

발간등록번호

11-1543000-000950-01

돈사 악취저감을 위한 휴믹산 복합 생균제 개발

(Probiotics mixed Humic acid complexes for Malodor
reduction in Livestock)

농업회사법인 (주)건영바이오

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돈사 악취저감을 위한 휴믹산 복합 생균제 개발에 관한 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2015년 7월 10일

주관연구기관명 : 농업회사법인 (주)건영바이오

주관연구책임자 : 김 현 우

연 구 원 : 윤 성 중

연 구 원 : 고 안 석

요 약 문

I. 제 목 : 돈사 악취저감을 위한 휴믹산 복합 생균제 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 가축분뇨에서 발생하는 각종 화합물은 불쾌한 악취로 작용하여 작업자의 심리 및 건강뿐만 아니라 가축의 심리에 영향을 미치고 유해미생물의 서식을 유발하여 가축의 건강유지 및 성장을 저해시키고 생산 효율성에 영향을 미침.
- 본 연구에서는 악취저감에 긍정적 영향을 미칠 것으로 생각되는 생균제와 휴믹 물질을 혼합하여 축사 내 살포용과 가축에 대한 급이용 혼합 생균제를 각각 제조하고, 현장에서 돈분 슬러리에 살포하여 슬러리의 pH 변화와 암모니아 및 황화수소 가스 발생량을 조사하고, 축사 내 악취발생요인인 암모니아 및 황화수소 가스와 분뇨 및 슬러리 속 미생물 균총 변화를 조사하여 혼합생균제의 악취발생 저감효과를 평가하고, 급이용 생균제를 처리하여 악취저감 효과 및 급이에 따른 성장 개선 효과 등을 평가하여 현장에서 실용화하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 생균제와 휴믹물질을 혼합한 복합 생균제 개발
- 살포용 복합 생균제 단기 및 장기 처리에 따른 슬러리 내 암모니아, 황화수소 농도 측정
- 살포용 복합 생균제 처리에 따른 슬러리 내 pH 변화 조사
- 살포용 복합 생균제 처리에 따른 슬러리 내 미생물 균총 변화 조사
- 복합 생균제 급이에 따른 돈사 내에 암모니아, 황화수소 농도 측정
- 복합 생균제 급이에 따른 슬러리 내 미생물 균총 변화 조사
- 복합 생균제 급이에 따른 이유자돈의 성장 개선 효과 조사

IV. 연구개발결과

- 휴믹산 함유 복합 생균제 개발 : 휴믹산 함유한 복합 생균제 생산하여 살포용(7%), 급이용(5%) 개발
- 복합 생균제의 단기/장기 살포한 결과 암모니아 75% 이상 감소, 황화수소 100% 감소함.
- 돈분 슬러리에 생균제 살포 후 총 균수, *E. Coli*, *Enterococcus* sp. 변화 검사 결과 대조구 대비 급격히 감소함.

- 복합 생균제를 사료에 0.2% 혼합하여 급이시 암모니아 73~75% 감소하였으며, 황화수소는 100% 감소하는 경향을 보임.
- 복합 생균제 급이에 따른 돈분 슬러리 내 미생물 균총의 변화는 복합 생균제 처리구가 대조구보다 총 균수, *E. coli*와 *Enterococcus sp.* 균총수가 현저하게 낮은 경향을 나타냄.
- 복합 생균제 급이에 따른 일일증체량 및 사료섭취량은 항생제 처리구가 가장 높았으며, 그 다음 복합 생균제 처리구가 높았으며, 무처리구가 가장 낮았음. 또한 사료요구율은 무처리구 비해 낮으나 항생제 처리구에 비해 높게 나타남.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 한국화학공학회 2015년 학술발표(돈사 악취저감을 위한 휴믹산 복합 생균제 개발)
- 보조사료 제조업 등록(등록 번호 제 6460000-502-2015-0015호)
- 시제품 개발 (GY-해머스)
- 우수한 축산환경개선제용 미생물제의 개발에 따른 미생물산업 기술을 육성하고 고품질 축산환경개선제 이용으로 악취 저감 및 가축분뇨 처리효율 개선
- 유기퇴비제조용 미생물 복합제로 적용확대하고 도축폐기물, 음식물쓰레기 등에 활용성을 검토

SUMMARY

(영문요약문)

This study was conducted to evaluate the effects of probiotics mixed humic acids as a livestock air environmental improving agents. Mixed probiotics was prepared as a spray and dietary types that composed of *Bacillus polyfermenticus* (1.0×10^6 CFU/g), *Lactobacillus plantarum* (1.0×10^6 CFU/g) and *Saccharomyces cerevisiae* (1.0×10^6 CFU/g) and mixed with 5% (w/w) humic acid complexes.

The spray experiment was conducted to evaluate efficiencies of spray type mixed probiotics to reduce odor emissions from pig slurry *in vitro*. In short term experiment, pH of treatment of 0.01% and 0.1% was lower than those of other treatment after 24hrs incubation. At 24hrs incubation, the emission of NH_3 in treatment of 0.05% and 0.1% were lower than those of other treatment. At 3hrs incubation, treatment of 0.05% and 0.1% showed lower emission of H_2S than those of other treatment.

The dietary experiment was conducted to evaluate the effect of the dietary type mixed probiotics on reduction of malodor in livestock. In piggery house, as the feeding of mixed probiotics, the emission of NH_3 showed lower than other piggery after 6weeks ($p < 0.05$). Total microflora, *E.coli* and *Enterococcus* sp. of spraying mixed probiotics had a tendency of decreased compared to control after 14 days.

From the results of above experiments, it seemed that spray and dietary types of mixed probiotics were highly effective in improving the reduction of NH_3 , H_2S emissions and intestinal microflora.

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1절	연구개발의 목적	1
제 2절	연구개발 필요성	2
제 3절	연구개발 범위	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	9
제 1절	해외 기술개발 현황	9
제 2절	국내 기술개발 현황	10
제 3절	국내외 시장 현황	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1절	연구내용 및 방법	14
제 2절	연구결과	19
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	29
제 1절	연구개발 목표의 달성도	29
제 2절	정량적 성과	29
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	30
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	31
제 7 장	연구시설·장비 현황	31
제 8 장	참고문헌	32

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 가축분뇨에서 발생하는 각종 화합물은 불쾌한 악취로 작용하여 작업자의 심리 및 건강뿐만 아니라 가축의 심리에 영향을 미치고 유해미생물의 서식을 유발하여 가축의 건강유지 및 성장을 저해시키고, 생산 효율성에 영향을 미침.
- 주요 악취성분인 암모니아나 황화수소 및 유기성 가스는 가축에게 치명적인 영향으로 만성적 질병발생의 원인이 되고 있으며, 환경문제와 더불어 민원을 유발하는 근원이 됨.
- 축산현장의 악취 저감을 위한 방안으로 배기팬에 덕트를 설치하여 최종 바이오필터로 처리를 하거나, 냉각 회수법을 이용한 악취물질을 제거하는 물리적인 방법과 KMnO_4 , H_2O_2 등과 같은 산화제를 이용한 화학적 방법 등이 제기되었으나, 이런 방안들은 현실적으로 경제성 또는 안전성 등의 문제로 인해 실제 농가 단위의 축산현장에 적용하기 어렵다는 단점을 가지고 있음.
- 이러한 단점을 보완하고자 현재 생균제(Probiotics)를 현장에서 사용하고 있는데, 생균제는 장내의 미생물 군집의 균형에 도움을 주는 미생물 및 균주가 생산한 대사산물을 포함하며, 가축에게 건조한 세포나 발효산물의 형태로 투여되어 장내 유해 미생물을 감소시키고 장내 균총을 개선해주는 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물 첨가제를 의미함.
- 이들은 강력한 장점막 부착력으로 장점막에 붙어 장질환을 유발하는 병원균을 경쟁적으로 떨어뜨려 배설시킴으로써 포도상구균(*Streptococcus aureus*), 콜레라(*Vibrio cholera*), 지하적리균(*Shigella dysenteriae*), 장염균(*Salmonella enteritidis*), 쥐티푸스균(*Salmonella typhimurium*) 및 대장균(*Escherichia coli* O-157)의 감염에 대한 예방효과와 증식을 억제하고 장내 유익균인 *Bifidobacterium* sp.의 발육에 최적인 환경 및 증식을 촉진하며, 장내 유기산의 주요 구성성분인 낙산이나 아세트산을 생산하여 장내 pH를 낮춰 유해 병원균의 발육을 억제하는 등의 작용을 통하여 가축의 생산성 향상과 유해 가스의 발생을 억제하는 기능을 담당함.
- 휴믹물질(Humic Substances)은 동식물 구성요소들의 분해과정에서 미생물의 작용으로 자연적으로 생성되는 유기고분자 물질로서 토양과 지하수에 가장 널리 분포하는 대표적인 자연

유기물질이다. 휴믹물질은 동물 사료에 첨가하면 동물의 성장을 촉진시킬 수 있다는 연구 보고가 있으며, 첨가된 휴믹물질은 가축의 사료 소화능력 증대, 설사방지 등에 효과가 있으며 면역력 향상에도 기여하는 것으로 보고됨.

- 따라서, 본 연구에서는 악취저감에 긍정적 영향을 미칠 것으로 생각되는 생균제들과 복합 휴믹 물질을 혼합하여 축사 내 살포용과 가축에 대한 급이용 혼합 생균제를 각각 제조하고, 현장에서 돈분 슬러리에 살포하여 슬러리의 pH 변화와 암모니아 및 황화수소 가스 발생량을 조사하고, 슬러리 속 미생물 균총 변화를 조사하여 살포용 복합 생균제의 악취발생 저감 효과를 평가하고, 급이용 복합 생균제를 처리하고 성장개선 효과를 평가하여 현장에서 실용화하고자 함.

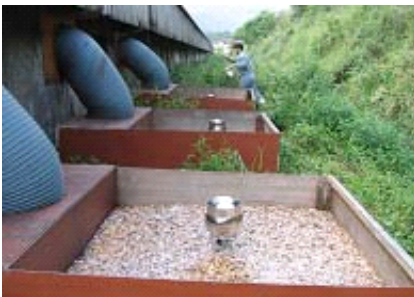
제 2 절 연구개발 필요성

가. 축산악취발생 요인

- 최근 들어 진행되어 온 가축 사육의 집단화와 밀폐화 경향은 대기오염문제 특히, 축산 농가 주변에서 빈번하게 제기되는 악취 민원으로 분쟁이 발생하고 있으며, 우리나라는 2005년부터 시행된 악취 방지법에서 악취관리대상을 특정시설에서 지역으로 확대하고, 악취유발물질 배출 기준 및 관리를 강화함에 따라 축산 농가에서는 축산업의 지속성과 생산성을 유지하면서 수익성 면에서 저렴하고 간편한 악취절감 기술과 친환경적인 가축 분뇨 처리 기술의 개발이 시급히 요구되고 있음(환경부, 2005).
- 일반적으로 양돈 분뇨와 같은 유기물로부터 생성되는 악취는 미생물 대사활동으로 야기되는 것으로, 미생물은 악취를 생성하기도 하고 악취를 저감하기도 하는 양면의 기능을 담당하고 있음.
- 악취의 생성 측면에서는 분뇨에 존재하던 혐기성 세균의 발효과정 중 혹은 최종 산물로서 휘발성 유기물질이 생성되는 것이고, 악취의 저감이란 측면에선 미생물의 활성으로 악취 유발물질의 분해 및 소화가 이루어지는 것으로 볼 수 있음.
- 돈분뇨에서 검출되는 미생물(indigenous genera)의 구성은 Gram-positive cocci (39%), *Eubacterium* (27%), *Lactobacillus* (20%), Gram-negative rods (*Escherichia*, 8%), *Clostridium*

(4%), *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides* (<2%) 등이 있으며, 이들 중에서 혐기성 혹은 통성혐기성 균이 주종을 이루고 있으며, 이들에 의한 분변으로부터의 악취 발생이 이루어지는 것으로 볼 수 있음 (Russel, 1979).

- 특히, *Streptococcus sp.* 및 *Peptostreptococcus sp.* 등이 분변 내의 암모니아와 휘발성 지방산을 주로 생산하는 종류이며, *Eubacterium sp.* 역시 다량의 부티르산, 포름산, 아세트산 등을 생산하는데 관여하는 종이며, 악취생성에 중요한 역할을 하는 그룹으로는 *Clostridium sp.*가 있으며, 이들은 암모니아, 황화수소, 지방산 및 아민을 다량 생성하고 인돌과 페놀의 생성에 관여하는 종으로 알려져 있음 (Russel, 1979).
- 축산현장의 악취저감을 위한 방안으로 배기팬에 덕트를 설치하여 최종 바이오필터로 처리를 하거나(NCSU, 1997), 냉각 회수법을 이용한 악취물질을 제거하는 물리적인 방법(USDA, 1998)과 KMnO_4 , H_2O_2 (Hollenback, 1971) 및 오존 (Wu et al., 1998)과 같은 산화제를 이용한 화학적 방법 등이 제기되었으나, 이런 방안들은 현실적으로 경제성 또는 안전성 등의 문제로 인해 실제 농가 단위의 축산현장에 적용하기 어렵다는 단점을 가지고 있음 (Kim et al., 2006).



