젖산균과 클로렐라 첨가가 이탈리아라이그라스-알팔파 혼파 사일리지의 사료가치 및 품질에 미치는 영향

최기춘^{1*} · M. Valan Arasu^{1,2} · S. Ilavenil¹ · 박형수¹ · 정민웅¹ · 이상학¹ · 정종성¹ · 황보순³ · 김원호¹ · 임영철¹

¹국립축산과학원, ²King Saud University, ³대구대학교

Effect of Lactic Acid Bacteria and Chlorella on Nutritive Values and Quality of Italian Ryegrass-Alfalfa Silage

Ki Choon Choi^{1*}, M. Valan Arasu^{1,2}, S. Ilavenil¹, Hyung Su Park¹, Min Woong Jung¹, Sang Hack Lee¹,
Jeong Sung Jung¹, Soon Hwangbo³, Won Ho Kim¹ and Young Chul Lim¹

¹Grassland and forage division, National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan-Eup, Cheonan-Si, Chungnam, 330-801, Republic of Korea, ²Department of Botany and Microbiology, Addiriyah Chair for Environmental Studies,

College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Saudi Arabia

³Department of Animal Resources, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

ABSTRACT

To provide the basic data on the utilization of chlorella as a method to improve the quality of forage, we examined the effect of the addition of lactic acid bacteria (LAB) and chlorella on the change of nutritive value, quality and microbes on Italian ryegrass and alfalfa mixture silage (IRG-Alfalfa silage). The nutritive values of IRG-Alfalfa silage were not significantly different in all treatments. The pH of IRG-Alfalfa silage decreased in both LAB and chlorella treatments. Further the content of lactic acid in the LAB treatment increased as compared to the control, and also significantly increased in the treatment of LAB with chlorella ($p < 0.05$). In addition, the number of LAB increased in lactic acid bacteria treatment as compared to the control, and also increased in the treatment of LAB with chlorella ($p < 0.05$). Therefore, we suggest that LAB and chlorella would improve the quality of IRG-Alfalfa silage.

(**Key words** : Italian ryegrass, Alfalfa, Silage, Lactic acid bacteria, Chlorella)

I. 서 론

최근 전 세계적으로 이상기후의 빈발로 인한 곡류생산의 안정성 상실, 바이오매스 이용 증가, 그리고 수입조사료 가격 상승으로 인하여 국내 양축농가의 사료비 부담이 크게 증가됨에 따라 조사료 생산 및 이용기술 측면에서 많은 정성을 기울이고 있다(Choi et al., 2012; Ha et al., 2012; Ji et al., 2011; Kim et al., 2011b). 이제까지 대부분 진행된 조사료에 대한 연구는 주로 증체량 및 기호성 증진을 위한 영양학적 측면에서의 접근(Kim et al., 2011a; Hwangbo et al., 2010; Jung et al., 2009)이었으나 최근 연구결과에 따르면 조사료는 가축의 생리활성을 촉진하는 다양한 기능성 물질을 함유하고 있는 것으로 보고(Mariadhas et al., 2014;

Choi et al., 2013a; Choi et al., 2013b; Hwang et al., 2013)되고 있기 때문에 조사료의 효율적인 활용을 위해서는 조사료의 영양강화 및 품질향상 기술 개발은 매우 중요하다.

영양 강화 조사료의 제조 기술 개발은 국내산 조사료의 품질 향상에 기여할 뿐 아니라 조사료 유통 활성화 및 신뢰도를 향상시켜 국내산 조사료의 안정성에 기여하고 또한 조사료의 영양 강화 및 품질향상을 통하여 수입 조사료의 대체가 가능할 것으로 생각된다.

