

혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이로 제조된 synbiotics의 첨가가 축우용 완전혼합사료의 호기적 안전성에 미치는 영향

이신자* · 신년학 · 정호식¹ · 현종환 · 문여황² · 이상석³ · 이성실

경상대학교 응용생명과학부(BK 21), ¹한양사료공업주식회사, ²진주산업대학교 동물생명과학과, ³순천대학교 동물자원과학과

Received September 2, 2008 / Accepted October 24, 2008

Effects of Supplemental Synbiotics Composed of Anaerobic Bacteria, Yeast and Mold on the Aerobic Stability of Total Mixed Ration for Cattle. Shin Ja Lee*, Nyeon Hak Shin, Ho Sik Jung¹, Jong Hwan Hyun, Yea Hwang Moon², Sang Suk Lee³ and Sung Sill Lee. *Division of Applied Life Science(BK 21 Program), Graduate School Gyeongsang National University, ¹Hanyang Feed Industrial Company limited, ²Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, ³Department of Animal Science & Biotechnology, Suncheon National University* - This study was conducted to investigate the effects of supplementation of synbiotics manufactured with anaerobic bacteria, yeast and mold on preservation of total mixed ration (TMR) by exposing days. Eight treatments were composed of untreated synbiotics (US), bacterial synbiotics (BS), yeasty synbiotics (YS), moldy synbiotics (MS), bacterial and mouldy synbiotics (BMS), yeasty and moldy synbiotics (YMS), bacterial and yeasty synbiotics (BYS), and bacterial, yeasty and moldy synbiotics (BYMS). After 7 days of anaerobic fermentation, fermented-TMRs were exposed to the air during 1, 3, 5, 7, 14 and 21 days. One hundred forty four (8 treatments×6 days×3 replications) fermented-TMRs were manufactured by vinyl bag (43 cm×58 cm). Although no significant differences in the activities of carboxymethylcellulase, xylanase and amylase were observed among treatments, their activities were seemed to increase by treatment of BYMS or YMS containing yeast. Total bacterial and mold counts also decreased in the treatments containing yeast. Potential pathogenic bacteria were less detected in BYMS and BMS for *E. coli*, BYMS and YS for *Salmonella*, and BMS and BYMS for *Shigella* than those of the other treatments, MS was, however, contaminated easier than US by pathogenic bacteria. From above results, synbiotics containing facultative anaerobic yeast have effects for preservation of TMR fermented anaerobically. Particularly, BYMS treatment having good results in nutrient contents, dry matter loss and pathogenic bacteria amounts was a reasonable synbiotics for preservation of the fermented-TMR.

Key words : Synbiotics, anaerobic fermentation, total mixed ration, preservation

서 론

축우사료와 관련하여 지난 10년간 가장 두드러진 현상의 하나는 완전혼합사료(TMR)의 이용이 현저히 증가되었다는 것이다. TMR은 우리나라에 1990년에 집단적으로 보급되면서 생수분 상태로 밀봉하여 haylage로 만들어 사용하였다. 그러나 보관 과정에서 영양적 손실이 많아 고수분의 silage 형태로 발효시켜 사용하여 왔다[21]. 이러한 관점에서 발효를 시킴으로써 고수분의 유기물 사료를 활용할 수 있는 TMF (total mixed fermentation)는 사료자원이 부족하여 조사료 수입에 의존하고 있는 우리나라 실정에 적합한 사료형태라고 볼 수 있다. 일반적으로 발효 조건이 좋을 경우는 별도로 미생물을 첨가할 필요가 없으나 그렇지 않을 경우는 발효를 신속하게 일어나게 하고 변패를 방지하기 위하여 미생물을 추가 접종할 필요가 있다. silage의 변패 과정은 통상적으로

효모에 의해서 최초로 일어나며 이로 인해 많은 효모를 포함하는 silage는 공기 노출에 대해 불안정하다고 보고되고 있다[14,47]. 현재 *Aspergillus oryzae*와 *Saccharomyces cerevisiae*가 주로 착유우의 사료 첨가제로서 이용되고 있으며 *A. oryzae*는 cellulases, hemicellulases, esterases와 같이 다양한 다당류 분해효소를 생산[39]하고 *S. cerevisiae*는 낮은 지방 함량과 높은 단백질, 비타민 함량을 가지고 있기 때문에 single cell protein로서의 산업적 이용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고[20], 산소와의 친화력이 높기 때문에 반추위내의 잔존 산소 제거에 효과가 있다[40]고 하였다. 옥 등[33]은 볏짚 silage에 효모를 첨가한 연구에서 효모의 첨가가 silage의 pH를 낮추고, 조단백질의 함량을 높일 수 있다고 보고하였다. 지금까지의 연구에서는 *A. oryzae*가 건물 소화율[11,45]과 우유 또는 FCM 생산량을 증가 시킨다[15,18,25]고 보고하였다. 그러나 LAB (lactic acid bacterium)의 사료첨가 효과에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있지만 곰팡이이나 효모의 첨가 효과에 대한 연구가 미흡한 실정이고, TMR을 이용한 TMF (total mixed fermentation)의 제조에 관한 연구도 잘 이루어

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5410, Fax : +82-55-751-5410

E-mail : tllsk1000@hanmail.net

지고 있지 않은 실정이다. 또한, probiotics 제품의 주종을 이루고 있는 미생물중 박테리아는 *Lactobacillus* spp, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*, 곰팡이는 *Aspergillus oryzae*로서 호기성 미생물로 구성되어 있다. 그러나 silage나 TMR의 발효는 혐기상태에서 이루어지기 때문에 혐기성유래 미생물을 이용하여 probiotics를 만들고 여기에 몇 가지의 prebiotics를 혼합한 synbiotics를 개발하였다. Probiotics란 항생물질(antibiotics)에 상대되는 개념으로 생균제라고도 하며 장내의 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주인 동물에게 유익한 효과를 발휘하는 살아있는 미생물 제제로서[9,19] 장관내에서 병원균의 집락 형성을 막아주는 효과를 발휘하는 것이다[30]. Prebiotics란 장내의 유용균을 증식시키는 인자로 장내 환경 개선과 숙주의 건강개선에 유의적인 작용을 하는 것으로[10] 올리고당, 식이섬유, 글루콘산 등이 있다. Probiotics와 prebiotics를 포함시킨 것을 synbiotics라고 한다.

