

엄나무 (*Kalopanax pictus* Nakai) 줄기 추출물이 *In vitro* 반추위 발효와 메탄저감에 미치는 영향

김재성¹ · 황문석² · 김용채² · 윤영만² · 배귀석³ · 김창현^{1*}

¹한경대학교 동물생명환경과학과, ²한경대학교 바이오가스연구센터,
³중앙대학교 동물자원공학과

The Effect of Castor Aralia (*Kalopanax pictus* Nakai) Trunk Extracts on Rumen Fermentation and Methane Reduction *In vitro*

Jae Seong Kim¹, Moon Seok Hwang², Yong Chae Kim², Young-Man Yoon²,
Gui Sek Bae³, Chang-Hyun Kim^{1*}

¹Department of Animal Life and Environment Science, Hankyong National University,
Anseong 17579, Korea,

²Biogas Research Center, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea,

³Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University, Anseong 17549, Korea

ABSTRACT

An experiment was conducted to examine the effects of *Kalopanax pictus* Nakai (*Kalopanax*) on *in vitro* rumen fermentation and methane (CH₄) reduction. *Kalopanax* trunk was extracted with 70% ethanol and 70% methanol. Rumen fluid, alfalfa hay and buffer (control: C) supplemented with 0.3% *Kalopanax* juice (T1), 0.3% ethanol extract (T2) and 0.3% methanol extract (T3) in the total volume of culture medium were incubated at 38°C for 24h and 48h. Rumen pH was lower in all *Kalopanax* treatments during all incubations than that in control (p<0.05). Total VFA and total gas production in T2 and T3 was significantly higher than that in C at 48h incubation (p<0.05). Ammonia-N was decreased in all treatments compared with C during the incubation periods (p<0.05). At 24h incubation, CH₄ contents were significantly reduced by both alcohol extracts. It is concluded that supplementing *Kalopanax* extracts can stimulate ruminal fermentation of rumen microorganisms and inhibit methanogenesis.

(Key words : *Kalopanax pictus*, Rumen, Extracts, Methane)

서 론 온도가 0.8°C까지 상승하였다 (NASA, 2005).
IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change,
온실가스에 의해 20세기 동안 지구의 평균 1994)는 이산화탄소 (CO₂), 메탄 (CH₄), 아산화

*Corresponding author : Kim, Chang-Hyun, Department of Animal Life and Environment Science, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea.

Tel: +82-31-670-5095, E-mail: kimch@hknu.ac.kr

2015년 6월 18일 투고, 2015년 7월 22일 심사완료, 2015년 7월 24일 게재확정

질소 (N₂O), 수소화불화탄소 (HFCS), 불화탄소 (PFCs), 불화유황 (SF₆) 등이 지구온난화와 같은 기후변화를 일으키는 6대 온실가스로 제시하였다. 특히 CH₄은 CO₂에 비해 생산되는 양은 적지만 지구온난화에 미치는 영향력이 23배 높기 때문에 CO₂ 다음으로 지구 온난화에 큰 영향을 미치는 원인으로 알려져 있다 (Steinfeld et al., 2006). 반추동물은 소화과정 중 반추위의 미생물 발효에 의해 섬유질 사료를 CH₄으로 전환시킴으로써 온실가스 발생에 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 반추동물의 반추위는 CH₄ 발생을 인위적으로 제어할 수 있는 가장 쉬운 영역이기 때문에 지구 온난화 방지를 위한 연구가 부각되고 있다. 따라서 반추위 내 CH₄ 발생을 최소화하면서도 동물의 생산성에 영향을 미치지 않거나 향상시킬 수 있고 추가적으로 지구환경을 보존하기 위한 연구가 요구되고 있다.

