

636.085  
L 2937

GOVP 12010214

최 종  
연구 보고서

가축의 사료 효율 증진 및 대사장애 예방을 위한  
Direct Fed Microbial (DFM) 개발에 관한 연구  
Studies on the Development of Direct Fed Microbial  
for Animals

Lactic acid dehydrogenase 생산성이 높은 미생물 배양물  
개발에 관한 연구  
Studies on the development of microbial culture for production of  
lactate dehydrogenase

도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 개발에  
관한 연구  
Studies on the development of fungal cultures with rumen  
contents by microbial fermentation

Chromosome homologus integration 방법을 통한 cellulase를  
생산하는 새로운 생균제 개발에 관한 연구  
Use of homologus stable chromosomal integration in engineering  
of probiotics for cellulase expression

연구 기관

성균관대학교

농 립 부



## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “가축의 사료 효율 증진 및 대사장애 예방을 위한 Direct Fed Microbial (DFM) 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “Lactic acid dehydrogenase 생산성이 높은 미생물 배양물 개발에 관한 연구; 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 개발에 관한 연구; Chromosome homologus integration 방법을 통한 cellulase를 생산하는 새로운 생균제 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 10 . 20 .

주관연구기관명 : 성균관대학교  
총괄연구책임자 : 신 형 태  
연 구 원 : 정 기 환  
연 구 원 : 성 하 균  
연 구 원 : 장 기 호  
협동연구기관명 : 성균관대학교  
협동연구책임자 : 백 순 용  
연 구 원 : 박 영 준  
연 구 원 : 홍 영 송  
연 구 원 : 백 승 우  
협동연구기관명 : 상지 대학교  
협동연구책임자 : 임 태 진  
연 구 원 : 조 광 근  
연 구 원 : 고 윤 정  
연 구 원 : 김 지 영

# 요 약 문

## I. 제 목

가축의 사료효율 증진 및 대사장애 예방을 위한 Direct Fed Microbial(DFM) 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

축산분야에서는 가축 사료에 금세기 최고의 과학적 발명이라고 할 수 있는 항생제 (antibiotics)의 사용으로 많은 생산성 향상을 도모할 수 있었다. 가축의 생산성을 증대시키기 위해서는 사료의 이용성을 높여야 하는데 현재까지 항생제, 생균제, 효소제 및 발효촉진제 사용이 가장 효과적이거나 항생제는 체내 잔류문제가 있고 효소 및 발효촉진제는 가격이 비싸고 전량을 수입에 의존해야 하므로 현재와 같이 생산비 비중이 큰 여건 하에서는 그 사용이 대단히 어려운 실정이다. 현재 시판되는 사료에 전적으로 의존하는 우리나라의 가축은 소화불량 등의 문제가 만연되고 있는 심각한 상태에 있다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 가장 좋은 방법은 섬유질이 많은 사료를 공급하는 것인데, 볏짚과 같이 풍부한 농산부산물을 갖고 있으면서도 이들의 소화흡수율과 기호도가 낮은 이유로 이용을 못하고 있는 실정이다.

반추위내 탄수화물 과다급여 또는 급속한 탄수화물 발효로 과량 생성되는 lactic acid에 의한 유산과다증은 가축의 생산성을 높이기 위하여 에너지 함량을 높게 급여해야만 하는 상황에서 필연적으로 발생하는 문제로서 아직도 뚜렷한 해결방법이 제시되지 못하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 완충제를 사용하여 중화시키는 방법과 효소를 생산하여 유산을 분해하고자하는 방법이 시도되기도 하였으나 최근의 연구동향을 보면 Lactic acid 이용율이 높은 미생물을 선별하고 이들의 성장 촉진인자 규명과 이의 대사과정을 규명하고자 하는 노력이 많이 이루어지고 있으나 아직까지 이와 같은 문제를 획기적으로 개선시킬 수 있는 결과는 나오지 않고 있다.

소의 도축시 발생하는 혈액 등의 도축 부산물은 식품 및 사료로 일부가 재이용되

는데 비해 채증의 10-20%의 용적으로, 전체 위용량의 약 85%를 차지하는 반추위에 남아있는 소화되지 않은 다량의 사료는 전량 폐기되고 있다. 이같은 반추위 내용물은 biological oxygen demand(BOD)가 25,000ppm 정도로 상당히 높고, 무기물 및 유기태 인과 질소의 함량이 높아 심각한 오염원이 되고 있으며 이의 폐기에 소요되는 비용도 무시할 수 없는 실정이다. 소의 도축 시 발생하는 반추위내용물 중 미소화 사료를 포함한 고형물은 10-20%정도이고, 반추위 미생물과 휘발성 지방산등 각종 발효산물이 포함되어 있는 반추위액이 80-90%를 차지하고 있다. 반추위 내용물을 사료자원으로 이용하고자 반추가축과 가금류 및 돼지에 대한 건조 반추위 내용물의 사료대체 가능성이 시도되었고, 국내에서도 silage 제조와 단세포단백질 생산기질의 이용 등이 검토되었으나 아직 실용화되지는 못하였다. 현재 일부 국가에서는 반추위내용물중 액상 부분을 이용하여 rumen bacterial inoculum, concentrate of natural and cultured rumen microorganisms 및 stabilized rumen extract 형태로 가축의 소화기 질병 예방 및 치료제로 일부가 사용되고 있으며, 최근 외국에서 생산되는 가축용 probiotics의 특수성분으로 이용되고 있다.

생균제는 미생물 자체를 가지고 만든 일종의 첨가제로서 가축의 사료에 첨가하여 영양소를 생산하거나 소화효소를 만들어 주며 유해한 미생물을 억제하는 항생제 유사물질 생산하며 미생물이 장내에서 성장하면서 이들 물질을 공급하게 된다. 요구르트는 식품을 통하여 젖산균을 공급해 주는 가장 전형적인 probiotics로서 사람이 먹는 요구르트를 돼지에서도 시험하여 효과가 인정되었다. 다른 probiotic으로서 *Lactobacillus* culture(예: Biomax, Lacta-a-bac, Probios, Pronifer)와 *Streptococci* 및 *Bifidobacteria*를 함유하는 것들도 있으며 (LBC, 또는 Feedmate 등은 *Streptococcus faecium* 등을 함유), 또는 *Bacillus subtilis*를 함유하는 것도 있고(Toyocerin, Floramate), 1위 내용물을 함유하는 것도 있다. 생균제로 사용되는 대표적인 미생물로는 *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *L. faecalis*, *L. helveticus*, *B. subtilis*, *L. latis*, Yeast, *L. salivarius* 등이 있다. 본 세부과제에서는 1, 2년차에 걸쳐서 국내외로부터 cellulose의 분해능력이 우수하고 안정성이 인정된 확보된 cellulase 유전자와 관련 문헌과 학회를 통하여 본 연구에 적합한 유산균에서 발현될 수 있는 유산균 shuttle vector를 이용하여 cellulase 유전자가 함유되어진

shuttle vector를 만들었고 이들 유전자와 vector를 이용하여 발현시킬 수 있는 host로서 내산성 장내 미생물인 유산균에 대한 담즙산과 항생제에 대한 내성 특성을 조사하였으며 이러한 연구 결과들을 바탕으로 3년차 최종 목표인 유산균에 cellulase를 형질전환 시켜서 발현양상을 확인하여 생균제제로의 이용성을 타진해 보는 것이다. 즉, 연구개발 목표는 다양한 섬유소 분해 미생물로부터 cellulase 유전자를 확보하여 bank화하고, Bank화된 cellulase 유전자 중에서 특히 단위동물의 소장내에 존재하는 단백질 분해효소에 안정성이 높은 것을 선별하고, 광범위한 host에서 효과적으로 복제 및 발현이 가능한 shuttle vector를 수집하여 *E.coli*-Lactic acid bacteria cloning vector를 개발하고, 젖산균 중 특히 단위동물의 장관내에 우점하는 *Lactobacilli* sp.를 확보하여 그들의 생리적 특성을 조사하고, *Lactobacilli* sp. 균주에 대한 최적의 형질전환방법을 모색하고, 선별된 cellulase 유전자를 *Lactobacilli* sp. 균주에 도입하여 형질전환시키고, 최종적으로 형질전환된 *Lactobacilli* sp. 균주의 생균제로서의 이용성을 연구하여 다음단계에서 이들 균주를 산업화 할 수 있도록 한다.

따라서 본 연구에서는 1) 반추위 대사장애의 1차적 원인물질인 lactic acid를 분해하여 glucose원인 pyruvate로 전환할 수 있는 lactic dehydrogenase를 다량 생산하며 반추위 발효촉진 물질을 함유하는 미생물 배양물과 2) 반추위 이상발효에 효과적인 반추위내용물을 기질로 이용하여 가축의 소화율을 개선할 수 있는 효모 및 곰팡이 배양물과 3) 내산성 장내 미생물인 *Lactobacillus acidophilus*에 cellulase 유전자를 도입하여 형질전환된 *Lactobacillus acidophilus* 균주를 개발하여 영양학적인 문제점을 해결함으로써 가축의 생산성 증가와 경제수명을 연장하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. Lactic acid dehydrogenase 생산성이 높은 미생물 배양물 개발에 관한 연구

##### 가. Lactic acid dehydrogenase 생성 미생물의 확보

Lactate의 이용성이 높은 균주를 분리하기 위하여 시료를 채취한 후 멸균식염수로 현탁시키고 각각의 선택배지(DHL, TATAC, PEES, YM, LBS, BS, NBGT 등)에 도말한 후 37°C에서 배양하여 나타난 colony를 분리하였다. 고효율 균주의 선발은 분리한 미생물중 lactate 첨가 배지에서의 성장율이 우수한 균주를 선별하기 위하여, 분리한 400여종의 미생물을 탄소원을 lactate로 제한한 MRS Broth에 접종하고 집적배양을 실시하여 우세하게 성장하는 10여종의 미생물을 분리하여 선발과정에서 이용하였다. 또한 본 연구목표 달성 가능성이 높은 균주를 위주로 당발효 검사와 생화학적 검사 및 Microbial Identification(MIDI) 등을 통하여 미생물을 간이 동정하였다.

##### 나. Lactic acid dehydrogenase 생성 미생물 배양조건 확립

선별한 미생물의 증식을 위한 최적 pH 범위, 최적 온도범위를 조사한 후 최적 생육조건을 결정하기 위하여 탄소, 질소, 인과 칼륨, 무기염류, 비타민 요구수준 및 C/N 비율을 조사한다. 선별한 효모의 산업적 배양을 위한 적정기질을 조사하기 위하여 산업적으로 이용가능한 lactate 등을 포함한 탄소원, 요소 등을 포함한 질소원,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  등을 포함한 인과 칼륨, 무기염류의 종류와 첨가수준실험을 실시한다.

##### 다. Lactic acid dehydrogenase 생산 균주의 생산성 및 안정성 구명

선별한 미생물을 이용한 lactic acid dehydrogenase 생산물의 반추위내 발효 특성에 미치는 효과 및 적정 사용수준을 조사하기 위하여 반추위에 Cannulae가 장착된 산양(*in vivo*)과 인공반추위(*in vitro*)를 이용하여 pH, lactate, VFA 등의 발효생성물 변화를 조사하고 *in situ* nylon bag 방법을 이용하여 사료의 반추위내 분해율 및 이용

을 등을 조사한다.

## 2. 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 개발에 관한 연구

### 가. 도축 반추위내용물 이용 미생물의 확보

반추위 내용물의 이용성이 높은 균주를 분리하기 위하여 도축장의 폐수, 토양 및 폐기물 등에서 분리용 시료를 채취한 후 멸균식염수로 현탁시키고 살균한 반추위액에 1%(vol/vol) 접종한 후 진탕배양기에서 3일간 배양하고 배양액을 희석하여 YM agar 평판배지에 pouring한 후 배양하면서 우세하게 나타나는 colony를 3차 계대하여 완전 분리하고 검경을 통해 효모를 선별한다. 그리고 도축 반추위내용물에서 배양하면서 생육도, 효소역가 및 발효 생성물, 내열성 등을 측정하여 유용균주를 선별한 후 동정한다.

### 나. 분리 미생물의 도축 반추위내용물에서의 배양조건 확립

선별한 효모 및 곰팡이의 증식을 위한 최적 pH 범위, 최적 온도범위를 조사한 후 최적 생육조건을 결정하기 위하여 탄소, 질소, 인과 칼륨, 무기염류, 비타민 요구수준 및 C/N 비율을 조사한다. 반추위 내용물을 효모 및 곰팡이 배양 기질화 하기 위하여 반추위 내용물을 잘 혼합한 후 압착 추출한 whole rumen extract 등 액상의 처리방법과 사용수준 및 이용성을 조사하고 고형물 당화 등의 처리방법과 사용수준 및 이용성을 조사하고 산업적 배양을 위한 탄소원, 요소 등을 포함한 질소원,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  등을 포함한 인과 칼륨, 무기염류의 종류와 보충수준실험을 실시한다.

### 다. 도축 반추위 내용물 이용 균주의 생산성 및 안정성 구명

선별한 효모와 곰팡이의 배양조건을 조사하기 위하여 종균제조 조건 및 발효조 system, 살균, 교반강도, 회전수, 거품유무, 발효열, 퇴적방법 등의 조건과 제어방법을 실험하고 Scale up 조건을 조사하고 경제성을 분석한다. 또한 도축반추위 내용물을 이용하여 20리터까지 대량 배양하여 배양물이 양계, 양돈 및 축우의 사료 이용을



에 미치는 효과를 조사하기 위하여 육계, 산란계, 양돈, 젖소 및 육우 사료에 수준별로 첨가하여 소화율을 조사하고 반추위 내 발효특성에 미치는 효과를 인공반추위(*in vitro*)를 이용하여 구명한다.

### 3. Chromosome homologous integration 방법을 통하여 cellulase를 생산하는 새로운 생균제의 개발

섬유소(cellulose)의 이용은 전통적으로 화학적, 효소적 분해에 비교적 안정한 천연상태의 것을 그대로 직접 펄프, 건축재, 의류, 연료로 이용하였으나, 1970년대초 석유파동을 거치면서 섬유소가 화석자원과는 달리 계속 축적되는 탄소원이라는 점에서 식량과 에너지원으로서 섬유소를 이용하고자 섬유소를 가수분해하여 Single Cell Protein이나 알콜, 아세트산 생산 등의 간접적 이용 및 폐수처리에 이르기 까지 많은 연구가 보고되고 있다.

Cellulase를 이용한 섬유소의 생물학적 가수분해는 화학적 방법과 비교하여 많은 장점을 지니고 있으나, 반응속도가 낮고 분해율이 극히 낮을 뿐 아니라 효소생산 비용이 매우 높아 섬유소 자원 이용에 큰 저해요인이 되고 있다. 이런 문제점을 보완하기 위해서는 무엇보다도 섬유소 분해 관련 효소를 생산하는 미생물을 개발하고, 보다 효과적인 효소 반응조건을 모색하여 높은 분해력을 가진 cellulase를 경제적으로 대량생산하는 것과 cloning된 cellulase 유전자를 이용하여 산업적으로 유용한 미생물에 형질전환시켜서 이들 미생물로부터 유용물질의 생산과 미생물 자체의 이용방안을 모색하는 것이 섬유소 자원의 적극적인 이용을 위해 매우 중요한 과제라고 하겠다.

따라서 본 연구의 내용은 다양한 섬유소 분해 미생물들로부터 분리된 cellulase 유전자를 bank하여 그들의 효소학적 특성을 규명함과 동시에 cloning vector를 이용한 유전자재조합 기법을 통해 내산성 장내 미생물인 *Lactobacilli*에 형질전환시킴으로써 cellulase 분비능력을 갖는 *Lactobacilli*의 새로운 미생물 균주를 개발하는 것이다. 또한 이들 미생물로부터 유전자의 발현양상과 안정성 및 생산된 cellulase 특성을 규명하여 최종적으로 이러한 cellulase 유전자가 형질전환된 *Lactobacilli* 균주를 단위동물의 사료에 첨가하여 장관 내에 정착시킴으로써 균주자체가 갖는 생균제로서의 고유한 기능과 아울러 cellulose를 분해 이용하는 새로운 생균제를 개발함으로써 단위동물에서 파생된

영양학적 문제점을 해결함과 동시에 나아가 고기능성 재조합 장내 미생물의 균주육종과 유용대사산물을 생산하기 위한 대량생산체계 방법을 모색하고자 본 연구를 실시하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. Lactic acid dehydrogenase 생산성이 높은 미생물배양물 개발에 관한 연구

곡류사료의 급여는 반추동물의 반추위내 미생물의 불균형을 발생한다. 즉, lactate 생성균인 *Lactobacillus sp.* 와 *Streptococcus bovis* 같은 균들이 계속 증식하고, 이들의 대사산물인 lactate은 반추위내 pH를 떨어뜨리고 낮은 pH는 반추동물에 유익한 섬유소-박테리아, 즉 *Bacteriodes succinogens*, *Ruminococcus albus* 그리고 *Ruminococcus flavefaciens*의 증식을 억제하여 소화 대사의 저하 작용을 일으킨다.

계속된 곡류 사료의 급여로 인한 lactate 축적과 pH의 저하는 lactic acidosis를 유발하여 여러 장애를 초래하고 심할 경우 가축을 잃는 큰 경제적 손실이 발생한다.

따라서 본 실험은 많은 에너지 사료 급여로 인한 lactate 생성을 줄이기 위하여 lactate dehydrogenase를 생산하는 미생물을 분리하여 동정 및 이들에 대한 특성을 규명하고, 반추동물에게 DFM으로 급여하였을 때 lactate 축적을 감소시킬 수 있는 가능성이 평가하기 위하여 *in vitro* 상에서 lactic acidosis 발생 및 예방에 대한 실험을 실시하였다.

Lactate dehydrogenase 생성 미생물을 분리하기 위하여 다양한 원료 즉, 식물, 물, 흙, 분 및 부산물로부터 총 327종의 균을 분리하였다. 이들 중 지시약 (bromocresol green)을 함유한 선택 배지를 이용하여 184종의 산생성 균을 선별하였으며, 다시 산생성 균를 lactate medium에 배양하여 잘 자라는 89종의 균을 선별하였다. 최종적으로 LDH 생성 균의 선별은 LDH 활성염색법 (LDH-staining method)을 이용하여 lactate dehydrogenase를 갖고 있는 20 종의 균을 선별하였다. 이들 중 Strain FFy111-1에서 가장 높은 LDH 역가가 발견되었으며, 효소 역가 (specific

activity)는 28.68 moles reduced NAD/min/mg protein 이었다. 그리고 Strain FFy111-1는 세포 외로 LDH를 분비하였는데 이 같은 사실은 Strain FFy111-1를 24시간 배양한 배양액에서 LDH를 활성염색에 의하여 발견함으로써 확인되었다.

미생물 동정 결과 FFy111-1는 *Lactobacillus* sp.으로 확인되었으며, 이 균을 *Lactobacillus* sp. FFy111-1로 명명하였다. *Lactobacillus* sp. FFy111-1은 배양액에 여러 가지의 탄소원 중 glucose, fructose, maltose를 공급하였을 때, 그리고 질소원 중 yeast extract,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 를 공급 하였을 때, 또한 무기물은  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 공급하였을 때 LDH 역가와 성장이 증가하였다. 특히, 탄소원으로 fructose, 질소원으로 yeast extract, 무기물로  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 를 공급하였을 때 균의 성장과 LDH 역가에 가장 좋은 영향을 주었으며, 배양액내 fructose는 2%, yeast extract는 4%, 그리고  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 는 0.05%를 함유하였을 때 균의 성장과 LDH 활성이 가장 높았다. 또한, 높은 LDH 활성과 함께 균의 최적성장을 위한 배양액의 pH와 배양 온도는 각각 6.5와 30°C이었다. 따라서, *Lactobacillus* sp. FFy111-1는 2% fructose, 4% yeast extract, 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 함유하고 pH가 6.5인 배양액에 접종하여 30°C에서 24 시간 배양하였을 때 균 성장과 LDH 활성이 가장 높았으며, 이때의 균 성장 흡광도는 2.01 이었고, 효소 역가는 103.89 moles reduced NAD/min/mg protein이었다. *Lactobacillus* sp. FFy111-1의 LDH가 효소 반응을 하기 위한 최적 pH는 7.5이었으며, pH 7.0 ~ 8.5의 좁은 범위에서 90% 이상의 LDH 활성을 보였다. pH에 대한 효소 안정성은 pH 7.0과 8.0에서 가장 높게 나타났다. LDH가 효소 반응을 하기 위한 최적 온도는 40°C이었으며, 30, 40, 50, 60 그리고 70°C에서 60분 동안 열처리후 LDH 역가는 각각 처리하지 않은 효소 역가의 89, 78, 37, 30 그리고 6% 수준이었다.

Strain FFy111-1의 LDH는 모든 VFAs 즉 10, 20, 30 그리고 40 mM의 acetate, propionate, butyrate, valate, isobutyrate 그리고 isovalate에 의하여 효소 활성이 억제되었으며, 40 mM의 VFAs에 의하여 LDH 활성이 완전히 억제되었다. 그리고 대부분의 무기물 즉 2 mM과 10 mM의  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  그리고  $\text{MnSO}_4$ 는 LDH 활성을 증진시키는 현상을 보였으나 10 mM  $\text{CuSO}_4$ 로 처리하였을 때 LDH역가는 처리하지 않은 효소 활성의 38% 수준까지 감소되는 효소 활성 억제 현상이 발견되었다. 26% glucose, 6% Cellobiose, 7% soluble starch, 26% glucose, 6%

cellulose, 7% cellobiose와 6% trypticase를 함유한 acidic feeds의 첨가로 *in vitro* 상에서 lactic acidosis를 발생시키는데 성공하였다. 그리고 acidic feed의 첨가량을 증가함에 따라 pH는 5.0이하로 계속 감소하였고 lactate, VFA, propionate, valate 그리고 butyrate는 증가하였다. *in vitro* acidic rumen fluid의 축적된 lactate는 LDH 조효소 처리에 의해 감소되었다. 즉, S108, C21-1, Fy110-8, F48 그리고 FFy111-1의 조효소 처리 후 *in vitro* acidic rumen fluid의 lactate 량 (relative lactate concentrate)은 97, 91, 89, 84 그리고 78%로 무처리구 (100%)에 비하여 낮게 나타났다. *in vitro* acidic rumen fluid의 lactate 축적은 LDH 생성 균주의 접종으로 감소되었다. 즉, 축적된 lactate량은 무처리구는  $50.85 \pm 7.35$  mM로 미생물 처리구 (S108,  $45.48 \pm 6.27$  mM; F48,  $41.84 \pm 7.55$  mM; FFy111-1,  $40.42 \pm 6.45$  mM)에서 더 낮게 나타났다. 따라서 위의 이와 같은 실험 결과들은 LDH 생성 미생물의 첨가 및 LDH 효소의 처리는 탄수화물을 많이 함유한 에너지 사료 급여로 인한 lactate 축적을 예방할 수 있다는 가능성을 시사하는 것이다.

## 2. 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 개발에 관한 연구

### 가. 도축 반추위액을 이용한 효모 배양물 개발

본 연구는 도축장에서 발생하는 반추위 내용물의 80-90%를 차지하는 반추위액을 이용하여 가축의 생산성을 향상시킬 수 있는 반추위 발효 촉진 미생물 배양물을 개발하기 위하여 수행하였다. 도축 반추위액의 이용성이 높은 야생효모를 분리 동정한 후 반추위액에서의 배양조건 조사실험을 실시하였다. 야생효모를 도축장 등에서 분리 동정한 후 반추위액에서의 증식속도가 빠른 3종(SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293)을 선별하여 적정 생육 pH와 온도를 조사한 후 실험에 사용하였다. 배양 기질은 도축 반추위액을 2겹의 cheese cloth로 여과한 whole rumen extract(W.R.E.)와 이를 수도물과 2:1(vol/vol)로 혼합한 dilute rumen extract (D.R.E.)를 제조한 후 효모 증식에 적합한 형태를 선택하고, 질소원(urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium phosphate 및 ammonium chloride), 요소 첨가수준(0, 0.1, 0.2 및 0.3%), 당밀 첨가수준(0, 2, 4 및 6%), 0.05%의 P 및 K 첨가( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCl 및

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0.02%의 trace elements첨가(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 및 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 및 C/N 비율(100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 및 100:4)이 효모증식에 미치는 영향을 조사한 후 최적조건을 설정하고 scale up에 따른 배양조건 개선 효과를 조사하였다.

도축장에서 분리된 반추위액의 이용성이 우수한 분리효모 SKK-Y-728과 SKK-Y-1293은 *Saccharomyces* 속이고 SKK-Y-786은 *Candida* 속이었으며, 적정 생육 pH와 온도는 SKK-Y-728이 pH 3.5-6.5, 30-35℃였고 SKK-Y-786은 pH 4-7.0, 30-35℃였으며 SKK-Y-1293이 pH 4-7.0, 25-35℃였다. 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293 모두 W.R.E.에서보다 D.R.E.에서 빠른 증식속도와 기질 이용성을 나타냈다. SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 효과적인 질소화합물은 urea와 ammonium sulfate였으며, SKK-Y-1293의 효과적인 요소 첨가수준은 0.1%였다. SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 생효모수와 기질 이용율이 2% 이상 6%의 당밀 첨가에 의해 크게 증가되었다(p<0.05). K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 첨가구에서 생효모수와 기질 이용율이 증가하였으나, 인, 칼륨 및 무기염류 첨가에 따른 유의적인 차이는 없었다. 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293은 C/N 비율 100:1.3에서 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0에서보다 높은 생효모수를 나타냈다(p<0.05). SKK-Y-728과 SKK-Y-786은 배양조건 개선에 의해 생효모수가 증가 되었으나, SKK-Y-1293은 배양조건 개선에 대한 효과가 없었다.

#### 나. 도축 반추위내용물을 이용한 곰팡이 배양물 개발

본 실험은 각종 발효산물 및 미지성장인자를 함유하고 있는 도축반추위액을 가축의 생산성 증진을 위한 효소( $\alpha$ -amylase 및 protease) 및 곰팡이배양물 생산 기질로 이용하기 위하여 *Aspergillus oryzae*가 최대의 효소를 생성하는 배양조건을 조사하고자 실시하였다. 반추위내용물을 이용한 *Aspergillus oryzae* 최적 배양조건을 조사하기 위하여 고지상자를 이용하여 *Aspergillus oryzae*를 0.5%(w/w) 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하면서 탄소원 및 증자의 효과, 수분함량 및 탄소원인 말분의 첨가비율 및 효소생성을 위한 최적 배양시간을 조사하고 생성된 효소의 특성을 조사하였다.

옥분, 말분 및 밀기울 첨가에 따른  $\alpha$ -amylase의 상대적인 활성(%)은 증자작업한

밀기울 100에 대하여 각각 78.5, 77.1 및 74.7로 탄소원 무첨가 18.5에 비하여 증가하였으며( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%) 또한 증자처리 한 말분 100에 대하여 52.2, 67.8 및 60.3으로 무첨가 21.5에 비하여 증가하였으나( $p < .05$ ) 탄소원간의 차이는 없었다. 증자 전에 비하여 증자작업으로  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 약 21-25가 증가하였고( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%)도 약 30-40이 증가하였다( $p < .05$ ).  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 수분함량 30-50%일 때 높았고( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%)은 수분함량 40%에서 높게 나타났다( $p < .05$ ). 반추위내용물과 말분의 비율에 따른  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 혼합비율에 따른 차이는 없었으나, protease의 상대적 활성(%)은 1:2의 비율일 때가 1:1, 1:4 및 1:5에 비하여 높게 나타났다( $p < .05$ ). 배양시간별(0-60시간)  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 24시간과 36시간이 다른 배양시간에 비하여 높게 나타났으며( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%)은 36시간과 48시간 째 높게 나타났다( $p < .05$ ). *Aspergillus oryzae*가 생성한  $\alpha$ -amylase의 경우 pH 5와 6에서 높은 상대적 활성을 나타냈으며( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%)은 pH 7에서 높게 나타났다( $p < .05$ ). 또한  $\alpha$ -amylase의 경우 40°C- 50°C에서 잔존활성이 85%-100%였으며 protease는 40°C에서 최대의 잔존 활성을 나타냈다.

#### 다. 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 첨가가 가축의 소화생리에 미치는 효과

본 연구는 반추위 미생물의 활력증진과 반추위 이상발효에 효과적인 반추위내용물을 이용하여 제조한 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물이 젖소의 반추위내 pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량, 휘발성지방산 함량 및 반추위내 영양소 소실율에 미치는 효과를 구명하기 위하여 수행하였다. 반추위에 cannula가 장착된 공시축은 대조구, *Aspergillus* 배양물 첨가구 및 *Saccharomyces* 배양물 첨가구로 나누어 3 × 3 Latin Square design에 의하여 배치하였으며, *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물은 각각 100g 씩 오전과 오후 사료급여 시 rumen cannula를 통하여 반추위에 직접 투여하였다. 반추위액의 채취는 오전 사료급여 전 30분과 사료급여 후 2, 5 및 8시간째 실시하여 반추위내 pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  및 휘발성지방산 함량을 측정하였다. 또한 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여전과 급여 14일 후 7일간 nylon bag을 이용하여 영양소 소실율을 조사하였다.

반추위내 건물 소실율은 배양 24시간째 대조구에 비하여 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 30.31%와 20.15% 높게 나타났으며, 배양 48시간째에는 45.56%와 30.33%로 급여구가 높았고 배양 72시간째에도 대조구에 비하여 10.50%와 10.01% 증가하였다( $p < .05$ ). 반추위내 유기물 소실율은 배양 24시간째 대조구에 비하여 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 8.61%와 8.31% 증가하였으며, 배양 48시간째에는 8.92%와 11.13%로 급여구가 높았고 배양 72시간째에도 대조구에 비하여 7.90%와 8.38% 증가하였다. 반추위내 NDF 소실율은 배양 48시간째 대조구에 비하여 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 9.75%와 8.30% 증가하였으며, 배양 72시간째에도 3.62%와 5.45% 증가하였다( $p < .05$ ). 반추위내 ADF 소실율은 배양 48시간째 대조구에 비하여 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 3.36%와 6.35% 증가하였으며, 배양 72시간째에도 7.17%와 5.67% 증가하였다( $p < .05$ ). 반추위내 평균 pH는 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다( $p < .05$ ). 반추위내 평균  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량( $\text{mg}/100\text{ml}$ )은 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구의 사료급여 5시간째  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량이 대조구에 비하여 각각 22.62%와 13.14%로 낮았으며( $p < .05$ ) 8시간째에도 대조구에 비하여 17.22%로 *Aspergillus* 배양물 급여구가 낮게 나타났다( $p < .05$ ). 반추위내 총 VFA 함량은 ( $\text{mmoles}/100\text{ml}$ ) *Aspergillus* 배양물 급여구는 대조구에 비하여 낮은 경향을 나타내었으나 *Saccharomyces* 배양물 급여구는 대조구와 유사하게 나타났다.

이상의 결과 반추위액을 이용한 배지에 효모(*Saccharomyces sp.*)를 배양한 효모배양물과 반추위액과 말분에 곰팡이(*Aspergillus sp.*)를 배양한 곰팡이 배양물을 이용함으로써 가축의 사료이용률과 생산성 향상뿐 아니라 유사 수입 사료 첨가제를 대체할 것으로 사료된다.

### 3. Chromosome homologous integration 방법을 통하여 cellulase를 생산하는 새로운 생균제의 개발

#### 가. 기술적 측면

- 각종 섬유소 분해 미생물의 cellulase 유전자에 관한 기초자료를 제공하며

우리나라 고유의 품종인 면양, 산양, 한우의 반추미생물로부터 분리한 cellulase와 다른 섬유소 분해 미생물로부터 분리한 cellulase와의 효소적 특성을 규명하여 비교연구가 가능하고 이들 cellulase 유전자를 산업미생물에서 발현할 수 있는 shuttle vector에 관한 기초자료를 공급할 수 있으며 이를 통해 최적의 형질전환 방법을 모색할 수 있을 것이다.

#### 나. 경제 · 산업적 측면

- 단위동물의 장관내에 우점하는 *Lactobacillus acidophilus*에 cellulase 유전자를 발현시킴으로써 새로운 생균제를 개발하여 단위동물에서 파생되는 영양학적인 문제점을 해결할 수 있으며
- 나아가 고기능성 장내 미생물의 균주 개발과 유용대사산물 생산에 대한 기초자료를 제공하는데 그 기대효과가 있다.

본 세부과제의 연구결과는 미생물을 이용한 모든 산업에 폭 넓게 활용할 수 있을 것이다. 본 연구에서 도출될 결과는 다음과 같이 활용할 수 있을 것이다.

- Bank화된 섬유소 분해효소 유전자중에서 축산분야에 적합한 유전자를 이용하여 산업적으로 이용가능성을 타진해 봄으로써 다른 산업에서의 이용가능성을 타진할 수 있는 시금석 역할을 할 수 있으며
- 축산 분야이외의 다른 산업에 적합한 유전자를 선별하여 미생물이 생산한 효소를 이용하거나 미생물과 섬유소 분해효소를 동시에 이용할 수 있을 것이며
- 각 산업의 각 공정에 적당한 효소를 선별 이용함으로써 공정의 경제성과 합리성을 기할 수 있으며
- 산업적으로 이용가능성이 높은 미생물에 섬유소 분해효소 유전자를 형질전환시키는데 있어서 중요한 기법인 형질전환 기법의 확립과 broad-host range vector를 선별함으로써 다른 종의 미생물에 형질전환시킬 수 있는 know-how를 축적함으로써 미생물을 이용한 산업에 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있을 것으로 사려된다.



## SUMMARY

### 1. Studies on the development of microbial culture for production of lactate dehydrogenase

1) For the screening LDH-producing bacteria, 327 strains were isolated from various sources, such as foods, water, plants, soil, feces, byproducts and what not. 184 acid-producing strains were selected medium above 327 isolates by yellow colour zone forming on selected medium containing indicator (bromocresol green) and then 89 lactate-utilizing strains which grew well on the lactate medium were selected. 20 strains which produce LDH were selected finally by LDH-staining method with native PAGE. FFy111-1 among LDH-producing strains was found to produce LDH with the most high enzyme activity. The specific activity was revealed 28.68 moles reduced NAD/min/mg protein. LDH in culture fluid was found by LDH-staining methods with native PAGE. This result indicated that FFy111-1 produced extracellular LDH. The strain FFy111-1 was indicated as *Lactobacillus sp.* and named *Lactobacillus sp.* FFy111-1.

2) LDH activities and cell growth of *Lactobacillus sp.* FFy111-1 were increased by glucose, fructose and maltose as carbon sources, yeast extract,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  as nitrogen and  $\text{NaCl}$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  among the mineral sources.

Specially, combination of fructose, yeast extract and  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  in the culture media was greatly influenced on growth and LDH activity. Growth and LDH activity were revealed the highest level when fructose, yeast extract and  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  were added 2, 4 and 0.05%, respectively. Also, optimum growth with high LDH activity were found at pH 6.5 and 30°C. The LDH producing microorganism, *Lactobacillus sp.* FFy111-1 was revealed better growth with high enzyme activity when 2% fructose, 4% yeast extract, 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were added at pH 6.5 and 3

0°C. *Lactobacillus sp.* FFy111-1 was revealed the highest growth and enzyme activity (2.02 at A<sub>340</sub> and 103.89 moles reduced NAD/ml/min) when it was incubated for 24 hour.

3) Optimum LDH activity of *Lactobacillus sp.* FFy111-1 was revealed at pH 7.5. However it had a narrow pH range from 7.0 to 8.5. The stability of FFy111-1's LDH was revealed the highest value at pH 7.0 and 8.0. The optimal temperature of *Lactobacillus sp.* FFy111-1's LDH was revealed at 40°C. The residual LDH activities were 89, 78, 37, 30 and 6% of its original LDH activity when it was incubated for 60 minutes at 30, 40, 50, 60 and 70°C, respectively. LDH of *Lactobacillus sp.* FFy111-1 was inactivated by 10, 20, 30 and 40mM of acetate, propionate, butyrate, valate, isobutyrate and isovalate. Also, its LDH was inactivated completely by 40mM of VFAs. BaCl<sub>2</sub> ZnCl<sub>2</sub> CoCl<sub>2</sub> CaCl<sub>2</sub> KCl, MgSO<sub>4</sub> and MnSO<sub>4</sub> except CuSO<sub>4</sub> enhanced LDH activity. However, residual enzyme activity with 10mM CuSO<sub>4</sub> was revealed 38% of its original LDH activity.

4) The *in vitro* lactic acidosis was induced by acidic feed which is consist of soluble starch (55%), glucose (26%), cellulose (6%), cellobiose (7%) and trypticase (6%). With increasing amount of acidic feeds, pH of *in vitro* rumen culture was revealed fell below 5.0, and lactate, total VFA, propionate, valate and butyrate were increased. *In vitro* lactate was decreased by treatments of crude LDH from *Lactobacillus sp.* FFy111-1. The relative lactate concentration of acidic rumen fluid treated with LDH of strain S108, C21-1, Fy110-8, F48 and FFy111-1 were decreased to 97, 91, 89, 84 and 78%, respectively. The lactate accumulate within *in vitro* acidic rumen fluid was reduced by inoculation of viable LDH-producing bacteria (mean value : S108, 45.48 ± 6.27mM; F48, 41.84 ± 7.55mM; FFy111-1, 40.42 ± 6.45mM, control, 50.85 ± 7.35mM). It was indicated that lactate accumulation can be prevented by adding either LDH or LDH-producing bacteria inoculation.

These results suggest that inoculation of LDH-producing bacteria and treatment of LDH enzyme have potential to prevent lactate accumulation in the rumen when ruminant animal was fed readily fermentable carbohydrates.

## 2. Studies on the development of fungal cultures with rumen contents by microbial fermentation

These studies were conducted to evaluate the feasibility of rumen fluid as a substrate for production of feed resources by yeast and mold strains.

These experiments were divided that optimization of growth of isolated yeast with the dilute rumen extract, and optimization of amylase and protease production by mold with rumen contents medium.

1st experiments, isolation and identification of wild type yeasts from slaughterhouse and evaluate the effect of nitrogen compounds(urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium phosphate and ammonium chloride), urea concentrations(0, 0.1, 0.2, and 0.3%), molasses concentrations(0, 2, 4 and 6%), P and K sources( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCl,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), trace elements( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and C/N ratio(100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 and 100:4) on cell growth of isolated yeast SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 with D.R.E..

SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 were cultivated at 30°C, initial pH 5.0 for 48 hour in shaking flasks or jar fermenter.

2nd experiments, The optimal conditions of *Aspergillus oryzae* cultivation were investigated to study the effects of maize meal, wheat middling and wheat bran as a carbon source, with or without steaming, in the ratio of rumen contents to carbon source(1:1~1:5), moisture contents(30~70%) and incubation time(6~60hr) on enzymes production with rumen contents. *Aspergillus oryzae* was cultivated at 30°C for 48 hour in Koji box. The optimum pH and temperature of enzymes( $\alpha$

-amylase, protease) in *Aspergillus oryzae* culture were tested at pH 3~10 and temperature 30~100°C.

3rd experiments, this study was to examine the effects of supplemental yeast(*Saccharomyces sp.*) and fungal(*Aspergillus sp.*) culture prepared from rumen contents on ruminal fermentation and nutrient disappearance. Three Holstein dairy cows, surgically fitted with ruminal cannula, were used in a 3 × 3 Latin Square design. Dietary treatments were 1) an unsupplemented basal diet, 2) basal diet plus 200g/d of *Aspergillus* culture, and 3) basal diet plus 200g/d of *Saccharomyces* culture. Cows were supplied 100g of *Saccharomyces* and *Aspergillus* Culture via the ruminal cannula at each feeding. Rumen fluid was sampled at -0.5, 2, 5 and 8 hour following the start of the morning feeding. Nylon bags containing rice straw were used to determine ruminal nutrient disappearance at 24, 48 and 72 hour.

#### 1st experiments

The yeast isolated from slaughterhouse were identified as *Saccharomyces* (SKK-Y-728 and SKK-Y-1293) and *Candida*(SKK-Y-786) on the basis of fatty acid composition of the cells. Maximum growth of isolated yeast SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 were appeared at the pH 3.5-6.5, pH 4.0-7.0, pH 4.0-7.0 and the temperature 30-35°C, 30-35°C, 25-35°C in Yeast Malt broth, respectively. Dried rumen fluid, contents of lysine, leucine and alanine were 2.56%, 2.1% and 1.7%; contents of phosphorus and potassium were 1.45% and 1.37%. Cell growth and nitrogen availability in the D.R.E. were higher( $p < 0.05$ ) than the W.R.E. by SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293. Effective nitrogen source for growth of SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 were appeared to urea and ammonium sulfate and growth of SKK-Y-1293 was increased at a concentration of urea 0.1%. Addition of P, K and trace elements had no effect of cell growth of SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293. Cell growth of SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 were increased by addition of molasses at a concentration of 2%-4%( $p < 0.05$ ). Cell growth of

SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 at the ratio of C/N, 100:1.3 were greater( $p < 0.05$ ) than the 100:3.2, 100:3.6 and 100:4.0. Cell growth of SKK-Y-728, SKK-Y-786 and SKK-Y-1293 was decreased by scale up but increased growth of SKK-Y-728, SKK-Y-786 by the modifying condition but not in SKK-Y-1293.

### 2nd experiments

Relative activity(%) of  $\alpha$ -amylase and protease were increased by addition of maize meal, wheat middling and wheat bran after cultivation for 48 hour compared with without carbon source( $p < 0.05$ ), but did not different in enzyme activity between carbon sources. Those were increased 21~25 and 30~50 by with steaming than without steaming( $p < 0.05$ ). Maximum relative activity(%) of  $\alpha$ -amylase and protease were appeared at the moisture contents 30~50%, 40% and incubation time 24~36, 36~48, respectively. Protease activity of 1:2 was higher than those of 1:1, 1:4 and 1:5( $p < 0.05$ ), but did not different in  $\alpha$ -amylase activity between carbon source ratio. Optimum pH and temperature of  $\alpha$ -amylase and protease in *Aspergillus oryzae* culture were detected as pH 5~6, temperature 40~50°C and pH 7, temperature 40°C.

### 3rd experiments

*Aspergillus sp.* and *Saccharomyces sp.* culture improved ruminal DM disappearance by 30.31%, 20.15% at the 24 hour incubation, and improved by 45.56%, 30.33% at the 48 hour incubation, and improved by 10.50%, 10.01% at the 72 hour incubation compared with control( $p < 0.05$ ), respectively. *Aspergillus sp.* and *Saccharomyces sp.* culture improved ruminal OM disappearance by 8.61%, 8.31% at the 24 hour incubation, and improved by 8.92%, 11.13% at the 48 hour incubation, and improved by 7.90%, 8.38% at the 72 hour incubation compared with control, respectively. *Aspergillus sp.* and *Saccharomyces sp.* culture improved ruminal NDF disappearance by 9.75%, 8.30% at the 48 hour incubation, and improved by 3.62%,

5.45% at the 72 hour incubation compared with control, respectively. *Aspergillus sp.* and *Saccharomyces sp.* culture improved ruminal ADF disappearance by 3.36%, 6.35% at the 48 hour incubation, and improved by 7.17%, 5.67% at the 72 hour incubation compared with control, respectively. The values of ruminal pH in cows receiving *Aspergillus sp.* and *Saccharomyces sp.* culture was lower ( $p < .05$ ) than the control. The  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration in the rumen was lowered ( $p < .05$ ) by 22.62%, 13.14% at the 5 hour, and lowered by 17.22%, 10.45% at the 8 hour for cows fed *Aspergillus sp.* and *Saccharomyces sp.* culture than for cows the an unsupplemented basal diet, respectively. Total VFA's concentration in the rumen was lower for cows fed *Aspergillus sp.* culture than for cows fed basal diet without *Aspergillus sp.*, and not affected by the addition of *Saccharomyces sp.* culture.

### **3. Use of homologous stable chromosomal integration in engineering of probiotics for cellulase expression**

The results we got from this project may be summarized as follows ;

1) We collected many cellulase genes from various microbial sources around the world, and selected cellulase gene from *Clostridium thermocellum* based on the high resistance to the attack of proteases present in the small intestine.

2) We constructed several expression vectors which could be used in lactic acid bacteria for high level expression of heterologous proteins.

3) We selected several *Lactobacillus* strains which shows high resistance to bile acids and low pH expected for animal stomach.

4) We established the method to efficiently to transform various lactobacilli.

5) Several cellulase-producing Lactobacilli was cloned using above expression strains and cellulase genes

## CONTENTS

Chapter 1 Introduction .....	39
Chapter 2 Studies on the development of microbial culture for production of lactate dehydrogenase .....	49
Experiment 1. Isolation and identification of lactate dehydrogenase producing microorganisms from various sources .....	49
1. Introduction .....	49
2. Materials and Methods .....	50
1) Sample collection .....	50
2) Culture medium .....	50
3) Screening for LDH-producing bacteria .....	50
4) Crude enzyme preparation .....	51
5) Lactate dehydrogenase assays .....	51
6) Gel electrophoresis .....	51
7) Identification of LDH-producing microorganisms .....	52
3. Results and Discussion .....	52
Experiment 2. Characteristics of substrates for enhancing growth with high LDH activity in <i>Lactobacillus</i> sp. FFy111-1 .....	59
1. Introduction .....	59
2. Materials and Methods .....	60
1) Strain and culture condition .....	60
2) Culture medium .....	60
3) Measurement of growth .....	60
4) Manipulation using fermentation technology .....	60
5) Crude enzyme preparation .....	61
6) Lactate dehydrogenase assays .....	61
3. Results and Discussion .....	61
1) Effect of carbon sources on growth and enzyme activity .....	61



2) Effect of nitrogen sources on growth and enzyme activity .....	66
3) Effect of mineral sources on growth and enzyme activity .....	70
4) Effect of pH, temperature and incubation time on growth and enzyme activity .....	74
Experiment 3. Characteristics of lactate dehydrogenase from <i>Lactobacillus</i> sp.	
FFy111-1 .....	78
1. Introduction .....	78
2. Materials and Methods .....	79
1) Strain and culture condition .....	79
2) Determination of temperature profile .....	79
3) Determination of pH profile .....	79
4) Effect of volatile fatty acids on L-nLDH .....	80
5) Effect of metal ion on L-nLDH .....	80
6) Crude enzyme preparation .....	80
7) Lactate dehydrogenase assays .....	81
3. Results and Discussion .....	81
1) Effect of pH on enzyme activity .....	81
2) Effect of temperature on enzyme activity .....	83
3) Effect of volatile fatty acids on enzyme activity .....	85
4) Effect of metal ion on enzyme activity .....	87
Experiment 4. Effects of bacterial lactate dehydrogenase supplementation on <i>in vitro</i> lactic acid accumulation in ruminal fermentation .....	88
1. Introduction .....	88
2. Materials and Methods .....	89
1) Direct-fed microbials preparation .....	89
2) Crude enzyme preparation .....	89
3) Preparation of <i>in vitro</i> fermentation .....	90
4) Induction of <i>in vitro</i> lactic acidosis .....	90

5) Effect of crude enzyme on lactate in acidic rumen fluid .....	90
6) Effect of viable bacteria on <i>in vitro</i> lactic acidosis .....	91
7) Analysis of volatile fatty acids .....	91
8) Analysis of lactate, acetate and pyruvate .....	91
9) Statistical analysis .....	92
3. Results and Discussion .....	92
1) Induction of <i>in vitro</i> lactic acidosis in ruminal fermentation by acidic feeds .....	92
2) The effect of crude enzyme on lactate accumulation by <i>in vitro</i> ruminal acidosis .....	96
3) The effect of supplementing viable LDH-producing bacteria on <i>in vitro</i> lactate accumulation in ruminal fermentation .....	101
Chapter 3 Studies on the development of fungal cultures with rumen contents by microbial fermentation .....	105
Experiment 1. Development of yeast culture with rumen fluid .....	105
I. Introduction .....	105
II. Materials and Methods .....	106
1. Isolation and identification of yeast for experiment .....	106
2. Measurements of optimum pH and temperature of isolated yeast .....	106
3. Measurements of producing conditions for medium from rumen fluid ..	106
4. Effects of nutrients on the growth of yeast .....	107
1) Nitrogens .....	107
2) Concentration of urea .....	107
3) Molasses .....	107
4) Phosphorus and potassium .....	107
5) Micro-minerals(Mg, Fe, Cu, Ca) .....	108
6) C/N ratio .....	108
5. Effects of scale up and changes of conditions of incubation .....	108

6. Criteria for evaluation .....	109
1) pH .....	109
2) Viable cells .....	109
3) Reducing sugar .....	109
4) NH <sub>3</sub> -N .....	109
5) Crude protein .....	109
6) Turbidity .....	109
7) Amino acids contents of rumen fluid .....	110
8) Mineral contents of rumen fluid .....	110
7. Statistical analysis .....	110
III. Results and Discussion .....	111
1. Selection and identification of isolated yeast .....	111
2. Optimum pH and temperature of SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293 .....	111
3. Chemical composition of basal medium from rumen fluid .....	116
4. Effects of rumen fluid concentration on the growth of isolated yeast .....	118
5. Effects of nitrogen sources on the growth of isolated yeast .....	128
6. Effects of urea concentration on the growth of isolated yeast .....	135
7. Effects of molasses concentration on the growth of isolated yeast .....	141
8. Effects of phosphorus and potassium on the growth of isolated yeast .....	149
9. Effects of micro-minerals on the growth of isolated yeast .....	156
10. Effects of C/N ratio on the growth of isolated yeast .....	162
11. Effects of scale up and changes of incubation on the growth of isolated yeast .....	168
Experiment 2. Development of <i>Aspergillus oryzae</i> culture with rumen contents .....	117
I . Introduction .....	117
II. Materials and Methods .....	178

1. Materials and microorganism .....	178
2. Measurements of incubation conditions of <i>Aspergillus oryzae</i> in rumen contents .....	178
1) Effects of carbon sources and steaming .....	178
2) Effects of moisture contents and rumen contents to wheat middling ratio .....	178
3) Optimum incubation time and characteristics of $\alpha$ -amylase and protease .....	179
3. Determination of incubation conditions and preparation of crude enzyme solution .....	179
4. Measurements of $\alpha$ -amylase and protease activity .....	179
III. Results and Discussion .....	180
1. Incubation conditions of <i>Aspergillus oryzae</i> in rumen contents .....	180
1) Effects of carbon sources and steaming on the relative activities of $\alpha$ -amylase and protease of <i>Aspergillus oryzae</i> .....	180
2) Effects of moisture contents on the relative activities of $\alpha$ -amylase and protease of <i>Aspergillus oryzae</i> .....	181
3) Effects of rumen contents to wheat middling ratio on the relative activities of $\alpha$ -amylase and protease of <i>Aspergillus oryzae</i> .....	182
4) Effects of incubation time on the relative activities of $\alpha$ -amylase and protease of <i>Aspergillus oryzae</i> .....	185
2. Characteristics of $\alpha$ -amylase and protease of <i>Aspergillus oryzae</i> .....	186
1) Stability on pH .....	186
2) Stability on temperature .....	188
Experiment 3. Effects of <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 and <i>Aspergillus oryzae</i> culture supplementation on the characteristics of rumen fermentation in dairy cows .....	190
I. Introduction .....	190

II. Materials and Methods .....	191
1. Preparation of <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 culture .....	191
1) Rumen fluid medium and microorganism .....	191
2) Incubation conditions of <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 .....	192
3) Producing of <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 culture .....	192
4) Viable cells and chemical composition of <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 culture .....	194
2. Preparation of <i>Aspergillus oryzae</i> culture .....	195
1) Rumen contents medium and microorganism .....	195
2) Incubation conditions of <i>Aspergillus oryzae</i> .....	195
3) Producing of <i>Aspergillus oryzae</i> culture .....	196
4) Enzyme activity and chemical composition of <i>Aspergillus oryzae</i> culture .....	198
3. Effects of <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 and <i>Aspergillus oryzae</i> culture supplementation on the digestibility of feeds in rumen .....	199
1) Animals and managements .....	199
2) Experimental diet and chemical analysis .....	199
4. Experimental design .....	201
5. Criteria for evaluation .....	202
1) Ruminal pH .....	202
2) Disappearance of experimental diet .....	202
3) Ruminal NH <sub>3</sub> -N .....	202
4) Ruminal VFAs .....	202
6. Statistical analysis .....	203
III. Results and Discussion .....	203
1. Disappearance of forages in rumen .....	203
1) Dry matter .....	203
2) Organic matter .....	205

3) NDF .....	207
4) ADF .....	209
2. Ruminal pH .....	211
3. Ruminal NH <sub>3</sub> -N .....	213
4. VFA's concentration in rumen .....	2157
Chapter 4 Use of homologous stable chromosomal integration in engineering of probiotics for cellulase expression .....	218
1. Introduction .....	218
2. Materials and Methods .....	220
1) Cellulase gene bank from microbes using cellulose .....	220
2) Collection of broad-host range vector and selection of chromosome integration vector .....	220
3) Cellulase identification on proteinase-resistant .....	220
4) Security of lactic acid bacteria of intestinal predominance .....	221
5) Incubation of <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> .....	221
6) Bile acid tolerance of <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> .....	221
7) Antibiotics sensitivity of <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> .....	222
8) Construction of <i>Lactobacillus</i> shuttle vector containing strong promoter and signal sequence .....	222
9) Development of electroporation methods for homologous vector-free stable chromosomal integration .....	223
10) Vector construction containing S-layer protein signal sequence .....	224
11) Transformation of <i>E. coli</i> and <i>Lactobacillus</i> .....	226
12) Test of cellulase activity .....	227
3. Results and Discussion .....	227
1) Security of cellulase gene .....	227
2) Collection of broad- host range vector and selection of shuttle vector .....	228

3) Selection of proteinase resistant cellulase gene .....	228
4) Physiological characterization of <i>Lactobacillus</i> sp .....	228
5) Analysis of cloned cellulase gene .....	230
6) Construction of <i>Lactobacillus</i> shuttle vector containing strong promoter and signal sequence .....	231
7) Development of electroporation methods for homologous vector-free stable chromosomal integration .....	236
8) New vector construction for cellulase expression .....	237
9) Cellulase activity by Congo red test .....	238
Literature cited .....	239

## 목 차

제 1 장 서 론 .....	39
제 2 장 Lactic acid dehydrogenase 생산성이 높은 미생물 배양물 개발에 관한 연구 .....	49
제 1 절 Lactate dehydrogenase 생성 균주의 분리 및 동정 .....	49
1. 서 론 .....	49
2. 재료 및 방법 .....	50
가. 시료의 선택 .....	50
나. 배지 .....	50
다. LDH 생성 균주의 선별 .....	50
라. 조효소액의 제조 .....	51
마. Lactate dehydrogenase 분석 .....	51
바. Gel 전기영동 .....	51
사. LDH-생성 균주의 동정 .....	52
3. 결과 및 고찰 .....	52
제 2 절 <i>Lactobacillus</i> sp. FFy111-1의 성장 및 LDH 생성 조건 .....	59
1. 서 론 .....	59
2. 재료 및 방법 .....	60
가. 균주의 선별 .....	60
나. 배지 .....	60
다. 성장률의 측정 .....	60
라. 배양조건의 조절 .....	60
마. 조효소액의 제조 .....	61
바. Lactate dehydrogenase 분석 .....	61
3. 결과 및 고찰 .....	61
가. 탄소원이 성장 및 효소 활성화에 미치는 영향 .....	61
나. 질소원이 성장과 효소 활성화에 미치는 영향 .....	66



다. 광물질 공급원이 성장 및 효소 활성화에 미치는 영향 .....	70
라. pH, 온도 및 배양시간이 성장 및 효소 활성화에 미치는 영향 .....	74
제 3 절 <i>Lactobacillus</i> sp. FFy111-1로부터 생성되는 lactate	
dehydrogenase의 특성 .....	78
1. 서 론 .....	78
2. 재료 및 방법 .....	79
가. 균주의 선별 .....	79
나. 배양 온도의 결정 .....	79
다. 배양 pH의 결정 .....	79
라. L-nLDH 활성화에 관한 휘발성 지방산의 효과 .....	80
마. L-nLDH 활성화에 관한 금속이온의 효과 .....	80
바. 조효소의 준비 .....	80
사. Lactate dehydrogenase 분석 .....	81
3. 결과 및 고찰 .....	81
가. 효소 활성화에 미치는 pH의 영향 .....	81
나. 효소 활성화에 미치는 온도의 영향 .....	83
다. 효소 활성화에 미치는 휘발성 지방산의 영향 .....	85
라. 효소 활성화에 미치는 금속이온의 영향 .....	87
제 4 절 Lactate dehydrogenase의 공급이 <i>in vitro</i> 상에서 lactic acid 축적에	
미치는 영향 .....	88
1. 서 론 .....	88
2. 재료 및 방법 .....	89
가. Direct-fed microbials의 준비 .....	89
나. 조효소액의 제조 .....	89
다. <i>In vitro</i> 상에서 발효의 준비 .....	90
라. <i>In vitro</i> lactic acidosis의 발현 .....	90
마. 산성 반추위액 내 lactate에 대한 조효소액의 효과 .....	90
바. <i>In vitro</i> lactic acidosis에서 생균의 효과 .....	91

사. 휘발성 지방산의 분석 .....	91
아. Lactate, acetate와 pyruvate의 분석 .....	91
자. 통계분석 .....	92
3. 결과 및 고찰 .....	92
가. 산성 사료에 의해 <i>in vitro</i> lactic acidosis의 유발 .....	92
나. <i>In vitro</i> ruminal acidosis에 의한 lactate 축적에 대한 조효소의 효과 .....	96
다. <i>In vitro</i> lactate 축적에 있어 LDH 생성 미생물 첨가의 효과 .....	101
제 3 장 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 개발에 관한 연구 ..	105
제 1 절 도축 반추위액을 이용한 효모 배양물 개발 .....	105
1. 서 론 .....	105
2. 재료 및 방법 .....	106
가. 효모의 분리 및 동정 .....	106
나. 효모의 증식조건 .....	106
다. 반추위액 배지(W.R.E., D.R.E.) 제조 및 배양조건 .....	106
라. 최적 배양조건 조사 .....	107
1) 질소원 첨가 효과 .....	107
2) 요소 첨가수준 .....	107
3) 당밀 첨가 효과 .....	107
4) 인과 칼륨 첨가 효과 .....	107
5) 무기염류 첨가 효과 .....	108
6) C/N 비율이 효모 증식에 미치는 효과 .....	108
마. Scale up 및 배양조건 개선 .....	108
바. 조사항목 .....	109
1) pH .....	109
2) 생효모수 .....	109
3) 환원당 함량 .....	109
4) NH <sub>3</sub> -N 함량 .....	109
5) 조단백질 함량 .....	109

6) 효모 증식속도 .....	109
7) 도축 반추위액의 아미노산 함량 .....	110
8) 도축 반추위액의 광물질 함량 .....	110
사. 통계분석 .....	110
3. 결과 및 고찰 .....	111
가. 효모의 선별 및 동정 .....	111
나. 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 적정 생육 pH 및 온도 .....	111
다. 반추위액 배지의 성분 .....	116
라. 반추위액 함량이 효모 증식에 미치는 영향 .....	118
1) SKK-Y-728 .....	118
2) SKK-Y-786 .....	122
3) SKK-Y-1293 .....	125
마. 질소원 첨가가 분리 효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과 .....	128
1) SKK-Y-728 .....	128
2) SKK-Y-786 .....	131
3) SKK-Y-1293 .....	133
바. 요소 첨가수준이 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과 .....	135
1) SKK-Y-728 .....	135
2) SKK-Y-786 .....	137
3) SKK-Y-1293 .....	139
사. 당밀 첨가수준이 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과 .....	141
1) SKK-Y-728 .....	141
2) SKK-Y-786 .....	144
3) SKK-Y-1293 .....	146

아. 인 및 칼륨 첨가가 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의	
증식에 미치는 효과 .....	149
1) SKK-Y-728 .....	149
2) SKK-Y-786 .....	152
3) SKK-Y-1293 .....	154
자. 무기염류 첨가가 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및	
SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과 .....	156
1) SKK-Y-728 .....	156
2) SKK-Y-786 .....	158
3) SKK-Y-1293 .....	160
차. C/N 비율이 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의	
증식에 미치는 효과 .....	162
1) SKK-Y-728 .....	162
2) SKK-Y-786 .....	164
3) SKK-Y-1293 .....	166
카. Scale up 및 배양조건 개선 효과 .....	168
1) SKK-Y-728 .....	168
2) SKK-Y-786 .....	171
3) SKK-Y-1293 .....	174
제 2 절 도축 반추위내용물을 이용한 곰팡이 배양물 개발 .....	177
1. 서 론 .....	177
2. 재료 및 방법 .....	178
가. 실험재료 및 사용균주 .....	178
나. 반추위내용물을 이용한 <i>Aspergillus oryzae</i> 배양조건 .....	178
1) 탄소원 결정 및 증자 효과 .....	178
2) 수분함량 및 반추위내용물과 말분의 혼합비율 결정 .....	178
3) 배양시간 결정 및 효소특성 조사 .....	179
다. 고지배양조건 및 조효소액 제조 .....	179

라. $\alpha$ -Amylase 및 protease activity 측정 .....	179
3. 결과 및 고찰 .....	180
가. 반추위내용물을 이용한 <i>Aspergillus oryzae</i> 배양조건 .....	180
1) 탄소원 및 증자작업이 효소역가에 미치는 영향 .....	180
2) 수분함량이 효소역가에 미치는 영향 .....	181
3) 반추위내용물과 말분의 혼합 비율이 효소역가에 미치는 영향 .....	182
4) 배양시간 .....	185
나. <i>Aspergillus oryzae</i> 가 생성한 $\alpha$ -amylase 및 protease의 특성 .....	186
1) 효소의 pH 안정성 .....	186
2) 효소의 열 안정성 .....	188
제 3 절 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 첨가가 가축의 소화생리에 미치는 효과 .....	190
1. 서 론 .....	190
2. 재료 및 방법 .....	191
가. <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 배양물 제조 .....	191
1) 반추위액 배지 제조 및 공시균주 .....	191
2) <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 배양 .....	192
3) <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 배양물 제조 .....	192
4) <i>Saccharomyces</i> sp. SKK-Y-728 배양물의 생균수 및 성분 .....	194
나. <i>Aspergillus oryzae</i> 배양물 제조 .....	195
1) 반추위 내용물 배지제조 및 공시균주 .....	195
2) <i>Aspergillus oryzae</i> 배양조건 .....	195
3) <i>Aspergillus oryzae</i> 배양물 제조 .....	196
4) <i>Aspergillus oryzae</i> 배양물의 효소역가 및 성분 .....	198
다. <i>Saccaromyces</i> sp. SKK-Y-728 및 <i>Aspergillus oryzae</i> 배양물 급여가 반추위내 사료 이용률에 미치는 효과 .....	199
1) 공시축 선정 및 사양관리 .....	199
2) 시험사료 및 성분분석 .....	199

라. 실험설계 .....	201
마. 조사항목 .....	202
1) 반추위내 pH 변화 측정 .....	202
2) 시험사료의 소실을 측정 .....	202
3) 반추위내 NH <sub>3</sub> -N 함량 측정 .....	202
4) 반추위내 휘발성지방산 함량 측정 .....	202
바. 통계분석 .....	203
3. 결과 및 고찰 .....	203
가. 조사료의 반추위내 소실을 .....	203
1) 건물소실을 .....	203
2) 유기물소화율 .....	205
3) NDF 소화율 .....	207
4) ADF 소화율 .....	209
나. 반추위내 pH 변화 .....	211
다. 반추위내 NH <sub>3</sub> -N 함량 .....	213
라. 반추위내 휘발성지방산 함량 .....	215
제 4 장 Chromosome homologous integration 방법을 통하여 cellulase를 생산하는 새로운 생균제의 개발 .....	218
제 1 절 서 론 .....	218
제 2 절 재료 및 방법 .....	220
1. 섬유소를 분해 이용하는 미생물로부터 cellulase 유전자의 bank화 .....	220
2. Broad-host range vector의 수집과 chromosome integration vector의 선별 .....	220
3. Proteinase-resistant한 cellulase 규명 .....	220
4. 장관내에 우점하는 Lactic acid bacteria의 확보 .....	221
5. <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> 의 배양 .....	221
6. <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> 의 담즙산에 대한 내성조사 .....	221
7. <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> 의 항생제 감수성 조사 .....	222

8. Strong promoter와 signal sequence를 함유하는 유산균 shuttle vector의 construction .....	222
9. Homologous vector-free stable chromosomal integration을 위한 electrophoration 방법 개발 .....	223
가. 재조합 plasmid DNA의 E. coli MC1061로의 형질전환 .....	223
나. 재조합 plasmid DNA의 Lactobacilli sp.로의 형질전환 .....	223
10. S-layer protein signal sequence를 장착한 vector construction .....	224
가. S-layer protein signal sequence의 cloning .....	225
나. 유산균용 vector의 구축 .....	225
다. Signal sequence와 cellulase gene의 ligation .....	226
라. Cellulase 발현 vector 구축 .....	226
11. E. coli와 유산균에 형질전환 .....	226
12. Cellulase 유전자의 발현양상 확인 .....	227
제 3 절 결과 및 고찰 .....	227
1. 활성도가 높은 cellulase 유전자 확보 .....	227
2. Broad- host range vector의 수집과 shuttle vector의 선별 .....	228
3. Proteinase-resistant한 cellulase 선별 .....	228
4. Lactobacillus sp.의 생리적 특성조사 .....	228
가. 내산성 조사 .....	229
나. 내담즙성 조사 .....	229
다. 항생제 감수성 조사 .....	229
5. 본 연구에서 cloning한 cellulase 유전자 분석에 대한 결과 .....	230
가. Fibrobactor succinogenes s85로부터 cloning한 CMC-Xylanase gene sequencing 결과 .....	230
나. Actinomyces sp. 40으로부터 cloning한 endoglucanase gene sequencing 결과 .....	230
다. Ruminococcus albus 7으로부터 cloning한 $\beta$ -glucosidase gene sequencing 결과 .....	231

6. Strong promoter와 signal sequence를 함유하는 유산균 shuttle	
vector의 construction .....	231
가. T7 RNA polymerase/T7 promoter를 이용한 발현 system구축 .....	231
나. 수행방법 .....	231
1) T7 RNA polymerase를 발현하는 유산균 개발 .....	231
2) T7 promoter에 의해 cellulase 효소 발현이 유도되는	
vector (pNZT-cellulase) 구축 .....	232
3) 1항에서 개발된 T7 RNA polymerase가 homologous integration된	
유산균에 2항의 vector 형질전환 .....	232
7. <i>E. coli</i> 와 <i>Lactobacillus</i> sp. 균주로 homologous vector-free	
stable chromosomal integration을 위한 electrophoration 방법 개발 .....	236
8. 새로운 cellulase발현을 위한 vector 구축 결과 .....	237
가. 3가지 promoter region의 cloning 결과 .....	237
나. 최종 cellulase발현 유산균용 vector의 구축 .....	237
9. Congo red test에 의한 cellulase 발현양상 조사 .....	238
가. <i>E. coli</i> JM 101에서 activity 확인 .....	238
나. <i>Lactobacillus reuteri</i> 에서 activity 확인 .....	238
참 고 문 헌 .....	239



## 제 1 장 서 론

축산분야에서는 가축 사료에 금세기 최고의 과학적 발명이라고 할 수 있는 항생제 (antibiotics)의 사용으로 많은 생산성 향상을 도모할 수 있었다. 항생제를 사용함으로써 이들의 1 차적 사용목적인 병원균의 성장을 억제시켜 성장을 촉진시킬 수 있었으며 또한 고기, 우유, 계란 등 축산물의 생산성 향상을 기할 수 있었다. 그러나 최근 항생제의 사용에 많은 문제점이 제기되고 있으며 특히 일부 국가에서는 항생제가 급여된 가축의 고기 수입을 규제하고 있어 항생제의 사용이 제한되고 있다. 항생제의 사용을 규제하고 있는 이유는 첫째, 가축에게 사용한 항생물질이 우유, 고기, 계란 등의 축산물에 잔류할 수 있다는 것과 둘째, 축산물을 통하여 섭취된 항생물질이 인체내 내성증가를 야기시켜 항생물질에 대하여 저항성을 갖는 여러 가지 문제점을 야기시키고 있기 때문이다. 이런 이유로 해서 영양학자들은 축산물생산에 이용할 수 있는 비항생제적 생물학적 방법(non-antibiotic biological tools)을 찾게 되었고 그 결과 몇몇 가능성이 있는 물질들을 개발하게 되었는데 그 대표적인 것이 바로 Direct Fed Microbial인 효모 및 곰팡이배양물과 생균제이다.

Direct Fed Microbial로서 가장 많이 이용되고 있는 미생물 중 효모로는 유포자 효모인 *Saccharomyces*와 무포자 효모인 *Tourlopsis*가 이용되는데 특히 *S. cerevisiae*가 많이 이용되고 있는데, *S. cerevisiae*는 pH 6.5 정도에서는 효모의 성장속도가 감소되면서 자신의 세포벽을 분해하여 대사물질을 배지에 배출하는 특성이 있기 때문이며 곰팡이류로는 *Aspergillus niger*와 *Aspergillus oryzae*가 이용되는데 이는 양조나 장류제조에 쓰이는 국균으로 집락은 황록색이나 오래되면 갈색이 된다. 여러 가지 단백질 및 탄수화물 분해효소를 생산하며 다른 생균제와 복합제로 사용된다(Peppler, 1979; Wiedmeier 등, 1987; Gomez 등, 1987; Martin 등, 1994).

유산생성균으로 주로 *Lactobacillus* 와 *Streptococcus*로 *Lactobacillus* spp중에는 *L. acidophilus*, *L. bulguricus*, *L. casei*, *L. plantarum* 그리고 *Streptococcus* spp 중에서는 *S. faecium*, *S. thermophilus*, *S. diacetylactus*가 주요 균종이며 포자형성 간균인 *Bacillus*속 균으로는 *B. subtilis*, *B. cereustoyoi*, *B. toyoi* 등이 있는데 이들은 호기성, 통성혐기성균이고 중온 및 고온성으로 내열성이 강하고 일반적으로 amylase와 protease를 분비하며 산과 암모니아를 생성하고 일부는 항생물질(subtilin, bacillomycin)을 생산하기도

한다(Underdahl 등, 1982; Underdahl, 1983; Fuller와 Coke, 1989; Dawson 등, 1990; Fuller와 Brooker, 1974).

