

비이온성 계면활성제 Tween 80의 첨가가 반추위 혼합 미생물에 의한 *in vitro* 가스발생량, 건물소화율, 효소활력 및 미생물 성장율에 미치는 영향

이신자 · 김완영¹ · 문여황² · 김현섭³ · 김경훈³ · 허종규⁴ · 이성실*

경상대학교 응용생명과학부, ¹한국농업대학 축산학과, ²진주산업대학교 동물생명과학과, ³농촌진흥청 축산자원개발부, ⁴서울대학교 농생명공학부

Received October 18, 2007 / Accepted November 26, 2007

Effects of Non-ionic Surfactant Tween 80 on the *in vitro* Gas Production, Dry Matter Digestibility, Enzyme Activity and Microbial Growth Rate by Rumen Mixed Microorganisms. Shin Ja Lee, Wan Young Kim¹, Yea Hwang Moon², Hyeon Shup Kim³, Kyoung Hoon Kim³, Jong Kyu Ha⁴ and Sung Sill Lee*. *Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, ¹Department of Animal Science, Korea National Agricultural College, ²Department of Animal Sci. & Biotech., RAIC, Jinju National University, ³National Livestock Research Institute, R.D.A, ⁴School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University* - The non-ionic surfactant (NIS) Tween 80 was evaluated for its ability to influence *in vitro* cumulative gas production, dry matter digestibility, cellulolytic enzyme activities, anaerobic microbial growth rates, and adhesion to substrates by mixed rumen microorganisms on rice straw, alfalfa hay, cellulose filter paper and tall fescue hay. The addition of NIS Tween 80 at a level of 0.05% increased significantly ($P<0.05$) *in vitro* DM digestibility, cumulative gas production, microbial growth rate and cellulolytic enzyme activity from all of substrates used in this study. *In vitro* cumulative gas production from the NIS-treated substrates; rice straw, alfalfa hay, filter paper and tall fescue hay was significantly ($P<0.05$) improved by 274.8, 235.2, 231.1 and 719.5% compared with the control, when substrates were incubated for 48 hr in *in vitro*. The addition of 0.05% NIS Tween 80 to cultures growing on alfalfa hay resulted in a significant increase in CMCase (38.1%), xylanase (121.4%), Avicelase (not changed) and amylase (38.2%) activities after 36 h incubation. These results indicated that the addition of 0.05% Tween 80 could greatly stimulate the release of some kinds of cellulolytic enzymes without decreasing cell growth rate in contrast to trends reported with aerobic microorganism. Our SEM observation showed that NIS Tween 80 did not influence the microbial adhesion to substrates used in the study. Present data clearly show that improved gas production, DM digestibility and cellulolytic enzyme activity by Tween 80 is not due to increased bacterial adhesion on the substrates.

Key words : Tween 80, DM digestibility, Enzyme activity, SEM

서 론

반추동물의 반추위 환경을 인위적으로 조절함으로써 사료의 이용효율을 증진시키고 반추동물의 생산성을 극대화시키기 위한 연구들이 반추동물 영양생리학 연구의 근간을 이루어 왔다. 반추위 발효를 조절하기 위하여 많은 종류의 사료 첨가제들이 개발되었거나 개발되고 있다. 지난 수 십 년간 수행된 연구의 방향은 주로 메탄 생성 억제제(methane producing inhibitors), 항생제 및 항생제 대체물질, 단백질이나 펩타이드 분해 억제제(proteolysis inhibitors) 또는 탈아미노 반응 억제제(deamination inhibitors), inophores계 항생제로 대표되는 프로토조아 제거제(defaunation agent), 외인성 효소제(exogenous enzymes), 지방산과 보호지방, 보호단백질,

완충제(buffering agents), 인공타액(artificial saliva), probiotics, 생효모 배양물(live yeast cultures)이나 곰팡이 발효 추출물(mold fermentation extracts)과 같은 비 세균성 미생물제제(non-bacterial direct-fed microbials, DFM) 등에 대한 것들로 요약할 수 있다[10]. 보다 최근에는 Lee와 Ha [14] 및 Lee 등[12,15-19]은 일련의 연구결과를 바탕으로 비이온성 계면활성제 Tween 80은 반추위 미생물의 성장률을 촉진시키고 혐기성 미생물이 분비하는 섬유소 효소의 분비를 촉진시키고 섬유소 소화율을 증가시키므로써 동물의 생산성을 향상시키기 때문에 사료 첨가제로서의 개발 가능성을 시사하였다. 실제로 Tween 80은 국내에서 2005년도에 사료첨가제로 개발되어 많은 양이 판매되고 있다. Lee와 Ha [14] 및 Lee 등[12,15-19]이 수행한 일련의 연구 중, *in vitro* 실험에서는 기질물질로 filter paper와 볏짚을 그리고 *in vivo* 실험에서는 사료원으로 주로 볏짚만을 이용하였다. 따라서 본 연구에서는 볏짚과 filter paper는 물론 조사료 자원으로 많이 이용되

*Corresponding author

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

E-mail : lss@gnu.ac.kr.

고 있는 두과의 알팔파 건조와 화본과의 툴페스큐 건조를 기질로 *in vitro* 배양하였을 때, 비이온성 계면활성제 Tween 80의 첨가가 반추위 발효성상, gas 발생량, 섬유소 분해효소의 활성, 각종 기질의 건물 소화율 그리고 미생물 성장률에 어떠한 영향을 미치는지를 구명하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

볏짚(국내산 동진벼), 알팔파(캐나다산 수입품), 툴페스큐(미국산 수입품) 그리고 filter paper (Whatman 1, Sigma-Aldrich)를 75°C의 강제 송풍 건조기에서 약 18시간 건조시킨 다음, 2 mm screen이 부착된 Wiley mill에서 분쇄하여 공시재료로 사용하였다. 전량이 cellulose로 구성된 filter paper를 제외하고 AOAC 법[1]으로 분석한 공시재료의 화학적 조성은 Table 1에서와 같다. 한편 비이온성 계면활성제(Non-ionic surfactant; NIS) Tween 80 (Description: Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate×Tween 80KR, Polysorbate, Catalog number: P0343)은 Sigma-Aldrich Korea로부터 구매하여 사용하였다. 구입한 Tween 80은 황색에 가까운 짙은 노란색으로 점성이 다소 높은 액체였지만 낮은 농도에서는 물과 쉽게 혼합되는 특징이 있었다. 따라서 *in vitro* 배양시에는 특별한 처리없이 농도를 계산하여 배양액중에 첨가하였다.

공시축 및 사양관리

반추위 누관이 장착된 체중 약 600 kg의 홀스타인 착유우 2두로부터 *in vitro* 시험을 위한 반추위액을 채취하였다. 사료는 농후사료와 조사료(볏짚+티모시)의 비율을 풍건기준으로 4:6(2+4)으로 하여 체중의 3% 양을 1일 2회(06:00와 16:00) 분할하여 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 자유 섭취토록 하였다.

