

비이온성 및 양쪽 이온성 계면활성제 첨가가 반추위 혼합 미생물의 성장과 벚짚의 *in vitro* 소화에 미치는 영향

이신자 · 김완영¹ · 문여황² · 김현섭³ · 김경훈⁴ · 하종규⁵ · 이성실*

경상대학교 응용생명과학부, ¹한국농업대학 축산학과, ²진주산업대학교 동물생명과학과,
³축산과학원 축산자원개발부, ⁴농촌진흥청, ⁵서울대학교 농생명공학부

Received February 28, 2008 / Accepted April 20, 2008

Effects of Non-ionic or Zwitterionic Surfactant on *in vitro* Digestibility of Rice Straw and Growth of Rumen Mixed Microorganisms. Shin Ja Lee, Wan Young Kim¹, Yea Hwang Moon², Hyeon Shup Kim³, Kyoung Hoon Kim⁴, Jong Kyu Ha⁵ and Sung Sill Lee*. *Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, ¹Department of Animal Science, Korea National Agricultural College ²Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, ³National Livestock Research Institute, R.D.A, ⁴Rural Development Administration, ⁵School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University* - This experiment was conducted to investigate effects of non-ionic or zwitterionic (+/-) surfactants on digestibility of rice straw, and changes of growth of rumen mixed microbes, pH, and gas production during *in vitro* fermentation. Also, during *in vitro* ruminal fermentation, microbial attachment on rice straw was investigated using scanning electron microscopy (SEM). Tween 80 or SOLFA-850 for non-ionic surfactant (NIS), and 3-(Dodecyldimethylammonio) propanesulfonate (DDAP) for zwitterionic surfactant (ZIS) was supplemented by 0.05% and 0.1% in Dehority's artificial medium containing Holtein rumen fluid, respectively, and the substrate for fermentation was rice straw passed through 1 mm screen. The experiment was composed of 7 treatments (two levels of two NISs, two levels of a ZIS) including the control, and 6, 12, 24, 48 and 72 hr of fermentation time with 3 replications per treatment. Treatment of Tween 80 increased *in vitro* DM digestibilities during 48 hr and 72 h post fermentations compared to the other treatments, whereas treatment of DDAP as a ZIS resulted in decreased DM digestibility than that of the control from 24 hr post fermentation ($P < 0.05$). Gas production *in vitro* was greater ($P < 0.05$) with addition of NIS than the control or ZIS, and increased as fermentation time elapsed. Rumen mixed microbial growth was greatest with addition of Tween 80 as NIS, and lowest when DDAP as ZIS was supplemented to the fermentation tube ($P < 0.05$). In SEM observation, rumen microbial population attached on rice straw particle was greater with addition of NIS, but was less with addition ZIS compared with the control. In conclusion we could not found any positive effects of ZIS surfactants on ruminal fermentation characteristics and rumen microbial growth rates.

Key words : Non-ionic surfactant, zwitterionic (+/-) surfactant, digestibility, SEM

서 론

반추동물의 반추위 환경을 인위적으로 조절함으로써 사료의 이용효율을 증진시키고 동물의 생산성을 극대화 시키고자 하는 노력들이 지속적으로 이루어져 왔다. 대표적인 반추위 발효 조절제로 Yucca와 같은 식물 추출물[2], monensin과 같은 항생제[25], 그리고 곰팡이 발효 추출물이나 생효모 배양물, 미생물제제 등[18]이 다양하게 이용되어 왔다. 또한 계면활성제인 surfactant는 미생물 세포막 표면에 부착하여 미생물에 대한 산소공급을 차단함으로써 호기성 미생물 성장을 감소시키며[11], 세포 내, 외의 효소를 유리시켜 효소기능 및 분비를 촉진 하는 것[22,23,26]으로 알려져 있다. 이러한

surfactant의 작용원리는 반추위내 혐기성 발효조건을 촉진 시키기에도 적합하여 반추동물용 제제로서 활용가능성을 인정받고 있다. Lee 등[16]과 Lee와 Ha [15]는 반추동물을 위한 반추위 발효조절제로서 비이온성 계면활성제인 Tween 80의 이용 가능성을 제시하였고, Lee와 Ha [15]는 *in vitro* 시험에서 barley grain과 orchard grass hay를 기질로 하여 혼합 반추위 미생물을 배양할 때, 비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant, NIS)인 Tween 80을 0.05% 첨가하면 cellulase, xylanase 및 amylase의 활성이 크게 증가되었다고 하였으며, Kamande 등[13]은 *in vitro* 시험에서 Tween 80이 기질에 대한 효소의 결합을 증진시키고 protease와 cellulase의 활성을 증가시키는 것으로 보고하였다. 따라서 현재까지 많은 연구가 진행되어 온 반추위 혐기성 미생물의 효소 분비를 촉진하는데 효과적인 비이온성 계면활성제[5,12,20,26]와 연구가 수행되어지지 않은 양쪽성 계면활성제가 *in vitro* 반추위 발효

*Corresponding author

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

E-mail : lss@gnu.ac.kr

특성과 반추위 미생물 성장에 대한 영향을 비교해 보고자 수행되었다.

