

# Fibrolytic Enzyme 첨가가 반추위 발효 정상 및 착유우의 유량 및 유성분에 미치는 영향

안종호·김연정·김현진

한경대학교 낙농학과

## Effects of Fibrolytic Enzyme Addition on Ruminant Fermentation, Milk Yield and Milk Composition of Dairy Cows

J. H. Ahn, Y. J. Kim and H. J. Kim

Department of Dairy Science, Hankyong National University

### ABSTRACT

We evaluated the effects of adding fibrolytic enzyme into ruminant diets on ruminal fermentation (*in vitro*) and lactational performances of dairy cows (*in vivo*). Through the *in vitro* experiment that was carried out with different contents of NDF (34, 38, 43%) in diets, digestibilities of NDF in the rumen appeared not significantly different by the addition of enzyme but were different by NDF content in diets showing higher digestibility in NDF 43% diet. It could be attributed by the relatively higher amount of hemicellulose in the current experimental diets than in conventional diets that might have been digested easily by the addition of fibrolytic enzyme in the rumen. The addition of fibrolytic enzyme tended to increase NDF digestibilities to a little extent both in 0.05 and 0.1% enzyme levels. Ruminal pH, NH<sub>3</sub>-N concentrations and VFA production in the rumen were not affected by the addition of fibrolytic enzyme. Activities of CMCase and xylanase were higher in enzyme treated diets of both NDF 34 and 38%. In particular, the activities of xylanase that slowly decreased from 0 to 12 hr but rapidly after 24 hr indicates that the major action of the enzyme in the rumen occurs in early period of incubation.

Through an *in vivo* experiment, fibrolytic enzyme addition into the diets of dairy cows indeed affected lactational performance of milk yield. The cows fed enzyme treated diets produced 8% (1.9kg/d) more amounts of milk than with no enzyme addition. Milk composition of milk fat and protein was not affected by enzyme addition. Overall, the results of this *in vivo* study indicates that fibrolytic enzyme can be used to improve milk production in lactating cows. In respect that animals in different treatments of this study had the same amounts of intake, the increased milk yield with enzyme addition may be attributed to the improved utilization of nutrients in the digestive tract.

(Key words : Fibrolytic enzyme, Milk yield, Milk composition, Rumen fermentation)

I. 서 론  
반추동물의 조사료 이용률 향상을 위한 방안  
으로 사료내 fibrolytic enzyme을 이용하는 여러 연구가 이루어져 왔으나 이의 작용 기작과 효과에 대하여는 다양한 결과를 나타내고 있다.

본 연구는 한경대학교 2000년도 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.

Corresponding author : Ahn, Jong-Ho, Department of Dairy Science, College of Agriculture, Hankyong National University, Ansong 456-749, E-mail : [jhahn@hnu.hankyong.ac.kr](mailto:jhahn@hnu.hankyong.ac.kr)

특히 Kopecny 등(1987)은 사료에 첨가한 fibrolytic enzyme이 반추위 박테리아에 의해 빠르게 분해되어 섬유소 분해율을 증진시키지 않는다고 하였는데 Stokes와 Zheng(1995)은 착유우에서 유량이 증가되었다 하여, 이의 효과를 입증하였다. 또한 Beauchemin 등(1995)도 cellulase와 xylanase를 조합하여 조사료를 기초로 한 사료에 첨가하여 거세우에게 급여하였을 때 성장을 효율적으로 증진시켰다고 보고하였다. 일반적으로 사료내 첨가 가능한 fibrolytic enzyme은 곰팡이 배양으로부터 분리된 것으로 반추동물이 사료를 섭취하고 나서 반추위내에서 사료가 소화되기 이전에 식물의 구조탄수화물을 효과적으로 가수분해한다고 보고되었으나(McHan, 1986; Stokes, 1992) 반추위내에서 일어나는 발효 정상 변화에 대해서는 아직 명확하게 알려져 있지 않고 있다. 또한 사료의 종류별로 효소 첨가 효과가 연구자에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 사료내의 영양소 함량 차이에서 나타나는 효과의 차이는 그 연구가 더욱 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 반추동물 사료에 fibrolytic enzyme을 첨가할 경우의 효과를 검증하기 위하여 사료내 NDF 함량 수준을 3가지로 (34, 38 및 43%) 달리 하였고 각각의 사료에 fibrolytic enzyme을 3가지 수준(0, 0.05 및 0.1%)으로 첨가하여 반추위액의 발효 정상 변화를 *in vitro*로 관찰하였으며, *in vivo* 실험을 통하여 fibrolytic enzyme을 사료에 첨가하였을 때 우유 생산량 및 유성분 등의 착유우 생산성 변화를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사료내 NDF 수준별 fibrolytic enzyme의 첨가 효과 (*In Vitro* 실험)

#### (1) 시험사료 설계

본 실험은 3×3 요인 실험법에 의하여 TMR (total mixed ration) 사료를 NDF (neutral detergent fiber) 수준별(34, 38 및 43%)로 배합한 후 바로 fibrolytic enzyme을 수준별(0, 0.05

및 0.1%)로 TMR 사료에 첨가하여 사용하였다.

#### (2) Rumen inoculum 준비

Rumen inoculum은 반추위 누관이 장착된 체중 600kg인 Holstein 착유우(비유량 25kg/d)의 본 연구 중 *in vivo* 실험과 동일하게 한 조사료 혼합사료(mixed ration, 16.6kg/d), 농후사료(concentrate, 6.6kg/d) 및 볏짚(rice straw, 4.0kg/d)을 배합하여 급여한 젖소로부터 사료 섭취 후 3시간 이내에 반추위로부터 내용물을 채취하였다. 반추위액은 2겹의 cheese cloth로 거른 후, 즉시 35℃의 보온병을 이용 실험실로 운반하였다. 다시 4겹의 cheese cloth로 여과한 다음 20 liter 용기 pyrex병에 39℃로 보관하였다. TMR 실험 사료는 NDF 수준별, fibrolytic enzyme 첨가별로 약 4g씩 정량 후 배양개시 30분전 반추위 내용물과 CO<sub>2</sub> bubbling으로 pH 7.0으로 보정하여 제조한 rumen buffer 용액과 1:1로 혼합하였으며, 이를 rumen inoculum으로 사용하였다. 위액의 회석 및 여과 전 과정을 O<sub>2</sub> free CO<sub>2</sub>를 분사하여 반추위액이 O<sub>2</sub>에 노출되지 않도록 유지하였으며, 배양 전 rumen inoculum을 39℃로 유지할 수 있도록 shaking incubator내에 보관하였다.

