

반추동물의 메탄감소를 위한 천연식물 추출물에 관한 연구*

이신자** · 엄준식***† · 이수경*** · 이일동*** · 김현상*** · 강한별*** · 이성실****

Studies on Natural Plant Extracts for Methane Reduction in Ruminants

Lee, Shin-Ja · Eom, Jun-Sik · Lee, Su-Kyoung · Lee, Il-Dong · Kim, Hyun-Sang · Kang, Han-Beyol · Lee, Sung-Sill

This study was conducted to evaluate natural plant extracts for methane gas reduction in ruminants. Rumen fluid was collected from cannulated Hanwoo cow (450±30 kg) consuming 400 g/kg concentrate and 600 g/kg timothy. The 15 ml of mixture comparing McDougall's buffer and rumen fluid in the ratio 2 to 1, was dispensed anaerobically into 50 ml serum bottles. Rumen fluid contents were collected and *in vitro* fermentation prepared control (timothy, 300 mg), ginseng, balloon flower, yucca plant, camellia, tea plant and ogapi extracts were added at the level of 5% against 300 mg of timothy as a substrate (v/w) and incubated for 3, 6, 9, 12, 24, 48, and 72 h. *In vitro* pH values range 6.55~7.41, this range include rumen titration. The dry matter digestibility was not differ between all treatments and control. Total gas emission was significantly higher ($p<0.05$) in ginseng and balloon flower treatments on 24 h than in control. Carbon dioxide emission was not differ all treatments on 9 h than in control and significantly higher ($p<0.05$) yucca plant, camellia and tea plant treatments on 12 h than control. Methane emission was not differ all treatments on 6 h than in control. The rumen microbial growth rate was significantly higher ($p<0.05$) in ginseng, balloon flower on 12 h and significantly higher ($p<0.05$) in ginseng, yucca plant, tea plant and ogapi treatments on 24 h than in control. Total VFA was significantly higher ($p<0.05$) in

* 본 논문은 농촌진흥청(과제번호 PJ011060) 'Original Technology Development and Industrialization of Functional Oligosaccharide for Antibiotics Alternatives Using Modified Rumen Microbial Ecosystem'에서 지원 받았음.

** 경상대학교 농업생명과학연구원&중점연구소

*** 경상대학교 응용생명과학부(BK21)

**** 경상대학교 농업생명과학연구원

***** Corresponding author, 경상대학교 응용생명과학부(BK21)&농업생명과학연구원, +82-55-772-1883

† These authors made an equal contribution to this paper.

tea plant and ogapi treatments on 12 h than in control and significantly higher ($p<0.05$) in ginseng, balloon flower treatments on 48 h than in control. Acetic acid was significantly lower ($p<0.05$) in ginseng and balloon flower treatments on 24 h than in control. Propionic acid was significantly higher ($p<0.05$) in ginseng and balloon flower treatments on 48 h than in control. As a results, sixth natural plant extracts had no significant effect dry matter digestibility and negative on rumen fermentation, but not effect methane reduction.

Key words : *dry matter digestibility, methane, natural plant extracts, pH, rumen microbial growth rate*

I. 서 론

20세기 이후 지구온난화의 가속화가 진행되면서 이상기후로 인한 자연재해가 발생되어 인류의 삶에 악영향을 미치고 있다. IPCC에서 선정한 온실가스 종류는 이산화탄소, 메탄, 아산화질소, 프레온, 오존 등이 있다. 이산화탄소는 온실가스의 약 72%이며, 메탄은 약 18%로 차지하는 비율은 적다. 그러나 메탄 1개 분자와 이산화탄소의 21개 분자가 지구온난화에 미치는 영향이 같은 만큼(IPCC, 2001) 메탄발생량이 증가하게 되면 지구온난화가 더욱 가속화된다.

전체 메탄발생량 중 반추동물에 의해 발생하는 메탄은 약 15%를 차지하고, 그 중 장내발효에서 발생하는 메탄의 비중이 약 75%를 차지한다(Crutzen, 1995). 반추동물의 메탄은 반추위 내 methanogen이 protozoa에 공생하여 발생하게 되는데(Newbold et al., 1997), 반추동물의 메탄 발생량을 감소시킨다면 반추위 내 서식하고 있는 미생물의 발효과정 중 생성되는 propionate 생성량의 증가(Grobner et al., 1982)로 인해 에너지 효율뿐만 아니라 반추가축의 성장률 및 유생산 증대의 효과(Makkar et al., 1993)가 있다고 알려져 있다. 즉 반추동물의 메탄발생량을 감소시킨다면 지구온난화를 늦추는 환경적 측면과 사료에너지의 사료 효율을 높이는 영양학적 측면을 향상 시킬 수 있는 일석이조의 효과가 나타난다(Lee and Ha, 2009).

