

## 양(+) 이온성 및 음(-) 이온성 계면활성제 첨가가 반추위 혼합 미생물에 의한 *In vitro* 건물소화율 및 미생물 성장에 미치는 영향

이신자\* · 신년학\* · 김완영\*\* · 문여황\*\*\* · 김현섭\*\*\*\* · 하종규\*\*\*\*\* · 이성실\*  
 경상대학교 응용생명과학부\*, 한국농업대학 축산학과\*\*, 진주산업대학교 동물생명과학과\*\*\*,  
 축산과학원 축산자원개발부\*\*\*\*, 서울대학교 농생명공학부\*\*\*\*\*

## The Effects of Negative- and Positive- Charged Surfactants on *In vitro* DM Digestibility and the Growth of Ruminal Mixed Microorganisms

S. J. Lee\*, N. H. Shin\*, W. Y. Kim\*\*, Y. H. Moon\*\*\*, H. S. Kim\*\*\*\*, J. K. Ha\*\*\*\*\*, S. S. Lee\*

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University\*, Department of Animal Science, Korea National Agricultural College\*\*, Department of Animal Sci. & Biotech., RAIC, Jinju National University\*\*\*, National Livestock Research Institute, R.D.A\*\*\*\*, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University\*\*\*\*\*

### ABSTRACT

In order to investigate the effects of supplemental ionic surfactants in *in vitro* ruminal fermentation, N-Lauroylsarcosine sodium salt (N-LSS) and sodium dodecyl sulfate (SDS) for negative (−) ionic surfactant, and hexadecylpyridinium chloride monohydrate (HPCM) and hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB) for positive (+) ionic surfactant were supplemented by 0.05% and 0.1% into the Dehority's artificial medium containing rice straw (1 mm) as a substrate. *In vitro* DM digestibility, the growth of rumen mixed microbes, pH, cumulative gas production and SEM (Scanning Electron Microscopy) observation of microbial attachment on rice straw particle were investigated through the experiment composing 9 treatments (two supplemental levels of two positive ionic (+) surfactant, two supplemental levels of two negative (−) ionic surfactant) including the control. The sample collection was at 6, 12, 24, 48 and 72 h post fermentation with 3 replications per treatments. DM digestibility in treatments supplemented (+) or (−) surfactants almost stopped afterward 12 h fermentation, *in vitro* DM digestibility at 72 h post fermentation in the ionic surfactants was at half level of that of the control ( $P < 0.05$ ). Accumulative gas production in *in vitro* was less ( $P < 0.05$ ) with addition of ionic surfactants compared to the control. The amount of rumen mixed microbes recovered from *in vitro* incubation fluid plateaued at 12 h post fermentation for the positive (+) ionic surfactants, but steadily increased as fermentation time elapsed for the control. Rumen microbial growth rate was significantly ( $P < 0.05$ ) low in the negative (−) ionic surfactant compared to the control. pH of the incubation fluid was ranged from 6.02 to 7.20, and was the highest in the negative (−) ionic surfactants, and was the lowest in the control ( $P < 0.05$ ). In SEM observation, rumen microbial population attached on rice straw particle was less with addition of ionic surfactants than the control. In conclusion we could not found any positive effects of negative- and positive- charged surfactants on ruminal fermentation characteristics and rumen microbial growth rates.

**(Key words :** Negative-ionic surfactant, Positive-ionic surfactant, Digestibility, SEM)

---

Corresponding author : S. S. Lee, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel: +82-55-751-5411, Fax: +82-55-751-5410, E-mail: lss@gnu.ac.kr.

## I. 서 론

반추동물의 생산효율을 향상시킬 목적으로 반추위 환경을 조절하려는 노력들이 수십년간 지속되어 오면서 그동안 주로 사료급여 및 사양관리 시스템 개발(NRC, 2001)이 근간을 이루어 왔으나, 최근에는 유전공학, 효소공학, 생물공학, 미생물공학, 천연물화학 등의 발전으로 식물추출물, 향생제, 미생물제제, 계면활성제 등 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있다(Yang과 Russell, 1993; 이 등, 1997; Lee 등, 2003; Lee와 Ha, 2003; Busquet 등, 2006). 그중, 계면활성제인 surfactant는 미생물 세포막 표면에 부착하여 미생물에 대한 산소공급을 차단함으로써 호기성 미생물 성장을 감소시키며(Hulme와 Stranks, 1970), 세포내, 외의 효소를 유리시켜 효소기능 및 분비를 촉진 하는 것(Reese와 Maguire, 1969; Munn 등, 1983; Yazdi 등, 1990)으로 알려져 있다. 이러한 surfactant의 작용원리를 이용하여 반추위내 혐기성 발효를 촉진시키기 위한 제제로서 그 가능성이 높이 평가되어 왔는데, 지금까지 반추위 발효 조절 기능이 밝혀진 계면활성제는 비이온성으로서 반추동물의 소화율과 생산성에 기여할 수 있는 제제로서 인정받고 있다.

