric acid 와 sodium phosphate가 첨가된 seed 배지에서 미리 키운 spore들을 1% (v/v) 수준으로 접종한 처리구를 5반복으로 120시간 배양하고, 시간대별로 (0, 24, 48, 72, 96, 120h) 샘플을 채취하여 십진희석 한 후 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco. Inc. U.S.A.)배지에 도말하여 32℃에서 24시간 배양하여 포자의 수를 측정하고 일부를 60℃에서 건조하여 세포의 건물중량을 측정하였다.

다. 연구결과

1) 생균제로 이용할 *Aspergillus oryzae* 의 선발

48시간 배양후 KACC 40242, KCTC 6095, 6291, 6292, 6596 의 5개 균주의 cell mass 가 높게 측정되었다(Figure 91). 또한 72, 96시간까지 배양했을 때 cell mass의 값이 점차 감소하는 것으로 보아 48시간 이후에는 autolysis가 일어나 그 균체가 감소한는 것으로 판단된다. 이 중 KACC 40242 의 경우 성장률이 높은 다른 균주보다 반복간 변이가 적고 성장 과정중 형태적 형상이 비교적 균일한 것으로 관찰 되었다. KACC 40234, KCTC 6377 의 경우는 72시간 배양시에 가장 높은 cell mass양이 측정되었다. 이는 생균제로 이용할 때 48시간에 높은 값을 갖는 균주들보다 배양시간에 있어서 생산성을 떨어뜨리는 원인이 될 것으로 판

단된다. KCTC 6595, 6909 는 다른 균주에 비해 성장률이 현저히 낮은 것으로 측정되었으나 KCTC 6909의 경우는 CMCase, Xylanase 역가가 다른 균주보다 현저히 높은 것으로 측정되었다. 비록 낮은 성장률이 생균제 제조시 사료에 급여되는 균체의 효과를 감소시킬 것으로 판단되나 다른 균주에 비해 높은 enzyme 활성이 이를 보완하기에 충분할 것으로 판단된다. 따라서 cell mass, enzyme 활성, 형태적 형상을 고려하여 KACC 40242 와 KCTC 6909 를 선발하여 차후 시험에 이용하였다.

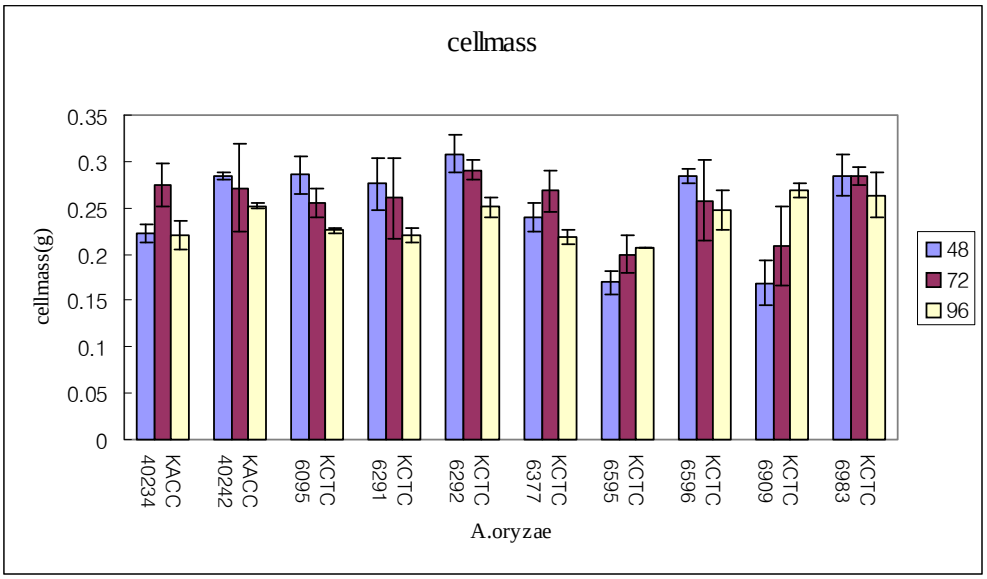


Figure 91. Comparison of cell mass production among different *Aspergillus oryzae* strains.

KCTC 6595, 6909 는 다른 균주에 비해 성장률이 현저히 낮은 것으로 측정되었으나 KCTC 6909의 경우는 CMCase(Figure 92), Xylanase(Figure 93) 역가가 다른 균주보다 현저히 높은 것으로 측정되었다. 비록 낮은 성장률이 생균제 제조시 사료에 급여되는 균체의 효과를 감소시킬 것으로 판단되나 다른 균주에 비해 높은 enzyme 활성이 이를 보완하기에 충분할 것으로 판단된다. 따라서 cell mass, enzyme 활성, 형태적 형상을 고려하여 KACC 40242 와 KCTC 6909 를 선발하

여 차후 시험에 이용하였다.

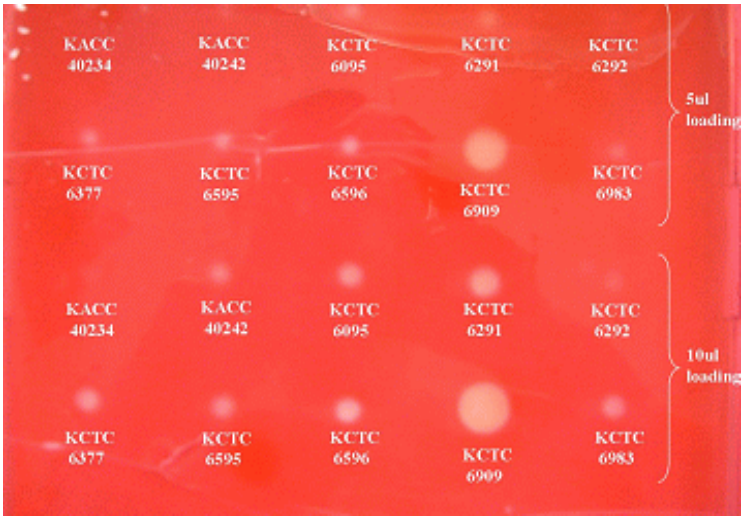


Figure 92. Comparison of CMCase activity among different *Aspergillus oryzae* strains.

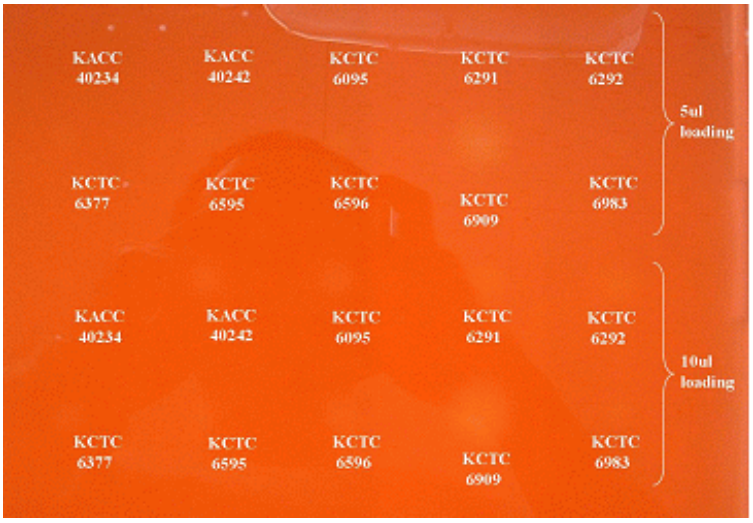


Figure 93. Comparison of xylanase activity among different *Aspergillus oryzae* strains.

2) *Aspergillus oryzae* 의 선발 및 배양액의 최적 pH 확인

KACC 40242 를 이용하여 생장에 가장 적합한 pH 조건을 결정하기 위하여 인위적으로 pH를 4.0~6.5 범위 내로 설정하여 시간대별 배양물을 채취하여 Lysis buffer로 용해한 후 측정한 단백질함량을 측정함으로써 곰팡이의 생장을 간접적으로 측정하였다. 그 결과 균체 단백질 함량은 pH 5.0과 5.5에서 가장 높았다 (Figure 94). 이는 일반적으로 *Aspergillus* 종의 곰팡이에서 분비되는 탄수화물 분해효소의 최적 pH가 5 - 5.5인 내용과 일치함을 알 수 있었다. 또한 배양이 지속됨에 따라 배양액의 pH가 증가하여 증식이 억제되는 점을 고려할 경우, *Aspergillus oryzae*를 배양할 경우 산도는 5 - 5.5를 유지하는 것이 바람직하다는 결론을 도출할 수 있었다.

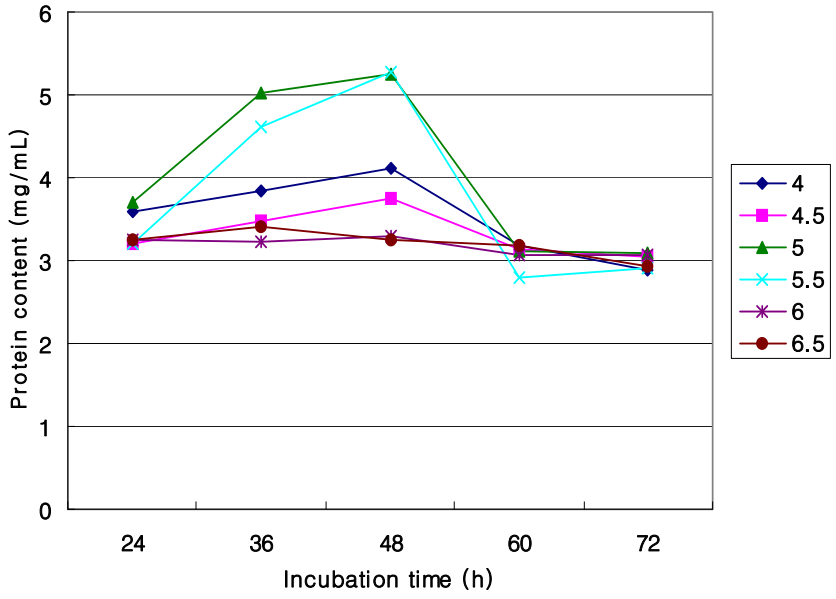


Figure 94. Protein production of *Aspergillus oryzae* by different pH.

3) *Aspergillus oryzae* 의 최적 접종량 확인 시험

Aspergillus oryzae KACC 40242 배양시 균체 생성량 및 적정 균체의 크기를 결정하기 위하여 0.7×10^3 cfu/ml의 종균배지를 배지의 0.1(a), 0.25(b), 0.5(c), 1(d), 1.5(e), 2(f)% (v/v) 수준으로 접종하여 72시간 배양한 후 배양액내 균체의 크기를 관찰한 결과(Figure 95, 96) 접종량이 증가할 수록 균체의 크기가 감소함을 확인할 수 있었다. 접종량이 증가하게 될 경우 한정된 영양소 공급상태에서 균체간 생존의 경합을 벌임으로써 균체의 크기가 감소하는 것으로 추정된다. 액체배양된 *Aspergillus oryzae* 배양액을 사료와 혼합할 경우 균체의 크기가 작을수록 사료 전체에 골고루 분산될 수 있는 장점이 있다. 따라서 현장에서 *Aspergillus oryzae*를 액체배양하여 첨가제로 사용할 경우 균체의 크기 감소는 중요한 요인이라 할 수 있다. 다만 접종되는 균체의 양이 증가할수록 미생물제제를 생산하기 위한 생산비에 변화를 초래할 가능성이 고려되어야 하겠다. 반면에 배양액에 존재하는 중금속과 같은 특정의 물질을 제거하기위한 목적일 경우에는 균체의 크기를 증가시킴으로써 균체의 회수에 편리성을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

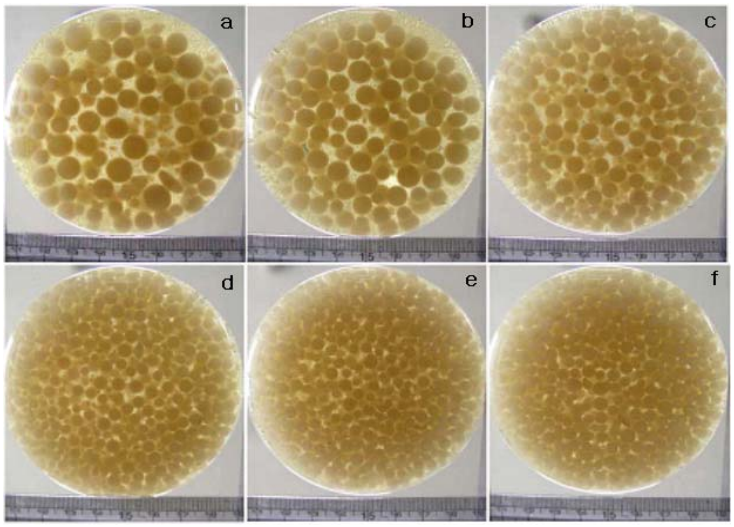


Figure 95. Colony size of Aspergillus oryzae by different amounts of inoculant after 72hr incubation. (a: 0.1%, b: 0.25%, c: 0.5%, d: 1.%, e: 1.5%, f: 2%)

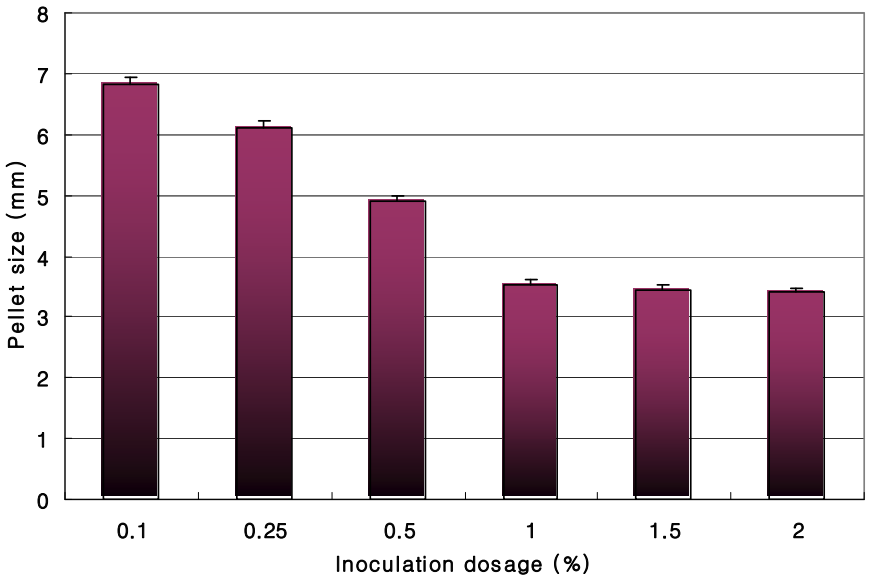


Figure 96. Pellet size of *Aspergillus oryzae* on different inoculation dosage

접종농도를 달리하여 배양한 *Aspergillus oryzae* 배양 상층액을 평판도말하여 군락의 개수를 조사한 결과 (Figure 97), 4배양 48시간까지 급격하게 군락의 수가 증가하고 이후 증가도가 감소함을 관찰할 수 있었다. 배양이 종료된 120시간 후의 군락의 수는 0.1% 처리구에서 가장 높게 관찰되었다. 최소의 접종량인 0.1% 처리구에서 배양 종료 후 최대의 군락이 관찰된 것은 배양액에 존재하는 전체 균체의 수가 적고 이는 균체간 경합도를 경감시키기 때문인 것으로 추정된다.

