

Saponin 함유 식물 추출물의 첨가가 반추위 발효성상과 메탄생성에 미치는 영향

옥지운¹ · 백열창¹ · 김경훈¹ · 이상철¹ · 설용주¹ · 이강연¹ · 최창원² · 전체옥³ · 이상석⁴ · 이성실⁵ · 오영균^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²대구대학교 동물자원학과, ³중앙대학교 자연과학대학, ⁴순천대학교 동물자원학과, ⁵경상대학교 동물생명과학과

Effects of Saponin Contained Plant Extracts on Ruminal Fermentation Characteristics and Methane Production

Ji Un Ok¹, Youl Chang Baek¹, Kyoung Hoon Kim¹, Sang Cheol Lee¹, Yong Joo Seol¹, Kang Yeon Lee¹, Chang Weon Choi², Che Ok Jeon³, Sang Suk Lee⁴, Sung Sil Lee⁵ and Young Kyoon Oh^{1*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea, ²Dept. of Animal resources, Daegu University, Korea, ³Dept. of Life Science, Chung-Ang University, Korea, ⁴Dept. of Animal Science & Technology, Sunchon National University, Korea, ⁵Dept. of Animal Science, Gyung-Sang National University, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of saponin contained plant extracts on *in vitro* rumen fermentation characteristics and methane production. Ruminal fluid was collected from rumen cannulated Hanwoo steers fed rice straw and concentrate (5:5). Collected rumen fluids, corn starch and buffer including saponin contained plant extracts (ginseng, Ogapi, soapwort, tea plant and yucca; 0.5%/15 ml) were incubated at 39°C for 24 h. All incubations were repeated five times. Ruminal pH in all treatments was lower ($p < 0.05$) compared with that of the control (no addition) during incubation time. The concentration of total VFA in all treatments was higher ($p < 0.05$) than that of the control after 12h incubation. Compared with the control, the concentration of acetate and propionate in all treatments was lower and higher after 6h incubation, respectively. The concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ in all treatments was lower ($p < 0.05$) than that of the control except for Ogapi or yucca extracts supplementation. The number of protozoa in all treatments was significantly ($p < 0.05$) lower than that of the control except for soapwort extract supplementation. The total gas production and methane production in all treatments was higher ($p < 0.05$) and lower ($p < 0.05$) compared with the control, except for ogapi or soapwort extracts supplementation after 12h incubation, respectively. Therefore, reduction in methane production by saponins may be results from decreased protozoal population without any negative *in vitro* fermentation.

(Key words : Saponin, Methane, Ruminal Fermentation, Protozoa)

서 론

IPCC (Intergovernmental Panel on Climatic Change)는 이산화탄소 (CO_2), 메탄 (CH_4), 아산화질소 (N_2O), 수소화불화탄소 (HFCS), 불화탄소 (PFCs), 불화유황 (SF_6)을 지구온난화를 일으키는 6대 온실가스로 선정하였으며, 그 중에서 주요 온실가스원인 이산화탄소, 메탄 및 아산화질소는 대기권에 축적되어 지구 표면 온도를 상승시키고 있으며 (IPCC, 1994; Cole 등, 1997; Moss 등, 2000), 매년 0.3~0.9%의 비율로 축적되는 양이 증가하고 있다 (Janzen 등, 1999; Desjardins 등, 2001). 특히 메탄가스는 이산화

탄소에 비해 생산되는 양은 적지만 지구온난화에 미치는 영향력이 21배 높기 때문에 (IPCC, 2001), 이산화탄소 다음으로 지구 온난화에 큰 영향을 미치는 원인으로 알려져 있다. 메탄가스는 논, 습지, 폐수 및 반추위와 같이 산소가 없는 혐기 생태계에서 주로 발생하고 이 중 반추위는 메탄 발생을 인위적으로 제어할 수 있는 가장 쉬운 영역이기 때문에 지구 온난화 방지를 위한 연구가 부각되고 있다. 따라서 반추위 내 메탄 발생을 최소화함으로써 동물의 생산성을 향상시키고 지구환경을 보존하기 위한 연구가 절실히 요구되고 있다.

Saponin으로 통칭되고 있는 화합물은 모두 배당체로 구성되어

* Corresponding author : Young Kyoon Oh, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea. Tel: 031-290-1665, Fax: 031-290-1660, E-mail: oh665@rda.go.kr

있고, 일반적으로 당 잔기 부분을 친수기로 하는 계면활성제로 triterpenoid나 steroid 계로 이루어져 있고 (Francis 등, 2002), 천연 물질로서 membranolytic 특성을 가지고 있다. 이러한 성질은 protozoa 세포막의 스테롤과 결합하여 세포 용해를 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 saponin 성분은 protozoa의 수를 감소시키며, 반추위 발효 특성 및 메탄생성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Makkar와 Becker, 1996; Hess 등, 2003; Pen 등, 2006).

