

Terpenoid 함유 식물 추출물의 첨가가 반추위 발효와 메탄 발생에 미치는 영향*

황희순** · 하동욱* · 이수경* · 이일동* · 이신자**** · 이성실*

Effects of Terpenoids-Rich Plant Extracts on Ruminal-fermentation and Methane Production

Hwang, Hee-Soon · Ha, Dong-Uk · Lee, Su-Kyoung ·
Lee, Il-Dong · Lee, Shin-Ja · Lee, Sung-Sill

This study was conducted to investigate effects of terpenoids-rich plant extracts (TRPE) on the *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane production. The ruminal fluid was collected from a cannulated Hanwoo cow fed concentrate and timothy in the ratio of 6 to 4. The TRPE as Mint (*Mentha arvensis* var. *piperascens*), Pine (*Pinus densiflora*), Japan cedar (*Cryptomeria japonica*), Sichuan pepper (*Zanthoxylum piperitum*), Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtuse*) and Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) were used in this study. The 15 mL of mixture, contains McDougall buffer and rumen fluid in the ratio of 2 to 1. The mixture was dispensed anaerobically 50 mL serum bottles and it is contained 0.3 g timothy substrate and 5% TRPE. The bottles were incubated at 39°C for 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 hours. The pH value decrease by increased incubation times and the pH values at all times were significantly ($p<0.05$) higher in treatments than in control. The digestibility of dry matter at 3 hours was significantly ($p<0.05$) higher in mint treatment than in control. Productions of total gas and carbon dioxide at before 12 hours was significantly lower ($p<0.05$) in treatments than in control. The methane production at 24 hours was significantly ($p<0.05$) lower in treatments than in control. The concentrations of acetic acid and propionic acid at 24 hours were significantly higher ($p<0.05$) in mint and pine treatments than in control. In conclusion, the terpenoid-rich plant extracts were shown to decreased methane emission and without adversely affected ruminal fermentation. Therefore, the terpenoid-

* 본 연구는 농림수산식품기술평가원(IPET)의 지원을 받았으며, 하동욱의 석사논문을 편집한 것임.

** Corresponding author, 경상대학교 응용생명과학부, 연락처(E-mail : lss@gnu.ac.kr)

*** 경상대학교 응용생명과학부

**** 경상대학교 농업생명과학연구원

rich plant extracts as mint and pine were shown to decreased methane production and it has potential possibility for ruminal fermentations.

Key words : *methane emission, plant extracts, rumen fermentation, terpenoids*

I. 서 론

메탄은 주요 온실가스 중의 하나로서, 연간 5억 톤 이상이 대기로 방출되고 있으며 전체 지구 온난화에 15~17% 정도 기여하고 있다(IPCC, 1992). 메탄은 전체 온실가스에서 이산화탄소보다 차지하는 비율이 낮지만 복사열의 흡수 능력이 21배 정도 높기 때문에(Tyler, 1991), 지구 온난화에 미치는 영향은 무시할 수 없는 수준이다(GIR, 2005). 반추위 내에서 발생하는 메탄은 혐기발효 과정에서 메탄생성균에 의해 발생되며, 지구에서 발생하는 총 메탄 발생량의 약 23~27%를 차지한다(IPCC, 2007). 또한 반추동물은 사료의 급여수준, 사료의 조성 그리고 소화율에 따라 섭취한 사료 에너지의 2~15%가 메탄의 생성에 의해 손실되기 때문에, 섭취한 사료가 대사 에너지로 전환되는 양이 감소하게 된다. 따라서 반추동물로부터 생성되는 메탄을 억제 하는 목적은 지구온난화를 억제 하는 환경적 측면, 그리고 메탄으로 방출되는 사료에너지를 최소화함으로써 사료 효율을 높이고자 하는 영양학적 측면이 있다(Lee et al., 2009). 반추위 내의 메탄 발생을 줄일 수 있는 방법은 크게 세 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 수소의 생성을 줄이는 방법, 두 번째는 수소를 메탄 생성이 아닌 propionate의 생성을 증진시키는 등의 숙주동물에게 이로운 방향으로 소비하는 방법, 세 번째는 메탄 생성균 자체를 억제하는 방법이다(Joblin, 1999). 최근까지 반추위 내의 메탄 발생을 줄이기 위해 불포화 지방산(Zhang et al., 2008), 할로젠 화합물(Hwang et al., 2012), 유기산류(Martin, 1998) 및 식물추출물(Hart et al., 2008)등을 이용한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 이러한 물질들의 사용시 사료 섭취량 감소, 동물에 대한 독성 등의 이유로 천연물을 이용한 반추동물의 메탄 저감제의 개발이 시급한 실정이다. 최근에는 장내 발효 조절과 메탄생성 감소를 위한 사료 첨가제로서 천연물질에 대한 관심이 증가하고 있으며(Wallce, 2002; Wenk, 2003), 많은 연구자들이 사포닌, 탄닌, 에센셜 오일, 유기황 화합물 등과 같은 식물유래 천연 물질들을 이용하여 반추위 메탄생성에 미치는 영향을 검토하여 일부 물질이 효과가 있음을 보고하였다(Kamra et al., 2006). Terpenoid는 식물체 2차 대사산물의 다양한 집단이며, 약 1,500가지의 화합물들이 문헌에 기록되어있다(Gershenzon and Croteau, 1991). 최근 조사에 의하면, terpene hydrocarbon(Sikkema et al., 1995) 및 tea tree oil(Cox et al., 1998; Gustafson et al., 1998)의 성분을 포함하는 고리형 탄화수소의 작용점이 세포막에 있다는 것이 밝혀졌고, 또한 고리형 탄화수소인 tetralin(Sikkema et al., 1992) 및 탄화수소 테르펜인 α -pinene, β -pinene, γ -terpinen 그리고 limonene(Sikkema et al., 1994)은 인공막