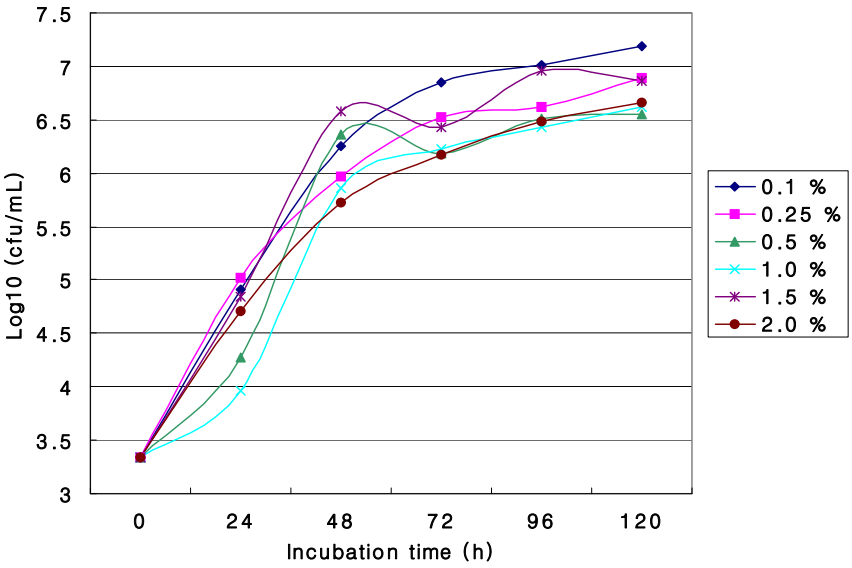


Figure 97. Colonizing pattern of *Aspergillus oryzae* by different amount of inoculator on plate culture.

4. Nitrogen stress 이용한 *Aspergillus oryzae*의 항균물질 유도 시험

가.연구의세부목표

Aspergillus niger, Aspergillus oryzae 의 곰팡이균은 전통적으로 장류 발효나 효소생산을 목적으로 사용된 균이다. 전통적으로 메주를 발효할 때 볏짚을 사용하여 *Bacillus* 와 *Aspergillus* 속 곰팡이의 접종효과를 얻었었다. 이들 곰팡이는 전분분해능력과 섬유소 분해능력이 뛰어나며, 이들에서 생성되는 효소는 pH가 낮은 조건에서도 효소활성을 유지하는 특성이 있다. 또한 *Aspergillus*균 배양물은 반추위에서 효소활성을 보이며 곰팡이 균체는 반추미생물의 단백질 급여원으로 작용할 수 있다. 이에 따라 본 연구의 목표는 *Aspergillus oryzae* 의 배지 영양소원을 달리하여 배양된 발효추출물의 항균물질 분비를 조사하고, 그 성분 특성 및 기작을 알아보기 위하여 수행하였다.

나.재료및방법

1) 균주

Aspergillus oryzae KACC 40242 는 농촌진흥청 농용미생물보존센터 (Korean Agricultural Culture Collection) 에서 분양받았으며, 변형된 Kimura (1997) 의 xylan 배지에 1%수준(v/v)으로 접종하여 배양하였다. 항균활력을 조사하기 위하여 사용된 균주로는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021 이었으며, 이 균주는 대표적인 Gram positive bacteria 로써 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures) 로부터 분양받아 Nutrient agar 배지에서 배양하여 사용하였다.

2) *Aspergillus oryzae* 항균활력 검증

Aspergillus oryzae 발효 추출물의 항균활력(Antimicrobial activity) 측정을 위하여 직경 6mm의 paper disc에 정해진 농도로 흡착시키고 clean bench 안에서 2시간 건조하였다. *Aspergillus oryzae* 발효추출물이 흡착된 paper disc를 detector로 사용할 *Bacillus subtils* 로 접종(1.0×10^8 cfu) 한 Nutrient agar배지에 얹고 37℃에서 10시간 배양한 후 저해환 (Inhibition zone diameter)의 지름(Ø)을 측정하였

다. 저해환의 해상도를 높이기 위하여 0.2% Tetrazolium red로 염색하였다. 이때 흡착시킨 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 건물함량(Dry matter)도 함께 측정하였다.

3) *Aspergillus oryzae* 발효 추출용매 및 농도결정

Aspergillus oryzae 발효 추출물의 추출용매(Extract solvent) 및 흡착농도(Diffusion dosage)별 항균활력 측정을 위하여 직경 6mm의 paper disc에 각각 5, 10, 25, 50㎕ 양만큼 흡착시키고 clean bench 안에서 2시간 건조하였다. *Aspergillus oryzae* 발효배양액 중 Watman No. 1 filter paper와 0.2㎛ spore membrane filter를 이용하여 모은 상층액(supernatant)을 동결건조(freezing-dry, Fd5512spt, Ilshin lab. Co.) 시킨 후 이를 각각 Haxane, Ethyl acetate, Methanol에 유기용매추출하고 진공감압농축기(Vacuum evaporator)로 1/100배로 농축하였다.
Aspergillus oryzae 발효추출물이 흡착된 paper disc를 detector로 사용할 *Bacillus subtils*로 접종(1.0×10^8 cfu) 한 nutrient agar 배지에 얹고 37℃에서 10시간 배양한 후 저해환 (inhibiton zone diameter)의 지름(Ø)을 측정하였다. 저해환의 해상도를 높이기 위하여 0.2% Tetrazolium red로 염색하였다.

4) 탄소원에 따른 nitrogen stress 반응 평가

본 배양배지로는 Kimura(1997)의 xylan 배지를 약간 변형하여 증류수 1000mL당 Yeast extract 16g, Soluble starch 10g, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ 0.5g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g을 용해시킨 후 121℃에서 15분 멸균하여 사용하였다. 여기에 citric acid와 sodium phospate가 첨가된 배지를 미리 seed배지로 사용하여 1%수준으로 접종하였다. *Aspergillus oryzae*는 300mL baffle flask에 액체배지를 100mL 넣고 30℃에서 200rpm의 호기 shaking incubator에서 배양되었다. 질소원 결핍을 주기 위한 조건으로는 72시간 배양된 100mL의 *Aspergillus oryzae* 배지에 한 처리구는 질소원(Yeast extract)이 첨가된 본 배양배지(Normal media)를 100mL 더 첨가하고(adding) 나머지 처리구는 질소원(Yeast extract) 이 제외된 본 배양배지(Stress media)를 100mL 더 첨가하여(adding) 48시간 더 배양하였다. 질소원은 Yeast extract를 기본으로 하고 점차 Ammonium sulfate, Lysine 등의 배합을 달리하였으며 탄소원도 Soluble starch를 기본으로 Soluble starch → Soluble starch, Soluble starch → Glucose, Glucose → Glucose 등으로 변형하여 배양하였다. 또 한 실험은 Soluble starch

→ Glucose를 단계별로 적용하고 48시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 균체(pellet)만 남도록 여과(filtering) 한 후 100mL 질소원공급배지와 질소원결핍배지로 나누어 담은 후 96시간 더 배양하고 시간대별로 샘플을 채취하였다.

5) *Aspergillus oryzae* 발효 추출물의 Bioautography Test

Aspergillus oryzae 발효 추출물의 극성정도를 측정하기 위하여 Bioautography test 방법을 이용하여 질소원공급배지와 질소원결핍배지에서 추출한 물질들의 항균활력을 검증하였다(Chang 등. 2002). *Aspergillus oryzae* 발효 추출물을 농도별로 (1~5㎕) 20×20 cm Silica gel TLC plate (Silica gel 60 F_{254} , Watman.)에 loading 하여 Benzene 과 Ethylacetate 를 1 : 2의 혼합물로 전개하였다. 전개된 TLC plate를 clean bench에서 완전 건조시킨 후 *Bacillus subtilis* 가 1.0×10^8 CFU의 농도로 접종된 nutrient agar 배지에 30분 동안 diffusion 시킨 후 37℃에서 10시간 배양하여 항균활력이 있는 밴드의 R_f value를 측정하였다. 배양된 *Bacillus subtilis* 배지는 0.2% Tetrazolium red 용액을 처리하여 해상도를 증가시킨 후 미생물의 성장 및 저해환의 크기를 측정하였다.

다.연구결과

1) *Aspergillus oryzae* 발효 추출용매 및 농도결정

Aspergillus oryzae 배양물의 항균활력을 측정하기 위하여 추출유기용매의 종류 및 흡착농도를 우선 알아보고자 실험한 결과는 Figure 98와 같다. 우선 3가지 종류의 유기용매 추출에 있어 hexane 을 이용한 것에서는 항균활력이 거의 측정되지 않았고, ethyl acetate 와 methanol 추출물에서 대표적인 gram positive bacteria 인 *Bacillus subtils* 의 생장을 저해하는 어떠한 물질이 존재함을 알 수 있었다. 특히 이들은 배양액을 동결건조한 powder를 액체유기용매에 solid : liquid 방법으로 추출함으로써 이루어졌으며 배양액을 그대로 액체유기용매에 liquid : liquid 로 추출한 방법은 이와 같은 결론을 얻지 못하였다. 특히 항균활력이 있는 것으로 나타난 ethyl acetate 추출물과 methanol 추출물을 paper disc 에 overloading 되지 않는 범위 내에서 더 자세하게 나누어 흡착시킨 결과는 Figure 99 과 같다. Haxane은 제외하고 ethyl acetate와 methanol 추출물만을 인위적으로 0.1~50㎕ 범위 내에서 흡착시켜 저해환의 크기를 측정하였는데 이중 methanol 추출물 50㎕를 흡착시켰을 때 *Bacillus subtils* 의 생장을 억제하는 저해환의 직경이 가장 높게 나타났다.

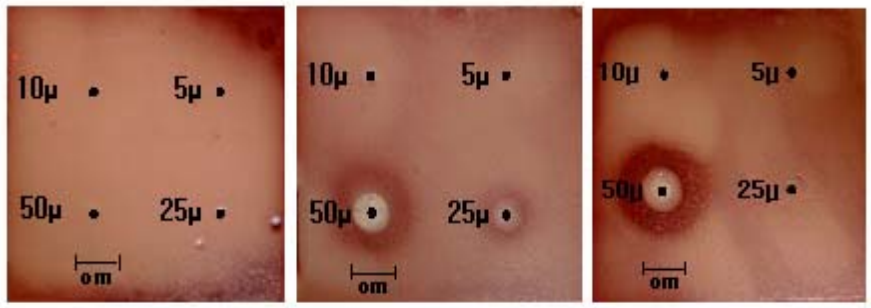


Figure 98. Dose dependent antimicrobial activities of A*spergillus oryzae* fermentation extracts on gram positive *Bacillus subtilis* (Each spot means extracts solved in, hexane, ethyl acetate and methanol at different dosage)

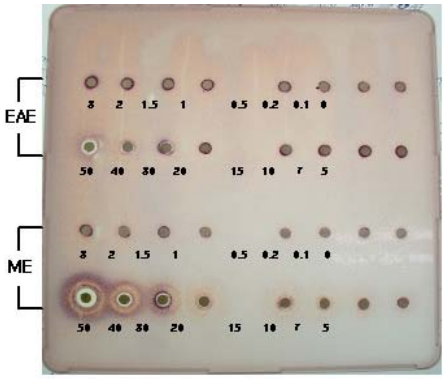


Figure 99. Dose dependent antimicrobial activities of *Aspergillus oryzae* fermentation extracts on gram positive *Bacillus subtilis* by paper disc diffusion method (μl) (EAE : ethyl acetate extract, ME : methanol extract, Each paper disc means different dosage)

2) 탄소원은 Soluble Starch로 고정하고 질소원의 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지에서 탄소원은 Soluble starch 로 고정하고 각각 48, 72, 96, 120 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양물에 질소원(Yeast extract) 공급 및 결핍

배지로 나누어 100mL 의 액체배지를 첨가한 후 48시간씩 동일하게 더 배양하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis* 대한 항균활력을 검증한 결과는 Figure 25과 같다. 탄소원이 Soluble starch 인 배지의 배양 첫 단계에서 72시간까지 배양하고 질소원 공급 및 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 48시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 항균활력이 가장 높게 나타났다. 균체의 성장에 있어서 대수기와 지수기에 다다르는 48시간과 72시간대에서 항균활력이 높게 나타났으며 96, 120 시간대의 항균활력은 상대적으로 낮게 측정되었다. 특히 질소원 공급배지에서도 모든 시간대에서 항균활력이 검증되었다. 이는 질소원 결핍배지의 항균활력보다 대체로 낮게 측정되었으며 두 처리간의 분비물질이나 함량에 차이가 나는 사실을 구명할 필요가 있다.

Table 25. Inhibition zone diameter of soluble starch with or without nitrogen source

Incubation time (h)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Normal media	Stress media
48	180	200
72	190	225
96	140	150
120	125	140

3) 탄소원은 Glucose로 고정하고 질소원의 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지에서 탄소원은 Glucose 로 고정하고 각각 48, 72, 96, 120 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양물에 질소원(Yeast extract) 공급 및 결핍배지로 나누어 100mL의 액체배지를 첨가한 후 48시간씩 동일하게 더 배양하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis* 대한 항균활력을 검증한 결과는 Figure 26과 같다. 탄소원이 Glucose 인 배지의 배양 첫 단계에서 72시간까지 배양하고 질소원 공급 및 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 48시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 항균활력이 가장 높게 나타났으나 유의차는 별로 보이지 않았다. 균체의 성장에 있어서 대수기와 지수기에

다다르는 48시간과 72시간대에서 항균활력이 높게 나타났으며 96, 120 시간대의 항균활력은 상대적으로 낮게 측정되었지만 큰 차이는 보이지 않았다. 그러나 이는 탄소원을 Soluble starch로 배양한 것보다 큰 저해환을 형성하지는 못하였다. 이것은 첫 단계에서 탄소원이 부족하였기 때문에 일단 성장에 지장이 있어 분비물이 많지 않았으리라고 추정할 수 있다. 특히 질소원 공급배지에서도 모든 시간대에서 항균활력이 검증되었다. 이는 질소원 결핍배지의 항균활력보다 대체로 낮게 측정되었으며 두 처리간의 분비물질이나 함량에 차이가 나는 사실을 구명할 필요가 있다.

Table26. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source

Incubation time (h)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Normal media	Stress media
48	80	90
72	90	100
96	80	90
120	75	80

4) 탄소원은 Soluble Starch에서 Glucose로 변경하고 질소원의 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지에서 탄소원은 첫 단계에서 Soluble starch 로 각각 48, 72, 96, 120 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양물에 두 번째 단계에서 탄소원을 Glucose로 교체하고 질소원(Yeast extract) 공급 및 결핍배지로 나누어 100mL의 액체배지를 첨가한 후 48시간씩 동일하게 더 배양하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis*에 대한 항균활력을 검증한 결과는 Table 27과 같다. 탄소원이 Soluble starch 인 배지의 배양 첫 단계에서 72시간까지 배양하고 질소원 공급 및 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 Glucose로 바꾼 후 48시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 항균활력이 가장 높게 나타났다. 다른 실험들과 마찬가지로 균체의 성장에 있어서 대수기와 지수기에 다다르는 48시간과 72시간대에서 항균활력이 높게 나타났으며 96, 120 시간대의 항균활력은 상대적으로 낮게 측정되었다. 특히 질소원 공급배지에서도 모든

시간대에서 항균활력이 검증되었다. 이는 질소원 결핍배지의 항균활력보다 대체로 낮게 측정되었으며 두 처리간의 분비물질이나 함량에 차이가 나는 사실을 구명할 필요가 있다.

Table 27. Inhibition zone diameter of soluble starch, glucose with or without nitrogen source

Incubation time (h)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Normal media	Stress media
48	155	180
72	170	220
96	120	140
120	105	120

Figure 100에서는 Bioautography test를 통하여 질소원공급 및 질소원 결핍 배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 배양추출물 성분의 항균활력을 각각 검증하였다. 질소원공급배지에서 성장한 *Aspergillus oryzae* 배양추출물의 항균활력은 72시간에 새로이 배지를 공급한 것이 가장 높게 나타났으며 96시간에 배지를 공급한 것에서도 높게 나타났다. 특히 72시간에 있어서 질소원 공급배지에서는 Rf value 가 0.653 인 지점에서 항균활력이 있는 밴드가 나타났고 질소원 결핍배지에서는 Rf value 가 각각 0.474와 0.653인 부분에서 밴드가 나타났으며 96시간에 배지를 추가공급 했을 때에는 Rf value 가 0.698 지점에 두 처리구 모두 항균활력을 나타내는 밴드가 형성되었다. 이는 질소원공급배지에서 자란 배양추출 물질과 질소원결핍배지에서 자란 배양 추출물의 성분이 다르다는 것을 간접적으로 증명하는 것이다. 이는 차후 성분분석을 통하여 그 성분을 구명하고 구조식 및 특성을 파악하여 높은 항균활력을 지니는 항균물질을 유도하는 것이 중요하다.

