

약용식물 4종의 *in vitro* 반추위 발효 성장 및 메탄 저감에 대한 영향*

김현상*** · 이성신*** · 위지수*** · 이유경**

Effect of Four Medicinal Plants on *In Vitro* Ruminal Fermentation and Methane Emission

Kim, Hyun-Sang · Lee, Seong-Shin · Wi, Ji-Soo · Lee, Yoo-Kyoung

The objective of this study was to the effect of four medicinal plants (*Rheum palmatum*, *Pharbitidis semen*, *Reynoutria japonica*, *Tribulus semen*) supplementation on methane reduction and ruminal fermentation in *in vitro* batch culture method. Each medicinal plant was supplemented 5% on a substrate basis in the bottle, then filled with buffered rumen fluid. Incubation was conducted for 24 hours in a shaking incubator (39°C, 120 rpm). The ruminal pH values were not significantly different between the control and treatment groups. However, the digestibility of the feed was significantly higher in the group supplemented with medicinal plants than control group. Methane production (mL/g of digested dry matter) and total gas production (mL) was significantly lower in the treatment group compared to the control group in *Tribulus semen* group. Total volatile fatty acids concentration were significantly higher in all treatment groups than control group, and acetate concentration was significantly higher in all treatment groups than control group except for *Rheum palmatum* group. Propionate concentration was significantly higher in all treatment groups than control group, while butyrate concentration was significantly higher in *Rheum palmatum* group than control group. Ammonia nitrogen concentration was significantly higher in all treatment groups than control group. In conclusion, the addition of medicinal plants did not negatively impact rumen fermentation, and the results indicate that *Tribulus semen* has potential as a feed additive for reducing methane emissions.

Key words : *feed additive, in vitro fermentation, medicinal plant, methane*

* 본 연구는 농촌진흥청 연구사업(RS-2020-RD009319) 및 2024년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문 연구원 지원사업에 의해 이루어진 것임.

** Corresponding author, 국립축산과학원 동물영양생리과(yoo3930@korea.kr)

*** 국립축산과학원 동물영양생리과

I. 서 론

농업 내 반추가축으로부터 배출되는 온실가스를 저감하기 위한 연구는 꾸준히 진행되고 있다. 메탄은 반추위 발효과정에서 발생되어 트림으로 배출되고 이 양은 축산분야 배출량의 90%를 차지한다(NIR, 2022). 메탄은 온실가스 문제뿐만 아니라 5~15%의 사료 에너지 손실을 야기하기 때문에 사료효율 증진을 위해서도 필요한 연구이다(Johnson et al., 2000).

반추동물의 반추위 내 메탄 생성을 감소시키기 위한 방법으로 모넨신과 같은 항생제를 이용할 수 있으나 국내의 이용제한으로 인해 메탄 저감 사료 첨가제로서 이용 가능한 국내 자원에 대한 스크리닝 연구는 활발하게 진행되고 있다. 최근에는 화합물인 3-NOP와 브로모포피 함유된 해조류와 같은 메탄저감 사료소재에 관한 많은 연구 결과가 발표되고 있으나 아직까지 국내 현장에서 적용하기는 어려운 실정이다(Almeida et al., 2021)

일부 약용식물에서 반추위 메탄생성저감 효과가 보고되었다. 여러 생리활성 능력 중 항산화 능력 및 항균활성을 보이는 식물을 반추위에 첨가 시 반추위 내 수소를 사용하여 메탄생성을 억제한다고 알려져 있다(Oskouieian et al., 2013; Oleszek and Kozachok, 2018; Efremenko et al., 2020). 또한 휘발성 지방산의 조성을 변경시키거나 소화율 향상 및 메탄생성세균과의 공생관계를 가진 protozoa를 사멸시킬 수 있다는 보고가 있다(Rowe et al., 1983).

식물의 2차 대사물질은 대표적인 항산화 물질로 알려져 있으며 phyto chemicals를 들 수 있다(Rice-Evans et al., 1996). 식물의 항산화능 화합물은 주로 polyphenol 물질들로 천연 유래 항산화제로서 잘 알려져 있으며, 미량으로도 기능을 조절함으로써 많이 연구되고 있다. 국내 약용식물 중 견우자, 대황, 질려자, 호장근에 대해 함유된 성분과 DPPH free radical 소거능 평가 등을 통해 천연 항산화제로서 연구되었다(Kim and Suh, 2005; Kim et al., 2007; Kim et al., 2016; Choi et al., 2017). 견우자와 호장근에서 90% 이상의 항산화 활성을 보였으며 비타민 C 활성 대비 약 10% 높았으며, 대황에는 항산화 물질인 rhapontingenin과 piceatannol이 분석되었으며, 천연 항산화제인 α -tocopherol과 비교하였을 때 항산화 활성이 유사한 결과를 보였다(Oh et al., 2001; Kim et al., 2011).

