

# 왕대, 솜대 및 조릿대 잎 추출물의 첨가 수준이 반추위 *in vitro* 발효성상, 메탄 발생량 및 미생물 조성에 미치는 영향

김현진<sup>1</sup>, 조성욱<sup>2</sup>, 이신자<sup>2</sup>, 정호식<sup>1</sup>, 이성실<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>(주)네오베이스, <sup>2</sup>경상국립대학교 농업생명과학연구원(중점연구소), <sup>3</sup>경상국립대학교 응용생명과학부(BK21)

## Effect of addition levels of *Phyllostachys bambusoides*(PHB), *Phyllostachys nigra var.henonis*(PHN) and *Sasa borealis*(SAB) leave extracts on rumen *in vitro* fermentation characteristics, methane production and microbial population

Hyun Jin Kim<sup>1</sup>, Seong-Uk Jo<sup>2</sup>, Shin Ja Lee<sup>2</sup>, Ho-Sik Jeong<sup>1</sup>, Sung Sil Lee<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Neobase Co.,Ltd

<sup>2</sup>Institute of Agriculture and Life Science & University-Centered Labs, Gyeongsang National University

<sup>3</sup>Division of Applied Life Science (BK21), Gyeongsang National University

**요약** 본 연구에서는 phenol compounds와 flavonoid가 풍부한 대나무 잎 추출물이 반추위 발효 특성, 소화율, 메탄 발생량 및 미생물 조성에 미치는 영향을 규명함으로써 메탄 저감제로써의 가능성을 조사하였다. *In vitro* 실험으로 각각의 배양액에 대나무 잎 추출물 0, 21, 42 및 63 mg/L의 농도로 첨가 하여 12, 24 및 48 시간 동안 발효시켰다. 총 가스 및 메탄 발생량은 발효시간 24시간에서 모든 대나무 잎 추출물의 첨가수준이 증가함에 따라 하계 감소하였으며, 특히 발효시간 48시간 PHN의 첨가수준 42 mg/L에서 메탄 생성량이 약 50% 감소하였다. 발효시간 48시간에서 총 VFA 생산량은 모든 대나무 잎 추출물의 첨가 수준에 따라 증가하였다. Methanogenic archaea 와 *Methanobrevibacter sp.* AbM4 의 개체수는 PHB와 PHN의 첨가 수준이 증가함에 따라 감소하였다. 결과적으로 PHB와 PHN의 첨가로 VFA 생산량이 감소하지 않았으며, 첨가량이 증가함에 따라 메탄 생성량이 감소하였다. 따라서 대나무잎 추출물은 메탄 저감제로써 이용가능성이 있으며, 후후 *in vivo* 실험을 통해 첨가제로써 안전성을 평가할 가치가 있다.

**Abstract** This study examined the potential of bamboo leaf extract, rich in phenol compounds and flavonoids, as a methane-reducing agent by determining its effects on the rumen fermentation characteristics, digestibility, methane production, and microbial community. *In vitro* experiments were conducted in which bamboo leaf extract was added at concentrations of 0, 21, 42, and 63 mg/L to the respective cultures and fermented for 12, 24, and 48 hours. The total gas and methane production at 24 h of fermentation decreased as the levels of all bamboo leaf extracts increased. In particular, the methane production at 48 h of fermentation decreased by approximately 50% at 42 mg/L of PHN. The total VFA production at 48 h of fermentation time increased with the addition of bamboo leaf extracts. The population of Methanogenic archaea and *Methanobrevibacter sp.* AbM4 decreased as the addition levels of PHB and PHN increased. As a result, VFA production did not decrease with the addition of PHB and PHN, and methane production decreased as the levels of addition increased. Therefore, bamboo leaf extract is a potential methane abatement agent, but further *in vivo* experiments will be needed to evaluate its safety as an additive.

**Keywords** : Ruminant, Methane, Bamboo Leave, *In vitro* Batch Culture, Microbial Population

본 논문은 2023 한국산학기술학회 추계학술대회에 포스터 발표되었던 내용을 토대로 추가 보완하여 논문으로 게재되었으며 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0)의 연구결과입니다.

These authors contributed equally to this work as the first authors.(Hyun Jin Kim, Seong-Uk Jo)

\*Corresponding Author : Sung Sill Lee(Gyeongsang National Univ.)

email: lss@gnu.ac.kr

Received May 9, 2024

Revised June 5, 2024

Accepted June 7, 2024

Published June 30, 2024

## 1. 서론

온실가스 중 메탄(CH<sub>4</sub>)은 지구 온난화의 원인 중 하나이며 온난화 지수로 볼 때, 이산화탄소(CO<sub>2</sub>) 보다 약 26 배나 높기 때문에 온난화에 큰 영향력을 끼친다[1]. 반추동물의 장내에서 발생하는 메탄은 탄수화물의 혐기성 발효의 최종산물 중 하나이며[2], 메탄 생성으로 인해 반추동물이 섭취하는 사료의 총 에너지 중 약 2~12%가 손실된다[3]. 그러므로 반추동물의 장내에서 메탄이 발생하는 것은 온난화로 인한 기후 상승과 사료 이용효율 저하와 같은 부정적인 영향을 미치기 때문에 이를 개선하기 위한 메탄 저감 연구가 지속적으로 진행 중이다[4,5].

현재까지 반추동물의 메탄 저감제로 화학 첨가물, 항생제, 미생물제제 등 많은 연구가 진행되었지만[6,7], 낮은 효능, 항생제 내성, 화학 첨가제의 동물 체내 부작용 그리고 사료효율 감소 등을 고려하여 천연 식물 첨가제 개발에 관심이 집중되고 있다[8].

식물이 환경에 적응하기 위해 생산하는 물질을 식물의 2차 대사산물이라하며[9], alkaloids, terpenes 및 phenols로 구분할 수 있다. Alkaloids는 질소(N) 함유 화합물로 일부 약리적물질로 사용되어지며, 대부분 다른 유기체에 작용하는 독성이 있다[10]. Phenols과 terpenes는 각각 flavonoid, tannins 및 saponins등이 있으며, 천연 항균제로 반추위 내 bacteria, fungi 및 protozoa에 작용하여 최종적으로 메탄저감 효과를 얻을 수 있다[8]. 천연 항균제로 essential oil의 주요 물질인 monoterpene hydrocarbons보다 phenol 화합물이 강한 항균효과를 갖는 가장 풍부한 식물의 2차 대사산물이다[11,12]. 그러므로 강한 항균작용으로 메탄 저감 효과를 얻을 수 있는 phenol 화합물을 활용하는 연구가 필요하다.

식물은 잎, 꽃, 열매, 씨앗, 나무껍질 및 뿌리에 Phenol 화합물을 함유하고 있다[13-15]. 대나무는 벼과에 속하는 식물로 대나무 잎에는 phenol 화합물인 flavonoid, phenol acid가 함유되어 있다[16,17].

국내에서 자생 중인 대나무의 종류는 대표적으로 왕대(*Phyllostachys bambusoides*(PHB)), 솜대(*Phyllostachys nigra var. henonis*(PHN)), 조릿대(*Sasa borealis*(SAB))등이 있으며, flavone glycosides, phenolic acids등을 함유하고 있다[18-20]. 그러므로 이와 같은 대나무 잎들은 반추동물의 메탄 저감에 효과가 있을 것으로 생각된다.