#### (3) 시료준비, 실험설계 및 배양방법

본 실험에 사용된 TMR은 1mm Wiley mill로 분쇄하여 pore size 0.177~1.19mm인 sieve를 통과시켜 미세 입자를 제거하고, 주요 배양 기질로 사용하였으며, 공시 시료의 원료 사료 배합량은 Table 1에 나타내었다. 실험사료의 영양소 조성은 Table 2와 같이 NDF 34%에서 38 및 43%로 증가함에 따라 ADF 함량은 21%에서 28%로만 증가하여 NDF 수준이 높아짐에 따라 NDF와 ADF 함량의 차이인 hemicellulose 함량이 더욱 증가하였다. 반면에 NSC(non-structural carbohydrates) 함량은 NDF 수준과 반대의 경향을 보였다. 사료단백질의 처리구별 수준은 14.9%로서 모든 구에서 동일하도록 배합하였다.

본 실험에 사용된 fibrolytic enzyme은 *Aspergillus niger*와 *Trichoderma longibrachaitum*로부

Table 1. The ingredient composition of experimental diets(%) (*in vitro* experiment)

Ingerdients	Diets		
	NDF	NDF	NDF
	34%	38%	43%
Wheat hard	2.8	3.1	2.9
Wheat bran	6.2	6.9	6.4
Soy bean hull	8.7	10.6	9.0
Corn gluten feed	3.9	4.4	4.1
Cotton seed meal	1.1	1.3	1.2
Coconut meal	1.1	1.1	1.2
Seasome meal	0.6	0.0	0.6
Soy bean meal	7.0	7.3	7.0
Lime stone	1.3	1.2	1.1
Lupin, flaked	2.2	1.2	2.3
Corn, flaked	38.2	30.3	23.6
Salts	0.5	0.6	0.6
Cotton seed	2.2	2.4	3.2
Cotton hull	5.5	6.2	5.8
Alfalfa cube	2.8	2.4	2.9
Rice straw	3.3	5.0	12.4
Alfalfa pellet	2.0	2.2	2.0
Beet pulp	6.9	7.3	7.1
Alfalfa hay	3.3	6.1	6.2
Buffering agent <sup>1)</sup>	0.4	0.4	0.4
Total	100.0	100.0	100.0

<sup>1)</sup> NaHCO<sub>3</sub>.

터 추출한 (CMCase activity 101.7CU/g, xylanase activity 103.8XU/g) 것으로서 Alltech, Inc.에서 제공하였다. 시험 사료의 배양은 Tilly와 Terry (1963)의 방법을 개량하여 실시하였으며, 250ml 용 삼각플라스크에 200ml의 rumen inoculum을 천천히 주입시키며 39°C로 설정된 항온 교반기

Table 2. Chemical composition of experimental diets (*in vitro* experiment) (% of DM basis)

Nutrients	Diets		
	NDF	NDF	NDF
	34%	38%	43%
Dry matter	88.88	88.90	89.03
Crude protein	14.93	14.95	14.96
Ether extracts	3.57	3.36	3.39
Crude fiber	14.50	16.72	18.88
Ash	6.82	7.26	7.87
NDF	34.13	38.48	43.16
ADF	21.11	24.48	28.11

(Vision Co., LTD.)에서 100rpm으로 교반하면서 배양하였다. 배양시간은 0, 2, 4, 6, 12, 24 그리고 48시간으로 하였다.

#### (4) 조사항목 및 분석방법

시험사료의 일반성분은 AOAC(1990) 방법에 따라 건물, 조단백질, 조지방을 분석하였고 Van Soest 등(1991)의 방법에 따라 NDF와 ADF를 분석하였다. pH 측정은 각 처리구 별 sample을 시간별로 꺼내어 미생물의 활동을 억제시키기 위하여 4°C 이하의 냉장고에 약 10분간 넣었다가 pH meter(ORION 290A)로 pH를 측정하였다. VFA 분석은 상층액 5ml를 25% metaphosphoric acid와 희석한 후 Gas Chromatography용 vial(11mm)에 넣어서 -30°C의 냉동고에 보관 후 분석시 저온에서 서서히 해동시켜서 14,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하여 Gas Chromatography(HP 6890 USA)를 이용하여 acetate, propionate, butyrate 등을 분석하였다(Erwin 등, 1961). NH<sub>3</sub>-N은 Chaney와 Marbach(1962) 방법에 준하여 분석하였다. 먼저 상층액 5ml를 0.1N HCl과 혼합 후 vial에 넣어 -30°C의 냉동고에 보관 후 분석시 저온에서 서서히 해동시켜서 14,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하여 사용하였으며 UV(SHIMADZU, UV-160A, Japan)로 Spec-

trophotometer의 wave-length를 630nm으로 하여 측정하였다. Enzyme activity는 DNS(dinitrosalicylic acid) 방법을 이용하여 cellulase는 Miller 등(1960) 방법에 의해, xylanase는 Bailey and Poutanen(1989)의 방법에 따라 측정하였다. 상층액 5ml를 vial에 넣어 -30℃의 냉동고에 보관 후 분석시 저온에서 서서히 해동시켜서 14,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 사용하였다. CMCase 효소 활성은 기질용액을 0.01M sodium phosphate buffer (pH6.8)에 2% CMC용액이 되게 하여, 위액 0.3ml와 CMC 기질용액 1.2ml을 섞고, 39℃에서 30분 동안 반응시키고 난 후, DNS 1.5ml을 첨가하고 100 rpm에서 5분간 진탕 반응시켜 상층액 내의 환원당의 양을 측정하였다. CMCcase의 1 unit는 1분 동안 1 mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Xylanase 효소 활성은 반추위액 0.375ml와 0.1M sodium phosphate buffer(pH7.0) 0.375ml, 1% xylan(from oats splets) 현탁액 0.75ml을 섞고, 65℃에서 20분간 반응시키고 난 후, DNS 1.5ml을 더하고 100rpm에서 10분간 진탕 반응시켜 상층액 내의 환원당의 양을 측정하였다. Xylanase의 1 unit는 1분 동안 1 mol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

(5) 통계분석

본 실험의 결과로 얻어진 자료에 대한 통계 처리는 SAS(Statistical analysis system, 1996)/PC system을 이용하여 분산 분석을 실시하여 유의한 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 이용하여 요인 분석하였다.

