

Animal Industry and Technology(축산기술과 산업) TITLE PAGE

Upload this completed form to website with submission

1
2
3

ARTICLE INFORMATION	Fill in information in each box below
Article Type	Research article
Article Title (English; within 20 words without abbreviations)	Evaluation of In Vitro Rumen Fermentation and Methane Emission Using Cashew Nut Shell Liquid as a Mitigation Agent
Article Title (Korean; English paper can be omitted)	캐슈넛 껍질액의 메탄저감제 활용을 위한 in vitro 반추위 발효성상 및 메탄 발생량 평가
Running Title (English; within 10 words)	CNSL for methane mitigation
Author (English)	Joonpyo Oh ¹ , Beom-Seok Kim ² , Jong-min Kim ² , Ja-kyeom Seo ^{2*}
Affiliation (English)	1 Cargill Animal Nutrition, Seongnam, South Korea 13630 2 Life and Industry Convergence Research Institute, Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang, 50463, Republic of Korea
Author (Korean; English paper can be omitted)	오준표 ¹ , 김범석 ² , 김종민 ² , 서자겸 ^{2*}
Affiliation (Korean; English paper can be omitted)	1 카길애그리퓨리나 2 부산대학교 생명자원과학대학 동물생명자원과학과
ORCID (for more information, please visit https://orcid.org)	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
Competing interests	No potential conflict of interest relevant to this article was reported.
Funding sources State funding sources (grants, funding sources, equipment, and supplies). Include name and number of grant if available.	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 Please specify the authors' role using this form.	Conceptualization: Seo JK. Methodology: Seo JK, Oh JP. Investigation: Oh JP, Kim JM. Data curation: Kim JM, Kim BS. Formal analysis: Kim BS. Software: Oh JP. Validation: Seo JK, Kim BS. Writing – original draft: Kim BS, Seo JK. Writing – review & editing: Oh JP, Seo JK.
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).

4
5 CORRESPONDING AUTHOR CONTACT INFORMATION

For the corresponding author (responsible for correspondence, proofreading, and reprints)	Fill in information in each box below
First name, middle initial, last name	Ja-kyeom Seo
Email address – this is where your proofs will be sent	jseo81@pusan.ac.kr
Secondary Email address	
Address	Room 3339, Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang, 50463, Republic of Korea
Cell phone number	+82-10-7202-3506
Office phone number	+82-55-350-5513
Fax number	+82-55-350-5519

6

7

ACCEPTED

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. 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 (NH₃-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, NH₃-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.

Key words : Cashew nut shell liquid; Methane mitigation; *In vitro* rumen fermentation; Volatile fatty acids; Greenhouse gas emissions

서론 (Introduction)

46

47 지구 온난화로 인한 기후변화는 전 지구적 차원의 문제로 대두되고 있으며, 최근 2011-2020년 사
48 이 지구 평균 표면 온도는 1850-1900년 대비 약 1.09°C 상승한 것으로 보고되었다[1]. 주요 온실가스
49 로는 이산화탄소(CO₂), 메탄(CH₄), 아산화질소(N₂O), 프레온가스(CFCs), 오존(O₃) 등이 있다. 특히
50 CH₄은 CO₂에 비해 배출량은 적지만 지구온난화지수(global warming potential, GWP)가 약 26배에 달
51 해, 기후변화에 미치는 영향이 매우 크다고 알려져 있다[2]. 전 세계 온실가스 배출량 가운데 농업,
52 임업 및 기타 토지 이용 분야(Agriculture, Forestry and Other Land Use, AFOLU)가 약 21%를 차지하
53 는 것으로 알려져 있으며, 이 중 약 25%는 반추동물의 장내 발효과정에서 발생하는 메탄에 의해 기
54 인하는 것으로 보고되었다[3]. 이에 따라 축산 분야의 온실가스, 특히 메탄 저감을 위한 다양한 노
55 력과 연구가 전개되고 있다[4].

