

Research Article

In Vitro 반추위 발효를 통한 볏짚 분해와 섬유소 박테리아 군집 변화의 관계 연구

성하균*

상지대학교 동물자원과학과, 원주 26339

Study on the Relationships between Rice Straw Degradation and Changes of Fibrolytic Bacteria Population by *in Vitro* Rumen Fermentation

Ha Guyn Sung*

Sangji University, Wonju 26339, Korea

ABSTRACT

This study was to research the relationships between rice straw degradation and changes of fibrolytic bacteria population during the *in vitro* rumen fermentation. Dry matter(DM) digestion of rice straw and population of fibrolytic bacteria were measured at the 0, 4, 8, 12 and 48 hours during the incubation. The populations of *F. succinogenes*, *R. albus* and *R. flavefaciens* were defined as log copy number of 16S rDNA by technical method of Quantitative real-time PCR.

Total population of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* was sum of bacteria attached on rice straw and suspended in medium. It's population was increased with incubation, reached top level of 29.0 Log copy No at the 24 hour and then decreased. In the meantime, DM digestion of rice straw showed the higher increasement from the 8 hour to the 24 hour than from the 0 hour to the 8 hour, and then a slowdown in increasing trend of digestibility. Attachments of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* were detected immediately after start of *in vitro* rumen incubation. At the same time, the colonized bacterial share were respectively 34.5%, 84.4% and 67.9% in total population. All of them was reached the highest colonized bacterial share above 94.7% at the 4 hour incubation. However population of attached bacteria was shown the highest level at the 12 hour or the 24 hour incubation. Kinetics of colonization were formed area of top speed from the 12 hour to the 24 hour and respectively reached 10.33, 9.28 및 8.30 Log copy No/h/g DM at the 24 hour by *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus*. The kinetics of rice straw degradation was formed top level of 0.95% DM/h at the 24 hour.

The present results gave clear evidence that degradation of rice straw was increased with the development of total fibrolytic bacteria in process of rumen fermentation. Also, their attachment was largely occurred immediately after insertion of rice straw, the colonized bacteria was actively proliferated, and then degradation of rice straw was maximized.

(Key words : Fibrolytic Bacteria, Rice Straw Degradation)

I. 서 론

반추동물의 가장 중요한 에너지 원료인 섬유소는 반추위에 서식하는 혐기성 미생물의 컨소시엄에 의하여 분해된다. 우리나라에서 섬유소 공급 원료로 대표적 자급 조사료로는 볏짚이 있으며, 이들 볏짚과 같은 조악한 섬유소 원료를 반추동물은 분해하여 에너지로 이용하는데, 반추위 발효의 주인공은 혐기성 미생물로서 이들은 반추위 내용물 1g당 10^{11} 마리 이상이 존재하는 것으로 보고되고 있다(Hungate, 1966, Krause and Russell, 1996, Russell and Rychlik, 2001).

섬유소 원료가 반추위에 유입시 반추위내 박테리아의 군집 분포가 섬유소를 얼마나 많이 그리고 빨리 분해하는지를 결정하는 요소라는 것을 여러 연구에서 보고 되어왔다(Akin and Barton, 1983; Miron et al., 2001; Pan et al., 2003; Khampa et al., 2006). 반추위내 사료 고형물에 부착되어있는 박테리아가 전체 반추위 미생물 분포의 70~80%로 상당히 많은 박테리아가 사료 입자에 부착하여 서식하는 것으로 보고되고 있다(Minato et al., 1993; Miron et al., 2001). 그리고 이들 박테리아 중 섬유소 분해에 주요 역할을 담당하는 대표적 반추위 박테리아로 *F. succinogenes*, *R. albus* 및 *R. flavefaciens*가 알려져 있으며(Forsberg et al., 1997; Sung,

* Corresponding author : Ha Guyn Sung, Dept. of Animal Science & Technology, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea
Tel: +82-33-730-0530, Fax: +82-33-738-7805, E-mail: haguyn@hanmail.net

2013), 반추위로 조사료가 유입되면 이들 박테리아의 부착과 섬유소 분해가 함께 일어나는 것으로 보고되고 있다 (McAllister et al., 1994; Michalet-Doreau et al., 2001). *F. succinogenes*, *R. albus* 및 *R. flavefaciens*의 반추위내 섬유소 분해와 이들 군집에 대한 다각적 연구가 이루어지고 있으며 지속적 관심이 집중되고 있다(Akin and Barton, 1983; Koike and Kobayashi, 2001; Koike et al., 2003; Hwang et al., 2008; Sung, 2013).

우리나라의 대표적 자급 조사료인 볏짚은 영양소 함량이 매우 낮고, 세포벽 구성 물질 중 대부분이 분해가 어려운 구조 탄수화물로 반추동물의 소화 및 이용 효율에 한계가 있다 (Jackson, 1977; Devendra, 1982). 따라서 본 연구는 반추동물이 볏짚을 소화하는 과정 중에 주요 반추위 섬유소분해 박테리아의 분포를 연구하여 이들 박테리아와 볏짚 소화와의 관계를 연구함으로써 볏짚의 이용효율을 증진시키기 위한 반추위 섬유소 박테리아에 좀 더 접근한 세부적 연구 자료를 제공하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시축 및 사양관리

공시축으로는 rumen fistula가 장착된 평균체중 550 kg의 홀스테인 수소 3두를 선발하여 전 실험 기간 동안 다른 우군으로부터 분리 관리하였다. 그리고 새로운 환경과 사료의 적응을 위하여 4주간의 적응사양 후에 본 실험의 공시축으로 사용하였다. 공시축은 시험사료를 준비하여 1일 2회 (08:00, 20:00)급여하였으며, 시험사료는 농후사료(40%)와 볏짚 (60%)을 혼합 급여하였다. 그리고 물은 자유 채식하도록 하였다.