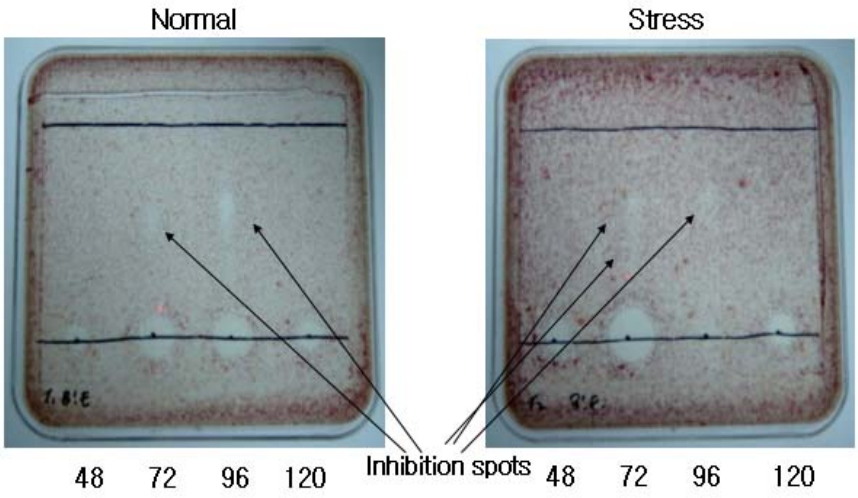


Figure 100. Bioautography test on soluble starch, glucose with or without nitrogen source on different incubation time

4) 탄소원은 Soluble starch, 질소원은 Yeast extract 로 72시간 배양하고 탄소원을 Glucose로 바꿔서 질소원의 공급 및 결핍배지를 첨가하여 48시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지 중 첫 단계에서 탄소원은 Soluble starch 로 공급하고 각각 72 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양물에 탄소원을 Glucose로 교체하고 질소원(Yeast extract) 공급 및 결핍배지로 나누어 100mL의 액체배지를 첨가한 후 48시간씩 동일하게 더 배양하고 24, 48시간대의 샘플을 채취하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis* 대한 항균활력을 검증한 결과는 Figure 101 과 같다. 탄소원이 Soluble starch 인 배지의 배양 첫 단계에서 72시간까지 배양하고 질소원 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 탄소원을 Glucose로 교체하고 24시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 단위 건물 함량 당 항균활력이 가장 높게 나타났다(Figure 102). 질소원의 공급 및 결핍된 배지를 첨가하기 이전의 24, 48, 72 시간 배양단계에서의 배양추출물도 항균활력을 보였으며 이후 질소원 결핍배지의 항균활력이 크게 나타났다. 이는 성장곡선과도 연관이 있어 균체가 많이 자랄수록 항균활력이 높게 나타나는 것으로써 성장이 좋을수록 물질의 분비가 많아지며 이들이 효력을 나타낼 가능성도 내포할 것이라는 것을 짐작할 수 있다.

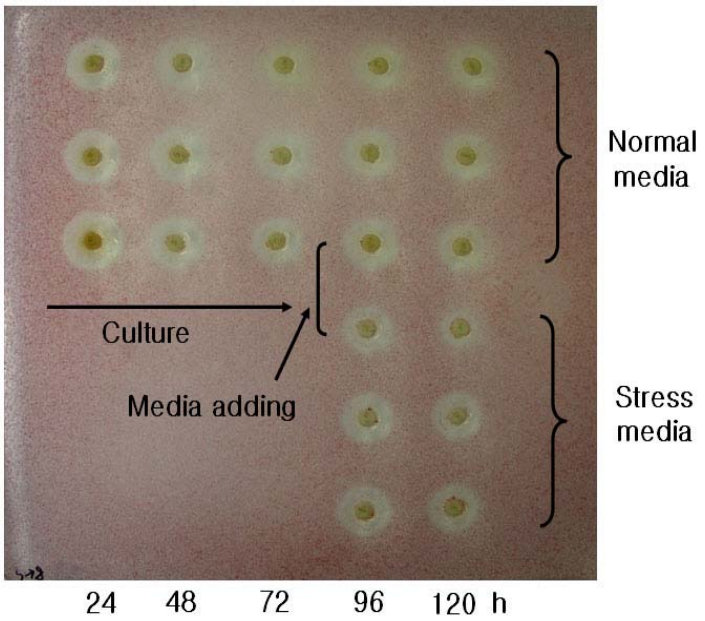


Figure 101. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source Yeast extract on different incubation time

Figure 102 에서는 질소원 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 의 건조중량을 측정한 후 단위 건물 함량이 지니는 저해환의 크기를 비교함으로써 시간대별 항균역가를 비교하여 나타내고 있다. 두 번째 단계에서 질소원 공급 및 결핍 배지를 첨가하고 96시간 배양했을 때 질소원 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 배양추출물의 항균역가가 공급배지에서 자란 것보다 약 20mm 저해환의 크기가 더 큰 것을 확인 할 수 있다. 또한 120시간대에서는 오히려 약 10mm 정도 저해환의 크기가 줄어든 것을 알 수 있었다. Bioautography test 를 통한 두 처리간의 추출물의 항균활력 물질의 성분이 다를 것이라는 간접적 증명은 **Figure** 103 에 보여주고 있다. 질소원공급배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 배양추출물의 Rf value가 0.623인 부분과 0.273인 부분인 결핍배지에서의 처리구와 항균활력이 다른 밴드가 나타났다.

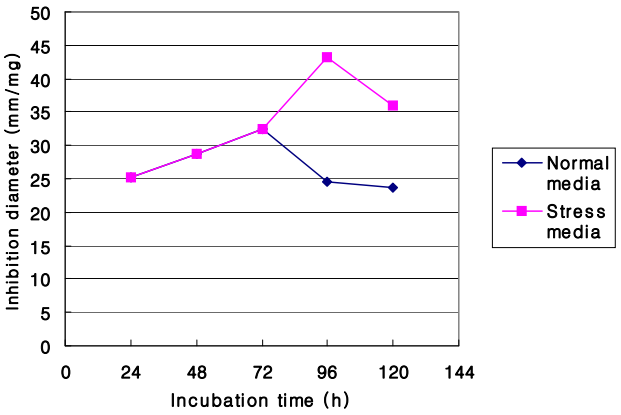


Figure 102. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source Yeast extract on DM basis

Figure 103. Bioautography test on glucose with or without nitrogen source Yeast extract on different incubation time

6) 탄소원은 Soluble starch, 질소원은 Yeast extract : Ammonium sulfate = 6 : 10로 72시간 배양하고 탄소원을 Glucose로 바꿔서 질소원의 공급 및 결핍배지를 첨가하여 48시간 배양한 *Aspergillusoryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지 중 첫 단계에서 탄소원은 Soluble starch 로 공급하고 각각 72 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양물에 탄소원을 Glucose로 교체하고 질소

원(Yeast extract : Ammonium sulfate = 6 : 10) 공급 및 결핍배지로 나누어 100mL의 액체배지를 첨가한 후 48시간씩 동일하게 더 배양하고 24, 48시간대의 샘플을 채취하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis* 대한 항균활력을 검증한 결과는 Figure 104 과 같다. 탄소원이 Soluble starch 인 배지의 배양 첫 단계에서 72시간까지 배양하고 질소원 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 탄소원을 Glucose로 교체하고 48시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 단위 건물 함량 당 항균활력이 가장 높게 나타났다. 그러나 24시간 더 키운 것과도 많은 차이가 나지는 않았다. 배지첨가 전 첫 번째 단계에서 이전 실험들과는 달리 24, 48, 72 시간대의 항균활력이 크게 나지는 않았으며 질소원 공급배지에서도 항균활력이 검증되었다.

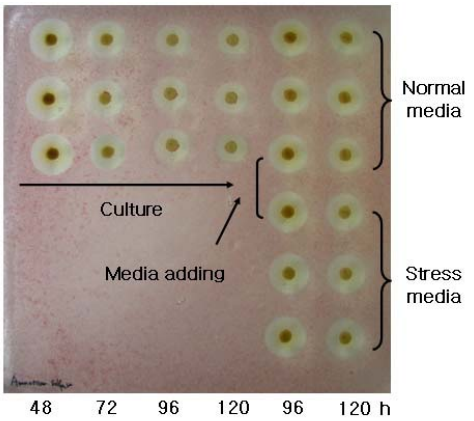


Figure 104. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source (Yeast extract : Ammonium sulfate = 6 :10) on different incubation time

Figure 105 에서는 질소원 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 의 건조중량을 측정한 후 단위 건물 함량이 지니는 저해환의 크기를 비교함으로써 시간대별 항균활력을 비교하여 나타내고 있다. 두 번째 단계에서 질소원 공급 및 결핍 배지를 첨가하고 96 및 120시간 배양했을 때 질소원 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 배양추출물의 항균활력이 공급배지에서 자란 것보다 약 15mm 저해환의 크기가 더 크고 이후로는 별로 차이가 나지 않음을 확인 할 수 있다.

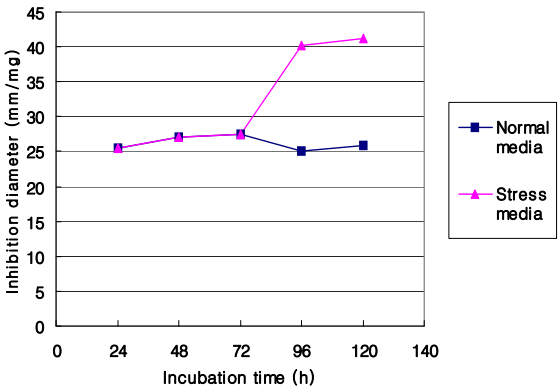


Figure 105. Inhibition zone diameter of glucose with or withoutnitrogen source (Yeast extract : Ammonium sulfate = 6 : 10) on DM basis

7) 탄소원은 Soluble starch, 질소원은 Yeast extract : Ammonium sulfate : Lysine = 6 : 5 : 5로 72시간 배양하고 탄소원을 Glucose로 바꿔서 질소원의 공급 및 결핍배지를 첨가하여 48시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지 중 첫 단계에서 탄소원은 Soluble starch 로 공급하고 각각 72 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양물에 탄소원을 Glucose로 교체하고 질소원(Yeast extract : Ammonium sulfate : Lysine = 6 : 5 : 5) 공급 및 결핍배지로 나누어 100mL의 액체배지를 첨가한 후 48시간씩 동일하게 더 배양하고 24, 48시간대의 샘플을 채취하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis* 대한 항균활력을 검증한 결과는 Figure 106과 같다. 탄소원이 Soluble starch 인 배지의 배양 첫 단계에서 72시간까지 배양하고 질소원 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 탄소원을 Glucose로 교체하고 48시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 단위 건물 함량 당 항균활력이 가장 높게 나타났다. 그러나 두 번째 단계에서 24시간 배양한 것은 질소원 공급 및 결핍배지의 항균활력 차이가 크지는 않았으며 배지 첨가 전 첫 단계에서의 *Aspergillus oryzae* 성장에 따라 24, 48, 72 시간대의 항균활력도 높게 나타났다. 또한 질소원이 공급된 배지에서도 항균활력이 검증되었다.

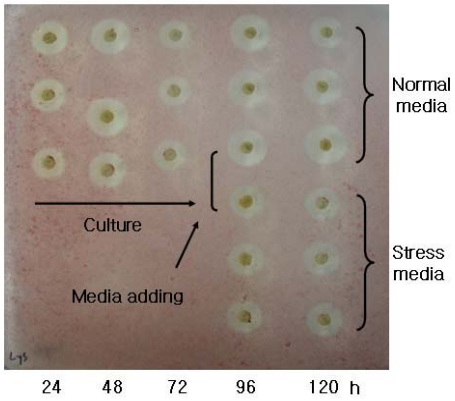


Figure 106. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source (Yeast extract : Ammonium sulfate : Lysine = 6 : 5 : 5) on different incubation time

Figure 107 에서는 질소원 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 의 건조중량을 측정한 후 단위 건물 함량이 지니는 저해환의 크기를 비교함으로써 시간대별 항균활력을 비교하여 나타내고 있다. 두 번째 단계에서 질소원 공급 및 결핍 배지를 첨가하고 120시간 배양했을 때 질소원 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 배양추출물의 항균활력이 공급배지에서 자란 것보다 약 10mm 저해환의 크기가 더 큰 것을 확인 할 수 있다. 이전 실험들과는 달리 96 시간대에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

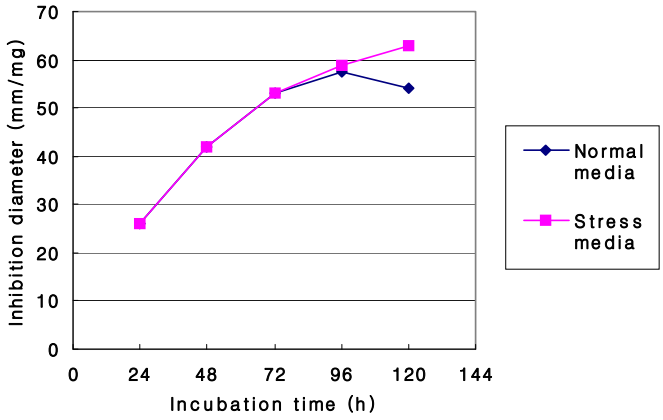


Figure 107. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source (Yeast extract : Ammonium sulfate :Lysine = 6 : 5 : 5) on DM basis

8) 탄소원은 Starch, 질소원은 Yeast extract로 48시간 배양하고 배지를 Filtering 한 후 탄소원을 Glucose로 바꿔서 질소원의 공급 및 결핍배지에 넣어서 96시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 발효추출물의 항균활력 검증

본 배양 배지 중 첫 단계에서 탄소원은 Soluble starch 로 공급하고 각각 48 시간 배양한 *Aspergillus oryzae* 의 배양배지를 filtering하였다. 계속해서 탄소원을 Glucose로 교체하고 질소원(Yeast extract) 공급 및 결핍배지로 나누어 100mL의 액체배지에 균체를 넣은 후 96시간씩 동일하게 더 배양하고 6, 12, 24, 48, 72, 96 시간대의 시료를 채취하였다. 이들 상층액을 동결건조하여 methanol 추출한 후 *Bacillus subtilis* 대한 항균활력을 검증한 결과는 Figure 108 과 같다. 탄소원이 soluble starch 인 배지의 배양 첫 단계에서 48시간까지 배양하고 질소원 결핍배지로 나눈 후 두 번째 단계에서 탄소원을 glucose로 교체하고 6시간을 키운 *Aspergillus oryzae* 의 배양추출물의 저해환의 크기가 가장 높게 나타났다. 또한 24시간 더 배양한 것이 단위 건물 함량 당 항균활력이 가장 높게 나타났으며 특히 질소원이 공급된 배지에서도 항균활력이 검증되었으나 시간대별로 변화가 전혀 나지 않았다.

