

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001254-01

발효기술을 적용한 사료첨가제 민간위탁생산시스템 구축  
(Construction of Nongovernmental CMO of Feed additives  
with Fermentation technology)

(주) 빅 바 이 오 젠

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발효기술을 적용한 사료첨가제 민간위탁 생산시스템 구축” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016 년 3월 일

주관연구기관명 : (주)빅바이오젠

주관연구책임자 : 허 강 칠

세부연구책임자 : 허 강 칠

연 구 원 : 송 인 근

연 구 원 : 장 인 환

연 구 원 : 이 상 용

연 구 원 : 박 효 정

연 구 원 : 허 회 정

연 구 원 : 박 효 정

연 구 원 : 박 신 근

연 구 원 : 신 수 만

위탁연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 김 수 기

위탁연구기관명 : 경상대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 김 삼 철



# 요 약 문

## I. 제 목

발효기술을 적용한 사료첨가제 민간위탁 생산시스템 구축

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

축산농가에 유용미생물을 적용한 발효 사료첨가제 보급을 위하여 보다 높은 효율로 생산할 수 있는 배양기법, 저비용 생산을 위한 최적 배지조성 및 배양조건, 품질평가방법에 관한 자료가 미비하여 전문화된 기술제공이 절실히 요구되고 또한 액상미생물제와 발효미생물제의 보급기술 및 현장적용 기술이 요구되고 있음.

본 과제는 축종별, 적용방법별 그리고 현장적용이 쉬운 다양한 부형제(천연 식물 및 각종 유기성 부산물)를 대상으로 한 발효 사료첨가제의 위탁생산시스템(CMO) 구축을 최종 목표로 하며 다음과 같은 연구를 수행함.

1. 유용미생물을 적용한 발효 사료첨가제 위탁 대량생산을 위한 CMO 시스템 확립
2. 식물, 부존자원 발효용 유용미생물의 선발, 효능평가 및 안전성 확보 기술보유
3. 선발된 동물용 발효 사료 첨가제의 사양실험을 통한 효능 검증과 원료 시제품의 위탁 생산 및 수익창출

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 발효 종균의 체계적인 관리를 위한 종균관리시스템 표준화
2. 유용미생물을 이용한 발효 사료첨가제 개발
3. 개발된 발효첨가제의 3종 축종에 대한 사양실험을 통한 효능 검증
4. 위탁생산된 발효 사료첨가제의 품질 확인을 위한 생균수 분석 외 추가 지표 설정
5. 위탁생산시스템(CMO)내 발효 사료첨가제의 고효율 대량생산시스템의 공정 확립 및 표준화
6. 발효 사료첨가제 생산을 계획하는 공공 기관에 대한 시설계획/생산/관리 컨설팅 메뉴얼 구축

이를 통해 거점 위탁생산체계 및 소규모 자체생산체계의 확대를 통해 경쟁력을 갖춘 전국적인 친환경 축산 인프라의 기반 조성에 기여

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 발효사료 첨가제 위탁생산 체제 구축

- 1) 종균관리시스템 관련, 동결건조 공정 개선 (적정 호제 종류 및 농도 결정)
- 2) 소량다품목/대량 위탁생산설비 보완 : 액상배양기 및 드럼형 발효기/발효실 설비
- 3) 각종 부산물을 이용한 고체발효 배합비 규명
- 4) 3종 미생물에 대한 고효율 액상배양 조건 규명 및 적합 범용 배지 조성
- 5) 맞춤형 고체 발효공정 완비
- 6) 위탁생산 실시 : 축협, 영농법인, 조합, 기업 (2014년 시작, 2015년 4곳)

##### 2. 유용미생물을 이용한 발효 사료 첨가제 개발

- 1) 미생물 범용 배양배지 4종 업그레이드 ⇒ 자가배양농가/농업법인 등에 공급
- 2) 가금티푸스 원인균 길항미생물 이용 가금용 생균제 개발 - 육계 사양실험 완료  
⇒ 특허등록
- 3) 효소활성, 병원균 길항미생물을 이용한 사료첨가제 개발
- 4) 복합발효 효소제 개발, 제품출시 및 중국내 사양실험 완료 ⇒ 중국 수출 추진중
- 5) 생물전환을 통한 생리활성물질의 사료첨가제 개발 - 육계 대상 효과검증 완료  
: 항산화물질 등의 생리 활성 발효사료 첨가제 개발 ⇒ 특허출원 및 사업화 계획중
- 6) 자가배양 또는 TMR용 발효종균제 업그레이드

##### 3. 위탁생산을 위한 고효율 액상 및 고체발효 조건 규명

- 1) 대표적 유용미생물 3종에 대한 대량배양용 범용 배지 조성
- 2) 액상배양물의 생존 연장을 위한 적정 보존제 및 처리 농도 결정
- 3) 유용미생물 동결건조체의 재생률을 증진시키기 위한 적정 동결억저제 및 농도 결정

##### 4. 유용미생물을 이용한 발효 사료첨가제 개발 및 효과 검증을 위한 지표 설정

- 1) 유용미생물 확립 및 조건 규명
- 2) 고효율 발효사료첨가제 제조 공정기술 확립 : 원료 종류별 제조 공정기술 확립
- 3) 기존의 발효 사료첨가제의 효능 평가 지표로 생균수 분석외 추가 평가지표 설정

##### 5. 개발된 발효 사료첨가제의 효과 검증과 급여체계 확립

- 1) 가금티푸스 길항미생물을 이용한 발효 사료첨가제의 육계에 대한 효과 검증
- 2) 유용미생물 혼합 발효를 이용한 발효사료첨가제의 한우에 대한 효과검증  
- 어린 송아지, 육성우, 비육우,
- 3) 유용미생물 혼합 발효를 이용한 발효사료첨가제의 돼지에 대한 효과검증  
- 이유자돈, 육성돈, 비육돈

V. 연구성과 및 성과활용 계획(단위 : 건수)

구분	특허		발효 사료첨가제			유전자원 등록	논문		기타 (학술 발표)
	출원	등록	제품 등록	위탁생산	컨설팅		SCI	비SCI	
1차 년도	목표	1						2	1
	달성	1		3		1		2	4
2차 년도	목표	2		1	1		1	2	1
	달성	2	1	1	3	1	0	3	7
3차 년도	목표	1	3	1	1	1	1	3	2
	달성	2	1	1	2	1	4	4	9
계	목표	4	3	2	2	1	1	4	6
	달성	5	2	533	5	2	6	4	6

\* 본 연구성과는 주관기관과 위탁기관에서 도출한 성과를 집계한 것임.

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타	
활 용 건 수	목표	1	2	1	3	3	
	달성	1년	2	3		3	
		2년		1		10	
		3년		1		8	1
		계	2	5		21	1

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### **Construction of Nongovernmental CMO of fermented feed additives**

In order to establish an effective CMO(Contract manufacturing organization) system achieved the four objectives, as follows:

1. Standardization of seed microbial control has been established.
2. New model case of contract manufacturing system for fermented feed additives on-demand was presented.(Several types of small amounts / Mass production)
3. Mass production process was improved and standardized to maximize the efficacy of the product and reduce production costs of fermented feed additives.
4. In addition to existing analysis of number of probiotic cells, there was supposed new analytical indicator candidates for the quality assurance of fermented feed additives.
5. Basic data and experiences were accumulated to advice in public organization like as agricultural cooperation that wish to self-made fermented feed additives.

Separately, it developed three kinds of fermented feed additives. Among them, fermented multi enzyme complex is scheduled for commercialization are currently exported to China.

#### **Research on developing fermented feed additives using useful microorganism and verifying the effect of fermented feed**

The knowledge for the cultivation technologies, medium composition, culture conditions and quality evaluation methods for production in low cost are lacked for supplying useful microorganism to livestock farmers. The production for supply of liquid and solid state fermentation microbial agents requires the field technology. The following studies were conducted to establish efficient production method of a useful microorganism along with the development of various excipients and formulation easy to apply to the field.

1. Establishing the useful microbial and identifying the conditions to develop fermented feedstuff additives.

- Establishing beneficial microorganisms such as lactic acid bacteria, bacillus, yeast, and photosynthetic bacteria to ferment plants and natural resources.
- Determining the condition of the liquid and solid state fermentations to develop fermented feed additives utilizing natural resources.

The microorganism with strong activities of digestive enzymes and anti-microbial activity were isolated from Korean cattle gastric juice, silage and seaweed powder. Feed fermentation was characterized by using lactic acid bacteria and bacillus strain, singly and mixedly in order to determine the liquid and solid state fermentation conditions.

2. Establishing high efficiency process technology to produce fermented feed additives

- Establishing processing technology according to materials of fermented feed additive.
- Establishing cultivation method through PBD (Plackett-Burman design) analysis
- Manufacturing of trial product and establishing the method for formulation

The impact on the cultivation results by the strain selected for each material of feedstuff was surveyed. The optimal mixing condition was examined based on the results. The design method for mixes, one of partial factor analysis method was used for the optimal mixing condition, and its effect was examined through variance analysis and response value was modeled using optimized tool, Finally the optimal medium composition of different features was surveyed.

3. Setting the indicator for efficacy evaluation in addition to method to identify the count of microbial in probiotic bacteria/fermented feed

- The water content, the count of microbial, pH, preservability
- Biological activity (Measurement of antioxidant activity, antimicrobial activity, and enzymatic activity)

The basic activity of various physiological activities were measured and compared on the prototype of fermented feed using single and mixed culture method. The activity of dehydrogenase which is used as indicator to determine living microorganism of soil was applied as a new evaluation method together with measuring the count of microbial which is a method to evaluate the quality of conventional feedstuff at storage temperature, 15°C and 30°C.

- Various useful strains for the fermentation of feed material were obtained from the byproducts of agricultural foods and it may be useful for the fermentation agricultural byproducts.
- The lactic acid bacteria and bacillus in mixing in a MRS medium were cultured, and antibiotic resistance spectrum which can identify the two bacteria for the quality control was established.
- Soybean meal of 3.96%, wheat bran of 19.76% and corn powder of 76.28% were derived for the optimal compounding conditions to ferment feedstuff efficiently using various strains through manufacturing process technology and PBD(Plackett-Burman design) analysis on different types of material.
- The result of measuring a variety of biological activities of the trial product manufactured confirmed that the mixed culture had high survival rate of lactic acid bacteria compared to the single culture.
- The activity of dehydrogenase, which is a new method to evaluate quality of fermented feed additives showed more active in the mixed culture compared to single culture.

**Effects of dietary supplementation of Fermented feed additive on growth performance, blood biochemical profiles and meat quality in broiler chickens, pigs and Hanwoo.**

1. The effect of fermented diets on growth performance and Fatty acid profile of broiler are as follows:
  - (1) Fermented diet supplemented groups had numerically higher feed intake, body weight gain, average daily gain and feed efficiency than the control.
  - (2) Fermented diet supplemented groups had higher myristic acid (C14:0) concentration than control, but lower pentadecanoic acid (C15:0) concentration.
  - (3) Oleic acid (C18:1n-9) concentration increased with increasing levels of fermented diet.
2. The effect of fermented diet on growth performance and blood metabolites of weaning pig are as follows:
  - (1) Final weight, gain, average daily gain and feed efficiency were numerically highest in HP treatment.
  - (2) Insulin, IgF-1 and blood glucose were highest 1% fermented diet (MP) treatment.

- (3) On 3 weeks, *Salmonella* and *E.coli* were not detected in all treatments.
3. The effect of fermented feed additives on growth performance, blood metabolites and meat quality of growing pig are as follows;
- (1) In 1.0% fermented diet (HP), feed intake and gain was lowest, but average daily gain was highest.
  - (2) Blood urea nitrogen and blood glucose were increased with increasing levels of fermented diet.
  - (3) Overall acceptability was numerically increased with increasing levels of fermented diet in raw and cooked pork loin.
4. The effect of fermented diet on growth performance and blood metabolites of Hanwoo calve are as follows;
- (1) Final weight increased with increasing levels of fermented diet.
  - (2) Average daily gain and feed efficiency were highest in 2% fermented diet (HP) treatment.
  - (3) Blood urea nitrogen increased with increasing levels of fermented diet.
5. The effect of fermented diet on growth performance, blood metabolites and meat quality of Hanwoo steer are as follows;
- (1) Gain and average daily gain were increased with increasing levels of fermented feed additives.
  - (2) In final blood metabolites, Growth hormone, total cholesterol and blood urea nitrogen were highest in HP treatment.
  - (3) Aroma and marbling score were higher than 0.5% fermented diet (LP) and 1% fermented diet (MP) treatment compared to CON treatment of raw *Longissimus* muscle.
  - (4) Oleic acid (C18:1n-9) concentration was highest in 1% fermented diet (MP) treatment.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

1. Overview of R & D projects
2. National and international technical developments
3. Contents and results of R & D projects
4. Contribution to the achievement of objectives and related fields
5. The outcomes of R & D projects and application
6. Overseas scientific and technological information gathered from the research and development process
7. Status of research facilities and equipment
8. Laboratory Safety Management Implementation Performance
9. References



# 목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약문	5
제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	399
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	414
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	415
제 7 장 연구시설·장비 현황	416
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	417
제 9 장 참고문헌	419

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

### 1. 연구개발 최종목표

최근 축산산업 환경은 곡물사료의 가격 상승과 항생제 사용 금지 정책에 따라 친환경 축산 및 사료대체원 이용을 통한 사양비 절감 및 축산물의 품질 향상과 특정 발효물질의 첨가로 육질 개선/유량 증진 및 브랜드 가치를 증진시키려는 방향으로 진행되고 있다.

근래 들어 새롭게 부상되고 있는 발효 사료첨가제는 생균제에 비해 기초 기술 및 효율적 생산공정 기술 수준이 낙후되어 있을 뿐만 아니라 생산시설이 부족한 상황이다.

본 과제에서는 특정 부산물 또는 친환경 천연물질의 발효 사료첨가제의 위탁생산시스템을 구축하여 ①기초기술 개발자에게는 시설의 초기 투자없이 창업 및 도약의 기회를 제공하고 ②위탁생산 의뢰자에게는 의뢰물의 원활한 생산-공급을 통하여 축산업의 질적 향상을 도모하며 ③ 기술이전을 통하여 자가 생산을 기획하는 신규 공익성 기관에 시설 투자에서 생산/운영에 이르는 노하우를 컨설팅하여 성공적인 생산체계 구축을 지원함으로써 친환경 축산의 기반 인프라를 구축하는 공익적 요소를 접목한 민간기업의 새로운 방향성을 제시하고자 한다.

이를 위해 본 과제에서는

가. 발효 사료첨가제 생산을 위한 특정 유용 미생물에 대한 지적재산권을 보유한 위탁생산 의뢰자 및 위탁생산시스템에서 사용하는 종균의 체계적인 관리(활력유지, 보관, 기밀유지 등)를 위한 종균관리시스템을 표준화 한다.

나. 위탁생산 수요조사를 통하여 적용하고자하는 발효원에 대한 유용미생물과 이를 이용한 발효 공정의 개발과 대량생산시스템을 이용하여 생산된 발효 사료첨가제의 사양실험을 통한 검증을 통하여 주문형 발효 사료첨가제의 위탁생산 모델 케이스를 제시한다.

다. 위탁생산(CMO)의 생산원가 절감 및 제품 효능을 극대화 하기 위한 발효 사료첨가제의 고효율 대량생산시스템의 공정 개선 및 표준화를 구축한다.

라. 발효 사료첨가제의 품질 검증을 위한 기존 생균수 분석외의 추가 지표 분석 항목을 설정한다.

마. 향후 자체 생산을 도모하는 소규모 영농 법인 및 공적 기관의 자체생산에 관련한 시설 설

계 및 공정에 관련한 컨설팅 메뉴얼을 구축한다. 이를 통해 의뢰 → 자체 생산 → 신규 의뢰의 순환구조를 형성시켜 거점 위탁생산체계 및 소규모 자체생산체계의 확대를 통해 경쟁력을 갖춘 전국적인 친환경 축산 인프라의 기반이 마련될 것임.

## 2. 발효 사료첨가제 위탁생산시스템 구축 필요성

### 가. 축산업 지원 사업의 문제점

#### (1) 각 지자체 농업기술센터에서 액상 미생물을 배양하여 농가에 보급

- 주로 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* 또는 *L. plantarum* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 등을 이용하나 대다수 농업기술센터에서 효능이 입증된 균주를 종균으로 사용하지 않음

(2) 배양 및 공급에 치중하여 충분한 생균수 분석 없이 공급하는 실정으로 비용 대비 효율이 떨어지고 있음.

### 나. 발효 사료첨가제의 생산 문제점

#### (1) 대부분의 TMR 사료 공장의 경우, 맥주박이나 감귤박 등의 자체 발효 후 사용

- 전문인력 없이 배양하여 발효물의 제품의 균일성이 없음

- 액상 종균의 경우, 일부에서는 FRP 재질의 배양기에서 직접 배양하여 사용  
→ 잡균의 오염으로 인한 안전성 문제 발생 소지를 안고 있음

#### (2) 기존의 고체발효기 : 온도제어가 불충분하여 많은 경험과 노하우가 필요함

→ 살균/온도제어/공기주입 제어/교반의 control이 쉬운 고체발효기 교환 필요

#### (3) 부산물 발효에 대한 현장 적용 기술의 부재 --> 효능의 극대화 부족

#### (4) 축종별 / 사양목적별 적용 종균의 다양성 부족 및 기초 결과 부재

⇒ 액상 종균의 관리가 철저한 표준화된 생산시스템에서의 발효 사료첨가제 생산 필요

전문인력의 연구 지원 및 표준화된 QC 체제하에서의 사료첨가제 생산 요구

기초연구기관과의 협력하에 연구개발을 병행한 지속적인 생산시스템 필요

⇒ 거점 위탁생산시스템(CMO)의 구축과 운영으로 문제점 극복 및 축산인프라 기반 조성

### 3. 연구범위

가. 주관기관 : 위탁생산 시스템의 전반적인 구축 및 매뉴얼 작성

(1) 표준화된 종균관리시스템 구축 및 매뉴얼

- 위탁 생산용 종균의 보안/보관 관리 체계
- 종균의 활력 유지 조건 파악

(2) 고효율 발효 사료첨가제 대량생산시스템의 정립/구축 및 위탁생산 체제 완성

- 미생물 종균의 고효율 액상 배양 조건
- SSF를 이용한 발효 사료첨가제의 대량생산공정의 공정 확립 및 표준화
- 발효 사료첨가제의 저장성 연장

(3) 미생물 발효제(starter)의 생산공정 개선 및 제제의 다변화

- 액상 및 수화제 starter 제형 개발
- 수화제 종균의 전처리 공정의 개선을 통한 수율 증진

(4) 생산 제품의 기존의 생균수 외, 추가 효능평가 지표를 반영한 생산 제품 QC 적용

- 발효 사료첨가제의 품질 확인을 위한 추가 지표를 반영한 QC 매뉴얼 확립

(5) 주문형 발효 사료첨가제 위탁생산 모델 체계 구축

- 적용 목적에 맞는 유용미생물 선정 / 발효공정 구축 / 사양실험을 통한 검증

(6) 발효 사료 첨가제 생산 관련, 생산량 및 발효원에 대한 적정 시설/장비/운영 컨설팅 매뉴얼 구축

- 적정 시설 용량 기획에 따른 설비 구축 및 생산 운영 노하우 전수 모델 (공익성 기관에 한정)

나. 제1 위탁연구기관 : 유용미생물을 이용한 발효 사료 첨가제 개발 및 발효사료  
효과 검증을 위한 지표 설정

(1) 발효 사료 첨가제 개발을 위한 유용미생물 확립 및 조건 규명

(가) 식물, 부존자원 발효용 유산균, 바실러스, 효모, 광합성세균 등 유용미생물 확립  
- 식물, 부존자원 발효용 유용균주 탐색 및 확립

(나) 범 부존자원 활용 발효사료첨가제 개발을 위한 액상발효 및 고상발효 조건 규명  
- 액상발효 조건 : 유용균주에 대한 단독배양 최적 조건 및 경제적 혼합배양법 확립  
- 고상발효 조건 규명: 미강, 쌀겨, 버섯폐배지, 과일박, 한방추출부산물, 유박,  
당밀, 분말왕겨,

비지 등 기타 식품가공부산물을 혼합한 유용미생물 발효 및 발효 사료 첨가제 개발

(2) 고효율 발효사료첨가제 제조 공정기술 확립

(가) 발효사료첨가제 원료 종류별 제조 공정기술 확립  
- 원료전처리, 가공, 후처리, 저장 중 QC공정 확립

(나) PBD(Plackett-Burman design)분석으로 배양법 확립  
- 원재료, 보조원료, 온도, 습도, 배양기간을 요인들로 한 배양특성 분석 및 배양법

(다) 시작품제작 및 제형화 방법 확립

(3) 기존의 생균제/발효사료내 생균수 분석방법 외, 효능 평가 지표 설정

(가) 수분함량, 생균수, pH, 보존성

(나) 생리활성 (항산화 활성, 항균활성, 효소활성) 측정

다. 제2 위탁연구기관 : 발효기술을 적용한 사료첨가제의 축종별 현장 적용시험

(1) 개발된 발효 사료 첨가제의 육계에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

(가) 육계의 성장에 미치는 효과 검증

(나) 육계의 소화율에 미치는 효과 검증

(다) 육계의 사료 효율에 미치는 효과 검증

(라) 육계의 항질병성 및 악취저감에 미치는 효과 검증

(2) 개발된 발효 사료첨가제의 육성비육돈에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

- (가) 육성비육돈의 성장에 미치는 효과 검증
- (나) 육성비육돈의 소화율에 미치는 효과 검증
- (다) 육성비육돈의 사료 효율에 미치는 효과 검증
- (라) 육성비육돈의 항질병성 및 악취저감에 미치는 효과 검증

(3) 개발된 발효 사료첨가제의 한우에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

- (가) 한우의 성장에 미치는 효과 검증
- (나) 한우의 소화율에 미치는 효과 검증
- (다) 한우의 사료 효율에 미치는 효과 검증
- (라) 한우의 항질병성 및 악취저감에 미치는 효과 검증

## 제 2 절 연구성과 목표 대비 실적

	평가내용	착안점 및 기준	실적	가중치 (%)
1	종균의 표준관리시스템 확립	종균의 안전 보장 및 비밀 유지를 위한 관리 체계	KACC 벤치마킹 관리체계 구축	4
		종균의 활력 유지 및 균일성 유지를 위한 계대 체계 확립	정기 점검 및 보관용/종균용 분리 체계	4
		종균의 장기적인 안전한 보관 체계 구축	동결건조 시스템을 도입한 운영 시스템 구축	4
2	발효 사료 첨가제 개발 (Lab scale)	식물, 부존자원 발효용 유용 미생물 분리/등정	6종의 유용미생물 유전자원 등록	5
		유용균주에 대한 단독배양 최적 조건 확립 및 경제적 혼합배양법 확립 규명	10 <sup>8</sup> cfu/g 이상 범용배지 조성	5
		미강, 쌀겨, 버섯폐배지, 과일박, 한방추출부산물, 유박, 당밀, 분말왕겨, 비지 등 기타 식품가공부산물을 혼합한 유용미생물 발효 및 발효 사료 첨가제 개발	소맥피/옥태말분 (효소제) 탈지대두박 (생리활성제) 버섯폐배지 (TMR용 발효사료)	10
	위탁생산시스템에서 생산한 시제품의 사양실험 결과 제시	3종 가축대상 실시	15	
3	발효 사료첨가제의 고효율 대량생산 시스템 공정 개선 및 표준화	고효율 종균 액상배양을 위한 저가형 미생물배지 개발	6종의 배지 개발	3
		표준화된 고효율 고상배양시스템 개발	10 <sup>8</sup> cfu/g 이상	10
		발효용 종균의 다양한 제형의 stater 개발	액상/수화제 /혼합종균제 개발	5
		위탁생산시스템 (CMO) 운영 모델 제시	축산박람회 참가 홍보	15

4	발효 사료첨가제 품질 평가를 위한 신규 지표 제안 및 QC 반영	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존의 생균수 분석 결과를 보완할 대사적 효능 반영 지표 제시 (생리활성 지표)</li> <li>- 위탁생산시스템(CMO)에서의 QC 반영</li> </ul>	생리활성 지표 후보 6개 제시 (탈수소효소활성, pH 등)	10
5	자가생산 희망 공공법인에 대한 컨설팅 매뉴얼	- 기초 기술이 부족한 자가생산 희망 공공 기관에 대한 맞춤형 컨설팅 시스템 제시	단위축협 사료공장, 영농법인 대상으로 컨설팅 제공	10
6	주분형 발효 사료첨가제의 위탁 생산 시스템 모델 제시	- 수요처의 발효원에 대한 적정 유용미생물 선정으로부터 발효제 개발, 사양실험, 대량 위탁생산에 이르는 맞춤형 발효사료첨가제 위탁생산시스템 모델 제시	소량/다품목 대량 위탁생산 체제 구축	20



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 축산환경

1. 최근 국내 축산업은 식생활의 서구화 및 소비자의 기호 변화 등으로 인하여 지속적으로 성장하여 왔으며, 농업 전반에 차지하는 매우 커져 2009년 기준 가축별 생산액은 돼지 5조원, 한우 4조원, 닭 2조원으로 증가하였음(농림수산식품부).

2. 국내 축산농가의 경우, 밀식사양 등으로 인한 면역력 감소와 질병 전파율의 확대, 급격한 기후 변화 등으로 폐사율이 증가하고 있음. 증대 등으로 인하여 가축생산성이 저하되고 있음.

3 미국, 오스트리아, 일본 그리고 우리나라의 가축 사육두수와 국토면적을 비교하였을 경우, 소의 경우 한국이 31마리/km<sup>2</sup>로 가장 많고 돼지의 경우에도 96마리/km<sup>2</sup>으로 26.53마리, 6.65마리, 0.29마리를 사육하는 일본, 미국, 호주에 비하여 매우 높은 실정.

4. 밀집사육으로 인한 사육동물의 면역력 감소와 질병 전파율의 확대, 급격한 기후 변화 등으로 사육 동물의 폐사율이 최근 들어 증가하고 있음. 따라서 이유시기에 효과적인 면역증강을 통한 성장촉진용 사료 첨가제의 개발로 질병에 대한 저항성을 극대화시킴으로써 매년 발생하는 엄청난 비용의 경제적 손실을 줄일 필요가 있음. 열악한 사육환경으로 인한 구제역, 콜레라등과 같은 전염병의 빈번한 발생으로 인하여 도산 농가가 속출하고 있으나 현재로서는 이를 획기적으로 억제할 수 있는 뚜렷한 방법이 도출되어 있지 않음

### 제 2 절 생균제 및 발효사료 첨가제 기술동향

1. 1990년대 후반부 이후, 생균제에 대한 지속적인 연구로 다수의 논문 및 특허가 발표되고 축산 현장에 도입되었음, 초기에는 Bacillus 속 균주가 주로 이용되어 가축의 생산성 증대에 기여하였으며, 최근에는 항생제 대체제로 부각되면서 질병억제, 면역력 증강 등에 관심이 집중되면서 유산균 속의 유용미생물이 생균제의 주요 균주로 사용되고 있음. 또한 악취 저감 및 축산분뇨의 효과적인 처리를 통한 축사환경 개선에 광합성 세균이 널리 사용되고 있으며 일부 질산화 세균을 적용하는 시도가 이루어지고 있음.

2. 가축질병 제어를 위한 예방용 사료첨가제로서 미생물, 효소, 식물추출물 등 천연자원들

이 주로 사용되며, 이들은 기존의 화학 성장촉진제를 감소시킬 수 있고 환경오염을 또한 줄일 수 있으며 기존의 성장촉진제와는 달리 가축 및 인체에 있어서 병원성 세균들에 대한 내성을 유발하지 않고 가축의 성장을 촉진시킬 수 있는 성장촉진제(growth promoter)로서 각광받고 있고, 농가현장 수요가 급증하고 있음

3. 미국의 다이어몬드-XP 제품이 국내에 소개/시판되면서 yeast culture를 포함한 미생물 배양체 및 효소제의 중요성이 부각되고 있음.

4. 발효 사료 첨가제는 생균제의 유용미생물의 기능외에 미생물의 체외 대사물과 발효과정에서 생성되는 생물전환물질에 의한 항생제 대체 기능 뿐만아니라 생산성 증대 등의 부수적인 효과를 기대하고 있음.

5. 최근 들어서는 생균제와 천연식물 및 유기성 부산물들을 이용한 발효첨가제 개발이 주로 이루어지고 있으며 주목적은 사료 대체에 의한 원가 절감과 가축의 질병억제에 대한 효능을 동시에 기대하고 있다. 그러나 한방 부산물, 인동속과 같은 천연식물들은 아직까지 발효대사물 보다는 그 자체, 또는 추출물 형태로 사용되고 있으며 근래에 이들 천연 식물에 대한 발효 연구가 다수 시도되고 있다.

### 제 3 절 생균제 및 발효 사료첨가제 시장 제품

1. 유기산제제 (acidifiers), 생균제 (probiotics), 프리바이오틱스 (prebiotics) 등의 사료첨가제들을 산업 현장에서의 사용이 증가되고 있고 우리나라는 생균제가 동물용의약품으로 관리되어오다가 2000. 7. 8일 농림부령 제 1368호에 의해 보조사료로 지정 및 판매 허용됨. 이에 생균제 제조업체가 급증하면서 품질 신뢰도에 대한 축산농가의 불만이 증가하고 있음. 따라서 생균제 품질관리 규격 가이드라인 보완 및 정확한 분석기법 개발 필요함

2. 기존의 생균제 및 발효 사료첨가제 제품들은 제조회사들이 영세하여 열악한 생산시설 환경과 생산 공정의 비효율성과 공정의 표준화부재 및 저장성 연장 기술의 부재로 제품에 대한 보증이 원활히 이루어지지 않고 있는 실정임.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

<주관기관, 빅바이오젠>

### ■ 1차년도 연구개발내용

#### 제 1 절 표준화된 종균관리시스템 구축 및 매뉴얼

##### 1. 연구방법

###### 가. 위탁생산용 균주의 보안/관리 체계

(1) 보안/관리 체계 벤치마킹 : 국내의 종균센터 중 신뢰성을 확보함과 동시에 본 과제와 유기적인 관계를 유지할 수 있는 국립농업과학원 산하 농업유전자원센터 미생물 은행(KACC)의 특허균주 기탁에 관련한 행정관리 시스템과 운영시설 및 장비를 견학함. 이를 통해 본 연구과제의 발효사로 또는 액상 발효종균의 위탁생산 의뢰자의 유용미생물 자원에 대한 보호/폐기 운영 시스템의 구축 방안과 동시에 본 연구기관에서 보유중인 위탁생산용 종균의 안정적인 보관 및 재생에 필요한 필수 요인들을 본 연구과제의 종균관리 시스템에 차용하여 접목함.

###### 나. 유용미생물의 분리/동정 및 기보유 균주의 기능성 파악

###### (1) 유용미생물 균주 분리 및 배양방법

자사에서 기보유한 균주 외에 새로운 균주 분리를 위해 산토양, 하우스토양, 돼지분변 등에서 각종 시료를 채취한 후에, 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl)에 현탁 시켰다. 바실러스속은 NB agar, 유산균 속은 MRS agar, 효모균 속은 PDB agar에 희석액 0.1ml를 첨가하여 유리병으로 도말하여 2일 배양한 후, 균주를 분리하였다.

###### (2) 가축 병원성 미생물 배양

병원성미생물은 *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus simmuns*, *Listeria monocytogens*, *Mammheimia haemolytica type A*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida type A*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium* *Staphylococcus aureus*를 LB agar에 35℃에서 계대배양하여 사용하였다.

### (3) 항균활성 검정

유산균 속은 병원성세균의 항균활성을 통한 균주 선발을 하였다. *Salmonella gallinarum* 외에 병원성 세균을 LB broth에 전 배양하여, LB agar에 세균현탁액( $1.0 \times 10^6$  cfu/ml)  $10 \mu\text{l}$ 을 퍼지지 않게 주입한 다음 도말하였다. 직경 5mm의 Cokr Borer를 이용하여 구멍을 내었으며, MRS broth에서 1일 배양한 배양액을 시린지 필터( $0.2 \mu\text{m}$ )에 여과하여 각각  $200 \mu\text{l}$ 를 첨가하여,  $35^\circ\text{C}$ , 20hr 후에 clear zone의 지름을 측정하였다.

### (4) Amylase/Glucoamylase 활성 균주

2.0% soluble starch 첨가한 Nutrient agar 배지를 조제하였으며,  $35^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양한 후에, Gram's iodine을 균체를 배양한 녹말 한천 평판상에 한방울 씩, 떨어뜨려 균체 주위에 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다. 대부분 효모는 amylase 분해능이 없으므로 같은 방법으로 glucoamylase 분해능을 관찰하였다.

### (5) Protease 활성 균주

1.0% skim milk 첨가한 Nutrient agar 배지를 조제하였으며,  $35^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양한 후에 균체 주위에 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

### (6) Cellulase 활성 균주

0.5% carboxymethyl cellulose를 함유한 Nutrient Broth agar에 접종하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다. 배양된 균들의 replica plate를 만들고 24시간 동안 배양한 후에, Gram's iodine을 균체를 배양한 녹말 한천 평판상에 한방울 씩, 떨어뜨려 균체 주위에 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

### (7) Xylanase 활성 균주

1.0% oat spelt xylan(sigma)를 함유한 Nutrient Broth agar에 접종하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양한 후에, Gram's iodine을 균체를 배양한 녹말 한천 평판상에 한방울 씩, 떨어뜨려 균체 주위에 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

### (8) Phytase 활성 균주

Phytase screening medium agar(glucose 1.5%, calcium phytate 0.5%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, KCl 0.05%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001%,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001%,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5%, agar 2%)을 조성하였으며, 10N NaOH로 pH 5.5으로 조정하여,  $121^\circ\text{C}$ , 15분 멸균하여 agar 배지를 조제하였다.  $35^\circ\text{C}$ , 2일 경과 후 주변에 clear zone이 큰 균주들을 선발하였다.

### (9) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 가용화 균주

불용성 인산염 가용화 미생물 분리에 사용된 PVK 배지의 조성은 glucose 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.02%, KCl 0.02%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, agar 2%, yeast extract 0.05%, pH 7.0으로 조정하여, 불용성 인산 염으로 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5%를 각각 첨가하여 agar배지를 제조하였으며, 35℃, 2일 경과 후 주변에 clear zone이 큰 균주들을 선발하였다.

#### (10) Hydroxyapatite 가용화 배지조성

불용성 인산염 가용화 미생물 분리에 사용된 PVK 배지의 조성은 glucose 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.02%, KCl 0.02%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, agar 2%, yeast extract 0.05%, pH 7.0으로 조정하여, 불용성 인산 염으로 Hydroxyapatite 0.5%를 각각 첨가하여 agar배지를 제조하였으며, 35℃, 2일 경과 후 주변에 clear zone이 큰 균주들을 선발하였다.

#### (11) 유용 미생물 종균(유산균, 바실러스, 효모)의 분리 후보균주 동정

선별한 균주(BBG L1, L29, L30, B1, B5, Y3, Y6)의 동정을 위해 생태학적, 생화학적 특성을 검토하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참고하여 균주 특성을 조사하였으며, 생화학적 실험은 Lactobacillus 속은 API50 CHL medium, Bacillus 속은 API50 CHB/E medium, Saccharomyces 속은 API20 C AUX Kit system을 이용하여 조사하였고, 유산균(BBG L1, L29, L30) 바실러스(BBG B1, B5)속의 균주동정은 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석하였으며, 효모(BBG Y3, Y6)속의 균주동정은 18S rDNA 유전자 염기서열을 분석하였다.

**다. 미생물 종균 대표 3종(유산균, 바실러스, 효모)의 동결건조를 통한 Ampule 제작 및 revival**

##### (1) 동결건조보호제 첨가 제제결정.

유산균, 바실러스, 효모를 배양한 배양액을 생균수 측정(cfu/ml)를 측정하였으며, control은 첨가물 대신, 증류수를 첨가하여 사용하였다. 첨가제 농도는 skim milk 10, 20, 30%, peptone 10, 20, 30%, tryptone 10, 20, 30%, soluble starch 10, 20, 30%, casein 10, 20%, soybean flour 10, 20%,으로 하였다. 동결건조 보호제가 첨가된 시료를 -60℃로 동결시킨 다음, 동결 건조기에서 동결 건조하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화 시킨 다음, 생균수를 측정하여, 동결건조 후의 생존율(%)을 측정하였다. 균주관리에 중점을 두기 위해, 앰플 제조 방법과 같은 배양액에 첨가물을 첨가하는 방법으로 진행하였다.

## (2) 동결건조보호제 최적농도 결정.

1차 테스트에 결과에서 좋게 나온 peptone을 유산균은 20%가 되게, 바실러스와 효모는 각 10% 농도가 되게 첨가하여 1차 방법과 같은 방법으로 실험하였다. 보호제의 상승효과를 점검하기 위해 control(무첨가), arabinose 1, 5%, cellobiose 1, 5%, corn starch 1, 5%, dextrin 1, 5%, fructose 1, 5%, galactose 1, 5%, glucose 1, 5%, lactose 1, 5%, maltose 1, 5%, mannose 1, 5%, soluble starch 1, 5%, sucrose 1, 5%, trehalose 1, 5% 첨가하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화 시킨 다음, 생균수를 측정하여, 동결건조 후의 생존율(%)을 측정하였다.

## (3) 동결보호제 첨가 제제결정.

동결보존제가 첨가된 시료를 적정농도로 첨가하여, -20℃로 동결시킨 후, 30일 경과 후에 실온에 녹여 생균수를 측정하여, 동결 후의 생존율(%)을 측정하였다. 유산균, 바실러스, 효모를 배양한 배양액을 생균수(cfu/ml)를 측정하였으며, control은 첨가물 대신, 증류수를 첨가하여 사용하였다.

## (4) 동결보호제 최적농도 결정.

동결보존제 1차 테스트결과 유산균은 glycerol, mineral oil를, 바실러스는 galactose, glycerol, mineral oil를, 효모는 glycerol, sucrose, trehalose를 10, 15, 20, 25, 30, 40% 농도로 배양액에 첨가하여 적정농도로 1차 테스트와 동일한 방법으로 진행하였다. 또한 각 시료를 혼합하여 용해가 되는 제형만 사용하여, 혼합 시 시너지 효과를 관찰하였다.

## 2. 연구결과

### 가. 위탁생산용 균주의 보안/관리 체계

#### (1) 균주 보안관리 시스템 구축에 관련한 벤치마킹 포인트

- ① ISO 9001 체제를 접목한 종균 관리 시스템 가동
  - 미생물자원관리 업무지침서를 중심으로 실시
- ② 종균의 비밀/누출 방지를 위하여 중요 균주에 대해서는 ampule 저장설비에 시건장치 설치
- ③ 미생물 그룹별로 별도 관리
- ④ 미생물 자원관리 실명제 실시

(2) 본 연구과제에서의 보안/운영관리 : KACC 미생물 자원관리 업무지침서 중 [특허균주 관리] 부분 차용하여 본 과제 시스템에 적용



(3) 종균관리 시스템 적용을 위한 시설/장비 보완

- ① 100L Autoclave 및 Clean bench(biosafety급) 추가 도입(자체 제원)
- ② 동결건조기, 원심분리기 등을 도입하여 연구개발활동과 병행 (과제 연구비)



- ③ 연구소 면적 확대 : 사무실의 신축 건물 2층으로의 이전을 통한 공간 확보  
[ 60 m<sup>2</sup> → 140 m<sup>2</sup> ]



- (4) 보완사항 : 초저온냉동고는 산업용 장비로서 종균 관리시스템 적용에는 비효율적  
→ 과제종료기간 전에 보완 필요

## 나. 유용미생물의 분리/동정 및 기보유 균주의 기능성 파악

유산균, 바실러스, 효모의 유용균주 분리를 위해, 유산균은 병원성 미생물에 대한 항균활성효과를 검정하여 균주를 선택 하였으며, 바실러스는 유기물 분해(효소분비능) 능력과 병원성미생물에 대한 항균활성에 효과가 있는 균주를 선택하였고, 효모는 유기물분해 능력을 검증하여, 분해 능력을 가지고 있는 균주를 선택하였다.

### (1) 병원성 미생물에 대한 유산균의 항균활성 조사

육계 사육시, 가장 큰 문제가 되는 가금티푸스, 추백리 등의 원인병원균인 *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*에 대한 항균활성 테스트를 하였으며, 그 결과 *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*의 3종에 대해 모두 항균활성이 나타나는 것은 BBG L1, 30, 39로 나타났고, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*의 2종에 대해 항균활성이 나타나는 것은 L29, L37으로 나타났으며, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*의 2종에 대해 항균활성이 나타나는 것은 L36으로 나타났다. *Salmonella gallinarum*의 1종에 대해 항균활성이 나타나는 것은 L5로 나타났다 (Table 1).

### (2) 길항 유산균의 분리 및 병원성 미생물에 대한 항균 스펙트럼 조사

유산균의 항균활성 실험에서, 항균활성이 높게 나온 BBG L1, L5, L29, L30, L36, L37, L39에 대해 병원성 미생물인 *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus simmuns*, *Listeria monocytogens*, *Mammheimia haemolytica type A*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida type A*에 대한 항균 스펙트럼을 조사하였으며, 그 결과 BBG L1은 14개의 병원성 균주 중 12개의 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 나타냈으며, L29는 11개의 병원성 미생물에 대한 항균효과를 나타냈고, L30은 L1과 같이 12개의 병원성 미생물에 대한 항균효과가 높게 나타났다 (Table 2, Fig. 1).

이와 같이 육계에 문제가 되는 *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*에 대한 항균활성이 높을 뿐 아니라, 전반적으로 다른 병원성 미생물에 다양한 항균활성이 높은 BBG L1, L29, L30를 이용하여, 균주동정을 진행하였다.





**Fig. 1. Antibacterial activities of the isolated bacteria.**

**Table 1 Antibacterial activities of the each isolated lactic acid bacteria strains against animal pathogens.**

BBG No	Source	<i>Salmonella gallinarum</i> (mm)	<i>Salmonella pullorum</i> (mm)	<i>Salmonella typhimurium</i> (mm)
1	Cecal of chick	9	15	12
2	KACC10771	0	0	0
3	Cecal of chick	0	15	0
4	Cecal of chick	0	0	0
5	Cecal of chick	12	0	0
6	Cecal of chick	0	0	0
7	Cecal of chick	0	12	0
8	Cecal of chick	0	13	0
9	Dung of chick	0	0	0
10	Dung of chick	0	0	0
11	Dung of pig	0	0	14
12	Dung of pig	0	0	13
13	Dung of pig	0	12	0
14	Dung of pig	0	0	0
15	Soil of forest	0	13	0
16	KACC91016	0	14	0
17	KCTC3600	0	9	0
18	KCTC3145	0	9	0
19	Soil of forest	0	15	0
20	Soil of forest	0	9	0
21	Soil of forest	0	0	0
22	Soil of forest	0	0	0
23	KCTC3928	0	12	0
24	KCTC3109	0	14	0
25	KACC10779	0	0	0
26	KACC10251	0	11	0
27	KCTC3112	0	13	0
28	KCTC3194	0	14	0
29	KCTC3018	0	12	9
30	Cecal of chick	11	13	13
31	Dung of chick	0	12	0
32	Dung of chick	0	13	0
33	Dung of pig	0	0	0
34	Dung of pig	0	15	0
35	Dung of pig	0	0	0
36	Dung of pig	9	12	0
37	KACC10773	0	14	9
38	KACC10213	0	13	11
39	Soil of forest	9	13	13
40	KACC10557	0	0	0

**Table 2. Antibacterial spectrum of isolated lactic acid bacteria strains BBG I(1, 5, 29, 30, 36, 37, 39). against pathogens**

	1	5	29	30	36	37	39
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Bacillus cereus</i>	10	10	10	0	0	0	11
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	18	13	15	14	11	14	0
<i>Escherichia coli</i>	13	0	13	13	0	0	0
<i>Haemophilus parasuis</i>	14	15	12	11	11	12	13
<i>Haemophilus simmuns</i>	14	18	19	16	15	18	17
<i>Listeria monocytogens</i>	18	16	12	15	0	12	14
<i>Mammheimia haemolytica type A</i>	14	14	12	11	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	14	0	0	0
<i>Pasteurella multocida type A</i>	13	13	11	14	11	12	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	9	11	0	14	11

(3) 바실러스 균주의 유기물 분해능 *Bacillus*속의 미생물들은 체외 분비효소인 cellulase, xylanase, lactase 등을 분비하여 난분해성 물질을 분해하고 이를 탄소원으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라(Kim et al., 1995; Kim et al., 2004; Lee and Choi, 2006) iturin, surfactin, fengycin, bacillomycin과 같은 항균성 항생물질을 생산하기 때문에 병원성 미생물 방제효과를 기대할 수 있다. 그러므로 병원성 미생물에 대한 항균 효과 뿐만 아니라, 유기물 분해 효과도 중요하다고 판단되어, 유기물 분해 테스트를 실행하였다.

바실러스에 의한 유기물(protease, amylase, cellulase)분해 효과에 대한 조사한 결과, protease 분비효과는 B5> B1> B20의 순으로 높게 나타났으며, amylase 분비효과는 B5> B4=B15= B22 순으로 나타났고, cellulase 분비효과는 B5> B2> B1> B20> B25 순으로 나타났다. 종합적으로 판단했을 때, protease, amylase, cellulase를 모두 분비하는 미생물에 대한 효소분비 능력은 BBG B 1, 5, 20, 25의 균주가 뛰어 났다(table 3).

Protease, amylase, cellulase의 효소분비가 높게 나타난 BBG B1, 5, 20, 25의 균주를 이용하여 xylanase, mannanase, phytase의 효소분비 효과를 검사하였으며, 그 결과 xylanase에 대한 효소분비는 B5> B1> B20> B25의 순으로 나타났으며, mannanase에 대한 효소분비는 B5> B1= B20= B25의 순으로 나타났다. Phytase에 대한 효소분비는 4종의 균주가 분비하지는 않은 것으로 나타났다(table 4).

불용성 인산 가용화 효과를 보기 위해, BBG B 1, 5, 20, 25의 균주를 이용하여 hydroxyapatite, Tricalcium phosphate에 대한 테스트를 진행하였으나, 4종의 분리 균주 모두 불용성 인산 가용화 효과는 나타나지 않았다(Table 5).



Fig. 2. Enzyme production of isolated bacteria.

여러 유기물에 대한 분해 능력이 뛰어난 BBG B1, 5, 20, 25의 균주의 배양(NB, 30℃, 3일, 150rpm)여과액을 이용하여, 병원성 미생물인 *Candida albicans*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과를 확인하였다. 그 결과 BBG *Bacillus tequilensis* B1의 균주만 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과만 나타났으며, BBG B5, 20, 25의 균주는 효과를 나타내지 않았다.

이와 같이 유기물 분해력이 높았던 BBG B5와 유기물 분해력과 병원성 미생물에 대한 항균 활성 효과가 있는 BBG B1을 균주동정을 진행하였다.

Table 3. Enzymatic activities of isolated *Bacillus* sp.

BBG NO	Source	Protease (mm)	Amylase (mm)	Cellulase (mm)
1	Soil of mountain	16	5	16
2	Soil of mountain	10	5	8
3	Soil of mountain	10	5	12
4	Soil of mountain	10	6	12
5	Soil of mountain	17	12	21
6	Vinyl house	10	5	0
7	Dung of pig(BS)	15	4	0
8	Dung of pig	15	0	0
9	Dung of pig	12	0	0
10	Dung of pig	15	0	0
11	Soil of vinyl house	15	0	0
12	KCTC1662	7	4	0
13	KCTC3709	8	0	0
14	KCTC1507	8	5	0
15	KCTC1509	8	6	0
16	Dung of chick	8	6	0
17	Dung of chick(BT)	13	0	0
18	Dung of chick(BC)	12	0	10
19	Dung of chick(BS)	13	0	0
20	Dung of chick(BS)	15	4	13
21	Dung of chick(BS)	5	0	0
22	Soil of vinyl house	0	6	0
23	KCTC3014	15	0	0
24	Soil of vinyl house	13	5	0
25	Soil of vinyl house	13	3	13

**Table 4. Enzyme production of isolated bacteria BBG B(1, 5, 20, 25).**

BBG NO	Xylanase (mm)	Mannanase (mm)	Phytase (mm)
1	16	14	0
5	23	20	0
20	14	14	0
25	12	14	0

**Table 5. Phosphate solubilizing activity of isolated bacteria BBG B(1, 5, 20, 25).**

BBG NO	Hydroxyapatite solubilization (mm)	Tricalcium phosphate solubilization (mm)
1	0	0
5	0	0
20	0	0
25	0	0

**Table 6. Antibacteria activity of each isolated bacteria strains against pathogens.**

Contents	1 (mm)	5 (mm)	20 (mm)	25 (mm)
<i>Candida albicans</i>	5	0	0	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	0	0	0

**(4) 효모의 유기물 분해능**

효모는 glucoamylase의 작용으로 전분이나 글리코겐과 같은 다당류의 비환원 말단으로부터 연속적으로 반응하여 glucose로 분해시키는 효과를 나타내는데, 이는 모든 효모가 이런 능력을 가지고 있는게 아니다. 현재 효모는 2차 대사산물의 분비로 단순히 yeast culture(배양물)에 중점을 가지고 있었으나, 유기물 분해능력이 있는 균주를 선택하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되어, 유기물 분해 테스트를 통해 분해능력이 균주를 선택하였다.

Protease, glucoamylase, cellulase의 분해효과에 대한 조사한 결과, BBG Y3, 6만 cellulase 분해 효과가 나타났다(Table 7). cellulase의 효소분비가 나타난 BBG Y 3, 6의 균

주를 이용하여 xylanase, mannanase, phytase의 효소분비 효과를 검사하였으며, 그 결과 xylanase, mannanase, phytase에 대한 효소분비는 2종 모두다 분비하지는 않은 것으로 나타났다(Table 8).

불용성 인산 가용화 효과를 보기 위해, BBG Y3, 6의 균주를 이용하여 hydroxyapatite, Tricalcium phosphate에 대한 테스트를 진행하였으나, 2종의 분리 균주 모두 불용성 인산 가용화 효과는 나타나지 않았다(table 9).

**Table 7. Enzyme production of isolated Yeast.**

BBG NO	Source	Protease (mm)	Glucoamylase (mm)	Cellulase (mm)
1	Soil of vinyl house(SC)	0	0	0
2	Soil of vinyl house(SC)	0	0	0
3	Soil of vinyl house(SC)	0	0	5
4	Soil of vinyl house(SC)	0	0	0
5	Soil of vinyl house(SC)	0	0	0
6	Soil of vinyl house(SC)	0	0	8
7	Dung of pig	0	0	0
8	KCTC7004	0	0	0
9	KCTC7238	0	0	0
10	KCTC7906	0	0	0
11	KCTC7118	0	0	0
12	Dung of pig	0	0	0
13	Dung of pig	0	0	0
14	Dung of pig	0	0	0
15	Dung of pig	0	0	0

**Table 8. Enzyme production of isolated bacteria BBG Y(3, 6).**

	Xylanase (mm)	Mannanase (mm)	Phytase (mm)
3	0	0	0
6	0	0	0

**Table 9. Phosphate solubilizing activities of isolated bacteria BBG Y(3, 6).**

	Hydroxyapatite solubilization (mm)	Tricalcium phosphate solubilization (mm)
3	0	0
6	0	0

**(5) 분리균주의 동정**

선별된 유산균인 BBG L1, L29, L30, 바실러스 BBG B1, B5와 효모 균인 Y3, Y6의 균주의 동정을 위해 생태학적, 생화학적 특성을 검토하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참고하여 생리적, 생화학적 특성을 조사하였다. BBG L1, L29, L30, B1, B5는 gram(+) 균으로 판명되었다. 분리된 유산균, 바실러스, 효모 모든 균은 citrate를 이용하였으며, glucose로부터 산을 분비하였다(Table 10).

