

## 반추위내 서식하는 혼합곰팡이와 박테리아에 의한 Linoleic Acid 가수소화반응과 Stearic Acid 생산에 관한 연구

남인식

농촌진흥청 축산연구소

홀스타인 건유우의 반추위에서 분리한 혼합 곰팡이에 첨가한 linoleic acid가 biohydrogenation 과정 중 생산되는 지방산의 농도와 종류를 측정하고, 최종 산물로 생산되는 지방산이 *trans*-11 vaccenic acid인지 stearic acid인지 조사하기 위하여 본 연구를 수행하였으며 결과는 다음과 같다. 반추위 혼합 박테리아 배양구에 linoleic acid 용액을 첨가한 결과, 배양 90분 이내에 100%의 linoleic acid가 stearic acid로 biohydrogenation되었다. 반면에 linoleic acid 용액을 반추위 혼합 곰팡이에 첨가한 결과 24시간 이내에 모든 linoleic acid는 conjugated linoleic acid (*cis*-9, *trans*-11)와 *trans*-11 vaccenic acid로 biohydrogenation되었다. Linoleic acid가 함유된 혼합곰팡이 처리구는 배양시간이 증가할수록 stearic acid의 농도도 소량 증가하는 경향을 보였다. 또한 linoleic acid가 함유되지 않은 혼합곰팡이 대조구에서도 배양시간이 증가할수록 stearic acid 농도가 처리구와 비슷하게 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 혼합 박테리아의 linoleic acid 첨가구에서는 배양시간이 증가할수록 stearic acid의 농도가 급격하게 증가하는 것을 조사되어 반추위 혼합곰팡이의 stearic acid 생산은 linoleic acid의 biohydrogenation과 무관하게 생산되는 것으로 조사되었다. 따라서 반추위 혼합 곰팡이에 의한 linoleic acid biohydrogenation의 최종 산물은 *trans*-11 vaccenic acid로 판단되며, 혼합 박테리아는 stearic acid로 나타났다.

**Key words** □ biohydrogenation, linoleic acid, mixed rumen bacteria, mixed rumen fungi, stearic acid

반추위 박테리아에서 linoleic acid (LA)의 biohydrogenation (BH) 경로는 모두 3단계로 구성되어 있다. 첫째로, LA는 박테리아에서 생산되는 isomerase에 의하여 축매되어 *cis*-9, *trans*-11 형태의 conjugated linoleic acid (CLA)로 isomerization된다. 둘째, CLA는 박테리아의 *cis*-9 reductase에 의하여 *trans*-11 octadecanoic acid로 가수소화(BH)된다. 마지막으로 *trans*-11 reductase에 의하여 *trans*-11 octadecanoic acid의 수소 이중결합이 단일결합화 되어 stearic acid (SA)로 BH되면서 모든 과정이 종료된다. 이러한 반추위 박테리아의 불포화지방산에 의한 BH 경로는 3가지 주요 실험 결과에 의해서 확인되었다(9, 31). Kemp와 Lander (24, 25)는 BH경로에 따라 반추위 박테리아를 group A와 group B로 분류하였다. BH의 최종 산물이 *trans*-11 vaccenic acid일 경우 group A로 분류하였으며, 최종 산물로 SA를 생산하면 group B로 분류하였다. 이는 오직 group B 박테리아만 *cis*-9 oleic acid (OA)나 *trans*-11 vaccenic acid (VA)를 SA로 BH시킬 수 있다는 것으로 의미한다. 따라서 반추동물이 섭취한 사료 내에 함유된 불포화지방산인 LA나 linolenic acid (LE)를 효과적으로 BH시키기 위해서는 group A 박테리아와 group B 박테리아를 동시에 필요로 한다. 이처럼 반추위 박테리아의 BH에 관한 연구는 많은 보고가 있었으나 반추위내 주요한 미생물 군중 하나인 곰