재료 및 방법

발효기질 및 계면활성제

In vitro 소화율 시험을 위한 기질로서 국내산 일반미(동진벼) 벃짚을 1 mm screen이 부착된 Wiley mill (Thomas scientific, No. 4, USA)로 분쇄하여 시료로서 사용하였으며, AOAC 법[1]으로 분석한 벃짚의 화학적 조성은 Table 1과 같다.

비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant, NIS)는 시판 Tween 80 (Sigma, Cat No. P8074, USA)와 SOLFA-850 ((주)일신유화, Korea) 2 종류를 사용하였고, 양쪽 이온성 계면활성제(Zwitterionic surfactant, ZIS)는 3-(Dodecyl dimethylammonio) propanesulfonate (Sigma Cat No. D4516, USA) 1 종류를 사용하였다.

배양액 제조 및 발효 조건

배양액은 Dehority와 Scott [4]의 방법에 따라 제조되었다. 반추위액은 농후사료와 벃짚(40:60)을 섞취(체중의 2%)하는 반추위 누관이 장착된 홀스타인 착유우 2두(평균체중 500 kg)로 부터 시험 2시간 전에 채취하여 4겹의 cheese cloth로 여과하고 30분~1시간 정도 정치시켜 사료입자를 가라앉힌 후, vacuum 펌프로 상층액을 채취하여 사용하였다. 계면활성제 첨가구는 혐기상태로 주입된 Dehority's artificial medium에 NIS 및 ZIS를 수준별(0.05%, 0.1%)로 첨가한 medium 15 ml을 벃짚 0.2 g이 든 시험관에 분주한 다음, 위액 5 ml를 넣고 39°C의 shaking incubator에서 시간대별로 발효시켰다.

In vitro 시험에서 2종의 비이온성 계면활성제와 1종의 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제의 반추위 미생물 발효효과에 대한 첨가 수준별 영향을 밝히기 위하여 0.05% 및 0.1% (v/w)의 첨가비율을 각각 설정함으로써 무처리 대조구와 함께 총 7 처리를 두었으며, *in vitro* 발효 시간 (6, 12, 24, 48 그리고 72 hr)에 따라 시료를 채취하여 처리 당 3반복으로 수행하였다.

Table 1. Chemical composition of experimental rice straw

Chemical composition	Rice straw
Moisture (%)	8.31
Crude protein (% DM)	5.07
Crude fat (% DM)	1.35
Crude fiber (% DM)	32.04
Crude ash (% DM)	13.42
NDF ¹⁾ (% DM)	75.41
ADF ²⁾ (% DM)	51.01

¹⁾NDF: Neutral detergent fiber

²⁾ADF: Acid detergent fiber

건물소화율, Gas발생량, 미생물성장 및 pH변화

In vitro 건물소화율은 Moore [21]방법에 따라 발효지표로서 배양액의 pH를 측정된 후, 미리 칭량된 filter paper (Whatman No. 541)를 통해 aspirator로 여과한 다음, filter paper에 남아있는 미 소화물질을 105°C drying oven에서 12 시간 동안 건조시킨 후, 아래 공식으로 구하였다.

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

Gas 발생량은 각 발효시간대별로 시험관을 shaking incubator에서 꺼낸 후, 온도에 따른 변화를 감안하여 상온에서 20분간 방치시킨 다음, 자체 고안된 water displacement apparatus를 이용하여 gas 발생량을 측정하였다[7].

미생물 함량은 반추위 혼합 미생물의 *in vitro* 발효에 있어서 배양액 중 미생물 함량은 각 발효시간대별 시험관으로부터 발효액 1.5 ml를 tube에 취하고, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료 입자를 제거하고, 상층액을 취하여 14,000 rpm에서 3분간 재원심분리하여 미생물 pellet을 침전시킨 다음, 상층액은 제거하고 침전물에 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 첨가하여 교반하여 현탁시킨다.