**Table 10. Physiological properties of isolated BBG strains.**

Test of characteristics	L1	L29	L30	B1	B5	Y6
Gram stain	+	+	+	+	+	fungi
Cell type	spherical	spherical	Rod	Rod	Rod	spherical
Colony color	White	White	White	Ivory	Ivory	White
Spore formation	-	-	-	+	+	+
Oxidase reaction	+	+	-	+	+	+
Catalase reaction	-	-	-	+	+	+
Urease reaction	-	-	-	+	+	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+	+
Marked acidity from glucose	+	+	+	+	+	+

균주 특성 실험은 API kit system을 이용하여 조사하였으며, 유산균은 BBG L30이 L1, L29에 비해 다양한 유기물을 이용하는 것으로 나타났으며, 바실러스균은 B1, B5의 똑같은 결과가 나타났다(Table 11, 12).

**Table 11. Biochemical characteristics of BBG L1, BBG L29, L30, B1 and B5 strains.**

NO	Substrate	L1	L29	L30	B1	B5	NO	Substrate	L1	L29	L30	B1	B5
1	GLY	-	-	-	+	+	26	SAL	+	+	+	+	+
2	ERY	-	-	-	-	-	27	CEL	+	+	+	+	+
3	DARA	-	-	-	-	-	28	MAL	-	+	+	+	+
4	LARA	+	+	+	+	+	29	LAC	-	+	+	+	+
5	RIB	+	+	+	+	+	30	MEL	-	+	+	+	+
6	DXYL	+	+	-	+	+	31	SAC	-	+	+	+	+
7	LXYL	-	-	-	-	-	32	TRE	+	+	+	+	+
8	ADO	-	-	-	-	-	33	INU	-	+	-	+	+
9	MDX	-	-	-	-	-	34	MLZ	-	-	+	-	-
10	GAL	+	+	+	+	+	35	RAF	-	+	+	+	+
11	GLU	+	+	+	+	+	36	AMD	-	-	-	+	+
12	FRU	+	+	+	+	+	37	GLYG	-	-	-	+	+
13	MNE	+	+	+	+	+	38	XLT	-	-	-	-	-
14	SBE	-	-	-	-	-	39	GEN	+	+	+	+	+
15	RHA	+	+	+	-	-	40	TUR	-	-	+	+	+
16	DUL	-	-	+	-	-	41	LYX	-	-	-	-	-
17	INO	-	-	-	+	+	42	TAG	+	+	-	-	-
18	MAN	-	-	+	+	+	43	DFUG	-	-	-	-	-
19	SOR	-	-	+	+	+	44	LFUG	-	-	-	-	-
20	MDM	-	-	+	-	-	45	DARL	-	-	+	-	-
21	MDG	-	-	+	+	+	46	LARL	-	-	-	-	-
22	NAG	+	+	+	+	+	47	GNT	-	-	+	-	-
23	AMY	-	+	+	+	+	48	2KG	-	-	-	-	-
24	ARB	+	+	+	+	+	49	5KG	-	-	-	-	-
25	ESC	+	+	+	+	+							

**Table 12. Biochemical characteristics of BBG Y6 strains.**

NO	Substrate	Read	NO	Substrate	Read
1	D-glucose	+	11	Methyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	+
2	Glycerol	-	12	N-acetyl-glucosamine	-
3	Calcium 2-keto-gluconate	-	13	D-cellobiose	-
4	L-arabinose	-	14	D-lactose	-
5	D-xylose	-	15	D-maltose	+
6	Adonitol	-	16	D-saccharose	+
7	Xylitol	-	17	D-trehalose	+
8	D-galactose	+	18	D-melezitose	+
9	Inositol	-	19	D-rafinoose	+
10	D-sorbitol	-	20		



16S rDNA 유전자 염기서열을 분석함으로써 균주를 최종적으로 동정하였다. 그 결과 유산균인 BBG L1은 *Pediococcus acidilactici* 나타났으며(Fig. 3-4), L29는 *Pediococcus pentosaceus*로 나타났고(Fig. 5-6), L30은 *Lactobacillus plantarum*로 나타났다(Fig. 7-8).

바실러스균인 BBG B1은 *Bacillus tequilensis*로 나타났으며(Fig. 9-10), B5는 *Bacillus amyloliquefaciens*로 나타났다(Fig. 11-12).

효모균인 BBG Y3, Y6을 동정하였으나 Y3의 경우 더블피크가 검출되어 순수분리가 되지 않은 것으로 판단되어, Y6만을 진행하였다. 그 결과 BBG Y6은 *Saccharomyces cerevisiae*로 나타났다(Fig. 11-12).

이와 같이 유용 미생물에 대한 생화학적 특성 파악 및 균주 동정을 통하여 각각의 미생물에 대한 특성을 파악하였다. *Pediococcus acidilactici* BBG L1은 다양한 항균 스펙트럼을 가지고 있으며, *Pediococcus pentosaceus* L29은 다양한 유기물 이용을 하는 것으로 나타났고, *Lactobacillus plantarum* BBG L30 다양한 항균 스펙트럼과 유기물을 이용하는 것으로 조사되었다. *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5은 *Bacillus tequilensis* BBG B1에 비해 amylase, cellulase, protease, mamnanase, xylanase의 효소 분비효과는 높게 나타났으나, B1이 가지고 있는 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과는 없었다. *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6은 다른 효모들에 비해 cellulase 분비효과를 나타내었으며, 이는 벃짚이나, 총채보리 등의 섬유질 사료에 첨가하여도 좋을 것으로 판단된다.

ctatacatgcagtcgaacgaacitccgttaattgattatgacgtgcttgactgaatgagattttaacacgaagtgagtg  
gaggacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgccagaagcaggggataaacacctggaaacagatgcta  
accgtataacagagaaaaccgctgggtticttttaaaagatggctctgctatcacttctggatggacccgcgcgca  
agctagtgggtgaggtaacggctcaccaggcgatgatgcgttagccgacctgagaggggtaatcggccacattgggactga  
gacacggccccagactcctacgggagggcagcagtagggaaatctccacaatggacgcaagtctgatggagc  
aacggcggctgagtgagaagggttcggctcgtaaagctctggtgtaaagaagaacgtgggtgagagtaactgttca  
ccagtgcaggatattaaccagaaagccacggcctaactacgtgccagcagccgcggtataacgtaggtggc  
aagcgttatccggattatigggcgtaaaagcagcgcagggcggcttttaagictaatgtgaaagccttcggctcaaccg  
aagaagtgcattggaaactgggagacttgagtgacagaaggagcagtggaactcattgtgtagcgggtaantgcgtagat  
alatggaagaacaccagtgggcgaaggcggctgctggctgtaactgacgctgaggctcgaagcatgggtagcgaaca  
ggattagataccctggtagtccatgccgtaaacgatgattactaagtgttgagggtttccgccctcagtgctgcagct  
aacgcattaaagtaatecggctggggagtagcaccgcaaggtgaaactcaaaaagaattgacggggggccc  
cacaagcgggtggagcatgtggttaattcgaagciacgcgaagaaccitaccaggtttgacatctctgccaacctaag  
agattaggcgttcccttcggggcagagaatgacagggtggtgcatgggtgctgctcagctcgtgctgtagat  
gttgggtaagtcggcaacgagcgcacaccttattactagttgccagcattcagttgggcactctagttagactgccgg  
tgacaaccgggaggaagggtggggagcagcicaaatcatcatgccccattgaccigggtacacacgtgctacaatggat  
ggtacaacgagtcgcgaaacegaggggttagetaatctcttaaaaccattctcagttcggactgtaggctgcaactgc  
ctacacgaagtcggaatcgcctagtaatcgcggatcagcatgcccggtgaaatcgttccgggcttgcacacaccgccc  
gtcacacatgagagttgtaacaccaaaagccgggtgggtaacctttaggagctagccgttaaggtgggacagatga ttagggggaagtc

Fig. 3. 16S rDNA sequence of *Pediococcus acidilactici* BBG L1.

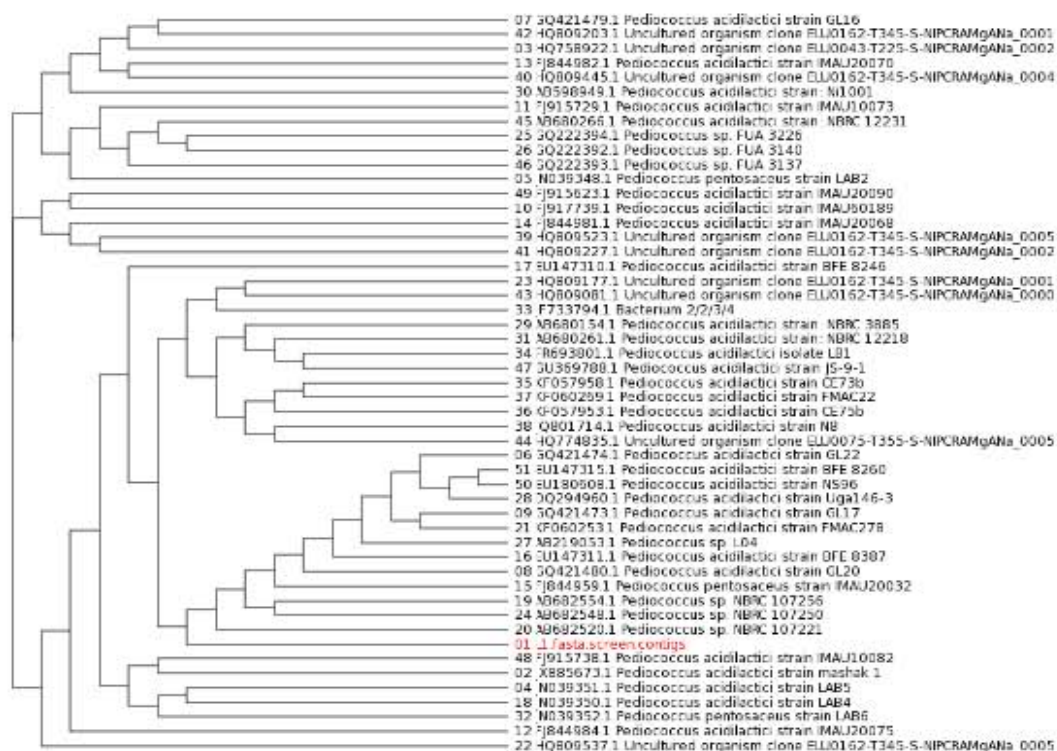


Fig. 4. Phylogenetic tree for bacteria strain of *Pediococcus acidilactici* BBG L1.

ggcgtagctataatgcaagtcgaacgaacttccgtaattgattatgacgtgcttgactgaatgagattttaacacgaag  
 tgagtgggcggacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgccagaaagcaggggataaacacctggnaacagat  
 gctaataccgataacagagaaaaccgctgggttttcttttaaaagatggctctgctatcactcttggatggaccgcgg  
 cgattagctagttggtaggtaacggctcaccaggcgatgatgcgtagccgacctgagagggtaatcgccacatigg  
 gactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtaggggaatcttccacaatggacgcaagtctga  
 tggagcaacggcggctgagtgaaaggggttccggctcgtaaagctctgtttgtaaaagaagaacgtgggtgagagtaact  
 gttacccagtgacggtaattaaccagaaaagccacggctaactacgtgccagcagccgggtaatacgttaggtggcaagc  
 gttatccggatttattggggcgtaaagcgagcgcaggcggcttttaagtctaattgtgaaagccttcggctcaaccgaaga  
 agtgcattggaaactgggagacttgagtgacagaagaggacagtggaactccatgtgtagcgggtgaaatgcgtagatata  
 ggaaagaaaccagtgggcgaaggcggctgtctggctgttaactgacgctgaggctcgaaagcatgggtgagc  
 gaacaggattagataacctggtagtccatgccgtaaacgatgattactaagtggtggagggtttccgcccctcagtgctg  
 cagciaacgcattaagtaaccgctggggagtagcaccgcaaggttgaacicaaaagaatgacgggg gccccacaa  
 gcgggtggagcatgtgggttaattcgaagctacgcgaagaaccttaccaggctcttgacatcttctgccaacctaagagatt  
 aggcgttcccttcggggacagaatgacaggtgggtgcatgggtgtcgtcagctcgtctgagatggttgggttaagtccc  
 gcaacgagcgaaccttataactagttgccagcattcagttggggcactctagtgagactgccggtgacaaaccggagga  
 aggtggggacgacgtcaaatcatatgcccitatgacctgggctacacacgtgctacaatggatgggtacaacgagtcgc  
 gaaaccgcgaggttagctaattctttaaaccattctcagttcggactgtaggctgcaactgcctacacgaagtcgga  
 atcgctagtaatcgggatacagcatgccgggtgaaacggttccggggccttgtaacacacggcccgtcacaccatgagag  
 ttgtaacaccaaaagccggtggggtaaccttttagggagctagccgtcaaggtggacagat

Fig. 5. 16S rDNA sequence of *Pediococcus pentosaceus* BBG L29.

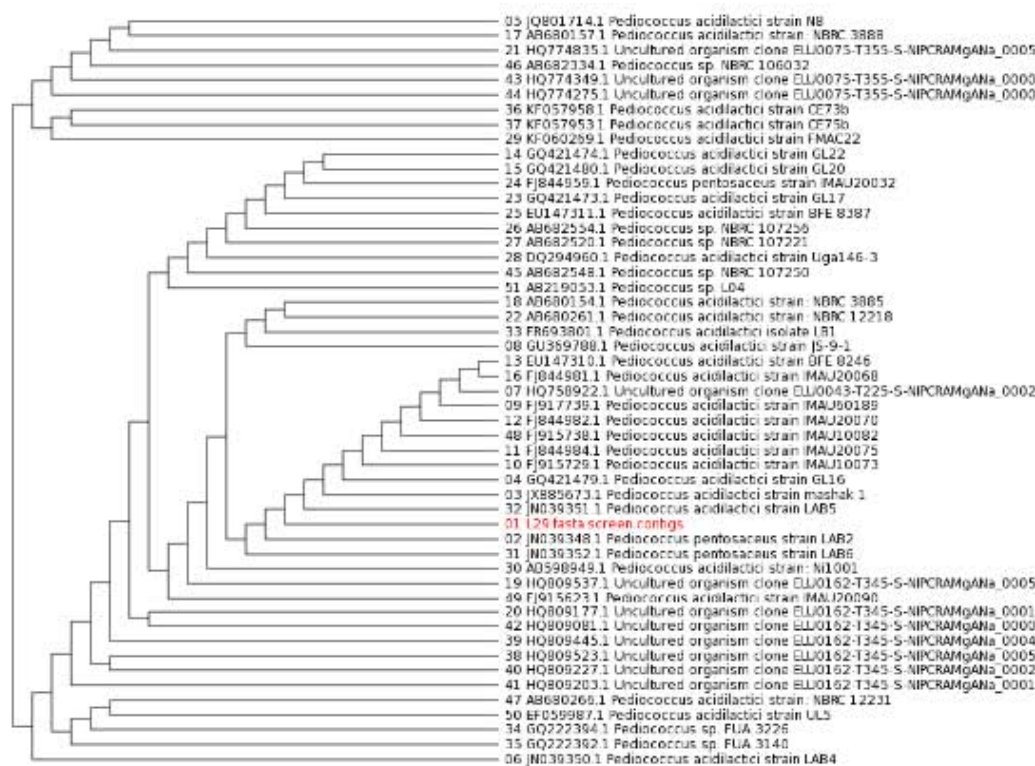
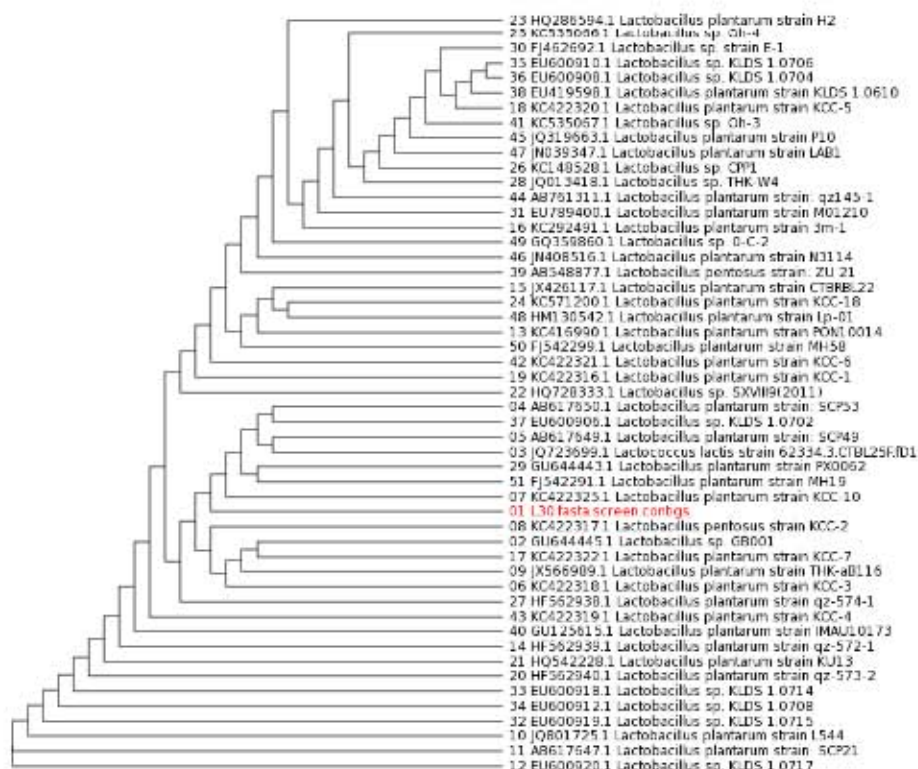


Fig. 6. Phylogenetic tree for bacteria strain of *Pediococcus pentosaceus* BBG L29.



ggacggcgtgctataatgcagtcgaacgaactctgggtattgattgggtgcttgcacatgattfacattigagtgagtggc  
 gaactggtagtaaacacgtgggaaacctgccagaagcgggggataaacacctggaaacagatgctaatac  
 cgataaactiggaccgatggctcagcttgaaagatggcttcggctatcactttggatgggtcccgccggcgattta  
 gctagatgggtgggtaacggctcaccatggcaatgatacgttagccgacctgagagggtaatcgccacattgggactgag  
 acacggcecaaacctctacggggagggcagcagtagggaaatcttcacaaatggacgaaagictgaitggagca  
 acgccgctgagtgagaagggttccggctcgtaaaactctgtgttaagaagaacataatcigagagtaactgttcagg  
 tattgacgggtatttaaccagaaagccacgggtaactacgtgccagcagccgcggtaatagctagggtggca  
 agcgttgcgggatttattgggcgtaaaagcagcgcagggcggttttttaagtctgatgtgaaagccttcggctcaaccga  
 agaagtgcacggaaactgggaaacitgagtgagaagaggacagtggaactccatgtgtagcgggtgaaatgcgtagata  
 tatggaagaacaccagtgggcgaaggcggctgtctggctgttaactgacgctgaggctcgaagatgggttagcaaacagg  
 attagataacctggtagtcataccgtaaacgatgaatgctaagtgttggagggttccgccctcagtgctgcagctaa  
 cgcattaagcattccgctggggagtagcggccgcaaggctgaaactcaaagggaattgacggggggcccgca  
 caagcgggtggagcatgtgtgtttaaattcgaagctacggcgaagaacctaccaggtcttgacatactatgca  
 aatctaagagattagacgttcccttcggggacatggatacaggtggtgcatggttgcctcagctcgtctcgtgagatgt  
 tgggttaagctcccgcaacgagcgcacaacctattatcagttgccagcattaagttgggcactctggtgagactgccggtg  
 acaaacgggaggaagggtggggatgacgtcaaatcatcatgcccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggatgg  
 tacaacgagittgcgaactcgcgagagiaagctaatctcttaaagccattctcagttcggattgtaggctgcaactcgcct  
 acatgaagtcggaaatcgctagtaatecgggacagcatgcccggtgaatacgttccggggccttgiacacaccgccct  
 cacaccatgagagittgaacaccaaacicgggtgggtaaccttttaggaaccagccgctaaagtgacag

**Fig. 7. 16S rDNA sequence of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**



**Fig. 8. Phylogenetic tree for bacteria strain of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**

gggccatggggggggtgctatacatgcaagtcgagcggacagatggggagcttgcctcctgatgttagcggcggacgggtga  
 gtaacacgtgggtaacctgcctgtaagactgggataactccgggaaaccggggctaataccggatgcttgtttgaaccgc  
 atgggtcaaacataaaaagggtggcttcggctaccacttacagatggaccgcggcgcatlagctagtgggt  
 gaggtaatggctcaccaggcaacgatgctgtagccgacctgagaggggtgatcgggccacac  
 tgggactgagacaeggccccagactcctacgggagggcagcagtaggggaatcttccgcaatg  
 gacgaaagtctgacggagcaacggcggctgagtgatgaagggtttcggatcgtaaaagctctgtttaggggaagaacaag  
 taccgttcgaatagggcgggtacctgacgggtacctaacagaaagccacgggtaactacgtgccagcagcccgggtaata  
 cgtagggtggcaagcgttgcgggaattatitggggcgtaaaagggtcgcagggcgggttccttaagtctgatgtgaaagcccc  
 ggctcaaccgggggggggtcattggaaactgggggaacttgagtgacagaagaggagagtgggaattccactgttagcgggtgaa  
 atgctgtagagatgtggaggaacaccagtgggcgaaggcgacctctggctgtaactgacgctgaggagcgaagcggtggg  
 gagcgaacaggatitagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgagtgctaaagtgttaggggggttccgccccctagt  
 gctgagctaacgcattagcactccgctggagtagcggctgcaagactgaaactcaaggaattgacggggccgcacaagcggtagcattggt  
 ftaattcgaagcaacgcgaagaaaccttaaccagggtcttgacatccctctgacaaatcctaga  
 gataggacgtcccttcgggggcagagtgacaggtgggtgcatgggttgcctcagctcgtgctgagatgttgggttaag  
 tcccgcaacgagcgaacccttgatcttagttgccagcattcagttggggcaciciaagggtgactgccggtgacaaaccgg  
 aggaaggtggggatgacgtcaaatcatcatgcccccttagacctgggctacacacgtgctacaatggacagaacaaaggg  
 cagegaaaccggaggttaagccaatcccacaaatctgttctcagttcggatcgcagctctgcaactcgaactgcgtgaagc  
 tggaatcgtctagtaatcgcggatcagcatgccgcggtgaaacgttccggggccttgiacacaccggcccgicacaccag  
 agagtttgaacaccggaagtcggtgaggttaaccttttaggagccagcccgccgaaggtgggaacaaga

**Fig. 9. 16S rDNA sequence of *Bacillus tequilensis* BBG B1.**



**Fig. 10. Phylogenetic tree for bacteria strain of *Bacillus tequilensis* BBG B1.**



catggcggcgtgctatacatgcaagtcgagcggacagatgggagcttgcctgatgttagcggcggacgggtgagtaa  
cacgtgggtaacctgcctgtaagactgggataactccgggaaaccggggctaataccggatgcttgttgaaccgcatgg  
ttcaaacataaaaagggtggcttcggctaccacttacagatggacccggcggcgcattagctagttgggtgaggtaacggctca  
ccaaggcgcacgatgcgtagccgacctgagaggggtgatcggccacactgggactgagacacggccccagact  
cctacggggaggcagcagtaggggaattctccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgcgtgagtg  
atgaagggttttcggatcgtaaagctctgtttaggggaagaacaagtgccgttcaaatagggcggcacct  
tgacggtaacctaacagaaagccacggctaaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtagggtggcaagc  
gittgtccggaattattggggcgtaaaggggctcgcagggcgggtttcttaagtctgatgtgaaagcccccggt  
caaccgggggaggggtcattggaaactgggggaacttgagtgacagaagaggagagtggaattc  
cacgtgttagcgggtgaaatgcgtagagatgtggagggaacaccagtgggcgaaggcgcactctc  
tggctgttaactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagataccctggtagtccacg  
ccgtaancgatgagtgctaaagtgttaggggggtttccgcccccttagtgctgacgtaacgcattaaagcact  
ccgcctggggagtagcggctcgaagactgaaactcaaggaattgacggggggcccgcacaagcgggtggagc  
atgtgggttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggcttgcacatcctctgacaatccagagataggacgtccc  
ttcggggggcagagtgacaggtgggtgcatgggttgcctcagctcgtgctgagatgttgggttaagtccc  
gcaacgagcgcgaaccttgatcttagttgccagcattcagttgggactctaaaggtagcggcgggtgacaacccgggagga  
agggtggggatgacgtcaaatcatcatgccccctatgacctggggctacacacgtgctacaatggggcagaacaaagggcagc  
gaaaccgcgaggttaagccaatcccacaaaatctgttctcagttcggatcgcagctcgaactcgcactgctgaaagctgga  
atcgttagtaatcgcggatcagcatgccgggtgaaatcgttccgggcttgtacacaccgccctcacaccacgagag  
ttgtaacaccggaagtcggtaggtaacctttggagccagccgccgaactgacgaatg

Fig. 11. 16S rDNA sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.

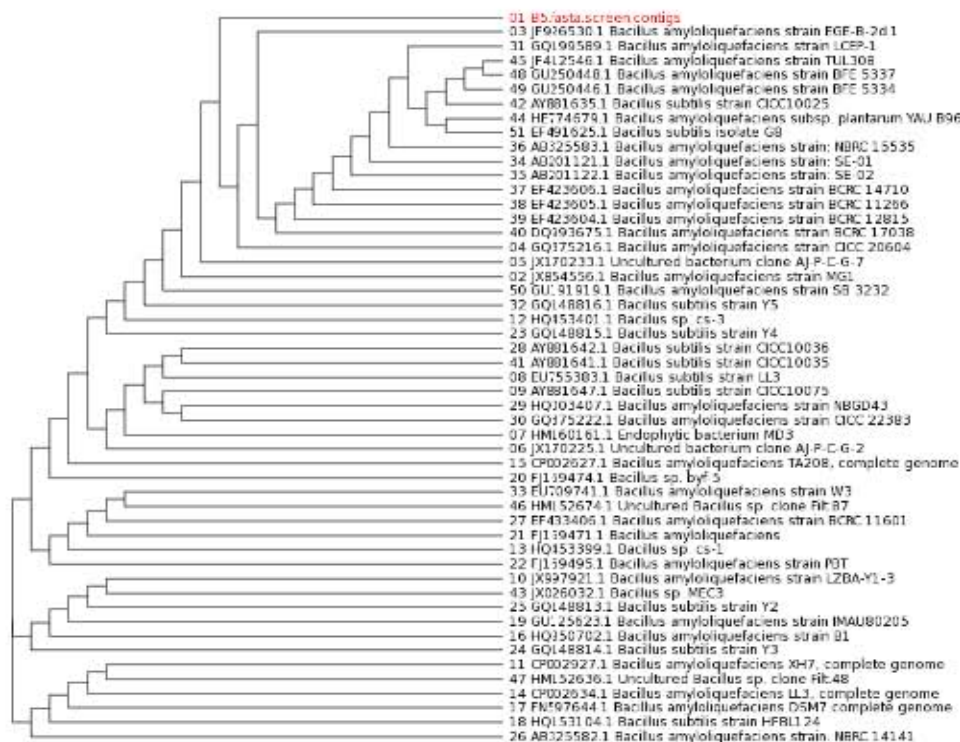
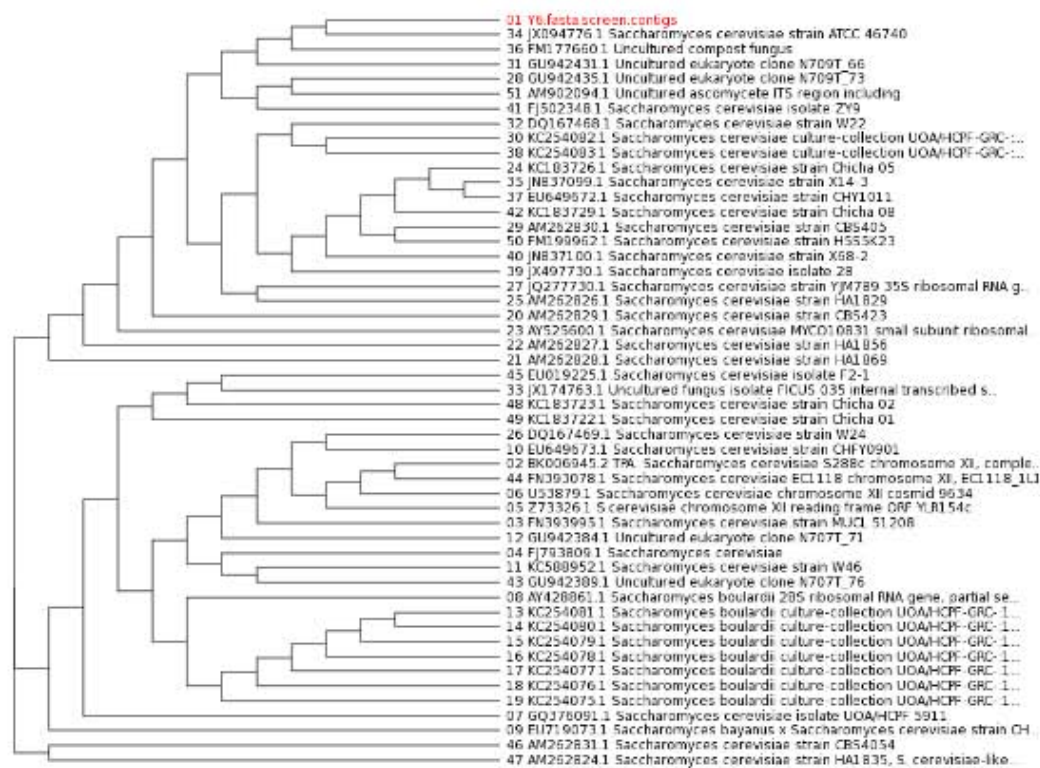


Fig. 12. Phylogenetic tree for bacteria strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.

tccgtaggtgaacctgcggaaggatcattaagaaaittaataaitttgaaaatggaittttttgttttggcaagagcat  
 gagagcttttaactgggcaagaagacaagagatggagagtcagccgggctgcgcttaagtgcgctgtcttgcaggctt  
 gtaagttcttcttgcattccaacgggtgagagatctctgtctttglataggacaataaacctgttcaatacaacacactgtggagtttcalatctttgcac  
 ttttctttgggcaicgagcaatcgggcccagaggtaacnaacacaacaaittactatcattaaattttgtcaaaaacaagaatttcgtaactggaaattt  
 taaaataftaaaaactttcaacaacggatcttgggttcgcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgatacgtaatgtgaattgcagaattccgtgaatcatcg  
 aactttgaacgcaatggcggccttggatccagggggcattgcccgtttgagcgtatcttccaaacatcttgittggtatgtgagtgatactttggagtt  
 aacttgaaattgctggccttttcaatggatgttttttccaagaagagggttcttgcggtcttggaggataatgcaagiacggctgttttaggtttaccaactgcgg  
 ciaatctttttatacagcgtatggaaacttatcgataagaagagagcgtctagggcaacaagtgttitaaggtttgacctcaaatcaggtaggagiacccgc  
 tgaacthaagcatalcaataagcggaggaaagaacccgcgaggthaagccaatcccacaatctgttctcagttcggatcgagctcgaactcgaactgcgtga  
 agctggaaatgctagtaatcgcggatcagatgcggcgggtaaacgcttccggggcttgcacacccggcctcacaccagagaggtttgtaaccccgaag  
 tcggtaggtaaacctttggagccagccgccaactgacgaatg

**Fig. 13. 16S rDNA sequence of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6**



**Fig. 14. Phylogenetic tree for bacteria strain of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

## 다. 미생물 종균(유산균, 바실러스, 효모)의 활력유지 조건 파악

종균의 활력유지 조건 분석하고자 유산균, 바실러스, 효모에 대한 동결건조보호제, 동결보존제, 액상보존제 실험을 진행하였다. 이 실험에 사용된 균주는 일반적으로 많이 사용되는 균주를 사용하고, 유산균은 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, 바실러스는 *Bacillus subtilis* BBG B20, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6를 이용하였다.

### (1) 동결건조보호제 첨가 제제

동결 건조란 건조의 한 종류로, 물질을 동결시키고, water vapor의 부분압을 낮춤으로써 얼음을 직접 증기로 만드는 승화에 의해 얻어진다. 낮은 압력하에서 얼음의 형태를 가지는 수분은 열 에너지를 공급함으로써 액체로 변하는 것이 아니라 water vapor로 직접 승화한다. 미생물 동결건조는 이런 낮은 압력하에서 승화과정뿐만 아니라, 동결 시에도, 생균수가 상당히 감소한다. 이런 문제점을 해결하기 위해 동결건조보호제로 뛰어난 보호효과를 갖는 제제를 찾고자 하였다.

생균수를 측정할 유산균, 바실러스, 효모를 배양한 액에 skim milk(10, 20, 30%), peptone(10, 20, 30%), tryptone(10, 20, 30%), soluble starch(10, 20, 30%), casein(10, 20%), soybean flour(10, 20%)의 첨가제의 농도를 달리 실험하였다(Tabel 13).

*Lactobacillus plantarum* L30에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 동결건조물의 생존률은 0.10%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 오래전부터 일반적으로 사용하고 있는 skim milk 처리구는 20.3-21.7%의 생존률을 나타냈다. *Lactobacillus plantarum* L30에 대한 동결건조보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Pepton > Tryptone > Soluble starch > Skim milk > Casein, Soybean flour 순으로 나타났으며, 이중 peptone 20% 첨가 시 보호효과가 높은 것으로 나타나 첨가제 최적농도 테스트에 적용하였다.

*Bacillus subtilis* BBG B20에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 동결건조물의 생존률은 3.30%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 오래전부터 일반적으로 사용하고 있는 skim milk 처리구는 33.3-67.7%의 생존률을 나타냈다. *Bacillus subtilis*인 BBG B20에 대한 동결건조보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Pepton 10% > Casein 10%, Tryptone 10%, Skim milk 10% > Pepton 20% > 순으로 나타났으며, 이중 peptone 10% 첨가 시 보호효과가 높은 것으로 나타나 첨가제 최적농도 테스트에 적용하였다

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 동결건조물의 생존률은 1.30%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 오래전부터 일반적으



로 사용하고 있는 skim milk 처리구는 4.10-7.10%의 생존률을 나타냈다. *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6에 대한 동결건조보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Pepton 10% > Pepton 20% > Casein 10% > 순으로 나타났으며, 이중 peptone 10% 첨가 시 보호효과가 높은 것으로 나타나 첨가제 최적농도 테스트에 적용하였다.

전반적으로 유산균, 바실러스, 효모 동결건조 시 10% 미만의 생존률을 보여, 반드시 동결건조보호제를 첨가하여 생존률을 높일 필요가 있는 것으로 판단된다.

**Table 13. Freeze-drying cryoprotective agents and survival rate of BBG strains.**

Cryoprotectant agent(%)		Survival rate(%)		
		<i>Lactobacillus plantarum</i> L30	<i>Bacillus subtilis</i> B20	<i>Saccharomyces cerevisiase</i> Y6
Control	0	0.10	3.30	1.30
Casein	10	15.9	66.7	12.8
Casein	20	18.8	27.3	2.60
Peptone	10	66.7	83.3	64.1
Peptone	20	76.8	56.7	30.8
Peptone	30	49.3	43.3	20.5
Skim milk	10	20.3	66.7	7.10
Skim milk	20	20.3	43.3	7.40
Skim milk	30	21.7	33.3	4.10
Soluble starch	10	29.0	43.3	5.10
Soluble starch	20	26.1	36.7	2.70
Soluble starch	30	24.6	29.7	2.00
Soybean flour	10	17.4	50.0	1.50
Soybean flour	20	17.4	36.7	2.60
Trypone	10	49.3	66.7	0.20
Trypone	20	61.0	60.0	1.00
Trypone	30	23.2	43.3	3.40

## (2) 동결건조보호제 최적농도

실험(1) 테스트에 결과에서 좋게 나온 peptone을 유산균은 20%가 되게, 바실러스와 효모는 각 10% 농도가 되게 첨가하여 같은 방법으로 실험하였다. 보호제의 상승효과를 점검하기 위해 control(물만첨가), peptone(10 or 20%), arabinose(1, 5%), cellobiose(1, 5%), corn starch (1, 5%), dextrin (1, 5%), fructose (1, 5%), galactose (1, 5%), glucose (1, 5%),

lactose (1, 5%), maltose (1, 5%), mannose (1, 5%), soluble starch (1, 5%), sucrose (1, 5%), trehalose (1, 5%)의 첨가제의 농도를 달리 실험하였다(Tabel 14).

*Lactobacillus plantarum* L30에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 동결건조물의 생존률은 1.20%(control)로 매우 낮게 나타났으며, peptone 20%만 첨가한 생존률은 40.0%로 나타났다. *Lactobacillus plantarum* L30에 대한 동결건조보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Lactose 1% > Arabinose 5% > Galactose 5% > Lactose 5% > Glucose 5% 순으로 나타났으며, 이중 peptone 20% + lactose 1% 첨가 시 80%의 생존률을 보여, peptone 20% 첨가 시 보다 2배 이상, 무처리구 보다 66배 이상의 보호효과를 나타내어, *Lactobacillus plantarum* L30동결건조보호제로 적합한 것으로 판단된다.

*Bacillus subtilis* BBG B20에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 동결건조물의 생존률은 7.86%(control)로 매우 낮게 나타났으며, peptone 10%만 첨가한 생존률은 78.6%로 나타났다. *Bacillus subtilis* BBG B20에 대한 동결건조보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Fructose 1%, Lactose 1% > Corn starch 5%, Dextrin 1%, Maltose 1% 순으로 나타났으며, 이중 peptone 20% + fructose 1%와 peptone 20%+lactose 1% 첨가 시 92.9%의 생존률을 보여, peptone 10% 첨가 시 보다 1.2배 이상, 무처리구보다 11배 이상의 보호효과를 나타내어, *Bacillus subtilis* BBG B20동결건조보호제로 적합한 것으로 판단된다.

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 동결건조물의 생존률은 7.00%(control)로 매우 낮게 나타났으며, peptone 10%만 첨가한 생존률은 30.0%로 나타났다. *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6에 대한 동결건조보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Mannose 1% > Corn starch 1% 순으로 나타났으며, 이중 peptone 20% + Mannose 1% 첨가 시 52.0%의 생존률을 보여, peotone 10% 첨가 시 보다 1.7배 이상, 무처리구보다 7배이상의 보호효과를 나타내어, *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6 동결건조보호제로 적합한 것으로 판단된다.

**Table 14. Freeze-drying cryoprotective agents mixing and survival rate of BBG strains.**

Cryoprotectant agent (%)		Survival rate(%)		
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Saccharomyces</i>
		<i>plantarum</i> L30	<i>subtilis</i> B20	<i>cerevisiase</i> Y6
Control	0	1.20	7.86	7.00
*	0	40.0	78.6	30.0
* + Arabinose	1	28.4	71.4	9.00
* + Arabinose	5	68.0	57.1	5.20
* + Cellobiose	1	20.4	57.1	11.0
* + Cellobiose	5	24.4	71.4	20.0
* + Corn starch	1	12.0	71.4	31.0
* + Corn starch	5	20.0	85.7	4.00
* + Dextrin	1	12.8	85.7	6.00
* + Dextrin	5	8.00	78.6	8.00
* + Fructose	1	24.0	92.9	25.0
* + Fructose	5	32.0	57.1	1.00
* + Galactose	1	16.8	78.6	30.0
* + Galactose	5	56.0	85.7	1.00
* + Glucose	1	28.4	71.4	51.0
* + Glucose	5	48.0	85.7	8.10
* + Lactose	1	80.0	78.6	11.0
* + Lactose	5	52.0	92.9	10.0
* + Maltose	1	14.0	85.7	23.0
* + Maltose	5	32.0	78.6	9.00
* + Mannose	1	21.2	64.3	52.0
* + Mannose	5	28.0	71.4	24.0
* + Soluble starch	1	16.4	78.6	22.0
* + Soluble starch	5	20.4	71.4	4.00
* + Sucrose	1	16.4	71.4	18.0
* + Sucrose	5	40.0	71.4	1.00
* + Trehalose	1	24.8	71.4	20.0
* + Trehalose	5	40.0	71.4	21.0

\* *Lactobacillus plantarum* L30(peptone 20%+ Cryoprotectant agent), *Bacillus subtilis* B20, *Saccharomyces cerevisiase* Y6(peptone 10% + Cryoprotectant agent)

### (3) 동결보호제 제제

동결보호제란 미생물 균주를 저장하는 방법 중 한가지로서, 동결 진행 시 얼음결정의 생성에 의해 세포의 파괴로 인한 미생물 저하현상이 나타난다. 동결 진행 시 미생물 저하현상을 억제하기 위하여, 세포의 파괴를 최소화하기 위한 동결보호제를 첨가한다. 동결보존 시 미생물 저하현상의 문제점을 해결하기 위해 동결보호제로 뛰어난 보호효과를 갖는 제제를 찾고자 하였다.

생균수를 측정할 유산균, 바실러스, 효모를 배양한 액에 arabinose, carboxymethyl cellulose, dextrin, fructose, galactose, glycerol, glucose, lactose, mannose, mineral oil, soluble starch, sucrose 30%(carboxymethyl cellulose 5% 첨가) 농도를 첨가하여, 일반적으로 쉽게 구할 수 있는, -20℃ 냉동고에 동결하여 미생물 균체수 변화를 측정하였으며, 생존률(%)로 표시하였다(Tabel 15).

*Lactobacillus plantarum* L30에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 0.0002%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 오래전부터 일반적으로 사용하고 있는 glycerol은 12.50%의 생존률을 나타냈다. *Lactobacillus plantarum* L30에 대한 동결보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Glycerol > Mineral oil > Glucose > Sucrose 순으로 나타났으며, 이중 glycerol, mineral oil 첨가 시 보호효과가 높은 것으로 나타나 첨가제 최적농도 테스트에 적용하였다.

*Bacillus subtilis* BBG B20에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 0.83%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 오래전부터 일반적으로 사용하고 있는 glycerol은 8.33%의 생존률을 나타냈다. *Bacillus subtilis*인 BBG B20에 대한 동결보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Galactose, Glycerol, Mineral oil > Sucrose > Soluble starch 순으로 나타났으며, 이중 Galactose, Glycerol, Mineral 첨가 시 보호효과가 높은 것으로 나타나 첨가제 최적농도 테스트에 적용하였다

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 0.0014%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 오래전부터 일반적으로 사용하고 있는 glycerol은 25.00%의 생존률을 나타냈다. *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6에 대한 동결보호제로 사용된 제제의 생존률 순서는 Glycerol > Trehalose > Sucrose > Glucose 순으로 나타났으며, 이중 Glycerol, Sucrose, Trehalose 첨가 시 보호효과가 높은 것으로 나타나 첨가제 최적농도 테스트에 적용하였다.

**Table 15. Cryoprotective agents and survival rate of BBG strains.**

Cryoprotectant agent(%)		Survival rate(%), after 30days		
		<i>Lactobacillus plantarum</i> L30	<i>Bacillus subtilis</i> B20	<i>Saccharomyces cerevisiase</i> Y6
Control	0	0.0002	0.8300	0.0014
Arabinose	30	0.0100	0.1670	0.1071
Carboxymethyl -cellulose	5	0.0010	0.2600	0.0143
Dextrin	30	0.0010	0.1830	0.0071
Fructose	30	0.0010	0.4330	2.8570
Galactose	30	0.0010	8.3330	6.5714
Glycerol	30	12.500	8.3330	25.000
Glucose	30	0.7500	1.6670	7.8571
Lactose	30	0.0020	0.6670	0.0143
Mannose	30	0.7500	1.0830	0.1071
Mineral oil	30	3.2500	8.3330	2.8571
Soluble starch	30	0.0010	2.4170	0.0071
Sucrose	30	0.4800	5.4170	11.428
Trehalose	30	0.0010	0.0025	14.285

**(4) 동결보호제 최적농도**

(3)의 동결보호제 제제결정 실험에서 결정 된 *Lactobacillus plantarum* L30은 glycerol, mineral oil를, *Bacillus subtilis* BBG B20는 Galactose, Glycerol, Mineral oil를, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6는 glycerol, sucrose, trehalose를 10, 15, 20, 25, 30, 40% 농도로 배양액에 첨가하여 최적농도를 알아보기 위해 진행하였다.

*Lactobacillus plantarum* L30에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 0.0001%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 30일 경과 후 가장 보호효과가 뛰어난 것은 glycerol 25% 첨가 시 1.06%(control 0.0001%)로 나와 첨가하지 않았을 때보다 약 10,000배 이상의 효과가 나타나, 유산균 동결보존 시 최적농도는 glycerol 25%로 결정하였다 (Tabel 16).

*Bacillus subtilis* BBG B20에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 23.00%(control)로 나타났으며, 30일 경과 후 가장 보호효과가 뛰어난 것은 galactose 10%, mineral oil 20% 첨가 시 33.33%(control 23.00)로 나와 첨가하지 않았을 때 보다 약 10% 이상의 효과가 나타나, 바실러스 동결보존 시 최적농도는 galactose 10%, mineral oil 20%로 결정하였다(Tabel 17).

*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 0.003%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 30일 경과 후 가장 보호효과가 뛰

어난 것은 glycerol 30% 첨가 시 58.33%(control 0.003%)로 나와 첨가하지 않았을 때보다 약 19,000만배 이상의 효과가 나타나, 효모 동결보존 시 최적농도는 glycerol 30%로 결정하였다 (Tabel 18).

동결진행 시, 동결하는 과정에서 미생물의 개체수가 동결 초기에 감소하는지, 시간이 지날 수록 감소하는 지 판단하기 위해, 동결보호효과가 잘나온 샘플위주로 동결 진행 1일, 30일 경과 후 생존률을 측정하여 개체수 변화를 비교하였다. 그 결과 동결 1일 후에 유산균은 제형의 차이에 의해 20.0-80.0% 감소 효과를 나타냈으며, 30일 99.0% 이상이 사멸되는 것으로 나타났다. 바실러스는 제형의 차이에 의해, 1일 경과 시 3.0-77.0% 감소 효과를 나타냈으며, 30일 이후에는 70% 이상이 사멸되는 것으로 나타났다. 효모는 제형의 차이에 의해, 1일 경과 시 17.0-92.0% 감소 효과를 나타냈으며, 30일 이후에는 일반적으로 90% 이상이 사멸되는 것으로 나타났다.

동결보호효과가 잘나온 샘플을 혼합 하였을 시, 시너지 효과가 있을 것으로 판단되어, 서로 용해가 되는 제형만을 테스트 하였으며, galactose 10%(33.33%), mineral oil(33.33%) 단독 첨가 시, 바실러스에서 보존효과가 가장 높게 나왔으나 glycerol 7.5%+ mineral oil 7.5% 혼합첨가 시 38.10%으로 나타나, 단독 사용 시 보다 높게 나와, 혼합보관방법을 추가 결정하였다.

**Table 16. Cryoprotective agents concentration and survival rate of *Lactobacillus plantarum* L30.**

Cryoprotectant agent(%)	Survival rate(%)							
	control		glycerol		mineral oil		glycerol(1): mineral oil(1)	
	1	30	1	30	1	30	1	30
	day	days	day	days	day	days	day	days
10			77.66	0.02	-	0.001	63.83	0.001
15			45.74	0.01	-	0.001	96.80	0.001
20			37.23	0.43	-	0.010	63.93	0.010
25	31.91	0.0001	55.32	1.06	-	0.200	61.70	0.032
30			43.01	0.28	-	0.280	37.23	0.106
40			20.04	0.23	-	0.001	34.04	0.319

**Table 17. Cryoprotective agents concentration and survival rate of *Bacillus subtilis* B20.**

Cryoprotectant agent(%)	Survival rate(%)						
	control		glycerol		galactose	mineral oil	glycerol(1): mineral oil(1)
	1 day	30 days	1 day	30 days	30 days	30 days	30 days
10			97.62	23.80	33.33	30.95	35.71
15			92.85	30.95	23.80	23.80	38.10
20	95.24	23.80	66.67	28.57	30.95	33.33	30.95
25			71.42	23.80	30.95	28.57	33.33
30			76.19	26.19	28.57	28.57	30.95
40			23.80	22.50	26.19	26.19	28.57

**Table 18. Cryoprotective agents concentration and survival rate of *Saccharomyces cerevisiae* Y6.**

Cryoprotectant agent(%)	Survival rate(%)						
	control		glycerol		sucrose	trehalose	sucroset(1): trehalosel(1)
	1 day	30 days	1 day	30 days	30 days	30 days	30 days
10			8.33	4.17	0.33	1.67	0.50
15			17.50	4.17	0.59	1.16	0.42
20	10.00	0.033	26.67	6.83	9.17	0.83	1.16
25			50.00	6.00	2.92	0.58	2.32
30			83.00	58.3	2.17	0.70	NS
40			37.95	10.0	2.50	0.91	NS

\* NS: not solution.

## 제 2 절 고효율 발효시료 생산 시스템의 정립/구축 및 위탁생산 체제 구축

### 1. 연구방법

#### 가. 미생물 종균(유산균, 바실러스, 효모)의 액상 최적배지 탐색

유산균은 *Lactobacillus plantarum* BBG-L30, 바실러스는 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6를 이용하였다. 최적배지 성분은 M9 minimal medium를 기준으로 탄소원은 arabinose, glucose, galactose, fructose, lactose, mannose, soluble starch, sucrose 및 trehalose를 각각 1%의 농도로 첨가하고 분리균주의 전 배양액을 1%씩 접종한 후 35℃에서 20hr, 150rpm으로 진탕 배양한 다음 배양액의 탁도를 660nm에서 측정하였다. 탄소원 첨가농도의 영향은 선정된 탄소원을 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 및 3.0% 씩 첨가하여 동일조건에서 검토하였다.

질소원은 yeast extract, soypeptone, peptone, tryptone, beef extract,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  등을 각각 0.5%의 농도로 첨가하고 분리균주의 전 배양액을 1%씩 접종한 후 35℃에서 20hr, 150rpm으로 진탕 배양한 다음 배양액의 탁도를 660nm에서 측정하였다. 안정적인 미생물 생육증진을 위해 질소원 첨가농도의 영향은 선정된 질소원 1을 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 및 2.1% 씩 첨가하여 탄소원과 동일조건에서 검토하였다. 질소원 2는 질소원 1과 같은 방법으로 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 및 2.0% 씩 첨가하여 탄소원과 동일조건에서 검토하였다.