현재까지 반추동물의 메탄 발생을 줄이는 연구로는 사료 조절 급여(Kim et al., 2011), halogenated analogues (Hwang et al., 2012), ionophore계통의 monensin (Odongo et al., 2007), long-chain fatty acid (Lee et al., 2015), acetogen competes (Lopez et al., 1999) 등을 이용한 연구사례가 있다. 그러나 halogenated analogues나 ionophore 계통의 항생제를 사용하면 2차 생산물질에 잔류되거나 내성 문제가 발생되어 한국에서는 사용이 전면 금지되어 있고, methanogen의 항생제 적응으로 인해 메탄 감소 효과가 없어진다는(Johnson and Johnson, 1995) 단점이 있다. 위와 같은 단점을 보완하기 위한 첨가물 중 천연 식물을 이용하여 반추동물의 메탄가스 감소를 위한 연구가 증가하고 있는 추세이다.

천연 식물 중 인삼은 여러 효소의 활성을 증가시키는 장점이 있고(Lee and Chung, 1977), 도라지 내 여러 성분 중 platycodin D는 항암활성 효과(Choi et al., 2001), 항염증 효과(Ahn et al., 2005), 항비만 효과(Lee et al., 2010), 그리고 콜레스테롤 저하 효과(Zhao et al., 2006)가 있다. 유카식물은 항균활성 물질로 작물보호 및 자연생태계 유지에 많이 쓰이고 있으며(Kim, 2004), 동백나무의 잎과 꽃 추출물은 항미생물 활성 및 항산화 효과(Lee et al., 2005), 항균 효과(Hahn, 2005), 혈전용해 효소 활성(Lim et al., 2006) 및 혈액 암세포성장 억제 효과(Kim et al., 2003)가 있다. 차나무는 항진균, 항염증 및 항산화 효과(Sur et al., 1998)가 있고, 오갈피는 자양, 강장제(Choi et al., 2001)로 사용한다는 보고가 있다.

따라서 위와 같은 효과를 가진 천연 식물 인삼(Ginseng), 도라지(Balloon flower), 유카식물(Yucca plant), 동백나무(Camellia), 차나무(Tea plant) 및 오갈피(Ogapi) 추출물의 첨가가 *in vitro* 메탄 발생 및 반추위 발효 성상에 미치는 영향에 대해 구명 하고자 연구를 실시하게 되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 시험설계

경상남도 진주시 경상대학교 야생동물보호센터에서 반추위에 cannula가 장착된 한우 암소 1두(체중 450±30 kg)로부터 *in vitro* 반추위 발효 시험을 위한 시험용 위액을 채취하였고, 사료는 timothy와 농후사료 비율을 6:4로 하여 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:00) 분할 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 자유섭취토록 하였다. AOAC (2012)법으로 분석한 timothy 화학적 조성 및 농후사료의 성분함량은 Table 1-1, 1-2와 같다.

Table 1-1. Chemical composition of diet used in experiments and feedstuff used as a substrate for *in vitro* incubation

Feedstuff	Chemical composition (% DM)						
	Moisture (%)	Crude protein (% DM)	Ether extracts (% DM)	Crude fiber (% DM)	Crude ash (% M)	NDF ¹ (% M)	ADF ² (% M)
Timothy	8.87	13.37	2.25	21.87	8.62	53.18	30.57

NDF¹: Neutral detergent fiber.

ADF²: Acid detergent fiber.

Table 1-2. Chemical composition of diets used in experiment

Feedstuff	Chemical composition (% DM)						
	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	Ca	P	TDN ¹
Concentrate	12.0	1.50	15.0	12.0	0.75	0.90	69.0

Ca : Calcium

P : Phosphorus

TDN¹ : Total Digestible Nutrients

2. 공시재료 및 시험방법

공시재료는 65°C dry oven에서 24시간 건조시킨 timothy를 2 mm screen이 장착된 wiley mill로 분쇄하여 기질로 이용하였다. 기질은 3 cm × 3.5 cm로 제작한 nylon bag에 0.3 g 투여 후 sealing하였고, 혐기상태의 McDougall's buffer (1948)와 반추위액을 2:1 비율로 섞은 배양액 15 ml를 50 ml serum bottle에 넣은 후 aluminum seal과 butyl rubber를 이용하여 밀봉하였다. 6가지 천연 식물 추출물 인삼(Ginseng), 도라지(Balloon flower), 유카식물(Yucca plant), 동백나무(Camellia), 차나무(Tea plant) 및 오갈피(Ogapi)는 한국식물추출물은행에서 분양받았으며(Table 2), dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) 1 ml에 희석한 후 15 µl 분주 후 39°C shaking incubator (Jeio Tech, SI-900R; 120 rpm)에서 발효시간 별(3, 6, 9, 12, 24, 48 및 72시간)로 식물 추출물을 분주하지 않은 timothy를 포함한 7처리 3반복 147개의 serum bottle로 *in vitro* 시험을 수행하였다.

Table 2. The general information regarding extracts used in the experiment^a

Botanical name	Scientific name	Family name	Part ^b	Solvent ^c
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	<i>Ginkgoaceae</i>	R	Mt 99.9%
Balloon flower	<i>Platycodon grandiflorum</i>	<i>Campanulaceae</i>	R	
Yucca plant	<i>Yucca smalliana</i>	<i>Agavaceae</i>	L	
Camellia	<i>Camellia japonica</i>	<i>Theaceae</i>	L	
Tea plant	<i>Thea sinensis</i>	<i>Theaceae</i>	L	
Ogapi	<i>Eleutherococcus sessilifolrus</i>	<i>Araliaceae</i>	L,R	

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

^b R, Root; L, Leaf

^c Nature of solvent used for extraction: Methyl alcohol 99.9% for HPLC.