<개방형 바이오필터>



<밀폐형 바이오필터>



<이산화염소 분사장치>

그림 1. 축사 악취저감 시설

나. 생균제 활용 미생물

- 생균제는 프로바이오틱스라고 불리기도 하며, 동물소화관내에서 유용한 작용을 하는 미생물로서 장내 균총 개선의 작용을 하며, 이런 생균제로 사용되는 균주로 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhodobacter* 등의 세균류, *Saccharomyces*를 포함하는 효모류, *Aspergillus* 등을 포함하는 곰팡이류 등이 있음 (Havenarr et al., 1995).
- 생균제로 이용되는 미생물은 일반적으로 안전하다고 인정되는 미국의 GRAS (Generally

Recognized As Safe)규정의 미생물을 이용하는데, 그 중 다양한 미생물을 서로 단독 배양 하여 혼합하거나 복합배양을 하여 이용하고 그 중에는 *Lactobacillus* sp.와 *Bifidobacterium* sp.이 가장 잘 알려져 있음. 이들 유산균은 생균제로서의 특성이 뛰어나서 lactic acid를 생산하며, indole, skatole, phenol, amine, ammonia 등의 유해물질을 생산하지 않는 유익한 미생물임 (이은영, 2008).

- 유산균은 낮은 pH 및 환원전위를 유지시키며, 유기산, bacteriocin, 이산화탄소, 에탄올, diacetyl, 저분자 향균물질 등을 생산하고, 영양소를 고갈시켜 우점화시키는 능력에 의해 향균력을 보이는 것으로 알려져 있음 (Adams and Nicholas, 1997; Brock and Madigan, 1988; Sanders et al., 1991).
- 유산균이 생성하는 박테리오신은 분자량 1,000이상의 단백질성 고분자물질로서 그람 양성균과 이에 관련된 균주에 활성을 가지는 좁은 스펙트럼을 보이고, 소화효소에 의해 쉽게 분해될 수 있어 장내에서의 향균력 보다는 생물방부제(biopreservative)로서의 효과를 인정 받음 (de Vuyst and Vandamme, 1994; Gourama and Bullerman, 1995).
- 과산화수소는 유산균이 catalase 효소를 생산하지 않음으로서 배양액내에 축적되며, 세포단백질과 세포막 지질의 sulfhydryl group을 산화시킬 수 있으며, 이산화탄소는 heterofermentive 유산발효에 의해 발생되며, 이산화탄소 자체의 살균력 (Lindgren and Dobrogosz, 1990) 및 효소적인 decarboxylation에 의한 저해효과가 있는 것으로 알려져 있음 (King and Nagel, 1975).
- Diacetyl (2,3-butanedione)은 버터의 향신성분으로서 citric acid 대사에 의해 생산되며, 이 향균물질은 pH 7이하에서 효과적이며, 효모, 곰팡이, 그람 음성균의 arginine binding protein과 반응하여 arginine 이용능을 방해하여 저해효과를 나타냄 (Jay, 1982).
- 저분자의 향균 물질에 대한 연구도 많은 연구가 진행되고 있으며, 최근까지 알려진 향균물질의 특징은 낮은 pH에서도 효과적이며, 열안정성이 있으며, 넓은 스펙트럼을 가지고, acetone 용해성 등의 성질을 가짐 (이은영, 2008). 그 중 reuterin은 *L. reuteri*에서 생산되며 혐기성 환경에서 glucose, glycerol, glyceraldehyde 존재 시 생산이 증진되며 (Axleson et al., 1989), 곰팡이, 세균, 원생동물, 바이러스에 대한 넓은 살균력을 가지는 것으로 알려져 있으며 (Chang et al., 1999; Condon, 1987), Reuterin은 sulfhydryl enzyme인 ribonuclease binding subunit의 억제제로 DNA 합성을 저해하며, Pyroglutamic acid는 *L. casei*, *L. pseudoplantarum*, *Streptococcus brevis* 에서 생산되며 *Bacillus subtilis*, *E. coli*,

Pseudomonas putida 등을 저해하는 효과를 지닌 것으로 알려져 있음 (Huttunen, 1995).

다. 축산에서의 생균제 역할과 기능

- 가축의 성장과 질병 예방 및 치료를 위한 사료 첨가제 중에서 최근까지 항생제가 가장 많이 사용되었으나, 항생제는 장기간 사용하거나 남용하게 되면 가축에게 내성이 생기고 축산물의 항생제 잔류 문제를 초래하게 되고, 2006년 이후 항생제를 가축의 성장촉진 목적으로 사용되는 것이 금지됨에 따라, 안전한 축산물에 대한 소비자의 요구, 환경 친화적인 축산환경 개선과 가축 질병 예방을 위한 생균제의 사용이 지속적으로 증가할 것으로 예상됨 (표 1).
- 생균제는 가축의 생산성을 개선시킬 목적으로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* 등을 부형제와 혼합하는 형태로 제조되고, 국내에서는 1980년대 후반부터 처음 보급되어 20년간 많은 성장을 보이고 그 내용에도 많은 변화가 있었다. 초기엔 돼지 사육에 있어서 생균제를 첨가하여 육성 비육돈의 성장과 육질개선에 이용되었으며, 최근엔 돈사 내 악취제거와 분뇨의 처리 등 환경개선제의 목적으로 활용되는 경우가 증가되고 있음.
- 생균제의 효능은, 강력한 장점막 부착력으로 장점막에 붙어 장질환을 유발하는 병원균을 경쟁적으로 떨어뜨려 밖으로 배설시켜주며, 항생제 투여에 따른 장내 균총의 파괴를 신속히 회복시켜주고, 병원균의 감염에 대한 예방 효과와 증식을 억제하며, 장내 유익균의 발육에 최적인 환경 및 증식을 촉진하고, 장내 유기산의 주요 구성 성분인 낙산이나 아세트산을 생산하며 장내 pH 를 낮춰 줌으로써 유해 병원균의 발육을 억제하며, 아밀라아제의 전분 분해효소나 비타민 B군(B1, B2, B12, 니코틴산, 엽산) 생성할 수 있는 기능이 있는 것으로 알려져 있음 (Bongaerts et al., 2005; Champbell et al., 1992; Goossens et al., 2005; Kekkonen, 2008)(그림 2, 그림 3).
- 또한, 생균제의 여러 가지 복합적인 작용에 의해 가축에 급이시 정상 균총을 유지하고 가축의 생산성 향상을 도모할 수 있는데, 양돈에 대한 생균제 급이시 성장률과 사료효율에 개선효과가 있다는 보고와 (Hong et al., 1996; Ko, 2000) 돼지의 소화능력을 개선시켜 분에서 발생하는 암모니아, 황화수소 및 휘발성 저급지방산 등의 악취량을 저감시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있음 (Chiang, 1995; Hong et al., 1996).

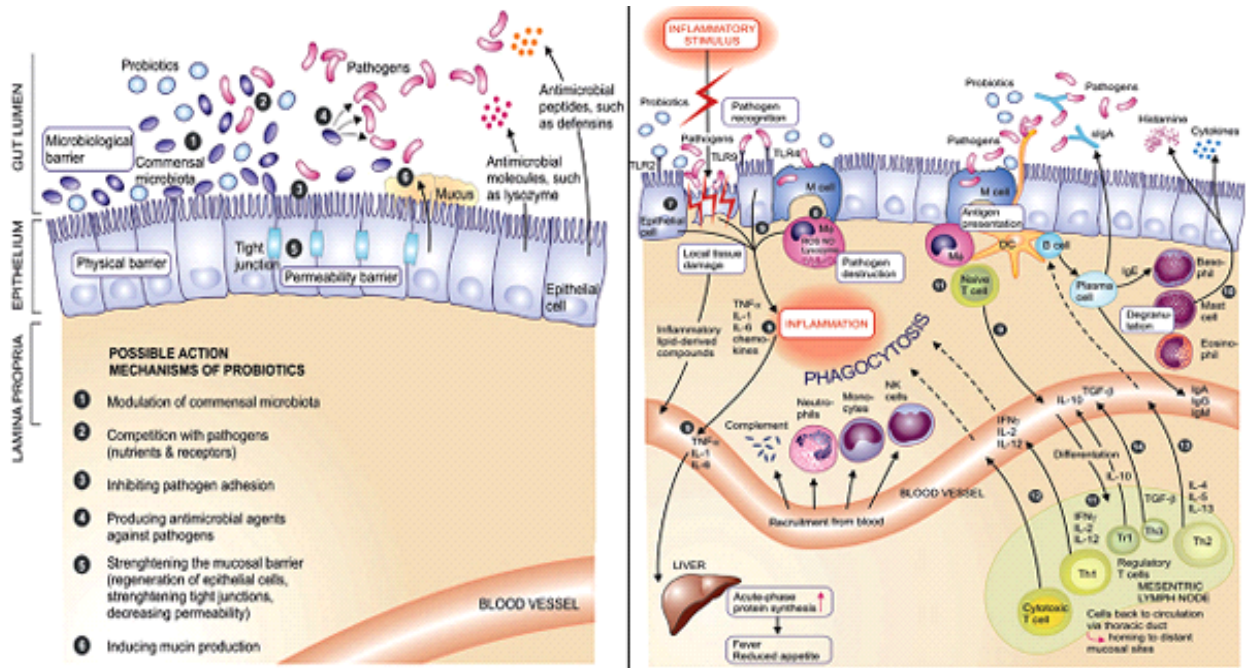


그림 2. 생균제의 작용기전 (출처 : Kekkonen, 2008)

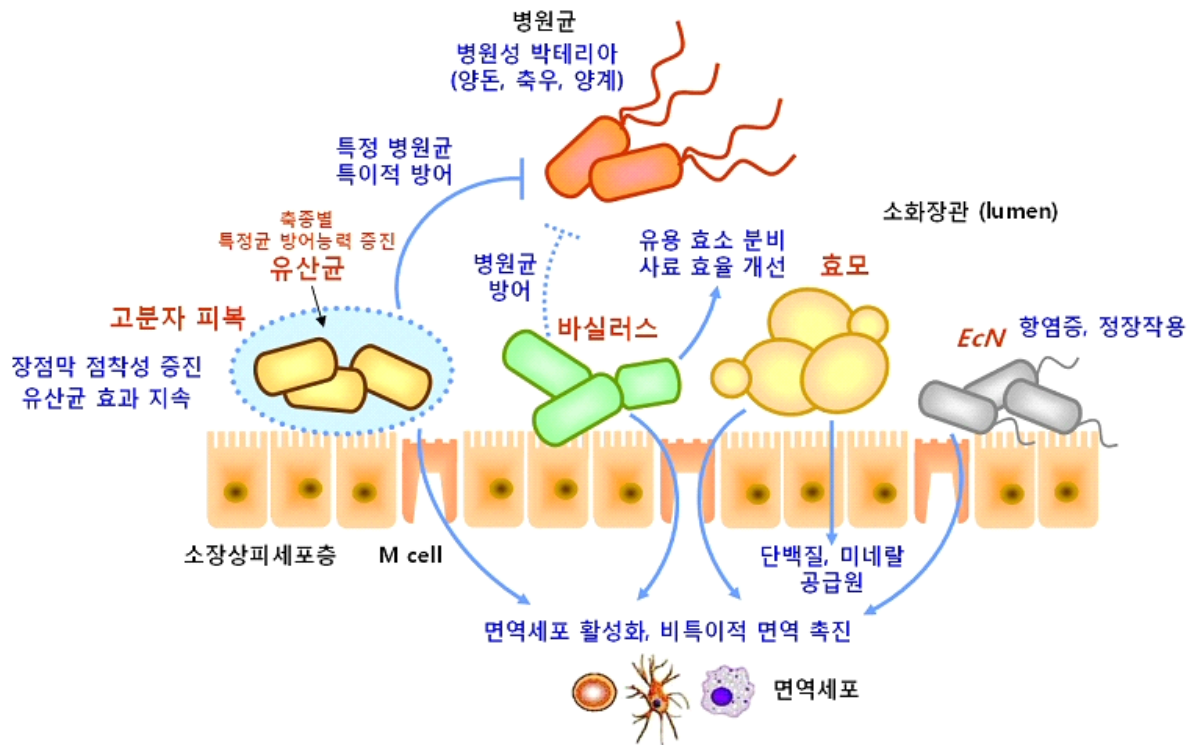


그림 3. 생균제의 작용기전 (출처 : 바이오 사료첨가제 개발 사업단)

