

천연물질을 이용한 반추동물 항생제 대체용 친환경 펠릿코팅오일의 개발*

최빛나** · 송완선** · 추병길*** · 조상범**** · 함영주***** · 김남형**** ·
양경희***** · 김영준***** · 이홍구***** · 최낙진*****

Development of an Environmental Friend Pellet Coating Oil for Replacement of Antibiotics for Ruminant Animal

Choi, Bitna · Song, Wan-Sun · Choo, Byung Kil · Cho, Sangbuem · Ham, Young-Joo ·
Kim, Nam Hyung · Yang, Kyoung Hee · Kim, Young Jun · Lee, Hong-Gu · Choi, Nag-Jin

This study investigated the effect of coated feed using mixed oil on rumen fermentation characteristics. Two experiments were conducted based on materials that were mixed. First, cashew nut and soybean oils were mixed with white mineral oil. And second, different plant extracts were mixed with white mineral oil. At first experiment, inclusion levels of mixed oil on diet (0.03%, 0.1%, 0.5%) were applied as variables. A coated diet was fermented with rumen inoculum according to in vitro rumen fermentation and its parameters were investigated. In the result of first experiment, no negative effects on rumen pH were found. Significantly decreased dry matter digestibility was detected at 0.5% treatment ($P<0.05$). Total gas productions in control and 0.03% were significantly greater than those of others ($P<0.05$). Significantly reduced methane productions were found in all treatments compared to the control ($P<0.05$). Inclusion of mixed oil

* 본 연구는 농림수산식품기술기획평가원의 ‘반추동물의 탄소배출 저감형 사료첨가제 개발’과 농촌진흥청의 ‘한우고급육 생산을 위한 과학적 비타민A 제한기술’(PJ0100232014)에 의해 이루어진 것임.

** 전북대학교 동물자원과학과

*** 전북대학교 작물생명과학과

**** (주)칼스 부설 순환농축산연구소

***** 연성대학교 뷰티스타일리스트과

***** 고려대학교 식품생명공학과

***** 건국대학교 동물자원과학과

***** Corresponding author, 전북대학교 동물자원과학과(nagjin@jbnu.ac.kr)

did not affect on ammonia production. Total volatile fatty acid production was also not influenced by coating with mixed oils. Rumen fermentation parameters were greatly changed according to introduced plant extracts at second experiment. The significantly lowest and greatest ammonia productions were found at treatments with *Ixeris dentata* and *Plantago asiatica*, respectively ($P<0.05$). The significantly greatest acetate and propionate productions were detected at treatments with *Crucuma longa* and *Zizyphus vulgaris* 1, respectively ($P<0.05$). All treatments, except *Chrysanthemum idicum*, *Euyale ferox* seed, *Moringa* leaf and fruit and *Zizyphus vulgaris* 1, showed significantly increased total volatile fatty acid production compared to the control ($P<0.05$). Only *Paeonia lactiflora* showed significantly lesser gas production than the control ($P<0.05$). In methane production, *Ceramium*, *Zizyphus*, *Paeonia*, *Agrimonia*, *Torilis*, *Mugwort*, *Foeniculum*, *Euphorbia*, *Taraxacum*, *Artemisia*, *Momordica*, *Curcuma* and *Moringa* reduced methane significantly compared to the control ($P<0.05$).

Key words : mineral oil, cashew nut oil, soybean oil, plant extract, rumen fermentation

I. 서 론

유기농업 실현을 위해서는 항생제의 효과적인 대체가 필요하다. 항생제는 가축의 치료와 생산성 향상을 목적으로 사용되어 왔다. 반추동물에 대한 항생제 사용목적들 중 하나로 반추위 메탄 생성 저감을 들 수 있다. 그 이유는 반추위에서 생산되는 메탄은 사료를 통하여 섭취되는 에너지 손실로 간주되기 때문이다. 즉 반추위 메탄 생성으로 인한 에너지 손실 방지는 사료 에너지의 이용효율을 증가시켜 생산성을 향상시킬 수 있게 된다(Lee et al., 2014). 또한 최근 지구 환경에 대한 관심이 증가되고 있어, 축산은 단순한 무항생제 축산물에만 국한되는 것이 아니라 환경오염 물질 배출을 최소화한 자연친화적인 축산물 생산으로 그 범위가 확장되고 있다. 대표적인 것이 반추위 메탄 생성이며 농업에서 발생하는 온실가스의 32%가 반추동물의 장관 내 메탄에 기인하는 것으로 보고된 바 있다. 이러한 메탄 발생은 2030년까지 현재의 약 60% 이상 증가할 것으로 전망되고 있다(Lee et al., 2014). 따라서 효율적인 반추위 메탄 생성 저감 기술 개발은 생산성 향상을 위해 사용되는 항생제를 대체할 수 있고, 지구 환경 보호를 통한 친환경 녹색 축산물 생산을 실현시킬 수 있다.

본 연구에서는 식물유와 다양한 식물추출물들을 혼합한 혼합오일이 반추위 발효에 미치는 영향을 알아보고, 반추위 메탄 저감 및 발효 촉진을 위한 최적 천연물 개발의 기초 자료 구축을 위한 목적으로 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 사료첨가용 물질

본 연구에서는 캐슈넛유(cashew nut oil), 대두유 그리고 식물추출물들을 화이트미네랄오일(white mineral oil)과 혼합한 혼합유를 제조한 뒤에 배합사료에 혼합유를 도포하는 형태로 사료에 물질을 첨가하였다. 캐슈넛유, 대두유 및 화이트미네랄오일은 (주)칼스(경기도 성남시)에서 공급받아 사용하였다.

2. 식물추출물의 제조

식물추출물은 총 25종의 식물들을 사용하여 제조하였다. 실험에 사용된 식물들은 거피연자육(*Euryale ferox* seed), 국화(*Chrysanthemum indicum*), 모링가열매(*Moringa oleifera* fruit), 모링가 잎(*Moringa oleifera* leaf), 민들레(*Taraxacum mongolicum* H.), 박하(*Mentha piperascens*), 땅빈대(*Euphorbia humifusa*), 비단풀(*Ceramium kondoi*), 사상자(*Torilis fructus*), 산조인(*Zizyphus vulgaris* 1오일층; 2 에탄올층), 선학초(*Agrimonia pilosa* Ledeb.), 쑥(*Mugwort*), 씬바귀(*Ixeris dentata* Nakai), 야관문(*Lespedeza cuneata*), 여주(*Momordica charantia* L.), 울금(*Curcuma longa* L.), 인진쑥(*Artemisia capillaris*), 자소엽(*Perilla frutescens*), 작약(*Paeonia lactiflora* Pallas), 차전초(*Plantago asiatica* L.), 치아씨드(*Salvia hispanica* seed), 팔각회향(*Illicii veri fructus*), 회향(*Foeniculum vulgare* Mill), 및 아니스(*Pimpinella anisum* L.) 등을 사용하였고, 식물추출물들은 (주)아가패 식품(경상북도 경산시)에서 구매하였다. 각 식물들은 1 mm screen이 부착된 cutter mill (MF10.1, IKA, Staufen, Germany)을 이용하여 곱게 분쇄한 후에 10배의 에탄올을 가한 후에 150 rpm의 교반속도로 24시간 동안 추출하였다. 추출이 완료된 후에는 여과지(Whatman filter paper No. 1)를 이용하여 고형물을 제거하고 여과액을 감압농축기(Rotary evaporator, EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였다. 농축이 완료된 추출물은 다시 0.45 μm 의 주사기 필터를 이용하여 여과한 후에 실험에 사용하였다. 산조인의 경우 농축 후 층분리 현상이 나타났으며, 오일층을 산조인 1으로, 그 외 에탄올층을 산조인 2로 구분하여 시험에 사용하였다.