2. Fibrolytic enzyme 첨가에 대한 착유우의 생산성 변화 (In Vivo 실험)

(1) 실험동물 및 사육조건

Multiparous Holstein cow 13두(평균체중 620kg, 유기 137일, 2.8산)를 이용하였으며, 모든 착유우는 자동급이기 (Seoil, Co. Korea)가 설치된 stall barn에서 사육되었다. 사료는 1일

3회 나누어 급여하였으며 원료사료 섭취량은 Table 3과 같다. 본 실험에 사용된 fibrolytic enzyme은 in vitro 실험과 같이 *Aspergillus niger*와 *Trichoderma longibrachaitum*로부터 추출한 (CMCase activity 101.7CU/g, xylanase activity 103.8XU/g) 것으로서 Alltech, Inc.에서 제공하였다. 농후사료(concentrate) 급여는 착유시 각각 1kg과 TMR 급여시 2kg을 균등 섭취하도록 고정 틀에서 급여하였으며, 2회 급여하

Table 3. Intakes of diets and nutrients of experimental diets of lactating dairy cows (in vivo experiment)

Item	Intakes and chemical composition
<b>Intakes of Diets, kg/day</b>	
<b>As-Fed (total)</b>	<b>26.00</b>
Mixed ration <sup>1)</sup>	16.40
Concentrate <sup>2)</sup>	6.60
Rice straw	3.00
<b>Dry Matter (total)</b>	<b>20.83</b>
<b>Composition, % of dry matter</b>	
Crude protein	18.16
Non structural carbohydrate	37.02
Neutral detergent fiber	35.02
Acid detergent fiber	19.66
Ether extract	3.89
Organic matter	91.84
Crude ash	8.16

<sup>1)</sup> contained alfalfa hay, oat hay, kline hay, soy hull, soybean meal, corn flaked, wheat grain, brewer's grain(wet), lupin flaked, cotton seed meal, canola seed meal, lime stone, tri-calcium phosphate, vitamin-mineral mixture. Chemical composition, % of DM: CP 21.27, EE 3.63, ash 7.79, NDF 23.57, ADF 1090, NSC 46.04.

<sup>2)</sup> contained wheat bran, soybean meal, corn flaked, wheat grain, cotton seed meal, canola seed meal, corn gluten meal, lime stone, tri-calcium phosphate, vitamin-mineral mixture. Chemical composition, % of DM: CP 16.91, EE 6.48, ash 7.09, NDF 43.51, ADF 24.72, NSC 30.34.

였다. TMR과 볏짚 급여는 모든 실험 동물이 급여 사료를 완전하게 섭취하도록 하였으며, 익일 아침 측정된 잔량은 모든 실험구에서 나타나지 않았다. Mineral mixture와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 착유는 매일 05:00 및 17:00시에 2회 착유하였다.

## (2) 실험설계 및 방법

본 실험은 fibrolytic enzyme 첨가에 대한 착유우의 생산성 변화를 조사하기 위해 실시하였으며, TMR 사료에 fibrolytic enzyme을 0.1% 첨가하고 simple change over design으로 실험구와 (cellulase activity: 1667.88CU/d, xylanase activity: 1702.32XU/d) 효소 무첨가구인 대조구를 배치하여 15일간의 적응 기간과 28일간의 실험 기간으로 총 86일간 실험을 수행하였다. 총 13두의 Holstein 착유우를 산차 및 유량을 고려하여 공시하였다. 평균 우유 생산량은 22±0.38 kg/day/head, 평균 체중은 620±9.21kg, milk fat은 3.5±0.23%, milk protein은 3.0±0.09%, body condition score는 2.5±0.20 그리고 somatic cell count는 30±1.8×10,000/ml이었다. 우유의 생산량 및 영양성분 조사는 실험 개시 15일, 21일 및 28일째에 실시하였으며, 우유 샘플은 오전 (06:00)과 오후(18:00)에 40ml 유량계를 이용 채취하였으며, 보관 및 운반중 유성분의 변화를 방지하기 위하여 5℃ 이하로 유지하였다.

## (3) 분석방법

사료의 화학 분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 시료의 건물과 조단백질, 조지방을 분석하였고, Van Soest 등(1991)의 분석방법에 따라 NDF(neutral detergent fiber)를 분석하였다. 우유 중의 fat, protein, lactose 및 MUN(milk urea nitrogen) 분석은 Milkoscan 5000(FOSS Electric Co.)을 이용하였다.

## (4) 통계분석

통계분석은 SAS(Statistical Analysis System, Version 5.0 USA, 1985) package program을 이용하여 각 처리구 간의 평균값을 Duncan's multiple range T-test를 이용하여 비교 검정하였

으며, 동물과 실험기간에 대한 영향을 아래와 같은 고려하여 통계적 분석 방법을 이용하였다.

$$Y_{ijk} = X + A_i + D_j + E_{ij},$$

(X=평균값, A=실험동물, D=실험사료)

## III. 결과 및 고찰

### 1. 사료의 NDF 수준별 fibrolytic enzyme의 첨가 효과 (*In Vitro* 실험)

처리구별 배양 시간에 따른 NDF 소화율, 반추위액의 pH 변화, NH<sub>3</sub>-N 농도에 대한 결과는 Table 4와 같다. 배양 시간별 NDF 소화율은 전 배양 시간동안 fibrolytic enzyme 첨가에 의한 영향은 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 enzyme 첨가에 따라 전반적으로 NDF 소화율이 다소나마 증가하는 경향을 보였다. Feng 등(1996)은 비육우에게 fibrolytic enzyme을 급여 직전 사료에 첨가 급여시 NDF 및 ADF 소화율이 개선되었다고 하였고, 또한 Lewis 등(1996)도 모든 효소 첨가구에서 대조구보다 NDF 및 ADF 소화율이 증가하는 경향을 나타내었다고 보고하였는데 본 실험의 결과는 효소 첨가에 따라 NDF 소화율이 미미하게 증가하는 경향만 보였다. NDF 수준별로는 배양 2시간대와 48시간대를 제외하고는 NDF 수준에 의해 유의하게 영향을 받았다(P<0.05). 전체적으로 보아 NDF 34% 수준보다 NDF 38 및 43% 수준에서 NDF 소화율이 높은 경향을 나타내었다. 본 실험 사료의 조성 성분으로 보아 NDF 성분 구성상 hemicellulose 함량이 높았으며 이로 인한 반추위내 NDF 소화율에 미치는 영향이 컸다고 사료된다.

