

# 백하수오 추출물이 *In vitro* 반추위 발효성상 및 메탄가스 생성에 미치는 영향

양승학<sup>1</sup> · 임정수<sup>1</sup> · 김 별<sup>1</sup> · 황옥화<sup>1</sup> · 조성백<sup>1</sup> · 최동윤<sup>1</sup> · 최석근<sup>2</sup> · 황성구<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원, <sup>2</sup>국립한경대학교

## Effects of *Cynanchum Wilfordii* Extract on *In vitro* Ruminant Fermentation Characteristics and Methane Production

Seung-Hak Yang<sup>1</sup>, Jung-Soo Lim<sup>1</sup>, Byul Kim<sup>1</sup>, Ok-Hwa Hwang<sup>1</sup>, Sung-Back Cho<sup>1</sup>, Dong-Yoon Choi<sup>1</sup>, Seok-Geun Choi<sup>2</sup>, Seong-Gu Hwang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, R.D.A., Suwon, 441-706, Rep. of Korea,

<sup>2</sup>Hankyong National University, Anseong City, 456-749, Rep. of Korea

### ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the effects of *Cynanchum wilfordii* (CW) on cell viability, anti-oxidant activity, volatile fatty acid (VFA) production and methane gas production. Collected rumen fluid incubated with CW powder (1% w/v) for 12 and 24 hours were analyzed for pH, VFAs and methane. Alamar blue assay showed no significant difference on the viability of 3T3-L1 and C2C12 cells treated with CW for 24 hours. TBARS data showed a dose dependent increase on the antioxidant activity of CW. VFAs increased in the CW-treated groups compared to the control group. In addition, propionate increased more than other VFAs by the treatment with CW. There was a significant decrease in methane gas production in batch culture treated with CW in 12hrs. In conclusion, it was suggested that *Cynanchum wilfordii* could manipulate rumen fermentation considered by increasing VFA production and inhibition of methanogenesis.

**(Key words :** Rumen fermentation, *Cynanchum wilfordii*, VFA, Methanogenesis)

### 서 론

가축의 메탄가스 발생은 환경오염의 원인 중 하나로 고려되고 있으며, 이 메탄가스를 줄이기 위한 다양한 방법을 모색하고 있다 (Yang et al., 2011). 2010년 국가온실가스 인벤토리 보고서 (NIR, 2013)에 의하면 CH<sub>4</sub> 배출원인 장내발효와 가축분뇨처리 부문의

2010년의 배출량은 각각 4.1 백만ton CO<sub>2</sub>eq. 과 1.2 백만ton CO<sub>2</sub>eq. 으로서 1990년에 비해 34.5%와 49.5% 증가하였으며 원인은 육류소비 증가 추세에 따른 가축사육두수의 증가로 판단되었다. 하지만 가축은 우리에게 주요한 단백질을 제공해주는 매우 중요한 식량자원 중 하나이다. 그러므로 현재 우리는 식량난의 문제와 악화되고 있는 환경문제를 동시에 해

\*Corresponding author : Seong-Gu Hwang, Division of Animal Life and Environmental Science, Hankyong National University, Anseong City, 456-749, Rep. of Korea. Tel: +82-31-670-5121, E-mail: sghwang@hknu.ac.kr

2013년 11월 30일 투고, 2013년 12월 16일 심사완료, 2013년 12월 19일 게재확정

결해야 하는 상황에 있으며 2000년도 이후부터 세계 각국은 기후 변화에 따른 생태계 변화의 심각성을 인지하고 새로운 국제협약과 이행을 위한 기술력 개발을 서두르고 있다.