본 시험에서는 이러한 기능을 가지고 있는 미생물 중에서도 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이를 조합한 synbiotic 제제를 TMR에 접종하였을 때, 개봉 후 기간의 경과에 따른 효소의 활성, 부패균의 증식 및 전자현미경을 통한 미생물 군집현황 등을 조사함으로써 혐기발효사료의 호기적 변패를 줄일 수 있는 균주나 균주 조합을 밝혀 보고자 수행되었다.

재료 및 방법

시험 설계

기초 TMR에 7 종류의 혐기미생물을 이용한 synbiotic 제제를 첨가, 발효시켜 대조구를 포함하여 총 8 처리구를 두었다. 처리구는 기본 TMR사료에 synbiotic 제제를 첨가하지 않은 US구(un-treated synbiotics), 혐기성 박테리아와 prebiotics로 만든 BS구(bacterial synbiotics; bacterial probiotics+prebiotics), 혐기성 효모와 prebiotics로 구성된 YS구(yeasty synbiotics; yeasty probiotics+prebiotics), 혐기성 곰팡이와 prebiotics로 구성된 MS구(mouldy synbiotics; moldy probiotics+prebiotics), 혐기성 박테리아와 효모 복합물 및 prebiotics로 구성된 BYS구(bacterial+yeasty synbiotics; bacterial and yeasty probiotics+prebiotics), 혐기성 박테리아 및 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 BMS구(bacterial+mouldy synbiotics; bacterial and mouldy probiotics+prebiotics), 혐기성 효모 및 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 YMS구(yeasty+moldy synbiotics; yeasty and moldy probiotics+prebiotics), 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 BYMS구(bacterial+yeasty+moldy synbiotics; bacterial, yeasty and moldy probiotics+prebiotics)로 나누었다. Prebiotics는 mannan oligosaccharide, lactose, sodium acetate 및 ammonium citrate로 구성되어 있다. 각각의 구체적인 미생물명과 Prebiotics의 종류와 함량 및 delivery system은

특히 관련 상의 문제로 본 논문에서 생략하고자 한다. 발효 TMR 사료의 제조에 사용된 probiotics 균주는 TMF 사료의 물리적·화학적 특성과 최종 TMF 사료의 온도 및 산소 그리고 성장률 등을 고려하여 선발하였다. 선발된 곰팡이는 Difco™ Potato Dextrose Broth 배지에 30°C에서 배양하였고, 박테리아는 Difco™ Lactobacilli MRS Broth 배지에 37°C에서 배양하였으며, 효모는 Difco™ YM Broth 배지를 이용하여 30°C에서 배양하였다. 곰팡이와 효모는 3일에 1회씩 계대 배양 하였고 박테리아는 2일에 1회씩 계대 배양하였다. 모든 배양은 혐기 상태에서 이루어 졌으며 혐기 배양장치는 Holdman 등[16], Ogimoto와 Imai [32] 및 Mitsuoka [27]의 방법에 준하여 제작하였다.

8 처리구 각각에 대해 개봉 후 노출 기간(1, 3, 5, 7, 14, 및 21일)별 3 반복으로 총 144(8 처리×6 노출 시간×3 반복)개의 발효 bag을 제조하였다.

시험 사료의 제조 및 시료 채취

기본 사료는 옥수수 flake, 맥주박, 대두피, 파쇄보리, 전지 면실, 벧짚, 페레니얼라이그라스 등 총 18종류의 단미사료 및 첨가제로 구성되어 있는 비육후기용 습식 TMR을 이용하였다. 시험사료는 기본사료인 TMR을 vinyl bag (가로 43 cm×세로 58 cm)에 약 1.5 kg을 다져 넣은 후, 공시된 균주액(무처리 구에는 증류수) 100 ml을 고르게 접종하고, 상부에 1.5 kg을 채워 넣고, 잘 섞은 다음, 진공 포장기[AZ-450, (주)인트라즈, Korea]를 이용하여 공기를 배제한 후, heat sealing하여 실온에서 7일 동안 발효시켜 제조하였다. 일반 발효사료의 유통 기간을 감안하여 발효기간을 7일로 정하였다. 공시균주의 접종액은 각 미생물이 최대 성장률을 나타내는 시간대를 감안하여 박테리아와 효모는 24시간대, 곰팡이는 36시간 계대배양액을 사용하였다.

시료 채취는 synbiotic제제 첨가 7일 후에 bag의 가로 상단 부를 개봉하여 1, 3, 5, 7, 14 및 21일 동안 실내에서 노출시켰다. 사료 내 효소 활성 및 균수 측정을 위한 시료채취는 bag의 개봉 표면 5 cm까지 부분을 제외한 중심부위에서 약 200 g 씩 3반복으로 채취하여 대표시료로 하였다. 전자현미경 관찰을 위한 시료는 개봉 14일된 사료의 중심부위에서 비슷한 크기와 모양의 벧짚을 채취하였다.

조사 항목 및 조사 방법

건물 감량 변화는 60°C의 건조기에서 72시간 건조 시킨 후 무게를 측정하여 감소한 량을 측정하였다.

Carboxymethylcellulase (CMCase)의 활성 측정은 환원당의 양을 DNS (dinitrosalicylic acid)법으로 측정하여 구하였다[26]. Cellulase 1 unit는 1 분당 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Xylanase 활성은 기질 용액을 0.1M acetate buffer에 2% (w/v) oat spelt xylan 현탁액이 되게 하여

cellulase 활력과 동일한 방법으로 측정하였다. Xylanase 1 unit는 1분당 1 μmol의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Amylase의 활력은 기질용액을 0.1 M acetate buffer에 1% (w/v) starch용액이 되게 하여 55°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, cellulase활력과 동일한 방법으로 측정하였다. Amylase의 1 unit는 1분당 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

사료 내 균수 측정은 개봉 후, 노출 기간별(1, 3, 5, 7, 14, 21일)로 혐기발효 TMR 시료 10 g에 멸균 증류수 90 ml을 넣어 homogenizer로 균질화시켜 멸균 증류수로 10¹¹까지 십진희석한 다음, 균수 측정을 위하여 평판배지에 분주·접종하여 도말하였다.