포자형성 간균인 *Colstridium butyricum*은 전분 및 당을 발효하여 알코올, 아세톤, 유기산을 생성한다. *C. butyricum miyairi*도 이용되는데 이 균은 통과균으로 체내에 오랫동안 잔류하지 않으며 젖산균 증식인자를 보유하고 있어 젖산생성균을 증식시키나 저급지방산(초산, 낙산 등) 등을 생성하므로써 병원성 세균들의 발육을 억제하는 작용을 나타낸다(Dawson, 1990).

가축이 건강을 유지하고 효율적인 생산을 하기 위해서는 유익한 미생물이 계속해서 증식되어야 하는데, 효모배양물은 산소와 강력한 친화력을 가지고 있기 때문에 장내의 산소를 제거하여 장내를 혐기상태로 만들므로 혐기성유익균의 증식을 도모하므로써 질병을 예방하는 작용(prophylactic mechanism)을 한다(Rose, 1980).

또한 효모배양물에는 효모세포자체의 영양물질인 필수아미노산, 비타민 B군, 미네랄 등이 풍부하게 들어 있고, 효모의 성장증식과정 및 자가분해시 배출되는 소화 효소와 대사물질이 가축의 생산성증대 및 소화율을 향상시키는 작용을 하며(enzymatic mechanism), 효모의 대사과정에서 형성된 광물질들은 chelated minerals로 체내이용률이 매우 높고 효모배양물은 소염물질을 함유하고 있으므로 장염이나 설사 등에 의하여 장점막이 파괴된 것을 치유하여 주는 작용을 한다(repairing mechanism)(Stark와 Wilkinson, 1989).

생효모의 세포벽은 만난(mannan)과 글루칸(glucan) 같은 고단위 화합물로 이루어져 강한 흡착력을 가지고 있어 수소의 수용에 따른 반추위내 산도(pH)의 상승(pH buffer) 및 산소의 완충작용과 영양소 저장고로 사용되어 장내 유익균의 성장을 증가시키고(Cartwright 등, 1986) 특히 농후사료의 과다급여는 반추위 pH를 6.0이하로 떨어뜨려 섬유소 분해미생물의 활력을 저하시키는데 이때 생효모배양물의 급여는 반추위내 pH증가로 섬유소 분해미생물의 활력을 향상시켜 가축의 정상적인 소화기능을 유지시켜 대사성질병의 예방 및 사료효율 개선을 가져올 수 있다(Gilliland 등, 1985).

효모배양물에는 핵산과 글루타민산(glutamic acid)등 천연항미료가 포함되어 있어 사료의 기호성을 증진시키고 반추위내 섬유소분해 박테리아는 효모의 지방 분해로

발생하는 지방산을 영양원으로 이용하므로 반추위내에 섬유소분해 박테리아수를 증가시켜 반추위내 총휘발성지방산의 생산을 증가시켜, 농후사료 의존도가 높은 여건에서 효모배양물의 급여는 유지방의 전구물질인 초산의 생산량을 증가시켜 유지방율을 높혀준다(Dawson과 Hopkins, 1991).

또한 생효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 배지 배양에 의한 곰팡이독소의 제독효과 시험에서 생효모균은 옥수수의 aflatoxin(59.01 ppb)의 제독효과를 보여 주었으며(박 등, 1989), 사일리지 제조시 생효모 첨가는 빠른 시간내에 혐기상태를 조성하여 식물의 효소 작용을 억제시키고 유익미생물에 의한 발효를 촉진시켜주는데 있다. 사일리지 작업시에 생효모배양물을 첨가하면 사일리지내의 산소를 흡착하여 식물에 의한 발효를 최단시간내에 중지 시켜주며 미생물의 성장, 증식을 촉진하여 사일리지의 품질을 향상시켜주고 보존성을 높여준다(Phillips와 Tungeln, 1984).

반추위 내용물은 건물기준으로 조섬유 함량이 30-40%, 조단백질 함량이 10-25%, 가용무질소를 함량이 38%이며 조회분 함량이 8-13% 정도로 우수한 영양적 가치를 가지고 있다(Antongiiovanni 등, 1973; Jovanovic와 Cuperlovic, 1977). 또한 아미노산 조성이 양호하고(Agrawala 등, 1953; Baumstark 등, 1960; Dryden 등, 1962), 가소화 에너지가 2,670 Kcal/Kg 이며(Hironaka, 1975), 미생물이 분비한 각종 효소(Hungate, 1966) 및 미지성장인자(Ruf 등, 1953; Bryant와 Doetsch, 1955) 등이 함유되어 있어 사료 첨가제로써 이용가치가 크다.

특히 건강한 소의 반추위 내용물을 투여한 송아지의 반추위가 보다 빨리 · 튼튼하게 발달하는데 이는 반추위내 미생물의 증식(McNeill 등, 1954; Gill과 King, 1958; Pouden, 1952; Gordon과 Moore, 1961)에 적합한 환경이 만들어져 소화기능이 촉진되고(Doetsch 등, 1952; Huhtanen 등, 1952; Bentley 등, 1954), 각종 영양소의 이용 능력이 크게 향상되기 때문에 각종 소화기 질병을 예방할 뿐 아니라 치료와 성장 촉진에 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Pouden과 Hibbs, 1949; Allison, 1964; Slyter, 1976).

또한 도축시 발생하는 반추위 내용물 중 미소화 사료를 포함한 고형물은 10-20% 정도이고, 반추위 미생물과 휘발성 지방산 등 각종 발효산물이 포함되어 있는 반추위액이 80-90%를 차지하고 있다.

유산균제가 어떤 기전에 의해 병원체의 증식을 억제하고 가축의 생산성을 높일 수 있는가에 대한 대답은 병원성 미생물이 자라기 어렵거나 또는 자라는데 방해가 되는 환경을 만들어 주기 때문이라고 요약하고 있으나, 지금까지 그 기전이 완전히 밝혀지지 않았고 몇 가지 가설이 제시되고 있다. 첫째로 유산균제로 사용되는 미생물들은 대부분 탄수화물을 에너지원으로 이용하기 때문에 최종 대사산물로 lactic acid를 생산하게 된다. Lactic acid가 독자적으로 *E. coli*와 같은 병원성 미생물의 증식을 방지하는 것은 아니지만 *Lactobacillus*나 *Streptococcus*에 의해 생산되는 대사물질의 활성은 pH가 낮을수록 증진되며, lactic acid 생성으로 pH가 낮아지면 병원성 미생물이 생존하거나 증식하기 어려운 환경이 조성된다(Tramer, 1966). 둘째로 *Streptococcus*나 *Lactobacillus*로부터 nisin이라는 천연 항생물질이 생산되며, lactic acid bacteria 중 다수가 bacteriocin을 생산하는데 이 물질은 항생제와 유사한 화합물이며(Tagg 등, 1976), 특정 *Lactobacillus* 종은 항생물질을 생산해서 병원균의 증식을 억제한다(Sabin, 1963). 셋째로 장독소의 중화에 관여한다. 동물이 스트레스를 받게 되면 사료섭취량이 감소하게 되어 *Lactobacillus*는 영양소를 공급받지 못하게 되어 감소하고, 반대로 *E. coli*와 같은 유해 세균이 번성하게 되어 설사가 일어난다. *E. coli*는 장독소를 생산하는데 반하여 특정 lactic acid bacteria는 장독소를 중화시키는 대사물질을 생산한다(Mitch와 Kenworthy, 1976). 넷째로 가축에 유산균제를 투여하면 이들 lactic acid bacteria가 장내에서 급격히 증식하여 장벽에 집락(colonization)을 형성하여 결과적으로 집락 형성 이후에 장에 들어가는 병원성 세균은 번식과 성장이 어렵게 된다. 다섯째로 유산균제를 투여하면 영양소의 증진에 영향을 미쳐서 *Lactobacillus* sp.는 amylase를 생산하여 소화를 증진시키고(Lindgren과 Refai, 1984), 또한 lactose를 소화시키는  $\beta$ -galactosidase와 기타 소화효소를 생산하여 영양소의 이용율을 높이며(Kim과 Gilliland, 1983), 장내에서 성장하고 있는 동안 콜레스테롤의 동화작용을 하는 것도 있다(Danielson 등, 1989).

우리나라의 반추가축은 조사료의 생산 및 급여여건이 부실한 실정에서 영양소 보충을 위하여 과도한 농후사료를 급여하게 되면 반추위내 pH가 저하되고 미생물균총이 파괴되면서 제1위 과산증이 생기면서 위점막이 손상되고 이로 인하여 간농양이 생기면서 동시에 여러 가지 대사성 질병이 발생하게 되어 가축의 생산성이 크게 저하되

고 단위가축에서는 사료의 급변, 항생물질 급여 등으로 장내균총이 변화되어 유해균에 의한 유해작용으로 사료의 소화, 흡수율이 저하되어 생산성이 떨어지므로 가축의 소화기관내 정상균총을 유지, 개선시키는 사료첨가제의 개발이 필요하다.

현재 사료산업에서 일반적으로 안정하다고 인정된(GRAS) 미생물 중 DFM으로 이용되는 것은 곰팡이 배양물, 유산균 및 배양물, 효모 및 배양물이며 나머지는 기타 효소생산에 주로 이용되거나 이용율은 높지 않다.

또한 경제적 측면에서 국내 축산업의 현 실정은 조사료자원 확보상태가 저조하여 농후사료에 주로 의존하는 사양형태로서 농후사료 과다급여에 의한 축우의 경제수명 단축, 생산비 과중, 생산성 저하의 3중적 경제손실을 보고있어 국제 경쟁력 향상에 막대한 지장을 초래하고 있다. 가축의 생산성을 증대시키기 위해서는 사료의 이용성을 높여야 하는데 현재까지 항생제, 생균제, 효소제 및 발효촉진제 사용이 가장 효과적이거나 항생제는 체내 잔류문제가 있고 효소 및 발효촉진제는 가격이 비싸고 전량을 수입에 의존해야 하므로 그 사용이 대단히 어려운 실정이다.

젖소에 생효모배양물을 급여하면 사료섭취량, 산유량 및 유지율이 증가한다고 발표되었는데(Shin 등, 1991<sub>a,b</sub>) 특히 농후사료의 급여비율이 높을 때 효과가 있다고 William 등(1991)은 보고하였는데, 이는 생효모배양물내 D-lactic acid를 이용할 수 있는 lactic dehydrogenase를 함유하고 있으며(Girard 등, 1993), 또한 효모가 완충작용(buffer effect)을 할 수 있는 세포벽을 가지고 있어 pH저하를 방지하기 때문이다. 젖소 송아지를 조기 이유하고자할 때 생효모배양물을 송아지 사료(starter)에 0.2% 첨가하면 대조구의 증체량이 737g인데 비하여 첨가구는 831g으로서 증체량면에서 13% 증가되었다고 Hughes(1988)가 발표하였다.

비육우에게 생효모배양물을 급여하면 사료섭취량이 증가하면서 사료효율이 개선되고, 또한 반추위내 pH를 상승시키므로써 제1위 과산증을 예방하여 주므로써 간농양을 예방하여 주는데 Nicholson(1977)의 보고에 의하면 보리(사료내 보리함량 75%)를 위주로 한 비육우사료에 생효모배양물을 급여하면 대조구에 비하여 사료섭취량은 9%, 일당 증체량은 25.9%, 사료효율은 13.3% 향상되었으며 특히 간농양 발생율을 57.4%나 감소시켰다.

생효모배양물은 유산균제제보다 돼지의 장내에서 유익균총의 증식을 도와

"competitive exclusion" 역할을 하므로서 장내 균총을 안정화시켜 소화기 장애를 예방하여 사료효율을 높여 주며 특히 탄수화물과 단백질 소화효소의 우수한 공급원이 되므로 자돈의 소화작용을 높여주며 건물 사료에 대한 적응력을 향상시켜 주며, 또한 생효모배양물은 자돈의 사료 섭취량을 증가시켜주며 항생제와 같이 사료효율과 증체량을 개선시켜 줄 뿐만 아니라 건물과 조섬유의 소화율을 높여 주고 임신돈의 태아발육을 촉진시켜 자돈의 생시체중을 증가시켜줄 뿐만 아니라 포유돈의 비유량을 증가시켜 자돈의 폐사율을 감소시켜 준다(Lyons, 1991).

생효모배양물의 급여는 가금의 장내에서 유산균의 생장을 촉진하여 유해세균(coliform, enterococci)의 수를 감소시킨다(Brake, 1991). 따라서 생효모배양물을 급여하면 장내의 환경을 양호하게하여 영양소의 소화흡수에 최적상태를 유지할 수 있게 하여 *Arber acer* 종을 가지고 실험 한 결과 생효모배양물 급여에 의하여 증체량이 높아지고 사료요구율이 개선되었다고 보고하였다(Shin 등, 1990, 1991<sub>a,b</sub>, 1995).

유산균제를 가축에 투여했을때 나타나는 효과를 살펴보면 육계에 있어서 Totuedo (1973)는 *Lactobacillus acidophilus*를 첨가한 시험에서 유산균제 첨가구는 증체율과 사료효율을 항생제 첨가구와 비슷하게 개선시켰으며, 이때 장내 E. coli 수는 현저히 낮아졌다고 보고하였다. Francis 등(1978)도 *Lactobacillus*를 첨가하면 증체나 사료효율을 개선하며 소화기관내의 coliform 세균 과 전체 호기성 미생물의 감소가 관찰되었다고 보고하였다.

효모는 약 60여속이 존재하는데 절반에 속하는 진효모 중 아직까지 인체나 가축에게 유해한 것은 발견되지 않았다(Kreger-van Rij, 1984, 1987). 식용 및 사료용 효모의 대표적인 것은 *Saccharomyces*속과 *Candida*속으로 *Saccharomyces*는 5탄당을 이용하지 못하며, 아미노산 및 비타민의 보충을 필요로 하기 때문에 주로 당밀을 기질로 하여 단세포 단백질 생산에 이용되고 있는데 반하여 *Candida*는 6탄당뿐 아니라 5탄당 이용율이 높아 조악한 기질에서도 비교적 빠르게 증식하며 아미노산이나 비타민을 보충할 필요가 없어 폐자원 활용시 많이 사용되고 있다.

현재 사용되는 사료용 효모제에는 활성효모제(active fermentation yeast)와 불활성효모제(inactive yeast, non-fermentative yeast, nutritional dried yeast) 가 있는데 불활성효모(inactive yeast)에는 (i) 토룰라효모(*Torula* dried yeast) : 토룰라효모는 일명 목

재효모(wood yeast)라고도 하며, 주로 *Torula utilis* 등의 *Torulopsis*속에 속하는 효소를 펄프제조시에 생기는 아황산 펄프폐액에 배양, 증식하여 건조시킨 것. (ii) 맥주효모(Brewers dried yeast) : 맥주의 제조과정 중에서 맥즙의 발효가 완료되어 맥주를 여과하면 이상의 맥주효모가 분리되는데, 이 효모(*Saccharomyces*)중에서 종효모로 사용하는 것을 제외한 것을 잘 세척후 건조시켜 이용. (iii) 건조알코올효모(distillers dried yeast) : 건조알코올효모는 알코올 또는 증류주 제조 공정중 알코올 발효액을 증류하기 전 또는 증류수에 분리하는 *Saccharomyces* 속의 효모를 건조한 것으로 발효 원료의 종류에 따라 곡류를 원료로 한 것은 건조곡류알코올효모(grain distillers dried yeast)라고 하고, 당밀을 원료로 한 것은 건조당밀알코올효모(molasses distillers dried yeast)라하여 서로 구별하기도 하는데 이러한 알코올효모는 사료가치나 이용면에서 *Torula*효모와 큰 차이가 없음. (iv) 건조효모(primary dried yeast 또는 dried yeast) : 효모의 배양기로부터 분리한 *Saccharomyces* 속의 비발효성의 건조효모로서 단백질 함량이 40% 이상이면 사료로서 인정. (v) 조사건조효모(irradiated dried yeast) : 구루병의 예방효과를 나타내기 위하여 자외선을 조사한 비발효성의 건조효모로서 ergocalciferol원(D<sub>2</sub>, anti-rachitic factor for poultry)으로서 널리 인정. (vi)활성효모(active yeast) : 활성효모는 제조과정에서 액체배지에서 효모를 증식시키고 이를 분리, 세척(washing)한 후 효모의 발효능력이 보존되도록 한 제품으로서 수분함량에 따라 compressed yeast(수분함량 70%)와 active dry yeast(수분함량 8%)로 구분한다. (vii) 생효모배양물 : 제조과정중 액체배양후 효모를 분리하지 않고, 모든 액체배양을 고체배지에 혼합하여 배양한 후 효모와 배지를 구분하지 않고 효모의 발효능력이 보존되는 방법으로 건조한 것이 생효모배양물(live yeast culture)로써 사료효율 증진을 위하여 주로 사용된다(Rose, 1980; Stark와 Wilkinson, 1989).

반추위 내용물을 사료자원으로 이용하고자 반추가축(Garrett등, 1959; Antongiovanni등, 1973; Messersmith등, 1974; Prokop등, 1974; Banting과 Bellanger, 1979)과 가금류(Hammond, 1944; Mann, 1962; Jovanovic과 Cuperlovic, 1977) 및 돼지(Oshida등, 1980; Gohl, 1981)에 대한 건조 반추위 내용물의 사료대체 가능성이 시험되었고, 국내에서는 silage 제조와 단세포단백질 생산기질로의 이용 등이 검토되었으나 아직 실용화되지는 못하였다(이 등, 1985; 황, 1991; 조, 1991).

현재 선진외국에서는 반추위 내용물중 액상부분을 이용하여 1) Rumen bacterial inoculum, 2) A concentrate of natural and cultured rumen microorganisms, 3) Stabilized rumen extract 형태로 가축의 소화기 질병 예방 및 치료제로 일부가 사용되고 있으며, 최근 외국에서 생산되는 가축용 probiotics의 특수성분으로 이용되고 있다.

생균제를 연구하는 학자들은 최근에 유전공학 기술이 발달하면서 보다 능력이 우수한 균주를 개발하기 위해 DNA 수준에서의 연구를 점진적으로 시도하게 되었다. McCarty 등(1988)은 쥐에서 분리한 *Lactobacillus fermentum* 균주로 부터 genomic DNA를 분리한 뒤 이것을 돼지에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus* 균주에 형질전환함으로써 *Lactobacillus acidophilus*가 쥐의 위상피세포에 흡착할 수 있는 능력을 부여하였다. 따라서 이러한 기술을 섬유소 분해 효소가 없어서 섬유소를 이용할 수 없는 가축을 대상으로 섬유소 분해 유전자를 *Lactobacilli*에 형질전환시켜 새로운 능력을 갖는 균주를 이들 가축에게 이용하려는 연구가 주목을 끌게 되었다.

실제로 돼지나 닭과 같은 단위동물들은 반추동물처럼 장관 내에 cellulose를 분해 이용하는 미생물들이 존재하지 않기 때문에 cellulose, arabinoxylan,  $\beta$ -glucan 등이 비교적 많이 함유된 보리나 밀 귀리와 같은 곡류사료 급여시 이들 섬유소가 장관내에서 교질상(gel-form)을 형성하여 영양소의 이용성 및 성장을 등을 감소시키며 특히 닭에 있어서는 항 영양성인자로 작용하여 영양소의 장통과 속도를 증가시키며 영양소를 피복하여 이용성을 저하시킨다. 현재 단위동물의 생산성을 증가시키기 위해 endo- $\beta$ -1,4-glucanase와 endo- $\beta$ -1,4-xylanase와 같은 cellulose 분해효소를 사료에 첨가하여 공급하고 있으나 사료비가 증가한다는 비 경제적인 문제가 따르며, 최근에 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Hall 등(1993)은 췌장의 exocrine acinar cell에서 합성되는 elastase I의 elastase I enhancer/ promoter에 proteinase-resistant  $\beta$ -1,4-glucanase 유전자를 fusion 시켜 소장의 상피세포에서 이들 효소가 분비되도록 유전공학기법으로 transgenic mouse를 만드는데 성공하여 단위동물의 섬유소 분해의 가능성을 제시하였지만 발현효율은 극히 낮았다.

현재까지 발표된 많은 섬유소 분해효소 유전자들은 곰팡이와 박테리아에서 cloning 되었는데, 그중 박테리아에서 cloning된 유전자들은 Table 1에서 보는바와



같다. 이들 유전자의 구조와 특성은 catalytic domain과 cellulose binding domain(CBD)을 가지고 있다. 두 domain 사이에는 linker가 있어서 각각의 domain이 독립적인 기능을 할 수 있도록 하는 역할을 한다(Ferreira 등, 1990; Gilbert 등, 1990; Kellett 등, 1990; Tomme 등, 1988; Van Tilbeurgh 등, 1986). 이렇게 연구 개발된 유전자들을 이용하여 probiotics로 산업화하는 연구는 이들 유용 유전자들을 shuttle vector에 cloning 하여 효모와 유산균에 형질전환시켜 발현시키는 단계까지 연구되었다.

현재 국내에서 도축폐기물을 이용한 생균제 개발과 효소생산 기술을 개발하였으며, 발효를 통해 유기성 폐기물의 사료자원화 기술을 확보하였으며(Cho 등, 1992; Hwang 등, 1992; Chung 등, 1992; Kim 등, 1992; Shin 등, 1994<sub>a,b</sub>) 특히 사료 이용을 증진을 위한 효모 배양물을 개발하기 위하여 토양 및 각종 폐기물로부터 벃짚 당화액과 반추위 내용물에서 증식속도가 빠른 4종의 *Saccharomyces cerevisiae*와 2종의 *Candida utilis* 및 2종의 *Aspergillus oryzae* 등 수종의 효모와 곰팡이를 분리·동정 하였다(황, 1991; 조, 1991; 김, 1993; 정, 1994),

또한 벃짚과 반추위 내용물 등의 유기성 폐기물의 당화조건과(Hwang 등, 1992) 배양기질로서의 처리조건을 조사하였으며(정 등, 1994; Shin 등, 1994<sub>a</sub>), 상기 분리 미생물의 증식조건 및 각종 배양기질에 대한 이용성을 조사하고(황 등, 1991; 조 등, 1991; 김, 1993; 정, 1994) 적정 배양조건에서 배양한 후 건조하여 각종 효소 역가, 영양소 함량 및 육계의 생산성에 미치는 효과를 연구하였다(조, 1991; 김, 1992)

또한 유기성 폐기물인 잔반의 사료 자원화를 위한 발효조건을 조사하고 이의 사료 가치를 구명하기 위하여 육계 및 흰쥐의 사료효율 및 증체량에 미치는 효과를 조사하였다(Shin 등, 1995).

또한 재래산양의 반추위로부터 cellulose를 분해하는 미생물 *Actinomyces* sp. KNG 40을 분리하여 endo- $\beta$ -1,4-glucanase 활성을 갖는 유전자 2개를 cloning 하였으며, 이들 유전자들로부터 발현되는 endo- $\beta$ -1,4 -glucanase의 효소적 특성규명과 이들 두 유전자의 정확한 유전자적 특징을 조사하기 위하여 sequencing이 진행되고 있다. 또한 반추미생물중 4가지 중요 섬유소 분해 미생물중에 포함되어 있는 *Ruminococcus albus* 7과 *Fibrobacter succinogens* S85로부터  $\beta$ -glucosidase와 endo- $\beta$ -1,4- glucanase를

cloning 하여 이들 두 효소에 대한 효소적 특성 또한 규명하여 반추가축 뿐만 아니라 단위가축의 사료첨가제로써 이용하기 위한 가장 적합한 효소로 확인되어 현재 생균제 제용 유전자로 이용하기 위하여 유전자적인 조작연구가 진행중에 있다.

따라서 본 연구에서는 각종 영양학적인 문제점을 해결하고 가축의 생산성 증가와 경제수명을 연장하기 위하여 반추위 대사장애의 1차적 원인물질인 D-lactic acid를 분해하여 glucose원인 pyruvate로 전환할 수 있는 lactic dehydrogenase를 다량 생산하며 반추위 발효촉진 물질을 함유하는 미생물배양물과 반추위 이상발효에 효과적인 반추위내용물을 기질로 이용하여 가축의 완충작용(buffer effect) 및 소화율을 개선할 수 있는 효모 및 곰팡이 배양물 및 내산성 장내 미생물인 *Lactobacillus acidophilus*에 cellulase 유전자를 도입하여 형질전환된 *Lactobacillus acidophilus* 균주 개발과 이들을 이용한 기존의 제품과 차별화된 가축의 사료 섭취량과 이용율을 증진시킴으로써 사료 원료 수입절감으로 외화를 절약하고 또한 수출을 통한 외화획득과 국내 축산업의 국제 경쟁력 향상을 도모하고자 한다.

## 제 2 장 Lactic acid dehydrogenase 생산성이 높은 미생물 배양물 개발에 관한 연구

### 제 1 절 Lactate dehydrogenase 생성 균주의 분리 및 동정

#### 1. 서 론

Lactate dehydrogenase는 다양한 원핵생물과 진핵생물에서 발견되어 왔다. LDH는 살아 있는 세포내에서 lactic acid와 pyruvic acid 간의 가역적 반응에 관계하는 중요한 효소이다. LDH의 형태와 기능은 서로 다른 속과 종에서 다르며 심지어 같은 종에서도 다르다(예 : L-nLDH, EC1.1.1.27; D-nLDH, EC1.1.1.28; D-iLDH, EE1.1.2.3; L-iLDH, EE1.1.2.4).

모든 유산균은 많은 양의 NAD-linked lactate dehydrogenase(nLDH)를 가지고 있으며 이 효소는 세포질에 존재한다. pyruvate는 다른 효소에 의해 L(+)- 또는 D(-)-lactate로 전환된다(Gasser, 1970; Hensel 등., 1977a; Savijoki and Palva, 1977; Ogata 등., 1983; Kawa 등., 1996; Malleret 등., 1998).

nLDH는 다른 균보다 유산균에서 많이 발견된다. 이것은 아마도 탄수화물을 성장과 에너지에 이용하는 데 제한받지 않는 종의 생존에 덜 중요하기 때문일 것이다(Gotz and Schleifer, 1976; Garvie, 1980; Wrba, 1990).

NAD/NADH를 보조소로 이용하지 않는 다른 형태의 LDH는 다양한 bacteria에서 발견된다. 이와 같은 효소는 NAD-independent LDH(iLDH)라 알려져 있고 서로 다른 종에서 각기 다른 기능을 갖는다(Doell, 1971; Hensel, 1977b; Gilmour 등., 1994). 이 효소는 lactate를 pyruvate로 전환시키고 pyruvate를 lactate로 전환시키는 반응은 in vivo나 in vitro 상에서 거의 일어나지 않는다. 유산균에 있어서 iLDH는 세포질 내에 존재하나, 다른 종류의 bacteria의 경우 종종 particle을 구성하고 있거나 세포막에 존재한다. 반추위 미생물의 경우 어떤 bacteria는 lactate metabolism에 관계하고 lactate dehydrogenase를 가지고 있다(Hino and Kuroda, 1993; Gilmour 등, 1994; Wyckoff

등, 1997). 이 LDH는 반추위의 낮은 pH(<6.0)와 반추위 기능 장애의 주범인 lactate의 균형에 중요한 역할을 한다.

이 실험의 목적은 가축의 생산성을 위한 direct fed-microbials로의 가능성을 평가하기 위해 다양한 공급원으로부터 LDH를 생성하는 미생물을 분리 동정하는 것이다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시료의 선택

시료는 식품, 물, 식물, 토양, 분뇨, 부산물 등 다양한 공급원으로부터 수집했다. 살아있는 세포로부터 시료를 채취하기 위해 slow cutting mixer와 stomacher(Seward #400)을 사용하였다. 생리식염수 50ml 에 다양한 시료 5g을 첨가하였다. 잘 섞은 후 20-30분간 방치하였다. 시료를 넣은 용액을  $10^4$ - $10^6$  비율로 희석하고 MRS 배지와 YM 배지를 사용하여 평판 배양하였다. 이 배지를 39°C에서 24시간 이상 배양하였다.

### 나. 배지

다양한 공급원으로부터 bacteria를 선택하기 위하여, 기본 culture media로 MRS와 YM, TSY 배지를 사용하였다(Table 7). lactate를 생성하는 미생물을 선택하기 위해 lactate 배지에서 lactic acid를 유일한 탄소원과 에너지원으로 공급하였다(Table 8).

### 다. LDH 생성 균주의 선별

분리한 미생물을 MRS와 YM 배지에서 bromocresol green(0.4g/l)으로 염색하여 산생성균을 선별하였다. 균주의 최종산물로서 산이 생성되어 노란색이 나타나는 것을 관찰하기 위하여 하루 동안 39°C에서 배양한 후 상온에서 2-3일간 방치시켰다. Lactate를 생성하는 균주를 선별하기 위하여, 산생성균을 lactate 배지에서 39°C에서 48시간동안 배양하고, UV spectrometer(Specord S100, Analytik Jena)를 가지고  $A_{650}$ 에서 성장률을 측정하였다.

LDH를 생성하는 균주의 동정은 Lactate dehydrogenase(LD) isoenzyme Kits #705A(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)를 가지고 native PAGE를 변형하여 LDH-staining method를 통해 실시하였다. 최종적으로, 분리한 균주는 TSY 배지에서 재배양하고 lactate dehydrogenase의 역가는 lactate와 NAD의 양을 측정하는 UV assay를 통해 측정하였다(Bermeyer, 1974)

#### 라. 조효소액의 제조

배양물을  $12,000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ , 10분간 원심분리시킨 후 상등액은 제거했다. 남은 미생물을 세척한 후 1ml의 tris-HCl buffer(0.05 moles, pH 7.0)넣고 다시 원심분리하였다. 세포추출물은 ultrasonication(VCX 400)을 통해 얻었다. 각 시간대별 파괴되지 않은 세포는 Gram 염색한 후 현미경으로 구분해 냈고 ultrasonication은 10분간(3초간 실행, 5초간 휴지, 20kHz, 40% pulse) 80%이상의 세포가 파괴될 때까지 실행하였다. 원심분리( $20,000 \times g$ , 10min)를 통해 세포의 파편을 제거한 후, 상등액과 세포추출물을 조효소액으로 사용하였다.

#### 마. Lactate dehydrogenase 분석

Lactate dehydrogenase의 활성은 lactate와 NAD를 UV spectrophotometer로 측정하였다(Bermeyer, 1974). complete assay mixture 0.5ml의 조성은 다음과 같다; tris-HCl(pH 7.0) 50mM, D,L-lactate (sodium salt) 12.5mM, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 1.5mM 추출물의 활성에 따라 protein 1-2mg/ml. 효소 반응은 세포추출물을  $25^{\circ}C$ 에서 첨가하면서부터 시작되었고, 활성은 UV spectrophotometer (Specord S100, Analytik Jena)를 이용하여 OD<sub>340</sub>에서 NADH의 변화를 계속적으로 측정하였다. 단백질의 농도는 micro protein determination method(Bradford, 1976)를 통해 측정하였다. 측정된 효소의 활성은 단백질 mg당 시간(분)당 환원된 NAD(NADH)의 mole수로 측정하였다.

#### 바. Gel 전기영동

전기영동은 native PAGE 방법을 이용하여 실시하였다. acrylamide gel의 농도는 12.5%이고 acrylamide와 methylene bis acrylamide의 비율은 37:1(w/w)이다.

단백질은 1%(v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol과 2mM EDTA가 함유된 20mM tris-HCl buffer(pH6.8)에 용해되었다.

조효소액은 gel 위를 일정한 볼트(20mV)에서 이동하고, gel의 하부에 이르면 전기영동을 끝마친다(4℃에서 1시간). gel은 LDH incubation buffer(lactate dehydrogenase L,D-isoenzymes Kits #705A, Sigma Chemical Co., St. Luis, USA) 15ml를 첨가한 agar-stain solution으로 옮겨 어두운 곳에서 25℃, 30분간 배양한다. 마지막으로 gel을 각 lane의 band의 상대적인 이동을 관찰하고 기록한다.

### 사. LDH-생성 균주의 동정

분리한 균주를 동정하기 위해, 형태학적이고 생리화적인 특성을 Microbiology a laboratory manual(Cappuccino와 Sheeman, 1975), Manual of methods for general bacteriology(Gerhardt 등., 1981), Microbiological methods(Collins와 Lyne, 1976), Bergey's manual of determinative bacteriology(Buchanan와 Gibson, 1974), Bergey's manual of systematic bacteriology(Sneath 등., 1980)을 통해 실험하였다.

fatty acid methyl ester(FAME) 분석을 통한 박테리아의 동정은 Microbial Identification System(Microbial ID, Inc. Newark, Del)으로 수행하였다. FAME analysis를 이용하기 위한 균주는 MRS broth에서 키웠고, 지방산 분석은 Gas chromatography(Hewlett Packard HP 6890)을 이용하여 분석하였다. FAME의 동정과 data 처리는 Sread(1989)와 Moore 등.(1994)의 방법으로 처리하였다. (Microbial ID, Inc, Newark, USA).

## 3. 결과 및 고찰

Lactate dehydrogenase는 많은 종류의 미생물로부터 발견되었고 LDH의 특성과 작용에 관해서는 많은 연구가 있었다(Palva, 1977; Ogata, 1983; Gilmour, 1994; Wyckoff 등, 1997). 본 연구는 LDH를 생성하는 bacteria를 찾아 반추가축을 위한 direct-fed microbials에 적용시키기 위해 실시하였고, 결과는 다음과 같다.

LDH를 생성하는 미생물을 찾기 위해, 시료를 식품, 물, 식물, 토양, 분, 부산물 등

다양한 공급원으로부터 찾았다(Table 1). 분리의 첫 번째 단계에서, 327가지를 MRS 배지와 YM 배지에서 1-2일간 39°C에서 배양하여 colony를 형성한 것을 분리한 후 분리한 미생물을 동일한 배지에서 3회 계대 배양하였다. 산이 최종 생성물(pyruvate 또는 lactate)이기 때문에 효소반응에서, 산생성 균주를 선별하여, 184종의 산생성균을 선별하였다. 산생성균주를 0.2% D,L-lactate sodium salt를 첨가한 lactate 배지에 배양시켰다. 그리고 89종의 lactate 배지에서 잘 자라는 lactate 이용 균주를 선별하였다.

20종의 lactate dehydrogenase를 가지고 있는 균주를 native PAGE를 이용한 LDH-staining 방법에 의해 선별하였다. LDH 생성균주는 요구르트에서 4종, 분에서 4종, 식품에서 6종, 폐수와 토양에서 3종, 반추위액에서 1종, 곤충에서 1종, 이끼에서 1종을 각각 분리하였다(Table 2). 이들의 LDH 활성은 Table 2에서 보여지는 바와 같고, 이중 4종은 sheep blood agar에서 용혈 작용을 보이므로 병원균으로 사료된다.

FFy111-1은 가장 높은 LDH 활성을 가지고 있고, F48은 두 번째로 높은 활성을 가지고 있는 것으로 보인다.

FFy111-1의 배양액 내 LDH는 UV spectrophotometer로 관찰이 되지 않았는데 이는 배양액에 적은 양의 단백질(0.16mg/ml)을 포함하고 있기 때문이다.

미생물의 동정은 LDH 활성이 가장 높은 FFy111-1로 수행하였다. FFy111-1의 형태학적, 생리학적 특징은 Table 3과 같다.

TSY 배지에서 37°C, 24시간을 배양한 후, 동그랗고 유백색의 colony가 생성되었다. FFy111-1은 간균이고, gram 양성이며, 활동성이 없고, 포자를 형성하지 않는다.

FFy111-1은 pH 6.5, 30°C에서 잘 성장하였다. FFy111-1은 catalase와 Voges-Proskauer test에서 음성을 나타내며, glucose와 lactose, sucrose로 산을 생성하는 것으로 나타났다(Table 3, 4).

FFy111-1의 지방산 조성은 Figure 1과 같다. FFy111-1종의 주된 지방산은 C16:0 (31.55%), C18:1 (29.62%)와 같은 branched-chain fatty acid이다. API kit 50 CHL 분석의 결과는 Table 4와 같다. API로 동정한 결과 FFy111-1은 *Lactobacillus* sp.(98%)라 사료된다.

결과적으로, FFy111-1은 형태학적 특성과 생화학적 특성, 세포내 지방산의 조성과 API 분석결과 *Lactobacillus* sp.라고 생각되어 *Lactobacillus* sp. FFy111-1라 이름 붙였다.

Table 1. Various sources for screening of LDH-producing bacteria

Item	Bacteria	
	MRS	YM
Commercial youghurt (Y)	20	-
Raw milk (M)	1	-
Feces(F)	16	17
infant, deer, goat, pig, chicken, dairy cow, Japanese cow etc.		
Waste water (W)	2	1
animal farm, household etc.		
Rumen contents (C)	5	-
dairy cow, deer.		
Vegetable and fruit (V)	12	14
groundsel, green bean sprouts, green onion, hot pepper, carrot Chinese cabbage, grape, corn, squash, cucumber, plum, lettuce etc.		
Root (R)	5	3
garlic, ginseng, ballon flower, codonopsis lanceolata etc		
Fermented foods (FF)	5	2
soybean paste, red pepper paste, fermented soy beans, kimchi, radish kimchi etc		
Soil (S)	7	5
field, mountain, animal farm, grass land etc.		
Insect (I)	6	4
moth, earth worm, spider, ant, leech etc.		
Other (E)	4	12
flower, moss, rusted iron, saliva, wild strawberry, wild grass, worm wood, paper sludge, food waste, wood etc.		
Total	83	48



Table 2. LDH activity of bacterial cell free extracts and hemolysis of strains selected by LDH-staining solution with native PAGE

Strains	Sources	pH	Protein	LDH activity	Hemolysis
T2-2	Youghurt	5.25	7.78	0.21	
Y2-4	Youghurt	4.55	3.44	4.56	
Y3-1	Youghurt	4.85	5.52	0.26	
Y9-5	Youghurt	4.65	5.20	1.02	
C21-1	Rumen fluid	4.59	5.88	12.79	
W24-2	Waste water	5.96	6.10	0.14	
FF29-3	Soybean paste	5.37	4.97	0.29	
F48	Feces	5.01	1.53	17.59	
F53	Feces	5.01	1.11	5.50	Positive
V58-1	Green bean sprout	4.78	6.74	0.14	
V96-3	grape	4.78	3.38	10.37	
S108	soil	4.57	1.77	2.87	
Vy3-2	Cabbage	5.06	12.64	5.59	Positive
Ry4	Gaelic	5.01	4.81	1.66	
Iy12-2	Eath warm	4.88	5.81	0.18	
Ey15-1-1	Moss	5.72	1.06	1.32	Positive
Sy16-2	Soil	2.95	1.05	16.32	Positive
Fy110-4	Feces	5.70	10.46	0.12	
Fy110-8	Feces	4.60	2.75	13.64	
FFy111-1	Watery radish kimchi	5.70	1.80	28.68	

The pH was measured on culture after incubation at 39°C for 24 hours.

LDH activity : M NADH/min/mg protein.

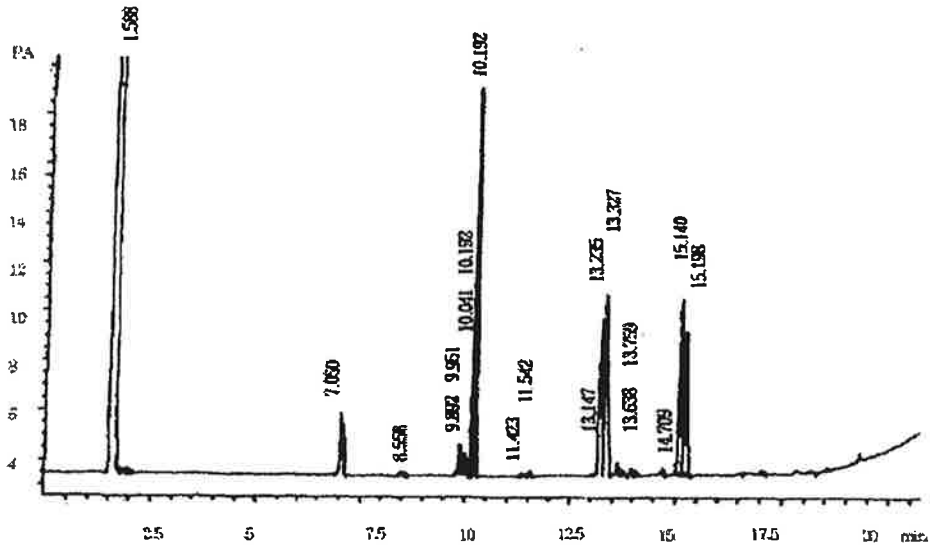
Protein : mg/mL.

Strain isolate from MRS medium expressed a capital letter such as Y, FF and V.

Strain isolate from MRS medium expressed a capital letter and a small letter such as Vy, FFy and Sy.

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of strain FFy111-1

Characteristics	Results
<b>Morphological characteristics</b>	
Gram staining	+
Shape of cell	Rod
Spore formation	-
<b>Biochemical characteristics</b>	
Catalase	-
Voges-Proskauer test	-
Oxidase	-
Urease	-
Nitrate reduction	-
Gelatin liquifaction	-



Retention time	Name	Content (%)
1.588	solvent	
7.050	14 : 0	4.37
8.558	15 : 0	0.20
9.892	Sum In Feature 3	2.64
9.951	Sum In Feature 3	1.53
10.041	16 : 1 w5c	0.40
10.192	16 : 0	31.55
11.423	17 : 0 ANYEISO	0.14
11.542	17 : 1 w8c	0.45
13.147	Sun In Feature 5	0.24
13.235	18 : 1 w9c	13.50
13.327	18 : 1 w7c	16.12
13.638	18 : 0	1.20
13.759	11 methyl 18 : 1 w7c	0.20
14.709	19 : 0 ISO	0.80
15.140	Sum In Feature 7	14.03
15.198	19 : 0 CYCLO w8c	12.64

Figure 1. Gas chromatogram of cellular fatty acids of strain FFy111-1

Table 4. API analysis of FFy111-1

Substrate	Fermentation	Substrate	Fermentation
Contron	-	Esculin	-
Glycerol	-	Salicin	-
Erythritol	-	Celobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	-
L-Arabinose	-	Lactose	+
Ribose	-	Melibiose	-
D-Xylose	-	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	-
Adonitol	-	Inulin	-
$\beta$ Menthyl-D-Xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	Raffinose	-
Glucose	+	Starch	-
Fructose	-	Glycogen	-
Mannose	-	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	-
Phamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fructose	-
$\alpha$ Methyl-D-Mannoiside	-	D-Arabitol	-
$\alpha$ Methyl-D-Glucoside	-	L-Arabito	-
N-Acetyl_Glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdalin	-	2-Keto-Gluconate	-
Arbutin	-	5-Keto-Gluconate	-

## 제 2 절 *Lactobacillus* sp. FFy111-1의 성장 및 LDH 생성 조건

### 1. 서 론

단위동물과는 달리, 반추동물은 반추위내에서 광범위한 미생물 효소가 생성된다. 그리고 이들 효소는 반추동물의 소화과정에서 중요한 역할을 수행한다. 반추위의 효소계의 가장 많이 연구된 것은 섬유소 및 식물 세포벽 구성 성분의 소화와 관계된 것이다. 반추위 내 섬유소 분해 능력은 주로 *Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*와 같은 protozoa, fungi, bacteria에 의해 생긴다 (Halliwell과 Bryant, 1981; Forsberg와 Cheng, 1992). 반추위에 존재하는 또 다른 효소로는 식물 세포벽의 구성 성분을 분해하는 효소(cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucanases, pectinases)와 amylases, proteases, phytases, taninases, 또 lactate와 pyruvate를 상호 전환시키는 효소(lactate dehydrogenase)가 있다. 이렇게 반추위 내에 효소들이 존재함에도 불구하고, 최근의 연구는 효소의 공급이 일당 증체량, 사료 효율과 반추동물의 생산성을 증가시킬 수 있다고 알려져 있다(Beachmin과 Rode, 1996).

반추위 내의 복합적인 기질의 효과적인 소화는 많은 효소들의 대등한 활성에 의해 이루어진다. 그러나, 반추위 효소들의 이러한 균형은 사료의 구조와 조성에 의해 방해받는다. 특히 반추동물의 생산성을 가장 높일 수 있는데 요구되는 에너지원으로서, 비섬유성 탄수화물(곡류 농후사료)은 반추위 생태를 파괴하는 주범이다. 바람직하지 못한 반추위 상태는 lactate 생성 bacteria에 의해 lactate가 축적되었기 때문이다 (Alan Dobson and Dobson, 1988; Asanuma and Hino, 1997). 또한 이러한 lactate의 축적은 lactate 이용 bacteria의 성장을 방해한다(Steward와 Bryant, 1988; Hino and Kuroda, 1993). lactate dehydrogenase는 lactate의 생성과 이용에 중요한 역할을 한다. 그러므로 많은 학자들은 lactate dehydrogenase에 관심을 가지고 있고 direct-fed microbial의 효소를 통해 반추위에서 lactate의 축적을 방지하는 방법을 찾고 있다. 위에서 기술한 연구 목적에 의해, 식품, 물, 식물, 토양, 분, 부산물 등 다양한 공급원으로부터 분리한 LDH 생성 bacteria인 FFy111-1을 선별하였다. 계속해서 세부적인 연구를 수행하기 위하여, FFy111-1종이 효소를 생성하는데 적절한 성장 조건을 요구하게 된다.

그러므로 이 실험의 목적은 LDH 생성 bacteria인 FFy111-1종의 성장 조건을 찾아내

기 위한 것이다. 발효기에서 미생물의 성장을 조절하기 위해, pH, 온도, 영양소 공급 원으로서의 질소와 탄소 공급원, 광물질공급원과 같이 발효와 관계된 가능한 모든 요인들을 고려하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 균주의 선별

반추위 발효시 생성되는 lactate의 축적을 방지하기 위해, 선행된 실험을 통해서 LDH 활성이 가장 높다고 밝혀진 FFy111-1을 동치미로부터 분리하였다. 이 미생물을 20% glycerol에서 -20℃에서 보관하였다.

### 나. 배지

미생물의 분리를 위한 MRS 배지와 TSY 배지에 기초한 기본 배지는 최소한의 영양소만을 함유하도록 제조하였다. 이 배지의 조성은 pepton, 10g; yeast extract, 1g; dextrose 10g; magnesium sulfate 0.1g; maganase sulfate 0.05g; monopotassium phosophate 0.5g를 증류수 1L에 함유되도록 하였다. pH는 멸균전 6.5가 되게 하였다.

### 다. 성장률의 측정

미생물의 성장은 0시간과 배양 24시간에 UV spectrophotometer(Specord S100, Analytik Jena)를 사용하여 A<sub>650</sub>에서 OD값을 측정하여 비교하였다.

### 라. 배양조건의 조절

접종액을 10ml TSY 배지가 담긴 40ml 시험관을 이용하여 39℃에서 3회 계대 배양한 후 12,000×g, 4℃, 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 멸균된 potassium phosphate buffer (0.07M, pH 6.5)로 세척하였다. 세척된 미생물을 동일한 양의 배지에 멸균된 buffer와 함께 넣어 주었다.

미생물이 생성하는 효소가 높은 활성을 갖게 하기 위해 pH, 온도, 탄소원(glucose,

lactose, cellobiose, sucrose, soluble starch, sodium acetate, pyruvic acid, butyric acid, fructose, galactose, maltose, mannose, salicine, D,L-lactate, L-lactate). 질소원 (yeast extract, malt extract, beef extract, peptone, tryptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ) 및 광물질 공급원( $\text{NaCl}$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{BaCl}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ )을 조사하였고, 탄소원 1%, 질소원 1%, 광물질 공급원 0.1%로 각각 조절하였다.

#### 마. 조효소액의 제조

배양물을  $12,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10분간 원심분리시킨 후 상등액은 제거했다. 남은 미생물을 세척한 후 1ml의 tris-HCl buffer(0.05 moles, pH 7.0)넣고 다시 원심분리하였다. 세포추출물은 ultrasonication(VCX 400)을 통해 얻었다. 각 시간대별 파괴되지 않은 세포는 Gram 염색한 후 현미경으로 구분해 냈고 ultrasonication은 10분간(3초간 실행, 5초간 휴지, 20kHz, 40% pulse) 80%이상의 세포가 파괴될 때까지 실행하였다. 원심분리( $20,000 \times g$ , 10min)를 통해 세포의 파편을 제거한 후, 상등액과 세포추출물을 조효소액으로 사용하였다.

#### 바. Lactate dehydrogenase 분석

Lactate dehydrogenase의 활성 측정은 2장 1절 재료 및 방법의 lactate dehydrogenase 활성 측정법과 동일하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 탄소원이 성장 및 효소 활성화에 미치는 영향

FFy111-1의 성장과 LDH 활성화에 관한 탄소원의 영향은 Table 5와 같다. 기본 배지에 glucose 대신에 다양한 탄소원을 급여하였을 때, glucose, lactose, cellobiose, sucrose, pyruvic acid, fructose, galactose, maltose와 mannose는 다른 탄소원에 비해 높은 성장률을 보였다. 그러나 전체적인 LDH 활성화는 glucose, pyruvic acid, fructose, galactose와 maltose일 때 증가하였다. specific activity는 탄소원에 따

라 다르게 나타났다. 전체적인 효소 활성은 glucose, cellobiose, sucrose, soluble starch, fructose, galactose, maltose, mannose와 salicine에서 높은 수준을 나타냈다. 전체 효소 활성과 specific activity는 효소의 단백질량의 차이에서 기인된다.

특히 여러 탄소원 가운데 fructose는 외견상의 성장과 전체 효소 활성과 specific activity (1040, 537, 1254%)를 가장 높이는 것으로 나타났다. 또한 glucose와 maltose는 세포의 성장과 전체 효소 활성과 specific activity에 좋은 영향을 끼친다.

탄소원의 이용에 관한 세부 연구를 위해, FFy111-1을 다음과 같은 성분(1% glucose, 1% fructose, 1% maltose, 1% yeast extract, 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% NaCl, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)이 함유된 배지에 접종시켰다. 성장과 LDH 활성에 관한 탄소원의 영향은 glucose, fructose, maltose를 각각 제외한 것을 비교하였다. 결과는 Figure 2에 나타나 있다.

성장(OD)은 fructose를 제외한 배지에서 가장 낮은 수준을 나타냈고 다음과 같이 나타났다. GFM(glucose, fructose, maltose) 1.63 > glucose (-), 1.50 > maltose (-), 1.43 > fructose (-), 1.01. 전체 효소 활성은 fructose에 의해 가장 크게 영향을 받는다. 전체 효소 활성(M reduced NAD/ml/min)은 다음과 같이 나타났다. GFM 94.80 > glucose (-), 88.61 > maltose (-), 83.48 > fructose (-), 66.63. specific activity(M reduced NAD/mg protein/min)는 다음과 같이 감소하였다. GFM 10.38 > fructose (-), 9.41 > maltose (-), 7.35 > glucose (-), 6.36.

결과를 종합해 볼 때, 탄소원으로서 fructose는 세포의 성장과 LDH 활성에 가장 좋은 영향을 끼치고, 그 결과는 Table 5에 나타나 있다. 그러므로 fructose는 다양한 탄소원 가운데 가장 효과적이라 사료된다.

fructose의 농도를 다르게 하였을 때 나타나는 결과는 Figure 3과 같다. fructose의 농도를 1%에서 2%로 증가시켰을 때 세포의 성장은 0.82, 0.87%로 각각 증가되었으나, 3% 이상 증가시켰을 때는 3%(0.78), 4%(0.69), 5%(0.60)로 낮아졌다. 전체 효소 활성은 2, 3과 4%의 fructose에서 각각 14.19, 13.77과 13.74%로 크게 증가하였다. 2% fructose는 가장 높은 효소 활성을 나타냈다. 또한, specific activity는 2% fructose에서 7.84로 가장 높게 나타났다.

따라서, 탄소원으로서의 fructose는 배지내 2%가 FFy111-1종의 성장과 LDH 활성을 가장 높게 하는 것으로 나타났다.



Table 5. Effect of carbon sources on the microbial growth and LDH production

Source	Growth	Relative growth	Total enzyme activity	Relative activity	Specific activity	Relative specific activity
None	0.15	100	10.68	100	11.72	100
Glucose	0.35	233	33.99	318	23.13	197
Lactose	0.18	120	3.89	36	10.50	90
Cellobiose	0.20	133	8.74	82	17.14	146
Sucrose	0.21	140	9.23	86	13.98	119
Soluble Starch	0.09	60	4.02	38	15.21	130
Sodium Acetate	0.11	73	5.01	47	9.89	84
Pyruvic Acid	0.22	147	12.14	114	10.03	86
Butric Acid	0.12	80	3.89	36	8.65	74
Fructose	1.56	1040	57.3	537	146.93	1254
Galatose	0.23	153	24.77	232	37.63	321
Maltose	0.42	280	44.68	418	40.25	343
Mannose	0.17	113	4.86	46	14.28	122
Salicine	0.05	33	2.43	23	17.34	148
D,L-lactate	0.03	20	1.94	18	10.13	86
L-lactate	0.10	67	6.32	59	7.63	65

None : basal medium excepted carbon sources. Growth : OD at  $A_{650}$ .

Total enzyme activity : M reduced NAD/ml/min.

Specific activity : M reduced NAD/mg protein/min.

Relative growth, activity and specific activity : 100% rates by none.

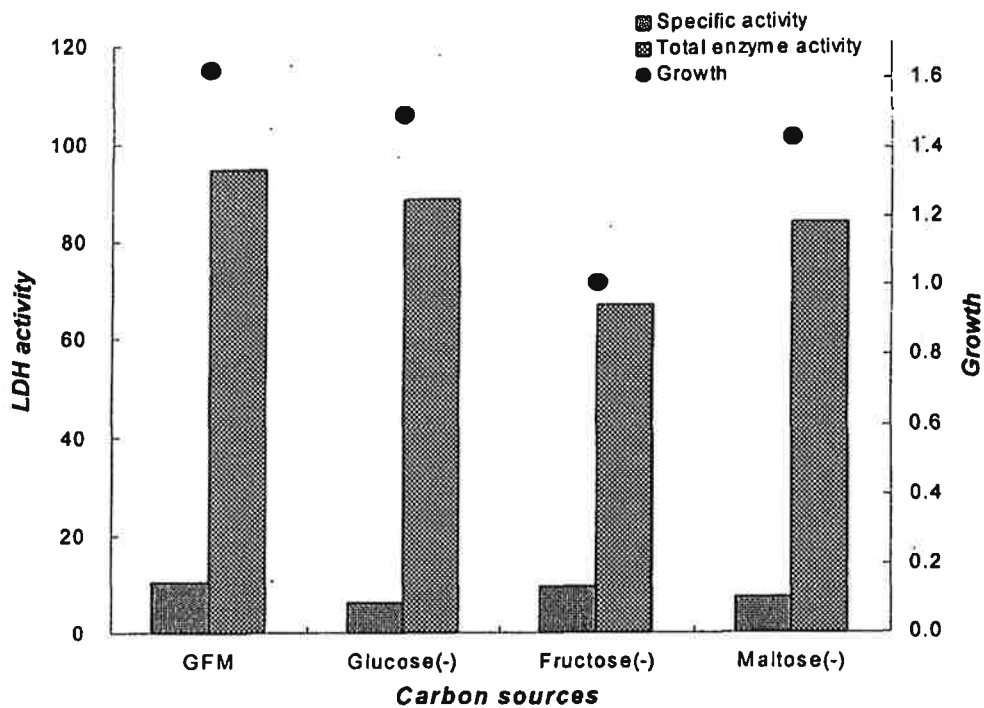


Figure 2. Effect of glucose, fructose and maltose on the cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

GFM : 1% glucose, 1% fructose, 1% maltose, 1% Yeast extract, 1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Glucose (-) : medium excepted glucose

Fructose (-) : medium excepted fructose

Maltose (-) : medium excepted maltose

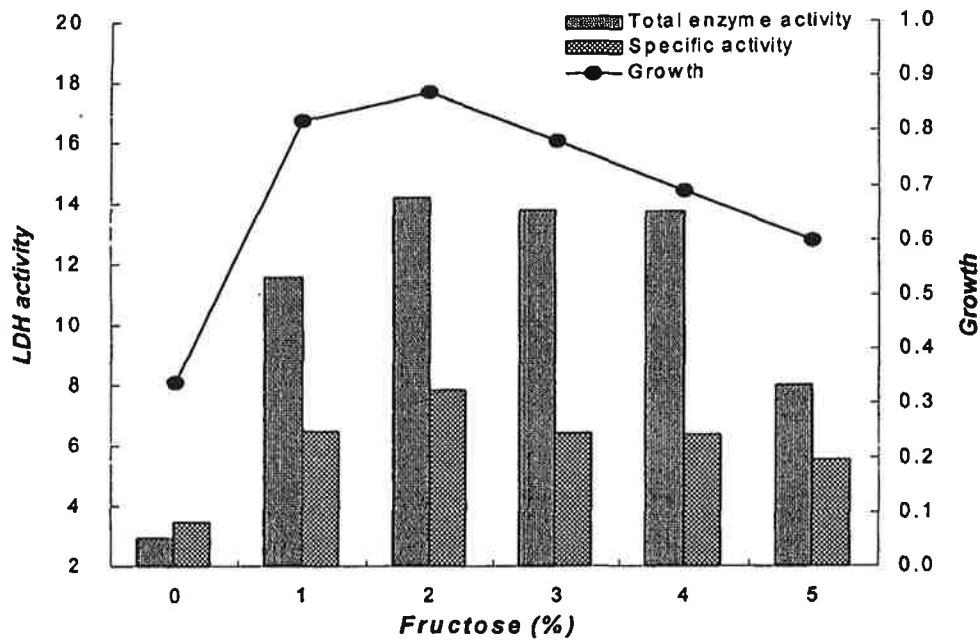


Figure 3. Effect of different concentration of fructose on cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

Culture medium contained 1% yeast extract and 0.1%  $KH_2PO_4$

## 나. 질소원이 성장과 효소 활성화에 미치는 영향

질소원이 FFy111-1의 세포 성장과 LDH 활성화에 미치는 영향은 Table 6과 같다. 다양한 질소원을 peptone과 yeast extract 대신에 공급하였다. 측정값은 생성된 세포의 양이 효소 활성을 분석하는데 모자라므로 유기태 탄소원을 공급한 처리구 평균에 기초하여 상대적으로 나타내었다. yeast extract, peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 세포의 성장을 증가시키는 경향을 나타냈으나, malt extract, beef extract와 tryptone은 성장에 효과가 없는 것으로 나타났다. yeast extract의 공급은 155%로 가장 높은 성장률을 나타냈다. 전체 효소 활성화와 specific activity는 여러 질소원 가운데 단지 yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 만이 좋은 효과를 나타냈고 yeast extract의 공급이 가장 높은 효과를 나타냈다. 결과적으로, yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 의 공급이 세포의 성장, 전체 효소 활성화와 specific activity에 가장 좋은 효과를 나타낸다.

질소원의 이용에 관한 세부 연구를 위해, FFy111-1종을 다음과 같은 성분(1% glucose, 1% fructose, 1% maltose, 1% yeast extract, 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1% NaCl과 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )이 함유된 배지에 접종시켰다. 세포의 성장과 LDH 활성화에 관한 질소원의 효과는 yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 를 각각 제외한 것을 서로 비교하였다. 결과는 Figure 4와 같다. yeast extract를 제외한 배지에서 세포의 성장과 LDH 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다. YNN(yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )과 yeast extract를 제외한 배지,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 를 제외한 배지와  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 제외한 배지에서 세포의 성장은 각각 1.63, 0.60, 0.95와 1.45로 나타났다. YNN과 yeast extract를 제외한 배지,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 를 제외한 배지와  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 제외한 배지에서 전체 효소 활성은 각각 94.80, 16.69, 61.41와 79.64로 나타났고 specific activity는 10.38, 6.35, 10.57과 13.36으로 나타났다. 결과를 종합해 볼 때, 질소원으로 yeast extract를 공급하였을 때 세포의 성장과 LDH 활성화에 가장 좋은 영향을 끼치고, 그 결과는 Table 6에 나타나 있다. 그러므로 yeast extract는 다양한 질소원 가운데 가장 효과적이라 사료된다. Yeast extract의 다양한 수준에 관한 결과는 Figure 5에 나타나 있다. 세포의 성장과 전체 효소 활성화는 yeast extract의 수준이 높아질수록 점차로 높아졌고 4%에서 각각 1.49와 84.74로 가장 높게 나타났다. yeast extract의 수준이 0%에서 2%로 증가할 때 specific activity가 점차로 증가하나, 3% 이상으로 증가할 경우 감소하

는 경향이 있다. 이 결과는 전체 효소 활성보다 더 높은 증가를 나타낸다.

따라서, 질소원으로서의 yeast extract는 배지 내 4%가 FFy111-1의 성장과 LDH 활성을 가장 높게 하는 것으로 나타났다.

Table 6. Effect of organic nitrogen sources on the microbial growth and LDH production

Source	Growth	Relative growth	total enzyme activity	Relative activity	Specific activity	Relative specific activity
None	0.10	9	ND		ND	
Yeast Extract	0.17	155	33.68	247	26.33	200
Malt Extract	0.02	18	0.42	3	1.56	12
Beef Extract	0.09	82	4.47	33	7.72	59
Peptone	0.15	136	10.37	76	9.09	69
Tryptone	0.07	64	1.43	10	4.22	32
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.14	127	34.94	227	22.26	169
NH <sub>4</sub> Cl	0.15	136	36.72	233	22.26	172
NH <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	0.14	127	11.60	85	13.98	106
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.14	127	9.18	67	9.09	67
NaNO <sub>3</sub>	0.11	100	5.32	39	10.86	83
KNO <sub>3</sub>	0.12	109	10.91	80	16.78	128
Mean	0.11	100	13.64	100	13.14	100

None : basal medium excepted nitrogen sources.

ND : non-detection.

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml.

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein.

Relative growth, activity and specific activity : 100% rates by mean.

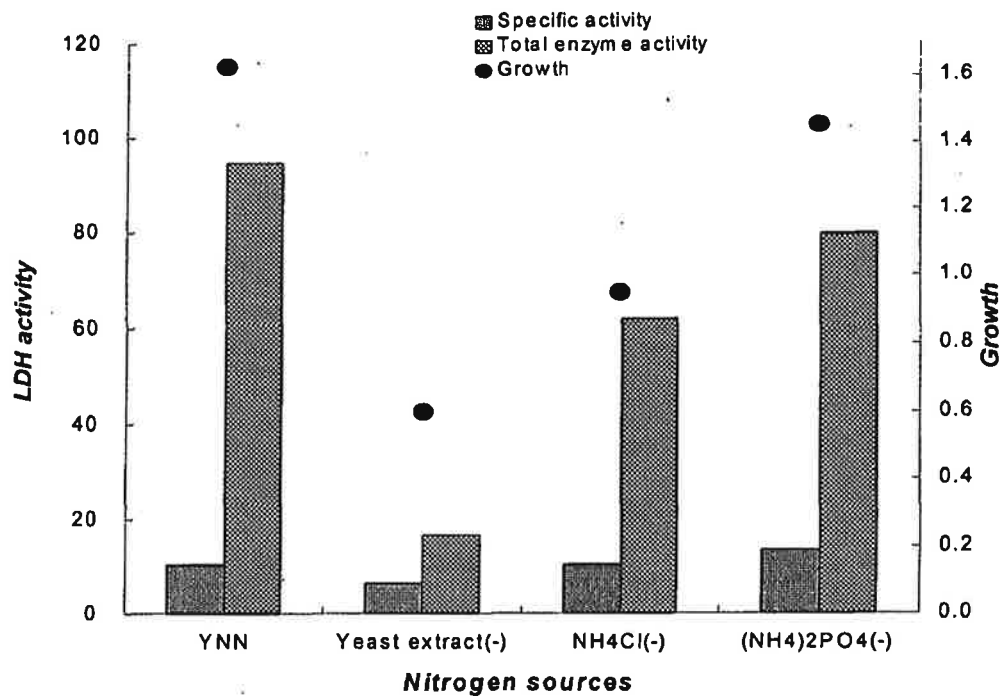


Figure 4. Effect of yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  on the cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

YNN : 1% glucose, 1% fructose, 1% maltose, 1% yeast extract, 1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,

1%  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , 0.1% NaCl and 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Yeast extract (-) : medium excepted yeast extract

$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  (-) : medium excepted  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$

$\text{NH}_4\text{Cl}$  (-) : medium excepted  $\text{NH}_4\text{Cl}$

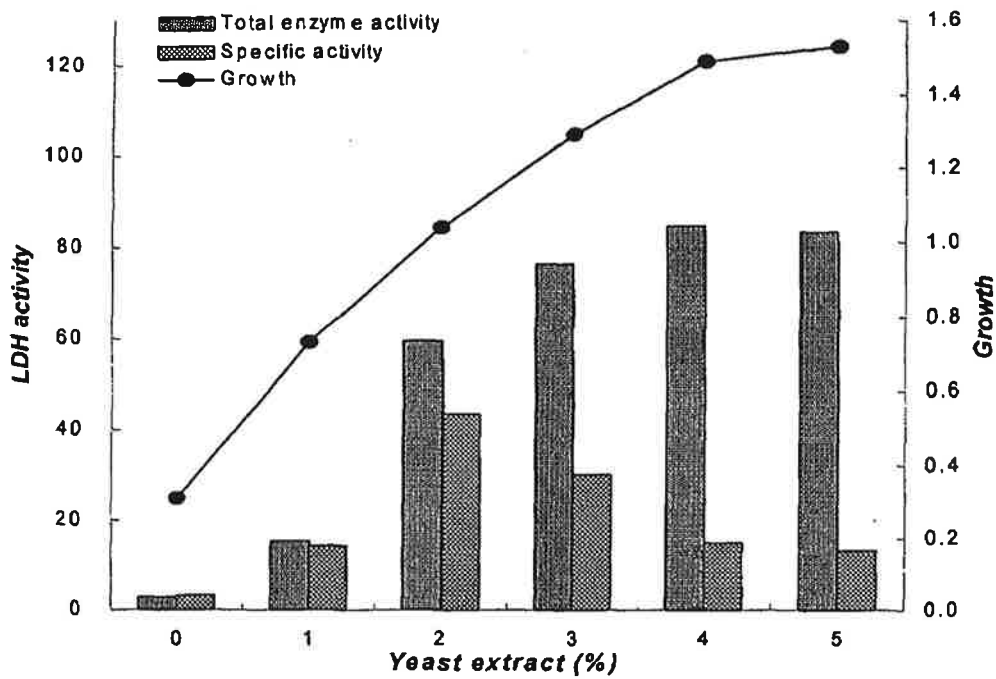


Figure 5. Effect of different concentration of yeast extract on cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

Culture medium contained 1% fructose and 0.1%  $K_2HPO_4$

#### 다. 광물질 공급원이 성장 및 효소 활성화에 미치는 영향

광물질 공급원이 FFy111-1종의 세포 성장과 LDH 활성화에 미치는 영향은 Table 7과 같다. 다양한 광물질 공급원을 magnesium sulfate, manganese sulfate와 monopotassium phosphate 대신에 공급하였다. 미생물 세포는  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{KCl}_2$ 와  $\text{CuSO}_4$ 를 공급할 때 거의 자라지 못한다(성장률, 2%). 그러나, 세포의 성장과 LDH 활성화는  $\text{NaCl}$ 과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 배지에 공급하였을 때 촉진된다. 세포의 성장, 총 효소 활성화와 specific activity는  $\text{NaCl}$ 을 공급하였을 때 105, 108과 120%로 증가하고  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 공급하였을 때 102, 114와 128%가 각각 증가한다. 이러한 결과는  $\text{NaCl}$ 과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 가 미생물의 성장과 효소 활성화에 가장 크게 영향을 끼친다는 것을 보여 준다.

광물질 공급원의 이용에 관한 세부 연구를 위해, FFy111-1종을 다음과 같은 성분(1% glucose, 1% fructose, 1% maltose, 1% yeast extract, 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1%  $\text{NaCl}$ 과 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )이 함유된 배지에 접종시켰다. 세포의 성장과 LDH 활성화에 관한 광물질 공급원의 효과는  $\text{NaCl}$ 과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 각각 제외한 것을 서로 비교하였다. 결과는 Figure 6과 같다. 세포의 성장률은 NK( $\text{NaCl}$ 과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )공급구(1.63)보다  $\text{NaCl}$ 을 제외한 구(2.02)와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 제외한 구(1.66)가 더 높았다. 그러나, 전체 효소 활성화는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 제외한 구가 64.91로  $\text{NaCl}$ 을 제외한 구(84.49)와 NK공급구(94.90)보다 낮았다. specific activity는 NK,  $\text{NaCl}$ 을 제외한 구와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 제외한 구가 각각 10.38, 6.82와 6.30으로 전체 효소 활성화와 유사한 경향을 나타냈다. 결과적으로 세포의 성장에 대조구(1.63)과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1.66)간에 차이가 없어,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 가 세포의 성장에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났으나 효소의 활성화에는 큰 영향이 있는 것으로 나타났다.

결과를 종합해 볼 때, 광물질 공급원으로  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 공급하였을 때 세포의 성장과 LDH 활성화에 가장 좋은 영향을 끼치고, 그 결과는 Table 7에 나타나 있다. 그러므로  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 는 다양한 광물질 공급원 가운데 가장 효과적이라 사료된다.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 다양한 수준에 관한 결과는 Figure 7에 나타나 있다.

세포의 성장과 전체 효소 활성화와 specific activity는 0.01%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 첨가했을 경우 효과가 없었다. 배지 내에 0.05%의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 첨가했을 경우, 세포의 성장과 전체 효소의 활성화와 specific activity는 각각 0.71, 12.39와 11.58로 가장 높은 수치를 나타냈으나  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 0.1%이상 첨가했을 경우 갑자기 낮아졌다.



따라서, 광물질 공급원으로서의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 는 배지내 0.05%가 FFy111-1종의 성장과 LDH 활성을 가장 높게 하는 것으로 나타났다.