메탄생성 박테리아 (Methanogen)는 protozoa와 공생관계를 이루며 (Finlay 등, 1994), saponin의 anti-protozoa 작용으로 인해 공생관계의 메탄생성 박테리아를 감소시킴으로서 반추위 내 메탄생성을 감소시킬 수 있다. 또한 반추위 내 saponin의 첨가는 특정 bacteria를 억제하여 반추위 발효를 조절할 수 있다고 하였다 (Cheeke, 2000).

최근의 연구에 의하면 saponin 함유 식물 추출물의 첨가가 반추위 내 미생물 단백질의 흐름을 향상시키고, 사료 이용성 및 미생물의 영양소 분해를 증가시키고, 분해된 사료의 unit당 메탄생성을 감소시킨다고 하였다 (Goel 등, 2008). 또한 *in vitro* 연구에서 saponin의 첨가는 메탄생성을 억제한다고 하였지만 (Pen 등, 2006), 또 다른 연구에서는 반추위 내 미생물에 미치는 영향은 다를 수 있다고 하였다 (Wallace, 2004).

따라서 본 연구는 saponin 함유 식물 추출물을 이용하여 *in vitro* 반추위 발효성상, 반추위 protozoa 및 메탄생성에 미치는 영향과 기작을 규명하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 위액의 채취

반추위액은 반추위 cannula가 시술된 2두의 거세 한우 (체중: 803 ± 0.5 kg)로부터 채취하였다. 공시동물은 벼짚과 농후사료의 비율을 5:5로 하여 1일 2회 분할 (07:00, 18:00) 급여하였고, 사료의 영양소 함량은 Table 1과 같다. 그리고 물과 미네랄 블록은 자유롭게 섭취토록 하였다. 반추위액은 오전사료 급여 1시간 전에 반추위 cannula를 통하여 4겹의 cheese cloth로 여과하여 채취하였다. 채취한 위액은 미리 보온되고 산소(O₂)를 완전히 제거하고 CO₂ 가스를 충전시킨 2 l 유리병에 담아 39°C로 유지하여 실험실로 이동하였고, 1시간 정지 후 vacuum 펌프로 사료입자를 제거한 후 상층액을 시험에 이용하였다.

2. 공시 시료 및 시험 방법

공시시료는 시판되는 옥수수 전분을 기질로 이용하였고, saponin 함유 식물추출물은 비누풀 (*Saponaria officinalis*: Leaf와 Root), 오가피 (*Acanthopanax senticosus*: Root), 유카 (*Yucca schidigera*: Leaf, Root와 Stem), 인삼 (*Panax ginseng*: Root) 및 차나무 (*Camellia sinensis*: Leaf)를 열수 추출법을 이용하여 추출한 것으

Table 1. Ingredient and chemical composition of diet

Ingredient composition	% of DM	
Corn	47.80	
Wheat Bran	41.00	
Soybean meal	5.00	
Rapeseed meal	2.00	
Molasses	2.00	
Limestone	1.50	
Salt	0.40	
Vitamin mix ¹⁾	0.20	
Lasalocid	0.10	
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 fiber	14.09	56.49
Acid detergent 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.

로 (주) 유로코스텍에서 구입하였다. 시험방법은 60 ml serum bottle에 혐기상태의 McDougall buffer (Table 2) 10 ml를 넣고, 기질로서 옥수수 전분 0.2 g, 반추위액 5 ml와 각 처리구별 식물추출물을 총 배양액의 0.5% 첨가수준으로 넣고, 고무마개로 입구를 막은 후 알루미늄 캡을 씌워 최대한 가스의 유출을 방지하였다. 각 처리구별 bottle은 39°C의 shaking water bath (100 rpm)에서 배양시간대별 (6, 12, 및 24 시간)로 5처리 5반복으로 시험을 수행하였다.

3. 조사 항목

각 배양시간대별로 serum bottle을 shaking water bath (100 rpm)에서 꺼낸 후, 온도에 따른 변화를 감안하여 상온에서 20분간 방치시킨 후, 총 gas 발생량, pH 및 protozoa 수 조사는 즉시 수행하였고, 메탄, 암모니아 및 VFA 측정은 sample 채취 후 조사하였다.

(1) pH 측정

pH는 각 발효시간대별 (6, 12 및 24시간)로 pH meter (Pinnacle M530, Corning, NY, USA)를 이용하여 조사하였다.

Table 2. The chemical composition of McDougall buffer

Ingredient	Amount (/L)
NaHCO ₃	9.80 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	4.62 g
KCl	0.57 g
NaCl	0.47 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.12 g
4% CaCl ₂ solution ¹⁾	1 ml

¹⁾ 4% CaCl₂ solution : CaCl₂ 4 g (/100 ml D.W.)

(2) VFA 농도

VFA의 농도는 Erwins 등 (1961)의 방법으로 다음과 같이 분석을 실시하였다. 각 배양시간별 배양 후 배양액 5 ml을 채취하여 HgCl₂ 0.05 ml, H₃PO₄ 1 ml, Pivalic acid 0.2 ml을 첨가 후 4℃에서 30분간 정치시켰다. 그 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 취하여 2 ml vial에 옮겨 담고 GC (VARIAN CP-3800, USA)를 이용하여 분석하였다.

