

## 반추위에서 분리한 곰팡이의 Conjugated Linoleic Acid 생산과 ITS-1 영역의 염기서열 해석

남인식

농촌진흥청 축산연구소

반추위에서 분리한 곰팡이(IS-13)의 conjugated linoleic acid 생산 과정을 조사하고 conjugated linoleic acid를 생산하는 곰팡이를 동정하기 위하여 본 연구를 실시하였다. IS-13 곰팡이가 함유된 배양액에 linoleic acid를 첨가한 결과 linoleic acid는 배양 12시간 이내에 conjugated linoleic acid와 trans-11 vaccenic acid로 biohydrogenation되었다. IS-13 곰팡이의 동정은 internal transcribed spacer 1 영역(ITS1)을 sequence하여 GenBank 유래의 관련 23속(종)의 반추위 곰팡이와 비교하였다. IS-13 곰팡이의 ITS1의 length는 218 bp인 것으로 확인되었으며, 염기서열 분석 결과 *Orpinomyces* species와 98% 일치하여 반추위내 *Orpinomyces* species는 conjugated linoleic acid 생산에 깊이 관여하는 것으로 확인되었다. 연구결과 본 균주는 *Orpinomyces* 속에 속하는 균으로 동정되었다.

**Key words** □ biohydrogenation, conjugated linoleic acid, isolation, *Orpinomyces* species, rumen fungus

반추위에서 생산되는 conjugated linoleic acid (CLA)는 반추위 미생물의 biohydrogenation (BH)이라는 과정을 통하여 생산되는 지방산을 말하는데, 주로 조사료에 많이 함유되어 있는 linoleic acid (LA)의 cis-12 형태의 이중 결합이 isomerization되어 trans-11로 변화된 상태의 지방산이다. CLA가 인간의 건강에 미치는 영향으로는 항당뇨, 항암, 체지방감소, 면역력증강 등으로 이와 관련하여 많은 논문이 발표되고 있다.

1960년대와 1970년대를 거쳐 반추위 세균의 BH와 관련된 많은 세균이 분리되었다. Kemp와 Lander (16)는 분리된 미생물의 지방산 최종 산물을 기초로 하여 group A와 group B균으로 나누었다. BH에 의한 group A 세균의 최종 지방산은 주로 trans-11-octadecanoic acid (vaccenic, VA)이며 group B는 octadecanoic acid (stearic, SA)이다.

Polan 등(25)은 12종의 반추위 세균을 분리 한 후 그들의 BH 능력을 확인해 보았다. 그중 두 종의 *Butyrivibrio fibrisolvens* A38와 D1에서 LA를 CLA로 변환시키는 것을 확인하였다. Kemp 등(18)도 5종의 반추위 세균에서 BH 능력을 확인하여 미생물을 동정하여 F2/6 (*Ruminococcus* sp.), F2/2 (*Eubacterium* sp.), W461 (*Eubacterium* sp.), P2/2 (*Fusocillus babrahamensis*) 그리고 T344 (*Fusocillus* sp.)라고 명명하였다. 이 중 그람 양성 구균인 F2/6, 그리고 그람 양성 간균인 F2/2는 LA와 linolenic acid (LE)를 VA까지 변환시키는 것으로 확인되었으며 나머지 미생물은 SA로 변환시키는 것으로 보고되었다(18). 현재까지 알려진 반추위 세균 중 CLA 생산에 가장 깊게 관련하고 있는 미생

물로는 *Butyrivibrio fibrisolvens*으로 약 65%의 CLA를 생산할 수 있는 것으로 보고되고 있다(25).