이 과정을 3회 반복한 후에 spectrophotometer (BIO-RAD Model 680, USA)를 이용하여 550 nm에서 O.D. (optical density)값을 비교하여 미생물 함량을 구하였다.

pH 변화는 각 발효시간대별 gas 발생량과 미생물 함량 측정을 위한 시료 채취 후 pH meter (Mettler Toledo, MP230, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

전자현미경(SEM) 관찰

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

통계 처리

시험결과는 SAS program [24]의 General Linear Model (GLM) procedure에 따라 처리되었으며, 각 처리구간에 유의성 검증을 위해 분산분석을 실시한 후, Duncan's multiple range test [6]로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

계면활성제 첨가에 따른 건물소화율

비이온성 및 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 반추위 혼합 미생물에 의한 발효시간별 볏짚의 *in vitro* 건물 소화율은 Table 2에서 보는 바와 같다.

반추위 혼합미생물에 의한 볏짚의 건물소화율은 12시간 발효 이후부터 처리 여부에 관계없이 건물 소화율이 증가하였다. 배양시간의 경과에 따른 건물 소화율은 NIS 중, Tween 80 처리구에서 48시간 발효 이후부터 타 처리구에 비해 유의적 ($P<0.05$)으로 높았다. 그러나 같은 NIS로서 SOLFA-850 처리구에서는 대조구에 비해 평균적으로 높은 소화율을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. Kamande 등 [13]은 NIS인 Tween 60과 Tween 80으로 cellulose 분해에 미치는 영향에 대한 연구에서 NIS 첨가가 cellulose 분해를 증가시켰는데, 특히 Tween 80에 의한 효과가 높았다고 보고하였다. Tween 80의 경우, 반추위 미생물과 같은 혐기성 미생물의 세포막 투과성을 증가시켜 세포내 효소와 세포벽 부착 효소를 세포 밖으로 분비시키는 효과가 매우 높아[23,26] 효소의 접근성과 곡류 및 목초 기질의 소화율을 증가[8, 9]시키는 것으로 알려져 있다.

한편, 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제인 DDAP 첨가구는 발효 24시간이후부터 대조구 보다 건물소화율이 유의적 ($P<0.05$)으로 낮아 ZIS는 미생물 발효를 오히려 억제시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

각 처리별 첨가 농도 간에는 각 발효시간대에서 유의적인 차이가 없었으나 NIS인 Tween 80처리구에서 24시간 발효 시, 0.05% 첨가구가 0.1%첨가구보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 것으로 나타났다.

반추위 미생물에 의한 *in vitro* 건물소화율은 발효 6~12시간대에서 가장 많이 소화(약 1.9~3.1%/hr) 되었으며, 다음으

로는 발효 48~72시간대(0.53~1.03%/hr)였으며, 양쪽(+/-) 이온성인 DDAP 첨가구에서는 발효 24시간 이후로 거의 소화가 일어나지 않은 것으로 나타났다. 전 처리구 중에서 발효 72시간대에서 NIS인 Tween 80을 0.05% 첨가하였을 때가 대조구에 비해 건물소화율이 약 38% 높아 가장 많이 향상된 것으로 나타났다.

계면활성제 첨가에 따른 Gas 발생량

In vitro 시험에서 비이온성(NIS) 및 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 반추위 혼합미생물에 의한 발효 시간별 가스 발생량에 대한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

가스 발생량은 NIS 두 처리구 모두, 대조구나 ZIS 처리구보다 유의적($P<0.05$)으로 많았으며, 발효시간의 경과함에 따라 증가하였다. 가스발생량 역시, 건물 소화율과 마찬가지로 NIS인 Tween 80 첨가구에서 가장 많이 발생하였으며, 다음으로 SOLFA-850 첨가구 순이었으며, DDAP첨가구는 대조구보다도 유의적($P<0.05$)으로 낮아서 미생물 발효를 오히려 억제시킨다는 건물 소화율의 결과를 뒷받침하고 있다.

NIS (Tween 80, SOLFA-850) 첨가수준 간에는 0.1% 첨가구에서 발효 48시간 이후에는 0.05% 첨가구보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높았다. Lee와 Ha [15]는 Tween 80을 이용한 *in vitro* 시험에서 반추위 혼합미생물 배양 시 Tween 80을 각각 0.05%와 0.1%로 첨가 하였을 때, 대조구에 비해 0.05% 수준에서는 유의적인 차이가 없었고, 0.1% 수준에서는 가스 발생량이 오히려 감소하였다고 보고하여 본 시험과 약간 상이한 결과를 나타내었다.

