



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0123968
(43) 공개일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 10/30 (2016.01) A23K 50/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/30 (2016.05)
A23K 50/10 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2021-0027583
(22) 출원일자 2021년03월02일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이신자
경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 256호(가좌동, 경상대학교)
이성실
경상남도 진주시 금산면 중천로 82, 107동 901호 (금산아이파크아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

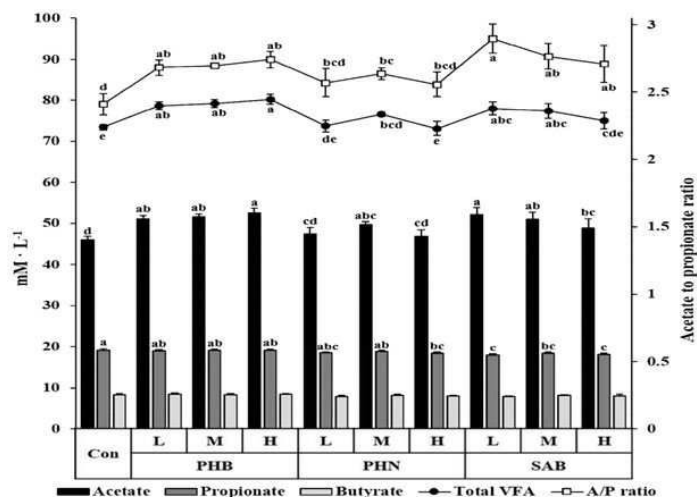
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 대나무 잎을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄저감용 사료첨가제 조성물

(57) 요약

본 발명은 대나무 잎을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄저감용 사료첨가제 조성물에 관한 것으로, 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*) 대나무 3종의 잎은 in vitro에서 향산화 활성을 나타내며, 위의 pH 및 건물 소화율에 영향을 주지 않으며, 메탄 및 이산화탄소의 생성이 감소하는 것을 확인한 바, 상기와 같은 효과를 가지는 대나무 잎은 가축의 성장을 촉진하고 사료 효율을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용하여도 안전한 합성 첨가제 또는 항생제 대체제로 사용될 수 있으며, 메탄가스 생성을 감소시키는 천연 메탄 저감제로서 사료 첨가제로 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

Y02P 60/50 (2020.08)

Y10S 426/807 (2013.01)

(72) 발명자

김현상

경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 256호(가좌동, 경상대학교)

엄준식

경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 256호(가좌동, 경상대학교)

최유영

경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 256호(가좌동, 경상대학교)

조성욱

경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 256호(가좌동, 경상대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395064620

과제번호 PJ014778032020

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 신농업기후변화대응체계구축(R&D)

연구과제명 흑염소 사료 내 다양한 메탄 저감제 첨가 급여 시 메탄 저감 수준 구명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상대학교

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

대나무 잎을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대나무는 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숭대(*Phyllostachys nigra*), 또는 조릿대(*Sasa borealis*)인 것을 특징으로 하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 총 가스 발생량, 메탄 발생량 및 이산화탄소 발생량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반추동물은 소, 염소, 양, 기린, 미국산 들소, 유럽산 들소, 야크(yak), 물소, 사슴, 낙타, 알파카(alpaca), 라마, 누(wildebeest), 영양, 가지뿔 영양(pronghorn) 및 닐가이 영양(nilgai)으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 사료첨가용 조성물을 포함하는 사료 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 사료첨가용 조성물은 건조사료 총 100 중량부에 대하여 0.1 내지 15 중량부로 첨가되는 것을 특징으로 하는 사료 조성물.

청구항 7

제5항에 따른 사료 조성물을 반추동물에 투여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대나무 잎을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄저감용 사료첨가제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항미생물 작용을 가진 천연물질, 반합성물질 혹은 합성물질을 통틀어 항생제라고 하며, 상기 항생제는 경구 혹은 주사제로 투여 혹은 국소적으로 사용하여 미생물에 의한 질병을 치료하거나 예방하는 목적으로 사용된다. 이러한 항생제는 지난 70여년 동안 감염성 질환을 가진 환자를 치료하는데 사용되어 왔으며, 현재는 인간의 질병 뿐만 아니라 동물의 질병을 치료 또는 예방하는 목적으로도 사용되고 있다.