2. *In Vitro* 반추위 발효 실험

In vitro 반추위 발효실험을 위한 *In vitro* 혐기배양 시스템은 Sung et al.(2006)의 방법을 응용하여 준비하였다. *In vitro* 배양을 위한 반추위액은 시험사료를 급여한 홀스테인 수소 3두로부터 각각 수거한 반추위액을 4겹의 cheese cloth로 거른 후 각각 동일량 혼합하여 준비하였으며, 준비된 반추위액과 McDougall Buffer (McDougall, 1948)을 1:4 (v/v)로 혼합하여 *In vitro* 반추위 발효용 배양액을 제조하였다. 그리고 혼합배양액은 30 ml씩 0.5 g의 분쇄된 볏짚이 들어있는 60 ml serum bottle에 분주하여 배양을 준비하였다. 각각의 준비된 *In vitro*

배양물은 39°C 120 rpm의 shaking incubator에서 48 시간동안 배양되었다.

3. 볏짚 시료 준비 및 소화율 측정

볏짚은 분쇄 후 2mm screen에 통과시켰으며, 분쇄시 발생한 미분 입자를 제거하기 위하여 증류수에 3번 세척 후 실온에 건조하였다. 건조 후 수거된 분쇄 볏짚을 건물 소화율 및 섬유소 박테리아 군집을 조사하기 위한 *In vitro* 실험용 시료로 사용하였다.

건물 소화율을 측정하기 위하여 분쇄된 볏짚이 들어있는 *In vitro* 배양물을 0, 4, 8, 12, 24 및 48시간 배양하였으며, *In vitro* 배양물은 시간대별 각각 3 bottle를 준비하여 3반복으로 실시하였다. 그리고 *In vitro* 배양 기간 동안 각 시간별 배양물을 수거하여 filter paper (Whatman No. 4)을 사용하여 미분해 잔여물을 수집하였다. 그리고 수집된 미분해 잔여 시료는 냉동 건조 후 샘플의 무게를 측정하여 실험 초기 무게 (투입 시료량)에서 감소한 양을 측정하여 백분율로 산정하였다. 또한 측정이 끝난 시료는 미생물 군집 조사를 위하여 4°C에서 냉장 보관 하였다.

4. 섬유소 박테리아 군집 조사

섬유소 박테리아 군집 조사는 주요 섬유소분해 박테리아 즉, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*를 대상으로 볏짚의 표면 부착 및 배양액내 부유 박테리아를 측정하였다. 실험 시료는 볏짚의 표면 부착 박테리아 군집 측정을 위하여 *In vitro* 건물 소화율 측정 후 냉장 보관한 샘플을 사용하였다. 그리고 *In vitro* 배양액내 부유 박테리아 군집 측정은 *In vitro* 건물 소화율 측정을 위해 각 시간대별 배양물을 filter paper (Whatman No. 4)을 사용하여 거를 때 통과한 배양물의 일정량을 멸균 용기에 담아 냉동 보관하여 시료로 사용하였다.

F. succinogenes, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 정량 분석은 Quantitative real-time PCR을 이용하여 실시되었다(Sung et al., 2009). Real-time PCR은 iCycler iQ real-time PCR system (Bio-Rad Inc. USA)에서 iQ Syber Green Supermix Supermix (Bio-Rad Inc. USA)를 가지고 매뉴얼에 따라 수행되었다. Total DNA는 *In vitro* 실험에서 준비된 미분해된 잔여 볏짚 및 배양액으로부터 각각 0.5 g씩 채취하여 Purdy et al.(1996)의 방법에 따라 추출하였다. 그리고 섬유소분해 박테리아의 군집 변화를 조사하기 위한 16S-rRNA의 중간 고유 영역을 증폭하기 위하여 *F. succinogenes*의 species-specific primer는

Fs219f (5'-GGT ATG GGA TGA GCT TGC-3')와 Fs654r (5'-GCC TGC CCC TGA ACT ATC-3'), *R. flavefaciens*의 species-specific primer는 Rf154f (5'-TCT GGA AAC GGA TGG TA-3')와 Rf425r (5'-CCT TTA AGA CAG GAG TTT ACA A-3'), 그리고 *R. albus*의 species-specific primer는 Ra1281f (5'-CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G-3')와 Ra1439r (5'-CCT CCT TGC GGT TAG AAC A-3')를 사용하였다(Koike and Kobayashi, 2001). Real-time PCR의 조건은 Tajima et al. (2001)의 방법을 개량한 94°C에서 30초 동안 변성(denaturation), 60°C에서 30초 동안 결합(annealing), 72°C에서 30초 동안 신장(extension) 순으로 48 cycles 실시하였다. 그리고 최초 cycle에서는 9분 동안 denaturation, 마지막 cycle에서는 10분 동안 extension 시켰다. 각 박테리아 군집의 정량은 16S rDNA의 copy No의 log값(Log copy No)로 표기하였다. 이 값(Log copy No)은 control plasmid를 사용하여 만들어진 표준곡선으로부터 계산하였고, control plasmid는 pGEM-T와 pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)를 사용하여 매뉴얼에 따라 각각 섬유소 박테리아의 species-specific primer로 증폭한 specific 16S rDNA 절편을 삽입하여 만들었다. 그리고 표준곡선은 control plasmid의 희석 배수에 따른 threshold cycle (Ct) 값과의 상관관계에 의하여 만들어졌다.

