

## 국내산 파(*Allium fistulosum* L.)와 탄닌산을 이용한 사료첨가제가 *in vitro* 반추위 발효성상과 메탄 발생에 미치는 영향\*

이신자<sup>\*\*†</sup> · 엄준식<sup>\*\*\*†</sup> · 김현상<sup>\*\*\*</sup> · 김형석<sup>\*\*\*</sup> · 이성실<sup>\*\*\*\*</sup>

### Effects of Dietary *Allium fistulosum* L. and Tannic Acid on *in vitro* Ruminal Fermentation Characteristics and Methane Emission

Lee, Shin-Ja · Eom, Jun-Sik · Kim, Hyun-Sang · Kim, Hyeong-Suk · Lee, Sung-Sill

This study was conducted to investigate for the natural methane emission inhibitor as a feed additive no adversely effect on rumen fermentation. Five different Control (Wheat barn (0.05 g), MRA(Methane Reduction Additive)-1 (*Allium fistulosum* L. (0.05 g)), MRA-2 (Sodium Lauryl Sulfate (0.025 g) + Wheat barn (0.025 g) mixed), MRA-3 (Sodium Dodecyl Sulfate (0.025 g) + Wheat barn (0.025 g) mixed), and MRA-4 (*Allium fistulosum* L. (0.02 g) + Tannic acid (0.02 g) + Wheat barn (0.01 g) mixed) contents were used to perform 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h incubation for *in vitro* fermentation. Ruminal pH values were ranged within normal ruminal microbial fermentation. Dry matter digestibility was not significantly different across the treatments during the whole fermentation time. Also, the result of microbial growth had no adversely effect on during the whole fermentation time. At 24 h, methane emission was significantly lower ( $P<0.05$ ) than all treatments except to MRA-1. Especially, MRA-4 carbon dioxide emission was significantly lower ( $P<0.05$ ) than control at 9, 24 and 48 h incubation. In addition MRA-4 propionate concentration was significantly higher ( $P<0.05$ ) than control at 24 h incubation. The result of RT-PCR Ciliate-associated methanogens were significantly lower ( $P<0.05$ ) at MRA-1, MRA-3 and MRA-4 than control at 24 h incubation.

\* 본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01266401)에서 지원 받았음.

† These authors contributed equally to this work as the first authors.

\*\* 경상대학교 농업생명과학연구원&중점연구소

\*\*\* 경상대학교 응용생명과학부(BK21Plus)

\*\*\*\* Corresponding author, 경상대학교 응용생명과학부(BK21Plus)&농업생명과학연구원&중점연구소 (lss@gnu.ac.kr)

Based on the present results, MRA-4 could be suggestible methane emission inhibitor as a natural feed additive.

Key words : *Allium fistulosum* L, carbon dioxide, methane, rumen, tannic acid

## I. 서 론

온실가스 증가로 지구온난화의 문제는 심각해지고 있고, special report on emissions scenarios (SRES)는 향후 10년마다 약 0.2℃씩 지구의 온도가 증가할 것으로 전망하였으며 (IPCC, 2011), 축산분야에서 배출되는 온실가스인 이산화탄소, 메탄 및 아산화질소 가스가 지구온난화의 주요한 원인이다. 축우농가의 대량화로 반추가축에서 연간 발생하는 메탄은 4.4 백만톤으로 1990년에 비하여 47.4%가 증가하여(Kim et al., 2016), 최근에 천연사료첨가제(Patra and Saxena, 2009; Benchaar and Greathead, 2011), 합성사료첨가제(McAllister and Newbold, 2008), 유용미생물(McGinn et al., 2004) 및 사료배합기술(Kim et al., 2011) 등을 활용한 메탄가스를 줄이는 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나 합성첨가제는 독성과 잔류의 위험성으로 대부분의 국가에서 사용이 금지되어 있어, 이를 대체하기 위한 천연첨가제의 연구가 활발히 진행되어 왔지만(Benchaar and Greathead, 2011) 메탄 저감의 지속성이 떨어지는 단점이 있어 이를 보완 할 수 있는 천연첨가제의 탐색이 필요하다.

파(*Allium fistulosum* L.)에 함유된 알리신은 일반적으로 향미생물, 항산화, 항혈전, 항암 등의 효과가 있고(Kim and Chun, 1999; Abu-Lafi et al., 2004), 반추동물에서는 알리신을 함유한 식물 추출물을 *in vitro* 반추위 메탄 저감 효과가 있으며(Patra and Saxena, 2009), 특히 Busquet 등(2005)은 파는 반추위 내 메탄 생성 박테리아를 억제하여 메탄 저감 효과가 있다고 보고하였다.