LAB, 곰팡이 및 효모의 수를 측정하기 위하여 사용한 배지는 각각 MRS (de Man-Rogosa-Sharpe, *Lactobacilli* MRS agar Medium, Lot No. 247940, Difco, USA)[4], PDB (Potato Dextrous agar Medium; Lot No. 254920, Difco, USA) [1] 및 YM (YM Broth Medium; Lot No. 6361447, Difco, USA)이다.

사료 중에 존재하는 total microbes, coli forms, *Salmonella* spp. 그리고 *Shigella* spp. 균수를 측정하기 위하여 총 세균에는 Plate count agar (Lot No. 234000, Difco, USA)를 coli forms bacteria에는 MacConkey agar (Lot No. 7177448, Difco, USA)를, 살모넬라와 이질균에는 *Salmonella-Shigella* agar (Lot No. 6352273, Difco, USA)를 사용하였고, 37°C 에서 24시간 혹은 48시간 배양 후 균수 측정을 하였다. 각각의 평판배지에 생성된 colony 수(30~300개)는 colony counter를 이용하여 계수하였다. 미생물의 수는 각 plate의 colony-forming unit (cfu)과 thallus forming unit (tfu)로 계산 후 10진법으로 환산하였다.

통계 처리

시험 결과는 SAS program의 General Linear Model (GLM) procedure [41]에 따라 처리되었으며, 각 처리구간에 유의성 검증을 위해 분산분석을 실시한 후, Duncan's multiple range test [7]로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

건물 함량 변화

혐기 발효사료의 개봉 후 노출 시간 경과에 따른 건물 감량은 Table 1에서 보는 바와 같다. 무처리 대조구와 효모와 곰팡이를 조합한 YMS처리구 그리고 박테리아와 효모 조합구인 BYS 처리구에서 개봉 후 시간이 경과할수록 건물 함량이 줄어들었다. 타 처리구에서도 통계적 유의차는 없었으나 건물 함량은 노출 시간이 증가될 수록 낮아졌다. 개봉 후 1일부터 21일까지의 건물 감량은 대조구에서 10.2%였으며, 혐기 미생물을 첨가하여 발효시킨 처리구에서는 5.3%에서 9.8% 범위로서 BMYS구에서 건물 감량이 가장 적어 호기적으로 노출 시 안정성이 대조구나 타 처리구에 비해 높은 것으로 나타났다.

Silage 제조 시, 발효 과정 동안 원료사료의 건물 함량이 감소되는데[3,43], 이때는 수용성 탄수화물이 감소[29]하고, 유기산이 생성[17]되는 등, 다양한 변화가 일어난다. 유산균을 silage에 첨가하면 건물 recovery가 향상되는데[44], 유산균을 첨가한 silage는 발효가 향상되고[43], 저장기간 동안이나 산소에 노출되었을 때, 효모의 성장을 억제함으로써 30일까지 silage 내에 열 발생을 줄여 호기적 안정성이 증가된다[6]. Nishino 등[31]은 *Lactobacillus casei*를 접종하였을 때, 이상 발효는 억제시켰지만 호기적 안정성에 대한 효과는 없었고, *Lactobacillus buchneri* 첨가 시에는 호기적 안정성은 향상되었지만 건물 감량과 NH₃-N 생산량이 증가되어 우점균주에 따라서도 발효 시 건물 감량에 차이가 있는 것으로 보고하였다. 본 시험에서 호기적 노출 시 나타나는 건물 감소율(1~21일)으로 평가해 볼 때, 대조구에 비해 YS, BMS 및 BMYS구에서 평균 34% 줄어 들었는데, 특히 BNYS구에서는 거의 50%에 이르러 사료의 저장성 향상에 크게 영향을 미칠 것으로 사료된다.

효소 활력 측정

7일 동안 발효시킨 후, 개봉한 TMR 사료의 노출 기간별 carboxymethylcellulase (CMCase) 활성은 Table 2에서 보는 바와 같다.

Table 1. Effects of exposing periods on the dry matter contents of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (%)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	72.53 ^a	71.95	73.01	73.20	71.54 ^a	71.69	75.25 ^a	71.42	5.03
3	70.90 ^{ab}	71.65	72.79	70.87	70.73 ^{ab}	71.39	74.11 ^{ab}	69.96	4.03
5	70.44 ^{ab}	68.40	69.97	70.43	70.48 ^{ab}	70.83	72.81 ^{ab}	69.96	3.29
7	67.38 ^{ab}	67.79	69.47	66.66	70.05 ^{ab}	69.60	70.51 ^{ab}	69.12	3.47
14	66.82 ^{ab}	67.66	69.45	66.60	69.25 ^{ab}	67.36	69.54 ^{ab}	67.79	2.69
21	65.16 ^b	65.94	67.64	66.30	64.54 ^b	66.26	68.62 ^b	67.66	2.99
Mean	68.87	68.90	70.39	69.01	69.43	69.52	71.81	69.32	0.35

