

천연 약용식물의 미생물 발효를 통한 장내 메탄 생성 억제 효과 비교 연구*

이아름*** · 박해령***** · 김미소*** · 조상범*** · ***** · 최낙진**

A Comparative Study between Microbial Fermentation and Non-Fermentation on Biological Activities of Medicinal Plants, with Emphasis on Enteric Methane Reduction

Lee, A-Leum · Park, Hae-Ryoung · Kim, Mi-So · Cho, Sangbuem · Choi, Nag-Jin

A study was conducted to improve the biological activity of two medicinal plants, *Eucommia ulmoides* Oliv. and *Glycyrrhiza uralensis*, by fermentation. The biological activity was assessed by determining antibacterial, antioxidant and antimethanogenic properties. Fermentation was achieved by adding the plant materials in MRS broth at 10% (w/v) and different starter cultures at 1% (v/v). Condition for fermentation were incubation temperature of 30°C and agitation at 150 rpm for 48 h. Six starter cultures, *Weissella confusa* NJ28 (Genbank accession number KJ914897), *Weissella cibaria* NJ33 (Genbank accession number KJ914898), *Lactobacillus curvatus* NJ40 (Genbank accession number KJ914899), *Lactobacillus brevis* NJ42 (Genbank accession number KJ914900), *Lactobacillus plantarum* NJ45 (Genbank accession number KJ914901) and *Lactobacillus sakei* NJ48 (Genbank accession number KJ914902) were used. Antibacterial activity was observed in *L. curvatus* NJ40 and *L. plantarum* NJ45 only as opposed to other treatments, including the non-fermented groups, which showed no antibacterial activity. Both plants showed antioxidant activity, although *E. ulmoides* Oliv. had lower activity than *G. uralensis*. However, fermentation by all strains significantly improved ($p < 0.05$), antioxidant activity in both plants compared to non-fermented treatment. Six treatments were based on antibacterial activity results, selected for *in vitro* rumen fermentation; 1)

* 본 연구는 농림수산식품기술기획평가원의 ‘반추동물의 탄소배출 저감형 사료첨가제 개발’에 의해 이루어진 것임.

** Corresponding author, 전북대학교 동물자원과학과(nagjin@jbnu.ac.kr)

*** 전북대학교 동물자원과학과

**** 건국대학교 동물자원연구센터

***** 농업기술실용화재단

non-fermented *E. ulmoides*, 2) fermented *E. ulmoides* NJ40, 3) fermented *E. ulmoides* NJ45, 4) non-fermented *G. uralensis*, 5) fermented *G. uralensis* NJ40, 6) fermented *G. uralensis* NJ45. A negative control was also added, making a total of 7 treatments for the *in vitro* experiment. Medicinal plant-based treatments significantly improved ($p < 0.05$) total volatile fatty acid (VFA) concentration. Significant methane reduction per mol of VFA were observed in *G. uralensis* ($p < 0.05$). Based on the present study, fermentation improves the biological activity of *E. ulmoides* Oliv. and *G. uralensis*. Fermented *G. uralensis* could also be applied as an enteric methane mitigating agent in ruminant animals.

Key words : *eucommia ulmoides oliv.*, *glycyrrhiza uralensis*, biological activity, enteric methane production

I. 서 론

메탄 저감은 전 세계적으로 관심을 갖는 중요한 분야이다. 최근 환경에 대한 관심이 증가함에 따라 공업뿐만 아니라 지속 가능한 산업인 농업에서의 메탄 저감에 많은 연구가 진행되고 있다. 농업분야에서 발생하는 비이산화탄소 온실가스(GHG, greenhouse gas)는 10~12%이며, 이 중 약 32%가 가축의 장내에서 유래하는 메탄가스인 것으로 알려져 있다(Smith, 2007). 메탄가스는 이산화탄소 대비 지구온난화에 미치는 영향력이 약 21배 높으며, 2030년까지 장내 메탄발생량은 약 60% 이상 증가할 것으로 전망하고 있다(IPCC, 2001; Bruinsma, 2003). 이에 따라 반추동물 메탄저감을 위해 화학물질 및 항생제를 이용한 여러 연구가 진행되었으나, 생산성 저하 및 축산물 잔류와 같은 문제가 대두됨에 따라 안전한 물질인 천연물에서 유래된 식물추출물이 각광을 받고 있다.

두충나무과에 속하는 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.)은 주로 한국, 일본 및 중국에서 자생하는 약용식물이다. 두충은 높은 항균활성을 가지며(Kim 등, 2013), 체내 항산화 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Kang 등, 2010). 다수 연구를 통해 두충 급여 시 한우의 육질을 개선한다거나 생산성이 증가하는 결과가 보고되었다(Kim 등, 2005).

