

식물성유 첨가가 *In vitro* 발효성상, NDF 소실을 및 지방산염 형성에 미치는 영향

김동일·최정락·이윤행·이정권·정태영
건국대학교 축산학과

Effects of Added Vegetable Oils on *In vitro* Formation of Fatty Acid Soaps and Fermentation Characteristics and NDF Disappearance Rate

D. I. Kim, J. R. Choi, Y. H. Lee, J. K. Lee and T. Y. Chung

Department of Animal Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT

In vitro experiments were conducted to determine the formation of fatty acid soaps (FAS) and neutral detergent fiber (NDF) disappearance rate. The substrates were a basal alfalfa hay containing 1) no oil, 2) 10% soybean oil, 3) 10% corn oil, on a weight basis. All the substrates were incubated in triplicate for 0, 3, 6, 12, 24 and 48h in each experiment. After the incubation in the first experiment serum bottles (60ml) were analyzed for nonesterified, esterified and fatty acid soaps contents. The serum bottles (120ml) from the second experiment were analyzed for pH, NH₃-N and VFA concentration, and dry matter and NDF disappearance rate. pH decreased and the concentration of NH₃-N increased significantly with longer incubation time (P<0.0001). The disappearance rates of dry matter and NDF significantly varied with feed, incubation time and oils (P<0.05). The molar concentration of total VFA increased and proportion of acetate significantly decreased with incubation time (P<0.0001), but the proportion of propionate significantly increased with longer incubation time (P<0.0001). Addition of oils to diet lowered the ratio of acetate:propionate (P<0.05). The esterified fatty acids (EFA) decreased with increasing incubation time (P<0.0001), and nonesterified fatty acids (NEFA) increased due to lipolysis of EFA. NEFA then reacted with cations to increase formation of FAS. The formation of FAS increased significantly at 48h of incubation time (P<0.0001). Especially, formation of stearic acid soaps was 27.5 and 32.5 folds with soybean oil and corn oil supplements, respectively, by 48h of incubation time (P<0.0001). Alfalfa hay had higher cation contents, particularly Ca, which react with NEFA and FAS can be formed with longer incubation time. Saturated fatty acids had a higher proportion of FAS than did unsaturated fatty acids, suggesting that the former may react more extensively with cations. FAS contents increased with increasing chain length of the fatty acids. Since added vegetable oils formed FAS, it might decrease negative effects on *in vitro* fermentation characteristics and NDF disappearance rate.

(**Key words** : Vegetable oil, Fatty acid soaps, NDF disappearance rate, *In vitro*)

Corresponding author : T. Y. Chung, Department of Animal science, College of Animal Husbandry, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea, Tel : 02-450-3673, E-mail : tyehyng@kkucc.konkuk.ac.kr

I 서 론

고능력우 사양에 있어서 사료내 지방을 첨가하여 에너지 밀도를 높이는 것이 필요하다. 그러나 지방첨가 수준이 높을 때에는 조섬유 소화율 감소 등 반추위내 대사에 문제를 야기시킬 수 있다. 반추가축 사료에 지방을 첨가하면 반추위 발효를 방해함으로써 지방의 다른 영양소의 소화율을 감소시킨다.

실제 사양 조건에서는 건물 기준으로 사료의 지방 함량이 5%를 넘게 되면 반추위내 조섬유 소화가 저하된다. 7~8% 이상이면 반추위 미생물에 직간접으로 나쁜 영향을 미친다. 그래서 초산/프로피온산 비율이 낮아지고 동시에 메탄, 수소 및 VFA 생성량이 감소한다(Boggs 등, 1987; Chalupa 등, 1984; Czerkawski와 Clapperton, 1984; Ikwuegbu와 Sutton, 1982). 지방첨가수준이 건물기준 10% 이하에서도 구조성 탄수화물의 반추위 소화율이 50% 이상 감소될 수 있다(Ikwuegbu와 Sutton, 1982). 또한 지방첨가는 반추위 미생물(특히 섬유소 분해박테리아)의 활성을 저해시켜 초산은 감소하고 프로피온산의 함량은 증가한다(Henderson, 1973).

지방의 종류와 형태는 반추위 발효에 영향을 미친다. 불포화지방산은 포화지방산보다 반추위 발효를 더 억제하나 장쇄지방산의 칼슘염, fatty alcohol 및 중성지방과 같은 반추위내 비분해 지방산 유도체 등은 유리지방산보다 반추위내 발효를 덜 억제한다(Chalupa 등, 1984; Czerkawski 등, 1984). 유리된 지방산이 사료입자에 흡착될 때 지방첨가가 미생물에 미치는 악영향을 억제할 수 있다(Harfoot 등, 1974).

불포화 지방산의 농도가 증가하면 반추위 내의 발효를 억제시키고, 반추위 미생물에 독성을 일으키기 때문에 불포화 지방산의 함량을 감소시킬 수 있는 방향으로 반추위내 대사 과정이 조정되어야 한다(Jenkins, 1993). 반추위에서는 자연적으로 양이온과 지방산이 결합하여 염을 형성한다. 지방을 첨가함으로써 야기되는 소화율의 저하는 양이온의 첨가로 개선될 수 있다. 알팔파에는 칼슘 함량이 높기 때문에 옥수수유 첨가시 발생하는 섬유소 소화율 저하현

상을 억제할 수 있다(White 등, 1958). 지방산을 칼슘염으로 대체한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험 결과 섬유소 소화역제 작용을 완화시킬 수 있다(Jenkins와 Palmquist, 1984).

Palmquist와 Yang(1999)은 heptadecanoic acid를 potassium과 결합시킨 지방산염을 알팔파, timothy 건초 및 밀짚에 흡착시킨 결과 알팔파가 다른 조사료에 비해 지방산염의 흡착량이 높았다. 또한 모든 조사료에서 사료입자의 크기가 작아질수록 흡착량이 높았다고 발표하였다.

지금까지 실험실에서 지방산 칼슘염을 제조하거나 제품화된 지방산 칼슘염을 구입하여 시험한 연구결과는 많으나 사료내 oil만을 첨가하여 반추위내에서 칼슘을 포함한 양이온과 결합하여 형성되는 지방산염 형성에 관한 논문은 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 칼슘을 포함한 양이온 함량이 다른 조사료에 비해 높고 지방산염 흡착량이 가장 높은 알팔파 건초를 기질로 선정하였다. 대두유와 옥수수유를 건물 기준으로 각각 10% 첨가하여 *in vitro* 배양시 nonesterified fatty acid(NEFA), esterified fatty acid(EFA) 및 fatty acid soaps(FAS)의 형성정도와 지방산 조성, 식물성유 첨가에 따른 반추위내 발효성상과 NDF 소화율에 미치는 영향에 대하여 조사하고자 실시하였다.