(3) 암모니아 (NH₃-N) 농도

암모니아는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법으로 다음과 같이 분석하였다. 암모니아 분석을 위한 전처리 과정은 우선 10 ml 원심분리관에 배양액 6.2 ml을 넣고 (미생물 작용 정지) 0.06 ml을 첨가하여 원심 분리 (3,000 rpm, 15분) 하였다. 원심분리 후, 상층액을 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고, 분석하기 전까지 냉동 보관 (-20℃) 하였다. 분석 전, 시료는 상온에서 녹여 원심분리 (12,000 rpm, 5분) 하고, 준비된 상층액 0.02 ml과 암모니아 표준 용액 (2.5, 5, 10, 20, 40 mg NH₃-N/100 ml), 증류수 (blank)를 각각 20 ml tube에 넣고, phenol color reagent와 alkali-hypochlorite reagent를 tube에 1 ml씩 첨가하여 혼합시킨 후, 37℃ 항온수조에서 15분간 배양하였다. 배양 후 각 tube에 8 ml의 증류수를 첨가하여 혼합하고, spectrophotometer (630 nm)로 OD (optical density)를 측정한다.

(4) Protozoa의 수

Protozoa의 수는 TBFS 용액 (trypan blue- formalin-salin; 증류수 900 ml, 35% formaldehyde 용액 100 ml, trypan blue 2 g, NaCl 8 g; dark blue 용액으로 living cell의 핵을 염색)으로 염색한 다음 Abe 등 (1972)의 방법에 따라 plankton counter glass를 이용하여 현미경 하에서 protozoa의 수를 측정하였다.

(5) 총 가스 및 메탄 발생량

총 가스발생량은 water displacement apparatus를 이용하여 gas 발생량을 측정하였다 (Ferorak와 Hrwdey, 1983). 메탄의 농도는

각 배양시간대별로 배양이 끝난 후 60 ml serum bottle의 알루미늄 캡 상단을 제거 후 실린지를 이용하여 12 ml의 가스를 채집하여 Molecular sieve 13 × 45-60 MESH (2.0M×1/8" × 2.0mm SS, VARIAN) column이 장착된 GC (Gas Chromatography; VARIAN CP-3800, USA)를 이용하여 분석하였다. Gas-tight syringe를 이용하여 gas 시료를 1.0 ml씩 주입하였으며, 0.1%, 1%, 2%, 10% methane (balance nitrogen)을 standard gas로 사용하였다. GC 분석 시 기계조건은 oven temperature 60℃, injector temperature 120℃, TCD (Thermal conductivity) temperature 120℃, FID (Flame ionization detector) temperature 200℃로 하였으며, total run time은 3분이었고, carrier gas로는 nitrogen을 이용하였다.

4. 통계처리

본 시험에서 얻은 결과들은 SAS (Statistical Analysis System) 통계 package (1999)의 GLM (General Linear Model) procedure를 이용하여 분산분석을 하였고, Duncan의 다중검정방법 (Duncan, 1995)으로 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. pH의 변화

반추위액이 첨가된 *in vitro* 시험에서 saponin 함유 식물 추출물을 첨가하여 배양시간별 pH 값을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 반추위 혼합 미생물 배양액의 pH 값은 배양시간 동안 처리에 관계없이 6.01~7.26 범위로 배양시간이 경과함에 따라 낮아졌으며, 처리구에 비해 대조구에서 유의적 ($p < 0.05$)으로 높았고, 비누풀 추출물 처리구에서 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 saponin 혹은 saponin 함유 식물 추출물의 첨가로 인하여 pH가 감소하였다는 연구 (Grobner 등, 1982; Lila 등, 2005)와 일치하였고, 본 시험에서 기질로 이용된 옥수수 전분 또한 pH의 값에 영향을 준 것으로 생각된다. Hussain 등 (1995)은 각각 농후사료와 조사료 위주의 처리구 간에 유가의 효과를 조사한 시험에서, 농후사료 위주 처리구의 pH가 낮게 유지된다고 보고하였고, 이는 시험에 이용된 반추위액 내 미생물의 기질이 높은 비율의 발효 탄수화물을 포함하고 있기 때문에 반추위 미생물 발효산물인 VFA의 생성량이 증가하여 pH가 낮은 것으로 생각된다.

2. VFA 생성량

반추위액이 첨가된 *in vitro* 시험에서 saponin이 함유된 식물 추출물을 첨가하여 배양시간별 VFA 농도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 총 VFA의 농도는 배양 6시간까지는 대조구와 모든 처리구에서 비슷한 경향을 나타내었으나, 배양 12시간 이후에는 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 높았다. 비누풀 추

Table 3. Effects of saponin-containing plant extracts on pH value

Treatment	Incubation Time (h)			
	0	6	12	24
Control	7.26 ^a	6.55 ^a	6.46 ^a	6.19 ^a
Ginseng	7.12 ^b	6.50 ^b	6.42 ^b	6.10 ^b
Ogapi	7.12 ^b	6.50 ^b	6.41 ^{bc}	6.09 ^{bc}
Soapwort	7.03 ^c	6.45 ^c	6.39 ^c	6.01 ^d
Tea plant	7.10 ^b	6.48 ^b	6.42 ^b	6.07 ^c
Yucca	7.05 ^c	6.48 ^b	6.41 ^{bc}	6.01 ^d

