

Caprylic Acid와 Cyclodextrin 복합물이 *In vitro* 반추위 발효성상 및 메탄 생성에 미치는 영향

김경훈* · 설용주* · 이성실** · 오영균* · 남인식* · 김도형* · 최창원*
농촌진흥청 축산과학원*, 경상대학교 농생명학부 낙농학전공**

Effects of Caprylic Acid and Cyclodextrin Complex on *In vitro* Fermentation Characteristics and Methane Production

K. H. Kim*, Y. J. Seol*, S. S. Lee**, Y. G. Oh*, I. S. Nam*, D. H. Kim* and C. W. Choi*

National Institute of Animal Science, RDA*,
Department of Dairy science, College of Agriculture and Science, Gyeong Sang National University**

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of dietary addition of caprylic acid (CA)-cyclodextrin (CD) complex on *in vitro* fermentation characteristics, total gas and methane production. Experiment was done with six treatment groups; 1) no CA-CD complex (control), 2) CA 20 mg (T1), 3) CD 830 mg (T2), 4) CA-CD complex 425 mg (T3), CA-CD complex 850 mg (T4), CA-CD complex 1,700 mg (T5). Ruminal pH, ammonia and total VFA concentrations of T2, T3, T4 and T5 were lower ($P<0.05$) than those of control and T1 for the 12h incubation. The increase in molar percentage of propionate was observed in T4 and T5 compared with control and T2 for the 8h incubation ($P<0.05$), however, the ratio of acetate to propionate was unchanged in all treatments. Total gas of T1 was lower than that of control, but T2, T3, T4 and T5 were higher compared with control for 12h incubation ($P<0.05$). If the methane ratio (as %) to total gas for all treatments was compared, T3, T4 and T5 (CA-CD supplemented groups) averaged 2.7% whereas control, T1 and T2 showed 3.4, 2.8 and 5.1%, respectively. Therefore, according to these results, it might be concluded that supplementation of CA-CD complex could reduce methane production without disrupting ruminal fermentation.

(Key words : Caprylic acid, Cyclodextrin, Methane, Rumen)

I. 서 론

반추위 메탄 생성균은 섬유소 등을 분해하는 과정에서 생성되는 이산화탄소와 수소를 이용하여 메탄을 발생시키고 그 결과, 반추가축의 에너지 이용효율은 감소한다. 사료급여 수준, 사료의 구성성분 및 소화율에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 섭취 사료에너지의 약 2~15%가 반추위 미생물 대사 과정 중 메탄으로 전환

되어 트립 또는 호흡을 통해 대기 중으로 방출되며, 그 양은 지구상에서 발생하는 총 메탄 중 약 16%인 연간 약 80 Tg으로 추정된다 (Johnson과 Johnson, 1995). 국내의 경우 동물이 생산하는 총 메탄 배출량 중 소가 차지하는 비율이 약 75%에 육박한다고 보고된 바 있다 (The Government of the Republic of Korea, 2003). 더욱이 메탄은 지구온난화에 미치는 영향이 이산화탄소에 비해 21배나 크기 때문에

Corresponding author : K. H. Kim, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea.
Tel : 031-290-1656, Fax : 031-290-1794, E-mail : kh665@rda.go.kr

(IPCC, 1996), 메탄을 줄이기 위한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

메탄 저감을 위한 주요 연구로는 클로르포름과 같은 할로젠 유사물질을 통한 메탄 발생 억제 (Van Nevel 등, 1995)와 Ionophore 물질인 monensin, salinomycin의 이용 (Van Nevel 등, 1992), 프로토조아 제거 (Newbold 등, 1995), *Saccharomyces cerevisiae*와 *Aspergillus oryzae*와 같은 생균제 이용 (Frumholtz 등, 1989)과 중쇄 지방산 (MCFA), 장쇄지방산 (LCFA), 식물성 오일 (Machmüller, 2006) 등을 첨가하여 반추동물의 메탄 생산을 억제하는 방법들이 연구되었으나 아직까지 괄목할 만한 연구 결과를 도출시키지 못하였다. 이 중 최근 많은 연구가 지속적으로 수행되고 있는 지방산을 이용한 메탄저감연구는 *in vitro* 실험 시 반추위내 메탄생성 대사를 억제하는 긍정적인 효과가 보고되고 있으나, *in vivo* 실험에서는 반추위내 미생물의 활성을 억제하여 섬유소 분해 감소와 사료의 기호성을 저하시키는 등 많은 문제점을 가지고 있다.