발효 시간대별 가스 발생량은 처리구별로 약간 다른 경향을 나타내었는데, NIS 중 Tween 80은 6~12시간대에서 약 2.12 ml/g으로서 전 처리구 중에서 가장 많이 생성된 이후로 시간이 경과함에 따라 점차 감소한 반면, 0.1% SOLFA 850 처리구

Table 2. Effect of surfactants on DM digestibility(%) of rice straw during *in vitro* fermentation by rumen mixed microorganisms

Item	Fermentation time (hr)				
	6	12	24	48	72
Control	9.46±3.14	20.85±1.46 ^{ab}	25.94±1.05 ^{bc}	31.59±1.39 ^b	44.23±0.10 ^b
Non-ionic surfactant					
Tween 80 (0.05%)	6.44±1.58	24.74±1.33 ^a	31.54±0.99 ^a	36.20±2.48 ^a	61.01±3.96 ^a
(0.10%)	5.06±1.36	22.12±1.30 ^{ab}	27.09±1.01 ^b	35.72±0.11 ^a	58.09±3.75 ^a
SOLFA-850 (0.05%)	5.20±1.85	16.50±1.22 ^{bc}	23.63±1.53 ^{bcd}	31.17±1.15 ^b	45.74±1.13 ^b
(0.10%)	5.33±0.13	21.13±1.04 ^{ab}	23.18±0.61 ^{cd}	31.84±0.82 ^b	45.46±2.79 ^b
Zwitterionic surfactant					
DDAP ¹⁾ (0.05%)	6.95±3.23	18.91±0.84 ^{ab}	22.61±1.54 ^{cd}	25.58±0.76 ^c	27.04±0.30 ^c
(0.10%)	4.35±0.78	12.17±3.70 ^c	21.37±0.73 ^d	23.56±0.92 ^c	24.56±0.34 ^c

¹⁾DDAP: 3-(Dodecyldimethylammonio) propanesulfanate

Mean±SE

Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P<0.05$)

와 대조구에서는 발효 24~48시간대에서 시간당 가스 발생량이 각각 0.8 ml/g 및 0.26 ml/g 으로서 많은 것으로 나타났다. 한편, 양쪽(+/-) 이온성인 DDAP구에서는 발효시간의 경과에 따른 가스 발생량이 매우 적은 것으로 나타나, 수질환경에서 계면활성제가 환경미생물에 대해 독성을 나타낸다고 한, De Oude [3]의 보고와 같이 본 시험에서 사용된 DDAP가 반추위 혐기미생물에 대해서 성장을 저해함으로써 소화율도 저하되고 Gas 발생량 또한 적어진 것으로 판단된다.

계면활성제 첨가에 따른 미생물 함량

In vitro 시험에서 비이온성(NIS) 및 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제를 첨가하였을 때, 발효 시간별 배양액 중 반추위 혼합 미생물 함량에 대한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

배양액 중 미생물 함량은 NIS로서 Tween 80 첨가구에서 가장 많았고, 다음으로 SOLFA-850 첨가구 순이었으며, ZIS인

DDAP 첨가구는 대조구보다도 함량이 적었다. 대조구에서는 발효시간이 경과함에 따라 미생물 함량이 증가되었으나 전체적으로 미생물 함량이 많았던 NIS 첨가구에서는 48시간 발효대에서 가장 높았다가 이후 72시간대에는 감소하였다. 미생물 함량은 NIS인 Tween 80을 0.05% 첨가한 구에서 48시간 발효 시에 처리구 중 가장 많았는데, 그 결과는 같은 시간대의 대조구에 비해 약 57%가 증가된 것으로 나타났다.

NIS의 이용과 관련하여 Lee 등[16]은 반추위내에 서식하고 비섭유 분해 미생물로 분류되는 미생물 4종(*R. amylophilus*, *M. elsdenii*, *P. ruminicola* 및 *S. ruminantium*)을 순수 배양하면서 비이온성 계면활성제 Tween 80을 무첨가 및, 첨가수준별(0.1%, 0.05%)로 미생물의 성장률에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과, Tween 80의 첨가에 의해 공시한 4종의 미생물의 성장률이 모두 크게 증가하는 것으로 나타났으며, Tween 80을 0.05% 첨가하였을 경우에 0.1% 첨가하였을 때

Table 3. Effect of surfactants on cumulative gas production (ml · g⁻¹) during *in vitro* fermentation by rumen mixed microorganisms