56 반추위 내 메탄생성균(Methanogen)은 수소(H₂)를 이용해 CH₄을 생성하며 이 과정에서 사료 총에
57 너지의 약 2-12%가 손실되는 것으로 보고된다[5,6]. CH₄ 생성 저감 시 반추위 내 잔류 H₂ 농도가 상
58 승하여 프로피온산(Propionate) 생성이 촉진되며, 생성된 propionate은 간에서 포도당 신생합성의 전
59 구체로 활용되어 가축의 에너지 공급을 강화한다[7,8]. 따라서 CH₄ 생성 억제는 온실가스 배출을 저
60 감함과 동시에 사료 에너지 이용 효율을 향상시킬 수 있다. 이러한 관점에서 반추위 내 메탄 생성
61 억제를 위한 다양한 물질이 연구되고 있으며, 특히 천연 식물성 추출물이 주목받고 있다[9-11].

62 캐슈넛 껍질액(Cashew Nut Shell Liquid, CNSL)은 인도, 브라질, 모잠비크 등 열대 지역에서 주로
63 생산되는 캐슈넛 산업의 부산물로서, 높은 중합 반응성을 지녀 전통적으로 접착제·코팅제 원료로
64 활용된다[12]. CNSL에는 다양한 생리활성 화합물이 함유되어 있으며, 특히 주요 성분인 아나카디
65 산(anacardic acid)은 반추위 내 그람양성균의 성장을 억제하고[13], CH₄ 생성을 저감하며 propionate
66 생성을 촉진하는 효과가 보고되었다[14]. 선행 *in vitro* 연구에서 CNSL 첨가는 CH₄ 생성을 최대 약
67 70.1% 감소시키고 propionate을 44.4% 증가시킨 바 있다[15]. 또한, *in vivo* 실험에서도 미생물 군집
68 의 변화와 H₂ 생성균 억제를 통해 CH₄ 저감 효과가 확인되었다[16, 17]. 이는 CNSL이 반추위 발효

69 조절 및 CH₄ 저감에 효과적인 사료첨가제가 될 가능성을 보여준다.

70 그러나 국내에서 CNSL 활용에 대한 반추위 발효성상 변화 및 CH₄ 저감 효과에 관한 연구는 아직
71 보고되지 않았으며, 향후 국내 축산 산업에서 CNSL을 메탄 저감용 사료첨가제로 활용하기 위해서
72 는 국내 실증연구를 통한 효과 검증 및 인증이 필요하다. 따라서 본 연구의 목적은 CNSL 첨가수준
73 에 따른 *in vitro* 반추위 발효 성상 및 메탄 저감 능력을 평가함으로써, 국내에서의 메탄 저감 사료첨
74 가제로서 CNSL의 활용 가능성을 탐색하는 데 있다.

75

76 **재료 및 방법(Materials and Methods)**

77

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

80

81 **1. 공시재료 및 공시동물**

82 본 연구에서 사용된 원료는 지역 사료회사에서 구매된 티모시(Miryang nonghyup, Miryang, Korea)
83 와 상용 배합사료(Farmsco Co. Ltd, Ansung, Korea)이며, 이를 1 mm 체가 부착된 분쇄기(CT 293
84 Cyclotec™ laboratory mill, FOSS, Hillerød, Denmark)로 분쇄 후, -80°C 초저온 냉동고(Innova® U725
85 Upright Freezer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)에서 실험 전까지 보관되었다. 반추위액 채취에
86 사용된 공시동물은 반추위 케놀라가 장착된 홀스타인 거세우 2두(553±24.0 kg)로, 조사료와 농후사
87 료를 6:4 비율로 급여하였다. 조사료원으로는 연맥, 농후사료원으로는 상용 배합사료(12% 조단백질
88 (crude protein, CP), 3.5% 조지방(ether extract, EE), 26% 중성세제 불용 섬유소(neutral detergent fiber,
89 NDF), 14.7% 산성세제 불용 섬유소(acid detergent fiber, ADF), 10% 조회분(Ash))를 1일 2회 급여하
90 였다. 또한, 물과 미네랄 블록은 항상 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다.

