

최 중
연구보고서

Probiotics와 bacteriocin을 이용한
반추가축의 사료 효율 증진 연구

Development of feed efficiency
improvement for ruminant
by probiotics and bacteriocin

연구기관

중앙대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Probiotics와 bacteriocin을 이용한 반추가축의 사료 효율 증진에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 07월 14일

주관연구기관명 : 중앙대학교

총괄연구책임자 : 장 문 백

세부연구책임자 : 윤 영 호

연 구 원 : 이 상 석

배 귀 석

정 경 진

변 정 열

배 임 희

이 종 혁

박 소 현

협동연구기관명 : 한경대학교

협동연구책임자 : 안 종 호

세부연구책임자 : 김 창 현

요 약 문

I. 제 목

Probiotics와 bacteriocin을 이용한 반추가축의 사료 효율 증진 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 항생성 미생물에 의한 반추위 발효 증진 및 천연 물질의 이용을 통한 사료 효율 증진 방안에 관한 연구로써 목표 미생물(target bacteria) 선발을 통한 반추위내 항생성 미생물 분리, 동정하였으며 이 분리, 동정된 미생물을 이용하여 *in vitro* 상에서 억제존 실험을 통하여 병원성 미생물에 대한 항생성 미생물의 효과 및 천연 물질 이용을 통한 사료 효율 개선 방안에 대한 연구 하였으며, 최종적으로 *in vivo* 시험을 통하여 반추가축에게 미생물제제 급여시의 효과를 규명하고자 하였으며 반추위내 서식하는 미생물 중 섬유소 분해력이 강한 혐기성 박테리아를 혐기적으로 순수 분리하였으며, 분리된 미생물들을 동정하고 이들 미생물들을 *in vitro* 상에서 단독 또는 혼합 배양 하였다. 배양을 통해 기질 분해율과 효소 분비량에 미치는 영향을 구명하고 미생물 성장률과 단백질 합성량에 미치는 영향을 구명하였다. 최종적으로 미생물제제를 반추동물에 급여하여 *in vivo* 시험을 통해 미생물제제의 효과를 규명하고자 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

목표 미생물(target bacteria) 선발을 통한 항생성 미생물의 선정 및 반추위내 항생성 미생물 분리, 동정하였고, 항생성 미생물의 효과 규명 및 장내 미생물에 의한 천연 물질의 효율성 검정하였으며 병원성 미생물에 대한 항생성 미생물의 효과 및 천연 물질 이용을 통한 사료 효율 개선 방안에 관한 연구를 수행하였으며, 반추 가축 생산성 증진을 위한 생균제제용 장내 미생물의 개발 연구를 위해 먼저, 반추위 발효 안정화 및 섬유소 이용성을 증진시킬 수 있는 장내 생균제제

후보 미생물의 탐색, 분리 및 동정을 하였으며, 선발된 균을 이용하여 *In vitro* 시험을 통해 분리 미생물의 사용 조건 규명하고 최종 생균제의 개발하였다. 개발된 생균제를 제조하여 반추동물을 이용하여 최종 개발품의 검증 시험을 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

목표 미생물(target bacteria) 선발을 통한 항생성 미생물의 선정 및 반추위내 항생성 미생물 분리, 동정하였고, 항생성 미생물의 효과 규명 및 장내 미생물에 의한 천연 물질의 효율성 검정하였으며 병원성 미생물에 대한 항생성 미생물의 효과 및 천연 물질 이용을 통한 사료 효율 개선 방안에 관한 연구를 수행하였다. 본 연구의 결과는 다음과 같다.

배지성분의 따른 bacteriocin의 생성에 미치는 영향은 1차년도 연구결과 항균력이 우수하다고 판단되는 송아지분변 분리균주인 *Lactobacillus plantarum* CU13 와 장내분리균주인 *Lactobacillus rhamnosus* CU02를 시험균주로 사용하였다. 유산균 증균배지인 MRS broth의 주요 구성성분의 함량에 따른 bacteriocin의 생성량과 최적의 조건을 찾기 위해 다음과 같이 배지성분의 함량을 달리 하여 병원성균의 억제정도와 Bacteriocin의 AU(activity unit per ml), 균의 성장 정도를 구하였다.

여기에 사용한 병원성 균은 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313이며, 균의 성장 정도는 Spectropotometer를 이용하여 OD(580nm)값으로 나타냈으며, AU의 측정을 위한 실험 방법은 diffusion zone의 방법으로 수행하고 sample은 분리균주를 37°C에 20시간 배양한 후 1500rpm으로 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. Table 1.은 MRS에 각각의 성분을 조절하여 성장 정도와 AU를 측정된 결과이다. 성분의 함량을 조절하여 측정해본 결과 13번 송아지 분리균주의 경우 tween 80을 0.5%로, glucose를 3%로, beef extract를 3%로, NaCl을 각각 1, 2%로 조절 했을 때에 normal한 MRS보다 높은 성장 정도와 과 AU를 나타내었으며, tween 80을 0%로, peptone을 2, 3%로, yeast extract를 각각 1, 2, 3%로, glucose를 0%로 조절 했을 때에 normal한 MRS보다 낮은 성장 정도와 AU를 나타내었고, tween 80을 1%로, peptone을 0%로, yeast extract를 0%로, glucose를

1%로, beef extract를 각각 0, 2%로, NaCl을 3%로 조절하였을 때에 normal한 MRS와 비슷한 성장 정도와 AU를 나타내었다. 1-2의 경우 normal한 MRS배지에서 보다 tween 80을 각각 0.5, 1%로, yeast extract를 각각 0, 1, 2, 3%로, beef extract를 각각 2, 3%로 조절 하였을 때에 성장 정도와 AU가 더 큰 것으로 나타났으며, peptone을 각각 0, 2, 3%로, glucose를 3%로, beef extract를 0%로 조절하였을 때에 normal한 MRS 배지와 비슷한 성장 정도와 억제력을 나타내었고, tween 80을 0%로, glucose를 0%로, beef extract를 0%로, NaCl을 각각 1, 2, 3%로 조절했을 때에 normal한 MRS보다 낮은 성장 정도와 AU를 나타내었다. 그 밖의 MRS에 포함된 광물질들은 분리균주의 성장이나 AU에 영향을 끼치지 않았다. 성장 정도와 AU가 높게 측정된 성분만을 교합하여 배지를 제조해서 배양을 해 보았지만 더 이상의 높은 성장률과 AU는 나타나지 않았다.

균체와 세포벽, 세포 내용물의 항균력은 균체 성분중의 억제력을 나타내는 부분을 찾기 위해 분리균주를 MRS배지를 이용하여 37°C에 20시간 배양한 다음 균체를 분리하여 동결건조 후 french pressure를 이용해 cell을 세포벽과 세포 내용물로 분리하였다. 실험은 균체와 세포벽, 세포 내용물로 수행했으며, diffusion zone의 방법을 이용하였다. 실험결과 13분 송아지 분리균주의 경우 균체에서 1600의 AU를, 세포벽에서 800의 AU를 나타내었으며 세포 내용물에서는 clean zone이 나타나지 않았다. 1-2의 경우 균체에서는 400의 AU를 나타내었으나 10배 희석의 경우 7mm의 clean zone이 나타나고 400배 희석의 경우 clean zone이 나타나지 않았으므로 AU는 10과 400 사이에 존재할 것으로 추측된다. 다음으로 여러 가지 indicator organisms의 억제 실험 결과는 분리균주의 억제 범위를 알아보기 위하여 여러 가지 indicator organisms를 이용하여 clean zone test를 수행하였다. 분리균주를 37°C에 20시간 배양한 후 1500rpm에서 원심분리하여 균체를 취하고, 동결건조 한 후 10배로 희석하여(w/v) clean zone을 측정하였다. indicator organisms은 총 13가지를 사용하였으며, 유산균종은 MRS에서 37°C에 20시간 배양한 후에 사용하였고, 그 밖의 나머지 organisms은 nutrient배지에서 37°C에 20시간 배양한 후에 사용하였다. 실험 결과 모든 13번 송아지 분리균주 *Lactobacillus plantarum* CU13는 *Streptococcus agalactiea* CU 31에서 가장 큰 clean zone을 나타내었으며, 1-2번 *Lactobacillus rhamnosus* CU02 는 *Straphylococcus aureus* CU 1161에서 가장 큰 clean zone을 나타내었다. 분리균주의 배양액과 세포추출액의 단백질전기영동의 특성으로 분리균주들은 37°C에

20시간동안 배양하여 1500rpm에 원심분리하여 상층액을 취하여 배양액을 2, 3의 sample로 취하였으며, 세포 추출물은 원심분리로 분리해낸 균체를 동결건조한 분말을 증류수로 20배 희석하여 french pressure를 이용해 상층액을 추출하여 3, 5의 sample로 취하였다.

sample들은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 수직형 젤(85×60×75mm)에서 PAGE를 실시하였다. 분리용 젤의 조성은 18%(w/v)acrylamide, 0.1%(w/v)SDS, 0.375M Tris-HCl pH8.8, 0.05%(v/v) TEMED 그리고 0.05% ammonium persulfate를 함유하였다. Stacking gel은 5%(w/v) acrylamide, 0.1%(w/v)SDS, 0.123M Tris-HCl pH6.8, 0.125%(v/v) TEMED, 0.075% ammonium persulfate를 함유하였다. 반추위 박테리아에 대한 박테리오신의 안정성 검사는 반추미생물의 억제활성 실험에서 4종의 병원성균(*E. coli* O-157, *Salmonella tythinurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*)에 대한 7종의 rumen bacteria(*Provetella ruminocola* ATCC23, *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17, *Selenomonas ruminantium* 2386, *Streptococcus bovis* JB1 and *Butryvibrio fibrisolvens* 2221)의 항생능력 측정하는 실험으로 계속적인 반복 실험을 통하여 rumen bacteria의 접종 시 clean zone 형성 균주를 찾아내는 실험을 실시하였다. 그 결과 7종의 rumen bacteria 중 *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17와 *Streptococcus bovis* JB1을 접종 했을 때 clean zone이 형성되었으며 그 외 3종의 반추미생물에서는 clean zone이 나타나지 않았다. Clean zone을 형성한 4종의 rumen bacteria 중 *Fibrobacter succinogenes* BL2와 *Ruminococcus albus* J6에서 나머지 다른 2종의 *Ruminococcus flavefaciens* No17와 *Streptococcus bovis* JB1 보다 clean zone의 형성이 뚜렷하게 나타났다. 이 4종의 rumen bacteria는 4종의 병원성균 모두에서 clean zone를 형성하였으나, *Listeria monocytogenes*와 *E. coli* O157에서 clean zone이 더 크게 나타났다. 앞선 Diffusion zone test를 통하여 항생능력을 갖고 있는 반추미생물 4종(*Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17 and *Streptococcus bovis* JB1) 중에 높은 활성을 갖고 있는 2종의 반추미생물(*Fibrobacter succinogenes* BL2 and *Ruminococcus albus* J6), 이 2종의 반추미생물을 혼합 배양한 균주와 대조구에서 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105을 감염시킨 ICR mouse male의 모든 처리구에서 처리 후 3일 까지 체중이 줄어들었으나, 5일 후에 control 처리구를 제외한 *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6와 rumen bacteria mixture의 3개의 처리구에서는 초기 체중보다 체중이 증가한 것을 관찰

할 수 있었다. Control 처리구는 초기 체중의 7.7% 정도의 체중 감소가 나타났고 나머지 3 처리구에서는 6% 이상의 체중 증가가 나타났다. 그 중 rumen bacteria mixture에서 통계적으로 유의하게 ($P < 0.05$) 높은 체중의 증가를 보였다. 또한 *Ruminococcus albus* J6 처리구에서도 높은 경향을 나타내었다. 항생능력을 가진 미생물 및 유산균의 첨가에 의한 반추위 내 발효 특성을 살펴 본 결과는 다음과 같았다. 본 연구에서 각각의 처리 균주를 첨가해 주었을 때 보다 각 균주의 혼합 배양한 균주를 첨가해 주었을 때의 반추위 내 발효 특성이 증가한 것이 나타났다. NDF, ADF의 소화율과 미생물 단백질 합성량, 효소의 활성등이 다른 처리 균주에 비해 혼합배양 균주에서 높게 나타난 반면에 $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 함량과 A/P ration는 낮게 나타났다. pH의 변화는 반추미생물에서 *S. bovis* 처리구에서 다른 처리구에 비해 시험기간 동안 pH의 전체 평균은 6.26으로 유의하게 낮았으며 ($P < 0.05$), 다른 처리구에서는 비슷한 경향을 나타내었고, Lactic acid bacteria의 pH value는 반추미생물 처리구의 급격한 변화와는 달리 pH value가 서서히 증가하는 안정적인 경향을 보였으며, 전체 시험기간 동안 통계적 유의성을 나타내지 않았다. 반추미생물 첨가시 NDF digestibility는 injection 후 10h 까지 증가하였으며, rumen bacteria mixture에서 가장 높은 소화율을 나타내었다. 지속적으로 NDF 소화율이 증가하던 *R. albus*는 평균 소화율 14.85로 유의성을 나타냈으며 ($P < 0.05$), Lactic acid bacteria 처리구는 소화율이 일정하게 유지되었으며, rumen bacteria 처리구와 비슷하게 10h 이후에 소화율의 감소 경향을 나타냈다. 소화율이 rumen bacteria 처리구 보다 낮게 나타난 이유는 섬유소 분해 반추미생물들에 의해 섬유소 분해 특성에 의한 조사료의 소화가 rumen bacteria 처리구에서 더 높게 나타났기 때문으로 사료된다. 반추 미생물 첨가시 ADF digestibility는 *S. bovis*와 Rumen bacteria mixture 처리구에서 다른 처리구에 비해 약 75%의 급격한 증가를 나타냈고, 1h 후에는 나머지 처리구들과 비슷하게 증가하여 8h 이후의 소화율은 다른 처리구와 비슷하게 나타났으며, Lactic acid bacteria 처리구의 ADF digestibility는 NDF digestibility와 경향이 비슷하게 나타났다. ADF digestibility 역시 급격한 증가와 감소가 나타나지 않고 비슷하게 유지되었으며, 10h 이후 소화율이 감소되는 경향을 보였다. Injection 후 1h 까지 반추미생물 처리의 모든 처리구에서 $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 함량이 급격하게 증가한 후 6h 까지 감소하고 6h 이후에 유지되는 경향을 나타냈다. 초기 농후사료의 빠른 발효에 의한 것으로 사료되며, *F. succinogenes* 에서 가장 높은 함량이 나타났으며, rumen bacteria mixture에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. Lactic acid bacteria의 모든 처리구에서는 control 처리구 보다 $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 낮은 합성률을 나타냈으며, rumen bacteria 처리구와 비슷한 경향을 보였다. Lactic acid bacteria에서도 lactic acid bacteria mixture에서 가장 낮은 합성률을 나타냈다. Rumen bacteria 처리구

의 미생물단백질합성량은 *S. bovis*와 rumen bacteria mixture 처리구에서 나머지 처리구보다 약 50% 높게 나타났다. 3h 까지 증가 경향을 나타낸 후 10h 까지 서서히 감소하다 10h 이후 다시 증가하는 경향을 보였다. Lactic acid bacteria 처리구의 미생물 단백질 합성량은 4h 까지 증가와 감소가 반복되다 4h 이후 거의 같은 함량을 유지하였다. 10h 이후 control 처리구를 제외한 모든 처리구에서 증가 경향을 나타냈으며, mixture 처리구에서 가장 높은 합성량을 보인 반면, control 처리구에서 가장 낮은 합성량을 나타냈다. 반추미생물 처리구에서의 VFA 생성량은 *S. bovis*에서 VFA의 생성량이 유의하게 높게 나타났으며 ($P<0.05$), 나머지 처리구는 비슷한 생성량을 나타냈다. 모든 Lactic acid bacteria 처리구에서 injection 후 3h 까지 급격하게 증가한 후 감소하는 경향을 나타냈다. 모든 처리구에서 4h까지 VFA의 합성량이 증가하였으며, 이후에는 감소 하였다. Control 처리구에서 초기의 생성이 가장 빠르게 나타났으며, 총 생성량 역시 가장 높게 나타났다. A/P ration 반추미생물 전체 처리구에서 유의한 차이를 나타내지 않았으며, *F. succinogenes* 처리구에서 나머지 처리구의 감소와는 다르게 A/P ration의 증가가 나타났으나 그 후엔 다른 처리구와 같이 3h에서 급격하게 감소하였다. 이 후 대부분의 처리구가 A/P ration을 일정하게 유지하였으며, 8h 이후에 *S. bovis*와 rumen bacteria mixture 처리구에서 나머지 세 균주의 증가와는 다르게 감소 경향이 나타났다. Lactic acid bacteria 처리구에서의 A/P ration은 control 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 증가와 감소가 반복적으로 나타나다 6h 이후에는 증가 추세를 보였다. 반추미생물의 *S. bovis* 처리구에서 avicelase activity가 나머지 5 처리구의 2배 이상의 활성이 나타났으며, 10h 이후의 서서히 나타나는 증가와는 대조적으로 급격한 증가가 나타났다. *S. bovis*를 제외한 나머지 처리구 중 rumen bacteria mixture에서 높은 활성을 나타냈고, CMCase activity는 모든 처리구에서 control 처리구 보다 유의적으로 활성을 나타냈으며 ($P<0.05$), 특히 *S. bovis*와 *F. succinogenes* 처리구에서는 control 처리구의 약 2배 가량의 높은 활성을 나타냈다. 또한 FPase activity는 Injection 후 2h 까지 모든 처리구에서 활성의 증가가 급격하게 나타났으며, *F. succinogenes* 처리구에서 가장 크고 빠르게 나타났다. 2~4h 사이에 활성의 저하가 나타나나 후 유지되다 10h 이후에는 증가 다시 활성의 증가 경향이 나타났으며, *R. albus* 처리구에서는 전체 평균이 133.01로 유의적으로 높게 나타났다. Lactic acid bacteria 처리구에서는 Lactic acid bacteria mixture 처리구는 다른 처리구에 비해 Avicelase의 활성이 유의적으로 높은 경향을 나타내었으며 ($P<0.05$), 나머지 처리구에서 활성이 비슷하게 나타나다 8h 이후 모든 처리구에서 활성의 증가가 나타났으며, CMCase activity는 모든 처리구에서 control 처리구의 활성보다 유의적으로 높게 나타났다 ($P<0.05$). 3~4h 까지 활성의 증가 후 유지되는 경향이

보였다. 그리고 FPase activity는 Lactic acid bacteria mixture 처리구를 제외한 모든 처리구에서 3h 까지 증가 후 감소의 경향이 나타난 반면, lactic acid bacteria mixture 처리구는 6h 까지 활성이 급격하게 증가한 후 6h 이후 감소하는 경향을 보였다. Lactic acid bacteria 처리구도 역시 control 처리구의 활성이 가장 낮게 나타났다. 유산균의 FPase 활성은 전체 평균은 차이가 없게 나타났다.

본 실험에서 사용한 혼합 균주에서의 발효 특성의 증가는 균주들의 상호 작용에 의해 나타난 것으로 사료되며, 일부 균들의 상호 길항작용이 나타나기도 하지만 순수배양 시 보다는 전반적으로 높은 활성을 나타내는 것은 나머지 균들이 억제력 완화 물질을 생성하거나 혼합 배양시 *R. albus*의 성장을 저하시킴으로써 *R. flavefaciens*에 대한 억제력을 완화 시켰다고 추측한다. 유산균 처리구에서는 반추 미생물 처리구와 비교하였을 때 NDF, ADF의 소화율과 VFA 합성량, 미생물 단백질 합성량이 낮게 나타났다. 이것은 본 실험에 이용한 반추미생물이 cellulose 분해 미생물로서 섬유소 분해가 빠르고 이용율이 증가하였기 때문이라고 사료된다(Dehority, 1965). 그러나 유산균 처리구에서도 반추미생물 처리구와 같이 전반적으로 혼합 균주의 접종 시에 NDF 소화율, ADF 소화율, 미생물 단백질 합성량고 효소활성이 높게 나타났으며, NH₃-N의 합성량고 A/P ration은 낮게 나타났다. 이를 통해, 생균제 활용 시 혼합 배양균의 이용이 바람직하다고 사료된다. 또한 반추가축의 생산성을 증진하기 위해 반추가축의 반추위의 발효를 활성화 시킬 수 있는 생균제를 개발하기 위해 장내로부터 섬유소 분해력이 강한 박테리아를 분리하였고 이 중 생균제 개발을 위해 여러 가지 특성분석을 하였으며 최종 두 균주를 선발하여 in vitro 및 in vivo 시험을 통해 생균제의 발효증진 효과를 조사하였다. 본 연구의 주요결과는 아래와 같다.

Roll tube법에 의해 Holstein 젖소의 반추위로부터 26균을 분리하여 colony 형태를 알아보기 위해 2% agar 함유된 DA medium 상에서 2~4일간 배양하였다. Colony의 크기는 지름 1~3mm 사이였으며 분리된 colony 중 H8, 13, 19, 20, 21, 24균들은 colony가 불규칙한 형태였고 나머지 균들은 원형의 형태 이었다. Colony로부터 순수분리하여 계대배양 한 후 filter paper를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에 26균주를 24시간 배양한 결과 H8, 20, 23 및 25균들이 filter paper를 분해하였다. 섬유소 분해력이 확인된 H8, 20, 23, 25균들을 16s rDNA 분석을 통해 동정한 결과 H8, H20 과 H25균은 섬유소 분해균인 *Ruminococcus flavefaciens*으로 확인되었으며, H23균의 경우 *Fibrobacter succinogenes*로 동정되었다. 비록 filter paper를 분해하지 못하였으나 starch, glucose 및 cellobiose를 탄수화물 공급원으로 한 DA medium에서 높은 활력을 보인 H7, 16 및 21균은

동정결과 *Megasphaera elsdenii*로 동정되었다.

Holstein 젖소의 반추위로부터 혐기성 섬유소 분해 박테리아들을 분리한 후 이들의 섬유소 분해 및 발효 특성을 조사하고자 기질을 filter paper와 볏짚을 사용하여 각 분리균들을 단독배양하여 기질분해율, 가스발생량 및 효소 분비 능력을 조사하였다. 공시균주는 H8(*Ruminococcus flavefaciens*), H20(*R. flavefaciens*), H23(*Fibrobacter succinogenes*), H25(*R. flavefaciens*) 및 RF(*R. flavefaciens sijpesteijn*, ATCC 19208) 5개의 균을 filter paper disk(Whatman No.1, Whatman, England)와 볏짚을 기질로 한 Dehority's artificial (DA) medium에서 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 8일 동안 교반 없이 39°C incubator에서 배양하였다. Filter paper를 기질로 하였을 때 건물 분해율 및 가스 발생량은 배양 초기에 H20균이 높았으며, 배양 후기에는 H25균이 높았다. 배양 8일째 가스발생량은 H20, H23, H25 및 RF균이 유의적 차이 없이 높았으나 H8균의 경우 가장 낮은 가스 발생량을 나타냈다. 누적가스 발생량의 경우 H20균이 전 배양기간 동안 높았으며, H25균의 경우 배양 4일과 6일에 높은 누적가스 발생량을 나타냈다. 가수분해효소 활력조사 결과 H20 및 H23균이 높은 효소활력을 나타내었다. 볏짚을 기질로 하였을 때 건물분해율의 경우 가스발생량은 배양 초기 H23균이 가장 높았으며, 배양 후기에 가서 RF균의 가스 발생량이 높았다. 누적가스 발생량은 배양 마지막인 8일을 제외하고 전 배양 기간동안 H23균이 가장 높았다. 가수분해효소 활력은 기질에 따라 차이가 있었으나 H20 및 H23의 효소 활력이 높게 나타났으며, filter paper와 볏짚을 기질로 이용했을 때 H20 및 H23균의 섬유소 분해 활력이 높은 것을 알 수 있었다.

단독배양을 통해 효소 활력이 우수한 H20과 H23균을 선발하여 공시하였고, 표준균주인 RF균과 *Ruminococcus albus hungate*(RA, ATCC27211)를 공시하여 각 균의 배양액을 혼합배양하였을 때 *in vitro* 발효특성을 조사하였다. 4개의 균을 5개 처리구로 혼합하여 DA medium에 탄소원으로 filter paper(Whatman No.1)를 기질로 한 배지에서 배양하였다. 최종적으로 가장 우수한 미생물 균은 기질 분해율, 가스발생량, 단백질 합성량 및 가수분해 효소의 활력이 가장 높게 나타난 RF-H20-H23을 선발 할 수 있었다.

최종 선발된 RF-H20-H23 그룹을 이용하여 혼합 정도를 단순화 하면서 *in vitro* 상에서 반추위액에 첨가하여 실제 반추동물에 급여시 반추위의 발효특성을 조사하고자 *in vitro* 실험을 수행하였다. 사용된 기질은 볏짚과 알팔파를 각각 두

번의 시험에 걸쳐 수행하였다. 벧짚기질을 사용하였을 때 건물분해율은 H20-H23 그룹이 전 배양 기간동안 가장 높았으며, 단독으로 반추위액에 접종한 H20군보다 혼합배양하여 접종한 RF-H20-H23, RF-H20 및 H20-H23 그룹의 건물분해율이 높게 나타났다. 가스 발생량 및 누적가스 발생량은 건물분해율과 같이 H20-H23 그룹에서 가장 많이 발생되었다. Xylanase 활력은 H20-H23 그룹에서 가장 높은 효소 활력을 나타냈다. 배양액내 pH 변화는 배양 후기에 H20-H23 그룹이 다른 그룹에 비해 높았으나 유의적인 차이는 없었으며, ammonia-N 농도는 RF-H20, H20-H23 및 H20 그룹이 배양 6시간부터 24시간까지 높았다. 그러나 배양 48시간과 72시간 때에는 모든 그룹 간에 유의적인 차이가 없었다. 배양액내 acetic acid의 농도는 배양 초기에 H20 그룹에서 가장 높았으며, 배양시간이 증가하면서 모든 처리에서 증가하였다. Propionic acid 와 butyric acid는 H20-H23 그룹에서 높았으며, valeric acid의 생성량은 H20 그룹에서 높았다. 알팔파를 기질로 하였을 때 건물분해율은 배양 초기 H20 그룹이 가장 높았으며, 배양 12시간부터 72시간까지 H20 그룹을 제외한 모든 그룹의 건물 분해율은 유의적으로 차이가 없었다. 가스발생량의 경우 RF-H20 그룹이 전 배양 기간동안 가장 높은 가스발생량을 나타냈으며, 배양 72시간대 RF-H20 그룹을 접종한 처리구가 28.53 ml/0.1g 으로 가장 높은 가스 발생량을 나타냈다. 누적가스 발생량은 control과 RF-H20 그룹에서 높게 발생하였으며 H20-H23 그룹이 배양 24시간 때부터 배양 72시간까지 가장 낮았다. H20 그룹이 높은 효소활력을 나타냈으며, H20-H23 그룹의 경우 xylanase 활력에서 높은 효소활력을 나타냈다. pH는 배양 0시간부터 배양 12시간까지 모든 처리구에서 유의적으로 차이가 없었으나 배양 24시간부터 H20-H23 과 H20 그룹이 다른 그룹에 비해 pH가 높았다. Ammonia-N는 배양 6시간째 H20-H23 과 H20 그룹이 가장 높았으며, 배양 12시간부터 24시간에는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. 배양 시간이 증가 할수록 acetic acid의 농도가 증가하여 모든 처리구에서 배양 72시간대에 가장 높았다. RF-H20 그룹이 50.01mM로 배양시간 중 가장 높은 acetic acid의 농도를 나타냈다. Propionic acid의 농도는 acetic acid와 같이 배양시간이 증가함에 따라 증가 하였으며, 배양 72시간대에 전체 그룹에 대해 유의적으로 차이가 없었다. Butyric acid의 생성은 acetic acid와 propionic acid의 농도와는 다르게 H20-H23 과 H20 그룹에서 가장 높은 농도를 나타냈다. Valeric acid는 배양 6일째 전체 그룹간 유의적인 차이가 없었으며, 배양 12시간부터 배양 마지막인 72시간까지 RF-H20-H23 과

RF-H20 그룹에서 가장 높았다. 따라서 in vitro 반추위혼합균을 이용한 생균제 첨가시험에서 기질분해율과 효소활력이 높은 H20-H23 그룹의 혼합균이 미생물 제제로서 이용 가능성이 높을 것으로 기대되었다.

최종적으로 실험실에서 규명된 H20-H23을 직접 반추가축의 사료에 첨가급여 시 반추위액의 발효성상을 조사하였다. 반추위액내 pH는 생균제 첨가구가 감소하였지만 대조구와 유의적 차이가 없었다. 반추위내 ammonia-N의 농도는 모든 시간대에서 생균제제 첨가구에서 유의적으로 높았다. 휘발성지방산의 농도도 유의적인 차이는 없었지만 생균제제 첨가구가 사료급여 후 0시간에서 6시간까지 높은 경향이였다. 반추위액을 채취하여 상층액을 조효소로 활용하여 가수분해효소의 활력을 분석한 결과 CMCase는 생균제첨가구가 사료급여 후 0시간과 3시간에 대조구보다 활력이 높은 경향이였다($p<0.1$). Xylanase의 활력은 전체 시간대에서 생균제제 첨가구가 높은 경향이였으며, 특히 3시간대에 유의적으로 대조구보다 월등히 높았다 ($p<0.05$).

결론적으로 실험실에서나 반추가축을 직접이용하여 개발된 생균제제는 반추동물에 급여시 동물의 반추위 발효조건을 개선하여 생산성을 증진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 개발된 결과의 이용효과는 우선 반추위내 혐기성 미생물의 분리를 통한 미생물의 분류자료를 제공하며, 반추위내 미생물에 의한 발효기작을 규명할 수 있었으며, 생균제제를 급여하여 반추위 발효를 인위적으로 조절하는 관련된 자료를 제공할 수 있다. 또한 현재 고섬유질 성분으로 구성되어 있는 국내 부존 사료자원을 효과적으로 이용할 수 있는 사료첨가제로 활용할 수 있다. 경제 산업적인 측면에서 개발된 제품의 활용할 수 있는 분야는 천연 물질의 산업적 이용에 따른 축산분야의 생산성 향상 및 사료 비용 절감, 사료 자원의 이용 효율 증대에 따른 농가 지출 절감, 암모니아 발생 및 반추위 발효 산물의 증가에 따른 가축의 생산성 향상, 산독증 및 가축의 질병 예방, 젖소의 유생산 증가, 장내 미생물의 이용성 증가에 따른 타 산업의 부가적 이익 기대 및 장내 미생물의 기술력 축적에 따른 국제 경쟁력 제고 등이 있을 수 있다.

SUMMARY (영문 요약문)

Development of feed efficiency improvement for ruminant by probiotics and bacteriocin

This project consists of 2 sections : Section I. Development of feed efficiency improvement for ruminant by probiotics and bacteriocin. Section II. Development of probiotics for the improvement of ruminant productivity

Section I : Development of feed efficiency improvement for ruminant by probiotics and bacteriocin. Section

Effects of antibiotics of the rumen microbe to be pathogenic organism (*Escherichia coli*, O157:H17, *Listeria* and *S. a*), it used to seven strains intestines microbe probe (*Provetella ruminocola* ATCC23, *Selenomonas ruminantium* 2386, *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* N017, *Streptococcus bovis* JB1, and *Butyribivrio fibrisolvens* 2221), separated and purely be able to stability of rumen fermentation and increased of cellulose utilization. Measure of antibiotics activity toward to pathogenic organism thought continuously Diffusion Zone experiment. The Result of non-filtering treatment strains, *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17, *Streptococcus bovis* JB1 have effect of antibiotics. And in vivo test operation to mouse, that observed weight variation of mouse after inject to mouse to selected strains through Diffusion. Zone. Each treatment divide control, selected rumen microbe (*Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17, *Streptococcus bovis* JB1), mixed culture, five repetition treatment and implement blow same condition. The result of decreased of control treatment the other side increased weight of mouse from all treatment at 3day to 5day and a trend mixed culture highest increased at mouse weigh of mixed culture. Moreover experimental conducted to ruminal fermentation property of Holsteincow. Results was NDF digestibility, ADF digestibility, ruminal microbes protein synthesis and VFA production was significantly higher mixed culture treatment than among treatment

Section II: Development of probiotics for the improvement of ruminant productivity

A series of experiments were carried out to develop a new probiotic for ruminants. Experiment 1 was conducted to isolate and identify cellulolytic bacteria from the rumen of Holstein cows. Twenty six bacteria were isolated from colonies grown in Dehority's artificial(DA) medium with 2% agar. The isolated bacteria were cultured in DA medium containing filter paper at 39°C for 24h and H8, H20, H23 and H25 strains were higher in degradability of filter paper. The results of 16s rDNA gene sequencing of isolated bacteria of four strains showed H8, H20 and H25 strains identified as *Ruminococcus flavefaciens* and H23 strain as *Fibrobacter succinogenes*.

Effects of isolated anaerobic bacteria H8(*Ruminococcus flavefaciens*), H20(*Ruminococcus flavefaciens*), H23(*Fibrobacter succinogenes*), H25(*Ruminococcus flavefaciens*) and RF(*Ruminococcus flavefaciens* sijpesteijn, ATCC 19208) cultured with filter paper or rice straw as a single carbon source on dry matter(DM) degradation, gas production and cellulolytic enzyme activities were investigated. Strain H25 degraded filter paper to 62% at 8 days after incubation, while the dry matter degradation rate of H8 was lower than the other strains. In all incubation times, the cumulative gas production was highest in H20 strain. The CMCase and Avicelase activities in the culture supernatant for the H20 strain was significantly higher than for the H8, H23, H25 and RF in all incubation times. When each bacterium was cultured with rice straw, the cumulative gas production was highest in the culture of H23 strain in all incubation times. The CMCase and Avicelase activities in the culture supernatant for the H20 and H23 strains were significantly higher.

An experiment was conducted to investigate the relative contributions of interactions between isolated cellulolytic bacteria. Considering the results of the previous experiments, H20 and H23 strains were selected and type strains of RF and *Ruminococcus albus*(RA, ATCC27211) were used for comparison with the isolated strains. Five groups were cultured in DA medium containing

filter paper as a sole carbon source and incubated at 39°C for 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 days without shaking. In an early stage of incubation, DM degradation and gas production were higher in the RF-H20-H23 group and in late stages of incubation, they were higher in the RA-RF-H20-H23 and RF-H23-RA groups than the other groups. The co-culture with RF, H20 and RA showed an antagonistic effect for all parameters. Hydrolytic enzyme activities were higher in the RF-H20-H23 and RA-RF-H20-H23 groups.

An *in vitro* culture experiment using with mixed rumen microorganisms was conducted to examine fermentation performance of rumen microbes supplemented with mixed culture of H20 and H23 strains. Five inoculation treatments were divided with a group without inoculation (control), RF-H20-H23, RF-H20, H20-H23 and H20 groups. Dry matter degradation of rice straw was highest in the culture inoculated with H20 and H23 strains, while DM degradation was higher in the cultures inoculated with more than one strain(H20). Gas production was higher in the H20-H23 group. Xylanase activity was highest in the H20-H23 group. Ammonia-N in the culture was higher in the RF-H20, H20-H23 and H20 groups at the 6 and 24h of incubation than in the other groups, while there was no significant difference between all treatments at 48 and 72h incubation times. In early incubation, acetic acid concentration was higher in the H20-inoculated culture than in the other cultures. Propionic and butyric acids concentrations were higher in the H20-H23 group and valeric acid concentration was higher in the H20 group compared with the other groups.

Another *in vitro* experiment was conducted to investigate effects of mixed inoculation of isolated anaerobic bacteria to the *in vitro* culture of mixed rumen microorganisms on alfalfa DM degradation and fermentation patterns. After start of incubation, DM degradation was higher in the H20 group, while from 12h to 72h incubation periods there were no significant differences between all treatments. Gas production was highest in the RF-H20 group during the whole incubation periods, especially at the 72h of incubation the gas production was highest(28.53 ml/0.1g). Xylanase activity was higher in

the H20-H23 group compared with the other groups. During the incubation period ranged from 0 to 12h, pH was not different between all treatment, while the H20-H23 and H20 groups were higher in pH than the others beyond the 24h incubation. Ammonia-N content in the culture was higher in the H20-H23 and H20 groups at the 6h incubation. Acetic acid content was highest(50.01mM) in the RF-H20 group at the 72h incubation. Butyric acid content was higher in the H20-H23 and H20 groups, and valeric acid content was higher in the RF-H20-H23 and RF-H20 groups in the incubation periods from 12 to 72h. Therefore, the cellulolytic bacteria group containing H20 and H23 strains would be used as an most effective direct-fed microbial additive due to its higher DM degradability and enzyme activities.

To examine effects of supplementation of developed direct-fed microbes (DFM) on DM degradation and ruminal fermentation in ruminant animals. A mixed culture of H20 and H23 strains were added into the diets for ruminally cannulated cows. Ruminal pH was tended to be reduced by the DFM supplementation compared with control, while ruminal ammonia nitrogen content was significantly higher in the DFM treatment than control ($p < 0.05$). Individual VFA concentration in the rumen of cows tended to be higher in the DFM treatment than control at 0 and 6h after feeding. CMCase activity the rumen fluid was in a higher tendency in the DFM treatment compared with control ($p < 0.1$) at 0 and 3 h after feeding. Xylanase activity was significantly higher in the DFM treatment than control at 3h after feeding ($p < 0.05$)

In conclusion, it was believed that feeding the DFM containing H20 and H23 strains isolated from the rumen of cows would increase production of ruminant animals by improving ruminal fermentation.

The present study would provide some information related to rumen microbial systems, mechanisms of ruminal fermentation and artificial control mechanisms of ruminal fermentation by feeding DFM. Again, the developed DFM could be used as a feed additive which improves feed values of byproducts in high fiber contents for livestock production. In economic and

industrial aspects, the DFM can increase livestock production, lower production costs, reduce the expenditure of farms by increasing the efficiency of use of feed sources, prevent diseases like acidosis, improve milk production of dairy cows, give a expectation on subsequent benefits from other industries which highly use gut microbes, and establish international competitiveness by accumulating the gut microbial technologies.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research.....	19
Part 1. Purposes and aims of research.....	19
Part 2. Objectives and contents of the research and development.....	23
Chapter 2 Current status of related research developed in Korea and other countries.....	24
Part 1. A Study on the isolation and identify rumen microbes content bacteriocin and probiotics of rumen.....	24
Part 2. Development of feed efficiency improvement for ruminant by probiotics and bacteriocin.....	25
Part 3. The future prospect.....	27
Chapter 3. Results of research.....	29
Part 1. Development of feed efficiency improvement for ruminant by probiotics and bacteriocin.	29
Part 2. Development of probiotics for the improvement of ruminant productivity	70
Chapter 4. Achievements of aims and contribution to related areas.....	168
Part 1. Aims of research.....	168
Part 2. Evaluation point of research.....	172
Chapter 5. Achievements of research.....	173
Chapter 6. Information collected from abroad during the research period....	174
Chapter 7. References.....	188

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	19
제 1절	연구개발의 필요성	19
제 2절	연구개발의 목적 및 범위.....	23
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	24
제 1절	반추위 내 항생성 미생물의 분리, 동정 및 이용 방안에 관한 연구의 국내 외 기술현황과 문제점.....	24
제 2절	장내 미생물을 이용한 생균제 개발을 통한 사료효율 증진방안의 국내 외 기술현황과 문제점.....	25
제 3절	앞으로의 전망.....	27
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	29
제 1절	항생성 미생물에 의한 반추위 발효 증진 및 천연 물질의 이용을 통한 사료 효율 증진 방안에 관한 연구.....	29
제 2절	반추 가축 생산성 증진을 위한 생산성 증진을 위한 생균제제용 장내 미생물의 개발 연구.....	70
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	169
제 1절	연구목표의 달성도.....	169
제 2절	관련 분야에의 기여도.....	173
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	174
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	175
제 7 장	참고문헌.....	190

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

최근 천연물질을 이용한 시장은 급격히 증가하는 추세에 있으며, 동(식물, 곰팡이, 효모, 박테리아, 기타 생물 자원을 이용한 천연물 산업은 21세기 바이오 산업의 핵심을 차지할 것으로 전망하고 있다. 천연물(Natural products)이란 동(식물, 미생물 등의 생물 자원으로부터 유래된 산물을 의미한다. 이러한 천연물의 유용성을 평가하고 고부가가치의 상품을 개발하는 것은 바이오산업의 발전뿐만 아니라 농생명공학의 발전 및 축산분야의 비용절감을 가져올 수 있다. 일반적으로 천연물질의 추출은 곰팡이, 효모, 박테리아를 이용하여 추출하고 있다. 지금까지 알려진 대표적인 천연물질로는 곰팡이에서 추출한 페니실린, 항균물질인 황합유물질(sulfanilamide), 세포외벽을 합성하는데 필요한 효소를 저해하는 락타민과 세포벽을 파괴하는 물질로 알려진 폴리펩타이드 등이 있다. 이중에서 항생제로 이용되고 있는 페니실린, 테트라사이클린, 모넨신은 미생물에 대한 내성의 증가 및 인체에도 치명적인 영향을 미칠 수 있어서 점차 사용량이 감소하거나 금지하고 있다. 1940년 초기 페니실린이 최초로 상업적으로 동물의 질병예방을 위해 이용되었다. 그러나 1947년 페니실린에 대한 박테리아의 내성이 보고되었으며 (Tan 등, 2000), 또한 병원균에 대한 항생제의 내성이 인간의 건강에 치명적인 영향을 줄 수 있다고 보고하였다 (Aaerstrup 등, 1998; Cohen, 1992). 1979년 환자의 장내에서 추출한 미생물을 통하여 실험한 결과 페니실린에 대한 내성은 단지 0.2%에 불과하였으나 1994년 6.6%로 급상승하였다 (CDC, 1994). 이와 같이 항생제의 내성의 증가는 인체의 건강뿐만 아니라 동물의 건강 및 식량생산에 있어서 중요한 문제로 대두되었다. 최근 유럽에서는 동물의 성장촉진제로서의 항생제의 이용을 금지하였으며 (European Commission/ Scientific Steering Committee, 1999) 미국에서도 점차 항생제의 이용에 대한 관리를 강화하고 있다. 따라서 항생제를 대체하기 위한 새로운 방법이 모색되어야 한다. 이를 위한 방안으로 미생물의 내성에 안정된 대체물질의 연구와 미생물첨가제(direct-fed microbials)가 가장 부각되고 있다. 최근 항생성미생물에 의해 생산되는 박테리오

신(bacteriocin)은 미생물에 의해 생산되는 천연물질로서 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 항생제를 대체하기 위한 새로운 방안으로 폴리펩타이드 계통의 박테리오신은 반추위 발효증진과 사료효율개선을 위한 방안으로 많은 잠재성을 지니고 있는 물질이다. 지금까지 사료효율을 증진시키기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 반추가축의 생산성증진을 위한 방안으로서 많은 연구자들은 반추위 발효조건을 변화시켜 사료 효율을 증진시켜 경제적, 기술적 이익을 얻고자 노력하였다. 특히 메탄 발생량을 억제하고, A:P ration의 감소는 프로피온산으로 전변을 용이하게 하며, 에너지의 유지(energy retention)이 증가하게 되어 에너지효율을 높일 수 있다. 또한 아미노산의 반추위내 deamination을 줄일 경우 암모니아의 생성 억제 및 아미노산의 영양학적 이용율을 높일 수 있다. 이와 같이 반추위에 발효조건을 변화시키고 사료효율을 높이기 위해서는 우선적으로 반추위내 미생물의 조절이 필수적이다. 반추위내 존재하는 그람 양성 박테리아 (예: *Streptococcus bovis*)는 빠른 속도로 젖산을 생성하며 이는 반추위내 pH의 저하와 심한 경우 가축이 폐사에 이르게 한다 (Owens et al., 1998). 더불어 그람 양성 박테리아는 그람 음성 박테리아보다 많은 양의 암모니아, 수소, 젖산을 생성한다. 여러 종류의 항생제는 그람 양성균의 성장을 억제하고, 결과적으로 반추위 발효조절 및 사료효율을 증진시키기 위한 목적으로 사용되고 있다. 1970년, 미국 FDA(food and drug administration)는 항생제인 모넨신을 비육우의 사료첨가제로서 이용을 승인하였으며, 그람 양성균에 효과적으로 작용하였다. 모넨신은 세포막을 구성하고 있는 양이온에 작용하여 대하여 양이온의 교환, 칼륨의 저하, 나트륨의 축적, 세포의 에너지의 감소에 따른 세포막을 파괴한다. 그러나 모넨신과 기타 ionophore 계통의 항생제는 일부 동물에게 급여시 치명적으로 작용한다. 또한 사료제조과정에서 모넨신의 첨가는 사람에게 두통, 멀미, 코피, 피부발진 등을 일으킬 수 있으며 (Pressman과 Fahim, 1982), 유럽에서는 모넨신의 사용을 금지하였다. 최근에 항생성미생물에 의해 추출한 박테리오신은 모넨신과 유사한 효과를 지닌 것으로 알려져 있다. 박테리오신(bacteriocin)의 정의는 1950년 이후 Jacob 등 (1951)에 의해 리보솜에서 합성되는 펩타이드로서 항생제와 구분되었다. Nisin은 최초 상업용으로 이용된 박테리오신으로서 박테리아에서 추출한 천연물질로 가장 널리 알려진 물질이다. 항생성 미생물에서 추출한 니신은 그람양성박테리아의 세포막을 파괴하며, 반추위미생물에 첨가하였을 때 모넨신과 마찬가지로 암모니아 생성을 줄이고 A/P ration를 감소시키는 것으로 보고되었다 (Callaway, 1997). 또한

최근의 보고를 통하여 니신이 반추위내 메탄생성을 억제하는 것으로 확인이 되었다(Klieve과 Hegarty, 1999). 지금까지의 실험결과에 의하면 항생성미생물에 의해 추출된 박테리오신은 반추동물의 경우 모넨신과 같은 항생제효과를 지닌 것으로 밝혀졌다.

박테리오신 유사물질이 *In Vivo* 에서 생성된 후 반추위 proteolytic organism 의 작용에 의해 파괴될 수 있으나, Chan(1999) 실험에서 proteolytic species으로 연구되었던 박테리오신 유사성 저해 활력을 나타내는 *Butyrivibrio fibrisolvens*는 반추위내에서 전반적으로 복잡한 경향을 나타내며(Kalmokoff 등, 1996), 박테리오신 유사 물질은 전반적인 반추위 발효에서 한정된 영향을 미치고, 식물입자의 표면에서 일어나는 환경적 특정 영역 내에서 어떠한 role에 따라 작용할 것으로 보인다(Chan 등, 1999).

현재 국내에서는 항생성 미생물을 이용한 반추위 발효 조절 및 사료효율개선 방안에 대한 연구가 전혀 이루어지고 있지 않다. 이는 반추동물의 생산에 있어서 항생성 미생물을 이용한 박테리오신의 개발과 이용이 생소할 뿐 만 아니라, 반추미생물을 연구하는 연구자들이 부족하기 때문일 것으로 보인다. 더불어 반추동물의 장내 미생물에서 항생성 미생물을 분리(동정하는데 고도의 분리기법이 요구되고, 장기간의 시간이 요구되는 작업이 될 수 있기 때문일 것이다. 그러나 항생성 미생물을 연구하고 있는 많은 연구자들이 언급한 것처럼 항생성 미생물을 이용한 천연물질 이용은 항생제를 대체할 수 있는 매우 효과적인 대체제로 제공될 수 있다(Teather와 Forster, 1998).

가축에게 이용되는 미생물제제는 최근 항생제를 위시한 성장촉진제 사용의 안정성 문제가 대두되면서 관심을 갖게 되었다. 이러한 미생물 제제의 첨가는 아직까지 큰 문제점이 발견되지 않고 있으며, 첨가효과에 따라 동물에게 급여시 장내 병원성미생물의 정착을 감소시키며, 소화율이 향상된다고 보고되고 있다. *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus*를 쥐에게 급여시 병원성 대장균의 장내 정착을 저해하였으며 (Duval-Iflah, 1998), 상업용 미생물첨가제로 사용되고 있는 *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*를 젖소에게 급여시 건물, 유기물, 조단백질 등의 소화율이 크게 향상된 것으로 나타났다 (Gomez와 Alarcon, 1990; Newbold등, 1995). 이외에 사료첨가제로서 반추위로부터 분리한 곰팡이를 양에게 급여하였을 때 반추위내 미생물수가 증가하였으며, 반추위내 pH의 안정화, 영양소 소화율이 증가하고 질소 축적율이 높아진 것으로 나타났다

(Lee 등, 1996). 이와 같이 유용미생물을 이용한 천연물질을 반추가축에게 급여할 경우 반추위내 미생물 군집의 변화, 반추위내 pH의 안정화, 휘발성지방산 생성량의 증가, 사료 섭취량의 증가, 소화율이 개선된다고 보고하고 있다. 그러나 한편으로 미생물제제의 첨가가 동물의 소화율향상에 영향을 주지 않는다는 연구결과도 보고되고 있다 (Martin과 Nisbet, 1989;Denigan, 1992). 현재까지 상업용으로 사용되고 있는 미생물제제들은 곰팡이 발효추출물과 효모 배양물이 상품화되어 시판되거나 젖산균을 사용하고 있다. 상업용 미생물제제로 이용되고 있는 효모 첨가제는 계통에 따라 동물의 장내에서 큰 차이를 나타낼 수 있고 장내 산도에 의해 많은 영향을 받으며, 지금까지 연구를 통해서 나타난 결과가 일관성이 낮은 것에 기인한다. 또한 섬유소 분해력이 월등한 곰팡이를 첨가제로서 사용할 경우에는 계대배양의 어려움과 배지조건상 경제성이 낮다는 문제점이 뒤따른다. 미생물제제로서 이용 가능한 후보미생물은 장내 생존성, 내산성, pH에서의 안정성, 높은 계대능력 및 효소 역가의 조건을 갖추어야 한다. 이와 같은 조건을 만족하기 위해서는 후보미생물을 숙주동물의 장내에서 분리하는 것이 가장 효과적이며, 또한 곰팡이나 효모보다 숙주동물의 장내 서식하고 있는 박테리아를 분리(동정하여 이용가능성을 알아보는 것이 미생물 제제로서의 효율을 높일 수 있을 것으로 보인다. 그러나 현재까지 동물의 장내 미생물을 이용한 생균제의 개발은 대부분 분리(동정에 머무르고 있는 실정이다. 이에 본 연구는 항생제와 화학물질의 사용에 대한 우려와 새로운 대체제의 개발 필요성을 부합하며, 반추가축의 위내 환경에 적합한 미생물제제를 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

본 연구는 반추위내 서식하는 미생물 중 섬유소 분해력이 강한 혐기성 박테리아를 혐기적으로 순수 분리하였으며, 분리된 미생물들을 동정하고 이들 미생물들을 *in vitro* 상에서 단독 또는 혼합 배양 하였다. 배양을 통해 기질 분해율과 효소 분비량에 미치는 영향을 구명하고 미생물 성장률과 단백질 합성량에 미치는 영향을 구명하였다. 최종적으로 미생물제제를 반추동물에 급여하여 *in vivo* 시험을 통해 미생물제제의 효과를 규명하고자 연구를 수행하였다.

2. 연구개발의 범위

연구개발의 목적에 따른 주요 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

가. 항생성 미생물에 의한 반추위 발효 증진 및 천연 물질의 이용을 통한 사료 효율 증진 방안에 관한 연구

- 1) 목표 미생물(target bacteria) 선발을 통한 반추위내 항생성 미생물 분리, 동정
- 2) 항생성 미생물의 효과 규명 및 장내 미생물에 의한 천연 물질의 효율성 검정
- 3) 병원성 미생물에 대한 항생성 미생물의 효과 및 천연 물질 이용을 통한 사료 효율 개선 방안에 대한 연구

나. 반추 가축 생산성 증진을 위한 생균제제용 장내 미생물의 개발 연구

- 1) 반추위 발효 안정화 및 섬유소 이용성을 증진시킬 수 있는 장내 생균제제 후보 미생물의 탐색, 분리 및 동정
- 2) *In Vitro* 시험을 통한 분리 미생물의 사용 조건 규명 및 최종 생균제의 개발
- 3) 대사 시험을 통한 최종 개발품의 검증 시험 및 산업화 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 반추위내 항생성 미생물의 분리, 동정 및 이용 방안에 관한 연구

1. 국내 기술 현황

아직까지 반추위내에 존재하는 항생성 미생물의 분리, 동정은 국내에서 시도되지 않았으며, 박테리오신을 이용한 사료효율 개선방안 및 가축에 대한 이용방안 역시, 현재까지 연구가 진행되지 않았다. 본 연구의 제안자는 미국 및 국내에서 본 연구를 수행하여 왔으며, 보다 효율적으로 박테리오신을 이용한 반추위 발효증진 방안을 연구하고자 하였다.

2. 국외 기술 현황

과거 20년 동안 비육우에서 모넨신이 사용되어 왔으며, 항생제(ionophore)의 일종인 모넨신의 내성이 사료효율을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Russell and Rychlik, 2001). 또한, 모넨신이 사람에게 접촉되었을 때 두통, 멀미, 피부질환 등이 발생되며, 동물에게도 유사한 문제가 발생하였다(Pressman and Fahim, 1982).

항생성 미생물에 대한 연구는 1947년 이후부터 시작되었으며, 그람양성박테리아에 효과적으로 작용하였다. 대표적인 물질로 젓산균에서 추출한 'nisin'이 상업적인 목적으로 이용되고 있으며, 계속적으로 새로운 항생성 미생물을 찾는 연구가 지속되고 있다(Sablon 등, 2000). 또한, 항생성 미생물은 병원성 미생물에 대한 살균작용이 있으며, 식물보존제로서의 이용도 증가하고 있다.

항생성 박테리아가 생산한 nisin이 메탄 생성 억제, 휘발성 지방산 비율감소 및 암모니아 생산을 감소시키는 것으로 보고되었으며(Callaway 등, 1997), 반추위내 박테리아 중 *S. bovis*종에서 박테리오신을 생산하는 능력을 지닌 박테리아를 분리 동정하였으며, PCR과 DNA sequence를 통하여 정확한 구조를 밝혀내었다. 반추위내 미생물 중 항생성 박테리아의 분리, 동정 및 박테리오신의 구조와 기능을 알아내려는 연구가 미국과 캐나다를 중심으로 진행되고 있으며, 이들을 통해 반추위 발효증진에 대한 연구가 수행되고 있다(Mantovani 와 Russell,

2001).

3. 문제점

모넨신 계통의 항생제를 장기간 투여시 프로토조아가 항생제 내성을 나타내었으며, 이를 대체할 획기적인 첨가제가 개발되지 못하고 있는 실정이다 (MaAllister, 1997). 현재까지 항생성 미생물을 이용한 추출물은 식품보존제로서 이용이 되었을 뿐, 가축의 성장촉진을 위한 사료첨가제로 이용되고는 있지 않으며 기초적인 연구개발이 필요하다. 장내 미생물을 이용한 항생성 박테리아의 분리, 동정은 반추위내 존재하는 미생물에 대한 내성을 감소시키며, 추후 이용 가능한 사료첨가제로서 가치가 높은 방안이다. 그러나 분리, 동정 과정이 일반 미생물에 비해 시간이 많이 소요되며 반추위내 효과를 검증하는데 기술과 분자생물학적인 접근이 요구되었다.

제 2 절 장내 미생물을 이용한 생균제제 개발을 통한 사료 효율 증진방안

1. 국내 기술 현황

반추동물의 생산성 향상을 위하여 중조(sodium bicarbonate)와 같은 완충제나 모넨신과 같은 항생제가 이용되어 왔으며, 그 효과도 입증된 바 있다. 그러나 완충제의 첨가는 기호성을 떨어뜨려 사료 섭취량을 감소시키고, 모넨신은 유지방 감소현상을 나타내는 등 부작용을 가져왔다(사료단기과정, 1997). 화학 제제의 사용은 식품의 안정성과 건강에 대한 소비자의 인식의 변화로 국내에서 사용이 점차 줄어들고 있으며, 새로운 천연물질을 이용한 사료첨가제의 개발이 시도되고 있다. 이에 누룩곰팡이(*aspergillus oryzae*)에 비티민과 무기질을 강화시킨 사료첨가제가 개발되어 산업화 되었으며, 효모배양물(*yeast culture extracts*)도 시판되고 있다. 이러한 미생물 제제의 첨가는 아직까지 큰 문제점이 발견되지는 않고 있지만, 사료효율 개선 및 소화율 증진에 있어서 개체마다 일정한 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 최근 반추위내 서식하고 있는 혐기성 곰팡이의 섬유소 분해능력이 뛰어난 것으로 알려져 있으며 이를 산업적으로 이용하려는 시도가 이

루어지고 있다. 그러나 곰팡이의 지속적인 세대 배양이 쉽지 않을 뿐만 아니라 혐기성 곰팡이는 사양체계, 축종, 지역, 숙주동물에 따라 차이를 보이고 있어서 연구수행과 산업적 이용에 많은 제약이 뒤따르고 있다(강민원 등, 2000).

현재, 반추위 내용물을 2% 함유한 제품이 출시되어 사료효율 개선 및 소화기 질병 예방용으로 판매되고 있으나, 구체적으로 반추위내 미생물을 이용한 제품은 개발되지 않았다(녹십자주식회사). 미생물 제제로서 박테리아의 사용은 젖산균을 이용하는 것이 대부분이며, 또한 사일리지의 품질을 유지하기 위한 대안으로도 이용되고 있다. 현재, 장내 미생물을 이용한 생균제의 개발은 진행되고 있지 않으며, 사일리지의 부패를 낮추기 위한 방안으로 연구가 진행되었다.

본 연구 제안자는 지금까지 천연물의 이용과 반추동물에 대한 천연물의 평가와 이용성에 관한 연구를 계속적으로 진행하였으며, 이러한 연구를 기초로 하여 장내 미생물을 이용한 천연물 제제의 산업적 개발을 수행하고자 하였다.

2. 국외 기술 현황

화학 첨가제의 사용에 대한 문제점이 대두되면서 사일리지의 품질을 유지하기 위한 방안으로 박테리아 접종이 등장했다. 박테리아를 접종한 고수분 알갱이의 호기 안정성, 소화율, 영양소 이용율을 측정된 결과 대조구에 비해 감소하였다(Philip 등, 1992). 북유럽을 중심으로 가축의 생산성 효율을 증진시키기 위하여 미생물 제제의 사용이 증가하고 있으며(Yoon and Stern, 1995), 대부분 상업용 미생물 제제는 젖산을 생산하는 *Lactobacillus*계 종의 박테리아가 가장 많이 이용되고 있다(Kung, 1999). Ecosyl® (*Lactobacillus spp.*)을 첨가한 경우 유기 소화율이 증가되었다고 보고되었으나, 섬유소 소화율에 대한 연구는 실행되지 않았다(Heron and Owen, 1991). 농후사료 급여시 발생하는 산도저하를 막기 위하여 박테리아와 효모를 복합하여 급여한 결과 반추위내 pH 저하를 억제할 수 있다는 결과를 얻었으며(Nocek, 2002), 젖산을 이용하는 미생물 중에서 반추위내에서 분리한 *Megasphaera elsdenii*를 속효성 사료원을 기질로 이용한 시험결과에서 젖산 축적을 막을 수 있었다(Kung and Hession, 1995). 젖소에서 산독증을 줄이기 위한 방안으로 젖산을 생산하는 박테리아인 *Lactobacillus*와 *Enterococcus*을 급여할 경우 예방의 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 이는 반추위내 젖산이 존재하기 때문에 반추위내에 쉽게 적응할 수 있기 때문인 것으로 사료된다(Nocek 등, 2002). 젖산과 glucose를 초산과 프로피온산으로 전환하는 박테리아로 알려진

*Propionibacterium*을 고농후 사료를 섭취하는 비육우에게 급여시 산독증의 위험을 줄일 수 있을 것으로 보인다(Ghorbani등, 2002).

3. 문제점

현재까지 국내에서 사용하고 있는 미생물 제제는 반추동물의 장내 미생물이기 보다는 곰팡이 추출물과 효모 추출물을 상품화하여 판매하고 있는 것이므로, 장내 생존성 및 효과가 일정치 않은 단점을 가지고 있다. 사료 첨가제로서 미생물의 직접적 사용이나 이들이 분비하는 효소 사용의 효과는 많은 긍정적인 결과를 보여주고 있으나, 미생물에 의한 영향인지에 대한 평가 방법이 제대로 이루어지지 않았다.

장내 미생물은 혐기성 상태에서 생존이 가능하므로 배양 방법이나 내산성에 강한 미생물을 선별해야 하는 분리, 동정상에 따른 시간과 기술이 요구되며, 생균제로서의 산업화를 위해서는 보다 적합한 부용제의 개발과 장기간 보존하기 위한 보존 방법이 요구된다.

제 3 절 앞으로의 전망

국내 사료자원의 부족과 해외 수입 의존도가 높은 상황에서 사료의 이용 효율을 높이기 위한 방안이 요구된다. 특히 조사료의 이용효율이 50% 정도이므로 조사료의 이용 효율을 높이기 위한 천연 물질의 생산 및 이용은 사료산업의 경제성을 높일 수 있는 방안으로 제시될 수 있다. 유럽을 중심으로 항생제의 사용이 금지되었고, 소비자의 식품 안정성에 대한 관심이 고조되고 있는 현 상황에서 항생제를 대체할 수 있는 새로운 대체제의 개발이 시급한 실정이다. 따라서 동물에게 적합한 항생제 대체제의 개발은 축산 분야의 발전에 기여할 것으로 예상된다.

천연 물질을 이용한 특허 출원은 1986년에는 21건에 불과하였으나, 2000년에는 375건, 2001년에는 436건으로 급격히 증가하는 추세이다. 이러한 특허 출원 동향은 보다 많은 천연물 자원의 국제 경쟁력 확보 및 향후 바이오 산업의 경쟁력 우위를 위한 기초 연구를 위해 필요한 사항이다. 최근에 반추 미생물과 효소 공학의 발전, 미생물의 bioinformatics의 발전 및 생명 공학의 발전은 반추위내 발효를 증진하고 소화율과 반추 가축의 생산성을 높이는데 많은 기여를 하고 있다. 이를 병합한 장내 미생물을 이용한 천연물질에 대한 연구는 개발의 효율성이 높

고 축산 분야의 발전에 기여할 것으로 보인다. 장내 항생성 미생물에 대한 연구는 새로운 항생제의 대체 방안으로 제시되고 있으며, 이와 더불어 국내에서 반추가축의 사료증진 방안으로는 전혀 연구되어 있지 않으므로, 연구 개발을 통하여 학문적인 영역과 산업적인 영역을 동시에 접근할 수 있는 부분으로 사용될 수 있다.