무기염은 무첨가,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  등을 0.1%의 농도로 첨가하고 분리균주의 전 배양액을 1%씩 접종한 후 35℃에서 20hr, 150rpm으로 진탕 배양한 다음 배양액의 탁도를 660nm에서 측정하였다. 무기염 첨가농도의 영향은 선정된 질소원을 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0% 씩 첨가하여 동일조건에서 검토하였다.

#### 나. 최적배양조건 탐색

유산균은 *Lactobacillus plantarum* BBG-L30, 바실러스는 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6를 이용하였다. 최적배양조건은 500ml 삼각 플라스크에 액체 배지를 200ml 첨가한 다음, 분리균주의 전 배양액을 1.0%씩 접종하여 검토하였다. 최적 배양온도는 배양온도를 25~50℃의 범위를 변화시키면서 150rpm에서 20시간 배양한 후 660nm에서 배양액의 흡광도를 측정하였다. 배지의 초기 pH는 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 첨가하여 초기 pH를 3-8 범위로 조절한 다음 실행하였고, 진탕속도의 영향은 pH를 7.0으로 조절한 후 진탕 속도를 50, 100, 150, 200, 250rpm으로 변화시키면서 35℃에서 20시간 배양하여



배양액의 흡광도를 660nm에서 측정하였다.

다. 액상배양 시스템의 재정비, 고체발효공정 전용 액상배양기 제작, 고체발효시설 준비 및 발효사료 첨가제 분쇄용 비발열 type 분쇄기 설치 완료

## 2. 연구결과

### 가. 미생물 종균(유산균, 바실러스, 효모)의 액상 최적배지 탐색

방료사료용 액상 스타터로 쓰여온 대표적인 2종의 유용미생물, 고초균, 유산균 및 효모에 대한 적정 최적배지를 탐색하기 위하여 대상균주로 유산균은 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, 바실러스는 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, 효모는 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6 균주에 대한 배양조건을 규명하였다.

#### (1) 탄소원의 영향

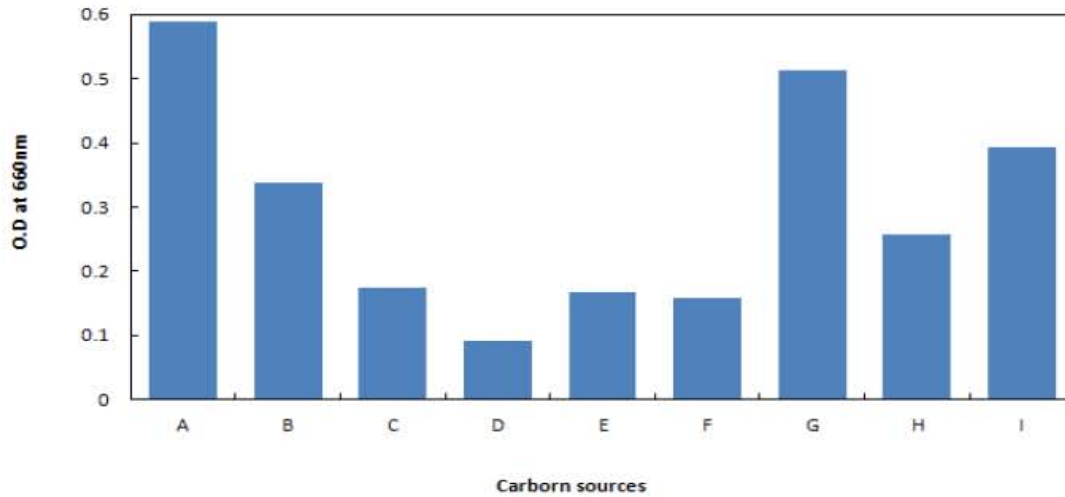
탄소원의 종류가 분리한 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 1, 3, 5에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30,의 최적의 탄소원은 glucose, trehalose 및 arabinose 순으로 잘 이용하였으나, fructose, galactose, lactose 및 mannose 등은 잘 이용하지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이상의 결과로 *Lactobacillus plantarum* BBG L30,의 최적 탄소원은 glucose로 결정하고 그 최적 첨가농도를 검토하여 Fig. 2에 나타내었다. Glucose의 첨가농도를 2.5%까지 증가시킴에 따라 균체의 성장은 거의 직선적으로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 거의 영향이 없는 것으로 나타나 glucose의 최적 첨가농도는 2.5%로 결정하였다.

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 최적의 탄소원은 soluble starch, arabinose, trehalose 및 glucose 순으로 잘 이용하였으나, fructose, galactose, lactose 및 mannose 등은 잘 이용하지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이상의 결과로 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 최적 탄소원은 soluble starch로 결정하고 그 최적 첨가농도를 검토하여 Fig. 4에 나타내었다. Soluble starch의 첨가농도를 2.0%까지 증가시킴에 따라 균체

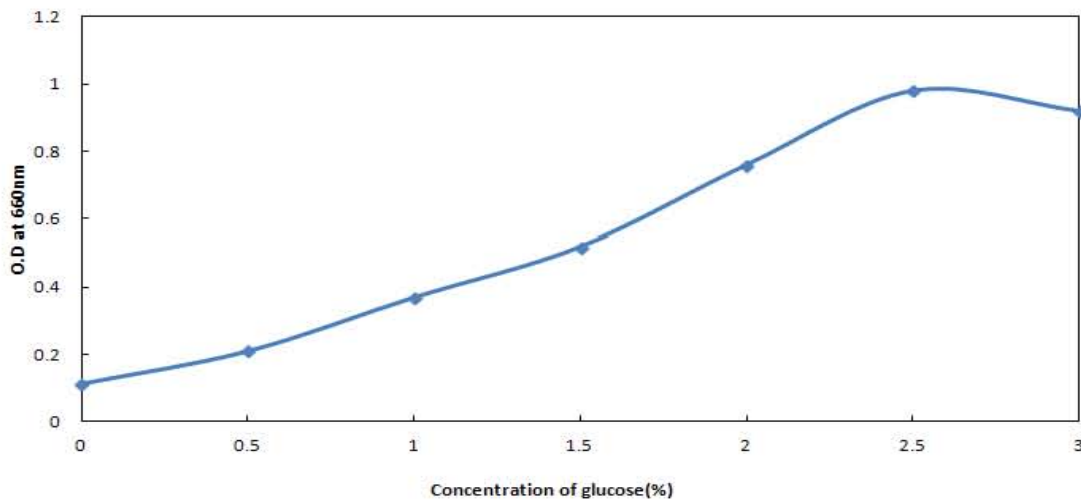
의 성장은 거의 직선적으로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 거의 영향이 없는 것으로 나타나 glucose의 최적 첨가농도는 2.0%로 결정하였다.

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6의 최적의 탄소원은 sucrose, glucose 및 arabinose 순으로 잘 이용하였으나, fructose, lactose 및 mannose 등은 잘 이용하지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이상의 결과로 *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6의 최적 탄소원은 sucrose로 결정하고 그 최적 첨가농도를 검토하여 Fig. 6에 나타내었다. Sucrose의 첨가농도를 2.5%까지 증가시킴에 따라 균체의 성장은 거의 직선적으로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 거의 영향이 없는 것으로 나타나 sucrose의 최적 첨가농도는 2.5%로 결정하였다. 이상의 결과에 따라 분리균주에 마다 이용하는 탄소원의 종류 및 첨가농도는 다소 차이가 있는 것으로 판단된다.

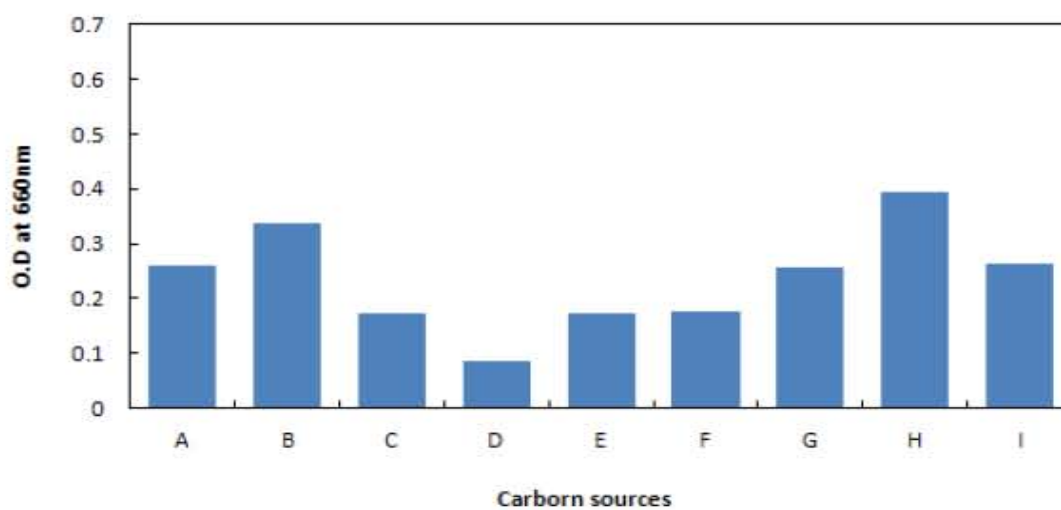


**Fig. 1. Effect of carbon sources to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**

**A: Gulcose, B: Arabinose, C: Mannose, D: Lactose, E: Galactose, F: Fructose, G: Sucrose, H: Soluble starch, I: Trehalose.**

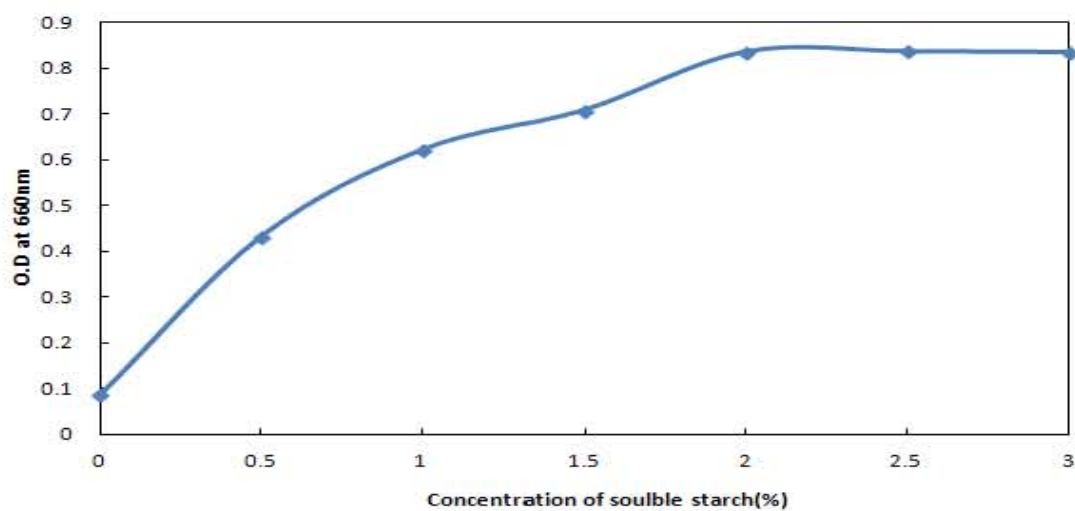


**Fig. 2. Effect of concentration of glucose to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**

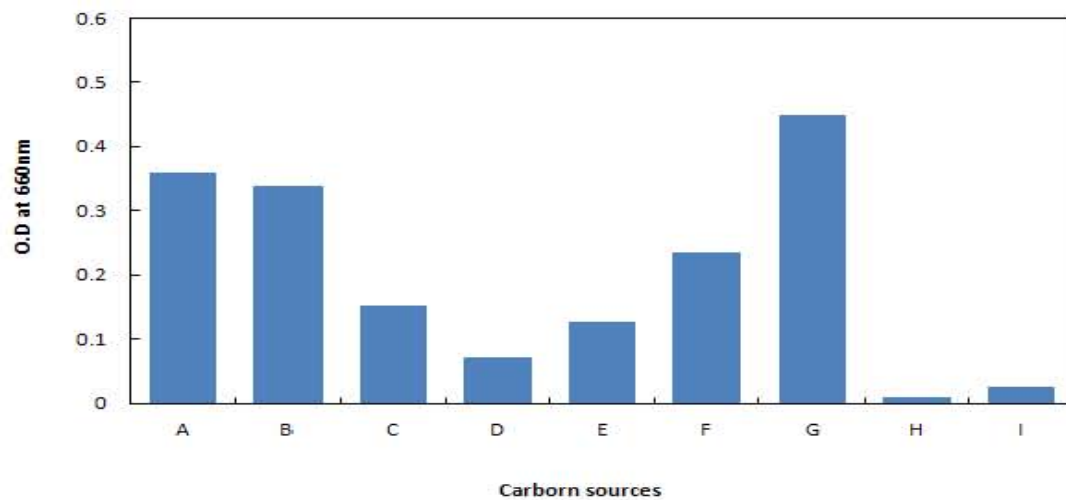


**Fig. 3. Effect of carbon sources to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**

**A: Glucose, B: Arabinose, C: Mannose, D: Lactose, E: Galactose, F: Fructose, G: Sucrose, H: Soluble starch, I: Trehalose.**

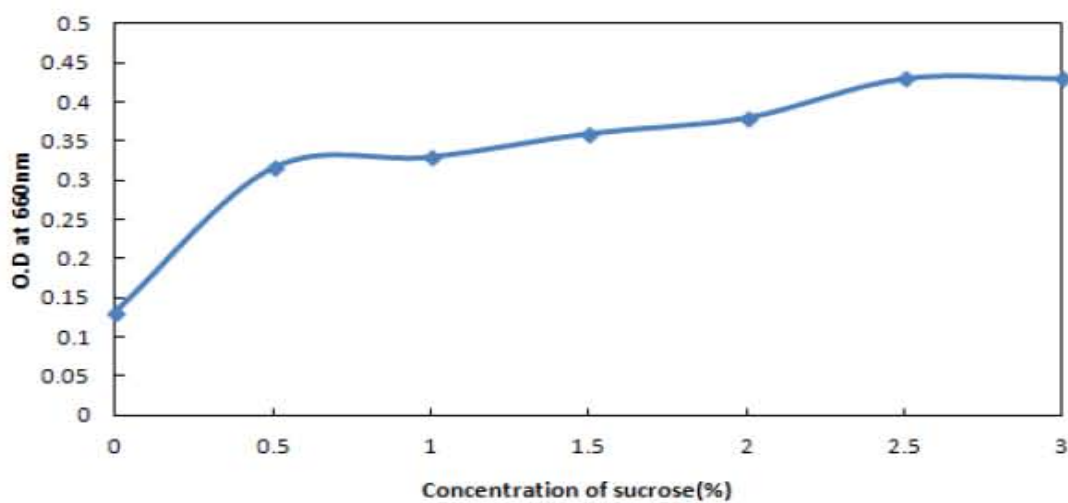


**Fig. 4. Effect of concentration of glucose to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**



**Fig. 5. Effect of carbon sources to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

**A: Glucose, B: Arabinose, C: Mannose, D: Lactose, E: Galactose, F: Fructose, G: Sucrose, H: Soluble starch, I: Trehalose.**



**Fig. 6. Effect of concentration of glucose to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

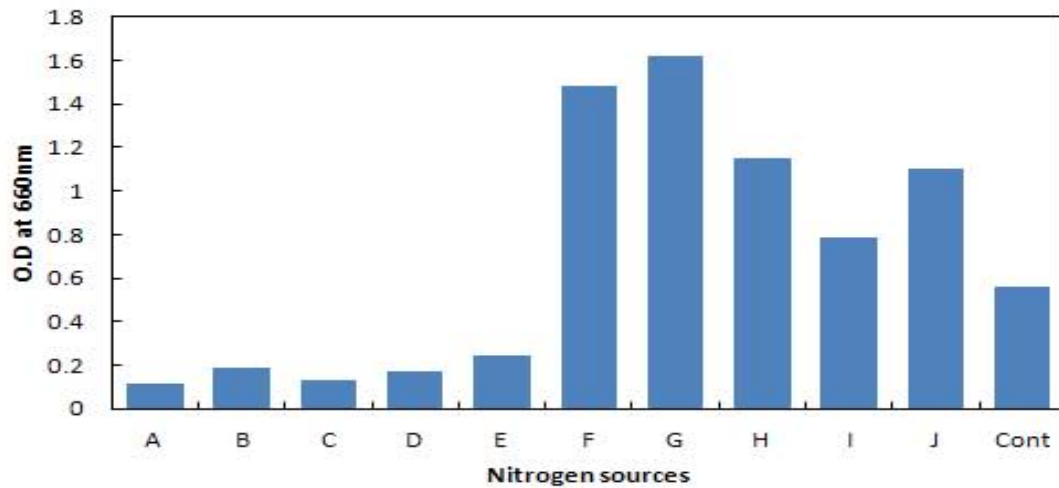
## (2) 질소원 1의 영향

질소원의 종류가 분리한 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 7, 9, 11에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30의 최적 질소원조건 탐색을 위해, M9 minimal medium에 glucose 2.5% 첨가하고 여러 종류의 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 배양한 결과  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  등의 무기질소원보다는 yeast extract, soypeptone 및 beef extract와 같은 유기질소원을 잘 이용하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 그 중에서 soypeptone를 첨가한 시험구에서 균체 성장이 가장 왕성하였기 때문에 최적 질소원을 soypeptone로 결정하고, 그 첨가 농도를 검토한 결과 1.5%까지 증가할수록 균체의 성장이 왕성하였으나, 그 이상의 농도에서는 균체 성장에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나 soypeptone의 최적 첨가 농도를 1.5%로 결정하였다(Fig. 8).

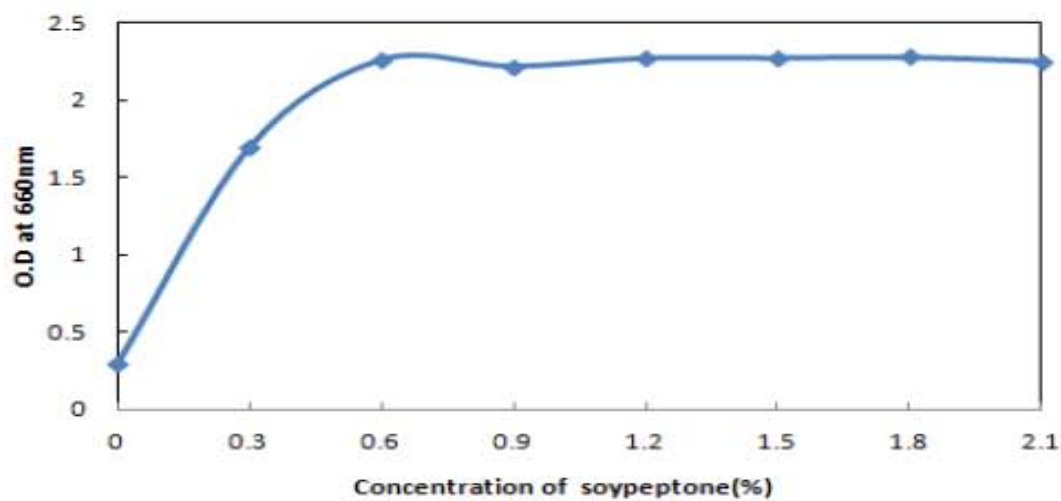
*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 최적 질소원조건 탐색을 위해, M9 minimal medium에 glucose soluble starch 2.0% 첨가하고 여러 종류의 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 배양한 결과  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  등의 무기질소원보다는 yeast extract, soypeptone 및 tryptone과 같은 유기질소원을 잘 이용하는 것으로 나타났다(Fig. 9). 그 중에서 soypeptone를 첨가한 시험구에서 균체 성장이 가장 왕성하였기 때문에 최적 질소원을 soypeptone로 결정하고, 그 첨가 농도를 검토한 결과 1.2%까지 증가할수록 균체의 성장이 왕성하였으나, 그 이상의 농도에서는 균체 성장에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나 soypeptone의 최적 첨가 농도를 1.2%로 결정하였다(Fig. 10).

*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 최적 질소원조건 탐색을 위해, M9 minimal medium에 sucrose 2.5% 첨가하고 여러 종류의 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 배양한 결과  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  등의 무기질소원보다는 yeast extract, soypeptone 및 beef extract와 같은 유기질소원을 잘 이용하는 것으로 나타났다(Fig. 11). 그 중에서 yeast extract를 첨가한 시험구에서 균체 성장이 가장 왕성하였기 때문에 최적 질소원을 yeast extract로 결정하고, 그 첨가 농도를 검토한 결과 1.2%까지 증가할수록 균체의 성장이 왕성하였으나, 그 이상의 농도에서는 균체 성장에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나 yeast extract의 최적 첨가 농도를 0.6%로 결정하였다(Fig. 12).

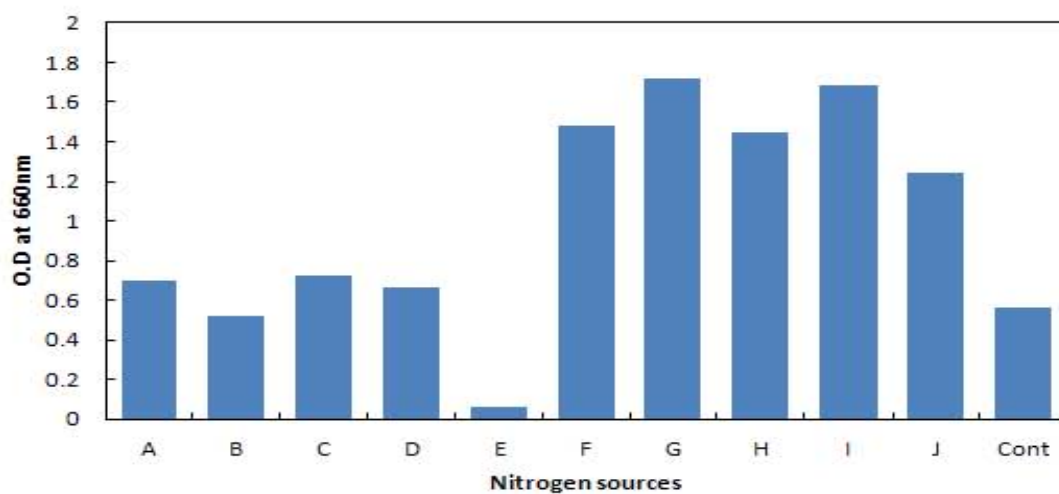


**Fig. 7.** Effect of nitrogen sources to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.

**A:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , **B:**  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , **C:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , **D:**  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , **E:**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , **F:** Yeast extract, **G:** Soypeptone, **H:** Peptone, **I:** Tryptone, **J:** Beef extract.

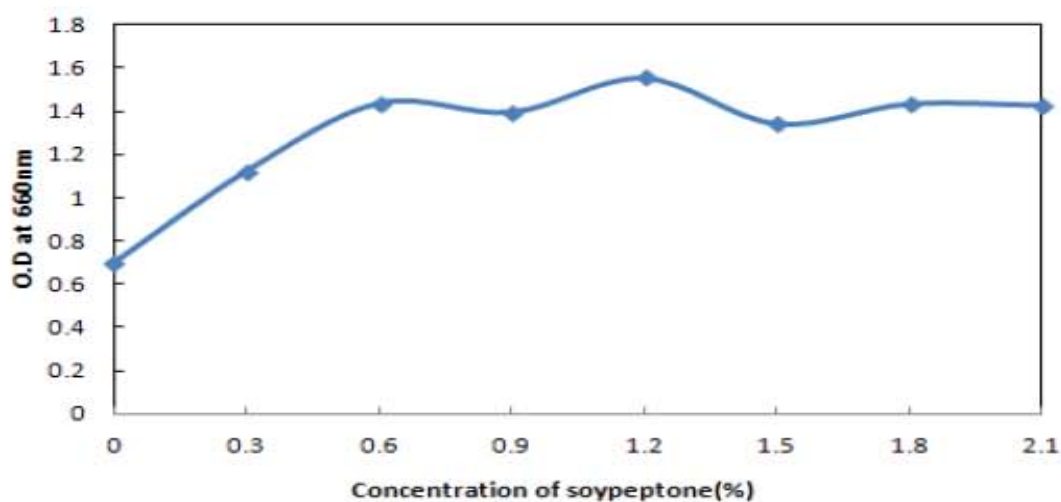


**Fig. 8.** Effect of concentration of soypeptone to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.



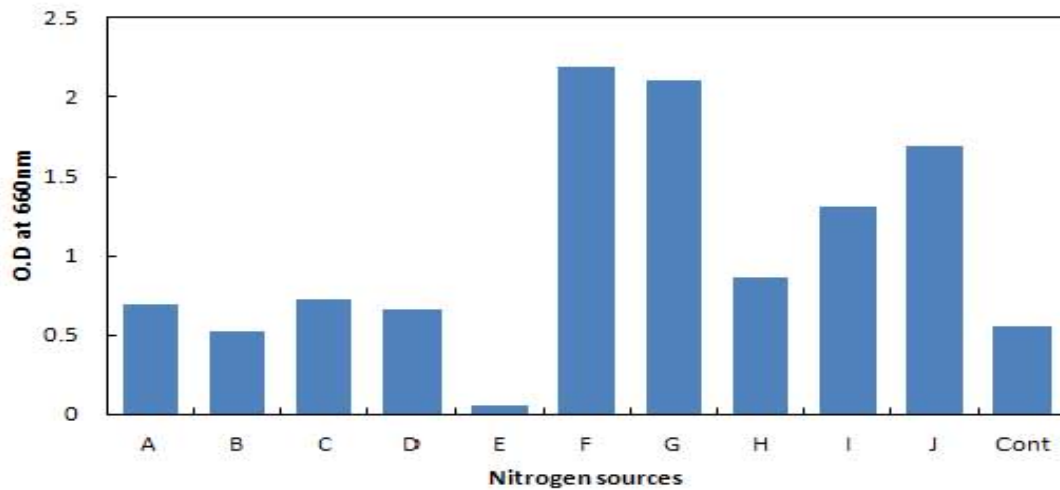
**Fig. 9. Effect of nitrogen sources to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**

**A:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B:  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , C:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , D:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , E:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , F: Yeast extract, G: Soypeptone, H: Peptone, I: Tryptone, J: Beef extract.**



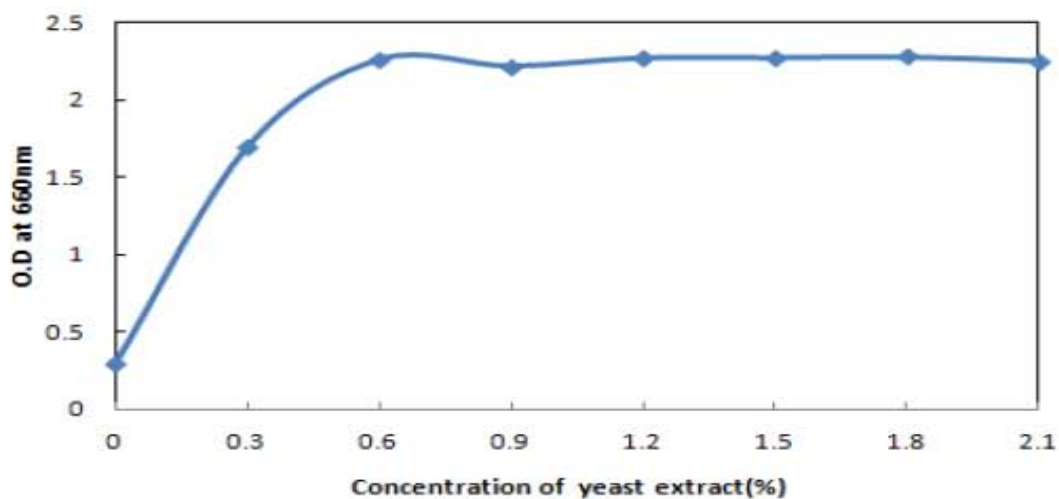
**Fig. 10. Effect of concentration of soypeptone to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**





**Fig. 11.** Effect of nitrogen sources to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.

**A:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , **B:**  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , **C:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , **D:**  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , **E:**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , **F:** Yeast extract, **G:** Soypeptone, **H:** Peptone, **I:** Tryptone, **J:** Beef extract.



**Fig. 12.** Effect of concentration of yeast extract to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.

### (3) 질소원 2의 영향

균체 수 증진을 위해 질소원을 단일 성분보다는, 혼합 성분으로 했을 때 안정적으로 배양이 잘되는 경우가 많아, 최적 배지조건에 soypeptone, yeast extract를 첨가하여, 생육에 미치는 영향을 검토하여(Fig. 13, 14, 15)에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30의 최적 질소원 2의 yeast extract 첨가농도를 1.2%까지 증가시키기에 따라 균체의 성장은 거의 직선적으로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 거의 영향이 없는 것으로 나타나 yeast extract의 최적 첨가농도는 1.2%로 결정하였다(Fig. 13).

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 최적 질소원 2의 yeast extract 첨가농도를 0.6%까지 증가시키기에 따라 균체의 성장은 거의 직선적으로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 거의 영향이 없는 것으로 나타나 yeast extract의 최적 첨가농도는 0.6%로 결정하였다(Fig. 14).

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6의 최적 질소원 2의 soypeptone 첨가농도를 1.4%까지 증가시키기에 따라 균체의 성장은 무처리구와 차이가 없는 것으로 나타나 soypeptone의 최적 첨가농도는 0%로, 첨가하지 않는 것으로 결정하였다(Fig. 15).

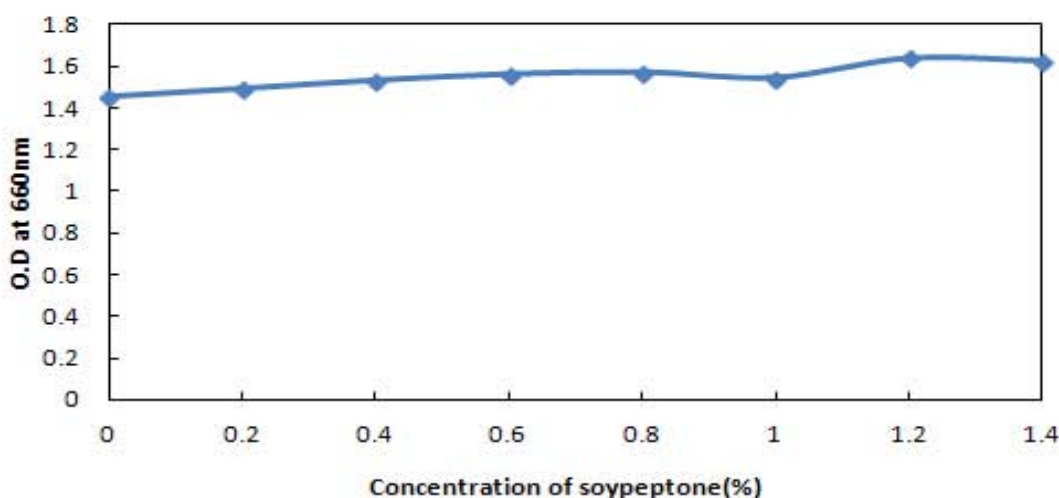
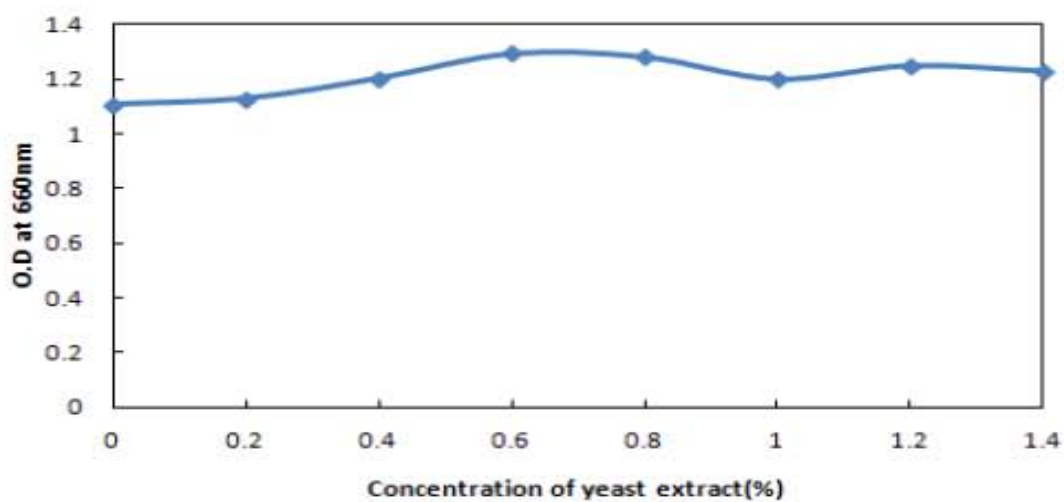
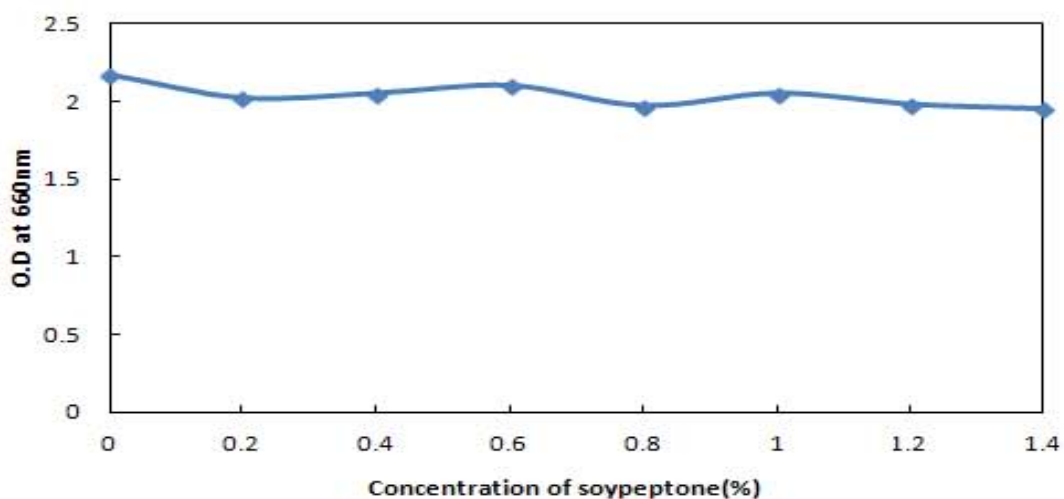


Fig. 13. Effect of concentration of yeast extract to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.



**Fig. 14. Effect of concentration of yeast extract to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**



**Fig. 15. Effect of concentration of soypeptone to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

#### (4) 무기염의 영향

무기염이 분리한 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 16, 18, 20에 나타내었다.

최적 배지 조건으로 9종류의 무기염 각각에 대한 영향을 검토한 결과, *Lactobacillus plantarum* BBG L30은  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 는 생육에 영향을 미쳤으나,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 같은 중금속염은 생육을 오히려 저해하는 것으로 나타났으며(Fig. 16), 최적 무기염은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2%로 결정하였다(Fig. 17).

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5는 최적 배지 조건으로, 9종류의 무기염 각각에 대한 영향을 검토한 결과,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 는 생육에 영향을 미쳤으나,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와 같은 중금속염은 생육을 오히려 저해하는 것으로 나타났으며(Fig. 18), 최적 무기염은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.6%로 결정하였다(Fig. 19).

*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6는 최적 배지 조건으로, 9종류의 무기염 각각에 대한 영향을 검토한 결과,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 생육에 영향을 미쳤으나,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와 같은 중금속염은 생육을 오히려 저해하는 것으로 나타났으며(Fig. 20), 최적 무기염은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2%로 결정하였다(Fig. 21).

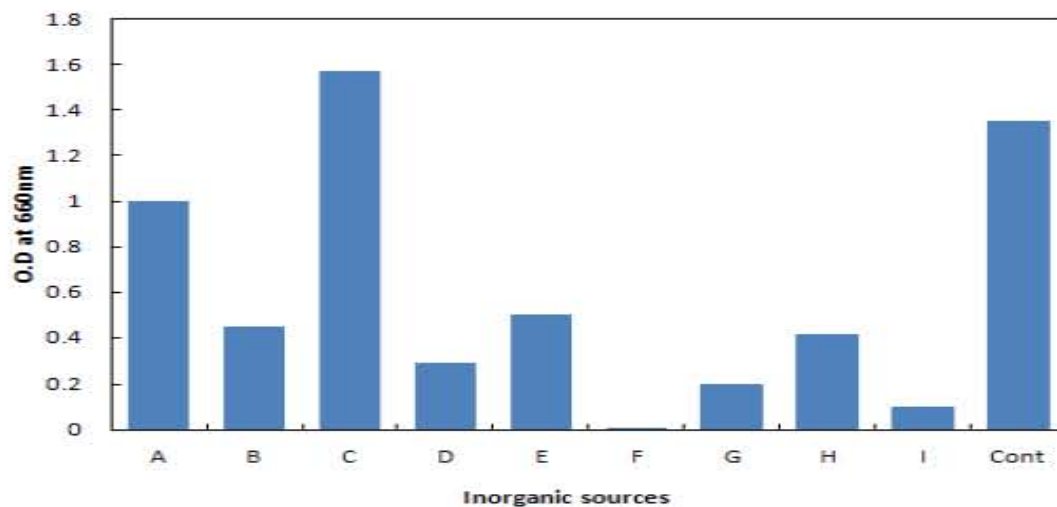


Fig. 16. Effect of inorganic salts to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.

A:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , C:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , D:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , F:  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , G:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , H:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , I:  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

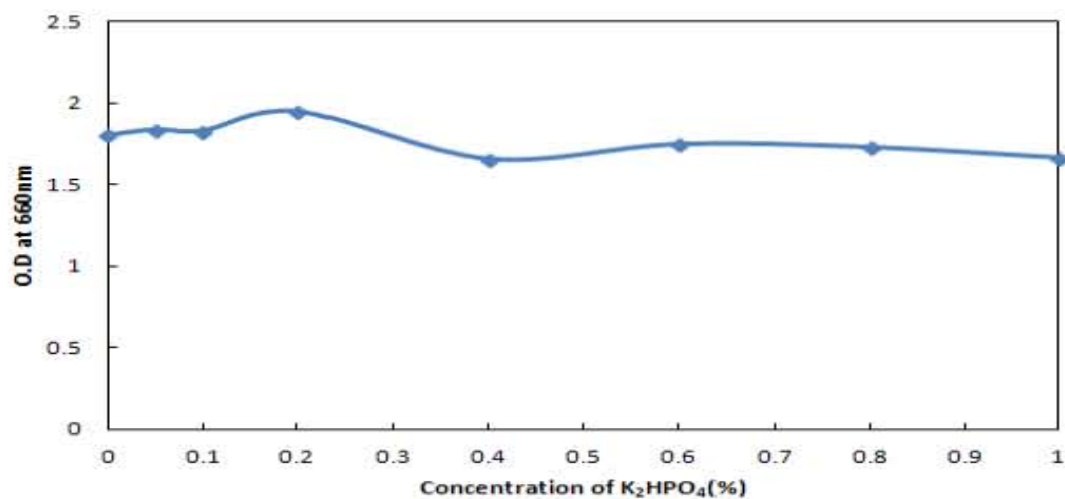
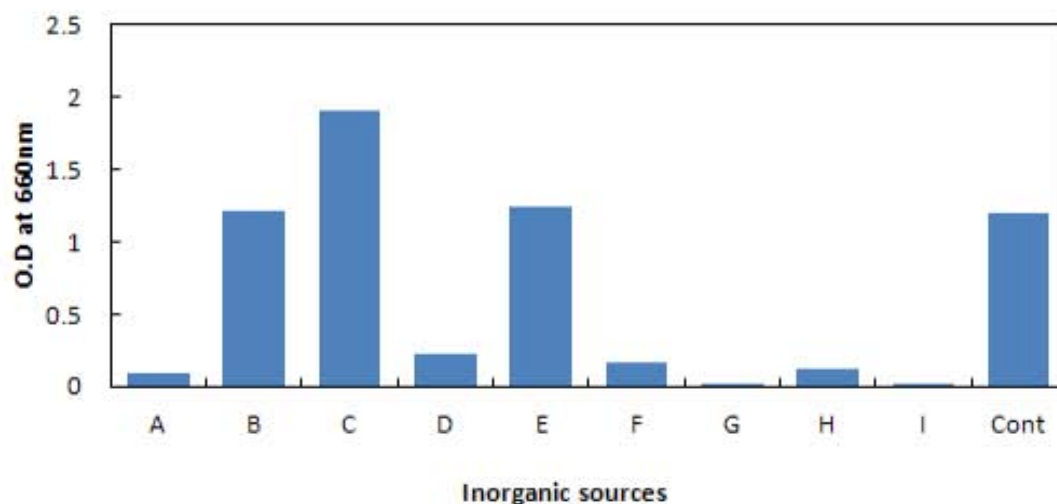
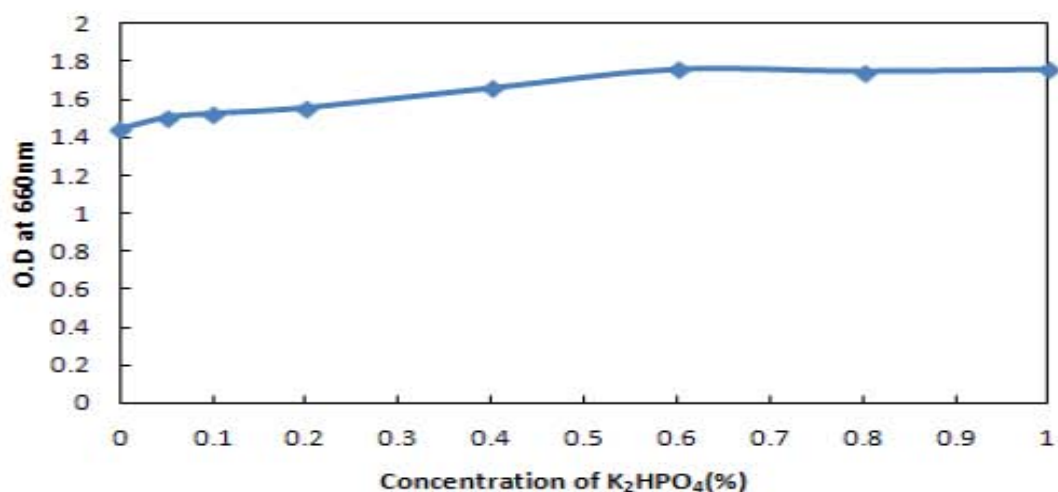


Fig. 17. Effect of concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  of the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.

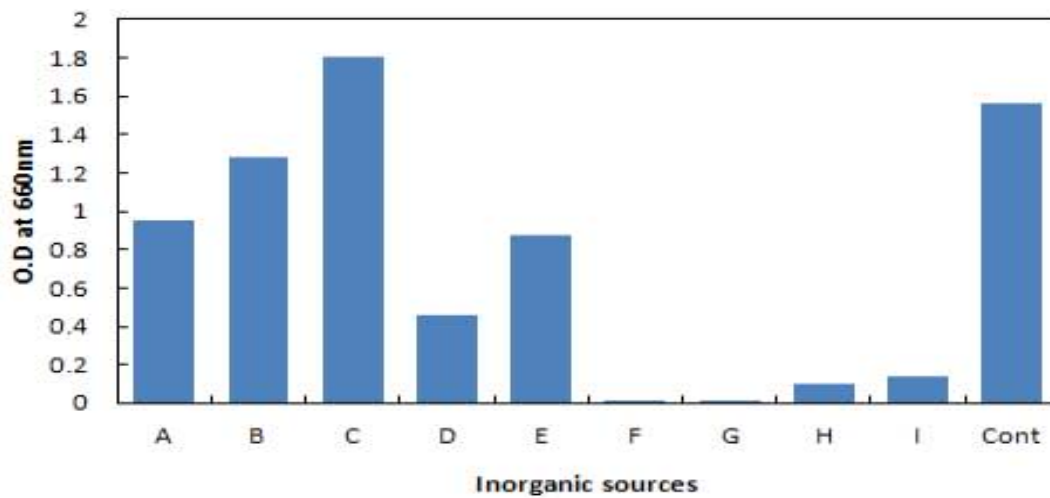


**Fig. 18.** Effect of inorganic salts to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.

A:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , C:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , D:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , F:  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , G:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , H:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , I:  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

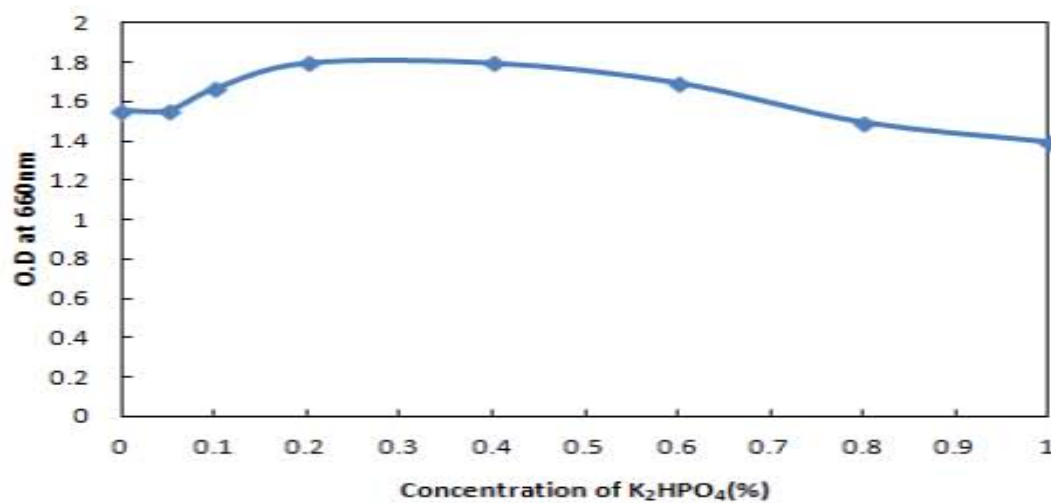


**Fig. 19.** Effect of concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  of the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.



**Fig. 20.** Effect of inorganic salts to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.

A:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , C:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , D:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , F:  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , G:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , H:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , I:  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$



**Fig. 21.** Effect of concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.

## 나. 최적배양조건 탐색

### (1) 온도의 영향

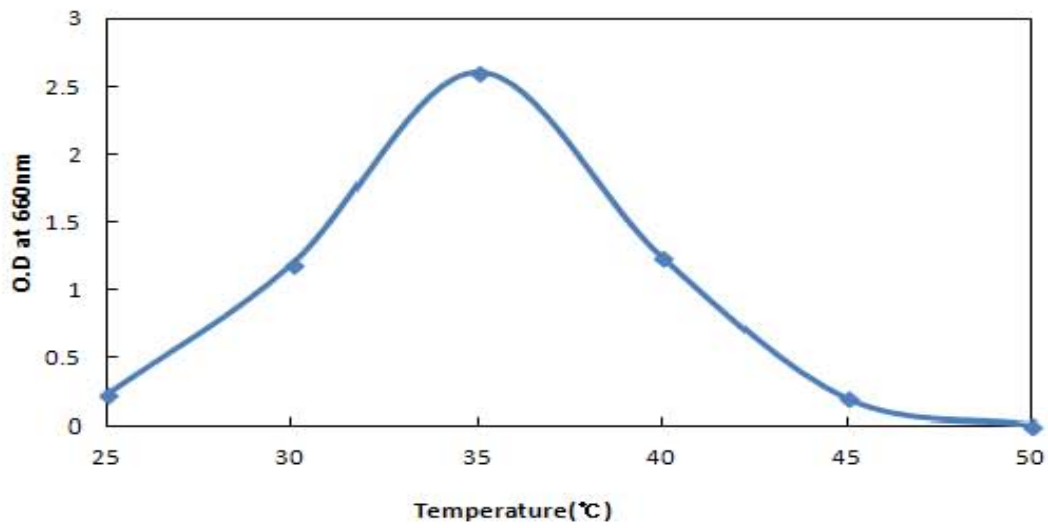
배양온도가 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 검토하여 Fig. 22, 23, 24에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30의 배양온도를 25~50℃ 범위로 변화시키면서 배양한 결과, 배양온도가 30℃에서 35℃로 높아짐에 따라 균체의 증식이 급격하게 이루어졌으나, 45℃에서 50℃까지는 급격하게 생육이 저해 되는 것으로 나타나, 생육 최적 온도를 35℃로 결정하였다 (Fig. 22).

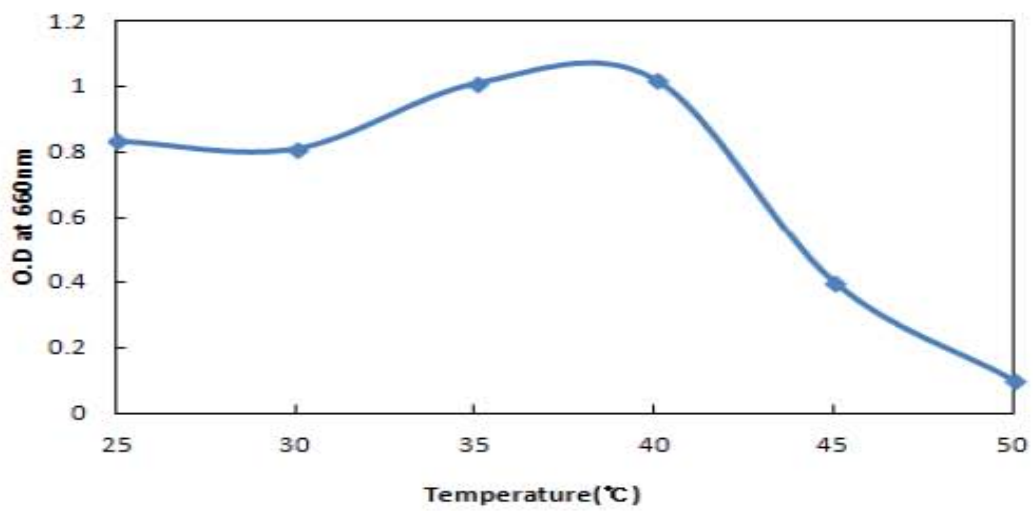
*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 배양온도를 25~50℃ 범위로 변화시키면서 배양한 결과, 배양온도가 25℃에서 40℃로 높아짐에 따라 균체의 증식이 급격하게 이루어졌으나, 45℃에서 50℃까지는 급격하게 생육이 저해 되는 것으로 나타나, 생육 최적 온도를 35℃로 결정하였다(Fig. 23).

*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 배양온도를 25~50℃ 범위로 변화시키면서 배양한 결과, 배양온도가 25℃에서 35℃로 높아짐에 따라 균체의 증식이 급격하게 이루어졌으나, 45℃에서 50℃까지는 생육이 저해 되는 것으로 나타나, 생육 최적 온도를 35℃로 결정하였다(Fig. 24).