5. 통계분석

각각 시험을 통해 얻어진 연구 결과는 실험기간 동안 누적 정리되었고, 모든 자료에 대한 각 시간대별 반복 결과는 측정치의 평균치를 구하여 결과치의 정확성을 확인 하였으며, 그래프에 표준편차 바로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 섬유소 분해 박테리아의 총균수 변화 및 볏짚 분해

본 연구는 *In vitro*에서 섬유소 분해 박테리아의 총 균수 변화와 이들에 의한 볏짚 분해 과정을 관찰하기 위하여 *In vitro* 볏짚 발효를 0, 4, 8, 12, 48시간 실시하였을 때 섬유소 분해 박테리아의 총 균수 및 볏짚 소화율은 Fig. 1 그리고 Fig. 2와 같다. 섬유소 분해 박테리아의 총 균수 변화는 Fig. 1에서와 같이 *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*의 볏짚 표면 부착 및 배양액내 부유 박테리아 수의 총 합을 16S rDNA의 Log copy No로 표기하였다. 섬유소 분해 박테리아 총 균수는 *In vitro* 배양 초기 24.5 Log copy No에서 시작하여 배양 시간이 경과함에 따라 증식을 하여 배양 16시간을 지나 24시간에서 최고 높은 군집(29.0 Log copy No)을 형성하였다. 그리고 배양 48시간에는 25.2 Log copy No으로 낮은 군락을 나타내었다. 그리고 Fig. 2에서와 같이 볏짚 소화율은 실험 기간 동안 배양 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하였다. 볏짚

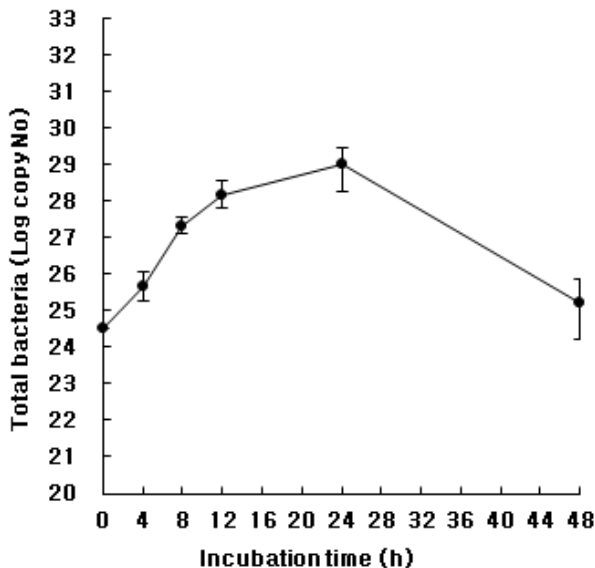


Fig. 1. The total populations of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* during the *in vitro* rumen incubation.

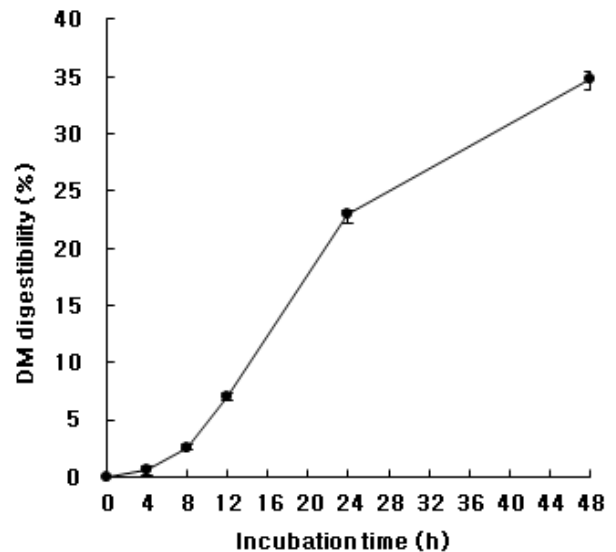


Fig. 2. DM digestion of rice straw during the *in vitro* rumen incubation.

소화의 증가는 배양 4시간까지는 소폭 증가를 보였으나 8시간을 지나며 24시간까지는 점점 큰 폭으로 증가하였고, 그 이후에는 소화율 증가가 점점 둔화되는 경향을 나타냈다. 또한 이상의 결과(Fig 1과 2)는 배양 초기에 섬유소 분해 박테리아의 총 균수 증가와 함께 볏짚의 소화율 증가가 발생하는 현상을 보여주었으며, 이들 총 균수가 최대를 이루는 배양 12-24시간에 볏짚 소화율도 빠르게 큰 폭으로 증가하였고, 이후에는 총 균수의 감소와 함께 소화율의 증가 둔화도 발견되었다.

섬유소 소화 저해인자로 알려진 methylcellulose의 연구를 통하여 섬유소 분해 박테리아가 조사료 분해에 핵심적 역할을 담당하고 있음이 재 입증되고 있으며(Sung et al., 2013; Min et al., 2013), 이 연구의 대조구 결과를 통하여 배양 시간이 경과함에 따라 섬유소 박테리아 증식과 볏짚 분해가 증가하는 경향은 본 실험의 결과와 유사함을 발견 할 수 있다. 또한 다른 연구자의 반추위내 조사료 소화율 증진을 위한 연구에서도 섬유소 소화 향상과 반추위 섬유소 박테리아의 증식과 관계가 있음을 보여 주고 있다. Sung (2014)은 볏짚의 NaOH 처리 연구에서 볏짚의 NaOH 처리 수준이 증가함에 따라 소화율이 증가함은 물론 *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*의 증식이 배양 초기에 발달함을 보고하였다. 그리고 미생물 첨가 연구에서도 섬유소 소화율의 증가와 함께 섬유소 박테리아 군집이 더 높은 수준으로 발달하였다(Sung, 2013). 따라서 이상의 결과들은 섬유소 박테리아가 섬유소 분해에 중요한 역할을 담당함을 16S rDNA 탐색 기법을 통해

좀 더 구체적으로 보여주고 있으며, 이들 총 균수 발달 변화와 섬유소의 분해 진행에 밀접한 관계가 있음을 명확히 보여주고 있다.

