

# 캐슈넛 껍질액의 메탄저감제 활용을 위한 *in vitro* 반추위 발효성상 및 메탄 발생량 평가

오준표<sup>1</sup>, 김범석<sup>2</sup>, 김종만<sup>2</sup>, 서자겸<sup>2\*</sup><sup>1</sup>카길애그리퓨리나<sup>2</sup>부산대학교 생명자원과학대학 동물생명자원학과

## Evaluation of *in vitro* rumen fermentation and methane emission using cashew nut shell liquid as a mitigation agent

Joonpyo Oh<sup>1</sup>, Beom-Seok Kim<sup>2</sup>, Jong-min Kim<sup>2</sup>, Ja-kyeom Seo<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Cargill Animal Nutrition, Seongnam, 13630 Korea<sup>2</sup>Life and Industry Convergence Research Institute, Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang 50463, KoreaReceived: Jul 17, 2025  
Revised: Aug 14, 2025  
Accepted: Aug 18, 2025

## \*Corresponding author

Ja-kyeom Seo  
Life and Industry Convergence  
Research Institute, Department of  
Animal Science, Pusan National  
University, Miryang 50463, Korea  
Tel: +82-55-350-5513  
E-mail: jseo81@pusan.ac.krCopyright © 2025 Korean Society of  
Animal Science and Technology.  
This is an Open Access article  
distributed under the terms of the  
Creative Commons Attribution  
Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>)  
which permits unrestricted  
non-commercial use, distribution,  
and reproduction in any medium,  
provided the original work is properly  
cited.

## ORCID

Joonpyo Oh  
<https://orcid.org/0000-0002-1906-5520>  
Beom-Seok Kim  
<https://orcid.org/0009-0005-0463-2712>  
Jong-min Kim  
<https://orcid.org/0009-0001-5687-5397>  
Ja-kyeom Seo  
<https://orcid.org/0000-0002-9176-5206>

## Abstract

This study evaluated the effects of different inclusion levels of cashew nut shell liquid (CNSL) on *in vitro* rumen fermentation and methane production to explore its potential as a methane-mitigating feed additive. An experimental diet (70% commercial concentrate, 30% timothy hay) was incubated with rumen fluid mixed with buffer for 48 h *in vitro*, with CNSL added at 0%, 0.02%, 0.2%, 1%, or 2% of substrate dry matter (DM). Total gas production was measured throughout incubation, and gas samples were analyzed by gas chromatography for methane content. *In vitro* dry matter digestibility (IVDMD) was determined after fermentation, and fermentation end-products including volatile fatty acid (VFA) profiles and ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) concentration were analyzed. Increasing CNSL levels led to a linear reduction in cumulative gas production (with significantly lower gas volume at 2% CNSL, particularly after 36–48 h;  $p < 0.05$ ). Methane production was dose-dependently suppressed: the proportion of methane in total gas decreased linearly as CNSL inclusion increased, and methane yield per unit substrate was reduced by 20% at the 2% CNSL level compared to the control. CNSL inclusion had no significant effect on IVDMD, NH<sub>3</sub>-N, or total VFA production. However, higher CNSL shifted the VFA profile by decreasing the acetate proportion while increasing the propionate proportion, resulting in a lower acetate-propionate ratio (with no clear effect on butyrate). In conclusion, CNSL supplementation reduced ruminal methane emissions without adverse effects on nutrient digestibility or overall fermentation, indicating that CNSL is a promising natural feed additive for methane mitigation in ruminant.

**Keywords:** Cashew nut shell liquid, Methane mitigation, *In vitro* rumen fermentation, Volatile fatty acids, Greenhouse gas emissions

**Competing interests**

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

**Funding sources**

Not applicable.

**Acknowledgements**

This research was carried out with the support of the Basic Research Support Program (2-year) funded by Pusan National University.

**Availability of data and material**

Upon reasonable request, the datasets of this study can be available from the corresponding author.

**Authors' contributions**

Conceptualization: Seo J.  
Methodology: Oh J, Seo J.  
Investigation: Oh J, Kim J.  
Data curation: Kim BS, Kim J.  
Formal analysis: Kim BS.  
Software: Oh J.  
Validation: Kim BS, Seo J.  
Writing - original draft: Kim BS, Seo J.  
Writing - review & editing: Oh J, Kim BS, Kim J, Seo J.

**Ethics approval and consent to participate**

The animal use protocol for rumen fluid collection was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Pusan National University (Approval No. PNU-2022-3168).