3. 조사항목

1) pH

pH는 가스 발생량 측정 후 serum bottle의 aluminum cap 및 butyl rubber를 weaton decapper (Weaton co., USA)를 이용하여 제거하여 건물소화율 실험을 위한 nylon bag을 수거 후 각 발효시간대별(3, 6, 9, 12, 24, 48 및 72시간) serum bottle 내 배양액을 pH meter (Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.

2) 건물소화율

배양액 채취 후 nylon bag을 수거하여 물을 채운 수조에 넣고 heidolphs rotamax 120 (Heidolph Instrument, Germany)를 이용하여 100 rpm 으로 20분씩 3회 씻은 후 65°C의 dry oven (Jeio tech, Korea)에서 약 24시간 건조시켜 건물 잔량을 측정하였다. 건물 소화율 공식은 아래와 같다.

$$\text{건물소화율(\%)} = \frac{\text{발효 전 건물 무게} - (\text{여과 후 남은 무게} - \text{blank})}{\text{발효 전 건물 무게}} \times 100$$

3) 총 가스, 이산화탄소 및 메탄 발생량

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, 10 ml profi syringe 주사기를 이용하여 가스 포집 후 9 ml 진공시험관(vacutainer)에 옮겨 담았다. 총 가스, 이산화탄소 및 메탄 발생량은 1 ml profi syringe 주사기로 이용하여 포집 후 GC (HP5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 분석하였다.

4) 미생물 성장량

배양액을 1.5 ml eppendorf tube에 1 ml 채취하여 사료입자를 제거하기 위해 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 새로운 eppendorf tube에 상등액을 채취 후, 14,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 미생물 pellet을 침전시켜 상등액을 제거하고 pellet에 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 1 ml 첨가하는 세척 과정을 3회 반복 후 spectrophotometer (BIO-RAD, Model 680)를 이용하여 550 nm에서 O.D. (optical density) 값을 구하여 미생물 성장량을 측정하였다.

5) VFA(Volatile Fatty Acid)

배양액을 1.5 ml eppendorf tube에 1 ml 채취하여 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 사료 입자를 제거하고, 상등액을 0.20 μ m syringe filter를 이용하여 2 ml serum bottle에 여과 후 -80°C deep freezer에 보관하였고, 분석은 HPLC (High performance liquid chromatography, Agilent-1200, Germany)를 이용하였다. 시료의 주입량은 20 μ l였고, 이동상 용액은 0.0085N H₂SO₄을 사용하였으며, 유속은 0.6 ml/min이었다. Column은 300 mm \times 7.8 mm I.d MetaCarb 87H (Varian, USA)를 사용하였으며, 온도는 35°C 에서 사용하였다.

4. 통계처리

본 시험에서 얻은 결과들은 SAS package program (1996)의 general linear model (GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 하였고, Duncan's multiple range test (Duncan, 1995)의 다중검정방법으로 평균 간의 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. pH

6가지 천연 식물 추출물이 *in vitro* 반추위 발효성상에 따른 pH의 변화에 대한 결과는 Table 3과 같다. 발효시간이 지날수록 pH는 낮아지는 경향을 보였으며, 발효 3, 6, 9시간대 pH는 7.12~7.41로 높게 측정되었는데 McDougall Buffer의 pH 값이 7.5 범위이므로(Hwang et al., 2013), 본 실험의 결과에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 발효 6, 9, 12시간대 차나무 첨가구에서 대조구에 비해 유의적(P<0.05)으로 높았고, 발효 72시간대 유카식물, 차나무, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 이를 제외한 발효시간대에는 대조구와 첨가구에 유의적(P<0.05) 차이가 없었다. 반추위 내 섬유질 함량이 높은 사료의 소화에 적절한 pH의 범위는 6.0~6.8 (McCullough et al., 1968)로 발효 24시간대 이후 모든 첨가구의 pH 범위는 6.55~6.75로 대부분 반추위 내 적정 pH 범위에 속하는 결과가 나타났다.

Table 3. Effects of natural plant extracts on *in vitro* pH value

Incubation (h)	Treatments							SEM ¹⁾
	Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
3	7.35 ^{ab}	7.35 ^b	7.35 ^a	7.40 ^a	7.39 ^a	7.41 ^a	7.39 ^a	0.04
6	7.23 ^b	7.23 ^b	7.23 ^b	7.20 ^b	7.27 ^{ab}	7.32 ^a	7.24 ^b	0.04
9	7.15 ^{ab}	7.15 ^b	7.15 ^{ab}	7.12 ^{ab}	7.14 ^{ab}	7.16 ^a	7.18 ^a	0.06
12	6.91 ^b	6.91 ^{ab}	6.91 ^{ab}	7.06 ^a	7.02 ^{ab}	7.05 ^a	7.03 ^{ab}	0.07
24	6.75	6.75	6.75	6.71	6.70	6.70	6.71	0.04
48	6.56	6.56	6.56	6.63	6.62	6.61	6.67	0.09
72	6.55 ^c	6.55 ^{abc}	6.55 ^{bc}	6.63 ^{ab}	6.60 ^{abc}	6.64 ^{ab}	6.67 ^a	0.04

