

무기물성 및 식물성 생리활성 물질이 반추위 미생물의 성장에 미치는 영향

신성환 · 이신자 · 옥지운 · 이상민 · 임정화 · 김경훈¹ · 문여황² · 이성실 *

경상대학교 응용생명과학부, ¹축산과학원 축산생명환경부 영양생리과, ²진주산업대학교 동물생명과학과

Received October 1, 2007 / Accepted November 13, 2007

Effects of Biologically Active Materials Prepared for Several Minerals and Plants on the Growth of Rumen Microbes. Sung Whan Shin, Shin Ja Lee, Ji Un Ok, Sang Min Lee, Jung Hwa Lim, Kyoung Hoon Kim¹, Yea Hwang Moon² and Sung Sill Lee*. *Division of Applied Life Science(BK 21), GyeongSang National University, ¹National Institute of Animal Science, Animal Nutrition and Physiology Division. ²Department of Animal Sci. & Biotech., RAIC, Jinju National University* - In order to know the effects of scoria, germanium, charcoal, ginger, stevia, and CLA(Conjugated Linoleic Acid) as biologically active materials on pathogenic microbes and rumen anaerobic microbes, the growth rate of pathogens (including *Escherichia coli* O157, *Salmonella paratyphi*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and *in vitro* rumen microbial growth, gas production, ammonia concentration, carboxymethyl-cellulase (CMCase) activity, and microbial populations were investigated. The growth of pathogenic microbes was inhibited by the supplement of 0.10% ginger. Ginger had powerful antimicrobial properties on all the pathogens used in this experiments. Additionally in the antibacterial assay by paper disc method, we could observe the clear zone of similar area with the positive control(antibiotics) for *E. coli* as applied with the 10% stevia or the 10% CLA only. The supplements of ginger, stevia and CLA in *in vitro* rumen fermentation inhibited populations of rumen bacteria and protozoa. Particularly supplement of ginger resulted in remarkable reduction of the protozoa population, which means it might serve as a source inhibiting material of methane creation in the rumen.

Key words : Biologically active materials, pathogenics, rumen microbes, microbial growth

서 론

경제성장과 국민소득 증대와 더불어 각종 성인병 발생이 증가함으로써 기능성 및 건강식품에 대한 수요가 급증함으로써 천연자원에서부터 소재개발에 많은 관심을 가지게 되었다. 축산식품 또한, 동물용 항생제의 오·남용 등으로 인한 문제점이 부각되면서 소비자들은 안전성이 확보된 건강한 생체 기능성 축산물을 선호하고 있다. 이러한 안전 축산식품 생산을 위한 하나의 방편으로써 천연 자원에 함유되어 있는 생리활성 물질들을 이용한다면 기능성과 더불어 안전성을 동시에 확보 할 수 있을 것으로 생각된다.

식물성 생리활성 물질재료로서 한방처방의 거의 절반이상 이용되고 있는 생강은 다년생 초본식물로서 그 특유의 맛과 향기를 지니고 있어 세계적으로 널리 이용되고 있는 향신료의 하나이며, 최근에 생강의 약리작용[19]이 많이 알려지고 있어 기능성 식품으로의 활용 등 이용범위가 넓어지고 있다. 약리의 효능으로는 생강 추출물의 DNA손상 억제작용[18], 항산화제 작용[20] 및 항균작용 등[22]이 보고되었고, 양 등[21]과 Lee 등[24]은 생강추출물의 농도에 비례하여 항산화 효과가 강하게 나타난다고 보고하였다. 남미가 주산지인 stevia는 stevioside 라는 설탕의 200-300배의 당도를 가지고 있

지만 칼로리가 매우 낮아(4 cal/g) 당뇨병, 고혈당증, 비만 및 충치를 억제하는 등의 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 무기물 기능성 물질로서 germanium은 각종 항암용 약제로 개발되어 의학적 치료영역에 적용되고 있으며, charcoal은 악취생성 억제[10] 및 유해물질의 제거[14] 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Scoria는 황토, 옥, 맥반석, 게르마늄석 등에는 없는 이산화티타늄이 천연상태로 3~7% 존재하여 광촉매작용을 하며, 제주산 scoria를 보조 사료로 사용 시, 사료 효율증대로 3~5%의 사료비 절감은 물론, 용존산소를 발생시키며 중금속 흡착능력이 뛰어나다[29]. 그 외의 다가 불포화 지방산인 CLA(conjugated linoleic acid)는 항암효과[3,8,16]가 있는 것으로 알려졌으며, 이후 항 돌연변이 및 항산화 효과[4,9] 등이 밝혀짐으로써 기능성 물질로서 관심이 매우 높다. 또한 CLA는 사료 중 포화지방산이 반추가축의 반추위내 미생물에 의한 발효과정 중 전환되는 지방산으로서 성장 촉진과 사료효율의 개선[2,25], 면역력의 증가[15] 등의 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀지고 있다.

