

허브부식토의 사료내 첨가에 따른 *In Vitro* 발효특성과 젖소의 유생산성에 미치는 영향

김현섭¹ · 박중국¹ · 김홍윤² · 김상범¹ · 양승학¹ · 김창현² · 안종호²

Effects of Dietary Herbaceous Peat on *In Vitro* Fermentation and Milk Production in Dairy Cows

Hyeon Shup Kim¹, Joong Kook Park¹, Hong Yun Kim², Sang Bum Kim¹,
Seung Hak Yang¹, Chang Hyun Kim² and Jong Ho Ahn²

ABSTRACT

This study was conducted to determine effects of dietary herbaceous peat on *in vitro* fermentation and milk production in dairy cows. Ruminal pH, gas production, VFA (volatile fatty acid), Ammonia-N, and rumen degradability were examined by the addition of three times over 0, 1, and 5% herbaceous peat with substrate of timothy hay, and the change of rumen fermentation characteristics were evaluated. In 0, 3, 12 and 24 hours cultivation, all treatments did not show a significant difference but the control at 6 hours appeared significantly lower pH compared to 1 and 5% treatments ($p < 0.05$). The gas production of the treatments significantly increased until 12 hours of cultivation compared to control ($p < 0.05$), the rumen ammonia concentration showed a tendency to increase until 24 hours in all treatment groups, and there was no significant difference between treatments. About the rumen degradability, 5% treatment showed higher rumen degradability in all hours than control and 1% treatment ($p < 0.05$). Meanwhile, for *in vivo* trial, 16 heads of Holstein lactation dairy cows were selected for experiment for four weeks in order to research the change of milk yield, milk compositions and change of somatic cell counts of lactation dairy cows by herbaceous peat feeding. The milk yield of vitamin C and herbaceous peat treatments (T3) was 25.0 kg but the control was 23.2 kg, herbaceous peat treatment (T1) was 23.1 kg, and vitamin C treatment (T2) was 23.4 kg, so there was linear increase effect of milk yield by T3. The partial significance of the milk (fat, milk protein, lactose, MUN and SNF) and change of somatic cell count before and after experiment by the control and treatments about change of milk and somatic cell counts ($p < 0.05$) were recognized. About change of milk in the first half (1~2 weeks) and latter half (3~4 weeks) during four weeks of experiments period, the herbaceous peat supplement treatments showed a tendency of significant decrease of quality of milk protein and SNF. The control and treatments did not show significant change of blood nutrients (total protein, cholesterol, NEFA, BUN), liver function component (AST, GGT) and minerals (Ca, P, Mg) before and after experiment. In summary, it is judged that herbaceous peat feeding for lactation dairy cows would be recommendable based on the results of milk, somatic cell count physiologically.

(**Key words** : Dairy cow, Herbaceous peat, Milk production, Rumen fermentation)

¹농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA, Korea)

²한경대학교 동물생명환경과학부 (School of Animal Life and Environment Science, Hankyong National University)

Corresponding author: J. H. Ahn, School of Animal Life and Environment Science, Hankyong National University, Anseong, 456-749, Korea. Tel: 031-670-5124, Fax: 031-670-5127, E-mail: jhahn@hknu.ac.kr

I 서 론

사료첨가제로서 항균성 물질은 동물산업에서 질병의 위험을 감소시키고 체중 증가에 의한 동물생산의 경제성을 향상시키기 위해 동물산업에 널리 이용되어 왔다(Hay, 1981; Gropp 등, 1992). 그러나 인간과 동물의 치료에 사용되는 항생제 사용은 교차내성(cross-resistance)과 강한세균 저항성의 문제로(Barton, 1998; Khachatourians, 1998), EU에서는 항생제 사용을 단계적으로 제한하고 있고, 국내에서도 2009년 1월부터 항생제를 단계적으로 제한하여 2012년에는 항생제 사용을 전면 제한하기로 되어 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 항생제 대체물질의 필요성 증가로 생균제, 효소제, 생리활성물질 등이 이용되고 있다. 특히, 최근 가축의 첨가제로 부식토(humus)를 주목하고 있는데, 부식토는 ‘리그닌단백복합체’이며 이것을 광의적으로 정의하면 토양에 투여 또는 존재하는 유기물이 다양한 미생물에 의하여 분해 작용을 하면서 원조직이 변형되거나 합성된 갈색 또는 암갈색의 일정한 형태가 없는 교질상이 다양한 물질이다. 그리고 분해에 대하여 상당 부분 저항성을 지닌 혼합 물질로 중생대 이끼류, 갈대 등이 지각변동에 의해 땅속에 묻혀 수백만 년 부식되어 검갈색 물질로 전환된 천연 무공해 토양이다. 한편, 부식물질(humic substances)은 humic acid (HA), fulvic acid 및 ulmic acid로 토양유기물의 주요구성 성분으로 이루어져 있으며, 이러한 성분은 식물성장을 위한 필수물질이다(Stevenson, 1994).

많은 항생제 대체물질 중 HA는 다양한 동물의 면역을 개선시키고 생리적인 변화를 통한 건강증진 효과와 깊은 관계가 있다. HA는 콜로이드 특성과 킬레이트 형태 때문에 사료와 음수에 함께 사용되어 외인성화합물의 독소효과를 변화시킬 수 있다(Livens, 1991). 또한 농약(Negre 등, 2001; Li 등, 2003), 돌연변이유발요인(Cozzi, 1993), 다양한 방향성 성분(Nanny

와 Maza 2001; Kollist Siigur 등, 2001), 중금속(Livens, 1991; Madronova 등, 2001; Hammock 등, 2003; Zraly 등, 2008), 아플라톡신 B1 (Van Rensburg 등, 2006) 및 미생물(Fein 등, 1999)에 강력한 친화력을 가지고 있다.