따라서 이번 연구는 국내에서 자생 중인 대나무 왕대, 솜대 및 조릿대 잎 추출물의 첨가수준에 따른 *in vitro* 반추위 발효, 메탄 발생과 미생물 조성에 미치는 영향을

조사하여, 기후변화와 사료 이용효율 저해하는 장내발효 메탄을 저감하는 첨가제로써 활용 가능성을 평가하기 위해 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시축 및 반추위액 채취

공시축의 사양관리 및 연구절차는 경상국립대학교 동물실험윤리위원회 심의를 거쳐 사전 승인을 획득하였다(승인번호: GNU-180130-A0007).

경상국립대학교 부설동물사육장(경남 진주시)에서 반추위에 cannula가 장착된 한우 암소 2두(체중 450 ± 30 kg)로부터 *in vitro* 반추위 발효시험을 위한 시험용 반추위액을 채취하였다. 선행연구 Jo 등[19]에서 동일한 방법으로 공시축의 사료 급여는 timothy와 corn grain 비율을 60:40 (w/w)로 하여 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:30) 분할 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 자유섭취토록 하였다.

시험용 반추위액은 오전 사료 급여 전에 채취하였고, 4겹의 cheese cloth에 걸러서 보온 용기에 담아 실험실로 운반하였다. 잔여 사료 입자 제거를 위해 cheese cloth로 다시 걸러낸 반추위액과 McDougall's buffer를 1:2의 비율로 혼합한 배양액을 39°C에서 혐기상태(O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub>)로 유지시켜 실험을 위한 배양액으로 사용하였다.

### 2.2 공시재료 및 *In vitro* 시험

*In vitro* 실험을 위한 기질은 65°C dry oven에서 24시간 건조시킨 timothy와 corn grain을 2 mm screen이 장착된 wiley mill로 분쇄하여 기질로 이용하였다. 기질은 nylon bag에 기질 timothy 0.2 g과 corn grain 0.1 g을 담아 sealing하여 사용하였다. 3가지 대나무 잎 추출물 PHB, PHN, 및 SAB는 한국식물추출물은행에서 분양받았다(Table 1). 추출 방법을 채집된 대나무 잎을 그늘에서 건조하고 분말화 시킨 후, 1L의 methyl alcohol (99.9 % purity, HPLC grade)에 첨가되어 상온에서 초음파 추출기(SDN-900H, SD-ULTRASONIC CO., LTD)를 이용하여 상온에서 추출되었다. 추출물은 이후 품질 필터 No. 100 (HYUNDAI MICRO CO., LTD)를 통해 여과되고 저압 하에서 건조되어 사용되었다. *In vitro* 시험은 50 mL serum bottle에 기질이 담긴 nylon bag과 대나무 잎 추출물의 첨가수준별(기질의

21, 42 및 63 mg/L)로 담아 준비하였고, 준비된 혼합배양액을 분주하고 혐기 유지를 위해 O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub> 가스를 이용하였다. 대나무 잎 추출물의 첨가수준은 선행연구 [21,22]를 참고하여 결정하였다. 배양은 39°C shaking incubator에서 발효시간을 12, 24 및 48시간으로 하여 샘플링을 진행하였다. 또한 각 처리 당 4반복으로 총 120개의 serum bottle이 사용되었다(Fig. 1.).

## 2.3 조사항목 및 분석방법

### 2.3.1 화학성분 분석

Timothy hay와 corn grain의 일반성분 분석은 AOAC (2012)[23] 방법에 따라서 수행하였고, neutral detergent fiber 및 acid detergent fiber는 Van Soest등[24]의 방법에 따라 분석하였으며, 결과는 Table 2와 같다.

### 2.3.2 pH 및 건물소화율

pH 측정은 각 발효 시간대별 배양액을 pH meter (S210 SevenCompact, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 건물 소화율은 nylon bag을 수거하여 물을 채운 수조에 넣고 Heidolphs Rotamax 120 (Heidolph Instrument, Germany)를 이용하여 100 rpm에서 20분간 3회 세척하여 65°C의 dry oven에서 48시간 건조 후 건물 잔량을 측정하였다. 기질의 건조 전과 건조 후의 차를 구하고 백분율로 환산하여 계산하였다.

### 2.3.3 총 가스, 메탄 발생량

총 가스 발생량은 Theodorou 등[32]의 방법으로 serum bottle의 head space에 있는 가스 발생량을 detachable pressure transducer 및 digital read-out voltmeter (Laurel Electronics, Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하고, 그 후 6 mL vacutainer에 가스를 포집하여 gas chromatography (GC; HP 5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 메탄 발생량을 측정하였다.

### 2.3.4 휘발성지방산

배양액을 1.5 mL eppendorf tube에 1 mL 채취하여 원심분리기(VS-15000 N, Vision, Korea)를 이용하여 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 사료 입자를 제거하고, 상층액을 0.20 µM syringe filter를 이용하여 2 mL serum bottle에 여과 후, 분석은 high

performance liquid chromatography (Agilent-1200, Germany)를 이용하였다. 시료의 주입량은 20 µL였고, 이동상용액은 0.0085N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였으며, 유속은 0.6 mL/min이었다. Column은 300 mm×7.8 mm I.d MetaCarb 87H (Varian, USA)를 사용하였으며, 온도는 35°C에서 사용하였다.

### 2.3.5 Real-time PCR

48시간 반추위액 샘플(1.8mL)에서 genomic DNA를 추출하기 위해 bead-beating 방법으로 물리적으로 파괴하고 상용 DNA 추출 키트 (QIAamp Fast DNA stool Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA)를 제조업체의 권장 사항에 따라 사용하였다. 총 bacteria, methanogenic archaea, ciliate protozoa, fungi, hydrogen 및 formate 생성 박테리아 (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*), Butyrate 생성 박테리아(*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio proteoclasticus*), succinate 및 propionate 생성 박테리아 (*Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*)는 Real-time PCR 기계(CFX96 Real-Time system, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 표적 반추위 미생물의 염기서열, 크기, 효율 및 PCR 조건에 대한 정보는 Table 3에 나와 있다. Real-time PCR 분석은 총 reaction mixture에는 2 µL 10 × buffer (BioFACT, Daejeon, Korea), 0.5 µL 10 mM dNTP Mix (BioFACT, Daejeon, Korea), 1 µL 10 × forward primer (10 µM), 1µL reverse primer (10 µM), 1 µL genomic DNA diluted 10-fold, 1 µL Evagreen (SolGent, Daejeon, Korea), 0.1 µL taq polymerase (BioFACT, Daejeon, Korea), and 13.4 µL PCR-grade water로 구성되었다. 각 미생물의 absolute quantification을 위해 각 target gene sequence를 포함하는 plasmids를 10배 희석하여 standard curve을 구한다. 각 미생물 plasmids의 모든 세부 제조 공정은 Kim 등[33] 및 Hamid 등[34]에 따라 수행하였다. 이 실험은 3반복으로 수행하였다.