장내 미생물에서 분리한 천연 물질의 사용은 가축의 질병 예방(산독증, 히드타민 축적, 제염염)에 간접적으로 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되며, 장내 미생물의 분리, 동정 및 생균제 개발은 장내 미생물에 대한 연구 기반을 마련할 수 있을 뿐만 아니라 우수한 미생물을 선별하여 보존제, 효소제 생산 등 산업적 이용 가능성이 높다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 항생성 미생물에 의한 반추위 발효 증진 및 천연 물질의 이용을 통한 사료 효율 증진 방안에 관한 연구

1. 목표 미생물(target bacteria) 선발을 통한 반추위내 항생성 미생물 분리, 동정

가. Holstein 반추위 내 분리균의 Bacteriocin 활성 양성 isolate 분포성향

Holstein rumen 으로부터 분리된 isolate의 병원성균주 *Salmonella typhimurium*, *E.coli* 0157, *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*에 대한 억제 활성 분포와 그 활성정도와 isolate 고유번호 및 양성 분포율 및 균주 수는 Table 1, 2, 3, 4에 각각 제시되었다.

Table 1-1. Holstein 반추위 내 분리균주의 *Salmonella typhimurium* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive		NO. of strain	Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)		NO. of strain	
54, 105, 146, 154, 155, 180, 185	3.5	45(22.5%)	155(77.5%)	200(100%)
141, 143, 149, 159, 171, 172, 173, 174, 176, 177, 178, 182, 186	4			
12,51	4.5			
30,55,66,83,99,106,157,164,169,175,189	5			
5	5.5			
82,130,133,179,195	6			
80	7			
129	7.5			
9,140	8			
81	9			
72	10			

Table 1-2. Holstein Rumen 분리균주의 *E.coli* 0157 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
20, 21, 21	3.5	22(11%)	178(89%)	200(100%)
32, 74, 75, 93, 114, 121, 181, 182	4			
53, 110, 113, 117	4.5			
55, 86, 179, 187	5			
198, 199	5.5			
35	6			

Table 1-3. Holstein Rumen 분리균주의 *Listeria monocytogens* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
9, 10, 15, 36, 46, 67, 74, 107, 109, 112, 115, 116, 118, 119, 120, 136, 145	3.5	42(21%)	158(79%)	200(100%)
56, 72, 81, 95, 106, 113, 134, 135, 144, 150, 155, 156	4			
73, 87, 91, 99, 108, 110	4.5			
88, 93, 96	5			
43, 160	5.5			
123	9			
34	9.5			

Table 1-4. Holstein Rumen 분리균주의 *Staphylococcus aureus* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive		Negative		Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
59, 179	4	25(12.5%)	175(87.5%)	200(100%)
193	4.5			
24, 64, 90, 109, 112	5			
78, 107	5.5			
102	6			
106, 111, 113, 177, 178	7			
116, 135	8			
143	8.5			
118	9.5			
185, 197	11			
74	14			
196	16			
73	19.5			

나. 한우 반추위 내에서 분리된 isolate의 bacteriocin 활성균주의 활성측정 결과

한우 반추위 내에서 분리된 isolate의 병원성균주 *Salmonella typhimurium*, *E.coli* 0157, *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*에 대한 억제 활성 분포와 그 활성정도, isolate 고유번호 및 양성 분포율 및 균주수는 Table 1-5, 6, 7, 8에 각각 제시되었다.

Table 1-5. 한우 반추위 내 분리균주의 *Salmonella typhimurium* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive		Negative		Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
1	6	4(20%)	16(80%)	20(100%)
3	10			
10	4			
12	4.5			

Table 1-6. 한우 반추위 내 분리균주의 *E.coli* 0157 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
1	8.5	2(10%)	18(90%)	20(100%)
3	13.5			

Table 1-7. 한우 반추위 내 분리균주의 *Listeria monocytogens* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
		0(0%)	20(100%)	20(100%)

Table 1-8. 한우 반추위 내 분리균주의 *Staphylococcus aureus* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
2	4.5	5(25%)	15(75%)	20(100%)
4	8.5			
11	7.5			
13	5			
14	5			

다. 토양분리균주의 Bacterionin 활성 측정 결과

Table 1-9. 토양 분리균주의 *Salmonella typhimurium* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1015	7	4(36%)	7(64%)	11(100%)
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1805	4.25			
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1809	6.25			
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1823	5.3			

Table 1-10. 토양 분리균주의 *E.coli* 0157 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1805	1.5	2(18%)	9(82%)	11(100%)
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ATCC13538	2			

Table 1-11. 토양 분리균주의 *Listeria monocytogens* 억제 bacteriocin 생산 균주 탐색

Positive			Negative	Total
Isolate(code)	Activity(mm)	NO. of strain	NO. of strain	
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1807	4	3(27%)	8(77%)	11(100%)
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1809	4.5			
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ATCC13538	3			

라. 억제활성

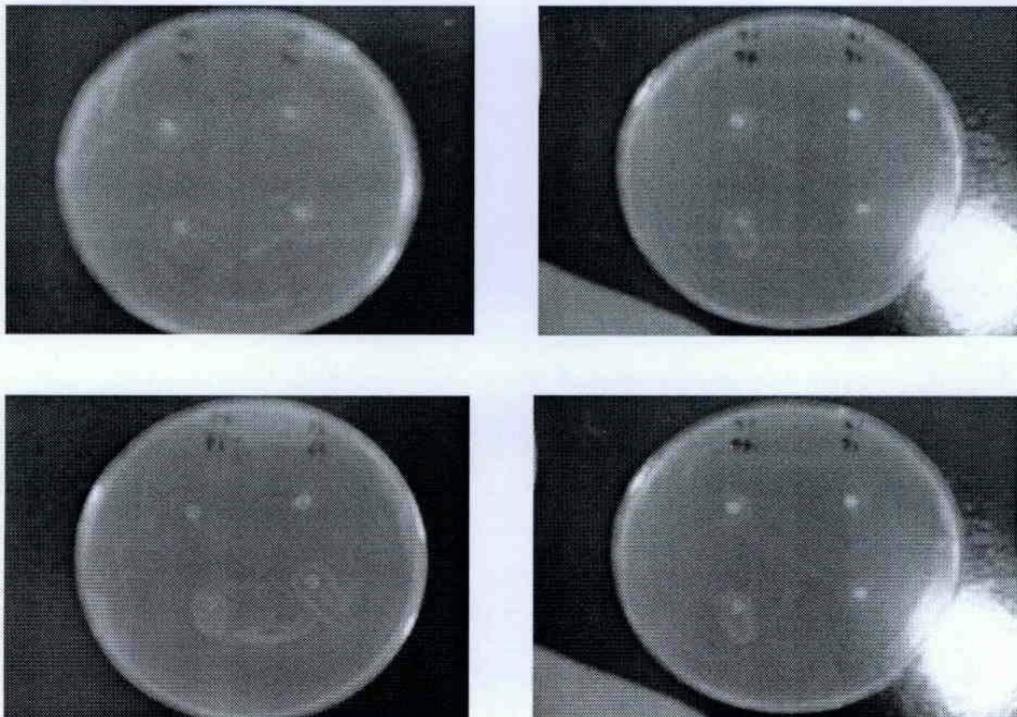


Fig 1-1. 송아지 분변에서 분리한 균주의 억제환(ultrasensitive method)

마. 억제 활성균주의 동정 결과

선별된 균주들의 동정은 Bergey's manual의하여 실시하였고, 선별된 균주들은 현미경으로 관찰한 후, Gram 염색으로 확인하였다. 당발효 실험은 단일집락을 취하여 MRS broth에서 계대배양한 후, 배양한 균체를 멸균증류수로 2회 세척 후, API 50 CHL kit(API, France)를 이용하여 공급사의 실험방법에 따라 수행하였고, 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 당의 이용성을 확인하였다.

Table 1-12. Sources of strains of *Lactobacillus spp.* used in this investigation

Species	Strains	Source
<i>Lactobacillus salivarius</i>	H072	중앙대학교 부속농장
<i>Lactobacillus plantarum</i>	H081	"
<i>Lactobacillus plantarum</i>	H182	"
<i>Lactobacillus plantarum</i>	H074	"

Table 1-13. Identification of *lactobacilli*

	H081	H182	H072	H074
Morphology				
Shape	rod	rod	rod	rod
Gram	+	+	+	+
Physiological Characteristic				
Ammonia From arginine	-	+	+	+
Gas From glucose	-	+	+	+
Growth at 15°C	+	-	+	+
Growth at 45°C	+	+	+	+
Fermentation				
Raffinose	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	-
Gluconate	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-
Salicin	+	+	+	-

API kit

H072 : *Lb. platarum* (99.9%)

H081 : *Lb. platarum* (99.8%)

H182 : *Lb. platarum* (99.8%)

H074 : *Lb. Salivarius*

2. 항생성 미생물의 효과 규명 및 장내 미생물에 의한 천연 물질의 효율 검증

가. 배지성분의 따른 bacteriocin의 생성에 미치는 영향
 1차년도 연구결과 항균력이 우수하다고 판단되는 송아지분변 분리균주인 *Lactobacillus plantarum* CU13 와 장내분리균주인 *Lactobacillus rhamnosus* CU02를 시험균주로 사용하였다. 유산균 증균배지인 MRS broth의 주요 구성성분의 함량에 따른 bacteriocin의 생성량과 최적의 조건을 찾기 위해 다음과 같이 배지성분의 함량을 달리 하여 병원성균의 억제정도와 Bacteriocin의 AU(activity unit per ml), 균의 성장 정도를 구하였다.

병원성 균은 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313이며, 균의 성장 정도는 OD(580nm)값으로 나타냈으며, AU의 측정을 위한 실험 방법은 diffusion zone의 방법으로 수행하고 sample은 분리균주를 37°C에 20시간 배양한 후 1500rpm으로 원심분리하여 그 상층액을 취하였다.

Table 2-1. Effect of nutrient component on bacteriocin production by *Lactobacillus spp*

성분	%	spec.(580nm)		Inhibitory zone(+mm)	
		13 ¹⁾	1-2 ²⁾	13 ¹⁾ (AU)	1-2 ²⁾ (AU)
MRS+tween 80	0	0.970	0.298	-	9.5(1)
	0.5	1.435	2.154	4(1)	3(6400)
	1	1.539	2.500	3(1)	4(6400)
MRS+peptone	0	1.310	1.841	3(1)	2(3200)
	2	-	2.221	-	2(3200)
	3	-	2.301	-	2(6400)
MRS+yeast	0	0.644	1.476	3(1)	2(6400)
	1	-	2.500	-	5(6400)
	2	-	2.500	-	4(6400)
	3	-	2.500	-	4(6400)
MRS+glucose	0	1.303	0.303	-	5(1)
	1	1.325		3(1)	
	3	1.503	2.096	5(1)	3(3200)
MRS+beef	0	1.365	1.945	3(1)	2(3200)
	2	1.627	2.096	3(1)	3.5(6400)
	3	1.657	2.301	6(1)	3(4400)
MRS+NaCl	1	1.583	2.475	4(1)	2(1600)
	2	1.552	1.662	5(1)	13(1)
	3	1.339	1.132	3(1)	11(1)
Normal		1.410	2.221	3(1)	2(3200)

1) Lactobacillus plantarum CU13 2) Lactobacillus rhamnosus CU02
-MRS+tween 80(0.0-1.0%), MRS+peptone(0.0-3.0%), MRS+yeast(0.0-3.0%),
MRS+glucose(0.0-3.0%), MRS+beef(0.0-3.0%), MRS+NaCl(1.0-3.0%)
성분의 함량을 조절하여 측정해본 결과 13번 송아지 분리균주의 경우 tween 80을 0.5%로, glucose를 3%로, beef extract를 3%로, NaCl을 각각 1, 2%로 조절했을 때에 normal한 MRS보다 높은 성장 정도와 과 AU를 나타내었으며, tween 80을 0%로, peptone을 2, 3%로, yeast extract를 각각 1, 2, 3%로, glucose를 0%로 조절했을 때에 normal한 MRS보다 낮은 성장 정도와 AU를 나타내었고, tween 80을 1%로, peptone을 0%로, yeast extract를 0%로, glucose를 1%로, beef extract를 각각 0, 2%로, NaCl을 3%로 조절하였을 때에 normal한 MRS와 비슷한 성장 정도와 AU를 나타내었다.

1-2의 경우 normal한 MRS배지에서 보다 tween 80을 각각 0.5, 1%로, yeast extract를 각각 0, 1, 2, 3%로, beef extract를 각각 2, 3%로 조절하였을 때에 성장 정도와 AU가 더 큰 것으로 나타났으며, peptone을 각각 0, 2, 3%로, glucose를 3%로, beef extract를 0%로 조절하였을 때에 normal한 MRS 배지와 비슷한 성장 정도와 억제력을 나타내었고, tween 80을 0%로, glucose를 0%로, beef extract를 0%로, NaCl을 각각 1, 2, 3%로 조절했을 때에 normal한 MRS보다 낮은 성장 정도와 AU를 나타내었다. 그 밖의 MRS에 포함된 광물질들은 분리균주의 성장이나 AU에 영향을 끼치지 않았다. 성장 정도와 AU가 높게 측정된 성분만을 교합하여 배지를 제조해서 배양을 해 보았지만 더 이상의 높은 성장률과 AU는 나타나지 않았다.

나. 균체와 세포벽, 세포 내용물의 항균력

균체 성분중의 억제력을 나타내는 부분을 찾기 위해 분리균주를 MRS배지를 이용하여 37°C에 20시간 배양한 다음 균체를 분리하여 동결건조 후 french pressure를 이용해 cell을 세포벽과 세포 내용물로 분리하였다. 실험은 균체와 세포벽, 세포 내용물로 수행했으며, diffusion zone의 방법을 이용하였다. Table 2는 균체와 세포벽에서 나타나는 항균력 실험의 결과이다.

Table 2-2. 분리균주의 균체와 세포벽의 희석배율에 따른 항균력

분리균주 희석배율	균체		세포벽	
	<i>Lb.planntarum</i> CU13	<i>Lb.rhamnosus</i> CU02	<i>Lb.planntarum</i> CU13	<i>Lb.rhamnosus</i> CU02
10배	+(8.5mm)	+(5mm)	+(12mm)	+(7mm)
400배	+(3.5mm)	+(2mm)	+(3mm)	-
800배	+(3mm)	+(2mm)	+(2mm)	-
1600배	+(2mm)	+(2mm)	-	-

* 세포 내용물에서는 clean zone이 나타나지 않았다.

실험결과 13분 송아지 분리균주의 경우 균체에서 1600의 AU를, 세포벽에서 800의 AU를 나타내었으며 세포 내용물에서는 clean zone이 나타나지 않았다.

1-2의 경우 균체에서는 400의 AU를 나타내었으나 10배 희석의 경우 7mm의 clean zone이 나타나고 400배 희석의 경우 clean zone이 나타나지 않았으므로 AU는 10과 400 사이에 존재할 것으로 추측된다.

다. 여러 가지 indicator organisms의 억제 실험

분리균주의 억제 범위를 알아보기 위하여 여러 가지 indicator organisms을 이용하여 clean zone test를 수행하였다.

분리균주를 37°C에 20시간 배양한 후 1500rpm에서 원심분리하여 균체를 취하고, 동결건조 한 후 10배로 희석하여(w/v) clean zone을 측정하였다. indicator organisms은 총 13가지를 사용하였으며, 유산균종은 MRS에서 37°C에 20시간 배양한 후에 사용하였고, 그 밖의 나머지 organisms은 nutrient배지에서 37°C에 20시간 배양한 후에 사용하였다.

실험 결과 모든 13번 송아지 분리균주 *Lactobacillus plantarum* CU13는 *Streptococcus agalactia* CU 31에서 가장 큰 clean zone을 나타내었으며, 1-2번 *Lactobacillus rhamnosus* CU02는 *Straphylococcus aureus* CU 1161에서 가장 큰 clean zone을 나타내었다.

Table 2-3. 여러 가지 indicator organism에 대한 분리균주의 항균력

indicator organism	분리균주	<i>Lactobacillus plantarum</i> CU13	<i>Lb.rhamnosus</i> CU02
<i>Escherichea coli</i> O157:H7 ATCC 35150		+(6mm)	+(6mm)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		+(7mm)	+(6mm)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		+(5mm)	+(7mm)
<i>Streptococcus uberis</i> CU 2140		+(6mm)	+(7mm)
<i>Streptococcus agalactiea</i> CU 31		+(8mm)	+(9mm)
<i>Streptococcus dysagalactiea</i> CU 2147		+(6mm)	+(6mm)
<i>Straphylococcus aureus</i> CU 1161		+(7mm)	+(10mm)
<i>Straphylococcus aureus</i> CU 1162		+(7mm)	+(6mm)
<i>Sporolactobaciillus inulinus</i> ATCC13538		+(3mm)	+(5mm)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU01		+(2mm)	+(2mm)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356		+(2mm)	+(2mm)
<i>Lactobacillus helveticus</i> CU 631		+(2mm)	+(2mm)
<i>Lb. rhmnosus</i> GG ATCC 53103		+(2mm)	+(2mm)

라. 분리균주의 배양액과 세포추출액의 단백질전기영동의 특성

분리균주들은 37℃에 20시간동안 배양하여 1500rpm에 원심분리하여 상층액을 취하여 배양액을 2, 3의 sample로 취하였으며, 세포 추출물은 원심분리로 분리해낸 균체를 동결건조한 분말을 증류수로 20배 희석하여 french pressure를 이용해 상층액을 추출하여 3, 5의 sample로 취하였다.

sample들은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 수직형 젤(85×60×75mm)에서 PAGE를 실시하였다. 분리용 젤의 조성은 18%(w/v)acrylamide, 0.1%(w/v)SDS, 0.375M Tris-HCl pH8.8, 0.05%(v/v) TEMED 그리고 0.05% ammonium persulfate를 함유하였다.

Stacking gel은 5%(w/v) acrylamide, 0.1%(w/v)SDS, 0.123M Tris-HCl pH6.8, 0.125%(v/v) TEMED, 0.075% ammonium persfate를 함유하였다.

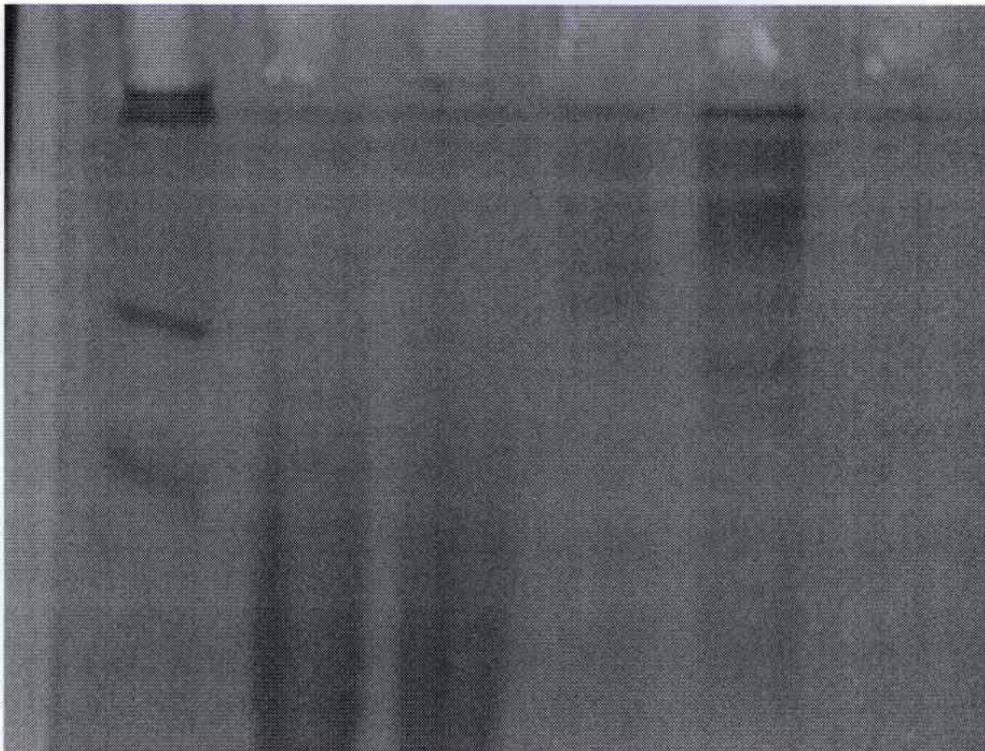


Fig 2-1. Characteristics of cell protein of Lactobacillus spp. in SDS PAGE

1. MW standard
2. *Lb.rhamnosus* CU12(배양액)
3. *Lb, plantarum* CU13(배양액)
4. *Lb.rhamnosus* CU02(세포추출물)
5. *Lb, plantarum* CU13(세포추출물)

마. 반추위 박테리아에 대한 박테리오신의 안정성 검사

1) Diffusion zone test

가) 재료 및 방법

1-1. 실험설계

반추위 내에서 분리. 동정된 반추 미생물 7균주와 병원성균 4균주를 Diffusion zone test 실시 24h 전에 계대배양 시킨 후, 이 균주를 이용하여 병원성균 4균주에 대한 각각의 7균주의 반추미생물의 항생능력을 Utrasensitive diffusion assay (Robert et al., 1991)를 통하여 측정하였다.

1-2. 사용 균주의 준비

a. 반추미생물의 준비 : 중앙대학교 동물자원과학과 반추영양/미생물 연구실에서 보유중인 7종의 반추미생물 (*Provetella ruminicola* ATCC23, *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17, *Selenomonas ruminantium* 2386, *Streptococcus bovis* JB1와 *Butryvibrio fibrisolvens* 2221)을 1회 계대배양하였다.

b. 병원성균의 준비 : *E. coli* O-157, *Salmonella tythinurium*, *Listeria monocytogenes*과 *Staphylococcus aureus* 4종을 사용하였다.

1-3. 배양

a. 반추미생물의 배양 : 반추미생물은 Rumen fluid Glucose Cellobiose Agar medium(table 1-1)을 선택배지로써 멸균된 25ml roll tube에 121℃ 15분 멸균된 RGCA medium 10ml을 넣은 후, 각각 반추미생물을 30 μ l를 접종한다. 접종 후에 CO₂ gas를 분주하여 혐기상태를 조성한 후, cap을 닫아 39℃의 incubator에서 24시간 배양하였다.

b. 병원성균의 배양 : 4종의 병원성균은 *Salmonella tythimurium*와 *Staphylococcus aureus*는 BHI medium(table 1-2)을 선택배지로 하고, *Listeria monocytogenes*와 *E. coli* O-157은 LB medium(table 1-3)을 선택배지로 이용하여, 멸균된 20ml roll tube에 121℃에서 15분 멸균된 medium을 10ml 넣은 후, 각각 병원성균을 150 μ l를 접종시켜, 37℃의 incubator에서 18시간 동안 배양하였다.

1-4. Diffusion zone

Diffusion zone test는(Figure 1-1) plate 내 RGCA medium을 이용한 base medium과, 병원성균을 접종시킨 MRS medium(table 1.4)을 이용한 top medium의 두 층으로 조성된 medium을 이용하여 실시하였다. Base medium이 굳으면 top medium을 base medium 위에 깔아준 후, 두 층의 배지가 굳으면 gel punch를 이용하여 plate에 4개의 well을 뚫어주고, 뚫린 부분의 배지를 걷어 낸 후에 계대배양 시킨 반추미생물 30 μ l를 well에 접종해줬다. 접종 후 plate내 CO₂ gas를 분주하여 혐기상태를 조성해준 뒤, CO₂ chamber안에 넣어 준다. 모든 처리가 끝난 CO₂ chamber를 39℃의 incubator 안에서 24h 배양하였다.

1-5. 분석

Diffusion zone test 실시 후 plate의 반추미생물을 접종한 well 주변의 clean zone 형성의 유·무와 범위를 통하여 향생물질의 생성 정도를 확인하였다.

2) 병원성균에 감염된 쥐를 통한 반추미생물의 향생능력의 규명

가) 재료 및 방법

2-1. 실험설계

Diffusion zone test를 통하여 선발된 억제 능력이 강한 반추미생물 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* 두 균주를 혼합 배양한 mixture와 control 처리구에 대한 동물실험은 6주령의 ICR mouse male (28±1g, 7주령)을 이용하였으며, 각 처리구당 5마리씩 4처리구(총 20마리)로 하여 한 케이지당 5마리씩 사육하였다. (table 1-5)

2-2. 사육조건

환경조건은 조명은 하루에 12시간, 22~23°C의 온도와 40~50%의 습도를 유지하였다. 사료급여는 익스트루전 형태의 펠렛사료(Agribrand Purina Korea, Korea)와 음수를 자유급여 하였으며, 깔집은 주 2회 교체하였다. 병원성균에 대한 저항력을 test하기 위해 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105를 강제급여 시켰으며, 동시에 *F. succinogenes*, *R. albus*와 Rumen bacteria mixture를 각각 강제급여 시켜 5일차까지의 체중 변화를 대조구와 병원성균 처리구와의 차이를 비교 측정하였다.

2-3. 사용균주의 준비

a. 반추미생물은 *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6와 Rumen bacteria mixture를 사용하였다.

b. 쥐에게 감염시킨 병원성균으로는 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105를 사용하였다.

2-4. 배양

a. 반추미생물의 배양 : 반추미생물은 RGCA(Rumen fluid Glucose Cellobiose Agar) medium(table 1-1)을 선택배지로써 멸균된 25ml roll tube에 121°C 15분 멸균된 RGCA medium 10ml을 넣은 후, 각각 반추미생물을 300µm 접종한다. 접종한 후에 CO₂ gas를 분주하여 혐기 상태를 조성한 후, cap을 닫아 39°C의 incubator에서 24시간 배양하였다.

b. 병원성균의 배양 : LB medium(table 1-3)을 선택배지로 이용하여, 멸균된 25ml roll tube에 121°C 15분 멸균된 medium을 10ml 넣은 후, 각각 병원성균을 150µm 접종한 후, 37°C의 incubator에서 18시간 동안 배양하였다.

2-5. 감염

각 처리구 별 5반복으로 총 20마리의 쥐에게 병원성균 E. coli O-157을 구강접종 하였다.

2-6. 접종

24시간 배양시킨 반추미생물을 2500rpm×15min 원심분리 시킨 후, 상층액을 버린 다음 증류수를 이용하여 3번 세척 후 반추미생물을 구강접종 하였다.

2-7. 분석

실험 실시일 후로 5일 동안 4처리구 5반복에 대한 쥐의 체중의 변화를 측정하였다.

2-8. 통계처리

본 실험의 모든 통계처리는 SAS (2000)의 program package의 GLM (general Linear Model) 방법에 의해 표준오차를 구하여 분산분석 후 Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1981)을 통하여 $P < 0.05$ 에서 처리간 평균의 유의차를 검정하였다.

Table 2-4. Rumen fluid glucose cellobiose agar medium

Component	Amount
Mineral solution I and II ^{a)}	15ml
Reazurin, 0.1% solution	0.1ml
Distilled water	50ml
Rumen fluid ^{b)}	40ml
Glucose	0.5ml
Cellobiose	0.5ml
Cystein-HCl·H ₂ O	0.5ml
Na ₂ CO ₃ , 8% solution	5ml

a) Mineral solution I. K₂HPO₄ : 0.60mg
 Distilled water: 100.00μl
 II. NaCl: 1.2mg
 (NH₄)₂SO₄: 1.2mg
 KH₂PO₄: 0.60mg
 CaCl₂: 0.12mg
 MgSO₄·7H₂O: 0.23mg
 Distilled water: 100.00 μl

b)Rumen fluid for culture media : Rumen fluid is obtained by filtering rumen contents, obtained from cattle on hay-concentrate ration, through two layers of gauze to remove the large particles and is stored under carbon dioxide in refrigerator -20°C. It is melted and centrifuged at 25,000rpm for 10min. before media are prepared.

Table 2-5. Brain Heart Infusion medium

Component	Amount
Calf Brain, Infusion form 200g	7.7g
Beef Heart, Infusion form 250g	9.8g
Proteose peptone	10g
Dextrose	2.0g
NaCl	5.0g
Na ₂ PO ₄	2.5g

Table 2-6. LB medium

Component	Amount
Trypton	10g
Yeast Extract	5g
NaCl	10g

Table 2-7. MRS medium

Component	Amount
Proteose peptone	10g
Beef Extract	10g
Yeast Extract	5g
Dextrose(d-glucose)	20g
Tween 80	1g
Ammonium citrate	2g
Sodium acetate	5g
Magnesium sulfate	0.1g
Manganese sulfate	0.05g
Dispotassium phosphate	2g
Agar	0.7g

Table 2-8. Experimental design of mouse trial

Group	Treatment
Control	Extrusion diet
Fibrobacter succinogenes	Extrusion diet with <i>E. coli</i> O157
Ruminococcus albus	Extrusion diet with <i>E. coli</i> O157
Rumen bacteria mixture	Extrusion diet with <i>E. coli</i> O157

나) 결과 및 고찰

(1) Diffusion zone test.

반추미생물의 억제활성 실험에서 4종의 병원성균(*E. coli* O-157, *Salmonella tythinurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*)에 대한 7종의 rumen bacteria(*Prevotella ruminicola* ATCC23, *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17, *Selenomonas ruminantium* 2386, *Streptococcus bovis* JB1 and *Butyrivibrio fibrisolvens* 2221)의 항생능력 측정하는 실험으로 계속적인 반복 실험을 통하여 rumen bacteria의 접종 시 clean zone 형성 균주를 찾아내는 실험을 실시하였다. 그 결과 7종의 rumen bacteria 중 *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17와 *Streptococcus bovis* JB1을 접종 했을 때 clean zone이 형성되었으며 그 외 3종의 반추미생물에서는 clean zone이 나타나지 않았다(Figure 1-3). Clean zone을 형성한 4종의 rumen bacteria 중 *Fibrobacter succinogenes* BL2와 *Ruminococcus albus* J6에서 나머지 다른 2종의 *Ruminococcus flavefaciens* No17와 *Streptococcus bovis* JB1 보다 clean zone의 형성이 뚜렷하게 나타났다(Figure 1-2). 이 4종의 rumen bacteria는 4종의 병원성균 모두에서 clean zone를 형성하였으나, *Listeria monocytogenes*와 *E. coli* O157에서 clean zone이 더 크게 나타났다.

Table 2-9. Clean zone 생성의 유.무

Species	Clean zone
<i>Provatella ruminocola</i> ATCC23	×
<i>Fibrobacter succinogenes</i> BL2	○
<i>Ruminococcus albus</i> J6	○
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> No17	○
<i>Selenomonas ruminantium</i> 2386	×
<i>Streptococcus bovis</i> JB1	○
<i>Butyribuivrio fibrisolvens</i> 2221	×

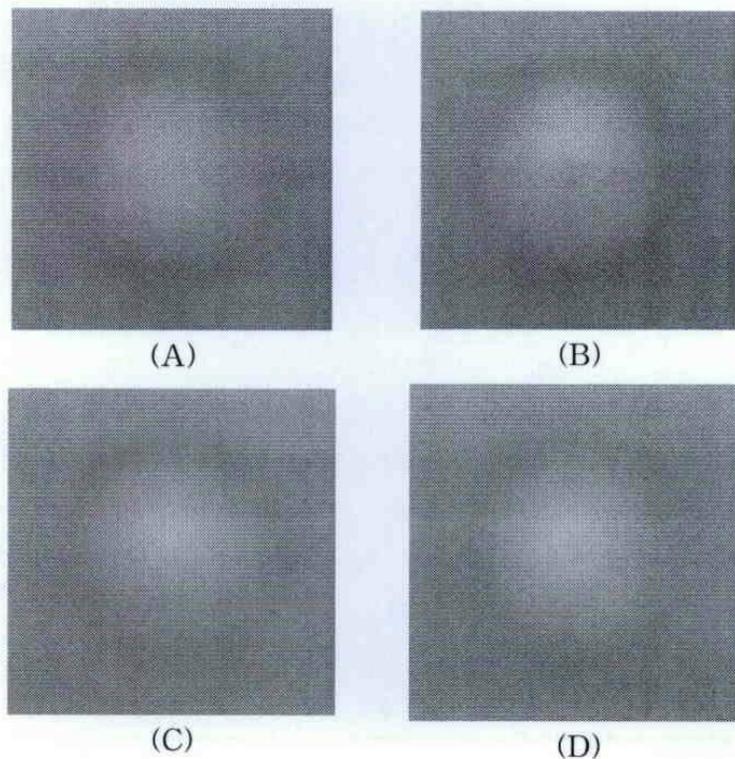


Figure 2-2. Diffusion zone formation of (A) *Fibrobacter succinogenes* BL2, (B) *Ruminococcus albus* J6, (C) *Ruminococcus flavefaciens* No17, (D) *Streptococcus bovis* JB1

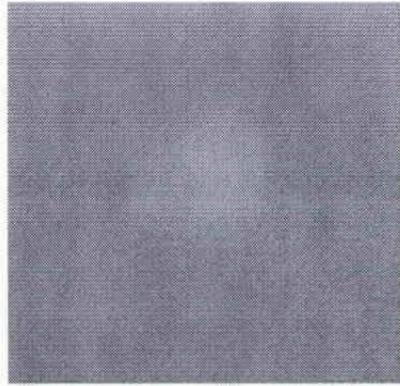


Figure 2-3. Diffusion zone non-formation of Rumen bacteria

(2) 병원성균에 감염된 쥐를 통한 반추미생물의 항생능력 규명

앞선 Diffusion zone test를 통하여 항생능력을 갖고 있는 반추미생물 4종 (*Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6, *Ruminococcus flavefaciens* No17 and *Streptococcus bovis* JB1) 중에 높은 활성을 갖고 있는 2종의 반추미생물(*Fibrobacter succinogenes* BL2 and *Ruminococcus albus* J6), 이 2종의 반추미생물을 혼합 배양한 균주와 대조구에서 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105을 감염시킨 ICR mouse male의 모든 처리구에서 처리 후 3일 까지 체중이 줄어들었으나, 5일 후에 control 처리구를 제외한 *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* J6와 rumen bacteria mixture의 3개의 처리구에서는 초기 체중보다 체중이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. Control 처리구는 초기 체중의 7.7% 정도의 체중 감소가 나타났고 나머지 3 처리구에서는 6% 이상의 체중 증가가 나타났다. 그 중 rumen bacteria mixture에서 통계적으로 유의하게 ($P < 0.05$) 높은 체중의 증가를 보였다. 또한 *Ruminococcus albus* J6 처리구에서도 높은 경향을 나타내었다.

Table 2-10. 처리균주에 따른 쥐의 체중변화

	Control	<i>F. succinogenes</i> BL2	<i>R. albus</i> J6	Rumen bacte mixture
0day	28.5 ^a	28.4 ^a	28.6 ^a	28.7 ^a
3day	26.28 ^a	26.98 ^a	26.34 ^a	26.9 ^a
5day	21.88 ^a	30.28 ^{bc}	30.74 ^{bc}	30.52 ^{bc}

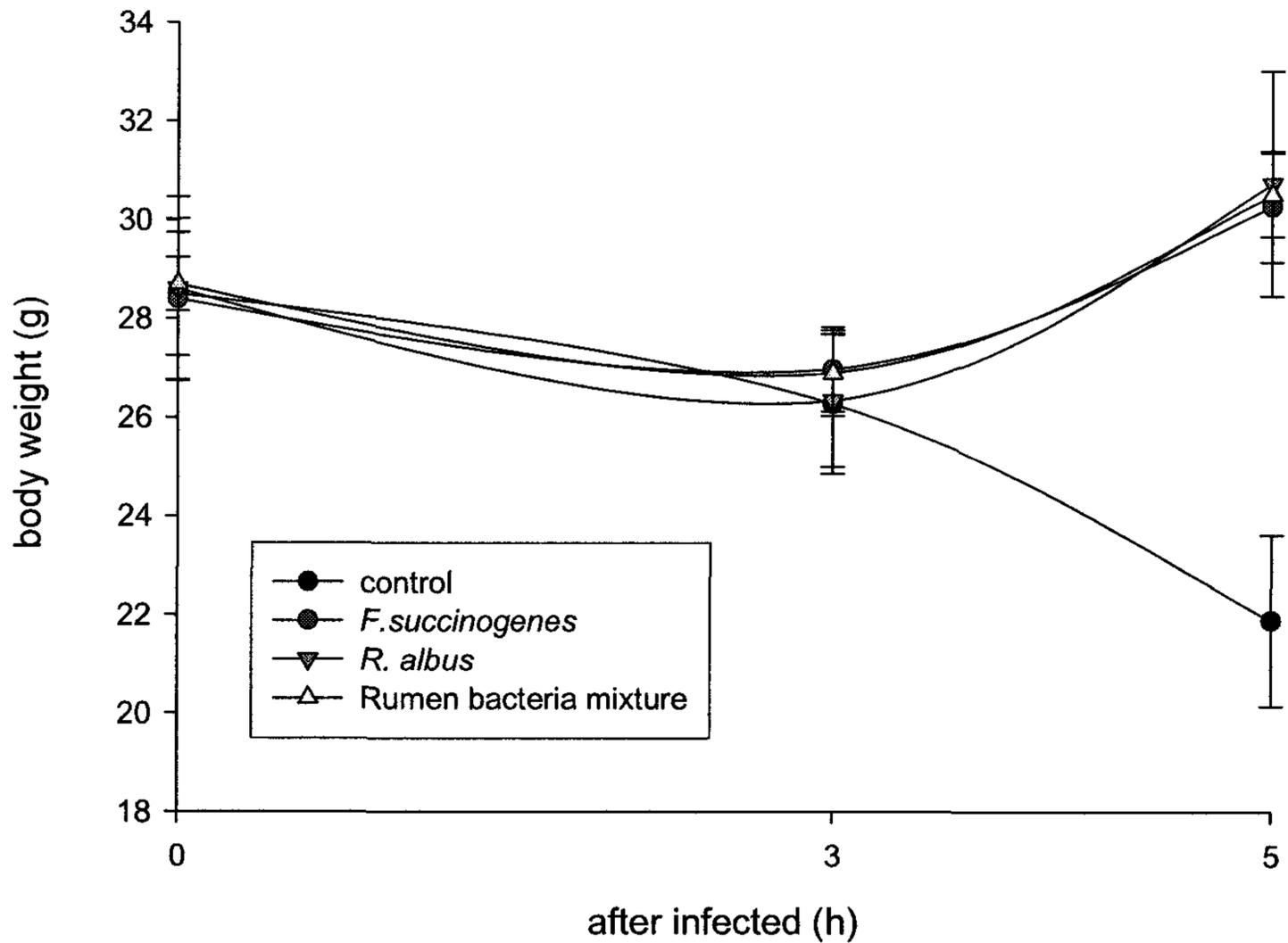


Figure 2-4. Escherichia coli O157:H7 ATCC 35105에 감염된 쥐에 있어서 처리 군주에 따른 쥐의 체중변화

3. 병원성 미생물에 대한 항생성 미생물의 효과 및 천연 물질 이용을 통한 사료 효율 개선 방안에 대한 연구

가. 항생능력을 가진 5종의 반추미생물과 3종의 유산균 첨가에 따른 반추가축의 발효성상의 변화

1) 재료 및 방법

1-1. 실험설계

a. 반추미생물의 반추위 내 접종

캐놀라가 장착된 550kg의 홀스타인 6두에 각각의 처리구를 아침 사료 급여 한시간 후 250ml 접종 후, 시간대 별 sampling한 후 이를 40℃ 냉동고에 보관하면서

Latin squire (6×6) 방법을 이용하여 실시하였으며, 분석을 통하여 반추가축의 반추위 내 발효 성상의 변화를 측정하였다.

b. 유산균 처리구

캐놀라가 장착된 550kg의 홀스타인 4두에 각각의 처리구를 아침 사료 급여 한시간 후 250ml 접종 후, 시간대 별 sampling한 후 이를 40℃ 냉동고에 보관하면서 Latin squire (4×4) 방법을 이용하여 실시하였으며, 분석을 통하여 반추가축의 반추위 내 발효 성상의 변화를 측정하였다.

1-2. 균주의 배양

a. 반추미생물 처리구

RGCA medium(Tabel 1-1)을 선택배지로써 멸균된 tube에 121℃ 15분 멸균된 RGCA medium 250ml을 넣은 후, 각각 반추미생물을 7ml를 접종한다. 접종 후에 CO₂ gas를 분주하여 혐기상태를 조성한 후, cap을 닫아 39℃의 incubator에서 24시간 배양한다.

b. 유산균 처리구

1-3. 사료급여 체계

사료급여는 체중의 2%로 조사료:농후사료의 비율을 6:4로 오전 8:00, 오후 8:00에 하루 두번 급여하였다.

1-4. 접종

: 오전 사료급여 1시간 후 fistura를 열어 1두에 반추미생물 4균 모두 넣어주고, 다른 1두에게는 유산균 2균을 넣어주었다.

1-5. Sampling

사료의 채취는 반추미생물의 접종하기1시간 전, 접종 후 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24h에 한번씩 반추위액과 사료를 분리하여 채취하였다. 시료의 채취는 4겹의 cheese cloth를 이용하여 실시하였다.

1-6. 분석:

a. pH value : Sampling한 후 바로 측정한다.

b. NDF, ADF : Van Soest법을 이용하여 측정(1970).

c. NH₃-N : Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 따라 phenol과 alkali를 각각 1ml씩 취하여 상층액 20μl에 첨가하여 vortexing하였다. 이를 60℃ dry oven에서 5분 배양하여 발색반응을 일으켰고, 이후 증류 희석된 발색시료는 spectrophotometer를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 암모니아 질소농도를 계산하였다.

d. Lowry protein : Folin-Ciocalteu reagent를 이용하여 측정하는 방법으로, alkaline copper용액 5ml을 상층액 1ml에 첨가하여 실온에 10분 이상 방치한 후 1N Folin-Ciocalteu phenol 을 0.5ml 가하여 섞은 후 30분에서 2시간 방치한

후 spectrophotometer 560nm에 고정하여 Optical Density를 읽는다.

e. VFA : Erwin등(1961)의 방법에 따라 상층액 1ml에 metaphosphoric acid 100 μ l를 첨가하고, 3,000rpm에서 원심분리한 후 상층액을 gas chromatography에 주입하여 분석하였다.

f. Enzyme activity : 섬유소 분해활력(Avicelase, CMCCase, FPase)의 측정은 Miller(1959)의 방법에 따라, 효소액 0.2ml와 기질용액으로 1%(w/v) CMC, 1% Avicel, 2%의 FP이 현탁된 0.1M acetate buffer(pH 5.0)를 혼합하여 1ml가 되게 한 후, 55°C에서 30분간 반응시키고 100°C에서 5분간 진탕하여 반응을 중지시킨 다음 상층액 내의 환원당의 양을 DNS(dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Avicelase, CMCCase와 FPase의 1 unit는 1분 동안 1 μ m의 glucose를 생성하는 효소의 양을 나타낸다.

1-7. 통계처리

본 실험의 모든 통계처리는 SAS (2000)의 program package의 GLM (general Linear Model) 방법에 의해 표준오차를 구하여 분산분석 후 Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1981)을 통하여 P<0.05에서 처리간 평균의 유의차를 검정하였다.

2) 결과 및 고찰

(1) Rumen bacteria 첨가에 의한 pH의 변화

Injection 후 1시간까지 모든 처리구에서 pH가 급격하게 감소하고 1~2시간 사이에 다시 급격히 증가 후 pH 6.5~7.0 사이를 유지한다. *S. bovis* 처리구에서 다른 처리구에 비해 시험기간 동안 pH의 전체 평균은 6.26으로 유의하게 낮았으며 ($P < 0.05$), 다른 처리구에서는 비슷한 경향을 나타내었다(Figure 1). 낮은 경향을 나타냈다. 초기 pH 감소는 사료 급여 후 농후사료의 빠른 섭취와 첨가한 반추 미생물들의 섬유소 분해에 의한 영향이라고 사료된다(Bryant and Barkey, 1953; Huogage, 1957; Hungate, 1950)..

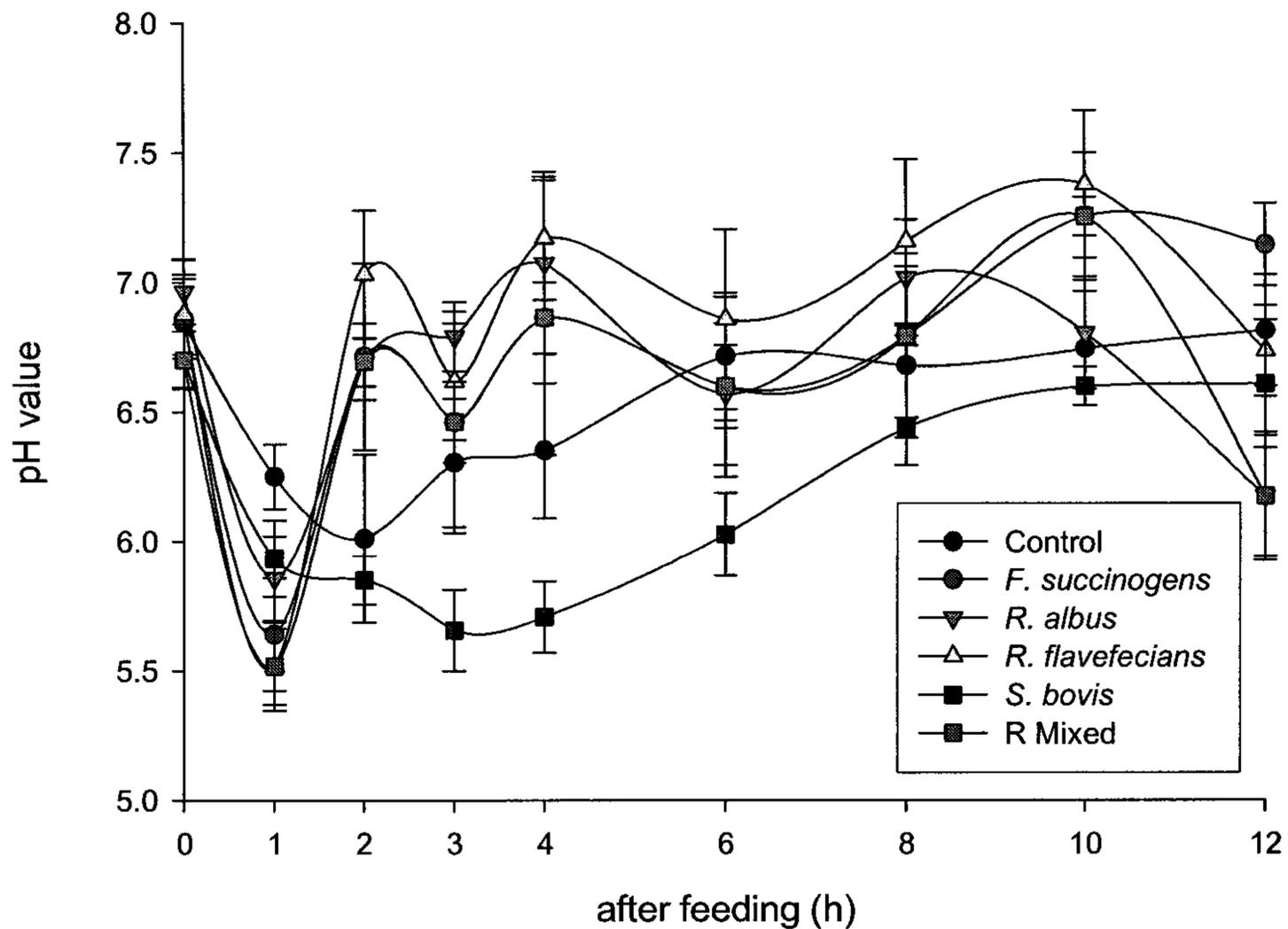


Figure 3-1. Change in pH by addition of rumen bacteria

(2) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 pH의 변화

Lactic acid bacteria의 pH value는 반추미생물 처리구의 급격한 변화와는 달리 pH value가 서서히 증가하는 안정적인 경향을 보였으며, 전체 시험기간 동안 통계적 유의성을 나타내지 않았다.

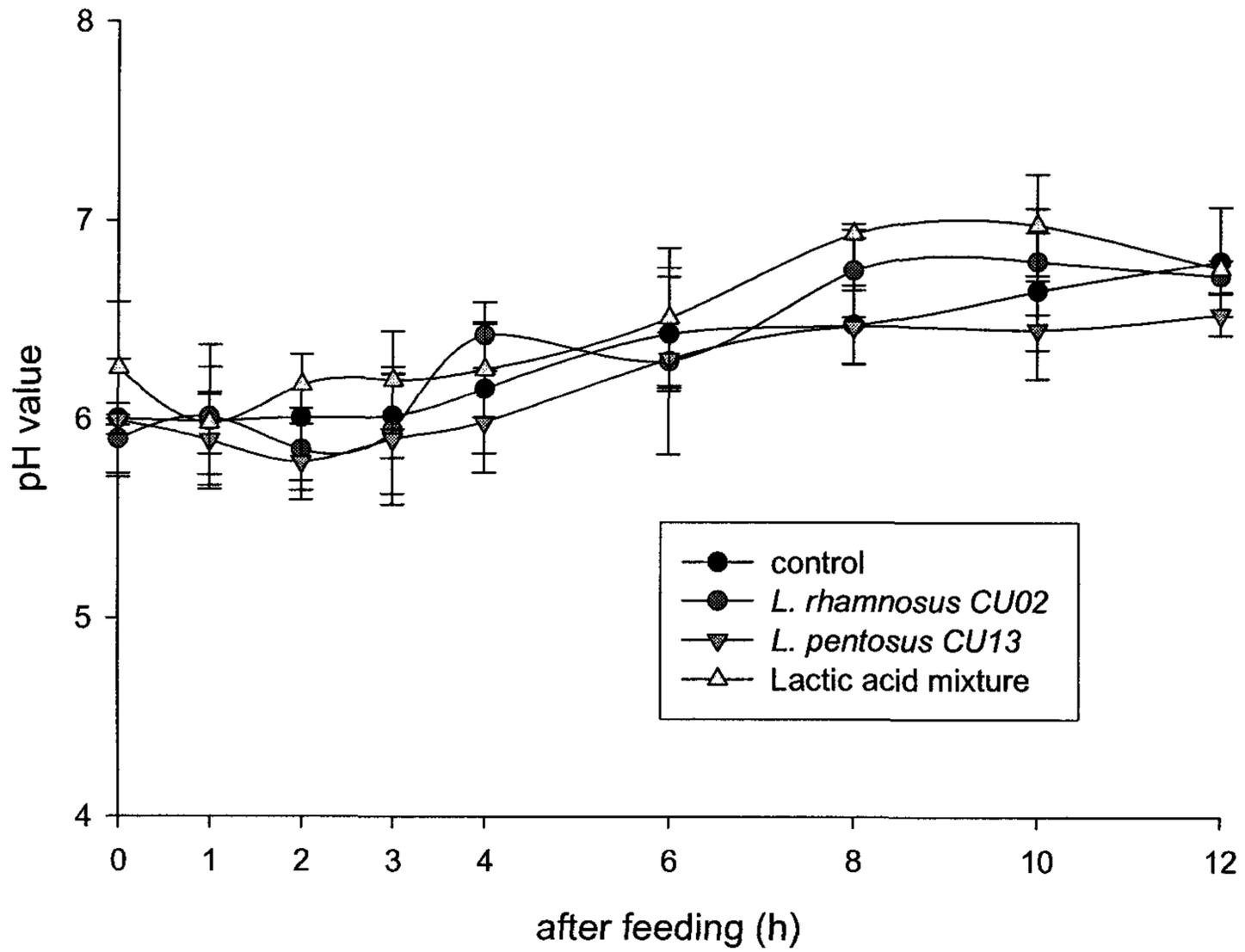


Figure 3-2. Change in pH by addition of lactic acid bacteria

(3) Rumen bacteria 첨가에 의한 NDF 소화율의 변화

NDF digestibility는 injection 후 10h 까지 증가하였으며, rumen bacteria mixture에서 가장 높은 소화율을 나타내었다. 지속적으로 NDF 소화율이 증가하던 *R. albus*는 평균 소화율 14.85로 유의성을 나타냈다($P < 0.05$). 이는 *R. albus*가 섬유소분해 박테리아로써 cellulose의 분해에 의한 것으로 사료된다.

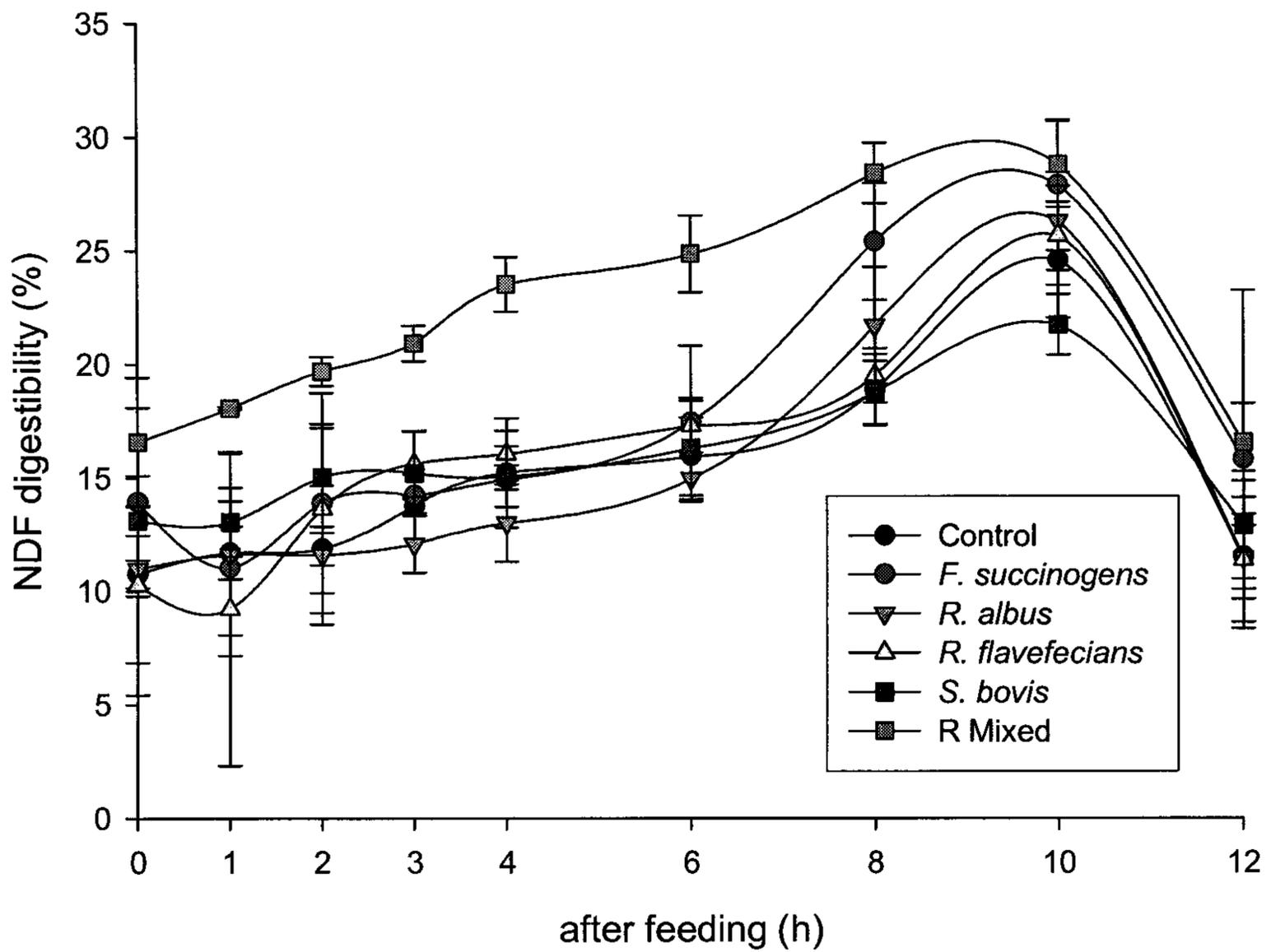


Figure 3-3. Change in NDF digestibility by addition of rumen bacteria

(4) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 NDF 소화율의 변화

Lactic acid bacteria 처리구는 소화율이 일정하게 유지되었으며, rumen bacteria 처리구와 비슷하게 10h 이후에 소화율의 감소 경향을 나타냈다. 소화율이 rumen bacteria 처리구 보다 낮게 나타난 이유는 섬유소 분해 반추미생물들에 의해 섬유소 분해 특성에 의한 조사료의 소화가 rumen bacteria 처리구에서 더 높게 나타났기 때문으로 사료된다.

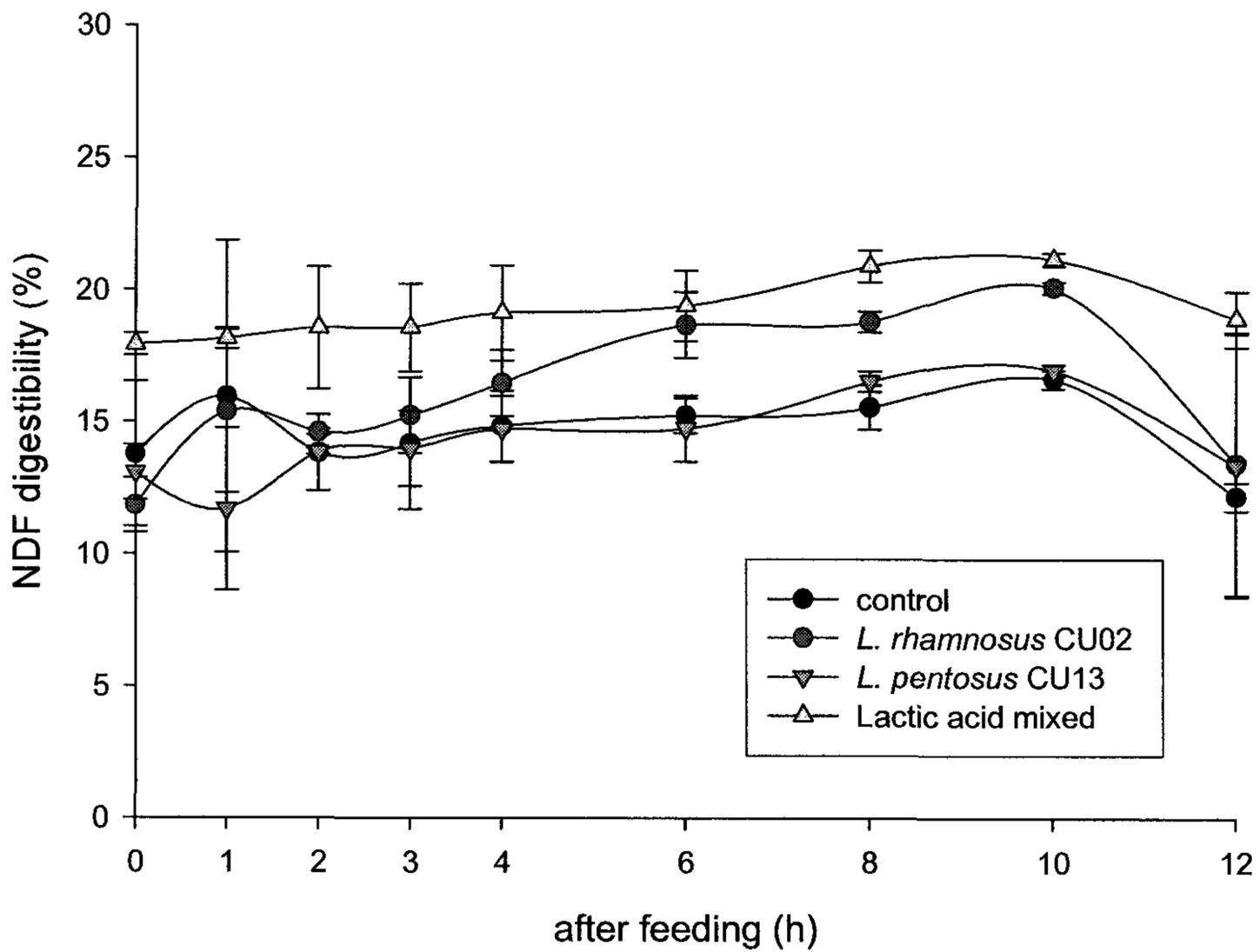


Figure 3-4. Change in NDF digestibility by addition of lactic acid bacteria

(5) Rumen bacteria 첨가에 의한 ADF 소화율의 변화

ADF digestibility는 *S. bovis*와 Rumen bacteria mixture 처리구에서 다른 처리구에 비해 약 75%의 급격한 증가를 나타냈고, 1h 후에는 나머지 처리구들과 비슷하게 증가하여 8h 이후의 소화율은 다른 처리구와 비슷하게 나타났다. NDF digestibility 역시 위의 두 처리구에서 초기에 높게 나타난 것으로 보아, 두 균주가 섬유소 분해를 빨리 일으킨다고 사료된다.