탄닌은 폴리페놀 화합물로서 일반적으로 항균, 항염증, 항바이러스 및 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Perez-Fonseca et al., 2016). 탄닌은 반추위 내에서 프로토조아를 감소시켜 메탄의 전구물질인 수소와 이산화탄소를 감소시켜 메탄을 저감시키고(Williams and Coleman, 1992), 탄닌은 반추위내 분해단백질을 보호하여 십이지장으로 단백질을 공급하는 효과 및 고창증 예방의 효과가 있었다(Irene, 2006; Waghorn, 2008). 또한, Yang 등(2017)은 cannula가 장착된 숫소에게 탄닌을 급여하면 반추위 내 프로토조아 및 메탄 생성 박테리아 감소로 메탄 발생량이 감소한다고 보고하여 탄닌 급여는 반추위 메탄 저감에 효과적이라고 보고하였다.

따라서, 본 연구에서 합성물질인 Sodium Lauryl Sulfate (SLS) 및 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)를 대체 할 수 있는 후보천연물질인 파와 탄닌산을 선택하여 반추위 내에서 메탄 저

감에 관한 비교 연구를 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 반추위액

연구 절차 및 공시축의 사양관리는 국립경상대학교 실험동물 복지 윤리법에 따라 수행되었으며, 반추위액은 국립경상대학교 야생동물보호센터에서 사육중인 반추위 cannula가 장착된 한우 암소(체중 450 kg ± 30 kg)로부터 채취하였다. 공시동물의 사양관리는 농후사료(제 BBVMRO 158호)와 timothy를 6:4의 비율로 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:00) 분할 급여 하였으며 물과 미네랄 블록은 자유 섭취토록 하였다. 반추위액은 오전 사료급여 직전 반추위 cannula를 통해 채취하여 4겹의 cheese cloth로 여과 한 다음, 혐기상태의 2 L의 유리병에 담아 실험실로 이동하여 39°C water bath (Lab Companion; BS-21)에 1시간 정치 후, 진공펌프로 사료 입자를 제거하여 *in vitro* 시험에 사용하였다.

### 2. 공시재료 및 *in vitro* 시험

2 mm으로 분쇄한 티모시를 65°C dry oven에서 24시간 건조시킨 후 공시재료로 사용하였고, 3 cm × 5.5 cm로 자체 제작한 nylon bag (Ankom Forage bag: R1020)에 공시재료 0.95 g을 모든 처리구에 일괄적으로 사용하였으며, 0.05 g은 처리구별로 메탄 저감을 위한 원료로 사용하였다. 대조구는 밀기울, 처리1구는(MRA-1; 파(*Allium fistulosum* L.) 0.05 g), 처리2구는(MRA-2; SLS(0.025 g) + 밀기울(0.025 g)), 처리3구는(MRA-3; SDS(0.025 g) + 밀기울(0.025 g)), 그리고 처리4구는(MRA-4; 파(0.02 g) + 탄닌산(0.02 g) + 밀기울(0.01 g))을 각각 넣어 heat sealing한 후 125 mL serum bottle에 투여하였다. 그 후 반추위액과 McDougall buffer (Mcdougall, 1948)를 1:2의 비율로 혼합한 배양액 60 mL를 혐기상태(O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub>)로 분주 후 밀봉하였다. 각 처리구별 배양은 39°C의 shaking incubator (Jeio Tech; SI-900R, 120 rpm)에서 시간대별 (3, 6, 9, 12, 24 및 48 h)로 3반복으로 *in vitro* 시험을 수행하였다. 공시재료, 대조구 및 처리구의 화학적 조성은 Table 1과 같다(AOAC, 2012).

Table 1. Chemical composition of Timothy and methane-reducing feed additives

Chemical composition (DM %)	Timothy	Treatments <sup>1</sup>				
		Control	MRA-1	MRA-2	MRA-3	MRA-4
Moisture (%)	8.87	11.15	11.21	10.98	11.04	11.07
Crude protein	13.37	14.09	14.90	13.82	14.04	13.94
Crude fat	2.25	7.83	7.55	7.90	7.90	7.34
Crude fiber	21.87	11.45	11.08	11.55	11.76	11.82
Crude ash	8.62	4.60	4.88	4.50	4.78	4.48
Ca	-	0.20	0.26	0.18	0.26	0.22
P	-	0.65	0.65	0.71	0.71	0.71
NDF <sup>2</sup>	53.18	-				
ADF <sup>3</sup>	30.57					

<sup>1</sup> Treatments : Control; wheat barn, MRA-1; *Allium fistulosum* L., MRA-2; Sodium Lauryl Sulfate and wheat barn, MRA-3; Sodium Dodecyl Sulfate and wheat barn, MRA-4; *Allium fistulosum* L., tannic acid and wheat barn.

<sup>2</sup> NDF : Neutral detergent fiber.

<sup>3</sup> ADF : Acid detergent fiber.

### 3. 분석항목 및 방법

pH 측정은 Weaton decapper (Weaton Co., USA)를 이용하여 serum bottle의 aluminum seal 및 butyl rubber를 제거한 후 배양액을 pH meter (Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.