## 서론

지구 온난화로 인한 기후변화는 전 지구적 차원의 문제로 대두되고 있으며, 최근 2011-2020년 사이 지구 평균 표면 온도는 1850-1900년 대비 약 1.09℃ 상승한 것으로 보고되었다[1]. 주요 온실가스로는 이산화탄소(CO<sub>2</sub>), 메탄(CH<sub>4</sub>), 아산화질소(N<sub>2</sub>O), 프레온가스(CFCs), 오존(O<sub>3</sub>) 등이 있다. 특히 CH<sub>4</sub>은 CO<sub>2</sub>에 비해 배출량은 적지만 지구온난화지수(global warming potential, GWP)가 약 26배에 달해, 기후변화에 미치는 영향이 매우 크다고 알려져 있다[2]. 전 세계 온실가스 배출량 가운데 농업, 임업 및 기타 토지 이용 분야(Agriculture, Forestry and Other Land Use, AFOLU)가 약 21%를 차지하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 약 25%는 반추동물의 장내 발효과정에서 발생하는 메탄에 의해 기인하는 것으로 보고되었다[3]. 이에 따라 축산 분야의 온실가스, 특히 메탄 저감을 위한 다양한 노력과 연구가 전개되고 있다[4].

반추위 내 메탄생성균(methanogen)은 수소(H<sub>2</sub>)를 이용해 CH<sub>4</sub>을 생성하며 이 과정에서 사료 총에너지의 약 2%-12%가 손실되는 것으로 보고된다[5,6]. CH<sub>4</sub> 생성 저감 시 반추위 내 잔류 H<sub>2</sub> 농도가 상승하여 프로피온산(propionate) 생성이 촉진되며, 생성된 propionate는 간에서 포도당 신생합성의 전구체로 활용되어 가축의 에너지 공급을 강화한다[7,8]. 따라서 CH<sub>4</sub> 생성 억제제는 온실가스 배출을 저감함과 동시에 사료 에너지 이용 효율을 향상시킬 수 있다. 이러한 관점에서 반추위 내 메탄 생성 억제제를 위한 다양한 물질이 연구되고 있으며, 특히 천연 식물성 추출물이 주목받고 있다[9-11].

캐슈넛 껍질액(cashew nut shell liquid, CNSL)은 인도, 브라질, 모잠비크 등 열대 지역에서 주로 생산되는 캐슈넛 산업의 부산물로서, 높은 중합 반응성을 지녀 전통적으로 접착제·코팅제 원료로 활용된다[12]. CNSL에는 다양한 생리활성 화합물이 함유되어 있으며, 특히 주요 성분인 아나카디산(anacardic acid)은 반추위 내 그람양성균의 성장을 억제하고[13], CH<sub>4</sub> 생성을 저감하며 propionate 생성을 촉진하는 효과가 보고되었다[14]. 선행 *in vitro* 연구에서 CNSL 첨가는 CH<sub>4</sub> 생성을 최대 약 70.1% 감소시키고 propionate를 44.4% 증가시킨 바 있다[15]. 또한, *in vivo* 실험에서도 미생물 군집의 변화와 H<sub>2</sub> 생성균 억제를 통해 CH<sub>4</sub> 저감 효과가 확인되었다[16,17]. 이는 CNSL이 반추위 발효 조절 및 CH<sub>4</sub> 저감에 효과적인 사료첨가제가 될 가능성을 보여준다.

그러나 국내에서 CNSL 활용에 대한 반추위 발효성상 변화 및 CH<sub>4</sub> 저감 효과에 관한 연구는 아직 보고되지 않았으며, 향후 국내 축산 산업에서 CNSL을 메탄 저감용 사료첨가제로 활용하기 위해서는 국내 실증연구를 통한 효과 검증 및 인증이 필요하다. 따라서 본 연구의 목적은 CNSL 첨가수준에 따른 *in vitro* 반추위 발효 성상 및 메탄 저감 능력을 평가함으로써, 국내에서의 메탄 저감 사료첨가제로서 CNSL의 활용 가능성을 탐색하는 데 있다.

## 재료 및 방법

본 연구를 위한 동물 사용 및 실험 절차는 부산대학교 동물 윤리 연구 위원회에서 검토 및 승인되었다(PNU-2022-3168).

**공시재료 및 공시동물**

본 연구에서 사용된 원료는 지역 사료회사에서 구매된 티모시(Miryang nonghyup, Miryang, Korea)와 상용 배합사료(Farmsco, Ansong, Korea)이며, 이를 1 mm 체가 부착된 분쇄기(CT 293 Cyclotec™ laboratory mill, FOSS, Hillerød, Denmark)로 분쇄 후, -80℃ 초저온 냉동고(Innova®

U725 Upright Freezer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)에서 실험 전까지 보관되었다. 반추 위액 채취에 사용된 공시동물은 반추위 케놀라가 장착된 홀스타인 거세우 2두( $553 \pm 24.0$  kg)로, 조사료와 농후사료를 6:4 비율로 급여하였다. 조사료원으로는 연맥, 농후사료원으로는 상용 배합 사료(12% 조단백질[crude protein, CP], 3.5% 조지방[ether extract, EE], 26% 중성세제 불용 섬유소[neutral detergent fiber, NDF], 14.7% 산성세제 불용 섬유소[acid detergent fiber, ADF], 10% 조회분[Ash])를 1일 2회 급여하였다. 또한, 물과 미네랄 블럭은 항상 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다.