Table 7. Effect of mineral sources on the microbial growth and LDH production

Source	Growth	Relative growth	Total enzyme activity	Relative activity	Special activity	Relative specific activity
None	0.43	100	44.68	100	23.64	100
NaCl	0.45	105	48.12	108	28.27	120
$\text{CoSO}_4$	0.01	2	ND		ND	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.44	102	50.99	114	30.17	128
$\text{MgSO}_4$	0.39	91	47.11	105	23.91	101
$\text{CaCl}_2$	0.36	84	27.20	61	23.24	98
KCl	0.01	2	ND		ND	
BaCl	0.40	93	14.91	33	14.76	62
$\text{CuSO}_4$	0.01	2	ND		ND	
$\text{MnSO}_4$	0.37	86	13.11	29	14.90	63

ND : non-detection.

None : basal medium excepted mineral sources.

Relative growth, activity and specific activity : 100% rates by none.

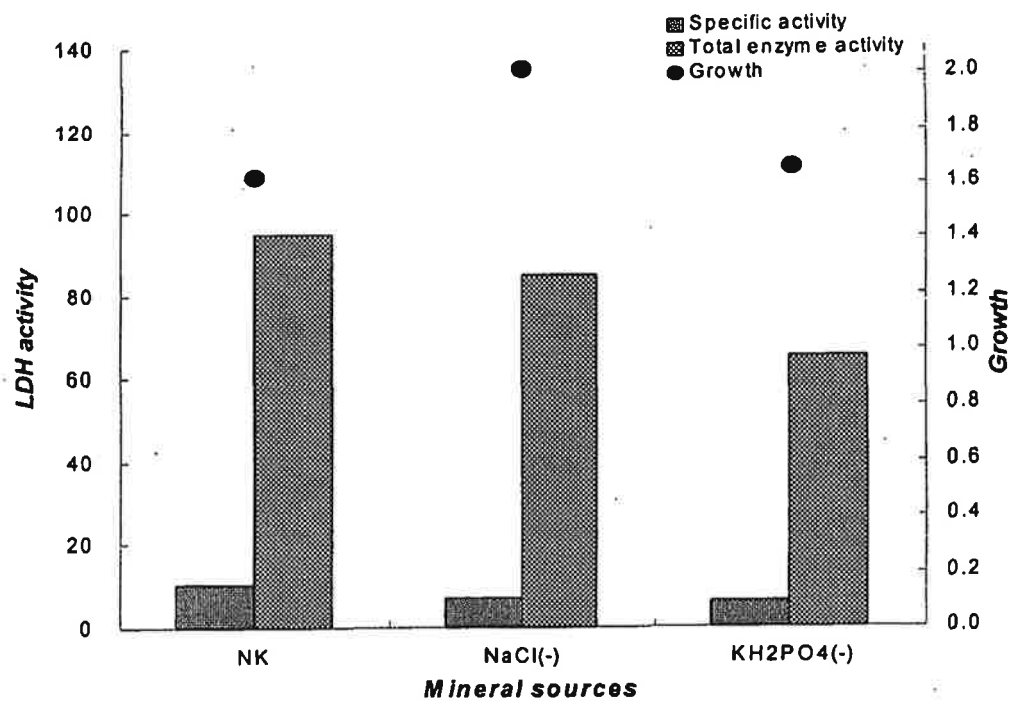


Figure 6. Effect of NaCl and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on the cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in A<sub>650</sub>

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

NK : 1% glucose, 1% fructose, 1% maltose, 1% yeast extract, 1% NH<sub>4</sub>Cl,  
1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl and 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

NaCl (-) : medium excepted NaCl

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (-) : medium excepted KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

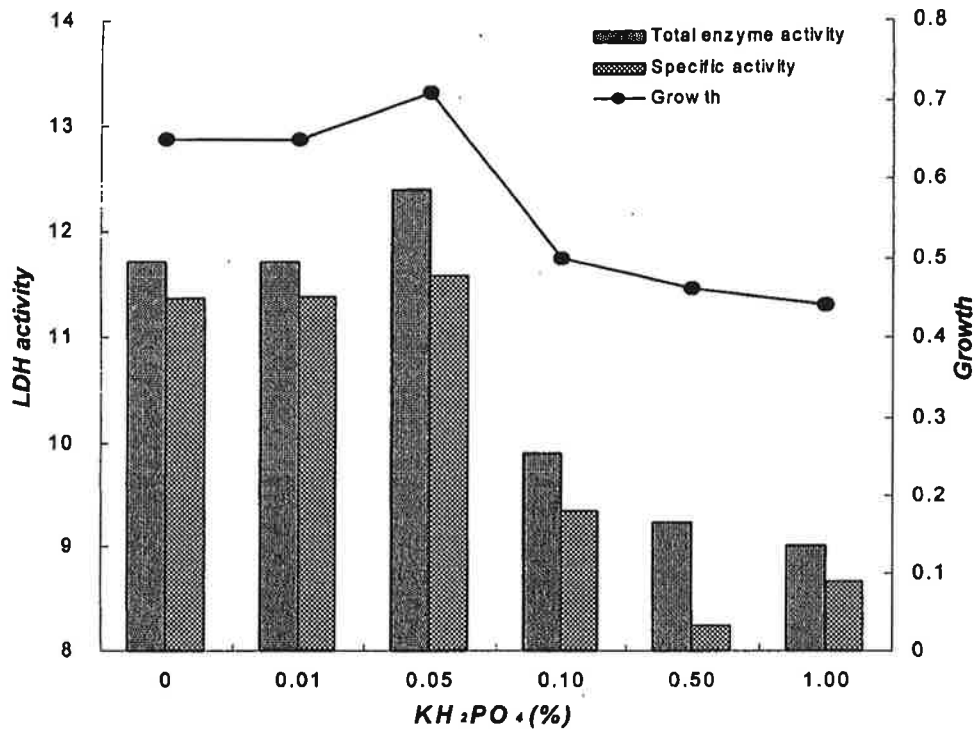


Figure 7. Effect of different concentration of  $KH_2PO_4$  on cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

Culture medium contained 1% glucose, 1% fructose and 0.1% yeast extract

## 라. pH, 온도 및 배양시간이 성장 및 효소 활성에 미치는 영향

pH, 온도와 배양시간에 따른 세포의 성장과 LDH 활성에 관한 영향은 Figure 8, 9와 10에 나타나 있다. 세포의 성장과 LDH 활성에 대한 최적 pH는 Figure 8에 나타난 것과 같이 pH 6.5이다. 세포의 성장은 pH가 높아질수록 증가하였고 최대 성장(0.71)은 pH 6.5와 7.0에서 보여 진다. 또한 전체 효소 활성은 pH 6.5에서 가장 높은 32.66을 나타냈으나 specific activity는 성장이 높아질수록 계속 감소했다.

세포의 성장과 LDH 활성에 대한 최적 온도는 Figure 9에 나타난 것과 같이 30°C이다. 세포의 성장과 전체 효소의 활성은 30°C까지 온도가 증가할수록 높아졌으나 온도가 35°C 이상이 됐을 때 갑자기 낮아졌다. specific activity는 전체 효소 활성이 높아지는 경향과는 반대로 낮아지는 경향을 나타냈다. 이 결과는 전체 효소 활성보다 성장을 더 많이 증가하는 것을 나타낸다. 결과적으로, 최대 성장과 전체 효소 활성은 30°C에서 각각 1.90과 92.22로 나타난다.

배양 시간에 따른 FFy111-1의 성장과 LDH 활성은 Figure 10과 같다. 세포의 성장은 24시간까지 계속 증가하다가 24시간째 2.02와 32시간째 2.04로 변화가 없어졌다. LDH 활성은 전체 효소 활성과 specific activity처럼 24시간까지 계속 증가하다가 갑자기 떨어졌다. 결과적으로 FFy111-1종의 성장과 LDH 활성은 24시간째 각각 A<sub>340</sub>에서 202와 103.89moles reduced NAD/min/mg protein으로 나타났다.

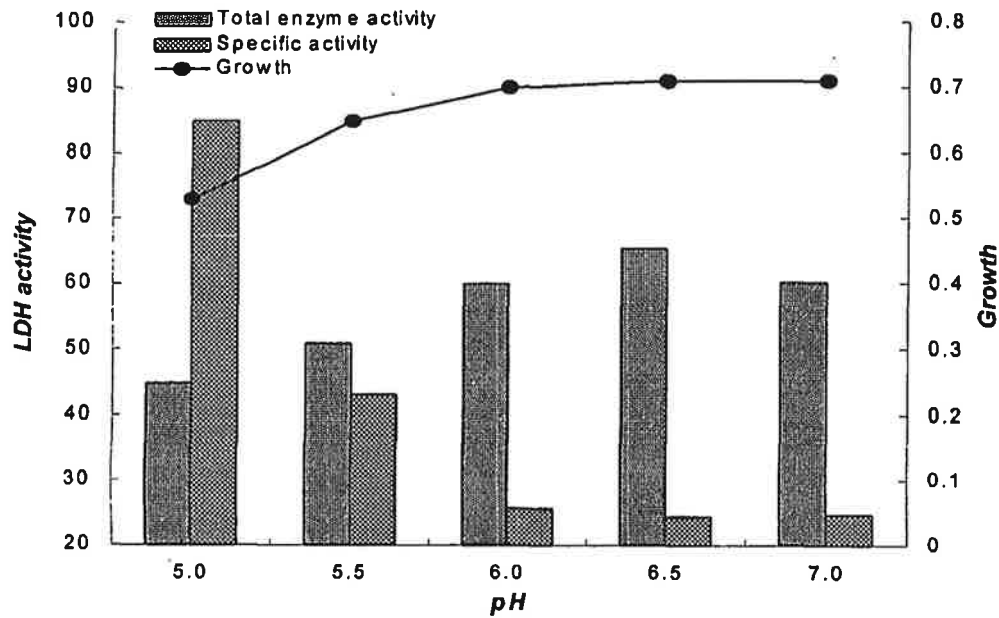


Figure 8. Effect of different pH on cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

Culture medium contained 1% fructose, 1% yeast extract and 0.1%  $KH_2PO_4$

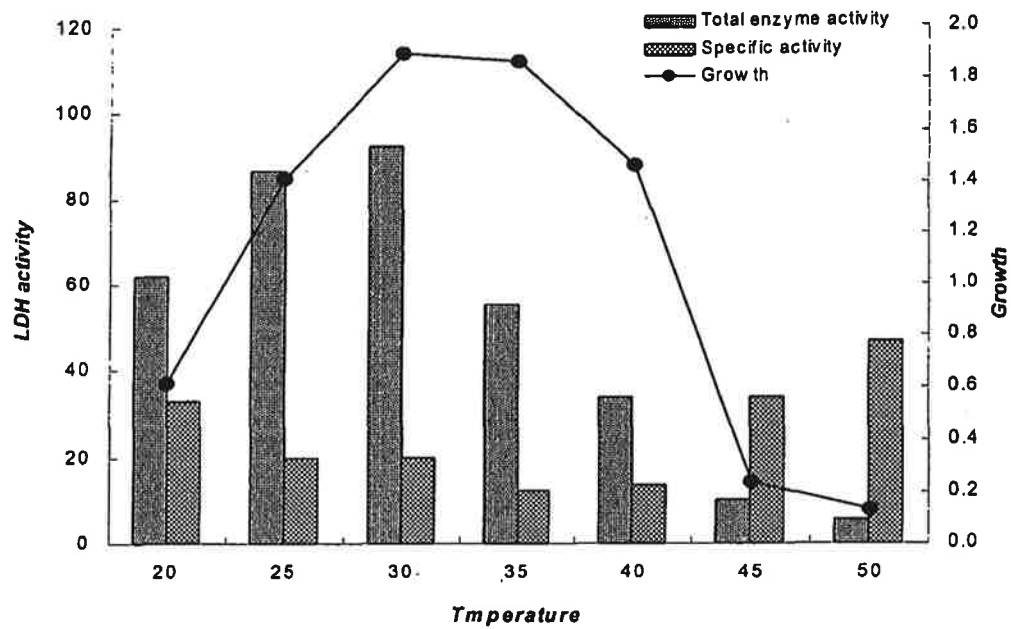


Figure 9. Effect of different temperature on cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in A<sub>650</sub>

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

Culture medium contained 2% fructose, 4% yeast extract and 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

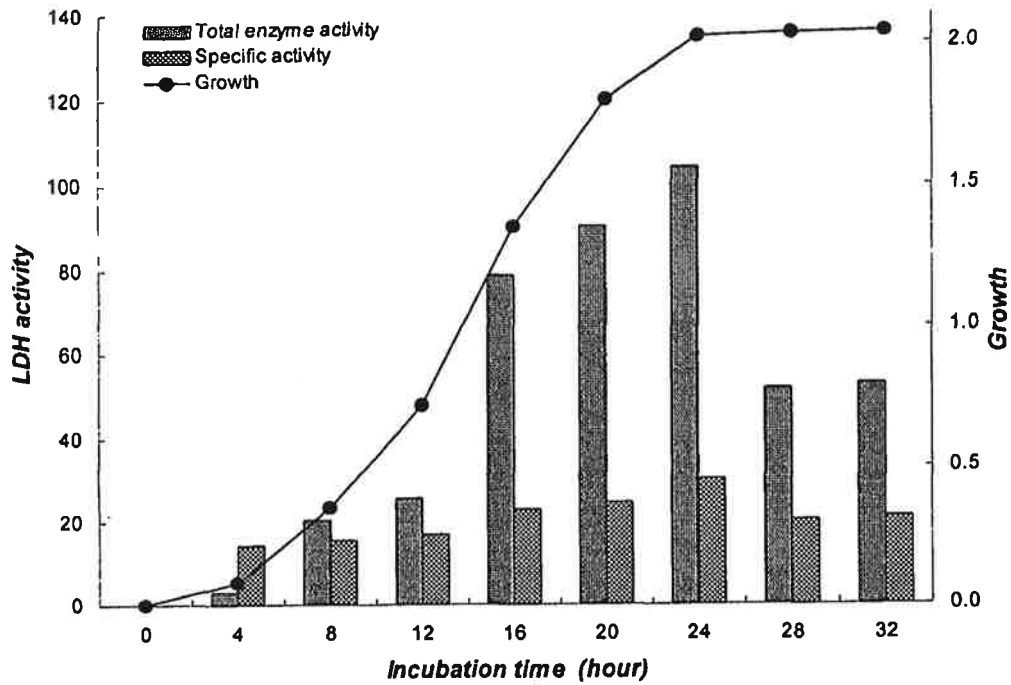


Figure 10. Effect of incubation time on cell growth and LDH activity.

Cell growth : optical density in  $A_{650}$

Total enzyme activity : M reduced NAD/min/ml

Specific activity : M reduced NAD/min/mg protein

Culture medium contained 2% fructose, 4% yeast extract and 0.5%  $KH_2PO_4$

### 제 3 절 *Lactobacillus* sp. FFy111-1로부터 생성되는 lactate dehydrogenase의 특성

#### 1. 서 론

LDH는 유산균 혹은 lactate을 이용하는 bacteria뿐만 아니라 호기성과 혐기성 조건에서 성장하는 bacteria에서도 존재한다. 이 효소는 다른 속과 종, 심지어 효소 작용의 환경 조건에 따라 같은 종에서조차 각기 다른 형태, 기능과 다른 특징을 나타낸다.

많은 lactate dehydrogenase(L-nLDH, EC1.1.1.27; D-nLDH, EC1.1.1.28))는 유산균에서 연구되어졌고(Hensel 등., 1977; Kim 등., 1991; Taguchi와 Ohta, 1992; Ferain 등., 1994), nLDH는 유산균에서보다 다른 bacteria에 존재한다(Javor, 1984; Tindall, 1992; Oren과 Gurevich, 1995). 이 nLDH는 효소작용을 위해서 NAD/NADH가 요구된다. 그러나 조효소로서 NAD/NADH를 사용하지 않는 다른 형태의 LDH는 다양한 bacteria에서 발견된다(Hino와 Kuroda, 1993). 이러한 효소는 NAD-independent LDH로 알려져 있고(D-iLDH, EE1.1.23; L-iLDH, EE1.1.24) 다른 종에서는 다른 기능과 특징을 가지고 있다.

효소 작용을 위한 최적 pH는 종에 따라 다르지만, LDH는 보통 pH6.0-8.0에서 최적의 활동을 한다. 그러나, 어떤 종류의 박테리아는 최적 활동이 5.3, 8.6 혹은 9.6에서 나타난다(Dolle, 1971; Garvie, 1980). lactate가 산화될 때 최적 pH는 보통 pyruvate의 환원을 위한 최적 pH보다 더 높다.

미생물의 LDH는 열에 대한 민감성에서 큰 차이를 보인다. 많은 연구에 있어서 이 효소는 주로 25°C에서 활성화되고, 30°C에서 효소를 분석하는데 사용된다. 그러나 온천에 서식하는 호열성 미생물인 *B. Caldolyticus*의 nLDH의 최적 온도는 55-66°C이고 *Thermotoga maritima*는 55°C이다(Weerkamp, 1972; Wrba 등., 1990).

nLDH의 저해제는 oxamate와 oxalate이고, nLDH 활성화는 L-lactate, D-lactate, D,L-lactate, pyruvate 및 NAD/NADH와 같은 기질의 농도와 종류에 따라 영향을 받는다. 또다른 요인은  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $CuSO_4$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  및 NaCl



과 같은 금속이온과의 결합이다.

미생물의 효소는 효소 작용 범위에서 존재하는 많은 요인들에 의해 각기 다른 특징들을 나타낸다. FFy111-1종은 반추동물 사료에 있어서 direct-fed microbials로 사용하는데 선택하였다. 반추위는 VFA, 온도, pH 및 섭취한 사료와 같은 여러 인자를 가지고 있는데, 이것은 미생물 효소의 작용에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 반추위 환경에 있어서 미생물 효소의 능력을 이해하기 위해서는 효소 작용이 반추위 내에서의 조건과 요인 하에서 평가되어야 한다.

이 실험의 목적은 LDH를 생성하기 위해 선택한 FFy111-1이 생산하는 LDH의 특징을 평가하는 것이다. 이러한 실험은 FFy111-1의 L-nLDH 활성에 있어서 pH, 온도, VFA와 광물질의 영향을 측정하기 위해 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 균주의 선별

반추위 발효시 생성되는 lactate의 축적을 방지하기 위해 선행된 실험을 통해서 LDH 활성이 가장 높다고 밝혀진 FFy111-1을 동치미로부터 분리하였다. 이 미생물을 20% glycerol에서 -20℃에서 보관하였다. 접종액을 10ml TSY 배지가 담긴 40ml test tube에서 2회 계대 배양한 후 250ml의 TSY broth가 담긴 1000ml 삼각 flask에서 39℃, 24시간 동안 배양하였다.

### 나. 배양 온도의 결정

효소 활성의 최적 온도는 다양한 온도(10-60℃)에서 결정하였다. 효소의 열안정성은 효소를 60분간 다양한 온도에서 열처리한 후 활성을 10분 간격으로 측정하였다.

### 다. 배양 pH의 결정

효소 활성에 있어서의 pH의 영향은 다양한 pH(3.0-10.0)에서 아래의 buffer를 이용하여 측정하였다. 효소 분석의 기질은 L-lactate sodium salt로 각각의 buffer에

0.05M이 되도록 조절하였다. 효소의 안정성을 결정하기 위해 효소 활성은 citrate, phosphate, tris와 glycine buffer를 이용해 다양한 pH(3.0-10.0)에서 측정하였다. 0.5ml의 효소액은 같은 양의 buffer와 혼합한 후 L-LDH의 활성을 39℃, 30분간 배양한 후 측정하였다.

이용된 buffer는 다음과 같다.

- pH 3.0-5.0 : 0.05M Citrate - Sodium citrate
- pH 4.0-6.0 : 0.05M Acetate - Sodium acetate
- pH 5.0-8.0 : 0.05M MES sodium salt
- pH 6.0-8.0 : 0.05M Monopotassium phosphate - Disodium phosphate
- pH 7.0-9.0 : 0.05M Monosodium phosphate - Disodium phosphate
- pH 7.0-10.0 : 0.05M Borate - Sodium borate
- pH 9.0-11.0 : 0.05M Glycine

#### 라. L-nLDH 활성에 관한 휘발성 지방산의 효과

효소 활성에 있어서 VFAs의 영향은 acetate, propionate, butyrate, valate, isobutylate와 isovalate를 다양한 농도(10, 20, 30, 40mM)에서 측정하였다. 0.5ml의 효소액을 각각 서로 다른 농도의 휘발성지방산 용액과 혼합하고 39℃, 30분간 배양한 후 L-LDH 활성을 측정하였다.

#### 마. L-nLDH 활성에 관한 금속이온의 효과

L-nLDH 활성에 관한 금속이온의 효과는 2mM과 10mM의 농도에서 측정하였다. 0.5ml의 효소액을 서로 다른 농도의 BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>와 각각 혼합하고 39℃, 30분간 배양한 후 L-LDH 활성을 측정하였다.

#### 바. 조효소의 준비

배양물을 12,000×g, 4℃, 10분간 원심분리시킨 후 상등액은 제거했다. 남은 미생물을 세척한 후 1ml의 tris-HCl buffer(0.05 moles, pH 7.0)넣고 다시 원심분리하였다. 세포추출물은 ultrasonication(VCX 400)을 통해 얻었다. 각 시간대별 파괴되지

많은 세포는 Gram 염색한 후 현미경으로 구분해 냈고 ultrasonication은 10분간(3초간 실행, 5초간 휴지, 20kHz, 40% pulse) 80%이상의 세포가 파괴될 때까지 실행하였다. 원심분리(20,000×g, 10min)를 통해 세포의 파편을 제거한 후, 상등액과 세포추출물을 조효소액으로 사용하였다.

#### 사. Lactate dehydrogenase 분석

Lactate dehydrogenase의 활성 측정은 2장 1절 재료 및 방법의 lactate dehydrogenase 활성 측정법과 동일하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 효소 활성에 미치는 pH의 영향

LDH의 최적 pH는 1970년대와 1980년대의 많은 초기 연구가에 의해 연구되었다(Gasser 등., 1970; Weerkamp 등., 1972; Holland와 Bitchard, 1975; Hensel 등., 1977; Crow and Prichard, 1977; Garvie, 1980). *L. casei*와 *L. curvatus*의 nLDH 활성은 FDP와(또는)  $Mn^{2+}$ 에 영향을 받는다(Gordon and Doelle, 1976; Hensel 등., 1977). lactate가 산화될 때의 최적 pH는 보통 pyruvate 환원될 때의 최적 pH보다 높다. nLDH가 활성을 나타내는 pH의 범위는 pyruvate가 있을 때 *L. casei*의 FDP-activated L(+)-nLDH는 4.5, *L. mesenteroides*의 D(-)-nLDH는 7.8까지 광범위하다(Doelle, 1971; Hensel 등, 1977). 저장을 위해 pH는 효소의 안정성에 중요하다. *S. cremoris*는 pH 6.0-6.5에 안정하나 pH가 알칼리성으로 되면 활성을 잃어버린다(Mou, 1972). *B. rettgeri*의 D(-)-nLDH는 -20°C, pH 7.0이상에서 활성을 잃어버린다(Garvie, 1980).

효소의 활성과 안정성에 대한 pH의 영향은 Figure 11과 12와 같다. L-nLDH의 활성은 재료 및 방법에 있는 buffer를 사용함으로써 pH 3.0-10.0까지 다양하게 측정하였다. *Lactobacillus* sp. FFy111-1가 생성하는 LDH의 최적 pH는 figure 21에 나타난 것과 같이 7.5이다. 효소는 산성 pH보다 알칼리성 pH에서 더 높은 활성을 나타내고, FFy111-1은 pH 7.0-8.5의 범위에서 원래의 효소 활성의 90% 이상을 보여주며 LDH가 활성을 나타내는 pH 범위는 좁은 것으로 나타났다. Dennis와 Kaplan(1960)은 *L. plantarum*의 최적 pH가 7.5라는 것을 발견했고, Gasser 등(1970)은 *L. acidophilus*가 생

성하는 LDH 최적 pH는 7.8이라고 했다. 같은 pH에서 효소 활성의 차이는 pH의 조절과 buffer의 성질에 의한 HCl과 NaOH의 양으로부터 기인된다. LDH는 phosphate, citrate, malate, imidazol 및 histidine과 같이 공통적으로 사용된 buffer 성분에 의해 저해될수 있다(Gordon와 Doelle, 1976; Crow와 Prichard, 1977). *A. viscosus*의 nLDH는 tris-glycine과 sodium acetate에 의해 영향을 받고 저해된다(Brown 등, 1975).

효소는 pH 7.0-8.0에서 가장 높은 안정성을 갖고 pH 6.0-9.0의 범위(93% 이상)에서 안정된 활성을 보여 준다(Figure 12). LDH 활성 (M reduced NAD/min/mg protein)은 pH 6, 7, 8과 9에서 각각 23.12, 24.87, 24.98과 23.73이다. 또한 효소는 높은 알칼리성 pH에서도 높은 활성을 나타낸다(pH 10과 11에서 각각 83과 72%)

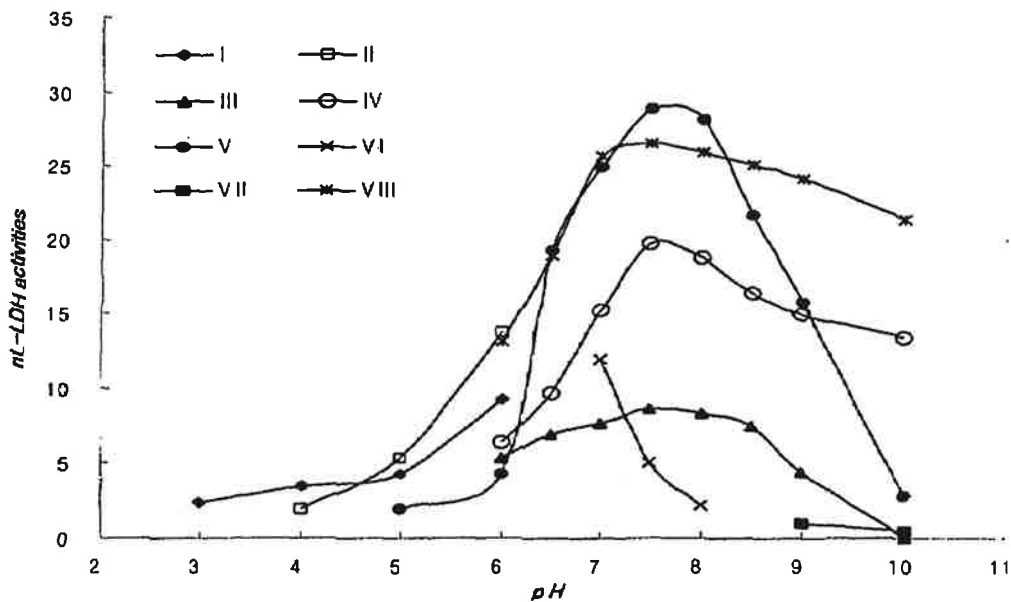


Figure 11. Effect of pH on L-nLDH activities.

L-nLDH : Moles NADH/mg protein/min

I : Citrate-Sodium citrate

II : Acetate-Sodium acetate

III : Mono-Dipotassium phosphate

IV : Mono-Disodium phosphate

V : Tris HCl-Tri

VI : Borate-Sodium borate

VII : Glycin

VIII : MES

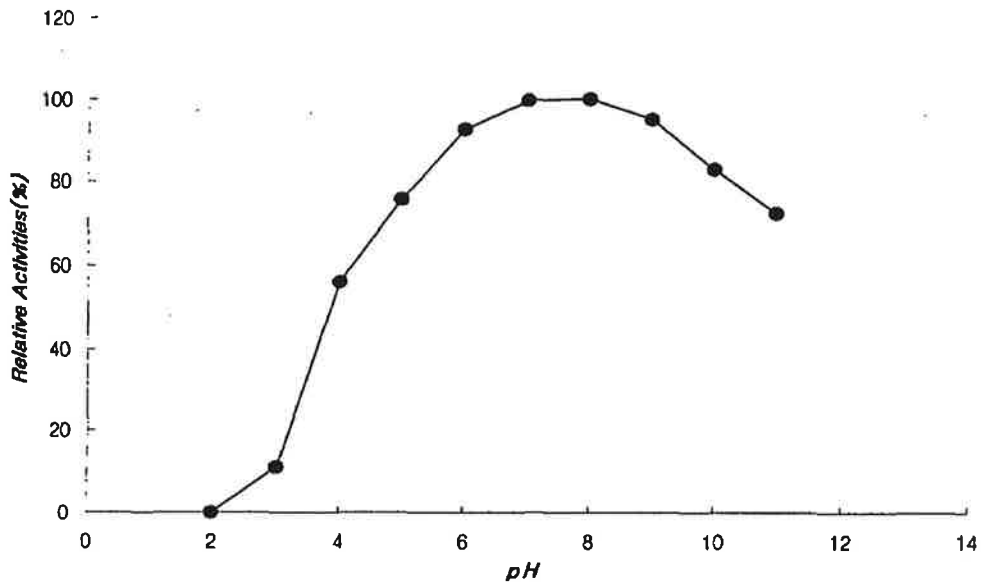


Figure 12. Stability of L-nLDH at different pH.

#### 나. 효소 활성에 있어서 온도의 영향

미생물 nLDH는 온도에 따라 매우 민감하게 변화한다. 이 효소는 일반적으로 25-30℃에서 분석되나 *B. caldolyticus*가 생성하는 nLDH의 최적 온도는 55-60℃이다(Weerkamp 와 Mac Elray, 1972). *L. acidophilus*는 80℃에서 5분 정도면 활성을 잃게 되고 *L. iensenii* 또한 80℃에서 5분 후에 불활성된다(Gasser 등., 1970). Hensel 등(1977)는 *L. casei*가 60℃에서 비교적 안정하나 *L. curvatus*는 60℃에서 불활성화된다고 보고했다. 서로 다른 nLDH의 형태와 서로 다른 종의 nLDH 간에 차이가 있음이 확실하다. 효소의 활성과 안정성에 대한 온도 차이에 관한 결과는 Figure 13과 14에 나타나 있다. FFy111-1의 L-LDH의 활성은 10-70℃의 다양한 범위에서 측정하였다. 최적 온도는 Figure 13에서 보여지듯이 40℃로 나타났다. 효소는 35-45℃에서 98과 95%로 각각 최대 활성을 나타냈다. 그러나 대개 다른 온도(10℃와 60℃에서 각각 31과 35%)에서는 불활성화된다.

열 안정성에 대한 연구에서, 효소액은 다양한 온도(30, 40, 50, 60과 70℃)에서 60분간 열처리를 한 후 남은 활성은 표준 분석 조건하에서 10분 간격으로 측정하였다. LDH는 30℃에서 가장 높은 열 안정성을 보여 준다(Figure 14). 이 온도에서 60분간 배양

시킨 후 남은 효소 활성은 원래 활성의 89%를 나타낸다. 40℃에서 효소 활성은 서서히 감소되고 60분 후에는 78%를 나타낸다. 그러나 배양액을 50℃ 이상의 온도에서 배양했을 때 효소 활성은 빠르게 불활성화된다. 50과 60℃에서의 남은 효소 활성은 원래 효소 활성의 37과 30%이고 효소 활성의 반감기는 70℃에서 10분이다.

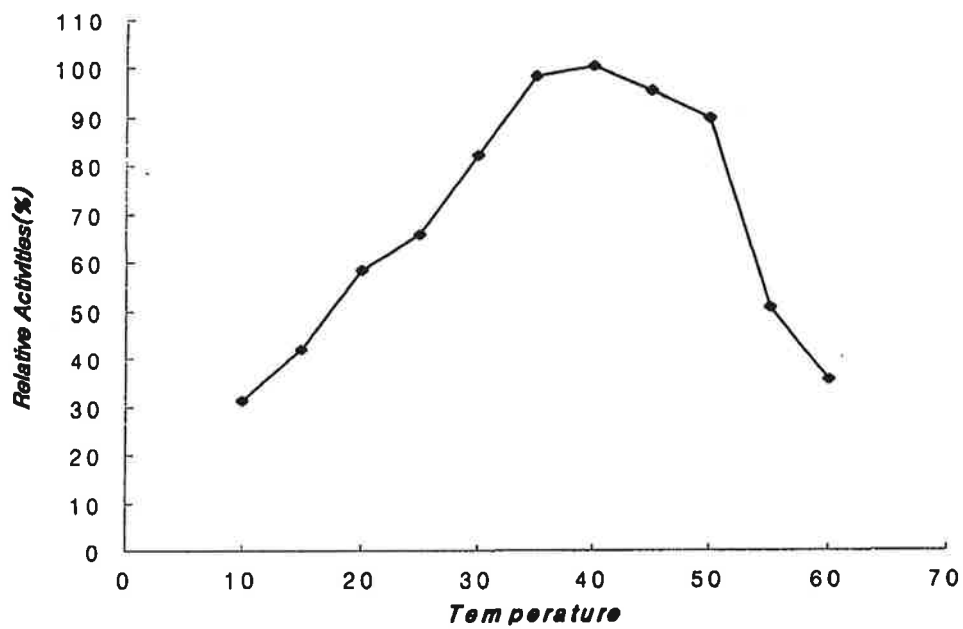


Figure 13. Effect of temperature on L-nLDH activity.

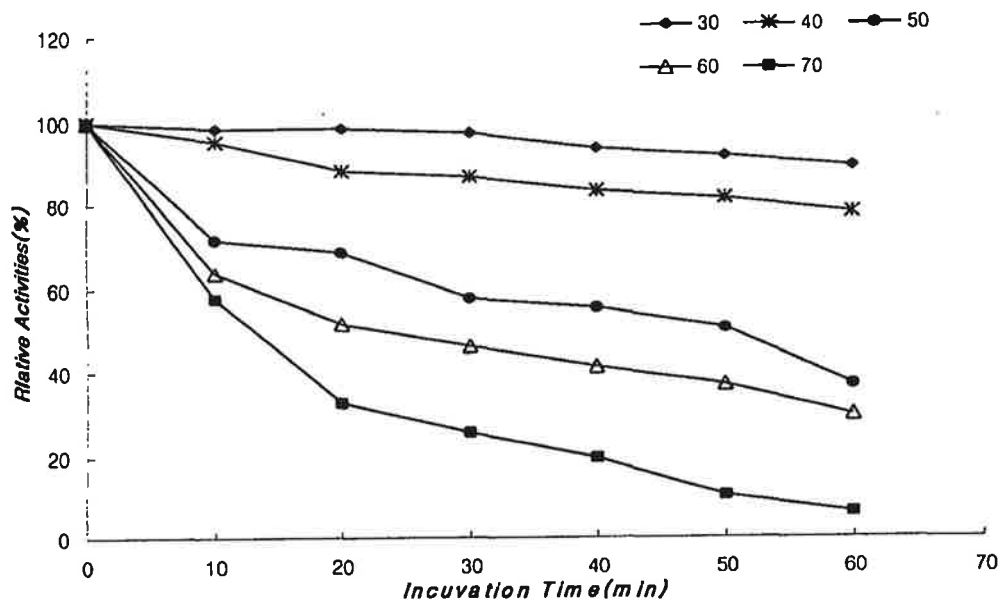


Figure 14. Thermal stability of L-nLDH at different temperature (30, 40, 50, 60 and 70°C).

#### 다. 효소 활성에 있어서의 휘발성 지방산의 영향

미생물 효소는 효소 반응 영역 안에 존재하는 많은 요인에 의해 다른 성질을 보여 주게 된다. FFy111-1은 반추동물의 DFM에 적용시키기 위해 선별되었다. 반추위는 VFAs, 온도, pH, 섭취된 사료와 같은 많은 요인을 갖는다.

VFAs는 효소 반응 영역에 있어서 낮은 pH를 나타내기 때문에 반추위의 많은 요인들 가운데 중요하다. Brown 등(1975)은 미생물 LDH 활성이 sodiumacetate에 의해 저해된다고 보고했다. Crow와 Prichard(1977)는 citrate가 존재할 경우 LDH가 불활성화되는 것을 관찰했다. 불활성 인자로서 VFAs의 역할은 Figure 15에 나타나 있다. L-nLDH 활성에 있어 VFAs의 영향은 VFAs의 다양한 농도에서 39°C, 30분 배양한 후 효소 활성을 측정하였다. 효소의 활성은 모든 VFAs 처리에 의해 활성을 잃게 된다. 효소액은 VFAs가 10mM 농도로 처리되었을 때 효소 활성이 acetate, propionate와 butyrate로 처리한 구에서 각각 처리하지 않은 대조구의 효소 활성의 88, 90과 88%로 서서히 감소된다. 그러나 valate, isobutyrate와 isovalate에서 각각 59, 75와 60%로 갑자기 감소한다. L-nLDH는 VFAs의 함유량이 증가함에 따라 강하게 불활성화 된다.

효소 활성의 반감기는 acetate와 butyrate의 10mM에서 나타나고, 10mM의 다른 산으로 처리한 효소는 원래 활성의 50% 이하로 감소된다. 효소는 valate와 isovalate의 40mM에 의해 완전하게 불활성화되고, acetate, propionate, butyrate와 isobutyrate 내에서 단지 2-5%의 활성만이 남게 된다.

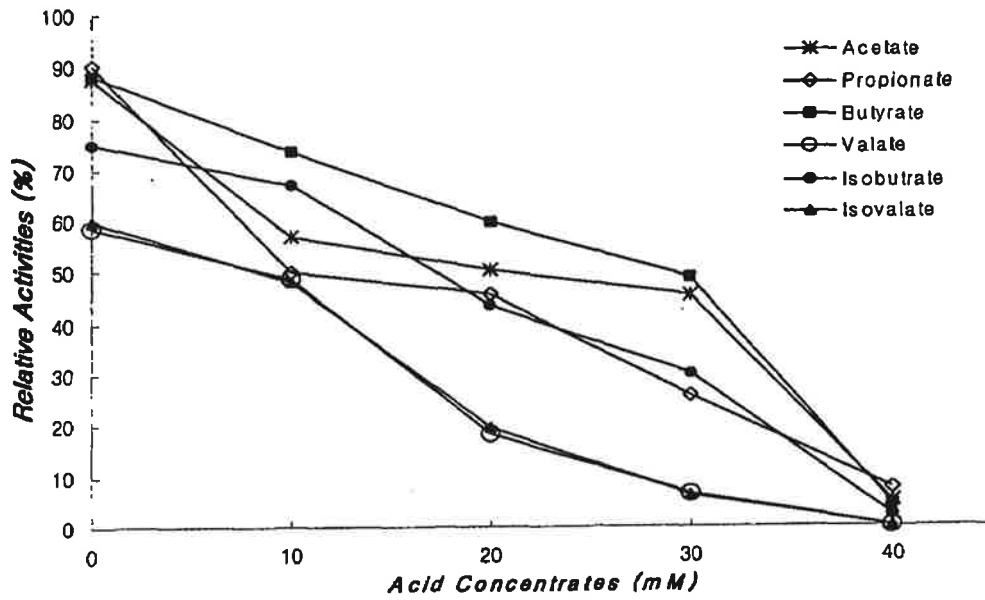


Figure 15. Effect of volatile fatty acids on L-nLDH activities.



### 라. 효소 활성화에 있어서 금속이온의 영향

LDH의 저해와 활성화는 초기 연구자들(Crow and Prichard, 1977; Garvie, 1980)에 의해 연구되었다. Hensel 등. (1977)은 효소 활성이  $Cd^{2+}$ 에 의해 불활성화되고  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ 와  $Ca^{2+}$ 에 의해 영향을 받지 않는다고 보고했다. Gordon과 Doelle(1974)는  $HgCl_2$ 와  $CuSO_4$ 의 LDH의 불활성화와  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $MgCl_2$ 와  $MnCl_2$ 가 LDH를 활성화시킨다는 것을 관찰했다. 이러한 결과는 다른 연구가에 의해 증명되었다(Dynon 등., 1972; Crow and Prichard, 1977; Garvie, 1980).

활성인자와 불활성인자로서의 금속이온의 역할은 Table 8과 같다. L-nLDH 활성화에 영향을 미치는 금속이온은  $39^{\circ}C$ , 30분간 배양시키며 2와 10mM의 금속이온을 첨가한 후 효소의 활성을 측정하였다. 효소의 활성화는  $BaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ 와  $FeSO_4$ 에 의해 증가된다. 특히 L-nLDH 활성화는 2mM의  $BaCl_2$ 와  $MnSO_4$ 에 의해 각각 원래 활성화에 비해 127와 124% 증가된다. 그러나, 효소의 활성화는 2mM의  $NaCl$ 과  $CuSO_4$ 에 의해 매우 불활성화되고, 10mM의  $CuSO_4$ 에 의해 강하게 불활성화된다.

Table 8. Effect of metal ion on L-nLDH activities

Source	2 mM		10 mM	
	Enzyme activity	Enzyme activity	Enzyme activity	Enzyme activity
None	32.69 ± 1.34	100	32.69 ± 1.34	100
$BaCl_2$	41.51 ± 2.04	127	39.22 ± 0.96	120
$ZnCl_2$	33.34 ± 3.21	102	34.65 ± 1.32	106
$CoCl_2$	33.01 ± 2.58	101	35.63 ± 2.39	109
$CaCl_2$	36.61 ± 1.87	112	34.97 ± 3.98	107
$NaCl$	32.03 ± 0.98	98	35.95 ± 2.10	110
$KCl$	34.97 ± 1.65	107	33.67 ± 2.25	103
$MgSO_4$	35.63 ± 0.78	109	37.91 ± 3.21	116
$MnSO_4$	40.53 ± 3.21	124	37.59 ± 2.88	115
$CuSO_4$	32.36 ± 1.05	99	12.42 ± 5.03	38
$FeSO_4$	35.63 ± 0.95	109	36.28 ± 1.75	111

Enzyme activity : M NADH per mg protein per min.

## 제4절 Lactate dehydrogenase의 공급이 in vitro 상에서 lactic acid 축적에 미치는 영향

### 1. 서 론

식물성 섬유소는 재생될 수 있고 반추동물이 이용하여 양질의 축산물을 만들 수 있는 가장 풍부한 자원이다. 반추동물은 반추위 내 미생물의 도움 없이는 이러한 중요한 기능을 수행할 수 없다. 비반추동물은 사료 내 구조적 탄수화물(cellulose와 hemicellulose)을 이용할 수 없으나, 반추동물은 반추위 미생물의 발효에 의해 이를 이용할 수 있다. 반추위 발효에 의해, 사료는 미생물체와 휘발성지방산, 메탄, 암모니아, lactate와 열로 합성된다. 반추동물은 VFA와 미생물체 단백질을 각각 에너지원과 단백질 공급원으로 이용한다.

반추위 미생물은 반추위내에서 섬유소를 분해하는 주된 역할을 하고 있다(Demeyer, 1981). 그러나 반추동물이 최적 반추위 소화를 위해 섬유질 사료를 공급받는다해도, 높은 생산성을 가진 가축에게는 에너지원의 수준이 높은 사료(곡물이나 사일리지)를 급여해야 한다. 이러한 사료(특히 사료의 에너지 농도가 높은 곡류)는 집약적인 사양 관리를 통해 높은 생산성을 가지게 한다. 왜냐하면, 전분이 곡류의 주된 에너지 조성 이기 때문이다. 그러나, 농후사료의 과도한 섭취는 *Streptococcus bovis*와 *Lactobacillus* sp.와 같은 반추위 미생물의 증식을 빠르게 하여 많은 양의 lactic acid를 생성하고 미생물의 성장을 줄이게 된다(Hungate 등., 1952; Slyter, 1976; Mackie and Gilchrist, 1979). lactic acid(pK 3.9 versus 4.8 for lactic acid)는 VFAs에 비해 상당히 강한 산이기 때문에, *S. bovis*가 늘어 나게 되면 종종 반추위의 pH가 낮아지고(<6.0) 반추위의 기능 장애를 초래한다(Slyter, 1976). 반추위의 바람직한 pH는 6.0-7.0 정도이나 유산균은 lactate의 축적과 반추위의 낮은 pH를 유발한다. 임상적 진단은 반추위와 혈액의 산도를 측정하는데 의존하고, 반추위의 pH가 5.6과 5.2일 때를 각각 만성 acidosis와 급성 acidosis라 한다(Owens 등, 1998). 반추위의 높은 산도는 반추위 내에서 유산생성균의 성장을 촉진하고, protozoa와 lactate를 생성하지 않는 균이 사멸하도록 하며, 반추위벽의 근육 활성을 저해하고(반추위 벽의 papillae나 finger-like projection의 기

능을 저해하여), 필수 VFAs의 흡수를 급격히 낮추고, 반추위벽의 염증을 유발하고, 전해질의 불균형과 체액의 반추위로의 급격한 유입으로 인한 체내 조직의 탈수 등으로 인하여 미생물의 불균형을 초래한다.

본 실험의 목적은 반추동물에게 미생물의 lactate dehydrogenase를 공급하여 반추위 내 lactate 축적을 방지하고 lactate의 이용성을 제고하여 반추동물의 사료 이용성의 전체적인 효과를 증가시키기 위한 direct-fed microbials로 이용 가능성을 조사하는 것이다. 그러므로, 그 첫 번째 단계는 산성 사료에 의한 lactic acidosis를 in vitro 상에서 감소시키는 것에 관한 것이고 두 번째 단계는 in vitro 상에서 산성 반추위액에 미생물의 효소를 첨가하여 lactate의 감소 효과를 측정하는 것이다. 마지막 단계는 살아 있는 LDH 생성 미생물을 in vitro 상에서 lactate가 축적된 반추위 발효에 공급한 효과를 살펴보는 것이다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Direct-fed microbials의 준비

LDH의 활성이 높게 나타난 C21-1, F48, F180, F110-8과 FFy111-1을 반추위액, 분, 토양과 동치미로부터 분리하여 반추위 발효 중 lactate의 축적을 방지하기 위해 준비하였다. 분리한 균을 20%의 glycerol에서 -20℃에서 보관하였다. 접종액을 10ml TSY 배지가 담긴 40ml test tube에서 2회 계대 배양한 후 TSY 배지에서 39℃에서 24-36시간 동안 배양하였다.

### 나. 조효소액의 제조

배양물을 12,000×g, 4℃, 10분간 원심분리시킨 후 상등액은 제거했다. 남은 미생물을 세척한 후 1ml의 tris-HCl buffer(0.05 moles, pH 7.0)넣고 다시 원심분리하였다. 세포추출물은 ultrasonication(VCX 400)을 통해 얻었다. 각 시간대별 파괴되지 않은 세포는 Gram 염색한 후 현미경으로 구분해 냈고 ultrasonication은 10분간(3초간 실행, 5초간 휴지, 20kHz, 40% pulse) 80%이상의 세포가 파괴될 때까지 실행하였다. 원심분리(20,000×g, 10min)를 통해 세포의 파편을 제거한 후, 상등액과 세포추출물을

조효소액으로 사용하였다.

### 다. *In vitro* 상에서 발효의 준비

반추위액은 fistula가 장착된 Holstein 젖소(550kg)에서 채취하였다. 사료 급여는 벃짚을 자유채식시키고 농후사료를 4주이상 6kg으로 제한 급여하였다. 반추위액과 내용물은 오전 사료급여 후 6시간째 채취하고, 4겹의 cheesecloth로 걸러 사용하였다. 이 작업은 혐기적인 상태에서 이루어졌다.

*In vitro* 실험은 50ml의 serum bottle에 butyl rubber stopper와 one-way gas release tube를 장착하여 사용하였다. 30ml의 반추위액을 serum bottle에 넣고 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas를 주사기로 넣어 실험에 이용하였다. 배양은 shaking incubator를 사용하여 39°C, 80rpm에서 실시하였다.

### 라. *In vitro* lactic acidosis의 발현

배지는 Limmin Kung(1995)의 방법을 기본으로 하여 변형하여 사용하였다. lactic acidosis의 발현은 정제된 기질로 55% soluble starch, 26% glucose, 6% cellulose, 7% cellobiose와 6% trypticase를 포함하게 하여 이용하였다. *in vitro* lactic acidosis를 유발하기 위해, 반추위액에 다양한 수준, 즉 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0과 10.0%의 산성 사료를 첨가하고 39°C에서 24시간 동안 80rpm으로 shaking incubator를 사용하여 배양하였다. 배양액으로부터 VFAs, lactic acid와 pH를 분석하였다.

### 마. 산성 반추위액 내 lactate에 대한 조효소액의 효과

산성 반추위액은 산성 사료를 2.0%(exp I), 2.5%(exp II)와 3.0%(exp III) 첨가한 *in vitro* 반추위액을 39°C, 24시간 동안 배양하여 사용하였다. LDH 효소반응을 위하여, 조효소액은 단백질의 동일한 농도에 맞춰 0.2ml(S108, Fy110-8, C21-1, FFy111-1과 F48)을 산성 반추위액 1.8ml와 혼합하였고, 이 혼합물을 39°C, 30분간 배양하였다. 대조구는 조효소액의 준비를 위해 tris buffer로 처리하였다. lactate가 LDH에 의해 감소된다는 것을 증명하기 위해, 하나의 처리구는 D,L-LDH(commercial

enzyme purified, L-nLDH : D-nLDH = 1:1)을 이용하였다. 배양액으로부터 lactate, acetate와 pyruvate를 분석하였다.

#### 바. *In vitro* lactic acidosis에서 생균의 효과

*In vitro* 상에서 2.5%의 산성 사료를 첨가하여 lactic acidosis를 유발하였다. *in vitro* 반추위 배양물에 S108, F48과 FFy111-1의 미생물 세포를 첨가하였다. 미생물 세포의 총량은 약 1g이고 접종하기 전에 증류수 1.2ml에 희석시켰다. Exp I는 미생물 세포를 24시간 동안 4시간의 간격을 두고 5차례 첨가하였다. Exp II와 Exp III는 배양 12시간 후부터 2시간의 간격을 두고 4차례 첨가하여 총 실험 시간이 20시간이었다. 대조구는 미생물 세포를 세척한 증류수로 처리하였다. *in vitro* 배양액으로부터 lactate, acetate, pyruvate와 pH를 분석하였다.

#### 사. 휘발성 지방산의 분석

배양액을 0.45  $\mu$ m의 disposable filter로 여과하고 gas chromatography (Varian 6000)으로 2-m, 2-mm, macro bore Carbowax M column(Supelco, Bellefonte, PA)을 이용하여 분석하였다. 질소를 carrier gas로 flow rate를 25ml/min으로 사용하였다. 시료 1  $\mu$ l를 split ratio 8:1로 주입하였다. 주입구의 온도는 170 $^{\circ}$ C이고 detector 온도는 180 $^{\circ}$ C였다. oven의 온도는 160 $^{\circ}$ C에서 2분간, 분당 13 $^{\circ}$ C씩 높아져 180 $^{\circ}$ C에서 7분을 유지시켰다.

#### 아. Lactate, acetate와 pyruvate의 분석

배양액을 0.45  $\mu$ m의 disposable filter로 여과하고 HPLC(Performance Liquid Chromatography, Varian 9012)으로 Carboxylic Acid Column(spherisorb Octyl, 25cm $\times$ 4.6mm ID,  $\mu$ m particles; Supelco)을 이용하여 분석하였다. 0.2M phosphoric acid를 carrier fluid로 flow를 0.8ml/min으로 사용하였다. 20  $\mu$ l의 시료를 microsyringe로 주입하였고 final holding time을 10분으로 하였다. 검출은 A<sub>210</sub>에서 UV spectrophotometer(Barian 9050)으로 수행하였다.

## 자. 통계분석

자료는 PC-SAS(SAS Institute Inc, 1985)을 통해 Duncan multiple range test로 분석하였다( $P < 0.05$ ).

## 3. 결과 및 고찰

### 가. 산성 사료에 의해 *in vitro* lactic acidosis의 유발

Lactic acidosis의 주된 원인은 반추위 내에서 lactic acid의 전구물질이 될 수 있는 탄수화물의 양이 많은 사료를 과잉 공급했기 때문이다. 대체로, 전분, sucrose, lactose 또는 glucose를 다량 함유하고 있는 사료이다(Herrera-Saldana 등., 1990; Zinn, 1991; Larson 등., 1993; Poore 등., 1993). 많은 lactic acid의 축적을 유도할 수 있는 탄수화물은 전분, maltose, sucrose, cellobios, fructose와 glucose이다(Dunlop, 1972). 이것들은 반추위 lactic acidosis를 일으킬 수 있다(Limmin Kung, 1995).

*in vitro* lactic acidosis를 유발하기 위해, 본 연구에서는 soluble starch, glucose, cellulose와 trypticase를 혼합한 산성 사료를 다양한 농도로 이용하였다. 산성 사료에 의한 *in vitro* 발효의 결과는 Figure 16과 Table 9와 같다.

배양물의 pH는 배양 초기에는 대개  $6.75 \pm 0.29$ 였으나, 산성 사료를 2.0% 이상 첨가하였을 때 5.0 이하로 떨어졌다(Figure 16). 산성 사료를 2.0과 2.5% 첨가하였을 때 pH는  $4.93 \pm 0.12$ 와  $4.70 \pm 0.10$ 으로 감소하였고, 산성사료가 10.0%일 때 pH는  $4.17 \pm 0.08$ 로 감소하였다. 배양액 내 lactate의 농도는 Figure 16과 같다. lactate는 배양 초기, 대조구와 1.0%의 산성 사료 첨가구에서는 측정할 수 없었고 1.5% 이상의 산성 사료를 첨가하였을 때 생성되었다. 2.0과 2.5%의 산성 사료를 첨가하였을 때, lactate는  $18.85 \pm 3.53\text{mM}$ 과  $38.21 \pm 7.14\text{mM}$ 이 증가하였다. lactate의 축적은 산성 사료의 공급량이 많아질수록 높아졌고, 10.0%의 산성 사료를 배양액에 첨가했을 때  $127 \pm 4.17\text{mM}$ 이 되었다. pH와 lactate의 결과의 연관성을 볼 때, lactate는 산성 사료를 배양액 내 1.5% 이상 급여했을 때 생성된다.

*In vitro* 발효에서의 VFAs의 변화는 Table 9와 같다. 전체 VFAs, propionate, valate

와 butyrate는 산성 사료의 양이 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타냈으나 acetate는 모든 산성 사료 첨가구에서 감소했다. 산성 사료 첨가구에서 acetate와 propionate(A/P ratio)의 변화는 acetate가 감소하고 propionate가 증가하게 된다. 전체 VFAs는 증가하는 경향을 보이는데 이것은 반추위 미생물이 탄수화물을 계속 유기산으로 발효했기 때문이다. 그러나 다른 VFAs는 지속적인 변화를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 다른 연구자의 결과와 유사했다(Slyter와 Rumsey, 1991; Krehbiel 등., 1995).

상기 결과로, 2.5%의 산성 사료 공급을 lactate의 축적을 방지하기 위한 다음 실험의 *in vitro* lactic acidosis를 유발하는데 선택하였다.

발효되는 20시간 동안의 lactate, acetate, pyruvate와 pH의 변화는 Figure 17과 같다. 발효되는 동안 lactate의 축적은 빠르게 증가하고 pH는 산의 생성에 의해 빠르게 감소했다. 배양물의 pH와 lactate는 배양 초기에 각각 6.49와 0mM이었으나, 배양후 20시간 후에는 4.59와 46.65mM이 되었다. acetate는 0시간째 7.63mM에서 8시간째 12.89mM로 빠르게 증가했고 20시간째는 13.71mM로 천천히 증가하였다. pyruvate는 0시간째 3.01mM에서 20시간째 3.10mM로 증가하는 경향을 나타냈다. 초기 *in vitro* 연구에서(Mackie 등, 1984; Tung과 Kung, 1993; Kung과 Hession, 1995), 반추위내 탄수화물을 급속히 분해시킴으로써 *in vitro* lactic acidosis를 유발시키는데 성공하였다.

Table 9. Effect of acidic feeds on rumen volatile fatty acids in in vitro ruminal fermentation

Item	VFAs contraction		
	Iniciate	None	1.0%
<b>Acidic feeds</b>			
Total VFA, mM/L	114.00 ± 6.53	122.03 ± 12.42	167.35 ± 11.67
Acetic acid, molar %	72.71 ± 1.29	68.58 ± 1.80	64.68 ± 0.18
Propionic acid, molar %	10.81 ± 1.47	12.45 ± 1.65	13.58 ± 0.08
Isobutric acid, molar %	0.81 ± 0.05	1.42 ± 0.34	0.92 ± 0.23
Butric acid, molar %	13.87 ± 0.49	14.18 ± 0.88	14.68 ± 0.71
Isovaleric acid, molar %	0.84 ± 0.23	1.20 ± 0.18	1.32 ± 0.21
Vaeric acid, molar %	0.98 ± 0.03	1.18 ± 0.21	1.44 ± 0.01
A/P ratio	6.73 ± 1.04	5.51 ± 0.88	4.76 ± 0.02
<b>Acidic feeds</b>	<b>1.5%</b>	<b>2.0%</b>	<b>2.5%</b>
Total VFA, mM/L	177.85 ± 10.88	168.24 ± 11.91	144.67 ± 3.13
Acetic acid, molar %	62.40 ± 0.59	56.37 ± 0.20	51.08 ± 11.75
Propionic acid, molar %	14.31 ± 0.45	16.49 ± 2.70	19.68 ± 0.71
Isobutric acid, molar %	0.84 ± 0.11	3.25 ± 3.15	1.05 ± 0.31
Butric acid, molar %	15.80 ± 0.42	16.91 ± 2.70	21.59 ± 1.47
Isovaleric acid, molar %	0.88 ± 0.13	3.41 ± 1.22	0.99 ± 0.08
Vaeric acid, molar %	1.33 ± 0.52	3.58 ± 2.46	2.12 ± 1.65
A/P ratio	0.18 ± 4.36	3.42 ± 0.56	2.60 ± 0.53
<b>Acidic feeds</b>	<b>3.0%</b>	<b>4.0%</b>	<b>5.0%</b>
Total VFA, mM/L	140.19 ± 14.62	152.47 ± 19.32	136.56 ± 13.68
Acetic acid, molar %	60.48 ± 3.03	59.94 ± 9.65	56.51 ± 13.96
Propionic acid, molar %	16.54 ± 0.58	13.57 ± 3.12	15.29 ± 4.21
Isobutric acid, molar %	0.72 ± 0.11	0.69 ± 1.53	0.88 ± 0.05
Butric acid, molar %	17.95 ± 0.19	17.11 ± 1.31	17.92 ± 2.30
Isovaleric acid, molar %	0.86 ± 0.11	0.96 ± 0.8	0.69 ± 0.11
Vaeric acid, molar %	3.46 ± 1.15	7.73 ± 1.21	8.71 ± 1.09
A/P ratio	3.66 ± 0.06	4.42 ± 0.65	3.70 ± 0.68



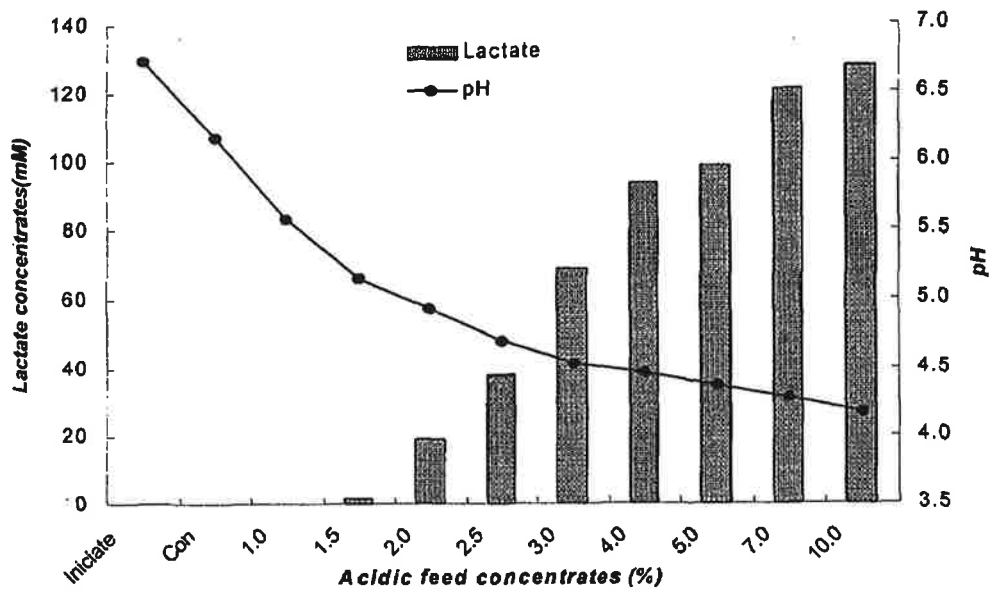


Figure 16. The effect of acidic feeds on in vitro lactate accumulation and pH in ruminal fermentation.

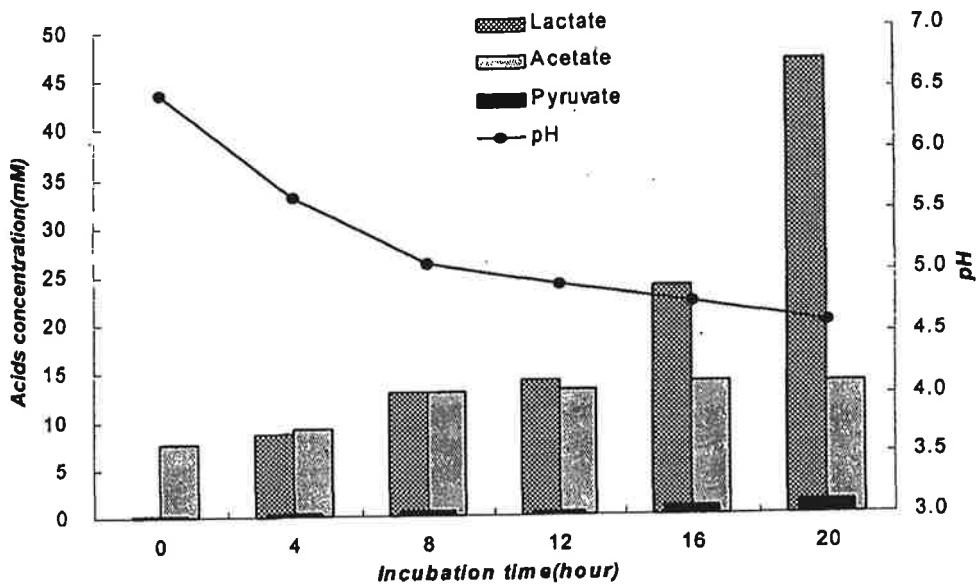


Figure 17. Process of in vitro lactic acidosis by supplementing 2.5% acidic feeds within ruminal fermentation.

#### 나. *In vitro* ruminal acidosis에 의한 lactate 축적에 대한 조효소의 효과

미생물 효소는 효소의 활성영역 주위의 많은 요인들로 인해 다른 활성을 나타낸다. 초기 연구는 LDH 활성이 온도, pH와 광물질, oxalate에 의해 영향을 받는다고 하였고(Wrba, 1990), 다른 LDH의 활성은 이러한 초기 연구의 결과에 의해 증명되었다. 반추위액 내 많은 요인들은 효소에 영향을 미칠 수 있고(Russel, 1985; Dehority, 1991; Weimer, 1992, 1996), VFAs, 광물질, pH, 섭취된 사료, 미생물과 미생물에 의해 생성된 효소가 LDH에 영향을 미친다.

산성 반추위액 내 lactate와 다른 산이 미생물 효소에 미치는 효과는 Table 10과 같다. 본 실험은 산성 반추위액에 산성 사료의 농도를 각각 다르게 첨가하여 (Exp I, 2.0%; Exp II, 2.5%; Exp III, 3.0%) 수행하였다.

Exp I에서 lactate는 대조구( $26.94 \pm 2.35\text{mM}$ )보다 S108종을 제외하고 조효소액을 첨가한 것이 낮았고( $27.21 \pm 0.95\text{mM}$ ), Exp II와 III에서는 미생물 조효소액을 첨가한 모든

처리구에서 lactate가 낮았다. 특히 FFy111-1종(평균 :  $33.64 \pm 13.86\text{mM}$ )은 다른 처리구와 대조구(S108,  $41.62 \pm 19.24\text{mM}$ ; Fy110-8,  $38.55 \pm 18.29\text{mM}$ ; C21-1,  $39.07 \pm 21.07\text{mM}$ ; F48,  $36.27 \pm 16.82$ ; control,  $43.08 \pm 18.77$ )에 비해 가장 낮은 lactate 수준을 나타냈다. Acetate의 농도는 조효소 처리에 의해 지속적인 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 즉 조효소를 처리한 것은  $15.86 \pm 5.82$ 에서  $18.00 \pm 8.54\text{mM}$ 으로 나타났고 처리하지 않은 것은  $16.60 \pm 7.55\text{mM}$ 으로 나타났다.

Exp. I, Exp. II와 Exp. III에서, 조효소 처리구의 pyruvate 함량은 대조구( $1.48 \pm 1.61\text{mM}$ )와 비교할 때 높은 수준을 나타냈고( $2.97 \pm 2.35\text{mM}$  -  $4.16 \pm 1.23\text{mM}$ ) 미생물 LDH 처리로 lactate의 산화에 영향을 끼친다고 보인다. 그러나 pyruvate가 증가하는 정도와 미생물 LDH 활성과 연관성은 찾을 수 없었다.

S108, C21-1, Fy110-8, F48과 FFy111-1의 조효소로 처리한 산성 반추위액의 상대적인 lactate 농도는 97, 91, 89, 84 및 78%로 감소한다(Figure 18). 조효소액 처리에 의한 lactate의 감소 결과는 조효소액 내 lactate dehydrogenase 때문이고, 이것은 D,L-LDH 첨가구(commercial enzyme purified, L-LDH : D-LDH = 1:1)가 43%의 감소율을 나타낸 것으로 증명할 수 있다( $24.67 \pm 12.17\text{mM}$ ).

LDH 활성과 감소된 lactate의 관계는 Figure 19와 같다. 감소된 lactate의 양은 조효소내 단백질 1mg에 의해 감소되는 lactate의 양으로 나타났다. S108, C21-1, Fy110-8, F48과 FFy111-1의 조효소로 처리한 산성 반추위액의 감소된 lactate의 양은 각각 2.87, 12.79, 13.64, 17.59 및  $28.68\text{mM/mg protein}$ 이고, 이 감소량은 조효소액의 LDH 활성과 관계가 있다.

Table 10. Effect of different bacterial crude enzyme on lactate, acetate and pyruvate in acidic fluid (Unit : mM)

	Control	S108	Fy110-8	C21-1	FFy111-1	F48	D,L-LDH
<b>Lactate</b>							
Ex I	26.94 ±2.35	27.21 ±0.95	23.79 ±0.32	21.54 ±1.12	20.72 ±0.86	21.21 ±0.23	11.18 ±4.21
Ex II	38.62 ±5.09	34.19 ±1.56	32.85 ±0.25	33.23 ±0.94	31.91 ±1.15	33.16 ±0.25	27.99 ±1.05
Ex III	63.68 ±0.47	63.47 ±1.21	59.02 ±0.05	62.45 ±0.62	48.28 ±0.69	54.43 ±1.80	34.84 ±14.09
Mean	43.08 ±18.77	41.62 ±19.24	38.55 ±18.29	39.07 ±21.07	33.64 ±13.86	36.27 ±16.82	24.67 ±12.17
<b>Acetate</b>							
Ex I	29.62 ±2.76	28.12 ±3.45	26.01 ±0.36	25.54 ±1.65	25.54 ±3.56	25.64 ±0.95	32.19 ±4.03
Ex II	10.02 ±0.81	11.39 ±0.33	10.72 ±0.63	10.69 ±0.21	10.29 ±0.03	10.87 ±0.06	10.42 ±0.18
Ex III	10.17 ±0.74	11.72 ±0.58	11.21 ±0.15	11.34 ±0.38	12.93 ±0.71	10.77 ±0.03	11.38 ±0.89
Mean	16.60 ±7.55	17.08 ±6.63	15.98 ±6.03	15.86 ±5.82	16.25 ±5.71	15.76 ±5.93	18.00 ±8.54
<b>Pruvate</b>							
Ex I	4.15 ±0.14	6.47 ±0.23	6.07 ±0.09	6.50 ±0.12	9.72 ±0.25	9.00 ±0.16	10.52 ±0.39
Ex II	0.10 ±0.13	0.89 ±0.06	0.71 ±0.18	0.71 ±0.18	0.51 ±0.02	0.65 ±0.09	0.51 ±0.04
Ex III	0.20 ±0.28	1.55 ±0.42	2.09 ±0.02	2.47 ±0.08	2.26 ±0.40	2.84 ±0.19	0.98 ±0.54
Mean	1.48 ±1.61	2.97 ±2.53	2.96 ±2.35	3.23 ±2.12	4.16 ±1.23	4.16 ±3.07	4.00 ±0.33

D,L-LDH : mixture of L-LDH and D-LDH (1:1).

L-LDH : commercial enzyme purified from porcine heart, Sogma L2881.

D-LDH : commercial enzyme purified from Staphylococcus epidermidis, Sigma L9636

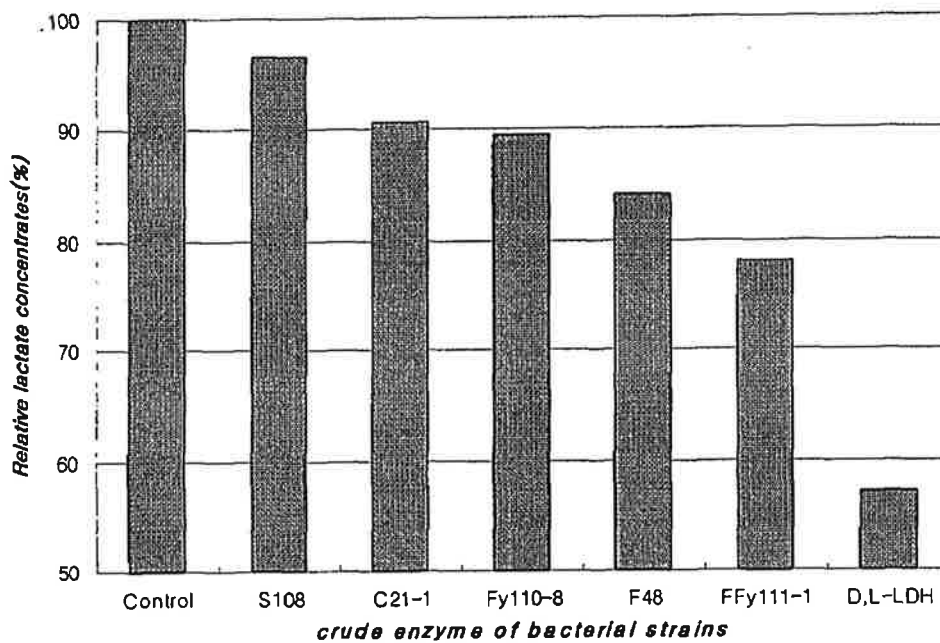


Figure 18. Relative lactate concentrates in acidic rumen fluid by treatments with different bacterial crude enzymes.

