

항균활성 천연물질을 이용한 반추위 메탄저감용 친환경 첨가제 개발*

이아름*** · 양진호*** · 조상범***.**** · 나종삼***** · 심관섭***** ·
김영훈*** · 배귀석***** · 장문백***** · 최빛나*** · 신수진*** · 최낙진**

Development of an Environmental Friend Additive Using Antibacterial Natural Product for Reducing Enteric Rumen Methane Emission

Lee, A-Leum · Yang, Jinho · Cho, Sang-Buem · Na, Chong-Sam ·
Shim, Kwan-Seob · Kim, Young-Hoon · Bae, Gui-Seck ·
Chang, Moon-Baek · Choi, Bitna · Shin, Su-Jin · Choi, Nag-Jin

The present study was conducted to investigate effective starter culture to improve biological activity of *Asarum sieboldii*. Antibacterial activity, antioxidant activity and reduction of enteric rumen methane production were used as criterions for biological activity. Ground *A. sieboldii* was added in MRS broth at 10% (w/v) and fermented by different starter cultures. *Weissella confusa* NJ28, *Weissella cibaria* NJ33, *Lactobacillus curvatus* NJ40, *Lactobacillus brevis* NJ42, *Lactobacillus plantarum* NJ45 and *Lactobacillus sakei* NJ48 were used for starter culture strains. Each starter culture was inoculated with 1% (v/v) ratio and fermentation was performed at 30°C with agitation (150 rpm) for 48 h. MRS broth for the control was employed without starter culture. Then the fermentation growth was dried and extracted using ethyl alcohol. The growth of starter culture was detected at NJ40, NJ42, NJ45 and NJ48. And the highest cell growth was found in NJ40. Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens*, *Mannheimia haemolytica* and *Salmon-*

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

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

*** 전북대학교 동물자원과학과

**** 건국대학교 동물자원연구센터

***** 전북대학교 동물생명공학과

***** 중앙대학교 생명자원공학과

ella gallinarum were observed in the extract fermented by NJ40 and NJ45. All treatments showed antioxidant activities, however, there were no significant differences ($p>0.05$). In *in vitro* rumen fermentation, negative control (NC) and positive control (PC) were assigned to without extract and with non-fermented *A. sieboldii* extract. Significant suppression of gas productions were detected in positive control and treatments compared to negative control ($p<0.05$). However, total volatile fatty acid production was not suppressed. Significant methane reduction per total volatile fatty acid productions were found in positive control and NJ45 treatment ($p<0.05$). The present study suggested a fermentation of *A. sieboldii* using NJ45 strain could improve its biological activity and make possible for its use in bio additive for enteric rumen methane mitigation without suppression of animal productivity.

Key words : *antibacterial activity, artificial chemical, asarum sieboldii, environmental friend additive, enteric methane production*

I. 서 론

항생제의 대체는 유기농업 실현에 있어 매우 중요한 숙제이다. 최근 환경에 대한 관심이 증가하고 있고, 환경오염을 저감시키며 축산물을 생산하는 기술도 유기농업의 중요한 분야이다. 지구에서 발생하는 비 이산화탄소온실가스(GHG, greenhouse gas)의 10~12%가 농업에서 유래되고 있으며, 이 중 약 32%가 가축의 장내에서 유래하는 메탄가스인 것으로 알려져 있다(Smith, 2007). 이러한 장내 메탄발생량은 2030년까지 60% 이상 증가할 것으로 전망되고 있다(Bruinsma, 2003). 따라서 적절한 방법을 통하여 장내에서 발생하는 메탄을 저감시키는 기술 개발이 필요하다. 그러나 반추동물의 장내 메탄저감은 가축의 생산성저하와 깊은 관련이 있어, 실제 농가에서는 메탄저감기술적용에 매우 소극적인 현실이다(Grainger and Beauchemin, 2011). 따라서 생산성에는 지장을 주지 않으며, 온실가스의 주된 원인인 메탄가스를 저감시키는 기술이 절실히 필요하다.