최근 산업적으로 광범위하게 이용되고 있는 cyclodextrin (CD)은 glucose로 구성되어 있는 환상형 다당류로서 수용액 상태에서 내부의 소수성 공간에 다양한 유기 복합물을 수용할 수 있기 때문에 산화되기 쉬운 물질이나 비수용성 물질을 CD 내부공간에서 안정화 시켜 불쾌한 냄새와 맛을 제거, 휘발성 물질의 방출을 지연시키는 물질로 보고되고 있다 (Martin Del Valle, 2004). 이러한 CD의 특성을 이용하여 MCFA와의 complex (CD complex)를 제조하여 반추위 미생물과 함께 배양한 연구에 따르면 메탄 생성이 억제되는 것으로 나타났다 (Ajisaka 등, 2002). 그러나 위의 연구결과는 반추위 발효에 지대한 영향을 가져다 줄 수 있는 CD와 MCFA 각각의 단독처리 효과를 구명하지 않았기 때문에 CD complex에 의한 메탄저감 효과의 기전을 분명히 하기에는 부족한 부분이 있었다. 따라서 본 연구는 CD 무첨가, 일정수준의 CD 및 caprylic acid 첨가 그리고 수준별 CD complex 첨가가 *in vitro* 반추위 발효성상 및 메탄생성 저감효과를 알아보려고 본 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. Caprylic acid-Cyclodextrin complex 제조

Caprylic acid-Cyclodextrin complex (CA-CD complex) 제조는 Ajisaka (2002)와 Martin Del Valle (2004)의 방법에 의하여 제조하였다. β -CD (sigma)와 고농도의 caprylic acid(CA, sigma)를 3:1 mole 비율로 혼합한 후 homogenizer를 이용하여 10분간 교반하였으며, 이후 3일 동안 room temperature에서 침전 시켰다. 침전물은 -80°C 에서 동결시킨 후 동결 건조하여 수분이 완전히 제거된 CA-CD complex powder를 제조하였다. 제조된 CA-CD complex내 caprylic acid 함량을 산분해법을 이용하여 조사한 결과, 지방함량이 2.0%로 나타났다.

2. CA-CD complex 첨가 수준 및 배양

본 연구는 Ajisaka (2002)의 연구결과를 기초로 하여 CA-CD complex 무첨가를 대조구 (Control), CA 20 mg 단독 첨가구(T1), CD 830 mg 단독 첨가구(T2), CA-CD complex 425 mg 첨가구(T3, CA 함량 10 mg), CA-CD complex 850 mg 첨가구(T4, CA 함량 20 mg), CA-CD complex 1700 mg 첨가구(T5, CA 함량 40 mg)로 하여 39°C incubator에서 혐기적으로 4, 8, 12시간 동안 각각 3반복의 배양실험을 수행하였다.

3. 반추위액 채취, buffer 제조 및 분석방법

반추위액은 반추위 캐놀라가 장착된 한우 거세우(체중: 568 ± 5.0 kg)로 부터 채취하였다. 공여측은 1일 2회(07:00, 18:00) 분할하여 배합사료 4 kg와 볏짚 4 kg을 섭취하였고, 사료의 영양소 함량은 Table 1과 같다. 그리고 물과 미네랄 블록은 자유로이 섭취도록 하였다. 반추위액은 아침 사료 급여 1시간 전에 채취하여 4겹의 cheese cloth를 이용하여 사료입자를 제거한 후 즉시, CO_2 gas가 충전된 보온병에 보관하여 실험실로 운반하였다. 배양액은 Miyazaki 등 (1989)의 방법으로 제조된 buffer 용액(KH_2PO_4 ,

Table 1. Ingredient and chemical composition of Concentrates

Ingredient composition	% of DM	
Corn	47.8	
Wheat bran	41.0	
Soybean meal	5.0	
Rapeseed meal	2.0	
Molasses	2.0	
Limestone	1.5	
Salt	0.4	
Vitamin mix ¹⁾	0.2	
Lasalocid	0.1	
Total	100	
Chemical composition	Concentrates	Rice straw
Dry matter	86.62	95.41
Crude protein	13.28	6.12
Ash	4.92	9.71
Neutral detergent-insoluble fiber	14.09	56.49
Acid detergent-insoluble fiber	2.95	37.68

¹⁾ Vit. A, 2,650,000 IU; Vit. D₃, 530,000 IU; Vit. E, 1,050 IU; Niacin, 10,000 mg; Mn, 4,400 mg; Zn, 4,400 mg; Fe, 13,200 mg; Cu, 2,200 mg; I, 400 mg; B.H.T, 10,000 mg per kg.