건물소화율은 serum bottle 내 nylon bag을 수거하여 물을 채운 수조에 넣고 Heidolphs Rotamax 120 (Heidolph Instrument, Germany)를 이용하여 100 rpm에서 20분간 3회 세척 후, 65°C의 dry oven (Jeio tech, Korea)에서 약 24시간 건조시켜 건물 잔량을 측정하였다. 그 후 발효 전 기질 량과의 차이를 구한 후, 이 차이를 발효 전 기질 량의 백분율로 환산하여 건물소화율을 계산하였다.

미생물성장량은 배양액 1 mL를 채취한 다음, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료입자를 제거하였다. 그 후 상등액을 14,000 rpm에서 3분간 재원심분리하여 미생물 pellet을 침전시킨 후 상등액은 제거하였고, pellet에 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 1 mL 첨가하여 vortex로 교반시키는 세척 과정을 3회 반복 진행한 후 spectrophotometer (BIO-RAD Model 680)로 550 nm에서 optical density (O.D) 값을 구하여 미생물성장량을 측정하였다.

총 가스 발생량은 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, 그 후 9 mL vacutainer에 가스를 포집하여 Gas Chromatography (GC; HP 5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 메탄 및 이산화탄소 발생량을 측정하였다.

휘발성지방산은 배양액 1 mL를 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리과정으로 사료입자를 제거하고, 상등액을 0.20  $\mu$ M syringe filter로 여과 후 High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Agilent-1200, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시료의 주입량은 20  $\mu$ L였고, 이동상 용액은 0.0085N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였으며, 유속은 0.6 mL/min이었다. Column은 300 mm  $\times$  7.8 mm I.d. MetaCarb 87H (Varian, USA)를 35°C에서 사용하였다.

미생물 군집변화를 측정하기 위하여 Real-Time PCR 분석을 실시하였다. 배양액 1 mL를 채취한 다음, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료 입자를 제거한 후, NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Düren, Germany)를 이용하여 DNA를 추출 후 Nano-drop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware USA)을 이용하여 DNA의 농도를 측정 후 10 mg/ $\mu$ L로 보정하여 시험에 사용하였다. 사용한 primer는 각각 total bacteria (Denman and McSweeney, 2006), Ciliate-associated methanogens (Skillman et al., 2006), Methanogenic archaea (Denman et al., 2007), *Fibrobacter succinogenes*와 *Ruminococcus flavefaciens* (Denman and McSweeney, 2006) 및 *Ruminococcus albus* (Koike and Kobayashi, 2001)이며, 시험에 사용하기 전 forward primer (FW)와 reverse primer (RW)를 각각 10  $\mu$ L와 증류수 180  $\mu$ L를 섞어 10 pmol로 희석하였다. 0.2 mL PCR tube (PCR-0208-FCP-C, Corning Axygen, New York, USA)에 10 mg/ $\mu$ L로 보정한 DNA와 증류수를 섞어 9  $\mu$ L 분주하고, primer 1  $\mu$ L와 SYBR Green (Code: QPK-201, Toyobo Co., LTD., Japan) 10  $\mu$ L를 섞은 pre-mixture를 11  $\mu$ L 분주하여 총 20  $\mu$ L가 되게 하였다. 그 후 Denman과 McSweeney (2006), Denman 등(2007)의 방법으로 Real-Time PCR (CFX96TM Real-Time system, BIO RAD)을 수행하였으며, total bacteria를 reference gene으로, 섬유소 박테리아(*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*)와 Methanogenic archaea 및 Ciliate associated methanogen의 발현율을 측정하였고, control구를 1로 보고 다른 첨가구를 상대정량하여 미생물 군집변화를 비교하였다.

#### 4. 통계처리

통계처리는 SAS package program (2002)의 General Linear Model (GLM) procedure에 따라 처리하였으며, 각 처리구간의 유의성 검증을 위해 분산분석을 실시 후, Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다( $P < 0.05$ ).

### Ⅲ. 결과 및 고찰

과 및 탄닌산이 *in vitro* 반추위 내 발효성상 중 pH, 건물소화율 및 미생물성장량에 미치는 영향은 Table 2와 같다. pH는 적정 수준을 유지하고 있었으며, 발효시간이 경과함에 따라 낮아지는 경향을 나타내었다. 일반적인 반추위 내 pH는 5.0~7.8의 상태를 유지한다(Ha et al., 2013)는 결과와 유사하였다. 건물소화율은 대조구와 첨가구를 비교하였을 때 유의적

Table 2. Effects of methane reduction additives on pH, dry matter digestibility, and microbial growth rate during *in vitro* rumen fermentation