Item	Fermentation time (hr)				
	6	12	24	48	72
Control	5.60±0.25 ^b	5.67±0.24 ^d	8.73±0.03 ^c	14.87±0.15 ^d	17.40±0.23 ^e
Non-ionic surfactant					
Tween 80 (0.05%)	3.53±0.26 ^c	16.47±0.43 ^{ab}	29.13±0.17 ^a	41.60±0.12 ^a	44.30±0.50 ^b
(0.10%)	6.07±0.37 ^b	18.47±1.38 ^a	25.27±1.78 ^a	42.67±1.23 ^a	46.13±0.32 ^a
SOLFA-850 (0.05%)	7.33±0.12 ^a	12.53±2.97 ^{bc}	18.83±0.12 ^b	32.60±0.51 ^c	37.57±0.32 ^d
(0.10%)	7.23±0.67 ^a	10.40±1.12 ^c	15.73±2.91 ^b	35.03±1.01 ^b	39.37±1.04 ^c
Zwitterionic Surfactant					
DDAP ¹⁾ (0.05%)	3.30±0.36 ^c	3.83±0.09 ^d	4.23±0.17 ^d	4.87±0.23 ^e	6.33±0.42 ^f
(0.10%)	3.97±0.12 ^c	4.20±0.32 ^d	4.90±0.44 ^{cd}	5.97±0.38 ^e	6.83±0.09 ^f

¹⁾DDAP: 3-(Dodecyldimethylammonio) propanesulfanate

Mean±SE

Means with different superscripts in the same column differ significantly (*P*<0.05)

Table 4. Effect of surfactants on microbial growth rate (O.D. value) during *in vitro* fermentation by rumen mixed microorganisms

Item	Fermentation time (hr)				
	6	12	24	48	72
Control	0.61±0.01 ^{cd}	0.74±0.00 ^d	0.79±0.01 ^c	0.84±0.02 ^d	0.91±0.01 ^c
Non-ionic surfactant					
Tween 80 (0.05%)	0.66±0.04 ^c	0.86±0.01 ^b	1.05±0.02 ^b	1.32±0.01 ^a	1.16±0.03 ^a
(0.10%)	0.67±0.03 ^{bc}	0.94±0.01 ^a	1.12±0.01 ^a	1.27±0.01 ^b	1.06±0.01 ^b
SOLFA-850 (0.05%)	0.72±0.02 ^{ab}	0.80±0.00 ^c	1.04±0.01 ^b	1.26±0.02 ^b	0.91±0.02 ^c
(0.10%)	0.74±0.01 ^a	0.81±0.01 ^c	1.05±0.01 ^b	1.11±0.02 ^c	0.94±0.02 ^c
Zwitterionic Surfactant					
DDAP ¹⁾ (0.05%)	0.59±0.01 ^d	0.66±0.00 ^e	0.70±0.00 ^d	0.66±0.00 ^e	0.65±0.00 ^d
(0.10%)	0.52±0.01 ^e	0.62±0.00 ^f	0.62±0.00 ^e	0.61±0.00 ^f	0.62±0.00 ^d

¹⁾DDAP: 3-(Dodecyldimethylammonio) propanesulfanate

Mean±SE

Means with different superscripts in the same column differ significantly (*P*<0.05)

보다 미생물의 성장률이 전반적으로 높았다고 하였다. 이러한 결과는 본 시험에서 발효 48시간 이후에는 일치하였으나 발효 12시간 및 24시간에는 Tween 80을 0.1% 첨가한 구에서 더 높게 나타나 미생물 성장이 발효 시간에 따라서 영향을 크게 받는다. Lee 등[19]은 반추위액에 NIS와 acrylic acid 중합체를 혼합 투여하였을 경우, 세포벽에 붙어있거나 세포내에 함유되어 있던 효소의 대부분이 위액 중으로 부유되어 작용을 함으로써 기질의 소화율을 향상시키는 동시에, 혐기 미생물의 산소 공급을 차단함으로써 반추위 미생물의 성장도 증가된다고 하였다.

양쪽(+/-) 이온성 계면활성제 처리구에서 미생물 함량이 대조구에 비해 유의적(P<0.05)으로 낮아 반추위 혼합미생물의 성장을 오히려 저해하는 독성이 있는 것으로 사료된다.

계면활성제 첨가에 따른 pH 변화

In vitro 시험에서 비이온성(NIS) 및 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제의 첨가가 반추위 미생물에 의한 발효 시간별 pH 변화에 미치는 영향은 Table 5에서 보는 바와 같다.

반추위 혼합미생물 배양액의 pH는 5.90~6.81수준으로서 소화율 및 미생물성장량 등 발효 특성에서 나쁜 영향을 끼쳤던 DDAP 첨가구에서 타 처리구에 비해 높았으며 발효시간이 경과함에 따라 pH는 전반적으로 낮아졌다. 발효시간 별로는 대조구에서는 48시간대에서, NIS 첨가구에서는 72시간대에서 pH 감소폭이 큰 것으로 나타났다.

