

최 종  
연구보고서

반추위 발효조절 기술개발에 관한 연구

The Study for Development of Ruminant  
Fermentation-Manipulating Technique

연구기관

서울대학교 농업생명과학대학  
농촌진흥청 축산기술연구소

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “반추위 발효 조절 기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 12월 27일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 하 종 규

연 구 원 : 이 세 영

연 구 원 : 이 덕 윤

연 구 원 : 박 성 호

협동연구기관명 : 축산기술연구소

협동연구책임자 : 이 왕 식

# 요 약 문

## I. 제 목

### 반추위 발효 조절 기술 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

반추동물이 섭취한 사료는 반추위에서 반추 미생물에 의해 분해되어 휘발성 지방산, 수소, 이산화탄소, 암모니아 등이 생산되며, 최종적으로 이산화탄소와 수소가 메탄생성박테리아에 의해 메탄으로 생성되는데 생성된 메탄은 체내에서 전혀 흡수되지 못하고 대기로 방출되어 이산화탄소와 함께 주요 지구온난화에 크게 영향을 미친다. 메탄은 반추위에서 생산되는 총 가스의 25~30%를 차지하며 사양조건에 따라 섭취된 에너지의 2~15%정도가 메탄가스로 손실되고 있다.

그 동안 반추동물의 에너지 이용효율을 높이기 위한 연구가 여러 측면에서 방대하게 수행되어져 왔지만 주로 사양체계의 조절에 의한 방법에 의존되어 왔으며 그 효과 또한 뚜렷하지 못하였다. 따라서 반추위내 발효를 최대한 유지하면서 메탄의 생성량을 감소시켜 에너지 이용효율을 높일 수 있는 뚜렷한 메탄생성 억제 방법이 개발되어야 할 것이다.

또 다른 하나는 반추위내에 존재하는 섬유소 물질 분해에 관여하는 효소의 70% 이상이 미생물체에 부착되어 있거나 미생물체내에 존재하기 때문에 사료의 분해에 직접 이용되지 못하고 허실되고 있다. 한편 non-ionic surfactants(surface active agents)와 acrylic acid polymers가 세포내 효소나 세포벽 효소를 방출시키는 효과가 매우 높다고 알려져 있어 이들 물질을 사용하여 효소의 분비를 촉진시킴으로서 에너지의 이용효율을 획기적으로 증가시킬 수 있다는 가능성을 보이고 있다.

따라서 본 연구의 목표는 메탄 생성 억제기술 개발과 효소분비 촉진제의

delivery system 개발을 통하여 반추위 발효 조절기술을 개발하여 사료 이용효율의 획기적인 향상과 배설량 및 메탄 생산량의 획기적인 감소를 통한 가축 생산성의 향상과 친환경 축산의 기틀을 마련하는데 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 반추위 메탄생성 억제기술 개발

##### 1. 반추위 미생물군 (박테리아, 프로토조아 및 곰팡이)의 분리 및 메탄생성 박테리아와의 혼합배양에 의한 잠재적 가스 발생량과 조성변화 구명

- 가. 반추위 미생물군의 분리 및 이들에 의한 가스 생성과 가스 조성 조사
- 나. 반추위 메탄생성 박테리아의 메탄생성량 조사
- 다. 반추위 미생물군과 메탄생성 박테리아의 혼합배양에 따른 가스량과 가스 조성 변화 조사

##### 2. 수소가스제어를 통한 메탄생성 억제기술 개발

- 가. 불포화지방산, 항생제, 유기산, 금속산화물, 할로겐화합물의 메탄생성 억제 능력 비교
- 나. 메탄생성 억제제의 혼합사용에 의한 메탄생성 억제기술 개발

##### 3. 연속발효조 실험을 통한 메탄생성 억제제의 메탄발생량 및 발효성상에 미치는 영향 구명

##### 4. *In vivo* 실험을 통한 메탄생성 억제기술 검증시험

#### 나. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

## 1. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

가. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

나. 개발 delivery system의 검증 실험

## 2. 효소분비 촉진제의 delivery system이 인공반추위 및 반추위 발효에 미치는 영향

가. 연속발효 시험을 통한 최적 첨가량과 사용조건 구명 및 최종 delivery system의 개발

나. 캐놀라 장작 한우를 공시한 delivery system의 검증 시험

## 3. 효소분비 촉진제 첨가가 한우 육성우의 생산성 및 사료 이용성에 미치는 영향

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 반추위 메탄생성 억제기술 개발

#### 1. 반추위 미생물군 (박테리아, 프로토조아 및 곰팡이)의 분리 및 메탄생성 박테리아와의 혼합배양에 의한 잠재적 가스 발생량과 조성변화 구명

##### 가. 반추위 미생물군의 분리 및 이들에 의한 가스 생성과 가스 조성 조사

1) 반추위액으로부터 박테리아, protozoa 및 fungi를 분리하였고, 박테리아가 protozoa와 fungi 보다 pH, total VFA, acetate 그리고 propionate 농도가 높았다.

2) 가스발생량과 메탄 발생량도 박테리아가 다른 미생물군보다 높았으며 옥수수를 기질로 하였을 때가 볏짚보다 가스발생량이 높았다.

## 나. 반추위 메탄생성 박테리아의 메탄생성량 조사

- 1) BES 처리에 의해  $\text{CH}_4$  생성량이 감소하였고  $\text{H}_2$ 의 생성량은 증가하였다.
- 2) 농후사료의 수준이 높을수록 가스발생량과  $\text{CH}_4$  발생량이 증가하였다.
- 3) 기질 조성에 따라 기질 건물 g당 20~30mM의  $\text{CH}_4$ 이 발생하였다.

## 다. 반추위 미생물군과 메탄생성 박테리아의 혼합배양에 따른 가스량과 가스 조성 변화 조사

- 1) fungi+methanogen(Fm)의 혼합배양이 bacteria+methanogen(Bm), protozoa+methanogen(Pm) 혼합배양보다 가스발생량과  $\text{CH}_4$  생성량이 높았다.
- 2) Fm은 배양초기 Bm보다 가스발생량이 높았다. 배양시간이 지남에 따라 Fm의 가스발생량 증가폭은 감소하고, Bm은 증가하여 48시간 이후에는 Bm의 가스발생량이 Fm보다 높을 것이다.
- 3) Fm에서  $\text{CH}_4$  발생량이 높았으며, 농후사료의 수준이 높을수록  $\text{CH}_4$  발생량이 높았다.
- 4) VFA 생성량도 Fm이 다른 미생물군보다 높았으며 농후사료의 수준이 높을수록 증가하였다.

## 2. 수소가스제어를 통한 메탄생성 억제기술 개발

### 가. 불포화지방산이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) 불포화지방산 첨가는 건물소화율을 감소시켰으며, 첨가수준이 높을수록 소화율이 감소하였다.
- 2) VFA는 불포화지방산 첨가에 의해 증가하였다.
- 3) 불포화지방산은 가스발생량과 메탄생성량을 감소시켰으며, 첨가수준이 높을수록 감소하였다.

나. 항생제가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) monensin 첨가는 건물소화율을 감소시켰다.
- 2) monensin 첨가는 propionate를 제외한 VFA의 생성을 감소시켰다.
- 3) 가스발생량과 메탄생성량도 마찬가지로 monensin 첨가에 의해 감소하였으며, 첨가수준이 높을수록 감소폭이 더 컸다.

다. 금속산화물이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1)  $MnO_2$ 와  $Fe_2O_3$ 는 건물소화율을 감소시켰다.
- 2) 금속산화물은 VFA의 생성량에 영향을 주지 않았다.
- 3)  $MnO_2$ 와  $KMnO_4$ 는 가스발생량과 메탄발생량을 감소시켰다.

라. 유기산이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) fumarate와 malate는 건물소화율을 감소시키지 않았다.
- 2) fumarate와 malate는 pH와 propionate 농도를 증가시켰으며, acetate:propionate 비율은 감소시켰다.
- 3) fumarate와 malate는 가스발생량을 증가시켰으며, 처리수준이 10mM 처리일 때 메탄발생량이 감소하였다.

마. Essential oil이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) Essential oil은 pH를 증가시켰고,  $NH_3-N$ 의 농도는 essential oil의 첨가수준이 증가할수록 감소하였다.
- 2) acetate, propionate, isobutyrate, isovalerate, valerate 그리고 total VFA의 농도도 essential oil의 첨가수준이 증가할수록 감소하였다.
- 3) 전체 가스발생량과 메탄발생량은 essential oil 10% 첨가시 감소하였으나  $H_2$  발생량은 essential oil의 첨가수준에 따라 차이가 없었다.

바. Lignosulfonate가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) 배양 0시간에는 lignosulfonate의 첨가수준이 증가함에 따라 pH가 감소하였으나 그 이후에는 lignosulfonate 1% 첨가구만 pH를 유의적으로 감소시켰다.
- 2) Lignosulfonate의 첨가는 대체로 가스발생량에 영향을 주지 않았다.
- 3) 전반적으로 lignosulfonate 1% 첨가시 메탄발생량이 유의적으로 감소하였고, 첨가수준이 증가함에 따라 메탄발생량이 감소하는 경향이 있었다. 반대로 H<sub>2</sub> 발생량은 전반적으로 lignosulfonate 1% 첨가시 H<sub>2</sub> 발생량이 가장 높았으며, 첨가수준이 증가할수록 H<sub>2</sub> 발생량이 증가하는 경향이 있었다.

#### 사. 한약재가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) pH는 계피 첨가구가 가장 높았으며, 감초 첨가구가 가장 낮았다. NH<sub>3</sub>-N의 농도는 한약재에 의해 영향을 받지 않았다.
- 2) acetate, propionate 그리고 total VFA의 농도는 정향 (clove) 첨가시에만 감소하였다. butyrate는 감초, 산초 그리고 정향 첨가시 감소하였다.
- 3) 전체 가스발생량은 정향 첨가시 감소하였고, 메탄발생량은 결명자 첨가구가 가장 낮았지만 유의적인 차이가 없었다. H<sub>2</sub> 발생량은 대조구와 처리구간에 차이가 없었다.

#### 아. 할로겐화합물이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 1) BES와 PMDI는 건물소화율에 영향을 주지 않았다.
- 2) BES와 PMDI는 total VFA, propionate, butyrate 그리고 valerate의 농도를 증가시켰으며, acetate:propionate 비율은 감소시켰다.
- 3) BES 첨가는 처리수준이 증가함에 따라 가스발생량을 감소시켰다.
- 4) BES와 PMDI는 메탄발생량을 현저하게 감소시켰으나, H<sub>2</sub> 가스 발생량은 증가시켰다.

#### 자. 할로겐화합물과 유기산 또는 불포화지방산과의 복합처리가 메탄생성과 발효에 미치는 영향



- 1) BES 복합처리시 PMDI 복합처리시에 비해 소화율과 total VFA의 농도가 높게 나타났다. 유기산 처리시 불포화지방산 처리시에 비해 소화율과 total VFA의 농도가 높았다.
- 2) BES 복합처리구가 PMDI 복합처리구보다 acetate의 molar proportion이 높았고, propionate의 molar proportion과 acetate:propionate의 비율은 유기산 처리구가 불포화지방산 처리구 보다 높았다.

### 3. 연속발효조 실험을 통한 메탄생성 억제제의 메탄발생량 및 발효성상에 미치는 영향 구명

- 가. pH, total VFA, acetate 그리고 propionate는 대조구와 BES처리구간에 유의적인 차이가 없었다.
- 나. Butyrate의 농도는 BES처리구가 높았고, acetate:propionate 비율은 BES 처리구가 낮았다.
- 다. 24시간 배양하는 동안 발생한 가스발생량은 대조구와 처리구간에 차이가 없었으나, BES 처리에 의해 메탄가스의 생성량은 감소하고, H<sub>2</sub> 가스의 생성량은 증가하였다.
- 라. 메탄생성박테리아의 16S rDNA band intensity는 BES 처리구가 낮았다.

### 4. *In vivo* 실험을 통한 메탄생성 억제기술 검증시험

- 가. 사료섭취량과 영양소 소화율은 BES, malate 또는 혼합제에 의해 영향이 없었다.
- 나. 메탄과 H<sub>2</sub> 가스의 생성비율도 처리구간에 차이가 없었다.
- 다. 메탄가스의 생성비율은 사료급여후 증가하다 감소하는 경향을 보이면서 8~16%가 메탄 가스로 생성되었다.

## 나. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

### 1. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

#### 가. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

- 1) 효소분비 촉진제는 filter paper의 분해율과 가스발생량을 증가시켰다.
- 2) 효소분비 촉진제는 CMCase와 xylanase의 활력을 증가시켰다.

#### 나. 개발 delivery system의 검증 실험

- 1) 액화법에 의한 효소분비 촉진제의 첨가는 섬유소 분해 미생물의 성장률을 증가시켰다.
- 2) 액화법에 의한 효소분비 촉진제의 첨가는 반추위 혐기성의 곰팡이의 성장률을 증가시켰다.
- 3) 액화법에 의한 효소분비 촉진제의 첨가는 세포벽에 붙어 있거나 세포내에 함유되어 있던 효소의 대부분이 위액 중으로 분비되었다.
- 4) 액화법에 의한 효소분비 촉진제는 볏짚의 in vitro 소화율을 45%이상 증가시켰다.
- 5) 액화법에 의한 효소분비 촉진제를 반추위에 투입한 결과 미생물 성장률, 총휘발성지방산의 농도, CMCase 그리고 xylanase의 역가를 증가시켰다.
- 6) 액화법에 의한 효소분비 촉진제의 첨가는 in situ 건물 소화율을 증가시켰다.

### 2. 효소분비 촉진제의 delivery system이 인공반추위 및 반추위 발효에 미치는 영향

#### 가. 연속발효 시험을 통한 최적 첨가량과 사용조건 구명 및 최종 delivery system의 개발

- 1) 효소분비 촉진제의 첨가는 가스발생량을 증가시켰으며, 첨가수준이 높을수록 가스발생량을 증가시켰다.
- 2) 효소분비 촉진제의 첨가는 미생물 성장률을 증가시켰지만, 처리수준간 차이는 없었다.
- 3) 효소분비 촉진제의 첨가는 CMCase의 역가와 섬유소분해율을 증가시켰으며, 0.005%의 첨가수준에서 가장 효과가 있었다.

#### 나. 케놀라 장작 한우를 공시한 delivery system의 검증 시험

- 1) premix법에 의한 효소분비촉진제의 첨가는 pH를 감소시켰으며, VFA 농도를 증가시켰고, 암모니아 농도는 감소시켰다.

#### **3. 효소분비 촉진제 첨가가 한우 육성우의 생산성 및 사료 이용성에 미치는 영향**

- 1) 효소분비 촉진제 첨가는 한우 육성우의 일당증체량을 증가시켰지만 유의성은 없었다.
- 2) 효소분비 촉진제 첨가는 한우 육성우의 혈중 대사물질의 함량에 영향을 주지 않았다.

#### **4. 연구개발결과 활용에 대한 건의**

가. 반추위 미생물군집별 (박테리아, 프로토조아 및 곰팡이균) 가스 발생량과 조성에 관한 연구결과는 반추위 발효를 연구하는 데 있어서 중요한 기초자료로 활용

나. 메탄생성억제제 첨가시 나타난 메탄억제 및 발효성상에 관한 결과는 첨가제를 개발하는 데 있어 중요한 자료로 활용

다. 효소분비촉진제 특허 출원: 반추위 발효조절제 사료첨가용 Delivery

system의 발명

라. Delivery system의 산업체 기술 이전 및 산업화 추진

마. 반추위 발효의 인위적 조절에 관한 기초 자료 제공

# SUMMARY

## I . Title

**The Study for Development of Ruminal Fermentation-Manipulating Technique**

## II. Objectives and Importance of the Study

Feeds ingested by ruminants are fermented to volatile fatty acids, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub>. Then terminally CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> are produced to methane by methanogens. Methane then become one of factors for global warming. The production of methane is 25~30% of total gases produced in the rumen and this causes a loss of 2~15% of total ingested energy.

There have been many attempts to reduce energy loss of ruminant. However, the research have been done mainly by controlling feeding system, but results were not significant. Therefore there is a need for methods to reduce methane production with maintaining maximum rumen fermentation.

Fibrolytic enzymes are not used completely and some are lost, because above 70% of them in the rumen exist in the microbial cell and cell wall. It was reported that non-ionic surfactant (surface active agents) and acrylic acids polymers release enzymes which exist in the cell or cell wall. Therefore it is highly possible that energy efficiency may be increased by promoting secretion of enzymes using these material.

The objectives of this study was to develop methods to reduce methane production and delivery system of enzyme inducer. The development will improve animal performance by reducing methane production and increasing feed efficiency.

### III. Contents and Scope of the Study

#### A. Development of methan-inhibiting technique in the rumen

1. Isolation of major ruminal microbial population (bacteria, protozoa and fungi) and investigation of their role on gas production and composition change by culturing individual microbial population or coculturing microbial populations with methanogens
  - a. Isolation of major ruminal microbials and investigation of their role on gas production and composition
  - b. Estimation of methane production by methanogens
  - c. Investigation of gas production and composition change by coculturing microbial population with methanogens
2. Development of technique to reduce methane production through H<sub>2</sub> gas control
  - a. Comparison of methane inhibitors such as unsaturated fatty acids, antibiotics, organic acids, metal compounds and halogen compounds
  - b. Development of technique to reduce methane production by using combinations of methane inhibitors
3. Effects of methane-inhibitors on methane production and fermentation characteristics in a continuous culture system
4. Verification of developed methane inhibitors with *in vivo* experiment

## **B. Development of delivery system of enzyme inducer**

### **1. Development of delivery system of enzyme inducer**

- a. Development of delivery system of enzyme inducer
- b. Experiment verifying developed delivery system

### **2. Effects of delivery system of enzyme inducer in artificial rumen fermenter on ruminal fermentation**

- a. Investigation of optimal level of supplementation through continuous culture and development of final delivery system
- b. Verification of delivery system using cannulated Hanwoo

### **3. Effects of enzyme inducer supplementation on production and feed efficiency of Hanwoo (Korean Native Cattle)**

## **IV. Results**

### **A. Development of methan-inhibiting technique in the rumen**

#### **1. Isolation of major ruminal microbial population (bacteria, protozoa and fungi) and investigation of their role on gas production and composition change by culturing individual microbial population or coculturing microbial populations with methanogens**

##### **a. Isolation of major ruminal microbial population and investigation of their role on gas production and composition**

- 1) Bacteria, protozoa and fungi were isolated from ruminal fluid. pH, total

VFA, acetate and propionate concentration in bacteria population were higher compared to protozoa and fungi

- 2) Gas and methane production of bacteria population were higher than other microbials and gas production with corn substrate was higher compared to rice straw substrate

#### **b. Estimation of methane production**

- 1) Methane production was increased, and H<sub>2</sub> was decreased by BES treatment.
- 2) As the level of concentrate was increased, the amount of gas and methane were increased.
- 3) 20~30mM/g substrate of methane was produced with slight variation by substrate composition.

#### **c. Investigation of gas production and composition change by coculturing microbial population with methanogens**

- 1) Gas and methane production were higher in fungi+methanogen (Fm) coculture compared to bacterial+methanogen (Bm) and protozoa+methanogen (Pm) coculture
- 2) Gas production of Fm was higher than Bm in early fermentation stage. As the culture time was increased, the rate of gas production in Fm was decreased and that of Bm was increased, and consequently after 48 hr incubation, the amount of gas production in Bm was higher than in Fm.
- 3) As the level of concentrate was increased, the amount of methane gas production was increased.



- 4) VFA production in Fm was higher compared to other microbial cocultures and was increased as the level of concentrate was increased.

## **2. Development of technique to reduce methane production through H<sub>2</sub> gas control**

### **a. Effects of unsaturated fatty acids on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) DM digestibility was decreased by unsaturated fatty acids and the trend was more noticed as the level of supplementation was increased.
- 2) VFA was increased by unsaturated fatty acids
- 3) Gas and methane production were depressed by unsaturated fatty acids and the effect was more noticed as the level of supplementation was increased.

### **b. Effect of antibiotics on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) Addition of monensin decreased DM digestibility.
- 2) Addition of monensin decreased VFA concentration except for propionate.
- 3) Gas and methane production were decreased by monensin with higher effect at higher level of supplementation.

### **c. Effect of metal compounds on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) MnO<sub>2</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> decreased DM digestibility.
- 2) Metal oxides did not affect VFA concentration.

3)  $MnO_2$  and  $KMnO_4$  decreased gas and methane production.

**d. Effect of organic acids on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) Fumarate and malate did not affect DM digestibility.
- 2) Fumarate and malate increased pH and propionate concentration, but decreased acetate:propionate ratio.
- 3) Fumarate and malate increased gas production and decreased methane production when the level of supplementation was 10mM.

**e. Effect of essential oil on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) Essential oil increased pH, but decreased  $NH_3-N$  concentration with higher effect at higher level of supplementation.
- 2) acetate, propionate, isobutyrate, isovalerate, valerate and total VFA concentration were decreased by essential oil and the effect was more noticed as the level of supplementation was increased.
- 3) Essential oil decreased total gas production and methane production when the level of supplementation was 1%.

**f. Effect of lignosulfonate on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) At incubation 배양 0시간에는 lignosulfonate의 첨가수준이 증가함에 따라 pH가 감소하였으나 그 이후에는 lignosulfonate 1% 첨가구만 pH를 유의적으로 감소시켰다.
- 2) Lignosulfonate did not affect gas production after 24h incubation.
- 3) Generally, 1% supplementation of lignosulfonate decreased methane production, and lignosulfonate tended to decrease with increasing levels

of supplementation.

- 4) 1% supplementation of lignosulfonate increased H<sub>2</sub> production, and lignosulfonate tended to decrease with increasing levels of supplementation.

#### **g. Effect of Chinese herbs on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) Cinnamon increased pH, but licorice root decreased. Chinese herbs did not affect NH<sub>3</sub>-N concentration.
- 2) acetate, propionate and total VFA were decreased by supplementation of clove, and butyrate concentration was decreased by licorice root, Chinese pepper and clove.
- 3) Addition of clove decreased also total gas production, and Cassia tora decreased methane production without statistical significance.

#### **h. Effect of halogenated compounds on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) BES and PMDI did not affect DM digestibility.
- 2) BES and PMDI increased total VFA, propionate, butyrate and valerate concentration, but decreased acetate:propionate ratio.
- 3) Gas production was decreased as the supplementation level of BES was increased.
- 4) BES and PMDI decreased methane production remarkably, but increased H<sub>2</sub> production.

#### **i. Effect of halogenated compounds and organic acids or unsaturated fatty acids on *in vitro* methane production and fermentation**

- 1) Digestibility and total VFA concentration in treatments containing BES

were higher compared to treatments containing with PMDI.

- 2) Digestibility and total VFA concentration in treatments with organic acids were higher compared to those with unsaturated fatty acids.
- 3) Molar proportion of acetate in treatment compounded with BES were higher compared to treatment compounded with PMDI.

### **3. Effects of methane-inhibitors on methane production and fermentation characteristics in continuous culture system**

- a. Treatment of BES did not affect pH, total VFA, acetate and propionate concentration.
- b. BES increased butyrate concentration, but decreased acetate:propionate ratio.
- c. BES did not affect gas production, and decreased methane production with increased H<sub>2</sub> production.
- d. BES decreased 16S rDNA band intensity of methanogens.

### **4. Verification of developed methane inhibitors in a *in vivo* experiment**

- a. Feed intake and nutrient digestibility were not significantly influenced by BES, malate or their mixture.
- b. Proportion of methane and H<sub>2</sub> production were not affected by BES, malate or their mixture.
- c. Proportion of methane production was increased after feeding ranging from 8 to 16%.

## **B. Development of delivery system of enzyme inducer**

### **1. Development of delivery system of enzyme inducer**

### **a. Development of delivery system of enzyme inducer**

- 1) Enzyme inducer increased degradability of filter paper and gas production.
- 2) Enzyme inducer increased activity of CMCase and xylanase.

### **b. Experiment verifying developed delivery system**

- 1) Liquidization of enzyme inducer increased the growth rate of cellulolytic bacteria.
- 2) Liquidization of enzyme inducer increased the growth rate of rumen anaerobic fungi.
- 3) Liquidization of enzyme inducer released enzyme from the cell or cell wall into rumen fluid.
- 4) Liquidization of enzyme inducer increased *in vitro* digestibility of rice straw to more than 45%.
- 5) Microbial growth rate, total VFA concentration, CMCase and xylanase activity were increased in Hanwoo when liquid enzyme inducer was infused into the rumen.
- 6) Enzyme inducer increased *in situ* DM digestibility.

## **2. Effects of delivery system of enzyme inducer in artificial rumen fermenter on ruminal fermentation**

### **a. Investigation of optimal level of supplementation through continuous culture and development of final delivery system**

- 1) Gas production was increased by the supplementation of enzyme inducer and the effect was more noticed as the level of supplementation was increased.

- 2) Enzyme inducer increased microbial growth rate without statistical significance.
- 3) Enzyme inducer increased CMCase activity and degradation rate of fiber.

**b. Verification of delivery system using cannulated Hanwoo**

- 1) Enzyme inducer decreased ruminal pH and  $\text{NH}_3\text{-N}$  and increased VFA concentration.

**3. Effects of enzyme inducer supplementation on growth performance and feed efficiency of Hanwoo**

- a. Enzyme inducer increased daily gain of growing Hanwoo without statistical significance.
- b. Enzyme inducer did not affect blood metabolites in growing Hanwoo.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction . . . . .	25
Chapter 2. Trends of the Study . . . . .	27
1. Development of methane-inhibiting technique in the rumen . . .	27
2. Development of a delivery system of the enzyme inducer . . .	29
Chapter 3. Contents and Results of the Study . . . . .	32
1. Development of methane-inhibiting technique in the rumen . . .	32
2. Development of a delivery system of the enzyme inducer . . .	88
Chapter 4. Achievement of the Study and its Contribution . . . . .	131
1. Development of methane-inhibiting technique in the rumen . . .	131
2. Development of a delivery system of the enzyme inducer . . .	132
Chapter 5. Application . . . . .	134

1. Development of methane-inhibiting technique in the rumen ·	
· · · · ·	134
2. Development of a delivery system of the enzyme inducer · ·	
· · · · ·	135
Chapter 6. Related information · · · · ·	137
Chapter 7. References · · · · ·	144



# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 . . . . .	25
제 2 장	국내외 기술개발 현황 . . . . .	27
제1절	반추위 메탄생성 억제기술 개발 . . . . .	27
제2절	효소분비 촉진제의 delivery system의 개발 . . . . .	29
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 . . . . .	32
제1절	반추위 메탄생성 억제기술 개발 . . . . .	32
제2절	효소분비 촉진제의 delivery system의 개발 . . . . .	88
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 . . . . .	131
제1절	반추위 메탄생성 억제기술 개발 . . . . .	131
제2절	효소분비 촉진제의 delivery system의 개발 . . . . .	132
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 . . . . .	134
제1절	반추위 메탄생성 억제기술 개발 . . . . .	134
제2절	효소분비 촉진제의 delivery system의 개발 . . . . .	135
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 . . . . .	137
제 7 장	참고문헌 . . . . .	144

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

지구상에서 가장 풍부한 에너지원은 섬유소인데, 이는 사람을 위시한 단위 동물은 이용하지 못하고 반추동물만이 이용할 수 있다. 따라서 에너지 자원 활용차원에서 반추동물은 매우 중요한 동물이라고 할 수 있으며 이와 같이 반추동물이 섬유소를 이용할 수 있는 것은 반추위내에 서식하는 다양한 종류의 혐기성 미생물(박테리아, 곰팡이, 프로토조아)에 의해 가능하다. 반추위내 미생물에 의해 생산되는 생산물의 종류와 양에 따라 반추동물의 생산능력에 영향을 미치게 된다. 반추 미생물에 의해 사료내 영양성분이 분해되어 최종 분해산물로써 휘발성 지방산, 수소, 이산화탄소, 암모니아 등이 생산된다. 이와 같은 발효산물들 중 휘발성지방산이나 암모니아 등은 반추가축이나 반추미생물에 의해 이용되어 결국 가축의 생산성에 중요하게 작용하지만, 반추위에서 일어나는 발효의 가장 마지막 단계는 메탄 생성 박테리아에 의해서 이산화탄소와 수소를 이용하여 메탄이 생성되는 단계인데, 생성된 메탄은 체내에서 전혀 흡수되지 못하고 대기로 방출되어 대기 오염의 원인이 되고 있다. 메탄은 반추위에서 생산되는 총 가스의 25~30%를 차지하며, 사양조건에 따라 섭취된 에너지의 2~15%정도가 메탄가스로 손실되고 있으며(Johnson 등, 1991; Holter & Young, 1992), 세계적으로는 연간 가축에 의한 메탄 배출량이 80Tg정도로 추산되며 이중 85% 정도가 반추가축의 장내발효에 의해 생성되는 것으로 알려지고 있다. 지구온난화 방지를 위한 국제기구인 정부간 협의회(IPCC)의 설립과 함께 온실가스 배출 감축에 대한 구체적 협의가 진행되고 있는 중이다. 메탄은 이산화탄소와 함께 지구온난화에 영향을 미치는 가장 큰 요인이며, 특히 메탄은 이산화탄소에 비해 온실효과 능력이 약 30배나 더 높아 지구 온난화에 미치는 영향이 매우 크다고 보고되고 있다.

따라서 반추동물의 에너지 이용효율을 높이기 위한 연구가 반추 동물영양학의 근간을 이루어 왔으며 여러 측면에서 방대하게 수행되어져 왔지만 주로 사양체계의 조절에 의한 방법에 의존되어 왔으며 그 효과 또한 뚜렷하지 못하였다. 그러나, 최근에 반추 미생물학과 효소공학, Biotechnology 및 유전자공학 등의 눈부신 발전으로 반추위내 발효를 인위적으로 조절하여 에너지의 이용효율을 높이고

메탄의 생성량을 감소시킬 수 있는 또 다른 가능성을 보이고 있으며 이들의 산업화가 여러 측면에서 모색되고 있다.

또 다른 하나는 반추위내에 존재하는 섬유소 물질 분해에 관여하는 효소의 70% 이상이 미생물체에 부착되어 있거나 미생물체내에 존재하기 때문에 사료의 분해에 직접 이용되지 못하고 허실되고 있다. 한편 효소공학에서 호기성 미생물을 대상으로 효소의 분비를 촉진시킬 목적으로 오래전부터 연구가 수행되어 온 물질인 non-ionic surfactants(surface active agents)는 세포내 효소와 세포벽 부착효소를 분비시키는 효과가 매우 높고(Reese와 Maguire, 1969), acrylic acid polymers는 세포내 효소를 방출시키는 효과가 매우 높다고 알려져 온 물질이다(Reese 등, 1969). 그러나 이러한 물질은 점도가 매우 높아 미생물의 세포벽에 피막을 형성하여 산소공급을 차단함으로서 미생물을 사멸시키기 때문에 호기성 미생물을 연구하는 대상에서 사장되어온 물질이지만 이러한 물질 중 몇 가지는 혐기성 미생물인 반추위 미생물의 성장률을 오히려 크게 높인다는 사실을 알게 되었다. 따라서 이러한 물질의 사용은 반추위내에서 효소의 분비를 촉진시킴으로서 에너지의 이용효율을 획기적으로 증가시킬 수 있을 것이다.

따라서 본 연구의 목표는 1) 메탄 생성 억제기술 개발과 2) 효소분비 촉진제의 delivery system 개발을 통하여 반추위 발효 조절기술을 개발하여 사료 이용효율의 획기적인 향상과 배설량 및 메탄 생산량의 획기적인 감소를 통한 가축 생산성의 향상과 친환경 축산의 기틀을 마련하는데 있다.

## 제 2 장    국내외 기술개발 현황

### 제1절    반추위 메탄생성 억제기술 개발

#### 1. 국내 기술 현황

- 가. 현재 국내에서는 메탄생성 억제에 관한 연구가 활발히 이루어지지 않은 편이며, 아직까지는 사료섭취량, 사료의 종류 및 문헌상에서 발견되는 몇 종류의 억제제를 이용하여 실험을 수행한 것이 대부분이다(축산연, 1990).
- 나. 최근에 *in vitro* gas test를 통해 사료 성분들의 잠재적인 메탄생성량을 알아보는 연구가 수행되었는데, 이 연구에서는 각 사료성분들의 메탄생성량 data를 이용하여 메탄생성을 감소시키는 방향으로 사료를 배합할 때 적용할 수 있을 것으로 기대하고 있다 (Lee 등, 2003).

#### 2. 국외 기술 현황

- 가. 최근 10년간 대기중 메탄의 농도는 매년 1% 이상의 증가추세에 있으며, 50년후 지구온난화 현상에 있어서 메탄이 차지하는 비율은 15~17%로 예측되었다(IPCC, 1992).
- 나. IPCC(1996)에 의하면 지구상에서 메탄가스 배출량은 총 500Tg (Teragram, 1Tg=10<sup>12</sup>g)이며 이중 동물의 장내 발효에 의해서는 65~100Tg이고 분뇨에 의해서는 20~30Tg가 배출되는 것으로 추정하였다.
- 다. 반추가축에 의해 방출되는 메탄가스는 연간 78Tg으로 추정되며 이것은 지구상의 전체 methane가스 발생량의 약 15%를 차지한다(Moss, 1993).
- 라. 메탄 가스는 논, 습지, 반추위와 같이 산소가 유입되지 않는 혐기성 생태계에서만 발생되며 반추 가축의 반추위는 총 메탄 발생량의 15%를 차지하지만 가장 제어하기 쉬운 부분이기 때문에 앞으로도 계속 많은 연구가 수행될 것으로 기대되고 있다.
- 마. 가축에 의해 생산되는 메탄생성량의 97% 정도는 반추가축에 의해 생성되며

그 중에서도 유우가 75%를 차지하는데(Crutzen, 1995), 유우는 약 200~400, 육우는 70~100, 산양은 10~30g/일의 메탄을 방출한다(Geschssner, 1994).

- 바. Methane은 g당 약 13.15Kcal의 에너지를 갖고 있으므로 사료 총 에너지의 3~12%가 methane으로 손실된다. 발생된 methane은 가축의 유지나 생산에 이용될 수 없어 결국 중요한 에너지의 손실을 초래하는 결과를 나타내기 때문에 methane 발생을 최소화함으로써 생산성을 높이고 지구환경을 보존하기 위한 연구가 오래 전부터 진행되어 왔다.
- 사. Thomas와 Clapperton(1972)는 장내발효에 의한 메탄생성을 줄이기 위한 가장 자연스러운 방법은 반추위내 사료의 발효율과 통과속도를 높여 프로피온산을 증가시키는 것이며 이는 에너지 이용효율을 개선할 수 있다고 하였다.
- 아. 메탄 발생억제를 위하여 사료급여체계에 대한 많은 연구가 진행되어 왔는데, Blaxter와 Clapperton (1965)이 면양을 이용하여 사료 섭취량 및 소화율로부터 최초로 메탄발생량을 추정 한 이후, 가축의 종류(Shibata 등, 1992), 사료섭취량(Johnson 등, 1993), 조사료와 농후사료의 비율(Shibata 등, 1992), 탄수화물의 종류(Moe와 Tyrrell, 1979) 및 조사료의 가공(Blaxter, 1989) 등 많은 요인에 의하여 영향을 받는다고 보고되고 있다.
- 자. 반추동물의 메탄 발생억제를 위한 여러 첨가제에 대해 많은 연구가 진행되어 왔는데 불포화지방산(Czerkawski 등, 1966), 지방(Van der Horning 등, 1981; Haaland, 1987), 질산(Jones, 1972) 등 메탄생성의 전구 물질인 수소를 이용할 수 있는 화합물군과 메탄생성박테리아가 대부분 붙어 기생하는 프로토조아의 억제제로서 ionophore계 항생제(Joyner 등, 1979; O'Kelly와 Spiers, 1992), 할로젠화합물(Bauchop, 1967; Wood 등, 1968)과 같이 메탄생성박테리아에 독성을 갖고 있는 화합물 등의 연구가 있었다.
- 차. Nollet 등(1996)은 2-bromoethanesulfonic acid와 ruminococcus productus 첨가에 의해 총에너지가 36.6%나 증가하였다고 보고하였다.

### 3. 문제점

- 가. 일부 메탄생성 억제제는 동물이나 반추미생물에게 독성을 가지고 있다. 대표적으로 질산의 첨가는 반추위내에서 nitrite로 전환되어 동물의 체내로 흡수

될 경우 세포에 필요한 산소의 공급이 부족될 수 있으며(Son 등, 1995), ionophore 계통의 항생제를 장기간 투여하게 되면 프로토조아가 항생제 내성을 나타내 메탄생성 억제효과가 감소되는 등(Johnson, 1974; Rumpler 등, 1986; Carmean, 1991)의 문제점이 있으며 아직까지 이렇다할 획기적인 첨가제가 개발되지 못하고 있는 실정이다(MaAllister, 1997).

나. 현재까지 개발된 반추위 메탄발생 저감 첨가제는 효과가 일시적이고 일부첨가제는 반추위 미생물의 성장을 저하시켜 생산성을 저해하는 것으로 나타나는 등 메탄 저감 연구 실적이 국내·외적으로 상당히 미흡한 실정이다.

