

ANIMAL

Effects of supplemented sodium butyrate on the *in vitro* rumen fermentation and growth performance of Hanwoo calves

Chae Hwa Ryu, Byeonghyeon Kim, Seul Lee, Hyunjung Jung, Youl Chang Baek*

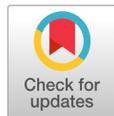
Animal Nutrition and Physiology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author: chang4747@korea.kr

Abstract

The study aimed to investigate the effects of supplemented sodium butyrate on the *in vitro* rumen fermentation and growth performance of Hanwoo calves. In total, four treatments were employed according to the sodium butyrate levels: no addition (control), an addition of 0.1% (treatment 1), an addition of 0.3% (treatment 2), and an addition of 0.5% (treatment 3). After 48 hours of fermentation, the ruminal pH was found to be higher in T1 than in C. Total volatile fatty acids were significantly higher in T2 and T3 than in C. The ratio of acetate and propionate was significantly lower in T1 and T3 than in C. In this study, the optimal concentration to promote rumen fermentation was found to be 0.3%, i.e., T2, and an experiment on Hanwoo calves at a farm was conducted. However, there were no significant differences between the treatment groups in terms of the daily weight gain, feed conversion ratio, and final body weight in the feeding experiment. Also, there were no significant differences in the body length, withers height, and height at hip cross between the control and the treatment groups. The addition of 0.3% sodium butyrate was most effective at promoting *in vitro* rumen fermentation, but it did not significantly affect the growth performance when fed to Hanwoo calves. This indicates that the addition of sodium butyrate improved rumen fermentation but did not have a growth-promoting effect. Future studies need to compare growth and carcass performance outcomes to confirm long-term effects.

Keywords: growth performance, Hanwoo calves, rumen fermentation, sodium butyrate



OPEN ACCESS

Citation: Ryu CH, Kim B, Lee S, Jung H, Baek YC. Effects of supplemented sodium butyrate on the *in vitro* rumen fermentation and growth performance of Hanwoo calves. Korean Journal of Agricultural Science 48:957-963. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20210081>

Received: September 15, 2021

Revised: November 10, 2021

Accepted: November 18, 2021

Copyright: © 2021 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

국내의 한우 산업은 협소한 우사에서 송아지를 생산하여 출하하기까지 질병 발생 없이 건강하고 우수한 개체로 사육하기 위해 집약적인 관리가 요구된다(Kang et al., 2002). 좁은 공간에서 밀집 사육하는 경우 우사는 다양한 병원체들에 의한 오염이 발생하며 질병 감염에 대한 위험도 높아진다. 가축사육 환경 내 잔존하는 병원체들은 현재 발병하지 않았더라도, 환경 조건이 적합할 때 언제든지 발병할 수 있으므로 송아지가 질병에 저항할 수 있도록 다양한 면역 증진 방법을 선택해야 한다(Heinrichs et al., 1995). 송아지는 국내 비육프로그램에 따라 높은 생산성을 위해 고에너지 사료를 급여하며 이에 따라 산독증, 반추위 발달 및 성장 지연 등 다양한 대사성 질병이 나타날 수 있다(Owens et al., 1998; Ahn et al., 2019).

낙산은 발효단계에서 생성되는 단쇄지방산으로 반추위 유두를 자극하여 반추위 발달을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Sander et al., 1959). Guilloteau 등(2009)은 생후 1개월부터 3개월령까지 낙산나트륨을 첨가 급여했을 때 성장성적에 긍정적인 효과가 나타났으나, 그 이후는 실험구와 대조구의 성장성적에 차이가 없다고 보고하였다. Cavini 등(2015)에서도 어린양에게 낙산 나트륨을 첨가 급여하였을 때, 반추위 발달 및 성장률에 영향을 미쳤다고 보고하였다. 그러나 국내 한우 송아지에게 낙산나트륨 첨가 급여하여 생산성에 어떠한 영향을 주는지에 대한 연구결과는 매우 부족한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 낙산 나트륨 첨가가 반추위 발효를 저해하지 않는 수준을 확인하고 한우 송아지에게 급여 시 성장 성적의 변화를 확인하고자 하였다.