최근에는 천연물질에 관한 많은 연구가 국내·외에서 수행되고 있으며, 약리성분이 풍부하고 향미생물, 항산화성을 함유하고 있는 약용식물을 축산물 생산에 이용하려는 연구가 진행되고 있다 (Lee et al., 2010). 지금까지 보고된 여러 약용식물 중 오갈피과에 속하는 엄나무 (*Kalopanax pictus* Nakai)는 우리나라에서도 1속 1종 2변종이 자생하고 있으며, 널리 이용되고 있는 건강식품 중의 하나이다. 엄나무는 여러 종류의 saponin과 lignan 및 phenol성 항산화 물질 등이 보고되고 있다 (Shao et al., 1990; Porzel et al., 1992; Choi, 1997). Saponin은 현재까지 대략 90과 500속 이상의 식물에서 확인된 것으로 알려져 있으며, 이 중 엄나무에서 추출된 saponin을 kalosaponin (kalopanax + saponin)이라고 한다 (Lee et al., 2002).

반추동물의 반추위 발효를 개선하면서 CH₄을 감소하기 위한 친환경적 수단으로 식물체 내에 존재하는 2차적인 물질의 특성에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다. 다양한

식물로부터 유래하는 saponin 성분은 반추위 발효 특성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 반추위 내 미생물 단백질 합성량을 증가시키고, 사료의 이용성 및 미생물의 영양소 분해를 증가시킨다. 또한 protozoa의 수를 감소시켜 CH₄ 생성을 억제하고, 반추동물의 배설물 내 암모니아 함량을 감소한다고 하였다 (Makkar et al., 1988; Wang et al., 1998; Bae et al., 2003).

하지만, 민간이나 한방에서 구황식물 혹은 약용식물로 이용되고 있으며 우리나라 산야에서 쉽게 구할 수 있고, saponin 성분을 함유하고 있는 약용식물인 엄나무가 반추위 발효 및 CH₄ 생성에 미치는 영향에 대한 연구가 전무하다. 이러한 이유로 본 연구에서 엄나무 줄기로부터 saponin과 같은 유효성분을 추출하기 위해 추출 방법을 달리하여 그 추출물을 알팔파를 사료원으로 하는 *in vitro* 반추위 발효실험에 첨가하여 반추위 발효특성 및 CH₄ 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 반추위액의 채취

반추위액은 반추위 캐놀라 (cannula)가 시술된 홀스타인 (체중 500 kg)로부터 채취하였다. 공시동물은 조사료와 농후사료를 6:4의 비율로 일 2회 급여하였다. 그리고 물과 미네랄 블록은 자유로이 섭취하도록 하였다. 반추위액은 오전 사료 급여 1시간 전에 4겹의 cheese cloth로 여과 후 채취하였고, head space가 없도록 하여 배양병 (serum bottle) 내 산소의 침입을 차단하였다. 채취된 위액 배양병은 외부온도에 따른 변화를 최소화하기 위하여 보온병에 주입하여 신속하게 실험실로 이동하였고, 2겹의 cheese cloth를 이용하여 한 번 더 여과하여 사료입자를 최소화한 후 시험에 사용되었다.

2. 공시시료 및 추출물 제조

공시시료는 분쇄기 (hammer mill)에서 1.0 mm로 분쇄한 알팔파 건초를 기질로 이용하였고, 시험구에 사용된 였나무는 경기도 안성시 인근에서 채취하였다. 였나무 추출물은 생즙, 70% 에탄올, 70% 메탄올을 추출용매로 이용하였고 각각의 추출물은 다음과 같이 추출하였다. 믹서기로 분쇄한 였나무를 cheese cloth를 이용하여 생즙을 추출하였고, 용매추출은 1 cm 내외로 조각 낸 였나무 100 g에 추출용매 400 ml을 투입하였고, 38°C 진탕배양기 (HBS-201SL, Hanbaek, Korea)를 이용하여 100 rpm에서 48시간동안 추출한 후 여과지 (Whatman filter paper No. 1, Whatman, England)에 여과하였고, 다시 감압농축기 (R-205 Professional/V-501, Buchi, Switzerland)에서 10 ml가 남을 때까지 감압농축 하였다.