II 재료 및 방법

1. 시험설계

본 시험은 alfalfa에 대두유와 옥수수유 첨가가 발효성상 및 지방산 염 형성간의 차이점을 조사하기 위하여 총 6번 실시하였다. 기질은 alfalfa(1st cut)로 하고 1) oil 무첨가구, 2) 대두유 10% 첨가구, 3) 옥수수유 10% 첨가구로 하였으며, oil 첨가수준은 기질 중량 건물 기준으로 하였으며, 시험 시간 직전에 micropipette을 이용하여 첨가하고 지방산 함량 계산시 보정하였다.

지방산 분석을 위한 시험에서는 60ml serum

bottle을 사용하여 3반복 하였고, 발효성상을 위한 시험에는 120ml serum bottle을 사용하여 3반복 하였다. 배양시간은 0, 3, 6, 12, 24 및 48시간에 걸쳐 완전 임의 배치법으로 실시하였다.

2. 시험사료와 배양액의 준비

시험사료를 Wiley mill(Thomas Scientific, Model 4, New Jersey, USA)에 1mm screen을 설치하여 분쇄한 후 50mesh sieve로 분진을 제거하여 기질로 사용하였다. 지방산 분획용 60 ml serum bottle에 0.5g을 배양기질로 사용하였고, 발효성상을 위한 120ml serum bottle에는 2g을 배양기질로 사용하였다. 지방산 분획용과 발효성상을 위한 시험을 serum bottle을 구분하여 실시한 것은 C:M(chloroform: methanol = 2:1, V/V, Folch 등, 1957) 용액에 처리할 수 있는 지방산량을 조정하기 위해서이다. 시험사료의 화학적 조성은 Table 1에서와 같다.

반추위액 채취를 위한 공시동물로는 건국대학교 축산대학 실험동물 사육실에서 반추위에 cannula를 장착한 Corridale×Suffolk 중 면양(평균체중 52.17kg±2.02) 3두를 이용하였다. 이들 면양에는 대사체중당 건물 55g(NRC, 1985)을 급여 기준량으로 하여 알팔파(1st cut)와 농후사료(젓소 큰송아지, 양주축협)를 7:3의 비율로 급여하였다. 급여사료의 화학적 조성은 Table 1에서 보는 바와 같다. 공시동물은 대사 cage에 수용하여 적응하였고, 사료는 1일 2회(09:00, 19:00) 급여하였으며, 물 및 mineral block (Vitablock, Castyne Ltd., England)은 자유섭취시켰다.

배양액은 아침사료 급여전 면양 rumen cannula로부터 위 내용물을 39℃ 보온병에 담아 실험실로 운반하여 4겹의 cheese cloth를 통해 여과하고 이를 McDougall(1948) 인공타액과 1:1로 혼합하여 사용하였다.

3. 배양방법

배양액을 60ml와 120ml serum bottle에 각각

15ml와 60ml씩 주입하고, 혐기 조건을 위해 O₂-free CO₂를 주입하였다. 각각의 bottle은 rubber stopper와 aluminum seal로 봉하였다. 배양조건은 39℃ . 유지된 shaking incubator (Chang Shin Co., Korea)에서 100rpm으로 교반하면서 시간대별로 각 serum bottle을 회수하여 분석하였다.

4. 배양물 처리 및 측정항목

(1) 발효성상

각각의 시간대별로 배양을 종료한 120ml serum bottle을 꺼내어 pH를 측정하고 다음 250ml 원심분리용 tube에 옮겨 18,000×g, 4℃ 서 30분간 원심분리(Supra 21K, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea) 하였다. 원심분리 후 상층액에 대해서는 암모니아태질소(NH₃-N) 및 휘발성지방산(volatile fatty acid, VFA) 농도를 측정하였다. 침전물에 대해서는 전량을 예비동결 후에 동결건조기(FD 8505, Ilshin Lab Co., LTD., Korea)에서 건조 처리한 후 고형물량을 측정하여 배양 전후의 차로부터 소실율을 산출하였다. 또한 동일시료를 사용하여 NDF 소실율을 산출하였다.

(2) 지방산 분획

각각의 시간대별로 배양을 종료한 60ml serum bottle을 꺼내어 50ml 원심분리용 tube에 옮겨 35,000×g, 4℃ 서 20분간 원심분리(Supra 21K, Hanil Science Industrial Co., LTD., Korea) 하였다. 위의 원심분리 속도에서는 상층액 내에 지방산이 거의 남지 않으므로 상층액은 제거하였다(Jenkins와 Palmquist, 1982).

5. 분석항목

(1) 화학성분 분석

시료의 일반성분 분석은 AOAC(1995) 방법에 준하여, NDF 및 ADF는 Van Soest 등(1991)의 방법에 의해 분석하였다. Ca, K, Mg 및 Na은 Automatic Absorption Spectrophotometer(Spectra AA 880, Varian, USA)를 이용하여 분석하였다.

Table 1. Chemical and fatty acid composition of experimental diets

| Item | Alfalfa 1st cut | Concentrate | Soybean Oil | Corn Oil |
|--------------------------------------------------|-----------------|-------------|------------------|----------|
| Dry matter(%) | 91.47 | 89.92 | | |
| | | | | |
| Crude protein | 20.00 | 15.17 | | |
| Ether extract | 2.78 | 3.06 | | |
| Crude fiber | 42.72 | 5.09 | | |
| Ash | 7.64 | 6.92 | | |
| Calcium | 1.75 | 0.81 | | |
| Potassium | 1.73 | 1.00 | | |
| Magnesium | 0.32 | 0.34 | | |
| Sodium | 0.46 | 0.46 | | |
| Nitrogen free extract | 26.86 | 69.76 | | |
| Neutral detergent fiber | 57.36 | 30.92 | | |
| Acid detergent fiber | 49.09 | 9.34 | | |
| Fatty acid composition, wt % of total fatty acid | | | | |
| C 14:0 | 3.63 | 0.36 | ND ¹⁾ | ND |
| C 16:0 | 31.71 | 18.30 | 10.93 | 12.48 |
| C 16:1n7 | 0.51 | 0.34 | 0.09 | 0.15 |
| C 18:0 | 6.52 | 1.94 | 4.13 | 2.05 |
| C 18:1n9 | 4.22 | 23.03 | 22.86 | 28.46 |
| C 18:2n6 | 16.19 | 48.60 | 53.25 | 55.03 |
| C 18:3n3 | 26.40 | 3.13 | 6.69 | 0.73 |
| C 20:0 | 3.22 | 0.42 | 0.35 | 0.45 |
| C 20:1n9 | ND | ND | 0.28 | 0.33 |
| C 20:5n3 | ND | 0.41 | ND | ND |
| C 22:0 | 3.22 | 1.49 | 0.38 | 0.15 |
| C 22:1n9 | ND | 1.49 | ND | ND |
| Others ²⁾ | 4.96 | 1.24 | 1.04 | 0.17 |
| Total | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

¹⁾ not detectable, ²⁾ unknown fatty acid.