### 영양소 성분분석

실험에 사용된 공시 사료의 영양소 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 건물(dry matter, DM, #934.01)은 National Forage Testing Association 2.2.2.5에 제시된 방법에 따라 분석되었다[18]. CP(#990.03), EE(#920.39), 산성세제불용성 섬유소(ADF, #973.18), Ash(#942.05)은 AOAC에 제시된 방법에 따라 분석되었다[19]. NDF와 리그닌(acid detergent lignin, ADL)은 Van Soest et al.의 방법으로 분석되었으며[20], NDF 분석 시 열에 안정한 열 안정성  $\alpha$ -아밀라아제를 사용하였고, 잔여 ash를 포함하여 결과를 표현하였다. 실험에 사용된 CNSL은 사료첨가제 회사 (Gene Biotech, Gongju, Korea)에서 제공받았으며, 원료 내 아나카디산(anacardic acid)은 60% 함유되었다.

### In vitro 발효 평가

공시 사료로는 1 mm 이하로 분쇄한 티모시와 배합사료를 3:7의 비율로 혼합하여 사용하였으며, 이를 0.5 g(건물 기준)씩 125 mL serum bottle에 분주하였다. 각 처리구의 반복수는 4 반복으로, *in vitro* 실험에 blank를 포함하여 총 24 개의 serum bottle이 사용되었다. 처리구당 CNSL 첨가 수준은 기질 대비 0%, 0.02%, 0.2%, 1%, 2%로 설정하였다. 반추위액은 사료 급여 전 오전에 캐놀라를 장착한 홀스타인 거세우 2두( $553 \pm 24.0$  kg)로부터 채취하였으며, 채취 즉시 2 L 보온병에 담아 30분 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 반추위액은 250  $\mu$ m mesh filter를 통해

**Table 1.** The formulation of experimental diet and their chemical composition

Items <sup>1)</sup>	Value (%)
Ingredients (% DM)	
Commercial concentrate mix	70
Timothy	30
Chemical composition (% DM or as stated)	
DM (% as fed)	89.6
CP	14.5
aNDF	46.2
ADF	25.4
Lignin	4.62
EE	3.29
Ash	8.03

<sup>1)</sup>Commercial concentration mix was purchased from Farmsco (Ansung, Korea). DM, dry matter; CP, crude protein; aNDF, neutral detergent fiber assayed with heat stable  $\alpha$ -amylase; ADF, acid detergent fiber; EE, ether extract.

여과한 후, *in vitro* buffer(Goering and Van Soest, 1970)와 1:2 비율로 희석하였다[21]. 반추위액 접종 전에는 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>를 30분간 주입하여 완전한 혐기 상태를 유지하였다.

준비된 buffer를 공시사료가 담긴 serum bottle에 50 mL씩 분주한 후, butyl rubber stopper와 aluminum cap으로 밀봉하였다. 이후 밀봉된 serum bottle을 39℃로 설정된 rotary shaker(JSSI-300T, JS Research, Gongju, Korea)에서 80 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양 과정에서 가스 발생량은 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48시간에 압력 트랜스듀서(pressure transducer, Sun Bee Instrument, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였고[22], 발생한 가스는 알루미늄 가스 포집백에 모아 메탄 발생량 분석에 사용하였다. 가스 시료 내 메탄 농도는 thermal conductivity detector와 Carboxen-1000 컬럼(3.05 m × 2 mm; Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)이 장착된 가스 크로마토그래피(gas chromatography, YL6500 GC system, Young In Chromass, Anyang, Korea)를 이용해 분석하였다. 가스 시료는 Gas-tight syringe로 2 mL씩 주입하였고, 30%, 15%, 7.5% CH<sub>4</sub>(Hankook SEM, Yangsan, Korea)을 standard gas로 사용하였다. 분석 시 injector, detector의 온도는 각각 60℃-180℃, 60℃, 130℃로 설정하였으며, 이동상 가스로는 He를 사용하고 유속은 20 mL/min으로 유지하였다.

48시간 배양 종료 시 반추위액과 소화물은 공극 크기 25 μm의 나일론 백(F57 filter bag, Ankom Technology, Macedon, NY, USA)을 사용하여 여과하였다. 필터에 남은 잔유물은 65℃에서 72시간 건조 후 무게를 측정하여 *in vitro* 반추위 건물 소화율(*in vitro* dry matter degradability, IVDMD)을 계산하였다. 여과된 반추위액은 3,000 g × 15 min으로 원심분리한 후 상등액을 채취하여 휘발성 지방산(volatile fatty acids, VFA)과 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N) 분석에 사용하였다. VFA 분석용 상등액에는 25% metaphosphoric acid(w/v) 200 μL를, NH<sub>3</sub>-N 분석용 상등액에는 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 μL를 첨가한 후 vortexing하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다.