반추위액의 pH 변화는 전체적으로 실험 개시부터 배양시간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, NDF 34% 수준의 배양 2시간대에서는 0, 0.05 및 0.1% fibrolytic enzyme 첨가구에서 각각 6.37, 6.35 및 6.39로서 0.05% 첨가구에서 가장 낮은 pH를 나타내었다(P<0.01). 또한 24시간대에서도 5.69, 5.60 및 5.69로서 0.05% 첨가구에서 가장

Table 4. Effects of NDF and fibrolytic enzyme levels on ruminal pH, ammonia-N concentrations and NDF digestibility (*in vitro* experiment)

Incubation (hr)	NDF 34%			NDF 38%			NDF 43%			Significance <sup>1)</sup>			
	0%	0.05%	0.1%	0%	0.05%	0.1%	0%	0.05%	0.1%	SEM <sup>2)</sup>	N	F	N×F
<b>Rumen pH</b>													
2	6.37 <sup>a*</sup>	6.35 <sup>a</sup>	6.39 <sup>b</sup>	6.35	6.36	6.30	6.40	6.38	6.35	0.03	NS <sup>3)</sup>	NS	NS
4	6.20	6.22	6.2	6.22	6.19	6.21	6.24	6.22	6.21	0.01	NS	NS	NS
6	6.38	6.09	6.08	6.08	6.08	6.08	6.13	6.11	6.10	0.06	NS	NS	NS
12	5.82	5.84	5.82	5.81	5.84	5.80	5.86	5.89	5.82	0.04	NS	NS	NS
24	5.69 <sup>a*</sup>	5.6 <sup>b</sup>	5.69 <sup>a</sup>	5.73	5.75	5.73	5.77	5.72	5.59	0.05	NS	NS	NS
48	5.62	5.65	5.61	5.68	5.66	5.67	5.76 <sup>a***</sup>	5.74 <sup>ab</sup>	5.73 <sup>c</sup>	0.01	***	NS	NS
<b>Rumen ammonia-N concentrations (mg/100ml)</b>													
2	5.78	6.65	6.22	5.05	5.61	7.13	4.70	5.14	5.27	0.53	* <sup>3)</sup>	NS	NS
4	7.11	6.86	7.42	6.84	6.63	8.21	6.93	7.26	7.24	0.64	NS	NS	NS
6	9.23	8.40	9.57	9.48	9.05	9.62	9.21	8.61	9.76	0.61	NS	NS	NS
12	13.14	15.06	15.80	14.54	16.11	17.14	17.75	19.11	21.46	0.66	***	***	NS
24	24.77	26.95	30.34	24.37	27.37	27.12	30.74	31.28	30.09	1.02	**	NS	NS
48	32.02	31.15	29.20	29.90	27.91	29.24	29.00	31.32	33.15	0.76	NS	NS	NS
<b>NDF digestibility (%)</b>													
0	10.09	13.93	16.62	30.56	24.07	24.77	26.61	30.38	36.35	3.69	*** <sup>3)</sup>	NS	NS
2	34.43	27.50	29.96	45.51	37.77	33.32	41.25	32.42	43.75	4.26	NS	NS	NS
4	46.66	37.00	36.25	46.42	36.23	42.62	46.52	48.93	55.17	3.49	**	NS	NS
6	45.18	44.76	39.75	43.23	42.10	45.42	53.23	54.86	52.41	5.43	*	NS	NS
12	46.00	47.48	45.50	47.20	53.34	58.58	55.66	56.84	60.12	3.88	**	NS	NS
24	55.27	57.01	59.04	62.21	63.00	61.63	59.78	65.31	63.11	1.48	**	NS	NS
48	61.09	59.63	67.99	64.75	68.14	67.95	63.79	64.56	65.41	4.03	NS	NS	NS

<sup>1)</sup> N = NDF effect, F = Fibrolytic enzyme effect, N×F = NDF×Fibrolytic enzyme interaction.

<sup>2)</sup> standard error of mean.

<sup>3)</sup> NS: not significant, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001.

낮은 결과를 나타내었다(P<0.01). NDF 43% 수준의 48시간대에서도 0, 0.05 및 0.1% fibrolytic enzyme 첨가구에서 각각 5.76, 5.74 및 5.73으로 나타나 대조구(0%)에 비하여 fibrolytic enzyme 첨가구에서 낮은 pH를 나타내었다(P<0.001). 이것은 본 실험의 fibrolytic enzyme 첨가구에서 섬유소의 분해가 증가한 것으로 보이며, 곰팡이로부터 추출한 효소제의 투여가 반

추위액의 pH를 낮춘다는 여러 보고들과 유사한 결과라고 할 수 있다(Martin과 Russell, 1986; Martin 등, 1989). 그러나 본 연구의 대부분의 배양 시간대에서는 fibrolytic enzyme의 첨가 수준에 의한 영향보다는 NDF 수준에 의해 영향을 더 받은 것으로 나타났다(P<0.001).