계면활성제를 이용한 일련의 시험 중, 앞서 수행한 비이온성 계면활성제와 양쪽 이온성(+/-) 계면활성제를 이용한 시험에서 비이온성 계면활성제는 *in vitro* 반추위 발효양상에 매우 긍정적인 결과를 얻었으나 양쪽 이온성(+/-) 계면활성제는 반추위 미생물에 오히려 독성으로서 작용하는 결과를 얻었다(De Oude, 1992). 또한 양(+)이온성과 음(-)이온성 계면활성제에 대한 국내의 연구가 전무한 사항이라 참고 자료를 찾을 수가 없었다. 따라서 본 시험은 일반적으로 많이 사용하는 양(+)이온 또는 음(-)이온성을 띠는 계면활성제를 선발하여 반추위 발효 정상 및 미생물 합성에 어떠한 영향을 미치는지를 규명해 보고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

## 1. 공시재료

*In vitro* 소화율 시험을 위한 기질로서 사용된 분쇄 볏짚(1 mm screen)을 AOAC법(1995)으로 분석한 화학적 조성은 건물기준으로 조단백질 5.07%, 조지방 1.35%, NDF, 75.41% 및 ADF 51.01% 수준이었다.

음(-)이온성 계면활성제(Negative-charged surfactant)로서 N-Lauroylsarcosine sodium salt(Sigma Cat No. L5777, N-LSS)와 Sodium dodecyl sulfate(Sigma, Cat No. L4509, SDS)를 사용하였고, 양(+)이온성 계면활성제(Positive-charged surfactant)로서 Hexadecylpyridinium chloride monohydrate(Sigma Cat No. C9002, HPCM)와 Hexadecyltrimethyl ammonium bromide(Sigma Cat No. H5882 ; HTBA)를 사용하였다.

2. *In vitro* 배양액

배양액은 Dehority와 Scott(1967)의 방법에 따라 제조하였다. 반추위액은 농후사료와 볏짚(40:60)을 섞취(체중의 2%)하는 반추위 누관이 장착된 홀스타인 착유우 2두(평균체중 500 kg)로 부터 시험 2시간 전에 채취하여 4겹의 cheese cloth로 여과하고 30분~1시간 정도 정치시켜 사료입자를 가라앉힌 후, vacuum 펌프로 상층액을 채취하여 사용하였다. 계면활성제 첨가구는 혐기상태로 주입된 Dehority's artificial medium에 양(+)이온성 및 음(-)이온성 계면활성제를 수준별(0.05%, 0.1%)로 첨가한 medium 15 ml 그리고 시료 0.2 g이 든 시험관에 처리된 위액 5 ml를 넣고 39°C의 shaking incubator에서 시간대별로 발효시킨 후, 분석 시료로 사용하였다.

## 3. 시험설계

*In vitro* 시험에서 2종의 음이온성(NLSS, SDS) 및 2종의 양이온성(HPCM, HTBA) 계면활성제의 반추위 미생물의 발효 효과에 대한 첨가 수준별 영향을 밝히기 위하여 0.05% 및

0.1% (v/w)의 첨가비율을 각각 설정함으로써 무처리 대조구와 함께 총 9 처리를 두었으며, *in vitro* 발효 시간 (6, 12, 24, 36, 48 그리고 72 h)에 따라 시료를 채취하여 처리 당 3반복으로 수행하였다.

#### 4. 조사항목 및 조사방법

##### (1) *In vitro* 건물소화율

Moore (1970) 방법에 따라 배양한 후 발효지표로서 배양액의 pH를 측정된 후, 미리 칭량된 filter paper (Whatman No. 541)를 통해 aspirator로 여과한 다음, filter paper에 남아있는 미소화물질을 105°C drying oven에서 12시간 동안 건조시킨 후, 아래 공식으로 구하였다.

$$\text{In vitro 소화율(\%)} = \frac{\text{발효 전 기질의 무게} - (\text{여과 후 남은 기질의 무게} - \text{Blank})}{\text{발효 전 기질의 무게}} \times 100$$

##### (2) Gas 발생량

각 발효시간대별(6, 12, 24, 36, 48 그리고 72 h)로 시험관을 shaking incubator에서 꺼낸 후, 온도에 따른 변화를 감안하여 상온에서 20분간 방치시킨 다음, 자체 고안된 water displacement apparatus를 이용하여 gas 발생량을 측정하였다 (Ferorak와 Hrwdey, 1983).

##### (3) 미생물 성장률

반추위 혼합 미생물의 *in vitro* 발효에 있어서 배양액 중 미생물 성장률은 각 발효시간대별(6, 12, 24, 36, 48 그리고 72 h) 시험관으로부터 발효액 1.5 ml를 tube에 취하고, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료 입자를 제거하고, 상층액을 취하여 14,000 rpm에서 3분간 재원심분리하여 미생물 pellet을 침전시킨 다음, 상층액은 제거하고 침전물에 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 첨가하여 교반하여 현탁 시킨다. 이 과정을 3회 반복한 후에 spectrophotometer (BIO-RAD Model 680)를 이용하여 550 nm에서 O.D. (optical density) 값을 비교하여 미생물 성장률을 구하였다.

##### (4) pH 변화

pH는 각 발효시간대별 (6, 12, 24, 36, 48 그리고 72 h) gas 발생량과 미생물 성장률 측정을 위한 시료 채취 후 pH meter(Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.