3. 펠렛코팅오일의 제조 및 사료코팅

본 연구에서는 두개의 실험으로 구성하였다. 첫 번째 실험에서는 캐슈넛유, 대두유 및 화이트미네랄오일을 7:1.5:1.5의 비율로 혼합한 혼합오일을 사용하였고, 두 번째 실험에서는 식물추출물과 화이트미네랄 오일을 1:9의 비율로 혼합하여 혼합오일을 제조하였다. 준비된

펠렛코팅오일은 노즐이 장착된 안개분사장치를 이용하여 사료 표면에 도포하였다. 이 때 도포 수준은 첫 번째 실험에서는 0.03% (w/w), 0.1% 및 0.5%로 하였고, 두 번째 실험에서는 0.1%로 도포하였다. 사료 표면에 도포된 펠렛코팅오일이 피막을 잘 형성하도록 1시간 정도 상온에서 정치시킨 후에 다시 1 mm screen이 부착된 cutter mill (MF10.1, IKA, Staufen, Germany)로 분쇄하여 실험에 사용하였다.

4. *In vitro* 반추위 발효 실험

1) 시험동물

공시축은 전라북도 김제 소재의 농장에서 반추위에 캐놀라가 장착된 거세우 2 두(체중 400 ± 30 kg)를 공시하여 *in vitro* 시험용 위액을 채취하였다. 사양관리는 농장 관행에 따라서, 사료 급여량은 건물 기준으로 볏짚 4 kg과 시판중인 비육전기 배합사료 4 kg을 1일 2회(오전 09:00 및 오후 17:00) 급여하였으며 물과 미네랄 블록은 자유 급여하였다.

2) 시험사료 및 시험설계

시험사료는 시판되고 있는 비육전기 배합사료를 사용하였고, 대조구는 펠렛코팅오일이 분사되지 않은 사료를 사용하였다. 첫 번째 실험은 펠렛코팅오일의 도포수준별 효과를 분석하여 대조구를 포함하여 총 4개의 시험구를 설정하였다(실험 1). 두 번째 실험은 총 25종의 식물추출물들을 각각 혼합한 펠렛코팅오일을 개별적인 시험구로 설정하여 대조구 포함 총 26개의 시험구로 설계하였다(실험 2). 모든 시험은 3반복으로 수행되었다.

3) 반추위액의 준비

반추위액은 캐놀라가 장착된 반추위에서 채취하였고, 4겹의 거즈에 걸러서 보온용기에 담아 이동하였다. 시험 전 반추위액의 사료입자를 제거하기 위해서 2겹의 거즈로 다시 걸러내었다. 반추위액을 McDougall's buffer (McDougall, 1948)와 1:4 비율로 희석하여 CO₂를 분사하여 혐기상태로 만들었다. 준비된 반추위 발효액 50 mL와 시험사료 0.5 g을 혐기적인 조건에서 혼합한 후에 발효를 개시하였다. 반추위액 발효 시험은 Tilley와 Terry (1963)의 방법에 준하여 수행하였다.

4) 반추위 pH의 변화 측정

반추위 pH는 배양이 종료된 시험병의 반추위액을 50 mL의 tube로 옮겨서 pH meter (S20 Seven Eazy™, Mettler-Toledo)를 이용하여 측정하였다. 실험 1에서는 배양시간을 0, 12 및 24시간으로 설정하였고, 실험 2에서는 24시간만 배양한 후에 평가하였다.

5) 총 가스 발생량, 메탄 및 수소 측정

총 가스 발생량을 0, 12 및 24 각 배양 종료 시간 대 별로 발생 가스량을 측정하였다. 반추위 발효 가스 발생량은 100 mL 용량의 유리주사기를 이용하여 측정하였고, 주사기 안의 가스들은 가스팩에 포집하였다. 포집한 가스는 Carboxen™, fused silica capillary column (0.53 mm I.d.×30 m length, SUPELCO, USA)이 장착된 gas chromatography (HP7890, Agilent, CA. USA)를 이용하여 분석하였다(oven 100°C, injector 150°C 및 TCD 150°C).

6) 암모니아(NH₃-N) 측정

반추위액 내 암모니아(NH₃-N) 함량은 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 수행하였다. 반추위액을 4,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액 20 µL에 phenol color reagent 1 mL와 alkali-hypochlorite reagent 1 mL를 완전히 혼합하는 전처리 과정을 수행하였다. 전처리한 시료는 37°C의 항온수조기에서 15 분간 반응 한 후 분광광도계(Optizen UV2120, Mecasis, Korea)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 휘발성 지방산(VFA) 농도 측정

반추위액 내 휘발성 지방산(VFA)은 Erwin 등(1961)의 방법에 따라 수행하였다. 배양이 종료된 반추위액을 4,000 rpm 원심분리하여 상등액 1 mL에 25% metaphosphoric acid 200 µL를 첨가하여 30분 동안 정치 후 13,000 rpm에서 원심 분리하는 전처리 과정을 수행하였다. 전처리한 시료를 Nukol™, fused silica capillary column (0.25 mm I.d. × 0.25 µm film × 30 m length, SUPELCO, USA)가 장착된 gas chromatography (HP7890, Agilent, CA. USA)로 분석하였다. 조건은 각각 oven 180°C, 220°C의 injector와 200°C의 detector로 설정한 후 분석하였다.

8) 건물소화율의 측정

건물소화율은 Moore (1970)가 제시한 방법에 준하여 측정하였다. 발효가 완료된 반추위 발효물은 여과지(Whatman filter paper No. 541)를 이용하여 여과한 후에 65°C 건조기에서 48시간동안 건조한 후에 무게를 측정하여 발효를 통하여 소실된 건물의 양을 계산하여 산출하였다.

9) 통계분석

본 시험의 자료는 SPSS program (version 18, IBM, NewYork, USA)의 General linear model을 이용하여 다중분석을 수행하였고, 유의적 차이는 Duncan's multiple comparison 방법으로 분석하였다.

10) 상대적 활성지수

각 식물추출물들을 요인으로 하고(실험 2) 반추위 발효 형태 중 총 휘발성 지방산과 메탄 발생량을 반응값으로 하여 표준화과정을 통하여 상대적 활성지수를 산출하였다. 다만 메탄 발생량은 낮을수록 우수한 활성이라고 할 수 있기에 역수를 취하여 산출하였다. 상대적 활성지수 산출식은 아래와 같다.

$$RPI = \sum \left(\frac{X_i - \mu_i}{\sigma_i} \right)$$

위 수식에서 X_i 는 각 식물추출물 처리 시험구에서 얻은 i 반응값이고, μ_i 와 σ_i 는 해당 i 반응값에 대한 모든 시험구의 평균과 표준편차 값을 의미한다. 메탄의 경우 $1/X$ 로 반응값을 변경하여 사용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 혼합오일 첨가 수준이 반추위 발효에 미치는 영향(실험 1)

전 배양 시간대 및 처리구별 *in vitro* 반추위 발효 pH는 6.7-7.2 범위 내에서 조사되었다. 펠렛코팅오일의 첨가에 따른 배양시간별 반추위 pH는 Table 1과 같으며, 반추위 미생물 발효에 대한 부정적 효과는 없는 것으로 판단된다.