Materials and Methods

실험 재료 및 화학적 성분분석

본 연구에서는 한우 송아지 사육에 많이 사용되고 있는 티모시(timothy)와 송아지용 배합사료(Onegiwoo, Woosung feed Co., Ltd., Nonsan, Korea)를 사용하였다. 실험에 사용된 사료의 일반 성분 분석은 60°C 송풍 건조기에서 48시간 건조한 후 건물 함량을 측정하였다. 건조된 시료는 분쇄기를 이용하여 1 mm 망에 통과 가능한 크기로 분쇄 후 일 반성분 분석에 이용하였다. 실험 사료의 조단백질(crude protein, CP), 조지방(ether extract, EE), 및 조회분(crude ash) 함량은 AOAC (2016)에 따라 분석하였으며, 중성세제불용섬유 (neutral detergent fiber, NDF)와 산성세제불용섬유 (acid detergent fiber, ADF) 함량은 Van Soest 등(1991)의 방법을 이용하여 분석하였다. 중성 세제 불용 조단백질(neutral detergent insoluble crude protein, NDICP)과 산성 세제 불용 조단백질(acid detergent insoluble crude protein, ADICP)은 Licitra 등(1996)의 방법으로 측정하였다. 비섬유소 탄수화물(nonfiber carbohydrate, NFC)은 $100 - \{CP\% + EE\% - Ash\% - (NDF\% - NDICP\%)\}$ 의 수식으로 산출하였으며(NRC, 2001), 실험에 사용된 사료의 화학적 성분은 Table 1과 같다.

Table 1. Chemical composition of experimental feed.

Item	Timothy	Concentrate
Dry matter (DM, %)	91.54	89.32
% DM		
Crude protein (CP)	9.04	20.98
Ether extract	0.81	3.96
Neural detergent fiber	73.56	32.49
Acid detergent fiber	42.57	14.58
Non-fiber carbohydrate	15.61	37.29
Crude ash	4.98	9.31
Neutral detergent insoluble CP	4.02	4.03
Acid detergent insoluble CP	1.69	1.19

반추위 발효 특성

실험 설계

본 연구는 낙산 나트륨을 급여 시 첨가 수준을 설정하기 위해 수행되었다. 실험 기질은 조사료와 배합사료(Onegiwoo, Woosung feed Co., Ltd., Nonsan, Korea)를 각각 4:6 비율로 배양병에 1 g씩 분주하였으며, 실험구는 낙산 나트륨 첨가량에 따라 0, 0.1, 0.3 및 0.5% 첨가로 구성하였다.

공시 동물 사양관리 및 반추위액 채취

공시 동물은 농촌진흥청 국립축산과학원에서 반추위 누관이 장착된 한우 거세우(체중 655 ± 70.7 kg) 2 두를 이용하여 오전 사료 급여전 반추위액을 채취하였다. 볏짚 2 kg과 비육전기 배합사료 5 kg을 하루에 2 회(07:00 및 16:00)에 나누어 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 무제한 급여하였다. 채취된 위액은 4 겹의 cheese cloth로 여과 후 O₂-free CO₂가 충전된 2 L, flask (39°C)에 head space가 없도록 채워졌으며, 산소의 침입을 차단하여 혐기 조건을 유지하였다.