콩과에 속하는 다년생 본초인 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 우수한 항산화능을 가지는 대표적 약용식물로 알려져 있으며(Sung, 2006), 여러 병원성 미생물에 대한 항균활성을 가지는 것으로 보고된 바 있다(Kim 등, 2006). 발효과정은 유용 미생물에 의해 이루어지는 것으로 약용식물이 가진 항균 및 항산화와 같은 생리활성을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Hong, 2011). 따라서 두충 및 감초는 가축 질병 예방 및 반추위 메탄 저감을 위한 약용식물 자원으로 활용될 수 있다.

이에 본 연구는 다양한 유산균을 이용하여 두충 및 감초를 발효시키고, 그 추출물을 이용하여 항산화활성, 항균활성 및 반추위 메탄저감효과를 조사함으로써, 이를 친환경약용식

물 반추가축사료첨가제로 개발하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 약용식물

실험에 사용된 약용식물인 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.) 및 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 전라북도 전주시 소재의 대형마트에서 구입하였다. 구입한 약용식물 2종은 열풍건조기를 이용하여 24시간 동안 60°C에서 건조하고, cutter miller(Philips, HR2860, Netherlands)를 이용하여 곱게 분쇄한 후에 사용하였다.

2. 균주

실험에 사용된 젓산균 6종으로는 *Weissella confusa* NJ28(Genbank accession number KJ914897), *Weissella cibaria* NJ33(Genbank accession number KJ914898), *Lactobacillus curvatus* NJ40(Genbank accession number KJ914899), *Lactobacillus brevis* NJ42(Genbank accession number KJ914900), *Lactobacillus plantarum* NJ45(Genbank accession number KJ914901) 및 *Lactobacillus sakei* NJ48(Genbank accession number KJ914902)을 사용하였다. Man, Rogosa, and Sharpe broth(MRS, Difco Laboratories, USA)를 균주배양을 위한 배지로 사용하였다.

3. 발효조건

발효를 위한 종균은 30°C 진탕배양기에서 150 rpm의 속도로 교반하며 24시간 동안 배양하였다. 두충 및 감초를 포함하는 본 배양용 배지는 분쇄된 두충 및 감초 분말 3 g을 30 mL의 MRS 액상배지에 첨가한 후에 멸균하여(121°C, 15 min) 준비하였다. 멸균이 완료된 본 배양용 배지에 미리 준비해둔 종균을 1% (v/v) 비율로 접종하였고, 30°C 진탕 배양기에서 150 rpm의 속도로 교반하며 48시간 동안 배양하였다.

4. 추출물 제조

배양이 완료된 배양액은 aluminum dish에 옮긴 후, 60°C의 열풍건조기에서 24시간 동안 건조하였다. 건조가 완료된 배양액은 막자 사발을 이용하여 분쇄하였다. 추출은 분쇄된 시료 1 g과 99.9% 에탄올 20 mL를 혼합하여 20시간 동안 추출하였다. 이후 추출물은 여과지

(Whatman No.1)로 여과하고, 진공감압농축기(N-1110, EYELA, Japan)를 이용하여 완전히 농축한 후에 2 mL의 99.9% 에탄올에 용해하였다. 준비된 약용식물 추출물은 실험 사용 전까지 -20°C 에서 보관하였다.

5. 생균수 측정

접종된 균주들의 성장효율 평가를 위해 발효 종료 후 생균수측정을 실시하였다. 생균수 측정은 연속 희석법과 평판 도말법을 이용하였다. 멸균된 0.8%(w/v) NaCl을 이용하여 희석하였으며, MRS 평판 배지를 이용하여 평판 도말 하였다. 균주 희석액을 도말한 MRS 평판 배지는 30°C 에서 20시간 이상 배양하였고, 배양 후 배지에 형성된 colony 개수를 계수하였다. 생균수 농도는 Log_{10} (CFU/mL)로 환산하여 표기하였다.

6. 항균활성 측정

항균활성은 준비된 약용식물 추출물을 이용하여 평가하였다. 실험에 사용한 병원균은 *Staphylococcus aureus*(wild type), *Listeria monocytogenes* KACC0550, *Salmonella gallinarum* ATCC9184 및 *Mannheimia haemolytica*(wild type)로 구성하였다. 항균활성은 중층배지를 이용한 생육저지환 측정법을 이용하였으며, 실험 방법은 다음과 같다. 4종의 병원균들은 LB (Difco, USA) 액체배지를 이용하여 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 멸균된 0.8% water agar 10 mL에 배양된 병원균을 1%(v/v) 비율로 혼합한 후에 LB(Difco, USA) 평판배지에 도포한 후 충분히 말려주었다. 직경 8 mm의 paper disk에 약용식물 추출물 100 μL 를 주입하고 상온에서 약 30분 정도 용매를 휘발하였다. 이후 paper disk를 준비된 병원균 함유 중층배지에 올려놓고, 37°C 항온항습기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 중층배지에 형성된 생육저지환의 지름을 측정하여 항균활성을 평가하였다.