(artificial membrane)의 구조 및 기능적 특성에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 화합물들은 세포막에 투과성을 가지고 있어 세포막을 팽창하게 한다. 이는 호흡효소를 억제하여 부분적으로 pH gradient 및 전자 전위를 소실하게 하여 세포의 에너지 시스템에 중대한 영향을 미친다(Griffin et al., 1999). 이러한 작용으로 인하여 Terpenoid 함유 식물 추출물은 미생물의 세포막에 직접적으로 작용하여 그람 양성균 및 그람 음성균의 성장을 억제한다는 것으로 알려져 있다(Calsamiglia et al., 2007). Agarwal 등(2009)의 연구에 따르면 *in vitro* 실험에서 peppermint oil이 VFA의 생성에 영향 없이 20% 정도의 메탄 생성을 저감한다고 보고하였으며, Patra 등(2006)은 methanol 및 ethanol을 이용하여 추출한 fennel seed 및 clove bud 추출물이 *in vitro* 상에서 메탄생성을 저해한다고 보고 하였다. 따라서 본 연구는 한국 식물 추출물 은행의 분양목록에서 Terpenoid를 함유하는 식물 추출물을 선택하여 반추위 내 메탄 발생 저감 및 반추위 발효성상에 미치는 영향을 조사하여 반추동물의 메탄저감 사료 첨가제로서의 가능성을 조사하고 메탄 저감능력을 가진 국내 자생 식물을 선발하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시축 및 사양관리

경상남도 진주 소재의 경상대학교 야생동물보호센터에서 반추위에 cannula가 장착된 한우(체중 450kg±30kg)로부터 *in vitro* 반추위 발효 시험을 위한 시험용 위액을 채취하였고, 사료는 농후사료와 티모시의 비율을 4:6로 하여 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:00) 분할 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 자유섭취토록 하였다.

2. 공시재료 및 시험설계

공시재료는 65°C dry oven에서 24시간 건조시킨 timothy를 2mm screen으로 분쇄한 후 3cm×3.5cm로 자체 제작한 nylon bag(Ankom Forage bag: R1020)에 넣어 heat sealing후 기질로 사용하였고, AOAC법(1995)으로 분석한 timothy의 화학적 조성 결과는 Table 1과 같다. 식물 추출물(Table 2)은 한국식물추출물은행에서 Methyl alcohol 99.9%로 추출한 것을 분양받아 Dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) 1ml에 희석 후 사용하였다. 시험용 위액 준비는 오전 사료 급여 시간 전에 반추위에 장착된 cannula를 통하여 채취하였고, 4겹의 cheese cloth에 걸러서 O₂-free N₂가 충전된 보온용기에 담아 실험실로 운반하였다. 잔여 사료 입자를 제거하기 위해 2겹의 cheese cloth로 다시 걸러낸 반추위액과

McDougall buffer를 1:2의 비율로 혼합한 배양액을 0.3g 티머시와 식물 추출물(기질의 5%) 이 담긴 50ml serum bottle에 혐기상태(O₂-free N₂)로 15ml를 분주하고, butyl rubber 및 aluminum cap으로 밀봉하였다. 각 처리구별 배양은 39°C의 shaking incubator(Jeio Tech, SI-900R; 120rpm)에서 시간대별(3, 6, 9, 12, 24, 48 및 72)로 3반복 수행하였다.

Table 1. Chemical compositions of experimental feedstuff

	Chemical composition						
	Moisture (%)	C. Protein (% DM)	C. fat (% DM)	C. fiber (% DM)	C. ash (% DM)	NDF ¹ (% DM)	ADF ² (% DM)
Timothy	8.87	13.37	2.25	21.87	8.62	53.18	30.57

¹ NDF : Neutral detergent fiber

² ADF : Acid detergent fiber

Table 2. The information regarding terpenoids-rich plant extracts used in the experiment

Bar code	Name	Botanical source	Plant Part
PB4414.1	Mint	<i>Mentha arvensis var. piperascens</i>	Whole plant
PB1398.4	Pine	<i>Pinus densiflora</i>	Leaves
PB1407.5	Japan cedar	<i>Cryptomeria japonica</i>	Stem
PB3587.2	Sichuan pepper	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Leaves
PB1413.3	Hinoki Cypress	<i>Chamaecyparis obtuse</i>	Leaves
PB1401.8	Japanese black pine	<i>Pinus thunbergii</i>	Leaves

Plant extracts were obtained from Plant Extract Bank (PEB) at Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Table 3. The chemical composition of McDougall buffer

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

4% CaCl₂ solution : CaCl₂ 4g (/dl D.W.)

3. 조사항목 및 조사방법

1) 총 가스, 이산화탄소 및 메탄 발생량 측정

Serum bottle을 shaking incubator에서 꺼낸 후, Theodorou 등(1994)의 방법으로 serum bottle의 head space에 있는 가스 발생량을 detachable pressure transducer 및 digital read-out voltmeter (Laurel Electronics, Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하였고, 9ml 진공시험관(vacutainer)에 가스를 포집하여 GC(HP 5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 가스 내 메탄 함량 및 이산화탄소 함량을 측정하였다.

2) pH 측정

가스 발생량 측정 및 가스 포집 후 Weaton decapper(Weaton Co., USA)를 이용하여 serum bottle의 aluminum seal 및 butyl rubber를 제거 한 후 배양액을 pH를 pH meter(Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.

3) 건물 소화율 측정

배양 상등액 채취 후 nylon bag을 수거하여 흐르는 물에 5분간 씻은 후 65°C의 dry oven에서 약 24시간 건조시켜 건물 잔량을 측정하였다. 건물 소화율은 투입한 기질의 양과 발효 후 nylon bag의 차이를 기질양의 백분율로 환산하여 구하였다.