본 연구는 생리적 활성이 있다고 알려져 있는 식용 가능한 식물성 또는 무기물성 유래의 몇 가지 생리활성물질을 이용하여 병원성 미생물에 대한 항균활성을 확인하고, 아울러 반추위 미생물에 대한 영향으로서 반추위 미생물 배양 시 가스발생량, 암모니아 농도, 섬유소 분해효소 활력 및 미생물의 수를 측정해 봄으로써 혐기성균에 대한 저해효과 여부도 확인해 보고자 수행되었다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5411, Fax : +82-55-751-5410

E-mail : lss@gnu.kr

재료 및 방법

생리활성물질 및 항생제

본 시험에 사용된 생리활성물질은 무기물성과 식물성에서 유래된 5종의 성분과 상업적으로 이용되고 있는 CLA (Materya사: State College, PA, USA)가 비교물질로서 공시되었다.

생강은 국내산을 시중에서 구매하여 잘 씻은 다음, 물기를 말리고 녹즙기로 즙액을 내었다. 식물에게 저온 stress를 부여함으로써 2차 대사성 활성물질 분비를 증가시키기 위하여 즙액을 냉동실(-4°C)에서 3일간 방치시켜, 비중이 큰 물질은 가라앉히고, 맑게 떠오른 상층액을 회수하여 filter paper로 거른 조추출액을 시료로 사용하였다. Stevia는 (주) 태경에서 생리활성물질로서 시판하고 있는 제품(구성성분: 효소처리 stevia 80% + Dextrin 20%), germanium는 (주)서봉 바이오베스틱 제품을 사용하였고, charcoal과 scoria는 (주) 한농차콜과 (주) Soap Plus에서 각각 구입하여 공시재료로 사용하였다. 생리활성물질의 농도(0.001, 0.01, 0.10, 1.00, 5.00 및 10.00%)는 용매로서 사용된 methylene chloride (CH₂Cl₂)의 양을 조절하여 맞추었다. 식물성 생리활성 물질들은 methylene chloride에 용해하여 사용하였고 무기물성 생리활성물질들은 methylene chloride에 부유시켜 사용하였다. Positive (+)대조구로서 사용된 항생제는 Sigma(Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Mo, USA)로부터 streptomycin sulfate(S9137), penicillin G potassium(P7794) 및 chloramphenicol(C1919)를 구입하여, 역가를 고려하여 각각 0.606 g, 0.132 및 0.030 g을 300 ml의 멸균증류수에 용해하여 사용하였다.

Table 1은 공시된 생리활성물질에 대한 정보를 나타내고 있다.

공시 미생물

병원성 미생물은 *Escherichia coli* O157(ATCC 700927D), *Salmonella paratyphi*(ATCC 9150), *Listeria monocytogenes*

Table 1. Biologically active materials used in the experiment

Materials	Features	Biological effect ¹⁾
Biologically active materials from minerals		
Scoria	powder	Nf, Ds
Germanium	powder	Nf, Ds
Charcoal	powder	Nf, Ds
Biologically active materials from plants		
Ginger extracts	powder	Am, Ma
Stevia	powder	Sweetener, Pg
CLA	liquid	Pi, Ai

¹⁾Ai : Accumulation Intramusclar, Am ; Antimicrobes, Ds ; Decreasing of bad smell, Nf ; Nitrogen of fecal, Ma : Medical action, Pg ; Promotion of growth, Pi ; Promotion of immune

(KCTC 3569) 및 *Staphylococcus aureus*(KCTC 1621) 4종을 축산과학원 동물병원에서 분양 받아 사용하였다.

반추위 cannula가 장착된 한우로부터 분리된 반추위 혼합 미생물은 Table 2의 Dehority's artificial medium [7]을 사용하여 Hungate [12]의 anaerobic gassing 방법으로 혐기배양하였다.

병원성 미생물에 대한 항균활성

공시한 병원성 미생물 4종이 동일한 량으로 혼합 배양된 시험관에 각각의 생리활성물질이 0.10%(v/v)가 되도록 첨가하여 0, 24, 48 및 96시간 동안 배양한 다음, 배양액을 채취하여 멸균 증류수로 3회 원심 분리시켜 세척한 후, 부유된 상층액을 spectrophotometer(Model EZ 201, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 650 nm에서 측정하였다.