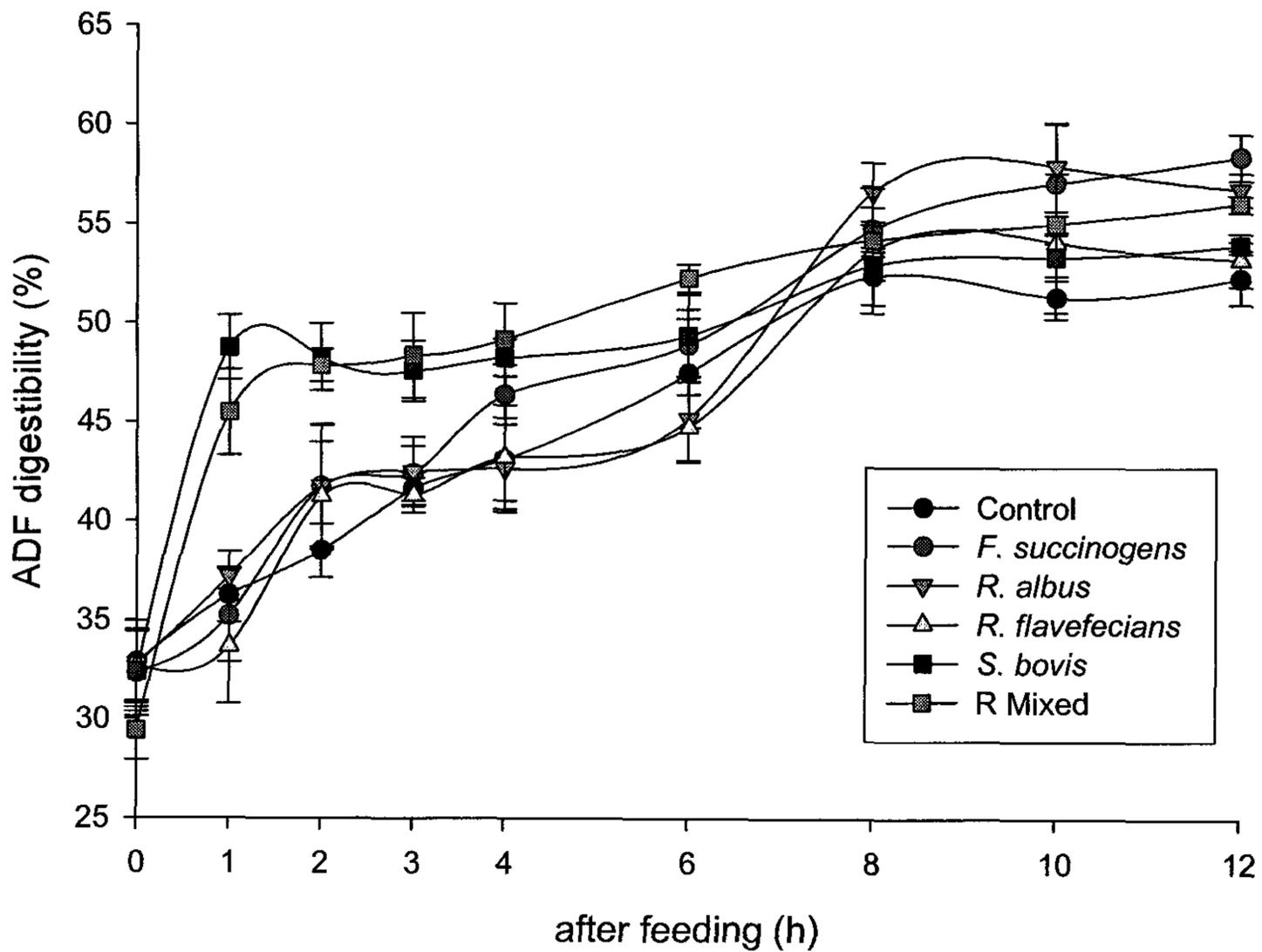


Figure 3-5. Change in ADF digestibility by addition of rumen bacteria

(6) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 ADF 소화율의 변화

Lactic acid bacteria 처리구의 ADF digestibility는 NDF digestibility와 경향이 비슷하게 나타났다. ADF digestibility 역시 급격한 증가와 감소가 나타나지 않고 비슷하게 유지되었으며, 10h 이후 소화율이 감소되는 경향을 보였다.

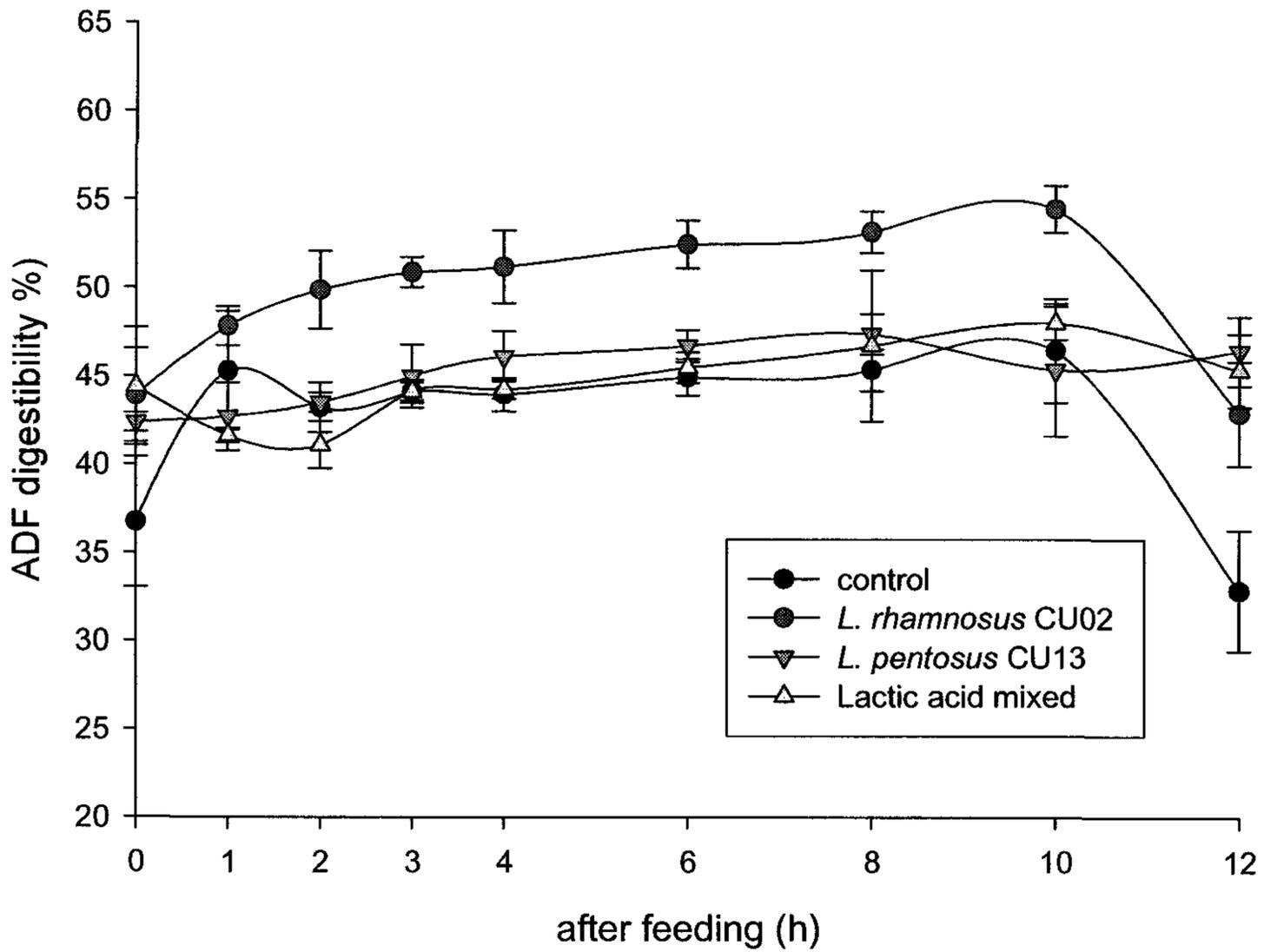


Figure 3-6. Change in ADF digestibility by addition of lactic acid bacteria

(7) Rumen bacteria 첨가에 의한 NH₃-N (mg/100ml) 합성량의 변화a

Injection 후 1h 까지 모든 처리구에서 NH₃-N의 함량이 급격하게 증가한 후 6h 까지 감소하고 6h 이후에 유지되는 경향을 나타냈다. 초기 농후사료의 빠른 발효에 의한 것으로 사료되며, *F. succinogenes* 에서 가장 높은 함량이 나타났으며, rumen bacteria mixture에서 가장 낮은 함량을 나타냈다.

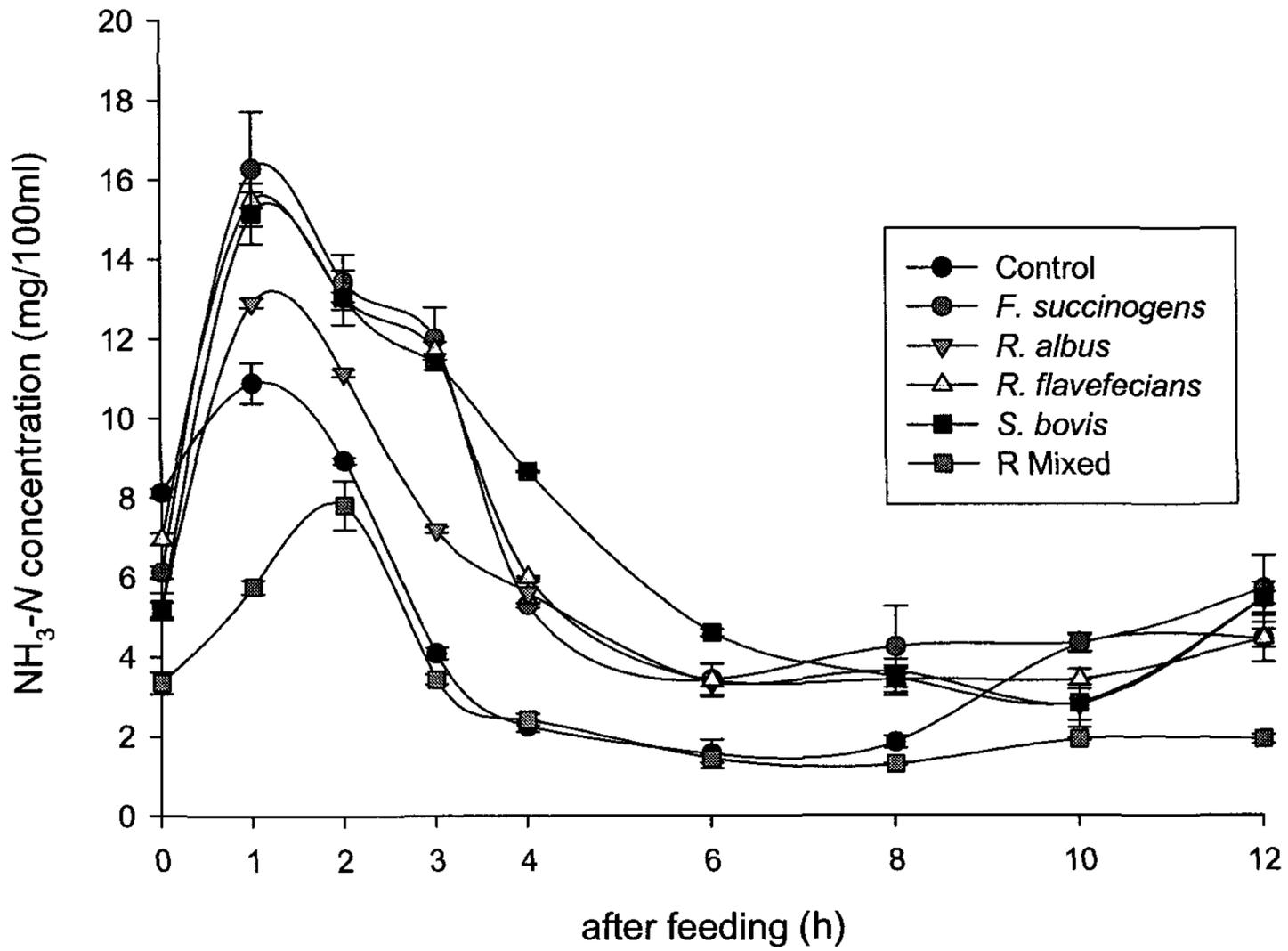


Figure 3-7. Change in NH₃-N (mg/100ml) concentration by addition of rumen bacteria

(8) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 NH₃-N (mg/100ml) 합성량의 변화
모든 처리구에서 control 처리구 보다 NH₃-N의 낮은 합성률을 나타냈으며,
rumen bacteria 처리구와 비슷한 경향을 보였다. Lactic acid bacteria에서도
lactic acid bacteria mixture에서 가장 낮은 합성량을 나타냈다.

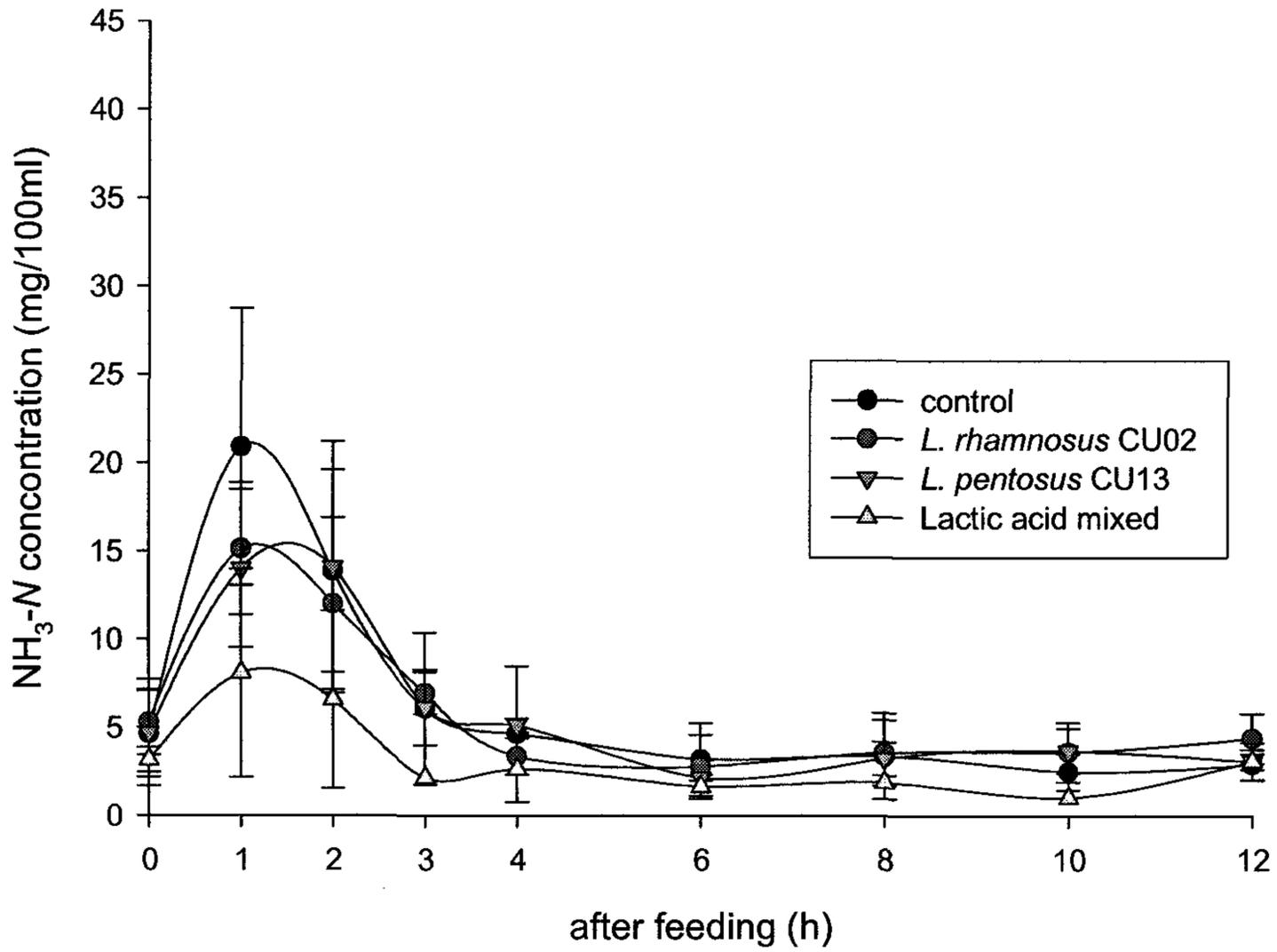


Figure 3-8. Change in NH₃-N (mg/100ml) concentration by addition of lactic acid bacteria

(9) Rumen bacteria 첨가에 의한 미생물 단백질 합성량의 변화

Rumen bacteria 처리구의 미생물단백질 합성량은 *S. bovis*와 rumen bacteria mixture 처리구에서 나머지 처리구보다 약 50% 높게 나타났다. 3h 까지 증가 경향을 나타낸 후 10h 까지 서서히 감소하다 10h 이후 다시 증가하는 경향을 보였다.

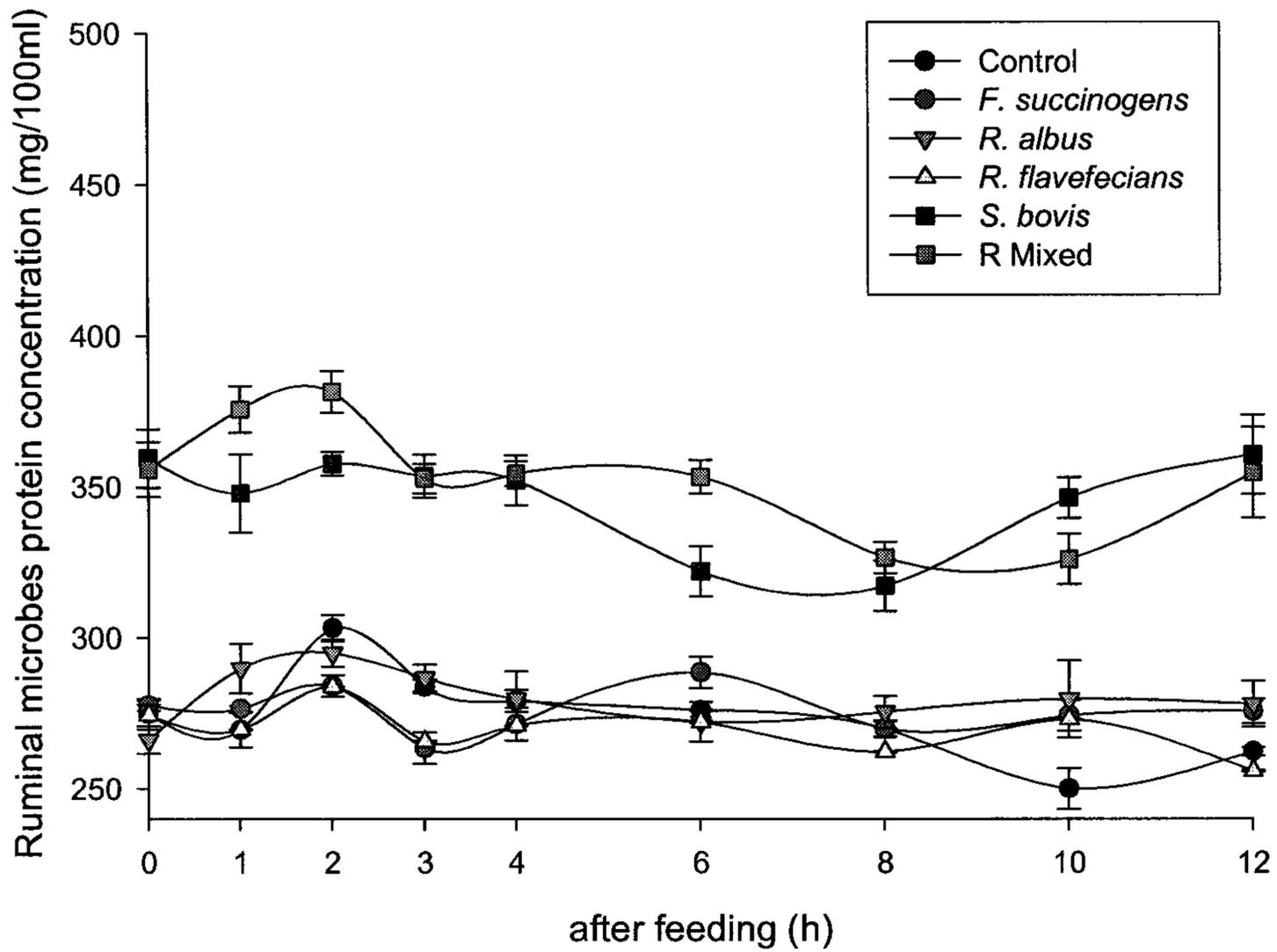


Figure 3-9. Change in Rumina microbes concentration by addition of rumen bacteria

(10) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 미생물 단백질 합성량의 변화

Lactic acid bacteria 처리구의 미생물 단백질 합성량은 4h 까지 증가와 감소가 반복되다 4h 이후 거의 같은 함량을 유지하였다. 10h 이후 control 처리구를 제외한 모든 처리구에서 증가 경향을 나타냈으며, mixture 처리구에서 가장 높은 합성량을 보인 반면, control 처리구에서 가장 낮은 합성량을 나타냈다.

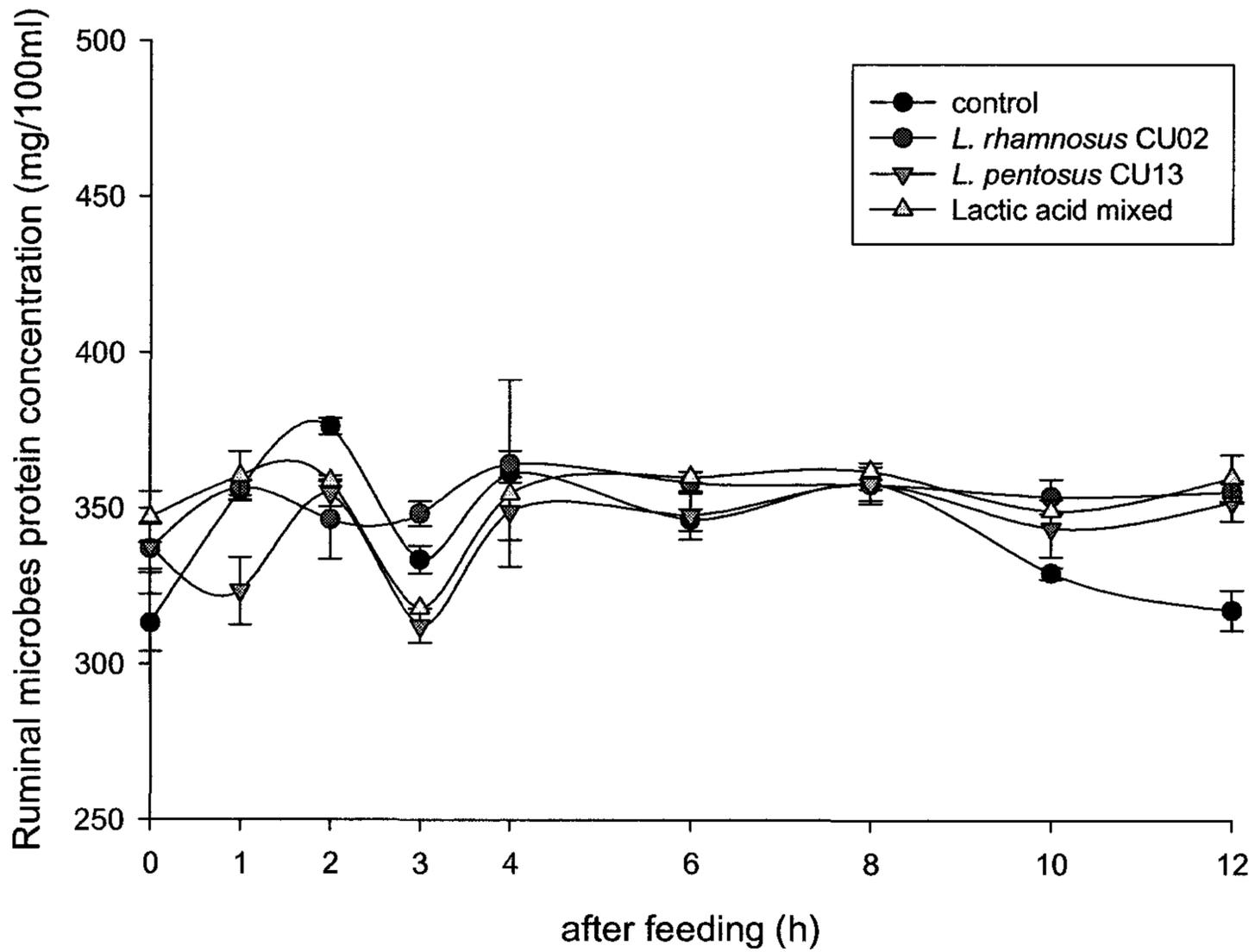


Figure 3-10. Change in Ruminal microbe concentration by addition of lactic acid bacteria

(11) Rumen bacteria 첨가에 의한 Total VFA production의 변화

*S. bovis*에서 VFA의 생성량이 유의하게 높게 나타났으며($P < 0.05$), 나머지 처리구는 비슷한 생성량을 나타냈다. 모든 처리구에서 injection 후 3h 까지 급격하게 증가한 후 감소하는 경향을 나타냈다.

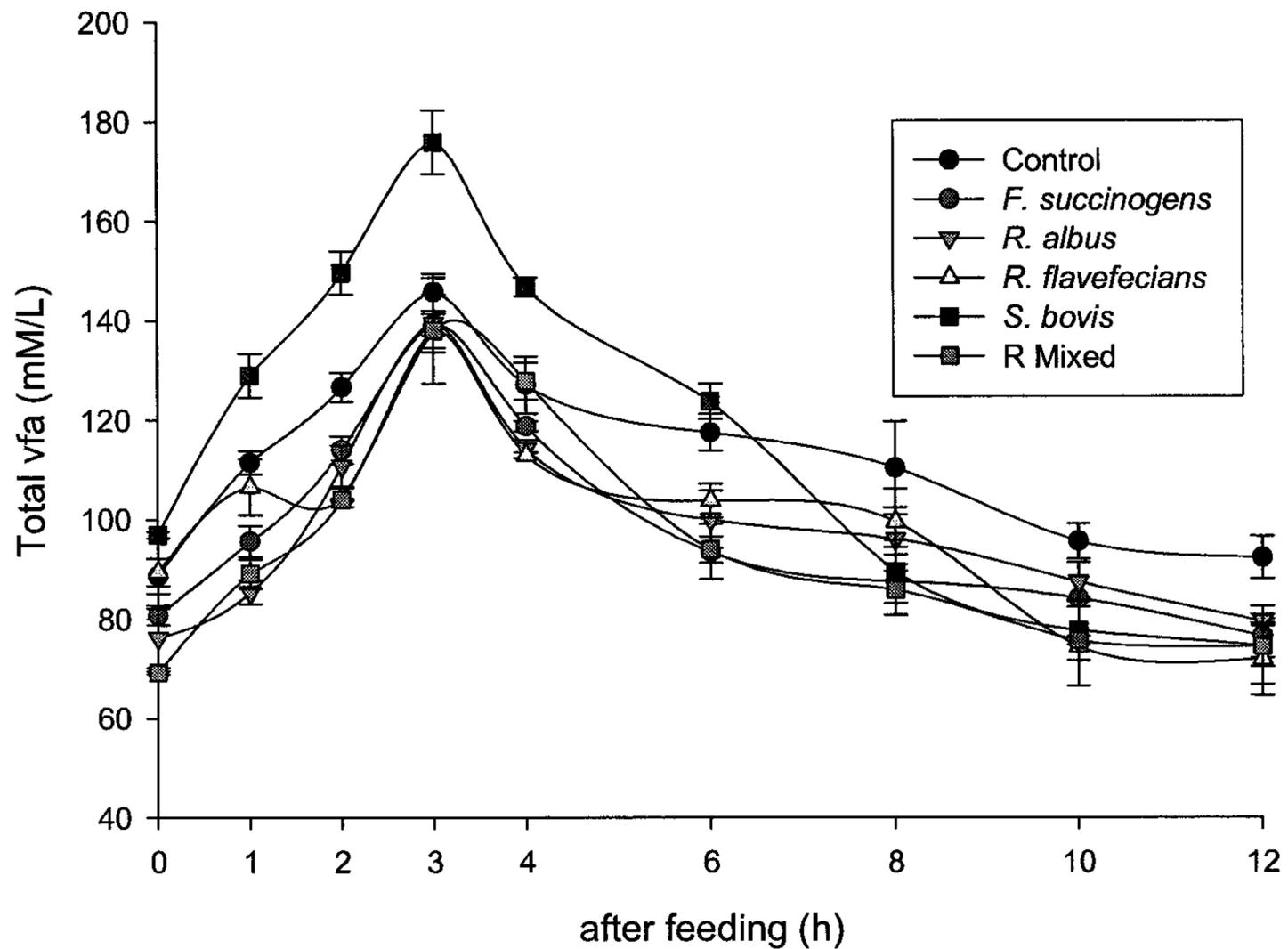


Figure 3-11. Change in Total VFA production by addition of rumen bacteria

(12) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 Total VFA production의 변화
 모든 처리구에서 4h까지 VFA의 합성량이 증가하였으며, 이후에는 감소하였다.
 Control 처리구에서 초기의 생성이 가장 빠르게 나타났으며, 총 생성량 역시 가장 높게 나타났다.

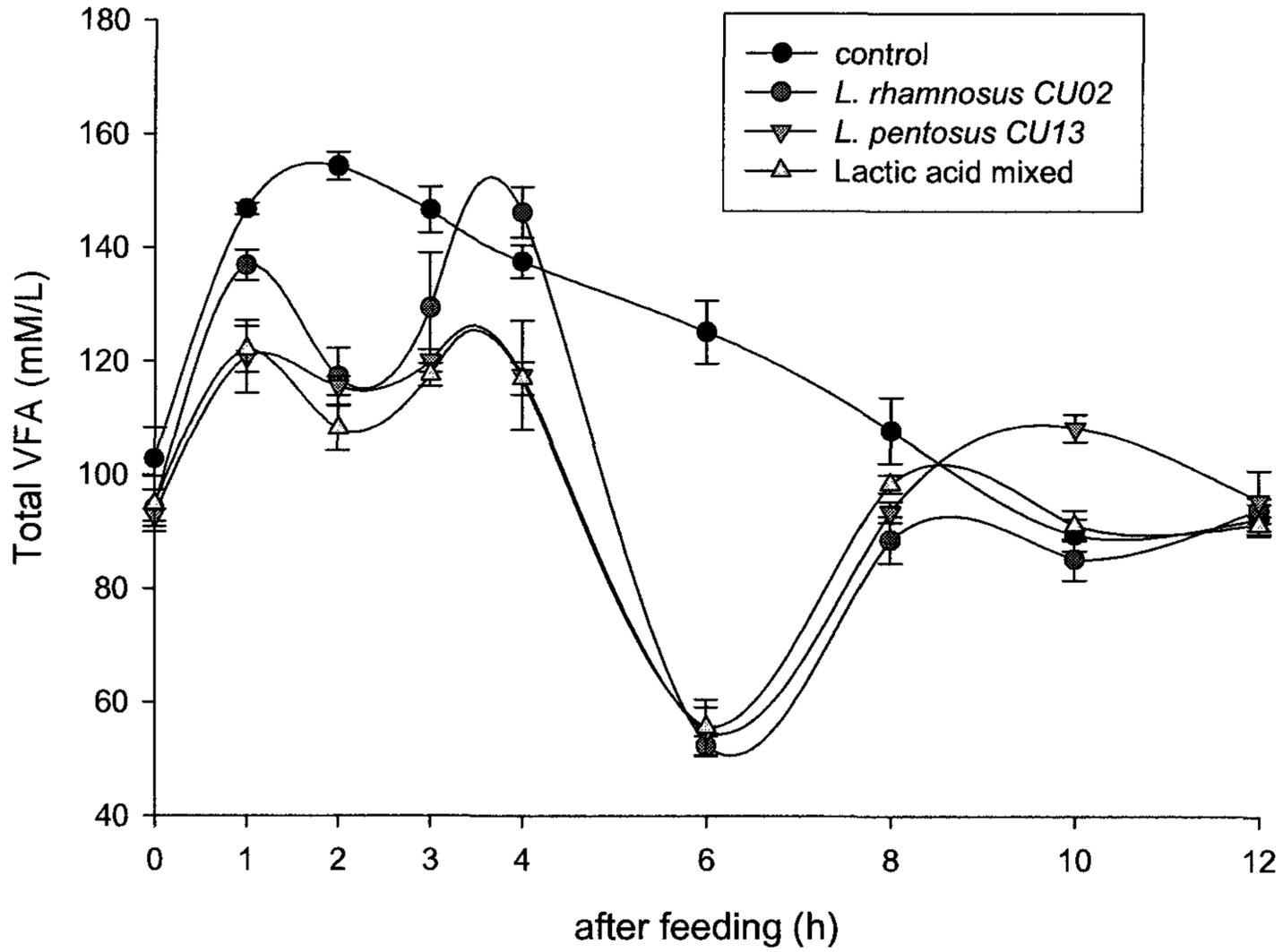


Figure 3-12. Change in Total VFA production by addition of lactic acid bacteria

(13) Rumen bacteria 첨가에 의한 A/P ration의 변화

A/P ration 전체 처리구에서 유의한 차이를 나타내지 않았으며, *F. succinogenes* 처리구에서 나머지 처리구의 감소와는 다르게 A/P ration의 증가가 나타났으나 그 후엔 다른 처리구와 같이 3h에서 급격하게 감소하였다. 이 후 대부분의 처리구가 A/P ration을 일정하게 유지하였으며, 8h 이후에 *S. bovis*와 rumen bacteria mixture 처리구에서 나머지 세 균주의 증가와는 다르게 감소 경향이 나타났다.

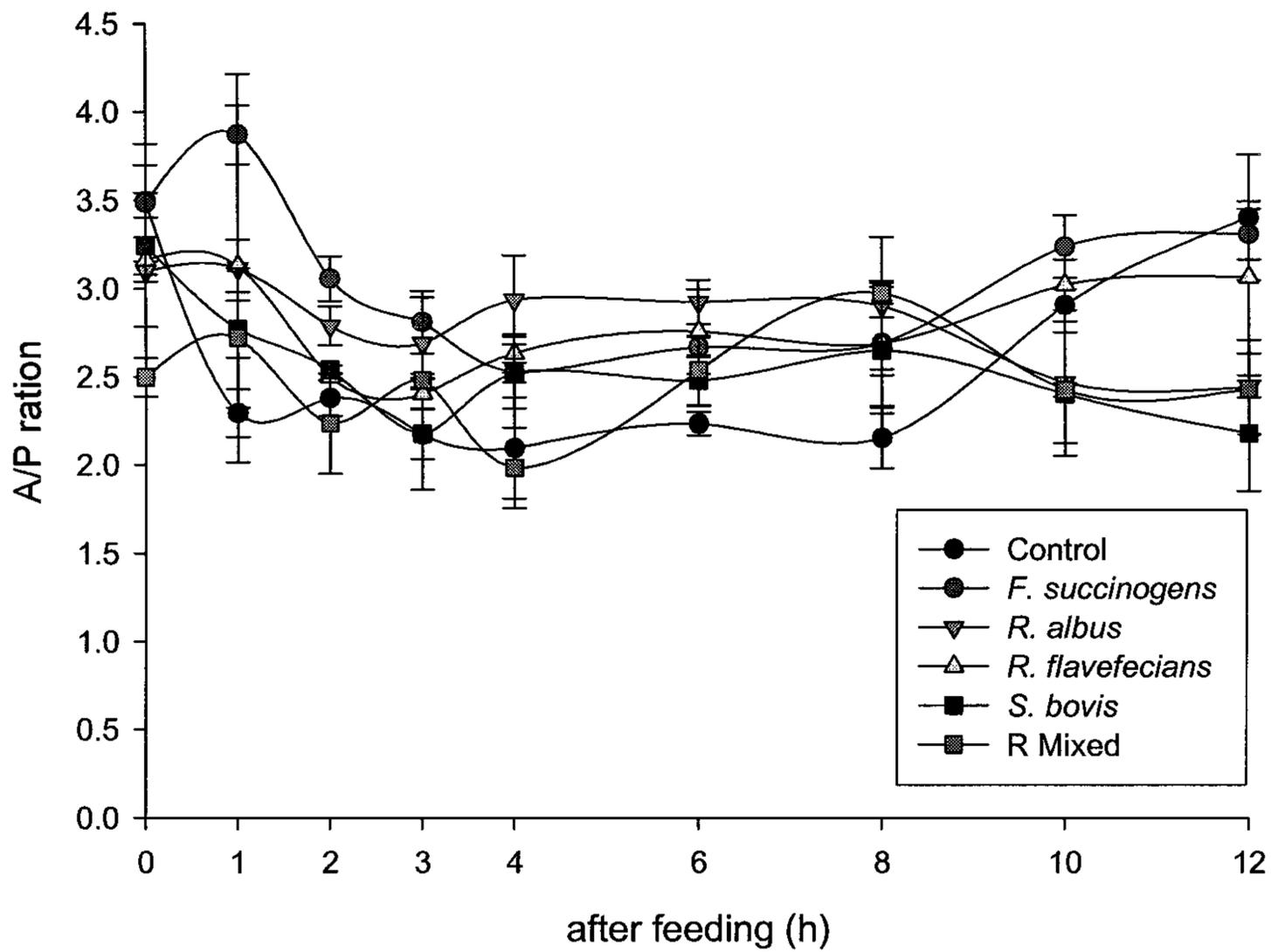


Figure 3-13. Change in A/P ration by addition of rumen bacteria

(14) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 A/P ration의 변화

Lactic acid bacteria 처리구에서의 A/P ration은 control 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 증가와 감소가 반복적으로 나타나다 6h 이후에는 증가 추세를 보였다.

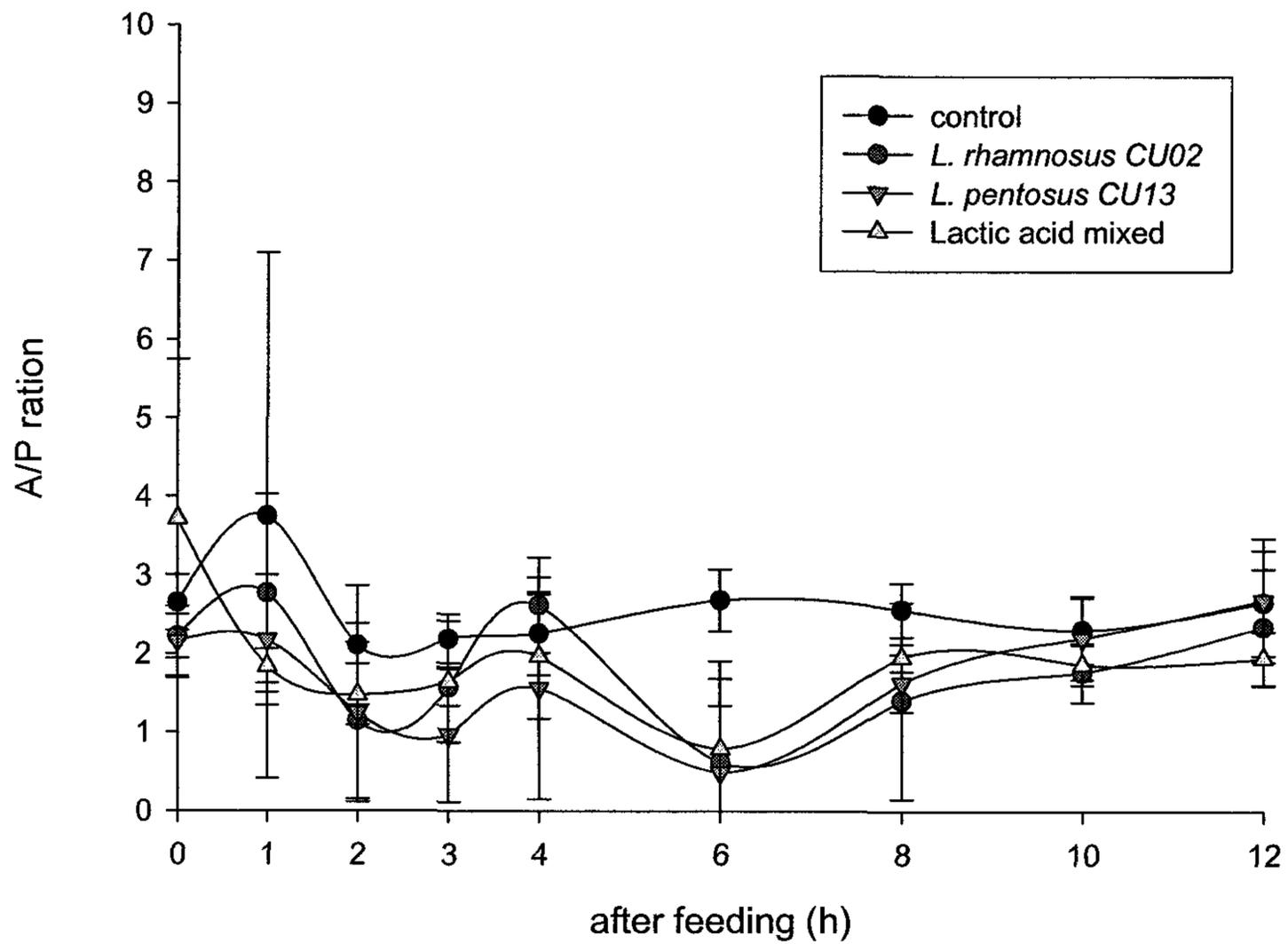


Figure 3-14. Change in A/P ration by addition of lactic acid bacteria

(15) Rumen bacteria 첨가에 의한 Avicelase 활성의 변화

S. bovis 처리구에서 avicelase activity가 나머지 5 처리구의 2배 이상의 활성이 나타났으며, 10h 이후의 서서히 나타나는 증가와는 대조적으로 급격한 증가가 나타났다. *S. bovis*를 제외한 나머지 처리구 중 rumen bacteria mixture에서 높은 활성을 나타냈다.

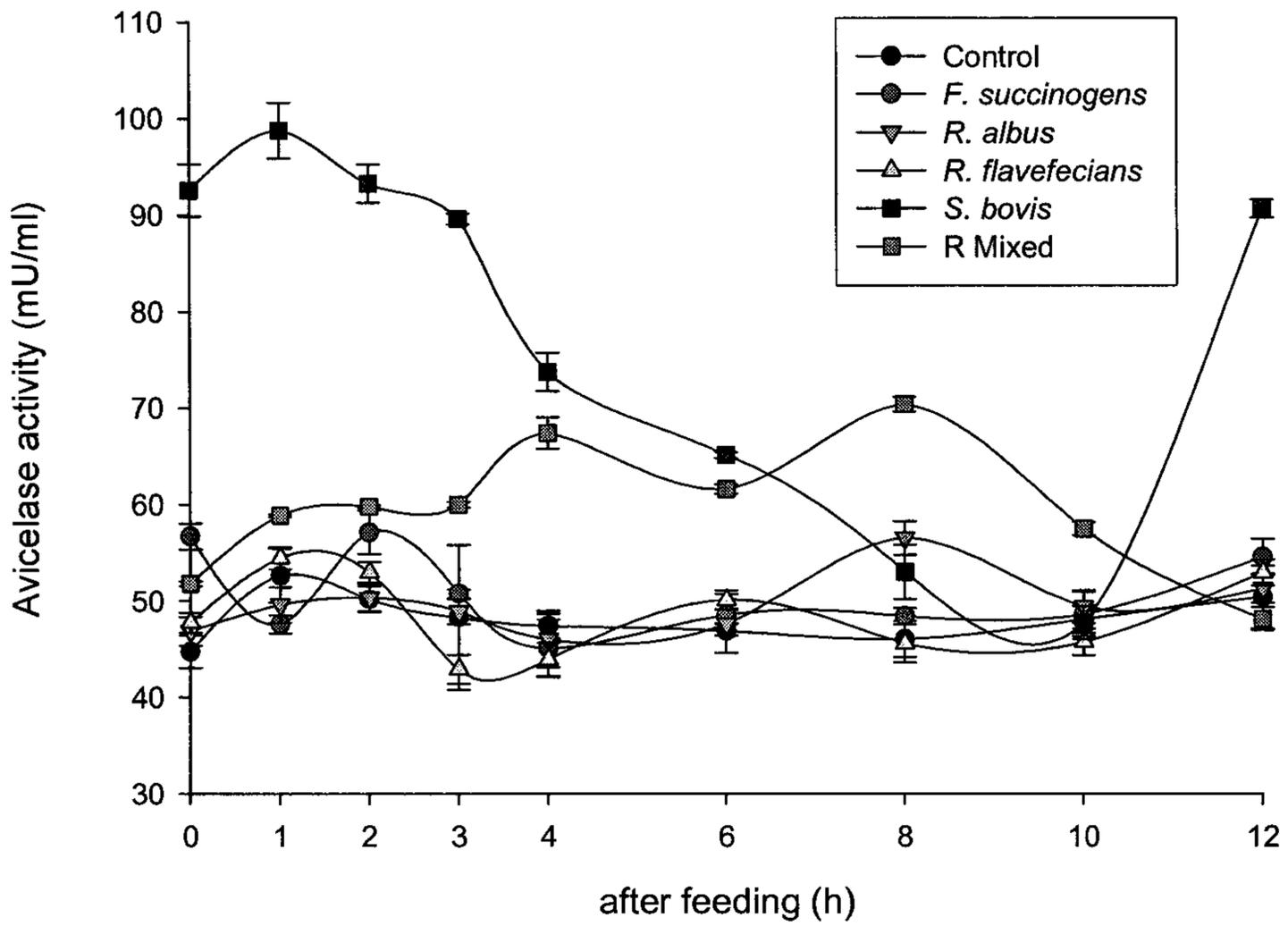


Figure 3-15. Change in Avicelase activity by addition of rumen bacteria

(16) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 Avicelase 활성의 변화

Lactic acid bacteria mixture 처리구는 다른 처리구에 비해 Avicelase의 활성이 유의적으로 높은 경향을 나타내었으며($P < 0.05$), 나머지 처리구에서 활성이 비슷하게 나타나다 8h 이후 모든 처리구에서 활성의 증가가 나타났다.

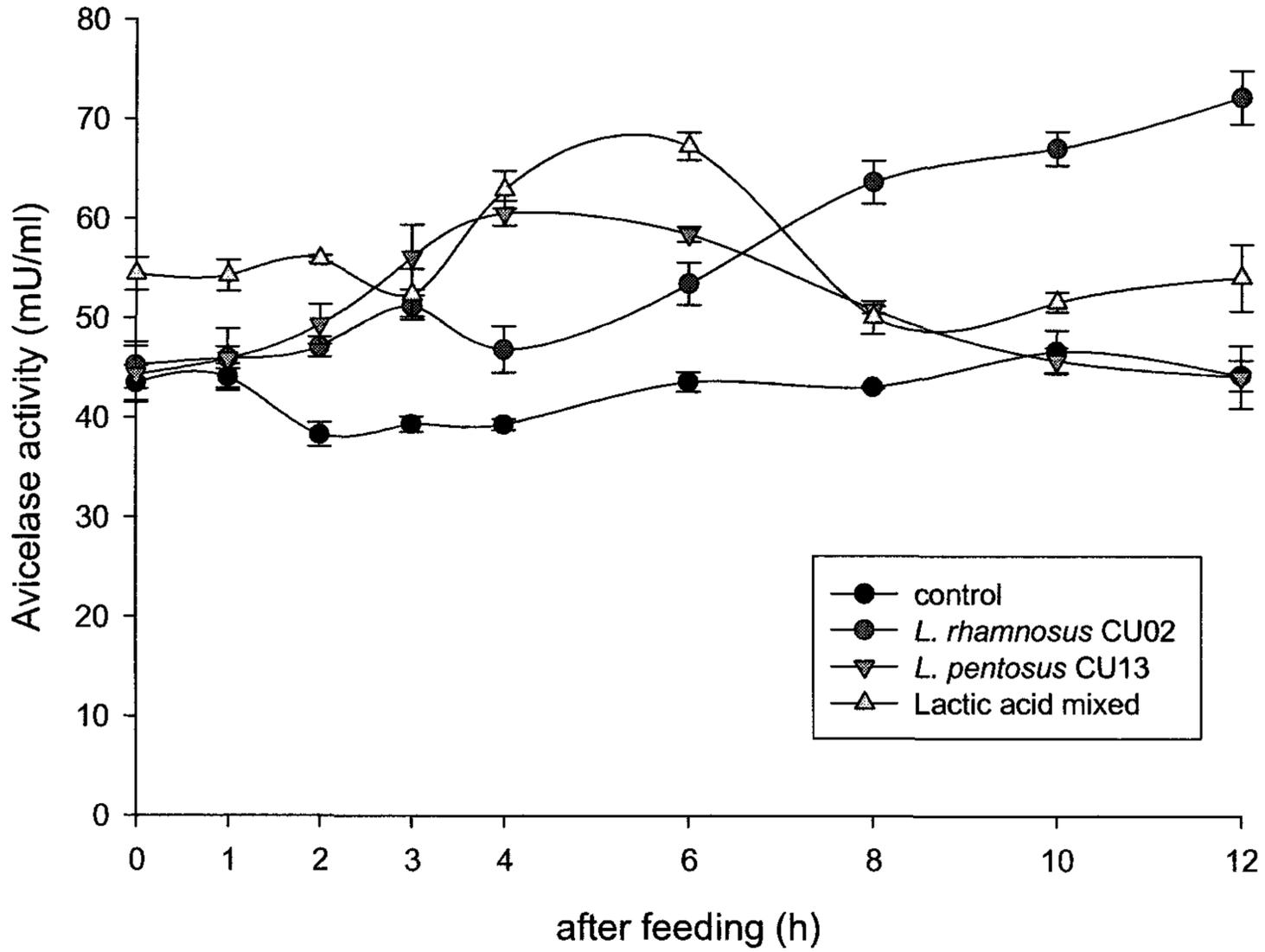


Figure 3-16. Change in Avicelase activity by addition of lactic acid bacteria

(17) Rumen bacteria 첨가에 의한 CMCase 활성의 변화

모든 처리구에서 control 처리구 보다 유의적으로 활성을 나타냈으며($P < 0.05$), 특히 *S. bovis*와 *F. succinogenes* 처리구에서는 control 처리구의 약 2배 가량의 높은 활성을 나타냈다.

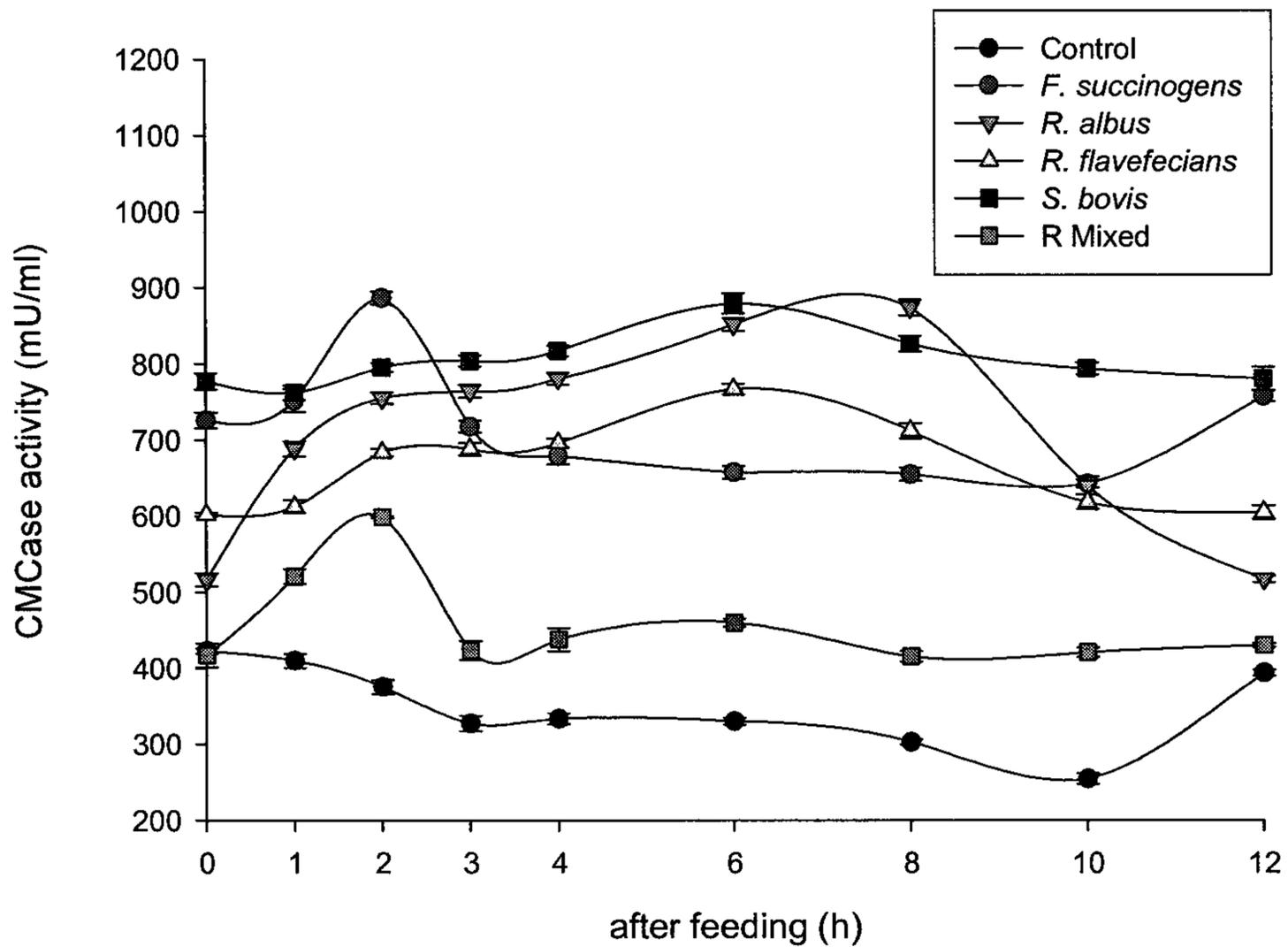


Figure 3-17. Change in CMCase activity by addition of rumen bacteria

(18) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 CMCase 활성의 변화

Lactic acid bacteria 처리구 역시 rumen bacteria 처리구와 비슷하게 모든 처리구에서 control 처리구의 활성보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 3~4h 까지 활성의 증가 후 유지되는 경향이 보였다.

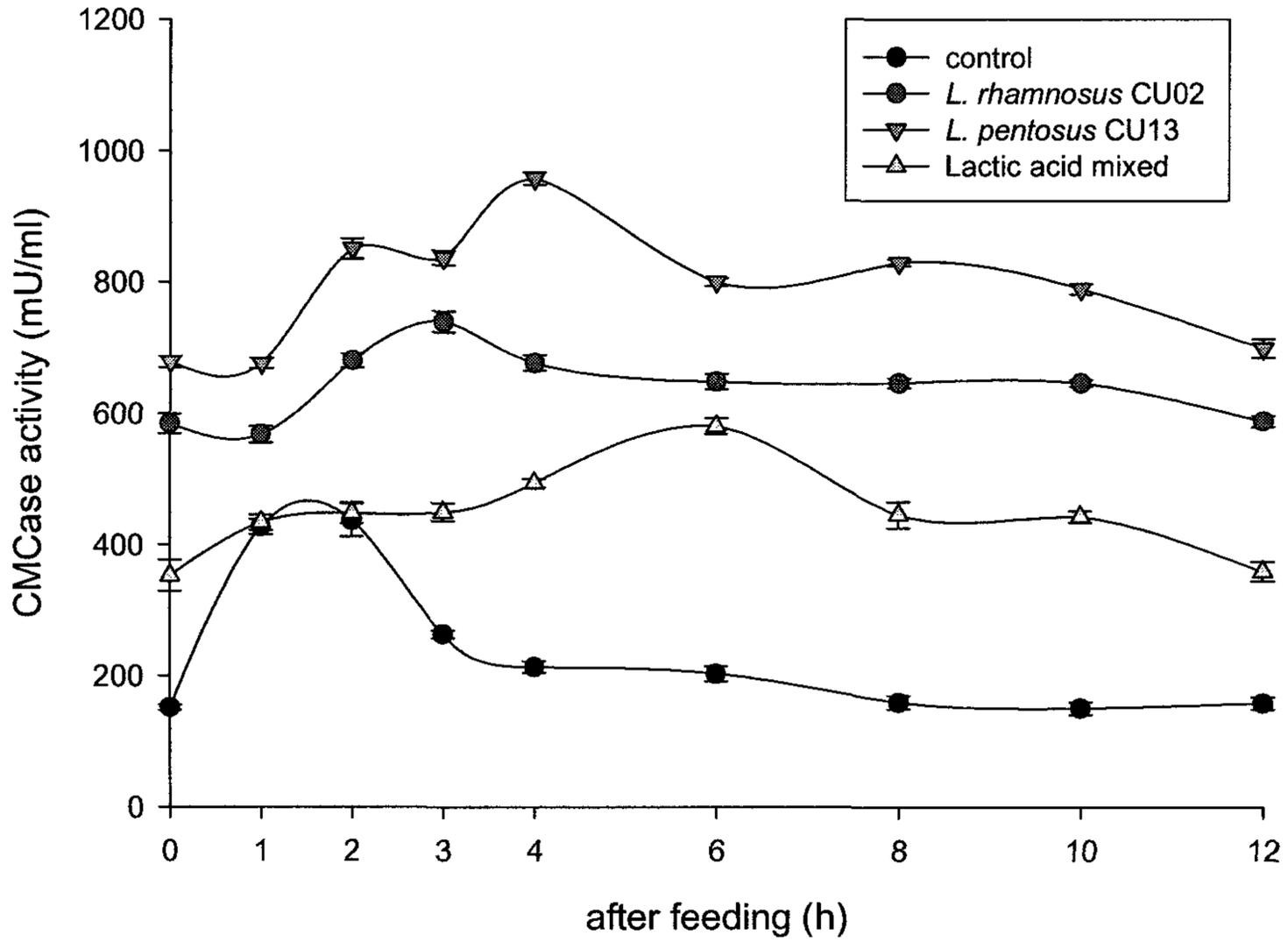


Figure 3-18. Change in CMCase activity by addition of lactic acid bacteria

(19) Rumen bacteria 첨가에 의한 FPase 활성의 변화

Injection 후 2h 까지 모든 처리구에서 활성의 증가가 급격하게 나타났으며, *F. succinogenes* 처리구에서 가장 크고 빠르게 나타났다. 2~4h 사이에 활성의 저하가 나타나나 후 유지되다 10h 이후에는 증가 다시 활성의 증가 경향이 나타났으며, *R. albus* 처리구에서는 전체 평균이 133.01로 유의적으로 높게 나타났다.

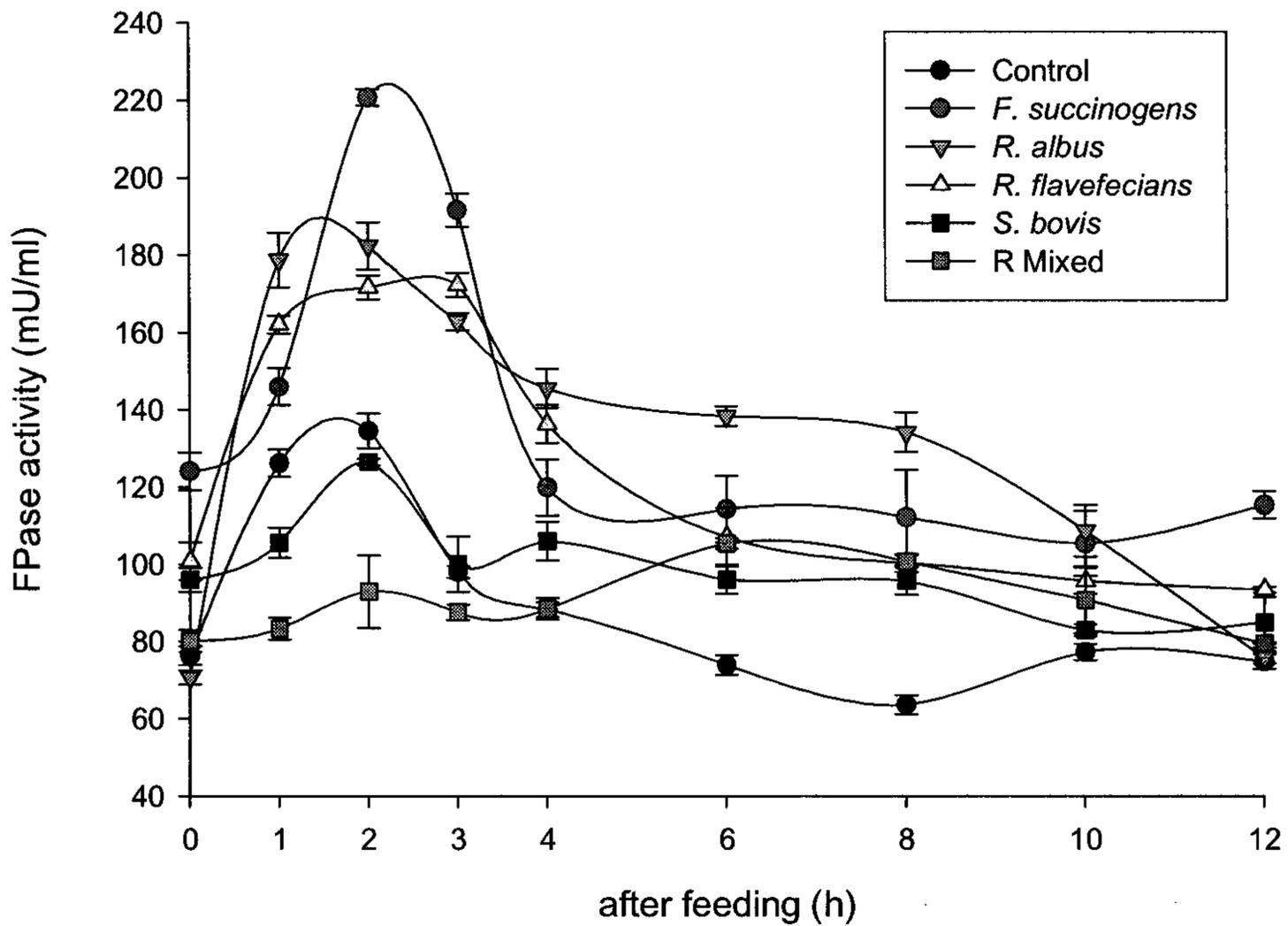


Figure 3-19. Change in FPase activity by addition of rumen bacteria

(20) Lactic acid bacteria 첨가에 의한 FPase 활성의 변화

Lactic acid bacteria mixture 처리구를 제외한 모든 처리구에서 3h 까지 증가 후 감소의 경향이 나타난 반면, lactic acid bacteria mixture 처리구는 6h 까지 활성이 급격하게 증가한 후 6h 이후 감소하는 경향을 보였다. Lactic acid bacteria 처리구도 역시 control 처리구의 활성이 가장 낮게 나타났다. 유산균의 FPase 활성은 전체 평균은 차이가 없게 나타났다.