## 제2절 효소분비 촉진제의 Delivery system의 개발

### 1. 국내기술 현황

국내에서 본 연구자들은 '91년부터 현재까지 약 40 여편의 연구 논문을 통하여 반추 곰팡이와 박테리아 그리고 효소에 관한 많은 결과를 도출하였는데 그 중에서 본 연구(효소분비 촉진제)와 관련된 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 반추위내 섬유소 분해효소를 위액중 총 효소, 위액부유효소, 사료부착효소 및 미생물부착효소로 분리하였을 경우, endoglucanase는 각각 1183.6, 362.7, 424.0 및 596.3IU, Glucosidase는 각각 27.7, 17.0, 12.1 및 6.8IU, Xylanase는 각각 1751.381, 528.6, 765.8 및 1572.6IU, xylosidase는 각각 55.2, 37.5, 22.9 및 22.5IU 측정되었다.

나. 가수분해효소의 위액부유, 사료 부착 및 미생물 부착에 대한 분포비율은 CMCase의 경우 각각 15, 24 및 61%, Xylanase는 각각 8, 13 및 75%의 비율이었으며 glucosidase의 경우 각각 34, 39, 27%, furanosidase는 각각 43, 33 및 23%였다.

다. Polysaccharide-degrading enzymes은 주로 미생물체에 부착되어 있었으며 monosaccharide-degrading enzymes은 주로 위액 중에 부유되어 있었다. 따라서 반추위내 가수 분해효소의 대부분(약 75% 이상)이 사료 분해에

이용되지 못하고 있는 실정이다.

- 라. 한우, 유우, 재래산양 및 면양 반추위의 CMCase는 사료급여 3시간 후 각각 255, 650, 988 및 548IU로서 축종별로 가수분해효소의 활력에는 많은 차이가 있었다.
- 마. 한우의 경우 사료급여 후 경과 시간 0, 3, 6 및 9시간에 따른 CMCase는 563, 255, 968 및 735IU로서 6시간대에 가장 높았으나 Xylanase는 각각 2,261, 2,309, 2,267 및 2,266IU로서 급여시간에 영향을 받지 않았다.
- 바. Surfactant와 acrylic acid polymers의 혼합물을 반추위액중에 투여하였을 경우 세포벽에 붙어있거나 세포내에 함유되어 있던 효소의 대부분이 위액중으로 부유된다는 사실을 발견하였다.
- 사. Surfactant는 점성이 높아 호기성 미생물의 세포벽을 점막을 형성하여 산소의 공급을 차단하여 호기성 미생물의 성장률을 억제시킨다고 알려져 왔으나 본 연구자들은 이 물질들이 반추위 혐기성 미생물의 성장률을 오히려 증가시킨다는 사실을 발견하였는데 이는 산소의 공급은 차단하지만 영양물질의 이동에는 크게 영향을 미치지 않기 때문으로 생각되며, 이러한 결과는 amylolytic bacteria와 곰팡이에서 두드러진 효과가 나타났다.
- 아. 반추 미생물의 세포막 투과성을 증가시킬 수 있는 물질은 세포내 효소들을 세포외로 분비시키는 효과가 매우 높아 벧짚과 같은 저질 조사료의 *in vitro* 소화율을 45% 이상 획기적으로 증가시키는 효과가 있었다(이 등, 1999).
- 자. 이러한 물질은 앞에서 언급한 바와 같이 점도가 상당히 높은 액상 물질이기 때문에 사료 첨가제로서 개발하기 위해서는 Delivery system의 개발이 절실히 요구되고 있다.

## 2. 국외 기술 현황

- 가. Non-ionic surfactants(surface active agents)는 세포막의 투과성을 증진시킴으로서 세포내 효소를 세포밖으로 분비시키며 또한 계면의 활성을 증진시켜 세포벽에 부착되어 있는 효소를 탈락시키는 효과가 매우 높고(Reese와 Maguire, 1969), acrylic acid polymers 역시 세포내 효소를 방출시키는 효과가 있다(Reese 등, 1969).

나. Non-ionic surfactant와 acrylic acid polymer는 점도가 상당히 높아 세포 벽에 피막을 형성하기 때문에 호기성 미생물의 경우 산소의 공급을 차단하여 성장률을 급격히 떨어뜨리는 경향이 있다.

### 3. 문제점

가. 현재까지는 반추 가축에 대한 에너지 이용효율의 개선 방법은 주로 사양과 사료 급여 체계의 조절이라는 다소 진부한 방법에 의존해 오고 있다.

나. 접근 방법을 달리한 효소분비 촉진제의 개발은 *in vitro* 상에서 획기적인 조사료의 소화율 증가를 보였으나 실제 동물의 생산반응에는 어떠한 영향을 미칠 것인가에 관한 실험이 수행되어야 한다.

다. Non-ionic surfactants와 acrylic acid polymers는 점도가 상당히 높아 동결 건조가 불가능하므로 적절한 delivery system의 개발이 필요하다.

라. Non-ionic surfactants와 acrylic acid polymers의 delivery system의 개발로 실험실내의 실험들이 산업적으로 응용될 수 있도록 하는 system 개발이 필요하다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 반추위 메탄생성 억제기술 개발

#### 1. 반추위내 미생물군 (박테리아, 프로토조아 및 곰팡이)의 분리 및 이들에 의한 가스 생성과 가스 조성 조사

##### 가. 연구의 세부목표

반추동물의 반추위내에 서식하고 있는 미생물은 크게 박테리아, 프로토조아 그리고 곰팡이로 나뉘는데 위액으로부터 이들 각각의 미생물 군집을 분리하고 이들이 생산하는 가스생성량과 가스 조성을 배양시간에 따라 조사하고자 한다.

##### 나. 연구 방법

###### 1) 공시축

벧짚과 농후사료를 6:4의 비율로 체중의 2%(풍건물 기준)를 섭취시킨 반추위 fistula가 장착된 홀스타인 수소를 공시했다.

###### 2) 반추위 미생물군의 분리 및 배양 (Figure 1)

- ① 위액 채취: 위액은 각 공시축들의 반추위 fistula를 통하여 위액과 반추위 고형물을 채취하여 미리 보온되고 이산화탄소가 충전된 용기에 보관하여 실험실로 운반하였다.
- ② 균질화(homogenization) : 채취한 위액을 electric mixer를 이용하여 균질화 시킨 다음 혐기상태에서 약 1시간 정도 정치시킨 후 vacuum pump를 이용하여 부유된 사료입자를 제거했다.
- ③ 원심분리 : 사료입자가 제거된 위액을 혐기상태에서 1차 원심분리(500×g, 5분)한 다음 상층액과 침전물을 분리하였다. 박테리아, 곰팡이 및



15분간)하여 MFF로 이용하였고 침전물은 MFF로 resuspension시킨 다음 fungal fraction과 bacterial fraction으로 이용하였다. 프로토조아를 분리하기 위하여 1차 원심분리후의 침전물을 MFF로 resuspension시키고 2차 원심분리(500×g, 15분)하였으며, residues 부분을 resuspension 시키고 protozoal fraction으로 이용하였다.

- ④ 항미생물제제 처리 : 항박테리아제(antibacterial agents)로는 streptomycin sulfate, penicillin G potassium 및 chloramphenicol을 가지고 100mL당 10mg의 농도로 첨가하였고, 항프로토조아제(antiprotozoan agents)로는 copper sulfate, sodium lauryl sulfate 및 dioctyl sulfosuccinate sodium salts를 100mL 위액당 15mg, 1.0mg 및 20mg의 농도로 각각 첨가하였으며 항곰팡이제(antifungal agent)로는 cychloheximide(0.05mg/ml)와 nystatin(200U/ml)을 위액 100mL당 각각 5mg과 20,000unit의 농도로 첨가하였다.
- ⑤ 미생물균의 배양 : 분리한 각각의 미생물 fraction을 기질은 각각 옥수수 와 벧짚이, 그리고 배지는 Lowe's medium (Lowe 등, 1985; Table 1)이 담겨 있는 serum bottle에 접종하고 39°C incubator에 4, 8, 12, 24, 그리고 48시간동안 배양하였다.

### 3) 조사항목 및 분석방법

- ① 가스 발생량 측정: 전체 가스발생량은 serum bottle내의 head space에 축적된 가스를 water displacement apparatus에 부착된 주사기로 흡입하여 burett내의 물을 밀어 올리는 양을 가스발생량으로 하였다. 그런 다음 가스를 다시 포집하고 GC(Varian)를 이용하여 가스 조성을 조사하였다.
- ② pH : 배양액의 pH는 pH meter로 측정하였다.
- ③ 휘발성지방산 함량 측정은 Erwin (1961)의 방법을 따라 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액 1ml을 eppendorf tube에 옮기고 25% metaphosphoric acid를 0.2ml씩 넣고 30분간 정치시켰다. 그 다음에 분석하기 전까지 -20°C에 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.

- 4) 통계분석: 시험결과에 대한 통계분석은 SAS package(1999)의 일반선형모델(GLM)을 이용하였다.

Table 1. The composition of Lowe's medium

Component	Amount(/L)
KCl	0.6g
NaCl	0.6g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2g
NH <sub>4</sub> Cl	0.54g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.68g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4g
Yeast extract	0.5g
Trypticase peptone	1g
PIPES	1.5g
Coenzyme M sol'n <sup>1)</sup>	10ml
Fatty acid sol'n <sup>2)</sup>	10ml
Trace elements sol'n <sup>3)</sup>	10ml
Haemin sol'n <sup>4)</sup>	10ml
Resazurin sol'n (0.1%) <sup>5)</sup>	1ml
Vitamin sol'n <sup>6)</sup>	10ml
Reducing agent sol'n <sup>7)</sup>	10ml

<sup>1)</sup>Coenzyme M sol'n : 2-mercaptoethane sulphonic acid, 0.4g(/100ml d.w.)

<sup>2)</sup>Fatty acid sol'n : acetic acid, 6.85ml; propionic acid, 3.0ml; butyric acid, 1.84ml; 2-methylbutyric acid, 0.55ml; isobutyric acid, 0.47ml; valeric acid, 0.55ml; isovaleric acid, 0.55ml; 0.2M NaOH, 700ml (/L d.w.). The pH was adjusted to 7.5 with 1M NaOH.

<sup>3)</sup>Trace elements sol'n : MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.25g; NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.25g; NaMoOL<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.25; H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.25g; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2g; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.05g; SeO<sub>2</sub>, 0.05g; NaVO<sub>3</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.05g; ZnCl<sub>2</sub>, 0.025g; CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.025g (/L d.w.).

<sup>4)</sup>Haemin sol'n : haemin 0.1g (/10ml ethanol), adjusting the volume to 1 L with 0.05M NaOH.

<sup>5)</sup>Vitamin sol'n : 1,4-naphthoquinone, 0.25g; calcium D-pantothenate, 0.2g; nicotinamide, 0.2g; riboflavin, 0.2g; thiamin · HCl, 0.2g; pyridoxine · HCl, 0.2g; biotin, 0.025g; folic acid, 0.025g; cyanocobalamin, 0.025g; p-aminobenzoic acid, 0.025g (/L 5mM HEPES)

<sup>6)</sup>Reducing sol'n : Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O, 2.5g; L-Cysteine · HCl, 2.5g (/100ml d.w.)

## 다. 연구결과

48시간 배양후 pH를 살펴보면 각각의 미생물군 모두 옥수수를 기질로 하였을 때가 볏짚보다 더 낮았으며 박테리아가 프로토조아와 곰팡이보다 pH가 낮았다 (Figure 2).

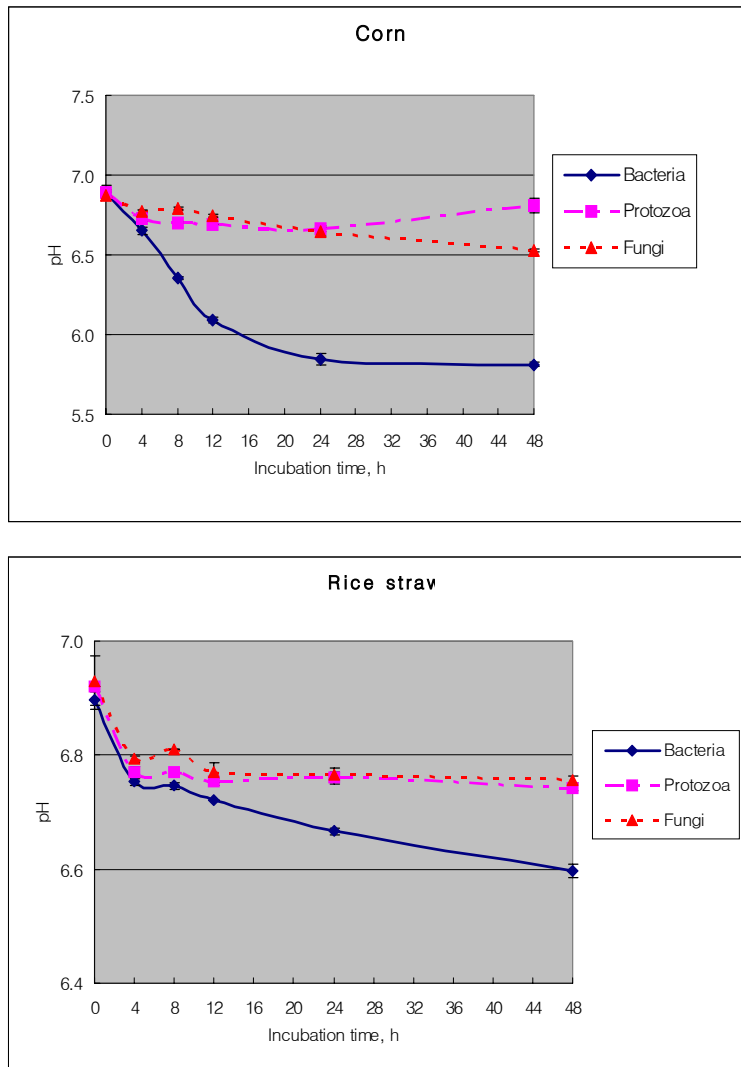


Figure 2. Change in the pH by rumen microbial fraction (bacteria, protozoa, fungi) as affected by substrates.

휘발성지방산(VFA)의 농도를 살펴보면 미생물 군집 모두 비교적 쉽게 분해되는 기질인 옥수수를 기질로 하였을 때가 볏짚을 기질로 하였을 때보다 높았다. (Table 2). 박테리아는 대부분의 VFA 농도가 protozoa나 fungi보다 높았으며 protozoa와 fungi간에는 비슷하였다. TVFA, acetate, propionate, butyrate, valerate의 농도에서는 기질과 미생물 군집에 따른 유의적 차이가 나타났다.

반추위내에서 박테리아는 종류와 수가 가장 많기 때문에 동일 조건에서 배양하였을 때 protozoa나 fungi 보다 더 많은 대사활동을 하게 되고, 그 결과 대사산물인 VFA의 농도가 더 높게 나타났을 것이다.

Table 2. Change in the VFA concentration (mM) by rumen microbial fraction (bacteria, protozoa, fungi) as affected by substrates

	Corn			Rice straw			SEM <sup>1</sup>	Significance <sup>2,3</sup>		
	Bacteria	Protozoa	Fungi	Bacteria	Protozoa	Fungi		S	M	S×M
TVFA	86.0	22.3	26.8	52.4	20.0	19.4	4.34	**	**	**
acetate	39.3	16.3	20.6	36.0	12.0	13.2	3.09	**	**	ns
propionate	28.3	2.3	4.4	10.2	2.5	4.3	0.83	**	**	**
isobutyrate	0.6	0.1	0.03	0.5	0.1	0.1	0.07	ns	**	ns
butyrate	15.3	3.2	1.5	3.6	4.8	1.5	0.56	**	**	**
isovalerate	0.8	0.2	0.1	1.0	0.2	0.2	0.09	ns	**	ns
valerate	1.6	0.2	0.1	1.0	0.3	0.2	0.10	*	**	**
A:P	1.4	7.1	4.7	3.5	4.8	3.1	0.87	ns	**	**

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>2</sup>S, substrate; M, microbes; S×M, interaction of substrate and microbes

<sup>3</sup>\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; ns, not significant

휘발성지방산과 마찬가지로 가스발생량에서도 미생물 군집과 기질에 따른 유의적 차이가 나타났다 (Table 3). 박테리아가 다른 미생물군보다 가스발생량이 높았으며 옥수수를 기질로 하였을 때가 볏짚보다 가스발생량이 훨씬 더 많았다. 발생한 가스를 분석한 결과, 메탄생성박테리아를 포함한 박테리아 군집에서 CH<sub>4</sub>

발생량이 높게 나타났고, protozoa와 fungi 군집에서도 농도는 낮지만 CH<sub>4</sub>이 생성되었다. 여기서 사용한 항박테리아제(antibacterial agents)인 streptomycin sulfate, penicillin G potassium 및 chloramphenicol이 archaea인 메탄생성박테리아를 완전히 억제하지 못하였을 것으로 추측된다. 그렇지만 기본적으로 protozoa와 fungi 군집은 기질이 분해되어 생성된 H<sub>2</sub>를 CH<sub>4</sub>으로 합성할 수 없으므로 생성된 H<sub>2</sub>가 축적되어 CH<sub>4</sub>보다 농도가 높은 것을 볼 수 있다.

Table 3. Change in the gas production and proportion by rumen microbial fraction (bacteria, protozoa, fungi) as affected by substrates

	Corn			Rice straw			SEM <sup>2</sup>	Significance <sup>3,4</sup>		
	Bacteria	Protozoa	Fungi	Bacteria	Protozoa	Fungi		S	M	S×M
Total gas, ml	27.7	12.2	6.7	10.1	0.6	ND <sup>1</sup>	0.24	**	**	**
CH <sub>4</sub> , mM	5.76	0.9	0.47	2.09	0.05	ND	0.11	**	**	**
H <sub>2</sub> , mM	0.59	2.07	0.55	0.23	0.01	ND	0.02	**	**	**

<sup>1</sup>ND, not detected

<sup>2</sup>SEM, standard error of means

<sup>3</sup>S, substrate; M, microbes; S×M, interaction of substrate and microbes

<sup>4</sup>\*\*, p<0.01; ns, not significant

## 2. 반추위내 메탄생성박테리아의 메탄생성량 조사 및 반추위 미생물군과의 혼합배양에 따른 가스량과 가스 조성 변화 조사

### 가. 연구의 세부목표

반추위내 메탄생성박테리아의 메탄생성량을 조사하고 메탄생성박테리아와 각각의 미생물군을 coculture 하였을 경우에 발생하는 가스생성량 및 가스의 조성(CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>)을 배양시간에 따라 조사하고자 한다.

### 나. 연구 방법

### 1) 메탄생성박테리아의 배양

① 균주 : *Methanobrevibacter ruminantium* (ATCC 35063)

② 배지 : ATCC medium 1471 sludge medium

Table 4. ATCC medium 1471 sludge medium for *Methanobrevibacter ruminantium*.

Ingredients	Amount (/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4g
NaCl	0.4g
NH <sub>4</sub> Cl	0.4g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0mg
Trace elements solution <sup>1)</sup>	1.0ml
Yeast extract	1.0g
Sodium acetate	1.0g
Sodium formate	2.0g
Rumen fluid	50.0ml
NaHCO <sub>3</sub>	4.0g
Fatty acid mixture <sup>2)</sup>	20.0ml
Resazurin	1.0mg
Cyteine HCl	0.5g
Na <sub>2</sub> S · 9H <sub>2</sub> O	0.5g
Distilled water	940.0ml

<sup>1)</sup>Trace elements solution : ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1g; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.03g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.3g; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.2g; CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.01g; NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.02g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.03g (/L distilled water)

<sup>2)</sup>Fatty acid mixture : Valeric acid, 0.5g; Isovaleric acid, 0.5g; alpha-methylbutyric acid, 0.5g; Isobutyric acid, 0.5g; Distilled water, 20ml. Adjust pH to 7.5 with concentrated NaOH



### ③ 배양 방법

ATCC medium 1471 sludge medium 60ml가 든 serum bottle에 *M. ruminantium*을 syringe로 접종하였고, bottle의 상층부를 H<sub>2</sub> 80%/ CO<sub>2</sub> 20%의 혼합가스로 충전한 후 bottle을 봉하고 37°C shaking incubator에서 배양하였다. 배지가 부영계 되는 turbidity가 나타나면 계대배양 하였다.

## 2) 메탄생성박테리아의 메탄생성량 조사

① 기질 : alfalfa와 배합사료를 8:2 그리고 2:8의 비율로 하여 기질 200mg을 60ml serum bottle에 담았다.

② 배지 : McDougall buffer (Table 5)

Table 5. The composition of McDougall buffer

Ingredients	Amount (/L)
NaHCO <sub>3</sub>	9.80g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4.62g
KCl	0.57g
NaCl	0.47g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.12g
4% CaCl <sub>2</sub> solution <sup>1)</sup>	1ml

<sup>1)</sup>4% CaCl<sub>2</sub> solution : CaCl<sub>2</sub> 4g (/100ml d.w.)

③ 20mM BES(bromoethanesulfonic acid) solution 준비 : 메탄생성균을 선택적으로 억제하는 것으로 밝혀진 BES를 20mM solution으로 만들고 배지에 넣기 전까지 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 bubbling하였다.

④ 위액채취: 볏짚과 농후사료를 6:4의 비율로 하여 급여시킨 반추위 fistula가 장착된 홀스타인 수소로부터 아침 사료 급여 전에 위액을 채취하였다.

⑤ 접종 및 배양 : 위액과 McDougall buffer를 1:2(v/v)의 비율로 섞은 후 한 시간동안 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> 가스로 bubbling 하였다. 이 위액과 buffer mixture를 기질이 담겨진 60ml serum bottle에 30ml씩 분주하고 butyl rubber stopper와 aluminium cap으로 봉하였다. 그 다음에 bottle을 39°C shaking incubator에서 4,

8, 12, 24, 48시간 배양하였다.

⑥ 일정시간 배양이 되면 가스발생량을 측정하고 발생된 가스를 vacutainer(Becton Dickinson®)에 보관하였다. 그리고 다시 bottle을 incubator에 넣고 48시간까지 배양하였다.

⑦ 48시간 배양후 가스발생량을 측정하고 pH를 측정하며 배양액을 원심분리하고 상층액은 VFA 분석을 위해 -20℃에 보관하였다.

⑧ *In vitro* 소화율을 구하기 위하여 배양액과 원심분리하고 남은 것을 suspension시킨 다음 filter paper(Whatman 541)로 거른다.

⑨ 조사항목 및 분석방법

㉠ 가스 발생량 측정: 전체 가스발생량은 serum bottle내의 head space에 측정된 가스를 water displacement apparatus에 부착된 주사기로 흡입하여 burett내의 물을 밀어 올리는 양을 가스발생량으로 하였다. 그런 다음 가스를 다시 포집하고 GC를 이용하여 가스 조성을 조사하였다.

㉡ pH : 배양액의 pH는 pH meter로 측정하였다.

㉢ 휘발성지방산 함량 측정 : Erwin (1961)의 방법을 따라 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액 1ml을 eppendorf tube에 옮기고 25% metaphosphoric acid를 0.2ml씩 넣고 30분간 정치시켰다. 그 다음에 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.

㉣ 소화율 : 배양액을 filter paper(Whatman 541)로 거른 다음 filter paper를 60℃ drying oven에 48시간 이상 건조시켰다. 그 다음 무게를 측정하여 기질의 배양 전과 후의 무게차이를 배양전의 기질 무게로 나누어 소화율을 구하였다.

### 3) 메탄생성박테리아와 반추위 미생물군과의 혼합배양에 따른 가스량과 가스 조성 변화 조사

가) Methanogen (*Methanobrevibacter ruminantium*), protozoa 그리고 fungi 배양

혼합배양하기 위해 Methanogen을 ATCC medium 1471 sludge medium (Table 4)에 배양하였으며 protozoa는 앞에서 설명한 물리화학적 방법으로 분리

하고 glucose를 넣은 Lowe's medium (Table 1)에 24시간 배양한 후 혼합배양시 접종하였고 fungi의 경우 *Piromyces* 속으로 밝혀진 균주를 Lowe's medium에 24시간 배양한 후 혼합배양시 접종하였다.

#### 나) 공시축

공시축으로 반추위 fistula가 장착된 홀스타인 수소를 공시하였으며 볏짚과 농후사료를 6:4의 비율로 체중의 2%(풍건물 기준)를 급여하였다.

#### 다) 혼합배양

- ① 기질 : alfalfa와 배합사료를 8:2 그리고 2:8의 비율로 하여 400mg을 120ml serum bottle에 담았다.
- ② 배지 : Lowe's medium (Table 1)을 사용하였으며 serum bottle에 50ml씩 분주하였다.
- ③ 위액채취 : 공시한 홀스타인 수소로부터 아침 사료 급여 전에 위액을 채취하였다.
- ④ 박테리아 fraction 분리 : 앞에서 설명한 물리화학적 방법을 통해 채취한 위액에서 박테리아 fraction을 분리하였으며 혼합배양시 접종하였다.
- ⑤ 혼합배양(co-culture) : 위에서 기질과 배지를 넣은 serum bottle에 박테리아, 프로토조아 그리고 곰팡이를 각각 5ml씩 접종하고 메탄생성균도 5ml씩 접종하였다. 그 다음 박테리아와 메탄생성균을 배양하는 bottle에는 anti-protozoan agent와 anti-fungal agent를 넣어 프로토조아와 곰팡이의 성장을 억제시켰다. 접종한 후 bottle은 butyl rubber stopper와 aluminium cap으로 봉한 후 39°C shaking incubator에서 4, 8, 12, 24, 48시간 배양하였다.
- ⑥ 일정시간 배양한 후 가스 발생량을 측정하고 발생된 가스를 vacutainer(Becton Dickinson®)에 보관하였다. 그리고 다시 bottle을 incubator에 넣고 48시간까지 배양하였다.
- ⑦ 48시간 배양후 가스발생량을 측정하고 pH를 측정하며 배양액을 원심분리하고 상층액은 VFA 분석을 위해 -20°C에 보관하였다.

#### 3) 조사항목 및 조사방법

- ① 가스 발생량 측정: 전체 가스발생량은 serum bottle내의 head space에 측

적된 가스를 water displacement apparatus에 부착된 주사기로 흡입하여 burett내의 물을 밀어 올리는 양을 가스발생량으로 하였다. 그런 다음 가스를 다시 포집하고 GC를 이용하여 가스 조성을 조사하였다.

- ② pH : 배양액의 pH는 pH meter로 측정하였다.
- ③ 휘발성지방산 함량 측정 : Erwin (1961)의 방법을 따라 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액 1ml을 eppendorf tube에 옮기고 25% metaphosphoric acid를 0.2ml씩 넣고 30분간 정치시켰다. 그 다음에 분석하기 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.
- ④ 소화율 : 배양액을 filter paper(Whatman 541)로 거른 다음 filter paper를  $60^{\circ}\text{C}$  drying oven에 48시간 이상 건조시켰다. 그 다음 무게를 측정하여 기질의 배양 전과 후의 무게차이를 배양전의 기질 무게로 나누어 소화율을 구하였다.

## 다. 연구 결과

### 1) 메탄생성박테리아의 메탄생성량 조사

반추위내 메탄생성박테리아의 메탄생성량을 조사하기 위해 BES(bromoethanesulfonic acid)라는 메탄생성박테리아를 선택적으로 억제하는 물질을 이용하여 메탄생성량을 추정하였다.

가스발생량을 살펴보면 BES 처리구는 메탄이 거의 발생하지 않았으며 전체 가스발생량도 적었다 (Table 6). 그리고 BES 처리에 의해 메탄생성이 억제되면서  $\text{H}_2$ 가 이용되지 못하고 축적되어 BES 처리구는 대조구보다  $\text{H}_2$ 의 농도가 높은 것을 볼 수 있다. 농후사료의 수준에 따른 차이를 보면 농후사료의 수준이 높아질수록 전체가스발생량과  $\text{CH}_4$  발생량이 높았다. 이는 미생물에 의해 쉽게 이용할 수 있는 기질의 양이 많기 때문에 그 대사산물로 가스와  $\text{CH}_4$ 의 양도 많을 것이다. 메탄생성박테리아의 메탄생성량은 배양 조건에 따라 다양하지만 여기서 기질의 조성을 달리하여 조사한 결과 기질 건물 g당 20~30mM의 메탄이 발생되었다.

Table 6. Effect of BES and concentrate level on *in vitro* gas production

	BES				SEM <sup>1</sup>	Significance <sup>2,3</sup>		
	No addition		Addition			B	L	B×L
	High concentrate	Low concentrate	High concentrate	Low concentrate				
Total gas, ml	44.0	36.6	37.6	28.5	1.08	**	**	ns
CH <sub>4</sub> , mM	5.6	3.8	0.2	0.1	0.66	**	*	*
H <sub>2</sub> , mM	0.07	0.10	2.86	1.02	0.10	**	**	**

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>2</sup>B, BES; L, level of concentrate; B×L, interaction of BES and level of concentrate

<sup>3</sup>\*, P<0.05; \*\*, P<0.01; ns, not significant

## 2) 메탄생성박테리아와 반추위 미생물군과의 혼합배양에 따른 가스량과 가스 조성 변화 조사

앞에서 반추위액으로부터 미생물군을 분리한 후 각각 단독 배양하여 가스량을 조사하였는데 이번에는 각 미생물군과 메탄생성박테리아를 혼합배양함으로써 나타나는 가스발생과 발효성상의 변화를 살펴보았다.

먼저, 전체 가스발생량을 보았을 때 (Table 7), fungi와 methanogen의 혼합배양(Fm)에서 가장 많이 발생하였고 그 다음으로 박테리아(Bm)가, 마지막으로 프로토조아(Pm)와 메탄생성박테리아를 혼합배양한 순서로 발생하였다. 비록 미생물 군집간에 차이는 없지만 CH<sub>4</sub> 생성량도 Fm이 Bm보다 높았다.

Bm 혼합배양에서 가장 많이 가스를 발생할 것으로 예상했지만 Figure 3에서 보는 것처럼 박테리아와 메탄생성박테리아 혼합배양은 배양 초기 가스발생량이 적었다. 이는 박테리아가 접종후 새로운 배지에 적응하는 lag time이 길었던 것으로 보인다. 그래서 배양초기 가스발생량이 적었고 전체적으로 가스발생량이 적었다. 반면에 곰팡이는 lag time이 박테리아보다 짧아 배양초기 가스발생량이 높았고 배양 전체적으로 가스발생량이 다른 곳보다 높았다. 배양시간을 늘린다면 박테리아와 곰팡이에서의 가스발생량이 비슷하거나 박테리아의 양이 더 높을 것으로 예상된다. 그 이유는 박테리아는 시간이 지남에 따라 가스발생량이 증가하

여 48시간에 가장 높았고 곰팡이는 24시간에 가장 높았다가 48시간에는 발생량이 줄었기 때문이다. Pm의 경우는 12시간 배양할 때까지 가스발생량이 증가하다가 그 이후에는 거의 일정하였다.

Table 7. Effect of coculture of methanoges with bacteria, protozoa or fungi on gas production at two different levels of concentrate

	High concentrate <sup>1</sup>			Low concentrate			SEM <sup>2</sup>	Significance <sup>3,4</sup>		
	Bm	Pm	Fm	Bm	Pm	Fm		L	M	L×M
Total gas, ml	40.3	8.3	54.7	31.8	6.4	48.4	4.3	**	*	ns
CH <sub>4</sub> , mM	1.2	0.3	1.8	1.0	0.2	1.7	0.19	**	ns	ns
H <sub>2</sub> , mM	0.9	0.03	0.2	0.5	0.03	1.4	0.26	**	*	**

<sup>1</sup>Bm, coculture of bacteria and methanogen; Pm, coculture of protozoa and methanogen; Fm, coculture of fungi and methanogen

<sup>2</sup>SEM, standard error of means

<sup>3</sup>L, level of concentrate; M, microbes; L×M, interaction of level of concentrate and microbes

<sup>4</sup>\*, P<0.05; \*\*, P<0.01; ns, not significant

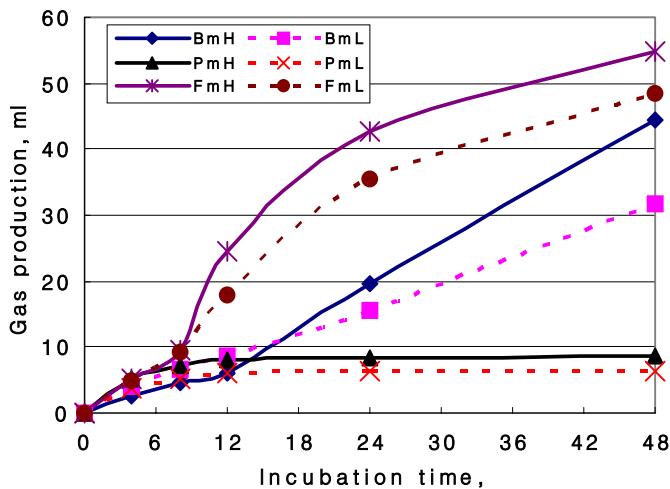
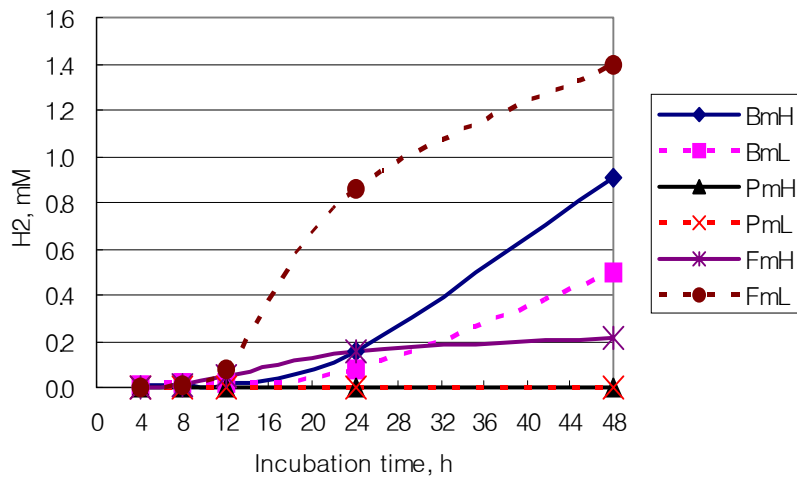


Figure 3. Effect of coculture between bacteria, protozoa, fungi and methanogen and concentrate level on gas production. BmH, coculture of bacteria and methanogen in the high concentrate level; BmL, coculture of bacteria and methanogen in the low concentrate level; PmH, coculture of protozoa and methanogen in the high concentrate level; PmL, coculture of protozoa and methanogen in the low concentrate level; FmH, coculture of fungi and methanogen in the high concentrate level; FmL, coculture of fungi and methanogen coculture in the low concentrate level.

Figure 4는 각 미생물군과 메탄생성박테리아의 혼합배양과 농후사료 수준에 따른 H<sub>2</sub>와 CH<sub>4</sub> 가스발생 양상을 보여주고 있다. H<sub>2</sub>의 농도는 농후사료 비율이 낮으면서 fungi와 methanogen을 coculture 하였을 때 높게 나타났다. 그리고 12 시간까지는 다른 것과 비슷하게 발생하다가 12시간 이후 갑자기 증가하기 시작하였다. 이는 fungi가 조사료에 부착한 후 조사료의 이용성이 크게 증가하였을 것으로 생각된다. CH<sub>4</sub>도 H<sub>2</sub>와 비슷한 경향을 보였는데 Fm에서 CH<sub>4</sub> 발생량이 가장 높았고 그 다음으로 박테리아, 프로토조아의 순서였으며, Fm은 배양 12시간 이후 CH<sub>4</sub>의 발생량이 크게 증가하였으며 농후사료의 수준이 높은 곳에서 CH<sub>4</sub>의 발생량이 높았다.



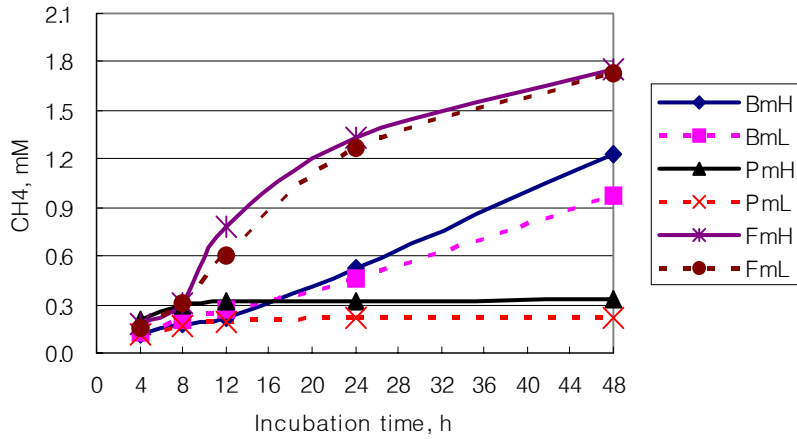


Figure 4. Effect of coculture between bacteria, protozoa, fungi and methanogen and concentrate level on H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production. BmH, coculture of bacteria and methanogen in the high concentrate level; BmL, coculture of bacteria and methanogen in the low concentrate level; PmH, coculture of protozoa and methanogen in the high concentrate level; PmL, coculture of protozoa and methanogen in the low concentrate level; FmH, coculture of fungi and methanogen in the high concentrate level; FmL, coculture of fungi and methanogen coculture in the low concentrate level.

Table 8은 혼합배양에 따른 발효성상을 보여주는 것으로, pH는 고농후사료에서의 Bm과 Fm이 가장 낮았고 Pm이 가장 높았다. VFA 생성량을 보면 미생물군 모두 농후사료 수준이 높은 곳이 VFA 생성량이 높았고, Fm이 다른 미생물군보다 높았다. 프로토조아는 가스발생량과 마찬가지로 전체적으로 VFA 생성량은 적지만 acetate:propionate 비율은 높게 나타났다. 반대로 Fm이 acetate:propionate 비율이 가장 낮았는데, 이는 Fm이 다른 미생물군보다 propionate 생성 비율이 높음을 보여주는 것이다.



