

발간등록번호

11-1543000-004593-01

# 한우에서 장내발효 메탄저감 효과가 있는 제품의 국내 효과 실증

2024. 6. 7.

주관연구기관 / 서울대학교 산학협력단

공동연구기관 / 카길애그리퓨리나

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한우에서 장내발효 메탄저감 효과가 있는 제품의 국내 효과 실증”  
(개발기간 : 2022. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 07.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단장(김재영)  
공동연구기관명 : 카길애그리퓨리나 대표이사(박종익)



주관연구책임자 : 서울대학교 김경훈  
공동연구책임자 : 카길애그리퓨리나 오준표

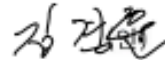
국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급			
							일반[ ], 보안[ <input checked="" type="checkbox"/> ]			
중앙행정기관명	농림축산식품부		사업명	사업명		2025 축산현안대응 산업화기술개발				
전문기관명	농림식품기술기획평가원			내역사업명		축산시설-환경개선				
공고번호	제 농축 2022-35호		총괄연구개발 식별번호							
			연구개발과제번호		322099-02					
기술분류	국가과학기술표준분류	LB0605	40%	LB0606	30%	LB0608	30%			
	농림식품과학기술분류	AB0201	40%	AB0202	30%	AB0203	30%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문									
	영문									
연구개발과제명	국문		한우에서 장내발효 메탄저감 효과가 있는 제품의 국내 효과 실증							
	영문		Demonstration of the goods with methane reduction effect in enteric fermentation of Hanwoo steers							
주관연구개발기관	기관명	서울대학교 산학협력단		사업자등록번호	119-82-03684					
	주소	(08826)서울시 관악구 관악로		법인등록번호	114371-0009224					
연구책임자	성명	김경훈		직위	교수					
	연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호					
연구개발기간	전체		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31( 21개월)							
	1단계	1년차	2022. 04. 01 - 2022. 12. 31( 9개월)							
		2년차	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31( 12개월)							
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		지방자치단체		합계			연구개발비 외 지원금	
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계		
총계	875,000	4,500	25,500			879,500	25,500	905,000		
1단계	1년차	375,000	2,250	12,750			377,250	12,750	390,000	
	2년차	500,000	2,250	12,750			502,250	12,750	515,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고				
공동연구개발기관	카길에그리퓨리나	오준표	부장			역할	기관유형			
						공동	대기업			
연구개발담당자 실무담당자	성명	김경훈		직위	교수					
	연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 06 월 07 일

연구책임자: 김 경 훈



주관연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 김재영

공동연구개발기관의 장: 카길에그리퓨리나 대표이사 박종역



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		2025축산현안대응 산업화기술개발		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
내역사업명 (해당 시 작성)		축산시설·환경개선		연구개발과제번호		322099-02	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0699	%	LB0504	%	SC0602	%
	농림식품 과학기술분류	RA0406	%	A202004	%	AB0299	%
총괄연구개발명 (과제선정 후 해당 시 작성)							
연구개발과제명		한우에서 장내발효 메탄저감 효과가 있는 제품의 국내 효과 실증					
전체 연구개발기간		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31( 1 년 9 개월)					
총 연구개발비		총 905,000 천원 (정부지원연구개발비: 875,000 천원, 기관부담연구개발비 : 30,000 천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ ] 기타[√ ]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준( 9 ) 종료시점 목표( 9 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)		-					
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)		-					
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		농가현장에서 장내발효 메탄저감 실적을 인정받을 수 있는 메탄저감제 조기 보급 및 확대를 위해 국내에 유통 가능한 제품을 대상으로 한우에서 메탄 저감 효과를 실증하고 장내발효 메탄저감제 등록 추진				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 문헌 또는 제조사의 제품정보를 분석하여 적정 급여수준(% 건물섭취량) 결정</li> <li>- 후보 물질 3점의 한우 in vivo 호흡챔버 메탄저감 효과 비교(단기 효과)를 통해서 최종 1점 선정의 실험적 근거 확보</li> <li>- 저감효과가 가장 큰 후보 1점의 5개월 이상 장기 급여 효과 측정 결과를 정리하여 온실가스종합정보센터에 감축계수 심의 신청(1차; 23년) 및 대응</li> </ul>				
	1년차	목표	문헌 또는 제조사의 제품정보를 분석하여 적정 급여수준(% 건물섭취량) 결정 하고 후보 물질 3점의 한우 in vivo 호흡챔버 메탄저감 효과 비교(단기 효과)를 통해서 최종 1점 선정의 실험적 근거 확보				
		내용	- 한우 거세우 8두(평균체중 321±14 kg)의 대표적인 사료를 급여하면서 3점의 후보물질이 대조구(무첨가구)와 비교하여 메탄발생이 감소(%)하는지를 측정하기 위해서 4기의 호흡챔버를 이용하여 단기 실험을 수행				
2년차	목표	- 저감효과가 가장 큰 후보 1점의 5개월 이상 장기 급여 효과 측정 결과를 정리하여 온실가스종합정보센터에 감축계수 심의 신청(1차; 23년) 및 대응을 하고 1차 신청에서 등록 거절 시에 추가 실험 수행과 과제 종료 후(24					

		년 7월) 2차 신청
	내용	한우 거세우 20두(평균 체중 348 ±18 kg)를 이용하여 1년차에서 선정된 후보 1개 제품이 장기간 지속적인 메탄감축효과가 있는지 알아보기 위해서 대조구(무첨가구)와 비교한 메탄감축(%)를 총 4회 측정하고 긍정적인 결과를 얻었을 경우, 온실가스종합정보센터 계수 검증항목에 준하여 결과를 정리하고 심의신청과 후속대응

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 저탄소산업 생태계 조성을 위한 국가 정책에 동참해서 축산업 분야에서 실질적인 온실가스 배출 감축목표 달성에 필요한 제1호 감축계수 등록</li> <li>○ 온실가스종합정보센터 검증 항목을 고려한 실험수행 방법의 매뉴얼 개발로 후속 연구의 수월성 증진</li> <li>○ 저메탄사료가 현장에 보급되고 농가 현장에서 장내발효 메탄부문 온실가스 실질 감축량이 국가온실가스 감축목표에 반영</li> </ul>				
---------------------	---	--	--	--	--

국문핵심어 (5개 이내)	탄소중립	메탄저감제	유통제품 검증	축산환경	감축계수
영문핵심어 (5개 이내)	Carbon zero	methane inhibiting feed additive	methane mitigation efficacy	livestock environment	Reduction factor

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	6p
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	7p
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	17p
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	62p
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 .....	63p
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	64p
참고 문헌 .....	43p

## 1. 연구개발과제의 개요

반추동물 장내발효 과정에서 발생하는 메탄(CH<sub>4</sub>)은 전 세계적으로 메탄 배출량의 주요 원인의 하나이다. 메탄은 100년 기준 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)보다 상대적으로 대기 온난화에 28배 더 강력한 영향을 미친다(Liu et al., 2021). 세계적으로 메탄 배출량의 30%를 차지하는 축산업(FAOSTAT, 2023)은 한국의 경우 2020년 기준으로 19.3 MtCO<sub>2</sub> eq/년으로 전체 농가 온실가스 배출량의 약 32.79%를 차지한다. 한국 정부는 이러한 문제를 해결하기 위해 사료 첨가제 중 메탄저감제를 신설하는 사료관리법의 “사료 등의 기준과 규격” 수정 고시하였고, 메탄저감제는 최소 10% 이상의 감축효과를 과학적 검증을 통해 증명해야 한다.

반추동물의 장내 발효 메탄 발생을 줄이는 노력은 경제적, 환경적인 면에서 아무리 강조해도 지나치지 않다. 메탄 생성은 반추동물의 총에너지 섭취량(Gross energy intake)의 4~8%가 손실되는 것으로 평가되고 있기 때문에(Appuhamy et al., 2016), 반추동물의 장내발효 메탄 생성을 감소시키기 위한 다양한 전략은 반추동물의 건강, 생산성, 환경 지속 가능성(Beauchemin et al., 2020)은 물론 농가 현장에 직접 적용할 수 있는 효과적이며 실용적인 접근 방법으로 이루어져야 한다(Arndt et al., 2022).

질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 캐슈넛 추출액(CNSL; cashew nut shell liquid), 사포닌, 마늘 성분 함유 첨가제는 메탄 발생량을 줄이기 위한 잠재적인 해결 방안으로 주목받아 왔다. 질산염은 대체 수소 이용원으로 작용함으로써 메탄 발생을 줄이는 것으로 알려져 있고(Feng et al., 2020; Abdelbagi et al., 2023), 캐슈넛 추출액도 수소 이용 경합과정에서 propionate 비율이 증가함으로써 메탄이 감소하는 것으로 보고되었다(Khurana et al., 2023; Ma et al., 2016). 사포닌은 반추위 내 프로토조아 세포막을 파괴하고 메탄 생성 관련 고세균을 줄여서 결과적으로 반추동물의 장내 발효 메탄 생성을 억제한다고 한다(Darabighane et al., 2021; Abdelbagi et al., 2023). 마늘 성분을 이용한 메탄저감제에는 Mootral사(스위스)가 개발한 Mootral Ruminant(마늘분말과 감귤추출액 혼합물)라는 제품이 알려져 있다. 그러나 위에서 언급한 모든 첨가제의 생체 내 메탄 억제 연구결과 들은 효과면에서 차이를 보여주고 있고 모두 외국에서 수행되었기 때문에 저탄소축산물 인증 또는 자발적 온실가스 감축사업과 같은 국내 정책 이행을 위해서는 국내 실험 실증의 필요성이 제기되어 왔다.

따라서, 본 연구는 우리나라에서 다양한 기능의 사료 첨가제로 이미 등록을 마친 질산염, 캐슈넛 추출액, 사포닌, 마늘 성분을 함유한 제품(각각의 제품명: SilvAir, Ruminup, Vital Yucca 그리고 국내 개발 마늘 제품 “가칭 Garlic AK”)을 한우 거세우에 급여하였을 때의 메탄저감 효과를 호흡대사챔버를 이용하여 측정하고 영양생리적인 영향을 종합적으로 규명하기 위해서 수행하였다. 또한, 10% 이상의 메탄 저감효과가 확인되고, 가격 면에서도 시장 진입이 가능한 제품이 있으면 메탄저감제 등록을 신청할 수 있도록 생체 내 평가를 통해서 각각의 첨가제들이 나타내는 대사 기전을 조사하였다.

본 연구에서는 반추가축의 호흡을 통해서 메탄과 함께 나오는 CO<sub>2</sub>를 지표 가스로 이용하여 메탄가스의 농도를 측정한 후에 최종적으로 1일 발생한 메탄가스를 정량화하는 방법(CO<sub>2</sub> 법)에서 얻은 결과를 호흡대사챔버를 이용해서 측정한 메탄발생량과 비교 분석하였다.

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### <호흡대사챔버를 이용한 메탄발생량 측정>

#### 1) 실험 동물 윤리

본 연구는 서울대학교 실험농장에서 사육되고 있던 홀스타인 거세우와 한우 거세우를 실험동물로 이용하였고, 실험동물을 대상으로 한 모든 실험의 방법은 서울대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인(SNU-221228-2)을 받았으며, 모든 실험은 관련 지침과 규정에 따라 수행되었다.

#### 2) 시험관 내 실험(in vitro) 방법에 의한 국내 유통 4개 제품의 메탄 저감 효과 비교(실험 1)

시험관 내 실험을 위한 반추위액 공여축으로 4마리의 홀스타인 거세우를 이용하였다(평균 체중 327±12kg). 각각의 홀스타인 거세우들은 조단백질 7.6%, 조지방 1.5%, NDF 64.1%가 함유된 연맥을 매일 2회 3.5kg씩 섭취하였으며, 동시에 조단백질 15.6%, 조지방 3.4%, NDF 16.0%가 함유된 농후사료 2.0kg를 09:00과 17:00 총 2차례 섭취하였다. 물은 자동급수기를 이용해서 공급되었다. 실험에 이용된 후보 제품명은 SilvAir' (SA; 5Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> · 10H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> 75% /DM), Ruminup' (RU; cashew nut shell liquid [CNSL]), 'Vital Yucca' (VY; 12% Yucca saponin) 그리고 '가칭 Garlic AK' (AK; 발효마늘 25%) 등 총 4 종이였다. 급여된 모든 사료 및 첨가제들은 DM 함량을 추정하기 위해 65°C의 건조 오븐에서 72시간 동안 건조하고(Thomas Scientific Model 4, Swedesboro, NJ, United States), 1mm 스크린을 통과하도록 분쇄한 후 화학 분석 전까지 4°C에서 보관하였다.

아침 사료 급여 전에 모든 홀스타인 거세우에서 약 800ml의 반추위액을 채취하여 4겹의 거즈를 통해서 이물질은 1차적으로 제거하고 O<sub>2</sub>-free 상태의 39°C로 유지된 플라스크에 보관하여 실험실로 신속히 운반하였다. 실험실에서 1:2(v/v) 비율로 O<sub>2</sub>-free 버퍼로 희석하였으며(pH 7.0 유지)(McDougall, 1948), 39°C의 온수 수조에서 지속적으로 이산화탄소를 주입하면서 혐기상태를 유지하였다. 또한, 시험관 내 실험에서는 공시축이 섭취한 사료들을 분쇄한 기질을 이용하였으며 60ml 배양병에 200mg (DM 기준)의 기질과 다양한 첨가량의 후보 제품 그리고 30ml의 반추위액(반추위 미생물 활성 상태)을 넣고 배양하였다. 후보 제품인 SA는 0.5, 1.0, 1.6, 2.5%/기질 DM, VY는 0.1, 0.3, 0.45, 0.6, 1.0%/기질 DM, RU는 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0%/기질 DM, AK는 0.1, 0.3, 0.6, 0.9%/기질 DM 첨가량으로 진행되었다. 각 배양 실험에서는 대조구(후보 제품 무첨가)와 양성(positive) 대조구(30 ppm monensin; CAS No. 22373-78-0, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)를 함께 배양하였다. 각 배양 실험에서 모든 첨가 수준은 3반복 실험으로 진행되었고 배양병은 고무마개로 밀봉하고 알루미늄으로 완전 밀봉 후에 39°C에서 24시간



동안 배양하고, 결과의 신뢰성 확보를 위해서 4번 각기 다른 날에 동일한 in vitro 실험을 반복 수행하였다.

24시간 배양 후, 배양병 상층에 있는 가스들의 부피를 측정하여 가스발생량 결과를 얻었고(Fedorah and Hrudey, 1983), 메탄 분석을 위해 가스 샘플들을 10ml 진공관으로 옮겨 보관하였다(ref 364979, BD Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

### 3) 생체 내 실험(in vivo) 방법에 의한 국내 유통 3개 제품의 메탄 저감 효과 비교(실험 2)

1개월 동안의 환경과 사료 적응 기간을 마친 한우 거세우 8두(평균체중  $321 \pm 14$  kg)를 무작위로 두 개의 인접한 우방에 4마리씩 배정하였다. 모든 거세우에게 농후사료와 티모시 건초(50:50)를 급여하면서 실험관 실험에서 얻어진 결과인 2.5% SA, 1% RU 그리고 0.6% VY/일일 건물섭취량(DMI)를 기초사료에 추가로 급여하였다. 기초사료의 원료 배합비율과 화학적 성분조성은 표 1과 같다. 본 실험은 duplicated 4 X 4 Latin square로 진행되었으며, 각 period는 총 24일(사료 적응 기간 17일, 호흡 챔버 적응 기간 3일, 메탄 측정 3일, 반추위 샘플 채취 1일)로 4 period까지 총 117일(휴지기 포함) 진행되었다. 또한, 각 period 사이에는 잔여 첨가제의 영향을 최소화하기 위해 7일간의 휴지기를 두었다. 또한, 호흡 챔버 4기는 각 1두씩 수용할 수 있었기 때문에 각 period는 1주일 간격으로 4두씩의 2개 그룹이 호흡챔버에 수용되었다. 우방에서는 하루 2회(09:00, 16:00) 개체별 사료급이를 위해서 잠금 장치인 스텐천을 이용하여 2시간 동안 계류해 놓은 뒤, 일반적인 비육 사료 급여 프로그램에 따라 농후사료를 먼저 급여 후 건초를 급여하였다. 또한, 거세우들은 우방과 호흡 챔버 모두에서 물을 자유롭게 마실 수 있었고, 사료 잔량이 기록되었다. 사료의 시료 채취는 각 period 시작 시점에서 이루어졌고, 수집 샘플들은 화학 분석이 이루어질 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관되었다.

**Table 1.** Ingredients and chemical composition of the diets fed to steers during the experimental period.

Ingredient composition, %DM	CON	SA	RU	VY
Concentrate				
Corn flour	13.97	13.63	13.83	13.89
Salt	0.10	0.09	0.09	0.09
Molasses	2.40	2.34	2.38	2.39
Sodium bicarbonate	0.16	0.16	0.16	0.16
Yeast culture product	0.04	0.04	0.04	0.04
Limestone powder	1.26	1.23	1.25	1.26
Palmolein oil	0.08	0.07	0.07	0.07
Sodium Gluconate	0.10	0.10	0.10	0.10
Mannanase	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin E (50%)	0.01	0.01	0.01	0.01
Fermented soy bean meal	2.00	1.95	1.98	1.99
Mineral premix	0.08	0.07	0.07	0.07

Vitamin premix	0.05	0.04	0.04	0.04
Wheat	12.50	12.19	12.38	12.43
Palm kernel meal	6.56	6.40	6.49	6.52
Copra meal	5.00	4.88	4.95	4.97
Rapeseed meal	1.69	1.65	1.67	1.68
DDGS corn	3.96	3.86	3.92	3.94
Roughage				
Timothy hay	50.00	48.75	49.50	49.70
Additive				
SilvAir (SA)	—	2.50	—	—
Ruminup (RU)	—	—	1.00	—
VitalYucca (VY)	—	—	—	0.60
Nutrient composition, %DM				
Organic matter (OM)	92.76	92.50	92.54	92.95
aNDFom1	40.56	39.00	38.44	39.74
ADFom2	23.31	22.45	21.96	22.66
Crude protein (CP)	12.93	13.44	13.06	12.95
Ether Extract (EE)	2.45	2.38	2.92	2.45
GE, cal/g	4279	4248	4312	4369

CON, control; SA, SilvAir; RU, Ruminup; VY, VitalYucca

<sup>1</sup>Neutral detergent fibre assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash. <sup>2</sup>Acid detergent fibre expressed excluding residual ash

#### 4) 질산염( $\text{NO}_3^-$ ) 제품(SilvAir)의 Top dressing 방법에 의한 장기 급여와 메탄 저감 효과(실험 3)

우사 환경에 1개월 간의 적응을 마친 한우 거세우 20두(평균 체중  $348 \pm 18$  kg)를 완전 임의 배치법 설계를 기반으로 4마리씩 인접한 5개의 우방에 배치되었다. 각 우방에서 4마리 중 2마리는 농후사료 50%와 티모시 건초 50%으로 구성된 기초사료(대조구) 급여 되었고, 나머지 2마리는 기초사료에 질산염( $\text{NO}_3^-$  함유 SilvAir' (SA;  $5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3^-$  75% /DM) 2.5%를 탑드레싱(처리구) 방식으로 제공되었다. 실험에 이용된 사료의 원료 배합비 및 화학적 성분 함량은 표 2에 나타내었다 호흡 챔버를 4기 보유하고 있기 때문에 실험 개시 후 21일, 51일, 80일, 112일 쯤에 각각 4마리씩 1주일 간격으로 5회 입실하는 방식으로 총 20두의 측정을 완료하였다. 실험 기간 동안 사료는 하루에 2번(09:0와 16:00) 농후 사료를 급여 한 뒤 건초를 급여하였으며, 개체별 사료 급여를 위해서 2시간 동안 자동 잠금 스텐션을 이용하여 한우 거세우들을 고정시켰다. 모든 실험 동물들은 우방과 호흡 챔버 내에서 물을 자유롭게 섭취할 수 있었으며, 사료 잔량은 건물 섭취량과 사료 요구율(FCR)을 측정하기 위해서 모두 수거하여 무게를 측정하였다. 체중은 매달 측정하여, 일당 증체량(ADG)를 계산하였다. 또한, 실험 개시 날에는 급여 사료를 샘플링하였으며, 호흡 챔버에서 메탄을 측정하는 기간에는 잔량이 남을 시에 잔량 또한 샘플링 하였다. 모든 사료 샘플들은 분석 전까지  $-20^\circ \text{C}$ 에서 보관 되었다.

#### 5) 질산염( $\text{NO}_3^-$ ) 제품(SilvAir) 함유 pellet의 장기 급여와 메탄 저감 효과

#### (실험 4)

실험 3을 완료한 후, 동일한 한우 거세우 20마리를(평균체중  $476 \pm 21$  kg) 4마리씩 총 5개의 우방에 재배치하였다. 한 우방당 한우 거세우 2마리에게는 대조구(CON)사료를 급여하였으며, 나머지 2마리에게는 대조구 사료에 2.0% SA (P-SA)가 함유된 pellet 사료(처리구)를 급여하였다. 실험 사료의 원료 조성과 화학적 성분은 표 2와 같고 총 48일 동안 완전 임의 배치법으로 설계되어 진행되었다. 장내 발효에 의한 메탄 발생량 측정은 19일차와 45일차에 각각 3일 동안 호흡대사챔버를 사용하여 진행되었다. 기타 실험 방법과 시료채취 그리고 보관 방법은 실험 3과 동일하게 수행하였다.