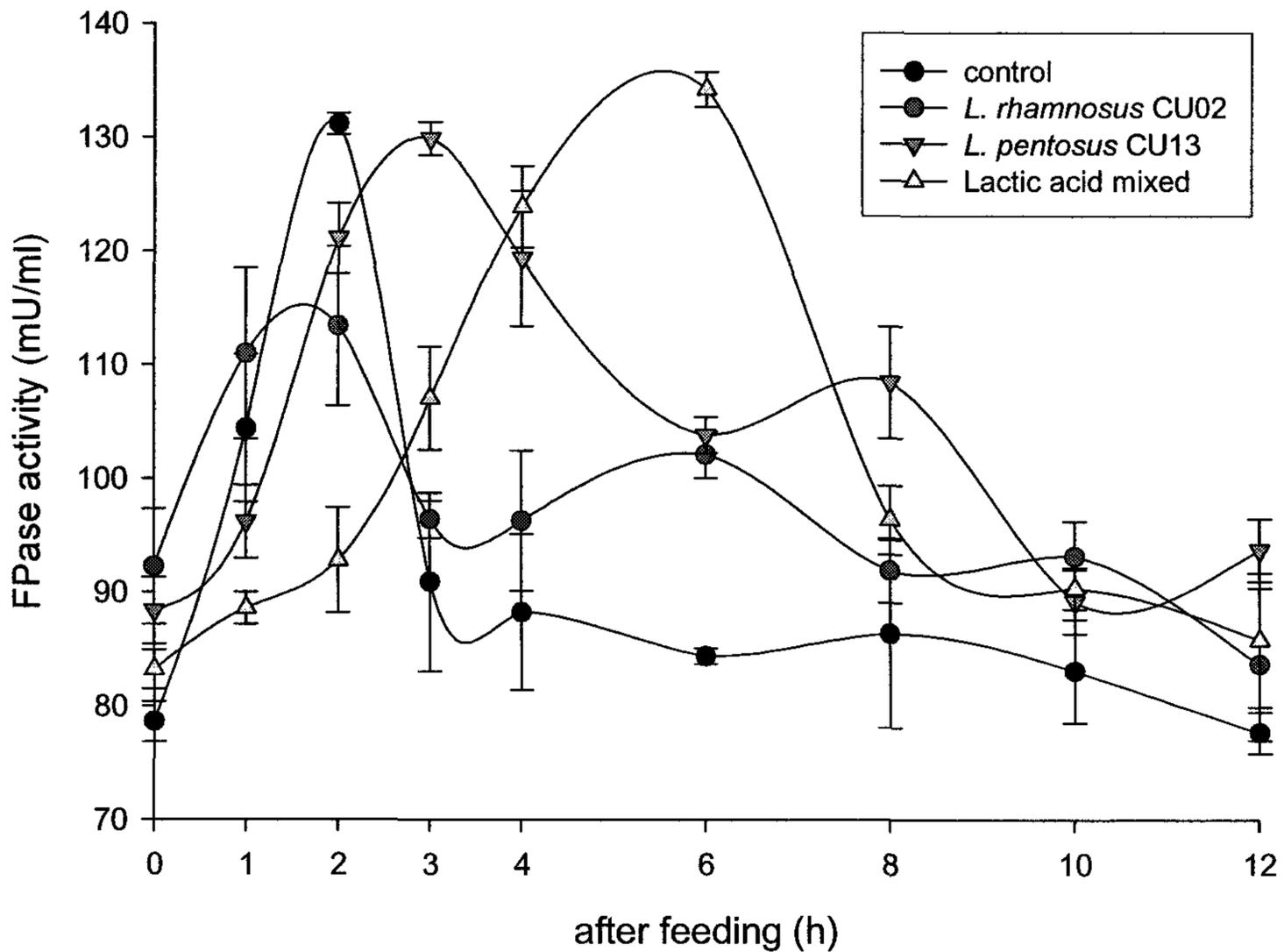


Figure 3-20. Change in FPase activity by addition of lactic acid bacteria

제 2 절 반추 가축 생산성 증진을 위한 생균제제용 장내 미생물의 개발 연구

1. 반추위 발효 안정화 및 섬유소 이용성을 증진시킬 수 있는 장내 생균제제 후보 미생물의 탐색·분리·동정 및 특성

시험 1. 반추위로부터 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 분리 및 동정(시험 1)

가. 재료 및 방법

1) 공시동물

반추위 누관이 장착된 580kg의 Holstein 건유우 3두를 공시하였다.

2) 사양관리

공시동물의 사양관리에 있어 Holstein 건유우는 티모시 건초와 옥수수 사일리지를 급여하였으며 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3) 조사항목 및 시험방법

가) 위액 채취

위액의 채취는 공시축의 반추위 캐놀라를 통하여 채취하였으며, 채취량은 300ml의 위액과 200g의 반추위 고형물을 채취하였다. 채취한 위액은 39℃가 유지되고 CO₂가 충전된 보온병에 보관하여 실험실로 운반하였다.

나) 섬유소 분해 박테리아의 선택배지 및 희석배지의 준비

채취한 위액과 고형물에 존재하는 섬유소 분해 박테리아를 순수 분리하기 위해 Enrichment기법에 의하여 Dehority's artificial(DA) medium (Dehority, 1963; Table 1)의 탄수화물원을 Sigmcell (sigma No. 5504)로 대체하여 선택배지를 준비하여 배양액 속에서 2일 동안 혐기배양을 실시한 후 고형물에 밀착되어 있는 섬유소 분해 박테리아를 분리하기 위해 4℃에서 15분 동안 cold shocking시켜준다. Cold shocking시켜준 배양액은 Bryant와 Burkey(1953)의 방법에 의하여 제

조된 혐기 희석배지(anaerobic dilution solution)에 넣고 심진희석법으로 희석하여 접종액으로 이용하였으며, Bryant's anaerobic dilution solution은 Table 1-1-2에 나타내었다.

Table 1-1-1. Dehority's artificial medium

Ingredients	100 ml
Mineral I solution ¹⁾	20 ml
Mineral II solution ²⁾	20 ml
Resazurine ³⁾	0.1 ml
Vitamin Mixture ⁴⁾	1.0 ml
VFA solution ⁵⁾	6.7 ml
Casein(Acid hydrolyzed casein)	2 g
Hemin solution ⁶⁾	0.1 ml
SIGMACELL(C-source)	0.2 g
8% Na ₂ CO ₃	5 ml
2.5% Cystein-HCL	0.1 ml

(Burk A. Dehority 1963)

- ¹⁾ Mineral I solution : KH₂PO₄ 4.5g in 1,000ml D.W
- ²⁾ Mineral II solution : CaCl₂ 0.25g, MgSO₄ 0.25g, NaCl 4.5g, (MnSO₄ · H₂O 0.10g, FeSO₄ · 7H₂O 0.10g, CoCl₂ · 6H₂O 0.01g in 1,000ml D.W
- ³⁾ Resazurine 0.1% solution : resazurine 0.1g in 100ml D.W
- ⁴⁾ Vitamin solution :
- ① Pyridoxine HCL 0.20g, riboflavin 0.20g, thiamine HCL 0.20g, nicotinic acid amide 0.20g, Ca-d-pantothenate 0.20g, para-amino benzoic acid 0.01g, stock solution 1.0ml in 1,000ml D.W.
- ② stock solution : Folic acid 0.125g, biotin 0.125g, cobalamine 0.125g in 25 ml D.W.
- ⁵⁾ VFA solution : Acetic 17ml(2.9×10^{-2} M), propionic 6ml(8.0×10^{-3} M), n-valeric, isovaleric and DL- α -methylbutyric acid, 1ml each(9×10^{-4} M)
- ⁶⁾ Hemin solution : Dissolve 50mg hemin in 1ml 1N NaOH; make to 100ml with D.W.

Table 1-1-2. Bryant's anaerobic dilution solution

Component	100 ml
Mineral solution I	7.5 ml
Mineral solution II	7.5 ml
Cystein-HCl · H ₂ O	0.05 g
Na ₂ CO ₃	0.03 g
Resazurine 0.1% solution	0.1 ml
Distilled water	100 ml

(Bryant and Burkey, 1953)

다) Roll-tube법에 의한 혐유소 분해 박테리아의 분리

십진희석법을 이용하여 희석된 접종액 1ml을 2.0%의 agar가 함유된 6.7ml의 Dehority's artificial(DA) medium이 든 시험관에 접종한 후, 즉시 시험관을 4°C의 항온 수조에서 회전시켜 agar를 굳힌 후, 39°C의 incubator에서 2~4일간 배양하였다. 형성된 colony를 분리하여 filter pape(Whatman No.1, Whatman, England)를 탄수화물 공급원으로 하는 Dehority's artificial(DA)에서 배양하였다.

라) Colony의 분리 및 분리균주의 보존

Filter paper를 기질로 한 DA medium에서 혐유소 분해력을 확인한 박테리아들은 cellobiose를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에 배양하였으며 균들의 순수성을 확인하기 위해 Gram staining을 한 후 현미경으로 관찰하였다. 관찰 결과 순수 균으로 판정된 균주는 일부 혐기성 상태로 Theather(1982)의 방법에 따라 DA medium에 20% glycerol을 첨가하여 -70°C에 냉동보관 하였다.

마) Colony의 특성조사

반추위로부터 분리한 혐유소 분해 박테리아를 agar plate상에서 24~48시간 배양하여 생성되는 colony의 형태(form), 높이(elevation), 가장자리(margin), 색소(color) 및 크기(size)를 조사하였다.

바) 분리된 혐기성 혐유소 분해 박테리아의 동정

(1) 분리된 혐기성 혐유소 분해 박테리아의 동정을 위한 계대배양

동정하기 전 순수한 혐유소 분해 박테리아를 다시 한 번 분리하기 위해 roll tube 법으로 배양하여 순수 colony를 분리한 후 filter paper(Whatman No.1, Whatman, England)를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에서 48시간 배양

하여 섬유소 분해력을 확인하였으며, 48시간 후 cellobiose를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에 계대하여 24시간 후 동정 작업을 수행하였다.

(2) 분리된 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 현미경적 검사

Cellobiose를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에 계대 배양 후 Gram 염색법을 통하여 분리된 섬유소 분해 박테리아를 염색한 후 1000배의 광학현미경 (No. 6H00342, Provis AX70, Olympus, Japan)상에서 미생물의 형태, 순수성 여부 및 염색반응을 관찰하였다.

(3) 분리된 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 16s rDNA분석

선발된 혐기성 박테리아의 16s rDNA분석은 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (No17121, (주)인트론, Korea)를 이용하여 박테리아의 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 Quick PCR premix(containing Taq DNA Polymerase, dNTPs, Reaction buffer and Tracking dye)를 이용하여 DNA를 증폭하였다. 증폭 조건은 Table 1-1-3과 같다. 증폭된 DNA는 50X TAE buffer가 들어있는 전기영동장치에 1% agarose를 만들어 55~60℃ 정도로 식힌 후 EtBr을 넣고 약 40분 정도 굳힌다. 굳은 1% agarose에 증폭된 DNA와 Marker를 각 well에 loading한 후 100V에서 30분 동안 전기영동을 걸고 결과를 관찰한 후 PCR Clean-up Kit(No.17091, (주)인트론, Korea)를 이용하여 purification 하였다. Purification과정이 끝나면 PCR products에 transformation을 하기 위하여 pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems을 이용하였다. Transformation 작업이 끝난 DNA vector를 competent cell에 transformation(No. 15041, DH5α, (주)인트론, Korea)하였다.

Transformation한 cell을 LB Broth(No. L-7275, Sigma, USA)에 접종하여 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 배양 후 LB Agar(Sigma Cat.No L-7025)plate에 X-gal/IPTG가 함유된 항생제를 도말하고 배양한 competent cell을 plate에 도말하였다. 12시간 배양한 후 백색 Colony가 자라면 *E-coli* LB broth에 ampicillin 항생제를 첨가하여 37℃에서 12시간 배양시킨 후 plasmid DNA Extraction Kit((주)인트론Cat. No17093)를 이용하여 purification 한 후 DNA sequencing을 해주었다.

Table 1-1-3. PCR condition

Step		PCR	
1 Cycle	Denaturation	94℃	2min
30 Cycles	Denaturation	94℃	20sec
	Annealing	50℃	20sec
	Extension	72℃	1min
1 Cycle	Extension	72℃	5min

나. 결과 및 고찰

1) Holstein 젖소의 반추위로부터 분리한 colony 형태 및 특징

Roll tube법에 의해 Holstein 젖소의 반추위로부터 26균을 분리하였다. 분리된 26균주의 colony 형태 및 특징을 알아보기 위해 2% agar가 함유된 DA medium 상에서 2~4일간 배양 후 성장한 colony의 형태 및 특징을 Table 4에 나타내었다. 반추위로부터 분리된 colony의 크기는 지름 1~3mm 사이였으며 분리된 colony 중 H-8, 13, 19, 20, 21, 24균들은 colony가 불규칙한 형태를 나타냈으며 나머지 균들은 원형의 형태를 나타내었다. 특히 불규칙한 colony 중 H-20, 21균은 가운데 부분이 노란색을 나타냈으며 가운데 부분을 중심으로 주위는 흰색의 방사형 모양을 나타냈다. H25균의 colony 경우 두개의 원형으로 구성된 모양을 띄고 있었고 짙은 노란색이었다. Sihpestcijn(1951) 과 Hungate(1957)의 보고에 의하면 *Ruminococcus flavefaciens*를 순수 배양했을 때 노란색의 colony가 형성되었고, cellulose와 cellobiose를 소화시킬 수 있는 능력이 있는 박테리아라고 하였으며 이때 cellulose 분해속도는 비교적 느리다고 보고하였다. *Ruminococcus albus*는 순수 배양하였을 때 백색 colony를 형성하며 cellulose 분해력이 높다 (Hungate, 1987). 그러나 사료의 구성비율, 급여회수, 급여수준과 사료채취시기와 같은 요인과 동물의 개체차와 같은 여러 가지 차이점 모두 미생물 군집의 변화에 영향을 미칠 수 있다(김, 1995).

2) 선발된 균들의 활력 및 섬유소 분해력 조사

Filter paper를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에 분리된 26균주를 24시간 배양한 결과 H25균이 filter paper의 형태를 변화 시키며 분해하였다. 배양

48시간에 이르러 H-8, 20, 23균들이 filter paper를 분해하였다. 또한 starch, glucose 및 cellobiose를 탄수화물 공급원으로 하는 DA medium에서도 이들 균주들은 높은 활력을 보였으며, filter paper 분해 능력은 보이지 않았으나 나머지 균들에 비해 H-7, 16, 21균들 또한 높은 활력을 나타냈다.

Table 1-1-4. Growth characteristics of strains isolated from the rumen of Holstein cows on Dehority's artificial agar medium

No. of Strain	Colony appearance				
	Form	Elevation	Margin	Color	Size(
H ¹⁾ -1	Circular	Flat	Entire	Yellow	2
H-2	Circular	Flat	Entire	Yellow	2.5
H-3	Circular	Flat	Entire	White	2.7
H-4	Circular	Flat	Entire	White	0.5
H-5	Circular	Flat	Entire	Yellow	2
H-6	Circular	Flat	Entire	White	3
H-7	Circular	Flat	Entire	White	2.5
H-8	Irregular	Flat	Undulate	Yellow	1
H-9	Circular	Flat	Entire	Yellow	1
H-10	Circular	Flat	Entire	White	1.5
H-11	Circular	Flat	Entire	White	2.5
H-12	Circular	Flat	Entire	Yellow	1.5
H-13	Irregular	Flat	Entire	Yellow	1
H-14	Circular	Flat	Entire	Variable	1.5
H-15	Circular	Flat	Entire	Variable	1.5
H-16	Circular	Flat	Entire	Variable	1.5
H-17	Circular	Flat	Entire	Yellow	1.5
H-18	Circular	Flat	Entire	White	2.5
H-19	Irregular	Flat	Lobate	Yellow	1
H-20	Irregular		Filamentous	Variable	3
H-21	Irregular	Flat	Filamentous	Variable	3
H-22	Circular	Flat	Entire	White	0.5
H-23	Circular	Flat	Entire	Yellow	5
H-24	Irregular	Flat	Entire	Yellow	1.5
H-25	Circular	Flat	Entire	Yellow	2
H-26	Circular	Flat	Entire	Yellow	1.5

¹⁾ H : Bacteria from the rumen of Holstein cows.

3) 16s rDNA 분석을 통한 섬유소 분해 박테리아의 동정



Figure 1-1-1. Electrophoresis of PCR amplification product

섬유소 분해력을 보인 H-8, 20, 23, 25균주와 starch, glucose 및 cellobiose를 탄수화물 공급원으로 한 DA medium에서 높은 활력을 보인 H-7, 16 및 21균을 선발하였으며, 각각의 박테리아들의 DNA를 추출하여 PCR 하였고, PCR 증폭 산물들을 1% agarose에 전기영동 한 결과를 Figure 1-1-1에 나타내었다.

분리한 7개 균 중 6개 균은 정상적인 PCR band를 나타내었으나, H23균은 정상적인 PCR band가 나타나지 않았다. 이것은 PCR의 수행 중 실수로 사료된다. 따라서 H23균은 다시 실험을 수행하였다. H7, H16 및 H21균의 PCR band는 1.5kb에서 뚜렷하게 나타났으며, H8 과 H20번 균주는 그 보다 약간 작은 크기의 band가 뚜렷하게 나타났다(Figure 1-1-2).

Sequencing 분석결과를 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 조사한 결과 H7, H16 및 H21균의 경우 비섬유소 분해균인 *Megasphaera elsdenii* 로 나타났으며(Table 1-5, 6, 8) H20 과 H25균은 섬유소 분해균인 *Ruminococcus flavefaciens*로 나타났다(Table 1-7, 9)



Figure 1-1-2. Electrophoresis of PCR amplification product

Table 1-1-5. H7 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Megasphaera elsdenii</i> 5T	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> T81	97%
<i>Megasphaera elsdenii</i> La03	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> JL1	97%
<i>Megasphaera elsdenii</i> AW106	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> ATCC 25940	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> YJ-4	97%
<i>Megasphaera elsdenii</i> S2	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> S3	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 7-11	97%

정상적인 PCR band가 나타나지 않은 H23균과 동정되지 않은 H8균의 DNA를 추출하여 다시 PCR을 수행하였으며, PCR 증폭 산물들을 1% agarose에 전기영동한 결과 정상적인 PCR band가 나타났다.

H8균은 sequencing 결과가 좋지 않아 H23균과 같이 다시 시험을 수행하였다. 그 결과 H8균은 *Ruminococcus flavefaciens*로, H23균은 경우 *Fibrobacter succinogenes*로 확인되었다(Table 1-10, 11).

Table 1-1-6. H16 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Megasphaera elsdenii</i> YJ-4	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 5T	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> T81	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> AW106	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> JL1	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 4-13	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> La03	94%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 7-11	94%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 2-9	94%

Table 1-1-7. H20 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP9155	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> AR69	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 4	91%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP-RI-Adx	91%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1	91%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> AR72	91%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> V1	90%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	90%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> JM1	90%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007	90%

Table 1-1-8. H21 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Megasphaera elsdenii</i> YJ-4	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 5T	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> La03	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> T81	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 2-9	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> AW106	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> JL1	95%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 7-11	96%
<i>Megasphaera elsdenii</i> 4-13	95%

Table 1-1-9. H25 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP-R1-Adx	91%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP-C14-Adx	91%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> R13e2	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> AR69	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP9155	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ATCC 49949	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 4	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> Y1	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> AR72	92%

Table 1-1-10. H8 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP9155	93%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> R13e2	94%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP-R1-AdX	93%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 4	93%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> AR72	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> LP-C14-Adx	93%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ATCC 49949	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1	92%
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> V1	92%

Table 1-1-11. H23 strain isolated from Holstein cows

Classification	Identities (%)
<i>Fibrobacter succinogenes</i> partial S85	97%
<i>Fibrobacter succinogenes</i> partial	97%
<i>Fibrobacter succinogenes succinogenes</i> BL2	96%
<i>Fibrobacter succinogenes succinogenes</i> B1	96%
<i>Fibrobacter succinogenes succinogenes</i> A3C	95%
<i>Fibrobacter succinogenes</i> HM2	91%
<i>Fibrobacter succinogenes</i> MC1	91%
<i>Fibrobacter succinogenes</i> MM4	91%
<i>Fibrobacter succinogenes</i> MB4	92%

시험 2. 선발된 혐기성 박테리아의 단독 배양이 filter paper의 분해율과 가스발생량 및 효소 분비 활력에 미치는 영향

Filter paper를 기질로 하였을 때 분리된 각 균들의 건물분해율과 가스발생량 및 효소 분비 능력을 알아보기 위해 수행하였다.

가. 재료 및 방법

1) 선발된 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 공시

16s rDNA분석에 의해 동정된 섬유소 분해력이 강한 혐기성 4균 (*Ruminococcus flavefaciens* H8, *Ruminococcus flavefaciens* H20, *Fibrobacter succinogenes* H23 및 *Ruminococcus flavefaciens* H25)을 공시하였으며, 표준균으로써 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입한 *Ruminococcus flavefaciens* Sijpesteijn(ATCC19208)를 이용하였으며 RF로 표시하였다.

2) 공시기질

지름 6mm의 filter paper disk (Whatman No.1, Whatman, England)를 공시기질로 사용하였다.

3) 선발된 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 배양

가) 사용배지

Dehority's artificial (DA) medium (Dehority, 1963; Table 1)이 19ml 들어있는 serum bottle에 탄소원으로 filter paper disk(Whatman No.1, Whatman, England)를 0.08g씩 첨가하였다. 첨가 후 121℃에서 15분간 autoclave 하였다.

나) 공시균주의 준비 및 접종

접종용으로 이용될 각 균주는 DA medium에 cellobiose를 탄소원으로 하는 배지에서 24시간 배양한 후 각 배양액을 1ml씩 시험용 serum bottle에 접종하였다. H8, H20, H23, H25 및 R.F의 접종시 총균수는 $0.23 \sim 4.6 \times 10^8$ cfu/ml이 었다.

다) 배양 방법 및 배양시간

혐기상태를 유지하며, 39℃ incubator에서 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 8일 동안 교반 없이

배양하였다.

4) 가스 발생량의 측정

발효가스 발생량 측정은 Williams(1996)와 Beuvink(1993)의 방법을 이용하여 각 시간대 마다 모든 배양 bottle을 incubater에서 제거하여 약 10분 동안 상온에서 냉각시킨 후 가스발생량 측정기를 이용하여 측정하였다. 가스발생량 측정 후 시간대별 분석용 bottle을 제외하고 paraffin 용액으로 stopper의 주사바늘 구멍을 밀폐시킨 후 다시 배양기에 넣어 배양을 계속하였다. 기질이 분해되면서 발생된 가스량은 ml/0.1g substrate DM 단위로 환산하였다.

5) 건물 분해율의 측정

배양이 완료된 serum bottle의 가스측정을 완료한 후 개봉하여 상층액을 회수하였다. 상층액을 회수한 후 남아있는 잔유물을 glass microanalysis filter holder assembly(No. 097531C, Fisher Scientific, USA)에 filter paper(Whatman No.1, Whatman, England)로 여과한 후 80°C의 drying oven에서 48시간 건조, 평량하여 건물 분해율을 측정하였다.

6) 가수분해 효소의 활력

가) 조효소액의 채취

각 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 8일 배양한 bottle에서 상층액을 채취하여 기질 입자를 제거하기 위해 500 × g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 pellet은 건물 분해율 측정을 위해 이용되었고 상층액은 다시 13,000 rpm에서 5분간 4°C의 microcentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany)를 이용하여 원심분리한 후 최종 상층액을 extracellular enzyme activity 분석을 위한 조효소액으로 사용하였다.

나) Avicelase 의 활력

배양액을 13,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 조효소로 이용하였다. 0.05M citrate buffer(pH 5.5)로 제조한 2% Avicel (No. 11365, Avicel® PH-101, Fulka, USA)를 이용하여 각각 blank tube에 2% Avicel solution 0.5ml 과 citrate buffer(0.05M, pH 5.5) 0.5ml를 넣어주었다. Sample tube에 2% Avicel solution 0.5ml과 조효소액 0.5ml를 넣어 45°C의 항온 수조에서 1시간 동안 진탕

배양하였다. 1시간 동안 반응시킨 후 효소 반응을 중지시키기 위하여 배양이 끝나면 각 tube를 boiling water에서 5분 동안 boiling한 후, ice water에서 5분 동안 식혀주었다. 식혀준 반응액을 13,000rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액 0.2ml를 채취하여 DNS(dinitrosalicylic acid)용액(Table 5) 0.6ml씩 넣어준 다음, 반응을 위해 5분 동안 boiling시킨 후, ice water에서 5분 동안 식혀주었다. 증류수 4.2ml을 각각의 tube에 5ml 되게 희석시킨 후 spectrophotometer(V-530, JASCO, Japan) 550nm에서 흡광도(OD값)를 측정하였으며, 기질로부터 유리된 환원당의 양은 glucose를 standard로 하여 $\mu\text{mol/ml/min}$ 단위로 환산하였다.

다) CMCase 활력

0.05M citrate buffer(pH 5.5)로 용해시킨 1% CMC (No. C-4888, carboxymethyl cellulose, Sigma, USA)의 기질을 이용하여 각각 blank tube에 1% CMC solution 0.5ml과 citrate buffer(0.05M, pH 5.5) 0.5ml를 넣어주었다. Sample tube에 1% CMC solution 0.5ml과 조효소액 0.5ml를 넣어 45°C water bath에서 1시간 동안 shaking 하지 않고 배양하였다. 배양 후 분석 방법은 앞의 Avicelase 분석방법과 같은 방법으로 하였다. 분석 후 기질로부터 유리된 환원당의 양은 glucose를 standard로 하여 $\mu\text{mol/ml/min}$ 단위로 환산하였다.

라) xylanase 활력

0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 용해시킨 2% oat spelt xylan (No. X0627, Sigma, USA)의 기질을 이용하여 각각 blank tube에 2% oat spelt xylan 0.5ml과 potassium phosphate buffer (0.05M, pH 7.0) 0.5ml를 넣어주었다. Sample tube에 2% oat spelt xylan 0.5ml과 조효소의 0.5ml를 넣어 45°C shaking water bath에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 분석 방법은 앞의 Avicelase 분석방법과 같은 방법으로 분석하였다. 분석 후 기질로부터 유리된 환원당의 양은 xylose (No. X3877, Sigma, USA)를 standard로 하여 $\mu\text{mol/ml/min}$ 단위로 환산하였다.

마) 단당류 분해 효소

β -D-glucosidase (No. N-7006, Sigma, USA) 및 β -xylosidase (N-2132, Sigma, USA)와 같은 단당류 분해 효소의 활력 측정은 Kohchi와 Tohe(1986)의 방법에 따라 각각 p-NP glucopyranoside(No. N7006, p-Nitrophenyl β -D-Glucopyranoside, Sigma, USA) 및 p-NP xylopyranoside(No. N2132, p-nitrophenyl β -D-xylopyranoside, Sigma, USA)를 3차 증류수에 10 mM의 농

도가 되게 하여 공시기질로 이용하였다. Microwell plate의 각 well에 50 μ l의 기질용액, 10 μ l의 0.5M potassium phosphate buffer (pH 6.5), 증류수 20 μ l와 조효소액 20 μ l를 혼합하여 100 μ l이 되게 하여 50°C에서 30분간 반응시키고 50 μ l의 1M Na_2CO_3 로 반응을 정지시킨 다음, 405nm에서 ELISA reader(TECAN, Sunrise Remote/Touch Screen F039300)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 효소활력 단위(1unit)는 1분 동안 μ mol의 p-NP (paranitrophenyl)의 방출량(μ mo/ml/min)으로 환산하여 표시하였다.

7) 통계분석

각 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 8일 동안 배양한 배양액을 가지고 처리별 3반복을 통해 얻어진 모든 결과들은 SAS(Statistical Analysis System, 1996) package의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 분석하였으며, Duncan's multiple range test에 의해 처리 평균간 유의성($p < 0.05$)을 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 건물분해율

Filter paper를 탄수화물원 기질로 이용시 각 균들의 순수배양에 따른 건물분해율을 Table 12에 나타내었다. 배양 1일에는 각 균들의 분해율은 유의적인 차이가 없었다. 배양 2일째에 H20균이 다른 균보다 월등히 높은 분해율을 나타내었다. 배양 3일째부터 H25균이 가장 높은 분해율을 나타냈으며, H20균이 그 다음으로 높은 분해율을 나타냈다. H23은 4일째 배양까지는 분해속도가 낮았으나 배양 6일부터 H20균과 H25균은 유사하게 높은 분해율을 보였다. 특히 표준균주인 RF균(ATCC19208)은 filter paper 분해율을 32% 정도 밖에 분해하지 못하는 것으로 나타났으며 H8균은 RF균보다도 더 낮은 분해율을 나타내었다.

Table 1-2-1. Dry matter degradation rates(%) of filter paper cellulose by pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	1.39	0.30	0.00	0.00	5.22	1.202
2	0.00 ^c	14.36 ^a	1.52 ^{bc}	5.34 ^b	0.67 ^{bc}	1.703
3	4.92 ^c	37.82 ^{ab}	32.74 ^b	43.45 ^a	4.43 ^c	4.607
4	12.65 ^c	48.49 ^a	27.12 ^b	54.15 ^a	0.00 ^d	6.287
6	17.08 ^d	58.03 ^b	64.57 ^{ab}	66.21 ^a	31.72 ^c	5.858
8	10.00 ^d	42.36 ^b	57.81 ^a	62.37 ^a	27.36 ^c	5.575

¹ DA medium: Dehority's artificial medium

H8 : *Ruminococcus flavefaciens* H8

H23 : *Fibrobacter succinogenes* H23

H20 : *Ruminococcus flavefaciens* H20

H25 : *Ruminococcus flavefaciens* H25

RF : *Ruminococcus flavefaciens* Sijpesteijn (ATCC 19208)

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

H20균이 초기 배양기간에 높은 분해활력을 나타내었다. 표준균인 RF균은 4일째까지는 거의 분해력이 없다가 6일째부터 filter paper를 분해하였으나 8일째에는 분해력이 떨어지는 경향이였다. 이결과는 filter paper를 기질로 이용한 건물분해율에서 *F. succinogenes*에 의한 분해율이 46.41%로 가장 높았으며, *R. albus* 및 *R. flavefaciens*는 각각 36.62 및 34.31%였고(p<.05) 공시된 모든 박테리아들은 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7까지 증가하였다(김 1995)는 결과와 비교해 보면 배양시간이 증가할수록 분해율이 증가하는 것이 일치하였으며 배양 8일째부터 분해율이 감소하는 것으로 나타나 박테리아들의 활력이 배양 8일째부터 점점 감소하였다.

H8균 또한 RF균과 유사하게 낮은 분해율을 나타내었지만 6일까지 서서히 분해율이 증가하는 경향을 보였다. H25균이 전 배양기간 동안 가장 우수한 분해력을 보였고 미생물제제의 후보 균이 되기 위해서는 초기 활력이 더욱 중요하기 때문에 H20균 또한 우수한 균으로 생각되었다.

2) 가스발생량

가스발생량은 배양 1일과 2일째에서 H20균이 가장 높았으며(p<0.05), 배양 3과

4일째에는 H25균이 가장 높았다 (Table 1-2-2). 배양 6일째의 가스 생성량에는 큰 차이가 없었지만 H23균이 H20균과 H25균에 비하여 약 0.45 ml/0.1g의 가스를 더 많이 발생시켰다($p < 0.05$). 하지만 H8균과 RF균의 경우 H20, H23, H25균에 비해 가스발생량이 낮았으며, H8균이 RF균에 비해 배양 4일 후부터 가스발생량이 낮아져 공시된 균주 중 filter paper를 이용하여 발효하는 능력이 가장 떨어짐을 알 수 있다. 가스발생량도 건물분해율과 유사하게 H20균이 2일째 가장 높은 것으로 나타나 초기 미생물의 활력이 빠름을 간접적으로 나타내었다.

Table 1-2-2. Gas production(ml/0.1g DM substrate) by pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	2.82 ^c	4.21 ^a	3.13 ^{bc}	3.30 ^b	2.39 ^d	0.092
2	2.41 ^c	5.43 ^a	3.87 ^b	4.03 ^b	1.29 ^d	0.177
3	1.76 ^d	3.80 ^b	3.08 ^c	4.50 ^a	1.03 ^e	0.173
4	1.02 ^d	2.87 ^b	2.64 ^b	3.60 ^a	1.38 ^c	0.150
6	0.85 ^d	2.48 ^b	2.90 ^a	2.43 ^b	1.38 ^c	0.145
8	0.47 ^c	1.53 ^a	1.63 ^a	1.23 ^a	1.57 ^a	0.117

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 12.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ($p < 0.05$).

3) 누적 가스발생량

Table 1-2-2에서는 각 배양일 별 가스발생량을 조사한 것이고 Table 1-2-3는 누적된 가스발생량을 조사한 것이다. 누적 가스발생량은 H20균이 배양 1일부터 전 배양기간 동안 가장 많은 가스를 발생시켰다. H25균의 가스발생량은 4일과 6일 배양일에 H20균의 가스발생량과 유의적인 차이가 없었지만 수치적으로는 여전히 H20균보다는 낮음을 알 수 있었다. 앞에서 조사된 건물분해율과 비슷한 양상으로 H8균과 RF균이 다른 균에 비해 가스발생량 또한 전 배양기간 동안 낮게 조사되었다. RF균은 배양 6일과 8일에 H8균과 유의적으로 같은 누적 가스량을 보였지만 배양 1, 2, 3 및 4일에선 가장 적은량의 가스를 발생하였다.

Table 1-2-3. Cumulative gas production(ml/0.1g DM substrate) by pure cellulolytic

bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	2.82 ^c	4.21 ^a	3.13 ^{bc}	3.30 ^b	2.39 ^d	0.092
2	5.08 ^c	9.21 ^a	6.89 ^b	7.09 ^b	3.63 ^d	0.238
3	6.70 ^d	12.92 ^a	9.88 ^c	11.22 ^b	4.67 ^e	0.413
4	7.58 ^c	15.41 ^a	12.17 ^b	14.48 ^a	5.92 ^d	0.592
6	8.47 ^c	17.93 ^a	14.98 ^b	16.87 ^a	7.55 ^c	0.841
8	9.53 ^d	19.57 ^a	16.23 ^c	18.27 ^b	9.33 ^d	1.162

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 12.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

4) 가수분해효소 활력

가) Extracellular CMCase 활력

Table 1-2-4. Extracellular CMCase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time (Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	36.22 ^c	69.44 ^a	31.82 ^d	48.12 ^b	13.48 ^e	4.963
2	36.82 ^d	73.89 ^a	48.40 ^c	61.68 ^b	17.24 ^e	5.357
3	47.67 ^d	84.73 ^a	59.04 ^c	65.80 ^b	24.13 ^e	5.265
4	45.75 ^d	76.15 ^a	62.31 ^c	69.38 ^b	31.52 ^e	4.417
6	40.77 ^d	74.31 ^a	69.83 ^b	65.70 ^c	39.07 ^d	4.029
8	35.24 ^d	65.56 ^a	66.69 ^a	60.88 ^b	40.22 ^c	3.570

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

Filter paper를 기질로 하여 순수배양 된 각 균의 배양액의 상층액에 존재하는 CMCase의 활력을 Table 15에 나타내었다. 배양 1일부터 전 배양기간 동안 H20 균의 CMCase 활력이 가장 높았으며 (p<0.05), 8일째에 H23균의 효소활력과는 유의적 차이가 없었으나 다른 균에 비하여 가장 높았다. H25균이 H20균보다는

유의적으로 전 기간 동안 CMCase의 활성이 낮았지만 1일부터 4일까지의 배양기간에 H20균을 제외하고는 다른 균에 비해 높은 활성을 나타내었다. H23균과 H25균의 경우 배양 1일부터 CMCase 활성이 서서히 증가하다가 배양 8일부터 감소하는 것을 볼 수 있었으며, RF균의 경우 배양 8일까지 계속 증가하였다.

나) Extracellular Avicelase 활성

Table 1-2-5. Extracellular Avicelase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	7.42 ^b	9.06 ^a	6.35 ^c	8.07 ^b	5.92 ^c	0.316
2	10.36 ^{ab}	10.87 ^a	10.32 ^{ab}	10.14 ^b	10.74 ^{ab}	0.106
3	12.59 ^b	13.47 ^a	12.37 ^b	13.67 ^a	12.27 ^b	0.186
4	9.93 ^{bc}	11.18 ^a	9.29 ^c	10.80 ^{ab}	9.42 ^c	0.234
6	9.88 ^a	9.38 ^b	9.25 ^b	9.68 ^{ab}	9.62 ^{ab}	0.081
8	11.43 ^c	15.43 ^a	11.22 ^c	13.10 ^b	11.43 ^c	0.440

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

Crystallized cellulose인 Avicel을 분해하는 효소인 Avicelase(β -1, 4 exoglucanase) 활성은 Table 16에 나타내었다. Cellulose 중에서 가장 분해가 어려운 Avicel에 대한 활성이 모든 균에서 낮음을 알 수 있었다. H20균이 1일 배양기간에 가장 높은 활성을 나타내었으며 ($p < 0.05$), 2일째에서도 H25균이 보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었으나 활성차이는 약 7.2%로 큰 차이가 나지 않았다. 각 균들은 배양 2일부터 Avicelase의 활성이 증가하여 배양 3일째에 최고치에 도달하였으며, 배양 4일과 6일에 Avicelase 활성이 감소하였다. 그러나 배양 8일에는 다시 증가하였다.

다) Extracellular xylanase 활성

Oat spelt로부터 추출된 xylan을 기질로 하여 각 균들의 extracellular xylanase

활력을 조사하여 Table 1-2-6에 나타내었다. Xylanase의 활력은 본 시험에서 조사된 다른 종류의 다당류 분해효소들의 활력보다 월등히 높았다. 각 균들의 xylanase 활력은 배양 1일부터 배양 4일까지 증가하였으며, 배양 6일부터 감소하였다. H23균과 RF균의 경우 다른 균에 비해 xylanase 활력이 낮았다. 특히 초기 배양기간인 1일과 2일째에 상당히 낮은 활력을 보였으나, 8일째에는 다른 균의 효소활력과 큰 차이를 나타내지 않았다. H25균의 xylanase 활력이 배양 4일째 576.23 $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 가장 높았으며 본 균이 전 배양기간 동안 가장 높은 xylanase의 활력을 나타내었고 다음으로 H20균이 높은 활력을 나타내었다.

Table 1-2-6. Extracellular xylanase activities(xylose $\mu\text{mol/ml/min}$) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	218.67 ^c	324.58 ^b	35.52 ^d	347.49 ^a	22.55 ^d	37.003
2	215.51 ^c	364.25 ^b	60.16 ^d	469.71 ^a	69.02 ^d	43.488
3	248.12 ^c	427.14 ^b	127.47 ^d	520.95 ^a	133.79 ^d	42.484
4	268.09 ^c	444.73 ^b	141.43 ^d	576.23 ^a	151.07 ^d	45.648
6	154.96 ^c	206.28 ^b	141.53 ^c	255.84 ^a	147.97 ^c	12.232
8	181.05 ^b	247.73 ^a	155.10 ^c	243.54 ^a	159.83 ^c	10.944

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

라) β -D-glucosidase 활력

이당류를 단당류로 분해하는 각 균들의 β -D-glucosidase 활력을 Table 1-2-7에 나타내었다. 배양한 균들 중 H23균이 다당류분해효소의 결과와는 달리 전 배양기간 동안 가장 높은 활력을 보였으며 특히 배양 8일째 113.76 pNP $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 가장 높은 활력을 보였다. RF균의 경우 β -D-glucosidase 활력이 다른 균들에 비해 낮았으며, 배양 일에 따라 β -D-glucosidase 활력이 증가와 감소를 반복 하였으나 그 차이는 크지 않았다. H8, H20 및 H25균들도 배양 일에 따라 β -D-glucosidase 활력이 증가와 감소를 반복 하였다.

Table 1-2-7. β -D-glucosidase activities(pNP μ mol/ml/min) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	34.26	37.98	42.71	44.48	33.56	1.737
2	25.48 ^{ab}	30.61 ^{ab}	34.74 ^{ab}	37.58 ^a	19.06 ^b	2.602
3	26.88 ^b	29.42 ^{ab}	34.80 ^a	20.50 ^c	20.26 ^c	1.639
4	21.07 ^{bc}	32.06 ^{ab}	39.19 ^a	35.39 ^{ab}	15.46 ^c	3.049
6	24.25 ^b	22.58 ^b	78.01 ^a	9.99 ^c	13.69 ^c	6.631
8	54.92 ^b	56.50 ^b	113.76 ^a	41.35 ^c	38.70 ^c	7.332

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

마) β -D-xylosidase 활력

이당류인 xylobiose를 xylose로 분해하는 β -D-xylosidase 활력은 각 균들 간에 유의적인 차이는 있었지만 그 차이는 크지 않았고 활력 또한 다른 효소들에 비해 높지 않는 것으로 나타났다. H23균이 다른 균들에 비해 전 배양기간 동안 높은 경향을 보였지만 H25균도 유사한 경향을 나타내었다(Table 1-2-8).

Table 1-2-8. β -D-xylosidase activities (pNP μ mol/ml/min) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with filter paper as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	14.50 ^b	14.92 ^b	16.75 ^a	15.63 ^{ab}	15.63 ^{ab}	0.288
2	20.29	21.50	18.96	22.40	20.17	0.774
3	13.27 ^b	14.22 ^{ab}	15.05 ^{ab}	15.52 ^a	15.05 ^{ab}	0.303
4	5.86 ^b	6.42 ^b	9.26 ^a	8.33 ^a	5.93 ^b	0.427
6	9.58 ^c	9.83 ^c	16.25 ^a	12.42 ^b	13.90 ^b	0.702
8	33.07 ^b	33.01 ^b	36.78 ^a	36.53 ^a	31.78 ^b	0.620

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

반추위내에 존재하는 혐기성 섬유소 분해 박테리아 중 *Ruminococcus*

falvefaciens, *R. albus*와 *Fiberobacter succinogens*등이 가장 분해력이 높은 것으로 알려져 있는데 (Hungate, 1966; Dehority, 1993) 본 시험에서는 Holstein의 반추위에서 선발된 혐기성 박테리아중 4개의 균을 선발하였고 16S rDNA를 분석한 결과 3개균은 *R. flavefaciens*로 밝혀졌고 나머지 1개균은 *Fiberobacter succinogens*로 밝혀졌다. 본 시험의 결과 섬유소 분해력, 가스발생량, 가수분해효소의 활력 전반에 걸쳐 *R. flavefaciens* sijpesteijn(ATCC19208)보다 본 실험실에서 분리된 동일한 *R. flavefaciens*균들이 월등히 우수한 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 *Ruminococcus*속의 박테리아는 여러 가지 많은 특징이 있기 때문에 각각의 특징을 명확히 구분하기가 어려우나 대부분의 strain은 cellulose의 이용 속도가 빠르며 (Dehority, 1965), 산소에 노출되면 거의 사멸하는 특징이 있다(Ayers, 1958 a, b). 또한 Hungate(1950)와 Sijpesteijn(1951)은 반추위내에서 cellulose를 분해하는 중요한 혐기성 섬유소분해 박테리아가 *Ruminococci*속이라고 보고하였고 Bryant와 Burkey(1953a), Hungate(1957), Bryant 등(1958a,b)은 소와 면양의 반추위에서 많은 종류의 strain을 분리 및 동정하였는데 이러한 *Ruminococcus*속의 특징으로는 비운동성이고 포자를 형성하지 않고 혐기성 박테리아로 cellulose를 발효시켜 많은 양의 succinic acid를 생성한다고 하였다. Ayers(1959)는 *R. falvefaciens*의 최종 발효생성물 중 succinic acid가 중요한 발효산물이며 acetic acid, formic acid 등도 다량 생성하고 H₂, ethanol 및 lactic acid 등도 소량 생산한다고 하였다. Sijpesteijn(1951)은 *R. falvefaciens*를 순수배양 했을 때 노란색의 colony를 형성하고 사슬형태로 성장하며 cellulose 와 cellbobiose를 소화시킬 수 있는 능력이 있는 박테리아라고 하였으며 이때 cellulose 분해속도는 비교적 느리다고 하였다. 그러나 본 시험에서 사용된 H20균과 H25균은 같은 *R. falvefaciens*로 동정은 되었지만 cellulose를 분해하는 속도가 기존의 ATCC 19208균주보다 빠르고 강력한 것으로 밝혀져 앞으로 더욱 세부적인 특성연구가 필요하다. 또한 이 균들을 미생물제제로 활용한다면 우수한 반추동물용 미생물제제로 이용될 것으로 기대가 되었다. 특히 *R. falvefaciens* H20균이 섬유소분해력, 가스발생량, CMCcase 효소활력에 있어서 빠른 반응을 나타내어 조사된 균들 중 가장 우수한 것으로 나타났다.

1970년 말 이후로 *in vitro* 가스 생성량을 측정하는 방법은 조사료의 발효와 소화율을 결정하는데 이용되어왔다(Theodorou 등, 1994, 1998). 생성된 가스량은 주로 발효된 기질의 양과 생산된 VFA의 양과 molar portion에 따라 영향을 받는다 (Beuvink and Spoelstra, 1992). Rymer and Givens (2002) 등은 가스생성량 분석

법은 반추위발효의 역동적 변수를 예측하며 특히 short chain fatty acids(SCFA)의 변화를 예측할 수 있다고 하였다. 또한, Theodorou 등은(1995) 반추위 곰팡이에 있어서 누적된 발효가스의 양을 측정하는 것은 특정 기질에 대한 미생물의 성장을 정확히 측정할 수 있는 유용한 방법이라고 하였다. 비록 본 연구에서 공시된 박테리아들이 기질입자에 강력히 부착하는 균들로서 배양액의 OD값과 단백질 합성량을 측정하는 데에는 어려움이 있어 직접적인 미생물의 합성량을 분석하지 못하였지만 누적가스발생량을 보았을 때 H20균이 가장 미생물 성장이 높았다. 또한 H25균과 H23균도 다른 박테리아보다 성장률이 높았음을 알 수 있었다. 이것은 섬유소 분해율과 효소활력에서도 비슷한 경향을 보여주었다. 효소분석의 결과 공시된 박테리아들은 endoglucanase인 CMCase와 xylanase 효소의 활력은 상당히 높았지만 Avicel과 같은 결정화된 섬유소의 분해능력은 전반적으로 낮음을 알 수 있었고 단당류를 분해하는 효소들도 높지 않았다. 또한 본 연구에서는 모두 extracellular enzyme만을 분석하여 효소의 분포가 세포내 및 세포에 부착되어 있는 효소의 활력이 우수한 것으로 알려져 있는데도 불구하고 본 연구에서는 조사하지 못하였던 것은 효과적으로 기질에 부착된 박테리아를 분리시키지 못하여 cell-bound 및 intracellular enzyme의 활력은 분석을 하지 못하였다. 그러나 본 시험의 결과만으로도 H20, H23 및 H25균의 섬유소 분해력이 우수함을 효소활력으로 알 수 있었고 이들의 효소활력은 기존에 알려진 *R. flavefaciens*균보다 높음이 입증되어 앞으로의 생균제로서 반추위에 첨가되었을 때의 효과가 기대되었다.

시험 3. 선발된 혐기성 박테리아의 단독 배양이 볏짚의 분해율과 가스발생량 및 효소 분비 활력에 미치는 영향

본 시험은 각 섬유소 분해균들을 순수배양하여 그 발효특성을 조사한 것은 시험 2와 동일하지만 이들 균을 배양하는데 이용하는 기질을 볏짚으로 사용하였다는 것이 차이점이다. 볏짚을 기질로 이용한 것은 순수 cellulose로만 구성이 되어있는 filter paper를 기질로 이용시의 각 균들의 발효특성을 이해하는 것도 중요하지만 현재 국내에서 가장 많이 조사료원으로 사용되는 부존사료자원인 볏짚을 기질로 하였을 때 발효특성이 어떻게 차이가 나고 어느 균이 가장 우수한지를 알아보고자 본 시험을 수행하였다. 물론, 볏짚은 순수한 섬유소보다는 복잡한 여러 가지 polymer들로 형성되어 있고 특히 반추위 미생물들이 분해하지 못한다고 알려져 있

는 lignin이 다량 함유되어 있어 분해와 성장에 있어 순수 박테리아의 배양이 어려울 것으로 예상되었다.

가. 재료 및 방법

1) 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 공시
시험1 에서와 동일한 미생물을 공시하였다.

2) 공시기질

본 시험에서는 볏짚을 증류수로 5번 이상 세척한 후 60℃의 drying oven에서 건조시킨 후 1 mm screen을 가진 hammer mill에서 분쇄하였으며, DA medium이 19 ml 들어있는 serum bottle에 탄소원으로 볏짚을 0.08 g씩 첨가하였다.

3) 혐기성 박테리아의 배양

배지, 공시균주의 준비 및 접종 그리고 배양 방법 및 배양시간 등은 시험2에서와 동일하게 실행하였다.

4) 가스 발생량의 측정

시험2에서와 동일하게 실행하였다.

5) 가수분해 효소의 활력

다당류 및 단당류 분해효소는 2에서와 동일한 방법으로 분석하였다.

6) 통계분석

시험2에서와 동일한 방법으로 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 건물분해율

Table 20에서 보는 바와 같이 시험 2의 filter paper를 기질로 이용 시보다 현저히 낮은 분해율을 나타내고 있다. H8균이 배양 4일에 53.78%로 가장 높은 분해율

을 보였다($p < 0.05$). 그러나 이후의 배양시간에서 다른 미생물들은 분해율이 서서히 증가하여 정상적인 분해양상을 나타내었지만 H8과 H23균은 감소하는 이상적인 분해양상을 나타내어 분석오차가 있었던 것으로 생각되었다. H8균을 제외한 나머지 균들의 볏짚 분해율은 8일 배양시 32.72%에서 36.95%로 유의적인 차이가 없었으나, H8균을 제외하고 초기 배양시간대에서 높은 분해율(20.65%)를 나타내었다. H23균은 배양 4일에 41.27%의 분해를 하였으며, H8균 다음으로 높은 분해율을 보였다. 시험 2와 비교시 RF 표준균주의 초기분해율이 상당히 떨어지는 것이 유사한 결과를 보였으나, H8균주가 높은 건물분해율을 보여 특징적인 차이를 보였다. 이러한 건물분해율에서 기질에 따른 분해양상의 차이는 각 미생물들의 기질 특이성에 차이가 있다는 것을 보여 주고 있다.

Table 1-3-1. Dry matter degradation rates(%) of rice straw by pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	7.01 ^a	0.00 ^c	5.37 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.840
2	25.75 ^a	2.26 ^c	20.65 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	3.192
3	33.96 ^a	7.21 ^b	22.99 ^a	5.21 ^b	0.00 ^b	4.240
4	53.78 ^a	25.10 ^c	41.27 ^b	18.68 ^d	13.03 ^d	4.083
6	48.54 ^a	24.59 ^b	25.83 ^b	21.81 ^b	28.36 ^b	2.869
8	16.73 ^c	32.72 ^{ab}	39.52 ^a	36.95 ^{ab}	36.95 ^{ab}	2.129

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

2) 가스 발생량

Table 1-3-2. Gas production(ml/0.1g DM substrate) by pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	4.38 ^{bc}	4.12 ^{cd}	6.19 ^a	4.63 ^b	3.97 ^d	0.094
2	2.98 ^c	3.43 ^b	3.73 ^a	3.38 ^b	2.25 ^d	0.068
3	1.93 ^{cd}	2.43 ^a	1.98 ^c	1.78 ^b	2.16 ^b	0.039
4	1.37 ^b	1.34 ^b	1.18 ^c	1.22 ^c	2.61 ^a	0.083
6	0.08 ^{cd}	0.67 ^b	0.15 ^c	0.00 ^d	1.70 ^a	0.119
8	0.70 ^b	0.67 ^b	0.20 ^c	0.20 ^c	1.27 ^a	0.107

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

배양 1일에서 모든 균들의 가스 발생량이 가장 높아 1일 배양동안 미생물의 성장 및 기질의 이용이 가장 활발하였다(Table 1-3-3). 이들의 가스 발생량은 filter paper의 가스발생량보다 더 높은 경향을 보였다. 가스발생속도도 더욱 빨라 순수 cellulose인 filter paper보다는 일반적으로 NDF와 ADF함량이 60% 및 40% DM 이상인 불용성 구조탄수화물과 복합 polymer들이 많은 복잡한 구조의 벃짚이더라도 벃짚 자체의 가용성 탄수화물(NFE 44% DM; 축산연구소 2002) 등이 초기에 빠르게 분해되어 미생물들이 이용함으로써 더 높은 가스발생량을 보이고 있는 것으로 생각되었다. 이러한 특징은 배양후기에 접어들면서 가용성 탄수화물을 모두 사용함으로써 4일째 이후 그 가스발생량이 급격히 감소하는 것을 보여 filter paper를 기질로 이용시 점진적인 감소현상과 대조적으로 난분해성 물질에 의해 미생물들이 기질 이용성이 급격히 감소되었던 것으로 생각되었다. 각 미생물별 가스발생량은 H23균의 경우 6.19 ml/0.1g DM으로 가장 높았으며(p<0.05), RF균은 배양 1일에 가스발생량이 낮았으나 배양 4일부터 높아 성장속도가 다른 균들과 비교하여 가장 느린 것이 간접적으로 판단되었다. H20균은 배양 3일에 가스발생량이 2.43 ml/0.1g DM으로 높았으며, H8균은 배양 6일에 가스발생량이 0.08 ml/0.1g DM 이었으나 배양 8일에는 0.70 ml/0.1g DM으로 증가 하였다.

3) 누적 가스발생량

누적 가스발생량은 Table 1-3-3에 나타내었다. H23균은 배양 1일부터 배양 6일까지 가장 많은 가스를 발생하였으며($p < 0.05$), 배양 8일에는 감소하였다. H8, H20, H25 및 RF균의 경우 배양 1일부터 점차 증가하였다. RF균의 경우 배양 8일에 13.73 ml/0.1g DM으로 가장 높은 누적 가스발생량을 보였다. 누적 가스발생량 또한 filter paper 기질이용시 보다 볏짚이용시 더욱 높은 가스발생량을 보이고 있다. 이것은 초기 배양시 가용성 탄수화물의 이용 속도가 빨라 초기에 많은 량의 가스를 발생시킴으로써 Table 14에서와 같이 비록 분해율은 낮지만 가스발생량은 높았던 것으로 생각된다.

Table 1-3-3. Cumulative gas production (ml/0.1g DM substrate) by pure cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cow and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	4.38 ^{bc}	4.12 ^{cd}	6.19 ^a	4.63 ^b	3.97 ^d	0.094
2	7.34 ^c	7.52 ^{bc}	9.39 ^a	7.97 ^b	6.29 ^d	0.156
3	9.34 ^b	9.89 ^b	11.85 ^a	9.69 ^b	8.35 ^c	0.177
4	10.48 ^b	10.90 ^b	12.83 ^a	10.89 ^b	10.91 ^b	0.149
6	10.47 ^d	11.53 ^c	13.00 ^a	11.13 ^c	12.47 ^b	0.182
8	11.00 ^c	12.10 ^b	12.77 ^b	11.20 ^c	13.73 ^a	0.283

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

4) 가수분해효소 활력조사

가) Extracellular CMCase 활력

CMCase 활력은 Table 1-3-4에 나타내었다. 모든 균이 배양 4일까지 효소의 활력이 점진적으로 증가한 후 정점에 도달하였으며 6일째부터는 서서히 감소하는 양상을 나타내었다. H20, H23 및 H25균들은 배양 2일째 가장 급진적으로 CMCase 효소의 활력이 증가하여 빠른 증가속도를 보인 반면 H8균과 RF균의 경우는 그 증가속도가 늦음을 알 수 있었다. 1일째 배양시 H23균이 가장 높은

CMCase 활성을 나타냈으며($p < 0.05$), 2 및 3일째에는 H20과 H23 및 H25균이 다른 균보다 유의적으로 높은($p < 0.05$) 효소활성을 나타냈다. 이러한 효소활성 특성은 가스발생량과 유사한 양상을 보이고 있다. H20균이 다른 균들에 비하여 CMCase 활성이 배양 4일에 전 기간 중 50.74 $\mu\text{mol/ml/min}$ 로 가장 높았으나 H23균과 H25균의 효소활성은 동일 기간동안에 유의적인 차이는 없었다.

RF균의 경우 다른 균들에 비해 배양 3일까지 CMCase 활성이 낮았으나 배양 4일에 큰 폭으로 증가하였다. 각 균들은 배양 1일부터 CMCase 활성이 증가하다가 배양 4일 이 후에 감소하는 것을 볼 수 있다. 6일 및 8일 배양기간에는 H20균이 다른 균에 비해 가장 높은 CMCase 효소활성을 나타내어 CMCase 효소활성에 있어 H20균이 볏짚을 기질로 이용시 가장 우수한 균으로 판단되었다

Table 1-3-4. Extracellular CMCase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw paper as a carbohydrate source

Incubation Time (Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	15.04 ^d	24.90 ^b	30.20 ^a	18.27 ^c	7.32 ^e	2.130
2	25.60 ^b	47.16 ^a	44.65 ^a	43.74 ^a	11.73 ^c	3.753
3	35.26 ^b	51.84 ^a	50.04 ^a	49.12 ^a	29.95 ^b	2.427
4	46.00 ^c	57.95 ^a	54.72 ^{ab}	52.05 ^{abc}	48.79 ^{bc}	1.345
6	42.49 ^b	50.74 ^a	43.30 ^b	46.04 ^b	44.22 ^b	0.943
8	37.69 ^{bc}	48.28 ^a	36.61 ^c	40.83 ^{bc}	44.07 ^{ab}	1.385

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ($p < 0.05$).

나) Extracellular Avicelase 활성

Table 1-3-5. Avicelase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	9.61 ^c	12.64 ^b	14.63 ^a	12.19 ^b	10.38 ^c	0.487
2	12.14 ^{bc}	15.71 ^a	17.41 ^a	14.80 ^{ab}	11.44 ^c	0.702
3	13.05 ^c	16.93 ^{ab}	17.94 ^a	14.59 ^{bc}	11.63 ^c	0.723
4	14.71 ^b	19.42 ^a	20.10 ^a	15.78 ^b	10.91 ^c	0.909
6	16.73 ^{bc}	18.50 ^{ab}	20.42 ^a	16.04 ^{cd}	14.12 ^d	0.637
8	14.92 ^b	22.13 ^a	19.47 ^{ab}	24.25 ^a	16.32 ^b	1.107

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

Avicelase 활력은 Table 1-3-4에 나타내었다. 전반적인 Avicelase의 활력은 filter paper 기질 이용시와 비교 했을 때 약간 높게 측정되어 난분해성 기질에 미생물들이 적응하기 위해 Avicelase의 분비량이 증가되어 더 높은 활력이 측정된 것으로 생각 되었다. 전체적으로 H23균이 모든 배양시간대에서 가장 높은 활력을 나타내었고 H25균이 배양 8일째 24.25 $\mu\text{mol/ml/min}$ 의 활력을 나타내어 가장 높았으나, H20과 H25균의 활력과는 유의적인 차이는 있지 않았다(P>0.05).

다) Extracellular xylanase 활력

벧짚을 기질로하여 순수 배양시 미생물들의 세포외 xylanase 활력을 Table 27에 나타내었다. H25균의 xylanase 활력이 배양 3일째 까지 가장 높았으며, 배양 6일째 전 배양기간 중 360.48 $\mu\text{mol/ml/min}$ 로 RF균을 제외하고 가장 높았으나 (p<0.05) 331.47 $\mu\text{mol/ml/min}$ 인 RF균과 유의적인 차이는 없었다. RF균의 경우 배양 3일째 xylanase 활력이 크게 증가하였으며 배양 8일째 감소하는 것을 볼 수 있어 성장속도나 활력의 증가속도가 느림을 다시 한번 확인할 수 있었다. 그러나 RF균이 4일부터 xylanase activity가 H25를 제외하고는 유의적으로 높았다. H20균 또한 xylanase 활력이 배양 6일까지 증가하였으며 배양 8일째 감소하였다. 다당류 분해효소들 중 본 시험에서 조사된 세 가지 효소들을 비교하였을 때 시험1과 유사하게 H20, H23 및 H25균들에서 가장 우수함을 알 수 있었다. 특히 H20균은 CMCcase, H23균은 Avicelase 그리고 H25균은 xylanase에서 다른 균들

에 비해 우수하였다.

Table 1-3-6. Extracellular xylanase activities(xylose $\mu\text{mol/ml/min}$) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	41.87 ^c	81.18 ^b	75.05 ^b	128.99 ^a	12.30 ^d	10.550
2	79.03 ^c	127.72 ^b	98.13 ^c	183.28 ^a	21.72 ^d	15.511
3	154.05 ^{bc}	166.59 ^b	133.01 ^c	321.20 ^a	152.86 ^{bc}	18.216
4	147.00 ^b	164.91 ^b	145.08 ^b	224.58 ^a	220.25 ^a	9.991
6	223.16 ^{bc}	251.65 ^b	185.88 ^c	360.48 ^a	331.47 ^a	18.698
8	219.08 ^b	225.51 ^b	160.98 ^c	266.81 ^a	268.77 ^a	11.109

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-12.

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

라) β -D-glucosidase 활력

β -D-glucosidase 활력은 Table 1-3-7에 나타내었으며 배양 2 및 4일째의 자료는 분석시의 오차에 의해 결과를 도출하지 못하였다. 배양 3일까지 그리고 8일째 모든 미생물에서 효소활력이 유의적인 차이가 없었다. 배양 6일시 H20균의 효소활력이 H8균보다 유의적으로 높았으나 ($p < 0.05$) 다른 비교 미생물들과의 차이는 없었다.

Table 1-3-7. β -D-glucosidase activities(pNP μ mol/ml/min) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	12.49	13.97	16.57	18.17	12.45	1.037
3	9.29	8.35	8.11	6.04	5.98	0.581
6	29.59 ^b	31.71 ^{ab}	34.49 ^a	32.78 ^{ab}	31.95 ^{ab}	0.583
8	7.92	6.05	10.04	9.49	13.72	1.111

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

마) β -D-xylosidase 활력

β -D-xylosidase 활력은 Table 1-3-8에 나타내었다. 배양 1일째에는 각 균들 간에 유의적 차이가 없었다. H23균의 경우 배양 2일째 β -D-xylosidase 활력이 39.68 pNP μ mol/ml/min로 가장 높았으며, H8균이 배양 4일째 7.78pNP μ mol/ml/min로 β -D-xylosidase 활력이 가장 낮았으나 H20, H25 및 RF균과의 유의적 차이는 없었다. 단당류 분해 효소의 경우 H8균이 전체 배양기간 동안 가장 낮았고 다당류와는 달리 H23균이 가장 높았으나 H8균을 제외한 균들과 비교시 큰 차이가 없었으며 특징적으로 RF균이 단당류분해효소가 다른 균들과 유사하게 나타났다.