항균활성 시험은 paper disc법을 이용하여 각 균주가 배양되어 있는 배지에 멸균증류수를 처리한 대조구(negative control), 시판 항생제를 처리한 항생제 처리구(positive control)와 methylene chloride (CH₂Cl₂)로 희석한 각각의 생리활성물질의 농도별(0.001, 0.01, 0.10, 1.00, 5.00 및 10.00%, v/v or w/v for biologically active materials prepared for plants or minerals/media)로 지름 5 mm의 Whatman #1 filter paper에

Table 2. The chemical composition of Dehority's artificial medium

Ingredients	100 ml
Mineral solution I ^{a)}	20 ml
Mineral solution II ^{b)}	20 ml
Resazurin	0.1 g
Rumen fluid ^{c)}	40 ml
Vitamin mixture ^{d)}	1.0 ml
V.F.A solution ^{e)}	6.7 ml
Casein(Acid Hydrolyzed Casein)	2 g
Hemin solution ^{f)}	0.1 ml
Carbohydrate(C-source)	0.5 g
8% Na ₂ CO ₃	5 ml
2.5% Cysteine-HCl	10 ml

^{a)}Mineral solution I : K₂HPO₄ 6.0g in 1,000 ml D.W.

^{b)}Mineral solution II : CaCl₂(anhydrous), 0.25 g; MgSO₄(anhydrous), 0.25 g; NaCl, 4.5 g; (NH₄)₂SO₄, 4.5 g; MnSO₄ · H₂O, 0.10 g; FeSO₄ · 7H₂O, 0.01 g in 1,000 ml D.W.

^{c)}Rumen fluid for culture media. Rumen fluid was obtained by filtering rumen contents.

^{d)}Vitamin solution : Pyridoxine HCl, 0.20 g; nicotinic acid amide, 0.20 g; Ca-d-pantothenate, 0.20 g; para-amino benzoic acid, 0.01 g; stock solution 1.0 ml in 1,000 ml D.W.

^{e)}VFA solution : Acetic, 17 ml(2.9×10⁻²M); propionic, 6 ml(8.0×10⁻³), n-valeric, isovaleric, and DL-α-methylbutyric acid, 1 ml each(9×10⁻⁴M).

^{f)}Hemin solution : Dissolve 50 mg hemin in 1 ml 1N NaOH ; make to 100 ml with water.

10 µl씩을 흡수시켜 용매는 증발시키고, 37°C에서 24시간동안 배양 후, clear zone을 관찰하였다.

반추위 미생물(박테리아, 프로토조아, 곰팡이) 수의 측정

반추위 박테리아는 Dehority's artificial medium에서 혐기 배양시킨 후, roll tube방법[11,12,28]으로 측정 하였다. 곰팡이는 Lowe's media [30]에 배양시킨 후, thallus 생성수를 측정하였다. 프로토조아는 살아있는 프로토조아와 죽은 프로토조아를 구분하여 측정하기 위해 TBFS 용액(trypan blue-formalin-salin; 증류수 900 ml, 35% formaldehyde 용액 100 ml, trypan blue 2 g, NaCl 8 g; dark blue 용액으로 living cell의 핵을 염색)으로 염색한 후, Abe 등[1]의 방법에 따라 plankton counter glass를 이용하여 현미경으로 측정하였다.

반추미생물의 가스 생성량 및 암모니아 농도

Serum bottle의 Dehority's artificial broth에서 혐기배양 중인 반추위 혼합 미생물에 methylene chloride로 희석한 (0.01, 0.10 및 1.00%) 각각의 생리활성 물질을 첨가한 후, 처리별 3반복으로 배양시간대에 따라 가스발생량을 측정하였다. 측정 전·후의 온도에 의한 오차를 줄이기 위하여 상온에서 20분간 방치 후, water displacement apparatus를 이용하여 측정하였다[25].

배양액의 암모니아의 농도는 Chaney와 Marbach [6]의 방법에 따라 측정하였다.

반추위 미생물의 carboxymethylcellulase (CMCase) 활성

반추위 혼합 미생물을 배양한 배양액을 10,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. CMCase 활성은 Miller 등[31]의 따라 0.1M acetate buffer (pH 5.0)에 CMC 1% (w/v)용액을 기질용액으로 하여, 위의 조효소액 0.5 ml과 CMC 기질용액 0.5 ml을 혼합하여 55°C에서 1시간동안 반응시켜 원심분리한 후, 상층액 0.2 ml에 DNS (Dinitrosalicylic acid) 0.6 ml을 추가하고, 100°C에서 5분간 진탕 반응시킨 다음, 상층액내 환원당 함량을 측정하여 구하였다.

통계처리

통계처리는 SAS package program [17]을 이용하여 분산 분석을 하였고, Duncan의 다중검정법으로 평균간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

병원성 미생물의 성장률과 항균활성 시험

병원성 미생물 배양액에 생리활성물질을 각각 0.10% 첨가하였을 때, 미생물의 성장률을 조사한 결과는 Fig. 1에서와 같다.