3.0 g; NaHPO₄ · 12H₂O, 18 g; NaHCO₃, 0.5 g; NaCl, 0.5 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g; CaCl₂ · H₂O; 0.1 g/L)에 glucose, 2 g; cellobiose, 2 g; NH₄Cl, 0.2 g; cysteine-HCl · H₂O, 0.6 g를 넣고 반추위액과 1:2 비율로 혼합하여 pH를 6.8로 맞추었고, CO₂ gas를 주입하여 본 시험 전까지 혐기상태를 유지하였다. 이후 실험설계에 따라 CA-CD complex를 넣고 배양액을 60 ml씩 분주하여 고무마개와 aluminum seal로 밀봉한 후 Ajisaka 등 (2002)의 방법을 이용하여 39℃ 회전식 (100 rpm) 배양기에서 배양하였다. 배양 후 배양 tube를 통하여 총 가스발생량을 측정하였으며, 각 처리구의 배양시간별 메탄의 발생량은 10 ml vacutainer에 수집하여 molecular sieve 13 × 45 ~60 MESH (2.0 M × 1/8" × 2.0 mm SS, VARIAN) column이 장착된 GC(VARIAN CP-3800, USA)

를 이용하여 분석하였다. 휘발성 지방산은 배양액 5 ml을 채취하여 HgCl₂ 0.05 ml, H₃PO₄ 1 ml, pivalic acid 0.2 ml를 첨가하여 4℃에서 30 분간 정치시킨 후, 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액 2 ml을 vial에 옮겨 담고 GC (VARIAN CP-3800, USA)를 이용하여 분석하였다(Erwins 등, 1961). NH₃-N은 10 ml 원심 분리관에 반추위액 6.2 ml을 넣고, HgCl₂ 0.06 ml을 첨가하여 3,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층액 1.5 ml를 UV측정용 cuvette에 넣고, spectrophotometer (UVIKON 923 Double beam UV/VIS)로 파장 630 nm상에서 측정하였다(Chaney와 Marbach, 1962).

4. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 모든 결과에 대한 통계 분석은 SAS(2002)의 ANOVA procedure를 통하여 분산분석을 실시하였고, 처리의 평균간 비교는 Duncan's multiple range test에 의하여 P<0.05에서 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 반추위 발효 성상

각 시험구별 배양시간에 따른 *in vitro* 반추위 pH 변화에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 모든 시험구에서 배양 12시간까지 pH가 지속적으로 감소하였다. 특히, 배양 8시간 후부터 수준별 CA-CD complex 첨가구인 T3, T4, T5와 CD 단독 첨가구인 T2구의 pH는 대조구나 지방산 단독 첨가구인 T1보다 유의적(P<0.05)으로 감소하였다. 또한 T3, T4, T5구의 CD complex 첨가수준이 증가함에 따라 모든 배양 시간에서 pH가 유의적(P<0.05)으로 감소하는 것으로 나타났다. CD는 미생물이 전분을 가수분해하는 과정에서 생산되는 특성상 반추위 미생물에 의해 쉽게 분해되어 에너지로 이용될 수 있는 것으로 판단되며 본 실험의 CD 첨가량에 따른 pH 변화도 이를 뒷받침하고 있다.

시험구별 VFA의 농도 변화는 Table 3에 나

Table 2. Effect of different levels of caprylic acid and cyclodextrin complex on ruminal pH change

Incubation time(h)	Treatments ¹⁾						SEM
	C	T1	T2	T3	T4	T5	
0	6.89 ^{ab}	6.92 ^a	6.91 ^{ab}	6.88 ^a	6.85 ^{bc}	6.82 ^c	0.024
4	5.90 ^c	5.90 ^c	6.15 ^a	6.10 ^a	5.99 ^b	5.93 ^c	0.029
8	5.81 ^a	5.79 ^a	5.38 ^c	5.52 ^b	5.37 ^c	5.23 ^d	0.026
12	5.55 ^b	5.67 ^a	4.98 ^{de}	5.20 ^c	5.05 ^d	4.97 ^e	0.042
Mean	6.04	6.07	5.86	5.92	5.82	5.73	

¹⁾ Control : CA-CD complex, 0 mg; T1 : CA(C8:0), 20 mg; T2 : CD, 830 mg; T3 : CA-CD complex, 425 mg; T4 : CA-CD complex, 850 mg; T5 : CA-CD complex, 1700 mg.

^{abcde} Means with different superscripts within same row in incubation time are significantly different(P<0.05).

타내었다. Total VFA는 모든 처리구에서 배양 12시간까지 계속 증가하였다. CA 단독 첨가구인 T1의 total VFA 함량은 각각 배양 12시간에서 대조구보다 유의적(P<0.05)으로 낮았고, CD 단독 첨가구 T2와 CA-CD complex의 첨가수준을 증가시킨 T3, T4, T5 처리구는 8시간 이후부터 대조구 보다 유의적(P<0.05)으로 낮았다. 그러나 T2, T3, T4, T5간에는 유의적인 차이가 없었다. Acetate 농도는 0시간에서 CD 단독 처리구에서 농도가 유의적으로 높았으며 이후 배양시간에서는 각 처리구간 유의성을 발견할 수 없었다. Propionate 농도는 배양 8시간에서만 T4, T5 처리구가 대조구와 T1, T2구 보다 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다. Butyrate 농도는 배양 8시간째부터 T2와 CA-CD complex 처리구인 T3, T4, T5가 대조구나 T1 보다 농도가 낮았다. Acetate : Propionate(A/P) 비율은 모든 배양시간에서 처리구 간 유의성이 나타나지 않았다.