현재 우리나라에서 많이 재배되고 있는 이탈리아 라이그라스(Italian ryegrass, IRG) ‘코원어리, 코스피드, 코원마스터’는 월동성과 습해에 강하고 초기생육이 우수하여 수량이 높은 사료작물로서 알려져 있다(Seo et al., 2011; Kim et al., 2009; Choi et al., 2008). 또한 두과목초의 단백질

* Corresponding author: Ki Choon Choi, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 331-808, Korea. Tel: +82-41-580-6755, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: choiwh@korea.kr

함량은 수확시기에 따라 다양한 차이를 보이지만 약 20% 내외의 함량을 가지고 있기 때문에 두과목초의 활용은 양질의 조사료 확보차원에서 매우 중요하다(Kim et al., 2007; Kim et al., 2005). 또한 녹조류인 클로렐라의 단백질 함량은 약 60% 정도이고 다양한 기능성(Bae et al., 2013; Ramos et al., 2010; Kang et al., 2004)을 가지고 있기 때문에 클로렐라의 이용은 조사료의 영양을 강화하고 양질의 조사료 이용성을 증진시키는데 중요한 방법이 될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 이탈리아 라이그라스-알팔파(IRG-Alfalfa)를 이용하여 사일리지 제조시 젖산균과 클로렐라를 처리하여 사일리지의 사료가치, 품질 및 미생물상의 변화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 포장시험 및 사일리지 제조

본 연구는 충남 천안 국립축산과학원 사료작물 재배지에 서 2012년 부터 2013년까지 수행되었다. 공시초종으로 이탈리아 라이그라스 ‘코원어리’와 알팔파 ‘버널’을 이용하여 수행하였다.

모든 초종은 파종적기에 파종하여 관행 시비한 다음 재배하였다. 수확은 수확적기(IRG; 개화기, Alfalfa; 개화기)에 수확하여 사일리지를 제조하였으며 이때 젖산균 첨가제(청미바이오, 한국)를 처리하여 각 처리당 3반복으로 하였다. 시험구는 대조구, 젖산균 첨가구, 젖산균과 클로렐라 첨가구로 구성하였다. 젖산균의 첨가제의 양은 첨가제 제조회사(청미바이오, 한국)에서 제시한 권장량을 증류수에 희석하여 사용하였다. 즉, 젖산균은 *L. plantarum*으로 1.5×10^{10} cfu/g을 함유하고 있으며, 본 균주를 증류수(1 g/100 ml)에 녹여 50 kg의 사일리지 제조에 이용하였다. 그리고 클로렐라(*Chlorella vulgaris*) 첨가는 0.25%로 첨가하여 젖산균 접종과 함께 사용하였다. 그리고 이탈리아 라이그라스(IRG)와 알팔파(alfalfa)의 비율을 8:2 수준으로 사일리지를 조제하여 사일리지의 특성을 조사하였다. 사일리지는 플라스틱 시험용 사일로에 충전 시킨 후 완전 밀봉하여 그늘에서 보관하였다. 이렇게 조제된 사일리지는 약 45일 동안 보관한 후 개봉하여 사료가치, 품질 및 미생물상을 조사하였다.

2. 사료가치 분석

사일리지의 사료가치를 조사하기 위하여 각 시험구에서 저장 45일후 사일리지 각 처리구당 약 500 g을 취하여 일

부는 65℃ 순환식 송풍건조기에서 3일 이상 건조 후 분쇄하여 시료의 Crude protein (CP)은 AOAC법(1990)에 의해 분석하였고, Neutral detergent fiber (NDF) 및 Acid detergent fiber (ADF) 함량은 Goering 및 Van soest법(1970)으로 분석하였다. *In vitro* 건물소화율은 Tilley 및 Terry법(1963)을 Moore(1970)가 수정한 방법을 이용하였으며, 가소화영양소 총량(total digestible nutrients, TDN)은 $88.9 - (ADF\% \times 0.79)$ 에 의해서 산출하였다. 그리고 나머지 일부는 -20℃ 냉동고에 보관하였다가 사일리지 특성조사에 사용하였다.

사일리지의 pH와 유기산 성분은 개봉한 사일리지 10g을 증류수 100 ml에 넣고 냉장고에서 주기적으로 흔들어 주면서 24시간 보관 후 4중 거즈로 1차 거른 뒤 여과지(Whatman No. 6)를 통과한 추출액을 조제하여 pH는 pH meter(HI 9024; HANNA Instrument Inc. UK)로, 그리고 젖산은 0.22 μ m 실린지 필터를 사용하여 여과시킨 다음 HPLC(HP1100, Agilent Co. USA)로 분석하였다. 초산과 낙산 분석은 Gas chromatography(GC-450, Varian Co., USA)를 이용하여 분석하였다. 추출액은 분석에 이용할 때까지 -70℃에서 냉동보관 하였다.

