

# cPCR 기법을 이용한 초기배양 pH에 의한 반추위 섬유소 분해 박테리아의 부착 및 발효에 관한 연구

김민석\* · 성하균\* · 김현진\* · 이상석\*\* · 장종수\*\*\* · 하종규\*

서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부 \*, (주)진마바이오텍 부설연구소 \*\*,  
한국방송통신대학교 농학과 \*\*\*

## Study on Rumen Cellulolytic Bacterial Attachment and Fermentation Dependent on Initial pH by cPCR

M. S. Kim\*, H. G. Sung\*, H. J. Kim\*, Sang S. Lee\*\*, J. S. Chang\*\*\*  
and J. K. Ha\*

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University \*,  
Research Institute, Genebiotech Co. \*\*,

Department of Agricultural Science, Korea National Open University \*\*\*

### ABSTRACT

The cPCR technique was used to monitor rumen fermentation and attachment of *Fibrobacter succinogenes* to cellulose at different pH in the *in vitro* culture medium. The target fragments of 16S rDNA (445 bp) were amplified from genomic DNA of *F. succinogenes* with specific primers and internal controls (205 bp) were constructed. Cell counts were estimated from the amounts of genomic DNA, which was calculated from cPCR results. *F. succinogenes* in pH 6.8 and 6.2 showed apparently higher attachment than in pH 5.8 during all incubation time. There were some difference between pH 6.8 and 6.2 in the degree of attachment, but the different was not significant ( $P > 0.05$ ). Cellulose degradation increased in process of incubation time and the increasing rate was higher when initial pH was higher. The pH in culture medium decreased regardless of initial pH in course of incubation time. After 24 h of incubation, medium pH was dropped by 0.24, 0.58 and 0.16 units from original medium pH 6.8, 6.2 and 5.8, respectively. More gas was produced at higher initial pH in the same manner as in cellulose degradation. In summary, Initial pH of rumen culture *in vitro* significantly influenced cellulose digestion, gas production, pH change and bacterial attachment. Especially, low pH (5.8) resulted in much lower bacterial attachment and fiber digestion compared to higher medium pH.

**(Key words)** : Initial medium pH, *F. succinogenes*, Attachment, Rumen fermentation, cPCR

### I. 서 론

조사료 구조 탄수화물의 1차 분해자는 혐기성 미생물로서 이들은 반추위내에 서식하며 반추동물의 사료 소화에 실제적인 영향을 준다.

반추위 미생물 중 박테리아만도 현재까지 200여 종이 분류되었는데(Russell과 Rychlik, 2001; 하 등 2005), 이들 반추박테리아 생태계의 연구에 주로 사용되어진 기법은 roll tube culture, MPN(most-probable-number), 현미경 관찰 등이

Corresponding author : J. K. Ha, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea. Phone : 02-880-4809 Fax : 02-875-8710 E-mail : jongha@snu.ac.kr

었다(Hungate, 1966; Deority 등, 1989; Bae 등, 1997). 그러나 이들 방법은 다양한 종류의 반추위 박테리아를 전부 배양할 수 없고, 다만 주어진 조건에서 배양된 극히 일부의 박테리아 외의 것은 관측할 수 없을 뿐만 아니라 특정 종류의 박테리아를 추적 할 수 없다는 큰 한계점이 있다. 따라서 최근에는 분자생물학적 기법을 반추위 혐기성 박테리아의 생태계 연구에 적용하려는 노력이 많아지고 있다(Stahl 등, 1988; Woese, 1994; Reilly 등, 2002; Koike 등, 2003).

박테리아의 16S rDNA의 특이성은 반추위 박테리아를 동정하고 분류하는데 중요한 자료가 될 뿐만 아니라 competitive PCR(cPCR)기법을 이용하여 각각 박테리아를 정량하는데 사용되어 왔다(Woese, 1987; Reilly와 Attwood, 1998). cPCR은 목표 유전자(16S rDNA의 특정 증폭부위)를 인지하는 동일한 primer를 갖는 competitor target을 샘플 DNA와 같이 넣어 PCR을 하는 것으로, Reilly와 Attwood(1998)가 반추위내 단백질 분해 박테리아인 *Clostridium proteoclasticum*의 수를 측정하는데 처음으로 사용하였다. 그리고 이 밖의 단백질 분해와 관련된 박테리아 *Streptococcus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella bryantii*, *Eubacterium* sp., *Prevotella*의 cPCR을 위한 specific primer가 고안되었다(Reilly 등, 2002). 또한 cPCR 기법은 섬유소 박테리아에까지 확장되어 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*와 *Ruminococcus flavefaciens*의 계수에 이용된 바 있으며(Koike와 Kobayashi, 2001), Koike 등(2003)은 섬유소 분해 박테리아들의 섬유소 부착 속도를 cPCR 기법을 이용하여 연구하였다.