***In vitro* 배양 및 실험설계**

In vitro 배양액은 Dehority artificial medium을 사용하였

Table 1. Chemical composition of rice straw, alfalfa hay and tall fescue hay used in the present study as substrates

| Chemical composition | Substrates | | |
|--------------------------|------------|-------------|-----------------|
| | Rice straw | Alfalfa hay | Tall fescue hay |
| Moisture (%) | 8.31 | 10.67 | 9.57 |
| Crude protein (% DM) | 5.07 | 21.59 | 12.65 |
| Crude fat (% DM) | 1.35 | 1.54 | 1.70 |
| Crude fiber (% DM) | 32.04 | 27.38 | 31.23 |
| Crude ash (% DM) | 13.42 | 6.23 | 7.77 |
| NDF ¹⁾ (% DM) | 75.41 | 35.44 | 52.16 |
| ADF ²⁾ (% DM) | 51.01 | 27.95 | 29.49 |

¹⁾NDF: Neutral detergent fiber, ²⁾ADF: Acid detergent fiber

고 Dehority와 Scott [3]의 방법에 따라 제조하였다. 반추위 혼합 미생물로 사용될 위액은 *in vitro* 미생물 접종 개시 2시간 전에 반추위 cannula를 통하여 채취하였다. 채취한 위액은 미리 보온되고 oxygen free-CO₂ gas가 충전된 용기에 담아 실험실로 운반한 다음 사료입자에 부착되어 있는 미생물을 분리하기 위하여 homogenizer에 넣고 oxygen free-CO₂ gas를 충전하여 강하게 교반한 다음 2겹의 cheese cloth로 여과하여 반추위 미생물을 분리하기 위한 시료로 사용하였다. 여과된 위액은 30분~1시간 정도 정치시켜 사료입자를 부유시킨 다음 진공펌프로 부유된 상층액을 완전히 제거시킨 후, 하층액을 반추위 혼합 미생물로 사용하였다.

공시된 기질(볏짚, 알팔파 건조, filter paper 그리고 툴페스큐 건조) 약 750 mg을 30 ml의 배양관 (serum bottle)에 넣고 9 ml의 Dehority artificial medium (NIS 처리구는 medium 제조시에 NIS가 총 배양액에 0.05% (v/v)되게 첨가, Control구는 동일양의 증류수로 대체함)을 anaerobic gas-sing system을 이용하여 혐기적으로 분주한 다음 121°C에서 20분간 멸균 시켰다. 멸균이 완료된 배양관에 시험설계에 따라 분리된 반추위 혼합 미생물을 각각 1 ml씩 혐기적으로 접종한 다음 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48 그리고 72 시간동안 38°C의 shaking incubator (120 rpm)에서 각 처리구마다 3반복으로 배양하였다. 각 배양 시간이 완료되면 발효시험관을 shaking incubator에서 꺼낸 후, gas 발생량 측정, 미생물 성장량과 효소활력 측정을 위한 sample 채취, 그리고 pH 측정 및 *in vitro* 소화율 측정의 순으로 분석작업을 수행하였다.

조사항목 및 조사방법

In vitro 건물 소화율은 Moore [24] 방법으로, 시험에 사용할 filter paper 무게를 미리 측정해 두었다가 pH 측정 후, filter paper에 걸리진 내용물과 filter paper를 105°C drying oven에서 12시간 건조시킨 다음, 아래 공식으로 구하였다.

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

In vitro 건물소화율 실험을 통해 얻어진 각 발효시간대별 소화율을 기초로 하여 다음의 Ørskov와 McDonald [32]의 방법에 의해 소화율을 추정하였다.

$$P = a + b (1 - e^{-ct})$$

P : 시간 "t" 경과시 반추위 내 건물 소화율(%)

a : 시간 "0" 시간대의 건물 소화율(%), 신속하게 소화되는 부분.

b : 주어진 시간에 있어서 소화될 수 있는 건물의 잠재적인 소화율(%)

c : "b"부분의 시간당 소화상수

t : 반추위내 발효시간

유효 소화도(effective ruminal digestibility, ED)는 사료의

반추위 내 통과속도를 시간당 6%(r=0.06)로 가정하여[25], 다음과 같은 공식으로 추정하였다[32].

$$ED = a + b\{c/(c+r)\}$$

r : 사료의 반추위내 통과속도

a, b, c : 건물 분해상수의 공식에서와 동일.

Gas 발생량은 각 발효시간대별로 시험관을 shaking incubator에서 꺼낸 후, 온도에 따른 변화를 감안하여 상온에서 20분간 방치시킨 다음, water displacement apparatus를 이용하여 gas 발생량을 측정하였다[6]. 가스발생량의 추정과 반추위 통과속도를 감안한 유효 가스발생량의 측정은 *in vitro* 소화율 방법에서와 동일하게 산출하였다.

In vitro 미생물 성장량 측정은 각 시간대별로 발효된 시험관으로부터 배양액 1.5 ml를 test tube에 취한 다음 사료입자를 제거하기 위하여 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 시킨다. 상층액을 14,000 rpm에서 3분간 다시 원심분리하여 미생물 pellet을 침전시킨 다음, 상층액은 제거하고 침전물에 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 첨가하여 vortex로 현탁시킨다. 이 과정을 3회 반복한 후에 spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 OD (optical density)값을 비교하여 미생물 성장량을 구하였다.

pH 변화는 각 발효시간대별 gas 발생량 측정과 미생물 성장량과 효소 활력측정을 위한 시료를 채취한 다음 pH meter (Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.

효소활력 측정에서 Cellulase 효소의 활력 측정은 Miller 등[23]의 방법에 따라, 조효소액 0.5 ml과 기질용액으로 2% (W/V)의 CMC 용액이 현탁된 0.1 M acetate buffer (pH 5.0)를 혼합하여 1 ml이 되게 한 후, 55°C에서 30분간 반응시키고 100°C에서 5분간 진탕하여 반응을 중지시킨 다음 상등액 내의 환원당의 양을 DNS (dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Cellulase의 1 unit는 1분당 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Xylanase 활력은 기질용액을 0.1 M acetate buffer에 2% (W/V) oat spelt xylan 현탁액이 되게 하여 cellulase 활력 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였다. Xylanase의 1 unit는 1분당 1 μmol의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Avicelase 활력은 기질용액을 0.1 M acetate buffer에 5% (W/V) avicel 용액이 되게 하여 cellulase 활력 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였다. Avicelase의 1 unit는 1분당 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Amylase의 활력은 기질용액을 0.1 M acetate buffer에 1% (W/V) starch용액이 되게 하여 cellulase 활력방법과 동일한 방법으로 측정하였으나, 반응시간을 55°C에서 2시간으로 하였다. Amylase의 1 unit는 1분당 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

반추위 혼합 미생물의 기질 부착성 관찰은 공시된 반추위

혼합 미생물이 공시된 각종 기질에 부착하는 정도나 양상을 관찰하기 위하여 전자현미경 SEM (scanning electron microscopy)을 촬영하였다. SEM 촬영을 위한 전처리는 Ho 등[9]의 방법을 응용하여 진공상태에서 시료의 변형을 방지하기 위하여 0.5%와 5% glutaraldehyde용액으로 고정된 후, cacodylic buffer로 세척하여 유기용매 치환법으로 10, 20, 30, 50, 70, 90 및 100%의 ethyl alcohol을 차례로 30분간 통과시켜 탈수 시켰다. 탈수가 끝난 시료를 임계점 건조법(critical point drying method)으로 시료를 내압한 다음 mounting 시켰다. 진공 증착장치에서 금(gold)를 분사하여 시료표면에 증착시킨 후 SEM으로 미생물의 부착양상을 관찰하였다.