## 2.4 통계처리

통계처리는 SAS package program (Statistical Analysis System software version 9.2, 2011)[35]의 일반선형모형(General linear model)의 절차를 이용하여 분산분석을 하였고, 각 처리구 간의 유의성 검증을 위하여 Tukey의 다중검정방법으로 실시하였다. 또한 Polynomial

Table 1. The general information regarding extracts used in the experiment

Botanical name	Scientific name	Korea name	Family name	Part	Solvent	Before plant	After extracts
Giant timber bamboo	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	왕대 (Wangdae)	Gramineae	Leaf	Methyl alcohol 99.9%	49 g	4.06 g
Henon bamboo	<i>Phyllostachys nigra var. henonis</i>	솜대 (Somdae)				80 g	4.71 g
Northern bamboo	<i>Sasa borealis</i>	조릿대 (Joritsdae)				70 g	4.76 g

Table 2. Chemical composition of ingredient used in *in vitro* experiment

Items <sup>1</sup>	Timothy hay	Corn grain
Dry matter (g/kg as feed basis)	910	950
Chemical composition DM (g/kg of DM)		
Crude protein	60.0	82.0
Ether extract	14.8	51.5
Crude ash	50.5	17.1
Neutral detergent fiber	780.0	148.0
Acid detergent fiber	443.0	44.0
Neutral detergent insoluble protein	18.4	5.10
Acid detergent insoluble protein	10.4	4.10
Lignin	79.5	6.50
TDN (% DM)	49.9	88.2

<sup>1</sup>DM, Dry matter; TDN, Total digestible nutrients.

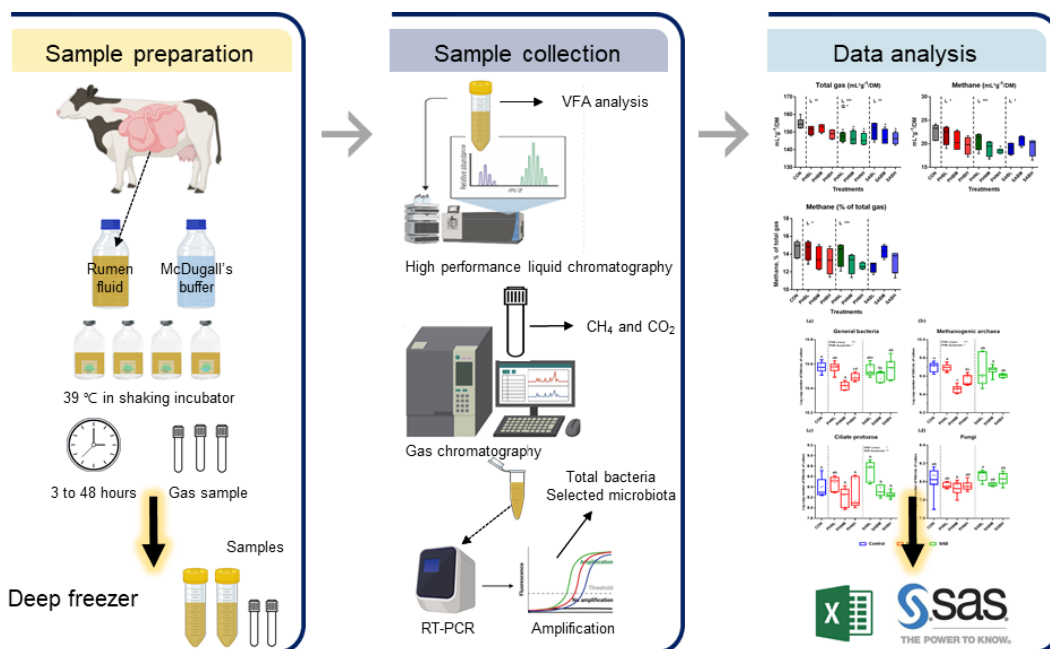


Fig. 1. *In vitro* batch culture experiments

Table 3. Primer sets used for relative quantification of bacterial species in the rumen using real-time PCR

Target species	Primer sequence (5'→3')	Size(bp)	Reference
General bacteria	F: CGGCAACGAGCGCAACCC	130	[25]
	R: CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC		
Fungi	F: GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	120	[25]
	R: CAAATTCACAAAGGATAGGATGATT		
Ciliate protozoa	F: GCTTTGCGWTGGTAGTGTATT	223	[26]
	R: CTTGCCCTCYAATCGTWCT		
Methanogenic archaea	F: GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA	232	[26]
	R: ACGGGCGGTGTGTGCAAG		
<i>Methanobrevibacter sp. AbM4</i>	F: TTTAATAAGTCTCTGGTGAATC	~160	[27]
	R: AGATTGCTTCTAGTTAGACGC		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: GTTCGGAATTACTGGCGTAAA	121	[25]
	R: CGCCTGCCCTGAACTATC		
<i>Ruminococcus albus</i>	F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCCG	176	[28]
	R: CCTCCTTGCGGTTAGAACA		
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F: CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG	132	[25]
	R: CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC		
<i>Prevotella ruminocola</i>	F: GCGAAAGTCGGATTAATGCTCTATG	185	[26]
	R: CCCATCCTATAGCGGTAACCTTTG		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	F: ACCGCATAAGCGCACGGA	78	[29]
	R: CGGGTCCATCTTGTACCGATAAAT		
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	F: TCCGGTGGTATGAGATGGGC	65	[30]
	R: GTCGCTGCATCAGAGTTTCTT		
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	F: TGGGTGTTAGAAATGGATTC	597	[31]
	R: CTCTCTGCACTCAAGAATT		

1 F=forward; R=reverse; bp=base pair.

contrasts를 이용하여 왕대, 솨대 및 조릿대가 반추위 발효 성상 및 가스 발생량에 미치는 효과(Linear, Quadratic)를 분석하였다. 또한,  $p < .05$ 는 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

### 3. 결과

#### 3.1 반추위 pH 및 건물소화율

대나무 잎 첨가 수준에 따른 pH 및 건물소화율은 Table 4와 같다. 발효시간이 증가 할수록 pH는 감소하였고, IVDMD(*In vitro* Dry Matter Digestibility)는 증가하였다. 발효 12시간에서 pH는 PHB와 PHN의 첨가 수준에 따라 Linear하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 발효시간 12시간에서 IVDMD는 PHB의 첨가 수준에 따라 대조구에 비해 Quadratic하게( $p < 0.05$ ), PHB의 첨가수준 21 mg/L에서 유의적으로( $p < 0.05$ ) 감소하였다. 발효 12시간에서 pH는 PHN 63 mg/L 첨가수준에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 발효 24시간에서 pH는

PHN과 SAB의 첨가수준에 따라 Linear하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 발효 24시간과 48시간에서 IVDMD는 PHN 추출물의 첨가수준에 따라 Linear하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).

#### 3.2 Gas 발생량

대나무 잎 첨가 수준에 따른 gas 발생량은 Table 5와 같다. 발효 24시간에서 총 gas 발생량은 모든 대나무잎 추출물의 첨가수준에 따라 Linear하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), PHN과 SAB의 42, 63 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 발효 48시간에서는 PHN의 첨가수준에 따라 Linear하게 증가하였다. 발효 24시간에서 메탄 발생량은 모든 대나무잎 추출물의 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 그 중 PHB의 42 mg/L 와 PHN의 42, 63 mg/L 첨가수준에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 발효 24시간에서 메탄 발생비율은 PHB와 PHN 추출물의 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 그 중 PHN의 모든 첨가수준에서 대조구에 비해 유의적으

Table 4. Additional effects of bamboo leave extracts on *in vitro* pH and IVDMD

Items	Incubation time (h)	Dose (mg/L)	Control	Treatment <sup>2</sup>			SEM <sup>3</sup>	p-value
				PHB	PHN	SAB		
pH	12	0	6.565					
		21		6.650	6.647	6.603	0.036	0.0715
		42		6.657	6.650	6.653		
		63		6.647	6.757†	6.650		
		Contrast <sup>4</sup>		L*	L***	-		
	0	6.174						
	24	21		6.183	6.263	6.167	0.044	0.1233
		42		6.300	6.240	6.333		
		63		6.263	6.295	6.273		
		Contrast		-	L**	L*		
		0	5.888					
	48	21		5.803	5.840	5.863	0.038	0.6129
42			5.800	5.823	5.895			
63			5.840	5.885	5.870			
Contrast			-	-	-			
0		33.72						
IVDMD <sup>1</sup>	12	21		28.00†	31.11	35.00	1.350	0.0017
		42		29.78	28.56	36.00		
		63		30.67	29.33	33.33		
		Contrast		Q*	-	-		
		0	48.66					
	24	21		46.33	45.44	49.11	1.777	0.0543
		42		41.89	42.33	42.67		
		63		44.78	42.89	46.22		
		Contrast		-	L**	-		
		0	59.53					
	48	21		59.67	60.56	60.22	1.106	0.0238
		42		59.50	54.67	59.50		
63			58.00	56.33	60.89			
Contrast			-	L**	-			
0								

<sup>1</sup>IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility.