쥐방울덩굴과에 속하는 세신(*Asarum sieboldii*)은 주로 한국과 중국에서 자생하는 다년생 식물이다(Quang 등, 2012). 주로 해열, 진통 및 항 알레르기에 효과가 있어 오래 전부터 이용되어 온 주요한 전통한약재이다(Hashimoto 등, 1994; Quang 등, 2012). 여러 연구를 통해 세신의 높은 항균활성효과가 보고된 바 있다(Ji 등, 2007; Choi 등, 2009). 따라서 세신은 가축질병 예방 및 반추위 메탄 저감을 위한 유용한 식물자원으로 활용될 수 있다. 발효과정은 미생물에 의하여 일어나는 것으로 식물이 가진 생리활성을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Hong, 2011).

이에 본 연구는 다양한 유산균을 이용하여 세신을 발효시키고, 그 추출물을 이용하여 항산화활성, 항균활성 및 반추위 메탄저감효과를 조사함으로써 우수한 균주를 선발하고, 천연 유기농 첨가제로 개발하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 약용식물

실험에 사용된 약용식물 세신(*Asarum sieboldii*)은 전라북도 전주시 소재의 대형마트에서 구입하여 사용하였다. 구입한 세신은 60℃ 열풍건조기를 이용하여 24시간 동안 건조하고 cutter miller(Philips, HR2860, Netherlands)을 이용하여 곱게 분쇄한 후에 사용하였다.

2. 균주

실험에 사용된 젓산균으로 *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. 모든 균주들은 MRS(Difco, USA) 배지를 이용하여 배양하였다.

3. 발효조건

발효를 위한 종균은 30℃ 진탕 배양기에서 150rpm의 속도로 교반하며 24시간 동안 배양하였다. 세신을 포함하는 본 배양용 배지는 분쇄된 세신 분말 3g을 30mL의 MRS 액상배지에 첨가한 후에 멸균하여(121℃, 15min) 준비하였다. 멸균이 완료된 배지에 준비된 종균을 1%(v/v) 비율로 접종하였고, 30℃ 진탕 배양기에서 150rpm의 속도로 교반하며 48시간 동안 배양하였다.

4. 추출물제조

배양이 완료된 배양액은 aluminum dish를 이용하여 60℃의 건조기에서 24시간 동안 건조하였다. 건조 완료 후에 막자 사발을 이용하여 분쇄하였다. 추출은 분쇄된 시료 1g과 99.9% 에탄올 20mL를 혼합하여 150rpm의 속도로 교반하며 20시간 동안 추출하였다. 이후 추출물은 여과지(Whatman No.1)를 이용하여 여과한 후에 진공감압농축기(N-1110, EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 후에 다시 2mL의 99.9% 에탄올에 용해시켰다. 준비된 추출물은 실험에 사용되기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

5. 생균수측정

접종된 균주들의 성장효율은 발효종료 후 생균수측정을 통하여 평가하였다. 생균수측정은 연속희석과 평판 도말 방법을 이용하였다. 희석은 멸균된 0.8%(w/v) NaCl을 이용하였고, 평판 도말은 MRS 평판 배지를 이용하였다. 균주 희석액이 도말된 평판배지는 30°C에서 20시간 이상 배양하였고, 배양 후 평판에 형성된 colony 개수를 계수하였다. 생균수 농도는 Log₁₀(CFU/mL)으로 표기하였다.

6. 항균활성 측정

항균활성은 준비된 추출물을 이용하여 평가하였다. 실험에 사용된 병원균들로, *Staphylococcus aureus* (wild type), *Listeria monocytogens* KACC0550, *Salmonella gallinarum* ATCC9184 및 *Mannheimia haemolytica*(wild type) 등을 사용하였다. 항균활성은 중층배지를 이용한 생육 저지환 측정법을 사용하였고, 상세한 방법은 다음과 같다. 병원균들은 LB(Difco, USA) 배지를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 증균하였다. 배양된 병원균을 멸균된 0.8% water agar 10mL에 1%(v/v) 비율로 혼합한 후에 LB(Difco, USA) 평판배지에 도포한 후 충분히 말려주었다. 추출물 100uL를 직경 8mm의 paper disk에 주입한 후에 상온에서 약 30분 정도 용매의 휘발을 유도하였다. 이후 준비된 paper disk를 준비된 병원균 함유 중층배지에 올려놓고, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후에 중층배지에 형성된 생육저지환의 지름을 측정하여 항균활성을 평가하였다.