통계처리

실험 결과는 SAS [27] program의 General Linear Model (GLM) procedure에 따라 처리되었으며, 각 처리구간에 유의성 검증을 위해 분산분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test [5]로 유의성 차이를 검정하였다. P<0.05 수준에서 유의성 유·무를 평가하였다.

결과 및 고찰

***In vitro* 건물 소화율**

반추위 혼합미생물에 의한 공시시료의 *in vitro* 건물 소화율은 Table 2에서와 같다. 배양 8시간 이후부터 NIS의 처리 여부에 관계없이 모든 처리구에서 건물소화율이 급격히 증가하였다. 그러나 배양시간의 경과에 따라 건물소화율이 증가되는 정도는 NIS 처리구가 무처리구에 비해 유의적으로 높았다(P<0.05). 발효 48시간대를 기준으로 볏짚, 알팔파 건초, filter paper 및 툴페스큐 건초의 건물 소화율을 비교할때 툴페스큐 건초의 건물 소화율이 (52.54%) 가장 높았고 볏짚이 (37.36%) 가장 낮았다. 48시간대 NIS 첨가구의 건물 소화율은 각각 40.06, 60.74, 61.03 및 64.12%로 측정되어 NIS의 첨가로 인하여 건물 소화율이 각각 7.22, 28.74, 45.30 및 22.04%정도 향상됨을 보였다. 이러한 증가율은 가장 최근에 볏짚에 관해서 review된 Van Soest [30]의 종설결과와 비교해 볼 때, *in vitro* 상에서 볏짚의 물리적 처리(Steam과 Pressure)에 의한 증가 약 +39 ml (g/kg)~+88 (g/kg)이나 화학적 처리(ammonia 처리와 urea처리)에 의한 증가율 약 +72~+330 (g/kg) 그리고 미생물 처리시 보다도 더 효과적이라는 것을 입증하는 결과라고 생각된다. 또한 국내에서 Lee와 Ha [14] 및 Lee 등[12,1518]의 연구결과를 바탕으로 비이온성 계면활성제 Tween 80은 반추위 미생물의 성장률을 촉진시키고 혐기성 미생물이 분비하는 섬유소 효소의 분비를 촉진시키고 섬유소 소화율을 증가시킴으로써 동물의 생산성을 향상시키기 때문에 사료 첨가제로서의 개발 가능성을 시사하였다. 실제로 Tween 80은 국내에서 2005년도에 사

Table 2. *In vitro* dry matter degradabilities (%) of various substrates by rumen mixed microorganisms

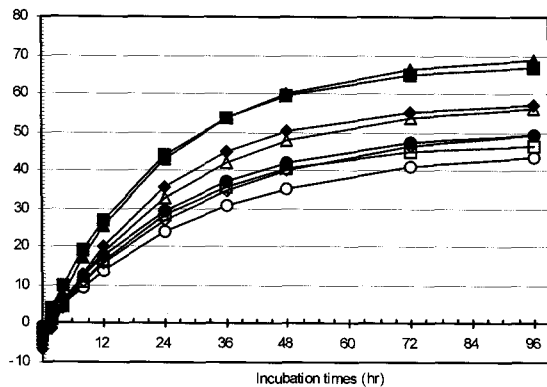
| Item | Substrates | | | | | | | | |
|--|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | Rice straw | | Alfalfa hay | | Filter paper | | Tall fescue hay | | |
| | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS | |
| <i>Incubation time</i> ----- <i>Extent of DM degradability (%)</i> ----- | | | | | | | | | |
| 2 h | 2.55±0.12 ^b | 3.56±0.35 ^{ab} | 3.52±0.30 ^{ab} | 4.20±0.66 ^a | 3.26±0.28 ^{ab} | 3.63±0.32 ^{ab} | 3.45±0.27 ^{ab} | 3.57±0.30 ^{ab} | |
| 4 h | 4.53±0.91 ^c | 4.72±0.58 ^{bc} | 7.34±1.11 ^b | 11.67±0.89 ^a | 5.01±0.19 ^{bc} | 5.22±0.91 ^{bc} | 7.28±0.35 ^b | 10.74±0.97 ^a | |
| 8 h | 8.90±1.22 ^{bc} | 10.19±0.55 ^{bc} | 7.90±0.67 ^c | 15.69±1.17 ^a | 9.90±1.12 ^{bc} | 10.04±0.20 ^{bc} | 11.47±0.74 ^b | 16.48±1.00 ^a | |
| 12 h | 14.71±0.46 ^b | 17.91±2.17 ^b | 15.68±2.57 ^b | 28.51±1.75 ^a | 18.01±1.44 ^b | 18.16±0.32 ^b | 18.67±1.43 ^b | 23.97±0.88 ^a | |
| 18 h | 20.47±0.71 ^b | 26.56±2.13 ^{bc} | 26.18±0.31 ^{bc} | 39.67±0.81 ^a | 20.81±0.46 ^d | 23.06±2.37 ^{cd} | 23.49±1.26 ^{cd} | 29.07±0.14 ^b | |
| 24 h | 24.99±1.37 ^c | 32.62±0.72 ^b | 26.55±2.71 ^c | 40.16±1.21 ^a | 24.34±1.67 ^c | 37.53±2.81 ^{ab} | 25.68±2.19 ^b | 38.42±2.41 ^{ab} | |
| 36 h | 25.47±2.21 ^d | 36.21±1.62 ^c | 33.30±0.63 ^c | 53.90±2.98 ^a | 33.92±2.74 ^c | 36.43±2.15 ^c | 43.62±1.10 ^b | 57.45±0.98 ^a | |
| 48 h | 37.36±1.00 ^d | 40.06±0.76 ^d | 47.18±3.71 ^{cd} | 60.74±0.71 ^{ab} | 42.00±1.11 ^d | 61.03±4.47 ^{ab} | 52.54±6.26 ^{bc} | 64.12±2.59 ^a | |
| <i>Parameters</i> ----- <i>DM degradability constants*</i> ----- | | | | | | | | | |
| a (%) | -0.57 | -0.74 | -2.98 | -1.56 | -0.75 | -6.49 | -3.16 | -4.21 | |
| b (%) | 46.53 | 51.70 | 50.70 | 69.40 | 52.65 | 64.32 | 61.31 | 74.12 | |
| a+b (%) | 45.96 | 50.96 | 47.72 | 67.84 | 51.90 | 57.83 | 58.15 | 69.91 | |
| k (h ⁻¹) | 0.0310 | 0.0364 | 0.0403 | 0.0445 | 0.0309 | 0.0443 | 0.0369 | 0.0423 | |
| ED ^{**} (%) | 17.24 | 21.04 | 19.65 | 31.12 | 19.36 | 23.73 | 22.87 | 29.76 | |

Mean±SE(Standard error). ^{a,b}Means with different superscripts in the same rows between control and NIS in a substrate are different ($P < 0.05$).

*The DM degradation parameters, *a*, *b* and *k* for the negative exponential equation, $P = a + b[1 - \exp(-k \times \text{time})]$; *P* is an *in vitro* digestibility rate at time *t*; *a*+*b*, potential degradation rate; *k*, the fractional rate of degradation per hour.