Incubation time (h)	Treatments <sup>1</sup>					SEM <sup>2</sup>	P-value	Mean
	Control	MRA-1	MRA-2	MRA-3	MRA-4			
pH								
3	7.00	7.00	7.02	7.02	7.01	0.01	0.588	7.01
6	6.76 <sup>bc</sup>	6.76 <sup>bc</sup>	6.75 <sup>c</sup>	6.81 <sup>ab</sup>	6.84 <sup>a</sup>	0.02	0.0165	6.79
9	6.60	6.62	6.63	6.63	6.63	0.02	0.6681	6.62
12	6.45 <sup>c</sup>	6.47 <sup>bc</sup>	6.48 <sup>bc</sup>	6.49 <sup>b</sup>	6.53 <sup>a</sup>	0.01	0.0004	6.49
24	6.30	6.28	6.32	6.30	6.29	0.02	0.7426	6.30
48	6.20 <sup>b</sup>	6.24 <sup>a</sup>	6.20 <sup>b</sup>	6.22 <sup>ab</sup>	6.22 <sup>ab</sup>	0.01	0.1068	6.21
Dry matter digestibility (%)								
3	34.03	32.89	36.49	34.77	33.12	2.30	0.8047	34.26
6	40.28	40.98	43.51	38.94	40.93	2.14	0.668	40.93
9	45.12	44.10	45.20	46.34	45.43	1.57	0.8955	45.24
12	48.58	47.18	43.94	45.60	44.10	1.96	0.3371	45.69
24	53.49	53.30	52.79	52.05	53.81	1.17	0.8403	53.09
48	56.49	56.99	56.45	56.90	56.00	0.83	0.9165	56.57
Microbial growth rate (O.D 550nm)								
3	0.07	0.06	0.06	0.08	0.08	0.01	0.6134	0.07
6	0.33 <sup>bc</sup>	0.27 <sup>c</sup>	0.30 <sup>bc</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.02	0.0081	0.34
9	0.37 <sup>b</sup>	0.42 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>ab</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.02	0.1216	0.41
12	0.44	0.46	0.42	0.49	0.55	0.05	0.3669	0.47
24	0.38	0.34	0.36	0.44	0.40	0.04	0.4525	0.38
48	0.55	0.58	0.47	0.49	0.49	0.04	0.3353	0.51

<sup>abc</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Treatments : Control; wheat barn, MRA-1; *Allium fistulosum* L., MRA-2; Sodium Lauryl Sulfate and wheat barn, MRA-3; Sodium Dodecyl Sulfate and wheat barn, MRA-4; *Allium fistulosum* L., tannic acid and wheat barn.

<sup>2</sup> SEM : Standard error of the mean.

( $P>0.05$ )인 차이를 보이지 않았다. 미생물 성장량은 발효 6, 9시간대 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 높았으며, 모든 첨가구에서 12시간대와 48시간대에서 최대치에 도달하였다. 이러한 결과는 파 및 탄닌산은 미생물의 성장 지연 현상은 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에 사용된 파와 탄닌산은 적정 범위의 pH 상태를 유지시키고, 건물소화율 및 미생물성장량에 부정적인 영향을 미치지 않으므로 총 가스 및 메탄을 줄일 수 있는 천연첨가제의 조건에 적합하다고 사료된다.

파 및 탄닌산이 *in vitro* 반추위 내 가스발생량에 미치는 영향은 Table 3과 같다. 총 가스 발생량은 발효시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 증가하였고, 발효 3, 9시간대 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 측정되었다. 메탄 발생량은 발효시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 증가하였고, 발효 24시간대 MRA-2, MRA-3 및 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮았으며, 특히 MRA-3구에서 다른 처리구들에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 측정되었다. 이산화탄소 발생량 역시 발효 24시간대에 MRA-2, MRA-3 및 MRA-4구에서 대조구에 비해 모두 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 측정되었다. 특히 발효 48시간대 MRA-4구에서 이산화탄소 발생량이 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 나타난 것은 탄닌 함유 식물 추출물을 이용한 이산화탄소 발생량 연구결과와 유사하였다(Tan et al., 2011; Lee et al., 2015). 따라서 이번 연구에 사용된 파와 탄닌산은 합성첨가제와 유사한 메탄 저감 효과를 보였고, 특히 이산화탄소 저감 효과는 합성첨가제보다 지속성 면에서 우수한 것으로 나타났다.

Table 3. Effects of methane reduction additives on total gas, methane and carbon dioxide emissions during *in vitro* rumen fermentation