<sup>2</sup>Treatment : PHB, *Phyllostachys bambusoides*; PHN, *Phyllostachys nigra* var. *henonis*; SAB, *Sasa borealis*.

<sup>3</sup>SEM, standard error of the mean

<sup>4</sup>Contrast : Orthogonal contrasts for L, linear and Q, quadratic effects. The levels of significance were assigned as follow : -, non-significant; \*,  $p < 0.050$ ; \*\*,  $p < 0.010$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

† Means ( $n = 10$ ) with different superscripts in the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 발효 48시간에서 메탄 발생량과 발생비율은 PHB와 PHN의 추출물 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), 메탄 발생량과 발생비율은 대조구에 비해 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 또한 SAB는 63 mg/L 첨가수준에서 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ).

### 3.3 휘발성지방산

대나무 잎 첨가 수준에 따른 휘발성지방산 생산량은

Fig. 2과 같다. 발효 12시간에서 PHB의 첨가수준에 따라 총 VFA(Volatile Fatty Acid)와 butyrate의 생산량은 Linear하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), acetate 생산량과 AP ratio(Acetate : Propionate Ratio)는 Linear하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 발효 12시간에서 PHB의 63 mg/L첨가구에서 대조구에 비해 acetate는 감소하였고, butyrate는 증가하였다( $P < 0.05$ ). 발효 12시간에서 PHN의 첨가수준에 따라 총 VFA와 butyrate의 생산량은 Linear하게 증가하였으며( $P < 0.05$ ), acetate와 propionate생산량은

Table 5. Additional effects of bamboo leave extracts on *in vitro* gas production

Items	Incubation time (h)	Dose (mg/L)	Control	Treatment <sup>1</sup>			SEM <sup>2</sup>	<i>p</i> -value
				PHB	PHN	SAB		
Total gas (mL/g DM)	12	0	92.54				1.806	0.0029
		21		93.53	89.98	96.21		
		42		89.98	88.37	98.10		
		63		90.17	86.50	92.43		
		Contrast <sup>3</sup>		-	L*	Q*		
	24	0	136.6				2.377	<.0001
		21		140.6	136.2	136.3		
		42		127.0	124.1 †	122.9 †		
		63		128.8	123.5 †	117.6 †		
		Contrast		L**	L***	L***		
	48	0	173.5				2.668	0.0003
		21		179.2	186.3	169.6		
42			181.9	173.9	168.7			
63			183.9	175.4	172.9			
	Contrast		L*	-	-			
Methane (mL/g DM)	12	0	15.84				1.172	0.4474
		21		13.93	14.31	16.25		
		42		13.18	14.84	14.48		
		63		12.93	13.37	13.02		
		Contrast		-	-	-		
	24	0	27.94				2.155	0.0004
		21		21.78	18.24	25.79		
		42		14.89 †	16.63 †	25.29		
		63		25.65	15.84 †	20.56		
		Contrast		Q*	L***Q*	L*		
	48	0	30.48				0.884	<.0001
		21		17.01 †	15.61 †	25.63		
42			17.62 †	15.09 †	29.24			
63			15.83 †	15.26 †	24.82 †			
	Contrast		L***Q**	L***Q***	-			
Proportion of methane (%)	12	0	17.01				1.167	0.2792
		21		14.81	15.86	16.88		
		42		14.64	16.82	13.20		
		63		14.33	15.41	14.11		
		Contrast		-	-	L*		
	24	0	20.46				1.192	<.0001
		21		15.48	13.40 †	18.87		
		42		15.44	13.39 †	20.59		
		63		19.92	12.83 †	17.58		
		Contrast		Q**	L***Q*	-		
	48	0	17.61				0.562	<.0001
		21		9.48 †	8.39 †	15.12		
42			9.69 †	8.68 †	17.35			
63			7.99 †	9.49 †	14.35 †			
	Contrast		L***Q**	L***Q***	-			

<sup>1</sup>Treatment : PHB, *Phyllostachys bambusoides*; PHN, *Phyllostachys nigra* var. *henonis*; SAB, *Sasa borealis*.

<sup>2</sup>SEM, standard error of the mean.

<sup>3</sup>Contrast : Orthogonal contrasts for L, linear and Q, quadratic effects. The levels of significance were assigned as follow, .non-significant; \*, *p* < 0.050; \*\*, *p* < 0.010; \*\*\*, *p* < 0.001. † Means(*n* = 10) with different superscripts in the same column differ significantly (*p* < 0.05).

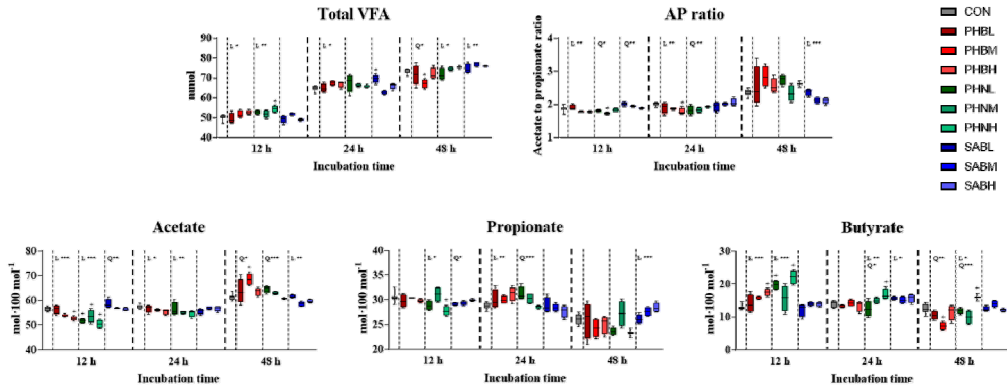


Fig. 2. Effects of bamboo leaf extracts addition on *in vitro* volatile fatty acids profiles.

Error bars are standard error of the mean (n=4).

Othogonal contrasts for L, linear and Q, quadratic effects.

The levels of significance were assigned as follow: \*,  $p < 0.050$ ; \*\*,  $p < 0.010$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

+ Means(n = 10) with different superscripts in the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

과 AP ratio는 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic한 영향을 받았다( $p < 0.05$ ). 또한 PHN의 첨가수준 63 mg/L에서 대조구에 비해 총 VFA와 butyrate 생산량은 유의적으로 증가하였지만 ( $p < 0.05$ ), propionate 생산량은 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 발효 12시간에서 acetate 생산량은 PHN의 모든 첨가수준에서 대조구에 비해 유의적( $p < 0.05$ )으로 감소하였다. SAB의 첨가수준에 따른 acetate와 propionate 생산량과, AP ratio는 Quadratic한 효과를 보였다( $p < 0.05$ ).