[0003] 한편, 항생제는 동물의 질병을 치료 또는 예방하는 목적 이외에도 동물의 성장을 촉진시키기 위한 성장 촉진제로도 사용되고 있다. 우리나라 축산업에 있어서, 모넨신과 같은 이오노포(ionophore)계 항생제, 클로로포름 및 할로젠 화합물 등이 대표적인 항생물질로 이용된다. 항생물질을 성장 촉진제로서 사료에 첨가하여 동물에게 투여하면 동물의 성장을 촉진시키고, 사료 이용 효율(feed utilization)을 개선함과 동시에 집단으로 사육되고 있는 동물들에게서 세균에 의한 감염성 질환의 유병율을 낮출 수 있다. 즉, 항생제는 동물에게서 감염성 질환을 예방하여 감염성 질환에 대한 유병율 및 사망률을 감소시키고, 성장 속도를 증가시킴으로써 육류, 달걀, 우유 등의 가격을 낮출 수 있는 경제적 효과를 가져올 뿐만 아니라 항생제 소비를 증가시켜 제약산업 측면에서도 긍정적인 영향을 미친다. 또한, 성장 촉진제로서 항생물질은 동물의 위장관에서 이로운 미생물을 자극하고 해로운

미생물을 억제함으로써 장내세균에 의한 바람직하지 못한 발효산물 즉, 젖산, 휘발성 지방산, 암모니아, 아민, 메탄 등의 생성을 억제한다. 특히, 메탄(methane)은 지구 온난화 현상의 주범으로써 동물이 일 년에 배출하는 메탄가스의 양이 80~115백 만톤으로, 전 세계 메탄가스 방출량의 15~20%를 차지한다. 동물의 항생제 및 성장 촉진제인 모넨신의 경우 반추위 동물의 위에서 프로피오네이트의 발효를 증가시킴으로써 지구 온난화의 주범인 메탄가스의 생성을 감소시킨다는 것이 보고된 바 있다.

[0004] 이와 같이, 축산업에 있어서 항생제는 가축의 생산성 향상에 큰 기여를 해왔으나 최근 축산물에 항생제 잔류와 다약제 내성 슈퍼 박테리아의 출현 등의 문제로 인하여 이러한 항생제 사용이 규제되고 있는 실정이다. 특히, 치료의 목적이 아닌 가축 생산성 향상을 위하여 배합 사료 내에 항생제를 포함시키는 것은 전면적으로 금지되고 있다.

[0005] 이에 친환경 축산과 유기 축산물 생산을 위하여 기존의 항생제를 대체할 수 있는 물질의 개발과 관련 기술의 개발이 매우 중요한 과제로 인식되고 있다. 항생제 대체의 가능성이 가장 높게 평가되고 있는 물질로는 식물에서 유래한 천연 추출물이 있다. 식물은 환경으로부터 자신을 보호하기 위하여 이차대사산물을 생산하며, 상기 이차대사산물은 여러 가지 생리활성 작용을 나타내므로 인간이나 동물의 질병을 예방 또는 치료하기 위한 의약품으로 사용될 수 있다. 병원성 미생물에 대한 항균 효과 역시 식물의 이차대사산물이 나타낼 수 있는 생리활성 중의 하나이다. 또한, 식물의 이차대사산물은 반추위 동물에 있어서 반추위 내 발효를 변화시켜 사료 에너지의 이용 효율을 증가시키는 반면 메탄가스 발생을 감소시킨다는 연구 결과들이 보고된 바 있으며, 식물이 생산하는 이차대사산물 중에서 항균작용을 나타내는 대표적인 성분들인 페놀성 물질, 정유, 플라보노이드, 사사포닌(sarsaponin)을 함유하는 일부 식물 추출물들이 메탄가스 생성을 감소시킨다는 것이 증명된 바 있다.

[0006] 반추위 메탄가스 저감에 대한 작용기전은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 발생하는 수소를 메탄가스 생성이 아닌 다른 방향으로 대사되게 하는 수소치환방법이다. 두 번째는 메탄가스를 생성하는 세균에 대하여 직접적인 항균작용을 통하여 메탄가스 생성을 줄이는 방법이다. 이들 두 가지 방법들 중에서 어떤 것이 효율적이라고 단정 지을 수는 없으나, 궁극적으로 메탄가스를 저감시키는 효과를 찾는 것이 더 중요하다.

[0007] 이에 본 기술은 반추위내 메탄가스를 줄일 수 있는 식물 또는 식물 추출물을 탐색하고 사료첨가제로서의 활용에 그 목적을 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2020-0071317호 (2020.06.19 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 반추동물 메탄 저감을 위한 사료 첨가용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 반추위 내 메탄가스 생성을 억제하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 대나무 잎을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가용 조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 사료 조성물을 반추동물에 투여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숭대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*) 대나무 3종의 잎은 in vitro에서 항산화 활성을 나타내며, 위의 pH 및 건물 소화율에 영향을 주지 않으며, 메탄 및 이산화탄소의 생성이 감소하는 것을 확인한 바, 상기와 같은 효과를 가지는 대나무 잎은 가축의 성장을 촉진

하고 사료 효율을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용하여도 안전한 합성 첨가제 또는 항생제 대체제로 사용될 수 있으며, 메탄가스 생성을 감소시키는 천연 메탄 저감제로서 사료 첨가제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*, PHB), 숨대(*Phyllostachys nigra*, PHN), 및 조릿대(*Sasa borealis*, SAB)이 반추위 내에서 발효 12 시간 대의 휘발성 지방산의 생산량을 분석한 결과이다.