반추위액의 NH<sub>3</sub>-N 농도에 대한 결과로서 NDF 수준 및 fibrolytic enzyme 첨가 후 배양

결과를 보면 배양 초기 1.85mg/100ml에서 배양 시간이 경과함에 따라 최저 29mg/100ml에서 최고 33.15mg/100ml의 범위를 나타내었다. 전체적으로 배양 개시 직후 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, fibrolytic enzyme 첨가에 따라 유의한 차이를 나타내지 않았다. Satter와 Slyter(1974)는 최대의 반추위 박테리아의 성장을 위해서는 5mg/100ml 이상의 암모니아 농도가 요구되어진다고 하였는데, 본 연구에서의 배양 후 2시간대부터 NH<sub>3</sub>-N 농도는 모든 처리구에서 5mg/100ml 이상으로 나타나 섬유소 분해 효소의 첨가로 인한 반추위내 미생물 활성 억제 작용은 없었다고 사료된다.

Table 5는 각 처리구 및 배양시간별 VFA 생성 및 A/P ratio를 나타내었다. 전체적으로 처리구의 종류에 따른 결과는 반추위내 pH 결과에서 반영된 바와 같이 배양시간이 경과함에 따라 크게 영향을 받은 것으로 나타났다. Acetic acid의 생성량은 배양 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었는데 배양 후 6시간대와 48시간대를 제외하고 NDF 수준에 의해 유의한 영향을 받았다( $P < 0.05$ ). Acetic acid의 변화를 보면 total VFA와 비슷한 경향을 보였는데, total VFA의 농도 변화가 acetic acid 농도 변화의 영향에서 기인된 것으로 사료된다. Propionic acid의 생성량 또한 acetic acid 생성량 변화와 유사한 경향을 나타내었으나 처리구간에 큰 차이를 나타내지는 않았다. 그러나, 배양 후 6시간대를 제외한 모든 배양시간대에서 NDF 수준이 높을수록 유의하게 낮았는데 이는 사료의 영양소 조성에서 NSC 함량이 상대적으로 낮았기 때문이다. Butyric acid의 생성량은 acetic acid와 propionic acid 생성 결과와 유사한 경향을 나타내었으나 유의한 차이를 나타내지는 않았다. Butyric acid의 경우에는 배양 4시간대에 NDF 43% 수준의 fibrolytic enzyme 0, 0.05 및 0.1% 첨가구가 각각 2.00, 1.99 및 2.14mM로 0.1% 첨가구에서 유의하게 높게 생성되었다( $P < 0.05$ ).

반추위내 발효산물로서 휘발성지방산의 생성량과 생성 비율을 비교 평가하는 acetic acid/propionic acid 비율(A/P ratio)은 처리구에 관계

없이 전체적으로 배양이 진행됨에 따라 배양 4시간에서 6시간 사이에 다소 증가하다 12시간 부터는 다시 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 각각의 휘발성지방산들이 4시간에서 6시간 사이에 증가된 결과와 상관이 있다고 볼 수 있다.

본 실험에서 사용된 fibrolytic enzyme은 곰팡이 배양 추출물을 이용하여 효소제를 제조한 것으로서, 대체적으로 VFA 생성량의 증가를 가져오는 것으로 보인다. 이와 같은 관점은 다른 연구에서도 밝혀지고 있는데(Gray와 Ryan, 1990), 특히 acetic acid 생성량의 증가와 propionic acid 생성량의 감소로 A/P 비율이 증가하는 것으로 알려져 있다(Arambel과 Tung, 1987; Weidemeier 등, 1987; Fondevila 등, 1990). 본 실험의 경우에는 NDF 수준에 의한 영향으로 배양 후 6시간까지와 배양 마지막 48시간대에 NDF 34% 수준에서 A/P 비율이 가장 높은 경향을 나타내었다. NDF 38% 수준에서는 배양 12시간대를 제외한 전 배양시간동안 fibrolytic enzyme 0.05% 첨가구에서 A/P 비율이 무첨가구에 비해 다소 높은 경향을 나타내었으나 유의성은 나타나지 않았다. Table 6은 배양시간별 CMCase와 xylanase의 효소 활성을 측정된 결과이다. CMCase와 xylanase 모두 처리구의 종류에 관계없이 배양시간이 지날수록 감소하는 경향을 나타내었다. CMCase의 효소 활성은 NDF 34 및 43% 수준에서는 fibrolytic enzyme 첨가구(0.05, 0.1%)가 무첨가구에 비해 효소 활성이 높았고, NDF 38% 수준에서는 무첨가구에서 효소 활성이 높았으나 유의성은 없었다. 배양개시 직후인 0시간대에는 NDF 수준과 fibrolytic enzyme 첨가 수준에 의해 유의하게 영향을 받는 것으로 나타났으며( $P < 0.05$ ), 4시간 배양시에도 NDF 수준에 의한 영향( $P < 0.01$ )과 fibrolytic enzyme 첨가 수준에 의한 영향( $P < 0.05$ )을 받았다. Xylanase의 효소 활성은 배양 후 4시간과 6시간대에서 NDF 수준에 의해 유의한 영향을 받는 것으로 나타났으며, 배양 24시간대에는 NDF와 fibrolytic enzyme 상호간의 영향을 모두 받는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 배양개시 후 0시간대부터 12시간대까지

Table 5. Effects of NDF and fibrolytic enzyme levels on VFA production and A/P ratio (*in vitro* experiment)