과거 부식물질은 동물 생산성에 있어 긍정적인 영향으로 인해 연구가 다양하게 진행되어 왔는데, 그 중 가금을 대상으로 한 humate 급여처리에 의해 체중과 사료 이용효율이 유의적으로 개선되고(Islam 등, 2005) 혈중콜레스테롤이 낮아졌으며, 일부 신장의 기능(creatine)이 낮아졌다는 보고가 있다(EL-Husseiny 등, 2008). 한편 반추동물을 대상으로 한 연구는 송아지에 sodium humate를 급여하여 체중을 증가시키고 폐사율을 감소시켰으며, 젖소에서는 유방염과 체세포수 감소에 대한 보고(Griban, 1988; Mosley, 1996)만 있을 뿐 젖소의 유생산성에 대한 급여 연구는 국내에서는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 부식토를 급여하였을 때 젖소의 생산성 향상에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

II 재료 및 방법

1. 허브부식토 공급수준에 따른 *in vitro* 반추위 발효 특성

1) Rumen inoculum

반추위액 채취는 충청남도 천안에 위치한 국립축산과학원의 반추위 캐눌라(cannula)가 장착된 Holstein 경산우(평균체중 650 kg)를 공시하였다. 공시축은 하루에 2회, 오전(08:00)과 오후(17:30)에 시판중인 농협사료 5 kg과 옥수수 사일리지 5 kg를 급여하였으며 오차드그라스(*Dactylis glomerata* L.)를 무제한 급여하였다. 위액 채취는 시험당일 오전에 농후사료 급여 후 1시간 30분 후 채취하였으며, 채취된 위액은 4겹의 거즈로 여과 후 2ℓ bottle에 head space가 없도록 하여 bottle내 산소의 침입을 최

소로 하였다. 채취된 위액 bottle은 외부온도의 변화를 최대한 감소시키기 위하여 보온병 (39 °C) 에 넣어 신속하게 실험실로 운반하였다.

2) 시험설계

본 시험은 티머시 건초를 기질로 하여 허브부식토 (herbaceous peat)를 0, 1 및 5%를 3반복으로 각각 첨가하여 *in vitro* 반추위내 pH, 가스발생량, VFA (volatile fatty acid), ammonia-N 및 건물분해율을 각각 조사하여 반추위내 발효성상의 변화를 평가하였다.

3) 시료준비 및 배양

본 시험에 사용된 공시기질인 티머시 건초를 1mm screen hammer mill에서 분쇄하여 각각의 처리구에 기질로 사용하였다. 배양개시 30분전 반추위액을 CO₂로 bubbling하여 pH를 6.5로 보정하고 McDougall's buffer solution (Troelsen 및 Donna, 1966)과 반추위액을 4:1로 혼합하여 rumen inoculum으로 사용하였다. 또한 위액의 회석 및 여과 전 과정동안 O₂ free CO₂를 분사하여 위액이 혐기상태를 유지하도록 하였다.

허브부식토는 상업적으로 이용되고 있는 허브초탄 (특허출원: 10-2005-0106746)을 적정 사용량에 준하여 기질의 1 및 5%를 각각 첨가하였다. 허브부식토의 화학적 특성 및 미생물 성상은 Table 1, 2와 같으며, 위액 주입 전 허브부식토와 기질은 전자저울에 칭량하여 serum bottle에 투입하였다. 배양은 Tilly와 Terry (1963)의 방법에 따라 실시하였으며 120 ml serum bottle에 buffer와 혼합된 위액을 40 ml 주입하고, 39 ± 0.5 °C . 설정된 항온 배양기(DS-10, Dasol Scientific CO., Korea)에서 배양하였으며, 배양시간은 0, 3, 6, 12 및 24시간으로 하였다. 본 시험의 처리구를 요약하면 다음과 같다.

Control : McDougall buffer solution 40 ml + Rumen fluid 10 ml + Timothy hay 0.5 g

1% HP : McDougall buffer solution 40 ml + Rumen fluid 10 ml + Timothy hay 0.5 g + Herba-

ceous peat (HP) 0.005g

5% HP : McDougall buffer solution 40 ml + Rumen fluid 10 ml + Timothy hay 0.5 g + Herbaceous peat (HP) 0.025 g

Table 1. Characteristics of herbaceous peat

Item	Contents
... hemical composition (%)...	
Dry matter	77.41
Crude protein	2.96
Ether extract	0.78
Crude ash	65.54
Neutral detergent fiber	50.87
Acid detergent fiber	40.52
... linal composition (µg/g)...	
Mg	1,709
Na	521
Cu	11.36
Zn	41.85
Fe	13,014
K	4,081
Mn	168.7
... oxin composition (µg/kg)...	
Zearalenone	8.36
Ochratoxin	N.D ¹⁾
Vomitoxin	0.07
Aflatoxin	1.95
... mino acid composition (%)...	
ASP (%)	0.14
SER (%)	0.07
GLU (%)	0.18
GLY (%)	0.12
HIS (%)	0.02
ARG (%)	0.06
THR (%)	0.08
ALA (%)	0.11
PRO (%)	0.07
TYR (%)	0.03
VAL (%)	0.08
LYS (%)	0.05
ISO (%)	0.06
LEU (%)	0.10
PHE (%)	0.06

¹⁾ N.D. : not detected.

Table 2. Composition of microorganism of herbaceous peat

Kinds of Bacteria	Count media	CFU ¹⁾ /g
Total bacteria	Aerobic count plates	2.1×10^7
Coliform	Coliform petrifilm	8.0×10^4
<i>Lactobacillus</i>	Rogosa agar plate	N.D. ²⁾
Yeast and mold	YM agar plate	N.D.
<i>Salmonellae</i>	BSA agar plate	N.D.
<i>Rhodococcus</i>	PD agar plate	1.7×10^7

¹⁾ Colony forming unit. ²⁾ N.D. : not detected.

4) 조사항목 및 분석방법

허브부식토의 미생물학적인 분석으로 총균수 (Total colony counts), 대장균군 (Coliform) 및 방선균 (*Rhodococcus*)은 부식토 1g과 9 ml의 0.85% NaCl 희석배지에 단계별 십집 희석하여 각 조건에 적합한 agar 배지 및 petri film (3M petri film, USA)에 1 ml 분주하여 37°C incubator에서 24~48시간 배양한 후 형성된 집락을 계수하였다. 발효가스 발생량 측정은 Williams 등 (1996)과 Beuvink 등 (1992)의 방법을 이용하여 각 시간대별 모든 serum bottle을 항온배양기에서 제거하여 약 5분 동안 실온에서 냉각시킨 후 가스발생량 측정기를 이용하였다. 기질이 분해되면서 발생한 가스발생량은 ml/0.5 g substrate DM 단위로 환산하였다. 가스발생량 측정이 종료된 serum bottle을 개봉하여 원심분리용 tube에 상층액을 회수하였으며 회수한 상층액은 원심분리기 (500 × g)에서 5분간 원심분리한 후 pH meter (Mettler-Toledo, CH/MP220)를 이용하여 pH를 측정하였다. 반추위액내 암모니아질소 농도 측정은 Chaney와 Mabach (1962)의 방법으로 수행 하였다. 0, 3, 6, 12 및 24시간 동안 배양한 배양 bottle에서 반추위액을 각각 채취하여 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 얻어진 상층액과 NH₃ standard를 각각 20 μl ± 20 ml 시험관에 주입 후, phenol color reagent와 alkali-hypochlorite를 1 ml } 첨가하였다. 발색반응을 위해 37°C 항온 수조에서 15분간 배양하여 반응을 시킨 후, 증류수를 8 ml 추가하여 희석하였다. 이후 spectro-