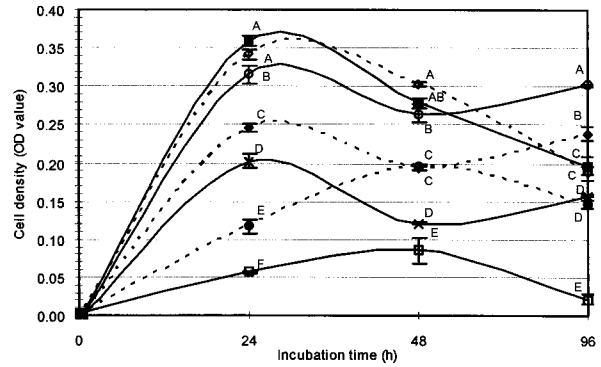


Fig. 1. Effect of 0.10% biologically active materials (●—●, Control; ◆—◆, Scoria; ×—×, Germanium; ◇—◇, Charcoal; □—□, Ginger; ■—■, Stevia; ○—○, CLA:Conjugated Linoleic Acid) on pathogenic cell growth. ABCDEF: The letters at the tops of the spots indicate statistical significance; means with different letters are significantly different (P<0.05).

대조구의 결과로 볼 때, 공시한 병원성 미생물들(*E. coli* O157, *S. paratyphi*, *L. monocytogenes*와 *S. aureus*)의 성장은 배양 후 48시간까지 지속적으로 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보였으며, 생리활성 물질로서 scoria, charcoal, stevia 및 CLA 첨가구에서는 병원성 미생물이 오히려 더욱 증가되었으나, 생강 첨가구에서는 항균활성을 나타내어 배양기간 동안 병원성 미생물이 거의 자라지 못하는 강한 항균력을 가지고 있어 병원성 미생물의 성장을 억제시키는 사료첨가제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다. 반추동물사료에서 병원성 미생물에 대한 항균활성은 사료의 저장기간을 연장시켜 주고 병원성 미생물에 의한 설사방지와 대사성 질병 등의 예방 효과 때문에 사료 첨가제로서의 개발 과정 중에 필수적으로 점검하는 항목 중의 하나이다. 그러나 생리활성 물질로서 scoria, charcoal, stevia 및 CLA 첨가가 오히려 병원성 미생물의 성장을 촉진시킨 결과를 구체적으로 확인하기 위해서는 병원성 미생물 세포막의 구조나 병원성 미생물의 종에 따른 보다 더 구체적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

공시 생리활성물질의 병원성 미생물 4종에 대한 paper disc법 활성 시험결과는 Fig. 2에서와 같다. 병원성 미생물 성장률 시험에서 배양액에 생리활성물질을 각각 0.10% 첨가하였을 때, 성장 억제 효과가 있었던 생강 첨가구(Fig. 1)에서 전혀 항균활성 효과를 나타내지 못한 반면 배지중 stevia 10% 첨가구와 CLA 10% 첨가구에서 *E. coli*에 대해서 positive control구와 비슷한 크기의 clear zone이 형성되었고 다른 처리구에서는 항균활성 효과가 전혀 없는 것으로 상이한 결과를 보였다. 이러한 결과가 극히 미량으로 수행되는 paper disc법에 의한 항균활성 구명시험의 한계인지 아니면 또 다른 원인이 있었는지는 추가적인 연구가 더 수행되어야 할