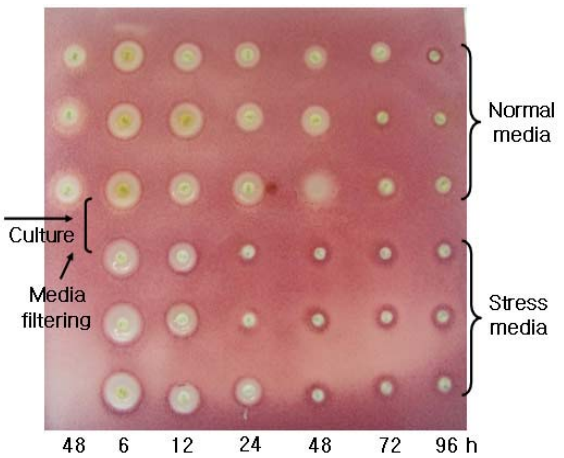


Figure 108. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source Yeast extract on different incubationtime by filtering method

Figure 109 에서는 질소원 공급 및 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 의 건조중량을 측정한 후 단위 건물 함량이 지니는 저해환의 크기를 비교함으로써 시간대별 항균활력을 비교하여 나타내고 있다. 두 번째 단계에서 질소원 공급 및 결핍 배지에 넣어서 24시간 배양했을 때 질소원 결핍배지에서 자란 *Aspergillus oryzae* 배양추출물의 항균활력이 공급배지에서 자란 것보다 약 150mm 저해환의 크기가 더 큰 것을 확인 할 수 있다.

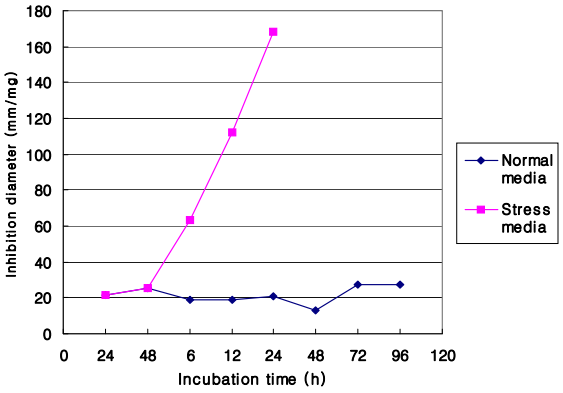


Figure 109. Inhibition zone diameter of glucose with or without nitrogen source Yeast extract on DM basis by filtering method

5. 효소제 및 생균제 대량 생산법 개발

가.세부연구목표

가축의 생산성 증진 목적으로 이용되는 생균제의 일종인 *Aspergillus oryzae*(*A. oryzae*)는 생균제의 제조 공정이 액상발효와 고상발효로 크게 구분될 수 있으며 국내에서 유통되고있는 *A. oryzae* 제품은 대다수가 고상발효를 이용하여 제조되고 있다. 그러나 1년차 연구결과와 같이 배지의 성분변화를 이용한 대사산물의 변화를 유도할 경우에는 액상발효 조건을 이용하여야 하는 특징이 있다. Bacteria를 이용하여 lysine을 생산하고 남은 폐배지는 bacteria 생장에 필요한 영양소 및 bacteria의 대사산물이 함유되어 있다. 따라서 이러한 배지를 bacteria의 배지로 이용할 경우 bacteria 대사산물에 의해 미생물의 생육이 억제될 수 있

다. 그러나 진핵생물인 *A. oryzae*는 bacteria의 대사산물에 의해 생육이 억제되는 정도가 적다. 따라서 본 연구는 *A. oryzae*의 액상발효를 위해 이용되는 배지성분을 lysine 제조 부산물(Condensed molasses solubles : CMS)을 이용함으로써 액상발효에 필요한 배지성분을 단순화하고, 부산물 이용을 통한 환경오염 저감의 효과를 얻고자 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 균주 및 배양방법

본 시험에서 사용된 배양배지는 CMS를 5, 10, 15, 및 20(w/v)%로 용해시킨 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 그리고, Kimura (1997)의 방법을 변형한 것으로서 xylan 배지를 증류수 1000mL 당 Yeast extract 16g, Soluble starch 10g, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ 0.5g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, citric acid와 sodium phospate가 첨가된 배지를 미리 seed배지로 사용하여 1%수준(v/v)으로 접종하였다. *Aspergillus oryzae* KCTC 6909와 KACC 40242를 각각 300mL baffle flask에 CMS 액체배지를 100mL 넣고 30℃에서 200rpm의 호기 shaking incubator에서 배양되었다. 배양물의 pH 와

2) cell mass 측정 및 real time PCR 분석 조건

Lysine 폐배지를 5, 10, 15, 및 20(w/v)%의 농도로 증류수에 희석하여 멸균시킨 후 3일간 정상배지(Kimura 배지)에서 배양된 *A. oryzae*를 접종하여 32℃에서 배양한 후 *A. oryzae* 균체의 건물중량 및 *A. oryzae* 균체의 ITS1 gene을 Real Time PCR을 이용하여 분석하였다. 유전자의 증폭을 위해 사용된 primer(붉은색)와 primer에 의해 증폭되는 ITS1 부위는 다음과 같다.

tttccgtagg tgaactgcgg aaggatcatt accgagtgta gggttcctag cgagcccaac
ctcccacccg tgtttactgt accttagttg cttcggcggg cccgccattc atggccgccg
ggggctctca gccccgggcc cgcgcccgcc ggagacacca cgaactctgt ctgatctagt
gaagtctgag ttgattgtat cgcaatcagt taaaactttc aacaatggat ctcttggttc cg

증폭된 염기서열을 E. coli vector에 cloning한 후 정량 PCR의 standard curve를 작성하여 배양물에 존재하는 *Aspergillus oryzae*의 함량을 정량적으로 분석하였다.

3) 효소역가 분석

배양 종료 후 *A. oryzae* 배양물을 원심분리하여 상층액을 회수하여 *A. oryzae*에 의해 분비된 cellulase와 xylanase 역가를 분석하였다. Cellulase와 xylanase의 역가는 상기된 분석방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

다. 연구결과

1) CMS 농도에 따른 *A. oryzae* 배양물의 pH 및 건물중량 변화

Lysine 폐배지(CMS)의 농도를 달리하여 *A. oryzae* KACC 40242를 배양하여 배양시간에 따른 배지의 pH를 조사한 결과는 Figure 110과 같다. 배지의 pH는 배양시간이 경과함에 따라 증가하였으며, *A. oryzae*의 생육에 가장 최적인 Kimura 배지에서 가장 pH가 높았으며, 배양초기(48 시간)에는 CMS의 농도가 낮을수록 pH가 높았다. 그러나 72시간이상 배양할 경우 배양종료 시간인 120 시간까지 pH가 CMS 5, 10, 15% 공히 일정하게 유지되었다. 다만 CMS 20% 처리구에서는 배양이 지속됨에 따라 pH가 계속적으로 증가하여 120 시간 배양 후 pH가 타 처리구와 동일하여 졌다. 성장과정 동안 *A. oryzae*는 배양액에 존재하는 유기산을 흡수하여 이용하기 때문에 *A. oryzae*의 성장이 지속됨에 따라 배양액의 pH가 증가하는 것으로 추정된다. 따라서 배양액의 pH 증가는 *A. oryzae*의 생장을 측정할 수 있는 간접적인 지표로 이용될 수 있음을 시사한다. 단순한 pH 결과만으로 예측할 경우 Kimuar 배지에서는 *A. oryzae*의 증식이 72시간 만에 종료되었으며, CMS 20% 처리구에서는 120시간 배양 동안 계속적인 증식이 발생하였을 것으로 추정할 수 있다.

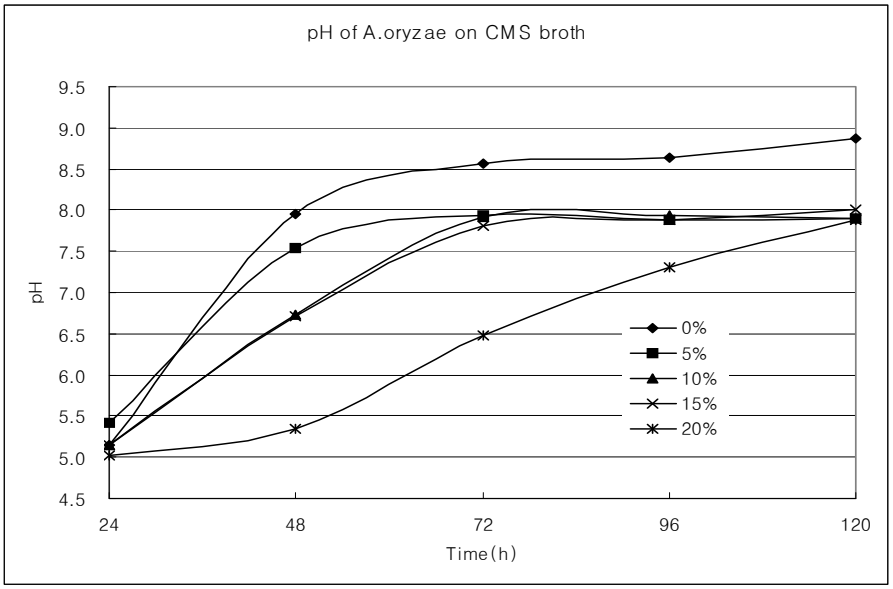


Figure 110. pH change in *Aspergillus oryzae* 40242 during incubation under different CMS concentrations

배양물에 존재하는 *A. oryzae* (40242) 균체의 건조중량은 배양이 지속됨에 따라 증가하였다(Figure 111). 그러나 균체의 건조중량은 일정 시간 후에는 감소하는 경향을 보였다. CMS의 함량이 20%인 처리구를 제외하고는 균체의 건물중량이 배양 48시간 까지 증가하였으나, 48시간 이후에는 일정하게 유지되거나 감소하였다. 그러나 CMS 20%처리구에서는 배양이 지속됨에 따라 배양액의 건물이 계속적으로 증가하였다(Fig 111). *Aspergillus oryzae* 생산에 효율적인 시간으로 추정되는 72시간 배양조건에서는 CMS 5% 처리구가 대조구에 비하여 건조중량이 낮았을 뿐 10% 이상의 처리구에서는 대조구와 동일하거나 높았다. 또한 72시간 배양조건에서 *A. oryzae* 균체의 건조중량은 CMS의 처리수준에 비례하여 증가하였다.

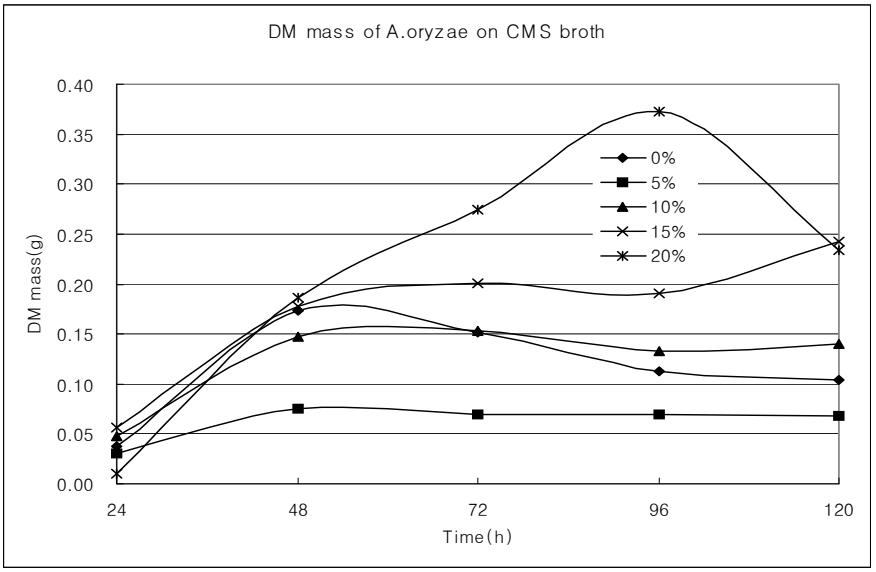


Figure 111. Fungal dry weight change in *Aspergillus oryzae* 40242 during incubation under different CMS concentrations.

2) CMS 처리농도에 따른 *Aspergillus oryzae* KCTC6909 균체 생성량 변화

섬유소분해효소(CMCase) 및 xylanase의 분비량이 높은 *A. oryzae* KCTC6909를 이용하여 CMS 배지에서의 균체 생성량 변화를 비교하였다(Figure 112). 배양이 지속됨에 따라 균체의 생성량은 모든 처리구에서 증가하였으나, CMS 처리구는 대조구인 Kimuar 배지에 비하여 균체 생성량이 낮았다. 그러나 *A. oryzae*의 생산에 효율적인 72시간을 기준으로 하여 균체의 생성량을 비교할 경우 CMS 처리농도가 10 - 15%일 경우 대조구에 비하여 낮은 경향은 있으나 통계적으로는 유의하지 않았다. 따라서 CMS의 처리농도를 10 - 15%로 하였을 경우 Kimura 배지와 견줄만한 배지를 생산할 수 있음을 의미한다.

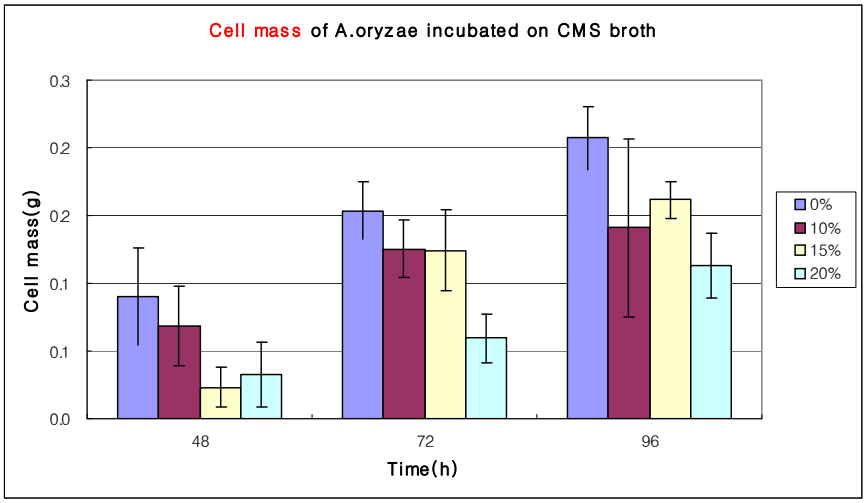


Figure 112. Fungal dry weight change in *Aspergillus oryzae* 6909 during incubation under different CMS concentrations.

2) CMS 처리농도에 따른 *Aspergillus oryzae* KCTC6909 효소활력 비교

배양액에 존재하는 CMCase의 활력은 모든 CMS 처리구가 대조구에 비하여 낮았다(Figure 113). Starch가 탄수화물의 주성분이 Kimura 배지에 비하여 수용성 탄수화물로 이루어진 CMS 배지가 탄수화물 분해효소인 CMCase 분비를 저하시키는 것으로 추정된다. CMS 처리구별 CMCase의 역가를 비교할 경우 배양 초기인 48시간과 배양 후기인 98시간에는 CMS 15% 처리구의 CMCase의 활력이 가장 높게 검출되었다. 그러나 72시간에는 CMS 10% 처리구에서 CMCase의 활력이 가장 높게 검출되었고, CMS 15%에서 가장 낮게 검출되었다. 전반적으로 CMCase의 활력은 CMS의 처리농도에 의해 유의적으로 변화를 보이지 않는 특징이 있었다. 특히 72시간 배양조건에서 CMCase의 역가는 CMS 5% 처리구와 CMS 10% 처리구에서 유의적인 차이가 없었다.