Table 1-3-8. β -D-xylosidase activities(pNP μ mol/ml/min) of pure cultured cellulolytic bacteria isolated from the rumen of Holstein cows and cultured with DA medium¹ with rice straw as a carbohydrate source

Incubation Time(Day)	H8	H20	H23	H25	RF	SEM
1	31.88	33.77	38.38	38.44	32.71	1.649
2	27.78 ^b	30.84 ^b	39.68 ^a	33.73 ^{ab}	30.04 ^b	1.311
3	13.60 ^b	14.92 ^{ab}	19.66 ^a	11.96 ^b	15.87 ^{ab}	0.924
4	7.78 ^b	9.01 ^b	17.04 ^a	7.90 ^b	8.39 ^b	0.971
6	31.04 ^{ab}	26.31 ^{ab}	33.88 ^a	25.84 ^b	27.14 ^{ab}	1.200
8	12.56 ^{ab}	10.72 ^{ab}	18.19 ^a	8.46 ^b	10.51 ^{ab}	1.335

¹ DA, H8, H23, H20, H25 and RF : Same as in Table 1-1-12.

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

대부분의 짚류에 있어서 절간의 목질화된 조직은 대부분 바깥쪽에 존재하기 때문에 미생물의 분해에 대한 저항성이 매우 높으며, 따라서 절간의 소화는 주로 내강(lumen)이나 조직의 손상부위를 통해 일어난다. 반면에 잎의 경우에는 목질화된 조직이 서로 분리되어 있기 때문에 미생물에 의한 사부조직의 분해가 보다 쉽게 일어난다. 짚류의 마디는 절간에 비해 미생물에 의한 분해가 더 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있으며(Haper와 Lynch, 1981), 벚짚의 경우에는 다른 짚류와는 달리 줄기가 잎에 비하여 소화율이 높다 (Jackson, 1978b). 짚류의 영양적 특성은 가용성 탄수화물과 단백질의 함량은 매우 낮는데 비하여 목질화된 세포벽 함량은 매우 높은데 있다. Han과 Garrett (1986)는 짚류 등의 작물 부산물의 영양 가치를 알팔파 건초에 비해 저질조사료는 조단백질, 칼슘, 카로틴, 가소화에너지, 대사에너지 및 정미에너지의 함량이 낮는데 비하여, 세포막구성성분 중 리그닌과 실리카의 함량은 높다고 하였다. Jackson (1978)은 벚짚의 실리카 함량은 12~16%로서 다른 짚류의 3~5%에 비해 높으며, 반면에 리그닌의 함량은 6~7%로서 다른 짚류의 10~12%에 비해 다소 낮다고 보고하였다. 리그닌은 섬유소의 소화율을 낮추는 가장 일반적인 요인으로 알려져 있으며 (Gould, 1984), 실리카도 반추위내에서의 섬유소 분해율과 부(-)의 상관관계를 갖는 것으로 보고되어 있다 (Van Soest와 Jones, 1968; Vans Soest, 1970).

식물체의 세포벽은 보통 제1기 세포벽(primary cell wall), 제2기세포벽(secondary cell wall) 및 세포와 세포사이의 중간막(middle lamella) 등의 3부분

으로 구분된다. 제1기 세포벽은 두께가 얇으며 식물체의 성장시에 형성되는데, 느슨하게 결합된 cellulose가 펙틴, hemicellulose, 구조성 단백질 및 히드록시프롤린(hydroxyproline)등과 함께 함유되어 있다 (Albersheim, 1975; Darvill 등, 1980). 세포벽의 비대기에 cellulose와 hemicellulose가 제1기 세포벽의 안쪽에 축적되어 제2기 세포벽을 형성하게 되는데, 리그닌은 제1기 세포벽의 구석에서 형성되기 시작하여 제2기 세포벽으로 점차 확산되며, 비대기의 말기에 특히 리그닌 형성은 현저하게 증가되며(Theander와 Åman, 1984) 세포벽의 목질화가 끝나게 되면 그 식물체 세포는 죽게 된다. 질류의 경우에는 제2기 세포벽이 세포벽 물질의 대부분을 차지하고 있다.

세포벽 성분 중 xylan과 cellulose는 그 구조에 있어서 6번 탄소에 xylan의 경우는 H가 결합되어 있는 반면에, cellulose의 경우에는 CH₂OH가 결합되어 있는 것을 제외하고는 기본적인 사슬은 glycosidic linkage로서 동일하기 때문에 식물체의 세포벽에 있어서 xylan도 cellulose와 수소결합을 형성할 수 있다(Theander와 Åman, 1984).

리그닌은 세포벽에 쌓여 표피를 형성하고 헤미셀룰로스와 공유결합을 하므로 리그닌-탄수화물 결합체 (ligno-carbohydrate complexes)를 형성하게 된다. 리그닌은 에테르결합(ether bond)을 통해 당잔기와 결합하며, 에스테르결합(ester bond)을 통해 유론산 잔기와 결합한다(Eriksson 등, 1980). 페놀산 단량체인 trans-ferulic acid와 trans-p-coumaric acid는 질류의 세포벽 물질과 에스테르결합을 하고 있다(Higuchi 등, 1967; Hartley, 1973; 1981; Theander 등, 1981). Ferulic acid는 비탄수화물 복합체인 리그닌(Higuchi, 1967)이나 suberin(Riley와 Kolattukudy, 1975)과 에스테르결합을 형성하며, p-coumaric acid도 리그닌(Nakamura와 Higuchi, 1978; Nimz 등, 1981), 큐틴(Kolattukudy 등, 1981) 및 탄수화물(Hartley 등, 1976) 등과 에스테르결합을 하고 있다. 큐틴과 suberin은 식물체의 세포벽내에서 탄수화물과 결합되어 있는데(Kolattukudy 등, 1981), 식물체 표피의 큐틴막은 식물체 내부조직으로의 미생물의 침투를 방해는 장애물로서 작용하며(Monson 등, 1972; Akin, 1989), 실리카가 혼입되어 존재하는 경우에는 미생물에 의한 큐틴막의 분해는 더욱 어렵게 된다(Harbers 등, 1981). 그리고 큐틴막은 반추위내에서 미생물들에 의해 분해가 되지 않음이 전자현미경적인 관찰을 통해 확인되었다 (Brazle과 Harbers, 1977; Harbers 등, 1981; Akin과 Benner, 1988). 그러나 반추위내의 일부 혐기성 곰팡이의 경우에는 큐틴막을 파괴

(penetration)한다는 보고도 있다(Ho 등, 1988). 큐틴의 에스테르 결합은 일부 병원성 곰팡이(Kolattukudy, 1980)나 호기성 박테리아(Sebastian과 Kolattukudy, 1988)에 의해 분해되는 것으로 알려져 있으나 반추위내의 박테리아에 의해 분해된다는 보고는 없다.

짚류의 조직 중 미생물에 의해 분해되기 어려운 조직으로 표피 이외에도 후막 조직(Spencer와 Akin, 1980; Harbers 등, 1982; Myung 등, 1987; Grenet, 1991)과 유관속 조직(Akin, 1979; Spencer와 Akin, 1980; Harbers 등, 1982; Myung 등, 1987; Grenet, 1991) 등이 있으며, 사부조직 (Akin, 1979; Spencer와 Akin, 1980; Grenet, 1991)과 유조직 (Akin, 1979; Spencer와 Akin, 1980; Myung 등, 1987; Grenet, 1991)등은 반추위내 미생물들에 의해 비교적 쉽게 분해된다. 식물체 조직의 분해에 있어서 반추위내 미생물들에 의해 비교적 쉽게 분해된다. 식물체 조직의 분해에 있어서 반추위내의 곰팡이는 박테리아가 분해할 수 없는 목질화된 조직을 선호하여 분해시킨다는 보고도 있다(Grenet과 Barry, 1988; Grenet 등, 1989b).

이상 벚짚의 특성에서 보았듯이 단순히 cellulose만으로 구성되어 있는 filter paper와는 달리 벚짚은 본 시험에서 이용된 순수 균들도 그 이용성에 있어서 상당히 어려움이 있었던 것으로 생각된다. 김 과 이(2003)는 일반적으로 벚짚과 filter paper간의 혼합 반추위 미생물에 의한 *in vitro* 분해율을 보면 filter paper가 분해율이 높는데 이러한 것은 filter paper가 순수 cellulose로 구성이 되어있고 그 반면 벚짚은 다양한 구조탄수화물들 (lignin, hemicellulose, cellulose 및 pectin 등)과 벚짚의 외피가 silica와 큐틴 등으로 덮여있기 때문에 filter paper에 비하여 반추위 미생물들이 분해가 용이하지 못하다고 하였다. 그러나 본 시험에서 초반배양시에 높은 가스발생량 등은 가용성 탄수화물을 이용한 것과 함께 Cheng 등(1980, 1983, 1984)이 설명한 것과 같이 박테리아가 식물표피 조직 중 기공을 통하여 조직내부로 침투할 수 있기 때문에 본 실험에서 벚짚을 1 mm size로 분쇄하여 물리적으로 분해가 되어 박테리아가 영양분이 풍부한 식물내로 용이하게 부착할 수 있었던 것도 하나의 원인인 것으로 생각되었다.

본 시험에서도 각 공시균주들의 건물분해율과 효소활력을 비교한 결과 H20, H23 및 H25균가 비록 각 조사항목에서 약간의 차이는 있었지만 표준균주인 *R. falavofaciens* Sijpesteijn(ATCC 19208)보다 벚짚을 기질로 이용시 우수한 활력을 나타내어 이들을 미생물제제로 활용시 그 효과가 기대되었다.

2. *In Vitro* 시험을 통한 분리 미생물의 사용 조건 규명 및 최종 생균제의 개발

시험 1. 선발 혐기성 박테리아의 혼합 배양이 filter paper의 건물 분해율, 가스발생량 및 효소 활력에 미치는 영향 I

단독배양을 통해 분해율과 효소 활력이 우수한 균들을 선발하였으며, 선발된 균들을 혼합하여 가장 우수한 미생물 그룹을 선발하여 최종 생균제로 사용하기 위해 본 시험을 수행하였다. 시험 2와 3의 순수배양에서 도출된 자료를 근거로 H20균과 H23균을 선발하였고 여기에 ATCC균주인 RF균과 *Ruminococcus albus*(ATCC 27211)균을 혼합하여 가장 적합한 혼합그룹을 선발하고자 건물분해율, 가스발생량, 가수분해효소활력 및 배양액내 단백질량을 분석하였다.

가. 재료 및 방법

1) 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 공시

시험 2와 시험 3에서 기질 분해율과 효소 활력이 높은 H20과 H23균을 선발하여 공시하였고, 표준균주인 RF균과 *Ruminococcus albus* Hungate (RA, ATCC27211)를 공시하였다.

2) 사용배지 및 공시기질

DA medium이 19ml 들어있는 serum bottle에 탄소원으로 filter paper disk(Whatman No.1, Whatman, England)를 원물기준 약 0.1g씩 첨가하였다.

3) 공시균주의 혼합 및 접종

접종용으로 이용될 각 공시균주는 DA medium에 cellobiose를 탄소원으로 하는 배지에서 24시간 배양한 후 H20, H23, RF 및 RA균을 RA-RF-H20-H23, RF-H20-H23, RF-H20-RA, RF-H23-RA 및 RA-H20-H23 등 5개 처리구로하여 각각의 균들의 배양액을 혐기를 유지하면서 멸균된 50ml bottle에 각 10ml씩의 동일량을 첨가하고 혼합하여 각 그룹의 접종균으로 이용하였다. 이용될 H20, H23,

RF 및 RA균들의 균수는 각각 0.23×10^8 , 0.93×10^8 , 2.4×10^8 및 0.91×10^6 cfu/ml이었다. 이들 균들의 배양액을 동일량 혼합한 후 각 처리구별로 접종량은 전체 1ml이 되도록 혐기상태를 유지하면서 본 시험용 serum bottle에 접종하였다.

4) 배양 방법 및 배양시간

혐기상태를 유지하며, 39°C incubator에서 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 8일 동안 교반 없이 배양하였으며 각 조사시간대별로 시료채취 및 각 시험을 수행하였다.

5) 건물 분해율의 측정

배양이 완료된 serum bottle을 개봉하여 상층액을 회수한 후 시험 2와 동일한 방법으로 건물분해율을 측정하였다.

6) 가스 발생량의 측정

시험 2와 동일하게 실행하였다.

7) 가수분해 효소의 활력

조효소액의 채취, 다당류 분해효소와 단당류 분해효소 또한 시험 2와 동일한 방법으로 분석하였다.

8) 미생물 혼합 배양에 의한 단백질 생산량 측정

각 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 8일 배양한 bottle에서 상층액을 채취하여 조효소액의 시료채취와 동일한 방법으로 시료를 채취하여 배양액내 단백질량을 측정하기 위한 시료로 이용하였다. 단백질 생산량 측정은 Bradford법(Bradford, 1976)에 따라 bovine serum albumin(Bio-Rad Protein Assay Standard II Cat NO. 500-0007, Bio-Rad Laboratories, USA) 1.40 mg/ml에 증류수 20ml을 넣어 0.05mg/ml 용액을 제조한 후 2, 3, 4 및 5배 희석을 하여 standard solution을 제조하였다. Bio-Rad Protein Assay system(NO.500-0006, Bio-Rad Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories, USA)은 3차 증류수와 1대 4로 혼합 제조하여, microwell plate의 각 well에 각각의 standard solution과 14,000rpm에서 5분 동안 원심 분리한 sample 각 10 μ l, dye reagent 200 μ l 넣어 혼합한 후 실온에서 5분간 배양한 뒤 595nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 단

백질량은 $\mu\text{g/ml}$ 로 환산하였다.

9) 통계분석

시험2와 동일한 방법으로 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 건물분해율

Filter paper를 탄수화물원 기질로 이용 시 각 균들의 혼합배양에 따른 건물분해율은 Table 2-1-1에 나타내었다. 배양 1일부터 배양 3일까지 RF-H20-H23 그룹이 가장 높은 건물분해율을 보였으나, 배양 4일부터 배양 8일까지는 RA-RF-H20-H23 그룹이 가장 높은 분해율을 보였다($p < 0.05$). RF-H20-RA 그룹의 경우 배양 초기부터 분해율이 낮았으며 배양 8일째 10.68%로 분해율이 가장 높은 RA-RF-H20-H23 그룹과 75.28%의 건물분해율 차이를 보여 거의 분해를 하지 못한 것으로 나타났다. 혼합균들의 건물분해율 결과 초기시간에 강력한 상호작용을 보인 경우는 RF-H20-H23 그룹이었고 시간이 지나면서 점진적으로 분해율이 높아진 것은 RA-RF-H20-H23과 RF-H23-RA 그룹이었다. 그와 반대로 두 *R. falvefaciens*균과 *R. albus*균으로 혼합된 RF-H20-RA 그룹의 경우는 상호 강력한 길항작용을 보인 것으로 판단된다. 본 시험의 결과와 시험 1의 순수배양시와 직접적 비교는 어렵겠지만 수치적으로 판단하였을 때 순수배양시 filter paper의 분해율은 60% 수준이었던 반면 본 시험3에서의 결과 80% 정도의 높은 건물 분해율을 보임으로 순수 배양시보다 혼합배양한 일부의 그룹에서는 상호 상승작용이 있음을 알 수 있었다.

Table 2-1-1. Dry matter degradation rates(%) of filter paper by co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	2.80 ^c	12.71 ^a	1.26 ^d	1.60 ^d	5.57 ^b	1.503
2	24.28 ^c	48.69 ^a	2.22 ^d	24.68 ^c	36.26 ^b	4.022
3	54.88 ^b	66.02 ^a	2.60 ^d	43.08 ^c	55.81 ^b	5.952
4	77.68 ^a	73.77 ^b	7.91 ^d	65.93 ^c	70.39 ^b	6.938
6	82.14 ^a	76.42 ^{bc}	7.74 ^d	79.13 ^{ab}	71.45 ^c	7.518
8	85.96 ^a	79.47 ^b	10.68 ^d	83.29 ^{ab}	72.20 ^c	7.558

H23 : *Fibrobacter succinogenes* H23

H20 : *Ruminococcus flavefaciens* H20

RF : *Ruminococcus flavefaciens* Sijpesteijn (ATCC 19208)

RA : *Ruminococcus albus* (ATCC 27211)

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

2) 가스발생량

Table 2-1-2. Gas production(ml/0.1g DM substrate) by co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	3.12 ^b	4.84 ^a	2.56 ^d	2.87 ^c	3.39 ^b	0.095
2	5.07 ^b	7.94 ^a	1.44 ^d	3.98 ^c	5.07 ^b	0.245
3	6.52 ^a	5.63 ^b	1.08 ^e	4.76 ^d	5.38 ^c	0.247
4	4.63 ^a	3.51 ^c	1.01 ^d	4.72 ^a	3.77 ^b	0.203
6	2.75 ^b	2.75 ^b	1.03 ^d	3.98 ^a	2.12 ^c	0.179
8	1.17 ^c	1.43 ^b	0.70 ^d	2.07 ^a	0.83 ^d	0.131

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

Table 2-1-2에 나타낸 것과 같이 가스발생량은 배양 1일과 배양 2일째에서

RF-H20-H23 그룹이 가장 높았으며($p < 0.05$), 배양 3일과 배양 4일째는 RA-RF-H20-H23 그룹이 가장 높았다($p < 0.05$). 배양 4일째의 경우 RF-H23-RA 그룹의 가스발생량은 RA-RF-H20-H23 그룹과 유의적으로 차이가 없었다. RA-H20-H23 그룹의 경우 배양 2일부터 배양 3일까지 많은 가스를 발생하였으며 배양 4일부터 가스발생량이 감소하였다. RF-H20-RA 그룹은 배양 초기부터 가스발생량이 낮았으며 배양 기간동안 다른 혼합군들에 비해 가장 낮은 가스발생량을 보였다. 이것으로 보아 가스발생량도 건물분해율과 유사하게 RF-H20-RA 그룹이 낮은 것으로 나타나 미생물의 활력이 거의 없음을 간접적으로 나타내었다. 가스발생량에서도 분해율의 결과와 유사하게 RF-H20-RA 그룹에서 가장 상호억제효과가 있었고, RF-H23-RA 그룹에서도 다른 혼합군과 비교 시 초반 배양시간 동안 억제효과가 있었다. 반면에 RF-H20-H23 그룹은 초반에 상호 상승작용으로 가스발생량이 가장 높았고 최고 7.94 ml/0.1g DM까지 높은 가스발생량을 보였고 RA-RF-H20-H23 그룹군도 후반배양 기간동안 높은 가스발생량을 나타내었다.

3) 누적 가스발생량

Table 2-1-3 Cumulative gas production(ml/0.1g DM substrate) by co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	3.12 ^{bc}	4.84 ^a	2.56 ^d	2.87 ^c	3.39 ^b	0.095
2	8.15 ^b	12.78 ^a	3.98 ^d	6.86 ^c	8.37 ^b	0.336
3	14.65 ^b	18.43 ^a	5.20 ^e	11.63 ^d	13.65 ^c	0.572
4	19.31 ^b	21.81 ^a	6.13 ^e	16.37 ^d	17.22 ^c	0.813
6	22.22 ^b	24.57 ^a	7.22 ^e	20.53 ^c	19.22 ^d	1.128
8	23.10 ^b	26.40 ^a	7.83 ^d	22.97 ^b	20.07 ^c	1.732

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ($p < 0.05$).

누적 가스발생량은(Table 2-1-3) RF-H20-H23 그룹이 배양 1일부터 전 배양기

간 동안 가장 많은 발효가스를 발생시켰다($p < 0.05$). 다음으로 RA-RF-H20-H23 그룹이 배양 2일째부터 많은 가스발생량을 보였으며 RA-H20-H23 그룹의 경우 배양 3일에서 배양 4일까지는 RF-H23-RA 그룹보다 가스발생량이 많았으나 배양 6일부터 배양 8일째에는 RF-H23-RA 그룹의 가스발생량이 높았다. RF-H20-RA 그룹의 경우 다른 혼합균들에 비해 누적 가스발생량이 낮았으며 앞에서 조사된 건물분해율과 가스발생량과 같은 양상이었다.

4) 가수분해효소 활력조사

가) Extracellular CMCase 활력

Filter paper를 기질로 하여 혼합배양 된 각 혼합균의 배양액 상층액에 존재하는 CMCase의 활력을 Table 31에 나타내었다. 배양 1일부터 배양 2일까지 RF-H20-H23 그룹의 CMCase 활력이 가장 높았으며 배양 2일부터 배양 3일까지는 RA-RF-H20-H23 그룹의 활력이 가장 높았지만 RA-H20-H23 그룹은 2일 및 3일 배양시 유의적인 차이가 없이 높은 효소활력을 나타내었다. 배양 6일부터 배양 8일까지 CMCase 활력은 RF-H23-RA 그룹이 가장 높았으며 배양 6일째 122.90 $\mu\text{mol/ml/min}$ 로 본 시험에서 가장 높은 CMCase 활력을 보였다. 그러나 6일째의 이러한 측정치는 RA-RF-H20-H23 그룹과는 유의적으로 차이가 없었다. RF-H20-RA 그룹의 경우 배양 전 배양기간 동안 다른 혼합균과 비교하여 낮은 CMCase 활력을 보였다.

Table 2-1-4. Extracellular CMCase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time (Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	39.19 ^e	55.00 ^a	42.12 ^d	45.06 ^c	49.13 ^b	1.486
2	75.41 ^b	84.77 ^a	54.47 ^c	76.24 ^b	84.84 ^a	3.091
3	106.97 ^a	102.74 ^b	64.79 ^d	95.85 ^c	104.90 ^a	4.174
4	114.94 ^a	103.07 ^b	64.83 ^d	98.34 ^c	99.66 ^{bc}	4.499
6	121.68 ^{ab}	117.89 ^{bc}	71.61 ^d	122.90 ^a	113.63 ^c	5.170
8	114.80 ^b	114.77 ^b	73.45 ^c	122.57 ^a	112.64 ^b	4.677

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

나) Extracellular Avicelase 활력

Table 32에서처럼 Avicelase 활력은 배양 1일부터 전 배양기간 동안 RF-H20-H23 그룹이 가장 높은 활력을 나타내었으며 ($p < 0.05$), 다른 혼합균과 비교시 배양 2일째에 효소의 급속한 증가를 보여 초기 배양에 높은 활력을 보였다. 배양 3일부터 배양 6일까지 RA-RF-H20-H23 그룹, RF-H23-RA 그룹 및 RA-H20-H23 그룹은 유의적으로 차이가 없었다. RF-H20-RA 그룹의 경우 가장 낮은 Avicelase 활력을 나타내었으며 앞에서 조사된 CMCase 활력과 비슷한 양상을 보였다.

Table 2-1-5. Extracellular Avicelase activities (glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	11.05 ^b	12.44 ^a	10.63 ^b	11.32 ^b	11.08 ^b	0.188
2	17.20 ^c	31.11 ^a	12.01 ^e	15.03 ^d	18.23 ^b	1.755
3	25.90 ^b	41.05 ^a	14.22 ^c	26.37 ^b	25.41 ^b	2.338
4	23.58 ^b	37.95 ^a	11.01 ^c	21.21 ^b	21.92 ^b	2.348
6	25.41 ^b	41.36 ^a	13.70 ^c	26.04 ^b	25.47 ^b	2.405
8	18.05 ^b	24.88 ^a	12.67 ^d	18.72 ^b	15.36 ^c	1.107

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ($p < 0.05$).

다) Extracellular xylanase 활력

RF-H20-H23 그룹에 xylanase의 활력은 다른 효소들과 같은 양상으로 배양초기 높은 활력을 보이고 있고 또한 배양 3일째까지 다른 혼합균과 비교하여 가장 높은 활력을 나타내었다. 특히 1일째의 효소활력은 다른 혼합균들에 비하여 2배 이상의 높은 활력으로 단기간 배양에서 이들 혼합균이 섬유소 이용 등에 있어서 가장 효과적인 혼합그룹으로 기대되었다(Table 33). 모든 혼합그룹에서 효소의 활력 증가 양상은 4일째 배양에서 최고에 달하였고 그 이후의 배양기간 동안은 약간의 증가만 일어났다. RF-H20-RA 그룹의 경우 초기배양 기간부터 다른 혼

합균들에 비하여 가장 낮은 효소 활성을 나타내었다.

Table 2-1-6. Extracellular xylanase activities (xylose $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-R A	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	74.14 ^c	155.51 ^a	66.75 ^d	75.49 ^c	83.71 ^b	8.764
2	156.49 ^c	227.65 ^a	89.93 ^d	149.87 ^c	179.08 ^b	11.978
3	227.26 ^b	249.90 ^a	115.58 ^d	188.30 ^c	234.01 ^b	12.927
4	298.12 ^a	301.87 ^a	111.29 ^c	203.69 ^b	212.21 ^b	18.938
6	324.34 ^a	314.92 ^{ab}	103.73 ^d	302.93 ^b	261.75 ^c	21.974
8	344.22 ^a	290.20 ^b	110.50 ^d	277.51 ^b	225.37 ^c	21.476

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

라) β -D-glucosidase 활성

Table 34에서 보는바와 같이 배양 1일에는 각 처리간 β -D-glucosidase 활성이 유의적으로 차이가 없었다. 다당류 분해효소와는 달리 RA-H20-RA균과 RA-RF-H20-H23균이 다른 미생물 혼합균에 비하여 월등히 높은 β -D-glucosidase 활성을 보였다. RF-H20-H23균과 RF-H23-RA균은 배양 기간 동안 유의적으로 비슷한 활성을 보였으나 배양 8일째에 RF-H20-H23균이 RF-H20-RA균에 비해 $9.19 \mu\text{mol/ml/min}$ 높았다.

Table 2-1-7. β -D-glucosidase activities(pNP $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	2.98	4.18	4.44	4.13	4.60	0.305
2	16.82 ^b	12.24 ^c	12.96 ^c	17.85 ^b	25.41 ^a	1.326
3	52.26 ^a	15.50 ^c	14.06 ^c	31.24 ^b	53.57 ^a	4.968
4	76.55 ^a	11.40 ^c	10.10 ^c	41.14 ^b	82.05 ^a	8.546
6	93.20 ^a	13.08 ^c	6.93 ^c	71.04 ^b	73.49 ^b	9.426
8	81.48 ^a	13.18 ^c	4.03 ^d	55.50 ^b	57.19 ^b	7.820

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

마) β -D-xylosidase 활력

각 혼합균들은 배양 2일째에 β -D-xylosidase 활력이 가장 높았다 (Table 2-1-8). 배양 2일째부터 배양 4일까지 RA-H20-H23균의 β -D-xylosidase 활력이 가장 높았으며 배양 2일째는 27.47 pNP μ mol/ml/min 효소 활력이 가장 높았다. 배양 4일부터 배양 8일까지는 RA-RF-H20-H23균이 가장 높은 활력을 보였으며, 배양 8일째는 24.31 μ mol/ml/min 다른 혼합균들에 비해 가장 높은 β -D-xylosidase 활력을 나타냈다.

Table 2-1-8. β -D-xylosidase activities(pNP μ mol/ml/min) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	5.73 ^{ab}	5.67 ^{ab}	6.04 ^a	5.67 ^{ab}	4.47 ^b	0.223
2	26.97 ^{ab}	24.44 ^b	25.09 ^{ab}	25.93 ^{ab}	27.47 ^a	0.446
3	15.40 ^{bc}	10.93 ^c	13.12 ^{bc}	17.39 ^b	24.39 ^a	1.333
4	20.88 ^a	9.77 ^b	9.78 ^b	18.36 ^a	25.05 ^a	1.861
6	19.95 ^a	6.33 ^c	8.30 ^{bc}	14.39 ^{ab}	10.71 ^{bc}	1.485
8	24.31 ^a	8.70 ^b	8.38 ^b	13.99 ^b	11.28 ^b	1.798

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

5) 배양액 내 총단백질량 생성량

혼합배양시 미생물 등이 분비하는 효소 등의 단백질 함량을 분석하기 위해 배양액 상층액의 단백질함량을 조사하였다. 배양 1일째에 RA-H20-H23균의 혼합배양이 가장 높은 단백질 생산량을 나타내었고 배양 2일째에는 본 혼합균과 함께 RF-H20-H23균들도 가장 높은 단백질 생산량을 나타내었다(p<0.05). 3일째부터 마지막 배양일 까지 RA-H20-H23균과 RA-RF-H20-H23 혼합균이 다른 미생물 혼합균과 비교하여 높은 단백질 생산량을 나타내었다. 단백질 분비량과 효소 활력과의 비교시 어느 정도 단백질 분비량과 상관관계가 있었다(Table 36).

Table 2-1-9. Total protein contents($\mu\text{g}/\text{ml}$) in the supernatant of culture of mixed cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RA-RF-H20-H23	RF-H20-H23	RF-H20-RA	RF-H23-RA	RA-H20-H23	SEM
1	1.48 ^b	1.88 ^{ab}	1.51 ^b	1.97 ^{ab}	2.32 ^a	0.112
2	2.92 ^b	4.23 ^a	1.51 ^c	2.69 ^b	4.87 ^a	0.328
3	10.43 ^a	7.77 ^{ab}	1.06 ^c	4.85 ^b	10.46 ^a	1.048
4	15.69 ^a	8.84 ^b	1.50 ^c	9.51 ^b	12.91 ^a	1.279
6	17.18 ^a	10.58 ^b	0.99 ^c	14.03 ^{ab}	15.20 ^{ab}	1.626
8	17.26 ^a	9.78 ^c	1.00 ^d	13.00 ^b	15.57 ^a	1.552

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

반추위내에는 다양한 미생물들이 서식하며 상호 상승작용과 협동작용 그리고 억제작용을 하면서 반추위 혐기성 미생물 생태계를 형성하고 있다. 그러므로 본 시험 또한 시험 2와 3에서 섬유소 분해력 등이 우수하다고 판단된 미생물들을 이용하여 상호 상승작용을 하는 미생물의 그룹을 찾고자 본 시험을 수행하였다. Osborn과 Dehority (1989)는 강력한 섬유소 분해균인 *Fibrobacter succinogenes* 와 *Prevotella ruminicola*를 혼합배양시 hemicellulose의 이용성이 단독배양시보다 증가한다고 하였으며, Dehority와 Scott (1967)은 hemicellulose를 분해하는 *B. ruminicola* H8균과 2-3종의 다른 섬유소 분해균을 혼합하여 배양시 *B. ruminicola* 순수배양시보다 cellulose 분해력이 증가하였다고 하였다. 이러한 증가는 hemicellulolytic bacteria에 의해 cellulose의 노출을 증가시켰기 때문으로 추측된다. 본 실험에서도 *R. albus*가 hemicellulose를 선호하기 때문에 *R. flavefaciens*와 혼합배양시 상호 상승작용이 있을 것으로 생각되었으나, *R. flavefaciens*와 *R. albus*를 혼합배양시 상호 강력한 억제작용이 있었다. 이것은 Odenyo 등(1991)이 짚류를 기질로하여 두 균을 혼합배양하였을 때 상호상승작용이 없었던 것과 일치하나, 본 시험에서는 기질을 일반 식물체가 아닌 순수 cellulose를 사용하여 더욱 상호간의 억제작용이 뚜렷하였던 것 같다. 본 시험에서 두 균간의 길항작용의 원인은 *R. albus*에 의해 *R. flavefaciens*가 cellulose의 부착이 제대로 되지 않았기 때문으로 생각된다(Mosoni 등, 1997). 최근의 연구결과에서 밝혀진 바에 의하면 *R. albus*가 *R. flavefaciens*를 억제하는 bacteriocin인 Albusin B를 생성하는 것으로 알려져 있으며(Chen 등, 2004), *R. flavefaciens* 와

*R. albus*를 cellobiose 배지에서 2~3시간 배양 후에 관찰한 결과 *R. flavefaciens*는 발견 할 수 없었다(Fondevila와 Dhority, 1996). 또한 면양(Van Gylswyk, 1970)과 젖소(Weimer 등, 1999)의 반추위내에서 *R. albus*가 *R. flavefaciens*보다 수적으로 우세한 것으로 알려져 있어 그 원인이 *R. albus*가 생산하는 bacteriocin이 특이적으로 *R. flavefaciens*에 작용하였기 때문이다. RF-H20-RA 혼합균의 기질이용성과 효소특성과는 반대로 본 시험의 결과 *Fibrobacter succinogenes* H23균이 섬유소 박테리아가 포함된 모든 배양에서 상승작용이 있는 것으로 나타나 이 H23균이 RA균의 억제력을 완화시키는 물질을 생성하였거나 또는 혼합배양시 RA균의 성장을 저해시킴에 의해 억제력을 완화시킨 것으로 생각되었다. 결론적으로 순수배양보다는 혼합배양시 비록 일부의 균들은 상호길항작용을 일으키기도 하지만 동일 species의 *R. flavefaciens*라도 subspecies 그룹에서 strain이 다른 균들을 혼합배양 하더라도 순수배양보다는 전반적으로 높은 활력을 보여 주어 순수배양보다는 생균제 활용시 혼합배양균을 이용하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

시험 2. 선발 혐기성 박테리아의 혼합 배양이 filter paper의 건물 분해율, 가스발생량 및 효소 활력에 미치는 영향 II

시험 1에서 기질 분해율과 효소활력이 우수한 조합균인 RF-H20-H23 그룹을 기초로 하여 혼합정도를 단순화 하면서도 더욱 효과적인 혼합그룹을 찾고, 또한 시험 3의 결과에서 RF균과 RA균의 antagonism이 있는 것으로 조사되어 이들의 상호관계를 조사하고자 각 2종씩의 균을 혼합배양하여 이들의 발효특성을 조사하였다.

가. 재료 및 방법

- 1) 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 공시
RF, H20, H23 및 RA균을 공시하였다.
- 2). 사용배지 및 공시기질

DA medium이 19ml 들어있는 serum bottle에 탄소원으로 filter paper disk(Whatman filter paper NO.1)를 원물기준 약 0.1g씩 첨가하였다.

3) 공시균주의 혼합 및 접종

단독 배양한 RF, H20, H23 및 RA균을 RF-H20-H23, RF-H20, RF-H23, H20-H23 및 RA-RF의 5개 처리구로 혼합 조합하여 각각의 균들의 배양액을 혐기를 유지하면서 멸균된 50ml bottle에 각 10ml씩을 첨가하고 혼합하여 각 그룹의 접종균으로 이용하였다. 각 공시균의 균수는 시험4와 유사하였다. 그리고 여기서 동일량 혼합된 각 처리구별로 접종량은 전체 1ml을 되도록 혐기상태를 유지하면서 본 시험용 serum bottle에 접종하였다.

4) 배양 방법 및 배양시간

혐기상태를 유지하며, 시험 2와 동일하게 수행하였다.

5) 건물 분해율의 측정

배양이 완료된 serum bottle을 개봉하여 상층액을 회수한 후 시험 4와 동일한 방법으로 건물분해율을 측정하였다.

6) 가스 발생량의 측정

시험 2와 동일하게 실행하였다.

7) 가수분해 효소의 활력

조효소액의 채취, 다당류 분해효소와 단당류 분해효소 또한 시험 2와 동일한 방법으로 분석하였다.

8) 미생물 혼합 배양에 의한 단백질 생산량 측정

시험 4와 동일한 방법으로 수행하였다.

9) 통계분석

시험2와 동일한 방법으로 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 건물분해율

배양 1일부터 전 배양기간 동안 동일한 species인 *R. flavefaciens* 혼합그룹인 RF-H20군에 건물분해율이 가장 높았다(Table 37). H20-H23군은 배양 1일에 10.83% 분해율로 RF-H20군과 유의적 차이를 보이지 않았지만 배양 2일, 4일 및 8일째에는 RF-H20군에 비해 분해율이 낮았다($p < 0.05$). RF-H20-H23군은 배양 6일째 다른 혼합군들에 비해 가장 높은 79.84% 건물분해율을 보였으나 RF-H20 그룹과 H20-H23 그룹과는 유의적 차이가 없었다. RF-H23 그룹의 경우 배양 1일부터 서서히 증가하여 배양 8일째는 73.68%의 건물분해율을 보였으나 RA-RF 그룹을 제외하고 나머지 그룹들과 비교시 낮은 건물 분해율을 나타내었다. RA-RF 그룹의 경우 다른 혼합군들에 비해 거의 기질을 분해하지 못한 것으로 나타나 *R. albus*와 *R. flavefaciens*간의 억제작용이 뚜렷함이 증명되었다.

Table 2-2-1. Dry matter degradation rates(%) of filter paper by co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	8.00 ^b	11.27 ^a	5.99 ^b	10.83 ^a	1.14 ^c	1.136
2	46.00 ^{ab}	49.93 ^a	37.90 ^c	43.95 ^b	2.49 ^d	4.247
3	58.67 ^{ab}	62.08 ^a	56.64 ^b	58.43 ^{ab}	5.08 ^c	5.801
4	68.14 ^b	71.32 ^a	60.67 ^d	65.74 ^c	10.96 ^e	6.011
6	79.84 ^a	76.97 ^a	69.26 ^b	77.30 ^a	17.57 ^c	6.694
8	78.96 ^{ab}	82.09 ^a	73.68 ^c	77.82 ^b	17.34 ^d	6.555

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ($p < 0.05$).

2) 가스발생량

가스발생량 또한 건물 분해율과 비슷한 경향을 나타내고 있으며(Table 38) H20-H23 그룹이 배양기간 동안 높은 가스발생량을 나타내었다. 그러나 2일째에는 RF-H20-H23 그룹이 가장 높은 가스발생량을 보였다. 가스발생량은 RA-RF 그룹을 제외하고 모든 그룹에서 2일 배양시 최고 발생량을 나타내어 이 시기가 가장 미생물 성장률과 기질 이용성이 높은 것으로 생각되었다. RA-RF 그룹은

배양 1일에 가스발생량이 2.20 ml/0.1g DM 이었으며 이 이후에는 거의 성장이 이루어지지 않은 것으로 판단되었다.

Table 2-2-2. Gas production(ml/0.1g DM substrate) by co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	5.67 ^{ab}	5.88 ^{ab}	3.09 ^{bc}	6.92 ^a	2.20 ^c	0.465
2	7.64 ^a	7.45 ^{ab}	5.04 ^c	7.43 ^b	1.45 ^d	0.278
3	5.56 ^b	5.07 ^b	4.75 ^c	5.36 ^a	1.13 ^d	0.208
4	3.13 ^b	2.87 ^c	3.16 ^b	3.41 ^a	1.42 ^d	0.108
6	2.02 ^b	1.50 ^c	2.27 ^{ab}	2.35 ^a	1.65 ^c	0.073
8	1.50 ^{ab}	1.00 ^c	1.40 ^b	1.67 ^a	1.47 ^{ab}	0.065

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

3) 누적 가스발생량

배양 2일까지 RF-H20-H23, RF-H20 그룹과 H20-H23 그룹에서 높은 누적 가스발생량을 나타내었고 3일에서 4일까지는 RF-H20-H23 그룹과 RF-H20 그룹이 다른 혼합그룹에 비하여 높았으며 6일 이 후는 RF-H20-H23 그룹이 가장 많은 가스를 축적시켰다(p<0.05; Table 39). RA-RF 그룹은 건물분해율과 같이 누적가스 발생량도 전 배양기간 동안 가장 낮게 나타내었다.

Table 2-2-3. Cumulative gas production (ml/0.1g DM substrate) by co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23 3	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	5.67 ^{ab}	5.88 ^{ab}	3.09 ^{bc}	6.92 ^a	2.20 ^c	0.465
2	13.41 ^a	13.49 ^a	8.17 ^b	14.75 ^a	3.64 ^c	0.701
3	18.62 ^a	18.67 ^a	12.95 ^c	17.48 ^b	4.77 ^d	0.694
4	22.01 ^a	21.87 ^a	16.01 ^c	20.89 ^b	6.16 ^d	0.912
6	24.33 ^a	23.30 ^b	18.08 ^c	22.95 ^b	7.70 ^d	1.151
8	25.97 ^a	24.43 ^b	19.37 ^c	24.03 ^b	9.30 ^d	1.627

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

4) 가수분해효소 활력조사

가) Extracellular CMCase 활력

6일 배양시 H20-H23 그룹이 배양기간 동안 가장 높은 CMCase의 활력 (101.13 $\mu\text{mol/ml/min}$)을 보였지만 전반적으로 섬유소 분해효소의 활력 또한 건물 분해율 및 가스발생량 등과 비슷하여 RF-H20 그룹에서 가장 높았으며 일부 배양시간대에서 RF-H20-H23 그룹과 H20-H23 그룹은 유의적 차이가 없었다. 시험 3의 CMCase 활력과 비교시 약간 낮게 측정이 되었는데 이러한 것은 배양조건의 차이가 아무리 똑같은 배지와 같은 온도 등을 같이 하더라도 미생물의 성장에 약간의 변이가 있음을 알았다. RA-RF 그룹의 경우 CMCase 활력이 가장 낮았다(Table 2-2-4).

Table 2-2-4. Extracellular CMCase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time (Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	59.14 ^a	58.90 ^a	30.57 ^c	54.91 ^b	12.98 ^d	4.959
2	79.38 ^b	83.04 ^a	68.66 ^c	78.04 ^b	23.14 ^d	5.937
3	89.16 ^b	91.83 ^a	89.21 ^b	89.98 ^b	48.60 ^c	4.441
4	85.99 ^a	87.49 ^a	79.20 ^b	86.33 ^a	57.92 ^c	3.022
6	92.60 ^d	99.02 ^b	96.41 ^c	101.13 ^a	60.28 ^e	4.037
8	99.54 ^a	99.68 ^a	95.87 ^a	99.95 ^a	64.09 ^b	3.783

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d,e} Means in the same row with different superscripts differ($p < 0.05$).

나) Extracellular Avicelase 활력

배양 초기 1일에서 2일까지 RF-H20-H23 그룹에서 Avicelase 활력이 가장 높았으며 배양 4일에서도 16.78 $\mu\text{mol/ml/min}$ 로 본 시험 기간 중 활력이 가장 높았다 ($p < 0.05$; Table 41). RF-H20 그룹은 배양 3일과 6일에 다른 혼합그룹에 비하여 Avicelase 활력이 가장 높았으며 ($p < 0.05$) 8일에는 H20-23 그룹과의 유의적 차이가 없었지만 다른 혼합그룹에 비교하여 유의적으로 높은 효소활력을 나타내었다 ($p < 0.05$).

Table 2-2-5. Extracellular Avicelase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	9.51 ^a	8.47 ^b	8.05 ^c	8.36 ^{bc}	6.75 ^d	0.241
2	11.90 ^a	8.59 ^b	8.85 ^b	9.03 ^b	6.64 ^c	0.462
3	11.60 ^c	15.50 ^a	9.82 ^e	10.87 ^d	13.50 ^b	0.546
4	16.78 ^a	8.55 ^b	10.12 ^b	9.48 ^b	7.82 ^b	0.938
6	12.02 ^b	14.31 ^a	8.30 ^c	8.11 ^c	5.74 ^d	0.845
8	8.30 ^{bc}	10.50 ^a	7.80 ^{bc}	9.86 ^{ab}	6.97 ^c	0.429

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

다) Extracellular xylanase 활력

배양 4일까지 3종의 미생물이 혼합된 RF-H20-H23 그룹이 가장 높은 xylanase의 활력을 보였다 ($p < 0.05$; Table 42). 배양 6일에는 H20-H23 그룹이 가장 높은 활력을 보였으며 배양 8일째에도 H20-H23 그룹과 RF-H20-H23 그룹을 제외하고 유의적으로 높은 효소활력을 나타내었다 ($p < 0.05$). RF-H20 그룹과 RF-H23 그룹은 배양 4일까지 xylanase의 활력이 증가하다가 배양 6일부터 낮아지는 것을 볼 수 있었으며 RA-RF 그룹은 배양 6일까지 xylanase의 활력이 증가하다 배양 8일부터 낮아지는 것을 볼 수 있었다.

Table 2-2-6. Extracellular xylanase activities(xylose $\mu\text{mol/ml/min}$) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	133.96 ^a	112.85 ^b	59.81 ^c	105.84 ^b	11.18 ^d	11.809
2	197.87 ^a	159.80 ^b	146.77 ^b	160.91 ^b	20.62 ^c	16.398
3	209.64 ^a	191.03 ^{ab}	177.67 ^b	180.02 ^b	60.92 ^c	14.448
4	275.04 ^a	233.60 ^b	182.07 ^c	184.92 ^c	81.76 ^d	17.660
6	199.23 ^b	186.81 ^{bc}	178.16 ^c	227.61 ^a	107.69 ^d	10.902
8	197.25 ^{ab}	180.38 ^b	177.25 ^b	232.89 ^a	102.34 ^c	12.519

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

라) β -D-glucosidase 활력

Table 2-2-7. β -D-glucosidase activities(pNP μ mol/ml/min) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	19.65 ^c	20.20 ^c	23.08 ^b	22.32 ^b	26.41 ^a	0.688
2	23.71 ^{ab}	24.12 ^{ab}	30.04 ^a	28.39 ^a	18.26 ^b	1.442
3	47.89 ^a	31.47 ^b	28.59 ^b	37.97 ^{ab}	39.85 ^{ab}	2.318
4	21.44	30.39	27.33	18.50	20.78	2.066
6	15.92 ^{bc}	19.43 ^{ab}	24.73 ^a	19.54 ^{ab}	13.56 ^c	1.184
8	18.49 ^{ab}	20.85 ^{ab}	22.76 ^a	18.33 ^{ab}	14.01 ^b	1.234

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

모든 혼합균들의 효소활력이 3일째에 가장 높았으며 RF-H20-H23 그룹이 β -D-glucosidase 활력이 가장 높았으나 H20-H23 그룹과 RA-RF 그룹은 유의적인 차이가 없었다(Table 43). RF-H23 그룹의 경우 배양 2일과 배양 6일에서 배양 8일 사이에 혼합균들 중 높은 활력을 나타냈으나 RA-RF 그룹과 유의적으로 차이가 있었다. 특이하게도 다른 다당류 분해효소와는 달리 RA-RF 그룹의 효소활력이 다른 혼합그룹과 유사한 경향을 보였는데 이러한 이유는 다른 혼합균들에서 활력이 아주 낮게 분비되어 RA-RF 그룹에서와 유사한 것으로 생각되었다. 결국 공시된 균들에서 단당류를 분해하는 효소의 역할은 아주 빈약한 것으로 생각된다. 그러므로 *Prevotella ruminicola*와 같은 단당류를 방출하는 미생물을 혼합배양시 더욱 효과적일 것으로 생각되며 더욱 추가적인 혼합배양 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

마) β -D-xylosidase 활력

본 시험에서 β -D-xylosidase 활력은 배양 4일째에 모든 그룹에서 효소활력이 급격히 증가하여 최고치에 도달하였고 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다(Table 2-2-8). 배양 1일에 RA-RF균이 다른 조합균과 비교하여 다른 조사항목에서 보았던 결과와는 다르게 가장 높았으며 H20-H23 그룹과는 유의적 차이는

없었다. RF-20 그룹과 H20-H23 그룹이 2일째 가장 높은 활력을 보였으며 RF-H23 그룹 배양 6일 이후 가장 높은 효소활력을 나타내었고, 4일째 최고의 활력을 나타내었지만 H20-H23 그룹만이 유의적으로 차이가 났다($p < 0.005$). β -D-xylosidase의 활력도 앞에서 조사된 β -D-glycosidase와 같이 모든 조합에서 낮은 활력을 나타내어 RA-RF균이 상대적으로 높은 결과를 초래한 것으로 생각된다.

Table 2-2-8. β -D-xylosidase activities(pNP μ mol/ml/min) of co-cultured cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	12.87 ^c	14.11 ^c	17.35 ^b	19.35 ^{ab}	21.00 ^a	0.883
2	14.59 ^b	14.93 ^b	23.78 ^a	25.65 ^a	14.54 ^b	1.385
3	24.03	21.62	24.80	28.25	21.10	1.367
4	66.88 ^{ab}	68.07 ^{ab}	83.86 ^a	64.93 ^b	72.59 ^{ab}	2.631
6	29.42 ^c	32.79 ^{bc}	58.86 ^a	35.83 ^b	36.37 ^b	2.822
8	8.78 ^c	11.51 ^{bc}	42.54 ^a	14.34 ^b	11.88 ^{bc}	3.359

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

5) 배양액 내 총단백질량 생성량

단백질 생성량은 RF-H20-H23, RF-H20균 및 H20-H23균이 일부 시간대를 제외하고는 유사한 경향을 나타내면서 다른 그룹에 비하여 높은 결과를 보였다 (Table 2-2-9). RA-RF균의 경우 단백질 생성량이 너무나 낮아 미생물의 성장이 거의 이루어지지 않았음을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

Table 2-2-9. Total protein contents ($\mu\text{g/ml}$) in the supernatant of culture of mixed cellulolytic bacteria

Incubation Time(Day)	RF-H20-H23	RF-H20	RF-H23	H20-H23	RA-RF	SEM
1	1.76 ^{ab}	1.26 ^{bc}	0.76 ^{cd}	1.95 ^a	0.38 ^d	0.172
2	4.32 ^a	3.86 ^{ab}	2.29 ^{bc}	4.47 ^a	0.39 ^c	0.507
3	5.70 ^b	6.34 ^b	5.45 ^b	8.36 ^a	1.29 ^c	0.647
4	9.23 ^{ab}	8.14 ^{ab}	6.69 ^b	10.05 ^a	1.48 ^c	0.864
6	9.23 ^{ab}	8.14 ^{ab}	6.69 ^b	10.05 ^a	1.48 ^c	0.864
8	11.06 ^a	8.61 ^a	6.63 ^b	10.39 ^a	1.68 ^c	0.953

H20, H23, RF and RA: Same as in Table 1-2-1.

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

시험 1에서 언급하였던 것과 함께 본 시험5에서 *R. flavefaciens*와 *R. albus*의 상호억제작용이 뚜렷함을 다시 한 번 확인할 수 있었으며, Odenyo 등(1994a)는 *R. flavefaciens*와 *R. albus*를 cellobiose 배지에서 2~3시간 배양 후에 관찰한 결과 *R. flavefaciens*는 발견할 수 없었다고 하였다. 반면 *R. albus*와 *F. succinogenes*는 함께 자랐다. 또한 Van Gylswyk (1970)과 Weimer 등 (1999)이 *R. albus*가 반추위내에서 *R. flavefaciens*에 억제작용을 하여 우점 한다고 하였지만 본 시험에서는 물론 공시된 두 미생물이 모든 RA균과 RF균을 대표하지는 않을 지라도 현재의 결과로는 두 미생물을 함께 배양하게 되면 시간이 지나더라도 RA의 우점이 거의 일어나지 않는 것으로 생각되어 단순히 *R. albus*가 bacteriocin을 생산하는 것 뿐 아니라 RF균도 역으로 알려져 있지는 않지만 RA를 억제하는 특정 물질을 분비하여 상호 길항작용을 일으킨 것 같다.

시험 2에서 건물분해율, 효소활력 및 가스발생량 등의 종합적으로 보았을 때 RF-H20-H23 그룹을 혼합하였을 때 가장 우수한 활력을 보였지만 RF-H20 그룹과 H20-H23 그룹 또한 그와 비슷한 효과를 나타내어 추가적으로 반추위 혼합 미생물에 이들 세 개의 배합균을 첨가 배양하여 그 효과를 검증해 보아야 할 것으로 생각되었다.

시험 3. 섬유소 분해 박테리아 혼합균의 첨가에 의한 *in vitro* 혼합반추위 미생물의 볏짚 분해율 및 발효특성에 미치는 영향

선발된 미생물들을 이용하여 생균제로서의 최적 사용조건을 구명하기 위하여 볏짚을 기질로 *in vitro* 상에서 혼합배양하여 소화율과 효소활력에 미치는 영향을 구명하였다. 최종적으로 가장 우수한 미생물군을 선발하여 혼합 반추위 미생물에 개발된 생균제를 접종하여 반추위내 발효 및 개선 효과를 구명하기 위해 수행 되었다.

가. 재료 및 방법

1) 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 공시

시험 2의 그룹 중 RF-H20-H23의 혼합군으로부터 RF, H20 및 H23균과 혼합 반추위액(rumen fluid)을 공시하였다.

2) 사용배지 및 공시기질

볏짚을 증류수로 5번 이상 세척한 후 60°C의 drying oven에서 건조시킨 후 1 mm screen을 가진 hammer mill에서 분쇄하였으며, DA medium이 16 ml 들어있는 serum bottle에 탄소원으로 볏짚을 0.2g씩 첨가하였다.

3) 반추위액의 채취 및 준비과정

캐놀라가 장착된 Holstein 젖소 1두로부터 위액을 채취하기 위해 1,000ml의 유리 병에 4겹의 cheesecloth 이용하여 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 39°C를 유지하는 보온 통에 넣어 운반하였으며, 운반해온 위액을 39°C 항온 수조에서 30분간 배양한 후 떠오른 사료입자들을 진공펌프를 이용하여 제거 하였다. 사료입자가 제거된 반추 위액에 CO₂를 충전 시켜주었다.

4) 공시균주의 혼합 및 접종

혐기상태를 유지하며 Holstein 젖소의 반추위 캐놀라를 통하여 채취한 반추위액(rumen fluid) 4ml과 단독 배양한 RF, H20 및 H23균을 RF-H20-H23, RF-H20, H20-H23 및 H20의 4개 처리구로 혼합 조합하여 각각의 균들의 배양액을 혐기상태를 유지하면서 멸균된 50ml bottle에 각 10ml씩을 첨가하고 혼합한 각 그룹의 접종균 0.4ml을 혐기상태를 유지하면서 본 시험용 serum bottle에 접종하였다. 이 용된 균들의 균수는 0.23 ~ 2.4 x 10⁸ cfu/ml 정도이었다.

5) 배양 방법 및 배양시간

혐기상태를 유지하며, 39°C incubator에서 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 교반 없이 배양하였으며 각 조사시간대별로 시료채취 및 각 시험을 수행하였다.

6) 건물 분해율의 측정

배양이 완료된 serum bottle을 개봉하여 상층액을 회수한 후 시험 2와 동일한 방법으로 건물분해율을 측정하였다.

7) 가스 발생량의 측정

시험 2와 동일하게 실행하였다.

8) 가수분해 효소의 활력

조효소액의 채취, 다당류 분해효소와 단당류 분해효소 또한 시험 2와 동일한 방법으로 분석하였다.

9) 미생물 혼합 배양에 의한 단백질 생산량 측정

시험 4와 동일한 방법으로 수행하였다.

10) 배양액 내 암모니아 측정

배양액 내 암모니아 측정은 Cheny와 Mabach(1962)의 방법으로 수행 하였다. 각 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 배양한 배양 bottle에서 상층액을 채취하였다. 채취한 배양액을 13,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 얻어진 상층액 과 NH₃ standard를 각각 0.02ml씩 20ml시험관에 넣고, Blank tube에는 멸균 증류수로 넣어주었다. 각각의 0.02ml sample 및 standard, 그리고 Blank를 넣은 시험관에 phenol 50g과 sodium nitroferricyanide [Na₂Fe(CN)₅NO · 2H₂O] 0.25g를 증류수 1L에 섞어 만든 phenol color reagent를 1ml씩 첨가한다. 1ml의 phenol color reagent를 첨가한 후 각각의 시험관에 (NaOH) 25g과 sodium hypochloride(4~6% NaCl) 16.8ml를 멸균 증류수 1L를 넣어서 만든 alkali-hypochlorite를 1ml씩 첨가하였다. 첨가 후 37°C 항온 수조에 에서 15분간 배양을 하여 발색 시킨 후 증류수를 8ml씩을 넣어 희석하였다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 640nm에서 OD(optical density)를 측정하였다.

11) 배양액의 pH 측정

배양이 끝난 serum bottle을 개봉하여 원심분리용 tube에 상층액을 회수 하였으며 회수한 상층액은 500 × g, 5분간 원심분리한 후 pH meter(Mettler-Toledo, CH/MP220)를 이용하여 pH를 측정하였다.

12) 배양액의 VFA 분석

배양액내 VFA는 Erwin 등(1961) 방법에 의해 수행 되었다. pH 측정 후 VFA를 측정할 배양액들은 microtubes(MCT-175-C, AXYGEN, USA)에 1ml씩 회수한 후 미생물의 작용을 정지하기 위해 0.1ml의 포화 HgCl₂ 용액과 25% HPO₃ 용액 0.2ml를 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 30분간 정치시킨다. 실온에서 정치시킨 배양액은 -20℃의 냉동고에 보관 하였다가 분석 시 13,000rpm에서 10분간 4℃의 microcentrifuge를 이용하여 원심분리 한 후 상층액을 채취하였으며, Gas Chromatography (HP6890, HP, USA)를 이용하여 채취한 상층액은 VFA 표준용액을 기준으로 분석하였다. GC의 분석 조건은 Table 46. 나타내었다.

Table 2-3-1. The conditions of GLC(Hewlett Packard GC-5890 series) for individual volatile fatty acid composition analysis

Items	Condition
Column	HP-Innowax(Crosslinked Polyethylene Glycol) 30m ×0.32mm ×0.5μl
Temperature pro.	10 °C/ min.
Detector	Flame Ionization Detector(FID)
Initial tem.	120 °C
Initial time	1 min.
Final tem.	180 °C
Final time	10 min.
Injector tem.	250 °C
Detector tem.	280 °C
Carrier gas	N ₂
Split ratio	100:1

13) 통계분석

각 0, 6, 12, 24, 48 및 72일 동안 배양한 배양액을 가지고 처리별 3반복을 통

해 얻어진 모든 결과들은 SAS(Statistical Analysis System, 1996) package의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 분석하였으며, Duncan's multiple range test에 의해 처리 평균간 유의성($p < 0.05$)을 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 건물분해율

시험 2에서 가장 활력이 좋은 RF-H20-H23 그룹을 선발하였으며, 볏짚을 기질로 한 혼합 반추위액과의 혼합배양에 따른 건물분해율을 Table 47에 나타내었다. H20-H23 그룹은 배양 6시간부터 가장 높은 분해율을 나타냈으며, 배양 72시간 때 53.6%의 가장 높은 건물분해율을 나타냈다. Control과 처리구간 건물분해율을 보면 혼합균을 접종한 처리구가 control보다 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 단독으로 배양하여 혼합 반추위액에 접종한 H20균보다 혼합배양하여 접종한 RF-H20-H23, RF-H20 및 H20-H23 그룹의 건물분해율이 높았다($p < 0.05$). 이 시험은 두 가지 중요한 의미를 준다. 하나는 혼합 반추위액만을 접종한 처리보다 선발된 섬유소분해균을 접종했을 때 건물분해율이 높다는 것과 다른 하나는 혼합 반추위액에 H20균과 같이 단독균을 접종한 처리보다는 선발된 섬유소분해균을 혼합하여 접종한 처리에서 건물분해율이 높다는 것이다.

Table 2-3-2. *In vitro* dry matter degradation rates(%) of rice straw by mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	5.30 ^{bc}	4.12 ^c	7.67 ^b	13.62 ^a	4.14 ^c	1.113
12	8.45 ^c	13.45 ^b	14.33 ^b	24.93 ^a	12.97 ^b	1.482
24	23.46 ^c	26.04 ^{bc}	28.04 ^b	34.63 ^a	23.52 ^c	1.208
48	33.49 ^c	35.61 ^{bc}	38.40 ^b	47.44 ^a	36.95 ^b	1.334
72	41.80 ^d	45.22 ^{bc}	47.17 ^b	53.60 ^a	44.82 ^c	1.079

H23 : *Fibrobacter succinogenes* H23

H20 : *Ruminococcus flavefaciens* H20

RF : *Ruminococcus flavefaciens* Sijpesteijn (ATCC 19208)

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

2) 가스발생량

Table 48에서 보는 바와 같이 배양 6, 12 및 48시간 때에서 H20-H23균을 접종한 처리구의 가스 발생량이 가장 높아 기질의 이용이 가장 활발하였음을 나타내고 있다. 배양 24시간 때에는 모든 처리에서의 가스발생량은 차이가 없었으며, 배양 48시간 때 H20-H23균을 접종한 처리구에서 29.03ml/0.1g 으로 가장 높은 가스발생량을 나타냈다(p<0.05). 배양 72시간 때 모든 처리의 가스발생량에서 큰 차이는 없었다(p<0.05). H20-H23균을 접종한 처리구의 가스발생량 또한 건물분해율과 비슷한 경향을 나타내고 있다.

Table 2-3-3. Gas production(ml/0.1g DM substrate) of rice straw by mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	5.70 ^d	6.13 ^c	6.67 ^b	7.00 ^a	6.10 ^c	0.128
12	11.63 ^c	12.30 ^b	12.73 ^b	13.90 ^a	11.70 ^c	0.231
24	17.80	20.77	20.20	20.90	19.70	0.491
48	27.37 ^b	28.10 ^b	28.17 ^b	29.03 ^a	28.10 ^b	0.175
72	33.33	34.33	34.33	34.13	33.83	0.156

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

3) 누적 가스발생량

전체 배양 기간동안 H20-H23 그룹을 접종한 처리구에서 높은 누적 가스발생량을 나타내었으며, 배양 24시간과 72시간 때 H20-H23, RF-H20-H23 및 RF-H20 그룹을 접종한 처리들은 누적 가스발생량에 있어 큰 차이는 없었다(p<0.05). 누적 가스발생량, 가스발생량 및 건물분해율 모두 비슷한 결과를 나타내고 있다(Table 2-3-4).

Table 2-3-4. Cumulative gas production(ml/0.1g DM substrate) of rice straw by mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	5.70 ^d	6.13 ^c	6.67 ^b	7.00 ^a	6.10 ^c	0.128
12	17.33 ^d	18.43 ^c	19.40 ^b	20.90 ^a	17.80 ^{cd}	0.349
24	35.13 ^c	39.20 ^{ab}	39.60 ^{ab}	41.80 ^a	37.50 ^{bc}	0.683
48	62.50 ^c	67.30 ^b	67.77 ^{ab}	70.83 ^a	65.60 ^{bc}	0.824
72	95.83 ^c	101.63 ^{ab}	102.10 ^{ab}	104.97 ^a	99.43 ^{bc}	0.944

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

4) 가수분해효소 활력조사

가) Extracellular CMCase 활력

각 처리구의 배양액에 존재하는 CMCase의 활력을 Table 50에 나타내었다. 24시간 배양시 H20균을 접종한 처리에서 배양기간 동안 가장 높은 CMCase 활력(12.15 $\mu\text{mol/ml/min}$)을 나타내었다(p<0.05). 배양 6시간과 12시간 때 CMCase 활력은 모든 처리에서 큰 차이가 없었으며, 48시간 배양에서도 처리간 차이가 없었다(p<0.05). 배양 72시간 때 H20균을 접종한 처리에서 11.36 $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 높은 CMCase 활력 보였으나 RF-H20과 H20-H23균을 접종한 처리구와 차이가 없었다(p<0.05).