팡이에 대한 반추위내 지방대사에 관한 연구는 찾아보기 힘들다. 최근, 반추위 곰팡이도 불포화지방산에 대한 BH 기능을 박테리아와 함께 수행하고 있다는 것이 보고되었다(32). 그러나 반추위 곰팡이의 불포화지방산 BH 과정에 있어서 생산되는 최종 산물인 지방산의 종류와 그 농도에 관해서는 아직까지 보고된 것이 없다. 따라서 본 연구의 목적은 반추동물의 사료 내에 가장 풍부하게 함유되어 있는 대표적인 불포화지방산 중 하나인 LA를 반추위 혼합 곰팡이배양액에 첨가하여 배양 시간별 LA의 BH 과정 중 생산되는 최종 산물의 농도를 확인하고 이를 반추위 혼합 박테리아 배양구와 비교하여 각 미생물구간 배양시간별 BH 과정 중 생산되는 최종산물 농도를 확인해 보고자 본 연구를 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### 반추위 미생물 분리를 위한 위액 채취

반추위액은 반추위 cannulae가 장착된 Holstein-Friesian 종에서 채취하였다. 반추위액을 공여한 소는 3 kg의 사일리지(건물기준)와 2.7 kg의 농후사료(91.5% wheat, 2.5% molasses, 0.5% soya oil, 5.5% minerals 및 vitamins, 건물기준)를 하루 2회 정량하여 오전(08:00)과 오후(17:00)에 급여하였으며 물은 자유 섭취케 하였다. 반추위액은 진공펌프와 연결된 내경 1 cm의 polyethylene pipe를 이용하여 반추위 cannulae를 통하여 혐기적으로 채취하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-31-290-1664, Fax: 82-31-290-1666  
E-mail: insiknam@rda.go.kr

### 반추위 혼합곰팡이와 박테리아 배양 방법

반추위 혼합곰팡이의 sub-culturing 및 배양은 12 ml의 tube를 이용하여 39°C에서 Joblin (20)의 방법으로 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>상에서 혐기적으로 배양하였다. 반추위 cannulae를 통하여 채취한 반추위액은 믹서기로 약 30초간 물리적 충격을 가한 후 두 겹의 거즈를 이용하여 사료입자를 제거한 후 반추위 곰팡이를 분리하였다. 여과를 거친 액상 중 1 ml를 취하여 0.5 ml 항미생물제제(2 × 10<sup>4</sup> IU/ml의 benzylpenicillin과 2 mg/ml의 streptomycin sulphate, Sigma, Poole, UK)가 함유된 Hay Sloppy 배지(HS, Table 1, 20)에 혐기적으로 접종하였다. 접종된 배양액은 39°C에서 3일간 혐기적으로 배양하였으며, 이 중 10%를 취하여 항미생물제제가 함유되어 있지 않은 새로운 HS 배지에 접종한 후 3일간 재배양하였다. 반추위 곰팡이의 계대 배양은 1주일에 1회씩 진행하였으며 계대배양 후 오염 여부를 확인하였다.

반추위 혼합박테리아의 sub-culturing 및 배양은 12 ml의 tube를 이용하여 39°C에서 Hungate (18)의 방법으로 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>상에서 혐기적으로 배양하였다. 반추위 박테리아를 분리하기 위하여 4겹의 거즈를 이용하였다. 거즈에 걸러진 반추위액은 water bath를 이용하여 39°C를 유지하였다. 반추위액은 CO<sub>2</sub> gas가 충전된 원심분리용 관에 신속하게 옮긴 후 150×g로 25°C에서 5분간 원심분리하여 사료입자, 원생동물 및 곰팡이를 반추위액과 분리하였다. Free-floating 박테리아를 분리하기 위하여 반추위 박테리아가 함유된 상층액을 25°C에서 1,000×g로 5분간 다시 원심분리하였다.

분쇄기로 30초간 파쇄하고 사료입자를 제거한 후 사료입자에 부착되어 있는 박테리아를 분리하였다.

위와 같은 과정을 통하여 얻은 사료부착 박테리아와 free-floating 박테리아는 Rumen Bacterial (RB) 배지(6)에 접종시켜 39°C에서 혐기적으로 배양하였다.

### 반추위 혼합곰팡이의 가수소화반응

1 ml의 반추위 곰팡이 배양액을 9 ml의 HS배지에 접종하여 39°C에서 24시간동안 예비배양과정을 거친 후 LA용액을 혐기적으로 주입시켰다. LA용액이 주입된 곰팡이는 1, 3, 6, 9, 12, 24 그리고 48시간 동안 39°C에서 혐기적으로 배양하였으며, 시간별 배양이 끝난 후에는 4°C 이하 얼음물에 20분간 넣어 BH 반응을 중지시켰다. 모든 배양액은 지방산 추출시까지 -80°C에서 보관하였다.