##### (5) 미생물 부착 양상의 전자현미경 (SEM) 관찰

SEM 관찰을 위한 시료의 준비는 발효 12시간 후 각 처리별로 비슷한 크기의 벧짚 fraction을 임의로 채취하여 Ho 등 (1988)의 방법을 응용한 전처리 방법을 이용하였다. 즉, 진공상태에서 시료의 변형을 방지하기 위하여 0.5%와 5% glutaraldehyde 용액으로 고정된 후, cacodylic buffer로 세척하여 유기용매 치환법으로 10, 20, 30, 50, 70, 90 및 100%의 ethyl alcohol을 차례로 30분간 통과시켜 탈수시켰다. 탈수가 끝난 시료를 임계점 건조법 (critical point drying method)으로 시료를 내압하여 mounting 시켰다. 진공 증착장치에서 금 (gold)을 분사하여 시료 표면에 증착시킨 후 SEM (Philips XL30 S FEG, Netherland)을 이용하여 관찰 (×5,000) 하였다.

#### 5. 통계처리

시험결과는 SAS (1999) program의 General Linear Model (GLM) procedure에 따라 처리되었으며, 각 처리구간에 유의성 검증을 위해 분산 분석을 실시한 후, Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 유의성을 검정하였다 (P<0.05).

### III. 결과 및 고찰

#### 1. *In vitro* 건물소화율

양(+)이온성 및 음(-)이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 반추위 혼합 미생물에 의한 발효시간별 벧짚의 *in vitro* 건물소화율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

반추위 혼합 미생물에 의한 벧짚의 건물소화율은 발효 6시간 경과시에는 양(+)이온성 계면

Table 1. The effect of negative-charged surfactant and positive-charged surfactant on *in vitro* DM digestibility(%) by rumen mixed microorganisms

Incubation time (h)	Item				
	Control	Negative-charged surfactant			
		N-LSS <sup>1)</sup>		SDS <sup>2)</sup>	
		0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	9.46±3.14 <sup>a</sup>	6.89±1.81 <sup>ab</sup>	5.24±0.33 <sup>b</sup>	6.71±0.56 <sup>ab</sup>	7.34±1.73 <sup>ab</sup>
12	20.85±1.46 <sup>ab</sup>	18.23±0.81 <sup>ab</sup>	18.83±2.65 <sup>ab</sup>	21.81±1.22 <sup>a</sup>	18.37±0.80 <sup>ab</sup>
24	25.9 ±1.05 <sup>a</sup>	21.84±1.59 <sup>a</sup>	19.35±0.56 <sup>a</sup>	22.38±0.40 <sup>a</sup>	21.02±2.54 <sup>a</sup>
48	31.59±1.39 <sup>a</sup>	22.02±1.30 <sup>a</sup>	20.69±2.58 <sup>a</sup>	23.93±0.42 <sup>a</sup>	23.11±3.67 <sup>a</sup>
72	44.23±0.10 <sup>a</sup>	25.02±1.12 <sup>b</sup>	23.80±0.41 <sup>b</sup>	24.20±1.57 <sup>b</sup>	24.30±0.33 <sup>b</sup>

Incubation time (h)	Item					
	Control	Positive-charged surfactant		Control		
		HPCM <sup>3)</sup>			HTAB <sup>4)</sup>	
		0.05 %	0.10 %		0.05 %	0.10 %
6	5.13±1.99 <sup>b</sup>	4.74±0.92 <sup>b</sup>	4.50±2.13 <sup>b</sup>	3.29±1.36 <sup>b</sup>		
12	18.29±0.94 <sup>ab</sup>	17.36±1.89 <sup>ab</sup>	16.26±0.82 <sup>b</sup>	15.03±1.89 <sup>b</sup>		
24	18.53±2.01 <sup>a</sup>	18.74±0.69 <sup>a</sup>	20.43±1.03 <sup>a</sup>	17.76±0.47 <sup>a</sup>		
48	20.42±0.18 <sup>a</sup>	20.01±1.07 <sup>a</sup>	20.91±1.62 <sup>a</sup>	21.42±0.56 <sup>a</sup>		
72	22.71±0.46 <sup>b</sup>	20.59±2.99 <sup>b</sup>	21.12±2.45 <sup>b</sup>	24.81±1.30 <sup>b</sup>		

<sup>1)</sup> N-LSS : N-Lauroylsarcosine sodium salt.

<sup>2)</sup> SDS : Sodium dodecyl sulfate.

<sup>3)</sup> HPCM : Hexadecylpyridinium chloride monohydrate.

<sup>4)</sup> HTAB : Hexadecyltrimethyl ammonium bromide.

Mean±SE(Standard error).

Mean with different superscripts in the same incubation time differ significantly (P<0.05).

활성제 첨가구가 대조구보다 낮았으며, 발효 12시간 이후부터 48시간 까지는 처리간에 유의한 차이가 거의 없었으나 72시간 발효 시에는 음(-)이온성 및 양(+)이온성 계면활성제 처리구 모두 대조구의 절반 수준으로 떨어져 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내었다. 계면활성제 첨가구의 경우, 발효 12시간 이후에는 건물소화가 거의 일어나지 않았다.