Table 1. Effect of different inclusion rate of mixed oil on pH of rumen simulated *in vitro* fermentation

Incubation time, h	Control	Treatment			SEM ¹⁾
		0.03%	0.5%	1%	
0	7.22	7.22	7.22	7.20	0.003
12	6.70 ^a	6.70 ^a	6.70 ^a	6.73 ^b	0.004
24	6.67	6.71	6.68	6.69	0.007

¹⁾ Standard error of the mean

^{a,b} Different superscript in same row means significantly different ($P < 0.05$)

반추위 *in vitro* 건물소화율(IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility)은 배양 0시간과 12시간에서 시험구들 간의 유의적인 차이 없이 서로 유사하게 나타났다(Table 2). 그러나 배양

24시간에서는 혼합오일 1% 첨가구가 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$).

Table 2. Effect of different inclusion rate of mixed oil on IVDMD (%) of rumen simulated *in vitro* fermentation

Incubation time, h	Control	Treatment			SEM ¹⁾
		0.03%	0.5%	1%	
0	1.65	0.68	1.13	1.43	0.246
12	29.36	30.01	29.86	28.01	0.348
24	41.65 ^b	39.25 ^b	39.89 ^b	34.93 ^a	0.881

¹⁾ Standard error of the mean

^{a,b} Different superscript in same row means significantly different ($P<0.05$)

총 가스 발생량은 전반적으로 펠렛코팅오일의 첨가 수준이 높아질수록 낮게 나타났다 (Table 3). 펠렛코팅오일 1% 첨가 수준에서 전체 배양시간대에 걸쳐 유의적으로 낮은 총 가스 발생량을 나타냈다. 메탄 생성량은 대조구와 비교 하였을 때 펠렛코팅오일 첨가구에서 통계적으로 낮게 조사되었다($P<0.05$). 펠렛코팅오일의 첨가량이 많아질수록 메탄생성량의 감소추세가 큰 것으로 보였으나, 펠렛코팅오일 첨가구 간의 통계적 유의성은 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 3. Effect of different inclusion rate of mixed oil on gas production (mL) of rumen simulated *in vitro* fermentation

Incubation time, h	Control	Treatment			SEM ¹⁾
		0.03%	0.5%	1%	
Total gas					
12	58.33 ^b	55.67 ^a	56.67 ^{ab}	55.66 ^a	0.399
24	78.67 ^b	78.67 ^b	74.67 ^a	73.33 ^a	0.785
H ₂					
12	0.05 ^a	0.06 ^b	0.06 ^b	0.05 ^{ab}	0.002
24	0.06 ^b	0.03 ^a	0.05 ^{ab}	0.05 ^{ab}	0.004
CH ₄					
12	2.13	1.99	2.24	2.18	0.041
24	4.81 ^b	4.29 ^a	4.20 ^a	4.11 ^a	0.101

¹⁾ Standard error of the mean

^{a,b} Different superscript in same row means significantly different ($P<0.05$)

암모니아태 질소 생성량은 Table 4에서 보는 것과 같다. 배양 12시간 및 24시간에서 모든 시험구에서 통계적 유의성이 관찰되지 않았다($P>0.05$). 결과적으로 펠렛코팅오일의 첨가로 인한 반추위 내 단백질 대사 작용에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

Table 4. Effect of different inclusion rate of mixed oil on ammonia nitrogen production (mg/100 mL) of rumen simulated *in vitro* fermentation

Incubation time, h	Control	Treatment			SEM ¹⁾
		0.03%	0.5%	1%	
0	1.78 ^b	1.61 ^{ab}	1.54 ^a	1.79 ^b	0.041
12	1.72	1.86	1.91	1.63	0.049
24	7.27	7.75	7.55	7.59	0.095

¹⁾ Standard error of the mean

^{a,b} Different superscript in same row means significantly different ($P<0.05$)

펠렛코팅오일 첨가가 반추위 발효 휘발성지방산 생성량에 미치는 효과는 Table 5에서 보는 것과 같다. 배양 12시간부터 배양 24시간까지 시험구들에서 유사하게 조사된 acetate는 주로 섬유질 사료 분해에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 이에 펠렛코팅오일의 첨가는 acetate 생성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. Propionate는 근내지방 합성의 전구 물질로 알려져 있는데, 배양 24시간에서 각 처리구별 propionate 생성량이 펠렛코팅혼합오일 첨가량이 높아질수록 생성량이 수치적으로 증가하는 경향을 보였다. 총 휘발성 지방산 생성량은 전체 배양시간에 걸쳐 시험구들간의 통계적 유의성이 나타나지 않았다($P>0.05$). A/P ratio는 수치가 2.2 이상일 때 반추위 발효가 안정적이라고 할 수 있는데, 모든 시험구들의 A/P ratio 수치는 정상적인 범주 내에 포함되는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 실험결과에서는 반추가축이 에너지 전구체인 휘발성 지방산 생성량과 A/P ratio의 결과를 근거로 수준별 펠렛코팅오일 첨가가 반추위 미생물 발효에 뚜렷한 부정적 영향을 주지 않는 것으로 예측할 수 있었다.

Table 5. Effect of different inclusion rate of mixed oil on volatile fatty acid production (mM) of rumen simulated *in vitro* fermentation

Incubation time, h	Control	Treatment			SEM ¹⁾
		0.03%	0.5%	1%	
Acetate					
0	10.02 ^a	10.30 ^a	10.74 ^b	10.96 ^b	0.118

Incubation time, h	Control	Treatment			SEM ¹⁾
		0.03%	0.5%	1%	
12	25.84	25.61	26.23	23.10	0.882
24	32.70	32.16	31.64	32.45	0.248
Propionate					
0	2.39	2.68	2.61	2.66	0.064
12	10.59 ^{ab}	9.63 ^a	10.66 ^{ab}	11.53 ^b	0.307
24	12.34	11.93	11.24	12.11	0.260
iso-Butyrate					
0	0.16	0.20	0.17	0.18	0.008
12	0.48 ^b	0.39 ^a	0.44 ^{ab}	0.51 ^b	0.016
24	0.58	0.57	0.61	0.65	0.013
n-Butyrate					
0	2.22	2.68	2.48	2.53	0.097
12	7.14 ^{ab}	6.13 ^a	7.00 ^{ab}	7.78 ^b	0.221
24	8.64	8.62	9.00	9.70	0.233
iso-Valerate					
0	0.42	0.54	0.47	0.49	0.026
12	1.21 ^{ab}	0.97 ^a	1.12 ^{ab}	1.29 ^b	0.046
24	1.46 ^{ab}	1.41 ^a	1.61 ^{ab}	1.77 ^b	0.054
n-Valerate					
0	0.22	0.27	0.25	0.25	0.012
12	1.01 ^b	0.82 ^a	0.94 ^{ab}	1.08 ^b	0.036
24	1.18	1.17	1.23	1.30	0.028
Total VFA					
0	15.44	16.67	16.73	17.06	0.277
12	46.27	43.54	43.40	45.29	0.948
24	56.90	55.85	55.33	57.97	0.621
A/P ratio					
0	4.20	3.90	4.11	4.13	0.077
12	2.45 ^{ab}	2.67 ^b	2.46 ^{ab}	2.01 ^a	0.102
24	2.65	2.70	2.83	2.69	0.050