반추위 미생물의 BH에 관한 연구는 1960년 초부터 시작하여 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 반추위 곰팡이는 반추위내에 서식하는 아주 중요한 미생물임에도 불구하고 그동안 진행되어 온 대부분의 연구는 반추위 박테리아에 국한되어 왔다. 따라서 본 연구의 목적은 반추위내 서식하는 곰팡이를 분리하여 분리된 곰팡이의 CLA생산능력을 조사하고 이를 동정하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 반추위액 채취, 곰팡이 배양 및 순수 분리

반추위액을 채취하기 위하여 반추위 케틀러가 장착된 홀스타인 젖소를 이용하였으며, 공사동물은 일일 3 kg (건물기준)의 건초 사일리지와 2.7 kg (건물기준)의 농후사료(91.5% wheat, 2.5% molasses, 0.5% soya oil, 5.5% minerals, vitamin)를 2회씩 정량하여 급여하였으며 물은 자유급수 시켰다. 반추위액은 반추위 케틀러를 통하여 내경이 1 cm인 진공펌프에 부착된 파이프를 통하여 혐기적 상태에서 채취하였다.

반추위액내 사료입자에 부착되어 있는 곰팡이를 분리하기 위하여 믹서기로 약 30초간 물리적 충격을 가한 후 두 겹의 cheesecloth로 사료입자를 분리하였다. 분리된 반추위액 중 1 ml를 취하여 항생제( $2 \times 10^4$  IU ml/ml의 benzylpenicillin, 2 mg ml/ml의 streptomycin sulphate, Sigma, Poole, UK)가 함유된 hay sloppy 배지(HS; Table 1)에 접종하여 39°C에서 3일간 배양 후 이중 10%를 취하여 항생제가 함유되지 않은 HS 배지에 계대배양 하였으며 이를 2회 반복하였다. 계대배양과정 중 또는 반추위

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-31-290-1664, Fax: 82-31-290-1666

E-mail: insiknam@rda.go.kr

**Table 1.** Composition (per litre) of Hay Sloppy medium, Cellobiose Agar medium and Cellobiose Sloppy medium used for culture and isolation of IS-13 rumen fungus

Component	Hay Sloppy	Cellobiose Agar	Cellobiose Sloppy
Solution A <sup>a</sup> (ml)	165	165	165
Solution B <sup>b</sup> (ml)	165	165	165
Rumen fluid <sup>c</sup> (ml)	170	170	170
Resazurin <sup>d</sup> (ml)	2	2	2
NaHCO <sub>3</sub> (g)	5	5	5
Yeast extract (g)	2	2	2
Peptone (g)	2	2	2
Cys-HCl·H <sub>2</sub> O (g)	0.2	0.2	0.2
Agar (g)	1	15	1
Hay <sup>e</sup> (g)	3	0	0
Cellobiose (g)	0	3	3
Glucose (g)	0	0	0
D.W. (ml)	485	451	485

<sup>a</sup>Solution A contained (g/L deionised water): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3; NaCl, 6; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3; CaCl<sub>2</sub>, 0.3; and MgSO<sub>4</sub>, 0.3.

<sup>b</sup>Solution B contained 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/L deionised water.

<sup>c</sup>Rumen fluid was filtered through 4 layers of cheese cloth, centrifuged for 30 min at 11,000×g, autoclaved at 125°C for 15 min, centrifuged again for 30 min at 11,000×g, gently bubbled with O<sub>2</sub> free-CO<sub>2</sub> gas, and stored at 80°C until used.

<sup>d</sup>0.1% resazurin solution.

<sup>e</sup>Field-cured grass hay (mostly *Lolium perenne*, *Lolium Multiflorum* and *Phleum pertense*); oven-dried then ground using a blender for 5 min

<sup>f</sup>Purite water with 0.2 micron filtration (Purite Ltd, Oxford, UK) sufficient to make up to 11.

박테리아의 오염여부를 확인하기 위하여 현미경과 spectrophotometer를 이용하여 배양액 중 생존해 있을지 모르는 박테리아를 관찰 또는 O.D.를 매일 측정하였으며 박테리아에 오염되지 않은 반추위 곰팡이 배양액 중 1 ml을 취하여 농도를 희석 후 Cellobiose Agar 배지(CA, Table 1, 15)가 함유된 roll tubes에 접종하여 39°C에서 약 4-5일간 혐기상태로 배양하였다. Roll tube 내에 생성된 곰팡이 colony는 멸균된 유리 피펫(20 cm)을 이용하여 선별하였으며 이를 HS 배지에 접종하여 39°C에서 5일간 배양하였다. 분리된 IS-13곰팡이의 CLA 생산능력을 알아보기 위하여 본 시험에 사용하였다.