photometer (V-530, Jasco, Japan)를 이용하여 640 nm에서 흡광도 (Optimal density)를 측정하여 암모니아질소 농도를 계산하였다. 배양액내 VFA는 Erwin 등 (1961) 방법에 의해 수행 되었다. pH 측정 후 VFA를 측정할 배양액은 microtubes (MCT-175-C, AXYGEN, USA)에 1 ml씩 회수한 후 미생물의 작용을 정지하기 위해 0.1 ml의 포화 HgCl₂ 용액과 25% HPO₃ 용액 0.2 ml를 첨가하여 혼합 후 실온에서 30분간 정치시켰다. 실온에서 정치시킨 배양액은 - 20 °C | 냉동고에 보관 하였다가 분석 시 13,000 rpm에서 10분간 4°C | 원심분리 튜브를 이용하여 원심분리 한 후 상층액을 채취하였으며, gas chromatography (HP6890, HP, USA)를 이용하여 상층액은 VFA 표준용액을 기준으로 분석하였다. 배양이 완료된 serum bottle의 가스측정을 완료한 후 개봉하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액의 남아있는 잔유물을 glass microanalysis filter holder assembly (No. 097531C, Fisher Scientific, USA)에 filter paper(Whatman No.1, Whatman, England)로 여과한 후 80°C | drying oven에서 48시간 건조 및 평량하여 건물분해율을 측정하였다.

2. 허브 부식토 급여에 따른 착유우의 유생산 효과

1) 공시동물, 시험기간 및 시험구 배치

공시가축은 충남 천안에 위치한 농촌진흥청 국립축산과학원에서 사육중인 체중 539.8 ± 22.2

kg, 분만 후 일수가 117±17일인 경산우 비유 중기 홀스타인 착유우 16두를 각 처리구당 4두 씩 임의 배치하여 공시하였고, 예비시험은 14 일간 실시하였으며 본 시험기간은 4주간 실시 하였다. 허브 부식토와 함께 사용한 비타민 C 는 항산화제로 허브 부식토내 함유된 미네랄의 이용성을 증진시키기 위해 사용하였다.

시험구 배치는 대조구와 처리구로는 허브부 식토구(일일 두당 20g, T1), Vit. C(일일 두당 20 g, T2), Vit. C + 허브부식토(일일 두당 각각 20 g, T3)로 하였다. 본 시험에 첨가되는 공시 재료로서 허브부식토(허브초탄, 늘푸름)와 비 타민 C(명품 C, 화신이엔비)를 사용하였다.

2) 공시사료 및 사양관리

본 시험에 사용된 공시사료는 Table 3에서 보는 바와 같다. 사료급여방법은 농후사료, 조 사료를 TMR(total mixed ratio)로 건물 기준 21.62 kg을 1일 2회 균등(09:00, 13:00) 급여하 였으며, 우선 처리구별 공시재료를 소실을 없 이 급여하였다. 착유는 매일 06:00 및 16:30시 에 2회 착유하였고, 산유량은 유량계를 이용하 여 측정하였다. 사양시험에 사용한 사료의 배 합비율은 Table 4와 같으며, 음수와 미네랄 블 록 섭취는 사양시험 전 기간 동안 자유섭취토 록 하였다.

3) 조사항목 및 분석방법

본 연구에 사용된 공시사료의 일반성분 함량 은 국립축산과학원 분석실에서 60℃ 건조기

에서 48시간 동안 건조시켜 건물함량을 측정하 였으며, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분 등의 일반성분은 AOAC(1990) 방법에 준하여 각각 분석하였다. 사료섭취량은 매일 아침 당일 사 료급여전 군별 잔량을 조사하였다. 산유량 및 유성분은 급여전 측정하여 시험 시작 후 매 1 주일 간격으로 4주간 유성분을 측정하였으며, 산유량은 매일 측정하였다. 유성분 분석은 06:00 및 16:30시에 유량계를 통하여 취한 약 50 ml 우유 샘플을 채취하여 Milko-scan 133-B (Foss Electric, Denmark)을 이용하여 2반복하여 평균치를 나타내었다. 혈중 대사 물질을 조사 하기 위해 시험전·후 오전 사료섭취 후 6시간 이후 채혈을 실시하였다. 채혈방법은 heparin 처리된 15 ml vacutainer를 사용하여 경정맥에서 약 10 ml를 채혈하여 곧바로 실험실로 운반한 다음 3,000 rpm에서 원심분리 후 혈청을 분리 하여 분석 시까지 냉동보존(-20℃)하였다. 분 석항목은 영양성분(총단백질, 콜레스테롤, NEFA, BUN), 간기능 성분(AST, GGT) 및 무기물(Ca, P, Mg)을 각각 조사하였다. 혈액 중 생화학 성 분 분석은 생화학 혈액성분 분석기(HEMACYTE; OSI, Oxford Science, Inc., USA)를 이용하였다.

3. 통계분석

모든 결과들은 SAS package program(2000, release. 8.1 version)의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 처리구별 분산 분석을 실시 하였으며, Duncan's multiple range test에 의해

Table 3. Chemical composition of experimental feeds

Item	DM	CP	EE	CF	NFE	Ash	TDN ¹⁾	NE _L ²⁾
Concentrate ³⁾	87.6	20.4	2.8	4.6	61.0	4.8	78.7	1.8
Corn silage	22.4	9.2	4.0	22.1	46.8	5.6	67.6	1.5
Hay	83.2	9.2	1.9	32.1	45.0	5.3	66.5	1.5

¹⁾ Calculated values based on NRC(1981).

²⁾ Assumed NE_L (Mcal/kg DM).

³⁾ Contained corn grain 63.0%; soybean meal 20.0%; cottonseed meal 9.4%; sugar beet pulp 6.0%; mineral 0.7%; vitamin mixture 0.9%.