도 2는 대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*, PHB), 숨대(*Phyllostachys nigra*, PHN), 및 조릿대(*Sasa borealis*, SAB)이 반추위 내에서 발효 24 시간 대의 휘발성 지방산의 생산량을 분석한 결과이다.

도 3은 대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*, PHB), 숨대(*Phyllostachys nigra*, PHN), 및 조릿대(*Sasa borealis*, SAB)이 반추위 내에서 발효 48 시간 대의 휘발성 지방산의 생산량을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0017] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0018] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 대나무 잎을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 대나무는 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 또는 조릿대(*Sasa borealis*)이다. 상기 조성물은 총 가스 발생량, 메탄 발생량 및 이산화탄소 발생량을 감소시킨다. 상기 메탄은 이산화탄소 다음으로 지구온난화에 가장 큰 영향을 미치는 요인이며, 반추동물이 탄수화물을 포함하는 사료를 섭취하는 경우 메탄가스 생성 미생물에 의해 반추위 내에서 생성되는데, 이는 사료 이용 효율을 떨어뜨리는 원인 중 하나로, 반추동물의 반추위 내의 메탄가스 생성을 억제시키는 것이 중요하다.

[0022] 상기 반추동물은 포유류 소목에 속하는 되새김 동물로 소, 염소, 황소, 물소, 들소, 사슴, 낙타, 양 등을 포함하며, 네 개의 격실의 위를 가지는데 그 중 하나가 반추위이다. 반추동물 반추위(rumen)라고 불리는 소화계에서 미생물의 발효를 통해 셀룰로즈(cellulose)를 휘발성 지방산(volatile fatty acid)으로 전환시키고 이것을 영양분으로 이용한다. 즉, 반추위 내에서 탄수화물의 분해를 통하여 휘발성 지방산, 수소, 이산화탄소 등이 생성되며, 상기 수소와 이산화탄소는 반추위 산도 하강의 원인이 된다. 상기 수소와 이산화탄소는 메탄으로 전환되어 소실된다.

[0023] 구체적으로 상기 반추동물은 소, 염소, 양, 기린, 미국산 들소, 유럽산 들소, 야크(yak), 물소, 사슴, 낙타, 알파카(alpaca), 라마, 누(wildebeest), 영양, 가지뿔 영양(pronghorn) 및 닐가이 영양(nilgai)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0024] 상기 유효성분은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능 및/또는 효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분으로 포함하는 것을 의미한다.

- [0025] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가용 조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 사료 조성물은 상기 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물 및 기타 공지의 사료 조성물에 첨가되는 성분을 포함할 수 있고, 상기 사료 조성물은 공지의 방법에 의해 제조되는 것으로, 이에 대한 상세한 설명은 생략하기로 한다. 또한 상기 사료는 일반벼짚, 야초, 목초, 엔시리지, 건초, 산야초 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 가축의 사육에 사용되는 사료이면 무방하다.
- [0027] 상기 사료첨가용 조성물은 건조사료 총 100 중량부에 대하여 0.1 내지 15 중량부로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 사료 조성물을 반추동물에 투여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 억제 방법을 제공한다
- [0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0030] **실시예 1: 공시동물 및 반추위액**
- [0031] 연구 절차 및 공시축의 사양관리는 국립경상대학교 실험동물 복지 윤리법에 따라 수행하였으며, 반추위액은 국립경상대학교 야생동물보호센터에서 사육중인 반추위에 캐놀라(cannula)가 장착된 한우 암소(체중 450 kg±30kg)로부터 채취하였다.
- [0032] 공시동물의 사양관리는 농후사료(제 BBVMRO 158호)와 티모시(timothy)를 6:4의 중량비로 혼합한 후, 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:00) 분할 급여하였으며, 물과 미네랄 블록은 자유 섭취하도록 하였다.
- [0033] 반추위액은 오전 사료급여 직전 반추위 캐놀라를 통해 채취하였고, 4겹의 직포(cheese cloth)를 이용하여 여과한 다음, 혐기상태의 2 L 유리병에 담아 신속하게 실험실로 이동하였다. 상기 반추위액은 39℃ 향온수조(water bath, Lab Companion; BS-21)에 1 시간 정지시킨 후, 진공 펌프로 사료 입자를 제거한 다음 in vitro 시험에 사용하였다.
- [0034] **실시예 2: 재료 및 in vitro 시험**
- [0035] 대조구는 티모시(*timothy*, *Phleum pretense*), 각 처리구인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)의 잎을 원료로 사용하였다. 각 처리구별 원료를 nylon bag에 넣어 열 봉합(heat sealing)한 후 50 mL 혈청 병(serum bottle)에 투여하였다. 이후 반추위액과 McDougall 버퍼(Mcdougall, 1948)를 1:2의 비율로 혼합한 배양액 20 mL를 혐기상태(O₂-free N₂)로 분주한 후 부틸 고무(butyl rubber)와 알루미늄 씰(aluminum seal)을 이용하여 혈청 병을 밀봉하였다. 대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)의 잎의 화학 성분은 하기 표 1과 같다.