7. 항산화활성 측정

약용식물 추출물의 항산화활성은 Juan과 Chou(2010)에 준하여 수행하였으며, DPPH(2, 2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl, Sigma, USA)를 이용하여 자유기 소거능을 평가하였다.

8. TLC-DPPH screening assay

약용식물 추출물의 TLC-DPPH screening assay는 Masoko와 Eloff(2008)에 준하여 수행하였으며, TLC silica gel F254(Silica gel 60 F254, Merck)를 이용하였다. 전개용매는 3가지 수준

의 ethyl acetate/methanol/water(EMW, 40:5.4:5, for polar/neutral), chloroform/ethyl acetate/formic acid(CEF, 5:4:1, for intermediate polarity/acidic) 및 benzene/ethanol/ammonium hydroxide(BEA, 90:10:1, for non-polar/basic)를 사용하였다. 전개 완료 후 TLC plate를 충분히 건조하고, 0.2% DPPH 용액(w/v, in methanol)을 고르게 분사하여 각각의 분획을 관찰하였다.

9. *In vitro* 반추위 발효시험

1) 공시축 및 사양관리

전라북도 진안 소재의 전북 축산 위생 연구소 한우 시험장에서 반추위 캐놀라 장착 한우 거세우(체중 400 kg ± 30 kg) 2두를 이용하였다. 공시축은 하루에 2회 오전(08:00)과 오후(17:30)에 볏짚 4 kg과 비육전기 배합사료 4 kg을 급여하였다.

2) 반추위액 준비

당일오전 사료급여 30분전 반추위에 장착된 캐놀라를 이용하여 반추위액을 채취하였고, 4겹의 cheese cloth로 여과 후 O₂-free CO₂가 충전된 2 L thermal flask로 옮겨 혐기 조건을 유지하여 실험실로 운반하였다. 잔여 사료입자를 제거하기 위해 반추위액을 8겹의 cheese cloth로 다시 여과하고 McDougall's buffer(Mcdougall, 1948)와 반추위액을 4:1로 혼합한 후 rumen inoculum으로 사용하였다.

3) 시료준비

기질로 사용된 오차드그라스는 2 mm sieve가 장착된 실험실용 분쇄기(Cutter mill, IKA MF10.1, Staufen, Germany)를 이용하여 분쇄하였다. 시험 설계는 대조구와 두충 및 감초추출물을 첨가한 처리구로 구성하고 24시간 동안 각각 3반복하였으며, Tilley와 Terry(1963)의 방법에 따라 수행하였다.

4) 분석항목 및 분석방법

총 가스 생성량은 실험용 유리주사기를 이용하여 배양병 내 가스 생성량을 측정하였다. 수소 및 메탄 생성량은 미리 포집해 둔 가스를 이용하여 CarboxenTM, fused silica capillary column(0.53 mm i.d. × 30 m length, SUPELCO, USA)이 장착된 gas chromatograph(HP7890, Agilent, CA, USA)로 분석하였고, oven, inlet 및 TCD 온도는 각 100°C, 150°C 및 150°C 였다. 반추위 발효 pH는 발효가 종료된 배양병을 개봉하여 pH meter(S20 Seven EasyTM, Mettler-Toledo)로 측정하였다. Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 따라 반추위액의 암모니아태 질소 함량을 평가하였다. 반추위액 배양액을 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 사료입자가 제거된 상등액 20 uL에 phenol color reagent 1 mL와 alkali-hypochlorite reagent 1 mL을 완전히

혼합하고, 50°C에서 7분간 반응 후 분광광도계(Optizen UV2120, Mecasis, Korea)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 휘발성지방산은 Erwin 등(1961)의 방법에 준하여, 사료 입자가 제거된 반추위액의 상등액 1 mL에 metaphosphoric acid 200 uL를 첨가하고 30분 동안 정치하여 13,000 rpm에서 원심분리하고 2 mL syringe filter를 이용하여 여과한다. 전 처리과정을 거친 시료를 Nukol™, fused silica capillary column(0.25 mm i.d. × 0.25 um film × 30 m length, SUPELCO, USA)이 장착된 gas chromatograph(HP7890, Agilent, CA, USA)로 분석하였고, oven, injector 및 detector 온도는 각 180°C, 220°C 및 200°C였다.