Table 8. Effect of coculture of methanogens with bacteria, protozoa or fungi on pH and VFA concentration

	High concentrate <sup>1</sup>			Low concentrate			SEM <sup>2</sup>	Significance <sup>3,4</sup>		
	Bm	Pm	Fm	Bm	Pm	Fm		L	M	L×M
pH	6.5	6.8	6.5	6.7	6.7	6.6	0.03	**	**	**
Total VFA, mM	35.1	12.8	36.7	21.8	13.3	26.6	2.12	**	**	**
acetate, mM	17.0	8.5	18.3	13.6	8.5	15.3	1.21	**	*	ns
propionate, mM	10.9	2.5	14.5	5.0	2.1	5.8	0.86	**	**	**
isobutyrate, mM	0.5	0.2	0.8	0.4	0.5	1.0	0.03	**	**	**
butyrate, mM	4.2	1.3	2.1	1.9	1.2	3.3	0.45	**	ns	**
isovalerate, mM	1.0	0.2	0.8	0.5	0.5	0.8	0.06	**	ns	**
valerate, mM	1.4	0.2	0.3	3.0	0.5	0.4	0.02	**	**	**
A:P	1.6	3.5	1.3	2.8	4.0	2.6	0.19	**	**	**

<sup>1</sup>Bm, coculture of bacteria and methanogen; Pm, coculture of protozoa and methanogen; Fm, coculture of fungi and methanogen

<sup>2</sup>SEM, standard error of means

<sup>3</sup>L, level of concentrate; M, microbes; L×M, interaction of level of concentrate and microbes

<sup>4</sup>\*, P<0.05; \*\*, P<0.01; ns, not significant

### 3. 수소가스제어를 통한 메탄 생성 억제 기술 개발

#### 가. 연구의 세부목표

발효산물로 발생하는 수소가스를 메탄생성박테리아와 경합하여 이용할 수 있는 물질을 사용하여 효과적으로 메탄생성을 억제할 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

#### 나. 연구 방법

##### 1) 불포화지방산이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

가) 불포화지방산의 종류

: oleic acid, linoleic acid, linolenic acid

나) 첨가수준 : 기질의 5, 10%

다) 기질 : 0.5g (Tall fescue : concentrate = 6:4)

라) 배지 : McDougall buffer (Table 5)

마) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간

바) 분석항목 : gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, pH, VFA and DM digestibility

사) 배양방법

- ① 160ml serum bottle에 기질 0.5g을 담았다. 이 때 분쇄한 tall fescue와 농후 사료를 6:4의 비율로 하였다.
- ② McDougall buffer 제조
- ③ 위액 채취 : 아침 사료 급여 전에 채취하고 4겹의 cheese cloth로 걸렀다.
- ④ 채취한 위액과 McDougall buffer를 1:4의 비율로 섞고 30분간 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 bubbling 하였다.
- ⑤ 위액과 buffer mixture를 60ml씩 bottle에 넣고, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid를 각각 기질의 5, 10%씩 bottle에 넣었다.
- ⑥ butyl rubber stopper와 aluminium seal로 bottle을 닫고 39°C incubator에 48시간 배양하였다. 배양 시작 후 6, 12, 24, 48시간에 incubator에서 bottle을 꺼내 gas production을 측정하고 계속해서 incubator에 배양하였다.

아) 분석방법

- ① gas production : 전체 가스발생량은 serum bottle내의 head space에 축적된 가스를 water displacement apparatus에 부착된 주사기로 흡입하여 burett내의 물을 밀어 올리는 양으로 구하였다.
- ② CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> : 가스발생량을 측정된 다음 7ml vacutainer에 보관하였다가 gas chromatography(Varian)를 이용해 CH<sub>4</sub>과 H<sub>2</sub>를 분석하였다.
- ③ pH : pH meter (Mettler Delta 340)로 측정하였다.
- ④ VFA : pH를 측정된 후 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액 1ml을 eppendorf tube에 옮기고 25% metaphosphoric acid를 0.2ml씩 넣고 30분간 정치시켰다. 그 다음에 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.
- ⑤ DM digestibility : 배양액을 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 상층액을 먼저 filter paper(Whatman 541)로 거른 다음 pellet을 약수저로 filter paper에 옮겼다. 증류수로 tube안을 깨끗이 하고 다시 filter paper에 걸렸다. 그 다음 filter paper를 60℃ drying oven에 48시간 이상 건조시키고 무게를 측정하여 기질의 배양전과 배양후의 무게 차이로 소화율을 구하였다.

2) 항생제가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

가) 항생제의 종류 : monensin, nisin

나) 첨가수준 : 0, 5, 10ppm

다) 첨가방법 : monensin과 nisin을 각각 95% ethanol에 녹인 후 배양액의 5, 10ppm 되도록 첨가

라) 기질 : 0.5g (Tall fescue : concentrate = 6:4)

마) 배지 : McDougall buffer

바) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간

사) 분석항목 : gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, pH, VFA and DM digestibility

아) 배양방법 : 실험 1)과 동일

자) 분석방법 : 실험 1)과 동일

### 3) 금속산화물이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 가) 금속산화물의 종류 :  $MnO_2$ ,  $KMnO_4$ ,  $Fe_2O_3$
- 나) 첨가수준 : 0, 500, 1000ppm
- 다) 첨가방법 :  $MnO_2$ ,  $KMnO_4$ ,  $Fe_2O_3$ 을 각각 배양액에 500, 1000ppm 첨가
- 라) 기질 : 0.5g (Tall fescue : concentrate = 6:4)
- 마) 배지 : McDougall buffer
- 바) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간
- 사) 분석항목 : gas production,  $CH_4$ ,  $H_2$ , pH, VFA and DM digestibility
- 아) 배양방법 : 실험 1)과 동일
- 자) 분석방법 : 실험 1)과 동일

### 4) 유기산이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 가) 유기산의 종류 : fumarate, malate
- 나) 첨가수준 : 0, 5, 10mM
- 다) 첨가방법 : bottle에 위액과 buffer를 넣은 다음 fumarate와 malate의 농도가 각각 5, 10mM이 되도록 무게를 제어 bottle에 넣었다.
- 라) 기질 : 0.5g (Tall fescue : concentrate = 6:4)
- 마) 배지 : McDougall buffer
- 바) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간
- 사) 분석항목 : gas production,  $CH_4$ ,  $H_2$ , pH, VFA and DM digestibility
- 아) 배양방법 : 실험 1)과 동일
- 자) 분석방법 : 실험 1)과 동일

### 5) Essential oil이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 가) 첨가수준 : 기질의 0, 1 그리고 10%를 첨가하였다.
- 나) 기질 : 기질은 tall fescue와 시판 농후사료를 분쇄하여 사용하였으며, 이들의 비율을 2:8과 8:2를 하여 0.5g을 배양에 사용하였다.
- 다) 배지 : McDougall buffer

- 라) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간
- 마) 분석항목 : gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, pH, NH<sub>3</sub>-N, VFA
- 바) 배양방법 : 실험 1)과 동일
- 사) 분석방법 : 나머지는 실험 1)과 동일하며 NH<sub>3</sub>-N 분석은 배양액을 원심분리한 후 상층액을 eppendorf tube에 1ml씩 옮기고 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다가 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 분석하였다.

#### **6) Lignosulfonate가 메탄생성과 발효에 미치는 영향**

- 가) 첨가수준 : 기질의 0, 0.25, 0.5 그리고 1%를 첨가하였다.
- 나) 기질 : 기질은 시판 농후사료를 분쇄하여 0.25g을 배양에 사용하였다.
- 다) 배지 : McDougall buffer
- 라) 배양시간 : 0, 3, 6, 12, 24시간
- 마) 분석항목 : pH, gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>
- 바) 배양방법 : 60ml serum bottle을 사용하였으며, 1:4(V/V)로 섞은 위액과 buffer mixture를 30ml 접종하여 실험하였으며, 나머지는 실험 1)과 동일하다.
- 사) 분석방법 : 실험 1)과 동일

#### **7) 한약재가 메탄생성과 발효에 미치는 영향**

- 가) 한약재의 종류 : 결명자, 계피, 감초, 산초, 정향
- 나) 첨가수준 : 기질의 0 그리고 5%를 첨가하였다.
- 다) 기질 : 분쇄한 alfalfa 200mg을 배양에 사용하였다.
- 라) 배지 : McDougall buffer
- 마) 배양시간 : 24시간
- 바) 분석항목 : gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, pH, NH<sub>3</sub>-N, VFA
- 사) 배양방법 : 60ml serum bottle을 사용하였으며, 1:4(V/V)로 섞은 위액과 buffer mixture를 30ml 접종하여 실험하였으며, 나머지는 실험 1)과 동일하다.
- 아) 분석방법 : 나머지는 실험 1)과 동일하며 NH<sub>3</sub>-N 분석은 배양액을 원심분리한 후 상층액을 eppendorf tube에 1ml씩 옮기고 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다가 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 분석하였다.

### 8) 할로젠화합물이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 가) 할로젠화합물의 종류 : BES(bromoethanesulfonic acid), PMDI(pyromellitic diimide)
- 나) 첨가수준 : 0, 15, 30 $\mu$ M (BES) and 0, 5, 10ppm (diimide)
- 다) 첨가방법 : bottle에 위액과 buffer를 넣은 다음 fumarate와 malate의 농도가 각각 5, 10mM이 되도록 무게를 재어 bottle에 넣었다.
- 라) 기질 : 0.5g (Tall fescue : concentrate = 6:4)
- 마) 배지 : McDougall buffer
- 바) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간
- 사) 분석항목 : gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, pH, VFA and DM digestibility
- 아) 배양방법 : 실험 1)과 동일
- 자) 분석방법 : 실험 1)과 동일

### 9) 할로젠 화합물과 불포화지방산 또는 유기산과의 복합처리가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

- 가) 할로젠화합물의 종류 : BES, PMDI
- 나) 불포화지방산의 종류 : oleic acid, linoleic acid, linolenic acid
- 다) 유기산의 종류: fumarate, malate
- 라) 첨가수준 : 5% (oleic acid, linoleic acid, linolenic acid), 10mM (fumarate and malate), 30 $\mu$ M (BES) and 10ppm (PMDI)
- 마) 기질 : 0.5g (Tall fescue : concentrate = 6:4)
- 바) 배지 : McDougall buffer
- 사) 배양시간 : 0, 6, 12, 24, 48시간
- 아) 분석항목 : gas production, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, pH, VFA and DM digestibility
- 자) 배양방법 : 실험 1)과 동일
- 차) 분석방법 : 실험 1)과 동일

## 다. 연구 결과

### 1) 불포화지방산이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

불포화지방산 첨가는 건물소화율을 감소시켰으며( $P<0.05$ ), oleic acid는 제외한 linoleic acid, linolenic acid는 첨가수준이 높을수록 소화율이 감소하였다 (Table 9). pH는 linolenic acid 첨가구에서 가장 높게 나타났으나, 처리구간 유의적인 차이는 없었다. 휘발성지방산(VFA)을 살펴보면 불포화지방산 처리에 의해 대체로 증가하였다. acetate 농도는 지방산 처리에 의해 증가하였지만 유의적인 차이는 없었고, propionate 농도는 지방산 처리에 의해 증가하였으며 10% 지방산 처리구는 유의적으로 높았다 ( $P<0.05$ ). 5% oleic acid 첨가는 VFA 농도에 거의 영향을 주지 않았으나 10% oleic acid 첨가는 propionate, butyrate를 유의적으로 증가시켰다 ( $P<0.05$ ). Linoleic acid 처리구에서는 첨가수준간에 VFA 함량의 차이가 없었다. Linolenic acid는 10% 첨가구가 5% 첨가구보다 대체로 높았으며 특히 propionate와 A/P 비율은 첨가수준간에 차이가 나타났다 ( $P<0.05$ ).

가스발생량을 살펴보면 불포화지방산 처리에 의해 대체로 가스발생량이 줄었으며, 불포화지방산 처리수준이 높을수록 더욱 감소하였다 ( $P<0.05$ ). Linolenic acid 첨가구가 다른 불포화지방산에 비해 가스발생량이 적었으며 linolenic acid를 10% 첨가하였을 때가 가스발생량이 가장 적었다 ( $P<0.05$ ). 불포화지방산 처리구 모두 메탄생성량이 감소하였으며 oleic acid를 제외한 지방산 처리구에서는 첨가수준이 높을수록 메탄생성량이 감소하여, linolenic acid 10% 첨가구가 메탄생성량이 가장 낮았다 ( $P<0.05$ ).  $H_2$  가스는 대조구와 지방산 처리구 사이에 차이가 없이 비슷하였다.

지방에 의한 메탄의 감소는 여러 기작에 의한 것이다. 여기에는 불포화지방산의 가수소반응(biohydrogenation), propionate 생성 증가 그리고 프로토조아(protozoa)의 억제 등이 있다. 반추위내에서  $H_2$ 는 주로  $CO_2$ 의  $CH_4$ 으로의 환원(48%), VFA 합성(33%), 그리고 박테리아 세포 합성(12%)에 이용되며 불포화지방산의 가수소반응에 이용되는  $H_2$ 의 양은 전체  $H_2$ 의 1% 밖에 되지 않기 때문에 지방의 가수소반응에 의한 메탄생성 감소는 충분히 설명되지 못한다(Czerkawski, 1986). Henderson(1973)에 따르면 지방은 propionate 생성에 기여하는 그람음성균에 영향을 끼치지 않는다고 보고하였는데, 이는 지방첨가에 의한 propionate 생

성 증가가 미생물의 작용이 아닌 다른 요인에 의한 것임을 설명하는 것으로 보인다. 또한 지방은 반추위내 ciliate protozoa의 수를 감소시킨다. ciliate protozoa에는 methanogens이 부착되어 있는 것을 볼 수 있는데, 이들 ciliate protozoa에 부착하여 살고 있는 methanogens은 전체 반추위 메탄발생량의 37%를 차지한다고 한다 (Hegarty, 1999). Galbraith 등(1971)은 지방산이 미생물 세포벽에 흡착되어 필수 영양소의 통과를 방해하기 때문에 유해하다고 보고하였다.

지방은 또한 유기물과 조섬유의 소화를 떨어뜨리는데(Zinn, 1989), 이것은 발효될 수 있는 기질의 양이 줄어 메탄생성의 기질도 감소하는 것이므로 결국 메탄이 감소하게 된다.

Table 9. Effects of unsaturated fatty acids on *in vitro* CH<sub>4</sub> production and fermentation

	Control	Oleic acid		Linoleic acid		Linolenic acid		SEM <sup>1</sup>
		5%	10%	5%	10%	5%	10%	
Digestibility, %	54.9 <sup>a</sup>	49.6 <sup>ab</sup>	51.0 <sup>ab</sup>	45.2 <sup>bc</sup>	42.0 <sup>c</sup>	46.9 <sup>bc</sup>	40.7 <sup>c</sup>	2.04
pH	6.40	6.41	6.42	6.40	6.42	6.48	6.52	0.03
VFA, mM								
acetate	33.4	40.2	45.0	45.3	45.3	38.5	45.5	3.10
propionate	10.8 <sup>c</sup>	13.0 <sup>bc</sup>	14.6 <sup>ab</sup>	14.4 <sup>abc</sup>	15.2 <sup>ab</sup>	13.0 <sup>bc</sup>	17.5 <sup>a</sup>	1.12
isobutyrate	0.7	0.8	0.9	1.1	0.9	0.8	0.9	0.09
butyrate	6.9 <sup>b</sup>	8.7 <sup>ab</sup>	9.6 <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	8.3 <sup>ab</sup>	10.5 <sup>a</sup>	0.76
isovalerate	1.3 <sup>b</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	1.7 <sup>ab</sup>	1.9 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	1.8 <sup>a</sup>	0.13
valerate	1.0	1.3	1.4	1.5	1.5	1.2	1.5	0.11
Total VFA	54.1	65.4	73.3	74.6	74.9	63.2	77.7	5.27
A/P	3.1 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>a</sup>	3.0 <sup>bc</sup>	3.0 <sup>c</sup>	1.5 <sup>d</sup>	0.04
Total gas, ml	98.1 <sup>ab</sup>	96.3 <sup>ab</sup>	95.5 <sup>cd</sup>	98.6 <sup>a</sup>	93.9 <sup>d</sup>	93.5 <sup>d</sup>	90.0 <sup>e</sup>	0.68
CH <sub>4</sub> , mM	6.4 <sup>a</sup>	6.0 <sup>b</sup>	5.8 <sup>b</sup>	6.1 <sup>b</sup>	5.4 <sup>c</sup>	5.1 <sup>d</sup>	4.7 <sup>e</sup>	0.08
H <sub>2</sub> , mM	0.15	0.16	0.16	0.16	0.15	0.15	0.15	0.003

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c,d,e</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly (P<0.05)



Figure 5는 배양시간에 따른 메탄생성량을 나타낸 것이다. 배양후 6시간에는 대조구와 처리구간에 차이가 없다가 12시간부터 linolenic acid가 메탄생성이 줄면서 메탄생성이 가장 낮았고, 24시간부터는 대조구와 oleic acid 처리구, linoleic acid 5% 처리구간에 비슷하였으며 linoleic 10% 처리구와 linolenic 처리구에서 메탄생성량이 줄어들었다.

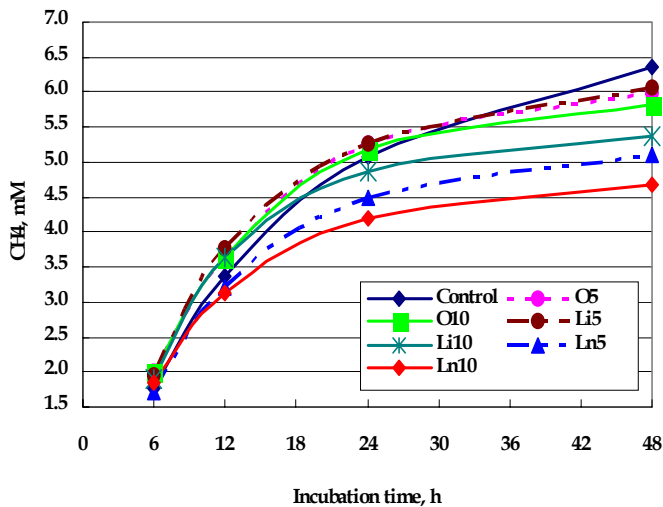


Figure 5. Effects of unsaturated fatty acids on CH<sub>4</sub> production. O, oleic acid; Li, linoleic acid; Ln, linolenic acid; 5, 10, supplementation level of fatty acids(%)

## 2) 항생제가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

48시간 배양후 건물소화율을 보면, monensin과 nisin 10ppm 처리는 대조구에 비해 건물소화율을 감소시켰으며, pH는 증가시켰다 (P<0.05) (Table 10).

휘발성지방산을 보면, nisin 처리는 VFA 생성에 영향을 주지 않았지만, monensin 처리는 propionate를 제외한 VFA의 생성을 감소시켰으며 (P<0.05) 유의적인 차이는 없지만 첨가수준이 높을수록 감소하였다. monensin 처리는

acetate는 감소시키고 propionate는 증가시켜 A/P 비율이 3.8~4.4로 대조구보다 낮았다. 전체 가스발생량도 마찬가지로 monensin 처리는 가스발생량을 유의적으로 감소시켰으며, 첨가수준이 높을수록 가스발생량을 감소시켰으나 ( $P<0.05$ ), nisin은 대조구와 차이가 없었다. CH<sub>4</sub> 가스도 가스발생량과 마찬가지로 monensin 처리에 의해 감소하였고, 첨가수준이 높을수록 감소하였으나 nisin은 영향을 주지 않았다. H<sub>2</sub> 가스의 생성량도 monensin 처리에 의해 감소하였으나 nisin은 영향을 주지 않았다.

Table 10. Effects of monensin and nisin on *in vitro* CH<sub>4</sub> production and fermentation

	Control	Monensin		Nisin		SEM <sup>1</sup>
		5ppm	10ppm	5ppm	10ppm	
Digestibility, %	44.3 <sup>a</sup>	34.3 <sup>c</sup>	33.3 <sup>c</sup>	42.0 <sup>ab</sup>	40.8 <sup>b</sup>	1.02
pH	6.5 <sup>d</sup>	6.7 <sup>b</sup>	6.7 <sup>a</sup>	6.5 <sup>d</sup>	6.6 <sup>c</sup>	0.004
VFA, mM						
acetate	49.4 <sup>a</sup>	37.5 <sup>bc</sup>	31.4 <sup>c</sup>	47.9 <sup>a</sup>	44.6 <sup>ab</sup>	2.39
propionate	7.9	8.8	8.2	7.5	7.0	0.52
isobutyrate	0.4 <sup>a</sup>	0.1 <sup>b</sup>	0.1 <sup>b</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.04
butyrate	7.5 <sup>a</sup>	4.6 <sup>b</sup>	4.1 <sup>b</sup>	6.5 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	0.51
isovalerate	0.6 <sup>a</sup>	0.3 <sup>c</sup>	0.3 <sup>c</sup>	0.5 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.02
valerate	0.5 <sup>a</sup>	0.2 <sup>b</sup>	0.2 <sup>b</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	0.06
Total VFA	66.3 <sup>a</sup>	51.6 <sup>bc</sup>	44.3 <sup>c</sup>	63.2 <sup>a</sup>	59.5 <sup>ab</sup>	3.38
A/P	6.2 <sup>a</sup>	4.2 <sup>b</sup>	3.8 <sup>c</sup>	6.4 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>	0.06
Total gas, ml	79.4 <sup>b</sup>	56.4 <sup>c</sup>	54.4 <sup>d</sup>	80.1 <sup>ab</sup>	81.1 <sup>a</sup>	0.41
CH <sub>4</sub> , mM	6.0 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	2.2 <sup>c</sup>	6.0 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>	0.05
H <sub>2</sub> , mM	0.13 <sup>a</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.003

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c,d</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly ( $P<0.05$ )

Figure 6에서 보는 바와 같이 배양 초기부터 monensin 처리구가 뚜렷하게 메탄생성량이 적었으며 nisin 처리에 의해서는 메탄생성이 억제되지 않고 대조구와 비슷하였다.

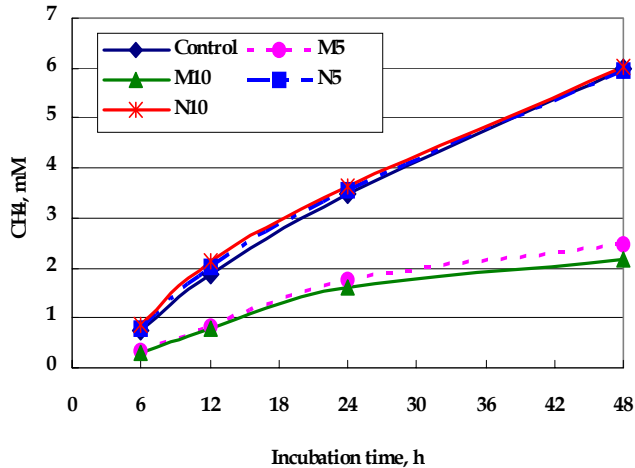


Figure 6. Effects of monensin and nisin on CH<sub>4</sub> production. [M, monensin; N, nisin; 5, 10, supplementation level of monensin and nisin(ppm)].

성장촉진제로써 또는 산중독증을 막기 위해 반추동물 사료에 사용되는 항생제와 ionophores 중 상당수가 메탄 발생에 영향을 미쳤다 (Van Nevel과 Demeyer, 1992). 이들의 메탄발생에 미치는 영향은 일정하지 않아, 감소시키거나 증가시켰다. 그러나, 그람양성균에 작용하는 것으로 알려진 avoparcin 그리고 ionophores는 메탄발생 억제효과가 분명하였으며 동시에 VFA 생성 형태가 acetate와 butyrate는 줄고 propionate는 증가하는 방향으로 변화되었다.

비육우에 널리 사용되고 있는 ionophore계 항생제 monensin은 메탄발생량을 약 25%까지 감소시켰다(Wedegaertner과 Johnson, 1983). Van Nevel과 Demeyer(1977)는 *in vitro* 연구를 통해 monensin이 반추위 메탄생성균에 직접적으로 독성이 있는 것이 아니고 formate lyase에 의해 formate가 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>으로 전변시키는 미생물을 억제하는 것이라고 보고하였다.

Ionophore계 항생제에 대한 미생물들의 반응은 종에 따라 다르다. 따라서 ionophore계 항생제에 의한 반추위 발효 변화는 미생물 군집이 ionophore에 대해

저항성이 있는 미생물 군집으로 바뀌기 때문일 것이고 이들 군집은 propionate를 더 생산하는 경향이 있는 것이다 (Henderson 등, 1981). 그러나 불행하게도 monensin과 lasalocid에 의한 메탄생성 억제효과가 오래 지속되지 못했다. Johnson 등(1991)은 monensin을 처리한지 약 2주후에 대조구와 메탄발생량이 비슷하게 되었다고 보고하였다. 그렇지만 ionophore에 의해 바뀐 VFA 생성비율은 사양시험이 끝날 때까지 지속되었다고 보고되었다 (Richardson 등, 1976). 비육우에서 ionophore계 항생제에 의해 항상 체중이 증가하지는 않지만 대개 사료섭취량이 감소하여 사료효율은 향상된다.

### 3) 금속산화물이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

MnO<sub>2</sub>와 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>는 대조구보다 건물소화율을 감소시켰으며 (P<0.05) 첨가수준이 높을수록 건물소화율이 감소하였다 (Table 11). pH는 대조구와 처리구간에 유의적인 차이가 없었다. VFA의 생성량을 보면 금속산화물의 종류와 첨가수준이 VFA 생성량에는 영향을 주지 않았다 (P>0.05). A/P 비율은 KMnO<sub>4</sub> 처리에 의해 감소하였고 (P<0.05), MnO<sub>2</sub> 500ppm 처리에 의해서는 증가하였다 (P<0.05).

전체 가스발생량은 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 500ppm 처리구를 제외한 나머지 금속산화물 처리구에서 가스발생량이 감소하였으며(P<0.05), MnO<sub>2</sub>와 KMnO<sub>4</sub>는 처리수준이 높을수록 감소하였다 (P<0.05). 메탄발생량을 보면 대조구와 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 처리구는 비슷하였고 MnO<sub>2</sub>와 KMnO<sub>4</sub> 처리구는 메탄가스 발생량을 감소시켰으며 처리수준이 높을수록 감소하였다 (P<0.05). H<sub>2</sub>가스의 발생량도 MnO<sub>2</sub>와 KMnO<sub>4</sub> 처리에 의해 감소하였다 (P<0.05).

Table 11. Effect of metallic oxides on *in vitro* ruminal fermentation and CH<sub>4</sub> production

	Control	MnO <sub>2</sub>		KMnO <sub>4</sub>		Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		SEM <sup>1</sup>
		(ppm)		(ppm)		(ppm)		
		500	1000	500	1000	500	1000	
Digestibility, %	62.1 <sup>b</sup>	50.0 <sup>e</sup>	43.4 <sup>f</sup>	68.6 <sup>a</sup>	59.3 <sup>bc</sup>	56.1 <sup>cd</sup>	53.0 <sup>de</sup>	1.79
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	0.05
VFA, mM								
acetate	39.2	41.5	40.8	39.7	35.9	41.8	38.9	1.35
propionate	11.3	11.7	11.9	12.2	13.4	12.0	11.1	0.45
isobutyrate	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	0.01
butyrate	5.7	6.0	5.8	5.6	5.3	6.0	5.6	0.19
isovalerate	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.03
valerate	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	30.03
Total VFA	58.3	61.4	60.7	59.6	56.9	62.0	57.7	2.04
A/P	3.5 <sup>bc</sup>	3.6 <sup>a</sup>	3.4 <sup>c</sup>	3.3 <sup>d</sup>	2.7 <sup>e</sup>	3.5 <sup>bc</sup>	3.5 <sup>ab</sup>	0.02
Total gas, ml	89.1 <sup>a</sup>	82.8 <sup>c</sup>	76.8 <sup>d</sup>	83.2 <sup>c</sup>	73.4 <sup>e</sup>	88.9 <sup>a</sup>	87.0 <sup>b</sup>	0.44
CH <sub>4</sub> , mM	5.0 <sup>a</sup>	4.5 <sup>c</sup>	3.8 <sup>d</sup>	4.6 <sup>c</sup>	3.6 <sup>e</sup>	5.0 <sup>ab</sup>	4.9 <sup>b</sup>	0.04
H <sub>2</sub> , mM	0.13 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.10 <sup>c</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.003

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c,d,e,f</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly (P<0.05)

#### 4) 유기산이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

Fumarate와 malate 처리는 건물소화율을 감소시키는 경향이 보이긴 하였지만 유의적인 차이는 없었다 (Table 12). pH는 fumarate와 malate 처리에 의해 증가하였으며, 첨가수준이 높을수록 증가하였다 (P<0.05).

휘발성지방산을 살펴보면, total VFA, acetate, butyrate, isobutyrate 그리고 isovalerate 농도는 fumarate와 malate 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나

propionate 농도는 유기산 처리에 의해 증가하였으며 처리수준간에는 차이가 없었다. propionate 농도의 증가와 함께 A/P 비율은 fumarate와 malate 처리에 의해 감소하였고 처리수준이 높을수록 A/P 비율은 더 감소하였다 ( $P<0.05$ ).

Table 12. Effects of organic acids on *in vitro* CH<sub>4</sub> production and fermentation

	Control	Fumarate		Malate		SEM <sup>1</sup>
		5mM	10mM	5mM	10mM	
Digestibility, %	46.1	44.8	43.3	42.8	42.8	1.15
pH	6.63 <sup>d</sup>	6.66 <sup>c</sup>	6.69 <sup>b</sup>	6.66 <sup>c</sup>	6.70 <sup>a</sup>	0.002
VFA, mM						
acetate	38.2	38.9	36.6	39.0	39.2	1.77
propionate	7.8 <sup>b</sup>	10.7 <sup>a</sup>	11.6 <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>	12.1 <sup>a</sup>	0.76
isobutyrate	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.01
butyrate	6.6	6.1	5.6	6.5	6.6	0.28
isovalerate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.03
valerate	0.5 <sup>b</sup>	0.5 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.6 <sup>ab</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.03
Total VFA	53.9	57.0	55.0	57.2	59.2	2.81
A/P	4.9 <sup>a</sup>	3.7 <sup>b</sup>	3.2 <sup>c</sup>	3.8 <sup>b</sup>	3.3 <sup>c</sup>	0.10
Total gas, ml						
CH <sub>4</sub> , mM	73.3 <sup>d</sup>	78.1 <sup>bc</sup>	78.9 <sup>ab</sup>	76.7 <sup>c</sup>	80.1 <sup>a</sup>	0.51
H <sub>2</sub> , mM	3.0 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	2.9 <sup>ab</sup>	2.6 <sup>c</sup>	0.06
H <sub>2</sub> , mM	0.11	0.12	0.11	0.11	0.11	0.002

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c,d</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly ( $P<0.05$ )

전체 가스발생량은 유기산 처리에 의해 증가하였으며 ( $P<0.05$ ), malate 처리구는 처리수준이 높을수록 증가하였다 ( $P<0.05$ ). 메탄발생량을 살펴보면 fumarate와 malate의 처리수준이 5mM일 때에는 메탄발생량이 대조구와 차이나지 않았지만 처리수준이 10mM일 때에는 메탄발생량이 감소하였다 ( $P<0.05$ ). Malate 10mM 처리구에서 메탄발생량이 가장 낮았다. H<sub>2</sub> 가스의 발생량은 유기산 처리에 의한 차이가 없었다. Figure 7에서 보는 바와 같이 배양후 12시간

까지 대조구와 처리구간에 메탄발생량이 비슷하였으나, 12시간 이후로 fumarate와 malate 10mM 처리구에서 점차 메탄생성이 줄어들었다.

유기산 제제는 최근에 항생제를 대체하기 위한 물질로써 부각되기 시작했다. 항생제는 반추위 미생물과 동물이 내성을 갖게 되고, 축산물에 잔류할 수 있는 문제점이 있어 항생제 대체물질 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다. 유기산 제제는 ionophore계 항생제처럼 lactate와 메탄의 감소, propionate 생성의 증가 그리고 이로 인한 사료효율 향상 등의 효과가 있어 항생제를 대체할 수 있을 것이다 (Russell과 Strobel, 1989).

앞에서 메탄 발생의 억제는 보통 propionate 생성의 증가가 동반되는 것을 볼 수 있었다. 이런 메탄과 propionate간의 역의 관계를 이용하여 propionate의 전구 물질인, fumarate나 malate를 이용하여 propionate 생성을 증가시켜 메탄을 억제하고자 하였다.

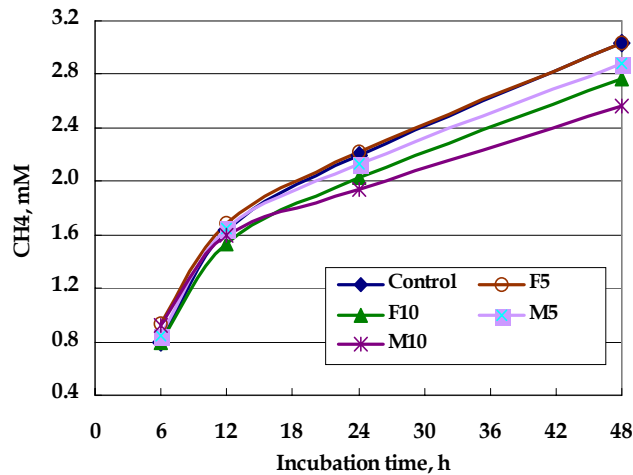


Figure 7. Effects of organic acids on CH<sub>4</sub> production. [F, fumarate; Ma, malate; 5, 10, supplementation level of organic acids(mM)].

## 6) Essential oil이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

Essential oil 첨가는 pH를 증가시켰으며, 기질 조성에 상관없이 essential oil의 첨가수준이 증가할수록 pH가 증가하였다 ( $P<0.01$ ) (Table 13).  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도는 농후사료 수준이 높은 곳이 높았으며, essential oil의 첨가수준이 증가할수록 감소하였다 ( $P<0.01$ ). acetate, propionate, isobutyrate, isovalerate, valerate 그리고 total VFA의 농도도  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도와 비슷한 경향을 보였으나, butyrate와 acetate:propionate ratio는 essential oil의 처리수준에 따른 차이는 없었다.

Table 13. Effect of essential oil and level of concentrate on *in vitro* methane production and fermentation

	High concentrate			Low concentrate			SEM <sup>1</sup>	Significance <sup>2</sup>		
	0	1%	10%	0	1%	10%		E	C	E×C
pH	6.61	6.63	6.66	6.68	6.70	6.75	0.01	**	**	ns
$\text{NH}_3\text{-N}$ , mg/dl	32.6	33.1	29.0	30.2	29.8	25.3	0.86	**	**	ns
VFA, mM										
acetate	54.6	53.3	50.4	50.1	51.4	47.3	1.39	**	**	ns
propionate	14.5	14.1	14.2	13.8	14.1	12.0	0.41	**	**	**
isobutyrate	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1	0.9	0.04	**	**	ns
butyrate	12.0	11.7	11.4	8.5	8.7	8.3	0.32	ns	**	ns
isovalerate	2.3	2.3	2.0	2.0	2.1	1.7	0.07	**	**	ns
valerate	1.4	1.4	1.3	1.2	1.2	1.1	0.03	**	**	*
TVFA	86.0	84.0	80.3	76.7	78.6	71.4	2.19	**	**	ns
A/P	3.78	3.77	3.56	3.64	3.66	3.94	0.05	ns	ns	**
Total gas, ml	124.3	125.5	117.6	105.4	100.6	94.6	2.82	**	**	ns
$\text{CH}_4$ , mM	13.7	13.8	12.3	11.0	10.5	9.5	0.25	**	**	ns
$\text{H}_2$ , mM	0.22	0.22	0.23	0.19	0.19	0.18	0.01	ns	**	ns

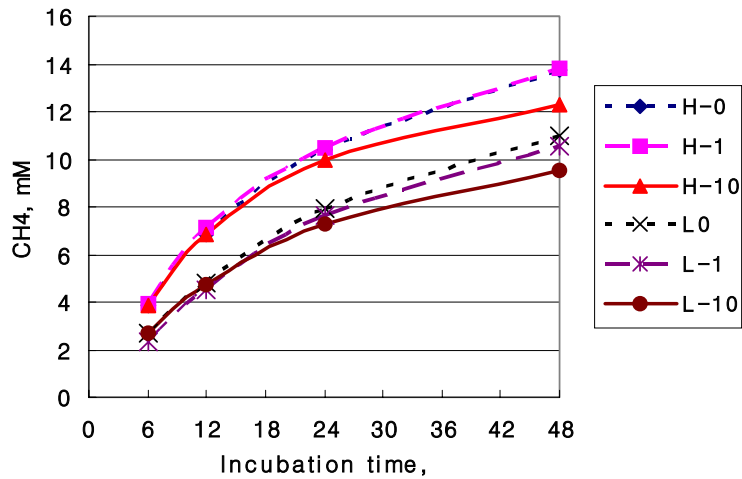
<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>2</sup>E, level of essential oil; C, level of concentrate; E×C, interaction of essential oil and concentrate; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; ns, not significant



전체 가스발생량과 메탄발생량도 마찬가지로 농후사료의 수준이 높을수록 높았으며, essential oil의 첨가수준이 높은 10%에서 감소하였다. 그러나, H<sub>2</sub> 발생량은 essential oil의 첨가수준에 따라 차이가 없었다.