표 1. 사료첨가제의 종류

구분	사료종류	품명
품질의 저하를 방지하기 위하여 사료에 첨가하는 것.	가. 결착제	(1) 천연결착제: 천연검· 구아검· 송진· 젤라틴· 카제인· 셀룰로오스· 리그닌셀포네이트 (2) 합성결착제: 알긴산나트륨·알긴산칼륨· 알긴산암모늄· 카제인나트륨·카르복실메틸셀룰로오스나트륨·폴리아크릴산나트륨·폴리메틸로카바마이드 (3) (1) 과 (2)의 합제
	나. 유화제	프로필렌글리콜·레스틴·글리세린 지방산 에스테르, 자당 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 글리세롤 지방산 에스테르와 그 합제
	다. 보존제	(1) 산미제 : 구연산·젓산·DL-사과산·낙산·낙산나트륨·소르빈산·소르빈산칼륨·호박산·초산·안식향산·안식향산나트륨·인산·DL-주석산·L-주석산·개미산·개미산칼슘· 푸말산 (2) 항응고제 : 화이트카본· 블랙카본· 활성탄· 실리카분말· 염화주석 (3) 항산화제 : 에톡시퀸· 부틸하이드록시톨루엔· 부틸하이드록시안isol· 몰식자산· 프로필· 레스베라트롤, 케르세틴 및 기타 천연항산화제 (4) 항곰팡이제 : 프로피온산· 프로피온산칼슘· 프로피온산나트륨 (5) (1) 내지 (4)의 합제
효용의 증대를 위하여 사료에 첨가하는 것	가. 아미노산제	아미노초산·DL-알라닌·L-라이신·염산염·L-라이신·염산염·액상·L-라이신·액상·L-라이신·황산염·L-글루타민산나트륨·L-글루타민산·DL-메치오닌·L-메치오닌·DL-메치오닌·수산화유도체·DL-메치오닌·수산화유도체· 칼슘염·L-트립토판·L-트립토판·L-트레오닌·DL-트레오닌·L-알기닌과 그 합제
	나. 비타민제	비타민A·프로비타민A·비타민B1·비타민B2·비타민B6·비타민B12·비타민C·비타민D·비타민D2·비타민D3·비타민E·비타민K·비타민K3·비타민K4·판토텐산·인노시톨·폴리나·이아신·비오틴·엽산· 타우린과 그 유사체 및 합제
	다. 효소제	(1) 당분해효소 : α -아밀라아제·말토게닉아밀라아제· β -아밀라아제·셀룰라아제· β -글루카나아제·엔도글루카나아제·엑소글루카나아제·글루코아밀라아제·헤미셀룰라아제·펙티나아제·락타아제·키시라나제·키토사나아제· β -만나아제 (2) 지방분해효소 : 리파아제 (3) 인분해효소 : 피타아제 (4) 단백질분해효소 : 알카리성프로테아제·산성 프로테아제·중성프로테아제·식물성 프로테아제·브로멜라인 (5) (1) 내지 (4)의 합제
	라. 생균제	(1) 유익세균 : 락토바실러스 락티스· 락토바실러스 루테리· 락토바실러스 불가리쿠스· 락토바실러스 브레비스· 락토바실러스 살리바리우스· 락토바실러스 에시도필러스· 락토바실러스 카제이· 락토바실러스 커바투스· 락토바실러스 퍼멘텀· 락토바실러스 프란타럼· 락토바실러스 헬베티쿠스· 락토바실러스 누에릭· 락토바실러스 페롤렌스· 락토바실러스 파라카제· 락토바실러스 크리스파투스· 로돕슈도모나스 캄페리타· 모나스쿠스 퍼퓨리우스· 바실러스 쉐투스· 바실러스 리체니포미스· 바실러스 서브틸리스· 바실러스 세레우스(도요이에 포함)· 바실러스 코아글란스· 바실러스 폴리프렌티쿠스· 바실러스 푸밀루스· 바실러스 클라우지· 비피도박테리움 롱검· 비피도박테리움 비피덤· 비피도박테리움 서모필럼· 비피도박테리움 인판티스·엔테로코커스 락티스· 엔테로코커스 썬모필러스· 엔테로코커스 웨시엄· 클로스트리듐 브티리검· 페디오코커스 세레비지아· 페디오코커스 애시디락티시· 페디오코커스 펜토사세우스 (2) 유익곰팡이균 : 아스퍼질러스 나이저·아스퍼질러스 오리제 (3) 유익효모제 : 맥주효모·토룰라효모·제빵효모·양조효모·건조효모·효모배양물 (4) 박테리오파지 : 살모넬라 갈리나룸 박테리오파지, 살모넬라 티피뮤리움 박테리오파지 (5) (1) 내지 (2), (3)의 합제
	마. 향미제	(1) 착향료 : 향미제(향미료를 기능성 첨가제로 하는 휘발성지방산 및 유기산제를 포함) (2) 감미료 : 천연감미료·설탕·포도당·사카린나트륨·네오헤스페리딘디하이드로칼콘 (3) 조미료 : 글루타민산 나트륨·마늘분말 (4) (1) 내지 (3)의 그 합제
	바. 비단백태 질소화합물	요소·대용단백·인산암모늄·인산요소·비우렛·황산암모늄·당밀요소·전분요소와 그 합제
	사. 규산염제	제올라이트·벤토나이트·고령토·일라이트·흑운모·견운모와 그 합제

제 3 절 연구개발 범위

가. 생균제의 소화효소 활성 측정

- 생균제의 소화효소(Protease, Lipase, Amylase) 활성 측정

나. 생균제와 휴믹물질을 혼합한 복합 생균제 개발

- 고체 발효기를 통한 휴믹물질 함유 복합 생균제 개발

다. 복합 생균제 돈분 슬러리 살포(단기 및 장기)에 따른 악취저감 효과 조사

- 단기 살포 및 장기 살포 실험을 통한 암모니아 및 황화수소 농도 감소 측정

라. 복합 생균제 돈분 슬러리 살포에 따른 슬러리 내 pH 변화 조사

- 단기 살포 및 장기 살포에 따른 슬러리 내 pH 변화 조사

마. 복합 생균제 돈분 슬러리 살포에 따른 슬러리 내 균총 변화 조사

- 단기 살포 및 장기 살포에 따른 슬러리 내 미생물 총균수, *E. Coli* 및 *Enterococcus* sp.의 총 균수 변화 조사

바. 복합 생균제 급이에 따른 돈사 내 악취저감 효과 조사

- 복합 생균제 급이에 따른 돈사 내 암모니아 및 황화수소 농도 감소 측정

사. 복합 생균제 급이에 따른 슬러리 내 균총 변화 조사

- 급이에 따른 슬러리 내 미생물 총균수, *E. Coli* 및 *Enterococcus* sp.의 총 균수 변화 조사

아. 복합 생균제의 급이에 따른 이유자돈 성장 개선 효과 조사

- 급이에 따른 일일 증체량, 사료섭취량 및 사료 요구율 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 해외 기술개발 현황

- 일본의 경우엔 생균제로 가장 각광받고 있는 *Bacillus polyfermenticus*는 1993년 일본의 Terakado가 공기로부터 분리한 아포성의 간균으로서, 장에 도달할 때까지 활성을 잃지 않아 매우 효과적인 것으로 알려져 있으며, 현재 사용되는 많은 제제들이 장에 도달하기까지 위산이나 기타 효소에 의해 분해되는 문제점이 있으므로 이러한 *Bacillus* sp.의 생균제가 활성아포를 형성하여 생균 대부분이 장에 도달하는 것은 매우 유익한 방법으로 간주됨 (이은영, 2008).
- 일본에서 프로바이오틱 생균제로 많이 이용되는 것은 유산균 (*Lactobacillus acidophilum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. lactis*), 비피더스 균(*Bifidobacterium lactis* Bb-12, *B. longum* BB536, *B. breve*), 고초균(*Bacillus subtilis*, *B. polyfermenticus*), *Clostridium butyricum*, *C. faecium*, *C. thermophilus*, *C. diacetylactis*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Propionibacterium* sp., 등이 알려져 있음 (Gnosis SPA, 2006).
- 유럽의 생균제이용은 가축영양과학위원회(SCAN)에서 *Bacillus toyoi* 제제를 처음 검토하였으며, 이후 SCAN은 생균제가 사료첨가제로서 안전하지 않을 경우 등록이 거절되고 있는데 생균제는 반드시 유해하지 않아야하며, 산과 담즙에 생존하여 대사적으로 활동성이 있어야하는 것을 조건으로 함.
- 생균제의 검토조건으로는 가축의 성장에 대한 안전성 자료와 가축사료에서 검사할 수 있는지 여부자료, 치료의 전 단계에서 미생물에 대한 내성으로 발전되지 않음에 대한자료, 성장 중인 가축의 대사과정 중에 미생물의 역할이 위해 없이 사용되었는지에 대한 독성연구가 진행된 결과, 환경에 미치는 해로운 영향을 미생물로부터 유래한 사항에 대한 검토 결과 등이 검토 대상이 되고 있으며, EU 국가에서는 현 항생물질과 비슷한 연구 자료를 구비하여 제출한 후 SCAN 심사를 통과해야 유통될 수 있음 (European Commission, 2005).
- 미국의 생균제는 DFM이라고 하며, FDA의 승인을 받은 제품은 없으나, 미국의 식품업계에 서도 무항생제 제품에 대한 수요가 늘기 때문에 일본에서 제조 판매되는 제품을 수입하여

닭과 돼지의 사육에 이용하는 실정임 (Food Industry Research and Development Institute, 2003).

- 현재 생균제에 대한 해외 동향에서 일본은 세계특허출원 건수의 절반가량을 차지하여 개발을 주도하고 있으며, 우리나라는 아주 낮은 수준의 기술을 보이는 것으로 나타났으며, 미생물을 유전공학적 처리로 개량하여 효소활성을 향상시키며, 그 생성물을 식품, 의약품 및 사료용으로 사용하는 것이 주를 이룸.
- 현재는 생균제의 장기보존을 위해 동결건조법이나 분무건조법 등에 의한 분말형태의 제조를 하게 되며, 이런 분말 생균제는 저온이나 상온에서 생존율이 저하되어 위산에 강하고 장 부착능이 우수한 생균제 생산공정에 대한 다양한 방법이 연구되고 있음 (Wells et al., 2005).

제 2 절 국내 기술개발 현황

- 많은 생균제 중에서 악취저감에 효과가 있는 것으로 알려진 균들을 선별, 조합하여 사용하면 그 효과가 클 것으로 판단됨에 따라 Ra등(2004)은 혼합 생균제를 비육돈에 급여하였을 때, 체중 증가 및 사료효율 향상뿐만 아니라 암모니아 및 황화수소 가스의 발생을 감소시킴으로써 사육환경 개선효과가 있는 것으로 보고함.
- 생균제 발효사료 급여에 의한 닭의 일당증체량 증가와 축사 내 유해가스인 암모니아 및 황화수소 가스의 감소효과에 대한 연구결과도 보고됨 (Kim 등, 2001; Ko등, 2001).
- *Lactobacillus* sp.는 GRAS(generally recognized as safe) 균주로서, 숙주에 대한 부착능을 가지고 병원성 세균의 장내 부착을 방해하거나 억제하고 bacteriocin 등의 항균 단백질을 생성하여 물리적, 화학적으로 병원균의 성장을 저지시키고 장내 미생물에 영향을 미치는 여러 종류의 대사산물을 생산하여 장내에 잔류 시, 장내 균총을 정상화시켜 증체율과 생산성 및 사료 이용율을 증진시켜주고, 장 내용물의 pH저하와 Coli forms, Salmonella 및 Clostridia 균 등 유해 미생물의 독소 작용을 억제하여 식중독 균주를 포함한 그람 양성 및 음성 세균, 병원성 곰팡이에 강한 생육 저해 활성을 나타내고 넓은 범위의 항진균 활성 및 항세균 활성을 나타내므로 강력한 천연 식품 보존제 및 사료보존제로의 활용이 가능한 것으로 보고함 (Yang과 Chang, 2008).

- *Bacillus* sp.는 포자를 형성하는 균주로서 α -amylase와 protease 생산능력이 뛰어나고, dipicolinic acid라는 항균 물질을 생성하여 소화기내 유해미생물을 억제하며, 젖산균 등 장내 유익한 미생물 군총의 증식을 촉진하는 기능을 보유한 것으로 보고함 (Lee, 2002).
- 권 등(2002)은 *B. subtilis*는 유기물의 분해와 질소 이용율을 증가시켜 혈액 내 요소성 질소를 감소시킴으로서 분뇨 내의 암모니아 발생량을 감소시킴과 동시에 계사 내 암모니아 가스의 생성을 감소시킨다고 하였으며, *B. licheniformis*는 항균능과, 열 안전성, 단백질 가수분해 저항성을 지니고 있고 장에 도달할 때까지 활성을 유지하여 생균제로서 매우 효과적이라고 하였고, 정과 장(2009)은 *B. polyfermenticus*가 항진균 및 항세균 활성을 동시에 가지는 항균물질을 생산하여 유해균의 성장을 억제할 수 있다는 결과를 도출함.
- *Clostridium* sp.인 *C. butyricum*은 Butyric acid를 생산하고 각종 당과 아미노산을 분해하며 설사를 유발하는 유해균의 증식을 억제하는데 쓰이며 영양소의 소화를 촉진하며, 산과 알칼리 조건에 대한 저항성이 강해 특정 유해세균의 생육억제 및 예방에도 유의적인 효과를 나타낸다고 보고함 (정과 장, 2009).
- 국내 생균제를 비롯한 사료첨가제 산업동향은 배합사료와 비슷하게 배합기술과 가공기술, 품질 확보 및 평가 기술에 의해 제조되며, 사료 혹은 사료첨가제 원료의 경우 수 년 이상의 개발 기간이 필요하나 원료를 조합하거나 배합하는 기술은 상대적으로 기술 레벨이 낮아 수 개의 선두업체를 제외한 다수의 중소기업이 진출, 경쟁하고 있으며, 국내의 경우 코페벤스페셜, 미래자원ML, 제일바이오, 이지바이오, CTCBio, 아미바이오, 진바이오텍, 대호 등이 선두업체이며, 최근 5년 국내 업체의 활발한 연구 개발을 통해 해외 선두 업체의 70~80% 기술 수준에 육박하고 있으며, 관련 제품 매출도 지속적으로 증가하고 있다.

