

국내 자생 해조류 첨가가 *in vitro* 반추위 발효 특성 및 메탄 발생량에 미치는 영향*

김별** · 위지수** · 이유경** · 김현상** · 성필남*** ·

이성대** · 황일기**** · 김현철***** · 이성신*****

The Effects of Korean Seaweeds on *In vitro* Ruminant Fermentation Characteristics and Methane Production

Kim, Byul · Wi, Jisoo · Lee, Yookyung · Kim, Hyunsang · Seong, Pilnam ·

Lee, Sungdae · Hwang, Ilki · Kim, Hyunchul · Lee, Seongshin

The present study was conducted to investigate the effects of seaweeds on *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane gas production. Five seaweeds (*Dictyota dichotoma*, DD; *Chrysiomenia wrightii* Yamada, CW; *Codium fragile*, CF; *Sargassum fusiforme*, SF; *Gracilaria vermiculophylla*, GV) were obtained from National Institute of Fisheries Science (NIFS) in South Korea. The ruminal fluids were collected from 3 rumen-cannulated Hanwoo steers (average 12-months-old). The buffered ruminal fluids (50 mL) were incubated with substrates (0.4 g of concentrate and 0.1 g of rice straw in dry matter basis) and seaweeds (5% of substrates) at 39°C for 24 and 48 hours. The total gas and methane production of all treatments incubated for 24 hours were not affected by the seaweed. However, methane production (mL/g of digested dry matter) in the CW and CF treatments incubated for 48 hours was decreased compared to control ($p < 0.05$). Additionally, the ruminal pH of all treatments incubated for 24 and 48 hours was lower than control ($p < 0.05$). There was no significant difference in total VFA concentration at 24 hours of incubation, but it was higher in the CF treatment at 48 hours of incubation ($p < 0.05$). The dry matter digestibility of all treatments incubated for 24

* 본 연구는 농촌진흥청 연구사업(RS-2023-00231243)의 지원에 의해 이루어진 것임.

** 농촌진흥청 국립축산과학원 동물영양생리과

*** 농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과

**** 해양수산부 국립수산물품질관리센터

***** 해양수산부 국립수산물품질관리센터 육종연구센터

***** Corresponding author, 농촌진흥청 국립축산과학원 동물영양생리과(shin7398@korea.kr)

and 48 hours were not affected by the seaweed. In conclusion, *Codium fragile* reduced *in vitro* methane production without negative effects on rumen fermentation characteristics.

Key words : *hanwoo, in vitro, methane, seaweed*

I. 서 론

지구온난화는 다량의 온실가스가 대기 중으로 배출됨에 따라 발생하게 되는 현상으로, 지구의 평균 기온이 2011년에서 2020년까지 1.09°C 상승하여 현재 기후 위기 상태라고 할 수 있다(기후변화에 관한 정부 간 협의체 IPCC, 2021). 다양한 온실가스 중 이산화탄소(CO₂)에 이어 메탄이 두 번째로 큰 비중을 차지하며, 메탄은 지구온난화 지수가 CO₂ 배출에 28~34배에 달한다(Glasson et al., 2022). 다른 온실가스에 비해 체류시간이 12년으로 짧아 배출량을 줄이면 가장 빠른 효과를 볼 수 있다. 이에 따라 온실가스 감축을 위한 전략 수립 목표가 구체화 되고 있으며 축산분야에서는 반추동물의 장내 발효 메탄 발생 저감이 주요 대상이다.

장내 발효는 반추동물이 섭취한 사료를 반추위 내 미생물이 분해 또는 흡수하는 과정에서 수소와 이산화탄소가 발생 되고 이를 메타노젠이 이용하여 메탄을 생성하고 트립을 통해 체외로 배출하게 된다(NIR, 2022). 메탄 발생량은 반추동물이 섭취하는 사료의 조성 및 급여량에 따라 반추위 미생물 군집과 소화 능력에 영향을 미쳐 메탄 배출에 영향을 미칠 수 있다(Abbott et al., 2020). 최근 반추위의 메탄 저감과 관련하여 발표되는 연구에는 다양한 해조류가 이용되고 있다. 해조류는 복합 탄수화물, 미네랄 등 영양학적 성분과(Kumar et al., 2008), 플로로탄닌 및 할로겐화 화합물과 같은 2차 대사산물을 함유하고 있어 메탄 저감과 관련된 연구가 진행되고 있다(Holdt and Kraan, 2011). 선행연구 중 홍조류인 *Asparagopsis* 종이 효과적인 메탄 저감율을 보였고(Roque et al., 2019), 이외에도 갈조류인 *Dictyota* 종(Brooke et al., 2020), 홍조류인 *Gigartina* 종(Maia et al., 2016), 녹조류인 *Ulva* 종(Machado et al., 2014) 등에서 메탄 저감 효능이 우수하다고 보고되었다.