배양시간에 따른 메탄발생량을 살펴보면, 배양초기부터 농후사료 수준이 높은 처리구가 메탄발생량이 높았으며, essential oil의 첨가수준간 차이는 배양후 12시간부터 나타나기 시작해서 배양시간이 길어질수록 그 차이가 점점 커졌다 (Figure 8). 배양시간에 따른 H<sub>2</sub> 발생량도 농후사료 수준이 높은 처리구에서 높았으며, 고농후사료에서 essential oil 10% 첨가구가 H<sub>2</sub> 발생량이 높았으나, 저농후사료에서는 essential oil 10% 첨가구가 H<sub>2</sub> 발생량이 낮아서 일정한 경향을 보이지 않았다.



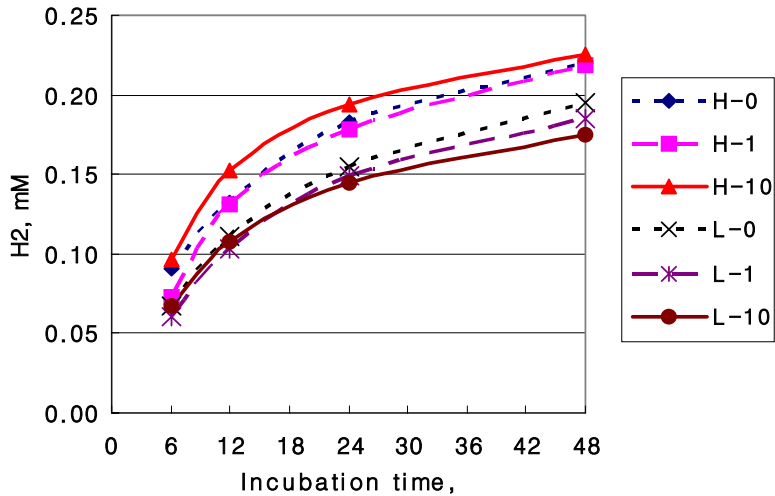


Figure 8. Effect of essential oil and level of concentrate on *in vitro* methane and H<sub>2</sub> production during 48h incubation. H, high level of concentrate; L, low level of concentrate; 0, 1 and 10, level of essential oil (%)

### 7) Lignosulfonate가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

배양 0시간에는 lignosulfonate의 첨가수준이 증가할수록 pH가 감소하였다 ( $P < 0.05$ ) (Table 14). 그 이후에는 lignosulfonate 1% 첨가구가 유의적으로 감소하였고 0.25%와 0.5% 첨가구는 대조구와 거의 차이가 없었다.

Lignosulfonate의 첨가는 배양초기 가스발생량을 증가시켰지만 배양시간이 길어질수록 처리구와 대조구 사이에 차이가 없었다 (Table 15).

3시간 배양후 메탄발생량은 lignosulfonate의 첨가수준에 따라 달랐다 (Table 16). Lignosulfonate 0.25% 첨가구는 메탄발생량이 대조구보다 높았으나, 1% 첨가구는 대조구보다 낮았고 ( $P < 0.05$ ), 첨가수준이 증가할수록 메탄발생량이 감소하였다 ( $P < 0.05$ ). 배양 6시간과 12시간후 lignosulfonate 1% 첨가구만 유의적으로 감소하였으나 ( $P < 0.05$ ), 첨가수준이 증가함에 따라 메탄발생량이 감소하는 경향이 있었다. 그리고 배양 24시간후에는 0.5%와 1% 첨가구에서 메탄발생량이 감소하였으며 ( $P < 0.05$ ), 역시 첨가수준이 증가함에 따라 메탄발생량이 감소하였다

( $P < 0.05$ ). 메탄발생량과는 반대로  $H_2$  발생량은 lignosulfonate 첨가에 의해 증가하였다 (Table 17). 배양 전반적으로 lignosulfonate 1% 첨가구에서  $H_2$  발생량이 가장 높았으며 ( $P < 0.05$ ), 첨가수준이 증가할수록  $H_2$  발생량이 증가하는 경향이 있었다.

Table 14. pH as influenced by lignosulfonate

Incubation time (h)	Control	Lignosulfonate			SEM <sup>1</sup>
		0.25%	0.5%	1%	
0	6.83 <sup>a</sup>	6.77 <sup>b</sup>	6.75 <sup>c</sup>	6.71 <sup>d</sup>	0.005
3	6.62 <sup>a</sup>	6.62 <sup>a</sup>	6.60 <sup>ab</sup>	6.59 <sup>b</sup>	0.010
6	6.53 <sup>a</sup>	6.52 <sup>a</sup>	6.52 <sup>a</sup>	6.49 <sup>b</sup>	0.008
12	6.42 <sup>a</sup>	6.42 <sup>ab</sup>	6.40 <sup>b</sup>	6.40 <sup>b</sup>	0.010
24	6.52 <sup>a</sup>	6.51 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	6.46 <sup>b</sup>	0.012

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c,d</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ )

Table 15. Gas production as influenced by lignosulfonate (ml)

Incubation time (h)	Control	Lignosulfate			SEM <sup>1</sup>
		0.25%	0.5%	1%	
3	18.2 <sup>b</sup>	19.6 <sup>a</sup>	19.5 <sup>a</sup>	18.9 <sup>ab</sup>	0.43
6	31.4 <sup>b</sup>	33.4 <sup>a</sup>	32.5 <sup>ab</sup>	31.0 <sup>b</sup>	0.68
12	40.1 <sup>b</sup>	42.5 <sup>ab</sup>	43.8 <sup>a</sup>	43.2 <sup>ab</sup>	1.21
24	51.4	53.62	53.39	53.34	0.92

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ )

Table 16. CH<sub>4</sub> production as affected by lignosulfonate (mM)

Incubation time (h)	Control	Lignosulfate			SEM <sup>1</sup>
		0.25%	0.5%	1%	
3	1.1 <sup>b</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	0.5 <sup>c</sup>	0.08
6	3.1 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	1.2 <sup>b</sup>	0.26
12	5.5 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>	0.22
24	8.6 <sup>a</sup>	8.7 <sup>a</sup>	7.7 <sup>b</sup>	5.5 <sup>c</sup>	0.29

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly (P<0.05)

Table 17. H<sub>2</sub> production as affected by lignosulfonate (mM)

Incubation time (h)	Control	Lignosulfate			SEM
		0.25%	0.5%	1%	
3	0.05 <sup>c</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.008
6	0.07 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.069
12	0.09 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.13 <sup>b</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.081
24	0.08 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.056

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly (P<0.05)

## 8) 한약재가 메탄생성과 발효에 미치는 영향

pH는 계피(cinnamon) 첨가구가 6.47로 가장 높았으며, 감초 (licorice root) 첨가구가 6.45로 가장 낮았다 ( $P<0.05$ ) (Table 18).  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도는 처리구간에 차이가 없었다.

acetate와 propionate의 농도는 정향 (clove) 첨가구만 각각 56.3mM, 17mM로 가장 낮았으며 ( $P<0.05$ ), 다른 처리구간에는 대조구와 차이가 없었다. isobutyrate는 계피 첨가구가 가장 높았으며 ( $P<0.05$ ), 감초 첨가구가 가장 낮았고 ( $P<0.05$ ), 그 이외의 처리구간에는 차이가 없었다. butyrate는 감초, 산초 (Chinese pepper) 그리고 정향 첨가구에서 대조구보다 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ). Total VFA의 농도는 정향 첨가구만 유의적으로 낮았고 ( $P<0.05$ ), 나머지 처리구간에는 차이가 없었다. 반대로 acetate:propionate ratio는 정향 첨가구만 대조구보다 높았다 ( $P<0.05$ ). 전체 가스발생량은 정향 첨가구만 대조구보다 낮았고 ( $P<0.05$ ), 나머지 처리구는 대조구와 차이가 없었다. 메탄발생량은 결명자 (Cassia tora) 첨가구가 가장 낮았지만 대조구와 유의적인 차이가 없었다.  $\text{H}_2$  발생량은 대조구와 처리구간에 차이가 없었다.

Table 18. Effect of Chinese herb on *in vitro* methane production and fermentation

	Control	Chinese herb <sup>1</sup>					SEM <sup>2</sup>
		Ct	Ci	Lr	Cp	Cl	
pH	6.45 <sup>ab</sup>	6.47 <sup>ab</sup>	6.47 <sup>a</sup>	6.45 <sup>b</sup>	6.45 <sup>ab</sup>	6.46 <sup>ab</sup>	0.01
NH <sub>3</sub> -N, mg/100ml	19.28	19.28	19.20	18.87	19.27	19.50	0.30
VFA, mM							
acetate	61.6 <sup>a</sup>	61.8 <sup>a</sup>	62.0 <sup>a</sup>	59.1 <sup>ab</sup>	58.3 <sup>ab</sup>	56.3 <sup>b</sup>	1.88
propionate	19.0 <sup>a</sup>	19.5 <sup>a</sup>	19.0 <sup>a</sup>	18.1 <sup>ab</sup>	17.8 <sup>ab</sup>	17.0 <sup>b</sup>	0.65
isobutyrate	1.4 <sup>b</sup>	1.3 <sup>bc</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.2 <sup>c</sup>	1.3 <sup>bc</sup>	1.2 <sup>bc</sup>	0.05
butyrate	8.6 <sup>ab</sup>	8.7 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>	7.9 <sup>bc</sup>	7.9 <sup>bc</sup>	7.6 <sup>c</sup>	0.27
isovalerate	2.5 <sup>b</sup>	2.6 <sup>ab</sup>	2.8 <sup>a</sup>	2.3 <sup>b</sup>	2.4 <sup>b</sup>	2.4 <sup>b</sup>	0.13
valerate	1.7 <sup>ab</sup>	1.7 <sup>ab</sup>	1.9 <sup>a</sup>	1.6 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	0.06
TVFA	94.7 <sup>a</sup>	95.6 <sup>a</sup>	96.0 <sup>a</sup>	90.1 <sup>ab</sup>	89.2 <sup>ab</sup>	86.0 <sup>b</sup>	2.97
A/P	3.2 <sup>bc</sup>	3.2 <sup>c</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>a</sup>	0.02
Total gas, ml	36.4 <sup>ab</sup>	35.7 <sup>abc</sup>	36.8 <sup>a</sup>	35.0 <sup>abc</sup>	34.5 <sup>bc</sup>	34.2 <sup>c</sup>	0.74
CH <sub>4</sub> , mM	4.5 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>b</sup>	5.0 <sup>a</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	0.23
H <sub>2</sub> , mM	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.005

<sup>1</sup>Ct, Cassia tora; Ci, cinnamon; Lr, licorice root; Cp, Chinese pepper; Cl, clove

<sup>2</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly (P<0.05)

### 8) 할로젠 화합물이 메탄생성과 발효에 미치는 영향

할로젠 화합물 BES가 건물소화율을 감소시키는 경향을 보였지만 대조구와 유의적인 차이는 없었고, PMDI도 건물소화율에 영향을 주지 않았다 (Table 19). pH는 처리구간에 크게 차이는 없지만 할로젠 화합물 처리에 의해 증가하였다 ( $P < 0.05$ ).

휘발성지방산을 살펴보면, total VFA의 양은 BES와 PMDI 처리에 의해 증가하였다 ( $P < 0.05$ ). 할로젠화합물이 acetate의 농도에는 영향을 주지 않았으나, propionate, butyrate 그리고 valerate의 농도는 증가시켰으며, A/P 비율은 감소시켰다 ( $P < 0.05$ ). 휘발성지방산에서 할로젠화합물의 종류와 첨가수준에 따른 차이는 없었다.

Table 19. Effects of halogen compounds on *in vitro* CH<sub>4</sub> production and fermentation

	Control	BES		PMDI		SEM <sup>1</sup>
		15μM	30μM	5ppm	10ppm	
Digestibility, %	54.9	49.6	50.7	53.7	53.4	1.34
pH	6.40 <sup>c</sup>	6.42 <sup>ab</sup>	6.42 <sup>ab</sup>	6.44 <sup>a</sup>	6.41 <sup>bc</sup>	0.01
VFA, mM						
acetate	33.4	39.6	44.1	40.6	40.4	3.00
propionate	10.8 <sup>b</sup>	17.9 <sup>a</sup>	18.1 <sup>a</sup>	18.7 <sup>a</sup>	19.6 <sup>a</sup>	1.26
isobutyrate	0.7	0.8	0.9	0.8	0.8	0.07
butyrate	6.9 <sup>b</sup>	10.5 <sup>a</sup>	10.7 <sup>a</sup>	12.2 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>	0.80
isovalerate	1.3	1.5	1.6	1.5	1.5	0.13
valerate	1.0 <sup>b</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	0.10
Total VFA	54.1 <sup>b</sup>	71.7 <sup>a</sup>	76.9 <sup>a</sup>	75.4 <sup>a</sup>	76.7 <sup>a</sup>	4.99
A/P	3.1 <sup>a</sup>	2.2 <sup>b</sup>	2.4 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	2.1 <sup>b</sup>	0.15
Total gas, ml	98.1 <sup>a</sup>	93.0 <sup>c</sup>	91.1 <sup>d</sup>	96.3 <sup>b</sup>	99.3 <sup>a</sup>	0.45
CH <sub>4</sub> , mM	6.4 <sup>a</sup>	0.2 <sup>c</sup>	0.1 <sup>c</sup>	0.6 <sup>b</sup>	0.2 <sup>c</sup>	0.05
H <sub>2</sub> , mM	0.15 <sup>d</sup>	2.70 <sup>c</sup>	2.54 <sup>c</sup>	3.06 <sup>b</sup>	3.69 <sup>a</sup>	0.10

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b,c,d</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ )

전체 가스발생량을 살펴보면, BES 처리구는 처리수준이 증가함에 따라 감소하였지만 ( $P < 0.05$ ), PMDI의 경우 5ppm 처리구는 가스발생량이 감소하였으나, 10ppm 처리구는 증가하여 처리수준에 따른 경향이 나타나지 않았다. 메탄발생량을 살펴보면 BES와 PMDI 처리에 의해 메탄발생량이 현저하게 감소하였고 ( $P < 0.05$ ), PMDI는 첨가수준이 높을수록 메탄발생량이 감소하였다 ( $P < 0.05$ ).

반면에  $H_2$  가스는 BES와 PMDI 처리에 의해 증가하였다. PMDI 처리구가 BES 처리구보다  $H_2$  가스의 발생량이 높으며, 첨가수준이 높을수록  $H_2$ 의 발생량이 증가하였다. Figure 9는 배양시간에 따른 메탄과  $H_2$  가스의 생성을 나타낸 것으로, 배양 초기부터 할로젠화합물에 의해 뚜렷하게 메탄생성이 억제되고  $H_2$  가스의 발생량도 증가하는 것을 볼 수 있다.

Bauchop(1967)은 chloroform( $CHCl_3$ ), carbon tetrachloride( $CCl_4$ ) 및 methylene chloride( $CH_2Cl_2$ )가 메탄생성을 억제하는 물질임을 발견하였다. 그 후에 진행된 연구들에 의하면 chloral hydrate, methylene bromide, di- 와 trichloroacetamide, bromochloromethane, hemi-acetal of chloral and starch (HCS), trichloroethyl adipate 와 -pivalate 등의 할로젠 화합물도 메탄억제 효과가 있었다.

또한 coenzyme-M의 Br 유사체인 2-bromoethanesulfonic acid(BES)도 methyl coenzyme-M reductase를 억제함으로써 메탄생성을 억제한다고 보고된 바 있다(Balch와 Wolfe, 1979). 그러나 위의 할로젠화 화합물 중에는 실제 동물에게 급여할 수 없는 것도 있으며, 장기간 동물에게 급여하였을 때, 반추위 미생물이 이들 화합물에 적응하거나 분해를 하여 메탄억제효과가 점차 감소되었다(Cole과 McCroskey, 1975). 이 외에도 할로젠화 화합물에 의한 메탄생성 억제는 반추위내 수소 축적 (Table 15), 기질의 이용성과 미생물체 단백질 합성의 감소, 사료섭취량 감소의 문제를 갖고 있음을 고려해야 한다.



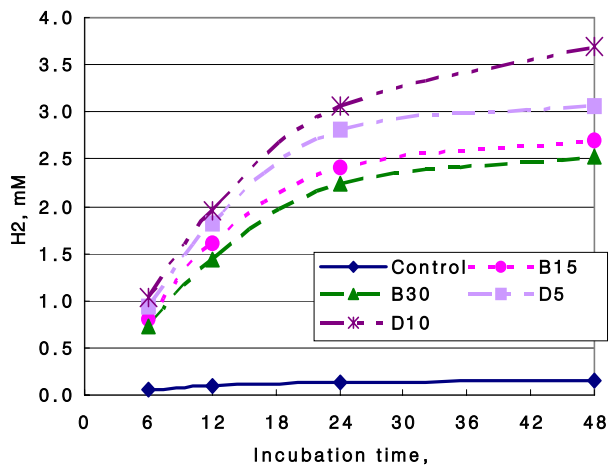
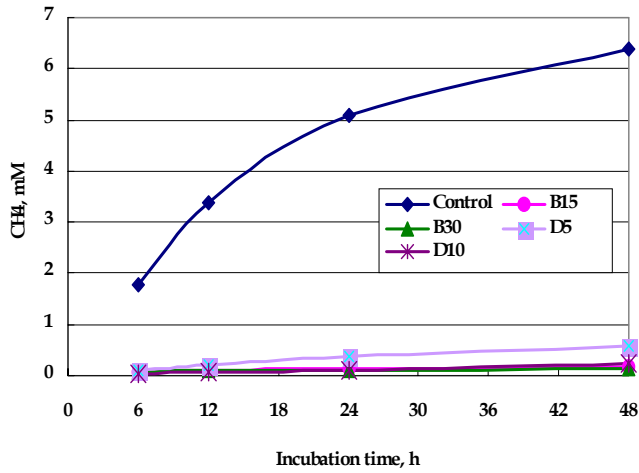


Figure 9. Effects of halogen compounds on CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> production. [B, BES; D, PMDI; 15, 30, supplementation level of BES(μM); 5, 10, supplementation level of PMDI(ppm)].

본 실험을 통해 할로겐 화합물이 가장 메탄생성을 억제하였음을 알 수 있었다. 그러나 메탄생성이 억제되면서 H<sub>2</sub>가 축적되었는데, 이는 반추위내 미생물 대사의 진행을 막아 동물의 소화율과 생산성을 감소시킬 수 있다. 따라서 할로

겐 화합물로 메탄생성을 억제하려면 축적될 수 있는 H<sub>2</sub>를 줄일 수 있는 물질이 함께 사용되어야 할 것이다.

### 9) 할로젠 화합물과 불포화지방산 또는 유기산과의 복합처리가 메탄생성에 미치는 영향

건물소화율을 살펴보면, BES 복합처리구가 PMDI 복합처리구보다 소화율이 높게 나타났다 ( $P < 0.01$ ) (Table 20). 그리고, 유기산 처리구가 지방산 처리구보다 소화율이 높고 ( $P < 0.01$ ), linolenic acid 처리구보다는 linoleic 처리구의 소화율이 더 높다 ( $P < 0.01$ ). pH는 fumarate와 malate 처리구간 비교에서 fumarate 처리구의 pH가 유의적으로 높게 나타났고 ( $P < 0.01$ ), 그 외의 처리구간 비교에서는 유의성이 없었다. PMDI+fumarate 처리구가 6.58로 pH가 가장 높았고, PMDI+malate 처리구가 6.36으로 가장 낮았다.

휘발성지방산을 살펴보면, BES와 유기산, 불포화지방산 복합처리구가 PMDI 복합처리구보다 total VFA의 농도가 높으며 ( $P < 0.01$ ), 유기산 처리구가 지방산 처리구보다 total VFA의 농도가 높게 나타났다 ( $P < 0.01$ ). BES+fumarate 처리구가 71.9mM로 가장 높고, BES+linolenic acid 처리구가 53mM로 가장 낮았다.

acetate의 molar proportion을 보면, BES 복합처리구가 PMDI 복합처리구보다 높으며 ( $P < 0.01$ ), 불포화지방산 처리구가 유기산 처리구보다 그리고 fumarate 처리구가 malate 처리구보다 acetate molar proportion이 높다 ( $P < 0.01$ ). propionate의 molar proportion은 유기산과 불포화지방산 처리구 사이에서 차이가 나타났는데, 유기산 처리구에서 propionate의 molar proportion이 높았다. butyrate의 molar proportion도 acetate와는 달리, PMDI 복합처리구가 BES 복합처리구보다 높으며 ( $P < 0.01$ ), fumarate 처리구보다 malate 처리구에서 높았다. 그리고 유기산 처리구보다 불포화지방산 처리구의 butyrate molar proportion이 높았다. A/P 비율은 propionate의 비율이 높은 유기산 처리구가 불포화지방산 처리구보다 낮았다.

Table 20. Effect of halogen compounds, organic acids and unsaturated fatty acids on *in vitro* CH<sub>4</sub> production and fermentation

	BES <sup>1</sup>						PMDI			Contrast <sup>3</sup>							
	F	M	LI	LN	F	M	LI	LN	SEM <sup>2</sup>	BES vs. PMDI	OA vs. FA	F vs. M	LI vs. LN	OA vs. FA	F vs. M	LI vs. LN	
Digestibility, %	54.9	56.8	52.9	52.4	53.6	55.3	52.0	34.1	1.58	**	**	ns	**	**	ns	**	**
pH	6.48	6.39	6.47	6.47	6.58	6.36	6.47	6.47	0.03	ns	ns	**	ns	ns	**	ns	ns
Total VFA, mM	71.9	70.5	57.6	53.0	60.0	61.0	54.9	57.6	1.69	**	**	ns	ns	**	ns	ns	ns
Molar proportion, %																	
acetate	53.4	51.3	56.1	56.2	51.0	48.8	54.2	53.0	0.33	**	**	**	ns	**	**	ns	ns
propionate	28.1	29.2	22.1	22.9	29.0	29.4	22.9	22.8	0.50	ns	**	ns	ns	**	ns	ns	ns
isobutyrate	1.4	1.3	1.5	1.5	1.3	1.2	1.4	1.6	0.02	**	**	ns	**	**	ns	**	**
butyrate	10.3	11.6	12.4	12.2	11.5	12.5	13.7	14.2	0.13	**	**	**	ns	**	**	ns	ns
isovalerate	1.7	1.7	1.9	1.8	1.6	1.7	1.7	1.9	0.03	*	**	*	ns	**	*	ns	ns
valerate	5.1	4.9	6.0	5.4	5.6	6.4	6.1	6.5	0.42	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A/P	1.9	1.8	2.5	2.5	1.8	1.7	2.4	2.3	0.05	**	**	*	ns	**	*	ns	ns
Total gas, ml	132.0	146.9	133.7	132.5	127.3	137.3	124.2	140.7	1.36	**	**	**	**	**	**	**	**
CH <sub>4</sub> , mM	5.0	5.4	5.2	5.3	2.6	2.4	2.4	3.2	0.19	**	**	ns	ns	ns	ns	*	*
H <sub>2</sub> , mM	1.6	1.4	2.1	1.7	3.2	3.3	4.0	5.1	0.14	**	**	**	ns	**	**	ns	*

<sup>1</sup>F, fumarate; M, malate; LI, linoleic acid; LN, linolenic acid; <sup>2</sup>SEM, standard error of means

<sup>3</sup>OA, organic acid; FA, fatty acid \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; ns, not significant

지금까지 메탄생성억제물질들의 메탄생성억제능력을 비교한 결과, 메탄생성을 억제하면서 건물소화율의 감소가 크지 않고 발효가 안정적으로 일어났던 메탄생성억제물질로는 할로겐화합물 BES, 유기산 fumarate와 malate 그리고 불포화지방산 linoleic acid가 있는데 그 중에서도 BES가 메탄생성억제능력이 가장 뛰어나다고 할 수 있다.

#### 4. 연속 발효조 실험을 통한 메탄생성억제제의 메탄발생량 및 기질 소화율, 발효성상에 미치는 영향

##### 가. 연구의 세부목표

선발된 메탄 생성 억제기술을 공시하여 연속발효조에서의 메탄 발생량 및 발효성상에 미치는 영향을 조사하였다.

##### 나. 연구 방법

1) 공시재료: 선발된 메탄 생성 억제제를 공시하여 발효조 (Figure 10) 2대를 동원하여 첨가구와 무첨가구로 나누어 실험을 수행하였다.

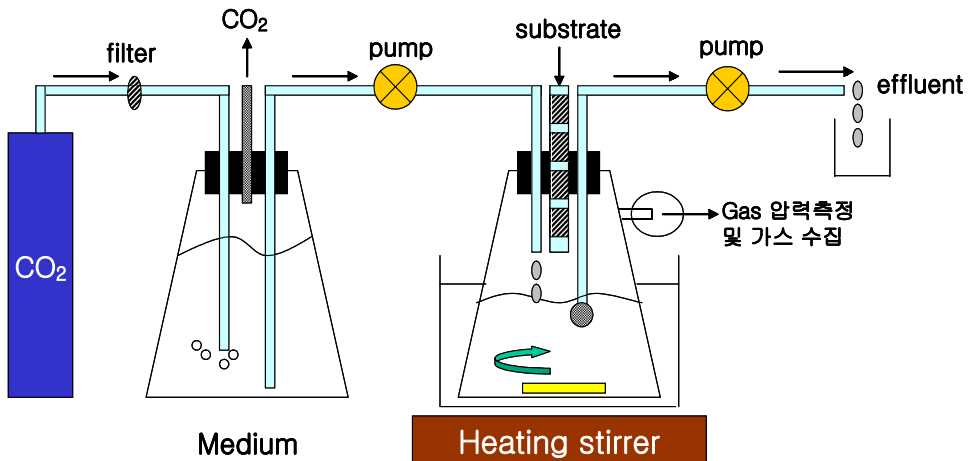


Figure 10. continuous culture

## 2) 연속발효조 조건

- ① 기질 : 12g/d (alfalfa : concentrate = 6 : 4)
- ② buffer : McDougall buffer (Table 5)
- ③ buffer flow rate : 50ml/h
- ④ 배양온도 : 39℃
- ⑤ 교반속도 : 25rpm

## 3) 배양방법

- ① 위액 채취 : 아침 사료 급여전에 캐놀라가 장착된 Holstein으로부터 채취하였고, 2겹의 cheese cloth로 걸렀으며 위액이 든 bottle을 39℃ water bath에 30분간 정치시켰다. 그러면 사료입자가 위로 뜨게 되는데 이들 사료입자를 제외한 나머지 부분을 배양할 때 사용하였다.
- ② 2L culture flask에 McDougall buffer 500ml와 위액 500ml를 넣고 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas로 bubbling 하였다.
- ③ 기질 12g을 culture flask에 넣었다. 이 때 분쇄한 알팔파와 농후사료를 6:4의 비율로 하였으며 기질은 배양시작 후 하루에 한번 24시간 간격으로 주었다.
- ④ Rubber stopper로 flask를 막고 가열교반기에 의해 39℃로 온도가 맞춰진 water bath에 넣고 25rpm 정도로 교반하면서 배양하였다.
- ⑤ buffer는 peristaltic pump에 의해 buffer bottle에서 flask로 시간당 50ml씩 들어가도록 하였다. 또한 peristaltic pump로 flask로부터 배양액을 시간당 50ml씩 나오도록 하였다.
- ⑥ 배양 후 2시간 간격으로 가스압력을 측정하고 가스를 vaccum container에 담아서 가스분석할 때까지 보관하였다.
- ⑦ 배양 후 4시간 간격으로 배양액의 pH를 측정하고 배양액을 원심분리하여 VFA 분석에 이용하였다. 또한 배양액을 가지고 methanogen의 군집 변화도 조사하였다.

## 4) 조사항목 및 분석방법

- ① gas production : 가스발생량은 발효조 상부에 설치되어 있는 gas 배출

구를 통해서 2시간 간격으로 측정하였다. 발효조 내부의 head space에 축적된 가스에 의해 생긴 가스압을 압력센서를 이용하여 측정하고 이를 부피로 환산하여 가스발생량을 구하였다.

② CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> : 가스 압력을 측정한 다음 7ml vacuum container에 보관하였다가 gas chromatography(Varian)를 이용해 CH<sub>4</sub>과 H<sub>2</sub>를 분석하였다.

③ pH : pH meter (Mettler Delta 340)로 측정하였다.

④ VFA : 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액 1ml을 eppendorf tube에 옮기고 25% metaphosphoric acid를 0.2ml씩 넣고 30분간 정치시켰다. 그 다음에 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.

⑤ methanogen 군집 변화 측정

메탄생성박테리아는 세포의 구조와 기관은 진핵생물과 비슷하나 세포벽에 peptidoglycan이 없는 특징을 가지고 있다. 또한 DNA 복제, 전사, 단백질합성에 관여하는 유전자들은 진핵생물의 유전자와 유사성을 지니고 있다. 반추위내 메탄 생성박테리아는 16S rDNA분석방법을 이용한 분류에 의하면 고세균(archaea bacteria)에 속한다. 16S rRNAs 분석방법에 따르면 메탄생성균주, 호열성균주(thermophiles) 및 호염성균주(halophiles)가 고세균에 포함된다. 16S rDNA 염기서열정보에 의하면 메탄생성 박테리아는 진핵생물과 Eubacteria와는 전혀 다른 염기서열을 지니고 있다. 따라서 PCR(polymerase chain reaction)과 RFLP(restriction fraction length polymorphism) 기법을 이용한 유전정보를 활용함으로써 반추위내 메탄생성박테리아의 양과 메탄생성억제제의 메탄생성 박테리아의 억제효과 및 사멸여부를 조사할 수 있다.

#### 7. 반추위액 채취 및 DNA 추출방법

시험에 사용할 반추위액은 연속배양장치에서 3일간 적응기간을 지난

후 4일째부터 분리하였다. 배양 4일 후 나일론필터를 사용하여 여과하고 남은 반추위액을 사용하였다. 반추위액내 포함되어 있는 고세균의 DNA는 Genomic DNA extraction kit(iNTRON)를 사용하여 추출하였다.

#### ㄴ. DNA 정량 분석

연속배양장치에서 3일간 적응기간을 마친 후 배양 후 12시간마다 배양액을 얻었다. 회수한 배양액은 Genomic DNA extraction kit(iNTRON)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 고세균특이 primer를 사용하여 PCR증폭을 마친 후, 1.5% agarose gel를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 젤상의 DNA를 정량하기 위하여 image analyzer(Biorad)을 이용하여 농도를 계산하였다.

#### ㄷ. PCR amplification

고세균의 16s rDNA 분석에 알맞은 두개의 universal primer를 제작하였다. 이들 primer의 염기서열은 1Af (5'-TCYGKTTGATCCYGSCRAG-3')와 1100Ar (5'-TGGGTCTCGCTGGTTG-3')로서 고세균의 16S rDNA에 이용되는 primer이다 (Whitford 등, 2001). PCR 증폭조건은 총 30cycle로 95℃에서 40초, 55℃에서 1분, 72℃에서 2분으로 반응시켰다. 반응 후 증폭된 DNA는 두개의 제한효소(Hha I/Hae III)로 절단후 절단부위의 길이에 따른 변이를 확인하기 위하여 3% metaphore agarose gel를 사용하여 DNA유형을 검사하였다.

### 다. 연구 결과

여러 가지 메탄생성억제제의 메탄생성억제 능력을 비교하여 가장 뛰어나다고 판단되는 BES를 연속발효조 실험에 공시하였으며 연속발효조 실험을 통해 batch culture보다 더욱 반추위 발효와 유사한 조건에서 BES의 메탄생성억제능력을 살펴보고자 하였다. 또한 BES 처리에 의한 메탄생성박테리아의 군집변화

도 살펴보았다.

pH는 대조구와 BES 처리구가 비슷하였다 (Table 21). 연속발효조는 계속적으로 pH 8인 McDougall buffer가 투입되므로 pH가 정상적인 반추위에서의 pH보다 높게 나타났을 것이다.

Total VFA와 acetate, propionate는 대조구와 BES 처리구간에 유의적인 차이가 없이 대조구가 높았으며, butyrate는 BES 처리구가 유의적으로 높았다 ( $P<0.05$ ). 또한, A/P 비율은 BES 처리구가 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

Table 21. Effect of BES (30 $\mu$ M/d) on 24h CH<sub>4</sub> production and fermentation in the continuous culture

	Control	BES	SEM <sup>1</sup>
pH	7.3	7.3	0.02
VFA, mM			
acetate	49.6	41.9	5.43
propionate	14.7	14.4	1.51
isobutyrate	1.1	1.0	0.11
butyrate	7.1 <sup>b</sup>	9.4 <sup>a</sup>	1.00
isovalerate	2.53	3.08	0.33
valerate	1.7	1.7	0.18
Total VFA	76.7	71.4	8.31
A/P	3.4 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	0.18
Total gas, ml/d	3499	3056	226.2
CH <sub>4</sub> , mM/d	24.7 <sup>a</sup>	17.6 <sup>b</sup>	1.88
H <sub>2</sub> , mM/d	0.2 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	1.02

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts in the same row differ significantly ( $P<0.05$ )

가스발생량은 대조구가 하루에 3499ml, BES 처리구가 3056ml로 BES 처리구가 가스발생량이 적지만 유의적인 차이는 없었다. 그러나, 메탄가스의 생성량은 BES 처리에 의해 감소하였으며 ( $P<0.05$ ), H<sub>2</sub> 가스의 생성량은 증가시켜 ( $P<0.05$ ) 할로젠화합물의 in vitro 실험결과와 일치하였다.



Figure 11은 24시간동안 발생하는 메탄과 수소의 발생량과 축적량을 나타낸 것이다. 배양시작시간(0h)에 기질을 넣어 주고 배양을 하여 배양초기 메탄생성이 높았다가 10h 이후로 점차 감소하는 경향을 보였다. BES 처리에 의해서 메탄가스의 생성이 억제되면서 배양 8h이후로 메탄가스의 축적량이 점점 차이나기 시작했다. 반면에 H<sub>2</sub> 가스의 농도를 살펴보면 대조구는 H<sub>2</sub> 가스의 농도가 0.1mM이하로 계속 유지되었지만 BES 처리구는 배양초기부터 H<sub>2</sub> 가스가 축적되면서 점점 증가하는 모습을 보였다.

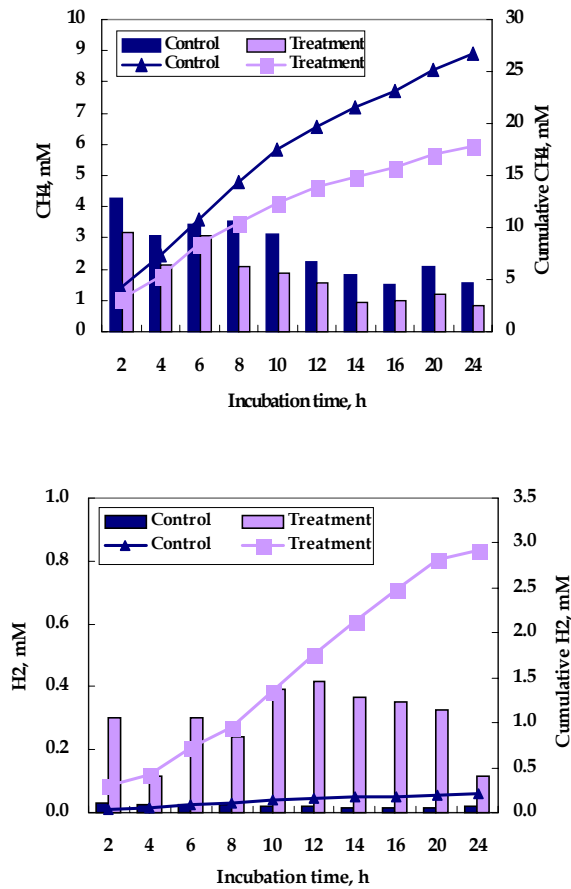


Figure 11. Effect of BES(30µM/d) on 24h CH<sub>4</sub> production and H<sub>2</sub> production in the continuous culture

○ 메탄생성박테리아의 DNA 정량분석

배양후 4일째부터 추출한 DNA을 고세균 primer로 증폭한 후 분석한 메탄생성균의 DNA양은 대조구와 처리구에서 많은 차이를 보였다(Figure 12). 배양 4일후 Image analyzer로 분석한 대조구의 16S rDNA 단편 강도(band intensity)는 1664 였으나 메탄억제제를 넣은 후 DNA 단편 강도는 1200에서 867로 시간이 지날수록 감소하였다.

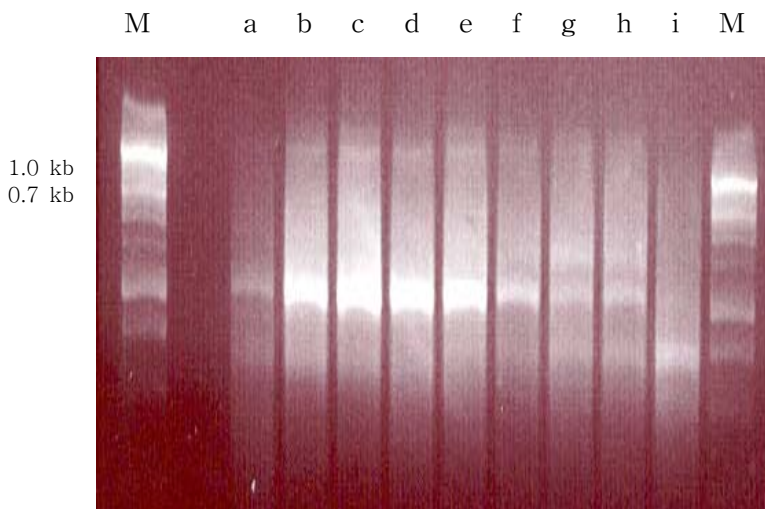


Figure 12. 16S rDNA fragment with universal archaea primer. DNA ladder was 1.0kb.M, Marker; a, control 0h; b, control 12h; c, control 24h; d, control 36h; e, control 48h; f, BES-treatment for 12h; g, BES-treatment for 24h; h, BES-treatment for 36h; i, BES-treatment for 48h.