4) 미생물 성장량 측정

pH 측정 후, 배양액을 1.5ml eppendorf tube에 채취하여 사료입자를 제거하기 위해 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 14,000 rpm에서 3분간 재원심 분리하여 미생물 pellet을 침전시킨 후, 상등액은 제거하고 pellet에 sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 1ml 첨가하여 vortex로 교반시키는 세척 과정을 3회 반복 후 spectrophotometer(BIO-RAD, Model 680)를 이용하여 550nm에서 O.D.(optical density) 값을 구하여 미생물 성장량을 측정하였다(Lee et al., 2007).

5) 암모니아 측정

Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 의해 phenol color reagent와 alkali-hypochlorite reagent로 위액중의 암모니아를 발색한 후 spectrophotometer(BIO-RAD Model 680)를 이용하여 630nm에서 O.D.(optical density)값을 구하여 측정하였다.

6) VFA 분석

배양액을 1.5ml Eppendorf tube에 채취하여 3,000rpm에서 3분간 원심 분리하여 사료입자를 제거하고, 상등액을 0.20 μ m syringe filter로 여과 후 HPLC(High performance Liquid Chromatography, Agilent-1200, Germany)를 이용하여 분석하였다. 시료의 주입량은 20 μ l였고, 이동상 용액은 0.0085N H₂SO₄을 사용하였으며, 유속은 0.6ml/min이었다. Column은 300mm \times 7.8mm I.d. MetaCarb 87H(Varian, USA)를 사용하였으며, 온도는 35 $^{\circ}$ C에서 사용하였다.

4. 통계처리

통계처리는 SAS package program(1996)의 General Linear Model(GLM) procedure에 따라 처리하였으며, 각 처리구간의 유의성 검증을 위해 분산분석을 실시 후, Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다($P < 0.05$).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 총 가스, 메탄 및 이산화탄소 발생량

Terpenoid 함유 식물추출물의 첨가가 *in vitro* 발효 시간대에 따른 총 가스, 메탄 및 이산화탄소 발생량에 미치는 영향은 Table 4, Table 5 및 Table 6과 같다. 총 가스 발생량은 배양 48시간까지 대조구에 비해 전 처리구에서 유의적($p < 0.05$)으로 낮았으나 배양 72시간에 Mint, Japan cedar 첨가구에서 각각 301.38ml/g DM 및 303.04ml/g DM으로 대조구(300.39 ml/g DM) 보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이러한 결과는 Table 9의 미생물 성장량과 비교하였을 때, Terpenoid 함유 식물추출물의 첨가로 미생물의 성장이 억제되어 나타난 결과라고 생각된다.

이산화탄소 발생량은 배양 12시간까지는 첨가구가 대조구 보다 적었지만, 12시간 후에는 대조구와 첨가구 간의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 Terpenoid 함유 식물 추출물의 첨가로 인하여 반추 미생물의 성장이 억제된 결과라 생각된다. 메탄 발생량은 배양 3, 6, 9 및 24시간대에 전 처리구에서 메탄의 생성이 유의적으로 억제되었으며($p < 0.05$), 특히 배양 24시간에 모든 첨가구 Mint(25.72ml/g DM), Pine(26.83ml/g DM), Japan cedar(27.47 ml/g DM), Sichuan pepper(26.06ml/g DM), Hinoki cypress(28.29ml/g DM), Japanese black pine (25.18ml/g DM)에서 대조구(43.62ml/g DM)에 비해 최대 58%의 메탄 생성을 억제하였다. 그러나 이는 일시적인 효과로 배양 48시간이 경과함에 따라 메탄 발생량은 대조구와 처리구 간 유의성을 보이지 않는데 이는 반추위 미생물이 배양 초기에 식물 추출물의 영향으로 메

탄생성이 억제되지만 배양 시간의 경과에 따른 반추위 미생물이 식물 추출물에 적응 한 결과라 생각된다.

Table 4. Effects of terpenoids-rich plant extracts on total gas production in the *in vitro* fermentation (ml/g DM)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	164.84 ^a	152.54 ^b	150.77 ^b	143.35 ^c	141.32 ^{cd}	142.1 ^{cd}	140.19 ^d	1.23
6	170.66 ^a	156.48 ^b	155.76 ^b	156.80 ^b	155.50 ^b	155.29 ^b	154.88 ^b	2.56
9	186.34 ^a	172.42 ^c	179.17 ^b	177.30 ^b	181.19 ^b	168.27 ^c	171.02 ^c	2.30
12	208.09 ^a	188.31 ^b	182.23 ^c	189.56 ^b	180.05 ^c	178.18 ^c	176.37 ^c	3.22
24	263.84 ^a	236.90 ^b	240.79 ^b	241.93 ^b	241.36 ^b	239.91 ^b	235.55 ^b	5.51
48	284.61 ^a	283.00 ^{ab}	280.56 ^{abc}	277.76 ^{bc}	279.99 ^{abc}	274.28 ^c	281.13 ^{ab}	3.42
72	300.39 ^{ab}	301.38 ^a	298.37 ^{ab}	303.04 ^a	298.52 ^{ab}	301.12 ^{ab}	294.68 ^b	3.42