반추위 *in vitro* 발효 및 분석방법

실험 배양 개시 30분 전 반추위액을 O₂-free CO₂로 bubbling 하여 pH를 6.5로 보정하고 NaHCO₃ 9.8 g, Na₂HPO₄·2H₂O 4.62 g, KCl 0.57 g, NaCl 0.47 g, MgSO₄·7H₂O 0.12 g, CaCl₂/100 mL 4 g로 구성된 McDougall's buffer solution (Troelsen and Hanel, 1966)과 반추위액을 4 : 1로 혼합하여 rumen inoculum으로 사용하였다. 또한 위액의 희석 및 여과 과정 동안 O₂-free CO₂를 분사하여 위액이 산소에 노출되지 않도록 혐기 상태를 유지하였으며 Tilley와 Terry (1963)의 방법에 따라 배양병을 3 반복하여 실험을 실시하였다. 총 가스 생성량은 실험용 유리 주사기를 이용하여 배양병에 있는 총 가스를 측정하였다. pH는 발효가 종료된 배양병을 개봉한 후 pH meter (S20 Seven Easy™, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA)를 이용하여 반추위액의 pH를 측정하였다. 반추위 암모니아태 질소의 함량은 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 진행되었으며, 4,000 rpm으로 15 분간 원심 분리하여 사료 입자가 제거된 반추위액의 상등액 20 µL에 phenol color reagent 1 mL 및 alkali hypochlorite reagent 1 mL를 완전히 혼합하여 37°C에서 15 분간 반응 후 분광 광도계(Optizen UV2120, Mecasis, Daejeon, Korea)를 이용하여 630 nm 흡광도에서 측정하였다. 휘발성 지방산은 Erwin 등(1961)의 방법에 따라 실시되었다. 사료 입자가 제거된 반추위액의 상등액에 1 mL에 metaphosphoric acid 200 µL를 첨가하여 30 분 동안 정지 후, 13,000 rpm에서 원심분리 하는 전처리 과정을 거친 시료를 Nukol™, fused silica capillary column (0.25 mm I.d. × 30 m length, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography (HP4890, Agilent, CA, USA)로 분석하였다(oven = 180°C, injector = 220°C 및 detector = 200°C).

한우 송아지의 성장 성적 평가

본 연구에서는 2 개월령 한우 송아지 14두(74.3 ± 4.62 kg)를 실험동물로 사용하였고, 전라북도 남원 소재의 한우 농가에서 사양 실험을 진행하였다. 실험동물들은 체중과 체적을 고려하여 총 2개의 우방에 나누어 배치하였고, 실험동물의 우방 배치와 각 우방에 대한 실험구 설정은 완전 임의 배치법에 따라 진행하였다. 실험 사료는 티모시와 시판 송아지 배합사료를 무제한으로 급여하였으며, 낙산 나트륨은 시판 배합사료에 0.3%를 혼합하여 급여하였다 (Table 1). 물과 미네랄 블록은 실험 동물이 자유롭게 접근하여 섭취할 수 있도록 하였다. 실험동물의 성장은 사양 실험 개시일을 기준으로 실험개시일과 120일에 체중 및 체적을 측정하여 비교하였다. 사료 섭취량은 일주일 동안 섭취하고 남은 사료량을 우방별로 측정하여 계산하였다. 얻어진 체중과 사료 섭취량 결과를 바탕으로 일당 증체량 및 사료 요구율을 평가하였다. 체적은 체장, 체고 및 십자부고를 측정하여 실험동물의 성장을 확인하였다. 본 연구는 국립축산과학원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호 NIAS 2019-346).

통계 분석

연구의 통계 분석은 SPSS 프로그램(Version 18, IBM, New York, USA)을 사용하였다. 반추위 발효 실험에서는 일반선형모형(general linear model)의 분산분석(analysis of variance)을 사용하였고, 각 평균간 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법(multiple range test)을 이용하여 분석하였다. 한우 송아지 성장성적은 T-검정(T-test)을 이용하여 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.