국내에서 자생하고 있는 해조류는 750여종 이상이며, 해조류 종류에 따라 특이적 생리활성을 나타내는 다양한 유효성분을 포함하고 있다(Cho et al., 1995). 청각(*Codium fragile*)에 존재하는 2차 대사산물은 항산화 능력, 항암, 항염증 특성과 같은 생리활성 능력이 있다는 보고가 있다(Lee et al., 2017; Sanjeeva et al., 2018). 또한 툿(*Sargassum fusiforme*)에서 생리활성 물질이 높아 기능성 소재로써 식품분야에서 이용되고 있다(Kwon and Yon, 2017). 국내에서도 일부 해조류를 활용한 메탄 저감 효능 연구가 진행되었으나(Choi et al., 2021; 2022), 국내 자생 해조류 종류와 우수한 특성에 비하면 여전히 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내에서 자생하고 있는 해조류 5종을 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효성

상 및 메탄 발생량을 분석하여 메탄 저감 소재로서 국내 자생 해조류의 활용 가능성을 평가하고자 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 반추위액 채취

공시축은 농촌진흥청 국립축산과학원에서 사육중인 반추위 캐놀라가 시술된 한우 거세우 3마리(평균 347.7±2.52일령)를 사용하였다(승인번호: NIAS 2023-0616). 시험사료는 농후사료와 볏짚(7:3)을 1일 2회(09:00 및 16:00) 나누어 급여하였고 물과 미네랄 블록은 자유 섭취하도록 하였다. 반추위액은 오전 사료급여 전 반추위 캐놀라를 통해 채취하였으며 4겹의 cheesecloth로 여과 한 다음 CO₂ gas가 충전된 병에 담아 실험실로 운반하였다.

2. 해조류 확보 및 처리

해조류는 국립수산물과학원에서 제공 받은 그물바탕말(*Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux, DD), 누른끈적이(*Chrysymenia wrightii* Yamada, CW), 청각(*Codium fragile*, CF), 툫(*Sargassum fusiforme*, SF)과 꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*, GV)를 처리구로 사용하였다. 누른끈적이와 꼬시래기는 *Rhodophyta* (홍조식물문)에 속해 홍조류라고도 불리며 누른끈적이는 2022년 6월경 경남 하이면 상죽암, 꼬시래기는 같은 해 7월경 전남 진도군에서 채집하였다. 그물바탕말과 툫은 *Ochrophyta* (대롱편모조식물문)에 속해 갈조류라고도 불리며 2022년 7월경 전남 완도군에서 채집하였다. 청각은 *Chlorophyta* (녹조식물문)에 속해 녹조류라고도 불리며 2022년 6월경 경남 하이면 상죽암에서 채집하였다. 수집된 해조류는 모래 및 잔여물 제거를 위해 21°C에서 3분간 세척한 후 동결건조 전까지 -80°C에 2일간 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 해조류는 -45°C에 5일간 모두 동결건조하였다. 동결건조한 후 cyclotec 1093 meal (FOSS, Hillerød, Denmark)를 이용하여 1 mm 크기로 분쇄하였다.

3. *In vitro* 배양

농후사료와 조사료(볏짚)는 60°C에서 48시간 건조시킨 후 cyclotec 1093 meal (FOSS, Hillerød, Denmark)를 이용하여 1 mm 크기로 분쇄하여 기질(조사료:농후사료=3:7)로 사용하였고 영양성분과 농후사료 조성은 Table 1과 2와 같다. 기질은 AOAC법(2016)을 활용하여 건물(DM, #930.15), 조단백질(CP, #990.03), 조회분(CA, #942.05), 조지방(EE, #2003.05) 및

산성세제 불용성 섬유소(ADF, #973.18)를 분석하였다. 중성세제 불용성 섬유소(aNDFom)는 Van Soest (1991)의 방법을 활용하여 조회분 함량을 보정한 함량을 도출하였다. 비구조성 탄수화물(NFC)은 NRC (2001) 가이드라인을 토대로 계산하였다(NFC=100-CP-EE-CA-NDF). 기질은 Filter bag (Ankom Forage bag: R1020)에 0.5 g을 넣어주었으며 처리구는 기질 대비 5% 첨가 후 밀봉하였다.