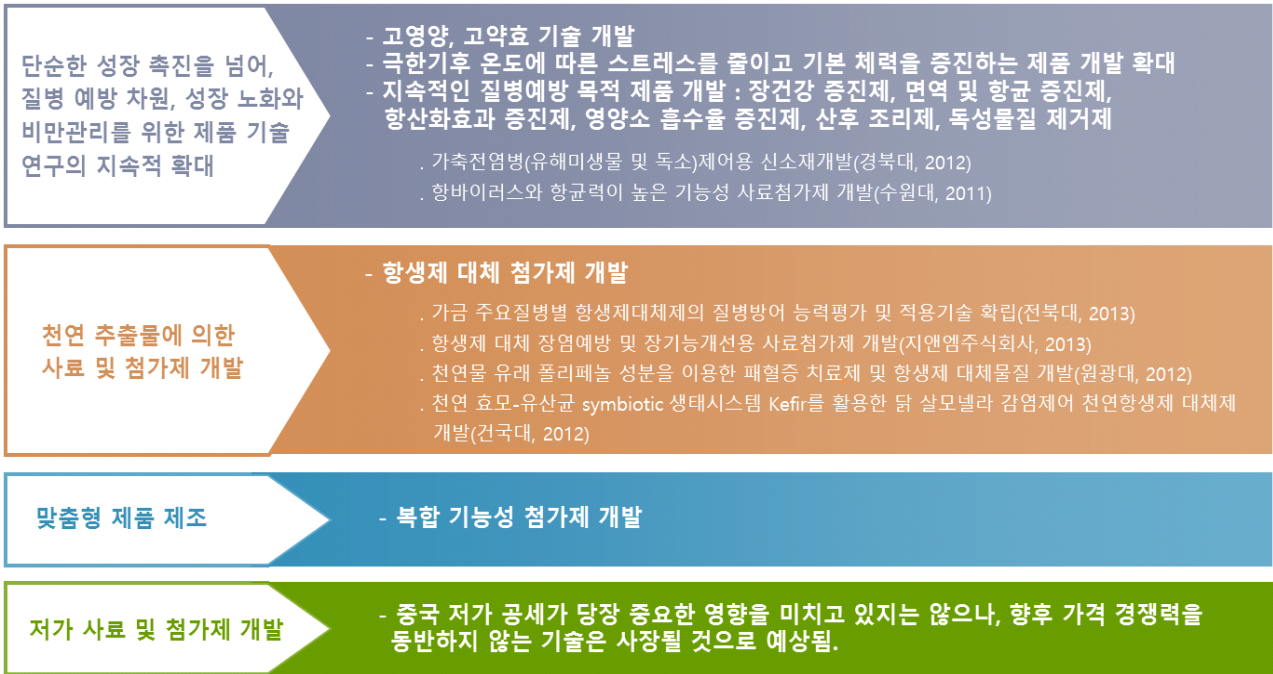


그림 4. 사료첨가제 개발 동향 (출처 : 사료첨가제 제조기술과 시장동향 분석, 2014)

제 3 절 국내외 시장 현황

- 세계 사료첨가제 시장은 2013년 기준 연평균 5.1%의 성장률을 나타내며, 2019년 약 173억 불의 규모를 가질 것으로 예상되고 있고, 전 세계 사료첨가제 시장의 85% 이상은 북미와 유럽에 집중되어 있으며, 아시아-태평양 지역의 경우, 소득 수준 향상과 육류 소비량이 증가함에 따라 지속적으로 증가할 것으로 예상됨.
- 대상 축종에 따른 시장 점유율은 약 73.4%는 돼지 또는 닭 사료용이며, 그 외 소 (19.2%), 수중배양/애완동물(7.4%) 등으로, 특히 애완동물 관련 산업과 사료첨가제 시장을 밀접하게 연관되어 있음.
- 2010년 이후 경기 침체기에도 애완동물 관련 물품의 지출액은 계속 증가되었고, 이는 가축 규모 축소에 따라 애완동물의 수요가 증가하고, 소비자의 취향이 고급화되면서 애완동물의 건강을 고려한 고품질 사료 소비가 증가하는 것도 사료첨가제 시장을 성장시키는 원인 중 하나인 것으로 파악됨 (Frost&Sullivan, 2014).

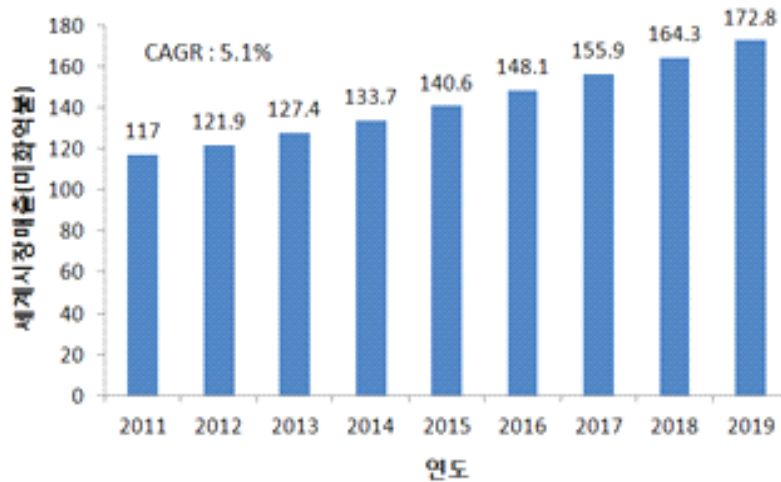


그림 5. 세계 사료첨가제 시장 규모

(출처 : Analysis of the global animal feed ingredients market)

- 국내 사료첨가제 시장은 2013년 기준 약 2,587억의 규모를 나타내고 있으며, 이는 해외 시장 대비 약 2%의 시장 비율을 나타내고 있으며, 2012년 기준 국내 수입 사료첨가제 규모를 살펴보면, 미네랄과 비타민의 경우 각각 약 5백만 달러이고 증가세에 있는 반면, 항생물질의 경우 4.2백만 달러에서 점차 감소되는 추세에 있음.
- Novus, Evonik과 같은 유럽과 미국의 해외 주요 업체는 합병과 통합을 통해 관련 사업을 수직/수평 계열화하고 있으며 배합사료 선두기업인 Cargill이 사료첨가제 선두업체인 Provimi사를 인수하는 등 사료 및 사료첨가제 기업간의 인수합병이 활발한 움직임을 보이고 있음 (Frost&Sullivan, 2014).

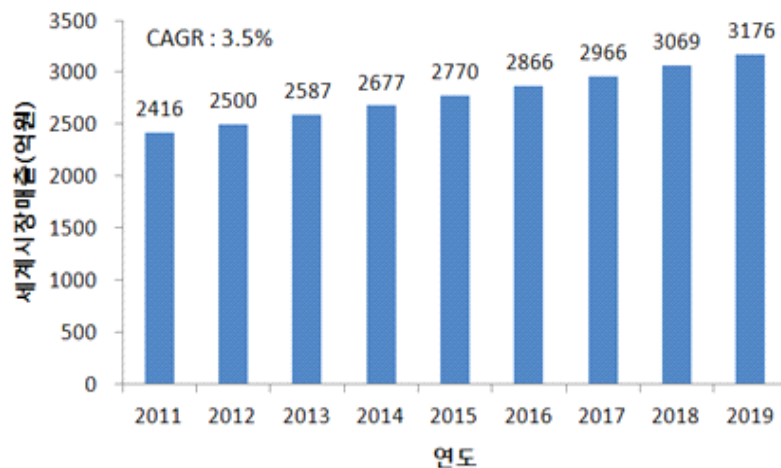


그림 6. 국내 사료첨가제 시장

(출처 : 농협경제연구원, 2013)

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구내용 및 방법

1. 생균제의 소화효소활성 측정 방법

- 소화효소활성 측정은 복합 생균제에 사용된 *Bacillus polyfermenticus*의 소화효소 활성 측정을 통해 *Bacillus subtilis*와 비교하였다. Protease 활성 측정을 위하여 각 시료는 25 mg/ml의 농도로 멸균 증류수로 현탁하여 원심분리하여 그 상층액을 효소 시료로 사용하였다. 시료 0.05 ml을 2% azocasein (0.2 M Tris-HCl, pH 7.5) 0.05 ml과 함께 혼합한 뒤 40°C water bath에서 20분간 반응시킨 후 꺼내어 10% TCA (trichloroacetic acid) 0.05 ml과 혼합하여 10분간 ice에서 넣어 유지시켰다. 이후 6,000×g에서 20분간 원심분리 시킨 후 상층액 0.15 ml만을 따로 취하여 6배 희석시킨 2 N Folin phenol reagent 0.3 ml과 7.5% Na₂CO₃ 0.45 ml을 차례로 첨가한 후 30°C water bath에서 2차 반응시켜 발색한 sample을 660 nm에서 흡광도를 측정하여 값을 구하였다. 단백질 분해 효소능 1 unit의 정의는 위의 실험 조건에서 1분간 효소 반응시 1 μmol의 tyrosine을 생성할 수 있는 능력으로 하였다.
- Lipase 활성 측정은 microplate assay 방법으로 측정하였다. microplate assay는 *p*-nitrophenyl ester (pNP-ester)를 기질로 사용하여 유리되는 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도 증가량으로 측정하였으며 반응액은 기질의 종류에 따라 두 가지 방법을 혼합하였다. Ester carbon의 길이가 12개 이하의 탄소수를 가진 기질(pNP-acetate)의 경우, acetonitrile로 녹인 10 mM pNP-acetate 5 μL, ethanol 5 μL, 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 180 μL와 효소액 10 μL를 섞은 다음 37°C에서 10분간 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, long chine인 pNP-palmitate를 기질로 사용할 경우 10 μL의 효소액과 170 μL의 buffer 혼합액(50 mM phosphate buffer containing 0.1% gum arabic and 0.2% deoxycholate) 그리고 isopropanol로 녹인 8 mM의 기질 20 μL를 혼합하여 동일한 조건으로 반응시켰다. 효소의 unit 측정은 1분간 1 μmol의 *p*-nitrophenyl를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.
- *alpha*-amylase는 25°C, pH 4.8의 Soluble starch(Sigma, USA)를 분해하여 1분 동안 maltose (Sigma, USA)를 1mole 생산하는 것을 amylase 1 unit으로 하였다. 25°C water bath에서 starch solution 25μl를 enzyme solution을 넣고, 3분 반응 후 Dinitrosalicylic acid reagent (Sigma, USA)를 50μl 첨가 하고, 5분 동안 boiling water bath에서 반응하였다. 그런 후 0.9mL 증류수를 추가하고, 540nm에서 OD값을 측정하여 amylase 활성을 측정하였다.

2. 복합 생균제 살포에 따른 효과 실험

가. 살포용 복합 생균제 제조

- 생균제의 제조에 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus polyfermenticus* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였고, *L. plantarum*은 glucose 20g/L, Molasses 10%, salts 5g/L, K₂HPO₄ 0.75g/L, MgSO₄ 0.75g/L, Peptone 5.08g/L, Yeast extract 7.08g/L의 배지로 37℃에서 48시간 배양하였다. *B. polyfermenticus*은 Nutrient broth 13g/L, MgSO₄ 0.51g/L, KCl 0.97g/L, CaCl₂ 0.2g/L, MnSO₄ 0.03g/L, FeSO₄ 0.0055g/L, Skim Milk 100g/L의 배지로 37℃에서 96시간 배양하였다. *S. cerevisiae*은 Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, Glucose 20g/L의 배지로 30℃에서 96시간 배양하여 고체발효에 사용하였다.
- 휴믹산이 첨가된 복합생균제의 제조공정은 3종의 원균을 각각의 최적배지에 액체배양하고 옥수수분말 30%, 대두박 30%, 소맥피 33% 와 당밀 7%를 이용하여 35℃에서 고체 배양기 (DM-704, Korea)이용하여 96시간 배양하였으며, 제조된 생균제에 7% (w/w) 휴믹산을 혼합하여 복합 생균제를 제조하였다. 고체 배양기는 함평축협 TMR의 협조를 받아 사용하였다 (그림 7).



그림 7. 생균제의 제조 공정

나. 복합 생균제 단기 살포 실험

- 전라남도 함평군에 위치한 한빛양돈조합법인 농장 내 비육돈사에서 돈분 슬러리를 채취하여 살포 실험을 진행하였다.
- 단기 살포 실험은 0, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간동안 37℃로 설정한 incubator에서 진행하였으며 대조구로 비육돈분 슬러리를 사용하고, 슬러리에 복합 생균제를 0.01%, 0.02%, 0.05% 및 0.1%를 각각 첨가한 4개의 처리구로 구성하여 진행하였다.

다. 복합 생균제의 장기 살포 실험

- 장기 살포 실험은 3, 7, 10, 14, 21, 27 및 30일 동안 37°C로 설정한 incubator에서 진행하였으며 비육돈분에 발생한 슬러리에 제조한 복합 생균제를 슬러리량의 0.05%의 비율로 주 2회 살포 처리하여 생균제를 살포하지 않은 슬러리 대조구와 함께 시험을 진행하였다.

라. 슬러리 내 pH 측정 방법

- 단기 살포 실험의 pH는 0, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간에 pH meter 이용하여 측정하였으며, 장기 살포 실험의 pH는 실험 시작일로 부터 3, 7, 10, 14, 21, 27 및 30일에 측정하였다.