3. 시험방법

시험구는 추출물을 첨가하지 않은 처리구를 대조구로 하고, T1은 였나무 생즙 추출물을 첨가하였고, T2는 였나무 70% 에탄올 추출물을 첨가하였고, T3는 였나무 70% 메탄올 추출물을 첨가하였다.

시험방법은 기질인 분쇄된 알팔파 건초 0.3 g을 120 ml의 배양병에 투입하였다. 배양개시한 시간 전 McDougall's buffer (McDougall, 1948) 용액 (pH 6.8) (Table 1)을 CO₂로 bubbling 하고 반추위 미생물 접종제인 반추위액과 4:1로 혼합하여 배양직전부터는 질소가스로 배양액을 투입하는 동안 bubbling을 계속하였다. 기질이 들어있는 배양병에 각 처리구별 추출물을 총 배양액의 0.3% 첨가수준으로 넣고 McDougall's buffer와 혼합된 반추위액을 30 ml 주입하고 butyl 고무 마개로 입구를 막은 후 알루미늄 캡을 씌워 밀봉하여 혐기상태 유지와 발효가스의 유출을 방지하였다.

각 처리구별 배양병은 38°C 진탕배양기에서 24 및 48시간동안 배양하였다. 시험은 각 처리구 및 각 배양시간대별 3반복으로 진행되었다.

Table 1. The chemical composition of McDougall's 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 ml |

[†] 4% CaCl₂ solution : CaCl₂ 4g (/100 ml D.W.).

4. 조사항목

배양시간이 완료된 후 배양병을 진탕배양기에서 꺼낸 후, 온도에 따른 변화를 감안하여 실온에서 5분간 방치시킨 후 배양병의 headspace내 총 가스 발생량, CH₄ 농도와 배양액내 pH를 즉시 조사하였고 휘발성지방산 (VFA) 및 암모니아태질소 (NH₃-N) 농도의 분석은 배양액에서 시료 채취 후 조사하였다.

(1) 총 가스 발생량

발효가스 발생량 측정은 각 시간대별 모든 배양병을 꺼내어 약 5분간 실온에서 방치시킨 후 분리형 압력 변환기 및 디지털 판독의 전압계 (Laurel Electronics, Inc., CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

(2) 메탄 (CH₄) 농도 분석

메탄의 농도는 각 배양시간대별로 배양이 끝난 후 120 ml의 배양병의 마개에 주사바늘을 주입하여 주사기에 5 ml의 가스를 채집하였다. 메탄 농도의 분석은 TCD (Thermal Conductivity Detector)와 Hayesep-Q packed column (직경 3 mm, 길이 3 m, 80/100 mesh

size)을 장착한 가스크로마토그래피 (gas chromatography) (GC-14A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였으며, 6:4 비율의 CH₄과 CO₂를 표준가스로 사용하였다. 총운전시간은 3분이었고, 수송가스로는 argon을 이용하였다.

(3) pH 측정

배양액의 pH는 각 발효시간대별 (24, 48시간)로 pH meter (Gmbh8603, Mettler-Toledo, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

(4) 휘발성지방산 (Volatile Fatty Acid, VFA) 농도

휘발성지방산의 농도는 Erwin et al. (1961)의 방법으로 다음과 같이 분석을 실시하였다. 각 배양시간대별 pH 측정 후 배양액 1.0 ml를 microtube에 회수한 후 미생물 작용을 정지하기 위해 0.1 ml의 포화 HgCl₂ 용액과 25% HPO₃ 용액 0.2 ml를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 30분간 정치시켰다. 실온에서 정치시킨 배양액은 분석 전까지 -20℃의 냉동고에 보관하였다가 마이크로원심분리기 (microcentrifuge) (5415R, Eppendorf, Germany)를 이용하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 얻어진 상층액을 가스크로마토그래피 (GC-14A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 표준용액을 기준으로 분석하였다.