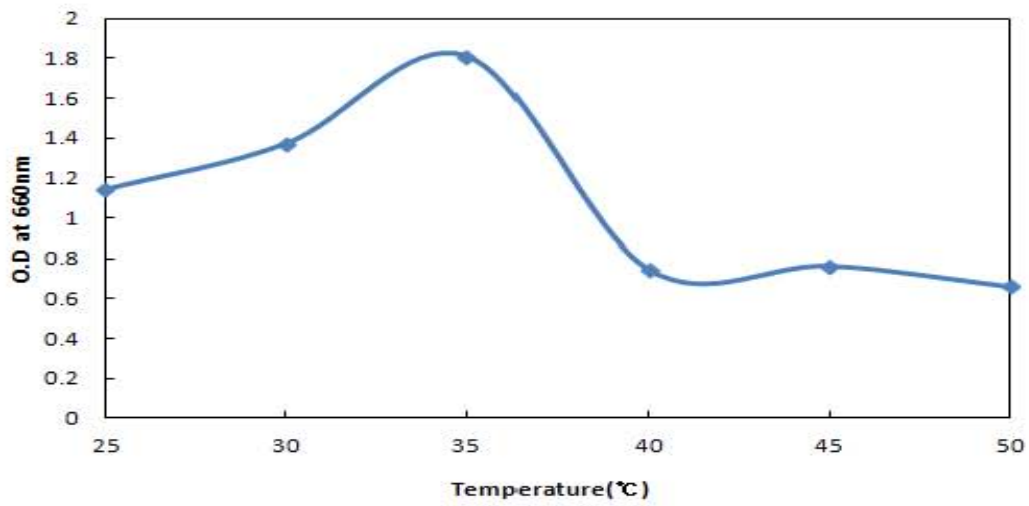




**Fig. 22. Effect of temperature to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**



**Fig. 23. Effect of temperature to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**



**Fig. 2A.** Effect of temperature to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BCG Y6.

## (2) 초기 pH의 영향

초기 pH가 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 검토하여 Fig. 25, 26, 27에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30은 pH 4.0이하에서는 생육이 급격히 떨어지는 현상을 보였으나, pH 5.0~8.0까지는 생육이 왕성하였다. 이상의 결과로 분리한 BBG L30의 배지의 초기 멸균 제조 시, pH 조정을 8.0로 결정하였다(Fig. 25).

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5는 pH 4.0이하에서는 생육이 급격히 떨어지는 현상을 보였으나, pH 5.0~8.0까지는 생육이 왕성하였다. 이상의 결과로 분리한 BBG B5의 배지의 초기 멸균 제조 시, pH 조정을 8.0로 결정하였다(Fig. 26).

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6는 pH 3.0~10.0까지 생육이 왕성하였다. 이상의 결과로 분리한 BBG Y6의 배지의 초기 멸균 제조 시, pH 조정을 8.0로 결정하였다(Fig. 27).

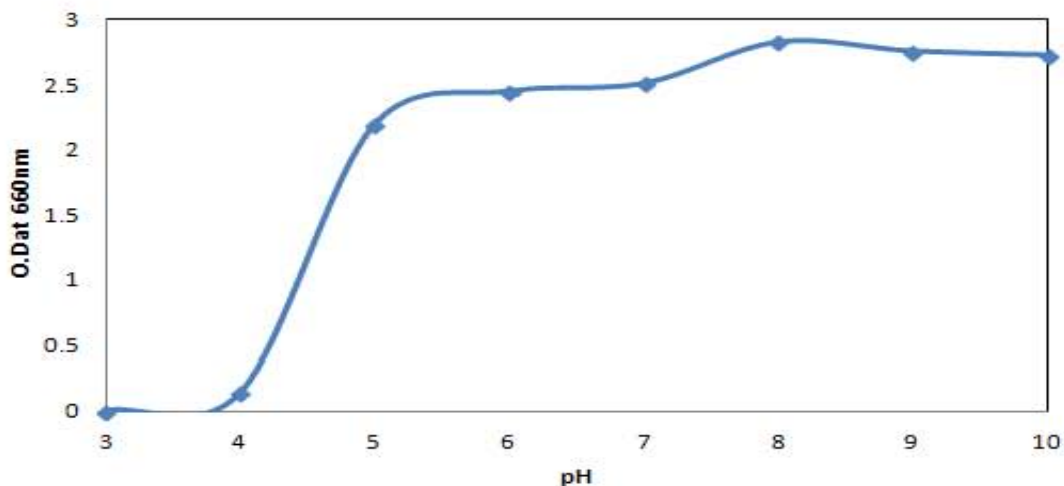
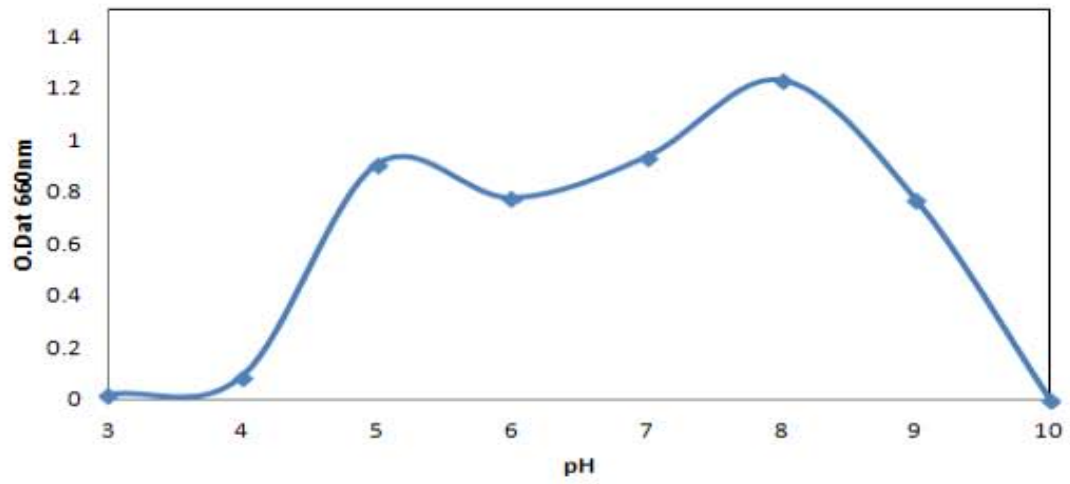
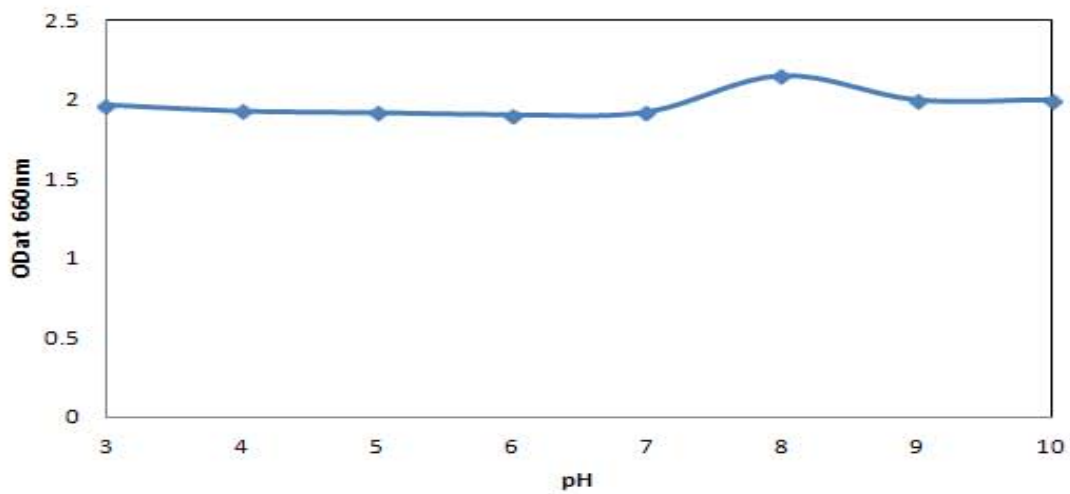


Fig. 25. Effect of pH to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.



**Fig. 26.** Effect of pH to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.



**Fig. 27.** Effect of pH to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.

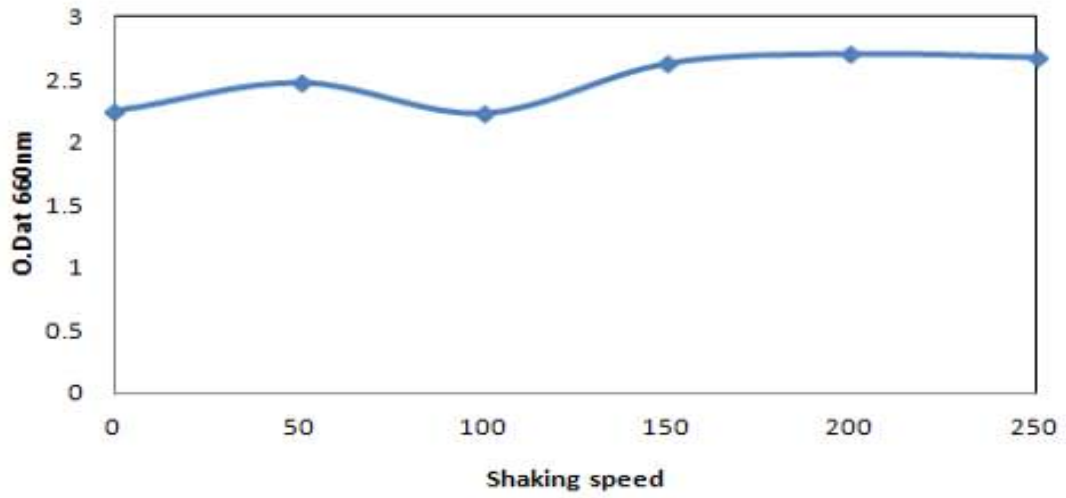
### (3) 교반 속도의 영향

교반속도가 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 28, 29, 30에 나타내었다.

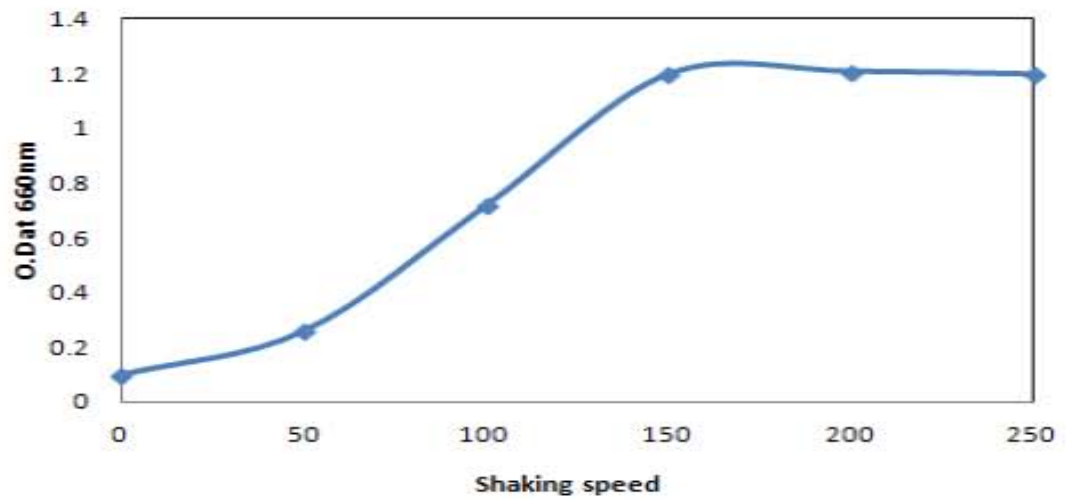
*Lactobacillus plantarum* BBG L30을 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에서 진탕속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250rpm으로 변화시키면서 배양한 결과, 0에서 250rpm까지 생육이 왕성하게 이루어 졌으며, 이상의 결과로 BBG L30의 배양을 위한 최적 진탕 속도는 200rpm으로 결정하였다(Fig. 28).

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5를 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에서 진탕속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250rpm으로 변화시키면서 배양한 결과 진탕 속도를 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 50에서 150rpm까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 이루어 졌으며, 150rpm 이상에서는 거의 비슷한 생육 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 BBG B5의 배양을 위한 최적 진탕 속도는 200rpm으로 결정하였다(Fig. 29).

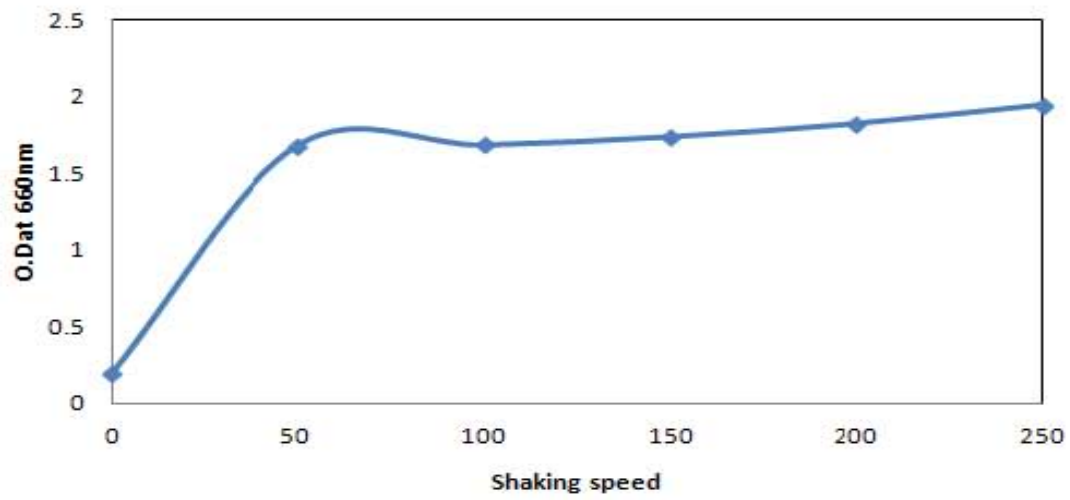
*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6를 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에서 진탕속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250rpm으로 변화시키면서 배양한 결과 진탕 속도를 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 50에서 250rpm까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 이루어 졌으며, 200rpm 이상에서는 거의 비슷한 생육 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 BBG Y6의 배양을 위한 최적 진탕 속도는 250rpm으로 결정하였다(Fig. 30).



**Fig. 28.** Effect of shaking speed to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.



**Fig. 29.** Effect of shaking speed to the growth of *Bacillus amyloquifaciens* BBG H5.



**Fig. 30. Effect of shaking speed to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**



#### (4) 배양시간의 영향

배양시간이 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 31~32에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30을 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에서, 진탕속도를 200rpm으로 0, 24, 48, 72, 96hr 배양한 결과 24hr에서 48hr까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 나타났으나, 48hr 이상의 시간에서는 거의 비슷한 생육 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 BBG L30의 배양을 위한 최적 배양 일수는 48hr로 결정하였다(Fig. 31).

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5를 배지 초기 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에서, 진탕속도를 200rpm으로 0, 24, 48, 72, 96hr 배양한 결과 배양 시간을 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 24hr에서 72hr까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 나타났으나, 96hr 이상의 시간에서는 거의 비슷한 생육 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 BBG B5의 배양을 위한 최적 배양 일수는 72hr로 결정하였다(Fig. 32).

*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6를 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에서, 진탕속도를 250rpm으로 0, 24, 48, 72, 96hr 배양한 결과 배양 시간을 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 24hr에서 72hr까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 나타났으나, 96hr 이상의 시간에서는 거의 비슷한 생육 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 BBG Y6의 배양을 위한 최적 배양 일수는 72hr로 결정하였다(Fig. 33).

이상의 결과를 바탕으로 *Lactobacillus plantarum* BBG L30의 최적 배지조성 및 최적배양 조건은 다음과 같다. 교반조건은 200rpm, 배양시간은 48hr, 배양온도는 35℃, 배지 조성은 glucose 2.5%, soypeptone 1.5%, yeast extract 1.2%,  $K_2HPO_4$  0.2%, 초기 pH 8.0으로 결정되었다(Table 1).

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 최적 배지조성 및 최적배양 조건은 다음과 같다. 교반조건은 200rpm, 배양시간은 72hr, 배양온도는 35℃, 배지 조성은 soluble starch 2.0%, soypeptone 1.5%, yeast extract 0.6%,  $K_2HPO_4$  0.6%, 초기 pH 8.0으로 결정되었다(Table 2).

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6의 최적 배지조성 및 최적배양 조건은 다음과 같다. 교반조건은 250rpm, 배양시간은 72hr, 배양온도는 35℃, 배지 조성은 sucrose 2.5%, yeast extract 0.6%,  $K_2HPO_4$  0.2%, 초기 pH 8.0으로 결정되었다(Table 3).

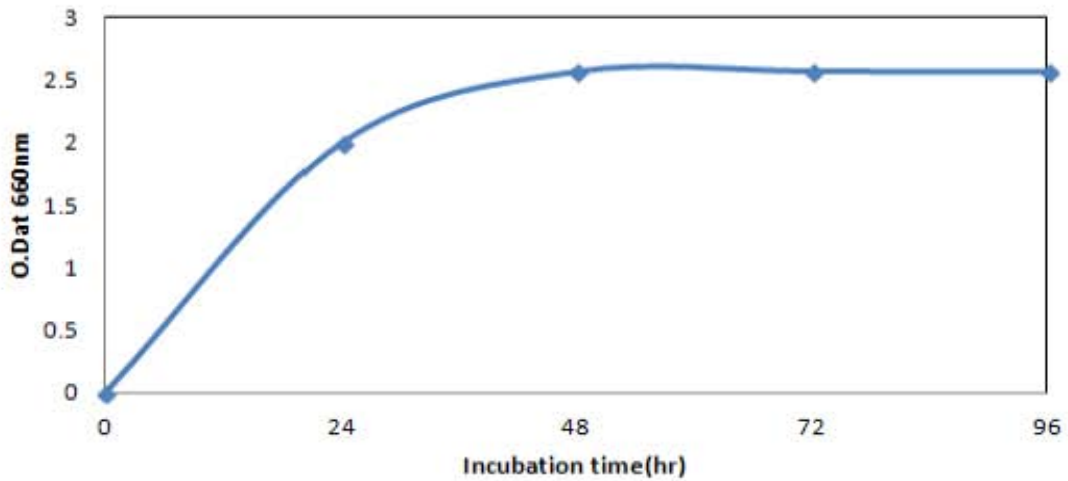


Fig. 31. Effect of incubation time to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.

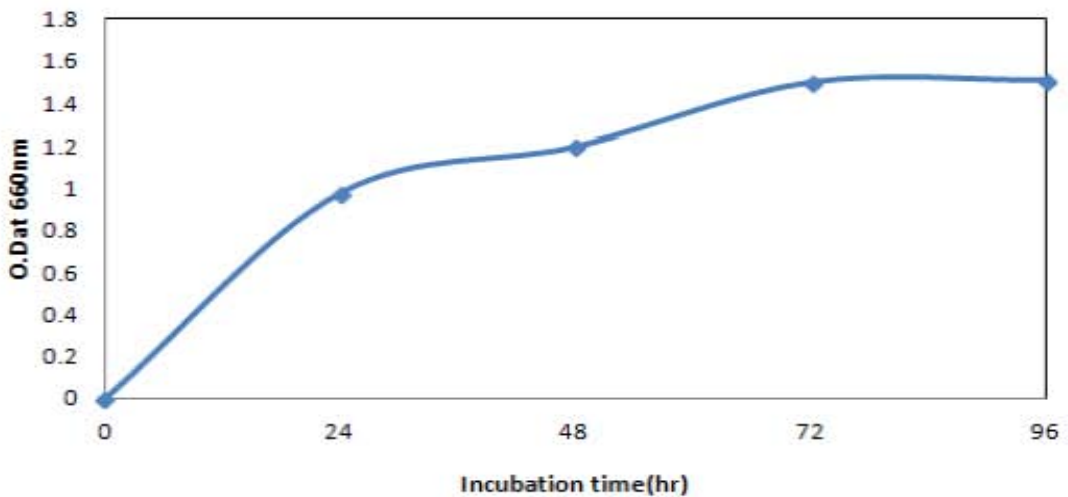
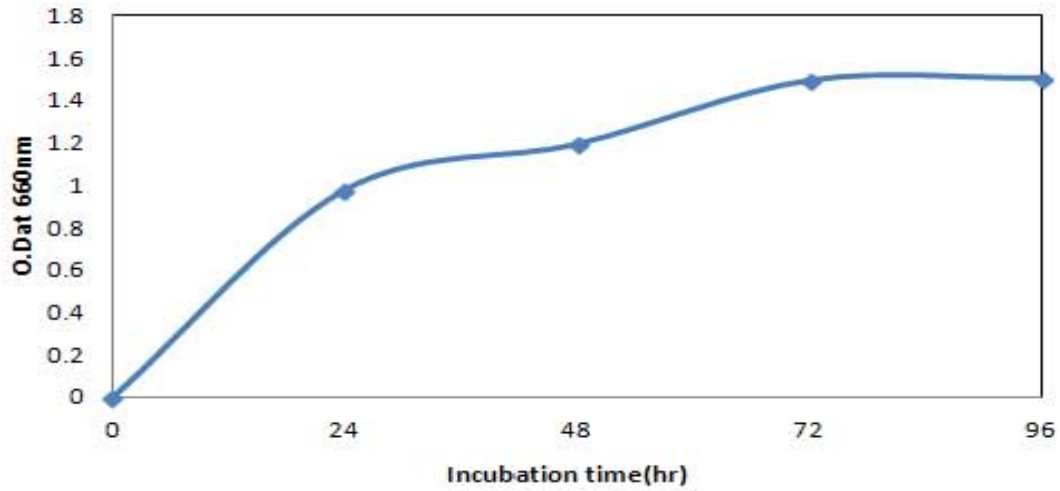


Fig. 32. Effect of incubation time to the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.



**Fig. 33. Effect of incubation time to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

**Table 1. Optimum condition for the cell growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**

Inoculation size	1.0%(v/v)
Agitation speed	200 rpm
Culture time	48 hr
Temperature	35°C
Glucose	2.5%(w/v)
Soypeptone	1.5%(w/v)
Yeast extract	1.2%(w/v)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2%(w/v)
pH	8.0

**Table 2. Optimum condition for the cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**

Inoculation size	1.0%(v/v)
Agitation speed	200 rpm
Culture time	72 hr
Temperature	35°C
Soble starch	1.0%(w/v)
Soypeptone	1.2%(w/v)
Yeast extract	0.6%(w/v)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6%(w/v)
pH	8.0

**Table 3. Optimum condition for the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

---

Inoculation size	1.0%(v/v)
Agitation speed	250 rpm
Culture time	72 hr
Temperature	35°C
Sucrose	2.5%(w/v)
Yeast extract	1.2%(w/v)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2%(w/v)
pH	8.0

---

다. 역상배양 시스템의 제정비 및 교체발효를 통한 발효 사료첨가제 생산을 위한 시설 인프라 설치

(1) 역상배양의 효율성 증진을 위한 기존 역상배양기 (5 ton / 1 Ton 멸균배양기) 제정비



pH sensor 장착 및 calibration 완료



고속 원심분리기



산업용 동결건조기

**(2) 발효 사료첨가제 및 효소제 병행 생산 시설 구축**



제2공장 신축 : 650 m<sup>2</sup>

- 1층 : 발효실 [50좌 (60발효상)]
- 2층 : 사무실 및 액상배양시스템 (고체발효 전용)



2014년 전반기내 3대 설치



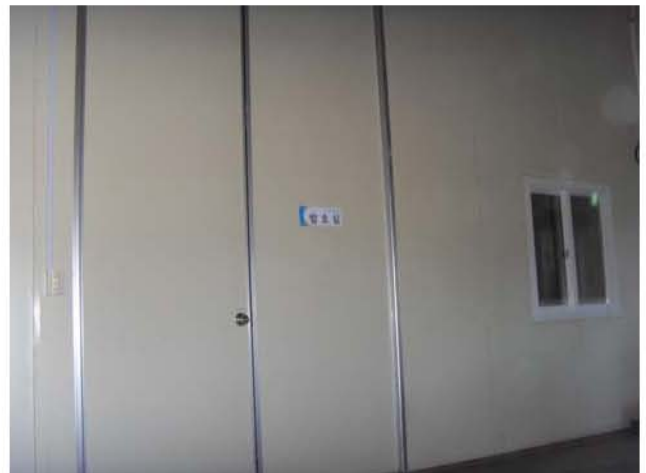
발효실 내부 전경



습도 / 온도 조절장치



비발열 type 분쇄기



발효실 입구



### 제 3 절 육계 발효사료 첨가제의 개발 및 사양실험(제2 위탁과제)용 발효사료 첨가제 공급

#### 1. 연구방법

##### 가. 가금티푸스 길항 유산균의 고체배양 조건 규명 및 발효사료 첨가제 개발

###### (1) 고상배양적용 미생물간의 길항효과 검증

선별한 균주(BBG L1, L29, L30, B1, B5, Y6)의 길항 여부를 확인하기 위해, 항균활성 방법과 동일하게 하여 실험하였으며, 유산균에 대한 길항 효과는 MRS agar에서 확인하였으며, 바실러스에 대한 길항 효과는 NB agar에서, 효모에 대한 길항 효과는 PDB agar에서 확인하였다.

###### (2) 고상배양적용 미생물간의 환경(pH, NaCl, 온도)에 따른 성장능력 파악.

pH에 따른 미생물 성장 검사는 HCl와 NaOH를 이용하여 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조정하여 테스트 하였으며, NaCl에 따른 미생물 성장 검사는 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0%를 첨가하여 테스트 하였고, 온도에 따른 미생물 성장 검사는 10, 18, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃에 배양하였다. 각 전 배양한 미생물을 준비하여 접종량은 1%, 35℃, 150rpm, 2일 배양하여 성장여부를 판단하였으며, 유산균은 MRS, 바실러스는 NB, 효모는 PDB를 멸균하여 이용하였다.

###### (3) 육계 사양시험용 발효 사료첨가제 제조

가금티푸스 길항유산균의 고체배양 조건이 설정되지 않아, 자사에서 사용하는 방법인 소맥피에 미생물(*Pediococcus acidilactic* BBG-L1, *Lactobacillus plantarum* BBG-L30, *Bacillus tequilensis* BBG-B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG-Y6)을 1% 접종하여, 수분함량을 50%가 되게 물을 첨가하였다. Growth chamber를 이용하여 35℃, 상대습도 95%으로 하여, 4일간 배양 및 발효를 진행하여, 건조한 것을, 위탁기관인 경상대학교에서 육계 사양테스트에 사용하였다

###### (4) 소맥피 발효물과 비발효물의 일반성분 및 아미노산 성분 변화검사

소맥피에 미생물(*Pediococcus acidilactic* BBG-L1, *Lactobacillus plantarum* BBG-L30, *Bacillus tequilensis* BBG-B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, *Saccharomyces*



*cerevisiase* BBG-Y6)을 1% 접종하여, 수분함량을 50%가 되게 물을 첨가하였다. Growth chamber를 이용하여 35℃, 상대습도 95%으로 하여, 4일간 배양 및 발효를 진행하여, 건조시켜 시료로 이용하였다. 발효시킨 것과 발효시키지 않은 것의 일반성분(조단백, 조지방, 조섬유, 조회분)을 AOAC법에 의하여 정량하였고, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl 법으로 측정하였다. 아미노산 17종에 대한 성분 비교를 amino acid auto analyzer(Amino acid analyzer S-433, Germany)를 사용하여 진행하였다.

#### (5) 고상배양 시 적용할 첨가미생물 및 발효시간 선택

첨가 미생물 종류를 선택하기 위해, 균종(유산균+바실러스+효모, 유산균+효모, 유산균+바실러스, 유산균)을 달리하여, 1%의 미생물을 소맥피에 접종하였고, 수분이 50%가 되게 물을 첨가하였다. 1, 4, 7일간, 35℃에서 혐기조건에서 발효시켜, 경과일에 따른 생균수 및 pH 변화를 측정하였다. 고상 배양시 사용된 균주는 유산균은 *Pediococcus acidilactic* BBG-L1, *Lactobacillus plantarum* BBG-L30를 혼합하여 사용하였으며, 바실러스는 *Bacillus tequilensis* BBG-B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5를 혼합하여 사용하였고, 효모는 *Saccharomyces cerevisiase* BBG-Y6를 이용하였다.

#### (6) 부산물 제제 탐색

고상배양은 실험 방법 (5)와 같은 방법으로 진행하였으며, 발효부산물은 소맥피, 탈지대두박, 탈지미강, 옥테말분, 두유박을 각각 4일간 발효시켜, 생균수 및 pH 검사를 진행하였다.

#### (7) 부산물 혼합제제 탐색

고상배양은 실험 방법 (5)와 같은 방법으로 진행하였으며, 발효부산물은 소맥피, 탈지대두박, 탈지미강, 옥테말분을 혼합하여 4일간 발효시켜, 생균수 검사를 진행하였다.

#### (8) 당첨가 차이에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

발효 시 당첨가(corn starch, glucose, sucrose, soluble starch)에 따른 생균수 및 pH 검사를 통해 발효상태를 검사하였다.

#### (9) 호기와 혐기 배양법에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

호기배양, 혐기배양조건에 발효시켜, 미생물 변화 경향을 검사하였으며, 또한 호기 or 혐기 상태에서의 미생물 균종 변화(유산균+바실러스+효모, 바실러스)에 따른 차이를 검사하였다.

(10) 온도 차이에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

발효 온도(25, 30, 35, 40, 45℃) 차이에 따른 생균수 및 pH 검사를 통해 발효상태를 검사하였다.

(11) 미생물 접종량에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

접종량 차이에 따른 생균수 및 pH 검사를 통해 발효상태를 검사하였다.

(12) 미생물 접종비율에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

접종비율 차이에 따른 생균수검사를 통해 발효상태를 검사하였다.

(13) 당첨가량 차이에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

당첨가량 차이에 따른 생균수검사를 통해 발효상태를 검사하였다.

나. 육계 사양실험 적용을 위한 발효 사료첨가제 시료 생산

2. 연구결과

가. 가금티푸스 길항 유산균의 고체배양 조건 규명 및 발효사료 첨가제 개발

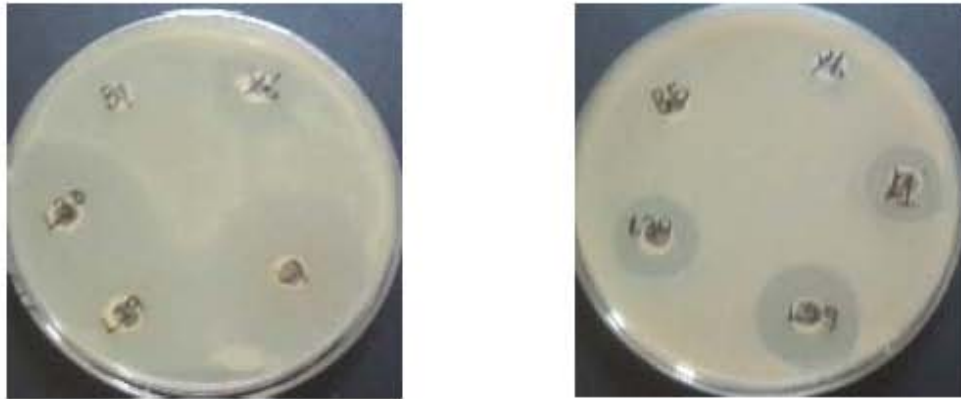
(1) 고상배양 적용 미생물간의 길항효과 검증

유용미생물의 길항 테스트 결과 유산균에 대한 효모, 바실러스, 유산균의 길항효과는 나타나지 않았으며, 효모에 대한 바실러스, 유산균의 길항효과는 나타나지 않았다. 바실러스에 대한 길항효과는, 유산균(*Pediococcus acidilactic* BBG L1, *Lactobacillus plantarum* BBG L30) 과, 효모(*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6) 배양액에서 *Bacillus tequilensis* BBG B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5에 대한 길항효과를 나타내었다(Fig. 1).

일반적으로 유산균에 의한 바실러스에 대한 길항효과를 가지고 있으나, 효모에 의한 바실러스 길항효과는 잘 나타나지 않는 것으로 보고 되어, 향후 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6에 병원성 미생물에 대한 항균효과 검증과 다른 생리활성물질효과 검증을 진행할 예정이다. 고체배지를 이용한 실험에서는 바실러스 2종에 대한 유산균과 효모의 길항효과가 나타났으나, 배양환경이 다르므로, 고상배양 시에는 다른 결과가 나올 수 있을 것으로 판단되어, 선별한 균주(BBG L1, L29, L30, B1, B5, Y6)를 이용하여 고상배양 테스트에 이용하였다.

고상배양테스트에서는 유산균으로 *Pediococcus acidilactic* BBG L1, *Lactobacillus plantarum* BBG L30를 혼합하여 사용하였으며, 효모는 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6를 사

용하였고, 바실러스는 *Bacillus tequilensis* BBG B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5를 혼합하여 사용하였다.



**Fig. 1. Growth inhibition of isolated bacteria on NA.**

(2) 고상배양 적용 미생물의 환경(pH, NaCl, 온도)에 따른 성장능력 파악.

고상 배양 시 사용하는 부산물 중에는 약산성이거나, 고농도의 염이 함유되어 있는 경우가 많아, 고상 배양 시 사용할 미생물(BBG L1, L30, B1, B5, Y6)의 pH와 NaCl의 농도에 따른 성장능력을 파악하였다. 또한 온도에 대한 성장 능력을 파악하여, 개발 제품을 생산 현장에서 사용 시, 저온과 고온에서 잘 자라는 미생물을 검증하였다.

pH 변화에 따른 유산균 *Pediococcus acidilactic* BBG L1, *Lactobacillus plantarum* BBG L30는 pH 2-3의 범위에서는 생육을 못하였으며, pH 4-10의 범위에서는 생육이 가능한 것으로 나타났다. 바실러스 *Bacillus tequilensis* BBG B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5는 pH 2-4, 10의 범위에서는 생육을 못하였으며, pH 4-9의 범위에서는 생육이 가능한 것으로 나타났다. 효모 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6는 pH 2에서는 생육을 못하였으며, pH 3-10의 범위에서는 생육이 가능한 것으로 나타나, 바실러스 보다 산성이나, 알칼리조건에서 생육이 더 유리한 것으로 판단된다(Tabel 1).

Table 1. Effect of pH to the growth of strains.

pH	L1	L30	B1	B5	Y6
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+
4	+	+	-	-	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	+

NaCl 변화에 따른 유산균 *Pediococcus acidilactic* BBG L1, *Lactobacillus plantarum* BBG L30는 8.0%의 이상의 농도에서는 생육을 못하였으며, 6.0%의 이하의 농도에서는 생육이 가능한 것으로 나타났다. 바실러스 *Bacillus tequilensis* BBG B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5는 0-10.0%의 농도에서도 생육이 가능한 것으로 나타나 고농도의 염분이 존재하여도 생육이 가능한 것으로 나타났다. 효모 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6는 0-10.0%의 농도에서도 생육이 가능한 것으로 나타나 고농도의 염분이 존재하여도 생육이 가능한 것으로 나타났다. 바실러스, 효모가 유산균보다 NaCl 고농도 조건에서 생육이 유리한 것으로 나타났다 (Table 2).

**Table 2. Effect of NaCl to the growth of strains.**

NaCl(%)	L1	L30	B1	B5	Y6
0	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+
10	-	-	+	+	+

온도 변화에 따른 유산균 *Pediococcus acidilactic* BBG L1, *Lactobacillus plantarum* BBG L30는 10℃ 이하, 50℃ 이상의 온도에서는 생육을 못하였으며, 18-45℃의 온도에서는 생육이 가능한 것으로 나타났다. 바실러스 *Bacillus tequilensis* BBG B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5는 10℃ 이하의 온도에서는 생육을 못하였으며, 18-50℃의 온도에서는 생육이 가능한 것으로 나타났다. 효모 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6는 , 10-50℃의 온도에서 생육이 가능한 것으로 나타났다. 바실러스, 효모는 유산균과 고온에서 생육이 유리하였으며, 효모는 유산균과 바실러스보다 저온에서 생육이 유리한 것으로 나타나는 특성을 나타냈다(Table 3).

**Table 3. Effect of temperature to the growth of strains.**

Temperature(℃)	L1	L30	B1	B5	Y6
10	-	-	-	-	+
18	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+

### (3) 육계 사양테스트 시료 제조

육계사양테스트를 1/4분기에 진행하여, 가금티푸스 길항유산균의 고체배양 조건이 설정되지 않아, 자사에서 사용하는 방법인 소맥피에 미생물(*Pediococcus acidilactic* BBG-L1, *Lactobacillus plantarum* BBG-L30, *Bacillus tequilensis* BBG-B1, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG-Y6)을 방법을 적용하였다. 발효물 생균수 검사를 한 결과 유산균  $4.6 \times 10^8$  cfu/g, 바실러스  $1.2 \times 10^7$  cfu/g, 효모  $4.6 \times 10^7$  cfu/g 로 나타났으며, 발효 후 pH는 4.52(초기 pH 6.44)를 나타냈다. 발효사료 건조물을 위탁기관인 경상대학교에서 육계 사양테스트에 사용하였다.

#### (4) 소맥피를 이용한 발효물과 미발효물의 일반성분 및 아미노산 성분 변화검사

소맥피를 발효시킨 것과 발효시키지 않은 것의 일반성분(조단백, 조지방, 조섬유, 조회분, 칼로리)과 아미노산 17종에 대한 성분 비교를 진행하였다.

발효물과 미발효물의 조단백질 성분은 발효물이 16.72%으로 미발효물의 15.09% 보다 1.63% 높게 나타났으며, 조지방 성분은 발효물이 2.84%, 미발효물이 3.44%로, 발효물보다 0.6% 높게 나타났다. 조회분 성분은 발효물이 5.10%으로 미발효물의 4.69% 보다 0.41% 높게 나타났으며, 조섬유 성분은 발효물이 9.79%으로 미발효물의 9.11% 보다 0.78% 높게 나타났다. 칼로리는 발효물이 4,049cal/g으로 미발효물의 3,945 보다 104칼로리 높게 나타났다. 전반적으로 조지방을 제외한 모든 성분함량이 미발효물보다 발효물이 높게 나타나는 것을 보았을 때, 발효과정 시 미생물의 영양소 이용과 대사산물의 생성에 의한 효과라 판단된다(Table. 4).

**Table 4. Contents of general component and energy in feedstuff.**

Material	Crude Protein (%)	Crude Fat (%)	Crude Ash (%)	Crude Fiber (%)	Energy (cal)
Wheat bran	15.09	3.44	4.69	9.11	3,945
Fermented Wheat bran	16.72	2.84	5.10	9.79	4,049

**Table 5. Amino acid contents in feedstuff.**

Contents	Wheat bran	Fermented Wheat bran
	(%)	(%)
Alanine	0.744	0.833
Arginine	1.068	1.157
Aspartic acid	1.091	1.137
Cystein	0.275	0.284
Glutamic acid	2.718	2.878
Glycine	0.822	0.904
Histidine	0.439	0.482
Isoleucine	0.461	0.516
Leucine	1.039	1.136
Lysine	0.683	0.749
Methionine	0.178	0.181
Phenylalanine	0.617	0.696
Proline	0.968	1.051
Serine	0.663	0.709
Threonine	0.550	0.587
Tyrosine	0.456	0.441
Valine	0.666	0.721
Total	13.438	14.462

발효물과 미발효물의 17종 아미노산 성분함량은, 미 발효물인 Tyrosine(0.456%)성분이 발효물의 Tyrosine(0.441) 성분보다 높은 것을 제외하고는, 16종(Alanine, Arginine, Aspartic acid, Cystein, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Valine)의 아미노산 함량이 미발효물보다 발효물의 함량이 높게 나타났다. 17종의 아미노산 함량 합계를 보면 미 발효물의 총 함량은 13.438%이며, 발효물의 총함량은 14.462%으로 1.0% 이상의 아미노산 함량이 높은 것으로 나타났다. 이는 미생물 발효 시에 분비되는 효모를 비롯한, 유산균, 바실러스균의 발효과정중 아미노산을 생성에 기여하기 때문으로 판단된다(Table 5).

#### (5) 고상배양 시 적용할 첨가미생물 및 발효시간 선택.

발효사료 제조 시, 첨가 미생물 종류를 선택하기 위해, 균종을 달리하여, 1. 유산균, 2. 유산균+바실러스, 3. 유산균+효모, 4. 유산균+바실러스+효모를 배양하였다.



유산균 단일 배양 시에 1일 차에  $1.2 \times 10^8$ cfu/g의 생균수가 검출되었으나, 발효 4일째  $5.0 \times 10^6$ cfu/g이 나타났고, 발효 7일째에  $1.0 \times 10^6$ cfu/g로 생균수가 검출되어, 발효일이 늘어나면 유산균의 생균수가 지속적으로 저하되는 현상이 나타났다(Fig. 2).

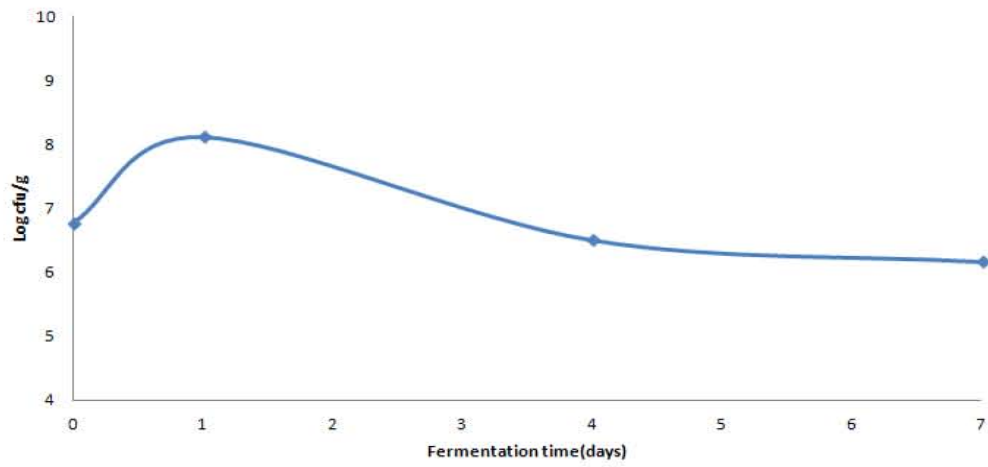
유산균 + 바실러스 배양 시에 1일 차에 유산균  $4.3 \times 10^8$ cfu/g, 바실러스  $1.5 \times 10^6$ cfu/g의 생균수가 검출되었으나, 발효 4일째 유산균  $7.0 \times 10^7$ cfu/g, 바실러스  $1.3 \times 10^6$ cfu/g이 나타났고, 발효 7일째에 유산균  $6.7 \times 10^7$ cfu/g, 바실러스  $1.5 \times 10^5$ cfu/g로 생균수가 검출되어, 발효일이 늘어나면, 유산균의 경우 유산균 단일 배양 시보다는 안정적인 상태로 된 것으로 판단되나, 바실러스의 생균수가 지속적으로 저하되는 현상이 나타났다(Fig. 3).

유산균 + 효모 배양 시에 1일 차에 유산균  $5.9 \times 10^6$ cfu/g, 효모  $2.1 \times 10^6$ cfu/g의 생균수가 검출되었으나, 발효 4일째 유산균  $4.2 \times 10^8$ cfu/g, 효모  $3.3 \times 10^6$ cfu/g이 나타났고, 발효 7일째에 유산균  $6.0 \times 10^7$ cfu/g, 효모  $1.0 \times 10^7$ cfu/g로 생균수가 검출되어, 발효일이 늘어나면, 유산균의 경우 유산균 단일 배양 시보다는 느리게 배양이 진행되는 것으로 나타났으며, 안정성 부분에는 유리한 것으로 판단된다. 효모의 경우 느린 성장으로 인해, 발효 마지막 날에 배양이 되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

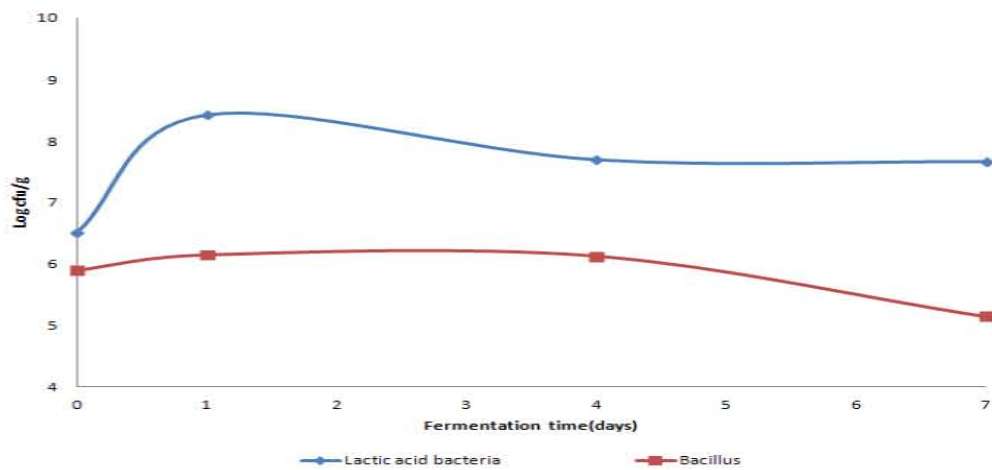
유산균 + 바실러스 + 효모 배양 시에 1일 차에 유산균  $8.3 \times 10^7$ cfu/g, 바실러스  $1.4 \times 10^6$ cfu/g, 효모  $4.0 \times 10^6$ cfu/g의 생균수가 검출되었으나, 발효 4일째 유산균  $2.2 \times 10^8$ cfu/g, 바실러스  $1.2 \times 10^8$ cfu/g, 효모  $3.2 \times 10^8$ cfu/g이 나타났고, 발효 7일째에 유산균  $1.1 \times 10^7$ cfu/g, 바실러스  $2.2 \times 10^5$ cfu/g, 효모  $3.2 \times 10^6$ cfu/g로 생균수가 검출되어, 발효일이 늘어나면, 유산균의 경우 유산균 단일 배양 시보다는 느리게 배양이 진행되는 것으로 나타났으며, 안정성 부분에는 유리한 것으로 판단된다. 바실러스의 경우 발효 4일차에 급격하게 생장이 이루어지는 것으로 나타났으며, 효모의 경우도 발효 4일차에 급격하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

발효에 의한 pH 변화는 발효 1일 차는 유산균 단일 배양 시에 가장 낮게 나타났으며, 유산균 + 바실러스 + 효모 배양 시가 가장 높게 나타났다. 발효 4일 차는 유산균 단일 배양 시에 가장 낮게 나타났으며, 유산균 + 바실러스 + 효모와 유산균 + 효모 배양 시에 높게 나타났다. 발효 7일 차는 유산균 단일 배양 시에 가장 낮게 나타났으며, 유산균 + 효모 배양 시에 가장 높게 나타났다(Fig. 6).

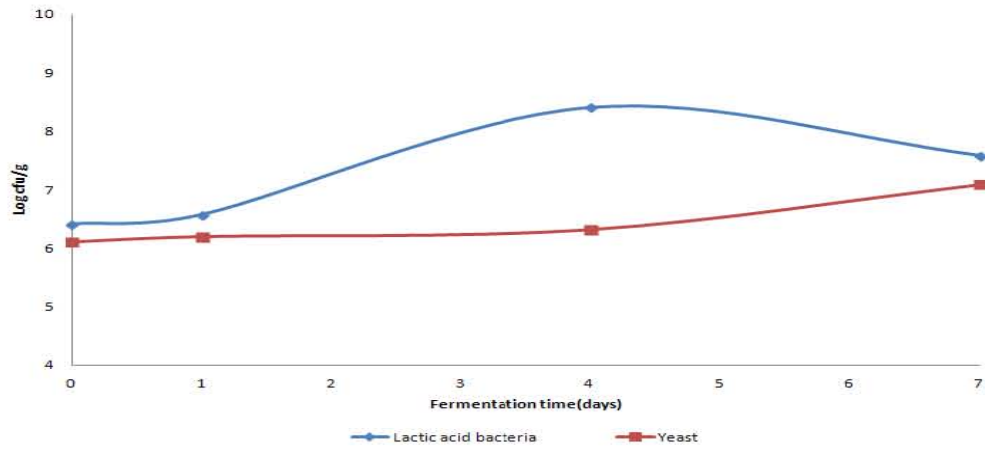
미생물의 접종액의 균 조성(1. 유산균, 2. 유산균+바실러스, 3. 유산균+효모, 4. 유산균+바실러스+효모)에 따라, 배양 패턴이 달라지는 것으로 나타났으며, 이상의 결과로 판단하였을 때, 발효 사료 제조 시에는 유산균+바실러스+효모의 조성으로 결정하였고, 발효시간은 4일로 결정하였다.



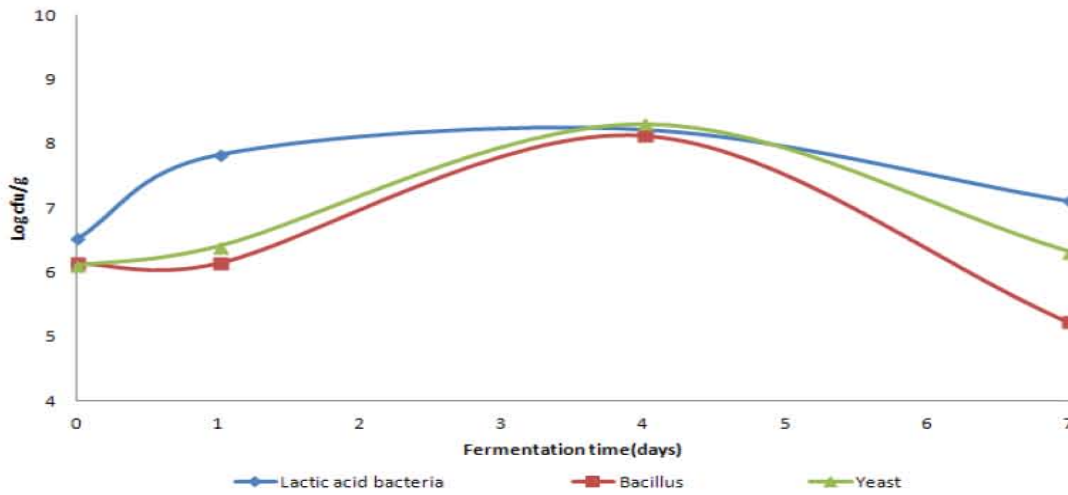
**Fig. 2. Viable cell change of Lactic acid bacteria by fermentation time.**



**Fig. 3. Viable cell change of Lactic acid bacteria and Bacillus by fermentation time**



**Fig. 4. Viable cell change of Lactic acid bacteria and Yeast by fermentation time.**



**Fig. 5. Viable cell change of Lactic acid bacteria, Bacillus and Yeast by fermentation time.**

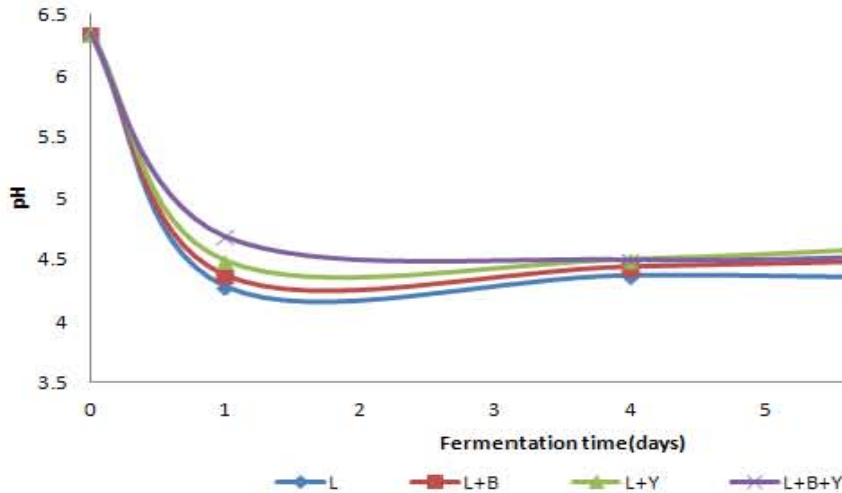


Fig. 6. pH change of Lactic acid bacteria, Bacillus and Yeast by fermentation time.