Results and Discussions

본 연구에서 수행된 반추위 발효 특성은 Table 2 및 3에서 볼 수 있다. 반추위 발효 개시 전 pH는 실험구 간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 암모니아태 질소생성량에서는 T3에서 C보다 유의적으로 낮은 결과를 보였다($p < 0.05$). 총 휘발성지방산, 초산 및 프로피온산에서는 실험구 간의 차이가 없었으나, 낙산과 발러릭산에서는 T2 및 T3에서 C보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 초산과 프로피온산의 비율에서는 T2 및 T3에서 C보다 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 48시간동안 반추위 *in vitro* 발효가 진행된 후, 반추위 pH는 C보다 T1에서 높은 결과를 나타냈다. 반추위 pH는 사료의 성분에 의해 영향을 받으며, 소화 속도에 따라 변화의 폭이 크다. 본 연구에서는 소량의 첨가제를 사용하여 유의적 차이가 나타났지만, 전실험구에서 반추위 발효 적정수준인 5.8 - 7.2 범위에 속해 반추위 발효에 부(-)의 영향이 없을 것으로 생각된다(Hiltner and Dehority, 1983). 총 가스 생성량 및 암모니아태 질소생성량에서는 실험구 간의 차이가 없었다. 총휘발성지방산은 T2와 T3에서 C보다 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 초산은 실험구 간 유의적 차이가 없었다. 프로피온산은 전 실험구 중 T1과 T3에서 가장 높았고($p < 0.05$), 낙산 및 발러릭산에는 T2와 T3에서 유의적으로 높은 결과를 보였다($p < 0.05$). 초산과 프로피온산의 비율에서는 T1과 T3에서 C보다 유의적으로 낮았으나($p < 0.05$), 2.27 - 2.51 수준으로 나타났다. 반추위 휘발성지방산은 탄수화물 유래 분해 산물이며, 반추동물의 주요 에너지원이다(Casper et al., 1990). 또한, 반추위 발효를 가장 쉽게 볼 수 있는 지표이며, 휘발성지방산이 높았던 T2 및 T3에서 C보다 높은 반추위 발효가 나타났다고 생각된다. 본 연구는 첨가제가 낙산 나트륨이므로 반추위내 낙산이 증가할 것으로 예상되었고 연구결과에서도 낙산 및 발러릭산이 증가하였다. 따라서 본 연구에서는 반추위 발효를 증진시키는 최적의 농도를 T2의 0.3%로 선정하여 사양 실험을 수행하였다.

Table 2. Effects of supplemental sodium butyrate on *in vitro* rumen fermentation at 0 h.

Item	C	T1	T2	T3	SEM	p-value
pH	7.02	7.04	7.05	7.06	0.006	0.128
Ammonia nitrogen (mg·dL ⁻¹)	7.43bc	7.26ab	7.74b	6.86a	0.113	<0.05
Total VFAs (mM)	18.99	16.78	23.87	23.97	1.374	0.149
Acetate (mM)	11.79	10.50	12.75	12.73	0.580	0.532
Propionate (mM)	3.36	2.92	3.94	3.92	0.210	0.276
Butyrate (mM)	2.61a	2.35a	4.49b	4.76b	0.385	<0.05
Valerate (mM)	1.24a	1.01a	2.68b	2.56b	0.263	<0.05
Acetate to propionate ratio	3.51b	3.60b	3.25a	3.26a	0.048	<0.05

C, no add; T1, add 0.1% sodium butyrate; T2, add 0.3% sodium butyrate; T3, add 0.5% sodium butyrate; SEM, standard error of mean; Total VFAs, total volatile fatty acids.

a - c: Different superscripts in same row means significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Effects of supplemental sodium butyrate on *in vitro* rumen fermentation at 48 h.

Item	C	T1	T2	T3	SEM	p-value
pH	6.73a	6.86b	6.78a	6.78a	0.017	<0.05
Total gas (mL)	192.50	195.00	190.00	191.67	0.946	0.335
Ammonia nitrogen (mg·dL ⁻¹)	11.15	8.89	16.65	16.61	1.427	0.106
Total VFAs (mM)	80.22a	82.39a	89.61b	90.78b	1.603	<0.05
Acetate (mM)	47.19	46.18	46.88	47.92	0.448	0.713
Propionate (mM)	18.79a	20.33bc	19.01ab	20.99c	0.336	<0.05
Butyrate (mM)	9.94a	10.42a	15.52b	14.47b	0.847	<0.05
Valerate (mM)	4.31a	5.47a	8.20b	7.50b	0.537	<0.05
Acetate to propionate ratio	2.51b	2.27a	2.47b	2.28a	0.039	<0.05

C, no add; T1, add 0.1% sodium butyrate; T2, add 0.3% sodium butyrate; T3, add 0.5% sodium butyrate; SEM, standard error of mean; Total VFAs, total volatile fatty acids.

a - c: Different superscripts in same row means significantly different ($p < 0.05$).