*F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*는 반추위 섬유소 분해에 있어 주요 역할을 담당하는 대표적 섬유소 박테리아로 잘 알려져 있으며(Forsberg 등 1997), 반추위로 유입된 조사의 분해는 우선적으로 이들 섬유소 분해 박테리아의 부착이 이루어지고, 그 후 부착된 박

테리아들의 증식과 함께 섬유소 소화는 가속화된다(McAllister 등 1994). 섬유소 박테리아의 섬유소 부착과 섬유소 소화는 반추위내 여러 환경 요인에 의해 영향을 받는데 이들 요인 중 가장 중요한 요인 중 하나는 pH이다(Miron 등, 2001). 특히 비육말기나 고 능력우의 경우에 반추위내 pH는 자주 6.0 이하로 떨어지는데(Slyter 등, 1976), pH 6.0 이하에서는 반추위내 섬유소 소화가 거의 일어나지 않는 것으로 보고된 바 있다(Mould 등, 1984).

따라서 본 연구는 대표적 반추위 섬유소분해 박테리아 중 하나인 *F. succinogenes*의 균수를 측정하기 위한 cPCR 기법을 수립하고, 배양 pH 조건에 따른 섬유소 소화율의 변화와 섬유소 부착 미생물 수를 cPCR로 모니터링 하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배양

순수배양에 사용한 반추위 박테리아 *F. succinogenes* S85는 캐나다 Guelph 대학의 Dr. C. W. Forsberg로 부터 제공받았으며, 균주는 39°C 혐기상태에서 RGC medium (Ogimoto et al., 1981)으로 배양되었다.

### 2. DNA 추출 및 16S rDNA 증폭

*F. succinogenes* 순수배양액과 *in vitro* 배양 후 수거한 cellulose에 부착된 미생물 DNA 추출은 Reilly 등(1998)의 방법에 따라 bead-beating 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 순수배양액 및 반추위액 1 ml 또는 건조된 cellulose sample 100 mg을 1.2 g silica beads (Biospec Products Ltd., USA)가 들어있는 1.5 ml 멸균튜브에 첨가하여 실온에서 12,000 × g로 10분간 원심분리 하였다. Pellet과 bead를 750 μl의 saline-EDTA solution(0.15M NaCl, 0.1M

EDTA)로 부유시켜 Mini-beadbeater (Biospec Products Ltd., USA)에서 초고속도로 2분간 작동 후 2분 동안 얼음에 냉각하는 순으로 2회 반복하여 cell을 파괴하였다. 그리고 Phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1)을 이용하여 단백질을 제거하고 DNA를 추출하였다. 단백질이 제거된 DNA에 ethanol을 부가하여 DNA를 침전시켰으며 4°C에서 10,000 × g로 20분간 원심분리 하여 DNA 침전물을 얻었다. 그리고 수거된 DNA는 진공건조한 후 TE buffer에 다시 용해하여 RNAase A(최종농도 1 mg mL<sup>-1</sup>)를 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 그리고 마지막으로 Phenol : chloroform : isoamyl alcohol를 사용하여 DNA를 다시 추출하였으며, 추출된 DNA는 UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 사용하여 농도를 측정하였다.

PCR에 사용한 specific primers는 Fs219f : GGTATGGGATGAGCTTGC와 Fs654r : GCCTGCCCTGAACTATC이었으며(Koike와 Kobayashi, 2001), cPCR은 template로 샘플 DNA와 internal control을 함께 넣어 실시하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초 동안 변성(denaturation), 60°C에서 30초 동안 결합(annealing), 72°C에서 30초 동안 신장(extension) 순으로 48 cycles 실시하였고, 최초 cycle에서는 9분 동안 denaturation, 마지막 cycle에서는 10분 동안 extension시켰다.