표 1

항목	왕대	숨대	조릿대
건조량	62.00±0.14	45.00±0.11	54.00±0.15
조단백질	16.64±0.77	13.15±0.35	14.82±0.20
에테르 추출물	3.69±1.30	2.49±0.56	0.65±0.15
조회분	7.28±0.01	12.12±0.11	7.99±0.05
조섬유	25.38±0.17	21.08±0.07	24.19±0.38
NDF	72.62±0.65	65.60±0.84	70.58±0.88
ADF	35.57±0.32	38.02±0.30	35.57±0.27

[0037] * NDF: Neutral detergent fiber(중성 세제 불용성 섬유); ADF: Acid detergent fiber(산성 세제 불용성 섬유)

[0038] **실시예 3: 분석항목 및 방법**

[0039] 3-1. 향산화 활성

- [0040] 항산화 활성을 분석하기 위해, DPPH 라디칼 소거능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용하여 Benzie와 Strain(1996)의 실험방법을 변형하여 측정하였다. 시료 100 μ L에 methanolic DPPH radical 0.1 mM용액 100 μ L 첨가, 혼합하여 1시간 뒤 spectrophotometer를 이용하여 525 nm에서 optical density (O.D) 값을 측정하여 분석하였다.
- [0041] 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 실험방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM의 ABTS 용액을 2.45 mM의 potassium persulfate와 95%의 에탄올을 섞어 734 nm에서 O.D값이 0.70 ± 0.02 가 되게 만든 후 100 μ L의 시료에 100 μ L의 ABTS 용액을 섞고 30분 뒤 spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 O.D값을 측정하여 분석하였다.
- [0042] 총 폴리페놀 함량은 Sigleton과 Rossi(1965)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 또한 Folin-Cioaltea 시약을 이용하여 분석하였고, catechin을 이용한 표준 곡선에 따른 검량선을 작성하여 총 폴리페놀함량을 계산하였다. 총 플라보노이드 함량은 Park 등(1997)의 방법을 일부 변형하여 분석하였고, quercetin을 이용한 표준 곡선에 따른 검량선을 작성하여 총 플라보노이드를 계산하였다.
- [0043] 3-2. pH 분석
- [0044] pH 분석을 위해, Weaton decapper(Weaton Co., USA)를 이용하여 혈청 병의 부틸 고무와 알루미늄 씬을 제거한 후 배양액의 pH를 pH 측정기(Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.
- [0045] 3-3. 총 가스 발생량 분석
- [0046] 총 가스 발생량은 Theodorou 등(1994)의 방법을 참고하여 수행하였다. 혈청 병의 상부 공간에 있는 가스를 detachable pressure transducer 및 digital readout voltmeter(Laurel Electronics, Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하였고, 이후 9 mL 진공관(vacutainer)에 가스를 포집하여 가스 크로마토그래피(gas chromatography; GC, HP 5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 메탄 및 이산화탄소 발생량을 측정하였다.
- [0047] 3-4. 건물 소화율(DMD) 분석
- [0048] 건물 소화율(dry matter digestibility) 분석을 위해, 혈청 병 내 nylon bag을 수거하여 물을 채운 수조에 넣고, Heidolphs Rotamax 120(Heidolph Instrument, Germany)를 이용하여 100 rpm에서 20분간 3회 세척 후, 65°C의 건조기(Jeio tech, Korea)에서 약 24시간 동안 건조시켜 건물 잔량을 측정하였다. 이후 발효 전 기질량과의 차이를 구한 후, 상기 차이를 발효 전 기질량의 백분율로 환산하여 건물 소화율을 계산하였다.
- [0049] 3-5. 미생물 성장량(MGR) 분석
- [0050] 미생물 성장량(microbial growth rate) 분석을 위해, 배양액 1 mL를 취한 후, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료입자를 제거하였다. 이후 상등액을 14,000 rpm에서 3분간 재원심분리하여 미생물 펠렛(pellet)을 침전시킨 다음 상등액 제거 후, 펠렛에 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 6.5)를 1 mL 첨가하여 볼텍스(vortex)로 교반하는 세척 과정을 3회 반복 수행하였다. 이후 분광광도계(spectrophotometer, BIO-RAD Model 680)로 550 nm에서 광학 밀도(optical density; O.D) 값을 측정하여 미생물 성장량을 계산하였다.
- [0051] 3-6. 휘발성 지방산(VFA) 분석
- [0052] 휘발성 지방산(volatile fatty acid) 분석을 위해, 배양액 1 mL를 취한 후, 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료입자를 제거하였다. 이후 상등액을 0.20 μ M 시린지 필터(syringe filter)로 여과한 다음 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC, Agilent-1200, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시료의 주입량은 20 μ L였고, 이동상 용액은 0.0085 N H₂SO₄를 사용하였으며, 유속은 0.6 mL/분이었다. 컬럼은 300 mm $\times$ 7.8 mm I.d. MetaCarb 87H(Varian, USA)을 35°C의 조건에서 사용하였다.
- [0053] **실시예 4: 통계처리**
- [0054] 통계처리는 SAS 9.4 (Statistical Analysis System, Inst. Inc., Cary, NC, USA)의 GLM procedure를 이용하여 분산분석을 하였다. 분석모델에는 시료별(effect of additive), 첨가수준(effect of dose) 및 각 요인의 상호효과(interaction effect of additive and dose)를 포함하여 분석하였고, Tukey의 다중검정방법을 이용하여 평균 간의 유의성(P<0.05)을 검정하였다.
- [0055] **시험예: 대나무 3종 잎이 반추동물 메탄 저감에 미치는 영향 분석**
- [0056] 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숭대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)의 잎이 in vitro 반