마. 슬러리 내 암모니아 및 황화수소 농도 측정

- 암모니아(NH₃) 및 황화수소(H₂S) 가스 측정은 검지관식 가스 측정기(GV100S, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 단기 살포 실험은 0, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간에 가스측정기를 이용하여 측정하였고, 장기 살포 실험의 경우 실험 시작일로 부터 3, 7, 10, 14, 21, 27 및 30일에 측정하였다.

바. 슬러리 내 균총검사

- 실험 시작일로 부터 매주 실험 일주일차 종료시인 0, 7, 14, 21 및 28일에 돈사에서 임의 채취한 슬러리를 익일 균총 검사 전까지 4°C에서 냉동 보관하였으며, 슬러리 내용물 1g에 멸균된 0.85% saline buffer 9ml을 첨가하여 혼합한 후 10⁻¹부터 10⁻⁶까지 각각의 비율로 희석하여 생균수 측정용 시료로 사용하였으며, 총균, *E. coli*, *Enterococcus* sp.를 측정하기 위해 LB agar (Difco, BDscience, USA), MRS agar (Difco, BDscience, USA)를 사용하였다. 균총을 조사하기 위하여 LB agar 및 위 세 가지 선택배지 평판에 희석된 시료를 각각 100 µl씩 분주하여 도말한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 균수를 측정하였다.

3. 복합 생균제 급이에 따른 효과 실험

가. 급이용 복합 생균제 제조

- 복합 생균제의 급이가 돈사 내 악취저감에 미치는 영향을 평가하기 위하여 급이용 생균제를 제조하여 실험을 실시하였다. 생균제의 제조에 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus polyfermenticus* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였고, 휴믹산은 제조된 생균제에 대하여 5% (w/w)가 되도록 첨가하여 복합 생균제를 제조하고 실험에 사용하였으며, 매일 본 사료에 복합 생균제를 0.2% 혼합하여 급이 하였고, 복합 생균제 급이에 따른 일일증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 측정하였다.

나. 실험기간 및 장소

- 전라남도 함평군에 위치한 한빛양돈조합법인 농장 내 비육돈사에서 2014년 10월 6일부터 2014년 11월 14일까지 6주간 복합 생균제를 급여 실험을 실시하였다.



그림 8. 실험 장소(한빛양돈조합법인, 함평)

다. 실험재료

- 급여용 복합 생균제는 *Bacillus polyfermenticus* (1.0×10^6 CFU/g), *Lactobacillus plantarum* (1.0×10^6 CFU/g) 및 *Saccharomyces cerevisiae* (1.0×10^6 CFU/g)를 이용하여 고체 발효 후 휴믹산 5%를 첨가하여 복합 생균제를 제조하였고, 원균은 함평축협 생물자원연구소에서 공급받아 사용하였다.

라. 실험동물 및 실험방법

- 실험은 비육돈을 대상으로 하였으며, 비육돈방 2개를 대조구와 처리구로 구분하여 매일 본 사료에 0.2% (w/w)의 첨가비율로 조절하여 급여 하였으며, 사료의 급여는 자유채식 하였으며, 각 구역의 면적과 사료, 급수시설은 동일하게 하였다.

마. 돈사 내 암모니아 및 황화수소 농도 측정

- 돈사 내 악취저감 효과를 측정하였다. 암모니아 및 황화수소 가스 측정은 검지관식 가스 측정기를 이용하여 측정하였으며, 0, 7, 14, 21, 28, 35 및 42일에 가스측정기를 이용하여 측정하였다.

바. 슬러리 내 균총 검사

- 실험 시작일로 부터 매주 실험 일주일차 종료 시인 0, 7, 14 및 21일에 비육 돈사에서 임의 채취한 슬러리를 익일 균총 검사 전까지 4℃에서 냉동보관 하였다. 슬러리 내용물 1 g

에 멸균된 0.85% saline buffer 9ml 을 첨가하여 혼합한 후, 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 각각의 비율로 희석하여 생균수 측정용 시료로 사용하였다. 총균, *E. coli*, *Enterococcus* sp.를 측정하기 위해 LB agar, MRS agar를 사용하였다. 균총을 조사하기 위하여 LB agar 및 선택배지 평판에 희석된 시료를 각각 100 μ l씩 분주하여 도말한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하여 균수를 측정하였다.

사. 복합 생균제 급이에 따른 성장 개선 효과

- 휴믹산이 첨가된 복합 생균제 급이에 따른 성장 개선 효과를 조사하기 위하여 랜드레이스 (landrace) 축종 24일령 이유자돈 27두를 대상으로 일당 증체량, 일당 사료섭취량 및 사료 요구율을 조사하였다. 실험은 무첨가구를 대조구로 하여 생균제 급이구 (사료 톤 당 생균제 0.2% 혼합 급이)와 Kitasamycin + Sulfamethazine 0.2% 첨가 급이구로 나누어 총 3개 군으로 하였으며, 각각의 시험구는 9두의 자돈을 대상으로 하였다. 실험동물의 체중은 시험개시 (1일)와 15일, 30일에 조사하였으며, 일당 증체량 (Weight gain)은 15일간의 증체량을 1일로 나누어 1두 당 1일 증체량 (Dairy weight gain)으로 표시하였다. 일당 사료섭취량 (Feed intake)은 사료 총 급여량에서 잔량을 제하여 총 섭취량을 구하고 사육 두수로 나누어 1두당 섭취량으로 표시하였으며, 15일을 나누어 1두당 1일 사료섭취량 (Dairy feed intake)로 표시하였다. 사료효율(Gain/Feed)은 일당 증체량을 일당 사료섭취량으로 나누어 계산하였다.

제 2 절 연구결과

1. 생균제의 소화효소 활성

- 생균제에 사용된 *Bacillus polyfermenticus*의 소화효소 활성 측정결과는 다음과 같다. 측정 결과, *B. polyfermenticus*는 *B. subtilis*에 비하여 지방소화력은 비슷하나 전분소화력은 2배, 단백소화력은 9배 이상 높은 것으로 나타났다. 두 미생물에서 lipase activity는 *Bacillus polyfermenticus*는 98 FIP Unit/mL, *B. subtilis* 100 FIP Unit/mL로 차이를 나타내지 않았으며, *alpha*-amylase는 *B. polyfermenticus* 410 FIP Unit/mL, *B. subtilis* 200 FIP Unit/mL로 *B. polyfermenticus*가 *B. subtilis* 보다 2배 이상의 높은 활성을 나타내었다. Protease의 경우는 *polyfermenticus*, *B. subtilis*가 각각 9.5 FIP Unit/mL, 1.0 FIP Unit/mL로 9배 이상의 유의한 차이를 나타내는 것으로 측정되었다 (그림 9).
- 이유자돈의 경우, 높은 장내 pH로 인한 *E. Coli*와 같은 병원성 미생물의 번식과 모유에서 고형사료로의 전환으로 인한 소화기능의 장애로 인해 설사가 발생하고 성장률 및 사료효율이 감소하게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 소화효소의 활성이 높은 생균제를 첨가함으로써 개선시킬 수 있다는 연구결과가 보고되고 있다.
- Han 등(1982)은 *Streptococcus faecium*을 비육돈사료의 사료에 첨가 급여 시 증체율에 있어서는 각각 7.3%, 13.7% 증가하였으며, 사료효율은 8.65%, 9.1%개선되었고, 조단백질 소화율 및 질소 축적율이 향상되었다고 보고하였다. Newman 등(1988)은 lysine의 공급량이 부족한 육성돈에 있어서 *Enterococcus faecium*은 lysine을 분비하여 성장률을 개선시킨다고 보고하였다. 또한, 홍 등(2002)은 비육돈에 복합 생균제 급여시 성장 및 영양소 소화율을 향상시키고 분내 가스 발생작용을 감소시킨다고 보고하였다.

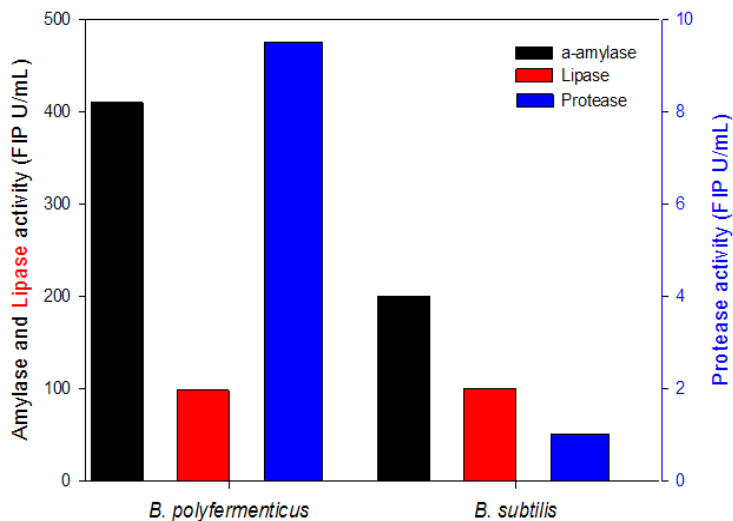


그림 9. *Bacillus polyfermenticus* 소화 효소 활성

2 휴믹물질 함유 복합 생균제 제조

- 복합 생균제는 *Bacillus polyfermenticus* (1.0×10^6 CFU/g), *Lactobacillus plantarum* (1.0×10^6 CFU/g) 및 *Saccharomyces cerevisiae* (1.0×10^6 CFU/g)를 이용하여 고체 발효 후 휴믹산 5%, 7%를 첨가함으로써 살포용, 급이용 복합 생균제를 제조하였다 (그림 10).



그림 10. (a) 생균제 분말, (b) 휴믹산 5% 함유 복합 생균제, (c) 휴믹산 7% 함유 복합 생균제

3 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 pH 변화

- 돈분 슬러리에 복합 생균제를 살포한 후 배양일에 따라 pH 변화를 관찰한 결과 단기 살포하였을 경우 24시간 배양한 동안 7.00 ~ 8.22의 범위를 나타내었다. 모든 처리구에서 배양 개시 후 6시간까지 pH는 감소하는 경향을 나타내었으며, 배양 0시간의 pH는 0.05%의 처리구가 7.72로 다른 대조구와 처리구들에 비해 유의적으로 낮게 측정되었고, 배양 3시간째에는 0.1% 처리구가 7.31로 측정되어 다른 처리구들에 비해 유의적으로 낮았다. 배양 종료 시인 24시간째에서는 0.01% 와 0.1% 처리구가 다른 처리구의 pH 수치에 비해 유의적으로 낮았다.
- 초기 pH의 감소는 복합 생균제의 살포로 유기산 성분이 증가하였기 때문인 것으로 사료되며 이후의 일부 pH 증가현상은 암모늄의 증가로 인해 pH가 영향을 받았기 때문인 것으로 사료된다
- 한편, 장기 살포시 pH 변화를 관찰한 결과 전체 배양일 30일 동안 7.62 ~ 8.42의 범위를 나타내었고, 대조구와 처리구 모두 배양 14일까지 증가하다가 감소하는 경향을 보였으며, 14일 이후부터는 대조구는 배양 종료일까지 증가하는 경향을 보였고 처리구의 pH 수준은 배양 종료일까지 감소하는 경향을 보였다. 전체 배양일 동안 대조구와 처리구의 pH 변화를 보면 대조구보다 처리구의 pH가 다소 낮은 경향을 보였다.
- Underdahl등(1982)과 White등(1969)에 의하면, 생균제의 첨가는 유산균의 유기산 분비에 의한 장내 pH 감소 효과가 있다고 하였다. 또한 Lee(2008)도 생균제의 작용기전으로 장내 세균 총 정상화, 항생물질 생산, 병원균의 정착을 저지하기 위한 영양소 경합, pH 저하에 의한 유기산 생산, 병원균 유해효소 억제, 부패산물 및 독소 생산저지, 소화효소 생산, 비타민 합성 및 면역자극 등을 언급한 바 있으며, 본 실험에서도 복합 생균제를 처리한 처리

구의 pH 수준이 다른 처리구들에 비해 낮은 결과를 나타내 복합 생균제의 작용에 의한 pH 저하 효과를 나타내었다.