^{a,b}Means with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

Table 2. Effects of exposing periods on the CMCase activity of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (IU; $\mu\text{mol glucose min}^{-1}\text{ml}^{-1}$)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	3.54 ^a	3.46 ^a	3.21 ^a	3.45 ^a	3.33 ^a	3.24 ^a	3.28 ^a	3.46 ^a	0.26
3	3.01 ^d	4.14 ^a	3.46 ^{cd}	3.50 ^{cd}	4.38 ^a	3.65 ^{bc}	3.48 ^{cd}	4.07 ^{ab}	0.32
5	3.32 ^{bc}	3.43 ^{abc}	3.26 ^{bc}	3.50 ^{abc}	3.86 ^a	3.08 ^c	3.67 ^{ab}	3.74 ^{ab}	0.30
7	3.00 ^c	3.64 ^{ab}	3.15 ^c	3.54 ^b	3.86 ^a	3.45 ^b	3.83 ^a	3.87 ^a	0.19
14	2.91 ^c	3.16 ^{bc}	3.00 ^{bc}	3.06 ^{bc}	3.23 ^{bc}	3.25 ^b	3.71 ^a	3.30 ^b	0.21
21	3.04 ^d	3.88 ^{abc}	3.36 ^{cd}	3.40 ^{cd}	4.03 ^{ab}	4.27 ^a	3.48 ^{bcd}	3.76 ^{abc}	0.35
Mean	3.14	3.62	3.24	3.41	3.78	3.49	3.58	3.70	0.08

^{a,b,c,d}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

대조구와 MS구를 제외하고 개봉 3일째와 마지막 21일째에 크게 증가 하였는데, BYS와 BMYS구에서 타 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. BMS구의 경우는 발효 21일째에 CMCase 활성이 크게($P < 0.05$) 높아졌는데, 활성에 영향을 끼친 synbiotics구에서는 노출 기간 중 대체로 두 번(3일, 21일)의 peak를 가지는 것으로 나타났다. 전 노출 기간 동안 CMCase 활성은 박테리아와 효모가 공히 조합되어 있는 BYS구와 BMYS구에서 높게 나타나, 혐기미생물에 의한 섬유소 분해활성은 박테리아와 효모가 공존할 때 서로 상승작용을 하는 것으로 추정된다. 일반적으로 cellulase의 활성은 곰팡이에서 주로 유래되는 것으로 알려져 있으나[36], 본 시험에서는 혐기성 곰팡이를 단일 균주로 한 MS구에서는 cellulase활성이 낮았던 반면, 혐기성 박테리아와 효모의 조합구에서 활성이 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 발효 TMR이 공기에 노출됨으로써 자연적 오염 등으로 인하여 혐기미생물들의 효소역가가 다양하게 변할 수 있다는 것을 의미한다.

Xylanase 활성은 Table 3에서 보는 바와 같이 대조구에서는 개봉 1일째에 처리구 중에서 가장 높았으나($P < 0.05$) 21일째에는 약 1/2 수준까지 지속적으로 낮아졌다. 전 노출 기간 동안 xylanase 활성을 높게 유지한 처리구는 효모(yeast) 첨가구인 BYS구와 YMS구로 나타났는데, 이는 반추동물이 효모사료를

섭취할 경우, 반추위내 혐기성 미생물과 섬유소 분해 미생물의 수를 증가시킨다는 결과[8,22]를 뒷받침하고 있다. 즉, 효모가 잔류산소를 제거하여 혐기상태를 제공[40]해 주고, 아미노산과 vitamin B군 등의 영양소를 공급함으로써 혐기성 미생물군을 증식[42]시킬 수 있기 때문이다. 따라서 효모의 첨가가 혐기성 세균과 곰팡이의 성장을 촉진시켜 xylanase activity가 높게 나온 것으로 사료된다. 그러나 효모 단독 처리구(YS)나 박테리아 단독 처리구(BS)에서는 대조구와 마찬가지로 노출 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다.

Amylase 활성은 Table 4에서 보는 바와 같이 개봉 1일째 YMS에서 높게 나타나고, 3일째는 유의적인 차이가 없었으나 개봉 5일째에는 BMYS구에서 타 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 개봉 7일째에는 전 처리구에서 대조구보다 높은 활력을 나타내었고, 개봉 14일째에는 YMS와 BYS에서 타 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 전 노출 기간 동안 amylase의 활성은 xylanase와 마찬가지로 효모와 혐기성 미생물(곰팡이, 세균) 조합구인 YMS 및 BYS 첨가구에서 높게 나타났다. Cellulase와 xylanase와 마찬가지로 amylase 역시, 반추위 곰팡이에 의해 많이 생성되는데[28,35,37,46], 일부는 상시적으로 존재하며 또한, 일부는 기질에 의해 유도되는 것을 알려져 있다. Cellulose, xylan 그리고 여러 종류

Table 3. Effects of exposing periods on the xylanase activity of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (IU; $\mu\text{mol xylosmin}^{-1}\text{ml}^{-1}$)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	3.43 ^a	2.81 ^b	2.36 ^{bc}	2.33 ^{bc}	2.50 ^{bc}	2.17 ^c	2.60 ^{bc}	2.49 ^{bc}	0.38
3	2.31 ^b	2.62 ^{ab}	2.32 ^{bc}	2.19 ^{bc}	2.92 ^a	2.38 ^b	2.72 ^{ab}	2.45 ^{ab}	0.33
5	1.75 ^c	2.15 ^{ab}	1.98 ^{bc}	1.99 ^{bc}	2.42 ^a	1.94 ^{bc}	2.04 ^{bc}	2.24 ^{ab}	0.22
7	1.94 ^d	2.33 ^{bcd}	1.98 ^{cd}	2.05 ^{cd}	2.78 ^{ab}	2.02 ^{cd}	2.84 ^{ab}	2.47 ^{abc}	0.32
14	1.83 ^d	1.92 ^{cd}	1.92 ^{cd}	2.04 ^{cd}	2.38 ^{ab}	1.98 ^{cd}	2.62 ^{ab}	2.24 ^{bc}	0.20
21	1.78 ^c	2.05 ^{bc}	1.98 ^c	2.31 ^{ab}	2.60 ^a	2.58 ^a	2.30 ^{ab}	2.01 ^{bc}	0.20
Mean	2.17	2.31	2.09	2.15	2.60	2.18	2.52	2.32	0.06

^{a,b,c,d}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

Table 4. Effects of exposing periods on the amylase activity of TMRs fermented by anaerobic synbiotics (IU; $\mu\text{mol glucose min}^{-1}\text{ml}^{-1}$)