(5) 암모니아태 질소 (NH₃-N) 농도

배양액 내 NH₃-N 농도의 분석은 Chaney and Marbach (1962)의 방법으로 수행되었다. 암모니아 분석을 위한 전처리 과정은 우선 배양액에서 채취한 시료를 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 얻어진 상층액과 NH₃-N 표준용액 (5, 10, 25 NH₃-N/100 ml)을 각각 시험관에 주입 후, phenol color reagent와 alkali-hypochlorite를 1 ml씩 첨가하였다. 발색반응을 위해 37℃ 항온 수조에서 15분간 배양하여 반응을 시킨 후, 증류수를 8 ml 추

가하여 희석하였다. 이후 분광광도계 (spectrophotometer) (V-530, Jasco, Japan)를 이용하여 640 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하여 NH₃-N 농도를 계산하였다.

5. 통계분석

시간대별 (24, 48시간) 배양액을 이용한 처리간 3반복을 통해 얻어진 모든 결과들은 SAS (Statistical Analysis System, 2003) package의 GLM (General Linear Model) procedure를 이용하여 분산분석을 하였고, Duncan의 다중검정방법 (Duncan, 1995)으로 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. pH의 변화

알팔파 건초를 기질로 한 반추위 *in vitro* 배양시험에서 엄나무 추출물을 첨가하여 배양시간별 pH값을 측정한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 발효 초기부터 대조구에 비하여 T2와 T3는 급격하게 낮아졌으며, T1은 다른 처리구에 비하여 비교적 적지만 낮아진 것을 볼 수 있었다. 모든 처리구에서의 pH값은 배양시간 동안 처리에 관계없이 5.75~6.44 범위로 배양시간이 경과함에 따라 낮아졌으며, 처리구에 비해 대조구가 유의적 ($p < 0.05$)으로 높았다. 이러한 결과는 saponin 혹은 saponin 함유 식물 추출물의 첨가로 인하여 pH가 감소하였다는 연구 (Grobner et al, 1982; Lila et al, 2005)와 일치하였는데, 이는 반추위 미생물 발효산물인 VFA의 생성과 산생성이 증가하여 pH가 낮은 것으로 생각된다.

2. 휘발성지방산 생성량

반추위 *in vitro* 시험에서 엄나무 추출물을

Table 2. Changes in pH of *in vitro* rumen fermentation supplemented with *Kalopanax pictus* Nakai trunk extracts

| Incubation Time (h) | Treatment [†] | | | | SEM |
|---------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| | C | T1 | T2 | T3 | |
| 24 | 6.44 ^a | 6.31 ^b | 5.85 ^c | 5.90 ^c | 0.77 |
| 48 | 6.31 ^a | 6.21 ^b | 5.75 ^d | 5.79 ^c | 0.075 |

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

[†] C: control, T1: 0.3% *Kalopanax pictus* juice, T2: 0.3% *Kalopanax pictus* ethanol extract, and T3: 0.3% *Kalopanax pictus* methanol extract.

첨가하여 배양시간별 VFA 농도를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 총 VFA 농도는 배양 24시간 동안 대조구에 비하여 T2는 높았으나 ($p < 0.05$), T1과 T3는 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배양 48시간에서는 대조구보다 T2와 T3가 유의적으로 높은 발생량을 나타내었고 ($p < 0.05$), 배양 전시간 동안 에탄올을 이용하여 추출한 추출액을 첨가하였을 때 총 VFA 발생량이 가장 높았다. T2와 T3가 pH 값이 유의적으로 낮고 총 가스 발생량이 유의적으로 높아진 현상은 추출물 첨가제에 의해 반추위 혐기성 미생물 활성이 높아져 기질에 대한 발효속도의 증가로 VFA 발생량이 높아진 것으로 생각된다 (Ok et al., 2011).