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

Table 5. Effects of terpenoids-rich plant extracts on methane production in the *in vitro* fermentation (ml/g DM)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	2.89 ^a	1.90 ^b	1.55 ^c	1.40 ^c	1.09 ^d	1.43 ^c	1.32 ^c	0.17
6	4.68 ^a	3.23 ^{bc}	3.22 ^{bc}	2.96 ^{bc}	2.46 ^c	3.34 ^{bc}	3.56 ^b	0.51
9	7.13 ^a	3.52 ^c	7.01 ^a	6.48 ^{ab}	6.91 ^{ab}	5.26 ^b	6.58 ^{ab}	0.9
12	26.02	9.34	8.87	10.17	18.23	8.96	8.17	10.21
24	43.65 ^a	25.72 ^b	26.83 ^b	27.47 ^b	26.06 ^b	28.29 ^b	25.18 ^b	7.33
48	65.03	62.73	70.80	69.30	68.12	63.59	70.62	13.34
72	88.47	91.61	91.73	90.47	108.38	114.43	84.07	22.12

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

Table 6. Effects of terpenoids -rich plant extracts on carbon dioxide production in the *in vitro* fermentation (ml/g DM)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	28.43 ^a	16.92 ^b	14.57 ^c	9.37 ^d	7.69 ^e	9.89 ^d	9.87 ^d	0.96
6	30.50 ^a	17.94 ^b	17.71 ^b	16.27 ^b	14.43 ^b	18.78 ^b	18.85 ^b	2.82
9	41.56 ^a	20.80 ^d	39.10 ^{ab}	34.69 ^{ab}	37.18 ^{ab}	25.64 ^{cd}	31.88 ^{bc}	4.80
12	75.58 ^a	44.52 ^{ab}	40.78 ^{ab}	50.11 ^{ab}	80.43 ^{ab}	40.25 ^{ab}	37.69 ^b	51.20
24	101.99	108.73	119.63	118.68	112.34	120.58	109.67	20.70
48	185.90	171.48	188.78	187.44	177.58	173.13	176.11	33.08
72	237.88	191.60	196.89	187.70	226.34	231.92	178.71	42.77

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

Crane 등(1957)은 limonene이 반추위 내 메탄생성을 억제한다고 보고하였으며, Yang 등(2007)은 2g의 Juniper berry EO(containing 35% α -pinene)을 소에게 급여 하였을 때 사료 섭취에는 영향을 미치지 않으면서 메탄 생성이 억제된다고 보고하였다. 그러나 본 연구의 결과는 Soliva 등(2008)의 pinene, limonellen, ω 3-carene 그리고 β -phellandren을 각각 35, 25, 12 및 14% 함유하는 *Pinus mugos* oil을 첨가하였을 때 메탄 생성에 영향을 미치지 않았다는 보고와는 상이하였는데, 이는 식물이 함유하고 있는 성분 및 양에 따라 반추위 내의 발효성상에 미치는 영향이 다르기 때문이라 생각된다.

2. pH 변화

Terpenoid 함유 식물 추출물의 첨가가 *in vitro* 상의 pH의 변화에 미치는 영향은 Table 7과 같다. pH 값은 초기 7.55 에서 6.52 정도의 범위로 배양시간의 경과에 따라 낮아지는 경향을 보였으며, 배양 초기 모든 대조구 및 처리구가 높은 pH를 형성한 것은 McDougall Buffer의 pH가 7.5 범위에 있어 배양액의 pH에 영향을 준 것으로 생각된다. 또한 McCullough (1973)는 cellulose 소화에는 pH 6.0~6.8, 단백질 합성은 6.3~7.4, 단백질 분해 활력은 6.5~7.0 그리고 총 VFA 생산량은 6.2~6.6에서 가장 높았다고 보고 하였다. 반추 위액의 pH는 반추위 발효에 영향을 미치는데 첫 번째는 pH의 값이 6.2 이하일 때 섬유소 분해 미생물들이 섬유소의 세포벽을 분해하는 활력이 낮아지게 되어(Argyle and Baldwin, 1988; Dijkstra et al., 1992) 섬유소 세포벽의 분해 정도와 미생물의 성장 그리고 휘발성 지방산과 메탄의 생

성에 영향을 미치고, 두 번째로 사료 섭취량의 증가 또는 다량의 농후사료 급여로 인한 기질의 발효 속도 증가로 휘발성 지방산의 생성이 증가될 때 반추 위액은 더욱 산성이 된다. 본 연구의 결과 Terpenoid 함유 식물 추출물 첨가구에서 pH가 대조구보다 높은 것을 볼 수 있으나, 24시간대 Mint 및 Pine 처리구에서 VFA의 생성이 증가하였고 건물 소화율에도 영향을 미치지 않아 반추위 발효에 영향을 미칠 정도는 아닌 것으로 생각된다.

Table 7. Effects of terpenoids-rich plant extracts on pH value in the *in vitro* fermentation

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	7.24 ^d	7.40 ^c	7.42 ^c	7.54 ^{ab}	7.55 ^a	7.51 ^b	7.52 ^{ab}	0.02
6	7.21 ^b	7.36 ^a	7.36 ^a	7.35 ^a	7.36 ^a	7.35 ^a	7.36 ^a	0.03
9	7.06 ^e	7.20 ^{ab}	7.13 ^{dc}	7.14 ^{dc}	7.11 ^d	7.22 ^a	7.17 ^{bc}	0.02
12	6.90 ^c	7.02 ^b	7.07 ^a	7.01 ^b	7.08 ^a	7.08 ^a	7.11 ^a	0.02
24	6.62 ^b	6.76 ^a	6.72 ^a	6.71 ^a	6.74 ^a	6.73 ^a	6.77 ^a	0.03
48	6.59 ^b	6.63 ^{ab}	6.65 ^a	6.65 ^a	6.66 ^a	6.66 ^a	6.66 ^a	0.02
72	6.56 ^e	6.64 ^{dc}	6.62 ^d	6.63 ^d	6.67 ^a	6.65 ^{bc}	6.66 ^{ab}	0.01

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

3. 건물 소화율

Terpenoid 함유 식물 추출물을 첨가가 *in vitro* 반추위 발효에 따른 건물 소화율에 미치는 영향은 Table 8과 같다. 배양 3, 6시간대의 Mint 처리구에서 소화율이 일시적으로 증가하였으나 9~12시간대에는 전 대조구와 처리구간 유의성이 없었고, 이후 배양 48시간대에 모든 처리구가 대조구에 비해 높았다($p < 0.05$). Mint의 주요 성분인 menthol은 항균 효과가 있다고 알려져 있으며(Craig, 1999), 이는 VFA의 생성 및 반추위 소화율에 부정적인 영향을 미친다는 것을 예상할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 Mint 추출물을 첨가함으로써 소화율이 향상되는 것으로 비취볼 때 반추위 소화율에 미치는 부정적인 영향은 없는 것으로 생각된다.