### 반추위 혼합곰팡이의 stearic acid 생산

1 ml의 반추위 곰팡이 배양액을 9 ml의 HS배지에 접종하여 39°C에서 24시간 동안 예비배양과정을 거친 후 LA용액(처리구, LA + D.W. + BSA)을 주입하거나 LA가 포함되지 않은 용액(대조구, D.W. + BSA)을 주입하였다. 대조구 및 처리구 용액이 주입된 곰팡이는 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 그리고 72시간동안 39°C에서 혐기적으로 배양하였으며, 시간별 배양이 끝난 후에는 4°C이하 얼음물에 20분간 넣어 BH 반응을 중지시켰다. 모든 배양액은 지방산 추출시까지 -80°C에서 보관하였다.

### 반추위 혼합박테리아의 stearic acid 생산

1 ml의 반추위 박테리아 배양액을 9 ml의 RB배지(Table 1)에 접종하여 39°C에서 12시간동안 예비배양과정을 거친 후 곰팡이 시험구와 같은 농도의 LA용액을 혐기적으로 주입시켰다.

LA용액이 주입된 박테리아는 40, 50, 60, 70, 80, 90, 그리고 100분간 39°C에서 혐기적으로 배양하였으며, 시간별 배양이 끝난 후에는 4°C이하 얼음물에 20분간 넣어 BH 반응을 중지시켰다. 모든 배양액은 지방산 추출시까지 -80°C에서 보관하였다.

**Table 1.** Composition (per litre) of Hay Sloppy medium and Rumen Bacteria medium used for culture of rumen fungi and bacteria

Component	Hay Sloppy medium	Rumen Bacteria medium
Solution A <sup>1</sup> , ml	165.0	
Solution B <sup>2</sup> , ml	165.0	
Salt solution <sup>3</sup> , ml		10.0
Rumen fluid <sup>3</sup> , ml	170.0	
Resazurin <sup>4</sup> , ml	2.0	4.0
VFA mix <sup>b</sup> , ml		3.10
Vitamin mix <sup>c</sup> , ml		5.0
Hemin solution <sup>d</sup> , ml		5.0
NaHCO <sub>3</sub> , g	5.0	
Yeast extract, g	2.0	10.0
Peptone, g	2.0	10.0
Cys-HCl·H <sub>2</sub> O, g	0.20	0.5
Agar, g	1.0	
Hay <sup>5</sup> , g	3.0	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , g		0.50
Glucose, g		2.0
D.W. <sup>6</sup> , ml	485.0	949.90

<sup>1</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>2</sup>Solution B contained 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/L deionised water.

<sup>3</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>4</sup>0.1% resazurin solution.

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

<sup>6</sup>Purite water with 0.2 micron filtration (Purite Ltd, Oxford, UK) sufficient to make up to 1 l.

<sup>a</sup>Salt solution contained (g/L deionised water): NaCl, 2; CaCl<sub>2</sub>, 0.2; MgSO<sub>4</sub>, 0.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; NaHCO<sub>3</sub>, 10.

<sup>b</sup>VFA mixture solution contained (ml/L deionised water): Acetate, 170; Propionate, 60; Butyrate, 40; Isovalerate, 10; Isobutyrate, 10; DL- $\alpha$ -methylbutyrate, 10; n-valerate, 10.

<sup>c</sup>Vitamin mixture solution contained: menadione, 100 mg in 30 ml of ethanol.

<sup>d</sup>Hemin solution: dissolve 50 mg hemin + 1 ml NaOH, make to 100 ml with D.W.

### Linoleic acid 용액 제조

본 연구에 사용된 LA 용액은 Kim 등(29)의 방법에 의하여 제조하였다. LA는 20%의 bovine serum albumin (BSA, Sigma, Poole, UK)이 함유된 증류수에 첨가하여 혼합하였다. 혼합된 LA는 증류수를 첨가하여 농도를 희석하였다.