Table 1. Chemical composition of experimental diets

Chemical composition	Concentrate	Rice straw
Dry matter (DM), %	87.78	98.33
Crude protein, % of DM	18.90	8.67
Ether extract, % of DM	3.38	0.83
Non-fiber carbohydrate, % of DM	47.14	13.76
aNDFom ¹ , % of DM	25.08	65.29
Acid detergent fiber, % of DM	10.84	46.79
Crude ash, % of DM	5.51	11.44

¹ aNDFom; method published by Mertens (2002) that includes the option of using a-amylase, sodium sulfite, and correcting for ash contamination.

Table 2. Ingredient of the concentrate mix used *in vitro* experiment

Ingredient	Composition, %
Corn flake	54.34
Corn gluten feed	5.08
Soybean meal	8.82
Wheat	6.51
Wheat bran	3.92
Palm meal	6.55
Soybean hull	6.51
Lupin flake	6.51
Limestone	0.77
Salt	0.37
Sodium bicarbonate	0.37
Vitamin & mineral mix ¹	0.25

¹ Vitamin (vit) & mineral mix; vit A, 2,650,000 IU; vit D3, 530,000 IU; vit E, 1,050 IU; Nicotinic acid, 10,000 mg; Fe, 13,200 mg; Mg, 4,400 mg; Zn, 4,400 mg; Cu, 2,200 mg; I, 440 mg; Co, 440 mg.

반추위액과 McDougall buffer를 1:3의 비율로 혼합한 후 39°C로 가열 교반하면서 CO₂를 주입하여 혐기상태를 유지하였다. 배양액은 filter bag이 들어있는 125 mL serum bottle에 50 mL씩 분주한 후 39°C 배양기에 24시간 및 48시간 동안 배양하였다. 실험 단위는 각 serum bottle이었으며 처리당 3반복으로 수행하였다.

4. *In vitro* 가스성상 및 반추위 발효성상 분석

총 가스 발생량은 24시간 배양 후 디지털 차압계(TPI645, TPI, Korea)와 눈금실린지를 이용하여 serum bottle 내부 압력이 대기압과 같아지도록 가스를 포집하여 산정하였다. 포집된 가스는 진공 처리된 serum tube (BD Vacutainer 367953, BD, USA)에 옮긴 후 GC (gas chromatograph; NL/450 GC, Bruker, USA)를 사용하여 메탄 발생량을 측정하였다. 가스 포집 후, pH meter (pinnacle pH meter M540, Corning, NY, USA)를 이용하여 반추위액의 산도를 측정하였다. 휘발성 지방산(VFA; volatile fatty acids)과 암모니아태 질소(NH₃-N) 분석을 위해 배양액을 채취하여 15 mL tube에 분주하였고, 미생물 활동 정지 목적으로 metaphosphoric acid (Wako, Japan) 용액과 위액을 1:10 비율로 희석하여 분석 전까지 -80°C에 냉동 보관하였다.

VFA 분석은 Erwin 등(1961)의 방법을 응용하여 활용하였다. 냉동보관된 샘플은 분석 전 용해시킨 후, 원심분리기(Vision Scientific CO. LTD, VS-550)를 이용하여 2,900 ×g, 4°C에서 20분간 원심 분리하였다. 분리된 상층액은 micro tube에 2 mL 옮긴 후 미량원심분리기(Cyclo1730MR, Labogene, Korea)를 이용하여 14,000 ×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하였으며, 0.20 μM syringe filter로 여과한 후 분석용 유리병에 옮겨 Thermo Scientific Gas Chromatograph (GC; Trace 1610)를 이용하여 분석하였다. VFA 표준용액은 volatile fatty acid standard solution (Catalog number. 46975-U; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용하였다.