Table 4. Ingredient and chemical composition of experimental diets

Item	TMR
Ingredient composition	
Concentrate ¹⁾ , kg/d	11.63
Corn silage, kg/d	25.00
Hay, kg/d	4.00
Chemical composition	
Dry matter, %	47.06
Crude protein, %	18.15
TDN, %	70.66
NE _L , Mcal/kg	1.64

¹⁾ Contained corn grain 63.0%; soybean meal 20.0%; cottonseed meal 9.4%; sugar beet pulp 6.0%; mineral 0.7%; vitamin mixture 0.9%.

처리 평균간 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하였다.

III 결과 및 고찰

1. 허브부식토 공급수준에 따른 *in vitro* 반추위 발효 특성

1) 성분분석

허브부식토 (herbaceous peat)의 성분분석에 대한 결과는 Table 1, 2와 같다. 미네랄 함량과 조회분 함량 (65%)이 높았으며, 토양에는 방선균이 대부분 존재하는 것으로 나타났다.

한편, 세균은 퇴비 부숙 중 부숙일수에 관계 없이 일정한 수를 유지하며, 고온성 미생물의 작용에 의한 분해가 끝나면 대부분의 분해 가능한 유기물이 분해되었기 때문에 분해속도가 훨씬 느려지고 온도도 40°C 이하로 감소한다. 이때에 다시 중온성 미생물이 재정착하는데 이 시기의 미생물 다양성지수는 증가하여 초기단계와 비슷한 다양성을 유지하다가 후발효과정 중 미생물 다양성 지수가 다시 서서히 낮아지며, 이것은 숙성단계 유기물의 상당한 부분이 더 이상 분해되지 않는 부식질 (humus)로 변화

되기 때문이다. 부식질의 대부분은 lignin 함량이 높고 가용 영양분의 함량이 낮으므로 이러한 환경에 적합한 미생물만이 존재하게 된다고 볼 수 있다.

황 등 (1993)은 파쇄목 혼합처리시 부숙 초기부터 모든 미생물의 밀도가 높고 특히 효모균이 풍부하며 부숙후기에도 *Bacillus*속 균을 제외한 미생물들은 다른 수분조절재 처리에 비해 높은 밀도를 보였다고 하였다. 효모는 부숙초기에 10⁴ 수준을 보였으나 점차 감소하며 부숙 1개월 후부터는 10⁴에서 검출되지 않았고 파쇄목을 부재료로 이용할 때 미생물상의 증가 효과가 크며, Vicki (1999)는 완숙퇴비에 존재하는 미생물을 호기성 세균, 혐기성 세균, 사상균, 방선균, 슈도모나스, 질소 고정균 등 6가지 기능적인 미생물군으로 분류하여 사상균은 10³~10⁴ cfu/g, 방선균은 10⁶~10⁸ cfu/g 이상, 슈도모나스와 질소고정균은 10³~10⁶ cfu/g 수준이면 완숙된 퇴비라고 하였으며, 특히 톱밥과 같은 목질재료를 퇴비 재료로 이용할 때 방선균 증가 효과가 크며, 방선균은 chitin과 cellulose와 같은 복잡한 화학 물질의 분해와 토양 구조 개량, 식물병원균의 감소 등 많은 기능을 담당한다고 보고하였다. 방선균은 목재 재료를 이용한 파쇄목 혼합구와 유사하게 왕겨를 사용하는 경우도 9.8 × 10⁸ cfu g⁻¹ 수준으로 상당히 높게 유지된다고 하였다.

일반적으로 영양상태가 결핍된 부식토는 무기물 및 조회분 함량 (2~4%)이 낮으며, 미네랄 결핍과 산도가 높다 (pH 3-4). 또한 색은 밝고 잘 부스러지는 특징을 갖는다 (Bozkurt 등, 2001; Pereverzev, 2005). 본 연구에서 허브부식토의 곰팡이 독소는 미국 식품의약국 (FDA)에서 사료허용기준치인 10 ppb를 초과하지 않았으며, 또한 살모넬라균도 검출되지 않아 안전하며 미네랄 함량 또한 풍부한 것으로 조사되어 사료첨가제로 이용이 적절할 것으로 생각된다.

2) pH

본 시험은 허브부식도를 0, 1 및 5% 수준으로 각각 첨가하여 반추위내 *in vitro* 배양시간별 pH 변화를 Table 5에 나타냈다. pH는 전체적으로 시험 개시부터 종료까지 배양시간이 경과함에 따라 모두 감소하는 경향을 나타냈다. 0, 3, 12 및 24시간 배양에 있어서 모든 처리구는 유의한 차이를 보이지 않았지만, 6시간에 대조구는 1 및 5% 첨가구와 비교하여 유의하게 낮은 pH를 나타냈다 ($p < 0.05$). 높은 영양물질 함유한 부식도의 특징은 조회분 함량과 무기질 함량이 높으며, pH는 약 6~8수준이다. 또한 부식도의 색은 어두운 갈색 또는 검은색을 나타내며, 건조 시 분말형태의 특징을 보인다 (Bozkurt 등, 2001; Pereverzev, 2005). 본 연구에서 배양 6시간에 pH가 처리구와 비교해볼 때 대조구에서 낮은 이유는 부식도의 pH 범위가 6~8로 반추위내 완충작용 역할을 한 것으로 생각되지만, 다른 시간대에는 pH의 차이가 없었으므로 더욱 정확한 이유를 알기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

3) 가스발생량

배양시간에 따른 반추위내 가스발생량의 변화는 Table 5와 같다. 배양 12시간까지 처리구에서 대조구와 비교하여 가스발생량이 유의하게 증가하였으나 ($p < 0.05$), 24시간에는 대조구에서 처리구와 비교하여 높은 가스발생량을 나타냈다. *In vitro* 가스 발생량을 조사하는 것은 조사료의 발효 특성 즉, 분해율을 평가하는 간접적 지표로 알려져 있고 (Theodorou 등, 1994, 1998), 기질의 발효정도에 따라 가스 발생량이 변화하여 (Beuvinck와 Spoelstra, 1992) 건물분해율과 가스발생량의 상관관계가 높은 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 허브부식도 첨가구는 대조구와 비교하여 기질로 사용한 티머시 건초의 초기발효 속도가 증가함에 따라 12시간까지 가스발생량이 증가한 것으로 생각되며, 24시간은 대조

구에서 21.67 mL로 1% (20.07 mL)와 5%구(19.60 mL) 보다 유의하게 증가하였으나 ($p < 0.05$) 전체 가스발생량은 차이가 없었다.