Incubation (hr)	NDF 34%			NDF 38%			NDF 43%			Significance <sup>1)</sup>			
	0%	0.05%	0.1%	0%	0.05%	0.1%	0%	0.05%	0.1%	SEM <sup>2)</sup>	N	F	N×F
<b>Acetic acid (mM)</b>													
2	20.42	19.77	20.17	19.15	18.18	20.10	18.14	16.16	16.78	1.50	* <sup>3)</sup>	NS	NS
4	18.21	18.05	20.89	19.08	19.15	16.58	14.75	14.25	14.61	0.65	**	NS	NS
6	15.58	15.93	16.28	16.14	15.84	18.18	15.40	14.86	15.41	1.23	NS	NS	NS
12	18.11	16.98	19.92	20.79	21.46	20.88	19.57	20.84	21.70	1.16	*	NS	NS
24	25.20	25.64	23.82	21.79	24.78	23.83	21.31	23.11	24.55	0.89	*	NS	*
48	25.95	25.04	25.10	23.56	25.49	24.54	24.65	22.94	23.17	0.90	NS	NS	NS
<b>Propionic acid (mM)</b>													
2	6.11	6.14	6.22	5.77	5.44	6.08	5.17	4.52	4.75	0.60	*	NS	NS
4	5.30	5.31	6.04	5.37	5.23	4.10	3.63	3.57	3.77	0.22	***	NS	NS
6	4.17	4.39	4.44	4.35	4.25	5.07	3.94	3.83	3.83	0.32	NS	NS	NS
12	5.15	4.57	5.86	5.89	6.24	5.98	5.63	6.00	6.46	0.41	*	NS	NS
24	8.00	8.05	7.56	6.56	7.30	7.48	6.78	7.14	7.18	0.42	*	NS	NS
48	8.91	8.27	8.07	7.66	7.91	8.10	7.07	7.19	6.97	0.41	**	NS	NS
<b>Butyric acid (mM)</b>													
2	3.14	3.32	3.25	3.06	2.85	3.25	2.55	2.28	2.43	0.38	*	NS	NS
4	2.87	2.86	3.21	2.76	2.70	2.12	2.00 <sup>b*</sup>	1.99 <sup>b</sup>	2.14 <sup>a</sup>	0.10	***	NS	NS
6	2.51	2.55	2.59	2.46	2.40	2.84	2.27	2.09	2.10	0.18	*	NS	NS
12	2.94	2.72	3.24	3.49	3.62	3.47	3.20	3.48	3.86	0.25	*	NS	NS
24	4.19	4.44	4.34	3.86	4.22	4.29	3.86	4.19	4.29	0.23	NS	NS	NS
48	5.04	4.65	4.54	4.51	4.66	4.64	4.22	4.14	4.02	0.15	**	NS	NS
<b>Total VFA (mM)</b>													
2	31.10	30.74	31.09	29.40	27.83	30.92	26.92	23.94	25.06	4.42	NS <sup>3)</sup>	NS	**
4	27.58	27.40	31.55	28.35	28.22	23.72	21.30	20.74	21.52	1.69	**	NS	NS
6	23.38	24.00	24.46	24.04	23.55	27.30	22.61	21.67	22.24	3.32	NS	NS	NS
12	27.44	25.45	30.39	31.75	32.86	31.84	29.84	31.87	33.88	1.87	*	NS	NS
24	39.19	40.04	37.68	34.08	38.29	37.61	33.85	36.51	38.09	3.05	NS	NS	NS
48	42.46	40.39	40.03	38.14	40.46	39.68	38.22	36.55	36.42	4.24	NS	*	NS
<b>A/P ratio</b>													
2	3.34	3.22	3.24	3.32	3.34	3.31	3.58	3.58	3.53	0.09	***	NS	NS
4	3.44	3.40	3.46	3.55	3.66	4.04	4.06	3.99	3.80	0.10	***	NS	NS
6	3.74	3.63	3.67	3.71 <sup>a**</sup>	3.73 <sup>a</sup>	3.59 <sup>b</sup>	3.91	3.88	4.02	0.04	***	NS	NS
12	3.52	3.72	3.40	3.53	3.44	3.49	3.48	3.47	3.36	0.08	NS	NS	NS
24	3.15	3.19	3.15	3.32	3.39	3.19	3.14	3.24	3.42	0.14	NS	NS	NS
48	2.91	3.03	3.11	3.08	3.22	3.03	3.49	3.19	3.32	0.08	***	NS	NS

<sup>1)</sup> N = NDF effect, F = Fibrolytic Enzyme effect, N×F = NDF×Fibrolytic enzyme interaction.

<sup>2)</sup> standard error of mean.

<sup>3)</sup> NS: not significant, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001.





Table 6. Effects of NDF and fibrolytic enzyme levels on CMCase and Xylanase activities (in vitro experiment)

Incubation (hr)	NDF 34%			NDF 38%			NDF 43%			Significance <sup>1)</sup>			
	0%	0.05%	0.1%	0%	0.05%	0.1%	0%	0.05%	0.1%	SEM <sup>2)</sup>	N	F	N×F
<b>CMCase<sup>3)</sup></b>													
2	14.17	11.14	16.10	13.93	16.14	8.58	15.48	15.49	11.02	1.62	NS	NS	NS
4	14.78	18.45	13.20	16.80	16.13	12.72	6.41	11.84	9.85	1.06	**	*	NS
6	15.89	18.74	8.96	15.12	6.03	5.33	10.64	11.15	14.17	1.06	NS	NS	NS
12	10.84	10.09	14.17	14.54	13.07	14.20	8.78	15.12	11.36	0.78	NS	NS	NS
24	2.24	2.88	2.04	2.48	2.32	2.22	2.12	2.02	2.08	0.26	NS	NS	NS
48	2.02	1.96	1.94	2.05	1.94	2.05	2.07	2.08	2.00	0.07	NS	NS	NS
<b>Xylanase<sup>3)</sup></b>													
2	7.39	6.26	8.54	9.51	6.99	5.33	5.68	7.19	5.83	0.74	NS	NS	NS
4	8.61	9.50	7.98	9.28	11.00	6.34	5.37	6.38	6.15	0.86	*	NS	NS
6	11.83	13.44	7.58	10.49	5.78	4.87	5.50	7.91	8.62	1.19	*	NS	NS
12	7.17	7.97	6.67	9.58	7.74	8.12	6.69	7.4	6.32	0.52	NS	NS	NS
24	5.30	9.78	1.46	2.83	4.22	3.68	2.77	2.77	9.01	0.59	NS	NS	*
48	1.67	1.64	1.67	1.46	1.02	1.63	1.26	1.56	1.92	0.50	NS	NS	NS

<sup>1)</sup> N = NDF effect, F = Fibrolytic enzyme effect, N×F = NDF×Fibrolytic enzyme interaction.

<sup>2)</sup> standard error of mean, NS: not significant, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001.

<sup>3)</sup> Activity : units/g for production of 1 mol glucose/min.

는 효소활성이 완만히 감소하나 24시간 이후부터는 급격히 감소하였다. 이는 24시간 이후부터 반추위미생물의 효소 활력이 점차 약해졌던 것으로 사료되며 반추위내 효소 활성 반응은 주로 배양 초기에 일어나는 것으로 생각할 수 있다.