7. 항산화활성 측정

추출물의 항산화활성은 DPPH(2, 2-di (4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl, Sigma, USA)를 이용한 자유기 소거능 평가방법을 이용하여 측정하였고, 그 방법은 Juan과 Chou(2010)에 준하여 수행하였다.

8. *In vitro* 반추위 발효시험

1) 공시축 및 사양관리

전라북도 김제 소재의 축산 위생 연구소 한우 시험장에서 반추위 캐놀라가 장착된 한우 거세우(체중 400kg±30kg) 2두를 공시하였으며, 공시축은 하루에 2회 오전(08:00)과 오후(17:30)에 볏짚 4kg과 비육전기 배합사료 4kg을 급여하였다. 미네랄 블록 및 물은 자유섭취 하도록 하였다.

2) 시험설계 및 반추위액준비

반추위 *in vitro* 발효는 총 4개의 시험구로 진행하였다. 아무런 추출물을 첨가하지 않은 시험구를 대조구(NC, negative control)로 하였고, 발효하지 않은 세신을 이용한 추출물을 처리구 1(PC, positive control)로 하였다. 그리고 각각 *L. curvatus* NJ40과 *L. plantarum* NJ45로 발효한 세신추출물을 첨가한 시험구들을 처리구 2(NJ40) 및 처리구 3(NJ45)으로 설정하였다. 반추위액은 당일오전 사료급여 30분전 반추위에 장착된 캐놀라를 이용하여 채취하였고, 4겹의 cheese cloth로 여과 후 O₂-free CO₂가 충전된 2L flask에 산소의 침입을 차단하여 혐기 조건을 유지하였다. 잔여 사료입자를 제거하기 위해 실험실로 운반한 반추위액을 8겹의 cheese cloth로 다시 걸러낸 후 McDougall's buffer(McDougall, 1948)와 반추위액을 4:1로 혼합하여 rumen inoculum으로 사용하였다.

3) 시료준비

실험의 기질로 사용된 오차드그라스는 2mm sieve가 장착된 실험실용 분쇄기(Cutter mill, IKA MF10.1, Staufen, Germany)를 이용하여 분쇄하였다. 시험 설계는 대조구와 추출물을 첨가한 처리구로 구성하였고, 125mL serum bottle에 50mL의 rumen inoculum과 0.5g의 오차드그라스 및 사료대비 1%의 기질을 첨가하였다. 실험은 Tilley와 Terry(1963)의 방법에 따라 수행하였으며, 모든 실험은 3반복으로 구성하였다.

4) 분석항목 및 분석방법

배양시간 별 총 가스 생성량은 실험용 유리주사기를 이용하여 배양병 내 가스 생성량을 측정하였다. 측정이 완료된 가스는 수소 및 메탄 발생량 측정을 위해 rubber stopper가 장착된 aluminum pack에 포집하였다. 수소 및 메탄 생성량은 CarboxenTM, fused silica capillary column(0.53mm i.d.×30m length, SUPELCO, USA)가 장착된 gas chromatograph(HP7890, Agilent, CA, USA)로 분석하였고, oven, inlet 및 TCD 온도는 각 100°C, 150°C 및 150°C였다. 발효가 종료된 배양병을 개봉한 후 pH meter(S20 Seven EasyTM, Mettler-Toledo)를 이용하여 반추위액의 pH를 측정하였다. 반추위액의 암모니아태 질소함량은 Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 따라 진행되었으며, 4,000rpm으로 15분간 원심분리 하여 사료입자가 제거된 반추위액의 상등액 20μL에 phenol color reagent 1mL 및 alkali-hypochlorite reagent 1mL을 완전히 혼합하여 37°C에서 15분간 반응 후 분광광도계(Optizen UV2120, Mecasis, Korea)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 휘발성지방산은 Erwin 등(1961)의 방법에 따라 실시되었다. 사료입자가 제거된 반추위액의 상등액 1mL에 metaphosphoric acid 200μL를 첨가하여 30분 동안 정치하여 13,000rpm에서 원심분리 하는 전 처리과정을 거친 시료를 NukolTM, fused silica capillary column(0.25mm i.d.×0.25μm film×30m length, SUPELCO, USA)이 장착된 gas chromatograph(HP7890, Agilent, CA, USA)로 분석하였고, oven, injector 및 detector 온

도는 각 180°C, 220°C 및 200°C였다.

