

# 반추위액 채취 시간이 사료작물의 *In vitro* 건물 소화율에 미치는 영향

조남철 · 정민웅 · 김맹중 · 임영철 · 육완방\*  
농촌진흥청 국립축산과학원

## Effect of Collection Times of Rumen Fluid on *In vitro* Dry Matter Digestibility of Forage Crops

Nam-Chul Jo, Min-Woong Jung, Meing-Jung Kim, Young Chul Lim and Wan-Bang Yook\*

National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 330-801, Korea

### Summary

Object of this study were to determine the influence of collection times of rumen fluid on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of forage crops. The donor cow was fed concentrate once a day and given free access to grass-legume mixture hay. Main plot was consisted of different collection time of rumen fluid; T1: 1 hour before concentrate feeding, T2: 1 hour after feeding, T3: 4 hour after feeding and T4: 8 hour after feeding. A total of 7 samples of 4 different forage crops (barely, Italian ryegrass, crimson clover, rye) were used for the estimation of IVDMD and tested in three replicates. For the DAISY<sup>II</sup> incubation, each sample was inserted into each filter bag then heat-sealed and incubated in a digestion vessel for 48 h at 39°C. The times of rumen fluid collection had no significant effect on the IVDMD values over all varieties except for 2 breeds of IRG (Kogreen and Kospeed). IVDMD values with T1 over all varieties were slightly higher than other treatments, however those with both T1 of Kogreen and Kospeed varieties were significantly higher than T2 (p<.05).

(Key words : *In vitro*, Dry matter digestibility, Forages, pH)

### 서 론

사료의 영양가치 평가는 실제 함량이나 성분분석 등 여러 가지 분석방법이 이용되고 있으나, 조사료의 사료가치에 있어서 *in vitro*

건물 소화율 (IVDMD) 측정은 효과적인 판단 기준으로 여겨지고 있다 (Smith 등, 1997). 또한 IVDMD은 *in vivo* 건물 소화율과 높은 상관관계를 나타내기 때문에 반추가축의 사료가치 평가에 있어 널리 이용되고 있다

\*건국대학교 (College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University, Seoul)

Corresponding author : Min-Woong Jung, Grassland & Forages Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6775. Fax: +82-41-580-6779. E-mail:mwjung@rda.go.kr.

2009년 6월 9일 투고, 2009년 6월 30일 심사완료, 2009년 7월 9일 게재확정

(Marten 및 Barnes, 1980). IVDMD 분석방법은 도입된 이후로 여러 해에 걸쳐 개선, 수정되어 왔으며, Tilley and Terry Method (TTM)가 Tilley 및 Terry(1963)에 의해 개발된 이후 소화율의 예측, 조사료의 사료가치 향상을 위한 평가방법으로 널리 이용되고 있다. 또한 반추동물 사료의 소화율 예측을 위한 분석방법 중 실험실에서 분석 가능한 실질적이고, 정확한 분석방법으로 이용되고 있다(Goldman 등, 1987; Stern 등, 1997). 여러 연구에서 소화율 예측의 정확성을 높이기 위한 연구가 시도 되었으며, 소화율 예측에 영향을 주는 요인으로는 반추위액의 희석 정도(Richards 등 1995), 분석 시료의 입자 크기(Cone 등, 1989; Richards 등, 1995), 위액의 채취시간(Cone 등 1989), 실험 과정 중 혐기 상태의 유지(Grant 및 Mertens 1992b) 등이 있다. TTM은 Aufrere과 Michalet-Doreau (1998)에 의해 전분질 사료원료의 분석에 적합하도록 수정되었으며, 위액의 적정 pH를 조절하기 위해 여러 가지 buffer를 이용한 시험이 시도되었다(Grant과 Mertens, 1992a). 많은 연구에서 TTM은 간단하고, 정확하며, 재현성이 높은 것으로 보고되었으나(Goldman 등, 1987; Aufrere과 Michalet-Doreau, 1988; Stern 등, 1997), 이러한 장점에도 불구하고 시간과 노동력을 많이 필요로 하며, 각각의 분석 시료를 독립적으로 배양해야 된다는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 DAISY<sup>II</sup> Incubator (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY)를 이용한 IVDMD의 분석 방법이 개발되었으며, 여러 가지 분석 시료의 IVDMD를 동시(25 samples per jar; 4 jars per incubator)에 분석할 수 있게 되어 노동력을 줄일 수 있게 되었다. 또한 DAISY<sup>II</sup> 시스템은 filter bags technique(Komarek 등, 1994)을 이용한 분석방법으로 전통적인 *in vitro* 방법(Goering와 VanSoest, 1970)과 비교해 손으로 하는 filtration 과정이 생략되어 오차를 줄일

수 있어 실험의 정확도를 높일 수 있다고 알려져 있다(Debbie 등 1997).