반추위 *in vitro* 배양액 내 개별 VFA 농도 변화에서 acetate의 농도는 배양 24시간에는 대조구에 비해 모든 처리구가 유의적인 차이가 없었으나, T2가 T1 보다 높았으며 ($p < 0.05$), 배양 48시간에는 대조구에 비해 T2와 T3가 높았으며 ($p < 0.05$), T1은 유의적인 차이를 보이지 않았다. Propionate의 경우 배양 24시간에는 대조구에 비해 T2와 T3가 높았으며, 배양 48시간에는 모든 처리구에서 대조구보다 유의적으로 높은 발생량을 나타내었다 ($p < 0.05$). Butyrate의 경우는 전 배양시간 동안 대조구에 비해 T2와 T3가 높았으며 ($p < 0.05$), T1은 유의적으로 낮았다. Iso-butyrate는 전 배양시간 동안 대조구에 비해 모든 처리구에서 유의적으로 낮았으며 ($p <$

0.05), valerate 경우는 배양 24시간에는 T2를 제외한 전 처리구에서 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았고, 배양 48시간에는 대조구에 비해 T2와 T3가 높았으며, T1은 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). Iso-valerate의 경우는 배양 전 시간 동안 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 낮은 발생량을 나타내었다 ($p < 0.05$). Acetate : Propionate (A:P)의 비율은 대조구와 비교하여 처리구에서 모두 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$).

반추위 *in vitro* 배양시 옴나무 추출물의 첨가는 반추위 미생물의 활성을 증가시켜 발효속도를 증가시킴으로써 VFA의 발생량을 증가시킨 것으로 생각된다. Sarsaponin을 첨가하여 실험한 Lila et al. (2003)과 tea saponin을 첨가하여 실험한 Guo et al. (2008)에 의하면 saponin의 첨가로 미생물 활성의 증가에 따른 기질 이용성의 증가로 총 VFA의 농도가 증가하였다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 특히, A:P비에서 모든 옴나무 추출물의 첨가에 따라 propionate가 증가한 것과 단백질 유래 VFA인 ios-butyrate와 iso-valerate가 감소한 것으로 보아 saponin에 의한 반추위내 protozoa의 성장이 억제되어 bacteria의 합성량을 증가시킴으로써 미생물에 의한 반추위내 발효조건의 증진된 것으로 생각된다 (Makkar et al. 1988; Ok et al., 2011).

Table 3. VFA (mmol/L) production of *in vitro* rumen fermentation supplemented with *Kalopanax pictus* Nakai trunk extracts

| Incubation Time (h) | Item | Treatment [†] | | | | SEM |
|---------------------|----------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------|
| | | C | T1 | T2 | T3 | |
| 24 | Total VFA | 79.05 ^b | 77.36 ^b | 97.16 ^a | 86.97 ^{ab} | 2.772 |
| | Acetate | 50.35 ^{ab} | 48.21 ^b | 55.58 ^a | 50.29 ^{ab} | 1.219 |
| | Propionate | 15.40 ^c | 17.55 ^c | 26.64 ^a | 23.56 ^b | 1.406 |
| | Butyrate | 8.44 ^c | 7.22 ^d | 11.41 ^a | 9.97 ^b | 0.501 |
| | Iso-butyrate | 1.12 ^a | 0.93 ^b | 0.56 ^c | 0.53 ^c | 0.076 |
| | Valerate | 1.52 ^b | 1.45 ^b | 1.76 ^a | 1.59 ^b | 0.042 |
| | Iso-valerate | 2.23 ^a | 1.99 ^b | 1.19 ^c | 1.00 ^c | 0.158 |
| | Acetate : Propionate | 3.26 ^a | 2.75 ^b | 2.08 ^c | 2.13 ^c | 0.146 |
| 48 | Total VFA | 81.52 ^c | 79.24 ^c | 101.3 ^a | 97.42 ^b | 2.933 |
| | Acetate | 50.22 ^b | 49.07 ^b | 57.05 ^a | 56.05 ^a | 1.082 |
| | Propionate | 15.82 ^d | 17.99 ^c | 27.70 ^a | 26.01 ^b | 1.531 |
| | Butyrate | 9.26 ^c | 7.25 ^d | 12.39 ^a | 11.16 ^b | 0.591 |
| | Iso-butyrate | 1.43 ^a | 1.05 ^b | 0.66 ^d | 0.73 ^c | 0.092 |
| | Valerate | 1.78 ^b | 1.54 ^c | 1.98 ^a | 1.92 ^a | 0.052 |
| | Iso-valerate | 3.00 ^a | 2.33 ^b | 1.51 ^c | 1.54 ^c | 0.187 |
| | Acetate : Propionate | 3.17 ^a | 2.73 ^b | 2.06 ^d | 2.15 ^c | 0.136 |