미생물상 조사를 위해서 사일리지 시료 10 g을 멸균된 250 mL의 플라스크에 넣고 멸균수 90 mL를 넣고 1시간동안 shaker(150 rpm)에서 shaking 시킨 후 미생물 희석법에 의해 희석하여 젖산균은 28℃에서 4일 동안 MRS agar에서 배양하였으며, 효모는 3M petrifilm(3M Microbiology Products, St. Paul, USA)에서, 곰팡이는 Potato Dextrose agar(PDA)를 이용하여 28℃에서 4일 동안 배양한 후 계수화 하였다

III. 결과 및 고찰

1. IRG-Alfalfa 사일리지의 사료가치 변화

IRG-Alfalfa 사일리지의 사료가치는 Table 1에 나타낸바와 같다. IRG-Alfalfa 사일리지의 대조구, 젖산균 단독처리구 및 클로렐라와 젖산균 공용 처리구의 조단백질 함량은 차이가 나지 않았다. 그러나 클로렐라와 젖산균 공용 처리구는 경미한 증가가 나타났다. 그리고 섬유소와 TDN 함량 그리고 *in vitro* 건물소화율(IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility) 처리구에서는 차이를 나타내지 않았다.

Choi et al.(2011c,d)은 옥수수 및 수단-수단그라스 곤포 사일리지 제조시 젖산균 첨가구와 무첨가구 사이에 사료가치는 변화는 나타나지 않았는데, 본 연구의 결과와 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 클로렐라에 의해 약간의 단백질

Table 1. Changes of nutritive value on mixture silage of Italian ryegrass and alfalfa according to inoculation of lactic acid bacteria and chlorella

Treatment	CP ³⁾ (%)	ADF ⁴⁾ (%)	NDF ⁵⁾ (%)	TDN ⁶⁾ (%)	IVDMD ⁷⁾ (%)
Control	12.00	35.06	53.40	61.20	71.54
LAB ¹⁾	12.00	36.29	55.20	60.23	70.97
LAB + CA ²⁾ 0.25%	12.69	33.73	53.59	62.25	73.26

¹⁾ LBA: Lactic acid bacteria, ²⁾ CA: chlorella additive, ³⁾ CP: Crude protein, ⁴⁾ ADF: Acid detergent fiber, ⁵⁾ NDF: Neutral detergent fiber, ⁶⁾ TDN: Total digestible nutrient, ⁷⁾ IVDMD: *in vitro* dry matter digestibility.

함량의 증가를 보였는데 이는 클로렐라 첨가에 의한 영향으로 생각된다. 따라서 클로렐라를 이용하여 조사료내 영양을 강화하기 위해서는 다양한 측면에서 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

2. IRG-Alfalfa 사일리지의 pH 및 유기산 함량 변화

IRG-Alfalfa 사일리지의 pH와 유기산 함량은 Table 2에 나타난 바와 같다.

IRG-Alfalfa 사일리지에서 대조구는 젖산균 단독처리구의 pH와 비슷하였으나 클로렐라와 젖산균 공용 처리구에서는 대조구에 비해 pH가 감소되었다($p < 0.05$). 젖산함량은 대조구에 비해 젖산균 단독처리구에서 증가되었으며($p < 0.05$), 클로렐라와 젖산균 공용 처리구에서는 대조구에 비해 젖산함량이 현저하게 증가하였다($p < 0.05$). 초산함량은 대조구에 비해 젖산균 단독처리구에서 감소되었으며($p < 0.05$), 클로렐라와 젖산균 공용 처리구에서는 대조구에 비해 현저하게 감소하였다($p < 0.05$). 낙산함량은 처리구간에 차이는 나타나지 않았으며 사일리지 등급은 모든 처리구에서 비슷한(우수) 등급으로 나타났다.

Choi et al. (2011a,b)은 하계사료작물 원형곤포사일리지

제조 연구에서 젖산균에 의한 pH의 영향은 없었다고 하였으며 또한 젖산함량은 젖산균을 첨가함으로써 증가한다고 보고하였는데 본 연구 결과와 비슷한 결과를 보였다. 그러나 본 연구에서 제시한 바와 같이 클로렐라와 젖산균 공용 처리함으로써 pH와 젖산균 함량이 현저하게 차이를 보였는데 이는 젖산균이 클로렐라를 영양원으로 활용하여 젖산균의 생장이 증가하여 나타난 결과로 보여진다. 그러나 사일리지 제조시 클로렐라의 활용에 대한 연구는 다양한 측면에서 이루어짐으로써 조사료의 영양강화물로서의 클로렐라의 사용가능여부가 결정될 것으로 보여진다.