**Table 2.** Ingredients and chemical composition of the diets fed to steers during experiments 1 and 2.

Ingredient composition, %DM	CON	SA	P-SA
Concentrate			
Grounded corn	13.97	13.63	13.70
Salt	0.10	0.09	0.09
Molasses	2.40	2.34	2.35
Sodium bicarbonate	0.16	0.16	0.16
Yeast culture product	0.04	0.04	0.04
Limestone powder	1.26	1.23	1.24
Palm olein oil	0.08	0.07	0.07
Sodium Gluconate	0.10	0.10	0.10
Mannanase	0.05	0.05	0.05
Vitamin E (50%)	0.01	0.01	0.01
Fermented soy bean meal	2.00	1.95	1.96
Mineral premix	0.08	0.07	0.07
Vitamin premix	0.05	0.04	0.04
Wheat	12.50	12.19	12.25
Palm kernel meal	6.56	6.40	6.43
Copra meal	5.00	4.88	4.90
Rapeseed meal	1.69	1.65	1.66
DDGS corn	3.96	3.86	3.88
SilvAir	–	2.50	2.00
Roughage			
Timothy hay	50.00	48.75	49.02
Nutrient composition, %DM			
Organic matter (OM)	92.76	92.50	90.69
aNDFom1	40.56	39.00	38.24
ADFom2	23.31	22.45	22.01
Crude protein (CP)	12.93	13.44	13.18
Ether Extract (EE)	2.45	2.38	2.33
GE, cal/g	4279	4248	4165
CON, control; SA, SilvAir (top-dressed); P-SA, SilvAir (pelleted)			

<sup>1</sup>Neutral detergent fibre assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive

of residual ash

<sup>2</sup>Acid detergent fibre expressed excluding residual ash

## 6) 호흡 챔버 작동 및 메탄 가스 발생량 측정

각 호흡챔버는 시험축이 입실된 후에 인접 챔버의 개체 들과 시각적인 소통을 하며 스트레스를 최소화할 목적으로 탈착이 가능한 투명한 폴리염화비닐(PVC) 시트를 이용하여 밀봉되었다. 각 챔버의 외형적 크기는 137(폭) X 356(깊이) X 200(높이)cm로, 호흡챔버 부피는 9.7m<sup>3</sup>이다. 각 호흡챔버 내부에는 사료급이기와 급수조가 설치되어 있고, 챔버 바닥은 미끄럼 방지를 위해서 고무 매트가 깔려 있고 뇨가 흘러내릴 수 있는 격차형 구멍(80 X 80cm)이 가운데 위치 하고있다. 각 호흡 챔버의 바닥과 챔버 바닥 사이에는 약 36cm 간격이 있어서 소변 수집을 위한 이동식 용기가 챔버의 밀봉 상태를 유지하면서 위치하도록 설계되었다. 또한, 모든 호흡 챔버는 순환 팬이 장착된 공기 냉각 장치(model DK-C-150E; Dryer Korea)와 공기 필터 장치가 포함된 독립적인 환경 조절 시스템을 갖고 있고, 주변 온도와 상대 습도를 각각 21℃와 60%로 유지하도록 조절하였다(model ALFFIZ-WBCAI-015H; Busung, Korea). 또한 환경 조절 시스템은 챔버 중앙 천장에서 직경 10cm의 단열 튜브를 통해 챔버에서 환경 조절 시스템으로 들어가고(0.6m/s), 제습된 공기는 다시 챔버 천장 뒤쪽의 튜브를 통해서 챔버 내부로 재순환(0.1m/s)된다. 이때에 공기 순환 속도는 가스의 손실을 방지하고 회수율을 극대화하기 위한 유속이 되도록 하였다. 냉동 장치에서 발생한 물은 워터 트랩에 부착된 튜브를 통해 챔버 외부로 배출되었다.

외부 공기가 챔버의 뒷문에 있는 직경 10cm의 개구부로 들어오고, 밀폐형 펌프를 통해 400L/min의 일정한 유속으로 배출되도록 제어기(Metabolic Controller, B.S. Technolab, Seoul, Korea)로 조절하였고, 각 호흡 챔버의 천장 앞부분에서 필터 박스가 포함된 공기 배출구를 통해서 직경 10cm의 폴리염화비닐(PVC) 파이프를 따라 챔버 내 공기가 유속계(model LS-3D; Teledyne Technologies, Thousand Oaks, CA, USA)를 통과한 후에 외부로 배출되었다(그림 1). 각 호흡 챔버의 가스 시료는 호흡 챔버와 배기 펌프 사이의 PVC 파이프 중간에서 분석 시스템에 연결된 가스 튜브를 통해 가스 샘플링 펌프(Columbus Instruments, Columbus, OH, USA)의 힘으로 분석기로 이동하였다.

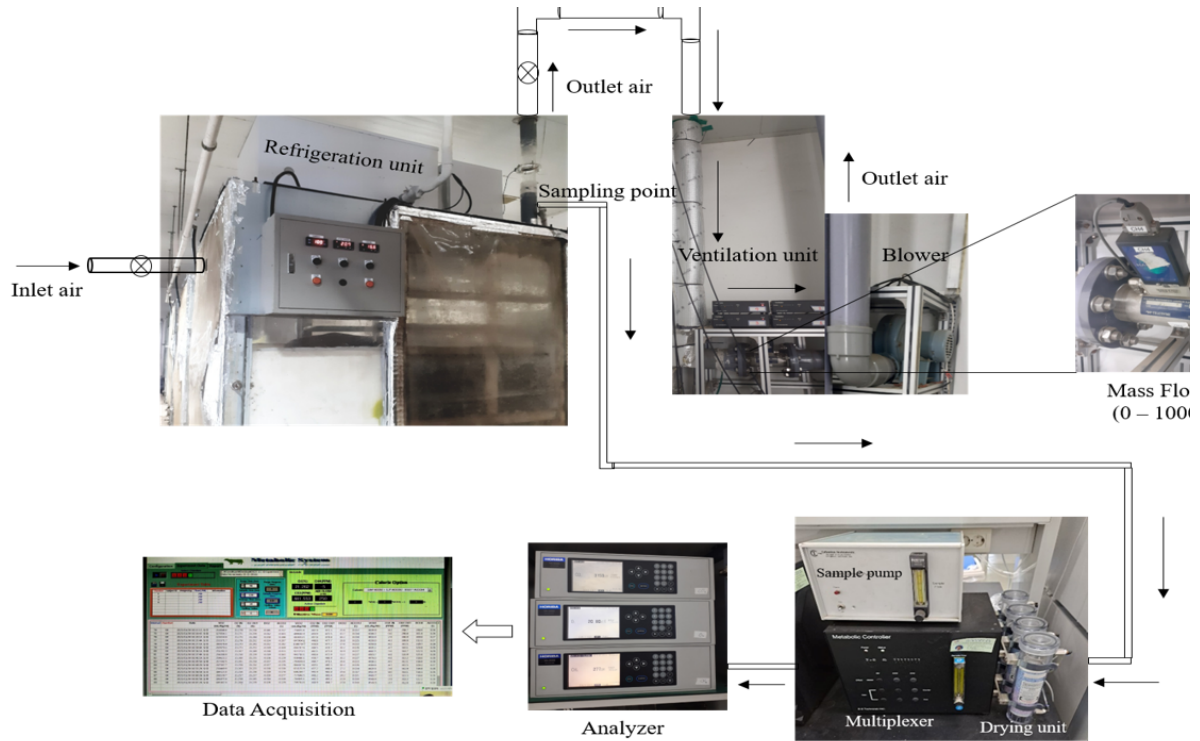


Figure 1. Gas flow of indirect respiratory chamber and gas analyzer in Pyeongchang campus of SNU.

분석 가스 시료가 메탄분석기(non-dispersive infrared  $\text{CH}_4$ sensor, 0-2000ppm; model VA-3000, Horiba Ltd., Tokyo, Japan)로 들어와서 최종 배출되는 과정은 제어기(Metabolic Controller, B.S. Technolab, Seoul, Korea)를 통해서 다음과 같이 조절된다. 4기의 챔버로 부터 공기 시료가 순차적으로 분석 채널로 들어오도록 하는 채널 전환 시스템은 6L/min으로 설정된 샘플 유속을 통해 분석 시료를 전달한다. 채널 전환에 필요한 시간은 소프트웨어를 통해 실험자가 설정한다. 본 연구에서는 각 챔버의 가스 농도 변화 대표값을 안정성으로 측정하기 위해서 외부 공기로 이전 챔버의 가스 시료를 씻겨내는 시간(purge time)과 다시 측정 챔버 공기로 샘플링 라인을 다시 채운 후에 분석까지 이루어지는 시간(sampling time)을 각각 90초와 120초로 하였다. 따라서 4개의 호흡챔버가 한 차례(one cycle) 분석을 완료하는데 걸리는 시간은 14분이 소요된다. 각 가스 시료는 분석 시스템에 들어가기 전에 건조제와 지시약(Mesh size 8, Drierite, Xenia, OH, USA)으로 채워진 원통형 플라스틱 칼럼에서 여과 및 건조되었다. 메탄가스 센서의 영점 조절(Calibration)은 각 가스 발생량 측정을 시작하기 전에 농도 807  $\mu\text{mol/mol}$   $\text{CH}_4$ 의 표준 가스 혼합물을 사용하여 수행하였다(Air Korea, Seoul, Korea).

4두의 실험축이 호흡 챔버에 배치하기 전에는 항상 표준 메탄 가스 혼합물(25% mol/mol balanced  $\text{N}_2$ ; Air Korea)를 이용하여 각 챔버의 회수율 측정을 진행하였다. 요약하자면, 휴대용 가스 유량계에 연결된 튜브를 통해 각 챔버에 고정된 양의 메탄(50mL/min)를 주입하였다. 회수율 측정을 위한 가스 시료 튜브는 사료 급이기 근처에 배치되어 동물이 주로 가스를 배출하는 장소와 동기화시켰다. 가스는 일정 시간 혼합되고 나면 평형 상태가 되는 메탄가스 농도를 회수율 계산에 이용하였다.

$$\text{Theoretical } CH_{4ppm} (\text{Th}CH_{4ppm}) = (\text{In}CH_{4mL/min} / \text{Dry}STPVRL_{mL/min}) \times 1000000$$

$$\text{Gas recovery rate (\%)} = (\text{D}CH_{4ppm} / \text{Th}CH_{4ppm}) \times 100$$

메탄 발생량은 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다.

$$CH_4\text{emission (L/min)} = (\text{Dry}STPVRL_{min} \times ([\text{D}CH_{4ppm}] / 1000000)) / \text{gas recovery rate (\%)}$$

## 7) 반추위액 및 혈액 시료 채취 방법

반추위액 시료 채취는 각 period의 24일째에 사료 급여 직전(0시간), 사료 급여 2, 4시간 후에 진행되었다. 구강 진공 튜브를 이용하여(Oriental Dream, Hwaseong, Korea) 반추위액 200ml을 채취하였고, 채취된 모든 반추위액은 4겹의 거즈를 통해서 이물질을 걸러내었다. 또한 pH 측정기(Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 즉시 pH를 측정한 직후, 50ml 튜브에 옮겨 담은 뒤 액체 질소에 급속 냉각시켰다. 그 후 추가 분석이 이루어질 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관되었다.

혈액은 실험 개시 26일 후에 사료 급여 1시간 전과 사료 급여 후 3시간 후에 총 2 차례 우사에 있는 모든 실험 동물에 대해서 경정맥에서 채취하였다. 혈액 샘플은 8.5mL 용량의 노란색 뚜껑(Ref.No: 367953, Beckton-Dickinsen, NJ, USA)이 있는 진공 튜브와 4mL 헤파린 처리가 된 진공 튜브(Ref. No: 367871 Beckton-Dickinsen, NJ, USA)로 옮겨 아이스박스에 옮겨 보관하였다. 혈청은 15분간  $2500 \times g$ 으로 원심분리하여(ScanSpeed 1580R, Labogene, Seoul, Korea) 상층액을 2mL 마이크로튜브(BS-400, Mindray, Beijing, China)로 옮겼으며, 콜레스테롤, 포도당, 중성지방, NEFA 등 혈액 대사 물질을 분석할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 전혈( $5 \mu\text{L}$ )은 혈액 가스 분석기(ABL90 FLEX PLUS, Radiometer America, CA, USA)를 사용하여 채취 직후 총 헤모글로빈 및 메트헤모글로빈 수치를 측정하는데 사용하였습니다.

## 8) 화학 분석

실험에 이용된 사료, 메탄저감제 후보물질, 사료 잔량들은  $65^{\circ}\text{C}$ 의 건조 오븐에서 72시간 동안 건조한 뒤 1mm 스크린을 이용하여 분쇄하였다(Thomas Scientific Model 4, NJ, USA). 분쇄된 샘플들은  $105^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 건조하여 DM량을 측정하였고, ANKOM A2000 섬유 분석기(ANKOM Thchnology Corp.)의 filter bag 기술을 사용하여 NDF 및 ADF 함량을 분석하였다. NDF 함량은 열에 안정한 아밀라아제를 사용하여 측정하고 잔류 회분(amylase neutral detergent fiber organic matter [aNDFom]; Van Soest et al. (1991))을 제외한 값을 사용하였다. ADF도 Van Soest (1973) 방법으로 측정했으며, 잔류 회분(aNDFom) 제외한 값을 사용하였다.

실험과 내 실험에서 얻은 상층 부분 가스 샘플의 메탄 농도는 이온화 검출기가 장착된 Agilent 7890B GC 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 샘플 주입구와 검출기의 온도는 각각  $200^{\circ}\text{C}$ 와  $250^{\circ}\text{C}$ 로

유지하였다. 가스 시료 10mL이 HayeSep Q-ValcoPLOT fused-silica capillary column (30 m × 0.53 mm × 20 μm; CFS-PQ3053-200, VICI Metronics, Danvers, MA, USA)에 a two-way stopcock (KOVAX, Seoul, Republic of Korea)을 통해서 주입되었다. 운반 헬륨 가스(99.99%; Air Korea)는 10mL/min의 유속으로 설정하고 오븐 온도는 80°C로 2.5분간 일정하게 유지하였다. 메탄 함량은 영점 조절(Calibration)시에 이용하였던 표준 가스 혼합물(8% mol/mol balance N<sub>2</sub>; AirKorea)을 사용하여 외부 교정을 통해 계산하였다.

반추위액의 암모니아태 질소(NH<sub>3</sub>-N) 농도는 비색법을 사용하여 측정하였다(Chaney and Marbach, 1962). 휘발성 지방산(VFA)의 측정을 위해서는 반추위액 5.0ml을 25% HPO<sub>3</sub> 및 2% pivalic acid 0.2ml와 혼합하였다(Erwin et al., 1961). 혼합물들은 FID 검출기가 장착된 Agilent 7890B GC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 시료 주입구와 검출기의 온도는 220°C로 유지하였다. 헬륨 운반 가스 유량은 1ml/min, 초기 오븐 온도를 80°C로 설정한 Nukol fused-silica capillary column (30m×0.25mm×0.25 μm; Cat. No: 24107, Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 분석시료(1μl)들을 주입하였다. 오븐 온도는 1분 동안 초기 온도에서 일정하게 유지되었고, 그 후 분당 20°C씩 증가하여 180°C의 온도까지 1분 동안 유지되었으며, 분당 10°C씩 증가하여 최종 온도 200°C까지 도달하기까지 최종 실행 시간은 14분으로 설정되었다.

### 9) DNA 추출, PacBio 시퀀싱 및 데이터 분석

실험 3에서 25일차에 사료 급여 후 4시간 때에 샘플링한 반추위액을 원심분리한 후 NucleoSpin soil 키트를 이용하여 메타게놈 DNA를 추출하였다(Macherey-Nagel, DuEren, Germany) (Bharanidharan et al., 2018). 아가로스 겔 전기영동을 통해 DNA 품질을 평가하고, Nano Drop 200 분광광도계(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 DNA 농도를 측정하였다. 반추위 내 미생물 군집을 정확하게 분석하기 위해 primer pair 27F (5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTCAG-3' ) 및 1492R (5' -GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3' )을 이용하여 Single-molecule real-time(SMRT)을 위해 16S rRNA 유전자의 전체 길이(V1-V9) 단편을 중합 효소 연쇄 반응(PCR)으로 증폭하였다. 바코드화된 PCR 산물은 2% 아가로스 겔 전기영동으로 분석하고, Qiaquick PCR 정제 키트로 정제하였다(Qiagen, Valencia, CA, USA). SMRT Bell libraries는 최종적으로 Pacific Biosciences (PacBio) Sequel system (Novogene Co., Ltd., Beijing, China)을 사용하여 시퀀싱하였다.

Raw sequencing reads는 cutadapt를 이용하여 어댑터 염기서열을 제거하기 위해서 처리되었고 (Martin, 2011) (v1.9.1), 키메라 염기서열(Chimeric sequences)은UCHIME으로 필터링하였다(Edgar et al., 2011). 다운스트림 분석을 위해 앰플리콘 길이가 1490nt를 초과하는 Pacbio long reads만 유지하였다. 고품질 판독은 기본 설정으로 QIIME2 VSEARCH 플러그인을 통해 “cluster features-de-novo” function을 사용하여 99% 서열 유사성 임계값에서 OTU로 클러스터링 되었다. Future-classifier plugin를 통해 “classify-sklearn” 알고리즘을 사용하여 SILVA 데이터베이스(v138)와 비교하며, OTU의 분류학적 할당을

수행하였다(Bokulich et al., 2018). 알파와 베타 다양성 측정은 QIIME2의 다양성 플러그인을 사용하여 수행하였다.

## 10) 통계 분석

In vitro 실험 데이터는 SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) PROC MIXED 절차에 따라 Tukey-Kramer adjustment을 거쳐 분석하였다. 첨가량은 고정효과로 간주되었고, 각각의 배양은 임의효과로 간주되었다. 각 후보 첨가량 증가에 따른 반응의 선형, 이차 및 삼차항 분석은 직교 다항식 대비(orthogonal polynomial contrasts)를 사용하여 수행하였다.

In vivo 실험 데이터는 처리구와 실험기간을 고정 효과로 실험측들을 임의 효과로 설정하고 SAS(version 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA)에서 혼합 모델 분산 분석(mixed-model analysis of variance)을 실시하였다. 반추위 발효 특성(pH, VFA, NH<sub>3</sub>)은 반복 측정 분산 분석(repeated-measures analysis of variance)으로 분석하였다. The Akaike information criterion을 이용하여 어떤 공분산 구조가 가장 적합한지 결정하고, 그 결과에 따라 발효 특성을 평가하기 위해 자동 회귀(autoregressive; ARI) 분석을 진행하였다. LSMEANS 함수를 이용하여 평균을 계산한 후, SAS PDIFF 옵션을 사용하여 비교하였다. 차이는  $P < 0.05$ 에서 통계적으로 유의미한 것으로 간주하고, 경향은  $0.05 \leq P < 0.10$ 에서 결정하였다.

## <CO<sub>2</sub> 법에 의한 메탄가스 정량화 방법과 호흡대사챔버 측정 값과의 비교>

공시축이 호흡챔버에 들어가기 직전 3일간 우방에서의 사료급여 시간대에 CO<sub>2</sub>법으로 측정을 진행하였다. 먹이를 먹으러 사료조에 공시축이 들어오면 스텐천을 이용해서 빠져나가지 못하게 고정하고 사료를 섭취하는 동안, 한 개체씩 실시간 날숨의 메탄, 이산화탄소 농도를 20분간 측정하였다(그림 1-1). 개체의 날숨은 개체의 코 주위에 위치시킨 공기 흡입튜브를 통해 가스측정기 Airwell+7e (KINSCO technology, Seoul, Korea)로 들어가 측정되었고 1초당 1개의 가스농도 데이터가 생성되어 저장되었다. 또한 측정시 바람의 영향을 최소화 하기 위해 사료조 전체를 투명 비닐커버로 덮은 후 측정하였다. 20분간 측정 이후 CO<sub>2</sub>법 측정 정확도 향상을 위한 실험의 목적으로 더욱 높은 농도의 날숨을 다시 20분 측정하였다. 공기 흡입튜브를 동물용 마스크에 연결하고 그 마스크를 동물에 씌운 후 날숨을 측정하였고, 마스크의 유무에 따른(저/고농도 날숨) 결과를 비교하였다. 날숨 측정 전후로 대기 중의 메탄, 이산화탄소 농도를 측정하여 실제 동물의 날숨 농도를 알 수 있도록 보정하였다.

측정된 메탄, 이산화탄소 농도 데이터를 통해 개체별로 각 사료급여 시간대의 메탄:이산화탄소 비율을 구하고, 수식(CIGR, 2002)을 통해 개체별 일일 이산화탄소 발생량을 구한 후 두가지 값을 곱하여 개체별 일일 메탄생성량을 산출하였다.