2. 볏짚의 표면 부착 주요 섬유소 분해 박테리아 변화

반추위내 박테리아 군집 분포 중에서 볏짚 표면 부착 섬유소 분해 박테리아 군집이 볏짚의 분해 과정에서 어떠한 변화가 있는지 관찰하기 위하여 본 시험이 실시되었다. 볏짚의 표면 부착 주요 섬유소 분해 박테리아 즉, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 배양 시간에 따른 군집 변화는 각각 Fig. 3, 4 및 5와 같다. 그리고 *F. succinogenes*의 볏짚 표면 부착 균수 변화는 Fig. 3의 A와 같으며, *In vitro*내 박테리아 군집 분포 중 볏짚 표면 부착 군집이 차지하는 비율(%)는 Fig. 3의 B와 같다. Fig. 3의 A와 같이 *F. succinogenes*의 볏짚 표면 부착 균수는 배양초기에 8.8 Log copy No/g DM으로 배양 초기부터 부착 군집이 발견되었으며, 배양 16 및 24시간에 공히 11.0 Log copy No/g DM으로 가장 높은 군집을 형성하였고, 배양 48시간에는 9.5 Log copy No/g DM으로 낮은 군집을 나타내었다. 그리고 Fig. 3의 B와 같이 볏짚 표면 부착 군집의 비율은 배양 초기 34.5%이었으며, 배양 4 및 8시간에 각각 94.7 및 97.3%로 정점을 나타내었고, 배양 24 및 28시간에는 각각 88.5 및 58.9%로 감소 경향을 나타내었다.

*R. flavefaciens*의 볏짚 표면 부착 균수 및 이들 군집의 분포

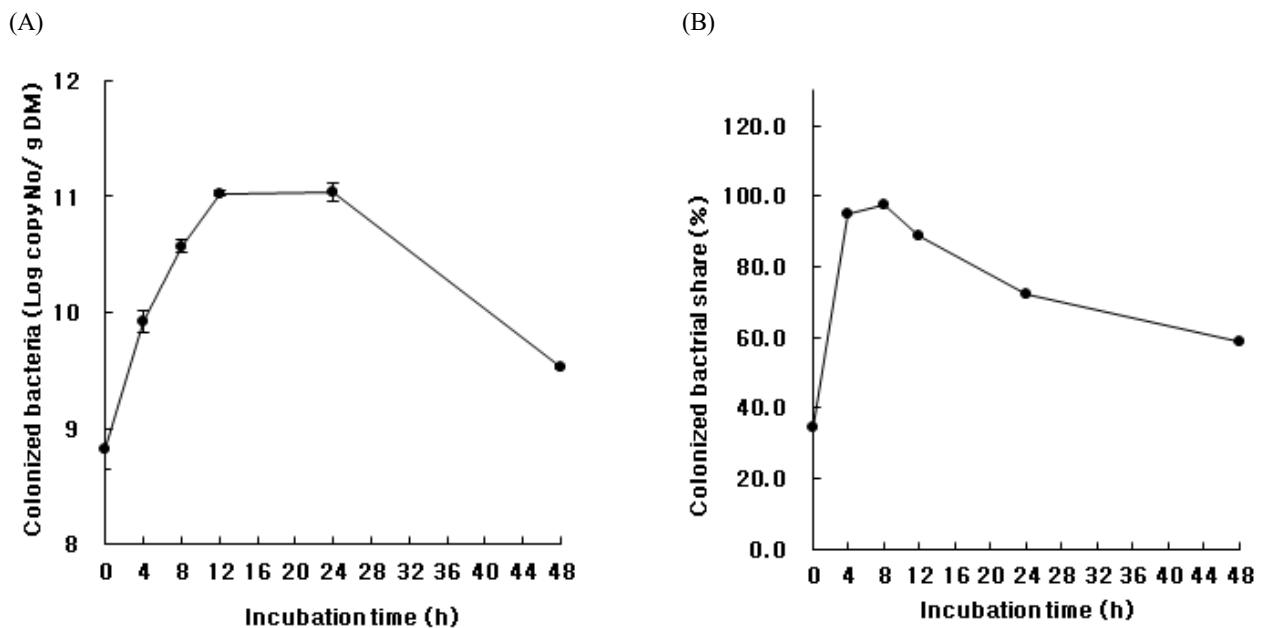


Fig. 3. The populations colonized on rice straw(A) and its share(B) by *F. succinogenes* during the *in vitro* rumen incubation.

비율은 각각 Fig. 4의 A 및 B와 같다. Fig. 4의 A와 같이 볏짚 표면 부착 균수는 배양초기에 8.4 Log copy No/g DM으로 배양 초기 부착 균락이 발견되었으며, 배양 16 및 24시간에 공히 9.6 Log copy No/g DM으로 가장 높은 균수를 형성하였고, 배양 48시간에는 8.5 Log copy No/g DM으로 낮은 균수를 나타내었다. 그리고 Fig. 4의 B와 같이 볏짚 표면 부착 균집의 비율은 배양 초기 84.4%를 나타냈으며, 배양 4, 8 및 12시간에 각각 98.5, 98.5 및 98.9%로 최고 수준을 나타내고, 이후 감소하여 배양 48시간에는 37.6%로 낮아지는 경향을 나타내었다.