3. IRG-Alfalfa 사일리지의 미생물상 변화

IRG-Alfalfa 사일리지내 미생물상 변화를 조사하였는데 그 결과는 Table 3에서 보는바와 같다. IRG-Alfalfa 사일리지의 대조구에서는 젖산균이 약 1.5×10^9 cfu/g의 정도를 보였으나 젖산균 단독처리구에서는 2.8×10^9 cfu/g의 증가되었다($p < 0.05$). 그리고 클로렐라와 젖산균 공용처리구는 2.6×10^9 cfu/g으로 대조구보다 증가되었다($p < 0.05$). 효모의 경우 모든 처리구에서 비슷한 수준을 보였으며 곰팡이는 10^3 cfu/g 이하였다.

Table 2. Changes of pH and organic acids on mixture silage of Italian ryegrass and alfalfa according to inoculation of lactic acid bacteria and chlorella

Treatment	pH	Lactate (%/DM ³⁾)	Acetate (%/DM)	Butyrate (%/DM)	Flieg's score
Control	4.11ab	6.03b	2.05a	0.08	Excellent
LAB ¹⁾	4.32a	7.28a	1.58b	0.04	Excellent
LAB + CA ²⁾ 0.25%	3.80b	7.73a	0.63c	0.06	Excellent

¹⁾ LBA: Lactic acid bacteria, ²⁾ CA: chlorella additive, ³⁾ DM: Dry matter.

a,b and c: Means with different letters within a column are significantly different at the 5% level.

Table 3. Changes of microbes on mixture silage of Italian ryegrass and alfalfa according to inoculation of lactic acid bacteria and chlorella

Treatment	LAB ³⁾ ($\times 10^7$ cfu ⁴⁾ /g)	Yeast ($\times 10^4$ cfu/g)	Fungi ($\times 10^3$ cfu/g)
Control	156b	15.0	0.00
LAB ¹⁾	284a	21.5	0.00
LAB + CA ²⁾ 0.25%	259a	21.0	0.00

¹⁾ LBA: Lactic acid bacteria, ²⁾ CA: chlorella additive, ³⁾ Lactic acid bacteria, ⁴⁾ CFU: Colony per unit

a and b: Means with different letters within a column are significantly different at the 5% level.

이상의 결과에서 제시한 바와 같이 젖산균을 첨가에 의해 사일리지내 젖산균 수가 현저하게 증가하였으며 특히 클로렐라와 젖산균 공용처리함으로써 젖산균 단독 처리구보다 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 젖산균이 클로렐라의 단백질을 이용하여 증식하는 것으로 해석되는데, 혐기상태에서의 젖산균의 증식에 클로렐라의 활용여부와 관한 연구도 수행되어야만이 사일리지내 미생물과의 연관관계가 해석될 수 있을 것으로 보여진다.

일반적으로 수확시기에 따라 두과목초의 단백질 함량은 차이는 보이지만 약 20% 내외의 함량을 가지고 있기 때문에 단백질함량을 높이기 위한 방법으로써 두과목초의 활용은 매우 중요하다. 본 시험의 결과에서 보는 바와 같이 화본과 목초와 두과목초를 혼파 또는 혼합함으로써 단백질 함량을 높이고 사료가치를 향상시킬 수 있다. 특히 본 실험에 사용된 클로렐라는 단백질 함량이 약 60% 정도이기 때문에 이러한 단백질 원료를 이용함으로써 조사료의 영양을 강화할 뿐 아니라 사일리지내 젖산함량을 증가시키고 젖산균의 증식을 유도할 수 있는 장점이 있기 때문에 경제성을 근거로 하여 클로렐라의 이용성에 관한 새로운 연구와 접근이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

이상의 IRG-Alfalfa 사일리지의 결과를 요약해 보면 IRG-Alfalfa 사일리지 제조시 클로렐라 처리에 의해 단백질 함량 및 젖산량이 향상되는 경향을 보였으며 또한 클로렐라와 젖산균 처리시 pH가 감소되었다. 또한 젖산균 처리시 젖산균 수가 현저히 증가되었으며 사일리지 품질도 향상되었다.