4) 암모니아질소 농도

반추위액내 암모니아 농도는 모든 처리구에서 24시간까지 증가하는 경향을 나타냈으며, 처리간 유의한 차이는 없었다 (Table 5). 일반적으로 반추위내 암모니아 농도는 반추미생물의 단백질 합성에 중요한 질소원이며, 반추위내 암모니아 농도는 사료내 단백질 함량이나 용해도와 그 밖의 물리 및 화학적 특성에 영향을 받는다 (Bryant, 1974). 본 시험에서는 단백질 함량이 낮은 티머시 건초를 기질로 사용함에 따라 반추위액내 단백질원의 감소로 처리구에서 유의한 차이를 나타내지 않은 것으로 생각된다. 비록 유의한 차이는 없었지만 1%구에서 대조구와 비교하여 6시간까지 농도가 증가하였으며, 5%구 또한 3시간에 암모니아질소 농도가 대조구 및 1%구에 비해 수치적으로 증가하였다. Church (1988)의 보고에 의하면 반추위내 암모니아 농도는 사료의 소화속도와 정의 상관관계의 경향을 나타낸다고 하였으며, 본 시험에도 유사한 경향을 보이는 것으로 나타났다.

5) 건물분해율

배양시간에 따른 반추위내 건물 분해율의 변화는 Table 5와 같다. 배양시간이 증가함에 따라 모든 처리구의 건물분해율은 증가하였으며, 모든 시간에서 5%구가 대조구 및 1%구와 비교하여 건물분해율이 높았다 ($p < 0.05$). 허브 부식도내 방선균은 cellulose, lignin과 다른 난분해성 물질의 분해에 중요한 역할을 담당한다고 보고되고 있어 (Baker 등, 1999), 본 연구에서도 이러한 영향으로 5%구에서 대조구 및 1%구에 비해 기질 (티머시 건초) 분해가 증가한 것으로 생각된다.

Table 5. Effects of the supplementation levels of herbaceous peat on *in vitro* ruminal pH value, gas production and ammonia-N concentration

Incubation time	Herbaceous peat (%)			SEM ¹⁾
	0	1	5	
..... pH				
0 hr	6.97	6.97	6.92	0.017
3 hr	6.94	6.90	6.95	0.010
6 hr	6.85 ^b	6.90 ^a	6.91 ^a	0.010
12 hr	6.84	6.84	6.87	0.010
24 hr	6.72	6.74	6.77	0.012
..... Gas production (ml)				
3 hr	4.33 ^b	5.07 ^a	5.13 ^a	0.151
6 hr	6.43 ^b	6.97 ^a	7.10 ^a	0.125
12 hr	12.10 ^b	12.53 ^{ab}	12.87 ^a	0.142
24 hr	21.67 ^a	20.07 ^b	19.60 ^b	0.356
..... NH ₃ -N, mg/dl				
0 hr	2.28	2.70	3.01	0.017
3 hr	5.19	5.99	6.16	0.010
6 hr	5.69	6.37	5.33	0.010
12 hr	5.96	5.97	5.57	0.010
24 hr	10.54	13.63	9.78	0.012
..... DM digestibility (%)				
3 hr	0.57 ^b	0.41 ^b	6.10 ^a	1.101
6 hr	2.18 ^b	1.62 ^b	7.10 ^a	0.866
12 hr	7.74 ^b	4.74 ^b	14.10 ^a	1.472
24 hr	27.40 ^b	26.37 ^b	33.61 ^a	1.207

^{a,b} Means in the same row with different superscript differ significantly ($p < 0.05$).

¹⁾ Standard error of means.

6) 휘발성지방산

허브부식토의 첨가에 따른 반추위 휘발성지방산 생산량에 미치는 영향을 살펴보면 (Table 6), acetate, propionate 및 butyrate 농도에서 대조구가 처리구와 비교하여 증가하였다. 한편, Zora 등 (2009)은 면양의 반추위내 부식산이 프로토조아에 미치는 영향을 *in vitro* 상에서 평가하였으며, 항프로토조아 제제로는 효과가 없었지만 미생물 성장 향상에는 효과가 있었다고 하였다. VFA의 양은 주로 발효된 기질의 양과 생산된 가스량에 따라 영향을 받는다 (Beuvinck

등, 1992). 하지만 본 연구에서는 이러한 상관관계가 낮았는데, 가장 큰 이유는 부식질 (humus)의 대부분은 lignin 함량이 높고 가용 영양분의 함량이 낮으므로 이러한 환경에 적합한 미생물만이 존재하게 된다고 볼 수 있다. 반추위내 증가된 대조구의 acetic acid 농도는 섬유소분해박테리아 군집 증가의 결과 (Harrison 등, 1988)와 일치하며, 처리구에서 대조구와 비교하여 acetic acid, propionic acid, butyric acid 및 총 휘발성지방산 함량의 감소는 반추위 미생물 군집이 아닌 방선균에서 생성된 cellulase

Table 6. Effects of the supplementation levels of herbaceous peat on *in vitro* ruminal volatile fatty acid production (mM)

Item	Incubation time(hr)	Herbaceous peat			SEM ¹⁾
		0%	1%	5%	
Acetic acid	0	7.81 ^a	6.56 ^b	6.33 ^b	0.240
	3	10.29 ^a	9.75 ^a	7.30 ^b	0.477
	6	11.63 ^a	10.59 ^b	10.52 ^b	0.199
	12	15.39 ^a	12.99 ^b	13.31 ^b	0.391
	24	20.87 ^a	18.57 ^b	18.32 ^b	0.438
Propionic acid	0	2.15 ^a	1.73 ^b	1.64 ^b	0.087
	3	3.36 ^a	3.21 ^a	2.26 ^b	0.181
	6	3.92 ^a	3.61 ^b	3.56 ^b	0.065
	12	5.22 ^a	4.61 ^b	4.56 ^b	0.113
	24	7.88	7.38	7.28	0.127
Butyric acid	0	2.15 ^a	1.73 ^b	1.64 ^b	0.087
	3	3.36 ^a	3.21 ^a	2.26 ^b	0.181
	6	3.92 ^a	3.61 ^b	3.56 ^b	0.065
	12	5.22 ^a	4.56 ^b	4.61 ^b	0.113
	24	7.88	7.38	7.27	0.127
Total VFAs	0	11.21 ^a	9.30 ^b	8.92 ^b	0.372
	3	15.26 ^a	14.49 ^a	10.60 ^b	0.746
	6	17.31 ^a	15.85 ^b	15.66 ^b	0.293
	12	22.92 ^a	19.62 ^b	20.00 ^b	0.541
	24	31.90 ^a	28.93 ^b	28.55 ^b	0.586
A : P	0	3.64	3.79	3.85	0.053
	3	3.06	3.03	3.24	0.061
	6	2.97	2.94	2.96	0.011
	12	2.95	2.85	2.89	0.027
	24	2.65	2.52	2.52	0.033

^{a,b} Means in the same row with different superscript differ significantly ($p < 0.05$).