Relative lactate concentrates : mean of Exp I, Exp II and Exo III

Control : tris-HCl which using preparation of crude enzyme

D,L-LDH : mixture of L-LDH and D-LDH(1:1)

L-LDH : commercial enzyme purified from porcine heart, Sigma L2881

D-LDH : commercial enzyme purified from *Staphylococcus epidermidis*, Sigma L9636

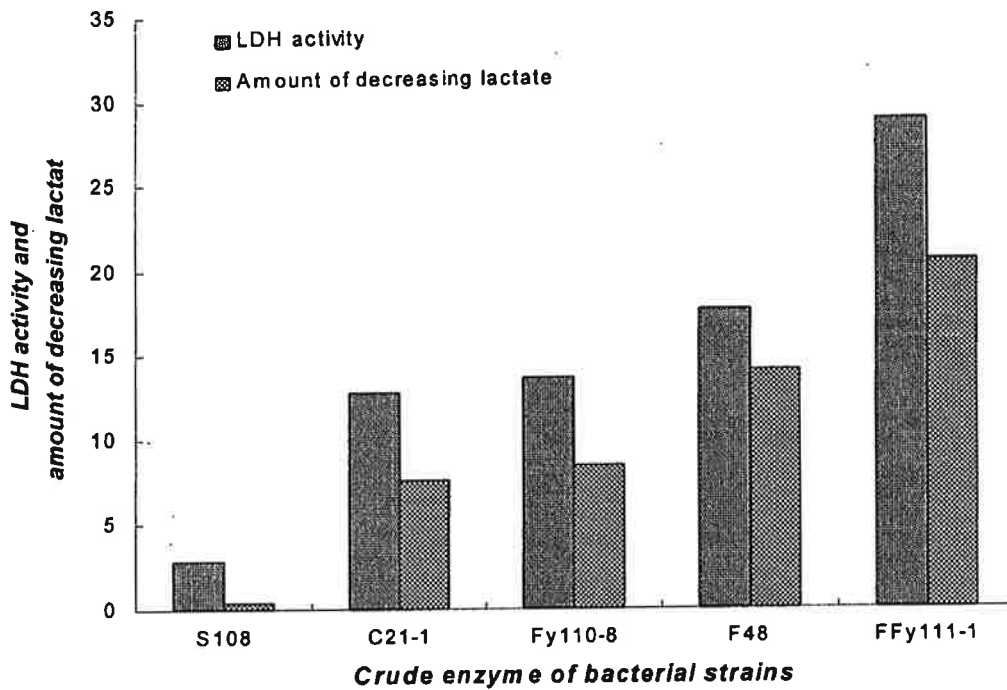


Figure 19. Relationship of LDH activity and amount of decreasing lactate in acidic rumen fluid by treatments with different bacterial crude enzyme.

LDH activity : M NADH/min/mg protein

Amount of decreasing lactate mean that lactate was decreased by one milligram of protein in crude enzyme(mM lactate/mg protein)

## 다. *In vitro* lactate 축적에 있어 LDH 생성 미생물 첨가의 효과

반추위 발효에 있어 lactate 축적을 예방하는데 반추위 미생물인 *Megasphaera elsdenii*의 첨가가 효과적이라는 것을 보여 주었다. Huffman 등.(1992)은 *Lactobacillus* spp.가 급성 acidosis를 감소시켜준다고 했다. Aslan(1995)는 *Sachromyces cerevisiae*를 가지고 실험을 했다. 그러나 이들의 보고는 미생물의 lactate dehydrogenase의 효과에 관한 것은 아니었다. 본 연구는 2.5%의 산성 사료를 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효 에서 lactate의 축적을 방지하기 위해, LDH활성이 낮은 S108, LDH 활성이 높은 F48, LDH 활성이 가장 높은 FFy111-1의 가능성을 평가하기 위해 수행하였다. 다양한 미생물 첨가에 의한 *in vitro* 반추위 발효에 관한 결과는 Table22와 같다. lactate 축적을 예방하는 효과는 다음과 같다.

Exp I은 미생물을 4시간 간격으로 24시간까지 첨가한 실험으로, lactate 농도는 증류수를 첨가한 대조구에 비해서 낮은 수준을 보여 주었다. Exp II와 Exp III은 미생물을 배양 12시간부터 2시간 간격으로 미생물을 첨가하여 총 실험 시간이 20시간으로, lactate의 축적은 대조구에 비해 낮았다. Exp I, Exp II와 Exp III의 결과로 미루어 볼 때, lactate의 축적은 대조구( $50.85 \pm 7.35\text{mM}$ )보다 미생물 첨가구(S108,  $45.48 \pm 6.27\text{mM}$ ; F48,  $41.84 \pm 7.55\text{mM}$ ; FFy111-1,  $40.42 \pm 6.45\text{mM}$ )가 낮았고, 가장 낮은 수준을 보인 것은 *Lactobacillus* sp. FFy111-1이다.

본 연구는 미생물 LDH 활성의 증가에 따라 lactate의 축적을 보다 효과적으로 예방하는 방법을 보여 준다. 초기 연구에서, 비록 다른 연구자들에 의해 LDH가 발견되었다고 할지라도(Gasser, 1970; Hino와 Kuroda, 1993; Savijoki와 Palva, 1997), lactate의 축적을 예방하기 위해 미생물을 이용한 LDH가 연구되었다. 그러므로, 본 연구는 LDH 생성 미생물이 반추위내에서 lactate의 축적을 방지할 수 있다고 사료된다. Acetate의 농도는 미생물을 첨가한 배양물(S108,  $17.20 \pm 6.34\text{mM}$ ; F48,  $11.44 \pm 2.34\text{mM}$ ; FFy111-1,  $14.84 \pm 5.97\text{mM}$ )이 대조구( $18.74 \pm 7.52\text{mM}$ )보다 낮았다. pyruvate는 미생물 첨가구에서 증가하고 lactate의 감소와 깊은 관계가 있는 것으로 보인다(Figure 20).

Exp I와 Exp II에서 pH가 증가한 것은 미생물의 첨가 때문이지만, Exp III에는 영향을 미치지 않은 것으로 보인다. 왜냐하면 ExpIII은 다른 산보다 더 산도가 높은 lactate의 양이 더 많이 축적되었기 때문이다(Figure 21). *Lactobacillus* spp.를 첨가한 배양물의 pH 증가는 Huffman 등.(1992)가 발표하였다.

Table 11. Effect of supplementing viable LDH-producing bacteria on in vitro ruminal fermentation

(Unit : mM excepted pH)

	Control	S108	F48	FFy111-1
<b>Lactate</b>				
Ex I	42.16±5.64	40.56±3.65	33.01±2.32	32.76±2.08
Ex II	55.91±10.40	44.66±8.03	41.46±0.56	40.55±1.99
Ex III	54.49±3.15	51.23±1.14	51.06±1.66	47.94±2.67
Mean	50.85±7.35	45.48±6.27	41.84±7.55	40.42±6.45
<b>Acetate</b>				
Ex I	30.78±0.95	26.28±0.09	11.37±0.86	25.37±0.38
Ex II	13.31±0.19	15.33±0.31	13.69±0.38	14.17±0.35
Ex III	12.13±1.67	10.00±0.14	9.27±1.36	9.98±0.37
Mean	18.74±7.52	17.20±6.34	11.44±2.34	14.84±5.97
<b>Pruvate</b>				
Ex I	0.47±0.04	0.90±0.07	0.72±0.05	0.82±0.11
Ex II	0.55±0.04	0.93±0.06	1.09±0.01	1.26±0.04
Ex III	0.30±0.05	0.87±0.08	0.75±0.07	0.73±0.17
Mean	0.44±0.79	0.90±0.41	0.85±0.26	0.94±0.29
<b>pH</b>				
Ex I	4.58±0.02	4.60±0.05	4.73±0.86	4.73±0.10
Ex II	4.61±0.02	4.63±0.06	4.68±0.01	4.69±0.04
Ex III	4.41±0.02	4.42±0.02	4.39±0.16	4.40±0.17
Mean	4.53±0.10	4.55±0.11	4.60±0.23	4.61±0.20

Exp I was added five times with bacterial cells at intervals of 4 hour for 24 hours, respectively.

Exp II and Exp III were added four times with bacterial cell at intervals of 2 hours after 12 hours of incubation and experiment was run for 20 hours.



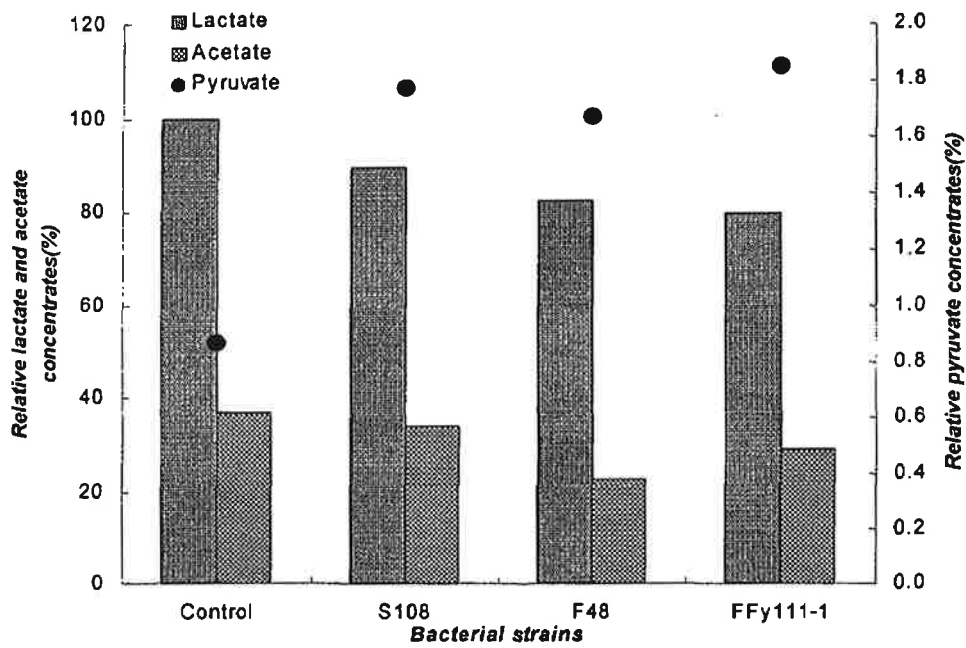


Figure 20. Relative lactate accumulation, and acetate and pyruvate production of in vitro ruminal fermentation by supplementing with viable LDH-producing bacteria(relative rate based concentrate of control).

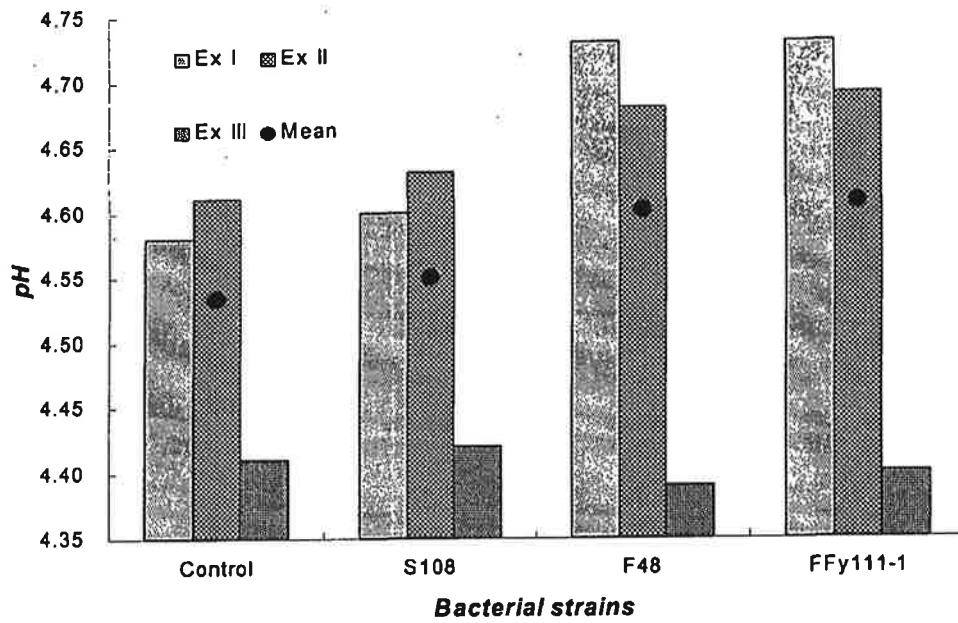


Figure 21. Effect of supplementing viable LDH-producing bacteria on in vitro ruminal pH.

## 제 3 장 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 개발에 관한 연구

### 제 1 절 도축 반추위액을 이용한 효모 배양물 개발

#### 1. 서 론

효모는 약 60여속이 존재하는데 절반에 속하는 진효모 중 아직까지 인체나 가축에게 유해한 것은 발견되지 않았다(Kreger-van Rij, 1984, 1987). 식용 및 사료용 효모의 대표적인 것은 *Saccharomyces*속과 *Candida*속으로 *Saccharomyces*는 5탄당을 이용하지 못하며, 아미노산 및 비타민의 보충을 필요로 하기 때문에 주로 당밀을 기질하는 단세포 단백질 생산에 이용되고 있는데 반하여 *Candida*는 6탄당뿐 아니라 5탄당 이용율이 높아 조악한 기질에서도 비교적 빠르게 증식하며 아미노산이나 비타민을 보충할 필요가 없어 폐자원 활용시 많이 사용되고 있다.

효모는 세포막이 강하기 때문에 위산, 항생제 및 항균제에 거의 영향을 받지 않을 뿐 아니라 통성혐기성이기 때문에 열악한 환경에서도 잘 자란다. 가축의 사료첨가제로 사용되는 효모는 대부분 생효모 배양물(live yeast culture) 형태로서 가축의 생산성 향상에 기여하고 있다. 즉 효모는 가축의 기호성을 증진시키고(Pepler, 1982), 효모 자체가 함유하고 있는 광물질, vitamin B군을 공급하고, 배양물내에 분비한 효소에 의해 사료의 소화율을 증진시키며(Sniffen, 1986), 산소와 강한 친화력을 갖고 있어 혐기성 세균의 증식을 도와주는데(Rose, 1980), 효모자체로서는 반추위내에서 증식을 할 수 없으나 생효모배양물로서는 반추위내 증식이 가능한 것으로 알려져 있다(Lyons, 1986).

따라서 본 실험은 도축 반추위액을 이용한 생효모 배양물을 개발하기 위하여 반추위액에서 증식속도가 빠르고, 안전한 야생효모를 분리하고, 그 적정 증식조건을 조사한 후 도축 반추위액을 이용한 배지에서의 최적 배양조건을 구명하는데 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 효모의 분리 및 동정

본 실험에서는 반추위 내용물의 이용성이 높은 균주를 분리하기 위하여 도축장의 폐수, 토양 및 폐기물등에서 분리용 시료를 채취한 후 멸균식염수로 현탁시키고 살균한 반추위액에 1%(vol/vol) 접종한 후 30℃의 진탕배양기에서 3일간 배양하였다. 그후 배양액을 희석하고 YM agar 평판배지에 pouring하여 30℃에서 48시간 배양한 후 우세하게 나타나는 colony를 3차 계대하여 완전 분리하고 검경을 통해 효모를 선별하였다. 분리한 효모는 사면배지(slant agar)에 보관하면서 실험균주로 사용하였으며, 효모의 동정은 MIDI(Microbial Identification Inc.)의 Yeast Library를 이용하였다.

### 나. 효모의 증식조건

분리한 효모의 증식을 위한 최적 pH범위는 Yeast Malt(YM) broth의 pH를 2-8로 조정한 후 30℃에서 배양하면서 증식속도를 조사하였고, 최적 온도범위는 pH 5.0인 YM broth에 분리효모를 1%씩 접종하고 25-45℃에서의 상대적 증식도를 조사하여 분리 효모의 적정 pH와 온도 범위를 결정한 후 최적 배양조건을 결정하기 위한 실험에 응용하였다.

### 다. 반추위액 배지(W.R.E., D.R.E.) 제조 및 배양조건

반추위액 농도를 60%, 50%, 40% 및 30%로 한 배지에서 분리효모를 배양했을 때 배양 36시간째 반추위액 농도 및 효모 종류에 관계없이  $10^7$  CFU/ml의 생효모수를 나타냈다. 따라서 본 실험에서는 반추위액의 사용량을 높이고자, 반추위액 농도 100%와 66.7%의 기본배지를 제조하였다. 즉, 채취한 반추위 내용물을 잘 혼합한 후 압착 추출한 whole rumen extract (W.R.E., 100%)와 W.R.E.를 수도물과 2:1로 혼합한 dilute rumen extract (D.R.E., 66.7%)를 2겹의 cheese cloth로 여과하여 2가지 형태의 기본배지(W.R.E.와 D.R.E.)를 제조한 후 W.R.E.와 D.R.E.에서의 효모 증식상태를

파악하여 분리 효모가 최대 증식속도 및 최고 생효모수를 나타내는 배지를 선택하여 실험에 사용하였다.

최적 반추위액 함량과 배양조건을 결정하기 위하여 500ml shaking flask를 사용하였는데, 각종 첨가물질과 pH를 5.0으로 조정한 반추위액 배지 100ml를 flask에 분주하고 121℃, 1.2kg/cm<sup>2</sup>에서 15분간 멸균한 후 배지로 사용하였다. 효모 접종액은 YM broth에서 16시간 배양한 효모 종배양액(seed culture)을 사용하였으며, 1ml(1%, vol/vol)를 접종하고 30℃에서 48시간 배양하였다.

## 라. 최적 배양조건 조사

### 1) 질소원 첨가 효과

균체의 증식이나 균체 단백질 함량을 증가시키는 질소원에 대한 첨가효과를 조사하기 위하여 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 NH<sub>4</sub>Cl을 질소함량으로 0.1%(w/v) 첨가하여 균주별 최적 질소원을 조사하였다.

### 2) 요소 첨가수준

질소 공급원으로 효과적인 요소를 질소함량으로 0, 0.1, 0.2 및 0.3%(w/v) 첨가하여 적정 공급수준을 조사하였다.

### 3) 당밀 첨가 효과

효모증식에 큰 영향을 미치는 가용성 당과 질소함량과의 비율을 고려해 total sugar 함량이 53%인 사탕수수 당밀을 증류수와 1:3 (w/v)으로 희석하여 각각 0, 2, 4 및 6%(v/v) 첨가하여 효모 증식에 미치는 효과를 조사하였다.

### 4) 인과 칼륨 첨가 효과

인과 칼륨 공급원으로 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl 및 KNO<sub>3</sub>를 P 및 K 함량으로 각각 0.05%(w/v) 첨가하여 적절한 공급원을 조사하였다.

## 5) 무기염류 첨가 효과

4종의 무기염류 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )를 0.02% 첨가하여 효모 증식에 미치는 효과를 조사하였다.

## 6) C/N 비율이 효모 증식에 미치는 효과

분리균 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 적정 C/N ratio를 조사하기 위하여 당밀과 요소를 이용해 C/N ratio를 100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 및 100:4로 조정된 후 효모의 증식 및 기질 이용성을 조사하였다.

## 마. Scale up 및 배양조건 개선

대량배양을 위한 기본실험은 7L jar fermenter (Model No. SY 500)를 사용하였는데, flask 배양에서 얻은 결과를 종합한 다음과 같은 최적조건에서 배양액을 flask 배양시 보다 30배 증가시킨 후 효모를 배양하면서 scale up에 따른 증식도의 변화를 조사하였다. 즉, 각 분리효모의 질소 및 당 이용율과 C/N 비율을 고려해 SKK-Y-728은 C/N비율을 100:1.5,  $NH_3-N$  함량이 100ml당 10mg 및 환원당 함량이 ml당 6.5mg이 되게 당밀을 이용해 조정하고  $K_2HPO_4$ 를 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.02%를 첨가하였고, SKK-Y-786은 C/N비율을 100:1.5,  $NH_3-N$  함량이 100ml당 15mg 및 환원당 함량이 ml당 10mg이 되게 요소와 당밀을 이용해 조정하고  $K_2HPO_4$ 를 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.02%를 첨가하였으며, SKK-Y-1293은 C/N비율을 100:2.0,  $NH_3-N$  함량이 100ml당 20mg 및 환원당 함량이 ml당 10mg이 되게 요소와 당밀을 이용해 조정하고  $K_2HPO_4$ 를 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.02%를 첨가하였다. 이와같이 제조한 배지는  $121^\circ C$ ,  $1.2kg/cm^2$ 에서 15분간 멸균하고 6N HCl을 이용해 pH를 5.0으로 조정 한후 효모 종배양액 1%를 접종하고  $30^\circ C$ 에서 48시간 배양하면서 증식도의 차이를 조사하였다.

또한 상기와 같은 최적조건에 pH는 5.3으로, agitator 속도는 150 rpm, 통기량은 1 vvm으로 고정한 개선조건에서의 효모증식 및 기질 이용성을 조사하였다.

## 바. 조사항목

### 1) pH

배양액의 pH는 pH meter(TOA HM 7B)를 이용하여 측정하였다.

### 2) 생효모수

생효모수는 YM agar plate를 이용해 30℃에서 36시간 배양한 후 colony를 계수하여 측정하였다.

### 3) 환원당 함량

배양액 10ml를 20,000×g, 4℃ 조건에서 30분간 원심분리(KUBOTA, KR-20000 T, RA-6)한 후 상등액을 취하여 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법으로 환원당 함량을 측정하였는데, 이때 측정파장은 575nm였다(Miller, 1959).

### 4) NH<sub>3</sub>-N 함량

배양액 10ml를 20,000×g, 4℃ 조건에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 Chaney와 Marbach(1962)의 방법으로 NH<sub>3</sub>-N 함량을 측정하였는데, 이때 측정 파장은 630nm였다.

### 5) 조단백질 함량

조단백질 함량은 AOAC(1990)방법에 의한 Kjeldahl system을 이용하였다.

### 6) 효모 증식속도

YM broth에서 분리균의 적정 생육 pH와 온도범위를 조사하기 위한 증식도 측정은 spectrophotometer(Spectronic 20, Bausch & Lomb, USA)를 이용하였으며, 흡광도 측정파장은 620nm였다

7) 도축 반추위액의 아미노산 함량

도축 반추위액의 아미노산 조성은 HPLC(Waters Associates Model 244)를 사용하여 분석하였는데, 분석조건은 Table 12와 같다.

8) 도축 반추위액의 광물질 함량

도축 반추위액의 광물질 함량은 Inductively Coupled Plasma(ICP) Emission Spectro Analyzer (JY38 puls ISA, Jobin Yuon, France)를 이용하여 분석하였다. Carrier gas로는 argon을 사용하였고, 표준용액은 ml당 1000  $\mu$ g을 함유한 ICP분석용 표준용액을 사용하였다.

사. 통계분석

실험결과에 대한 통계처리는 SAS(1985)를 사용하였으며, 평균간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)에 의하였다.

Table 12. Analytical conditions for the determination of amino acids by HPLC

Model	Waters Associates Model #244 Waters U6K Injector Waters 510 Pump $\times$ 2 Waters 680 Gradient Controller Waters 441 Absorbance Detector D 520 Integrator
Column	Waters PICO, TAG Column(15cm $\times$ 3.9mm, 4 $\mu$ m)
Detection wave length	254 nm
Mobile phase	A-0.14M sodium acetate 0.05% Triethylamine 11 Milli-Q quality water pH 6.4 with phosphoric acid Buffer : Acetonitrile = 94:6(V/V) B-60% Acetonitrile



### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 효모의 선별 및 동정

20여종의 도축장 토양과 폐기물 등의 시료에서 분리한 67종의 fungi 중 반추위액에서의 증식이 가장 우수하게 나타난 3종의 효모(SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293)를 선별하였다.

SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293을 Microbial Identification Inc.(MIDI)의 yeast library를 이용하여 동정한 결과, SKK-Y-728과 SKK-Y-1293은 *Saccharomyces*속으로, SKK-Y-786은 *Candida*속으로 분류되었다.

#### 나. 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 적정 생육 pH 및 온도

분리한 효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 pH 및 온도의 영향은 Figures 22, 23 및 24와 같다. SKK-Y-728은 pH 4.5에서 가장 빠른 증식을 하였으며 pH 3.5-6.5에서 80%이상의 상대적 증식도를 나타내 비교적 넓은 범위의 pH에서 잘 증식하였으나, pH 2.5에서는 49.6%, pH 7.5와 8.0에서는 각각 68.5%와 38.7%로 증식도가 낮아졌다.

온도에 의한 SKK-Y-728의 증식도는 30℃에서 배양시 최대 증식도를 나타냈으며, 25℃에서는 73.5%로 35℃에서는 80.6%로 상대적 증식도가 낮아진 후 40℃와 45℃에서는 각각 56.5%와 2.1%로 매우 낮은 증식도를 나타냈다. 따라서 SKK-Y-728의 적정 증식 pH 및 온도 범위는 각각 pH 3.5-6.5와 25-35℃였다.

SKK-Y-786은 pH 6.0에서 최대 증식도를 나타냈으며 pH 7.0에서 94.6%의 상대적 증식도를 보였으며, pH 5.0, 4.0 및 3.0에서는 각각 96.6%, 94.6% 및 75.7%의 상대적 증식도를 나타내 높은 pH에서도 잘 증식하였으나 pH 2.0에서는 7.6%로 매우 낮은 증식도를 보였다. 또한 SKK-Y-786은 35℃에서 최대 증식도를 나타냈으며, 30℃에서도 98.8%의 상대적 증식도를 나타냈으나 25℃와 40℃에서는 각각 65.2%와 67.9%로 증식도가 저하된 후 45℃에서는 10.6%로 크게 낮아졌다. 따라서 SKK-Y-786의 적정 증식 pH 범위는 4-7.0이며, 온도범위는 30-35℃ 인 것으로 나타났다.

SKK-Y-1293은 pH 6.0에서 증식도가 가장 높았으며 pH 7.0과 8.0에서는 82.9%와 69.4%의 상대적 증식도를 나타냈고, pH 5.0 과 4.0에서는 98.6%와 92.9%의 증식도를 보였으나, pH 3.0에서 61.4%로 낮아진 후 pH 2.0에서는 3.1%로 매우 낮은 상대적 증식도를 나타냈다.

온도에 의한 SKK-Y-1293의 증식도를 보면 30℃에서 최대의 증식을 나타냈고 25℃와 35℃에서 각각 89.6%와 88.4%의 상대적 증식도를 나타냈으나 45℃에서는 26.7%의 증식도를 보였다. 따라서 SKK-Y-1293의 최적 증식 pH와 온도범위는 pH 4.0-7.0과 25-35℃로 넓은 범위의 pH와 온도에서 증식하는 것으로 나타났다.

이상의 결과 분리 효모의 적정 증식 pH 및 온도 범위는 SKK-Y-728이 각각 pH 3.5-6.5와 25-35℃이고, SKK-Y-786이 각각 pH 4.0-7.0과 30-35℃이며, SKK-Y-1293은 각각 pH 4.0-7.0과 25-40℃로 나타나, 일반적으로 효모 증식을 위한 적정 pH가 4.0-6.5, 적정온도 25-35℃이고 최하 pH 1.5-3.5이며 최대생육 pH는 8.0-8.5라는 보고(Barnett등, 1983)와 대체로 일치하며, 분리 효모의 경우 넓은 범위의 증식 pH와 온도를 갖고 있었다.

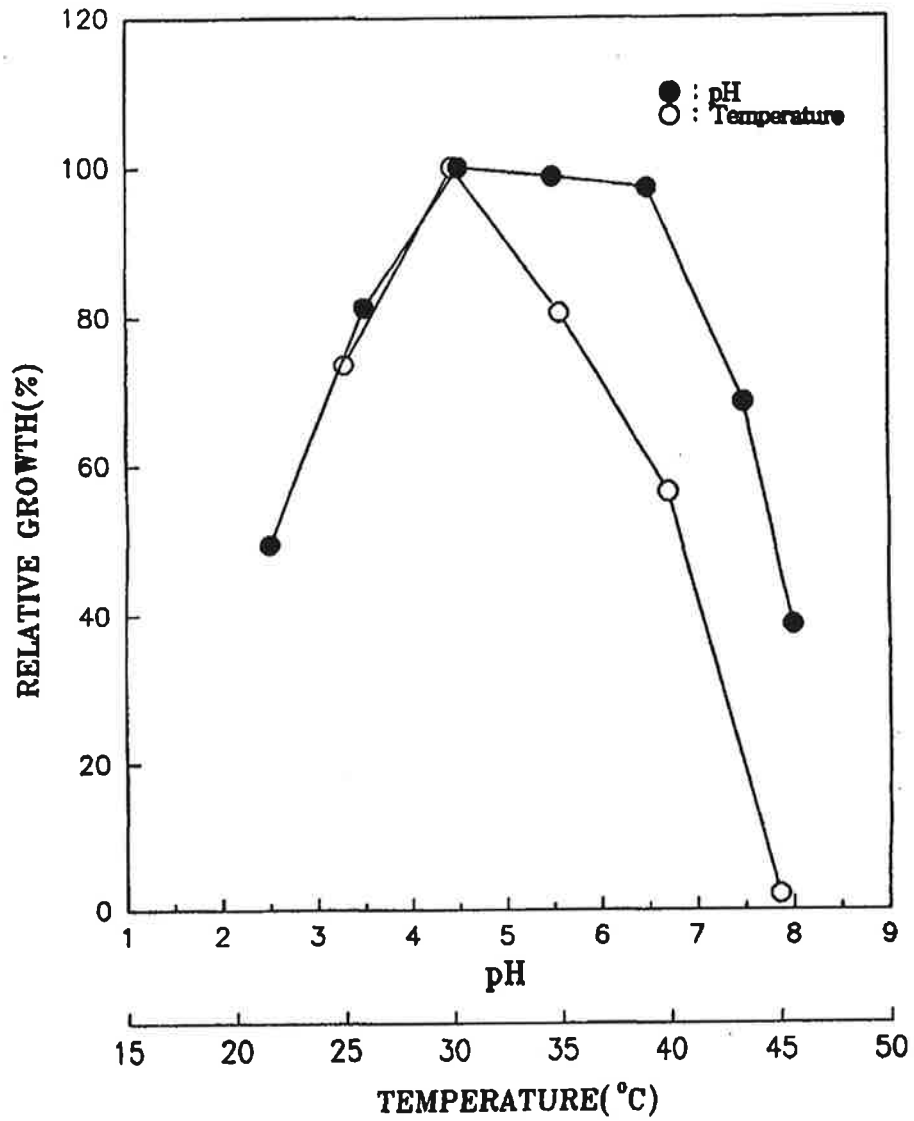


Figure 22. Effect of pH and temperature on the relative growth of the isolated strain SKK-Y-728.

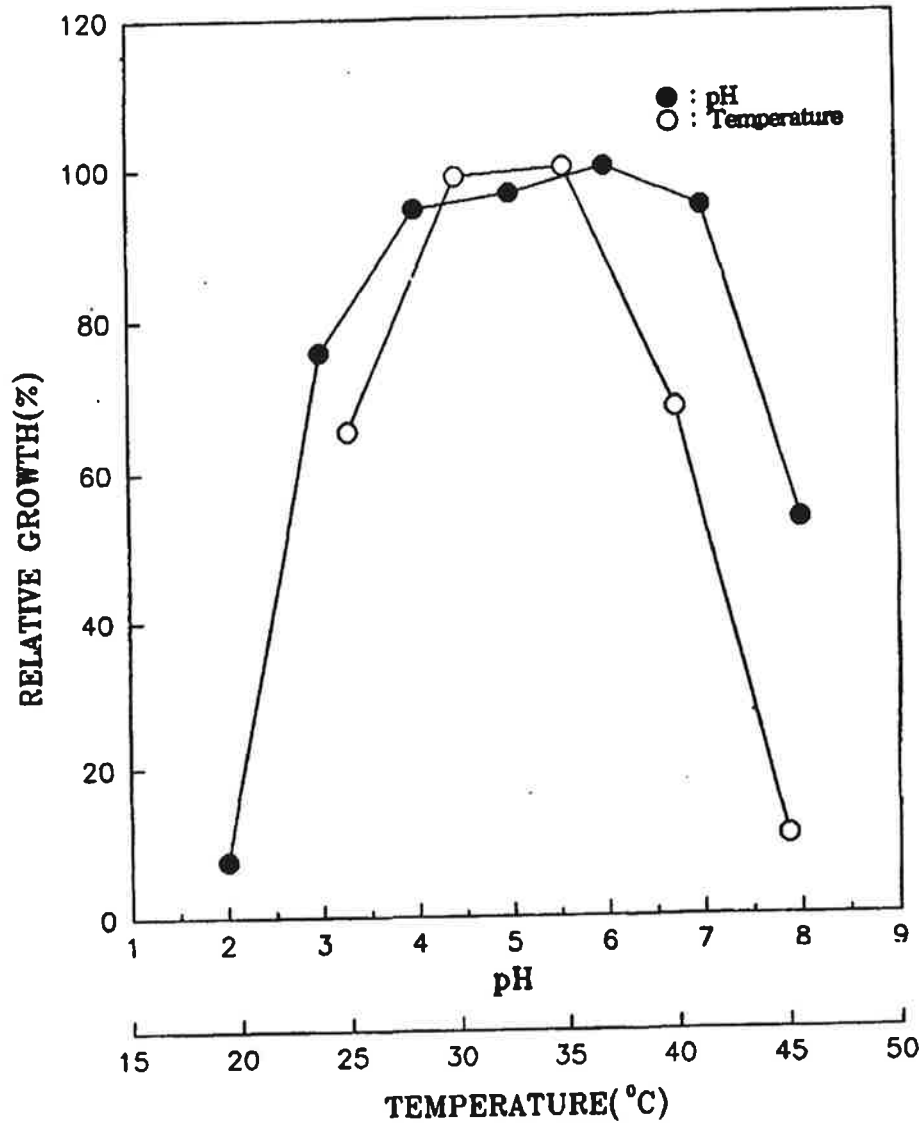


Figure 23. Effect of pH and temperature on the relative growth of the isolated strain SKK-Y-786.

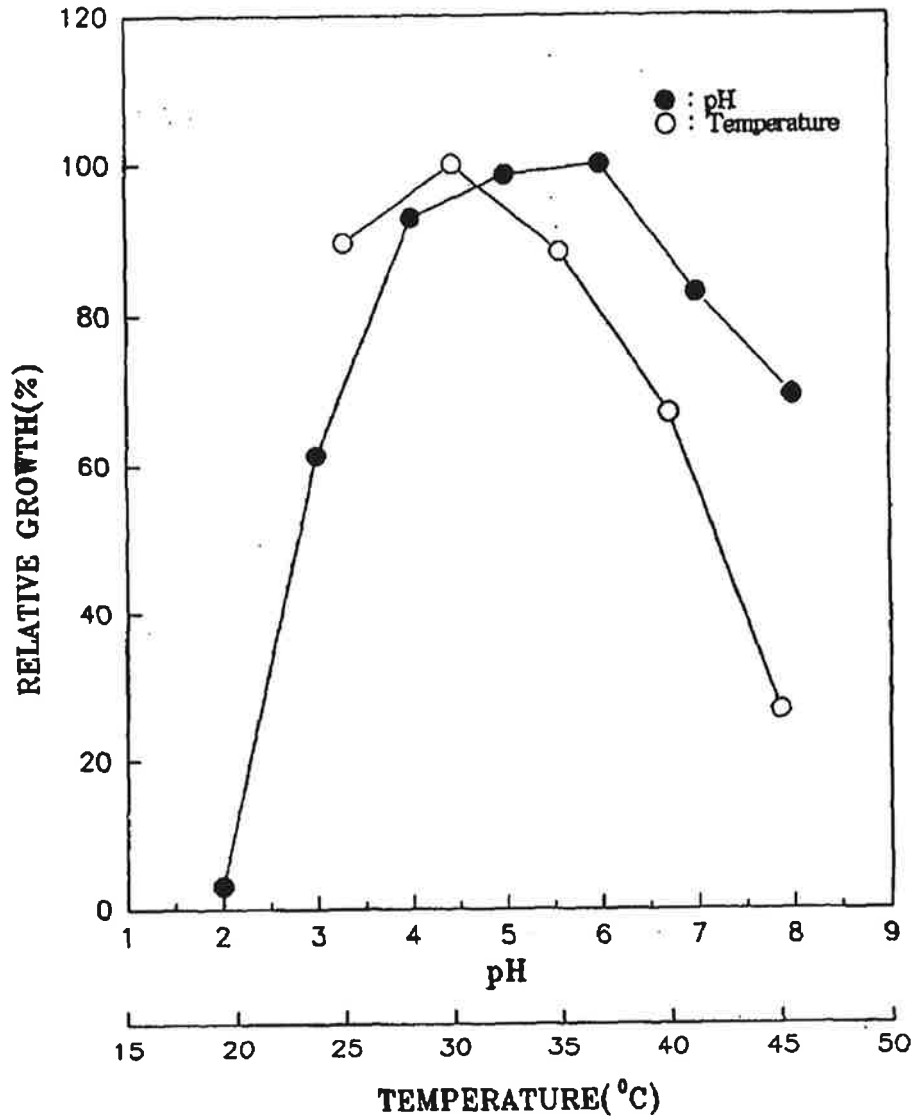


Figure 24. Effect of pH and temperature on the relative growth of the isolated strain SKK-Y-1293.

#### 다. 반추위액 배지의 성분

도축장에서 수거한 반추위 내용물을 잘 혼합한 후 압착하고 2겹의 cheese cloth로 여과한 100% 반추위액(W.R.E.)과 66.7%로 희석한 반추위액(D.R.E.) 배지의 조성은 Table 13에서와 같이 W.R.E.의 환원당 함량은 76.3mg/100ml이고 조단백질 함량은 865mg/100ml였으며 NH<sub>3</sub>-N 함량은 33.2mg/100ml였다. 그리고 D.R.E.의 환원당 함량은 45.1mg/100ml, 조단백질 함량은 865mg/100ml였고 NH<sub>3</sub>-N 함량은 27.7mg/100ml였다. 또한 건조한 반추위 고형물의 조단백질 함량은 21.1%였고, 조섬유 함량은 22.4%였는데, 이같은 결과는 건조한 고형물의 조단백질 함량이 21.8%, 조섬유 함량 30.3%, 조지방 함량 6.1% 및 조회분이 11.5%였다고 보고한 Jovanovic과 Cuperlovic (1977)의 결과와 유사한 경향을 나타냈으나, Messersmith등(1974)과 황(1991)이 보고한 조성분과는 차이가 있었다.

건조한 반추위액의 아미노산 및 광물질 함량은 Table 14에서 보는 바와 같이 아미노산 중 leucine, lysine 및 alanine 함량이 2.1%, 2.56% 및 1.71%로 높게 나타나 Abdo 등(1964)의 결과와 유사하였으며, 광물질중 인과 칼륨도 각각 1.45%와 1.37%로 높게 나타났다. 반추위 내용물의 성분은 채식된 사료와 타액의 유입 및 위내 통과속도등에 의해 차이가 심하고(Hungate, 1966), 사료 채식후 도살 전까지의 시간, 사료 채취방법 및 반추위 내용물의 액상과 건물비등 여러가지 요인 때문에 차이가 심한 것으로 생각된다.

Table 13 . Chemical composition of basal medium and dried rumen contents

Item	Contents
<u>Basal medium</u>	
W.R.E.	
Reducing sugar(mg/100ml)	76.3±2.5 <sup>#</sup>
Crude protein(mg/100ml)	865±63.0
NH <sub>3</sub> -N(mg/100ml)	33.2±1.38
pH	6.8±0.57
D.R.E.	
Reducing sugar(mg/100ml)	45.1±1.5
Crude protein(mg/100ml)	670±56.0
NH <sub>3</sub> -N(mg/100ml)	27.7±1.23
pH	6.3±0.64
<u>Dried rumen contents</u>	
Crude protein(%)	21.1±1.54
Crude fiber(%)	22.4±1.92

<sup>#</sup> Mean ± SD

Table 14. Amino acid and mineral contents of dried rumen fluid

Amino acid	Contents(%)	Mineral	Contents
Threonine	1.31	Ca(%)	0.98
Isoleucine	1.48	P (%)	1.45
Leucine	2.10		
Phenylalanine	1.45	K (%)	1.37
Lysine	2.56		
Methionine	0.54	Mg(%)	0.14
Valine	1.47		
Aspartic acid	0.99	Mn(ppm)	380
Tyrosine	1.27		
Histidine	1.54	Fe(ppm)	568
Arginine	1.40		
Cystine	0.30	Zn(ppm)	256
Serine	1.19		
Glutamic acid	1.59	Cu(ppm)	36
Glycine	1.29		
Alanine	1.71		

#### 라. 반추위액 함량이 효모 증식에 미치는 영향

효모증식에 적절한 반추위액 농도를 조사하기 위하여 100% 반추위액 배지(W.R.E.)와 수도물과 2:1(v/v)로 희석한 66.7% 반추위액 배지(D.R.E.)를 pH 5.0으로 조정한 후 121℃, 1.2kg/cm<sup>2</sup>에서 15분간 멸균하고 효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293을 30℃에서 48시간 배양한 결과는 다음과 같다.

##### 1) SKK-Y-728

W.R.E.와 D.R.E.를 기질로 SKK-Y-728을 배양한 결과는 Figures 25 및 26과 같다. 생효모수( $10^7$  CFU/ml)는 배지종류에 관계없이 배양 12시간 이후에 크게 증가하여 배양 24시간째 W.R.E.가 3.34개인데 비하여 D.R.E.에서는 7.15개로 나타나



D.R.E.에서 증식속도가 빨랐다( $p < 0.05$ ). 배양 48시간째 W.R.E.에서는 5.67개로 24시간 이후 증가하였으나, D.R.E.에서는 5.07개로 24시간째 보다 약간 감소하였다.

W.R.E.의 pH는 배양 24시간째 5.24로 배양전 5.18에 비해 큰 변화가 없었으나 D.R.E.에서는 24시간째 6.97로 적정 pH범위보다 높아 24시간 이후 효모증식을 저해한 것으로 생각되며, 배양시간이 경과함에 따라 48시간째 W.R.E.에서는 7.06으로, D.R.E.에서는 7.85로 높아져 SKK-Y-728의 적정 pH 범위인 pH 3.5-6.5를 벗어났는데 이와 같은 pH상승은 Hunkova와 Fencel(1978)의 보고와 같이 일부 혐기발효가 일어나 ethanol을 생성했기 때문으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 W.R.E.에서 배양전 32.3에서 서서히 감소해 48시간째 26.6으로 약 17.7% 이용되었고, D.R.E.에서는 26.23에서 21.47로 약 19.8% 이용되었다.

환원당 함량(mg/ml)은 W.R.E.가 배양전 0.72에서 배양 24시간째 0.46으로 약 36.1% 이용된 후 48시간째 0.38로 약 47%정도 이용되었으나 D.R.E.에서는 배양전 0.49에서 24시간째 0.27로 약 45%정도 이용되어 D.R.E.에서의 기질 이용율이 W.R.E.보다 높았다.

이상의 결과 SKK-Y-728 배양시 W.R.E.에서 초기 증식속도가 느린 것은 기질 함량이 높아 효모증식을 저해했기 때문으로 생각되며, 생효모수 및 기질 이용율을 종합할 때 D.R.E.가 W.R.E.보다 적합한 배지로 나타났다.

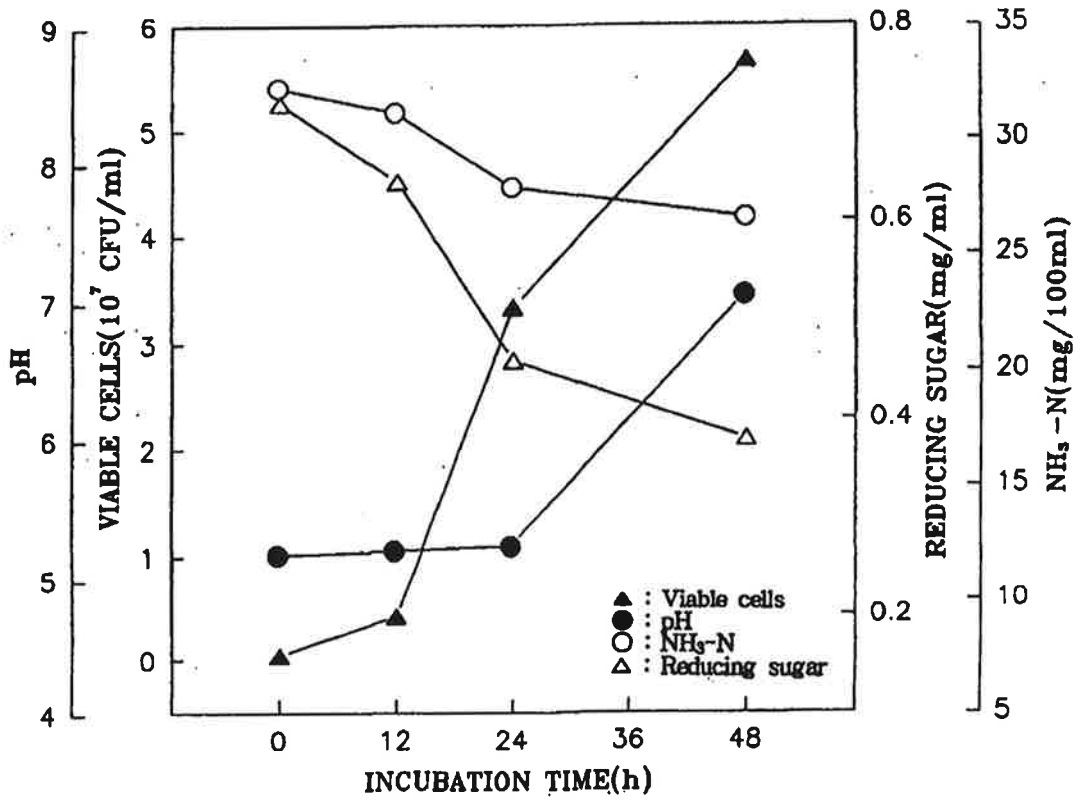


Figure 25. Viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in W. R. E. by isolated stain SKK-Y-728.

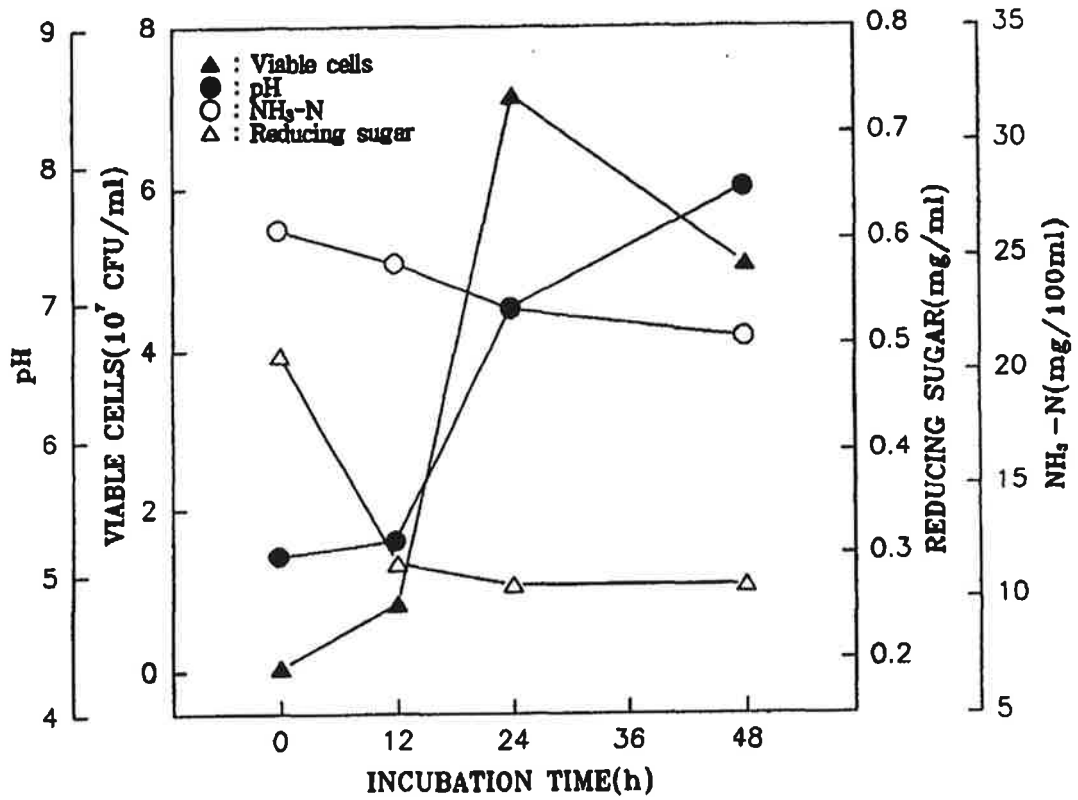


Figure 26. Viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated stain SKK-Y-728.

## 2) SKK-Y-786

W.R.E.와 D.R.E.에서의 SKK-Y-786 증식 및 기질 이용성은 Figures 27 및 28과 같다. W.R.E.에서는 24시간째 6.31개로 최대 생효모수( $10^7$  CFU/ml)를 나타낸 후 48시간째 4.01개로 감소하는 경향을 나타냈으나, D.R.E.에서는 12시간째 5.09개로 크게 증가한 후 24시간째 6.65개로 약간 증가하였으며 배양시간이 경과함에 따라 48시간째 4.14개로 감소하였다. W.R.E.와 D.R.E. 배지의 48시간째 pH는 7.05와 7.03으로 SKK-Y-786의 적정 pH범위인 4.0-7.0을 유지하였다. W.R.E.의  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml)함량은 배양전 33.9에서 감소하여 48시간째 26.0으로 약 23.4% 이용되었고, D.R.E.에서는 27.8에서 18.1로 34.9%의 이용율을 보였으며, 특히 D.R.E.에서는 배양 12시간째 22.3%를 이용하여 효모 증식속도와 유사한 경향을 보였다. 환원당 함량(mg/ml)은 최대 효모수를 보인 배양 24시간째 W.R.E.가 배양전 0.74에서 0.34로 55.4%이용되었고, D.R.E.에서는 배양전 0.49에서 0.21로 57.1%의 이용율을 나타내 차이가 없었다. 이상의 결과 SKK-Y-786배양시 최고 생효모수에는 차이가 없었으나, D.R.E.에서 초기 12시간까지의 증식속도가 빠른 것으로 나타났다.

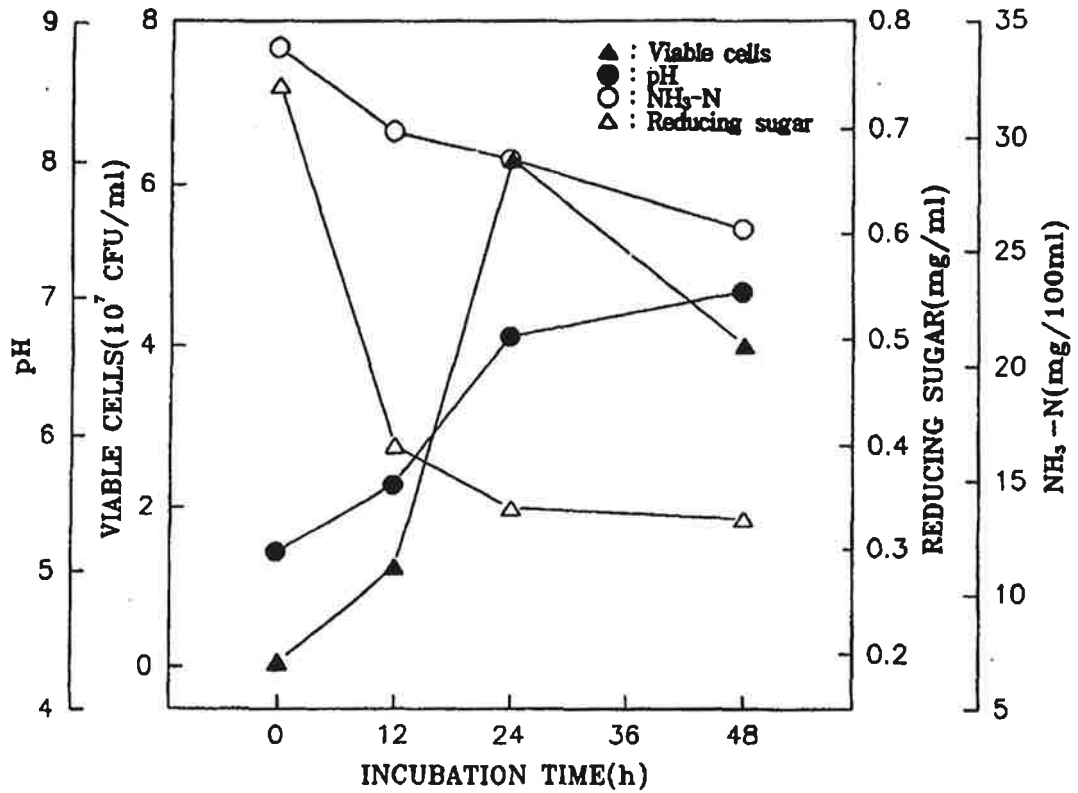


Figure 27. Viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in W. R. E. by isolated stain SKK-Y-786.

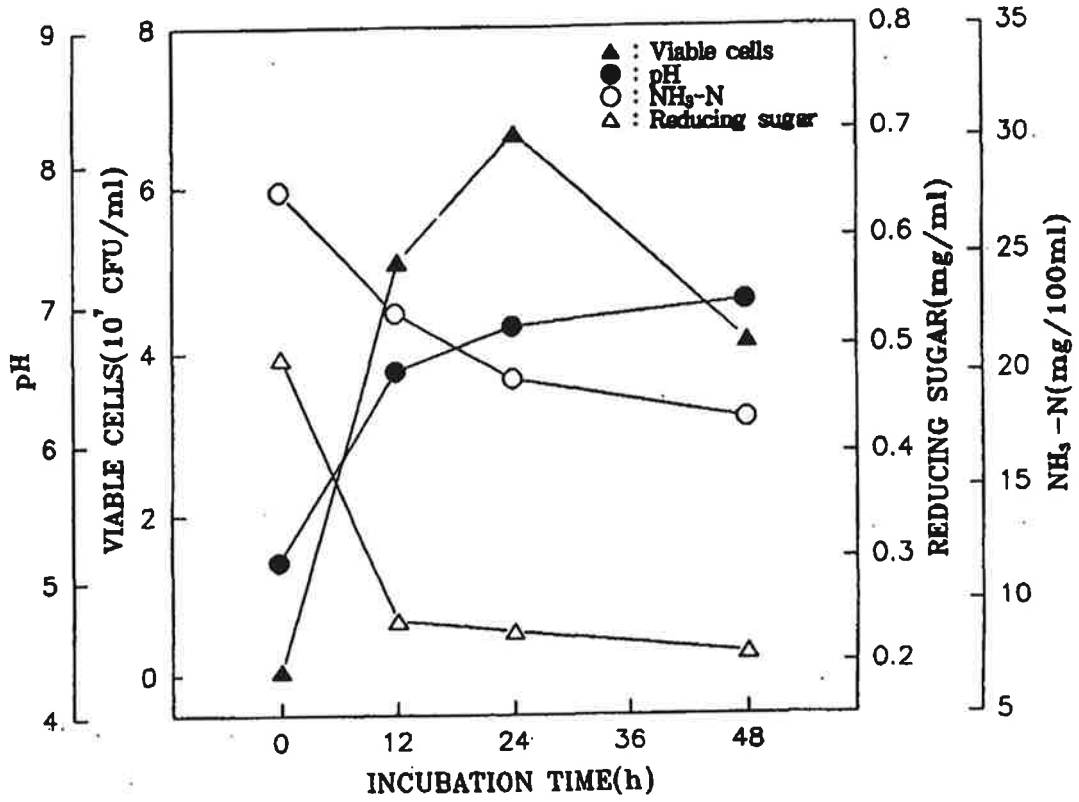


Figure 28. Viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated stain SKK-Y-786.

### 3) SKK-Y-1293

W.R.E.와 D.R.E. 배지에서 SKK-Y-1293 배양시 증식속도 및 기질 이용성은 Figures 29 및 30와 같다. 효모증식은 D.R.E.에서 빨라 12시간째 3.57개( $10^7$  CFU/ml)였으며 그후 24시간째 9.42개로 증가한 반면 W.R.E.에서는 12시간째 2.03개에서 24시간째 5.37개로 증가하여 D.R.E.에서 증식속도 및 최대 생효모수가 높았다 ( $p < 0.05$ ).

배양액내 pH는 W.R.E.와 D.R.E. 모두 배양 24시간까지는 각각 6.53과 6.55로 SKK-Y-1293의 적정 pH 범위인 4.0-7.0을 유지하였으나 배양 48시간째에는 7.46과 7.58로 적정범위보다 높았다. 기질 이용율은 W.R.E.에서 배양전  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml)과 환원당 함량(mg/ml)이 32.4와 0.76에서 48시간째 18.8과 0.35로 각각 42%와 54%의 이용율을 나타냈다. D.R.E.에서는  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)이 배양전 26.0에서 48시간째 7.1로 72% 이용되어 W.R.E.보다 약 30% 높았고 ( $p < 0.05$ ), 환원당 함량(mg/ml)은 배양전 0.52에서 0.21로 59.6%의 이용율을 나타내 D.R.E.에서의 기질이용율이 상대적으로 높았으며, SKK-Y-1293의 경우 도축 반추위액의 이용성이 매우 높은 효모로 나타났다.

이상의 결과 최대 생효모수 및 기질 이용율등을 고려할 때 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293 배양시 적합한 배지형태는 W.R.E.보다 D.R.E.인 것으로 생각된다.

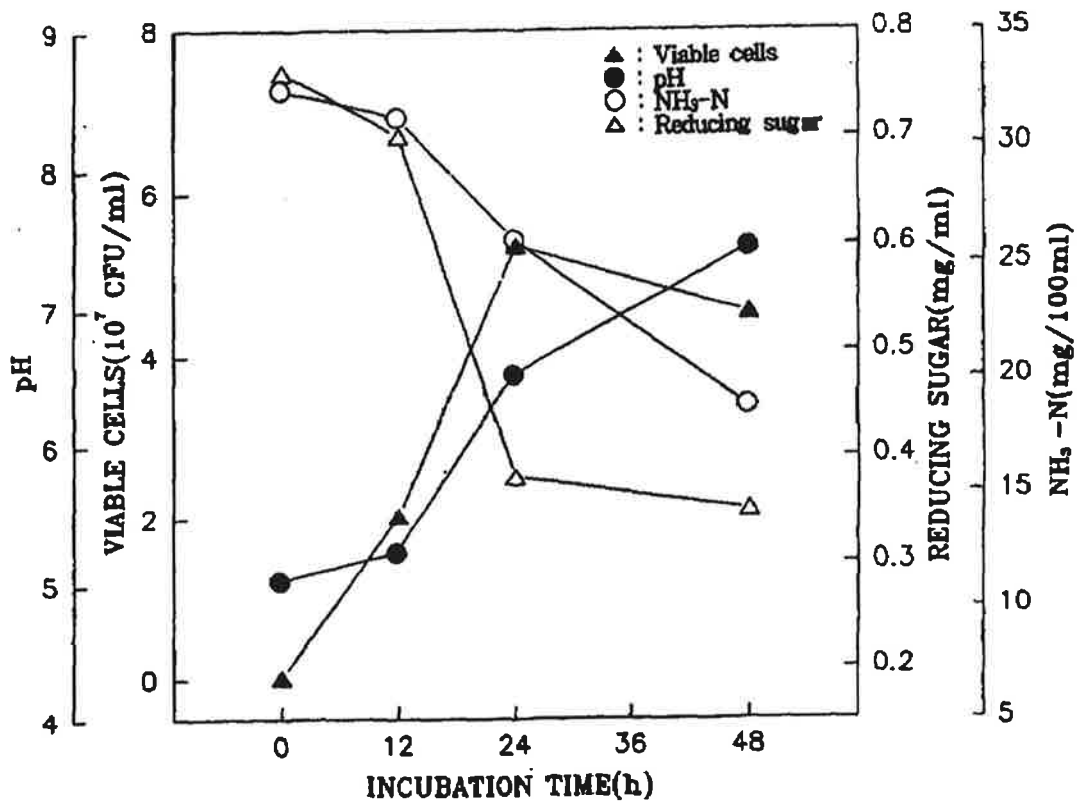


Figure 29. Viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in W. R. E. by isolated stain SKK-Y-1293.



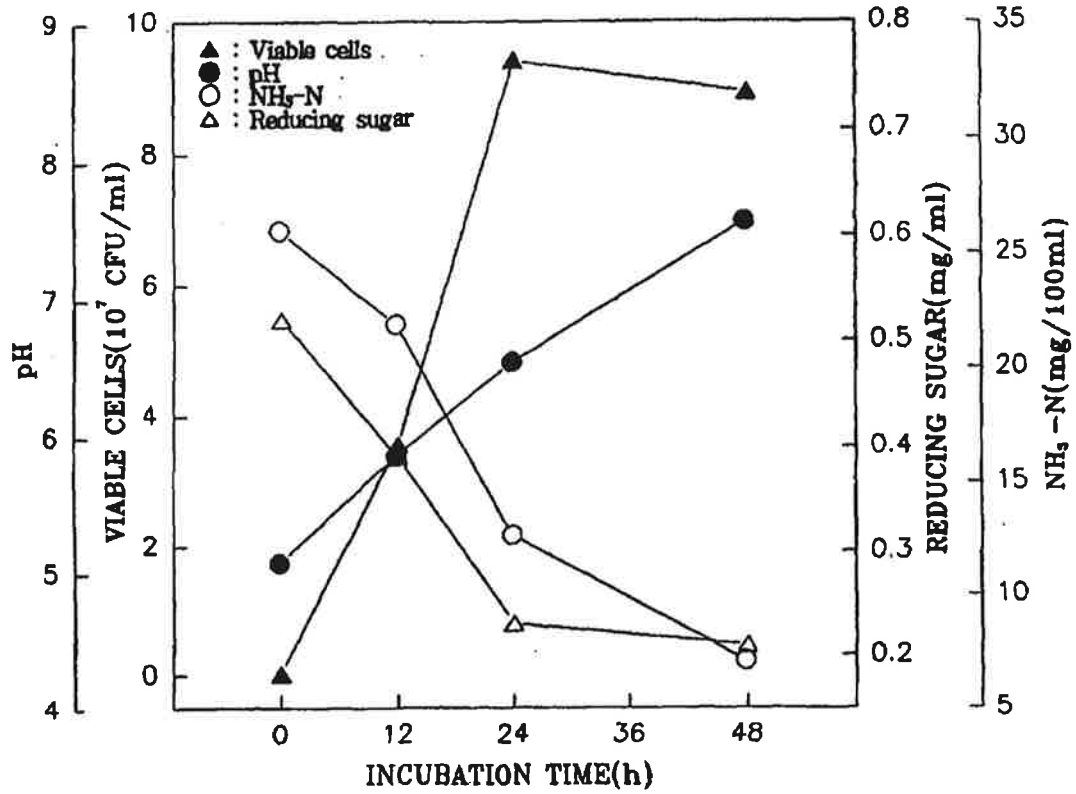


Figure 30. Viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated stain SKK-Y-1293.

## 다. 질소원 첨가가 분리 효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과

대부분의 효모는 질소 공급원으로 ammonia, urea, allantoin, amino acid, 염기, peptide(Berry와 Brown, 1987) 및 nitrate(Pateman과 Kinghorn, 1976)등을 이용하는 것으로 알려져 있다. 질소 공급원으로 황산암모늄 사용시 암모늄은 질소원으로 이용되고 황산이온이 남아 배양액의 pH가 낮아지나, 암모니아나 nitrate 이용시에는 pH가 높아지는 특징이 있다. 효모는 유기질소원 공급시 효모생육이 빨라지나 천연효모로 생육에 amino acid를 요구하는 효모는 거의 없는 것으로 알려져 있어 각종 무기태 질소 공급원이 널리 사용되고 있다. 질소 공급원으로 사용한 urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium phosphate 및 ammonium chloride가 분리 효모의 증식에 미치는 효과는 다음과 같다.

### 1) SKK-Y-728

질소원 첨가에 따른 SKK-Y-728의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 31에서 보는 바와 같다. 생효모수는 대조구와 질소원 첨가구 모두 배양 24시간째 최대 효모수를 보인 후 감소하였는데, 질소원 중 요소와 ammonium sulfate 첨가구에서 배양 24시간째 대조구 6.03개에 비해 7.88개와 7.52개로 가장 높았으나 기타 질소원 첨가구에서는 5.82-6.27개로 대조구와 유사하였다. 강과 성(1989)은 감귤과피 압착액을 이용한 단세포 단백질 생산에 질소원으로 요소 첨가시 대체로 균체량 및 균체 단백질 함량이 증가한다고 보고하였으며, 정과 정(1987)은 고구마 주정폐액을 이용한 단세포 단백질 생산에 요소가 가장 우수한 질소원이라 하였으며, 일반적으로 *Saccharomyces cerevisiae* 배양시 요소가 질소 공급원으로 널리 이용되고 있다.

배양액내 pH는 대조구와 질소원 첨가구 모두 배양 24시간째 pH 6.67-7.01로 SKK-Y-728의 적정 pH 범위인 3.5-6.5보다 높아 이후 효모증식이 저해된 것으로 생각된다. 본 실험의 pH 증가 및 효모증식 감소현상은 *Saccharomyces cerevisiae*가 반추위액내 미지성장인자(UGF)로 알려져 있는 휘발성지방산(VFA) 및 유기산을 이용하여 ethanol등을 생성하기 때문에 배양액내 pH가 증가한다는 보고(Dawson, 1987)와

ethanol의 함량이 2% 이상일때 *Saccharomyces cerevisiae*의 수율이 저하되며 acetaldehyde dehydrogenase 및 isocitrate lyase등의 enzyme 생성량이 감소한다고 보고한 Orlova등(1980)의 결과와 같은 원인으로 생각된다.

NH<sub>3</sub>-N 함량(mg/100ml)은 대조구를 제외하고 모든 질소원 첨가구에서 질소원의 분해에 의해 배양 12시간까지 증가하다가 24시간째 크게 감소하였는데, 대조구가 28.5에서 21.3으로 약 24% 이용된데 비하여 질소원 첨가구는 최대 NH<sub>3</sub>-N함량을 나타낸 12시간째를 기준으로 배양 종료시 요소 첨가구가 약 14.5%의 이용율을 보였으나 기타 질소원 첨가구는 약 8-10%정도의 이용율을 나타내 대체적으로 대조구보다 이용율이 낮았다.

환원당 함량(mg/ml)은 배양전에 비해 배양 종료시 대조구가 0.46에서 0.25로 약 45% 이용되었으나 질소원 첨가구는 약 40-42%정도로 질소원의 종류에 관계없이 대조구보다 약간 낮았으며 요소 첨가구가 42.2%로 조금 높았으나 질소원간의 차이는 없었으며, 환원당은 주로 효모증식이 왕성한 24시간 이전에 주로 이용되는 것으로 나타났다.

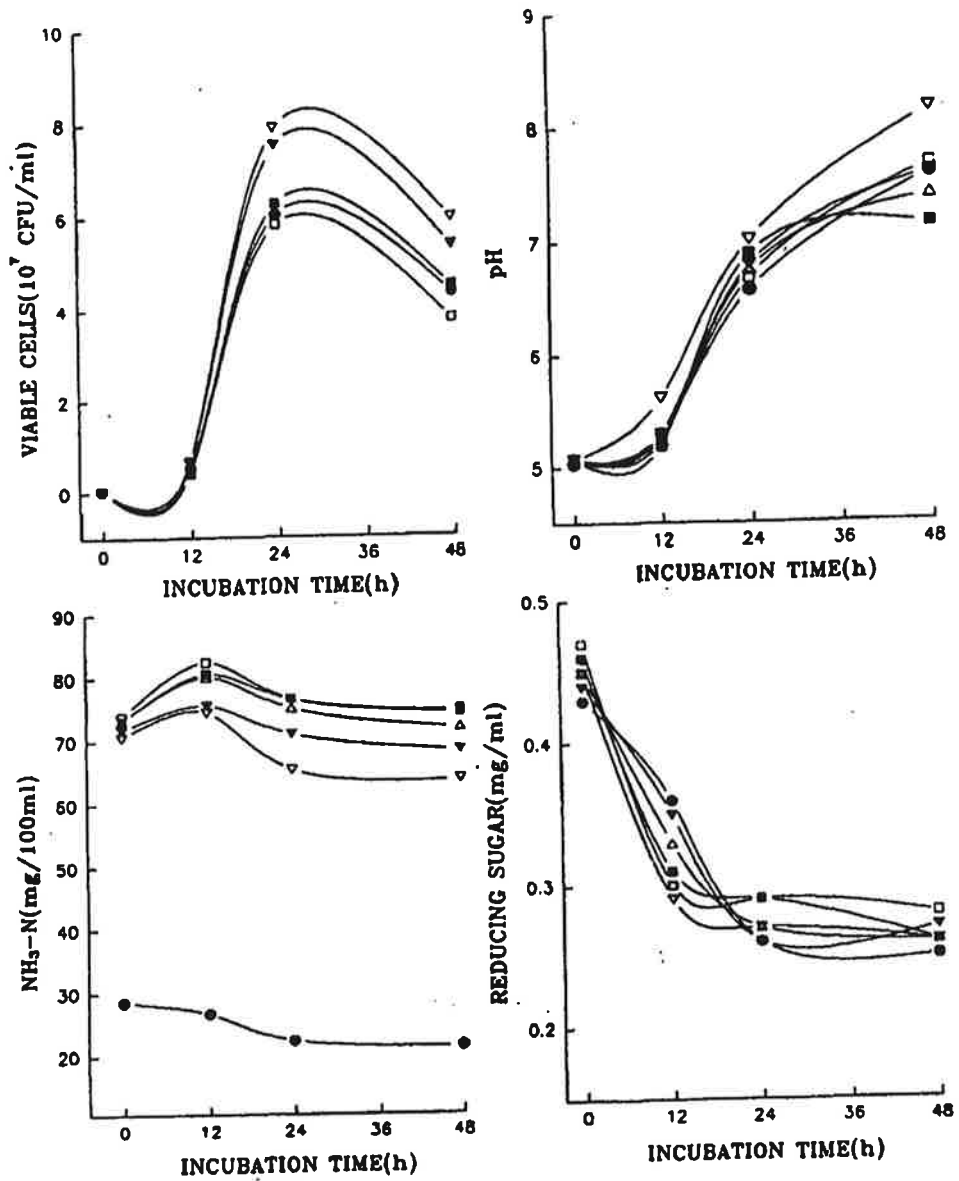


Figure 31. Effect of nitrogen compounds on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 (●, control; ▽, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO; ▼, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; □, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; ■, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; △, NH<sub>4</sub>Cl).