IV. 요약

본 연구에서는 IRG-Alfalfa 사일리지 제조시 젖산균과 클로렐라를 처리하여 사일리지의 사료가치, 품질 및 미생물상의 변화를 조사하였다.

IRG-Alfalfa 사일리지 제조시 대조구와 클로렐라와 젖산균 공용 처리구의 조단백질 함량은 비슷한 수준을 보였으며 섬유소와 TDN 함량 그리고 *in vitro* 건물소화를 처리구에서는 차이를 나타나지 않았다. IRG-Alfalfa 사일리지 제조시 클로렐라와 젖산균 공용 처리시 pH가 감소되었다. 젖산함량은 대조구에 비해 젖산균 단독처리구에서 증가되었으며($p<0.05$), 클로렐라와 젖산균 공용 처리구에서는 젖산함량이 현저하게 증가하였다($p<0.05$). 그리고 젖산균 단독 처리구의 젖산균 수는 대조구에 비해 현저하게 증가하였으며($p<0.05$). 또한 클로렐라와 젖산균 공용처리구도 현저하게 증가하였다($p<0.05$).

이상의 결과를 요약해 보면 IRG-Alfalfa 사일리지 제조시 젖산균과 클로렐라 처리에 의해 사일리지의 품질이 향상되었다.

V. 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ008445)의 지원에 의해 이루어진 것임.

VI. REFERENCES

- AOAC. 1990. Official method of analysis. 15th ed. Washington, DC.
- Bae., M.J., Shin, H.S., Chai, O.H., Han, J.G. and Shon, D.H. 2013. Inhibitory effect of unicellular green algae(*Chlorella vulgaris*) water extract on allergic immune response. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93:3133-3136.
- Choi, G.J., Lim, Y.C., Kim, K.Y., Kim, M.J., Ji, H.C., Lee, S.H., Park, H.S., Moon, C.S., Lee, E.S. and Seo S. 2008. A cold-tolerant and medium-maturing italian ryegrass(*Lolium multiflorum* Lam.) new variety, 'Kowinmaster'. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 28:177-184.
- Choi, K.C., Jo, N.C., Jung, M.W., Lee, K.D., Kim, J.G., Lim, Y.C.,