추위 내 발효성상 중 메탄 저감에 미치는 영향을 평가하기 위해, 잎의 항산화 활성, pH 변화, 반추 위에서 총 가스, 메탄, 이산화 탄소 생산량 변화, 건물 소화율, 미생물 성장량, 휘발성 지방산 생산의 변화를 평가하였다.

1) 항산화 활성

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)의 항산화 활성을 평가하기 위해, 각 대나무 잎에 함유된 총 폴리페놀(카테킨) 함량, 총 플라보노이드(케르세틴) 함량, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능, 및 ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거능을 하기 표 2와 같이 분석하였다.

표 2

항목	왕대	숨대	조릿대
총 폴리페놀 (mg 카테킨 / g 추출물)	43.54±8.68	31.04±5.83	44.54±6.07
총 플라보노이드 (mg 케르세틴 / g 추출물)	17.13±0.45	16.73±0.52	19.60±0.49
DPPH에 대한 IC50 (μ g / mL)	163.13	115.58	125.43
ABTS에 대한 IC50 (μ g / mL)	97.07	47.43	54.17

표 2에 나타난 바와 같이, 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)의 잎에는 항산화 활성을 나타내는 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량이 높고, 라디칼 소거능이 우수한 것으로 나타났다.

2) pH 변화

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*, PHB), 숨대(*Phyllostachys nigra*, PHN), 및 조릿대(*Sasa borealis*, SAB)이 반추위 내의 pH에 미치는 영향을 평가하기 위해, 대나무 3종의 잎을 0.03%(Low), 0.06%(Medium) 또는 0.09%(High)의 농도로 반추위에 처리하고, 배양 시간에 따른 pH 변화를 하기 표 3과 같이 분석하였다.

표 3

실험군		배양 시간				
		6 시간	12 시간	24 시간	48 시간	72 시간
대조군		7.27	6.92	6.59	6.18	6.05
PHB	Low	7.32	6.94	6.66	6.24	6.04
	Medium	7.34	7.03	6.64	6.21	6.05
	High	7.37	7.05	6.60	6.22	6.09
PHN	Low	7.31	7.03	6.72	6.30	6.14
	Medium	7.32	7.09	6.69	6.27	6.12
	High	7.33	7.08	6.71	6.25	6.12
SAB	Low	7.35	7.14	6.77	6.23	6.15
	Medium	7.35	7.12	6.72	6.20	6.13
	High	7.41	7.09	6.73	6.20	6.08
SEM		0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
P-value		0.0225	<.0001	<.0001	0.0009	0.0006
대조	A	0.2792	0.0003	0.0002	0.0146	0.0074
	D	0.0006	<.0001	<.0001	0.0001	0.001
	A*D	0.8867	0.0037	0.0583	0.5290	0.0651

* SEM: 평균의 표준 오차(Standard error of the mean); A: 첨가 효과; D: 용량 효과; A*D: 첨가 효과와 용량

효과 사이의 상호작용

상기 표 3에 나타난 바와 같이,

3) 총 가스 생산

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)이 반추위에서 발생시키는 총 가스 발생량을 하기 표 4과 같이 분석하였다.