#### 반추위곰팡이의 CLA 생산 및 pH 변화

본 시험에 시료로 사용된 지방산 linoleic acid (LA, C18:2<sub>cis</sub>, 9<sub>cis</sub>-12)용액은 Kim 등(19)의 방법에 따라 제조하였다. 분리된 IS-13 곰팡이는 HS 배지에 39°C에서 24시간 예비배양 후 LA 용액을 혐기적으로 주입시킨 다음 배양을 시작하였다. 배양 시작 후 72시간까지의 pH 변화를 알아보기 위하여 배양시간별(0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72)로 배양 tubes를 꺼내어 배양액의 pH를 측정하였다. 배양이 끝난 시험구는 얼음물에 넣어서 곰팡이의 활성

을 급격하게 낮추어 BH 반응을 멈추게 하였다. 시험구는 매 시험 당 동일한 조건에서 3배수로 시험을 실시하였다.

#### 지방산 추출 및 분석

IS-13 곰팡이 배양액에 함유된 지방산은 hexane-isopropanol을 이용하여 Hara와 Radin 방법(11)을 이용하여 추출하였다. 지방산의 methyl esters (FAME)는 Chouinard 등(8)과 Christie (9)의 방법으로 준비하였으며, FAME는 Feng 등(10)의 방법으로 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

#### IS-13 곰팡이의 genomic DNA 추출

반추위에서 분리된 IS-13 곰팡이는 Cellobiose Sloppy 배지 (CS, Table 1, 15)를 이용하여 39°C incubator에서 3일간 혐기적으로 배양한 후 원심분리(2000×g, 5 min)하여 균체를 포집하였다. 포집된 IS-13 균체 중 약 0.1 g (wet weight)을 액체질소를 이용하여 분쇄한 후 1 ml의 DNA 추출 buffer (0.7 M NaCl, 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 M Tris/HCl pH 7.5, 0.05 M EDTA, 1% SDS)를 첨가하여 65°C에서 30분간 배양하였다. 그 후 1 ml의 chloroform/ isoamyl alcohol 첨가하여 4°C 얼음에 꽂아놓아 30분간 방치한 다음 20,000×g에서 20분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 새 tube에 옮긴 후 동량의 2-propanol을 첨가하여 3,500×g에서 5분간 다시 원심분리 하였다. 이렇게 하여 얻어진 pellet는 진공건조기를 이용하여 건조 후 25 μl의 DW를 첨가하여 -80°C에 저장하였다.

#### Internal transcribed spacer 1 region 증폭을 위한 primer 및 PCR 조건

ITS region의 DNA를 증폭하기위한 primer는 primer A; 5'-TGACACACCGCCCGTC-3', primer B; 5'-CTGCGTCTTCATCGAT-3'을 사용하였고(20), 영국 Clontech 제품의 0.2 μm dNTPs (200 μm MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM KCl; 50 mM Tris/HCl pH 8.4; 10 mM) 0.25 unit *Taq* polymerase를 사용하였다. DNA amplification을 위한 PCR의 조건은 최초 denaturation 94°C에서 2분 1회, denaturation 94°C에서 1분, annealing 45°C에서 1분, extension 72°C에서 1.5분씩 35회 반복하여 수행하였다. PCR product는 pUC18 *MspI* Digest (Sigma, USA) ladder와 함께 3% agarose gel에서 전기영동을 하여 PCR product band를 확인한 뒤, 남아 있는 PCR product를 QIA-quick-spin PCR 정제 column (Qiagen, UK)을 사용하여 정제한 후 염기서열 분석 시료로 사용하였다.