### 3. Internal control 구축 및 standard curve

cPCR에 사용하기 위한 internal control은 증폭된 16S rDNA 절편을 제한효소(Ssp I 과 Sma I)로 절단하여 동일 primers로 증폭이 가능하도록 제작되었다. 제작되어진 internal control은 TA plasmid vector(pGEM-T Easy Vector Systems, Promega, USA)를 이용하여 Kit 사용 설명서에 따라 *E. coli* Top10F'(Invitrogen, USA)에 형질전환 시켜 보관하였다.

cPCR에서 증폭된 DNA 절편들은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 전기영동을 한 후 GS-670 imaging densitometer (Bio-rad, USA)를 이용하여 목표 DNA 절편과 internal control DNA 절편의 밴드강도를 측정하였다. 각 농도별 목표 DNA 절편과 internal control DNA 절편이 1:1의 band 비율을 나타내는 지점과 상응하는 genomic DNA 농도, internal control plasmid 농도를 각각 X, Y축으로 하여 standard curve를 구축하였다. Cell 수는 100% DNA 추출 및 동일 16S copy number를 가정하고 계산하였다.

### 4. In vitro 실험 및 분석

배양초기 pH를 5.8, 6.2와 6.8로 다르게 하였을 때 cellulose에 부착한 *F. succinogenes*를 분석하기 위하여 McDougall Buffer(McDougall, 1948)를 이용하여 *in vitro* 배양을 실시하였다. 우선 반추위액과 CO<sub>2</sub>로 환원된 McDougall Buffer를 1:2(v/v)로 혼합한 후 60 ml를 0.5 g의 Sigmacell<sup>®</sup> cellulose(Sigma, USA)가 들어있는 125 ml serum bottle에 혐기적으로 분주하여 48 시간 동안 39°C에서 배양하였다. 이때 *in vitro* 발효액의 배양초기 pH는 HCl의 첨가량을 달리 하여 pH 6.8, 6.2 그리고 5.8로 조절하였다. 이때 반추위액은 농후사료와 알팔파를 4:6으로 하루에 2회씩(09:00, 17:00) 일개월간 급여한 누관이 장착된 체중 500 Kg의 Holstein 거세우로부터 채취한 것을 네 겹의 cheese cloth로 거른 후 사용하였다.

*In vitro* 배양은 각 pH 처리마다 3반복으로 실시하였고, 배양기간 동안 가스 생산량, pH 변화, cellulose DM 소화율 및 cellulose에 부착한 *F. succinogenes*를 분석하기 위하여 배양 후 0, 10분, 2, 4, 8, 12, 24 그리고 48 시간째에 샘플링을 하였다.

가스 생산량은 detachable pressure transducer와 digital readout voltmeter (Laurel Electronics,

USA)로 가스 생성량을 측정하였으며, 배양액의 pH는 pH meter(Mettler® Delta 340, Mettler-Toledo AG, UK)로 측정하였다. 그리고 cellulose의 DM 소화율은 배양액을 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 침전물을 60℃에서 48 시간 동안 건조하여 칭량한 DM을 최초 첨가한 양에서 감하여 계산하였으며, 이때 DM량은 cellulose를 첨가하지 않은 배양물(Blank)로 보정하였다.

Cellulose 부착 *F. succinogenes*의 cell number 계산을 위한 DNA는 배양액을 12,000 × g에서 10분간 원심 분리한 cellulose를 0.9% NaCl로 2 번 세척한 후 동결 건조하여 사용하였다.

### 5. 통계처리

각 처리구별로 3반복씩 수행된 *in vitro* 시험을 통해 각각 시간 때에 수집된 샘플로부터 분석된 가스 생산량, cellulose DM 소화율 및 *F. succinogenes*의 부착에 관한 연구 결과의 수치는 SAS(1996)의 ANOVA(Analysis of Variance) Procedure로 분석하였고, 평균의 처리간 유의성은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 이용하여 검정되었다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. *F. succinogenes*를 위한 cPCR용 standard curve 구축

동일한 primers로 샘플 DNA와 internal control (competitor target)을 동시에 증폭하는 분자 생물학적 기법 즉, cPCR를 이용하여 반추위 내 특정 박테리아의 생태를 정확히 추적하기 위해서는 종 특이적 primer의 선정이 정확히 이루어져야 한다. 또한 샘플로부터 증폭된 DNA 절편과 구별 될 수 있는 크기의 internal control의 제작 및 샘플과 internal control을 동일한 primer로 증폭할 수 있는 PCR 조건의 확

립이 우선적으로 이루어져야 한다(Reilly와 Attwood, 1998; Reilly 등, 2002). 그리고 이렇게 구한 cPCR 결과와 박테리아 수(cell equivalent)의 관계를 구하여야 한다.