¹⁾ Standard error of the mean

^{a,b} Different superscript in same row means significantly different (P<0.05)

2. 식물추출물 함유 펠렛코팅혼합오일이 반추위 발효에 미치는 영향(실험 2)

본 연구에서는 약용식물로 주로 이용되고 있으며, 국내에서 수급이 용이한 약용식물들을 대상으로 실험을 수행하였다. 감국(*Chrysanthemum indicum* Linne)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로, 한방에서는 감국을 장기간 복용 시 혈기에 좋으며 몸이 가볍게 하고 소화에 큰 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Bae et al., 2009). 거피연자육(*Euryale ferox* Salisb.)은 수련과에 속하는 식물로, 한방에서는 이 종자를 신장질환, 만성설사, 백대하, 비장질환 등에 사용하며 최근 연구에 따르면 면역증진에도 도움을 주는 것으로 보고되었다(Choo et al., 2009). 땅빈대(*Euphorbia humifusa*)는 일년생 초본으로서 전국의 전야나 노변에 야생하며, 항산화활성으로 보이며 구균과 나균에 대한 항균활성과 포도상구균, 대장균 및 녹농균에 대해 살균작용에 효과가 우수하다(Heo et al., 2008). 박하(*Mentha piperascens*)는 꿀풀과에 속하는 다년생 식물로 한국, 중국, 시베리아 습지에 자생한다. 전통적으로 거풍, 진해, 해독, 두통, 치통, 복부고창에 대해 치료효과가 있으며 항미생물 및 항산화작용이 있다고 알려져 있다(Kim et al., 2009; Lim et al., 2012). 쑥(*Mugwort, Artemisia princeps* var. *orientalis*)은 항암 및 혈압강하 효과, 간 기능 개선효과, 항산화 효과 그리고 카드뮴 독성저하효과, 담즙산 분비 촉진 및 반추위내 발효조건 개선으로 사료내의 지방분해가 왕성하여 반추위내 propionic acid의 함량이 증가된다는 연구 결과가 있다(Kim et al., 2009). 씬바귀(*Ixeris dentate* Nakai)는 국화과에 속하는 여러해살이풀로 주로 한국, 일본, 중국에 분포한다. 그 효능은 항돌연변이성 항암활성 효과가 있으며 메탄올 추출물은 콜레스테롤혈증을 가진 쥐에 대한 개선효과를 보였다(Park, 2014). 아니스(*Pimpinella anisum* L.)는 일년생 초본식물로 중동지역이 원산지이며 요즘은 유럽, 러시아, 아시아 등지에서 재배되며, 약리효능으로는 항진균성, 구풍약, 이노제, 산통 등에 효능이 있다(Lee et al., 1997). 울금(*Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하는 다년생 초본으로서 인도뿐만 아니라 동남아시아를 중심으로 열대 및 아열대 지방에서 재배한다. 기능으로는 항산화작용, 항균성, 항암성, 항돌연변이성, 항종양성에 관한 연구가 보고되고 있다(Choi, 2009). 인진쑥(*Artemisia capillaries*)은 국화과에 속하는 다년생 초본식물로서 일본, 중국 등 동남아시아, 유럽에 분포되어 있다. 인진쑥의 효능은 항산화, 항균 및 항염증 작용, 간 기능 및 당대사 개선 지질 과산화 및 melanin 생성 억제 의외에도 혈압 조절, 이뇨, 지혈, 해열, 진통, 변비예방, 소화불량해소에 효과가 있다(Moon et al., 2011). 차전초(*Plantago asiatica*)는 질경이과에 속하는 다년생 초본으로 일본, 중국, 동시베리아 등에 분포하며 예로부터 거담, 항균, 진해작용 등에 사용되어왔다. 또한 천식, 위장병, 이뇨, 설사, 심장병 등 다양한 생리활성을 가지고 있다(Jeon et al., 2014). 치아씨앗(*Salvia hispanica*)는 멕시코가 원산지이며 차조기과 민트속에 속하는 사루비아의 일종으로 1년생 열대/아열대 식물이다. 현재까지 다당체의 보습력과 자극완화효과와 키토산 올리고당의 보습성과 생리활성 등이 연구되어 왔다(Lee et al., 2010). 팔각회향(*Illicii Veri Fructus*)은 붓순

나무과에 속한 팔각회향의 열매로서 항산화제, 항염증 치료제, 항발암성 치료제, 마취제 등으로 사용되며, *p-Anisaldehyde*는 항진균효과 및 살비효과가 있는 것으로 보고되었다(Lee et al., 2013a). 비단풀(*Ceramium kondoi*)은 대극과에 딸린 한해살이풀로서, 항암작용, 해독작용, 항균작용, 진정작용 등이 뛰어나서 암, 염증, 천식, 당뇨병, 심장병, 신장질환, 악성 두통에 쓰인다. 또한 세균성 설사, 장염, 기침, 황달, 종기, 타박상 등을 치료에도 쓰인다(An et al., 2006). 산조인(*Zizyphus vulgaris*)은 낙엽성 관목으로 한방에서 불면증, 신경쇠약 치료의 목적으로 사용되고 있으며 소화완화, 강장, 항알레르기, 간 보호작용이 있고 대장암과 성인병 예방에 효과가 있다(Cho et al., 2005). 작약(*Paeoniae lactiflora*)은 목단과에 속하는 식물로서 다년초이며, 진경, 진통, 근육의 경련, 두통, 복통, 이질, 세균성 감염 및 지한, 조경 등에 유효하다. 또한 주로 간에 작용하며 간의 기운을 부드럽게 하고 혈액을 보충하는 기능을 가지고 있다(Ji et al., 2002). 또한 항균작용, 항염, 항괴양작용 등의 약리기능성이 뛰어난 약용 식물이다(Park and Cho, 2010). 중국, 한국, 일본 등 동양에서는 주로 뿌리를 약재로, 서양에서는 화훼로 재배하고 있으며, 약리 작용은 활혈, 진통, 진경, 해혈, 혈압강하 등에 효과가 있다 (Park et al., 2011). 선학초(*Agrimonia pilosa*)는 장미과에 속하는 다년생 숙근초로서 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지사, 토혈, 혈뇨, 자궁출혈 등에 치료 약물로서 널리 이용되어 왔다 최근에는 선학초 추출물에서 항균성, 항고혈압 작용이 있음이 보고 되었다 (Min et al., 2008). 북반구 온대와 남아메리카에 분포되어 있으며 우리나라에는 경기, 충남, 충북, 전남, 전북에 걸쳐 자생하고 있다. 예부터 민간요법에서 지혈, 소염, 진통, 및 암환자의 치료에 사용되어 왔다(Jang et al., 2008). 사상자(*Torilis fructus*)는 미나리과의 두해살이 풀인 사상의 열매로 한국, 일본, 중국, 대만, 인도, 미얀마 등지에서 분포한다. 약리 효과로는 항원충작용, 성 호르몬 유사작용과 항알레르기 작용 등이 있고, 수렴성 소염약으로 가려움증 등에 효과가 있다(Hong and Kim, 2013). 여주(*Momordica charantia* L.)는 일년생 박과 식물로, 인도네시아, 인도 및 동남아시아의 말레이시아, 필리핀, 대만에서 기능성 채소로 식용되어오고 있다. 여주는 혈당강하 기능이 탁월하며, charantin이라는 성분은 인슐린 분비를 촉진함으로써 혈당을 낮춰주는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 종자에서 분리되어지는 단백질 중 MAP3는 암세포를 파괴하는 natural killer 세포를 활성화시킴으로서 암세포 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 추측 되고 있다(Park et al., 2007). 회향(*Foeniculum vulgare*) Umbelliferae과에 속하는 다년생 초본으로, 한증, 위통, 구토, 건습각기, 요심통, 산후혈운 등에 응용되는 약재이다(Lee et al., 2007). 최근 연구에서 회향 추출물이 손상된 간 회복에 긍정적인 효과를 가지고 회향 추출물의 급여는 쥐에서 혈압강화 효과가 뛰어나는 것을 보여줬다. 회향 종자는 전통적으로 항염증, 진통제, 구충제, 이뇨제, 진경제로 사용되어 왔다(Seo et al., 2011). 모링가(*Moringa oleifera* Lam) 잎과 열매는 동남아시아와 극동지방, 아프리카 등 세계 여러 나라에 널리 퍼져있으며, 전통적으로 모링가의 모든 부위는 종양, 히스테리, 괴혈병, 마비성발작, 피부감염과 같은 질환에 포괄적으로 사용되었다. 모링가