#### DNA 염기서열 분석 및 homology 분석

DNA sequencer (CEQ system, ver.8.0.52, Perkin Elmer USA)를 이용하여 분석하였다. GenBank에서 제공하는 23 속(종)의 반추위 곰팡이 ITS1 rDNA 염기서열(2, 5, 27)과 IS-13곰팡이의 ITS1 rDNA 염기서열과 비교하기 위하여 사용된 software는 CLUSTAL W program (12)을 사용하였으며 각 곰팡이 간 homology 분석은 Saito와 Nei (26)의 방법을 사용하였다.

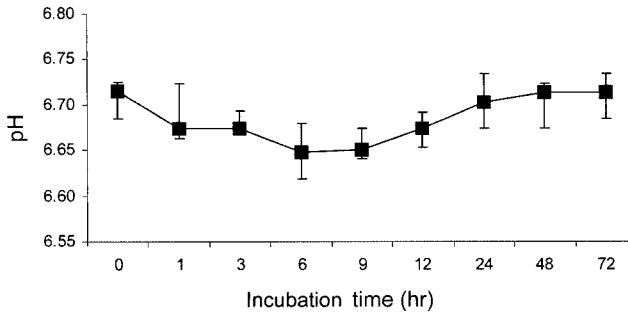


Fig. 1. Effect of linoleic acid solution (LA + dH<sub>2</sub>O + BSA) supplementation on pH by IS-13 rumen fungus. Anaerobic incubation was conducted at 39 °C for 72 hr.

### 결 과

#### IS-13 곰팡이의 CLA 생산 및 pH 변화

본 연구는 반추위에서 분리한 IS-13 곰팡이의 BH 생산 경향, CLA 생산 능력 및 곰팡이 배양액의 pH 변화를 알아보기 위하여 실시하였다. 배양액의 초기 pH는 6.72를 나타내었으며, 배양 9시간에는 6.65로 조사되어 일정 배양시간이 길어지면서 배양액의 pH도 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 9시간 이후 배양액의 pH는 다시 증가하는 것으로 조사되었는데 이러한 증가 경향은 배양 24시간까지 지속된 후 24시간 이후부터 배양 종료시간인 72시간까지는 pH가 6.70-6.71을 나타내어 배양액내 pH가 안정화되는 경향을 나타내었다.

24시간 예비배양 후 LA를 첨가하여 배양한 IS-13 곰팡이의 BH 경향과 CLA 생산은 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2A는 곰팡이의 BH 초기 경향을 나타내고 있다. 고농도의 LA는 소량의 CLA와 VA로 BH되며, 배양시간이 길어질수록 LA의 농도는 감소하고 CLA의 농도와 VA의 농도는 증가하였다(Fig. 1B and C). Fig. 1D는 곰팡이의 BH 말기 과정을 보여주고 있다. LA와 CLA의 농도는 감소하였으며, 반면에 곰팡이 지방산 BH의 최종 산물인 VA의 농도가 현저히 증가하였다.

#### CLA 생산 IS-13 곰팡이의 ITS1영역 PCR 증폭을 통한 동정

CLA 생산능력을 확인한 반추위 곰팡이의 유전자 서열과 GenBank로부터 유래하는 23속(종)의 반추위 곰팡이 유전자의 homology를 측정하여 동정하기 위하여 수행된 연구결과를 보면 다음과 같다. ITS1 rDNA를 성공리에 증폭하였으며 그 크기는 400 bp 이하로 나타났고, Negative control 구에서는 PCR product를 획득할 수 없었다(Fig. 3). 총 383 bp의 IS-13 곰팡이의 ITS-1 영역을 sequence하여 얻은 결과를 23속(종)의 반추위 곰팡이의 ITS-1 region sequences와 비교하였다. IS-13 곰팡이의 homology는 maximum-likelihood와 distance matrix법을 기초로 하여 23속(종)의 곰팡이와 IS-13곰팡이의 homology 결과를 Table 2과 같이 도출해 내었다. IS-13곰팡이와 *Anaeromyces* sp. (AUC-1, AUC-2)간에는 68-70%, IS-13와 *Piromyces* sp. (PCG-1, PAC-