5) 통계분석

본 연구는 SPSS program(version 18, IBM, NY, USA)의 General Linear Model에 따라 처리되었다. 각 시험구간 유의성검증을 위해 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시한 후에 사후분석으로 Duncan's multiple range test를 하였다. 통계적 유의성은 5% 유의수준으로 평가하였다. 모든 통계분석은 SPSS program(version 18, IBM, NY, USA)을 이용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

접종된 균주들의 성장효율 평가를 위한 생균수 측정 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같다. *W. confusa* NJ28, *W. cibaria* NJ33을 제외한 나머지 발효 균주들은 세신을 포함하는 배지에서 잘 성장하는 것으로 조사되었다. 특히 *L. curvatus* NJ40에서 유의적으로 높은 균주 성장효율이 관찰되었다($p < 0.05$). *L. curvatus*는 젓산균으로 주로 소시지와 같은 식육발효식품에서 발견되는 균주이며(Aymerich 등, 2003), 높은 식염 농도에서 생육이 가능한 내염성균으로 여러 생육환경에서도 생육이 가능한 것으로 알려져 있다(Moon, 1993).

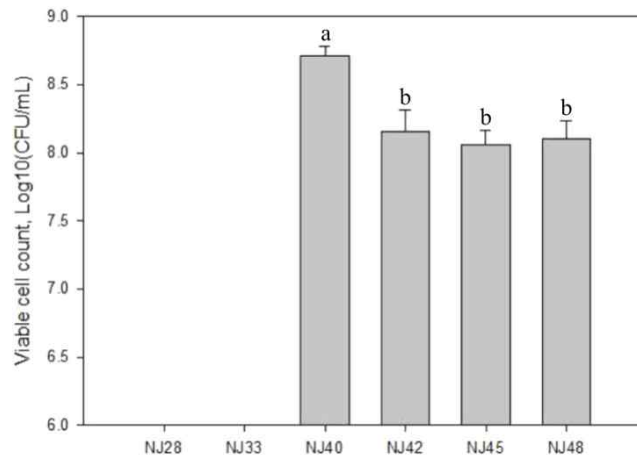


Fig. 1. Cell viability of stater culture strains in MRS broth containing 10%(w/v) *Asarum sieboldii*. In treatments, NJ28, *W. confusa* NJ28; NJ33, *W. cibaria* NJ33; NJ40, *L. curvatus* NJ40; NJ42, *L. brevis* NJ42; NJ45, *L. plantarum* NJ45 and NJ48, *L. sakei* NJ48 were inoculated, respectively

세신 추출물을 이용하여 평가된 항균활성측정 결과는 Table 1에서 보는 것과 같다. 총 6가지의 서로 다른 접종 균주를 사용한 처리구들 중에서 *L. curvatus* NJ40 및 *L. plantarum* NJ45에서 실험에 사용된 모든 병원균에 대해 높은 항균활성을 나타내었다. 균주를 접종하지 않고 세신을 배지에 혼합하여 배양시간 동안 동일한 조건으로 배양과정만 거친 후 추출한 대조구에서는 항균활성이 나타나지 않았다. 즉, *L. curvatus* NJ40과 *L. plantarum* NJ45에서 나타난 항균활성은 발효과정을 통하여 생성된 것으로 판단된다. Ham(2014)은 종균 발효 시 식물의 생물학적 활성을 향상시킬 수 있다고 하였으며, Kim 등(2003)은 발효를 통해 식물 추출물의 총 페놀함량 및 항산화활성이 증진된 결과를 보고한 바 있다. 또한 유산균 발효는 식물의 항산화활성을 증가시킴으로 식물의 이용성을 향상시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Hong, 2011).