개체별 일일 이산화탄소 발생량 계산수식은 아래와 같다.



$$(1) \text{ Total heat production (HP, watt)} = 7.64 \times BW^{0.69} + Y \left[ \frac{23}{M} - 1 \right] \left[ \frac{57.27 + 0.302 \times BW}{1 - 0.171 \times Y} \right]$$

$$(2) \text{ CO}_2 \text{ (L/day)} = \text{HPU} \times 180 \times 24$$

HP = heat production of the animal

BW = body weight of the animal

Y = average daily gain of the animal

M = energy content of the feed, MJ/kg dry matter

HPU = heat producing unit, HP/1,000

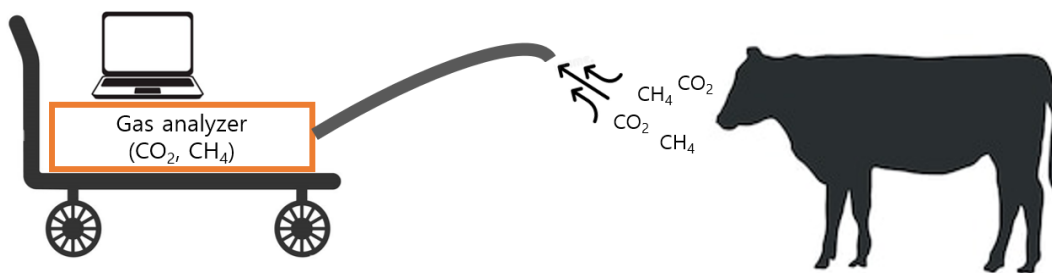


Figure 1-1. The installation of the CO<sub>2</sub> method to compare with respiratory chamber method

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 시험관 내 실험(in vitro) 방법에 의한 국내 유통 4개 제품의 메탄 저감 효과 비교(실험 1)

첫번째 수행된 시험관 내 실험(표 3)은 후보 제품사의 권장 첨가량을 기준으로 수행하였다. SA는 기질 건물 기준으로 0.5, 1.0, 1.6% 첨가할 때 가격은 각각 5, 10, 16원으로 추정되었으며 첨가제 중에서 가장 가격이 낮았다. 첨가 효과는 1%와 1.6% 첨가수준에서 4.2%와 8.2% 감소하는 것으로 나타났다. RU는 0.1, 0.2, 0.3% 첨가 수준의 가격이 40, 80, 120원을 가장 가격이 높았으며, 본 실험에서는 메탄 저감 효과가 없었다. VY는 0.15, 0.30, 0.45% 첨가수준의 가격이 25, 50, 74원으로 추정되었고, 0.3%와 0.45% 수준에서 11%과 8%의 감소를 보였다. AK는 0.3, 0.6, 0.9%로 첨가량이 증가하면서 메탄 억제효과는 반대로 감소하는 것으로 나타났다.

**Table 3.** Dose dependent effects of SilvAir (SA), RuminUp (RU), Vital Yucca (VY), and Garlic AK (AK) , on *in vitro* CH<sub>4</sub> production in the first batch (n=3)

	Price (won/kg DM)	pH	Total gas (mL)	CH <sub>4</sub> (% total gas)	CH <sub>4</sub> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL/g DM substrate)	CH <sub>4</sub> (% change)
Control		6.60	33.5	13.8	4.61	23.1	
Monensin (50 ppm)		6.55	21.6	14.1	3.05	15.3	-33.9
SA (0.5 % DM)	5	6.62	32.4	14.5	4.71	23.5	2.0
(1.0 % DM)	10	6.59	31.2	14.2	4.42	22.1	-4.2
(1.6 % DM)	16	6.60	30.1	14.1	4.24	21.2	-8.2
RU (0.1 % DM)	40	6.60	32.8	14.6	4.79	23.9	3.7
(0.2 % DM)	80	6.61	32.4	14.3	4.64	23.2	0.6
(0.3 % DM)	120	6.55	31.2	15.1	4.70	23.5	1.9
VY (0.15 % DM)	25	6.57	29.7	15.6	4.63	23.1	0.3
(0.30 % DM)	50	6.58	26.8	15.3	4.11	20.5	-11.0
(0.45 % DM)	74	6.56	27.1	15.7	4.24	21.2	-8.1
AK (0.3 % DM)	23	6.61	30.0	15.0	4.51	22.5	-2.3
(0.6 % DM)	45	6.60	31.4	14.6	4.58	22.9	-0.7
(0.9 % DM)	68	6.60	32.2	14.7	4.75	23.8	2.9

첫 번째 시험관 내 실험에서 SA가 기대했던 수준의 메탄 저감 효과를 보여주지 않았기 때문에 두 번째 시험관 내 실험(표 4)에서는 SA의 효과를 재확인하였다. 그러나 두번째 실험에서도 그 효과는 더 작게 나타났다. RU는 0.2와 0.3% 첨가 수준만을 재확인 했지만 첫 번째 실험과 같이 메탄 저감효과가 없었다. VY는 첫 번째 실험에서 11%과 8%의 감소 효과가 있었기 때문에 이를 재확인하였으나, 본 실험에서는 효과가 전혀 없었다. AK는 첫 번째 실험에서 첨가 수준을 줄이면 더 효과가 클 수 있다는 결과를 얻었기 때문에 0.1%를 추가해서 총 4수준의 실험을 수행하였

고 기대했던 대로 0.1% 첨가수준에서 3.8%로 조금 더 감축이 되었으나 생체 내 실험에서 확인해볼 정도의 효과는 아니었다.

**Table 4.** Dose dependent effects of SilvAir (SA), RuminUp (RU), Vital Yucca (VY), and Garlic AK (AK) , on *in vitro* CH<sub>4</sub> production in the second batch (n=3)

	Price (won/kg DM)	pH	Total gas (mL)	CH <sub>4</sub> (% total gas)	CH <sub>4</sub> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL/g DM substrate)	CH <sub>4</sub> (% change)
Control		6.61	32.1	15.7	5.03	25.2	
Monensin (50ppm)		6.66	26.3	12.9	3.39	17.0	-32.6
SA (0.5 % DM)	5	6.66	33.7	15.6	5.25	26.3	4.4
(1.0 % DM)	10	6.64	31.8	15.1	4.81	24.0	-4.5
(1.6 % DM)	16	6.65	33.8	15.3	5.17	25.9	2.7
RU (0.2 % DM)	80	6.63	33.3	15.7	5.21	26.1	3.6
(0.3 % DM)	120	6.63	32.7	15.6	5.10	25.5	1.3
VY (0.15 % DM)	25	6.65	34.5	15.9	5.48	27.4	9.0
(0.30 % DM)	50	6.65	33.1	15.7	5.20	26.0	3.4
(0.45 % DM)	74	6.66	34.7	16.1	5.57	27.9	10.7
AK (0.1 % DM)	8	6.61	32.6	14.9	4.84	24.2	-3.8
(0.3 % DM)	23	6.63	31.4	15.6	4.88	24.4	-3.0
(0.6 % DM)	45	6.62	33.1	14.8	4.91	24.6	-2.5
(0.9 % DM)	68	6.62	32.6	15.6	5.08	25.4	0.9

SA는 첫번째와 두 번째 결과들이 기존의 연구 결과 (Feng et al., 2020)와 다르게 나타났기 때문에 1.0%와 1.6%에서만 재확인(표 5)을 하였으나 결과가 크게 다르지 않았다. RU 또한 세 번의 확인 실험 모두 저감 효과가 아주 작았다. VY는 세 번째 실험에서는 첫 번째 실험의 11%과 8% 보다는 적은 6%와 8%의 메탄 감축 효과를 보였다. AK는 세 번째까지의 실험 모두에서 생체 내 실험으로 가져갈 의미를 확인하지 못하였다.

**Table 5.** Dose dependent effects of SilvAir (SA), RuminUp (RU), Vital Yucca (VY), and Garlic AK (AK) , on *in vitro* CH<sub>4</sub> production in the third batch (n=3)

	Price (won/kg DM)	pH	Total gas (mL)	CH <sub>4</sub> (% total gas)	CH <sub>4</sub> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL/g DM substrate)	CH <sub>4</sub> (% change)
Control		6.71	29.6	15.9	4.69	23.5	
Monensin (50 ppm)		6.70	18.2	8.8	1.61	8.1	-65.7
SA (1.0 % DM)	10	6.68	28.5	15.7	4.48	22.4	-4.6
(1.6 % DM)	16	6.71	28.4	15.6	4.43	22.2	-5.5
RU (0.2 % DM)	80	6.67	29.1	15.9	4.63	23.2	-1.2
(0.3 % DM)	120	6.67	29.5	16.1	4.74	23.7	1.0

VY (0.30 % DM)	50	6.70	27.8	15.9	4.41	22.1	-5.9
(0.45 % DM)	74	6.66	26.3	16.4	4.31	21.6	-8.0
AK (0.1 % DM)	8	6.68	29.8	15.8	4.72	23.6	0.6
(0.3 % DM)	23	6.67	29.1	15.7	4.53	22.7	-3.4
(0.6 % DM)	45	6.68	30.3	15.8	4.78	23.9	1.9

네번째 실험에서 SA 첨가 수준을 2.5%로 높였더니, 16%까지 감축 효과를 보였다. RU는 가격도 가장 높았고 네 번째 실험에서 약 7% 메탄감소가 있었으나 네 번째의 실험 간에 변이도 컸고 모두 저감 효과가 적었다(표 6). VY도 네 번째 실험에서 10% 이상의 메탄 감소를 보였지만, 매년 감소효과를 다르게 보였다. AK는 네 번째까지의 실험 모두에서 생체 내 실험으로 가져갈 의미를 확인하지 못하였다. 따라서 시험관 내 실험(in vitro)에서 ‘Garlic AK’는 시장 진입 최대 가격 내에서도 메탄저감 효과가 나타나지 않았기 때문에 생체 내 실험(in vivo)에서 제외하였다.

**Table 6.** Dose dependent effects of SilvAir (SA), RuminUp (RU), Vital Yucca (VY), and Garlic AK (AK), on *in vitro* CH<sub>4</sub> production in the fourth batch (n=3)

	Price (won/kg DM)	pH	Total gas (mL)	CH <sub>4</sub> (%) total gas)	CH <sub>4</sub> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL/g DM substrate)	CH <sub>4</sub> (%) change)
Control		6.61	36.2	15.7	5.65	28.3	
Monensin (50 ppm)		6.64	27.0	12.1	3.27	16.4	-42.1
SA (1.0 % DM)	10	6.64	33.0	15.1	4.99	24.9	-11.8
(1.6 % DM)	16	6.62	32.8	15.0	4.93	24.6	-12.9
(2.5 % DM)	25	6.65	31.9	14.7	4.70	23.5	-16.9
RU (0.5 % DM)	200	6.60	35.4	14.9	5.28	26.4	-6.7
(1.0 % DM)	400	6.62	34.3	15.8	5.42	27.1	-4.2
VY (0.6 % DM)	100	6.60	31.2	15.8	4.91	24.6	-13.1
(1.0 % DM)	165	6.60	31.4	16.1	5.07	25.3	-10.4
AK (0.1 % DM)	8	6.68	29.8	15.8	4.72	23.6	0.6
(0.3 % DM)	23	6.67	29.1	15.7	4.53	22.7	-3.4
(0.6 % DM)	45	6.68	30.3	15.8	4.78	23.9	1.9

시험관 내 시험으로 4회 수행한 결과를 종합한 것을 그림 2에 나타내었다. AK를 제외한 모든 메탄 저감제들은 시험관 내에서 24시간 배양 후 메탄 생성이 선형적(p<0.1)으로 감소하는 결과를 보였다. 3개 첨가 제품의 최대 메탄 생성 감소율은 SA 2.5%, VY 0.6%, RU 0.5% DM substrate 첨가 수준에서 mL/g DM incubated 단위 기준으로 각각 16.93%, 13.08% 그리고 6.69%로 나타났다.

비록 시험관 내 실험은 생체 내 실험에 비해서, 시간 경과에 따른 VFA 흡수 현상이 없는 등, 시험 방법적인 한계가 존재하지만, 메탄 저감제로서 일차적인 가능성을 평가하고, 메탄 저감 효과에 대해 식별하는 데 매우 효과적으로 이용될 수 있다.

그러나, 실제 농가 단위에서 메탄 감소를 위한 실용적이고 효과적이며, 안전한 전략을 개발하기 위해서는 시험관 내 실험뿐만 아니라, 생체 내 실험 또한 진행되어야 한다. 따라서 시험관 내 실험 결과에 기초해서 3개(SA, RU 그리고 VY) 만을 대상으로 생체 내 실험의 메탄 저감 효과를 확인하기로 결정하였다.

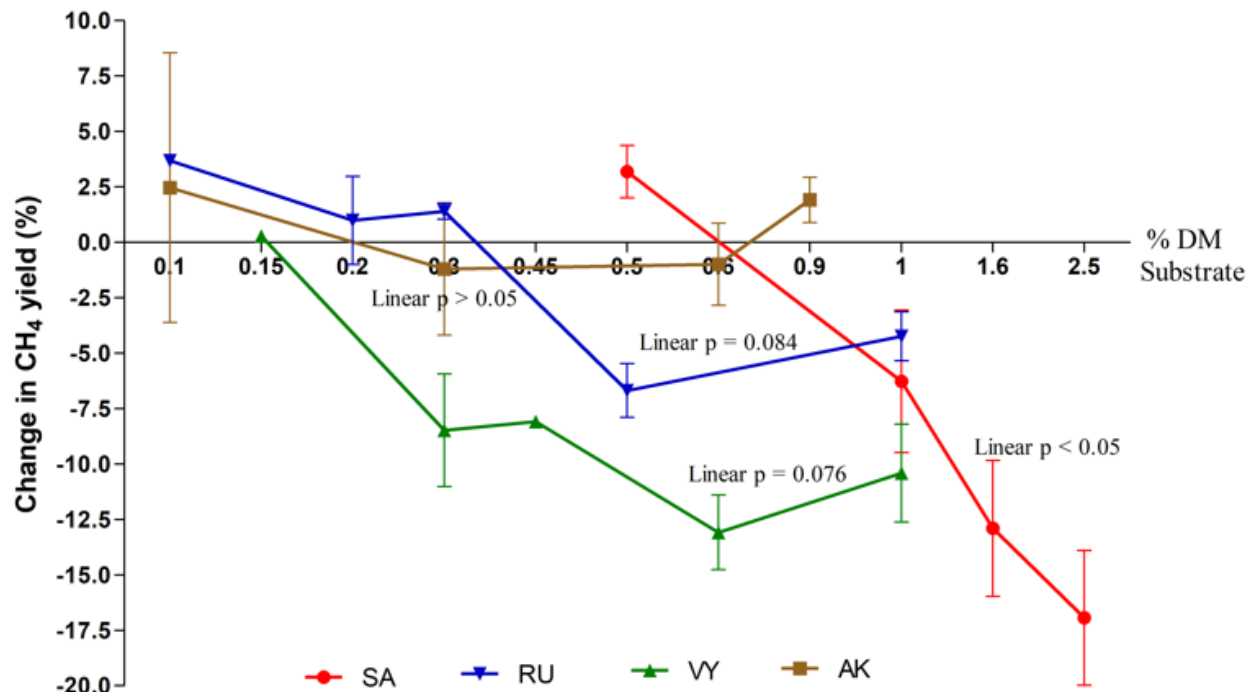


Figure 2. Dose dependent effects of SilvAir (SA), Vital Yucca (VY), RuminUp (RU) and Garlic AK (AK) , on *in vitro* CH<sub>4</sub> production (n=4).

## 2) 생체 내 실험(in vivo) 방법에 의한 국내 유통 3개 제품의 메탄 저감 효과 비교(실험 2)

대조구 및 처리구 당 영양소 섭취량에는 유의적인 차이(P>0.05)가 없었다. 메탄 발생량(g/d)의 경우는 SA와 RU를 첨가한 한우 거세우에서 각각 15.9%와 12.9%의 유의적인 감소(P<0.005)를 보였다(표 7). 그러나 메탄 발생량을 건물(DM) 섭취량 당으로 환산했을 때에는 SA는 수치상으로의 10.1% 감소를 보였고, RU를 첨가한 한우 거세우는 대조구 대비 12.5%의 유의미한 감소(P<0.05)를 보였다. RU를 섭취한 한우 거세우는 메탄(Ym)로 손실된 GEI에서도 대조구 대비 12.5 감소(P<0.05)한 것으로 관찰되었다.

Table 7. Least-squares means of DMI and enteric CH<sub>4</sub> emission from Hanwoo steers (n = 8) fed diet supplemented with 2.5% SilvAir (SA), 1.0% Ruminup (RU) and 0.6% Vitalyucca (VY)

	CON	SA	RU	VY	SEM	p value
DMI (Barn, kg/d)	7.7	7.6	7.8	7.9	0.13	0.519
DMI (Chamber,	6.7	6.2	6.7	6.8	0.31	0.326

	kg/d)					
CH4 (g/d)	119.1a	100.2b	103.7bc	118.0ac	9.97	0.003
CH4(g/kg DMI)	17.9a	16.1ab	15.7b	17.6ab	1.53	0.026
CH4 (%GEI)	5.6a	5.0ab	4.9b	5.5ab	0.47	0.025

대조구 및 각각의 처리구 간에 평균 반추위 pH와 총 휘발성지방산 농도 또는 개별 휘발성 지방산의 농도는 유의적인 차이가 존재하지 않았다( $P>0.05$ )(표 8). 대조구와 다른 처리구간에 유의적인 차이는 존재하지는 않았지만, SA를 섭취한 동물은 RU 그룹과 비교하였을 때 4시간 후  $\text{NH}_3\text{-N}$  농도가 더 높았다( $P<0.05$ ). 마찬가지로, RU를 섭취한 그룹은 SA 그룹에 비해 반추위 acetate: propionate 비율이 더 낮았다( $P<0.05$ ).

**Table 8.** Ruminal fermentation characteristics in Hanwoo steers (n = 8) fed diet supplemented with 2.5% SilvAir (SA), 1.0% Ruminup (RU) and 0.6% Vitalyucca (VY)

Item	0h				2h			
	CON	SA	RU	VY	CON	SA	RU	VY
Time interval								
pH	7.00	7.04	7.05	7.05	6.58	6.74	6.61	6.61
Total VFA, mM	28.3	26.1	27.2	28.4	44.7	39.5	45.5	43.9
VFA, %								
Acetate	68.8	68.6	67.8	68.1	61.1	62.6	62.1	60.7
Propionate	16.1	16.2	17.0	16.9	21.3	20.5	20.8	21.1
Iso-butyrate	0.12	0.12	0.13	0.12	0.09	0.09	0.10	0.09
Butyrate	12.6	12.5	12.3	12.4	14.6	14.0	14.1	15.2
Iso-valerate	1.66	1.79	1.85	1.67	1.17	1.22	1.33	1.14
Valerate	0.79	0.81	0.86	0.84	1.75	1.62	1.58	1.69
Acetate:Propionate	4.29	4.25	4.00	4.07	2.88	3.13	2.88	2.82
$\text{NH}_3\text{-N}$ , mg/dL	11.1	11.2	10.5	11.7	25.5	25.4	24.7	23.2

4h				SEM	p value		
CON	SA	RU	VY		treat	hours	treat x hours
6.52	6.58	6.54	6.54	0.06	0.130	<.0001	0.440
43.0	39.8	39.3	39.0	3.13	0.651	<.0001	0.719
62.9	65.2	62.2	63.3	0.87	0.162	<.0001	0.146
19.4	18.7	20.2	19.2	0.49	0.261	<.0001	0.403
0.08	0.08	0.08	0.08	0.01	0.503	<.0001	0.771
15.3	13.6	15.0	15.0	0.58	0.447	<.0001	0.095
0.86	0.90	0.95	0.91	0.09	0.326	<.0001	0.776
1.49	1.46	1.62	1.55	0.11	0.876	<.0001	0.509
3.26 <sup>ab</sup>	3.51 <sup>a</sup>	3.09 <sup>b</sup>	3.30 <sup>ab</sup>	0.12	0.015	<.0001	0.418
15.4 <sup>abc</sup>	19.7 <sup>a</sup>	12.7 <sup>bc</sup>	12.4 <sup>bc</sup>	1.98	0.033	<.0001	0.132

질산염( $\text{NO}_3^-$ )은 질산염 환원 박테리아에 의한 수소이온 경쟁을 통해서 메탄 생성에 대한 수소 이온 가용성 감소에 기인 하면서 메탄을 감소 시킨다(Yang et al., 2016; Abdelbagi et al., 2023). 반추위에서 질산염( $\text{NO}_3^-$ )과 아질산염( $\text{NO}_2^-$ )은 암모니아( $\text{NH}_3$ )로의 환원이 발생되며( $\Delta G_0 = -33.9 \text{ kJ/mol H}_2$ ), 이산화탄소( $\text{CO}_2$ )에서 메탄으로의 환원보다 열역학적(thermodynamically)으로 더 활발히 이루어진다(Gibbs free energy,  $\Delta G_0 = -254 \text{ kJ/mol H}_2$ ).

본 연구 결과에서는, 첨가량 기준으로 볼 때 생체내 실험이 시험관 내 메탄 감소 효과 보다는 질산염( $\text{NO}_3^-$ )을 함유한 SA의 질산염 환원이 더 효과적으로 일어난 것으로 밝혀졌다. 최근 메타 데이터 분석에도 (Feng et al., 2020), 질산염 첨가량이 건물 기준 당 1% 증가할 때 마다 메탄 생산량이 각각  $9.1 \pm 1.4\%$ ,  $7.3 \pm 2.0\%$ 씩 감소하였다고 보고하였다. 또한, 비록 시험관 내 실험과 생체 내 실험이 동일한 반추위액 샘플 및 동물을 대상으로 이루어진 것은 아니지만, SA 2.5% DM(i.e 1.58% DM  $\text{NO}_3^-$ ) 첨가 수준에서 시험관 실험과 생체 실험에서 메탄 생산량이 각각 16.9% 그리고 15.9% 감소하였다. 또한, 통계적 유의성은 없었지만, 본 실험에서의 첨가량과 동일한 생체 내 실험을 진행한 다른 연구에서도(Feng et al., 2020) 메탄 발생량이 10.1%가 감소하는 효과를 보였다.