^{abcd} Means with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

Table 4. Effects of saponin-containing plant extracts on volatile fatty acid(VFA)

Incubation Time (h)	Item	Treatment					
		Control	Ginseng	Ogapi	Soapwort	Tea plant	Yucca
0	Total VFA mmol/L	58.46 ^{bc}	51.64 ^{cd}	47.16 ^d	58.68 ^{bc}	69.13 ^a	63.10 ^{ab}
	Acetate, mol (%)	61.04 ^{bc}	60.94 ^{bc}	61.56 ^{ab}	60.74 ^{dc}	60.20 ^d	61.82 ^a
	Propionate, mol (%)	21.04 ^b	21.32 ^{ab}	21.02 ^b	21.28 ^{ab}	21.88 ^a	21.64 ^{ab}
	Butyrate, mol (%)	1.04 ^a	1.08 ^a	1.10 ^a	1.02 ^{ab}	0.90 ^{bc}	0.88 ^c
	Iso-butyrate, mol (%)	14.96 ^{abc}	14.64 ^{bc}	14.20 ^c	15.14 ^{ab}	15.50 ^a	14.34 ^{bc}
	Iso-valerate, mol (%)	1.92 ^{ab}	2.02 ^{ab}	2.12 ^a	1.82 ^b	1.55 ^c	1.32 ^c
	Acetate : Propionate	2.92 ^a	2.84 ^{ab}	2.94 ^a	2.86 ^{ab}	2.75 ^b	2.84 ^{ab}
6	Total VFA mmol/L	59.66 ^a	59.18 ^a	58.10 ^a	63.08 ^a	58.68 ^a	62.34 ^a
	Acetate, mol (%)	64.68 ^a	60.38 ^{bc}	63.06 ^{ab}	61.30 ^{bc}	59.36 ^c	59.98 ^c
	Propionate, mol (%)	20.76 ^c	24.02 ^b	23.30 ^b	26.14 ^a	23.20 ^b	22.86 ^b
	Butyrate, mol (%)	0.90 ^a	0.70 ^a	0.56 ^a	0.60 ^a	0.56 ^a	0.78 ^a
	Iso-butyrate, mol (%)	11.90 ^{bc}	13.16 ^{abc}	11.68 ^c	10.32 ^c	15.12 ^a	14.88 ^{ab}
	Iso-valerate, mol (%)	1.78 ^a	1.72 ^a	1.42 ^b	1.60 ^{ab}	1.80 ^a	1.54 ^{ab}
	Acetate : Propionate	3.10 ^a	2.52 ^{bc}	2.70 ^b	2.36 ^c	2.54 ^{bc}	2.62 ^b
12	Total VFA mmol/L	79.62 ^d	85.94 ^{cd}	95.16 ^b	110.50 ^a	92.88 ^{bc}	93.54 ^{bc}
	Acetate, mol (%)	61.66 ^a	56.36 ^b	59.60 ^a	61.40 ^a	60.70 ^a	60.08 ^a
	Propionate, mol (%)	23.56 ^b	27.38 ^a	26.80 ^a	26.06 ^a	26.03 ^a	26.08 ^a
	Butyrate, mol (%)	0.68 ^a	0.86 ^a	0.88 ^a	0.52 ^a	0.90 ^a	0.90 ^a
	Iso-butyrate, mol (%)	12.22 ^{ab}	13.52 ^a	10.94 ^{bc}	10.60 ^c	10.78 ^{bc}	11.28 ^{bc}
	Iso-valerate, mol (%)	2.16 ^a	1.92 ^b	1.78 ^{bc}	1.44 ^e	1.58 ^{de}	1.66 ^{cd}
	Acetate : Propionate	2.62 ^a	2.08 ^c	2.24 ^{bc}	2.36 ^b	2.35 ^b	2.30 ^{bc}
24	Total VFA mmol/L	119.90 ^c	123.24 ^c	133.04 ^b	146.20 ^a	123.92 ^c	135.56 ^b
	Acetate, mol (%)	63.28 ^a	58.24 ^b	59.56 ^b	62.80 ^a	58.46 ^b	59.34 ^b
	Propionate, mol (%)	22.64 ^c	28.40 ^a	28.20 ^a	26.16 ^b	29.40 ^a	29.18 ^a
	Butyrate, mol (%)	1.08 ^a	1.14 ^a	1.08 ^a	0.74 ^b	1.22 ^a	1.16 ^a
	Iso-butyrate, mol (%)	10.70 ^a	9.98 ^a	9.08 ^b	8.50 ^{bc}	8.66 ^{bc}	8.16 ^c
	Iso-valerate, mol (%)	2.30 ^a	2.22 ^{ab}	2.10 ^b	1.84 ^c	2.24 ^{ab}	2.18 ^{ab}
	Acetate : Propionate	2.80 ^a	2.06 ^c	2.12 ^c	2.40 ^b	1.98 ^c	2.04 ^c

^{abcde} Means with different superscripts within same row in incubation ($p < 0.05$).