다수의 반추동물의 장내 발효 조절 연구가 수행되어 할로젠화합물, 생균제 등의 첨가에 의해 *in vitro* 반추위 메탄가스 발생이 감소되었으나, 국내사용이 불가능하거나 미생물 활성자체를 억제시켜 소화흡수율도 감소시키는 결과가 보고되었다 (Nevel et al., 1992; Van Frumholtz et al., 1989). 한편, 천연 추출물을 이용한 메탄저감 연구에서 사포닌, 탄닌 성분, 식물추출원액 (essential oil) 등이 *in vitro* 반추위 메탄생성 저감에 일부 효과가 있는 것이 보고되었으며, 그 중 식물유래 사포닌 추출물을 첨가했을 때 프로토토조아 수가 감소되었고 메탄가스 발생이 저감되었다고 보고하였다 (Blaxter, 1989; Carmean, 1991; Czerkawski et al., 1966; Machmüller et al., 2006; Ok et al., 2011; Patra et al., 2006; Yang et al., 2011). 이와 같이 다양한 기능을 가진 천연추출물의 탐색을 통해 반추위 발효 조절이 가능할 것으로 생각되며, 본 연구에서는 항균효과 등 생리활성기능으로 알려진 백하수오의 추출물을 이용하여 반추위 발효 정상 변화 및 메탄가스 생성조절에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 백하수오 추출물 준비

세포독성을 조사하기 위하여 중국산 백하수오를 구입하여 백하수오 샘플 무게의 10배의 물을 가한 후, 95~100℃, 6시간 동안 열수 추출하여 3000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 상등액을 얻은 다음 진공여과기를 이용하여 여과지 (No.4)로 거른 후 여액을 동결건조하여 실험에 이용하였다.

### 2. 세포배양

실험에 사용한 3T3-L1 마우스 지방전구세포와 C2C12 마우스 근섬유세포는 한국세포주은행에서 분양 받았으며, 90%의 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco BRL, USA)가 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

### 3. 반추위 *in vitro* 배양

반추위용액과 고형분이 (50:50) 잘 혼합되어 있는 반추위액 샘플은 두 개 장소의 낙농가로부터 아침 일찍 사료급여 전에 플라스틱에 채취하여 연구실로 운반해 온 후 잘 흔들어 섞은 뒤 치즈형걸이로 걸러 CO<sub>2</sub>를 충전한 후 39℃ 수조에서 사용 시까지 보관하였다. 백하수오를 통풍건조기를 이용하여 50℃에서 충분히 건조시켜 그라인더로 파쇄한 후 1 mm sieve로 걸러 얻어진 고운 파우더를 사료 내 1% 및 반추위용액 내 0.02%가 되도록 첨가하여 실험에 이용하였다. 백하수오 분말의 일반성분분석 결과는 조단백질 8.64%, 조지방 1.13%, 조섬유 3.87%, 조회분 2.10%로 나타났다. 160 ml 혈청병을 이용하여 티모시 등 조사료를 백하수오 첨가 또는 무첨가 반추위 용액 내에 첨가하여 (2:1 v/v) 기질로 이용하였다. 배양시간은 24시간 및 48시간 동안 실시하였다.

### 4. 조사항목 및 분석방법

#### (1) 백하수오 추출물의 세포독성 평가

백하수오의 세포생존능력을 확인하기 위하여 Alamar Blue (invitrogen Co, USA)를 실험하였으며, 3T3-L1 cell과 C2C12 cell을 각각 96well plate에 well당  $1 \times 10^4$  cells을 분주하였

다. 백하수오 추출물을 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였다. 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간과 24시간 동안 각각 배양한 후, Alamar Blue 시약을 처리하였으며, 시약을 처리 후, 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 뒤 ELISA reader기를 이용하여 570/600 nm로 흡광도를 측정하였다.