Table 2-3-5. Extracellular CMCase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of rice straw of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	6.37	7.01	6.30	6.65	6.96	0.134
12	10.82	10.48	10.34	10.93	10.88	0.162
24	10.81 ^b	10.97 ^b	10.40 ^b	10.18 ^b	12.15 ^a	0.213
48	10.65	10.18	10.10	9.56	9.78	0.189
72	9.48 ^c	10.26 ^b	10.62 ^{ab}	10.26 ^{ab}	11.36 ^a	0.212

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

나) Extracellular Avicelase 활력

Table 51에서처럼 Avicelase 활력은 배양 6시간 때 control 과 RF-H20-H23 그룹을 접종한 처리구에서 높은 활력을 나타냈으나 RF-H20 그룹과 H20-H23 그룹을 접종한 처리구와 비교 하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 배양 12시간 때 Avicelase 활력은 control, RF-H20-H23 그룹 과 RF-H20 그룹을 접종한 처리구가 높았으며, H20-H23군 과 H20군을 접종한 처리구는 활력이 낮았다. 배양 24시간 과 48시간 때 처리구간 차이가 없었으며, 배양 72시간 때 H20군을 단독으로 배양하여 접종한 처리구에서 Avicelase 활력이 13.02 $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 본 시험에서 가장 높은 활력을 나타냈다($p < 0.05$).

Table 2-3-6. Extracellular Avicelase activities (glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of rice straw of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	6.05 ^a	5.59 ^a	5.50 ^{ab}	5.21 ^{ab}	4.51 ^b	0.181
12	7.85 ^a	8.05 ^a	7.89 ^a	7.09 ^b	7.16 ^b	0.117
24	8.38	8.10	8.03	7.91	7.93	0.082
48	8.70	8.07	8.12	8.66	8.42	0.127
72	8.26 ^c	8.31 ^c	8.82 ^{bc}	10.50 ^b	13.02 ^a	0.542

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

다) Extracellular xylanase 활력

Xylan을 기질로 하여 각 처리구들의 Extracellular xylanase 활력을 조사한 것을 Table 52에 나타내었다. Xylanase의 활력은 CMCase와 Avicelase보다 월등히 높음을 알 수 있었다. 각 처리구들의 xylanase 활력은 배양 6시간 때부터 배양 48시간까지 증가하였으며, 배양 72시간부터 감소하는 것을 볼 수 있었다. H20-H23 그룹을 접종한 처리구는 배양 48시간 때 110.33 $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 본 시험에서 가장 높은 xylanase 활력을 나타내었으며, 전 배양기간 동안 높은 활력을 나타내었다. 본 시험에서의 결과를 보면 혼합 섬유소 분해균을 접종한 처리구가 접종하지 않은 control보다 xylanase 활력이 높은 것으로 나타났다.

Table 2-3-7. Extracellular xylanase activities(xylose $\mu\text{mol/ml/min}$) of rice straw of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	16.87 ^b	24.77 ^a	21.00 ^{ab}	21.32 ^{ab}	22.92 ^a	0.876
12	25.00 ^c	31.88 ^b	20.82 ^d	35.69 ^a	26.06 ^c	1.465
24	43.05 ^c	43.73 ^c	53.91 ^b	53.19 ^b	65.55 ^a	2.262
48	94.46 ^{bc}	97.42 ^{bc}	103.15 ^{ab}	110.33 ^a	90.47 ^c	2.259
72	61.97 ^d	74.88 ^{ab}	71.79 ^{bc}	77.93 ^a	69.00 ^c	1.602

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

5) 배양액 내 총 단백질량 생성량

단백질함량은 혼합배양시 미생물들이 분비하는 효소 등의 단백질 함량을 분석하기 위해 조사하였다(Table 2-3-8). 단백질 생산량은 배양 6시간 때부터 배양 48시간까지 control 과 모든 처리구에서 큰 차이가 나지 않았으며, 배양 12시간 때 모든 처리구에서 단백질 생성량은 가장 높았다. 배양 72시간 때 H20-H23 그룹, H20군 및 RF-H20-H23 그룹을 접종한 처리구에서 높은 단백질 생성량을 나타냈다.

Table 2-3-8. Total protein contents ($\mu\text{g/ml}$) of rice straw of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	5.22	5.18	4.98	5.06	4.67	0.109
12	9.14	10.08	10.58	10.41	10.79	0.291
24	6.03	5.91	5.93	6.46	5.93	0.150
48	7.46	7.82	7.89	7.39	7.98	0.125
72	7.71 ^b	8.46 ^a	7.84 ^b	8.91 ^a	8.59 ^a	0.142

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

6) 배양액내 pH, 암모니아 및 VFA

Table 2-3-9. Mean values for *in vitro* fermentation variables of cellulolytic bacteria addition in rumen fluid

	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
pH	6.48	6.48	6.48	6.48	6.48	0.002
NH ₃ -N(mg/100ml)	21.15 ^b	21.64 ^b	22.77 ^a	22.64 ^a	22.85 ^a	0.216
Total VFA(mM)	64.02	66.02	66.60	66.58	66.58	0.423
Acetic acid(mM)	40.80 ^b	41.32 ^{ab}	41.86 ^{ab}	41.51 ^{ab}	42.22 ^a	0.193
Propionic acid(mM)	12.46 ^b	13.20 ^a	13.18 ^a	13.45 ^a	13.25 ^a	0.112
Butyric acid(mM)	5.90	6.07	6.09	6.17	6.00	0.040
Valeric acid(mM)	2.20 ^b	2.13 ^b	2.20 ^b	2.26 ^{ab}	2.37 ^a	0.027
Isobutric acid(mM)	0.71	0.72	0.73	0.74	0.71	0.009
Isovaleric acid(mM)	2.56 ^b	2.56 ^b	2.57 ^b	2.82 ^a	2.60 ^b	0.037

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

각 처리 그룹들의 pH, 암모니아 및 VFA의 발생량 평균을 Table 2-3-9에 나타내었다. pH 평균 결과 6.48로 모든 처리 그룹에서 동일하게 나타났으며, 배양액내의 암모니아 평균 농도는 H20, H20-H23 및 RF-H20에서 높게 측정되었다. Total VFA 생성량은 모든 처리 그룹간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. Acetic acid 평균 생성량은 42.22mM/100ml로 H20 그룹에서 가장 높게 나타난 반면 대조구에서의 acetic acid 평균 생성량은 40.80mM/100ml로 가장 낮게 측정되었으며, 나머지 처리 그룹들의 acetic acid 평균 생성량은 비슷하게 생성되었다. Propionic acid의 평균 생성량은 대조구를 제외한 모든 처리에서 유의적인 차이가 없이 높게 생성되었으며 acetic acid 평균 생성량과 같이 대조구의 경우 가장 낮은 propionic acid의 평균 생성량을 나타내었다. Butyrate 와 isobutyrate 평균 생성량의 경우 모든 처리에서 유의적인 차이가 없었으며, valeric acid 와 isovaleric acid의 평균 생성량의 경우 각각 H20 과 H20-H23 그룹에서 가장 높

은 생성량을 나타내었다. 이 결과로 보아 암모니아 발생 농도가 높으면 각 VFA의 생성량도 높게 나타난다는 것을 알게 되었다.

가) 배양액의 pH

볏짚을 기질로 이용했을 때 혼합 그룹들의 pH의 값은 Table 55 과 Figure 3에 나타내었다. 배양 초기부터 배양시간이 경과하면서 pH의 값은 모든 처리구에서 감소하였다. 배양 6시간에는 혼합 그룹들간 pH는 유의적으로 차이가 없었으나 배양 12시간대 RF-H20, H20 및 RF-H20-H23 그룹이 높게 나타났다. 배양 마지막인 72시간대 control 과 H20-H23 그룹이 가장 높게 측정되었다.

Table 2-3-10. pH values of rice straw of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(h)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	6.72	6.74	6.72	6.74	6.75	0.006
6	6.55	6.54	6.56	6.54	6.55	0.005
12	6.50 ^b	6.52 ^{ab}	6.56 ^a	6.50 ^b	6.54 ^{ab}	0.008
24	6.42 ^a	6.37 ^b	6.39 ^{ab}	6.40 ^{ab}	6.39 ^{ab}	0.006
48	6.32 ^b	6.36 ^a	6.33 ^b	6.35 ^{ab}	6.35 ^{ab}	0.006
72	6.36 ^a	6.32 ^b	6.32 ^b	6.36 ^a	6.30 ^b	0.008

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

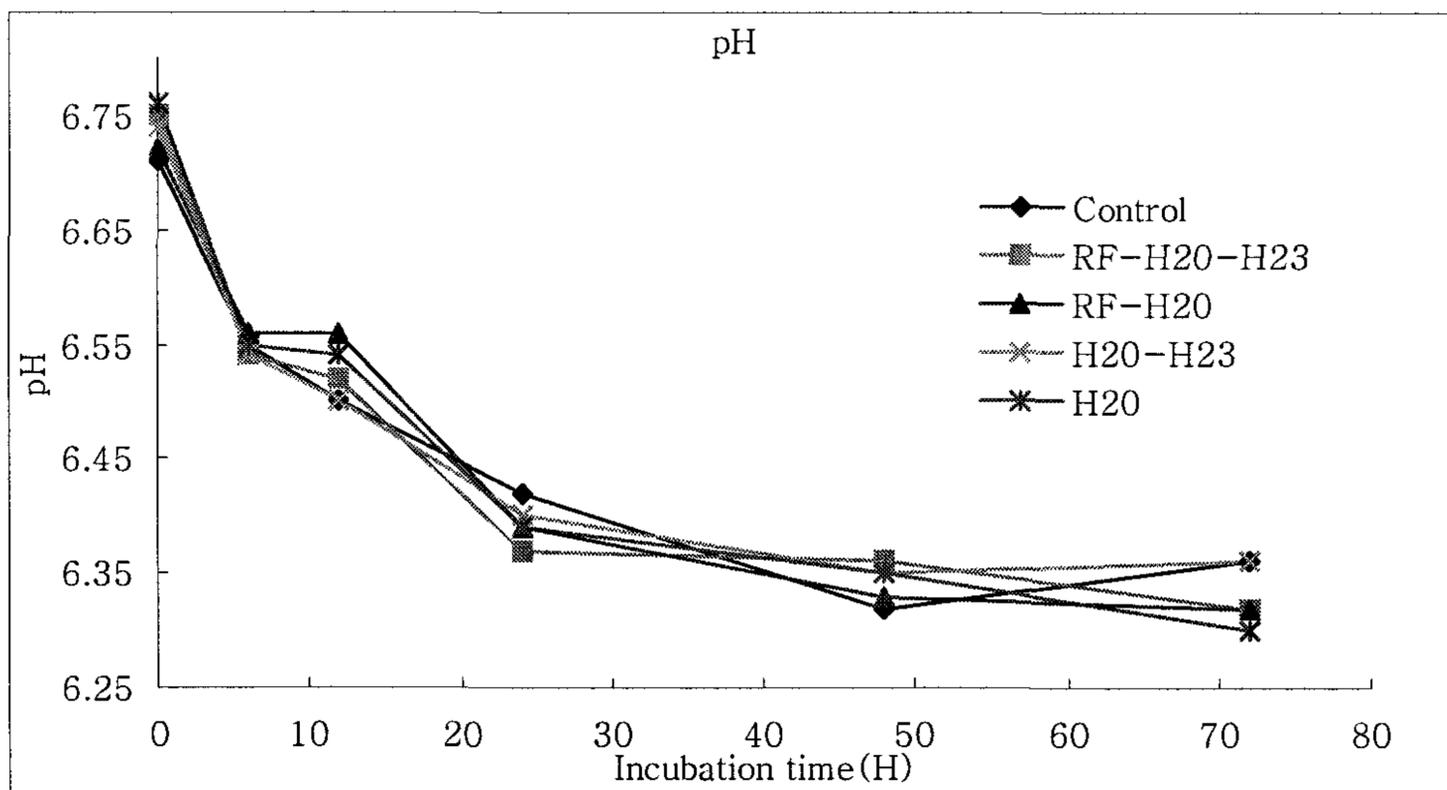


Figure 2-3-1. Change of pH values in the culture of rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

나) 암모니아태 질소

Table 2-3-11. Ammonia-N(mg/100ml) of rice straw of the culture of rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(h)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	13.76	16.82	16.75	15.31	16.74	0.4740
6	13.68 ^b	13.97 ^b	15.69 ^{ab}	16.22 ^a	16.40 ^a	0.0320
12	15.38 ^b	15.40 ^b	17.08 ^a	16.35 ^{ab}	16.59 ^{ab}	0.0852
24	18.82 ^{ab}	18.02 ^b	21.17 ^{ab}	21.74 ^a	22.46 ^a	0.0694
48	31.44	32.33	31.95	32.54	31.30	0.9162
72	33.82	33.31	33.99	33.66	33.63	0.9618

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

암모니아태 질소농도는 Table 2-3-11 과 Figure 2-3-2에 나타내었다. 배양 6 시간부터 72시간까지 암모니아질소 농도는 H20, H20-H23 및 RF-H20 그룹에서 높은 농도를 나타냈다. 이는 효소에 의한 사료내 단백질분해가 증가하여 암모니

아질소농도가 증가했다는 보고(Hristov 등, 1998, 2000)와 같은 결과라 보여 진다. 반면 대조구와 RF-H20-H23 그룹은 배양 전반에 걸쳐 암모니아질소농도가 낮게 나타났다.

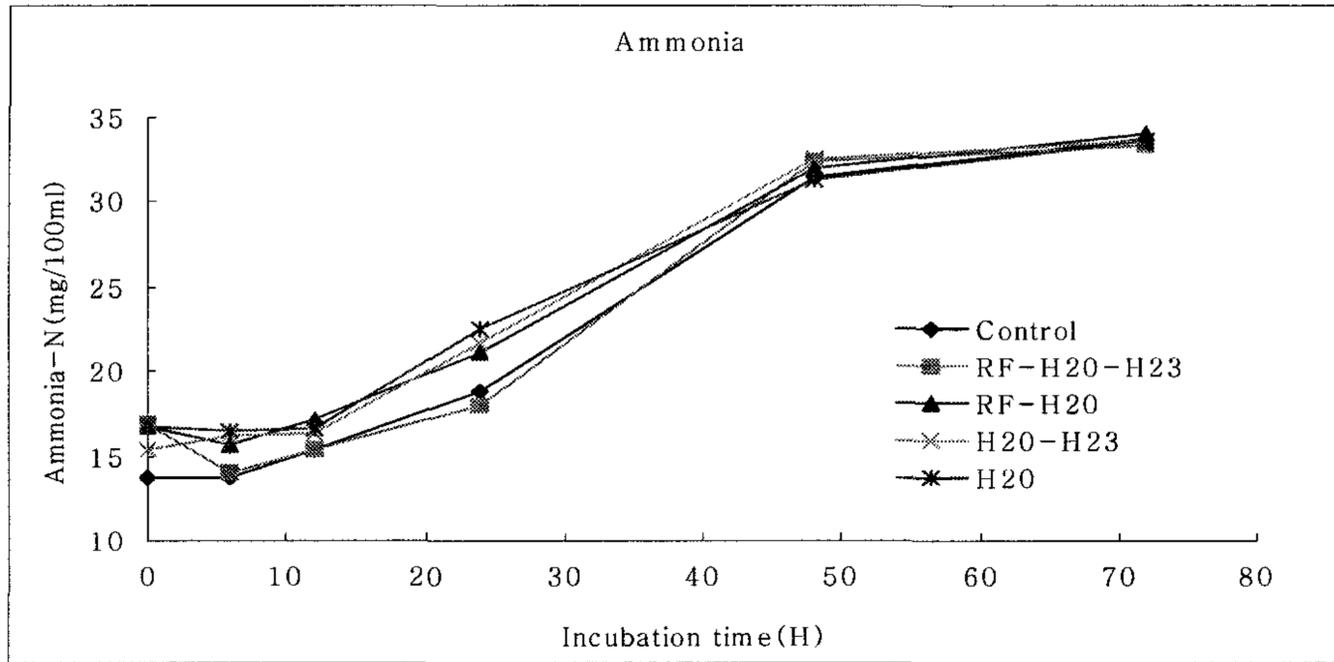


Figure 2-3-2. Change of ammonia-N(mg/100ml) in the culture of rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

다) 배양액내 VFA

Table 2-3-12. Total VFA production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	37.75	37.63	37.16	35.57	39.27	0.687
6	45.70	46.54	48.03	44.74	47.94	0.525
12	58.47 ^b	58.44 ^b	60.63 ^{ab}	62.56 ^a	57.88 ^b	0.604
24	66.85	74.40	72.26	75.58	70.72	1.754
48	86.87	86.74	86.75	87.67	90.06	0.521
72	88.49 ^b	92.23 ^{ab}	94.80 ^a	93.32 ^{ab}	93.63 ^{ab}	0.848

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

벗짚을 기질로 하여 혼합반추위 미생물의 배양시 섬유소분해 박테리아의 혼합

그룹첨가시 총휘발성지방산의 변화를 Table 58과 Figure 5에 나타내었다. 모든 처리구에서 배양 24시간까지 지속적으로 증가하였으며, 48시간 배양이후부터 서서히 증가속도가 감소하였다. 배양 12시간대에에서 H20-H23 혼합 그룹의 첨가시 RF-H20 처리구를 제외한 모든 처리구에 비하여 유의적으로 높은 휘발성지방산 (62.56 mM/100ml)을 생성하였다($p < 0.05$). 72시간 배양시에는 control에서 가장 낮은 총휘발성지방산의 생성량을 나타내었으며 특히, RF-H20 첨가구에 비하여 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 전반적으로 control에 비하여 모든 첨가구에서 높은 총휘발성지방산의 생산하는 경향을 보였다.

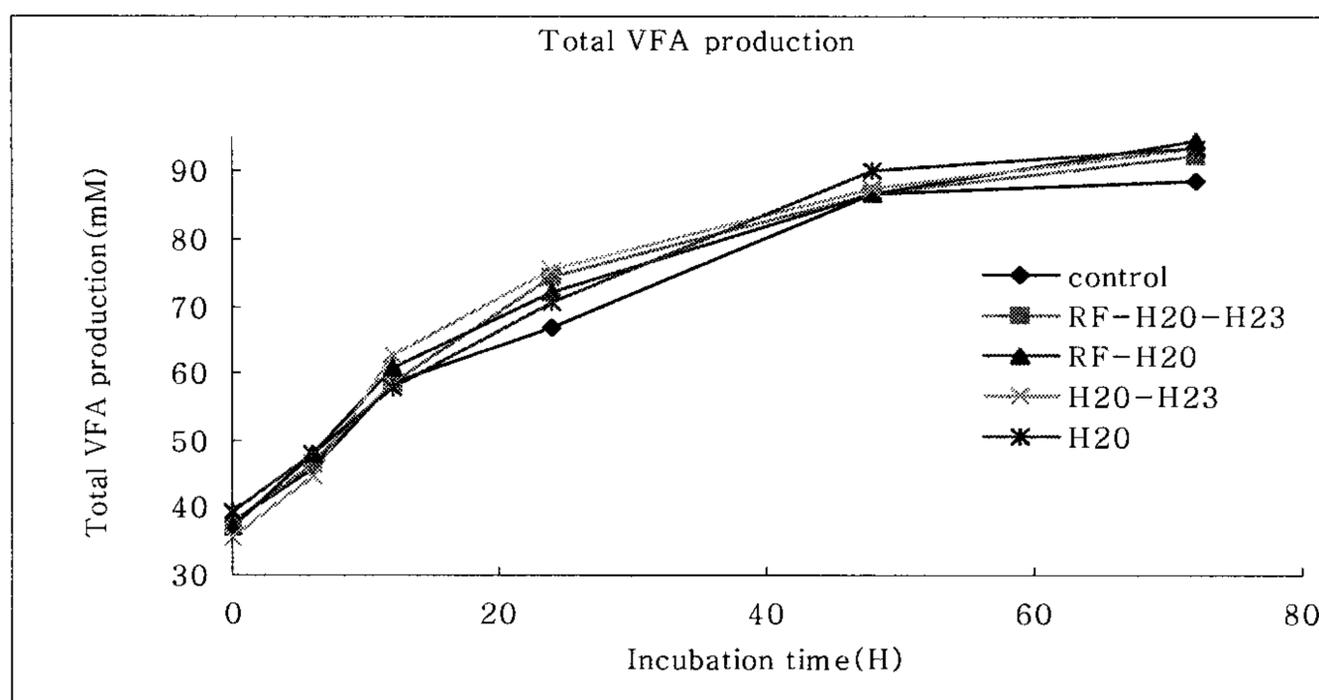


Figure 2-3-3. Change of Total VFA production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

Table 2-3-14. Acetic acid production(mM) the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	26.32 ^{ab}	26.70 ^{ab}	26.38 ^{ab}	25.31 ^b	27.99 ^a	0.357
6	31.21 ^{ab}	31.66 ^{ab}	32.68 ^{ab}	30.67 ^b	33.17 ^a	0.367
12	38.58 ^{ab}	38.09 ^b	39.83 ^{ab}	40.54 ^a	37.59 ^b	0.393
24	46.05	46.41	43.98	45.47	45.86	0.439
48	51.46 ^b	51.49 ^b	51.81 ^b	51.74 ^b	54.04 ^a	0.349
72	53.11	54.6	56.51	55.3	56.02	0.498

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

Acetic acid의 농도는 Table 2-3-14와 Figure 2-3-4에 나타내었다. 배양 0시간 부터 6시간대 acetate의 농도는 H20 그룹에서 27.99, 33.17mM/100ml로 가장 높았으며($p < 0.05$), 배양 12시간대는 H20-H23 그룹에서 acetate의 농도가 40.54mM/100ml로 가장 높게 나타났다($p < 0.05$). 배양시간이 증가하면서 acetic acid의 농도는 모든 처리 그룹에서 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 배양 마지막인 72시간대 모든 처리 그룹에서 acetate의 농도는 유의적으로 차이가 없었다.

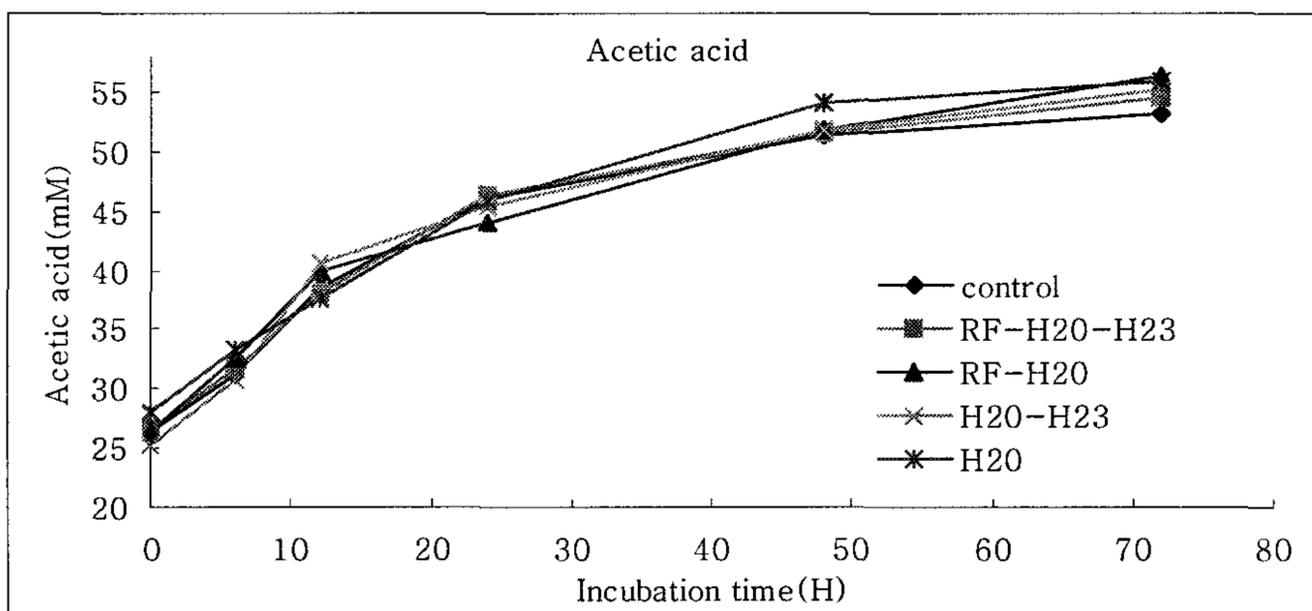


Figure 2-3-4. Change of acetic acid concentration(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

각 그룹들에서 생성된 propionic acid 농도는 배양 시간이 증가하면서 모든 그룹에서 증가하는 것으로 나타났다(Table 2-3-15, Figure 7). Acetic acid의 농도에 비해 propionic acid 농도는 3~5배 적게 측정되었다. 배양 0시간대 H20 그룹에서 propionic acid 농도가 가장 높게 측정되었으며, control, RF-H20-H23, RF-H20 및 H20-H23은 유의적으로 차이가 없었다($p < 0.05$). 배양 6일째 모든 처리에서 propionic acid의 농도는 차이가 없었으며($p < 0.05$), 배양 24시간에서 배양 48시간대 propionic acid의 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 배양 72시간대는 control을 제외한 모든 처리 그룹에서 높게 측정되었다($p < 0.05$).

Table 2-3-15. Propionic acid production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	5.42 ^{ab}	5.42 ^{ab}	5.34 ^{ab}	5.11 ^b	5.63 ^a	0.068
6	8.10	8.48	8.70	8.26	8.69	0.101
12	12.76 ^b	12.34 ^b	12.54 ^b	13.59 ^a	12.22 ^b	0.187
24	15.12	16.00	15.05	16.12	14.99	0.301
48	17.61	17.70	17.75	18.28	18.43	0.132
72	17.79 ^b	19.27 ^a	19.67 ^a	19.37 ^a	19.51 ^a	0.217

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

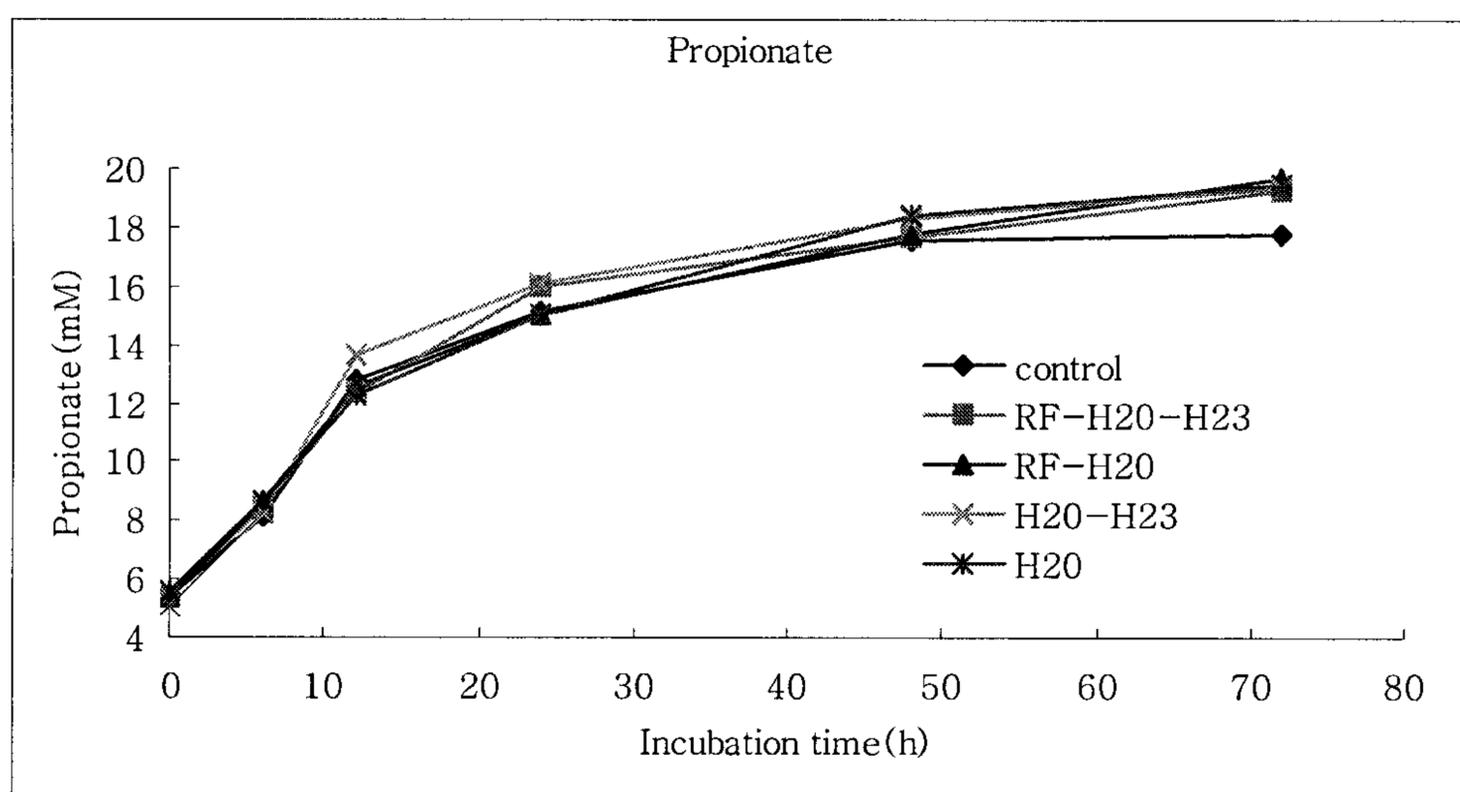


Figure 2-3-5. Change of propionic acid concentration(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

Table 2-3-16. Butyric acid production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	2.82 ^a	2.63 ^{ab}	2.62 ^{ab}	2.50 ^b	2.71 ^{ab}	0.040
6	3.45 ^{ab}	3.50 ^{ab}	3.65 ^a	3.30 ^b	3.52 ^{ab}	0.046
12	4.94 ^b	4.95 ^b	5.07 ^b	5.26 ^a	4.87 ^b	0.047
24	7.00 ^c	7.20 ^{bc}	7.56 ^a	7.57 ^a	7.36 ^{ab}	0.073
48	8.91	8.90	8.73	9.05	8.82	0.047
72	8.72 ^b	9.28 ^a	9.44 ^a	9.34 ^a	8.98 ^{ab}	0.092

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

배양 시간이 증가하면서 butyric acid의 생성도 모든 처리 그룹에서 증가하였다(Table 2-3-17, Figure 2-3-6). 배양 12 및 24시간대 H20-H23 그룹에서 5.26 및 7.57mM/100ml로 butyric acid를 가장 많이 발생시켰으며($p < 0.05$), 배양 48시간대는 모든 처리 그룹에서 butyric acid의 생성은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 배양 마지막 시간대인 72시간에 butyric acid의 생성은 RF-H20, H20-H23 및 RF-H20-H23 그룹에서 각각 9.44, 9.34 및 9.28mM/100ml로 control에 비하여 유의적으로 높은 butyric acid의 생성을 나타냈다 ($p < 0.05$).

Valeric acid의 생성량은 Table 61 과 Figure 9에 나타내었다. 배양 6시간부터 12시간까지 valeric acid의 생성량은 모든 처리 그룹에서 유의적인 차이가 없었으며, 배양 24시간대 RF-H20, H20 및 H20-H23 그룹의 valeric acid 생성량이 2.14, 2.08 및 2.06mM로 높았으며, 배양 7일째 모든 처리 그룹에서 유의적 차이를 보이지 않았다.

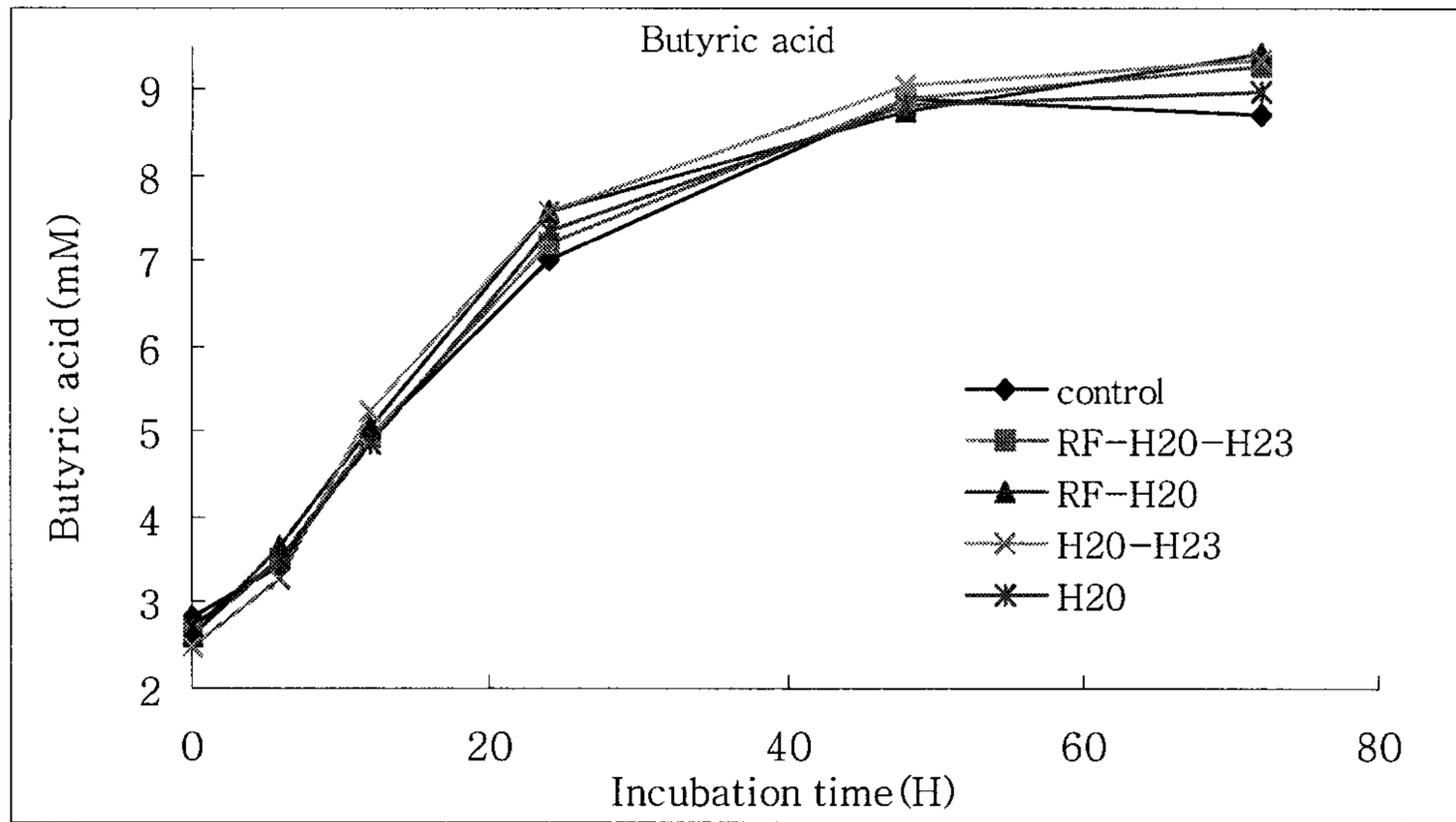


Figure 2-3-6. Change of butyric acid concentration(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Table 2-3-17. Valeric acid production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	1.11	0.97	0.95	0.91	1.01	0.034
6	1.02	1.02	1.04	1.16	1.24	0.039
12	1.12	1.1	1.12	1.1	1.11	0.007
24	1.85 ^b	1.87 ^b	2.14 ^a	2.06 ^a	2.08 ^a	0.037
48	3.79 ^{ab}	3.74 ^b	3.69 ^b	3.66 ^b	3.97 ^a	0.039
72	4.19	4.1	4.23	4.26	4.33	0.049

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-3-2.

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

시험 2에서 가장 섬유소 분해 능력이 우수한 RF-H20-H23 그룹을 선발하여 혼합 반추위액에 혼합박테리아를 첨가하여 배양한 결과 분리된 섬유소 분해균을 접종하지 않은 처리구가 가장 낮은 활력을 보였으며, 단독 보다는 혼합균을 접종한 처리에서 높은 분해 활력을 나타내었다. 정(1996)은 건물소실율에 있어서 혼

합배양액 중의 건물소실이 단일배양액 중의 건물소실보다 일반적으로 많음을 알 수 있었으며, 이는 반추위 미생물의 교호작용의 중요성을 지적해 주는 결과라고 하였다. Odenyo 등(1991)은 혼합균에 의한 분포가 단독배양보다는 더 넓게 존재하기 때문이라고 하였으며, Osborne 와 Dehority(1989)는 pentose를 이용하지 못하는 *F. succinogenes*를 hemicellulose를 분해하는 *Prevotella ruminocolar*와 함께 배양시 단독배양시 보다 hemicellulose의 분해율이 증가한다고 하였다. 미생물 제제의 반추동물 사료내 첨가는 반추위내 미생물이 이용 가능한 환원당의 농도를 증가시키고, 그 결과로서 사료내 반추위분해단백질과 발효동조화현상이 나타나 미생물 단백질합성량이 증가하며, 아울러 반추위 미생물에 의한 소화율이 증가할 뿐만 아니라 산유성적 또한 개선되는 것으로 보고되고 있다(Hristov 등, 1988; Rode 등, 1999; Wang 등, 2001). 따라서 처리 그룹들 중 H20-H23 그룹을 반추위 혼합 미생물에 접종하였을 때 가장 높은 활력을 나타내었으며, 이 결과로 보아 H20-H23 그룹을 생균제로 이용시 반추위내에서 높은 활력을 나타낼 것으로 생각된다.

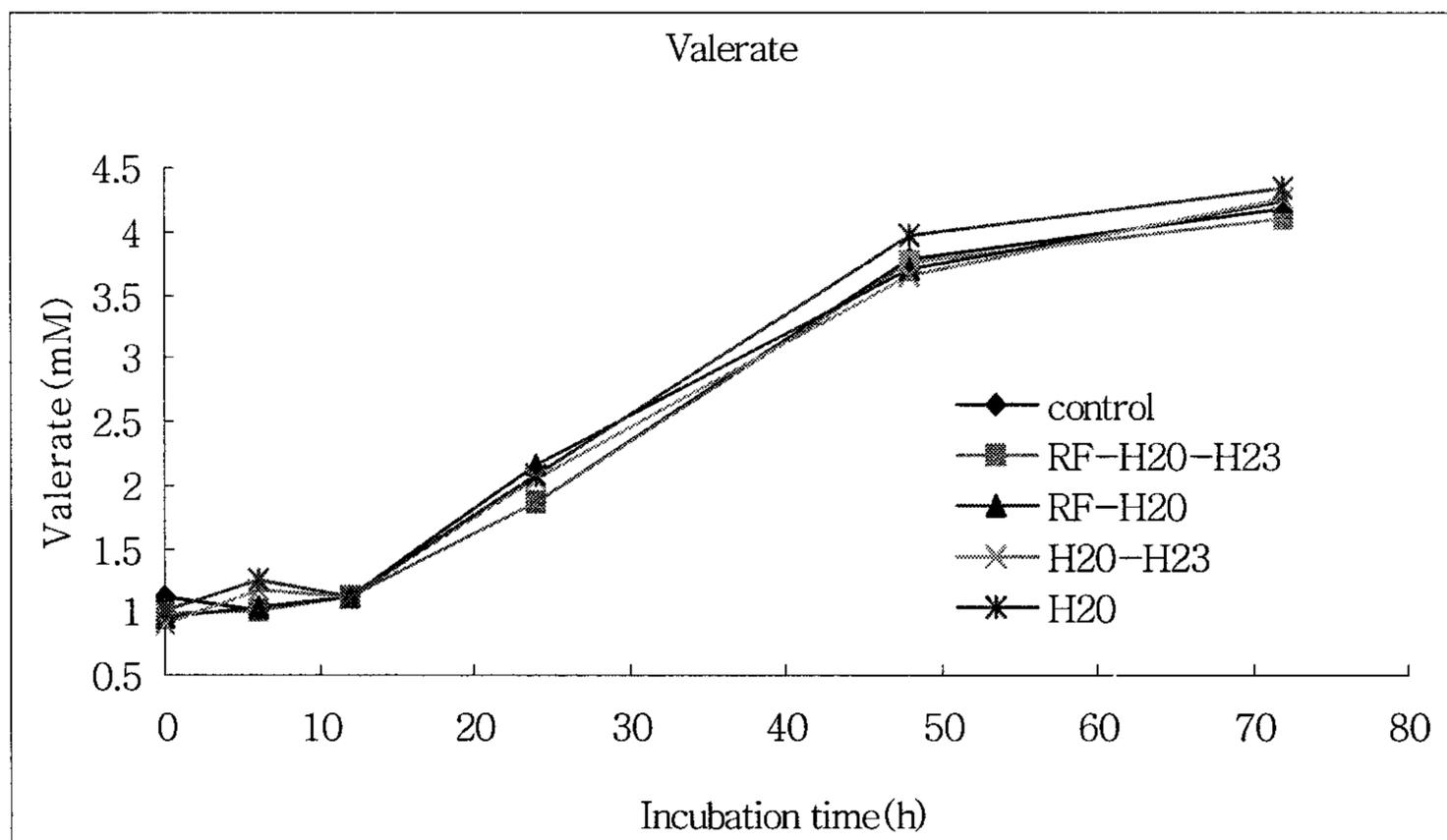


Figure 2-3-7. Change of valeric acid concentration(mM) in the culture of rumen added with anaerobic cellulolytic bacteria.

시험 4. 섬유소 분해 박테리아 혼합균의 첨가에 의한 *in vitro* 혼합반추위 미생물의 알팔파 분해율 및 발효특성에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 혐기성 섬유소 분해 박테리아의 공시

시험 6에서 사용한 RF-H20-H23의 혼합균으로부터 RF, H20 및 H23균과 혼합반추위액(rumen fluid)을 공시하였다.

2) 사용배지 및 공시기질

알팔파 건초를 1 mm screen을 가진 hammer mill에서 분쇄하였으며, DA medium이 16 ml 들어있는 serum bottle에 탄소원으로 알팔파 건초를 0.2g씩 첨가하였다.

3) 반추위액의 채취 및 준비과정

시험 6과 동일하게 실행하였다.

4) 공시균주의 혼합 및 접종

시험 6과 동일하게 실행하였다.

5) 배양 방법 및 배양시간

혐기상태를 유지하며, 39°C incubator에서 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 교반 없이 배양하였으며 각 조사시간대별로 시료채취 및 각 시험을 수행하였다.

6) 건물 분해율의 측정

배양이 완료된 serum bottle을 개봉하여 상층액을 회수한 후 시험 2와 동일한 방법으로 건물분해율을 측정하였다.

7) 가스 발생량의 측정

시험 2와 동일하게 실행하였다.

8) 가수분해 효소의 활력

시험 2와 동일한 방법으로 분석하였다.

9) 미생물 혼합 배양에 의한 단백질 생산량 측정

시험 4와 동일한 방법으로 수행하였다.

10) 배양액내 암모니아 측정

시험 6과 동일한 방법으로 수행하였다.

11) 배양액의 pH 측정

시험 6과 동일한 방법으로 수행하였다.

12) 배양액의 VFA 분석

시험 6과 동일한 방법으로 수행하였다.

13) 통계분석

시험2와 동일한 방법으로 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 건물분해율

알팔파를 기질로 하여 혼합배양된 섬유소 분해 박테리아를 혼합 반추위액에 접종 하였을 때의 기질 분해율을 Table 62에 나타내었다. Control과 모든 처리구는 배양 6시간 때부터 전 배양 시간동안 계속해서 건물분해율이 증가하였다. 배양 6시간 때 H20균을 첨가한 처리구가 다른 처리구에 비해 높은 분해율을 나타내었으며, 배양 12시간 때는 control과 RF-H20-H23균 및 RF-H20균을 접종한 처리구에서 높은 분해율을 나타내었다($p < 0.05$). 배양 48시간 때는 처리간 분해율의 차이가 나지 않았다. 배양 72시간 때 RF-H20균을 첨가한 처리구가 29.41%로 본 시험에서 가장 높은 건물 분해율을 나타내었다($p < 0.05$).

Table 2-4-1. Dry matter degradation rates(%) of alfalfa in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	2.75 ^b	0.94 ^b	2.04 ^b	2.40 ^b	5.25 ^a	0.480
12	4.78 ^b	7.43 ^{ab}	8.14 ^a	9.60 ^a	6.62 ^{ab}	0.540
24	15.81 ^a	15.80 ^a	15.72 ^a	13.82 ^{ab}	12.66 ^b	0.416
48	25.70	25.53	25.91	25.93	27.53	0.360
72	28.87 ^a	27.05 ^{ab}	29.41 ^a	26.96 ^{ab}	18.49 ^b	1.517

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

2) 가스발생량

Table 63에서처럼 RF-H20균을 첨가한 처리구가 배양기간 동안 가스발생량이 가장 높았으며($p < 0.05$), 가스 발생량은 건물분해율과 비슷하게 배양 6시간 때부터 전 배양 기간동안 증가 하였다. H20균을 접종한 처리구는 배양 6시간부터 전 배양 기간동안 다른 처리구에 비해 낮은 가스발생량을 보였으며($p < 0.05$), 배양 72시간 때 RF-H20균을 접종한 처리구가 28.53 ml/0.1g 으로 본 시험에서 가장 높은 가스발생량을 보였다.

Table 2-4-2. Gas production(ml/0.1g DM substrate) of alfalfa in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	4.67 ^a	3.83 ^b	4.60 ^a	3.70 ^b	3.80 ^b	0.143
12	9.43 ^a	8.77 ^b	9.73 ^a	8.17 ^c	8.63 ^{bc}	0.165
24	16.93 ^{ab}	16.37 ^b	17.33 ^a	14.37 ^d	15.27 ^c	0.304
48	23.77 ^a	23.60 ^a	23.90 ^a	21.73 ^d	22.53 ^b	0.255
72	27.90 ^b	27.40 ^{bc}	28.53 ^a	26.40 ^d	26.83 ^{cd}	0.014

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

3) 누적 가스발생량

누적 가스발생량은(Table 2-4-3) 선발된 섬유소 분해균을 접종하지 않은

control과 RF-H20균을 혼합해서 접종한 처리구가 전 배양기간 동안 가장 높은 누적 가스량을 보였다. H20-H23균을 혼합하여 접종한 처리구는 배양 24시간 때부터 배양 72시간 때까지 가장 낮은 누적 가스발생량을 나타냈으며(p<0.05), 앞에서 조사한 가스발생량과 같은 양상을 보였다.

Table 2-4-3. Cumulative gas production (ml/0.1g DM substrate) of alfalfa of the culture rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	4.67 ^a	3.83 ^b	4.60 ^a	3.70 ^b	3.80 ^b	0.143
12	14.10 ^a	12.60 ^b	14.33 ^a	11.87 ^c	12.43 ^{bc}	0.214
24	31.03 ^a	28.97 ^b	31.67 ^a	26.23 ^d	27.70 ^c	0.555
48	54.80 ^a	52.57 ^b	55.57 ^a	47.97 ^d	50.23 ^c	0.775
72	82.70 ^a	79.97 ^b	84.10 ^a	74.37 ^d	77.07 ^c	0.971

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscripts differ(p<0.05).

4) 가수분해효소 활력조사

가) Extracellular CMCase 활력

전 배양 기간동안 H20균을 첨가한 처리구가 가장 높은 CMCase 활력을 보였다(p<0.05, Table 2-4-5). CMCase의 활력은 배양 12시간 때 H20균을 첨가한 처리구가 24.54 $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 배양 기간동안에 가장 높은 CMCase 활력을 나타냈으며, 배양 72시간 때에는 모든 처리구의 CMCase 활력이 감소하는 것을 알 수 있었다.

Table 2-4-5. Extracellular CMCase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of alfalfa in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	10.48 ^b	10.43 ^b	10.43 ^b	10.59 ^a	16.09 ^a	0.844
12	21.75 ^{ab}	14.10 ^c	11.65 ^c	21.01 ^b	24.54 ^a	1.365
24	12.04 ^c	12.38 ^c	13.03 ^c	15.16 ^b	20.17 ^a	0.821
48	15.29 ^c	15.78 ^c	17.13 ^{bc}	20.60 ^{ab}	22.03 ^a	0.815
72	14.55 ^b	14.52 ^b	14.86 ^b	16.34 ^{ab}	18.90 ^a	0.582

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

나) Extracellular Avicelase 활력

Extracellular Avicelase 활력은 Table 66에 나타내었다. Cellulose 중에서 가장 분해가 어려운 Avicel에 대한 활력이 모든 처리에서 낮았으며, 배양 6시간 때부터 배양 72시간 때까지 Avicelase의 활력은 모든 처리에서 차이가 없었으나 ($p < 0.05$), 배양 12시간 때 RF-H20-H23균을 혼합 반추위액에 첨가한 처리구가 8.11 $\mu\text{mol/ml/min}$ 으로 가장 낮았다. 모든 처리구는 배양 48시간 때까지 증가하다가 배양 72시간 때 감소하는 것으로 나타났다.

Table 2-4-6. Extracellular Avicelase activities(glucose $\mu\text{mol/ml/min}$) of alfalfa in the culture rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	9.16	10.60	9.45	10.70	11.62	0.374
12	9.89 ^a	8.11 ^b	11.04 ^a	10.90 ^a	11.37 ^a	0.379
24	12.88	12.38	12.83	12.73	12.81	0.092
48	14.28	14.06	13.95	13.79	14.02	0.119
72	10.72	11.49	10.83	10.80	10.40	0.243

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

다) Extracellular xylanase 활력

H20균과 H20-H23균을 혼합 반추위액에 첨가하였을 때 xylanase 활성이 다른 균들을 첨가한 처리구보다 높았다($p < 0.05$, Table 2-4-7). 앞 시험의 CMCase 활성과 같은 결과를 보였으며, H20-H23균을 첨가한 처리구는 배양 6시간 때부터 배양 48시간까지 xylanase의 활성이 증가하다가 배양 72시간 때 감소하며, H20균을 첨가한 처리구의 경우 배양 72시간까지 계속해서 xylanase의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 선발된 혼합균을 접종하지 않은 처리구 control과 RF-H20-H23균과 RF-H20균을 첨가한 처리구들의 xylanase 활성은 배양 12시간 때부터 배양 72시간 때까지 비슷한 것으로 나타났다.

Table2-4-7 . Extracellular xylanase activities (xylose $\mu\text{mol/ml/min}$) of alfalfa in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	13.84 ^c	20.01 ^b	13.46 ^c	43.98 ^a	41.51 ^a	3.666
12	17.41 ^b	19.35 ^b	16.66 ^b	31.96 ^a	34.17 ^a	2.080
24	29.31 ^b	29.74 ^b	31.21 ^{ab}	32.40 ^{ab}	36.70 ^a	0.966
48	24.82 ^b	28.21 ^b	26.50 ^b	41.49 ^a	45.17 ^a	2.341
72	23.09 ^c	27.30 ^{bc}	24.29 ^{bc}	34.44 ^b	57.64 ^a	3.819

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

5) 배양액 내 총단백질량 생성량

단백질 생성량은 Table 68에 나타내었다. Control과 모든 처리구는 배양 12시간 때를 제외하고 유사한 경향을 나타내었다. 배양 12시간 때 H20균을 첨가한 처리구가 4.27 $\mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높았으며($p < 0.05$), RF-H20균을 첨가한 처리구는 3.20 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 낮은 단백질 생성량을 나타냈다.

Table 2-4-8. Total protein contents($\mu\text{g}/\text{ml}$) of alfalfa in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time	Control	RF-H20-H2 3	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
6	2.90	4.04	3.53	3.87	3.72	0.176
12	3.62 ^{ab}	3.66 ^{ab}	3.20 ^b	3.60 ^{ab}	4.27 ^a	0.141
24	4.60	3.62	3.59	4.53	4.73	0.204
48	3.49	3.61	3.60	4.35	3.88	0.183
72	3.07	3.50	3.77	3.27	3.81	0.142

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

6) 배양액내 pH, 암모니아 및 VFA

가) 배양액의 pH

Table 2-4-9. Mean values for *in vitro* fermentation variables of cellulolytic bacteria addition in rumen fluid

	Control	RF-H20- H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
pH	6.63 ^b	6.53 ^b	6.65 ^a	6.66 ^a	6.66 ^a	0.004
NH ₃ -N(mg/100ml)	30.09	30.12	30.74	30.12	30.93	0.297
Total VFA(mM)	53.34 ^b	55.16 ^{ab}	56.52 ^a	53.17 ^b	53.13 ^b	0.460
Acetic acid(mM)	36.88 ^{ab}	38.07 ^a	38.43 ^a	37.25 ^{ab}	36.12 ^b	0.309
Propionic acid(mM)	8.95 ^b	9.18 ^{ab}	9.63 ^a	9.40 ^{ab}	9.37 ^{ab}	0.081
Butyric acid(mM)	3.36 ^c	3.49 ^{bc}	3.60 ^{ab}	3.77 ^a	3.77 ^a	0.049
Valeric acid(mM)	1.63 ^a	1.69 ^a	1.76 ^a	1.30 ^b	1.38 ^b	0.050
Isobutric acid(mM)	0.61	0.65	0.67	0.66	0.65	0.009
Isovaleric acid(mM)	1.91 ^c	1.98 ^b	2.04 ^a	1.92 ^c	1.95 ^{bc}	0.014

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

처리 그룹별 pH 평균은 볏짚을 기질로 이용했을 때 유의적으로 차이가 없었던 것과는 다르게 H20-H23, H20 및 RF-H20 그룹에서 pH 평균이 높게 나타났으며, 암모니아 평균 농도의 경우 볏짚을 기질로 이용했을 때 H20-H23, H20 및 RF-H20 그룹에서 많이 발생되었으나 본 시험에서는 처리 그룹간 유의적인 차이가 없었다. Total VFA, acetic acid 및 propionic acid 발생량 평균의 경우

RF-H20 그룹에서 가장 높은 발생량을 나타냈으며, butyric acid 평균 발생량의 경우 H20-H23 과 H20 그룹에서 3.77mM/100ml로 가장 높게 나타났다. Valeric acid 생성량 평균의 경우 RF-H20-H23과 RF-H20 그룹에서 가장 높게 나타났으며, isobutyric acid 발생량 평균은 처리별 그룹들간 유의적인 차이는 없었다. Isovaleric acid 발생량은 RF-H20 그룹에서 가장 많은 발생하였다. 볏짚을 기질로 이용시 VFA 발생량과 비교하였을 때 acetic acid의 발생량이 적은 반면 propionic acid와 butyric acid 및 valeric acid의 발생량이 높게 나타났다(Table 2-4-9).

Table 2-4-10. pH values of alfalfa of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	Control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	6.74	6.71	6.74	6.74	6.72	0.007
6	6.68	6.69	6.69	6.68	6.68	0.006
12	6.62	6.65	6.63	6.64	6.65	0.007
24	6.58 ^b	6.58 ^b	6.6 ^a	6.64 ^a	6.63 ^a	0.007
48	6.6 ^b	6.57 ^b	6.6 ^{ab}	6.6 ^{ab}	6.64 ^a	0.009
72	6.59 ^b	6.61 ^{ab}	6.63 ^a	6.64 ^a	6.63 ^a	0.006

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

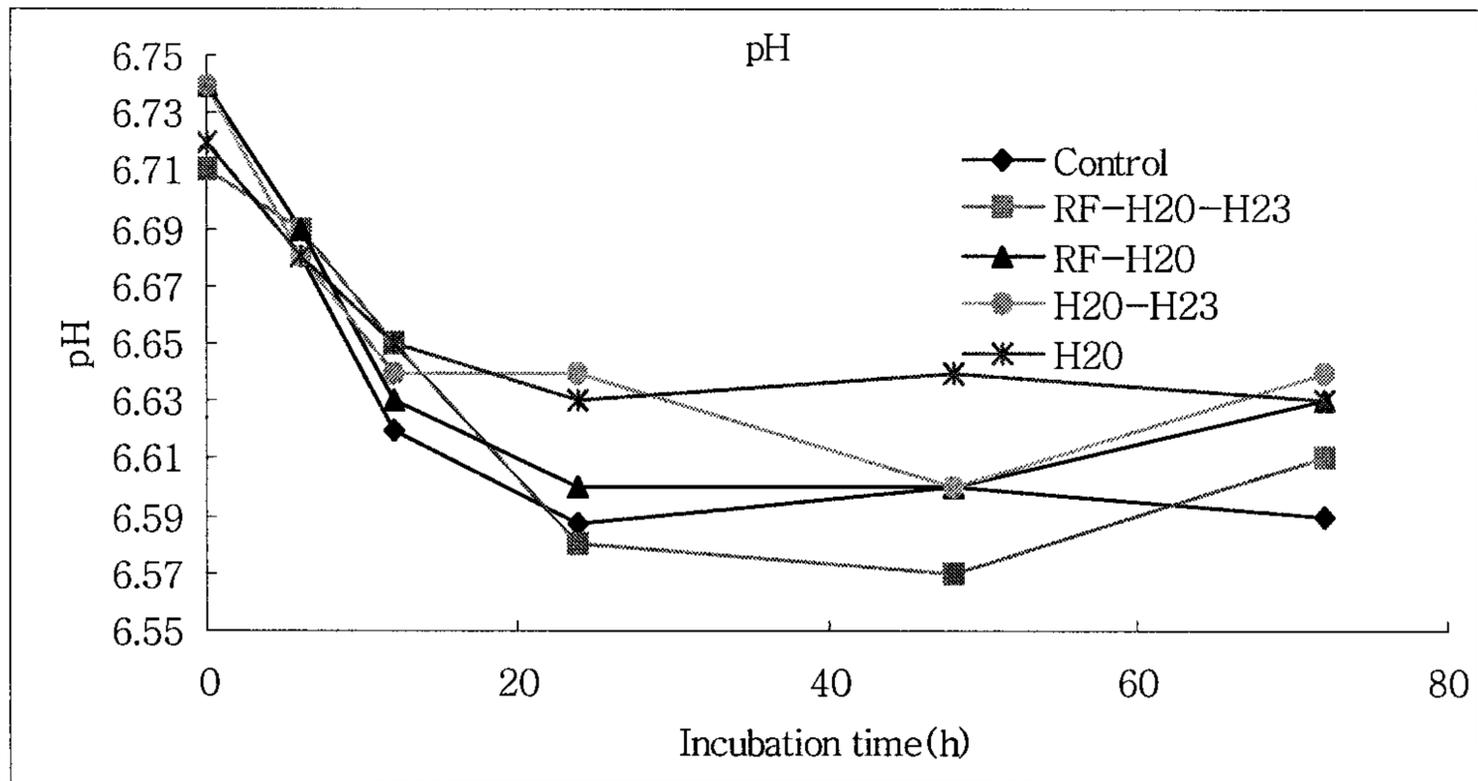


Figure 2-4-1. Change of pH value in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

각 혼합 그룹의 pH의 값을 측정한 결과를 Table 2-4-10 와 Figure 2-4-1에 나타내었다. 배양 0시간에서 12시간 때까지 모든 처리구에서 pH 값은 유의적으로 차이가 없었으나 배양 24시간부터 control, RF-H20-H23 및 RF-H20 그룹에 비해 H20-H23 과 H20 그룹의 pH가 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 배양 초기 pH 6.7로 모든 처리구가 비슷하였으나 배양시간이 경과하면서 pH는 감소하였으며, 48시간째 RF-H20-H23 그룹이 6.57로 가장 낮았다. 반면, H20균의 경우 6.64로 가장 높았다.

나) 암모니아태 질소

암모니아질소의 농도는 배양 6시간째 H20-H23 과 H20 그룹이 가장 높은 농도를 나타냈으며, 배양 12시간부터 배양 24시간에는 모든 그룹에서 유의적으로 차이가 없었다(Table 71, Figure 11). 배양 48시간부터 배양 72시간에서는 H20 그룹이 49.56mg/100ml으로 가장 높은 암모니아질소농도를 나타냈으며, 나머지 그룹들은 유의적으로 차이가 없었다.