Table 8. Effects of terpenoids-rich plant extracts on the *in vitro* dry matter disappearance (%)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	21.82 ^{ab}	24.03 ^a	21.71 ^{ab}	22.20 ^{ab}	20.91 ^{ab}	21.55 ^{ab}	20.64 ^b	1.71
6	22.76 ^{ab}	24.06 ^a	23.96 ^a	23.31 ^{ab}	21.62 ^b	21.92 ^{ab}	22.92 ^{ab}	1.14
9	23.55	25.15	24.15	23.92	24.04	24.42	22.94	1.41
12	29.13	27.32	28.16	29.84	28.92	30.70	26.66	3.22
24	48.34	44.96	46.57	46.74	46.94	45.96	45.93	2.54
48	48.55 ^{bc}	51.23 ^{ab}	47.09 ^c	50.76 ^{ab}	50.11 ^{abc}	50.13 ^{abc}	52.15 ^a	1.82
72	50.37	54.26	50.51	51.24	50.19	52.86	52.20	3.07

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

4. 미생물 성장량

Terpenoid 함유 식물 추출물의 첨가가 *in vitro* 반추위 발효 시간대에 따라 미생물 성장량에 미치는 영향은 Table 9와 같다. 미생물 성장량은 배양 6시간대에 대조구에 비해 전 처리구에서 낮았으나 9시간대에 전 처리구에서 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이후 배양에는 유의적인 차이를 보이지 않으며 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$).

Terpenoid는 미생물의 세포막과의 직접적인 상호작용으로 미생물 성장을 억제하는데 (Griffin et al., 1999; Davison and Naidu, 2000; Dorman and Deans, 2000), 이는 소수성인 Terpenoid가 미생물의 지질 이중층에 축적되어 막의 구조가 변형되기 때문인 것(Sikkema et al., 1994; Ultee et al., 1999; Griffin et al., 1999)으로 생각되며 이 같은 효과는 반추 미생물의 성장률을 변화시켜 반추위 미생물의 수를 조절하여 반추위 발효성상에 영향을 미치게 된다(Calsamiglia et al., 2007). 그러나 에센셜 오일에서 분리해낸 주요 화합물들을 같은 농도(3 ml/L of liquid)로 처리한 실험에서 고리형 탄화수소(limonene, pinene)는 영향을 미치지 않거나 때때로, 미생물의 활력을 증가시켰지만, 산화형 고리 탄화수소나 특정 알콜(terpinen-4-ol, α -terpineol) 들은 미생물에 의한 발효를 억제한다고 한다(Calsamiglia et al., 2007). 본 연구에 사용한 식물 추출물의 주요 성분들은 Son 등(1990)의 연구에 따르면 Pine, Japan cedar, Sichuan pepper, Hinoki cypress, Japanese black pine의 주요 성분은 α -pinene, β -pinene, Δ^3 -carene이며, Mint의 성분은 (-)-menthol, (-)-menthone 등을 함유하고 있다(Song et al., 2002)고

하였다. 상기의 함유 성분을 볼 때, 각 식물 추출물에 따라 함유 성분들의 차이가 있어 나타난 결과라 생각된다.

Table 9. Effects of terpenoids -rich plant extracts on growth rate of ruminal microbe in the *in vitro* fermentation (O.D. at 550 nm)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	0.71	0.74	0.63	0.65	0.60	0.62	0.55 ^a	0.10
6	0.56 ^a	0.52 ^a	0.47 ^{ab}	0.50 ^a	0.47 ^{ab}	0.48 ^{ab}	0.38 ^b	0.06
9	0.66 ^b	0.66 ^b	0.78 ^{ab}	0.74 ^{ab}	0.80 ^a	0.70 ^{ab}	0.75 ^{ab}	0.07
12	0.69 ^{ab}	0.75 ^a	0.71 ^{ab}	0.61 ^b	0.62 ^{ab}	0.66 ^{ab}	0.72 ^{ab}	0.07
24	0.95 ^a	0.80 ^{bc}	0.84 ^{abc}	0.78 ^c	0.84 ^{abc}	0.91 ^{abc}	0.93 ^{ab}	0.07
48	0.75 ^b	0.73 ^b	0.75 ^b	0.64 ^b	0.75 ^b	0.75 ^b	0.88 ^a	0.06
72	0.78 ^a	0.65 ^{bc}	0.62 ^c	0.73 ^{abc}	0.71 ^{abc}	0.70 ^{abc}	0.73 ^{ab}	0.06

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

5. 암모니아 생성량

Terpenoid 함유 식물 추출물의 첨가가 *in vitro* 반추위 암모니아 생성에 미치는 영향은 Table 10과 같다. 초기 배양 시간대에는 암모니아 생성량에 약간의 유의성이 있으나($p < 0.05$), 12시간대 까지는 유의성이 없이 증가 하는 경향을 보였다. 24시간대에 대조구에 비해 전 처리구에서 암모니아 생성량이 증가하였으나 유의성은 없었다($p < 0.05$). 암모니아 생성량이 급격히 증가하는 데는 Table 9에서 보이듯이 반추위 미생물이 사멸하면서 일어나는 lysis의 영향인 것으로 생각된다. Nugent와 Mangan(1981)의 연구에 의하면, 단백질원 분해산물인 암모니아는 박테리아와 프로토조아에 의해 발생이 조절되며, 주로 작용하는 것은 박테리아라고 보고하였다. McIntosh 등(2003)은 BEO(blend of essential oils)를 첨가하였을 때, hyperammonia-producing bacteria에 속하는 *Clostridium sticklandi* 및 *Peptostreptococcus anaerobius*를 억제하여 암모니아 생성을 억제한다고 하였으나 본 연구 결과와는 상이하였다.