따라서 국내식물자원 중 약용식물 4종에 대해 메탄 저감 첨가제로서 *in vitro* 반추위 발효 특성과 메탄 발생량에 미치는 영향을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 사료 및 약용식물

본 연구는 국립축산과학원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호 NIAS

2020-0453). 시험 사료는 조사료(켄터키블루그라스, 톨페스큐)와 농후사료를 이용하였으며, 첨가제로는 대황(RP, *Rheum palmatum*), 견우자(PS, *Pharbitidis Semen*), 호장근(RJ, *Reynoutria japonica*), 질러자(TS, *Tribulus semen*)를 준비하였다. 준비된 사료는 60°C 건조 오븐에 72 h 건조한 후, 사이클론 밀(cyclotec 1093, Foss, Hillerød, Denmark)에 분쇄하여 1 mm 스크린을 통과한 시료를 이화학 성분 분석과 *in vitro* 반추위 발효 실험에 이용하였다. 시험 기질의 영양소 성분과 농후사료 조성은 Table 1과 2와 같다.

Table 1. The chemical composition (% of DM basis) of substrates used in *in vitro* experiment

Content	Concentrate	Mix forage ¹
Crude protein	12.79	14.21
Ether extract	3.09	0.94
Neutral detergent fiber	21.60	11.66
Acid detergent fiber	11.66	35.79
Crude ash	3.98	6.57
Non-fiber carbohydrate	58.55	6.99

¹ Kenturkey bluegrass to tall fescue ratio = 5:5.

Table 2. Ingredients of the concentrate mix used in *in vitro* experiment

Ingredient	Composition (%)
Corn flake	58.10
Soybean	16.60
Corn	11.70
Wheat gluten	5.80
Soybean meal	3.50
Lupin flack	2.30
Limestone	0.80
Sodium bicarbonate	0.60
Salt	0.40
Vitamin & mineral mix ¹	0.20

¹ Vitamin(vit) & mineral mix: vit A, 2,650,000 IU; vit D3, 530,000 IU; vit E, 1,050 IU; Nicotinic acid, 10,000 mg; Fe, 13,200 mg; Mg, 4,400 mg; Zn, 4,400 mg; Cu, 2,200 mg; I, 440 mg; Co, 440 mg.

2. *In vitro* 반추위 배양 및 샘플링

반추위액은 캐놀라가 장착된 비육 후기 한우 거세우 3두(평균 체중 736 kg, 39개월령)로부터 오전 사료 급여 전 채취하여 4겹의 cheese cloth로 사료입자를 제거한 후 멸균된 Mcdogall buffer (Tilley and terry, 1993)와 1:2 비율로 혼합한 후 혐기상태 유지를 위해 CO₂ gas를 지속적으로 주입하고 39°C로 가열 교반하였다. 배양시험은 125 mL serum bottle에 기질 0.5 g (조사료 0.1 g, 농후사료 0.4 g)을 담은 후 건조된 대황, 견우자, 호장근, 질려자를 기질 대비 0.5% 첨가하였다. 이후 준비된 혼합배양액 50 mL을 분주하여 shaking incubator에서 24시간 배양하였으며 처리당 5회 반복시험으로 수행하였다.

24시간 배양종료 후 디지털 차압계(TPI645, TPI, Korea)를 통해 총 가스 발생량을 측정 후 진공 처리된 serum tube (BD Vacutainer 367953, BD, USA)에 가스를 포집하였다. 이후 serum bottle의 알루미늄 캡과 고무마개를 제거한 후 반추위액을 15 mL tube에 각각 옮겨 담은 후 암모니아태 질소와 휘발성 지방산 분석을 위해 미생물 활동 정지 목적인 metaphosphoric acid (Wako, japan) 용액을 1:10 비율로 희석하여 분석 전까지 -80°C에 보관하였다.

3. *In vitro* 반추위 발효성상 및 가스 분석

반추위액 pH는 pH meter (pinnacle pH meter M540, Corning, NY, USA)를 이용하여 측정하였고 포집된 가스는 GC (Gas chromatograph; NL/450 GC, Bruker, USA)를 이용해서 메탄 발생량을 분석하였다.