다양한 Guest 물질을 이용한 *in vitro* 연구결과를 살펴보면 중쇄지방산(MCFA)을 이용한 CD complex 첨가 실험에서는 CD complex의 첨가량 증가가 pH를 저감시키지만 total VFA는 유의적 차이는 없다고 보고하였고(Ajisaka 등, 2002), Iodopropane을 이용한 연구에서는 CD complex의 첨가량 증가가 pH를 유의적으로 저감시키고 total VFA는 증가시킨다고 하였다

(Mohammed 등, 2004). Diallyl maleate를 이용한 pH의 변화는 없었지만 total VFA는 증가한다고 보고하였다(Lila 등, 2004). 즉, CD complex가 pH 및 VFA 생성에 미치는 효과는 지금까지 보고된 결과가 서로 상이하게 나타나고 있는데, 시험에 사용된 CD complex내 guest 물질이 서로 다를 뿐 아니라 미생물의 에너지원으로 이용된 성분이 glucose, corn starch, 건초와 배합사료로 각기 달랐던 것이 원인으로 판단된다.

각 처리구가 배양시간별 *in vitro* 반추위 미생물의 암모니아 생성량 변화를 Table 4에 나타내었다. T1은 대조구와 유의적인 차이가 없었으나, T2, T3, T4, T5는 배양시작 4시간부터 대조구보다 암모니아 농도가 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 사료 중의 단백질은 반추위내 내 미생물에 의하여 아미노산 또는 암모니아로 분해되고, 미생물은 다시 암모니아를 이용하여 미생물체 단백질을 합성한다. 본 연구에서는 배양시간 경과함에 따라 CD가 함유된 모든 처리구(T2, T3, T4, T5)에서 대조구에 비하여 암모니아 농도가 유의적(P<0.05)으로 감소하였는데, 이러한 결과는 CD의 주요 구성성분인 가용탄수화물의 이용 증가에 따라 미생물단백질 합성을 위한 암모니아의 이용도 증가(Lila 등, 2004)하였기 때문으로 보인다. Guest 물질로서 diallyl maleate(Lila 등, 2004), allyl iso-thiocyanate

Table 3. Effect of different levels of caprylic acid and cyclodextrin complex on *in vitro* VFA production

Incubation Time(h)	Item	Treatments ¹⁾						SEM
		C	T1	T2	T3	T4	T5	
0	Total VFA mmol/L	22.65 ^{ab}	24.45 ^a	18.59 ^d	20.28 ^{cd}	19.95 ^{cd}	21.75 ^{bc}	1.159
	Acetate, mol (%)	68.38 ^b	65.17 ^b	75.08 ^a	69.37 ^b	65.65 ^b	66.97 ^b	2.762
	Propionate, mol (%)	12.56 ^b	11.29 ^d	13.69 ^a	12.83 ^b	11.93 ^c	11.80 ^{cd}	0.316
	Butyrate, mol (%)	15.38 ^{bc}	20.10 ^{abc}	11.22 ^d	16.22 ^{bcd}	22.42 ^a	21.24 ^{ab}	2.888
	Valerate, mol (%)	1.87 ^a	1.74 ^b	ND	ND	ND	ND	0.017
	Acetate: Propionate	5.44	5.78	5.48	5.40	5.51	5.68	0.234
	4	Total VFA mmol/L	35.99 ^{ab}	36.99 ^a	30.70 ^b	29.42 ^b	31.77 ^b	29.49 ^b
Acetate, mol (%)		63.65 ^a	61.68 ^b	66.03 ^{ab}	63.99 ^{ab}	65.40 ^{ab}	70.37 ^a	3.358
Propionate, mol (%)		17.00	16.22	16.94	16.14	16.57	17.87	1.213
Butyrate, mol (%)		14.89 ^{ab}	19.77 ^a	17.03 ^a	19.87 ^a	18.03 ^a	11.75 ^b	3.026
Valerate, mol (%)		1.07 ^b	1.18 ^a	ND	ND	ND	ND	0.034
Acetate: Propionate		3.75	3.80	3.91	3.97	3.95	3.94	0.024
8		Total VFA mmol/L	41.15 ^a	41.91 ^a	33.88 ^b	34.68 ^b	33.29 ^b	33.78 ^b
	Acetate, mol (%)	60.86 ^{cd}	59.67 ^d	68.88 ^a	63.46 ^{bcd}	66.86 ^{ab}	64.06 ^{ab}	2.262
	Propionate, mol (%)	17.44 ^{cd}	17.00 ^d	17.26 ^d	18.83 ^{bc}	20.03 ^b	21.57 ^a	0.809
	Butyrate, mol (%)	19.54 ^{ab}	21.06 ^a	13.85 ^c	17.71 ^{abc}	12.46 ^c	14.37 ^{bc}	2.912
	Valerate, mol (%)	1.10 ^a	1.15 ^a	ND	ND	0.32 ^b	ND	0.230
	Acetate: Propionate	3.49	3.51	3.99	3.38	3.34	2.97	0.099
	12	Total VFA mmol/L	44.51 ^a	40.27 ^b	39.37 ^b	37.32 ^{bc}	37.38 ^{bc}	35.02 ^c
Acetate, mol (%)		60.88 ^a	60.29 ^c	68.23 ^a	62.59 ^{ab}	65.07 ^{ab}	65.90 ^{ab}	1.909
Propionate, mol (%)		19.20	20.05	20.16	21.69	21.81	19.89	1.454
Butyrate, mol (%)		16.66 ^{ab}	17.39 ^a	11.62 ^d	15.73 ^{abc}	13.13 ^{cd}	14.21 ^{bc}	1.604
Valerate, mol (%)		1.22	1.15	ND	ND	ND	ND	0.041
Acetate: Propionate		3.17	3.04	3.39	2.88	2.99	3.34	0.297