10. 통계분석

본 연구는 SPSS program(version 18, IBM, NY, USA)의 General Linear Model(GLM)에 따라 처리하였다. 각 시험구간 유의성검증은 일반선형모형으로 분산분석을 실시한 후, 사후 분석으로 Duncan's multiple range test를 하였다. 통계적 유의성은 5%의 유의수준으로 평가하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

접종된 균주의 성장효율 평가를 위해 실시한 생균수 측정 결과는 Fig. 1A, 1B에서 보는 바와 같다. *W. confusa* NJ28, *W. cibaria* NJ33 및 *L. sakei* NJ48을 제외한 나머지 젖산균들은 두층과 감초를 포함한 배지에서 안정적인 성장을 보이는 것으로 조사되었다. 두층이 포함

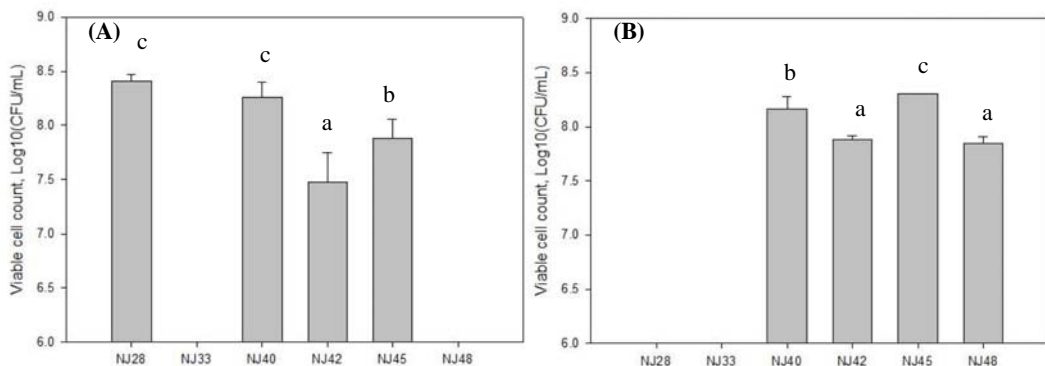


Fig. 1. Cell viability of starter culture strains in MRS broth containing 10% (w/v) *Eucommia ulmoides* Oliv. (A) and *Glycyrrhiza uralensis* (B).

In treatments, NJ28, *W. confusa* NJ28; NJ33, *W. cibaria* NJ33; NJ40, *L. curvatus* NJ40; NJ42, *L. brevis* NJ42; NJ45, *L. plantarum* NJ45 and NJ48, *L. sakei* NJ48 were inoculated, respectively

된 배지에서는 *W. confusa* NJ28 및 *L. curvatus* NJ40에서 유의적으로 높은 균주 성장률을 나타내었다($p < 0.05$). *W. confusa*는 주로 Greek salami, Mexican pozol 및 Malaysian chili bo와 같은 다양한 식품에서 발견되며(Nam 등, 2002), *Weissella* 종은 주로 김치 발효에서 흔히 검출되는 균주로 김치의 산도 조절에 높은 영향을 미칠 것으로 예상하는 균주이다(Lee 등, 2010). *L. curvatus*는 주로 식육발효제품에서 발견되는 균주이며(Aymerich 등, 2003), 내염성 균으로 다양한 환경에서 생육이 가능한 균주로 알려져 있다(Moon, 1993).

두층과 감초 추출물을 이용하여 평가된 항균활성 측정 결과는 Table 1과 같다. 각기 다른 6종의 접종균주를 이용하여 발효한 처리구들 중 *L. curvatus* NJ40 및 *L. plantarum* NJ45으로 발효한 처리구가 몇몇의 병원균을 제외한 나머지에서 항균활성을 나타내었다. 이와 대조적으로 균주를 접종하지 않고 발효한 두층과 감초 추출물에서 항균활성이 나타나지 않았다. 즉 *L. curvatus* NJ40 및 *L. plantarum* NJ45으로 발효한 처리구의 항균활성이 발효과정을 통해 나타난 것으로 판단된다. Kim 등(2003)은 식물추출물의 발효과정을 통해 총 페놀함량 및 항산화활성이 증진된 결과를 확인하였으며, Ham(2014)은 종균 이용 식물 발효 시 식물의 특정 생리활성을 향상시킬 수 있다고 보고하였다.

Table 1. Antibacterial activity of ethanol extracts of fermented *Eucommia ulmoides* Oliv. and *Glycyrrhiza uralensis* using different starter culture strains

Medicinal plants	Pathogenic bacteria	Treatments ¹						
		Con	NJ28	NJ33	NJ40	NJ42	NJ45	NJ48
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Clear zone, mm							
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	9.39	ND	9.17	ND
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND	10.63	ND	ND	ND
	<i>Manheimia heamololytica</i>	ND	ND	ND	10.93	ND	ND	ND
	<i>Salmonella gallinarum</i>	ND	ND	ND	9.21	ND	9.06	ND
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	9.41	ND	9.61	ND
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>Manheimia heamololytica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>Salmonella gallinarum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹ Con, non-fermented; NJ28, *W. confusa*; NJ33, *W. cibaria*; NJ40, *L. curvatus*; NJ42, *L. brevis*; NJ45, *L. plantarum* and NJ48, *L. sakei*.