○ 메탄생성박테리아의 제한효소 처리후 단편 변화

두개의 제한효소 HhaI/Hae III로 처리후 제한효소길이다형성분석방법 (RFLP: restriction fraction length polymorphism)에 의한 DNA절편의 유형변화는 Figure 13과 같다.

제한효소 처리후 메탄생성억제제를 처리한 DNA 유형은 대조구에 비하여 단편의 수가 현저히 감소하였으며 DNA 농도 또한 감소하였음을 볼 수 있다.

따라서, 메탄생성억제제를 이용하였을 때 반추위내 메탄생성박테리아의 군집변화를 예측할 수 있다.

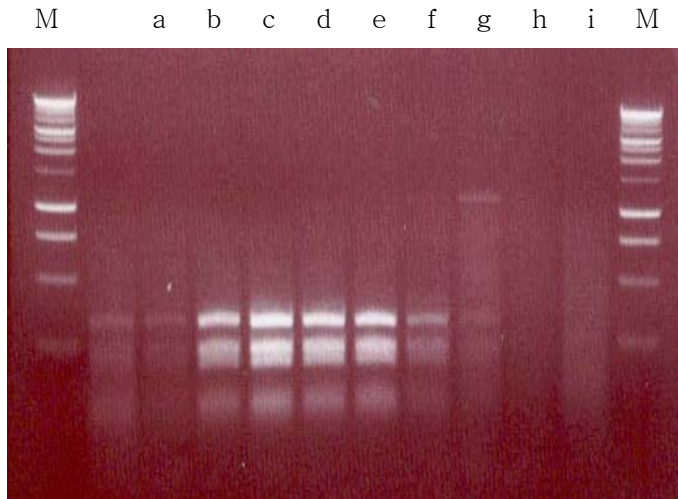


Figure 13. 16S rDNA that was digested with HhaI and HaeIII

Marker; a, control 0h; b, control 12h; c, control 24h; d, control 36h; e, control 48h; f, BES-treatment for 12h; g, BES-treatment for 24h; h, BES-treatment for 36h; i, BES-treatment for 48h.

## 5. *in vivo* 실험을 통한 메탄 생성 억제 기술 검증

### 가. 연구의 세부목표

*in vitro*와 continuous culture를 통해 결정된 메탄 생성 억제제를 공시하여 발효성상과 메탄 발생에 미치는 영향을 *in vivo* 실험으로 그 효과를 검증하고자 한다.

## 나. 연구 방법

- 1) 공시동물 : cannula가 장착된 Holstein 수소 4두를 공시하였다.
- 2) 처리 :
  - ① Control
  - ② BES : 30 $\mu$ M (0.3g/d)
  - ③ Malate : 10mM (67g/d)
  - ④ BES + Malate : BES 30 $\mu$ M+Malate 10mM
  - ⑤ 첨가수준 계산은 Martin 등(1999)의 방법을 따라 평균체중 485kg steer의 반추위 볼륨을 50L로 추정하고 계산하였으며, 처리는 오전 사료 사료급여시 사료에 top-dressing 하여 처리하였다.
- 3) 실험디자인 : 4 $\times$ 4 Latin square design
- 4) 공시사료 : timothy와 농후사료를 공시사료로 사용하였으며 급여할 때에는 6 : 4 의 비율로 체중의 2%를 하루에 2회 (0900, 1800)로 나누어 급여하였다.
- 5) 사료 적응기간 : 10일
- 6) 분시험기간(시료채취) : 3일(11 ~13일째날)
  - ① 분 채취 : 11, 12일째날 오전 사료 급여전
  - ② 가스 채취 :
    - 11일째날 오전 사료 급여직전 (0시간)과 급여후 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12시간
    - 12일째날 오전 사료 급여직전 (0시간)과 급여후 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12시간
  - ③ 위액 채취 :
    - 13일째날 오전 사료 급여직전 (0시간)과 급여후 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12시간
- 7) 분석항목 및 분석방법
  - ① 사료섭취량 (feed intake) : 분시험기간동안에 급여한 사료의 잔량을 그 다음날 오전 사료 급여전에 수거하여 105 $^{\circ}$ C drying oven에서 12시간 이상 건조시킨 후 무게를 측정하여 사료 건물섭취량을 계산하였다.

- ② 건물소화율 (DM digestibility) : 동물이 배설한 분의 양을 측정하고 분을 끌고루 섞은 다음 분을 채취하였다. 채취한 분을 60°C drying oven 에 48 시간 이상 건조시킨 후 무게를 측정하여 분의 건물함량을 구하였다. 그리고 건조된 분을 Wiley mill (1mm screen)로 분쇄하여 분의 CP, EE, CF, ash, NDF, ADF를 분석하였다.
- ③ CH<sub>4</sub> & H<sub>2</sub> 농도 : 오전 사료급여전과 급여후 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12시간에 10ml syringe를 이용하여 캐놀라 뚜껑으로부터 가스를 채취한 다음 7ml vacutainer에 보관하였다가 GC (Varian 3800)로 분석하였다.
- ④ pH : 오전 사료급여전과 급여후 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12시간에 4겹의 cheese cloth로 걸러 위액을 채취하여 바로 pH meter로 pH를 측정하였다.
- ⑤ VFA : pH를 측정한 후 위액을 50ml corning tube에 옮긴후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 eppendorf tube에 1ml씩 옮기고 25% metaphosphoric acid(HPO<sub>3</sub>)를 0.2ml씩 넣고 30분간 정치시킨다. 그 다음에 분석하기 전까지 -20°C에 보관하였다가 GC(HP 6890)로 분석하였다.
- ⑥ NH<sub>3</sub>-N : ⑤에서 원심분리한 상층액을 eppendorf tube에 1ml씩 옮기고 분석하기 전까지 -20°C에 보관하였다가 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 분석하였다.
- 8) 통계분석: 시험결과에 대한 통계분석은 SAS package(1999)의 분산분석 (ANOVA)을 이용하고, 각 처리구별 유의성 검정은 Tukey's test를 이용하였다.

#### 다. 연구 결과

BES와 malate의 처리효과가 *in vivo*에서는 *in vitro*와는 달리 차이가

나타나지 않았다 (Table 22). 사료섭취량, 영양소 소화율, VFA의 농도와 조성 그리고 CH<sub>4</sub>과 H<sub>2</sub>의 생성비율 모두 대조구와 처리구 사이에 유의적인 차이가 없이 비슷하게 나타났다 (Table 23). 현재까지 발표된 메탄생성억제제가 동물생산성에 미치는 영향에 관한 연구결과는 많다. 할로겐화 화합물인 BCM, HCS의 처리는 사료섭취량을 감소시켰으며, 일당증체량은 증가시켜 사료효율이 12~13% 증가하였다. 그러나 유사한 할로겐화 화합물인 amicloral도 유의적인 차이는 없었지만, 경향은 BCM과 HCS와 비슷하였다. Malate 처리는 사료섭취량에 영향이 없었으며, 일당증체량과 사료효율을 각각 4%, 8%씩 증가시켰다.

Figure 14는 오전 사료급여부터 오후 사료급여 후 3시간까지 CH<sub>4</sub>과 H<sub>2</sub>의 생성비율을 보여주는 것이다. CH<sub>4</sub> 가스는 사료급여 후 증가하다 감소하는 경향을 보이면서 8~16%가 CH<sub>4</sub> 가스로 생성되었다. 오전 사료 급여하고 9시간 후에 사료를 급여하면 다시 CH<sub>4</sub> 가스가 증가하는 경향이 보이지만 시간대별로 처리간 유의적인 차이는 나타나지 않았다. H<sub>2</sub> 가스의 생성비율을 살펴보면, H<sub>2</sub> 가스도 사료급여 1시간 후 급격히 증가하였다가 3시간 이후 0.1~0.2%의 생성비율을 유지하게 된다. 다시 오후 사료를 급여하게 되면 0.4~0.5%까지 생성된다. 그러나 H<sub>2</sub> 가스도 시간대별로 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 22. Effect of BES and malate on *in vivo* nutrient digestibility

	Control	BES	Malate	BES+Malate	SEM <sup>1</sup>
DM intake, kg	8.1	8.5	8.0	8.2	0.42
Digestibility, %					
DM	65.0	67.4	67.6	66.9	2.10
CP	60.9	62.2	63.4	61.6	1.65
EE	57.0	59.9	60.6	60.6	5.15
CF	58.4	60.2	60.1	61.7	6.71
Ash	31.4	37.9	34.4	35.7	6.35
NDF	50.8	55.9	54.9	55.9	5.52
ADF	43.4	49.8	47.3	48.7	6.30

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

Table 23. Effect of BES and malate on in vivo fermentation characteristics and gas proportion

	Control	BES	Malate	BES+Malate	SEM <sup>1</sup>
pH	6.60	6.64	6.39	6.71	0.186
NH <sub>3</sub> -N, mg/dl	7.2	6.2	7.2	6.5	0.89
VFA, mM					
acetate	90.3	86.1	86.1	86.1	8.01
propionate	25.2	22.4	22.9	24.4	3.36
isobutyrate	1.4	1.2	1.4	1.2	0.16
butyrate	16.3	14.8	16.0	16.0	2.31
isovalerate	2.1	1.7	2.1	1.9	0.42
valerate	1.6	1.5	1.6	1.5	0.22
TVFA	136.9	127.7	130.0	131.0	14.02
A/P	3.6	3.9	3.8	3.6	0.21
CH <sub>4</sub> , %	11.7	13.1	12.4	12.7	1.46
H <sub>2</sub> , %	0.2	0.2	0.2	0.2	0.04

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

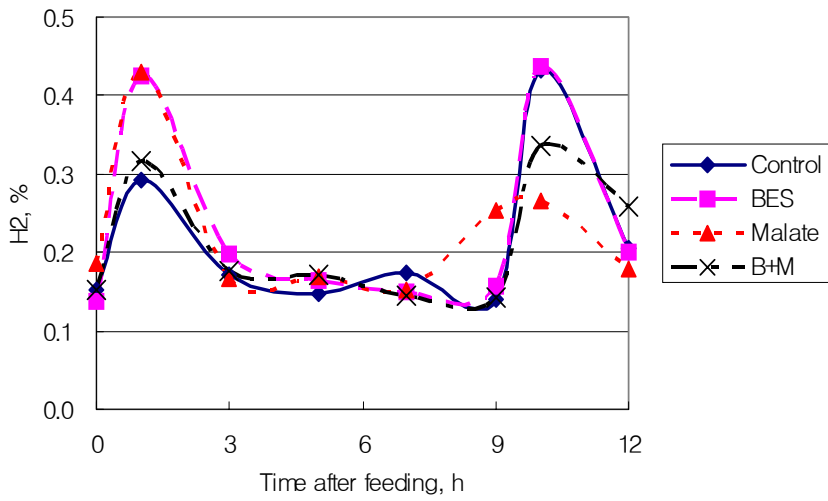
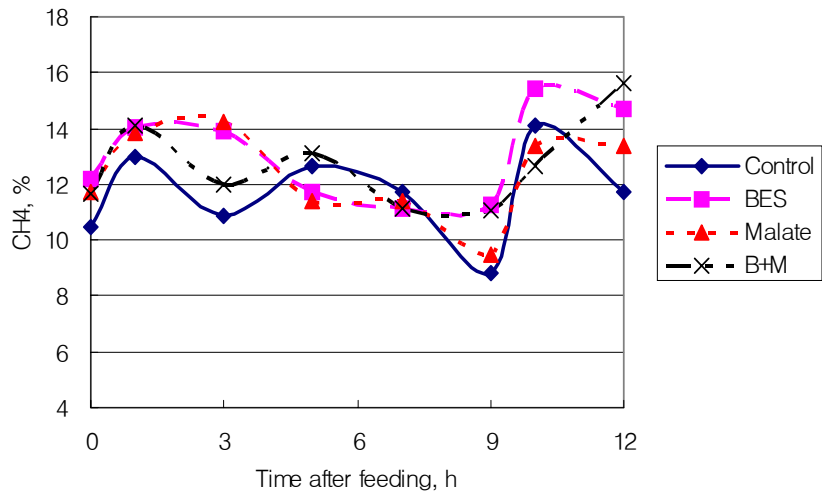


Figure 14. Effect of BES and malate on CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> proportion in Holstein steer.



## 제2절 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

### 1. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발 및 *in vitro* 발효에 미치는 영향

#### 가. 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

##### 1) 시험의 세부목표

효소분비촉진제 개발을 위하여 사용한 물질, non-ionic surfactants와 acrylic acid polymers는 점도가 상당히 높은 물질이기 때문에 사료 첨가제로 이용하기 위해서는 delivery system의 개발이 필요하다. 가장 간편하고 효율적으로 이용할 수 있는 방법을 선택하기 위하여 delivery system들이 반추미생물에 의한 섬유소 분해력, 발효성상, 미생물의 성장률, 가수분해효소의 활력에 미치는 영향을 구명한다.

##### 2) 공시동물

반추위 캐놀라가 장착된 한우 2두를 공시하여 *in vitro* 실험을 위한 위액 채취의 donor로 이용하였다. 공시동물은 조사료와 농후사료를 7:4의 비율로 하여 체중의 2% 수준으로 급여하였다.

3) Delivery system(운반체 형태)의 공시: 3가지 종류의 운반체 형태를 공시하였다.

가) Delivery system(운반체 형태)의 공시: 3가지 종류의 운반체 형태를 공시

- (1) **액화부형법**: 효소분비촉진제를 액상부형제인 증류수와 함께 혐기상태에서 4℃를 유지하며 1분간 sonication시켜 제조
- (2) **유화제결착법**: 효소분비촉진제와 sodium caseinate를 증류수와 1:3:5로 혼

- 합하여 homogenizer로 유화시킨 후 동결건조기로 건조
- (3) **Premix법**: 밀기울을 이용하여 단계적으로 혼합시켜 제조

나) 시험처리구

- (1) 대조구: 반추위 미생물 + 0.5g 밀기울
- (2) 액화부형법: 반추위 미생물 + 0.5g 밀기울 + 액화시킨 0.005% 효소분비촉진제
- (3) 유화제결착법: 반추위 미생물 + 0.5g 밀기울 + 유화제로 유화시킨 0.005% 효소분비촉진제
- (4) Premix법: 반추위 미생물 + 0.5g 밀기울 + 밀기울에 premix된 0.005% 효소분비촉진제

4) 조사항목

공시재료를 배양액 중에 농도별로 투여한 다음 시간의 경과 (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 및 48 시간)에 따라 *in vitro* 발효성상, *in vitro* 섬유소 소화율, 가수분해 효소 활력 및 Gas 생성량 및 미생물의 성장률을 조사하였다.

가) *In vitro* 발효성상

*In vitro* 상에서 각 시간대별로 배양액을 채취하여 암모니아태 질소 (NH<sub>3</sub>-N) 및 휘발성 지방산 (VFA)의 농도를 측정하기 위해 시료로 사용하였다. 암모니아태 질소의 농도는 배양액을 원심분리 (6,000 x g, 15분) 한 후, 상층액을 이용하여 Chany와 Marbach (1962)의 방법으로 분석하였다. VFA함량은 Erwin 등 (1961)의 방법에 따라 전처리한 후, gas chromatography (GC)를 이용하여 분석한다.

나) *In vitro* 섬유소 소화율

원심분리 후 잔량을 Wheaton filtering apparatus를 이용하여 여과시켰다. 여과시킬 때 먼저 60℃의 알코올로 3번 세척한 후 증류수로 두 번 세척하였다. 남은 잔량은 78℃에서 12시간 수분을 제거한 후 실온에서 2시간 건조시키고 중량을 측정하여 투입 시료량과 차이를 구하였으며 이 차이량을 투입 시료

량에 대한 백분율로 환산하여 섬유소 분해율을 측정하였다.

#### 다) 가수분해효소 활력측정

배양액을 1,500 x g, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. CMCase의 활성은 기질용액을 0.1M acetate buffer (pH 5.0)에 1%(W/V) CMC용액이 되게 하여, 조효소액 0.5ml과 CMC 기질용액 0.5ml을 섞고, 55°C에서 1시간 반응시키고, 원심분리한 후, 상층액 0.2ml에 DNS 0.6ml을 더하고 100°C에서 5분간 진탕반응시켜 상등액내의 환원당의 양을 DNS (Dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하는 방법을 하였다. CMCase의 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$  mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Xylanase도 CMCase의 측정법과 동일한 방법으로 수행하였으며, 분석방법은 Miller 등 (1960)의 CMCase측정방법과 동일하였다.

#### 라) Gas 생성량 및 미생물의 성장률

생성되는 가스량을 측정하기 위하여 각 시간대별로 배양된 배지에 paraffin 처리를 한 후, 개봉하여 gas production을 측정하고 다시 paraffin 처리를 하였다. 배양된 serum bottle은 gas production 측정 전에 온도에 의한 가스 측정의 오류를 방지하기 위하여 상온에서 20분간 방치되었으며, gas production의 측정은 William 등 (1996)과 Beuvink (1993)을 방법을 혼합·수정하여 사용하였다. 각 시간대별로 배양한 후 시료 3mL을 채취, 원심분리(6,300×g, 15분, 4°C)하여 bacterial fraction을 취하여 cell pellet을 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 세척하였다. 그리고 나서 spectrophotometer를 이용하여 파장 600nm에서 optical density를 측정하여 미생물의 성장률을 측정하였다.

### 5) 연구결과

Table 24에서 delivery system 개발을 위하여 3가지 delivery system을 이용하여 반추위액내 미생물들을 *in vitro* 배양시 filter paper의 분해율을 측정하였다. 효소분비촉진제 투여시 delivery system에 따라 차이가 없이 대조구에 비하여 filter paper 분해율이 증가되었으며 이와 상관적으로 가스생성량도 같은 경향을

보였다 (Table 25). 배양후 18시간대에 모든 처리구의 미생물성장율이 최대에 도달하였으며 모든 처리구간에는 큰 차이가 없었다 (Table 26). 모든 delivery system들이 대조구에 비하여 배양액내 암모니아 발생량이 2.8에서 8.0%정도 높았으며 총 휘발성지방산 생성량은 처리구간 큰 차이가 없었다 (Table 27). Acetic acid는 모든 처리구에서 배양시간이 경과함에 따라 감소하였으며, 반대로 propionic acid는 배양시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 각 휘발성지방산들도 처리구간에 생성량에는 크게 차이가 없었다. 효소분비촉진제를 투여함으로써 CMCase나 xylanase 활성이 증가하였으며 CMCase의 활성은 delivery system간에는 크게 차이가 없었으나 xylanase 활성의 경우 유화제결착법이 가장 높게 측정이 되었다 (Table 24).

Table 24. The effects of delivery systems of the enzyme inducer (Tween 80) on *in vitro* dry matter degradabilities (%) of filter paper in mixed rumen microorganism cultures

Incubation time(h)	Control	Liquidization	Emulsification	Premix
0	12.76	10.22	15.79	10.87
3	13.62	14.14	17.17	17.62
6	16.22	17.75	19.46	20.69
9	19.89	24.43	26.43	23.38
12	22.38	30.16	28.46	28.96
18	32.87	41.29	38.26	36.93
24	35.06	42.66	43.30	40.68
48	42.77	50.10	48.10	48.10

Table 25. The effects of delivery systems of the enzyme inducer (Tween 80) on *in vitro* gas production (ml) in mixed rumen microorganism cultures

Incubation time(h)	Control	Liquidization	Emulsification	Premix
3	5.87	5.07	5.60	4.93
6	16.10	18.33	17.07	18.07
9	21.64	25.80	25.00	25.40
12	26.78	32.93	32.33	31.60
18	34.45	40.93	44.10	40.57
24	40.54	46.43	46.53	45.33
48	45.33	49.00	51.27	50.20

Table 26. The effects of delivery systems of the enzyme inducer (Tween 80) on cell growth (OD value) in mixed rumen microorganism cultures

Incubation time(h)	Control	Liquidization	Emulsification	Premix
0	0.48	0.46	0.44	0.48
3	0.75	0.76	0.83	0.80
6	1.11	1.14	0.99	1.03
9	1.15	1.31	1.11	1.10
12	1.43	1.59	1.53	1.47
18	1.50	1.71	1.71	1.69
24	1.08	1.23	1.14	1.09
48	1.18	1.28	1.31	1.29

Table 27. The effects of delivery systems of the enzyme inducer (Tween 80) on the concentrations of ammonia-N, total VFA and the molar proportions of individual VFA in mixed rumen microorganism cultures

	Control	Liquidization	Emulsification	Premix
NH <sub>3</sub> -N (mg/liter)	133.7	137.4	144.3	140.7
Total VFA(mmol/liter)	41.2	41.1	42.4	42.2
Acetic acid (mmole/mole)	596.7	600.4	601.3	603.7
Propionic acid (mmole/mole)	281.2	281.3	278.2	279.4
Iso-butyric acid (mmole/mole)	9.2	8.8	7.4	7.7
Butyric acid (mmole/mole)	103.0	102.1	102.2	99.5
Iso-valeric acid (mmole/mole)	4.7	4.2	4.3	4.9
Valeric acid (mmole/mole)	6.2	6.0	5.6	4.8

Table 28. The effects of delivery systems of the enzyme inducer (Tween 80) on CMCase and xylanase activities ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{ml}$ ) of the supernatant of the medium incubated with mixed rumen microorganisms

Incubation time(h)	Control	Liquidization	Emulsification	Premix
<i>CMCase</i>				
3	142.29	161.20	146.05	162.44
6	50.30	59.66	56.21	58.34
9	30.76	37.71	41.27	37.33
12	37.63	47.52	49.41	45.08
18	30.84	43.44	44.12	42.01
24	27.47	34.27	33.32	38.87
48	22.39	29.58	26.88	27.82
mean	48.81	59.05	56.75	58.84
<i>Xylanase</i>				
3	216.61	206.56	226.26	210.25
6	210.94	233.46	251.51	213.66
9	192.95	198.81	232.02	199.95
12	116.34	111.48	120.72	99.36
18	70.09	74.83	59.61	76.45
mean	161.39	165.03	178.02	159.93

이상의 결과로 보아 각 delivery system간에 큰 차이가 없었지만 유화제결착법이 전반적으로 우수한 경향을 보이며 또한 본 방법을 이용시 효소분비촉진제를 동결건조시켜 사료에 직접 첨가하거나 다른 첨가제와 함께 사용하는 것이 이점이 있는 방법인 것으로 사료된다.

## 나. 개발 delivery system의 검증 실험

### 1) 시험의 세부목표

효소분비촉진제를 산업화시키기 위한 delivery system을 위해 실시된 시험1 (효소분비 촉진제의 delivery system의 개발)의 연구결과를 토대로 선발된 방법이 *in vitro* 상에서 효소분포체계에 미치는 영향을 구명하고 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 소화율에 미치는 영향과 반추 미생물의 효소분비 촉진율에 미치는 영향을 조사하는 것이다.

### 가) 선발된 효소분비촉진제 delivery system이 반추 미생물의 성장률에 미치는 영향

(1) 공시동물: 반추위 캐놀라가 장착된 한우 1두를 공시하여 *in vitro* 실험을 위한 위액 채취의 doner로 이용한다.

(2) 공시미생물: 섬유소 분해 미생물 4 종 (cellulolytics: *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 및 *B. fibrisolvens*), 비 섬유소 분해 미생물 4 종(non-cellulolytics: *B. amylophilus*, *M. elsdenii*, *P. ruminicola* and *S. ruminantium*), 그리고 polycentric 반추위 혐기성 곰팡이 2종과 monocentric 반추위 혐기성 곰팡이 2종 등 총 12종의 순수 미생물(pure strains)을 공시하였다.

(3) 공시재료 및 농도 : Tween 80을 시험1에서의 액화부형법을 선발 공시하였고 투여 농도는 총 배지 중에 0.000(무첨가), 0.001, 0.005%로 3 수준이었으며 무첨가구는 증류수로 대체하였다.

(4) 미생물의 배양 : 박테리아는 다음의 Table 29에서와 같이 modified Dehority medium (Scott and Dehority, 1965; modified by Weimer *et al.*, 1990)에서 배양하였고 곰팡이는 Table 30에서와 같이 Lowe 등 (1985)이 이용한 배지 B(medium B)에서 배양하였다. 미생물의 분주와 접종 및 배양의 전 과정은 anaerobic gassing system하에서 혐기적으로 수행되었다. 박테리아는 38.5°C에서



4, 8, 12, 16 및 20시간동안, 곰팡이는 1, 2, 3, 4 및 5일간 각각 배양하였다.

Table 29. Modified Dehority medium for incubation of rumen bacteria

Components	Amount contained	Components	Amount contained
Mineral soln. I <sup>1</sup>	7.5 ml	VFA solution <sup>4</sup>	6.7 ml
Mineral soln. II <sup>2</sup>	7.5 ml	Hemin solution <sup>5</sup>	0.1 ml
Cystein-HCl · H <sub>2</sub> O	0.05 g	Glucose	0.5 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.3 g	Cellobiose	0.5 g
0.1% resazurin	0.1 ml	Soluble starch	0.7 g
Vitamin mixture <sup>3</sup>	1.0 ml	Distilled water	100.0 ml

(5) 배양액의 희석 및 미생물 균집 측정: 배양액은 Bryant와 Burkey (1953)가 사용한 혐기희석액(anaerobic dilution solution)을 사용하여 십진희석법으로 10<sup>0</sup>~10<sup>-9</sup>까지 희석하는데, 총균수는 10<sup>-7</sup>~10<sup>-9</sup>희석액, 곰팡이는 10<sup>-3</sup>~10<sup>-5</sup> 희석액을 접종액으로 이용하였다.

Table 30. Components of medium B for enumeration of anaerobic rumen fungi

Components	Medium B	Components	Medium B
Trypticase Peptone	0.10 g	Trace mineral soln B	1.00 ml
Yeast extract	0.05 g	VFA B	1.00 ml
Glucose	0.25 g	0.1% Hemin soln.	1.00 ml
Cellobiose	0.25 g	0.1%Resazurin	0.10 ml
Agar	0.20 g	dH <sub>2</sub> O(distilled water)	100 ml
Mineral I	7.50 ml	NaHCO <sub>3</sub>	0.30 g
Macro mineral soln B	5.40 ml	Cystein-HCl · H <sub>2</sub> O	0.05 g

## 나) 액화 효소분비촉진제의 효과 검증시험 (*in vitro* 시험)

### (1) 공시동물

반추위 캐놀라가 장착된 한우 2두를 공시하여 *in vitro* 실험을 위한 위액 채취의 donor로 이용하였다. 공시동물은 조사료와 농후사료를 7:4의 비율로하여 체중의 2% 수준으로 급여하였다.

### (2) 조사항목

공시재료를 배양액 중에 농도별로 투여한 다음 각 공시 기질별로 시간의 경과에 따라 *in vitro* 건물 섬유소 소화율, 가수분해효소 활력 및 Gas 생성량을 조사하였고 배양액내의 효소분포체계 또한 조사하였다.

(가) *In vitro* 건물 소화율 : 시험 1과 동일

(나) 가수분해효소 활력측정 : 시험 1과 동일

(다) Gas 생성량 : 시험 1과 동일

### (3) 효소분포체계

(가) 조효소액의 준비: 채취된 배양액을 물리 및 화학적 방법을 통하여 배양액중 부유효소 (C-free)와 미생물세포벽 부착효소 (C-bound)로 분리하여 조효소액중에 분포하는 각종 가수분해효소의 종류와 역가를 비교하는 대상 효소는 다음과 같았다.

#### (나) 효소의 분석방법

① Polysaccharide-degrading enzyme: 시험 1의 CMCase와 xylanase의 역가 분석법과 동일하였다.

② Hexoside-degrading enzyme:  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase 등과 같은 hexoside-degrading enzyme들의 역

가측정은 Kohchi와 Tohe (1986)의 방법에 따라 각각 p-nitrophenyl (p-NP)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, p-NP glycopyranoside 및 p-NP xylopyranoside 등과 같은 기질로 50 mM의 acetate buffer (pH 5.0)에 1mg/ml이 되게 한 다음 기질용액에 효소액 0.5ml이나 0.2ml를 혼합하여 1ml이 되게 하여 55°C에서 30분간 반응시키고 2ml의 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 반응을 정지시킨 다음, 400nm에서 흡광도를 측정한다. 효소활력 단위 (1 unit)는 1분 동안 1 $\mu$ mol의 p-NP의 생성량을 환산하여 표시하였다.

- ③ Protease: Hazen (1974)의 방법에 따라서 azocasein을 25mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 1.25mg/ml(w/v)이 되게 용해한 다음 azocasein solution 4ml와 효소액 1 ml를 혼합하여 39°C에서 2시간 동안 반응시키고 30%의 trichloroacetate (w/v) 1ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 6,500xg(4°C)에서 5분간 원심 분리한 후 상층액 2ml에 0.25N NaOH 2ml를 첨가하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard curve 는 0.25N NaOH에 azocasein 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 및 0.0 mg/ml의 농도로 하여 측정하였다.

#### 다) 반추위 효소분비촉진제의 효과 검증 시험 (대사시험)

##### (1) 공시동물 및 시험설계

반추위 fistula가 장착된 한우 6두에게 농후사료의 급여량은 고정하고 조사료원인 볏짚, 목건초 및 옥수수사일리지는 무제한 급여하였다. 공시동물은 무처리구 (효소 분비 촉진제를 첨가하지 않은 구)와 처리구(효소 분비촉진제를 반추위내로 투여한 구)로 나누어 처리구 당 3 반복으로 실험을 수행하였다.

(2) 공시동물의 사양 관리: 공시동물의 일반적인 사양관리는 축산기술연구소의 관행법에 따랐다.

##### (3) 조사항목 및 방법

(가) 반추위 발효성상 : 반추위액의 발효성상을 측정하기 위하여 각 시험사

료 급여전 (0시간)과 급여후 3, 6 및 9시간에 위액을 채취한다. 위액은 채취 즉시 4겹의 cheese cloth로 여과한후 pH를 측정하고 암모니아태 질소 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) 및 휘발성 지방산 (VFA)의 농도를 측정하였다. 채취한 위액의 pH는 Digital pH-meter (Wheaton 120)를 이용하여 측정하였으며  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도는 반추위액을 원심분리 (6,000×g, 15분)한 후, 상층액을 이용하여 Chany와 Marbach (1962)의 방법으로 분석하였다. VFA의 함량은 cheese cloth로 여과한 위액 5ml를 취하여 Erwin 등 (1961)의 방법에 따라 전처리한 후, gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였다.

(나) 반추위내 미생물 성장률 : 시험 1과 동일

(다) 반추위내 가수분해효소의 역가 비교 : 시험 1과 동일

(라) 사료의 *in situ* 소화율: 각 처리구의 반추위에 급여 조사료와 동일한 종류의 조사료원이 충전된 나일론 백 (Mononylon 천, 기공크기 : 25 $\mu$ m)을 0, 3, 9, 12, 24, 48 및 72시간 현수시켜 배양시간에 따른 반추위내에서 섬유소의 disappearance rate를 Mehrez와 Ørskov (1977)의 방법으로 측정하며, 배양 0시간에서의 건물 소실율은 시료를 반추위내에서 배양시키지 않고 단지 세척에 의한 건물 손실만을 측정하여 계산하였다.

## 2) 연구 결과

(1) 선발된 효소분비촉진제 delivery system이 반추 미생물의 성장률에 미치는 영향

섬유소 분해 미생물 4 종 (cellulolytics: *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 및 *B. fibrisolvens*), 비 섬유소 분해 미생물 4 종(noncellulolytics: *B. amylophilus*, *M. elsdenii*, *P. ruminicola* and *S. ruminantium*), 그리고 polycentric

반추위 혐기성 곰팡이 2종과 monocentric 반추위 혐기성 곰팡이 2종 등 총 12종의 순수 미생물(pure strains)을 공시하여 Non-ionic surfactants중 Tween 80을 증류수에 액화부형시켜 순수 배양배지에 0.000%(무첨가), 0.001% 및 0.005%의 3 수준으로 첨가하였을 경우 미생물의 성장률에 미치는 영향을 Figure 15, Figure 16 및 Figure 17에 각각 나타내었다.

Figure 15는 섬유소 분해 미생물 4 종(cellulolytics: *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 및 *B. fibrisolvens*)의 성장률을 나타낸 것인데, Tween 80의 첨가에 의해 공시한 4종의 미생물의 성장률이 모두 다 증가하는 것으로 나타났다. Figure 16은 섬유소 분해 미생물이 아닌 전분이나 단백질류를 주로 분해하는 미생물 군 4 종(noncellulolytics: *B. amylophilus*, *M. elsdenii*, *P. ruminicola* and *S. ruminantium*)에 대한 성장률을 나타낸 것으로 섬유소 분해 박테리아에서와는 달리 Tween 80의 첨가가 공시한 4종의 모두의 성장률에 큰 영향을 나타내지 않았다.