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	3.57 ^a	3.50 ^a	3.66 ^a	3.47 ^a	3.85 ^a	3.69 ^a	4.04 ^a	3.78 ^a	0.45
3	3.58 ^a	3.95 ^a	3.29 ^a	3.69 ^a	3.89 ^a	3.59 ^a	3.83 ^a	3.86 ^a	0.52
5	3.13 ^c	3.89 ^b	3.18 ^c	3.02 ^c	3.68 ^b	3.08 ^c	3.70 ^b	4.28 ^a	0.23
7	3.14 ^c	3.64 ^{bc}	4.29 ^a	3.97 ^{ab}	4.12 ^{ab}	4.01 ^{ab}	4.11 ^{ab}	3.79 ^{ab}	0.39
14	3.09 ^c	3.57 ^b	3.25 ^{bc}	3.38 ^{bc}	4.12 ^a	3.14 ^c	4.39 ^a	3.61 ^b	0.25
21	3.26 ^{ab}	3.54 ^{ab}	3.23 ^{ab}	3.79 ^a	3.44 ^{ab}	3.52 ^{ab}	3.47 ^{ab}	3.09 ^b	0.35
Mean	3.30	3.68	3.48	3.55	3.85	3.51	3.92	3.74	0.07

^{a,b,c}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

의 당을 기질로 한, 배지에서 배양한 곰팡이에 의해서도 amylase의 활력이 나타나지만, 전분을 기질로 사용한 배지에서 훨씬 높다[28,46]고 알려져 있다.

미생물 수 측정

혐기 발효시킨 TMR을 개봉한 후 노출 시기별 희석액의 총 세균수는 Table 5에서 보는 바와 같다. 개봉 후 3일째부터 곰팡이 단독 처리구인 MS구에서 타 처리구에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 증가하였으며, 개봉 후 5일째에는 무처리 대조구인 US구와 박테리아 단독처리구인 BS구에서 급격하게 증가하여 전 처리구의 평균으로 볼 때 이 시기에 총 미생물 수가 가장 왕성하게 번식한 것으로 나타났다. 개봉 7일째에는 US구가 다른 처리구에 비해 총 미생물 수가 현저히($P < 0.05$) 많았으며, 대조구인 US구와 효모와 곰팡이 조합구인 YMS구의 노출 시기별 총 미생물 균총의 변화는 개봉 후 5일과 7일을 정점으로 정규분포 곡선의 형태를 유지하고 있었다. 그러나 박테리아가 포함되어 있는 BS구, BYS구, BMS구, 및 BMYS구에서는 개봉 후 5일째와 21일째에 두 번의 peak를 나타내었으며, 노출 시기별 균총의 변화도 경향이 일정하지 않은 편이었다. 전체적으로 처리구중 효모(YMS, BYS)를 첨가하였을 때, 총 미생물의 수가 적고, 노출 시간 경과에 따라서도 대체로 일정하여 부패

가 지연되고 있다는 것을 의미하고 있다.

혐기 발효시킨 TMR을 개봉한 후 노출 시기별 곰팡이(mold)의 수는 Table 6에 나타난 바와 같다. 개봉 후 3일째까지는 곰팡이가 거의 발견되지 않았으나, 곰팡이 처리구인 MS구에서 발견되어, 개봉 5일째부터 MS구에서부터 곰팡이가 크게 증식되기 시작하였다. 개봉 3일째에 MS구에서 곰팡이가 증식된 것은 곰팡이의 생활주기 특성상 약 24~32시간이 소요되는 것으로 설명할 수 있다[12]. 무처리 대조구의 경우, 개봉 7일째부터 급격하게 증가되어 14일째에 peak에 도달한 후 감소하는 경향이었으며, 평균 곰팡이의 수도 타 처리구에 비해 많았는데, 이는 호기성 곰팡이에 의해 부패가 가장 빨리 진행되고 있다는 것을 의미한다. 효모와 곰팡이 조합구인 YMS구에서는 전 노출 기간 동안 거의 발견되지 않은 것으로 조사되어 호기성 곰팡이에 대한 증식 억제력이 가장 강한 것으로 나타났다.

본 시험에서 효모(yeast) 역시 $10^7 \sim 10^9$ 까지 희석하여 측정해 보았으나, 너무 많은 수가 자라서 측정이 거의 불가능하여 data로 나타내지 못하였다.

혐기 발효시킨 TMR을 개봉한 후, 노출 시기별 유산균(LAB)의 수는 Table 7에 나타내었다. 유산균 수는 개봉 후 7일까지는 노출 시간에 따라 증감되면서 처리 간에 유의차($P < 0.05$)를 나타내었으나, 14일 이후는 거의 관찰되지 않아

Table 5. Effects of exposing periods on the total bacterial counts ($\text{cfu}^2 \times 10^8$) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	0.33 ^a	0.33 ^a	4.67 ^a	0.67 ^a	1.67 ^a	0.33 ^a	5.00 ^a	5.67 ^a	4.28
3	12.67 ^{ab}	0.67 ^b	3.00 ^b	25.338 ^a	1.33 ^b	1.00 ^b	2.67 ^b	12.00 ^{ab}	11.58
5	148.00 ^a	148.00 ^a	1.67 ^b	42.33 ^{ab}	56.67 ^{ab}	50.00 ^{ab}	34.33 ^b	98.00 ^{ab}	54.98
7	149.67 ^a	20.00 ^b	34.67 ^b	58.00 ^b	3.00 ^b	18.00 ^b	51.33 ^b	5.00 ^b	31.38
14	70.33 ^a	7.33 ^c	5.00 ^c	46.67 ^b	9.33 ^c	4.00 ^c	0.67 ^c	12.00 ^c	8.99
21	0.33 ^a	153.67 ^a	77.33 ^a	65.67 ^a	25.00 ^a	42.00 ^a	0.00 ^a	52.33 ^a	92.94
Mean	63.56	55.00	21.06	39.78	16.17	19.22	15.67	30.83	6.52

^{a,b,c}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

²⁾cfu: Cell forming unit.