ND, not detected.

대조구와 처리구의 항산화활성 측정 결과는 Figure 2A, 2B에서 보는 바와 같다. 각 추출물들의 두층 추출물 첨가 시 항산화활성은 수치적으로 19%에서 30%로 다양하게 조사되었

으나, 각 처리구들간의 차이에 대한 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 이에 따라 종균을 이용한 두층의 식물 발효 시 항산화활성의 변화는 나타나지 않는 것으로 판단된다. Fig. 2B의 감초 추출물 첨가 시 항산화활성 결과로 보아 감초는 전체 처리구가 유의적으로 높은 항산화활성을 나타내는 것으로 조사되었다($p < 0.05$). 특히 대조구 대비 종균 발효가 된 전체 처리구가 높았으며, 이는 감초 발효 시 식물의 항산화활성이 개선된 것으로 예측해 볼 수 있다.

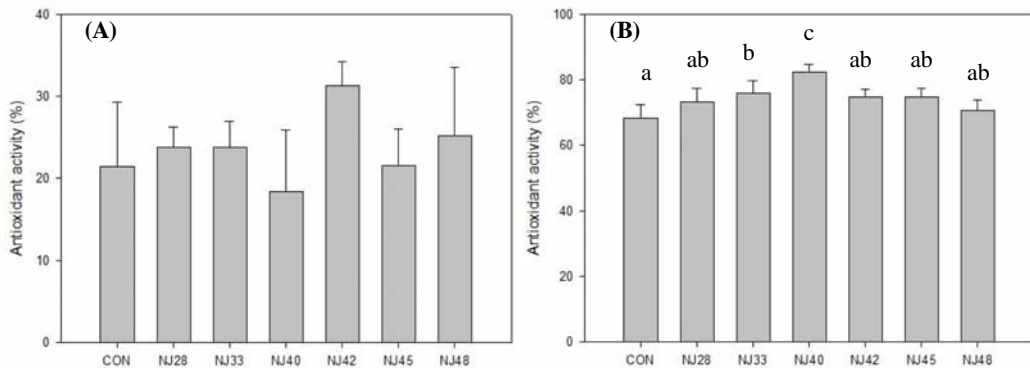


Fig. 2. Antioxidant activity of ethanol extracts of fermented *Eucommia ulmoides* Oliv. (A) and *Glycyrrhiza uralensis* (B) using different starter culture strains.

In treatments, CON, control; NJ28, *W. confusa* NJ28; NJ33, *W. cibaria* NJ33; NJ40, *L. curvatus* NJ40; NJ42, *L. brevis* NJ42; NJ45, *L. plantarum* NJ45 and NJ48, *L. sakei* NJ48 were inoculated, respectively

항산화 활성이 높게 조사된 감초의 특정 성분 확인을 위한 Thin layer chromatography (TLC) 결과는 Fig. 3과 같다. 본 실험에 사용된 3가지 수준의 전개용매를 이용하여 각 감초 추출물의 반응 생성물을 분리하고, DPPH 용액을 이용하여 항산화 활성을 띠는 물질을 확인하였다. Ethyl acetate/methanol/water 수준의 용매에서 감초추출물 중 *L. curvatus* NJ40으로 발효한 추출물이 Rf 0.19의 새로운 spot이 발견되었다. 이를 제외한 나머지 용매 수준에서는 차이점이 발견되지 않았다.

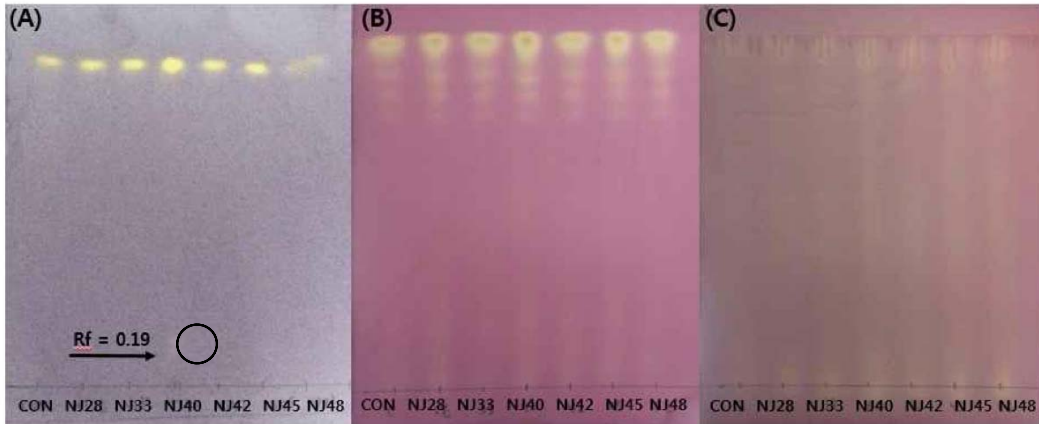


Fig. 3. Antioxidant activity of ethanol extract of fermented *Glycyrrhiza uralensis* constituents developed in ethyl acetate/methanol/water (A), chloroform/ethyl acetate/formic acid (B), and benzene/ethanol/ammonium hydroxide (C) solvent compositions and reacted with 0.2% DPPH solutions. Bright spot indicated as the compound of antioxidant activity.