^{a-d} Means with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05)

[†] C: control, T1: 0.3% *Kalopanax pictus* juice, T2: 0.3% *Kalopanax pictus* ethanol extract and T3: 0.3% *Kalopanax pictus* methanol extract.

3. 암모니아태 질소 (NH₃-N) 농도

엄나무 추출물을 첨가하여 배양시간별 NH₃-N 생성량을 측정한 *in vitro* 반추위 배양시험의 결과는 Table 4와 같다. 배양 전시간 동안 대조구에 비하여 모든 처리구에서 낮게 나타났

다 (p<0.05). 배양 24시간에는 T1과 T3에서 가장 낮았으며, 배양 48시간에 들어서는 전 처리구에서 낮은 발생량을 나타내었다 (p<0.05). 이는 saponin의 첨가로 반추위 NH₃-N 농도의 감소는 protozoa가 총 반추위 질소의 약 10~40%를 생성하는데 (Van soest, 1994),

Table 4. NH₃-N (ml/dL) production of *in vitro* rumen fermentation supplemented with *Kalopanax pictus* Nakai trunk extracts

| Incubation Time (h) | Treatment [†] | | | | SEM |
|---------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| | C | T1 | T2 | T3 | |
| 24 | 16.66 ^a | 13.38 ^c | 14.91 ^b | 13.34 ^c | 0.093 |
| 48 | 25.97 ^a | 19.27 ^b | 20.53 ^b | 20.31 ^b | 0.210 |

^{a-c} Means with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05).

[†] C: control, T1: 0.3% *Kalopanax pictus* juice, T2: 0.3% *Kalopanax pictus* ethanol extract, and T3: 0.3% *Kalopanax pictus* methanol extract.

이러한 반추위 protozoa의 수가 감소하였기 때문인 것으로 생각되며 결국 옴나무 추출물의 급여에 의해 사료 단백질의 손실량을 감소시켜 반추동물의 단백질 이용율을 증가시킬 수 있다고 생각된다.

4. 총 가스 및 CH₄ 발생량

옴나무 추출물을 첨가하여 *in vitro* 배양시 간별 총 가스 및 CH₄ 발생량을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 총 가스 발생량의 경우, 배양 24시간부터 대조구에 비해 처리구에서 유의적으로 높았으며, 다른 처리구에 비해 T2의 가스 발생량이 가장 높았다 ($p < 0.05$). 배양 48시간에는 대조구와 비교하여 T2와 T3가 유의적으로 높은 가스 발생량을 나타내었으며 ($p < 0.05$), T1은 유의적인 차이가 없었다. 미생물 발효에 있어서 가스 발생량은 기질의 발효의 정도와 VFA 발생 정도를 나타내는 중요한 지표로서 간주되고 있다 (Beuving and Spoelstra, 1992; Rymer and Givens, 2002). 본 시험에서 T2와 T3가 대조구에 비해 전 배양

시간 동안 가스 발생량이 유의적으로 높고, 총 VFA 생성량도 유의적으로 높은 것으로 보아 첨가된 옴나무 추출물 특히 알코올 추출물들이 반추위 미생물에 의한 발효를 증진시키는 효과가 있다고 생각이 된다.