### 지방산 분석

곰팡이와 박테리아 배양액에 함유된 지방산은 hexane-isopropanol을 이용하여 Hara와 Radin 방법(15)을 이용하여 추출하였다. 지방산의 methyl esters (FAME)는 Chouinard 등(7)과 Christie (8)의 방법으로 준비하였으며, FAME는 Feng 등(11)의 방법으로 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

### 통계분석

본 시험에서 얻어진 결과는 SAS package (33)를 이용하여 t-검정을 실시하였다. 모든 배양실험은 3회 이상 반복 실시 하였으며, 평균값과 표준편차로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 반추위 혼합곰팡이의 지방산 가수소화반응

24시간동안 예비 배양된 곰팡이 배양액 10 ml에 LA용액을 첨가 후 39°C에서 48시간 동안 배양하였으며, 시간별로 생성된 지방산의 종류와 농도는 Table 2와 같다. LA를 곰팡이가 함유된 HS배지에 첨가함과 동시에 그 농도가 감소하기 시작하였으며 배양 24시간 내에 모든 LA는 CLA나 VA로 변환되었다.

CLA는 LA 첨가 후 1-12시간 사이에 생성되었으며, 배양 9시간대에서 가장 높은 농도(6-12%)의 CLA가 생성되는 것으로 관찰되었다. VA는 배양 후 1시간부터 생성되기 시작하였으며, 배양 24시간 이내에 모든 LA는 CLA생산을 거쳐 VA로 가수소화되

었다. 반추위 곰팡이의 불포화지방산 BH 과정은 배양 후 24시간 이내에 모두 완료되는 것으로 관찰되었다. 불포화지방산은 반추위 박테리아에 있어서 독으로 작용한다(29). 따라서 반추위 박테리아는 불포화지방산 BH 과정을 거쳐 이를 포화지방산으로 변환시킨다(17, 19).

곰팡이는 여러 가지 요인에 의하여 BH 기능을 수행하는 것으로 판단된다. LE를 곰팡이와 함께 배양하면, gas생산, 섬유소분해 능력 등이 감소한다(30). 이는 불포화지방산이 곰팡이의 조사로 분해능을 방해하기 때문에 이를 최소화하기 위하여 불포화지방산을 포화지방산으로 가수소화시키는 것으로 판단된다. 섬유소분해나(12, 21) 반추위 대사(2, 14)에 있어서 반추위 곰팡이와 박테리아는 깊은 상호작용을 보여주고 있다.

일반적으로 반추동물은 농후사료와 조사료원을 통하여 두 가지 다른 형태의 지방을 섭취한다. Triglycerides는 농후사료에 많이 함유되어 있으며, glycolipids는 조사료에 많이 들어있다. Triglycerides는 반추위 미생물에 의하여 쉽게 BH되나 glycolipids는 섬유소가 분해되면서 BH되므로 triglycerides보다 좀더 긴 시간을 필요로 한다. 반추위 곰팡이는 박테리아보다 높은 섬유소분해능을 가지고 있다(1). 따라서 섬유소 분해능이 뛰어난 곰팡이는 조사료 내에 많이 함유되어 있는 glycolipids를 주로 가수소화시키고 박테리아는 농후사료 내에 풍부하게 함유되어 있는 triglycerides를 주로 가수소화시키는 것으로 생각된다. 이러한 이유로 반추위 곰팡이의 불포화지방산 BH시간이 박테리아보다 더 긴 시간을 필요로 하는 것으로 판단된다.

인체나 동물에 있어서 포화지방산이 미치는 악영향으로는 체내 체지방을 증가시키고 혈액 및 혈관내 콜레스테롤 함량을 증가시킨다(4). 이러한 영향은 궁극적으로 인슐린 분비나 동맥경화에 깊은 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(13). 그러나 위와 같은 악영향은 CLA에 의해 예방된다는 많은 보고가 있다(3). 따라서 고양이, 개 및 반추동물의 장내 미생물에서 생산되는 CLA는 장내 미생물의 생존뿐만 아니라 host의 질병을 예방하는데 있어서 중요한 물질인 것으로 판단된다.