의 꽃 뿌리, 씨, 잎, 열매에는 다른 식물들에 비해 비타민, 플라보노이드, 아미노산 등과 같은 피토케미칼이 풍부하며 특히 모링가 잎은 콜레스테롤 제거 및 간 손상 방지와 염증, 심장병 등을 치료하는 효과가 있으며, 뿌리와 씨, 나무 진액은 관절염 치료에 효과가 있다(Cho and Chang, 2014). 야관문(*Lespedeza cuneata* G. Don)는 콩과 싸리속에 속하는 여러해살이 식물의 전초로서 우리나라, 일본, 중국, 대만, 인도에 널리 분포하며, 항산화효과, 혈당강화효과, 세포보호효과, 인슐린 분비 촉진효과, 항균효과 등이 있음이 보고되었다(Lee et al., 2013b). 또한 간과 콩팥의 기능을 보호하고 폐를 강화시키는데 사용하였으며, 해수, 천식, 유방염, 종기, 시력 강화 작용에 뛰어난 효과가 있다고 알려져 있다(Lee et al., 2011). 민들레(*Taraxacum platycarpum*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전국각지에 야생하는 식물이다. 한방에서는 치창, 건위, 종기, 결핵, 해열, 황달, 간질, 부인병 등에 효과가 인정되어 사용되어 왔으며, 유럽에서는 민들레를 귀중한 약초로 인정하여 변비, 류마티스, 노이로제, 야맹증 등에 이용하고 있다(Lee et al., 2004). 또한 항 위염효과, 항산화작용, 항 알레르기 활성화, 항균작용, 항암 및 항 종양활성, 체내 지질대사 개선 효과 등에 관한 연구가 보고되고 있다(Han et al., 2011). 자소엽(*Perilla frutescens* var. *acuta*)은 꿀풀과에 속하는 식물로 항염증 및 항알레르기작용, 항균작용, 항산화작용 등의 약리작용이 보고되어 있으며 해열약으로 더위 먹은데, 감기, 산욕열, 황달, 각종 신경성열병 등에 사용되며 지혈약으로도 사용된다(You et al., 2012).

1) 반추위 발효 형태

총 휘발성 지방산생성량에 있어 다양한 식물추출물들이 혼합된 펠렛코팅오일의 효과는 Fig. 1A에서 보는 것과 같다. 국화, 거피연자육, 모링가잎, 모링가열매 및 산조인 1을 제외한 모든 식물추출물 처리구들에서 대조구에 비하여 유의적으로 높은 휘발성 지방산 생성량을 나타내었다.

발효가스 생성량은 Fig. 1B에서 보는 것과 같다. 본 연구에서는 작약을 제외한 모든 추출물들이 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 즉 통계적으로 작약을 제외한 모든 추출물들은 대조구와 같은 양의 발효가스를 생산하였다. 그러나 휘발성 지방산 생성량은 일부 추출물에서 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. 따라서 본 결과는 일부 식물추출물들은 에너지원인 휘발성 지방산을 좀 더 많이 생성하면서 발효가스는 대조구와 유사하게 생성하여 에너지 효율측면에서 매우 우수하다고 할 수 있다.

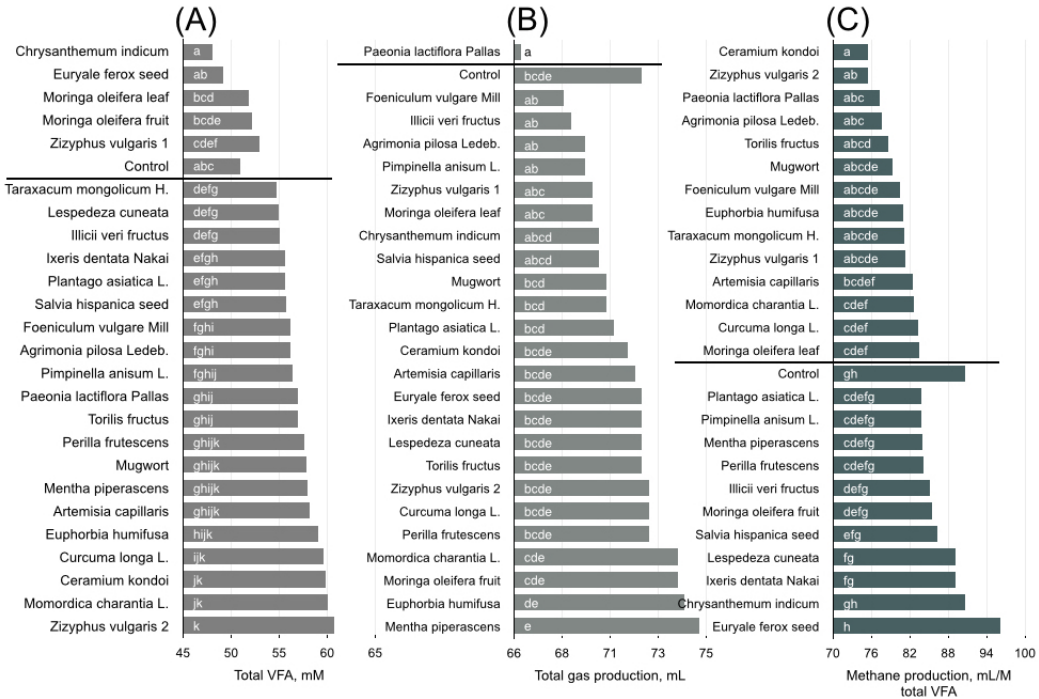


Fig. 1. Effect of different inclusion rate of mixed oil with various plant extracts on total volatile fatty acid production (A), gas production (B) and methane production (C) of rumen simulated in vitro fermentation. Different letters in same graph mean significantly different (P<0.05).

