

겨자종자와 겨자분의 첨가가 반추위 발효성상과 메탄생성에 미치는 영향

이강연¹ · 김경훈¹ · 백열창¹ · 옥지운¹ · 설용주¹ · 한기준¹ · 박근규² · 류호태³ · 이상석⁴ · 전체옥⁵ · 오영균^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²건국대학교 동물자원센터, ³자연과기술(주), ⁴순천대학교 동물자원학과, ⁵중앙대학교 자연과학대학

Effects of Mustard Seeds and Powder on *In vitro* Ruminal Fermentation Characteristics and Methane Production

Kang Yeon Lee¹, Kyoung Hoon Kim¹, Youl Chang Baek¹, Ji Un Ok¹, Yong Joo Seol¹, Ki Jun Han¹, Keun Kyu Park²,
Ho Tae Ryu³, Sang Suk Lee⁴, Che Ok Jeon⁵ and Young Kyoon Oh¹

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea, ²Animal Resources Research Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, ³Nature & Technology Co. LTD, ⁴Dept. of Animal Science & Technology, Sunchon National University, Korea, ⁵Dept. of Life Science, Chung-Ang University, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of mustard, which contains allyl isothiocyanate, on ruminal fermentation and methane emission *in vitro*. To this end, diluted ruminal fluid (30 ml) was incubated anaerobically at 39°C for 6, 12, and 24 h with or without seeds or powdered mustard. Either mustard seed or powdered mustard was weighed and serially (0, 3.33, 5.00, 6.67, and 8.33 g/L) mixed with ruminal fluid. Ammonia-N was increased ($P < 0.05$) by mustard treatment in a dose dependent manner. Regardless of concentration or form, mustard increased ($P < 0.05$) total VFA content but decreased ($P < 0.01$) pH compared to control group. Molar proportion of acetate (A) was decreased ($P < 0.05$) whereas propionate (P) was increased ($P < 0.05$) by mustard treatment, thereby A:P ratio was decreased ($P < 0.05$) compared to control group. Total gas production was increased ($P < 0.01$) in a linear manner by mustard treatment compared to control group. There was no effect of mustard powder, except 8.33 g/L level at 6 h, on methane emission. However, at 24 h, methane emission was reduced ($P < 0.05$) by 4.77% and 11.54% with 6.67 g/L and 8.33 g/L of mustard seeds supplementation, respectively. Altogether, these results suggest that mustard seeds containing allyl isothiocyanate may reduce methane production without disturbing ruminal fermentation.

(**Key words** : Mustard, Methane, Ruminal fermentation)

서 론

메탄은 반추위 메탄 생성균의 섬유소 발효 과정에서 생성되는 분해산물로 숙주동물에 이용되지 못하고 트립이나 방귀의 형태로 대기중에 방출된다. 메탄의 생성량은 사료의 급여 수준, 구성성분 및 소화율에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 섭취 에너지의 약 2~12%가 반추위 미생물 대사 과정 중 메탄으로 전환되어 소실된다 (Johnson and Johnson, 1995). 동물의 장내 발효를 통해 배출되는 메탄은 지구상에서 발생하는 총 메탄의 약 16%를 차지하고 있고 (Johnson 등, 1995), 국내의 경우 동물이 생산하는 메탄 배출량 중 75%는 소에 의해 배출된다 (The Government of Republic of Korea, 2003). 메탄은 이산화탄소 다음으로 지구온난화에 큰 영향을 미치는 온실가스 중의 하나로, 지구온난화에 미치는 영향력이 이산화탄소보다 21배가량 높은 것으로 알려져 있다 (IPCC, 2001).

이러한 이유로 현재 세계 곳곳에서는 반추위 미생물에 의해 생산되는 메탄을 줄이기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

반추위 장내 발효에 의해 생성되는 메탄 발생량을 줄이기 위한 다양한 연구로는 할로젠 화합물을 이용한 메탄 발생 억제 (Rufener and Wolin, 1968; Trei 등, 1971)와 프로토조아의 제거 (Newbold 등, 1995) 및 식물의 2차 대사 생성물 중 항균성을 가진 에센셜 오일을 이용한 메탄 저감 연구 (Ohene-Adjei 등, 2008; Agarwal 등, 2009; Kumar 등, 2009; Tatsuoka 등, 2008) 등이 있다. 이들 연구는 반추위 내 메탄 생성 억제에 대한 긍정적인 효과를 보고하고 있지만, 화학적 합성물에 의한 동물체내 독성이나 강한 항균성으로 인해 메탄 생성균 뿐만 아니라 다른 미생물들의 발효까지 억제시킴으로써 섬유소 분해율이 저하되는 등의 문제점을 가지고 있다.

최근에는 반추위 발효를 증진시키면서 메탄 생성을 억제하는 물

* Corresponding author : Young Kyoon Oh, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea. Tel: 031-290-1665, Fax: 031-290-1660, E-mail: oh665@korea.kr

질로 황함유 화합물의 연구가 진행되고 있다. 마늘 등에 함유된 allium이나 와사비 등에 함유된 allyl isothiocyanate와 같은 황함유 화합물들은 반추위 내 발효성상에 긍정적인 효과를 보이면서 메탄을 저감시키는 효과가 뛰어난 것으로 보고된 바 있다(Lila 등, 2003; Mohammed 등, 2004; Kamel 등, 2008; Chaves 등, 2008; Kongmun 등, 2010). 이 중에서도 allyl isothiocyanate는 반추위 내 발효성상은 향상시키면서 메탄 발생 억제 효과가 탁월한 것으로 보고되었다(Lila 등, 2003). Mohammed 등(2004)의 연구 결과에 의하면 allyl isothiocyanate를 함유한 horseradish oil을 이용하여 메탄 저감 시험을 수행한 결과 반추위 발효의 증가와 함께 메탄 발생량은 *in vitro* 실험에서는 90%, *in vivo* 실험에서는 19% 감소하였다. Tyagi와 Singhal(1998)의 연구에서도 mustard oil 첨가 처리구에서 메탄 저감 효과가 나타났다. 이는 horseradish와 mustard에 함유된 allyl isothiocyanate가 메탄 생성균이 이용하는 NADH의 수소 공급을 막고 acetate의 생성량을 줄이면서 메탄 생성을 억제시켰기 때문이라고 Hino 등(1985)과 Lila 등(2003)이 보고하였다.