휘발성 지방산 분석은 4°C에서 해동한 후, 미량원심분리기(Cyclo1730MR, Labogene, Korea)를 이용하여 14,000 ×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액 1 mL를 분리하여 2-ethyl butyrate 100 mL를 첨가한 후 GC (6890N, Agilent Technologies, USA) 분석용 유리병에 옮겨 분석하였다. 휘발성 지방산 표준용액은 volatile fatty acid standard solution (Catalog number. 46975-U; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 이용하였다(Erwin et al., 1961).

암모니아태 질소 분석은 샘플을 상온에서 충분히 용해시킨 후 14,000 ×g, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 분석에 활용하였다. 샘플 상층액과 암모니아 표준용액(50, 100, 200, 400 ppm)을 10 μL씩 1.5 mL micro tube에 분주하고, phenol color reagent (Phenol 50 g/L와 sodium nitroferricyanide 0.25 g/L)와 alkali-hypochlorite reagent (sodium hydroxied 25 g/L와 4-6% sodium hypochlorite 16.8 mL/L)를 각각 500 μL씩 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 37°C 항온수조에서 15분간 충분히 발색한 후, 96 well microplate에 200 μL씩 옮긴 후 UV spectrophotometer (Catalog number. 168-1150; Bio-Rad Laboratories, Inc, California, USA)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플 내 암모니아태 질소 함량은 암모니아 표준용액의 검량선을 기준으로 하여 계산한 값을 활용하였다(Chaney and Marbach, 1962).

4. 통계분석

연구에서 나온 모든 결과는 SAS의 PROC GLM (Enterprise Guide 7.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석을 실시하였다. 처리에 의한 평균 간 비교는 Tukey's range test를 이용하였다. 유의성은 $p < 0.05$ 수준으로 판단하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

약용식물의 생리활성 중 항산화능에 대한 연구는 계속해서 발표되고 있으며 산업적으로 이용하고 있다. 이번 연구에 이용한 약용작물 4종인 대황, 견우자, 호장근, 질려자에 함유된 anthraquinone 유도체, flavonoid, polyphenol류 물질이 그람 음성 및 양성균에 대한 항균 및 항산화 능력이 여러 선행연구에서 밝혀졌다. 호장근의 경우, 가축의 phytobiotic 소재로서 활용 가능성에 대해서도 언급되었다(Kianbakht and Jahaniani, 2003; Jung et al., 2007).

이번 연구의 *in vitro* 발효성상 및 메탄 발생량 결과는 Table 3과 4와 같다. 반추위 미생물은 pH에 매우 민감하기 때문에 발효성상 중 중요한 지표이다(Hiltner and Dehority, 1983). 반추위 pH가 5.5 이상이면 부정적인 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있으며, 모든 첨가구의 pH는 6.63~6.67로 확인되었으며 유의적인 차이가 없었다. 건물 소화율은 대조구에 비해 약용식물 전 처리구에서 유의적으로($p < 0.05$) 높았으며, 총 가스 발생량은 대조구에 비해 대황과 질려자 처리구에서 유의적으로($p < 0.05$) 높았다. pH의 변화 및 총 가스발생량은 발효속도와 관련이 있다고 했는데(Yang et al., 2011), 약용식물 첨가가 소화율 및 가스 발생량 저하를 보이지 않아 반추위 발효과정에 부정적으로 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

Table 3. Effect of adding four medicinal plants supplementation on gas production incubated for 24 h

Item	CON	Treatment				SEM	p-value
		RP	TS	PS	RJ		
TG, mL	68.4 ^b	77.6 ^a	77.6 ^a	73.4 ^{ab}	70.4 ^{ab}	1.22	0.046
CH ₄ , mL	5.12	5.31	5.05	5.55	5.32	0.16	0.272
CH ₄ , %	7.49 ^a	6.85 ^{ab}	6.51 ^b	7.57 ^a	7.57 ^a	0.14	0.050
CH ₄ , mL/g of dDM	20.38 ^a	19.18 ^{ab}	17.84 ^b	20.35 ^a	19.89 ^a	0.60	0.040

SEM: standard error of the mean; dDM, digested dry matter; TG, total gas production; CH₄, methane gas production.

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

RP, *Rheum palmatum*; TS, *Tribulus semen*; PS, *Pharbitidis Semen*; RJ, *Reynoutria japonica*.