¹⁾ Standard error of means.

의 직접적인 영향으로 나타난 결과로 생각된다.

따라서 허브부식토를 0, 1 및 5% 수준으로 각각 첨가하여 반추위내 *in vitro* 배양시간별 반추위 발효특성은 대부분 조사항목에서 휘발성지방산 농도를 제외하고 처리구가 대조구에 비해 개선효과를 나타냈으며, 적절한 급여량은 추가적인 사양시험을 통해 연구해야 할 것으로

판단된다.

2. 허브부식토 급여에 따른 착유우의 유생산 효과

1) 유량 및 유성분

각 처리별 산유량을 살펴 본 결과 Table 7에

서 보는 바와 같이 1일 평균 산유량은 T3구가 25.0 kg으로 대조구 (23.2 kg), T1구 (23.1 kg), T2구 (23.4 kg)와 비교하여 수치적으로 증가하였다. 또한 시험 초기 유량과 비교하여 대조구를 포함한 T1 및 T2구에서는 유량이 0.8~1.7kg까지 감소한 반면, T3구는 오히려 1.7kg 증가하였다.

한편, 500두의 고능력우를 대상으로 부식토를 급여 후 유생산량을 시험한 결과, 사료섭취량은 17.2 kg에서 16.3 kg으로 0.9 kg 감소한 반면 유량은 평균 0.7 kg 증가하였다. 이러한 사료섭취량 및 생산성의 변화는 사료내 영양소를 보다 완전히 소화하기 때문이다 (Mosley, 1996). 본 시험에서는 비록 유의한 차이는 없었으나,

부식토와 비타민 C의 단독처리 보다 혼합처리 하여 공급 시 오히려 유생산량이 증가하는 것으로 조사되었다.

부식토 급여에 따른 유성분 및 체세포 수 변화는 Table 7에서 보는 바와 같다.

초기 1~ 주간 유성분 변화에서 유단백질과 무지고형분 함량은 T2구에서 T3구 보다 유의적으로 증가하였으며 ($p<0.05$), 유당은 T1구에서 대조구와 다른 처리구와 비교하여 가장 높은 함량을 나타냈다 ($p<0.05$). 체세포수는 T3구에서 가장 낮았으며 T1, 대조구, T2순으로 유의한 차이를 보였으며, 이는 허브부식토가 첨가된 T1과 T3구에서 체세포 수 감소의 효과가 있음을 증명하였다. Griban (1988)의 보고에 의

Table 7. Milk production as influenced by supplementation of herbaceous peat and vitamin C in dairy cows

Item	Control	T1	T2	T3	SEM ¹⁾
Milk yield (kg/day)					
Initial (0 wks)	24.9	24.5	24.6	24.7	0.265
Final (4 wks)	23.2	23.1	23.4	25.0	2.368
... Interim milk composition (1~2 wks) ...					
Milk fat, %	3.53	3.65	3.71	3.50	0.272
Milk protein, %	3.24 ^{ab}	3.20 ^{ab}	3.29 ^a	3.17 ^b	0.148
Lactose, %	4.72 ^b	4.88 ^a	4.80 ^b	4.73 ^b	0.094
MUN, mg/dl	10.58 ^a	8.80 ^{ab}	7.24 ^b	9.93 ^{ab}	1.013
SNF, %	11.65 ^{ab}	11.85 ^{ab}	11.91 ^a	11.54 ^b	0.361
Free fatty acid, %	0.76	0.71	0.98	0.90	0.200
Somatic cell counts ($\times 10^3$ /mL)	283.5 ^b	134.9 ^c	629.1 ^a	33.1 ^c	216.95
... Final milk composition (3~4 wks) ...					
Milk fat, %	2.87 ^c	3.76 ^{ab}	3.91 ^a	3.52 ^b	0.345
Milk protein, %	3.21 ^c	3.35 ^{ab}	3.40 ^a	3.27 ^{bc}	0.155
Lactose, %	4.63 ^c	4.86 ^a	4.79 ^{ab}	4.73 ^{bc}	0.081
MUN, mg/dL	9.39 ^a	7.58 ^{ab}	6.90 ^b	9.29 ^a	1.079
SNF, %	10.85 ^c	12.04 ^a	12.17 ^a	11.61 ^b	0.455
Free fatty acid, %	0.83	0.66	0.79	0.81	0.210
Somatic cell counts ($\times 10^3$ /mL)	284.9 ^{ab}	111.6 ^c	476.5 ^a	37.1 ^c	122.08

^{a,b,c} Means in the same row with different superscripts differ ($p<0.05$).

¹⁾ Standard error of means.

T1 : Herbaceous peat, T2 : Vitamin C, T3 : Herbaceous peat + Vitamin C.

하면 부식토를 착유우에 급여하였을 때 유방염을 감소시키고 체세포수를 감소시킨다고 하였으며, 이는 부식토내 유익한 미생물과 풍부한 미네랄 때문인 것으로 판단되며 본 시험결과와 일치하였다.

시험 3~4주간 결과에서는 유지방, 유단백질 및 무지고형분에서 대조구가 처리구와 비교하여 낮은 함량을 나타냈으며, 결과적으로 허브 부식토와 비타민의 첨가는 유성분 함량에 있어

긍정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 반면, T3구에서는 대조구와 비교하여 유지방, 유단백질, 유당 함량이 차이가 없었으며, 이러한 이유는 다른 처리구와 달리 20g의 공급량을 나눠서 급여했기 때문에 공급 수준이 낮은 것으로 생각된다. MUN 수치는 국내 젖소의 적정 MUN 함량(유단백질 3.2 기준)인 12~18 mg/dl 보다 낮았다(Yoon 등, 2004). 이러한 결과는 모든 처리구에서 공급된 사료의 에너지 과잉과 단백

Table 8. Blood metabolites as influenced by supplementation of herbaceous peat and vitamin C in dairy cows