91

92 **2. 영양소 성분분석**

93 실험에 사용된 공시 사료의 영양소 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 건물(dry matter, DM,
94 #934.01)은 National Forage Testing Association 2.2.2.5에 제시된 방법에 따라 분석되었다[18].
95 CP(#990.03), EE(#920.39), 산성세제불용성 섬유소(acid detergent fiber, ADF, #973.18), Ash(#942.05)
96 은 AOAC에 제시된 방법에 따라 분석되었다[19]. NDF와 리그닌(acid detergent lignin, ADL)은 Van
97 Soest 등의 방법으로 분석되었으며[20], NDF 분석 시 열에 안정한 열 안정성 α -아밀라아제를 사용
98 하였고, 잔여 ash를 포함하여 결과를 표현하였다. 실험에 사용된 CNSL은 사료첨가제 회사(Gene
99 Biotech Co. Ltd, Gongju, Korea)에서 제공받았으며, 원료 내 아나카딕산(anacardic acid)은 60% 함유
100 되었다.

101 **3. *In vitro* 발효 평가**

102 공시 사료로는 1 mm 이하로 분쇄한 티모시와 배합사료를 3:7의 비율로 혼합하여 사용하였으며,
103 이를 0.5 g(건물 기준)씩 125 mL serum bottle에 분주하였다. 각 처리구의 반복수는 4 반복으로, *in*
104 *vitro* 실험에 Blank를 포함하여 총 24 개의 serum bottle이 사용되었다. 처리구당 CNSL 첨가 수준은
105 기질 대비 0%, 0.02%, 0.2%, 1%, 2%로 설정하였다. 반추위액은 사료 급여 전 오전에 캐놀라를 장착
106 한 홀스타인 거세우 2두(553±24.0 kg)로부터 채취하였으며, 채취 즉시 2 L 보온병에 담아 30분 이내
107 에 실험실로 운반하였다. 운반된 반추위액은 250 μ m mesh filter를 통해 여과한 후, *in vitro*
108 buffer(Goering and Van Soest, 1970)와 1:2 비율로 희석하였다[21]. 반추위액 접종 전에는 O₂-free CO₂
109 를 30분 간 주입하여 완전한 혐기 상태를 유지하였다.

110 준비된 buffer를 공시사료가 담긴 serum bottle에 50 mL씩 분주한 후, butyl rubber stopper와
111 aluminum cap으로 밀봉하였다. 이후 밀봉된 serum bottle을 39°C로 설정된 rotary shaker(JSSI-300T, JS
112 Research, Gongju, Korea)에서 80 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양 과정에서 가스 발생량은 3,
113 6, 9, 12, 24, 36, 48시간에 압력 트랜스듀서(pressure transducer, Sun Bee Instrument, Seoul, Korea)를 이

114 용하여 측정하였고[22], 발생한 가스는 알루미늄 가스 포집백에 모아 메탄 발생량 분석에 사용하였
115 다. 가스 시료 내 메탄 농도는 thermal conductivity detector와 Carboxen-1000 컬럼(3.05 m × 2 mm;
116 Agilent Technology, CA, USA)이 장착된 가스 크로마토그래피(gas chromatography, YL6500 GC
117 system, Young In Chromass, Gyeonggi-do, Korea)를 이용해 분석하였다. 가스 시료는 Gas-tight syringe
118 로 2 mL씩 주입하였고, 30%, 15%, 7.5% CH₄(Hankook SEM, Yangsan, Korea)을 standard gas로 사용하
119 였다. 분석 시 injector, detector의 온도는 각각 60–180°C, 60°C, 130°C로 설정하였으며, 이동상 가스
120 로는 He을 사용하고 유속은 20 mL/min으로 유지하였다.