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

¹⁾ SEM: Standard error of the mean

2. 건물 소화율

6가지 천연 식물 추출물이 *in vitro* 반추위 발효 성장에 따른 건물 소화율 결과는 Table 4와 같다. 건물 소화율은 전 발효시간대에 첨가구와 대조구간 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으며, 특히 발효 3, 6, 9시간 건물소화율의 변화가 이루어지지 않은 것은 3, 6, 9시간대 미생물 성장량이 대조구와 유의적($P < 0.05$)인 차이가 나타나지 않는 것과 같은 현상이라 생각한다. Hristov (1999)에 따르면 알팔파를 섭취하는 어린 암소에게 유카식물 파우더를 첨가하였을 때 역시 소화율에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다는 결과가 나타났다. 또한, Ok (2010)의 *in vitro* 실험에서 유카식물 첨가구간 건물 소화율이 증가하지 않는 결과와 일치하였다. 발효 12시간대 이후 건물 소화율은 전 첨가구간 대조구와 유의적($P < 0.05$)인 차이가 나타나지 않았다.

Table 4. Effects of natural plant extracts on *in vitro* dry matter digestibility (%)

Incubation (h)	Treatments							SEM ¹⁾
	Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
3	24.19	23.17	23.06	23.37	22.07	21.72	21.85	1.75
6	24.23	24.92	23.12	23.79	22.26	23.26	22.62	2.44
9	24.35	25.65	23.46	24.67	26.33	25.39	22.80	2.29

Incubation (h)	Treatments							SEM ¹⁾
	Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
12	28.34	34.90	35.23	28.83	29.11	28.12	28.99	4.63
24	32.62	36.13	37.52	36.39	37.87	38.44	40.05	6.89
48	44.21	43.68	40.52	43.78	39.65	40.14	45.44	3.40
72	49.54	48.44	48.87	49.85	46.71	44.10	46.71	5.21

¹⁾ SEM : Standard error of the mean

3. 총 가스, 이산화탄소 및 메탄 발생량

6가지 천연 식물 추출물이 *in vitro* 반추위 발효 성상에 따른 총 가스, 이산화탄소 및 메탄 발생량 결과는 Table 5와 같다. 총 가스 발생량은 발효 24시간대 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았고, 발효 72시간대 동백나무 첨가구를 제외한 나머지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 총 가스 발생량이 줄어들지 않는 것으로 보아 6가지 천연 식물 추출물은 반추위 내 미생물뿐만 아니라 발효성상에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. 이산화탄소 발생량은 발효 6시간대 유카식물 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮았고, 발효 12시간대 유카식물, 동백나무, 차나무 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 발효 24, 48시간대 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)인 차이가 나타나지 않았으며, 발효 72시간대 동백나무 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 식물추출물을 첨가한 메탄발생량 저감 선행연구는 pen 등(2006)과 Gel 등(2012)이 있으며, Kim 등(2015)의 실험에서 9시간대 동백나무 추출물에서도 감소하는 효과를 보였다. 그러나 본 실험에서 이용된 유카식물, 동백나무 추출물의 첨가는 메탄 감소에 효과가 없었으며, 뿐만 아니라 나머지 식물 추출물에서도 감소 효과는 나타나지 않았다. Ok 등(2011)의 *in vitro* 실험 오갈피 첨가구에서도 메탄 발생량 감소에 영향을 미치지 않는 결과와 일치 하였다. 메탄 발생량의 비율은 24시간대 이후 급격히 증가하였는데 이와 같은 결과는 식물 추출물의 첨가는 발효 초기에는 일시적인 효과가 있지만, 발효 시간이 지날수록 지속성이 떨어지기 때문에 위와 같은 결과가 나타났다고 사료되며 위 실험에 사용된 식물 추출물 외 Lee 등(2016)과 Manlin 등(2012)의 결과에서도 발효 시간이 지날수록 메탄 발생량의 비율이 점점 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Table 5. Effects of natural plant extracts on total gas, carbon dioxide, methane emission *in vitro* (mL/g DM)