NH₃-N 분석은 Chaney와 Marbach (1962)의 방법을 응용하여 사용하였다. 냉동보관된 샘플을 상온에서 충분히 용해시킨 후 원심분리기(Vision Scientific CO. LTD, VS-550)를 이용하여 2,900 ×g, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 분석에 활용하였다. 샘플 상층액과 암모니아 표준용액(50, 100, 200, 400 ppm)을 1.5 mL micro tube에 10 μL씩 분주하고, phenol color reagent (Phenol 50 g/L와 sodium nitroferricyanide 0.25 g/L)와 alkali-hypochlorite reagent (sodium hydroxide 25 g/L와 4-6% sodium hypochlorite 16.8 mL/L)를 각각 500 μL씩 첨가하여 혼합하였다. 57°C 항온수조에서 혼합액을 5~7분간 충분히 발색하여 96 well microplate에 200 μL씩 옮긴 후 UV spectrophotometer (Catalog number. 168-1150; Bio Rad Laboratories, Inc, California, USA)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플 내 NH₃-N 농도는 암모니아 표준용액의 검량선을 기준으로 하여 계산한 값을 활용하였다.

5. 통계분석

본 연구에서 나온 모든 결과는 SAS program (Enterprise guide 7.1, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)의 GLM (General Linear Model) procedure를 이용하여 분석을 실시하였다. 처리에 의한 평균 간 비교는 Tukey's test를 이용해 분석하였다. 유의성은 $p < 0.05$ 수준으로 판단하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 반추위 총 가스 및 메탄 발생량 결과

해조류의 첨가에 따른 *in vitro* 배양 24시간대 반추위 내 총 가스 및 메탄 발생량 결과 (Table 3)는 전 처리구에서 유의적인 차이가 없었다. 반면, 해조류 첨가에 따른 *in vitro* 배양 48시간대 반추위 내 총 가스 발생량에서는 유의적인 차이는 없었으나 (Table 4), 메탄 발생량 결과에서는 유의적인 결과를 나타냈다 ($p < 0.05$). 메탄 발생량 (mL, mL/g of DM, mL/g of dDM) 결과에서 대조구와 비교했을 때, 해조류 처리구 중 CW와 CF 처리구가 유의적으로 가장 낮았다 ($p < 0.05$). Keskinaya 등(2022)의 연구에서 청각 추출물 내 페놀성 화합물이 풍부하였고, 그 중 Diosgenin이 높은 물질 중 하나로 확인되었다. Diosgenin은 스테로이드 사포닌 계열에 속하는 2차 대사산물로 (Hernández-Vázquez et al., 2020), 프로토조아 분해를 야기해 공생 관계인 메탄 생성균을 감소시켜 메탄 발생을 저감시킬 수 있다 (Newbold et al., 1995; Newbold, 2010). 본 실험에서도 선행연구와 유사하게 청각 처리구에서 메탄 발생량이 감소되었으며, 이는 청각에서 존재하는 페놀성 물질로 인한 영향으로 사료된다. Ito 등(2018)의 연구에서 누른끈적이 (*Chrysymenia wrightii* Yamada)를 포함한 21종의 해조류 지방산 분석을 실시한 결과 C14:0(미리스트산)은 0.81~9.52% 수준의 범위에서 7.09%였고, SFAs (포화지방산, Saturated fatty acids)는 45.48~60.33% 범위 중 57.43%이었다. 급여 사료 내 지방 및 지방산과 반추동물의 메탄 배출 관계에 대해 보고되었다 (Beauchemin et al., 2007). C12:0 (라우르산), C14:0(미리스트산) 등은 메탄 배출과 메탄을 생성하는 박테리아 수를 감소시키고 (Dohme et al., 2001), Zhou 등(2013)은 라우르산이 *M. ruminantium*의 세포 생존력을 감소시키는 능력을 가지고 있다고 보고했다. 정확한 억제 효과를 알기 위해서는 지방산 분석 및 추가 연구가 필요할 것으로 보인다. Sofyan 등(2022)은 해조류 관련 메타 분석 결과를 통해 메탄 환원력이 우수한 해조류 종을 확인하였고, 30~40% 사이의 메탄 감소 가능성을 보인 해조류로 꼬시래기와 갈파래류 등을 보고하였다. 하지만 본 실험에서 SF와 GV 처리구의 메탄 발생량은 유의적인 차이가 없었다. 해조류에 존재하는 영양성분과 2차 대사산물의

농도는 지역, 환경 및 채취시기 등을 포함한 여러 요인에 따라 달라지며, 이는 반추동물의 장내 메탄 발생량 저감 효과도 달라질 수 있어(Abbott et al., 2020), 본 실험 결과와 다른 결과를 보인 것으로 사료된다.