따라서 *F. succinogenes*를 위한 종 특이적 primer는 Koike와 Kobayashi(2001)가 보고한 것을 선정하였으며, 본 실험실에 보유 중인 반추위 박테리아 *F. succinogenes*, *S. bovis*, *R. flavefaciens*, *R. albus* 등과도 primer 특이성을 확인하였다(결과 미 제시). 그리고 선정된 primer를 이용하여 *F. succinogenes*의 genomic DNA로부터 445bp 크기의 DNA 절편과 205bp의 internal control을 제작하였고(Fig. 1), 각 단계마다 생산된 DNA 절편을 전기영동한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 원래 의도한 band들 즉, *F. succinogenes*의 genomic DNA로부터 445bp의 band와 이를 제한효소 *Ssp* I와 *Sma* I로 절단된 240, 146 그리고 59bp의 band들을 얻을 수 있었다.

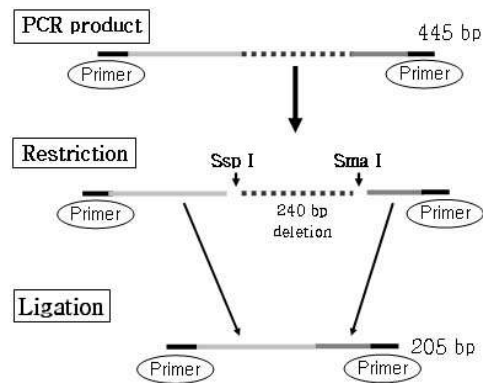


Fig. 1. Construction of internal control construction for the detection of *F. succinogenes*.

특이적 primer와 internal control를 사용하여 cPCR용 표준곡선을 만들기 위하여 순수 배양한 *F. succinogenes*에서 추출한 genomic DNA를 정확히 정량하였다. 그리고 각각의 genomic DNA를 균일하게 희석하여 internal control과 함께 cPCR를 수행하였을 때, Fig. 3A에서와

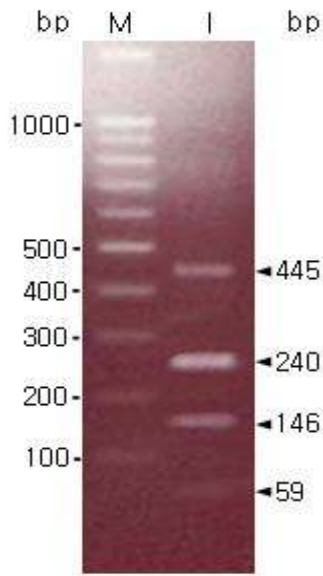
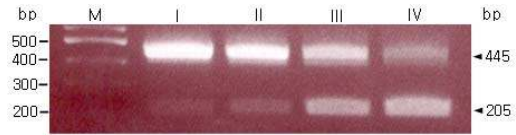


Fig. 2. Construction of target and internal control DNA for the detection of *F. succinogenes*. PCR product (445 bp) from genomic DNA was restricted to three fragments, 240, 146 and 59 bp by using *Ssp* I and *Sma* I. (M: Ladder marker, I: PCR product and restricted fragments).

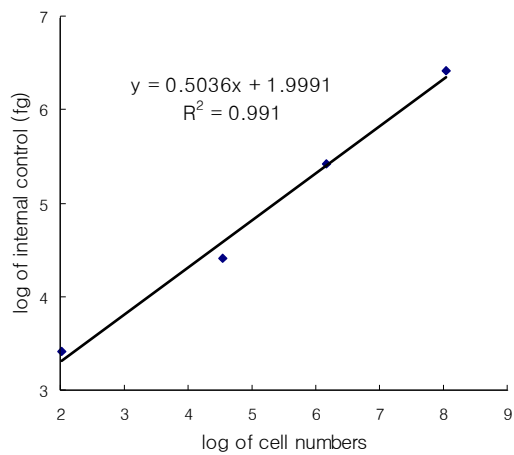
같이 genomic DNA의 농도가 낮아짐에 따라 gel 상의 밴드형성(445bp)이 약해지었고 이에 상응하여 internal control의 밴드(205bp)는 점점 강하게 형성되었다. 이때 260pg 농도의 internal control을 사용하여 genomic DNA 농도가 5.5~110ng의 범위에서 DNA 증폭이 이루어 졌는데, genomic DNA와 internal control의 band 강도 비율과 genomic DNA 농도 사이의 상관 관계는 Fig. 3B와 같았다.