NH<sub>3</sub>-N 측정은 Chaney와 Marbach의 방법을 일부 변형하여 수행하였다[23]. 냉동 보관해둔 샘플을 4℃에서 해동한 후, 20,000 g × 15 min 원심 분리하여 상등액을 사용하였다. 상등액과 NH<sub>3</sub>-N standard를 96-well plate에 각각 2 μL씩 분주하고, alkali-hypochlorite(sodium hydroxide 25 g, sodium hypochlorite 16.8 mL, distilled water 1 L)와 phenol color reagent(phenol 50 g, sodium nitroferricyanide 0.25 g, distilled water 1 L)를 각각 100 μL씩 분주하였다. 37℃에서 15분간 반응시켜, 마이크로플레이트 리더기(microplate reader, iMARK, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 630 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

VFA 측정은 Erwin et al.의 방법에 따라 진행하였다[24]. 냉동 보관해둔 샘플을 4℃에서 해동 후 20,000 g × 15 min 원심분리하고, 상등액 200 μL를 99.9% ethanol 800 μL와 혼합하여 희석하였다. 희석된 샘플은 flame ionization detector와 Nukol Fused silica capillary 컬럼(30 m × 250 μm × 0.25 μm, Supelco, PA, USA)이 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 7890A, Agilent Technology)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 90℃에서 시작하여 90℃-200℃(15℃/min, hold 2 min), 최종 230℃(20℃/min, hold 8 min)로 설정하였으며, 질소를 이동상 가스로 사용하고 유속은 30 mL/min으로 유지하였다.

## Gas 지표

*In vitro* gas 발생량은 Schofield et al.이 제시한 단순 지수 모델(simple exponential model)을 이용하였다[25]. T는 시간(h), L은 지연시간(h), e는 자연로그, K<sub>g</sub>는 가스 발생량에 대한 분해상수(h<sup>-1</sup>), V<sub>max</sub>는 이론적 최대 가스 발생량(mL) 그리고, V<sub>T</sub>는 T 시간 당 가스 발생량(mL)을 의미한다.

$$V_T = 0(0 \leq T \leq L) \quad (1)$$

## 통계 분석

통계 분석은 GLIMMIX 절차(SAS version 9.4; SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 수행하였으며, 사용된 통계 모델은 다음과 같다.  $y_{ij}$ 는  $i$ 번째 처리군의  $j$ 번째 반복에서 측정된 값,  $\mu$ 는 전체 평균,  $T_i$ 는  $i$ 번째 처리군의 고정 효과( $i = 1-5$ ; 대조군, 0.02%, 0.2%, 1%, 2% CNSL),  $e_{ij}$ 는 실험 오차를 나타낸다.

$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (2)$$

처리 효과는 Linear 및 Quadratic 반응을 평가하기 위해 Orthogonal polynomial contrasts를 사용하여 분석하였다. 처리구 간 평균 비교는 Tukey's multiple comparison test를 통해 수행하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 검증되었고, 유의수준  $0.05 \leq p < 0.10$ 인 경우는 경향이 있는 것으로 판단하였다.

## 결과 및 고찰

CNSL의 첨가 농도에 따른 *in vitro* 반추위 내 가스 발생량과 gas parameter, CH<sub>4</sub> 발생량에 대한 결과는 Table 2에 제시하였다. *in vitro* 발효 실험에서 기질이 혐기성 발효를 통해 VFA로 전환되는 과정에서 CO<sub>2</sub>가 생성되어[26], 가스 발생량은 반추위 내 사료 분해율과 밀접한 관계에 있다. 모든 처리구에서 발효 시간이 경과함에 따라 총 가스 발생량은 증가하였다. 배양 후 24시간부터 CNSL 첨가 수준이 높아질수록 가스 발생량이 선형적으로 감소했다. 특히, 배양