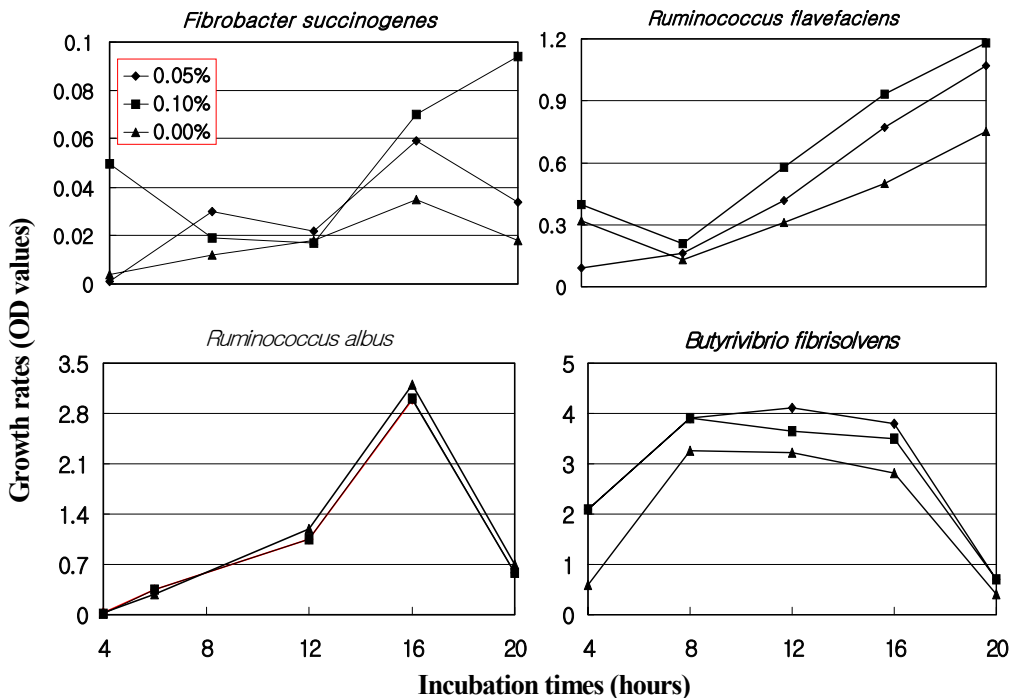


Figure 15. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on the growth rate of rumen cellulolytic bacteria

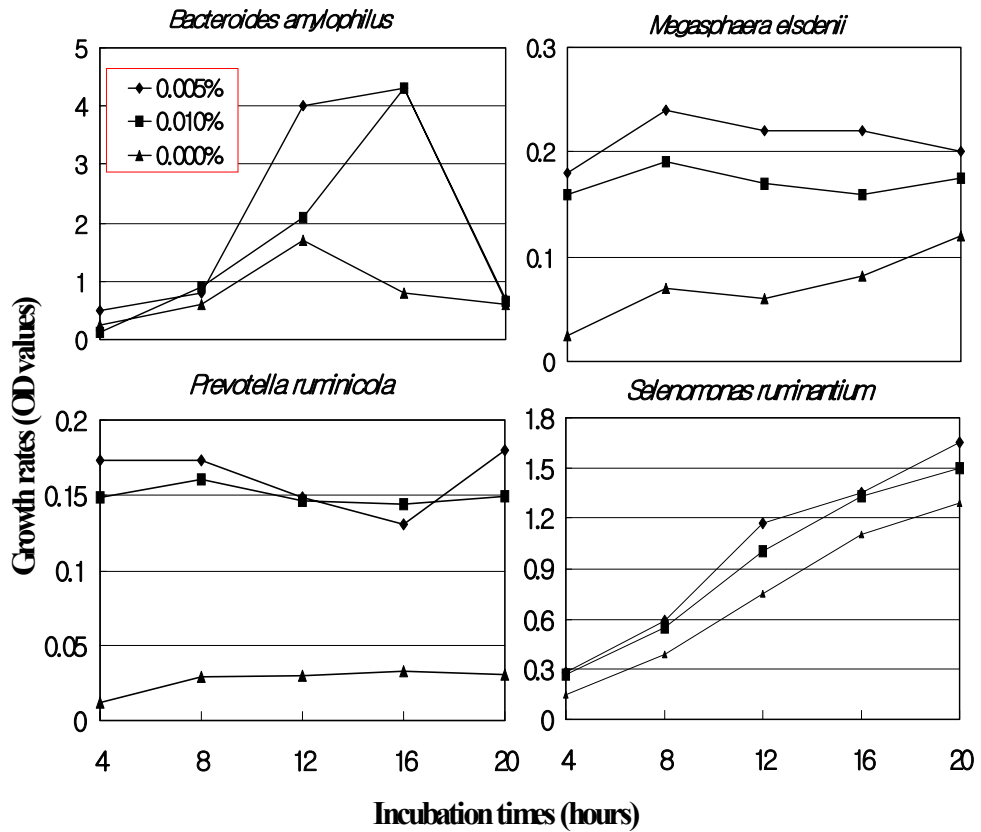


Figure 16. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on the growth rate of rumen amylolytic and proteolytic bacteria

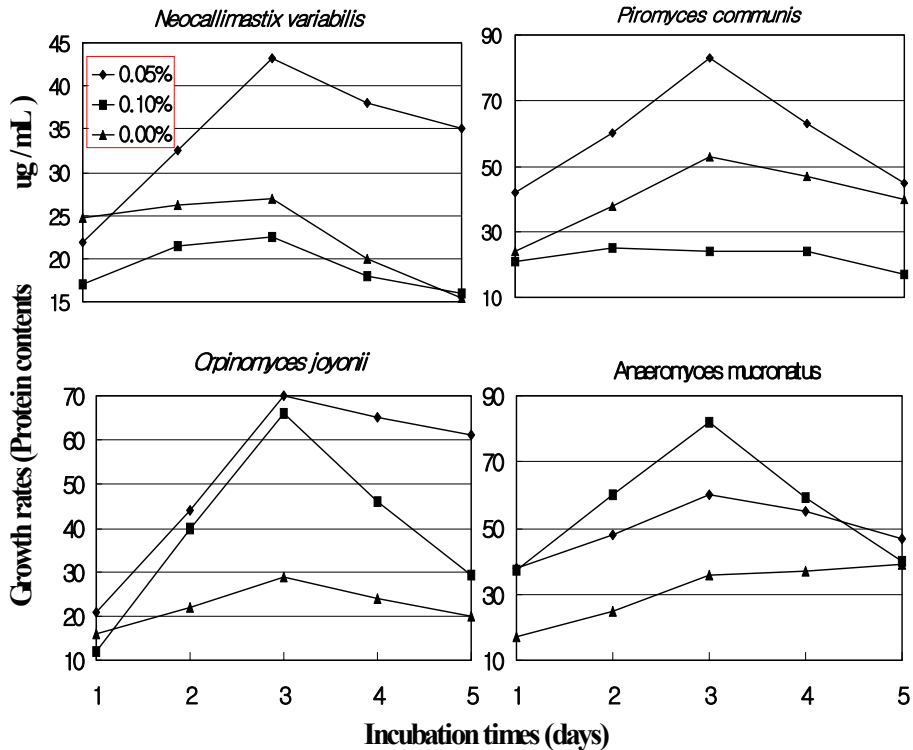


Figure 17. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on the growth rate of rumen anaerobic fungi

지금까지 반추위에서 분리·동정된 혐기성 곰팡이에는 5속(genera)(*Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* 및 *Ruminomyces* 속)에 16종(species)의 곰팡이가 있고 비반추 초식동물의 분에서도 2속(*Piromyces* 와 *Caecomyces* 속)에 4종의 곰팡이가 분리·동정되었다. 이들은 크게 zoospore, sporangium 및 rhizoid의 3개 부위로 구성되어 있는데 이러한 구성요인들의 미세구조와 형태 및 크기는 속과 종을 분류·동정하는 지표가 되고 있으며 stalk 당 하나의 sporangium이 있는 곰팡이를 monocentric 곰팡이 두 개 이상의 sporangia가 있으면 polycentric 곰팡이라고 한다. Figure 17에서 보는 바와 같이 반추위 혐기성 곰팡이 역시 섬유소 분해 박테리아에서와 마찬가지로 Tween 80을 첨가하면 곰팡이의 성장률이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 monocentric 곰팡이인 *Neocallimastix*와 *Piromyces* 속 뿐

만 아니라 polycentric 곰팡이인 *Orpinomyces* 및 *Ruminomyces(Anaeromyces)* 속에서도 동일한 경향을 보였다.

## (2) 액화 효소분비촉진제의 효과 검증시험 (*in vitro* 시험)

효소분비 촉진제를 반추위액중에 투여하였을 경우 세포벽에 붙어있거나 세포내에 함유되어 있던 효소의 대부분이 위액 중으로 부유된다는 사실을 발견하였으며(Table 31) 요약하면 Figure 18과 같다.

Table 31. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on the distribution of enzymes in rumen fluids of Korean native cattle

Enzymes	Enzyme activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ) distributed in					
	TWN80	0.000%	TWN80	0.005%	TWN80	0.010%
	C-bound	C-free	C-bound	C-free	C-bound	C-free
Cellulase	846.61 <sup>a</sup>	352.69 <sup>c</sup>	626.18 <sup>c</sup>	456.76 <sup>d</sup>	744.70 <sup>b</sup>	473.54 <sup>d</sup>
Xylanase	1,691.88 <sup>b</sup>	463.42 <sup>c</sup>	1427.47 <sup>c</sup>	874.72 <sup>d</sup>	1924.39 <sup>a</sup>	1023.61 <sup>d</sup>
Pectinase	460.36 <sup>a</sup>	586.96 <sup>a</sup>	531.14 <sup>a</sup>	607.24 <sup>a</sup>	565.29 <sup>a</sup>	471.10 <sup>a</sup>
Protease	45.49 <sup>cd</sup>	90.69 <sup>b</sup>	40.09 <sup>d</sup>	141.85 <sup>a</sup>	64.38 <sup>c</sup>	147.72 <sup>a</sup>
Amylase	114.43 <sup>d</sup>	377.63 <sup>c</sup>	52.32 <sup>d</sup>	584.14 <sup>b</sup>	67.57 <sup>d</sup>	706.14 <sup>a</sup>
Glucanase	1279.53 <sup>a</sup>	501.73 <sup>c</sup>	1124.81 <sup>b</sup>	1115.34 <sup>b</sup>	1211.15 <sup>ab</sup>	1101.47 <sup>b</sup>

또한, 이 물질들은 점성이 높아 미생물세포벽에 점막을 형성하여 산소의 공급을 차단하여 호기성 미생물의 성장률을 억제시킨다고 알려져 왔으나 본 연구에서는 이 물질들이 반추위 혐기성 미생물의 성장률을 오히려 증가시킨다는 사실을 발견하였는데 이는 산소의 공급은 차단하지만 영양물질의 이동에는 크게 영향을 미치지 않기 때문으로 생각된다. 또한, 반추 미생물의 세포막 투과성을 증가시킬 수 있는 물질은 세포내 효소들을 세포외로 분비시키는 효과가 매우 높아 볏짚과 같은 저질 조사료의 *in vitro* 소화율을 45% 이상 획기적으로 증가시



키는 효과가 있었다(Figure 19).

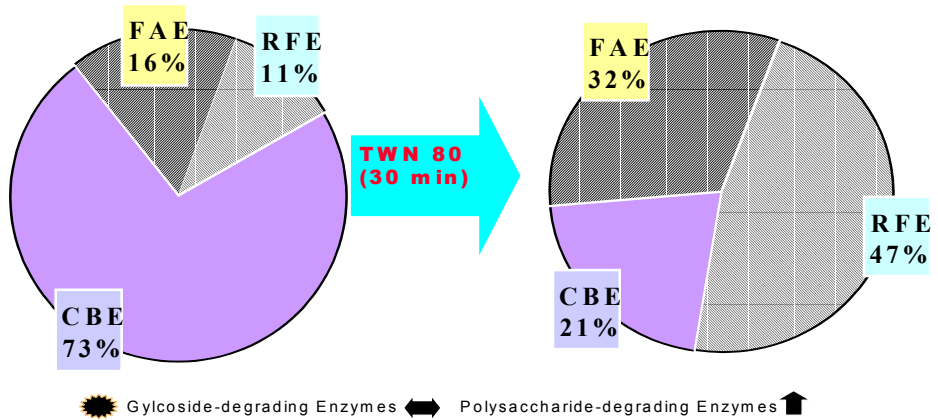


Figure 18. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on the distribution of enzymes in rumen fluids

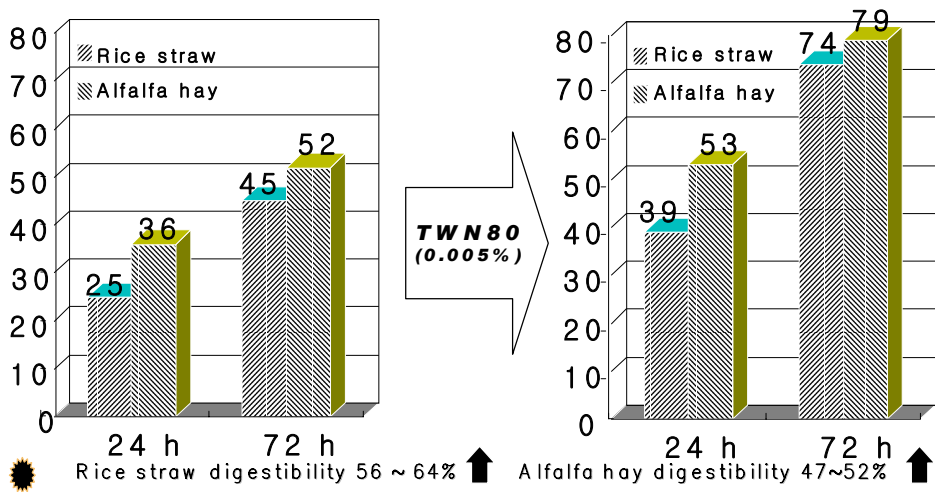


Figure 19. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on the distribution of enzymes in rumen fluids

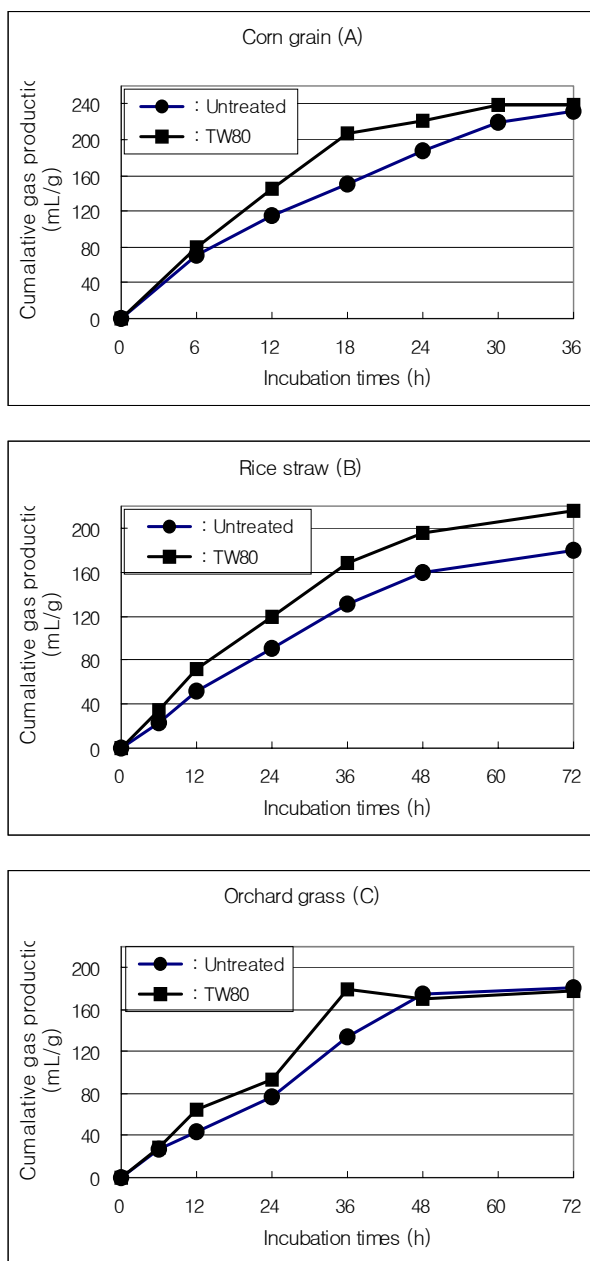


Figure 20. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on cumulative gas production (ml/g substrate) in the head space of culture test tubes grown on rumen anaerobic mixed microorganisms

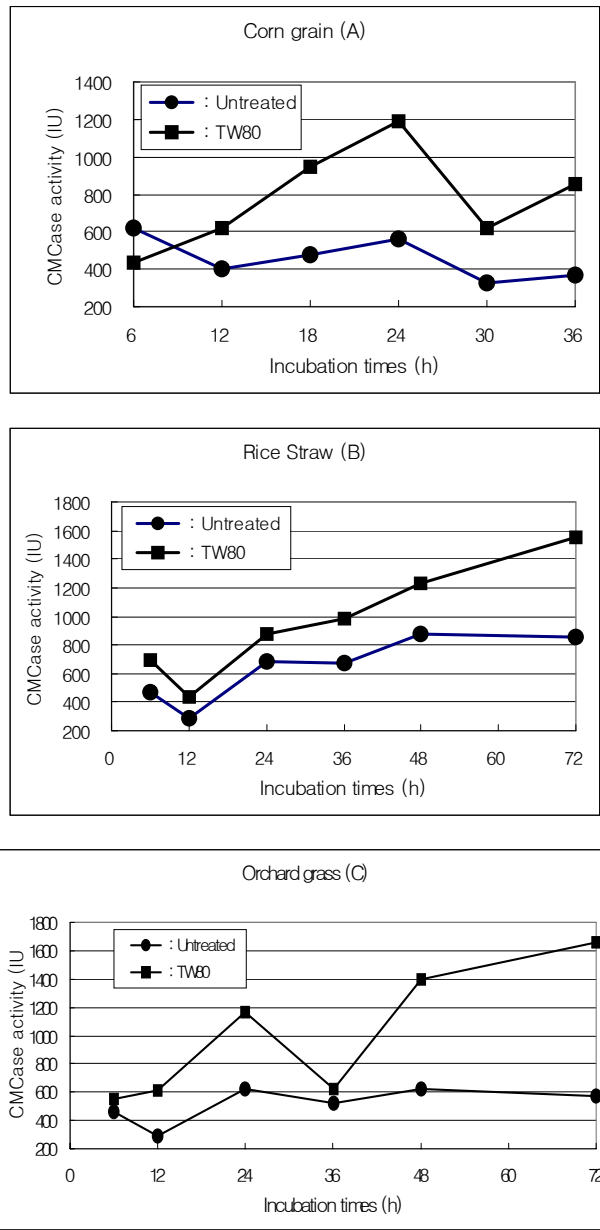


Figure 21. The effects of the liquidized enzyme inducer (Tween 80) administrations on CMCCase activity (mmol/min/ml) in the culture supernatants of mixed rumen anaerobic microorganisms

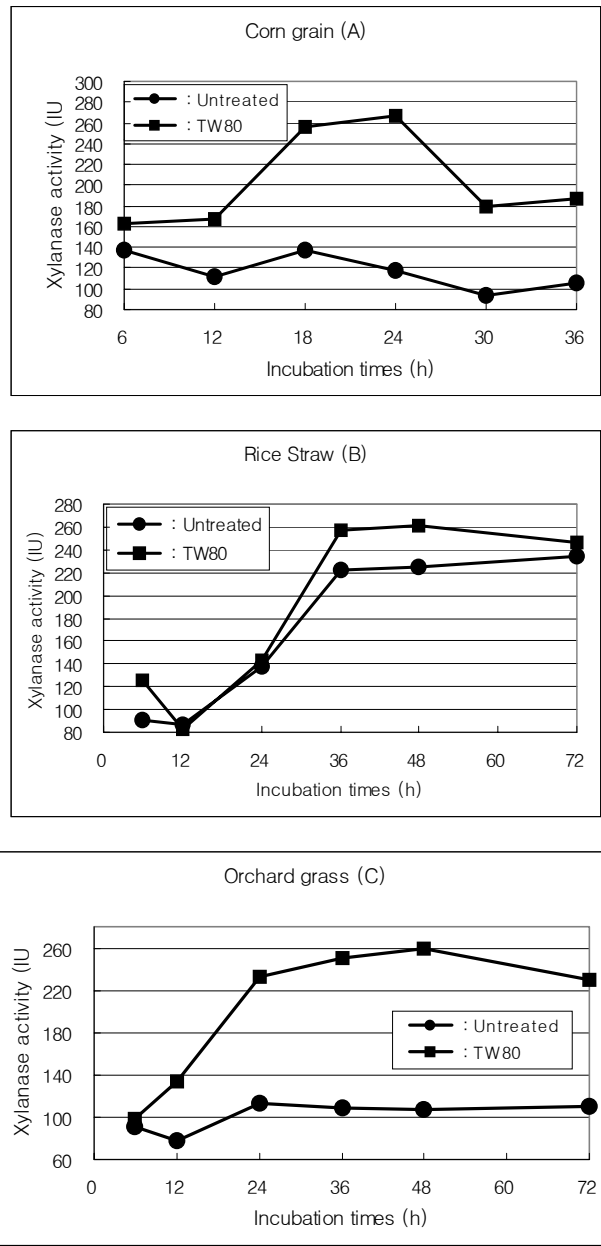


Figure 22. The effects of the liquidized the enzyme inducer (Tween 80) administration on xylanase activity (mmol/min/ml) in the culture supernatants of mixed rumen anaerobic microorganisms

이러한 결과는 옥수수, 벧짚 및 오차드 그라스를 기질로 이용한 *in vitro* 실험에서도 동일한 경향을 보였다. Figure 20에서 보는 바와 같이 효소분비 촉진제를 액화시켜 실험을 수행하였을 때 배양조내의 가스 생성량 (cumulative gas production, ml/g substrate) 이 급격히 증가하였다. 또한 배양액중의 CMCase 효소 역가 (mmol/min/ml) 역시 반추위 미생물 효소분비 촉진제에 의하여 증가하였을 뿐만 아니라 (Figure 21) xylanase의 역가 역시 증가하였다(Figure 22). 따라서 본 연구에서 개발된 액화법으로 효소분비촉진제를 반추동물의 사료내에 첨가 이용하게 된다면 생산성을 크게 향상시킬 수 있어 산업화의 가능성이 충분히 검증되었다.

### (3) 효소분비촉진제의 delivery system(액화법)의 효과 검증시험 (대사시험)

효소분비 촉진제를 반추위액중에 투여하였을 경우 세포벽에 붙어있거나 세포내에 함유되어 있던 효소의 대부분이 위액중으로 부유된다는 사실을 발견하였으며 또한, 이 물질들은 점성이 높아 미생물세포벽에 점막을 형성하여 산소의 공급을 차단하여 호기성 미생물의 성장률을 억제시킨다고 알려져 왔으나 본 연구에서는 이 물질들이 반추위 혐기성 미생물의 성장률을 오히려 증가시킨다는 사실을 발견하였고 벧짚과 같은 저질 조사료의 *in vitro* 소화율을 45% 이상 획기적으로 증가시키는 효과가 있었다. 한편, 기질에다 직접 점성의 촉진제를 premix하여 배양조내의 가스 생성량이 급격히 증가하고 효소 역가가 증가하는 등 고무적인 결과들을 도출하였다.

따라서 본 연구에서 개발된 효소 분비 촉진제는 반추동물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있는 물질로 산업화의 가능성이 충분히 검증되었다. 이러한 현상들이 실제 동물에게도 나타나는 지를 검증하기 위해서 한우의 반추위에 효소분비 촉진제를 액화시킨 후 투여하여 반추위 발효성상과 대사산물 및 *in situ* 소화율 시험을 수행하였다. Figure 23에서 보는 바와 같이 효소분비촉진제를 직접 0.001% 수준으로 반추위내로 투여하였을 경우에도 반추위내 혐기성 미생물들의 성장률이 급격히 증가하였다. 또한 발효가 촉진되어 pH value가 감소하였으며(Figure 24) 반추위내 총 휘발성 지방산의 농도 역시 급격히 증가하였다(Figure 25).

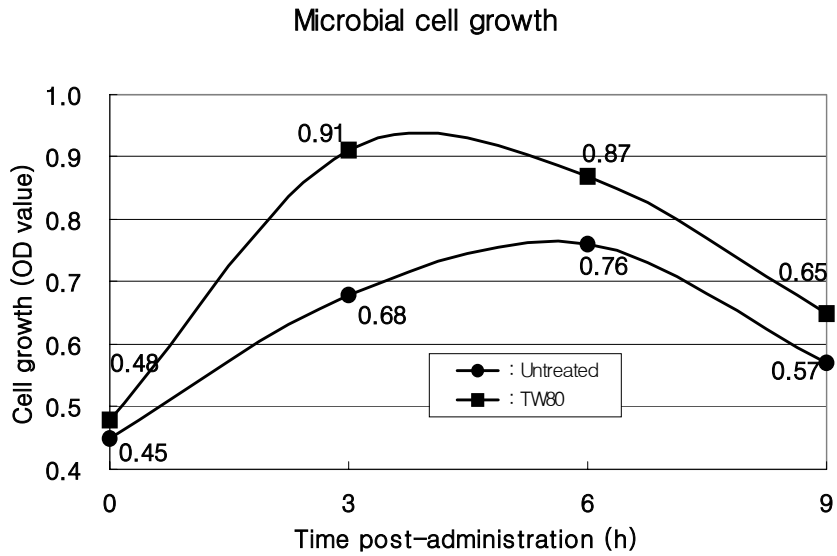


Figure 23. Influence of the emulsified enzyme inducer (Tween 80) administration to the rumen of Korean native cows on microbial cell growth rate.

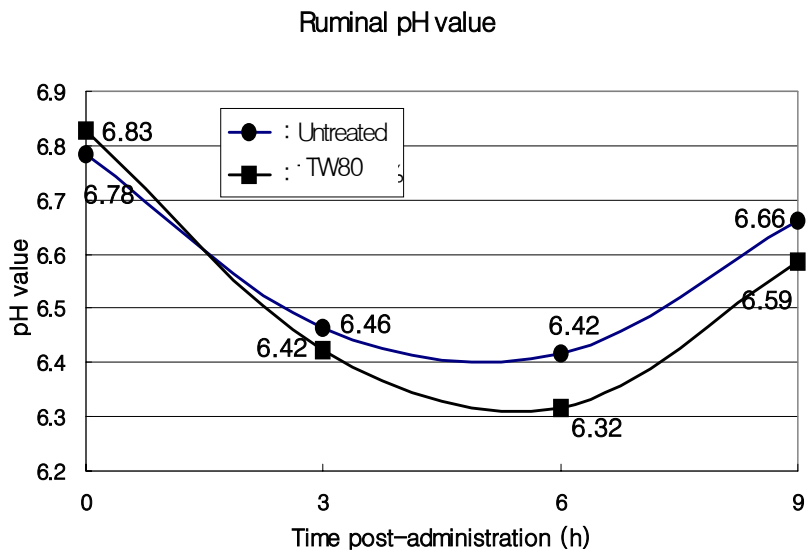


Figure 24. Influence of the emulsified enzyme inducer (Tween 80) administration to the rumen of Korean native cows on ruminal pH value.

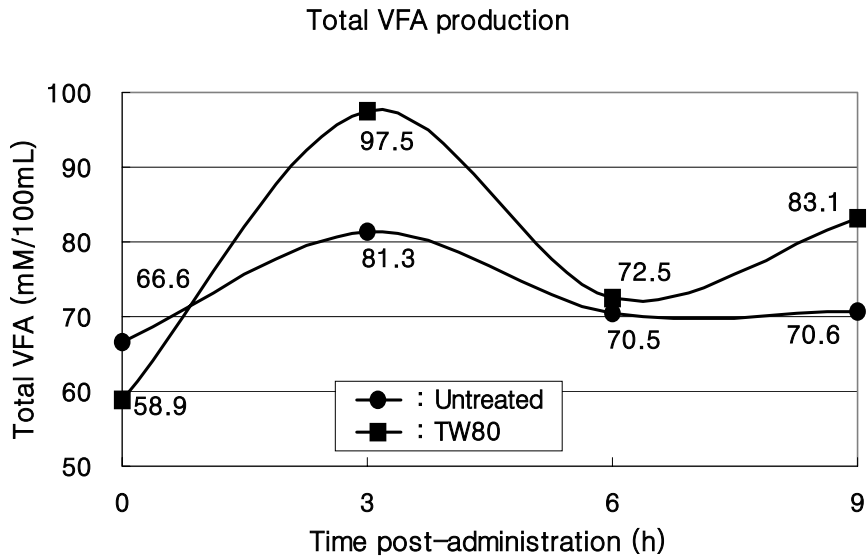


Figure 25. Influence of the emulsified enzyme inducer administration to the rumen of Korean native cows on rumen total VFA production

또한, Figure 26에서 보는 바와 같이 효소분비촉진제를 한우의 반추위내로 투여하였을 경우, 반추위액중의 CMCCase 효소 역가 (mmol/min/ml)가 급격히 증가하였을 뿐만 아니라 xylanase의 역가 역시 크게 증가하였다. 이러한 경향은 CMCCase의 경우는 사료 급여후 6시간 이후 시간에서, xylanase는 사료급여후 3시간대에서 많은 차이가 있었다.

효소분비촉진제의 투여로 한우의 반추위내 혐기성 미생물들이 급격히 증가하였고 효소의 활성이 증가하였을 뿐만 아니라 VFA의 생성량을 증가된 반추위내에서 *in situ* 건물 소화율을 측정된 결과 역시, 위에서 조사된 모든 항목에서와 마찬가지로 상당히 의미 있는 결과를 보였다(Figure 27).

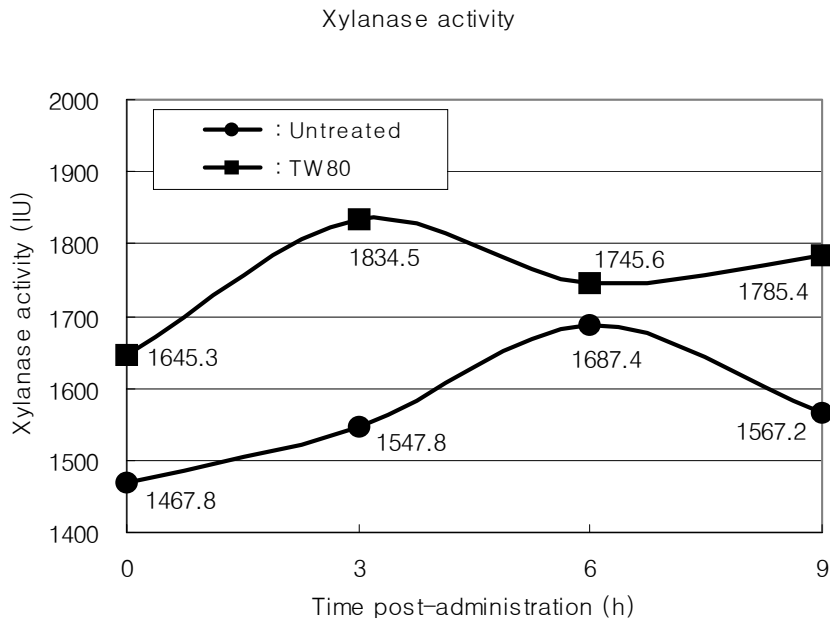
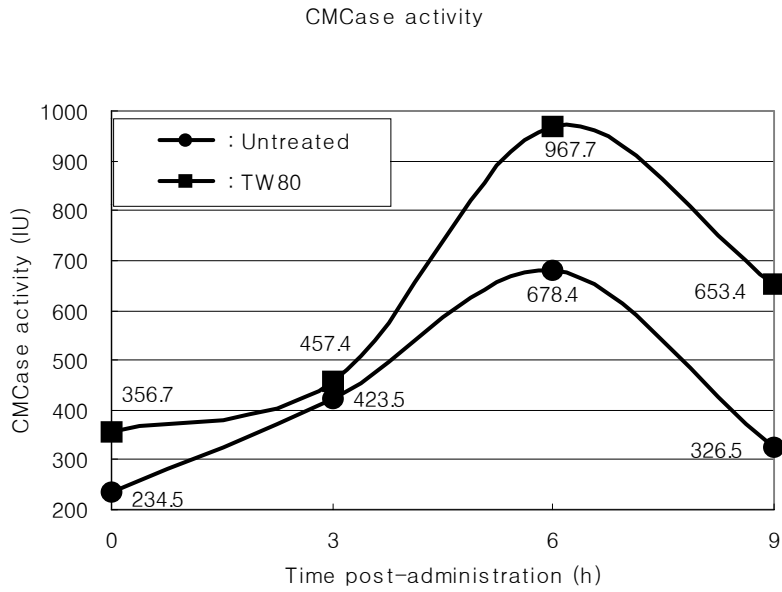


Figure 26. Influence of the emulsified enzyme inducer(Tween 80) administrations to the rumen of Korean native cows on CMCase and xylanase activities(mmol/min/ml) in the rumen



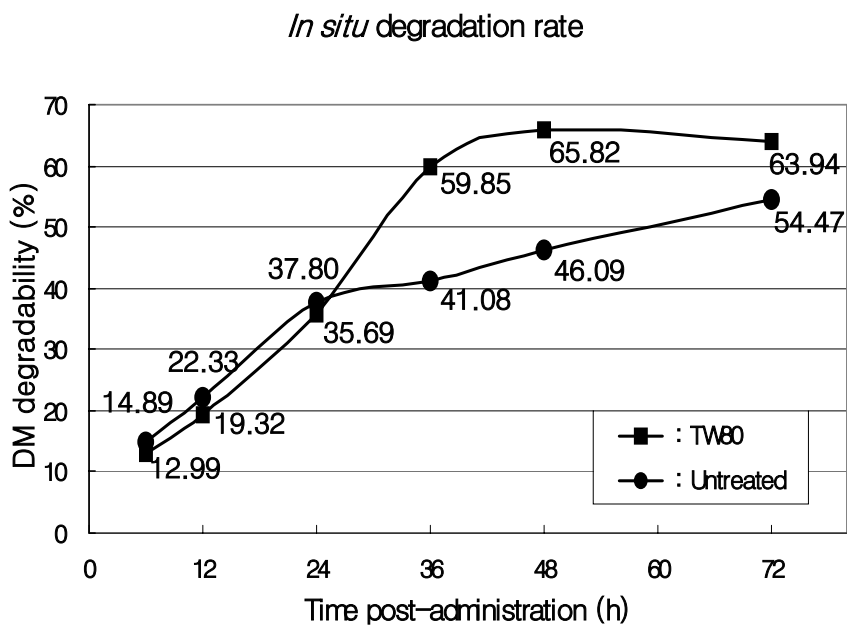


Figure 27. Influence of the emulsified enzyme inducer administration to the rumen of Korean native cows on *in situ* degradation rate (%)

## 2. 효소분비촉진제의 Delivery system이 인공반추위 및 반추위 발효에 미치는 영향

### 가. 연속 발효시험을 통한 최적 첨가량과 사용조건 구명 및 최종 Delivery system의 개발

#### 1) 시험의 세부목표

선발된 premix 법에 의한 delivery system을 공시하여 첨가수준별로 인공반추위(연속 발효조)내에서의 발효성상 및 가스 발생량, 기질의 소화율, 효소의 역가 및 미생물 성장률 등에 미치는 영향을 구명한 다음 최적 첨가량을 결정하고 사용방법 등의 조건을 구명함으로써 최종 delivery system을 개발한다.

#### 2) 공시동물

반추위 케놀라가 장착된 한우 2두를 공시하여 *in vitro* 실험을 위한 위액 채취의 donor로 이용하였다. 공시동물은 조사료와 농후사료를 7:3의 비율로 하여 체중의 2% 수준으로 급여하였다.

#### 3) 공시재료 : 반추위액과 볏짚을 기질로 공시하고 발효기를 이용 첨가구와 무첨가구로 나누어 수행하였다.



Figure 28. Bioflo III artificial rumen fermenter

가) 효소분비촉진제 처리수준: 전체 배양액의 0.001, 0.005, 0.01% 수준으로 효소분비촉진제 첨가

나) 인공반추위 배양조건 : 인공 반추위는 Bioflo III Laboratory-scale fermenter (New Brunswick Scientifics, USA; Figure 12)를 개량하여 반추위 미생물의 성장에 적합하도록 CO<sub>2</sub> gas를 사용하여 혐기적 조건을 유지시키고, 교반속도는 25rpm, 배양온도는 39℃로 맞추어 사용하고 반추위액은 2ℓ 정도를 채취하여 이용하였다.

다) 조사항목 : 가스농도, 소화율, 효소역가 및 미생물 성장을 등

(1) 반추위액 발효성상 및 가스농도 측정 : 인공 반추위로부터 시료는 peristaltic pump를 이용하여 반추위액을 채취였고 반추위액의 채취는 배양 시작 전(0)과 배양 후에는 6, 12, 24, 48, 72시간에 걸쳐 채취하였다. pH meter를 이용하여 채취 즉시 pH를 측정하고 가스발생량을 측정하였다. 인공반추위에서 가스발생량은 infra-red gas analyzer를 사용하여 측정하였다.

## (2) 기질 소화율

발효조에 최초 투입 기질량과 72시간 발효후의 기질량의 차이로 환산하였다. 원심분리 후 잔량을 Wheaton filtering apparatus를 이용하여 여과시켰다. 여과시킬 때 먼저 60°C의 알코올로 3번 세척한 후 증류수로 두 번 세척하였다. 남은 잔량은 78°C에서 12시간 수분을 제거한 후 실온에서 2시간 건조시키고 중량을 측정하여 최초 투입 시료량과 차이를 구하였으며 이 차이량을 투입 시료량에 대한 백분율로 환산하여 소화율을 측정하였다.

## (3) 가수분해효소 활력측정

배양액을 1,500 x g, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. CMCase의 활성은 기질용액을 0.1M acetate buffer (pH 5.0)에 1%(W/V) CMC용액이 되게 하여, 조효소액 0.5ml과 CMC 기질 용액 0.5ml을 섞고, 55°C에서 1시간 반응시키고, 원심분리한 후, 상층액 0.2ml에 DNS 0.6ml을 더하고 100°C에서 5분간 진탕반응시켜 상등액내의 환원당의 양을 DNS (Dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하는 방법을 하였다. CMCase의 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$  mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

## (4) 미생물의 성장률

각 시간대별로 시료 3mL을 채취, 원심분리(6,300×g, 15분, 4°C)하여 bacterial fraction을 취하여 cell pellet을 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 세척하였다. 그리고 나서 spectrophotometer를 이용하여 파장 600nm에서 optical density를 측정하여 미생물의 성장률을 측정하였다.

## 4) 연구 결과

무침가구와 각 수준별 효소분비촉진제 투여구와의 가스발생량을 비교한 결과 전

반적으로 효소분비 촉진제의 가스발생량이 무첨가구에 비해 증가하였으며, 특히 0.001%와 0.005% 첨가구에서 가장 높은 현상을 나타내었다 (Figure. 29).

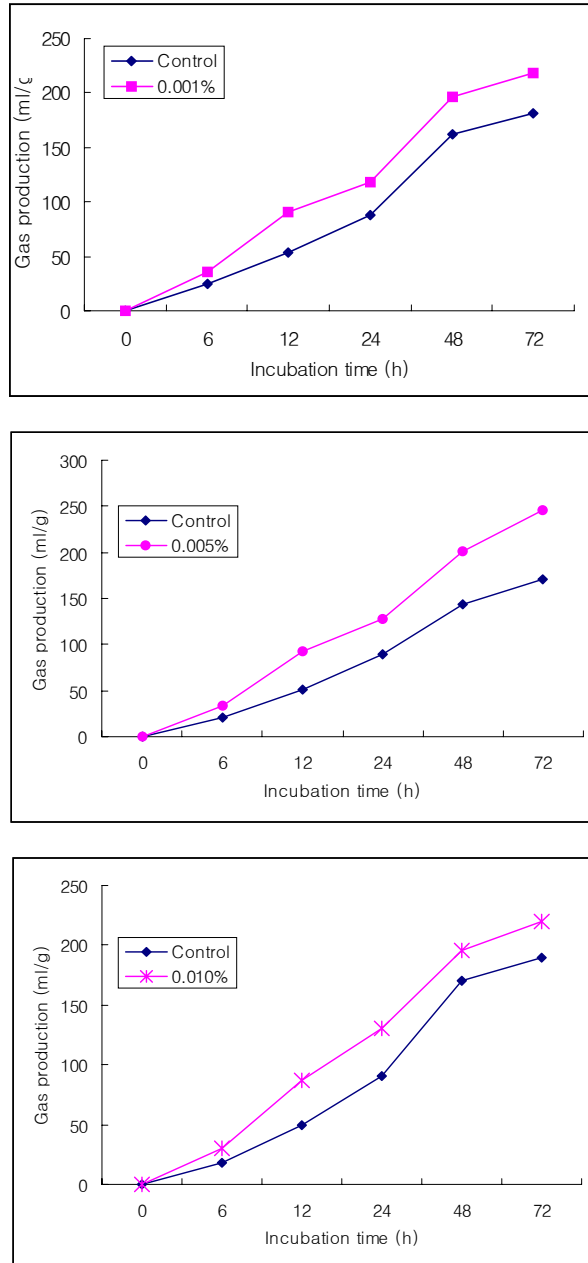
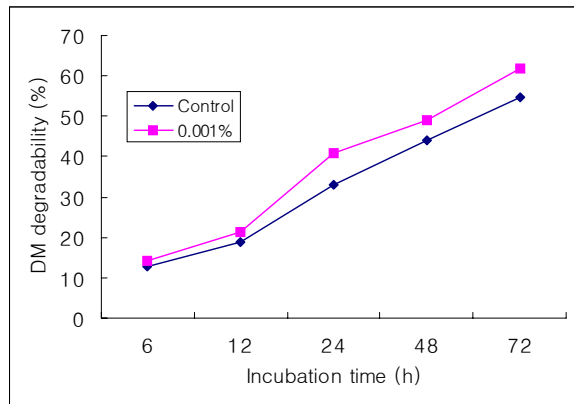


Figure. 29. Gas production as influenced by enzyme inducer

무첨가구와 각 수준별 효소분비촉진제 투여구와 건물소화율을 비교시 모든 처리구에서 배양시간이 증가함에 따라 건물분해율이 증가하였다. 볏짚의 건물분해율이 효소분비촉진제를 첨가함에 따라 약 60%까지 증가하여 소화율이 낮은 볏짚이더라도 촉진제의 이용시 분해량이 증가된다는 것을 알수 있었으며 첨가수준별 소화율의 비교시 0.001%와 0.005% 첨가구에서 대조구와 0.01%첨가구보다 높았다 (Figure. 30).