Incubation (h)	Items	Treatments							SEM ¹⁾
		Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
3	Total gas	158.15 ^{ab}	164.06 ^a	158.87 ^{ab}	158.25 ^{ab}	157.99 ^{ab}	153.58 ^b	154.98 ^b	3.34
	CO ₂	15.26 ^b	28.58 ^a	22.50 ^{ab}	16.70 ^b	21.50 ^{ab}	18.63 ^{ab}	21.34 ^{ab}	5.69
	CH ₄	1.89	3.32	2.72	2.68	2.38	2.44	2.73	0.74
6	Total gas	170.19 ^{ab}	176.47 ^a	170.71 ^{ab}	173.36 ^{ab}	171.38 ^{ab}	165.47 ^b	170.66 ^{ab}	4.08
	CO ₂	29.65 ^a	35.19 ^a	32.55 ^a	17.67 ^b	33.91 ^a	25.71 ^{ab}	31.28 ^a	6.04
	CH ₄	5.08	5.91	5.93	4.12	5.57	9.12	5.60	3.43
9	Total gas	182.18 ^{ab}	192.51 ^a	184.21 ^{ab}	186.44 ^{ab}	182.75 ^{ab}	180.31 ^b	177.35 ^b	5.49
	CO ₂	34.76	41.22	49.31	47.23	47.56	50.63	43.91	9.92
	CH ₄	7.39 ^b	10.35 ^a	9.75 ^a	9.40 ^{ab}	9.49 ^a	10.32 ^a	8.97 ^{ab}	1.10
12	Total gas	194.12 ^{ab}	192.05 ^b	196.56 ^a	195.47 ^{ab}	196.25 ^{ab}	192.36 ^{ab}	194.90 ^{ab}	2.22
	CO ₂	41.66 ^b	52.57 ^b	66.54 ^b	110.87 ^a	105.05 ^a	113.07 ^a	49.50 ^b	13.66
	CH ₄	13.04 ^{bc}	12.05 ^{bc}	13.72 ^b	28.86 ^a	27.95 ^a	29.80 ^a	10.27 ^c	1.54
24	Total gas	240.53 ^b	254.39 ^a	254.50 ^a	251.18 ^{ab}	252.84 ^{ab}	252.89 ^{ab}	249.72 ^{ab}	6.46
	CO ₂	129.98	125.33	139.10	159.49	170.16	169.94	136.71	41.41
	CH ₄	39.98 ^b	38.90 ^b	37.47 ^b	52.34 ^{ab}	85.29 ^a	61.74 ^{ab}	36.63 ^b	22.70
48	Total gas	275.63 ^{ab}	291.10 ^a	267.94 ^b	283.26 ^{ab}	280.97 ^{ab}	281.91 ^{ab}	278.27 ^{ab}	10.08
	CO ₂	155.27	167.31	157.64	211.20	176.96	195.28	197.76	57.56
	CH ₄	57.75 ^b	56.03 ^b	67.24 ^b	71.40 ^b	84.77 ^{ab}	77.26 ^{ab}	107.64 ^a	18.41
72	Total gas	275.99 ^d	313.37 ^a	305.27 ^{ab}	302.26 ^{abc}	257.92 ^c	293.28 ^c	295.98 ^{bc}	6.14
	CO ₂	165.66 ^b	213.38 ^{ab}	194.22 ^b	212.22 ^{ab}	282.30 ^a	251.06 ^{ab}	230.62 ^{ab}	36.74
	CH ₄	65.20 ^b	106.6 ^{ab}	84.38 ^b	104.87 ^{ab}	85.08 ^b	103.77 ^{ab}	180.78 ^a	47.52

^{abcd} Means with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$)

¹⁾ SEM : Standard error of the mean

4. 미생물 성장량

6가지 천연 식물 추출물이 *in vitro* 반추위 발효 시간에 따른 미생물 성장량 결과는 Table 6과 같다. Pen 등(2006)의 유카식물 추출물 실험결과 *in vitro* 발효 6시간까지 미생물 성장량

이 높게 측정되었다는 연구 결과가 있었지만, 본 실험에서는 발효 3, 6, 9시간대 유카식물 첨가구를 포함한 천연 식물 추출물 모든 첨가구에서 대조구와 차이를 보이지 않았다. 발효 12시간대 총 가스 발생량이 가장 높았던 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적 ($P<0.05$)으로 높았으며, 발효 24시간대 인삼, 유카식물, 차나무, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 발효 48시간대 동백나무 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮았고, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았으며, 발효 72시간대 인삼 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 특히 발효 24시간대 인삼, 유카식물, 차나무, 오갈피, 발효 48시간대 오갈피, 발효 72시간대 인삼 첨가구는 대조구에 비해 총 가스 발생량 및 메탄 발생량의 감소가 일어나지 않는 것을 보아 protozoa의 감소는 일어나지 않았으나, bacteria의 수가 증가 하여 미생물 성장량이 높게 측정된 것으로 사료되며, sliwinski 등(2010) 유카식물 추출물 첨가 실험에서의 protozoa 감소가 일어나지 않은 선행 연구 결과와 일치하였다. 추후 Real-Time PCR을 통해 미생물의 군집 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 6. Effects of natural plant extracts on *in vitro* rumen microbial growth rate (OD at 550 nm)