Table 6. Effects of exposing periods on the fungal count (tfu²×10⁵) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	0.67	nd ³⁾	0.33	0.33	1.67	nd	nd	nd	1.14
3	nd	nd	nd	3.67	nd	nd	nd	nd	0.41
5	6.00 ^b	1.00 ^c	0.33 ^c	24.00 ^a	0.33 ^c	1.33 ^c	0.33 ^c	0.67 ^c	1.56
7	68.67 ^a	6.33 ^{cd}	54.00 ^b	8.67 ^{cd}	12.33 ^c	1.00 ^d	0.33 ^d	1.33 ^d	4.65
14	81.33 ^a	9.33 ^c	5.33 ^{cd}	19.00 ^b	7.33 ^c	5.33 ^{cd}	1.00 ^d	7.00 ^c	2.82
21	41.67 ^a	23.67 ^b	39.00 ^a	26.33 ^b	3.33 ^d	16.33 ^c	0.33 ^d	6.67 ^d	3.76
Mean	39.67	10.08	19.80	13.67	5.00	6.00	0.50	3.92	4.46

^{a,b,c,d}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

²⁾tfu: Thallus forming unit.

³⁾nd: Not detected.

Table 7. Effects of exposing periods on the lactic acid bacterial count (cfu²×10⁶) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	135.00 ^{bc}	249.33 ^a	234.67 ^a	100.67 ^c	214.00 ^{ab}	153.33 ^{bc}	256.67 ^a	118.33 ^c	43.75
3	16.00 ^c	120.67 ^{ab}	80.67 ^{bc}	30.33 ^c	119.00 ^{ab}	65.67 ^{bc}	31.67 ^c	177.67 ^a	34.62
5	194.00 ^a	177.00 ^a	212.00 ^a	270.67 ^a	32.33 ^b	174.00 ^a	174.67 ^a	56.67 ^b	60.40
7	32.33 ^b	103.00 ^a	99.67 ^a	37.00 ^b	3.67 ^c	115.67 ^a	53.33 ^b	41.00 ^b	13.87
14	nd ³⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
Mean	94.33	162.50	156.75	109.67	92.25	127.17	129.09	98.42	9.71

^{a,b,c}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

²⁾cfu: Cell forming unit.

³⁾nd: Not detected.

혐기상태가 완전히 해제된 것으로 사료된다. Yeast는 mold와 같이 호기적 변패에 가장 큰 원인균으로서 호기적 안전성을 높이기 위한 방법으로 유산균을 첨가하면 yeast의 활력을 감소시킨다는 보고가 있다. Driehuis 등[6]은 혐기 상태일 때, yeast의 생존율은 감소하고, 결과적으로 유산균의 silage 첨가는 효모(yeast)의 활력을 떨어뜨렸다고 하였다. 그리고 다시 호기 발효일 때, 유산균의 첨가는 효모의 성장을 억제시켰다[5,23,34,38]. Silage의 호기적 변패는 여러 가지 미생물 작용에 의해 발생되는데, 주로 yeast에 의해 일어나며[2], 기타 세균들에 의해서도 일어나는데[41], silage의 제조에 영향을 미치는 미생물 중에서 유산균만이 유익균으로 작용하며, 그 이외의 미생물은 유해균으로 작용한다[21]고 하였다. 호기성균이나 yeast는 mold와 같이 호기적 변패에 가장 큰 원인균으로써, 유산균을 첨가하므로 인해 yeast가 감소될 것으로 기대를 했으나, 본 시험에서는 그러한 결과를 얻지 못하였다.

혐기 발효시킨 TMR을 개봉한 후, 노출 시기에 따른 대장균(*E. coli*)의 수는 Table 8에 나타난 바와 같이 무처리구인 US구

와 박테리아 단독 처리구인 BS구에서는 전 노출 시기 동안 지속적으로 관찰되었으며, MS구에서는 개봉 21일째를 제외하고, 개봉 3일째 되는 시기부터 가장 많이 관찰되어 대장균에 가장 취약한 것으로 조사되었다. 효모 첨가구인 BY스구, YMS구 및 BMYS구에서는 노출 기간 중 두 번 이상 관찰되지 않아 대장균에 대체로 강한 것으로 나타났다.

*Salmonella*균은 Table 9에서 보는 바와 같이 무처리구(US), YS구, YMS구, 그리고 BMYS구에서는 전 노출 기간 동안 전혀 발견되지 않았으나, 곰팡이 단독처리구인 MS구에서는 개봉 후 5일, 14일, 21일째에도 발견되어 *salmonella*균에 가장 많이 노출되는 것으로 나타났다.

*Shigella*균은 Table 10에서 보는 바와 같이 BMS구와 BMYS구에서는 전혀 발견되지 않았으나, *Salmonella*균에 가장 오염이 많이 되었던 MS구에서는 개봉 후 5일째 되는 시기부터 계속해서 *Shigella*균이 많이 발견되어 가장 취약한 처리구인 것으로 나타났다.

Han 등[13]은 곰팡이인 *Aspergillus oryzae*를 산란계에 급여했을 때 *E. coli*와 호기성 박테리아는 감소하고 유산균은 증가

Table 8. Effects of exposing periods on the *E. coli* count (cfu²×10³) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	0.33 ^a	0.67 ^a	0.33 ^a	0.33 ^a	nd ³⁾	0.33 ^a	0.33 ^a	nd	0.50
3	3.67 ^b	8.33 ^b	0.33 ^b	86.33 ^a	nd	1.33 ^b	nd	1.33 ^b	4.34
5	25.00 ^b	15.00 ^c	0.33 ^d	44.00 ^a	0.33 ^d	0.33 ^d	1.00 ^d	nd	2.91
7	0.33 ^b	3.67 ^b	nd	12.67 ^a	nd	nd	nd	nd	3.06
14	22.67 ^a	5.00 ^b	0.67 ^b	17.67 ^a	1.67 ^b	0.33 ^b	0.33 ^b	1.00 ^b	3.72
21	10.33 ^a	23.00 ^a	21.33 ^a	nd	2.67 ^a	4.33 ^a	5.33 ^a	2.67 ^a	12.08
Mean	10.39	9.28	3.83	26.83	0.78	1.11	1.17	0.83	3.18

^{a,b,c,d}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P<0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

²⁾cfu: Cell forming unit.