## (2) 백하수오의 항산화 기능 평가

지질과산화율을 측정하는 방법으로 과산화지표인 Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)는 ZeptoMetrix의 Assay Kit를 이용하여 Ohkawa 등 (1979)이 기술한 방법으로 Thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 물질을 추출하여 측정 하였다. 혈장 0.2 ml에 8.1% sodiumdodecyl sulfate와 20% acetic acid 1.5 ml를 가한 후 잘 섞고, 0.8% TBA 1.5 ml와 증류수 0.6 ml를 넣고 95°C에서 1시간 가열 후, 5분간 냉각하였고, 증류수 1 ml와 n-butanol/pyridine (15:1, v/v)과 5.0 ml의 증류수를 가하여 30초간 진탕하였다. 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 10분간 실온에서 안정시킨 후, 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## (3) 가스 발생량 분석

*In vitro* 배양액의 가스발생량은 압력변환기 LANA/CENA-USP (Piracicaba, SP Brazil)을 사용하여 Mauricio 등 (1999)의 방법에 따라 분석하였다. 160 ml 혈청병에 희석한 반추위 용액 75 ml를 취하고 백하수오 분말 0.5g을 넣은 후 고무마개로 밀봉하고 흔들어 준 뒤 39°C에 인큐베이터 넣고 매뉴얼에 따라 흔들어 주며 발생가스를 측정하였다.

## (4) 휘발성 지방산((Volatile Fatty Acid, VFA) 분석

*In vitro* 배양액의 휘발성 지방산 분석은

Erwin (1961) 방법에 준하여 분석하였다. 배양이 완료된 배양물을 10 ml 정도 취하여 거르기로 거른 후 여액 5 ml를 15 ml 원심튜브에 넣고 HgCl<sub>2</sub> 0.05 ml를 넣어 미생물작용을 정지시킨 후 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 ml를 첨가하여 미생물 단백질을 제거한 후 Internal standard로 Pivalic acid 0.2 ml를 넣은 후 잘 섞는다. 3000 rpm (4°C)에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 1 ml Eppendorf tube에 분주하여 -70°C에 보관하였으며 Gas Chromatography를 이용하여 분석하였다.

## (5) 메탄가스 발생량

메탄가스분석은 Shimadzu 2014 gas chromatography를 이용하여 분석하였으며 열전도 검출기를 이용하여 검출하였다. 메탄가스 분리는 ShinCarbon ST micro-packed column을 이용하여 분리하였다. 이때 이동상가스는 10 ml/min의 헬륨을 이용하였다. 검출기 및 칼럼 내 온도는 각각 250°C 및 60°C로 유지하였다. 최종 가스 발생량은 적정 농도구간 내에서 표준가스 농도의 면적에 따른 직선 회귀식을 작성하고 분석샘플 면적에 따른 농도를 구하였다.

## (6) 통계분석

실험데이터는 General Linear Model Procedure를 이용하여 ANOVA 분석법을 통해 분산분석을 실시하였으며 각 평균값에 대해서는 T-test (SAS, 2000)를 실시하여 유의성 (\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01)을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 백하수오의 세포 내 독성평가

Fig. 1에서는 지방전구 세포인 3T3-L1 cell과 근섬유 세포인 C2C12 cell을 이용하여 백하수오 추출물의 세포독성을 확인하였다. 처