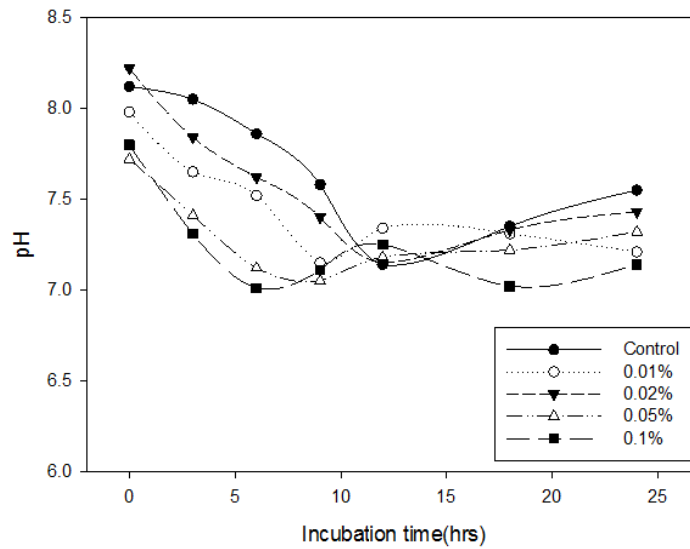


그림 11. 복합 생균제 단기 살포에 따른 슬러리 내 pH 변화

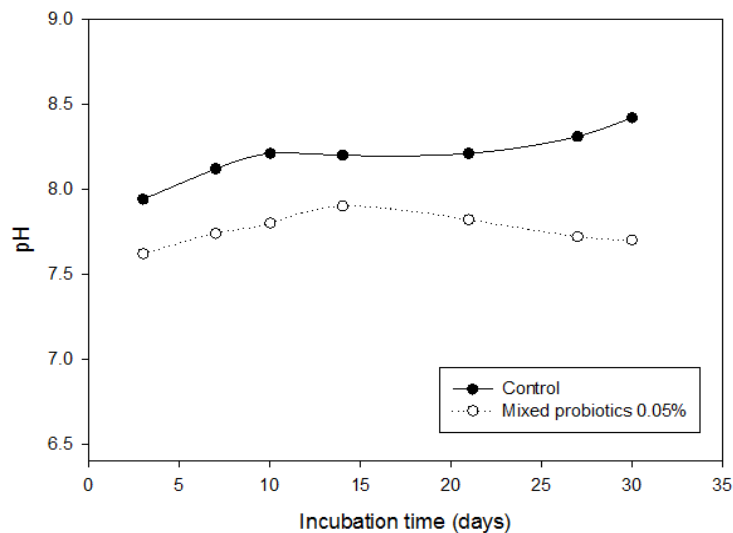


그림 12. 복합 생균제 장기 살포에 따른 슬러리 내 pH 변화

4 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 암모니아 및 황화수소 감소 효과

- 복합 생균제를 돈분 슬러리에 살포하여 단기 및 장기간 슬러리 내의 암모니아 및 황화수소 가스변화에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.
- 복합 생균제를 단기간 살포한 경우, 암모니아 가스 농도는 3시간까지 급속도로 감소하다가 24시간까지 서서히 감소하는 경향을 보였다. 즉 대조구의 암모니아 가스 농도가 15.0 ~ 32.0 ppm의 범위를 나타내었으며, 0.1% 처리구는 살포 6시간 경과 후 75% 이상의 높은 감

소율을 나타내었다.

- 복합 생균제를 장기간(30일) 살포한 경우, 대조구의 암모니아 가스 농도가 15.0 ~ 28.0 ppm의 범위를 나타내었으며, 0.05% 처리구의 암모니아 가스 농도는 7.0 ~ 11.0ppm 범위로 나타났다. 0.05% 처리구는 살포 30일 경과 후 10ppm 이하의 낮은 암모니아 가스 농도를 유지하였으며, 대조구와 비교시 75% 이상 암모니아 저감효과를 보였다 (그림 13).
- 한편, 황화수소 가스는 단기 살포한 경우 대조구는 4.0 ~ 15.0 ppm의 농도 범위를 보였으며, 대조구의 경우는 1.0 ~ 12.0 ppm의 농도 범위를 보였다. 살포 6시간 경과 후 감소하다가 24시간까지 증가하는 추세를 보였다. 장기 살포한 경우 대조구는 4 ~ 6ppm 범위를 유지하였으며 0.05% 처리구는 살포 3일후부터 황화수소는 검출되지 않아 100% 저감효과를 보였다 (그림 14).

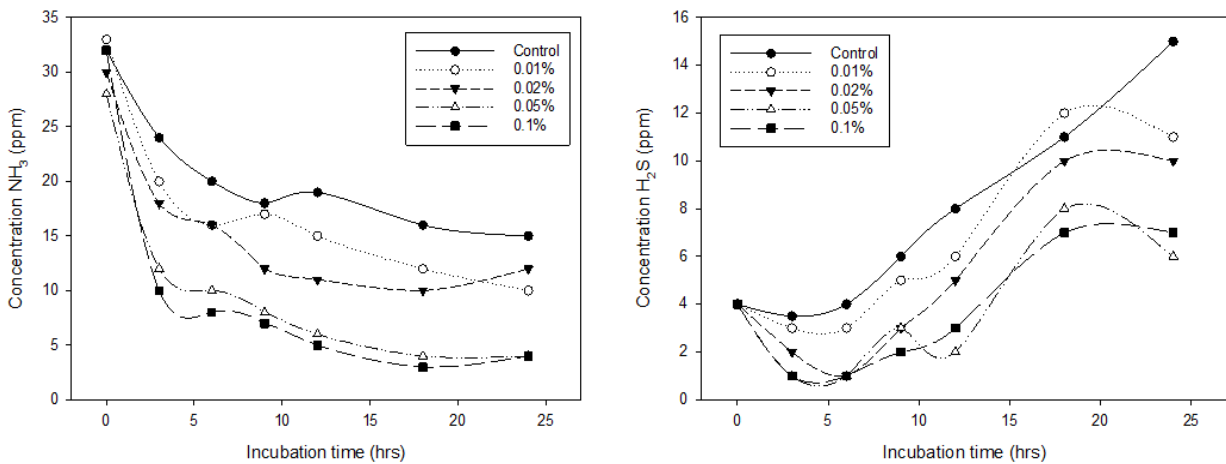


그림 13. 복합 생균제 단기 살포에 따른 슬러리 내 NH₃ 와 H₂S 농도 변화

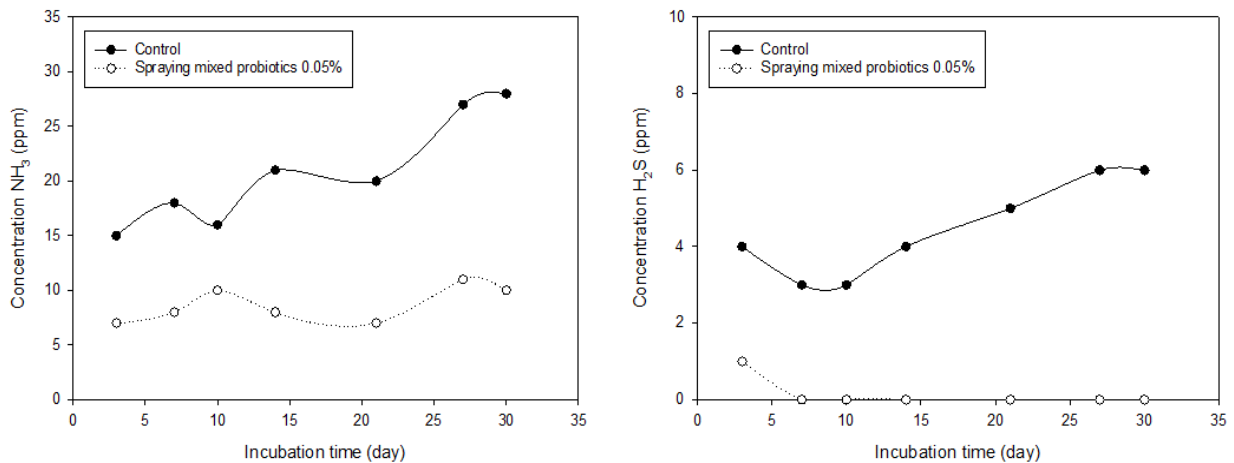


그림 14. 복합 생균제 장기 살포에 따른 슬러리 내 NH₃ 와 H₂S 농도 변화

5 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 균총 변화

- 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 균총을 분석한 결과 총균의 경우 처리구가 대조구에

비해 실험기간동안 낮은 경향을 보였으며, 또한 *E. coli*와 *Enterococcus* sp.의 장내 균 총 수는 살포 일주일 이후부터 처리구가 대조구보다 낮은 경향을 보였다. 이는 살포한 복합 생균제가 돈분의 정상 및 pH를 변화시켜 악취발생에 관여하는 미생물 종의 변형을 유도한 결과로 사료된다.

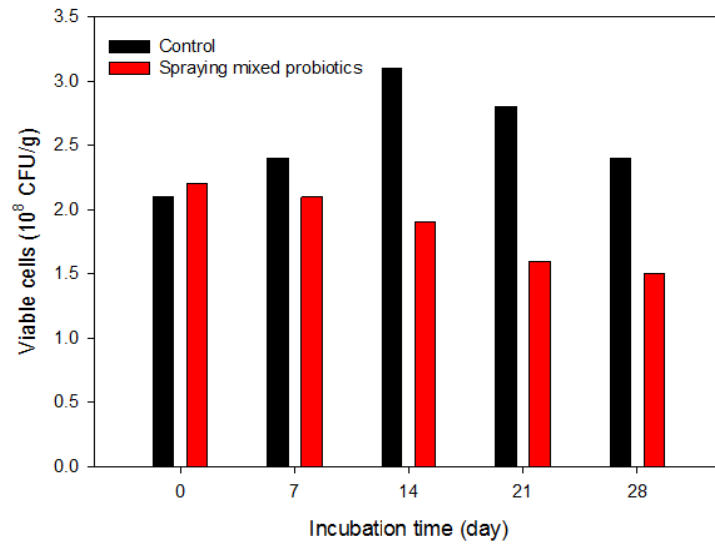


그림 15. 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 총균 변화

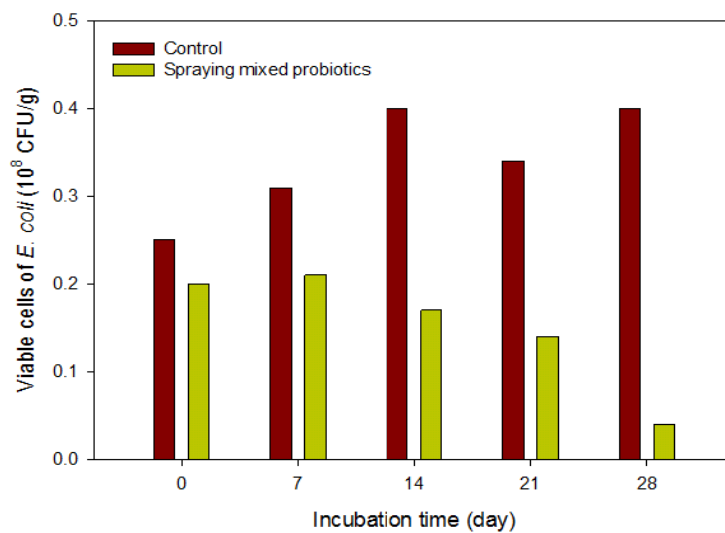


그림 16. 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 *E. Coli* 변화

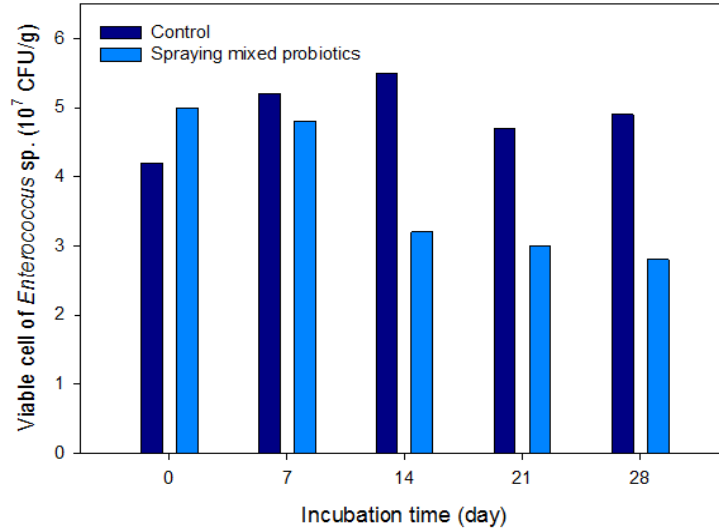


그림 17. 복합 생균제 살포에 따른 슬러리 내 *Enterococcus* sp. 변화

6. 복합 생균제 급이에 따른 돈사 내 암모니아 및 황화수소 저감 효과

- 복합 생균제의 급이에 따른 돈사 내 암모니아와 황화수소 가스의 농도를 6주간 측정된 결과 다음과 같다. 암모니아 가스 농도는 급이 7일 후 25% 감소하였으며, 3주후에는 70% 이상 감소하였으며 6주 후에는 75% 이상 감소하였다. 이는 대조구에 비해 73% 이상 감소하는 경향을 보였다.
- 한편, 황화수소 가스의 농도는 대조구에서 3.0 ~ 2.0 ppm 범위로 나타났으며 2.0 ppm를 유지하였다. 복합 생균제 처리구는 급이 3주 후에 1ppm으로 감소하다가 5주 후에는 0ppm으로 감소하여 100% 저감 효과를 보였다.
- 최근의 연구에서도 생균제 급이에 따른 가축의 장내 균총 변화로 장내환경을 개선하여 원천적으로 암모니아 발생량을 저감하고자 하는 연구들이 다양하게 진행되어 왔으며 생균제 살포에 따른 암모니아 및 황화수소 저감 효과는 다양하게 입증되어오고 있다.
- Wang 등(2009)은 비육돈을 대상으로 한 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, aluminum silicate 및 유장가루가 함유된 제제를 사료에 첨가한 결과 처리구의 슬러리에서 발생된 암모니아가 대조구의 슬러리에서 발생된 암모니아에 비해 낮았다고 보고하였다. 또한 Ra 등(2004)의 연구에서도 백년초 함유 복합 생균제를 육계 및 비육돈에 급이하면 체중 증가 및 사료효율 향상뿐만 아니라 암모니아 및 황화수소가스의 발생량을 감소시킬 수 있다고 하였다. *Bacillus subtilis* 배양물을 육계사료에 1~2% 첨가할 경우 약 36.1~72.2%의 암모니아 가스가 감소되었다는 보고도 있다 (Santoso 등; 1999).
- Hong 등(2002)은 비육돈에 복합 생균제를 첨가 시, 대조구에 비해 분의 암모니아가 유의적으로 감소하였다고 하였고, Chiang과 Hsieh (1995)도 유산균과 *Bacillus*제제가 함유된 생균제를 급여한 결과 계분과 바닥에서의 암모니아 생성이 감소하였다고 하였다.

