

# Methyl-Coenzyme M Reductase 억제제 첨가가 *in vitro* 반추위 발효성상과 메탄 생성에 미치는 영향

박철주\*, 김민석\*, 이인표\*\*, 김미옥\*\*, 이창훈\*\*

\*전남대학교 동물자원학부

\*\*㈜에스씨바이오

\*e-mail: qkrcjfwon@naver.com

## Effects of Methyl-Coenzyme M Reductase inhibitors on *in vitro* rumen fermentation characteristics and methane emissions.

Cheol-Ju Park\*, Minseok Kim\*, In Pyo Lee\*\*, Miok Kim\*\*, Chang Hoon Lee\*\*

\*Division of Animal Science, Chonnam National University

\*\*R&D Center, SCBIO Co, Ltd

### 요약

본 연구에서는 Methyl-coenzymeM reductase(MCR) 효소를 억제하는 MCR inhibitor를 합성하고, 이 화합물이 *in vitro* 반추위 발효성상과 메탄 발생량에 미치는 영향을 조사하였다. MCR inhibitor를 첨가하지 않은 그룹을 대조구로 하고 MCR inhibitor를 0.001% 첨가한 그룹을 처리구로 하여 *in vitro* 배양을 수행하였다. 배양 24시간 후에 대조구와 처리구에서 pH, 건물 소화율, 총 가스 발생량 및 메탄 발생량을 측정 후 비교분석하였다. 건물 소화율은 유의적인 차이가 없었으나, pH는 MCR inhibitor 처리에서 유의적으로 증가하였다. 총 가스 발생량은 유의적인 차이가 없었으나, 메탄 발생량 및 건물 g 당 메탄 발생량은 MCR inhibitor를 첨가한 그룹에서 유의적으로 감소하였다. 본 연구 결과 *in vitro* 상에서 MCR inhibitor의 첨가는 반추위 발효 성상에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 메탄 저감 효과가 있는 것으로 나타났으며, 향후 동물실험을 통해 MCR inhibitor가 반추동물의 반추위 대사와 메탄발생량에 미치는 영향을 검증해야 할 것으로 판단된다.

## 1. 서론

메탄(CH<sub>4</sub>)은 온실가스에 기여하는 물질이며, 지구온난화지수(global warming potentia)가 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)보다 약 28배 더 높은 것으로 알려져 있다 [1]. 반추동물의 장내 메탄 발생량은 전 세계 온실가스 배출량의 최대 17%를 차지하며, 사료 에너지 손실량의 2~12%를 반영한다 [2,3]. 전 세계적으로 육제품과 유제품에 대한 수요가 증가함에 따라 반추동물의 장내발효 메탄 발생량을 감소시킬 수 있는 연구들이 지속적으로 진행되고 있다.

반추위에 서식하는 메탄생성균(Methanogen)은 주로 H<sub>2</sub>와 CO<sub>2</sub>를 기질로 사용하여 메탄을 생성한다. [4]. 메탄생성균에 존재하는 Methyl-coenzyme M reductase(MCR)는 메탄 생성과정의 마지막 단계에서 필수적인 환원효소로서, methyl thioether methyl-coenzyme M과 thiol coenzyme B를 기질로 하여 메탄으로 환원시키는 역할을 한다 [5, 6]. 지금까지 연구된 대부분의 메탄저감제는 장기적인 효과를 보여주지 못하였지만, 최근 연구에 의하면 3-nitrooxypropanol(3NOP) 화합물이 MCR 효소를 억제하여 반추동물에 첨가 시 장기적인 메탄저감효과를 보여주었다 [7]. 본 연구에서 메탄생성균의 MCR

효소를 억제하는 새로운 화합물을 합성하고, 이 화합물이 *in vitro* 반추위 발효성상과 메탄 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 MCR inhibitor 합성

물질합성에 필요한 모든 재료는 상업적 공급자로부터 얻었으며 더 이상 정제하지 않고 사용하였으며 용매는 산화알루미늄 킬럼을 사용하여 건조하였다. 코팅된 실리카 겔 60 F254 플레이트에서 박층 크로마토그래피를 수행했습니다. 중간체의 정제는 순상 칼럼 크로마토그래피(MPLC, Silica gel 230-400 mesh)로 수행하였다. NMR 스펙트럼은 Avance 300 MHz(Bruker, Billerica, MA, USA)에서 기록하였다. LC/MS 데이터는 Waters 2695 LC 및 Micromass ZQ를 사용하였다.