발효 24시간에서 PHB의 첨가수준에 따라 총 VFA와 propionate 생산량이 Linear하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), acetate와 AP ratio의 생산량은 Linear하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그 중 AP ratio는 PHB의 63 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). PHN의 첨가수준에 따라 acetate와 propionate의 생산량은 Linear 또는 Quadratic하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), butyrate 생산량과 AP ratio는 Linear 또는 Quadratic하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그 중 butyrate 생산량은 63 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적( $p < 0.05$ )으로 증가하였다. SAB의 첨가수준에 따른 butyrate 생산량은 Linear하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), 총 VFA 생산량은 21 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였다.

발효 48시간에서 추출물 PHB의 첨가수준에 따라 총 VFA, acetate 및 butyrate의 생산량이 Quadratic한 영향을 받았다( $p < 0.05$ ). 그 중 21 mg/L 첨가구의 총

VFA, acetate 및 butyrate의 생산량은 대조구에 비해 유의적( $p < 0.05$ )인 영향을 받았다. PHN의 첨가수준에 따라 총 VFA, acetate 및 butyrate 생산량은 Linear 또는 Quadratic한 효과를 받았다( $p < 0.05$ ). 그 중 butyrate 생산량은 63 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). SAB의 첨가수준에 따른 총 VFA와 propionate 생산량은 Linear하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), acetate 생산량과 AP ratio는 Linear하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).

### 3.4 미생물 조성 변화

대나무 잎 첨가 수준에 따른 미생물 조성 변화는 Table 6과 7과 같다. 발효 48시간에서 PHB와 PHN의 첨가수준에 따른 General bacteria의 DNA양은 Linear 또는 Quadratic하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 발효 48시간에서 PHN의 21 mg/L 첨가구에서 General bacteria의 DNA양이 대조구에 비해 증가하였다( $p < 0.05$ ).

Fungi의 DNA양은 모든 대나무 잎 추출물의 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그 중 PHN과 SAB의 모든 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). Fungid의 DNA양은 PHB의 21 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 감소하였고( $p < 0.05$ ), 63 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 증가하였다( $p < 0.05$ ).

Ciliate protozoa의 DNA양은 모든 대나무 잎 추출물의 첨가수준에 따른 Linear 또는 Quadratic한 영향



Table 6. Effects of bamboo leave extracts addition on microbial abundance (Log copy number of DNA/mL of rumen fluid) of general bacteria, fungi, ciliate protozoa, and methanogenic archaea at 48 h incubation time

Items	Dose (mg/L)	Control	Treatment <sup>1</sup>			SEM <sup>2</sup>	p-value
			PHB	PHN	SAB		
General bacteria	0	11.27					
	21		11.32	11.57†	11.40	0.054	<.0001
	42		11.15	11.37	11.33		
	63		11.06	11.33	11.09		
	Contrast <sup>3</sup>		L***Q**	Q*	-		
Fungi	0	7.745					
	21		7.575†	7.898†	7.998†	0.022	<.0001
	42		7.662	7.932†	8.071†		
	63		7.925†	7.980†	8.078†		
	Contrast		L***Q***	L***Q*	L***Q***		
Ciliate protozoa	0	7.185					
	21		7.559†	7.715†	8.063†	0.064	<.0001
	42		7.329	7.161	8.066†		
	63		7.476	7.286	8.211†		
	Contrast		L*Q*	Q*	L***Q***		
Methanogenic archaea	0	8.131					
	21		8.104	8.008	7.866†	0.039	<.0001
	42		7.926†	7.896†	8.023		
	63		7.855†	7.687†	8.155		
	Contrast		L***	L***	Q***		

<sup>1</sup>Treatment : PHB, *Phyllostachys bambusoides*; PHN, *Phyllostachys nigra* var. *henonis*; SAB, *Sasa borealis*;

<sup>2</sup>SEM, standard error of the mean

<sup>3</sup>Contrast : Orthogonal contrasts for L, linear and Q, quadratic effects. The levels of significance were assigned as follow, -, non-significant; \*,  $p < 0.050$ ; \*\*,  $p < 0.010$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . † Means ( $n = 10$ ) with different superscripts in the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

을 받았으며( $p < 0.05$ ), 그 중 PHB와 PHN의 21 mg/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 또한 SAB의 모든 첨가수준에서는 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ).

Methanogenic archaea의 DNA양은 PHB와 PHN 첨가수준에 따라 Linear하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 그 중 42와 63 ml/L 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 SAB에서는 첨가수준에 따라 Quadratic하게 영향을 받았고( $p < 0.05$ ), 그 중 21 mg/L에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하는 효과를 보였다( $p < 0.05$ ).

PHB의 첨가수준에 따른 *Methanobrevibacter* sp. AbM4, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Anaerovibrio lipolytica*의 DNA 양은 Linear하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).

PHN의 첨가수준에 따른 *Methanobrevibacter* sp. AbM4의 DNA 양은 Linear하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerovibrio lipolytica*의 DNA양은 PHN의 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic한 효과를 보였다( $p < 0.05$ ).

SAB의 첨가수준에 따른 *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Anaerovibrio lipolytica*의 DNA양은 Linear 또는 Quadratic한 효과를 보였으며( $p < 0.05$ ), *Methanobrevibacter* sp. AbM4, *Fibrobacter succinogenes*의 DNA의 양은 Quadratic한 효과를 보였다( $p < 0.05$ ). 그 중 *Prevotella ruminicola*의 DNA 양은 모든 대나무 잎 추출물의 첨가수준에 따라 Linear 또는 Quadratic한 효과를 보였다( $p < 0.05$ ).

Table 7. Effects of bamboo leave extracts addition on microbial abundance (Log copy number of DNA/mL of rumen fluid) of selected bacteria species at 48 h incubation time

Items	Dose (mg/L)	Control	Treatment <sup>1</sup>			SEM <sup>2</sup>	P-value
			PHB	PHN	SAB		
<i>Methanobrevibacter sp. AbM4</i>	0	7.270					
	21		7.299	7.074	7.480		
	42		7.149	7.029	7.598	0.044	<.0001
	63		7.081	6.821	7.222		
	Contrast <sup>3</sup>			L***	L***	Q***	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0	10.06					
	21		10.26	10.28	10.48		
	42		10.04	9.976	10.14	0.058	<.0001
	63		10.19	10.61	10.25		
	Contrast			-	L***Q***	Q*	
<i>Ruminococcus albus</i>	0	8.809					
	21		8.790	8.596	8.843		
	42		8.342	8.340	8.959	0.066	<.0001
	63		8.384	9.025	8.775		
	Contrast			L***	Q***	-	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0	8.712					
	21		8.737	8.279	8.596		
	42		8.351	8.360	8.777	0.041	<.0001
	63		8.351	8.821	8.672		
	Contrast			L***	Q***	-	
<i>Prevotella ruminicola</i>	0	10.50					
	21		10.59	10.53	10.74		
	42		10.46	10.54	10.78	0.029	<.0001
	63		10.42	10.85	10.62		
	Contrast			L***Q***	L***Q**	L**Q***	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0	8.298					
	21		8.217	7.913	8.177		
	42		8.266	7.924	8.270	0.056	<.0001
	63		8.253	8.376	8.114		
	Contrast			-	Q***	L***	
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	0	10.87					
	21		10.76	10.88	10.68		
	42		10.81	10.77	10.72	0.026	<.0001
	63		10.78	10.86	10.72		
	Contrast			L*	-	L**Q**	
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	0	8.769					
	21		8.410	8.248	8.553		
	42		8.531	8.245	8.510	0.057	<.0001
	63		8.195	8.601	8.389		
	Contrast			L***	Q***	L***	

<sup>1</sup>Treatment : PHB, Phyllostachys bambusoides; PHN, Phyllostachys nigra var.henonis; SAB, Sasa borealis.