Table 3. Effects of seaweed additives on total gas and methane production after *in vitro* 24 h of incubation

Item ¹	CON	Treatments ²					SEM ³	p-value
		DD	CW	CF	SF	GV		
Total gas, mL	45.80	42.39	38.05	39.72	41.94	42.35	1.258	0.657
CH ₄ , %	5.73	5.64	5.09	6.72	6.41	5.86	0.184	0.109
CH ₄ , mL	2.94	2.42	1.96	2.67	2.69	2.49	0.127	0.410
CH ₄ , mL/g of DM	5.87	3.80	3.61	5.08	5.12	4.74	0.260	0.110
CH ₄ , mL/g of dDM	8.92	6.42	6.05	8.33	7.91	7.36	0.340	0.104

¹ DM, dry matter; dDM, digestible DM.

² Treatments were supplemented 5% of substrates (DM basis); DD, *Dictyota dichotoma*; CW, *Chrysiomenia wrightii* Yamada; CF, *Codium fragile*; SF, *Sargassum fusiforme*; GV, *Gracilaria vermiculophylla*.

³ SEM, standard error of means.

Table 4. Effects of seaweed additives on total gas and methane production after *in vitro* 48 h of incubation

Item ¹	CON	Treatments ²					SEM ³	p-value
		DD	CW	CF	SF	GV		
Total gas, mL	74.40	70.40	58.04	67.04	63.68	59.06	1.912	0.069
CH ₄ , %	7.28	6.08	6.16	5.80	6.83	7.15	0.199	0.116
CH ₄ , mL	5.75 ^a	4.30 ^{ab}	3.48 ^b	3.76 ^b	4.37 ^{ab}	4.85 ^{ab}	0.215	0.024
CH ₄ , mL/g of DM	10.83 ^a	8.17 ^{ab}	6.60 ^b	7.14 ^b	7.44 ^{ab}	8.18 ^{ab}	0.432	0.026
CH ₄ , mL/g of dDM	13.92 ^a	10.76 ^{ab}	9.36 ^b	9.56 ^b	11.44 ^{ab}	12.18 ^{ab}	0.465	0.007

¹ DM, dry matter; dDM, digestible DM.

² Treatments were supplemented 5% of substrates (DM basis); DD, *Dictyota dichotoma*; CW, *Chrysiomenia wrightii* Yamada; CF, *Codium fragile*; SF, *Sargassum fusiforme*; GV, *Gracilaria vermiculophylla*.

³ SEM, standard error of means.

^{a-b} Superscript represents significance difference by Tukey's multiple comparison (p<0.05).

2. 반추위 발효성상 결과

해조류 첨가에 따른 배양 24시간대 반추위 *in vitro* 발효성상 및 건물소화율 결과는 Table 5에 나타내었다. 해조류 처리구의 반추위 pH는 5.86~6.18로, DD 처리구를 제외한 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 낮았으며, 특히 SF와 GV 처리구에서 가장 낮았다 ($p<0.05$). 반추위 pH에 영향을 미치는 Total VFA 농도와 acetate, propionate, iso-butyrate, butyrate, iso-valerate, valerate, A:P ratio (Acetate:Propionate ratio)에서 유의적인 차이가 없었으나, pH 강하와 음의 상관관계인 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도는 SF, GV 순으로 낮아($p<0.05$), pH에 차이가 있는 것으로 사료된다. Wang 등(2008)의 연구에 따르면 일부 해조류의 플로로탄닌이 반추위액에서 플로로탄닌-단백질 복합체로 형성되어 $\text{NH}_3\text{-N}$ 축적이 감소될 수 있다. Choi 등(2021)의 연구에서도 갈조류 추출물을 이용한 *in vitro* 배양 실험에서 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도가 감소하였으며, 이번 연구 결과와 유사하였다. 한편, 건물 소화율은 유의적인 차이가 없어, 해조류의 첨가가 건물 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 5. Effects of seaweed additives on rumen fermentation characteristics and IVDMD production after *in vitro* 24 h of incubation