그러나 위의 연구 결과는 allyl isothiocyanate를 함유한 식물의 오일 추출물을 이용한 것으로 allyl isothiocyanate 특유의 강한 매운향이 짙어 실제 가축에게 급여가 불가능하다. 따라서 본 연구는 allyl isothiocyanate를 함유하면서 매운향이 강하지 않은 겨자종자와 겨자분을 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효성상 및 메탄 생성 저감 효과를 알아보려고 실시하였다.

재료 및 방법

1. 반추위액의 채취 및 완충용액 제조

반추위액은 반추위 캐놀라가 장착된 2두의 한우 거세우(평균 780.5±6.5 kg)로부터 채취하였다. 공여축은 1일 2회 분할하여 농후 사료 5 kg과 볏짚 3 kg을 섭취하였고, 물과 미네랄 블록은 자유 섭취할 수 있도록 하였다. 사료의 영양소 함량은 Table 1과 같다. 반추위액은 오전 사료 급여 전에 반추위 캐놀라를 통하여 4겹의 cheese cloth를 이용하여 사료입자를 제거하고 CO₂ 가스를 충전시킨 2L 유리병에 담아 39°C를 유지하며 실험실로 운반하였다. 완충용액은 McDougall(1947)의 방법으로 제조하였고 미리 채취해두었던 반추위액과 4:1의 비율로 혼합하여 pH는 6.8로 맞춘 뒤 CO₂ 가스를 주입하고 본 시험 전까지 혐기상태를 유지하였다.

2. 시험 방법

기질로는 옥수수 전분을 이용하였고, 첨가물질로는 (주)자연과 기술에서 공급받은 겨자종자와 겨자분을 이용하였다. 시험방법은 60 ml serum bottle에 기질인 옥수수 전분 0.2 g를 넣고 겨자 무첨가군을 대조군(Control)으로 겨자종자 첨가구(3.33 g/L 첨가(S1), 5.00 g/L 첨가(S2), 6.67 g/L 첨가(S3) 및 8.34 g/L 첨가(S4))와

Table 1. Ingredient and chemical composition of diet

Ingredient composition	% of DM	
Corn	47.80	
Wheat Bran	41.00	
Soybean meal	5.00	
Rapeseed meal	2.00	
Molasses	2.00	
Limestone	1.50	
Salt	0.40	
Vitamin & mineral mix ¹⁾	0.20	
Lasalocid ²⁾	0.10	
Total	100	
Chemical composition	Concentrates	Rice straw
Dry matter	86.62	95.41
Crude protein	13.28	6.12
Ash	4.92	9.71
Neutral detergent fiber	14.09	56.49
Acid detergent fiber	2.95	37.68

¹⁾ vitamin A: 2,650,000 IU, vitamin D3: 530,000IU, vitamin E: 1,050 IU, Nicotinic acid: 10,000 mg, Fe: 13,200 mg, Mn: 4,400 mg, Zn: 4,400 mg, Copper: 2,200 mg, Iodine: 440 mg, Cobalt: 440 mg.

²⁾ Lasalocid is an antibiotic from the group of carboxylic ionophores and is used as sodium salt.

겨자분 첨가구(3.33 g/L 첨가(P1), 5.00 g/L 첨가(P2), 6.67 g/L 첨가(P3) 및 8.34 g/L 첨가(P4))로 하여 기질과 첨가제가 담긴 serum bottle에 완충용액과 혼합한 반추위액을 30 ml 넣어 고무마개로 입구를 막은 후 알루미늄 캡을 씌워 가스의 유출을 방지하였다. 각 처리구별 bottle은 39°C shaking incubator (150 rpm)에서 배양시간대별(6, 12, 및 24시간)로 9처리 3반복으로 시험을 수행하였다.

3. 조사 항목

각 배양시간대별로 bottle을 shaking incubator (150 rpm)에서 꺼낸 후, 찬물에 10분가량 넣어 미생물 발효를 정지시킨 뒤 꺼내어 pH, 암모니아, 휘발성 지방산, 총 가스 및 메탄 발생량을 측정하였다.

(1) 총 가스 및 메탄 발생량

총 가스 발생량은 water displacement apparatus를 이용하여 측정하였다(Ferorak와 Hrwdey, 1983). 각 시간대별 메탄 발생량은 배양이 끝난 후 60 ml serum bottle의 알루미늄 캡 상단을 제거한 후 실린지를 이용하여 12 ml의 가스를 BD vacutainer(UA No

additive, BD Franklin Lakes NJ USA Mfg by BD, USA 8359927)에 채집하였다. 채집한 가스는 Molecular sieve 13×45-60 MESH (2.0M×1/8"×2.0 mm SS, Varian) column이 장착된 GC (Gas Chromatography; Varian CP-3800, USA)를 이용하여 분석하였다. Gas-tight syringe를 이용하여 시료를 1.0ml씩 주입하였고, 1.0%, 10.1% 및 19.5% methane (balance nitrogen)을 standard gas로 사용하였다. GC 분석 조건은 oven temperature 60°C, injector temperature 120°C, TCD (Thermal conductivity) temperature 120°C, FID (Flame ionization detector) temperature 200°C로 하였으며, total run time은 1.45 분이었고, carrier gas로 nitrogen을 이용하였다.