**Table 2.** Gas production and parameters after *in vitro* incubation of treatments using mixed rumen fluid

Item	CNSL (%)					SEM	<i>p</i> -value	
	0	0.02	0.2	1	2		Linear	Quadratic
Gas production (mL/g DM)								
3 h	62.7 <sup>ab</sup>	59.8 <sup>b</sup>	62.2 <sup>ab</sup>	63.4 <sup>ab</sup>	65.1 <sup>a</sup>	0.82	< 0.05	0.6132
6 h	102	96.9	101	104	104	2.10	0.0815	0.4180
9 h	143	136	143	146	145	3.39	0.1790	0.3559
12 h	176	169	176	180	177	3.96	0.2915	0.2644
24 h	263	256	261	260	245	4.16	0.0213	0.0980
36 h	312 <sup>a</sup>	303 <sup>a</sup>	306 <sup>a</sup>	299 <sup>a</sup>	277 <sup>b</sup>	4.63	< 0.001	0.1095
48 h	333 <sup>a</sup>	325 <sup>a</sup>	326 <sup>a</sup>	318 <sup>a</sup>	294 <sup>b</sup>	4.55	< 0.001	0.0945
Fitted parameters of gas								
V <sub>max</sub> <sup>1)</sup>	356 <sup>a</sup>	350 <sup>ab</sup>	347 <sup>ab</sup>	333 <sup>b</sup>	300 <sup>c</sup>	5.08	< 0.001	0.1230
K <sub>g</sub> <sup>2)</sup>	0.06 <sup>c</sup>	0.06 <sup>c</sup>	0.06 <sup>bc</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.001	< 0.001	0.5022
Methane production								
%	11.6 <sup>ab</sup>	11.8 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	11.4 <sup>b</sup>	10.6 <sup>c</sup>	0.06	< 0.001	0.0677
mL/g DM	38.8 <sup>a</sup>	38.2 <sup>ab</sup>	38.4 <sup>ab</sup>	36.2 <sup>b</sup>	31.2 <sup>c</sup>	0.55	< 0.001	< 0.05
mL/g DDM	66.7 <sup>a</sup>	65.8 <sup>ab</sup>	60.3 <sup>ab</sup>	62.4 <sup>ab</sup>	51.0 <sup>b</sup>	3.30	< 0.05	0.1559

<sup>1)</sup>Theoretical maximum gas production (mL/g DM).

<sup>2)</sup>Fractional rate of gas production (h<sup>-1</sup>).

<sup>a-c)</sup>Means within a row with different superscript letters indicate significant differences among the treatments ( $p < 0.05$ ). CNSL, cashew nut shell liquid; DM, dry matter; DDM, Digestible dry matter.



36시간과 48시간 시점에서는 CNSL 2% 첨가구의 가스 발생량이 유의적으로 가장 낮았다( $p < 0.05$ ). CNSL 첨가 수준에 따른 가스 발생량의 감소는, 선행연구의 결과와 일치하였다 [15,27,28]. 이론적 최대 가스 발생량( $V_{max}$ )은 CNSL 첨가 수준에 따라 선형적으로 감소하였으며 ( $p < 0.001$ ), 2% 첨가 수준에서 가장 낮았다( $p < 0.05$ ). 또한 가스 발생에 따른 속도 상수( $K_g$ )는 CNSL 첨가 수준에 따라 증가하였으며( $p < 0.001$ ), 2% 첨가 수준에서 가장 높았다( $p < 0.05$ ).

메탄 발생량의 경우, CNSL 농도가 증가함에 따라 메탄 비율은 선형적으로 감소하였으며( $p < 0.001$ ), 2% CNSL 첨가 수준에서 가장 낮았다( $p < 0.05$ ). DM당 메탄 발생량 또한 2% CNSL 처리구에서 대조구 대비 약 20%가 감소하였고( $p < 0.05$ ), 분해된 DM당 메탄 발생량 역시 2% CNSL 처리구에서 가장 낮았으며( $p < 0.05$ ), 대조구 대비 약 24%가 감소하였다. Shinkai et al.의 연구에서 CNSL 첨가에 따라 메탄 생성량이 감소하였으며[17], Wakai et al.의 연구에서는 CNSL의 첨가에 따라 메탄 생성균과 일부 세균의 성장을 선택적으로 억제하여 메탄 생성 감소를 보고하였다[29]. 본 연구에서 또한 메탄 발생량이 감소하였고, 메탄 발생량의 감소가 미생물 군집의 변화에 의한 것인지 다른 요인에 의한 것인지 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

CNSL 첨가 농도에 따른 *in vitro* 발효 특성 차이를 비교하기 위해 IVDMD 및  $NH_3$ -N, 총 VFA 발생량, VFA 조성을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. IVDMD에서는 CNSL 첨가 수준에 따른 유의적 차이는 없었다. 반추위 내  $NH_3$ -N 농도는 사료 중 단백질이 미생물에 의해 분해되어 형성되는 주요 발효산물로, 이는 미생물의 단백질 이용 효율 및 암모니아의 미생물체 단백질 전환 효율과 밀접히 연관된다[30]. 본 연구의 반추위 내  $NH_3$ -N 농도는 처리구 간 유의적인 차이를 나타내지 않았다. VFA는 반추위 미생물이 사료 내 유기물을 분해하면서 생성되는 최종 대사 산물로, 반추위 발효 상태를 평가하는 중요한 지표이다. 본 연구에서 총 VFA 농도는 대조군과 CNSL 처리구 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 아세트산의 농도는 CNSL 농도가 증가할수록 선형적으로 감소하여, 2% CNSL 처리구에서 가장 낮았고( $p < 0.05$ ), 프로피온산 비율은 CNSL 첨가 수준이 증가함에 따라 선형적으로 증가하여( $p < 0.001$ ), 2% CNSL 처리구에서 가장 높았다( $p < 0.05$ ). 이에 따라 A:P ratio 또한 선형적으로 감소하여, 2% 첨가 수준에서 가장 낮았다( $p < 0.05$ ). 뷰티르산 조성은 처리에 따른 뚜렷한 변화 경향이 없었다.