한편, RU는 1.0% DM (0.50% DM CNSL) 보충 시 시험관 실험 및 생체 실험 모두에서 메탄생성이 감소되었다. 이러한 감소는 시험관 실험(Adetunji et al., 2020; Oh et al., 2017) 및 생체 실험(Branco et al., 2015; Konda et al., 2019)에서 수행된 다른 연구 보고와 일치한다. 그러나, 본 실험에서는 동일한 첨가량 수준에서 시험관 실험은 4.2% 감소 효과를 보였지만 생체 실험에서는 약 3배 더 높은 12.5%의 감소 효과를 보였다. 이는 사료 급여 방식 및 구성에서 상호작용을 받았을 때 그 효과가 두드러질 수 있다. 특히 농후사료와 조사료 비율이 50:50일 때 메탄 저감 효과가 증가할 수 있다(Oh et al., 2017). 비록 실험축의 품종은 다르지만, 본 실험에서 이용된 조사료와 농후사료의 비율은 50:50 이었다. 그러나, 본 조농비율은 시험관 내 실험 및 생체 내 실험에서 모두 동일 하였기에, 생체 내에서 RU보충으로 메탄 생성량이 더 크게 감소한 이유는 설명이 불충분하다. 게다가, 홀스타인 암소에게 3주동안 CNSL 0.57% DMI를 급여하였을 시, 반추위 메탄 발생량은 37% 감소 했다는 보고(Mitsumori et al., 2014; Shinkai et al., 2012)와 CNSL 0.5-0.75% DMI를 급여하였을 때 메탄 생성량이 20% 감소하였다(Maeda et al., 2021)는 보고 등으로 보아서 생체실험에서의 메탄 저감 효과를 보여주는 최소 수준의 첨가량이 아직 분명하지 않다.

사포닌은 반추동물 장내 메탄생성을 감소시키는 데 효과적인 첨가물로서 평가되어 왔다. 사포닌과 사포닌 함유 식물은 메탄생성에 있어 수소 이온( $\text{H}_2$ )을 공급하는(Newbold et al., 2015) 프로토조아에 대한 메탄 생성 억제 효과가 존재한다(Patra and Saxena, 2009). 특히 스테로이드 사포닌으로 분류되는 유카 사포닌의 경우에는, 프로토조아의 세포막 콜레스테롤과 직접 상호작용 하여, 프로토조아의 사멸을 유도할 수 있다(Patra and Saxena, 2009). 시험관 실험을 중심으로 진행된 이전의 실험 결과들에 대한 메타 분석에서는 유카 사포닌은 대조구에 비하여 유의적으로 메탄 발생량을 감소시켰으며, 기질 당 메탄 발생량( $\text{mLCH}_4/\text{g DM incubated}$ )은 13.1%이 감소되었다(Jayanegara et al., 2014). 또한, 메탄 발생량을 15% 이상 감소시키기 위해서 가장 이상적인 시험관 내 실험의 함량은 기질 건물 당 2-3%가 적절하다고 보고하였다 (Jayanegara et al., 2014). 그러나 해당 첨가량은 본 실험의 0.6% VY에 함유된

0.072% DM 사포닌과 비교하였을 때 매우 높은 양이다. 이는 낮은 수준의 VY 내에 있는 *Yucca schidigera*에 resveratrol, yuccaols와 같은 phenolics의 존재(Oleszek et al., 2001)가 메탄 저감 효과를 향상시켰을 수도 있기 때문에 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 더욱이 VY의 시험관 내 메탄 감소 효과가 생체 내 실험에서는 일관성이 없었는데 이러한 문제는 여러 연구에서도 보고 되어왔다(Kholif, 2023). 동일한 첨가량에서도 일관되지 않은 결과에 대한 원인은 2가지로 볼 수 있다. (i) 화합물의 분해 속도는 시험관 내 실험 및 생체 내에서 다를 수 있고, (ii) 본 실험의 생체 내 실험에서 적용된 낮은 사포닌 첨가량 때문일 수 있다. 실제로 Newbold et al. (1997)는 반추위 내 미생물은 사포닌을 프로토조아에 영향을 줄 수 없는 사포게닌으로 분해할 수 있기 때문에 프로토조아에 대한 사포닌의 효과는 일시적이라고 보고하였다. 또한 다른 시험관 내 연구에서는 사포닌의 분해 속도는 서서히 진행 되어, 배양 후 12시간 후부터 급격하게 늘어난다고 보고된 바 있다(Makkar and Becker, 1997). 반면에, 면양 실험에서는 반추위에서 투입 1시간 후부터 빠르게 가수분해 된다는 보고도 있다(Meagher et al., 2001). 이러한 연구들은 사포닌의 분해 속도와 분해 범위가 배양 시스템에 따라서 다양하다는 것을 암시한다. 또한, 이는 일부 사포닌이 생체 내보다 시험관 내에서의 실험 결과가 더 좋은 원인을 설명하기도 한다. 최근에 보고된 메타 분석 결과에서는 생체 실험에서 7.3%의 메탄 저감 효과를 도출하기 위해서는 최소 0.5% DM의 첨가수준이 필요하다고 하였고(Ridla et al., 2021), 본 실험의 처리 수준 보다도 몇 배 높은 양에 해당한다. 게다가, 본 연구에서 얻어진 시험관 실험 결과를 생체 실험에 확대 적용하는 것은 사료의 제한 급여 조건에서도 확인되는 약 3%/h의 반추위 통과 속도(outflow)를 고려하지 않은 것과 같다(Yáñez Ruiz et al., 2004). 이러한 점들이 시험관 실험과 비교하여 생체 실험에서 메탄저감 효과 감소 원인에 대한 설명이 될 수 있고 생체 실험에서는 시험관 실험 대비 80% 이상 첨가량을 증가시켜야 한다는 것을 시사한다. 하지만, 유카(*Yucca schidigera*)에 대해서 연구한 문헌(Holtshausen et al., 2009; Giliwski et al., 2002)에 의하면, 1% DMI까지 첨가량을 높였음에도 메탄 저감이 유의적으로 발견되지 않았다.

메탄 생성 감소는 반추위 발효 특성의 변화와 함께 이루어진다. 본 연구에서 SA의 첨가는 이전 연구들과 동일하게 acetate: propionate의 비율이 감소하였다(Guyader et al., 2015; Hulshof et al., 2012; Veneman et al., 2015). 암모니아 농도는 반대로 증가하였는데, SA를 급여한 실험축 반추위 내에서 첨가된 질산염의 유의미한 감소를 암시하며, 이에 따라 메탄 생성 감소를 이끌어 냈을 것이라 사료된다. Dai and Faciola, (2019)는 프로토조아의 제거로 프로토조아의 미생물 포식이 감소(Park and Yu, 2018)하게 되면 미생물 단백질을 암모니아로 탈아미노화 할 수 없게 되고(Newbold et al., 2015), 결과적으로 낮은 propionate 농도 및 암모니아 농도로 나타난다고 보고하였다. 이전 연구에서는(Kholif, 2023) 사포닌 성분을 활용하면 반추위 propionate 비율 증가와 프로토조아 개체 수가 감소를 보고하였다. Cardozo et al. (2005) 또한 *Y. schidigera* 사포닌이 propionate를 증가시키고 acetate 비율을 감소시킨다고 보고하였다. CNSL을 1.3% 첨가하였을 때에도 propionate의 유사한 증가(45%)가 확인되었고(Watanabe et al., 2010), 프로토조아 수와 메탄 생성과 관련된 고세균의 구조 변화도 보고되었다(Su et al., 2021). 통계적 유의성은 없었지만, RU 처리구에서의 acetate: propionate의 비율 감소와 RU, VY에서의 암모니아 감소는 잠재적인 항프로토조아 효과를 암시한다고 볼 수 있고 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.



최근의 메타분석 연구에서, Morgavi et al. (2023)는 메탄 저감제를 이용한 25%까지의 메탄생성 억제는 실질적으로 생산 정미 에너지의 이용 효율을 높이는 어렵다고 보고하였다. 그러므로, 동물의 생산성 증진을 위해서는 최소 30% 이상의 메탄 생성을 억제할 필요가 있지만 메탄 저감 효과를 높이기 위해서 SA, RU, VY의 첨가량을 높이는 것은 항영양인자와도 관계가 있기 때문에 많은 주의가 필요하다. 예를 들어, 2.0% DM 이상의 질산염 첨가는 아질산염독성으로 인하여 적절하지 않으며 (Abdelbagi et al., 2023), 건물 섭취량, 일당 증체량(ADG) 및 사료 요구량(FCR)이 감소할 수 있다고 한다(Hegarty et al., 2016; Pesta et al., 2016). 그러나, 현재까지 보고된 문헌을 바탕으로 볼 때, CNSL 2.5% DMI까지의 급여는 생산성에 있어서 부정적인 효과가 보고되지 않았다. 비록, SA, RU, VY 급여에 따른 일당 증체량 및 사료요구율은 측정되지 않았지만, 건물섭취량의 차이가 없었던 결과로 부정적 효과가 없음을 유추할 수 있다. 따라서 본 실험에서 이용된 첨가량은 한우 거세우의 생산성 관점에서의 최적의 첨가량일수 있다는 점을 시사하였다.

또한 0.4% DM의 *Y. schidigera* 사포닌은 시험관 실험에서 아밀라아제 활성 및 NDF 소화율을 감소시켰다(Holtshausen et al., 2009; Hristov et al., 2003). 더 나아가, 생체 실험에서의 0.5% DMI 이상의 사포닌 첨가는 메탄이 더 이상 감소되지 않을 뿐만 아니라, 영양소 소화율에도 부정적인 영향을 미칠 수 있다는 보고가 있다(Ridla et al., 2021). 본실험에 사용된 VY를 2-3% DM(0.24-0.36% yucca saponins;)까지 첨가량을 높이면 메탄저감 효과가 있을 수도 있지만 추가 사료 비용의 증가는 실제 농가 적용에 할 때 제한 요인이 될 수 있다.

메탄 저감 후보 물질인 SA와 RU는 사료에 각각 2.5% DM, 1% DM씩 첨가하였을 시, 전체 VFA 생산에 부정적인 영향을 주지 않고 한우 거세우 반추위 장내 발효 메탄 생성을 감소시켰다. 또한, SA와 RU는 메탄 감소 효과가 시험관 실험 및 생체 실험에서 모두 일관되게 메탄생성이 억제되었다. 그러나 VY에서 얻은 시험관 실험 결과를 생체 실험에 적용하였을 시 반추위 내 부피에 비례하여 메탄저감 효과가 적거나 없음을 시사하였다. 추가적으로 SA와 RU의 효과를 더 잘 규명하기 위해서는 향후 연구에서 프로토조아를 포함한 반추위 미생물 군집의 변화에 대한 조사가 필요하다. 또한, 메탄 저감 효과의 장기간 지속 여부 및 사료 요구율 및 성장과 같은 생산성 향상에 대한 연구도 추가적으로 필요하다. 전반적으로 RU의 급여가 가장 이상적으로 보이나, RU의 메탄 저감 효과를 연구한 생체 내 실험이 드문 만큼 한국의 농가 현실에 맞는 사료 첨가제를 통한 메탄 저감 가능성을 촉진하기 위해서는 RU에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

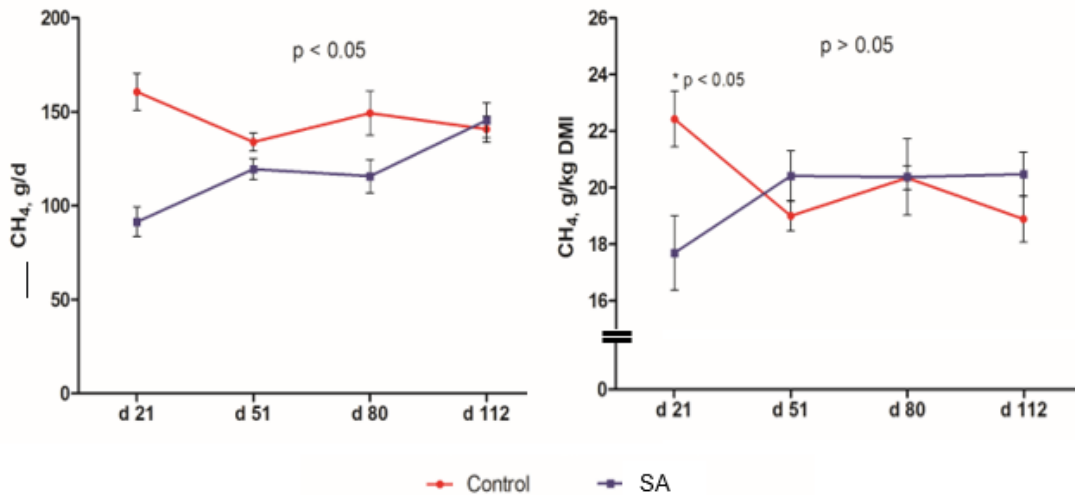
본 실험의 결과를 요약 하면, SA와 RU를 사료의 건물섭취량 당 2.5%와 1.0% 첨가하였을 때, SA와 RU 모두 1일 메탄 발생량(g/d)이 각각 약 16%와 13% 유의성 있게 감소하였다. 그동안 해외 연구 축적이 많은 제품도 SA와 RU이다. 그중에서 SA의 메탄 저감 효과는 RU와 비교해서 본 실험에서도 컸고 기존 보고된 논문들 들에서도 일관성있는 감축 결과를 보였다. 또한 가격 면에서도 본 실험을 수행하던 기간에서 조사된 결과에 의하면 SA가 RU 보다 90% 저렴했기 때문에 시험관 내 실험 결과와 본 실험 결과를 종합해서 최종 장기 급여 실험을 위한 제품으로 SA를 선택하였다.

### 3) 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 제 품(SilvAir)의 Top dressing 방법에 의한 장기 급여와 메탄 저감 효과(실험 3)

장기간(115일간) 기초사료와 함께 2.5% SA를 섭취한 거세 한우의 우방에서 조사된 건물섭취량은 대조구와 비교하여 감소하였다(P<0.05)(표 9). 그러나 평균 일일 증체량(ADG)이나 사료 전환 비율(FCR)에 부정적인 영향은 관찰되지 않았다(P>0.05). CH<sub>4</sub> 측정을 위한 호흡 챔버에서는 시험 기간 내내 2.5% SA 처리 그룹에서 건물 섭취량의 감소가 관찰되었으며(P<0.005), CH<sub>4</sub> 생산량(g/일) 감소로 이어졌다(표 10; 그림 3). 건물 섭취량 당 메탄발생량(g/kg DMi)으로 표현했을 때는 초기 단계(실험 개시 21일차 까지)에서만 감소(P<0.05)가 확인되었지만, 그 이후에는 차이가 없었다(P>0.05).

**Table 9.** Least-squares means of DMI, ADG and FCR of Hanwoo steers (n = 10) fed diet supplemented with 2.5% SilvAir (SA) for 115 days in the pen.

Item	CON	SA	SEM	p value
Initial BW, kg	347.60	346.50	5.92	0.897
Final BW, kg	454.30	443.10	5.46	0.940
DMI, kg	8.35	7.97	0.07	0.002
Average daily gain, kg/d	0.74	0.67	0.03	0.130
Feed conversion ratio	11.40	12.22	0.58	0.332

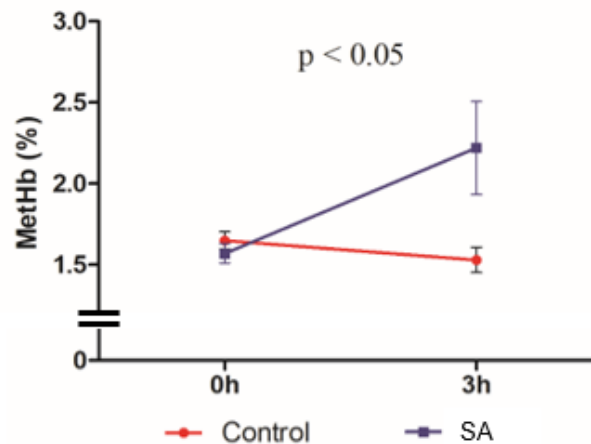


**Figure 3.** Effects of SilvAir (SA) on CH<sub>4</sub> production and yield (n=10) over a long-term supplementation of 115 days.



**Table 11.** Blood metabolite profile of Hanwoo steers (n = 10) fed diet supplemented with 2.5% SilvAir (SA) for 26 days.

Item	CON	SA	SEM	p value
Total protein, g/dL	6.67	6.71	0.13	0.756
Albumin, g/dL	3.79	3.73	0.06	0.305
Globulin, g/dL	2.88	2.98	0.12	0.432
T-Bilirubin, mg/dL	0.03	0.04	0.01	0.058
D-Bilirubin, mg/dL	0.02	0.02	0.00	0.165
Creatinine, mg/dL	0.98	0.96	0.04	0.641
Blood Urea Nitrogen (BUN), mg/dL	26.9	27.3	1.66	0.813
Aspartate Transferase (AST), U/L	57.6	68.0	8.44	0.234
Gamma-glutamyl Transferase (GGT), U/L	11.5	10.00	2.06	0.476
Lactate dehydrogenase (LDH), U/L	1076.3	1102.9	50.9	0.608
Creatine Kinase (CK), U/L	119.9	139.8	13.5	0.157
Alkaline Phosphatase (ALP), U/L	185.7	174.0	17.5	0.511
Serum Amyloid A (SSA), $\mu$ g/mL	14.2	29.7	6.15	0.941



**Figure 4.** Effects of SA on blood methemoglobin (MetHb) levels after 26 d of supplementation.

반추위 pH, 암모니아 농도 및 총 휘발성 지방산 농도는 처리 간에 차이가 없었지만( $P > 0.05$ ), SA 섭취는 초산과 낙산 비율을 각각 증가 및 감소( $P < 0.0001$ )시켰다(표 12).

**Table 12.** Rumen fermentation characteristics in Hanwoo steers (n = 10) fed diet supplemented with 2.5% SilvAir (SA) for 25 days.

Item	Control			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		
	0 h	2 h	4 h	0 h	2 h	4 h
pH	7.04	6.61	6.57	6.94	6.67	6.61
Total VFA, mM	55.65	94.73	90.04	62.45	90.95	91.05
VFA, %						
Acetate	68.84	62.50	65.03	70.98	66.16	67.29
Propionate	14.41	19.10	16.78	14.74	17.83	16.40
Iso-butyrate	1.31	0.90	0.74	1.05	0.88	0.78
Butyrate	12.73	14.70	15.07	11.03	12.57	13.35
Iso-valerate	1.94	1.25	0.89	1.44	1.20	0.92
Valerate	0.78	1.54	1.48	0.77	1.36	1.27
Acetate:Propionate	4.79	3.29	3.89	4.87	3.72	4.14
NH <sub>3</sub> -N,mg/dL	12.39	22.66	13.96	12.21	26.24	16.25

SEM	P-value		
	diet	hours	diet x hours
0.08	0.998	<.0001	0.144
3.76	0.590	<.0001	0.438
0.51	<.0001	<.0001	0.162
0.38	0.323	<.0001	0.014
0.06	0.252	<.0001	0.001
0.35	<.0001	<.0001	0.592
0.08	0.049	<.0001	0.000
0.06	0.077	<.0001	0.079
0.12	0.048	<.0001	0.152
1.39	0.172	<.0001	0.327

#### 4) 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 제품(SilvAir) 함유 pellet의 장기 급여와 메탄 저감 효과 (실험 4)

실험 3에서의 SA를 탑드레싱 형태로 급여 것과 달리, 실험 4에서 펠렛으로 제조해서 SA를 급여한 결과, 한우 거세우의 건물섭취량은 감소하지 않았다(표 13). 그러나 처리 간에 CH<sub>4</sub> 생산량(g/일) 및 발생량(g/kg DMI)에서 SA의 급여효과가 관찰되지 않았다(표 14).