IVDMD 분석에 영향을 주는 또 다른 주요 요인에는 위액을 채취하는 소의 급여 사료(Barnes, 1965)와 반추위액의 채취시간이 있다. 조사료의 IVDMD이 급여사료에 의해 큰 영향을 미치지 않는다는 연구결과도 있으나(Quicke 등 1995; Marinucci 등; 1992), 대부분의 연구에서 IVDMD은 위액을 채취하는 소의 급여사료에 따라 영향을 받는다고 보고되고 있다(Reid 등, 1964; Nelson 등, 1972; Grasnt 등, 1974). Reid 등(1964)은 청예를 급여한 소에서 채취한 위액보다 건초를 급여한 소의 위액을 이용한 IVDMD가 높게 나타난다고 하였다. 또한 Harris (1970)은 IVDMD의 변이를 줄이기 위한 위액 채취 방법으로, 반추위액을 채취하기 1시간 전에는 건초나 물의 급여를 금지하고, 항상 하루의 같은 시간대에 채취하는 것을 권장하였다. 또한 위액 채취시 반추위의 윗부분의 위액을 채취하여 바닥부분에 가라앉아 있는 작은 입자들의 방해로 인한 위액 여과로부터 발생할 수 있는 변이를 줄일 것을 권장하였다.

현재 국립축산과학원 초지사료연구센터에서는 조사료의 IVDMD 분석을 위해 혼합건초를 자유 채식시키는 Holstein에서 배합사료 급여(1일 1회)전에 반추위액을 채취하여 분석에 이용하고 있다. 하지만 혼합건초의 자유채식은 사료급여 횟수를 증가시키는 효과가 있어, 침 분비량을 증가시키고 제 1위 내 pH를 정상범위로 유지하여 사료의 분해를 안정화하고 미생물의 성장을 및 성장효율을 향상시키는(맹, 1998) 것으로 알려져 있다. 따라서 본 시험은 혼합건초를 자유 채식케 하는 Holstein에서 채취한 위액을 이용한 소화율 분석에서 위액의 채취 시간이 사료작물의 IVDMD에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 공시동물

본 시험에 사용된 사료작물은 청보리(Yong-yang, Yu-yeon), 크림슨 클로버(Tibbee), 이탈리아 라이그라스(Kospeed, Kogreen, Hwasan 101), 호밀(Wintergreen) 등 4작물 7품종을 공시재료로 이용하였다. 사료작물은 2007년 가을에 파종하여 2008년 봄에 수확하여 이용하였으며, 농촌진흥청 조사료 표준재배법에 준하여 재배하여 수확 적기에 예취하여 이용하였다. 공시한 사료작물의 사료가치는 Table 1에서 보는 바와 같다. 위액 채취에 사용한 공시우는 농촌진흥청 국립축산과학원에서 사육중인 반추위에 Cannula가 장착된 생후 49개월 된 Holstein을 이용하였다. 공시우의 사료급여는 건유기 배합사료를 매일 아침 9시 30분에 1회 급여 하였으며, 배합 성분표는 Table 2에서 보는 바와 같다. 혼합건초와 물은 자유 채식토록 하였으며, 급여한 혼합건초의 사료가치는 Table 3과 같다.

2. 시험 설계

본 시험은 반추위액의 채취시간에 따른 4

Table 2. Nutrient composition of concentrate of donor cow diets

Feedstuff	% as feed
Corn grain	47
Tapioca	10
Soybean meal	13
Rapeseed meal	4
Wheat bran	18
Alfalfa cubes	1
Corn germ meal	4.4
Sugar cane	2
Salt	0.3
Limestone	0.3

처리로 시험을 수행하였다. 반추위액의 채취 시간은 T1:사료 급여 전, T2:사료급여 직후(급여 1시간 후), T3:사료급여 후 4시간, T4:사료급여 후 8시간으로 하였다. 시료는 각 3반복으로 실험하였으며, IVDMD의 분석은 배양 48시간 후에 실시하였다.