In treatments, *W. confusa* NJ28, *W. cibaria* NJ33, *L. curvatus* NJ40, *L. brevis* NJ42, *L. plantarum* NJ45 and *L. sakei* NJ48 were inoculated, respectively

두충과 감초 추출물이 *in vitro* 반추위 발효 성상에 미치는 효과는 Table 2와 같다. 반추위 *in vitro* 발효는 총 7개 시험구로 진행하였다. 아무것도 첨가하지 않은 시험구를 대조구(NC, negative control)로 하였고, 발효하지 않은 두충을 이용한 추출물을 처리구 1(EN, *E. ulmoides*), 각각 *L. curvatus* NJ40과 *L. plantarum* NJ45로 발효한 두충을 이용한 추출물을 첨가한 처리구를 처리구 2(ENJ40) 및 처리구 3(ENJ45)로 설정하였다. 또한 발효하지 않은 감초를 이용한 추출물을 처리구 4(GN, *G. uralensis*)로 하였으며, 각각 *L. curvatus* NJ40과 *L. plantarum* NJ45로 발효한 감초를 이용한 처리구를 처리구 5(GNJ40) 및 처리구 6(GNJ45)로 명명하였다. 배양시간 동안 반추위 발효 pH는 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 그러나 모든 시험구에서 측정된 반추위 pH 값은 수치적으로 반추위 발효 적정 범위인 5.80~7.20(Hiltner와 Dehority, 1983) 범위 내에 속하여 간접적으로 추출물의 첨가가 반추위 발효에 부의 영향을 미치지 않는 것으로 확인 할 수 있었다. 암모니아태 질소 생성량은 감초 추출물 첨가구에서 유의적으로 높게 나타났으며, 전반적으로 두충 추출물 첨가구에서 유의성 있게 낮았다 ($p < 0.05$). 일반적으로 반추위내 적정 암모니아태 질소 생성량은 최소 5.0 mg/100 mL에서 최대 29 mg/100 mL로 알려져 있는데(Stiles 등, 1970), 본 실험의 모든 시험구는 적정 수준에 있는 것으로 조사되었다. 암모니아태 질소는 반추동물에게 필수적인 요소로서, 단백질 대사효율 및 미생물 성장효율과 밀접한 관련이 있다(Smith, 2007). 암모니아태 질소가 증가한

것은 미생물의 암모니아태 질소 이용효율이 낮아졌다거나 반추위내 단백질 분해효율이 높아진 것으로 판단할 수 있다(Satter와 Slyter, 1974). 이는 미생물 성장 및 대사효율이 낮아진 것으로 예측해 볼 수 있으며, 총 휘발성지방산 생성량을 통해 입증할 수 있다.

Table 2. *In vitro* rumen fermentation parameters of ethanol extract of fermented *Eucommia ulmoides* Oliv. and *Glycyrrhiza uralensis* using different starter culture strains at 24 h

Contents	Treatments ¹							SEM ²
	Negative control	<i>E. ulmoides</i>	<i>E. ulmoides</i> NJ40	<i>E. ulmoides</i> NJ45	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i> NJ40	<i>G. uralensis</i> NJ45	
pH	6.60	6.63	6.64	6.62	6.62	6.61	6.62	0.004
NH ₃ -N, mg/dL	6.24 ^{ab}	5.86 ^a	5.86 ^a	6.61 ^b	7.16 ^c	7.52 ^c	7.15 ^c	0.145
Total VFA, mM	60.35 ^a	66.77 ^c	63.85 ^{abc}	65.78 ^{bc}	66.33 ^c	65.62 ^{bc}	61.57 ^{ab}	0.670
Acetate, mM	36.21 ^a	40.07 ^{bc}	38.84 ^{bc}	39.75 ^{bc}	40.95 ^c	39.86 ^{bc}	38.27 ^{ab}	0.398
Propionate, mM	12.76 ^{ab}	13.76 ^d	13.05 ^{abcd}	13.58 ^{cd}	13.49 ^{bcd}	12.86 ^{abc}	12.32 ^a	0.131
iso-Butyrate, mM	0.69 ^a	0.76 ^b	0.69 ^a	0.71 ^{ab}	0.70 ^{ab}	0.68 ^a	0.65 ^a	0.009
n-Butyrate, mM	7.83 ^{abc}	8.59 ^d	7.98 ^{abc}	8.29 ^{cd}	8.09 ^{bcd}	7.68 ^{ab}	7.49 ^a	0.093
iso-Valerate, mM	1.69	2.30	2.10	2.17	1.96	3.49	1.81	0.229
n-Valerate, mM	1.18 ^c	1.28 ^e	1.20 ^{cd}	1.27 ^{de}	1.14 ^{bc}	1.06 ^{ab}	1.03 ^a	0.022
A/P ratio	2.84 ^a	2.91 ^b	2.98 ^c	2.93 ^b	3.04 ^d	3.10 ^e	3.11 ^e	0.022
Total gas, mL	76.67 ^c	76.00 ^c	77.67 ^c	77.33 ^c	70.33 ^b	69.00 ^b	64.00 ^a	1.108
Hydrogen, mL	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.001
Methane, mL	6.84 ^b	7.25 ^{bc}	7.22 ^{bc}	7.87 ^c	6.05 ^a	6.55 ^{ab}	6.67 ^{ab}	0.148
Methane yield per VFA, mL/mM	0.11 ^{bc}	0.11 ^{bc}	0.11 ^{bc}	0.12 ^c	0.09 ^a	0.10 ^{ab}	0.11 ^{bc}	0.003