한우 송아지를 이용한 성장 성적을 비교한 사양실험에서는 개시체중에서 대조구와 실험구 간의 유의적 차이가 없었다(Table 4). 일당증체량에서는 대조구가 실험구보다 높은 수치를 보였고, 사료 섭취량에서는 대조구보다 실험구에서 수치적으로 높았으나 모두 통계적 유의성이 없었다. 사료 요구율 및 종료 체중은 대조구보다 실험구에서 낮게 나타났으나 이 또한 유의적 차이가 없었다. 송아지의 체적에서는 실험 시작 시 체장, 체고 및 십자부고에서 유의적 차이가 나타나지 않았으며, 실험 종료 시에도 체장, 체고 및 십자부고에서 모두 유의적 차이가 없었다(Table 5).

Table 4. Effects of supplemental sodium butyrate on growth performance of Hanwoo calves.

Item	C	T	SEM	p-value
Initial body weight (kg)	74.86	73.71	4.620	0.907
Daily weight gain (kg·day ⁻¹)	1.01	0.93	0.089	0.705
Feed intake (kg·day ⁻¹)	4.03	4.12	0.207	0.846
Forage	0.70	0.61	0.049	0.370
Concentrate	3.33	3.57	0.191	0.539
Feed conversion ratio	5.35	4.87	0.973	0.798
Final body weight (kg)	153.36	146.64	10.046	0.753

C, no add; T, add 0.3% sodium butyrate; SEM, standard error of mean.

Table 5. Effects of supplemental sodium butyrate on body size of Hanwoo calves.

Item	C	T	SEM	p-value
Initial (cm)				
Body length	78.14	78.00	1.400	0.962
Withers height	80.57	82.00	1.141	0.553
Height at hip cross	84.86	86.57	1.364	0.551
Finish (cm)				
Body length	99.51	98.83	2.018	0.873
Withers height	96.40	97.73	1.818	0.730
Height at hip cross	100.97	101.37	2.117	0.929

C, no add; T, add 0.3% sodium butyrate; SEM, standard error of mean.

낙산은 반추위 유두 발달을 촉진하는 것으로 알려져 있어(Kim et al., 2012), 본 연구에서는 낙산 나트륨의 첨가 급여가 반추위 발효에 도움을 줄 것으로 예상하였다. *In vitro* 반추위 발효에서 0.3%이상의 낙산 첨가가 반추위 발효 증진에 영향을 주었다고 판단하였으나, 한우 송아지에게 직접 급여하였을 때는 성장 성적에 큰 영향을 미치지 못했다. Górká 등(2011)의 연구에서는 농후사료를 급여하는 송아지에게 낙산나트륨을 첨가 급여하였을 경우 성장성적은 긍정적이거나 유의성이 없었다고 보고하였다. 본 연구 또한 개월령이 낮은 송아지를 이용했으나 이미 농후사료를 급여하고 있어 성장성적에 직접적 영향이 없었다. 별도의 처리 및 가공이 없는 낙산 나트륨 급여시 반추위 내 위장관 벽에 흡수 및 이용 될 수 있으며, Ma 등(2018)의 낙산 나트륨 급여시 반추위 과산증을 개선하는 효과가 있다고 보고하였다. 일련의 연구결과, 낙산 나트륨이 반추위 발효를 증진시키고 반추위 안정화에 도움을 줄 수 있으나, 첨가제 급여 시기에 따라 성장이 촉진되는 효과가 나타나지 않을 수 있다. 추후 연구에서는 첨가제 급여 시기를 보완할 필요가 있다고 생각되며, 성장 성적 및 도체 성적을 비교해 장기적 효과를 확인할 필요가 있다고 생각된다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

본 성과물은(논문) 농촌진흥청 연구사업(PJ0143952021)의 지원 및 2021년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문 연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것입니다.