## 2. Fibrolytic enzyme 첨가에 대한 착유우의 생산성 변화 (In Vivo 실험)

젖소의 산유량, 우유 내 영양소 함량 및 생산량에 대한 fibrolytic enzyme의 첨가 영향을 Table 7에 나타내었다. Fibrolytic enzyme 첨가에 의한 산유량은 효소 첨가구와 무첨가구에서 각각 25.80 및 23.90kg/d로서 fibrolytic enzyme 첨가구에서 약 8%(1.90kg/d) 증가하는 결과를 나타내었다. 유지방 함량의 경우는 fibrolytic enzyme 첨가구와 무첨가구의 유지방 함량이 모두 3.70%로서 enzyme 첨가구와 무첨가구간

의 차이가 없었다. 그러나 우유 성분에 대한 생산량을 고려한 경우 생산량(g/day)은 효소 첨가구가 대조구에 비해 유의하게 높은 결과를 나타내었다 (P<0.01). 유단백질 함량은 무첨가구 2.92%와 첨가구 3.05%로 효소 이용시 증가하는 결과를 보였으나 통계적 유의차는 없었다. 체내 단백질 이용 효율을 섭취 단백질에 대한 우유 단백질 생산량의 비율로 평가할 경우 대조구 20.29%에 비해 fibrolytic enzyme 첨가구에서 23.41%로 약 3.1% 증가하여 섬유소 분해 효소를 사용시 젖소의 우유 단백질 생산 효율을 향상시키는 것으로 나타났다. 일반적으로 젖소의 단백질 이용 효율을 섭취 단백질의 우유 생산 효율로 평가할 경우 약 25~35%라는 점을 감안할 때 본 연구의 단백질 생산 효율이 약 20~23%의 범위를 나타낸 것은, 본 연구의 주요 조사료원으로 이용한 볏짚이 반추위내 미생물 단백질 합성 효율을 낮추는 요인이 되었다고 사료된다. Kung 등(2002)은 젖소 사료

Table 7. Effects of fibrolytic enzyme addition on milk yield and milk composition of dairy cows (*in vivo* experiment)

Item	Fibrolytic enzyme	Control	SEM <sup>1)</sup>
<b>Milk yield and composition</b>			
Milk yield (kg/day)	25.80	23.90	2.85
Fat (%)	3.70	3.70	0.18
Protein (%)	3.05	2.92	0.05
Lactose (%)	4.33	4.34	0.05
Solid Not Fat (%)	8.08	7.69	0.08
Total Solid (%)	12.36	11.69	0.21
Urea (mg/dl)	16.84	17.54	1.69
Citric acid (%)	0.19	0.18	0.01
<b>Yields of milk components</b>			
Fat (g/day)	954.82	884.12	24.60**
Protein (g/day)	787.55	697.33	12.67***
Lactose (g/day)	1117.14	1038.36	12.63*
Solid Not Fat (g/day)	2085.50	1902.62	18.73*
Total Solid (g/day)	3189.31	2794.46	51.46**

<sup>1)</sup> Means of triplicate  $\pm$  standard error of mean.

Different superscripts in the same column of each storage period significantly differ (\* P<0.05, \*\* P<0.01).

로 옥수수 사일리지와 알팔파 사일리지를 이용 시 fibrolytic enzyme 적용은 유량 증가에 도움이 되며, 1.8kg의 유량 증가와 0.04%의 우유 단백질 함량 증가를 나타내어 사료 단백질 생산 효율이 증가하였다고 하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 보였다. 반면, fibrolytic enzyme 첨가에 의한 유성분 변화라는 관점에서는 Kung 등(2000)은 fibrolytic enzyme 급여로 유량 증가가 있었던 반면 유지율 감소가 나타났다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 유성분의 변화가 통계적으로 유의하게 나타나지 않았으며 우유 생산량 증가 결과를 반영하여 평가할 때 유지지방과 유단백 모두 효소 첨가구에서 유의하게 증가하였다. 이것은 효소 첨가로 인한 사료의 영양소 이용 효율이 증가한 결과라고 판단할 수 있다. Stokes와 Zheng(1995)은 fibrolytic

enzyme 이용시 평균 유량 증가가 4.0kg이었으며, 이는 건물섭취량 2.0kg 증가에 기인한다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 건물급여량을 고정하여 실험이 수행되었기 때문에 건물섭취량의 증가에 기인한다기보다 영양소 이용 효율이 효소 첨가로 인해 향상되었다고 볼 수 있다. 우유중 urea-N 함량 결과는 대조구의 17.54 mg/100ml와 첨가구의 16.84mg/100ml로 효소 첨가구에서 낮은 경향을 보였다. 본 연구에서는 사료단백질의 함량이 효소 첨가구 및 대조구간 동일하였다는 점을 감안하면 반추위내 미생물의 단백질 합성 효율이 효소 첨가에 의해서 증가하였을 것으로 판단되며 결과적으로 본 연구의 우유 단백질 생산 효율 증가를 유도하였다고 사료된다.

#### IV. 요약

본 연구는 우유의 생산성 향상을 위하여 우유 사료에 fibrolytic enzyme을 첨가하여 반추위내 발효 성상과 비유중인 젖소의 생산성에 미치는 영향을 평가하였다. 본 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다.

*In vitro* 실험을 통하여 NDF 함량 수준이 다른 TMR 사료에 fibrolytic enzyme을 3가지 수준(0, 0.05, 0.1%)으로 달리하여 첨가하였을 때 나타난 NDF 소화율은 효소 첨가시 다소 증가하는 경향을 보였으며 NDF 수준별로는 NDF 38 및 43% 수준보다 NDF 34% 수준에서 NDF 소화율이 낮은 경향을 나타내었는데 이는 본 시험 사료의 조성 성분으로 보아 NDF 성분 구성상 hemicellulose 함량이 높아 이 점이 반추위내 NDF 소화율에 영향을 주었다고 사료된다. 반추위액의 pH는 fibrolytic enzyme의 첨가 수준에 의한 영향보다는 NDF 수준에 의해 영향을 더 받은 것으로 나타났으며(P<0.001) NH<sub>3</sub>-N 생성도 전체적으로 fibrolytic enzyme 첨가에 따른 효과가 나타나지 않았다.