**ED: Effective degradability (substrate availability) of various un- and NIS treated substrates was calculated as $ED = a + b[k_d / (k_d + k_p)]$, *k_d* (*k*) is a digestion rate constant, and *k_p* is a passage rate constant assumed to be 0.05h⁻¹.

(A) *In vitro* DM digestibility curve (%)



(B) Cumulative gas production curve

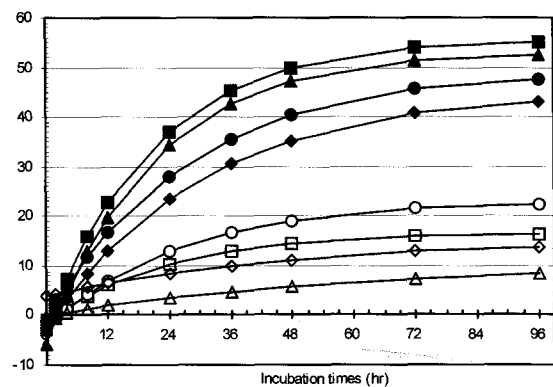


Fig. 1. Fitted curves of *in vitro* DM digestibility profile (A) and cumulative gas production profile (B) by rumen mixed anaerobic microorganisms grown in the medium with un-treated (open style) and NIS-treated (filled style) substrates (rice straw, ○-●; alfalfa hay, □-■; filter paper, ◇-◆; and tall fescue hay, △-▲); representing the rate of gas production expressed in mL gas · g⁻¹ DM · hr⁻¹. The cumulative gas production and *in vitro* DM digestibility profiles were derived from a negative exponential equation without lag time: $Gp = a + b[1 - \exp(-k \times \text{time})]$.

료첨가제로 개발되어 많은 양이 시판되고 있다.

그림 1(A)는 각종 기질에 NIS를 첨가하였을 경우에 건물 소화율이 급격히 증가하는 현상을 시각적으로 보여 주고 있다.

Gas 발생량

공시시료를 반추위 혼합미생물로 배양하여 생성된 cumu-

lative gas 발생량은 Table 3에서와 같이 무처리 기질의 경우는 배양 8-12시간 이후부터 NIS 처리 기질은 배양 4시간 이후부터 가스 발생량이 급격히 증가하였다. 발효 48시간대를 기준으로 볏짚, 알팔파 건초, filter paper 및 툴페스큐 건초 0.1 g의 기질에서 발생된 가스량은 각각 11.10, 14.40, 10.57 및 5.80 ml로서 알팔파 건초에서의 가스 발생량이 가장 높았

Table 3. Cumulative gas production rate (ml/0.1 g substrate) in *in vitro* fermentation of various substrates by rumen mixed microorganisms

| Item | Substrates | | | | | | | |
|----------------------------------|---|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| | Rice straw | | Alfalfa hay | | Filter paper | | Tall fescue hay | |
| | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS |
| <i>Incubation time</i> | <i>Extent of cumulative gas production (ml/ 0.1 g DM of substrates)</i> | | | | | | | |
| 2 | 0.00±0.00 ^c | 1.93±0.24 ^b | 0.00±0.00 ^c | 2.53±0.20 ^b | 4.13±0.22 ^a | 2.43±0.90 ^b | 0.00±0.00 ^c | 2.73±0.30 ^b |
| 4 | 0.03±0.03 ^d | 6.53±0.44 ^{ab} | 1.07±0.12 ^d | 7.33±0.07 ^a | 5.40±0.53 ^b | 3.27±0.55 ^c | 1.27±0.42 ^d | 6.37±0.8 ^{ab} |
| 8 | 1.93±0.09 ^e | 12.23±0.07 ^{ab} | 4.50±0.25 ^{de} | 14.40±0.47 ^a | 5.47±0.57 ^d | 6.83±1.13 ^{cd} | 1.63±0.03 ^e | 9.63±2.67 ^{bc} |
| 12 | 2.53±0.07 ^f | 16.47±0.43 ^b | 7.30±0.40 ^{de} | 23.40±0.36 ^a | 5.53±1.07 ^{ef} | 10.87±0.44 ^{cd} | 1.70±0.21 ^f | 13.70±3.66 ^{bc} |
| 18 | 4.27±0.19 ^f | 21.77±0.67 ^c | 7.37±0.61 ^e | 31.43±0.74 ^a | 8.23±0.20 ^e | 17.97±0.52 ^d | 1.87±0.09 ^g | 29.00±0.61 ^b |
| 24 | 6.67±0.28 ^d | 29.13±0.17 ^b | 12.53±0.81 ^c | 39.50±0.36 ^a | 9.00±1.40 ^d | 27.27±2.12 ^b | 3.27±0.38 ^c | 36.80±0.20 ^a |
| 36 | 8.67±0.54 ^{de} | 35.80±0.83 ^b | 11.43±0.37 ^d | 44.80±0.52 ^a | 10.33±3.16 ^{de} | 29.73±0.92 ^c | 5.40±3.41 ^e | 43.30±0.70 ^a |
| 48 | 11.10±0.31 ^e | 41.60±0.12 ^b | 14.40±2.18 ^d | 48.27±0.57 ^a | 10.57±0.07 ^e | 35.00±0.55 ^c | 5.80±0.90 ^f | 47.53±1.03 ^a |
| <i>Parameters</i> | <i>Gas production parameters</i> | | | | | | | |
| a (%) | -2.22 | -0.84 | -1.04 | -2.71 | 3.93 | -2.49 | -0.09 | -5.78 |
| b (%) | 25.41 | 50.13 | 17.87 | 58.45 | 11.21 | 47.69 | 10.05 | 58.83 |
| a+b (%) | 23.19 | 49.29 | 16.83 | 55.74 | 15.14 | 45.20 | 9.96 | 53.05 |
| k (h ⁻¹) | 0.0377 | 0.0360 | 0.0423 | 0.0476 | 0.0216 | 0.0327 | 0.0185 | 0.0478 |
| E _{GP} [*] (%) | 8.70 | 20.15 | 7.15 | 25.80 | 7.31 | 16.37 | 2.62 | 22.97 |

Mean±SE(Standard error). ^{a,b}Means with different superscripts in the same rows between control and NIS in a substrate are different ($P<0.05$).

^{*}The gas production parameters, *a*, *b* and *k* for the negative exponential equation, $G_p = a + b[1 - \exp(-k \times \text{time})]$; G_p is a gas production (mL/0.1g DM of substrate) of time *t*; *a*+*b*, potential gas production; *k*, the fractional rate of gas production per hour; ^{*}E_{GP}, Effective gas production rate.

고 톨페스큐 건초에서 가장 낮았다. 48시간대 NIS 첨가구의 0.1 g의 기질에서 발생된 가스량은 각각 41.60, 48.27, 35.00 및 47.53 ml로서 NIS의 첨가로 인하여 가스발생량이 각각 274.77, 235.20, 231.12 및 719.48%정도 증가되었다.