Incubation (h)	Treatments							SEM ¹⁾
	Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
3	0.49	0.56	0.52	0.46	0.54	0.47	0.47	0.06
6	0.62	0.58	0.59	0.63	0.65	0.62	0.72	0.08
9	0.71	0.77	0.71	0.76	0.70	0.84	0.78	0.12
12	0.68 ^c	0.83 ^b	1.02 ^a	0.81 ^{bc}	0.96 ^{ab}	0.92 ^{ab}	0.96 ^{ab}	0.08
24	0.84 ^b	0.95 ^a	0.89 ^{ab}	0.96 ^a	0.83 ^b	0.99 ^a	1.00 ^a	0.06
48	0.89 ^{ab}	0.81 ^{bc}	0.95 ^{ab}	0.88 ^{ab}	0.71 ^c	0.88 ^{ab}	1.04 ^a	0.09
72	0.75 ^{bcd}	0.94 ^a	0.84 ^{abc}	0.72 ^{cd}	0.78 ^{bcd}	0.69 ^d	0.88 ^{ab}	0.08

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

¹⁾ SEM : Standard error of the mean

5. VFA(Volatile Fatty Acid)

6가지 천연 식물 추출물이 *in vitro* 반추위 발효 시간에 따른 VFA 결과는 Table 7과 같다. Total VFA 농도는 발효 3, 6, 9시간대 모든 첨가구에서 대조구와 차이를 나타내지 않았는

데, 유카식물 첨가구에서 total VFA 농도에 영향이 없었다는 Pen 등(2006)의 연구결과와 일치하였다. 발효 12시간대 차나무, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았는데 acetate 농도, propionate 농도가 증가하여 total VFA 농도가 높아 위와 같은 결과가 나타났다고 사료된다. 발효 24시간대 인삼, 차나무 첨가구를 제외한 나머지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮았다. 발효 48시간대에 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았으며, 발효 72시간대 인삼, 도라지, 유카식물 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. Acetate 농도는 발효 3시간대 유카식물 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮았고, 발효 24시간대 인삼, 도라지, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮았으며, 발효 48, 72시간대 모든 첨가구에서 대조구와 차이를 보이지 않았다. Propionate 농도는 발효 3시간대 유카식물 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았고, 발효 12시간대 차나무, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았으며, 발효 48시간대 인삼, 도라지 첨가구, 발효 72시간대 인삼 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 특히 발효 3시간대의 유카식물 첨가구의 acetate 농도는 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮았고, propionate 농도는 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 이는 propionate 농도가 높으면 acetate 농도가 감소한다는 Wina 등(2005)의 결과와 일치 하였다. 반추위 발효 과정 중 생성되는 propionate 농도가 증가하면 메탄 발생량을 감소시킨다(Grobner et al., 1982)는 결과가 있지만 본 연구에서는 propionate 농도가 높은 첨가구에서 메탄 발생 감소의 결과는 나타나지 않았다.

Table 7. Effects of natural plant extracts on *in vitro* VFA (mM)

Incubation (h)	Items	Treatments							SEM ¹⁾
		Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
3	Total VFA	35.94 ^{abc}	37.55 ^a	36.84 ^{ab}	36.18 ^{abc}	34.26 ^{bcd}	32.53 ^d	33.13 ^{cd}	1.67
	Acetate	28.79 ^{ab}	29.91 ^a	27.58 ^{bc}	25.85 ^{cd}	26.12 ^{cd}	24.47 ^d	25.00 ^d	1.26
	Propionate	7.14 ^c	7.64 ^{bc}	9.26 ^{ab}	10.33 ^a	8.14 ^{bc}	8.06 ^{bc}	8.14 ^{bc}	0.89
6	Total VFA	40.42	40.81	41.07	40.66	38.34	36.37	43.18	4.35
	Acetate	30.82	30.59	29.48	30.10	29.57	28.02	30.31	2.20
	Propionate	9.59	10.22	11.59	10.57	8.77	8.35	12.87	3.62
9	Total VFA	50.65 ^{ab}	55.59 ^a	47.72 ^b	55.76 ^a	54.55 ^a	54.33 ^a	52.84 ^{ab}	3.38
	Acetate	32.12 ^b	36.59 ^a	33.65 ^{ab}	34.62 ^{ab}	34.55 ^{ab}	34.78 ^{ab}	34.29 ^{ab}	1.86
	Propionate	18.53 ^{ab}	19.00 ^a	14.08 ^b	21.14 ^a	19.99 ^a	19.56 ^a	18.54 ^{ab}	2.46