출물의 경우, pH 값이 유의적으로 낮고, 총 가스 및 메탄 발생량이 유의적으로 높은 것으로 보아 반추위 혐기성 미생물 활성을 높여 VFA 생성량 또한 높은 것으로 생각된다. Lila 등 (2003)은 sarsaponin의 첨가로 총 VFA의 농도가 증가하고, Guo 등 (2008)도 tea saponin을 첨가하였을 때 배양 24시간 후 총 VFA 생성량이 증가하였다고 보고하였다. 각각의 VFA 농도 변화에서 acetate의 농도는 배양 6시간부터 모든 처리구에서 낮은 경향을 나타내었고, 시험 종료 시(배양 24시간) 비누풀 추출물을 제외한 모든 처리구가 대조구에 비해 낮았다($p<0.05$). Propionate의 농도는 모든 처리구에서 시험 종료 시(배양 24시)까지 계속 증가하였고, 배양 종료 시에 비누풀 추출물 처리구를 제외한 모든 처리구에서 대조구보다 유의적($p<0.05$)으로 높았다. 반추위 발효에서 saponin의 주된 효과는 propionate의 농도를 증가시키는 것으로 propionate의 농도 증가에 의해 protozoa의 주요 최종 산물인 acetate의 농도는 감소한다(Wina 등, 2005). 따라서 protozoa의 수가 saponin 첨가에 의해 감소되면 propionate의 농도가 증가하고, acetate의 농도는 감소할 것이다. 본 시험에서도 protozoa의 수(Table 6)가 대조구에 비해 적었던 비누풀 추출물 처리구를 제외한 모든 처리구에서 propionate 농도가 대조구에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높았고, acetate의 농도가 대조구에 비해 유의적($p<0.05$)으로 낮았다. 또한 증가된 propionate의 농도는 반추위 내 수소 이용에 propionate와 methane이 경쟁 관계라는 가설을 입증하는 것으로서, 메탄 발생량 감소에 따라 반추위 내 생성된 수소는 propionate의 전구물질로 이용되어 propionate의 농도가 증가한 것으로 생각된다. Butyrate의 농도는 배양 6시간부터 대조구와 처리구에서 비슷한 경향을 나타내었고, 비누풀 추출물 처리구에서만 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다.

Acetate : Propionate (A/P) 비율은 처리구에서 낮은 경향을 나

타내었고, 배양 6시간부터 모든 처리구의 A:P 비율이 유의적($p<0.05$)으로 낮았으며, Pen 등 (2006)이 *in vitro* 시험에서 *Yucca schidigera*와 *Quillaja saponaria* 추출물이 A:P 비율을 감소시킨다는 결과와 일치하였다.

3. 암모니아 (NH₃-N) 농도

반추위액이 첨가된 *in vitro* 시험에서 saponin 함유 식물 추출물을 첨가하여 배양시간별 암모니아 생성량을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 그 결과 암모니아의 농도는 배양 6시간부터 대조구에 비해 처리구에서 낮은 경향을 나타내었고, 배양 24시에서도 오가피와 유카 추출물 처리구는 대조구와 비슷한 경향을 나타내었지만, 다른 모든 처리구에서 대조구 보다 낮게 나타났다($p<0.05$). 유카 추출물을 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험에서, 반추위 암모니아 농도는 감소한다고 하였지만, 동일한 유카를 이용한 시험에서도 시험 결과가 일정하게 나타나지 않았다(Wallace 등, 1994; Wu 등, 1994; Eliwiński 등, 2002; Eryavuz와 Dehority, 2004). Saponin의 첨가로 반추위 암모니아 농도의 감소는 protozoa가 총 반추위 질소의 약 10~40%를 생성하는데(Van Soest, 1994), 이러한 반추위 protozoa의 수가 감소하였기 때문인 것으로 생각된다.

4. 반추위 protozoa 수 변화

반추위액이 첨가된 *in vitro* 시험에서 saponin 함유 식물 추출물을 첨가하여 반추위 protozoa 수의 변화를 측정한 결과는 Table 6과 같다. 그 결과 반추위 배양액 내 protozoa 수는 대조구와 비누풀 추출물 처리구에서 유의적($p<0.05$)으로 많았고, 차나무 및 유카 추출물 처리구에서 유의적($p<0.05$)으로 적었다. 반추위 메탄생

Table 5. Effects of saponin-containing plant extracts on *in vitro* NH₃-N (mg/l) production

Treatment	Incubation Time (h)			
	0	6	12	24
Control	120.6 ^c	110.8 ^a	110.3 ^a	111.5 ^a
Ginseng	120.5 ^{cd}	110.5 ^{ab}	110.2 ^a	110.6 ^b
Ogapi	119.9 ^d	110.7 ^{ab}	110.3 ^a	111.5 ^a
Soapwort	124.0 ^a	110.4 ^b	110.1 ^a	110.8 ^b
Tea plant	123.4 ^a	110.7 ^{ab}	109.9 ^b	110.8 ^b
Yucca	121.9 ^b	110.5 ^{ab}	109.7 ^c	112.0 ^a

^{abcd} Means with different superscripts in the same column differ significantly ($p<0.05$).