Item	Control	T1	T2	T3	SEM ¹⁾
Cholesterol, mg/dL	188.75 ^{ab}	180.25 ^{ab}	230.75 ^a	137.33 ^b	11.933
NEFA, µEq/L	240.50	263.00	286.25	259.00	20.772
Total protein, g/dL	8.83 ^a	8.35 ^{ab}	7.68 ^b	9.08 ^a	0.204
BUN, mg/dL	7.75	8.50	8.75	7.00	0.473
AST, mg/dL	78.50	86.00	93.75	84.50	2.740
GGT, mg/dL	22.25	40.00	26.50	21.50	4.397
Ca, mg/dL	8.03	7.78	8.18	8.18	0.084
P, mg/dL	6.03	6.10	5.30	5.90	0.225
Mg, mg/dL	2.38 ^b	2.48 ^{ab}	2.60 ^a	2.40 ^b	0.035
..... 4 wks					
Cholesterol, mg/dL	171.25	170.75	206.75	146.25	11.023
NEFA, µEq/L	231.25	277.75	255.75	221.00	11.122
Total protein, g/dL	8.90	8.85	7.73	8.75	0.202
BUN, mg/dL	9.25	9.50	13.00	10.67	0.682
AST, mg/dL	98.00	100.00	103.50	96.00	3.605
GGT, mg/dL	23.50	28.50	24.25	21.25	1.884
Ca, mg/dL	7.90	7.48	7.78	7.73	0.100
P, mg/dL	6.40	5.83	5.70	5.93	0.229
Mg, mg/dL	2.68	2.60	2.70	2.60	0.062

^{a,b,c} Means in the same row with different superscripts differ (p<0.05).

¹⁾ Standard error of means.

T1 : Herbaceous peat, T2 : Vitamin C, T3 : Herbaceous peat + Vitamin C.

Abbreviations : NEFA (Nonesterified fatty acid), BUN (blood urea nitrogen), AST (aspartate aminotransferase), GGT (gamma-glutamyl transferase).

질의 결핍으로 인한 영양소 불균형이 원인이 된 것으로 생각된다. 체세포 수 변화는 처리구 간 시험 전·후 차이가 없었으며, 개체 차이의 변화로 판단된다.

2) 혈액 성분

Table 8은 대조구와 처리구의 시험 시작 전·후의 혈액을 채취하여 혈액 내 생화학 분석을 실시한 것이다. 분석 결과 영양성분(총단백질, 콜레스테롤, NEFA, BUN), 간기능 성분(AST, GGT) 및 무기물(Ca, P, Mg)에서 시험 시작 전·후 뚜렷한 변화를 나타내지는 않았으나, 이러한 결과는 유성분 결과와 동일한 것으로 젖소 착유우에게 부식토 급여가 생리적으로 무리가 없어 적용 가능한 것으로 생각되며, 추가적인 사양시험이 필요할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 허브부식토의 사료첨가제로서의 사용은 유생산량 및 유성분에서 긍정적인 효과를 나타냈으며, 향후 반추동물의 성장 단계에 따른 다양한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

IV 요약

본 연구는 허브 부식토를 이용하여 첨가 수준별 *in vitro* 반추위 발효특성 평가와 젖소를 이용하여 급여시 유생산성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 시험 1에서는 티머시 건초를 기질로 하여 허브부식토(herbaceous peat)를 0, 1 및 5%를 3반복으로 각각 첨가하여 *in vitro* 반추위내 pH, 가스발생량, VFA (volatile fatty acid), ammonia-N 및 건물분해율을 조사하여 반추위내 발효성상의 변화를 평가하였다. pH 변화는 0, 3, 12 및 24시간 배양에 있어서 모든 처리구에서 유의한 차이를 보이지 않았지만 6시간, 대조구에서 1 및 5% 첨가구와 비교하여 유의하게 낮은 pH를 나타냈다($p < 0.05$). 가스 발생량은 배양 12시간까지 처리구에서 대조구와 비교하여 유의하게 증가

하였으며($p < 0.05$), 반추위액내 암모니아 농도는 모든 처리구에서 24시간까지 증가하는 경향을 나타냈으며, 처리구 간 유의한 차이는 없었다. 건물분해율은 모든 시간에서 5%구가 대조구 및 1%구와 비교하여 건물분해율이 높았다($p < 0.05$). 따라서 허브부식토를 0, 1 및 5% 수준으로 각각 첨가하여 반추위내 *in vitro* 배양시간별 반추위 발효특성은 대부분 조사항목에서 처리구가 대조구에 비해 개선효과를 나타냈으며, 시험 2에서는 젖소를 이용하여 사양시험을 통해 유생산성을 평가하였으며, 유유산량 변화와 유성분 및 체세포 수 변화를 조사하기 위해 홀스타인 착유우 16두를 공시하여 4주간 사양시험을 실시하였다. 산유량은 T3구가 25.0 kg으로 대조구(23.2 kg), 부식토 처리구(23.1 kg), 비타민 C 처리구(23.4 kg)와 비교하여 수치적으로 증가하였다. 대조구와 처리구별 시험시작 전·후 유성분(유지방, 유단백, 유당, MUN 및 SNF) 및 체세포 수의 변화는 일부 유의성이 인정되었다($p < 0.05$). 4주간의 시험 기간 중 전반기(1~2주)와 후반기(3~4주)의 유성분 변화를 보면 부식토 첨가구에 있어서 유단백질과 SNF가 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 대조구와 처리구의 시험 시작 전·후의 혈액 내 영양성분(총단백질, 콜레스테롤, NEFA, BUN), 간기능 성분(AST, GGT) 및 무기물(Ca, P, Mg)에서 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 착유우에 부식토를 급여하는 것이 유성분, 체세포 수 및 생리적으로 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단된다.

V 인용 문헌

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis (15th) of the association of official analytical chemists. Washington DC.
2. Baker, M., B. Knoop, S. Quiring, A. Beard, B. Lesikar, J. Sweeten and R. Burns. 1999. Composting Guide Index Prepared by the Texas Agricultural Extension Service Solid and Hazardous Waste Management Division.