*R. albus*의 부착 균수 및 부착 균집의 비율은 Fig. 5의 A 및 B와 같다. Fig. 5의 A와 같이 부착 균수는 배양초기에 6.9 Log copy No/g DM에서 증가하여 배양 24시간에 8.5 Log copy No/g DM으로 가장 높은 균수를 형성하였고, 배양 48시간에는 6.9 Log copy No/g DM으로 낮은 수준을 나타내었다. 그리고 Fig. 5의 B와 같이 부착 균집의 비율은 배양 초기 67.9%에서 증가하여 배양 4, 8 및 12시간에 각각 97.1, 98.1 및 98.2%로 높은 수준을 나타내고, 이후 감소하여 배양 48시간에는 35.1%로 낮은 수준을 나타내었다.

이상의 *In vitro* 실험 결과는 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 배양 시작 초기에 신속하게 볏짚 표면 부착이 이루어짐을 발견할 수 있었으며, 이들 부착 균수의 변화는 *F. succinogenes*와 *R. flavefaciens*는 배양 12 및 24시간에 정점 수준을 형성하고 그 이후에는 감소하는 유사한 경향을 나타내었으나 *R. albus*는 배양 24시간에 정점을 형성하는 다른 경향을

나타냈다(Fig. 3, 4 및 5의 A). 그리고 섬유소 박테리아의 *In vitro*내 균집 분포 중 볏짚 표면 부착 박테리아가 차지하는 비율은 배양 전기(배양 4시간)까지 급증하여 배양액내 부유 균보다 더 우세한 균락을 형성하는 특성을 나타내었다. 그러나 배양 시간에 따른 부착 균집의 비율의 변화 경향은 초기 부착 비율뿐만 아니라 최고 수준을 형성하는 시기 및 이후 감소 현상은 각각의 섬유소 박테리아 중에 따라 다른 경향을 나타내었다(Fig. 3, 4 및 5의 B).

반추위내 박테리아 균집은 반추위액내 부유 박테리아, 사료입자 부착 박테리아, 반추위 벽에 서식하는 박테리아, 프로토조아 및 곰팡이에 붙어있는 박테리아로 크게 분리 할 수 있으며(Cheng and Costerton, 1980; McAllister et al., 1994), 반추위내 유입된 조사료 분해에 있어 사료 입자에 부착한 박테리아의 중요성에 대하여 연구되어 왔다(McAllister et al., 1994; Miron et al., 2001). Sung (2014)의 선행 연구로 *in situ* 실험에서 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*과 *R. albus*는 모두 반추위 발효 0-1시간 사이에 볏짚 표면에 부착이 80% 이상 완료되었고, 이후 발효가 계속 진행되는 동안 일정 수준의 균집이 유지되는 것을 보고하였는데, 섬유소 박테리아의 초기 부착 및 균집 발달 과정은 본 *In vitro* 연구 결과와 유사한 것으로 사료된다. 그리고 이들 부착미생물에 대한 ATP 및 효소 생산량 측정을 통한 연구에서도 사료 입자에 부착한 미생물에 의한 ATP 생산량은 전체의 75%를 차지하였고, 또한 이들 미생물이 분비하는 endoglucanase와 xylanase는 전체의 88-91%를 차지하였다고 보고된 바 있다(Minato et al., 1993;

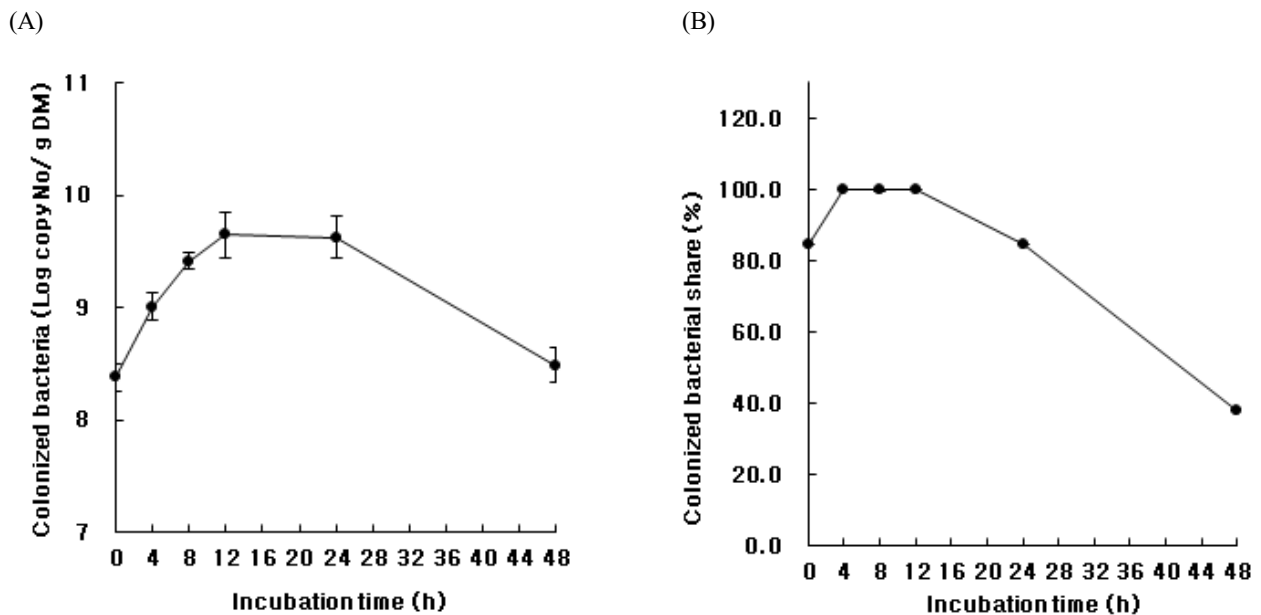


Fig. 4. The populations colonized on rice straw(A) and its share(B) by *R. flavefaciens* during the *in vitro* rumen incubation.