Table 6. Microbial population of the anaerobic media added saponin-containing plant extracts after 12 h incubation

	Treatment					
	Control	Ginseng	Ogapi	Soapwort	Tea plant	Yucca
Protozoa (Cell×10 ⁴)	2.30 ± 0.15 ^a	2.08 ± 0.20 ^{ab}	1.82 ± 0.07 ^{bc}	2.30 ± 0.20 ^a	1.60 ± 0.10 ^c	1.50 ± 0.05 ^c

^{abc} Means with different superscripts in the same row differ significantly ($p<0.05$).

성 박테리아는 protozoa와 내부-외부 공생관계 (Finlay 등, 1994)에 있으므로 protozoa의 수는 메탄 발생량에 영향을 줄 것이다. 본 시험 결과에서도 메탄 발생량이 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮았던 차나무와 유카 추출물 처리구에서 protozoa의 수 역시 유의적 ($p < 0.05$)으로 적었으며, 비누풀 추출물 처리구를 제외한 모든 처리구에서 protozoa의 수가 적은 경향이 있었다. Saponins는 스테롤에 결합되는 능력을 가지고 있으며, 그 결과 protozoa 세포막을 용해시키는 것으로 알려져 있고 (Patra and Saxena, 2009), 이러한 성분이 반추위 protozoa와 특정 bacteria를 억제하여 반추위 발효를 조절한다고 보고하였다 (Cheeke, 2000). Wallace 등 (1994)은 *Yucca schidigera* saponin (0.1%)이 ciliate protozoa의 활동을 억제시킨다고 보고하였고, Lila 등 (2005)도 Holstein 거세우에 sarsaponin을 급여한 결과, 반추위액 내 총 protozoa의 수가 감소한다고 하였으며, 주로 중국에서 연구가 많이 이루어진 tea saponin 또한 반추위 protozoa의 수를 감소시킨다고 보고되었다 (Liu 등, 2003; Hu 등, 2005; Guo 등, 2008).

5. 총 가스 및 메탄 발생량

반추위액이 첨가된 *in vitro* 시험에서 saponin 함유 식물 추출물을 첨가하여 배양시간별 총 가스 및 메탄 발생량을 측정하는 결과는

Table 7과 같다.

총 가스 발생량의 경우, 배양 초기인 6시간에는 인삼과 비누풀 추출물 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 낮은 경향이 있었지만, 배양 12시간부터는 대조구에 비해 모든 처리구에서 총 가스 발생량이 높았고, 비누풀 추출물 처리구는 전 배양시간 동안 유의적 ($p < 0.05$)으로 가장 높았다. 미생물 발효에 있어서 가스 발생량은 발효의 정도를 나타내는 중요한 지표로서 간주되고 있는데, 본 시험에서 비누풀 추출물의 경우, 대조구에 비해 전 배양시간 동안 가스 발생량이 유의적으로 높고, 또한 메탄 발생량 및 총 VFA 생성량도 유의적으로 높은 것으로 보아 반추위 혐기성 미생물 발효를 증진시키는 추출물인 것으로 생각된다.

메탄 발생량은 배양 6시간부터 차나무와 유카 추출물 처리구에서 대조구에 비해 낮았고, 비누풀 추출물의 경우, 전 배양시간 동안 대조구에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 높았다. Saponin이나 saponin이 풍부한 식물은 많은 연구에서 반추위 메탄 생성을 감소시킨다고 보고되었고, *Yucca schidigera* (sarsaponins; steroidal saponins)와 *Quillaja saponaria* (triterpenoid type saponins)의 사포닌 추출물 및 다른 사포닌 함유 식물들의 *in vitro* (Takahashi 등, 2000; Pen 등, 2006; Holtshausen 등, 2009)와 *in vivo* 연구 (Sliwinski 등, 2002a; Pen 등, 2007; Wang 등, 2009a; Santoso 등, 2004; Holtshausen 등, 2009)를 통하여 메탄생성을 감소시키는 것을 증

Table 7. Effects of saponin-containing plant extracts on *in vitro* gas production