Incubation time (h)	Treatments <sup>1</sup>					SEM <sup>2</sup>	P-value	Mean
	Control	MRA-1	MRA-2	MRA-3	MRA-4			
Total gas emission (mL/g DM)								
3	180.35 <sup>a</sup>	178.02 <sup>ab</sup>	173.59 <sup>c</sup>	175.01 <sup>bc</sup>	176.39 <sup>bc</sup>	1.12	0.0133	176.67
6	213.35 <sup>ab</sup>	211.23 <sup>b</sup>	210.39 <sup>b</sup>	217.89 <sup>a</sup>	214.03 <sup>ab</sup>	1.50	0.0392	213.38
9	259.28 <sup>a</sup>	255.17 <sup>ab</sup>	255.48 <sup>ab</sup>	244.61 <sup>b</sup>	243.29 <sup>b</sup>	3.67	0.0392	251.57
12	274.12	280.83	270.11	274.70	270.53	3.19	0.1996	274.06
24	337.64 <sup>a</sup>	331.41 <sup>ab</sup>	323.91 <sup>ab</sup>	311.14 <sup>b</sup>	316.73 <sup>a</sup>	6.96	0.1225	324.17
48	304.59 <sup>ab</sup>	300.68 <sup>b</sup>	302.58 <sup>ab</sup>	320.17 <sup>a</sup>	303.69 <sup>ab</sup>	5.32	0.1437	306.34
Methane emission (mL/g DM)								
3	1.53 <sup>b</sup>	1.56 <sup>ab</sup>	1.65 <sup>ab</sup>	2.15 <sup>ab</sup>	3.49 <sup>a</sup>	0.57	0.1539	2.08
6	6.04 <sup>bc</sup>	6.34 <sup>bc</sup>	4.62 <sup>c</sup>	7.83 <sup>ab</sup>	10.07 <sup>a</sup>	0.91	0.016	6.98
9	17.88	15.34	14.79	14.31	15.47	1.42	0.4770	15.56

Incubation time (h)	Treatments <sup>1</sup>					SEM <sup>2</sup>	P-value	Mean
	Control	MRA-1	MRA-2	MRA-3	MRA-4			
12	24.52	24.70	20.58	23.74	25.53	2.45	0.6636	23.82
24	56.89 <sup>a</sup>	55.12 <sup>a</sup>	40.49 <sup>b</sup>	28.42 <sup>c</sup>	42.91 <sup>b</sup>	4.58	0.0051	44.77
48	57.68 <sup>a</sup>	57.17 <sup>a</sup>	43.47 <sup>ab</sup>	35.63 <sup>b</sup>	37.52 <sup>b</sup>	3.99	0.0276	46.29
Carbon dioxide emission (mL/g DM)								
3	9.88 <sup>a</sup>	9.62 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	3.31 <sup>ab</sup>	2.34 <sup>ab</sup>	2.57	0.0857	5.16
6	33.98 <sup>ab</sup>	33.45 <sup>ab</sup>	36.58 <sup>a</sup>	34.32 <sup>ab</sup>	31.88 <sup>b</sup>	0.95	0.0618	34.04
9	49.11 <sup>a</sup>	46.66 <sup>a</sup>	39.56 <sup>b</sup>	34.55 <sup>b</sup>	34.69 <sup>b</sup>	1.98	0.0009	40.91
12	50.67	50.28	55.50	58.23	50.08	3.27	0.3382	52.95
24	90.63 <sup>a</sup>	81.89 <sup>ab</sup>	69.95 <sup>bc</sup>	60.40 <sup>c</sup>	73.06 <sup>bc</sup>	4.41	0.0063	75.19
48	89.95 <sup>a</sup>	97.52 <sup>a</sup>	93.68 <sup>a</sup>	89.79 <sup>a</sup>	74.84 <sup>b</sup>	3.84	0.0175	89.15

<sup>abc</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> Treatments : Control; wheat barn, MRA-1; *Allium fistulosum* L., MRA-2; Sodium Lauryl Sulfate and wheat barn, MRA-3; Sodium Dodecyl Sulfate and wheat barn, MRA-4; *Allium fistulosum* L., tannic acid and wheat barn.

<sup>2</sup> SEM : Standard error of the mean.

과 및 탄닌산이 *in vitro* 반추위 내 휘발성지방산에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 4와 같다. 총 휘발성지방산 함량은 발효 24시간대 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. 초산(Acetic acid) 함량은 발효 6, 9시간대 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 측정 되었으며, 발효 48시간대 초산 함량은 MRA-1구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮았다. 프로피온산(propionic acid) 함량은 발효 24시간대 MRA-4구가 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. 반추위 내 프로피온산은 메탄의 전구물질인 수소를 이용하여 생성되는 것으로 (Grobner et al., 1982), 탄닌산이 반추위 내 수소를 이용하여 메탄 생성을 줄여주는 것으로 사료된다.

과 및 탄닌산이 *in vitro* 반추위 내 미생물 군집변화에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 1과 같다. 섬유소 분해 박테리아인 *Ruminococcus albus*와 *Fibrobacter succinogenes*는 발효 12시간대 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮았고, 발효 24시간대 *Ruminococcus albus*는 MRA-1, MRA-2 및 MRA-3구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 높았으며, *Fibrobacter succinogenes*는 MRA-2, MRA-3 및 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. 본 연구 결과와 음이온성 계면활성제인 SLS는 반추위 내의 carboxy-methyl cellulase enzyme의 활성과 ciliate protozoa의 수를 감소시켜 유기물과 섬유소 분해율을 감소시키는 Santra 등(2007)의 결과와 유사하였다. 하지만, 계면활성제의 농도를 높이면 사료에 효소의 부착을 방해하는 McAllister 등(2000)의 결과와는 상이하였다. Tan 등(2011)은 *Leucaena leucocephala*에서 추출한 탄닌이 반추위 내 프로토조아 및 메탄 생성 박테리아



감소의 효과가 있다고 보고하였다. 본 연구에서 발효 24시간대 MRA-2구에서 ciliate-associated methanogens이 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮았고 MRA-1 및 MRA-4구에서 또한 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮은 것으로 나타나 파와 탄닌산은 합성첨가제의 메탄 저감의 대체 효능이 있는 것으로 사료된다.