Table 1. Antibacterial activity of ethanol extracts of fermented *Asarum sieboldii* using different starter culture strains

Pathogenic bacteria	Treatment ¹						
	Con	NJ28	NJ33	NJ40	NJ42	NJ45	NJ48
Clear zone, mm							
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	13.76	ND	12.64	ND
<i>Listeria monocytogens</i>	ND	ND	ND	12.37	ND	9.98	ND
<i>Manheimia heamoltyica</i>	ND	ND	ND	20.17	ND	16.95	ND
<i>Salmonella gallinarum</i>	ND	ND	ND	9.38	ND	8.99	ND

¹ Con, not fermented; NJ28, *W. confusa*; NJ33, *W. cibaria*; NJ40, *L. curvatus*; NJ42, *L. brevis*; NJ45, *L. plantarum* and NJ48, *L. sakei*.

ND, not detected.

대조구와 처리구들의 항산화활성 결과는 Fig. 2에서 보는 것과 같다. 각 추출물들의 항산화활성은 수치적으로 6%에서 16%로 다양하게 조사되었으나, 시험구들간의 차이에 대한 통계적 유의성은 발견되지 않았다($p>0.05$). 즉 세신은 발효를 통하여 항산화활성의 변화는 기대할 수 없는 것으로 판단되었다.

세신 추출물들이 *in vitro* 반추위 발효 성상에 미치는 효과는 Table 2에서 보는 것과 같다. 전 배양시간 동안 반추위 pH는 세신 추출물을 첨가한 처리구(PC, NJ40 및 NJ45)에 비해 대조구(NC)에서 유의적으로 낮게 조사되었다($p<0.05$). 그러나 모든 시험구에서 나타난 반추위 pH 측정값들은 반추위 발효 적정 범위인 5.80~7.20(Hiltner와 Dehority, 1983) 범위 내에 위치하여 반추위 발효에 추출물들이 부(-)의 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 반추위 암모니아태 질소 생성량은 대조구(NC)에서 유의성 있게 가장 낮게 나타났다($p<0.05$). 일

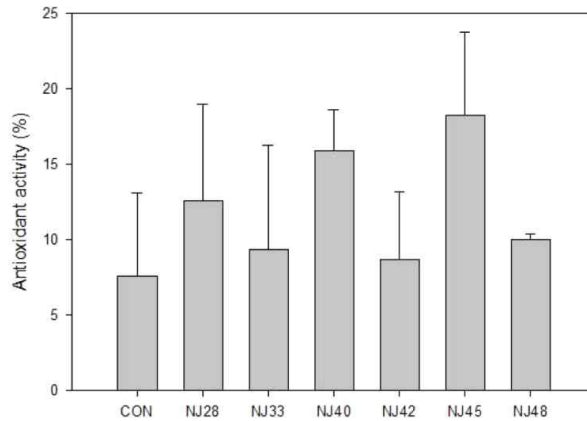


Fig. 2. Antioxidant activity of ethanol extracts of fermented *Asarum sieboldii* using different starter culture strains. In treatments, CON, control; NJ28, *W. confusa* NJ28; NJ33, *W. cibaria* NJ33; NJ40, *L. curvatus* NJ40; NJ42, *L. brevis* NJ42; NJ45, *L. plantarum* NJ45 and NJ48, *L. sakei* NJ48 were inoculated, respectively