본 연구에서는 다양한 식물추출물들을 펠렛코팅오일에 첨가하였을 때에 반추위내 메탄 생성 저감 효과를 조사하였고, 그 결과는 Fig. 1C에서 보는 것과 같다. 비단풀, 산조인2, 작약, 선학초, 사상자, 쑥, 회향, 땅빈대, 민들레, 산조인 1, 인진쑥, 여주, 울금, 모링가잎 등의 추출물들이 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 메탄생성효율을 나타내었다. 반추위 발효 pH와 개별적인 휘발성 지방산 생성량은 Table 6에서 보는 것과 같다. 반추위 발효 pH는 모두 안정적인 반추위 발효 pH 범위 내에 위치하는 것으로 나타남으로서 실험에 사용한 식물추출물들이 반추위 발효에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 암모니아태 질소는 2.73에서 3.81로서 큰 차이를 나타내고 있으며, 썩바귀에서 가장 낮게 나타났으며, 차전초에서 가장 높게 나타났다. Acetate와 propionate 생성량은 각각 울금과 산조인 1에서 가장 높게 나타났다.

Table 6. Effect of different inclusion rate of mixed oil with various plant extracts on pH, ammonia nitrogen and volatile fatty acid productions of rumen simulated *in vitro* fermentation

Treatment	pH	NH ₃ -N	Volatile fatty acids profiles (mM)					AP	
			C2	C3	iC4	nC4	iC5		nC5
Control	6.62 ^{efgh}	3.37 ^{de}	31.0 ^{bc}	12.98 ^{bcd}	0.47 ^{bcdef}	4.83 ^{bcd}	0.86 ^{bc}	0.83 ^{abcde}	2.39 ^{abcdef}
P1	6.60 ^{bcdefg}	3.45 ^{defg}	30.3 ^{bc}	12.20 ^{bc}	0.44 ^a	4.52 ^a	0.91 ^{bcde}	0.78 ^{ab}	2.48 ^{cdef}
P2	6.62 ^{efg}	3.62 ^{ghi}	29.3 ^a	12.02 ^a	0.45 ^{bcd}	4.57 ^{ab}	0.96 ^{bcdef}	0.81 ^{abcde}	2.44 ^{cdef}
P3	6.63 ^{fg}	3.37 ^{cd}	32.0 ^{cde}	13.11 ^{bcd}	0.48 ^{bcdef}	4.87 ^{bcd}	0.95 ^{bcdef}	0.84 ^{abcde}	2.44 ^{cdef}
P4	6.61 ^{defg}	3.30 ^c	30.6 ^{bc}	13.31 ^{bcde}	0.54 ^{bcdef}	5.29 ^{bcdef}	1.16 ^{bcdef}	0.96 ^{abcdef}	2.30 ^{abcd}
P5	6.60 ^{bcdefg}	3.30 ^c	31.8 ^{cd}	14.16 ^{defghi}	0.60 ^{fg}	5.80 ^{defg}	1.30 ^{fg}	1.07 ^{ef}	2.26 ^{abc}
P6	6.61 ^{cdefg}	3.35 ^{cd}	34.3 ^{fg}	14.99 ^{ghij}	0.57 ^{bcdefg}	5.84 ^{defg}	1.19 ^{bcdefg}	1.01 ^{abcdef}	2.29 ^{abcd}
P7	6.61 ^{cdefg}	3.67 ^{hij}	34.8 ^{fgh}	15.32 ^{hij}	0.58 ^{cdefg}	6.13 ^{efg}	1.21 ^{cdefg}	1.03 ^{abcdef}	2.27 ^{abcd}
P8	6.60 ^{bcdef}	3.72 ^{ij}	35.4 ^{gh}	15.50 ^{ij}	0.59 ^{efg}	6.03 ^{efg}	1.23 ^{defg}	1.05 ^{bcdef}	2.28 ^{abcd}
P9	6.63 ^{fg}	3.41 ^{def}	33.5 ^{defg}	14.69 ^{efghij}	0.60 ^{efg}	5.91 ^{efg}	1.25 ^{efg}	1.06 ^{cdef}	2.29 ^{abcd}
P10	6.61 ^{cdefg}	3.39 ^{cd}	34.7 ^{fgh}	16.02 ^j	0.69 ^g	6.64 ^g	1.51 ^g	1.22 ^f	2.17 ^a
P11	6.60 ^{bcdef}	3.74 ^{ij}	30.5 ^{bc}	13.98 ^{defgh}	0.58 ^{defg}	5.72 ^{cdefg}	1.12 ^{bcdef}	1.02 ^{abcdef}	2.19 ^{ab}
P12	6.60 ^{bcdefg}	3.41 ^{cde}	34.6 ^{fgh}	14.02 ^{defgh}	0.48 ^{bcdef}	5.18 ^{bcdef}	0.98 ^{bcdef}	0.86 ^{abcde}	2.47 ^{cdef}
P13	6.61 ^{defg}	3.38 ^{de}	35.5 ^{gh}	14.58 ^{efghi}	0.50 ^{bcdef}	5.44 ^{bcdef}	1.03 ^{bcdef}	0.82 ^{abcde}	2.43 ^{bcdef}
P14	6.62 ^{efg}	2.73 ^a	34.6 ^{fgh}	13.48 ^{cde}	0.46 ^{bcde}	5.28 ^{bcdef}	0.93 ^{bcde}	0.84 ^{abcde}	2.58 ^{ef}
P15	6.59 ^{abcde}	3.07 ^b	33.8 ^{efg}	13.78 ^{defg}	0.47 ^{bcdef}	5.11 ^{bcde}	0.96 ^{bcdef}	0.84 ^{abcde}	2.46 ^{cdef}
P16	6.58 ^{ab}	3.57 ^{fghi}	36.6 ^h	15.18 ^{ghij}	0.53 ^{bcdef}	5.70 ^{cdefg}	1.12 ^{bcdef}	0.97 ^{abcdef}	2.41 ^{abcdef}
P17	6.60 ^{bcdefg}	3.63 ^{hi}	36.5 ^h	14.97 ^{fghij}	0.52 ^{bcdef}	5.62 ^{cdef}	1.06 ^{bcdef}	0.92 ^{abcde}	2.44 ^{cdef}
P18	6.58 ^{abc}	3.59 ^{ghi}	35.2 ^{fgh}	14.57 ^{efghi}	0.56 ^{bcdefg}	5.69 ^{cdefg}	1.23 ^{defg}	1.02 ^{abcdef}	2.43 ^{bcdef}
P19	6.59 ^{abcde}	3.50 ^{efgh}	35.5 ^{gh}	14.24 ^{defghi}	0.51 ^{bcdef}	5.33 ^{bcdef}	1.06 ^{bcdef}	0.91 ^{abcde}	2.50 ^{cdef}
P20	6.59 ^{abcd}	3.31 ^c	34.4 ^{fg}	14.30 ^{defghi}	0.55 ^{bcdef}	5.60 ^{cdef}	1.15 ^{bcdef}	0.99 ^{abcdef}	2.41 ^{abcdef}
P21	6.58 ^{abc}	3.81 ^j	35.2 ^{fgh}	13.48 ^{cde}	0.44 ^{bc}	4.82 ^{bcd}	0.89 ^{bcd}	0.78 ^{abc}	2.62 ^f
P22	6.61 ^{defg}	3.71 ^{ij}	35.2 ^{fgh}	13.54 ^{cdef}	0.44 ^b	4.83 ^{bcd}	0.87 ^{bc}	0.78 ^{ab}	2.60 ^f
P23	6.59 ^{abcde}	3.71 ^{ij}	35.0 ^{fgh}	13.28 ^{bcde}	0.43 ^b	4.76 ^{bc}	0.84 ^b	0.78 ^a	2.64 ^f
P24	6.57 ^a	3.60 ^{ghi}	33.3 ^{def}	14.28 ^{defghi}	0.58 ^{cdefg}	5.75 ^{cdefg}	1.22 ^{cdefg}	1.03 ^{abcdef}	2.33 ^{abcde}
P25	6.63 ^g	3.65 ^{hij}	33.2 ^{def}	14.32 ^{defghi}	0.59 ^{efg}	6.18 ^{fg}	1.08 ^{bcdef}	1.07 ^{def}	2.33 ^{abcd}
SEM	0.003	0.038	0.287	0.145	0.011	0.083	0.028	0.018	0.018
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	<0.001