(2) 반추위 발효 특성

1) pH 측정

pH는 각 시간대별로 pH meter (Pinnacle M503, Corning, NY, USA)를 이용하여 조사하였다.

2) 암모니아(NH₃-N) 농도

암모니아는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법으로 분석하였다. 암모니아 분석을 위해 1.5 ml micro tube에 미생물의 작용을 정지시키는 HgCl₂ 10 ul를 첨가하고 시료 1 ml을 넣어 vortexing 하였다. 시료는 분석하기 전까지 냉동보관(-20°C) 하였고, 분석 전, 상온에서 녹여 원심분리(12,000 rpm, 5분)후 상층액 0.02 ml과 암모니아 표준 용액(25, 50, 100, 200 ppm), 증류수(blank)를 각각 20 ml 시험관에 넣고 phenol color reagent와 alkali-hypochlorite reagent를 각각 1 ml씩 첨가하여 혼합 한 후, 37°C 항온수조에서 15분간 배양하였다. 배양 후 각 tube에 8 ml의 증류수를 첨가하여

혼합한 후, spectrophotometer (630 nm)로 OD(optical density) 값을 측정하였다.

3) 휘발성 지방산(VFA) 농도

휘발성 지방산의 농도는 Erwins 등(1961)의 방법으로 분석하였다. 각 배양 시간별 배양 후 배양액 1 ml을 채취하여 HgCl₂ 10 ul, 25% H₃PO₄ 용액 200 ul 및 Pivalic acid 용액 40 ul를 첨가한 후 vortexing 하여 시약과 샘플을 혼합하였다. 그 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 취하여 2 ml vial에 옮겨 담고 GC (Varian CP-3800, USA)를 이용하여 분석하였다.

4. 통계 분석

본 시험의 결과는 SAS package (2002)에 포함된 일반선형모형 (GLM procedure)을 이용하여 분산분석을 시행하였다. 그리고 처리 평균 간 비교를 위해 Duncan (1955)의 다중 검정방법으로 비교하였고, 95% 신뢰 수준에서 검증하였으며, 직교다항대비 (orthogonal polynomial contrasts)를 이용하여 linear 및 quadratic effect를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 총 가스 및 메탄 발생량

겨자종자와 겨자분 첨가구가 *in vitro* 반추위 총 가스발생량 및 메탄생성에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 총 가스발생량은 모든 처리구에서 대조구에 비해 직선적으로 증가하였다(P<0.01).

Table 2. Effect of Mustard seed and powder on gas production, methane and hydrogen emission

h	Gas production (ml)	Treatment ¹⁾								SEM ²⁾	P value					
		C	MS				MP				Control vs Treat.	MS		MP		
			S1	S2	S3	S4	P1	P2	P3			P4	Linear	Quad. ³⁾	Linear	Quad.
6	Total gas	7.80 ^e	14.83 ^f	15.63 ^c	15.77 ^c	16.53 ^d	19.60 ^c	22.37 ^b	24.57 ^a	22.37 ^b	0.238	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	Methane	0.41 ^e	0.85 ^d	0.78 ^{de}	0.69 ^e	0.52 ^f	1.17 ^b	1.25 ^{ab}	1.28 ^a	1.02 ^c	0.034	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	Methane (%)	5.29 ^{bc}	5.70 ^{ab}	5.01 ^{cd}	4.34 ^e	3.17 ^f	5.97 ^a	5.60 ^{ab}	5.21 ^{bc}	4.54 ^{dc}	0.173	0.0748	<.0001	0.0012	0.0022	0.0020
	Hydrogen	0.003 ^e	0.008 ^{fg}	0.010 ^{fg}	0.020 ^{cd}	0.051 ^a	0.013 ^{ef}	0.017 ^{de}	0.027 ^{bc}	0.029 ^b	0.0022	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2498
12	Total gas	19.63 ^b	30.87 ^e	33.5 ^f	34.57 ^e	34.90 ^e	36.00 ^d	36.80 ^c	38.30 ^b	40.47 ^a	0.264	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	Methane	2.36 ^d	3.95 ^{bc}	3.91 ^{bc}	3.50 ^c	3.34 ^c	5.01 ^a	5.10 ^a	4.55 ^{ab}	4.89 ^a	0.204	<.0001	0.0052	<.0001	0.0005	0.0006
	Methane (%)	12.02 ^b	12.78 ^{ab}	11.68 ^{bc}	10.11 ^{cd}	9.58 ^d	13.91 ^a	13.85 ^a	11.88 ^b	12.08 ^b	0.534	0.9455	0.0001	0.0511	0.3865	0.0653
	Hydrogen	0.011 ^d	0.018 ^{bc}	0.018 ^{bc}	0.020 ^b	0.024 ^a	0.016 ^c	0.019 ^{bc}	0.020 ^b	0.026 ^a	0.0010	<.0001	<.0001	0.2891	<.0001	0.8803
24	Total gas	34.17 ^f	43.40 ^e	47.30 ^d	49.33 ^c	50.60 ^{bc}	44.6 ^e	51.60 ^b	53.30 ^a	54.30 ^a	0.490	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	Methane	5.16 ^f	6.94 ^{de}	7.21 ^{cd}	7.08 ^{de}	6.75 ^e	7.61 ^c	8.71 ^{ab}	8.93 ^a	8.33 ^b	0.143	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	Methane (%)	15.08 ^{cd}	16.00 ^{bc}	15.25 ^{cd}	14.36 ^d	13.34 ^e	17.08 ^a	16.87 ^{ab}	16.75 ^{ab}	15.34 ^c	0.300	0.1050	0.0014	0.0138	0.8318	0.0001
	Hydrogen	0.017 ^c	0.024 ^{abc}	0.027 ^a	0.028 ^{ab}	0.028 ^{ab}	0.024 ^{abc}	0.017 ^c	0.019 ^{bc}	0.021 ^{abc}	0.0025	0.0273	0.0009	0.0097	0.7062	0.9316

^{abcde} Means with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05).