## 2) SKK-Y-786

5종의 질소 화합물 첨가에 의한 SKK-Y-786의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 32에서 보는 바와 같다. 최대 생효모수를 보인 배양 24시간째 대조구 6.87개에 비해 요소 및 ammonium chloride 첨가구는 각각 6.03개 및 6.24개로 큰 차이가 없었으나 기타 질소원 첨가구는 4.95-5.71개로 대조구보다 낮은 경향을 나타냈다.

이때 배양액내 pH는 대조구가 6.78, 요소와 ammonium chloride 첨가구가 6.67과 6.72로 기타 질소원 첨가구 6.29-6.52에 비해 상대적으로 높았으나 SKK-Y-786의 적정 pH인 4-7.0보다 낮았으며, 배양 종료시까지 적정 pH를 유지해 pH에 의한 증식저해는 없는 것으로 생각되며, pH 증가와 생효모수간에 상관관계가 큰 것으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 배양전 대조구 24.8과 질소원 첨가구 67-71에서 배양후 서서히 감소하여 배양 종료시 대조구의 이용율이 약 33%인데 비하여 질소원 첨가구는 약 22%-25%로 낮게 나타났다.

환원당 함량(mg/ml)은 대조구가 배양전 0.42에서 배양 48시간째 0.21로 감소하여 약 48%의 이용율을 보였으나, 질소원 첨가구는 대체로 배양 24시간까지 감소한 후 변화가 없어 약 38-43%의 이용율을 나타내 대조구보다 낮았다. 요소 첨가구가 42.9%로 질소원중 이용율이 가장 높았으나 질소원 종류에 따른 차이는 없었다.

*Candida utilis*는 lactate를 비롯한 단쇄지방산을 탄소 및 에너지 공급원으로 이용할 수 있기 때문에(Eddy와 Hopkins, 1985; Leao와 van Uden, 1986), 반추위액내 존재하는 식물체의 세포벽 구성물질인 hemicellulose로부터 유래한 galactose와 arabinose와 같은 당을 증식에 이용하고, alcohol류의 생성량도 *Saccharomyces cerevisiae*에 비해 적기 때문에 SKK-Y-786배양액중의 pH도 SKK-Y-728에 비해 높지 않은 것으로 생각되며, 효모증식을 저해한 것은 낮은 가용성 당함량과 당과 질소와의 비율인 것으로 생각된다.

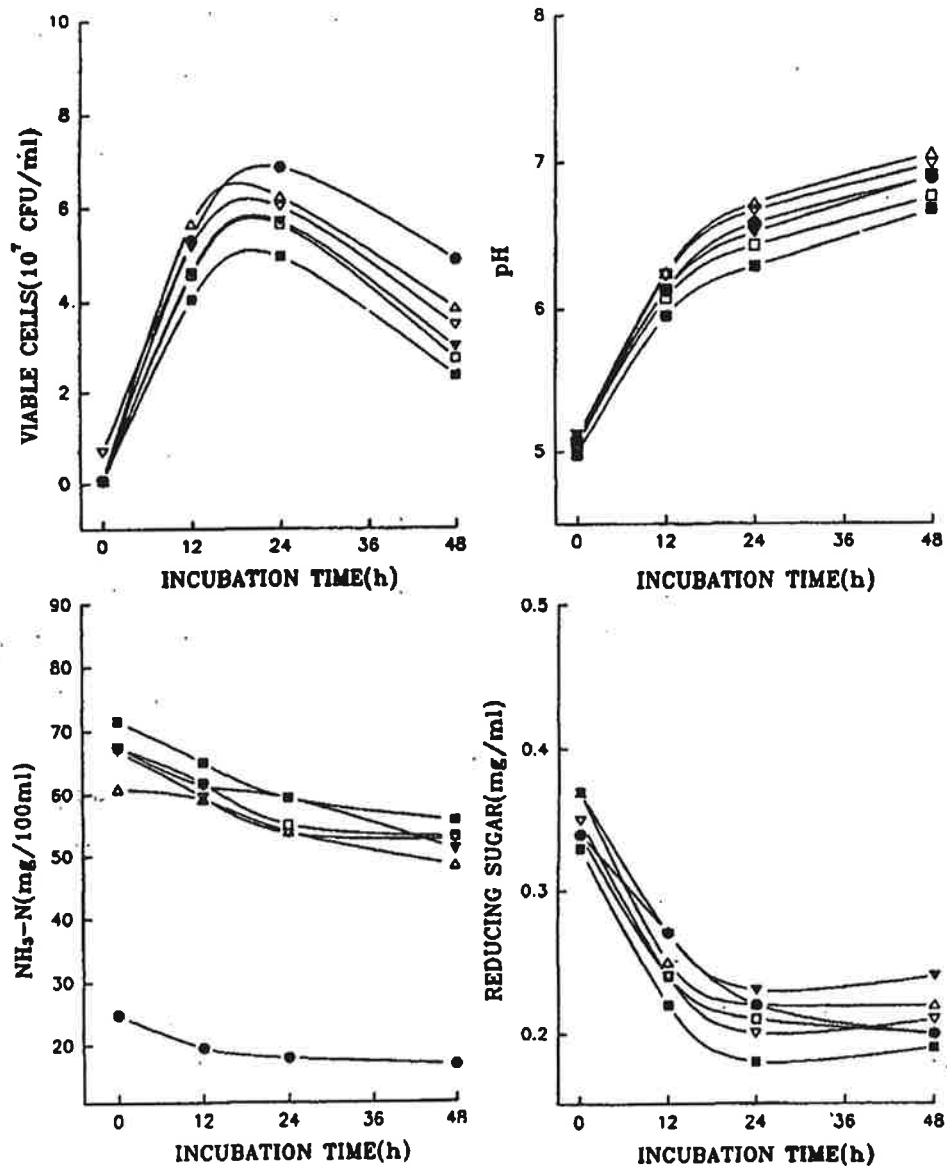


Figure 32. Effect of nitrogen compounds on the viable cells, pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 (●, control; ▽,  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ; ▼,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; □,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; ■,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; △,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).

### 3) SKK-Y-1293

질소화합물 0.1% 첨가에 의한 SKK-Y-1293의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 33에서 보는 바와 같다. 질소화합물 종류에 따른 생효모수의 차이는 없었으나 요소와 ammonium sulfate 첨가구가 타 질소원 첨가구에 비하여 빠른 증식을 하는 것으로 나타났다. 즉, 대조구의 경우 배양 24시간째 10.47개로 증가하였으나 질소원 첨가구는 요소와 ammonium sulfate 첨가구가 13.62개와 12.67개로 대조구보다 높았으며 기타 질소원 첨가구는 9.97-10.67개로 대조구와 유사하였다. 배양시간이 경과함에 따라 대조구에서는 24시간이후 감소하였으나 질소원 첨가구는 48시간까지 계속 증가하여, SKK-Y-1293은 질소 요구량이 높은 효모인 것으로 보여진다.

배양액내 pH는 배양 24시간째 대조구가 6.82이고 질소원 첨가구 7.04-7.34로 나타나 SKK-Y-1293의 적정 생육 pH인 4.0-7.0보다 다소 높았으며 배양 종료시에는 대조구 및 질소원 첨가구의 pH가 약 8.0정도로 높게 나타났다. SKK-Y-1293의 경우 pH 7.5에서도 약 80% 이상의 상대적 생육도를 나타내기 때문에 24시간 이후에도 증식이 가능했던 것으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 대조구가 배양전 27.5에서 배양 48시간째 9.7로 64.7% 이용된데 비하여 질소원 첨가구는 요소와 ammonium sulfate 첨가구가 배양전 약 80에서 각각 48.6과 50.1로 39.6%와 38% 이용되어 다른 질소원 첨가구보다는 높았으나 모든 질소원 첨가구가 대조구보다 낮게 나타났다.

환원당 이용율은 대조구가 ml당 배양전 0.46mg에서 48시간째 0.21mg으로 감소하여 54.3%인데 비하여 질소원 첨가구는 요소 63.6%, ammonium sulfate 62.7% 및 기타 질소원 60-61%로 대조구보다 높았으나 질소원 종류에 따른 차이는 없었다.

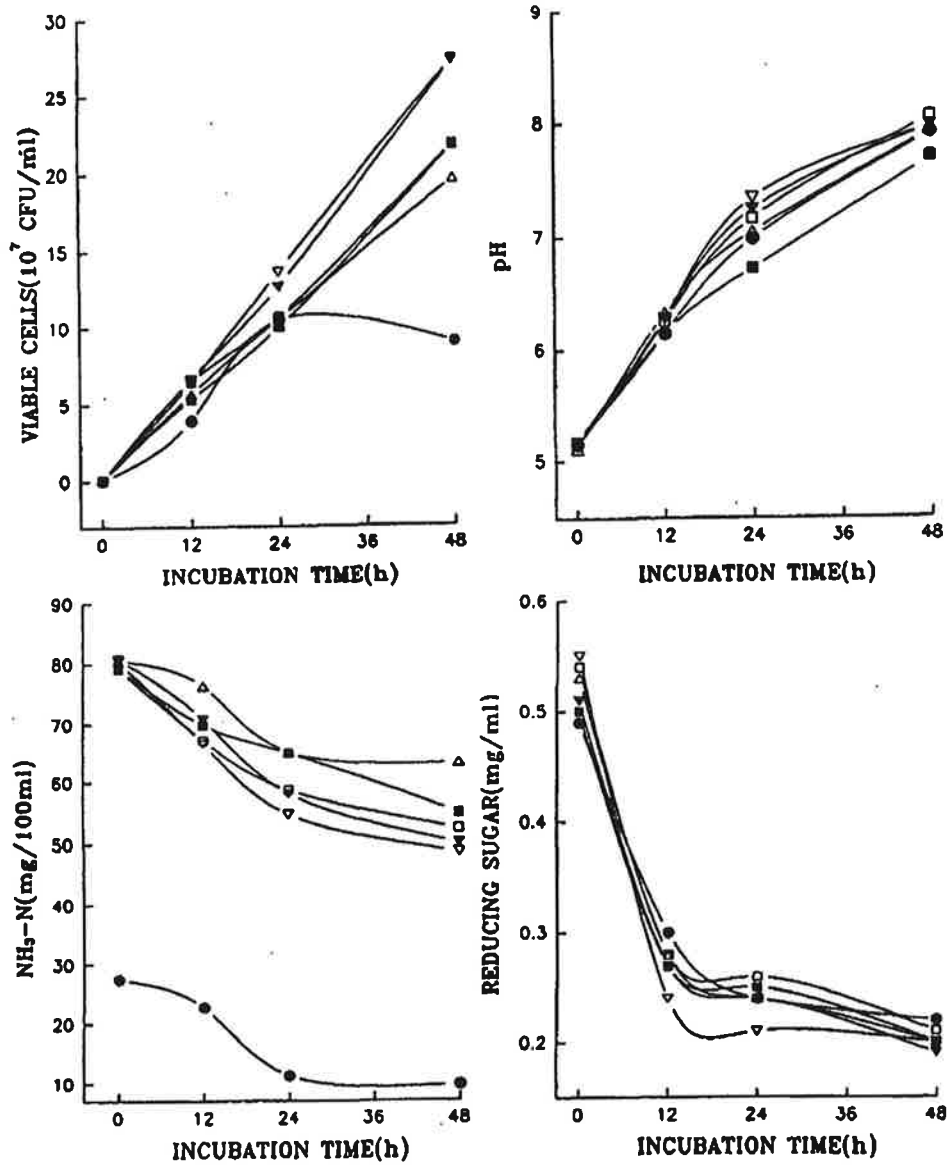


Figure 33. Effect of nitrogen compounds on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 (●, control; ▽, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO; ▼, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; □, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; ■, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; △, NH<sub>4</sub>Cl).



바. 요소 첨가수준이 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과

1) SKK-Y-728

요소 첨가수준에 따른 SKK-Y-728의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 34에서 보는 바와 같다. 생효모수는 배양 12시간까지는 0.3% 첨가구가 0.93으로 대조구 0.54와 0.1% 및 0.2% 첨가구 5.1과 7.8보다 높아 요소 첨가량이 많을수록 증식속도가 빨랐다. 그러나 배양 24시간째에는 0.1%와 0.2% 첨가구가 7.6개과 8.01개로 대조구와 0.3% 첨가구 6.03개 및 6.54개보다 높아 12시간 이후의 증식속도가 상대적으로 빨랐으며, 0.3% 첨가구는 질소함량이 환원당 함량에 비해 지나치게 높은 수준으로 생각된다.

pH는 배양 24시간까지는 대조구와 질소원 첨가구 모두 pH 6.67-6.90으로 나타나 80% 이상의 상대적 증식도를 나타내는 적정 pH 상한선인 pH 6.5보다 높았으며, 48시간째에는 7.5이상으로 매우 높아 24시간 이후 효모증식을 저해하였다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 대조구의 경우 배양 종료시까지 서서히 감소하여 약 25%의 이용율을 보인 반면 요소첨가구는 첨가수준에 관계없이 배양 12시간까지 증가한 후 감소하였는데, 12시간을 기준으로 48시간째 약 15-20%의 낮은 이용율을 보여 대조구보다 낮게 나타났다. Pinon(1977)과 Croes등(1978)은 배양액내 질소 함량이 지나치게 높으면 균체단백질합성에 저해작용을 한다고 보고하였는데, 본 실험에서도 12시간 이후  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량이 높은 것이 효모증식을 제한하는 요인중 하나로 생각된다.

환원당 이용율은 대조구가 약 42%인데 비하여 요소 첨가구에서 대체로 43-44%의 이용율을 나타내 대조구보다 높았으나 큰 차이는 없었다.

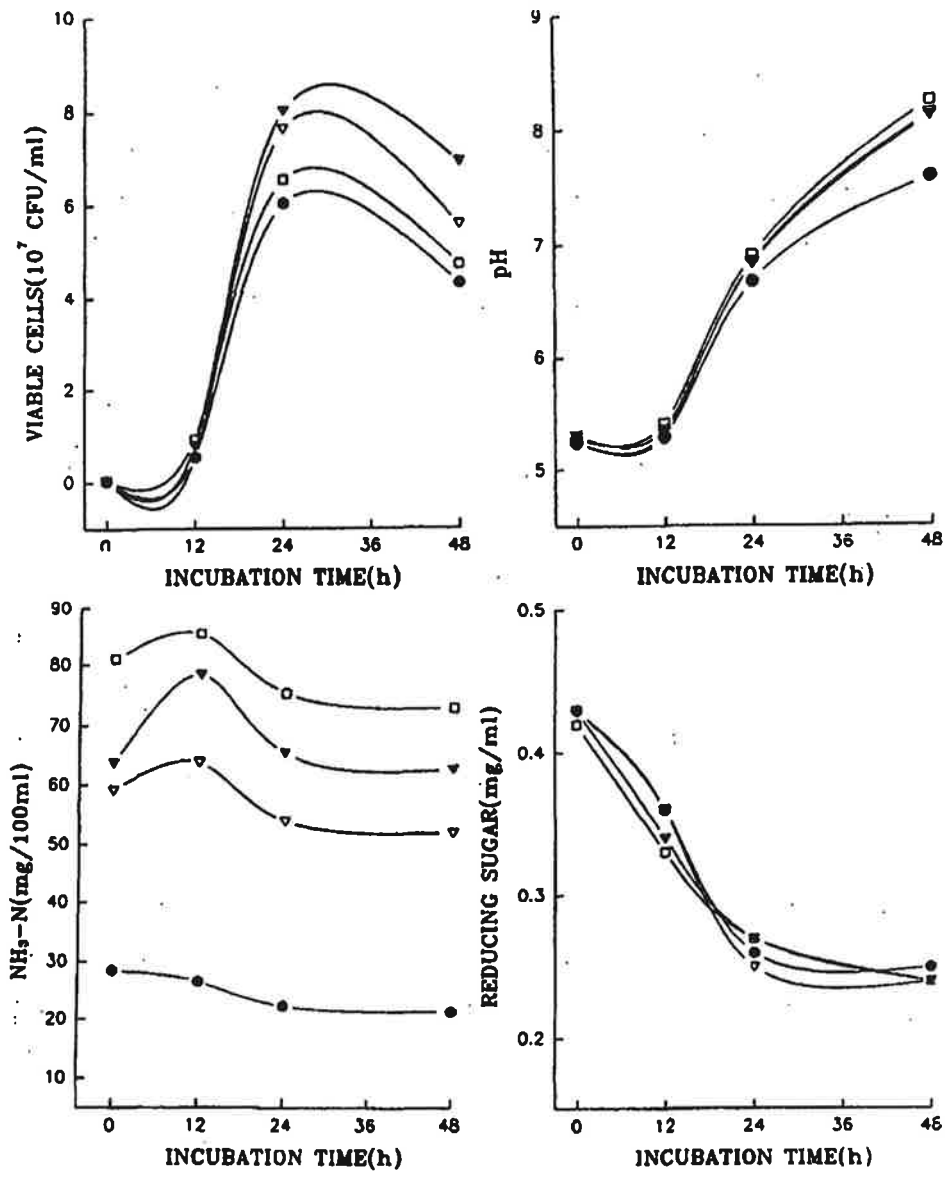


Figure 34. Effect of urea concentration on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 (●, control; ▽, urea 0.1%; ▼, urea 0.2%; □, urea 0.3%).

## 2) SKK-Y-786

SKK-Y-786의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 35와 같다. 대조구와 요소 첨가구 모두 배양 12시간째 생효모수가 크게 증가한 후 24시간까지 계속 증가하였으나, 12시간 이후의 증가폭은 작았으며 24시간 이후 감소하였다. 즉 SKK-Y-786의 경우 배양 12시간째까지는 대조구가 5.3개이고 요소 0.1%, 0.2% 및 0.3% 첨가구가 각각 5.57개, 5.70개 및 5.70개로 차이가 없었으나, 24시간째에는 대조구 6.87개에 비해 요소 0.1% 및 0.2% 첨가구가 7.57개와 7.30개로 높게 나타났으나 0.3% 첨가구는 대조구와 유사한 6.17개였다.

배양액내 pH는 요소 첨가수준이 높을수록 높은 경향을 나타냈으나 배양 24시간까지는 요소 0.3% 첨가구를 제외하고 pH 6.78-7.0으로 SKK-Y-786의 적정 pH인 4.0-7.0 범위내에 있어 증식에 지장을 주지는 않은 것으로 생각된다.

배양전  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 대조구 24.8에 비해 요소 첨가수준이 증가할수록 51.5, 64.1 및 81.7로 높았으며 배양시간이 경과함에 따라 서서히 감소하여 48시간째 대조구가 16.7로 32.7% 이용되었으나 요소 첨가구는 37.4, 51.2와 66.0으로 25.4%, 20.1% 및 19.2% 이용되어 대조구보다 이용율이 낮았고, 또한 첨가수준이 증가할수록 이용율이 낮게 나타났다.

환원당 함량(mg/ml)은 배양전 약 0.40-0.42에서 최대 생효모수를 보인 배양 24시간째 대조구가 0.24로 46.6% 이용되었고 요소 0.1%, 0.2% 및 0.3% 첨가구는 0.22, 0.21 및 0.22로 각각 46.3%, 50% 및 45%의 이용율을 나타내 요소 첨가구의 이용율이 대조구보다 높았고, 최대 효모수를 나타낸 요소 0.2% 첨가구의 이용율이 가장 높았다.

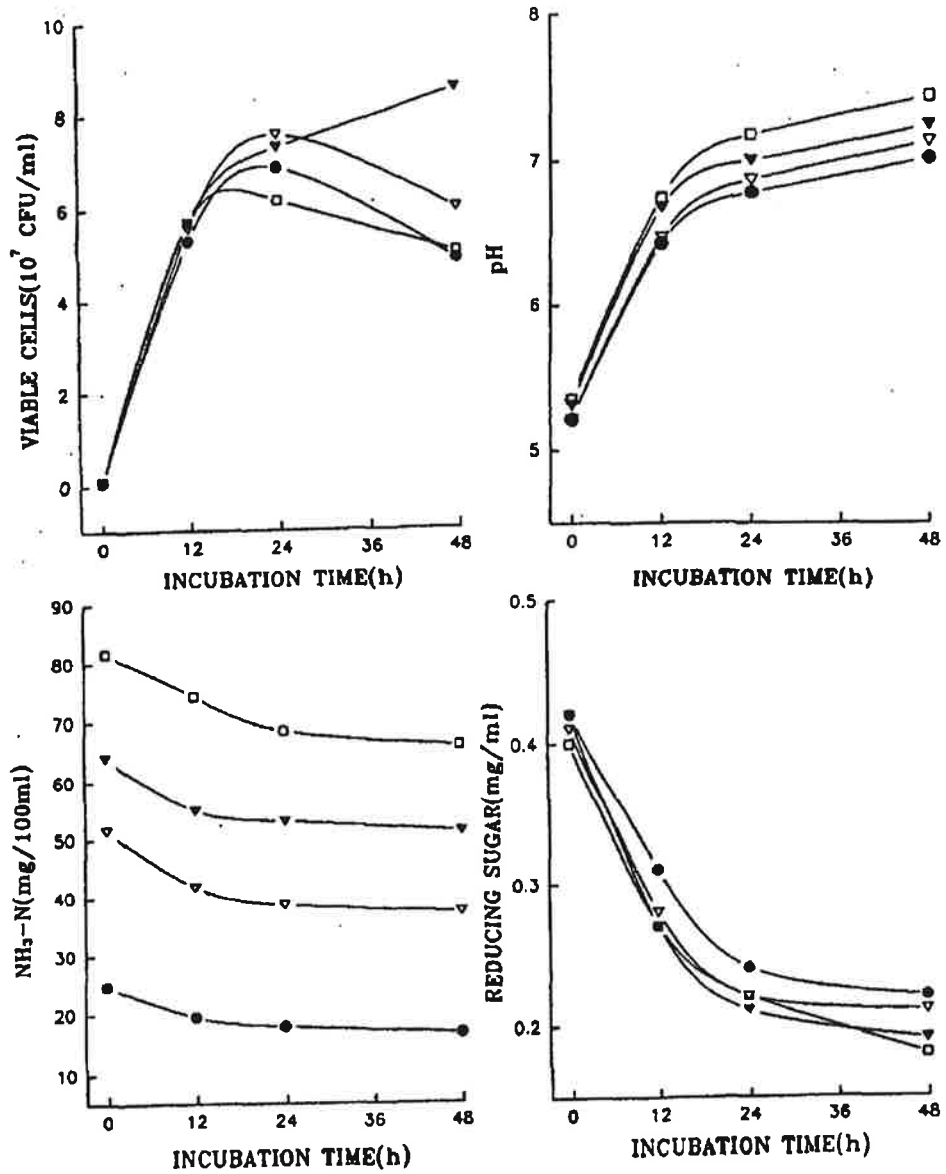


Figure 35. Effect of urea concentration on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 (●, control; ▽, urea 0.1%; ▼, urea 0.2%; □, urea 0.3%).

### 3) SKK-Y-1293

요소 첨가수준에 따른 SKK-Y-1293의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 36과 같다. 배양 12시간까지의 생효모수는 요소 0.2% 첨가구가 5.6개로 대조구 및 타 첨가수준보다 높았으나, 24시간째에는 대조구와 0.1% 첨가구가 각각 10.47개와 10.64개로 요소 0.2%와 0.3% 첨가구의 8.43과 8.51보다 높았고, 배양 종료시에는 0.1% 첨가구에서 18.93개의 최대 생효모수를 나타냈다.

배양액내 pH는 배양 12시간까지는 요소 첨가수준에 관계없이 pH 6.04-6.40으로 SKK-Y-1293의 적정 pH인 4.0-7.0을 유지하여 증식에 지장을 주지는 않았으나 이후 24시간째에는 대조구와 요소 0.1% 첨가구를 제외하고 7.2이상으로 높아졌으며, 48시간째에는 0.1% 첨가구가 8.21로 가장 높은 pH를 나타내 적정 pH보다 높았다.

배양전  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 SKK-Y-728 및 SKK-Y-786과 같이 요소 첨가수준이 증가할수록 높게 나타났으며, 배양시간이 경과함에 따라 감소하여 이용율은 48시간째 대조구가 9.7로 64.7% 인데 비하여 0.1%, 0.2% 및 0.3% 첨가구는 약 22-36%의 이용율을 나타내 대조구보다 낮았으며, 요소 첨가수준이 증가할수록 낮은 이용율을 나타냈다.

환원당 함량(mg/ml)은 배양전 0.44-0.46에서 배양 종료시 대조구가 0.21로 54.3%, 0.1%와 0.2% 첨가구가 0.18, 0.20으로 각각 59%와 54%의 이용율을 나타냈으며, 최대 생효모수를 보인 0.1% 첨가구의 이용율이 가장 높았으나 처리구간에 유의적인 차이는 없었다.

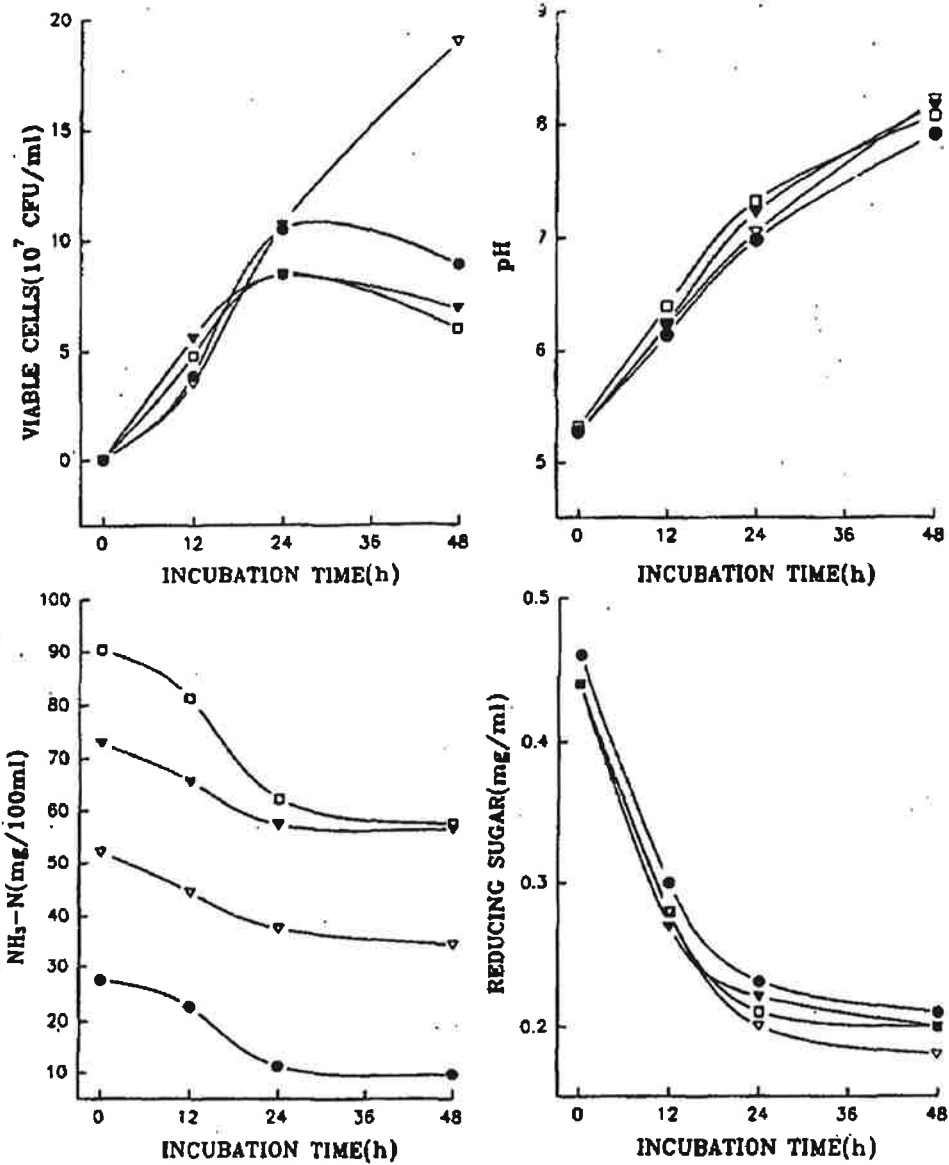


Figure 36. Effect of urea concentration on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents, and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 (●, control; ▽, urea 0.1%; ▼, urea 0.2%; □, urea 0.3%).

## 사. 당밀 첨가수준이 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과

당밀의 영양소 함량은 제당에 이용하는 원료, 생산지역, 기후조건 및 제조 공정에 따라 변이가 심한데, 사탕무우 당밀의 경우 당함량은 낮으나 질소함량이 높으며 Ca와 biotin 함량이 낮은 반면 사탕수수 당밀은 당, 질소 및 biotin 함량이 높아 효모증식에 매우 효과적인 에너지원으로 알려져 있다(Crueger, 1984).

반추위액 배지(D.R.E.)내 환원당 함량이 ml당 평균 0.5mg 정도 함유되어 있으나 이용율이 낮아 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293 배양시 이용율이 약 40-60% 정도이며, 질소함량에 대한 비율이 낮아 효모증식이 저해된 것으로 추정되어 당밀을 첨가하여 질소에 대한 당의 비율을 높였을 때 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1) SKK-Y-728

당밀 첨가에 의한 SKK-Y-728의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 37과 같다. 생효모수는 당밀 첨가 수준이 증가할수록 12시간째부터 차이를 나타내 대조구 0.42개에 비해 2%, 4% 및 6% 첨가구가 1.73개, 3.63개 및 3.23개로 크게 증가하였으며, 24시간째에는 대조구 5.89개에 비해 2%, 4% 및 6% 첨가구가 각각 8.03, 9.12 및 10.03개로 4%와 6% 첨가구는 대조구에 비해 155%와 175.6% 증가한 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

당밀 첨가에 의한 pH변화는 배양후 당밀 첨가수준이 높을수록 높은 수준을 유지하여 배양 24시간째 대조구 6.44를 제외하고 6.8-7.2로 적정 생육 pH인 3.5-6.5보다 높게 나타나 이후 증식을 저해한 요인중 하나로 생각된다.

배양액내  $\text{NH}_3\text{-N}$ 함량은 배양전 27.9-28.8에서 배양 종료시 대조구가 21.6으로 24.2% 이용되었으나 2%, 4% 및 6% 첨가구는 20.6, 17.0 및 12.3으로 각각 28.5%, 40.1% 및 55.9%가 이용되어 첨가수준이 증가할수록 높은 질소 이용율을 나타냈다. 또한 최대 생효모수를 보인 배양 24시간째까지의 질소 이용율이 대조구는 22.5%, 2%, 4% 및 6% 첨가구는 26.4%, 32.0% 및 45.2%로 전체 이용율의 80% 이상을 이용하였으며, 효모증식속도가 빠를수록 질소 이용율이 높았다.

환원당 함량은 배양전 대조구가 0.49, 2%, 4% 및 6% 첨가구가 1.78, 3.29 및 4.85

로 당밀 첨가수준이 증가할수록 높았으며, 발효가 진행되면서 최대 생효모수를 나타낸 24시간째까지 크게 감소하여 대조구가 0.28로 42.9% 이용되었으나 2%, 4% 및 6% 첨가구는 0.68, 1.06 및 1.40으로 각각 61.8%, 67.8% 및 71.7%의 높은 이용율을 나타내어 당밀을 기질로 하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양한 결과 36시간째 가장 높은 수율 및 기질 소비량을 나타냈다는 Agarwal등(1947)의 보고와 유사하였다.

Berry와 Brown(1987)은 *Saccharomyces cerevisiae*는 당 농도가 높을 때 호흡과정에 저해를 받아 ethanol발효가 일어나 수율이 감소한다고 보고하였는데, 본 실험에서 사용한 당밀 회석액 6% 첨가수준은 SKK-Y-728의 증식을 저하시키는 정도의 당농도가 아닌 것으로 생각된다. *Saccharomyces cerevisiae*는 탄소원의 이용율이 다양하여 탄소 및 에너지 공급원으로 지방산을 이용할 뿐만아니라(Cassio등, 1987), sucrose, glucose, fructose, galactose, maltose 및 maltotriose등의 당을 능동수송이나 수용확산에 의해 흡수 이용하는 것으로 알려져 있는데(Stewart와 Russell, 1987), 본 실험에 사용된 도축 반추위액내의 각종 탄소원이 배양시 분리효모의 증식에 이용되는 것으로 생각된다.



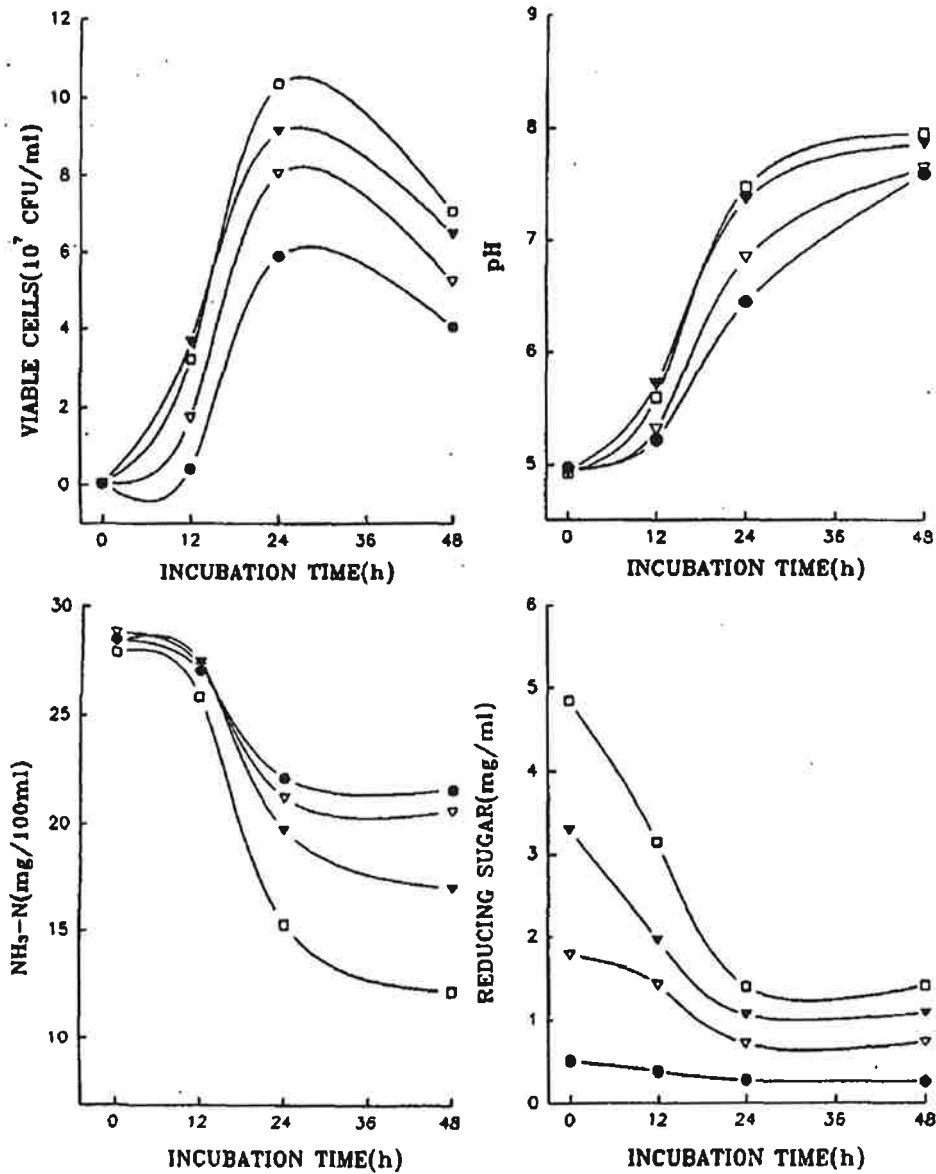


Figure 37. Effect of molasses concentration on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 (●, control; ▽, molasses 2%; ▼, molasses 4%; □, molasses 6%).

## 2) SKK-Y-786

당밀 첨가에 의한 SKK-Y-786의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 38과 같다. 생효모수는 배양 12시간째 부터 당밀 첨가구가 5.0개 이상으로 대조구 3.6개보다 많았으며, 24시간째부터 당밀 첨가수준과 비례해 증가하여 4%와 6% 처리구가 대조구 6.92개에 비하여 11.36개와 12.53개로 크게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 2% 첨가구는 7.87개로 대조구보다 높았으나 타 첨가구에 비해 낮은 생효모수를 나타냈다. 대조구에서는 24시간 이후 생효모수가 감소하였으나 당밀 첨가구에서는 24시간 이후에도 약간 상승하는 것으로 나타났다.

배양액내 pH는 배양 24시간까지는 6% 첨가구 7.05를 제외하고 6.4-6.8로 적정생육 pH인 4.0-7.0을 유지하였으나, 배양 48시간째에는 대조구를 제외하고 모든 처리구에서 pH 7.0이상을 나타내 pH 상승이 효모증식을 저해한 것으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 배양후 12시간까지는 서서히 감소하다가 이후 24시간째 까지 크게 감소한 후 큰 변화가 없었다. 대조구의 경우 배양 종료시 26.7%의 이용율을 보인 반면 당밀 2%, 4% 및 6% 첨가구는 각각 46.3%, 75.0% 및 85.95%의 이용율을 나타내 당밀 첨가 수준이 증가함에 따라 질소 이용율이 상승하는 것으로 나타났다.

환원당 이용율 또한 배양 종료시 대조구가 44.8% 인데 비하여 당밀 2%, 4% 및 6% 첨가구는 각각 70.0%, 72.8% 및 76.7%가 이용되어 당밀 첨가수준이 증가할수록 이용율이 상승하였으나 큰 차이는 없었다. 이는 당밀을 첨가함으로써 공급된 당이 효모의 증식 및 유지에 필요한 에너지로 이용되기 때문에 효모증식이 가능하다고 보고한 Barford(1987)의 결과를 고려할 때 본 실험에서 첨가한 당밀이 반추위액내 존재하는 에너지원보다 효모의 유지와 증식에 필요한 에너지원으로 쉽게 이용되어 분리균의 증식을 촉진한 것으로 생각된다. 또한 *Candida utilis*는 당농도에 저해를 받지않고 다량의 균체를 생성하며(Berry와 Brown, 1987), 산소공급이 부족하거나 탄소원에 적응치 못하였을때 소량의 alcohol 발효가 이루어 진다고 하였는데(Barford, 1987), 본 실험에서는 SKK-Y-786 배양시 alcohol은 생성되지 않은 것으로 생각된다.

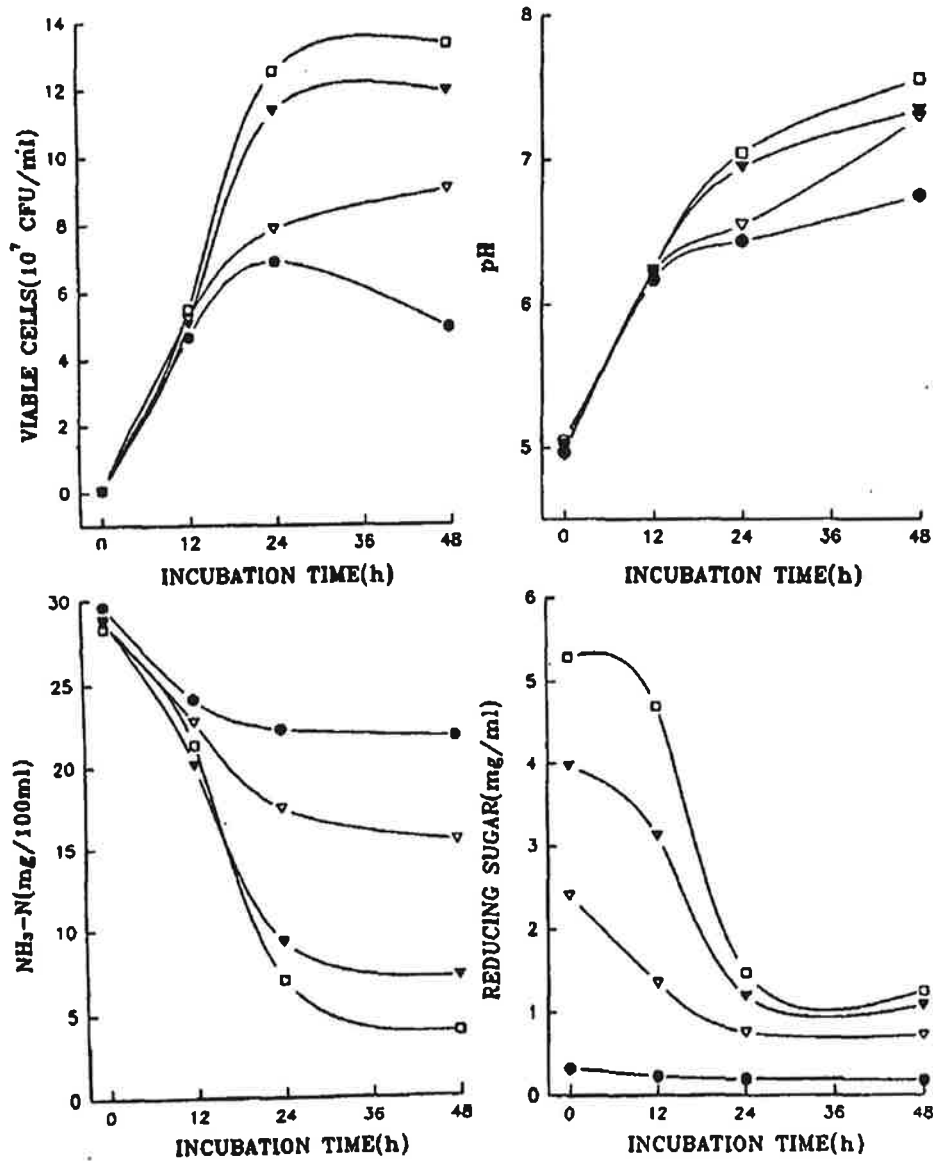


Figure 38. Effect of molasses concentration on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 (●, control; ▽, molasses 2%; ▼, molasses 4%; □, molasses 6%).

### 3) SKK-Y-1293

당밀 첨가 수준에 따른 SKK-Y-1293의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 39와 같다. 생효모수는 배양후 12시간까지는 대조구와 당밀 첨가구간에 차이가 적었으나, 24시간째에는 대조구 10.97개에 비하여 당밀 2%, 4% 및 6% 첨가구가 각각 17.76개, 18.17개 및 16.73개로 크게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 배양 48시간째 대조구의 경우 9.24개로 감소하였으나 당밀 첨가구는 각각 23.33개, 26.33개 및 24.35개로 증가하였다( $p < 0.05$ ).

배양액내 pH는 배양후 12시간까지는 대조구와 첨가구가 유사하였으나 24시간째에는 대조구의 경우 7.13으로 SKK-Y-1293의 적정 pH인 4.0-7.0보다 높았으나 당밀 첨가구는 첨가수준이 높을수록 낮게 나타나 2%, 4% 및 6% 첨가구가 각각 6.61, 5.87 및 5.78로 적정 pH를 유지하여 당밀 첨가구에서는 pH에 의한 증식저해 현상은 없었다. 이는 SKK-Y-728 및 SKK-Y-786와는 다른 경향으로 SKK-Y-1293의 경우 질소 요구량이 높아 분해된 질소화합물들이 배양액내 축적되는 양이 적었기 때문으로 생각된다.

타 분리효모에 비하여 질소 이용율이 매우 높아 배양 종료시 대조구가 72.9%인데 비해 당밀 첨가구에서는 98% 이상으로 높게 나타났으며( $p < 0.05$ ), 그중 4% 첨가구가 99%로 가장 높았다. 또한 생효모수가 크게 증가한 24시간까지의 이용율이 높았으며 배양종료시 배양액내  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량이 100ml당 0.3-0.4mg으로 매우 적어 효모증식의 제한요인으로 작용하므로 24시간째 질소를 보충해야 할 것으로 추정된다.

환원당 함량(mg/ml) 배양전 대조구 0.29와 2%, 4% 및 6% 첨가구 2.11, 3.93 및 4.69에서 배양후 계속 감소하여 배양종료시 대조구가 44.8% 이용된데 비하여 당밀 첨가구는 각각 60.2%, 70.7% 및 68.7%가 이용되어 대조구보다 약 20% 정도 높았으며 그중 4% 첨가구가 타첨가구에 비해 다소 높은 이용율을 나타냈다.

당밀은 다량의 당 이외에 질소 화합물, 비타민 및 미량의 광물질을 함유하고 있고 (Imrie, 1969) 또한 소량의 acetic acid, propionic acid butyric acid 및 valeric acid 등도 함유하고 있어 (Anderson, 1956; Dierssen 등, 1956), 사탕무우 당밀은 지나치게 높은 sulphur dioxide를 함유하고 있어 yeast의 수율을 저하시키며 (Baker, 1976), 사탕수수 당밀에는 경우에 따라 상당량의 hydroxymethyl furfural이 함유되어 있어 혐기조건에서는 효모의 생육을 저해하나, 호기조건에서는 0.4%까지는 사용이 가능하다는 보

고(Rose와 Harrison, 1970)가 있으나, 본 실험에서는 당밀 첨가에 의하여 분리 효모의 증식이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

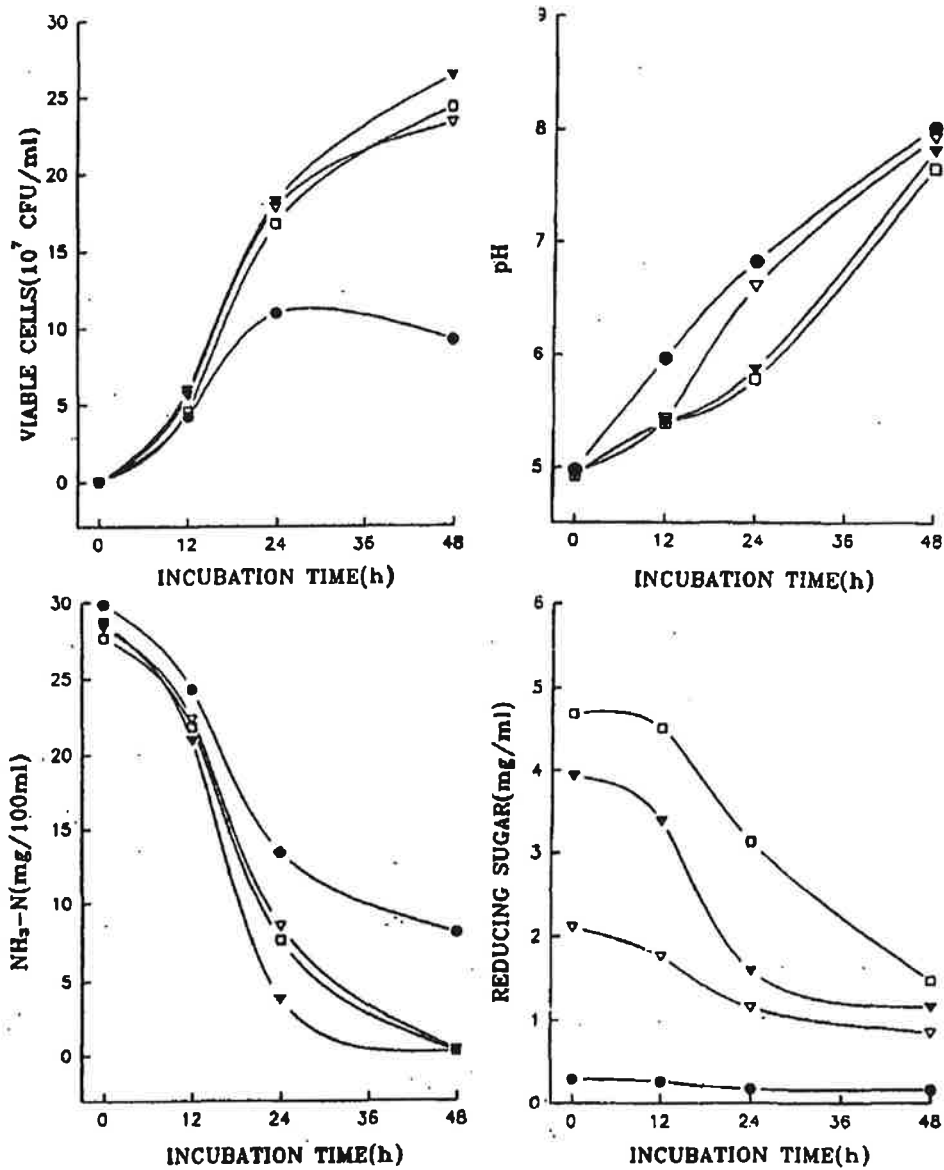


Figure 39. Effect of molasses concentration on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 (●, control; ▽, molasses 2%; ▼, molasses 4%; □, molasses 6%).

## 아. 인 및 칼륨 첨가가 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과

인은  $H_2PO_4$  형태로서만 이용되는데, 인은 세포내에서  $PO_4^{2-}$  형태로서 기질과 탄수화물 합성에 관여하며(Kulaev와 Vagabov, 1983), 칼륨이온( $K^+$ )은 세포내로의  $PO_4^{2-}$ 의 수송을 보조하여 phosphate의 흡수를 촉진하는 상호작용을 갖고있다(Schmidt 등, 1949). 효모 배양중 인의 함량은 효모의 생육에 큰 영향을 미치지 않으나 인의 함량에 따라 성장율과 세포 구성물질이 변한다고 Suomalainen과 Oura(1975)이 보고하였으며, 효모는 인산이 제한인자일 경우 non-specific phosphomonoesterase를 분비하여 phosphate ester로부터 생성된 인산을 이용한다고 알려져 있다(Schurr와 Yagil, 1971).

### 1) SKK-Y-728

인과 칼륨 첨가에 의한 SKK-Y-728의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $NH_3-N$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 40과 같다. 생효모수는 배양 24시간째 인산과 칼륨 첨가구가 5.23-6.33개로 대조구 5.67개와 차이가 없었으며, 모든 처리구에서 배양 24시간째 최대 효모수를 보인 후 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 칼륨 공급원 첨가구 5.59개와 5.23개보다는 인산 공급원 첨가구의 생효모수가 6.23개와 6.33개로 높은 경향을 나타냈는데, 그중  $K_2HPO_4$  첨가구가 6.33개로 가장 높은 생효모수를 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다.

pH 또한 인산 공급원 첨가구가 대조구나 칼륨 첨가구에 비해 높은 경향을 나타냈으며, 배양 24시간째  $K_2HPO_4$  첨가구가 6.55로 SKK-Y-728의 적정 pH인 3.5-6.5보다 약간 높았다. 그러나 대조구와 칼륨 첨가구에서는 6.29-6.42로 적정 pH를 유지하였으며, 그후 모든 처리구에서 7.3이상으로 높아졌는데, 이는 24시간 이후의 질소 이용율이 저하되었기 때문으로 추정된다.

배양액내  $NH_3-N$  함량(mg/100ml)은 배양후 서서히 감소하다가 24시간째 크게 감소한 후 변화가 없었다. 배양 종료시 대조구의 질소 이용율이 27.5%인데 비하여  $KH_2PO_4$  첨가구와  $K_2SO_4$  첨가구는 26.3%와 28.7%로 유사하였으나,  $K_2HPO_4$  첨가구가 31.9%로 다소 높았고 KCl 첨가구는 25.5%로 낮은 이용율을 나타냈으나 대조구와 첨

가구간에 유의적인 차이는 없었다.

환원당 함량도 배양 24시간까지 크게 감소한 후 변화가 적었는데, 대조구의 환원당 이용율이 43.5%인데 비하여  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  및  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  첨가구와  $\text{K}_2\text{SO}_4$  및  $\text{KCl}$  첨가구는 각각 42.2%, 43.2%와 42.5%, 41.3%로 대조구와 차이가 없었으며 인과 칼륨 첨가구 간에도 차이가 없었다.



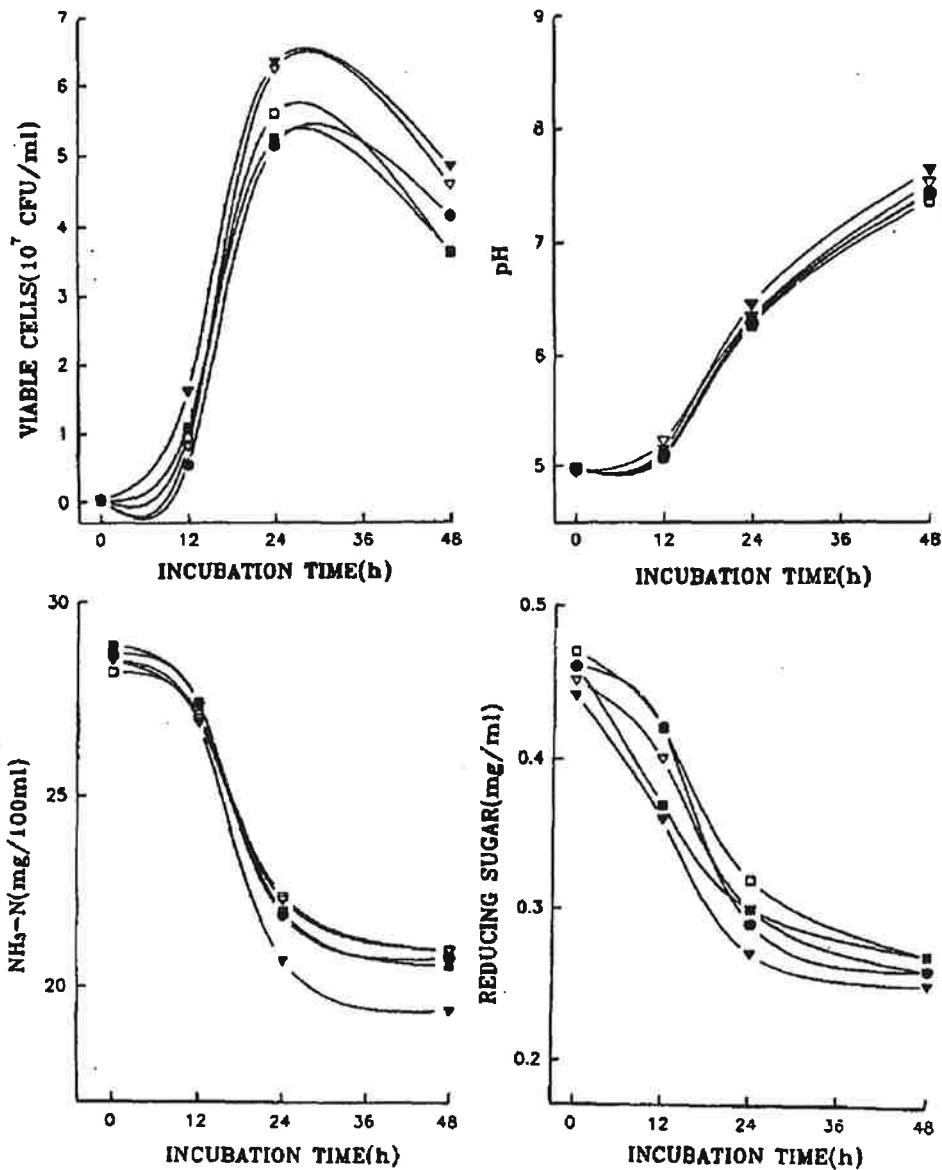


Figure 40. Effect of P and K sources on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 (●, control; ▽, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ▼, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; □, KCl; ■, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

## 2) SKK-Y-786

SKK-Y-786배양시 인산 및 칼륨 첨가에 따른 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 41과 같다. 생효모수의 경우 배양 12시간째 크게 증가한 후 24시간째까지 증식이 이루어졌으나, 그후 배양시간이 경과하면서 감소하는 경향을 나타냈다. 최대 생효모수를 보인 배양 24시간째 대조구가 6.07개인데 비하여  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  첨가구가 7.17개로 다소 높았으나, 기타 첨가구는 6.27-6.47개로 대조구와 유사하였다.

배양액내 pH는 대조구와 첨가구 모두 배양후 증가하여 최대 생효모수를 나타낸 24시간째 6.4-6.53으로 SKK-Y-786의 적정 pH인 4.0-7.0을 유지하였고 배양 종료시에도 적정 pH 수준을 유지하여 pH에 의한 증식저해는 없는 것으로 나타났다.

질소 이용율은 전 배양기간을 통해  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  첨가구가 25.7%로 대조구 23.2%와 기타 첨가구 22.8-24.4보다 약간 높았으나 큰 차이가 없었다.

환원당 이용율 또한  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  첨가구가 45.4%로 대조구 42.2% 및 기타 첨가구 43.2-43.5%와 큰 차이가 없었다.

일반적으로 *Candida utilis*를 배양할때 0.05%의  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  첨가가 효과적인 것으로 알려져 있으나(Barnett등, 1983), 본 실험에서는 인 및 칼륨공급에 따른 효모 증식의 차이는 없었다.

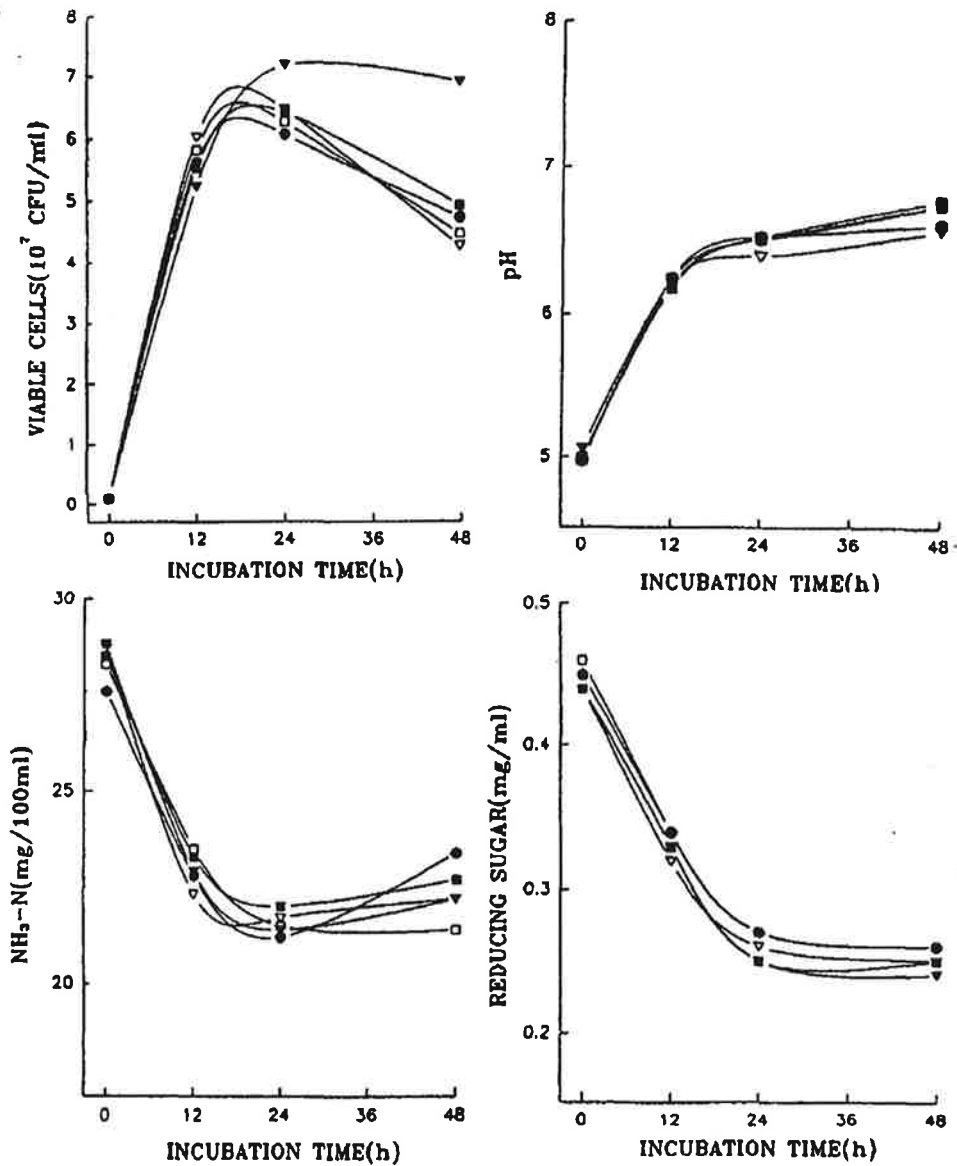


Figure 41. Effect of P and K sources on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 (●, control; ▽, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ▼, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; □, KCl; ■, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 3) SKK-Y-1293

인산과 칼륨 공급원 0.05% 첨가에 따른 SKK-Y-1293의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 42와 같다. 생효모수는 대조구와 첨가구 모두 약 9.27-9.77개로 차이가 없었으며, pH도 배양 24시간까지는 모든 처리구에서 6.89-7.05로 다소 높았으나 SKK-Y-1293의 적정범위를 유지하였으며, 그후 배양시간이 경과하면서 증가하였다.

질소 이용율은 대조구가 66.5%인데 비하여 인 및 칼륨 첨가구는 66.1-68.1%로 차이가 없었으며, 환원당 이용율 또한 대조구 52.3%에 비해 인 및 칼륨 첨가구는 약 50-54.3%로 차이가 없었으며, 공급원간에도 차이가 없었다.

이상의 결과 도축 반추위액을 기질로 분리 효모 배양시 인 및 칼륨의 공급은 생효모수 증가 및 기질 이용율 증진에 효과가 없는것으로 나타났는데, 이는 반추위액내 함유되어 있는 인과 칼륨이 이용되었기 때문으로 추정된다.

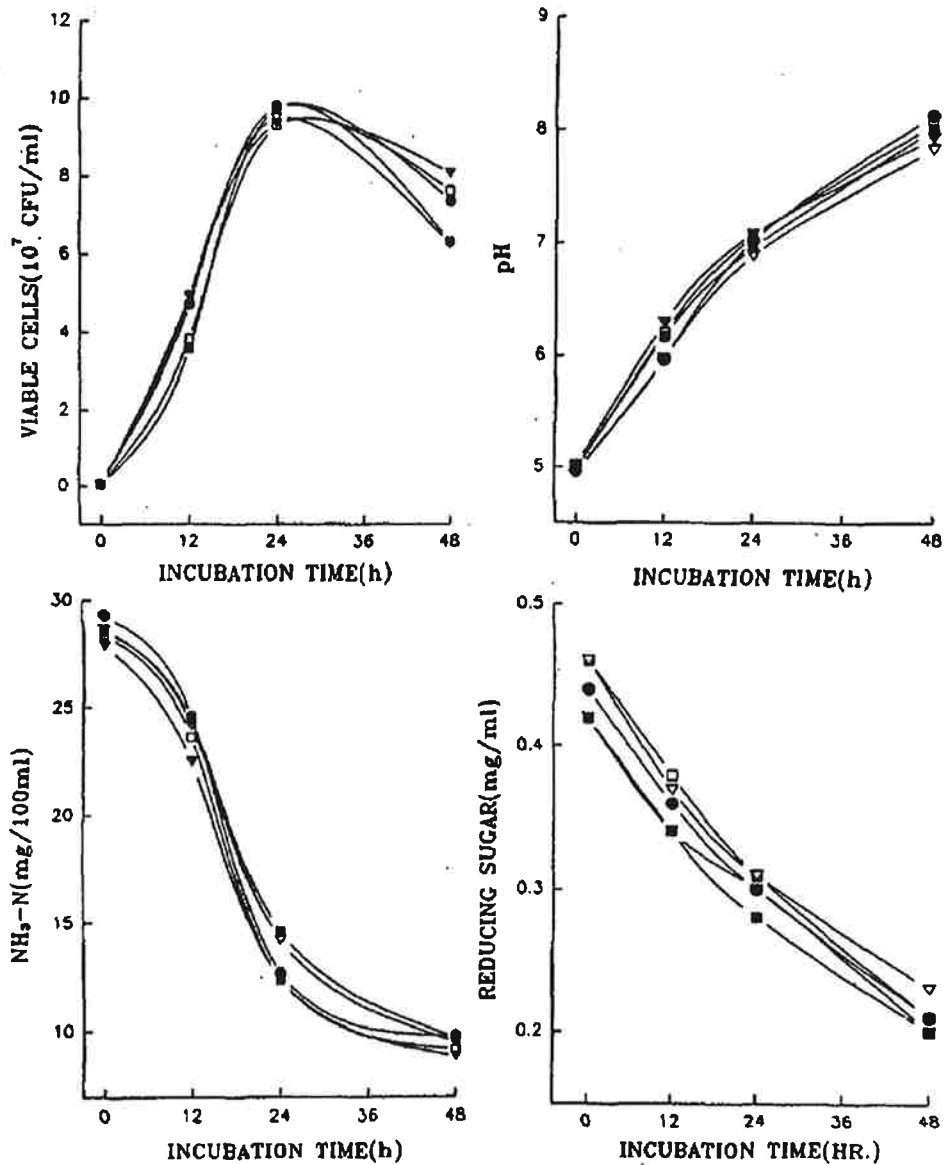


Figure 42. Effect of P and K sources on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 (●, control; ▽, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ▼, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; □, KCl; ■, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

자. 무기염류 첨가가 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 효과

4종의 무기염류( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  및  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )를 배양액에 0.02% 첨가할때 효모증식에 미치는 효과는 다음과 같다.

1) SKK-Y-728

무기염류 첨가에 따른 SKK-Y-728의 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $NH_3-N$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 43과 같다. 생효모수는 배양 24시간째까지 증가한 후 감소하였는데, 최대 효모수를 나타낸 24시간째 대조구와 Mg 첨가구가 6.42개와 6.53개로 유사한 반면, Fe, Cu 및 Ca 첨가구는 5.62개, 4.97개 및 5.84개로 다소 낮았으나 유의적인 차이는 없었다.

배양액내 pH는 24시간까지는 6.04-6.31로 SKK-Y-728의 적정 생육 pH인 3.5-6.5를 유지하였으나 그후 적정 pH보다 높아지는 것으로 나타났다.

질소 이용율은 대조구가 30.5%인데 비하여 Mg 첨가구가 32.4%로 약간 높았으나 Fe, Cu 및 Ca 첨가구는 각각 29.0%, 26.4% 및 27.3%로 대조구보다 낮은 이용율을 나타냈다.

환원당 이용율은 Mg 첨가구가 약 50%로 대조구 46.9% 보다 다소 높았으며, Fe, Cu 및 Ca 첨가구는 44.9%, 43.8% 및 44%로 대조구보다 낮았으나 유의적인 차이는 없었다.

Mitchison(1958)은 *Saccharomyces cerevisiae*가 bud cell 형성후 약 20분간 지수적으로 급격한 성장을 나타냈다고 보고하였으며, Elliott와 McLaughlin(1979)은 *Saccharomyces cerevisiae*의 총단백질 및 RNA 합성율이 대수적으로 증가한다고 발표하였다. Novotny등(1988)과 Walker-Caprioglio등(1990)은 alcohol생성으로 인한 효모의 생육저해는 ethanol 존재시 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포막을 구성하는 주요 성분인 총sterol 함량을 크게 감소시키며, Casey등(1984)과 Mishra와 Prasad(1989)는 지방산, 인지질 및 ergosterol을 첨가하므로써 수율을 높히고 ethanol에 대한 내성을 증가시켰다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서도 SKK-Y-728의 경우 alcohol생성에 의해 효모의 증식이 일부 저해되는 것으로 사료된다.