계면활성제의 선정에서 가장 중요한 사항은 계면활성제의 독성과 분해 시 생성될 수 있는 중간생성물의 잠재적인 독성이다. 이러한 독성에 대한 실험은 계면활성제의 각 종류별로 독성에 관해 연구한 De Oude (1992)에 의해 그

독성의 영향이 어느 정도인지 알려져 있다. 또한 독성을 가지는 계면활성제가 박테리아에게 어떻게 영향을 미치는지는 Helenius와 Simons (1975)에 의해 제시되었던 작용으로 지질과 세포막사이의 상호작용에서의 교란 그리고 계면활성제와 세포내 단백질 사이의 상호작용이라는 것으로 요약할 수 있다.

이러한 이론적 배경에서 볼 때, 본 시험에서 사용된 계면활성제가 가지는 자체 독성과 분해 시 생성될 수 있는 중간 생성물의 잠재적 독성에 의해 (De Oude, 1992) 건물소화율이 대조구보다도 낮아진 것으로 사료된다.

## 2. Gas 생성량

*In vitro* 시험에서 양(+)이온성 및 음(-)이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 반추위 혼합 미생물에 의한 발효시간별 가스 발생량은 Table 2에서 보는 바와 같다.

양(+) 혹은 음(-) 이온성 계면활성제 첨가는 반추위 혼합미생물의 발효에 의한 가스 생성량을 억제하여 전 발효시간대에 걸쳐 대조구에 비해 첨가구에서 유의적 ( $P<0.05$ )으로 낮게 나타났다. *In vitro* 발효 12~48시간동안 대조구의 경우는 반추위 미생물에 의해 시간당 0.26 ml/g 의 가스가 발생한 것으로 조사되었으나 이온성

계면활성제 첨가구에서는 시간당 평균 0.06 ml/g 수준에 지나지 않았다.

이온성 계면활성제의 첨가 수준에 따른 영향을 보면, 0.05% 보다 0.1% 수준에서 높거나 비슷한 수준을 보여 본 시험에 사용된 계면활성제 자체의 순수 독성에 의한 반추미생물의 발효억제라기 보다는 적정 첨가수준에 대한 문제도 있을 것으로 사료된다.

미생물 발효에 있어서 가스 생성량은 발효의 정도를 나타내는 중요한 지표로서 간주되고 있는데, 본 시험에서 무처리 대조구에 비해서 이온성 계면활성제 첨가구에서 가스 생성량이 크게 낮은 것은 사용된 계면활성제가 혐기미생물

Table 2. The effects of negative-charged surfactant and positive-charged surfactant on *in vitro* cumulative gas production( $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ ) by rumen mixed microorganisms

Incubation time (h)	Item				
	Control	Negative-charged surfactant			
		N-LSS <sup>1)</sup>		SDS <sup>2)</sup>	
		0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	5.60±0.25 <sup>a</sup>	3.43±0.27 <sup>bc</sup>	4.30±0.35 <sup>bc</sup>	4.33±0.44 <sup>bc</sup>	4.03±0.38 <sup>bc</sup>
12	5.67±0.24 <sup>a</sup>	3.73±0.27 <sup>bc</sup>	4.77±0.38 <sup>ab</sup>	4.40±0.42 <sup>b</sup>	4.47±0.66 <sup>b</sup>
24	8.73±0.03 <sup>a</sup>	5.10±0.15 <sup>de</sup>	6.67±0.64 <sup>b</sup>	5.73±0.23 <sup>bcd</sup>	6.37±0.32 <sup>bc</sup>
48	14.87±0.15 <sup>a</sup>	6.03±0.09 <sup>f</sup>	7.47±0.18 <sup>b</sup>	6.30±0.17 <sup>ef</sup>	6.70±0.15 <sup>de</sup>
72	17.40±0.23 <sup>a</sup>	6.40±0.06 <sup>e</sup>	8.47±0.13 <sup>b</sup>	7.53±0.18 <sup>cd</sup>	8.43±0.26 <sup>b</sup>

Incubation time (h)	Item			
	Positive-charged surfactant			
	HPCM <sup>3)</sup>		HTAB <sup>4)</sup>	
	0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	1.80±0.15 <sup>d</sup>	2.47±0.63 <sup>cd</sup>	4.00±0.25 <sup>b</sup>	4.23±0.26 <sup>b</sup>
12	2.70±0.35 <sup>c</sup>	3.77±0.15 <sup>bc</sup>	4.07±0.22 <sup>b</sup>	4.60±0.10 <sup>ab</sup>
24	4.53±0.26 <sup>e</sup>	5.43±0.18 <sup>cde</sup>	6.43±0.35 <sup>b</sup>	6.53±0.07 <sup>b</sup>
48	5.37±0.15 <sup>g</sup>	6.00±0.21 <sup>f</sup>	6.87±0.03 <sup>cd</sup>	7.20±0.06 <sup>bc</sup>
72	7.63±0.03 <sup>c</sup>	6.40±0.23 <sup>e</sup>	7.03±0.17 <sup>d</sup>	7.70±0.15 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup> N-LSS : N-Lauroylsarcosine sodium salt.

<sup>2)</sup> SDS : Sodium dodecyl sulfate.

<sup>3)</sup> HPCM : Hexadecylpyridinium chloride monohydrate.

<sup>4)</sup> HTAB : Hexadecyltrimethyl ammonium bromide.

Mean±SE(Standard error).