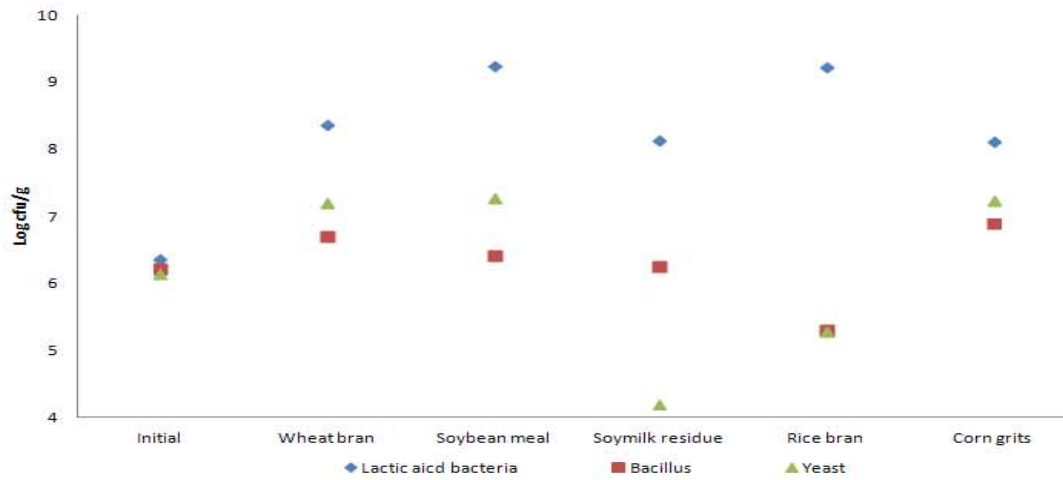
\* L: Lactic acid bacteria, L+B: Lactic acid bacteria, Bacillus, L+Y: Lactic acid bacteria, yeast, L+B+Y: Lactic acid, Bacillus, Yeast.

#### (6) 부산물 계제 탐색

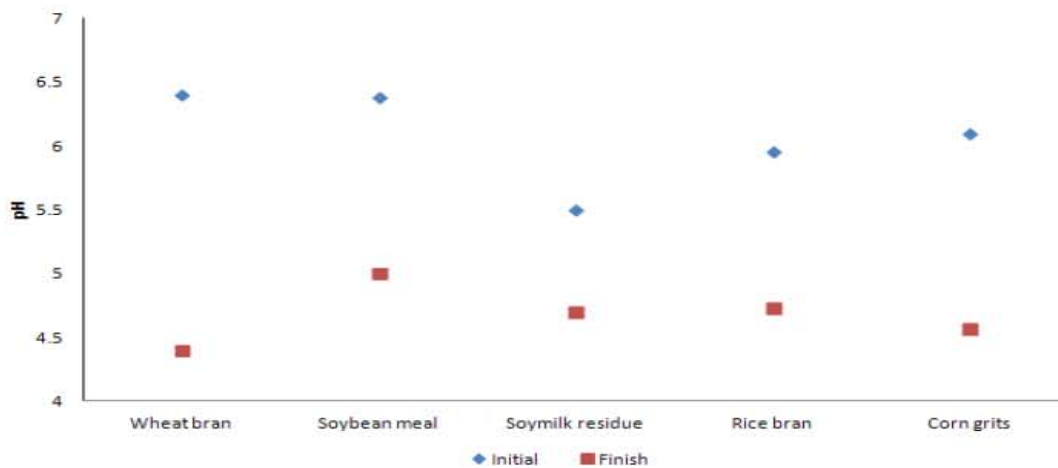
일반적으로 구하기 용이한 농업부산물인 소맥피, 대두박, 두유박, 미강, 옥태말분에 미생물을 배양하기 위한 원료를 결정하기 위해 테스트하였다.

Fig. 7과 같이, 유산균, 바실러스, 효모의 생균수를 보았을 때, 대두박(soybean meal) 발효물이 유산균  $2.3 \times 10^9$  cfu/g, 바실러스  $4.3 \times 10^6$  cfu/g, 효모  $2.8 \times 10^7$  cfu/g으로 나타나, 소맥피 발효물에 비해 유산균 개체수가 많았으며, 미강에 비해 효모, 바실러스 개체수가 많아 부형제 단일 사용 시, 대두박을 주원료로 결정하였다.

Fig. 8과 같이, 발효물의 pH 측정결과 소맥피(6.40→4.40), 대두박(6.38→5.00), 두유박(5.50→4.70), 미강(5.96→4.73), 옥태말분(6.10→4.57)로 나타났으며, 대두박 발효물의 pH가 5.00으로 나타나, 유산균, 바실러스, 효모의 저장성이 다른 원료에 비해 유리한 것으로 판단된다.



**Fig. 7. Viable cell change of various materials by fermentation.**



**Fig. 8. PH change of various materials by fermentation.**

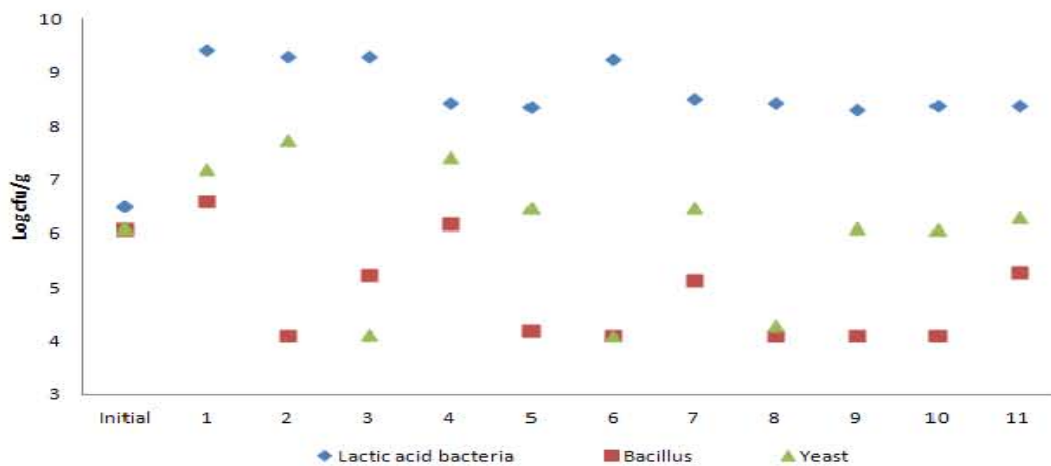
**(7) 부산물 혼합제제 탐색**

단일 원료 사용 시, 대두박이 880원/kg, 소백피 350원/kg, 미강 320원/kg, 옥태말분 450원/kg 선으로, 대두박의 가격이 높아, 혼합 원료를 사용 하여, 미생물 기체수와 단가절하의 효과를 검정하기 위해 다음과 같은 조성으로 실험을 진행하였다(Table 6).

Fig. 9와 같이, 유산균, 바실러스, 효모의 생균수를 보았을 때, 혼합 조성 시, 7(대두박 50%, 옥데말분 50%, 유산균  $2.6 \times 10^9$ cfu/g, 바실러스  $1.2 \times 10^4$ cfu/g, 효모  $1.2 \times 10^4$ cfu/g)의 제형에서 유산균이 잘나온 것을 제외하고는, 단일 조성 시 보다 생균수가 적게나와 혼합 조성보다는 단일 조성으로 가는 것으로 결정하였다. 단일 조성 시 Fig 9와 거의 유사한 결과로, 대두박(soybean meal) 발효물이 유산균  $4.3 \times 10^9$ cfu/g, 바실러스  $6.1 \times 10^6$ cfu/g, 효모  $2.0 \times 10^7$ cfu/g으로 나타나, 혼합조성으로 인한 발효보다는 대두박으로 단일 배양하여, 첨가량을 약간 줄이는 방식이 더 효율적이고, 단가 절감 면에서 유리한 것으로 판단된다.

**Table 6. Mixing ratio of raw materials.**

No	Soybean meal	Wheat bran	Rice bran	Corn grits
(%)				
1	100	-	-	-
2	-	100	-	-
3	-	-	100	-
4	-	-	-	100
5	50	50	-	-
6	50	-	50	-
7	50	-	-	50
8	50	25	25	-
9	50	-	25	25
10	25	50	-	25
11	25	25	25	25



**Fig. 9. Viable cell change by mixing ratio of raw materials.**

### (8) 당첨가 차이에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

대두박을 이용한 발효 시 당첨가(corn starch, glucose, sucrose, soluble starch)에 따른 발효폐턴을 점검하였다.

Fig. 10과 같이 유산균의 경우 당 첨가 하였을 때 보다, 무첨가구에서 높게 나타나, 당 첨가에 의해, 유산균이 성장하는데 이용하지 않은 것으로 판단된다.

바실러스의 경우 당 첨가 하였을 때, 대조구가  $1.0 \times 10^5$ cfu/g로 나타났으며, glucose 첨가구가  $2.3 \times 10^7$ cfu/g, sucrose 첨가구가  $2.6 \times 10^7$ cfu/g로 다른 실험구에 비해 높게 나타났다. 이는 바실러스가 대두박 내에서 고상 발효 시에, 단당류와 이당류 같은 이용하기 쉬운 저탄당의 영양분을 개체수 증식에 이용하기 때문인 것으로 판단된다.

효모의 경우 당 첨가 하였을 때, 대조구가  $2.2 \times 10^6$ cfu/g로 나타났으며, corn starch 첨가구가  $1.6 \times 10^7$ cfu/g, soluble starch 첨가구가  $1.2 \times 10^7$ cfu/g로 다른 실험구에 비해 높게 나타났다. 효모의 액상 배양 시 corn starch, soluble starch를 탄소원으로 첨가하게 되면, 거의 탄소원으로 이용하지 못하는 현상이 대부분의 효모에서 일어나는 것을 보았을 때, 대두박 내에서 고상 발효 시에, 유산균, 바실러스 등과 같은 미생물이 전분분해를 하여, 단당류로 분해하는데 에너지를 소모하는 기간에, 효모는 개체수 증식에 에너지를 소모하기 때문인 것으로 예상된다.

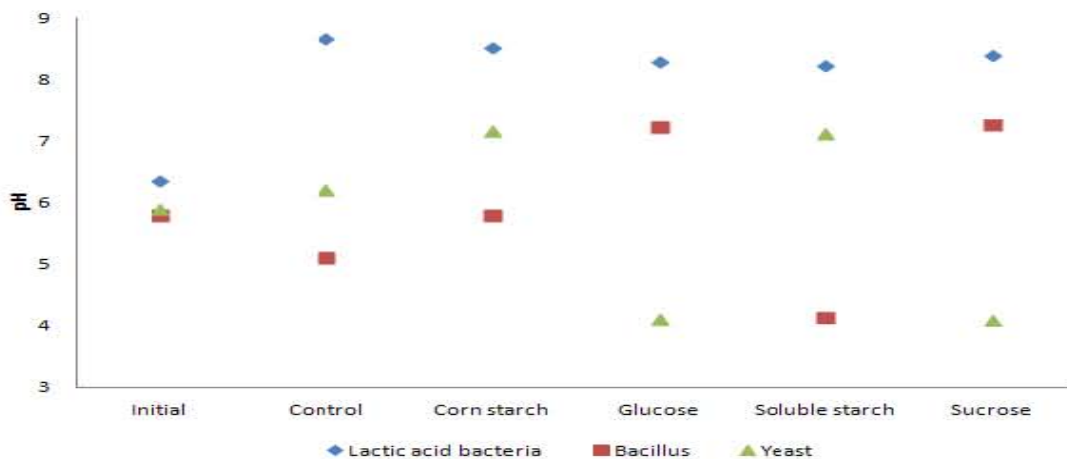


Fig. 10. Viable cell change by add an additive.

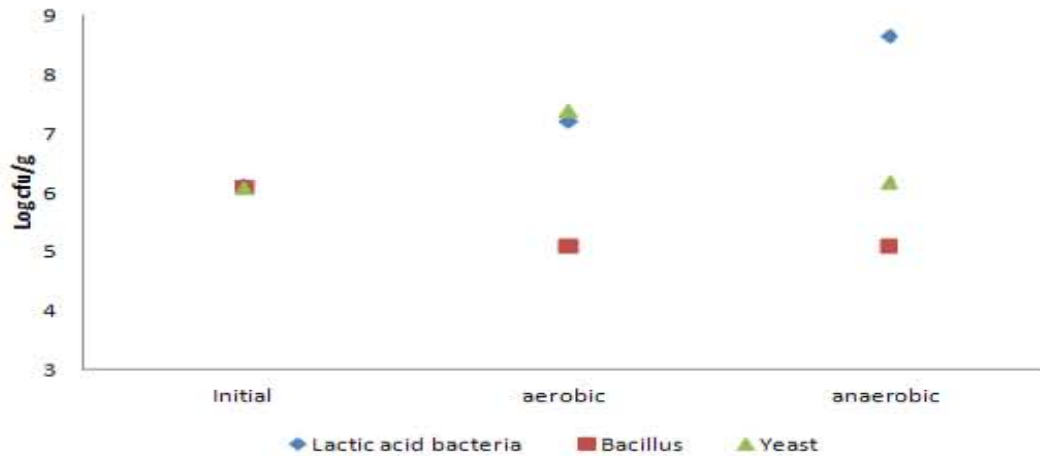


**(9) 호기와 혐기 배양법에 따른 발효물의 미생물 변화 검사**

대두박을 이용한 발효 시 호기배양, 혐기배양조건에 따른 발효폐턴과 호기, 혐기 조건에서 접정 미생물의 조성에(유산균+바실러스+효모, 바실러스)따른 발효폐턴을 검정하였다.

Fig. 11에서와 같이 호기 배양 시에는 효모의 개체수가 혐기 배양 시보다 높게 나타났으며, 유산균의 개체수는 호기는 보다 혐기 배양 시에 증가하는 것으로 나타났다.

Fig. 12에서와 같이 바실러스를 단일 배양할 때, 호기 배양 시에는 바실러스의 개체수가 혐기 배양 시 보다 높게 나타나는 것으로 나타났다.



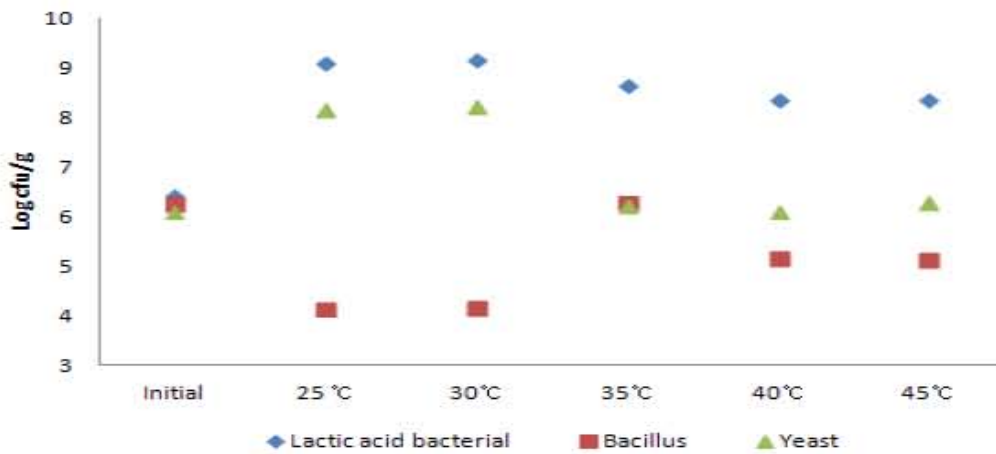
**Fig. 11. Viable cell change by condition for fermentation(Lactic acid bacteria, Bacillus and Yeast).**



**Fig. 12. Viable cell change by condition for fermentation (Bacillus).**

**(10) 온도 차이에 따른 발효물의 미생물 변화 검사**

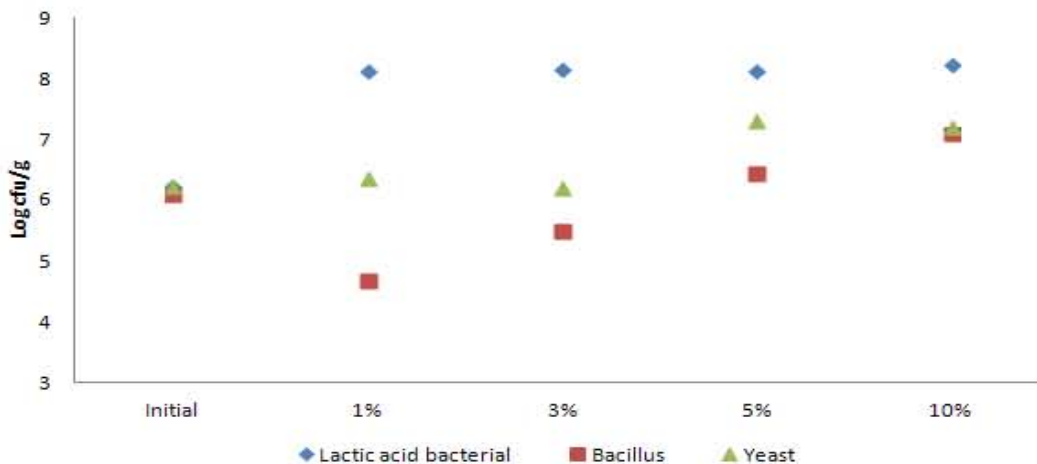
대두박을 이용한 발효 시 발효 온도(25, 30, 35, 40, 45℃)에 따른 발효패턴을 검정하였다. Fig. 13과 같이 유산균, 효모의 개체수는 25℃, 30℃ 배양 시에, 35, 40, 45℃보다 높게 나타났으며, 바실러스 개체수는 오히려 감소하는 것으로 나타났다.



**Fig. 13. Viable cell change by temperature for fermentation.**

**(11) 혼합미생물 접종량에 따른 발효물의 미생물 변화 검사**

대두박을 이용한 발효 시 혼합 미생물 접종량(1, 3, 5, 10%)에 따른 발효패턴을 검정하였다. Fig. 14와 같이 접종 1%에 대한 개체수를 나타내었으며, 유산균의 개체수는 접종량에 관계없이 비슷한 개체수를 나타내었으며, 바실러스는 개체수는 동일 비율로 혼합된 미생물 혼합액 10% 첨가 시에 증가하는 것으로 나타났으며, 효모는 5% 이상 접종 시에 증가하는 것으로 나타났다.



**Fig. 14. Viable cell change by inoculation for fermentation.**

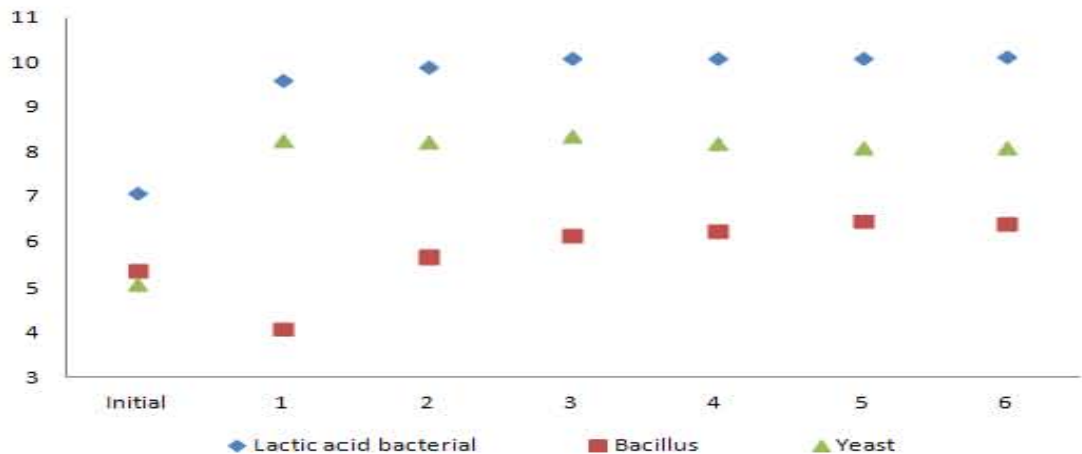
**(12) 최적 고상배양 조건에서의 미생물 첨가 조성비에 따른 변화**

유산균을 고효율로 배양하기 위한, 최적 고상배양 조건(25℃, 혐기, 발효 4일, 수분함량 50%)과, Fig. 14의 결과를 바탕으로 Table 7과 같이 조성하여, 미생물 조성비에 따른 변화를 관찰하였다.

Fig. 15에서와 같이, 유산균은 0.33%( $5.2 \times 10^9$ cfu/g) 첨가구 보다는, 0.5% 첨가한 조성 비에서,  $1.0 \times 10^{10}$ cfu/g 이상의 개체수가 나타났다. 효모는 첨가량이 증가함에 따라 비례적으로 증가하지 않았으나, 지금까지 테스트 한 결과에서 최대치가  $10^7$  cfu/g수준으로 나타난 것이,  $10^8$  cfu/g수준으로, 전체 테스트 시료에서 향상되었다. 이는 미생물 비율 조성비에 의한 영향 보다는, Fig. 13에서와 같이 25℃의 온도 설정으로 인하여, 미생물 개체수가 향상되었을 것으로 판단된다. 바실러스는 첨가량에 따라 증가하는 경향이 있으나, 미생물 개체수는  $10^6$  cfu/g 수준으로 크게 증식되지는 않았다.

**Table 7. Mixing ration of microbes.**

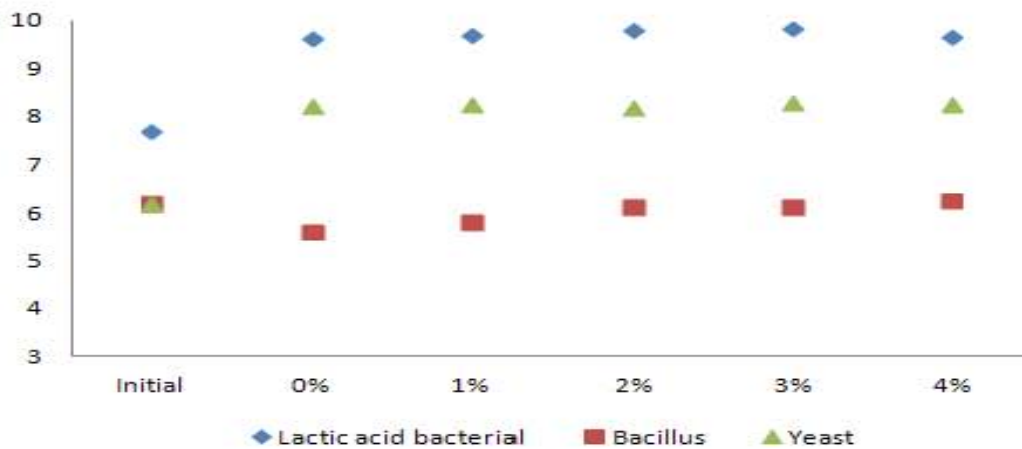
No	Lactic acid bacterial (%)	Bacillus (%)	Yeast (%)
1	0.34	0.33	0.33
2	0.50	5.00	4.50
3	0.50	6.00	3.50
4	0.50	7.00	2.50
5	0.50	8.00	1.50
6	0.50	9.00	0.50



**Fig. 15. Viable cell change by microbe ratio for fermentation.**

**(13) 최적 고상배양 조건에서의 sucrose 첨가량에 따른 변화.**

유산균을 고효율로 배양하기 위한, 최적 고상배양 조건(25℃, 혐기, 발효 4일, 수분함량 50%)에서, 동일 비율로 혼합된 미생들의 접종량을 10%로 하였을 때, sucrose 농도(0, 1, 2, 3, 4%)에 따른 변화를 관찰하였다. 35℃에서(Fig. 16) 당 첨가한 배양 결과와는 달리, 당첨가량에 따른 영향은 나타나지 않았으며, 25℃에서는 전반적으로 유산균과 효모의 미생물 개체 수가 효율적으로 증식되었다.



**Fig. 16. Viable cell change by sucrose ratio for fermentation.**

**나. 육계 사양실험 적용을 위한 발효 사료첨가제 시료 제조 및 공급**

발효 사료첨가제 생산을 위한 starter에 적용된 *L. plantarum* 균주는 가금티푸스 원인균주에 길항성을 갖는 균주로 내산성, 내담즙성, 내염성 등의 다양한 환경에 대한 저항성을 갖춘 균주로 돼지의 장에서 분리한 균주임.

이 균주는 전년도에 천안소재 천양양계농장에서 음수 급이를 통하여 약 한달 간 액상 생균제로 적용하였을 당시, 가금티푸스가 발생하지 않았으나 음수 관로에 바이오필름의 형성으로 인한 니플 막힘 현상에 의해 적용을 유보하였던 전력이 있음.

또한 신규로 분리된 *L. acidilactis* 균주는 가금티푸스 및 추백리 원인 균주에 대한 길항성을 나타내는 균주로 두 균주간에는 길항성이 없어 복합적으로 적용하였을 경우 길항 효과가 상승되었음.

이들 균주를 이용한 발효사료 첨가제의 육계적용 효과는 제2위탁과제의 사양실험 연구결과에서 다루고 있음.

## 제 4 절 신규 분리 유용미생물을 이용한 발효 사료첨가제의 어린 송아지에 대한 효과 검증

### 1. 연구방법

#### 가. 송아지 사양 테스트 시료제조

어린송아지의 생산성과 환경에 미치는 발효 사료 첨가제 급이효과의 검증을 위해 사양테스트에 사용할 시료를 다음과 같이 제조하였다. 위탁 연구기관인 건국대학교에서 선별한 *Bacillus subtilis* sk877와 자사 선별균주 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5를 바실러스로 사용하였으며, 유산균은 위탁 연구기관인 건국대학교에서 선별한 *Lactobacillus plantarum* sk3121, *Lactobacillus brevis* 1304를 사용하여 발효사료를 35℃, 3일, 통성 혐기 조건에서 제조하였다.

### 2. 결과

제 2 위탁과제 1차년도 결과 참조

## 제 5 절 민간위탁 생산시스템(CMO)을 위한 액상스타터 제품개발

### 1. 연구방법

#### 가. 단일 배양액 미생물 제품 첨가 제제

*Bacillus amyloliquefaciens*, *Saccharomyces cerevisiase*, *Lactobacillus plantarum* 각각 배양한 배양액에 액상보존제가 첨가된 시료를 적정농도로 첨가하여, 25℃에서 보관하였으며, 30일 경과 후에, 생균수를 측정하여 생존율(%)을 측정하였으며, control은 첨가물 대신, 증류수를 첨가하여 사용하였다.

#### 나. 단일 배양액 보존제 첨가 시, 온도 및 시간에 따른 생균수 변화.

액상보존제 1차 테스트결과 가장 높게 나온 보존제를(유산균은 sodium malate, glucose를, 바실러스는 glucose, 효모는 sodium succinate)를 선택하여 2% 농도로, 온도(4, 10, 18, 25, 35℃)에 변화에 따른 시간(7, 14, 21, 28일)별 생균수를 체크를 하여, 생존률(%)을 측정하였다.

#### 다. 혼합 미생물 제품 보존제 첨가 제제

*Bacillus amyloliquefaciens*, *Saccharomyces cerevisiase*, *Lactobacillus plantarum*이 같은 비율로 혼합된 배양액에, 액상보존제가 첨가된 시료를 적정농도로 첨가하여, 25℃에서 보관하였으며, 30일 경과 후에, 생균수를 측정하여 생존율(%)을 측정하였으며, control은 첨가물 대신, 증류수를 첨가하여 사용하였다.

#### 라. 혼합 미생물 제품 보존제 첨가 시, 온도 및 시간에 따른 생균수 변화.

액상보존제 테스트결과 가장 높게 나온 보존제를 sodium malate 2% 농도로, 온도(4, 10, 18, 25, 35℃)에 변화에 따른 시간(7, 14, 21, 28일)별 생균수를 체크를 하여, 생존률(%)을 측정하였다.

### 2. 연구결과

유산균, 바실러스, 효모에 대한 병원성 항균테스트, 유기물분해효과(효소분비) 검증을 통해 가금티푸스형인균 외에 여러 병원성 미생물에 효과가 뛰어난 *Lactobacillus plantarum* BBG L30와 유기물분해효과가 뛰어난 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, cellulase 분비능력이 있는 *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6를 분리하였다.

실제로 개인, 영농조합법인, TMR 회사 등 에서는 고상배양물 형태의 제품뿐만 아니라, 액상



제품(스타터 or 음수용)의 위탁생산도 빈번하게 일어나는 실정을 반영하여, 액상스타터 제품 개발을 진행하였다. 유용균주를 이용하여 민간 위탁 생산시스템(CMO)을 위한 액상스타터를 개발하기 위해, 미생물 배양액의 저장성을 늘리기 위한 보존제 테스트를 진행하였다.

#### 가. 단일 배양액 미생물 제품 첨가 제제

*Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6를 각각 배양한 액에, citric acid, carboxymethyl cellulose, dextrin, fructose, galactose, glycerol, glucose, lactose, mannose, mineral oil, potassium hydroxide, potassium sodium ttrate, soluble starch, sodium acetate, sodium alginate, sodium hydroxide, sodium malate, sodium succinate, soluble starch, trehalose를 농도별로 첨가하여, 25℃, 30일 보관후에 미생물 생균수 변화를 측정하였으며, 생존률(%)로 표시하였다 (Table 1).

*Lactobacillus plantarum* L30에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 0.80%(control)로 매우 낮게 나타났으며, 보호효과가 뛰어난 것은 sodium malate로 6.60%의 생존률을 나타냈으며, 0.80% 무첨가구보다 8배 이상의 효과가 나타나, 유산균 액상배양액 보존제는 sodium malate 2% 농도로 결정하였다.

*Bacillus subtilis* BBG B20에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 20.3%(control)로 나타났으며, 보호효과가 뛰어난 것은 glucose로 33.3%의 생존률을 나타냈으며, 20.3% 무첨가구보다 1.6배 이상의 효과가 나타나, 바실러스 액상배양액 보존제는 glucose 2% 농도로 결정하였다.

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6에 아무것도 첨가하지 않고 첨가물 대신 같은 양의 물을 첨가한 생존률은 1.00%(control)로 낮게 나타났으며, 보호효과가 뛰어난 것은 sodium succinate로 50.0%의 생존률을 나타냈으며, 1.00% 무첨가구보다 50배 이상의 효과가 나타나, 효모 액상배양액 보존제는 sodium succinate 2% 농도로 결정하였다.



**Table 1. Preserved agents and survival rate of microbe.**

Preserved agent(%)	Survival rate(%), after 30days			
		<i>Lactobacillus plantarum</i> L30	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BBG B5	<i>Saccharomyces cerevisiase</i> Y6
Control	0	0.80	20.3	1.00
Citric acid	0.5	1.20	16.7	0.10
Carboxymethyl cellulose	0.2	0.80	22.2	10.0
Dextrin	2.0	2.00	22.2	3.60
Fructose	2.0	6.40	22.2	8.00
Galactose	2.0	0.40	22.2	10.0
Glucose	2.0	12.0	33.3	25.0
Glycerol	2.0	0.40	24.4	7.10
Lactose	2.0	0.40	12.2	30.0
Mannose	2.0	6.00	11.1	40.0
Mineral oil	2.0	0.60	30.0	15.0
Soluble starch	2.0	1.00	23.3	6.50
Potassium hydroxide	0.5	5.40	22.2	0.20
Potassium sodium tatrata	2.0	1.80	24.4	4.60
Sodium acetate	2.0	6.00	22.2	2.20
Sodium alginate	0.2	1.00	27.8	1.00
Sodium hydroxide	0.5	4.80	24.4	0.20
Sodium malate	2.0	6.60	23.3	2.20
Sodium succinate	2.0	6.00	20.0	50.0
Soluble starch	2.0	1.00	23.3	6.50
Sucrose	2.0	2.40	22.2	11.0
Trehalose	2.0	2.00	14.4	12.0

**(2) 단일 배양액 보존제 첨가 시, 온도 및 시간에 따른 생균수 변화**

제품생산 시 저장 온도와 저장기간에 따른 생균수 변화가 나타날 것으로 판단되어, 액상보존제 테스트결과 가장 높게 나온 보존제 중, *Lactobacillus plantarum* L30은 sodium malate 2%를, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5는 glucose 2%, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6 sodium succinate 2% 농도로 첨가하여, 온도(4, 10, 18, 25, 35℃) 변화와 시간(7, 14, 21, 28일)에 따른 생균수 변화를 관찰하였다.

*Lactobacillus plantarum* L30 제품 조성 시, Table 2에서 보는 바와 같이 18℃ 이하에서 보관한 시료는, 25℃ 이상에서 보관한 시료보다 전반적으로 생존률이 높게 나오는 경향성을 나타냈다. 무처리구 보다 sodium malate 2% 처리구가 생존률을 높이는 것으로 나타났으며, 보존제를 저온에서 처리 시에 효과가 더 큰 컷으로 나타났다. 유산균 배양액은 10℃ 이하로 보관 방법을 설정하였다.

**Table 2. Preserved agents and survival rate of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.**

Days	Survival rate(%), Sodium malate									
	4℃		10℃		18℃		25℃		35℃	
	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%
7	1.00	34.0	4.500	40.0	4.00	40.0	0.01	26.0	0.01	3.500
14	0.60	25.0	0.650	34.0	1.56	26.0	ND	19.0	ND	0.060
21	ND	18.0	0.001	30.0	0.29	18.0	ND	15.0	ND	0.005
28	ND	9.0	ND	10.0	ND	5.00	ND	5.00	ND	ND

\* ND: not detected, 10<sup>3</sup>cfu/ml.

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5 제품 조성 시, Table 3에서 보는 바와 같이 18℃ 이상에서 보관한 시료는, 10℃ 이하에서 보관한 시료보다 전반적으로 생존률이 높게 나오는 경향성을 나타냈다. 처리구 보다 무처리구가 생존률을 높이는 것으로 나타나, 바실러스에는 보존제를 첨가하지 않기로 결정하였으며, 중온 이상에서의 제품 보관 시 저장성이 더 증대되지만, 바실러스 특유의 고유취와, 오염가능성이 매우 높아, 10℃이하의 저온에서 보관하는 것으로 결정하였다.

**Table 3. Preserved agents and survival rate of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**

Days	Survival rate(%), Glucose									
	4℃		10℃		18℃		25℃		35℃	
	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%
7	40.0	44.0	30.0	33.0	40.0	70.0	60.0	70.0	90.0	20.0
14	38.0	42.0	30.0	31.0	40.0	55.0	60.0	67.0	80.0	18.0
21	38.0	41.0	30.0	31.0	38.0	52.0	58.0	62.0	66.0	18.0
28	30.0	28.0	30.0	28.0	38.0	32.0	58.0	40.0	40.0	10.0

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6 제품 조성 시, Table 4에서 보는 바와 같이 18℃ 이하에서 보관한 시료는, 25℃ 이상에서 보관한 시료보다 전반적으로 생존률이 높게 나오는 경향성을 나타냈다. 무처리구 보다 sodium succinate 2% 처리구가 생존률을 높이는 것으로 나타났으며, 효모 배양액은 10℃ 이하로 보관 방법을 설정하였다.

**Table 4. Preserved agents and survival rate of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

Days	Survival rate(%), Sodium succinate									
	4℃		10℃		18℃		25℃		35℃	
	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%
7	61.0	64.0	70.0	74.0	70.0	73.0	40.0	48.0	25.0	40.0
14	40.0	45.0	31.0	37.0	38.0	46.0	30.0	36.0	20.0	40.0
21	22.0	34.0	23.0	31.0	25.0	39.0	23.0	30.0	15.0	27.0
28	16.0	30.0	20.0	31.0	22.0	35.0	10.0	15.0	10.0	20.0

#### 다. 혼합 미생물 제품 보존제 첨가 제제

액상스타터가 단독 제형뿐만 아니라, 혼합 제형도 출하될 것으로 판단하여, 각각 배양한 액을 동일비율(1:1:1)로 섞은 혼합액에, citric acid, carboxymethyl cellulose, dextrin, fructose, galactose, glycerol, glucose, lactose, mannose, mineral oil, potassium hydroxide, potassium sodium ttrate, soluble starch, sodium acetate, sodium alginate, sodium hydroxide, sodium malate, sodium succinate, soluble starch, trehalose를 적정농도로 첨가하여, 25℃, 30일 후에 생존률을 관찰하였다.

혼합한 배양액이다 보니 한종류의 미생물에 보존작용하는 제제보다는, 혼합한 미생물에 모두 보존효과를 나타내는 제제를 중점으로 선택하였다. 그 결과 Sodium malate 2% > sodium succinate 2% > soluble starch 2% 순으로 나타났다. 보존제 무처리구의 유산균은 0.001%, sodium malate 처리구의 유산균은 7.14%로 나타나, 무처리 군보다 7,000배 이상의 보존효과를 나타내었으며, 무처리 구의 바실러스는 58.0%, sodium malate 처리구의 바실러스는 60.0%로 나타나, 큰차이는 나타나지 않았다. 무처리구의 효모는 0.2%, sodium malate 처리구의 효모는 9.0%로 나타나, 무처리구보다 45배 이상의 보존효과를 나타내었다. 혼합배양액 보존제는 sodium malate 2% 첨가농도로 결정하였다(Table 5).

**Table 5. Preserved agents and survival rate of microbe mixture.**

Preserved agent(%)	Survival rate(%), after 30days			
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Saccharomyces</i>	
	<i>plantarum</i> L30	<i>amyloliquefaciens</i> B5	<i>cerevisiae</i> Y6	
Control	0	0.0001	58.0	0.200
Citric acid	0.5	4.2900	70.0	0.010
Carboxymethyl cellulose	0.2	0.0002	56.0	0.100
Dextrin	2.0	0.0001	46.0	0.100
Fructose	2.0	0.1420	68.0	0.200
Galactose	2.0	0.0001	56.0	0.300
Glucose	2.0	0.0001	62.0	0.100
Glycerol	2.0	0.0001	72.0	0.010
Lactose	2.0	0.1420	46.0	1.000
Mannose	2.0	0.0001	52.0	0.200
Mineral oil	2.0	0.0010	66.0	0.001
Soluble starch	2.0	0.0001	56.0	0.300
Potassium hydroxide	0.5	0.0030	64.0	1.000
Potassium sodium tatrte	2.0	0.2850	50.0	0.300
Sodium acetate	2.0	0.0030	78.0	0.001
Sodium alginate	0.2	0.0001	60.0	0.001
Sodium hydroxide	0.5	0.0010	50.0	0.001
Sodium malate	2.0	7.1420	60.0	9.000
Sodium succinate	2.0	7.1420	50.0	6.000
Soluble starch	2.0	4.2850	56.0	0.300
Sucrose	2.0	0.0030	56.0	0.400
Trehalose	2.0	0.0001	50.0	0.500

**라. 혼합 미생물 제품 보존제 첨가 시, 온도 및 시간에 따른 생균수 변화.**

제품생산 시 저장 온도와 저장기간에 따른 생균수 변화가 나타날 것으로 판단되어, 액상보존제 테스트결과 가장 높게 나온 보존제 sodium malate 2% 농도로 첨가하여, 온도(4, 10, 18, 25, 35℃) 변화와 시간(7, 14, 21, 28일)에 따른 생균수 변화를 관찰하였다.

Table 3, 4, 5에서와 같이 전반적으로 바실러스 균을 제외한 유산균, 효모의 저장 온도가 높을수록 미생물 개체수는 감소하였으며, 고온(35℃), 중온(25℃)보다 18℃ 이하의 서늘한 곳에서 보관했을 때, 5배 이상의 저장효과를 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* L30 제품 조성 시, Table 6에서 보는 바와 같이 18℃ 이하에서 보관한 시료는, 25℃ 이상에서 보관한 시료보다 전반적으로 생존률이 높게 나오는 경향성을 나타냈다. 무처리구 보다 sodium malate 2% 처리구가 생존률을 높이는 것으로 나타났으며, 보존제를 저온에서 처리 시에 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

**Table 6. Preserved agents and survival rate of *Lactobacillus plantarum* L30.**

Days	Survival rate(%), Sodium malate									
	4℃		10℃		18℃		25℃		35℃	
	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%
7	9.3	12.8	8.4	13.4	11.6	12.8	11.6	13.6	3.7	8.4
14	6.0	12.7	4.2	12.8	6.9	10.5	7.7	10.5	1.7	5.6
21	3.5	12.0	3.2	12.0	5.7	8.2	3.5	6.9	1.0	4.0
28	3.0	11.8	2.3	12.0	4.8	7.3	1.4	4.5	0.6	1.9

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5 제품 조성 시, Table 7에서 보는 바와 같이 무첨가구보다, sodium malate 2% 첨가구에서 높게 나타났다. 미생물 개체수와 온도와는 비례관계를 나타내지 않았다.

**Table 7. Preserved agents and survival rate of *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5.**

Days	Survival rate(%), Sodium malate									
	4℃		10℃		18℃		25℃		35℃	
	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%
7	13.3	13.3	16.2	18.6	14.8	16.6	22.3	16.6	13.3	14.8
14	13.3	13.3	14.8	18.6	14.2	14.8	17.8	16.0	11.2	13.4
21	13.3	13.3	11.4	17.6	13.8	14.6	14.5	16.0	10.9	12.8
28	13.3	13.3	11.4	17.6	13.5	14.6	13.8	15.7	8.5	12.8

*Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6 제품 조성 시, Table 8에서 보는 바와 같이 10℃ 이하에서 보관한 시료는, 25℃ 이상에서 보관한 시료보다 전반적으로 생존률이 높게 나오는 경향성을 나타냈다. 무처리구 보다 sodium succinate 2% 처리구가 생존률을 높이는 것으로 나타났다.

**Table 8. Preserved agents and survival rate of *Saccharomyces cerevisiase* Y6.**

Days	Survival rate(%), Sodium malate									
	4℃		10℃		18℃		25℃		35℃	
	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%
7	19.2	23.1	2.3	12.8	5.2	7.7	3.8	7.7	0.6	2.1
14	6.9	21.6	1.5	12.8	2.5	6.4	1.8	7.5	0.2	1.6
21	1.5	16.6	1.5	12.8	1.8	6.4	1.9	7.2	0.1	0.1
28	2.18	15.4	1.5	7.70	1.3	6.4	1.0	7.0	0.1	0.1

(2) 단일 배양액 보존제 첨가, (4)혼합 미생물 제품 보존제 첨가 결과를 비교하였을 때, 유산균은 단일 미생물 제품 조성 시보다, 혼합 미생물 제품으로 조성하였을 때, 저장성이 향상되는 것으로 나타났으며, 효모는 유산균과 바실러스 혼합 시 저장성이 저하되는 것으로 나타났다.

가급티푸스, 추백리 등의 닭 주요 병원성 미생물에 의한 질병을 예방하는 미생물은, 유산균이 큰 효과를 나타내므로, 유산균을 많이 보존할 수 있는, 혼합 미생물 조성에 sodium malate 2%를 첨가한 조성으로 결정하였으며, 저장온도는 10℃로 결정하였다.

**마. 액상 대량배양 조건 탐색**

최적 배양조건에 맞추어 배양시간 및 배양 용량(1,000L)이 *Lactobacillus plantarum* BBG L30, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5, *Saccharomyces cerevisiase* BBG Y6의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 1~6에 나타내었다.

*Lactobacillus plantarum* BBG L30의 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에, 호기조건하에서 24, 48, 72, 96hr 배양한 결과 invitro test에서 결과와 경향성이 비슷하게 배양 시간을 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 24hr에서 48hr( $9.8 \times 10^9$ cfu/ml)까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 나타났으나, 72hr 경과 후에 흡광도 값은 크게 감소하지 않았지만, 미생물의 개체수가 감소되는 것으로 나타나, 배양 시간을 48hr로 결정하였다(Fig. 61, Fig. 62).

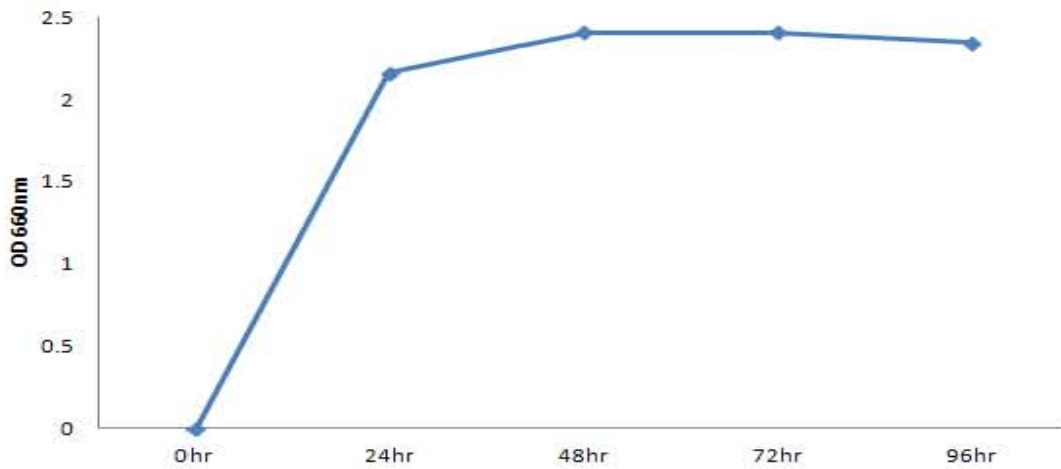


Fig. 1. Effect of large scale culture(1,000 liter) to the growth of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.



Fig. 2. Effect of large scale culture(1,000 liter) to the viable cell of *Lactobacillus plantarum* BBG L30.

*Bacillus amyloliquefaciens* BBG B5의 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양 온도에, 호기조건하에서 24, 48, 72, 96hr 배양한 결과 *invitro test*에서 결과와 경향성이 비슷하게 배양 시간을 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 24hr에서 72hr( $1.1 \times 10^8$  cfu/ml)까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 나타났으나, 72hr 경과 후에 흡광도 값은 크게 감소하지 않았으며, 미생물의 개체수 또한 증가하지 않는 것으로 나타나, 배양 시간을 72hr로 결정하였다(Fig. 63, Fig. 4).



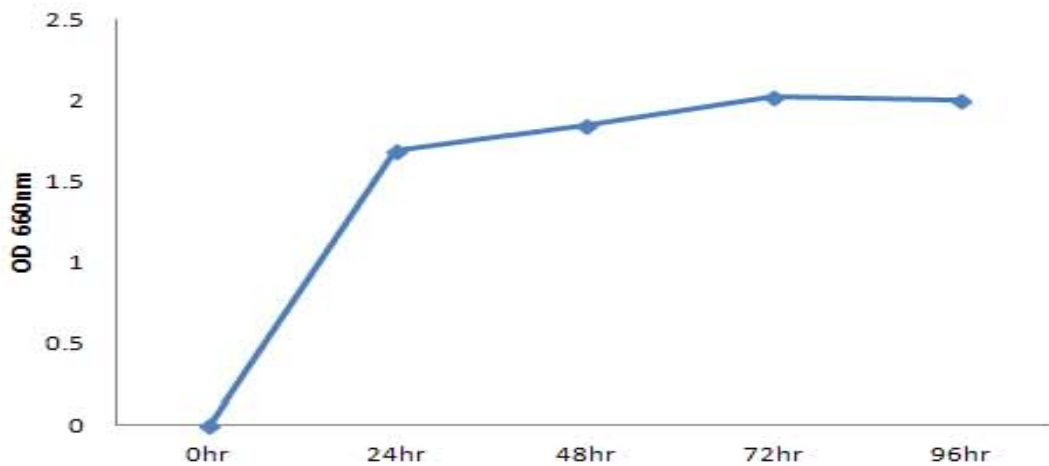


Fig. 3. Effect of large scale culture(1,000 liter) to the growth of *Bacillus amyloquelarius* BBG B5.

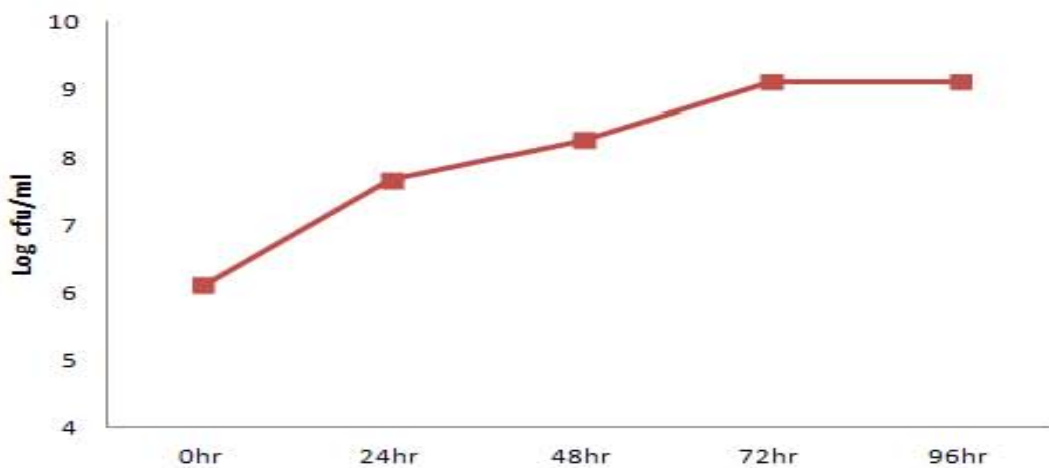
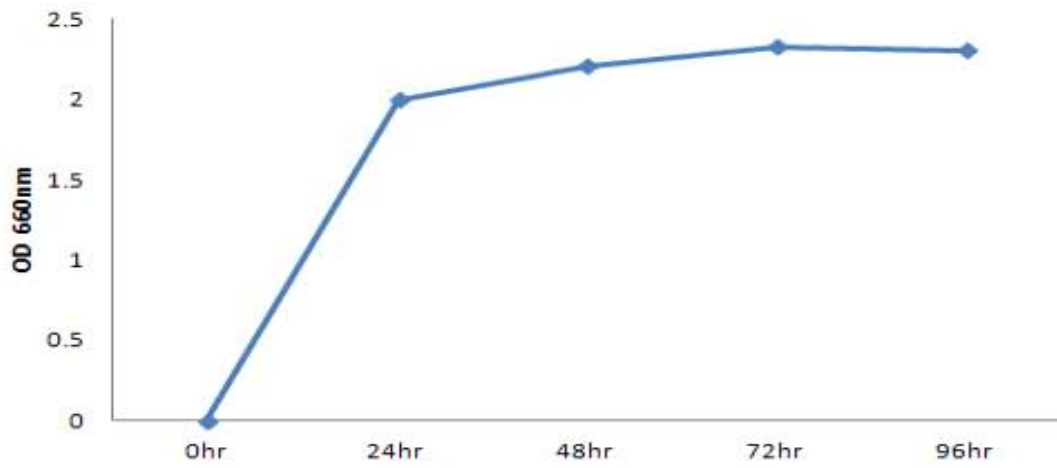
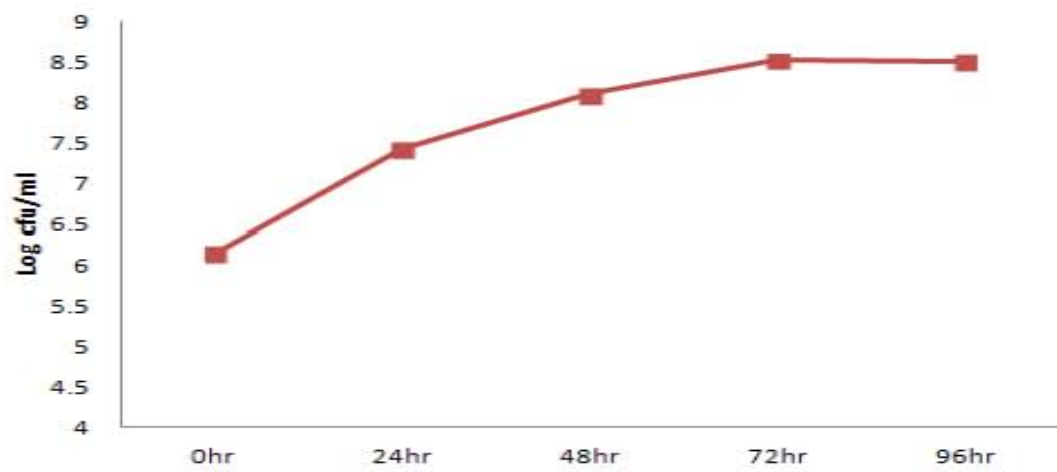


Fig. 4. Effect of large scale culture(1,000 liter) to the viable cell of *Bacillus amyloquelarius* BBG B5.