ND : not detected.

¹⁾ Control : CA-CD complex, 0 mg; T1 : CA(C8:0), 20 mg; T2 : CD, 830 mg; T3 : CA-CD complex, 425 mg; T4 : CA-CD complex, 850 mg; T5 : CA-CD complex, 1700 mg.^{abcd} Means with different superscripts within same row in incubation time are significantly different (P<0.05).

Table 4. Effect of different levels of caprylic acid and cyclodextrin complex on *in vitro* NH₃-N (mg/L) production

Incubation time(h)	Treatments ¹⁾						SEM
	C	T1	T2	T3	T4	T5	
0	89.11	88.05	89.11	88.05	85.53	86.96	7.059
4	85.53 ^a	79.32 ^a	46.15 ^{bc}	43.04 ^{bc}	53.82 ^b	40.78 ^c	11.258
8	43.71 ^a	48.04 ^a	27.21 ^b	26.96 ^b	21.80 ^c	23.37 ^{bc}	5.064
12	38.56 ^a	32.12 ^a	21.74 ^b	22.02 ^b	22.83 ^b	22.40 ^b	7.404
Mean	64.23	61.88	46.05	45.02	45.99	43.38	

¹⁾ Control : CA-CD complex, 0 mg; T1 : CA(C8:0), 20 mg; T2 : CD, 830 mg; T3 : CA-CD complex, 425 mg; T4 : CA-CD complex, 850 mg; T5 : CA-CD complex, 1700 mg.

^{abc} Means with different superscripts within same row in incubation time are significantly different (P<0.05).

(Lila 등, 2003), iodo-propane (Mohammed 등, 2004)의 CD complex를 이용한 반추위 발효대사 연구에서도 CD가 함유된 모든 처리구에서 대조구에 비하여 암모니아 농도가 모두 유의적으로 감소하였는데, 이는 본 연구 결과와 일치하였다.

2. Total 가스 및 메탄 발생량

Caprylic acid, CD, CA-CD complex 처리구가 *in vitro* 반추위 total gas 및 메탄생성에 미치는 영향은 Table 5에 나타내었다. T1구는 대조구와 비교하여 total gas 발생량이 배양 4 및 12시간에서 유의적으로 감소하였지만 (P<0.05), T2구와 T3, T4, T5구의 12시간에서의 total gas 생성량은 대조구와 비교하여 유의적 (P<0.05)으로 증가하였다. T1 처리구는 지방산만 단독으로 첨가하였기 때문에 반추위 미생물의 활성 및 발효를 억제하여 total gas 생성량이 다른 처리구와 비교하여 유의적으로 감소한 것으로 보인다 (Machmüller, 2006). 이와 같은 발효억제에 의해 T1구의 메탄 발생량은 대조구보다 4 및 12시간에서 유의적 (P< 0.05)으로 감소하였고, 12시간에서는 약 26% 감소 효과가 있었다. Cyclodextrin 단독 첨가구인 T2는 대조구와 비교하여 메탄 발생량이 모든 측정시간에서 유의적