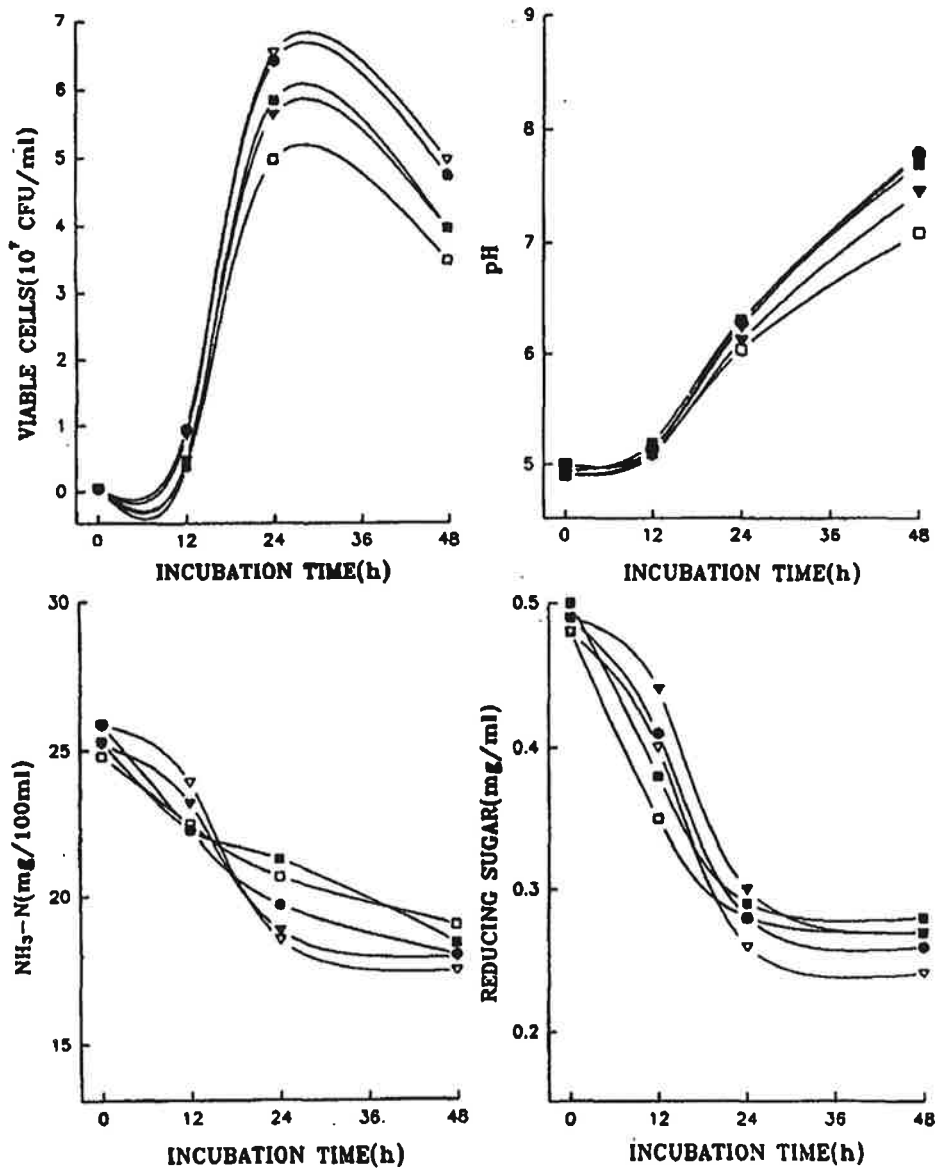


Figure 43. Effect of trace elements on the viable cells, pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 (●, control; ▽, Mg; ▼, Fe; □, Cu; ■, Ca).

## 2) SKK-Y-786

SKK-Y-786 배양시 무기염류 첨가가 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)에 미치는 영향은 Figure 44와 같다. 생효모수는 배양 12시간째 크게 증가한 후 24시간째까지 증가하다가 감소하는 경향을 나타냈으며, SKK-Y-728과 마찬가지로 대조구와 첨가구간에는 차이가 없었다. 즉, 배양 12시간째 대조구가 4.12개로 무기염류 첨가구 3.98-4.73개와 차이가 없었고, 24시간째에도 대조구 5.23개와 무기염류 첨가구 4.65-5.32개 간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

배양액내 pH는 배양 종료시까지 SKK-Y-786의 적정 pH인 4.0-7.0을 유지하여 pH에 의한 증식저해는 없었다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 배양 24시간까지 감소한 후 큰 변화가 없었는데, 질소 이용율은 대조구가 23.1%로 무기염류 첨가구 21.4-24.5%와 차이가 없었으며 무기염류 간에도 질소 이용율의 차이는 없었다.

환원당은 대조구와 무기염류 첨가구 모두 배양 24시간 이전에 주로 이용되어, 배양 종료시 대조구가 46.0%로 무기염류 첨가구 42.9-50%와 유사하게 나타났다.

Alcohol을 발효기질로 한 *Candida utilis*의 성장율은 0.5%의 ethanol공급 및 pH 5-6에서 최대를 나타냈으나, 1% 이상의 ethanol 함유시 성장을 저해하며(Prior등, 1980), 또한  $\text{NADH}_2$ 가 과다할 때 butyric acid를 흡수하여 butanol을 생성하고 그 결과 pH가 증가하며, 미생물 성장과 발효산물의 생성량이 저하된다고 Spivey(1978)가 보고하였으나, 본 실험에서는 SKK-Y-786의 경우 alcohol 생성에 의한 영향은 없는 것으로 생각된다.



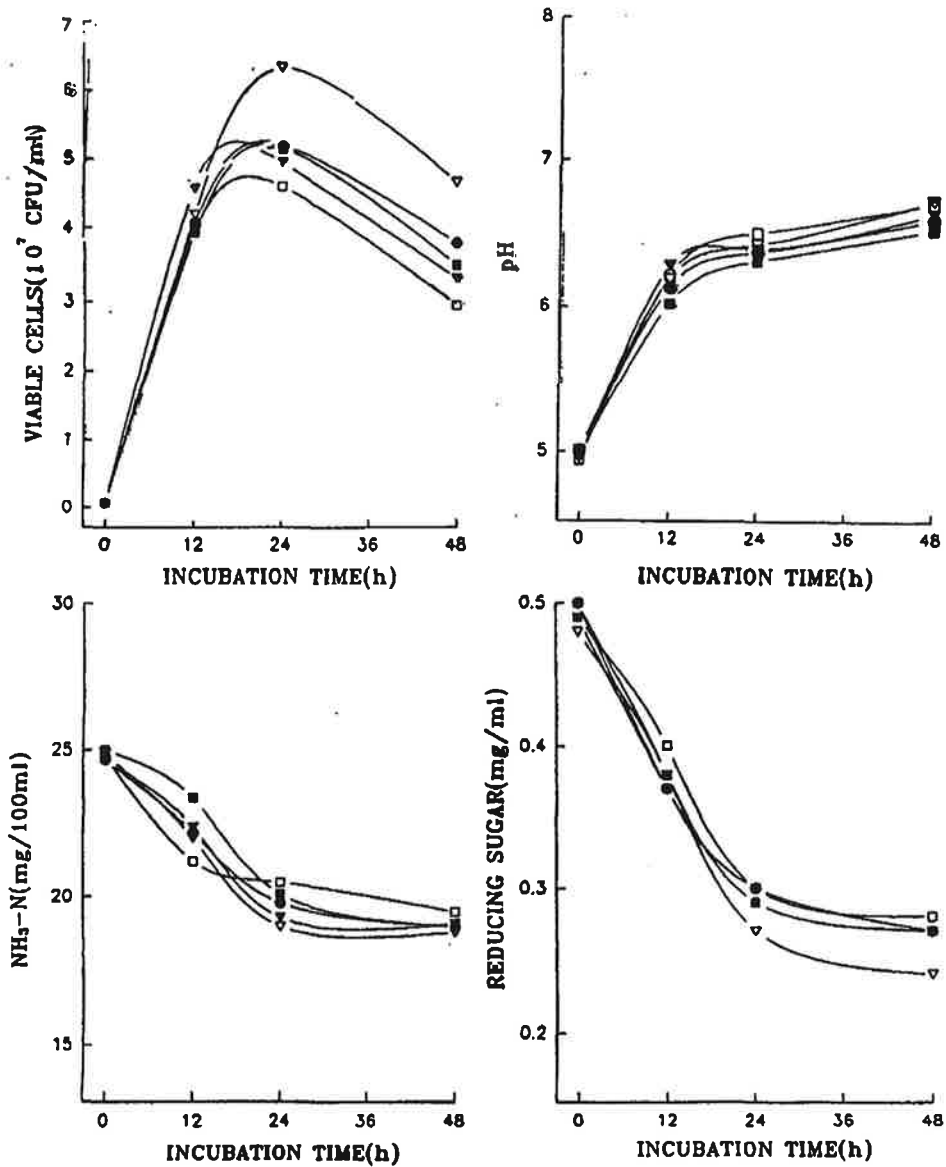


Figure 44. Effect of trace elements on the viable cells, pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 (●, control; ▽, Mg; ▼, Fe; □, Cu; ■, Ca).

### 3) SKK-Y-1293

SKK-Y-1293 배양시 무기염류의 첨가가 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)에 미치는 영향은 Figure 45와 같다. 생효모수는 배양 24시간까지 증가한 후 감소하는 경향을 나타내, 배양 12시간째 Mg 첨가구가 3.93개로 대조구 3.24개 및 기타 무기염류 첨가구 3.17-3.44개 보다 높았으나, 24시간째에는 대조구가 9.85개로 Mg 첨가구 9.37개와 유사하였다. 그러나 Fe, Cu 및 Ca 첨가구는 각각 8.09개, 7.24개 및 8.77개로서 대조구보다 오히려 낮게 나타나, Fe, Cu 및 Ca 0.02% 첨가에 의해 효모증식이 저해된 것으로 생각된다.

배양액내 pH는 24시간까지 대조구와 무기염류 첨가구 모두 SKK-Y-1293의 적정 pH인 4-7을 유지하였으며, 배양 종료시에도 대조구 7.29와 Mg 첨가구 7.34를 제외하고 pH 7.0이하를 유지하였다.

질소 이용율은 배양후 서서히 증가하여 배양 종료시 대조구가 60%인데 비하여 Mg 첨가구는 65.1%로 약 5%정도 증가하였으나, Fe, Cu 및 Ca 첨가구는 각각 58.6%, 50% 및 55%로 대조구보다 낮은 이용율을 보여 생효모수와 유사한 경향을 나타냈다.

환원당 이용율은 Mg 첨가구가 56.6%로 대조구 54.4% 보다 높았으나, Fe, Cu 및 Ca 첨가구는 각각 52.7%, 48.2% 및 51.8%로 대조구보다 이용율이 낮아 질소 이용율과 유사한 경향을 나타냈다.

Maiorella등(1984)에 의하면 Ca은 효모생육에 필수영양소는 아니지만 *Saccharomyces*속의 성장인자로 주로 대수기(log phase)에 흡수 이용되고 세포벽과 원형질막에서 새로이 합성되어 세포막의 완충능력에 기여한다고 하였는데, 본 실험에서는 반추위액내에 함유되어 있는 Mg과 Ca등의 무기염류가 효모생육에 충분히 이용되기 때문에 무기염류 첨가에 의한 효모증식 촉진 효과는 없는 것으로 생각된다.

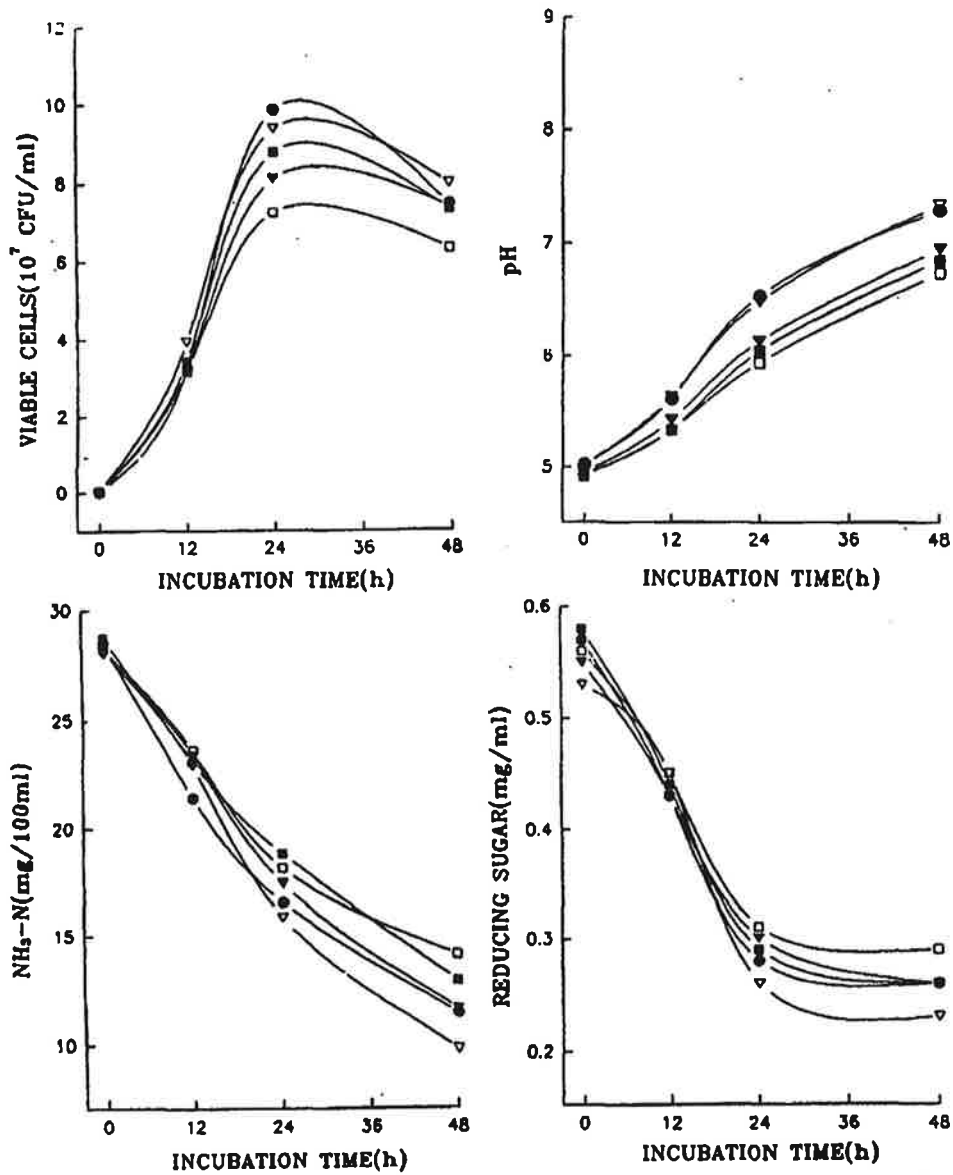


Figure 45. Effect of trace elements on the viable cells, pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 (●, control; ▽, Mg; ▼, Fe; □, Cu; ■, Ca).

차. C/N 비율이 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293  
의 증식에 미치는 효과

효모 배양시 배양액내 질소원 농도와 C/N비율이 중요한데, 질소원이 결핍되면 효모증식이 현저하게 저하되고 에너지원이 높으면 호기조건에서도 alcohol발효가 일어나 증식이 저하되기 때문에 이들의 절대량과 함께 C/N비율을 조정해 주어야 한다.

효모 배양시 일반적인 C/N 비율은 100:2.5-100:3.5로 알려져 있는데(정, 1993), 본 실험에서는 C/N 비율을 100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0로 하여 분리효모 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

1) SKK-Y-728

SKK-Y-728배양시 C/N 비율이 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)에 미치는 영향은 Figure 46과 같다. 생효모수는 C/N 비율이 낮아질수록 높게 나타나 배양 24시간째 C/N 비율 100:1.3에서 11.67개로 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0의 10.51개, 8.17개 및 8.63개에 비하여 증식속도가 빨랐으며 ( $p<0.05$ ), 100:3.6과 100:4.0은 유사한 수준을 나타냈다.

배양액내 pH는 배양 12시간까지 SKK-Y-728의 적정 pH인 3.5-6.5를 유지하였으나 이후 계속 상승하여 24시간째에는 100:1.3이 7.02인데 비해 타 처리구는 7.39-7.48로 C/N 비율이 증가할수록 높은 pH를 나타내, 이후 효모 증식에 영향을 미친 것으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량(mg/100ml)은 C/N 비율에 관계없이 배양 종료시까지 감소하였으며, 질소 이용율은 C/N 비율이 증가할수록 낮아져 100:1.3이 60.1%로 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0의 32.2%, 27.8% 및 23.9%보다 높았다( $p<0.05$ ). 따라서 SKK-Y-728은 질소 요구량이 낮은 효모로 생각된다.

환원당 함량은 배양 12시간째까지 급격히 감소한 후 서서히 감소하였는데, 전체적으로 당 이용율이 높아 배양전 5.24-5.35에서 배양 종료시 0.79-0.87로 크게 감소하였으며, 환원당 이용율은 C/N 비율 100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0이 각각 83.4%, 83.9%, 84.7% 및 84.9%로 C/N 비율에 관계없이 유사한 경향을 나타냈다.

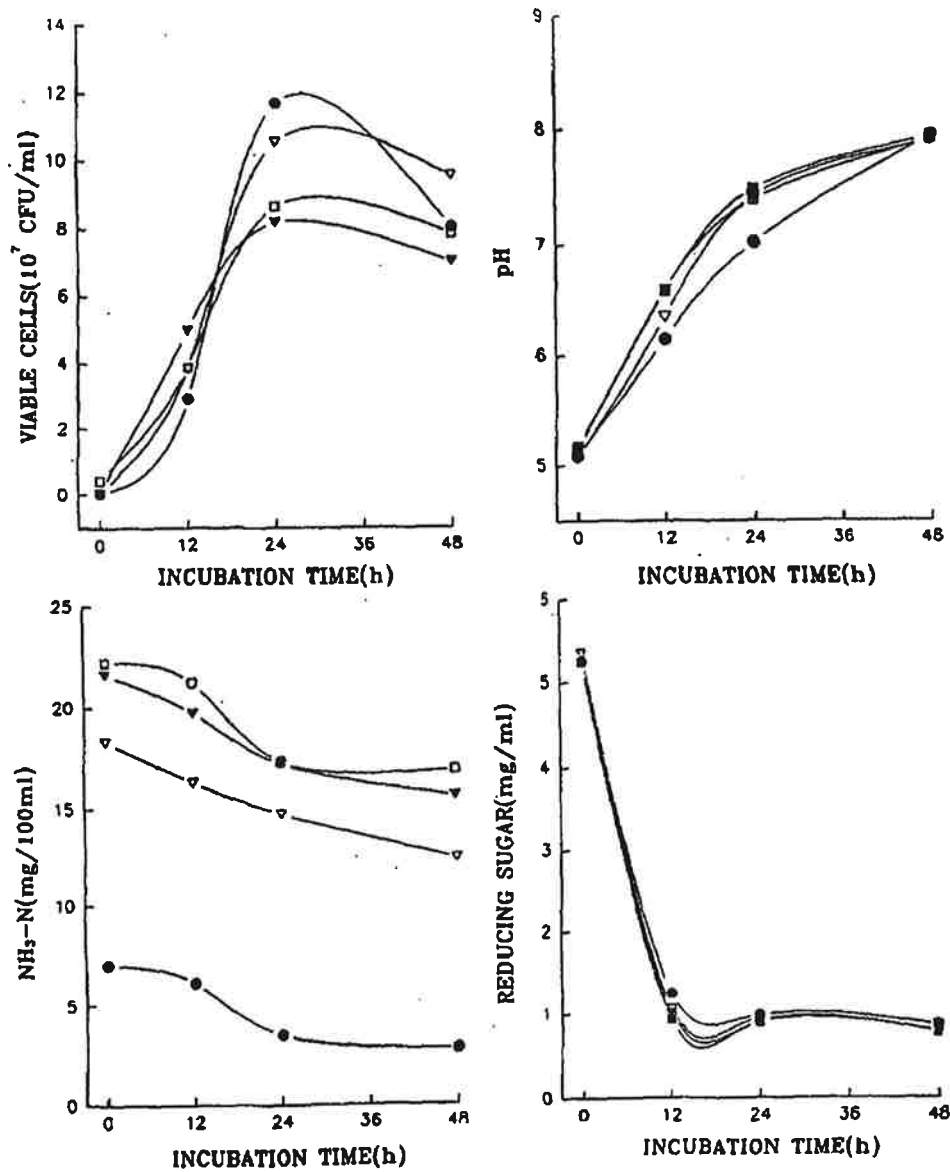


Figure 46. Effect of C/N ratio on the viable cells, pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 (●, 100:1.3; ▽, 100:3.2; ▼, 100:3.6; □, 100:4.0).

## 2) SKK-Y-786

SKK-Y-786 배양시 C/N 비율이 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)에 미치는 영향은 Figure 47과 같다. 배양 12시간째까지는 C/N 비율에 따른 차이가 없었으나, 그후 C/N 비율이 낮을수록 높은 생효모수를 나타내 배양 24시간째 100:1.3이 12.57개, 100:3.2가 11.12개로 100:3.6, 8.77개와 100:4, 8.7개보다 높았으며( $p < 0.05$ ), 배양 종료시까지 증식하는 것으로 나타났다.

배양액내 pH는 배양후 증가하여 24시간째 pH 7.1-7.48로 SKK-Y-786의 적정 pH인 4.7보다 높았으며, C/N 비율이 증가할수록 높은 경향을 나타냈다. 따라서 배양 24시간 이후 효모증식이 저하된 것이 SKK-Y-786이 pH 8.0에서는 약 55%의 상대적 증식만이 가능하기 때문에 상승한 pH에 의한 것으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량은 배양후 서서히 감소하다가 24시간째 크게 감소하는 경향을 나타냈는데, 이용율은 C/N비율 100:1.3이 84.4%로 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0의 30.3%, 18.3% 및 15.3%에 비해 높아( $p < 0.05$ ), C/N 비율이 낮을수록 높은 경향을 나타냈다.

환원당 함량은 배양후 급격히 감소한 후 서서히 감소하였는데, 환원당 이용율은 C/N비율 100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0이 각각 86.4%, 85.7%, 83.3% 및 83.5%로 차이가 없었다.

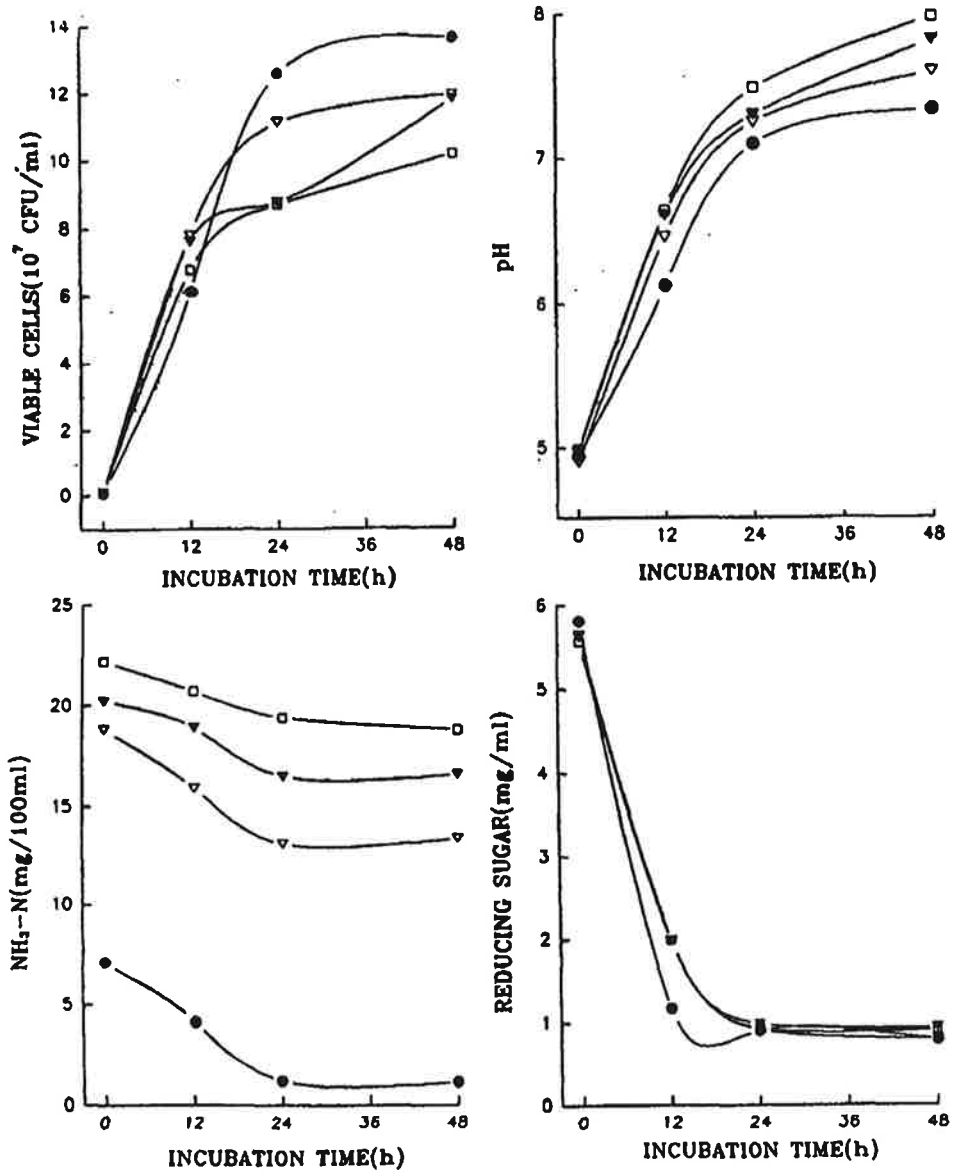


Figure 47. Effect of C/N ratio on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 (●, 100:1.3; ▽, 100:3.2 ▼, 100:3.6; □, 100:4.0).

### 3) SKK-Y-1293

SKK-Y-1293 배양시 C/N 비율에 따른 배양액내 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figure 48과 같다. 배양 12시간까지는 C/N비율이 증가할수록 생효모수가 높게 나타났으나, 24시간째에는 100:1.3이 18.37로 타 처리구보다 높았으며( $p < 0.05$ ), 100:3.2와 100:3.6은 14.85와 15.71로 비슷하였고 100:4.0은 8.92개로 가장 낮게 나타났다. 이후 48시간째에는 100:1.3과 100:3.2구에서 24.77과 23.64로 크게 증가하였고, 100:3.6은 17.57로 소폭 증가하였으나 100:4.0은 7.73으로 감소하였다.

배양액내 pH는 배양후 상승하여 24시간째 100:1.3과 100:3.2는 SKK-Y-1293의 적정 pH인 4.0-7.0을 유지하였으나, 100:3.6과 100:4.0은 7.14와 7.18로 적정 pH보다 약간 높았으며, 배양 종료시에는 모든 C/N 비율에서 7.4이상으로 상승하였다.

배양액내  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량은 서서히 감소하다가 24시간째 크게 감소하는 경향이었으며, C/N비율 100:1.3에서는 배양 종료시  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량이 100ml당 0.46mg으로 매우 낮은 수준을 나타냈다. 질소 이용율은 C/N비율 100:1.3이 93.6%로 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0의 56.5%, 53.0% 및 48.2%보다 높았으며( $p < 0.05$ ), C/N 비율이 증가할수록 낮은 질소 이용율을 나타냈으나 전체적으로 SKK-Y-728과 SKK-Y-786에 비해 질소 이용율이 높았다.

환원당 함량도  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량과 마찬가지로 배양후 24시간째까지 크게 감소하였으며, 이용율은 C/N비율 100:1.3, 100:3.2, 100:3.6 및 100:4.0이 각각 84.6%, 89.3%, 87.5% 및 86.6%로 유사하였다.

본 실험 결과는 효모 배양시 환원당 1.4%를 함유한 당밀 배지에 대해 4%의 corn steep liquor를 첨가하였을 때 수율이 가장 높았다고 보고한 Agarwal등(1947)의 결과와 같이 탄소화물 공급원으로서 당밀을 공급하여 각 균주의 증식에 적합한 C/N 비율을 어느 정도 조정해 주어야 한다고 생각된다.

이상의 결과 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모는 ammonia 및 urea와 같은 질소 화합물을 쉽게 이용할 수 있으므로(Cooper와 Sumrada, 1975), 이와같은 질소원을 다량 함유하고 있는 반추위액을 기질화하여 효모를 배양할 때 C/N 비율이 생효모수와 질소 및 당 이용율에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.



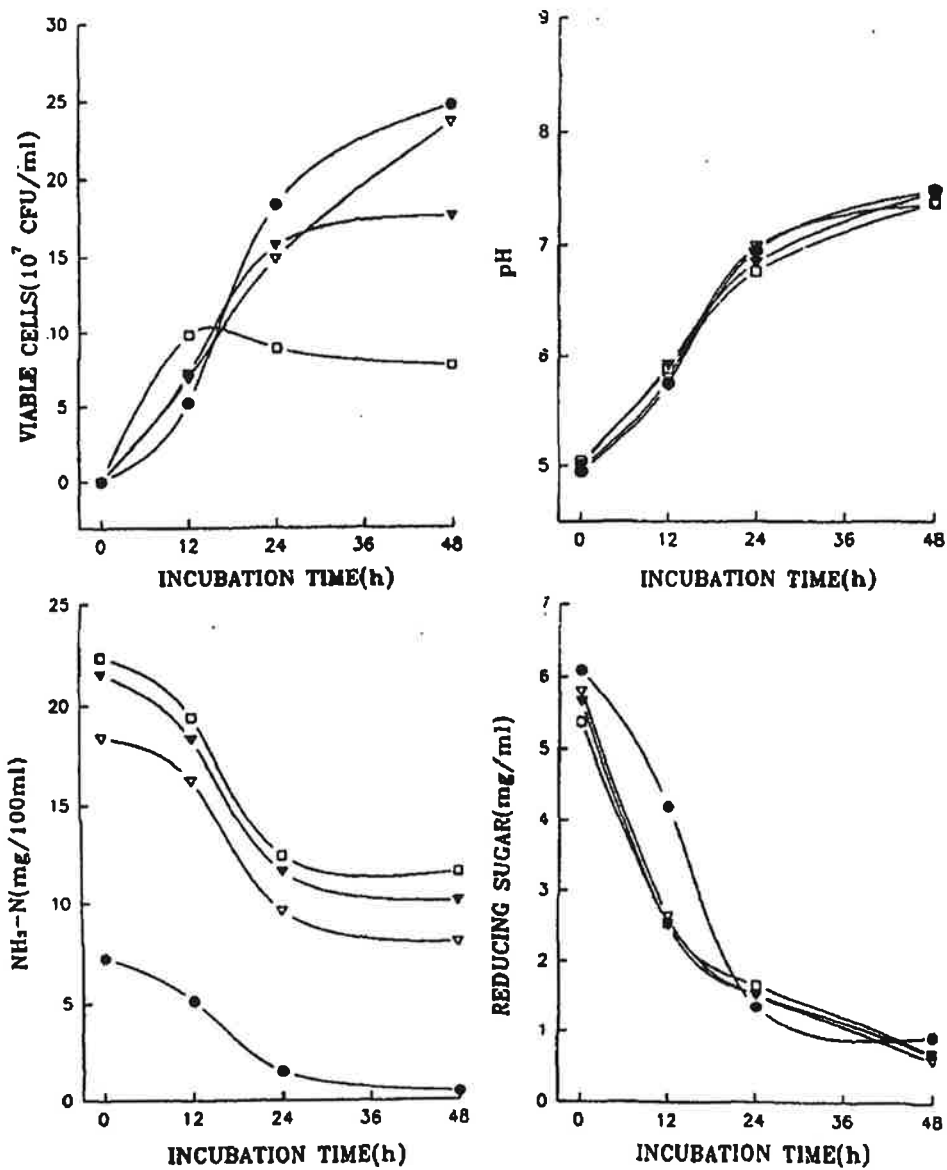


Figure 48. Effect of C/N ratio on the viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 (●, 100:1.3; ▽, 100:3.2 ▼, 100:3.6; □, 100:4.0).

### 카. Scale up 및 배양조건 개선 효과

7 L jar fermenter를 이용하여 flask에서의 실험결과를 종합한 최적조건과 최적조건에 pH를 5.3으로 고정하고 산소를 공급(1 vvm)하면서 150rpm으로 교반하는 개선조건에서 SKK-Y-728, SKK-Y-786 및 SKK-Y-1293을 배양한 결과는 다음과 같다.

#### 1) SKK-Y-728

SKK-Y-728을 최적조건 및 개선조건으로 배양했을 때 배양액내 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figures 49 및 50과 같다.

Jar fermenter에서 scale up하여 배양했을 때 flask 배양보다 생효모수가 낮은 경향을 보였는데, 이는 scale up에 따른 증식한계로 발효조건의 개선이 요구되었다. 즉, 최적조건에서 배양시 24시간째 9.57개로 최대 생효모수를 나타낸 후 감소하였으며, pH는 서서히 증가하여 24시간째 7.13으로 SKK-Y-728의 적정 pH인 3.5-6.5보다 높게 나타나 이후 효모증식을 저해한 것으로 생각된다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량은 배양후 계속 감소하여 59.8%의 이용율을 나타냈으며, 환원당 함량은 24시간째까지 급격히 감소하여 78.9%의 이용율을 나타냈다.

개선조건에서는 생효모수가 배양 12시간째 13.23개로 최적조건 9.57개보다 높았으며, 배양 종료시까지 계속 증가해 14.53개로 최대 효모수를 나타냈다. 질소 이용율은 68.9%였고 환원당 이용율은 87.8%로 최적조건에 비해 각각 약 9%정도 증가하였다.

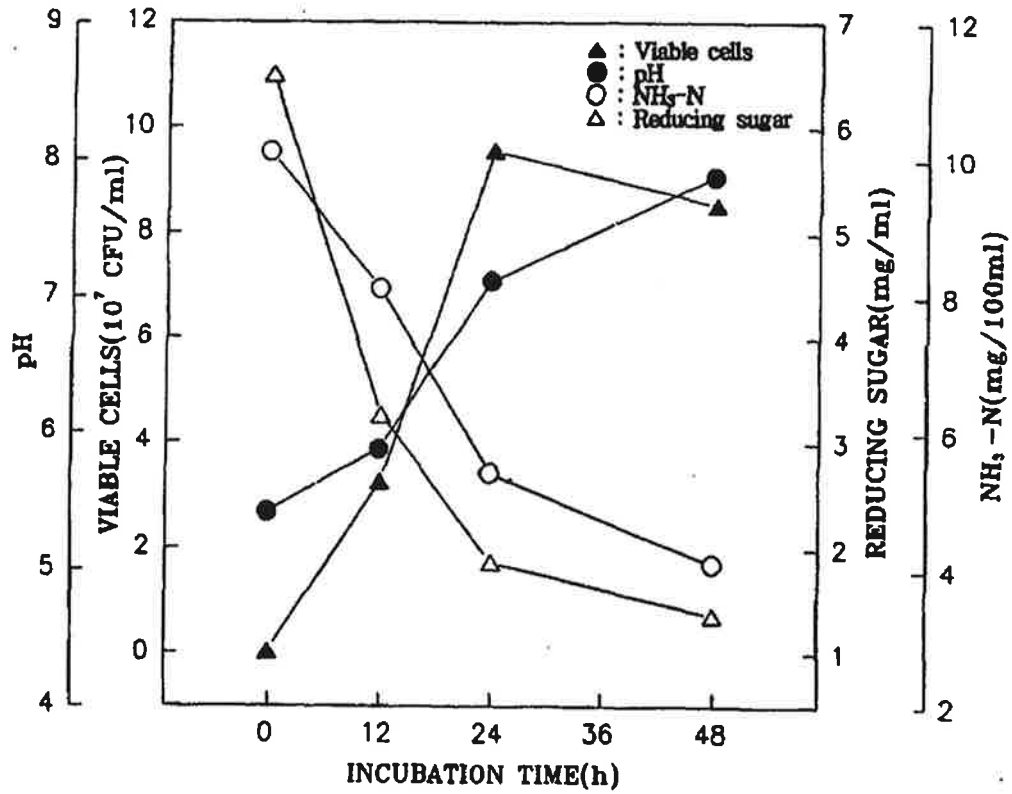


Figure 49. Effect of optimum condition on viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 with jar fermenter.

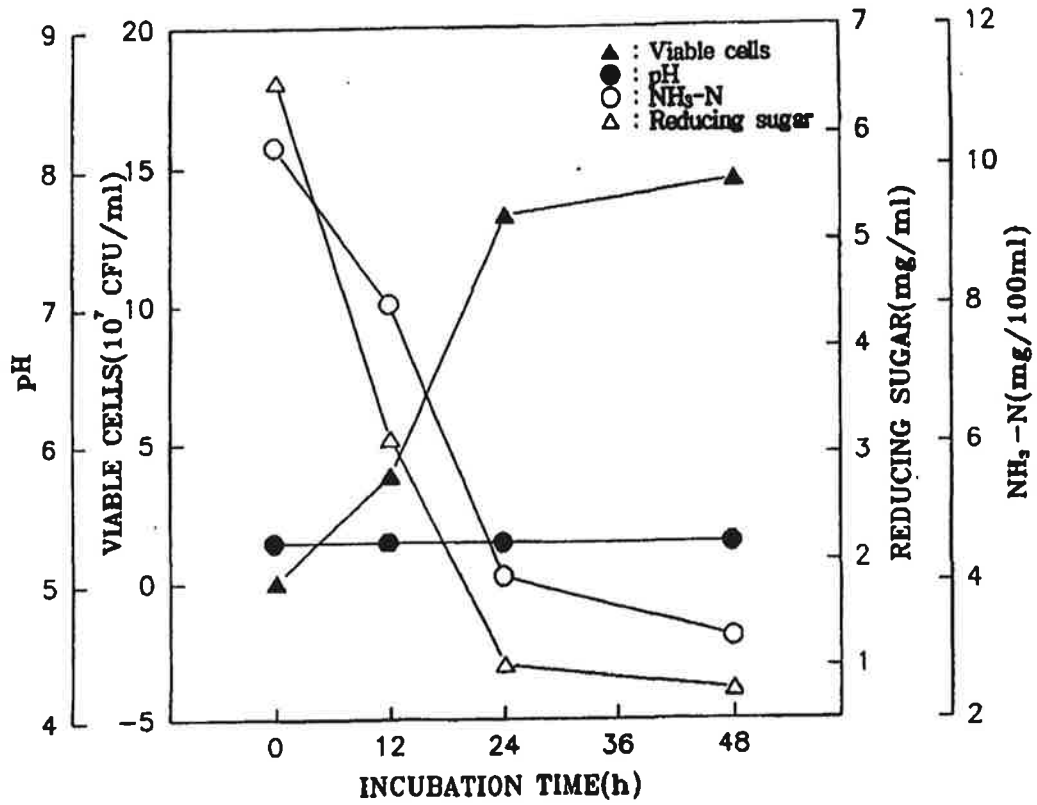


Figure 50. Effect of modifying condition on viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-728 with jar fermenter.

## 2) SKK-Y-786

최적조건과 개선조건에서 SKK-Y-786 배양시 배양액내 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figures 51 및 52와 같다. SKK-Y-786은 scale up에 따른 생효모수의 차이는 없었으나, 최적조건과 개선조건 간에는 차이를 나타냈다. 즉, 최적조건의 경우 배양 12시간째 생효모수가 6.43개로 증가한후 24시간 및 48시간째에는 11.47과 13.2로 배양 종료시까지 증가하였으며, pH는 서서히 증가하여 24시간째 7.37로 SKK-Y-786의 적정 pH인 4.0-7.0보다 다소 높게 나타났다.  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량은 배양후 24시간까지 크게 감소한후 서서히 감소하여 68.7%의 이용율을 나타냈으며, 환원당 함량도 24시간째까지 급격히 감소하여 배양 종료시 83.4%의 이용율을 나타냈다.

개선조건에서는 생효모수가 배양 12시간째 6.77개로 최적조건 6.43개와 차이가 없었으나 24시간 및 48시간째에는 각각 13.52개와 15.84개로 최적조건보다 높았으며, 질소 이용율과 환원당 이용율은 75.8%와 88.9%로 최적조건에 비해 이용율이 각각 7%와 5% 증가하였다.

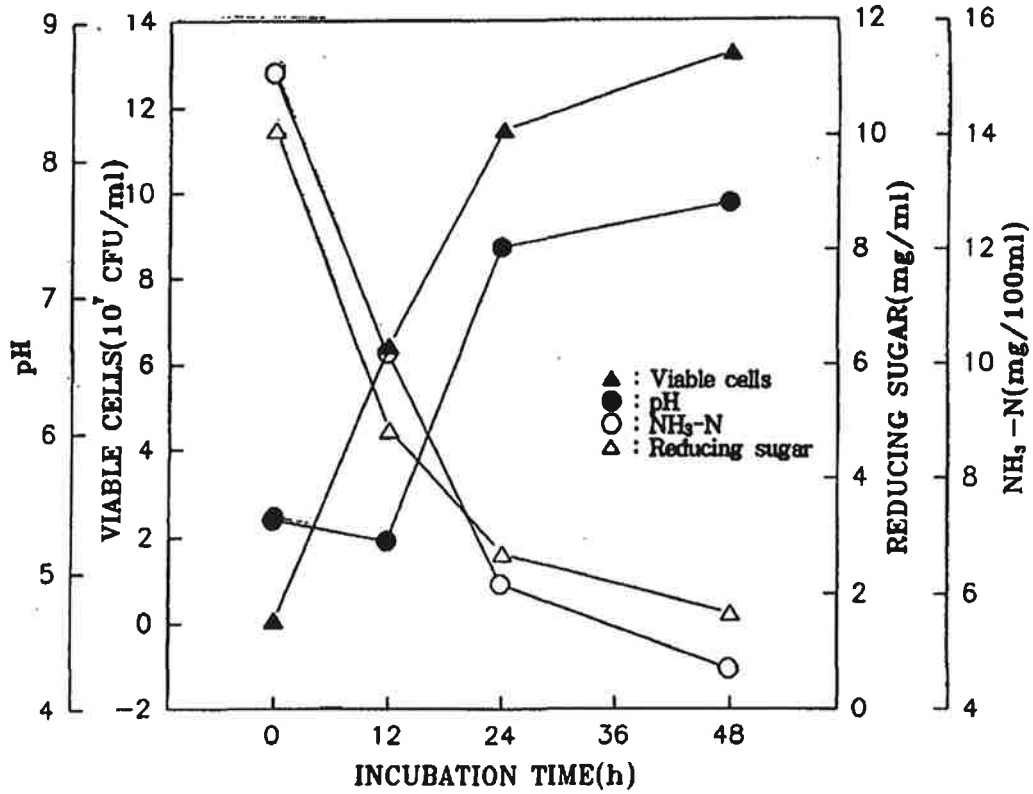


Figure 51. Effect of optimum condition on viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 with jar fermenter.

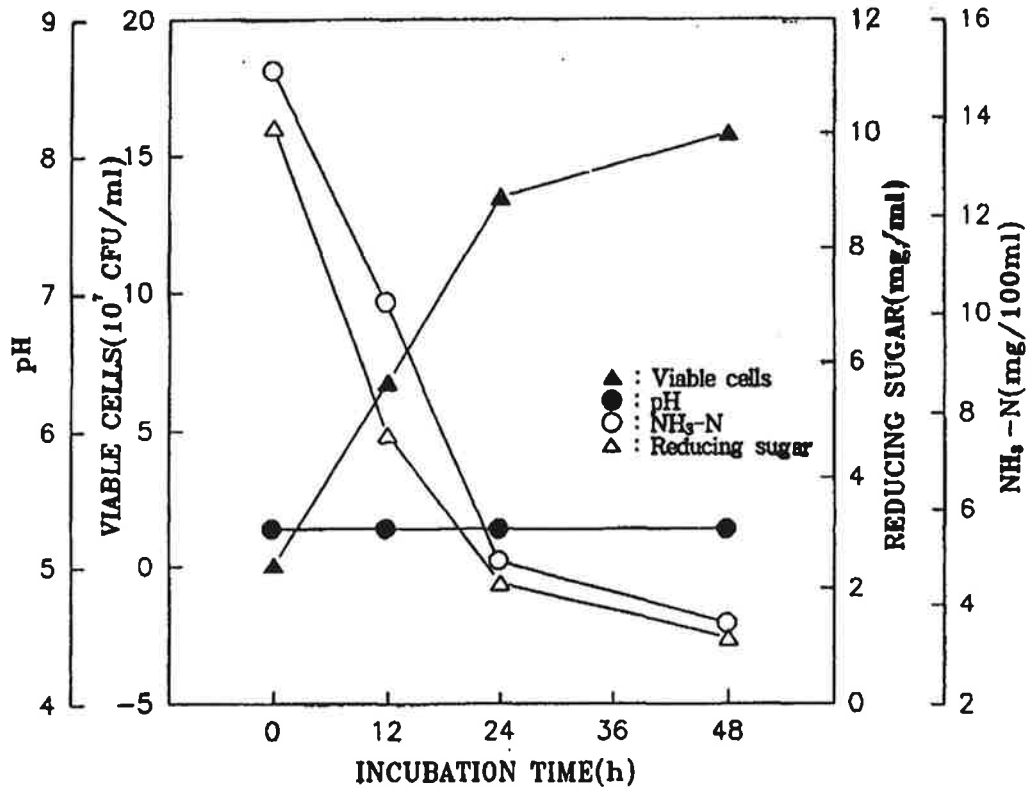


Figure 52. Effect of modifying condition on viable cells, pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-786 with jar fermenter.

### 3) SKK-Y-1293

SKK-Y-1293은 최적조건과 flask 배양간에 생효모수에서 큰 차이가 없었으며, 최적조건과 개선조건으로 배양시 배양액내 생효모수( $10^7$  CFU/ml), pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/100ml) 및 환원당 함량(mg/ml)은 Figures 53 및 54와 같다. 최적조건에서 배양시 12시간째 5.92개로 증가한후 24시간 및 48시간째에는 15.95개와 24.74개로 배양종료시까지 계속 증가하였으며, pH는 서서히 증가하여 24시간째 6.85로 SKK-Y-786의 적정 pH인 4.0-7.0을 유지한후 48시간째 7.88로 크게 증가하였다.

$\text{NH}_3\text{-N}$  함량은 배양후 계속 감소하여 83.2%의 이용율을 나타냈으며, 환원당 함량도 크게 감소하여 82.0%의 이용율을 나타냈다.

개선조건에서는 생효모수가 배양 12시간째 5.77개로 최적조건 5.92개와 차이가 없었으며, 24시간 및 48시간째에도 각각 14.33개와 25.43개로 차이가 없었다.

질소 이용율과 환원당 이용율은 82.8%와 81.0%로 최적조건과 차이가 없어 SKK-Y-1293의 경우 배양조건 개선 효과가 적었다.

이상의 결과 SKK-Y-728과 SKK-Y-786은 개선조건에 의해 생효모수가 증가하여 당 밀에 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양하였을 때와 glucose에 peptone 및 urea등의 질소 공급원을 달리한 배지에 *Candida utilis*를 배양하였을 때 각각 430-590ml와 460-550ml  $\text{O}_2$ /dry weight의 산소를 요구하며(Bronn, 1966), 호흡능에 있어서 *Candida utilis*는 250ml  $\text{O}_2$ /biomass/h이고 *Saccharomyces cerevisiae*는 100-150ml  $\text{O}_2$ /biomass/h이라고 한 Barford(1987)의 결과를 고려할 때, 본 실험에서 개선조건의 효과는 산소공급에 따른 것이라고 사료된다.



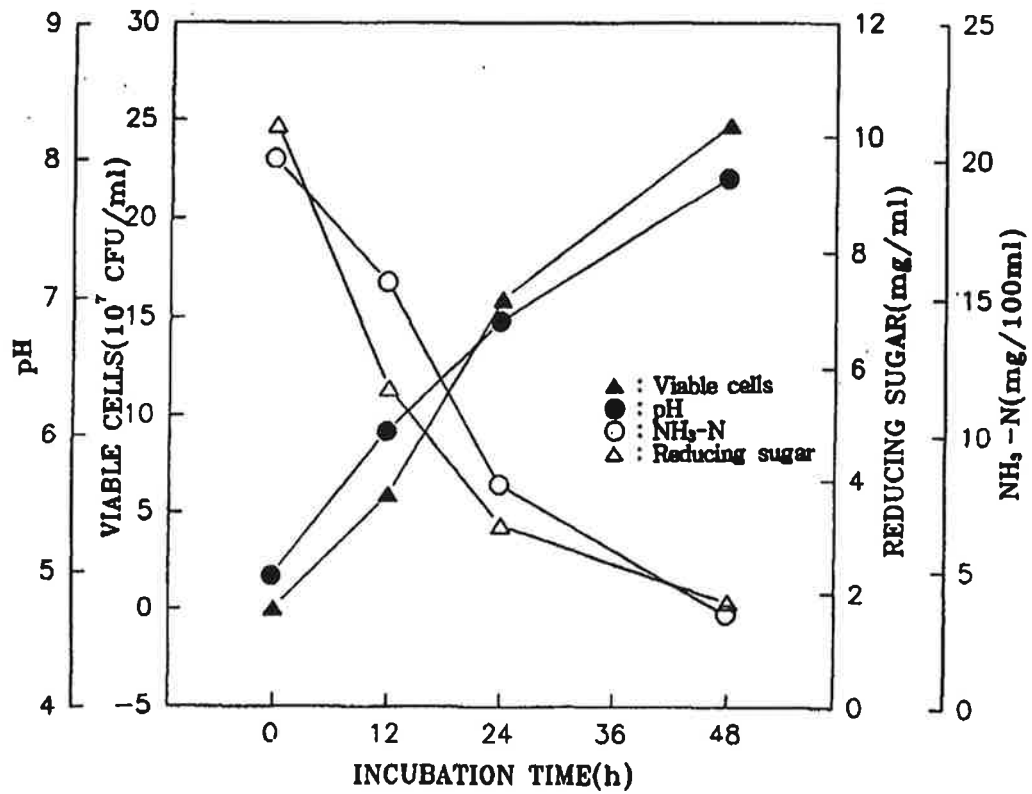


Figure 53. Effect of optimum condition on viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 with jar fermenter.

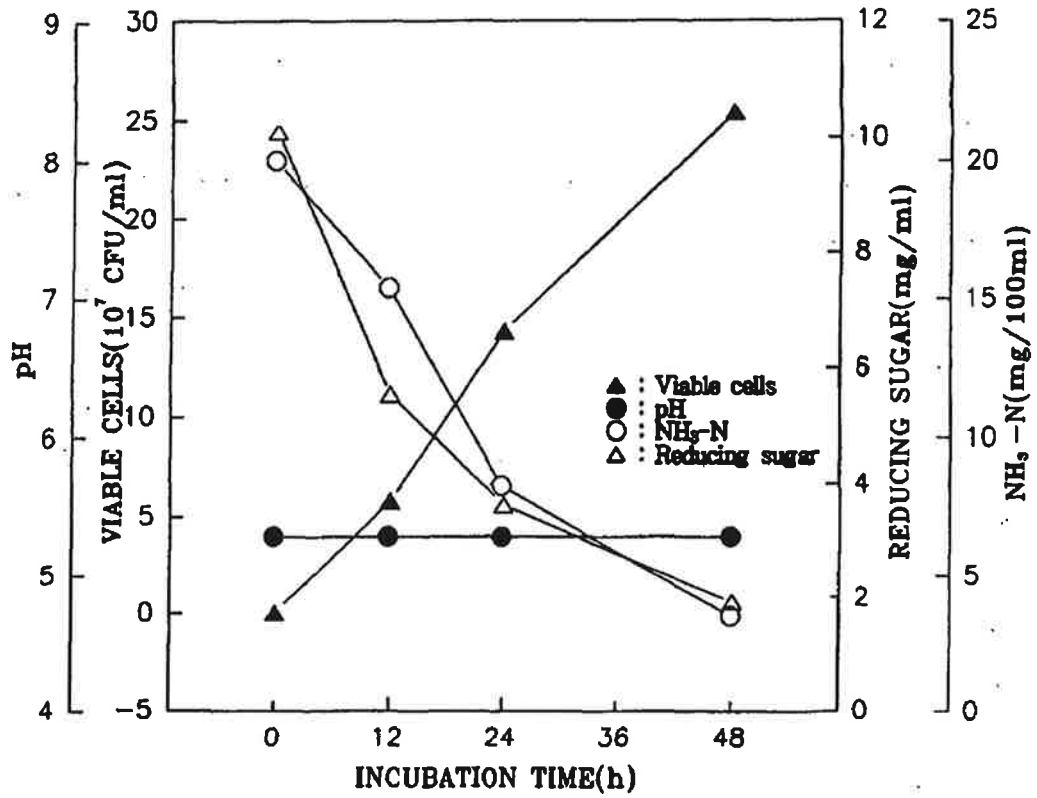


Figure 54. Effect of modifying condition on viable cells, pH, NH<sub>3</sub>-N contents and reducing sugar in D. R. E. by isolated SKK-Y-1293 with jar fermenter.

## 제 2 절 도축 반추위내용물을 이용한 곰팡이 배양물 개발

### 1. 서 론

축산분야에서는 항생제를 사용함으로써 가축의 성장능력과 생산성을 향상시킬 수 있었다. 그러나 최근 항생제의 사용이 많은 문제점을 야기하고 있어 축산물생산에 이용할 수 있는 비항생제적 생물학적 물질들을 개발하게 되었는데, 그 대표적인 것이 효모나 곰팡이배양물 및 생균제 등이다. 최근 널리 이용되는 곰팡이류는 *Aspergillus niger* 와 *Aspergillus oryzae*로 다양한 단백질 및 탄수화물 분해효소를 생산함으로써 그 배양물 및 배양추출물이 널리 사용되고 있다(Wiedmeir 등, 1987; Gomez 등, 1990; Martin 등, 1990).

*Aspergillus oryzae*는 생육 pH와 온도범위가 매우 넓은 호기성 곰팡이로 다양한 유기성폐자원을 기질로 이용할 수 있으며(Garraway와 Evans, 1984), 생성하는 효소는 amylase, xylanase 및 protease 등으로 이들 효소는 기질의 이용성을 증가시킴으로서 사료적 가치를 향상시키고(Pettersson 등, 1989), 동물 체내에서 생성되는 내인성 효소의 작용을 보충하여 영양소의 소화 및 체내 흡수를 용이하게 한다(Graham 등, 1988). 또한 *Aspergillus oryzae*는 균체 단백질 함량도 30-60% 이며 riboflavin, folic acid 및 nicotinic acid 등 다양한 비타민을 합성할 뿐만 아니라 발효과정에서 생성된 미지성장 인자 공급원으로서 가축의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Russo와 Lfeimann, 1959; Tsang과 Schaible, 1960).

*Aspergillus oryzae* 배양물을 반추가축에게 급여하면 미생물 단백질의 생성이 촉진되는데, 이는 *Aspergillus oryzae*가 생성하는 protease에 의하여 사료단백질이 분해되어 펩타이드태 질소가 많이 생성되어 이를 이용하는 미생물의 생육이 촉진되기 때문이며(Gomez 등, 1987), 또한 반추위내 총미생물 수와 섬유소분해 bacteria 수를 증가시켜 사료효율을 증진시켰다고 Firkins 등(1990)이 보고하였다.

도축 반추위내용물은 조섬유 함량이 30-40%, 조단백질 함량이 10-20%, 가용무질소물 함량이 38-40% 및 조회분 함량이 8-13% 정도이고(Antongiovanni 등, 1973), 아미노산 조성이 양호하고 가소화 에너지가 2,670 kcal/kg 이며, 미생물이 분비한 각종 효

소(Provos와 Doetsch, 1959; Hungate, 1966) 및 미지성장인자(Ruf 등, 1953) 등이 함유되어 있어 사료자원으로 이용할 수 있다. 이러한 반추위내용물을 사료자원으로 이용하고자 반추가축(Prokop 등, 1974)과 가금류(Mann, 1962; Jovanovic 과 Cuperlovic, 1977)에 대한 건조 반추위내용물의 사료대체 가능성이 연구되었고, 국내에서는 silage 제조와 단세포단백질 생산기질의 이용 등이 시도되었으나 실용화 되지는 못하였다(이 등, 1985; 정, 1994; 황, 1991).

따라서 본 실험의 목적은 각종 발효산물 및 미지성장인자를 함유하고 있는 도축반추위내용물을  $\alpha$ -amylase와 protease를 다량 함유한 곰팡이배양물의 생산기질로 이용하기 위하여 *Aspergillus oryzae*가 효소를 최대량 생성하는 배양조건을 조사하기 위하여 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험재료 및 사용균주

실험에 사용된 반추위내용물은 도축장에서 채취하여 4℃에서 냉장 보관하면서 기질로 사용하였으며, 균주는 *Aspergillus oryzae*를 쌀에 번식시킨 종국을 사용하였다. 실험에 사용한 반추위내용물의 AOAC 방법(1990)으로 분석한 조성분 함량은 건물기준으로 조단백질 21.1%, 조섬유 20.4% 그리고 조지방 13.7% 였다.

### 나. 반추위내용물을 이용한 *Aspergillus oryzae* 배양조건

#### 1) 탄소원 결정 및 증자 효과

옥분, 말분 및 밀기울을 탄소원으로 반추위내용물과 혼합하여 배양한 후 효소역가를 측정하여 가장 효과적인 탄소원을 결정하였으며, 100℃에서 20분간의 증자에 따른 효소역가를 비교하였다.

#### 2) 수분함량 및 반추위내용물과 말분의 혼합비율 결정

수분함량을 30, 40, 50, 60 및 70%로 조정하여 효소생성에 가장 효과적

인 수분함량을 결정하였으며, 반추위내용물과 가장 효과적인 탄소원인 말분의 혼합비율을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 및 1:5로 조절하여 효소역가에 미치는 영향을 측정하였다.

### 3) 배양시간 결정 및 효소특성 조사

최대의 균성장 및 효소생성을 위한 배양시간을 조사하기 위하여 12시간 간격으로 60시간까지 효소활성을 측정하였다. 또한 *Aspergillus oryzae* 배양물의 pH 안정성은 0.1M acetate buffer(pH 3-6)와 McIlvaine buffer(pH 7-10)를 이용하여 조사하였으며, 효소의 열안정성은 30℃-100℃까지 10℃ 간격으로 protease의 경우 McIlvaine buffer(pH 7)를  $\alpha$ -amylase는 0.1M acetate buffer (pH 6)을 이용하여  $\alpha$ -amylase와 protease의 역가에 미치는 영향을 조사하였다.

### 다. 고지배양조건 및 조효소액 제조

반추위내용물과 탄소공급원을 혼합한 후 가로 30cm, 세로 20cm 그리고 깊이 5cm의 고지(Koji)상자에 넣어 30℃ incubator에서 48시간 배양하였으며, *Aspergillus oryzae* 접종량은 0.5%(w/w)로 하였다. 조효소액은 *Aspergillus oryzae* 배양물 5g을 채취하여 분쇄한 후 100ml 삼각 flask에 넣고 1% saline 50ml를 첨가하여 혼합하고 toluene 0.5ml를 첨가하여 25℃에서 1시간동안 진탕과 방치 후 Whatman No. 2 filter paper로 여과하여 제조하였다.

### 라. $\alpha$ -Amylase 및 protease activity 측정

$\alpha$ -amylase activity는 조효소액 1ml를 1% soluble starch용액(pH 6.0, 0.1M acetate buffer)에 넣고 40℃에서 10분간 반응시킨 다음 0.5ml를 취하여 0.1N HCl 10ml와 혼합한 후 혼합액 1ml와 iodine 용액(0.05% iodine + 0.5% KI) 10ml를 반응시켜 660nm에서 흡광도를 측정하는 iodine color reaction 방법(Kim 등, 1991)으로 측정하였다. 그리고 효소역가 1 unit은 40℃에서 1분당 starch-iodine 용액의 color를 1% 감소시키는데 필요한 효소의 양으로 계산하였다.

Protease activity는 Hammastein casein 0.6% 용액(pH 7.0, 0.1M phosphate buffer) 1ml에 조효소액 1ml를 가하고 37℃에서 10분간 반응시킨 후 0.4M TCA 용액 2ml를

가한 후 37°C에서 25분간 방치한 다음 Whatman No. 2 여과지로 여과한 여액 1ml를 취하고 0.4M NaCO<sub>3</sub> 용액 5ml와 Folin-Cialteu reagent 희석액 1ml를 가해 37°C에서 20분간 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하는 Folin법을 일부 변경시킨 유 등(1984)의 방법으로 측정하였는데, 효소역가는 37°C에서 10분간 반응시켰을 때 흡광도를 0.01 상승시키는 효소량을 1 unit으로 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 반추위내용물을 이용한 *Aspergillus oryzae* 배양조건

##### 1) 탄소원 및 증자작업이 효소역가에 미치는 영향

옥분, 말분 및 밀기울 첨가에 따른  $\alpha$ -amylase의 상대적인 활성(relative activity, %)은 증자작업한 밀기울 100에 대하여 각각 78.5, 77.1 및 74.7로 탄소공급원 무첨가 18.5에 비하여 크게 증가하였으나( $p < .05$ ), 탄소원에 따른 차이는 없었다(Table 1). Protease의 상대적 활성(%) 또한 증자한 말분 100에 대하여 52.2, 67.8 및 60.3으로 탄소공급원 무첨가 21.5에 비하여 증가하였으며( $p < .05$ ), 특히 말분을 첨가하였을 때 높은 것으로 나타났다(Table 15).

증자작업에 따른  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 증자작업 전에 비하여 옥분, 말분 및 밀기울에서 각각 20.9, 21.7 및 25.3이 증가하였고( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%)도 각각 40.4, 32.2 및 29.5가 증가하였으며 균사형성 속도도 증자작업 전에 비하여 증가하는 것으로 나타났다. 이는 탄소원이 증자되면서 조직이 파괴되고 전분질 원료가 호화되어 *Aspergillus oryzae*의 균사가 쉽게 침입하게 되어 발육과 amylase 작용이 쉽게 일어난 결과로 생각된다. *Aspergillus oryzae*는 매우 다양한 탄소원을 이용하여 성장할 수 있는데(Ingold, 1984), Yokotsuka(1964)는 고지배양 시 밀을 첨가 배양하면 균의 성장과 효소생산에 효과적이라고 보고하였으며, 石丸(1962)은 여러가지 목재의 톱밥 및 미강을 이용하여 국균을 배양하고 효소역가를 비교한 결과 밀기울 고지의 전분 당화력이 80%, 대두박 고지의 단백질 분해력이 70% 였다고 보고하였다.

본 실험결과 강피류 탄소원에 따른 효소역가는 통계적인 유의차는 없었으나 조단백질 함량이 12-15%, 조섬유 함량이 6-8% 그리고 가용무질소물 함량이 40-60% 인 말분의 첨가가 *Aspergillus oryzae* 배양에 적합한 것으로 나타났다.

Table 15. Effect of carbon sources and steaming on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*

Carbon source	Relative activity(%)			
	$\alpha$ -Amylase		Protease	
	Without steaming	With steaming	Without steaming	With steaming
Without carbon source	18.5 <sup>c</sup>	-	21.5 <sup>a</sup>	-
Corn meal	78.5 <sup>b</sup>	99.4 <sup>a</sup>	52.2 <sup>c</sup>	92.6 <sup>b</sup>
Wheat middling	77.1 <sup>b</sup>	98.8 <sup>a</sup>	67.8 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
Wheat bran	74.7 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	60.3 <sup>c</sup>	89.8 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Means in the same enzyme with different superscripts differ significantly( $p < 0.05$ ).

## 2) 수분함량이 효소역가에 미치는 영향

반추위내용물과 말분을 혼합하여 수분함량이 각각 30, 40, 50, 60 및 70%에서 배양하였을 때 *Aspergillus oryzae*가 생성한  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 각각 97.1, 100, 94.0, 83.8 및 40.2로 30%-50%는 차이가 없었으나 60%와 70%에서는 효소생성량이 저하되는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). Protease의 상대적 활성(%)은 각각 75.5, 100, 90.2, 78.4 및 51.4로 수분함량 40%에 비하여 30%와 60% 및 70%에서는 낮게 나타나( $p < 0.05$ ), 상대적 효소활성을 고려할 때 수분함량은 40%가 가장 적합한 것으로 생각된다(Figure 55). 미생물 성장 시 수분함량이 부족하면 증식을 위한 유도기가 길어져 성장속도가 감소되며 세포물질 합성량도 감소하는데, Yokotsuka(1964)는 수분함량이 60% 일 때에는 박테리아 성장이 유리하고 수분함량이 45%일 때에는 곰팡이의 성장이 적합하다고 발표하여 본 실험 결과와 유사하였다. 그러나 허(1974)는 생돈분이

나 계분 70%에 밀기울과 쌀겨를 혼합하여 *Aspergillus kawachii*와 *Aspergillus ubamii* 등을 배양할 때 수분함량이 45%-50%일 때 악취가 제거되고 비타민 B<sub>12</sub> 생성량이 현저히 증가되었다고 보고하였다.

Table 16. Effect of moisture contents on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*

Moisture contents(%)	Relative activity(%)	
	$\alpha$ -amylase	Protease
30	97.1 <sup>a</sup>	75.5 <sup>b</sup>
40	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
50	94.0 <sup>ab</sup>	90.2 <sup>ab</sup>
60	83.8 <sup>b</sup>	78.4 <sup>b</sup>
70	40.2 <sup>c</sup>	51.4 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Means in the same column with different superscripts are different(P<.05)

### 3) 반추위내용물과 말분의 혼합 비율이 효소역가에 미치는 영향

반추위내용물과 말분의 비율을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 및 1:5로 하고 수분함량을 40%로 조절한 후 30℃에서 배양한 결과  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 각각 100, 99.4, 99.0, 98.9 및 98.4로 반추위내용물과 말분의 비율에 따른 차이가 없었으나 (Figure 56), protease의 상대적 활성(%)은 각각 84.9, 100, 90.5, 79.5 및 74.6으로 1:2의 비율일 때가 1:1, 1:4 및 1:5에 비하여 높게 나타났다(p<.05).



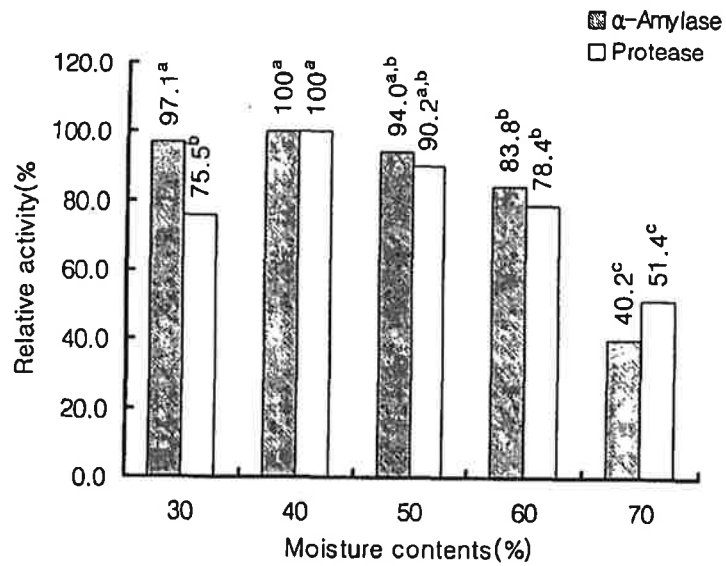


Figure 55. Effect of moisture contents on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*<sup>a,b,c</sup>. Means in the same enzyme with different superscripts differ significantly ( $p < .05$ ).

Table 17. Effect of wheat middling ratio as a carbon source on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*

Carbon source ratio	Relative activity(%)	
	$\alpha$ -amylase	Protease
1 : 1	100	84.9 <sup>b,c</sup>
1 : 2	99.4	100 <sup>a</sup>
1 : 3	99.0	90.5 <sup>a,b</sup>
1 : 4	98.9	79.5 <sup>c</sup>
1 : 5	98.4	74.6 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Means in the same column with different superscripts are different ( $p < .05$ )

본 실험에서는 탄소원인 말분의 비율이 높을수록 protease의 활성이 감소하였는데 이는 *Aspergillus oryzae*는 알칼리성 protease와 중성 protease를 주로 생성하고 산성 protease는 약간 생성하며 기질 중 탄소원의 비율이 클수록 산성 protease 생성비율이 높아지게 된다는 Elizabeth(1982)의 보고와 같은 결과로 생각된다. *Aspergillus oryzae* 배양시 탄소원과 질소원의 비율이 중요한데 C/N 비율이 작을수록 균체량이 많아져 효소의 분비량이 증가되므로 반추위내용물과 말분의 혼합비율은 1:2가 적합한 것으로 나타났다.

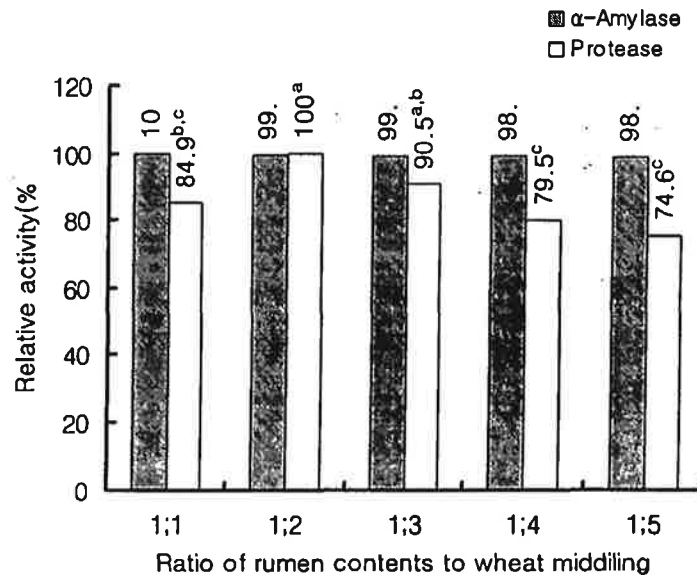


Figure 56. Effect of rumen contents to wheat middling ratio on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae* (<sup>a,b,c</sup> Means in the same enzyme with different superscripts differ significantly (P < 0.05)).

#### 4) 배양시간

최적 효소생성 시간을 조사하기 위하여 반추위내용물과 말분을 1:2로 혼합한 후 수분함량을 40%로 조정하고 30℃ 에서 배양한 결과 균의 성장은 12시간 이후부터 나타나기 시작하여 36시간 이후에는 포자를 형성하기 시작하였고 효소생성도 12시간째부터 증가하기 시작하여 36시간째에 최대에 달한 후 점차 감소하는 것으로 나타났다(Figure 57).

배양시간별(6, 12, 24, 36, 48 및 60시간)로 측정된  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 각각 19.5, 68.3, 99.2, 100, 85.4 및 86.8으로 24시간과 36시간이 다른 시간에 비하여 높은 활성을 나타냈다( $p < .05$ ). Protease의 상대적 활성(%)은 배양시간별로 각각 12.2, 55.0, 88.6, 100, 96.6 및 87.0으로 36시간과 48시간이 다른 시간에 비하여 높은 활성을 나타냈다( $p < .05$ ). 배양 36시간과 48시간째 이후  $\alpha$ -amylase와 protease의 상대적 활성(%)이 감소하는 것은 측정효소가 미생물체외로 분비되는 효소로 protease의 영향에 의하여 가수분해되기 때문으로 생각된다. 반추위내용물과 말분을 이용하여 *Aspergillus oryzae*를 배양할 때 36-48시간이 최적배양시간이라고 생각된다.