- 이러한 생균제의 약취저감효과에 나타나는 결과차이는 첨가되는 균주의 종류와 첨가방법 및 환기방식 등의 외부적 요건 때문으로 판단되며 적정 환기율을 유지하고 효과유지를 위한 지속적인 방안을 연구한다면 효율적인 약취저감효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.
- 본 연구결과에 따르면, 복합 생균제를 사용할 경우 생균의 활성이 활발히 이루어지면서 암모니아가스 생성에 긍정적으로 작용되어 암모니아 저감에 효과가 있을 것으로 생각되며, 복합 생균제의 암모니아 감소효과를 지속적으로 유지하기 위한 방안 연구 및 감소효과에 관한 추가적 실험이 필요할 것으로 판단된다.

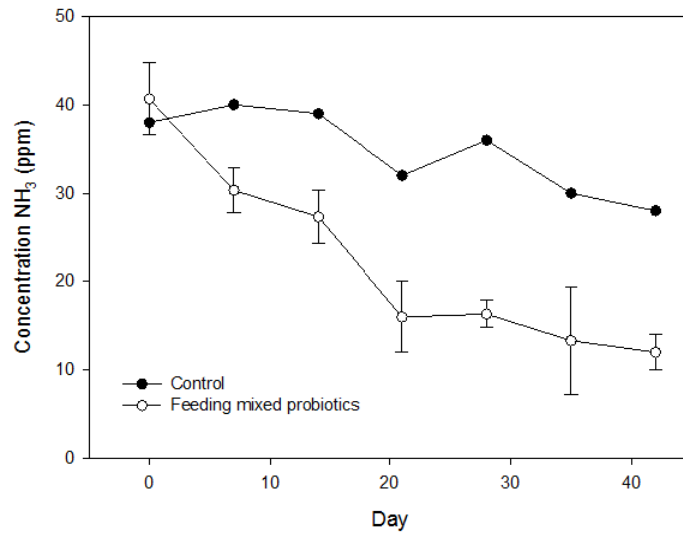


그림 18. 복합 생균제 급이에 따른 돈사 내 암모니아(NH₃) 농도 변화

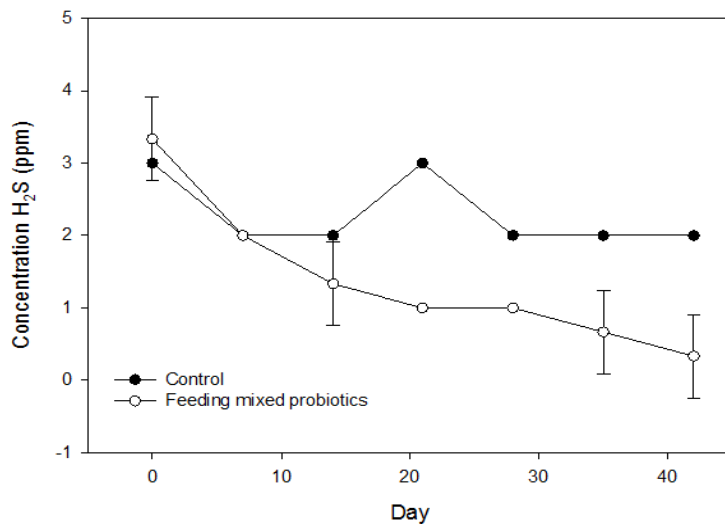


그림 19. 복합 생균제 급이에 따른 돈사 내 황화수소(H₂S) 농도 변화

7 복합 생균제 급이에 따른 슬러리 내 균총 변화

- 생균제 급이 전후의 비육 돈사의 돈분 슬러리에 존재하는 미생물 균총의 변화를 다음과 같이 나타내었다. 총균의 경우 생균제 처리구가 배양시간 경과에 따라 최소 0.6 ~ 1.8 ×

10^8 CFU/g의 범위로 대조구 $2.7 \sim 4.1 \times 10^8$ CFU/g에 비해 낮은 총균량을 보였으며 *E. coli*와 *Enterococcus sp.* 균총 수는 *E. coli*의 경우는 생균제 급여 14일 이후부터 급격한 감소 현상을 나타내었고, *Enterococcus sp.*는 생균제 급여 7일 이후부터 처리구가 50% 이상의 감소현상을 나타내었으며, 전체적으로 생균제 처리구가 대조구보다 총균수, *E. coli*와 *Enterococcus sp.* 균총수가 현저하게 낮은 경향을 나타내었다.

- 축종 분변으로부터 발생, 배출되는 질소화합물성 악취물질은 발생하는 질소의 50% 이상분뇨의 요소의 형태로 배설되므로 소화기관에서의 단백질 소화율 증진을 도모할 수 있는 소화 효소의 활용이 축사 악취 감소에 효과적일 것으로 판단되므로, 본 연구에서의 휴믹물질 함유 생균제의 활용 기회가 확대될 것으로 기대되며, 축사 환경 개선을 위한 생균제의 역할과 메커니즘에 대한 세부 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

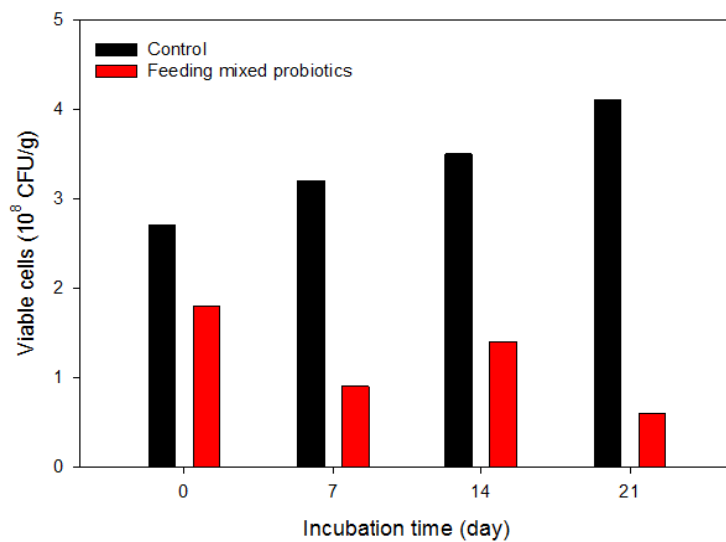


그림 20. 복합 생균제 급여에 따른 슬러리 내 총균 변화

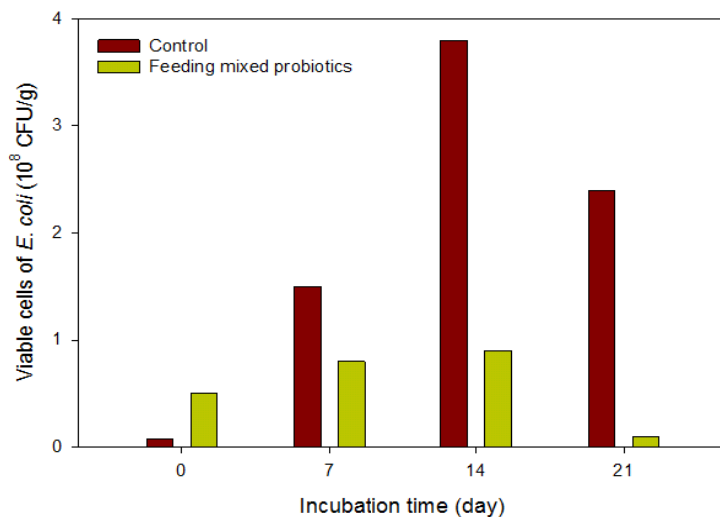


그림 21. 복합 생균제 급여에 따른 슬러리 내 *E. Coli* 변화

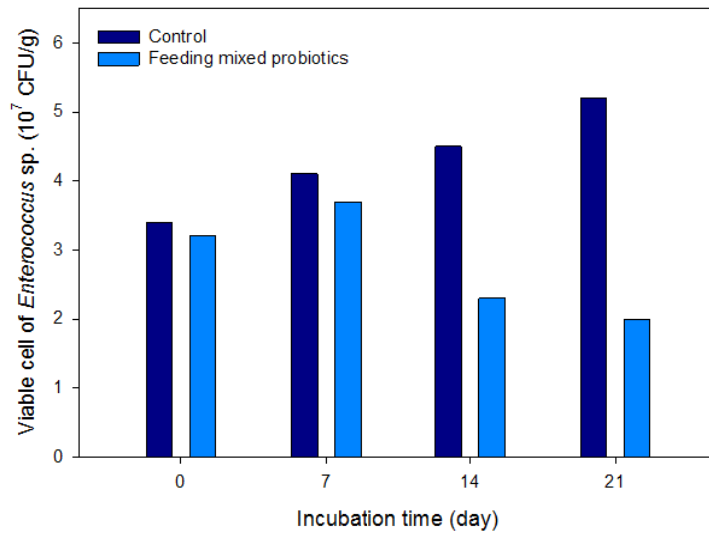


그림 22. 복합 생균제 급여에 따른 슬러리 내 *Enterococcus* sp. 변화

8. 급여에 따른 이유자돈의 일일증체율, 사료섭취량 및 사료요구율

- 휴믹산이 포함된 생균제 급여에 따른 이유자돈의 사료섭취량, 증체량 및 사료효율의 결과는 다음과 같다. 개시체중에 대하여 급여 시작 1~2주까지 증체율은 항생제 처리구 0.30, 생균제 처리구 0.26 및 무처리 대조구는 0.24로 항생제 처리구가 생균제 처리구와 무처리보다 유의하게 증체량이 증가한 것으로 나타났다 ($P < 0.05$). 그러나, 3~4주 구간에서는 항생제 처리구 0.72, 생균제 처리구 0.56 및 무처리 대조구는 0.59로서 생균제 처리구의 증체율이 가장 낮은 증체율을 나타내었다. 생균제 급여 개시 4~6주 구간에서는 생균제 처리구가 0.80, 항생제 처리구 0.76, 무처리구 0.74로 생균제 처리구가 가장 높은 증체율을 나타내었다. 종합적인 증체율에 대한 평가는 항생제 처리구가 0.58, 생균제 처리구 0.51 및 무처리구 0.49로 항생제 처리군이 가장 높았으며, 동일한 처리구에 대한 사료섭취율의 변화도 일일증체율과 변동 양상과 매우 유사하게 나타내었다. 위의 결과를 토대로 한 사료요구율은 급여 개시 1~4주까지는 생균제 처리구가 무처리구와 항생제구에 비하여 낮은 사료요구율을 나타내었으나, 4~6주 구간에서는 가장 높은 사료요구율을 나타내어 전체적으로는 무처리구보다는 낮으나, 항생제 처리구보다는 높은 사료요구율을 나타내었다. 1~15일까지는 0.3% 혼합제제 첨가구에서 항생제구보다 유의하게 높게 나타내었다 ($P < 0.05$). 생균제 급여 초기인 1~4주 동안 생균제 처리구의 상대적인 사료요구율이 낮은 것은 휴믹산 첨가에 따른 축종의 기호성 저하 및 사료 첨가 전 생균제의 보존상태 차이에 따른 것으로 사료되었다.