Table 10. Effects of terpenoids -rich plant extracts on ruminal NH₃-N concentration in the *in vitro* fermentation (mg/dl)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
3	2.37 ^a	2.15 ^a	1.36 ^{bc}	2.57 ^a	2.25 ^a	2.11 ^{ab}	1.25 ^c	0.43
6	2.57	2.30	3.02	3.09	2.75	2.55	2.44	0.48
9	2.63	3.18	3.22	3.50	3.09	3.51	3.83	0.83
12	3.58	3.51	4.11	3.70	4.36	4.72	4.89	0.90
24	5.15 ^b	5.85 ^{ab}	5.84 ^{ab}	6.31 ^{ab}	6.14 ^{ab}	6.79 ^a	7.01 ^a	0.84
48	18.47	18.13	17.68	18.46	19.31	17.44	16.68	2.95
72	26.5 ^a	22.18 ^b	24.54 ^{ab}	25.37 ^{ab}	22.22 ^b	25.16 ^{ab}	27.03 ^a	2.03

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

6. 휘발성 지방산 생성량

Terpenoid 함유 식물 추출물의 첨가가 *in vitro* 반추위 VFA 생성에 미치는 영향은 Table 11과 같다. 초기 배양시간대 acetate 및 propionate 생성량은 대조구에 비해 떨어진 양상을 보이며, 대조구와 처리구 모두 배양 6시간대 더욱 감소되는데 이는 Table 9에서 보인 반추 미생물의 성장량 저하에 따른 결과로 생각되며, 이후 배양시간의 경과에 따라 미생물 성장량과 동일한 양상으로 acetate 및 propionate 생성량이 다시 증가하였다. Acetate의 증가량은 배양 12시간에서 24시간까지 가장 높았고, 특히 Mint와 Pine 처리구에서 증가량이 가장 높았다. 이후 미생물의 lysis 과정에 들어서면서 acetate의 증가량은 서서히 감소하였다. propionate의 경우 japan cedar와 Sichuan pepper는 반추위 미생물 성장 패턴에 관계없이 지속적으로 증가하지만 이외 대조구와 다른 처리구에서는 미생물 성장량에 따라 감소하였다가 다시 증가하는 경향을 보인다. A/P ratio는 배양 전 시간대에 대조구와 처리구간 유의성을 나타내는데($p < 0.05$), 9시간대의 Pine 처리구에서 가장 낮았다. 24시간대부터 48시간대까지는 대조구와 모든 처리구에서 증가하지만 다시 72시간대에는 감소하였는데, Hinoki cypress 처리구에서만 증가하는 경향을 나타내었다.

일반적으로 propionic acid의 생성이 증가하면 hydrogen sink에 의해 메탄의 생성이 줄어들게 되는데(Irmgard Immig, 1996), 본 연구의 결과 Mint 및 Pine 처리구에서 propionic acid의 생성이 대조구보다 증가하는 경향이 있었으나, propionic acid의 생성량 증가 구간과 메탄 생성억제 구간의 연관성은 찾아 볼 수 없었다. Hydrogen sink 작용 보다 Terpenoid 식물 추

출물이 메탄 생성균에 직접적으로 작용하여 메탄 생성이 감소한 것이라 생각된다. 특히 Mint 및 Pine 식물 추출물이 acetic acid 및 propionic acid의 생성을 증가시키며, 이는 동물의 에너지 활용 측면에 큰 도움이 될 것이라 생각된다.

Table 11. Effects of terpenoids-rich plant extracts on VFA concentration in the *in vitro* fermentation (mM/g)