*Saccharomyces cerevisiae* BBG Y8의 배지 초기 pH를 8.0으로 하고, 온도를 35℃의 배양온도에, 호기조건하에서 24, 48, 72, 96hr 배양한 결과 *invitro test*에서 결과와 경향성이 비슷하게 배양 시간을 증가 시킬수록 미생들의 증식은 왕성하였다. 24hr에서 72hr( $5.2 \times 10^8$  cfu/ml)까지는 직선적으로 생육이 왕성하게 나타났으나, 72hr 경과 후에 흡광도 값은 크게 감소하지 않았으며, 미생들의 개체수 또한 증가하지 않는 것으로 나타나, 배양 시간을 72hr로 결정하였다 (Fig. 5, Fig. 6).



**Fig. 5. Effect of large scale culture(1,000 liter) to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**



**Fig. 6. Effect of large scale culture(1,000 liter) to the viable cell of *Saccharomyces cerevisiae* BBG Y6.**

## 바. 제품개발 및 등록

위와 같은 유용한 자료를 바탕으로 혼합미생물 제형으로 조성하여 양계, 산란계 전용 제품을 개발하였으며, 민간위탁 생산시스템(CMO) 사업을 위하여, *Saccharomyces cerevisiae*  $1 \times 10^6$ cfu/ml, *Lactobacillus plantarum*  $1 \times 10^6$ cfu/ml 로 등록성분을 등록하였으며, 보조사료 생균제로 등록성분이 없는 *Bacillus amyloliquefaciens*는 첨가성분으로  $1 \times 10^6$ cfu/ml으로 조성하였다.

앞으로 신규 개발한 제품을 이용하여 민간위탁 생산시스템(CMO) 사업을 진행할 것이며, 꾸준한 품질관리와 제품개발을 통한, 수요자와 공급자의 서로 만족할 수 있는 공동번영을 최우선 목표로 하고 있다.

## 제 6 절 연구과정에서 도출된 기초기술을 이용한 사업화 및 기술이전

- 자체 액상배양 및 TMR 적용 또는 스타터를 이용한 발효사료 생산
- 발효사료 위탁생산시스템의 거점기지 및 이를 이용한 발효사료 생산 인프라 확대 기대

### 1. 원가 절감 및 효과적 발효사료 생산을 위한 기초 발효기술 도출 및 기술이전

- 기술이전 대상 : oo축협섬유질사료공장
- 기술이전 기술 : 버섯폐배지를 주로 이용한 발효사료 생산 및 TMR 적용 (5~7%)

발효사료용 부산물 1차 : 팥이버섯폐배지 (50%):비지박(20):미강(30%) 적용  
 2차 : 팥이버섯폐배지(60%):비지박(20%):미강(20%) 적용

버섯배지	미강(%)	비지(%)	pH	<i>B. subtilis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
50	30	20	4.56	$2.0 \times 10^6$	$3.3 \times 10^8$	$3.3 \times 10^5$
60	20	20	4.53	$2.6 \times 10^6$	$2.5 \times 10^8$	$3.1 \times 10^6$
80	0	20	4.89	$2.0 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$1.4 \times 10^6$

고체발효 조건 : 35℃, 함수량 40%, 24시간 배양, 혼합 종균 starter 1.5% 접종

### 2. 기존 보유균주/분리균주의 다기능성 profile 분석 결과를 이용한 신규 발효사료용 복합미생물 Starter 의 보조사료 성분등록 및 판매 (사업화 성공 사례 1)

- 현재 3곳의 발효사료 자체 생산 섬유질사료공장에 판매 중

### 3. 액상배양 효율 증진을 위한 배지 조성에서 도출된 결과를 토대로(사업화 성공 사례 2) 기존의 미생물 배양배지 제품 업그레이드 및 자체 미생물 액상배양 사료공장에 판매

- 4곳의 섬유질 사료공장 및 2곳의 양돈 농가에 판매 중 → 확대되고 있음

### 4. 기술개발 결과를 이용한 위탁생산 희망 법인과의 MOU 추진

- 플무신허 : MOU 문건 사전 조율 후, 주주총인 승인 대기 중

### 5. 中國 多康美有限公司 (청도 소재)와 기술이전 및 제품 수입 판매 교섭중

- 기술 이전 대상 : 액상미생물 배양 / 발효사료 생산 → 기술이전료 / 컨설팅비 (본사 연구원의 파견으로 고급기술 노출 차단)
- 제품 수입 대상 : 광합성 미생물 / 복합미생물 수화제

## ■ 2차년도 연구개발내용

### 제 1절 고효율 발효 사료첨가제 대량 생산시스템 정립

#### 1. 발효사료 첨가제 공정기술 확립 및 표준화

##### 가. 연구방법

###### (1) 이유자돈 및 육성우용 발효 사료첨가제 개발 및 사양실험 제공

이유자돈 및 육성우용 발효 사료첨가제를 개발하기 위하여 1차년도 연구수행 과정에서 고체발효를 통한 발효사료첨가제 생산을 위한 적용균주로 주관기관인 (주)빅바이오텔과 제1위탁기관인 건국대학교 산학협력단에서 분리한 유용미생물인 *Pediococcus acidilactic* BBG-L1, *Lactobacillus plantarum* SK3121, *Bacillus subtilis* SK877, *Bacillus subtilis* BBG-B20, *Saccharomyces cerevisiase* BBG-Y6 5종 균주의 액상배양액을 고상발효를 위한 starter로 이용하였다.

고체발효는 2종의 바실러스 혼합액상 starter를 적용한 고상발효와 2종의 유산균 균주 및 1종의 효모 혼합액상 starter를 적용한 고상발효로 각각 시행한 후, 각각의 건조발효물을 1:1로 혼합하였다.

각각의 고상발효는 액상 starter를 고상발효물의 증량에 대비하여 1% 접종하고, 최종수분 함량을 50%가 되게 물을 첨가하였다. 발효실에서 tray를 이용하여 3일간 배양 및 발효를 진행한 후, 건조시켰다.

###### (2) 고상배양 시 적용할 발효미생물의 접종방법

발효종균(starter)의 접종방법을 선택하기 위해, 균종의 다양한 혼합 형태(유산균+바실러스+효모, 유산균+효모, 유산균+바실러스, 유산균, 효모, 바실러스)를 달리하여, 1%의 액상혼합배양액을 대두박에 접종하였고, 수분이 50%가 되게 물을 첨가하였다. 35℃에서 3일간 발효시켜, 경과일에 따른 생균수 및 pH 변화를 측정하였다.

고상 배양시 사용된 균주로 유산균은 *Pediococcus acidilactic* BBG-L1와 *Lactobacillus plantarum* SK3121를 혼합하여 사용하였으며, 바실러스는 *Bacillus subtilis* SK877 및 *Bacillus subtilis* BBG-B20를 혼합하여 사용하였고, 효모는 *Saccharomyces cerevisiase* BBG-Y6를 적용하였다.

###### (3) 부산물 제제 탐색

고상배양은 실험 방법 (2)와 같은 방법으로 진행하였으며, 발효부산물은 두유박(soymilk residue) 미강(rice bran), 옥분(corn grits), 소맥피(wheat bran), 맥주박(wet brewer's

grain), 탈지대두박(soybean meal)에 각각 바실러스를 단일 접종하고, 효모와 유산균을 혼합 접종하여, 35℃에서, 오픈된 비닐팩에 3일간 발효하여 생균수 측정을 하였다.

#### (4) 부산물 혼합제제 탐색

고상배양은 실험 방법 (2)와 같은 방법으로 진행하였으며, 발효부산물은 소맥피, 탈지대두박, 옥태말분을 혼합하여 3일간 발효시켜, 생균수 검사를 진행하였다.

#### (5) 질소원 첨가물 차이에 따른 발효물의 미생물 균총 변화 검사

발효 시 다양한 질소원(Corn Steep Liquor, Ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), Ammonium sulfate( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Ammonium nitrate( $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ )의 2% 첨가에 따른 발효양상을 점검하였다.

#### (6) 당첨가 차이에 따른 발효물의 미생물 균총 변화 검사

당 2% 첨가(molasses, glucose, sucrose, sodium succinate, sodium malate, sodium acetate, corn starch)에 따른 발효양상을 점검하였다.

#### (7) 당밀 첨가량에 따른 발효물의 미생물 균총 변화 검사

Molasses 0, 2, 4, 6, 8, 10% 첨가량에 따른 발효패턴을 점검하였다.

#### (8) 유기산염 첨가에 따른 발효물의 미생물 균총 변화검사

유기산염 2% 첨가(sodium succinate, sodium malate, sodium acetate)에 따른 발효패턴을 점검하였다.

#### (9) 수분첨가량 설정

수분 30, 35, 40, 45, 50, 55%에 따른 발효양상을 점검하였다.

#### (10) 발효시간 설정

발효 시간(0, 12, 24, 48, 72, 96hr) 차이에 따른 발효양상을 점검하였다.

#### (11) 온도 차이에 따른 발효물의 미생물 변화 검사

발효 온도(20, 25, 30, 35, 40, 45℃) 차이에 따른 발효양상을 점검하였다.

## 나. 연구결과

### (1) 발효 미생물 접종 및 배양방법 선택

대두박에 단일배양(log CFU/g) 시, 유산균은 9.30, 효모는 8.12, 바실러스는 9.15의 균체 농도를 나타내었으며, 혼합배양(coculture) 시 유산균은 혼합 균종에 관계없이 9.20-9.25의 균체 농도를 나타내어 유산균의 단일배양과 유사한 증식결과를 나타내었다. 효모 또한 혼합 균종에 관계없이 7.90-8.12의 균체농도를 나타내어, 효모를 단일배양 할 때와 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 바실러스는 혼합 균종에 관계없이 6.10-6.12의 균체농도를 나타내어, 바실러스의 단독 배양 시와 많이 차이를 나타내었다(Table 1).

따라서 유산균, 효모 및 바실러스를 고농도 액상배양하여 사용하기 위해서는 3종의 혼합 배양보다는, 각 균을 단일 접종하여 배양하는 방법이나, 바실러스를 단일 접종하고, 효모와 유산균은 혼합 배양하는 방법이 효과적인 것으로 나타났다. 이 중에 발효 미생물의 대량 배양 방법은 편의성과 배양인원 투입 및 배양기의 오염 방지등의 여러 요소를 고려할 때, 바실러스의 단독 배양 및 효모와 유산균을 혼합 배양하는 방법으로 최종 선택하였다.

Table 1. Viable cell density of fermented soybean meal according to various kinds of microbial inoculation.

Strains	Log CFU/g		
	LAB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Bacillus</i> spp.
LAB*	9.30	-	-
Y*	-	8.12	-
B*	-	-	9.15
Y+B	-	7.90	6.10
LAB+B	9.25	-	6.12
LAB+Y	9.25	8.15	-
LAB+Y+B	9.20	8.13	6.20

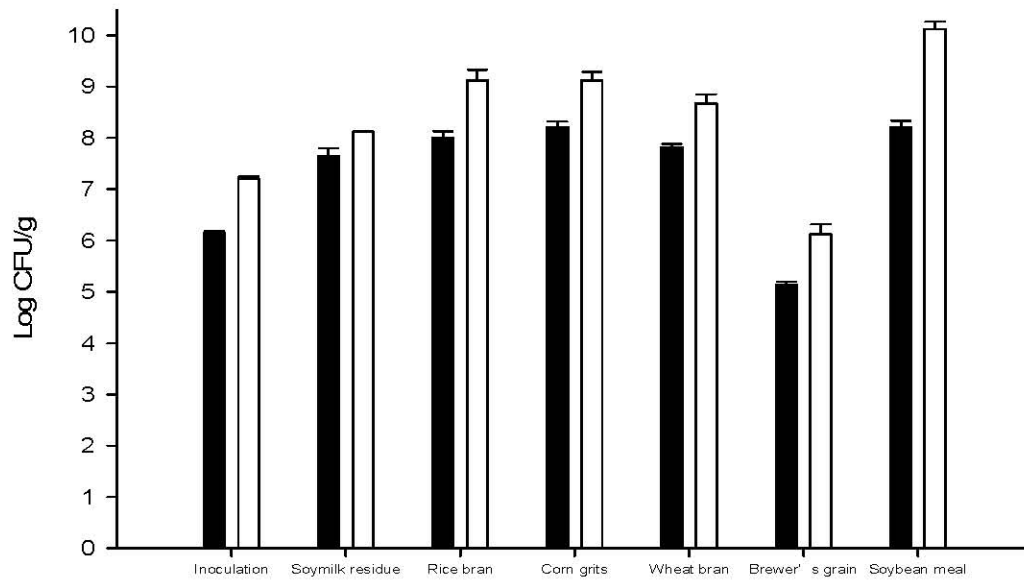
\* LAB: Lactic acid bacteria, Y: *Saccharomyces cerevisiae*, B: *Bacillus* spp.

### (2) 적정 고상 발효를 위한 부산물 선정

#### (가) 단일부산물

단일부산물에 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 1에서와 같이 대두박(soybean meal)의 균체농도가(log cfu/g) 유산균 10.12, 효모 8.21로 미강이나, 옥분, 소맥피보다 높게 나타나, 유산균+효모 혼합배양 시에 대두박을 주원료로 사용하였다.

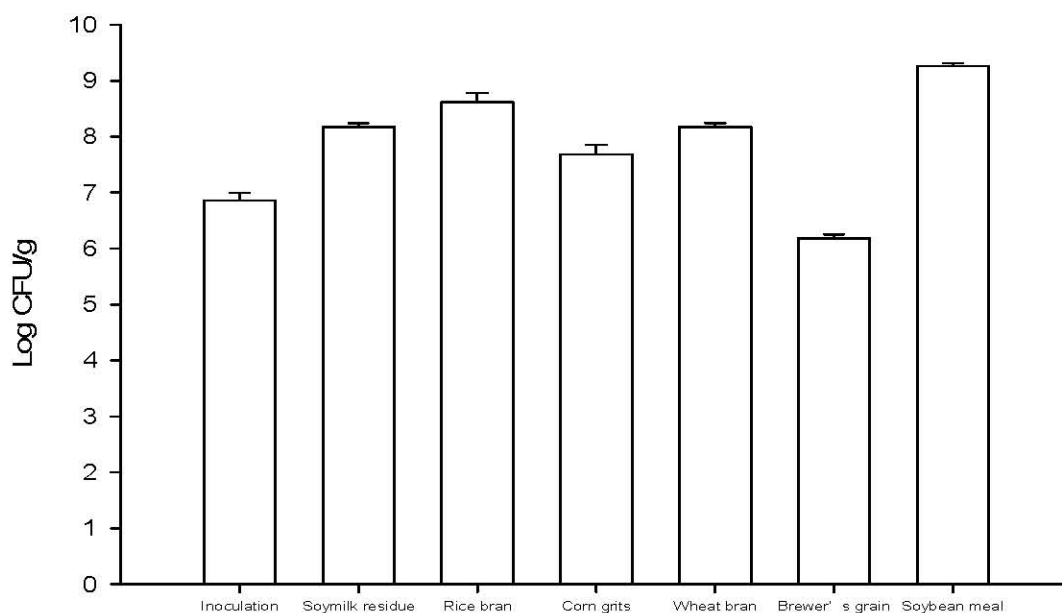




**Fig. 1.** Effect of different raw organic by-products on viable microbial cell density after solid fermentation by coculture.

□: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*.

단일부산물에 바실러스 단독배양 시, Fig. 2에서와 같이 대두박(soybean meal)의 균체농도가(log cfu/g) 9.26으로, 8.62의 미강이나, 8.17의 옥분, 소맥피보다 높게 나타나, 바실러스 단독배양 시에 대두박을 주원료로 사용하였다.



**Fig. 2.** Effect of different raw organic by-products on viable microbial cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*.

## (나) 혼합부산물

Table 2와 같이 혼합부산물에 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 3에서와 같이 72hr 발효 시에 대두박(soybean meal) 단일발효부산물의 균체농도가(log cfu/g) 유산균 10.30, 효모 8.70로 가장 높았으며, 옥분, 소맥피를 첨가한 혼합 발효부산물보다 균체농도의 안정성이 있는 것으로 판단되어 대두박을 단일 원료로 사용하였다.

혼합부산물에 바실러스 단독배양 시, Fig. 4에서와 같이 대두박(soybean meal)의 균체농도가(log cfu/g)9.30으로, 2번째로 높게 나온 2번 조성(대두박(50%)+소맥피(50%)보다) 9.12보다 높게 나타나, 안정적인 품질을 위하여, 최종적으로 바실러스 단독배양 시에 대두박을 단일 원료로 사용하였다.

**Table 2. Mixing ratio of raw organic materials for solid fermentation by dual microbial strains**

No	Soybean meal	Wheat bran	Corn grits
	(%)		
1	100	0	0
2	50	50	0
3	50	0	50
4	50	25	25
5	25	50	25
6	25	25	50
7	33	34	33

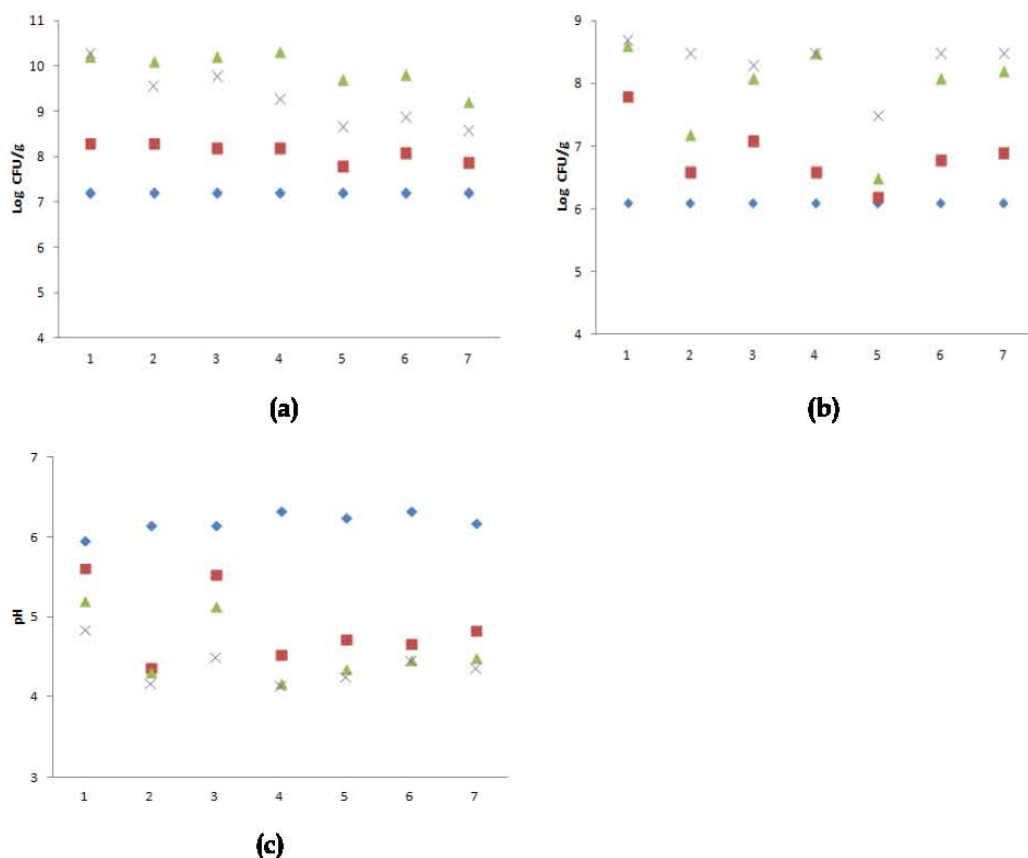


Fig. 3. Effect of different mixed materials on viable cell density and pH exchange by fermentation of coculture.

(a): Lactic acid bacteria, (b): *Saccharomyces cerevisiae*, (c): pH, ◆: 0hr, ■: 24hr, ▲: 48hr, ×: 72hr.

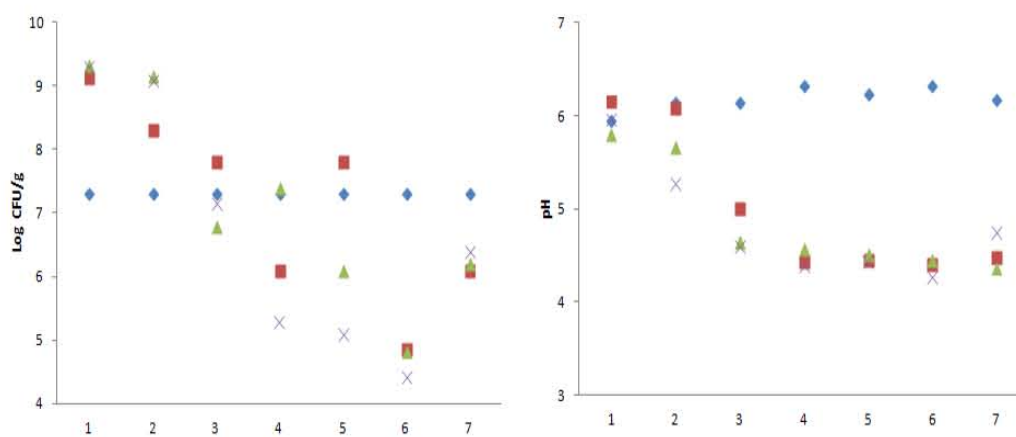


Fig. 4. Effect of different mixed materials on viable cell density and pH by fermentation of *Bacillus subtilis*.

◆: 0hr, ■: 24hr, ▲: 48hr, ×: 72hr.

### (3) 질소원 첨가를 탐색

질소원 2.0%첨가에 따른 유산균/효모 혼합배양 시, Fig. 5에서와 같이 발효 72hr에 배양된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) corn steep liquor처리구 9.75, control처리구 9.74, ammonium sulfate( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )처리구 9.72로 나타나, 가장 높게 나온 corn steep liquor처리구와 control처리구의 차이가 나타나지 않았다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) corn steep liquor처리구 8.20, control처리구 8.21, ammonium sulfate처리구 8.21로 나타나, 가장 높게 나온 ammonium sulfate처리구와 control처리구의 차이가 나타나지 않았다. 따라서 유산균+효모 혼합배양 시에 질소원은 첨가하지 않는 것으로 결정하였다.

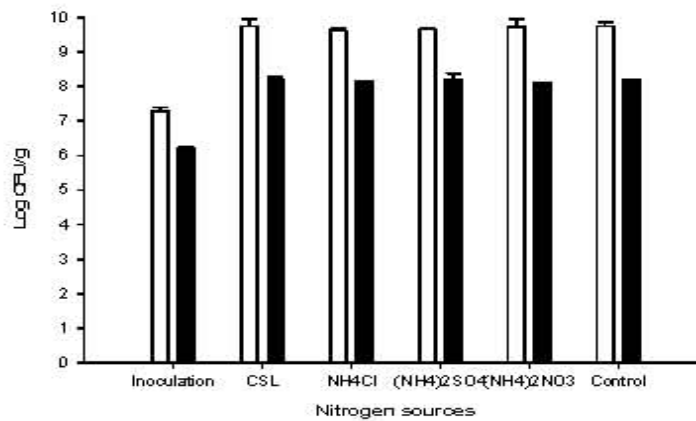


Fig. 5. Effect of different nitrogen sources on viable cell density by fermentation of coculture. □: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*, CSL: Corn Steep Liquor.

질소원 2.0%첨가에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 6에서와 같이 발효 72hr에 배양된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) control처리구 10.21, ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )처리구 10.19, ammonium nitrate( $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ )처리구 10.03로 나타나, 가장 높게 나온 control처리구와 Ammonium chloride( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )처리구의 차이가 나타나지 않았다. 따라서 바실러스 배양 시에 질소원은 첨가하지 않는 것으로 결정하였다.

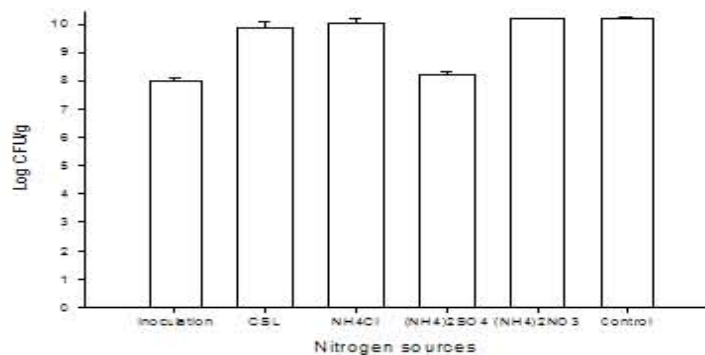


Fig. 6. Effect of different nitrogen sources on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*. CSL: Corn Steep Liquor.

#### (4) 당 첨가물 탐색

당 2.0%첨가물에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 7에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) 당밀(molasses)처리구 9.75, 옥수수전분(corn starch)처리구 9.63, control처리구 9.43로 나타나, 가장 높게 나온 당밀처리구와 control처리구의 차이가 0.32 나타났다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) 당밀(molasses)처리구 8.21, 유당(lactose)처리구 8.21, control처리구 8.18로 나타나, 가장 높게 나온 당밀처리구 및 유당처리구는 control처리구와 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서 유산균+효모 혼합배양 시에 유산균 증식에 효과가 있는 탄소원으로 당밀을 첨가하는 것으로 결정하였다.

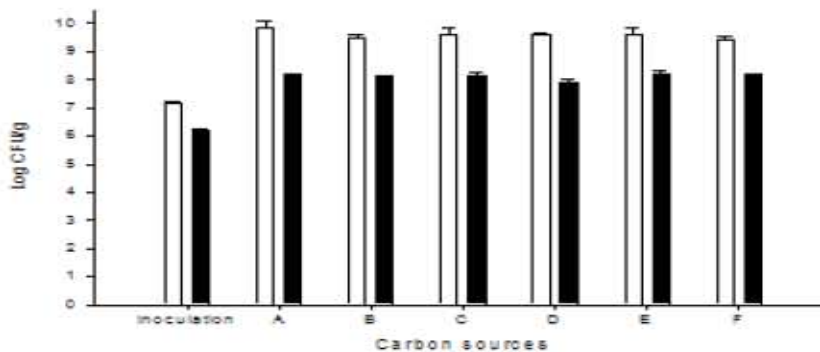


Fig. 7. Effect of different carbon sources on viable cell density by fermentation of coculture. □: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*, A: Molasses, B: Glucose, C: Sucrose, D: Corn starch, E: Lactose, F: Control.

당 2.0%첨가물에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 8에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) 당밀(molasses)처리구 10.28, 옥수수전분(corn starch)처리구 10.17, 유당(lactose)처리구 10.18, control처리구 9.81로 나타나, 가장 높게 나온 당밀(molasses)처리구 10.28와 control처리구의 차이가 0.47나타났다. 따라서 바실러스 배양 시에 바실러스 증식에 효과가 있는 탄소원으로 당밀을 첨가하는 것으로 결정하였다.

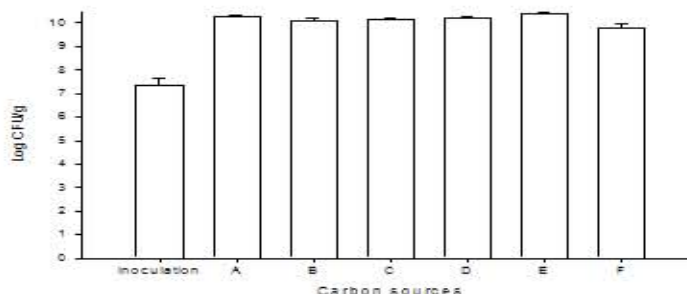


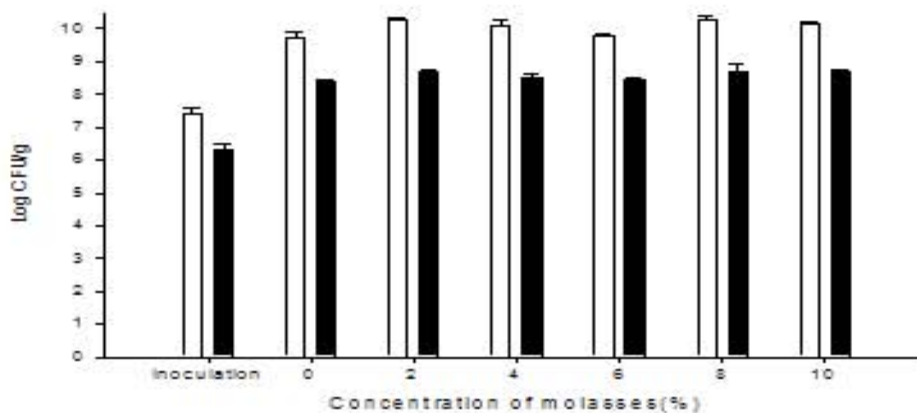
Fig. 8. Effect of different carbon sources on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*.

A: Molasses, B: Glucose, C: Sucrose, D: Corn starch, E: Lactose, F: Control.

**(5) 당첨가량 결정**

당첨가량에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 9에서의 같이 발효 72hr에 배양 된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) 2.0%, 8.0%처리구 10.26, 0.0%처리구 9.74로 나타나, 가장 높게 나온 2.0, 8.0%처리구와 0.0%처리구의 차이가 0.52 나타났다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) 2.0, 10.0% 처리구가 8.68, 0.0%처리구 8.39도 나타나, 가장 높게 나온 2.0, 10.0%처리구와 0.0%처리구의 차이가 0.29으로 나타났다.

당밀 첨가량에 비례하여 유산균 및 효모의 증식은 일어나지 않았으며, 무처리구에 비해 2.0% 처리구가 높게 나타났다. 최종적으로 유산균+효모 혼합배양 시에 유산균 증식에 효과가 있는 탄소원으로 당밀을 2.0%첨가하는 것으로 결정하였다.



**Fig. 9. Effect of different molasses concentration on viable cell density by fermentation of coculture.**

□: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*.

당첨가량에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 10에서의 같이 발효 72hr에 배양 된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) 2.0, 4.0%처리구 9.14, 0.0%처리구 8.35로 나타나, 가장 높게 나온 2.0, 4.0%처리구 9.14와 0.0%처리구의 차이가 0.79나타났다.

당밀 첨가량에 비례하여 바실러스의 증식은 일어나지 않았으며, 2.0%처리구와 4.0%처리구가 같은 효과를 나타내어, 최종적으로 바실러스 배양 시에 바실러스 증식에 효과가 있는 탄소원으로 당밀을 2.0%첨가하는 것으로 결정하였다.



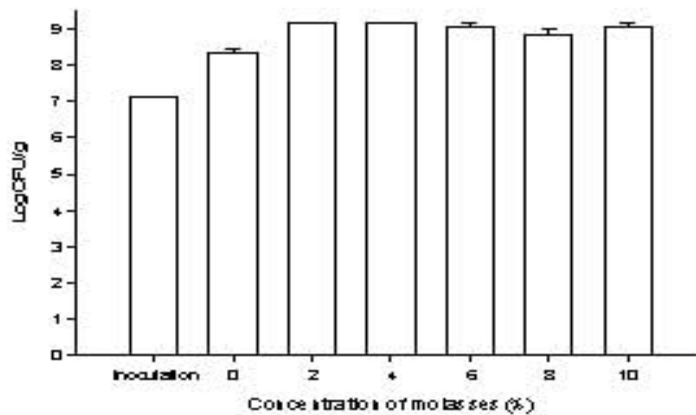


Fig. 10. Effect of different molasses concentration on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*.

#### (6) 유기산염 첨가물 선택

pH 완충 효과를 가지는 유기산염 2.0% 첨가량에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 11에서와 같이 발효 72hr에 배양된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) sodium malate처리구 9.74, control 9.73, sodium succinate처리구 9.59, sodium acetate 9.42 순으로 나타나, 가장 높게 나온 sodium malate처리구와 control처리구의 차이가 0.01 나타났다. 따라서 유기산염 첨가에 따른 유산균의 균체 증식은 나타나지 않았다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) sodium succinate처리구 8.22, sodium malate처리구 8.21, control 8.18, sodium acetate 7.93 순으로 나타나, 가장 높게 나온 sodium succinate처리구와 control처리구의 차이가 0.04로 나타났다. 따라서 유기산염 첨가에 따른 효모의 균체 증식은 나타나지 않았다. 최종적으로 유산균+효모 혼합배양 시 유기산염은 첨가하지 않은 것으로 결정하였다.

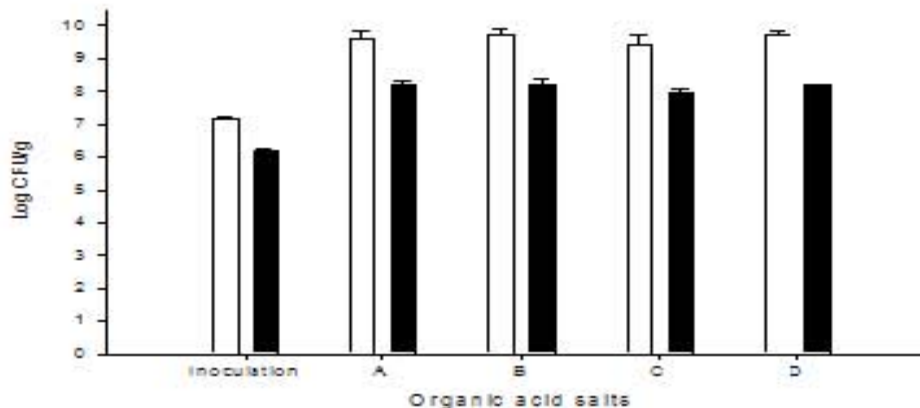


Fig. 11. Effect of different organic acid salts on viable cell density by fermentation of coculture. □: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*, A: sodium succinate, B: sodium malate, C: sodium acetate, D: Control.



유기산염 2.0%첨가량에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 12에서와 같이 발효 72hr에 배양된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) control 10.21, sodium succinate처리구 10.19, sodium malate처리구 10.04, sodium acetate 8.97 순으로 나타나, 가장 높게 나온 sodium succinate처리구 10.19와 control처리구의 차이가 -0.02나타났다. 따라서 유기산염 첨가에 따른 바실러스 증식은 나타나지 않아, 최종적으로 바실러스 배양 시에 첨가하지 않은 것으로 결정하였다.

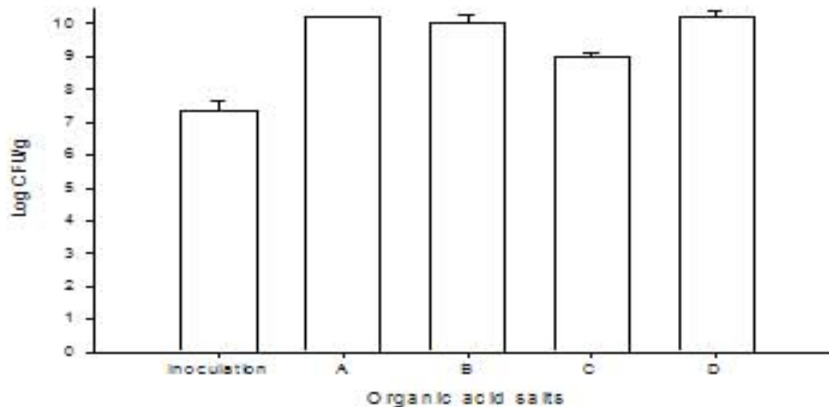


Fig. 12. Effect of different organic acid salts on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*. A: sodium succinate, B: sodium malate, C: sodium acetate, D: Control.

#### (7) 수분첨가량 설정

수분첨가량에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 13에서와 같이 발효 72hr에 배양된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) 50%처리구 10.18, 55%처리구 10.18, 45%처리구 9.85, 40%처리구 9.71, 35%처리구 9.00, 30%처리구 7.34 순으로 나타나, 가장 높게 나온 50, 55%처리구와 가장 낮게 나온 30%처리구의 차이가 2.84 나타났다. 유산균의 균체 증식을 위한 충분한 수분 첨가가 충족되어야 유산균의 발효가 바람직하게 이루어지는 것으로 판단되며, 이는 발효 초기에 충분한 수분공급이 이루어지지 않으면, 발효 시 발효열에 의한 수분증발로 인한 수분부족에 의한 것으로 판단된다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) 50%처리구 8.36, 55%처리구 8.32, 40%처리구 8.15, 45%처리구 8.11, 35%처리구 7.88, 30%처리구 6.18 순으로 나타나, 가장 높게 나온 50%와 가장 낮게 나온 30%처리구의 차이가 2.18 나타났다. 효모의 균체 증식을 위한 수분첨가량이 충족되어야 발효가 충분히 될 것으로 판단된다. 따라서 유산균+효모 혼합배양 시 수분첨가량은 50%로 결정하였다.

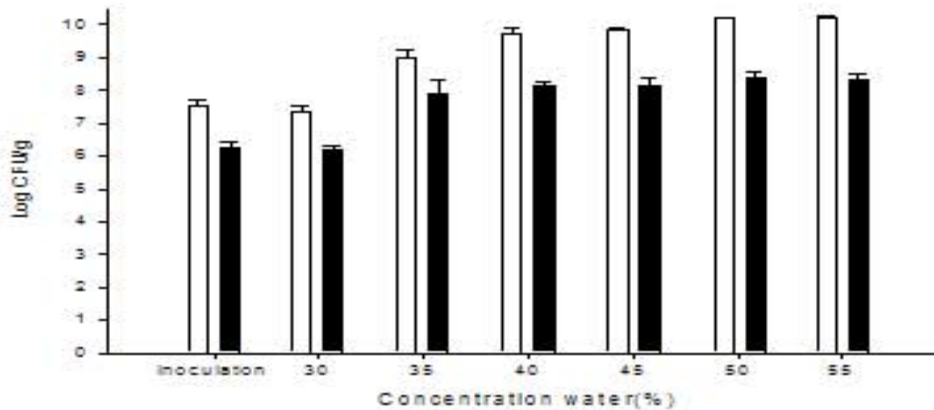


Fig. 13. Effect of different water concentration on viable cell density by fermentation of coculture.

□: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*.

수분첨가량이 다른 바실러스 단독배양 시, Fig. 14에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) 50%처리구 9.26, 55%처리구 9.25, 45%처리구 8.20, 40%처리구 7.81, 35%처리구 7.54, 30%처리구 7.17 순으로 나타나, 가장 높게 나온 50, 55%처리구와 가장 낮게 나온 30%처리구의 차이가 2.09 나타났다. 혼합배양 조건과 마찬가지로 바실러스 증식 및 발효를 위해서는 충분한 수분이 초반에 필요한 것으로 나타났으며, 최종적으로 바실러스 배양 시 수분첨가량을 50%로 결정하였다.

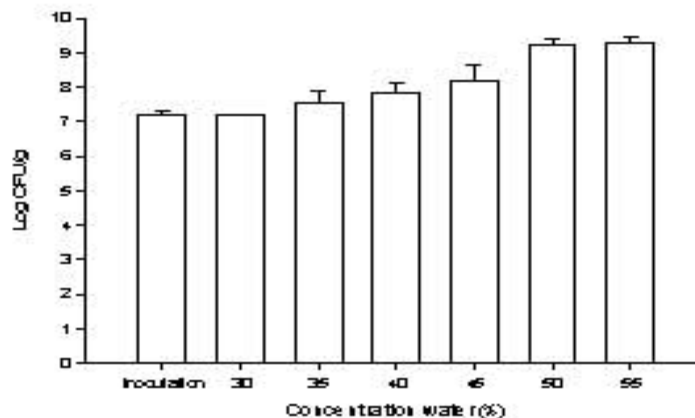
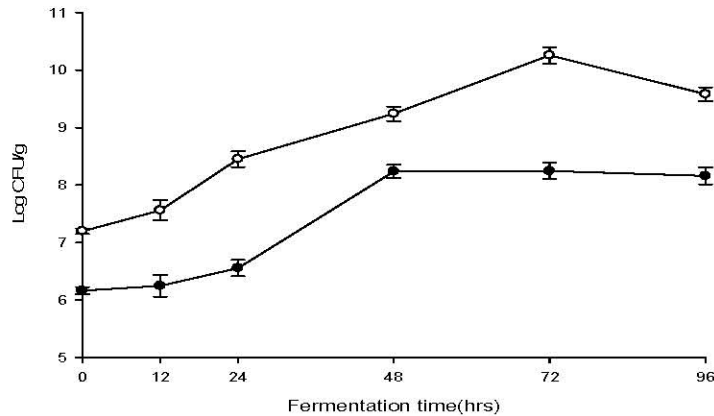


Fig. 14. Effect of different water concentration on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*.

**(8) 발효시간 설정**

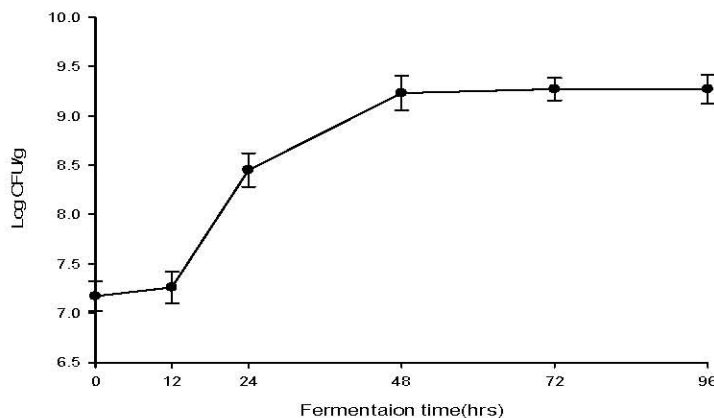
발효시간에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 15에서와 같이 유산균의 균체농도는(log cfu/g) 72hr> 96hr> 48hr> 24hr> 12hr 순으로 나타났다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) 72=48hr>96>24hr>12hr 순으로 나타나, 최종적으로 유산균+효모의 혼합 배양 시, 72hr의 발효 시간을 결정하였다.



**Fig. 15.** Effect of different fermentation time on viable cell density by fermentation of coculture.

○: Lactic acid bacteria, ●: *Saccharomyces cerevisiae*.

발효시간에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 16에서와 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) 72hr=96hr> 48hr> 24hr> 12hr 순으로 나타나, 최종적으로 발효시간을 72hr로 결정하였다.



**Fig. 16.** Effect of different fermentation time on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*.

### (9) 온도 설정

온도에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 17에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) 35℃처리구 9.35, 40℃처리구 9.09, 30℃처리구 9.03, 25℃처리구 8.74, 45℃처리구 8.25, 20℃처리구 8.19 순으로 나타나, 가장 높게 나온 35℃처리구와 가장 낮게 나온 20℃처리구의 차이가 1.16 나타났다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) 25℃처리구 8.26, 30℃처리구 8.19, 35℃처리구 8.19, 20℃처리구 7.21, 40℃처리구 6.29, 45℃처리구 5.28순으로 나타나, 가장 높게 나온 25℃처리구와 가장 낮게 나온 45℃처리구의 차이가 3.00 나타났다. 25, 30, 35℃처리구의 효모 균체농도차이가 거의 나질 않아, 유산균+효모 혼합 발효 시, 유산균이 가장 잘 증식 되는 35℃를 최적 온도로 결정하였다.

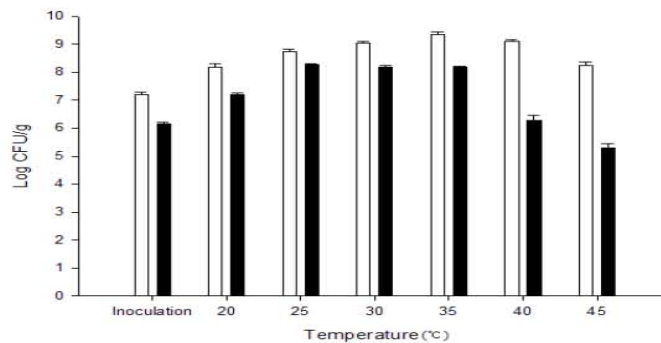


Fig. 17. Effect of different temperature on viable cell density by fermentation of coculture. □: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*.

온도에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 18에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) 35℃처리구 9.43, 30℃처리구 9.28, 40℃처리구 9.13, 25℃처리구 8.61, 45℃처리구 8.56, 20℃처리구 7.83순으로 나타나, 가장 높게 나온 35℃처리구와 가장 낮게 나온 20℃처리구의 차이가 1.60 나타났다. 따라서 바실러스 발효 시, 바실러스가 배양이 잘 되는 35℃를 최적 온도로 결정하였다.

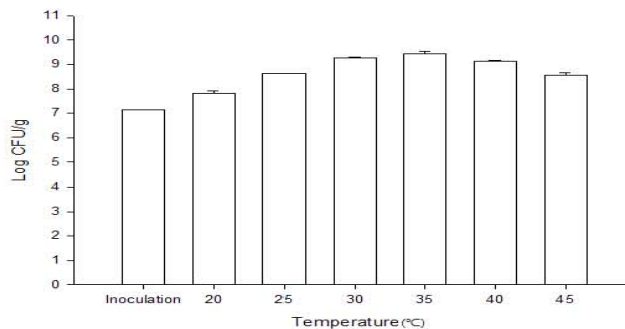


Fig. 18. Effect of different temperature on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*.

## 2. 대량시스템 정립(Scale-up)

### 가. 연구방법

#### (1) 대량시스템 정립(Scale-up)

회전식 드럼발효기(200kg), 트레이(4.5kg×45ea), 비닐백(10kg×20ea), 쌀포대(20kg×10ea)에 각각 바실러스, 효모+유산균 혼합배양하여 생균수 증식이 가장 잘되는 고효율 발효방법을 찾고자 35℃에서 3일간 발효하여 발효패턴을 점검하였다

#### (2) 트레이 발효(Tray fermentation) Scale-up시, 생균수 및 pH 변화.

트레이(4.5kg×45ea) 방법을 이용한 바실러스, 효모+유산균 혼합배양하여 생균수 증식이 가장 잘되는 고효율 발효방법을 찾고자 35℃에서 0, 1, 2, 3일간 발효하여 발효패턴을 점검하였다.

#### (3) 발효물과 비발효물의 일반성분 및 아미노산 성분 변화검사

최종적으로 대두박에 미생물(*Pediococcus acidilactic* BBG-L1, *Lactobacillus plantarum* SK3121, *Bacillus subtilis* SK877, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B20, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6)을 1% 접종하여, 수분함량을 50%가 되게 물을 첨가하였다. 발효실에서 tray를 이용하여 35℃, 3일간 배양 및 발효를 진행하여, 건조시켜 시료로 이용하였다. 발효시킨 것과 발효시키지 않은 것의 일반성분(조단백, 조지방, 조섬유, 조회분)을 AOAC법에 의하여 정량하였고, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl 법으로 측정하였다. 아미노산 15종에 대한 성분 비교를 amino acid auto analyzer(Amino acid analyzer S-433, Germany)를 사용하여 진행하였다.

### 나. 연구결과

#### (1) 발효방법 설정

발효방법에 따른 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 19에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 유산균의 균체농도는(log cfu/g) 트레이발효(tray fermentation)처리구 9.28, 회전드럼발효기(rotary drum fermentor)처리구 8.68, 쌀자루를 이용한 발효(rice bag)처리구 8.33, 비닐백발효(plastic bag)처리구 7.40 순으로 나타나, 가장 높게 나온 트레이발효(tray fermentation)처리구와 가장 낮게 나온 비닐백발효(plastic bag)처리구의 차이가 1.88 나타났다. 효모의 균체농도는(log cfu/g) 트레이발효(tray fermentation)처리구 8.36, 회전드럼발효기(rotary drum fermentor)처리구 7.68, 쌀자루를 이용한 발효(rice bag)처리구 6.34, 비닐백발효(plastic bag)처리구 6.17 순으로 나타나, 가장 높게 나온 트레이발효(tray fermentation)처리구와 가장

낮게 나온 비닐백발효(plastic bag)처리구의 차이가 2.19 나타났다. 유산균과 효모 모두 트레이발효(tray fermentation)처리구의 균체농도가 가장 높게나와 최종적으로 트레이발효(tray fermentation)방식을 결정하였다.

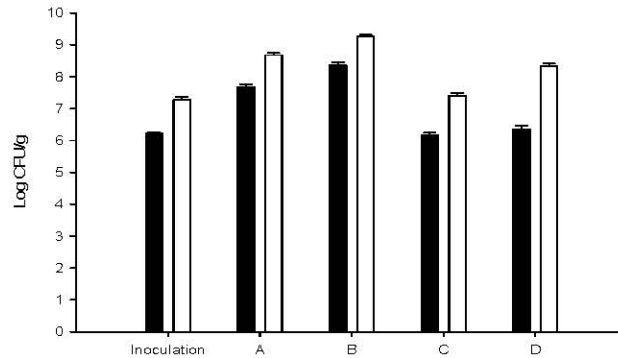


Fig. 19. Effect of different fermentation methods on viable cell density by fermentation of coculture.

□: Lactic acid bacteria, ■: *Saccharomyces cerevisiae*, A: Rotary drum fermentor, B: Tray, C: Plastic bag, D: Rice bag.

발효방법에 따른 바실러스 단독배양 시, Fig. 20에서와 같이 발효 72hr에 배양 된, 바실러스의 균체농도는(log cfu/g) 트레이발효(tray fermentation)처리구 9.17, 쌀자루를 이용한 발효(rice bag)처리구 7.70, 회전드럼발효기(rotary drum fermentor)처리구 6.14, 비닐백발효(plastic bag)처리구 5.31 순으로 나타나, 가장 높게 나온 트레이발효(tray fermentation)처리구와 가장 낮게 나온 비닐백발효(plastic bag)처리구의 차이가 4.04 나타났다. 바실러스 배양 시 혐기조건보다 호기조건이 되어야 증식이 일어나는데, 호기조건상태인 트레이발효(tray fermentation)방식이 다른 방법보다 높게 나타나 바실러스 배양 시 트레이발효(tray fermentation)방식을 결정하였다.