이와 같은 cPCR의 원리를 이용하여 목표 DNA 절편과 internal control DNA 절편의 band 강도가 1:1 비율로 형성되는 지점을 찾기 위하여 internal control을 균일하게 희석하고 각각의 희석된 internal control에서 대하여 genomic DNA를 여러 농도로 희석하여 cPCR을 실시하였다. 그 결과 목표 DNA 절편과 internal



(A)

(B)



(C)

Fig. 3. Establishment of standard curve for detecting *F. succinogenes*. Genomic DNA of *F. succinogenes* cells was serially diluted and coamplified with internal control (A). The ratio of the intensities of internal control to the target DNA was plotted against the dilution of the target DNA on a log scale (B). The concentration of internal control were plotted against the cell numbers (C).

control DNA 절편의 band 강도가 1:1 비율로 형성되는 internal control의 농도와 genomic DNA 농도의 상관관계를 나타내는 그래프를 구하였다. 그리고 이를 토대로 genomic DNA 농도를 균수로 환산하여 internal control 농도와 균수 사이의 상관관계를 나타내는 표준 곡선인 Fig. 3C를 만들 수 있었다. 이때 균수는 genomic DNA 농도를 single cell의 DNA 농도로 나누어 얻었다. 즉, *F. succinogenes*의 genome size와 1Kbp의 DNA weight(1.1 attogram)를 이용하여 single cell의 이론적인 DNA 농도를 계산하고 이를 균수로 환산하였다. 이때 대입된 genome size 값은 3.6 Mbp이었다 (Ogata et al., 1997).

이상과 같이 internal control과 함께 샘플 DNA를 경합 증폭시키는 cPCR 결과들은 반추위 박테리아의 수를 측정하기 위해 이미 사용되었는데, Reilly 등(2002)은 질소와 탄수화물에 따른 단백질 분해 박테리아의 생태 변화 연구에, 그리고 Koike와 Kobayashi(2001)는 섬유소 분해 박테리아(*F. succinogenes*, *R. albus* 및 *R. flavefaciens*) 군집변화 추정에 본 기법을 이용한 바 있다. 본 연구의 결과도 지금까지의 기존 연구 결과들과서와 마찬가지로 반추미생물의 수를 추정하는데 잘 이용될 수 있음을 입증해 주고 있다.

## 2. pH가 다른 *in vitro* 배양조건에서 섬유소에 부착된 *F. succinogenes*의 모니터링

반추위 pH가 조사료의 소화에 현저히 영향을 준다는 것은 오래 전부터 잘 알려진 사실이다. 이러한 결과에 대한 원인으로 지금까지는 미생물 군집의 변화(Russell과 Rychlik, 2001), 낮은 pH에서의 미생물의 생존 능력(Russell and Wilson, 1996) 등으로 설명해 왔으나, 최근 (Mourino 등, 2001)의 연구에 의하면 반추위의 pH가 섬유소 분해 박테리아의 부착정도를 변화시키는 것도 한 원인으로 들 수 있다. 따라

서 pH에 따른 *F. succinogenes*의 cellulose 분해와 cellulose 부착을 cPCR로 모니터링한 결과는 다음과 같다.