본 연구에서는 CNSL 첨가 수준 증가에 따라 메탄 생성이 억제되고 프로피온산 비율이 증가하는 경향을 확인하였으며, 이는 선행 연구들과 일치한다. Watanabe et al.은 *in vitro* 반추위

Table 3. Analysis of fermentation characteristics using mixed rumen fluid

Item	CNSL (%)					SEM	$p$ -value	
	0	0.02	0.2	1	2		Linear	Quadratic
IVDMD (%)	58.4	58	64.7	58.2	61.2	3.22	0.9862	0.3784
$NH_3$ -N (mg/dL)	42.9	43.1	44.3	45.4	44.1	1.15	0.4495	0.3590
Total VFA (mM)	84.5	93.1	91.6	88.2	87.4	5.65	0.6516	0.7020
Fitted parameters of gas								
Acetate	619 <sup>ab</sup>	622 <sup>a</sup>	622 <sup>a</sup>	603 <sup>b</sup>	578 <sup>c</sup>	3.70	< 0.001	0.5353
Propionate	159 <sup>c</sup>	160 <sup>c</sup>	161 <sup>c</sup>	176 <sup>b</sup>	195 <sup>a</sup>	0.87	< 0.001	0.0568
Butyrate	112	113	112	110	113	0.85	0.8328	< 0.05
A:P ratio	3.89 <sup>a</sup>	3.88 <sup>a</sup>	3.86 <sup>a</sup>	3.42 <sup>b</sup>	2.96 <sup>c</sup>	0.02	< 0.001	0.5732

<sup>a-c</sup>Means within a row with different superscript letters indicate significant differences among the treatments ( $p < 0.05$ ).

CNSL, cashew nut shell liquid; IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility;  $NH_3$ -N, ammonia-nitrogen; A:P ratio, acetate to propionate ratio; VFA, volatile fatty acid.

발효 실험에서 CNSL이 메탄 발생을 최대 70%까지 유의적으로 감소시키는 동시에 프로피온산 생성은 약 44%까지 증가시킨다고 보고하였다[15]. Shinkai et al.의 *in vivo* 사양 실험 결과에서도, CNSL을 4주간 급여한 처리구에서 건물섭취량(DMI) 당 메탄 배출량이 약 19%~38% 감소하였으며, 아세트산 비율은 감소하고 프로피온산 비율은 유의적으로 증가하였다[17]. 또한, CNSL 급여 시 섬유소 분해균과 포메이트 생성균의 감소 및 프로피온산 생성균의 증가는 미생물 군집 변화가 메탄 저감과 연관됨을 시사하였다[17]. Wakai et al.은 CNSL의 주요 성분인 아나카디산이 메탄생성균에 선택적 억제 효과를 보이며, 프로피온산 생성균은 50  $\mu\text{g/mL}$  이상의 고농도에 서도 성장이 거의 저해되지 않음을 확인하였다[30]. 이는 CNSL이 메탄 생성 미생물을 선택적으로 억제함으로써 반추위 내 수소 축적을 방지하고, 상대적으로 영향을 덜 받는 프로피온산 생성균을 통해 잔여 수소가 프로피온산 합성 경로로 유입될 수 있는 기작을 제시한다. Mitsumori et al.은 CNSL 첨가로 인한 메탄 발생 저감 효과가 반추위 내 아세트산 생성 감소 및 프로피온산 생성 증가와 밀접하게 동반되었으며, 그에 따라 수소 가스 방출이 유의적으로 증가하는 대사적 변화가 확인되었다[31]. 이는 메탄 생성이 억제될 때 이용되지 않고 남은 수소 일부가 가스 형태로 방출되거나 프로피온산 합성 경로로 전환됨을 의미한다.