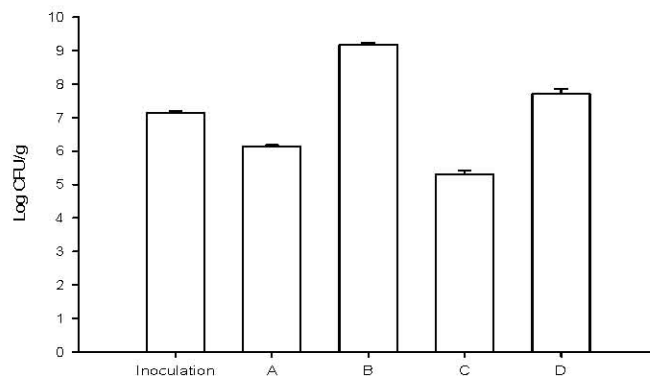


Fig. 20. Effect of different fermentation methods on viable cell density by fermentation of *Bacillus subtilis*. A: Rotary drum fermentor, B: Tray fermentation, C: Plastic bag, D: Rice bag.

## (2) Scale-up에 의한 생균수 및 pH 변화

Scale-up공정에서 유산균+효모 혼합배양 시, Fig. 21에서와 같이 유산균은 발효시간에 따라 증식하여 72hr(log 10.25CFU/g)에 최고치에 달했으며 96hr에는 감소하는 것으로 나타나, *invitro*시험결과와 비슷한 양상을 나타내었다. 효모는 발효시간에 따라 증식하여 48hr(log 8.22CFU/g)에 최고치에 달했으며, *invitro*시험결과와 비슷한 양상을 나타내었다. 따라서 유산균+효모 혼합 발효 시, 발효시간은 72hr로 결정하였다.

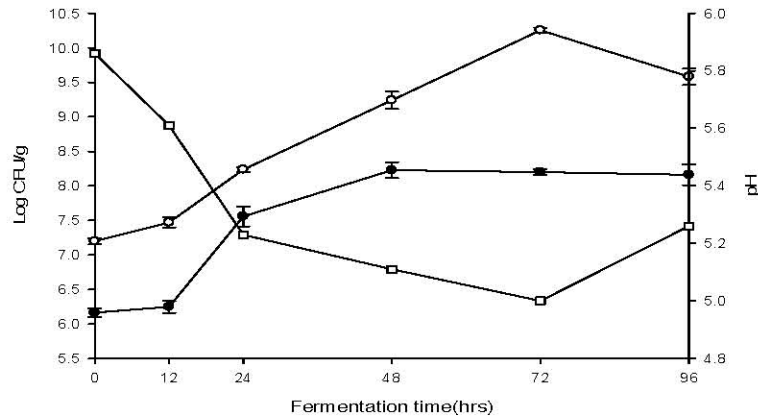


Fig. 21. Effect of different fermentation time on viable cell density and pH by fermentation of coculture of lactic acid bacterium and yeast

○: Lactic acid bacteria, ●: *Saccharomyces cerevisiae*, □: pH

Scale-up공정에서 바실러스 단독 배양 시, Fig. 22에서와 같이 바실러스는 발효시간에 따라 증식하여 48-72hr에 최고치에 달했으며, *in vitro*시험결과와 비슷한 양상을 나타내어, 발효시간은 72hr로 결정하였다.

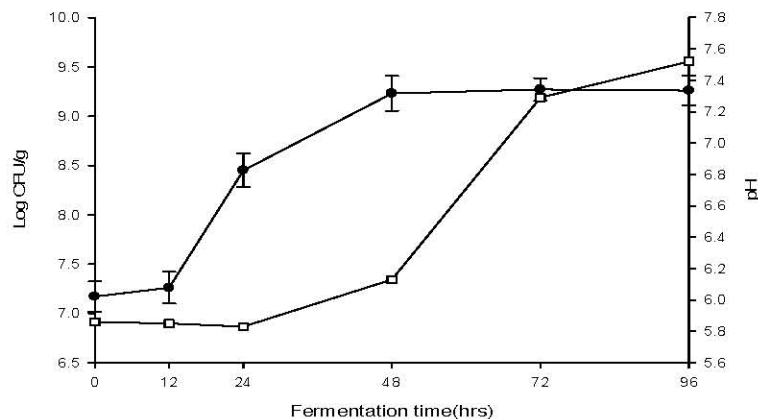


Fig. 22. Effect of different fermentation time on viable cell density and pH by fermentation of *Bacillus subtilis*.

●: Viable cell density(log CFU/g), □: pH.



### (3) 발효물과 비발효물의 일반성분 및 아미노산 성분 변화검사

Scale-up공정에서 트레이발효(tray fermentation) 및 건조한 것을, 1:1로 혼합하여 일반성분과 15종의 아미노산 분석을 하였다.

그 결과, Table 4와 같이 유산균, 효모, 바실러스 발효에 의한 발효대두박은 비발효물보다 조단백질 +4.47%, 조지방 +0.63%, 조섬유 +2.35%, 칼로리 +128cal 높게 나타났으며, 조회분 -0.52% 적게 나타나, 발효미생물에 의한 발효 시, 유용성분들이 증가하는 것으로 예상된다. 또한 15종의 아미노산 분석결과 Table 5와 같이 발효미생물에 의한 발효물(39.83%)이 비발효물(36.84)보다 아미노산 함량이 2.99% 높게 나타났으며, 전체 아미노산함량이 골고루 증가되는 것으로 나타났다.

**Table 4. Contents of general component and energy in fermented and non-fermented feedstuff.**

Material	Crude Protein (%)	Crude Fat (%)	Crude Ash (%)	Crude Fiber (%)	Energy (cal)
Soybean meal	42.70	2.52	6.99	5.80	3,929
Fermented soybean meal	47.17	3.15	6.47	8.15	4,057

**Table 5. Amino acid contents in fermented and non-fermented feedstuff.**

Contents	Soybean meal (%)	Fermented soybean meal (%)
Alanine	1.873	1.996
Arginine	2.722	2.797
Aspartic acid	4.348	4.714
Glutamic acid	7.322	7.878
Glycine	1.689	1.851
Histidine	1.038	1.100
Isoleucine	1.530	1.700
Leucine	3.171	3.460
Lysine	2.349	2.593
Phenylalanine	1.894	2.080
Proline	2.277	2.572
Serine	2.081	2.168
Threonine	1.594	1.698
Tyrosine	1.309	1.430
Valine	1.639	1.815
<b>Total</b>	<b>36.836</b>	<b>39.852</b>

### 3. 발효사료 첨가제의 저장성 연장

#### 가. 연구방법

습사료첨가제 및 건조사료첨가제의 저장조건 및 저장기간을 알아보기 위하여, 유산균-효모 혼합발효, 유산균, 효모, 바실러스 발효습사료첨가제를 제조하였으며 4, 10, 20, 25, 30, 35℃에 저장하여 0, 7, 14, 21, 28일 관찰하여 생균수의 변화를 관찰하였다. 건조발효사료첨가제는 습사료첨가제와 달리 유산균-효모 혼합발효, 바실러스 발효시켜 건조한 시료를 1:1 혼합하여 사용하였으며, 4, 15, 25, 35℃에 저장하여 0, 30, 60, 90, 120일 관찰하였다.

#### 나. 연구결과

##### (1) 발효 습사료첨가제

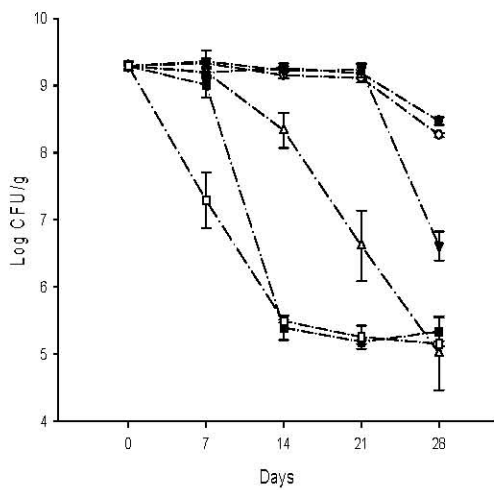
###### (가) 유산균+효모 혼합발효 습사료첨가제 저장조건

유산균+효모 혼합발효 습사료첨가제의 저장온도에 따른 변화는 Fig. 23에서와 같이 유산균의 균체농도(log CFU/g)는 4℃처리구 9.29→8.47, 10℃처리구 9.29→8.26, 20℃처리구 9.29→6.61, 25℃처리구 9.29→5.01, 30℃처리구 9.29→5.33, 35℃처리구 9.29→5.15 순으로 나타나, 10℃ 이하에서 보관하는 방법이 합리적인 것으로 나타났다. 효모의 균체농도(log CFU/g)는 4℃처리구 8.27→8.23, 10℃처리구 8.27→8.15, 20℃처리구 8.27→4.61, 25℃처리구 8.27→3.99, 30℃처리구 8.27→3.44, 35℃처리구 8.27→3.25 순으로 나타나, 저장온도가 상승할수록 비례적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 10℃ 이하에서 보관하는 방법이 합리적인 것으로 나타났다.

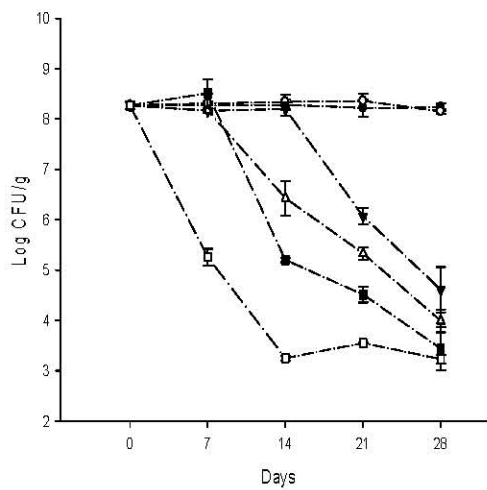
유산균+효모 혼합발효 습사료첨가제의 저장온도에 의한 시험결과 장기간 보관 시, 효모가 유산균보다 열에 취약하여 감소하는 폭이 더 큰 것으로 나타났고, 10℃ 이하로 보관하는 방법이 가장 합리적인 것으로 나타났다.

###### (나) 유산균발효 습사료첨가제 저장조건

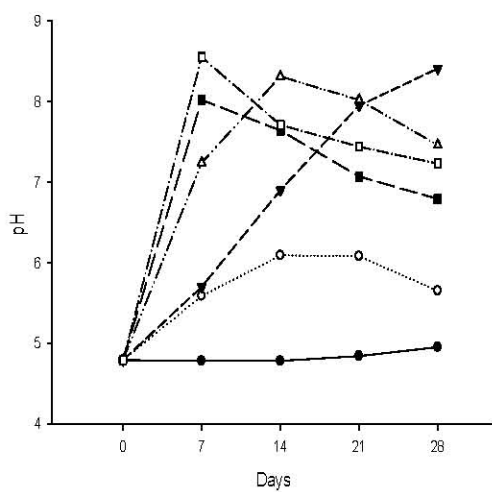
유산균발효 습사료첨가제의 저장온도에 따른 변화는 Fig. 24에서와 같이 유산균의 균체농도(log CFU/g)는 4℃처리구 9.33→8.39, 10℃처리구 9.33→8.15, 20℃처리구 9.33→8.39, 30℃처리구 9.33→5.54, 35℃처리구 9.33→5.13, 25℃처리구 9.33→4.85 순으로 나타났다. 유산균+효모 혼합 발효물보다 유산균 단독 발효 시, 20℃처리구의 균체농도가 감소하는 폭이 적게 나타났으며, 20℃ 이하에서 보관하는 방법이 합리적인 것으로 판단된다.



(a)



(b)



(c)

Fig 23. Effect of different storage temperature on viable cell density and pH by fermentation of coculture.

(a): Lactic acid bacteria, (b): *Saccharomyces cerevisiae*, (c): pH, ●: 4°C, ○: 10°C, ▼: 20°C, △: 25°C, ■: 30°C, □: 35°C

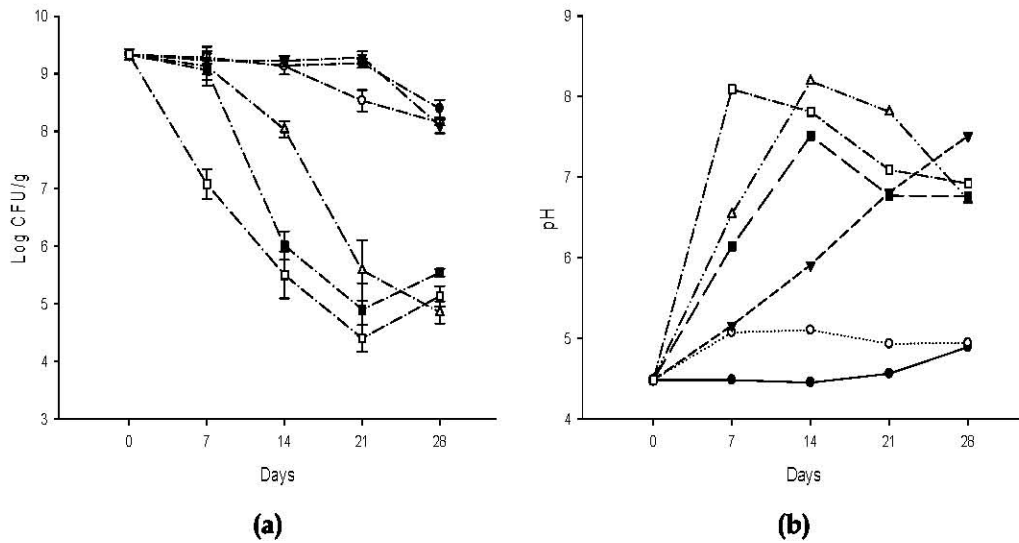


Fig 24. Effect of different storage temperature on viable cell density and pH by fermentation of lactic acid bacteria.

(a): pH, (b): Viable cell density, ●: 4°C, ○: 10°C, ▼: 20°C, △: 25°C, ■: 30°C, □: 35°C

(다) 효모발효 습사료첨가제 저장조건

효모발효 습사료첨가제의 저장온도에 따른 변화는 Fig. 25에서와 같이 유산균의 균체농도 (log CFU/g)는 4°C처리구 8.26→8.15, 10°C처리구 8.26→8.19, 20°C처리구 8.26→6.08, 25°C처리구 8.26→4.40, 30°C처리구 8.26→3.22, 35°C처리구 8.26→3.00 순으로 나타났다. 효모 단독배양 시, 유산균+효모 혼합발효들과 비슷한 양상이 나타났으며, 10°C 이하에서 보관하는 방법이 합리적인 것으로 판단된다.

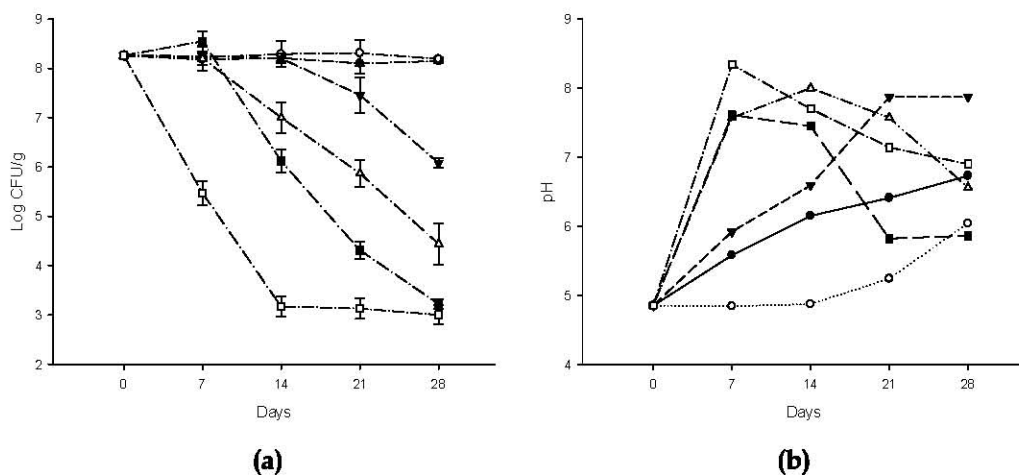
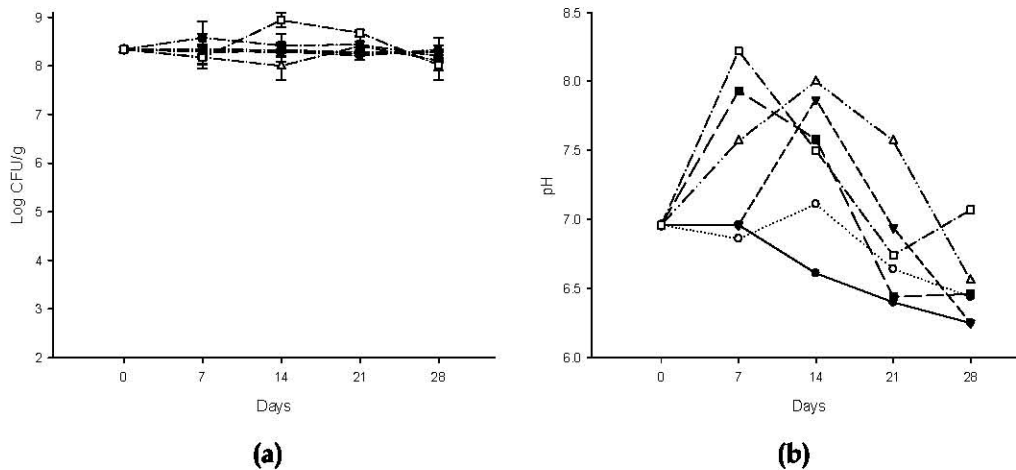


Fig 25. Effect of different storage temperature on viable cell density and pH by fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*.

(a): pH, (b): Viable cell density, ●: 4°C, ○: 10°C, ▼: 20°C, △: 25°C, ■: 30°C, □: 35°C

**(라) 바실러스 발효습사료첨가제 저장조건**

바실러스발효 습사료첨가제의 저장온도에 따른 변화는 Fig. 26에서와 같이 유산균의 균체농도(log CFU/g)는 4℃처리구 8.34→8.15, 10℃처리구 8.34→8.29, 20℃처리구 8.34→8.28, 25℃처리구 8.34→8.11, 30℃처리구 8.34→8.20, 35℃처리구 8.34→8.02 으로 나타났다. 바실러스 단독배양 시, 습사료첨가제는 상온에서도 감소되지 않는 것으로 나타났다.



**Fig 26. Effect of different storage temperature on viable cell density and pH by fermentation of *Bacillus subtilis*.**

**(a): pH, (b): Viable cell density, ●: 4℃, ○: 10℃, ▼: 20℃, △: 25℃, ■: 30℃, □: 35℃**

**(2) 발효 건조사료첨가제**

유산균-효모 혼합발효 건조물과 바실러스 발효 건조물을 1:1로 혼합한 시료를 4, 15, 25, 35℃에 저장하여 0, 30, 60, 90, 120일동안 발효미생물의 균체농도의 변화를 관찰하였다.

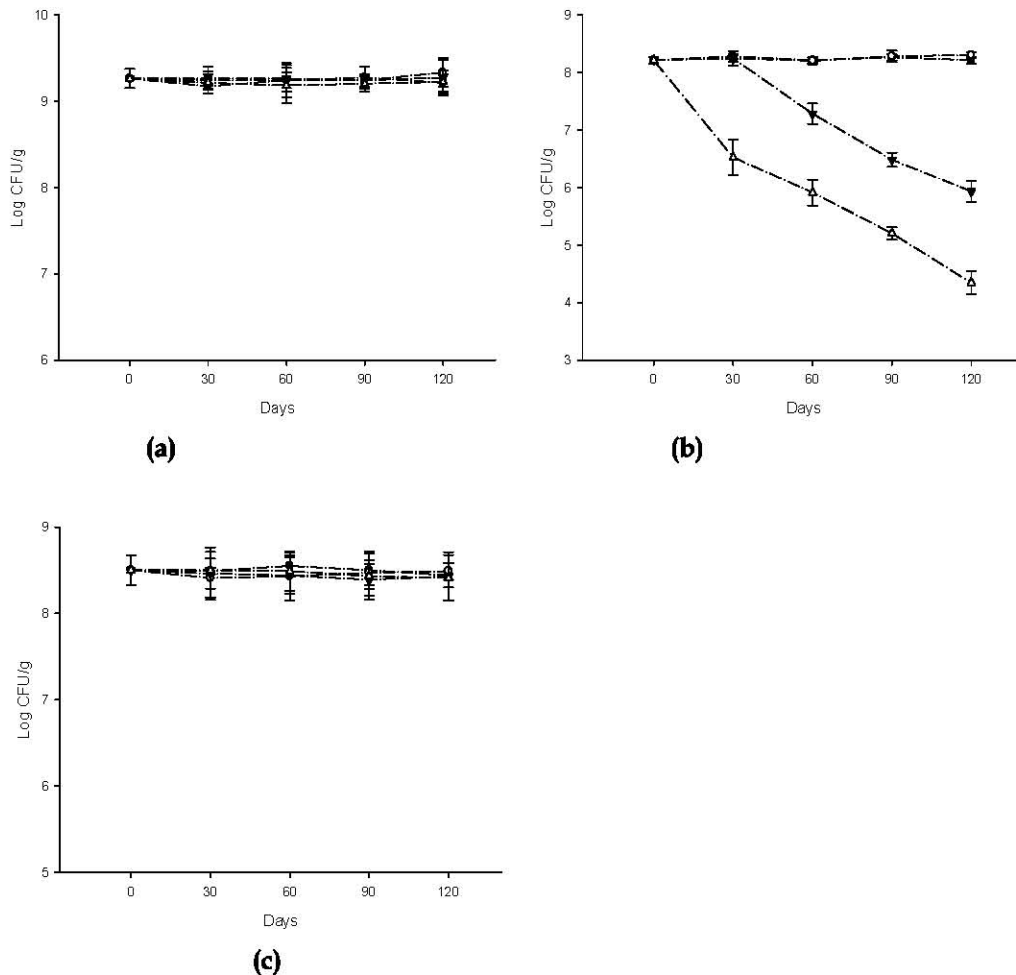
건조사료첨가제의 저장온도에 따른 유산균의 변화는 Fig. 25에서와 같이 유산균의 균체농도 (log CFU/g)는 4℃처리구 9.26→9.21, 10℃처리구 9.26→9.23, 20℃처리구 9.26→9.26, 30℃처리구 9.26→9.21, 35℃처리구 9.26→9.21, 25℃처리구 9.26→9.21 으로 나타났다. 발효습사료첨가제와는 달리 건조상태의 건조사료첨가제의 유산균은 35℃이하, 120일 보관하여도 안전한 것으로 나타났다.

건조사료첨가제의 저장온도에 따른 효모의 변화는 Fig. 25에서와 같이 효모의 균체농도(log CFU/g)는 4℃처리구 8.21→8.21, 15℃처리구 8.21→8.30, 25℃처리구 8.21→5.93, 35℃처리구 8.26→4.34 순으로 나타났다. 유산균과는 대조적으로 15℃ 이하에서는 120일 보관하여도 균체농도 변화가 나타나지 않았으며, 25℃ 이하에서는 30일, 35℃ 30일 이전에 균체농도가 감소하였다. 이와 같이 효모는 유산균과는 다르게 온도에 의해 매우 민감한 것으로 판단되어, 효모

의 균체농도유지를 의해서는 15℃이하에서 보관하는 방법이 바람직한 것으로 나타났다.

건조사료첨가제의 저장온도에 따른 바실러스의 변화는 Fig. 27에서와 같이 유산균의 균체농도(log CFU/g)는 4℃처리구 8.50→8.44, 15℃처리구 8.50→8.49, 25℃처리구 8.50→8.43, 35℃처리구 8.50→8.41 으로 나타났다. 유산균과 마찬가지로 바실러스의 균체농도는 35℃, 120일 보관하여도 안전한 것으로 나타났다.

이와 같이 유산균과 바실러스의 균체농도가 35℃, 120일 보관하여도 안전한 것으로 나타났으나, 효모의 사용목적(생균수 or 대사물질)에 따라 저장온도는 35℃, 15℃이하로 결정할 수 있으며, 본 시험의 목적 상, 효모의 생균수 또한 중요함으로 건조사료첨가제 보관온도는 15℃로 하였다.



**Fig 27. Effect of different storage period for different temperature on viable cell density of dried fermentation feedstuff.**

**(a): Lactic acid bacteria, (b): *Saccharomyces cerevisiae*, (c) *Bacillus*, ●: 4℃, ○: 15℃, ▼: 25℃, △: 35℃.**

#### 4. 소량 다품목 생산시스템 구축 및 고농도 배양기술 구축

##### 가. 소량 다품목 위탁생산 시스템 구축

###### (1) 위탁생산시스템 대상자의 위탁생산 우선순위 결정 : 공익적 위탁생산을 최우선 고려

- ① 신규 발효사료첨가제 제품개발 위한 연구과제 시제품 위탁생산
- ② 생산시설이 없는 기술 벤처기업의 제품 위탁생산
  - 시장 진입에 따른 기업간 경쟁 유도로 관련분야산업의 품질 향상 및 기술 증진
  - 연구/기술개발자의 창업 및 회사 경쟁력 강화

**기존 정부지원 공공기관의 제품생산 설비 사용의 문제점 극복**

- 장점 : 미생물 산업 관련분야의 기술개발/생산시설이 집적화 되어 있음
- 단점 : 각 장비별 담당자의 부재로 장비/시설 임대시 직접 가동하는 경우가 많음  
→ 기술개발자의 경우, 대단위 장비 사용의 경험이 별로 없어 어려움

- ③ 시군 농업기술센터 등 공공기관의 위탁생산 의뢰 : 고체 발효사료 등
- ④ 중소 영농법인의 소규모 위탁생산
- ⑤ 사료공장
- ⑥ 기타

###### (2) 위탁생산 품목 및 종균관리 : 발효사료첨가제 관련 전 분야 (종균 ~ 첨가제)

품 목	위탁생산/관리 내용	수요처
유용미생물 종균 관리	유용미생물의 장기보관용 동결건조 Ampule	대학/연구기관등 기초연구/기술자
유용미생물 종균 배양액	Pilot 실험용 종균 배양액	대학등 유용미생물의 현장접근용 pilot 규모 실증화
유용미생물 배양배지	바실러스/유산균 효모 산업용 배지	TMR 공장등의 미생물 자가배양용
고상발효용 종균 배양액 (Starter)	부산물 이용 발효사료 생산용 /TMF 생산용 발효종균 seed (단일 균주 / 혼합균주 종균배양액)	TMR 공장/영농법인/자가 농장등 드럼형 습사료/고상발효사료 생산을 위한 발효 요구처
발효사료첨가제 (액상/분말)	사양실험용 소규모 위탁생산 제품 판매용 대량 위탁생산 등	연구기관/공공기관/영농법인/사료공장, 벤처기업 등
사료첨가제용 미생물 수화제 (동결건조)	생균제 원료 / 사일리지발효제 등	연구기관, 동물의약품업체, 벤처기업 등



### (3) 시스템 구축 현황

(가) 종균관리 부분: 배양기/크린벤치/고속원심분리기, 초저온냉동고, 동결건조기 등 운영



- 운영메뉴얼 : KACC 관리 운영메뉴얼 벤치마킹

- 동결건조 조건 : 1-2차년도 연구과제 진행 도출 동결건조보호제 및 농도 적용

(나) 유용미생물 액상배양 종균 부문 (소량 seed 및 대량 starter 위탁생산)



대량 위탁생산 : 5톤 배양기  
소량 위탁생산 : 1톤Ton 배양기 / 0.5톤 배양기

**(다) 고상발효 사료첨가제 / 습발효사료**



**(라) 수화제 type 사료첨가제 / 사일리지 발효제 등**



(마) 합효사료첨가제 대량 위탁생산 플랜트 구축



## 나. 고농도 배양기술 구축

### (1) 유용미생물 액상배양

- 1차년도 연구결과 보고서 참조

### (2) 고상발효를 이용한 발효사료 첨가제

- 2차년도 연구결과실적 [1장 고효율 발효 사료첨가제 대량 생산시스템 정립] 참조

### (3) 소규모 다품종 생산시스템 :

소규모 다품종 생산을 위한 시스템은 2차년도 연구결과실적 [1장 고효율 발효 사료첨가제 대량 생산시스템 정립]에서 기술한 연구실험 결과를 바탕으로 정립하였다.

위탁생산 의뢰자가 요구하는 여러 가지 요구 사항에 부응하기 위하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

표와 같이 바실러스, 유산균, 효모, 바실러스+효모, 바실러스+유산균, 효모+유산균, 바실러스+효모+유산균, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*를 고농도로 배양하기 위하여 각 균에 해당하는 원재료조성(materials composition)을 표시하였으며, 고농도 배양을 위해서는 기본적으로 대두박(A 조성)을 사용하도록 하였다.

대두박 사용 시 원가 상승에 대한 부담이 큰 업체나 축산농가에 대해서는 B조성과 같은 원재료나, 그 외에 더 저렴한 원재료를 이용하도록 하였다.



**Table. Small-scale production systems.**

Single / Coculture	Strains	Materials composition
Bacillus <sup>1)</sup>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i>	A. Soybean meal B. Soybean meal 50%+ Wheat bran 50%
Lactobacillus <sup>1)</sup>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. mesenteriods</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Pediococcus acidilactic</i> , <i>P. dextrinicus</i>	A. Soybean meal B. Soybean meal 50%+ Corn grits 50%
Yeast <sup>1)</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A. Soybean meal B. Soybean meal 33%+Wheat bran 33%+ Corn grits 33%
Bacillus <sup>1)</sup> , Yeast <sup>1)</sup>	-	A. Soybean meal B. Soybean meal 66.0%+Wheat bran 17.0%+ Corn grits 17.0%
Bacillus <sup>1)</sup> , Lactobacillus <sup>1)</sup>	-	A. Soybean meal B. Soybean meal 75%+ Corn grits 25%
Lactobacillus+Yeast <sup>2)</sup>	-	A. Soybean meal B. Soybean meal 75%+ Corn grits 25%
Bacillus <sup>1)</sup> , Lactobacillus+Yeast <sup>2)</sup>	-	A. Soybean meal B. Soybean meal 75%+ Corn grits 25%
<i>Aspergillus niger</i> <sup>1)</sup>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat bran 70%+Corn grits 30%
<i>Aspergillus oryzae</i> <sup>1)</sup>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Wheat bran 70%+Corn grits 30%

<sup>1)</sup>: one strain fermentation, <sup>2)</sup>: coculture fermentation



## 5. 교체대상조건을 반영한 대용량 고효율 미생물 고상발효기의 제작 및 효능 검증

### 가. 미생물 고상발효기의 제작

(1) 위탁생산에 대응함과 동시에 연구결과에서 도출된 운전 변수를 효율적으로 적용하기 위하여 기존에 판매되는 기성 교체발효기를 대신하여 제작함.

#### (2) 반영조건

- ① 온도제어
- ② 교반 효율성
- ③ 에어 공급

#### (2) 제원

- 1,350L x 1,250D x 1,650 H
- Working volume : 2.5 루베
- 교반모터 : 3.75 kw
- 감속기 비율 : 1/30
- 기어 및 베어링 : No. 120 / UCFC 212
- 송풍기 : 200 W
- 히터 : 5 kw
- 스팀 배관 : STS 304



제작 교체발효기 (스크류 콘베이어는 본사 보유의 장비를 정비하여 연결)

나. 물 공급라인과 에어공급라인 연결 후, 교체발효 운전조건 및 효율을 2차년도 잔여기간에 분석 예정

## 제 2 절. 미생물 발효종균제(starter)의 생산공정 개선 및 제제의 다변화

### 1. 액상제형 개발

#### 가. 연구방법

액상제형을 개발하기 위해 1차년도 연구결과 유산균(*Lactobacillus plantarum* BBG-L30) sodium malate 2.0%, 효모(*Sacchromyces cereviase* BBG-Y6) sodium succinate 2.0%, 바실러스(*Bacillus subtilis* BBG-20) sodium malate 2.0%, 유산균+효모+바실러스 혼합액 sodium malate 2.0%을 첨가하여, 25℃, 28일간 저장 하였을 때, 균체농도의 보존효과가 있는 것으로 나타났다. 보존효과 확인 및 최적농도 설정을 위하여, 각 제형의 농도를 0, 1, 2, 3, 4, 5% 첨가하였으며, 유산균은 0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 240일 동안, 효모는 0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 210일, 바실러스는 0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 210일, 유산균+효모+바실러스혼합액(동일비율)0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 210일 균체농도를 관찰하였다.

#### 나. 연구결과

##### (1) 유산균

유산균(*Lactobacillus plantarum* BBG-L30) 단일 배양액의 제형화를 위해, sodium malate 첨가량과 저장기간에 따른 유산균의 변화는 Fig. 28에서와 같이 240일간의 저장 시, 유산균의 균체농도(log CFU/ml)는 5%처리구 9.16→5.26, 4%처리구 9.26→5.18, 3%처리구 9.26→3.29, 2%처리구 9.26→0.00, 1%처리구 9.26→0.00, 0%처리구 9.26→0.00 순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 첨가량이 증가할 수록 유산균의 보존효과는 증가하는 것으로 나타났다.

120일간의 저장 시 유산균의 균체농도(log CFU/ml)는 5%처리구 9.16→5.51, 4%처리구 9.26→5.35, 3%처리구 9.26→3.94, 2%처리구 9.26→0.00, 1%처리구 9.26→0.00, 0%처리구 9.26→0.00 순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 첨가량이 증가할수록, 유산균의 보존효과는 증가하는 것으로 나타났다.

90일간의 저장 시 유산균의 균체농도(log CFU/ml)는 5%처리구 9.16→5.86, 4%처리구 9.26→5.52, 3%처리구 9.26→4.25, 2%처리구 9.26→3.15, 1%처리구 9.26→2.13, 0%처리구 9.26→0.00 순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 첨가량이 증가할수록, 유산균의 보존효과는 증가하는 것으로 나타났다.

60일간의 저장 시 유산균의 균체농도(log CFU/ml)는 5%처리구 9.16→6.41, 4%처리구 9.16→5.81, 3%처리구 9.26→4.82, 2%처리구 9.26→3.93, 1%처리구 9.26→3.53, 0%처리구 9.26→



2.12 순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 첨가량이 증가할수록, 유산균의 보존효과는 증가하는 것으로 나타났다.

28일간의 저장 시 유산균의 균체농도(log CFU/ml)는 5%처리구 9.16→6.25, 4%처리구 9.16→6.25, 3%처리구 9.26→4.75, 2%처리구 9.26→4.75, 1%처리구 9.26→4.65, 0%처리구 9.26→4.12 순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 첨가량이 증가할수록, 유산균의 보존효과는 증가하는 것으로 나타났다.

이와 같이 sodium malate 첨가량이 증가할수록, 유산균 저장 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 버퍼효과가 있는 sodium malate의 첨가량이 증가할수록, 저장효과가 증가하는 것으로 판단된다. sodium malate 첨가량을 많이 첨가하면 좋겠지만, 1kg에 9,000원대의 단가가 형성되어 있어, 5% 첨가 시 450원/L의 가격인상이 되므로, 최고 5%이하로 첨가하는 것으로 결정하였다.

보존효과가 좋은 sodium malate 5.0% 처리구를 유산균 액상제품의 저장효과를 극대화하기 위해 첨가하기로 결정하였으며, 10℃이하의 저온저장 방법을 최종적으로 결정하였다.

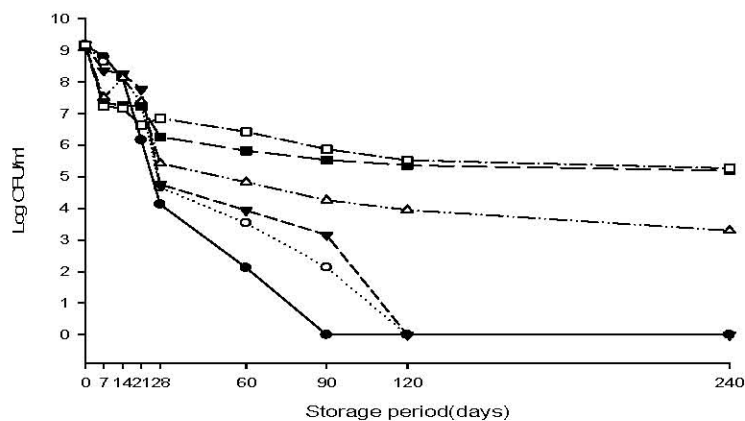


Fig. 28. Effect of different storage period for different material concentration on viable cell density of *Lactobacillus plantarum* BBG-L30.

●: 0%, ○: 1%, ▼: 2%, △: 3%, ■: 4%, □: 5%

## (2) 효모

효모(*Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6)의 단일 배양액의 제형화를 위해, sodium succinate 첨가량과 저장기간에 따른 효모의 변화는 Fig. 29에서와 같이 210일간의 저장 시, 0%처리구 8.29→6.23, 5%처리구 8.29→6.12, 4%처리구 8.29→4.13, 3%처리구 8.29→0, 2%처리구 8.29→0.00, 1%처리구 8.29→0.00순으로 나타났다. 이와 같이 sodium succinate 1, 2, 3%, 4%첨가 시, 효모의 보존효과는 감소하는 것으로 나타났으며, 5% 첨가 시에는 무처리구보다 근소하게 낮았다.

120일간의 저장 시 효모의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.29→7.18, 5%처리구 8.29→7.11, 4%처리구 8.29→6.24, 3%처리구 8.29→4.89, 2%처리구 8.29→4.29, 1%처리구 8.29→

4.16순으로 나타났다. 이와 같이 sodium succinate 1, 2, 3%, 4%첨가 시, 효모의 보존효과는 감소하는 것으로 나타났으며, 5% 첨가 시에는 무처리구보다 근소하게 낮았다.

90일간의 저장 시 효모의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.29→7.20, 5%처리구 8.29→7.13, 3%처리구 8.29→6.70, 4%처리구 8.29→6.60, 2%처리구 8.29→5.60, 1%처리구 8.29→5.50순으로 나타났다. 이와 같이 sodium succinate 1, 2, 3%, 4%첨가 시, 효모의 보존효과는 감소하는 것으로 나타났으며, 5% 첨가 시에는 무처리구보다 근소하게 낮았다.

60일간의 저장 시 효모의 균체농도(log CFU/ml)는 3%처리구 8.29→7.24, 5%처리구 8.29→7.20, 0%처리구 8.29→7.16, 4%처리구 8.29→7.12, 2%처리구 8.29→7.12, 1%처리구 8.29→6.35순으로 나타났다. 이와 같이 sodium succinate 1%첨가 시, 효모의 보존효과는 감소하는 것으로 나타났으며, 2, 4% 첨가 시에는 무처리구보다 보존효과가 근소하게 낮았으며, 3, 5% 첨가 시에는 무처리구보다 보존효과가 근소하게 높게 나타났다.

28일간의 저장 시 효모의 균체농도(log CFU/ml)는 2%처리구 8.29→7.25, 3%처리구 8.29→7.23, 4%처리구 8.29→7.15, 5%처리구 8.29→7.12, 0%처리구 8.29→7.11, 1%처리구 8.29→6.41순으로 나타났다. 이와 같이 sodium succinate 1%첨가 시, 효모의 보존효과는 감소하는 것으로 나타났으며, 2, 3, 4, 5% 첨가 시에는 무처리구보다 근소하게 높게 나타났다.

이와 같이 sodium succinate 첨가 후, 28일간 저장 시, 1% 처리구를 제외한 모든 처리구에서 저장효과를 나타내었으나, 저장 시간이 증가할수록 sodium succinate 첨가한 시험구가 오히려 첨가하지 무처리구에 비해 저장감소효과를 나타내 sodium succinate를 첨가하지 않기로 결정하다.

28-60일의 보존효과가 있는, 2.0%이상의 sodium succinate 처리구는 효모 액상제품의 저장효과를 극대화 하기 위해 최종적으로 첨가하지 않기로 결정하였으며, 10℃이하의 저온저장하는 방법을 최종적으로 결정하였다.

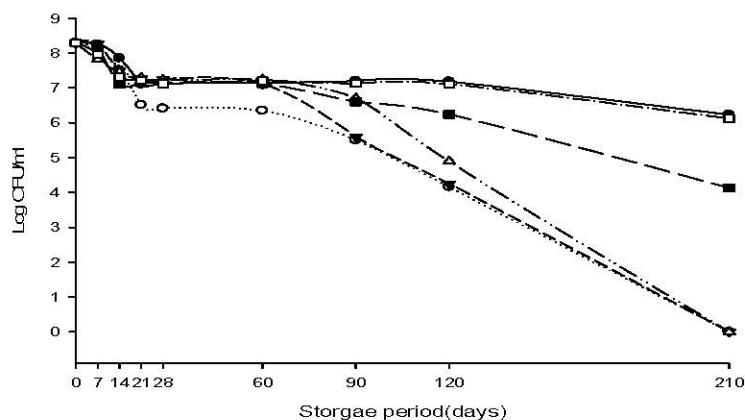


Fig. 29. Effect of different storage period for different material concentration on viable cell density of *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6.

●: 0%, ○: 1%, ▼: 2%, △: 3%, ■: 4%, □: 5%

### (3) 바실러스

바실러스(*Bacillus subtilis* BBG-20)의 단일 배양액의 제형화를 위해, sodium malate 첨가량과 저장기간에 따른 바실러스의 변화는 Fig. 30에서와 같이 210일간의 저장 시, 0%처리구 8.28→7.84, 1%처리구 8.28→7.15, 2%처리구 8.28→7.14, 5%처리구 8.28→7.14, 3%처리구 8.28→6.76, 4%처리구 8.28→6.75순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 1, 2, 3%, 4%, 5% 첨가 시, 바실러스의 보존효과는 무처리구에 비교하였을 때, 나타나지 않았다.

120일간의 저장 시 바실러스의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.28→8.24, 2%처리구 8.28→7.51, 5%처리구 8.28→7.32, 3%처리구 8.28→7.26, 1%처리구 8.28→7.25, 4%처리구 8.28→7.21순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 1, 2, 3%, 4%, 5% 첨가 시, 바실러스의 보존효과는 무처리구에 비교하였을 때, 나타나지 않았다.

90일간의 저장 시 바실러스의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.29→8.25, 2%처리구 8.29→7.61, 5%처리구 8.28→7.61, 1%처리구 8.28→7.52, 3%처리구 8.28→7.52, 4%처리구 8.28→7.25순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 1, 2, 3%, 4%, 5% 첨가 시, 바실러스의 보존효과는 무처리구에 비교하였을 때, 나타나지 않았다.

60일간의 저장 시 바실러스의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.28→8.25, 2%처리구 8.28→7.93, 3%처리구 8.28→7.84, 1%처리구 8.28→7.75, 5%처리구 8.28→7.71, 4%처리구 8.28→7.64순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 1, 2, 3%, 4%, 5% 첨가 시, 바실러스의 보존효과는 무처리구에 비교하였을 때, 나타나지 않았다.

28일간의 저장 시 바실러스의 균체농도(log CFU/ml)는 5%처리구 8.28→8.24, 2%처리구 8.25→8.21, 1%처리구 8.28→8.20, 3%처리구 8.28→8.20, 0%처리구 8.28→8.18, 4%처리구 8.28→8.17순으로 나타났다. 이와 같이 sodium malate 4%첨가 시, 효모의 보존효과는 감소하는 것으로 나타났으며, 1, 2, 3, 5% 첨가 시에는 무처리구보다 근소하게 높게 나타났다.

이와 같이 sodium malate 첨가 후, 28일간 저장 시, 4% 처리구를 제외한 모든 처리구에서 저장효과를 나타내었으나, 저장 시간이 증가할수록 sodium malate 첨가한 시험구가 오히려 첨가하지 않은 무처리구에 비해 저장감소효과를 나타내 sodium malate를 첨가하지 않기로 결정하다.

한달정도의 보존효과가 있는, 2.0%이상의 sodium succinate 처리구는 효모 액상제품의 저장효과를 극대화 하기 위해 최종적으로 첨가하지 않기로 결정하였으며, 제품의 특이취 저감을 위해, 10℃이하의 저온저장하는 방법을 최종적으로 결정하였다.

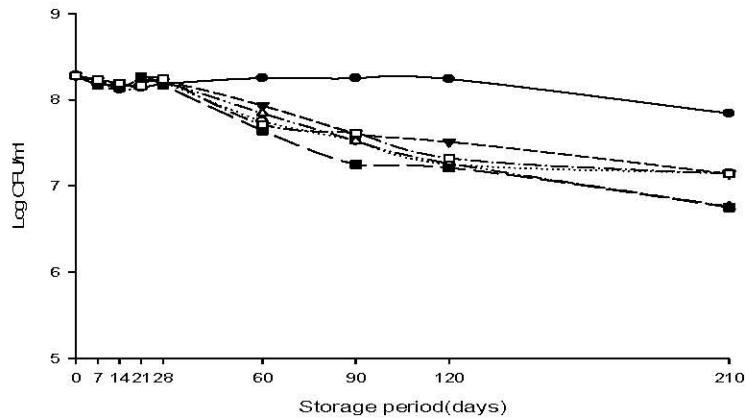


Fig. 30. Effect of different storage period for different material concentration on viable cell density of *Bacillus subtilis* BBG-B20.

●: 0%, ○: 1%, ▼: 2%, △: 3%, ■: 4%, □: 5%

#### (4) 유산균+효모+바실러스 혼합조성

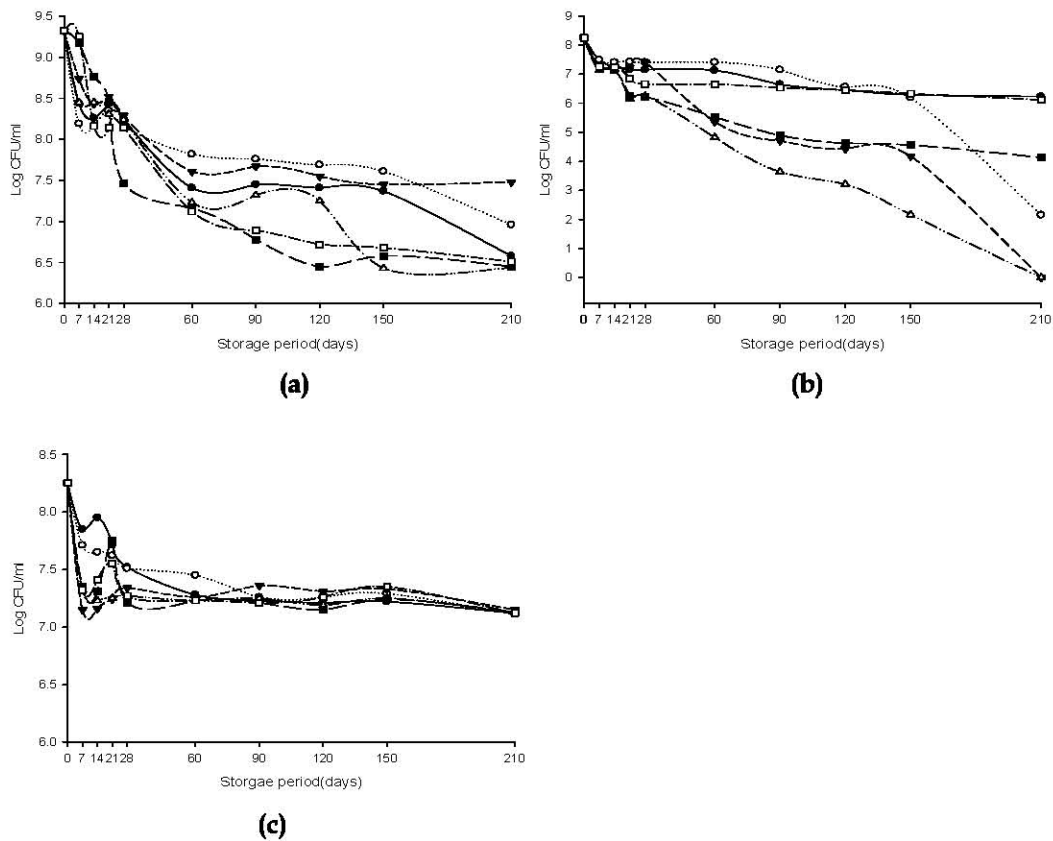
혼합액의 제품 제형화를 위해, sodium malate 첨가량과 저장기간에 따른 유산균의 변화는 Fig. 31에서와 같이 210일간의 저장 시, 유산균의 균체농도(log CFU/ml)는 2%처리구 9.32→7.48, 1%처리구 9.32→6.96, 0%처리구 9.32→6.58, 5%처리구 9.32→6.51, 4%처리구 9.32→6.45, 3%처리구 9.32→6.44 순으로 나타났다. 이와 같이 무처리구보다 sodium malate 1, 2% 처리구에서 유산균의 보존효과가 증가하는 것으로 나타났으며, 3, 4, 5% 농도에서는 무처리구와 차이가 나타나지 않았다.

혼합액의 제품 제형화를 위해, sodium malate 첨가량과 저장기간에 따른 효모의 변화는 Fig. 29에서와 같이 210일간의 저장 시, 효모의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.25→6.23, 5%처리구 8.25→6.12, 4%처리구 8.25→4.13, 1%처리구 8.25→2.15, 2%처리구 8.25→0, 3%처리구 8.25→0 순으로 나타났다. 이와 같이 무처리구보다 sodium malate 모든처리구에서 효모의 보존효과는 나타나지 않았으며, 효모 단독 배양액 조성 시와 같이 5% 처리구에서만 무처리구에 비해 - log 0.10CFU/g의 근소한 차이를 나타내었다. 14-120일사이 저장 시에 1% sodium malate 처리구가 무처리구보다 높게 나와 보존효과가 있었으나, 150일 이후부터 무처리구가 더 높게 나타나 90일 정도의 단기 보관 시에 적용할만한 농도로 판단된다. Sodium malate 첨가량이 더 증가하면 효모 저장효과가 증진 시킬 수 있을 것으로 예상되나, 경제성이 없어 더 이상의 농도에서는 진행하지 않기로 결정하였다.

혼합액의 제품 제형화를 위해, sodium malate 첨가량과 저장기간에 따른 바실러스의 변화는

Fig. 29에서와 같이 210일간의 저장 시, 바실러스의 균체농도(log CFU/ml)는 0%처리구 8.25→7.12, 1%처리구 8.25→7.11, 2%처리구 8.25→7.15, 3%처리구 8.25→7.12, 4%처리구 8.25→7.13, 5%처리구 8.25→7.12로 나타났다. 이와 같이 무처리구와 sodium malate 모든처리구에 서 처리효과가 같아, 보존효과는 나타나지 않았다.

저장기간이 경과할수록, 유산균과 효모의 균체 감소는 증가하였으며, 바실러스는 log 1.50CFU/ml 정도의 변화만 나타나고, 지속적인 균체농도를 유지하였다. 혼합액의 제품조성을 위하여, 유산균과 효모에 저장 효과를 나타내는 sodium malate 1%를 최종적으로 첨가하기로 결정하였으며, 저장온도 또한 10℃이하에 저장하기로 결정하였다.