본 연구 결과에 의하면 배양액의 pH 조건이 48시간 배양하는 동안 cellulose 소화(Fig. 4), 발효 현상(Fig. 5과 6) 및 *F. succinogenes*의 섬유소 부착(Fig. 7)에 현저한 영향을 주었다. Cellulose 분해는 배양시간이 진행됨에 따라 증가되었으며 초기배양 pH가 증가함에 소화율이 높아졌다(Fig. 4). 배양 초기 4시간 동안은 cellulose 분해 지체기(lag time)로서 소화율이 낮았고 처리간에 차이가 없었으나, 그 이후에는 pH 6.2와 6.8의 소화율이 pH 5.8과 뚜렷이 차이를 보이기 시작하였다( $p < 0.05$ ). pH 6.2와 6.8 처리간에 cellulose 소화 증가율은 24시간까지 차이가 없었으나, 그 이후에는 초기 pH가 6.8 일 때가 현저히 높았다( $p < 0.05$ ). 배양 48시간 후 건물 소화율을 비교하여 보면 pH 6.8이 39.22%로 가장 높았고, pH 6.2는 28.11%이었으며, pH 5.8은 소화율이 단지 9.7%에 불과하였다.

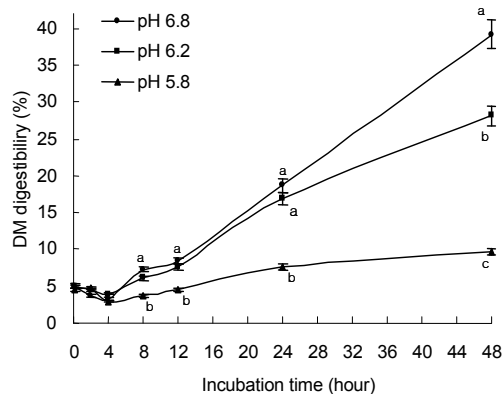


Fig. 4. Dry matter digestibility of cellulose as affected by the initial pH of incubation medium.

이와 같은 실험 결과는 알팔파의 NDF 소화율이 pH 6.2보다 pH 5.8에서 현저히 낮았고, pH가 낮으면 섬유소의 발효 개시에 소요되는

지체기가 훨씬 길었다고 보고한 Grant(1994)와 Grant와 Weidner(1992)의 실험 결과와 유사 하였다. 그리고 Mould 등(1984)은 pH 6.0 이하에서는 섬유소 발효가 완전히 억제됨을 *in vivo* 실험을 통하여 보고하였고, 섬유소 박테리아의 섬유소 분해를 위한 반추위의 적정 pH 환경은 6.0에서 7.0이라는 사실이 Owens 등(1998)에 의해보고 된 바 있다.

다( $p < 0.05$ ). 이와 유사한 결과로 Mourino 등 (2001)은 초기 발효 pH조건이 *in vitro* 발효와 pH 변화에 영향을 미침을 보고하였으며, 또한 초기 발효 pH 6.6에서 CO<sub>2</sub>가 많이 생산되었고 pH가 5.3으로 감소함에 따라 CO<sub>2</sub> 생산량이 직 선인 감소를 보였다고 보고한 바 있다.

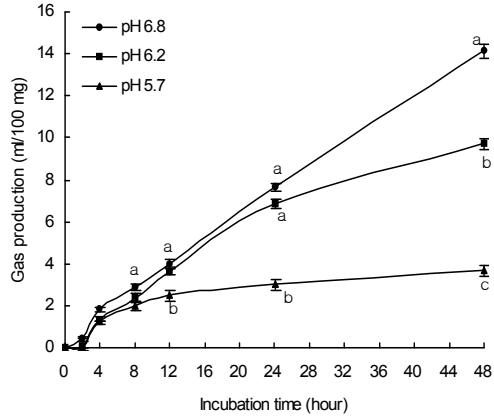


Fig. 6. Effect of different initial pH on gas accumulation during the fermentation.

Fig. 5. Medium pH changes as influenced by the initial pH of incubation medium.

본 실험에서는 초기 pH가 전 발효기간 동안의 반추위액 pH 변화에 영향을 미침을 보여주고 있다(Fig. 5). pH 6.8, 6.2 그리고 5.8, 모두 배양시간이 경과함에 따라 pH가 감소하였으나, 그 감소 폭은 초기 pH에 따라 달라서 48시간 동안 각각 0.24, 0.58 그리고 0.16 정도씩 감소되었다. 이들 pH 감소는 미생물의 cellulose 분해 산물에 의한 것으로 DM 소화율과 상관관계가 있음을 Fig. 4와 비교해 보면 알 수 있다. 가스 생산량은 발효 시간이 경과함에 따라 초기 pH가 높을 때 더 크게 증가하였다(Fig. 6). 이러한 증가 경향은 DM 소화율과 아주 유사한 것으로, pH 6.8과 6.2는 12시간 이후부터 pH 5.7과 큰 차이를 보였으며, pH 6.8과 6.2 시험구 간에는 24 시간 후부터 큰 차이를 보였