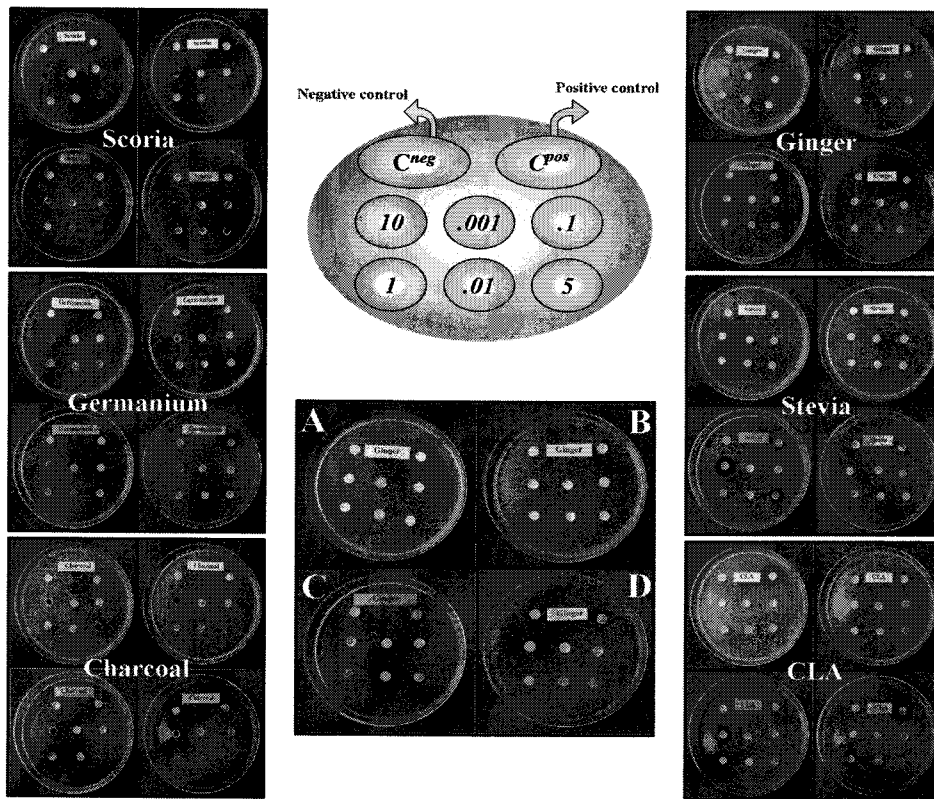


Fig 2. Clear zone as measured by supplemental levels (0.001, 0.01, 0.10, 1.00, 5.00 and 10.00%) of biologically active materials, control and antibiotic treatment. (A, *Staphylococcus aureus*; B, *Listeria monocytogenes*; C, *Escherichia coli* O157; D, *Salmonella parathphi*). CLA, Conjugated Linoleic Acid.

것으로 생각된다.

반추위 미생물 수

반추위액이 첨가된 Dehority's artificial media에 생리활성물질을 각각 1.00%씩 첨가하여 혐기 배양시켰을 때, 반추위 미생물(박테리아, 프로토조아, 곰팡이)의 수를 측정된 결과는 Table 3에서와 같다.

반추위 박테리아의 수는 charcoal 첨가구와 germanium 첨가구에서 가장 많았고, scoria 첨가구에서는 대조구와 차이가 없었으나 생강, stevia 및 CLA 첨가구에서는 대조구에 비해 유의적(P<0.05)으로 적었다.

반추위액 배양액 중, 살아있는 프로토조아의 수는 germanium, charcoal 및 scoria 첨가구에서는 대조구와 차이가 없었으나, 생강, stevia 및 CLA 첨가구에서는 대조구에 비해 유의적(P<0.05)으로 적은 것으로 나타났다. 죽은 프로토조아의 수는 생강과 scoria 첨가구에서 가장 많았고(P<0.05), stevia와 나머지 처리구간에는 비슷한 수준이었다. 메탄을 생성하는 세균들의 30% 이상이 프로토조아의 세포벽에 붙어서 생장하는 특징을 가지고 있어[23], 본 시험의 결과로 볼 때, 생강과 stevia 및 CLA를 이용하여, 특히 생강 첨가구에서는 살아있는 프로토조아의 수는 적고, 죽은 프로토조아 수는 많은

것으로 나타나, 반추위내에서 메탄을 생성하는 균들의 서식처인 프로토조아를 억제함으로써 메탄 생성량을 저감시킬 수 있을 것으로 생각된다. 반추위 곰팡이의 수는 대조구에서 가장 적었으며(P<0.05) 다른 처리구에서는 차이가 나타나지 않아 본 시험에서 사용된 생리활성물질이 반추위 곰팡이는 오히려 증식시키는 결과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 생강은 병원성균 뿐만 아니라 반추위 박테리아 및 프로토조아도 억제하고, stevia 및 CLA는 병원균에 대한 항균효과는 없었으나 반추위 박테리아와 프로토조아의 증식을 억제하는 것으로 나타나 이들 생리활성물질을 반추동물용 첨가제로서 사용할 경우, 적절한 첨가수준 결정이 매우 중요할 것으로 사료된다.

반추위 미생물 발효에 의한 가스 생성량

In vitro 반추위 미생물 발효 (12시간)에 의한 가스 생성량은 Fig. 3에서와 같다. 가스 생성량 조사에서 생강, stevia 및 CLA는 0.01% 및 0.10% 까지 첨가하였을 때는 반추위 미생물에 의한 가스 생성량에 영향을 미치지 않았으나, 1.00%로 높여서 첨가함으로써 가스 생성량이 유의적(P<0.05)으로 감소하였고, scoria 첨가구는 0.10과 1.00% 첨가에서 영향을 받지 않았으나 0.01% 첨가로 인하여 가스발생량이 유의적

Table 3. Microbial populations after 12 h incubation of the anaerobic media added 1.00% of biologically active materials