총 가스내 CH₄의 농도는 배양 24시간에서는 T2와 T3가 대조구에 비해 낮았고 ($p < 0.05$), T1의 경우, 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만, 배양 48시간에는 대조구와 전 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과 옴나무에 대한 두 가지 알코올추출방법으로 추출된 추출물이 반추위내 protozoa의 수를 감소시켜 protozoa에 공생하는 methanogen의 수를 억제하고, VFA 중 propionate를 증가시켜 반추위 내 methanogen의 수소이용을 감소시켜 CH₄ 생성이 감소된 것으로 생각된다. 특히 알코올 추출법에 의해 옴나무 내의 saponin과 유효한 물질들이 추출물에 더 많이 포함됨으로써 옴나무 즙에 비해 CH₄ 저감의 효과가 더욱 더 높았다고 생각된다. Saponin이나 이것이 풍부한 식물은 많은 연구에서 반추위 CH₄ 생성

Table 5. Gas production and CH₄ concentration of *in vitro* rumen fermentation supplemented with *Kalopanax pictus* Nakai trunk extracts

| Incubation Time (h) | Treatment [†] | Gas production | |
|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| | | Total gas (ml) | CH ₄ (%) |
| 24 | C | 76.86 ^d | 11.62 ^a |
| | T1 | 84.18 ^c | 11.57 ^a |
| | T2 | 106.99 ^a | 9.31 ^b |
| | T3 | 101.46 ^b | 10.36 ^b |
| | SEM | 3.745 | 0.328 |
| 48 | C | 82.24 ^b | 12.37 |
| | T1 | 85.17 ^b | 11.29 |
| | T2 | 108.82 ^a | 12.50 |
| | T3 | 105.74 ^a | 11.44 |
| | SEM | 3.625 | 0.267 |

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

[†] C: control, T1: 0.3% *Kalopanax pictus* juice, T2: 0.3% *Kalopanax pictus* ethanol extract, and T3: 0.3% *Kalopanax pictus* methanol extract.

을 감소시킨다고 보고되어 (Takahashi et al., 2000; Sliwinski et al., 2002; Santoso et al., 2004; Pen et al., 2006, 2007; Holtshausen et al., 2009; Wang et al., 2009), 본 연구에서도 CH₄의 저감이 엽나무 내에 존재하는 saponin 이 주로 작용한 것으로 생각된다.

배양 24시간에서 T1은 CH₄ 발생량 감소에 영향을 미치지 않았으며 T2와 T3에서는 영향을 주었으나, 48시간 배양 완료 후 모든 처리구가 총 가스 내 CH₄의 농도를 감소시키지 못하였다. 이것은 분획배양 (batch culture)의 특성으로 배양시간이 점차 경과함에 따라 추출물의 성분이 모두 소모되어 배양 48시간에서는 CH₄ 발생을 억제하지 못한 것으로 생각된다.

결 론

알팔파 건초를 기질로 한 *in vitro* 반추위 내 미생물발효 특성 실험에 엽나무 알코올추출물을 첨가하였을 때 반추위내 protozoa를 억제하고 bacteria의 활성을 증가시킴으로써 기질의 발효속도, 총 VFA 발생량과 총 가스 발생량을 촉진시키고, NH₃-N의 발생량을 감소시켜 단백질 이용효율을 증가시켰다. 특히 이들 추출물의 첨가로 CH₄ 생성량이 감소되어 축산업 분야에서 주요 온실가스 배출원인 반추동물의 장내로부터 배출되는 CH₄의 저감을 위한 하나의 방법으로써 본 연구결과가 큰 의미를 가진다. 그러나, 본 실험은 분획배양실험으로 연속발효시험과 동물실험을 통한 엽나무 알코올 추출물의 CH₄ 저감효과에 대한 추가연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치 식품기술개발사업 (과제번호: 314075-3)에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