Mean with different superscripts in the same incubation time differ significantly ( $P<0.05$ ).

에 의한 발효를 억제하였거나 가스 생성자체를 억제하는 물질로서 작용하였다고 볼 수 있다.

### 3. 미생물 성장률

*In vitro* 시험에서 양(+)이온성 및 음(-)이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 발효 시간별 배양액 중 반추위 혼합 미생물 성장률은 Table 3에서 보는 바와 같다.

배양액 중 미생물 성장률은 0.52~1.00 수준으로서 양(+)이온성 계면활성제인 HPCM 및 HTAB 1% 첨가구에서 평균 0.89 및 0.88으로서 대조구의 0.78 보다 성장률이 높았다.

발효 초기 6~24시간까지는 양(+)이온성 계면활성제로서 HPCM과 HTAB를 0.1% 첨가한 구에서 대조구에 비해 미생물 함량이 각각 35% 및 28% 많았으나 ( $P<0.05$ ), 48시간 발효 이후부터는 대조구에서 비슷하거나 많은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 각 처리구의 미생물 성장 양상이 발효시간대별로 달랐기 때문인데, 양(+)이온성 계면활성제 첨가구는 12시간 발효 시에 미생물 성장률이 peak에 도달한 이후, 점차 감소하는 반면, 대조구에서는 72시간까지 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 음(-)이온성 계면활성제 첨가구는 반추위 미생물 성장률에 있어서 대조구보다 유의적으로 낮았

Table 3. The effects of negative-charged surfactant and positive-charged surfactant on *in vitro* microbial growth by rumen mixed microorganisms (O.D. value)

Incubation time (h)	Item				
	Control	Negative-charged surfactant			
		N-LSS <sup>1)</sup>		SDS <sup>2)</sup>	
		0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	0.61±0.01 <sup>bc</sup>	0.60±0.00 <sup>c</sup>	0.53±0.00 <sup>d</sup>	0.54±0.01 <sup>d</sup>	0.52±0.00 <sup>d</sup>
12	0.74±0.00 <sup>c</sup>	0.69±0.00 <sup>d</sup>	0.62±0.00 <sup>e</sup>	0.64±0.00 <sup>e</sup>	0.63±0.01 <sup>e</sup>
24	0.79±0.01 <sup>c</sup>	0.70±0.01 <sup>d</sup>	0.63±0.01 <sup>e</sup>	0.63±0.00 <sup>e</sup>	0.62±0.01 <sup>e</sup>
48	0.84±0.02 <sup>a</sup>	0.64±0.00 <sup>d</sup>	0.63±0.01 <sup>d</sup>	0.65±0.01 <sup>d</sup>	0.63±0.00 <sup>d</sup>
72	0.91±0.01 <sup>a</sup>	0.65±0.0 <sup>fgc</sup>	0.64±0.00 <sup>g</sup>	0.66±0.00 <sup>f</sup>	0.64±0.00 <sup>g</sup>

Incubation time (h)	Item			
		Positive-charged surfactant		
		HPCM <sup>3)</sup>		
	0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	0.66±0.00 <sup>b</sup>	0.94±0.02 <sup>a</sup>	0.64±0.02 <sup>bc</sup>	0.91±0.03 <sup>a</sup>
12	0.77±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.03 <sup>a</sup>	0.75±0.01 <sup>c</sup>	0.95±0.01 <sup>b</sup>
24	0.76±0.01 <sup>c</sup>	0.86±0.02 <sup>b</sup>	0.71±0.00 <sup>d</sup>	0.91±0.01 <sup>a</sup>
48	0.75±0.02 <sup>b</sup>	0.83±0.01 <sup>a</sup>	0.70±0.01 <sup>c</sup>	0.82±0.01 <sup>a</sup>
72	0.73±0.01 <sup>d</sup>	0.83±0.01 <sup>b</sup>	0.69±0.01 <sup>e</sup>	0.80±0.01 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> N-LSS : N-Lauroylsarcosine sodium salt.

<sup>2)</sup> SDS : Sodium dodecyl sulfate.

<sup>3)</sup> HPCM : Hexadecylpyridinium chloride monohydrate.

<sup>4)</sup> HTAB : Hexadecyltrimethyl ammonium bromide.

Mean ± SE (Standard error).

Mean with different superscripts in the same incubation time differ significantly ( $P<0.05$ ).

고, 발효시간의 경과에 따른 변화도 거의 나타나지 않아 미생물 성장을 억제하는 물질로서 작용한 것으로 사료된다.

#### 4. pH 변화

*In vitro* 시험에서 양(+)이온성 및 음(-)이온성 계면활성제의 첨가가 반추위 미생물에 의한 발효 시간별 pH 변화에 미치는 영향은 Table 4에서 보는 바와 같다.

반추위 혼합 미생물 배양액의 pH는 6.02~

7.20 수준으로 그 폭이 매우 컸는데, 음(-)이온성 계면활성제 첨가구에서 가장 높았고 (평균 7.02), 다음으로 양(+)이온성 계면활성제 첨가구였으며 (평균 6.80), 대조구에서 평균 6.44로서 가장 낮았다 (P<0.05).