121 48시간 배양 종료 시 반추위액과 소화물은 공극 크기 25 μm의 나일론 백(F57 filter bag, Ankom
122 Technology Corp., NY, USA)을 사용하여 여과하였다. 필터에 남은 잔유물은 65°C에서 72시간 건조
123 후 무게를 측정하여 *In vitro* 반추위 건물 소화율(*In vitro* dry matter degradability, IVDMD)을 계산하
124 였다. 여과된 반추위액은 3,000 g × 15 min으로 원심분리한 후 상등액을 채취하여 휘발성 지방산
125 (volatile fatty acids, VFA)과 암모니아성 질소(NH₃-N) 분석에 사용하였다. VFA 분석용 상등액에는
126 25% metaphosphoric acid(w/v) 200 μL를, NH₃-N 분석용 상등액에는 0.2 M H₂SO₄ 200 μL를 첨가한 후
127 vortexing하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

128 NH₃-N 측정은 Chaney와 Marbach의 방법을 일부 변형하여 수행하였다[23]. 냉동 보관해둔 샘플을
129 4°C에서 해동한 후, 20,000 g × 15 min 원심 분리하여 상등액을 사용하였다. 상등액과 NH₃-N standard
130 를 96-well plate에 각각 2 μL씩 분주하고, alkali-hypochlorite(sodium hydroxide 25 g, sodium
131 hypochlorite 16.8 mL, distilled water 1 L)와 phenol color reagent(phenol 50 g, sodium nitroferricyanide
132 0.25 g, distilled water 1 L)를 각각 100 μL씩 분주하였다. 37°C에서 15분간 반응시켜, 마이크로플레이
133 트 리더기 (microplate reader, iMARK, Bio-Rad Inc., CA, USA)를 이용하여 630 nm 파장에서 흡광도
134 를 측정하였다.

135 VFA 측정은 Erwin 등의 방법에 따라 진행하였다[24]. 냉동 보관해둔 샘플을 4°C에서 해동 후

136 20,000 g × 15 min 원심분리하고, 상등액 200 μL를 99.9% ethanol 800 μL와 혼합하여 희석하였다. 희
137 석된 샘플은 flame ionization detector와 Nukol Fused silica capillary 컬럼(30 m × 250 μm × 0.25 μm,
138 Supelco Inc., PA, USA)이 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 7890A, Agilent Technology, CA, USA)
139 를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 .90°C에서 시작하여 90–200°C(15°C/min, hold 2 min), 최종
140 230°C(20°C/min, hold 8 min)로 설정하였으며, 질소를 이동상 가스로 사용하고 유속은 30 mL/min으
141 로 유지하였다.

142

143 4. Gas 지표

144 *in vitro* gas 발생량은 Schofield 등이 제시한 단순 지수 모델(simple exponential model)을 이용하였
145 다[25]. T는 시간(h), L은 지연시간(h), e는 자연로그, K_g 는 가스 발생량에 대한 분해상수(h⁻¹), V_{max} 는
146 이론적 최대 가스 발생량(mL) 그리고, V_T 는 T 시간 당 가스 발생량(mL)을 의미한다.

147

$$148 \quad V_T = 0(0 \leq T \leq L)$$

$$149 \quad V_T = V_{max} \times [1 - e^{-K_g \times (T-L)}](T \geq L)$$

150

151 5. 통계 분석

152 통계 분석은 GLIMMIX 절차(SAS version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 수행
153 하였으며, 사용된 통계 모델은 다음과 같다. y_{ij} 는 i번째 처리군의 j번째 반복에서 측정된 값, μ 는 전
154 체 평균, T_i 는 i번째 처리군의 고정 효과($i = 1-5$; 대조군, 0.02%, 0.2%, 1%, 2% CNSL), e_{ij} 는 실험 오차
155 를 나타낸다.