Table 18. Effect of incubation time on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*

Incubation time(hr)	Relative activity(%)	
	$\alpha$ -amylase	Protease
6	19.5 <sup>d</sup>	12.2 <sup>a</sup>
12	68.3 <sup>c</sup>	55.0 <sup>c</sup>
24	99.2 <sup>a</sup>	88.6 <sup>b</sup>
36	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
48	85.4 <sup>b</sup>	96.6 <sup>a</sup>
60	86.8 <sup>b</sup>	87.0 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Means in the same column with different superscripts are different( $p < .05$ )

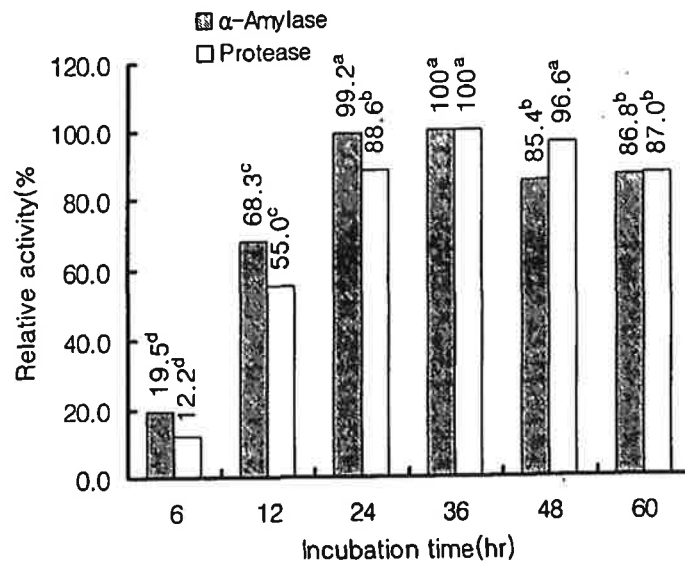


Figure 57. Effect of incubation time on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*<sup>{a,b,c,d}</sup> Means in the same enzyme with different superscripts differ significantly ( $P < .05$ ).

#### 나. *Aspergillus oryzae*가 생성한 $\alpha$ -amylase 및 protease의 특성

##### 1) 효소의 pH 안정성

기질용액의 pH를 3-10까지 각각 조정한 후 측정된 pH에 대한 효소의 안정성은(Figure 58)  $\alpha$ -amylase의 경우 상대적 활성(%)이 각각 30.8, 60.4, 95.3, 100, 51.4, 24.8, 10.8 및 6.2로 pH 5와 6에서 다른 pH보다 높은 활성을 나타냈으며( $p < .05$ ), protease의 상대적 활성(%)은 각각 17.2, 16.5, 24.5, 72.3, 100, 75.8, 83.0 및 78.9로 다른 pH에 비하여 pH 7에서 높은 활성을 나타냈다( $p < .05$ ).

일반적으로 대부분의 곰팡이가 분비한 protease는 한정된 pH에서 활성을 보이는 bacteria나 효모보다는 매우 넓은 범위의 pH에서도 활성을 나타내는데, 본 실험에서도 유사한 경향을 나타냈다. 이는 *Aspergillus oryzae*가 생성하는 산성 protease의 최적

pH가 3.0~4.0, 중성 protease는 7.0 그리고 알카리성 protease는 9.0-10.0 이라는 Elizabeth(1982)의 연구결과와 유사하였다.

Table 19. Effect of pH on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*

pH	Relative activity(%)	
	$\alpha$ -amylase	Protease
3	30.8 <sup>c</sup>	17.2 <sup>c</sup>
4	60.4 <sup>b</sup>	16.5 <sup>c</sup>
5	95.3 <sup>a</sup>	24.5 <sup>c</sup>
6	100 <sup>a</sup>	72.3 <sup>b</sup>
7	51.4 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
8	24.8 <sup>c</sup>	75.8 <sup>b</sup>
9	10.8 <sup>d</sup>	83.0 <sup>b</sup>
10	6.2 <sup>d</sup>	78.9 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Means in the same column with different superscripts are different(p<.05)

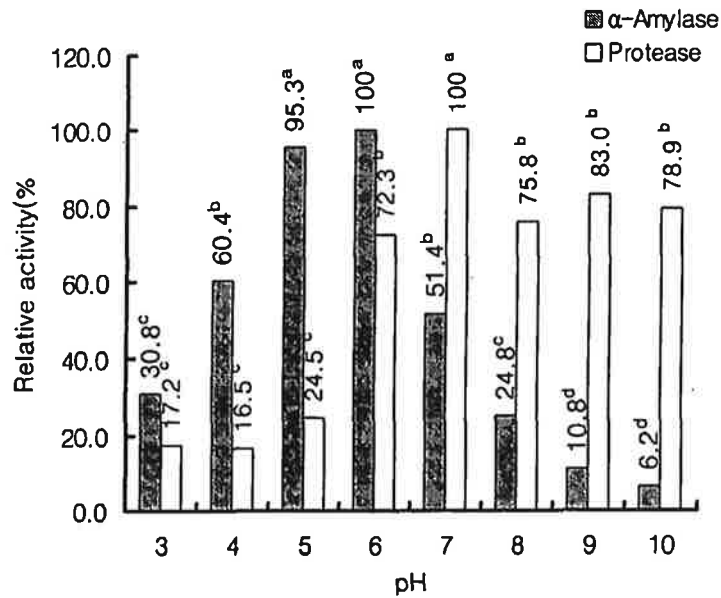


Figure 58. Effect of pH on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*<sup>(a,b,c,d)</sup> Means in the same enzyme with different superscripts differ significantly( $P < .05$ ).

## 2) 효소의 열 안정성

온도를 30℃-100℃까지 10℃ 간격으로 조정하여 측정한  $\alpha$ -amylase의 상대적 활성(%)은 40℃-50℃에서 잔존활성이 85%-100% 이었고 60℃이상에서는 효소활성이 크게 저하되었고 80℃부터는 효소활성이 측정되지 않았다(Figure 59). 온도에 따른 protease의 상대적 활성(%) 조사결과 최적온도는 40℃로 나타나 사상균 protease의 최적온도 40℃-45℃와 유사하였으며 80℃부터는 효소역가가 측정되지 않았다.

Table 20. Effect of temperature on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*

Temperature( <sup>o</sup> C)	Relative activity(%)	
	$\alpha$ -amylase	Protease
30	43.2 <sup>c</sup>	60.2 <sup>b</sup>
40	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
50	85.3 <sup>b</sup>	55.7 <sup>b</sup>
60	63.8 <sup>b,c</sup>	11.4 <sup>c</sup>
70	14.2 <sup>d</sup>	3.0 <sup>d</sup>
80	-	-
90	-	-
100	-	-

<sup>a,b,c,d</sup> Means in the same column with different superscripts are different(p<.05)

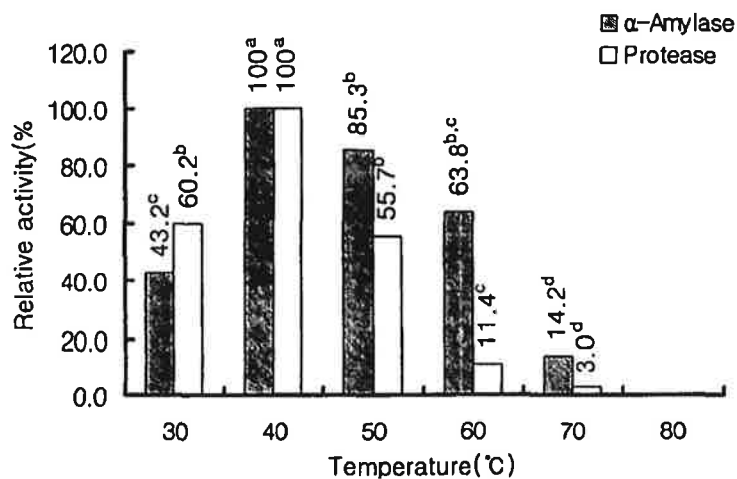


Figure 59. Effect of temperature on the relative activities of  $\alpha$ -amylase and protease of *Aspergillus oryzae*{<sup>a,b,c,d</sup> Means in the same enzyme with different superscripts differ significantly(p<.05)}.

### 제 3 절 도축 반추위내용물을 이용한 효모 및 곰팡이 배양물 첨가가 가축의 소화생리에 미치는 효과

#### 1. 서 론

반추위 발효를 조절하므로써 반추가축의 생산성을 향상시키는데 주로 사용되는 사료첨가제로 buffer제와 반추위내 발효를 담당하는 미생물들을 직접적으로 조절하는 항생물질 및 호르몬제 등을 들 수 있는데, 이 중 특히 항생물질은 계속 사용하게 되면 내성균 문제와 가축의 조직내 잔류 문제를 야기시켜 그 사용에 많은 제약을 받고 있으며 일부 국가에서는 항생제가 급여된 가축의 고기 수입을 규제하고 있어 항생제의 사용이 제한되고 있다. 최근의 영양학자들은 축산물 생산에 이용효율을 높이는 비항생제적 생물학적 방법(noni-antibiotic biological tools)을 이용한 효소제, 생균제 및 생효모배양물 등에 관한 연구와 이용이 증가되고 있으며 현재 가축사양 프로그램(Animal feeding program) 중의 하나인 Direct Fed Microbials의 사용에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. 반추동물에서는 효모배양물(*Saccharomyces cerevisiae*)이나 진균배양물(*Aspergillus oryzae*)의 단독 또는 타 미생물과 혼합하여 사료에 이용되고 있다(Williams와 Newbold, 1990).

곰팡이와 효모배양물의 사료 중 첨가는 반추위내 미생물 군집의 변화(Wiedmeier 등, 1987; Frumholtz 등, 1989; Fondevila 등, 1990), VFA의 생성량과 그 비율의 변화(Wiedmeier 등, 1987), 사료 섭취량의 증가(Kellems 등, 1990), 소화율과 사료이용효율의 개선(Wiedmeier 등, 1987; Fondevila 등, 1990), 산유량과 증체량의 향상(Kellems 등, 1990) 등의 효과를 나타내므로써 가축의 생산성을 향상시키는 것으로 보고되었다.

반추위 내용물은 건물기준으로 조섬유 함량이 30-40%, 조단백질 함량이 10-25%, 가용무질소물 함량이 38%이며 조회분 함량이 8-13% 정도로 우수한 영양적 가치를 가지고 있고(Antongiovanni 등, 1973; Jovanovic과 Cuperlovic, 1977), 미생물이 분비한 각종 효소(Hungate, 1966) 및 미지성장인자(Ruf 등, 1953; Bryant와 Doetsch, 1955)등이 함유되어 있어 사료첨가제로써 이용가치가 크다.

건강한 소의 반추위 내용물을 투여한 송아지의 반추위가 보다 빨리 튼튼하게 발달



하는데 이는 반추위내 미생물의 증식(McNeill 등, 1954; Gill과 King, 1958; Pounden, 1952; Gordon과 Moore, 1961)에 적합한 환경이 만들어져 소화기능이 촉진되고 (Doetsch 등, 1952; Huhtanen 등, 1952; Bentley 등, 1954), 각종 영양소의 이용 능력이 크게 향상되기 때문에 각종 소화기 질병을 예방할 뿐만 아니라 치료와 성장 촉진에 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Pounden과 Hibbs, 1948; Allison, 1976; Slyter, 1976).

조사료의 생산 및 급여여건이 열악한 실정에서 과다한 농후사료를 급여하면서 생산성을 어느 정도 향상시키고 있으나 반추위내 pH를 저하시켜 섬유소분해 박테리아의 수가 감소되어 구조 탄수화물의 소화율이 낮아지고 나아가 여러 가지 대사성 질병이 발생하게 되어 가축의 생산성이 크게 저하되고 있다.

따라서 본 연구에서는 반추위 미생물의 활력증진과 반추위 이상발효에 효과적인 반추위내용물을 이용하여 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물과 *Aspergillus* 배양물을 제조하고 반추위내용물을 이용한 배양물이 젖소의 반추위내 pH, NH<sub>3</sub>-N 함량, 휘발성 지방산 함량 및 반추위내 영양소 소실율에 미치는 효과를 구명하기 위하여 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 제조

#### 1) 반추위액 배지 제조 및 공시균주

반추위액 배지는 채취한 반추위 내용물을 수도물과 1 : 1의 비율로 혼합한 후 압착 추출한 rumen extract를 2점의 cheese cloth로 여과하여 기본배지를 제조하였다(Table 21).

본 실험에 사용한 효모는 *Saccharomyces* sp.인 SKK-Y-728로 Yeast Malt agar 에 배양한 후 냉장(4℃)보관하면서 사용하였다. 효모 접종액은 YM broth에서 16시간 배양

한 효모 종배양액(seed culture)을 사용하였으며, 1% (v/v)를 접종하고 30℃에서 48시간 배양하였다.

Table 21. Chemical composition of rumen contents medium

Item	Contents
Reducing sugar(mg/100ml)	45.1±1.5 <sup>#</sup>
Crude protein(mg/100ml)	670±56.0
NH <sub>3</sub> -N(mg/100ml)	27.7±1.23
pH	6.3±0.64

<sup>#</sup> Mean ± SD

### 2) *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양

*Saccharomyces* sp.인 SKK-Y-728 배양은 7 L jar fermenter(Model No. SY 500)를 이용하였는데, 공시효모의 질소 및 당 이용율을 고려해 C/N비율을 100 : 1.5, NH<sub>3</sub>-N 함량이 100ml당 10mg 및 환원당 함량이 ml당 6.5mg이 되게 당밀을 이용해 조정하였다. 이와 같이 제조한 배지는 121℃, 1.2kg/cm<sup>2</sup>에서 15분간 멸균하고 6N HCl을 이용해 pH를 5.0으로 조정된 후 효모 종배양액 1%를 접종하고 30℃에서 agitator 속도는 150 rpm, 통기량은 1 vvm으로 고정하고 24시간 배양하였다.

### 3) *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 제조

도축 반추위 내용물을 이용한 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 제조는 Figure 60과 같은 방법으로 제조하였다. 즉 30℃에서 24시간 배양한 *Saccharomyces* sp.인 SKK-Y-728 배양액과 밀기울과 옥수수분말을 동량 혼합한 사료와 1 : 1 (w/w)의 비율로 혼합하고 50℃에서 2차 배양과 건조과정을 48시간 거친 후 2 mm로 분쇄하여 제조하였다.

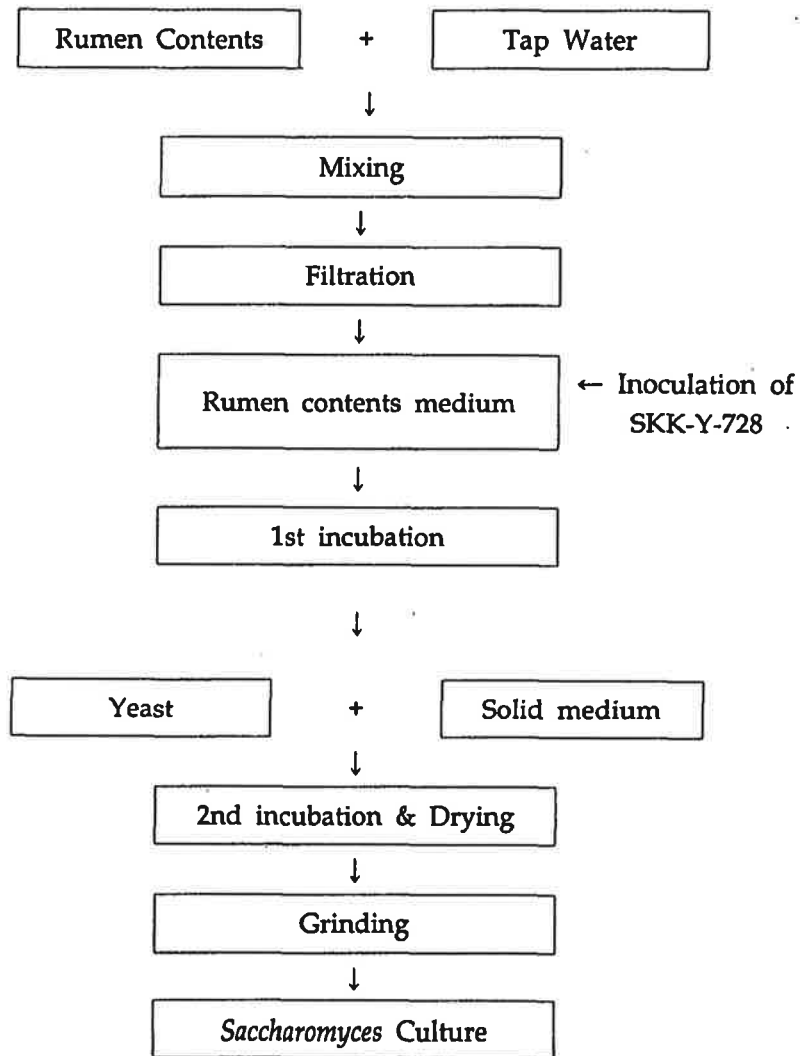


Figure 60. Flow diagram for preparing of *Saccharomyces sp.* culture with rumen contents.

4) *Saccharomyces sp.* SKK-Y-728 배양물의 생균수 및 성분

도축 반추위 내용물을 기질로 이용하여 *Saccharomyces sp.*인 SKK-Y-728을 배양했을 때 생효모수는  $1.83 \times 10^7$  (CFU/ml) 이었고 질소 이용율은 68.9%였고 환원당 이용율은 87.8%로 나타났다.

도축 반추위 내용물을 기질로 제조한 *Saccharomyces sp.* SKK-Y-728 배양물의 일반 조성분 함량은 Table 22와 같다.

Table 22. Chemical composition and viable cell counts of *Saccharomyces sp.* SKK-Y-728 culture

Item	Contents
Chemical composition	
Dry matter	91.19
Organic matter	94.82
Crude ash	5.18
Crude protein	19.13
Crude fiber	9.43
Crude fat	6.36
Viable counts( $10^7$ CFU/ml)	1.83

## 나. *Aspergillus oryzae* 배양물 제조

### 1) 반추위 내용물 배지제조 및 공시균주

실험에 사용된 반추위 내용물은 도축장에서 채취하여 냉장보관하면서 기질로 사용하였으며, 균주는 *Asp. oryzae*를 쌀에 번식시킨 종국을 구입하여 사용하였다. AOAC 방법(1990)으로 분석한 반추위내용물의 조성분 함량은 각각 조단백질 21.1%, 조섬유 20.4%, 조지방 13.7%였다.

### 2) *Aspergillus oryzae* 배양조건

각종 발효산물 및 미지성장인자를 함유하고 있는 도축반추위액을 가축의 생산성 증진을 위한 균체 단백질 및 효소생산( $\alpha$ -amylase, protease)의 기질로 이용하기 위하여 *Asp. oryzae*가 도축반추위액에서 최대의 효소를 생성하는 배양조건을 조사한 결과는 Table 23과 같다.

옥분, 말분, 밀기울 첨가에 따른  $\alpha$ -amylase의 상대적인 역가(%)는 밀기울 100에 대하여 각각 78.5, 77.1 및 74.7로 탄소원 무첨가 18.5에 비하여 증가하였고, protease의 상대적 역가(%) 또한 멸균처리한 말분 100에 대하여 52.2, 67.8 및 60.3으로 무첨가 21.5에 비하여 증가하였으나 탄소원에 따른 차이는 없었다. *Asp. oryzae*가 생성한  $\alpha$ -amylase의 상대적 역가(%)는 수분함량 30-50%일 때 균체성장 및 효소생성이 높았고, protease의 상대적 역가(%)는 수분함량 40%에서 가장 높은 효소 역가를 나타냈다. 반추위내용물과 탄소원의 비율에 따른  $\alpha$ -amylase의 상대적 역가(%)는 혼합비율에 따라 차이가 없었다. 배양시간별  $\alpha$ -amylase의 상대적 역가(%)는 24시간과 36시간이 다른 시간에 비하여 높은 역가를 나타냈으며( $p < .05$ ), protease의 상대적 역가(%)는 36시간과 48시간이 다른 시간에 비하여 높은 역가를 나타냈다.

Table 23. Formula and fermentation conditions for production of *Aspergillus oryzae* culture with rumen contents

Item	Conditions
Formula <sup>a</sup> (%, w/w)	
Rumen contents	66.6
Corn meal	16.7
Wheat bran	16.7
Fermentation condition	
Temperature(°C)	30
Incubation time(hr)	48
Moisture contents(%)	40
Inoculum size(%)	0.5

<sup>a</sup> All values are expressed on as fed basis.

### 3) *Aspergillus oryzae* 배양물 제조

도축 반추위 내용물을 이용한 *Asp. oryzae* 배양물 제조는 Figure 61과 같은 방법으로 제조하였다. 즉 도축장에서 수거한 반추위내용물에서 고형물 부분을 선별한 후 탄수화물 공급원(밀기울 : 옥수수분말 = 1 : 1)과 2 : 1(w/w)의 비율로 혼합한 후 *Asp. oryzae* 를 0.5% (w/w) 접종하고 30°C incubator에서 48시간 배양하고 60°C의 drying oven에서 8시간 건조시킨 후 2 mm로 분쇄하였다.

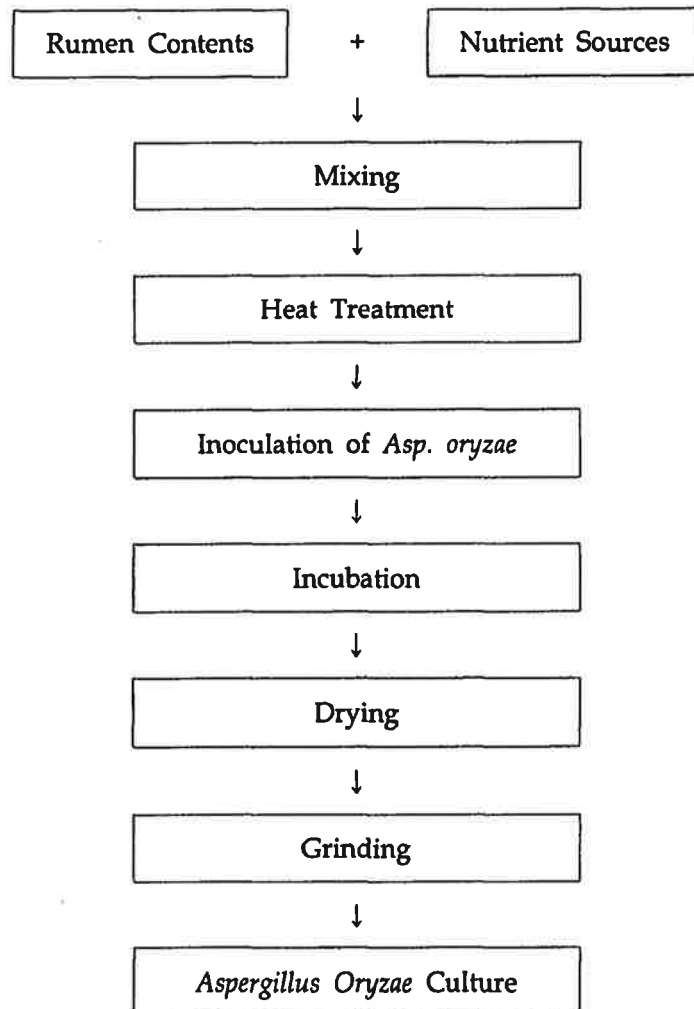


Figure 61. Flow diagram for preparing of *Asp. oryzae* culture with rumen contents

4) *Aspergillus oryzae* 배양물의 효소역가 및 성분

도축 반추위 내용물을 기질로 이용하여 *Asp. oryzae*를 배양했을 때 상대적 효소역가 및 *Asp. oryzae* 배양물의 일반 조성분 함량은 Table 24와 같다.

Table 24. Chemical composition and enzyme activity of *Asp. oryzae* culture

Item	Contents
Chemical composition	
Dry matter	95.05
Organic matter	93.33
Crude ash	6.67
Crude protein	19.07
Crude fiber	14.47
Crude fat	7.09
Enzyme activity	
Amylase <sup>a</sup>	89.10
Protease <sup>b</sup>	33.70

<sup>a</sup> One unit of enzyme activity was defined as quantity of enzyme that causes 1% reduction of blue color intensity of starch-iodine solution at 40°C per 1 min.

<sup>b</sup> One unit of enzyme activity was defined as amount of enzyme causing and increase in absorbance at 660nm by 0.01 after 10 min.



다. *Saccaromyces* sp. SKK-Y-728 및 *Aspergillus oryzae* 배양물  
 급여가 반추위내 사료 이용률에 미치는 효과

1) 공시축 선정 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시축은 성균관대학교 실험축사에서 사육중인 rumen cannula가 장착된 평균체중 600Kg인 Holstein 젖소 3두로 사료는 2회(06:00, 16:00)로 나누어 급여하였고 일반 사양관리는 성균관대학교 실험축사의 관행 사양관리 방법에 준하였으며 광물질 공급원으로는 mineral block (Table 25)을 사용하였고 물은 자유 음수토록 하였다.

Table 25. Chemical composition of mineral block

Minerals		Contents
NaCl	(%)	99.0
Mg	(%)	0.5
Fe	(ppm)	8.5
Cu	(ppm)	7.0
Co	(ppm)	2.2
Mn	(ppm)	10.5
Zn	(ppm)	10.8
I	(ppm)	20.0

2) 시험사료 및 성분분석

전 시험기간을 통하여 공시축에게 급여한 농후사료는 비유중기용으로 농후사료는 1일 4Kg을 2회에 나누어 급여하였고 조사료는 볏짚을 자유 채식시켰는데 농후사료의 원료조성(Table 26)과 AOAC(1990) 방법으로 분석한 농후사료 및 조사료의 조성분 함량은 Table 27과 같다.

Table 26. Ingredient composition of concentrate diet(%)<sup>a</sup>

Ingredients	Contents(%)
Corn	48.0
Sorghum	5.0
Soybean meal	11.0
Rapeseed meal	5.0
Cottonseed meal	5.0
Wheat bran	13.3
Tapioca	5.0
Molasses	4.0
Calcium phosphate	0.8
Limestone	1.0
Salt	0.83
Buffer(MgO)	0.3
Yeast culture	0.2
Avoparcin	0.07
Vitamin & mineral premix <sup>b</sup>	0.5

<sup>a</sup> As fed basis

<sup>b</sup> Vitamin & mineral premix contain Vit A, 2,000,000 IU; Vit D, 400,000 IU; Vit E 4,000 IU; Mg, 20,000mg; Fe, 15,000mg; Mn, 10,000mg; Zn, 10,000mg; Cu 5,000mg; I, 200mg; Co, 50mg; Se, 40mg per Kg.

Table 27. Chemical composition of experimental diet(%)<sup>a</sup>

Items	Concentrate	Rice straw
Dry matter	88.4	87.9
Organic matter	94.1	87.6
Crude protein	16.9	5.7
Crude ash	3.1	2.1
Crude fiber	5.7	31.2
Ca	0.9	0.4
P	0.6	0.1
K	0.1	0.1
Mg	0.07	0.03

<sup>a</sup> All values are expressed on a dry matter basis except dry matter

#### 라. 실험설계

반추위 미생물의 활력증진과 반추위 이상발효에 효과적인 반추위내용물을 이용하여 제조한 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물과 *Aspergillus* 배양물이 젖소의 반추위내 pH, NH<sub>3</sub>-N 함량, 휘발성지방산 함량 및 반추위내 영양소 소실율에 미치는 효과를 구명하기 위하여 대조구, *Saccharomyces* sp. 배양물 첨가구 및 *Aspergillus* 배양물 첨가구로 나누어 공시축을 3 × 3 Latin Square design에 의하여 배치하였다. 또한 *Saccharomyces* sp. 배양물과 *Aspergillus* 배양물은 각각 100g 씩 오전과 오후 사료급여 시 rumen cannula를 통하여 반추위에 직접 투여하였다. 공시축은 배양물 급여전과 급여 14일 후 7일간 오전 사료급여 전 30분과 사료급여 후 2, 5 및 8시간째 반추위액을 채취하여 반추위내 pH, NH<sub>3</sub>-N 및 휘발성지방산 함량을 측정하였다. 또한 *Saccharomyces* sp. 배양물과 *Aspergillus* 배양물 급여전과 급여 14일 후 7일간 nylon bag을 이용하여 영양소 소실율을 측정하였다.

## 마. 조사항목

### 1) 반추위내 pH 변화 측정

*Saccharomyces* sp. 배양물과 *Aspergillus* sp. 배양물 첨가에 따른 반추위내 pH 변화 측정을 위한 rumen fluid는 사료급여 30분전과 사료급여 후 2, 5 및 8 시간에 채취한 후 즉시 pH meter(TOA HM 7B)를 사용하여 측정하였다.

### 2) 시험사료의 소실을 측정

조사료의 반추위내 소실율은 6×12cm의 nylon bag(pore size 12 μm)을 이용하여 조사하였는데, 공시축에 급여한 볏짚을 2mm로 분쇄하고 2.5 - 3.5g을 nylon bag에 넣고 봉한 후 24, 48 및 72시간 배양하였다. 각각의 반추위 발효 시간별에 따라 배양시킨 후 nylon bag에서 맑은 물이 나올 때까지 일정한 동작으로 흐르는 수돗물에 충분히 세척하고 60℃의 drying oven에서 72시간 건조 후 칭량한 다음 분석에 이용하였다. 시험사료와 nylon bag내 잔류사료의 일반성분은 AOAC(1990) 방법에 준하여 분석하였으며, acid detergent fiber(ADF) 및 neutral detergent fiber(NDF) 함량은 Van Soest(1970) 방법에 따라 분석하였다.

### 3) 반추위내 NH<sub>3</sub>-N 함량 측정

각각의 발효시간별에 따라 처리구별로 채취한 rumen fluid의 NH<sub>3</sub>-N 함량은 Chaney와 Marbach(1962) 방법에 의하였다. 즉, 발효액을 20ml centrifuge tube에 12ml씩 넣고 13,000rpm, 4℃조건에서 15분간 원심분리하여 상등액을 분석용 시료로 사용하였는데, 이때 사용된 기기는 Spectrophotometer(Hewlett Packard 8543)로 측정파장은 630nm로 하였다.

### 4) 반추위내 휘발성지방산 함량 측정

발효시간별로 채취한 rumen fluid의 휘발성 지방산 함량은 Stewart와 Duncan(1985) 방법에 의하여 발효액을 25% phosphoric acid와 5 : 1의 비율로 혼합한 후 20ml centrifuge tube에 12ml씩 넣고 13,000rpm, 4℃조건에서 15분간 원심분리

후 얻어진 상층액을 overnight 동결보존한 후 해동시켜 8,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

#### · 바. 통계분석

실험결과에 대한 통계처리는 Statistical Analysis System(SAS, 1985)를 사용하며, 각처리 평균간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)에 의한다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 조사료의 반추위내 소실율

##### 1) 건물소실율

대조구와 *Aspergillus* sp. 및 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 급여에 따른 반추위내 건물 소실율(%)은 Table 28 및 Figure 62와 같다. 건물 소실율(%)은 시험전 배양 48시간제 대조구, *Aspergillus* sp. 및 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 급여구가 각각 24.44, 23.17 및 23.95로 차이가 없었으며 배양 72시간제에도 37.57, 38.61 및 38.01로 차이가 없었으나 급여 2주 후부터 3주 사이에는 배양 24시간제 대조구 13.00에 비하여 *Aspergillus* sp.와 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 급여구가 각각 16.94 와 15.62로 높게 나타났다. 배양 48시간제에도 대조구 25.22에 비하여 *Aspergillus* sp.와 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 급여구가 36.71과 32.87로 높았고( $p<.05$ ) 배양 72시간제에도 대조구 37.87에 비하여 *Aspergillus* sp.와 *Saccharomyces* sp. SKK-Y-728 배양물 급여구가 41.85와 41.66으로 증가하였다( $p<.05$ ).

Adams 등(1981), Gomez-Alarcon 등(1990), Arambel과 Kent(1988) 및 Harrison 등(1988)은 곰팡이 배양물의 첨가로 반추위 및 총장관에서의 DM 소화율이 현저하게 증가되었다고 하였고, Wiedmeier 등(1987)은 *Asp. oryzae* 배양물 급여시 젖소의 반추위내 DM, ADF 및 hemicellulose 소화율이 각각 39, 28 및 47% 정도 향상되었다고 하

였으며 Carro 등(1992)은 *in vitro* 실험에서 DM 1g당 yeast culture 15mg 첨가시 조사료 : 농후사료의 비율을 30 : 70으로 하였을 때 DM 및 NDF의 분해율이 증가하였다고 보고하여 본 실험결과와 유사하게 나타났다.

그러나 Bertrand와 Grimes(1997)는 일일 3g의 *Asp. oryzae* fermentation extract 급여시 DM 및 영양소 분해율의 변화는 없었다고 보고하였다.

Table 28. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* dry matter disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%)

Item	Treatment	Rumen exposure time(hr)		
		24	48	72
Before supplementation	Control	11.25±0.27 <sup>1</sup>	24.44±0.70	37.57±1.17
	A. C. <sup>2</sup>	10.91±0.14	23.17±0.39	38.61±0.50
	S. C. <sup>3</sup>	10.67±0.43	23.95±0.84	38.01±0.85
After supplementation	Control	13.00±1.00	25.22±1.40 <sup>b</sup>	37.87±2.27 <sup>b</sup>
	A. C.	16.94±1.43	36.71±1.23 <sup>a</sup>	41.85±1.89 <sup>a</sup>
	S. C.	15.62±1.04	32.87±0.53 <sup>a</sup>	41.66±3.02 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Mean ± SD

<sup>2</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>3</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts differ significantly(p<.05)

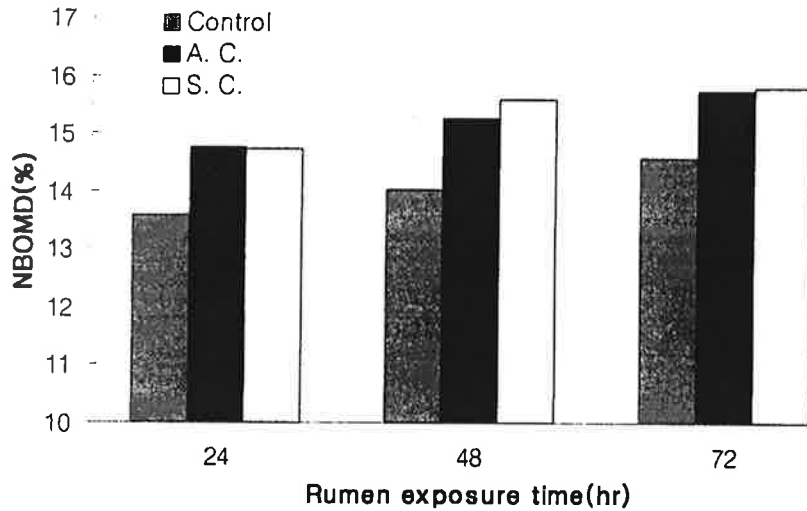


Figure 62. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* dry matter disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%).

## 2) 유기물소화율

대조구와 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여에 따른 반추위내 유기물 소실율은 Table 29 및 Figure 63과 같다. 시험전에는 배양 24시간째 대조구; *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 11.55, 12.00 및 11.12로 차이가 없었으며 배양 72시간째에도 13.42, 13.85 및 13.34로 차이가 없었으나 급여 2주 후부터 3주 사이에는 배양 24시간째 대조구 13.59에 비하여 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 14.76과 14.72로 증가하였다. 배양 48시간째에도 대조구 14.01에 비하여 15.26과 15.57로 급여구가 높았고 배양 72시간째에도 대조구 14.56에 비하여 15.71과 15.78로 증가하였으며 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구간에는 차이가 없었다.

Yoon과 Stern(1996)은 하루 yeast culture 57g과 Fungal culture 3g을 급여하는 실

험에서 yeast culture를 급여한 처리구에서 반추위의 liquid dilution rate이 다른 처리구에 비해 낮아져 반추위내 유기물 소화율과 진정 유기물 소화율이 각각 18.6%와 12.1% 증가되어 십이지장으로 유입되는 유기물의 양이 작아지는 경향을 나타냈다고 보고하였으며 Wohit(1990)은 yeast culture 급여에 의해 산유량과 건물 섭취량이 증가한 것은 단백질과 조섬유 소화율의 향상에 기인한 것이라고 하였고, Arambel 등 (1987)은 yeast culture에 적용된 소와 그렇지 못한 소의 위액을 *in vitro*의 배지로 사용한 결과 yeast culture에 적용된 소의 위액에서 건물 소실율과 acetate와 propionate 비율이 높아지는 경향이 있다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과로 생각된다.

Table 29. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* organic matter disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%)

Item	Treatment	Rumen expoure time (hr)		
		24	48	72
Before supplementation	Control	11.55±0.46 <sup>1</sup>	12.85±0.34	13.42±0.18
	A. C. <sup>2</sup>	12.00±0.11	13.10±0.23	13.85±0.60
	S. C. <sup>3</sup>	11.12±0.29	12.50±0.14	13.34±0.49
After supplementation	Control	13.59±0.13	14.01±0.04	14.56±0.14
	A. C.	14.76±0.17	15.26±0.20	15.71±0.23
	S. C.	14.72±0.20	15.57±0.38	15.78±0.09

<sup>1</sup> Mean ± SD

<sup>2</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>3</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture



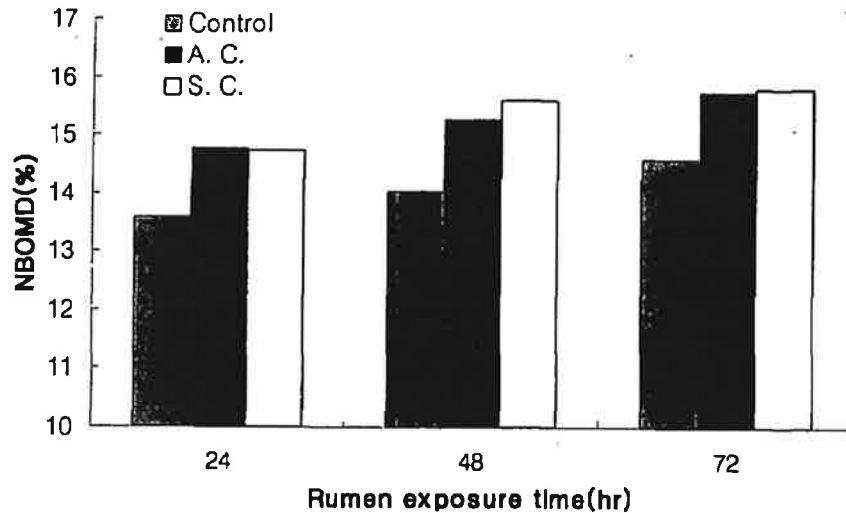


Figure 63. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* organic matter disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%).

### 3) NDF 소화율

대조구와 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여에 따른 반추위내 NDF 소실율은 Table 30 및 Figure 64와 같다. 시험전에는 배양 24시간째 대조구, *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 11.13, 10.49 및 10.81로 차이가 없었으며 배양 72시간째에도 17.25, 17.57 및 17.25로 차이가 없었으나 급여 2주 후부터 3주 사이에는 배양 48시간째 대조구 14.57에 비하여 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 15.99와 15.78로 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 배양 72시간째에도 대조구 17.42에 비하여 18.05와 18.37로 증가하였으나 유의적인 차이는 없었으며 *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구간에도 차이가 없었다.

Wiedmeier 등(1987)은 *Asp. oryzae* 급여시 젖소의 반추위내 ADF 및 hemi-cellulose 소화율이 각각 28% 및 47% 정도 향상되고, 총장관내에서 NDF와 ADF의 소화율은 5.3% 및 3% 정도 증가된다고 하였으며 Carro 등(1992)은 *in vitro* 실험에서 DM 1g당

yeast culture 15mg 첨가시 조사료와 농후사료의 비율을 30대 70으로 구성하였을 때 DM 및 NDF의 분해율이 증가하였다고 하였다. 또한 Plata 등(1994)은 수수짚의 첨가 수준별에 따른 yeast culture 첨가가 *in situ* 실험에서 6시간 제 NDF 분해율을 증가시켰다고 하였으며 Harrison 등(1988)과 Dawson 등(1990)은 yeast culture 첨가에 따라 총 박테리아 및 섬유소분해 bacteria의 활력이 증가되어 NDF 소화율이 증가한다고 보고하여 본 실험과 유사하게 나타났다.

Table 30. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* neutral detergent fiber disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%)

Item	Treatment	Rumen exposure time (hr)		
		24	48	72
Before supplementation	Control	11.13±0.80 <sup>1</sup>	14.69±1.71	17.25±0.76
	A. C. <sup>2</sup>	10.49±1.86	14.38±0.55	17.57±1.57
	S. C. <sup>3</sup>	10.81±0.39	13.71±0.63	17.25±0.61
After supplementation	Control	11.80±0.66	14.57±0.50	17.42±0.47
	A. C.	12.24±0.37	15.99±0.70	18.05±0.28
	S. C.	12.37±0.25	15.78±0.56	18.37±0.04

<sup>1</sup> Mean ± SD

<sup>2</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>3</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture

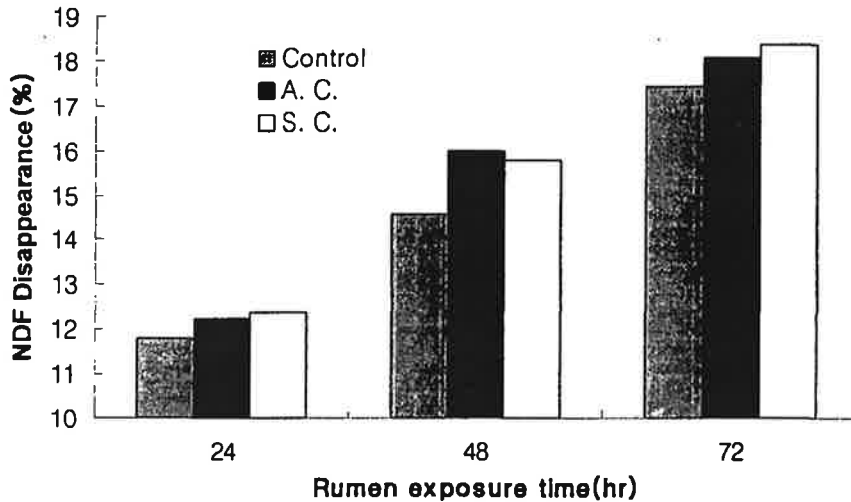


Figure 64. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* neutral detergent fiber disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%).

#### 4) ADF 소화율

대조구와 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여에 따른 반추위내 ADF 소실율은 Table 31 및 Figure 65와 같다. 시험전에는 배양 24시간째 대조구, *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 11.94, 11.42 및 11.03으로 차이가 없었으며 배양 72시간째에도 23.30, 22.95 및 23.25로 차이가 없었으나 급여 2주 후부터 3주 사이에는 배양 48시간째 대조구 18.75에 비하여 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 19.38과 19.94로 증가하였으나 유의적 차이는 없었다. 배양 72시간째에도 대조구 23.29에 비하여 24.96과 24.61로 증가하였으며( $p < 0.05$ ) *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여구간에는 차이가 없었다.

Wiedmeier 등(1987)은 *Asp. oryzae* 배양추출물 급여시 젖소의 반추위내 ADF 및 hemicellulose 소화율이 각각 28% 및 47% 정도 향상되고, 총장관내에서 ADF의 소화

율은 3% 정도 증가되며 하루 90g의 yeast를 급여한 실험에서 cellulolytic bacteria의 수가 ml당  $39.8 \times 10^8$ 로써 대조구의  $25.0 \times 10^8$ 보다 증가하였으며, 동시에 ADF와 hemicellulose의 소화율도 대조구보다 각각 0.7%, 4.2% 상승하여 섬유소 분해율을 향상시키는 것으로 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

그러나 Kamalamma 등(1996)은 *in vitro* 실험에서 YC(Yea-sacc) 첨가가 NDF와 ADF의 분해율에는 영향을 미치지 못하였다고 보고하였고 Oellermann 등(1990)은 *Asp. oryzae* fermentation extract를 일일 0, 1, 2, 4g 과 6g을 각각 급여시 처리구간에 CP, ADF 및 NDF 소화율에 큰 차이가 없다고 보고하여 본 실험결과와 차이가 있었다.

Table 31. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* acid detergent fiber disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%)

Item	Treatment	Rumen exposure time (hr)		
		24	48	72
Before supplementation	Control	11.94 ± 0.35 <sup>1</sup>	19.77 ± 0.70	23.30 ± 0.82
	A. C. <sup>2</sup>	11.42 ± 2.90	19.49 ± 1.77	22.95 ± 0.68
	S. C. <sup>3</sup>	11.03 ± 1.50	19.60 ± 1.58	23.25 ± 0.75
After supplementation	Control	12.66 ± 0.29	18.75 ± 0.58	23.29 ± 0.28 <sup>b</sup>
	A. C.	13.36 ± 0.33	19.38 ± 0.45	24.96 ± 0.59 <sup>a</sup>
	S. C.	13.74 ± 0.26	19.94 ± 0.63	24.61 ± 0.85 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Mean ± SD

<sup>2</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>3</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts differ significantly ( $p < .05$ )

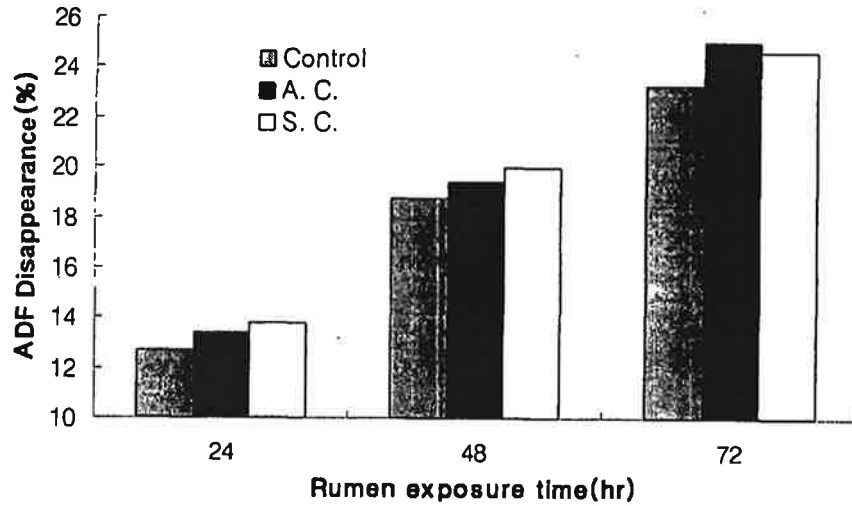


Figure 65. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on *in situ* acid detergent fiber disappearance of rice straw in the rumen of dairy cows(%).

#### 나. 반추위내 pH 변화

반추위내 평균 pH는 대조구와 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 6.41, 6.38 및 6.38로 차이가 없었으나 급여 2주 후 7일간 측정된 반추위내 pH 변화는 Table 32 및 Figure 66과 같다. 평균 pH는 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 대조구의 6.49에 비하여 각각 6.28과 6.12로 유의적으로 낮은 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). Chiquette(1995)는 *Asp. Oryzae* 단독 첨가나, *S. cerevisiae*와 혼합으로 첨가했을 때 사료 급여시와 급여 후 8시간째 반추위내 pH가 낮아졌다고 하였으며, Wiedmeier 등(1987)은 곰팡이 배양물을 Holstein 착유우에 급여하였을 경우 반추위내 미생물의 수가 증가하므로써 영양소의 이용성이 증가하고 특히 영양소의 유기물 분해가 높아져 대사산물인 휘발성 지방산의 생성량이 증가하고 그 결과 pH가 감소된다고 하여 본 실험 결과와 유사하였다.

그러나 Dawson 등(1990)은 *in vitro* 실험에서 효모배양물이 반추위내 pH를 0.2 정도 높인다고 보고하였으며, Adams 등(1981)의 연구에서도 농후사료와 조사료의 비율이 50 : 50인 기본사료에 1.85% 수준의 효모배양물을 첨가하고 11시간 경과 후의 반추위내 pH는 대조구에 비해 0.1 정도 상승했다고 보고하여 본 실험과 다른 결과를 보였다.

Rose(1980)는 효모배양물을 전분함량이 높은 농후사료에 첨가시켜 급여할 경우 효모가 분비하는 lactate dehydrogenase에 의해 반추위액의 pH저하가 방지될 수 있으며 효모가 lactate를 이용하는 *Selenomonas ruminantium*의 성장을 촉진시켜 lactate의 이용성을 높임으로써 반추위액의 pH를 높일 수 있다고 하였으며, Nisbet과 Martin(1991)은 효모는 malate같은 유산이용미생물의 growth factor를 공급하여 반추위 미생물의 lactate를 이용율을 증가시키므로써 반추위내의 pH를 적절하게 변화시킨다고 보고하였다.

Table 32. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on the ruminal pH of dairy cows

Item	Treatment	After feeding (hr)				Mean
		- 0.5	2	5	8	
Before supplementation	Control	6.64	6.29	6.34	6.36	6.41
	A. C. <sup>1</sup>	6.65	6.18	6.28	6.40	6.38
	S. C. <sup>2</sup>	6.62	6.20	6.31	6.39	6.38
After supplementation	Control	6.51	6.44	6.54	6.47	6.49 <sup>a</sup>
	A. C.	6.21	6.01	6.12	6.14	6.12 <sup>b</sup>
	S. C.	6.44	6.27	6.30	6.40	6.28 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>2</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts differ significantly(p<.05)

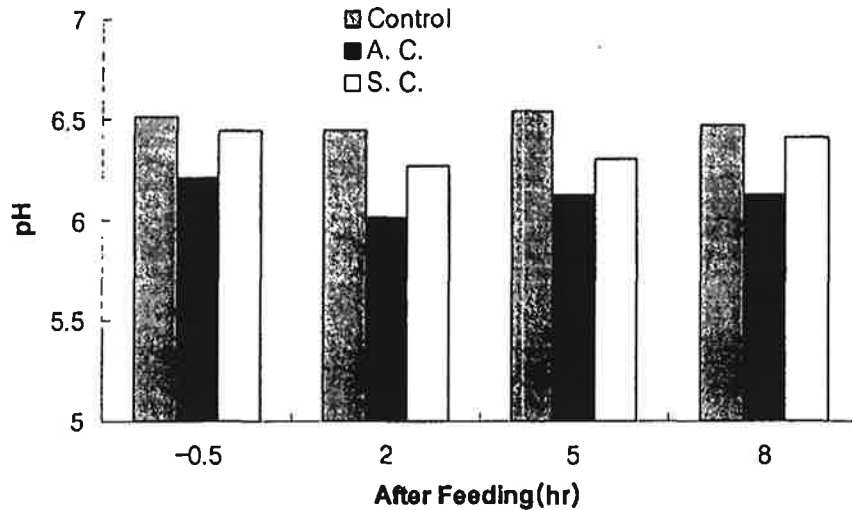


Figure 66. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on the ruminal pH of dairy cows.

#### 다. 반추위내 NH<sub>3</sub>-N 함량

시험전 반추위내 평균 NH<sub>3</sub>-N 함량(mg/100ml)은 대조구와 *Aspergillus* 및 *Saccharomyces* 배양물 급여구가 각각 15.77, 16.21 및 15.11로 차이가 없었으나 급여 2주 후 7일간 측정된 반추위내 NH<sub>3</sub>-N 함량 변화는 Table 33 및 Figure 67과 같다. *Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양물 급여구의 사료급여 5시간째 NH<sub>3</sub>-N 함량이 17.20인 데 비하여 각각 13.31과 14.94로 낮았으며(p<.05) 8시간째에도 대조구 9.47에 비하여 *Aspergillus* 배양물 급여구는 7.84로 낮게 나타났으나(p<.05) *Aspergillus* 배양물 급여구와 *Saccharomyces* 배양물 급여구간에는 차이가 없었다.

Harrison 등(1988)과 Newbold 등(1990)은 효모배양물 첨가가 반추위내 NH<sub>3</sub>-N의 농도를 감소시킨다고 하였는데, 이는 반추위 미생물에 의한 proteolytic, peptidolytic 및 deaminative activity가 감소하는 것이 아니고, 미생물의 성장율이 증가하여 나타난 결과라고 하였으며(Williams와 Newbold, 1990), Martin 등(1989)은 효모배양물의 첨가

로 인하여 반추위액의 암모니아 농도가 감소되었으며 acetate 보다는 propionate의 생성량이 많이 증가되었다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다.

Chiquette (1995)는 *Asp. oryzae* 단독 급여시 반추위내 NH<sub>3</sub>-N 함량이 증가하는 경향을 보였으며, *S. cerevisiae*와 *Asp. oryzae*의 혼합급여시 각각 단독으로 급여했을 때보다 반추위내의 NH<sub>3</sub>-N 농도가 낮았다고 하였으며 Wiedmeier 등(1987), Fondevila 등(1990) 및 Gomez-Alarcon 등(1990)은 곰팡이 배양물의 첨가로 인하여 반추위내 NH<sub>3</sub>-N 의 농도가 증가한다고 보고하여 본 실험과 차이가 있었다.

곰팡이 배양물의 첨가가 반추위내 NH<sub>3</sub>-N의 농도를 증가(Arambel 등, 1988; Gomez-Alarcon 등, 1990; Frumholtz 등, 1989; Fondevila 등, 1990)시키는 이유는 곰팡이의 endogenous proteolytic activity에 의한 proteolysis의 자극 때문이라고 하였는데, 이는 Wiedmeier 등(1987)이 곰팡이 배양물 첨가시 proteolysis에 기인된 측쇄지방산(branched chain fatty acid)의 생성량이 증가한다고 한 결과에서 볼 수 있다.

Table 33. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on the ruminal NH<sub>3</sub>-N contents of dairy cows(mg/100ml)

Item	Treatment	After feeding (hr)			
		- 0.5	2	5	8
Before supplementatio n	Control	12.44±0.61	29.89±1.51	11.02±0.21	9.83±0.57
	A. C. <sup>1</sup>	12.15±0.37	31.13±1.27	12.35±0.11	9.23±0.67
	S. C. <sup>2</sup>	11.99±0.37	27.34±0.14	11.35±1.21	9.75±0.84
After supplementatio n	Control	12.74±0.53	25.76±0.86	17.20±0.69 <sup>b</sup>	9.47±0.30 <sup>a</sup>
	A. C.	11.75±0.53	25.61±0.51	13.31±0.42 <sup>a</sup>	7.84±0.50 <sup>b</sup>
	S. C.	11.41±0.77	24.58±0.56	14.94±0.55 <sup>a</sup>	8.48±0.42 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>2</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts differ significantly(p<.05)



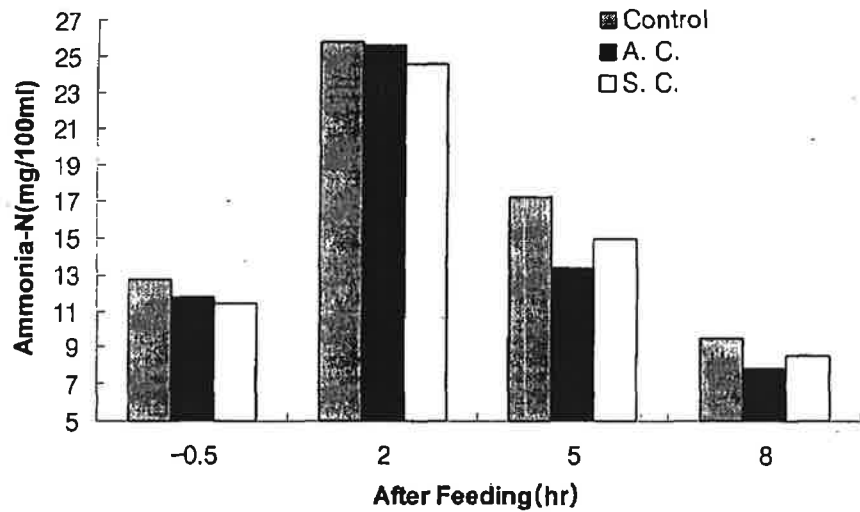


Figure 67. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on the ruminal  $\text{NH}_3\text{-N}$  contents of dairy cows(mg/100ml).

#### 라. 반추위내 휘발성지방산 함량

반추위내 휘발성지방산(VFA) 함량은 Table 34에서 보는 바와 같이 사료급여 30분전, 사료급여 2, 5 및 8시간째 대조구의 총 VFA 함량(mmoles/100ml)은 87.48, 77.57, 70.67 및 72.20으로 나타나 *Aspergillus* 배양물 급여구 98.35, 92.82, 80.68 및 73.98에 비하여 낮은 경향을 나타내었으나 *Saccharomyces* 배양물 급여구 89.77, 83.01, 70.33 및 72.26과 유사하게 나타났다. Propionic acid에 대한 acetic acid의 비율도 대조구가 3.42, 2.29, 2.09 및 2.56이고 *Aspergillus* 배양물 급여구가 3.16, 2.55, 2.46 및 2.46이었으며 *Saccharomyces* 배양물 급여구는 2.47, 1.88, 2.40 및 2.62로 처리간에 통계적 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Yoon과 Stern(1996)은 yeast와 fungal culture의 단독 급여보다 혼합급여시 반추위내 iso-acids 몰농도의 변화가 관찰되었으며, 혼합급여시 valerate의 농도가 낮아졌으며 또한 각각 단독으로 급여했을 때보다 혼합으로 급여했을 때 isovalerate와 isobutyrate의

몰농도가 낮아졌다고 보고하였다. Oellermann 등(1990)은 *Asp. oryzae* fermentation extract를 일일 1, 2, 4g 과 6g을 각각 급여시 처리구간에 total VFA와 acetate, propionate 등의 함량은 차이를 나타내지 않았으나, 4g과 6g 급여시 대조구와 비교해서 isovaleric acid 함량이 높게 나타났다고 보고하였다.

Carro 등(1992)은 *in vitro* 실험에서 건물 1g당 yeast culture 15mg 첨가시 조사료와 농후사료를 50 : 50으로 설정하였을 때 acetate의 농도는 감소한 반면 butyrate와 valerate의 농도는 증가하였다고 하였으며, 30 : 70으로 설정하였을 때에는 VFA의 생성량이 증가하였다고 보고하였다.

Plata 등(1994)은 수수짚의 첨가수준별에 따른 yeast culture 첨가가 총 VFA의 농도에는 영향을 주지 않았으나, 첨가수준이 높아질수록 acetate의 농도는 증가하는 반면 propionate의 농도를 감소하였다고 보고하였으며, Chiquette (1995)는 *Asp. oryzae* 단독 첨가나 *S. cerevisiae*와 혼합으로 첨가했을 때 사료급여 이전에 acetate( $P<0.01$ ), propionate ( $P=0.07$ )와 total VFA( $P<0.01$ )의 농도가 높았다고 보고하였다.

곰팡이나 효모배양물은 반추위내에서 VFA의 생성량을 증가시키지만(Martin과 Nisbet, 1989), 효모 배양물의 첨가는 acetate의 생성량이 감소하는 것보다 propionate의 생성량을 상대적으로 증가하므로 A/P 비율을 감소시키는 결과를 초래하나(Adams 등, 1988; Wiedmeier 등, 1987; Harrison 등, 1988; Newbold 등, 1990), 곰팡이 배양물 첨가는 butyrate 생성량의 증가와 propionate 생성량의 감소 때문에 오히려 A/P 비율이 증가하게 된다(Arambel 등, 1987; Wiedmeier 등, 1987; Gomez-Alarcon, 1990; Frumholtz 등, 1989; Fondevila 등, 1990)고 보고하였다.

Table 34. Effect of *Aspergillus* and *Saccharomyces* cultures supplementation on the ruminal total VFA production(mmoles/100ml) and VFA composition of dairy cows(%)

Treatment	Items	After feeding(hr)			
		- 0.5	2	5	8
Control	C <sub>2</sub>	48.52	42.40	36.27	38.72
	C <sub>3</sub>	14.20	18.53	17.32	15.15
	iso-C <sub>4</sub>	0.93	1.00	0.95	0.90
	C <sub>4</sub>	12.60	16.38	15.85	13.94
	iso-C <sub>5</sub>	0.54	1.07	0.83	0.94
	C <sub>5</sub>	0.81	1.24	1.02	0.82
	total	87.48	77.57	70.67	72.20
	A/P	3.42	2.29	2.09	2.56
A. C. <sup>1</sup>	C <sub>2</sub>	55.68	52.19	44.29	41.09
	C <sub>3</sub>	17.61	20.45	17.98	16.72
	iso-C <sub>4</sub>	0.91	0.94	0.94	1.00
	C <sub>4</sub>	15.25	1.63	14.72	13.29
	iso-C <sub>5</sub>	0.57	0.61	0.80	0.92
	C <sub>5</sub>	1.09	1.31	1.12	0.93
	total	98.35	92.82	80.68	73.98
	A/P	3.16	2.55	2.46	2.46
S. C. <sup>2</sup>	C <sub>2</sub>	37.09	50.50	47.94	48.60
	C <sub>3</sub>	15.03	26.80	20.00	18.57
	iso-C <sub>4</sub>	0.49	0.82	0.61	0.66
	C <sub>4</sub>	10.93	19.42	19.24	1.62
	iso-C <sub>5</sub>	0.31	0.88	0.54	0.77
	C <sub>5</sub>	0.81	1.65	1.07	0.93
	total	89.77	83.01	70.33	72.26
	A/P	2.47	1.88	2.40	2.62

<sup>1</sup> *Aspergillus oryzae* culture

<sup>2</sup> *Saccharomyces cerevisiae* culture

## 제 4 장 Chromosome homologous integration 방법 을 통하여 cellulase를 생산하는 새로운 생균 제의 개발

### 제 1 절 서 론

개발도상국으로서, 공업으로 산업을 주도하였던 우리 나라는 이제 우루과이 라운드라는 제 3세계를 포함하는 세계적인 협상이 타결됨에 따라 더 이상 시장 개방에 대한 국가적인 1차 산업 보호 정책을 지속할 수가 없는 실정이 되었다. 그러나 완충시기에 있는 이 시점에서 기술 개발은 앞으로의 산업에 새로운 계기를 마련할 것이다.

현재 시판되는 사료에 전적으로 의존하는 우리 나라의 가축은 소화불량 등의 문제가 연되고 있는 심각한 상태에 있다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 가장 좋은 방법은 섬유질이 많은 사료를 공급하는 것인데, 볏짚과 같이 풍부한 농업부산물을 갖고 있으면서도 이들의 소화흡수율과 기호도가 낮은 이유로 이용을 못하고 있는 실정이다. 본 연구과제는 이와같은 잉여 농업부산물을 고품질의 사료로 만들고, 소화불량의 원인을 근본적으로 치유하는, 즉 cellulolytic biomass를 왕성하게 분해하며 촉진시키는 미생물효소들을 대량생산하는 것이므로, 이 연구결과는 바로 실용화, 상품화 될 수 있다. 개발된 균주들은 유전공학기법으로 보다 강력한 균주로 만들 수 있도록 세부과제 연구자들과의 긴밀한 공동연구를 계획하고 있으므로 그 실현가능성이 높은 것으로 사료된다.

한편, 사료첨가제의 목적으로 이미 미국에서 상품화된 *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm)와 *Saccharomyces cerevisiae* culture는 사용된 균주의 특성상, 소의 소화불량의 주원인이 되는 cellulolytic biomass를 효과적으로 분해할 효소가 전혀 없거나, 극히 소량만이 존재하는 문제점이 있다. 또한, 이 균주들을 배양하는 배지등 여러 배양조건등 생산원가가 비싸 이 상품을 손쉽게 사용하지 못하고 있는 실정이다. 따라서, cellulolytic biomass를 분해할 수 있는 효소를 값싼 농산 부산

물들을 이용하여 대량생산 할 수 있는 균주들을 개발함으로써 생산단가를 낮추고, 이들의 extract와 정제된 효소들을 사료에 첨가한다면 기존의 상품보다 월등한 효과가 기대된다.

또한, 이 연구가 성공하면 미국 등 세계 여러나라의 소에서 나타나는 소화불량을 치료하기 위하여 이용될 수 있으며, 그밖에 섬유산업, 제제산업, 목재가공산업 등 잠재적인 산업적 이용성은 지대하다. 이 연구를 통하여 개발될 사료의 세계적 시장성은 실로 대단하다. 일례로 미국에만 현재 대략 1억 2천만 마리의 소가 있으며, 그들이 먹는 사료중 조사료(forage)의 1년 소비량이 4억 4천여만 톤, 값으로 262억 달러에 이른다. 이와같이 비단 우리 나라의 수요를 충족할 뿐 만 아니라, 전 세계를 상대로 하여 우리의 개발된 제품을 판매한다고 할 때, 본 연구의 전망은 대단히 밝다고 하겠다.

본 연구에서는 2년차에 구축한 vector들을 가지고 여러차례 유산균에 형질전환을 실시하여 우선 T7 RNA polymerase 유전자가 유산균의 chromosome에 integration됨을 확인하고 이렇게 integration된 유산균에서 T7 RNA polymerase가 발현하면 이것을 cellulase gene을 함유하는 T7 RNA polymerase promoter를 장착한 vector가 인식하여 섬유소 분해 미생물로부터 유래한 섬유소 분해 유전자를 발현 할 수 있는 vector를 형질전환 시켜 최종 목표로 하는 cellulase를 발현하는 형질전환된 유산균주의 개발에 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 이미 제 1년차에서는 섬유소 분해 유전자 확보와 이들 유전자의 산업적 이용성 조사, 유전자들로부터 생산된 섬유소 분해 효소의 특성 조사와 더불어 이들 유전자를 발현시키는데 필요한 적합한 vector 확보 관계와 유산균에 대한 조사 문제가 수행되어졌다.

2년차에서는 1년차의 연구결과를 바탕으로 *Lactobacillus acidophilus*의 배양 특성을 조사하였으며, *Lactobacillus acidophilus* 균주의 담즙산에 대한 내성 조사와 항생제 감수성 조사가 이루어졌고, cellulase gene을 함유하는 유산균 shuttle vector를 만들어 host인 *E. coli* 수준에서 construction을 확인하였다.

3년차에서는 구축된 vector system을 이용하여 electro-transformation방법을 이용하여 T7 RNA polymerase가 integration된 유산균주에 cellulase가 발현할 수 있는 T7 promoter를 장착한 vector를 형질전환시켜 발현양상을 보는 것으로 여러차례 형

질전환을 실시하였지만 생각했던 것 보다 형질전환효율이나 발현 양상이 극히 미비하여 이 과제에서 제일 중요하다고 생각되는 vector construction을 다시 계획하여 실험에 착수하게 되었고 새롭게 구축한 vector system을 이용하여 형질전환시켜 cellulase 유전자가 발현됨을 확인하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 섬유소를 분해 이용하는 미생물로부터 cellulase 유전자의 bank화

섬유소를 분해 이용하는 미생물로 알려진 반추미생물과 토양미생물로부터 섬유소 분해 능력이 강력한 cellulase 유전자를 확보하여 그들이 생산하는 효소에 관한 기질특이성 및 온도 pH에 대한 안정성을 조사하여 자료화하고 cell line 별로 bank화 하였다.

### 2. Broad-host range vector의 수집과 chromosome integration vector의 선별

문헌검색을 통하여 산업적으로 유용한 미생물인 Lactic acid bacteria와 *Bacillus sp.* 뿐만 아니라 Gram positive bacteria에서 복제가 가능한 broad-host range vector에 대한 자료를 수집하고 비교적 host 에서 높은 copy number를 지니며 적절한 selection marker를 갖고 transformation 효율이 높은 최적의 shuttle vector를 선별하였다.

### 3. Proteinase-resistant한 cellulase 규명

Cellulase의 proteinase에 대한 안정성을 조사하기 위해서 Hall 등 (1993)이 제시한 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. Bank화된 cellulase 유전자를 *E. coli* cloning vector인 pUC19에 삽입하여 형질전환시킨 다음 얻어진 재조합 *E. coli* clone으로부터 조효소액 (crude enzyme solution)을 추출하였

다. 추출한 조효소액을 37℃에서 50mM sodium acetate buffer (pH 7.0)속에서 10:1(W/W)의 비율로 proteinase와 혼합하여 배양시키고 일정한 시간 간격을 두어 혼합배양액을 옮겨 100배로 희석한 다음 0.1 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride로 처리하고 기질에 대한 residual cellulase activity를 측정하여 cellulase의 proteinase에 대한 안정성을 규명하였다.

#### 4. 장관내에 우점하는 Lactic acid bacteria의 확보

단위동물 (돼지, 닭)의 장관으로부터 분리된 *Lactobacillus acidophilus* 균주 KCTC 3146, 3149, 3150, 3152 (swine intestine), 3153, 3154, 3155 (chick intestine) *L. bulgaricus* 3188을 한국과학 기술연구원 유전공학 센터 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures)으로 부터 분양받아 본 실험의 균주로 이용하였다.

#### 5. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*의 배양

*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*의 배양배지는 MRS broth (DIFCO Laboratories)를 이용하고 37℃에서 진탕 배양하며 cellulase screening 배지로는 0.5% (W/V) carboxymethylcellulose (CMC), 1.5%(W/V) agar를 함유한 MRSC plate를 이용하여 37℃에서 배양하였다. Electroporation을 하기 위해서는 *Lactobacillus acidophilus*를 mid-exponential growth phase (6시간 OD<sub>600</sub>=1.0)까지 배양하고 plasmid DNA의 분리를 위해서는 MRS broth에 20mM DL-threonine을 첨가하였다. 또한 형질전환된 *Lactobacillus acidophilus*의 selection에 tetracycline (5 µg/ml), kanamycin(1mg/ml) 항생제를 이용하였다.

#### 6. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* 의 담즙산에 대한 내성 조사

*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*를 생균제제로 사용할 경우 가축의 장관에 정착 서식 하기 위해서 필요한 성질인 담즙산에 대한 내성을 검사하기

위하여 oxgall을 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 % 첨가한 MRS broth에 *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*를 접종하고 37°C에서 24시간 배양후 생균수를 측정하였다 (Kim, 1990).