3. 시험 방법

(1) 일반성분, NDF 및 ADF

IVDMD 측정에 사용한 사료작물은 시료를

Table 1. Chemical composition of forage crops used in this experiment (% DM basis)

	CP	NDF	ADF
Crimson clover (Tibbee)	12.56	50.48	38.75
IRG (Kospeed)	9.27	53.38	30.30
IRG (Kogreen)	10.92	56.02	34.32
IRG (Hwasan 101)	6.89	54.11	32.85
Whole crop barely (Yong-yang)	8.60	44.27	22.55
Whole crop barely (Yu-yeon)	7.83	46.16	26.88
Whole crop rye (wintergreen)	10.02	61.11	37.54

CP = Crude protein; NDF = Neutral detergent fiber; ADF = Acid detergent fiber

Table 3. Formula of mixed concentrate for experimental cow

% as feed						
CP	CF	EE	ADF	NDF	Ash	Moisture
8.36	30.45	1.28	37.07	61.67	6.57	13.05

EE = Ether extract; CP = Crude protein; CF = Crude fiber; NDF = Neutral detergent fiber; ADF = Acid detergent fiber.

채취한 후 60℃의 건조기에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하여 분석하였다(Willey mill, 1 mm screen). 일반성분은 AOAC (1995)법으로 분석하였으며, NDF와 ADF는 Ankom Fiber Analyser (ANKOM Technology, 1998)를 이용하여 분석하였다.

(2) 소화율 분석

1) 샘플 준비

소화율 시험에 사용할 filter bag은 미생물 소화에 방해하는 계면 활성제를 제거하기 위해 아세톤에 3~5분간 담가 놓았다가 건조시킨 후 사용하였다. 사료작물의 시료는 채취한 후 60℃의 건조기에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하여(Willey mill, 1mm screen), 0.5g의 샘플을 칭량하여 filter bag 넣은 후 heat sealer를 이용하여 밀봉한 후 배양병(Digestion jar)에 넣어 두었다.

2) Buffer solution과 Rumen inoculum의 준비

Buffer solution은 Kansas State-buffer solution with urea (Marten와 Barnes, 1980) 방법으로 조제하였으며, 그 성분표는 Table 4와 같

다. 각각 제조한 buffer solution을 한 용기에 266 ml의 Solution B와 1330 ml의 solution A를 1:5 비율로 섞은 후 solution A와 B의 혼합 용액 1600 ml를 배양병에 담은 후 39℃로 데워주었다. 우사에서 위액을 채취하기 위해 보온병을 39℃의 물을 채워 따뜻하게 덥혀준 후, cannula가 장착된 젓소로부터 위액 채취 직후에 물을 버린 후 채취한 위액을 4겹의 거즈에 걸러 보온병에 담았다. 실험실로 가져온 위액은 CO<sub>2</sub>를 공급하면서 혐기상태를 유지하여 주었다. Buffer solution이 채워진 배양병에 400 ml의 위액을 넣은 후 CO<sub>2</sub>로 30초간 정화 시킨 후 DAISY<sup>II</sup> Incubator에서 48시간 동안 배양시켰다. 이 때 배양기의 온도는 39.5℃±0.5로 유지 하였다.

3) 소화율의 측정

배양병에서 48시간 배양된 filter bag은 흐르는 물로 완전하게 씻어낸 후 true digestibility를 측정하기 위해 Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY)에 넣고 NDF 분석법을 시행한 후 무게를 측정하여 계산하였다. 계산공식은 아래와 같다.

Table 4. Sources of buffer used in this experiment

Buffer solution A	g/liter	Buffer solution B	g/liter
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	Na <sub>2</sub> S <sub>9</sub> H <sub>2</sub> O	1.0
NaCl	0.5		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1		
Urea	0.5		

$$\% \text{ IVDMD} = \frac{100 - (W3 - (W1 * C1)) * 100}{W2}$$

W1 = Bag tare weight

W2 = Sample weight

W3 = Final bag weight after *In Vitro* and sequential treatment

C1 = Blank bag correction (final oven-dried weight/original blank bag weight)

### (3) pH의 측정

반추위에서 채취한 반추위액의 pH, buffer solution과 혼합한 위액의 pH 및 배양 48시간 후의 pH는 pH meter (HI 9024; HANNA Instrument Inc. UK)를 이용하여 측정하였다.