Incubation Time (h)	Treatment	Gas production (ml/Incubation)			
		Total gas	Methane	Hydrogen	Methane(%)
6	Control	10.28 ^b	0.54 ^b	0.010 ^b	5.32 ^b
	Ginseng	10.44 ^b	0.53 ^b	0.0088 ^c	5.10 ^c
	Ogapi	10.20 ^b	0.53 ^b	0.0086 ^{cd}	5.22 ^b
	Soapwort	14.28 ^a	0.83 ^a	0.012 ^a	5.76 ^a
	Tea plant	8.24 ^c	0.40 ^c	0.006 ^e	4.80 ^d
	Yucca	9.84 ^b	0.50 ^b	0.008 ^d	5.10 ^c
12	Control	17.86 ^c	1.33 ^b	0.018 ^{ab}	7.44 ^a
	Ginseng	18.74 ^{bc}	1.31 ^b	0.016 ^{bc}	6.98 ^b
	Ogapi	19.16 ^b	1.40 ^b	0.017 ^b	7.30 ^{ab}
	Soapwort	20.66 ^a	1.59 ^a	0.019 ^a	7.70 ^a
	Tea plant	18.18 ^c	1.19 ^c	0.015 ^c	6.54 ^c
	Yucca	18.18 ^c	1.17 ^c	0.015 ^c	6.42 ^c
24	Control	27.86 ^c	2.68 ^b	0.029 ^a	9.64 ^{ab}
	Ginseng	28.18 ^{de}	2.50 ^c	0.024 ^b	8.90 ^c
	Ogapi	28.88 ^c	2.71 ^b	0.022 ^b	9.38 ^{bc}
	Soapwort	31.64 ^a	3.20 ^a	0.030 ^a	10.12 ^a
	Tea plant	28.56 ^{cd}	2.54 ^c	0.022 ^b	8.95 ^c
	Yucca	30.44 ^b	2.42 ^c	0.022 ^b	7.93 ^d

^{abcde} Means with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

명하였다.

본 시험 결과, *in vitro* 시험에서 tea saponin의 첨가에 의해 12~26%의 메탄 발생량이 감소하였다는 이전의 보고(Liu 등, 2003; Hu 등, 2005ab)와 일치하였고, Pen 등(2006)도 *in vitro* 연구에서 유카 saponin의 첨가는 메탄생성 억제에 효과적이라고 하였다. *In vivo* 연구에서, Santos 등(2004)와 Wang 등(2009a)은 양에 25일 동안 sarsaponin 급여(35% saponins)하여 각각 7.1% (0.12 g/kg diet) 및 15.5% (0.13 g/kg diet) 메탄을 감소시켰다고 보고하였다.

수소 발생량은 전 배양시간동안 비누풀 추출물 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 대조구에 비해 유의적 ($p<0.05$)으로 낮았다. 반추위 protozoa는 대사산물로서 수소를 생성한다고 알려져 있고, saponin의 첨가에 의해 반추위 protozoa의 수(Table 6)가 감소하였기 때문에 수소 발생량 또한 감소한 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 saponin 함유 식물 추출물을 이용하여 반추위 발효상과 메탄생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 반추위액은 볏짚과 농후사료를 5:5 비율로 급여한 거세한우 2두의(체중: 803 ± 0.5 kg) 반추위 cannula를 통하여 채취하였다. 채취한 반추위액은 buffer와 1:2 (V/V)의 비율로 혼합하여 배양액으로 사용하였으며, 15 ml 배양액에 옥수수 전분 0.2 g를 첨가하고, saponin 함유 식물 추출물 (비누풀, 오가피, 유카, 인삼 및 차나무)을 0.5% 첨가하여 39°C에서 24시간동안 배양하였다. 반추위 발효상에 있어서 pH 값은 배양 시간동안 모든 처리구가 대조구에 비해 유의적 ($p<0.05$)으로 낮게 나타났으며, 총 휘발성 지방산의 함량은 배양 12시간부터 모든 처리구에서 유의적 ($p<0.05$)으로 높았다. Acetate의 농도는 배양 6시간부터 처리구에서 낮았고, propionate의 농도는 높아 역의 관계를 나타내었다. 암모니아의 농도는 최종 발효시간인 24시간에 오가피와 유카추출물 처리구는 대조구와 비슷한 수준이었지만, 다른 처리구는 유의적 ($p<0.05$)으로 낮았다. 반추위 protozoa의 수는 비누풀 추출물 처리구를 제외한 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의적 ($p<0.05$)으로 적었다. 총 가스 발생량은 배양 12시간부터 처리구에서 높은 경향이 있었지만, 메탄 발생량은 오가피와 비누풀 추출물 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 낮게 나타났다. 따라서 본 시험 결과를 볼 때 saponin의 첨가에 의해 메탄 발생량이 감소하는 것은 반추위 protozoa의 감소에 의해 나타난 것으로 생각된다.

(주제어: 사포닌, 메탄, 반추위 발효, 프로토조아)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국책기술개발사업 연구과제 (과제번호 : PJ007451)의 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Abe, M., Shibui, H. and Kumeno, F. 1972. Improved method for counting rumen protozoa. Jap. J. Zootech. Sci. 43:535.
- Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modification reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8:130
- Cheek, P. R. 2000. Actual and potential application of Yucca schidigera and Quillaja saponaria saponins in human and animal nutrition. J. Anim. Sci., 77:1-10.
- Cole, C. V., Duxbury, J., Freney, J., Heinemeyer, O., Minami, K., Moseir, A., Paustian, K., Rosenberg, N., Sampson, N., Sauerbeck, D. and Zhao, Q. 1997. Global estimates of potential mitigation of greenhouse gas emissions by agriculture. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 49:221-228.
- Desjardins, R. L., Kulshreshtha, S. N., Junkins, B., Smith, W., Grant, B. and Boehm, M. 2001. Canadian greenhouse gas mitigation options in agriculture. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 60:317-326.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics., 11:1-6.
- Eliwiński, B. J., Kreuzer, M., Wettstein, H. R. and Machmüller, A. 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins and associated emissions of nitrogen and methane. Arch. Anim. Nutr. 56:379-392.
- 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.
- Eryavuz, A. and Dehority, B. A. 2004. Effect of Yucca schidigera extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. 117:215-222.
- Ferorak, P. M. and Hrwdey, S. E. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic culture in serum bottle. Environ. Technol. Lett. 4:268.
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., Hirt, R. R. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. FEMS Microbiol. Lett. 117:157-162.
- Francis, G., Keem, Z., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. Br. J. Nutr., 88:587-605.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2008. Effects of Sesbania sesban and Carduus pycnocephalus leaves and Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. Anim. Feed Sci. Tech., 147:72-89.
- Grobner, M. A., Johnson, D. E., Goodall, S. R. and Benz, D. A. 1982. Sarsaponin effects on *in vitro* continuous flow fermentation of a high grain diet. J. Anim. Sci., 55:491-497.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E. and