(2) pH 측정

배양액은 각각의 시간대별(0, 3, 6, 12, 24, 48시간)로 배양을 종료한 용기를 꺼내어 즉시 pH meter(pH 209, Hanna Instruments, Italy)를 이용하여 측정하였다.

(3) NDF 소실율

배양전의 시료와 배양후 동결건조한 시료를 Van Soest 등(1991)의 방법으로 분석하여 그 차를 이용하여 배양전후의 NDF 소실율을 산출하였다.

(4) NH₃-N 측정

NH₃-N은 Chaney와 Marbach(1962) 방법에 따라서 12ml의 상층액을 원심분리하여 0.02ml를 20ml test tube에 넣고, phenol color reagent와 alkali-hypochlorite를 각각 1ml를 첨가 후 혼합하여 water bath에서 발색반응 후 spectrophotometer(UV S-2100, Scinco Co., LTD., Korea)를 이용하여 630nm의 파장에서 표준 NH₃-N용액과 시료의 흡광도를 측정하였다.

(5) VFA 측정

배양액중의 VFA는 원심분리후 상층액과 25% metaphosphoric acid를 4:1 비율로 혼합한 후 상층액을 이용하여 GC(HP 6890 Series GC System, Hewlett Packard, USA)로 분석하였고, VFA 표준용액으로는 acetic과 propionic acid를 각각 0.05M, butyric, iso-butyric, valeric 및 iso-valeric acid는 각각 0.01M을 혼합하여 만든 용액을 사용하여 표준용액의 면적과 비교하여 VFA의 생성량을 측정하였다.

(6) 지방산 염 측정

2시간동안 80℃ 서 건조시킨 후 Folch solution(chloroform:methanol = 2:1, V/V, Folch 등, 1957)을 넣은 후 homogenizing 하였다. 뚜껑을 닫은 후 600×g에서 10분간 원심분리하여 추출물은 250ml separatory funnel로 옮긴다. 이 과정을 2번 더 반복하여 FAS를 제외한 NEFA와 EFA를 추출하였다. Folch solution의 1/4 volume의 0.9% NaCl solution을 첨가하여

잘 혼합한 후 정치시키면 수용액층과 유기용매층으로 분리된다. 유기용매층만 round flask에 분리하고 EYELA evaporator를 이용하여 유기용매를 제거하고 지질만을 분리하였다. Chloroform 5ml를 이용하여 round flask내의 지질을 추출한 후 1ml를 silicagel plates(20cm×20cm Slica gel 60 F254, Merck Ltd.)에 spot한 후 thin layer chromatography 방법으로 전개하여 분획하였다. 전개용매는 hexane:diethylether:acetic acid(80:30:1, v/v)를 이용하였다.

원심분리용 tube에 남아있는 FAS는 2시간 동안 80℃ 서 건조시킨 후 지방산 분석에 사용하였다. 3가지 분획(NEFA, EFA 및 FAS)의 지방산 함량 및 조성을 분석하기 위하여 1mg의 nonadecanoic acid(C_{19:0})를 internal standard로 사용하여 one-step extraction and methylation 방법(Sukhija와 Palmquist, 1988)을 이용하여 GC(HP 6890 Series GC System, Hewlett Packard, PA, USA)로 분석하였다. GC에는 FID(Flame Ionization Detector)가 장착되어 있으며, 칼럼은 fused silica capillary column[Omegawax 320; 30m×0.32mm(i.d.) with 0.25µm film thickness, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA]을 사용하였고, 질소를 carrier gas로 하였다. Data는 Integrator(HP 3395; Hewlett Packard, PA, USA)를 이용하여 산출하였다.

6. 통계분석

본 시험에서 얻어진 모든 data는 GLM (general linear model)으로 SAS package program (2002, release, 8.e ver.)을 이용하여 분석하였다. 본 시험의 통계분석 모델은 다음과 같다.

$$Y_{ijkl} = \mu + F_i + T_j + O_k + F \times T_{ij} + e_{ijkl}$$

μ = 시험전체 평균,

F_i = 사료(oil 무첨가구, 대두유 10% 첨가구, 옥수수유 10% 첨가구)간의 평균효과 ($i = 1, 2, 3$),

T_j = 배양시간의 평균효과($j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$)

O_k = 대두유와 옥수수유간의 평균효과($k = 1, 2$),

$F \times T_{ij}$ = 사료와 배양시간의 상호작용의 평균효과,
 e_{ijkl} = 실험잔차이다.

각 처리구의 평균치는 LSMean으로 보고하였다. 각 처리구간 평균치간의 유의적 차이 검정은 PDIFF 방식으로 실시하였으며, 유의성은 $P < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 있었던 것으로 인정하였다.

III 결과 및 고찰

1. pH, NH₃-N 및 VFA의 변화

각 처리구간 배양시간별 배양액 중 pH, NH₃-N 및 VFA의 변화는 Table 2에 나타내었다.

pH는 처리구(사료)와 배양시간별로 유의적인 차이를 보였고($P < 0.0001$), 처리구와 배양시간의 상호작용에도 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). 그러나 oil간 효과는 없었다.

배양시간이 증가함에 따라 pH는 감소하였으며($P < 0.0001$), 대조구에 비해 대두유 및 옥수수유 첨가구의 pH가 유의적으로 낮았다($P < 0.0001$).

NH₃-N 농도의 변화는 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다($P < 0.0001$). 그러나, 대조구를 포함한 oil의 종류별(처리구), oil의 종류와 배양시간과의 상호작용(처리구와 배양시간 상호작용) 및 oil간만(oil간)의 효과는 없었다.

총 휘발성 지방산 농도는 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다($P < 0.0001$). 배양시간 12 및 24시간에서 옥수수유를 첨가한 구의 총 휘발성 지방산 농도가 다른 처리구에 비해 낮았지만 유의적인 차이는 없었다. 처리구, 처리구와 배양시간의 상호작용 및 oil간 효과는 없었다.