NH₃-N, ammonia nitrogen (mg/100 mL); C2, acetic acid; C3, propionic acid; iC4, iso-butyric acid; nC4, n-butyric acid; iC5, iso-valeric acid; nC5, n-valeric acid; AP, acetate to propionate ratio

P1, *Euryale ferox* seed; P2, *Chrysanthemum indicum*; P3, *Moringa oleifera* fruit; P4, *Moringa oleifera* leaf; P5, *Taraxacum mongolicum* H.; P6, *Mentha piperascens*; P7, *Euphorbia humifusa*; P8, *Ceramium kondoi*;

P9, *Torilis fructus*; P10, *Zizyphus vulgaris* 1; P11, *Zizyphus vulgaris* 2; P12, *Agrimonia pilosa* Ledeb.; P13, Mugwort; P14, *Ixeris dentata* Nakai; P15, *Lespedeza cuneata*; P16, *Momordica charantia* L.; P17, *Curcuma longa* L.; P18, *Artemisia capillaris*; P19, *Perilla frutescens*; P20, *Paeonia lactiflora* Pallas; P21, *Plantago asiatica* L.; P22, *Salvia hispanica* seed; P23, *Illicii veri fructus*; P24, *Foeniculum vulgare* Mill; P25, *Pimpinella anisum* L.

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j Different superscripts in same column mean significantly different ($P < 0.05$).

2) 상대적 성능지수를 이용한 효과 비교

총 휘발성 지방산과 메탄생성량을 기준으로 각 식물들의 상대적 성능지수를 평가하였다. 그 결과 산조인 2와 비단풀 추출물을 포함한 펠렛코팅오일이 가장 우수한 것으로 나타났고 반대로 국화와 거피연자육의 경우 오히려 반추위 발효를 대조구에 비하여 좋지 않게 하는 것으로 나타났다. 일련의 실험 결과, 식물추출물들을 이용하여 반추위 발효의 조절이 가능한 것으로 나타났으며, 식물추출물이라고 해서 모두 반추위 발효를 긍정적인 방향으로 유도할 수 있는 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

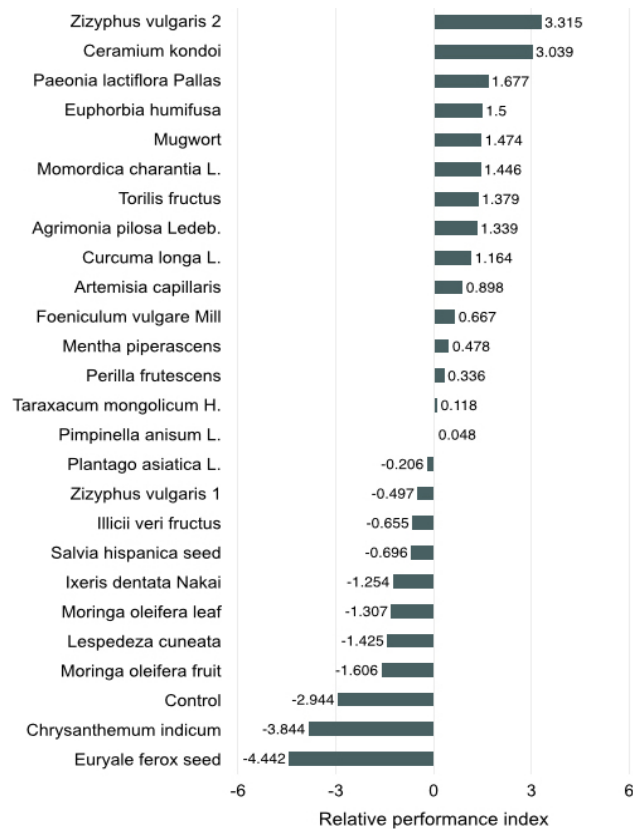


Fig. 2. Relative performance index of plant extracts on volatile fatty acid production and methane reduction.

[Submitted, June. 11, 2015; Revised, June. 11, 2015; Accepted, June. 18, 2015]

Reference

1. An, D. H., S. J. Cho, E. S. Jung, H. J. Lee, J. H. Hwang, E. Park, H. R. Park, and S. C. Lee. 2006. Antioxidant and Anticancer Activities of Water Extracts from *Ceramium kondoi*. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 35(10): 1304-1308.
2. Bae, H. J., H. Y. Lee, and J. E. Paik. 2009. Physicochemical Properties of Sugar-snap Cookies Prepared with *Chrysanthemum indicum* Linne Powder. Korea J. Food & Nutr. 4: 570-576.
3. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8: 130-132.
4. Cho, H. J. and Y. C. Chang. 2014. Extract of *Moringa* Root Inhibits PMA-induced Invasion of Breast Cancer Cells. Journal of Life Science. 24(1): 8-13.
5. Cho, J. H., Y. G. Han, O. S. Kwon, B. J. Min, K. S. Son, Y. J. Chen, and I. H. Kim. 2005. Effect of *Zizyphus vulgaris* Supplementation on Growth performance, Blood Cortisol and Meat Quality Characteristics in Finishing Pig. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 25(1): 20-25.
6. Choi, H. Y. 2009. Antimicrobial Activity of ULGeum (*Curcuma longa* L.) Extract and Its Microbiological and Sensory Characteristic Effects in Processed Foods. Korean J. FOOD COOKERY SCI. 25(3): 350-356.
7. Choo, S. J., Y. H. Kim, I. J. Ryoo, G. H. Xu, and I. D. Yoo. 2009. Application as a Conneceutical Ingredient of *Euryale ferox* Seed Extract. J. Soc. Consmet. Scientists Korea. 35(4): 309-315.
8. Erwin, E., G. Marco, and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy. Sci. 44: 1768-1771.
9. Han, E. K., E. J. Jung, J. Y. Lee, Y. X. Jin, and C. K. Chung. 2011. Antioxidative Activity of Ethanol Extracts from Different Parts of *Taraxacum officinale*. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 40(1): 56-62.
10. Heo, S. I., W. Hu, W. Han, and M. H. Wang. 2008. Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of Extracts from *Euphorbia humifusa*. Kor. J. Pharmacogn. 39(4): 295-299.
11. Hong, S. and O. Kim. 2013. The Effects of *Torilis fructus* Extracts Against Enteropathogenic *Escherichia coli* in Piglets. Korean J. Vet Serv. 36(4): 283-289.