### 4. 통계분석

본 시험에서 얻은 결과는 Windows 용 SPSS/PC (Statistical Package for the Science, ver 12.0. USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였다. 위액 채취 시간에 따른 처리구 간

의 비교는 one-way ANOVA test를 시행하였으며, 사후분석은 Tukey (HSD) 방법에 의해 실시하였고, 유의수준  $\alpha$ 는 0.05로 평가하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 위액 채취 시간에 따른 소화율의 변화

혼합건초를 자유 채식시킨 Holstein에서, 위액 채취 시간을 달리하여 분석한 IVDMD 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 모든 사료작물에서 T1 처리구의 위액을 이용한 IVDMD가 T2, T3, T4 처리구에서 채취한 위액을 이용한 IVDMD 보다 높게 나타났다. 특히 IRG의 Kospeed의 경우 T1 처리구에서 T2 처리구보다 IVDMD가 유의적으로 높았으며, Kogreen의 경우에도 T1 처리구에서 T2 및 T3 처리구보다 IVDMD이 유의적으로 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 하지만 나머지 모든 사료작물에서는 처리구간에 IVDMD의 차이는 있었지만 유의성은 인정되지 않았다. Lorin (1970)은 IVDMD의 변이를 줄이기 위한 위액 채취 방

Table 5. Effect of the collections n of rumen fluid with concentrate feeding on *in vitro* dry matter digestibility of different forage crops

	T1	T2	T3	T4	Average
Crimson clover (Tibbee)	67.86±0.14	67.12±0.61	67.67±1.30	67.82±0.17	67.62±0.69
IRG (Kospeed)	74.24±0.35 <sup>a</sup>	69.49±0.84 <sup>b</sup>	74.03±1.32 <sup>a</sup>	74.06±0.64 <sup>a</sup>	72.96±2.21
IRG (Kogreen)	74.30±0.29 <sup>a</sup>	69.83±0.64 <sup>b</sup>	70.36±1.14 <sup>b</sup>	73.08±1.06 <sup>a</sup>	71.89±2.07
IRG (Hwasan 101)	75.82±2.12	72.62±1.48	74.81±0.93	73.62±1.90	74.22±1.90
Whole crop barely (Yong-yang)	75.62±0.70	74.43±0.86	76.77±1.51	74.16±1.21	75.25±1.44
Whole crop barely (Yu-yeon)	71.63±1.10	70.12±0.82	69.25±2.49	71.33±2.53	70.58±1.91
Whole crop rye (Wintergreen)	71.09±3.01	70.78±1.74	67.95±1.28	68.64±1.39	69.61±2.20
Mean	73.24	70.79	71.70	72.10	71.96

Each value represents Mean ± SD

T1: 1 hour before feeding, T2: 1 hour after feeding, T3: 4 hour after feeding and T4: 8 hour after feeding of concentrate

<sup>a</sup> and <sup>b</sup>; Values with different letters in same row are significantly different at the 5% level

법으로, 반추위액을 채취하기 1시간 전에는 소에게 건초나 물의 급여를 금지하는 것을 권장하였다. 하지만 본 연구에 사용한 공시우의 경우 T1 처리구와 T2 처리구 사이인 오전 9시 30분에 건유기 배합사료를 급여 하였으며, 위액 채취 시간에 상관없이 혼합건초와 물을 자유 채식케 하였다. 하지만 배합사료 급여로 인한 반추위액의 pH 감소 폭이 7.05~6.38로 크지 않았으며, 혼합건초의 자유 채식으로 인한 조사료의 충분한 급여로 반추위액의 pH가 사료 급여 시간과 위액 채취 시간에 관계없이 혐유소분해박테리아의 정상 pH 범위인 6.0~6.8 (Hutjen, 1995) 사이로 유지되어 처리구간에 IVDMD의 차이가 크지 않았던 것으로 생각된다. 또한 제 1위 내 pH가 6.7일 때에는 전분, 당, cellobiose, hemicellulose, pectin 등의 분해에 의한 미생물 성장효율이 상호 차이가 없지만, pH가 낮아짐으로써 cellulose, hemicellulose, pectin 등의 소화율이 크게 낮아지고 미생물의 성장량도 크게 감소하게 되는데 (Strobel과 Russell, 1986), 본 실험에서는 소화율 분석에 사용한 반추위액의 배양 전 pH는 6.72~6.93으로 사료의 안정적이 소화에 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한 사료급여 횟수의 증가는 침분비량이 증가하고 1위 내 pH를 정상으로 유지되어 사료의 분해를 안정화시키기 때문에 미생물의 성장을 및 성장요율이 향상하게 되는데 (맹, 1998), 본 시험에 사용한 공시우의 경우 혼합건초의 자유 채식이 사료급여 횟수를 증가시키는 효과를 가져와 제 1위내

pH가 정상범위를 유지되어 처리구간 IVDMD의 차이가 크지 않았던 것으로 생각된다.