Item ¹	CON	Treatments ²					SEM ³	p-value
		DD	CW	CF	SF	GV		
pH	6.18 ^a	6.12 ^{ab}	6.06 ^{bc}	5.96 ^{cd}	5.90 ^d	5.86 ^d	0.291	<0.001
Total VFA, mM	72.26	68.79	70.28	68.30	71.89	72.80	0.624	0.128
Acetate, %	55.83	54.65	54.34	55.39	54.67	54.32	0.181	0.052
Propionate, %	27.06	27.67	28.42	27.43	27.18	27.53	0.156	0.137
Iso-butyrate, %	1.30	1.45	1.42	1.47	1.50	1.54	0.029	0.205
Butyrate, %	12.01	12.16	11.92	11.88	12.68	12.62	0.139	0.412
Iso-valerate, %	2.37	2.54	2.42	2.39	2.44	2.44	0.024	0.455
Valerate, %	1.43	1.52	1.47	1.43	1.52	1.54	0.018	0.186
A:P ratio	2.06	1.98	1.94	2.02	2.01	1.97	0.015	0.181
$\text{NH}_3\text{-N}$, mg/dL	14.61 ^{ab}	15.03 ^{ab}	14.89 ^{ab}	14.14 ^a	13.00 ^c	13.76 ^{bc}	0.213	0.001
IVDMD, %	64.60	61.90	61.41	63.13	62.54	64.22	0.747	0.847

¹ VFA, volatile fatty acids; A/P ratio, acetate-to-propionate ratio; $\text{NH}_3\text{-N}$, ammonia-nitrogen; IVDMD, *in vitro* DM digestibility.

² Treatments were supplemented 5% of substrates (DM basis); DD, *Dictyota dichotoma*; CW, *Chrysymenia wrightii* Yamada; CF, *Codium fragile*; SF, *Sargassum fusiforme*; GV, *Gracilaria vermiculophylla*.

³ SEM, standard error of means.

^{a-d} Superscript represents significance difference by Tukey's multiple comparison ($p<0.05$).

Table 6. Effects of seaweed additives on rumen fermentation characteristics and IVDMD production after *in vitro* 48 h of incubation

Item ¹	CON	Treatments ²					SEM ³	p-value
		DD	CW	CF	SF	GV		
pH	6.04 ^a	5.95 ^b	5.94 ^b	5.79 ^c	5.75 ^c	5.78 ^c	0.026	<0.001
Total VFA, mM	87.90 ^{bc}	88.96 ^{ab}	83.08 ^c	92.98 ^a	90.29 ^{ab}	92.10 ^{ab}	1.005	0.001
Acetate, %	55.16	54.89	54.56	54.17	55.05	55.32	0.233	0.791
Propionate, %	26.41	27.29	26.60	27.21	27.32	25.65	0.322	0.685
Iso-butyrate, %	1.68	1.81	1.76	1.70	1.64	1.63	0.047	0.905
Butyrate, %	12.20	11.55	12.05	12.25	11.69	12.40	0.134	0.431
Iso-valerate, %	2.87	2.88	3.12	2.99	2.72	3.16	0.060	0.239
Valerate, %	1.68	1.58	1.89	1.69	1.58	1.85	0.045	0.229
A:P ratio	2.09	2.01	2.06	2.00	2.02	2.16	0.032	0.746
NH ₃ -N, mg/dL	20.74 ^{ab}	16.72 ^{bcd}	16.43 ^{cd}	19.50 ^{abc}	14.97 ^d	22.81 ^a	0.752	<0.001
IVDMD, %	80.27	75.52	70.46	74.77	72.26	73.42	0.962	0.092

¹ VFA, volatile fatty acids; A/P ratio, acetate-to-propionate ratio; NH₃-N, ammonia-nitrogen; IVDMD, *in vitro* DM digestibility.

² Treatments were supplemented 5% of substrates (DM basis); DD, *Dictyota dichotoma*; CW, *Chrysymenia wrightii* Yamada; CF, *Codium fragile*; SF, *Sargassum fusiforme*; GV, *Gracilaria vermiculophylla*.

³ SEM, standard error of means.