Table 4. Effects of methane reduction additives on total VFA, acetic acid and propionic acid concentration during *in vitro* rumen fermentation

Incubation time (h)	Treatments <sup>1</sup>					SEM <sup>2</sup>	P-value	Mean
	Control	MRA-1	MRA-2	MRA-3	MRA-4			
Total VFA (mM/L)								
3	28.71 <sup>b</sup>	31.17 <sup>a</sup>	30.93 <sup>ab</sup>	29.97 <sup>ab</sup>	30.05 <sup>ab</sup>	0.70	0.1882	30.17
6	37.36 <sup>a</sup>	34.35 <sup>ab</sup>	31.68 <sup>ab</sup>	33.54 <sup>ab</sup>	30.72 <sup>b</sup>	1.69	0.1263	33.53
9	43.85 <sup>a</sup>	40.81 <sup>ab</sup>	35.45 <sup>ab</sup>	32.43 <sup>c</sup>	33.92 <sup>c</sup>	2.06	0.0132	37.29
12	31.45 <sup>a</sup>	43.67 <sup>b</sup>	39.84 <sup>b</sup>	61.61 <sup>a</sup>	59.29 <sup>a</sup>	1.33	<.0001	47.17
24	74.56 <sup>c</sup>	73.77 <sup>ab</sup>	72.24 <sup>b</sup>	74.31 <sup>ab</sup>	78.73 <sup>a</sup>	1.50	0.1009	74.72
48	83.65 <sup>ab</sup>	78.02 <sup>b</sup>	84.63 <sup>a</sup>	87.02 <sup>a</sup>	84.93 <sup>a</sup>	1.49	0.0165	83.65
Acetic acid concentration (mM/L)								
3	19.75 <sup>b</sup>	22.60 <sup>a</sup>	22.55 <sup>a</sup>	21.94 <sup>a</sup>	21.59 <sup>ab</sup>	0.60	0.0419	21.69
6	25.69 <sup>a</sup>	22.85 <sup>ab</sup>	21.02 <sup>b</sup>	21.53 <sup>b</sup>	19.71 <sup>b</sup>	1.17	0.0405	22.16
9	26.43 <sup>a</sup>	24.15 <sup>ab</sup>	23.49 <sup>ab</sup>	20.67 <sup>b</sup>	21.08 <sup>b</sup>	1.51	0.1146	23.16
12	19.82 <sup>c</sup>	25.87 <sup>b</sup>	23.24 <sup>bc</sup>	33.25 <sup>a</sup>	33.21 <sup>a</sup>	1.15	<.0001	27.08
24	40.70 <sup>ab</sup>	39.96 <sup>ab</sup>	37.82 <sup>b</sup>	39.97 <sup>ab</sup>	42.99 <sup>a</sup>	1.16	0.1101	40.29
48	45.21 <sup>a</sup>	40.51 <sup>b</sup>	43.37 <sup>ab</sup>	45.81 <sup>a</sup>	45.36 <sup>a</sup>	1.05	0.0269	44.05
Propionic acid concentration (mM/L)								
3	6.98 <sup>a</sup>	6.77 <sup>ab</sup>	6.66 <sup>ab</sup>	6.37 <sup>b</sup>	6.75 <sup>ab</sup>	0.13	0.0661	6.71
6	9.85	9.17	8.78	10.05	8.97	0.55	0.4422	9.37
9	14.70 <sup>a</sup>	14.25 <sup>a</sup>	9.62 <sup>b</sup>	9.83 <sup>b</sup>	10.76 <sup>b</sup>	0.59	0.0002	11.83
12	9.52 <sup>d</sup>	15.12 <sup>c</sup>	14.22 <sup>c</sup>	25.19 <sup>a</sup>	22.57 <sup>b</sup>	0.44	<.0001	17.33
24	29.06 <sup>b</sup>	29.07 <sup>b</sup>	30.84 <sup>ab</sup>	30.32 <sup>ab</sup>	31.42 <sup>a</sup>	0.58	0.0568	30.14
48	35.64	35.20	37.67	38.36	36.38	1.40	0.4949	36.65

<sup>abc</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> Treatments : Control; wheat barn, MRA-1; *Allium fistulosum* L., MRA-2; Sodium Lauryl Sulfate and wheat barn, MRA-3; Sodium Dodecyl Sulfate and wheat barn, MRA-4; *Allium fistulosum* L., tannic acid and wheat barn.

<sup>2</sup> SEM : Standard error of the mean.