Table 4. Effect of adding four medicinal plants supplementation on rumen fermentation parameters and digestibility incubated for 24 h

Item	CON	Treatment				SEM	p-value
		RP	TS	PS	RJ		
pH	6.67 ^{ab}	6.63 ^b	6.63 ^b	6.63 ^b	6.67 ^a	0.01	0.040
IVDMD, %	50.28 ^c	55.55 ^{ab}	56.64 ^a	54.61 ^{ab}	53.56 ^b	0.57	0.001
Total VFA, mM	86.95 ^c	92.71 ^a	90.19 ^b	91.48 ^{ab}	90.20 ^b	0.36	<0.001
Acetate, mM	51.06 ^b	52.26 ^{ab}	52.61 ^a	53.02 ^a	52.72 ^a	0.20	0.021
Propionate, mM	20.02 ^c	21.20 ^b	20.76 ^b	21.80 ^a	20.96 ^b	0.09	<0.001
Butyrate, mM	12.44 ^b	14.81 ^a	12.83 ^b	12.54 ^b	12.73 ^b	0.11	<0.001
Valerate, mM	1.39 ^d	1.83 ^a	1.68 ^b	1.63 ^b	1.57 ^c	0.02	<0.001
BCFA, mM	2.04 ^c	2.60 ^a	2.32 ^c	2.48 ^b	2.22 ^d	0.02	<0.001
A:P ratio	2.55 ^a	2.47 ^b	2.54 ^a	2.43 ^b	2.51 ^a	0.01	<0.001
NH ₃ -N, mg/L	186.77 ^d	236.65 ^b	244.39 ^b	256.20 ^a	224.63 ^d	3.12	<0.001

SEM: standard error of the mean; VFA, volatile fatty acids; IVDMD, *in vitro* digestibility; BCFA, branched-chain fatty acid; A:P ratio, acetate to propionate ratio; NH₃-N, ammonia-nitrogen.

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

RP, *Rheum palmatum*; TS, *Tribulus semen*; PS, *Pharbitidis Semen*; RJ, *Reynoutria japonica*.

Soliva 등 (2008)은 메탄 발생량 저감과 관련하여 총 가스 대비 메탄의 비율이 절대 메탄 생성보다 더 관련성이 높으며, 이 비율의 수치가 낮으면 사료의 소화 가능한 부분의 메탄 생성 가능성이 낮다는 것을 나타낸다고 하였다. 이번 실험의 메탄 발생량은 대조구와 처리구간의 유의적 차이를 보이지 않았으나 총 가스 발생량과 건물 소화율 대비 발생량에서는 질려자 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 낮았으며, 대황 처리구에서 수치적으로 낮은 경향을 보였다. 질려자에는 10종 이상의 steroid saponin을 함유하고 있으며, Feng 등(2012)의 연구에서는 질려자 추출물 첨가 수준이 증가함에 따라 프로토조아 수의 감소와 메탄 발생량 저감이 확인되었다. Garcia-Gonzalez 등(2006)의 대황 첨가 연구에서는 건물 소화율은 증가하지 않았지만 총 가스 발생량과 메탄 발생량이 저감이 확인되었다.

암모니아태 질소(NH₃-N) 생성량은 대조구에 비해 전 처리구에서 유의적으로($p < 0.05$) 높았다. 사료 내 단백질 원료가 분해되어 최종 발효산물로 NH₃-N이 생성되며, 미생물 성장효율과 관련이 있다. 반추위 내 적정 암모니아태 질소 생성량은 5.0~29.0 mg/dL로 알려져 있으며(Stiles et al., 1970), 전 처리구에서 적정 범위로 확인되었다. 다양한 약용식물의 첨가 연구에서도 유사하게 메탄 저감과 암모니아 생성량이 증가하는 연구가 있었다(Soliva et al., 2008; Lee et al., 2014; Morsy et al., 2022; Pazla et al., 2022). 하지만 이번 연구에서는 선행 연구(Feng et al., 2012)와 달리 메탄 발생량은 저감되지만 암모니아태 질소 생성량은 증가

하는 결과를 보였다.