¹⁾ Treatment, C: Control, MS (S1: mustard seed; 3.33 g/L, S2: mustard seed, 5.00 g/L, S3: mustard seed, 6.67 g/L, S4: mustard seed, 8.34 g/L), MP (P1: mustard powder; 3.33 g/L, P2: mustard powder; 5.00 g/L, P3: mustard powder; 6.67 g/L, P4: mustard powder; 8.34 g/L)

²⁾ Standard Error of Means

³⁾ Quadratic

반추위 미생물의 발효에 있어 가스발생량은 pH와 더불어 반추위 내 발효성상을 파악하는 중요한 지표로 이용된다. 본 실험결과에서는 총 가스발생량과 더불어 VFA도 증가한 것으로 보아 겨자종자와 겨자분은 반추위 내 발효를 증진시키는 것으로 사료된다.

메탄 발생량은 겨자종자의 경우 배양 6시간에 S2, S3 및 S4 처리구에서 5.29%, 17.9% 및 40.07%로 감소하였고 (P<0.01), 배양 12시간에는 2.83%, 15.89% 및 20.30%가 감소하였다 (P<0.05). 배양 24시간에는 S3와 S4 처리구에서 4.77% 및 11.54% 감소하였다 (P<0.05). 겨자분은 배양 6시간에 P4 처리구에서 메탄 발생량이 14.18% 감소하였고 (P<0.05) 그 외 다른 처리구에서는 효과가 나타나지 않았다. 본 실험결과는 Tyagi와 Singhal (1998)이 보고한 겨자유의 메탄 저감 효과의 결과와 일치하였다. 겨자의 메탄 저감 효과는 겨자 내에 함유되어있는 allyl isothiocyanate 성분이 methanogen의 NADH 이용을 방해 (Hino 등, 1985; Lila 등, 2003)하여 메탄의 생성을 저감시켰기 때문인 것으로 사료된다. 겨자 내에 함유되어 있는 allyl isothiocyanate의 메탄 저감 효과는 Lila 등 (2003)과 Mohammed 등 (2004)의 연구를 통해 확인되었다. 이들의 연구 결과 총 가스생성량은 증가하면서 메탄 생성량은 감소하는 것으로 나타나 본 실험과 일치하였다. 그러나 Lila 등 (2003)의 연구 결과에서는 1.6 g/L 첨가 시 메탄 저감율은 100%로 나타났고, Mohammed 등 (2004)의 결과에서는 1.7 g/L 첨가 시 약 90% 가량 메탄이 저감된 것으로 나타나 본 실험결과는 기존의 연구에 비해 그 효과가 미약하다는 것을 알 수 있다. 이는 본 실험에 사용한 첨가물인 겨자종자는 약 96 ppm 정도의 allyl isothiocyanate를 함유하고 있지만 (Son and Lee, 2006), allyl isothiocyanate의 추출물이 아닌 식물체 자체의 일부를 사용하였기 때문에 메탄 저감 물질 외에 조단백질나 당질 또는 조섬유와 같은 다른 영양성분의 영향으로 메탄 저감율이 적었던 것으로 생각된다. 특히 겨자분은 겨자종자에서 기름을 짜내고 남은 고형물로 Son과 Lee (2006)의 연구결과에 의하면 기름을 짜낸 겨자분은 가공과정에서 allyl isothiocyanate의 소실율이 높아 그 함량이 겨자 종자의 0.54% 정도로 매우 낮다고 밝혔다. 이러한 이유로 겨자분에서의

메탄 저감 효과가 타 실험에 비해 낮게 나타났던 것으로 보인다.

2. 반추위 발효성상

겨자종자와 겨자분을 첨가한 처리구의 pH는 6.69~6.13으로 첨가량이 증가할수록 낮아졌고 (P<0.01) 배양시간이 경과함에 따라 지속적으로 감소하였다 (Table 3). 특히 24시간 배양 후에는 모든 처리구가 대조구보다 현저하게 낮은 pH를 보였다 (P<0.01). 겨자종자와 겨자분은 식물체의 일부로 이들의 일반성분을 알아보면 겨자종자의 경우 조단백질 23.59%, 당질 21.04% 및 조섬유 3.85%이고, 겨자분은 조단백질 33.74%, 당질 26.42% 및 조섬유 7.16% (Son and Lee, 2006)로 반추위 내 미생물에 의한 발효에 이용될 수 있는 당질과 조섬유 및 단백질질을 함유하고 있다. 따라서 이들 영양성분으로 인해 반추위 내 발효가 증진되어 휘발성 지방산의 생성량이 증가하게 되고 이에 따라 pH도 낮아진 것으로 사료된다.

반추위액이 첨가된 *in vitro* 실험에서 겨자종자와 겨자분을 첨가하여 배양시간별 암모니아 생성량을 측정된 결과 암모니아 농도는 배양 6시간의 P1과 P2 처리구를 제외한 나머지 처리구가 대조구보다 유의적으로 높은 것으로 나타났다 (Table 4). 특히 배양 24시간에는 대조구의 암모니아 농도가 14.75 mg/100 ml인 것에 비해 겨자종자는 S1 31.42 mg/100 ml, S2 49.12 mg/100 ml, S3 63.76 mg/100 ml 및 81.91 mg/100 ml로 나타났고, 겨자분에서도 P1 36.09 mg/100 ml, P2 69.31 mg/100 ml, P3 98.08 mg/100 ml 및 P4 117.66 mg/100 ml로 첨가량이 증가할수록 급격하게 증가하였다. 이는 겨자 내에 포함되어있는 allyl isothiocyanate 함유물질을 이용하여 수행했던 기존의 실험들과는 반대의 결과로 Lila 등 (2003)의 allyl isothiocyanate α-cyclodextrin complex를 첨가한 경우 암모니아 농도는 첨가량이 증가할수록 감소하는 결과를 보였다. 또한 Mohammed 등 (2004)의 horseradish oil cyclodextrin complex를 첨가한 실험에서도 암모니아 농도는 감소한 것으로 나타났다. 본 실험의 암모니아 농도 결과가 기존의 실험들과 다른 이유는 실험에 사용된 첨가물질이 상이하기 때문이다. Lila 등 (2003)