Lee 등[17]은 한우의 반추위액을 채취하여 벃짚을 기질로 한 *in vitro* 시험에서 대조구에 비하여 NIS 첨가구의 pH가 낮아지는 경향을 나타내었다고 하였는데, 본 시험에서는 발효 24시간까지는 처리구간에 pH차이가 없었으나 24시간 이후부터 0.05% Tween 80 처리구를 제외하고 대조구보다 유의적으로 높아 상이한 결과를 나타내었다.

Lang와 Wagner [14]의 보고에 의하면 계면활성제의 독성은 pH 또는 인공합성 여부에 따라서도 많이 차이를 보이는데, pH 7 이상일 경우에는 양(+) 이온성 계면활성제의 독성이 강하고, pH 7 이하의 경우에는 음(-) 이온성 계면활성제가 강한 독성을 나타낸다고 하였다. 그러나 비이온성의 경우에는 pH와는 무관하게 상대적으로 이온성을 가지는 계면활성제보다 적은 독성을 나타내며, 생물 계면활성제의 경우는 합성 계면활성제제의 경우보다 대부분 독성이 적다. 그러나 어떤 경우에는 생물 계면활성제의 독성이 합성 계면활성제의 경우만큼 강한 독성을 나타내기도 한다고 하였다.

본 시험에서는 모든 처리구에서 pH 7 이하로서 양쪽(+/-) 이온성인 DDAP의 음이온이 반추위 미생물 발효에 독성을 나타낸 것으로 추측된다.

전자현미경에 의한 미생물 부착 양상 관찰

전자 현미경(SEM)을 이용하여 일반 배양액에서 발효된 벃짚 입자와 비이온성(NIS) 및 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제가 첨가된 배양액에서 발효된 벃짚 입자에 대한 반추위 미생물의 부착 양상을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 비이온성 계면활성제 처리구(Fig. 1. ㉔~㉞)에서는 무처리구(Fig. 1. ㉑~㉓)에 비해 미생물 부착이 현저히 많았으나 +/- 양쪽 이온성 계면활성제 처리구(Fig. 1. ㉟~㉡)에서는 무처리구(Fig. 1. ㉑~㉓)에 비해 미생물의 부착이 현저히 줄어들었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 비이온성 계면활성제는 반추위 미생물이 사료입자에 부착하는 것을 도움으로써 소화율을 비롯한 반추위 발효특성을 좋게 하는 반면, 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제는 오히려 반추위 미생물의 사료 입자 부착을 저해함으로써 소화율 및 발효에 악영향을 미친 것으로 사료된다.

Table 5. Effect of surfactants on the change of pH during *in vitro* fermentation by rumen mixed microorganisms

Item	Fermentation time (hr)				
	6	12	24	48	72
Control	6.80±0.02 ^a	6.71±0.02 ^a	6.55±0.02 ^b	6.10±0.01 ^d	6.02±0.02 ^c
Non-ionic surfactant					
Tween 80 (0.05%)	6.62±0.11	6.60±0.09	6.40±0.10 ^c	6.36±0.22 ^{cd}	5.90±0.04 ^c
(0.10%)	6.78±0.05	6.68±0.03	6.56±0.04 ^b	6.56±0.03 ^{abc}	6.34±0.04 ^b
SOLFA-850 (0.05%)	6.76±0.00	6.70±0.03	6.77±0.04 ^a	6.55±0.05 ^{abc}	6.29±0.04 ^b
(0.10%)	6.71±0.04	6.65±0.04	6.64±0.01 ^{ab}	6.43±0.07 ^{bc}	6.26±0.06 ^b
Zwitterionic Surfactant					
DDAP ¹⁾ (0.05%)	6.72±0.04	6.74±0.02	6.78±0.01 ^a	6.72±0.01 ^{ab}	6.72±0.05 ^a
(0.10%)	6.75±0.04	6.72±0.03	6.77±0.03 ^a	6.80±0.02 ^a	6.81±0.02 ^a

¹⁾DDAP: 3-(Dodecyldimethylammonio) propanesulfanate

Mean±SE

Means with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05)