## 2. 배양시간에 따른 반추위액의 pH 변화

배양 시간에 따른 반추위액의 pH의 변화는 Table 6에서 보는 바와 같다. Cannula로부터 채취한 반추위액의 pH 변화는 T1:7.05, T2:6.63, T3:6.40, T4:6.38로 배합사료 급여 후 시간이 지남에 따라 낮아지는 경향을 보였으나 그 폭은 크지 않았다. pH가 가장 낮은 T4의 경우에도 pH가 6.38으로 반추위내 최적 pH 범위인 6.0~6.3 (맹, 1998)을 크게 벗어나지 않았으며, 이러한 결과는 혼합건초를 자유 채식 시킨 결과 조사료의 섭취가 늘어나 저작시간과 반추시간이 길어져 침 분비가 촉진되어 배합사료 급여로 인해 생성된 산의 중화가 이루어져 (Weimer, 1996), pH의 감소 폭이 반추위내 최적 pH 범위를 벗어나지 않은 것으로 생각된다. 또한 발효 48시간 후의 pH 범위도 6.49~6.30으로 발효 전의 pH 보다는 낮았으나, 혐유소분해박테리아의 정상 pH 범위인 6.0~6.8 (Hutjen, 1995) 보다 높게 나타나 미생물에 의한 사료작물의 분해가 안정적으로 이루어진 것으로 생각된다.

따라서 본 시험의 결과 혼합건초의 자유채식은 사료급여 횟수를 증가시킴과 동시에 조사료의 충분한 급여로 이어져 침 분비량이 증가하여, 배합사료 급여 후에도 제 1위 내 pH가 정상범위를 유지하여 사료작물의 안정적인 소화에 영향을 미친 것으로 나타났다.

Table 6. The changes of pH of the inoculum

Treatment	Original rumen inoculum	Before digestion	After digestion
T1	7.05	6.93	6.49
T2	6.63	6.82	6.44
T3	6.40	6.72	6.30
T4	6.38	6.74	6.30

T1: 1 hour before feeding, T2: 1 hour after feeding, T3: 4 hour after feeding and T4: 8 hour after feeding of concentrate

또한 반추위액 채취 시간에 따른 IVDMD은 IRG의 Kospeed, Kogreen을 제외한 나머지 사료작물의 경우 하루 일과(09:00~18:00) 중에 어느 시간대를 선택해도 IVDMD 분석치의 유의성이 인정되지 않아 소화율 분석을 위한 반추위액 채취 시간의 제약을 받지 않은 것으로 나타났다. 하지만 본 실험의 결과만을 가지고 혼합건초를 자유 채식하는 Holstein을 이용한 IVDMD 분석에 있어, 반추위액 채취 시간에 관계없이 IVDMD 차이가 없다고 단정하기는 힘들며, 보다 많은 조사료 자원을 이용한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 실험은 국립축산과학원에 초지사료연구센터에서 조사료의 IVDMD 분석을 위해 사용 중인 Holstein을 이용하여, 혼합건초를 자유 채식케 하는 Holstein에서 반추위액의 채취 시간이 사료작물의 IVDMD에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 사료작물은 청보리(Yong-yang, Yu-yeong), 크림슨 클로버(Tibbee), 이탈리아인 라이그라스(Kospeed, Kogreen, Hwasan 101), 호밀(Wintergreen) 등 4작물 7품종을 공시재료로 이용하였으며, 반추위액의 채취 시간은 T1:농후사료 급여 전, T2:사료급여 직후(급여 1시간 후), T3:사료급여 후 4시간, T4:사료급여 후 8시간으로 하였다. 모든 사료작물에서 T1 처리구의 위액을 이용한 IVDMD가 T2, T3, T4 처리구에서 채취한 위액을 이용한 IVDMD 보다 높게 나타났다. 특히 IRG의 Kospeed의 경우 T1 처리구에서 T2 처리구보다, Kogreen의 경우 T1 처리구에서 T2 및 T3 처리구보다 IVDMD이 유의적으로 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 하지만 나머지 모든 사료작물에서 처리구간에 IVDMD의 차이는 있었지만 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 혼합건초의 자유채식이 사료급여 횟수를 증가시킴과 동시에 조사료를 충분히 급여하는 효과를 가져와 침 분비

량이 증가하여, 배합사료 급여 후에도 제 1 위 내 pH가 정상범위를 유지하여 사료작물의 안정적인 소화에 영향을 미친 것으로 생각된다.