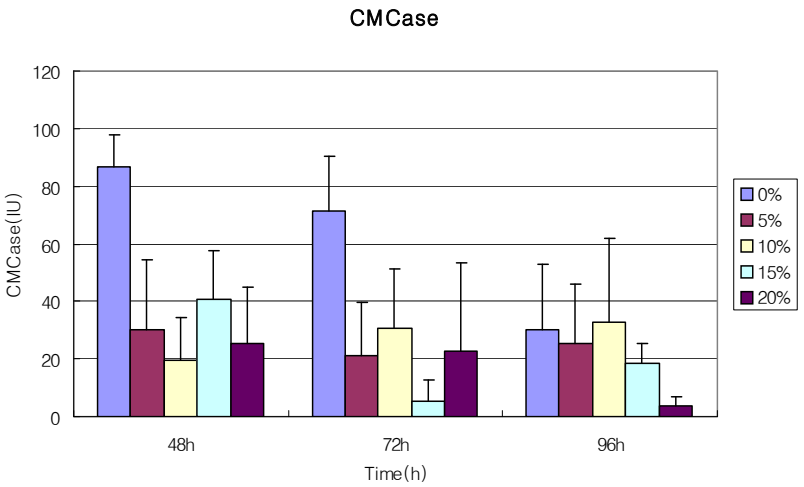


Figure 113. Comparison of *A. oryzae* CMCase activities among different CMS concnetrations

Xylanase의 활력은 배양초기인 48시간에는 대조구에서 가장 높게 검출되었다 (Figure 114). 그러나 72시간 배양 후에는 CMS 5%처리구의 xylanase 활력이 가장 높게 검출되었으며, 96시간 배양 후에는 CMS 10% 처리구의 xylanase 활력이 가장 높게 검출되었다. 대규모로 *A. oryzae*를 배양할 경우 24시간의 차이는 생산단가와 직접적으로 연계되는 사항이므로 96시간 배양보다 72시간 배양이 유리할 것으로 사료되어 72시간 배양을 기준점으로 삼았다. 이 경우 xylanase와 CMCase의 활력이 가장 우수한 조건은 CMS 5% 처리를 통하여 *A. oryzae*를 배양하는 것으로 결정하여 *in vitro, in situ* 및 *in vivo* 실험에 있어서 처리농도로 결정하였다.

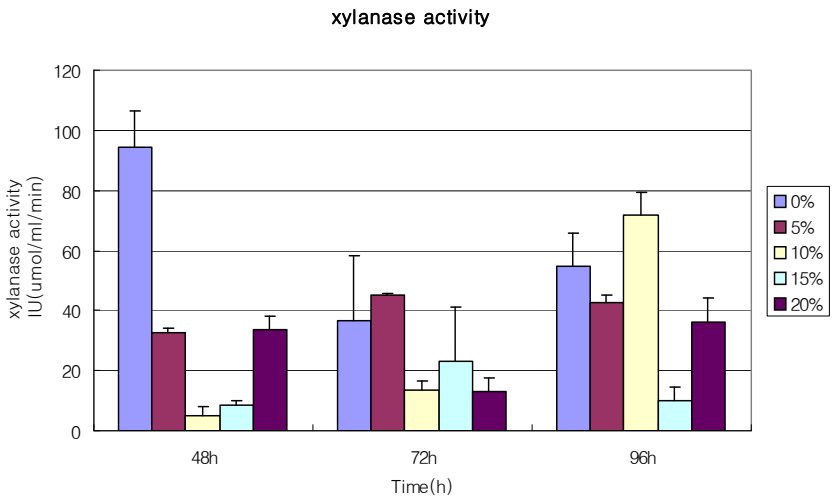
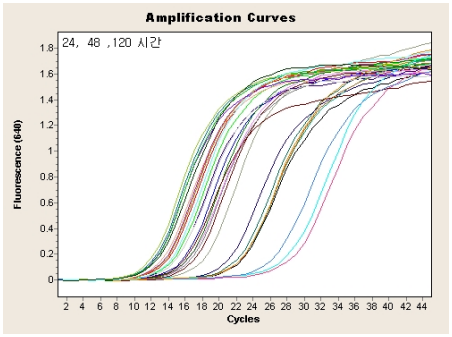


Figure 114. Comparison of *A. oryzae* xylanase activities among different CMS concnetrations

3) CMS 처리농도에 따른 *A. oryzae* ITS1 gene 정량

배양물에 존재하는 *A. oryzae*의 함량을 rITS1 gene의 함량을 정량 PCR을 이용하여 검출하였다(Figure 115). 일반적인 *A. oryzae*의 cfu 검출방법으로 사용되는 평판도말법은 배양물을 평판에 도말하여 24시간 이상 배양한 후 agar plate에 존재하는 군락의 수를 관찰하는 방법이다. 그러나 이러한 평판도말법을 실시할 경우 1일 이상의 시간이 소요되므로 배양액을 이용한 2차적인 실험에 지장을 초래하게 되는 문제점이 있다. 또한 현미경을 이용하여 직접 포자를 관찰하는 방법은 흑갈색의 현탁액 상태인 CMS 배지에서는 현실적으로 불가능 하였다. 따라서 본 연구진은 경제성은 없으나 실험의 신속성 및 정확성을 기하기 위하여 정량 PCR을 이용한 *A. oryzae*의 검출 및 정량 방법을 개발하게 되었다.



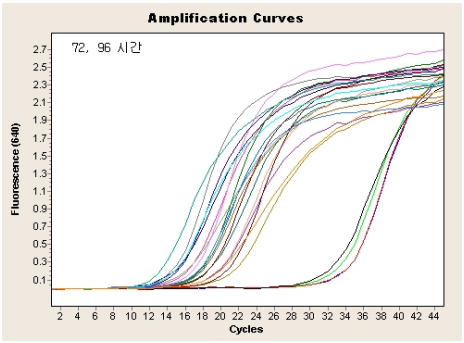


Figure 115. Amplication curve of *A. oryzae* rITS1 gene among different CMS concentrations during incubation

정량 PCR결과에 의하면 ITS1의 함량은 96시간까지는 CMS 처리구에서 낮게 유지되었으나, 배양 120 시간이 되었을 경우 CMS 15% 및 20% 처리구에서 높게 나타났다(Fig 116). 건물생성량의 결과와 비교하여 볼 겨우 CMS 15% 처리구에 비하여 CMS20% 처리구가 96시간 배양시 가장 많은 건물을 생산한 것과는 다른 양상을 보였다. 그러나 배양 120시간에는 15%와 20%의 건물함량이 유사하게 생산되는 것으로 미루어 보아 결과의 유사성은 있다고 할 수 있다. 정량 PCR을 이용하여 *A. oryzae*를 정량적으로 분석하는 방법은 실제 미생물제제로 시판되는 제품의 품질검사 및 효능시험에 적용될 수 있는 방법이다. 즉 몇 몇의 *A. oryzae* 제품은 제조과정에서 열처리를 실시하여 *A. oryzae*의 생존성을 제거한 후 시판하는 경우가 있다. 이 경우 생균제로 등록하기 위하여 실제 효능이 없는 다른 균을 임의로 첨가하여 균체의 수를 기준에 부합시킨다. 본 연구결과를 적용할 경우 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 또한 생균제로 이용되는 다양한 균주의 primer를 제작할 경우 생균제의 평가시 평판도말법에 비하여 신속하고 정확한 생균제의 품질검사가 가능할 것으로 사료된다. 또한 CMS를 *A. oryzae*의 배지로 이용한 본 연구의 결과는 lysine 폐배지를 이용하여 *A. oryzae* 생균제를 대량으로 생산할 수 있는 방법을 제시하고 있다.

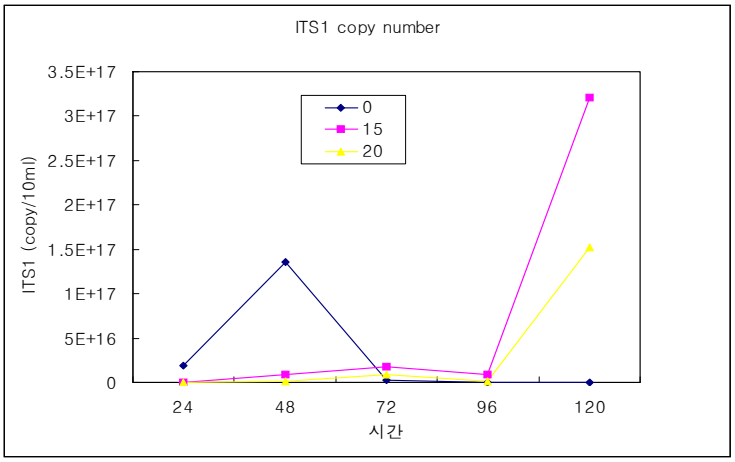


Figure 116. Results of *A. oryzae* ITS1 gene analysis in the cultures of different CMS concentration conditions.

6. 유우 사양시험을 통한 미생물 부착 강화 기술의 실증시험

가.연구의세부목표

본 연구의 목표는 선행 연구결과에서 선발된 조건(5% CMS 액상배지에 *A. oryzae*를 접종후 30℃에서 200rpm의 호기 shaking incubator에서 배양)을 바탕으로 실제 사양시험에 적용하기 위해 *in situ, in vitro* 시험을 통해 사료내 적정 첨가량을 결정하는데 있다. 또한 현재까지 사용되고 있는 반추가축용 사료 첨가제들은 분말 또는 액상 형태로 농가에 제공되어 사료 급여시 top-dressing 형태로 이용되어져 왔다. 효소제나 생균제 계열의 사료 첨가제들은 사료와 함께 반추동물에게 급여할 경우, 반추위내 미생물이나 자체 생산되는 효소들에 의해 분해되거나, 기능을 발휘하기 전에 by-pass 되어 효과가 낮아질 수 있는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 개발된 생균제를 spray 처리하고 이렇게 처리된 사료를 적정조건에서 배양하였다. 이는 생균제에서 생산되는 효소에 의한 화학적 분해와 배양시 미생물의 성장에 의한 물리적 분해를 통해 lignin과 같이 반추위 내에서 분해하기 어려운 성분을 일부를 분해시킴으로써 소화율을 증진시키고 나아가 생산성을 높이는 데 그 목적이 있다.

나.연구방법

1) 선발된 CMS-*A. oryzae*의 적정 처리수준의 결정 (*in situ, in vitro*)

가) in situ 시험

시험기질로 1cm로 세절한 Rice straw 를 사용하여 각각 Table 28 와 같이 처리하였다. 처리에 필요한 생균제중 Nor 처리구는 Kimura (1997)의 방법을 변형한 것으로서 xylan 배지를 증류수 1000mL 당 Yeast extract 16g, Soluble starch 10g, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ 0.5g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g을 용해시킨 후 121℃에서 15분간 멸균한 배지에 1%수준(v/v)으로 접종하였다. CMS 처리구는 5% CMS 액상배지를 121℃에서 15분간 멸균한 배지에 1%수준(v/v)으로 접종하였다. 이들 처리에 필요한 생균제는 30℃에서 200rpm의 호기 shaking

incubator에서 배양하여 제조하였고 Nor 처리구는 48시간 CMS 처리구는 72시간을 각각 배양하여 사용하였다. 시험 전 배양한 생균제를 사료에 전처리(spray)하여 30℃에서 12시간 동안 배양하였다. 물을 처리한 대조구 Rice straw와 효소제를 처리한 Rice straw를 1.5g 씩 nylon bag (5X12cm; pore size, 53um)에 넣어 아침 사료급여 직전에 cannula를 통해 넣은 후 배양을 시작하였다. 반추위 내에서 배양한 후 24시간과 48시간에 샘플링 하였다. 배양 후의 nylon bag을 freezer dryer를 이용하여 dry 한 후 배양 전과 후의 무게차이로 소실율을 구하였다.

Table 28. The level of enzyme treatment (ml/g Rice straw)

Treatment	Nor-*A. oryzae*	CMS-*A. oryzae*
Blank		
Nor-con	2	
Nor-2	2	
Nor-0.2	0.2	
Nor-0.02	0.02	
CMS-con		2
CMS-2		2
CMS-0.2		0.2
CMS-0.02		0.02

나) in vitro 시험

시험기질로는 Rice straw를 분쇄하여 1mm screen으로 걸러 Table 28 와 같이 처리하였다. 처리에 필요한 생균제는 in situ 시험과 같은 조건으로 적용하였다. 누관이 장착된 체중 500 kg의 Holstein 거세우로부터 수거한 반추위액과 McDougall Buffer(McDogall, 1948)을 1:4(v/v)로 혼합하여 *in vitro*용 혼합배양액을 준비하였다. 그리고 혼합배양액은 50 ml씩 0.5 g의 처리된 볏짚이 들어있는 125 ml serum bottle에 분주여 배양을 준비하였다. 각각의 준비된 culture는 39 ℃ incubator에서 48 시간 배양 후 0, 3, 6, 9, 12, 24 그리고 48 시간째에 샘플링을 하였다. 처리구별 건물 소화율, pH 그리고 가스 발생량을 측정하였다.

2) 유우사양시험을 통한 효소제와 생균제 검증 (*in vivo* 시험)

유우사양시험을 통한 효소제와 생균제 검증 시험은 충남 논산 소재 완전 목장에서 평균 3산차의 비유후기 착유우를 각 처리당 3마리씩 공시하였다. 시험사료는 TMR 형태로 TAble 29 과 같이 천안 논산 소재 유전 TMR에서 제조하였다. Tween80+enzyme 처리구는 Non-ionic surfactant 와 cellulase 와 xylanase의 혼합처리가 반추위내 조사료 소화율과 미생물 부착에 미치는 영향에서 시험된 조건과 같이, 조사료 kg 당 1.25% Tween 80 와 5Units xylanase, 1.25Units cellulase 를 spray 처리 한 후 지대로 포장하여 실온 24시간동안 실온 배양 후 급여하였다. CMS-*A. oryzae* 처리구는 5% CMS 액상배지에 *A. oryzae*를 1%수준(v/v)으로 접종한 후, 30℃에서 72시간 동안 200rpm의 호기 shaking incubator에서 배양한 배양물을 spray 처리 한 후 지대로 포장하여 실온 24시간동안 실온 배양 후 급여하였다. 사료급여는 자유채식으로 급여하였으며 매일 05:00에 착유 후 급여하였다. 유량은 매일 오전, 오후 착유시 milkmeter를 이용하여 측정하였고, 유성분은 시험개시 후 1주에서 3주까지 매주 화요일 샘플링 하여 Somascope MK2 Lactoscope FTIR (삼현테크)를 이용해 분석하였다.

Table 29. The TMR formula of experimental diets

	%
호마박	1.55
맥주박	10.33
백피	3.87
비트펄프	2.58
알팔파	3.87
옥수수 후레이크	4.91
장유박	1.63
면실	5.16
주정박	8.52
건초 클라인	1.03
톨페스큐	1.03
유정믹스 농후사료	18.07
혼합건초 유정믹스2	7.75
사일리지 유정믹스6	18.07
액상주정박	9.04
DDGS 주정박	2.58

Table 30. Nutrient contents of experimental diets feed

	Control	Tween+enzyme	CMS-*A. oryzae*
CP	15.08	5.99	5.23
EE	8.03	7.95	7.11
ADF	73.92	75.07	76.42
NDF	45.79	48.7	49.99
ash	1.28	1.48	1.38

다.연구결과

1) 선발된 CMS-*A. oryzae*의 적정 처리수준의 결정 (*in situ, in vitro*)

0시간대에 nylon bag을 washing 해주고 나서 각 처리간의 소화율의 변이가 높은 수치를 보였다. 이는 CMS-*A. oryzae* 처리의 경우 시험 전 처리한 CMS가 용해되어 빠져나갔을 것이라 사료된다. 이를 보정해 주기위해 0시간대의 소화율을 측정하여 이를 DM 값으로 환산한 후 24시간과 48시간 소화율에 대입시켜 결과를 산출하였다. 이렇게 산출된 값의 결과는 Figure 117과 같다. 대조구와 모든 처리구에서 유의적인 차이는 없었으나, 각각의 처리구는 처리한 수준이 낮을 수록 소화율이 증가하는 경향이었으며 CMS-*A. oryzae* 처리구보다 일반배지 배양물 처리구의 소화율이 더 높았다. 또한 Table 31에 제시한 in vitro 시험 결과에서 보면, 48시간대에서일반배지 배양물 2ml 처리구, CMS 0.2 처리구 그리고 CMS-*A. oryzae* 0.02 ml 처리구가 다른 처리구 보다 소화율이 높았다($p<0.05$). 48시간대 소화율에서 이들 처리구 간에는 일반배지 배양물 2ml 처리구가 가장 높은 값이었으나 서로간에 통계적인 유의차를 보이지 않는 범위에 있었다. Figure 118에서 제시한 가스 생성량 결과도 소화율의 결과와 같은 경향을 보였다. 일반 배지 배양물 처리구가 모든 실험 결과에서 높은 수치를 보였으나, 일반 배지 성분중 yeast extract 나 starch 같은 고가의 원료를 사용했을 경우 생산성이 떨어지게 되며, CMS의 경우 생균제의 생산단가도 절감할 수 있을 뿐 아니라 폐자원을 이용한다는 측면에서 반추가축을 위한 생균제 개발에 적합할 것이라 판단된다.