계면활성제의 독성은 배양액의 pH에 따라서 독성이 다르게 나타나는데, pH 7 이상일 경우에는 양(+)이온성 계면활성제의 독성이 강하고, pH 7 이하의 경우에는 음(-)이온성 계면활성제가 강한 독성을 나타낸다 (Lang와 Wagner, 1993)고 하였다. 즉, 수소이온 (H+)의 농도가 높

Table 4. The effects of negative-charged surfactant and positive-charged surfactant on *in vitro* pH values by rumen mixed microorganisms

Incubation time (h)	Item				
	Control	Negative-charged surfactant			
		N-LSS <sup>1)</sup>		SDS <sup>2)</sup>	
		0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	6.80±0.02 <sup>b</sup>	7.20±0.05 <sup>a</sup>	7.09±0.03 <sup>a</sup>	7.14±0.05 <sup>a</sup>	7.08±0.06 <sup>a</sup>
12	6.71±0.02 <sup>d</sup>	7.01±0.04 <sup>a</sup>	7.03±0.01 <sup>a</sup>	6.94±0.03 <sup>ab</sup>	6.87±0.05 <sup>bc</sup>
24	6.55±0.02 <sup>c</sup>	7.13±0.02 <sup>a</sup>	7.03±0.08 <sup>a</sup>	7.01±0.03 <sup>a</sup>	7.06±0.05 <sup>a</sup>
48	6.10±0.01 <sup>e</sup>	7.00±0.03 <sup>a</sup>	6.97±0.04 <sup>abc</sup>	6.95±0.03 <sup>abc</sup>	7.00±0.02 <sup>a</sup>
72	6.02±0.02 <sup>d</sup>	7.03±0.01 <sup>a</sup>	6.98±0.02 <sup>ab</sup>	6.91±0.06 <sup>b</sup>	6.98±0.01 <sup>ab</sup>

Incubation time (h)	Item			
	Positive-charged surfactant			
	HPCM <sup>3)</sup>		HTAB <sup>4)</sup>	
	0.05 %	0.10 %	0.05 %	0.10 %
6	6.87±0.06 <sup>b</sup>	6.79±0.07 <sup>b</sup>	6.77±0.02 <sup>b</sup>	6.84±0.02 <sup>b</sup>
12	6.94±0.05 <sup>ab</sup>	6.94±0.01 <sup>ab</sup>	6.84±0.01 <sup>c</sup>	6.85±0.01 <sup>bc</sup>
24	6.79±0.04 <sup>b</sup>	6.81±0.02 <sup>b</sup>	6.76±0.04 <sup>b</sup>	6.84±0.02 <sup>b</sup>
48	6.74±0.01 <sup>cd</sup>	6.59±0.22 <sup>d</sup>	6.75±0.02 <sup>bcd</sup>	6.80±0.00 <sup>abcd</sup>
72	6.76±0.02 <sup>c</sup>	6.76±0.05 <sup>c</sup>	6.74±0.02 <sup>c</sup>	6.75±0.01 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> N-LSS : N-Lauroylsarcosine sodium salt.

<sup>2)</sup> SDS : Sodium dodecyl sulfate.

<sup>3)</sup> HPCM : Hexadecylpyridinium chloride monohydrate.

<sup>4)</sup> HTAB : Hexadecyltrimethyl ammonium bromide.

Mean±SE(Standard error).

Mean with different superscripts in the same incubation time differ significantly (P<0.05).

은 상황에서 과잉의 양(+)이온성 계면활성제가 첨가되면 생물체에 대한 독성을 나타낸다는 것을 의미하는데, 본 시험에서는 음(-)이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 오히려 배양액의 pH가 7 이상으로 높아지고, 미생물에 대한 독성을 의미하는 미생물 생성량이 처리구 중에서 낮았기 때문에 이온성 계면활성제가 독성을 나타내는 경우가 혐기성인 반추미생물에 있어서는 더욱 복잡한 환경적 기작으로 작용하고 있

는 것으로 사료된다.

이온성 계면활성제의 첨가수준에 따른 pH의 변화는 없었으며, 발효시간의 경과에 따른 pH 변화는 이온성 계면활성제 첨가구에서는 불규칙하였으나 대조구에서는 시간이 경과함에 따라 지속적으로 감소하였다. 대조구에서는 특히, 발효 48시간대에서 pH가 6.2로 급격하게 저하된 이후로 반추위 섬유소 분해균의 활성이 떨어지는 수준인 pH 6.2 이하로 지속되었는데,