효소분비촉진제의 첨가수준별 미생물성장율을 측정한 결과는 Table 31에 나타내었다. 미생물성장율은 처리간 큰 차이는 없었지만 효소분비촉진제를 투여함으로써 대조구에 비해 증가하였으며, 특히 0.005%첨가구에서 높은 증가량을 보였다. CMCase 활력에 대한 첨가수준별 효과는 Table 32에 나타나 있는데, 대조구와 비교하여 전반적으로 효소분비촉진제를 투여한 경우 50%이상의 효소활력이 증가되었고 이것은 미생물 세포내 존재하던 섬유소 분해 효소들이 세포밖으로 방출되었으며 또한 미생물의 성장과 활력이 증가되었기 때문으로 사료된다. 특히, 0.005% 첨가구가 가장 활력이 높았으며 0.01%첨가구도 비슷한 경향을 보여 주었다.



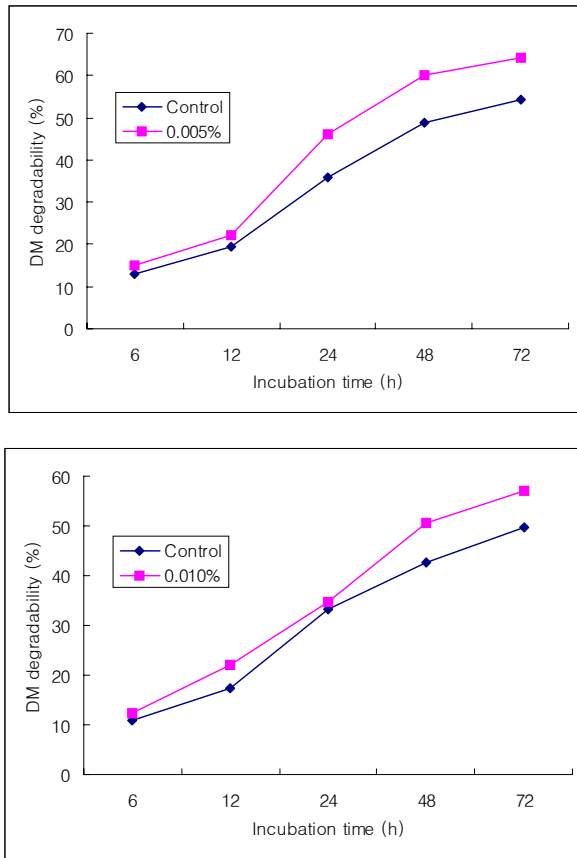


Figure. 30. Dry matter digestibility as influenced by enzyme inducer

결론적으로 연속배양조의 인공반추위에서 사용한 premix법 효소분비촉진제의 첨가는 모든 첨가구에서 섬유소분해율을 증가시켰으며, 특히 0.005%의 첨가수준에서 가장 효과가 있었지만 0.001% 첨가수준시에도 비슷한 효과를 보여주었다.

Table 31. Cell growth as affected by the levels of enzyme inducer

Incubation time(h)	Supplementation levels of the enzyme inducer			
	0%	0.001%	0.005%	0.01%
0	0.49	0.46	0.44	0.48
6	1.11	1.16	0.99	1.03
12	1.43 <sup>b</sup>	1.49 <sup>ab</sup>	1.53 <sup>a</sup>	1.46 <sup>ab</sup>
24	1.08 <sup>b</sup>	1.23 <sup>a</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.10 <sup>b</sup>
48	1.18 <sup>b</sup>	1.26 <sup>ab</sup>	1.31 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>
72	1.22	1.31	1.33	1.25

Table 32. CMCase activity ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{ml}$ ) as influenced by the levels of enzyme inducer

Incubation time(h)	Supplementation levels of the enzyme inducer			
	0%	0.001%	0.005%	0.01%
6	234.5 <sup>b</sup>	331.4 <sup>a</sup>	356.7 <sup>a</sup>	306.8 <sup>ab</sup>
12	423.5	446.5	457.4	387.7
24	678.4 <sup>c</sup>	896.1 <sup>ab</sup>	967.7 <sup>a</sup>	799.2 <sup>b</sup>
48	326.5 <sup>c</sup>	620.7 <sup>ab</sup>	653.4 <sup>a</sup>	563.3 <sup>b</sup>
72	301.7	420.9	469.8	475.9

#### 나. 캐놀라 장착 한우를 공시한 Delivery system의 검증 시험

##### 1) 시험의 세부목표

반추위 캐놀라가 설치된 한우를 공시하여 최종 개발된 반추위 효소분비 촉진제를 직접 가축에 급여한 다음 대사시험을 수행하여 그 효과를 검증하였다. 반추위 발효성상, 반추위내 미생물 생성량, 반추위내 효소의 역가 비교, 사료의 *in vitro*, *in situ* 및 *in vivo* 소화율 등을 측정하였다.



## 2) 연구 방법

### 가) 공시동물 및 시험설계

사료급여량은 가축 체중의 1.75%(풍건물기준)로 고정하였고 농후사료와 조사료의 비율은 6:4로 하여 조사료원으로 볏짚을 급여하는 3개의 처리구를 두고 반추위 fistula가 장착된 한우 거세우 9두를 공시하여 3(효소분비 촉진제 첨가제 3수준) X 3(동물반복)의 Latin square design으로 실험을 수행하였다.

나) 공시동물의 사양관리: 사료의 급여는 1일 2회 (9:00 과 17:00)에 나누어 급여하였으며 효소분비촉진제는 급여되는 농후사료에 premix하여 급여하였다. 물은 자유채식 시켰다.

### 다) 공시사료

한우 거세우에 대한 *in vivo* 소화시험은 자체 배합한 배합사료를 이용했으며 배합비율은 Table 33에서 보는 바와 같으며, 배합사료와 볏짚의 일반 성분 함량은 Table 34와 같다.

### 라) 조사항목 및 방법

#### (1) 조성분 분석

사료의 조성분은 AOAC(1984)법에 의하여 분석하였다.

#### (2) 반추위 발효성상

반추위액의 발효성상을 측정하기 위하여 각 시험사료 급여전 (0시간) 과 급여후 1, 3, 6 및 9시간에 위액을 채취하였다. 위액은 채취 즉시 4 겹의 cheese cloth로 여과한 후 pH를 측정하고 암모니아태 질소 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) 및 휘발성 지방산 (VFA)의 농도를 측정하였다. 채취한 위액의 pH는 Digital pH-meter (Wheaton 120)를 이용하여 측정하였으며  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도는 반추위액을 원심분리 (6,000xg, 15분)한후, 상층액을 이용하여 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 전처리한 후, gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였다.

Table 33. The formula (%) of compound feed for Hanwoo steers

<b>Ingredients</b>	
Yellow corn, ground	35.12
Wheat bran	28.00
Soybean meal	12.60
Fish meal	1.00
Corn gluten feed	10.00
Soybean hull	8.00
Molasses	3.00
Limestone	1.76
Salt	0.50
Lasalocid sodium	0.02

Table 34. Chemical composition of compound feed and rice straw for Hanwoo steers

	Compound feed	Rice straw
Dry matter	87.78	87.07
Crude protein	16.68	5.31
Ether extract	2.95	1.24
Crude fiber	6.62	27.72
Crude ash	5.95	13.16

### (3) 효소 활력측정

시험(1)과 동일한 방법으로 가수분해 효소의 활력을 측정하였고 protease는 Hazen(1974)의 방법에 따라서 azocasein을 25mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 1.25mg/ml(w/v)이 되게 용해한 다음 azocasein solution 4ml와 효소액 1ml를 혼합하여 39℃에서 2시간 동안 반응시키고 30%의 trichloroacetate(w/v) 1ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 6,600xg(4℃)에서 5분간 원심분리한 후 상층액 2ml에 0.25N

NaOH 2ml를 첨가하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard curve는 0.25 N NaOH에 azocasein 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 및 0.0 mg/ml의 농도로 하여 측정하였다.

#### (4) *In vitro*, *in situ* 및 *in vivo* 소화율

*In vivo* 소화시험은 첨가제를 급여한 후 10일 동안 적응시키고 5일 동안 분을 채취하였으며 실험 마지막날 반추위액을 채취하였다. *In situ* 소화율은 각 처리구의 반추위에 급여 조사료와 동일한 종류의 조사료원이 충전된 나일론 백 (Mononylon 천, 기공크기 : 25 $\mu$ m)을 0, 3, 9, 12, 24, 48 및 72시간 현수시켜 배양시간에 따른 반추위내에서 섬유소의 disappearance rate를 Mehrez와 Ørskov (1977)의 방법으로 측정하며, 배양 0시간에서의 건물 소실율은 시료를 반추위내에서 배양시키지 않고 단지 세척에 의한 건물 손실만을 측정하여 계산하였다.

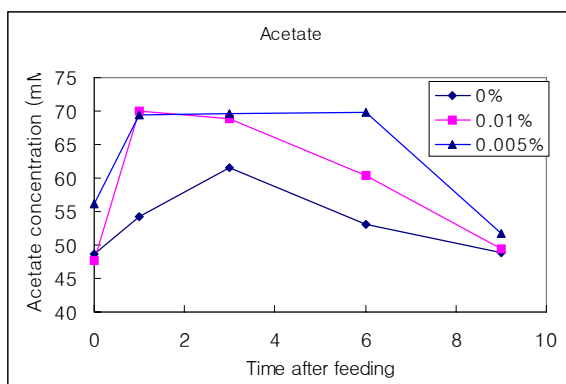
### 3) 연구 결과

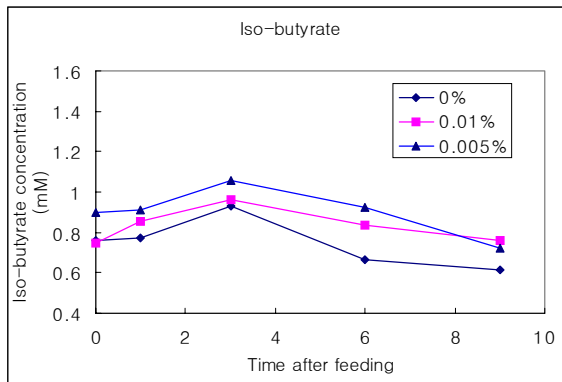
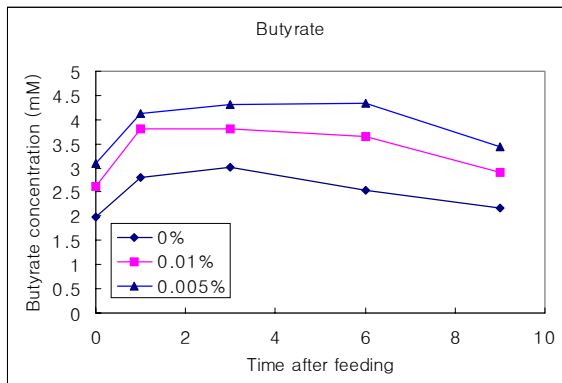
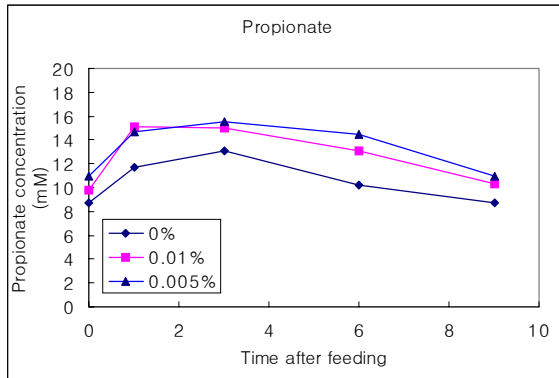
효소분비 촉진제를 반추위액 중에 투여하였을 경우 세포벽에 붙어 있거나 세포내에 함유되어 있던 효소의 대부분이 위액 중으로 부유된다는 사실이 1차년 시험결과 밝혀졌으며, 이 물질들은 점성이 높아 미생물 세포벽에 점막을 형성하여 산소의 공급을 차단하여 호기성 미생물의 성장률을 억제시킨다고 알려져 왔으나 본 연구의 결과 반추위 혐기성 미생물의 성장율을 오히려 증가시킨다는 사실을 발견하였고 앞의 연구결과 *in vitro* 소화율을 획기적으로 증가시키는 효과가 있었다. 그러므로 반추동물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있는 물질로 산업화의 가능성을 검증하기 위하여 기질에다 직접 점성의 효소분비촉진제를 Premix법에 의해 가축사료에 첨가하여 급여하였을때 반추위내 발효성상, 미생물 성장률, 효소활력 및 소화율 시험을 수행하였다. 효소분비촉진제 첨가시 모든 첨가구에서 반추위액의 pH가 대조구에 비하여 낮았으며 이러한 것은 반추위내 발효 정도가 향상되었음을 나타내었다 (Table 35).

Table 35. Ruminal pH as influenced by enzyme inducer

Incubation time(h)	Supplementation levels of the enzyme inducer		
	0%	0.001%	0.005%
0	7.02	6.86	6.93
1	6.68	6.64	6.70
3	6.69	6.51	6.41
6	6.65	6.48	6.47
9	6.89	6.76	6.71
Daily mean	6.79	6.65	6.65

Premix법에 의한 효소분비촉진제 급여시 반추위내의 개개 휘발성 지방산 (VFA)의 사료급여후 시간에 따른 변화를 Figure 30에서 나타내었다. 모든 VFA 들이 사료급여 3시간 후에 최고치에 도달하였으며 반추위 pH의 변화에서 보았듯이 무첨가구가 첨가구에 비해 모든 시간대에서 낮은 경향을 나타내어 효소분비 촉진제에 의해 많은 휘발성 지방산이 생산되었다.





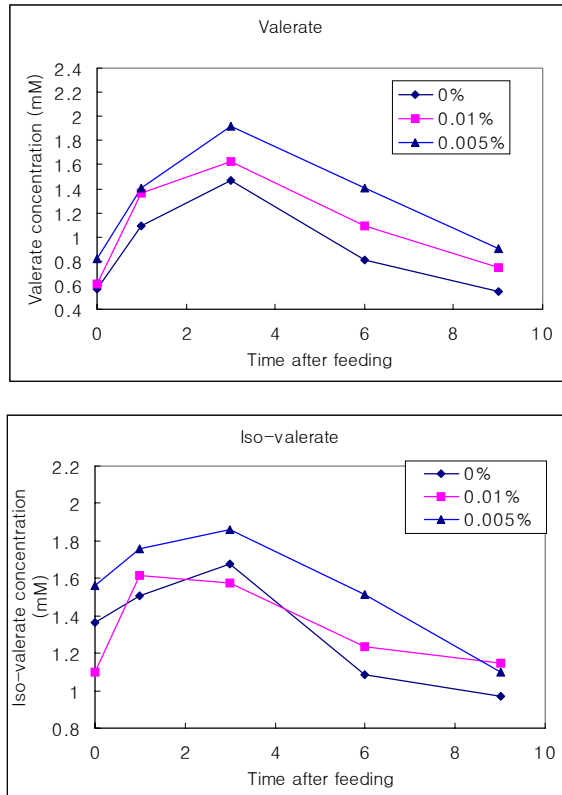


Figure 30. VFA concentration as influenced by enzyme inducer

Premix법에 의한 효소분비촉진제 첨가급여시 거세한우의 반추위내 암모니아 발생량을 Table 36에서 나타내었다. 모든 시간대에서 무첨가구가 효소분비촉진제에 비하여 높은 암모니아 농도를 나타내었다. 이러한 것은 대조구에 비하여 효소분비촉진제를 급여하였을 때 두 첨가수준 모두에서 효소분비촉진제에 의한 미생물 합성량의 증가에 필요한 질소 이용성이 높아졌기 때문에 암모니아 농도가 감소한 것으로 사료된다.

Figure 31에서 보는 바와 같이 Premix법으로 제조한 효소분비촉진제를 급여하였을 때 0.001% 첨가수준은 반추미생물의 성장에 크게 영향을 미치지 않았지만 0.005%로 첨가수준을 증가시켰을 때는 특히 사료급여 후 3시간에 가장 큰 증가를 보여주었다. Table 37은 Premix법에 의한 효소분비촉진제 첨가수준에 따른 거세 한우 반추위내 발효성상의 변화에 미치는 영향을 종합적으로 나타내었다.

Table 36. NH<sub>3</sub>-N concentration as influenced by enzyme inducer (mg/100ml)

Incubation time(h)	Supplementation levels of the enzyme inducer		
	0%	0.001%	0.005%
0	8.49	4.68	6.22
1	11.98	9.71	8.56
3	8.49	4.35	6.02
6	12.29	9.82	8.56
9	4.08	3.54	3.10
Daily mean	9.07	6.42	6.49

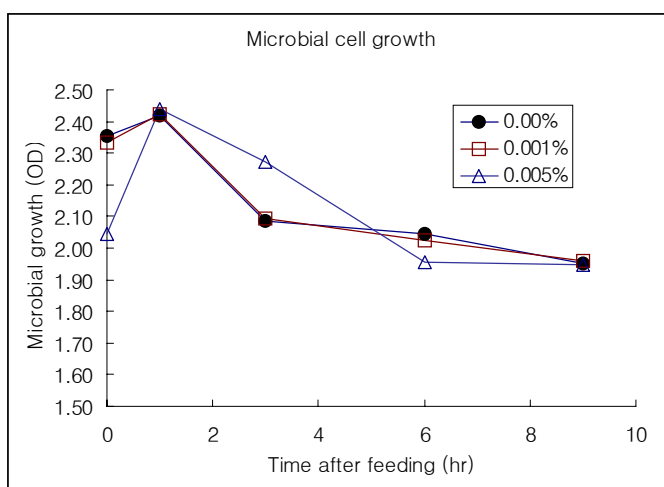


Figure 31. Microbial growth as influenced by enzyme inducer

Table 37. Rumen fermentation characteristics as affected by enzyme inducer

Incubation time(h)	Supplementation levels of the enzyme inducer		
	0%	0.001%	0.005%
pH	6.79	6.65	6.65
NH <sub>3</sub> -N (mg litre <sup>-1</sup> )	90.7	64.2	64.9
Total VFA (mmol litre <sup>-1</sup> )	69.2	78.6	84.3
Acetic acid (mmol mol <sup>-1</sup> )	771.1	755.2	752.2
Propionic acid (mmol mol <sup>-1</sup> )	150.6	160.9	157.6
Isobutyric acid (mmol mol <sup>-1</sup> )	10.8	10.7	10.8
Butyric acid (mmol mol <sup>-1</sup> )	36.0	42.8	45.8
Isovaleric acid (mmol mol <sup>-1</sup> )	19.0	17.0	18.6
Valeric acid (mmol mol <sup>-1</sup> )	12.5	13.4	15.0

### 3. 효소분비촉진제 첨가가 한우 육성우의 생산성 및 사료 이용성에 미치는 영향

#### 가. 연구수행방법

##### 1) 시험동물 및 시험설계

효소분비촉진제의 사료내 첨가가 한우 육성우의 생산성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 평균 체중 139kg 정도의 한우 육성우 30두를 공시하여 효소분비촉진제 무투여구와 투여구로 구분하여 221일간 사양시험을 수행하였다.

##### 2) 사양관리

시험축은 왕겨가 깔린 콘크리트 바닥의 개방우사에서 사육되었으며, 조사료는 볏짚을 자유채식 시켰고, 농후사료는 자체 배합한 육성우용 사료를 자유채식 시켰다. 시험축의 발육조사는 매 15일 간격으로 수행하였다. 체중측정은 오전 9 ~



10시경 공복시에 우형기를 이용하여 계측하였다. 사료 잔량 조사는 매일 아침 사료급여 전에 하였으며, 급수는 급수탱크를 이용하여 급여하였다.

### 3) 시험사료의 분석

시험사료의 샘플은 사료가 배합될 때마다 채취하여 냉장보관 후 분석에 이용하였으며, 시험사료의 화학적 조성은 AOAC 방법 (1990)에 의하여 분석되었다.

## 나. 연구결과

### 1) 시험사료의 영양소 함량

시험사료의 조성은 Table 38에서 보는 바와 같고, 배합사료의 영양소 함량은 조단백질 16%, TDN 70%로 하여 축산기술연구소 사료공장에서 제조하여 시험에 사용하였다.

Table 38. Formula and nutrient composition (Unit : %)

Ingredients	%
Flaked corn	35.00
Wheat bran	28.00
Soybean meal	12.60
Fish meal	1.00
Corn gluten	10.00
Soybean hull	8.00
Molasses	3.00
Limestone	1.68
Salt	0.50
Lasalocid	0.02
CP(%)	16.00
TDN(%)	71.00

전 시험기간 동안 (221일) 한우 육성우의 체중변화를 보면 (Table 39), 개시시 체중은 동일하게 139kg으로 시작하였으며, 종료시 체중은 대조구가 321.0kg 인 반면에 효소분비촉진제 투여구는 329.0kg으로, 총증체량이 무투여구 182.0kg이었고, 투여구 190.0kg으로 평균 일당증체량 무투여구 0.82kg인 반면, 투여구는 0.86kg으로 평균 일당증체가 대조구에 비교하여 5%정도 증가하였으나 처리에 따른 효과는 적었다.

효소분비촉진제를 사료에 첨가시 한우 육성우의 사료섭취량과 사료이용성에 미치는 효과를 Table 40에 나타내었다. 사료섭취량과 사료이용성에 있어서는 효소분비촉진제의 첨가에 의한 영향은 없었다.

Table 39. Growth performance as influenced by enzyme inducer

Items	Control	Enzyme inducer
Intial weight (kg)	139.0	139.0
Final weight (kg)	321.0	329.0
Total weight gain (kg)	182.0	190.0
<sup>r</sup> Average Daily gain (kg)	0.82	0.86

Table 40. Feed intake and feed conversion as influenced by enzyme inducer

Items	Control	Enzyme inducer
Feed intake (kg/d)		
Concentrate	4.04	4.04
Roughage	2.64	2.58
Feed conversion (intake/gain)		
Concentrate	4.93	4.70
Roughage	3.22	3.00

Table 41. Blood constituents as influenced by enzyme inducer

Items	Control	Enzyme inducer
Glucose(mg/dl)	80.5	83.1
Total cholesterol(mg/dl)	144.5	141.0
BUN(mg/dl)	14.1	14.1
Albumin(g/dl)	4.3	4.3
Calcium(mg/dl)	10.2	10.3
Phosphorus(mg/dl)	7.5	7.2
LDH(U/l)	940.5	891.8
GOT(U/l)	70.3	69.4
GPT(U/l)	23.5	22.1
Alk. Phosphate(U/l)	176.3	186.8

Table 41은 효소분비촉진제의 투여 유무에 따른 한우 육성우의 혈액중 영양대사물질의 함량을 조사한 결과를 나타내었으나, 처리에 의하여서는 혈액대사물질의 함량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 본 연구에서 조사된 glucose 함량은 권 등(1997)이 홀스타인 수소와 거세우에서 조사하여 보고한 수소 75.7~96.5, 거세우 70.0~102.3와 유사한 결과를 보여주고 있다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 반추위 메탄생성 억제기술 개발

1년차 연구목표는 반추위 미생물군(박테리아, 프로토조아 및 곰팡이군)의 분리, 이들이 메탄생성에 미치는 영향 조사 그리고 반추위 미생물군과 메탄생성박테리아와의 혼합 배양이 가스 발생량과 조성에 미치는 영향을 구명하는 것이었다. 위 연구목표를 달성하기 위해 반추위액으로부터 박테리아, protozoa 그리고 fungi를 분리하였으며, 이들 미생물군을 기질의 조성을 달리하여 배양하여 가스 발생량과 조성을 조사하였다. 또한 분리한 미생물군과 메탄생성박테리아를 혼합 배양하여 가스발생량 및 조성 변화를 조사하여 1년차 연구 목표를 달성하였다. 본 연구의 결과에 의하면 반추위에서 메탄생성을 억제하는 데 있어 미생물군집별 미치는 영향이 상이하며 메탄생성박테리아와의 상호작용도 각기 다를 수 있다. 이러한 결과는 반추위 발효를 연구하는 데 있어서 중요한 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 보인다.

2년차 연구목표는 수소가스 제어를 통한 메탄생성 억제기술 개발과 연속 발효조 실험을 통한 메탄생성억제제의 메탄발생량 및 발효성상에 미치는 영향을 구명하는 것이었다. 위 연구목표를 달성하기 위해 메탄억제능력이 있는 것으로 알려져 있는 물질들 (불포화지방산, 항생제, 유기산 그리고 할로겐화합물 등)을 찾아 이들을 *in vitro* 상에서 단독 그리고 혼합처리하여 메탄생성 억제능력이 가장 뛰어나면서 반추위 발효에는 역효과가 없는 방법을 찾고자 하였다. 실험결과, 할로겐화합물이 메탄생성 억제능력이 가장 우수하였으나, H<sub>2</sub> 가스가 축적되어 이를 줄이기 위해 불포화지방산이나 유기산을 혼합처리 하였다. 연속배양실험에서는 메탄생성억제능력이 가장 우수한 BES를 공시하여 메탄생성억제능력을 살펴 보았고, 이에 더하여 가스발생량과 발효 뿐만 아니라 PCR 기법을 이용하여 메탄생성박테리아의 군집변화도 살펴보아 2년차 목표 달성에도 무리가 없었다. 2년차 연구결과는 반추위 발효에 영향을 주지 않으면서 메탄생성 억제를 달성하 기란, 역시, 이론과 마찬가지로, 어렵다는 기존의 학설을 재확인하였으며 단일 물질을 이용한 일정 단계의 조절로는 메탄생성 억제가 어렵다는 점도 확인시켜

주었다. 그러나 본 연구결과 일부의 물질 특히 BES와 같은 물질이 메탄생성 억제능력이 매우 높다는 점과 비록 그 효과는 낮으나 메탄생성에 영향을 줄 수 있는 물질들도 있어 금후 연구가 계속되면 새로운 메탄생성 억제물질의 발견 가능성도 시사해 주고 있다. 본 연구에서 사용한 각종 물질들의 작용기작이 좀 더 명확히 밝혀지면 반추위내 메탄가스 억제방안 개발이 좀 더 쉬워질 것으로 보이며, 이러한 연구의 기초자료로 본 연구결과가 유용하게 이용될 것으로 기대한다.

3년차 연구목표는 메탄생성 억제기술을 동물을 이용한 *in vivo* 상태에서 검증하는 것이었다. model 제제로써 2년차 연구를 통해 메탄생성 억제제로 비교적 효과가 우수했던 BES와 malate를 첨가하여 반추위 발효와 가스 발생에 미치는 영향을 측정하였다. 동물을 직접 이용한 *in vivo* 실험에서는 *in vitro* 실험에서처럼 메탄억제제의 효과가 나타나지 않았다. 이는 반추위 미생물 특히 methanogen들이 이들 물질에 적응하여 나타난 결과일 수도 있으나 첨가량이나 첨가방법을 달리하여 연구한다면 차후 효과가 있는 메탄억제제를 개발할 수 있는 가능성도 있다.

## 제2절 효소분비촉진제의 Delivery system 개발

협동연구과제인 “효소분비촉진제의 delivery system 개발과 산업화 연구”의 1년차 연구목표는 효소분비촉진제의 delivery system의 개발과 개발된 delivery system의 실험실내 검증실험을 하는 것이었다. 개발하려는 효소분비촉진제가 점도가 상당히 높은 물질이기 때문에 사료 첨가제로 이용하기 위해서는 delivery system의 개발이 필요하다. 가장 간편하고 효율적으로 이용할 수 있는 방법을 선택하기 위하여 delivery system들이 반추미생물에 의한 섬유소분해력, 발효성상, 미생물의 성장률, 가수분해효소의 활력에 미치는 영향을 구명하였다. *In vitro* 실험과 *in situ* 실험을 통해, 사용한 3가지 delivery system이 효소의 분비를 촉진시키고 소화율과 효소역가를 향상시킴을 검증하여 목표를 100% 달성하였다.

2년차 연구목표는 1년차에서 선발된 delivery system으로 제조된 효소분비촉진제의 최적 첨가량과 사용조건을 연속 발효시험을 통해 구명하고 최종적으로 캐

높라가 장착된 한우를 공시하여 최종 delivery system을 검증하는 것이었다. 연속 발효시험에서 premix법에 의해 제조된 효소분비촉진제를 첨가시 0.005%첨가수준에서 가스발생량, 건물분해율, 섬유소 분해효소의 활력 등이 가장 우수하였다. 한우 대사시험에서도 0.005% 수준에서 반추위 발효성상 및 건물 소화율이 가장 향상되는 결과를 얻으면서 목표를 100% 달성하였다.

3년차 연구목표는 효소분비촉진제 첨가가 한우 육성우의 생산성 및 사료 이용성에 미치는 영향을 조사하는 것이었다. 본 연구목표를 달성하기 위하여 한우 육성우 30두를 공시하여 효소분비촉진제 무투여구와 투여구로 구분하여 221일간 사양시험을 수행하였다. 그러나, 효소분비 촉진제의 첨가가 사료섭취량과 사료이용성 그리고 혈액대사물질의 함량에 영향을 미치지 않았다. 비록 사양시험에서는 효소분비 촉진제의 첨가효과가 나타나지 않았지만, 대사시험에서는 효과가 입증되어 만약 첨가수준을 달리하여 사양시험을 실시한다면 또다른 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구결과는 효소분비 촉진제의 사용으로 사료 이용성 향상 및 분 배설량 감소를 기대할 수 있으며 이를 통해 가축생산성 향상 뿐만 아니라 환경문제 해결에도 효과를 기대할 수 있으며, 볏짚과 같은 부존사료자원이나 소화율이 낮은 조사료들의 에너지 이용성과 소화율 향상에 효과가 있음을 입증해 주는 결과이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제1절 반추위 메탄생성 억제기술 개발

1. 기초자료 제공 : 반추미생물 분리, 배양, methanogen과의 coculture, 메탄생성 과정 및 기전

2. 산업계 자료 및 기술 제공 : 각종 메탄생성 억제제의 사용수준, 방법

3. 논문 발표 :

1) 학술지 발표 :

① Effects of various methane inhibitors on *in vitro* methane production and fermentation (게재 예정)

② Inhibition of *in vitro* methane production by halogenated compounds, organic acids and unsaturated fatty acids (게재 예정)

2) 학회 발표 :

① “Effects of essential oil on *in vitro* gas production and fermentation”  
(The 4th Joint Symposium of Korea and Japan on Rumen Metabolism and Physiology, 2002)

② “Effects of essential oil on *in vitro* gas production and fermentation”  
(The 2nd Joint Colloquium on Agricultural Genomics, 2002)

③ “Effects of various methane-inhibitors on methane production and

fermentation in vitro” (한국동물자원과학회, 2003)

- 3) 대농민/산업체 발표 : “메탄가스 생성조절과 반추동물의 생산성”  
(제10회 사료가공단기과정)

## 제2절 효소분비 촉진제의 delivery system의 개발

1. 기초자료 제공 : 효소분비 system, 효소분비 촉진제의 작용기전
2. 특허출원 : 출원 완료 (첨부 참조)
3. 산업체 기술이전 : 이전 완료 (첨부 실시계약서 참조)
4. 논문 발표

### 1) 학술지 발표

- ① Effects of surfactants and acrylic acid polymers on the distribution of ruminal enzymes and the growth of ruminal microorganisms (게재)
- ② Effects of Non-ionic Surfactants on Enzyme Distributions of Rumen Contents, Anaerobic Growth of Rumen Microbes, Rumen Fermentation Characteristics and Performances of Lactating Cows (게재)
- ③ Influences of Surfactant Tween 80 on the Gas Production, Cellulose Digestion and Enzyme Activities by Mixed Rumen Microorganisms (게재)
- ④ The effects of non-ionic surfactant on the fermentation characteristics,



microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of korean native cows. (게재 예정)

2) 학회 발표

- ① “Influences of surfactants on the enzyme distributions in the rumen compartments and the growth of pure cultures of rumen microbes” (The 3th Joint Symposium of Korea and Japan on Rumen Metabolism and Physiology, 2000)
- ② “Effects of Non-ionic Surfactants on Enzyme Distributions of Rumen Contents, Anaerobic Growth of Rumen Microbes, Rumen Fermentation Characteristics and Performances of Lactating Cows” (International Symposium on Recent Advances in Animal Nutrition, 2002)
- ③ “효소분비 촉진제의 delivery system이 거세한우의 반추위 발효특성 및 영양소 소화율에 미치는 영향” (한국동물자원과학회, 2003)

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

사료이용율을 높이고 반추동물의 생산 효율을 향상시키기 위해 반추위 환경을 조절하려는 노력들이 상당히 있어 왔다. 이러한 노력의 결과 많은 종류의 첨가제가 개발되었고 반추위 대사에 영향을 줄 수 있었다. 지난 10년동안 시도되었던 반추위 조절방법에는 메탄 억제제, 항생제, 단백질 분해 억제제나 deamination inhibitor, defaunation agents, 미생물 효소, 지방산 또는 지질 급여, 버퍼제, artificial saliva, propionate 생성 촉진, yeast culture나 mold 발효추출물을 포함한 non-bacterial direct-fed microbials(DFM) 등이 있다.

surfactant Tween 80은 여러 호기성 곰팡이에서 효소의 분비를 촉진시키는데 효과적인 surfactant로 잘 알려져 있다 (Reese and Macquire, 1969; Schewale and Sadana, 1978; Deshpande et al., 1987; Hung et al., 1988; Long and Knapp, 1991). Yazdi 등 (1990)도 호기성 ascomycetes fungus *Neurospora crassa*의 cellulase complex에 관한 연구를 통해 surfactant Tween 80이 효소의 유도과 분비를 자극하는데 효과적이라는 것을 증명하였다. Yazdi 등 (1990)은 *N. crassa*의 여러 cellulolytic enzymes 분비는 세포막의 지방 조성과 밀접하게 관련되어 있다는 것을 증명하였다. 즉, 세포막 지질의 불포화도가 증가하면서 세포막의 유동성이 바뀌고, 효소의 분비가 증가하였다. surfactant의 효과는 크게 세 가지를 들 수 있다: 1)세포막에 작용하여 투과율 (permeability) 증가 (Reese and Macquire, 1969), 2) 결합되어 있는 효소의 분비 촉진, 그리고 3) 산소 공급의 감소로 인한 성장률 감소 (Hulme and Stranks, 1970).

Lee 등 (2003)은 예비실험에서 Tween 80이 고농후사료를 급여한 소에서 반추미생물의 succinate와 lactate 이용율을 촉진시키고, polysaccharide 분해 효소의 활력을 향상시키는 것을 발견하였다. 그리고 배지내 Tween 80의 농도가 0.05% (v/v)일 때 반추위 박테리아와 fungi의 성장률, 곡물 소화율, succinate와 lactate dehydrogenase 활력 그리고 polysaccharide 분해 효소의 활력이 증가하였다.

NIS가 여러 호기성 곰팡이의 cellulase complexes로부터 효소의 분비를 촉진

시키는데 가장 효과적인 surfactant로 알려져 있지만 (Deshande et al., 1987; Wittenberger et al., 1987), 반추위 혐기성 미생물에 대한 효과는 아직 뚜렷하게 보고 되지 않았다. 그렇지만, 호기성 미생물을 이용한 여러 연구들을 통해 Tween 80의 사료첨가제로써의 가능성을 보여주었고, 이는 항생제나 ionophore에 대한 의존도를 경감시키는 주는 것이다.

메탄가스는 이산화탄소 다음으로 지구온난화에 영향을 미치는 요인이다. 대기 로 방출되는 메탄의 양이 매년 1%씩 증가하고 있는 추세이며, 양적으로는 연간 400~600 Tg으로 전체 지구온난화의 15%를 기여한다. 메탄은 이산화탄소보다 적외선을 흡수하는 능력이 21배 높기 때문에 (Tyler, 1991), 적은 양이더라도 지구온난화에 미치는 영향을 무시해서는 안된다.

메탄가스의 주요 발생원을 살펴보면 습지대, 바다 등의 자연환경, 석유·가스·석탄 등의 연료 사용, 쓰레기 매립지와 폐수로부터 발생하며, 농업과 관련해서는 논과 가축으로부터 주로 발생한다. 가축으로부터 발생하는 메탄가스의 양은 연간 80 Tg으로 이는 전체 지구온난화의 약 2%를 차지한다(Johnson et al., 1991). 가축에서 발생하는 메탄가스는 대부분 반추동물에서 발생하는 것으로 그 중에서 소가 75%를 차지하며 나머지는 면양, 산양 등에서 발생된다.