표 4

실험군		배양 시간				
		6 시간	12 시간	24 시간	48 시간	72 시간
대조군		54.60	86.55	120.27	154.94	163.40
PHB	Low	53.69	85.52	116.03	151.14	159.89
	Medium	51.79	85.20	116.89	152.32	157.61
	High	51.18	83.11	115.27	148.80	155.19
PHN	Low	50.13	83.15	115.48	147.31	155.41
	Medium	50.00	82.01	114.76	114.76	154.42
	High	49.54	81.22	111.81	145.86	153.20
SAB	Low	51.08	82.23	115.72	151.04	158.77
	Medium	50.07	81.18	114.66	146.94	151.99
	High	48.04	77.53	109.04	146.45	152.78
SEM		0.25	0.51	0.55	0.79	0.78
P-value		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
대조	A	<.0001	0.0011	0.0411	0.0497	0.0972
	D	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	A*D	0.0056	0.1288	0.1293	0.405	0.4022

* SEM: 평균의 표준 오차(Standard error of the mean); A: 첨가 효과; D: 용량 효과; A*D: 첨가 효과와 용량 효과 사이의 상호작용

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 총 가스 발생량은 발효시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 증가하였다.

4) 메탄 발생량

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)이 반추위에서 발생시키는 메탄 발생량을 하기 표 5와 같이 분석하였다.

표 5

실험군		배양 시간				
		6 시간	12 시간	24 시간	48 시간	72 시간
대조군		3.22	7.24	14.79	23.68	24.96
PHB	Low	3.41	6.00	11.84	22.94	28.59
	Medium	3.58	7.81	12.51	20.58	27.77
	High	3.21	6.26	13.09	20.46	27.72
PHN	Low	3.23	5.84	12.97	21.65	24.70
	Medium	3.51	5.21	14.24	19.84	25.76
	High	3.96	6.41	14.55	18.45	26.13
SAB	Low	3.87	6.54	15.51	19.57	28.71
	Medium	3.68	6.46	14.81	20.72	26.68
	High	3.87	5.77	13.28	20.39	26.60
SEM		0.09	0.16	0.35	0.26	0.55
P-value		0.0146	<.0001	0.0212	<.0001	0.0773

대조	A	0.0755	0.0517	0.0223	0.0281	0.1009
	D	0.0168	<.0001	0.0949	<.0001	0.0261
	A*D	0.0841	0.0017	0.0855	0.0065	0.5072

* SEM: 평균의 표준 오차(Standard error of the mean); A:첨가 효과; D: 용량 효과; A*D: 첨가 효과와 용량 효과 사이의 상호작용

상기 표 5에 나타난 바와 같이, 메탄 발생량은 발효시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 증가하였고, 대조구와 비교하였을 때 발효 12 시간 및 24 시간대에서는 대부분의 대나무 잎 처리구에서 메탄 발생량이 대조군에 비해 감소하였고, 발효 48 시간대에서는 모든 대나무 잎 처리구에서 메탄 발생량이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

5) 이산화 탄소 발생량

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)이 반추위에서 발생시키는 이산화 탄소 방출량을 하기 표 6와 같이 분석하였다.

표 6

실험군		배양 시간				
		6 시간	12 시간	24 시간	48 시간	72 시간
대조군		15.09	34.79	55.03	79.95	80.67
PHB	Low	15.58	28.30	44.03	77.97	91.74
	Medium	16.55	35.99	44.86	69.24	89.92
	High	15.98	29.38	47.31	68.74	89.32
PHN	Low	15.75	27.32	46.74	74.22	79.72
	Medium	17.12	23.99	51.17	65.93	82.51
	High	20.30	29.27	52.12	60.65	83.02
SAB	Low	18.34	32.76	55.56	65.04	92.64
	Medium	15.98	29.17	53.89	69.03	87.07
	High	17.00	28.40	48.58	67.56	82.92
SEM		0.49	0.77	1.41	0.87	1.85
P-value		0.0287	<.0001	0.0363	<.0001	0.1081
대조	A	0.2501	0.0347	0.0528	0.0085	0.0934
	D	0.0204	<.0001	0.0297	<.0001	0.0691
	A*D	0.0926	0.0025	0.2443	0.001	0.4894

* SEM: 평균의 표준 오차(Standard error of the mean); A:첨가 효과; D: 용량 효과; A*D: 첨가 효과와 용량 효과 사이의 상호작용

상기 표 6에 나타난 바와 같이, 이산화 탄소 발생량은 발효시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 증가하였고, 대조구와 비교하였을 때 발효 12시간 및 24시간대에서는 대부분의 대나무 잎 처리구에서 이산화 탄소 발생량이 대조군에 비해 감소하였고, 발효 48 시간대에서는 모든 대나무 잎 처리구에서 이산화 탄소 발생량이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

6) 건물 소화율

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숨대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)이 반추위에서 건물 소화율(dry matter digestibility)에 미치는 영향을 하기 표 7과 같이 분석하였다.