¹ Negative control, no additive; *E. ulmoides*, *E. ulmoides* only; *E. ulmoides* NJ40, *L. curvatus* as starter culture strain; *E. ulmoides* NJ45, *L. plantarum* as starter culture strain; *G. uralensis*, *G. uralensis* only fermented; *G. uralensis* NJ40, *L. curvatus* as starter culture strain; *G. uralensis* NJ45, *L. plantarum* as starter culture strain.

² Standard error of the mean.

a, b, c, d, e Different superscript in same row means significantly different (p<0.05).

본 연구에서는 총 휘발성지방산 생성량이 NC에 비하여 전체 처리구에서 유의적으로 높게 조사되었으며(p<0.05), 발효와 미생물 단백질 합성간의 관계가 항상 일정하지 않은 것으로

로 판단되었다. 또한 총 휘발성지방산은 반추위내 발효를 평가하는 주된 지표로서, 안정적인 발효가 이루어졌을 때 높은 생성량을 나타내는데, 본 실험결과 두층과 감초 추출물의 첨가가 안정적인 반추위 발효에 기여한 것으로 판단된다. 섬유질 사료의 분해에 의해 생성되는 acetate는 총 휘발성지방산과 비슷한 수준으로 나타났으며, NC에 비해 식물추출물 첨가구들에서 높았고 특히 GN에서 유의적으로 가장 높게 조사되었다($p < 0.05$). Propionate는 GNJ45에서 유의적으로 낮게 나타났지만 이를 제외한 나머지 식물추출물 첨가구가 NC에 비해 높았다($p < 0.05$). A/P ratio는 전체 시험구가 2:1 이상으로 조사되었다. 미생물 발효에 의해 생성되는 총 가스 생성량은 NC 및 두층 추출물 첨가구에서 유의적으로 높았으며, 전반적으로 감초 추출물 첨가구에서 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 수소 생성량은 전체적으로 통계적 유의차가 없었다. 메탄 생성량은 감초 추출물 첨가구에서 전반적으로 낮았으며, 두층 추출물 첨가구가 유의적으로 높은 생성량을 나타내었다($p < 0.05$). 메탄 생성량을 총 휘발성지방산 생성량 대비 환산하여 비교한 결과, NC와 두층 추출물 첨가구는 비슷한 수준으로 나타났으며, 감초 추출물 첨가구 중 GN 및 GNJ40에서 유의적으로 낮은 메탄 생성 효율을 나타내는 것으로 조사되었다($p < 0.05$).

IV. 요약

본 연구는 반추위 메탄저감용 약용식물 첨가제 개발을 위해 유산균을 이용하여 발효한 두층 및 감초 추출물의 항균활성, 항산화활성 및 *in vitro* 반추위 발효시험을 실시하였다. 발효 약용식물 추출물 제조를 위해 집중된 종균의 성장효율을 조사하기 위해 실시한 생균수 측정 결과 *L. curvatus* NJ40, *L. brevis* NJ42 및 *L. plantarum* NJ45가 두층과 감초 모두에서 유의적으로 높은 균주 성장을 나타냈다($p < 0.05$). 항균활성측정 결과는 두층과 감초 추출물에서 공통적으로 *L. curvatus* NJ40 및 *L. plantarum* NJ45로 발효한 추출물이 일부 병원균에 대한 항균효과를 나타내는 것으로 조사되었다. *In vitro* 반추위 발효시험에서 두층 및 감초 발효 추출물을 적용한 결과, 감초 추출물에서 메탄 저감효과가 나타났다. 특히 반추위내 미생물 발효 특성을 대표할 수 있는 휘발성지방산 생성효율을 향상 시키면서, 전반적 반추위 발효에 부정적 영향이 없는 것으로 나타났다.