Biologically active materials	Microbes			
	Bacteria	Protozoa		Fungi
		Live cell	Dead cell	
cfu ¹⁾ ×10 ⁸	cell×10 ²	cell×10 ³	tfu ²⁾ ×10 ⁴	
Control	34.13±17.02 ^b	41.42±3.57 ^{ab}	19.58±4.37 ^b	11.27±6.23 ^b
Scoria	38.54±13.26 ^b	38.34±8.47 ^{ab}	39.57±7.32 ^a	22.58±3.58 ^a
Germanium	66.87±8.42 ^a	47.32±3.69 ^a	22.42±8.39 ^b	38.69±7.39 ^a
Charcoal	75.69±14.24 ^a	42.78±4.78 ^{ab}	19.71±8.87 ^b	29.57±5.12 ^a
Ginger	9.87±7.19 ^c	6.21±7.83 ^c	47.57±8.59 ^a	23.76±5.49 ^a
Stevia	13.45±3.28 ^c	29.75±9.34 ^b	27.47±12.21 ^{ab}	29.66±12.29 ^a
CLA ³⁾	9.32±2.64 ^c	12.08±2.53 ^c	21.23±5.19 ^b	41.18±17.89 ^a

Mean±standard error.

Mean with different superscripts in the same microbial fractions differ significantly (P<0.05).

¹⁾: colony formation unit/mL. ²⁾: thallus formation unit/mL. ³⁾CLA : Conjugated Linoleic Acid.

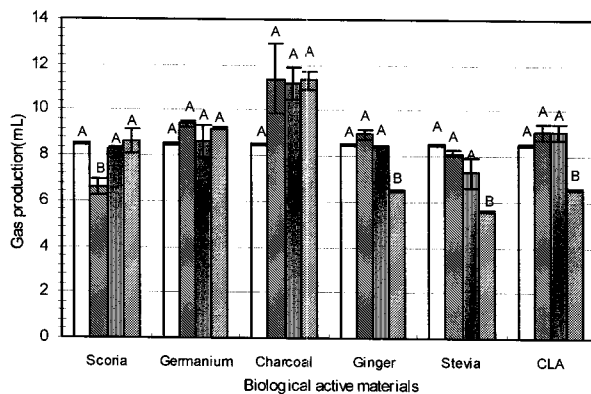


Fig 3. *In vitro* gas production from the head spaces of anaerobic medium after 12 h incubation by various supplemental levels (□; 0.00%, ▨; 0.01%, ▩; 0.10%, ▪; 1.00%) of biologically active materials. CLA, Conjugated Linoleic Acid. AB: The letters at the tops of the bar (length means standard errors) indicate statistical significance; means with different letters are significantly different (P<0.05).

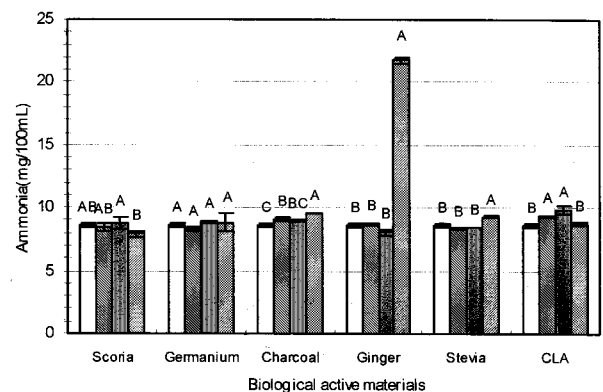


Fig 4. *In vitro* NH₄-N concentration in the supernatant of anaerobic medium after 12 h incubation by various supplemental levels (□; 0.00%, ▨; 0.01%, ▩; 0.10%, ▪; 1.00%) of biologically active materials. CLA, Conjugated Linoleic Acid. ABC: The letters at the tops of the bar (length means standard errors) indicate statistical significance; means with different letters are significantly different (P<0.05).

(P<0.05)으로 감소하여 첨가수준에 따른 효과가 다르게 나타났다. Germanium구와 charcoal구에서는 첨가수준에 따른 가스발생량에 차이가 없었다. 가스발생량과 반추위 미생물 성장이 밀접한 관계가 있음을 볼 때[13,27], 가스발생량이 급격히 떨어지는 첨가수준에서는 반추위 미생물 성장을 저해할 것으로 보아 생강, stevia 및 CLA를 반추위 미생물에 적용할 경우, 0.1% 정도에서 첨가수준이 결정되는 것이 바람직할 것으로 생각되었다.

반추위액 암모니아 농도

반추위액이 첨가된 *in vitro* 실험에서 생리활성물질 6종을 농도별로 처리하여 12시간 배양 후, 측정된 암모니아태 질소 농도는 Fig. 4에서와 같다.