**Table 13.** Least-squares means of DMI, ADG and FCR of Hanwoo steers (n = 10) fed diet incorporated with 2.0% SilvAir (P-SA) for 47 days

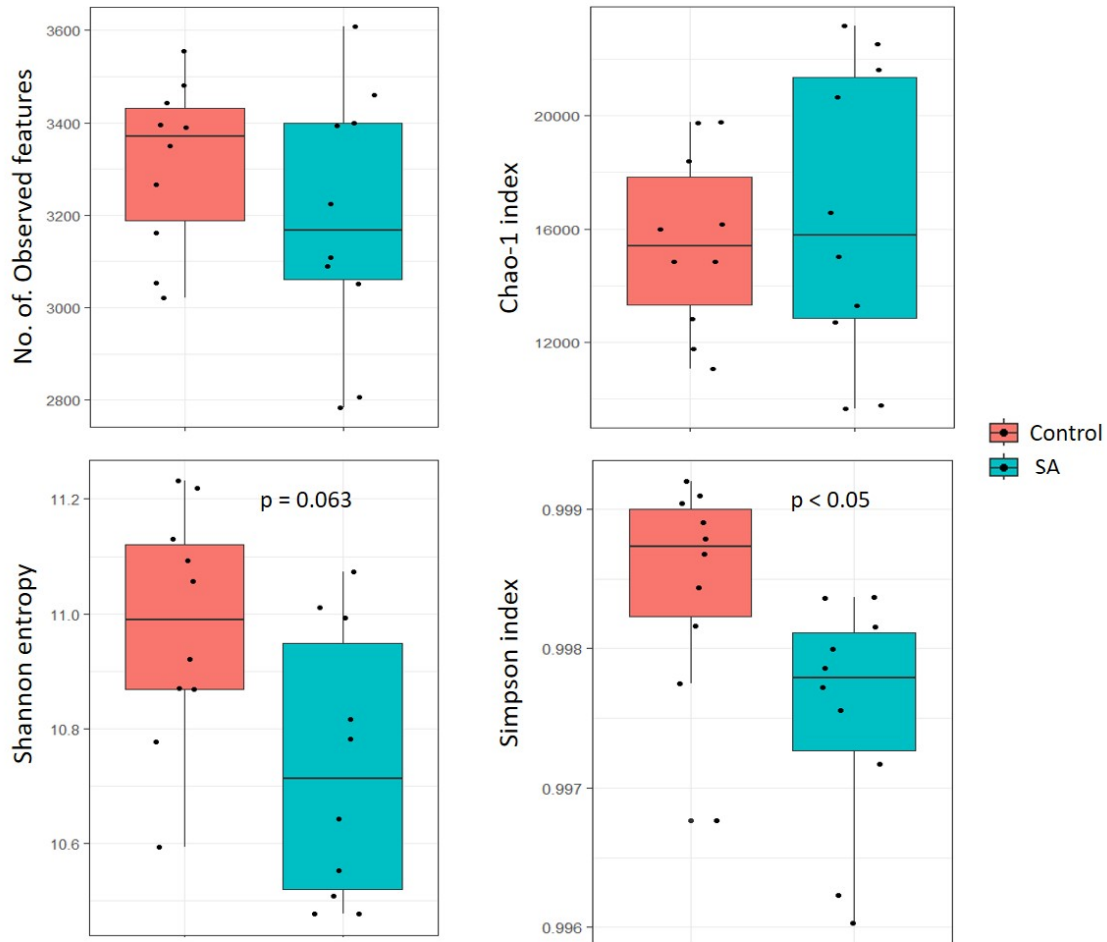
Item	CON	P-SA	SEM	p value
Initial BW, kg	476.89	476.33	4.79	1.000
Final BW, kg	500.89	501.33	8.32	0.970
DMI, kg	7.48	7.41	0.10	0.644
Average daily gain, kg/d	0.38	0.40	0.05	0.797
Feed conversion ratio	24.01	20.20	1.97	0.826

**Table 14.** Least-squares means of enteric CH<sub>4</sub> emission from Hanwoo steers (n=10) fed diet incorporated with 2.0% SilvAir (P-SA) for 47 days in the chambers

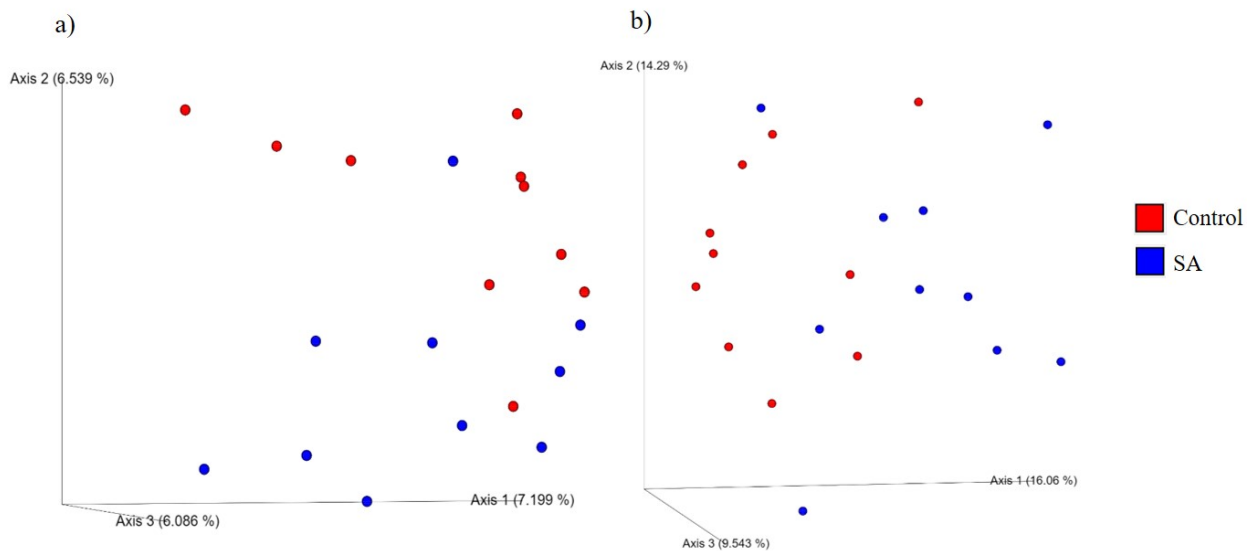
Item	Day 19		Day 45		SEM	p value		
	CON	P-SA	CON	P-SA		diet	days	diet × days
Intake, kg/d (chamber)								
Dry matter (DM)	6.40	6.57	6.51	6.94	0.25	0.421	0.163	0.550
Organic matter (OM)	6.01	6.17	6.14	6.51	0.24	0.409	0.195	0.615
aNDFom	2.76	2.84	2.64	2.80	0.11	0.510	0.185	0.641
Gross energy (GE, MJ/d)	110.4	113.4	112.5	119.2	4.40	0.450	0.195	0.617
CH <sub>4</sub> (g/d)	114.4	108.9	111.2	111.3	5.87	0.963	0.477	0.463
CH <sub>4</sub> (g/kgDMi)	17.9	16.6	17.4	16.1	0.85	0.521	0.167	0.965
CH <sub>4</sub> (g/kgOMi)	19.1	17.7	18.4	17.1	0.91	0.469	0.167	0.961
CH <sub>4</sub> (g/kgaNDFomi)	41.6	38.5	42.9	39.9	2.06	0.527	0.168	1.000
Ym	5.77	5.35	5.57	5.18	0.27	0.509	0.167	0.961

### 5) 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 제품(SilvAir)의 Top dressing 급여와 미생물 군집 변화 (실험 5)

품질 관리 후, 추가 분석을 위해 총 평균 길이가 1496 nt인 203,809개의 고품질 long reads 시퀀스를 얻었으며, 샘플 당 평균 10,190개의 reads가 있었다. 관찰된 OTU 수, Chao1은 그룹 간에 차이가 없었다(P>0.05). Shannon 엔트로피(P=0.063) 및 Simpson 지수(P<0.05)와 같은 다양성 추정치는 대조구 그룹과 비교했을 때 SA를 섭취한 처리구 그룹에서 낮았다(그림 5). Unweighted 및 Weighted Unifrac 거리를 사용한 PCoA 분석에 의한 세균 군집 비교는 각각 그룹 간 변이의 PC1(7.2%) 및 PC2(16.1%)를 설명하고 있다(그림 6).



**Figure 5.** Alpha diversity metrics of the bacterial/archaeal composition in the rumen of Hanwoo steers supplemented with 2.5% SilvAir (SA) for 25 days.



**Figure 6.** Principal coordinate analysis (PCoA) plots of the bacterial/archaeal community compositions in the rumen of Hanwoo steers using an unweighted (a) and weighted (b) UniFrac metric.

모든 샘플에서 relative abundance가 0.1% 이상인 14개의 박테리아 문이 발견되었으며, 두 가지 가장 우점 문은 평균적으로 각각 25.6%와 17.3%의 비율로 Firmicutes와 Bacteroidetes 이었다(Table 15; 그림 7). 평균 39.38%가 고세균으로 분류되었으며, 이 중 31.55%는 아직 정확히 분류되지 않아서 한우의 반추위에는 미지의 고세균들이 더 많이 서식하고 있음을 시사하였다. 분류된 고세균 중에서 Aenigmarchaeota (2.92%)가 가장 우세한 문이었으며, 이어서 Euryarchaeota (2.58%)와 Nanoarchaeota (2.32%)가 뒤를 이었다. 평균 고세균: 박테리아 비율과 Bacteroidetes: Firmicutes 비율은 각각 0.79와 0.68로 나타났다. 가장 우세한 다섯 가지 속은 Prevotella sp. (6.09%), Christensenellaceae (4.31%), Rikenellaceae (4.22%), Ruminococcus sp. (4.08%), Lachnospiraceae (4.22%)였다. Methano brevibacter millerae (2.04%)는 반추위에서 가장 우세한 고세균이었다 (표 15; 그림 8).

**Table 15.** Relative abundance (%) of taxa in the rumen of Honwoo steers supplemented with 2.5% SA representing > 0.1% of total sequences

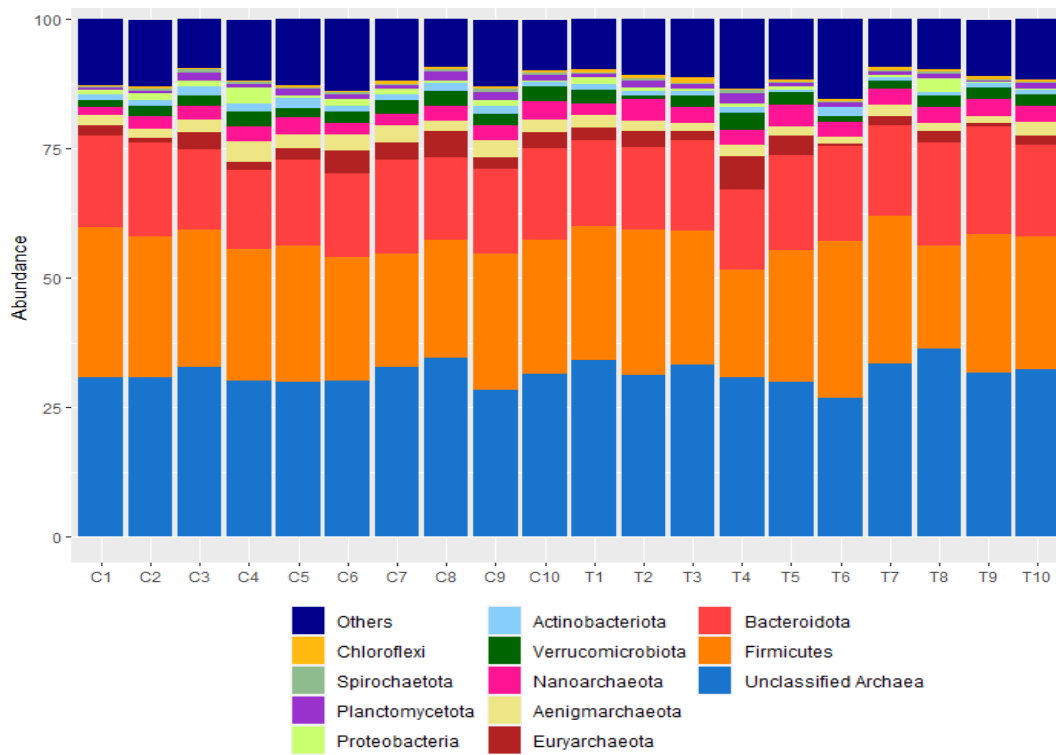
	Relative abundance (%)		SEM	p value
	Control	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		
Archaea:Bacteria	0.79	0.79	0.02	0.984
Bacteroidetes:Firmicutes	0.66	0.70	0.02	0.401
Unclassified Archaea	31.15	31.96	0.48	0.212
Euryarchaeota	2.73	2.44	0.33	0.739
Methanobrevibacter millerae	2.01	2.08	0.29	0.919
Methanobrevibacter	0.37	0.19	0.08	0.293
Methanobrevibacter ruminantium	0.24	0.10	0.03	0.073
Methanosphaera	0.10	0.06	0.01	0.254
Nanoarchaeota	2.66	3.19	0.14	0.030
Woesearchaeales Unclassified	2.72	1.92	0.16	0.023
Aenigmarchaeota	2.72	1.92	0.16	0.023
Deep_Sea_Euryarchaeotic_Group (DSEG)	2.39	2.92	0.13	0.024
Aenigmarchaeota Unclassified	0.27	0.27	0.02	0.972
Firmicutes	25.54	25.75	0.58	0.864
Christensenellaceae R-7 group	4.45	4.17	0.25	0.490
Lachnospiraceae NK3A20 group	3.63	2.04	0.30	0.007
Ruminococcus sp.	3.00	5.15	0.50	0.047
Oscillospiraceae NK4A214 group	1.55	1.42	0.15	0.698
Acetitomaculum	1.33	0.88	0.12	0.084
Mogibacterium	0.95	0.75	0.06	0.166
Lachnospiraceae ND3007 group	0.83	1.20	0.13	0.250
RF38	0.69	0.71	0.07	0.853
Succiniclasticum	0.55	1.10	0.14	0.066
Lachnospiraceae Unclassified	0.53	0.42	0.02	0.044
Ruminococcaceae unclassified	0.51	0.47	0.06	0.632
Clostridium methylpentosum_group	0.51	0.24	0.12	0.253
Mycoplasma	0.48	0.17	0.09	0.094
Eubacterium coprostanoligenes group	0.41	0.33	0.03	0.099
Ruminococcus gauvreauii group	0.48	0.26	0.04	0.003



Erysipelatoclostridiaceae Unclassified	0.34	0.77	0.21	0.332
Anaerovoracaceae Family XIII AD3011	0.32	0.23	0.02	0.025
Clostridium methylpentosum group	0.23	0.11	0.04	0.121
Eubacterium hallii group	0.22	0.13	0.02	0.007
Clostridia Unclassified	0.21	0.31	0.03	0.101
Saccharofermentans	0.14	0.18	0.02	0.205
Oscillospiraceae Unclassified	0.13	0.10	0.01	0.420
Solobacterium	0.13	0.08	0.01	0.051
Marvinbryantia	0.12	0.10	0.01	0.357
Butyrivibrio	0.11	0.14	0.02	0.368
Selenomonas	0.06	0.10	0.01	0.237
Selenomonas ruminantium	0.02	0.06	0.01	0.073
Bacteroidota	16.84	17.85	0.32	0.190
Prevotella	6.01	6.17	0.45	0.870
Rikenellaceae RC9 gut_group	3.88	4.57	0.29	0.162
F082	2.02	1.99	0.18	0.937
Prevotellaceae Unclassified	1.74	1.87	0.13	0.710
Muribaculaceae	1.28	1.13	0.18	0.567
Bacteroidales Unclassified	0.90	1.01	0.09	0.646
Prevotella ruminicola	0.24	0.14	0.04	0.212
p-251-o5	0.19	0.17	0.04	0.812
Verrucomicrobiota	2.26	2.07	0.14	0.529
WCHB1-41 Unclassified	1.63	1.60	0.11	0.855
Candidatus Omnitrophus	0.18	0.11	0.03	0.250
Actinobacteriota	1.41	0.89	0.09	0.013
Olsenella	0.58	0.30	0.05	0.003
Atopobium	0.19	0.10	0.02	0.010
Eggerthellaceae DNF00809	0.19	0.23	0.03	0.398
Bifidobacteriaceae Unclassified	0.14	0.03	0.03	0.090
Planctomycetota	1.06	0.94	0.10	0.663
p-1088-a5_gut_group	0.74	0.43	0.08	0.134
Pirellula	0.18	0.29	0.04	0.293
Spirochaetota	0.43	0.30	0.03	0.107
Treponema	0.12	0.15	0.02	0.446
Sphaerochaeta	0.11	0.17	0.02	0.191
Chloroflexi	0.40	0.57	0.04	0.068
Flexilinea	0.41	0.30	0.03	0.114
Proteobacteria	1.10	0.77	0.18	0.424
Paracaedibacteraceae Unclassified	0.98	0.29	0.16	0.029
Patescibacteria	0.32	0.48	0.05	0.181
Candidatus Saccharimonas	0.22	0.33	0.03	0.119
Others	16.89	17.47	0.45	0.565

Phylum 수준에서, SA를 보충한 소는 Nanoarchaeota( $P < 0.05$ ), Actinobacteria( $P < 0.05$ ) 및 Chloroflexi( $P = 0.068$ )의 반추위 풍부도가 더 높았지만, Aenigmarchaeota의 풍부도는 더 낮았다( $P < 0.05$ ) (표 14). Genus 수준에서, SA를 보충 급여한 거세우는 Ruminococcus sp. ( $P < 0.05$ ), Succiniclasicum ( $P = 0.066$ ), Selenomonas Ruminantium( $P = 0.073$ )가 더 높게 나타났고

Olsenella, Atopobium 및 Methanobrevibacter Ruminantium (P=0.073)는 낮게 나타났다.



**Figure 7.** Bacterial/archaeal composition at phylum level in the rumen of Hanwoo steers supplemented with 2.5% SilvAir (SA) representing > 0.5% of total sequences.

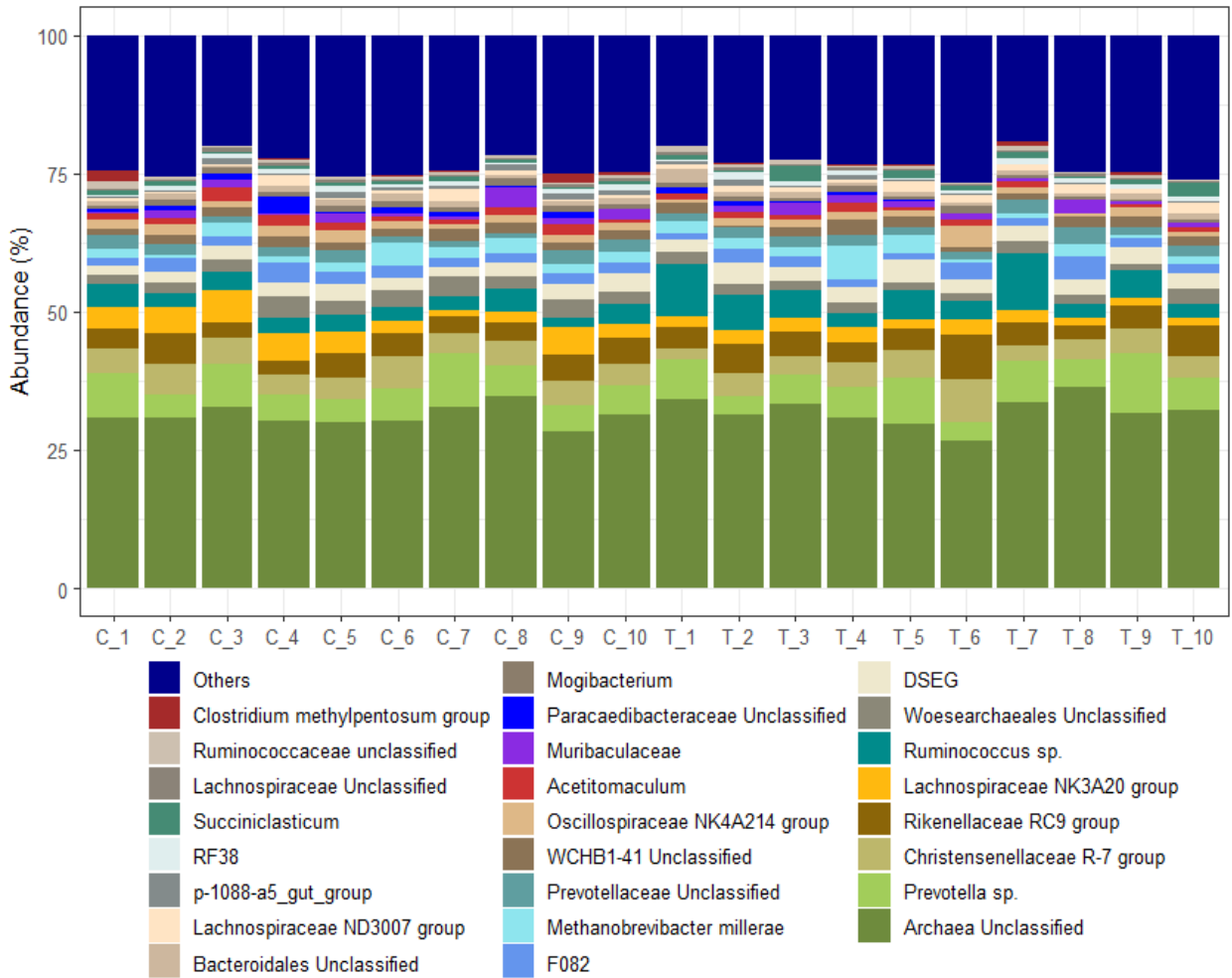


Figure 8. Bacterial/archaeal composition at genus level in the rumen of Hanwoo steers supplemented with 2.5% SilvAir (SA) representing > 0.5% of total sequences.