표 7

실험군		배양 시간				
		6 시간	12 시간	24 시간	48 시간	72 시간
대조군		31.30	38.93	52.27	65.07	68.41

PHB	Low	31.16	40.51	53.84	64.58	67.48
	Medium	30.87	39.49	56.22	64.87	67.60
	High	34.25	40.90	55.57	65.82	67.11
PHN	Low	31.42	43.04	56.18	61.83	66.39
	Medium	31.51	40.83	53.90	64.90	67.51
	High	32.37	42.56	57.03	63.46	66.40
SAB	Low	34.30	42.88	56.88	64.05	67.29
	Medium	33.45	43.48	56.62	64.56	67.75
	High	33.27	42.03	54.09	65.39	69.30
SEM		0.60	0.63	0.61	0.32	0.38
P-value		0.4193	0.0495	0.0126	0.0164	0.2724
대조	A	0.2370	0.1566	0.8681	0.0224	0.1823
	D	0.2655	0.0058	0.0008	0.0192	0.1488
	A*D	0.6112	0.6722	0.2573	0.1718	0.4919

* SEM: 평균의 표준 오차(Standard error of the mean); A:첨가 효과; D: 용량 효과; A*D: 첨가 효과와 용량 효과 사이의 상호작용

상기 표 7에 나타난 바와 같이, 솜대(PHN)의 0.06% 첨가구에서 대조구에 비해 건물소화율이 낮게 나타났으나, 나머지 모든 첨가구에서는 유의적인 차이가 없었다. 솜대(PHN)의 0.06% 첨가구도 시간이 지나며 유의적인 차이가 없었다.

7) 미생물 성장량

대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 솜대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)이 반 추위에서 미생물 성장량(microbial growth rate)에 미치는 영향을 하기 표 8과 같이 분석하였다.

표 8

실험군		배양 시간				
		6 시간	12 시간	24 시간	48 시간	72 시간
대조군		0.32	0.42	0.48	0.45	0.45
PHB	Low	0.33	0.40	0.41	0.44	0.49
	Medium	0.32	0.40	0.42	0.45	0.48
	High	0.32	0.40	0.43	0.41	0.49
PHN	Low	0.26	0.34	0.34	0.34	0.46
	Medium	0.28	0.24	0.37	0.29	0.52
	High	0.32	0.23	0.35	0.32	0.60
SAB	Low	0.26	0.26	0.31	0.31	0.56
	Medium	0.28	0.27	0.32	0.36	0.59
	High	0.24	0.25	0.30	0.31	0.58
SEM		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
P-value		0.0061	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
대조	A	0.0103	<.0001	<.0001	0.0002	0.0038
	D	0.027	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	A*D	0.0942	<.0001	0.0462	0.0419	0.0211

* SEM: 평균의 표준 오차(Standard error of the mean); A:첨가 효과; D: 용량 효과; A*D: 첨가 효과와 용량 효과 사이의 상호작용

상기 표 8에 나타난 바와 같이, 미생물 성장량은 발효시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 증가하였고, 대조구와 비교하였을 때 발효 72 시간대에서 모든 처리구가 대조군보다 미생물 성장량이 높은 것으로 나타났다.

[0091] 8) 휘발성 지방산

[0092] 대나무 3종인 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 숭대(*Phyllostachys nigra*), 및 조릿대(*Sasa borealis*)이 반추위에서 휘발성 지방산(volatile fatty acid, VFA)에 미치는 영향을 하기 분석하였다.