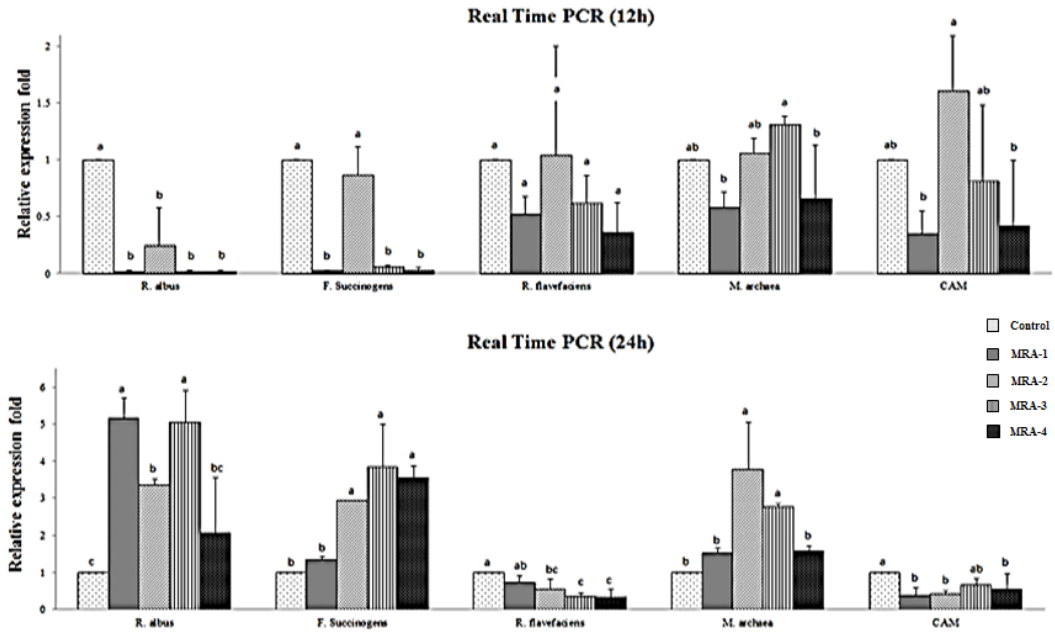


Fig. 1. Relative quantification analysis of rumen microorganism population *in vitro* ruminal fermentation by methane reduction additives 12 h and 24 h fermentation time.

<sup>abc</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Control; wheat barn, MRA-1; *Allium fistulosum* L., MRA-2; Sodium Lauryl Sulfate and wheat barn, MRA-3; Sodium Dodecyl Sulfate and wheat barn, MRA-4; *Allium fistulosum* L., tannic acid and wheat barn.

R. albus; *Ruminococcus albus*, F. succinogenes; *Fibrobacter succinogenes*, R. flavefaciens; *Ruminococcus flavefaciens*, M.archaea; Methanogenic archea and CAM : Ciliate-associated methanogens.

#### IV. 요약

본 연구는 반추동물의 메탄 감소에 효과가 있는 합성첨가제를 대체 할 수 있는 천연첨가제를 찾고자 연구를 실시하였다. 첨가제인 MRA-1(과), MRA-2 (SLS), MRA-3 (SDS), MRA-4(과+탄닌산)를 만들어 발효시간대별(3, 6, 9, 12, 24 및 48 h) *in vitro* 시험을 실시하였다. pH는 발효시간동안 적정범위였으며, 건몰소화율은 모든 발효시간대별 모든 처리구에서 대조구와 유의적( $P > 0.05$ )인 차이를 보이지 않았고, 미생물성장량에도 부정적인 영향을 미치지 않았다. 메탄 발생량은 발효 24시간대 MRA-1구를 제외한 나머지 처리구에서 대조구에 비해 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮게 측정되었으며, 특히 이산화탄소 발생량은 MRA-4 첨가구에서 발효 9, 24, 48시간대에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮았다. 메탄생성량 감소에 영향이 있는 프로피온산 함량은 발효 24시간대 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았

다. Ciliate-associated methanogens은 발효 24시간대 MRA-1, MRA-3 및 MRA-4구에서 대조구에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 측정되었다. 따라서 파와 탄닌산은 반추위 내 메탄 저감 효과가 있는 합성첨가제를 대체 할 수 있어 반추동물용 천연 메탄 저감제로서의 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

[Submitted, November. 5, 2018 ; Revised, November. 19, 2018 ; Accepted, November. 20, 2018]