### 6) 질산염( $\text{NO}_3^-$ ) 제품(SilvAir)의 실험 3, 실험 4 그리고 실험 5의 종합 고찰

공시동물의 건물 섭취량 감소는  $\text{NO}_3^-$ 의 부정적 효과를 시사하며(Bruning-Fann & Kaneene, 1993), 이는 총 혈중 헤모글로빈(Hb)에 대한 메트헤모글로빈(MetHb)의 비율이 20% 이상 증가할 때 발생한다는 보고가 있다(Cockrum et al., 2010). 본 실험에서는 건물 내 1.578%  $\text{NO}_3^-$ 가 포함되었던 실험 3에서 우방에서의 건물섭취량이 대조구보다 4.5% 감소하였다. 그러나, 실험 3에서 관찰된 건물 섭취량의 감소는 SA를 섭취한 모든 실험축의 혈중 MetHb 수준이 총Hb의 2.5% 미만으로 분석되었기 때문에  $\text{NO}_3^-$  중독으로 인한 건물 섭취량 감소는 아닌 것으로 판단된다. 이는 건물 내  $\text{NO}_3^-$ 가 2.2~2.6% 포함된 사료를 반추 동물이 섭취 하였을 때, MetHb 수준이 5% 미만으로 유지되면서 건물 섭취량이 6~16% 감소한다는 이전 연구들과 동일한 결과를 보였다(Hulshof et al., 2012; Newbold et al., 2014; Velazco et al., 2014). 그러나, 이전 연구들과 비교하여 50~80%의 낮은  $\text{NO}_3^-$ 를 급여한 실험 3의 건물섭취량 감소는 다른 요인들의 영향이 있을 것이라 판단된다.  $\text{NO}_3^-$ 는 쓴맛이 나면서 기호성을 저하시킬 수 있다(Farra & Satter, 1971; Lichtenwalner et al., 1973). 그러므로, 비록  $\text{NO}_3^-$ 의 급여량이 권장 수준(<2%) 이 내였지만, 사료 위에 SA를 탑 드레싱 형태로 직접 뿌리는 방식은 실험 3의 결과와

같이 건물 섭취량을 낮추는 결과를 초래할 수 있다. SA가 실험 4에서 건물섭취량에 영향을 미치지 않은 것은 이 가설을 뒷받침해준다. 그러므로, 사료 위에 탑 드레싱 형태로 급여하는 것에 비해, 펠렛사료로 만들어 SA를 섭취하게 하는 것이 기호성을 개선하는 데에 유익할 수 있음을 시사한다. 또한, 장기간의 급여기간 동안 혈중 MetHb 수준이 증가하여 잠재적으로 독성을 유발하고, 이로 인해 실험 후반에 건물 섭취량이 감소했을 수 있으므로, 이는 추가적인 연구가 필요하다.

우선,  $\text{NO}_3^-$ 의 완전한 환원은  $\text{CO}_2$ 에서  $\text{CH}_4$ 로의 전환보다 더 많은 에너지를 생산하며, 동물의 생산성을 향상시킬 수 있다는 연구가 있다(Ungerfeld & Kohn, 2006). 또한, 사료 내 건물 당 3.0% 및 1.25%의  $\text{NO}_3^-$ 를 농후사료와 함께 급여한 비육우 실험에서도 생산성이 향상되었다(Araujo et al., 2021; Lee et al., 2017a). 그러나, 본 연구에서는 SA를 섭취한 처리구에서는 건물 섭취량의 감소로 일당 증체량이나 사료 요구율에서 유의미한 향상이 나타나지 않았다. 본 연구에서의  $\text{NO}_3^-$ 가 동물의 일당 증체량이나 사료 요구율에 미치는 영향이 없었던 결과는 높은 조농 비율(조사료 60: 농후사료 40%)의 조건에서  $\text{NO}_3^-$ 를 급여하였을 때 일당 증체량 및 사료 요구율에 영향을 미치지 않았다는 결과와 유사하다(El-Zaiat et al., 2014). De Raphélis-Soissan 등(2014) 또한 사료 내 건물 당 2%의  $\text{NO}_3^-$ 가 보충된 농후 사료를 양에게 급여하였을 때 일당 증체량이 차이가 없었다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은  $\text{NO}_3^-$ 가 반추동물의 생산성에 미치는 영향이 사료 구성 및 조농 비율과 같이 여러 요인에 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

호흡 챔버를 이용한  $\text{CH}_4$  발생량 측정은 국제적인 인정을 받고 있지만, 격리에 의한 문제점 또한 보고된 바가 있다(Storm et al., 2012). 본 연구에서 호흡 챔버 내 격리로 인해서 건물섭취량이 우사와 비교하여 18.8% 감소하였으며, 이는 이전 연구와도 일치한다(Reynolds et al., 2014; Vyas et al., 2016). 본 실험에서도, 실험 3에서 SA 처리구가 보여준 호흡 챔버 내의 건물섭취량 감소(17.4%)는 우사에서의 건물섭취량 감소(4.5%)보다 더 컸다. 이는 SA에 의해 추가된 N으로 인하여 대조구와 처리구 간에 동일한 질소량을 가지고 있지 않았으며, 이는 호흡 챔버 내에서 N의 배출과 분뇨로서의 N 기반 배출이 증가하였을 수 있다. 또한 이는 실험 축들의 호흡기에도 영향을 주었을 가능성이 있고 결과적으로는 건물섭취량을 감소시켰을 수 있다는 점에 주의해야 할 것이다(Lee & Beauchemin, 2014). 반대로 실험 4에서는 대조구와 처리구 간에 건물섭취량 감소가 관찰되지 않았는데 그 이유를 설명할 수 있는 근거가 없어서 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다. 그러나, 실험 3에서 시험축들이 호흡 챔버 내에서  $\text{CH}_4$ 를 측정하였던 경험이 있었고, 실험 4를 위해서 호흡 챔버에 들어갔을 때는 비교적 적응이 더 된 상태일 수 있었다. 이점이 실험 4의 호흡 챔버 내에서의 건물 섭취량 감소가 크지 않았던 것을 설명할 수도 있을 것으로 생각된다. 반추동물에서 건물섭취량과 장내 발효  $\text{CH}_4$  발생량과의 관계는 이미 많은 연구를 통해서 잘 알려져 있다(Hristov et al., 2018). 시험 기간 동안 관찰된 SA 처리에 의한  $\text{CH}_4$  발생량(g/d)의 감소는 SA의 효과보다는 호흡 챔버에서의 건물섭취량의 급격한 감소와 연관이 있을 것으로 사료된다.

반추동물의 메탄 저감제로서  $\text{NO}_3^-$ 의 효과에 대한 많은 연구는  $\text{NO}_3^-$ 가 유용한  $\text{CH}_4$  저감제라고 보고하고 있다(Lee & Beauchemin, 2014). 그러나, 본 연구에서는 SA의 급여는 실험 초기 21일까지만  $\text{CH}_4$  발생량(g/kg DMI)의 감소가 관찰되었다. Troy 등 (2015)는  $\text{NO}_3^-$ (사료 건물 내 2%)가 포함된 농후사료 위주의 사료를

비육우에게 급여한 실험에서 CH<sub>4</sub> 발생량의 차이가 없었다고 하였으며, 반대로 높은 조사료 비율이 높은 조건에서는 대조구 대비 17%의 CH<sub>4</sub> (g/kgDMI) 감소를 보고하였다. 마찬가지로, 대부분의 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 급여 실험은 높은 조농 비율의 사료 급여 프로그램을 기반으로 CH<sub>4</sub> 저감 실험을 진행하였으며, 동시에 유의적인 CH<sub>4</sub> 감소를 관찰하였다(Guyader et al., 2015; Hulshof et al., 2012; Newbold et al., 2014). 본 연구에서의 조사료의 비율은 50%였음에도 불구하고, SA의 급여기간이 길어짐에 따라서 CH<sub>4</sub> 발생량에 유의적인 영향을 주지 못하였다. 또한, 본 연구의 결과는 우사 내에서의 건물섭취량과 비교하여 호흡챔버 내에서의 건물섭취량이 18.8%가 낮았기 때문에 결과 해석에 어려움이 있다. Lee et al. (2017b)의 연구에서도 실험축들에게 높은 조농 비율의 사료 프로그램에서 최대 2.5% DM의 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 급여하였을 때, CH<sub>4</sub> 발생량의 감소가 유의적으로 차이가 나지 않았다. 또한 실험축들이 우사에서 호흡 챔버로 옮겨질 때 관찰된 건물섭취량 20% 감소로 인하여 CH<sub>4</sub> 발생량 차이가 존재하지 않았다고 설명하였으며, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>가 포함된 농후 사료의 기호성이 낮아지면서 오히려 조사료를 선택 채식하는 채식 행동 변화도 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서도, 앞서도 기술한 바와 같이, SA를 탐드레싱하면서, 농후 사료의 기호성이 나빠졌고, 이에 따라 CH<sub>4</sub> 생산이 가장 많고, 저감 효과가 가장 뚜렷한 사료 급여 후 초기 6시간 동안의 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 섭취가 충분히 이루어지지 않았을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 장기간의 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 급여는 CH<sub>4</sub> 발생량(g/kg DMI)에서 차이를 발견하지 못하였다는 연구 논문은 많이 찾아볼 수 있다(Granja-Salcedo et al., 2019; Lee et al., 2017b, 2017a).

Wallace et al. (2015)는 반추동물에서 메탄 생성균인 *Methanobrevibacter*의 비율과 높은 CH<sub>4</sub> 발생량 간의 연관성을 보고하였다. 그러므로 SA를 급여된 초기 단계의 처리구에서 낮은 CH<sub>4</sub> 발생량을 보인 것은 *Methanobrevibacter Ruminantium*의 개체 수가 약 54% 감소된 것과 관련이 있다고 하였다. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 또는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 환원형이 메탄생성균에 독성을 가질 수도 있다고 보고한 Iwamoto et al. (2002)의 *in vitro* 시험에서 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 에스테르는 매우 특이적으로 고세균 성장을 억제하고 *ethanobrevibacter ruminantium* 성장 억제에는 100배 더 낮은 농도로도 충분하다고 하였다(Duin et al., 2016). 또한, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 환원에 의한 반추위 내 H<sub>2</sub>(메탄생성균의 에너지 원) 결핍은 반추위 내 메탄생성균 개체 수 감소를 초래할 수 있다(Lee and Beauchemin, 2014). 이는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 또는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 환원하는 미생물로 확인된 *Selenomonas ruminantium*의 개체 수 증가로도 설명된다(Asanuma et al., 2015). SA를 섭취한 한우 거세우들의 반추위 내 NH<sub>3</sub>-N 농도의 수치적 증가 또한 본 관찰을 뒷받침 해준다. 마찬가지로, 처리구에서 *Succiniclasticum*의 개체 수가 두 배 증가한 것은 본 박테리아가 H<sub>2</sub>를 이용함으로써, CH<sub>4</sub> 저감에 기여한다 할 수 있다. 왜냐하면, 본 박테리아들은 반추위 내에서 succinate을 프로피온산으로 환원하는데 기여하기 때문이다(Van Gylswyk, 1995). 본 연구와 일관되게, Granja-Salcedo et al. (2019)는 13개월간의 장기간에 걸쳐 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 급여하면 반추위 발효 경로를 변화시키며, 프로피온산을 생산하는 박테리아 및 *Selenomonas ruminantium*를 증가시키고, *Methanobrevibacter sp*의 비율을 감소시켰다고 보고하였다.

본 연구에서 SA를 섭취한 동물들에서 H<sub>2</sub> 소비에 관여하는 반추위 미생물의 증가에도 불구하고, 반추위 내 프로피온산 비율의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 초산 비율의 증가와 낙산 비율의 감소는 관찰되었다. 이러한 결과는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>가 포함된 사료를 양에게 급여한 여러 연구들과도 일치한다(Hulshof et al., 2012; Li et al., 2012; Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2010). NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 환원은 H<sub>2</sub>를 메탄 생성에서 멀어지게 할 수 있지만, 프로피온산 또는 낙산 생산과 같은 과정에서도 H<sub>2</sub>를 멀어지게 할 수 있다(Ungerfeld & Kohn, 2006). 따라서 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 반추위에 도입하는 것은 발효 양상을 초산 생산 쪽으로 유도하게 한다는 것이 일반적인 추론이다. 실제로 SA를 섭취한 동물들에서는 섬유소 분해가 증가하는 것으로 알려져 있고 초산 생산균인 Ruminococcus sp.의 개체 수가 72% 증가하는 것이 관찰되었다(Crost et al., 2018). 다른 여러 연구에서는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>가 섬유소 분해 미생물 개체군에 독성으로 작용한다고 하고 있다(Asanuma et al., 2015; Iwamoto et al., 2002). 그러나 본 연구에서 Ruminococcus sp.의 개체 수가 증가한 것은 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>첨가와 함께 in vitro 반추위 배양에서 보여진 Ruminococcus albus의 적응 여부와 관련이 있을 수 있다(Zhou et al., 2012). 본 연구 결과와 유사하게, Granja-Salcedo et al. (2019)과 Zhao et al. (2015)도 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 보충 급여에 의해 소의 반추위 내 주요 섬유소 분해 미생물이 영향을 받는다고 보고했다. 또한, Ruminococcus sp.의 증가는 SA를 섭취한 동물의 조사료 선택 채식 행동과 관련이 있을 수 있으며, 이는 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로, 실험 3에서 112일 동안의 긴 기간 동안 사료 건물 당 2.5%의 SA를 급여함으로써, 건물섭취량은 약 4.5% 감소하였고 동물의 생산성에는 부정적인 영향을 미치지 않았다. 실험 4에서 건물섭취량에 부정적인 영향이 없었던 것은 SA를 펠렛으로 급여한 때문으로 해석된다. 한우 거세우는 SA 보충급여 초기 단계에서 반추위 내 Methanobrevibacter 개체 수를 감소시키며 CH<sub>4</sub> 배출량을 감소시켰다. 그러나 장기 급여 시험에서는 CH<sub>4</sub> 발생량의 지속적인 감소가 보이지 않았던 것은 조농 비율과도 관련이 있을 것으로 생각되며 추가 연구의 필요성이 제기된다.

## 7) CO<sub>2</sub> 법에 의한 메탄가스 정량값과 호흡대사챔버 측정값과의 비교 및 고찰

실험 2에서 3종의 메탄저감제의 메탄 저감 효과 비교를 진행할 때에 CO<sub>2</sub>법을 함께 운영하면서 각 메탄저감제의 효과를 확인하였다. 대조구의 메탄생성량 (L/kg, DMI)을 기준으로 메탄저감제의 메탄 저감 능력을 평가했을 때 SA는 6.5%, RU는 9.3%, VY는 5.6%의 메탄저감 효과를 보였다. 하지만 그룹 간 통계적으로 유의미한 차이는 보이지 않았다(표 16).

호흡챔버를 기준으로 CO<sub>2</sub>법을 평가하였을 때 정확도는 105% (±30, standard deviation) 를 나타내었고(표 17) 평균 메탄 생성량의 경우 호흡챔버와 매우 유사하나 낮은 relationship을 보였다(표 17). 해당 결과를 통해 CO<sub>2</sub>법은 각각의 개체에 대한 메탄생성량 보다는 군집의 메탄생성량을 추산하는데 더욱 적합한 방법일 것으로 생각된다.

Table 16. Methane mitigation effect of methane reducing agents.

실험군	CON	SA	RU	VY	P-value
메탄생성량, L/day	160	140	144	151	0.304
메탄생성량, L/kg, DMI	21.6	20.2	19.6	20.4	0.249
메탄생성량 변화, %		-6.5%	-9.3%	-5.6%	

Table 17. Performance of the CO<sub>2</sub> method comparing with the respiration chamber. Comparison of L/day data.

	L/day	Standard deviation	Coefficient of variation	정확도
호흡챔버 (reference)	150	±33	22%	100% (reference)
CO <sub>2</sub> 법	149	±16	11%	105%
비교	P > 0.1			개체별 데이터를 아래 공식으로 정확도 계산하여 전체 평균 하였음 (CO <sub>2</sub> 법 값/호흡챔버 값)*100

Nitrate를 장기 급여한 호흡대사챔버 실험(실험 3)의 메탄저감 효과 검증을 CO<sub>2</sub>법을 이용한 측정값과 비교한 결과, 대조구의 메탄생성량 (L/kg, DMI)을 기준으로 메탄저감제의 메탄 저감 능력을 평가했을 때 SA는 약 16%의 메탄 저감 효과를 보였다(표 18). 다음으로 호흡챔버와 실험결과 경향이 비슷한 period 1 데이터만을 이용하여 CO<sub>2</sub>법을 비교하였다. 호흡챔버를 기준으로 CO<sub>2</sub>법을 평가하였을 때 정확도는 91% (±32, standard deviation), pearson correlation은 0.58을 나타내었다(표 19). 평균 메탄생성량의 경우 호흡챔버와 어느 정도 비슷한 메탄저감률을 나타냈고 moderate relationship (그림 9)을 보임에 따라 CO<sub>2</sub>법은 메탄발생량 추정법이라는 한계가 있지만 메탄저감제의 메탄저감률을 측정하는 측면에서 사용 가능한 메탄생성량 추정법이라 판단된다.

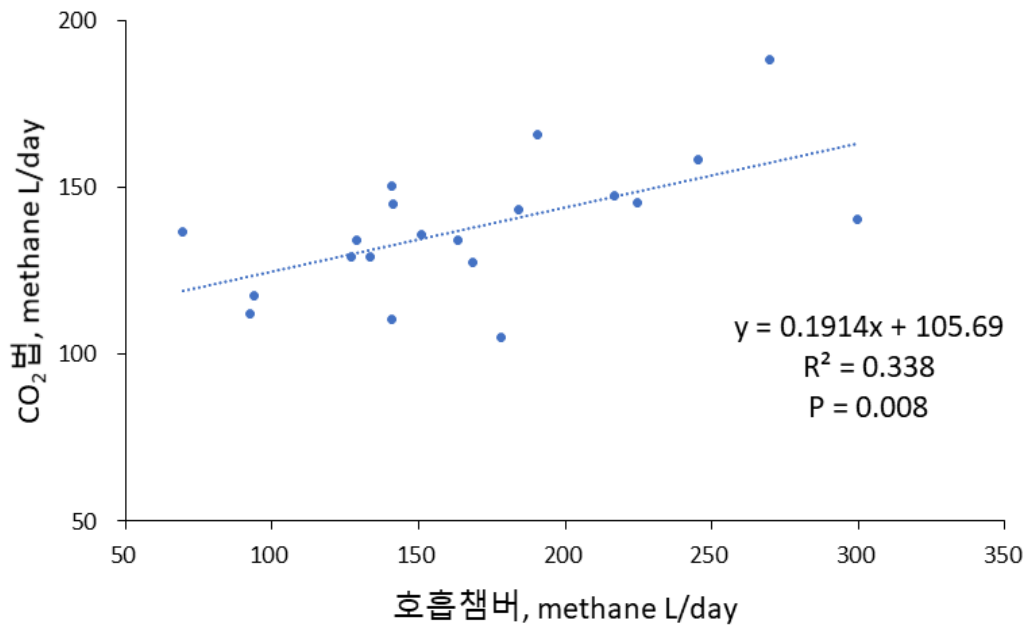
Table 18. Change of methane production during the long-term nitrate feeding estimated by the CO<sub>2</sub> method.

Period	1		2	
	CON	SA	CON	SA
메탄생성량, L/day	151	125	158	132
메탄생성량, L/kg, dmi	19.3	16.3	19.6	16.4
메탄생성량 변화, %	-15.5%		-16.3%	
P-value	< 0.01		< 0.001	

Table 19. Performance of the CO<sub>2</sub> method comparing with the respiration chamber. Comparison of L/day data. Only the period 1 data were used due to the similar methane reducing trend with the respiration chamber.

	L/day	Standard deviation	Coefficient of variation	정확도	Pearson correlation
호흡챔버 (reference)	168	±60	36%	100% (reference)	0.58
CO <sub>2</sub> 법	138	±20	14%	91%	
비교	P < 0.05			개체별 데이터를 아래 공식으로 정확도 계산하여 전체평균 하였음  (CO <sub>2</sub> 법 값/호흡챔버 값)*100	P < 0.01





**Figure 9.** Linear regression for methane production (L/day) between the respiration chamber and the CO<sub>2</sub> method.

CO<sub>2</sub>법은 Madsen et al. (2010)에 의해 처음으로 그 개념이 제시되어 아직까지 활발하게 연구가 이루어지지 않는 메탄측정법이다. 이에 따라 본 실험의 결과를 평가할 만한 CO<sub>2</sub>법 참고문헌은 매우 적은 상황이다. CO<sub>2</sub>법을 이용하여 도출된 157개의 측정값을 호흡챔버와 비교한 Hellwing et al. (2013)의 연구에서는 메탄 생성량에 대한 CO<sub>2</sub>법과 호흡챔버의 linear regression R<sup>2</sup>값이 0.55를 보였고, 이는 본 실험의 0.338보다 높다. 본 실험의 측정값은 20개로써 Hellwing et al. (2013)의 측정값(157개)에 비해 매우 적은 측정값으로, 본 실험의 linear regression R<sup>2</sup>값이 낮은 이유는 적은 측정값에서 기인했을 것으로 생각된다. Haque et al. (2017)의 연구에서 CO<sub>2</sub>법과 호흡챔버의 평균 메탄생성량으로 비교했을 때 CO<sub>2</sub>법의 정확도는 89~102%를 나타내었으며 이는 본 실험에서 나타난 정확도 91%, 105% 와 유사하다. 또한 본 실험에서 나타난 CO<sub>2</sub>법과 호흡챔버의 상관계수(r = 0.58)는 Haque et al. (2017)의 상관계수(r = 0.78)보다는 낮았으나 상관 정도가 크게 다르지 않았다.

CO<sub>2</sub>법은 호흡챔버법을 대체할 수 있는 여러 대체 메탄 측정방법 중 하나이며, 다른 대체 메탄 측정방법을 호흡챔버와 비교한 연구들을 통해 간접적으로 본 실험의 결과를 평가할 수 있다. Hammond et al. (2015)는 Greenfeed를 호흡챔버법과 비교하여 0.01, 0.06의 linear regression R<sup>2</sup>을 보고하였고, Munoz et al. (2012)는 SF<sub>6</sub> 방법을 호흡챔버법과 비교하여 0.69의 linear regression R<sup>2</sup>을 보고하였다. Greenfeed를 호흡챔버법과 비교하여 Velazco et al. (2016)는 0.85, Garnsworthy et al. (2019)는 0.81의 높은 correlation을 보고하였지만, Doreau et al. (2018)는 0.37의 낮은 correlation을 보고하였다. SF<sub>6</sub> 방법을 호흡챔버법과 비교하여 Garnsworthy et al. (2019)는 0.87의 높은 correlation, Doreau et al. (2018)는 0.33~0.78의 다양한 correlation을 보고하였다. 본 실험에서 CO<sub>2</sub>법은 호

흡챔버법에 대해  $R^2 = 0.338$ ,  $r = 0.58$ 을 보였고 Greenfeed, SF<sub>6</sub> 방법과 비교하여 크게 떨어지지 않는 수준을 나타내었다. CO<sub>2</sub>법을 이용한 추가적인 실험을 통해 다양하고 많은 데이터를 이용한 해당 방법의 평가가 필요하다.