Table 3. Effects of mustard seed and powder on pH value by mixed ruminal microorganisms

Time (h)	Treatment ¹⁾										P value				
	C	MS				MP				SEM ²⁾	Control vs Treat.	MS		MP	
		S1	S2	S3	S4	P1	P2	P3	P4			Linear	Quad. ³⁾	Linear	Quad.
6	6.69 ^a	6.59 ^b	6.56 ^b	6.53 ^c	6.50 ^{cd}	6.49 ^d	6.51 ^{cd}	6.49 ^d	6.50 ^d	0.009	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001
12	6.54 ^a	6.46 ^b	6.44 ^c	6.42 ^c	6.39 ^d	6.41 ^{cd}	6.30 ^e	6.19 ^f	6.18 ^f	0.008	<.0001	<.0001	0.0033	<.0001	0.0002
24	6.42 ^a	6.33 ^b	6.29 ^c	6.27 ^c	6.17 ^e	6.25 ^d	6.24 ^d	6.19 ^e	6.13 ^f	0.007	<.0001	<.0001	0.3006	<.0001	0.0002

^{abcde f}Means with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05).

¹⁾ Treatment, C: Control, MS (S1: mustard seed; 3.33 g/L, S2: mustard seed, 5.00 g/L, S3: mustard seed, 6.67 g/L, S4: mustard seed, 8.34 g/L), MP (P1: mustard powder; 3.33 g/L, P2: mustard powder; 5.00 g/L, P3: mustard powder; 6.67 g/L, P4: mustard powder; 8.34 g/L)

²⁾ Standard Error of Means

³⁾ Quadratic

Table 4. Effects of mustard seed and powder on *in vitro* NH₃-N (mg/) production by mixed ruminal microorganisms

Time (h)	Treatment ¹⁾										SEM ²⁾	P value			
	C	MS				MP				Control vs Treat.		MS		MP	
		S1	S2	S3	S4	P1	P2	P3	P4			Linear	Quad. ³⁾	Linear	Quad.
6	13.48 ^e	15.59 ^d	16.88 ^c	17.74 ^{bc}	18.60 ^b	13.05 ^e	13.98 ^e	17.31 ^c	25.31 ^a	0.348	<.0001	<.0001	0.0105	<.0001	<.0001
12	13.33 ^h	14.84 ^g	16.70 ^f	18.67 ^e	20.50 ^d	13.55 ^h	21.51 ^c	27.38 ^b	32.98 ^a	0.276	<.0001	<.0001	0.4380	<.0001	<.0001
24	14.75 ⁱ	31.42 ^h	49.12 ^f	63.76 ^e	81.91 ^c	36.09 ^g	69.31 ^d	98.08 ^b	117.66 ^a	1.305	<.0001	<.0001	0.9882	<.0001	0.0410

^{abcdehgi} Means with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05).

¹⁾ Treatment, C: Control, MS (S1: mustard seed; 3.33 g/L, S2: mustard seed, 5.00 g/L, S3: mustard seed, 6.67 g/L, S4: mustard seed, 8.34 g/L), MP (P1: mustard powder; 3.33 g/L, P2: mustard powder; 5.00 g/L, P3: mustard powder; 6.67g/L, P4: mustard powder; 8.34 g/L)

²⁾ Standard Error of Means

³⁾ Quadratic.

Table 5. Effects of mustard seed and powder on volatile fatty acid (VFA) by mixed ruminal microorganisms