**Table 2.** Biohydrogenation of linoleic acid by mixed rumen fungi cultured at 39°C incubator for 48 hr

Incubation time (hr)	Fatty acid conversion <sup>a</sup>		
	LA <sup>b</sup>	CLA <sup>c</sup>	VA <sup>d</sup>
0	100±0.0	0.0	0.0±0.0
1	94.7±0.3	3.2±0.2	2.1±0.3
3	83.8±2.4	4.1±1.3	12.1±2.1
6	71.1±4.5	7.0±2.4	22.0±5.4
9	50.7±6.8	10.1±4.1	39.2±8.1
12	15.1±3.1	8.0±3.4	76.9±6.5
24	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
48	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0

<sup>a</sup>The data are expressed as the percentage of total fatty acids

<sup>b</sup>LA = *cis*-9, *cis*-12 linoleic acid

<sup>c</sup>CLA = *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid

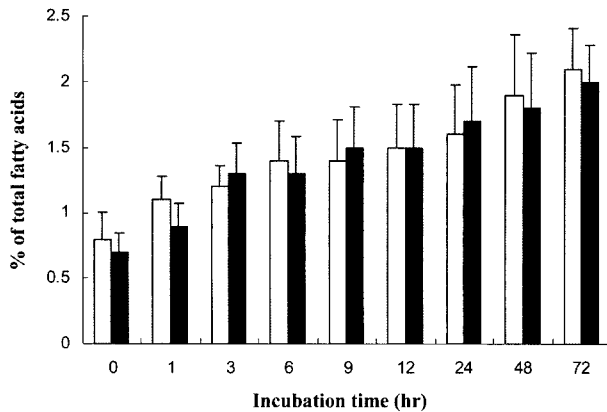
<sup>d</sup>VA = *trans*-11 vaccenic acid

### 반추위 혼합곰팡이의 stearic acid 생산

본 연구는 반추위 혼합 곰팡이의 배양시간별 SA생산농도를 조사함과 동시에 반추위 혼합 곰팡이에 의해서 생산되는 SA가 BH에 의한 것인지를 알아보기 위하여 LA 용액 첨가구(LA+dH<sub>2</sub>O+BSA)와 대조구(D.W.+BSA)로 나누어 배양시간별 SA 농도를 비교하여 보았으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

LA 용액(LA+D.W.+BSA)을 반추위 곰팡이 배양액에 첨가한 결과, 0.6-1.0%의 SA가 배양 0시간에 검출되었으며 배양시간이 증가할수록 천천히 증가하는 경향을 나타내어 배양 72시간에서는 2.0-2.6%까지 증가하였다. LA가 함유되지 않은 대조구(D.W.+BSA)에서도 실험초기에 0.5-0.8%의 SA가 검출되었고 배양 72시간에는 1.6-2.3%의 SA가 생산되어 처리구와 대조구간 유의차를 발견하지 못하였다.

배지에서 검출된 소량의 SA는 곰팡이의 BH과정을 통하여 생성된 최종 산물로 보기 어렵다. 만약 곰팡이의 BH과정에 의하여



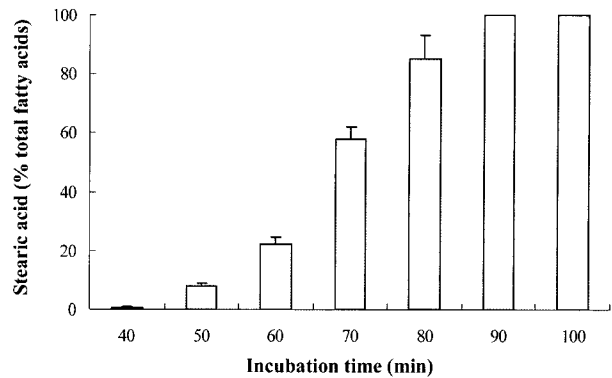
**Fig. 1.** Stearic acid production by mixed rumen fungi compared with or without linoleic acid supplementation. The incubations were performed in triplicate, and the values are Means±the Standard Deviations. □ with containing linoleic acid (linoleic acid + D.W. + BSA), ■ without containing linoleic acid (D.W. + BSA).

SA가 생성된다면 배양시간이 증가할수록 VA의 함량이 감소함과 동시에 SA의 농도가 급격하게 증가해야 하나 본 연구에서는 배양 24시간이후의 VA의 농도변화를 찾아볼 수 없었다. 따라서 곰팡이의 BH 최종 산물은 VA인 것으로 판단되며, 이러한 패턴은 최종 산물이 VA로 알려진 group A 박테리아(16, 26, 28)의 BH와 동일한 것으로 판단된다. 반추위 곰팡이는 반추위 박테리아와 마찬가지로 섬유소를 분해하여 생성되는 산물중 하나인 volatile fatty acids (VFAs)를 이용하여 C18:0 (SA) 또는 C18:1 (Oleic acid)로 생합성하는 기능이 있다(5, 25). 반추위 곰팡이의 체내 지방함량을 보면 약 48%가 포화지방산으로 구성되어 있다. 반추위 미생물의 지방대사중 SA가 VA로 생합성 된다는 보고는 아직까지 없다. 따라서 곰팡이의 배양과정 중 BH와 관계없이 SA가 생성되는 이유는 두 가지 경로로 나타날 수 있다. 첫째 곰팡이 체내에 존재하는 SA 중 일부가 지방산추출 과정 중 함께 추출되어 검출되었거나, 둘째 곰팡이가 배지 내에 함유되어 있는 건초를 분해하여 생성된 VFA를 생합성하여 SA가 검출된 것으로 판단된다.