156

$$157 \quad y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

158

159 처리 효과는 Linear 및 Quadratic 반응을 평가하기 위해 Orthogonal polynomial contrasts를 사용하

183 CNSL 첨가 농도에 따른 *in vitro* 발효 성상 차이를 비교하기 위해 IVDMD 및 $\text{NH}_3\text{-N}$, 총 VFA 발생
184 량, VFA 조성을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. IVDMD에서는 CNSL 첨가 수준에 따른 유의
185 적 차이는 없었다. 반추위 내 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도는 사료 중 단백질이 미생물에 의해 분해되어 형성되는 주
186 요 발효산물로, 이는 미생물의 단백질 이용 효율 및 암모니아의 미생물체 단백질 전환 효율과 밀접
187 히 연관된다[29]. 본 연구의 반추위 내 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도는 처리구 간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.
188 VFA는 반추위 미생물이 사료 내 유기물을 분해하면서 생성되는 최종 대사 산물로, 반추위 발효 상
189 태를 평가하는 중요한 지표이다. 본 연구에서 총 VFA 농도는 대조군과 CNSL 처리구 간에 유의한
190 차이를 보이지 않았다. 그러나 아세트산의 농도는 CNSL 농도가 증가할수록 선형적으로 감소하여,
191 2% CNSL 처리구에서 가장 낮았고($p<0.05$), 프로피온산 비율은 CNSL 첨가 수준이 증가함에 따라
192 선형적으로 증가하여($p<0.001$), 2% CNSL 처리구에서 가장 높았다($p<0.05$). 이에 따라 A:P ratio 또한
193 선형적으로 감소하여, 2% 첨가 수준에서 가장 낮았다($p<0.05$). 뷰티르산 조성은 처리에 따른 뚜렷
194 한 변화 경향이 없었다.

195 본 연구에서는 CNSL 첨가 수준 증가에 따라 메탄 생성이 억제되고 프로피온산 비율이 증가하는
196 경향을 확인하였으며, 이는 선행 연구들과 일치한다. Watanabe 등은 *In vitro* 반추위 발효 실험에서
197 CNSL이 메탄 발생을 최대 70%까지 유의적으로 감소시키는 동시에 프로피온산 생성은 약 44%까
198 지 증가시킨다고 보고하였다[15]. Shinkai 등의 *in vivo* 사양 실험 결과에서도, CNSL을 4주간 급여한
199 처리구에서 건물섭취량(DMI) 당 메탄 배출량이 약 19~38% 감소하였으며, 아세트산 비율은 감소하
200 고 프로피온산 비율은 유의적으로 증가하였다[17]. 또한, CNSL 급여 시 섬유소 분해균과 포메이트
201 생성균의 감소 및 프로피온산 생성균의 증가는 미생물 군집 변화가 메탄 저감과 연관됨을 시사하
202 였다[17]. Wakai 등은 CNSL의 주요 성분인 아나카딕산이 메탄생성균에 선택적 억제 효과를 보이
203 며, 프로피온산 생성균은 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 고농도에서도 성장이 거의 저해되지 않음을 확인하였다
204 [30]. 이는 CNSL이 메탄 생성 미생물을 선택적으로 억제함으로써 반추위 내 수소 축적을 방지하고,
205 상대적으로 영향을 덜 받는 프로피온산 생성균을 통해 잔여 수소가 프로피온산 합성 경로로 유입

206 될 수 있는 기작을 제시한다. Mitsumori 등은 CNSL 첨가로 인한 메탄 발생 저감 효과가 반추위 내
207 아세트산 생성 감소 및 프로피온산 생성 증가와 밀접하게 동반되었으며, 그에 따라 수소 가스 방출
208 이 유의적으로 증가하는 대사적 변화가 확인되었다[31]. 이는 메탄 생성이 억제될 때 이용되지 않
209 고 남은 수소 일부가 가스 형태로 방출되거나 프로피온산 합성 경로로 전환됨을 의미한다.

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

214

215 결론(Conclusion)