Incubation (h)	Treatments							SEM
	Control	Mint	Pine	Japan cedar	Sichuan pepper	Hinoki cypress	Japanese black pine	
Acetic acid								
3	49.61 ^a	30.51 ^b	27.75 ^b	27.79 ^b	22.92 ^b	21.06 ^b	20.88 ^b	6.94
6	23.81	23.07	22.71	22.90	22.77	22.89	23.61	0.83
9	34.86 ^{bc}	36.65 ^{bc}	54.20 ^a	50.04 ^{ab}	40.05 ^{abc}	31.75 ^c	33.08 ^c	8.67
12	35.74 ^a	35.65 ^a	33.55 ^b	35.44 ^a	33.03 ^b	34.30 ^{ab}	33.04 ^b	0.91
24	58.06 ^c	67.51 ^a	64.81 ^{ab}	60.78 ^{bc}	58.56 ^c	58.67 ^c	58.49 ^c	2.71
48	70.4 ^a	65.82 ^b	64.43 ^{bc}	62.50 ^c	62.75 ^c	64.17 ^{bc}	68.42 ^a	1.2
72	73.76 ^{bc}	74.32 ^{bc}	70.74 ^c	78.76 ^b	85.58 ^a	84.37 ^a	68.74 ^c	2.99
Propionic acid								
3	15.27 ^a	15.26 ^a	10.17 ^{bc}	7.62 ^c	8.19 ^c	11.31 ^b	10.46 ^{bc}	1.58
6	8.14 ^b	9.13 ^{ab}	8.96 ^{ab}	10.96 ^a	9.19 ^{ab}	10.19 ^{ab}	9.24 ^{ab}	1.14
9	11.96 ^{bc}	10.59 ^{bc}	32.51 ^a	13.00 ^{bc}	17.67 ^b	9.59 ^c	12.22 ^{bc}	4.06
12	15.99 ^{ab}	15.17 ^{bc}	14.84 ^c	15.68 ^{abc}	15.42 ^{bc}	16.65 ^a	16.15 ^{ab}	0.58
24	24.34 ^b	29.61 ^a	30.64 ^a	24.84 ^b	23.06 ^b	23.34 ^b	22.46 ^b	2.54
48	21.80 ^a	20.36 ^b	20.25 ^b	19.43 ^c	19.76 ^{bc}	20.39 ^b	21.86 ^a	0.38
72	24.50	23.80	22.75	43.20	29.31	25.76	24.80	11.43
a/P ratio								
3	3.25 ^{ab}	2.04 ^{bc}	2.79 ^{abc}	3.65 ^a	3.03 ^{abc}	1.91 ^c	2.00 ^{bc}	0.68
6	2.92 ^a	2.53 ^{ab}	2.53 ^{ab}	2.16 ^b	2.48 ^{ab}	2.28 ^b	2.55 ^{ab}	0.24
9	2.93 ^{ab}	3.48 ^a	1.67 ^b	4.09 ^a	2.65 ^{ab}	3.31 ^a	2.84 ^{ab}	0.83
12	2.24 ^{bc}	2.35 ^a	2.26 ^{ab}	2.26 ^{ab}	2.14 ^{cd}	2.06 ^d	2.05 ^d	0.06
24	2.39 ^{ab}	2.34 ^{ab}	2.12 ^b	2.45 ^{ab}	2.54 ^a	2.51 ^a	2.61 ^a	0.18
48	3.23 ^a	3.23 ^a	3.18 ^{abc}	3.21 ^{ab}	3.18 ^{abc}	3.15 ^{bc}	3.13 ^c	0.03
72	3.01 ^{ab}	3.13 ^{ab}	3.11 ^{ab}	2.36 ^b	2.93 ^{ab}	3.29 ^a	2.78 ^{ab}	0.46

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

본 연구에서 국내 자생 식물 추출물이 반추위 발효성상과 메탄발생에 미치는 영향을 종합해 보면 대부분의 처리구에서 메탄생성 억제 효과가 있는 것으로 생각되며, 특히 Mint와 Pine 처리구에서 반추위 발효에 영향을 덜 미치면서 메탄생성을 억제하는 효과가 더 큰 것으로 생각된다. 다만, 반추위 미생물이 식물추출물의 첨가에 대한 적응력이 큰 것으로 보아 단일 추출물 보다는 메탄 생성을 억제하는 여러 추출물을 혼합하여 첨가하는 연구가 필요한 것으로 생각된다.

IV. 요약

본 연구는 Terpenoid 함유 식물 추출물을 이용하여 *in vitro* 반추위 발효성상 및 메탄생성에 미치는 영향을 알아보고자 수행하였다. 반추위액은 티머시(timothy)와 농후사료를 6:4의 비율로 급여한 반추위 cannula가 시술된 한우 암소에서 채취하였다. 본 실험에 사용한 식물 추출물은 박하(Mint), 소나무(Pine), 삼나무(Japan cedar), 초피나무(Sichuan pepper), 편백(Hinoki cypress) 그리고 해송(Japanese black pine)을 사용하였으며, 반추위액과 McDougall buffer를 1:2의 비율로 혼합한 배양액을 0.3g 티머시와 식물 추출물(기질의 5%)이 담긴 50ml serum bottle에 혐기상태로 15ml를 분주하였다. Serum bottle은 39°C, 150rpm으로 3, 6, 9, 12, 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. 실험 결과 pH 값은 점점 감소하였으며, 전 배양시간에 걸쳐 대조구보다 유의적($p < 0.05$)으로 높았다. 건물 소화율은 배양 3시간대는 Mint 처리구만 유의적($p < 0.05$)으로 높았으나, 이후 24시간까지 모든 처리구에서 유의성이 없었다. 총 가스 발생량은 전 처리구에서 유의적($p < 0.05$)으로 낮았으며, 이산화탄소 발생량은 배양 12시간대까지 감소하였으나, 그 이후는 유의적 차이가 없었다. 메탄 발생량의 경우 24시간대에 대조구에 비해 모든 첨가구에서 유의적($p < 0.05$)으로 감소하였다. 미생물 성장량은 첨가구에 따라 각각 다른 양상을 나타냈으나 24시간대는 모든 처리구에서 유의적($p < 0.05$)으로 성장량이 감소하였다. 암모니아 측정량은 배양 12시간부터 첨가구에서 증가하는 경향을 보였으나 72시간대는 감소하였다. acetic acid 및 propionic acid도 대조구보다 유의적($p < 0.05$)으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 본 실험에 사용한 Terpenoid 함유 식물 추출물 6종 모두 소화율에 영향을 미치지 않으며 메탄저감 효과를 나타내었다. 특히 Mint 및 Pine 추출물은 총 VFA, acetic acid 및 propionic acid의 생성을 증가시켰으며 상기의 결과를 종합하였을 때, 반추위 발효성상에 악영향을 미치지 않으며 메탄 발생을 저감하는 식물 추출물로는 Mint 및 Pine이 적합하다고 생각된다.