Acetate는 시험구 모두 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였고($P < 0.0001$), 대조구에 비해 oil 첨가구가 유의적으로 낮아졌다($P < 0.05$). Propionate는 시험구 모두 배양시간이

증가함에 따라 유의적으로 증가하였지만($P < 0.0001$), 처리구 및 oil간 효과는 없었다. iso-butyrate는 배양시간의 변화에는 유의적인 경향이 없지만 oil 첨가구에 비해 대조구가 유의적으로 높았다($P < 0.05$). Butyrate, valerate 및 iso-valerate는 배양시간에 따른 유의적인 변화는 있었지만($P < 0.0001$), 처리구, 처리구와 배양시간의 상호작용 및 oil간 효과는 없었다. A/P 비율은 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 낮아졌으며($P < 0.0001$), 처리구간에도 유의적인 차이를 보여 대두유 및 옥수수유 첨가구에 비해 대조구가 높았다($P < 0.05$).

면양에게 아마유를 급여하였더니 총휘발성지방산 농도에는 영향을 미치지 않았으나 acetate와 butyrate 농도를 각각 18과 61% 감소시켰으며 propionate를 최대 2배까지 증가시켰다는 Ikwuegbu와 Sutton(1982)의 보고와 본 연구결과와 유사하였다. 또한 Czerkawski와 Clapperton(1984)도 아마유 1g 첨가시마다 총휘발성지방산, acetate 및 butyrate를 각각 5, 13 및 41% 감소시켰으며 propionate는 9% 증가시켜 수소의 생성을 감소시켰다고 보고한 바 있다. 반추위내 pH는 아마유 첨가로 낮아지는 경향을 보였다는 Ikwuegbu와 Sutton(1982)의 보고와는 유사한 경향을 보여주었다. 또한 양 등(1998)은 오차드그라스 시료에 목초 추출지질을 3%와 6% 첨가한 *in vitro* 시험결과 시간이 경과함에 따라 pH는 감소하고 총 VFA 농도는 증가하였다고 하였다.

Harfoot 등(1974)은 반추위 내에서 유리된 지방산이 사료입자에 흡착되기 때문에 지방 첨가시 미생물에 미치는 유해한 영향을 억제할 수 있다고 하였다. 반추위 내용물 중 사료내 지방(중성지방과 미생물의 가수분해에 의해 생성된 유리지방산)은 소수성 상호작용에 의해 사료입자에 흡착된다(Lough, 1969).

반추위내 미생물은 알팔파와 같은 섬유소 사료를 소화할 때 식물표면 조직중 기공(stomata)을 통하여 조직내부로 침투하여 세포내부 물질을 먼저 소화하고 외부물질을 소화하게 된다. 즉, 반추위내 미생물은 섭취한 사료에 대하여 일단 외피부터 공격하게 되지만 쉽게 소화시킬

수 없기 때문에 외피의 파쇄된 부분을 통하여 세포내부로 침투한 후 소화하기 쉬운 내부 물질을 먼저 공격하고 그후 소화하기 어려운 외피부분을 공격하는 inside-out이라는 개념으로 소화작용을 하게 된다(Cheng 등, 1991; 배 등, 1992).

본 시험에 기질로 사용한 시료는 1mm 이하의 사료입자도를 가진 알팔과 건초로써 1mm 이상의 사료입자에 비해서 표면적이 높을 것으로 생각된다. 배양시간 모두 배양액내 중성지방과 유리된 지방산이 표면적이 높은 알팔과 사료입자에 흡착되어 지방첨가로 인해 발생하는 미생물에 미치는 유해한 영향을 감소시킬 수 있다. 또한 배양액내 미생물이 사료입자의 기공을 통하여 침투하여 세포내부 물질을 소화시킨 후 외피를 소화하기 때문에 발효성상에 미치는 영향이 없었던 것으로 사료된다.

김(2004)의 시험결과 알팔과는 지방산염 흡착율이 다른 목건초 종류에 비해 가장 높았고, 또한 지방산염을 최대로 흡착할 수 있는 능력을 가지고 있었다. 또한 칼슘을 포함한 양이온의 함량이 4.26%(건물기준, Table 1)로 높은 알팔과의 경우 배양시간이 증가함에 따라 양이온이 용출되면서 사료입자에 흡착된 유리지방산과 결합하여 지방산염을 형성하기 쉽다. 대두유나 옥수수유를 알팔과 건초에 첨가하였을 때 반추위내 발효성상에 영향을 미치지 않은 것은 배양 24 및 48시간에서 대조구에 비해 oil 첨가구의 지방산염 형성이 유의하게 증가하여(Table 3) 미생물에 미치는 NEFA의 유해한 영향이 감소한 것도 한 요인이라 볼 수 있다.

따라서 본 시험에서 oil을 10% 첨가해도 반추위 발효성상에 미치는 유해한 영향은 없는 것으로 사료된다.

2. 건물 및 NDF 소실율

각 처리구간 배양시간별 배양액 중 건물과 NDF 소실율의 변화는 Table 2에 나타내었다.

건물소실율은 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였으며($P<0.0001$), 처리구 및 oil간 효과에도 유의적인 차이가 있었다($P<$

0.05). 특히 배양 초기에서 옥수수유 처리구에서 건물소실율이 다른 처리구에 비해 높았으나 24 및 48시간에는 대조구가 약간 높았다.

NDF 소실율은 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였으나($P<0.0001$), 처리구, 처리구와 배양시간의 상호작용 및 oil간 영향은 없었다.

Jenkins와 Palmquist(1982)는 우지를 10% 첨가한 *in vitro* 배양시험에서 지방 첨가구의 NDF 소화율이 무첨가구에 비해서 유의적($P<0.01$)으로 낮았다고 하여 본 시험과는 다른 경향을 보여주었다. 면양에게 아마유 급여시 에너지, 유기물의 소화율 특히 ADF 소화율이 저하된다는 Ikwuegbu와 Sutton(1982)의 연구결과와는 달리 배양 12시간까지는 건물소실율이 대조구에 비해 높은 경향을 보여주었으나 24 및 48시간 배양시에는 오히려 낮아지는 경향을 나타내었다.

Jenkins(1993)는 지방을 첨가했을 때 사료의 조성이 반추위 발효성상에 영향을 미친다고 하였다. 지방은 보통 발효를 억제하나 사료에 건조 함량을 증가시키면 억제 작용을 감소시킬 수 있다. 젖소에게 fescue 건초를 50% 급여할 때 채종유나 우지를 10% 첨가해도 유기물의 소화율에는 영향을 미치지 않았다는 보고(Doreau 등, 1991)와 유사한 결과를 보였다.