216

217 본 연구에서는 국내에서의 메탄 저감 사료첨가제로서 CNSL의 활용 가능성을 탐색을 위해
218 CNSL농도별 *in vitro* 발효 성상 분석 및 메탄 발생량을 분석하였다. CNSL 첨가 수준에 따른
219 IVDMD, NH₃-N, 총 VFA 발생량의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 CNSL 첨가 수준이 높아
220 질수록 총 가스 발생량과 메탄 발생량은 선형적 감소하였고, 프로피온산의 비율은 선형적 증가
221 하였다. CNSL 첨가는 반추위 메탄 발생을 감소시키면서도 영양소 소화에는 큰 영향을 주지 않으
222 므로, 잠재적으로 사료 에너지 손실을 줄여줄 가능성이 있다. 상기의 결과를 바탕으로, CNSL은
223 메탄 저감용 사료첨가제로서의 가능성을 보여준다. 하지만, CNSL 첨가에 따른 메탄 저감 기작
224 을 명확히 규명하기 위해서는 반추위 내 미생물 군집의 변화에 대한 추가 분석이 필요하다. 향후
225 16S rRNA gene sequencing이나 Metagenome 분석을 통해 CNSL이 메탄생성고세균뿐만 아니라 프
226 로피온산 생성과 관련된 미생물의 비율 변화에 어떤 영향을 미치는지 상세히 파악할 필요가 있
227 다. 또한, 본 연구의 *in vitro* 결과는 반추위의 복잡한 동적 환경을 완전히 반영하지 못하므로,
228 CNSL 첨가가 반추동물의 메탄 배출, 에너지 효율 및 성장 성적에 미치는 장기적 영향을 평가하
229 고, 최적의 첨가 농도를 재검토하기 위한 *in vivo* 사양 실험을 할 필요가 있다.

ACCEPTED

231

232

요약 (Korean Abstract)

233

234 본 연구에서는 *in vitro* 반추위 발효 성상과 메탄 발생에 대한 캐슈넛 껍질액(CNSL)의 첨가 수준별
235 효과를 평가하여, 메탄 저감 사료첨가제로서 CNSL 의 활용 가능성을 탐색하였다. 티모시와 상용
236 배합사료를 1 mm 이하로 분쇄한 후 3:7 비율로 0.5 g 씩 125 mL serum bottle 에 분주하였다. 처리구당
237 CNSL 첨가 수준은 기질 대비 0%, 0.02%, 0.2%, 1%, 2%로 설정하였다. 홀스타인 거세우로부터
238 채취한 반추위액은 *in vitro* buffer 와 1:2 비율로 혼합하고 O₂-free CO₂를 30 분간 주입하여 혐기
239 상태를 유지한 뒤, 각 bottle 에 50 mL 씩 접종하였다. 시료는 39°C, 80 rpm 에서 48 시간 배양하였으며,
240 배양 중 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 시간에 가스 발생량을 측정하고 메탄 농도를 분석하였다. 배양 종료 후
241 잔유물로 *in vitro* 건물소화율(IVDMD)을 산출하고, 원심분리한 여과액으로 휘발성 지방산(VFA)과
242 암모니아성 질소(NH₃-N)를 분석하였다. CNSL 첨가 수준 증가에 따라 총 가스 발생량은 선형적으로
243 감소하였으며, 특히 배양 36-48 시간 시점에서 2% CNSL 처리구의 가스 발생량이 유의적으로 가장
244 낮았다($p < 0.05$). 메탄 발생 또한 첨가 수준 증가에 따라 억제되어 총 가스 중 메탄 비율이 선형적으로
245 감소하였고, 2% 처리구에서는 단위 기질당 메탄 발생량이 대조구 대비 약 20% 감소하였다. 한편
246 CNSL 첨가는 IVDMD, NH₃-N 농도 및 총 VFA 생성에는 유의한 영향을 미치지 않았다. 반면 VFA
247 조성에서는 아세트산 비율이 감소하고 프로피온산 비율이 증가하여 A:P 비율이 낮아지는 선형적
248 변화가 나타났으며, 뷰티르산 비율에는 뚜렷한 영향이 없었다. 결론적으로, CNSL 첨가는 *in*
249 *vitro* 조건에서 반추위 메탄 배출과 총 가스 생산을 감소시키면서도 영양소 소화와 전반적인
250 발효에는 부정적인 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 CNSL 이 반추동물의 메탄 저감을 위한
251 유망한 천연 사료첨가제가 될 수 있음을 시사한다.