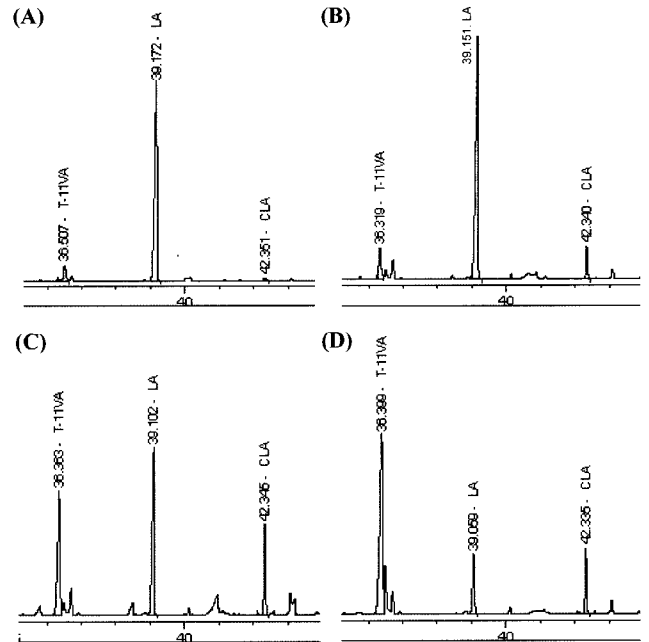


Fig. 2. Biohydrogenation by IS-13 rumen fungus incubated with linoleic acid in HS medium at 39°C. Chromatograms (A to D) show progressive depletion of linoleic acid and accumulation of CLA and *trans*-11 vaccenic acid by IS-13 rumen fungus over 9 hr incubation. Linoleic acid was decreased with increasing CLA and *trans*-11 vaccenic acid during incubation period by IS-13 rumen fungus. Linoleic acid was supplemented after 24 hr pre-incubation of IS-13 rumen fungus.

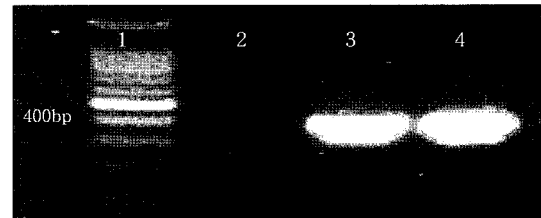


Fig. 3. Electrophoretogram of PCR amplified product using ITS1 rRNA regions primer from genomic DNA of IS-13 rumen fungus. Lane 1, pUC18 *MspI* Digest ladder; lane 2, Negative control; lane 3, 4, ITS1 of IS-13 rumen fungus.

1, PAK-1, PCS-1, PLA-1)는 최소 61.7%에서 최대 75%까지 다양한 상동성을 나타내었고, IS-13 곰팡이와 *Neocallimastix* sp. (NMW-3, NMW-4, NP, NFa, NF, MNW-5, NCS-2, MNW-2, NSC-1, NUC-1, NMG-2)간에는 74-76%의 homology를 보여주었으며, IS-13 곰팡이와 *Caecomyces* sp. (CC)는 67% 그리고 *Glomus* sp. (Gsp)는 40%로 낮은 상동성 결과를 보여 주었다. 반면, IS-13 곰팡이는 *Orpinomyces* sp.와 비교하여 상당히 높은 상동성을 보여 주었는데, 특히 OUC-1과 98%의 rRNA sequence가 일치하는 것으로 나타났다. 그 외에도 OUC-1a은 89% 그리고 OUC-1b와 95%가 일치하였다. 따라서 본 연구 결과에 의하면