12. Jang, S. H., E. A. Yu, K. S. Han, S. C. Shin, H. K. Kim, and S. G. Lee. 2008. Changes in Total Polyphenol Contents and DPPH Radical Scavenging Activity of *Agrimonia pilosa* According to Harvest Time and Various Part. Korean J. Medical Crop Sci. 16(6): 397-401.
13. Jeon, S. Y., J. Y. Park, I. Shin, S. O. Kim, H. D. An, and M. R. Kim. 2014. Ethanol Extract of *Plantago asiatica* L. Controls Intracellular Fat Accumulation and Lipid Metabolism in 3T3-L1 Adipocytes. Kor. J. Herbology. 29(4): 77-82.
14. Ji, S. T., S. J. Lee, K. E. Lee, Y. T. Son, and Y. K. Chung. 2002. Inhibitory Effect of Extracts from Paeoniae radix on Postprandial Hyperglycemia. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(1): 131-135.
15. Kim, B. K., C. B. Choi, and Y. J. Kim. 2009. Effects of Dietary Mugwort on the Performance and Meat Quality of Hanwoo Steers during Refrigerated Storage. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 29(3): 340-348.
16. Kim, Y. R., B. K. Lee, J. Y. Kim, J. S. Kim, W. S. Lee, S. Y. Lee, E. J. Kim, B. K. Ahn, and C. W. Kang. 2009. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 29(2): 168-177.
17. Lee, A. Y., H. S. Kim, G. Choi, J. M. Chun, B. C. Moon, and H. K. Kim. 2013a. Comparison of Major Compounds in Illicii Veri Fructus by Extraction Solvents. Kor. J. Herbology. 28(6): 47-51.
18. Lee, H., J. Y. Jung, B. M. Hwang, S. K. Ku, Y. W. Kim, and S. Y. Jee. 2013b. Anti-inflammatory effects of *Lespedeza Cuneata* *in vivo* and *in vitro*. Kor. J. Herbology. 28(4): 83-92.
19. Lee, A. R., J. Yang, S. Cho, C. S. Na, K. S. Shim, Y. H. Kim, G. S. Bae, M. B. Chang, B. Choi, S. J. Shin, and N. J. Choi. 2014. Development of an environmental friend additive using antibacterial natural product for reducing enteric rumen methane emission. Korean J. Organic Agri. 22(3):491-502.
20. Lee, B. C., C. G. Joo, J. Y. Hur, Y. H. Keun, Y. J. Kim, C. W. Lee, J. W. Kim, Y. I. Park, H. S. Kim, and T. B. Choe. 2010. Moisturizing Effects and Composition Analysis of Proteoglycan Isolated from Chia (*Salvia hispanica*) Seed. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 36(2): 121-128.
21. Lee, H. J., G. N. Lim, M. A. Park, and S. N. Park. 2011. Antibacterial and Antioxidative Activity of *Lespedeza cuneata* G. Don Extracts. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 39(1): 63-69.
22. Lee, J. G., Y. J. Kown, H. J. Jang, J. J. Kwag, O. C. Kim, and Y. H. Choi. 1997. A Comparison of Different Extraction Methods for the Volatile Components of Anise (*Pimpinella anisum* L.). Agricultural Chemistry and Biotechnology. 40(2):144-147.

23. Lee, S. H., H. J. Park, E. Y. Hur, Y. S. Cho, and S. M. Cho. 2004. Antioxidative and Antimicrobial Qualities of Different Parts of the Dandelion Plant (*Taraxacum officinale*) from Different Habitats. Korean J. Community Living Science. 15(1): 85-90.
24. Lee, J. C., E. Lee, H. Oh, H. S. Yoon, T. K. Ha, E. H. Hong, and Y. C. Lee. 2007. Effects of Fructus Foeniculi Extract on Recovering Liver Function. Kor. J. Herbology. 22(4): 213-218.
25. Lim, H. S., J. H. Kim, H. Ha, C. S. Seo, and H. K. Shin. 2012. Comparative Study of the Anti-inflammatory Effects of Menthae Herba from Korea and China. Kor. J. Pharmacogn. 43(3): 231-238.
26. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43: 99-109.
27. Moon, Y. D. 1993. Studies on microbiological and physicochemical properties of fermented sausages manufactured with *Lactobacillus curvatus* K12-3. Ph.D. Thesis. Kunkuk University. Seoul.
28. Min, K. J., J. W. Song, and C. G. Cha. 2008. The Antioxidative and Antitumor Activity of Extracts of *Agrimonia pilosa*. J. Fd Hyg. Safety. 23(2): 149-156.
29. Moon, Y. H., J. B. Yang, and I. C. Jung. 2011. Effect of Feeding Mugwort (*Artemisia capillaries*) TMR Fodder on Physicochemical and Sensory Characteristics of Hanwoo Rump Meat. J. East Asian Soc Dietary Life. 21(3): 345-352.
30. Park, K. D., and S. H. Cho. 2010. Antimicrobial Characteristics of *Paeonia lactiflora* Pall. Extract Tested against Food-putrefactive Microorganisms. Korea J. Food Preserv. 17(5): 706-711.
31. Park, S. J. 2014. Antioxidant and Anti-Adipogenic Effects of Ethanolic Extracts from *Ixeris dentate Nakai*. The Korean Journal of Cullinary Research. 20(1): 133-142.
32. Park, Y., H. O. Boo, Y. L. Park, D. H. Cho, and H. H. Lee. 2007. Antioxidant Actiity of *Momordica charantia* L. Extracts. Korea J. Medicinal Crop Sci. 15(1): 56-61.
33. Seo, D. J., T. H. Kim, H. S. Kim, and M. Choe. 2011. Effects of *Foeniculi fructus* Water Extracts on Activities of Key Enzymes of Lipid Metabolism Related with Obsity. Korean J. Plant Res. 24(2): 181-188.
34. Tilley, J. and R. Terry. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. British Grassland Soc. 18: 104-111.
35. You, J. S., S. Y. Kim, S. H. Kim, and T. Y. Shin. 2012. Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta*. Kor. J. Pharmacogn. 43(2): 163-166.