Lee와 Ha [14]는 Tween 80을 이용하여 *in vitro* 시험에서, 보리 알곡과 오차드그라스 건초를 기질로 하여 반추위 혼합 미생물을 배양 시에 Tween 80을 각각 0.05%와 0.10%를 첨가하였을 때, 0.05% 수준에서는 무첨가구와 비교하여 가스 생성량에서 유의적인 차이가 없었고, 0.10% 수준을 첨가하였을 경우에는 가스 생성량이 감소하였다고 하였는데 이는 기질의 종류와 비이온성 계면활성제의 첨가 수준이 가스 발생량에 다양한 영향을 미치는 것으로 이해할 수 있다. 또한 NIS의 첨가로 인하여 각종 기질의 건물 소화율과 기질에서의 가스발생량이 크게 증가하였지만 증가폭과 두 조사항목과 기질 상호간에 뚜렷한 차이점이 나타나지 않았다. 그러나 NIS의 첨가로 인하여 유효 가스발생량이 벚짚, 알팔파 건초, filter paper 및 톨페스큐 건초 기질에서 각각 2.32, 3.61, 2.24 및 8.77 배 정도 급격히 증가되는 것으로 조사되었다. 가스 발생량이 증가되었다는 것은 기질의 분해와 발효가 많이 진행되었다는 것을 의미하므로[21,22] 벚짚과 같은 저질 조사료뿐만 아니라 톨페스큐와 같은 양질의 조사료 그리고 알팔파와 같은 두과 조사료 자원을 이용할 경우에도 NIS는 사료 첨가

제로서 두루 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

그림 1(B)는 각종 기질에 NIS를 첨가하였을 경우에 가스 발생량이 급격히 증가하는 현상을 시각적으로 보여 주고 있다.

In vitro 미생물 성장률

NIS의 첨가에 의한 반추위 혼합 미생물의 성장률은 Table 4에서와 같다. *In vitro*상에서 미생물의 성장률이 정점에 달하였던 18시간대를 기준으로 벚짚, 알팔파 건초, filter paper 및 톨페스큐 건초 기질에서의 미생물 성장률이 OD값 기준으로 각각 0.86, 0.95, 0.70 및 1.28로서 톨페스큐 건초에서의 미생물 성장률이 가장 높았고 filter paper 기질에서 가장 낮았다. 동일 발효시간대 NIS 첨가구의 미생물 성장률은 각각 1.03, 1.22, 0.82 및 1.45로 측정되어 NIS의 첨가로 인하여 미생물의 성장률이 유의적($P<0.05$)으로 증가하였다. 비이온성 계면활성제인 Tween 80은 호기성 미생물 특히 곰팡이로부터 효소생산량을 증가시킬 목적으로 아주 오래 전인 1960년대에 효소생산 공정에 사용된 물질이었지만[26,28] Tween 80은 점도가 높은 지방질로 구성되어 있어 이 물질이 미생물 막을 둘러싸고 산소공급을 차단시켜 미생물의 성장을 억제시키는 역할을 함으로써[4,31] 현재는 호기성 미생물에는 사용하지 않고 있다. 그러나 Lee 등이 수행한 일련의 연구

Table 4. Microbial growth rate (OD value) in *in vitro* various substrtes by rumen mixed microorganisms

| Incubation time(h) | Substrates | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Rice straw | | Alfalfa hay | | Filter paper | | Tall fescue hay | |
| | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS |
| 2 | 0.82±0.05 ^{bc} | 0.74±0.02 ^c | 0.88±0.02 ^b | 0.89±0.06 ^b | 0.62±0.03 ^d | 0.57±0.04 ^d | 1.15±0.02 ^a | 1.21±0.01 ^a |
| 4 | 0.74±0.02 ^d | 0.74±0.03 ^d | 0.82±0.02 ^c | 1.06±0.02 ^b | 0.66±0.02 ^d | 0.52±0.02 ^e | 1.12±0.03 ^b | 1.21±0.03 ^a |
| 8 | 0.69±0.02 ^{de} | 0.76±0.02 ^{cd} | 0.81±0.02 ^c | 0.99±0.03 ^b | 0.57±0.02 ^f | 0.66±0.01 ^e | 1.15±0.02 ^a | 1.21±0.05 ^a |
| 12 | 0.81±0.01 ^d | 0.97±0.02 ^c | 0.98±0.04 ^c | 1.12±0.05 ^b | 0.60±0.02 ^e | 0.68±0.02 ^e | 1.18±0.01 ^b | 1.31±0.03 ^a |
| 18 | 0.86±0.03 ^c | 1.03±0.00 ^c | 0.95±0.03 ^d | 1.22±0.01 ^b | 0.70±0.01 ^f | 0.82±0.03 ^c | 1.28±0.03 ^b | 1.45±0.01 ^a |
| 24 | 0.70±0.02 ^e | 1.03±0.06 ^c | 1.04±0.01 ^c | 1.27±0.02 ^b | 0.66±0.01 ^e | 0.85±0.06 ^d | 1.12±0.02 ^c | 1.47±0.02 ^a |
| 36 | 0.67±0.03 ^e | 0.98±0.02 ^d | 1.00±0.00 ^d | 1.41±0.05 ^b | 0.42±0.07 ^f | 0.70±0.04 ^e | 1.19±0.03 ^c | 1.58±0.02 ^a |
| 48 | 0.67±0.01 ^e | 1.33±0.10 ^b | 1.09±0.03 ^c | 1.57±0.03 ^a | 0.62±0.05 ^e | 0.92±0.05 ^d | 1.11±0.03 ^c | 1.68±0.02 ^a |

Mean±SE (Standard error). ^{a,b}Means with different superscripts in the same rows between control and NIS in a substrate are different ($P<0.05$).

[12,15-19]를 통하여 NIS는 반추위 혐기성 미생물의 성장률을 오히려 증가 시킨다고 하였다.

Lee 등[15]은 반추위 순수 미생물을 이용한 실험에서 NIS Tween 80을 0.05%와 0.10% 수준으로 첨가하였을 경우에 비섭유소 분해 미생물군(*Ruminobacter amylophilus*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola* 및 *Selenomonas ruminantium*)의 성장률은 크게 증가되었으며 섭유소 분해 미생물군(*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* 및 *Butyrivibrio fibrisolvens*)의 성장률에는 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 monocentric 혐기성 곰팡이(*Neocallimastix patriciarum* 및 *Piromyces communis*) 및 polycentric 혐기성 곰팡이(*Orpinomyces joyonii* 및 *Anaeromyces mucronatus*)의 성장률은 크게 증가한다고 하였다. 또한 그람 양성 박테리아 보다는 그람 음성 박테리아의 성장률에 더 많은 영향을 나타낸다고 하였다. Lee 등[15]은 NIS Tween 80을 반추위액 중 0.05% 수준으로 반추위 누관을 통하여 첨가하였을 경우에도 반추위내 총 혐기성 미생물의 수가 증가한다고 하였다. 이러한 일련의 결과들과 본 연구에서의 결과는 NIS는 효소생성 촉진의 목적으로 호기성 미생물에는 사용할 수 없지만 혐기

성 미생물에는 사용 가능하다는 것을 충분히 증명하는 연구 결과로 생각된다.

배양액중 pH와 효소활력의 변화

NIS의 첨가에 의한 반추위 혼합 미생물의 pH의 변화는 Table 5에서 보는 바와 같이 NIS 처리구에서는 배양 3시간 이후부터 서서히 저하되기 시작하였고, 8시간 이후부터는 급격히 저하되었으나, 대조구에서는 pH의 유의한 변화가 거의 없었다.