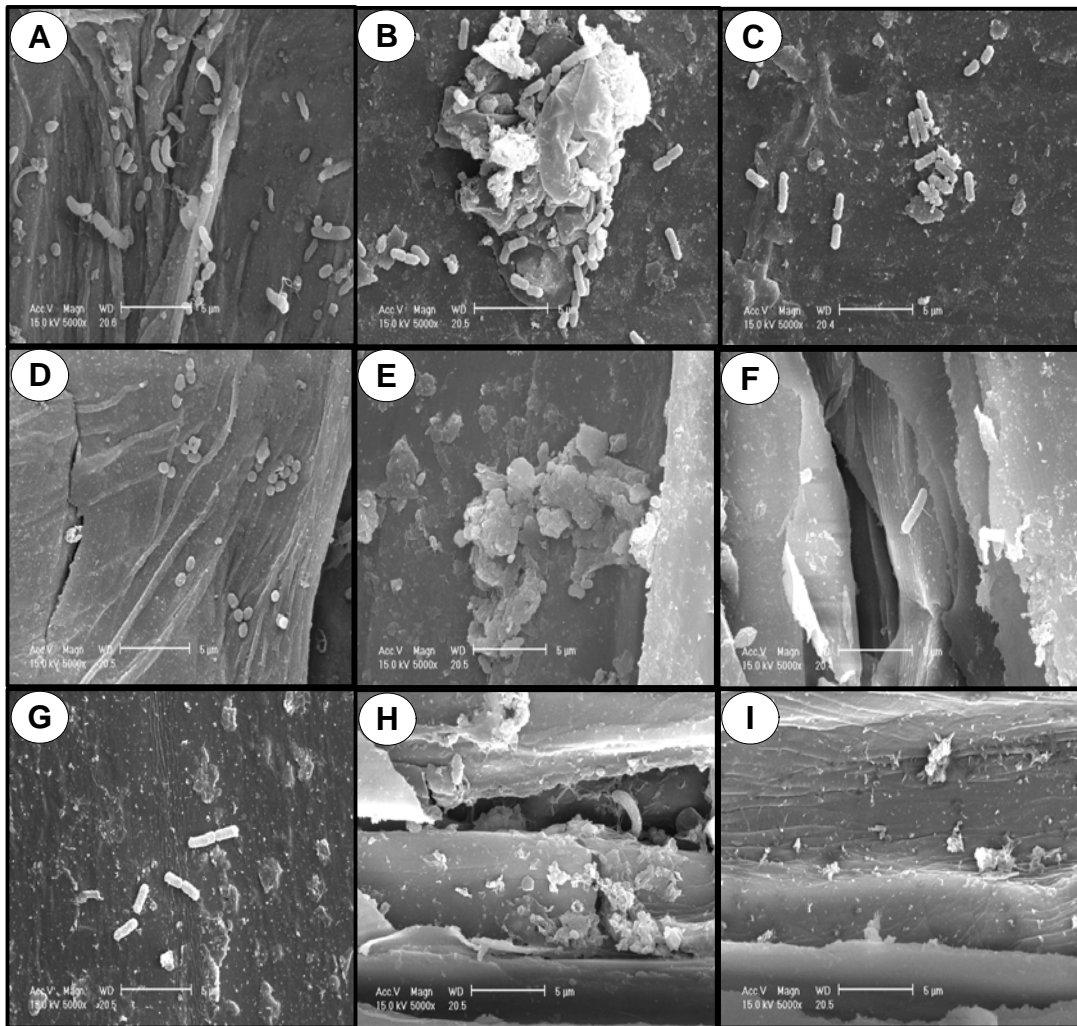


Fig. 1. SEM (Scanning electron microscopy) observation of *in vitro* microbial attachment on the surface of internode fraction of rice straw un-treated (A) and treated with negative-charged surfactant (B) 0.05% N-LSS,  $\times 5,000$ ; (C) 0.1% N-LSS,  $\times 5,000$ ; (D) 0.05% SDS,  $\times 5,000$ ; (E) 0.1% SDS,  $\times 5,000$ ) and treated with positive-charged surfactant (F) 0.05% HPCM,  $\times 5,000$ ; (G) 0.1% HPCM,  $\times 5,000$ ; (H) 0.05% HTAB,  $\times 5,000$ ; (I) 0.1% HTAB,  $\times 5,000$ ).



이 시기가 시간당 가스 발생량과 더불어 건물 소화율이 가장 왕성하게 일어나는 시기와 일치하고 있다.

## 5. SEM에 의한 미생물 부착 양상

전자현미경 (Scanning electron microscopy : SEM)을 이용하여 일반 배양액에서 발효된 볏짚 입자와 양(+) 이온성 및 음(-) 이온성 계면활성제가 첨가된 배양액에서 발효된 볏짚 입자에 대한 반추위 미생물의 부착 양상을 조사한 결과는 Fig. 1와 같다. 음(-) 이온성 계면활성제인 N-LSS (Fig. 1-㉑~㉒)와 SDS (Fig. 1-㉓~㉔) 그리고 양(+) 이온성 계면활성제인 HPCM (Fig. 1-㉕~㉖)와 HTAB (Fig. 1-㉗~㉘) 첨가구에서 무처리 대조구 (Fig. 1-㉙)에 비해 미생물 부착이 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 이러한 미생물 부착 양상으로 보아 양(+) 이온성 또는 음(-) 이온성 계면활성제는 볏짚입자에 대한 반추위 미생물의 부착을 방해하는 특성을 나타내고 있다는 것을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 양(+) 이온성 및 음(-) 이온성 계면활성제는 대조구에 비해서 반추위 발효특성이 좋지 않아 미생물 생성량이 떨어지고, 반추위 미생물의 사료 입자 부착을 저해함으로써 소화율에 있어서도 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났다.