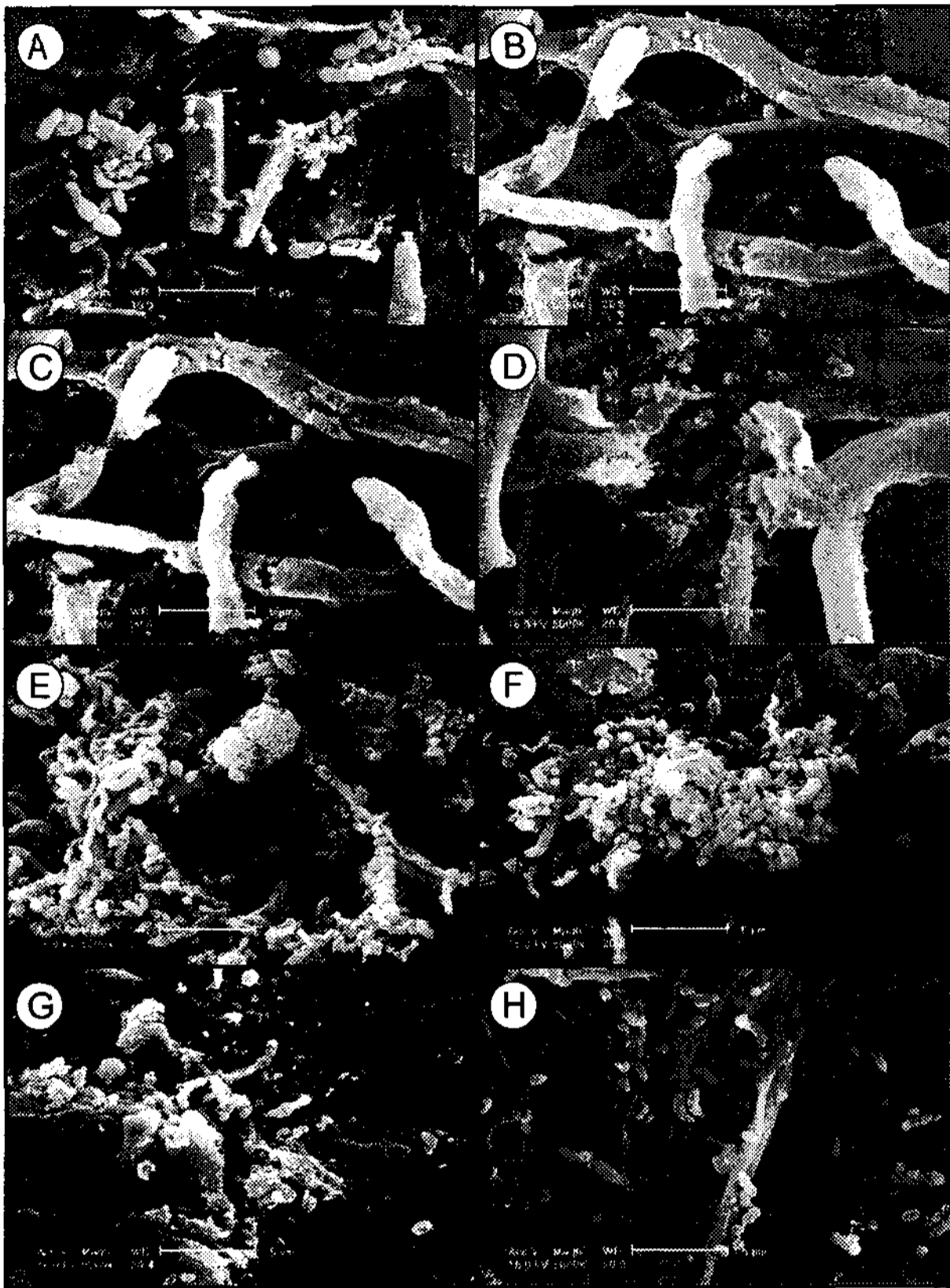


Fig. 1. Scanning Electron Microscopy (SEM) observation of *in vitro* microbial attachment on the surface of internode fraction of rice straw untreated (A, B), supplemented with zwitterionic surfactants (C 0.05% DDAP, $\times 5,000$; D 0.1% DDAP, $\times 5,000$) and supplemented with non-ionic surfactants (E 0.05% Tween 80, $\times 5,000$; F 0.1% Tween 80, $\times 5,000$; G 0.05% SOLFA-850, $\times 5,000$; H 0.1% SOLFA-850, $\times 5,000$).

요 약

본 연구는 반추위 미생물 발효에 있어서 계면활성제의 이온성 여부가 발효시간별 *in vitro* 건물소화율, 미생물 성장량, pH 변화, Gas 발생량 및 SEM에 의한 미생물 부착 양상을 조사하기 위해 수행되었다.

1 mm 입자도의 볏짚을 기질로 하여 Holstein 젖소 위액을 이용한 Dehority's artificial medium에 대조구를 비롯하여 비이온성 계면활성제(NIS)로서 시판되고 있는 Tween 80과 SOLFA-850 2종류, 그리고 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제(ZIS)로서 3-(Dodecyldimethylammonio) propanesulfonate (DDAP) 1 종류를 이용하여 각각 0.05% 및 0.1% 수준으로 첨가함으로써 총 7처리를 두었다. 발효시간은 6, 12, 24, 48 및 72시간으로 설정하여 각 처리 당 3반복으로 시험을 수행하였다.