<sup>2</sup>SEM, standard error of the mean

<sup>3</sup>Contrast : Orthogonal contrasts for L, linear and Q, quadratic effects. The levels of significance were assigned as follow, -, non-significant; \*,  $p < 0.050$ ; \*\*,  $p < 0.010$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . † Means( $n = 10$ ) with different superscripts in the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

#### 4. 고찰

대나무 잎 추출물의 첨가수준이 증가함에 따라 대조구에 비해 IVDMD는 감소하였고, pH는 증가하였다 (Table 4). 이는 대조구에 비해 첨가구의 소화율이 낮은 것인데, 소화율이 감소하는 것은 phenol 화합물과 flavonoid가 건물소화에 영향을 미치는 bacteria의 수를 감소시켰기 때문이다[36].

본 연구 결과에서는 PHB 첨가수준이 증가함에 따라 general bacteria의 개체수가 감소하였지만, 건물 소화율에는 유의적인 영향을 미치지 않았다. Cushine 등[37]에 따르면 phenol 화합물이 메탄 생성 박테리아를 감소 시켰기 때문에 총 박테리아 수가 감소 했을 수 있다고 하였다. 반추위 pH는 5이하에서 반추위 미생물에 부정적인 영향을 준다고 알려져 있다[38]. 하지만 본 연구에서는 5.800~7.757 사이를 유지하였기 때문에 pH변화에 의한 미생물 활동에 부정적인 영향을 미치지 않았다.

대나무 잎 추출물의 첨가수준이 증가함에 따라 총 VFA의 발생량이 감소하지는 않았으며(Fig. 2), acetate는 감소하였고 butyrate는 증가하였다. 이러한 결과는 첫 번째, Moss 등[39]에 따르면, acetate 생성 과정 중 수소가 생성되는데, 대나무잎 추출물의 첨가에 의해 acetate 생성량을 감소시켰고 이로 인해 메탄의 전구물질인 수소가 감소되어 결과적으로 메탄이 감소되었을 수 있다. 두 번째, Goel[40] 등에 따르면 메탄이 생성될 때 사용하고 남은 전자는 NADH를 환원시키고, acetoacetyl CoA는 환원된 NADH에 의해 butyl CoA로 전환되어 butyrate의 생성량을 증가 시킨다고 하였다. 따라서 대나무잎 추출물의 첨가에 의해 butyrate 생성량 증가로 인해 메탄이 감소되었을 수 있다.

총 가스 발생량과 메탄 생성량은 대나무 잎 추출물의 첨가수준이 증가함에 따라 감소하였다(Table 4). 대나무 잎 추출물에는 항균, 항산화 물질인 phenol 화합물과 flavonoid가 함유 되어 있다[16]. PHB에는 catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, 3-hydroxy benzoic acid, ferulic acid, homoorientin 등[18,41], PHN에는 isoorientin, vitexin, cis-coumaric acid, *p*-coumaric acid, luteolin 6-*C*-(6'-*O*-trans-caffeoyl)glucoside, vitariflavone, tricetin 등[42], 그리고 SAB에는 syringaresinol, tricetin, tricetin 7-*p*-β-D-glucopyranoside, luteolin 6-*C*-α-L-rhamnoside, apigenin 6-*C*-β-D-xylopyranosyl-8-*C*-D-glucopyranoside 등이 있다[43-45]. 본 연구 결과는 PHB와 PHN의 첨가로 메탄생성 박테리아를 감

소시켰으며, caffeic acid와 chlorogenic acid의 메탄 생성 박테리아를 감소시킨다는 결과와 동일하다[46,47]. Phenol 화합물과 flavonoid는 bacteria의 세포벽 합성 또는 핵산 합성의 억제제를 통해 미생물의 수를 감소시킨다고 한다[29]. 기질이 분해 되면 미생물이 VFA와 수소를 생성하고 methanogen에 의해 메탄이 생성되기 때문에[48], 미생물의 수가 감소되어 총 가스 발생량과 메탄 생성량이 감소하였을 거라 생각한다.

또한 PHB와 PHN의 첨가구에서 methanogen archaea의 개체수가 감소하였다(Table 5). SAB 첨가구는 methanogen archaea의 개체수가 증가 하였지만 메탄 생성량은 감소하였다. SAB 첨가가 methanogen archaea의 대사 저하이거나 미생물의 조성 구성이 변형되어[49], 메탄 생성량이 감소한 것으로 생각된다. Flavonoid는 그람 양성 bacteria에 대한 항균효과를 가지고 있다[29]. 대나무 잎 추출물의 첨가 수준이 증가함에 따라 그람 양성균인 *Methanobrevibacter sp.* AbM4의 개체수는 감소하였고, VFA 생산량은 증가하였다(Table 6). *M. sp.* AbM4는 총 VFA 농도와 음의 상관관계로, *M. sp.* AbM4의 개체수가 감소하고, VFA 생산량이 증가한다면 결과와 동일하다[50]. Cato 등[51]에 따르면 섬유소 분해 미생물인 *Fibrobacter succinogenes*는 수소를 발생하지 않는다고 하였다. PHN의 첨가구에서 섬유소 분해 bacteria인 *F. succinogenes*가 증가 하였지만, 메탄 생성의 전구물질인 수소가 발생하지 않았기 때문에 메탄 생성이 저감된 것으로 생각된다. 섬유소 분해 박테리아인 *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*는 섬유소 분해시 수소를 발생하는데, PHB의 첨가구에서 섬유소 분해 bacteria인 *R. albus*, *R. flavefaciens*가 감소하였기 때문에 메탄 생성이 저감된 것으로 생각 된다.

#### 5. 결론

왕대, 솜대, 조릿대 잎 추출물에는 phenol 화합물과 flavonoid가 풍부하여 항균기능을 가지고 있다. 본 연구 결과에서 대나무 잎 추출물은 총 VFA생산량은 감소하지 않았지만 methanogens 조성과 메탄 생성량이 감소했다. 대나무 잎 추출물을 첨가하는 것은 메탄 저감에 유용한 첨가제가 될 수 있음을 확인 하였다. 하지만 실제 반추위와 *in vitro* 실험 환경과는 결과가 다르게 나타날 수 있으므로 대나무 잎 추출물을 활용하여 반추동물의 *In vivo* 실험을 하는 추가 연구가 필요 할것이다.