Time (h)	Item	Treatment ¹⁾										SEM ²⁾	P value			
		C	MS				MP				Cont. vs Treat.		MS		MP	
			S1	S2	S3	S4	P1	P2	P3	P4			Linear	Quad. ³⁾	Linear	Quad.
6	Total VFA mmol/L	27.9 ^e	40.1 ^d	44.6 ^{cd}	45.5 ^{cd}	48.1 ^{bc}	48.1 ^{bc}	49.8 ^{abc}	54.9 ^a	52.3 ^{ab}	1.81	<.0001	<.0001	0.0141	<.0001	<.0001
	Acetate, mol (%)	65.1 ^a	64.4 ^a	61.7 ^{ab}	60.6 ^{ab}	60.5 ^{ab}	53.3 ^b	61.7 ^{ab}	62.1 ^{ab}	57.5 ^{ab}	3.17	0.1688	0.0083	0.5250	0.6461	0.7004
	Propionate, mol (%)	14.6 ^c	17.8 ^{ab}	18.0 ^{ab}	19.2 ^a	19.4 ^a	15.6 ^{bc}	16.7 ^{bc}	17.5 ^{ab}	16.7 ^{bc}	0.73	0.0014	<.0001	0.0297	0.0549	0.2729
	Butyrate, mol (%)	4.3 ^{ab}	4.5 ^{ab}	3.8 ^{ab}	3.0 ^{ab}	2.7 ^b	11.4 ^a	4.1 ^{ab}	3.3 ^{ab}	3.5 ^{ab}	2.54	0.9297	0.0026	0.3672	0.3896	0.5746
	Iso-butyrate, mol (%)	10.5 ^{ab}	9.9 ^{ab}	9.6 ^{ab}	9.6 ^{ab}	9.0 ^b	10.7 ^a	9.8 ^{ab}	9.6 ^{ab}	9.2 ^{ab}	0.46	0.1248	0.0106	0.7972	0.0615	0.8404
	Valerate, mol (%)	4.8 ^{ab}	2.4 ^b	5.9 ^{ab}	6.5 ^{ab}	7.3 ^{ab}	7.5 ^{ab}	6.3 ^{ab}	6.1 ^{ab}	11.4 ^a	2.24	0.4172	0.1906	0.6602	0.0923	0.3901
	Iso-valerate, mol (%)	0.8 ^d	1.1 ^{bcd}	1.1 ^{bcd}	1.1 ^{bcd}	1.0 ^{cd}	1.5 ^a	1.4 ^{ab}	1.3 ^{abc}	1.7 ^{abcd}	0.11	0.0037	0.0590	0.0018	0.2249	0.0084
	Acetate:Propionate	4.4 ^a	3.6 ^{bc}	3.4 ^{bcd}	3.2 ^{de}	3.1 ^e	3.3 ^{cde}	3.7 ^b	3.6 ^{cd}	3.4 ^{bcd}	0.09	<.0001	<.0001	<.0001	0.0017	0.0131
12	Total VFA mmol/L	37.4 ^f	45.7 ^e	51.7 ^{de}	57.8 ^{cd}	61.8 ^c	57.5 ^{cd}	72.0 ^b	73.9 ^b	81.2 ^a	2.11	<.0001	<.0001	0.2650	<.0001	0.0044
	Acetate, mol (%)	57.0 ^{ab}	56.3 ^{ab}	54.6 ^b	54.8 ^{ab}	55.8 ^{ab}	58.5 ^{ab}	58.3 ^{ab}	59.6 ^a	57.1 ^{ab}	1.43	0.9439	0.4093	0.3388	0.7919	0.3180
	Propionate, mol (%)	15.5 ^c	19.2 ^{cd}	20.5 ^{bc}	22.1 ^b	24.2 ^a	19.2 ^{cd}	18.7 ^d	20.5 ^{bc}	21.7 ^b	0.54	<.0001	<.0001	0.1485	<.0001	0.2513
	Butyrate, mol (%)	6.1 ^a	5.8 ^{ab}	4.9 ^{bcd}	4.7 ^{cd}	3.3 ^e	5.7 ^{abc}	4.3 ^{de}	4.1 ^{de}	3.5 ^e	0.33	0.0005	0.0012	0.3941	<.0001	0.4976
	Iso-butyrate, mol (%)	10.8 ^{ab}	11.4 ^a	10.3 ^{bc}	10.1 ^{bcd}	9.6 ^{cde}	10.0 ^{bcd}	8.8 ^e	9.4 ^{de}	9.0 ^e	0.26	0.0029	0.0020	0.1912	0.0011	0.0465
	Valerate, mol (%)	9.7	6.1	8.5	7.0	5.8	5.2	8.4	4.7	7.4	1.62	0.0986	0.1802	0.8917	0.4328	0.3277
	Iso-valerate, mol (%)	1.0 ^b	1.2 ^{ab}	1.2 ^{ab}	1.3 ^{ab}	1.3 ^{ab}	1.4 ^{ab}	1.5 ^{ab}	1.6 ^a	1.4 ^{ab}	0.14	0.0442	0.0947	0.3304	0.1091	0.1428
	Acetate:Propionate	3.7 ^a	2.9 ^{bc}	2.7 ^{cde}	2.5 ^{ef}	2.3 ^f	3.0 ^b	3.1 ^b	2.9 ^{bcd}	2.6 ^{de}	0.09	<.0001	<.0001	0.0027	<.0001	0.2171
24	Total VFA mmol/L	53.6 ^c	66.3 ^d	72.4 ^{cd}	77.5 ^{bc}	82.1 ^b	72.7 ^{cd}	82.4 ^b	93.1 ^a	97.9 ^a	2.56	<.0001	<.0001	0.0525	<.0001	0.0146
	Acetate, mol (%)	62.0 ^a	60.2 ^{ab}	56.9 ^{cd}	55.1 ^d	56.1 ^{cd}	58.2 ^{bc}	58.0 ^{bcd}	57.1 ^{cd}	56.2 ^{cd}	0.89	0.0001	0.0018	0.1407	<.0001	0.0190
	Propionate, mol (%)	16.1 ^c	17.1 ^d	18.2 ^{cd}	19.4 ^{ab}	20.4 ^a	15.8 ^e	17.7 ^{cd}	18.7 ^{bc}	20.0 ^a	0.33	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001	0.0055
	Butyrate, mol (%)	4.9 ^c	6.7 ^a	6.5 ^{ab}	6.1 ^{bcd}	5.8 ^d	6.4 ^{abc}	6.3 ^{abc}	6.5 ^{ab}	6.1 ^{cd}	0.13	<.0001	0.0407	<.0001	<.0001	<.0001
	Iso-butyrate, mol (%)	10.3 ^b	10.9 ^a	10.0 ^{bc}	9.7 ^{cd}	9.5 ^{de}	9.2 ^c	9.3 ^c	9.2 ^c	9.4 ^{de}	0.12	<.0001	0.0001	0.0788	<.0001	<.0001
	Valerate, mol (%)	6.0 ^{ab}	3.6 ^b	6.8 ^{ab}	7.8 ^a	6.3 ^{ab}	8.9 ^a	7.2 ^{ab}	6.8 ^{ab}	6.4 ^{ab}	1.16	0.5713	0.3647	0.0970	0.2905	0.0060
	Iso-valerate, mol (%)	0.7 ^c	1.5 ^d	1.6 ^c	1.8 ^b	2.0 ^a	1.4 ^d	1.6 ^c	1.8 ^b	2.0 ^a	0.03	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	Acetate:Propionate	3.8 ^a	3.5 ^b	3.1 ^d	2.8 ^e	2.7 ^e	3.7 ^a	3.3 ^c	3.1 ^d	2.8 ^e	0.05	<.0001	<.0001	0.0057	<.0001	0.8566

^{abcdef} Means with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05).