252

253

Acknowledgments

254

255 이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

256

ACCEPTED

257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291

References

- [01]. Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2021.
- [02]. Lelieveld J, Crutzen P, Brühl C. Climate effects of atmospheric methane. *Chemosphere*. 1993;26(1-4):739-68.
- [03]. Lamb WF, Wiedmann T, Pongratz J, Andrew R, Crippa M, Olivier JG, et al. A review of trends and drivers of greenhouse gas emissions by sector from 1990 to 2018. *Environmental research letters*. 2021;16(7):073005.
- [04]. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2023. Standards established to expand the supply of methane-reducing feed. Sejong (Korea): MAFRA.
- [05]. Newbold C, Lassalas B, Jouany J. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in applied microbiology*. 1995;21(4):230-4.
- [06]. Russell J. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*. 1998;81(12):3222-30.
- [07]. Wiltrout D, Satter L. Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating cow. *Journal of Dairy Science*. 1972;55(3):307-17.
- [08]. Hristov A, Oh J, Firkins J, 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. *Journal of animal science*. 2013;91(11):5045-69.
- [09]. Knapp JR, Laur G, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of dairy science*. 2014;97(6):3231-61.
- [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(3):460.
- [11]. Menon A, Pillai C, Sudha J, Mathew A. CASHEWNUT SHELL LIQUID-ITS POLYMERIC AND OTHER INDUSTRIAL-PRODUCTS. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 1985;44(6):324-38.
- [12]. Kubo I, Muroi H, Himejima M, Yamagiwa Y, Mera H, Tokushima K, et al. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993;41(6):1016-9.
- [13]. Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry*. 2006;99(3):555-62.

- 292 [14]. Van Nevel C, Demeyer D, Henderickx H. Effect of fatty acid derivatives on rumen methane and
293 propionate in vitro. *Applied Microbiology*. 1971;21(2):365-6.
- 294 [15]. Watanabe Y, Suzuki R, Koike S, Nagashima K, Mochizuki M, Forster R, et al. In vitro evaluation
295 of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants.
296 *Journal of dairy science*. 2010;93(11):5258-67.
- 297 [16]. Su C, Shinkai T, Miyazawa N, Mitsumori M, Enishi O, Nagashima K, et al. Microbial community
298 structure of the bovine rumen as affected by feeding cashew nut shell liquid, a methane-inhibiting
299 and propionate-enhancing agent. *Animal science journal*. 2021;92(1):e13503.
- 300 [17]. Shinkai T, Enishi O, Mitsumori M, Higuchi K, Kobayashi Y, Takenaka A, et al. Mitigation of
301 methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *Journal of dairy science*.
302 2012;95(9):5308-16.
- 303 [18]. Shreve B, Thiex N, Wolf M. National forage testing association reference method: dry matter by
304 oven drying for 3 hours at 105 C. NFTA Reference Methods National Forage Testing Association,
305 Omaha, NB. 2006.
- 306 [19]. Cunniff P, Washington D. Official methods of analysis of AOAC International. *J AOAC Int*.
307 1997;80(6):127A.
- 308 [20]. Van Soest Pv, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and
309 nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*.
310 1991;74(10):3583-97.
- 311 [21]. Goering HK. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications): US
312 Agricultural Research Service; 1970.
- 313 [22]. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production
314 method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds.
315 *Animal feed science and technology*. 1994;48(3-4):185-97.
- 316 [23]. Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical*
317 *chemistry*. 1962;8(2):130-2.
- 318 [24]. Erwin E, Marco GJ, Emery E. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas
319 chromatography. 1961.
- 320 [25]. Schofield P, Pitt R, Pell A. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of*
321 *animal science*. 1994;72(11):2980-91.
- 322 [26]. Tedeschi LO, Fox DG. RUMINANT NUTRITION SYSTEM: XANEDU PUBLISHING
323 Incorporated; 2020.
- 324 [27]. Oh S, Suzuki Y, Hayashi S, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Potency of cashew nut shell liquid
325 in rumen modulation under different dietary conditions and indication of its surfactant action
326 against rumen bacteria. *Journal of Animal Science and Technology*. 2017;59:1-7.