(P<0.05)으로 증가하였고, 배양 12시간에서 대조구 0.88 ml와 T2구 1.86 ml를 비교했을 때, 110%의 큰 차이가 있었다. CA-CD complex구인 T3, T4, T5의 12시간 배양 시 메탄생성량은 대조구와 차이가 없었으나, 메탄 발생량이 가장 많았던 T2구와 비교하면 47% 감소한 것으로 나타났다. 따라서 CD 단독 첨가는 메탄을 증가시키지만 CA-CD complex 첨가에 의해서는 감소함으로써 CA의 메탄저감 효과가 CA-CD complex에 의해서도 나타나는 것을 알 수 있었다. CA-CD complex의 메탄 저감 효과는 total gas 발생량에 대한 메탄 비율(%)에서도 더욱 명확히 알 수 있다. 12시간 배양시간에서 대조구는 3.4% 이었지만, 메탄 발생량이 가장 적었던 T1구는 2.8%, 메탄 발생량이 가장 많았던 T2구는 5.1%, 그리고 T3, T4, T5구는 평균 2.7%로 T1구와 통계적 차이가 없었다. Guest 물질로 MCFA (Ajisaka 등, 2002), allyl isothiocyanate (Lila 등, 2003), diallyl maleate (Lila 등, 2004) 등을 이용한 보고들을 종합해 보면, 모든 CD complex 처리구에서 total gas 발생량을 증가시켰지만, 메탄 생성은 현저히 감소하였다고 보고하였으며, 이는 본 연구 결과와 일치하였다. 반면에 CA만 첨가할 경우에는 반추위 발효의 index라고 할 수 있는 total gas도 함께 감소하여 반추위 발효를 일부 저해하는 것

Table 5. Effect of different levels of caprylic acid and cyclodextrin complex on *in vitro* gas production

Incubation time(h)	Treatments ¹⁾	Gas production(mL/Incubation)			
		Total gas	CH ₄	H ₂	CH ₄ (%)
4	Control	18.8 ^b	0.39 ^b	0.015 ^{bc}	2.07 ^c
	T1	15.2 ^c	0.26 ^c	0.012 ^c	1.76 ^d
	T2	20.1 ^{ab}	0.51 ^a	0.017 ^b	2.60 ^a
	T3	18.8 ^b	0.44 ^b	0.015 ^{bc}	2.32 ^b
	T4	21.9 ^a	0.52 ^a	0.025 ^a	2.35 ^b
	T5	21.7 ^{ab}	0.40 ^b	0.026 ^a	1.86 ^{cd}
	SEM	1.547	0.042	0.002	0.134
8	Control	24.7 ^{bc}	0.72 ^b	0.019 ^b	2.91 ^b
	T1	22.8 ^c	0.62 ^b	0.021 ^b	2.72 ^b
	T2	27.3 ^{ab}	0.99 ^a	0.019 ^b	3.65 ^a
	T3	26.1 ^{ab}	0.50 ^c	0.024 ^b	1.92 ^{cd}
	T4	24.7 ^{abc}	0.41 ^c	0.025 ^b	1.65 ^d
	T5	27.7 ^a	0.61 ^b	0.052 ^a	2.33 ^c
	SEM	1.537	0.054	0.005	0.172
12	Control	25.3 ^b	0.88 ^b	0.011 ^c	3.44 ^b
	T1	23.1 ^c	0.65 ^c	0.021 ^{bc}	2.80 ^{bc}
	T2	34.4 ^a	1.86 ^a	0.037 ^a	5.01 ^a
	T3	35.5 ^a	1.03 ^b	0.026 ^{ab}	2.89 ^{bc}
	T4	36.9 ^a	0.99 ^b	0.028 ^{ab}	2.71 ^{bc}
	T5	36.9 ^a	0.93 ^b	0.037 ^a	2.53 ^c
	SEM	1.354	0.123	0.006	0.426

¹⁾ Control : CA-CD complex, 0 mg; T1 : CA(C8:0), 20 mg; T2 : CD, 830 mg; T3 : CA-CD complex, 425 mg; T4 : CA-CD complex, 850 mg; T5 : CA-CD complex, 1700 mg.

^{abcd} Means with different superscripts within same column in incubation time are significantly different(P<0.05).

으로 나타났다. 수소 발생량은 배양시간이 증가 할수록 대조구에 비해 T3, T4, T5에서 증가하였고, T5에서는 최대 3배 증가하였다. 이러한 결과는 Ajisaka 등 (2002)의 보고와는 다르지만 Lila 등 (2003)의 보고와는 일치하였다.