^{a-d} Superscript represents significance difference by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

해조류 첨가에 따른 배양 48시간대 반추위 *in vitro* 발효정상 및 건물소화율 결과는 Table 6 과 같다. 반추위 pH는 5.75~6.04로, CF, SF, GV 처리구에서 유의적으로 가장 낮았다($p < 0.05$). 이는 pH 저하와 양의 상관관계인 Total VFA 농도가 CF, GV, SF 순으로 높았고($p < 0.05$), SF 처리구의 경우에는 pH 저하와 음의 상관관계인 NH₃-N 농도가 가장 낮았기($p < 0.05$) 때문으로 판단된다. 반추위 미생물 성장을 위한 적정 NH₃-N 농도 범위는 6~30 mg/mL (Preston and Leng, 1987)이고, 본 실험에서 해조류를 첨가한 처리구의 NH₃-N 농도는 14.97~22.81 mg/dL로 반추위 미생물 성장에 부정적인 영향은 없는 것으로 판단된다. 건물 소화율은 전 처리구에서 유의적인 차이가 없었으며, 이는 본 실험에서 첨가된 해조류가 반추위 건물 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

V. 적 요

국내에서 자생하고 있는 해조류를 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효정상 및 메탄 발생량 분

석을 실시하였다. 해조류 처리구에서 *in vitro* 배양 24시간대 총 가스 및 메탄 발생량 결과는 전 처리구에서 유의적인 차이가 없었으나 배양 48시간대 메탄 발생량 결과에서는 누른 끈적이와 청각 처리구에서 유의적으로($p<0.05$) 낮았다. 해조류 처리구의 반추위 pH는 5.75~6.12로 대조구 대비 유의적으로($p<0.05$) 낮았다. Total VFA 농도는 배양 24시간대에서 유의적인 차이가 없었으나, 청각 처리구에서 배양 48시간대 대조구 대비 유의적으로($p<0.05$) 높았다. $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도는 툃 처리구에서 배양 24시간과 48시간대 모두 대조구 대비 유의적으로($p<0.05$) 낮았다. 건물 소화율은 배양 24시간과 48시간대 모두 유의적인 차이를 보이지 않아 해조류가 반추위 건물 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않았다. 이를 통해 청각이 반추위 발효성상 및 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 메탄 발생량을 감소시키는 효과를 보여, 추후 메탄 저감 소재로서 평가를 위해 가축 급여 실험을 통한 검증이 필요하다.

[Submitted, March. 26, 2024; Revised, June. 10, 2024; Accepted, July. 2, 2024]

References

1. Abbott, D. W., I. M. Aasen, K. A. Beauchemin, F. Grondahl, R. Gruninger, M. Hayes, and X. Xing. 2020. Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: Challenges and opportunities. *Animals*. 10(12): 2432.
2. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. Development and Use of In House Reference Materials: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Page 2. 19Th Edition of the AOAC International Official Methods of Analysis, Appendix F.
3. Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, and H. V. Petit. 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Can. J. Anim. Sci.* 87: 431-440.
4. Brooke, C. G., B. M. Roque, N. Najafi, and M. Hess. 2020. Methane reduction potential of two pacific coast macroalgae during *in vitro* ruminant fermentation. *Front. Mar. Sci.* 7: 7.
5. Chaney, A. L. and E. P. Edward. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. chem.* 8(2): 130-132.
6. Cho, D. M., D. S. Kim, D. S. Lee, H. R. Kim, and J. H. Pyeun. 1995. Trace component and functional saccharides in seaweed-1 changes in proximate composition and trace element according to the harvest season and places. *Bull Korean Fish Soc.* 28: 49-59.
7. Choi, Y., S. J. Lee, H. S. Kim, J. S. Eom, S. U. Jo, L. L. Guan, and S. S. Lee. 2021. Effects of seaweed extracts on *in vitro* rumen fermentation characteristics, methane produc-