- 327 [28].Adetunji AP, Aderinboye RY, Adebayo KO, Ojo VO, Idowu PA, Mtileni B. Effect of cashew nut
328 shell liquid at varying inclusion levels on rumen fermentation and methane production in vitro.
329 Journal of Animal Behaviour and Biometeorology. 2020;8(2):82-7.
- 330 [29].Firkins J, Yu Z, Morrison M. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for integration of
331 microbiology and nutrition for dairy. Journal of dairy science. 2007;90:E1-E16.
- 332 [30].Wakai M, Hayashi S, Chiba Y, Koike S, Nagashima K, Kobayashi Y. Growth and morphologic
333 response of rumen methanogenic archaea and bacteria to cashew nut shell liquid and its
334 alkylphenol components. Animal Science Journal. 2021;92(1):e13598.
- 335 [31].Mitsumori M, Enishi O, Shinkai T, Higuchi K, Kobayashi Y, Takenaka A, et al. Effect of cashew
336 nut shell liquid on metabolic hydrogen flow on bovine rumen fermentation. Animal Science
337 Journal. 2014;85(3):227-32.

ACCEPTED

338 **Tables and Figures**

339

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

Items ¹⁾	
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

341 ¹⁾Commercial concentration mix was purchased from (Farmsco Inc., Seongnam-si, Korea); DM, dry matter; CP, crude
 342 protein; aNDF, neutral detergent fiber assayed with heat stable alpha-amylase; ADF, acid detergent fiber; EE, ether
 343 extract.
 344

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

Item	CNSL					SEM	p-value	
	0%	0.02%	0.2%	1%	2%		Linear	Quadratic
Gas production (ml/g DM)								
3 h	62.7 ^{ab}	59.8 ^b	62.2 ^{ab}	63.4 ^{ab}	65.1 ^a	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 ^a	303 ^a	306 ^a	299 ^a	277 ^b	4.63	<0.001	0.1095
48 h	333 ^a	325 ^a	326 ^a	318 ^a	294 ^b	4.55	<0.001	0.0945
Fitted parameters of gas								
V _{max} ¹⁾	356 ^a	350 ^{ab}	347 ^{ab}	333 ^b	300 ^c	5.08	<0.001	0.1230
K _g ²⁾	0.06 ^c	0.06 ^c	0.06 ^{bc}	0.06 ^b	0.07 ^a	0.001	<0.001	0.5022
Methane production								
%	11.6 ^{ab}	11.8 ^a	11.8 ^a	11.4 ^b	10.6 ^c	0.06	<0.001	0.0677
ml/g DM	38.8 ^a	38.2 ^{ab}	38.4 ^{ab}	36.2 ^b	31.2 ^c	0.55	<0.001	<0.05
ml/g DDM	66.7 ^a	65.8 ^{ab}	60.3 ^{ab}	62.4 ^{ab}	51.0 ^b	3.30	<0.05	0.1559

346 CNSL, cashew nut shell liquid; SEM, standard error of the mean; DM, dry matter; DDM, Digestible dry matter.

347 ¹⁾Theoretical maximum gas production (mL/g DM).

348 ²⁾Fractional rate of gas production (h⁻¹).

349 ^{a,b,c}means within a row with different superscript letters indicate significant differences among the treatments (p<0.05)

350

351 **Table 3. Analysis of fermentation characteristics using mixed rumen fluid.**

Item	CNSL					SEM	<i>p</i> -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 ^{ab}	622 ^a	622 ^a	603 ^b	578 ^c	3.70	<0.001	0.5353
Propionate	159 ^c	160 ^c	161 ^c	176 ^b	195 ^a	0.87	<0.001	0.0568
Butyrate	112	113	112	110	113	0.85	0.8328	<0.05
A:P ratio	3.89 ^a	3.88 ^a	3.86 ^a	3.42 ^b	2.96 ^c	0.02	<0.001	0.5732

352 CNSL, cashew nut shell liquid; SEM, standard error of the mean; IVDMD, in vitro dry matter digestibility; NH₃-N,
 353 ammonia-nitrogen; A:P ratio, acetate to propionate ratio; VFA, volatile fatty acid
 354 ^{a,b,c}means within a row with different superscript letters indicate significant differences among the treatments (*p*<0.05)