## 인 용 문 헌

1. 맹원재, 1998. 반추동물영양학. 향문사. pp 168
2. Ankom, Technology Corporation 1998. Method for determining Acid Detergent Fiber, Neutral Detergent Fiber and Crude Fibre, using the Ankom Fiber Analyser. Ankom Technology Corporation, 14 Turk Hill Park, Fairport New York 14450, USA
3. AOAC International. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. 16th edition. Arlington, VA, USA, Association of Analytical Communities
4. Aufrere, J. and Michalet-Doreau. B. 1988. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 20:203-218.
5. Barnes, R. F. 1965. Use of *in vitro* fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake. Agron. J. 57:213.
6. Cone, J. W., Cline-Theil, W., Malestein, A. and van't Klooster, A. T. 1989. Degradation of starch by incubation with rumen fluid. A comparison of different starch sources. J. Sci. Food Agric. 49:173-183.
7. Debbie, J. R. Cherney, Martin, J., Traxler, and James B. Robertson. 1997. Use of Ankom Determination Systems to Determine Digestibility. NIRS Forage and Feed Testing Consortium Annual Conference, February 19-20.
8. Goering, H. K. and Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agric. Handbook 379, ARS, USDA, Washington, DC.
9. Goldman, A., Genizi, A., Yuzari, A. and

- Seligman, N. G. 1987. Improving the reliability of the two-stage *in vitro* assay for ruminant feed digestibility by calibration against *in vivo* data from a wide range of sources. Anim. Feed Sci. Technol. 18:233-245.
10. Grant, R. J., P. J. Van Soest, and R. E. McDowell. 1974. Influence of rumen fluid source and fermentation time on *in vitro* true dry matter digestibility. J. Dairy Sci. 57:1201.
11. Grant, R. J. and D. R. Mertens. 1992a. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. J. Dairy Sci. 75:1581-1587.
12. Grant, R. J., and D. R. Mertens. 1992b. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. J. Dairy Sci. 75:1263-1272.
13. Harris L. E. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals.
14. Hutjen, M. F. 1995. Feeding application for high producing cow. p.34. In Proc. Cornell Nutr. Cont. for Feed Manufactures.
15. Komarek, A. R., J. B. Robertson and P. J. Van Soest. 1994. Comparison of the filter bag technique to conventional filtration in the Van Soest analysis of 21 feeds. Proceedings of the National Conference on Forage Quality, Evaluation, and Utilization. Lincoln, NE.
16. Marinucci, M. T., B. A. Dehority, and S. C. Loerch. 1992. *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. J. Anim. Sci. 70:296.
17. Marten, G. C., and R. F. Barnes. 1980. Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems. Pages 61-128 in Standardization of Analytical Methodology for Feeds. W. J. Pigden, C. C. Balch, and M. Graham, eds. Int. Dev. Res. Center, Ottawa, Canada
18. Nelson, B. D., H. D. Ellzey, C. Montgomery, and E. B. Morgan. 1972. Factors affecting the variability of an *in vitro* rumen fermentation technique for estimating forage quality. J. Dairy Sci. 55:358.
19. Quicke, G. V., O. G. Bentley, H. W. Scott and A. L. Moxon. 1959. Cellulose digestion *in vitro* as a measure of the digestibility of forage cellulose in ruminants. J. Animal Sci. 18:275.
20. Reid, R. L., G. A. Jung, and S. Murray. 1964. The measurement of nutritive quality in a bluegrass pasture using *in vitro* and *in vivo* techniques. J. Animal Sci., 23: 700.
21. Richards, C. J., J. F. Pedersen, R. A. Britton, R. A. Stock, and C. R. Krehbiel. 1995. *In vitro* starch disappearance procedure modifications. Anim. Feed Sci. Technol. 55:35-45.
22. Smith K. F., Reed K. F. M. and Foot J. Z. (1997) An assessment of the relative importance of specific traits for the genetic improvement of nutritive value in dairy pasture. Grass and Forage Science, 52, 167-175.
23. Stern, M. D., A. Bach, and S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. J. Anim. Sci. 75:2256-2276.
24. Strobel, H. J. and J. B. Russell. 1986. Effects of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultivates of mixed rumen bacteria. J. Dairy Sci. 69:2941.
25. Tilly, J. M. and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassl. Soc. 18:104-111.
26. Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacterial digest cellulose faster. J. Dairy Sci. 79:1496.