#### 반추위 혼합박테리아의 stearic acid 생산

반추위 혼합 곰팡이의 SA생산농도와 비교하기위하여 동일량의 LA용액(LA+D.W.+BSA)을 혼합 박테리아 배양구에 첨가하여 생산된 배양시간별 SA농도를 Fig. 2에 나타내었다.

배양 60분에서 20% 이상의 SA가 LA로부터 가수소화되었으며 모든 LA는 배양 90분 이내에 SA로 변환되어 박테리아의 불포화지방산 BH 최종 산물은 SA인 것으로 확인 되었다. 반추위 혼합 박테리아는 OA, LA 그리고 LE는 반추위 박테리아에 의해서 SA로 가수소화 된다는 많은 연구가 보고가 있는데(27, 28, 35)이는 본 연구에서도 LA는 박테리아에 의해 가수소화되었으며 최종 산물은 SA인 것으로 확인되어 위의 보고와 일치하는 결과를 보였다. 지금까지 분리된 group B 박테리아는 *Fusocillus*



**Fig. 2.** Stearic acid production by mixed rumen bacteria that are incubated anaerobically with linoleic acid solutions. The incubations were performed in triplicate, and the values are Means±the Standard Deviations.

*babrahamensis* P2/2, *Fusocillus* T344 등이며, 이들은 불포화지방산을 포화지방산으로 가수소화할 수 있는 *trans*-11 reductase 효소를 분비하는 것으로 보고되었다(22, 23, 34). 또한 안정적인 가수소화를 위해서는 지방산의 농도, 미생물의 구성 및 배양환경이 가장 중요한 요인으로 작용하고 있다(22).

이상의 결과를 종합해 보면, 반추위 박테리아의 불포화지방산 BH 최종 산물은 포화지방산인 SA인 것으로 나타났으나, 곰팡이는 VA인 것으로 나타났다. 따라서 반추위 곰팡이의 BH 패턴은 최종산물이 VA인 group A 박테리아와 같은 것으로 조사되었다.

#### 참고문헌

1. Akin, D.E. 1994. Ultrastructure of plant cell-walls degraded by anaerobic fungi, p. 169-190. In D.O. Mountford and C.G. Orpin (eds). *Anaerobic fungi: Biology, Ecology and Function*, Marcel Dekker, New York, USA.
2. Bauchop, T. and D.O. Mountford. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and present of rumen methanogenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 1103-1110.
3. Belury, M.A. 2002. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanism of action. *J. Nutr.* 132, 2995-2998.
4. Blackburn, H., A. Key, H.L. Taylor, and J.T. Anderson. 1973. Diet and coronary heart disease. *Nutr. Rev.* 31, 17-18.
5. Body, D.R. and T. Bauchop. 1985. Lipid composition of an anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, isolated from bovine rumen. *Can. J. Microbiol.* 31, 464-466.
6. Caldwell, D.R. and M.P. Bryant. 1966. Medium without rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14, 794-801.
7. 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.
8. Christie, W.W. 1982. A simple procedure for the rapid trans methylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 23, 1072-1075.
9. Dawson, R.M.C. and P. Kemp. 1970. Biohydrogenation of dietary