### 2.2 공시재료 및 *in vitro* 실험 설계

국립 전남대학교 한우실습장의 3마리 한우로부터 반추위액을 채취한 후 4겹의 cheese cloth로 여과하였다. 여과된 반추

위액은 Mcdougall's buffer와 1:2 비율로 혼합하여, CO<sub>2</sub> gas 로 bubbling을 한 후 *in vitro* 배양액으로 사용하였다 [8]. 혐기상태(CO<sub>2</sub> gas)를 유지하면서 60mL serum bottle에 *in vitro* 배양액 15mL를 분주하고 기질 0.3g TMR 사료(CP 11.5%, EE 5.1%, NDF 52.2%, ADF 27.0%)와 합성된 MCR inhibitor를 기질 대비 0.001% 수준으로 첨가한 후 butyl rubber stopper와 aluminum seal로 밀봉하였다. 모든 처리구는 3반복 실험을 진행하였으며, 24시간 동안 39°C, 70rpm으로 설정된 shaking incubator(HB-201SF, Hanbaek scientific Co.)에서 배양하였다.

### 2.3 반추위 가스 및 메탄 발생량

Serum bottle를 shaking incubator에서 꺼낸 후 150mL glass syringe를 이용하여 총 가스 발생량을 측정하였다. Syringe를 통해 포집된 가스는 tedlar bag에 이동시킨 후 Porapak Q 80/100 column(60m x 0.125mm x 0.25um, Agilent)과 flame ionization detector가 장착된 gas chromatography(Trace 1310, Thermo fisher scientific Inc.)에서 메탄 발생량을 측정하였다.

### 2.4 반추위 발효성상

총 가스 발생량을 측정한 후 배양이 완료된 serum bottle의 내용물을 50mL conical tube에 이동시켜, 10분 동안 4°C, 16,000xg로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액의 pH는 pH meter(ST300, OHAUS Co.)를 이용하여 측정하였으며, conical tube의 내용물은 filter paper에 여과 후 48시간 동안 60°C에서 건조하여, 기질의 잔량을 측정하였다. 건물 소화율은 건조 후 기질의 양과 투입된 기질의 양의 차이 값을 백분율로 환산하여 구하였다.

### 2.5 통계 분석

MCR Inhibitor가 반추위 발효성상과 메탄 발생량에 미치는 영향을 파악하기 위해 XLSTAT (version 2022.1.1)를 이용하여 통계처리를 진행하였다. 각 그룹별로 측정된 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 5%( $p < 0.05$ ) 수준에서 student's t-test 분석을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

pH 및 건물 소화율은 Table 1에 명시하였다. 건물 소화율은

MCR Inhibitor의 첨가에 따른 유의적인 차이가 없었으나, pH는 MCR Inhibitor에서 유의적으로 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 반추위 pH는 반추위 발효속도와 미생물의 생육에 적합한 환경을 파악할 수 있는 지표로서 활용된다 [9]. 본 연구 결과 반추위 pH는 반추위 발효에 부정적인 영향이 없는 수준이었으며 [10], 건물 소화율에 유의적인 차이가 없음을 보았을 때 MCR inhibitor는 반추위 발효와 미생물의 성장에 부정적인 효과가 없을 것으로 판단된다.

총 가스 발생량 및 메탄 발생량은 Table 2에 명시하였다. 총 가스 발생량은 유의적인 차이가 없었으나, 메탄 발생량 및 건물 g 당 메탄 발생량은 MCR inhibitor 첨가 시 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 이전의 연구에 의하면 3-Nitrooxypropanol(3-NOP) 화합물은 coenzyme M과 구조적으로 유사하며, coenzyme M대신 coenzyme B에 결합되어 특이적으로 MCR의 활성을 억제하여, 반추위 메탄 발생량을 유의적으로 감소시킬 수 있는 물질로 보고되었다 [11]. 본 연구에 첨가된 MCR Inhibitor 또한 3-NOP 화합물과 유사한 작용을 하여 메탄 발생량을 감소시킨 것으로 판단되며, MCR Inhibitor는 반추위 발효 성상에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 메탄 저감 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Effect of a MCR inhibitor on rumen fermentation characteristics after *in vitro* incubation.