**Table 2.** Sequence pair distance (%) of 23 different fungal genus (species) in the rumen

Isolate code	Rumen fungal genus <sup>a</sup> (species)	Percent identity (%)	GenBank no.
AUC-1	<i>Anaeromyces</i> sp.	70	AF170187
AUC-2	<i>Anaeromyces</i> sp.	68	AF170188
PCS-1	<i>Piromyces</i> sp.	75	AF170206
OUC-1b	<i>Orpinomyces</i> sp.	95	AF170190
OUC-1	<i>Orpinomyces</i> sp.	98	AF170191
OUC-1a	<i>Orpinomyces</i> sp.	89	AF170189
NMW-4	<i>Neocallimastix</i> sp.	75.2	AF170200
NMW-5	<i>Neocallimastix</i> sp.	72.8	AF170201
NMW-3	<i>Neocallimastix</i> sp.	75.7	AF170199
NCS-2	<i>Neocallimastix</i> sp.	76.2	AF170195
NP	<i>N. patriciarum</i>	72	AF170197
NMW-2	<i>N. frontalis</i>	78.1	AF170198
NUC-1	<i>N. frontalis</i>	73.9	AF170202
NF	<i>N. frontalis</i>	75	AF170192
NMG-2	<i>N. frontalis</i>	73.9	AF170196
NFA	<i>N. hurleyensis</i>	75	AF170193
NCS-1	<i>N. frontalis</i>	74.9	AF170194
PCG-1	<i>Piromyces</i> sp.	71.7	AF170205
CC	<i>Caecomyces communis</i>	67	AF492020
PLA-1	<i>Piromyces</i> sp.	71.5	AF170207
PAK-1	<i>Piromyces</i> sp.	69.5	AF170204
PAC-1	<i>Piromyces</i> sp.	69.5	AF170203
GPS	<i>Glomus</i> sp.	40	AY174699

<sup>a</sup>Retrieved from GenBank

IS-13 곰팡이는 *Orpinomyces* 속으로 판단된다.

## 고찰

반추위 미생물의 BH에 관한 연구는 1960년대에 시작되어 현재까지 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 지금까지 연구된 내용을 보면 대부분 반추위 박테리아의 BH에 관한 내용이었다. 반추위 곰팡이의 지방대사에 관한 연구보고는 극히 드물다. 반추위 곰팡이의 지방대사에 관한 연구는 Kemp 등(17)이 처음으로 보고되었다. Kemp 등(17)은 *Piromonas communis*에 불포화지방산을 첨가 후 *cis-trans* isomerization과  $\Delta^9$ -desaturase 기능을 확인하였고, 소량의 CLA와 VA를 TLC를 이용하여 검출하였다고 보고하였다.  $\Delta^9$ -desaturase는 주로 반추동물의 유선세포 등에서 SA를 oleic acid (C18:1<sub>cis-9</sub>)로 또는 VA를 CLA로 생합성 시키는데 주로 사용된다. 본 연구에서도 LA가 반추위 곰팡이의 *cis-trans* isomerization 기능에 의해서 CLA로 변환되어 Kemp 등(17)의 일부 보고와 일치하는 결과를 보여주었다. 본 연구에서는

배양 후 약 24시간 이내에 BH 작용이 끝나는 것으로 나타났으나, Kemp 등(17)은 소량의 CLA와 VA만을 검출하였다고 보고하였다. 이는 총 배양시간, 첨가한 지방산의 농도, 배지내 pH, 수용성탄수화물의 첨가 유무 등 다양한 환경에 따라 미생물의 BH 기능에 많은 차이를 가져다 줄 수 있기 때문이다(7, 21). 초식동물에서 분리한 곰팡이는 현재까지 약 5종 14속이 분리 및 확인되었다(13). 반추위 곰팡이는 박테리아와 비슷한 복합 효소생산 시스템을 가지고 있으나 각 곰팡이 종이나 사료의 형태에 따라 효소를 생산해내는 능력이 다르다(1).