본 연구에서 지방첨가시 24시간 배양후 건물소실율과 NDF 소실율은 각각 평균 28.7과 47.9%였는데 이는 양 등(1998)이 오차드그라스에 지방을 3% 또는 6% 첨가시 각각 30~3%과 50~60%라고 발표한 내용과 유사하였다.

즉, 지방 급여는 반추위내 발효를 억제하나, 급여사료에 건조의 비율을 높이면 지방의 분산 효과로 조섬유 소화율을 높일 수 있었다(Devendra와 Lewis, 1974). Harfoot과 Hazlewood(1988)는 지방산과 양이온이 반응하여 지방산염을 형성하는데 시간이 필요한데, 그 이유는 반추위내 지방산이 주로 사료입자에 흡착되어 있기 때문이라고 하였다. 본 시험에서 배양시간 24 및 48시간에서 대조구에 비해 oil 첨가구에서 지방산염 형성이 유의하게 증가하였다. 또한 본 시험에 사용한 알팔과 건초는 조

섬유, NDF 및 ADF 함량이 각각 42.72, 57.36 및 49.09%(Table 1)로 화분과와 저질 조사료에 비해서는 낮지만 곡류사료에 비해서는 높으며, 알팔과 사료입자의 지방산염 흡착량은 다른 목 건초 종류에 비해서 가장 높았다(김, 2004).

배양시간 전반에 걸쳐 NDF 소실율이 oil 첨가로 인해 유의적인 차이가 없었던 것은 기질로 알팔과만을 사용하였기 때문에 섬유소 함량이 높아서 가수분해된 지방산이 알팔과 사료입자에 분산되어 흡착되었고, 배양시간이 증가함에 따라 지방산염을 형성하였기 때문인 것으로 사료된다.

3. 지방산 변화

(1) 지방산 분획내 총 함량 변화

각 처리구간 배양시간별 지방산 분획내 총 함량 변화를 Table 3과 Fig. 1~3에 나타내었다.

FAS는 배양시간이 증가함에 따라 유의하게 증가하였으며($P < 0.0001$), 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과에도 유의적인 차이가 있었다($P < 0.0001$). 특히 배양시간 24시간에

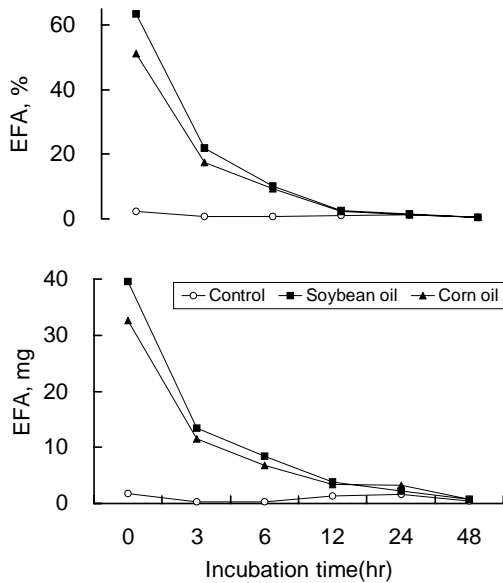


Fig. 1. Proportion and concentration of esterified fatty acid (EFA) with incubation time *in vitro*.

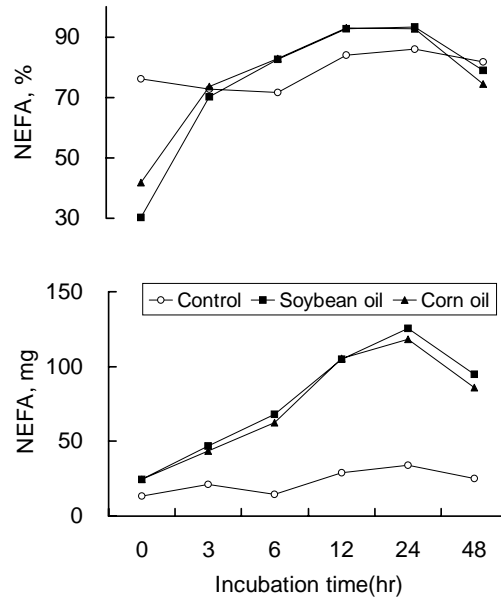


Fig. 2. Proportion and concentration of non-esterified fatty acid (NEFA) with incubation time *in vitro*.

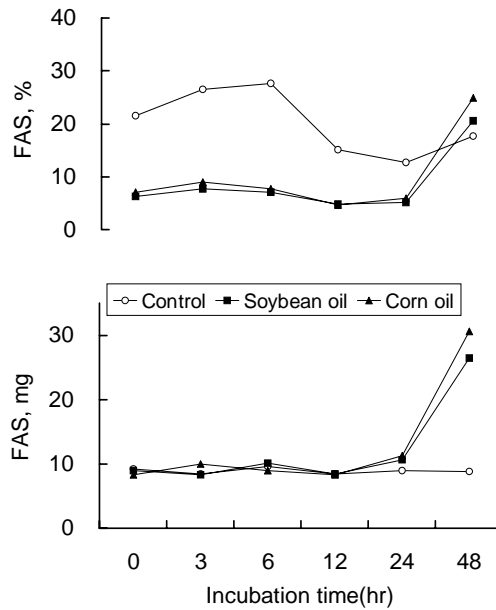


Fig. 3. Proportion and concentration of fatty acid soaps (FAS) with incubation time *in vitro*.

서 oil 첨가구에서 높아지다가 48시간에는 대두유 및 옥수수유 첨가구가 각각 21.83 및 25.95 mg/g DM으로 지방산염을 형성하였다. NEFA의 변화를 보면 배양시간 0시간에 비해 24시간까지는 큰 폭으로 증가하다가 48시간에는 FAS의 형성으로 인하여 24시간에 비해서 유의적으로 감소하였다($P<0.0001$). 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과에도 유의적인 차이가 있었다($P<0.0001$). EFA의 변화를 보면 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다($P<0.0001$). 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과에도 유의적인 차이가 있었고($P<0.0001$), oil간 효과도 유의적인 차이가 있었다($P<0.01$).