지방(fat 혹은 oil)은 사료의 정미에너지를 제

한하지 않고 메탄 생성을 줄일 수 있는, 항생제와 같은 합성 메탄 생성 저해제를 대체할 수 있는 물질로 주목을 받아왔다. 면양을 이용한 실험에서 MCFA와 LCFA 모두가 메탄을 줄였다는 Czerkawski와 Blaxter(1966)의 보고 이후, bio-hydrogenation 과정에서의 수소 경합 때문에

메탄저감 효과가 클 것으로 기대되는 LCFA에 대한 연구가 더 많이 진행되었지만 사료섭취량 감소가 메탄 저감의 원인으로 밝혀지거나 반추위 섬유소 분해율도 상당히 저해한다는 사실도 지적되었다 (Johnson과 Johnson, 1995; Beauchemin과 McGinn, 2006). LCFA에 비하여 MCFA 연구는 비교적 적은 편이다. Machmüller (2006)는 그동안 수행된 MCFA의 메탄 저감효과에 대한 보고에서 C12:0과 C14:0은 사료의 3% 첨가로도 *in vivo*의 경우 소화율이나 에너지 이용성에 대한 영향 없이도 약 50%의 메탄 저감이 가능하다고 보고하였으나, MCFA가 반추위 사료입자에 흡수되거나, 미네랄과의 염을 형성한다는 점, 그리고 메탄 생성균 이외의 미생물과 숙주동물에 의한 이용 등에 의해 그 효과가 감소한다고 하였다. Soliva 등 (2004)도 MCFA의 메탄 저감효과는 단기간의 효과이기 때문에 미생물이 적응되어 있는 장기간의 실험이 수행되어야 한다고 지적하고 있다. Ajisaka 등 (2002)는 유리 지방산은 냄새가 좋지 못하고, 동물의 기호성에도 영향을 줄 뿐 아니라 용점이 낮기 때문에 현실적인 사용이 어렵다고 지적하면서 문제점을 해결하는 방법으로 각각의 caprylic acid (C8), capric acid (C10)와 CD와의 complex 제조 이용에 대한 긍정적인 *in vitro* 실험결과를 보고하였다.

Cyclodextrin은 본 실험에서 사용한 β -CD 이외에도 α -, γ -CD가 있고, 각각은 6, 7, 8개의 glucose가 α -(1,4) 결합을 하고 있는 환상형 다당류이다. 내부는 소수성의 특징이 있기 때문에 다양한 소수성 유기물과 결합하여 빛, 온도, 공기로 부터의 안정성을 높이고, 불쾌한 냄새를 방지하고, 기질의 용해도를 향상시키는 효과가 있다 (Martin Del Valle, 2004). 지방산의 경우, 탄소 수에 따라서 1 분자 혹은 그 이상의 CD와 결합하고 결합 지방산의 물에 대한 용해성이 높아지며 β -CD의 유효력이 가장 강한 것으로 알려져 있다 (Dochène 등, 2003). 이러한 특성을 이용한 본 연구와 Ajisaka 등 (2002)의 결과는 CA-CD complex의 *in vitro* 메탄 저감 효과를 입증하였으나, *in vivo* 실험 결과는 아직 보고된 바 없다. CA-CD complex의

특징은 *in vivo*에서도 사료섭취량과 섬유소 분해율의 저해 없이 메탄생성량을 감소시키는 효과가 있을 것으로 기대된다.

본 연구 결과를 종합해 보면, CD는 반추위 미생물의 활성을 증가시켜 total gas와 메탄생성이 동시에 증가되어 메탄감소에는 효과가 없는 것을 확인할 수 있었으나 CA-CD complex를 반추위 미생물과 함께 배양할 경우 반추위 발효에 악영향을 미치지 않고 메탄 생성량을 유의적으로 감소시키는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 CA-CD complex가 CD 또는 CA를 각각 첨가하여 배양할 경우 나타나는 부정적인 요인들을 모두 제거할 수 있는 방법임을 보여준다. 그러나 본 연구에서 사용한 CA-CD 첨가 수준은 CA 농도를 기준으로 결정되었기 때문에 CD 농도를 기준으로 하면 약 6.9 g~27 g/L로 상업적으로 이용되고 있는 일반적인 첨가제 사용 수준보다 현저히 높은 비율로 이용되었기 때문에 1.0g/L 미만의 실용화 수준에서의 CA-CD complex 첨가가 반추위 발효 및 메탄 저감효과에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

IV. 요약

본 연구에서는 caprylic acid와 cyclodextrin과의 complex (CA-CD complex)의 첨가수준이 *in vitro* 반추위 발효 성장과 메탄 생성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. CA-CD complex 무첨가구를 대조구로 설정 하였으며, 처리구로는 CA 20 mg 단독 첨가구(T1), CD 830 mg 단독 첨가구(T2), CA-CD complex 425 mg 첨가구 (T3, CA 함량 10 mg), CA-CD complex 850 mg 첨가구(T4, CA 함량 20 mg), CA-CD complex 1700 mg 첨가구(T5, CA 함량 40 mg)이며, 3반복으로 4, 8, 12시간의 배양 실험을 수행하였다. 모든 시험구에서 배양 12시간까지 pH가 지속적으로 감소하였다. 특히, 배양 8시간 후부터 T2, T3, T4, T5 처리구에서 대조구보다 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$). Total VFA 농도는 대조구에 비해 T2, T3, T4, T5구들이 8시간과 12시간에서 유의적 ($P<0.05$)으로 감소하였다. Propionate 농도는 배양 8시간에서만 다른 처리구보다 T4,