## References

- [1] J. Lelieveld, P. J. Crutzen, and C. Brühl, "Climate effects of atmospheric methane," *Chemosphere*, vol.26, no.1-4, pp.739-768, 1993, Feb, 1993.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90458-H](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90458-H)
- [2] S. J. Meale, A. V. Chaves, J. Baah, and T. A. McAllister, "Methane Production of Different Forages in In vitro Ruminant Fermentation," *Asian-Australas J Anim Sci*, vol.25, no.1, pp.86-91, Jan, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11249>
- [3] K. A. Johnson, and D. E. Johnson, "Methane emissions from cattle," *J Anim Sci*, vol.73, no.8, pp.2483-2492, Aug, 1995.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- [4] R. J. Wallace, N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold, "Natural Products as Manipulators of Rumen Fermentation," *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol.15, no.10, pp.1458-1468, Jan, 2002.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1458>
- [5] C. Wenk, "Herbs and Botanicals as Feed Additives in Monogastric Animals," *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol.16, no.2, pp.282-289, Feb, 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.282>
- [6] A. N. Hristov, J. Oh, J. L. Firkins, J. Dijkstra, E. Kebreab, G. Waghorn, H. P. Makkar, A. T. Adesogan, W. Yang, C. Lee, P. J. Gerber, B. Henderson, and J. M. Tricarico, "Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options," *J Anim Sci*, vol.91, no.11, pp.5045-5069, Nov, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
- [7] J. R. Knapp, G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, and J. M. Tricarico, "Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions," *J Dairy Sci*, vol.97, no.6, pp.3231-3261, June, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
- [8] V. Baca-Gonzalez, P. Asensio-Calavia, S. Gonzalez-Acosta, J. M. Perez de la Lastra, and A. Morales de la Nuez, "Are Vaccines the Solution for Methane Emissions from Ruminants? A Systematic Review," *Vaccines (Basel)*, vol.8, no.3, pp.460, Aug 20, 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030460>
- [9] A. Kossel, "Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle," *Du Bois-Reymond's Archiv/Arch Anat Physiol Physiol Abt*, vol.278, pp.181-186, 1891.
- [10] R. Bodas, N. Prieto, R. García-González, S. Andrés, F. J. Giráldez, and S. López, "Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites," *Animal Feed Science and Technology*, vol.176, no.1-4, pp.78-93, Sep, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
- [11] J. Dai, and R. J. Mumper, "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties," *Molecules*, vol.15, no.10, pp.7313-7352, Sep, 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- [12] C. Benchaar, and H. Greathead, "Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants," *Animal Feed Science and Technology*, vol.166-167, pp.338-355, Jun, 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024>
- [13] D. A. Levin, "Plant Phenolics: An Ecological Perspective," *The American Naturalist*, vol.105, no.942, pp.157-181, Mar, 1971.  
DOI: <https://doi.org/10.1086/282712>
- [14] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *J Nutr Biochem*, vol.13, no.10, pp.572-584, Oct, 2002.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- [15] E. Cardoso-Gutierrez, E. Aranda-Aguirre, L. E. Robles-Jimenez, O. A. Castelan-Ortega, A. J. Chay-Canul, G. Foggi, J. C. Angeles-Hernandez, E. Vargas-Bello-Perez, and M. Gonzalez-Ronquillo, "Effect of tannins from tropical plants on methane production from ruminants: A systematic review," *Vet Anim Sci*, vol.14, pp.100214, Dec, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100214>
- [16] M. J. Kim, Byun, M. W., & Jang, M. S, "Physiological and antibacterial activity of bamboo (Sasa coreana Nakai) leaves.," *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition (Korea Republic)*, vol.25, no.1, pp.135-142, Nov, 1996.  
<https://scienceon.kisti.re.kr/srch/selectPORSrchArticle.do?cn=JAKO199611920129182>
- [17] L. Van Hoyweghen, T. De Beer, D. Deforce, and A. Heyerick, "Phenolic compounds and anti-oxidant capacity of twelve morphologically heterogeneous bamboo species," *Phytochem Anal*, vol.23, no.5, pp.433-443, Sep-Oct, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.1377>
- [18] I. O. Ju, Jung, G. T., Ryu, J., Choi, J. S., & Choi, Y. G., "Chemical Components and Physiological Activities of Bamboo (Phyllostachys bambusoides Starf) Extracts Prepared with Different Methods," *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol.37, no.4, pp.542-548, Aug, 2005.  
[https://koreascience.kr/article/JAKO20050463744673\\_8.page](https://koreascience.kr/article/JAKO20050463744673_8.page)
- [19] S. U. Jo, S. J. Lee, H. S. Kim, J. S. Eom, Y. Choi, Y. Lee, and S. S. Lee, "Dose-Response Effects of Bamboo Leaves on Rumen Methane Production, Fermentation Characteristics, and Microbial Abundance In Vitro," *Animals (Basel)*, vol.12, no.17, pp.2222, Aug 29, 2022.  
[https://koreascience.kr/article/JAKO20163076590370\\_2.page](https://koreascience.kr/article/JAKO20163076590370_2.page)
- [20] J.-W. Kang, J.-P. Chang, J.-H. Yoo, E.-S. Doh, and K.-J. Kil, "Antioxidant activities of extracts from different parts of Sasa borealis," *The Korea Journal of*

- Herbology*, vol.31, no.6, pp.45-52, Nov, 2016.  
<https://koreascience.kr/article/JAKO201606776011850.page>
- [21] S.-U. Jo, S.-J. Lee, Y.-J. Lee, H.-S. Kim, J.-S. Eom, Y.-Y. Choi, E.-J. Bae, and S.-S. Lee, "Effects of Additional Levels of Phyllostachys bambusoides on Ruminant Fermentation Characteristics and Methane Emission in vitro," *Korean Journal of Organic Agriculture*, vol.29, no.2, pp.241-256, Aug, 2021.  
<https://koreascience.kr/article/JAKO202123258371424.page>
- [22] S. U. Jo, S. J. Lee, H. S. Kim, J. S. Eom, Y. Choi, Y. Lee, and S. S. Lee, "Dose-Response Effects of Bamboo Leaves on Rumen Methane Production, Fermentation Characteristics, and Microbial Abundance In Vitro," *Animals (Basel)*, vol.12, no.17, pp.2222, Aug 29, 2022.  
 DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12172222>
- [23] W. George Jr, "Official Methods of Analysis of AOAC International 19th edition, volume II," *Rockville, USA, AOAC International*, pp.20-25, 2012.
- [24] P. J. Van Soest, J. B. Robertson, and B. A. Lewis, "Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition," *J Dairy Sci*, vol.74, no.10, pp.3583-3597, Oct, 1991.  
 DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- [25] S. E. Denman, and C. S. McSweeney, "Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen," *FEMS microbiology ecology*, vol.58, no.3, pp.572-582, Dec, 2006.  
 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x>
- [26] J. T. Sylvester, S. K. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, and J. L. Firkins, "Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR," *J Nutr*, vol.134, no.12, pp.3378-3384, Dec, 2004.  
 DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3378>
- [27] M. Zhou, M. Hünnerberg, K. A. Beauchemin, T. A. McAllister, E. K. Okine, and L. L. Guan, "Individuality of ruminal methanogen/protozoa populations in beef cattle fed diets containing dried distillers' grain with solubles," *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, vol.62, no.4, pp.273-288, Dec, 2012.  
 DOI: <https://doi.org/10.1080/09064702.2013.788206>
- [28] R. F. Wang, W. W. Cao, and C. E. Cerniglia, "A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods," *J Appl Microbiol*, vol.83, no.6, pp.727-736, Dec, 1997.  
 DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00300.x>
- [29] D. M. Stevenson, and P. J. Weimer, "Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol.75, no.1, pp.165-174, May, 2007.  
 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0802-y>
- [30] D. Paillard, N. McKain, L. C. Chaudhary, N. D. Walker, F. Pizette, I. Koppova, N. R. McEwan, J. Kopečný, P. E. Vercoe, and P. Louis, "Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different Butyrivibrio-like bacteria from the rumen," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol.91, pp.417-422, Nov, 2007.  
 DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9121-7>
- [31] K. Tajima, R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, and Y. Benno, "Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR," *Appl Environ Microbiol*, vol.67, no.6, pp.2766-2774, Jun, 2001.  
 DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001>
- [32] M. K. Theodorou, B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France, "A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds," *Animal feed science and technology*, vol.48, no.3-4, pp.185-197, Feb, 1994.  
 DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- [33] H. Kim, B. Kim, S. Cho, I. Kwon, and J. Seo, "Dietary lysophospholipids supplementation inhibited the activity of lipolytic bacteria in forage with high oil diet: an in vitro study," *Asian-Australas J Anim Sci*, vol.33, no.10, pp.1590-1598, Oct, 2020.  
 DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0850>
- [34] M. M. A. Hamid, J. Moon, D. Yoo, H. Kim, Y. K. Lee, J. Song, and J. Seo, "Rumen fermentation, methane production, and microbial composition following in vitro evaluation of red ginseng byproduct as a protein source," *Journal of Animal Science and Technology*, vol.62, no.6, pp.801, Nov, 2020.  
 DOI: <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.6.801>
- [35] SAS. 2011. SAS/STAT Software for PC. Version 9.2. SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.
- [36] A. K. Patra, "Recent Advances in Measurement and Dietary Mitigation of Enteric Methane Emissions in Ruminants," *Front Vet Sci*, vol.3, pp.39, May, 2016.  
 DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00039>
- [37] T. P. Cushnie, and A. J. Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids," *Int J Antimicrob Agents*, vol.26, no.5, pp.343-356, Nov, 2005.  
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- [38] W. H. Hoover, "Chemical factors involved in ruminal fiber digestion," *J Dairy Sci*, vol.69, no.10, pp.2755-2766, Oct, 1986.  
 DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80724-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80724-X)
- [39] A. R. Moss, J.-P. Jouany, and J. Newbold, "Methane production by ruminants: its contribution to global warming," *Ann. Zootech.*, vol.49, no.3, pp.231-253, Apr, 2000.  
 DOI: <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- [40] G. Goel, H. P. Makkar, and K. Becker, "Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using