반추위 내 미생물의 활동에 대한 최적의 총 VFA (volatile fatty acid) 농도는 70~150 mM 로 알려져 있으며 acetate:propionate:butyrate의 비율이 6:3:1로 알려져 있다(McDonald, 2002). 이번 연구 결과, 총 VFA 농도는 대조구에 비해 전 처리구에서 유의적으로($p<0.05$) 높았으며 적정 농도 범위로 확인되었다. Acetate 농도는 대황 처리구를 제외한 전 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았으며, propionate 농도는 전 처리구에서 유의적으로($p<0.05$) 높았다. Butyrate 농도는 대황 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았으며, valerate 농도는 전 처리구에서 유의적으로($p<0.05$) 높았다. BCFA (branched-chain fatty acid)는 아미노산의 탈아미노화에 의해 반추위에서 형성되며, 농도는 식이 단백질의 반추위 분해에 따라 달라질 수 있으며(Allison et al., 1978) 이번 연구에서는 대조구에 비해 전 처리구에서 유의적으로($p<0.05$) 높았다. 이번 연구에서 약용식물 첨가구에서 모두 휘발성 지방산의 농도가 비슷하거나 유의적으로 높은 결과를 보였으며, 특히 메탄 생성과정과 음의 상관관계인 propionate의 농도가 대조구에 비해 모든 식물 첨가구에서 높았다. 이는 반추위 환경의 향상된 향산화 능력을 통해 반추위 수소 분압의 고갈에 의한 반추위 발효 및 프로피온산 생성의 촉진 효과로 이어지는 것으로 판단된다(Wu et al., 2022).

IV. 적 요

이번 연구에서는 향산화 효과가 있는 약용식물로 알려진 대황, 견우자, 호장근, 질려자를 메탄 저감 사료첨가제로 이용하고자 *in vitro* 반추위 발효특성과 메탄 발생량에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 각 약용식물을 건조시켜 분쇄 후 기질의 0.5%를 첨가하여 24시간 배양 실험을 진행하였다. 반추위 pH는 대조구와 약용식물 첨가간의 유의적인 차이가 없었으며 적정 수치를 보였다. 건물 소화율과 총 가스 발생량은 약용식물 전 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 메탄 발생량은 질려자 처리구에서만 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. 이외에도 암모니아태 질소와 휘발성 지방산 모두 약용식물 처리구에서 유의적으로 높았으며, 특히 propionate 생성량은 전 처리구에서 유의적으로 높았다. 연구결과, 약용식물 첨가가 반추위 발효에는 부정적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였다.

이 중 질려자 처리구에서 반추위 발효특성에 부정적인 영향을 보이지 않고 메탄 저감을 보이는 사료첨가제로서 활용성을 확인하였다. 추후 다양한 첨가 수준에 대한 연구를 진행하여 적정수준을 찾고 급여사료 종류, 가축의 연령, 사육환경 등 다양한 조건을 고려한 *in vivo* 실증 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

1. Allison, M. J. 1978. Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 35(5): 872-877.
2. Almeida, A. K., R. S. Hegarty, and A. Cowie 2021. Meta-analysis quantifying the potential of dietary additives and rumen modifiers for methane mitigation in ruminant production systems. *Anim Nutr.* 7(4): 1219-1230.
3. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8(2): 130-132.
4. Choi, H. D., S. N. Yu, S. G. Park, Y. W. Kim, H. W. Nam, H. H. An, S. H. Kim, K. Y. Kim, and S. C. Ahn. 2017. Biological Activities of *Pharbitis nil* and Partial Purification of Anticancer Agent from Its Extract. *Journal of Life Science.* 27(2): 225-232.
5. Efremenko, E., O. Senko, N. Stepanov, N. Mareev, A. Volikov, and I. Perminova. 2020. Suppression of methane generation during methanogenesis by chemically modified humic compounds. *Antioxidants.* 9(11): 1140.
6. Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
7. Feng, Z. H., Y. F. Cao, Y. X. Gao, Q. F. Li, and J. G. Li. 2012. Effect of gross saponin of *Tribulus terrestris* on ruminal fermentation and methane production in vitro. *J. Anim. Vet. Adv.* 11(12): 2121-2125.
8. Garcia-Gonzalez, R., S. Lopez, M. Fernandez, and J. S. Gonzale. 2006 Effect of addition of some medicinal plants on methane production in a stimulating fermenter (RUSITEC). *Int Congr Ser.* 1293: 172-175
9. Hiltner, P. and B. A. Dehority. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 46(3): 642-648.
10. Johnson, D. E., K. A. Johnson, G. M. Ward, and M. E. Branine. 2000. Ruminants and other animals. *Anonymous Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment*, Springer. pp. 112-133.
11. Jung, H. K., Y. J. Kim, B. K. Park, S. C. Park, Y. S. Jeong, and J. H. Hong. 2007. Antioxidative and Antimicrobial Activities of Medicinal Plant Extracts for Screening Phytobiotic Material. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 36(10): 1235-1240
12. Kianbakht, S. and F. Jahaniani. 2003. Evaluation of antibacterial activity of *Tribulus terrestris* L. *Ir J Med Sci.* (03): 22-24
13. Kim, C. J. and H. J. Suh. 2005. Antioxidant Activities of Rhubarb Extracts Containing