- Kim, W.H., Oh, Y.K., Choi, J.H., Kim, C.M., Jung, D.K., Choi, J.M. and Kim, H.G. 2011a. Effect of Harvest Stage of Corn on Nutritive values and quality of roll baled corn silage manufactured with corn grown in paddy land. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 31:65-74.
- Choi, K.C., Jung, M.W., Kim, W.H., Kim, C.M., Yoon, S.H., Choi E.M., Kim, J.G., Lee, S.M., Choi, J.M., Kim, H.G. and Lim, Y.C. 2011b. Effect of harvest stage of sorghum $\times$ sorghum hybrid(SSH) on the quality of round baled SSH Silage. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 31:143-150.
- Choi, K.C., Na, S.P., Jung, M.W., Lim, Y.C., Park, H.S., Kim, J.K., Kim, W.H., Kim, M.J., Choi, G.J., Kim, M.H., Lee, S.R., Kim, D.H. and Yook, W.B. 2012. Effect of application of cattle slurry on dry matter yield and nutritive value of whole crop barley and italian ryegrass and environmental pollution in paddy land. J. Lives. Hous. & Env., 18:123-130.
- Choi, K.C., Hwang, J.M., Bang, S.J., Son, Y.O., Kim, B.T., Kim, D.H., Lee, S.A., Chae, M., Kim, D.H. and Lee J.C. 2013a. Methanol extract of the aerial parts of barley(*Hordeum vulgare*) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. Pharmaceutical Biology. 51:1066-1076.
- Choi, K.C., Hwang, J.M., Bang, S.J., Kim, B.T., Kim, D.H., Chae, M., Lee, S.A., Choi, G.J., Kim, D.H. and Lee J.C. 2013b. Chloroform extract of alfalfa(*Medicago sativa*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by downregulating ERK/NF- κ B signaling and cytokine production. Journal of Medicinal Food. 16:410-420.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Agric. Handbook 379, U. S. Gov. Print. Office, Washington, DC.
- Ha, Y.S. and Park, K.K. 2012. Cost analysis of wrap silage production in the paddy field for forage crop cropping system. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 32:75-84.
- Hwang, J.M., Choi, K.C., Bang, S.J., Son, Y.O., Kim, B.T., Kim, D.H., Choi, G.J., Kim, D.H., Shi, X. and Lee J.C. 2013. Anti-oxidant and anti-inflammatory properties of methanol extracts from various crops. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 22:265-272.
- Hwangbo, S., Jo, I.H., Jung, G.W., Kim, W.H., Lim, Y.C. and Kim J.D. 2010. The effect of feeding mixed-sowing winter forage crop and whole crop barley silage on feed intake, nutrient digestibility and blood characteristics in the Korean black Goats. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 30:49-58.
- Ji, H.C., Kwon, O.D., Kim, W.H., Lim, Y.C., Cho, J.H. and Lee KW. 2011. Selection of pasture species at paddy field in southern region of Korea. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 31:113-118.
- Jung, G.W., Jo, I.H., Whangbo, S. and Lee, S.H. 2009. Effects of feeding total mixed rations containing different winter forage crop silages on feed intake, nutrient digestibility and blood characteristics in Korean black goats. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 29:389-398.
- Mariadhas, V.A., Ilavenil, S., Kim, D.H., Gun, R.S., Lee, J.C. and Choi, K.C. 2014. *In vitro* and *in vivo* enhancement of adipogenesis by italian ryegrass(*Lolium multiflorum*) in 3T3-L1 cells and mice. PLoS One. 9:e85297.
- Moore, J.E. 1970. Procedure for the two-stage *in vitro* digestion of forage. Univ. of Florida, Depart. of Anim. Sci.
- Kang, M.S. and Sim, S.J. and Chae, H.J. 2004. Chlorella as a functional biomaterial. KSBB Journal. 19:1-11.
- Kim, J.G., Chung, E.S., Kim, M.J., Seo, S., Lee, J.K., Kim, J.D. and Seo J.H. 2005. Effect of seeding dates and rates on the productivity and nutritive value of hairy vetch(*Vicia villosa* Roth). Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 25:17-22.
- Kim, J.G., Park, H.S., Kim, M.J., Choi, K.C., Seo, S. and Lim, Y.C. 2011a. Evaluation of palatability for domestic developed forage crop silage in Korean native cattle. Proceedings of the Korean Society of Grassland Science Conference. 37:196-197.
- Kim, M.J., Choi, G.J., Yook, W.B., Lim, Y.C., Yoon, S.H., Kim, J.G., Park, H.S. and Seo S. 2007. Effects of seeding method on the winter survival, dry matter yield and nutrient value of italian ryegrass in paddy field. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 27:269-274.
- Kim, M.J., Choi, K.J., Kim, J.G., Seo, S., Yoon, S.H., Lim, Y.C., Im, S.K., Kwon, E.G., Chang, S.S., Kim, H.C. and Kim, T.I. 2009. Effect of varieties and seeding date on over winter and dry matter yield of italian ryegrass in paddy field. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 29:321-328.
- Kim, W.H., Kim, K.Y., Jung, M.W., Ji, H.J., Lim, Y.C., Seo, S., Kim, J.D., Yoon, B.K. and Lee, H.W. 2011b. Dry matter yield and forage quality at mixture of annual legumes and italian ryegrass on paddy field. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 31:33-38.
- Lim, Y.C., Yoon, S.H., Kim, W.H., Kim, J.G., Choi, G.J., Kim, M.J., Jung, M.W., Seo, S. and Yook, W.B. 2007. Growth characteristics and productivity of winter crops after the continuous whole crop rice cultivation in paddy field in middle region. Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science. 27:183-188.

- Ramos, A.L., Torello, C.O. and Queiroz, M.L. 2010. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutrition Cancer*. 62:1170-1180.
- Seo, S., Kim, W.H., Kim, K.Y., Choi, G.J., Ji, H.C., Lee, S.H., Lee, K.W. and Kim, M.J. 2011. Forage productivity and quality of domestic italian ryegrass and barley varieties. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*. 31:261-268. (Received January 21, 2014 / Revised February 26, 2014 / Accepted March 9, 2014)