#### 7. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*의 항생제 감수성 조사

*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*를 생균제로 이용할 경우 장내에서 생존하기 위해서 갖추어야 할 조건중의 하나인 각종 항생제에 대한 저항성을 알기 위하여 5종의 항생제 (penicillin, kanamycin, erythromycin, streptomycin, chloroamphenicol)에 대한 감수성을 Bauer와 Kirby의 disc diffusion 방법(1991)에 준하여 다음과 같이 시험하였다. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* 균주를 MRS broth에 37°C에서 12시간 배양하고 Tryptic soy 평판배지에 유리봉으로 고르게 도말한 뒤 실온에서 2시간동안 건조시킨 다음 Dispense-O-disc dispenser (DIFCO)로 항생제 disc를 agar 표면에 이식하고 37°C에서 24시간 배양 후 각 항생제에 disc 억제환 (growth inhibition zone)직경을 측정하여 저항성을 판별하였다.

#### 8. Strong promoter와 signal sequence를 함유하는 유산균 shuttle vector의 construction

본 연구에서는 *Lactobacillus plantarum*과 *Enterococcus faecalis*에서 유래한 promoter와 secretion signal sequence를 이용한 vector system의 구축과 아울러 cellulase 발현율을 증가시키기 위한 T7 RNA polymerase/T7 promoter system을 이용한 vector system을 구축하였다(Figure 68). 후자의 vector system을 이용하는 목적은 유산균에서 cellulase의 발현율을 증가시키기 위한 것으로 T7 bacteriophage에서 유래한 T7 RNA polymerase는 매우 독특하게 T7 promoter만 인식하고 *E. coli*나 유산균 RNA polymerase에 의해서는 인식되지 않는다. 따라서 우리가 원하는 유전자를 매우 효율적으로 발현시키기 위하여 T7 RNA polymerase를 유산균의 chromosomal DNA에 homologous integration 시키고, T7 promoter에 의한 cellulase 발현 vector를 만들어 RNA transcripts를 증가시키게 됨으로 cellulase의 발현을 증가시킬 수 있도록 하였다.



## 9. Homologous vector-free stable chromosomal integration을 위한 electrophoration 방법 개발

### 가. 재조합 plasmid DNA의 *E. coli* MC1061로의 형질전환

CaCl<sub>2</sub> 를 이용한 competent *E. coli*를 만드는 방법(Cohen 등, 1972)은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 먼저 12시간 정도 배양한 *E. coli* 배양액 1ml를 LB broth 100ml에 접종하여 37°C에서 진탕배양하여 OD<sub>600</sub> 값이 0.4에 도달할 때까지 배양하였다. 그런다음 얼음에서 10분간 방치후 세포를 4°C 5500rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하고 60ml의 0.1M CaCl<sub>2</sub>로 세척하였다. 얼음에서 20분간 방치후 다시 원심분리하여 세포를 회수하고 1ml의 0.1M CaCl<sub>2</sub> 용액에 resuspension 시킨 뒤 그 중 0.1ml을 취하여 형질전환시키려는 재조합 plasmid DNA와 섞고 60분간 방치 후 42°C에서 90초간 열충격을 준 뒤 여기에 900 μl의 새로운 LB broth를 첨가하고 37°C에서 90분간 전배양 한 뒤 적절한 항생제가 포함된 LB 평판배지에 도말하고 12-16시간 배양하면서 생성된 colony를 확인하였다.

### 나. 재조합 plasmid DNA의 *Lactobacilli* sp.로의 형질전환

*Lactobacilli* sp.에 재조합 plasmid DNA를 형질전환시키기 위해 Bates 등(1989)이 제시한 electroporation 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. *Lactobacilli* sp. 균주를 MRS broth 50ml에서 대수증기 (6시간 OD<sub>600</sub>=1.0)까지 배양한 다음 10,000 ×g에서 원심분리하여 세포를 회수하고 여기에 1×PEB buffer(1mM MgCl<sub>2</sub> 7mM potassium phosphate, 272 sucrose, pH 7.4)로 2번 세척한 다음 2.5×PEB buffer 2.5ml에 suspension 시켰다. 형질전환시킬 plasmid DNA(1 μg)를 얼음상태에서 방치한 0.8ml의 세포현탁액에 첨가하고 섞어주었다. 그런다음 0.2cm electroporator cuvette에 이들을 넣고 electroporator(Bio-Rad Laboratories)로 electric field strength(6.25kv/cm), capacitance(25 μF), time constant (3.5-4.0ms)에서 실시하였다. Electroporation된 세포는 즉시 MRS broth 에서 10배 희석시키고 37°C에서 3시간 전배양시키며 적정량의 항생제가 첨가된 MRSC 평판배지에 도말한 뒤 37°C에서 48시간

배양한 후 형성된 colony들을 관찰하였다.

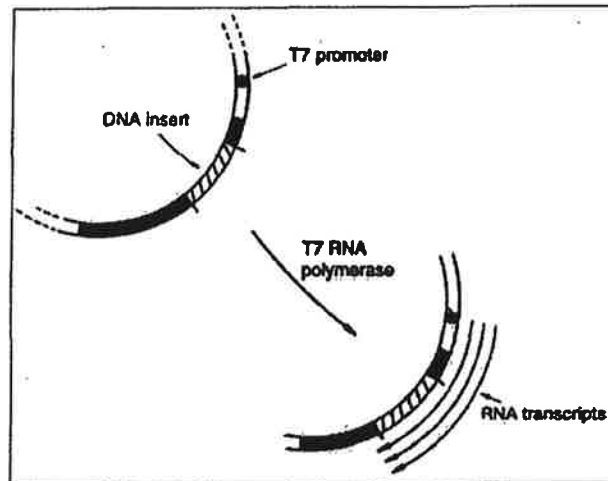


Figure 68. 발현율을 증가시키기 위한 T7 RNA polymerase/T7 promoter system.

#### 10. S-layer protein signal sequence를 장착한 vector construction

현재까지 외래 단백질을 생산하는 유산균을 개발하기 위해 전 세계의 연구자들이 많은 노력을 기울여 왔음에도 불구하고 아직까지 이렇다할 발현 vector system은 많이 보고된 것이 없는 실정이다. 최근에 gram positive bacteria의 cell wall의 구성물질인 S-layer protein의 연구가 진행되면서 이 protein 유전자의 signal sequence를 이용하여 외래단백질을 발현시키는 연구가 활발하게 진행중에 있다. 따라서 본 연구에서는 그동안 구축되어온 vector system을 약간 변경하여 이 signal sequence를 이용하여 cellulase를 발현시키기 위해 아래 그림과 같은 vector system을 계획하고 구축하는데 성공하였다.

### 가. S-layer protein signal sequence의 cloning

S-layer protein signal sequence를 gene bank에 등록되어있는 *Lactobacillus brevis* 균주의 S-layer protein signal sequence를 바탕으로 3가지 부위를 cloning하기 위해 아래와 같이 primer를 제작하고 PCR amplification 방법으로 이 signal sequence들을 증폭하였다(Figure 74).

#### Primer (3가지)

PS1-2 : N - TTGAATTCACCCAGCCAGCCAGTACCAGAAGC  
C - TAAATCTAGACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA  
PS1-3 : N - TTGGATCCTAACTTCGGTTATACTATTCTTG  
C - TAAATCTAGACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA  
PS1-4 : N - TTGGTCCTAACTTCGGTTATACTATTCTTG  
C - TAAATCTAGACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA

\* C - terminal은 같은 것임

ps 1-2 : *Lactobacillus brevis*에는 두 가지 promoter region이 있는 것으로 알려져 있는데 이 두가지 promoter region을 다 포함한 640bp의 fragment를 증폭하기 위해 제작한 primer

ps 1-3 : 두 개의 promoter region중 한 개 만 포함한 280bp의 fragment를 증폭하기 위해 제작한 primer

ps 1-4 : ps1-3에서 약간 변형시킨 160bp의 fragment를 증폭하기 위해 제작한 primer

증폭된 fragments를 cloning vector인 pGEM-T vector에 TA ligation을 실시하여 cloning에 성공하였다.

### 나. 유산균용 vector의 구축

유산균용 vector의 구축은 그동안 2년차와 3년차에 걸쳐서 실험한 결과들을 바탕으로 pNZ3004를 기본 vector로 하여 구축을 시도하였다.

pNZ3004는 vector자체에 lac promoter를 가지고 있으므로 이를 제거해 주는 작업과 이곳에 각각 cloning된 gene fragment를 삽입시켜주기 위해 site를 부여해 주는 작업으로 진행되었다.

우선 pNZ3004에서 lac promoter를 제거시켜주는 작업은 Hind III와 EcoR I의 제한효소로 처리하여 제거 시켰고 site를 부여 시켜주기 위해 pUC19 vector의 Hind III와 EcoR I site로 처리해서 얻은 fragment를 ligation시켰다. 그래서 3.8kb의 유산균용 vector를 구축하였고 이 vector에 S-layer protein signal sequence와 cellulase gene을 삽입시키기위해 준비하였다.

#### 다. Signal sequence와 cellulase gene의 ligation

Cloning된 signal sequence와 cellulase gene의 ligation은 PCR방법으로 수행되었다. Signal sequence는 양 말단에 EcoR I or Bam H I과 Xba I의 단편으로 준비되었고 cellulase gene은 Xba I과 Xho I으로 각각 준비되었다. 각각의 fragments들을 PCR reaction mixture에 섞은 후 각각의 말단에 있는 primer로 합성시키면 signal sequence의 Xba I과 cellulase gene의 Xba I 서로간에 ligation이 일어나고 합성이되면 signal sequence와 cellulase gene이 서로 결합하여 새로운 fragment가 나오게되는 원리를 이용하였다. 이렇게 각각 증폭된 fragments를 전기영동으로 확인한 후 gel elution하여 pET vector에 cloning 하였다.

#### 라. Cellulase 발현 vector 구축

② 항에서 준비된 3.8kb의 유산균용 vector를 EcoR I과 Sal I으로 digestion하여 전기영동으로 확인한 후 gel elution하고 ③ 항에서 준비된 signal sequence와 cellulase gene이 결합되어있는 fragment를 같은 site인 EcoR I과 Sal I으로 digestion하여 fragment를 얻은 후 위의 vector와 ligation을 실시하였다.

### 11. E. coli와 유산균에 형질전환

구축된 vector를 우선 E. coli에 형질전환을 실시하여 발현양상을 확인하고

plasmid를 대량으로 추출하기위해 실시하였다. 형질전환 방법은 위에서 기술한 것파 크게 다른점이 없이 electro-transformaion 방법을 이용하였다. 우선 E. coli host로는 MC1061과 JM101을 선정하였다. 이 각각의 E. coli균주를 competent cell을 제조하고 0.2 cm electroporator cuvette에 cell을 넣고 ligation mixture를 2 $\mu$ l를 넣고 잘 섞어 준 후 electroporator(Bio-Rad Laboratories)로 electric field strength(6.25kv/cm), capacitance(25  $\mu$ F), time constant (3.5-4.0ms)에서 실시하였다. Electroporation된 세포는 즉시 LB broth에서 10배 희석시키고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양 후 Erythromycin 항생제가 들어있는 LB plate에 도말하여 24시간 배양 후 colony들의 plasmid를 조사하여 형질전환된 colony를 선별하였다. 이렇게 하여 형질전환된 colony를 다시 항생제가 있는 LB broth에 배양 후 plasmid를 추출하였다. Plasmid를 200ng/ $\mu$ l 이상 농축시키고 위에서 소개된 방법으로 유산균에 형질전환을 실시하였다.

## 12. Cellulase 유전자의 발현양상 확인

E. coli에서 cellulase 유전자가 발현하는지 알아보기위해 LB agar plate에 CMC (0.2%)를 첨가하여 키운 후 Congo-red 방법을 이용하여 CMCase activity를 측정하였다. CMCase activity는 형질전환이 되었다고 생각되는 균주를 CMC가 들어있는 LB agar plate에 키운 후 congo-red를 plate에 붙고 20분에서 30분간 반응시킨 후 1M NaCl 용액으로 15분간 destaining 시킨다음 clear zone을 확인하였다

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 활성도가 높은 cellulase 유전자 확보

· 섬유소 분해 미생물로 알려진 *Clostridium thermocellum*, *Clostridium josui*, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* 균주와 우리나라 재래산양의 반추위로부터 분리한 내산성 반추미생물인 *Actinomyce* KNG 40 균주로부터 cloning된 cellulase 유전자들을 각각 확보하였으며, 본 연구실에서는 다년간의 연구를 통한 결과로서 본 연구실에서 분리한 *Actinomyce* KNG 40 균주로부터 cloning한 endoglucanase

gene, 반추미생물인 *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus*로부터 cloning한 CMC-xylanase gene과  $\beta$ -glucosidase gene에 대한 유전적인 특성을 규명하였다.

## 2. Broad- host range vector의 수집과 shuttle vector의 선별

Gram 음성세균은 물론 Gram 양성 세균 내에서도 효과적으로 복제 발현이 가능한 vector에 관한 정보를 문헌조사를 통해 수집하였으며, 특히 *E. coli*-Lactic acid bacteria shuttle vector를 선별, 확보하기 위해 Netherlands for Dairy research(NIZO)의 De Vos 박사로부터 pNZ123과 pNZ3004를 분양 받았으며, 특히 벨기에의 Pascal Hols로부터 pGIP741과 pGIP008을 분양받아 총 4개의 유전자중 pNZ123과 pGIP741, pGIP008을 본 연구의 expression vector로 사용하였다. pNZ123의 특징을 살펴보면 우선 크기가 2.8 kb이고 chloramphenicol에 대한 항생제 marker를 지니고 있으며, *E. coli*, Lactic acid bacteria 뿐만 아니라 *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*와 같은 균주에서도 복제가 가능하며 숙주내 높은 복제수를 유지하고 multicloning site를 가지고 있어 본 연구의 목적에 부합한 것으로 판단되었다.

## 3. Proteinase-resistant한 cellulase 선별

단위동물의 장관내에서 효과적으로 cellulosic biomass를 분해할 수 있으면서 단위동물의 소장내에서 분비되는 pancreatin, trypsin, elastase에 대해 효소적 안정성을 갖는 cellulase들을 선별하기 위해 4종의 cellulase 들을 가지고 실험한 결과 *Clostridium thermocellum*에서 유래한 endoglucanase A가 모든 소장내 단백질 분해효소에 대하여 적어도 1시간의 반감기를 유지하여 안정성이 높은 것으로 나타났다. 그러나 본 연구실에서 cloning한 *Actinomyce* KNG 40 균주로부터 cloning된 endoglucanase도 소장내 대표적인 소화효소에 대하여 상당한 저항성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

## 4. *Lactobacillus* sp.의 생리적 특성조사

단위동물의 장관으로부터 분리된 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3146, 3150, 3152 (swine intestine), KCTC 3155, ATCC (American Type Culture collection) 33199

(chick intestine) 균주와 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188 균주를 한국과학기술원 유전공학 센터와 미국 ATCC로 부터 분양받아 본 연구의 균주로 사용하였으며, 생균제로서 가져야 할 생리적 특성인 내산성, 내담즙성 항생제 내성에 대한 조사를 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

#### 가. 내산성 조사

유산균이 장내에 정착하여 생존하기 위한 중요성질인 내산성을 조사하기 위해 유산균 배양배지로 알려진 MRS broth내에 pH를 각각 4와 3으로 조정하여 48시간 배양하면서 균주의 성장정도를 육안으로 판별한 결과 균주마다 독특한 특성을 나타내었는데 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3146, 3152, 3155와 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188의 경우 pH 4에서도 생장에 억제를 받지 않았으며 특히 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3152와 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188 두 균주에 있어서는 pH 3에서도 미약하나마 성장을 보여 내산성이 우수한 균주로 확인되었다.

#### 나. 내담즙성 조사

유산균이 장내에 정착하여 생존하기 위한 중요성질인 내담즙성을 조사하기 위해 유산균 배양배지로 알려진 MRS broth내에 oxgall 농도를 각각 0.3, 2, 3, 5%로 유지하여 48시간 배양하면서 균주의 성장정도를 판별한 결과 Table 3-5에서 제시한 바와 같이 전체적으로 모든 균주가 oxgall 0.3% 수준에서도 생장이 억제되지 않았으며 이는 균주가 바로 동물의 장관내에서 분리한 것이기 때문인 것으로 판단되었다. 특히 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3150 균주에 있어서는 최고 oxgall 5%의 농도에도 생장이 억제되지 않은 것으로 보아 내담즙성이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다.

#### 다. 항생제 감수성 조사

유산균의 항생제 내성을 조사하기 위해 11종의 항생제에 대해서 Kirby-Bauer 방법(Koneman, 1979)을 변형하여 실시한 결과 균주마다 독특한 항생제 감수성을 나타내어 어떤 일정한 경향을 볼 수는 없었으나 전체적으로 모든 균주에 대해서 Kanamycin, Streptomycin에 대한 저항성이 우수하였으며, *Lactobacillus*

*acidophilus* KCTC 3152와 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188에 있어서는 다른 균주에 비해 ampicillin, kanamycin, streptomycin, neomycin, gentamycin에 대한 저항성이 우수한 것으로 나타났다.

## 5. 본 연구에서 cloning한 cellulase 유전자 분석에 대한 결과

본 연구를 위하여 *Ruminococcus albus* 7으로부터 cloning한  $\beta$ -glucosidase gene과 *Fibrobactor succinogenes* s85로부터 cloning한 CMC-xylanase gene, *Actinomyces* sp 40으로부터 cloning한 endoglucanase를 포함한 총 3개의 cellulase 유전자에 대한 sequencing 실험을 완료하여 유전자 분석을 마친 결과는 Figure 68, 69 및 70에서 보는 바와 같다. 그림에서 보는바와 같이 유전자의 염기서열 순서, 유전자 특성과 유전자의 조절 부위, 아미노산 서열 규명이 완료되었다. 현재 이들 유전자들을 Genbank에 등록하여 Accessen Number를 받았다.

### 가. *Fibrobactor succinogenes* s85로부터 cloning한 CMC-Xylanase gene sequencing 결과

(Genbank Accessen Number U94826)

- A. Sequencing 한 전체 insert의 길이 : 2043 bp
- B. Protein coding region : 81-2039(1958 bp)
- C. Molecular weight(MW) : 68756(654 amino acid)

### 나. *Actinomyces* sp. 40으로부터 cloning한 endoglucanase gene sequencing 결과

(Genbank Accessen Number U94825)

- A. Sequencing 한 전체 insert의 길이 : 2641 bp
- B. Protein coding region : 186-2249(2063bp)
- C. Molecular weight(MW) : 71846(688 amino acid)



다. *Ruminococcus albus* 7으로부터 cloning한  $\beta$ -glucosidase gene sequencing 결과

(Genbank Accessen Number U92808)

A. Sequencing 한 전체 insert의 길이 : 3225 bp

B. Protein coding region : 430-2712(2282bp)

C. Molecular weight(MW) : 84609(760 amino acid)

6. Strong promoter와 signal sequence를 함유하는 유산균 shuttle vector의 construction

가. T7 RNA polymerase/T7 promoter를 이용한 발현 system구축

a. T7 RNA polymerase를 발현하는 유산균 개발

b. T7 promoter에 의해 cellulase 발현이 유도되는 vector 구축

나. 수행방법

T7 RNA polymerase/T7 promoter를 이용한 발현 system구축

T7 bacteriophage에서 유래된 T7 RNA polymerase는 매우 독특하여 T7 promoter만 인식하고 매우 효율적으로 mRNA를 만들어 낸다. 따라서 발현시키고자 하는 외래유전자를 T7 promoter 뒤에 구축한 vector를 만들고 이를 T7 RNA polymerase를 미량으로 발현하는 균주에 형질전환시키면 이 polymerase가 T7 promoter를 인식해 전사를 시작하게 되는데, 그 효율이 매우 높아 전체 mRNA의 10~50%를 차지하게 된다는 원리를 이용하였다.

1) T7 RNA polymerase를 발현하는 유산균 개발

2.7kb T7 RNA polymerase gene을 *E. coli* BL21(DE3) genomic DNA로부터 PCR 증폭하여 pGEM-T vector에 TA cloning하고 T7 RNA polymerase gene

바로 앞에 pNZ3004 vector의 유산균 lac promoter를 PCR 증폭하여 접합시켜 lac promoter에 의해 T7 RNA polymerase가 유산균에서 발현되도록 하였다. 또한 *Lactobacillus*에 integration을 유도하기 위하여 *Lactobacillus plantarum*의 genomic DNA에서 homologous integration에 이용되는 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 후 위에서 구축한 Lac promoter/T7 RNA polymerase를 이곳 증폭된 genomic DNA 상에 insertion 시켰다.

이렇게 구축된 위의 vector(pGIP-LT7)를 유산균의 genomic DNA에 안정적으로 형질전환시켜 homologous integration된 균주를 최종 선발한 후 T7 RNA polymerase gene의 발현을 확인하기 위하여 현재 electrophoration을 이용한 형질전환 과정을 수행중에 있다(*Lactobacillus plantarum*/T7 RNA polymerase, Figure 69 및 70).

## 2) T7 promoter에 의해 cellulase 효소 발현이 유도되는 vector (pNZT-cellulase) 구축

자체의 분비 signal을 포함한 cellulase gene을 PCR 증폭하여 cellulase gene 발현이 T7 promoter에 의해 유도되도록 T7 cassette를 만든 후 이렇게 만들어진 T7 promoter/cellulase 카셋트를 잘라내어 pNZT-cellulase vector를 구축하였다 (Figure 71 및 72).

## 3) 1항에서 개발된 T7 RNA polymerase가 homologous integration된 유산균에 2항의 vector 형질전환

*Lactobacillus plantarum*/T7 RNA polymerase 균주에 pNZT-cellulase를 형질전환시켜 *L. plantarum*-T7 RNA polymerase-cellulase system을 완결하는 형질전환을 실시하였다.

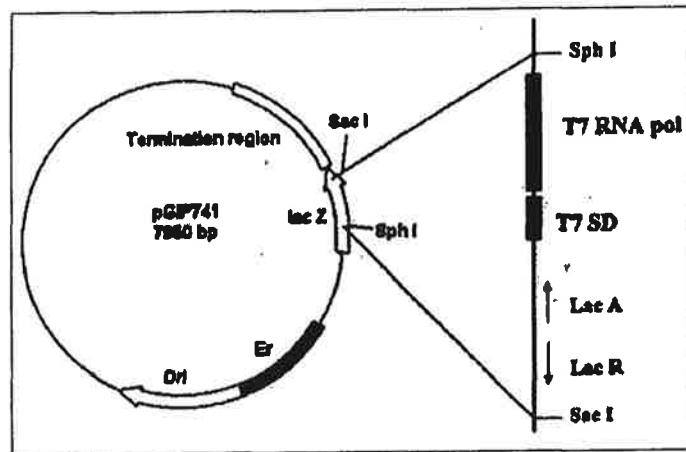


Figure 69. pGIP741 vector와 T7 RNA polymerase gene을 재조합 시키기 위한 homologous integration vector

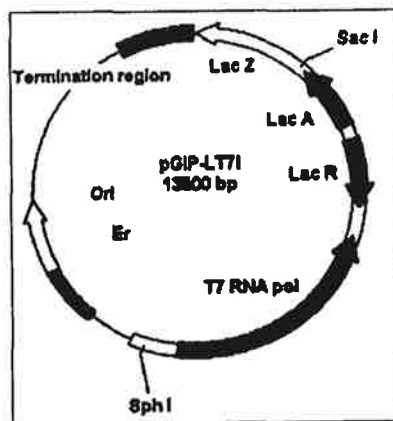


Figure 70. 구축이 완결된 T7 RNA polymerase gene을 chromosomal homologous integration 시키기 위한 pGIP-LT71 vector

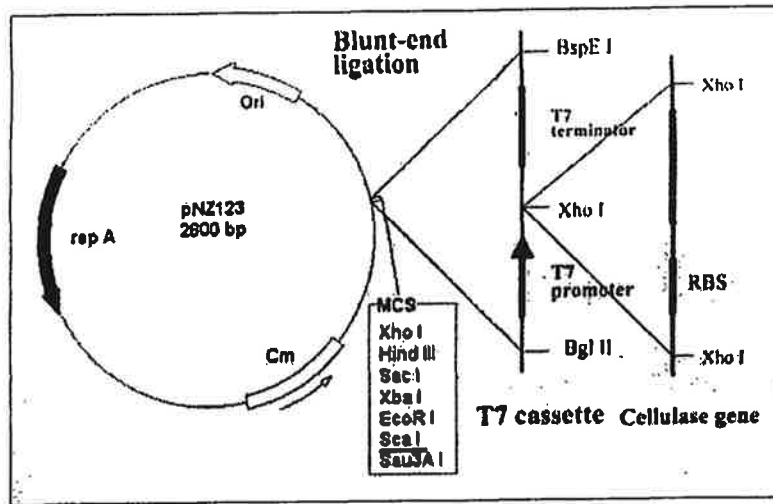


Figure 71. pNZ123 유산균 vector에 T7 promoter와 cellulase gene을 재조합 시키기 위한 expression vector

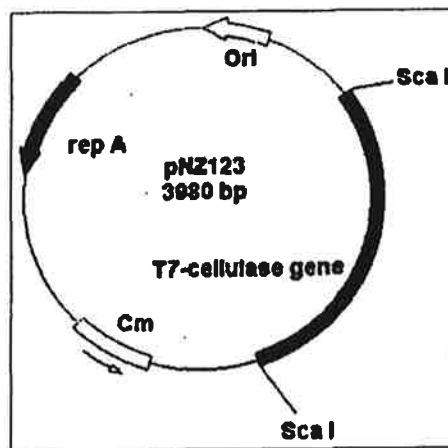
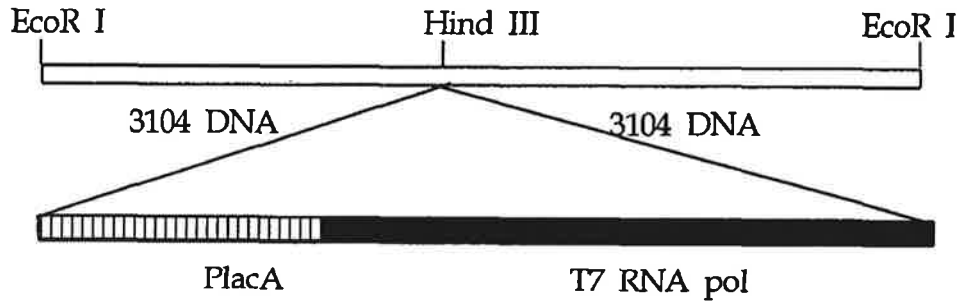


Figure 72. 구축이 완결된 T7 promoter-cellulase gene 발현을 위한 유산균 expression vector

① pT7I



② pT7I-2



③ pT7I-3



④ Cellulase 발현 vector (pPP-cellulase)



<용어설명>

- PCR 10/20 : *L. plantarum*의 genomic DNA로부터 유래한 DNA 단편으로 위 유산균에 homologous recombination에 의한 integration에 필요
- PlacA : 유산균용 lacA promoter
- T7 RNA pol : T7 RNA polymerase gene
- Cm<sup>R</sup> : 항생제 chloramphenicol 저항성 유전자
- Origin : pGIP741에서 온 유산균용 replication origin
- 3104 : *L. plantarum* 3104의 genomic DNA 단편으로 균에 integration 시 이용됨.
- RBS와 SS : *L. plantarum*에서 유래한 ribosome binding site와 signal sequence

Figure 73. 유산균용 T7 RNA pol을 함유한 integration용 vector와 cellulase 발현 vector

7. *E. coli*와 *Lactobacillus* sp. 균주로 homologous vector-free stable chromosomal integration을 위한 electrophoration 방법 개발

구축된 재조합 plasmid를 각각 *E. coli* MC1061과 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188, *Lactobacillus plantarum* KCTC 1048 균주에 형질전환하였다. *E. coli*는 전통적으로  $\text{CaCl}_2$  방법을 사용하였고 *Lactobacillus* sp.는 electroporation 방법을 사용하였으며, 이때 조건은 6250 V/cm에서 25  $\mu\text{F}$ 로 single electronic pulse를 주었다. 그 결과 table 1에서 보는 바와 같이 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188, *Lactobacillus plantarum* KCTC 1048 균주의 electroporation 효율을 조사한 결과 plasmid 1  $\mu\text{g}$  당 각각  $6.4 \times 10^1$ ,  $2.4 \times 10^2$  으로 형질전환 효율이 비교적 낮은 것으로 나타났으며, 균주 간의 비교에 있어서는 *Lactobacillus plantarum* KCTC 1048 균주가  $8.0 \times 10^2$ 으로 형질전환 효율이 높게 나타났으며, *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188 균주가  $1.2 \times 10^2$ 으로 낮게 나타났다.

Table 35. Transformation efficiency of plasmids transformed into *Lactobacillus* sp. by electroporation

Strains or plasmids	Efficiency(CFU/ $\mu\text{g}$ )
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> KCTC 3188 (pNZ123)	$1.2 \times 10^2$
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> KCTC 3188 (PNZ3004)	$6.4 \times 10^1$
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 1048 (pNZ123)	$8.0 \times 10^2$
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 1048 (pNZ3004)	$2.4 \times 10^2$

8. 새로운 cellulase 발현을 위한 vector 구축 결과 :  
 가. 3가지 promoter region의 cloning 결과



M : 1kb marker  
 1 : 1-2 signal seq. promoter  
 2 : 1-3`signal seq. promoter  
 3 : 1-4 signal seq. promoter

그림 74. S-layer protein signal sequence와 promoter

ps1-2 : 640bp  
 ps1-3 : 280bp  
 ps1-4 : 160bp

나. 최종 cellulase 발현 유산균용 vector의 구축

- 1단계 : pNZ3004(Hind III/EcoR I digestion)과 pUC19(Hind III/EcoR I digestion) ligation  
 2단계 : Signal sequence와 cellulase의 PCR amplification 후 fragment를 얻음  
 3단계 : 1단계의 vector를 EcoR I과 Sal I으로 digestion 후 2단계의 fragment도 EcoR I과 Sal I으로 digestion 시킨 후 ligation하여 아래와 같은 vector가 구축되었다.

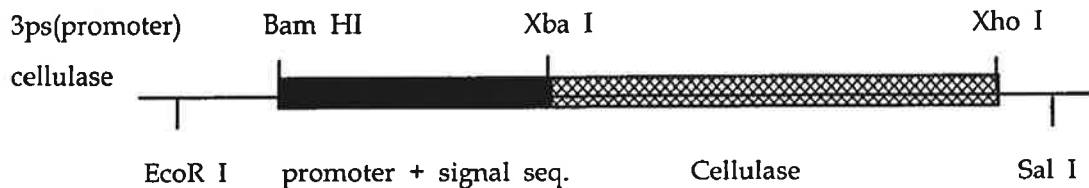


Figure 75. 새롭게 구축된 3ps(promoter+signal sequence)+cellulase 가 구축된 vector

9. Congo red test에 의한 cellulase 발현양상 조사  
가. *E. coli* JM 101에서 activity확인(그림 76)



Figure 76. *E. coli* JM101에 형질전환되어 CMCase activity를 보이는 균주

나. *Lactobacillus reuteri*에서 activity확인 (그림 77)

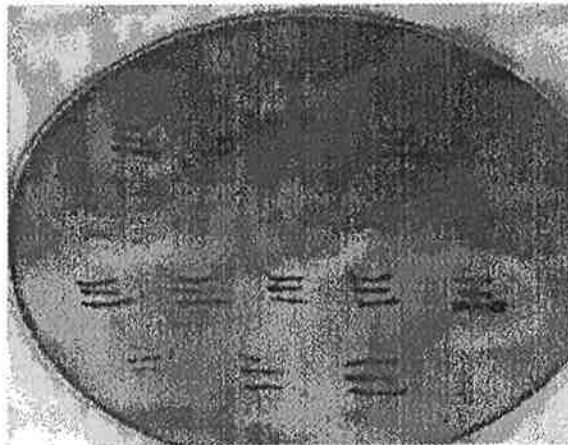


Figure 77. *Lactobacillus reuteri*에 형질전환되어 CMCase activity를 보이는 균주



## 참 고 문 헌

1. Abdo, K. M., K. W. King and R. W. Engel. 1964. Protein quality of rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 23:734-736.
2. Adams, P. C., M. L. Galyean, H. E. Kiesling, J. D. Wallace and M. D. Finkener. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation performance of growing steer and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53:780
3. Agarwal, D. N., K. Singh, P. S. King and W. H. Peterson. 1947. Yields and Vitamin content of food yeasts grown on different kinds of molasses. *Arch. Biochem.* 14:105-115.
4. Agrawala, I. P., C. F. Huffman, R. W. Luecke and C. W. Duncan. 1953. A quantitative study of rumen synthesis in the bovine on natural and purified rations. III. Riboflavin, Pantothenic acid and niacin. *J. Nutr.* 49:631.
5. Allison, M. J., R. W. Dougherty and J. A. Bucklim. 1964. Intraruminal inoculation and adaptation to grain. *J. Anim. Sci.* 23:1205(Abstr.)
6. Andersen, E. 1956. Volatile acids in molasses. *International sugar J.* 58: 133-135.
7. Antongiovanni, M., A. Giorgetti and B. M. Poli. 1973. Valore nutritivo del contenuto ruminale disidratato. *Aliment. Anim.* 17:47-54.
8. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*(14th Ed.). Assoc. Office. Anal. Chem. Washington, D. C.
9. Arambel, M. J. and B. A. Kent. 1988. Effect of yeast culture on milk production response and apparent nutrient digestibility in early lactating cows. *J. Dairy Sci.* 71(Suppl. 1):220.(Abstr.).
10. Arambel, M. J., C. F. Bagley and J. L. Walters. 1987. Effect of iso-acids ruminal fermentation characteristics and apparent nutrient digestibility. *Proc. Western Section Am. Soc. Anim. Sci.* 38:201-202.
11. Asanuma, N. and T. Hono. 1997, Tolerance to low pH and lactate production

- in rumen bacteria. Anim. Sci. Technol. (Jan) 68:367-376.
12. Aslan, V., S. M. Thamabors, R. J. Jorgenson and A. Bass. 1995. Induced acute ruminal acidosis in goats treated with yeast (*Sacharomtces cerevisiae*) and bicarbonate. Acta. Vet. Scand. 36:65-77.
  13. Baker, B. P. 1976. Composition, properties and uses of molasses and related products. UMT Co., Ltd., London.
  14. Banting, A. De L. and M. Bellanger. 1979. Preliminary studied of the effects of a reparation containing freeze-dried rumen fluid on the growth of fattening lambs. Recueil de Medecine Veterinaire 155(3) 239-241.
  15. Barford, J. P. 1987. The Technology of aerobic yeast growth. In D. R. Berry, G. G. Stewart and I. Russel(Eds.), Yeast Biotechnology. pp. 200-230. Unwin Hyman Ltd. London.
  16. Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow. 1983. Yeast : characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
  17. Baumstark, J. S., R. A. Bloomfield, G. B. Garmer and M. E. Murrer. 1960. Amino acid composition of rumen fluid and rumen microorganisms. J. Anim. Sci. 19:1247.
  18. Beauchemin, K. A. and N. M. Rode. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In : Rode, L. M.(ed) Animal Science Research and Development-Meeting Future Challenge. pp.103-130. Proc. Can. Anim. Sci. Lethbridge.
  19. Bentley, O. G., R. R. Johnson, S. Vanecko and C. H. Hunt. 1954. Studies on factors needed by rumen microorganisms for cellulose digestion *in vitro*. J. Anim. Sci. 13:581-593.
  20. Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis(3rd Ed.), Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc. New York.
  21. Berry, D. R. and C. Brown. 1987. Physiology of yeast grown. In D. R. Berry, G. G. Stewart and I. Russell(Eds.). Yeast Biotechnology. pp. 161-199. Unwin

Hyman. Ltd., London.

22. Bertrand, J. A. and L. W. Grimes. 1997. Influence of Tallow and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract in dairy cattle rations. J. Dairy Sci. 80:1179.
23. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
24. Brake, J. 1991. Lack of effect of a live yeast culture on broiler breeders and progeny performance. Poultry Sci. 70:1037-1039.
25. Brown, A. T., C. P. Christian and R. L. Eilert. 1975. Purification, characterization and regulation of a nicotinamide adenine dinucleotide-dependent lactate dehydrogenase from *Actinomyces viscosus*. J. Bacteriol. 122:1126-1135.
26. Bryant, M. P. and R. N. Doetsch. 1955. Factors necessary for the growth of *bacteroides succinogenes* in the volatile acid fraction of rumen fluid. J. Dairy Sci. 38:340-350.
27. Buchanan, R. E. and N. E. Gibbson. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (8th ed.) p. 529-550. Williams and Wilkins. Baltimore.
28. Carro, M. D., P. Lebzien and K. Rohr. 1992. Influence of yeast culture on *in vitro* fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. Anim, Feed Sci. Technol., 37:209.
29. Cartwright, C.P., J.R. Juroszek, M.J. Beavan, F.M.S. Ruby, S.M.F. de Moris and A.H. Rose. 1986. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. General. Microbiol. 132:369.
30. Casey, G. P., C. A. Magnus and W. M. Ingledew. 1984. High-gravity brewing :effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. Appl. Environ. Microbiol. 48:639-646.
31. Cassio, F., C. Leao and N. van Uden. 1987. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl.

- Environ. Microbiol. 53:509-513.
32. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8:130-132.
  33. Chiquette, J. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cows. Can. J. Anim. Sci. 75:405.
  34. Cho, D.W., J.H. Hwang, K.H. Chung and H.T. Shin. 1992. Studies on the utilization of rumen contents by yeast cultivation. Proceedings of '92 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Sokcho, Republic of Korea. A # 9229(Abstr.).
  35. Chung, K.H., B.S. Kim and H.T. Shin. 1992. Effect of various N and C sources on the cellulolytic activity of rumen bacterial fraction in *in vitro*. Proceedings of '92 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Sokcho, Republic of Korea. A # 9226(Abstr.).
  36. Collins, C. H. and P. M. Lyne. 1976. Microbiological Methods. p. 169-180. Butterworths. London.
  37. Cooper, T. G. and R. Sumrada. 1975. Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 121:571-576.
  38. Croes, A. F., J. M. Steijns, M. L. De Vries and J. A. vander Putte. 1978. Inhibition of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* by ammonium ions: Interference of ammonia with protein metabolism. planta. 141:205-209.
  39. Crow, V. L. and G. C. Prichard. 1977. Fructose 1,6-diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*; kinetic properties and factors affecting activation. J. Bacteriol. 131:82-91.
  40. Crueger, W. and A. Crueger. 1984. Single-cell protein (SCP). In: T. D. Brock (Eds.). Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. Science Tech, Inc., pp.267-276.
  41. Danielson, A. D., E. R., Peo, K. M. Shahani Jr., A. J. Lewis, P. J. Whalen and

- M. A. Amer. 1989. Anticholestermic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Anim. Sci.* 67:966.
42. Dawson, K. A. 1987. Mode of action of the yeast culture, Yea-Sacc, in the rumen: a natural fermentation modifier. In: T.P. Lyons(Eds.). *Biotechnology In the Feed Industry*, pp.119-125.
43. Dawson, K. A., K. E. Newman and J. A. Boling. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and *Lactobacilli* on roughage fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392-3398.
44. Dawson, K.A. and D.M. Hopkins. 1991. Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 69(Suppl. 1):531.
45. Dawson, K.A., K.E. Newman and J.A. Boling. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and *lactobacilli* on roughage fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392.
46. Dehority, B. A. 1991. Cellulose digestion in ruminants. In: C. H. Haigler and P. J. Weimer (Ed.) *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. p 327. Marcel Dekker, New York, NY.
47. Demeyer, D. I. 1981. Rumen microbes and the digestion of plant cell walls. *Agric. Environ.* 6:295-337.
48. Dennis, D. and N. O. Kaplan. 1960. D- and L- lactic acid dehydrogenases in *Latobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 235:810-818.
49. Dierssen, G. A., K. Holtegaard, B., Jensen and K. Rosen. 1956. Volatile carboxylic acids in molasses. *International Sugar J.* 58:35-39.
50. Doelle, H. W. 1971. Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent and nicotinamide adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenase in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 108:1284-1289.
51. Doetsch, R. N., R. Q. Robinson and J. C. Shaw. 1952. Techniques employed in

- cultural investigations of the bacteriology of bovine rumen contents. *J. Anim. Sci.* 11:537.
52. Dryden, L. V., A. M. Hartman, M. P. Bryant, I. M. Robinson and L. A. Moore. 1962. Production of vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>12</sub> analogues by pure cultures of ruminal bacteria. *Nature* 195:201.
  53. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1-42.
  54. Dunlop, R. H. 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 259-309.
  55. Dynon, M. K., G. R. Jago and B. E. Davidson. 1972. The sub-unit structure of lactate dehydrogenase from *Streptococcus cremoris* US3. *Eur. J. Biochem.* 30:348-353.
  56. Eddy, A. A. and P. G. Hopkins. 1985. The putative electrogenic nitrate-proton symport of the yeast *Candida utilis*. Comparison with the systems absorbing glucose or lactate. *Biochem. J.* 231:291-297.
  57. Elizabeth Moore-Landecker. 1982. *Fundamentals of the fungi*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
  58. Elliott, S. G. and C. S. McLaughlin 1979. Synthesis and modification of proteins during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 137:1185-1190.
  59. Ferain, T. D. Garmyn, N. Bernard, P. Hols and J. Delcour. 1994. *Lactobacillus plantarum* ldhL gen : overexpressio and delation. *J. Bacteriol.* 176:596-601.
  60. Ferreira, L. M. A., A. J. Durrant, J. Hall, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert. 1990. Spatial separation of protein domains is not necessary for catalytic activity or substrate binding in a xylanase. *Biochem. J.* 269:261.
  61. Firkins J. L., W. P. Weiss, M. L. Eastridge, and B. L. Hull. 1990. Effect of feeding fungal culture extract and animal-vegetable fat on degradation of hemicellulose and on ruminal bacterial growth in heifers. *J. Dairy Sci.* 73:1812-1822.

62. Firkins, J. L., W. P. Weiss, M. L. Eastridge and B. L. Hull. 1990. Effect of feeding fungal culture extract and animal-vegetable fat on degradation of hemicellulose and ruminal bacterial growth in heifers. *J. Dairy. Sci.* 73: 1812-1822.
63. Fondevila, M., C. J. Newbold, P. M. Hotten and E. R. Orskov. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw. *Anim. Prod.* 41:422-425.
64. Forbers, C. M. and K.-J. Cheng. 1992. Molecular strategies to optimize forage and cereal digestion by ruminants. In : Bills D. D. and King, S. D. (eds) *Biotechnology and Nutrition*, pp. 107-147. Betterworth Heinmann, Stoneham.
65. Francis, C., D. M. Janki, A. S. Arafa and R. h. Harms. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poult. *Poult. Sci.* 57:1687.
66. Frumholtz, P. P., C. J. Newbold and R. J. Wallace. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci.* 113:169-172.
67. Fuller, R. and B.E. Brooker. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. *Amer. J. Clin. Nutr.* 27:1305.
68. Fuller, R. and C.B. Cole. 1989. The scientific basis of the probiotic concept. In B.A. Stark and J.M. Wilkinson (Eds.). *Probiotics: Theory and Applications*. pp. 1-14.
69. Garraway, M. O. 1984. *Fungal Nutrition*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
70. Garraway, M.O. and R.C. Evans. 1984. *Fungal nutrition and physiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
71. Garrett, W. N., J. H. Meyer and G. P. Lof. 1959. The comparative energy requirements of sheep and cattle for maintenance and gain. *J. Anim. Sci.* 18: 528-547.
72. Garvie, E. I. 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological review.* 44:

106-139.

73. Gasser, F. 1970. Electrophoretic characterisation of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. J. Gen. Microbiol. 62:241-150.
74. Gerhardt. P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. 410-441. American Society for Microbiology. Washington.
75. Gilbert, H. J., J. Hall, G. P. Hazlewood, and L. M. A. Ferreira. 1990. The N-terminal region of an endoglucanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* constitutes a cellulose-binding domain that is distinct from the catalytic centre. Mol. Microbiol. 4:759.
76. Gill, J. W. and K. W. King. 1958. Nutritional characteristics of *Butyrivibrio*. J. Bact. 75:666-673.
77. Gilliland, S.E., C.R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 49:377.
78. Gilmour M. H. J. Flint and W. J. Mitchell. 1994. Multiple lactate dehydrogenase activities of the rumen bacterium *Selenomonas ruminantium*. Microbiology. 140:2077-2084.
79. Girard, I.D., C.R. Jones and K.A. Dawson. 1993. Lactic acid utilization in rumen-simulating cultures receiving a yeast culture supplement. J. Anim. Sci. 71(Suppl. 1):288.
80. Gohl, G. 1981. Tropical Feeds. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
81. Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas and J. T. Huber. 1987. Effect of *Aspergillus Oryzae*(AMAFERM) and yeast on feed utilization by holstein cows. J. Dairy. Sci. 70(Suppl. 1):218(Abstr.)
82. Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas and J. T. Huber. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of diary components. J. Dairy Sci. 73:703-710.



83. Gordon, G. L. and H. W. Doelle. 1974. Molecular aspects for the metabolic regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide-dependent D(-)-lactate dehydrogenase from *Leuconostoc*. Microbios 9:199-215.
84. Gordon, G. L. and H. W. Doelle. 1976. Purification, properties and immunological relationship of L(+)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. Eur. J. Biochem. 67:543-555.
85. Gordon, G. L. R. and W. E. C. Moore. 1961. Growth stimulation of *Butyrivibrio* by mucin. J. Dairy Sci. 44: 1772-1773.
86. Gotz, F. and K. H. Schleifer. 1976. Comparative biochemistry of lactate dehydrogenases from staphylococci. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkol. Infektionskr. Abst. 1 Suppl. 5:245-252.
87. Graham, H., W. Lowgren, D. Pettersson and P. Aman. 1988. Effect of enzyme supplementation on digestion of a barley/pollards-based pig diet. Nutr. Rep. Inter. 38:1073-1079.
88. Halliwell, G. and M. P. Bryant. 1963. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. J. Gen. Microbiol. 32:441-450.
89. Hammond, J. C. 1944. Dried cow manure and dried rumen contents as a partial substitute for alfalfa leaf meal. Poultry Sci. 23:471-476.
90. Harada, Y. 1951. Rep. Tatsuno Inst. Soy Sauce 2:51-52.
91. 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 population. J. Dairy Sci. 71:2967.
92. Hensel, R., U. Mayr, H. Fujiki and O. Kandler. 1977a. Comparative studies of lactate dehydrogenases in lactic-acid bacteria. Amino acid composition of the L-lactate dehydrogenase of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. Eur. J. Biochem. 80:83-92.
93. Hensel, R., U. Mayr, K. O. Stetter and O. Kandler. 1977b. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification

- and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei ssp. casei* and *Lactobacillus curvatus*. Arch. Microbiol. 112:81-93.
94. Herrera-Saldana, R., R. Gomez-Alarcon, M. Torabi and J. T. Huber. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. J. Dairy Sci. 83:142-150.
  95. Hino, T. and S. Kuroda. 1993. Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. Appl. Environ. Microbiol. 59:255-259.
  96. Hironaka, R. 1975. Use of dried paunch residue in ruminant diets. Can. J. Anim. Sci. 55:471-472.
  97. Holland, R and G. C. Pritchard. 1975. Regulation of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose 1,6-diphosphate and metal ions. J. Bacteriol. 121:777-784.
  98. Huffman, R. P., K. K. Karges, T. J. Klöpfenstein, R. A. Stock, R. A. Britton and L. D. Roth. 1992. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on substrate ruminal acidosis. In: Abstracts of ASAS/ADSA. p. 87. Midwestern Section.
  99. Hughes, J. 1988. The effect of a high-strength yeast culture in the diet of early-weaned calves. Anim. Prod. 46:526 (Abstr.).
  100. Huhtanen, C. N., M. R. Rogers and L. S. Gall. 1952. Improved techniques for isolating and purifying rumen organisms. J. Bact. 64:17-23.
  101. Hungate, R. E. 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press. New York.
  102. Hungate, R. E., R. W. Dougherty, M. P. Bryant and R. M. Cello. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. Cornell Vet. 42:423-449.
  103. Hunkova, Z. and Z. Fencl. 1978. Toxic effects of fatty acids on yeast cells: possible mechanisms of acids. Biotechnol. Bioeng. 20:1235-1248.
  104. Hwang, J.H., D.W. Cho, K.H. Chung and H.T. Shin. 1992. Studies on the

- development of high protein feed with rumen contents by microbes. Proceedings of '92 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Sokcho, Republic of Korea. A # 9228(Abstr.).
105. Imrie, F. K. E. 1969. Fermentation media. sugar and molasses. Proc. Biochem. January:34-35.
  106. Ingold, C. T. 1984. The Biology of Fungi(5th Ed.). Hutchinson Co. Ltd. London
  107. Javor, B. J. 1984. Growth potential of Halophilic bacteria isolated from sola salt environments: Carbon and salt requirements. Appl. Environ. Microbiol. 48:352-360.
  108. Jovanovic, M. and Cuperlovic, M., 1977. Nutritive value of rumen contents for monogastric animals. Anim. Feed Sci. Technol. 2:351-360.
  109. Jovanovic, M. and M. Cuperlovic. 1974. Mogucnosti Koriscenja nekih klanichih otpadakau ishrani zivotinja. Krmiva(Zagreb), XVI. pp. 241-246.
  110. Kamalamma, U. Krishnamoorthy, P. Krishnappa. 1996. Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc) on rumen fermentation *in vitro* and production performance in crossbred dairy cows. Anim, Feed Sci. Technol., 57:247.
  111. Kawa, Y., T. Saito, T. Konno and T. Iton. 1996. Compositional characteristics of lactic acid produced by Lactobacillus acidopholus group lactic acid bacteria. Anim. Sci. Technol (Jpn). 67:621-629.
  112. Kellems, R. O., A. Lagerstedt and M. W. Wallentine. 1990. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. J. Dairy Sci. 73:2922.
  113. Kellett, L. E., D. M. Poole, L. M. A. Ferreira, A. J. Durrant, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert. 1990. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose- binding domains and are encoded by adjacent genes. Biochem. J. 272:3696.

114. Kim, B.S., K.H. Chung and H.T. Shin. 1992. Effect of various N and C sources on the cellulolytic activity of strained rumen fluid in *in vitro*. Proceedings of '92 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Sokcho, Republic of Korea. A # 9227(Abstr.).
115. Kim, H. S. and S. E. Gilliland. 1983. Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. J. Comp. Path. 73:215.
116. Kim, S. F. and S. J. Pack. 1991. Cloning and nucleotide sequence of the *Lactobacillus casei* lactate dehydrogenase gene. Appl. Environ. Microbiol. 57:2413-7.
117. Kreger-van Rij, N. J. W. 1987. Classification of yeasts. In A. H. Rose and J. S. Harrison(Eds.). The yeasts. Vol 1, pp.5-61. Academic Press. London.
118. Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The Yeasts, A Taxonomic Study (3rd Ed.), Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands.
119. Krehbiel, C. R., R. A. Britton, D. L. Harmon, T. J. Wester and R. A. Stock. 1995a. The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. J. Anim. Sci. 73:3111-3121.
120. Kulaev, I. S. and V. M. Vagabov. 1983. Polyphosphate metabolism in microorganisms. In A. H. Rose, T. G. Morris and D. W. Tempest(Eds.). Advances in microbial physiology. 24:83-174.
121. Larson, E. M., R. A. Stock, T. J. Klopfenstein, M. H. Sindt and R. P. Huffman. 1993. Feeding value of wet distillers byproducts for finishing ruminants. J. Anim. Sci. 71:2228-2239.
122. Leao, C. and N. van Uden. 1986. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Candida utilis*. Appl Microbiol. Biotechnol. 23: 389-393.
123. Limmin Kung, Jr. and A. O. Hession. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 73:250-256.

124. Lindgren, S. and O. Refai. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage  
J. Appl. Bacteriol.57: 221-228.
125. Lyons, T. P. 1986. Biological tools of improving feed efficiency. Proceedings  
Alltech's Second Annual Biotechnology Symposium. Lexington.
126. Lyons, T. P. 1991. Biological tools of improving feed efficiency. Proceedings  
Alltech's 7th Annual Biotechnology Symposium. Lexington.
127. Mackie, R. I. and F. M. C. Gilchrist. 1979. Changes in lactate-producing and  
lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during  
stepwise adaptation to a high-concentrate diet. Appl. Environ. Microbiol.  
38:422-430.
128. Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist and S. Heath. 1984. An *in vitro* study of  
ruminal micro-organisms influencing lactate turnover and its contribution to  
volatile fatty acid production. J. Agric. Sci. 103:37-42.
129. Maiorella, B. L., H. W. Blanch and C. R. Wilke. 1984. Feed component inhibi-  
tion in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng  
26:1155-1166
130. Malleret, C. R. Lauret, S. D. Ehrlich, F. Moret Deville and M. Zagorec. 1998.  
Disruption of the both sole IdhL gen in *Lactobacillus Sakei* prevents the  
production of both L- and D-lactate. Microbiology. 144:3327-3333.
131. Mann, I. 1962. Animal By-Products: Processing and Utilization. pp. 219-220.  
FAO Animal Production and Health Series No. 9.
132. Mann, I. 1962. Animal By-Products: Processing and Utilization. pp. 219-220.  
FAO Animal Production and Health Series No. 9.
133. Martin S. A., D. J. Nisbet and R. G. Dean. 1989. Influence of a commercial  
yeast supplement on the *in vitro* ruminal fermentation. Nutr. Rep. Int. 40:395.
134. Martin, S. A. and D. J. Nisbet. 1990. Effects of *Aspergillus oryzae* fermenta-  
tion extract on fermentation of amino acids; bermudagrass and starch by  
mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 68:2142-2149

135. Martin, S. A. and D. J. Nisbet. 1994. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.
136. McCarty, D. M., Lin, J. H. C., Rincker, L. A. and Savage, D. C. 1988. Genetic transformation in *Lactobacillus* sp. strain 100-33 of the capacity to colonize the nonsecreting gastric epithelium in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 416-422.
137. McNeill, J. J., R. N. Doetsch and J. C. Shaw. 1954. Some nutritional requirements of bovine rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 37:81-88.
138. Messersmith, T. L., W. R. Fulton and T. J. Klopfenstein. 1974. Dried paunch as a roughage source in beef finishing rations. *J. Anim. Sci.* 39:246(Abstr.).
139. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Animal. Chem.* 31:426-428.
140. Mishra, P. and R. Prasad. 1989. Relationship between ethanol tolerance and acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Biotechnol.* 30: 284-298.
141. Metchnikoff, E. 1908. Prolongation of life. G. P. Putnam's Sons. New York.
142. Mitch, I. and R. Kenworthy. 1976. Investigation on metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *Escherichia coli* pathogen for pig. *J. Appl. Bacteriol.* 41:63.
143. Mitchison, J. M. 1958. The growth of single cells. II. *Saccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research.* 15:214-221.
144. Molinari, R. and F. J. S. Lara. 1960. The lactic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum*. *Biochem. J.* 75:57-65.
145. Mou, L., D. P. Mulvena., H. A. Jonas and G. R. Jago. 1972. Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide- dependent D- and L-lactate dehydrogenases in group N *Streptococcus*. *J. bacteriol.* 111:392-396.
146. Newbold, C. J., P. E. V. Williams, N. McKain, A. Walker and R. J. Wallace. 1990. The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the

- rumen of sheep. Proc. Nutr. Soc. 49:47A.
147. Nicholson, H.H. 1977. Effect of yeast culture vs. brewers yeast in feedlot cattle. Diamond V. Yeast Culture Research Briefs (RB) - 58a.
  148. Nisbet, D. J., and S. A. martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. 69:4628.
  149. Novotny, C., B. Behalova, R. Struzinsky, M. Novak and J. Zajicek. 1988. Sterol composition of a 5.7-sterol-rich strain of *Saccharomyces cerevisiae* during batch growth. Folia Microbiol. 33:377-385.
  150. Oellermann, S. O., M. J. Arambel, B. A. Kent and J. L. Walters. 1990. Effect of graded amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility in cattle. J. Dairy Sci. 73:2413-2416.
  151. Ogata, M. K. Aribara and T. Yag. 1983. D-lactate dehydrogenase of *Desulferbrio Vulgaris*. Microbiologica. 6:1-6.
  152. Oren, A. and P. Gurevich. 1995. Diversity of lactate metabolism in *Hulophilic archaea*. Can. J. Microbiol. 41:302-307.
  153. Orlova, V. S., N. M. Semikhatova and S. S. Rylkin. 1980. Effect of ethanol concentration in physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* under periodic cultivation. Microbiologicheskii Zhurnal. 42:718-722.
  154. Oshida, T., T. Honjyo and K. Tanaka. 1980. Studies on the effects of liquid fermented feed of swine waste (LFF) in the finishing pig; In case of added LFF 20%. Bull. Anim. Hyg. 11:21-28.
  155. Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. J. Anim. Sci. 76:275-286.
  156. Pateman, J. A. and J. R. Kinghorn. 1976. Nitrogen metabolism. In J. E. Smith and D. R. Berry(Eds.), The Filamentous Fungi, Vol. 2, pp.159-237. New York.
  157. Peppler, H. J. 1979. Production of yeasts and yeast products. In H. J. Pelman (Eds.). Microbial Technology(2nd Ed.) vol. 1.

158. Pepler, H. J. 1982. Yeast extracts. *In*; Fermented Foods. A. H. Rose(Eds). 293-312. London. Academic Press.
159. Pettersson, D., H. Graham and P. Amen. 1989. Enzyme supplementation of broiler chickens. *Anim. Prod.* 51:399-404.
160. Phillips, W.A. and D. Von Tungeln. 1984. Effect of adding yeast culture to the receiving ration of stressed stocker calves. *Okla. Agr. Exp. Sta. Res.*
161. Pinon, R. 1977. Effects of ammonium ions on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell. Res.* 105:367-378.
162. Plata P. F., G. D. Mendoza M., J. R. Barcena-Gama, S. Gonzalez M. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Anim, Feed Sci. Technol.*, 49:203.
163. Poore, M. H., J. A. Moore, T. P. Eck, R. S. Swingle and C. B. Theurer. 1993. Effect of fiber source and ruminal starch degradability on site and extent of digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:2244-2251.
164. Pouden, W. D. 1952. Prophylaxis, diagnosis and therapy of Rumen Dysfunction. *Calif. Vet.* Vol. 5, No. 5.
165. Pouden, W. D. and J. W. Hibbs. 1948. The influence of the ration and rumen inoculations on the establishment of certain rumen microorganisms in the rumens of young calves. *J. Dairy Sci.* 31:1041-1050.
166. Pouden, W. D. and J. W. Hibbs. 1949. Cud inoculations for calves. *Ohio Farm and Home Res.* 34:43-46.
167. Prokop, M. J., T. J. Klopfenstein and T. Messersmith. 1974. Blood and paunch meal in ruminant rations. *J. Anim. Sci.* 39:250(Abstr.).
168. Prokop, M. J., T. J. Klopfenstein and T. Messersmith. 1974. Blood and paunch meal in ruminant rations. *J. Anim. Sci.* 39:250(Abstr.).
169. Provos, P. J. and R. N. Doetsch. 1959. Studies on amylolysis in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 42:913(Abstr.).
170. Rose, A. H. 1980. Recent research on industrially important strain of *saccha-*



- romyces cerevisiae*. In F. A. Skinner, S. M. Passmore and R. R. Davenport (Eds.). *Biology and Activities of Yeasts*. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No. 9. pp. 103-121. Academic Press, London.
171. Rose, A. H. and J. S. Harrison. 1970. The Yeasts. In A. H. Rose and J. S. Harrison(Eds.). Vol. III. *Yeast Technology-Introduction*. pp. 349-420.
172. Ruf E. W., W. H. Hale and W. Burroughs. 1953. Observations upon an unidentified factor in feedstuffs stimulatory to cellulose digestion in the rumen and improved liveweight gains in lambs. *J. Anim. Sci.* 12:731-739.
173. Ruf, E. W., W. H. Hale and W. Burroughs. 1953. Observations upon an unidentified factor in feedstuffs stimulating to cellulose digestion in the rumen and improved liveweight gain in lambs. *J. Anim. Sci.* 12:731-739.
174. Russel, J. B. and R. L. Baldwin. 1979a. Substrate preferences in rumen bacteria; evidence of catabolite regulatory mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:319-329.
175. Russell, J. B. 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604-670.
176. Russo, J. M. and V. Lfeimann. 1959. The value of corn fermentation condensed solubles as a growth stimulant for chickens. *Poultry Sci.* 38:26-30.
177. Sabin, D. B. 1963. An antibiotic-like effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature.* 199:811.
178. SAS. 1985. *SAS User's Guide; Statistics*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
179. Savijoki, K. and A. Palva. 1997. Molecular characterization of the L-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) of *Lactobacillus helveticus* and biochemical characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2850-2856.
180. Schmidt, G., L. Hecht and S. J. Thannhauser. 1949. The effect of potassium ions on the absorption of orthophosphate and the formation of metaphosphate by bakers yeast. *J. Biol. Chem.* 178:733-742.
181. Schurr, A. and E. Yagil. 1971. Regulation and characterisation of acid and

- alkaline phosphatase in yeast. *J. Gen Microbiol.* 65:291-303.
182. Shin, H.T., H.D. Bae and K.H. Chung. 1991<sub>a</sub>. Effect of live yeast culture supplementation and the performance of lactating dairy cows. Proceedings of '91 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Cheju, Republic of Korea. D # 9121(Abstr.).
183. Shin, H.T., H.D. Bae, K.H. Chung and S.K. Lee. 1991<sub>b</sub>. Studies on the stability of yeast in live yeast culture. Proceedings of '91 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Cheju, Republic of Korea. D # 9120(Abstr.).
184. Shin, H.T., H.D. Bae, K.W. Chung, Y.K. Kim, J.H. Shon and S.K. Lee. 1990. Evaluation of live yeast culture as sources of probiotics for broiler. The 5th AAAP 3: I-143.
185. Shin, H.T., S.T. Cha and K.H. Chung. 1995. Effect of yeast culture supplementation on the performance of layers. '95 Annual Meeting of Korean J. Anim. Nutr. Feed. 23(Abstr.).
186. Shin, H.T., K.H. Chung, S.T. Cha and Y.O. Kim. 1994<sub>a</sub>. Studies on the development of yeast culture with rumen contents. I. Proceedings of '94 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Jinju, Republic of Korea. D # 9404(Abstr.).
187. Shin, H.T., K.H. Chung, S.T. Cha and Y.O. Kim. 1994<sub>b</sub>. Studies on the development of yeast culture with rumen contents. II. Proceedings of '94 Annual Meeting of Korean Federation of the Societies in Animal Sciences. Jinju, Republic of Korea. D # 9425(Abstr.).
188. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.*43:910-929.
189. Slyter, L. L. and T. S. Rumsey. 1991. Effect of coliform bacteria, feed deprivation and pH on ruminal D-lactic acid production by steer or continuous-culture microbial populations change from forage to concentrates. *J. Anim. Sci.*

69:3055-3066.

190. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. Berget's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore.
191. Sniffen C. J. 1986. Natural growth stimulators: micronutrients of the rumen- the role of yeast culture in the rumen. Alltech's Second Annual Symposium. Lexington, Ky.
192. Spivey, M. J. 1978. The acetone/butanol/ethanol fermentation. Proc. Biochem. 13:24-25.
193. Sread, D. E. 1989. Grouping of *Xanthomonas campestris pathovars* of vereals and grasses ny fatty acid profilomg. EPPO Bull. 19:57-68.
194. Stark, B. A. and J.M. Wilkinson. 1989. Probiotics: Theory and Applications. Chalcombe Publications, Great Britain.
195. Steward C. S. and M. P. Bryant. 1988. The rumen bacteria. In: P. N. Hobson (Ed.) The Rumen Microbiol Ecosystem. P 21. Elsevier Science Publishing, New York.
196. Stewart, C. S. and Duncan, S. H. 1985. The effect of avoparcin on cellulolytic bacteria of the bovine rumen. J. General Microbiol. 131:427-435.
197. Stewart, G. G. and I. Russell. 1987. Control of sugar and carbohydrate metabolism in yeasts. In D. R. Berry, G. G. Stewart and I. Russell(Eds.). Suomalainen, H., E. Oura. 1975. Yeast nutrition and solute uptake. In A. H. Rose and J. S. Harrison(Eds.). The Yeasts. Vol. 2. p. 15. Academic Press, London.
198. Suomalainen, H., E. Oura. 1975. Yeast nutrition and solute uptake. In A. H. Rose and J. S. Harrison(Eds.). The Yeasts. Vol. 2. p. 15. Academic Press, London.
199. Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol, Rev. 40:722.
200. Taguchi H. and T. Ohta. 1992. Usual amono acid substitution in the

- anion-binding site of *Lactobacillus plantarum* non-allosteric L-lactate dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 209:993-998.
201. Tindall, B. J. 1992. The family *Halobacteria* Caeae. In: M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (Ed.) The Prokaryotes. (2nd ed.) p. 768-808. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
202. Tomme, P., H. Van Tilbeurgh, G. Pettersson, J. Van Damme, J. Vandekerckhove, J. Knowles, T. Teeri and M. Claeysens. 1988. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. Eur. J. Biochem. 170:575.
203. Totuado, F. 1973. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on growth, feed conversion, malabsorption of fat syndrome and intestinal flora. Poul. Sci. 52:197.
204. Tramer, J. 1966. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. Nature. 211:204.
205. Tsang, S. T. L. and P. I. Schaible. 1960. The value of corn fermentation solubles in poultry nutrition. Poultry Sci. 39:257.
206. Tung, R. S. and L. Kung, Jr. 1993. In vitro effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. J. Dairy Sci. 76:1083-1089.
207. Underdahl, N. R., A. Torres-Median and A.R. Doster. 1982. Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in the control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. Amer. J. Vet. Res. 43:227.
208. Underdahl, N.R. 1983. The effect of feeding *Streptococcus faecium* upon *Escherichia coli* diarrhea in gnotobiotic pigs. Prog. Fd. Nutr. Sci. 7:5.
209. Van Tilbeurgh, H., P. Tomme, M. Claeysens, R. Bhikhabhai and G. Pettersson. 1986. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Separation of functional domains. FEBS Lett. 204:223.
210. Walker-Caprioglio, H. M., W. M. Casey and L. W. Parks. 1990. *Saccharomyces Cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the

211. Weerkamp, A. and R. D. MacElroy. 1972. Lactate dehydrogenase from an extremely *thermophilic bacillus*. Arch. Microbiol. 85:113-122.
212. Weimer, P. J. 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 12:189-194.
213. Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal digest cellulose faster? J. Dairy Sci. 79:1496-1502.
214. Wiedmeier, R. D., M. J. Aramble, and J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70:2063-2068.
215. Wiedmeier, R. D., M.J. Arambel and J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70: 2063.
216. Williams, P. E. V. and C. J. Newbold. 1990. Rumen probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminants productivity. In "Recent Advances in Animal Nutrition" Eds by W. Haresign and D. J. A. Cole. p.211. Butterworths, London.
217. Williams, P. E. V., C. A. G. Tait, G. M. Innes and C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Sacharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Anim. Sci. 69:3016-3026.
218. Wohlt, J. E., Chung, C. H. and Finkelstein, A. D. 1990. Use of supplemental yeast to improve intake, nutrient digestibility and performance during early lactation by dairy coattle. J. Dairy Sci. 73(Suppl.1):236.
219. Wrba, A., Janicke, R. Huber, R. and H. O. Steter. 1990. Lactate dehydrogenase from the extrem thermophole *Thermotoga maritima*. Eur. J. Biochem. 188:195-201.
220. Wyckoff, H. A., J. Chow, T. R. Whitehead and M. A. Cotta. 1997. Cloning, sequence, and expression of the L-(+) lactate dehydrogenase of *Streptococcus*

- bovis*. Curr. Microbiol. 34:367-373.
221. Yokotsuka, T. 1964. Oilseed protein foods - symposium.
222. Yoon, I. K., and M. D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on ruminal fermentation in dairy cows. J. Dairy Sci. 79:411
223. Zinn, R. A. 1991. Comparative feeding value of steam-flaked corn and sorghum in finishing diets supplemented with or without sodium bicarbonate. J. Anim. Sci. 69:905-913.76.
224. 강신권, 성낙계. 1989. 감귤과피 압착액을 기질로 한 SPC생산. Kor. J Appl. Microbiol. Bioeng. 17:556-562.
225. 김복영. 1991. 수질오염과 농업. 한국환경농학회 편집위원회(편집), 한국환경농학회.
226. 김봉석. 1993. 반추위 내용물을 *Aspergillus Oryzae* 배양물 개발 및 육계의 생산성에 미치는 영향. 석사학위 논문. 성균관대학교.
227. 김희수. 1990. Microencapsulation에 의한 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3205의 생존에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.
228. 박종명, 손성완, 진 영화, 조준형, 이 재진, 조태행, 낭궁선, 박근식. 1989. 암모니아 및 효모를 이용한 옥수수중의 아플라톡신 除毒. 농시논문집 (가축위생편) 31(3): 49.
229. 石丸. 木材麴 化學酵素利用. 微生物飼料 の 基礎と 實際.
230. 유주현, 양한철, 정동효, 양릉. 1984. 식품공학실험(II). 탐구당. 서울.
231. 이남형, 윤철석, 박전홍, 오태광, 홍석산. 1985. 도살장 부산물 및 폐기물로 부터 고단백 가축사료의 개발. 과학기술처 연구보고서 N 98(1-4)-2351-5.
232. 정기환. 1994. 도축 반추위액을 이용한 사료자원 개발에 관한 연구. 박사학위 논문. 성균관대학교.
233. 정동욱, 정지훈. 1987. 고구마 주정 폐액을 자화하는 효모에 의한 SCP생산. 한국농화학회지. 30:258-263.
234. 정동효. 1993. 생물공학. 선진문화사.
235. 조대우. 1991. 효모배양에 의한 도축우 반추위 내용물의 사료화에 관한연구. 석사

학위 논문. 성균관대학교.

236. 허정숙. 1974. 든 또는 계의 생분을 이용한 발효사료의 조제방법. 특허공보 제 267호
237. 황지현. 1991. 반추위 내용물을 이용한 고단백질 사료 개발에 관한 연구. 석사학위 논문. 성균관대학교.