- tion, and microbial abundance. *Scientific Reports*. 11(1): 24092.
8. Choi, Y., S. J. Lee, H. S. Kim, J. S. Eom, S. U. Jo, L. L. Guan, and S. S. Lee. 2022. Red seaweed extracts reduce methane production by altering rumen fermentation and microbial composition *in vitro*. *Front. Vet. Sci.* 9: 985824.
 9. Dohme, F, A. Machmuller, A. Wasserfallen, and M. Kreuzer. 2001. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in applied microbiology*. 32(1): 47-51.
 10. Erwin, E. S, G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
 11. Glasson, C. R., R. D. Kinley, R. de Nys, N. King, S. L. Adams, M. A. Packer, and M. Magnusson. 2022. Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. *Algal Res.* 64: 102673.
 12. Hernández-Vázquez, J. M. V., H. López-Muñoz, M. L. Escobar-Sánchez, F. Flores-Guzmán, B. Weiss-Steider, J. C. Hilario-Martínez, J. Sandoval-Ramírez, M. A. Fernández-Herrera, and L. Sánchez Sánchez. 2020. Apoptotic, necrotic, and antiproliferative activity of diosgenin and diosgenin glycosides on cervical cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* Mar 15. 871: 172942.
 13. Holdt, S. L. and S. Kraan. 2011. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23: 543-597.
 14. IPCC AR6 WGI. 2021. "IPCC, 2021: Summary for policymakers".
 15. Ito, M., K. Koba, R. Hikihara, M. Ishimaru, T. Shibata, H. Hatate, and R. Tanaka. 2018. Analysis of functional components and radical scavenging activity of 21 algae species collected from the Japanese coast. *Food chemistry*. 255: 147-156.
 16. Kwon, Y. R. and K. S. Yon. 2017. Antioxidant and physiological activities of *Hijikia fusiforme* by extraction methods. *Korean Journal of Food Preservation*. 24(5): 631-637.
 17. Keskinaya, H. B., E. Deveci, E. Güneş, E. S. Okudan, C. Akköz, N. E. Gümüş, and S. Karakurt. 2022. Chemical Composition, *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activities of Marine Macroalgae *Codium fragile* (Suringar) Hariot. *Commagene J. Biol.* 6(1): 94-104.
 18. Kumar, C. S., P. Ganesan, P. V. Suresh, and N. Bhaskar. 2008. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds — A review. *J. Food Sci. Technol.* 45: 1-13.
 19. Lee, S. A., S. M. Moon, Y. H. Choi, S. H. Han, B. R. Park, M. S. Choi, and C. S. Kim. 2017. Aqueous extract of *Codium fragile* suppressed inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells and carrageenan-induced rats. *Biomed. Pharmacother.* 93: 1055-1064.

20. Machado, L., M. Magnusson, N. A. Paul, R. de Nys, and N. Tomkins. 2014. Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. *PLoS ONE*. 9(1): e85289.
21. Maia, M. R., A. J. Fonseca, H. M. Oliveira, C. Mendonça, and A. R. Cabrita. 2016. The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. *Scientific reports*. 6(1): 32321.
22. Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85: 1217-1240.
23. National Greenhouse Gas Inventory Report of Korea. 2022. Greenhouse Gas Inventory and Research Center.
24. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington, D.C. National Academy Press.
25. Newbold, C. J., B. Lassalas, and J. P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 230-234.
26. Newbold, C. J. 2010. Assessing antiprotozoal agents. In *Vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants*. 47-53.
27. Preston, T. R. and K. A. Leng. 1987. Matching Ruminant Production System with Available Resources in the Tropics and Subtropics. Penambul Books, Armidale. pp. 20-25.
28. Roque, B. M., J. K. Salwen, R. Kinley, and E. Kebreab. 2019. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *J. Clean. Prod.* 234: 132-138.
29. Sofyan, A., A. Irawan, H. Herdian, M. A. Harahap, A. A. Sakti, A. E. Suryani, H. Novianty, T. Kurniawan, I. N. G. Darma, A. Windarsih, and A. Jayanegara. 2022. Effects of various macroalgae species on methane production, rumen fermentation, and ruminant production: A meta-analysis from in vitro and in vivo experiments. *Animal Feed Sci. Technol.* 294: 115503.
30. Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed.; Cornell University Press: United State.
31. Wang, Y., Z. Xu, S. J. Bach, and T. A. Mcallister. 2008. Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*. 145(1-4): 375-395.
32. Zhou, X., L. Meile, M. Kreuzer, and J. O. Zeitz. 2013. The effect of saturated fatty acids on methanogenesis and cell viability of *Methanobrevibacter ruminantium*. *Archaea*.