Table 2-4-11. Ammonia-N concentration(mg/100ml) of alfalfa of the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	17.46 ^a	14.8 ^{ab}	16.54 ^{ab}	15.49 ^{ab}	13.12 ^b	0.564
6	18.03 ^b	17.36 ^b	18.00 ^b	20.76 ^a	21.02 ^a	0.429
12	25.25	27.01	27.07	30.56	28.86	0.771
24	31.72	31.91	34.07	30.45	33.4	0.689
48	42.20 ^b	42.83 ^b	42.16 ^b	40.34 ^b	47.76 ^a	0.742
72	45.88 ^b	46.82 ^b	47.76 ^{ab}	46.98 ^b	49.56 ^a	0.421

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

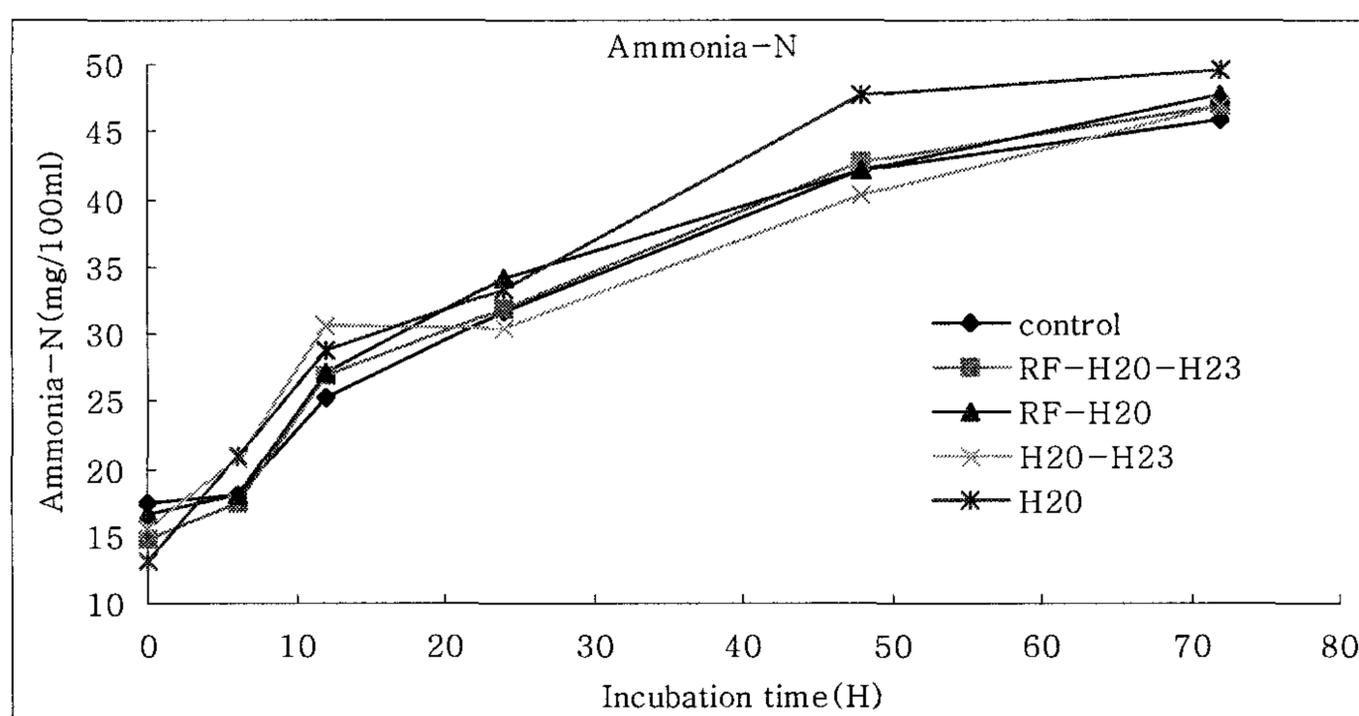


Figure 2-4-2. Change of ammonia-N(mg/100ml) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

다) 배양액내 VFA

알팔파를 기질로 하여 혼합반추위 미생물의 배양시 섬유소분해 박테리아의 혼합 그룹첨가시 총휘발성지방산의 변화를 Table 2-4-12과 Figure 2-4-3에 나타내었다. 모든 처리구에서 배양간이 증가함으로써 지속적으로 증가하였다. 배양 0시간대에 control이 H20 첨가구에 비하여 유의적으로 높은 총VFA발생량을 나타

내었다($p < 0.05$). 6시간 동안 배양시 control에서의 총VFA발생량은 아주 미약하였으나 H20-H23과 H20 첨가구에서는 높은 증가율을 나타내어 control에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 12시간과 24시간 배양동안에는 총VFA의 생성량이 처리가 차이가 없었으나, 48시간 및 72시간에서는 H20 처리구가 가장 높은 총VFA 발생량을 보였다. 특히 48시간대에 H20처리구의 총VFA는 다른 처리구에 비교하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

Table 2-4-12. Total VFA production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	17.46 ^a	14.80 ^{ab}	16.54 ^{ab}	15.49 ^{ab}	13.12 ^b	0.564
6	18.03 ^b	17.36 ^b	18.00 ^b	20.76 ^a	21.02 ^a	0.429
12	25.25	27.01	27.07	30.56	28.86	0.771
24	31.72	31.91	34.07	30.45	33.40	0.689
48	42.20 ^b	42.83 ^b	42.16 ^b	40.34 ^b	47.76 ^a	0.742
72	45.88 ^b	46.82 ^b	47.76 ^{ab}	46.98 ^b	49.56 ^a	0.421

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

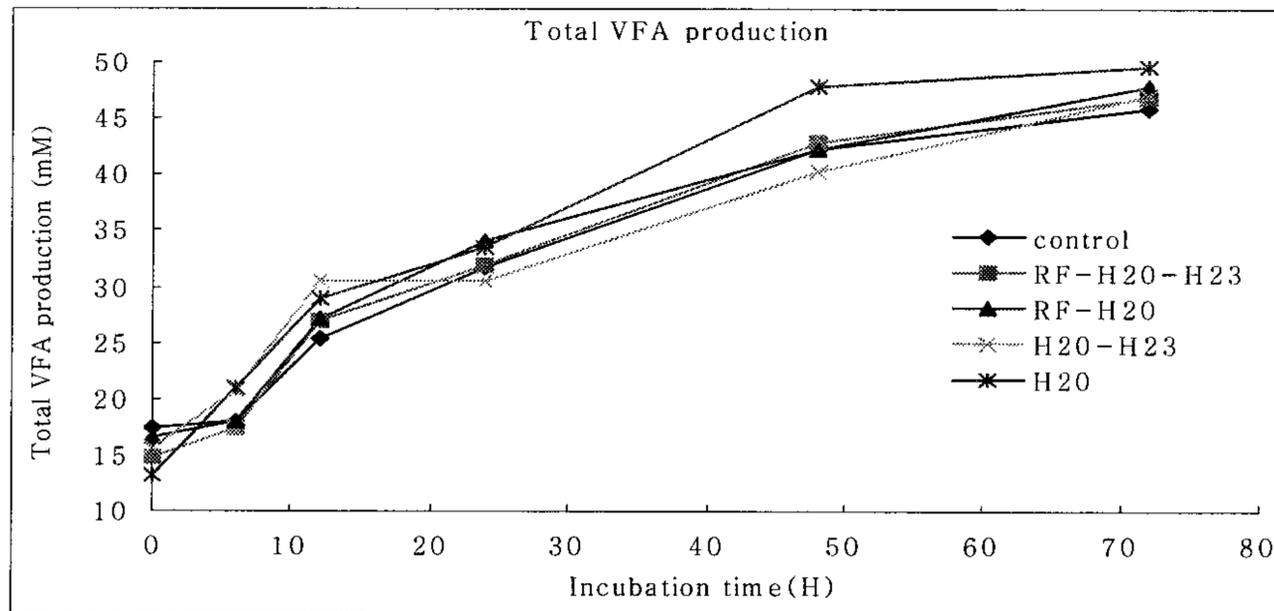


Figure 2-4-3. Change of total VFA production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

배양 시간에 따른 배양액내 acetic acid의 생성량은 Table 2-4-13, Figure

2-4-4에 나타내었다. 배양시간이 증가 할수록 acetic acid의 농도도 증가하였다. 배양 0시간에서 6시간 때에는 모든 처리구의 acetic acid의 농도는 유의적으로 차이가 없었으나 배양 12시간대에 H20-H23 그룹이 36.95mM로 다른 그룹과 비교하여 높았다($p < 0.05$). 전체의 acetic acid 농도는 배양 72시간대에 가장 높았으며, RF-H20 첨가구가 50.01mM으로 배양시간 중 가장 높은 경향이였다($p > 0.05$).

Table 2-4-13. Acetic acid production(mM) in the culture of rumen added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	26.61	27.87	27.99	30.05	27.07	0.514
6	32.58	34.55	33.68	33.51	32.96	0.639
12	33.50 ^{ab}	31.04 ^b	33.1 ^{ab}	36.95 ^a	34.83 ^{ab}	0.780
24	42.01 ^a	41.81 ^a	41.36 ^a	37.67 ^b	35.88 ^b	0.732
48	39.26 ^b	43.84 ^a	44.48 ^a	38.89 ^b	38.43 ^b	0.809
72	47.3	49.31	50.01	46.39	47.57	0.744

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

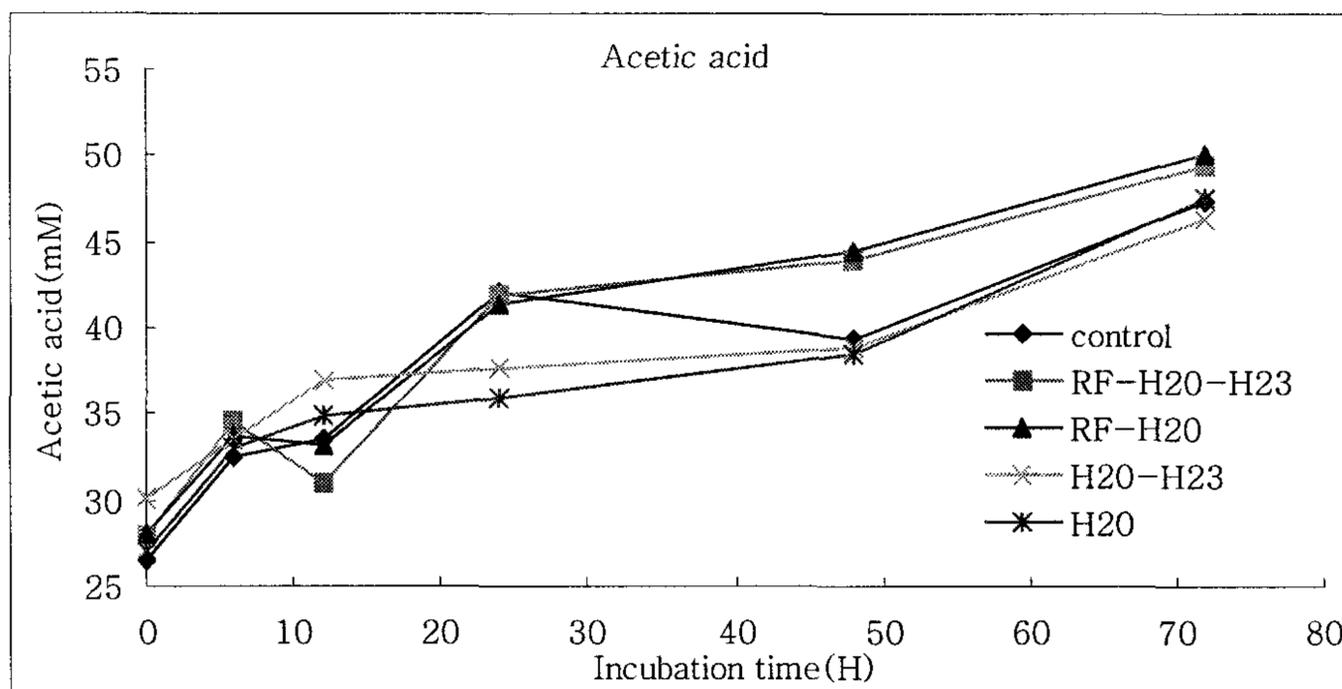


Figure 2-4-4. Change of acetic acid(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

Propionic acid의 생성은 acetic acid와는 다르게 배양 12시간까지 전체 그룹들 간 차이가 없었으나 배양 24시간대 RF-H20-H23 및 RF-H20 그룹이 높은 농도로 propionic acid를 생성하였다($p < 0.05$, Table 74, Figure 14). Propionic acid의 농도는 acetic acid 농도와 같이 배양시간이 증가함에 따라 propionic acid의 농도가 증가 하였으며, 배양 72시간대에 전체 그룹의 propionic acid의 농도는 유의적으로 차이가 없었다.

Table 2-4-14. Propionic acid production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	5.14	5.14	4.95	5.28	4.78	0.100
6	6.18	6.88	6.74	6.42	6.46	0.142
12	8.11	7.89	9.26	8.32	9.08	0.224
24	10.77 ^{ab}	11.11 ^a	11.01 ^a	10.44 ^{bc}	10.24 ^c	0.106
48	10.69 ^b	12.02 ^a	12.17 ^a	11.8 ^a	11.38 ^b	0.188
72	12.84	12.01	13.63	14.13	14.27	0.417

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

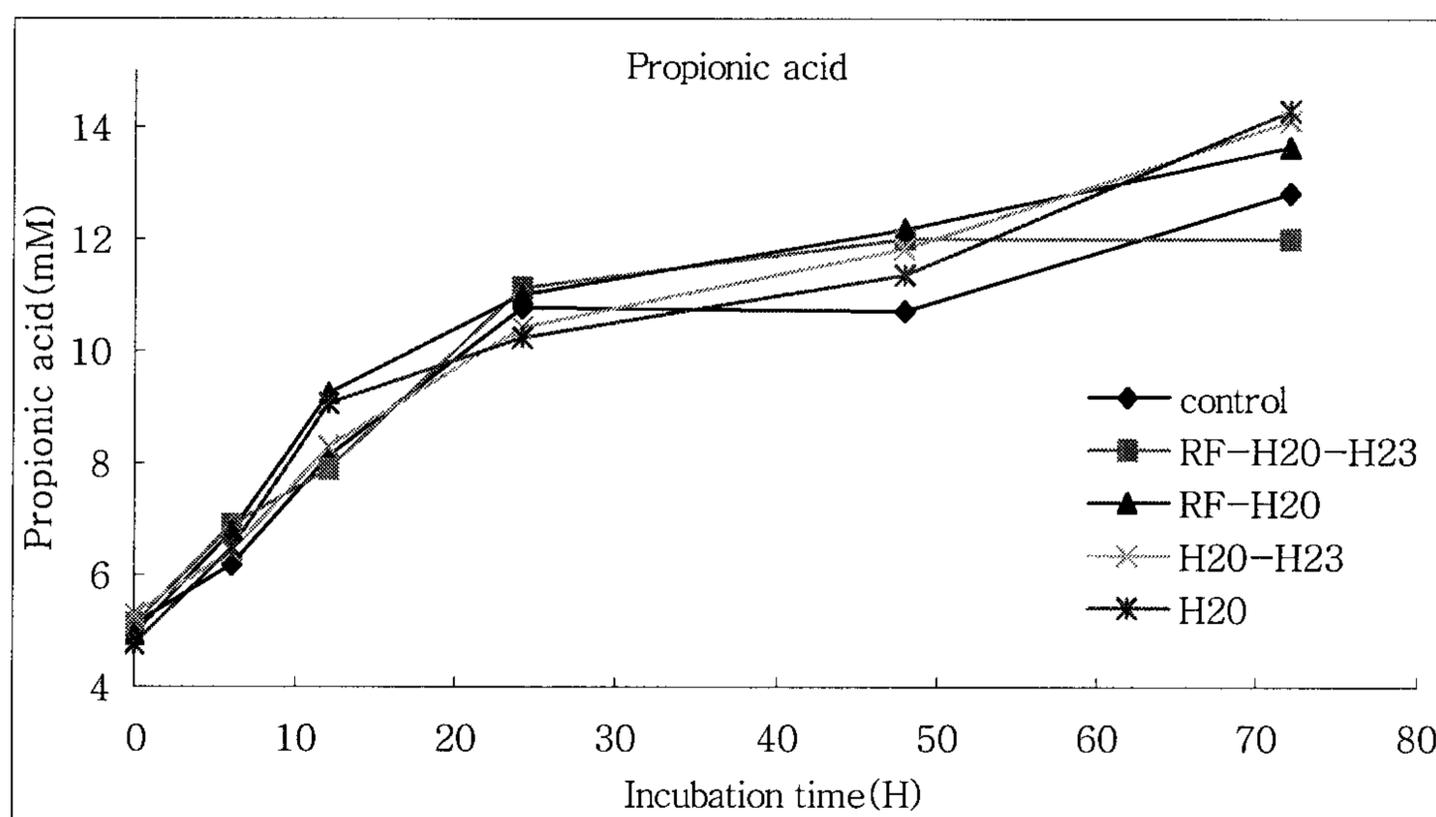


Figure 2-4-5. Change of Propionic acid concentration(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

Butyric acid의 생성은 acetic acid보다 10~30배 적게 생성되었다(Table 75, Figure 15). Butyric acid의 농도는 배양 0시간부터 배양 12시간까지 전체 처리 그룹에서 유의적인 차이가 없었으며, 배양 24시간대 RF-H20-H23 및 RF-H20 그룹이 가장 높았으며 H20-H23에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 배양 72시간대 butyric acid의 생성은 acetic acid와 propionic acid의 농도와는 다르게 H20-H23과 H20 그룹에서 가장 높은 농도를 보였다.

Table 2-4-15. Butyric acid production(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	1.54	1.53	1.47	1.57	1.47	0.038
6	1.66	1.99	1.84	1.97	2.04	0.059
12	2.47	2.37	2.83	2.43	2.71	0.071
24	4.41 ^{ab}	4.58 ^a	4.62 ^a	4.29 ^b	4.47 ^{ab}	0.041
48	4.67	4.98	5.22	5.26	5.26	0.092
72	5.4 ^b	5.54 ^b	5.61 ^b	6.30 ^a	6.69 ^a	0.144

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

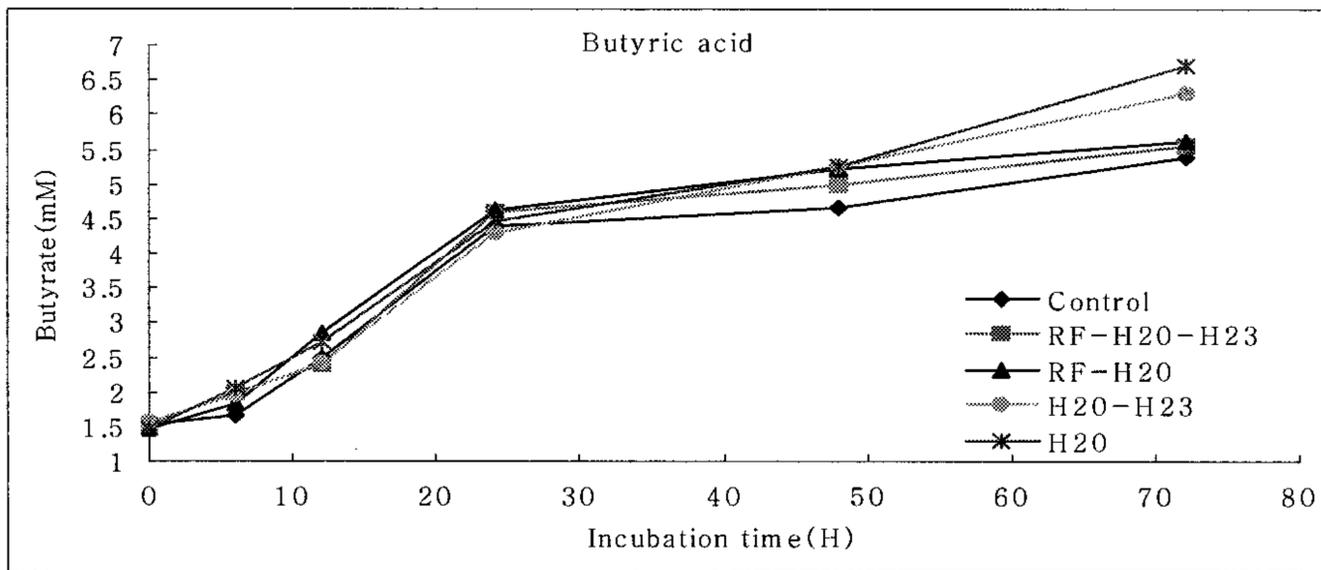


Figure 2-4-6. Change of butyric acid concentration(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

Acetate와 propionate에 비해 소량 생성되는 valeric acid는 배양 6일째 전체 그룹간 유의적인 차이가 없었으며, 배양 12시간부터 배양 마지막인 72시간까지 RF-H20-H23 과 RF-H20 그룹에서 가장 높은 valeric acid가 생성되었다($p < 0.05$, Table 76, Figure 16). 모든 처리에서 valeric acid 생성은 배양 초기부터 계속해서 증가하였으며, 이것은 acetic acid, propionic acid 와 butyric acid 농도가 배양 시간에 따라 증가하는 결과와 같다.

Table 2-4-16. Valeric acid production(mM) in the culture of rumen added with anaerobic cellulolytic bacteria

Incubation time(H)	control	RF-H20-H23	RF-H20	H20-H23	H20	SEM
0	0.72 ^a	0.64 ^{ab}	0.61 ^{ab}	0.64 ^{ab}	0.59 ^b	0.019
6	0.59	0.65	0.64	0.63	0.62	0.012
12	0.61 ^{ab}	0.60 ^{ab}	0.72 ^a	0.59 ^b	0.65 ^{ab}	0.018
24	1.32 ^{bc}	1.40 ^{ab}	1.44 ^a	1.29 ^c	1.34 ^{bc}	0.017
48	2.72 ^b	3.1 ^a	3.24 ^a	1.87 ^c	1.84 ^c	0.162
72	3.85 ^a	3.76 ^a	3.88 ^a	2.78 ^b	3.21 ^{ab}	0.139

H20, H23 and RF : Same as in Table 2-4-1.

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

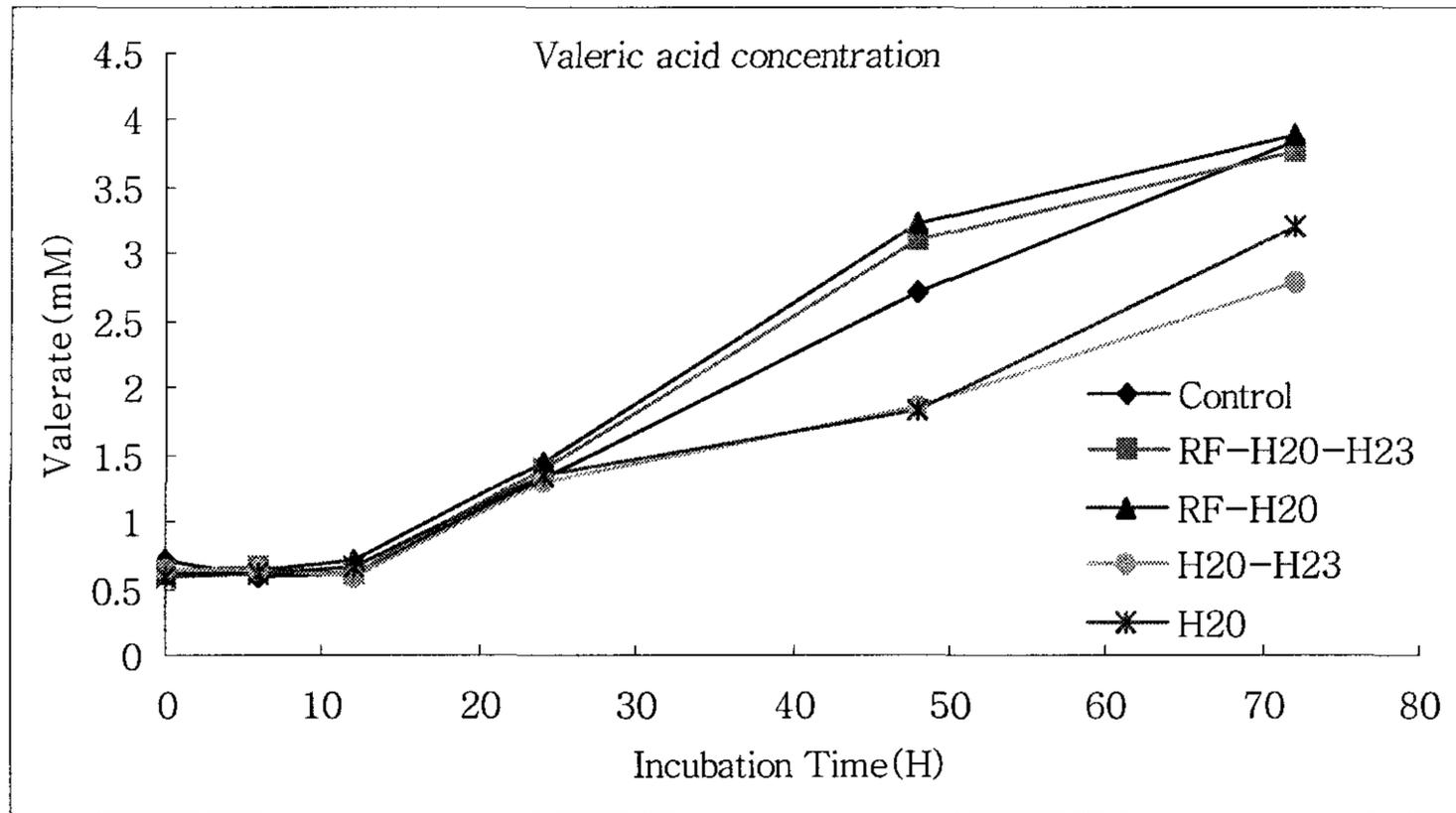


Figure 2-4-7. Change of valeric acid concentration(mM) in the culture of mixed rumen microorganisms added with anaerobic cellulolytic bacteria.

본 시험에서는 미생물제제로서 이용 가능성이 높은 RF-H20-H23 그룹을 이용하여 시험한 결과 시험 3에서 볏짚을 기질로 이용한 결과와 비교시 차이가 있었으나 Avicel과 xylan을 기질로한 효소활력 조사에서 Avicelase와 xylanase의 활력이 높게 나타났다.

현재까지 국내에서 사용하고 있는 미생물 제제는 반추동물의 장내 미생물이기 보다는 곰팡이 추출물과 효모 추출물을 상품화하여 판매하고 있는 것이므로 장내 생존성 및 효과가 일정치 않은 단점을 가지고 있었으며, 계통에 따라 동물의 장내에서 큰 차이를 나타낼 수 있고 장내 산도에 의해 많은 영향을 받으며, 지금까지 연구를 통해서 나타난 결과가 일관성이 낮은 것에 기인한다. 또한 계대배양의 어려움과 배지조건상 경제성이 낮다는 문제점이 뒤따른다. 미생물제제로서 이용 가능한 후보미생물은 장내 생존성, 내산성, pH에서의 안정성, 높은 계대 능력 및 효소 역가의 조건을 갖추어야 한다. 따라서 시험 6과 시험 7의 결과에서 기질 분해율과 효소활력이 높은 H20-H23 그룹의 혼합균이 미생물제제로서 이용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

3. 대사 시험을 통한 최종 생균제 개발품의 검증

최종 선발된 H20과 H23을 혼합하여 direct-fed microbes(DFM)로 반추동물에 급여시 개발된 생균제제의 반추위내 발효특성을 조사하고자 본 시험을 수행하였다.

1. 재료 및 방법

가. 시험장소 및 기간

사양시험은 충청북도 충주시 주덕면 소재 농가에서 수행하였고, 기타 시험사료의 성분 분석, 자료 처리 및 분석은 본 대학 동물영양학 실험실에서 수행하였다. 반추위액내 pH, 효소활력, 휘발성지방산 및 암모니아를 분석하기 위한 사양시험은 2005년 3월 20일부터 5월 8일까지 실시하였다. 모든 분석은 사양시험이 시작된 후 예비시험기간 1주와 본시험 기간 6주, 총 7주이며 본시험 후 3주 단위로 위액을 채취하였다.

나. 시험동물, 시험사료 및 시험설계

사양시험에 이용된 시험동물은 반추위 cannula가 장착된 Holstein 건유우(평균 체중 550~600kg) 6두를 공시하였다. 반추동물 전용 DFM의 효과를 구명하기 위한 시험사료는 시판 번식우 사료(농협사료)와 annual ryegrass 건초만을 기초사료로 급여한 대조구와, 이들 사료에 DFM을 총 급여사료의 2.5% 수준으로 각각 2등분하여 오전과 오후로 첨가급여하여 1개 첨가구로 두었다. 사양시험을 위해 2처리 2반복으로 급여 후 3주째에 시간대별 위액채취 후 다시 처리를 바꿔 실시하였다.

Table 3-1. The formula (%) of compound feed for cows

Ingredients	(%)
Corn flake	25.0
Wheat bran	25.0
Molasses	5.0
Wheat grain	14.0
Corn gluten feed	3.0
Soybean meal	25.0
Calcium phosphate	0.4
Limestone	1.8
Vitamin premix ¹	0.4
Mineral premix ²	0.4
Total	100.00

시험 사료의 급여는, 1일 농후사료 5kg(건물기준 약 4.5kg)과 조사료 7kg(건물 기준 약 6.6kg)을 2회에 걸쳐 오전 9시와 오후 6시로 나누어 2등분하여 제한 급여하였으며, 음수와 미네랄 블록은 사양시험 전 기간동안 충분 하게 하였다. 기타 사양관리는 시험 목장의 관행에 준하였다. 배합 사료의 배합비율은 Table 77에서 보는 바와 같으며, 배합 사료와 annual ryegrass의 일반성분 함량은 Table 78와 같다.

Table 3-2. Chemical composition of compound feed for cows (% , DM basis)

	Compound feed	Annual ryegrass
Dry matter	95.2	90.9
Crude protein	14.5	6.8
Ether extract	2.0	1.5
Crude fiber	7.1	21.2
Crude ash	8.9	2.8
NDF	36.5	71.2
ADF	11.8	40.5

다. 액상 DFM준비

1) 공시균주의 준비 및 접종

Table 3-3. Dehority's artificial medium

Ingredients	100 ml
Mineral I solution ¹⁾	20 ml
Mineral II solution ²⁾	20 ml
Resazurine ³⁾	0.1 ml
Vitamin Mixture ⁴⁾	1.0 ml
VFA solution ⁵⁾	6.7 ml
Casein(Acid hydrolyzed casein)	2 g
Hemin solution ⁶⁾	0.1 ml
8% Na ₂ CO ₃	5 ml
2.5% Cystein-HCL	0.1 ml

(Burk A. Dehority 1963)

- ¹⁾ Mineral I solution : KH₂PO₄ 4.5g in 1,000ml D.W
²⁾ Mineral II solution : CaCl₂ 0.25g, MgSO₄ 0.25g, NaCl 4.5g, (MnSO₄ · H₂O 0.10g, FeSO₄ · 7H₂O 0.10g, CoCl₂ · 6H₂O 0.01g in 1,000ml D.W
³⁾ Resazurine 0.1% solution : resazurine 0.1g in 100ml D.W
⁴⁾ Vitamin solution :
 ① Pyridoxine HCL 0.20g, riboflavin 0.20g, thiamine HCL 0.20g, nicotinic acid amide 0.20g, Ca-d-pantothenate 0.20g, para-amino benzoic acid 0.01g, stock solution 1.0ml in 1,000ml D.W.
 ② stock solution : Folic acid 0.125g, biotin 0.125g, cobalamine 0.125g in 25ml D.W.
⁵⁾ VFA solution : Acetic 17ml(2.9 × 10⁻²M), propionic 6ml(8.0 × 10⁻³M), n-valeric, isovaleric and DL-α-methylbutyric acid, 1ml each(9 × 10⁻⁴M)
⁶⁾ Hemin solution : Dissolve 50mg hemin in 1ml 1N NaOH; make to 100ml with D.W.

본 대학에서 분리 동정된 섬유소 분해력이 강한 혐기성 2균(*Ruminococcus flavefaciens* H20, *Fibrobacter succinogenes* H23)을 공시하였다. 접종용으로 이용될 각 균주는 Dehority's artificial(DA) medium(Dehority, 1963; Table 79)에 cellobiose를 탄소원으로 하는 배지에서 24시간 배양하였다. 접종용 배지는 H20과 H23균주에 따라 DA medium에 탄수화물 공급원으로 각각 Sigmacell(sigma No. 5504) 또는 starch(sigma No. 9765)를 사용하였으며, 혐기적 방법으로 배양액을 준비하여 시험용 100ml serum bottle에 배지를 75ml씩 분주하였다. 24시간 배양시킨 각 배양액을 1ml씩 미리 준비한 배지가 담긴 시험용 serum bottle에 접종하였다. 접종시 H20과 H23의 총 균수는 각각 9.3과 2.4×10⁷ cfu/ml이었다.

2) 배양 방법 및 배양시간

접종된 배양액은 혐기 상태를 유지하여, 39°C incubater에서 35시간 동안 교반

없이 배양하였다. 준비된 배양액(DFM)은 사료에 첨가되기 전까지 4°C 냉장보관되었다.

다. 조사 항목 및 시험방법

1) 사료성분 분석

건물, 조단백질, 조지방, 조회분 등은 AOAC(1990) 방법에 의하여 분석하였고, ADF(acid detergent fiber)와 NDF(neutral detergent fiber)함량은 Van Soest 등 (1991)의 방법에 따라 분석하였다.

2) 시료 채취

전 시험 기간 7주 동안 1주일간의 예비 기간을 거쳐 본실험인 2주째부터 반추위액을 채취하였다. 반추위액을 채취하기 위해 50ml의 conical tube에 4점의 gauze를 이용하여 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 pH 측정 후 추가발효를 방지하기 위해 ice box를 이용해 냉장상태를 유지하여 신속히 본 대학으로 운반 후 분석을 실시하였다.

3) 반추위 pH측정

반추위액을 채취한 즉시 pH meter(Mettler-Toledo, CH/MP220)를 이용하여 pH를 측정 하였다.

4) 암모니아태 질소

반추위액내 암모니아 측정은 Cheny와 Mabach(1962)의 방법으로 수행 하였다. 생균제 급여 후 0, 1, 3, 6시간대 반추위액을 채취하였다. 채취한 위액을 13,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 얻어진 상층액 과 NH₃ standard를 각각 0.02ml씩 20ml시험관에 넣고, blank tube에는 멸균 증류수로 넣어주었다. 각각의 0.02ml sample 및 standard, 그리고 blank를 넣은 시험관에 phenol 50g과 sodium nitroferricyanide [Na₂Fe(CN)₅NO · 2H₂O] 0.25g를 증류수 1L 에 섞어 만든 phenol color reagent를 1ml씩 첨가한다. 1ml의 phenol color reagent를 첨가한 후 각각의 시험관에 (NaOH) 25g과 sodium hypochloride(4~6% NaCl) 16.8ml를 멸균 증류수 1L를 넣어서 만든 alkali-hypochlorite를 1ml씩 첨가하였다. 첨가 후 37°C 항온

수조에 에서 15분간 배양을 하여 발색 시킨 후 증류수를 8ml씩을 넣어 희석하였다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 640nm에서 OD(optical density)를 측정하였다.

5) VFA 분석

반추위내 VFA는 Erwin 등(1961) 방법에 의해 수행 되었다. pH 측정 후 VFA를 측정할 반추위액들은 microtubes(MCT-175-C, AXYGEN, USA)에 1ml씩 회수한 후 미생물의 작용을 정지하기 위해 0.1ml의 포화 HgCl₂ 용액과 25% HPO₃ 용액 0.2ml를 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 30분간 정치시킨다. 실온에서 정치시킨 배양액은 -20℃의 냉동고에 보관 하였다가 분석 시 13,000rpm에서 10분간 4℃의 microcentrifuge를 이용하여 원심분리 한 후 상층액을 채취하였으며, Gas Chromatography (HP6890, HP, USA)를 이용하여 채취한 상층액은 VFA 표준용액을 기준으로 분석하였다. GC의 분석 조건은 Table 80에 나타내었다.

Table 3-4. The conditions of GLC(Hewlett Packard GC-5890 series) for individual volatile fatty acid composition analysis

Items	Condition
Column	HP-Innowax(Crosslinked Polyethylene Glycol) 30m ×0.32mm ×0.5 μ l
Temperature pro.	10 °C/ min.
Detector	Flame Ionization Detector(FID)
Initial tem.	120 °C
Initial time	1 min.
Final tem.	180 °C
Final time	10 min.
Injector tem.	250 °C
Detector tem.	280 °C
Carrier gas	N ₂
Split ratio	100:1

6) 위액내 가수분해 효소의 활력

가) 조효소액의 채취

생균제 급여후 0, 1, 3, 6 시간대의 반추위액을 채취하여 기질 입자를 제거하기 위해 13,000 rpm에서 5분간 4℃의 microcentrifuge(Eppendorf Centrifuge 5415R,

Eppendorf, Germany)를 이용하여 원심분리한 후 최종 상층액을 extracellular enzyme activity 분석을 위한 조효소액으로 사용하였다.

나) Avicelase 의 활력

반추위액을 13,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 조효소로 이용하였다. 0.05M citrate buffer(pH 5.5)로 제조한 2% Avicel(No. 11365, Avicel[®] PH-101, Fulka, USA)를 이용하여 각각 blank tube에 2% Avicel solution 0.5ml 과 citrate buffer(0.05M, pH 5.5) 0.5ml를 넣어주었다. Sample tube에 2% Avicel solution 0.5ml 과 조효소액 0.5ml를 넣어 45°C의 항온 수조에서 1시간 동안 진탕 배양하였다. 1시간 동안 반응시킨 후 효소 반응을 중지시키기 위하여 배양이 끝나면 각 tube를 boiling water에서 5분 동안 boiling한 후, ice water에서 5분 동안 식혀주었다. 식혀준 반응액을 13,000rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액 0.2ml를 채취하여 DNS(dinitrosalicylic acid)용액 0.6ml씩 넣어준 다음, 반응을 위해 5분 동안 boiling시킨 후, ice water에서 5분 동안 식혀주었다. 증류수 4.2ml을 각각의 tube에 5ml 되게 희석시킨 후 spectrophotometer (V-530, JASCO, Japan) 550nm에서 흡광도(OD값)를 측정하였으며, 기질로부터 유리된 환원당의 양은 glucose를 standard로 하여 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ 단위로 환산하였다.

다) CMCase 활력

0.05M citrate buffer(pH 5.5)로 용해시킨 1% CMC(No. C-4888, carboxymethyl cellulose, Sigma, USA)의 기질을 이용하여 각각 blank tube에 1% CMC solution 0.5ml과 citrate buffer(0.05M, pH 5.5) 0.5ml를 넣어주었다. Sample tube에 1% CMC solution 0.5ml과 조효소액 0.5ml를 넣어 45°C water bath에서 1시간 동안 shaking 하지 않고 배양하였다. 배양 후 분석 방법은 앞의 Avicelase 분석방법과 같은 방법으로 하였다. 분석 후 기질로부터 유리된 환원당의 양은 glucose를 standard로 하여 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ 단위로 환산하였다.

라) xylanase 활력

0.05M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 용해시킨 2% oat spelt xylan(No. X0627, Sigma, USA)의 기질을 이용하여 각각 blank tube에 2% oat spelt xylan 0.5ml과 potassium phosphate buffer(0.05M, pH 7.0) 0.5ml를 넣어주었다. Sample tube에 2% oat spelt xylan 0.5ml과 조효소의 0.5ml를 넣어 45°C shaking water bath에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 분석 방법은 앞의 Avicelase 분석방법과 같은 방법으로 분석하였다. 분석 후 기질로부터 유리된 환

원당의 양은 xylose(No. X3877, Sigma, USA)를 standard로 하여 $\mu\text{mo}/\text{ml}/\text{min}$ 단위로 환산하였다.

7) 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과들은 SAS package program(1996)을 이용하여 t-test를 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 반추위 pH

기초사료만 급여한 대조구와 액상 미생물제제를 첨가 급여한 젖소의 반추위내 pH에 대하여 Table 81에 나타내었다. 비록 통계적으로 유의성은 없지만 반추위내 pH는 액상 미생물제제를 첨가한 급여구에서 보다 낮아지는 경향이였다. 모든 처리구의 pH는 사료 급여 후 3시간대에 가장 낮아졌으며, 6시간대부터 서서히 회복되는 경향이였다. 사료급여 전 대조구와 첨가구 사이의 반추위내 pH는 약간 높은 수준을 유지하여 pH 6.86과 pH 6.92를 나타내었지만, 사료급여 후 1, 3, 6시간대의 반추위내 pH가 대조구보다 첨가구에서 더 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 이유는 생균제를 섭취함으로써 반추위내 혼합 미생물의 활성이 증가됨에 따라 사료의 발효가 급속하게 반추위내에서 증가된 것으로 생각된다.

Table 3-5. Effects of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal pH value in cows

Time after feeding	control	DFM	SEM ¹	Pvalue
0 hr	6.86	6.92	0.041	0.478
1 hr	6.73	6.64	0.041	0.280
3 hr	6.57	6.48	0.034	0.217
6 hr	6.60	6.55	0.033	0.412

¹ SEM, standard error of means.

나. 반추위액내 암모니아태 질소

반추동물 전용 생균제 급여시 급여시간대별 암모니아태 질소함량 변화는 Table 3-5에 나타내었다. 반추위 암모니아 발생량은 생균제 급여 전·후 모두

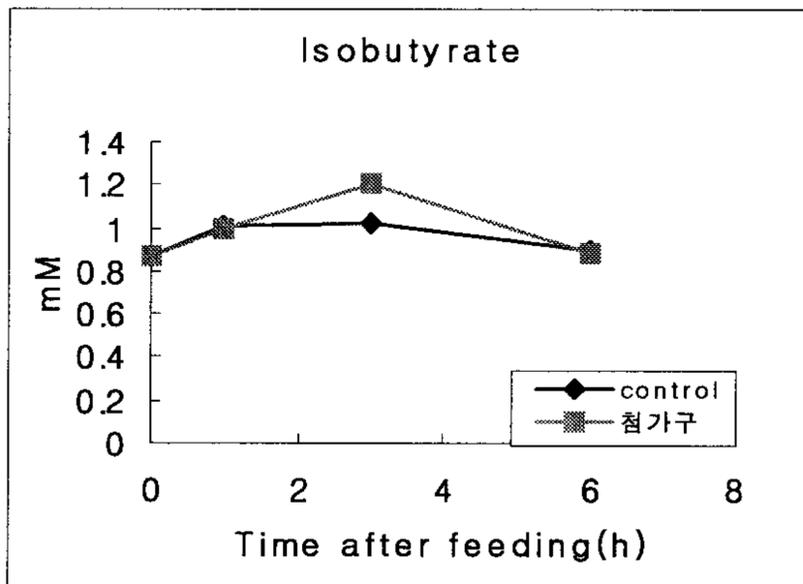
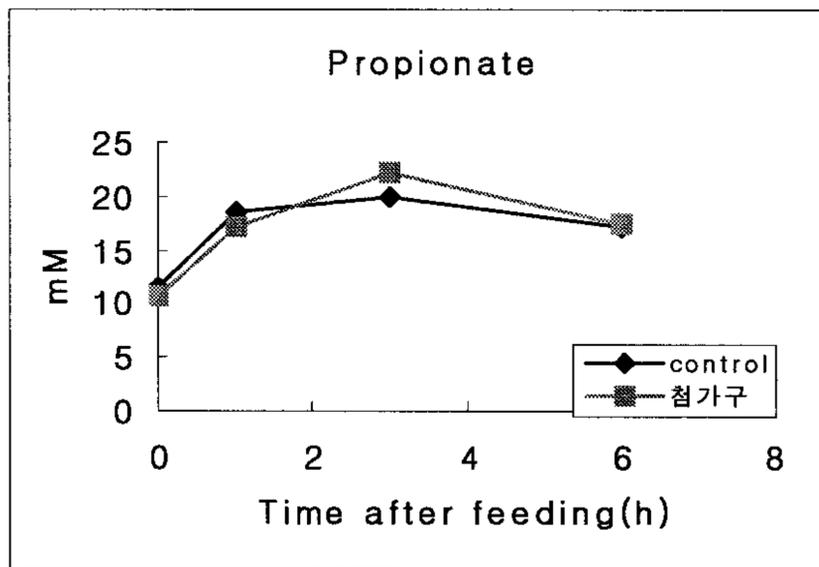
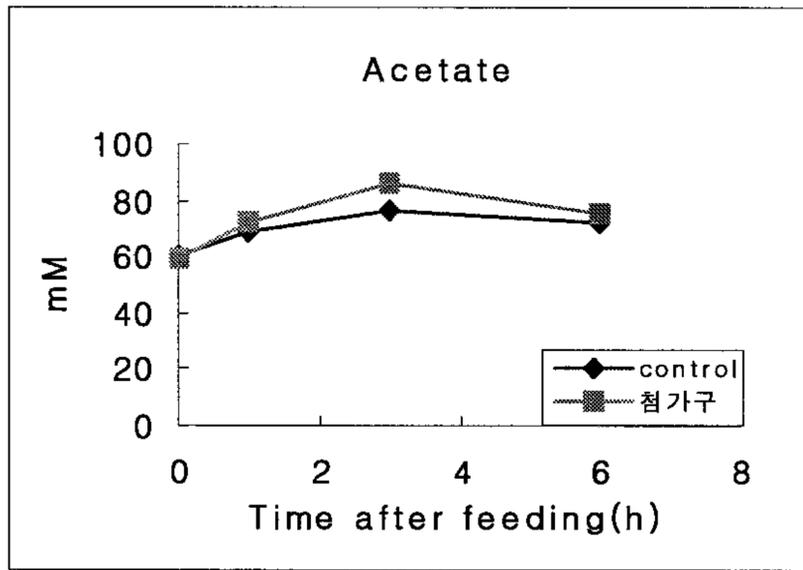
대조구와 첨가구의 유의적인 차이를 볼 수 있었다($p < 0.05$). 생균제 급여 후 1시간의 대조구와 첨가구는 각각 32.33와 43.47 mg/100ml의 함량변화를 보였고, 대조구는 3시간의 32.93 mg/100ml로 급여 후 1시간대와 비슷한 함량을 보였으며, 첨가구는 3시간의 55.66 mg/100ml로 계속 증가한 후 6시간대 18.38mg/100ml로 감소하였다($p < 0.05$). 이 (2006)에 의하면 *in vitro*상에서 본 DFM을 첨가 후 배양처리에서 암모니아가 증가하였다. 이것은 반추위내 미생물 활성 증가로 단백질분해가 증가하여 암모니아질소농도가 증가했다는 보고(Hristov 등, 1998, 2000)와 같은 결과라 보여 진다. 반면 대조구는 전반적으로 암모니아질소농도가 첨가구에 비해 낮게 나타났다($p < 0.05$).

Table 3-6. Effects of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal ammonia-N (mg/100ml) in cows

Time after feeding	control	DFM	SEM	Pvalue
0 hr	15.35	22.69	1.880	0.047
1 hr	32.33	43.47	2.800	0.043
3 hr	32.93	55.66	3.800	0.001
6 hr	8.678	18.38	2.376	0.037

다. 반추위액의 VFA

첨가구와 대조구의 반추액내 VFA의 함량 변화는 Fig. 17과 같다. 반추위내 acetic acid 함량에서 사료급여 직전 0시간의 대조구와 첨가구는 각각 60.54와 58.86 mmol이며, 사료급여 1시간 이후 증가하여 3시간에 최고점에 도달한 후 6시간대 감소하였다. 모든 시간대의 유의한 차이는 없었으나 수치상으로 사료급여 후 3시간의 첨가구에서 다소 높은 함량을 보였다. Acetate와 마찬가지로 propionate, isobutyrate, butyrate 및 valerate도 대조구와 첨가구 모두 급여 후 3시간에 함량이 최고점에 도달한 후 6시간대 감소하였으며, 유의적 차이는 없었다.



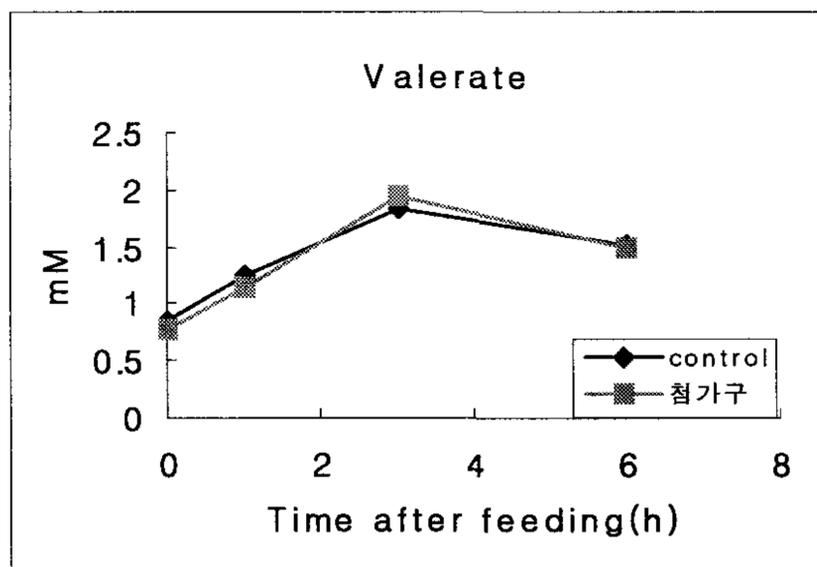
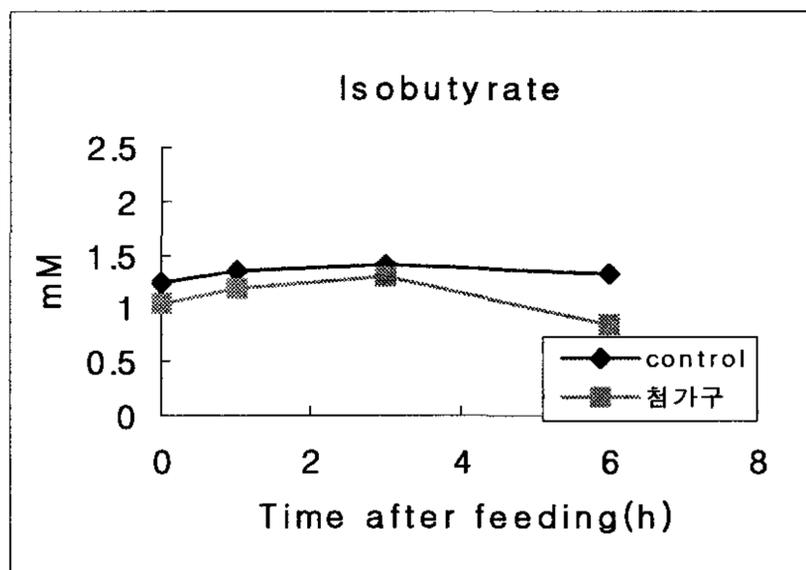
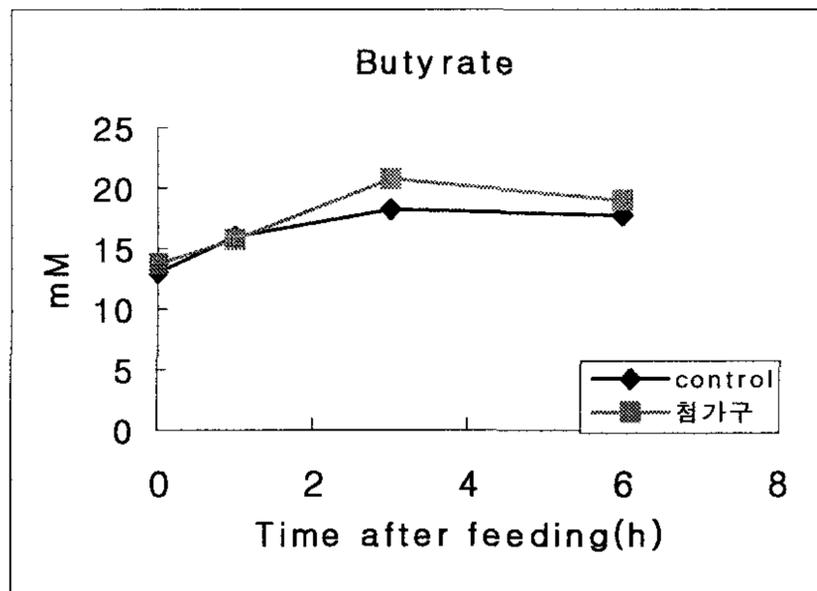


Figure 3-1. Effect of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal volatile fatty acid production(mM) in cows.

Table 3-7. Effects of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal total VFA production(mM) in cows

Time after feeding	control	DFM	SEM	Pvalue
0 hr	87.98	86.16	8.151	0.925
1 hr	106.99	108.49	4.392	0.886
3 hr	119.04	133.86	7.056	0.348
6 hr	110.85	114.77	8.897	0.853

Isovalerate는 대조구보다 오히려 첨가구에서 함량이 낮게 나타났다. 반추위 VFA는 pH와 직접적인 연관이 있었으며, total VFA의 농도(Table 83)에서 사료 급여 1시간 이후 증가하여 3시간에 최고점에 도달한 것과 반대로 pH는 사료급여 후 3시간에 최저점에 도달한 후 마지막 6시간에 회복을 나타내었다. 따라서 반추위내 pH와 VFA의 관계는 직접적인 연관이 있었다.

라. 반추위액내 가수분해 효소의 활력

1) Extracellular Avicelase 활력

Crystallized cellulose인 Avicel을 분해하는 효소인 Avicelase(β -1, 4 exoglucanase) 활력은 Table 84에 나타내었다. Cellulose 중에서 가장 분해가 어려운 Avicel에 대한 활력이 대조구와 첨가구 모두 낮음을 알 수 있었다. 생균제 급여 전과 급여 후 모든 시간대에 대조구와 첨가구의 유의적 차이는 없었다.

Table 3-8. Effects of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal Avicelase(glucose μ mol/ml/min) in cows

Time after feeding	control	DFM	SEM	Pvalue
0 hr	3.82	4.45	0.531	0.584
1 hr	10.79	11.92	1.140	0.642
3 hr	7.07	8.15	0.864	0.559
6 hr	7.07	8.44	0.910	0.480

2) Extracellular CMCCase 활력

CMCase 활력은 Table 85에 나타내었다. 대조구와 첨가구 모두 급여 후 1시간대에 효소의 활력이 증가한 후 정점에 도달하였으며 3 및 6시간대에 서서히 감소하는 양상을 나타내었으며 유의적인 차이는 없었다. 비록 유의적 차이는 없었지만 생균제 급여 후 3시간대에서 대조구와 비교해 CMCase의 활력이 증가하는 경향을 보였다($p < 0.1$).

Table 3-9. Effects of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal CMCase(glucose $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$) in cows

Time after feeding	control	DFM	SEM	Pvalue
0 hr	37.34	53.96	4.986	0.096
1 hr	83.70	108.83	7.986	0.119
3 hr	64.34	84.25	5.844	0.088
6 hr	49.97	55.34	5.360	0.637

3) Extracellular xylanase 활력

Xylanase 활력은 Table 86에 나타내었다. 생균제 급여전과 급여후 모든 시간대에 대조구보다 첨가구의 xylanase 활력이 높게 나타났으며, 생균제 급여 후 3시간대 유의적 차이가 있었다($p < 0.05$). 급여 후 1시간대는 비록 유의적 차이는 없었지만 대조구와 비교해 첨가구의 xylanase 활력이 높은 경향이 있었다($p < 0.1$). 이는 생균제 첨가로 인해 5탄당인 헤미셀룰로스를 특히 잘 분해하는 것으로 생각된다.

Table 3-10. Effect of supplementation of the aqueous DFM on postprandial change ruminal Xylanase(xylose $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$) in cows

Time after feeding	control	DFM	SEM	Pvalue
0 hr	170.93	234.85	21.522	0.144
1 hr	312.32	403.51	27.598	0.099
3 hr	247.13	366.28	26.930	0.018
6 hr	230.00	295.40	28.727	0.275

본 *in vivo* 시험을 통해 결론적으로 본 연구에서 개발된 반추위 유래 혐기성 섬유소 분해 박테리아를 이용한 DFM을 제조하여 반추가축에 급여하였을 때 반추위내 발효조건을 향상시켜 반추가축의 생산성 증진에 가능성을 제시하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표의 달성도

본 연구는 반추 가축 생산성 증진을 위한 생균제제용 장내 미생물의 개발을 연구목표로 하여 수행되었다. 현재까지 다양한 생균제제가 개발되고 있었으나 이들 제품에 이용되는 균주들이 효모와 박테리아들로 모두 반추가축에서 유래된 것들이 아니기 때문에 반추위내 발효에 대한 반응효과는 상당한 변이를 나타내었다. 그러므로 반추동물의 장내에서 반추위 발효를 증진시킬 수 있는 특히, 볏짚과 같은 고섬유질 사료소화율을 향상시킬 수 있는 사료첨가제를 개발한다면 반추동물의 생산성을 증진시킬 것으로 생각되었다. 그래서 본 연구는 반추동물의 장내에서 섬유소 분해 박테리아를 분리하여 생균제제를 개발하기 위하여 연구가 수행되었다. 본 연구를 수행하기위해 강력한 섬유소 분해 박테리아를 탐색하고 분리 및 동정을 하였다. 본 시험에서는 이미 기존에 알려져 있는 균인 *Ruminococcus flavefaciense*와 *Fibrobacter succinogens*가 강력한 섬유소 분해 박테리아로 분리 및 동정되었다. 이들 분리균들은 섬유소를 기질로 하여 배양되었을 때 다양한 가수분해효소에 대하여 높은 활력을 나타내었다.

분리된 균들을 이용하여 최종의 혐기성 섬유소 분해 박테리아로 구성된 생균제제를 만들고자 분리균들을 이미 type strain으로 알려진 균들과 단독 또는 혼합하여 미생물의 성장률, 건물분해율 및 효소활력을 조사하여 최종의 생균제 그룹을 선발하였다. 선발된 미생물그룹이 생균제제로써 우수한 능력이 있는지를 검증하기위해 *in vitro* 시험을 통해 반추위내에서의 발효향상에 영향을 미치는지 조사하였으며, 본 시험의 결과 최종적으로 H20과 H23균주의 혼합급여시 발효양상을 향상시켰다. 최종 생균제제로 두 종의 균을 혼합한 액상 생균제제를 반추위누관이 장착된 젖소에 첨가급여시 반추위 발효특성 및 반추위내 가수분해 효소의 활력을 조사하였으며 그 결과 반추위 발효를 증진시키며, 효소의 활력을 증가시킴으로써 생균제제의 효과가 검증되었다.

이상의 단계별 시험과정을 통해 본 연구목표인 반추동물용 생균제제의 개발은 성공적으로 달성되었다고 판단된다.

1. 1차년도 연구개발목표의 달성도

연구개발의 목표	연구평가		
	착안사항	연구성과	달성도
<p>목표 미생물 (target bacteria) 선별을 통한 항생성 미생물의 선정 및 반추위내 항생성 미생물 분리, 동정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 반추위내 항생성 미생물의 분리 및 동정 ○ 항생성 미생물에 의한 목표 미생물(target bacteria) 선별 및 박테리오신 항균 활성 검정 ○ 분자생물학적 접근을 통한 항생성 미생물의 정보 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항균력이 가장 높은 반추위미생물 분리 ○ 목표 미생물의 항균활성 검정 ○ 분자생물학적 접근방법을 이용한 유산균과 반추위 미생물의 정보 획득 	100%
<p>반추위 발효 안정화 및 섬유소 이용성을 증진시킬 수 있는 장내 생균제 후보 미생물의 탐색, 분리 및 동정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혐기 생태계로부터 강력한 활력을 가진 박테리아의 분리 ○ 분리 박테리아의 screening 및 동정 작업 수행 ○ 분자생물학적 방법에 의한 미생물의 특성 파악 ○ 동정된 균주의 특성 조사 및 균주 등록 ○ 분리 박테리아가 생산하는 효소 및 효소의 특성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 강력한 섬유소 분해력을 가진 혐기성 박테리아의 분리 ○ 섬유소 분해력에 따른 선별 및 생화학적, 분자생물학적 방법에 의한 분리 박테리아의 동정 및 미생물의 특성파악완료 ○ 동정된 균주에 대한 섬유소 기질에 대한 특성 조사 및 효소의 활력 조사 	100%

2. 2차년도 연구개발목표의 달성도

연구개발의 목표	연구평가		
	착안사항	연구성과	달성
항생성 미생물의 효과 및 장내 미생물에 의한 물질의 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 반추위액내 박테리오신의 안정성 검정 ○ <i>In Vitro</i> 실험을 통한 항생성 미생물의 이용 방안 연구 ○ 천연 물질 급여가 장내 미생물 및 발효 특성에 미치는 효과 	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> 시험과 mouse 시험을 통한 안정성 검증 ○ <i>In vitro</i> 시험을 통한 반추위 발효특성 검정 ○ 미생물에 의한 천연물질이 mouse와 <i>in vitro</i> 시험을 통한 안정성 검정 	100%
<i>In Vitro</i> 시험을 통한 미생물의 조건 생균제 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리된 미생물들의 단독 혹은 혼합 배양에 따른 건물 소화율과 효소 분비량에 미치는 영향 구명 ○ 미생물 성장률과 단백질 함량에 미치는 영향 구명 ○ 혼합 반추위 미생물 배양액에 생균제의 접종을 통한 반추위내 안정성 및 발효 개선 효과 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ DA medium에서 분리된 미생물의 단독 또는 혼합배양시 filter paper와 벧짚을 기질로 하여 건물 소화율과 효소활력을 조사하였음. ○ 가스발생량 및 단백질 합성량을 통해 분리 미생물들의 성장률을 조사하였음 ○ <i>Ruminococcus albus</i>와 <i>R. flavefaciense</i>간의 antagonism이 있음을 확인하였으며, 두 균종을 혼합생균제로 활용할 수 없음을 확인함. ○ <i>In vitro</i> 상에서 혼합 반추위 미생물에 발효제를 첨가하여 배양시 H20과 H23의 혼합균 첨가시 우수한 발효특성을 나타내었음. 	100%

3. 3차년도 연구개발목표의 달성도

연구개발의 목표	연구평가		
	착안사항	연구성과	달성
병원성 미생물에 대한 항생성 미생물의 효과 및 천연 물질 이용을 통한 사료 효율 개선 방안에 관한 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병원성 미생물에 대한 박테리오파지의 효과 검증 ○ <i>In Vitro</i> 실험 방법에 의한 사일리지 항원성 미생물의 첨가 효과 조사 ○ 항생성 미생물의 접종에 따른 사일리지 개선 방안에 관한 연구 ○ 천연 물질 이용을 통한 가축의 생산성 향상 방안에 관한 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병원성균에 감염된 쥐에게 항생능력을 갖고 있는 반추미생물 투여시 대조구의 체중 감소에 비해 체중 증가가 나타나는 것을 관찰함 ○ <i>in vivo</i> 시험을 통하여 NDF, ADF의 소화율 증가와 미생물단백질 합성량 증가, VFA 생성량 증가, 효소 활력 증가 관찰. ○ 단일 균주를 통한 미생물 제제의 첨가보다 혼합 균주 배양을 통한 미생물 제제의 개발이 더 효과적일 것으로 사료 됨. 	100%
대사 시험을 통한 최종 개발품의 검증 시험 및 산업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발 생균제의 투여에 의한 반추위 미생물 성장에 미치는 영향 구명 ○ 생균제가 반추위내 발효 산물의 변화에 미치는 영향 구명 ○ 생균제의 산업화를 위한 delivery system 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젖소의 <i>in vivo</i> 시험을 통해 개발 생균제를 사료에 첨가 급여하였음. ○ 젖소의 반추위내 발효 조건이 반추동물용 생균제 급여에 의해 향상되었으며 반추동물의 생산성이 증가될 것으로 기대됨. ○ 생균제의 산업화를 위해서는 혐기미생물의 특성과 발효산물의 적절한 이용을 위해서는 액상으로 사료첨가 급여시 적절한 delivery system이 고려됨. 	100%

제 2 절 관련 분야에의 기여도

국내 반추위 및 장내 혐기성 미생물에 대한 연구는 일부 연구자들에 의해 연구되어 왔으며 산업화를 위한 연구를 수행하여 왔다. 그러나 여전히 국내 반추동물들의 반추위와 장내 미생물의 분포 및 특성을 밝혀야할 필요성이 있다. 왜냐하면 반추동물의 생산성을 증진시키기 위해서는 무엇보다도 반추위내 미생물들의 발효 특성이 규명되고 난 후에야 반추위 발효를 촉진시키고 결국 동물의 생산성을 증진시킬 수 있기 때문이다. 그러므로 본 반추동물용 생균제제 개발연구를 통해 혐기성 미생물의 분포 및 특성에 대한 기초 자료를 제공하였다.