³⁾nd: Not detected.

Table 9. Effects of exposing periods on the *Salmonella* count (cfu²×10¹) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	nd ³⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
5	nd	nd	nd	24.67 ^a	nd	nd	nd	nd	5.46
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
14	nd	6.67 ^b	nd	147.67 ^a	nd	nd	nd	nd	24.99
21	nd	53.33 ^a	nd	42.00 ^a	0.67 ^b	0.33 ^b	nd	nd	18.48
Mean	nd	30	nd	71.45	0.67	0.33	nd	nd	9.16

^{a,b}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P<0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

²⁾cfu: Cell forming unit.

³⁾nd: Not detected.

Table 10. Effects of exposing periods on the *Shigella* count (cfu²×10¹) of TMRs fermented by anaerobic synbiotics

Exposing periods (day)	Treatments								SEM ¹⁾
	US	BS	YS	MS	BYS	BMS	YMS	BMYS	
1	nd ³⁾	0.67 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.67
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
5	0.33 ^b	nd	nd	14.00 ^a	0.67 ^b	nd	0.33 ^b	nd	1.45
7	nd	nd	0.33 ^b	15.33 ^a	nd	nd	nd	nd	1.79
14	3.33 ^b	1.33 ^b	nd	70.00 ^a	nd	nd	nd	nd	9.72
21	34.33 ^b	7.67 ^{cd}	6.33 ^{cd}	71.33 ^a	2.33 ^{cd}	nd	9.00 ^c	nd	4.23
Mean	12.66	3.22	3.33	42.67	1.50	nd	4.67	nd	5.08

^{a,b,c,d}Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P<0.05$).

¹⁾SEM: Pooled standard error of the mean.

²⁾cfu: Cell forming unit.

³⁾nd: Not detected.

하는 경향을 나타내어 살모넬라를 감소시킨다고 보고 하였다. 또한, Line 등[24]은 생효모를 육용종계에 급여하였을 때, 맹장에서 살모넬라 균체가 감소하였다고 보고하였다.

본 시험에서는 병원성균(*E. Coli*, *Salmonella*, *Shigella*)의 오

염에 가장 강한 처리구는 본 시험에 사용된 모든 미생물 혼합구인 BMYS구였으며, BMS와 YMS구도 대장균과 *Salmonella*균의 오염에 강해, Bacteria와 mold 그리고 yeast와 mold가 혼합된 첨가구가 대체로 병원균에 강한 면모를 보였다.

요 약

본 시험은 혐기성 박테리아, 효모 및 곰팡이로 제조한 Synbiotics를 TMR에 첨가하여 발효시킨 후, 개봉하여 공기에 노출시킨 기간에 따른 보존성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행되었다. 처리구는 무처리 대조구인 US구, 혐기성 박테리아와 prebiotic으로 만든 BS구, 혐기성 효모와 prebiotic로 구성된 YS구, 혐기성 곰팡이와 prebiotic으로 구성된 MS구, 혐기성 박테리아와 혐기성 곰팡이 그리고 prebiotic로 만든 BMS구, 혐기성 효모와 혐기성 곰팡이 그리고 prebiotics로 만든 YMS구, 혐기성 박테리아와 혐기성 효모 그리고 prebiotics로 만든 BYS구, 마지막으로 혐기성 박테리아, 효모 그리고 곰팡이 복합물과 prebiotics로 구성된 BMYS구로서 총 8 처리구로 나누었다. 개봉 후 노출 기간(1, 3, 5, 7, 14 및 21일)별 3반복으로 총 144개의 bag을 공시사료로 제조하였다. CMCase, xylanase 및 amylase의 평균 활성은 통계적 유의차는 없었으나 효모가 첨가된 BYS구 및 YMS구에서 좋은 편이었고, 총 세균수에서도 효모가 첨가된 구(YMS, BYS)에서, 곰팡이 수에서도 효모 첨가구(YMS, BMYS, BYS)에서 낮은 경향이 있었다. 병원성 균인 E. coli는 BYS구와 BMYS구, Salmonella균은 BMYS구와 YS구, 그리고 Shigella 균은 BMS와 BMYS구에서 대체로 낮았으나, MS구에서는 대조구보다도 모든 병원균에 더 많이 오염된 것으로 나타났다. 이상의 결과들을 살펴볼 때, 혐기성 효모 첨가구(BYS, YMS, BMYS)가 저장성에서 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 모든 미생물을 혼합한 BMYS구에서 영양소 함량과 건물 감량 및 병원성균 수 등에서 좋은 결과를 나타내어 혐기발효 TMR의 보존에 유리할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 동물생명산업센터(RAIC)의 지원으로 수행되었으며, 주연구자는 BK 21 사업단의 박사 후 연구원으로 인건비 지원을 받았습니다.