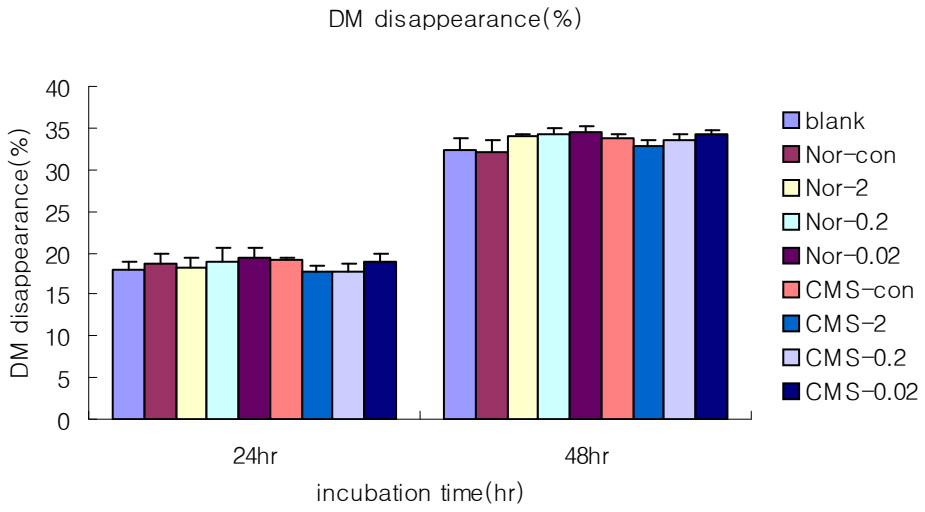


Figure117. Comparison of in situ DM disappearance of rice straw (blank : DW treatment, Nor-con : only modifid tajima medium treatment, Nor-2 : 2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, Nor-0.2 : 0.2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, Nor-0.02 : 0.02ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modified Kimura medium treatment, CMS-con : only CMS liquid medium treatment, CMS-2 : 2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium, CMS-0.2 : 0.2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium, CMS-0.02 : 0.02ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium)

Table 31. Comparison of in vitro DM disappearance of rice straw

	0hr	3hr	6hr	9hr	12hr	24hr	48hr
Blank	17.60^{bcde}	17.28^{bc}	17.44^{d}	21.68	25.56^{bc}	32.13	38.51^{cd}
Nor-con	16.97^{cde}	18.01^{bc}	19.18^{cd}	19.57	30.21^{a}	31.79	39.59^{bcd}
Nor-2	18.17^{bcd}	18.44^{c}	20.72^{bcd}	25.60	29.64^{ab}	35.48	42.90^{a}
Nor-0.2	14.84^{e}	15.90^{c}	19.50^{cd}	22.56	19.14^{e}	29.39	38.08^{d}
N0r-0.02	18.47^{bcd}	18.03^{bc}	22.35^{abc}	26.22	20.31^{de}	31.19	40.97^{abc}
CMS-con	15.53^{ed}	15.74^{c}	20.08^{bcd}	16.50	22.40^{cde}	30.21	39.72^{bcd}
CMS-2	20.12^{ab}	18.50^{b}	23.26^{ab}	22.78	21.72^{cde}	31.54	39.59^{bcd}
CMS-0.2	19.75^{abc}	22.99^{a}	25.66^{a}	30.64	23.28^{cde}	33.27	40.80^{abcd}
CMS0.02	22.15^{a}	22.41^{a}	25.40^{a}	26.48	24.11^{cd}	32.74	41.73^{ab}

blank : DW treatment, Nor-con : only modifid tajima medium treatment, Nor-2 : 2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, Nor-0.2 : 0.2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, Nor-0.02 : 0.02ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, CMS-con : only CMS liquid medium treatment, CMS-2 : 2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium, CMS-0.2 : 0.2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium, CMS-0.02 : 0.02ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium

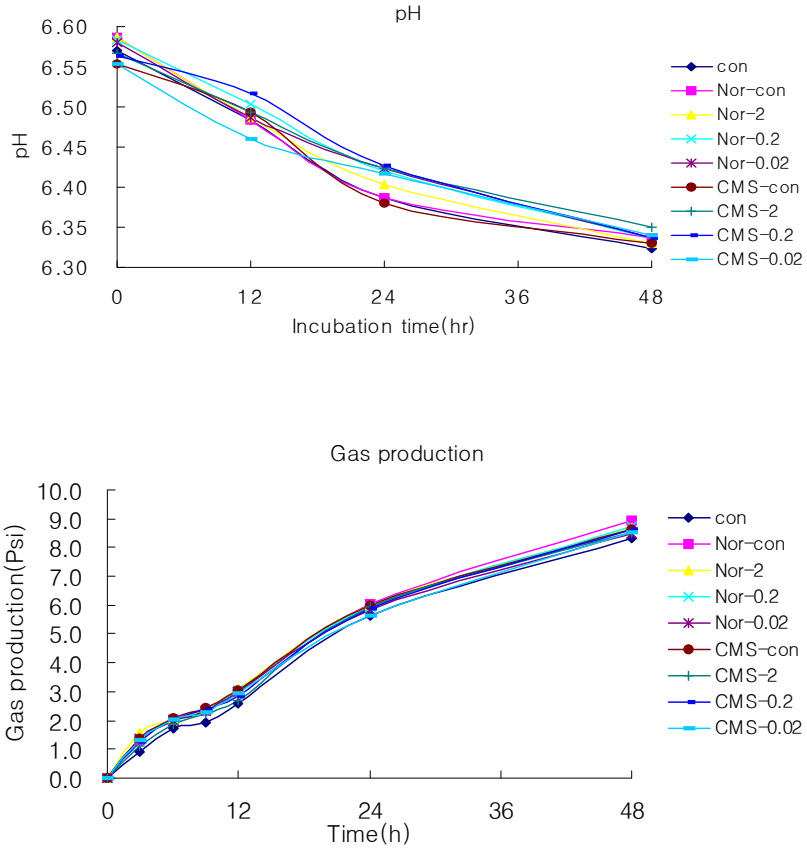


Figure 118. Comparison of pH and gas production of rice straw in vitro culture condition

(blank : DW treatment, Nor-con : only modifid tajima medium treatment, Nor-2 : 2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, Nor-0.2 : 0.2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, Nor-0.02 : 0.02ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on modifid tajima medium treatment, CMS-con : only CMS liquid medium treatment, CMS-2 : 2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium, CMS-0.2 : 0.2ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium, CMS-0.02 : 0.02ml/g DM rice straw treated *A. oryzae* fermentation on CMS liquid medium)

2) 유우 사양시험을 통한 미생물 부착 강화 기술의 실증시험

시험기간중 평균 유량은 대조구가 34kg, Tween80, cellulase 그리고 xylanase를 혼합한 처리구가 36kg 그리고 CMS-*A.oryzae* 처리구가 32kg 이었다. 유우 사양시험을 통해 얻은 유량 결과는 Figure 119에 제시하였다. Figure 119은 대조구와 각 처리구간의 상대적 비교를 위해 시험사료 급여일의 유량을 기준으로 유량변화량으로 환산하여 나타내었다. Tween80, cellulase 그리고 xylanase를 혼합한 처리구가 CMS-*A.oryzae* 처리구와 대조구에 비해 시험기간이 경과 할수록 증가하였으며, 시험 18일째 4kg 증가로 가장 높았다. 그러나 통계적 유의차는 없었다. 대조구의 유량은 전체 시험기간 동안 유량변화가 없었다. TMR 사료에 *A.oryzae* 배양물을 하루에 5g씩 배합하여 30일 동안 급여한 후, 마지막 3일 동안의 유량을 분석했을 때 평균 유량에 영향을 미치지 않는다(Higginbotham 등, 2004). 이는 CMS-*A.oryzae* 처리구는 시험 초기 10일 까지는 유량이 감소하다가 시험 종료일 시점에는 기존의 유량으로 회복되어 대조구의 수준으로 유량을 유지하는 결과와 일치한다. 또한 A. oryzae 배양물 급여가 유생산량을 증가시키는데 영향을 줄 수 있는 최적기는 다량의 NSC를 급여하였을 때나(Gomez-Alarcon 등, 1990), 비유초기의 경우라고 보고 하였다.(Kellems 등, 1990). 이는 비유후기의 착유우에 시험한 본 연구에서는 유량에 영향을 미치지 않는다는 결과를 뒷받침한다.
시험기간 동안 Tween80, cellulase 그리고 xylanase를 혼합한 처리구를 제외한 대조구와 CMS-A.oryzae 처리구에서 유지방이 증가하였으며 Tween80, cellulase 그리고 xylanase를 혼합한 처리구가 평균 4.8%, CMS-*A.oryzae* 처리구가 4.5% 그리고 대조구가 4.1% 이었다(Figure 120). 대조구와 처리구 모두에서 높은 수치의 평균 유지율을 보이는 것은 TMR 사료를 급여함으로써 반추위내 pH가 적정하게 유지된 것으로 판단된다. 유단백질과 유당은 모든 시험구에서 각각 평균 3%와 4.7% 이었으며 통계적 유의차는 없었다(Figure 120). 본 시험에서는 위의 결과를 종합해 볼 때, 유량을 증가시키고 유질을 개선하는 방법으로 Tween80, cellulase 그리고 xylanase를 혼합하여 TMR 사료에 전 처리하여 급여하는 방식을 농가에 적용할 수 있을 것이라 사료된다.

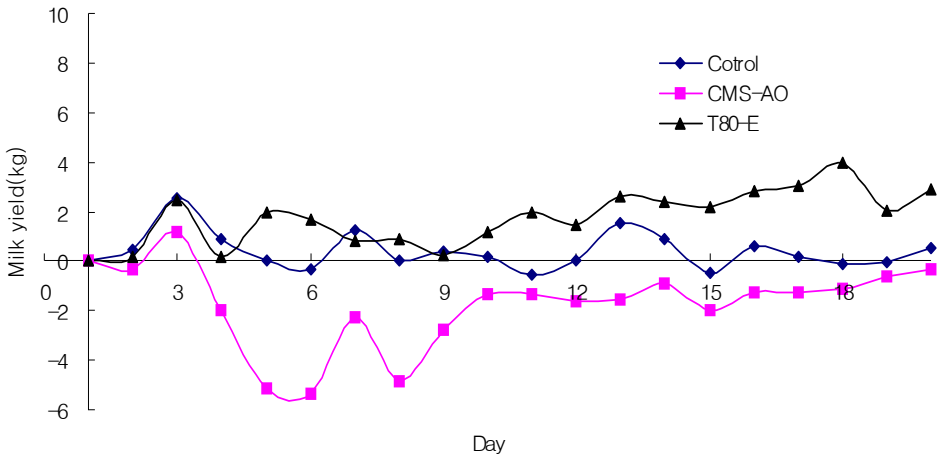
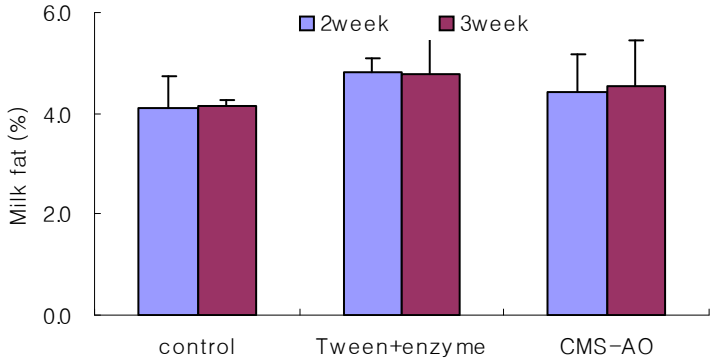
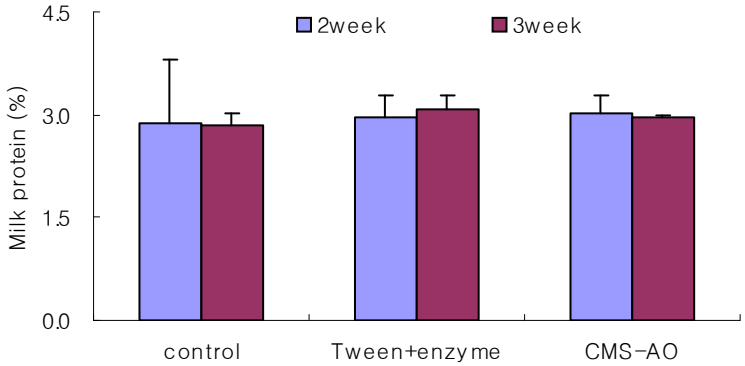
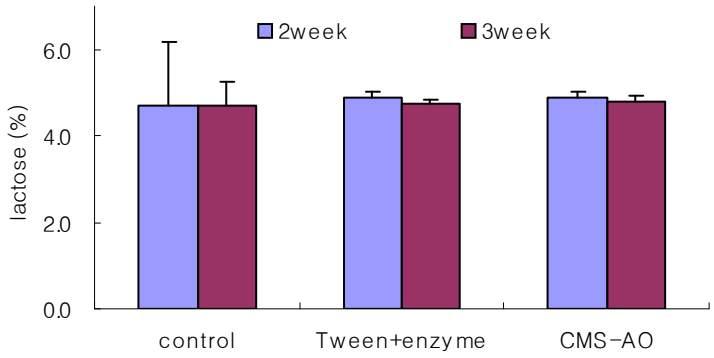


Figure 119. Results of milk production during experiment period (control : only TMR feeding, Tween+enzyme : treatment of 1.25% Tween 80, 5Units xylanase and 1.25Units cellulase /g forage, CMS-*A. oryzae* : treatment of 0.02ml CMS-*A. oryzae*/g forage)


6.0
4.0
2.0
0.0
Milk fat (%)
2week
3week
control
Tween+enzyme
CMS-AO


4.5
3.0
1.5
0.0
Milk protein (%)
2week
3week
control
Tween+enzyme
CMS-AO


6.0
4.0
2.0
0.0
lactose (%)
2week
3week
control
Tween+enzyme
CMS-AO

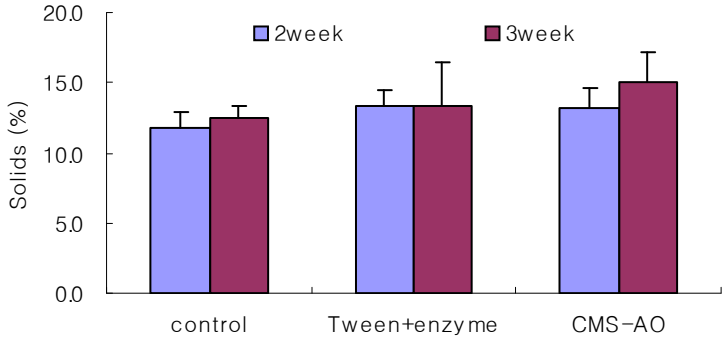


Figure 120. Results of milk composition during experiment period (control : only TMR feeding, Tween+enzyme : treatment of 1.25% Tween 80, 5Units xylanase and 1.25Units cellulase /g forage, CMS-*A. oryzae* : treatment of 0.02ml CMS-*A. oryzae*/g forage)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 혐기박테리아 부착 강화 기술을 이용한 조사료 이용성 향상 기술 개발