따라서 본 연구의 결과에서 나타난 메탄 생성 저감과 프로피온산 증가 현상은 CNSL 첨가로 인해 메탄 생성에 소비되지 않고 남은 수소가 프로피온산 생성 경로로 재분배된 결과로 해석될 수 있다. 향후 CNSL에 의한 메탄 저감 효과가 구체적으로 어떤 미생물 군집의 변화나 대사 경로의 조절에 기인하는 것인지를 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 결론

본 연구에서는 국내에서의 메탄 저감 사료첨가제로서 CNSL의 활용 가능성을 탐색을 위해 CNSL농도별 *in vitro* 발효 성상 분석 및 메탄 발생량을 분석하였다. CNSL 첨가 수준에 따른 IVDMD,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , 총 VFA 발생량의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 CNSL 첨가 수준이 높아질수록 총 가스 발생량과 메탄 발생량은 선형적 감소하였고, 프로피온산의 비율은 선형적 증가하였다. CNSL 첨가는 반추위 메탄 발생을 감소시키면서도 영양소 소화에는 큰 영향을 주지 않으므로, 잠재적으로 사료 에너지 손실을 줄여줄 가능성이 있다. 상기의 결과를 바탕으로, CNSL은 메탄 저감용 사료첨가제로서의 가능성을 보여준다. 하지만, CNSL 첨가에 따른 메탄 저감 기작을 명확히 규명하기 위해서는 반추위 내 미생물 군집의 변화에 대한 추가 분석이 필요하다. 향후 16S rRNA gene sequencing이나 metagenome 분석을 통해 CNSL이 메탄생성고세균 뿐만 아니라 프로피온산 생성과 관련된 미생물의 비율 변화에 어떤 영향을 미치는지 상세히 파악할 필요가 있다. 또한, 본 연구의 *in vitro* 결과는 반추위의 복잡한 동적 환경을 완전히 반영하지 못하므로, CNSL 첨가가 반추동물의 메탄 배출, 에너지 효율 및 성장 성적에 미치는 장기적 영향을 평가하고, 최적의 첨가 농도를 재검토하기 위한 *in vivo* 사양 실험을 할 필요가 있다.

## 요약

본 연구에서는 *in vitro* 반추위 발효 성상과 메탄 발생에 대한 캐슈넛 껍질액(CNSL)의 첨가 수준별 효과를 평가하여, 메탄 저감 사료첨가제로서 CNSL의 활용 가능성을 탐색하였다. 티모시와 상용 배합사료를 1 mm 이하로 분쇄한 후 3:7 비율로 0.5 g씩 125 mL serum bottle에 분주

하였다. 처리구당 CNSL 첨가 수준은 기질 대비 0%, 0.02%, 0.2%, 1%, 2%로 설정하였다. 홀스타인 거세우로부터 채취한 반추위액은 *in vitro* buffer와 1:2 비율로 혼합하고 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>를 30 분간 주입하여 혐기 상태를 유지한 뒤, 각 bottle에 50 mL씩 접종하였다. 시료는 39°C, 80 rpm에서 48시간 배양하였으며, 배양 중 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48시간에 가스 발생량을 측정하고 메탄 농도를 분석하였다. 배양 종료 후 잔유물로 *in vitro* 건물소화율(IVDMD)을 산출하고, 원심분리한 여과액으로 휘발성 지방산(VFA)과 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N)를 분석하였다. CNSL 첨가 수준 증가에 따라 총 가스 발생량은 선형적으로 감소하였으며, 특히 배양 36–48시간 시점에서 2% CNSL 처리구의 가스 발생량이 유의적으로 가장 낮았다( $p < 0.05$ ). 메탄 발생 또한 첨가 수준 증가에 따라 억제되어 총 가스 중 메탄 비율이 선형적으로 감소하였고, 2% 처리구에서는 단위 기질당 메탄 발생량이 대조구 대비 약 20% 감소하였다. 한편 CNSL 첨가는 IVDMD, NH<sub>3</sub>-N 농도 및 총 VFA 생성에는 유의한 영향을 미치지 않았다. 반면 VFA 조성에서는 아세트산 비율이 감소하고 프로피온산 비율이 증가하여 A:P 비율이 낮아지는 선형적 변화가 나타났으며, 부티르산 비율에는 뚜렷한 영향이 없었다. 결론적으로, CNSL 첨가는 *in vitro* 조건에서 반추위 메탄 배출과 총 가스 생산을 감소시키면서도 영양소 소화와 전반적인 발효에는 부정적인 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 CNSL이 반추동물의 메탄 저감을 위한 유망한 천연 사료첨가제가 될 수 있음을 시사한다.