Nitrate를 장기 급여한 호흡대사챔버 실험(실험 3) period 1 에 대해 CO<sub>2</sub>법 측정시 마스크를 이용하여 착용 유무에 따른 차이를 알아보았을 때 기본적으로 측정되는 CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> 농도에 많은 차이가 있었다. 전 실험군에 대한 CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> 평균값을 산출했을 때 마스크 착용시 [CO<sub>2</sub>:15,668ppm, CH<sub>4</sub>:1107ppm], 마스크 미착용시 [CO<sub>2</sub>:2618ppm, CH<sub>4</sub>:189ppm]을 나타내었다. 마스크 사용으로 인해 약 5.9배 더 높은 농도의 날숨을 측정할 수 있는 것을 확인하였다. 마스크의 사용은 보다 안정적인 날숨 측정을 가능케 했는데, 반추동물의 eructation(트림)에 의한 CH<sub>4</sub> 농도의 규칙적인 오르내림을 확인할 수 있었다(그림 10). 마스크를 사용하지 않을 때는 상대적으로 넓은 공간 안에서 대기과 희석된 날숨을 측정하는 반면, 마스크 사용시 동물의 코 주위에서 최소한으로 희석된 날숨을 바로 흡입하여 측정하기 때문에 CH<sub>4</sub>의 규칙적인 오르내림을 잘 측정할 수 있었던 것으로 생각된다. 마스크를 사용함에 따라 메탄발생량 추정의 정확도는 개선되었으나 그 개선폭은 작았다(표 20). 마스크 사용으로 인해 더욱 높은 농도의 날숨을 측정함으로써 메탄발생량 추정의 정확도가 향상되었다는 것을 확인했지만, 더욱 다양한 환경 속에서 비교를 진행하여 마스크 사용의 효용성을 평가하는 것이 필요하다.

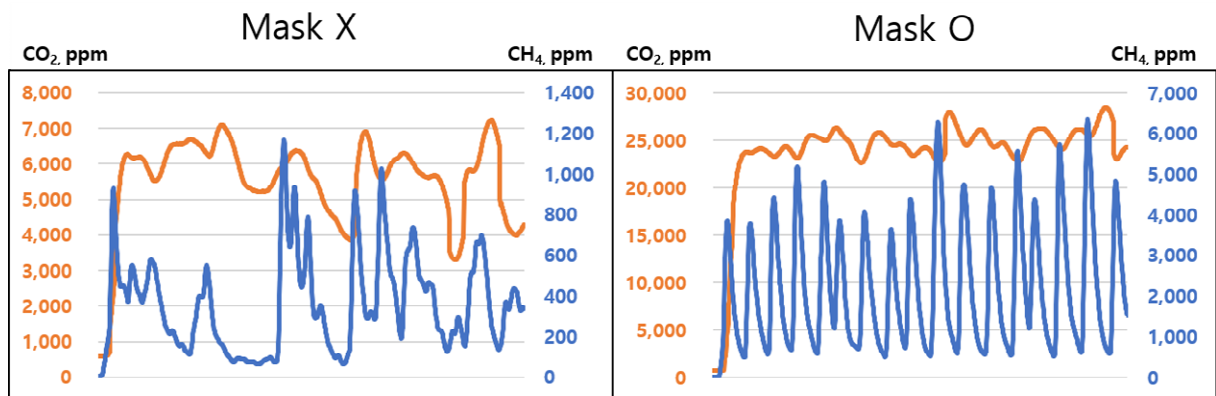


Figure 10. CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> concentration changing pattern during 20 min of gas sampling with or without mask. figure was made with the data of same animal and sampling period.

**Table 20.** Comparison of the CO<sub>2</sub> method gas collection ways(with or without mask) with the respiration chamber. Comparison of L/day data. Only the period 1 data of the experiment 3 were used due to the similar methane reducing trend with the respiration chamber.

	L/day	정확도
호흡챔버 (reference)	168	100%
CO <sub>2</sub> 법 (with mask)	138	90.9%
CO <sub>2</sub> 법 (without mask)	136	89.6%
비교		개체별 데이터를 아래 공식으로 정확도 계산하여 전체평균 하였음  (CO <sub>2</sub> 법 값/호흡챔버 값)*100

새로운 메탄측정법인 CO<sub>2</sub>법을 호흡챔버와 비교해 본 결과, CO<sub>2</sub>법은 호흡챔버를 대체하여 사용될 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서는 호흡챔버와 비교하여 CO<sub>2</sub>법의 메탄발생량 추정능력 및 메탄저감 탐지능력이 긍정적으로 평가되었지만 해당 방법을 이용한 비교실험이 많지 않기 때문에 다양한 환경에서의 다양한 데이터로 더욱 명확한 검토가 필요하다. 본 CO<sub>2</sub>법은 현재 정립 과정 중에 있으며 추후 호흡챔버의 사용 없이 on-site 반추동물 메탄 측정법으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## <인용문헌>

- Abdelbagi, M., Ridwan, R., Fitri, A., Nahrowi, Jayanegarac, A., 2023. Performance, Methane Emission, Nutrient Utilization, and the Nitrate Toxicity of Ruminants with Dietary Nitrate Addition: A Meta-analysis from In Vivo Trials. *Trop. Anim. Sci. J.* 46, 74–84. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.1.74>
- Adetunji, A.P., Aderinboye, R.Y., Adebayo, K.O., Ojo, V.O., Idowu, P.A., Mtileni, B., 2020. Effect of cashew nut shell liquid at varying inclusion levels on rumen fermentation and methane production in vitro. *J. Anim. Behav. Biometeorol.* 8, 82–87. <https://doi.org/10.31893/JABB.20011/PDF/JABBNET-8-2-82.PDF>
- Appuhamy, J.A.D.R.N., France, J., Kebreab, E., 2016. Models for predicting enteric methane emissions from dairy cows in North America, Europe, and Australia and New Zealand. *Glob. Chang. Biol.* 22, 3039–3056. <https://doi.org/10.1111/gcb.13339>
- Araujo, R. C., Pereira, M. L. R., Couto, V. R. M., Lemos, B. J. M., Jorge da Cunha, P. H., Arnhold, E., Silva, J. A., & Fernandes, J. J. R. (2021). Dose-response effect of encapsulated nitrate replacing soybean meal on growth performance, ingestive behavior, and blood metabolites of feedlot finishing bulls. *Livestock Science*, 247, 104475. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2021.104475>
- Arndt, C., Hristov, A.N., Price, W.J., McClelland, S.C., Pelaez, A.M., Cueva, S.F., Oh, J., Dijkstra, J., Bannink, A., Bayat, A.R., Crompton, L.A., Eugène, M.A., Enahoro, D., Kebreab, E., Kreuzer, M., McGee, M., Martin, C., Newbold, C.J., Reynolds, C.K., Schwarm, A., Shingfield, K.J., Veneman, J.B., Yáñez-Ruiz, D.R., Yu, Z., 2022. Full adoption of the most effective strategies to mitigate methane emissions by ruminants can help meet the 1.5 °C target by 2030 but not 2050. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2111294119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111294119>
- Asanuma, N., Yokoyama, S., & Hino, T. (2015). Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. *Animal Science Journal*, 86(4), 378–384. <https://doi.org/10.1111/ASJ.12307>
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J., Wang, M., 2020. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation, in: *Animal*. pp. S2–S16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Bharanidharan, R., Arokiyaraj, S., Kim, E. B., Lee, C. H., Woo, Y. W., Na, Y., Kim, D., & Kim, K. H. (2018). Ruminant methane emissions, metabolic, and microbial profile of Holstein steers fed forage and concentrate, separately or as a total mixed ration. *PLoS ONE*, 13(8), e0202446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202446>
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0470-Z>
- Branco, A.F., Giallongo, F., Frederick, T., Weeks, H., Oh, J., Hristov, A.N., 2015.

- Effect of technical cashew nut shell liquid on rumen methane emission and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 4030–4040. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9015>
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 2572–2579. <https://doi.org/10.2527/2005.83112572x>
- CHANEY, A.L., MARBACH, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130–132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
- CIGR 2002. Climatization of animal houses – heat and moisture production at animal and house level. In 4th Report of CIGR Working Group (ed. S Pedersen and K Sällvik), pp. 1–46. Research Centre Bygholm, Danish Institute of Agricultural Sciences, Denmark.
- Cockrum, R. R., Austin, K. J., Ludden, P. A., & Cammack, K. M. (2010). Effect of subacute dietary nitrate on production traits and plasma analytes in Suffolk ewes. *Animal*, 4(5), 702–708. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991534>
- Crost, E. H., Le Gall, G., Laverde-Gomez, J. A., Mukhopadhyaya, I., Flint, H. J., & Juge, N. (2018). Mechanistic insights into the cross-feeding of *Ruminococcus gnavus* and *Ruminococcus bromii* on host and dietary carbohydrates. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 415081. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02558/BIBTEX>
- Dai, X., Faciola, A.P., 2019. Evaluating Strategies to Reduce Ruminal Protozoa and Their Impacts on Nutrient Utilization and Animal Performance in Ruminants –A Meta-Analysis. *Front. Microbiol.* 10, 2648. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02648>
- Darabighane, B., Mahdavi, A., Aghjehgheshlagh, F.M., Navidshad, B., Yousefi, M.H., Lee, M.R.F., 2021. The Effects of Dietary Saponins on Ruminal Methane Production and Fermentation Parameters in Sheep: A Meta Analysis. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 11, 15–21.
- De Raphélis-Soissan, V., Li, L., Godwin, I. R., Barnett, M. C., Perdok, H. B., & Hegarty, R. S. (2014). Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. *Animal Production Science*, 54(10), 1860–1866. <https://doi.org/10.1071/AN14329>
- Doreau, M., Arbre, M., Rochette, Y., Lascoux, C., Eugène, M., & Martin, C. (2018). Comparison of 3 methods for estimating enteric methane and carbon dioxide emission in nonlactating cows. *Journal of animal science*, 96(4), 1559–1569. <https://doi.org/10.1093/jas/sky033>
- Duin, E. C., Wagner, T., Shima, S., Prakash, D., Cronin, B., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S., Rumbeli, R., Stemmler, R. T., Thauer, R. K., & Kindermann, M. (2016). Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 6172–6177. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1600298113/SUPPL\\_FILE/PNAS.201600298SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1600298113/SUPPL_FILE/PNAS.201600298SI.PDF)
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR381>

- El-Zaiat, H. M., Araujo, R. C., Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Louvandini, H., Pires, A. V., Patino, H. O., Correa, P. S., & Abdalla, A. L. (2014). Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. *Journal of Animal Science*, 92(5), 2214–2224. <https://doi.org/10.2527/JAS.2013-7084>
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M., 1961. Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. *J. Dairy Sci.* 44, 1768–1771. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(61\)89956-6](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(61)89956-6)
- Farra, P. A., & Satter, L. D. (1971). Manipulation of the Ruminant Fermentation. III. Effect of Nitrate on Ruminant Volatile Fatty Acid Production and Milk Composition. *Journal of Dairy Science*, 54(7), 1018–1024. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(71\)85965-9](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(71)85965-9)
- Fedorah, P.M., Hruday, S.E., 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4, 425–432. <https://doi.org/10.1080/09593338309384228>
- Feng, X.Y., Dijkstra, J., Bannink, A., van Gastelen, S., France, J., Kebreab, E., 2020. Antimethanogenic effects of nitrate supplementation in cattle: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 103, 11375–11385. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18541>
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., González, J.S., 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.008>
- Garnsworthy, P. C., Difford, G. F., Bell, M. J., Bayat, A. R., Huhtanen, P., Kuhla, B., ... & Yan, T., 2019. Comparison of methods to measure methane for use in genetic evaluation of dairy cattle. *Animals*, 9(10), 837. <https://doi.org/10.3390/ani9100837>
- Gebhardt, R., Beck, H., 1996. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 31, 1269–1276. <https://doi.org/10.1007/BF02587912>
- Granja-Salcedo, Y. T., Fernandes, R. M. I., De Araujo, R. C., Kishi, L. T., Berchielli, T. T., De Resende, F. D., Berndt, A., & Siqueira, G. R. (2019). Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 427616. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00614/BIBTEX>
- Guyader, J., Eugène, M., Meunier, B., Doreau, M., Morgavi, D. P., Silberberg, M., Rochette, Y., Gerard, C., Loncke, C., & Martin, C. (2015). Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *Journal of Animal Science*, 93(7), 3564–3577. <https://doi.org/10.2527/JAS.2014-8196>
- Guyader, J., Eugène, M., Doreau, M., Morgavi, D.P., Gérard, C., Loncke, C., Martin, C., 2015. Nitrate but not tea saponin feed additives decreased enteric methane emissions in nonlactating cows. *J. Anim. Sci.* 93, 5367–5377. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9367>
- Hammond, K. J., Humphries, D. J., Crompton, L. A., Green, C., & Reynolds, C. K.,

2015. Methane emissions from cattle: Estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.02.008>
- Haque, M. N., Hansen, H. H., Storm, I. M., & Madsen, J., 2017. Comparative methane estimation from cattle based on total CO<sub>2</sub> production using different techniques. *Animal Nutrition*, 3(2), 175-179. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.04.004>
- Hegarty, R.S., Miller, J., Oelbrandt, N., Li, L., Luijben, J.P.M., Robinson, D.L., Nolan, J. V., Perdok, H.B., 2016. Feed intake, growth, and body and carcass attributes of feedlot steers supplemented with two levels of calcium nitrate or urea. *J. Anim. Sci.* 94, 5372-5381. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0266>
- Hellwing, A. L. F., Lund, P., Madsen, J., & Weisbjerg, M. R., 2013. Comparison of enteric methane production predicted from the CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> ratio and measured in respiration chambers. *Adv. Anim. Biosci*, 4, 557. <https://doi.org/10.1017/S2040470013000125>
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1843>
- Hristov, A.N., Ivan, M., Neill, L., McAllister, T.A., 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 105, 163-184. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00060-9)
- Hristov, A. N., Kebreab, E., Niu, M., Oh, J., Bannink, A., Bayat, A. R., Boland, T. M., Brito, A. F., Casper, D. P., Crompton, L. A., Dijkstra, J., Eugène, M., Garnsworthy, P. C., Haque, N., Hellwing, A. L. F., Huhtanen, P., Kreuzer, M., Kuhla, B., Lund, P., ...Yu, Z. (2018). Symposium review: Uncertainties in enteric methane inventories, measurement techniques, and prediction models. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 6655-6674. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13536>
- Hulshof, R.B.A., Berndt, A., Gerrits, W.J.J., Dijkstra, J., van Zijderveld, S.M., Newbold, J.R., Perdok, H.B., 2012. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. *J. Anim. Sci.* 90, 2317-2323. <https://doi.org/10.2527/JAS.2011-4209>
- Iwamoto, M., Asanuma, N., & Hino, T. (2002). Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to Reduce Nitrate and Nitrite with Special Reference to the Suppression of Ruminant Methanogenesis. *Anaerobe*, 8(4), 209-215. <https://doi.org/10.1006/ANAE.2002.0428>
- Jayanegara, A., Wina, E., Takahashi, J., 2014. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the Rumen: Influence of addition levels and plant sources. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 27, 1426-1435. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14086>
- Kamel, C., Greathead, M.J., Ranilla, M.L., Tejido, S., Ramos, M., Carro, D., 2009. Effects of garlic oil on in vitro rumen fermentation and methane production are influenced by the basal diet. *Dairy Cattle*.

- Kaspar, H.F., Tiedje, J.M., 1981. Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen: Nitrous oxide production and effect of acetylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 705–709. <https://doi.org/10.1128/aem.41.3.705-709.1981>
- Kholif, A.E., 2023. A Review of Effect of Saponins on Ruminant Fermentation, Health and Performance of Ruminants. *Vet. Sci.* <https://doi.org/10.3390/vetsci10070450>
- Khurana, R., Brand, T., Tapio, I., Bayat, A.R., 2023. Effect of a garlic and citrus extract supplement on performance, rumen fermentation, methane production, and rumen microbiome of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 106, 4608–4621. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22838>
- Konda, S., Onodera, R., Kanchanasatit, E., Boonsaen, P., Sawanon, S., Nagashima, K., Suzuki, Y., Koike, S., Kobayashi, Y., 2019. Effect of cashew nut shell liquid feeding on fermentation and microbiota in the rumen of Thai native cattle and swamp buffaloes. *Livest. Sci.* 226, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.06.011>
- Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P., Navanukraw, C., 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on in vitro fermentation using gas production technique. *Livest. Sci.* 127, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.08.008>
- Ku-Vera, J.C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S.S., Montoya-Flores, M.D., Molina-Botero, I.C., Arango, J., Gómez-Bravo, C.A., Aguilar-Pérez, C.F., Solorio-Sánchez, F.J., 2020. Role of Secondary Plant Metabolites on Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Front. Vet. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00584>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2017a). Effects of encapsulated nitrate on growth performance, carcass characteristics, nitrate residues in tissues, and enteric methane emissions in beef steers: Finishing phase. *Journal of Animal Science*, 95(8), 3712–3726. <https://doi.org/10.2527/JAS.2017.1461>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2017b). Effects of encapsulated nitrate on growth performance, nitrate toxicity, and enteric methane emissions in beef steers: Backgrounding phase. *Journal of Animal Science*, 95(8), 3700–3711. <https://doi.org/10.2527/JAS.2017.1460>
- Lee, C., & Beauchemin, K. A. (2014). A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(4), 557–570. <https://doi.org/10.4141/CJAS-2014-069/ASSET/IMAGES/LARGE/CJAS-2014-069F5.JPG>
- Li, L., Davis, J., Nolan, J., & Hegarty, R. (2012). An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. *Animal Production Science*, 52(7), 653–658. <https://doi.org/10.1071/AN11254>
- Lichtenwalner, R. E., Fontenot, J. P., & Tucker, R. E. (1973). Effect of Source of Supplemental Nitrogen and Level of Nitrate on Feedlot Performance and Vitamin A Metabolism of Fattening Beef Calves. *Journal of Animal Science*, 37(3), 837–847. <https://doi.org/10.2527/JAS1973.373837X>



- Liu, S., Proudman, J., Mitloehner, F.M., 2021. Rethinking methane from animal agriculture. *CABI Agric. Biosci.* 2, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00041-y>
- Liu, Y., Ma, T., Chen, D., Zhang, N., Si, B., Deng, K., Tu, Y., Diao, Q., 2019. Effects of tea saponin supplementation on nutrient digestibility, methanogenesis, and ruminal microbial flora in dorper crossbred ewe. *Animals* 9, 29. <https://doi.org/10.3390/ani9010029>
- Ma, T., Chen, D., Tu, Y., Zhang, N., Si, B., Deng, K., Diao, Q., 2016. Effect of supplementation of allicin on methanogenesis and ruminal microbial flora in Dorper crossbred ewes. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/S40104-015-0057-5/TABLES/5>
- Madsen, J., Bjergh, B. S., Hvelplund, T., Weisbjerg, M. R., & Lund, P., 2010. Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the methane production from ruminants. *Livestock Science*, 129(1-3), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.01.001>
- Maeda, K., Nguyen, V.T., Suzuki, T., Yamada, K., Kudo, K., Hikita, C., Le, V.P., Nguyen, M.C., Yoshida, N., 2021. Network analysis and functional estimation of the microbiome reveal the effects of cashew nut shell liquid feeding on methanogen behaviour in the rumen. *Microb. Biotechnol.* 14, 277–290. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13702>
- Makkar, H.P.S., Becker, K., 1997. Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 243–245. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00207.x>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99–109. <https://doi.org/10.1042/bj0430099>
- Meagher, L.P., Smith, B.L., Wilkins, A.L., 2001. Metabolism of diosgenin-derived saponins: Implications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 157–170. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00223-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00223-1)
- Mitsumori, M., Enishi, O., Shinkai, T., Higuchi, K., Kobayashi, Yosuke, Takenaka, A., Nagashima, K., Mochizuki, M., Kobayashi, Yasuo, 2014. Effect of cashew nut shell liquid on metabolic hydrogen flow on bovine rumen fermentation. *Anim. Sci. J.* 85, 227–232. <https://doi.org/10.1111/asj.12133>
- Morgavi, D.P., Cantalapiedra-Hijar, G., Eugène, M., Martin, C., Noziere, P., Popova, M., Ortigues-Marty, I., Muñoz-Tamayo, R., Ungerfeld, E.M., 2023. Review: Reducing enteric methane emissions improves energy metabolism in livestock: is the tenet right? *Animal*. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100830>
- Muñoz, C., Yan, T., Wills, D. A., Murray, S., & Gordon, A. W., 2012. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from

- dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(6), 3139–3148. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4298>
- Newbold, C., El Hassan, S.M., Wang\*, J., Ortega, M., Wallace, R., 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78, 237–249. <https://doi.org/10.1079/bjn19970143>
- Newbold, C.J., De la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., McEwan, N.R., 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Newbold, J. R., van Zijderveld, S. M., Hulshof, R. B. A., Fokkink, W. B., Leng, R. A., Terencio, P., Powers, W. J., van Adrichem, P. S. J., Paton, N. D., & Perdok, H. B. (2014). The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. *Journal of Animal Science*, 99(11), 5032–5040. <https://doi.org/10.2527/JAS.2014-7677>
- Nolan, J. V., Hegarty, R. S., Hegarty, J., Godwin, I. R., & Woodgate, R. (2010). Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. *Animal Production Science*, 50(8), 801–806. <https://doi.org/10.1071/AN09211>
- Oh, S., Suzuki, Yasuyuki, Hayashi, S., Suzuki, Yutaka, Koike, S., Kobayashi, Y., 2017. Potency of cashew nut shell liquid in rumen modulation under different dietary conditions and indication of its surfactant action against rumen bacteria. *J. Anim. Sci. Technol.* 59, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0150-8>
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., Cheeke, P., 2001. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roehl. *J. Agric. Food Chem.* 49, 747–752. <https://doi.org/10.1021/jf001056f>
- Park, T., Yu, Z., 2018. Do Ruminant Ciliates Select Their Preys and Prokaryotic Symbionts? *Front. Microbiol.* 9, 1710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01710>
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr. Res. Rev.* <https://doi.org/10.1017/S0954422409990163>
- Pesta, A.C., Bondurant, R.G., Fernando Fernando, S.C., Erickson, G.E., Fernando, S.C., 2016. Use of Dietary Nitrate or Sulfate for Mitigation of Methane Production by Finishing Steers, *Nebraska Beef Cattle Reports*.
- Reynolds, C. K., Humphries, D. J., Kirton, P., Kindermann, M., Duval, S., & Steinberg, W. (2014). Effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3777–3789. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-7397>
- Ridla, M., Laconi, E.B., Nahrowi, Jayanegara, A., 2021. Effects of saponin on enteric methane emission and nutrient digestibility of ruminants: An in vivo meta-analysis, in: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, p. 012028. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012028>
- Sari, N.F., Ray, P., Rymer, C., Kliem, K.E., Stergiadis, S., 2022. Garlic and Its Bioactive Compounds: Implications for Methane Emissions and Ruminant Nutrition. *Animals*. <https://doi.org/10.3390/ani12212998>

- Shinkai, T., Enishi, O., Mitsumori, M., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Takenaka, A., Nagashima, K., Mochizuki, M., Kobayashi, Y., 2012. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *J. Dairy Sci.* 95, 5308–5316. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5554>
- Śliwiński, B.J., Kreuzer, M., Wettstein, H.R., Machmüller, A., 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. *Arch. Tierernähr.* 56, 379–392. <https://doi.org/10.1080/00039420215633>
- Stasiuk, M., Kozubek, A., 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0193-1>
- Storm, I. M. L. D., Hellwing, A. L. F., Nielsen, N. I., & Madsen, J. (2012). Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. *Animals 2012, Vol. 2, Pages 160–183, 2*, 160–183. <https://doi.org/10.3390/ANI2020160>
- Su, C., Shinkai, T., Miyazawa, N., Mitsumori, M., Enishi, O., Nagashima, K., Koike, S., Kobayashi, Y., 2021. Microbial community structure of the bovine rumen as affected by feeding cashew nut shell liquid, a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent. *Anim. Sci. J.* 92, e13503. <https://doi.org/10.1111/asj.13503>
- Troy, S. M., Duthie, C. A., Hyslop, J. J., Roehe, R., Ross, D. W., Wallace, R. J., Waterhouse, A., & Rooke, J. A. (2015). Effectiveness of nitrate addition and increased oil content as methane mitigation strategies for beef cattle fed two contrasting basal diets. *Journal of Animal Science*, 93(4), 1815–1823. <https://doi.org/10.2527/JAS.2014-8688>
- Ungerfeld, E.M., Kohn, R.A., 2023. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation, in: *Ruminant Physiology*. Brill | Wageningen Academic, pp. 55–85. [https://doi.org/10.3920/9789086865666\\_003](https://doi.org/10.3920/9789086865666_003)
- Van Gylswyk, N. O. (1995). *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 297–300. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-297/CITE/REFWORKS>
- Van Soest, P.J., 1973. Collaborative Study of Acid-Detergent Fiber and Lignin. *J. AOAC Int.* 56, 781–784. <https://doi.org/10.1093/jaoac/56.4.781>
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Apajalahti, J. A., Newbold, J. R., Dijkstra, J., Leng, R. A., & Perdok, H. B. (2010). Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5856–5866. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-3281>
- Vargas, J., Tarnonsky, F., Maderal, A., Fernandez-Marenchino, I., Podversich, F., Cuervo, W., Gomez-Lopez, C., Schulmeister, T., DiLorenzo, N., 2023. Effects of Processing Methods and Inclusion Levels of Dried Garlic on In Vitro Fermentation and Methane Production in a Corn Silage-Based Substrate.

Animals 13, 1003. <https://doi.org/10.3390/ani13061003>

- Velazco, J. I., Cottle, D. J., & Hegarty, R. S. (2014). Methane emissions and feeding behaviour of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. *Animal Production Science*, *54*(10), 1737–1740. <https://doi.org/10.1071/AN14345>
- Velazco, J. I., Mayer, D. G., Zimmerman, S., & Hegarty, R. S., 2016. Use of short-term breath measures to estimate daily methane production by cattle. *animal*, *10*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001603>
- Veneman, J.B., Muetzel, S., Hart, K.J., Faulkner, C.L., Moorby, J.M., Perdok, H.B., Newbold, C.J., 2015. Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows? *PLoS One* *10*, e0140282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140282>
- Vyas, D., McGinn, S. M., Duval, S. M., Kindermann, M., & Beauchemin, K. A. (2016). Effects of sustained reduction of enteric methane emissions with dietary supplementation of 3-nitrooxypropanol on growth performance of growing and finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, *94*(5), 2024–2034. <https://doi.org/10.2527/JAS.2015-0268>
- Wallace, R. J., Rooke, J. A., McKain, N., Duthie, C. A., Hyslop, J. J., Ross, D. W., Waterhouse, A., Watson, M., & Roehe, R. (2015). The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics*, *16*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-2032-0/TABLES/4>
- Watanabe, Y., Suzuki, R., Koike, S., Nagashima, K., Mochizuki, M., Forster, R.J., Kobayashi, Y., 2010. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. *J. Dairy Sci.* *93*, 5258–5267. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2754>
- Yáñez Ruiz, D.R., Moumen, A., Martín García, A.I., Molina Alcaide, E., 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J. Anim. Sci.* *82*, 2023–2032. <https://doi.org/10.2527/2004.8272023x>
- Yang, C., Rooke, J.A., Cabeza, I., Wallace, R.J., 2016. Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: Microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00132>
- Zhao, L., Meng, Q., Ren, L., Liu, W., Zhang, X., Huo, Y., & Zhou, Z. (2015). Effects of Nitrate Addition on Rumen Fermentation, Bacterial Biodiversity and Abundance. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*(10), 1433–1441. <https://doi.org/10.5713/AJAS.15.0091>
- Zhou, Z., Yu, Z., & Meng, Q. (2012). Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. *Bioresource Technology*, *103*(1), 173–179. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.10.013>

**(1) 정성적 연구개발성과**

- ▶ 현재 “사료 등의 기준과 규격”에 따른 메탄저감제 등록 제품이 아직 없기 때문에 농림축산식품부에서 시행중인 한우의 저탄소축산물 인증제에 저메탄이 포함되지 못하고 있음
- ▶ 따라서 국내 시장에 이미 유통되고 있거나 첨가제 등록을 마친 제품들 중에 연구논문을 통해서 메탄저감 효과가 보고된 적이 있는 4개의 제품을 선정하여 한우를 대상으로 메탄점감 효과를 호흡대사챔버를 이용하여 그 효과를 실증하였음.
- ▶ 아래 2개의 제품에서 10% 이상의 메탄저감 효과(g/d)를 보였기 때문에 메탄저감제 등록을 위한 기본 요건을 갖추
  - 질산염(NO3-)을 함유한 “SilvAir”
  - 캐슈넛 추출액(CNSL)을 함유한 “Ruminup”
- ▶ 최종보고서가 제출 완료되면, 해당 업체에서는 메탄저감제 등록 자료로 사용하기 위해서 실험결과 공개를 요청을 할 것으로 예상
- ▶ 본 연구에서 메탄저감 효과를 보인 첨가수준에 해당하는 제품의 높은 가격 또는 섭취량 저하 문제 등은 해당 업체가 풀어야 할 내용임

**(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)**

- ▶ 10% 이상의 메탄 저감 효과를 보인 “SilvAir”와 “Ruminup”을 메탄저감제로 등록하는 것은 해당 제품의 제조회사가 국립축산과학원의 사료공정심의위원회가 요구하는 자료를 갖추어서 직접 심의를 받아야 함
- ▶ 정책제안은 종료후 1년차(2024년)에 주관연구기관에서 달성할 계획임
- ▶ 1단계(2022-2023)내 정량적 성과목표인 학술발표 1건은 초과 달성(2건)
- ▶ 종료 1년차 목표인 학술논문 1건도 기한 내에 달성 가능

성과지표명			(단위 : 건, 천원)			
			연도	1단계 (2022~2023)	종료후	계
메탄저감제 등록	등록	목표(단계별)		1		15%
		실적(누적)		0		
	정책제안	목표(단계별)		1		30%
		실적(누적)		0		
계						

\* 1」 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, **논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.**

\* 2」 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다  
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

**(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)**

**[과학적 성과]**

**논문(국내외 전문 학술지) 게재**

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 19th 2022 Asian-Australasian Association of Animal Production (AAAP) Animal Science Congress (AAAP 2022)	임세윤, 김상엽, 바라니, 김경훈, 백명기	2022.08.25	제주 ICC	대한민국
2	The 74 <sup>th</sup> Annual Meeting of EAAP	R. Baranidharan, P. Xaysana, R. Ibdhi, J. Lee, B.M. Tomple, J. Oh, M. Back, K.H. Kim	2023. 8. 28	Lyon	프랑스



**PP1-99** **Assigning animals into experimental groups that have as similar mean and variance as possible with EXCEL VBA Macro**  
 HJ Kim<sup>1</sup>, H Kim<sup>1</sup>, A Jang<sup>2</sup> and S Kim<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Poultry Research Institute, National Institute of Animal Science, Pyeongchang 25342, Korea, <sup>2</sup>Department of Applied Animal Science, College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

**PP2** Ruminant Nutrition Aug. 25, 13:00-14:20 / Foyer (3F)

**PP2-1** **The impact of the fecal microbiome on feed efficiency in early fattening Hanwoo steers**  
 SH Sim<sup>1</sup>, HS Lee<sup>1,2</sup>, S Yoon<sup>1</sup>, HS Seon<sup>1</sup>, CJ Park<sup>1</sup> and M Kim<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Division of Animal Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea, <sup>2</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, 980-8572, Japan

**PP2-3** **Supplemental effects of bypass fat, glycerol, and soybean meal on performance in late-fattening Hanwoo steers under the heat stress condition**  
 JS Woo<sup>1</sup>, SS Jang<sup>2</sup> and KK Park<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Konkuk University, Seoul, Korea, <sup>2</sup>National Institute of Animal Science, Pyeongchang, Korea

**PP2-5** **The study of nutritive value of legumes as ruminant feed in Raman district, Yala Province, Thailand**  
 Jantarat Sitthisak, Kochi Aisah and Kraiprom Thaintip  
 Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, 94000, Thailand

**PP2-7** **Effects of energy feeds on Hanwoo rumen fermentation characteristics and microbial amino acids composition *in vitro***  
 SY Kim<sup>1</sup>, JH Lee<sup>1</sup>, JY Song<sup>2</sup>, GS Bae<sup>1</sup>, MH Lee<sup>1</sup>, SY Jung<sup>1</sup>, EJ Kim<sup>3</sup> and CH Kim<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Hankyong National University, Anseong, Korea, <sup>2</sup>Nonghyupfeed, Seoul, Korea, <sup>3</sup>Kyungpook National University, Sangju, Korea

**PP2-9** **Development of customized milk replacer and optimization of artificial weaning program for the Hanwoo calves**  
 HR Nam<sup>1</sup>, HJ Lee<sup>2</sup>, EB Lee<sup>2</sup>, SH Oh<sup>2</sup> and SK Kang<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Graduate School of International Agricultural Technology, Seoul National University, Gangwon-do, Korea, <sup>2</sup>Institutes of Green Bio Science and Technology, Seoul National University, Gangwon-do, Korea

**PP2-11** **Evaluation of *in vitro* methane production in differently-treated soybean meals and a rumin-up containing cashew nutshell liquid**  
 SY Im<sup>1</sup>, SY Kim<sup>1</sup>, R Bharanidharan<sup>2</sup>, KH Kim<sup>3</sup> and M Baik<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Seoul National University, Seoul, Korea, <sup>2</sup>Seoul National University, Pyeongchang, Korea

Nutrient rich novel feed supplements for grazing lambs <i>A.S. Chaudhry</i>	582
The order of distribution of two forages affects daily intake and diet composition in dairy goats <i>R. Delagarde, J. Belz and B. Bluet</i>	583
Feeding frequency has no effect on intake and milk production in dairy goats fed on fresh herbage <i>R. Delagarde, J. Belz and B. Bluet</i>	583
Effects of dietary energy on late-gestation metabolism in prolific ewes <i>M. Plante-Dubé, C. Sylvestre, R. Bourassa, P. Luimes, S. Buczinski, F. Castonguay and R. Gervais</i>	584
The effect of feeding with hemp seeds addition on physicochemical and sensory properties of beef <i>P. Pogorzelska-Przybyłek, C. Purwin, M. Modzelewska-Kapitula, M. Borsuk-Stanulewicz and K. Tkacz</i>	584
Association of feed efficiency with growth and slaughtering performance in Nellore cattle <i>S.F.M. Bonilha, J.A. Muñoz, B.R. Amâncio, J.N.S.G. Cyrillo, R.H. Branco, R.C. Canesin and M.E.Z. Mercadante</i>	585
Effects of dietary nitrate on performance and enteric methane production in Hanwoo steers <i>R. Bharanidharan, P. Xaysana, R. Ibdhi, J. Lee, B.M. Tomple, J. Oh, M. Baik and K.H. Kim</i>	585
Impact of additives and forage levels on nutrients digestibility and sorting index of Nellore bulls <i>E. Magnani, T.H. Silva, L.B. Tosesti, E.M. Paula, P.R. Leme and R.H. Branco</i>	586
Feed efficiency traits calculated at post-weaning and pre-slaughter periods in Nellore cattle <i>S.F.M. Bonilha, J.A. Muñoz, B.R. Amâncio, J.N.S.G. Cyrillo, R.H. Branco, R.C. Canesin and M.E.Z. Mercadante</i>	586
Environmental protection study on replacing alfalfa with sesbania for feeding ruminants <i>L.Y. Wang and Y.J. Tian</i>	587
Multi performance analysis of soybean self-consumption on a mixed crop-livestock farm <i>M. Jouffroy, A. Berchoux, M. Duval, M. Weens, E. Hermant and M. Legris</i>	587
Effects of leaf size and harvesting season on nutritive quality of white clover <i>X. Chen, K. Theodoridou, O. Cristobal-Carballo and T. Yan</i>	588
Image analysis of feed boluses collected from cows after ingestive chewing <i>B. Delord, M. Berger, R. Baumont, P. Nozière, A. Le Morvan, F. Guillon and M.F. Devaux</i>	588

**Session 47. One-health, one nutrition, one Earth: role of nutrition in livestock production**

Date: Wednesday 30 August 2023; 8.30 – 13.00  
Chair: Latifa / Weill

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	에비 특허출원	CO2법을 이용한 반추동물 메탄생산량 추정의 정확도를 향상시키는 측정 장치 및 방법	서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)	2024.04.04	10-2024-0046046						

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2024.04.04  
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(PN240377KR)  
 출원번호 10-2024-0046046 (접수번호 1-1-2024-0377319-11)  
 (DAS접근코드82DD)  
 출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)  
 대리인성명 특허법인더웨이브(9-2020-100161-1)  
 발명자성명 백명기 이재성  
 발명의명칭 CO2법을 이용한 반추동물 메탄생산량 추정의 정확도를 향상시키는 측정 장치 및 방법

# 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지([www.patent.go.kr](http://www.patent.go.kr))에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.  
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도



**【서지사항】**

**【서류명】** 특허출원서

**【참조번호】** PN240377KR

**【출원구분】** 특허출원

**【출원인】**

**【명칭】** 서울대학교산학협력단

**【특허고객번호】** 1-2007-050924-2

**【대리인】**

**【명칭】** 특허법인더웨이브

**【대리인번호】** 9-2020-100161-1

**【지정된변리사】** 차현태, 류재용, 윤정원

**【발명의 국문명칭】** CO2법을 이용한 반추동물 메탄생산량 추정의 정확도를 향상시키는 측정 장치 및 방법

**【발명의 영문명칭】** Measuring device and method to improve accuracy of the estimated methane production in ruminant using the CO2 method

**【발명자】**

**【성명】** 백명기

**【성명의 영문표기】** Myunggi Baik

**【주민등록번호】** [REDACTED]

**【우편번호】** [REDACTED]

**【주소】** [REDACTED]

**【발명자】**

**【성명】** 이재성  
**【성명의 영문표기】** Jaesung Lee  
**【주민등록번호】** [Redacted]  
**【우편번호】** [Redacted]  
**【주소】** [Redacted]  
**【출원언어】** 국어

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1545026972  
**【과제번호】** 322099022SB010  
**【부처명】** 농림축산식품부  
**【과제관리(전문)기관명】** 농림식품기술기획평가원  
**【연구사업명】** 2025축산현안대응산업화기술개발  
**【연구과제명】** 한우에서 장내발효 메탄저감 효과가 있는 제품의 국내 효과  
**실증**  
**【과제수행기관명】** 서울대학교 산학협력단  
**【연구기간】** 2023.01.01 ~ 2023.12.31  
**【입시 명세서】** 제출  
**【취지】** 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인더웨이브 (서명 또는 인)

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
										√

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황																	
			학위별				성별		지역별											
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타							

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)
서울대	온시가스 측정장치					2022.6월	29,500	농 대 목 장 (평창)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

--

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

--

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 목표 1: 문헌 또는 제조사의 제품정보를 분석하여 적정 급여수준(% 건물섭취량) 결정	○ <b>제품의 가격 및 사용량을 조사 완료</b>	○ 100
	○ in vitro 실험을 4회 수행하여 적정 급여수준 결정과 후보물질 1개 탈락 결정	○ 100
	○ 단기효과 실험을 통해서 장기 효과 검증을 위한 최종 후보 물질 결정 - 장, 단기 실험 모두 완료	○ 100
○ 목표 2: 최종 후보 물질의 in vivo 호흡챔버 메탄저감 효과 비교(단기 효과 3개 후보, 장기효과 1개 후보)	○ 아래 2개의 제품에서 10% 이상의 메탄저감 효과(g/d)를 보였기 때문에 메탄저감제 등록을 위한 기본 요건을 갖추 - 질산염(NO3-)을 함유한 “SilvAir” - 캐슈넛 추출액(CNSL)을 함유한 “Ruminup”	○ 100
	○ 새로운 메탄측정법인 CO <sub>2</sub> 법을 호흡챔버와 비교해 본 결과, CO <sub>2</sub> 법은 호흡챔버를 대체하여 사용될 수 있는 가능성 확인	○ 100
○ 목표 3: 현장에서 측정가능한 CO <sub>2</sub> 법 개발과 호흡대사 챔버 결과와의 비교를 통한 실용성 검증		

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

해당 사항 없음

---

##### 2) 자체 보완활동

---

해당 사항 없음

---

##### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 
- 사료공정서에 등록되어 있거나 등록 가능한 제품을 대상으로 국내에 시판중인 반추가축용 첨가제에 대한 메탄저감 효과를 in vivo 호흡챔버를 이용하여 처음 수행함
  - “사료 등의 기준과 규격”에서 요구하는 실험 방법으로 메탄 저감 효과를 실증하였고, 2개의 제품에서 10% 이상의 메탄저감 효과를 보였기 때문에, 향후 해당 제조회사에 의해 최초의 등록 요청 사례로 연결될 것으로 예상
-



## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 전세계 메탄저감제 규모 예상
  - 메탄저감제가 사료 건물의 1%로 전세계 축우의 40%에 급여된다고 가정했을 때 메탄저감제는 연간 약 468만톤이 필요함
  - 메탄저감제의 가격이 국내 반추동물 배합사료 가격과 동일하다고 가정했을 때 이를 가격으로 환산하면 약 2조3260억원의 시장규모를 가짐
- 국내 메탄저감제 규모 예상
  - 메탄저감제가 사료 건물의 1%로 국내 축우의 60%에 급여된다고 가정했을 때 메탄저감제는 연간 약 3만5700톤이 필요함
  - 메탄저감제의 가격이 국내 반추동물 배합사료 가격과 동일하다고 가정했을 때 이를 가격으로 환산하면 약 180억원의 시장규모를 가짐

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	2 (IF 5.0)
	비SCIE	
	계	
학술발표	SCIE	1
	비SCIE	2
	계	3
인력양성	학사	
	석사	
	박사	1
	계	
정책, 홍보	정책제안	1
	메탄저감제 등록	1
저감계수등록		1

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 2025 축산현안대응 산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 2025 축산현안대응 산업화기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개 하여서는 안 됩니다.