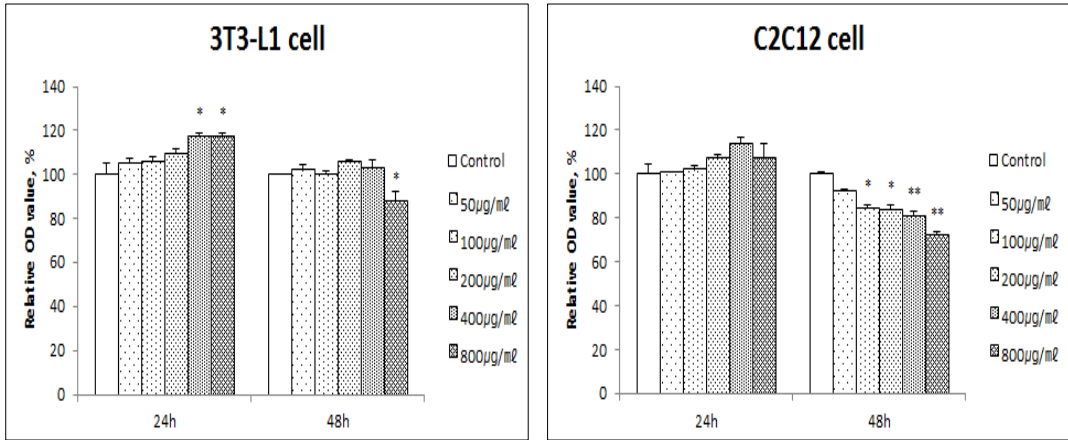


Fig. 1. The changes of the cell viability in the 3T3-L1 and C2C12 cells affected by *Cynanchum wilfordii* (CW).

\*p<0.05; \*\*p<0.01; compared within same incubation group.

리농도는 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml으로 실시하였으며, 처리 후 24시간 48시간에 따른 세포 독성을 조사하였다. 실험 결과 지방전구세포인 3T3-L1 cell 에서는 농도 및 시간에 따른 세포독성은 거의 나타나지 않았으나 800 µg/ml 처리 후 48시간이 경과하자 control에 비하여 감소하는 것을 확인하였다. 근섬유세포주인 C2C12 cell을 대상으로 한 결과에서는 처리 후 24시간 경과에서는 세포독성이 나타나지 않았으나 처리 후 48시간 군에서는 100 µg/ml에서부터 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 다른 식물유래추출물의 연구결과와 유사하게 백하수오의 일정수준 이상의 첨가가 세포의 활성을 억제할 수 있음을 보여주었다(Ok et al., 2006).

2. TBARS를 통한 백하수오의 항산화 효과

Fig. 2에서는 백하수오 추출물이 항산화 효과를 확인한 결과로 실험결과 TBARS inhibition 능력이 농도에 따라 증가하는 경향이 나타났다.

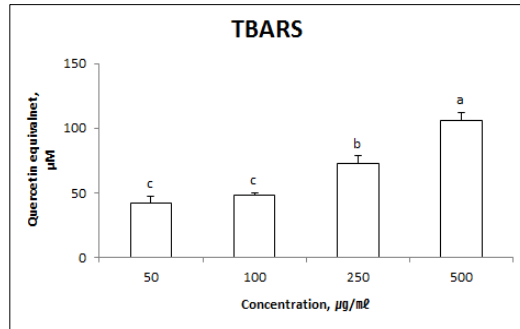


Fig. 2. The changes of the antioxidant activity (uM) by *Cynanchum wilfordii* (CW) with different concentration.

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts in the same column of each group are significantly different (p<0.05).

3. 백하수오 추출물 첨가에 의한 *In vitro* 배양의 pH 및 총 가스발생량

Table 1에서는 미생물 활성에 따른 백하수오 추출물의 반추위 내 대사활성에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 본 실험결과 12시간, 24시간 배양결과 백하수오 분말에 의한 pH의 변화에 있어 유의적인 차이가 없었다. pH의 변화 및 총 가스발생량은 발효속도와

Table 1. The changes of the pH and total gas production (ml) by *Cynanchum wilfordii* (CW) in the ruminal incubation.

Incubation time (h)	Control		CW	
	pH	Total gas production	pH	Total gas production
0	7.48 ± 0.02	—	7.40 ± 4.96	—
12	7.27 ± 0.01	633.33 ± 65.65	7.28 ± 0.05	731.00 ± 85.73
24	6.9 ± 0.01	445.33 ± 4.37	6.9 ± 0.01	517.00 ± 14.15

관련이 있다고 했는데 (Yang et al., 2011), 백하수오 분말첨가에 있어서 총 가스발생량이 증가하는 경향을 보였으나 반추위 발효과정에 유의적으로 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

Table 2에서는 미생물 배양시간에 따른 백하수오 추출물의 메탄가스 감소량을 확인하였다. 실험결과로부터 백하수오의 12시간 처리구에서 메탄가스 발생량이 약 21% 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 백하수오의 24시간 처리구에서는 감소했던 메탄가스량이 다시 증가하였는데 이는 총 휘발성 지방산 생산량의 증가와 관련이 있을 것으로 생각되는데 24시간 배양결과에서 acetate의 증가폭이 propionate보다 컸으며 propionate가 아닌 acetate 생성과정에서 발생하는 수소가 메탄 생성에 기여했을 것으로 판단된다.