Lee와 Ha [14]는 보리 알곡과 오차드그라스 건초를 기질로 하여 반추위 혼합미생물을 *in vitro* 배양한 시험에서 Tween 80을 0.05%와 0.10%로 각각 첨가하였을 때의 pH 변화를 시험하였는데 NIS 무첨가구와 첨가구 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않았다고 하였으나, 본 실험 결과에서는 이와는 대조적으로 유의하게 큰 변화를 보여 주었다. Goto 등 [8]은 Tween 80의 첨가 시에 pH의 변화가 NIS 첨가에 따른 변화 보다는 기질에 따른 차이가 더 컸다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 기질에 따른 차이보다는 NIS 첨가에 따른 변화가 큰 것으로 보인다.

Table 5. Changes of pH value in *in vitro* fermentation of various substrates by rumen mixed microorganisms

| Incubation time(h) | Substrates | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Rice straw | | Alfalfa hay | | Filter paper | | Tall fescue hay | |
| | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS |
| 2 | 7.33±0.01 ^{abc} | 7.18±0.01 ^c | 7.36±0.00 ^{ab} | 7.24±0.01 ^{bc} | 7.40±0.00 ^a | 7.30±0.01 ^{abc} | 7.45±0.08 ^a | 7.40±0.10 ^a |
| 4 | 7.29±0.00 ^{de} | 7.10±0.01 ^f | 7.37±0.00 ^{bc} | 7.20±0.01 ^f | 7.39±0.01 ^b | 7.25±0.01 ^{ef} | 7.74±0.04 ^a | 7.33±0.01 ^{cd} |
| 8 | 7.26±0.00 ^{bc} | 7.00±0.00 ^d | 7.37±0.01 ^b | 7.12±0.01 ^{cd} | 7.39±0.01 ^b | 7.19±0.02 ^c | 7.62±0.01 ^a | 7.36±0.14 ^b |
| 12 | 7.28±0.02 ^{bc} | 6.93±0.02 ^e | 7.34±0.01 ^{bc} | 6.96±0.01 ^e | 7.36±0.01 ^b | 7.14±0.02 ^d | 7.63±0.01 ^a | 7.21±0.12 ^{cd} |
| 18 | 7.27±0.01 ^d | 6.79±0.02 ^f | 7.35±0.01 ^c | 6.80±0.01 ^f | 7.42±0.00 ^b | 7.11±0.01 ^e | 7.53±0.00 ^a | 6.71±0.01 ^g |
| 24 | 7.27±0.01 ^c | 6.62±0.03 ^e | 7.38±0.00 ^b | 6.59±0.01 ^e | 7.42±0.01 ^b | 7.08±0.03 ^d | 7.54±0.02 ^a | 6.49±0.01 ^f |
| 36 | 7.26±0.03 ^c | 6.25±0.05 ^e | 7.36±0.02 ^b | 6.29±0.02 ^e | 7.46±0.03 ^a | 7.02±0.00 ^d | 7.54±0.03 ^a | 6.15±0.02 ^f |
| 48 | 7.28±0.01 ^d | 6.07±0.01 ^g | 7.37±0.01 ^c | 6.17±0.01 ^f | 7.47±0.04 ^b | 6.91±0.01 ^e | 7.53±0.02 ^a | 6.10±0.01 ^g |

Mean±SE(Standard error). ^{a,b}Means with different superscripts in the same rows between control and NIS in a substrate are different ($P<0.05$).

Table 6. Influence of non-ionic surfactant Tween 80 on CMCase, xylanase, avicelase, and amylase activities in the supernatant of growing rumen anaerobic mixed microorganisms

| Item | Substrates | | | | | | | |
|-----------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Rice straw | | Alfalfa hay | | Filter paper | | Tall fescue hay | |
| | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS | Control | NIS |
| Incubation time | CMCase activity (IU; $\mu\text{mol glucose min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) | | | | | | | |
| 12 | 3.73±0.39 ^a | 3.33±0.51 ^a | 3.41±0.25 ^a | 2.98±0.57 ^a | 3.37±0.27 ^a | 3.97±0.29 ^a | 3.78±0.18 ^a | 2.80±0.12 ^a |
| 24 | 6.03±0.38 ^b | 6.15±0.34 ^b | 5.04±0.50 ^b | 4.94±0.47 ^b | 5.86±0.22 ^b | 7.56±0.45 ^a | 6.26±0.65 ^b | 5.36±0.24 ^b |
| 36 | 7.18±0.41 ^{bc} | 7.99±0.65 ^{ab} | 6.20±0.45 ^c | 8.56±0.66 ^a | 6.83±0.26 ^{bc} | 8.96±0.27 ^a | 9.32±0.12 ^a | 6.31±0.07 ^c |
| 48 | 7.36±0.07 ^d | 8.01±0.70 ^{cd} | 6.30±0.30 ^d | 9.96±0.63 ^{bc} | 8.31±1.36 ^{cd} | 11.53±0.56 ^{ab} | 12.93±1.13 ^a | 6.95±0.34 ^d |
| Incubation time | Xylanase activity (IU; $\mu\text{mol xylose min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) | | | | | | | |
| 12 | 4.43±0.73 ^c | 8.05±0.49 ^a | 4.23±0.18 ^c | 5.70±0.27 ^a | 5.02±0.77 ^{bc} | 5.63±0.59 ^b | 5.09±0.41 ^{bc} | 6.00±0.44 ^a |
| 24 | 9.52±0.94 ^c | 31.81±1.06 ^a | 15.20±1.81 ^c | 33.39±2.09 ^a | 11.61±0.65 ^c | 15.17±4.47 ^c | 11.07±0.41 ^c | 32.62±2.45 ^b |
| 36 | 13.69±0.99 ^b | 40.60±2.24 ^a | 17.69±2.10 ^b | 39.17±2.27 ^a | 15.92±0.59 ^b | 15.87±0.90 ^b | 15.09±0.58 ^b | 33.75±1.67 ^a |
| 48 | 13.76±0.66 ^{bc} | 37.72±2.88 ^a | 18.07±1.33 ^{bc} | 36.83±2.82 ^{bc} | 20.16±0.91 ^{bc} | 26.44±1.63 ^{bc} | 20.94±4.72 ^{bc} | 35.40±1.00 ^b |
| Incubation time | Avicelase activity (IU; $\mu\text{mol glucose min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) | | | | | | | |
| 12 | 3.40±0.35 ^a | 3.03±0.46 ^a | 2.76±0.51 ^a | 3.10±0.23 ^a | 3.07±0.25 ^a | 3.62±0.27 ^a | 2.55±0.11 ^a | 3.44±0.16 ^a |
| 24 | 5.23±0.36 ^{bc} | 5.30±0.29 ^{bc} | 4.50±0.40 ^{bc} | 4.34±0.43 ^c | 5.05±0.19 ^{bc} | 6.71±0.40 ^a | 4.68±0.18 ^{bc} | 5.63±0.57 ^{ab} |
| 36 | 5.89±0.06 ^b | 5.72±0.20 ^b | 5.15±0.20 ^b | 5.05±0.24 ^b | 5.53±0.53 ^b | 6.77±0.10 ^a | 5.57±0.28 ^b | 5.71±0.20 ^b |
| 48 | 6.12±0.35 ^{bc} | 6.14±0.23 ^{bc} | 5.54±0.28 ^c | 5.28±0.38 ^c | 5.82±0.23 ^{bc} | 7.28±0.33 ^a | 5.42±0.08 ^c | 6.60±0.38 ^{ab} |
| Incubation time | Amylase activity (IU; $\mu\text{mol glucose min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) | | | | | | | |
| 12 | 8.26±0.86 ^a | 7.21±1.19 ^{ab} | 7.01±0.52 ^{ab} | 6.13±1.18 ^{ab} | 6.84±0.89 ^{ab} | 8.79±0.64 ^a | 7.83±0.36 ^{ab} | 5.36±0.23 ^b |
| 24 | 14.85±0.93 ^b | 15.15±0.84 ^b | 12.43±1.23 ^b | 12.18±1.17 ^b | 14.45±0.53 ^b | 18.63±1.12 ^a | 15.44±1.61 ^b | 13.21±0.58 ^b |
| 36 | 13.65±0.78 ^{bc} | 15.18±1.24 ^{ab} | 11.77±0.85 ^c | 16.26±1.26 ^a | 12.98±0.50 ^{bc} | 17.02±0.51 ^a | 17.70±0.22 ^a | 12.00±0.13 ^c |
| 48 | 12.24±0.12 ^d | 13.33±1.16 ^{cd} | 10.48±0.50 ^d | 16.57±1.04 ^{bc} | 13.83±2.26 ^{dc} | 19.19±0.92 ^{ab} | 21.51±1.88 ^a | 11.56±0.57 ^d |