- Phenolic Compounds. J. Korean Soc. Food Cult. 20(1): 77-85.
14. Kim, J. H. and Y. S. Ko. 2011. The biological activities of extracts and fractions of herbal plants. JKMR. 21(1): 47-56.
 15. Kim, M. J., T. K. Jung, H. C. Park, and K. S. Yoon. 2016. Skin Volume Augmentation and Anti-wrinkle Effects of Tribulus terrestris Fruit Extract. KSBB Journal. 31(3): 178-185.
 16. Kim, Y. H., S. M. Lee, S. J. Cheon, M. J. Jang, D. H. Jun, H. J. Choi, W. A. Cho, and J. T. Lee. 2007. Study on Anti-oxidant Activity of Four Kinds of Korea Herb Medicine Materials. JKSF. 5(4): 139-144.
 17. Lee, A., H. R. Park, M. S. Kim, S. B. Cho, and N. J. Choi. 2014. A Comparative Study between Microbial Fermentation and Non-Fermentation on Biological Activities of Medicinal Plants, with Emphasis on Enteric Methane Reduction. Korean J Organic Agri. 22(4): 801-813.
 18. McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, C. A. Morgan, L. A. Sinclair, and R. G. Wilkinson. Animal Nutrition. 6th ed. London: Prentice Hall, 2002.
 19. Morsy, T. A., G. A. Gouda, and A. E. Kholif. 2022. In vitro fermentation and production of methane and carbon dioxide from rations containing Moringa oleifera leave silage as a replacement of soybean meal: In vitro assessment. Environ. Sci. Pollut. Res. 29(46): 69743-69752.
 20. National Inventory Report (NIR). 2022. Greenhouse Gas Inventory and Research Center of Korea.
 21. Oleszek, M. and S. Kozachok. 2018. Antioxidant activity of plant extracts and their effect on methane fermentation in bioreactors. Int. Agrophys. 32(3): 385-401.
 22. Oh, S. J., N. I. Baek, and H. Y. Kim. 2001. Piceatannol, Antioxidant Compound Isolated from the Root of Rheum undulatum L. Appl Biol Chem. 44(3): 208-210.
 23. Oskoueian, E., N. Abdullah, and A. Oskoueian. 2013. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. Biomed Res Int. 349129.
 24. Pazla, R., N. Jamarun, M. Zain, A. Arief, G. Yanti, E. M. Putri, and R. H. Candra. 2022. Impact of Tithonia diversifolia and Pennisetum purpureum-based ration on nutrient intake, nutrient digestibility and milk yield of Etawa crossbreed dairy goat. Int. J. Vet. Sci. 11(3): 327-335.
 25. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med. 20(7): 933-956.
 26. Rowe, J. B., A. Davies, and A. W. J. Brome. 1983. Changing rumen fermentation by chemical means. In Recent Advances in Animal Nutrition in Australia, 1983, ed. D. J.

- Farrell and P. Vohra. University of New England Publishing Unit, Armidale. pp. 102-109.
27. Soliva, C. R., A. B. Zeleke, C. Clement, H. D. Hess, V. Fievez, and M. Kreuzer. 2008. In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Anim Feed Sci Technol.* 147(1-3): 53-71.
 28. Stiles, D. A., E. E. Bartley, R. E. Meyer, C. W. Deyoe, and H. B. Pfof. 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(10): 1436-1447.
 29. Tilley, J. M. A. and D. R. Terry. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage sci.* 18(2): 104-111.
 30. Wu, Q., H. Chen, F. Zhang, W. Wang, F. Xiong, Y. Liu, L. Lv, W. Li, Y. Bo, and H. Yang. 2022. Cysteamine Supplementation In Vitro Remarkably Promoted Rumen Fermentation Efficiency towards Propionate Production via Prevotella Enrichment and Enhancing Antioxidant Capacity. *Antioxidants.* 11(11): 2233.
 31. Yang, S. H., S. Y. Lee, S. B. Cho, K. H. Park, J. K. Park, D. Y. Choi, and Y. H. Yoo. 2011. The Effect of Vegetable Sources Supplementation on In vitro Ruminant Methane Gas Production. *JAES.* 17(3): 171-180.