Reference

1. Agarwal, N., C. Shekhar, R. Kumar, L. C. Chaudhary, and D. N. Kamra. 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148: 321-327.
2. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis 16th edition. Association of official analytical chemists, Washington, D.C.
3. Argyle, J. L. and R. L. Baldwin. 1988. Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. *J. Dairy Sci.* 71: 1178-1188.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
5. Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. D. Carro, and C. Kamel. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 88: 4393-4404.
6. Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 90: 2580-2595.
7. Crane, A., W. O. Nelson, and R. E. Brown. 1957. Effects of D-limonene and α -D-pinene on *in vitro* carbohydrate dissimilation and methane formation by rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 40: 1317-1323.
8. Craig, W. J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(3): 491-499.
9. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem.* 8: 130.
10. Chaves, A. V., M. L. He, W. Z. Yang, A. N. Hristov, T. A. McAllister, and C. Benchaar. 2008. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Can. J. Anim. Sci.* 89: 97-104.
11. Davidson, P. M. and A. S. Naidu, 2000. Phyto-phenols. In *Natural Food Antimicrobial Systems* (Naidu, A. S. ed). CRC Press. pp. 265-293.
12. Dijkstra, J., H. D. Neal, C. St., D. E. Beaver, and J. France. 1992. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. *J. Nutr.* 122: 2239-2256.
13. Dorman, H. J. D. and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
14. Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11: 1-6.

15. Gershenzon, J. and R. Croteau. 1991. Terpenoids. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites* (Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R., eds). Academic Press, pp. 165-219.
16. Greenhouse Gas Inventory and Research center of Korea. 2005.
17. Griffin, S. G., S. G. Wyllie, J. L. Markham, and D. N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* 14: 322-332.
18. Ha, J. K., S. S. Lee, Y. S. Moon, and C. H. Kim. 2005. *Ruminant nutrition and physiology*. Seoul National University press. p. 255.
19. Hart, K. J., D. R. Yanez-ruiz, S. M. Duval, N. R. McEwan, and C. J. Newbold. 2008. Plant extract to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 8-35.
20. Hwang, H. S., J. U. Ok, S. J. Lee, G. M. Chu, K. H. Kim, Y. K. Oh, S. S. Lee, and S. S. Lee. 2012. Effects of Halogen compounds on *in vitro* Fermentation Characteristics in the Rumen and Methane Emissions. *Kor. J. life sci.* 22(9): 1187-1193.
21. IPCC. 1992. Intergovernmental panel on climate change. *Climate Change 1992. The supplementary report to the IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, New York.
22. IPCC (Intergovernmental panel on climate change). 2007. *IPCC Fourth Assessment Report*.
23. Irmgard Immig. 1996. The rumen and Hindgut as source of ruminant methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment*. 42: 57-72.
24. Joblin, K. N. 1999. Ruminant acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1307-1313.
25. Kamel, C., H. M. R. Greathead, M. L. Tejido, M. J. Ranilla, and M. D. Carro. 2008. Effects of allicin and diallyl disulfide on *in vitro* rumen fermentation of a mixed diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145(1): 351-363.
26. Kamra D. N., N. Agarwal, and L. C. Chaudhary. 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 351-363.
27. Kim, H. J. and H. S. Chun. 1999. Biological Functions of Organosulfur Compounds in Allium Vegetables. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 28(6): 1412-1423.
28. Kongmun, P., M. Wanapat, P. Pakdee, and C. Navanukraw. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Livest. Sci.* 127: 38-44.
29. Lee, S. Y. and J. K. Ha. 2009. Mitigation strategies for enteric methane emission. *Proceedings of 2009 Annual Congress of KSAST, KOREA.* 1: 103-121.
30. McCullough, M. E. 1973. Optimum feeding of dairy animals for meat and milk. *Univ. of*

Georgia, Athens.

31. Martin, S. A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 3123-3132.
32. McDougall, E. I. 1948. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43: 99.
33. McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5011-5014.
34. Nugent, J. H. A. and J. L. Mangan. 1981. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction I (18S) leaf protein from lucern (*Medicago sativa* L.). *Br. J. Nutr.* 46: 39-58.
35. Patra, A. K., D. N. Kamra, and N. Agarwal. 2006. Effects of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in *in vitro* gas production test. *Int. Cong. Ser.* 1293: 176-179.
36. Patra, A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. van Leeuwen.* 96: 363-375.
37. SAS., 1996. SAS User Guide. Release 6.12 Edition. SAS Inst. Inc. Cary NC. USA.
38. Sikkema, J., J. A. M. Bont, and B. Poolman. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 8022-8028.
39. Soliva, C. R., S. Widmer, and M. Kreuzer. 2008. Ruminal fermentation of mixed diets supplemented with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) flowers and pine (*Pinus mugo*) oil or mixtures containing these preparations. *J. Anim. Feed Sci.* 17: 352-362.
40. Son, J. O. and B. H. Hwang. 1990. Terpenoid Analysis of the Main Softwoods Essential Oil. *J. Kor. For. En.* 10(2): 84-96.
41. Song, H. P., S. L. Shim, I. S. Jung, D. H. Kim, and K. S. Kim. 2009. Analysis of volatile organosulfur compounds in korean allium species. *Korean J. Food Preserv.* 16(6): 929-937.
42. Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
43. Tyler S. C. 1991. The global methane budget. In *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethane* (J. E. Rogers and W. B. Whitman, eds). American Society of Microbiology, pp. 7-38.
44. Ultee, A., E. P. Kets, and E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4606-4610.
45. Wallace, J. R., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Trferredegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15(10):

1371-1522.

46. Wenk, C. 2003. Herb and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16: 282-289.
47. Yang, W. Z., C. Benchaar, B. N. Ametaj, A. V. Chaves, M. L. He, and T. A. McAllister. 2007. Effect of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 90: 5671-5681.
48. Zhang, C. M., Y. Q. Guoa, Z. P. Yuan, Y. M. Wu, J. K. Wang, J. X. Liu, and W. Y. Zhuh. 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 146: 259-269.