References

- American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of dairy products. 16th eds. APHA Inc. Washington DC.
- Beak, T. and F. Gross. 1964. Ursachen der unterschiedlichen Habarkeit von Gaerfutter. *Das Wirtschaftseigene Futter*. **10**, 298-312.
- Cussen, R. F., R. J. Merry, A. P. Williams and J. K. S. Tweed. 1995. The effect of additives on the ensilage of forage of differing perennial ryegrass and white clover content. *Grass Forage Sci.* **50**, 249-258.
- De Man, J. C., M. Rogosa and M. E Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink and P. G. Van Wikselaar. 1999b. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows, pp. 106-107. In Proceedings of the 12th International Silage Conference. Pauly, T. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink and S. F. Spoelstra. 1999a. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 583-594.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. **11**, 1-42.
- El Hassan, S. M., C. J. Newbold, I. E. Edwards, J. H. Topps and J. R. Wassace. 1996. Effect of yeast culture on rumen fermentation, microbial protein flow from the rumen and live-weight gain in bulls given high-cereal diets. *J. Anim. Sci.* **62**, 43-48.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bact.* **66**, 365-378.
- Gibson, G. R. and B. M. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
- Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas and J. T. Huber. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* **73**, 703-710.
- Ha, J. K., S. S. Lee, Y. S. Moon and C. H. Kim. 2005. Ruminant Nutrition and physiology. pp. 154, Seoul National University press.
- Han, S. W., Lee, K. W., Lee, B. D. and C. G. Sung. 1999. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* culture on fecal microflora, egg qualities, and nutrient metabolizabilities in laying hens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* **12**, 417-421.
- Hara, S., M. Itoh. and Y. Ohyama. 1979. Aerobic deterioration of silages changes in temperature, gas metabolism, heat production and microflora. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **50**, 549-556.
- Harris, B. Jr., H. H. Van Horn, K. E. Manookian, S. P. Marshal, M. J. Taylor, and C. J. Wilcox. 1983. Sugarcane silage, sodium hydroxide and steam pressure-treated sugarcane bagasse, corn silage, cottonseed hulls, sodium bicarbonate, and *Aspergillus oryzae* product in complete rations for lactating cows. *J. Dairy Sci.* **66**, 1474-1485.
- Holdman, L. V., E. P. Coto and W. E. C. Moore. 1977. Anaerobic laboratory manual (4th eds), Virginia Polytech. Inct. and State Univ. Blackburg, Virginia, USA.
- Keady, T. W. J. and J. J. Murphy. 1996. Effects of inoculant Treatment on ryegrass silage fermentation, digestibility, rumen fermentation. and performance of lactating dairy cattle. *Grass Forge Sci.* **51**, 232-241.
- Kellems, R. O., A. Lagerstedt and M. V. Wallentine. 1990. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vita-

- min supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. *J. Dairy Sci.* **73**, 2922-2928.
19. Kelly, D. 1998. Probiotics in young and newborn animals. *J. Anim. Feed Sci.* **7**, 15-23.
 20. Kim, J. W., J. S. Park. 1997. Industrial effective microorganisms (III). Classification, Characterization and Industrial use of Yeast. *Kor. Jour. of Microbiology and Biotechnology.* **10**, 26-33.
 21. Ko, Y. D. 1999. Silage manufacturing strategy of Rumen Animal. Sun Jin. pp30-31.
 22. Kumar, U., Sareen, V. K. and S. Singh. 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci Food Agric.* **73**, 231-236.
 23. Kung, Jr. L. and N. K. Ranjit. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* **84**, 1149-1155.
 24. Line, J. E., J. S. Bailey, Cox, N. A., N. J. Stem and T. Tompkins. 1998. Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Sci.* **77**, 405-410.
 25. Marcus, K. M., J. T. Huber and S. Cramer. 1986. Influence of feeding Vita during hot weather on performance of lactating cows in a large dairy herd. *J. Dairy Sci.* **69** (Suppl. 1), 188 (Abstr.).
 26. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Giennon and A. L. Burton. 1960. Measurement of Carboxymethylcellulase activity. *Anal. biochem.* **1**, 127-132.
 27. Mitsuoka, T. 1980. Zonaisaikinno Sekai. *Sobunsha* **21**, 1-34.
 28. Mountfort, D. O. and R. A. Asher. 1988. Production of α -amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2293-2299.
 29. Nicholson, J. W. G., R. E. McQueen, E. Chan and R. S. Bush. 1991. Forage conservation round bales or silage bage: effect on the characteristics and performance. *Anim. Sci.* **71**, 1167-1180.
 30. Nisbet, D. J., D. E. Corrier, C. M. Scanlan, A. G. Hollister, R. C. Beier and J. R. Deloach. 1993. Effect of defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. *Avian Disease* **37**, 1017-1025.
 31. Nishino, N., H. Wada, M. Yoshida and H. Shiota. 2004. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a Total Mixed Ration ensiled with and Without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactococcus buchneri*. *J. Dairy Sci.* **87**, 2563-2570.
 32. Ogimoto, K. and S. Imai. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan. Scientific Societies Press. Tokyo, Japan.
 33. Ok, J. U., S. M. Lee, S. J. Lee, J. H. Lim, T. W. Kang, H. Y. Jung, Y. H. Moon and S. S. Lee. 2006. Effect of Yeast Addition in Rice Straw Silage Fermentation. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **48**, 691-698.
 34. Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber and F. Driehuis. 2001. Anaerobic aconversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2 propanediol by *Lactococcus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 125-132.
 35. Pearce, P. D. and T. Bauchop. 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1265-1269.
 36. Pettersson, D., H. Graham and p. Amen. 1989. Enzyme supplementation of broiler chickens. *Ani. Prod.* **51**, 399-404.
 37. Phillips, M. W. and G. L. R. Gordon. 1988. Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, Britian and New Zealand. *Biosystems* **21**, 377-383.
 38. Ranjit. N. K., C. C. Taylor and L. King. 2002. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass Forage Sci.* **57**, 73-81.
 39. Roper, K. B. and D. I. Fennell. 1965. The Genus *Aspergillus*. pp 357-404, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
 40. Rose, A. H. 1980. Rent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In Skimmer, F. A., S. M. Passmore and R. R. Danenpor (eds.), Biology and Activities of yeasts. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series **9**, 103. Academic Press, London. UK.
 41. SAS. 1999. SAS/STAT software for PC. Release 8.01. SAS institute Inc., Cary, N. C., U.S.A.
 42. Sniffen, C. J. 1986. Natural growth stimulators: Micronutrient requirements of the rumen and the role of the yeast cultures in the rumen. Altech's Second Annual Symposium Lecington, Kentucky, USA.
 43. Stokes, M. R. 1992. Effects of an enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. *J. Dairy Sci.* **75**, 764-773.
 44. Weinberg, Z. G. and R. E. Muck. 1996. New trends in development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 53-68.
 45. Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel and J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract in ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* **70**, 2063-2068.
 46. Williams, A. G. and C. G. Orpin. 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* **33**, 418-426.
 47. Woolford, M. K. 1990. The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 101-116.
 48. Woolford, M. K. and J. E. Cook. 1978. A note on the effect on the aerobic deterioration of maize silage on the manipulation of the microflora by means of antibiotics. *Anim. Feed Sci. Technol.* **3**, 89-94.