반적으로 반추위내 암모니아태 질소의 적정 생성량은 최소 5.0~8.0mg/100mL에서 최대 29 mg/100mL로 알려져 있다(Stiles 등, 1970). 본 연구는 모든 시험구들에서 관측된 암모니아태 질소 농도들이 적정 수준에 있는 것으로 나타났다. 반추위내 암모니아태 질소는 단백질 대사효율 및 미생물 성장효율과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(smith, 2007). 대조구에 비하여 암모니아태 질소가 증가하였다는 것은, 미생물에 의한 암모니아태 질소 이용효율이 낮아졌거나, 반추위내 단백질 분해효율이 향상된 것으로 판단될 수 있다(Satter와 Slyter, 1974; Hristov와 Ropp, 2003). 미생물에 의한 질소 이용 효율이 낮아진 것은 미생물 성장 및 대사 효율이 낮아진 것과 같은 의미를 가지며 이러한 현상은 총 휘발성지방산 생성량을 통하여 입증할 수 있다. 본 연구에서는 총 휘발성지방산 함량이 대조구(NC)에 비하여 처리구에서 증가한 것으로 확인되어 반추위 미생물 활력 저하로 인한 암모니아 축적은 아닌 것으로 판단되었다. 또한 단백질 대사효율 증가는 측쇄 지방산 생성효율을 통하여 판단될 수 있다(Oltjen, 1969). 본 연구에서는 측쇄지방산인 butyrate 및 valerate의 합성량이 처리구들에서 모두 대조구보다 높게 나타남으로써 처리구의 높은 암모니아태 질소 생성량은 단백질 분해 효율 증가로 추측할 수 있었다. 따라서 실험에 사용된 세신 추출물의 첨가가 반추위 암모니아태 질소 생성량에 긍정적인 영향을 미친 것으로 판단된다. 반추위 발효를 평가하는 주된 요소 중 하나인 총 휘발성지방산은 대조구(NC)에 비해 세신 추출물을 첨가한 처리구에서 유의적으로 높은 생성량을 나타내었다($p < 0.05$). 일반적으로 총 휘발성지방산은 반추위내에서 안정적인 발효가 이루어졌을 때 높은 생성량을 나타내는데, 본 실험 결과 세신 추출물의 첨가가 안정적인 반추위 발효에 기여한 것으로 판단된다. 반추위내 acetate는 주

로 섬유질 사료의 분해에 의해 생성되는데, 그 생성량이 총 휘발성지방산과 비슷한 형태를 나타내었고, 대조구(NC)에 비해 처리구들 에서 유의적으로 높게 생성되었다($p < 0.05$). 반추위내에서 근내지방 합성원료로 이용되는 propionate는 대조구(NC)에 비해 처리구들에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 특히 PC에서 유의적으로 높게 조사되었으며, 대조구(NC)에서 가장 낮았다($p < 0.05$). A/P ratio의 경우 전체 처리구가 2:1 이상으로 조사되었다.

Table 2. *In vitro* rumen fermentation parameters of ethanol extract of fermented *Asarum sieboldii* using different starter culture strains at 24 h

Contents	Treatments ¹				
	Negative control	Positive control	NJ40	NJ45	SEM ²
pH	6.60 ^a	6.64 ^b	6.64 ^b	6.63 ^b	0.005
NH ₃ -N, mg/100 mL	6.24 ^a	7.66 ^b	7.84 ^b	7.44 ^b	0.207
Total VFA, mM	60.35 ^a	69.72 ^b	67.08 ^b	68.54 ^b	1.185
Acetate, mM	36.21 ^a	42.38 ^b	42.29 ^b	42.41 ^b	0.819
Propionate, mM	12.76 ^a	14.33 ^c	13.56 ^b	13.84 ^{bc}	0.196
iso-Butyrate, mM	0.69 ^a	0.78 ^b	0.73 ^a	0.73 ^a	0.012
n-Butyrate, mM	7.83 ^a	8.77 ^c	8.23 ^{ab}	8.34 ^{bc}	0.118
iso-Valerate, mM	1.69 ^a	2.20 ^c	2.08 ^b	2.05 ^b	0.060
n-Valerate, mM	1.18	1.25	1.18	1.18	0.012
A/P ratio	2.84 ^a	2.96 ^b	3.04 ^c	3.06 ^c	0.027
Total gas, mL	76.67 ^b	69.00 ^a	69.67 ^a	70.67 ^a	0.965
Hydrogen, mL	0.04 ^b	0.03 ^a	0.03 ^a	0.03 ^{ab}	0.001
Methane, mL	6.84	6.02	6.65	6.28	0.129
Methane yield per VFA, mL/mM	0.11 ^c	0.09 ^a	0.10 ^b	0.09 ^{ab}	0.003

¹ Negative control, no additive; Positive control, *A. sieboldii* only fermented; NJ40, *L. curvatus* NJ40 as starter culture strain; NJ45, *L. plantarum* NJ45 as starter culture strain.

² Standard error of the mean.

^{a, b, c, d} Different superscript in same row means significantly different ($p < 0.05$).