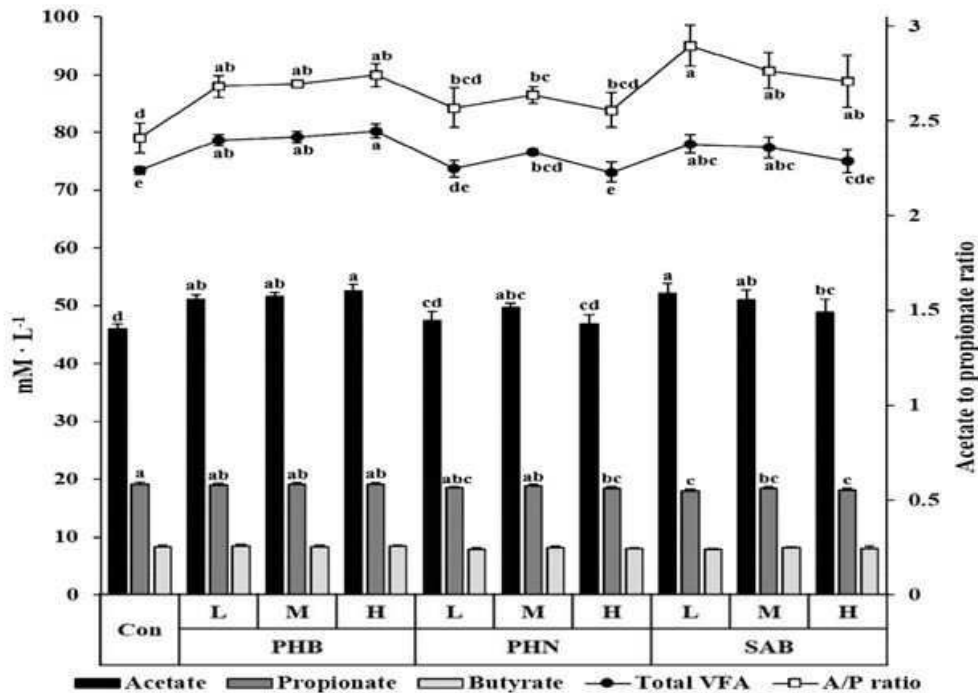
[0093] 도 1 내지 도 3에 나타난 바와 같이, 반추위 발효성상의 주요지표인 휘발성지방산(VFA) 농도는 왕대(PHB)에서 첨가수준이 높아질수록 아세트이트와 총 휘발성지방산 농도가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났고, 조릿대(PHN)에서는 첨가수준이 낮아질수록 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

[0094] 상기 결과는 전체적으로 대나무 잎의 농도별 첨가가 in vitro 실험에서 발효성상에 부정적인 영향을 미치지 않았고, 메탄 발생량을 줄이기 때문에 사료 첨가제로 이용가능성이 있다는 것을 입증한다.

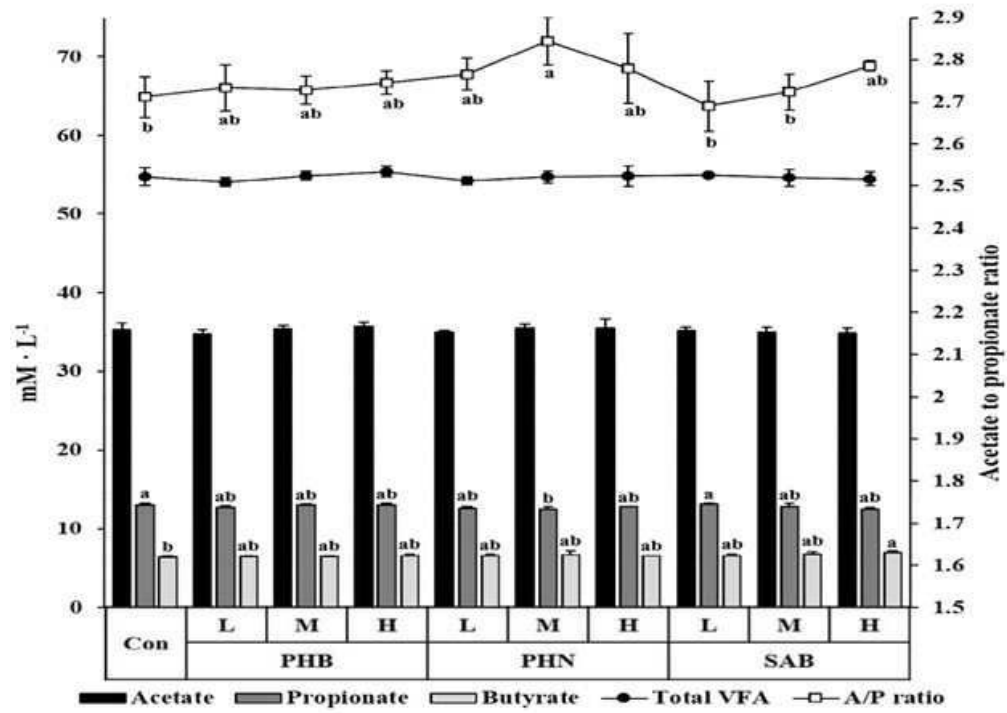
[0095] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

도면1



도면2



도면3