자연계에서 발생하는 메탄가스는  $H_2$ , formate, acetate, methanol 그리고 mono-, di-, tri-methylamine과 같은 다양한 기질들이 이용되어 발생된다(Wolin과 Miller, 1987). 수중 침전층, 하수 처리장과 같은 혐기환경에서는 모든 유기물의 탄소가  $CO_2$ 와  $CH_4$ 으로 전환된다. 이런 환경에서는 유기물이 몇 주 또는 몇 달 동안 머물러 있기 때문에 syntrophic hydrogen-producing acetogens, acetotrophic methanogen과 같은 성장속도가 느린 박테리아 군집(doubling time > 3일)이 유지될 수 있어 이들 박테리아에 의해 acetate, propionate 그리고 butyrate가  $CO_2$ 와  $CH_4$ 으로 완전히 전환된다. 그러나 반추위에서는 유기물의 이전시간이 1~2일이기 때문에 유기물의 탄소가  $CO_2$ 와  $CH_4$ 으로 완전 전환하기에는 너무 빠르다(Hobson과 Wallace, 1982). 그러므로 반추위에서는 주로  $H_2/CO_2$ , formate를 기질로 하여 메탄이 생성되며, acetate, propionate 그리고 butyrate는 반추위에서 축적되었다가 동물의 소화관에서 흡수되고 이용된다.

메탄생성균에 의해  $CO_2$ 가  $CH_4$ 으로 전환될 때 4개의 중간대사물질들을 거치는데, 여기에는 formyl, methenyl, methylenyl 그리고 methyl이 있다. 지금까지  $CO_2$ 가

CH<sub>4</sub>으로 환원되는 과정에 6개의 조효소(coenzyme)가 관여하는 것으로 확인되었으며, 그 환원과정은 7단계로 나뉜다 (DiMarco 등, 1990). MFR, H<sub>4</sub>MPT 그리고 HS-CoM에 의해 탄소가 운반되며 마지막으로 CH<sub>3</sub>-S-CoM이 methyl-coenzyme reductase에 의해 CH<sub>4</sub>으로 환원되면서 끝나지만, 이 반응은 CO<sub>2</sub>가 MFR과 결합하여 formyl-MFR을 형성하는 반응을 활성화시키면서 다음 CH<sub>4</sub> 생성반응과 연결되어 있다(Romesser과 Wolfe, 1982).

메탄생성균은 독특한 보조인자(coenzyme M, HS-HTP, F420)와 지질(isopranyl glycerol ethers)을 가지고 있어 구별이 분명한 미생물이다. 메탄생성균의 세포벽은 pseudomurein, 단백질, 당단백질(glycoprotein) 또는 heteropolysaccharides로 이루어져 있다. 메탄생성균은 배양조건이 까다로운 혐기성 박테리아로, 산화환원전위가 -300mV이하의 환경에서만 자란다(Stewart와 Bryant, 1988). 메탄생성균은 여러 혐기 서식지에서 분리되었는데 현재까지 66종이 분리되었다(Mackie 등, 1992). 이 중에서 5종만이 반추위로부터 분리되었으며(McAllister 등, 1996), *Methanobrevibacter ruminantium*과 *Methanosarcina sp.*는 반추위에서 mL당 1×10<sup>6</sup> 으로 존재한다(Miller 등, 1986). 메탄생성균은 반추위에서 그 수가 많지 않지만 반추위에 일찍 정착하면서(예를들어, 어린 양에서 생후 30시간 이내) 반추위 미생물군의 기본적인 구성요소가 된다(Morvan 등, 1994).

에너지를 살펴보면 반추위의 메탄생성균은 주로 H<sub>2</sub>(80%)와 formate(18%)를 기질로 이용하여 메탄을 생성한다. 그러나, *Methanosarcina*는 예외적으로 methylamines, methanol, 또는 acetate로부터 메탄을 생성한다(Patterson과 Hespell, 1979).

동물이 섭취한 사료가 반추위에서 발효되어 최종산물인 휘발성지방산(VFA), CO<sub>2</sub>, 그리고 CH<sub>4</sub>를 생성하는 과정에서 메탄이 생성되기까지 많은 미생물들이 관여한다는 것을 볼 수 있는데, 우선 박테리아, 프로토조아 그리고 곰팡이를 포함한 1차 발효미생물이 단백질, 전분 그리고 식물 세포벽 물질을 가수분해하여 단순당과 아미노산을 생성한다. 이들 단순 물질들은 다시 1차와 2차 발효미생물들에 의해 발효되어 VFA, H<sub>2</sub> 그리고 CO<sub>2</sub>가 생성되며, H<sub>2</sub>와 CO<sub>2</sub>는 methanogens에 의해 메탄생성에 이용된다. Methanogens은 다른 반추미생물에 의해 생성된 H<sub>2</sub>를 빠르게 메탄생성에 이용함으로써, 반추위내 H<sub>2</sub> 농도를 1μM 미만으로 낮게 유지시켜 주는데, 이를 종간수소전이(interspecies hydrogen transfer)라고 한다. methanogens으로의 종간수소전이는 섬유소분해박테리아(*Ruminococcus albus*,

*Ruminococcus flavefaciens*) 뿐만 아니라 비섭유소분해박테리아(*Selenomonas ruminantium*), 곰팡이 그리고 프로토조아 모두로부터 일어난다. methanogens은 중간수소전이를 통하여 NADH와 같은 환원된 nucleotide의 축적을 막음으로써 다른 반추미생물에 의한 소화를 촉진시킨다(Williams, 1994).

반추위에서 메탄을 감소시키기 위해서는 크게 methanogens을 직접적으로 억제하는 방법과 메탄생성의 기질인  $H_2$ 를 methanogens이 아닌 다른 방향으로 이용되도록 하여 메탄을 줄이는 방법이 있을 것이다. 무엇보다도 반추위에서 메탄을 억제하는데 있어 중요한 것은 상당한 메탄 감소 뿐만 아니라 소화율 감소와 같은 역효과가 없어야 하며, 그 방법이 동물에게 안전해야 하고, 메탄억제효과가 지속적이어야 한다는 것이다.

메탄발생은 사료섭취량과 역의 관계가 있다. 즉, 사료섭취량이 증가할수록 섭취한 사료당 메탄발생량이 감소하였다고 보고하였다 (Johnson 등, 1993). 그리고 유지수준으로 급여하였을 때 소화율이 증가하면 메탄발생량도 증가하였다고 보고하였다 (Blaxter과 Clapperton, 1965). 소화율이 증가할수록 메탄의 기질이 많이 발생하기 때문에 메탄발생량은 증가하게 된다.

발효되는 탄수화물의 형태도 메탄발생량에 영향을 주는데, 이는 주로 반추위내 pH와 미생물군집에 영향을 주기 때문일 것이다. 구조탄수화물(cellulose, hemicellulose, pectin)이 비구조탄수화물(soluble sugars, fructosan, starch)보다 메탄을 더 발생하며 (Moe와 Tyrrell, 1979), 비구조탄수화물도 더욱 나누면 수용성당이 전분보다 메탄을 더 발생시킨다고 보고하였다. Ørskov 등(1968)도 농후사료의 양이 증가할수록 메탄발생량은 점차 감소하여 조농비율이 20 : 80일 때의 메탄발생량은 100% 건초 급여했을 때의 절반정도였다고 보고하였다. 농후사료를 급여할수록 메탄발생량이 줄어드는 것은 반추위내에서 농후사료가 빠르게 발효되어 lactate, VFA와 같은 발효산물이 축적되면서 반추위 pH가 떨어진다. Methanogens은 낮은 pH에서 억제되기 때문에 메탄발생이 줄어드는 것이다 (Demeyer과 Henderickx, 1967). 농후사료가 증가함에 따라 propionate 비율이 17%에서 31%로 증가하였는데, 이는 메탄과 propionate 생성사이에 서로 역의 관계에 있음을 보여주는 것이다 (Van Nevel 등, 1974). 이 관계를 근거로 하여, 사료의 조성과 양을 조절하여 반추위내에서 VFA 조성을 변화시키면 메탄의 생성을 변화시킬 수 있게 된다. 즉, acetate:propionate(A/P) 비율의 감소는 메탄발생을 줄여줄 것이다.

본 연구에서 조사한 불포화지방산, 항생제, 유기산 그리고 할로젠 화합물외의 메탄억제방법으로는 다음과 같다.

#### 1) 프로토조아 제거 (Defaunation)

반추위의 프로토조아(protozoa)는 숙주동물에게 필수적이지는 않지만 전반적인 반추위 소화과정에서 중요한 역할을 하는 것은 분명하다. 프로토조아는 박테리아를 포식하고 반추위내에서 선택적으로 남아 있으면서 미생물체 단백질 합성의 효율과 양을 감소시키며, 앞에서 언급한 바와 같이 프로토조아에는 메탄생성박테리아가 부착되어 살고 있기 때문에 프로토조아는 메탄발생에 중요한 역할을 한다. 이 외에도 프로토조아가 반추위내의 소화, 발효양상 등에 미치는 영향을 살펴보기 위해 반추위에서 프로토조아를 제거하는데 이것을 defaunation이라 한다.

소, 면양, 산양의 경우 defaunation시키면 정상적인 동물에 비해 메탄발생량이 20-50%정도 감소되었으며 (Kreuzer 등, 1986), Kreuzer(1986)는 defaunation을 통해 총섭취에너지중 메탄으로의 에너지 손실이 7.87%에서 5.49%로 줄어들었다고 보고하였다. 하지만 *in vivo* 실험을 통해 볼 때, defaunation에 의한 메탄의 감소는 사료 조성에 의해 결정되었다. 조사료만을 급여했을 때는 defaunation에 의한 메탄 감소가 없었지만, 농후사료를 함께 급여하였더니 메탄이 감소되었다 (Itabashi 등, 1984).

Defaunation에 의한 메탄생성 감소는 프로토조아에 부착된 메탄생성박테리아의 감소, 조섬유 소화율의 감소, 그리고 프로토조아에 의해 발생되던  $H_2$ 와 formate의 감소로 설명된다(Van Nevel과 Demeyer, 1995).

반추위에서 프로토조아를 제거하기 위해서는 그 방법이 선택적, 효과적, 지속적이어야 하고, 적용이 용이해야 하며, 동물에게 무해하여야 하지만, 아직까지는 이를 만족시키는 방법이 없다 (Van Nevel과 Demeyer, 1995). 프로토조아를 제거하기 위한 화학적 제제로는 copper sulfate, dioctylsodium sulfosuccinate, sodium lauryldioxy sulfate, calcium peroxide 등이 있다. defaunation된 동물을 유지하기 위해서는 재접종을 막기 위해 다른 동물과 격리하여야 하는 어려움도 있을 것이다.

## 2) Acetate 생성(acetogenesis)의 유도

포유동물과 흰개미의 대장에서는 acetate 생성박테리아(acetogens)가 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>를 이용하여 acetate를 생성한다.



이 과정을 reductive acetogenesis라고 부르며, 대장 발효에서 중요한 H<sub>2</sub> 처리 역할을 하고 있다. 반추위에서도 acetogens가 분리되었는데, 이들은 CO<sub>2</sub>를 acetate로의 환원시키는 능력도 가지지만, formate, glucose, cellobiose, 그리고 fructose를 포함한 다른 기질들로부터 acetate를 생산하기도 하며 (Greening와 Leedle, 1989), 반추위에서 수적으로도 methanogens와 비슷하게 존재한다 (Leedle와 Greening, 1988). 반추위에서 이 반응을 촉진시킬 수 있다면 methanogens와 기질경쟁을 하여 메탄발생량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 동물에 의해 쉽게 에너지원으로 이용될 수 있는 acetate가 생성되므로 에너지 효율을 높일 수 있을 것이다 (Weimer, 1998). 하지만, acetogens는 H<sub>2</sub>에 대한 친화도가 methanogens보다 상당히 낮기 때문에 반추위에서 acetogenesis는 잘 일어나지 않는다 (Mackie와 Bryant, 1994).

Weimer(1998)는 acetogens의 다양한 기질 이용능력 때문에 H<sub>2</sub>에 대한 친화도가 낮은 것이라고 보고, 정상적인 반추위의 methanogens와 효과적으로 기질경쟁을 하려면 H<sub>2</sub>에 대한 친화도가 높은 전문적인 acetogens를 발견하거나 생명공학 적 접근방법을 제시하면서 화학적 억제방법과 병행하면 더욱 효과가 있을 것이라 하였다. Nollet 등(1997)은 BES를 처리하여 메탄생성박테리아를 억제하고 acetate생성 박테리아를 첨가하여 메탄의 감소 뿐만 아니라 VFA 생성을 촉진시켜 약 13~15%의 에너지 이용효율 증가효과를 얻었다고 보고하였다.

현재까지 발표된 메탄생성억제제가 동물생산성에 미치는 영향에 관한 연구결과는 많지 않다. 할로겐화 화합물인 BCM, HCS의 처리는 사료섭취량을 감소시켰으며, 일당증체량은 증가시켜 사료효율이 12~13% 증가하였다. 그러나 유사한 할로겐화 화합물인 amicloral도 유의적인 차이는 없었지만, 경향은 BCM과 HCS와 비슷하였다. Malate 처리는 사료섭취량에 영향이 없었으며, 일당증체량과 사료효율을 각각 4%, 8%씩 증가시켰다.

Sauer 등(1998)은 유우에서 대두유 처리에 의한 메탄억제와 유량, 유성분 변화를 살펴보았다. 대두유 처리는 메탄발생량을 감소시키지 않았지만,  $\text{CO}_2:\text{CH}_4$ 의 비율은 유의적으로 높아 전체 가스발생량에서 메탄의 비율이 감소하였음을 의미한다. 사료섭취량은 감소시켰으나 유지방과 유단백질의 함량에는 영향을 끼치지 않았다. 그리고 우유의 지방산 조성에서는 필수지방산인 linoleic acid의 함량을 증가시켰다. 그러나, Casper와 Schingoethe(1989)는 유우에 지방을 첨가하면 유선에서의 아미노산 흡수가 감소하여 유단백질 함량이 감소한다고 하였으며, Sutton과 Morant(1989)는 장쇄불포화지방산을 첨가하면 유지방 함량이 급격하게 감소한다고 보고하였다. 따라서 유우에게 있어 지방 첨가는 유성분에 크게 영향을 줄 수 있으므로 메탄억제를 위한 지방 첨가는 신중해야 할 것이다.

지금까지 많은 물질들이 반추위의 메탄생성에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 줌으로써 메탄생성이 억제되는 기전을 살펴보았다. 그러나, 대부분 만족스러운 효과를 보여주지는 못했다. 사료의 조성에 따라 메탄 억제 효과가 변하였으며, 장시간 처리하였을 때 반추미생물이 그 물질에 대해 적응하거나 분해하여 그 효과가 지속적이지 못하였다. 반추위에서 acetate 생성반응을 유도하기 위해 제시했듯이 다른 억제제와의 병행하여야 그 효과가 나타나기도 하였다. 유기산은 propionate 생성을 촉진시키면서 메탄생성을 억제하여 안전하고 에너지 효율적으로 바람직하지만 다른 물질에 비해 메탄억제효과가 크지 않았다.

이상적인 메탄생성억제제는 그 작용이 특이적, 지속적이어야 하고, 동물에게는 독성이 없어야 하며, 축산물에 잔류되지 않고 안전해야 할 것이다. 이것을 만족하기 위해서는 하나의 방법으로는 힘들지만, 할로겐화 화합물과 acetogenesis를 동시에 처리하는 방법과 같이 여러 방법을 병행한다면 더 효율적인 메탄억제 방법이 될 것으로 본다. 최근에는 식물추출물 중에서 메탄생성 억제 물질을 찾거나, 생명공학 기법을 이용해 메탄생성 과정에 관여하는 효소의 발현을 억제하는 연구 등이 진행되고 있다.

지구온난화의 규제 및 방지를 위한 국제협약인 교토의정서(1997)는 선진국들의 온실가스 배출량을 2008년부터 2012년까지 지난 90년 수준보다 5.2% 줄이자는 게 주요 요지로서, 여러 선진국에서는 메탄가스의 감소 연구가 활발하다. 우리나라도 앞으로 감축의무에 참여하는 것이 불가피할 것이다. 따라서, 아직까지는 메탄억제에 대한 구체적인 성과는 미흡하지만 환경친화적인 축산을 위해 노력해야 할 것이다.



## 제 7 장    참고문헌

- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis(14th Ed.). Association of official analytical chemists. Washington, D.C.
- Abe, M., H. Shibui and F. Kumeno. 1972. Improved method for counting rumen protozoa. Jap. J. Zootech. Sci. 43:535.
- Allison, M. J. 1978. Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 35:872-877.
- Asther, M., G. Corrieu, R. Drapon, and E. Odier.1987. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by Phanerochaete chrysosporium INA-12. Enzyme Microbiol. Technol. 9:245-249.
- Balch, W. E. and R. S. Wolfe. 1979. Transport of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in Methanobacterium ruminantium. J Bacteriol 137(1): 264-73.
- Bauchop, T. 1967. Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues. J. Bacteriol. 94: 171-175.
- Blaxter, K. L. and J. L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. Br J Nutr 19(4): 511-22.
- Blaxter, K.L. 1989. Energy metabolism in animal and man. Cambridge University Press, New York.
- Blaxter, K.L. and J.L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. Br. J. Nutr. 19:511.
- Brown M. R. W., and R. M. E. Richards. 1964. Effect of polysorbate (Tween) 80 on the resistance of Pseudomonas aeruginosato chemical inactivation. J. Pharm. Pharmacol. 16:51-55.
- Brownlee, A.G. 1986. Properties of chitin synthesis from a rumen anaerobic fungus. p. 4. In; Abstract of XIV International Congress of Microbiology.
- Bryant, M. P., and L. A. Burkey. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the

- bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36:205
- Caldwell, D. R., and M. P. Bryant. 1966. Medium without rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14:794-801.
- Carmean, B. R. 1991. Persistence of monensin effects on nutrient flux in steers. M. S. Thesis, Colorado State Univ. Fort, Collins.
- Casper, D. P., and D. J. Schingoethe. 1989. Model to describe and alleviate milk protein depression in early lactation dairy cows fed a high fat diet. *J. Dairy Sci.* 72: 3327-3335.
- Chaney, A.L. and E.P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Biochem.* 8:130.
- Cole, N. A., and J. E. McCroskey. 1975. Effects of hemiacetal of chloral and starch on the performance of beef steers. *J. Anim. Sci.* 41: 1735-1741.
- Coleman, G.S. 1978. Rumen entodiniomorph protozoa. In: *Methods of cultivation parasites in vitro.* p:39. Ed by A.E.R. Taylor and J.R. Baker. Academic Press, London.
- Crutzen, P.J. 1995. The role of methane in atmospheric chemistry and climate. In: *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction.* Ed. Engelhardt, W.V., et al.
- Czerkawski, J. W., W. W. Christie, et al. 1975. Changes in the rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *Br J Nutr* 34(1): 25-44.
- Czerkawski, J.W. 1974. Methods for determining 2-6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. *J. Sci. Food. Agric.* 25:45.
- Czerkawski, J.W. 1986. Degradation of solid feeds in the rumen; Spatial distribution of microbial activity and its consequences. In: *Control of digestion and metabolism in ruminants.* p. 158. Ed by L.P. Milligan, W.L. Grovum, and A. Dobson. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Czerkawski, J.W., K.L. Blaxter and F.W. Wainman. 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *Brit. J. Nutr.* 20:349

- Czerkwaski, J. W. 1986. An Introduction to Rumen Studies. New York, Pergamon Press.
- Dehority, B. A., and H. W. Scott. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 52:418-426.
- Dehority, B.A. 1965. Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 89:1515.
- Demain, A. L., and J. Birnbaum. 1968. Alternation of permeability for the release of metabolites from microbial cells. *Curr. Topics Microbiol. Immun.* 46:1-25.
- Demeyer, D. I. and H. K. Henderickx 1967. Methane production from glucose in vitro by mixed rumen bacteria. *Biochem J* 105(1): 271-7.
- Deshpande, M. V., M. C. Srinivasan, and S. S. Deshmakh. 1987. Effects of fatty acids on cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its mutants. *Biotechnol. Lett.* 9:301-304.
- DiMarco, A. A., T. A. Bobik, et al. 1990. Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annu Rev Biochem* 59: 355-94.
- Erwin, E. S., G. T. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768
- Fedorak, P.M. and S.E. Hrwdey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4:425
- Gay, L. 1991. Chitin content and chitin synthesis activity as indicator of the growth of three different anaerobic rumen fungi. *FEMS. Microbiol. Lett.* 80:99.
- Goering, H.K and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses. Apparatus, reagents, procedures and some application. Agricultural Research Service Agriculture Handbook No. 379.
- Gordon, G.L.R and M.W. Phillips. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 55:1703.
- Gosh, A., B. K. Gosh, H. Trimino-Vazquez, D. E. Eveleigh, and B. S. Montenecourt. 1984. Cellulase secretion from hyper-cellulolytic mutant *Trichoderma viride* Rut-C30. Arch. Microbiol. 140:126.
- Graham, H., P. Aman, O. Theander, N. Kolankaya, and C. S. Stewart. 1985. Influence of heat sterilisation and ammoniation on straw composition and degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. Anim. Feed Sci. Technol. 12:195-203.
- Haaland, G. L. 1987. Protected fat in bovine rations. Ph.D Dissertation. Colorado State University. Fort, Collins.
- Halliwell, G., and M. P. Bryant. 1963. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. J. Gen. Microbiol. 32:441-448.
- Hazen, G.G. 1974. Proteinases: Methods for automatic analysers. In "Methods of enzymatic analysis" Ed. by H.O. Bergmeyer. p. 1000 (Vol. 2). Verlag Chemie, Academic Press, Inc. USA.
- Hegarty, R. S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. Aust. J. Agric. Res. 50: 1321-1327.
- Heinrichova, K., M. Wojciechowiez, and A. Ziolecki. 1985. An exo-D-galacturonase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from bovine rumen. J. Gen. Microbiol. 131:2053-2058.
- Henderson, C., C. S. Stewart, and F. V. Nekrep 1981. The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. J. Appl. Bacteriol. 51: 159-169.
- Hobson, P. N. and R. J. Wallace 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. Crit Rev Microbiol 9(4): 253-320.
- Holdman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore. 1977. Anaerobic laboratory manual (4th), Virginia Polytech. Inst. and State. Univers. Blackburg, Virginia.
- Horton, G. M. J. 1980. Use of feed additives to reduce ruminal methane production and deaminase activity in steers. J. Anim. Sci. 50(6):1160-1164.
- Hulme, M. A., and D. W. Stranks. 1970. Induction and theregulation of

- production of cellulase by fungi. *Nature*, London. 226:469-470.
- Hung, B. R., L. Lara, M. A. Patron, N. N. Ugarova, W. Bechstedt, and S. Clappes. 1988. Tween 80 and proteose peptone effect on cellulase production. *Acta Biotechnol.* 8:461
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophyllic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1
- Hungate, R.E. 1966. *The rumen and its microbes.* Academic Press, Inc., New York.
- IPCC(Intergovernmental Panel on Climate Change). 1992. *Climate change 1992.* Ed. Houghton, J.T. et al. Cambridge University Press, New York.
- IPCC(Intergovernmental Panel on Climate Change). 1996. *Guidelines for national greenhouse gas inventory.* Green House Gas Inventory Workbook. 2.
- Irvine, H.L. and Stewart, C.S. 1991. Interactions between anaerobic cellulolytic bacteria and fungi in the presence of *Methanobrevibacter smithii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 12:62.
- Itabashi, H., T. Kobayashi, and M. Matsumoto 1984. The effects of rumen ciliate protozoa on energy metabolism and some constituents in rumen fluid and blood plasma of goats. *Jap. J. Zootech. Sci* 55: 248-256.
- Johnson, D. E. 1974. Adaptation responses in nitrogen and energy balance of lambs fed a methane inhibitor. *J. Anim. Sci.* 38: 154-157.
- Johnson, D. E., A. S. Wood, J. B. Stone, and E. J. Moran 1972. Some effects of methane inhibition in ruminants(steers). *Can. J. Anim. Sci.* 52(703-712).
- Johnson, D. E., T. M. Hill, B. R. Carmean, D. W. Lodman, and G. M. Ward. 1991. New perspectives on ruminant methane emissions. In *Energy Metabolism of Farm Animals* (C. Wenk and M. Boessinger, eds) pp. 376-379. ETH, Zurich, Switzerland.
- Johnson, D. E., T. M. Hill, G. M. Ward, K. A. Johnson, M. E. Branine, B. R. Carmean, and D. W. Lodman 1993. Principle factors varying methane emissions from ruminants and other animals. *Atmospheric Methane:*

- Source, Sinks, and Role in Global Change. M. A. K. Khalil. Berlin, Germany, Springer-Verlag. NATO ADI Series Vol 113.
- Johnson, D.E., T.M. Hill, G.M. Ward, K.A. Johnson, M.E. Branine, B.R. Carmean, and D.W. Lodman, 1993. Principle factors varying methane emission from ruminants and other animals. In: Atmospheric methane: sources, sinks, and role in global change. Ed Khalil, M.A.K. NATO ADI Series Vol 113, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Jones, G. A. 1972. Dissimilatory metabolism of nitrate by the rumen microbiota. *Can. J. Microbiol.* 18:1783-1787.
- Joyner, A. E., L. J. Brown, T. J. Fogg, and R. T. Rossi. 1979. Effect of monensin on growth, feed efficiency and energy metabolism of lambs. *J. Anim. Sci.* 48:1065-1069.
- Julian, C.J. and J.W. Czerkawski. 1974. The isolation of rumen anaerobic bacteria and protozoa using a marker. *J. Anim. Sci.* 56:1100.
- Kreuzer, M., M. Kirchgessner, and H. L. Muller. 1986. Effect of defaunation on the loss of energy in wethers fed different quantities of cellulose and normal or steamflaked maize starch. *Anim. Feed Sci. & Technol.* 16: 233-241.
- Leadley, J. A. and R. C. Greening 1988. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. *Appl Environ Microbiol* 54(2): 502-6.
- Lee, S.S., J.K. Ha and K.-J. Cheng. 2000. Relative Contributions and Interactions between Bacteria, Protozoa and Fungi in in vitro Degradation of Orchardgrass Cell Walls. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 66, No. 9, 3807~3813.
- Lee, S. S., B. H. Ahn, H. S. Kim, C. H. Kim, K. -J. Cheng and J. K. Ha. 2003. Effects of non-ionic surfactants on enzyme distributions of rumen contents, anaerobic growth of rumen microbes, rumen fermentation characteristics and performances of lactating cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:104-115.

- Leibholtz, J. 1975. Ground roughage in the diet of the early-weaned calf. *Anim. Prod.* 20:93-100.
- Long, K., and J. S. Knapp. 1991. The effect of Junlon PW110 and Tween 80 on the production of cellulolytic enzymes by *Coprinus cinereus*. *Mycol. Res.* 95:1077
- Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. J. Trinci. 1987. Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. *J. Gen. Microbiol.* 133:1829
- Lowe, S.E., M.K. Theodorou, A.P.J. Trinci and R.B. Hespell. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semidefined media lacking rumen fluid. *J. Gen. Microbiol.* 131:2225
- Mackie, R. I., and M. P. Bryant. 1994. Acetogenesis and the rumen: syntrophic relationships. *Acetogenesis*. H. L. Drake. New York, Chapman and Hall: 331-364.
- Mackie, R. I., B. A. White, and M. P. Bryant. 1992. Methanogenesis, biochemistry. Pages 97-109 *in* J. Lederberg, ed. *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press, San Diego, CA.
- Martin, C., A.G. Williams and B. Michalet-Doreau. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 72:2962.
- Martin, S. A., and J. M. Macy. 1985. Effects of monensin, pyromellitic diimide and 2-bromoethanesulfonic acid on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 60(2): 544-550.
- Martin, S. A., M. N. Streeter, D. J. Nisbet, G. M. Hill, and S. E. Williams. 1999. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77:1008-1015.
- McAllister, T. A., E. K. Okine, G. W. Mathison, and K. -J. Cheng (1996). "Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants." *Can. J. Anim. Sci.* 76: 231-243.
- McCraib, G. J., K. T. Berger, T. Magner, C. May, and R. A. Hunter. 1997. Inhibiting methane production in Brahman cattle by dietary supplementation

- with a novel compound and the effects on growth. *Austr. J. Agric. Sci.* 48:323-329.
- Mehrez, Z.A. and E.R. Ørskov. 1977. A studies of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.(Camb)*. 88:645.
- Merry, R.J., M.K. Theodorou, M.G. Raurich and M.S. Dhanoa. 1991. Use of headspace gas pressure in batch cultures to assist in determination of nutritive value of silage to rumen bacteria. Presented at a Conference on Forage Conservation Towards 2000. Institute of Grassland and Forage Research, Federal Research Centre of Agriculture, BraunschweigVolkenrode, Germany.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid as reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Miller, T. L., M. J. Wolin, H. Zhao, and M. P. Bryant. 1986. Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:201-202.
- Moe, P.W. and H.F. Tyrrell. 1979. Methane production in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 62:1583.
- Morris, E. J., and N. P. Van Gylswyk. 1980. Comparison of the action of rumen bacteria on cell walls of *Eragrostis tef*. *J. Agric. Sci.* 95:313-323.
- Morvan, B., J. Dore, et al. (1994). "Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb." *FEMS Microbiol Lett* 117(3): 249-56.
- Munn, E. A., G. P. Hazlewood, and M. Graham. 1983. Uptake and incorporation of the products of proteolysis by the rumen bacterium *Bacteroides rumenicola* R8/4. *Curr. Microbiol.* 8:317-320.
- Newbold, C.J. and K. Hillman. 1990. The effect of ciliate protozoa on the turnover of bacterial and fungal protein in the rumen of sheep. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:100.
- Newbold, C.J., P.W. Griffin and R.J. Wallace. 1989. Interactions between rumen bacteria and ciliate protozoa in their attachment to barley straw.



- Lett. Appl. Microbiol. 8:63.
- Nollet, L., D. Demeyer, et al. (1997). "Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis." *Appl Environ Microbiol* 63(1): 194-200.
- O'Kelly, J. C., and W. G. Spiers. 1992. Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay. *Aust. J. Agric. Res.* 43:1789-1793.
- O'Kelly, J.C. and W.G. Spiers. 1992. Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay either ad libitum or at the rate of 250g/Hour. *Aust. J. Agric. Res.* 43:1789.
- Olubobokun, J.A., W.M. Craig and W.A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701.
- Ørskov, E.R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.(Camb).* 92:499.
- Patterson, J. A., and R. B. Hespell (1979). "Trimethylamine and methylamine as growth substrates for rumen bacteria and *Methanosarcina barkeri*." *Curr. Microbiol.* 50: 212-219.
- Paunescu, E., A. Ciolac-Negoescu, and G. Pisica. 1964. The effect of Tween 80 and penicillin on the physicochemical properties of the cell wall in mycobacteria. *Academie Republicii Populare Romine, Institutul de Biochimie, Studii si Cercetari de Biochimie.* 7:83-89.
- Reese, E. T., and A. Maguire. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied Microbiol.* 17:242-245.
- Richardson, L. F., A. P. Raun, E. L. Potter, C. O. Cooley, and R. P. Rathmacher (1976). "Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo." *J. Anim. Sci.* 43: 657-664.
- Romesser, J. A. and R. S. Wolfe (1982). "Coupling of methyl coenzyme M reduction with carbon dioxide activation in extracts of *Methanobacterium*

- thermoautotrophicum." J Bacteriol 152(2): 840-7.
- Rumpler, W. V., D. E. Johnson, and D. B. Bates. 1986. The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores. J. Anim. Sci. 62:1737-1741.
- Russell, J. B. 1983. Fermentation of peptides by *Bacteroides ruminicola* B14. Appl. Environ. Microbiol. 45:1566-1574.
- Russell, J. B. and H. J. Strobel (1989). "Effect of ionophores on ruminal fermentation." Appl Environ Microbiol 55(1): 1-6.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1988. Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. J. Nutr. 118:271-278.
- SAS. 1999. User's Guide: Statistics, Version 6 Editions. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.
- Sauer, F. D., V. Fellner, R. Kinsman, J. K. G. Kramer, H. A. Jackson, A. J. Lee, and S. Chen. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. J. Anim. Sci. 76:906-914.
- Sawyer, M. S., W. H. Hoover, et al. (1974). "Effects of a ruminal methane inhibitor on growth and energy metabolism in the ovine." J Anim Sci 38(4): 908-14.
- Schewale, J. G., and J.C. Sadana. 1978. Cellulase and  $\alpha$ -glucosidase production by basidiomycetes species. Can. J. Microbiol. 24:1204-1216.
- Scott, H. W., and B. A. Dehority. 1965. Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. J. Bacteriol. 89:1169
- Shibata, M., F. Terada, K. Iwasaki, M. Kurihara. and T. Nishida. 1992. Methane production on heifers, sheep and goats consuming diets of various hay-concentrate ratios. Anim. Sci. Technol. (Jpn). 3:1221.
- Smith, P. H., and R. E. Hungate (1958). "Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* n. sp." J. Bacteriol. 75: 713-718.
- Stewart, C. S. and M. P. Bryant. 1988. The rumen bacteria. Pages 21-75 in P. N. Hobson, ed. Anaerobic Bacteria in Habitats Other than Man.

Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA.

- Storm, E and E.R. Ørskov. 1983. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 1. Large scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. *Brit. J. Nutr.* 50:463.
- Sutton, J. D., and S. V. Morant. 1989. A review of the potential of nutrition to modify milk fat and protein. *Livest. Prod. Sci.* 23:219–237.
- Syrnge, R.L.M. 1953. Note on the occurrence of diaminopimelic acid in some intestine. *Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Brit. Grassl. Soc.* 18:104.
- microorganisms from farm animals. *J. Gen. Microbiol.* 9:407.
- Theodorou, M. K., M. Gill, C. King, and D. E. Beaver. 1990. Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: a novel method for the quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1073
- Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18:104.
- Trei, J. E., R. C. Parish, et al. (1971). "Effect of methane inhibitors on rumen metabolism and feedlot performance of sheep." *J Dairy Sci* 54(4): 536–40.
- Trinci, A.P.J., D.R. Davies, K. Gull, M.I. Lawrence, B.B. Nielsen, A. Rickers and M.K. Theodorou. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 98:129.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer (1992). "Influence of antibiotics and a deaminase inhibitor on volatile fatty acids and methane production from detergent washed hay and soluble starch by rumen microbes in vitro." *Anim. Feed Sci. & Technol.* 37: 21–31.
- Van Nevel, C., and D. Demeyer (1995). Feed additives and other interventions for decreasing methane emissions. *Biotechnology in animal feeds and animal feeding.* R. J. Wallace, and A. Chesson. Weinheim, Germany, VCH: 329–349.
- Wallace, J. R., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation.

- Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(10):1371-1522.
- Wallace, R. J., and M. L. Brammall. 1985. The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. J. Gen. Microbiol. 131:821-832.
- Weimer, P. J. (1998). "Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective." J. Anim. Sci. 76: 3114-3122.
- Weimer, P. J., J. M. Lopez, and A. D. French. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microflora. Appl. Environ. Microbiol. 56:2421
- Weller, R.A., F.V. Gray and A.F. Pilgrim. 1958. The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of sheep. Br. J. Nutr. 12:421.
- Widyastuti, Y., C.J. Newbold, C.S. Stewart and E.R. Ørskov. 1995. Interactions between rumen anaerobic fungi and ciliate protozoa in the degradation of rice straw cell walls. Lett. Appl. Microbiol. 20:61.
- Williams, A. G., S. E. Withers, and K. N. Joblin. 1994. The effect of cultivation with hydrogen-consuming bacteria on xylanolysis by *Ruminococcus flavefaciens*. Curr. Microbiol. 29:133-138.
- Wittenberger, C. L., A. J. Beaman, and L. N. Lee. 1987. Tween 80 effect on glucosyltransferase synthesis by *Streptococcus salivarius*. J. Bacteriol. 133:231-239.
- Wolin, M. J., and T. L. Miller 1987. Bioconversion of organic carbon to methane and CO<sub>2</sub>. Geomicrobiol. J. 5: 239-259.
- Wood, J. M., F. S. Kennedy, and R. S. Wolfe. 1968. The reaction of multihalogenated hydrocarbons with free and bound reduced vitamin B<sub>12</sub>.
- Work, E and D.L. Dewey. 1953. The distribution of  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -diaminopimelic acid among various microorganisms. J. Gen. Microbiol. 9:394.
- Work, E. 1950. A new naturally occurring amino acid. Nature. 165:74.
- Yazdi, M. T., J. R. Woodward, and A. Radford. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. J. Gen. Microbiol. 136:1313-1319.

- 이성실, 하종규, 신기준, K.-J. Cheng. 1999. 반추위내 가수분해효소의 종류와 분포 체계에 관한 연구. 미발표 논문
- 축산연. 1990. 축산시험연구사업보고서. 축산기술연구소
- 이성실, 하종규, 최윤재, 한인규, 문태현, 김창현. 1995. 반추위 곰팡이의 분리·동정과 섬유소 분해효소의 특성 구명 및 이들의 산업적 이용에 관한 연구. II. 볏짚의 화학적 처리와 이의 급여가 축종별 반추위내 곰팡이의 군집변화에 미치는 영향. 한영사지. 19:411.
- 축산기술연구소. 1994. 축산시험연구보고서. p119-125.
- 축산연. 1999. 축산시험연구사업보고서. 축산기술연구소

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.