- dous Waste Management Initiative Team. <http://aggie-horticulture.tamu.edu/extension/compost/compost.html>.
3. Barton, M.D. 1998. Does the use of antibiotics in animals affect human health. *Aust. Vet. J.* 763:177-180.
 4. Beuvink, J.M., S.F. Spoelstra and R.J. Hogendorp. 1992. An automated method of measuring the time course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Neth. J. Agri. Sci.* 40:401-407.
 5. Bozkurt, S., M. Lucisano, L. Moreno and I. Neretnieks. 2001. Peat as a potential analogue for the long-term evolution in landfills. *Earth-Sci. Rev.* 53:95-147.
 6. Bryant, M.P. 1974. Nutritional features and ecology of predominant anaerobic bacteria of the intestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 27:1313-1317.
 7. Chaney, A.L. and E.P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Biochem.* 8:130-132.
 8. Church, D.C. 1988. *The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition.* Prentice Hall. Englewood Cliff. New Jersey.
 9. Cozzi, R., M. Nicolai, P. Perticone, R. Desalvia and F. Spuntarelli. 1993. Desmutagenic activity of natural humic acids Inhibition of mitomycin-C and maleic hydrazide mutagenicity. *Mutat. Res.* 299:37-44.
 10. El-Husseiny, O.M., A.G. Abdallah and K.O. Abdel-Latif. 2008. The Influence of Biological Feed Additives on Broiler Performance. *Int. J. Poultry Sci.* 7:862-871.
 11. Erwin, E.S., S.J. Marco and E.M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
 12. Fein, J.B., J.F. Boily, K. Guclu and E. Kaulbach, 1999. Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces. *Chem. Geol.* 162:33-45.
 13. Griban, V.G., L.M. Stepchenko and L.V. Zhorina. 1988. The live weight gain and disease resistance of young cattle and poultry stock as influenced by physiologically active peat preparation. In: *Proc VIII Int Peat Congr, Leningrad, Russia.* pp. 45-50.
 14. Gropp, J., D. Birzer and A. Schuhmacher. 1992. Vom Gesamtnutzen der Futterzusatzstoffe; ein Beitrag zur Auflösung des Widerstreits von Ökonomie und Ökologie. pp. 168-204. *Schriftenreihe der Akademie für Tiergesundheit, Bonn, Band 3.* Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung Gießen.
 15. Hammock, D., C.C. Huang, G. Mort and J.H. Swinehart. 2003. The effect of humic acid on the uptake of mercury (II), cadmium (II), and zinc (II) by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 44:83-88.
 16. Harrison, G.A., R.W. Hemken, K.A. Dawson, R.J. Harmon and K.B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
 17. Hays, V.W. 1981. *The Hays Report: Effectiveness of feed additive usage of antibacterial agents in swine and poultry production.* Long Beach, CA: Rachele Laboratories, Inc.; Report, 12476-01,5/pp. 81-91.
 18. Islam, K.M.S., A. Schuhmacher and J.M. Gropp. 2005. Humic acid substances in animal agriculture. *Pakistan J. Nutr.* 4:126-134.
 19. Khachatourians, G.G. 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can. Med. Assoc. J.* 159:1129-1136.
 20. Kollist-Siigur, K., T. Nielsen, C. Gron, P.E. Hansen, C. Helweg, K.E. Jonassen, O. Jorgensen. and U. Kirso. 2001. Sorption of polycyclic aromatic compounds to humic and fulvic acid HPLC column materials. *J. Environ. Qual.* 30: 526-537.
 21. Li, H., G.Y. Sheng, B.J. Teppen, C.T. Johnston and S.A. Boyd. 2003. Sorption and desorption of pesticides by clay minerals and humic acid-clay complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67:122-131.
 22. Livens, F.R. 1991. Chemical-reactions of metals with humic material. *Environ. Pollut.* 70:183-208.
 23. Madronova, L., J. Kozler, J. Cezikova, J. Novak, and P. Janos. 2001. Humic acids from coal of the North-Bohemia coal field. III. Metal-binding properties of humic acids-measurements in a column arrangement. *React Funct. Polym.* 47:119-

- 123.
24. Mosley, R. 1996. Field trials of dairy cattle. Non-published research. Enviromate, Inc.
 25. Nanny, M.A. and J.P. Maza. 2001. Noncovalent interactions between monoaromatic compounds and dissolved humic acids: A. deuterium NMR T-1 relaxation study. *Environ. Sci. Technol.* 35:379-384.
 26. Negre, M., H.R. Schulten, M. Gennari and D. Vindrola. 2001. Interaction of imidazolinone herbicides with soil humic acids. *J. Environ. Sci. Health B.* 36:107-125.
 27. Pereverzev, V.N. 2005. Peat soils of the kola peninsula. *Eurasian Soil Sci.* 38:457-464.
 28. Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-111.
 29. Troelsen, J.E. and H.J. Donna. 1966. Ruminant digestion *in vitro* as affected by inoculum donor collection day, and fermentation time. *Can. J. Anim. Sci.* 46:149-156.
 30. Yoon, J.T., J.H. Lee, C.K. Kim, Y.C. Chang and C.-H. Kim. 2004. Effects of milk production, season, parity and lactation period on variations of milk urea nitrogen concentration and milk components of Holstein dairy cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 4:479-484.
 31. SAS. 2000. SAS/STAT[®] Software for PC. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
 32. Stevenson, F.J. 1994. Humus chemistry-genesis, composition, reactions. John Wiley & Sons, NY. p. 443.
 33. Theodorou, M.K., D.R. Daivies, B.B. Nielsen, M.I.G. Lawrence and A.P.J. Trinci. 1998. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. In: *In vitro* Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants. (Ed. Deaville, E.R., Owen, E., Adesogan, A.T., Remyer, C., Huntington, J.A. and Lawrence, T.L.J). Occasional publication, No. 22. British Society of Animal Science, UK. pp. 55-63.
 34. Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
 35. Van Rensburg, C.J., C.E.J. Van Rensburg, J.B.J. Van Ryssen, N.H. Casey and G.E. Rottinghaus. 2006. *In vitro in vivo* assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult. Sci.* 85:1576-1583.
 36. Vicki. B. 1999. Evaluating microbiology of compost. *BioCycle* May. 40:62-64.
 37. Williams, A., M. Amat-Marco and M.D. Collins. 1996. Pylogenetic analysis of *Butyrivibrio* strains reveals three distinct groups of species within the *Clostridium* subphylum of the Gram-positive bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:195-199.
 38. Zora, V., K. Svetlana and J. Dusan. 2009. Effect of humic acid on fermentation and ciliate protozoan population in rumen fluid of sheep *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.* 89:1936-1941.
 39. Zraly, Z., B. Pisaikova, M. Trkova and M. Navratilova. 2008. Effect of humic acids on lead accumulation in chicken organs and muscles. *Acta. Vet. Brno.* 77:439-445.
 40. 황인갑. 1993. 송아지 설사증. *바이엘사보*. 대가 측면 p. 32.
(접수일: 2011년 3월 7일, 수정일 1차: 2011년 3월 21일, 수정일 2차: 2011년 4월 12일, 게재확정일: 2011년 4월 21일)