Acetic acid의 생성량은 NDF 수준에 의해 유의한 영향을 받았으나 (P<0.05) propionic acid의 생성량은 처리구간에 큰 차이를 나타내지 않았다. Acetic acid와 propionic acid 생성량 모

두 효소 첨가에 의한 영향은 유의하게 나타나지 않았고 A/P ratio는 NDF 34% 수준의 fibrolytic enzyme 첨가구에서 무첨가구에 비해 다소 높은 경향을 나타내었다. CMCase의 효소 활성은 NDF 34 및 43% 수준에서 fibrolytic enzyme 첨가구(0.05, 0.1%)가 무첨가구에 비해 높은 효소 활성을 보였다. Xylanase의 효소 활성은 배양 개시 후 0시간대부터 12시간대까지는 효소 활성이 완만히 감소하였고 24시간 이후부터는 급격히 감소하였다.

*In vivo* 실험을 이용하여 fibrolytic enzyme 첨가에 따른 착유우의 생산성 변화 결과는 다음과 같다. Fibrolytic enzyme 첨가에 의한 산유량은 enzyme 첨가구와 무첨가구에서 각각 25.80 및 23.90kg/d로서 enzyme 첨가구에서 약 8% (1.90kg/d) 증가하는 결과를 나타내었다. 유지방 및 유단백 함량의 경우는 fibrolytic enzyme 첨가구와 무첨가구간 차이가 없었으나 일일 생산량으로 환산하여 평가하면 enzyme 첨가시 유성분 생산량이 유의하게 증가하는 결과를 보였다 ( $P<0.01$ ).

이상의 결과들로 볼 때, *in vitro* 실험의 경우 fibrolytic enzyme 첨가시 반추위내 발효성상에 명확한 변화를 보여주지 못했지만 enzyme 첨가에 따라 전반적으로 NDF 소화율이 다소나마 증가하는 경향을 보였다. *In vivo* 실험 결과를 종합하면 착유우 사료에 fibrolytic enzyme를 첨가시 유성분의 변화보다 유량의 증가 효과가 나타났으며 이는, 사료섭취량을 제한한 본 실험의 특성상, 사료섭취량 증진 효과가 아니라 체내 영양소 이용성 증진에 따르는 효과라고 판단되었다. 반추동물의 생산성 향상을 위한 방안으로서 fibrolytic enzyme 이용 효과는 연구자에 따라 다양한 결과를 나타내므로 효소의 적용 방법에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

## V. 인 용 문 헌

1. A. O. A. C. 1990. Official Methods of Analysis (15th ed.) Association of Official Agricultural Chemists Washington, D. C.
2. Arambel, M. J. and Tung, R. S. 1987. Evaluation of *saccharomyces cerevisiae* growth in the rumen ecosystem. 19th Biennial Conference on Rumen Function, Chicago.
3. Bailey, M. J. and Poutanen, K. 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. Applied Microbiology and Biotechnology 30:5.
4. Beauchemin, K. A., Rode, L. M. and Sewalt, V. J. H. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forage. Can. J. Anim. Sci. 75:641.
5. Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clinical Chemistry 8:130.
6. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and Multiple F test. Biometrics 11:1.
7. Erwin, E. S., Macro, G. T. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44:1768.
8. Feng, T., Hunt, C. W., Pritchard, G. T. and Julien, W. E. 1996. Effects of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. J. Anim. Sci. 74:1349.
9. Fondevila, M., Newbold, C. J., Hotton, P. M. and Orskov, E. R. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the ruminal fermentation of sheep fed straw. Anim. Prod. 52:422.
10. Gray, W. R. and Ryan, J. P. 1990. Two distinct modes of action, namely *ab initio* and *ad finem*, of the yeast culture Yea-Sacc on ruminal fermentation in sheep. Trans. Biochem. Soc. 18:349.
11. Johnston, J. D. 2000. Fibrozyme and *in vitro* NDF response - Moving from theory to practical commercial reality. In: Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of the 16th Annual Symposium (T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 487.
12. Kopecny J., Marounek, M. and Holub, K. 1987. Testing the suitability of the addition of *Trichoderma viride* cellulase to feed ration for ruminants. Zivvok. Vyr. 32:587.
13. Kung, L., Cohen, M. A., Rode, L. M. and

- Treacher, R. J. 2002. The effect of fibrolytic enzyme sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2396.
14. Kung, L., Treacher, R. J., Nauman, G. A., Smagala, A. M., Endres, K. M. and Cohen, M. A. 2000. The effect of treating forage with fibrolytic enzymes on its nutritives values and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115.
  15. Lewis, G. E., Hunt, C. W., Sanchez, W. K., Treacher, R., Pritchard, G. T. and Feng, P. 1996. Effect of direct-fed enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020.
  16. Martin, S. A., Nisbet, D. J. and Dean, R. G. 1989. Influence of a commercial yeast culture supplement on the *in vitro* ruminal fermentation. *Nutr. Rep. Int.* 40:395.
  17. Martin, S. A. and Russell, J. B. 1986. Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of hexoses by ruminal bacteria: Evidence for the phosphotransferase transport system. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1348.
  18. McHan, F. 1986. Pre-treatment of coastal bermuda grass with sodium hydroxide and cellulase before ensiling. *J. Dairy Sci.* 69:1837.
  19. Miller, J. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal. Biochem.* 1:127.
  20. SAS. 1996. User's Guide: Statistics, Version 6.12 Edition. SAS Inst., Inc., Cary., NC.
  21. Satter, L. D. and Syster, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 32:209.
  22. Stokes, M. R. 1992. Effects of an enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. *J. Dairy Sci.* 75:764.
  23. Stokes, M. R. and Zheng, S. 1995. The use of carbohydrate enzymes as feed additives for early lactation cows. 23rd Biennial Conf. on Rumen Function, Chicago, IL. p. 35. (Abstr.).
  24. Tilly, J. M. A. and Terry, R. A. 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crop. *J. Brit. Grass. Soc.* 18:104.
  25. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583.
  26. Weidmeier, R. D., Arambel, M. J. and Walters, J. L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063.
- (접수일자 : 2002. 11. 26 / 채택일자 : 2003. 2. 19)