IS-13 곰팡이의 PCR 증폭 산물은 383 bp로 나타났는데, 이는 Brookman 등(5)이 보고한 *Orpinomyces* sp.의 염기서열 길이와 유사한 결과를 보였다. 이중 *Orpinomyces* sp.의 ITS-1 영역의 염기서열 길이는 약 218 bp로 나타났다. 이는 Nicholson 등(23)이 *Orpinomyces* sp.의 ITS-1영역의 염기서열 길이를 보고한 약 220 bp와 일치하였다. *Orpinomyces* sp.으로 분리 동정된 곰팡이는 크게 두개의 species가 있는데 그중 Barr 등(2)에 의해 분리된 *Orpinomyces joyonii*가 있다. 초기의 *Orpinomyces joyonii*는 유주자의 꼬리가 여러개의 형태로 나타나 *Neocallimastix* sp.와 비슷하여 *Neocallimastix joyonii*로 명명 되었었다. *Orpinomyces joyonii*는 filament rhizoid form과 다양한 형태의 유주자를 가지고 있다. *Orpinomyces intercalaris*는 Ho 등(14)에 의해 분리동정되었는데, bulbous 형태의 유주자와 33-48  $\mu$ m의 multi zoospore flagella와 26-95  $\mu$ m의 bulbous sporangia 형태를 보인다고 하였다. 한편 *Orpinomyces* sp.의 반추위내 기능에 관한 연구는 상당히 제한되어 있는데, Akin 등(1)은 나뭇잎과 나무줄기를 여러 종의 반추위 곰팡이와 함께 배양을 하면 *Neocallimastix* sp.와 함께 *Orpinomyces* sp. 배양구에서 가장 빠른 나뭇잎 분해율을 보였고 나무줄기의 분해율은 *Orpinomyces* sp. 배양구 가장 빨랐다고 하였다. 또한, Borneman 등(4)은 bermuda grass 잎을 곰팡이와 함께 배양할 경우 *Orpinomyces* sp. 배양구에서 가장 높은 cellulases와 xylanases활성을 보여 *Orpinomyces* sp.는 반추위 곰팡이 중에서 섬유소 분해에 깊게 관여하고 있다고 하였다. 특히 반추위 곰팡이 중 *Orpinomyces joyonii*만이 옥수수로부터 전분을 분해할 수 있는 능력이 있다(22). 따라서 *Orpinomyces* sp.는 반추위 곰팡이 중 가장 다양하고 높은 활성의 효소를 생산하고 있는 것으로 판단된다. Li와 Heath (20)는 반추위 곰팡이의 rDNA 염기서열을 이용하여 각 곰팡이의 homology를 비교하였는데 *Orpinomyces* sp., *Neocallimastix* sp. 그리고 *Piromyces* sp. 중에서 *Anaeromyces* sp. 나 *Caecomyces* sp. 종보다 좀더 높은 연관성을 보였다고 하여, 본 연구결과와 일치하였다. Brookman 등(5)은 rRNA 염기서열 결과에 의하면 OUC-1a, OUC-1b 그리고 OUS-1은 *Orpinomyces* sp.라고 하였으며, 최근 이를 기초 자료로 *Orpinomyces* sp. genome의 구조에 관한 연구가 보고되었다(24).