Table 2. The changes of the methane gas production (ml) by *Cynanchum wilfordii* (CW) in the ruminal incubation.

Incubation time (h)	Control	CW
12 <sup>†</sup>	20.21±2.09 <sup>a</sup>	15.86±1.67 <sup>b</sup>
24 <sup>†</sup>	42.94±1.75 <sup>b</sup>	51.51±2.18 <sup>a</sup>

<sup>†</sup> Effect of *Cynanchum wilfordii* (CW) on methane gas production during incubation time.

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts in the same row of each group are significantly different (p<0.05).

#### 4. 암모니아태 질소 발생량

Table 3에서는 미생물 활성화에 따른 백하수오 추출물의 반추위내 대사활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 암모니아태 질소를 측정하였다. 본 실험결과 12시간과 24시간 배양에서 시험구간 유의적인 차이가 없었다. Nugent와 Mangan (1981)은 단백질원 분해산물인 암모니아는 박테리아와 프로토조아에 의해 발생이 조절되며, 주로 작용을 하는 것은 박테리아라고 보고했다. 한편 Monensin을 급여한 시험에서 반추위내의 단백질의 분해가 감소되었고 암모니아 농도가 낮아졌다고 했으며, *in vitro* 배양시험에서도 monensin의 첨가시 암모니아태 질소의 양이 줄었다고 했다 (Van nevel and Demeyer, 1977; Whetstone et al., 1981). 본 시험의 결과로부터 백하수오 추출물이 박테리아와 프로토조아의 반추위 발효 모두에 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

Table 3. The changes of the NH<sub>3</sub>-N (ppm) by *Cynanchum wilfordii* (CW) in the ruminal incubation.

Incubation time (h)	Control	CW
0	4.60 ± 0.01	
12	7.48 ± 0.22	7.94 ± 1.05
24	10.09 ± 0.90	11.27 ± 0.00

Table 4. The changes of the volatile fatty acid (mM) by *Cynanchum wilfordii* (CW) in the ruminal incubation.

VFA(mM)	Incubation time (h)	Control	백하수오 분말
Acetate	0	22.07	
	12	32.28	33.12
	24	54.42	58.12
Propionate	0	14.67	
	12	20.19	25.50
	24	25.38	31.16
iso-butylate	0	1.01	
	12	0.55	1.12
	24	1.10	1.76
Butylate	0	11.50	
	12	18.39	22.20
	24	23.20	28.18

### 5. 휘발성 지방산 분석

Table 4는 반추위 내 백하수오 추출물의 휘발성 지방산에 미치는 영향에 대해 분석한 결과이다. 배양시간을 0, 12, 24시간 그룹으로 지정하여 수행한 결과 배양시간이 길어질수록 대조군에 비해 백하수오 분말 처리구에서 acetate, propionate, iso-butylate, butylate의 농도가 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었다 ( $P>0.05$ ).