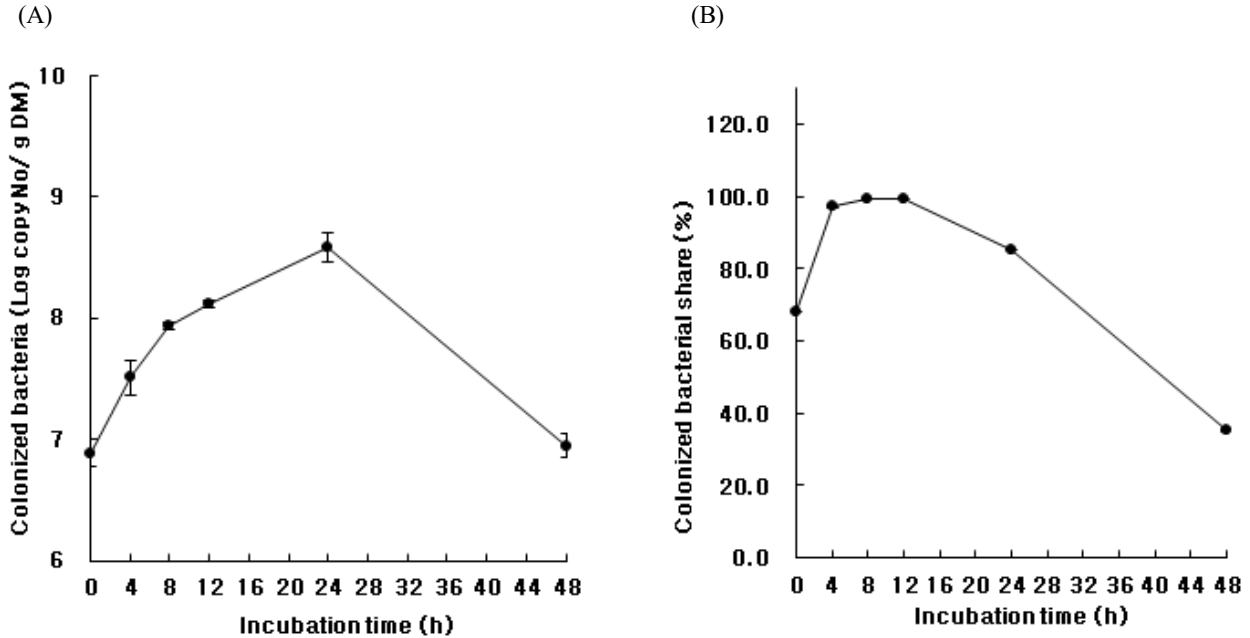


Fig. 5. The populations colonized on rice straw(A) and its share(B) by *R. albus* during the *in vitro* rumen incubation.

Williams and Strachan, 1984). Pell and Schofield(1993)는 섬유소 분해 박테리아의 부착과정은 초기에는 박테리아가 섬유소원으로 이동하고, 다음으로 이들 박테리아가 기질의 비특정 부위에 이동 및 부착하고, 이어서 식물 표면이 파손된 특정 소화부위에 부착한 박테리아에 의하여 분해가 먼저 시작되고, 마지막으로 식물조직의 특정부위에 부착한 박테리아들이 활발한 증식하여 군집을 형성하고 분해가 이루어진다고 기술한 바 있다. 반추위내 유입된 조사료 표면에 섬유소 분해 박테리아의 초기 부착 과정을 관찰한 Sung (2014)은 *in situ* 조사에서 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus* 모두 볏짚이 반추위에 유입된 후 5분 내에 상당량의 수가 부착함을 발견하였다. 또한 NaOH 처리 볏짚을 관측하였을 때, NaOH 처리 볏짚에 부착된 섬유소 분해 박테리아 군집의 증가 현상이 배양 12시간에 발견되었다.

따라서 본 연구 결과들은 볏짚이 반추위에 유입되면 즉시 섬유소 분해 박테리아의 볏짚 표면 부착이 발생하며, 이들 박테리아는 소화 초기부터 반추위액 부유 박테리아보다 우세한 군집을 형성하며, 이후 부착 박테리아의 증식이 극대화되며, 최고 수준의 군집을 만들면서 볏짚 소화에 기여한다는 것을 명확히 입증한 것으로 사료된다.

3. 섬유소 분해 박테리아의 부착 속도 및 볏짚 분해 속도의 관계

In vitro 배양기간 동안 섬유소 분해 박테리아의 볏짚 부착

속도는 시간대별 부착 박테리아의 수를 각각 배양 시간(0, 4, 8, 12, 24, 48시간)으로 나눈 값(Log copy No/h/g DM)으로 나타내었고(Fig. 6), 섬유소 분해속도는 시간대별 소화율을 각각 배양 시간으로 나눈 값(% DM/h)으로 나타내었다(Fig. 7).

Fig. 6에서와 같이 배양기간 동안 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 부착 속도는 유사한 증가 경향을 나타내었다. 이들 모든 균주는 배양 0-4시간에 큰 차이로 높아지는 부착 속도를 보였고, 이후에도 점점 높아져서 배양 12시간을 지나 24시간에 가장 높은 부착 속도 즉, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*는 각각 10.33, 9.28 및 8.30 Log copy No/h/g DM에 도달하였다. 그리고 배양 48시간에는 다소 낮은 부착 속도를 나타냈다.

섬유소 분해 속도는 Fig. 7에서와 같이 배양 0-12시간에는 점진적으로 높아지다가 배양 12-24시간에 큰 폭으로 높아져 배양 24시간에 0.95% DM/h로 최고 정점을 나타냈다. 그리고 배양 48시간에는 다소 낮은 섬유소 분해 속도를 나타냈다. 또한 본 연구 결과(Fig. 6과 7)는 볏짚 표면 부착 속도의 정점 형성이 섬유소분해 속도보다 빠르게 진행되었지만, 모두가 배양 24시간 내에 최고 수준에 도달함을 보여 주었다.