T5 처리구가 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타났다. Acetate : Propionate (A/P) 비율은 모든 배양 시간에서 처리구간 유의적인 차이가 없었다. 암모니아 농도는 대조구에 비해 T2, T3, T4, T5 처리구에서 배양 4시간부터 대조구보다 암모니아 농도가 유의적 ($P<0.05$)으로 감소하였다. Total gas는 T1구에서 대조구보다 유의적 ($P<0.05$)인 감소가 있었으나, T2, T3, T4, T5 처리구에서는 대조구에 비하여 12시간에서 유의적 ($P<0.05$)으로 증가하였다. Total gas 발생량에 대한 메탄 비율 (%)은 12시간 배양시간에서 대조구는 3.4%이었지만, 메탄 발생량이 가장 적었던 T1구는 2.8%, 메탄 발생량이 가장 많았던 T2구는 5.1%, 그리고 T3, T4, T5구는 평균 2.7%로 T1구와 통계적 차이가 없었다. 따라서 CA-CD complex를 이용하면, 반추위내 발효에 부정적 영향 없이 메탄을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

V. 인 용 문 헌

1. Ajisaka, N., Mohammed, N., Hara, K., Mikumi, K., Hara, K., Hashimoto, Kumata, T., Kanda, S. and Itabashi, H. 2002. Effects of medium-chain fatty acid-cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. Anim. Sci. J. 73: 479-484.
2. Beauchemin, K. A. and McGinn, S. M. 2006. Methane emission from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. J. Anim. Sci. 84:1489-1496.
3. Czerkawski, J. W., Blaxter, K. L. and Wainman, F. W. 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. Br. J. Nutr. 20: 349-362
4. Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modification reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8:130-132.
5. Dochène, D., Bochet, A., Yu, S. C., Pepin, C. and Seiller, M. 2003. Cyclodextrin and emulsion. Int. J. Pharm. 266:85-90.
6. Erwin, E. S., Marco D. J. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44:1768-1770.
7. Frumholtz, P. P., Newbold, C. J. and Wallace, R. J. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). J. Agric. Sci. 113:169-172.
8. IPCC. 1996. Greenhouse gas inventory revised methodology. guidelines for national greenhouse gas inventories. Vol. 3. Bracknell. UK.
9. Johnson, K. A. and Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73:2483-2492.
10. Lila Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. and Itabashi, H. 2003. Effect of α -cyclodextrin allyl isothiocyanate on ruminal microbial methane production *in vitro*. Anim. Sci. J. 74:321-326.
11. Lila, Z. A., Mohammed, N., Tatsuoka (Ajisaka), N., Kanda, S., Kamada, T., Kurokawa, Y. and Itabashi, H. 2004. Effect of cyclodextrin diallyl maleate on methane production, ruminal fermentation and microbes *in vitro* and *in vivo*. Anim. Sci. J. 75:15-22.
12. Machmüller, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. Agric. Ecosys. Environ. 112: 107-114.
13. Martin Del Valle, E. M. 2004. Cyclodextrin and their uses : a review. Proc. Biochem. 39:1033-1046.
14. Miyazaki, K., Hino, T. and Itabashi, H. 1989. Changes caused by ethanol in fermentation pattern and membrane fatty acid composition of rumen microorganisms. Jpn. J. Zootech Sci. 60:776-782.
15. Mohammed, N. and Lila, Z. A. 2004. Effects of cyclodextrin-iodopropane complex on methane production, ruminal fermentation and microbes, digestibility and blood metabolites in steers. Anim. Sci. J. 75:131-137.
16. Newbold, C. J., Lassalas, B. and Jouany, J. P. 1995. The importance of methanogens associated

- with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. Lett. Appl. Microbiol. 21:230-234.
17. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. 2002. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
18. Soliva, C. R., Meile, L., Hindrichsen, I. K., Kreuzer, M. and Machmüller, A. 2004. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. Anaerobe. 10:260-276.
19. The Government of the Republic of Korea. 2003. Second National Communication of the Republic of Korea Under the United Nations Framework Convention on Climate Change. <http://www.keei.re.kr>.
20. Van Nevel, C. J. and Demeyer, D. I. 1992. Influence of antibiotics and a deaminase inhibitor on volatile fatty acids and methane production from detergent washed hay and soluble starch by rumen microbes *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 37:21-31.
- (접수일자 : 2007. 8. 10. / 채택일자 : 2007. 9. 17.)