배양액의 암모니아 농도는 생강 첨가구에서 1.00% 첨가시에만 높고, 타 처리구에서는 거의 비슷한 농도를 나타내었다. 암모니아는 대부분의 반추위 미생물 성장에 있어 필수적인 질소원이고[5,12], 단백질이 분해되어야 생성되는데, 생강 첨가구에서는 배양액 중 암모니아의 농도가 높은 것으로 볼 때, 미생물에 의한 단백질 분해(proteolysis)를 증가시킨 것으로 사료되는데 그 정확한 기전은 알 수 없었다.

반추위 미생물의 carboxymethylcellulase (CMCase) 활성

반추위액이 첨가된 *in vitro* 실험에서 생리활성물질 6종을 농도별로 처리하여 12시간 배양 후, 측정된 반추위 미생물의 CMCase 활성은 Fig. 5에서와 같다.

대조구와 비교하였을 때, scoria 첨가구의 경우 CMCase활

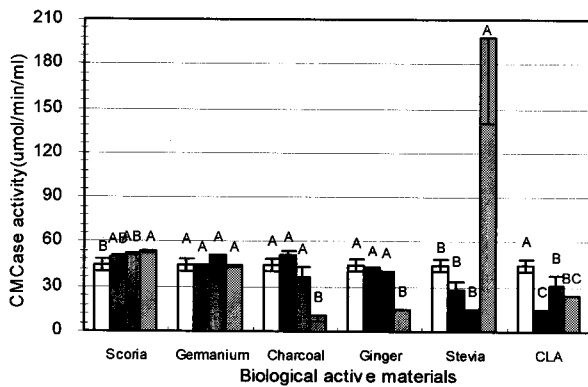


Fig 5. *In vitro* CMCCase activity in the supernatant of anaerobic medium after 12 h incubation by various supplemental levels (□; 0.00%, ▨; 0.01%, ▩; 0.10%, ■; 1.00%) of biologically active materials. CLA, Conjugated Linoleic Acid. ABC: The letters at the tops of the bar (length means standard errors) indicate statistical significance; means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

력이 높게 나타나 scoria의 특성이 반추위 미생물의 CMCCase의 활성을 촉진시키는 기작이 있는 것으로 사료된다. Stevia는 1.00% 첨가구에서 CMCCase의 역가가 경이적으로 높게 나타났는데, 이러한 이유는 stevia의 첨가로 인해 CMCCase 효소 활성이 높아진 것이 아니라 stevia는 80% 이상이 sucrose로 구성된 물질로서 높은 수준으로 첨가하면 배양액 속으로 stevia의 당들이 유리되므로 본 시험에서 유리 환원당의 수준으로 CMCCase의 역가를 측정하는 방법의 사용으로 인하여 급격한 증가를 나타낸 것으로 생각된다. 한편, germanium 첨가구에서는 첨가수준에 따른 차이가 없었으나, charcoal, 생강 및 CLA 첨가구에서는 0.01%까지는 CMCCase의 활력에 차이가 없었으나 1% 첨가시, 대조구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 떨어졌다.

요 약

본 연구는 무기물성 및 식물성 유래 생리활성물질로서 scoria, germanium, charcoal, 생강, stevia 및 CLA(conjugated linoleic acid)가 병원성 미생물 및 반추위 미생물에 대한 작용을 조사하기 위하여 수행되었다. 병원성 균으로서 *Escherichia coli* O157, *Salmonella paratyphi*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*에 적용하여 항균활성을 측정하고, *in vitro* 발효 시 반추위 미생물 성장률, 가스 생성량, 암모니아 농도, CMCCase 활성 및 미생물의 수를 측정하였다.

병원성 미생물 배양액에 생강을 0.1% 첨가한 구에서만 항균활성이 나타났으나, paper disc법에 의한 항균활성 시험에서는 stevia 10%첨가구와 CLA 10% 첨가구에서 *E. coli*에 대해서 항생제 첨가구인 positive control 구와 비슷한 크기의

clear zone을 형성하였다.