본 연구의 결과와 유사한 연구로 Koike et al.(2003)는 오차드 건초를 사용한 *in situ* 실험에서 10분 만에 오차드 줄기에 부착한 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 수가 각각 10^5 , 10^4 및 10^4 /g DM 이었다고 보고하였고, 이들 모두 24시간에 최고 값에 도달함을 보고하였다. 그리고 볏짚을 이

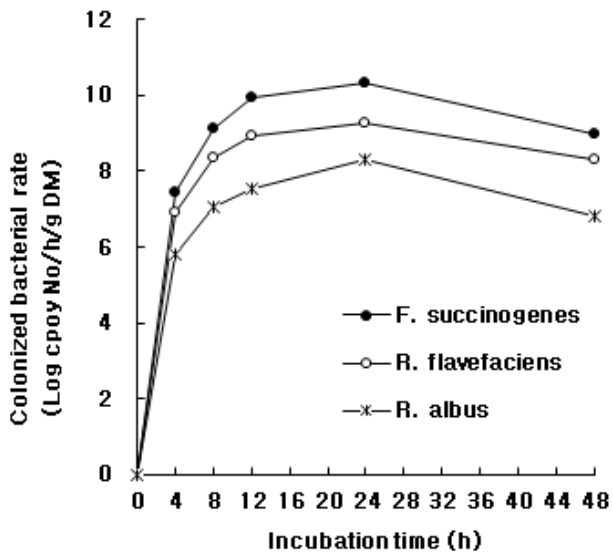


Fig. 6. The rates of fibrolytic bacteria colonized on rice straw with the times of *in vitro* incubation.

용한 *in situ* 연구에서 Sung (2014)은 반추위내 대표적 섬유소 분해 박테리아가 5분만에 볏짚에 부착한 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*가 각각 8.48, 6.75와 6.38 Log copy No/h/g DM로 급속도의 초기 부착을 보고하였으며, *in situ* 볏짚 소화율은 8-12시간에 가장 빠른 속도의 소화율이 발생함을 발견하였다.

따라서 이상의 실험 결과들은 섬유소 분해 박테리아가 섬유소 분해 과정에서 초기부터 섬유소 입자에 급속도로 부착이 발생하고, 이들 부착 속도의 가속화가 섬유소 분해 속도의 가속화 보다 동시적이면서도 좀 더 빠르게 진행됨을 보여 주었다. 이것은 섬유소 분해 박테리아의 섬유소 입자 표면 부착과 섬유소 소화 사이에 밀접 상관관계가 존재함을 명확히 보여준다고 사료된다.

IV. 요약

본 연구는 반추동물이 볏짚을 소화하는 과정 중에 주요 섬유소 분해 박테리아의 분포 변화를 연구하여 반추위내 볏짚 이용효율을 증진시키기 위한 진보적 연구 자료를 제공하고자 실시하였다. 본 연구를 수행하기 위하여 분쇄 볏짚을 기질로 사용한 *In vitro* 반추위 발효를 실시하였으며, 배양 0, 4, 8, 12, 48시간에 볏짚 건물 소화율 및 섬유소 분해 박테리아 균수 변화를 조사하였다. 섬유소 분해 박테리아 균수는 *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*를 대상으로 Quantitative real-time

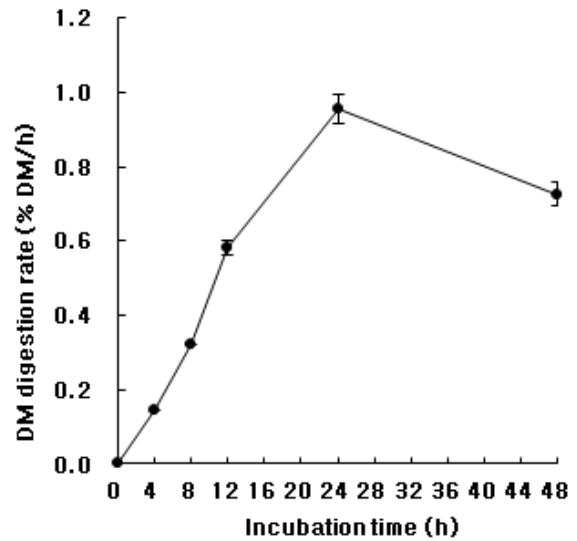


Fig. 7. The rates of rice straw degradation during the *in vitro* rumen incubation.

PCR을 이용하여 16S rDNA의 copy No의 log값(Log copy No)을 측정하였다.

섬유소 분해 박테리아의 총 균수는 *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*의 볏짚 표면 부착 및 배양액내 부유 박테리아의 총합으로 배양 시간에 따라 증식을 하여 24시간에서 최고 균집(29.0 Log copy No)을 형성하고, 이후 감소하였다. 이에 볏짚 소화율도 24시간까지 점점 큰 폭으로 증가하였고, 이후에는 점점 둔화되는 경향을 나타냈다.

F. succinogenes, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*는 배양 시작 즉시 볏짚 표면에 부착이 발생됨을 발견하였으며, 이때 이들의 부착 균집의 비율은 각각 34.5%, 84.4% 및 67.9%로 차지하였다. 그리고 이들 섬유소 분해 박테리아의 볏짚 부착 비율은 모든 균수가 공히 배양 4시간째부터 94.7% 이상 최고 수준에 이르렀고, 부착 균수는 균종에 따라 각각 배양 12시간 또는 24시간째에 최고 수준을 나타냈다.