1년차 연구목표는 반추위내에서 섬유소에 부착할 수 있는 박테리아의 정량방법을 구축하는 것이었다. 이를 달성하기 위하여 cPCR과 Real-Time PCR의 internal control과 plasmid standard의 제조방법을 확립하였다. 이를 바탕으로 조/농 비율에 따른 섬유소 분해 박테리아와 전분 분해 박테리아의 분포를 정량화 하였고, 또한 반추위내 pH 변화에 따른 섬유소 분해 박테리아의 분포도도 관찰함으로써 1년차 목표를 달성하였다. 이 기술은 앞으로 섬유소 분해 박테리아 외에도 반추위내 중요한 역할을 하는 미생물의 정량에도 쉽게 응용할 수 있으며, 그 미생물의 kinetics를 관찰 하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

2년차 연구는 생물, 물리, 화학적 처리를 통하여 섬유소 분해 미생물의 부착을 유도하고 그럼으로써 조사료의 소화율을 높이는 데 그 목적이 있다. 먼저 생물학적 처리로써 *Saccharomyces* spp.의 처리는 분명 소화율이나 섬유소 분해 미생물의 부착을 증진시킬 수 있는 가능성을 제공하였다. 만약 *Saccharomyces spp.*에 대한 좀더 충분한 이해를 하고 이를 바탕으로 이번 과제에서 진행된 실험의 결점을 보완한다면 충분히 반추위내 조사료의 소화율을 증진시키고 반추가축의 생산성을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 물리적인 처리의 경우 소화율은 볏짚을 기질로 사용했을 시 낮은 온도로 처리할수록 높은 소화율을 보였으나 미생물 부착에 관하여 일관된 결과를 얻지는 못했다. 이는 앞으로 물리적인 처리와 또 생물학적, 화학적 처리를 병행 함으로써 더 좋은 효과를 얻을 가능성이 높다고 여겨진다. 화학적 처리의 경우 이미 많이 알려져 있고 농가에 널리 사용되고 있는 바와 같이 수산화나트륨, 과산화수소, 암모니아의 처리가 반추위내 조사료 소화율을 현저히 증가시켰고 이는 섬유소 미생물의 부착을 높였기 때문이라는 것을 다시 확인 할 수 있었다. 하지만 최근 들어 화학적 처리에서 생성되는 물질이 반추 미생물이나 환경적인 면에서 악영향을 미친다는 보고에 따라서 화학적 처리에 버금가는 처리방법의 고안이 시급한 실정이라 할 수 있겠다. 그 중 하나로 제

시된 물질이 바로 non-ionic surfactant인 Tween 80라고 할 수 있겠다. 지금까지 보고된 Tween 80의 기능을 고려하여 효소제와 혼합처리 하였을 때 반추위내 조사료의 소화율 향상 효과를 *in vitro, in situ* 실험을 통하여 확인할 수 있었다. 그럼으로써 3년차 과제의 목표인 in vivo 실험을 통한 Tween 80와 효소제의 혼합처리에 대하여 반추위내 조사료의 소화율과 미생물 부착과의 관계를 규명하고자 하였다. 하지만 예상과는 달리 Tween 80가 섬유소 분해 박테리아인 *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens* 의 부착을 증진시키지 않는 것으로 관찰되었다. 이는 Tween 80와 효소제의 첨가에 의해서 나타나는 소화율의 향상이 반추위내 섬유소 분해 박테리아의 부착증가에 의존하지는 않는다고 해석할 수 있다. 여기서 Tween 80가 갖고 있는 이러한 기능과 박테리아의 부착을 높일 수 있는 다른 물질의 혼합처리에 대하여 연구한다면 차후 조사료 소화에 탁월한 제품을 개발할 수 있을 것이라 예상된다.

결론적으로 본 과제 수행 결과 혐기 반추미생물의 부착을 측정할 수 있는 방법을 개발하였고 아울러 이를 이용하여 혐기미생물의 부착과 관련된 주요 요인을 검토 할 수 있었으며, 부착을 증가시킬 수 있는 방안을 제안할 수 있었다.

제 2 절 곰팡이를 이용한 조사료 이용성 향상 방안 개발

혐기성곰팡이의 선발에 있어서 총 500개의 혐기곰팡이 균총을 반추위로부터 분리하여 최종적으로 실험에 이용한 균주는 1개 이었다. rITS1 gene을 이용하여 분자생물학적으로 혐기곰팡이의 분류를 실시한 것은 국내에서 처음 시도되었다. 또한 rITS1 gene을 정량적으로 분석할 수 있는 real time PCR조건을 확립한 것은 국내 반추미생물분야의 기술적 수준을 진일보시켰다. 제1세부과제의 박테리아의 정량 PCR 방법과 연계하여 분석을 실시할 경우 반추동물에게 급여된 사료의 조건 및 상태에 따른 반추위내 미생물의 균총의 변이를 분자생물학적인 방법으로 분석할 수 있는 기반을 확립하였다는 것은 국내 반추영양학 연구분야의 질적 향상에 기여하였다고 평가한다.

호기성 곰팡이의 선발에 있어서는 총 10개의 Aspergillus oryzae 균주에 대하여 성장특성 및 효소발현특성을 비교하여 2개의 균주를 선발하였다. 현재 국내에서 시판되고 있는 대부분의 Aspergillus oryzae를 균주로 하는 생균제는 cellulase와 xylanase의 역가 보다는 amylase와 protease에 초점을 두어 선발하여

시판하고 있는 현실을 고려할 경우 생균제의 개발에 새로운 접근방법을 제시하였다고 평가할 수 있겠다. 다만 본 연구진이 선발한 xylanase와 cellulase의 활력이 우수한 균주(KTCT 6909)의 경우 성장속도가 amylase의 분비량이 높은 균주(KACC 40242)에 비하여 부진한 문제점 해결이 요구되고 있다. 당초 계획에는 Saccharomyces 균주의 선발도 수행할 예정이었으나 유사계통의 잔존으로 인한 오염을 우려하여 Saccharomyces에 대한 선발은 실시하지 않았으나 소기의 목적은 달성하였다고 평가한다.

효소제용 혐기성곰팡이의 최적 배양조건 확립을 위하여 cellulase와 xylanase의 분비를 유도하는 볏짚을 기질로 하여 혐기곰팡이 *N. frontalis*를 배양하여 효소제 생산의 이용가능성을 타진하였다. 그 결과 볏짚을 기질로 하여 혐기곰팡이를 배양할 경우 추가적인 수용성 탄수화물의 공급이 있을 경우 곰팡이의 성장촉진 및 효소생산성이 증가할 가능성을 확인하였다. 다만 현실적인 문제는 대규모 혐기배양에 많은 제약이 있어 본 연구진은 *N. frontalis*의 xylanase를 호기성 미생물에서 발현시키는 방법에 대한 연구를 수행하고 있다.

세포내 단백질 발현의 분석을 위해 본 연구진이 수행한 이차원전기영동 기법은 최근 다양한 분야에서 적용되고 있는 proteomics 기법으로 특히 2D-DIGE 기법은 최신의 방법으로 평가받고 있는 기법을 축산분야의 연구에 도입하였다. 재정상의 이유로 발현된 모든 단백질에 대한 동정은 불가능 하였으나 6개의 단백질에 대한 동정을 실시함으로써 소기의 목적을 달성하였다고 평가한다.

효소제 및 생균제의 대량 생산법 개발을 위하여 산업폐기물로 평가되는 CMS를 Aspergillus oryzae의 배지로 이용하여 생균제를 생산하는 방법을 개발하였다. 본 기술은 생균제의 액체배양시 소요되는 생산단가를 현저히 절감할 수 있는 배양방법으로 약간의 수정 후 현장적용이 가능한 방법이다. 개발된 방법을 토대로 본 연구진은 농림기술관리센터의 지원을 받아 CMS를 이용한 축우용 완전발효사료의 개발을 2007년 6월부터 연구를 수행할 계획이다.

또한 Aspergillus oryzae rITS1 gene을 표적유전자로 하여 정량 PCR을 수행하여 시료에 존재하는 균주의 함량을 정량적으로 분석하는 방법을 확립하였다. 본 결과는 사료첨가제의 품질을 평가함에 있어서 이용되는 관행법에 비하여 신속하고 정확한 방법으로 당장 현장적용이 가능한 방법이다. 본 방법을 이용할 경우 사료 및 분에 존재하는 Aspergillus oryzae의 함량을 측정할 수 있음으로써 이의 효능검사에 활용할 수 있는 방법이다. 뿐만 아니라 본 연구진이 개발한

primer는 모든 Aspergillus 종에 적용될 수 있는 primer로 곡류에 존재하여 aflatoxin을 생성하는 Aspergillus flavus의 검출에도 이용할 수 있도록 고안된 것이다. 따라서 곡류의 표면에서 DNA를 추출한 후 AO-ITS1 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시할 경우 Aspergillus flavus의 존재 가능성에 대하여 검사할 수 있다.

사양실험을 통한 실증시험을 위하여 사전에 *in vitro*, *in situ*를 이용한 효능검정을 수행한 후 유우를 이용한 사양시험을 실시하였으나 기대되는 성적을 얻지 못 하였다. 가장 큰 이유로는 농가에서 기존에 사료에 첨가하는 첨가제를 모든 처리구에 급여함으로써 기대효과를 얻지 못한 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기초자료 제공 : 반추위 미생물의 정량 방법, 섬유소 분해 미생물의 작용기작, 여러 가지 물질의 처리가 반추위내 미치는 영향, 반추영양에 있어서 분자생물학의 접목, 반추영양에 있어서 proteomics 기법 적용

2. 산업계 자료 및 기술 제공 : 각종 반추위내 소화율을 높일 수 있는 물질의 소개와 이들의 최적의 사용 수준 및 방법, 생균제 제조에 있어서 생산단가 절감 방안 제시, 정량 PCR을 이용한 생균제의 품질검사 방안 제시, 곡류에 존재하는 Aspergillus flavus의 검출이 가능한 PCR primer 자료 제시

3. 논문 발표

1) 학술지 발표 :

Study on Rumen Cellulolytic Bacterial Attachment and Fermentation Dependent on Initial pH by cPCR. Korea journal of Animal Science and Technology. 47(4)615~624.

Low Ruminal pH Reduces Dietary Fiber Digestion via Reduced Microbial Attachment. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 20, No. 2. 200~207

Effects of Tween 80 pretreatment on dry matter disappearance of rice straw and cellulolytic bacterial adhesion. Asian-Australasian Journal of Animal science (submitted)

2) 학회 발표 :

Effect of methylcellulose on attachment of *Fibrobacter succinogenes* and fiber

digestion. The 5th Joint Symposium of Japan-Korea-China on Rumen Metabolism and Physiology 2005

Bacterial attachment and dietary fiber digestion as influenced by rumen pH. The 5th Joint Symposium of Japan-Korea-China on Rumen Metabolism and Physiology 2005

Effects of exogenous fibrolytic enzyme pretreatment on bacterial adhesion and NDF digestibility in the rumen. The 5th Joint Symposium of Japan-Korea-China on Rumen Metabolism and Physiology 2005

Yeast culture treatment on rumen bacterial attachment on ruce straw as determined by Real-Time PCR. The 12th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress Proceedings 2006

Real-Time PCR detection of cellulolytic bacteria adhesion on rice straw. The 12th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress Proceedings 2006

Quantification of rumen anaerobic fungus Neocallimastix frontlis attached to rice straw using real time PCR. The 12th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress Proceedings 2006

Production of direct fed microbials, Aspergillus oryzae fermentation extract using lysine fermentation by-product. The 12th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress Proceedings 2006

The effects of Tween 80 and xylanase and cellulase mixture on ruminal fermentation characteristics and cellulolytic bacterial adhesion. The 6th Joint Symposium of Japan-Korea-China on Rumen Metabolism and Physiology 2007

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

반추동물은 스스로 섬유소를 분해할 수 있는 enzyme을 생산하지 못하지만, 반추위내 서식하고 있는 박테리아, 곰팡이 그리고 프로토조아에 의해 분해함으로써 섬유소를 에너지원으로 이용할 수 있다. 반추동물은 이러한 미생물들이 서식할 수 있는 환경과 장소를 제공하고, 미생물들은 반추동물에 protein, vitamin 그리고 short chain organic acids를 제공함으로써 서로 공생관계에 있다. 반추동물의 소장에서 흡수되는 아미노산의 80~90%는 미생물 단백질체로 공급이 되고, 에너지원으로 이용되는 VFA는 이 미생물들의 by-product로써 제공이 된다. 즉 반추동물의 있어서 반추위 미생물은 없어서는 안 될 필수적인 요소라고 할 수 있겠다.

반추위 미생물의 생태는 적어도 30종 이상의 박테리아 (10^{10} ~ 10^{11} / 위액 1ml)와 40여 종의 프로토조아 (10^5 ~ 10^7/ 위액 1ml) 그리고 5속의 곰팡이 (<10^5 / 위액 ml) 로 구성되어 있다(Orpin and Joblin, 1997; Stewart et al., 1997; Williams and Coleman, 1997). 반추위내 박테리아는 사료의 분해, 미생물 단백질체, VFA의 공급 등의 면에서 볼 때 프로토조아나 곰팡이에 비하여 더 중요한 역할을 담당한다 (Stewart et al., 1997). 반추위 박테리아는 반추위내 서식하는 위치에 따라 5종류로 분류할 수 있다: 1) 위액에 떠다니는 박테리아; 2) 사료입자에 약하게 붙어있는 박테리아; 3) 사료입자에 강하게 붙어있는 박테리아; 4) 반추위 벽에 붙어있는 박테리아; 4) 프로토조아나 곰팡이에 붙어 기생하는 박테리아 (Cheng and Costerton, 1980, McAllister et al., 1994). 위의 박테리아 군집 중 사료입자에 붙어있는 종류가 반추위를 우점하고 있으며 약 전체에 75% 정도 점유하고 있다 (Craig et al., 1987). 사료입자에 붙어있는 박테리아 군집은 반추위 endoglucanase 와 xylanase 활성에 약 88~91%, amylase 활성에 70%, protease 활성에 75%를 차지할 정도로 그 역할이 매우 중요하다(Minato et al., 1993). 그러나 반추위액에 떠다니는 박테리아나 사료입자에 약하게 붙어있는 박테리아 그리고 반추위 벽이나 프로토조아, 곰팡이에 기생하는 박테리아의 경우는 사료입자 분해에 직접적으로는 관여는 하지 않는다. 이는 섬유소 분해 박테리아의 부착능

력을 떨어뜨리면 그 활성을 잃는다는 보고들에서도 반추위 박테리아의 부착의 중요성을 할 수 있다 (Gong and Forsberg, 1989; Miron et al., 1998). 그러므로 그동안 사료의 높은 소화를 통해서 반추동물의 생산성을 높이기 위하여 반추위 내 미생물부착을 높이려는 연구들이 많이 진행되었다. 사료의 소화율을 높이기 위하여 물리적, 화학적, 생물학적 또는 non ionic surfactant 등의 기타 첨가제를 이용한 연구들이 많이 발표되었다 (Wanapat et al., 1985; Moon et al., 1990).