Authors Information

Chae Hwa Ryu, <https://orcid.org/0000-0002-7753-0929>

Byeonghyeon Kim, <http://orcid.org/0000-0003-4651-6857>

Seul Lee, <http://orcid.org/0000-0001-9667-8155>

Hyunjung Jung, <http://orcid.org/0000-0002-7004-2017>

Youl Chang Baek, <http://orcid.org/0000-0003-4454-5339>

References

- Ahn JS, Kwon EG, Shin JS, Kim MJ, Son GH, Choi CS, Lee CW, Park JK, Park BK. 2019. Changes in growth performance, carcass characteristics, and meat properties of late fattening Hanwoo steers according to supplementation of rumen protected methionine and lysine. *Korean Journal of Agricultural Science* 46:671-682. [in Korean]
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. Official methods of analysis. AOAC, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Casper DP, Schingoethe DJ, Eisenbeisz WA. 1990. Response of early lactation dairy cows fed diets varying in sources of nonstructural carbohydrate and crude protein. *Journal of Dairy Science* 73:1039-1950.
- Cavini S, Iraira S, Siurana A, Foskolos A, Ferret A, Calsamiglia S. 2015. Effect of sodium butyrate administered in the concentrate on rumen development and productive performance of lambs in intensive production system during the suckling and the fattening periods. *Small Ruminant Research* 123:212-217.
- Chaney AL, Marbach EP. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8:130-132.
- Erwin E, Marco GJ, Emery E. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 44:1768-1771.
- Górka P, Kowalski ZM, Pietrzak P, Kotunia A, Jagusiak W, Holst JJ, Guilloteau P, Zabielski R. 2011. Effect of method of delivery of sodium butyrate on rumen development in newborn calves. *Journal of Dairy Science* 94:5578-5588.
- Guilloteau P, Zabielski R, David JC, Blum JW, Morisset JA, Biernat M, Woliński J, Laubitz D, Hamon Y. 2009. Sodium-butyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young calves. *Journal of Dairy Science* 92:1038-1049.
- Heinrichs A, Wells S, Losinger W. 1995. A study of the use of milk replacers for dairy calves in the United States. *Journal of Dairy Science* 78:2831-2837.
- Hiltner P, Dehority B. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 46:642-648.
- Kang S, Cho C, Kim J, Ahn B, Chung H, Seo K. 2002. Effect of hwangto, illite, oligosaccharides, charcoal powder and chromium picolinate on the growth performance and immunity in early weaned Hanwoo Calves. *Journal of Animal Science and Technology* 44:531-550. [in Korean]
- Kim WY, Lee SH, Hwang JH, Kim SK, Lee SS, Yeo JM. 2012. Effects of concentrate feeding on rumen papillae development in Hanwoo calves before weaning. *Journal of Animal Science and Technology* 54:355-361. [in Korean]

- Licitra G, Hernandez T, Van Soest P. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57:347-358.
- Ma N, Abaker JA, Bilal MS, Dai H, Shen X. 2018. Sodium butyrate improves antioxidant stability in sub-acute ruminal acidosis in dairy goats. *BMC Veterinary Research* 14:1-13.
- NRC (National Research Council). 2001. Nutrient requirement of dairy cattle. 7th revised edition. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. 1998. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science* 76:275-286.
- Sander EG, Warner RG, Harrison HN, Loosli JK. 1959. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *Journal of Dairy Science* 42:1600-1605.
- Tilley J, Terry dR. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science* 18:104-111.
- Troelsen J, Hanel DJ. 1966. Ruminant digestion *in vitro* as affected by inoculum donor, collection day, and fermentation time. *Canadian Journal of Animal Science* 46:149-156.
- Van Soest P, Robertson J, Lewis B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74:3583-3597.