[논문접수일 : 2014. 11. 5. 논문수정일 : 2014. 11. 7. 최종논문접수일 : 2014. 11. 7.]

Reference

1. Aymerich, T., B. Martin, M. Garriga, and M. Hugas. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4583-4594.
2. Bruinsma, J. 2003. *World agriculture: Towards 2015/2030: An FAO perspective*. Rome: Earthscan.
3. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 130-132.
4. Erwin, E., G. Marco, and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy. Sci.* 44: 1768-1771.
5. Ham, Y. J. 2014. A study for the fermentation of medicinal plant to develop natural skin cosmetics. Ph.D. Thesis. Konkuk University. Seoul.
6. Hiltner, P. and B. Dehority. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 642-648.
7. Hong, K. P. 2011. Optimum conditions for production of fermented grapefruit extract using *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. *J. East Asian Soc. Dietary. Life.* 21: 661-668.
8. IBM SPSS. 2009. *IBM SPSS statistics base 18*. Chicago. IL: SPSS Inc.
9. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2001. *Climate change 2001: The scientific basis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
10. Juan, M. Y. and C. C. Chou. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbial.* 27: 586-591.
11. Kang, S. Y., M. H. Lee, Y. H. Ko, S. H. Sohn, Y. S. Moon, and I. S. Jang. 2010. Effect of dietary supplementation of *Acanthopanax senticosus* and *Eucommia ulmoides* on antioxidant defense system in Laying hens. *Korean J. Poult. Sci.* 37: 15-21.
12. Kim, H. W., H. J. Shin, D. B. Hwang, J. E. Lee, M. C. Park, J. H. Kim, and D. U. Kim. 2013. Antimicrobial activity and safety test of mixed plant extracts including *Phellodendron amurense* and *Eucommia ulmoides* Oliv. *Korean Chem. Eng. Res.* 51: 536-539.
13. Kim, J. H., Y. M. Kim, M. D. Lee, J. H. Shin, and Y. D. Ko. 2005. Effects of feeding *Eucommia ulmoides* leaves substituted for rice straw on growth performance, carcass characteristics and fatty acid composition of muscle tissues of Hanwoo steers. *J. Anim. Sci & Technol.* 47: 963-974.
14. Kim, N. M., J. W. Lee, J. H. Do, and J. W. Yang. 2003. Effects of the fermentation periods

- on the qualities and fuctionalities of the fermentation broth of wild vegetables. Korean. J. Food Sci. Technol. 35: 272-279.
15. Kim, S. J., J. Y. Shin, Y. M. Park, K. M. Chung, J. H. Lee, and D. H. Kweon. 2006. Investigation of antimicrobial activity and stability of ethanol extracts of Liorice root (*Glycyrrhiza glabra*). Korean J. Food Sci. Technol. 38: 241-248.
 16. Lee, K. W., J. Y. Park, J. Y. Chun, N. S. Han, and J. H. Kim. 2010. Importance of *Weissella* species during Kimchi fermentation and future works. Kor. J. Microbial. Biotechnol. 38: 341-348.
 17. Masoko, P. and J. Eloff. 2008. Screening of twenty-four south african combretum and six terminalia species (combretaceae) for antioxidant activities. Afr. J. Trad. CAM. 4: 231-239.
 18. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43: 99-109.
 19. Moon, Y. D. 1993. Studies on microbiological and physicochemical properties of fermented sausages manufactured with *Lactobacillus curvatus* K12-3. Ph.D. Thesis. Kunkuk University. Seoul.
 20. Nam, H. R., M. S. Ha, O. Bae, and Y. H. Lee. 2002. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. Appl. Environ. Microbial. 68: 4642-4645.
 21. Satter, L. and L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Brit. J. Nutr. 32: 199-208.
 22. Smith, P., D. Martino, Z. Cai, D. Gwary, H. Janzen, P. Kumar, B. McCarl, S. Ogle, F. O'Mara, and C. Rice. 2007. Policy and technological constraints to implementation of greenhouse gas mitigation options in agriculture. Agric. Ecosyst. Environ. 118: 6-28.
 23. Stiles, D., E. Bartley, R. E. Meyer, C. Deyoe, and H. Pfost. 1970. Feed Processing. VII. Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (starea) on rumen metabolism in cattle and on urea toxicity. J. Dairy. Sci. 53: 1436-1447.
 24. Sung, K. C. 2006. A study on the pharmaceutical characteristics and analysis of Glycyrrhizin extract. J. of Korean Oil Chemists' Soc. 23: 215-222.
 25. Tilley, J. and R. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. British Grassland Soc. 18: 104-111.