발효 초기 pH는 *F. succinogenes*의 cellulose 부착에도 큰 영향을 주었다(Fig. 7). 발효과정 전 기간동안 초기 pH가 6.8과 6.2일 때 cellulose 건물 g당 부착 균주의 수가 pH 5.6일 때에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 pH 6.8과 6.2 사이에는 cellulose에 부착된 균수에 큰 차이가 없었다( $P > 0.05$ ). 이와 같이 *F. succinogenes*는 pH 배양조건에 민감하였는데 Roger 등(1990)도 pH가 4.5에서 6.0으로 증가함에 따라 *F. succinogenes*의 cellulose 부착이 증가함을 관찰하였으며, pH 6.0과 7.0에서 가장 안정된 부착을 보았으나 pH 7.5 이상에서는 급격한 부착력 약화를 보고하였다. pH 6.8과 6.2의 부착 *F. succinogenes*의 분포는 발효 초기에 증가하다 잠시 감소추세를 보였으나(배양 4~8 시간) 다시 회복하여 배양 48시간까지 계속 증가하였다. 이러한 섬유소 부착 박테리아의 생태계 변화경향은 혼합배양으로 감소추세를 보

인 시기는 다르지만 Mourino 등(2001)도 발효 초기에 부착이 증가하다 감소하고 다시 회복되어 일정 수준을 유지하는 유사한 결과를 보고하였다. 반면에 pH 5.8에서는 pH 6.8 그리고 6.2와는 전혀 다른 양상으로 cellulose 부착 *F. succinogenes*의 수가 배양 2시간 이후에는 배양이 진행됨에 따라 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 앞으로 낮은 pH와 부착 미생물의 탈락 그리고 미생물의 성장과의 상관관계에 대하여 좀더 세부적 연구가 진행되어야 하겠지만 이 같은 현상은 낮은 pH로 인하여 초기에 부착한 *F. succinogenes*의 탈락이 증가되고, 성장이 억제된 원인도 있었기 때문으로 사료된다. 비록 pH가 반추박테리아의 부착율에 영향을 준다는 것은 이전에도 보고된 바 있으나 이들 연구는 대부분 P 또는 N과 같은 물질의 함량을 사용하여 간접적으로 측정된 결과들이며, 직접 박테리아의 수를 측정한 것은 본 연구가 최초인 것으로 생각된다.

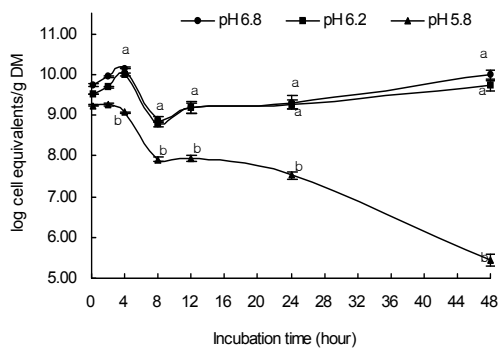


Fig. 7. The number of *F. succinogenes* attached to cellulose as influenced by the initial pH.

결론적으로 발효 초기 pH는 *F. succinogenes*에 의한 섬유소 소화, 가스 생산 및 박테리아의 cellulose 부착에 큰 영향을 주었다. 반추위액의 pH가 6.0 이하이면 섬유소 소화가 억제된다는 지금까지의 연구 결과는 본 연구가 재확인 하였으며, 또한 그 원인들 중 하나로

박테리아의 섬유소 부착 감소도 있었다는 사실을 역시 확인 할 수 있었다.