1. Bae, G.S., Nam, K.P., Kim, H.S., Lee, S.G., Choi, H.S., Min, W.K., Joo, J.W., Maeng, W.J., Chang, M.B., 2003. Effects of the artificial culture medium of wild ginsengs on rumen fermentation characteristics *in vitro*. J. Anim. Sci. Technol. 45, 987-996.
2. Beuvink, J.M.W., Spoelstra, S.F., 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 505-509.
3. Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Biochem. 8, 130-132.
4. Choi, S.W., 1997. Antioxidative properties of methanolic extracts in leaves of *Kalopanax pictus* Nakai. Res. Bull. Hyoseung Catholic Univ. Daegu, 54, 131-139.
5. Duncan, D.B., 1955. Multiple range and multiple *F* test. Biometrics. 11, 1-42.
6. Erwin, E.S., Marco, S.J., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44, 1768-1771.
7. Grobner, M.A., Johnson, D.E., Goodall, S.R., Benz, D.A. 1982. Sarsaponin effects on *in vitro* continuous flow fermentation of a high grain diet. J. Anim. Sci. 55 (Suppl.), 491.
8. Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., McSweeney, C.S. 2008. Effects of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen

- microorganisms. Lett. Appl. Microbiol. 47, 421-426.
9. Holtshausen, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R., 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.
 10. 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.
 12. Lee, C.-H., Jo, D.-K., Lee, K.-Y., Kwon, K.-W., Choi, M.-S., 2002. Growth factors affecting to kalosaponins contents of *Kalopanax pictus* Nakai. *Kor. J. Plant. Biotechnol.* 29, 209-215.
 13. Lee, S.M., Hwang, J.H., Kim Y.J., 2010. Effects of dietary supplementation of castor aralia (*Kalopanax pictus* Nakai) on performance and fatty acid composition of chicken meat. *Kor. J. Food Sci. Anim. Resour.* 30, 305-312.
 14. Lila, Z.A., Mohammed, N., Kanda, S., Kurihara, M., 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.
 15. Makkar, H.P.S., Singh, B., Dawra, R.K., 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak on various microbial activities of the rumen. *Br. J. Nutr.* 60, 287-296.
 16. McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43,99-109.
 17. NASA., 2005. Global temperature trends: 2005 summation (Available at <http://data.giss.nasa.gov/gistemp/2005/>).
 18. Ok, J.U., Baek, Y.C., Kim, K.H., Lee, S.C., Seol, Y.J., Lee, K.Y., Choi, C.W., Jeon, C.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.* 53, 147-154.
 19. Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, M., Morikawa, R., 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.
 20. Pen, B., Takaura, K., Yamaguchi, S., Asa, R., 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.
 21. Porzel, A.T.V., Schmidt, S.J., Lischewski, M., Adam, G., 1992. Studies on the chemical constituents of *Kalopanax septemlobus*. *Planta Med.* 58, 481-482.
 22. Rymer, C., Givens, D.I., 2002. Relationships between patterns of rumen fermentation measured in sheep and *in situ* degradability and the *in vitro* gas production profile of the diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 31-44.
 23. Santoso, B., Mwenya, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H., 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.
24. SAS. 2003. SAS/STAT® Software for PC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
26. Shao, C.J., Kassi, R., Ohtani, K., Kohda, H., 1990. Saponins from leaves of *Kalopanax pictus* Nakai, Harigiri. Structures of kalopanax-saponins JLa and JLb. Chem. Pharm. Bull. 38, 1087-1089.
27. Sliwinski, B.J., Soliva, C.R., Machmüller, A., Kreuzer, M., 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Tech. 101, 101-114.
28. Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., de Haan, C., 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
29. Takahashi, J., Miyagawa, T., Kojima, Y., Umetsu, K., 2000. Effects of *Yucca schidigera* extract, probiotics, monensin and L-cysteine on rumen methanogenesis. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 13, 499-501.
30. Van Soest, P.J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2nd ed. Cornell University Press, New York, USA.
31. Wang, Y., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Rode, L.M., Cheeke, P.R., Cheng, K.-J., 1998. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). Anim. Feed Sci. Technol. 74, 143-153.