- batch and continuous fermentations," *Br J Nutr*, vol.101, no.10, pp.1484-1492, May, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114508076198>
- [41] H.-J. Kim, M.-A. Kang, S.-H. Kim, S.-H. Yim, and I.-S. Lee, "Bioactive phenolic constituents from the culms of *Phyllostachys bambusoides*," *Natural Product Sciences*, vol.17, no.4, pp.267-272, Dec, 2011.  
<https://koreascience.kr/article/JAKO201111436239801.page>
- [42] H. J. Lee, K. A. Kim, K. D. Kang, E. H. Lee, C. Y. Kim, B. H. Um, and S. H. Jung, "The compound isolated from the leaves of *Phyllostachys nigra* protects oxidative stress-induced retinal ganglion cells death," *Food Chem Toxicol*, vol.48, no.6, pp.1721-1727, Jun, 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.052>
- [43] Y. H. Jeong, S. Y. Chung, A. R. Han, M. K. Sung, D. S. Jang, J. Lee, Y. Kwon, H. J. Lee, and E. K. Seo, "P-Glycoprotein Inhibitory Activity of Two Phenolic Compounds,(-)Syringaresinol and Tricin from *Sasa borealis*," *Chemistry & biodiversity*, vol.4, no.1, pp.12-16, Jun, 2007.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790001>
- [44] H. S. Park, J. H. Lim, H. J. Kim, H. J. Choi, and I. S. Lee, "Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*," *Arch Pharm Res*, vol.30, no.2, pp.161-166, Feb, 2007.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02977689>
- [45] K.-D. Yoon, C.-Y. Kim, and H. Huh, "The flavone glycosides of *Sasa borealis*," *Korean Journal of Pharmacognosy*, vol.31, no.2, pp.224-227, Jun, 2000.  
<https://koreascience.kr/article/JAKO200003041284320.page>
- [46] Q. Jin, W. You, X. Tan, G. Liu, X. Zhang, X. Liu, F. Wan, and C. Wei, "Caffeic acid modulates methane production and rumen fermentation in an opposite way with high-forage or high-concentrate substrate in vitro," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol.101, no.7, pp.3013-3020, Nov, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10935>
- [47] S. Svane, and H. Karring, "Combining fluoride with either phenolic compounds or plant extracts offers potential mitigation strategy for ammonia and methane emissions from livestock manure," *Environmental Technology & Innovation*, vol.28, pp.102830, Nov, 2022.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102830>
- [48] J. K. Ha, S. S. Lee, Y. S. Moon, C. H. Kim, S. W. Seo, M. K. Beak, ... and N. J. Choi, "Ruminant nutrition and physiology". *Seoul National University press*. Seoul, Korea. 2005.
- [49] A. Machmuller, C. R. Soliva, and M. Kreuzer, "Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep," *Reprod Nutr Dev*, vol.43, no.1, pp.41-55, Jan-Feb, Dec, 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.1051/rnd:2003005>
- [50] M. Zhou, E. Hernandez-Sanabria, and L. L. Guan, "Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies," *Appl Environ Microbiol*, vol.75, no.20, pp.6524-6533, Oct, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02815-08>
- [51] E. P. CATO, W. Moore, and M. P. BRYANT, "Designation of neotype strains for *Bacteroides amylophilus* Hamlin and Hungate 1956 and *Bacteroides succinogenes* Hungate 1950," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol.28, no.4, pp.491-495, Oct, 1978.  
DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-491>

김 현 진(Hyun-Jin Kim)

[정회원]



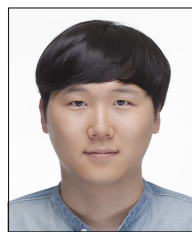
- 2023년 3월 : 경상대학교 응용생명과학부 (박사 수료)
- 2010년 3월 ~ 현재 : Neobase.Ltd 연구원

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

조 성 옥(Sung-Uk Jo)

[정회원]



- 2024년 2월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2024년 3월 ~ 현재 : 경상국립대학교 농업생명과학연구원 선임연구원

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

이 신 자(Shin-Ja Lee)

[정회원]



- 2003년 8월 : 경상대학교 낙농학과 (농학사)
- 2007년 8월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2012년 3월~ 2013년 2월 : 경북도립대학교 축산학과 교수 (초빙교원)
- 2013년 1월 ~ 현재 : 경상국립대학교 농업생명과학연구원 학술연구교수

<관심분야>

치유농업, 동물매개치유, 동물자원, 반추동물영양

---

정 호 식(Ho-Sik Jeong)

[정회원]



- 1987년 2월 : 농촌진흥청 연구원
- 1990년 5월 : 한양사료(주) 대표이사
- 2008년 8월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2010년 3월 : 경상대학교 응용생명과학부 겸임교수
- 2009년 8월 ~ 현재 : Neobase.Ltd 대표이사

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

---

이 성 실(Sung-Sill Lee)

[정회원]



- 1995년 2월 : 서울대학교 동물자원과학과 (농학박사)
- 1995년 9월 ~ 1997년 12월 : Canada Lethbridge Research center 박사 후 과정
- 1999년 2월 ~ 2002년 2월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 영양생리과 연구사
- 2002년 3월 ~ 현재 : 경상국립대학교 동물생명융합학부 교수
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 한국가축사양표준 젖소분과위원장

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사