이와 같은 결과로 미루어 볼 때 반추위에 서식하는 곰팡이 중 *Orpinomyces* sp.는 반추위내에서 지방산 BH와 CLA생산에 관여하는 것으로 확인되었으며, 본 연구를 기초 자료로하여 반추위 곰팡이의 지방산 BH와 CLA생산을 증가시킬 수 있는 연구를 지속적으로 수행해야 할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Akin, D.E., W.S. Borneman, and C.E. Lyon. 1990. Degradation of leaf blades and stems by monocentric and polycentric isolates of ruminal fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.* 31, 205-221.
- Barr, D.J.S., H. Kudo, K.D. Jackober, and K-J. Cheng. 1989. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp., *Pirromyces communis* and *Prpinomyces bovis*, gen. Nov., sp. nov. *Can. J. Bot.* 67, 2815-2824.
- Bauchop, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 148-158.
- Borneman, W.S., D.E. Akin, and L.G. Ljungdahl. 1989. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1066-1073.
- Brookman, J.L., G. Mennim, A.P.J. Trinci, M.K. Theodorou, and D.S. Tuckwell. 2000. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiol.* 146, 393-403.
- Chen, Y.C. and R.S. Hseu. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=21314281>
- Choi, N-J., J.Y. Imm, S.J. Oh, B.-C. Kim, H.-J. Hwang, and Y.J. Kim. 2005. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 643-653.
- Chouinard, P.Y., L. Corneau, M.J. Kelly, J.M. Griinari, and D.E. Bauman. 1999. Effect of dietary manipulation on milk conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 233.
- Christie, W.W. 1982. A simple procedure for the rapid trans methylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 23, 1072-1075.
- Feng, S., A.L. Lock, and P.C. Garnsworthy. 2004. A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *J. Dairy Sci.* 82, 2737-2745.
- Hara, A. and N.S. Radin. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420-426.
- Higgins, D.G., A.J. Bleasby, and R. Fuchs. 1992. CLUSTAL W improved software for multiple sequence alignments. *CABIOS* 8, 189-191.
- Ho, Y.W. and J.S. Barr. 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia* 87, 655-677.
- Ho, Y.W., N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1994. *Orpinomyces intercalaris*, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon* 50, 139-150.
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 1119-1122.
- Kemp, P. and D.J. Lander. 1984. Hydrogenation in vitro of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed culture of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130, 527-533.
- Kemp, P., D.J. Lander, and C.G. Orpin. 1984. The lipids of rumen fungus *pirromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 27-37.
- Kemp, P., R.W. White, and D.J. Lander. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolated from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.* 90, 100-114.
- Kim, Y-J., R.H. Liu, D. Bond, and J.B. Russell. 2000. The effect of linoleic acid concentration on the conjugated linoleic acid (CLA) Production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5226-5230.
- Li, J. and I.B. Heath. 1992. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (*Neocallimastaceae*) and the Chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. *Can. J. Bot.* 70, 1738-1746.
- Martin, S.A. and T.C. Jenkins. 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and *trans*-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 80, 3347-3352.
- McAllister, T.A., Y. Dong, L.J. Yanke, H.D. Bae, K-J. Cheng, and J.W. Costerton. 1993. Cereal grain digestion by selected stains of rumen fungi. *Can. J. Microbiol.* 39, 367-376.
- Nicholson, M.J., E.J. Kim, M.K. Theodorou, and J.L. Brookman. 2002. Understanding the molecular ecology of rumen fungi-A DDGE approach. In 'Beyond Antimicrobials- the Future of Gut Microbiology' (Ed. R. J. Wallace). Proceeding of the 3rd RRI-INRA, Aberdeen.
- Nicholson, M.J., M.K. Theodorou, and J.L. Brookman. 2005. Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus *Orpinomyces*-insights into an AT-rich genome. *Microbiol.* 151, 121-133.
- Polan, C.E., J.J. McNeill, and S.B. Tove. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 88, 1056-1064.
- Saito, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Wubet, T., M. Weiss, I. Kottke, and F. Oberwinkler. 2003. Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*). *Can. J. Bot.* 81, 255-266.

(Received March 26, 2007/Accepted May 29, 2007)

**ABSTRACT : Isolation and Identification of Rumen Fungus and Its Produced Conjugated Linoleic Acid In Sik Nam** (National Livestock Research Institute, RDA 564, Suwon 441-706, Republic of Korea)

The aim of this study was to isolate and identify rumen fungus which produces conjugated linoleic acid. IS-13 fungus hydrogenated conjugated linoleic acid and *trans*-11 vaccenic acid within 12 hr after addition of linoleic acid. The homology of IS-13 rumen fungus was compared with internal transcribed spacer 1 region (ITS1) sequences of twenty three rumen fungi. The length of ITS1 region of IS-13 isolate was 218 bp. IS-13 isolate has the most similar sequence (98% matched) with *Orpinomyces* species according to maximum-likelihood and distance matrix results. The result supported that IS-13 isolate belonged to *Orpinomyces* genus.