이들 중 최근 많은 연구가 진행된 non ionic surfactant인 Tween 80는 *in vitro* 실험에서 cellulase 활성과 반추위내 안정성, 박테리아의 양, 박테리아의 성장률, enzyme accessibility와 사료의 분해를 높였다고 보고되었다 (McAllister et al., 2000; Lee and Ha, 2003; Lee et al., 2003; Akin, 1980; Lee et al., 2003; Goto et al., 2003). 또한 Kamande et al (2000) 은 *in vitro* 상에서 enzyme이 기질에 붙어 반응하는 것을 촉진시켰으며, 미생물 protease와 cellulase 활성을 높였다고 보고하였다. 또한 Wang et al. (2003)은 Tween 80가 *in vitro* 실험에서 corn과 orchardgrass silages를 기질로 했을 때 가스와 VFA 생성량을 높였다고 보고하였다. 이러한 Tween 80의 반추위내의 positive 효과는 Tween 80가 미생물의 부착을 높였기 때문일 것이라는 추측되고 있다.

사료의 소화율을 높이기 위한 많은 연구들 중 현재까지 지속적으로 연구되고 있는 것이 효소제이다. 효소제는 초기 비반추동물에게 사용되기 시작하였고, 현재에는 반추동물의 섬유소 분해율을 높이기 위하여 사용되고 있다. 최근 연구에서 섬유소 분해 효소제의 첨가는 반추동물의 산유량과 증체량(Beauchemin et al., 1995)을 증가시켰다고 보고되었다. 또한 DM이나 섬유소의 소화율이 증가하였음을 *in vitro, in situ, in vivo*에서 입증하였다 (Feng et al., 1996; Krause et al., 1996).

1969년 “축산 및 수의 영역에 있어서 항생물질의 사용에 관한 합동위원회”가 가축의 성장촉진 목적에 사용되는 사료첨가의 항균성 물질은 약제내성균이나 R 플라스미드의 증가를 촉진하는 원인이 되어 가축과 사람에게 영향을 미친다는 스완보고서를 계기로 항생제 남용 문제에 관심이 증가되기 시작했다(김상호 등, 2003). 최근에는 EU, WHO, FAO 그리고 OIE등 해외의 기관에서뿐 아니라 국내에서도 가축사료 생산에 항생제 사용에 대한 규제가 강화되고 있으며, 이의 대한으로 미생물제제(Direct-fed mocrobials)가 대체물질로 대두되고 있다.

이런 DFM 제조에는 박테리아, 효모, 곰팡이 등이 사용되고 (Oetzel 등, 2007;

Raeth-Knight, 2007), 현재 상업적으로 사용되고 있는 DFM으로는 *Aspergillus oryzae, Saccharoyces cerevisiae* 를 젖소에게 급여 시 건물, 유기물, 조단백질 등의 소화율이 크게 향상된 것으로 나타났다(Gomez-Alarcon, 1990; Newbold 등, 1995). 또한 착유우에 곰팡이와 효모를 첨가하면 산유량이 증가하고(williams 등, 1991). 반면 산유량에 영향이 없다는 보고도 있었다(Higgenbotham 등 1994).

반추위에서 분리한 곰팡이를 양에게 급여하였을 때 영양소 소화율이 증가하고, pH가 안정되며, 반추위내 미생물의 수가 증가하고, 질소 축적율이 높아졌다고 보고하였다(Lee 등, 2000). 반추위내 혐기 곰팡이는 다른 미생물보다 효소적 기능이 뛰어나다고 평가되고 있기 때문에 차후 능력이 우수한 곰팡이의 순수분리 및 대량 배양조건의 확립이 이루어진다면 DFM제제로의 활용이 가능할 것이다.

CMS(condensed molasses solubles)의 NPN원으로 사용하기 위해 미생물에 대한 이용성을 요소와 비교실험 에서는 요소보다 CMS 첨가시 반추위 미생물의 cellulose 이용율이 증가하였다(Hannon 등, 1990). 현재까지 CMS를 DFM 생산하는데 배지성분으로 사용된 연구자료는 없었으며, 따라서CMS를 배지로 사용하는 기법의 확립은 lysine 생산과정 중 발생하는 폐자원을 효과적으로 이용하는데 하나의 가능성을 제시할 수 있다.

제 7 장 참고문헌

Akin, D. E. 1980. Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. Appl. Environ. Microbiol. 39:242-252.

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. 75:641-644.

Brookman, J. L., G. Mennim, et al. 2000. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 185 rRNA. Microbiology. 146. 393-403.

Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VMK, Kauffeldt C, and Rutledge R (1991) Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. Theor. Appl. Genet. 83:194-200.

Chang. J. S., J. O'Fallon and R. E. Calza. Efforts toward the purification of fungal growth inhibiting factor from cicer mlkvetch(*Astragalus cicer*). Asian-Aust. J. Sci. 2002 15: 1002-1010

Cheng, K. J. and J. W. Costerton, 1980. Adhesive bacteria- Their role in digestion of plant material, urea and ephithelial cells. Pages 225-250 in digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Y. Ruchebusch and P. Thivend, Eds, MTP press Ltd., Lancaster, England.

Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H. and Costerton, J. W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants, ed. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima. Academic Press. Toronto, pp. 595-624.

Craig, W. M., Brown, D. R., Broderick, G. A. and Ricker, D. B. 1984. Polysaccharide levels of fluid and particulate microbes. Can. J. Anim. Sci. 64(suppl). 63-63.

Craig, W. M., G. A. Broderick and D. B. Ricker, 1987. Quantitation of microorgani는 associated with the particulate phase of ruminal ingesta. J. Nutr. 117:56-64.

Dehority, B. A. 1993. Microbiol ecology of cell wall fermentation. In Forage cell wall structure and digestibility, ed. H.G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield and J. Ralph. American Society of Agronomy Inc., Madison, pp. 425-453.

Dehority, B. A. and J. A. Grubb. 1980. Effect of short-term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers. Appl. Environ. Microbiol 39(2): 376-81.

Erickson, T., Börjesson, J. and Tjerneld, F. 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Enzyme Microb. Technol. 31:353-364.

Feng, P., C. W. Hunt, G. T. Pritchard and W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on in 냐셔 and in citro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. J. Anim. Sci. 74:1349-1357.

Flint, H. J. and Forsberg, C. W. 1995. Polysaccharide degradation in the rumen: biochemistry and genetics. In Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. ed. W. v. Engelhardt, S. Leonhard-Mar, G. Breves and D. Giesecke. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 43-70.

Gerald E. Higginbothama et al. 2004. Effect of feeding aspergillus oryzae extract on milk production and rumen parameters. Livestock Production Science 86: 55-59.

Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas, and J. T. Huber. 1990. Influence of cultures of aspergillus oryzae on rumen and total tract digestibility of dietary components. J Dairy Sci 73: 703-710.

Gong, J., and C. W. Forsberg. 1989. Factors affecting adhesion of Fibrobacter succinogenes S85 and adherence defective mutants to cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3039-3044.

Goto, M., Bae, H., Lee, S. S., Yahaya, M. S., Karita, S., Wanjae, K. and Cheng, K. J. 2003. Effects of surfactant Tween 80 on forage degradability and microbial growth on the in vitro rumen mixed and pure cultures. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16:672-676.

Hannon, K., and A. Trenkle. 1990. Evaluation of condensed molasses fermentation solubles as a nonprotein nitrogen source for ruminants. J Anim Sci 68: 2634-2641.

Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York, N.Y.

Jue, C. K., and P. N. Lipke. 1985. Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue. J Biochem Biophys Methods 11: 109-115.

Kamande, G. M., J. Baah, T. A. McAllister, K. J. Cheng and J. A. Shelford. 2000. Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein adsorption, and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. J. Dairy Sci. 83:536-542.

Kellems, R. O., A. Lagerstedt, and M. V. Wallentine. 1990. Effect of feeding aspergillus oryzae fermentation extract or aspergillus oryzae plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of holstein cows during a complete lactation. J Dairy Sci 73: 2922-2928.

Kim, C. -H., Kim, J. N. Ha, J. K., Yun, S. G. and Lee, S. S. 2004. Effects of dietary addition of surfactant Tween 80 on ruminal fermentation and nutrient digestibility of Hanwoo steers. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17:337-342.

Kim, H. S., Ahn, B. S., Chung, S. G., Moon, Y. H., Ha, J. K., Seo, I. J., Ahn, B. H. and Lee, S. S. 2006. Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. Animal Feed Science and Technology. 126:23-29.

Kim, W. J., Y. Gamo, et al. 2005. Pretreatment of surfactant tween 80 and fibrolytic enzyme influencing volatile fatty acid and methane production of a total mixed ration by mixed rumen microorganisms at in vitro. Japanese

Society of Grassland Science. 51:145-152.

Kimura, A., M. Takata, Y. Fukushi, H. Mori, H. Matsui and S. Chiba. 1997. A catalytic amino acid and primary structure of active site in Aspergillus niger alpha-glucosidase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61(7): 1091-1098

Koike, S. and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR asays for the rumen cellulolytic bacteria : *Fibrobacter succinogens, Ruminococcus albus and Ruminococcus flavefaciens*. FEMS Microbiol. Lett. 204. 361-366.

Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. J. Dairy Sci. 86:1429-1435.

Krause, D. O., J. B. Russell. 1996. How many ruminal bacteria are there? J. Dairy Sci. 79:1467-1475.

Latham, M. J., Brooker, B. E., Pettipher, G. L. and Harris, P. J. 1978. Adhesion of bacteroides succinogenes in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell walls in leaves of perennial ryegrass(Lolium perenne). Appl. Environ. Microbiol., 35, 1166-1173.

Lee, S. S. and J. K. Ha. 2003. Influences of surfactant Tween 80 on the gas production, cellulose digestion and enzyme activities by mixed rumen microorganisms. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16:1151-1157.

Lee, S. S., B. H. Ahn, H. S. Kim, C. H. Kim, K. J. Cheng and J. K. Ha. 2003. Effects of non-ionic surfactants on enzyme distributions of rumen contents, anaerobic growth of rumen microbes, rumen fermentation characteristics and performance of lactating cows. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16:104-115.

Lee, S. S., H. S. Kim, et al. 2004. The effects of a non-ionic surfactant on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. Animal Feed Science Technology 115: 37-50.

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. Animal Feed Science and Technology 88: 201-217.

Lowe, S. E., M. K. Theodorou, A.P.J. Trinci and R. B. Hespell. 1985. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungi on defined and semidefined media lacking rumen fluid. J. Gen. Microiol. 131. 2225-2229

McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, and K. J. Cheng, 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72:3004-3018.

McAllister, T. A., K. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford and K. J. Cheng. 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. Can. J. Anim. Sci. 80:35-44.

McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43:99-109.

Merry, R. J. and A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. Br. J. Nutr. 50:70.

Minato, H, and Suto, T. 1979. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. III. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to starch granules in vitro and elution of bacteria attached therefrom. J. Gen. Appl. Microbial., 25,71-93.

Minato, H., M. Mismori, and K. J. Cheng. 1993. Attachment of microorganisms to solid substrates in the rumen. Pages 139-145 in Proc. MIE Bioforum on Genetic, Biochemistry and Ecology of Lignocelluose Degradation. Institut Pasteur, Paris, France.

Miron J., and C. I. Forsberg. 1998. Features of Fibrobacter intestinalis DR7 mutant which is impaired with its ability to adhere to cellulose. Anaerobe 4:35-43.

Miron J., E. Morag, E. A. Bayer, R. Lamed, and D. Ben-Ghedalia. 1998. An adhesion defective mutant of *Ruminococcus albus* SY3 is impaired in its capability to degrade cellulose. J. Appl. Microbiol. 84:249-254.

Miron, J., and D. Ben-Ghedalia. 1992. The degradation and utilization of wheat straw cell wall monosaccharide components by degined ruminal

cellulolytic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:432-437.

Moon, Y. S., J. K. Ha, G. H. Cho and I. K. Han. 1991. Studies on improving nutritive value of rice straw. Ⅱ. Effects of Repeated Usage of Alkaline Hydrogen Peroxide Solution on Cell Wall Constituents and Digestibilities of Rice Straw in Sheep. Kor. J. Anim. Nutr. Feed. 15:182-185.

Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, et al. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. J. Anim. Sci. 79(6):1621-1630.

Morrison, M., Mackie, R. I. and Kistner, A. 1990. 3-phenypropionic acid improves the affinity of *Ruminococcus albus* for cellulose in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 56,3220-3222.

Newbold, C. J., R. J. Wallace, X. B. Chen, and F. M. Mcintosh. 1995. Different strains of saccharomyces cerevisiae differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. J. Anim. Sci. 73: 1811-1818.

Oetzel, G. R., K. M. Emery, W. P. Kautz, and J. E. Nocek. 2007. Direct-fed microbial supplementation and health and performance of pre- and postpartum dairy cattle: A field trial. J Dairy Sci 90: 2058-2068.

Orpin, C. G., and K. N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. Pages 140-195 in The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart, Eds. Blackie Academic and Professonal, Publishers, London.

Orpin, C. G. and K. N. Joblin., The rumen anaerobic fungi in The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson. P.N(ed) Elsevier, London. 1988. 129-150.

∅rskov, E. R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci(Camb). 92:499.

Pan, J., S. Koike, T. Suzuki, K. Ueda, Y. Kobayashi, K. Tanaka, M. Okudo. 2003. Effect of mastication on degradation of orchardgrass hay stem by rumen microbes: fibrolytic enzyme activities and microbial attachment. Anim. Feed Sci. Tech. 106, 69-79.

Pell, A. N., and P. Schofield. 1993. Microbial adhesion and degradation of

plant cell walls Pages 397-423 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility. R. D. Hatfield, H. G. Jung, J. Ralph, D. R. Buxton, D. R. Mertens, and P. J. Weimer, eds ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.

Raeth-Knight, M. L., J. G. Linn, and H. G. Jung. 2007. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of holstein dairy cows. J Dairy Sci 90: 1802-1809.

Reddy, S. K. K., and M. Morrison. 1998. Biochemical and molecular characterization of adherence-defective mutants of *Ruminococcus albus* strain 8. Page 132 in Proc. Mie Bioforum on Celluose Degradation, Institute Pasteur, Paris, France.

Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bondy, and P. Gouet. 1990. Effects of physiochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobactor succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 49:572-576.

Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001 Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press. 1.82-1.83

SAS. 1996. SAS User's Guide (Version 7). SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Selinger, L.B., C.W. Forsberg and K.J. Cheng. 1996. The Rumen : A unique source of enzymes for enhancing Livestock production. Anaerobe. 2:263-284.

Stewart, C. S., H. J. Flint, and M. P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. Pages 10-72 in The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart, Eds. Blackie Academic and Professional Publishers, London.

Stewart, C. S., S. H. Duncan, and H. J. Flint. 1990. The properties of forms of *Ruminococcus flavefaciens* which differ in their ability to degrade cotton cellulose. FEMS Microbiol. Lett. 72:47-50.

Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, and Y. Benno. 2001. Diet-Dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl. Environ. Microb. 2766-2744.

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. 82:2164-2169.

Wanapat, M., F. Sundstol and T. H. Garmo. 1985. A Comparison of alkali treatment methods to improve the nutritive value of straw Digestibility and Metabolizability. Anim. Feed Sci. Tech. 12:295-309.

Wang, Y., McAllister, T. A., Baah, J., Wilde, R., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Shelford, J. A., Kamande, G. M. and Cheng, K. J. 2003. Effects of Tween 80 on in vitro fermentation of silages and interactive effects of Tween 80, monensin and exogenous fibrolytic enzymes on growth performance by feedlot cattle. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16:968-978.

Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1997. The rumen bacteria. Pages 73-139 in The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart, Eds. Blackie Academic and Professional Publishers, London.

Williams, A. G., and N. H. Strachan. 1984. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. Can. J. Anim. Sci. 64:58-59.

Wubah, D.A., D.E. Akin and W.S. Borneman, 1993. Biology fiber-degradation, and enzymology of anaerobic zoosporic fungi. Critical Reviews in Microbiology, 19(2):99-115.

김민석, 이상석, 최낙진, 하종규. 2003. Detection of *Streptococcus bovis* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. 한국 동물자원과학회. p109.

서성. 2001. 국내 조사료 생산현황과 나아가야 할 방향. 낙농산업과 기술. 61-72

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.