#### IV. 요약

본 연구는 배양초기 pH 조건이 *F. succinogenes*의 섬유소 부착과 섬유소 소화에 미치는 영향을 보고자 실시하였다. 선정된 specific primer를 이용하여 *F. succinogenes*의 genomic DNA로부터 445bp의 16S rDNA 절편을 증폭하여 205bp의 internal control을 제작하였고, cPCR 결과로부터 박테리아 수를 계산할 수 있는 표준곡선의 회귀식( $r^2 > 0.99$ )을 얻을 수 있었다. *In vitro* 배양초기 pH에 따른 *F. succinogenes*의 cellulose 부착을 cPCR로 모니터링한 결과, 발효과정 전 기간동안 초기 pH가 6.8과 6.2일 때 cellulose 건물 g당 부착 균주의 수가 pH 5.6일 때 보다 높았으나, pH 6.8과 6.2 사이에서는 큰 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). Cellulose 분해는 배양시간이 진행됨에 따라 증가 되었으며, 분해 정도는 pH가 증가함에 따라 더 높았다. 배양초기 pH가 6.8, 6.2 그리고 5.8일 때 48 시간동안 감소한 pH는 각각 0.24, 0.58 그리고 0.16 이었다. 가스 생산량은 발효 시간이 경과함에 따라 pH가 높을수록 더 많았다. 결론적으로 발효 초기 pH는 *F. succinogenes*에 의한 cellulose 소화, 가스 생산, pH 변화 및 cellulose 부착에 큰 영향을 주었으며, 특히, 낮은 pH(5.8)에서는 섬유소 소화 및 박테리아 부착을 현저한 감소 시켰다.

#### V. 사사

본 연구는 2004년에 농림기술관리센터, 농림기술개발연구과제(과제명: 미생물 부착 강화기술을 이용한 조사료 이용성 향상방안 개발)와 Brain Korea 21로 연구비 지원을 받아 이루어진 것으로 이 지면을 빌어 감사를 드립니다.



## VI. 인 용 문 헌

1. Bae, H. D., McAllister, T. A., Kokko, E. G., Leggett, F. L., Yanke, L. J., Jakober, K. D., Ha, J. K., Shin, H. T. and Cheng, K. J. 1997. Effect of silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65: 165-181.
2. Dehority, B. A., Tirabasso, P. A. and Grifo, A. P. Jr. 1989. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including in the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2789-2792.
3. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11:1.
4. Firsberg, D. W., Cheng, K. J. and White, B. A. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In *Gastrointestinal Microbiology*, R. I. Mackie and B. A. White (Eds), Chapman and Hall, New York, U.S.A, p319-379.
5. Grant, R. J. 1994. Influence of corn and sorghum starch on the *in vitro* kinetics of forage fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 77:1563-1569.
6. Grant, R. J. and Weidner, S. J. 1992. Digestion kinetics of fiber: influence of *in vitro* buffer pH varied within observed physiological range. *J. Dairy Sci.* 75:1060-1068.
7. Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press. New York, N. Y.
8. Koike, S. and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 361-366.
9. Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86:1429-1435.
10. McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A. and Cheng, K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72:3004-3018.
11. McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
12. Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrisont, M. 2001. Adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. *J. dairy Sci.* 84:1294-1309.
13. Mould, F. L., Ørskov, E. R. and Mann, S. O. 1984. Associative effects of mixed feeds. I. effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
14. Mourino, F., Akkarawongsa, R. and Weimer, P. J. 2001. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 84:848-859.
15. Ogata, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Sugiura, M., Tajima, K., Mitsumori, M., Sekizaki, T., Kudo, H., Minato, H. and Benno, Y. 1997. Construction of a *Fibrobacter succinogenes* Genomic Map and Demonstration of Diversity at the Genomic Level. *Curr. Microbiol.* 35:22-27.
16. Ogimoto, K. and Imai, S. 1981 *Atlas of Rumen Microbiology*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
17. Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J. and Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
18. Reilly, K. and Attwood, G. T. 1998. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:907-913.
19. Reilly, K., Carruthers, V. R. and Attwood, G. T. 2002. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. 43:259-270.
20. Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S. and Gouet, P. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3081.
21. Russell, J. B. and Rychlik, J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science.* 292:1119-1122.
22. Russell, J. B. and Wilson, D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest

- cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 70:1503-1509.
23. SAS. 1996. User's Guide, Version 6.12. Statistical Analysis System Inst. Inc. Cary NC. USA.
24. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910-929.
25. Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R. and Montgomery, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1079-1084.
26. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-227.
27. Woese, C. R. 1994. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol Rev.* 58:1-9.
28. 하중규, 이성실, 문양수, 김창현. 2005. 반추동물 영양생리학. 서울대학교출판부. pp122-249.  
(접수일자 : 2005. 5. 18. / 채택일자 : 2005. 8. 10.)