Gulati 등(1997)은 해바라기유를 *in vitro* 배양한 결과 배양 24시간에 EFA의 95%가 NEFA로 가수분해되었다고 하여 본 시험 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 반추위내 FAS를 형성하는 것은 사료내 칼슘 함량보다는 첨가한 지방의 농도에 따라 다르다고 보고하였다(Palmquist, 1987). 본 시험에서도 대조구에 비해서 oil 첨가구가 지방산염을 형성하는 비율이 높았다. 지방의 가수분해의 특징은 대부분의 증성지방을 짧은 시간내에 유리지방산으로 변화시킨다고 보고한 결과(Hawke와 Silcock, 1970)와 본 연구결과에서 나타난 배양 3시간에 NEFA가 70% 이상으로 증가하였다는 사실과 잘 부합된다. 일반적으로 고지방 사료에 칼슘 함량을 증가시키면 반추위 내 지방산과 칼슘이 반응하여 지방산염을 형성하여 섬유소 분해 억제 작용을 완화시킨다(Palmquist와 Jenkins, 1980). 그러나, 반추위 내에서 염 형성을 하기 위해서는 지방산과 양이온이 반응하는 시간이 필요하며, 또한 사료내 양이온이 용해되는 시간도 필요하다. 본 시험에서는 배양시간 24시간에서야 대조구에 비해서 oil 첨가구의 지방산염 형성 비율이 증가하다가 48시간에 가서야 큰 폭으로 증가하였다.

지방산염 형성 정도는 사료내 지방 함량뿐만 아니라 사료 내 칼슘의 용해도, 반추위내 pH 및 지방산의 포화도와 사슬길이에 따라 다르며, 또한 사료 내 칼슘 함량보다는 지방산 농

도에 따라 더 영향을 받는다(Jenkins와 Palmquist, 1982; Palmquist 등, 1986).

(2) EFA, NEFA 및 FAS의 지방산 조성변화
각 처리구간 배양시간별 지방산 변화를 Table 4에 나타내었다. EFA의 지방산 조성변화를 보면, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, *cis*- $C_{18:1}$ 및 $C_{18:2}$ 지방산 모두 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다($P<0.0001$). 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과도 유의적인 차이를 보였다($P<0.0001$). $C_{18:0}$ ($P<0.0001$)과 $C_{18:2}$ ($P<0.01$)는 대두유 첨가구에 비해 옥수수유 첨가구에서 지방분해가 더 빠르게 일어나 oil간에 유의적인 차이가 있었다. Jenkins(1993)는 급여하는 지방의 형태에 따라 그 분해 비율이 다르다고 하였다. 본 실험에서 모든 지방산이 배양시간 12시간에서 0시간에 비해 90% 이상이 가수분해되었다는 결과를 얻었으나 EFA는 배양시간 2시간안에 80% 이상이 가수분해되어 NEFA의 함량이 증가한다는 보고(Hawke와 Silcock, 1970)와는 다른 경향을 보여주었다. Beam 등(2000)은 순수 배양시험에서 대두유를 2에서 10%로 첨가했을 때 가수분해 비율이 각각 44%/h에서 30%/h로 감소한다고 보고하였다. 또한 사료에 첨가되는 지방의 형태 및 양에 따라 가수분해 비율이 다르다고 하였다. 즉, 첨가하는 oil 량이 증가할수록 분해 비율은 감소한다는 것이다. 본 시험에서는 대두유 및 옥수수유 모두 10%를 첨가하여 첨가량이 높았기 때문에 지방분해 비율이 낮은 것으로 사료된다. 대두유와 옥수수유의 지방산 조성(Table 1)이 다르기 때문에 배양시간에 따른 분해 비율중 특히 $C_{18:0}$ 과 $C_{18:2}$ 의 경우 대두유에 비해 옥수수유의 분해비율이 빠른 것으로 사료된다.

Table 4에서 NEFA의 지방산 조성 변화를 보면, $C_{16:0}$ 과 $C_{18:0}$ 지방산은 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였고($P<0.0001$), 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과도 유의적인 차이를 보였다($P<0.0001$). $C_{16:0}$ 은 배양시간 24시간까지는 증가하다가 48시간에는 24시간에 비해 감소하였다. $C_{18:0}$ 은 48시간까지 계속

증가하여 대두유를 첨가한 구에서 34.89mg/g DM으로 가장 높은 수준이었다. C_{16:0}과 C_{18:0}의 증가는 EFA가 배양액 내에서 반추위 미생물에 의해 가수분해 후 유리된 불포화지방산에 대한 수소첨가의 최종 산물이다(Palmquist와 Jenkins, 1980). *cis*-C_{18:1}은 배양시간 12시간까지는 증가하다가 24시간 이후에는 검출되지 않았다(P<0.0001). 처리구, 처리구와 배양시간의 상호작용 및 oil간 효과에도 유의적인 차이가 있었다(P<0.0001). *trans*-C_{18:1}은 배양시간 24시간까지는 증가하다가 48시간에는 크게 감소하였다(P<0.0001). 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용에도 유의적(P<0.0001)인 차이가 있었지만 oil간 효과는 없었다. Beam 등(2000)은 대두유를 2%에서 10%로 첨가했을 때 C_{18:1}의 수소첨가 비율은 C_{18:2}와 비교해서 모든 첨가수준에서 약 3.6%/h로 낮았다고 보고하였다.

C_{18:2}가 풍부한 대두유와 옥수수유를 첨가하면 배양시간 초기에는 반추위 내 불완전한 수소첨가 현상으로 인해 *trans*-C_{18:1} 뿐만 아니라 CLA 함량을 증가시키지만, 최종적으로는 C_{18:0}으로 전환된다(Jenkins, 1993). C_{18:2}는 배양시간 6시간까지는 증가하다가 12시간부터 감소하였다(P<0.0001). 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과에도 유의적(P<0.0001)인 차이가 있었고 oil간 효과(P<0.01)도 있었다. C_{18:3}은 옥수수유 첨가구는 12시간부터 대두유 첨가구는 24시간부터 검출되지 않았다. 대두유와 옥수수유의 C_{18:3} 함량이 각각 6.69 및 0.73%로 옥수수유에 비해 대두유가 높기 때문에 배양시간 12시간에서도 C_{18:3}이 검출된 것으로 판단된다. 불포화 지방산중 C_{18:2}와 C_{18:3}은 반추위내 미생물에 의해 C_{18:0} 또는 *trans* 형태의 지방산으로 변형(transformation)되어 그 함량이 감소한 것으로 판단된다. *In vivo*와 *in vitro* 시험에서 C_{18:2}와 C_{18:3}은 각각 10 및 5%만이 수소첨가 현상을 피할 수 있었다(Tamminga와 Doreau, 1991). Beam 등(2000)은 대두유를 2%에서 10%로 첨가했을 때 C_{18:2}의 수소첨가 비율이 각각 14.3%/h에서 1.2%/h로 감소하였다고 보고하였다. 또한 사료내 C_{18:2}의 농도가 높으면 수소첨가가 감소함으로써 하부 소화기관에서 상기 불

포화지방산의 유출량이 증가한다고 하였다. 본 시험에서는 oil을 10% 첨가하여 지방분해가 느리게 일어났기 때문에 C_{18:2}와 C_{18:3}이 배양시간 6시간까지는 증가하였고 12시간 이후에는 수소첨가에 의해 감소하였다고 사료된다. Yang 등(2000)은 orchard grass 건초를 기질로 하여 *in vitro* 배양시험 결과 시간이 경과함에 따라 PUFA(C_{18:2}, C_{18:3})의 함량은 감소하고 C_{18:0}은 증가하였고 C_{18:1}은 배양 6시간까지는 증가하였으나 그 이후 약간 감소하였는데 이는 접종물로서 위액을 사용함으로써 유리지방산 조성이 달라졌기 때문이라고 보았다.