## References

1. Abu-Lafi, S., J. W. Dembicki, P. Goldschlag, L. O. Hanus, and V. M. Dembitsky. 2004. The Use of the 'Cryogenic' GC/MS and on-Column Injection for Study of Organosulfur Compounds of the *Allium Sativum*. *J. Food. Compost. Anal.* 17(2): 235-245.
2. AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition.
3. Benchaar, C. and H. Greathead. 2011. Essential Oils and Opportunities to Mitigate Enteric Methane Emissions from Ruminants. *Anim. Fed. Sci. Technol.* 166-167: 338-355.
4. Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. Carro, and C. Kamel. 2005. Effect of Garlic Oil and Four of its Compounds on Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy. Sci.* 88(12): 4393-4404.
5. Denman, S. E. and C. S. McSweeney. 2006. Development of a Real-Time PCR Assay for Monitoring Anaerobic Fungal and Cellulolytic Bacterial Populations within the Rumen. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 58: 572-582.
6. Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and Diversity Analysis of Ruminal Methanogenic Populations in Response to the Antimethanogenic Compound Bromochloromethane. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 62: 313-322.
7. Duncan, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F test. *Biometrics.* 11: 1-6.
8. 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.
9. Ha, J. K., S. S. Lee, Y. S. Moon, C. H. Kim, S. W. Seo, M. K. Beak, S. S. Lee, S. Y. Lee, W. S. Lee, J. S. Jang, and N. J. Choi. 2013. Ruminant Nutrition and Physiology. Seoul National University press.
10. IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change). 2001. The scientific basis. Cambridge, UK; Cambridge University Press.

11. Irene, M. H. 2006. Unravelling the Conundrum of Tannins in Animal Nutrition and Health (Review). *J. Sci. Food. Agric.* 86: 2010-2037.
12. 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.
13. Kim, H. J., and H. S. Chun. 1999. Biological Functions of Organosulfur Compounds in Allium Vegetables. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 28: 1412-1423.
14. Kim, M. S., S. H. Yang, Y. K. Oh, and K. H. Park. 2016. Estimation of Greenhouse Gas Emissions from Korean Livestock During the Period 1990~2013.
15. Koike, S. and Y. Kobayashi. 2001. Development and Use of Competitive PCR Assays for the Rumen Cellulolytic Bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 204: 361-366.
16. Lee, S. K., S. J. Lee, I. D. Lee, H. S. Kim, D. S. Oh, J. S. Eom, J. H. Lim, and S. S. Lee. 2015. Effects of Tannin-Riching Plant Extracts on Rumen Fermentation, Microbial Growth and Methane Emission. *J. Agric. Life. Sci.* 49(5): 195-210.
17. McAllister, T. A. and C. J. Newbold. 2008. Redirecting Rumen Fermentation to Reduce Methanogenesis (Review). *Aust. J. Exp. Agric.* 48(2): 7-13.
18. McAllister, T. A., K. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford, and K.-J. Cheng 2000. Effect of a Surfactant and Exogenous Enzymes on Digestibility of Feed and on Growth Performance and Carcass Traits of Lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80(1): 35-44.
19. McDougall, E. I. 1948. Studies on Ruminant Saliva. 1. The Composition and Output of Sheep's Saliva. *Biochem. J.* 43: 99.
20. McGinn, S. M., K. A. Beauchemin, T. Coates, and D. Colombatto. 2004. Methane Emissions from Beef Cattle: Effects of Monensin, Sunflower Oil, Enzymes, Yeast, and Fumaric Acid. *J. Anim. Sci.* 82(11): 3346-3356.
21. Patra, A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary Phytochemicals as Rumen Modifiers: A Review of the Effects on Microbial Populations. *Anton. Van. Leeuwen.* 96(4): 363-375.
22. Perez-Fonseca, A., Y. Alcalá-Canto, A. Z. M. Salem, and A. B. Alberti-Navarro. 2016. Anticoccidial Efficacy of Naringenin and a Grapefruit Peel Extract in Growing Lambs Naturally-Infected with *Eimeria* spp. *Vet. Parasitol.* 232: 58-65.
23. Santra, A., S. A. Karim, and O. H. Chaturvedi. 2007. Rumen Enzyme Profile and Fermentation Characteristics in Sheep as Affected by Treatment with Sodium Lauryl Sulfate as Defaunating Agent and Presence of Ciliate Protozoa. *Small. Ruminant. Res.* 67(2-3): 126-

137.

24. Skillman, L. C., A. F. Toovey, A. J. Williams, and A. D. G. Wright. 2006. Development and Validation of a Real-Time PCR Method to Quantify Rumen Protozoa and Examination of Variability Between *Entodinium* Populations in Sheep Offered a Hay-Based Diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 200-206.
25. Tan, H. Y., C. C. Sieo, N. Abdullah, J. B. Liang, X. D. Huang, and Y. W. Ho. 2011. Effects of Condensed Tannins from *Leucaena* on Methane Production, Rumen Fermentation and Populations of Methanogens and Protozoa *in vitro*. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 169: 185-193.
26. 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.
27. Wagorn, G. 2008. Beneficial and Detrimental Effects of Dietary Condensed Tannins for Sustainable Sheep and Goat Production - Progress and Challenges. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 147: 116-139.
28. Williams, A. G. and G. S. Coleman. 1992. *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag New York Inc.
29. Yang, K., C. G. Wei, Y. Zhao, Z. W. Xu, and S. X. Lin. 2017. Effects of Dietary Supplementing Tannic Acid in the Ration of Beef Cattle on Rumen Fermentation, Methane Emission, Microbial Fora and Nutrient Digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101(2): 302-310.