Mean±SE(Standard error). Means with different superscripts in the same row differ(P<0.05).

NIS의 첨가에 의한 반추위 혼합 미생물의 효소활력은 Table 6에서와 같다.

Tween 80을 0.05% 수준으로 알팔파 건초 기질에 첨가하여 배양 36시간 후에 섬유소 분해 효소의 활력을 측정 하였을 때, Avicelase의 경우는 무첨가구와 비교하여 변화가 없었지만 CMCase와 xylanase 및 amylase의 활력은 무처리구에 비해 각각 38.1, 121.4 및 38.2%가 증가하였다. 벼짚 기질에서도 Avicelase을 제외한 CMCase와 xylanase 및 amylase의 활력은 무처리구에 비해 각각 11.3, 196.6 및 11.2% 증가하였다. 하지만 filter paper와 톨페스큐 건초 기질에서는 Avicelase의 활력이 22.4와 2.51%로 증가하였다. 이러한 결과들은 호기성 미생물에서와는 달리 Tween 80을 0.05% 수준으로 배지에 첨가하면 혐기성 미생물의 성장률을 감소시키지 않고 오히려 증가시키며 여러 종류의 섬유소 분해효소의 분비가 촉진될 수 있다는 것을 시사하는 것이다.

반추위 혼합 미생물의 기질 부착성 관찰

공시된 반추위 혼합 미생물이 공시된 각종 기질에 부착하는 정도나 양상을 관찰하기 위하여 *in vitro* 상에서 12시간 배양하여 전자현미경 SEM을 촬영한 결과는 Figure 2에서와 같

다. Kamande 등[11]은 protease의 활성과 cellulose 분해율에 미치는 Tween 60과 Tween 80의 효과를 구명하기 위한 시험에서 cellulose 분해율은 NIS 첨가로 유의하게 증가 되었으며, 같은 NIS 중에서도 Tween 80의 효과가 더 높았고, cellulose의 효소에 의한 분해율을 결정짓는 가장 중요한 요인은 미생물이나 효소가 목표하는 기질에 부착 할 수 있게 하는 능력에 달려 있다고 하였다. NIS Tween 80의 첨가로 인하여 미생물의 수가 증가하고[2], 미생물의 성장률이 증가하며 [15], 섬유소 분해효소의 활력이나 효소역가가 증가하고[14, 15,20], 알곡이나 조사료 기질에 효소의 접근성이 증가하며 [7,8] 섬유소 소화율이 증가한다[13]는 일련의 연구결과들과 섬유소 분해작용에 있어서 섬유소 분해 미생물의 기질에의 부착(microbial adhesion)은 가장 필수적인 요소라는 점[29]을 감안한다면 NIS의 첨가로 인하여 미생물의 기질 부착성이 크게 증가하여야 하겠지만, 본 연구에서 객관성을 유지하기 위하여 수 없이 많은 전자현미경 관찰이 이루어졌으나 NIS의 처리로 인하여 기질부착성이 증가한다는 어떠한 증거도 발견하지 못하였다.

그러나 미생물의 부착 정도는 기질에 따라서 매우 다양한 양상을 보였다. Filter paper와 같은 단일기질은 벼짚, 알팔

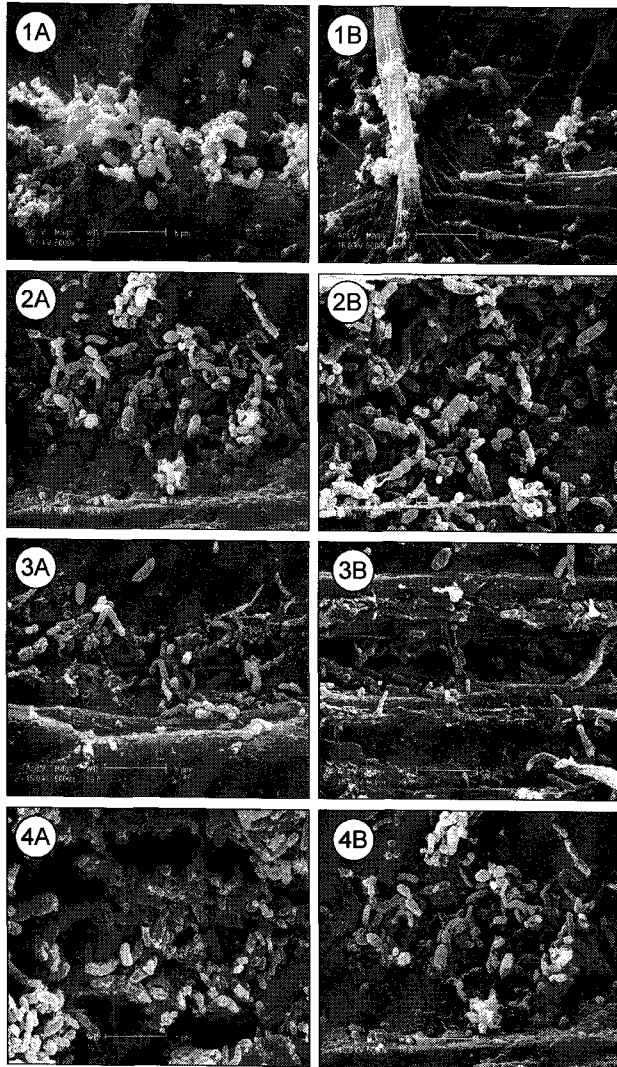


Fig. 2. SEM(Scanning Electron Microscopy) observation for (A) untreated and (B) NIS-treated substrates (① rice straw, ② alfalfa hay, ③ filter paper and ④ tall fescue hay) incubated in *in vitro* cultures for 12hr by rumen mixed microorganisms ($\times 5000$).

파, 툴페스큐와 같은 복합기질에 비해 미생물의 부착 정도가 가장 높았다. 또한 복합기질 중에서도 두과목초인 알팔파가 화본과 목초인 벧짚과 툴페스큐 보다 미생물 부착이 많았으며 화본과 목초 중에서는 툴페스큐가 벧짚에 비해 조금 더 많은 미생물이 기질에 부착되었다.