시료내 EFA와 첨가한 대두유와 옥수수유가 배양시간이 증가함에 따라 반추위 미생물에 의한 가수분해 작용으로 NEFA로 유리되고, NEFA는 시료에서 용해된 양이온 및 배양액내에 존재하는 양이온과 결합하여 지방산 염을 형성하게 된다(Jenkins와 Palmquist, 1982).

Table 4에서 지방산염의 지방산조성을 살펴보면, C_{16:0}과 C_{18:0} 지방산은 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였고(P<0.0001), 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용 효과에도 유의적인 차이를 보였다(P<0.0001). 또한 oil간 효과에서도 배양시간 전반에 걸쳐 대두유 첨가구보다 옥수수유 첨가구가 유의적으로 높았다(P<0.05). 특히 C_{18:0}은 배양시간 48시간에서 대두유 및 옥수수유 첨가구에서 각각 12.53 및 15.17mg/g DM으로 0시간에 비해 각각 27.5 및 32.5배 증가하였다(P<0.0001). C_{16:0}은 배양시간 48시간에서 대두유 및 옥수수유 첨가구에서 각각 4.35 및 5.44mg/g DM으로 0시간에 비해 각각 1.9 및 2.4배 증가하였다(P<0.0001). *cis*-C_{18:1}은 배양시간 12시간까지는 증가하다가 24시간 이후에는 검출되지 않았다(P<0.0001). 처리구, 처리구와 배양시간의 상호작용 및 oil간 효과에도 유의적인 차이가 있었다(P<0.0001). *trans*-C_{18:1}은 oil 첨가구에서는 0시간에는 검출되지 않았고, 그 이후 배양시간에서는 유의하게 증가하였다(P<0.0001). 처리구 및 처리구와 배양시간의 상호작용에도 유의적(P<0.0001)인 차이가 있었지만 oil간 차이는 없었다. 48시간에서 대두유 및 옥수수유 첨가구에

서 각각 1.98 및 2.17mg/g DM으로 3시간에 비해 각각 9.4 및 9.7배 증가하였다($P < 0.0001$). $C_{18:1}$ 지방산의 경우 *cis*보다는 *trans* 형이 더 쉽게 지방산염을 형성하였다. $C_{18:2}$ 과 $C_{18:3}$ 은 배양 시간별 변화가 크지 않지만 48시간에는 0시간에 비해서 약간 증가하였다($P < 0.0001$).

배양 48시간에서 포화지방산($C_{16:0}$, $C_{18:0}$)의 함량(wt%)은 대조구, 대두유 첨가구 및 옥수수유 첨가구에서 각각 73.16, 85.38, 및 87.33%였고, 불포화지방산($C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$)의 함량은 각각 26.84, 14.62 및 12.67%로서 포화지방산이 불포화지방산보다 더 많은 지방산염을 형성하였다. 그리고 포화지방산의 경우 지방을 첨가할 때가 첨가하지 않았을 때보다, 또한 사슬의 길이가 길어질수록 지방산염 형성 비율이 높아졌다. 이와 같은 사실은 포화지방산이 불포화지방산보다 불용성염(*insoluble soaps*) 형태로 더 많이 존재하기 때문에 전자가 양이온과 더 잘 반응한다는 Jenkins와 Palmquist(1982)의 결과와 잘 일치한다. 포화지방산이 양이온과 더 쉽게 반응하여 지방산염을 형성하기 때문에 반추위 내에서 불포화지방산보다 반추위 미생물의 성장을 억제하는 효과가 적다(Jenkins와 Palmquist, 1982).

결론적으로 *in vitro* 배양시 대두유와 옥수수유를 10% 첨가하더라도 배양 12시간까지는 배양액내에서 빠르게 가수분해 후 유리된 지방산이 미생물과 결합하여 표면적이 높은 알팔과 사료입자에 분산되어 흡착한다. 배양시간이 증가할수록 칼슘을 포함한 양이온 함량이 높은 알팔과가 분해되면서 양이온이 용해되어 유리된 지방산과 결합하여 지방산염을 형성하게 된다. 이때 불포화지방산보다는 포화지방산이 양이온과 반응하여 지방산염을 형성하기 쉽다. 또한 $C_{16:0}$ 이상의 장쇄지방산이 주로 지방산염을 형성하였다. 이러한 특성 때문에 배양액내에 유리된 지방산이 염을 형성하기 쉽고 oil 첨가시 발생하는 발효성상 및 NDF 소실율에 미치는 부의 영향을 최소화 한 것으로 사료된다.

IV 요약

식물성유 첨가시 배양시간에 따른 지방산염의 형성 정도와 발효성상 및 NDF 소실율에 미치는 영향을 규명하고자 *in vitro* 시험을 실시하였다. 기질은 알팔과 건조로 하고 1) oil 무첨가구, 2) 대두유 10% 첨가구 및 3) 옥수수유 10% 첨가구로 하였으며, oil 첨가 수준은 기질 중량 건물 기준으로 첨가하였다. 발효성상 및 NDF 소실율을 위한 시험에서는 120ml serum bottle를 사용하여 3반복 실시하여 pH, NH_3-N , VFA 농도 및 건물과 NDF 소실율을 분석하였다. 지방산 분획을 위한 시험에서는 60ml serum bottle를 사용하여 3반복 실시하여 NEFA, EFA 및 FAS의 형성 정도를 분석하였다.

pH는 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였고, NH_3-N 농도는 유의하게 증가하였다($P < 0.0001$). 건물 및 NDF 소실율은 처리구, 배양시간 및 oil간 유의하게 차이를 보여주었다($P < 0.05$).