## IV. 요약

본 연구는 반추위 미생물 발효에 있어서 계면활성제의 이온성 여부가 발효시간별 *in vitro* 건물소화율, 미생물 성장률, pH 변화, gas 생성량 및 SEM에 의한 미생물 부착 양상을 조사하기 위해 수행되었다. 분쇄 볏짚 (1 mm)을 기질로 하고, Holstein 젖소의 위액을 이용한 Dehority's artificial medium에 음(-) 이온성 계면활성제로서 N-Lauroylsarcosine sodium salt (N-LSS)와 Sodium dodecyl sulfate (SDS) 그리고 양(+) 이온성 계면활성제로서 Hexadecylpyridinium chloride monohydrate (HPCM)와 Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB)를 각각 0.05

% 및 0.10% 수준으로 배양액에 첨가하여 대조구를 포함하여 총 9처리를 두었다. 발효시간은 6, 12, 24, 48 및 72시간으로 설정하여 각 처리당 3반복으로 시험을 수행하였다. *In vitro* 건물 소화율에서 음(-) 이온성 및 양(+) 이온성 계면활성제 처리구는 발효 12시간 이후에 건물소화가 거의 일어나지 않았으며, 발효 72시간 후 건물 소화율은 계면활성제 첨가구 모두, 대조구의 절반 수준이었다 ( $P<0.05$ ). 가스 생성량은 전 발효시간대에 걸쳐 양(+) 혹은 음(-) 이온성 계면활성제 첨가구가 대조구에 비해 유의적 ( $P<0.05$ )으로 낮게 나타났다. 미생물 성장률은 양(+) 이온성 계면활성제 첨가구에서 12시간 발효 시 미생물 성장률이 peak에 도달한 이후, 점차 감소하는 반면, 대조구에서는 72시간까지 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었고, 음(-) 이온성 계면활성제 첨가구는 대조구보다 유의적으로 낮았다. 반추위 혼합 미생물 배양액의 pH는 6.02~7.20 수준으로 음(-) 이온성 계면활성제 첨가구에서 가장 높았고, 다음으로 양(+) 이온성 계면활성제 첨가구, 대조구 순으로 이었다 ( $P<0.05$ ). SEM에 의한 반추위 미생물의 볏짚입자 부착 양상에서 계면활성제 첨가구가 대조구에 비해 미생물 균집량이 적은 것으로 관찰되었다. 따라서 양(+) 이온성 및 음(-) 이온성 계면활성제는 반추위 발효 작용과 미생물 성장에 긍정적인 효과가 없는 것으로 사료된다.

## V. 사 사

본 연구는 BK 21 농생명산업 글로벌인재 육성사업단, 산업자원부 동물생명산업센터(RAIC)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## VI. 인용 문헌

1. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis 16th edition. Association of official analytical chemists,

- Washington, D. C.
2. Busquet, M., Calsamiglia, A., Ferret and Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761.
  3. De Oude, N. T. 1992. The handbook of environmental chemistry. Vol 3 part F: anthropogenic compounds. Springer Verlag, Heidelberg, FRG.
  4. Dehority, B. A. and Scott, H. W. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forage by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 50:1136.
  5. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11:1.
  6. Ferorak, P. M. and Hrwdey, S. E. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4:425.
  7. Helenius, A. and Simons, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biophys. Acta* 415:29.
  8. Ho, Y. W., Abdullah, N. and Jalaludin, S. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134:177.
  9. Hulme, M. A. and Stranks, D. W. 1970. Induction and the regulation of production of cellulase by fungi. *Nature, London* 226:469.
  10. Lang, S. and Wagner, F. 1993. Biological activities of biosurfactants. In: Kosaric *Biosurfactants*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
  11. Lee, S. S. and Ha, J. K. 2003. Influences of surfactants Tween 80 on the gas production, cellulose digestion activities by mixed rumen microorganisms. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:1151.
  12. Lee, S. S., Ahn, B. H., Kim, H. S., Kim, C. H., Cheng, K. J. and Ha, J. K. 2003. Effects of non-ionic surfactants on enzyme distributions of rumen contents, anaerobic growth of rumen microbes, rumen fermentation characteristics and performances of lactating cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:104.
  13. Moore, J. E. 1970. Procedure for two-stage *in vitro* digestion of forage. In L. E. Harrison(ed.). *Nutrition research technique for domestic and wild animals. J. Brit. Grassl. Sci.* 18:119.
  14. Munn, E. A., Hazlewood, G. P. and Graham, M. 1983. Uptake and incorporation of the products of proteolysis by the rumen bacterium *Bacteroides rumenicola* R8/4. *Curr. Microbiol.* 8:317.
  15. National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* Natl. Acad. Press, Washington DC.
  16. Reese, E. T. and Maguire, A. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied Microbiol.* 17:242.
  17. SAS. 1999. *SAS/STAT software for PC.* Release 8.01. SAS institute Inc., Cary, N. C., U.S.A.
  18. Yang, C. M. and Russell, J. B. 1993. The effect of monen supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vitro* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71:3470.
  19. Yazdi, M. T., Woodward, J. R. and Radford, A. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *J. Gen. Microbiol.* 136:1313.
  20. 이성실, 하종규, 강희신, Cheng, K. J. 1997. 반추위 혐기성 곰팡이의 산업적 활용 방안에 관한 고찰 : 종설. *한국낙농학회지.* 19:249.  
(접수일자 : 2007. 8. 7. / 채택일자 : 2007. 10. 19.)