Items	pH	DMD <sup>1)</sup> (%)
Control	6.550 <sup>b</sup>	51.000
MCR Inhibitor	6.573 <sup>a</sup>	48.722
SEM	0.005	0.007
<i>P</i> -value	0.028	0.051

<sup>1)</sup> DMD : dry matter digestibility

<sup>a-c</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

SEM, Standard error of the mean.

Table 2. Effect of a MCR inhibitor on gas production after *in vitro* incubation.

Items	TG <sup>1)</sup> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL/g DDM <sup>2)</sup> )
Control	101.333	8.545 <sup>a</sup>	55.869 <sup>a</sup>
MCR Inhibitor	103.000	7.393 <sup>b</sup>	50.588 <sup>b</sup>
SEM	0.894	0.215	1.254
<i>P</i> -value	0.370	0.002	0.026

<sup>1)</sup> TG : total gas production

<sup>2)</sup> DDM : digested dry matter

<sup>a-c</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

SEM, Standard error of the mean.

## 4. 결론

본 연구 결과 *in vitro* 상에서 MCR Inhibitor의 첨가는 반추위 발효 성상에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 메탄 저감 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 MCR Inhibitor가 메탄생

성과정에서 관여하는 환원효소인 MCR의 활성을 억제시킨 것에 기인한 결과로 판단된다. 그러나 반추동물의 반추위 발효는 사료의 종류와 사양관리 등의 다양한 환경에 영향을 미치기 때문에 향후 동물실험을 통해 MCR Inhibitor가 메탄 발생량에 미치는 효과를 검증해야 할 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

1. Y. Choi, S. J. Lee, H. S. Kim, J. S. Eom, S. U. Jo, L. L. Guan, J. Seo, H. Kim, S. S. Lee & S. S. Lee (2021). "Effects of seaweed extracts on in vitro rumen fermentation characteristics, methane production, and microbial abundance." *Scientific reports*, Vol. 97. December, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03356-y>
2. J. R. Knapp, G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, & J. M. Tricarico, (2014). "Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions." *Journal of dairy science*, Vol. 97, No. 6 pp. 3231-3261, April, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
3. K. A. Johnson, & D. E. Johnson, (1995). "Methane emissions from cattle." *Journal of animal science*, Vol. 73, pp. 2483-2492, August. 1995.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
4. A. Patra, T. Park, M. Kim, & Z. Yu (2017). "Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances." *Journal of animal science and biotechnology*, Vol. 8, No.13, pp. 8-17, January, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
5. H. Chen, Q. Gan, & C. Fan(2020). "Methyl-Coenzyme M Reductase and Its Post-translational Modifications." *Frontiers in microbiology*, Vol. 11, October, 2020,  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578356>
6. S. Scheller, M. Goenrich, R. K. Thauer, & B. Jaun, (2013). "Methyl-coenzyme M reductase from methanogenic archaea: isotope effects on the formation and anaerobic oxidation of methane." *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 135, pp. 14975-14984, October, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/ja406485z>
7. G. Yu, K. A. Beauchemin & R. Dong. "A Review of 3-Nitrooxypropanol for Enteric Methane Mitigation from Ruminant Livestock", *Animals*, Vol. 11, December, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11123540>
8. E. I. McDougall (1948). "The composition and output of sheep's saliva." *The Biochemical journal*, Vol. 43, pp. 99-100, 1948.
9. J. W. Lee, K. W. Kim, C. H. Ryu, S. S. Lee, S. H. Lee, D. Y. Jeon, H. J. Roh, N. J. Choi, "Effect of Different Forage Source and Nutrient Levels in Diet on in vitro Goat Rumen Fermentation and Methane Production", *Korea Journal of Organic Agriculture*, Vol. 27, No. 4, pp. 529-540, November, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11625/KJOA.2019.27.4.529>
10. P. Hiltner & B. A. Dehority. "Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria." *Applied and environmental microbiology*, Vol. 46, pp. 642-648, September, 1983.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.46.3.642-648.1983>
11. Z. Liu, K. Wang, X. Nan, M. Cai, L. Yang, B. Xiong & Y. Zhao. "Synergistic Effects of 3-Nitrooxypropanol with Fumarate in the Regulation of Propionate Formation and Methanogenesis in Dairy Cows In Vitro.", *Applied and environmental microbiology*, Vol. 22, No. 86, March, 2022.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01908-21>