In vitro 반추위 미생물 발효시험에서는 생강, stevia 및 CLA가 반추위 박테리아와 프로토조아의 증식을 억제하는 것으로 나타났는데, 특히 생강 첨가구의 경우 메탄 생성균의 서식지로 알려져 있는 프로토조아를 크게 억제함으로써 메탄생성 억제제로서 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Abe, M., and F. Kumeno. 1972. Modifying method for counting protozoa. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **43**, 535-536.
2. Baumgard, D. E., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Saebo and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Ame. J. Phys.* **278**, 179-184.
3. Belury, M. A., K. P. Nickel, C. E. Bird and Y. Wu. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutrition Canc.* **26**, 149-157.
4. Benzamin, H., J. M. Storkson, K. Albright and M. W. Pariza. 1990. TPA-mediated induction of ornithine decarboxylase activity in mouse forestomach and its inhibition by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *FASEB J.* **4**, A508.
5. Bryant, M. P. and I. M. Robinson. 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* **44**, 1446-1456.
6. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* **8**, 130-132.
7. Dehority, B. A. 1965. Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.* **89**, 1515-1520.
8. E. J. Kim and M. S. Ahn. 1993. Antioxidative Effect of Ginger Extracts. *Kr. J. Soc. Food Sic.* **9**, 37-42.
9. Fedorak, P. M. and S. E. Hrwdey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* **4**, 425-432.
10. Ha, Y. K., J. M. Storkson and M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* **50**, 1097-1101.
11. Ha, Y. L., N. K. Geimm and M. W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcino Genesis* **8**, 1881-1887.
12. Hoffman, P. S., L. Pine, and S. Bell. 1983. Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl. Environ Microbiol.* **45**, 784-791.
13. Holdman, L. V., E. P. Cato and W. E. C. Moore. 1977. Anaerobic laboratory manual (4th ed.), Virginia Polytech. Inst. And Sate. Univ. Blackburg, Virginia. USA.
14. Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. pp. 92-446, Academic Press, NY. USA.

15. Hungate, R. E. 1968. Ruminal fermentation. Hand book of physiology. *Allimentary canal*. V, 2725-2745.
16. J. H. Kang, B. W. Ahn, D. H. Lee, H. S. Byun, S. B. Kim and Y. H. Park. 1988. Inhibitory Effects of Ginger and Garlic Extracts on the DNA Damage. *Kr. J. Food SCI. Technol.* **20**, 289-291.
17. J. K. Ha, S. S. Lee, Y. S. Moon, C. H. Kim. 2005. Ruminant Nutrition and Physiology. pp. 122-239, Seoul National University Press. Seoul, Korea.
18. J. K. HA. 2001. Study on the Development of Low Pollution Swine Diets and Improving Survival Rate of New Born Piglets. pp. 1-156, Korea Department Ministry of Agriculture and Forestry.
19. K. S. Yang, J. H. Yu, J. I. Hwang, R. Yang. 1974. Synergistic Effect of Citric Acid on Antioxidant Property of Red Pepper. *Kr. J. Food SCI. Technol.* **6**, 193-198.
20. Kakano, K., H. Kataoka and M. Matsumura. 1996. High density culture of Propionic-bacterium freudenreichii coupled with propionic acid removal system with activated charcoal. *J. Ferment and Boieng.* **81**, 37-41.
21. Lee, Y. B., Y. S. Kim and C. R. Ashmore. 1986. Antioxidant property in ginger Rhizome and its application to meat product. *Food Sci.* **51**, 20-23.
22. Lowe, S. E., M. K. Theodorou, A. P. J. Trinci and R. B. Hespell. 1985. Growth of an anaerobic rumen fungi on defind and semi-defind media lacking rumen fluid. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2225-2229.
23. M. L. Kim. 2002. Function of Spice and Herbs. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **12**, 431-453.
24. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **23**, 257-270.
25. Morries, J. G., R. L. Baldwin, W. J. Maeng and B. T. Maeda. 1975. Basic characteristics of a computer simulated model of nitrogen in the grazing ruminant. Tracer studies on non-protein nitrogen for ruminant. II. International Atomic Energy Agency. Vienna. Italy.
26. Park, Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu and M. W. Pariza. 1999. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* **34**, 235-241.
27. Parodi, P. W. 1994. Conjugated linoleic acid: An anti-carcinogenic fatty acid present in milk fat. *Aust. J. Dairy Technol.* **49**, 93-97.
28. S. S. Lee, J. K. Ha, Y. J. Choi, In K. Han, T. H. Moon and C. H. Kim. 1995. Studies on the Isolation and Identification of Rumen Fungi Characterization of Cellulolytic Fungal Enzymes, and Its Industrial Utilization. II. Effects of Chemical Treatment of Rice Straw and Animal Species Fed Rice Straw and Animal Species Fed Rice Straw on the Anaerobic Fungal Population in the Rumen. *Kor. J. Anim. Nutri. Feed* **19**, 411-418.
29. SAS. 1996. SAS Uaer Guide. Release 6.12 edition. SAS Inst. Inc. Cary NC. USA.
30. Scimeca, J. A. 1998. Toxicological evaluation of dietary conjugated linoleic acid in male Fisher 344 rats. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 391-395.
31. W. D. Ji, H. C. Chung, M. S. Jeong, S. J. Lee and Y. G. Chung. 1997. Antimicrobial Activity and Distilled Components of Garlic(*Allium sativum* L.) and Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **40**, 514-518.