## REFERENCES

1. Climate Change 2021. The physical science basis. Contribution of Working Group I to the sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC; 2021.
2. Lelieveld J, Crutzen PJ, Brühl C. Climate effects of atmospheric methane. *Chemosphere*. 1993;26:739-68. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90458-H](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90458-H)
3. Lamb WF, Wiedmann T, Pongratz J, Andrew R, Crippa M, Olivier JGJ, et al. A review of trends and drivers of greenhouse gas emissions by sector from 1990 to 2018. *Environ Res Lett*. 2021;16:073005. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abec4e>
4. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Standards established to expand the supply of methane-reducing feed. Sejong: MAFRA; 2023.
5. Newbold CJ, Lassalas B, Jouany JP. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett Appl Microbiol*. 1995;21:230-4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01048.x>
6. Russell JB. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J Dairy Sci*. 1998;81:3222-30. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75886-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75886-2)
7. Wiltrout DW, Satter LD. Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating cow. *J Dairy Sci*. 1972;55:307-17. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85487-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85487-0)
8. Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, et al. Special topics — mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. a review of



- enteric methane mitigation options. *J Anim Sci.* 2013;91:5045-69. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
9. Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM. Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J Dairy Sci.* 2014;97:3231-61. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
  10. Baca-González V, Asensio-Calavia P, González-Acosta S, Pérez de la Lastra JM, Morales de la Nuez A. Are vaccines the solution for methane emissions from ruminants? a systematic review. *Vaccines.* 2020;8:460. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030460>
  11. Menon ARR, Pillai CKS, Sudha JD, Mathew AG. Cashewnut shell liquid-its polymeric and other industrial-products. *J Sci Ind Res.* 1985;44:324-38.
  12. Kubo I, Muroi H, Himejima M, Yamagiwa Y, Mera H, Tokushima K, et al. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J Agric Food Chem.* 1993;41:1016-9. <https://doi.org/10.1021/jf00030a036>
  13. Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem.* 2006;99:555-62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.023>
  14. Van Nevel C, Demeyer DI, Henderickx HK. Effect of fatty acid derivatives on rumen methane and propionate in vitro. *Appl Microbiol.* 1971;21:365-6. <https://doi.org/10.1128/am.21.2.365-366.1971>
  15. Watanabe Y, Suzuki R, Koike S, Nagashima K, Mochizuki M, Forster RJ, et al. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. *J Dairy Sci.* 2010;93:5258-67. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2754>
  16. Su C, Shinkai T, Miyazawa N, Mitsumori M, Enishi O, Nagashima K, et al. Microbial community structure of the bovine rumen as affected by feeding cashew nut shell liquid, a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent. *Anim Sci J.* 2021;92:e13503. <https://doi.org/10.1111/asj.13503>
  17. Shinkai T, Enishi O, Mitsumori M, Higuchi K, Kobayashi Y, Takenaka A, et al. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *J Dairy Sci.* 2012;95:5308-16. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5554>
  18. Shreve B, Thiex N, Wolf M. National forage testing association reference method: dry matter by oven drying for 3 hours at 105 C. Omaha, NB: NFTA Reference Methods; National Forage Testing Association; 2006.
  19. Cunniff P, Washington D. Official methods of analysis of AOAC International. *J AOAC Int.* 1997;80:277-81. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.1.277>
  20. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991;74:3583-97. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
  21. Goering HK. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Maryland, MD: US Agricultural Research Service; 1970.
  22. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 1994;48:185-97. <https://doi.org/10.1016/0377-8401>

- (94)90171-6
23. Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem.* 1962;8:130-2. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
  24. Erwin ES, Marco GJ, Emery EM. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J Dairy Sci.* 1961;44:1768-71.
  25. Schofield P, Pitt RE, Pell AN. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J Anim Sci.* 1994;72:2980-91. <https://doi.org/10.2527/1994.72112980x>
  26. Tedeschi LO, Fox DG. The ruminant nutrition system. Livonia, MI: Xanadu; 2020.
  27. Oh S, Suzuki Y, Hayashi S, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Potency of cashew nut shell liquid in rumen modulation under different dietary conditions and indication of its surfactant action against rumen bacteria. *J Anim Sci Technol.* 2017;59:27. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0150-8>
  28. Adetunji AP, Aderinboye RY, Adebayo KO, Ojo VO, Idowu PA, Mtileni B. Effect of cashew nut shell liquid at varying inclusion levels on rumen fermentation and methane production in vitro. *J Anim Behav Biometeorol.* 2020;8:82-7. <https://doi.org/10.31893/jabb.20011>
  29. Wakai M, Hayashi S, Chiba Y, Koike S, Nagashima K, Kobayashi Y. Growth and morphologic response of rumen methanogenic archaea and bacteria to cashew nut shell liquid and its alkylphenol components. *Anim Sci J.* 2021;92:e13598. <https://doi.org/10.1111/asj.13598>
  30. Firkins JL, Yu Z, Morrison M. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *J Dairy Sci.* 2007;90:E1-E16. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-518>
  31. Mitsumori M, Enishi O, Shinkai T, Higuchi K, Kobayashi Y, Takenaka A, et al. Effect of cashew nut shell liquid on metabolic hydrogen flow on bovine rumen fermentation. *Anim Sci J.* 2014;85:227-32. <https://doi.org/10.1111/asj.12133>