¹⁾ Treatment, C: Control, MS (S1: mustard seed; 3.33g/L, S2: mustard seed, 5.00g/L, S3: mustard seed, 6.67g/L, S4: mustard seed, 8.34g/L), MP (P1: mustard powder; 3.33g/L, P2: mustard powder; 5.00g/L, P3: mustard powder; 6.67g/L, P4: mustard powder; 8.34g/L)

²⁾ Standard Error of Means

³⁾ Quadratic.

과 Mohammed 등(2004)이 실험에 첨가한 cyclodextrin은 glucose로 구성되어 있는 환형 다당류이다. Cyclodextrin은 그 구성성분인 가용 탄수화물의 이용이 증가함에 따라 반추위 내 미생물 단백질 합성을 위한 암모니아의 이용이 증가하게 되고(Lila 등, 2003) 이에 따라 분석을 통해 검출되는 암모니아의 농도는 감소했던 것으로 보인다. 반면 본 실험에 사용한 겨자종자와 겨자분은 식물의 여러 부분 중에서도 단백질의 함량이 가장 높은 종자부위(Rune, 1973)로 앞서 언급한 Son과 Lee(2006)의 결과에 의하면 겨자종자와 겨자분의 조단백질 함량은 23.49% 및 33.74%이다. 이에 따라 겨자종자와 겨자분은 기존의 연구자들이 사용한 전분질 cyclodextrin complex 첨가에 비해 조단백질 함량이 높아 암모니아의 생성량도 증가한 것으로 사료된다.

총 VFA는 모든 처리구에서 첨가량에 따라 유의적으로 높아졌고 배양시간이 지남에 따라 증가하였다(Table 5). 겨자종자의 경우 대조구와는 총 VFA 생성량이 큰 차이가 있었지만(P<0.01) S1과 S2 사이에서는 유의적인 차이가 없었고, S3와 S4 간에도 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 겨자분은 겨자종자와 마찬가지로 대조구와 큰 차이를 보였으나(P<0.01), 배양 6시간에는 P1과 P3 사이에만 유의적인 차이가 있었고(P<0.01), 배양 12시간에는 P1과 P4를 제외하고 P2와 P3 간에 차이가 없었다. 배양 24시간에는 P1과 P2 사이에 유의적인 차이가 있었으나(P<0.01) P3와 P4 간에는 차이가 없었다. Acetate 농도는 겨자종자와 겨자분의 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 배양 24시간 후에는 S4와 P4 처리구에서 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(P<0.01). Acetate와 반대로 propionate는 겨자분의 6시간 배양을 제외하고 모든 처리구에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다(P<0.05). Acetate의 감소와 propionate의 증가로 A:P ratio는 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다(P<0.05). Butyrate는 겨자종자와 겨자분 모두에서 6 및 12시간 배양 시 첨가수준이 증가함에 따라 감소하였으나 24시간 배양 후에는 증가하였다. Iso-butyrate의 경우 겨자종자는 배양 6시간과 12시간에 감소하였고 24시간에는 대조구와 비슷하였으며, 겨자분은 배양 6시간과 24시간에는 대조구와 유의성을 보이지 않았고 배양 12시간에는 증가하였다. Valerate의 경우 대조구와 처리구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았고 iso-valerate는 첨가량에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 할로겐 화합물이나(Trei 등, 1971) ionophore 또는 다른 메탄 생성균의 활성을 억제시키는 물질을 첨가(Goodrich 등, 1984)하여 메탄 생성을 저감하는 실험을 수행했던 다른 연구들의 휘발성 지방산의 생성 결과와 유사하였다. 특히 Demeyer와 Van Nevel(1975)의 연구 결과에 의하면 A:P ratio가 감소하는 것은 메탄 생성이 저감되는 것과 더불어 메탄 생성에 쓰이지 못한 수소가 propionate의 생산에 이용되어 propionate의 농도를 증가시켰기 때문이라고 하였다. 본 실험의 결과는 allyl isothiocyanate를 함유한 다른 추출물의 실험과도 유사하였다(Lila 등, 2003; Mohammed 등, 2004).

요 약

본 연구는 allyl isothiocyanate를 함유한 겨자종자와 겨자분을 이용하여 반추위 발효성과 메탄 배출에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다. 완충용액과 혼합한 반추위액 30 ml에 겨자종자와 겨자분을 첨가하여 39°C에서 6, 12, 그리고 24시간 동안 배양하였다. 겨자종자와 겨자분은 각각 0, 3.33, 5.00, 6.67 및 8.34 g/L 첨가하였다. 총 가스 생성량은 모든 처리구에서 유의적으로 증가하였다(P<0.01). 메탄 배출량은 겨자종자를 6.67 g/L 및 8.34 g/L 첨가하였을 때 각각 4.77% 및 11.54% 감소하였다(P<0.05). 겨자분에서는 배양 6시간에 8.34 g/L를 첨가하였을 때를 제외하고 효과가 나타나지 않았다. 반추위 발효성에 있어, pH는 대조구와 비교하여 모든 처리구에서 낮게 나타났다(P<0.01). 암모니아의 농도는 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였다(P<0.01). 총 휘발성 지방산 농도는 모든 처리구가 대조구보다 높았다(P<0.05). 대조구와 비교하여 acetate의 농도는 감소하였고, propionate의 농도는 증가하였다(P<0.05). Acetate와 propionate 변화로 인해 A:P ratio 역시 감소하였다(P<0.05). 본 시험 결과로 보아, allyl isothiocyanate를 함유한 겨자종자를 첨가하였을 때 반추위 발효성에 영향을 미치지 않고 메탄 생성량을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