### 결 론

본 연구결과는 백하수오의 세포독성 확인 및 항산화 효과와 반추위내 휘발성 지방산 생성, 메탄가스 발생량, 단백질 대사 등 반추위발효에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 세포는 3T3-L1 세포와 C2C12에서 Alamar blue를 이용하여 독성을 확인하였으며, 반추위액을 백하수오 분말과 함께 혼합한 후 12시간 또는 24시간 *in vitro* 배양하였

다. 배양기간별 샘플링을 실시하여 pH, 휘발성 지방산 그리고 메탄가스 생성량을 측정하였다. 3T3-L1 cell 에서는 처리 후 48시간이 경과하자 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조구에 비하여 감소하는 것으로 나타났으며, 근섬유세포주인 C2C12 cell 에서는 처리 후 48시간 군에서는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 항산화 실험결과 TBARS 저해 능력이 농도에 따라 증가하는 경향을 보였다. *In vitro* 배양실험에서 pH 변화는 유의적인 차이가 없었으며 휘발성 지방산 생성은 백하수오 분말 처리구에서 증가하는 경향을 보였다. 또한 암모니아태 질소는 증가하는 경향을 보였다. 한편, 백하수오 분말의 12시간 처리구에서 메탄가스 발생량이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 이러한 결과들을 종합할 때 백하수오 분말의 첨가급여는 휘발성 지방산 생성량을 증가시키며 메탄가스 발생을 줄일 가능성이 제시되었다. 결론적으로 백하수오는 항산화기능을 가진 반추위 발효 조절제로서의 역할이 기대된다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제 번호: PJ907110)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인 용 문 헌

1. Blaxter, K.L., 1989. Energy Metabolism in Animals and Man. Cambridge University Press, New York. USA.
2. Carmean, B.R., 1991. Persistence of monensin effects on nutrient flux in steers. M.S. Thesis. Colorado State Univ., Fort Collins. USA.
3. Czerkawski, J.W., Blaxter, K.L., 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. Erwin, E.S., Marco, J., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44, 1768.
5. Frumholtz, P.P., Newbold, C.J., 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.
6. Goering, H., Van Soest, K., 1970. Forages fiber analysis. Agricultural hand book no. 379. Department of Agriculture, Washington D.C. USA.
7. Machmüller, A., 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. Agric. Ecosy. Environ. 112, 107-114.
8. Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim. Feed Sci. Tech. 79, 321-330.
9. National Inventory Report, 2013. Greenhouse Gas Inventory & Research Center of Korea.
10. Nugent, J.H.A., Mangan, J.L., 1981. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction I(18S) leaf protein from lucern (*Medicago sativa* L.). Br. J. Nutr. 46, 39-58.
11. Official Methods of Analysis, 1995. Association of official analytical chemistry (AOAC) INTERNATIONAL, 16th Ed. Washington, D.C., USA.
12. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351-358.
13. Ok, J.U., Lee, S.M., Lim, J.H., Lee, S.J., Moon, Y.H., Lee, S.S., 2006. Effects of Plant-origin Biological Active Materials on the Activities of Pathogenic Microbes and Rumen Microbes. J. Anim. Sci. & Technol. (Kor) 48, 709-718.
14. Ok, J.U., Baek, Y.Ch., Kim, K.H., Lee, S.Ch., Seol, Y.J., Lee, K.Y., Choi, Ch.W., Jeon, Ch.O., Lee, S.S., Lee, S.S., Oh, Y.K. 2011. Effects of Saponin Contained Plant Extracts on Ruminal Fermentation Characteristics and Methane Production. J. Anim. Sci. & Technol. (Kor) 53, 147-154.
15. Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., 2006. Effect of plant extract on *in vitro* mutagenesis, enzyme activity and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Anim. Feed Sci. Technol. 128, 276-291.

16. Van Nevel, C.J., 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.
17. Van Nevel, C.J., Demeyer, D.I., 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 34, 251-257.
18. Whetstone, H.D., David, C.L., Bryant, M.P., 1981. Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms *in vitro*. J. Anim. Sci. 53, 803-809.
19. Yang, S.H., Lee, S.Y., Cho, S.B., Park, K.H., Park, J.K., Choi, D.Y., Yoo, Y.H., 2011. The Effect of Vegetable Sources Supplementation on *in vitro* Ruminal Methane Gas Production. Korea Soc. Livestock Housing Environ. (Kor) 17, 171-180.