요 약

비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant: NIS) Tween 80의 첨가가 gas 발생량, 각종 기질의 건물 소화율, 섬유소 분해효소의 활력, 미생물 성장률 그리고 미생물의 기질 부착성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 벧짚, 알팔파 건초, filter paper 그리고 툴페스큐 건초를 공시하여 *in vitro* 시험을

수행하였다. NIS Tween 80을 0.05% (v/v) 수준으로 배지에 첨가하였을 때, *in vitro* 건물 소화율, cumulative gas 생성량, 미생물 성장률 그리고 섬유소 분해효소의 활력 등 조사항목 모두가 모든 공시된 기질에서 유의적 ($P < 0.05$)으로 증가하였다. 벧짚, 알팔파 건초, filter paper 및 툴페스큐 건초로부터 발생된 *in vitro* 48시간 배양후의 가스량이 NIS의 첨가로 인하여 무처리구에 비하여 각각 274.8, 235.2, 231.1 및 719.5%가 유의적 ($P < 0.05$)으로 증가하였다. Tween 80을 0.05% 수준으로 알팔파 건초 기질에 첨가하여 배양 36시간 후에 섬유소 분해효소의 활력을 측정 하였을 때, Avicelase의 경우는 무첨가구와 비교하여 변화가 없었지만 CMCase, xylanase 및 amylase의 활력은 무처리구에 비해 각각 38.1, 121.4 및 38.2%가 증가하였다. 이러한 결과들은 호기성 미생물에서와는 달리 Tween 80을 0.05% 수준으로 배지에 첨가하면 혐기성 미생물의 성장률을 감소시키지 않고 오히려 증가시키며 여러 종류의 섬유소 분해효소의 분비가 촉진될 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 전자현미경(SEM) 관찰결과 NIS Tween 80의 첨가가 미생물의 기질 부착성을 증가시키지는 못하였다. 따라서 NIS Tween 80의 첨가로 가스발생량과 *in vitro* 건물 소화율 그리고 섬유소 분해효소의 활력이 증가한 이유는 미생물의 기질 부착성 때문이 아니라는 것을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis 16th edition. Association of official analytical chemists, Washington, D. C.
2. Akin, D. E. 1980. Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 242-252.
3. Dehority, B. A. and H. W. Scott. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forage by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* **50**, 1136-1141.
4. Deshpand, M. V., M. C. Srinivasan and S. S. Deshmakh. 1987. Effects of fatty acids on cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its mutants. *Biotechnol. Lett.* **9**, 301-304.
5. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **11**, 1-42.
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**, 425-432.
7. Goto, M., H. Bae, S. S. Lee, M. S. Yahaya, S. Karita, K. Wanjae and K. J. Cheng. 2003. Effects of surfactant tween 80 on forage degradability and microbial growth on the *in vitro* rumen mixed and pure cultures. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**, 672-676.
8. Goto, M., H. Bae, M. S. Yahaya, S. Karita, W. Kim, J. Baah, K. Sugawara and K. J. Cheng. 2003. Effects of surfactant Tween 80 on enzymatic accessibility and degrada-

- tion of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) at different growth stage. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**, 83-87.
9. Ha, J. K., S. S. Lee, Y. S. Moon and C. H. Kim. 2005. Ruminant Nutrition and Physiology. pp. 224-237, *Seoul National University Press. Seoul, Korea.*
 10. Ho, Y. W., N. Abdullah and S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 177-181.
 11. Kamande, G. M., J. Baah, J. K. Cheng, T. A. McAllister and J. A. Sheford. 2000. Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein adsorption, and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. *J. Dairy Sci.* **83**, 536-542.
 12. Kim, C. H., J. N. Kim, J. K. Ha, S. G. Yun and S. S. Lee. 2004. Effects of dietary addition of surfactant Tween 80 on ruminal fermentation and nutrient digestibility of Hanwoo steers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **17**, 337-342.
 13. Kim, H. S., B. S. Ahn, S. G. Chung, Y. H. Moon, J. K. Ha, I. J. Seo, B. H. Ahn and S. S. Lee. 2006. Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. *Animal Feed Science Technology* **126**, 23-29.
 14. Lee, S. S. and J. K. Ha. 2003. Influences of surfactants Tween 80 on the gas production, cellulose digestion activities by mixed rumen microorganisms. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**, 1151-1157.
 15. Lee, S. S., B. H. Ahn, H. S. Kim, C. H. Kim, K. J. Cheng and J. K. Ha. 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**, 104-115.
 16. Lee, S. S., B. H. Ahn, H. S. Kim, C. H. Kim, K. J. Cheng and J. K. Ha. 2002. 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. 2002 International Symposium in J. Anim. Sci.* **15**, 97-108.
 17. Lee, S. S., C. H. Kim, J. K. Ha, Y. H. Moon, N. J. Choi and K. J. Cheng. 2002. Distribution and Activities of Hydrolytic Enzymes in the Rumen Compartments of Hereford Bulls fed Alfalfa Based Diet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **15**, 1725-1731.
 18. Lee, S. S., J. K. Ha, K. J. Shin, C. H. Kim, M. Goto and K. J. Cheng. 2000. Influences of surfactants on the enzyme distributions in the rumen compartments and the growth of pure cultures of rumen microbes. 3rd Korean-Japan Joint Symp. on Rumen Metabolism and Physiology. *Proceedings of Japanese Society for Rumen Metabolism and Physiology* **11**, 79-79. (October 1~3, Seagaia, Miyazaki, Japan)
 19. Lee, S. S., K. J. Shin, W. Y. Kim, J. K. Ha and I. K. Han. 1999. The Rumen Ecosystems: As a Fountain Source of Novel Enzymes -Review Article. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **12**, 988-1001.
 20. McAllister, T. A., K. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford and K. J. Cheng. 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* **80**, 35-43.
 21. Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci. Camb.* **93**, 217-222.
 22. Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Ann. Res. Dev.* **28**, 7-55.
 23. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Giennon and A. L. Burton. 1960. Measurement of Carboxymethylcellulase activity. *Anal. biochem.* **1**, 127-132.
 24. Moore, J. E. 1970. Procedures for the two-stage in vitro digestion of forages. 3. In L. E. Harris(ed.) Vol. 1. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. pp. 5001-5003, Utah State Univ., Logan, UT.
 25. National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Natl. Acad. Press, Washington DC.
 26. Reese, E. T. and A. Maguire. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied Microbiol.* **17**, 242-245.
 27. SAS, 1999. SAS/STAT software for PC. Release 8.01. SAS institute Inc., Cary, N.C., U.S.A.
 28. Schewale, J. G. and J. C. Sadana. 1978. Cellulase and glucosidase production by basidiomycetes species. *Can. J. Microbiol.* **24**, 1204-1216.
 29. Sung, H. G., Y. Kobayashi, J. Chang, A. Ha, I. H. Hwang and J. K. Ha. 2007. Low Ruminant pH reduced Dietary Fiber Digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20**, 200-207.
 30. Van Soest, P. J. 2006. Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* **130**, 137-171.
 31. Yazdi, M. T., J. R. Woodward and A. Radford. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1313-1319.
 32. Ørskov, E. R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.(Camb).* **92**, 499-503.