현재까지 다양한 생균제제들이 개발되고 가축에 이용되면서 항생제 대체 또는 친환경 사료첨가제로써 다양하게 이용되고 있다. 하지만 반추동물과 단위동물의 소화기관은 너무나 큰 차이점을 가지고 있기 때문에 시중에 판매되는 단위동물 전용 생균제제를 반추동물에 그대로 적용할 수 없으며 그 효과를 기대할 수 없을 것으로 판단된다. 그러므로 본 연구에서 개발된 생균제제는 항생제를 대체하는 의미보다는 반추위 발효를 촉진시킴으로써 영양소 이용효율을 증진시키고 결국 반추동물의 대사성 질병을 예방하고 젖소의 유량 등의 생산성을 증진시키는 데 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

반추 가축 생산성 증진을 위한 생균제제용 장내 미생물의 개발 연구에서 개발된 생균제는 최종 산업화를 위해 우선 대사시험이 아닌 생산관련 사양시험을 통해 적정한 급여체계를 구명하는 연구가 추가적으로 실시되어야 할 것이다. 생산성에서 개발된 생균제제의 능력이 검증되고 적정 공급방법이 채택된 후 반추동물 생산성 및 대사성 질병 예방용 생균제제로 사업화할 계획이다. 또한 사업화 이전에 개발된 생균제제의 특허출원과 등록이 우선되어 특정 산업체와의 기술지도 및 기술이전 과정의 절차를 거친 후 본 기술을 산업화하는데 협조할 계획이다.

산업화 이외에도 본 연구의 결과를 이용하여 반추동물의 반추위 발효에 대한 특정 미생물들의 역할에 대한 연구를 추가로 수행되어야 할 것이다. 단순히 산업화를 위한 제품의 개발도 중요하지만 반추위내에서의 본 생균제제의 발효와 관련된 역할의 메카니즘을 규명하는 연구도 지속적으로 수행될 것이다. 본 연구결과를 토대로 섬유소 발효가 우수한 미생물 제제이외에 단백질과 기타 영양소의 발효를 증진시키고 반추위내 미생물 단백질을 증가시킬 수 있는 반추동물로부터 유래된 미생물을 이용한 사료첨가제의 개발연구도 진행될 것이다.

최종적으로 현재 국내 사료첨가물 중 생균제는 몇 종의 효모와 유산균들로만 구성 되어 있는데 이들 제품들은 단위동물 위주의 생균제들로 반추동물 전용의 생균제로 이용될 새로운 유익한 미생물들도 법적으로 이용될 수 있도록 시책건의를 추진할 것이며 또한 생균제로서의 제품화에 대한 모색과 급여 효과와 기능성에 관해서 세미나와 학술지를 통하여 소비자에 대한 홍보와 교육을 실시해야 할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 Bacteriocins : 특성, 기능과 구조

1. 서론

Bacteriocin은 살균제, 항생물질 같은 기질의 단백질로써 많은bacteria에 의해 생산되어, 같은 종 또는 연관된 다른 종에 대해 특이성을 갖고 균들을 사멸시키는 작용을 하며 다른 항생물질들과는 달리 단백질로 분류된다(Reeves, 1965; Daw, 1989; Gratia and Grenier, 1992; Laukova and Marekove, 1993). 1925년 Gratia의 *Escherichia coli*를 이용한 연구에서 이 종이 높은 특정 항생물질을 생산하고 같은 종의 다른 균들에게 작용한다는 연구결과에 의해 bacteriocin의 개념이 처음 알려지게 되었다. 이물질은 *Enterobacteriaceae*의 다양한 종들에게서 활성을 나타내고, 그 generic name를 'colicine' 이라 명명하였다. Jacob et al., (1952)의 연구에 따르면 *Enterobacteriaceas* 외에도 항생능력을 갖고 있는 bacteria들이 발견되었으며, 특히 높은 항균성을 가진 단백질을 'bacteriocin'이라 명명하였다. Fredercq (1957, 1963)는 여러 종류의 bacteriocin을 발견하였으며 각각의 분석방법을 이용하여 bacteria의 종에 따른 bacteriocin type을 확립시켰다. 이후 현재까지 Bacteriocin에 대한 연구는 bacteriocin의 발견에 따라 분자생물학적 연구 (Fredericq, 1957)를 바탕으로 이루어지고 있으며, 특히 bactericin의 유리, 작용, 생합성에 대한 연구가 지속적으로 이루어져왔다(Davies and Reeves, 1975; Geli and Lazdunski, 1992; Lakey et al., 1993). 또한 세포질의 세포 생리학 내의 생화학적 도구로써의 bacteriocin의 이용에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 (Libertin et al 1992; Frarkas-Himsley et al., 1992; Becker et al., 1993), 질병학 연구에 있어서도 새로운 연구방향을 제시해 주고 있다(Pitt, 1980; Daw et al., 1992; Siragnsa, 1992; Unlman et al., 1992; Vebek et al., 1993).

따라서 bacteriocin에 대한 연구는 형태학적 연구에서 시작하여 분자생물학, 미생물학과 관련하여 연구가 활발히 이루어져 오고 있다.

2. Bacteriocin의 분류

Bacteriocin의 분류와 그에 따른 명명은 근래에 들어오면서 급격하게 변화, 발전하고있다. Bacteriocin의 증명과 분류에 있어서 전자현미경의 역할이 두드러지게 이용되었다. Bacteriocin은 크게 Fredericq와 Bradely에 의한 방법으로 분된다. Fredericq(1959)의 분류방법은 bacteriocin의 면역특이성과 흡착방법의 특이성에 따라서 나타나는 방법이다. E-colicin에 의해 생성되는 bacteriocin은 E1, E2, E3 등으로 나누어지는데 이들은, 흡착은 같은 수용체에서 나타나는 것이 특징이다. 하지만 면역특이성은 다르게 나타나는 것이 특징이다. Colicin Ia, Ib의 경우 이것들 역시 면역범위에 따라 세부적으로 분류가 되는데(Reeves, 1965) 이렇게 분류된 bacteriocin의 종류는 E-coli의 colicins, Pseudomonas aeruginosa의 pyocin, Enterobacter cloacae의 cloacin, Yersinia pestis의 pestisin, Listeria monocytogenes의 monocin, Bacillus cereus의 cerecin, 그리고 Staphylococcus의 staphylococin로 분류 되어진다. 그러나 Bradely(1966)의 분류학상의 지표는 자연적인 현상을 기초로 한다. 분자량의 차이에 의해 두 group로 나누어 bacteriocin의 차이점을 특징짓는 것이 가장 큰 특징이며, 저 분자량의 특징을 갖는 bacteriocin은 일반적으로 내열성과 초고속원심분리에 의해 침전되지 않으며, 전자현미경으로 측정이 불가능하다. 고 분자량의 특징을 갖는 bacteriocin은 group는 쉽게 침전이 이루어지며, 또한 내열성 특징과 trypsin에 대한 저항성을 갖는다. 전자현미경으로의 측정이 가능하다. 이러한 분자량을 이용한 분류방법의 예는 Bacillus species 중에서 생성되는 bacteriocin을 들 수 있다. 그러나 이러한 분류 방법은 민감도가 높은 세포에서의 배양증식은 가능하지 않다고 하는데 이것은 단지 분자량의 높고 낮음의 형태학상에 따른 분류이기 때문이다(Bradley, 1966).

Gram positive bacteria에 의해 생산되는 bacteriocin은 대부분의 위에서 언급된 bacteriocin 분류 방법에 부합되지 않는 특성을 가지고 있다. Gram positive bacteria의 경우 항생능력이 더 광범위하게 활성을 나타내고, 특정수용체에 의해 간접적으로 활성이 나타나며, lysin에 의해 유리현상이 높게 나타나기 때문이다. 또한 gram positive bacteria는 세포외막이 없고, 면역성이 gram positive bacteria에 따라 bacteriocin이 다르게 group화 되어 표준 면역성이 다르게 나타나는 특성을 가지고 있기 때문이다(Tagg et al., 1976; Strasser de-saad and Hanea de-Nadra, 1993; Havarstein et al., 1994).

최근에는 bacteriocin을 no-colicin-like characteristic 또는 Bacteriocin like inhibitory substances(BLIS)로 분류하고 있으며, gram positive bacteria의 대부분 종이 BLIS를 생산한다고 보고하였다(Tagg, 1976; 1992).

3. Bacteriocin의 생화학적 특성

Bacteriocin의 생화학적 구조는 단지 bacteria에 의해서 생산되는 단백질 특성을 알아내면서부터 시작되었다. Bacteriocin의 단백질은 단백질 분해 효소에 의해 초기 분해가 이루어지며, 세포 내에서 agar 또는 반투막을 통과하여 확산에 의해 분자량이 대략적으로 결정된다는 이론을 초기 연구에서 알아냈으며 (Loyola-Rodriguez et al., 1992), 최근에 bacteriocin의 화학적·물리적 특성이 구체적으로 밝혀지게 되었다(Stiles et al., 1994; Hastings et al., 1995). 또한 지속적인 연구과정을 통하여 bacteriocin은 미량의 탄수화물과 인, 단백질 분자가 합쳐진 것이라는 것이 밝혀졌으며(Kingsbury, 1966; Reeves, 1972; Paw and Falkner, 1993), bacteriocin이 아미노산의 구성과 관련하여 연구를 진행될 수 있는 중요한 계기가 되었다. 아미노산의 배열이 다르거나 교차 구성은 같은 group의 bacteriocin이 하나의 bacteriocin에서 다른 bacteriocin으로 분자가 변형이 이루어지는 것을 알아냈다(Konisky and Richards, 1970; Howard et al., 1989; Nieto-Lazano et al., 1992; Koebink and Brahn 1993). 그 예로 Kageyama and Egami(1962)의 *P. aeruginosa*에 의해 생산되는 bacteriocin인 pyocins에 관한 연구에서 pyocin은 세포 용해에 의해 축적되고 생성되며, 다른 group의 S type의 pyocin은 mitomycin C를 유발시켜 정제할 수 있다. 또한 R type pyocin과 단백질 분해효소의 민감성과 agar을 통한 확산 정도의 차이에 의해서 구분이 가능하다.

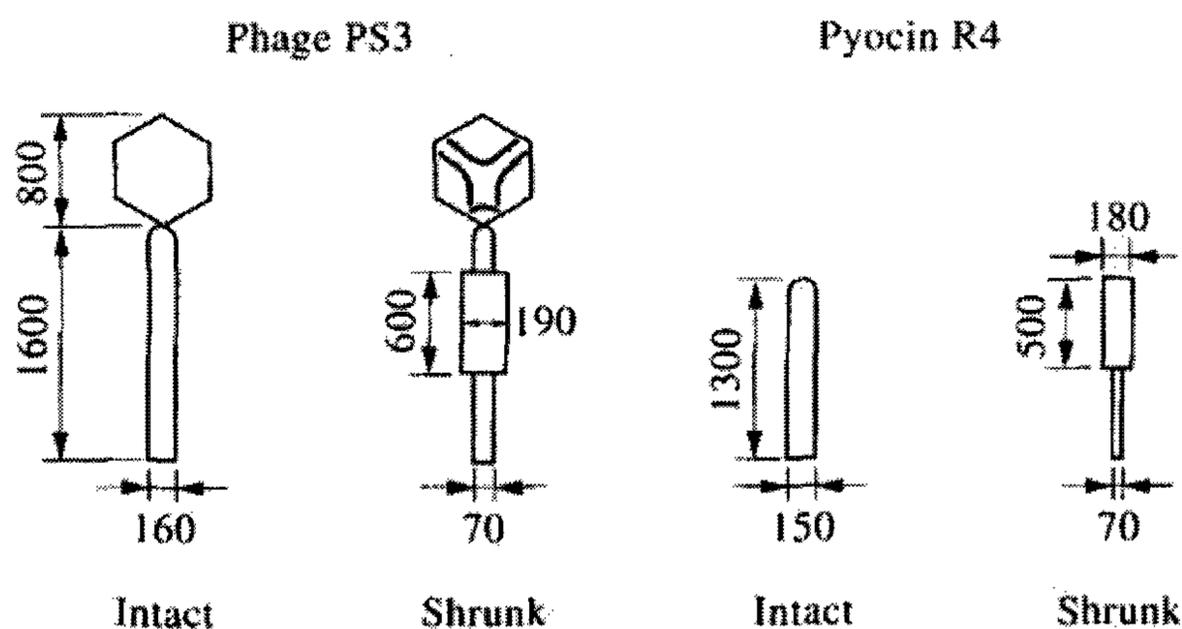


Figure 1. Morphological comparison of phage PS3 and R-type poocin of *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Bacteriocin의 초미세구조

가. 일반적인 구조

초기 전자현미경을 통한 bacteriocin의 형태학상의 명확한 구조는 얻지 못했다 (Konisky, 1982). 이후의 연구에서 bacteriocin의 형태를 두 개의 group로 나누었다. 첫번째 group는 전자현미경을 통해 관찰 불가능한 것과, 두번째 group는 전자현미경에 의해 cloacin C5, R pyocin같은 정확한 구조가 관찰 가능한 것으로 나뉘었다(Figure 2.). 첫번째 group의 예로 Colicin E3은 trypsin의 첨가에 의한 bacteriocin의 단백질 소화가 35k Da amino-terminal 부분과, 15k Da carboxy-terminal 부분으로 E3의 구조가 나타나는 것을 관찰하였다(Ohno et al., 1977; Soham and Djebli, 1992; Yajima et al., 1992). Bacteriocin 구조의 형태학상 구조를 알아내는 가장 보편적인 방법은 bacteria로부터 얻은 입자를 이용하는 방법이다. 이렇게 입자를 이용한 bacteriocin의 구조는 동결과 용해에 의해서 형태가 변형되고, 입자들이 불활성화 될 수 있다. 그러나 tris-HCl buffer을 이용하여 acetone dry ice bath에서 급속 냉동을 시켜주면 rosette clusters 형태로 보존될 수 있으며, 이와 같은 방법으로 측정된 bacteriocin의 구조는 다양하게 나타난다.

나. 활성 형태의 형태학상 구조

초기에는 bacteriocin 형태가 형태학적으로 불연속적으로 나타나는지 연속적으로 나타나는지 알 수 없었고, 활성이 이완형태에서 나타나는지 수축형태에서 나타나는지 알지 못했다(Bradley and Robertson, 1968). 이후의 연구에서 수축 상태에서 이완 상태로 전환되는 동안에 활성이 감소되고, 이완이 나타나는 상호관련 작용이 나타나는 것을 알아냈다(Higerd et al., 1969; Govan, 1974; Daw, 1989). 이것은 수축 후 이완 상태에서 활성이 증가하지 않거나 적게 나타난다는 것을 알 수 있었다(Figure 3). Bacteriocin의 수축 형태의 생물학적 특성은 Higerd et al. (1969)의 *P. aeruginosa* 종의 pyocin의 연구에서 발견되었으며, Coetzee et al. (1968)에 의하면 H₂O₂, ethanol 첨가와 수축상태에서 bacteriocin의 활성이 높게 나타났다.

다. 활성 형태

Bacteriocin의 작용에 관한 기초 자료는 bacteriocin의 특정 수용체에 흡착을 통해 생화학적 작용과 민감한 세포의 바깥 세포질에 위치하면서 특정표적에 따라 위치 이동이 변화하는 것이 알려지고 난 후 부터이다(Nomura, 1967 Parker et al., 1989). Kinetic data의 지표는 bacteriocin이 단일 충돌 과정에 의해서 민감한

세포의 사멸과 치명적인 자멸작용으로 나타나는데, 기존의 항생물질의 고사작용과 같은 생화학적 반응이 이루어진다(Mayr-Harting et al., 1972). Bacteriocin 작용 형태는 하나의 형태가 다른 하나의 형태로의 작용에 의해 다른 하나를 변화시키는 것으로 나타난다(Braun et al., 1994; Montville and Bruno, 1995). 초기 연구에서는 Colicin E3는 단백질 합성의 특정 작용의 억제를 유도한다는 것을 알아냈다(Schwartz and Helinski, 1971). Colicin E2는 DNA를 분해하고 DNA 합성에 억제에 특정 작용을 유도한다. 또한 작용 억제의 또 다른 한가지 원인은 ion의 결핍에서도 나타나는데 potassium과 magnesium ion이 부족할 경우 세포 사멸의 1차적 원인이 된다(Konisky, 1982). Bacteriocin에 착생하는 작용에 의해서도 억제 작용이 나타나는데(Figure 4.), 이것은 수용성 단백질 내로 소수성의 나선형 bilayer 내에서 자연발생적으로 착생 형태가 나타나며, 이는 균주의 배양시 성장이 완전히 정지되어 RNA, DNA와 단백질의 합성을 억제하는 작용을 한다. 따라서 bacteriocin에 의한 RNA가 불활성화는 사멸작용이 숙주세포의 활성화에 치명적인 영향을 준다(Kaziro and Ranak, 1965 Coetzee et al., 1968). 이와 같이 민감한 bacteria의 형태학적인 변화는 이러한 bacteriocin의 작용 형태를 유도하게 되는 것이다.

라. 형태학적 변화에 따른 bacteriocin의 작용의 관계

Bacteriocin에 의한 bacteria의 사멸은 kinetic과정에 의하여 이루어지며, 이러한 bacteriocin의 작용은 전자현미경을 통하여 Bacteriocin의 작용에 민감한 bacteria의 형태 또는 bacteriocin의 민감도 둘 사이에서 연관된 작용을 관찰하여 알 수 있었다. 또한 bacteriocin 처리와 함께 민감한 세포에서는 형태학적인 변화가 gram positive bacteria에서 나타났으며, 대부분의 bacteria는 전자현미경의 관찰이 불가능 하다(Vlaemynck et al., 1995). Streptococcus 종의 A group의 형태학적인 변화에 의해서 핵물질의 응축, ribosomes의 손실과 세포 내용물의 용해가 나타났기 때문이다.

마. Bacteriocin의 유전적 결정요소

Bacteriocin의 유전적 특징은 세포질의 유전자와 관련이 크며, 대부분의 bacteriocin의 유전적 유전자 결정은 유전자의 위치에 따라 나타나며, 대부분이 plasmid에 위치해 있으며, 염색체 내에도 위치하는 bacteriocin도 있다. 유전자 결정은 bacteriocin의 화학적 구성뿐 아니라 생합성에 의해서도 나타나고, 그것은 숙주세포의 면역력과 세포가 유리되어 나타난다.

Key : ∓ indicates few strains utilize; ± indicates most strains utilize.

¹⁾ Data from Bergey's manual(1974), Holdeman *et al.* (1977) and Ogimoto (1970, 1977b, 1980).

²⁾ Data from Puttilz and Seeley(1968).

반추위 내에서 섬유소를 소화할 수 있는 미생물로는 박테리아, 프로토조아 그리고 곰팡이 등이 있으나, 그 중에서도 섬유소 분해 박테리아(cellulolytic bacteria)의 역할이 가장 중요하다(하 등 2005). 특히 박테리아는 반추위 내에 우점하고 있으며, 실질적인 섬유소 분해 미생물 군집이기 때문이다(Windham과 Akin, 1984). 반추위 내에는 여러 종류의 섬유소 분해 박테리아가 있지만, 그 중에서 가장 대표적인 것은 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* 그리고 *Ruminococcus albus*이다(Hungate, 1963).

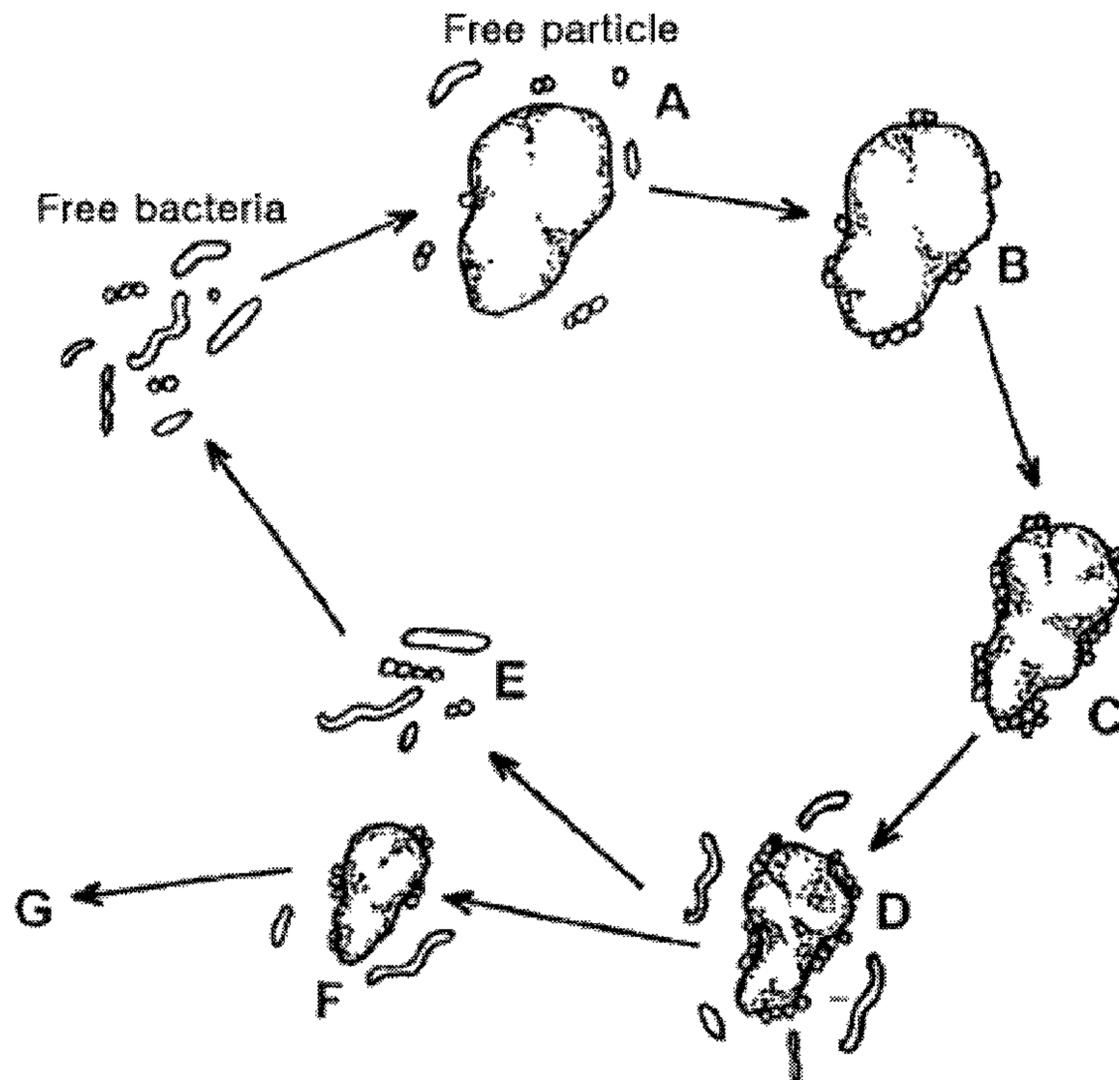


Figure 2. Schematic diagram of bacterial movement through the three

compartments in the rumen as feed particles are digested. The free bacteria into compartment 1 move into compartment 2, that area near the feed particles (A). The colonizing bacteria attach to the feed particle and establish compartment 3 (B). The attached bacteria begin to grow and digest the feed particle which increases the microbial mass in compartment 3 (C). Release of end-product or soluble substrates from the feed particle attracts other bacteria from compartment 2 and markedly increases microbial mass (D). As the feed particle is digested and substrate may become limiting, some of the bacteria dissociate and return to compartment 1 (E) while the bacteria still firmly attached to the remaining portion of the feed particle (F) pass on down the digestive tract (G) (redraw from McAllister *et al.*, 1994).

F. succinogenes, *R. flavefaciens* 및 *R. albus* 등을 포함하는 주요한 반추위내 섬유소분해 박테리아는 cellulase와 hemicellulase의 분비하는 기능을 가지고 있다 (Bryant, 1973; Forsberg 등, 1981; Greve 등, 1984; McDermid 등, 1990; Pettipher와 Latham, 1979). 반추위내 존재하는 섬유소분해균은 주로 탄수화물을 발효하여 생성된 에너지로 증식하는데 *R. flavefaciens* 과 *R. albus* 는 주로 cellulose와 pentosan등이 분해된 에너지를 공급받아 증식하며 *F. succinogenes*는 이들과 함께 glucose를 에너지원으로 이용하여 증식한다(Cheng 등, 1969). 반추위 박테리아들의 발효 특성은 Table 에 나타내었다.

섬유소분해 박테리아는 대부분 불용성 기질인 사료입자에 붙어서 존재할 뿐만 아니라(Kudo 등, 1987a,b; McAllister 등, 1990a,b,c) 식물표면에 붙어서 복합적인 미생물군락을 형성시켜야만 그 본래의 기능을 발휘하면서 생존할 수 있다 (Kudo 등, 1986; Kudo 등, 1990). 반추위 내 박테리아의 상존 위치에 따른 분류는 Figure .에 나타내었다.

1. *Fibrobacter succinogenes*

*F. succinogenes*는 Hungate(1947, 1950)에 의해 *Bacteroides succinogenes*로 분리 되었으며, *F. succinogenes*는 전분, xylan 및 cellulose와 같은 다당류를 소화시킬 수 있는 능력이 있으며(Bryant 등, 1958b), 편성 혐기성이며 그람음성(-), 간균의 형태로 발효시 succinic acid를 생성한다(Bryant, 1959).

McDermid 등(1990)에 의하면 *F. succinogenes*는 6종류의 endoglucanase

(Crobsby 등, 1984), 2종류의 cellobiosidase, β -glucosidase, xylanase, xylosidase, acetylxytan estrase, ferulic, esterase 및 arabinofuranosidase 등의 효소를 생산할 수 있다고 하였다.

모든 섬유소 분해 박테리아는 endoglucanase와 β -glucosidase(Gong과 Tsao, 1979; Lineweaver와 Burk, 1934)나 cellobiose phosphorylase (Ayers, 1958b)나 두 효소의 조합된 효소(Park과 Ryu, 1983)를 생성한다. *F. succinogenes*가 생산하는 효소는 주로 세포외 배양액에서 존재하고 cellobiase는 주로 cell-associated형태로 분비된다고 하였다. 또한 Forsberg 등(1981)에 의하면 *F. succinogenes*에 의해 생성되는 CMCase, xylanase 및 aryl- β -xylosidase의 80% 이상이 세포로부터 배양액내로 방출된다고 하였고, Groleau와 Forsberg(1983)와 Huang 등(1988)은 extracellular enzyme이 70% 이상이라고 보고하였으며, 김 (1995)은 cellulase의 활력이 80% 이상이라고 하였다. 이러한 섬유소 분해효소들이 섬유소를 분해하여 VFA(volatile fatty acids)를 생산하며, 이들이 흡수되어 에너지원으로, 또는 체조직의 합성이나 생산 등에 이용된다(하 등, 2005)

2. *Ruminococcus* 속

Hungate(1950)와 Sijpesteijn(1951)은 반추위내에서 cellulose를 분해하는 중요한 혐기성 섬유소 분해 박테리아가 *Ruminococcus*속이라고 보고하였으며, Bryant와 Burkey(1953a), Hungate(1957)는 소와 면양의 반추위에서 많은 종류의 strain을 분리·동정하였는데 이러한 *Ruminococcus*속의 특징으로는 그람양성(+)이며, 비운동성이고 포자를 형성하지 않으며, 혐기성 박테리아로 cellulose를 발효시켰을 때 많은 양의 succinic acid를 생성한다고 보고하였다. Sijpesteijn(1951)과 Hungate(1957)는 *Ruminococcus* 속이 cellulose와 cellobiose를 소화시킬 수 있는 능력이 있는 박테리아라고 하였으며 이 때 cellulose분해속도는 비교적 느리다고 보고하였다.

가. *Ruminococcus flavefaciens*

*R. flavefaciens*에 의해 cellulose가 발효되며 최종 발효생성물 중succinic acid가 중요한 발효산물이며 acetic acid, formic acid 등도 다량 생성하고 H₂, ethanol 및 lactic acid 등도 소량 생산한다고 하였다(Ayers, 1959).

*R. flavefaciens*는 단독 배양시 두 가지 성장 단계의 immature alfalfa와 mature

alfalfa를 기질로 이용한 건물 분해율 측정에서 35.1%와 47.0%의 기질 분해율은 나타냈으며, immature orchardgrass와 mature orchardgrass를 기질로 이용하였을 때 분해율은 각각 21.0% 과 32.5%로 나타났다 (Fondevila and Dehority, 1996). 반면 김(1995)은 alfalfa를 기질로한 *R. flavofaciens*의 단독 배양에서 26.3%의 건물 분해율을 나타냈으며, filter paper를 기질로 이용한 건물 분해율에서 34.3%, 볏짚을 이용한 건물 분해율에서 16.8%를 나타냈다. 이러한 결과는 박테리아의 strain과 specis에 따라 이용한 기질에 대한 분해율에 차이가 있다고 하였으며, 섬유소 분해 박테리아가 분리된 축종과 지역 등에 따라 같은 종의 균일지라도 섬유소를 분해하는 특성에 있어 약간의 차이가 있다고 생각하였다(Min, 1991)

나. *Ruminococcus albus*

*R. albus*는 그람음성균(-)으로 cellulose, cellobiose와 glucose를 분해하고 rhamnose를 salicin과 함께 다른 여러 탄수화물을 분해한다. Cellulose의 분해력이 대단히 큰 미생물로서 succinic acid는 소량 생산하나 H₂와 etnanol은 다량 생산하며 일부의 strain에서는 lactic acid도 생산한다고 하였으며(Hungate, 1957), Hungate(1966)에 의하면 반추위내 섬유소 분해미생물들의 성장에 필요한 영양소 중 lactic acid를 요구하는 균으로 보고 하였다. 김(1995)은 *R. albus*의 단독배양시 filter paper, 볏짚 및 알팔파 건초에 대한 건물 분해율에서 각각 36.62%, 16.98% 그리고 27.31%의 건물 분해율을 나타냈다고 하였다.

*R. albus*의 볏짚 분해율을 전자현미경으로 관찰한 결과 그 표면에 기질 유도성인 돌출 구조물과 기질에 단단히 부착하는 glycocalyx를 갖고 있으며, 많은 소포체와 cellulosome 등이 섬유소 분해 과정에 관여하고 있음을 보여 주었으며, *R. albus*에 의한 cellulose의 분해는 세균의 부착과 hemicellulose의 분해에 이어 섬유소 chain의 절단을 통한 섬유소 길이의 단축, microfibril의 횡적 분열 및 출현의 단계를 거치는 것으로 나타나 endo 및 exo-type의 cellulase가 모두 작용하고 있음을 시사하였다(김 등, 1997)

제 3 절 반추위내 혐기성 박테리아 간의 상호작용

반추위내 박테리아간 작용에는 상승작용과 길항작용이 있다. 일반적으로 상승

작용이란 몇 가지 요인이 겹쳤을 때 각각의 요인이 지닌 작용보다 더 커지는 작용을 말하며, 길항작용은 2가지 요인이 동시에 작용하여 그 효과를 상쇄시키는 작용을 말한다.

반추위내에서 미생물간 상승작용과 길항작용이 일어나는 것으로 알려져 있다. *F. succinogenes*와 *Prevotella ruminicola*를 혼합배양시 hemicellulose의 이용성이 단독배양시보다 증가한다고 하였다. Dehority와 Scott (1967)은 hemicellulose를 분해하는 *P. ruminicola* H8균과 2-3종의 다른 섬유소 분해균을 혼합하여 배양시 *P. ruminicola* 순수배양시보다 cellulose 분해력이 증가하였다고 하였으며, 혼합균에 배양을 통한 섬유소 분해율의 증가는 섬유소 분해 효소의 분포가 단독배양보다는 더 넓게 존재하기 때문이라고 하였다(Odenyo 등, 1991). Osborne과 Dehority(1989)는 pentose를 이용하지 못하는 *F. succinogenes*를 hemicellulose를 분해하는 *P. ruminicola*와 혼합배양을 했을 때 단독배양시 보다 hemicellulose의 분해율이 증가하였다고 하였다. Williams 등(1991)은 두 종류의 *Selenomonas ruminantium*을 각각 *Neocallimastix frontalis*와 배양시에 xylan의 분해율에는 아무런 영향을 미치지 않지만 3종류를 모두 혼합 배양시켰을 경우에는 xylan의 이용률이 크게 향상되었다고 하였다. Williams 등(1994)은 젖산이용 박테리아인 *Veillonella parvula*(*V. alcalescens*와 동일한 종)를 *Piromyces communis*와 혼합배양하면 곰팡이에 의해서 생성된 젖산의 농도를 감소시킬 뿐만 아니라 propionate의 생성량을 증가시키는 역할을 함으로써 xylanolysis를 증가시킨다고 하였다. 어떤 비섬유소분해 박테리아와 섬유소분해 박테리아가 결합될 때 cellulose분해를 증진시킬 수 있다(Dehority와 Scott, 1967; Kudo 등, 1987a). Fondevila와 Dehority(1996)는 비섬유소분해균인 *Prevotella ruminicola*와 2가지 섬유소분해균(*Fibrobacter succinogenes*와 *Ruminococcus flavefaciens*)과 혼합배양하면 섬유소 소화율에서 단독 배양시 보다 증가한다고 하였으며, 섬유소분해균인 *F. succinogenes*와 *R. flavefaciens*를 혼합하면 *F. succinogenes*의 단독 배양시 보다 섬유소 분해율이 감소한다고 하였다. 이와 같은 결과는 *R. flavefaciens*균이 *F. succinogenes*에 의한 기질 분해를 방해하는 물질을 생산하기 때문이라 하였다. 또한 *R. flavefaciens*는 섬유소 분해 곰팡이와 상호억제 작용이 있는 것으로 발견되었으며, 이에 반해 *F. succinogenes*는 그러한 활력이 없는 것으로 관찰되어졌다(Irvine and Stewart, 1991; Bernalier et al., 1992; Roger et al., 1993). Odenyo 등 (1994a)은 *R. flavefaciens*와 *R. albus*를 cellobiose 배지에서 2에서 3

시간 배양하였을 때 *R. flavefaciens*는 발견할 수 없었으며, 대조적으로 *R. albus*과 *F. succinogenes*은 함께 자랐다고 하였다. 이러한 억제 물질은 *R. albus* 배양 상층액 내에서 발견 되었으며, pronase E와 α -chymotrypsin의 처리에 의해 파괴된다고 하였다. 이러한 억제 능력이 반추위 섬유소 박테리아들의 경쟁에서 생산되는 bacteriocin에 의한 것이 원인이라는 것을 얻었다. *Hydrogentrophic* 박테리아는 곰팡이에 의한 섬유소 분해율을 증가시키는 작용을 하지만(Fonty 등, 1988b; Bernalier 등, 1990, 1991; Teunissen 등, 1992) cellulolytic 박테리아는 곰팡이와 서로 antagonistic을 갖거나 곰팡이의 cellulolysis에는 영향을 미치지 않고(Joblin 등, 1990; Irvine과 Stewart, 1991; Joblin, 1991; Bernalier 등, 1992; Roger 등, 1992) 또한 xylanolysis에도 영향을 미치지 않는 것으로 알려지고 있다(Williams 등, 1991; 1994). Cellulolytic 박테리아에 의해서 곰팡이의 cellulolysis와 xylanolysis가 저해되는 이유는 박테리아에 의해서 분비되는 protein 때문일 것이라고 Stewart 등(1992)과 Bernalier 등(1993)은 추정하였다. Williams 등(1991)은 기전은 확실치 않지만 cellulolytic 박테리아가 곰팡이의 성장을 저해시키는 것 같다고 하였다. 또한 면양 (Van Gylswyk, 1970)과 젖소 (Weimer 등, 1999)의 반추위내에서 *R. albus*가 *R. flavefaciens*보다 수적으로 우세한 것으로 알려져 있어 그 원인이 *R. albus*가 생산하는 bacteriocin이 특이적으로 *R. flavefaciens*에 작용하였기 때문이며, 최근의 연구결과에서 밝혀진 바에 의하면 *R. albus*가 *R. flavefaciens*를 억제하는 bacteriocin인 Albusin B를 생성하는 것으로 알려졌다 (Chen 등, 2004).

이러한 결과는 반추위내 미생물간 상승작용과 길항작용은 매우 복잡하고 연구자들 간에도 결과가 상이하여 일관되게 설명하기에는 많은 어려움이 있다.

제 4 절 반추위내 미생물 투여효과

최근 전 세계적으로 항생제 사용에 대한 규제가 강화되고 있으며, 그 대안으로 비항생제적 방법에 관한 미생물제제(Direct-fed microbials)가 항생제 대체물로 사용되고 있다(Fuller, 1989; Lyons와 Jacques, 2000; Harris와 Webb, 1990; Martin과 Nisbet, 1992). Direct-fed microbials(DFMs) 제조에는 박테리아, 효모, 곰팡이 등이 사용되고 있다(Wiedimeier 등, 1987; Harrison 등, 1988; Kung 등,

1997). 미생물제제로 이용되는 미생물들은 유해세균이 장 점막을 침입하는 것을 막고(Fuller and Brooker, 1974), 유산 생성으로 장내 pH를 저하시키며 항균작용(Underdahl 등, 1982)을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 미생물제제의 첨가는 아직까지 큰 문제점이 발견되지 않고 있으며, 첨가효과에 따라 동물에게 급여시 장내 병원성미생물의 정착을 감소시키며, 소화율이 향상된다고 보고 되고 있다. *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus*를 쥐에게 급여시 병원성 대장균의 장내 정착을 저해하였으며(Duval-I, 1998), 상업용 미생물첨가제로 사용되고 있는 *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*를 젖소에게 급여시 건물, 유기물, 조단백질 등의 소화율이 크게 향상된 것으로 나타났다(Gomez와 Alarcon, 1990; Newbold등 1995). 또한 착유우에 곰팡이와 이스트제제를 첨가하면 산유량이 증가되었다고 한 보고도 있다(Williams 등, 1991). 그러나 다른 연구 결과에서는 산유량에 영향이 없었다(Higgenbotham 등 1994). 이외로 사료첨가제로서 반추위로부터 분리한 곰팡이를 양에게 급여하였을 때 반추위내 미생물수가 증가하였으며, 반추위내 pH의 안정화, 영양소 소화율이 증가하고 질소 축적율이 높아진 것으로 나타났다(Lee 등, 1996). 그러나 한편으로 미생물제제의 첨가가 동물의 소화율향상에 영향을 주지 않는다는 연구결과도 보고 되고 있다(Martin과 Nisbet, 1989; Denigan, 1992). 이들 미생물이 반추동물의 생산성 향상에 미치는 영향은 일관적이지 못하며, 또한 효과가 있는 경우에도 그 작용기전이 정확하지 않다(Wallace, 1994). 미생물제제의 작용기전에 대한 가설은 병원성 박테리아의 성장을 억제하고, 장내에 유익한 미생물수를 증가시키며, 섬유소 소화를 용이하게하며, 독소의 활성을 억제하고 그리고 위벽 내에 산소를 제거하는 것으로 알려지고 있다.

현재까지 상업용으로 사용되고 있는 미생물제제들은 곰팡이 발효추출물과 효모 배양물이 상품화되어 시판되거나 젖산균을 사용하고 있다. 상업용 미생물제제로 이용되고 있는 효모 첨가제는 계통에 따라 동물의 장내에서 큰 차이를 나타낼 수 있고 장내 산도에 의해 많은 영향을 받으며, 지금까지 연구를 통해서 나타난 결과가 일관성이 낮은 것에 기인한다. 또한 섬유소 분해력이 월등한 곰팡이를 첨가제로서 사용할 경우에는 계대배양의 어려움과 배지조건상 경제성이 낮다는 문제점이 뒤따른다. 미생물제제로서 이용 가능한 후보미생물은 장내 생존성, 내산성, pH에서의 안정성, 높은 계대 능력 및 효소 역가의 조건을 갖추어야 한다. 이와 같은 조건을 만족하기 위해서는 후보미생물을 숙주동물의 장내에서 분리하는 것이 가장 효과적이며, 또한 곰팡이나 효모보다 숙주동물인 장내 서식하고 있

는 박테리아를 분리·동정하여 이용가능성을 알아보는 것이 미생물제제로서의 효율을 높일 수 있을 것이다.

제 7 장 참고문헌

- Abdel-Bar, N., Harris, N. D. and Rill, R. L. 1987. Purification and properties of an anti-microbial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.*52(2):411-415.
- Adams, M.R. and Hall, C.J.1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic acid and their mixtures. *International J. Food Sci. Technol.* 23:287-292
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- Axeleson, L. and S. Lindgern. 1987. Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 62:433-440.
- Ayers, W. A. 1958. Phosphorylation of cellobiose and glucose by *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* 76:515.
- Ayers, W. A. 1959. Phosphorolysis and synthesis of cell by cell extracts from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Biol. Chem.* 234:2819.
- Barrow, P. A., R. Fuller, and M. J. Newport. 1977. Changes in the microflora and physiology of the anterior tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to the pathogenesis of diarrhea. *Infect. Immun.* 18:586-595.
- Becker, R. J., Cooper, A. J and Starzyka, M. J., 1993. Evidence for association of bacteriocinogenic activity with membrane vesicles of *Thermus rubens*. *Microbios.*, 73, 123-133
- Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnenoy and P. Gouet. 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Curr. Microbiol.* 25:143.
- Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnenoy and P. Gouet. 1993. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neoclimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 139:873.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.-R. and Servin, A.L. 1993. Adhesion of human Bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enterotoxin-cell interactions, *Appl. Environ.*

- Microbial., 59:4121-4128.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.-R. and Servin, A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria, *Gut*, 35:483-489.
- Biswas SR, Ray P, Johnson MC, Ray B(1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin ACH, by *Pediococcus acidilatic* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1265-1267.
- Bradley, D. E., 1996. The structure of pyocin particles released from *Pseudomonas aeruginosa* by mitomycin C. *Int. Congr. Elect. Microsc.*, 6, 115-116
 Bradley, C. E. and Robertson. D., 1968. The structure and infective process of a contractile *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage. *J. Gen. Virol.*, 3, 247-254
- Braun, V., Pils, H. and Gross. P., 1994. Colicins, structure, mode of action, transfer through membrane and evolution. *Arch. Microbiol.*, 161. 199-206.
- ten Brink, B., Minekus, M., vander Vossen, J. M.B.M., Leer, R. J. and Huis In't Veld, J. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli Preliminary characterization and optimization of production of acdocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 77:140-148.
- Bryant, M. P. and L.A. Burkey. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36:205.
- Bryant, M. P. 1959. Bacterial species of the rumen. *Bacteriol Rev.* 23:125.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.* 32:1809.
- Bruce, B. B., S. E. Gilliland, L. J. Bush, and T. E. Staley. 1979. Influence of feeding cells of *Lactobacillus acidophilus* on the fecal flora of young dairy calves. *Okallahoma Anim. Sci. Res. Rep.* 207.
- Chan, R.C.Y., Reid, G., Irvin, R.T., Bruce, A.W. and Costerton, J.W. 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments, *Infect. Immun.*, 47:84-89.
- Chan, R.C.Y., Bruce, A.W. and Reid, G. 1984. Adherence of cervical, vaginal

- and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of Gram-negative uropathogens by competitive exclusion , *J. Urol.*, 131:596-601.
- Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Biochem.* 8:130-132.
- Chauvier, G., Coconnier, M. H., Kerneis , S., Darfeuille-Michard, A., Joly, B. and Servin , A.L. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli*(ETEC) from human enterocyte like Caco-2 cells by heat -killed *Lactobacillus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 91:213-218
- Cheng, K.-J., G. A. Jones. F. J. Simpson and M. P. Bryant. 1969. Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. *Can. J. Microbiol.* 15:1365.
- Coconnier, M.-H., Bernet, M.-F., Chauviere, G. and servin , A.L. 1993a. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB., inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells, *J. Diarrhoeal Dis .Res.*, 11:235-242.
- Coconnier, M.-H., Bernet, M.-F., Kerneis, S., Chauviere, G ., Fourniat, J. and Servin, A.L. 1993b. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion, *FEMS Microbiol. Lett.*, 110:299-306
- Coetzee. H. L., Coetzee, J. N. and Smit, J. A., 1968. Bacteriophage tail like particles associated with intra species killing of *Proteus vulgaris*. *J. Gen. Virol.*, 2, 29-36. Crosby, B., B. Collier, D. Y. Thomas, R. M. Teather and J. D. Erfle. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of cellulase genes from *Bacteroides succinogenes*. In " Proc. 5th Can. Bioenergy R & D. Seminar." Ed. S. Hasnani. p. 573. Elsevier Applied Sciences Publishers, Barking, England
- Dahiya, R.S. and M. L. Speck. 1963. Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus* . *J. Dairy Sci.* 51(10);1568-1572.
- Davies, J. K. and Reeves, P., 1975. Genetic of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group B. *J. Bacterio.*, 123, 96-101

- Daw, M. A. 1989. PhD thesis, Dublin University, Trinity College Dublin, Ireland.
- Daw, M. A., Corcorn, G. D., Falkiner, F. T. and Keane, C.T., 1992. Application and assessment of cloacin typing of *Enterobacter cloacae*, *J. Hosp. Infect.*, 20, 141-151
- Dehority, B. A. and H. W. Scott. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forage by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci* 50:1136.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1-42.
- Erwin, E, S., Marco, S. J and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy sci.* 44:1768-1771. Farkas-Himsley, H., Zhang, Y. S., Yuan, M. and Musclow, C. E., 1992. Partially purified bacteriocin kills malignant cells by apoptosis: programmed cell death. *Cell Mol. Biol. Noisy le grand.* 38, 643-651.
- Finlay, B.B. and Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity, *Microbiol. Rev.*, 53:210-230
- Fondevila, M. and B. A. Dehority. 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *J. Anim. Sci.* 74:678.
- Forsberg, C. W., T. J. Beveridge and A. Hellstrom. 1981. Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:886.
- Frank, J.F., and E.H. Marth. 1977. Inhibition of enteropathogenic
- Frank, J. F. 1991. Mechanism of pathogen inhibition by lactic acid bacteria , *The 7th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health* , Seoul, Korea, p. 3-10.
- Fredericq. P., 1957. Colicins *Ann. Rev. Microbiol.*, 11, 7-22
- Fredericq, P., 1963. On the nature of colicinogenic factors: a review. *J. Theor. Biol.*, 4, 159-161
- Fuller, R. 1992. *Probiotics: The Scientific Basis* .Chapman and Hall. p 1-3.
- Geli, V. and Lazdunski, C., 1992. An α -helical hydrophobic hairpin as a specific determinant in protein-protein interaction occurring in *Escherichia coli* colicin A and B immunity systems. *J. Bacteriol.*, 147, 6432-6437.

- Gottschalk, G. 1986. Lactate fermentation , in *Bacterial Metabolism*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 214-224.
- Gong, C.-S. and G. T. Tsao. 1979. Cellulase biosynthesis and regulation. In "Annual reports on fermentation processes." Ed. D. Perleman. P.111. Academic Press, Inc., New York.
- Govan. J. R. W., 1974. Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: morphology and mode of action of contractile pyocins. *J. Gen. Microbiol.*, 80, 1-15.
- Gratia. A., 1925. sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille, *C. R. Soc. Biol.*, 93, 1040-1041.
- Gratia. J. P. and Grenier L., 1992. Differential activity of bacteriocins and celotaxime against *Serratia marcescens* clinical isolate SMG40 and its pigmented variant. *Int. J. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.*, 276, 340-346.
- Greve, L. C., J. M. Labavitch and R. E. Hungate. 1984. α -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: Purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Appl. Environ. microbiol.* 47:1135.
- Groleau, D. and C. W. Forsberg. 1983. Partial characterization of the extracellular endoglucanase produced by *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* 29:504.
- Harrison, G. A., R. V. Hemken, K. A. Dawson, R. J. Harmon and K. B. Baker. 1988. Influence of addition of yeast supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967.
- Hastings, J. W., Stiles, M. E and Von Holy, A., 1995. Bacteriocins of leuconostocs isolated from meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 75-82
- Havarstein, L.S., Holo, H. And Nes, I. F., 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequence with leader peptides that are common among peptide bacteriocin produced by Gram positive bacteria. *Microbiology*, 140, 2383-2389.
- Heener, H., and R. Heemer. 1952. Cytological study of *Thermobacterium acidophilus* R26 cultured in the absence of deoxyribonucleosides. *Exp.Cell Res.* 3:675.
- Higgenbotham, G. E., C. A. Collar, M. S. Aseltine and D. L. Bath. 1994.

- Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* extract on milk yield in a commercial dairy herd. *J. Dairy Sci.* 77. 343.
- Higerd, T. B., Baechler, C. A. and Berk, R. S., 1969. Morphological studies of relaxed and contracted forms of purified pyocin particles. *J. Bacteriol.*, 98,1378-1389.
- Howards, P., Cavard, D. and Lazdunski, C., 1989. Aminoacid sequence and length requirements for assembly and function of the colicin A lysis protein. *J. Bacteriol.*, 171, 410-418.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Cheng, K. J. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. sci.* 76:3146-3156.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Cheng, K. J. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. sci.* 78:477-487.
- Huang, L., C. W. Forsberg and D. Y. Thomas. 1988. Purification and characterization of a chloride-stimulated cellobiosidase from *Bacteroides succinogenes* S85. *J. Bacteriol.* 170:2923.
- Hungate, R.E. 1957. Microorganism in the rumen of cattle fed a constant ration. *Can. J. Microbiol.* 3:289.
- Irvine, H. L. and C. S. Stewart. 1991. Interactions between anaerobic cellulolytic bacteria and fungi in the presence of *Methanobrevibacter smithii*. *Lett. Appl. Microbiol.*12:62.
- Itoh, K/ 1999. Lactic acid bacteria and intestinal microflora, The 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health, Seoul, Korea, p, 23-25.
- Jacob, F., Siminovitch, L. and Wollman, E., 1952. Sur la biosynthesis d'une colicine et sur son mode d'action. *Ann. Inst. Pasteur*, 83, 285-315.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl, *Appl. Environ. Microbiol.* 44:525-532.
- Jay, J. M. 1986. *Modern food microbiology*. New York, van Nostrand Reinhold, Jenny, B. F., H. U Vandijk, and J. A. Collins. 1991. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *J. Dairy Sci.* 74 : 1968. Joblin, K. N., G. E. Naylor and

- A.G Williams.1990.The effect of Methanobrevibacter smithii on the xylanolytic activity of rumen fungi. Appl. Environ. Microbiol. 56:2287.
- Joerger MC. Klaenhammer TR. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bactericin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167:439-446.
- Jonsson, E. and Conway, P. 1992. Probiotics for pigs. In: R. Fuller (Ed.) Probiotics: The Scientific Basis. PP 260-316. Chapman & Hall, London.
- Jonsson, E. and P. Conway. 1992. Probiotics for pigs. In Probiotics—the science basis, ed R. Fuller, Chapman and Hall, 260-316.
- Kaziro, Y. and Tanaka, M., 1965. Studies on the mode of action of pyocin. I. Inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. J. Biochem., 57, 689-695.
- King, A.D.J. and Nagel . C.W. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*, J. Fd. Sci.,40:362-366
- Kingsbury, D., 1966. Bacteriocin production by strains of *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol., 91, 169-1699.
- Koebink, R. and Braun, V., 1993. Insertion derivatives containing segments of up to 16 amino acid identify surface and periplasm-exposed regions of the outer membrane receptor of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., 3, 826-839
- Konisky, J., 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Ann. Rev. microbial., 36, 125-145.
- Konisky, R. and Richard, S. F., 1970. Characterisation of colicin Ia and colicin Ib. J. Biol. Chem., 245, 2972-2978.
- Kroger, M., and Kurmann, J.A. 1989. Fermented milks— past, present and future. Food Technol. 43:92-99
- Kudo, H., K.-J Cheng and J. W. Costerton. 1987a. Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the in vitro degradation of straw cellulose. Can. J. Microbiol. 33:244.
- Kudo, H., K.-J Cheng and J. W. Costerton. 1987b. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic bacteria from cellulose fibers. Can. J. Microbiol. 33:267.
- Kudo, H., K.-J. Cheng, S. Imai and S. S. Han. 1990. Effect of feed on the

- composition of the rumen ciliate protozoal population in cattle and its relationship to cellulolytic ciliate protozoa. *Anim Feed Sci. Technol.* 29:159.
- Kung, L., Jr., 1996. Direct-fed microbial and enzyme feed additives Lindgren S.E. Dobrogosz W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*87:49-163.
- Lakey, J. H., Duche, D., Gonzalez-Manas, J. M., Baty, K. and Pattus, F., 1993. Fluorescence energy transfer distance measurements the hydrophobic helical hairpin of colicin A in the membrane bound state. *J. Mol. Biol.*, 230, 1055-1067.
- Laukova, A. and Marekova, M., 1993. Antibacterial spectrum of bacteriocin-like substances produced by rumen staphylococci. *Folia Microbiol. Praha.* 38, 74-76.
- Libertin, C. R., Dumitru, R. and Stein, D. S., 1992. The hemolysin/ bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 115-120.
- Linweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56:658.
- Loyola-Rodriguez, J. P., Morisaki, I., Kitamura, K. and Hamada, S. 1992. Purification and characterization of extracellular mutacin, a bacteriocin *Streptococcus sorbini*. *J. Gen. microbial.*, 138, 269-274.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A. J., and Berkeley, R. C. W., 1972. Methods for studying bacteriocins. I: *Methods in Microbiology*, Moris, J. R. and Ribbons, D. W. (eds). Academic Press, pp. 315-422.
- McAllister, T. A., K-J. Cheng, L. M. Rode and J. G. Buchaman-Smith. 1990a. Use of formaldehyde to regulate digestion of barley starch. *Can. J. Anim. Sci.* 70:581.
- McAllister, T. A, L. M. Rode and K-J. Cheng. 1990b. Morphological study of the digestion of barley and corn by rumen microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 30:91.
- McAllister, T. A, L. M. Rode, K-J Cheng and J. G. Buchaman-Smith. 1990c. Effect of ruminal colonization on cereal grain digestion. *Can. J. Anim. Sci.* 70:571.

- McDermid, K., C. R. Mackenzie and C. W. Forsberg. 1990. Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:127.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publications, Marlow. UK.
- Mieto-Lozano, J. C., Meyer, J. N., Sletten, K., Pleaz, C. And Nes, I. F., 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *pediococcus acidilactici*. *J. Gen. microbial.*, 138, 1985-1990.
- Min, B. R., W. J. Maeng and N. K. Cho. 1991. Isolation, identification and activity of cellulolytic bacteria in the rumen. II. The activity of cellulolytic bacteria in the rumen. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 15:103.
- Montville, T. J. and Bruno, m. E. C., 1995. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bactericins and other antimicrobial protein. *Int. J. food Microbiol.*, 24, 53-59.
- Monura, M., 1967. Colicins and related bacteriocins. *Ann. Rev. microbiol.*, 12, 257-284.
- Newbold, D. J., R. Brock and R. J. Wallace. 1991. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci.* 116:159.
- Newbold, D. 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.
- Nungate, R. E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press, New York.
- Ohno. S., Ohon-Iwashita, Y., Suzuki, K. and Imahori, K., 1977. Purification and characterization of active component and active fragment of Colicin E3. *J. Biochem, (Tokyo)*, 82, 1045-1053.
- Ouwehand, A .C. and Conway, P.L. 1996a. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus , *J.Appl . Bacterial .* , 80:311-318
- Ouwehand, A .C. and Conway , P. L. 1996b. Specificity of spent culture fluids of *Lactobacillus* sp. to inhibit adhesion of enteropathogenic filamentous *Escherichia coli* cells, *Microb. Ecol Health Dis .* ,

9:239-246.

- Parker, M. W., Pattus, F., Tucker, A. D. And Tsernoglou, K., 1989. Structure of the membrane forming fragment of the colicin A. *Nature*, 337, 93-96.
- Park, W. S. and D. D. Y. Ryu. 1983. Cellulolytic activities of *Clostridium thermocellum* and its carbohydrate metabolism. *J. Ferment. Technol.* 61:5631.
- Pettipher, G. L and M. J. Latham. 1979. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 110:29.
- Piard JC, Delorme F, Giraffa G, Commissaire J, Desmazes M. 1990. Evidence for a bactericin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *J. Neth. Milk Dairy* 44:143-158.
- Pirce, R J., J.S. Lee. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. *J. Milk Food Technol.* 33:13-18.
- Pitt, T. L., 1980. State of the art: typing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Host. Infect.*, 1, 195-1101
- Plockova, M., Chumchalova, J. and Tomanova, J. 1997. Antifungal activity of *Lactobacillus acidophilus*, CH5 metabolites. *Portav. Vedy.* 15(1):39-48.
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., and Schleiger, K. H. 1994 Taxonomy of lactic acid bacteria. In: *Bacteriocins of Lactic acid bacteria* (eds. L. de Vuyst and E.J. Van Dumme) P. 13-90. Blackie Academic and Professional, Glasgow
- Raibaud, P., M. Caulet, and J.V. Galpin. 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J. Appl. Bacteriol.* 24:285-306.
- Ragg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W., 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
- Reeves, P., 1965. The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, 29, 24-45.
- Reeves, P., 1972. The bacteriocins, molecular biology, biochemistry, biophysics, Vol 11. Springer-Verlag, New-York.
- Robert, I. L., Micael, R., Sylvia, S.S.L. Harwig, Richard, J, and Patricia, E.

1991. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunological Method* , 137:167-173.
- Robinson , I. M., H.M. Stromley, and V.H. Varel. 1988. *Streptococcus* intestinals, a new species from the colons and feces of pigs. *Int. J.Syst, Bacteriol.* 38:245-248.
- Robinson , I. M., S.C. Whipp, and J. A. Bucklin . 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 24:285-306.
- Roger, V., E. Grenet, J. Jamot, A. Bernalier, G. Fonty and P. Gouet. 1982. Degradation of maize stem by two rumen fungal species, *Piromyces communis* and *Caecomyces communis*, in pure cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Reprod. Nutr. Dev.* 32:321.
- SAS. 2000. SAS/STAT® User's guide (Release 8.1 ed.). Statistics, SAS Inst, Inc., Cary, NC.
- Schillinger U , Lucke FK. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1901-1906.
- Schwartz, S. A. and Helinski, K. R., 1971. Purification and characterization of colicin E1. *J. Biol. Chem*, 246, 6318-6327.
- Shahani, K.M., J.R.Vakil, and A. Kilara. 1976. Natural antibiotic activity of *L. acidophilus* and *bulgaricus* . I. Cultural conditions for the production of antibiosis . *Cult . Dairy Prod. J.* 11:14.
- Sijpesteijn, A. K. 1958. On *Ruminococcus flavefaciens*, a cellulose-decomposing bacterium from the rumen of sheep and cattle. *J. Gen. Microbiol.* 5:869.
- Siragusa, G. R., 1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3508-3513.
- Siragusa, G. R. and M. G. Johnson. 1989. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H2O2 antimicrobial system. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(11):2802-2805
- Soham, M. and Djebli, A. 1992. Structural studies on colicins E3 and its immunity protein. In: *Bacteriocins, microcins and antibiotics* James R., Lazdunski, C. and Pattus. F. (eds). NATO ASI Series. pp. 203-214.
- Stiles, M. E., 1994. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *J. Dairy Sci.* 77, 2718-2722.

- Strasser de Saad. M. A. And Hanea de-Nadra, M. C., 1993. Characterisation of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosuceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 406-410.
- S.T. Ogunbanwo(a), A. I. Sanni and A.A. Onilude, 2003, Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* ., *African journal of Biotechnology.*, 2(8):219-227.
- S.T. Ogunbanwo(b), A. I. Sanni and A.A. Onilude, 2003, Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1., *African journal of Biotechnology.*,2(7):179-184.
- Teunissen, N. J., H. J. M. Op den Camp, C. G. Orpin, J. H. J. Huis in'tveld and C. D. Vogels. 1992. Effects of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and nonruminants with methanogenic bacteria on cellulolytic and xylanolytic activities. *Arch. Microbiol.* 157:176.
- Van Soest, P. J., Roberts, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Venkitanaeayanan, K. S., C. -M. Lin, J. Bailey and M. P. Doyle. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *J. Food Protection* .65(1):100-105.
- Vlaemynck, G., Herman, L. and Coudijzer, K., 1995. Isolation and characterisation of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 211-217.
- Wallace, R. J. 1994. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: Progress and problem. *J. Anim. sci.* 72:2992.
- Wang, Y., T. A. McAllister, L. M. Rode, K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, V. L. Nsereko, A. D. Iwaasa, and W. Z. Yang. 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the rumen simulation technique(Rusitec). *Br. J. Nutr.* 85:325.
- Watson, J.A. and J.Schubert. 1969. Action of hydrogen peroxide on growth

- inhibition of *Salmonella typhimurium* . J. Gen. Microbiol. 57(1):25-34.
- Weimer, P. J. 1992. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? J. Dairy Sci. 79:1496.
- Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel and J. L. Walters. 1987. Effects of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrients digestibility. J. Dairy Sci. 70:2063.
- Williams, A. G., S. E. Withers and K. N. Joblin. 1991. Xylanolysis by cocultures of the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* and ruminal bacteria. Lett. appl. Microbiol. 12:232.
- Williams, A. G., S. E. Withers, G. E. Naylor and K. N. Joblin. 1994. Effect of heterotrophic ruminal bacteria on xylan metabolism by the anaerobic fungus *Piromyces communis*. Lett. Appl. Microbiol. 19:105.
- Yajima, S., Muto, Y., Yokoyama Masaki, H and Uozumi, T., 1992. The secondary structure of the colicin E3 immunity protein as studied by 1H-1H and 1H and 15N two dimensional NMR spectroscopy. Biochemistry: 31, 5578-5586.
- Zani, G., B. Biavati, and F. Crociani, 1974. Bifidobacteria from the feces of piglets. J. Appl. Bacteriol. 3:537-647.
- ZoBEL, C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterail activity, J. Bacteriol., 46:39-56.
- 강민원. 2000. 반추곰팡이를 이용한 효소첨가제의 개발. 석사학위논문. 서울대학교.
- 김동신. 1998. 식품발효미생물학. 유한문화사. pp. 25-27,69
- 김현욱, 강영재, 김동신, 백영진, 안종건, 윤영호, 이신호, 최충국, 1991. 낙농 및 식품미생물학, 선진문화사, 서울, pp.61-70.
- 백영진, 1991. 유산균이 생산하는 항균물질. 보건학종합학술대회. 단행권. 서울. pp.118-119.
- 변정렬, 2002. *Lactobacillus* spp. 에 의한 세포내 glutathione과 IgM 상승 효과 및 분리균주의 특성. 중앙대학교 98회 석사학위 논문.
- 윤청후. 2005. Hydrogen Peroxide(H₂O₂)을 생산하는 *Lactobacillus fermentum* CS12-1의 항균활성에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문.
- 정충일, 강국희, 1999. 우유.유제품 미생물학 . 유한문화사. 서울 PP.95-105.
- 하종규, 이성실, 문양수, 김창현. 2005. 반추동물영양생리학. 3장. 반추위와 반추위

미생물129.