- McSweeney, C. S. 2008. Effects of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*. 47:421-426.
- Hess, H. D., Kreuzer, M., Diaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R. and Machmuller, A. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 109:79-94.
- Holtshausen, L., Chaves, A. V., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., McAllister, T. A., Odongo, N. E., Cheeke, P. R. and Benchaar, C. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2809-2821.
- Hu, W. L., Liu, J. X., Ye, J. A., Wu, Y. M. and Guo, Y. Q. 2005a. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 120:333-339.
- Hu, W. L., Wu, Y. M., Liu, J. X., Guo, Y. Q. and Ye, J. A. 2005b. Tea saponins affect *in vitro* fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, B6:787-792.
- Hussain, I. and Cheeke, P. R. 1995. Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate or roughage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51:231-242.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 1994. Radiative Forcing of Climate Change. The 1994 Report of Scientific Assessment. Working Group of IPCC WMO. UNEP. pp:1-28.
- IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change). 2001. Climate change 2001. The scientific Basis. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Janzen, H. H., Desjardins, R. L., Asselin, J. M. R. and Grace, B. 1999. The Health of our Air: Towards sustainable agriculture in Canada. Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. Publication No. 1981/E.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. and Itabashi, H. 2003. Effect of sarsaponin on rumen fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 86: 3330-3336.
- Lila, Z. A., Mohammed N., Kanda, S., Kurihara, M. and Itabashi, H. 2005. Sarsaponin effects on ruminal fermentation and microbes, methane production, digestibility and blood metabolites in steers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 12:1746-1751.
- Liu, J. X., Yuan, W. Z., Ye, J. A. and Wu, Y. M. 2003. Effect of tea (*Camellia sinesis*) saponin addition on rumen fermentation *in vitro*. *Trop Subtrop Agro-Ecosyst.*, 3:561-564.
- Makkar, H. P. S. and Becker, K., 1996. Effect of *Quillaja saponins* on *in vitro* rumen fermentation. *Adv. Exp. Med Biol.*, 405: 387-394.
- Moss, A. R., Jouany, J. -P. and Newbold, C. J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49, 231-235.
- Patra, A.K., Saxena, J. 2009b. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr. Res. Rev.* 22:204-219.
- Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, M., Morikawa, R. and Takahashi, J. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 129:175-186.
- Pen, B., Takaura, K., Yamaguchi, S., Asa, R. and Takahashi, J. 2007. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* with or without β -1, 4 galacto- oligosaccharides on ruminal fermentation, methane production and nitrogen utilization in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138:75-88.
- Santoso, B., Mwenya, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H. and Takahashi, J. 2004. Effects of supplementing galactooligosaccharides, *Yucca schidigera* and nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livest. Prod. Sci.* 91:209-217.
- SAS. 1996. SAS Uaer Guide. Release 6.12 edition. SAS Inst. Inc. Cary NC. USA.
- Sliwinski, B. J., Soliva, C. R., Machmüller, A. and Kreuzer, M. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 101:101-114.
- Takahashi, J., Miyagawa, T., Kojima, Y. and Umetsu, K. 2000. Effects of *Yucca schidigera* extract, probiotics, monensin and L-cysteine on rumen methanogenesis. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13:499-501.
- Wallace, R. J., Arthaud, L. and Newbold, C. J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on rumen ammonia concentrations and rumen microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1762-1767.
- Wallace, R. J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.*, 63:621-629.
- Wang, C. J., Wang, S. P. and Zhou, H. 2009. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148:157-166.
- Wina, E., Muetzel, S. and Becker, K. 2005. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Productions- A Review *J. Agric. Food Chem.*, 53:8093-8105.
- Wu, Z., Sadik, M. Sleiman, F. T., Sima, J. M., Pessarakli, M. and Huber, J. T. 1994. Influence of yucca extract on rumen metabolism in cow. *J. Anim. Sci.*, 72:1038-1042.
- Van Soest, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed.; Cornell University Press: United States, 1994.

(Received Sep. 5, 2010; Revised Feb. 24, 2011; Accepted Mar. 7, 2011)