- fats in ruminants, p. 504-518. In A.T. Phillipson (ed). physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Oriol Press, Newcastle-upon-Tyne, UK.
10. Eysssen, H. and A. Verhulst. 1984. Biotransformation of linoleic acid and bile acids by *Eubacterium lentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 39-42
  11. 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.
  12. Fonty, G. and K.N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with rumen microorganisms in relation to fibre digestion, p. 655-680. In T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima (eds). *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, Academic Press, New York, USA.
  13. Glueck, C.J. 1979. Dietary fat and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 2703-2711.
  14. Greening, R.C. and J.A.Z. Leedle. 1989. Enrichment and isolation of *Acetivomaculum ruminis* gen. nov., sp. Nov., acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Arch Microbiol.* 152, 399-401.
  15. Hara, A. and N.S. Radin. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420-426.
  16. Hazlewood, G.P., P. Kemp., D. Lander, and R.M.C. Dawson. 1976. C18 unsaturated fatty acid hydrogenation patterns of some rumen bacteria and their ability to hydrolyse exogenous phospholipid. *Br. J. Nutr.* 35, 293-297.
  17. Henderson, C. 1973. The effects of fatty acids on pure culture of rumen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 36, 187-188.
  18. Hungate, R.E. 1966. The Rumen and its microbes, p. 8-90. Academic Presses, New York and London.
  19. Hunter, W.J., W.J. Baker, I.S. Rosenfeld, J.B. Keyser, and S.B. Tove. 1976. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: VII. Hydrogenation by cell free preparation of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 251, 2241-2247.
  20. Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 1119-1122.
  21. Joblin, K.N. 1990. Bacterial and protozoal interactions with rumen fungi, p. 311-324. In D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, J.R. Wilson and P.J. Harris (eds). *Microbial and Plant Opportunities to Improve Ligno-cellulose Utilisation By Ruminant*, Elsevier, New York, USA.
  22. Kellens, M.J., H.L. Goderis, and P.P. Tobback. 1986. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by mixed culture of rumen microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1268-1278.
  23. Kemp, P. and D.J. Lander. 1983. The hydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid by pure cultures of two rumen bacteria. *Biochem. J.* 216, 519-522.
  24. 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.
  25. Kemp, P., D.J. Lander, and C.G. Orpin. 1984. The lipids of rumen fungus *piromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 27-37.
  26. 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.
  27. Kepler, C.R., K.P. Hiron, J.J. McNell, and S.B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241, 1350-1354.
  28. Kepler, C.R. and S.B. Tove. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate *cis*-12, *trans*-11 isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242, 5686-5692.
  29. 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.
  30. Lee, S.S., J.K. Ha, and K.J. Cheng. 2001. Effects of LCFA on the gas production, cellulose digestion and cellulose activities by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* RE1. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 14, 1110-1117.
  31. Noble, R.C., W. Steel, and J.H. Moore. 1969. The incorporation of linoleic acid into the plasma lipids of sheep given intraruminal infusions of maize oil or free linoleic acid. *Br. J. Nutr.* 23, 709-714.
  32. Nam, I.S. and P.C. Garnsworthy. 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J. Appl. Microbiol.* In press.
  33. SAS. 1999. SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute, Cary, NC, USA.
  34. White, R.W., P. Kemp, and R.M.C. Dawson. 1970. Isolation of rumen bacterium that hydrogenates oleic acid as well as linoleic acid and linolenic acid. *Biochem. J.* 116, 767-768.
  35. Van de Vossenberg, J.L.C.M. and K.N. Joblin. 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 424-428.

(Received March 26, 2007/Accepted May 14, 2007)

---

**ABSTRACT : Biohydrogenation of Linoleic Acid and Stearic Acid Production by Mixed Rumen Fungi and Bacteria**

**In Sik Nam** (National Livestock Research Institute, RDA 564, Suwon 441-706, Republic Korea)

The objective of this study was to confirm biohydrogenation of linoleic acid and stearic acid production by mixed rumen fungi and bacteria. In mixed fungal biohydrogenation study, when linoleic acid solution was added to fungal culture (after 24 hr pre-incubation), all linoleic acids were converted to *trans*-11 vaccenic acid via *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid production within 24 hr period of incubation. All linoleic acid solution was hydrogenated to *trans*-11 vaccenic acid within 24 hr incubation and this was continued until the end of incubation (48 hr). Both treatments (added linoleic acid solution or the same amount of solution without containing linoleic acid into fungal cultures) produced the similar amount of stearic acid. In contrast, 100% of linoleic acid solution was hydrogenated to stearic acid in mixed bacterial culture. It is concluded that the end product of mixed fungal biohydrogenation of linoleic acid is *trans*-11 vaccenic acid whereas mixed bacteria produced stearic acid as an end product of their biohydrogenation.