모든 휘발성지방산 조사결과에 의하면 세신 추출물을 첨가한 처리구들이 NC에 비해 전체적으로 높게 나타났다. 반추위내 미생물 발효에 의해 생성되는 총 가스 생성량은 세신 추출물을 첨가하지 않은 대조구(NC)에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 수소 생성량은 세신 추출물을 첨가하지 않은 대조구(NC)에서 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 생성량은

0.03에서 0.04mL로 전반적으로 낮게 조사되었다. 메탄 생성량은 통계적 유의차는 없었으나 ($p>0.05$), 수치적으로 대조구(NC)에 비해 처리구들에서 낮은 경향을 보였다. 메탄 생성량을 휘발성지방산 생성량 대비로 전환하여 비교한 결과, NC에서 유의적으로 높은 메탄 생성 효율을 나타내었다($p<0.05$). 처리구들 중에서는 PC에서 유의적으로 낮은 메탄 생성 효율을 나타내었다($p<0.05$).

IV. 요약

본 연구는 천연물질에서 유래한 반추위 메탄저감용 친환경 첨가제 개발을 위해 각기 다른 종균을 이용하여 발효한 세신 추출물의 항균활성, 항산화활성 및 *in vitro* 반추위 발효시험을 체계적으로 실시하였다. 접종된 균주들의 성장효율을 알아보기 위해 실시한 생균수측정 결과 *L. curvatus* NJ40 균주에서 유의적으로 높은 균주성장을 나타냈다($p<0.05$). 항균활성측정 결과는 대조구 대비 *L. curvatus* NJ40 및 *L. plantarum* NJ45 균주와 발효된 세신 추출물이 병원균에 대한 항균효과를 나타내는 것으로 조사되었다. *In vitro* 반추위 발효실험에 세신 및 발효 세신 추출물을 적용한 결과, 휘발성 지방산 생성량 대비 반추위 메탄 저감효과가 나타났다. 특히 반추위 미생물 활력 및 사료이용 효율을 대표할 수 있는 휘발성 지방산 생성효율에 대한 부정적 효과 없이, 오히려 휘발성지방산 생성효율을 향상시키면서 반추위 메탄 저감효과를 가져올 수 있는 것으로 나타났다.

[논문접수일 : 2014. 8. 13. 논문수정일 : 2014. 8. 18. 최종논문접수일 : 2014. 8. 21.]

References

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. Choi, J. H., M. H. Yu, E. Y. Hwang, and I. S. Lee. 2009. Effect of *Rosmarinus officinalis*

- L. fractions on antimicrobial activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and resistant genes regulation. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 38: 541-547.
5. 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.
 6. Grainger, C. and K. Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 166: 308-320.
 7. Ham, Y. J. 2014. A study for the fermentation of medicinal plant to develop natural skin cosmetics. Ph.D. Thesis. Konkuk University. Seoul.
 8. Hashimoto, K., T. Yanagisawa, Y. Okui, Y. Ikeya, M. Maruno, and T. Fujita. 1994. Studies on Anti-Allergic Components in the Roots of *Asiasarum sieboldi*. *Planta. Med.* 60: 124-127.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Hristov, A. and J. Ropp. 2003. Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 86: 2416-2427.
 12. Ji, Y. J., J. W. Lee, and I. S. Lee. 2007. Antimicrobial effect of medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Life. Sci.* 17: 412-419.
 13. 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.
 14. Kim, N. M., J. W. Lee, J. H. Do, and J. W. Yang. 2003. Effects of the fermentation periods on the qualities and functionalities of the fermentation broth of wild vegetables. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 35: 272-279.
 15. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43: 99-109.
 16. Moon, Y. D. 1993. Studies on microbiological and physicochemical properties of fermented sausages manufactured with *Lactobacillus curvatus* K12-3. Ph.D. Thesis. Konkuk University. Seoul.
 17. Oltjen, R. R. 1969. Effects of feeding ruminants non-protein nitrogen as the only nitrogen source. *J. Anim. Sci.* 28: 673-681.
 18. Quang, T. H., N. T. T. Ngan, C. V. Minh, P. V. Kiem, B. H. Tai, N. P. Thao, S. B. Song, and Y. H. Kim. 2012. Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary

- metabolites from the roots of *Asarum sieboldii*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22: 2527-2533.
19. Satter, L. and L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Brit. J. Nutr. 32: 199-208.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.