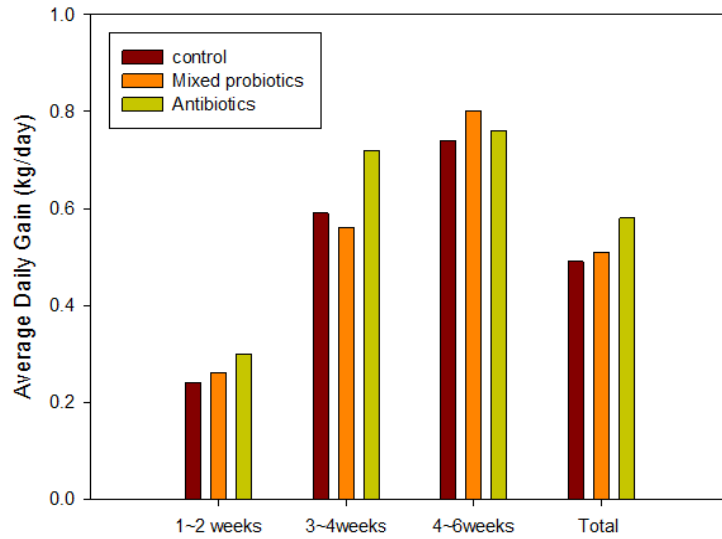


그림 23. 복합 생균제 급이에 따른 성장 개선 효과-일일증체율

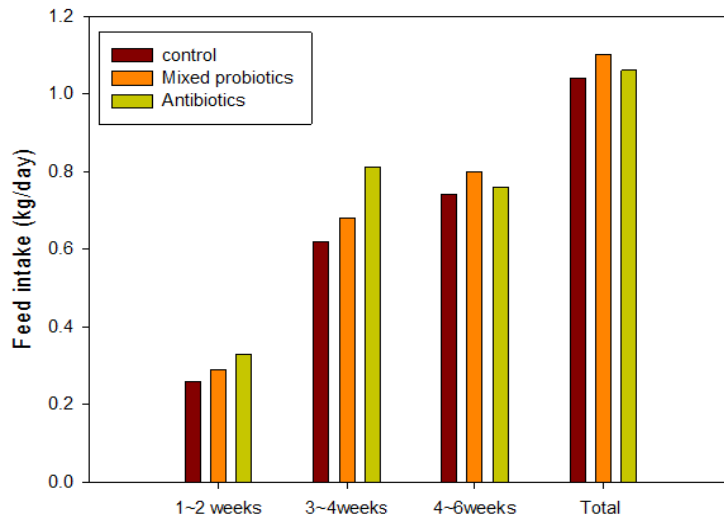


그림 24. 복합 생균제 급이에 따른 성장 개선 효과-사료섭취량

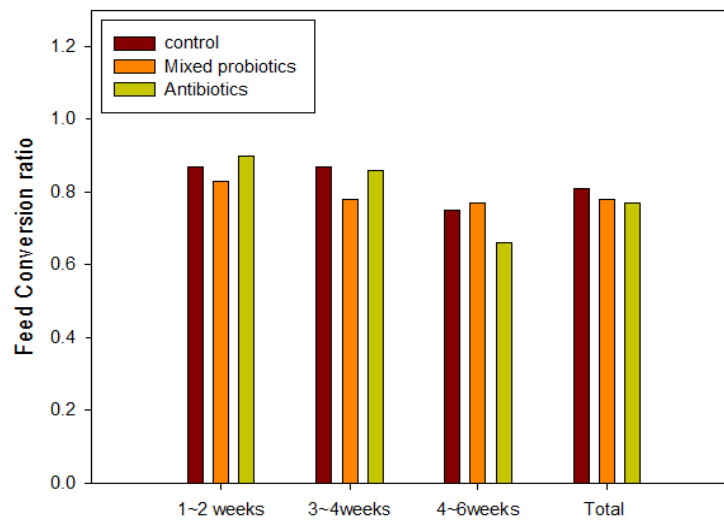


그림 25. 복합 생균제 급이에 따른 성장 개선 효과-사료요구율

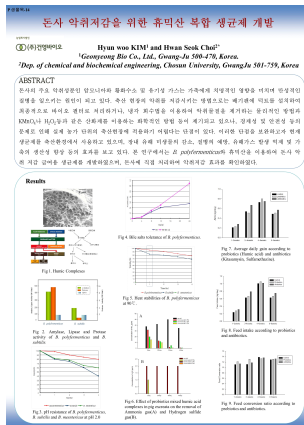
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발 목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
돈사 약취 저감 생균제 2건 이상 개발	돈사 내 약취저감을 위한 살포용(휴믹산 7%) 복합 생균제와 급이용(휴믹산 5%) 복합 생균제 등 2건을 개발	100
약취 감소율 : 암모니아 70% 이상, 황화수소 95% 이상	살포용 : 암모니아 75% 이상, 황화수소 100% 감소 함. 급이용 : 암모니아 73 ~ 75% 이상, 황화수소 100% 감소 함	100
기술 및 제품 실용화 : 1건	보조사료 제조업 1건 등록 (등록 번호 제 6460000-502-2015-0015호) 제품(GY-해머스) 개발	100

제 2절 . 정량적 성과

- 학술발표 (한국화학공학회 2015년도 봄 총회 및 학술대회)
- 보조사료 제조업 등록 (등록 번호 제 6460000-502-2015-0015호)
- 제품(GY-해머스) 개발



등록번호 제 6460000-502-2015-0015 호

보조사료 제조업등록증

대표자: 서인현 생년월일: 1961년 6월 1일
 제조업세영: 농림축산검역본부 제조업등록번호: 6460000-502-2015-0015
 휴간명: 해머스

소재지: 전라남도 곡성군 일면면 437(하이옴힐 삼일보육센터 103호)
 생산사료의 종류: 이송물체
 생산능력(1일 생산량): 0.1톤
 등록조건: 위탁 제조

2015년 6월 18일

전라남도지사



<살포용 제품>

<급이용 제품>

해머스 효능/효과	<ul style="list-style-type: none"> - 약취 감소 및 해충 발생 억제 : 축사 환경개선 - 장내 미생물총의 정상화 : 유해균의 억제, 감염예방 - 부패산물 생산 억제 : 암모니아, 아민, 인들의 감소
용법 및 용량	<ul style="list-style-type: none"> - 살포용 : 바닥재(툽밥, 왕겨) 10평당 본제 1kg 살포 - 급이용 : 사료 1톤당 1~2kg 첨가하여 급여

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

□ 성과의 활용계획

- 우수한 축산환경개선제용 미생물제의 개발에 따른 미생물산업 기술을 육성하고 고품질 축산환경개선제 이용으로 악취 저감 및 가축분뇨 처리효율 개선
- 유기축산으로 생산된 축산품 이용에 따른 국민의 건강 증진 효과를 이루고 축산 농민 및 주변의 환경개선 효과 및 삶의 질을 향상하며 고품질 상품 이용에 따른 수입대체 효과 및 수출 육성하여 국가의 경제적, 산업적 측면에서 적극 활용
- 악취저감 미생물 대량배양 ⇒ 유기 축산 및 양돈 사양관리기술 ⇒ 축산농가 현장 효과 검증 후 보급 ⇒ 악취저감 미생물제로 활용함으로써 경제적, 산업적 측면에 적극 활용
- 유기퇴비제조용 미생물 복합제로 적용확대하고 도축폐기물, 축사구비, 음식물쓰레기 등에 활용성을 검토

□ 성과의 파급효과

- 경제/산업적 측면 : 본 과제에서 개발한 시제품의 판매 및 개발된 기술을 기업에 기술이전을 함으로써 기업의 경제적인 이익에 도움을 줄 것으로 예상되고, 더불어 항생제 대체제의 수입 의존도를 감소시키고 해외 시장 개척에도 기여할 것으로 사료됨. 또한, 친환경 축산물의 생산을 통해 축산산업 및 축산물의 경쟁력을 강화할 수 있으며 이를 통해 축산물의 FTA 위기를 완화시키는데 도움이 될 것으로 기대됨.
- 농어업인/소비자 측면 : 축산활동 농민의 생산성과 수익성을 개선하고 항생제 사용 금지에 따른 불안감을 해소함으로써 농축산업에 대한 신뢰를 재구축하고 지속발전 가능한 친환경 축산으로 전환할 수 있는 계기를 마련하는데 기여할 것으로 기대됨.
또한, 소비자의 측면에서는 축산식품 안전성 향상으로 소비자가 안심하고 구매할 수 있을 것으로 보여지고, 소비자들이 단순히 가격만 보고 축산물을 구매하는 것이 아니라 구매 시 친환경/무항생제 제품을 고려하게 됨으로써 축산식품 소비의 질적 향상에도 기여할 것으로 기대됨.

□ 향후 계획

- 돈사 악취저감 실험결과의 정확성을 높이기 위해 공인시험기관에 의뢰하여 효능검사를 수행할 예정이며, 제품의 업그레이드를 위해 악취효과가 있는 식물추출물을 혼합하여 제품의 효능을 높이며, 고유기술 확보와 지식재산권 확보를 위해 특허출원을 진행할 예정임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

-해당 사항 없음-

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당 사항 없음 -

제 8 장 참고문헌

Ministry of Environment, Korea (2005). Offensive Odor Control Law.

Russell, E. G. 1979, Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(2): 187-193.

이은경, 임정수. 양돈 분뇨의 악취특성 및 문제 해결을 위한 환경개선제 사용 현황 및 전망. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 38, No. 3, 244-254 (2010)

이은영. 축산 환경개선제로 생산유통되는 생균제의 문제점 및 검증방안. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 36, No. 2, 87-95(2008).

진상근, 2005. 미생물제제를 이용한 무항생제 돼지고기 생산방법, 10-2005-0038269.

Adams, M. R. and L. Nicholaides. 1997. Reviews of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control.* 8: 227-239.

Axelsson, L. T., T. C. Chung, W. J. Dobrogosz and S. E. Lindgren. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.

Brock, T. D. and M. T. Madigan, 1988. *Biology of microorganisms*. 5th eds, Prentice-Hall International Editions, London, England.

Chang, Y.-H., J.-K. Kim, J.-H. Yoon, W.-Y. Kim, Y.-W. Choi, W.-J. Lee, Y.-B. Kim, and Y.-H. Park. 1999. Characteristics of *Lactobacillus leuteri* BSA-131 isolated from swine intestine. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 23-27.

Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 269-280.

de Vuyst, L. and E. J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria, *In* L. de Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), *Microbiology, Genetics and Applications*, Blackie Academic and Professional. Glasgow.

- Dobrogosz, W. J., I. A. Casas, G. A. Pagano, T. L. Talarico, B.-M. Sjberg and M. Karlsson. 1989. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota, pp. 283-292. In Gruff, R. *et al.*, (ed.), *The regulatory and Protective Role of the National Microflora*. Stockton Press, New York.
- Gourama, H. and L. B. Bullerman. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **58**: 1249-1256.
- Havenaar, R., B. T. Brink and J. H. J. I. Veid. 1992. Selection of strains for probiotic use, pp. 209-224. In Fuller, R. (ed.), *Probiotics : The scientific basis*. Chapman & Hall, London.
- Huttunen, E., K. Noro, and Z. Yang. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.* **5**: 503-513.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 525-532.
- King, A. D. J. and C. W. Nagel. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Fd. Sci.* **40**: 362-366.
- Lindgren, S. E. and W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 149-163.
- Morris, J. G. 1976. Oxygen and obligate anaerobe. *J. Appl. Bact.* **40**: 229-244.
- Sanders, M. E., J. K. Kondo and D. L. Willrett. 1991. Application of lactic acid bacteria, pp. 433-459. In I. Goldberg and R. Williams(ed.1), *Biotechnology and Food Ingredient*, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hollenback, R. C. 1971. Manure odor emissions when using hydrogen peroxide. Food Machinery Corp., Princeton, NJ. Rep. no.5638-R.
- Kim, K. Y., H. L. Choi, H. J. Ko, Y. G. Lee and C. N. Kim. 2006. Evaluation of odor reduction in the enclosed pig building through spraying biological additives. *J. Anim. Sci. Technol.* **48(3):467-478**.

North Carolina State University. 1997. Biofilter for removing odorous compounds in exhaust from swine buildings. Animaland Poultry Waste Management Research: A Progress Report, July 15.

United States Department of Agriculture, Agricultural Science and Education Impact. 1998. Greater harmony between agriculture and the environment. February 9.

Wu, J. J., S. H. Park, S. M. Hengemuehle, M. Yokoyama, H. L. Person and S. J. Masten. 1998. The effect of storage and ozonation on the physical, chemical, and biological characteristics of wine manure slurries. *Ozone Science and Engineering*. 20:35-50.

Bongaerts, G., R. Severijnen, and H. Timmerman. 2005. Effect of antibiotics, probiotics and prebiotics in treatment for hepatic encephalopathy, *Med. Hypotheses* **64**: 64-68.

Champbell, G. L. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds. *A Rev. Can. J. Anim. Sci.* **72**: 449-466.

Chiang, S. H. and Hsieh, W. H. 1995. Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asia-Aust. J. Anim. Sci.* **8**: 159-162.

Goossens, D., D. Jonkers, M. Russel, A. Thijs, A. van den Bogaard, E. Stobberingh, and R. Stockbrgger. 2005. Survival of the probiotics, *L. plantarum* 299v and its effect on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition, *Digest. Liver Dis.* **37**: 44-50.

Hong, J. W., I. H. Kim, O. S. Kwon, J. H. Kim, B. J. Min, and W. B. Lee. 2002. Effects of dietary probiotics supplementation on growth performance and fecal gas emission in nursi. **44**: 305-314.

Ko, T. G. 2000. Study for the development of antibiotics-free diet for weanling pigs. *Kor. J. Ani. Res. & Sci.* **42**: 37-44.

Kekkonen, R. 2008. Immuomodulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. Ph.D thesis. University of Helsinki.

Bristol Myers Squibb Company, Method for preventing or treating the development of

resiratory allergies, US-0144287.

Common wealth Scientific and Industrial Research Org. 2006. Reservation and transport of probiotic, 10-2006-70006224.

European Commission. 2005. Opinion on the use of certain micro-organisms as additives in feeding stuffs.

Food Industry Research and Development Institute. 2003. Acid-and bile salt-resistant isolates having the ability to lower and assimilate cholesterol, US-0684105.

Gnosis SPA, 2006. Method for preparing yeast microcapsule, JP-0038801.

National agriculture & food research organization, 2005. Microorganism preparation for preparing feed and its utilization, JP-0275765.

Porubcan, Randolph Stanley, 2003. Formulations to increase survival of probiotic bacteria and extend their shelf-life, US-0743402.

Wells, J. E., Yen, J. T., and Miller, D.N. 2005. Impact of dried skim milk in production diets on *Lactobacillus* and pathogenic bacterial shedding in growing-finishing swine. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 400-407.

Frost and Sullivan, 2014. Analysis of the global animal feed ingredients market

<http://aflnews.co.kr>. 미생물제제 보조사료 투자비 관련, 2013

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술료사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술료사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.