In vitro 건물 소화율은 NIS인 Tween 80 첨가구에서 48시간 및 72시간 발효 시, 타 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로

높았으나, ZIS인 DDAP 첨가구는 발효 24시간이후 부터 대조구보다도 건물소화율이 낮게 나타났다($P < 0.05$).

가스 발생량은 NIS 두 처리구 모두, 대조구나 ZIS 처리구보다 유의적($P < 0.05$)으로 많았으며, 발효시간의 경과함에 따라 증가하였다.

미생물 성장량은 NIS인 Tween 80 첨가구에서 가장 많았고, 다음으로 SOLFA 850 첨가구 순이었으며, ZIS인 DDAP 첨가구는 대조구보다도 적었다($P < 0.05$).

전자현미경으로 관찰한 미생물 부착 양상에서 NIS 첨가구는 무처리구에 비해 미생물 군집이 현저히 많았으나 ZIS 첨가구는 오히려 적은 것으로 나타났다.

따라서 양쪽(+/-) 이온성 계면활성제는 반추위 발효 작용과 미생물 성장에 긍정적인 효과가 없는 것으로 사료된다.

References

1. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis 16th edition. Association of official analytical chemists, Washington, D.C.
2. Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret and C. Kamel, 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **89**, 761-771.
3. De Oude, N. T. 1992. The handbook of environmental chemistry. Vol. 3, part F: anthropogenic compounds. Springer Verlag, Heidelberg, FRG.
4. Dehority, B. A. and 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.
5. Deshpande, M. V., M. C. Srinivasan and S. S. Deshmakh. 1987. Effects of fatty acids on cellylase production by *Penicillium funiculosum* and its mutants. *Biotechnol. Lett.* **9**, 301-304.
6. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* **11**, 1-42.
7. Ferorak, P. M. and S. E. Hrwdey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* **4**, 425-432.
8. Goto, M., H. D. Bae, M. S. Yahaya, S. Karita, K. Wangjiae, K. Sugawara and K. J. Cheng. 2003. Effect of surfactants Tween 80 on enzymatic accessibility and degradation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) at different growth stages, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**, 83-87.
9. Goto, M., H. D. Bea, S. S. Lee, M. S. Yahaya, S. Karita, K. Wangjiae and K. J. Cheng. 2003. Effect of surfactants 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.
10. Ho, Y. W., N. Abdullah and S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbial.* **134** 177-181.
11. Hulme, M. A. and D. W. Stranks, 1970. Induction and the regulation of production of cellulase by fungi. *Nature*

- London* **226**, 469-470.
12. Hung, B. R., L. Lara, M. A. Patron, N. N. Ugarova, W. Bechstedt and S. Clappes, 1988. Tween 80 and proteose peptone effect on cellulase production. *Acta. Biotechnol.* **8**, 461-464.
 13. 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 absorption, and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. *J. Dairy Sci.* **83**, 536-542.
 14. Lang, S. and F. Wagner. 1993. Biological activities of biosurfactants. *Kosaric Biosurfactants*, Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Lee, S. S., H. S. Kim, Y. H. Moon, N. J. Choi and J. K. Ha. 2004. The effects of a non-ionic surfactants on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. *Anim. Feed Sci. and Technol.* **115**, 37-50.
 18. Lee, S. S., J. K. Ha, H. S. Kang and K. J. Cheng. 1997. Industrial application of anaerobic rumen fungi: A review. *Korean J. Dairy Sci.* **19**, 249-276.
 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. Long, K. and J. S. Knapp. 1991. The effect of Junlon PW110 and Tween 80 on the production of cellulolytic enzymes by *Coprinus cinereus*. *Mycol. Res.* **95**, 1077-1081.
 21. Moore, J. E. 1970. Procedures for the two-stage in vitro digestion of forages. pp 5001-5003, In Harris, L. E. (ed.), *Nutrition research techniques for domestic and wild animals*, Vol. 1. Utah State Univ., Logan, UT.
 22. Munn, E. A., G. P. Hazlewood and M. Graham. 1983. Uptake and incorporation of the products of proteolysis by the rumen bacterium *Bacteroides rumenicola* R8/4. *Curr. Microbiol.* **8**, 317-320.
 23. Reese, E. T. and A. Maguire. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied Microbiol.* **17**, 242-245.
 24. SAS. 1999. SAS/STAT software for PC. Release 8.01. SAS institute Inc., Cary, N.C., U.S.A.
 25. Yang, C. M. and J. B. Russell. 1993. The effect of monen supplementation on ruminal ammonia accumulation in vitro and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* **71**, 3470-3476.
 26. 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.