총 휘발성 지방산 농도는 배양시간이 증가함에 따라 유의하게 증가하였다($P < 0.0001$). Acetate는 시험구 모두 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였고($P < 0.0001$), 대조구에 비해 oil 첨가구가 유의적으로 낮아졌다($P < 0.05$). Propionate는 시험구 모두 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였지만($P < 0.0001$), 처리구 및 oil간 효과는 없었다. Oil 첨가구에서 A/P 비율이 유의하게 낮아졌다($P < 0.05$).

EFA는 배양시간이 증가함에 따라 유의하게 감소하였고($P < 0.0001$), NEFA는 EFA의 가수분해로 인하여 증가하였다. 배양시간 48시간에서는 NEFA가 양이온과 결합하여 FAS의 형성 비율이 유의적으로 증가하였다($P < 0.0001$). 특히 $C_{18:0}$ 의 FAS 형성은 배양시간 48시간에서 대두유 및 옥수수유 첨가구에서 각각 12.53 및 15.17mg/g DM으로 0시간에 비해 각각 27.5 및 32.5배 증가하였다($P < 0.0001$).

배양시간이 증가할수록 칼슘을 포함한 양이온 함량이 높은 알팔과가 분해되면서 양이온이 용해되어 유리된 지방산과 결합하여 지방산염

을 형성하게 된다. 이때 불포화지방산보다는 포화지방산이 양이온과 반응하여 지방산염을 형성하기 쉽다. 또한 C_{16:0} 이상의 장쇄지방산이 주로 지방산염을 형성하였다. 이러한 특성 때문에 배양액내에 유리된 지방산이 염을 형성하기 쉽고 oil 첨가시 발생하는 발효성상 및 NDF 소실율에 미치는 부의 영향을 최소화 한 것으로 사료된다.

V 인 용 문 헌

1. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C.
2. Beam, T. M., Jenkins, T. C., Moate, P. J., Kohn, R. A. and Palmquist, D. L. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.*, 83:2564-2573.
3. Boggs, D. L., Bergen, W. G. and Hawkins, D. R. 1987. Effects of tallow supplementation and protein withdrawal on ruminal fermentation, microbial synthesis and site of digestion. *J. Anim. Sci.*, 64:907-914.
4. Chalupa, W., Rickabaugh, B., Kronfeld, D. S. and Sklan, D. 1984. Rumen fermentation *in vitro* as influenced by long chain fatty acids. *J. Dairy Sci.*, 67:1439-1444.
5. Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8:130-132.
6. Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H. and Costerton, J. W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants (T. Tsuda ed.). Academic Press, Inc. pp. 595-624.
7. Czerkawski, J. W. and Clapperton, J. L. 1984. Fats as energy yielding compounds in the ruminant diet. Fats in animal nutrition (J. Wiseman ed.). Butterworth, London. pp. 249-263.
8. Devendra, C. and Lewis, D. 1974. The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep. *Anim. Prod.*, 19:67-76.
9. Doreau, M., Legay, F. and Bauchart, D. 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 74: 2233-2242.
10. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226:497-509.
11. Gulati, S. K., Scott, T. W. and Ashes, J. R. 1997. *In vitro* assessment of fat supplements for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 64:127-132.
12. Harfoot, C. G. and Hazlewood, G. P. 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: The Rumen Microbial Ecosystem (P. N. Hobson ed.). Elsevier Applied Science. London and New York. pp. 285-322.
13. Harfoot, C. G., Crouchman, M. L., Noble, R. C. and Moore, J. H. 1974. Competition between food particles and rumen bacteria in the uptake of long-chain fatty acids and triglycerides. *J. Appl. Bact.*, 37:633-641.
14. Hawke, J. C. and Silcock, W. R. 1970. The *in vitro* rates of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents. *Biochim. Biophys. Acta.*, 218:201-212.
15. Henderson, C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci., Camb.*, 81:107-112.
16. Ikwuegbu, O. A. and Sutton, J. D. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.*, 48:365-375.
17. Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 76:3851-3863.
18. Jenkins, T. C. and Palmquist, D. L. 1982. Effect of added fat and calcium on *in vitro* formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. *J. Anim. Sci.*, 55:957-963.
19. Jenkins, T. C. and Palmquist, D. L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.*, 67:978-986.
20. Lough, A. K. 1969. Aspects of lipid digestion in the ruminant: In Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Proceedings of the Third International Symposium, Cambridge, England,

- pp. 519-528.
21. McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.*, 43:99-109.
 22. Palmquist, D. L. 1987. Adding fat to dairy diets. *Animal Health & Nutrition*, pp 32-35.
 23. Palmquist, D. L. and Jenkins, T. C. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.*, 63:1-14.
 24. Palmquist, D. L. and Yang, U. M. 1999. Adsorption of fatty acids to plant surfaces. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 29(ISRP), pp 59-60.
 25. Palmquist, D. L., Jenkins, T. C. and Joyner, A. E. Jr. 1986. Effect of dietary fat and calcium source on insoluble soap formation in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 69:1020-1025.
 26. Sukhija, S. and Palmquist, D. L. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.*, 36:1202-1206.
 27. Tamminga, S. and Doreau, M. 1991. Lipids and rumen digestion. In: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion* (J. P. Jouany ed.). INRA, Paris. pp 151-163.
 28. Van Nevel, C. J. and Demeyer, D. I. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36:53-63.
 29. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583-3597.
 30. White, T. W., Grainger, R. B., Baker, F. H. and Stroud, J. W. 1958. Effect of supplemental fat on digestion and the ruminal calcium requirement of sheep. *J. Anim. Sci.*, 17:797-803.
 31. Yang, U. M., Fujita, H. and Chung, T. Y. 2000. Effects of grass lipid and its fatty acids on ruminal fermentation and microbial growth *in vitro*. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.*, 13:176-181.
 32. 김동일. 2004. 식물성유 첨가가 반추위내 지방산 조성, 지방산염 형성 및 NDF 소화율에 미치는 영향. 건국대학교 박사학위논문.
 33. 배희동, K. J. Cheng, T. A. McAllister, 신형태. 1992. 반추위내 미생물의 소화작용과 발효조절에 관한 고찰. *한국영양사료학회지*, 16:359-382.
 34. 양운목, Hiroshi Fujita, 정태영. 1998. *In vitro* 배양시 목초의 지질이 목초 성분의 분해와 미생물 성장소 함량에 미치는 영향. *한국영양사료학회지*, 22:413-418.
- (접수일자 : 2004. 1. 27. / 채택일자 : 2004. 5. 24.)