F. succinogenes, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 최고 수준의 볏짚 표면 부착 속도는 배양 12시간에 시작되어 배양 24시간에 각각 10.33, 9.28 및 8.30 Log copy No/h/g DM에 도달하였다. 그리고 섬유소 분해 속도는 표면 부착 속도보다 좀 늦은 배양 24시간에 0.95% DM/h로 최고 정점에 도달하였다.

따라서 본 연구결과는 반추위 발효 진행 과정에서 섬유소 분해 박테리아 총균의 증식에 따라 조사료의 소화가 증가되며, 상당히 많은 섬유소 분해 박테리아들이 조사료 유입과 동시에 표면 부착이 발생하고, 이들 부착 섬유소 분해 박테리아의 활성화가 먼저 진행된 후에 섬유소 분해 활성화가 이루어

저야 조사료 소화의 극대화를 가져올 수 있다는 사실을 제시하여 주었다.

V. REFERENCES

- Akin, D.E. and Barton, F.E., 1983. Rumen microbial attachment and degradation of plant cell walls. Federation. Proceeding. 42:114-121.
- Cheng, K.J. and Costerton, J.W. 1980. Adhesive bacteria. Their role in digestion of plant material, urea and epithelial cells. Pages 225-250 in digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Ruchebusch, Y. and Thivend, P. Eds, MTP press Ltd., Lancaster, England.
- Devandra, C. 1982. Perspectives in the utilization of untreated rice straw by ruminants in Asia. In: The utilization of fibrous agricultural residue as animal feeds. ed. P. T. Doyle. School of Agric. and Forestry. Univ. of Melbourne. Aust.
- Forsberg, 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.
- Hungate, R.E. 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press. New York, N. Y.
- Hwang, I.H., Lee, C.H. Kim, S.W., Sung, H.G., Lee, S.Y., Lee, S.S., Hong, H., Kwan, Y.C. and Ha, J.K. 2008. Effects of mixtures of Tween80 and cellulolytic enzymes on nutrient digestion and cellulolytic bacterial adhesion. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21:1604-1609.
- Jankson, M.G. 1977. The alkali treatment of straw. Anim. Feed Sci. Technol. 2:105-116.
- Khampa, S.,M. Wanapat, C. Wachirapakorn, N. Nontasol, M. Wattiaux, A. and Rowlison, P. 2006. Effect of levels of sodium DL-malate supplementation on ruminal fermentation efficiency of concentrates containing high levels of cassava chip in dairy steers. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19:368-375.
- 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.
- 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.
- Krause, D.O. and Russell, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? J. Dairy Sci. 79:1467-1475.
- 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.
- McDougall, E.I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43:99-109.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L. and Fonty, G. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. Reprod. Nutr. Dev. 41:187-194.
- Minato, H., Mitsumori, M. and Cheng, K.J. 1993. Attachment of microorganisms to solid substrates in the rumen. Pages 139-145 in Proc. MIE bioforum on Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation. Institut Pasteur, Paris, France.
- Min J.K., Sung H.G., Santi D.U., Ha J.K., and Lee S.S. 2013. Effects of Methylcellulose on Fibrolytic Bacterial Detachment and *In vitro* Degradation of Rice Straw. Asian Australas. J. Anim. Sci. 10 : 1459-1465
- Minato, H., Mitsumori, M. and Cheng, K.J. 1993. Attachment of microorganisms to solid substrates in the rumen. Pages 139-145 in Proc. MIE bioforum on Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation. Institut Pasteur, Paris, France.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrisont, M. 2001. Adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. J. Dairy Sci. 84:1294-1309.
- Pan, J., Koike, S., Suzuki, T., Ueda, K., Kobayashi, Y., Tanaka, K. and Okubo, M. 2003. Effect of mastication on degradation of orchardgrass hay stem by rumen microbes: fibrolytic enzyme activities and microbial attachment. Anim. Feed Sci. Technol. 106:69-79.
- Pell, A.N. and Schofield, P. 1993. Microbial adhesion and degradation of plant cell walls Pages 397-423 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility. R. D. Hatfield, H. G. Jung, J. Ralph, D. R. Buxton, D. R. Mertens, and P. J. Weimer, eds ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Purdy, K.J., Embley, T.M., Takii, S. and Nedwell, D.B. 1996. Rapid extraction of DNA and RNA from sediments by novel hydroxyapatite spin-column method. Appl. Environ. Microbiol. 62:3905-3970.
- Russell, J.B. and Rychlik, J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. Science. 292:1119-1122.
- Sung, H.G., Min, D.M., Kim, D.K., Li, D.Y., Kim, Y.H., Upadhaya, S.D. and Ha, J.K. 2006. Influence of transgenic corn on the *In vitro* rumen microbial fermentation. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19:1761-1768.
- Sung H.G., Kim M.J., Upadhaya S.D., Ha J.K. and Lee S.S.. 2013. Effects of methylcellulose on cellulolytic bacteria attachment and rice straw degradation in the *In vitro* rumen fermentation. Asian Australas. J. Anim. Sci. 26:1276-1281.
- Sung, H.G., Kobayashi, Y., Chang, J., Ha, A., Hwang, I.H. and Ha, J.K. 2009. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20:200-207.
- Sung, H.G. 2013. The Effects of yeast culture utilization on rice straw digestibility and cellulolytic bacterial function in ruminant. J.

Animal Science and Technology. 55:41-49.

Sung, H.G. 2014. Study on roughage degradation and adhesion of rumen fibrolytic bacteria by Real-Time PCR. *J. Animal Science and Technology*. 34:60-67.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Benno, Y. 2001. Diet-Dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microb.*

2766-2744.

Williams, A.G. and Strachan, N.H. 1984. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. *Can. J. Anim. Sci.* 64:58-59.

(Received : January 23, 2017 | Revised : February 14, 2017 | Accepted : March 19, 2017)