(주제어: 겨자, 메탄, 반추위 발효)

인 용 문 헌

- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C. and Kamra, D. N. 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148:321-327.
- Amlan K. Patra. And Jyotisna Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites in inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71:1198-1222.
- Amrish Kumar Tyagi. 2002. Influence of water soaking of mustard cake on glucosinolate hydrolysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 99:215-219.
- Blaxter, K. L. and Clapperton, J. L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition* 19:511-522.
- Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., Garcia-Gonzalez, R., Rodriguez, A. B., Wallace, R. J. and Gonzalez, J. S. 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:245-258.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate

- diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83:2572-2579.
- Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modification reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130.
- Chaves, A. V., He, M. L., Yang, W. Z., Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Benchaar, C. 2008. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Can. J. Anim. Sci.* 89:97-104.
- Demeyer, D. and Van Nevel, C. J. 1975. Methanogenesis, and integrated part of carbohydrate fermentation and its control. Pages 366-382 in *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. L. W. McDonald and A. C. I. Warner, ed. Univ. of New England Publishing Unit, Armidale, Australia.
- Ferorak, P. M. and Hrwdey, S. E. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic culture in serum bottle. *Environ. Technol. Lett.* 4:268.
- Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M., Bodas, R. and Gonzalez, J. S. 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:36-52.
- Goodrich, R. J., Garnett, J. E., Gast, D. R., Kirick, M. A., Larson, D. A. and Meiske, J. C. 1984. Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.* 58:1484-1498.
- Hino, T. and Russell, J. B. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(6):1368-1374.
- IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change). 2001. *Climate change 2001. The scientific basis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Johnson, D. E., Wood, A. S., Stone, J. B. and Moren, E. T. Jr. 1972. Some effects of methane inhibition in ruminants (steers). *Can. J. Ani. Sci.* 52: 703-708.
- Johnson, K. A. and Johnson, D. E. 1995. Methane emission from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-2492.
- Kamel, C., Greethead, H. M. R., Tejido, M. L., Ranilla, M. J. and Carro, M. D. 2008. Effects of allicin and diallyl disulfide on *in vitro* rumen fermentation of a mixed diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:351-363.
- Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P. and Navanukraw, C. 2010. Effect of cocount oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Licest Sci.* 127:38-44.
- Kumar, R., Kamra, D. N., Agrawal, N. and Chaudhary, L. C. 2009. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 9:237-243.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. and Itabashi, H. 2003. Effect of α -cyclodextrin allyl isothiocyanate on ruminal microbial methane production *in vitro*. *Anim. Sci. J.* 74:321-326.
- Lin, C. M., Kim, J., Du, W. X. and Wei, C. I. 2000a. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *J. Food protection.* 63:25-30.
- Lin, C. M., Preston, J. F. and Wei, C. I. 2000b. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *J. Food Protection.* 63:727-734.
- McDougall, E. I. 1947. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
- Mithen, R. 2006. Sulphur-containing compounds. In: Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the human diet*. Blackwell publishing, Chennai, India. pp. 25-46.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Koji Hara, Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S. and Itabashi, H. 2004. Effect of Japanese horeradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *J. Anim. Sci.* 82:1839-1846.
- Newbold, C. J., Lassalas, B. and Jouany, P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Microbiology.* 21:230-234.
- Ohene-Adjei, S., Chaves, A. V., McAllister, T. A., Benchaar, C., Teather, R. M. and Forster, R. J. 2008. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microbial. Ecol.* 56:234-242.
- Patra, A. K., Kamra, D. N. and Agarwal, N. 2006a. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 128:276-291.
- Patra, A. K., Kamra, D. N. and Agarwal, N. 2006b. Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in *in vitro* gas production test. *Int. Congress Ser.* 1293:176-179.
- Rufener, W. H. Jr. and Wolin, M. J. 1968. Effect of CCl₄ on methane and volatile acid production in continuous culture of rumen organisms and sheep rumen. *Microbiology.* 16:1955-1056.
- Rune, Björkman. Interaction between proteins and glucosinolate isothiocyanates and oxazolidinethiones from *Brassica napus* seed. 1973. *Phytochemistry.* 12:1585-1590.
- SAS. 2002. *SAS User's Guide : Statistics, Version 9.1 Edition*. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Son, M. H. and Lee, J. Y. 2006. Standardization of processing conditions of mustard powder and mustard oil for quality improvement. *The Korean Journal of culinary research.* 12(4): 131-139.
- The Government of the Republic of Korea. 2003. second National Communication of the Republic of Korea Under the United

- Nations Framework Convention on Climate Change. <http://www.Keei.re.kr>.
- Trei, J. E., Parish, R. C., Singh, Y. K. and Scott, G. C. 1971. Effect of methane inhibitors on rumen metabolism and feedlot performance of sheep. *J. Dairy Sci.* 54:536-540.
- Tyagi, A. K. and Singhal, K. K. 1998. Effect of mustard oil and glucosinolate on rumen fermentation. *Indian J. Anim. Nutr.* 16:12-18.
- Van Nevel, C. J., Henderickx, H. K., Demeyer, D. I. and Martin, J. 1969. Effect of chloral hydrate on methane and propionic acid in the rumen. *Microbiology.* 17:695-700.
- Zebeli, Q., Tafaj, M., Weber, I., Steingass, H. and Drochner, W. 2008. Effects of dietary forage particle size and concentrate level on fermentation profile, *in vitro* degradation characteristics and concentration of liquid- or solid- associated bacterial mass in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 140: 307-325.
- (Received Apr. 30, 2012; Revised Feb. 25, 2013; Accepted Feb. 26, 2013)