Incubation (h)	Items	Treatments							SEM ¹⁾
		Control	Ginseng	Balloon flower	Yucca plant	Camellia	Tea plant	Ogapi	
12	Total VFA	63.34 ^b	65.23 ^b	69.21 ^b	67.42 ^b	69.88 ^b	82.48 ^a	88.60 ^a	3.86
	Acetate	39.13 ^c	39.58 ^c	42.10 ^c	40.79 ^c	42.40 ^c	51.49 ^b	57.99 ^a	2.68
	Propionate	21.06 ^b	21.05 ^b	22.25 ^b	21.79 ^b	22.85 ^b	29.16 ^a	29.06 ^a	1.42
24	Total VFA	104.65 ^a	99.78 ^{ab}	98.45 ^b	96.03 ^b	99.14 ^b	104.29 ^a	95.90 ^b	2.80
	Acetate	67.35 ^a	62.09 ^{bc}	63.28 ^{bc}	64.21 ^{abc}	65.34 ^{ab}	67.07 ^a	61.04 ^c	1.95
	Propionate	30.40 ^{ab}	30.46 ^{ab}	27.84 ^{bc}	25.94 ^c	27.88 ^{bc}	31.97 ^a	29.82 ^{abc}	2.09
48	Total VFA	109.86 ^b	119.81 ^a	117.83 ^a	103.49 ^b	104.31 ^b	108.38 ^b	102.83 ^b	4.45
	Acetate	70.63	73.62	73.70	69.67	68.88	71.44	68.88	4.51
	Propionate	32.11 ^b	37.33 ^a	36.18 ^a	26.68 ^c	28.77 ^{cd}	30.65 ^{bc}	28.59 ^d	1.09
72	Total VFA	134.09 ^c	196.14 ^b	262.06 ^a	238.47 ^{ab}	127.28 ^c	118.66 ^c	113.53 ^c	29.00
	Acetate	92.08 ^b	79.82 ^b	77.98 ^b	140.09 ^a	82.69 ^b	72.60 ^b	73.86 ^b	14.45
	Propionate	34.12 ^b	107.36 ^a	75.13 ^{ab}	33.35 ^b	37.71 ^b	39.57 ^b	33.38 ^b	26.91

^{abcd} Means with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$)

¹⁾ SEM : Standard error of the mean

IV. 요약

6가지 천연 식물 추출물의 첨가가 반추동물의 메탄 감소에 대한 연구를 수행하였다. 반추위액은 cannula가 장착된 한우에서 채취하였으며, 공시축의 사양관리는 timothy와 농후사료 6:4 비율로 급여하였다. 50 ml serum bottle에 timothy 0.3 g, 반추위액 5 ml, McDougall's buffer 10 ml를 각각 넣고 인삼, 도라지, 유카식물, 동백나무, 차나무, 오갈피 추출물을 기질의 5%를 첨가한 뒤 발효시간대별(3, 6, 9, 12, 24, 48, 및 72시간) 7처리 3반복 수행하였다. pH는 6.55~7.41로 반추위 적정 pH 범위에 속하였다. 건물소화율은 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다. 총 가스 발생량은 발효 24시간대 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였다. 이산화탄소 발생량은 발효 9시간대, 메탄 발생량은 6시간대에서 첨가구와 대조구간 유의적($P < 0.05$)인 차이가 나타나지 않았다. 미생물성장량은 발효 12시간대 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였고, 발효 24시간대 인삼, 유카식물, 차나무, 오갈피 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였다. Total VFA 농도는 발효 12시간 차나무, 오갈피 첨가구에서

대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 증가하였고, 발효 48시간 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 증가하였다. Acetate 농도는 발효 24시간 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 감소하였고, propionate 농도는 발효 48시간 인삼, 도라지 첨가구에서 대조구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 증가하였다. 결과적으로 6가지 천연식물 추출물의 첨가는 *in vitro* 반추위 발효성상에는 이상이 없었으나 메탄 감소의 효과는 나타나지 않았다. 추후 6가지 천연 식물 추출물의 농도를 달리하여 추가적인 시험이 필요할 것으로 사료 된다.

[Submitted, September. 29, 2017 ; Revised, October. 20, 2017 ; Accepted, October. 24, 2017]

References

1. Ahn, K. S., E. J. Noh, H. L. Zhao, S. H. Jung, S. S. Kang, and Y. S. Kim. 2005. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by Platycodon grandiflorum saponins via suppression of nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.* 76: 2315-2328.
2. AOAC. 2012. Official methods of analysis 19th edition. Association of official analytical chemists, Washington, D. C. USA.
3. Choi, C. Y., J. Y. Kim, Y. S. Kim, Y. C. Chung, J. K. Seo, and H. G. Jeong. 2001. Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1141-1151.
4. Crutzen P. 1995. The role of methane in atmospheric chemistry and climate. *Proceedings of the eighth international symposium on ruminant physiology.* 291-316.
5. Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11: 1-6.
6. Goel, G. and H. P. Makkar. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44: 729-739.
7. Grobner, M. A., D. E. Johnson, S. R. Goodall, and D. A. Benz. 1982. Sarsaponin effects on *in vitro* continuous flow fermentation of a high grain diet. *J. Anim. Sci.* 33: 64-66.
8. Hahn, Y. S. 2005. Antimicrobial effects of *Camellia japonica* L. leaves extract on food-borne pathogenic microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 113-121.
9. Hristov, A. N., T. A. McAllister, F. H. Van Herk, K. Cheng, C. J. Newbold, and P. R. Cheeke. 1999. Effect of *yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in

- heifers. *J. Anim. Sci.* 77: 2554-2563.
10. 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 halogenated compounds on *in vitro* fermentation characteristics in the rumen and methane emissions. *J. Life Sci.* 22: 1187-1193.
 11. Hwang, H. S., D. G. Ha, S. K. Lee, I. D. Lee, S. J. Lee, and S. S. Lee. 2013. Effects of terpenoids rich plant extracts on ruminal fermentation and methane production. *Korean J. Organic Agric.* 21: 629-646.
 12. IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change). 2001. The scientific basis. Cambridge, UK; Cambridge University Press.
 13. Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
 14. Kim, D. R., J. J. Ha, J. T. Kim, and Y. H. Song. 2011. Evaluation on the greenhouse gas emission according to the intake levels of total mixed rations of hanwoo Cow. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor).* 53: 475-480.
 15. Kim, E. T., L. L. Guan, S. J. Lee, S. M. Lee, S. S. Lee, I. D. Lee, S. K. Lee, and S. S. Lee. 2015. Effects of flavonoid-rich plant extracts on *in vitro* ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 28: 530-537.
 16. Kim, J. H., S. Y. Lee, and S. I. Cho. 2003. Anti-proliferative effect of *Camellia japonica* leaves on human leukemia cell line. *Korea J. Herbol.* 18: 93-93.
 17. Kim, O. R. 2004. Isolation and identification of antimicrobial compounds from *Yucca smalliana* Fern. Department of agricultural chemistry, Graduate School, Chonnam National University.
 18. Lee, H. Y., R. H. Kang, S. Y. Kim, S. I. Chung, and Y. S. Yoon. 2010. Platycodin D inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells by modulating kruppel-like factor 2 and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Phytother. Res.* 24: S161-S167.
 19. Lee, S. J. and J. N. Chung. 1977. Biochemical studies on ginseng saponins (I X). *Korean Biochem. J.* 10: 59-69. 2016.
 20. Lee, S. J., S. K. Lee, M. S. Kim, and S. S. Lee. Effects of nitrate-rich extracts on the *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *J. Agric. Life. Sci.* 50: 95-105.
 21. Lee, S. Y., E. J. Hwang, G. H. Kim, Y. B. Choi, C. Y. Lim, and S. M. Kim. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *camellia japonica* L. *Korean J. Med Crop. Sci.* 13: 93-100.
 22. Lee, S. J., D. S. Oh, D. H. Kim, J. U. Ok, S. K. Lee, J. H. Lim, and S. S. Lee. 2015.

- Effects of long-chain fatty acids on *in vitro* rumen microbial population, dry matter digestibility and methane production. *J. Agric. Life. Sci.* 49: 47-56.
23. 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.
 24. Lim, C. Y., S. Y. Lee, B. S. Pyo, and S. M. Kim. 2006. Fibrinolytic enzyme activity of extract from *Camellia japonica* L. *Korean J. Med Crop. Sci.* 14: 195-201.
 25. Lopez, S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, and C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 1-10.
 26. Makkar, H. P. S., M. Blümmel, N. K. Borowy, and K. Becker. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61:161-165.
 27. Wei, M., L. Ren, Z. Zhou, and Q. Meng. 2012. Effect of addition of three plant extracts on gas production, ruminal fermentation, methane production and ruminal digestibility based on *in vitro* technique. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 4304-4309.
 28. McCullough, M. E. and W. W. G. Smart Jr. 1968. Effects of intake of forage level on ruminal turnover rate, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flow in sheep. *J. Anim. Sci.* 62: 216.
 29. McDougall, E. I. 1948. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43: 99-109.
 30. Newbold, C. J., S. M. El Hassan, J. Wang, M. E. Ortega, and R. J. Wallace. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78: 237-249.
 31. Odongo, N. E., R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, M. M. Or-Rashid, S. E. Hook, J. T. Gray, E. Kebreab, J. France, and B. W. McBride. 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1781-1788.
 32. Ok, J. U. 2010. Analysis on various feed Additives utilization for methane reduction and improvement of fermentation characteristics in the rumen. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
 33. Ok, J. U., Y. C. Baek, K. H. Kim, S. C. Lee, Y. J. Seol, K. Y. Lee, C. W. Choi, C. O. Jeon, S. S. Lee, S. S. Lee, and Y. K. Oh. 2011. Effects of saponin contained plant extracts on ruminal fermentation characteristics and methane production. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor).* 53: 147-154.
 34. Pen, B., C. Sar, B. Mwenya, K. Kuwaki, R. Morikawa, and J. Takahashi. 2006. Effects of

- Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. Anim. Feed Sci. Technol. 129: 175-186.
35. SAS. 1996. SAS User Guide. Release 6.12 edition. SAS Inst. Inc. Cary NC. USA.
 36. Sliwinski, B. J., M. Kreuzer, H. R. Wettstein, and A. Machmuller. 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diet containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. Arch Anim Nutr. 56: 379-392.
 37. Sur, P., T. Chaudhuri, J. R. Vedasiromoni, A. Gomes, and D. K. Ganguly. 1998. Anti-inflammatory and antioxidant property of saponins of tea *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze root extract. Phytother. Res. 12: 174-176.
 38. 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.
 39. Wina, E., S. Muetzel, and K. Becker. 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production a review. J. Agric. Food Chem. 53: 8093-8105.
 40. Zhao, H. L., K. Cho, Y. W. Ha, T. Jeong, W. S. Lee, and Y. S. Kim. 2006. Cholesterol-lowering effect of platycodin D in hypercholesterolemic ICR mice. Eur. J. Pharmacol. 537: 166-173.