**Fig. 31. Effect of different storage period for different material concentration on viable cell density of mixed microbials.**

(a): *Lactobacillus palantarum*, (b) *Saccharomyces cereviase*, (c):*Bacillus subtilis*, ●: 0%, ○: 1%, ▼: 2%, △: 3%, ■: 4%, □: 5%

## 2. 동결건조 수화제 개발

### 가. 연구방법

#### (1) 원심분리

유산균, 바실러스, 효모를 배양액을 원심분리(5,000g)하여, 분리된 균체(cake)만 회수하였다.

#### (2) 동결건조보호제

분리된 균체 1g에 동결건조보호제로 적용할 casein(10, 20, 30%), peptone(10, 20, 30%), corn starch(10, 20, 30%), skim milk(10, 20, 30%), soluble starch(10, 20, 30%), tryptone(10, 20, 30%), yeast extract(10, 20, 30%) 첨가하였으며, 나머지는 멸균수를 첨가하여 최종무게가 10g이 되게 조성하여, 균체와 첨가한 재료를 믹스하였다. 유산균, 효모는 deep freezer를 이용하여 -80℃로 급냉하여 1일간 동결시켰으며, 바실러스는 2일간 동결시켜, 1일간 동결건조 시켜 만든 제품을 생균수를 측정하여 동결건조보호제로 사용한 재료의 효능을 측정하였다.

또한 동결건조보호제의 효과를 증대시키기 위해 당 첨가에 따른 변화를 관찰하였다. 유산균 중 *Pediococcus acidolactic*은 skim milk 20%, *Lactobacillus plantarum*은 skim milk 30%, *Saccharomyces cerevisiae*는 skim milk 30%, *Bacillus subtilis*는 corn starch 20%를 기본으로 한후, arabinose(1, 5%), dextrin(1, 5%), fructose(1, 5%), galactose (1, 5%), glucose(1, 5%), lactose(1, 5%), maltose(1, 5%), mannose(1, 5%), sucrose(1, 5%), trehalose(1, 5%), monosodium glutamate(1, 5%)의 첨가제의 농도를 달리 실험하였다.

동결건조보호제의 효과차이를 보기 위해, 1차 시험보다, 기간을 2배로 강화하여, 유산균, 효모는 deep freezer를 이용하여 -80℃로 급냉하여 2일간 동결시켰으며, 바실러스는 4일간 동결시켜, 2일간 동결건조 시켰다. 각 공정에 맞는 생균수를 측정하여 나온 결과를, 동결건조 후에 생존률(%)을 계산하였다.

### 나. 연구결과

유용미생물의 장기보존을 위한 동결건조는 미생물 균체를 냉동 건조시킴으로써 저장하는 방법이며, 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다. 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등에서 동결건조의 장점을 찾을 수 있는 반면 동결건조 과정에서 균체의 손상을 받아 활성과 생존율에 많은 영향을 미치게 되므로 미생물 균체의 생존율을 최대한 높일 수 있는 방법이 요구된다. 동결건조보호제(cryoprotectant agents)는 생존율에 미치는 가장 중요한 인자이지만, 보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결건조, 건조시간에 등에 따라 다르며, 미생물의 종류에 따라서는 보호제가 생존율에 악영향을 미칠수도 있어 보호제 선택 시 많은 주의

가 필요하다.

(1) 유산균(Lactic acid bacteria)

(1) *Pediococcus acidolactic*

1차년도에 분리한 유용균주 중 하나인 *Pediococcus acidolactic* BBG-L1(P.A)는 *Lactobacillus plantarum*와 다른 형태의 유산균으로, 동결건조 시 다른 결과가 예상되어, *Pediococcus acidolactic* BBG-L1에 맞는 동결건조보호제를 탐색하였다.

*Pediococcus acidolactic* BBG-L1(P.A)의 동결건조 수화제를 제제화하기 위해, 주원료로 사용할 동결건조보호제 첨가에 따른 P.A의 생존율(%) 변화는 Fig. 32에서와 같이, skim milk 20%처리구(no. 12) 71.01, skim milk 30%처리구(no. 13) 69.13, yeast extract 30%처리구(no. 22) 55.07, skim milk 10%처리구(no. 11) 21.31 순으로 나타났으며, skim milk 20%처리구가 무처리구(no. 1) 4.4에 비해 66.61 높은 동결건조보호효과를 나타내었다. 첨가제별 동결건조 보호효과는 skim milk 처리구가 다른 첨가물처리구보다 월등하게 높았으며, 다른 처리구 중 yeast extract 30%처리구만 보호효과가 높게 나타났다. yeast extract의 첨가함량이 30%보다 높은 함량이 첨가되면 skim milk 20, 30%처리구와 비슷한 효과를 나타낼 것으로 예상되나, 경제성이 맞지 않아 추가실험은 하지 않기로 하였다. 이와 같이 skim milk 20%처리구에서 P.A의 동결건조보호효과가 다른 처리구에 비해 높게 나타나, 주원료로 사용할 동결건조보호제는 skim milk 20%로 결정하였다.

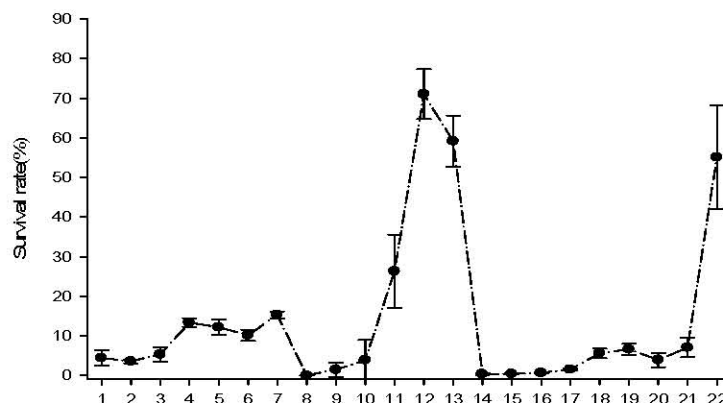


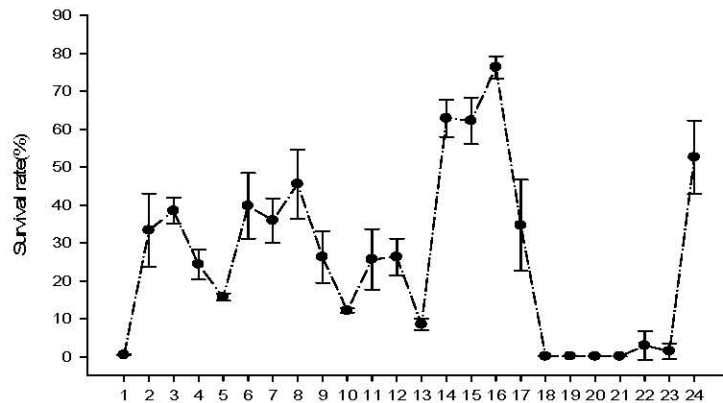
Fig. 32. Effect of cryoprotectant agents on viable cell density of *Pediococcus acidolactic* BBG-L1.

1: control, 2: casein 10%, 3: casein 20%, 4: casein 30%, 5: peptone 10%, 6: peptone 20%, 7: peptone 30%, 8: corn starch 10%, 9: corn starch 20%, 10: corn starch 30%, 11: skim milk 10%, 12: skim milk 20%, 13: skim milk 30%, 14: soluble starch 10%, 15: soluble starch 20%, 16: soluble starch 30%, 17: tryptone 10%, 18: tryptone 20%, 19: tryptone 30%, 20: yeast extract 10%, 21: yeast extract 20%, 22: yeast extract 30%.



*Pediococcus acidolactic* BBG-L1(P.A)의 동결건조보호제의 보조첨가제에 따른 P.A의 생존율 (%) 변화는 Fig. 33에서와 같이, skim milk 20% + maltose 5%(no. 16)처리구 76.28, skim milk 20% + maltose 1%(no. 15)처리구 62.18, skim milk 20% + lactose 5%(no. 14) 62.82, skim milk 20% + monosodium glutamate 5%(no. 24)처리구 52.56 순으로 나타났다.

Skim milk 20% + maltose 5%처리구(no. 16, 76.28%), 무처리구(no. 1, 0.45%), skim milk 20%(no. 2, 33.34%)와 비교하였을 때, Skim milk 20% + maltose 5%처리구의 동결건조보호효과가 높게 나타났다. 첨가제별 동결건조보호효과는 maltose 처리구가 다른 첨가물처리구보다 높았으며, 다른 처리구 중 lactose처리구와 monosodium glutamate처리구의 보호효과가 높게 나타나, 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 이와 같이 skim milk 20% + maltose 5%처리구에서 P.A의 동결건조보호효과가 다른 처리구에 비해 높게 나타나, 보조원료로 사용할 동결건조보호제는 maltose 5%로 결정하였으며, *Pediococcus acidolactic* BBG-L1의 동결건조 시, skim milk 20% + maltose 5%를 동결건조보호제로 결정하였다.



**Fig. 33.** Effect of different cryoprotectant agents on viable cell density of *Pediococcus acidolactic* BBG-L1.

1: control, 2: corn starch 20%+, 3: 2+arabinose 1%, 4: 2+arabinose 5%, 5: 2+dextrin 1%, 6: 2+dextrin 5%, 7: 2+fructose 1%, 8: 2+fructose 5%, 9: 2+galactose 1%, 10: 2+galactose 5%, 11: 2+glucose 1%, 12: 2+glucose 5%, 13: 2+lactose 1%, 14: 2+lactose 5%, 15: 2+maltose 1%, 16: 2+maltose 5%, 17: 2+mannose 1%, 18: 2+mannose 5%, 19: 2+sucrose 1%, 20: 2+sucrose 5%, 21: 2+trehalose 1%, 22: 2+trehalose 5%, 23: 2+monosodium glutamate 1%, 24: 2+monosodium glutamate 5%.

(2) *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* BBG-L30(L.P)의 동결건조 수화제를 제제화하기 위해, 주원료로 사용할 동결건조보호제 첨가에 따른 L.P의 생존율(%) 변화는 Fig. 34에서와 같이, skim milk 30%처리구(no. 13) 66.97, casein 30%처리구(no. 4) 57.58, skim milk 20%처리구(no. 12) 30.09, yeast extract 30%처리구(no. 22) 27.58 순으로 나타났으며, skim milk 30%처리구가 무처리구(no. 1) 0.001에 비해 66.97의 높은 동결건조보호효과를 나타내었다. 첨가제별 동결건조보존효과는 skim milk 처리구가 다른 첨가물처리구보다 높았으며, 다른 처리구 중 casein, yeast extract 처리구가 보호효과가 높게 나타났다. 이와 같이 skim milk 30%처리구에서 L.P의 동결건조보호효과가 다른 처리구에 비해 높게 나타나, 주원료로 사용할 동결건조보호제는 skim milk 30%로 결정하였다.

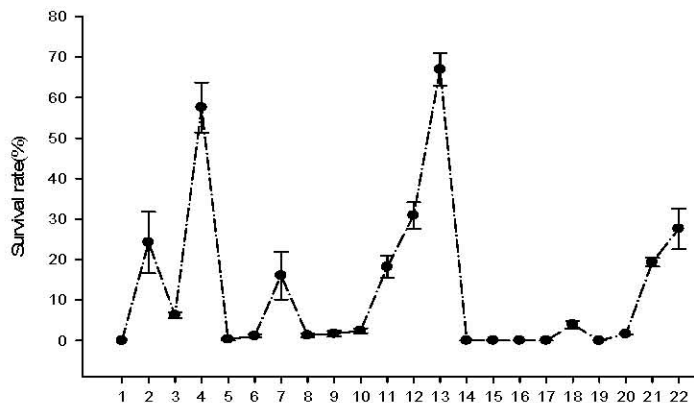


Fig. 34. Effect of cryoprotectant agents on viable cell density of *Lactobacillus plantarum* BBG-L30.

1: control, 2: casein 10%, 3: casein 20%, 4: casein 30%, 5: peptone 10%, 6: peptone 20%, 7: peptone 30%, 8: corn starch 10%, 9: corn starch 20%, 10: corn starch 30%, 11: skim milk 10%, 12: skim milk 20%, 13: skim milk 30%, 14: soluble starch 10%, 15: soluble starch 20%, 16: soluble starch 30%, 17: tryptone 10%, 18: tryptone 20%, 19: tryptone 30%, 20: yeast extract 10%, 21: yeast extract 20%, 22: yeast extract 30%.

*Lactobacillus plantarum* BBG-L30(L.P)의 동결건조보호제의 보조첨가제에 따른 L.P의 생존율(%) 변화는 Fig. 35에서와 같이, skim milk 30% + glucose 5%(no. 12)처리구 76.67, skim milk 30% + glucose 1%(no. 11)처리구 62.67 순으로 나타났다.

Skim milk 30% + glucose 5%처리구(no. 12, 76.67%), 무처리구(no. 1, 0.007%), skim milk 20%(no. 2, 18.75%)와 비교하였을 때, Skim milk 30% + glucose 5%처리구의 동결건조보호효과가 높게 나타났다. 첨가제별 동결건조보호효과는 glucose 처리구가 다른 첨가물처리구보다 높

있으며, 다른 처리구 중 maltose, mannose, galactose 처리구의 보호효과가 높게 나타나, 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 이와 같이 skim milk 30% + glucose 5% 처리구에서 L.P의 동결건조보호효과가 다른 처리구에 비해 높게 나타나, 보조원료로 사용할 동결건조보호제는 glucose 5%로 결정하였으며, *Lactobacillus plantarum* BBG-L30(L,P)의 동결건조 시, skim milk 30% + glucose 5%를 동결건조보호제로 결정하였다.

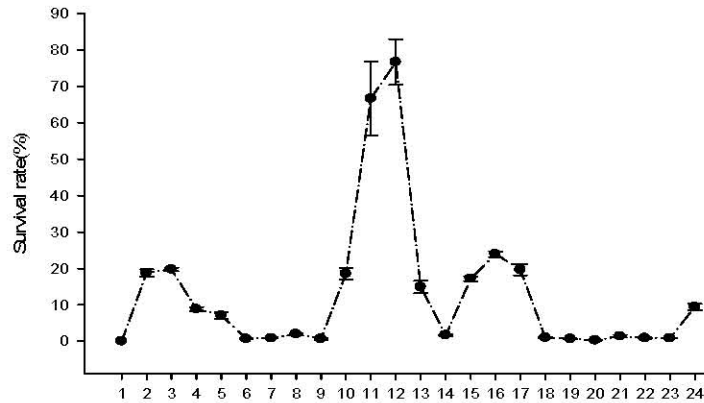


Fig. 35. Effect of different cryoprotectant agents on viable cell density of *Lactobacillus plantarum* BBG-L30.

1: control, 2: corn starch 20%+, 3: 2+arabinose 1%, 4: 2+arabinose 5%, 5: 2+dextrin 1%, 6: 2+dextrin 5%, 7: 2+fructose 1%, 8: 2+fructose 5%, 9: 2+galactose 1%, 10: 2+galactose 5%, 11: 2+glucose 1%, 12: 2+glucose 5%, 13: 2+lactose 1%, 14: 2+lactose 5%, 15: 2+maltose 1%, 16: 2+maltose 5%, 17: 2+mannose 1%, 18: 2+mannose 5%, 19: 2+sucrose 1%, 20: 2+sucrose 5%, 21: 2+trehalose 1%, 22: 2+trehalose 5%, 23: 2+monosodium glutamate 1%, 24: 2+monosodium glutamate 5%.

(3) 효모

*Sacchomyce cereviase* BBG-Y6(S.C)의 동결건조 수화제를 제제화하기 위해, 주원료로 사용할 동결건조보호제 첨가에 따른 S.C의 생존율(%) 변화는 Fig. 36에서와 같이, skim milk 30%처리구(no. 13) 78.84, yeast extract 30%처리구(no. 22) 62.18, skim milk 20%처리구(no. 12) 58.33, yeast extract 20%처리구(no. 21) 48.72 순으로 나타났으며, skim milk 20%처리구가 무처리구(no. 1) 11.84에 비해 50.34 높은 동결건조보호효과를 나타내었다. 첨가제별 동결건조보호효과는 skim milk, yeast extract 처리구가 보호효과가 높게 나타났다. 이와 같이 skim milk 30%처리구에서 S.C의 동결건조보호효과가 다른처리구에 비해 높게 나타나, 주원료로 사용할 동결건조보호제는 skim milk 30%로 결정하였다.

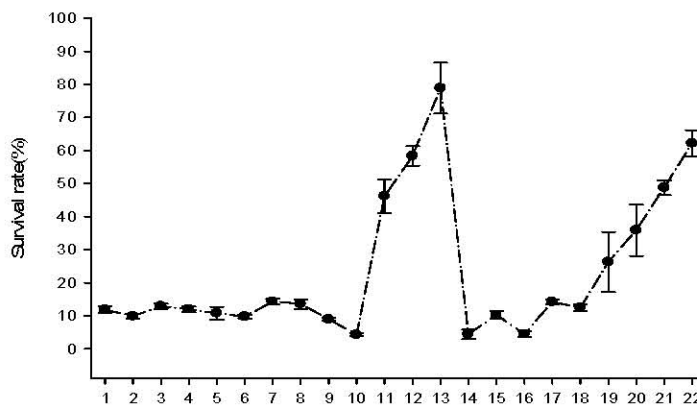
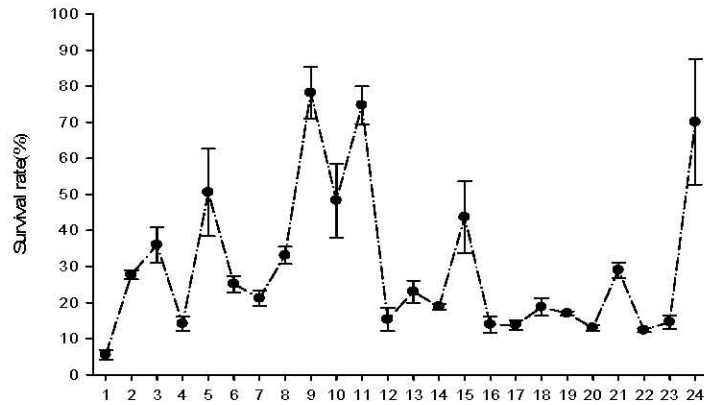


Fig. 36. Effect of cryoprotectant agents on viable cell density of *Sacchomyces cereviase* BBG-Y6.

1: control, 2: casein 10%, 3: casein 20%, 4: casein 30%, 5: peptone 10%, 6: peptone 20%, 7: peptone 30%, 8: corn starch 10%, 9: corn starch 20%, 10: corn starch 30%, 11: skim milk 10%, 12: skim milk 20%, 13: skim milk 30%, 14: soluble starch 10%, 15: soluble starch 20%, 16: soluble starch 30%, 17: tryptone 10%, 18: tryptone 20%, 19: tryptone 30%, 20: yeast extract 10%, 21: yeast extract 20%, 22: yeast extract 30%.

*Sacchomyces cereviase* BBG-Y6(S.C)의 동결건조보호제의 보조첨가제에 따른 S.C의 생존율(%) 변화는 Fig. 37에서와 같이, skim milk 30% + galactose 1%(no. 9)처리구 78.16, skim milk 30% + glucose 1%(no. 11)처리구 74.71, skim milk 30% + monosodium glutamate 5%(no. 24)처리구 70.11 순으로 나타났다.

Skim milk 30% + galactose 1%처리구(no. 9, 78.16%), 무처리구(no. 1, 5.52%), skim milk 20%(no. 2, 27.70%)와 비교하였을 때, Skim milk 30% + galactose 1%처리구의 동결건조보호효과가 높게 나타났다. 첨가제별 동결건조보호 효과는 galactose, glucose, monosodium glutamate처리구가 다른 첨가물처리구보다 높게 나타났다. 이와 같이 skim milk 30% + galactose 1%처리구에서 S.C의 동결건조보호효과가 다른 처리구에 비해 높게 나타나, 보조원료로 사용할 동결건조보호제는 galactose 1%로 결정하였으며, *Sacchomyces cereviase* BBG-Y6(S.C)의 동결건조시, skim milk 30% + galactose 1%를 동결건조보호제로 결정하였다.



**Fig. 37. Effect of different cryoprotectant agents on viable cell density of *Sacchomyces cerevisiae* BBG-Y6.**

1: control, 2: corn starch 20%+, 3: 2+arabinose 1%, 4: 2+arabinose 5%, 5: 2+dextrin 1%, 6: 2+dextrin 5%, 7: 2+fructose 1%, 8: 2+fructose 5%, 9: 2+galactose 1%, 10: 2+galactose 5%, 11: 2+glucose 1%, 12: 2+glucose 5%, 13: 2+lactose 1%, 14: 2+lactose 5%, 15: 2+maltose 1%, 16: 2+maltose 5%, 17: 2+mannose 1%, 18: 2+mannose 5%, 19: 2+sucrose 1%, 20: 2+sucrose 5%, 21: 2+trehalose 1%, 22: 2+trehalose 5%, 23: 2+monosodium glutamate 1%, 24: 2+monosodium glutamate 5%.

다. 바실러스

*Bacillus subtilis* BBG-B20(B.S)의 동결건조 수화제를 제제화하기 위해, 주원료로 사용할 동결건조보호제 첨가에 따른 B.S의 생존율(%) 변화는 Fig. 38에서와 같이, corn starch 20%처리구(no. 9) 84.13, skim milk 20%처리구(no. 12) 78.57, yeast extract 20%처리구(no. 24) 76.98, 순으로 나타났으며, corn starch 20%처리구가 무처리구(no. 1) 15.88에 비해 68.25 높은 동결건조보호효과를 나타내었다. 이와 같이 corn starch 20%처리구에서 B.S의 동결건조보호효과가 다른 처리구에 비해 높게 나타나, 주원료로 사용할 동결건조보호제는 corn starch 20%로 결정하였다.

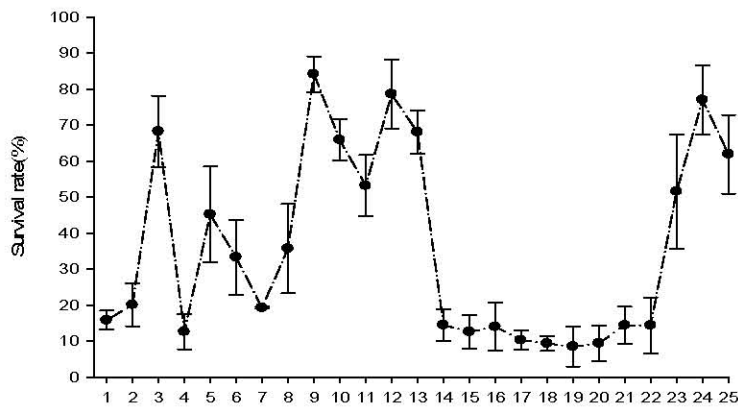
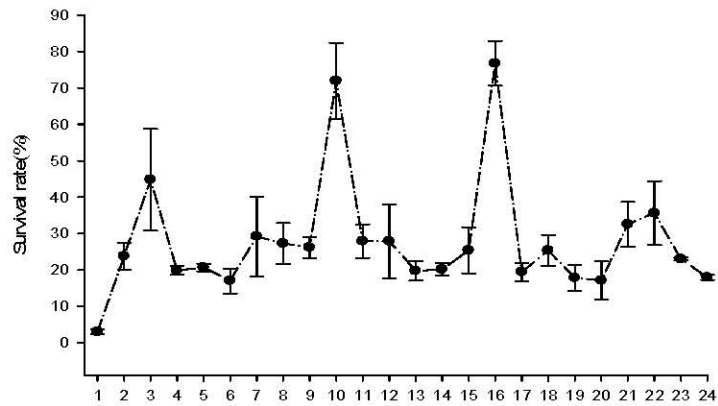


Fig. 38. Effect of cryoprotectant agents on viable cell density of *Bacillus subtilis* BBG-B20.

1: control, 2: casein 10%, 3: casein 20%, 4: casein 30%, 5: peptone 10%, 6: peptone 20%, 7: peptone 30%, 8: corn starch 10%, 9: corn starch 20%, 10: corn starch 30%, 11: skim milk 10%, 12: skim milk 20%, 13: skim milk 30%, 14: soluble starch 10%, 15: soluble starch 20%, 16: soluble starch 30%, 17: soybean flour 10%, 18: soybean flour 20%, 19: soybean flour 30%, 20: tryptone 10%, 21: tryptone 20%, 22: tryptone 30%, 23: yeast extract 10%, 24: yeast extract 20%, 25: yeast extract 30%.

*Bacillus subtilis* BBG-B20(B.S)의 동결건조보호제의 보조첨가제에 따른 B.S의 생존율(%) 변화는 Fig. 39에서와 같이, corn starch 20% + maltose 5%(no. 16)처리구 76.74, skim milk 20% + galactose 5%(no. 10)처리구 71.95 순으로 나타났다.

Skim milk 20% + maltose 5%처리구(no. 16, 76.74%), 무처리구(no. 1, 3.02%), skim milk 20%(no. 2, 23.80%)와 비교하였을 때, Skim milk 20% + maltose 5%처리구의 동결건조보호효과가 높게 나타났다. 첨가제별 동결건조보호효과는 maltose, galactose 처리구가 다른 첨가물처리구보다 높게 나타났다. 이와 같이 skim milk 20% + maltose 5%처리구에서 B.S의 동결건조보호효과가 다른처리구에 비해 높게 나타나, 보조원료로 사용할 동결건조보호제는 maltose 5%로 결정하였으며, *Bacillus subtilis* BBG-B20(B.S)의 동결건조시, skim milk 20% + maltose 5%를 동결건조보호제로 결정하였다.



**Fig. 39. Effect of different cryoprotectant agents on viable cell density of *Bacillus subtilis* BBG-B20.**

1: control, 2: corn starch 20%(+), 3: 2+arabinose 1%, 4: 2+arabinose 5%, 5: 2+dextrin 1%, 6: 2+dextrin 5%, 7: 2+fructose 1%, 8: 2+fructose 5%, 9: 2+galactose 1%, 10: 2+galactose 5%, 11: 2+glucose 1%, 12: 2+glucose 5%, 13: 2+lactose 1%, 14: 2+lactose 5%, 15: 2+maltose 1%, 16: 2+maltose 5%, 17: 2+mannose 1%, 18: 2+mannose 5%, 19: 2+sucrose 1%, 20: 2+sucrose 5%, 21: 2+trehalose 1%, 22: 2+trehalose 5%, 23: 2+monosodium glutamate 1%, 24: 2+monosodium glutamate 5%.



## 제 3 절. 복합발효 효소제 개발

### 1. 후보균주선발

#### 가. 후보균주 선발

##### (1) Amylase 활성 배지 조성

2.0% soluble starch 첨가한 Luria Bertani Broth(LB Broth)agar 배지를 조제하였으며, 35℃에서 24시간 동안 배양한 후에, Gram's iodine을 균체를 배양한 녹말 한천 평판상에 한방울씩, 떨어뜨려 균체 주위에 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

##### (2) Protease 활성 배지 조성

0.5% skim milk 첨가한 Nutrient agar배지를 조제하였으며, 35℃에서 24시간 동안 배양한 후에 균체 주위에 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

##### (3) Cellulase 활성 배지 조성

0.5% carboxymethyl cellulose를 함유한 Nutrient Broth agar에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 배양된 균들의 replica plate를 만들고 24시간 동안 배양한 후에, 0.2%(w/v) Congo red 용액으로 염색하였으며 1M NaCl로 세척한 후에 나타나는 노란색 투명환(halo)이 큰 균주들을 선발하였다.

##### (4) Xylanase 활성 배지 조성

0.5% oat spelt xylan(sigma)를 함유한 Nutrient Broth agar에 접종하고 37℃에서 24시간 동안 배양한 후에, 0.2%(w/v) Congo red 용액으로 염색하였으며 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

##### (5) Mannanase 활성 배지 조성

0.5% locust bean gum (sigma)를 함유한 Nutrient Broth agar에 접종하고 37℃에서 24시간 동안 배양한 후에, 0.2%(w/v) Congo red 용액으로 염색하였으며 투명환(Clear zone)이 큰 균주들을 선발하였다.

발효 복합효소제를 개발하기 위해, 기 분리된 바실러스 균주 40종, 유산균 40종, 효모 10종, 곰팡이(*Aspergillus* 속, *Rhizopus* 속 등) 30종의 균주를 후보선발 균주로 이용하였다. 이 후보 선발균주로 이용하여 amylase 분비 효율이 높은 균주를 *Bacillus* 속 *acillus subtilis* BBG-B20, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, *Aspergillus* 속 *Aspergillus oryzae* BBG-A10, *Aspergillus niger* BBG-A152을 선발하였으며, protease, cellulase, xylanase, mannanase의 효소분비 효과를 관찰하였다(Table 1).

**Table 6. Enzymatic activities of isolated microbials.**

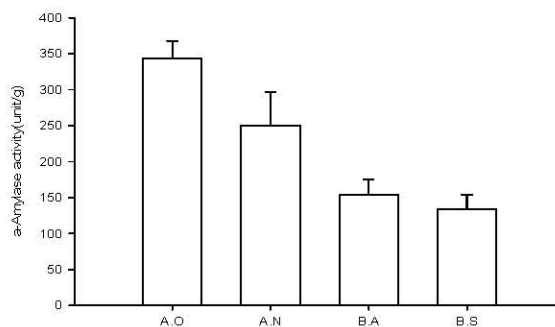
BBG NO	amylase (mm)	protease (mm)	cellulase (mm)	xylanase (mm)	mannanase (mm)
B5	16	14	10	10	10
B20	11	13	20	20	20
A10	14	8	9	8	8
A15	12	0	0	0	0

**나. a-Amylase 분비 균주 선발**

후보균주로 선발된 *Bacillus subtilis* BBG-B20, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, *Aspergillus oryzae* BBG-A10, *Aspergillus niger* BBG-A15를 LB broth와 PDB broth에 접종하여 35℃에 24hr 전 배양하여  $1.0 \times 10^7$  cfu/ml의 농도가 되도록 희석하여, 소맥피 100g에 5%씩 접종하였다. 오픈해농은 비닐팩에 수분을 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다.

Amylase 활성은 0.1M sodium acetate buffer 완충용액(pH4.8)에 1.0% soluble starch를 녹인 후 0.5 mL를 기질로 이용하였고 미생물의 배양 상층액 0.5 mL를 효소액으로 첨가하여 37℃에서 30분 반응시켰다. 이 때 생성된 환원당의 함량은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)방법(20)으로 540nm에서 측정하였으며, 본 연구에서 효소 활성의 1 unit은 1 분에 1  $\mu$ mol의 glucose를 생산하는 효소량으로 정의하였다.

그 결과, *Aspergillus oryzae* BBG-A10는 349unit/g, *Aspergillus niger* BBG-A15는 297unit/g, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5는 174unit/g, *Bacillus subtilis* BBG-B20는 156unit/g으로 나타나, 최종적으로 메주에서 분리한 *Aspergillus oryzae* BBG-A10으로 결정하였다(Fig. 40).



**Fig. 40. Effect of different microbials enzyme production.**

A.O: *Aspergillus oryzae* BBG-A10, A.N: *Aspergillus niger* BBG-A15, B.A: *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5, B.S: *Bacillus subtilis* BBG-B20.

## 2. 발효원료 최적조성

### 가. 발효원료의 선택

발효원료 선택을 위하여 옥분, 소맥피, 대두박, 미강 100g에 *Aspergillus oryzae* BBG-A10를 전 배양( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)하여, 5%씩 접종하였으며, 오픈해농은 비닐팩에 수분을 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다.

그 결과, 옥분은 174unit/g, 소맥피는 174unit/g, 대두박은 174unit/g, 미강은 174unit/g로 나타났으며, 소맥피가 174unit/g로 가장 높게 나타나, 발효 주원료로 소맥피를 결정하였다 (Fig. 41).

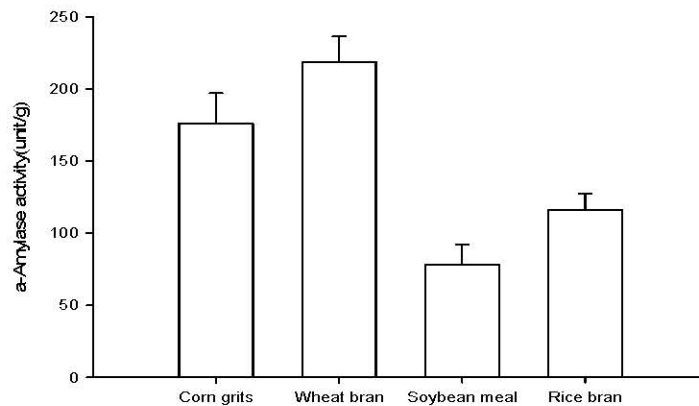


Fig. 41. Effect of different materials enzyme production.

### 나. 발효원료의 최적 조성

발효 주원료로 선택된 소맥피와 두 번째로 높게 나온 옥분을 혼합하여, 효소분비에 적합한 비율을 찾고자 소맥피 100%, 소맥피 70%, 소맥피 50%, 소맥피 20%, 소맥피 0%로 시험하였다. 혼합 발효원료 100g에 *Aspergillus oryzae* BBG-A10를 전 배양( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)하여, 5%씩 접종하였으며, 오픈해농은 비닐팩에 수분을 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다(Table 7).

Table 7. Mixing ration of raw materials.

No	Wheat bran (%)	Corn grits (%)
1	100	0
2	70	30
3	50	50
4	20	80
5	0	100

그 결과, 소맥피 100% 처리구는 183unit/g, 소맥피 70% 처리구는 222unit/g, 소맥피 50% 처리구는 163unit/g, 소맥피 20% 처리구는 138unit/g, 소맥피 0% 103unit/g으로 나타났다. 옥분의 함량이 50%이상 함유되는 처리구에서는 a-amylase 활성이 감소되는 것으로 나타났으며, 소맥피 100% 처리구보다, 소맥피 70% 처리구의 a-amylase 활성이 더 높게 나타나 최종적인 발효원료로 소맥피 70%, 옥분 30%로 결정하였다(Fig. 42).

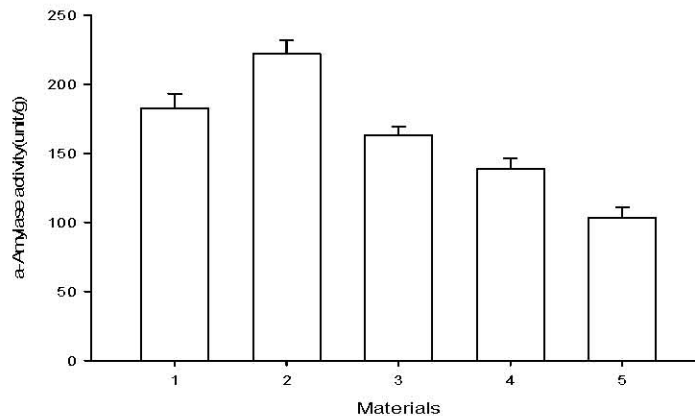


Fig. 42. Effect of different mixed materials enzyme production.

Show table 6.

### 3. 발효 최적조건

#### 가. 상대습도에 따른 효소활성특성

효소분비에 적합한 상대습도를 찾고자 0, 10, 50, 90%로 시험하였다. 혼합 발효원료 100g에 *Aspergillus oryzae* BBG-A10를 전 배양( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)하여, 5%씩 접종하였으며, 오픈해놓은 비닐팩에 수분을 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다.

그 결과, 상대습도 0% 처리구는 90unit/g, 10% 처리구는 92unit/g, 50% 처리구는 162unit/g, 90% 처리구는 214unit/g으로 나타났다. 상대습도 함량이 0, 10, 50% 처리구에서는 a-amylase 활성이 감소되는 것으로 나타났으며, 이는 상대습도가 낮은 처리구에서는 plant growth chamber가 온도를 맞추기 위해 열풍이 chamber안으로 들어오는데, 열풍으로 인해 빠른 건조가 일어나 발효가 제대로 되지 않은 것으로 판단된다. 이와 같이 90% 처리구의 a-amylase 활성이 다른 처리구보다 높게 나타나 최종적인 상대습도는 90%로 결정하였다(Fig. 43).

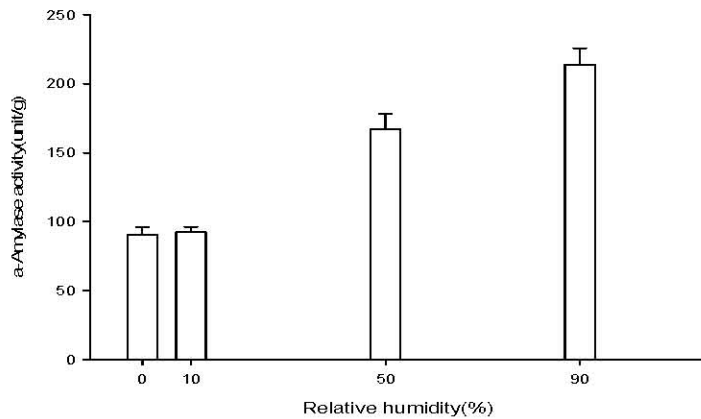


Fig. 43. Effect of relative humidity on enzyme production.

### 나. 원료 높이에 따른 효소활성특성

효소분비에 적합한 배양 발효높이를 찾고자 2.5, 5, 10, 15cm로 트레이(15×20cm) 용기에 시험하였다. 혼합 발효원료에 *Aspergillus oryzae* BBG-A10를 전 배양( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)하여, 5%씩 접종하였으며, 수분을 40%로 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 3일간 발효하여 α-amylase 분석하였다.

그 결과, 2.5cm 처리구는 223unit/g, 5cm 처리구는 193unit/g, 10cm 처리구는 199unit/g, 15cm 처리구는 136unit/g로 나타났다. 원료의 높이가 가장 낮은 2.5cm 처리구가 효소활성이 가장 높았으며, 5, 10cm 처리구는 큰 차이가 나지 않았으나, 발효높이가 15cm 처리구에서는 효소활성이 가장 떨어지는 것으로 나타나, 대량발효 시 발효높이를 15cm 미만으로 하여야 할 것으로 판단된다. 효소활성이 가장 높게 나온 처리구는 2.5cm이나, 대량발효 시 2.5cm로 대량 발효하기에는 생산성 및 인건비 등의 조건들이 적합하지 않아, 최종적으로 발효높이를 10cm로 결정하였다(Fig. 44).

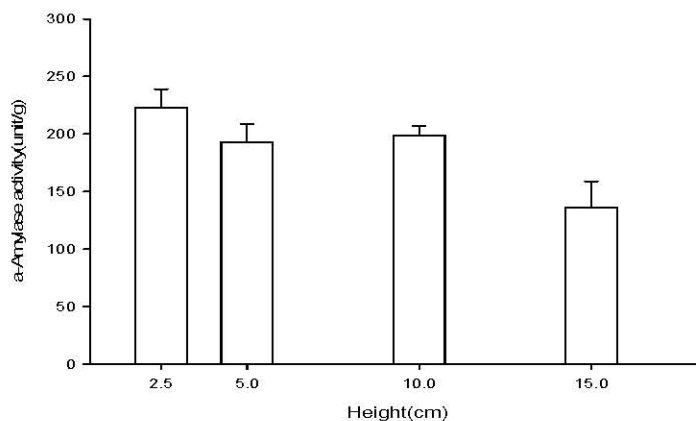


Fig. 44. Effect of different height on enzyme production.

#### 다. 온도에 따른 효소활성특성

효소분비에 적합한 발효 온도를 찾기 위해 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃ 시험하였다. 혼합 발효원료에 *Aspergillus oryzae* BBG-A10를 전 배양( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)하여, 5%씩 접종하였으며, 수분을 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm), 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다.

그 결과, 20℃ 처리구는 62.3unit/g, 25℃ 처리구는 129.3unit/g, 30℃ 처리구는 171.3unit/g, 35℃ 처리구는 171.7unit/g, 40℃ 처리구는 48.3unit/g, 45℃ 처리구는 11.6unit/g, 50℃ 처리구는 11.6unit/g로 나타났다. 발효온도가 40℃ 이상에서는 오히려 낮은 온도인 20, 25℃ 낮게 나타났는데, 이는 고온에서는 *Aspergillus oryzae* BBG-A10의 증식이 잘 되지 않은 것으로 보이며, 20, 25℃에서는 증식속도가 30, 35℃ 처리구보다 느려 효소활성이 차이가 나타는 것으로 판단된다. 효소활성이 가장 높게 나온 처리구는 30, 35℃로 나타나, 대량발효 시 30-35℃ 유지하는 것이 적절한 것으로 판단되며, 최종적으로 초기 온도는 30℃ 처리구로 결정하였다(Fig. 45).

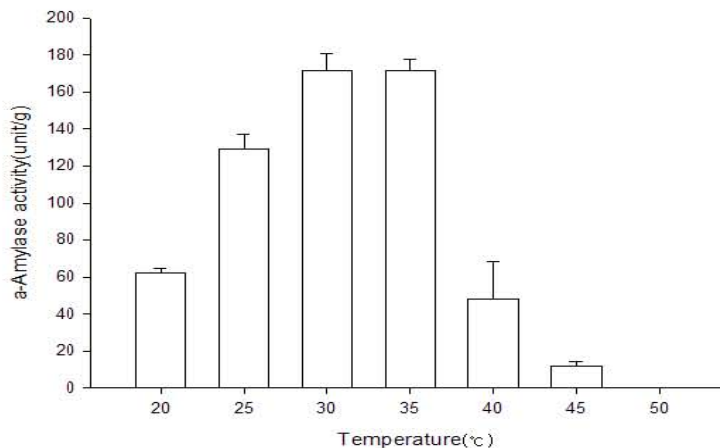


Fig. 45. Effect of different temperature on enzyme production.

#### 라. 발효미생물 접종량에 따른 효소활성특성

효소분비에 적합한 균주 접종량을 찾기 위해, 혼합 발효원료에 *Aspergillus oryzae* BBG-A10를 전 배양( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)하여, 1, 5, 15, 25, 50 %씩 접종하였으며, 수분을 최종적으로 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm), 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다.

그 결과, 1% 처리구는 167.7unit/g, 5% 처리구는 202.7unit/g, 15% 처리구는 316.7unit/g, 25% 처리구는 276.7unit/g, 50% 처리구는 253.0unit/g로 나타났다. 1-15% 처리구는 접종량의 증가에 따라 비례적으로 효소활성이 증가하였으나, 25-50% 접종량은 15% 접종 처리구보다 낮게 나타나, *Aspergillus oryzae* BBG-A10의 접종량은 최종적으로 15%로 결정하였다(Fig. 46).

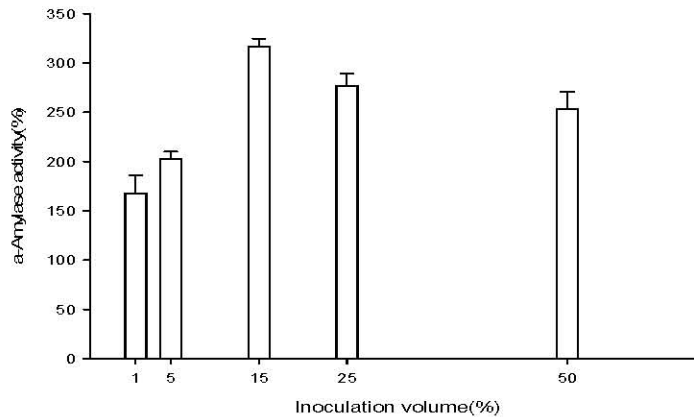


Fig. 46. Effect of inoculation volume on enzyme production.

#### 마. Coculture에 따른 효소활성특성

발효효소제의 효소활성의 효능증가를 위해, *Aspergillus oryzae* BBG-A10외에 *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5(LB, 35°C, 24hr), *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6(PDB broth, 30°C, 24hr), *Pediococcus dextrincus* BBG-L45(MRS broth, 37°C, 24hr)를 전 배양 ( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)하여 사용하였으며, *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%를 기본적으로 접종하여 Table 8과 같은 조성으로 시험하였다. 수분을 최종적으로 40% 조정하여 plant growth chamber에 30°C, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm)에 3일간 발효하여 a-amylase 분석하였다.

Table 8. Mixing ration of microbials.

No	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pediococcus dextrincus</i>
	BBG-B5	BBG-Y6 (%)	BBG-L45
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0	1	0
4	0	0	1
5	1	1	1
6	1	1	0
7	1	0	1
8	0	1	1



그 결과, 1(무처리)의 처리구는 236unit/g, 2의 처리구는 244unit/g, 3의 처리구는 241unit/g, 5의 처리구는 246unit/g, 6의 처리구는 245unit/g, 7의 처리구는 244unit/g, 8의 처리구는 239unit/g로 나타났다. 1의 무처리구에 비해 1% 혼합 발효한 처리구의  $\alpha$ -amylase 효소활성이 저해되지 않는 것으로 나타나, 최종적으로 *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%에, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5 1%, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6 1%, *Pediococcus dextrincus* BBG-L45 1% 씩 첨가하여 혼합 발효 시키는 방법을 결정하였다(Fig. 47).

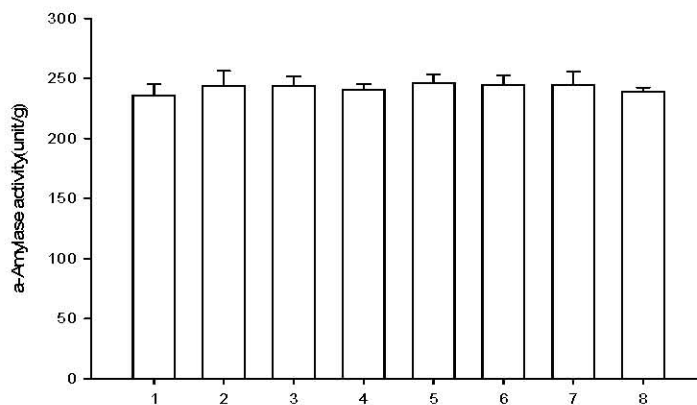


Fig. 47. Effect of microbial coculture on enzyme production.

#### 바. 탄소원 첨가에 따른 효소활성특성

탄소원의 첨가에 따른  $\alpha$ -amylase 효소활성의 변화를 보기 위해, 산업적으로 이용이 가능한 원료 중, corn starch, glucose, molasses, sucrose를 각 2% 첨가하여 시험하였다. 혼합 발효 원료에 전 배양( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)한 *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5 1%, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6 1%, *Pediococcus dextrincus* BBG-L45 1% 씩 접종하였다. 수분을 최종적으로 40% 조정하여 plant growth chamber에 30℃, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm), 3일 발효한 발효물을  $\alpha$ -amylase 분석하였다.

그 결과, 무처리구 발효물은 303.7unit/g, corn starch 처리구 발효물은 302.3unit/g, glucose 처리구 발효물은 292.7unit/g, molasses 처리구 발효물은 269.0unit/g, sucrose처리구 발효물은 277.7unit/g로 나타났다. 모든 탄소원 2% 첨가는 무처리구에 비해 증가하지 않았으며, 오히려 당밀(molasses) 처리구는 효소활성이 떨어지는 경향이 나타나, 탄소원 2% 첨가 최종적으로 탄소원은 첨가하지 않는 것으로 결정하였다(Fig. 48).

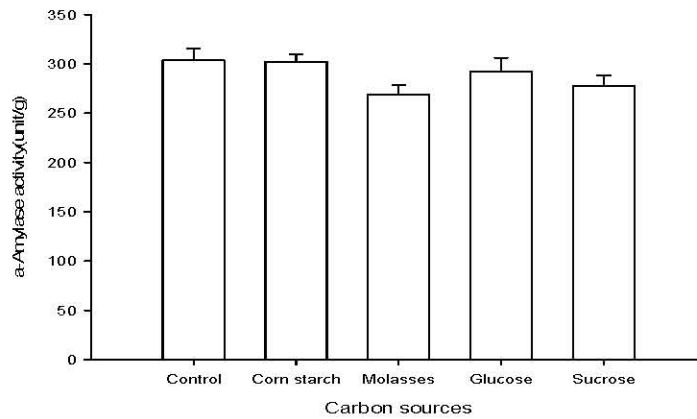


Fig. 48. Effect of carbon sources on enzyme production.

#### 사. 질소원 첨가에 따른 효소활성특성

탄소원의 첨가에 따른  $\alpha$ -amylase 효소활성의 변화를 보기 위해, 산업적으로 이용이 가능한 원료 중, peptone, yeast extract, malt extract, beef extract를 각 2% 첨가하여 시험하였다. 혼합 발효원료에 전 배양( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)한 *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5 1%, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6 1%, *Pediococcus dextrincus* BBG-L45 1% 씩 접종하였다. 수분을 최종적으로 40% 조정하여 plant growth chamber에 30°C, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm), 3일 발효한 발효물을  $\alpha$ -amylase 분석하였다.

그 결과, 무처리구 발효물은 345.3unit/g, peptone 처리구 발효물은 346.0unit/g, yeast extract 처리구 발효물은 344.7unit/g, malt extract 처리구 발효물은 342.3unit/g, beef extract 처리구 발효물은 313.7unit/g로 나타났다. 모든 질소원 2% 첨가는 무처리구에 비해 증가하지 않았으며, 오히려 beef extract 처리구는 효소활성이 떨어지는 경향이 나타나, 최종적으로 질소원은 첨가하지 않는 것으로 결정하였다(Fig. 49).

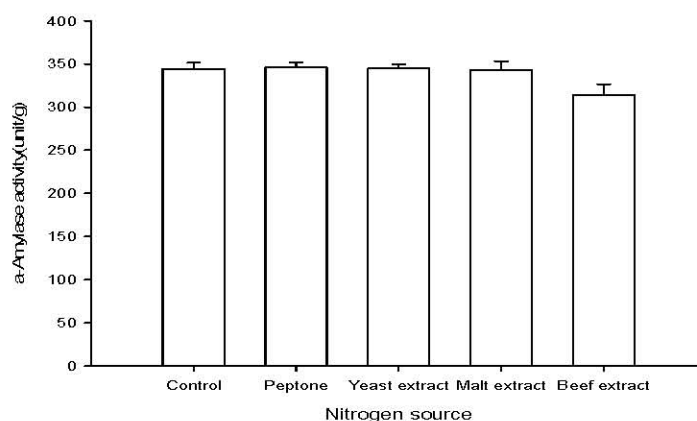


Fig. 49. Effect of nitrogen sources on enzyme production.

### 아. 원료증자에 의한 효소활성특성

원료 증자에 따른  $\alpha$ -amylase 효소활성의 변화를 보기 위해, 고압멸균기에 용기에 담은 원료를 오픈하여 121°C, 1hr 증자하였다. 증자한 원료와 증자하지 않은 원료에 전 배양 ( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)한 *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5 1%, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6 1%, *Pediococcus dextrincus* BBG-L45 1% 씩 접종하였다. 수분을 최종적으로 40% 조정하여 plant growth chamber에 30°C, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm), 3일 발효한 발효물을  $\alpha$ -amylase 분석하였다.

그 결과, 증자하지 않은 발효물은 346.0unit/g, 증자한 발효물은 332.3unit/g로 나타났다. 증자하지 않은 처리구가 증자한 처리구보다 약간 높게 나타나, 최종적으로 증자하지 않는 방법으로 결정하였다(Fig. 50).

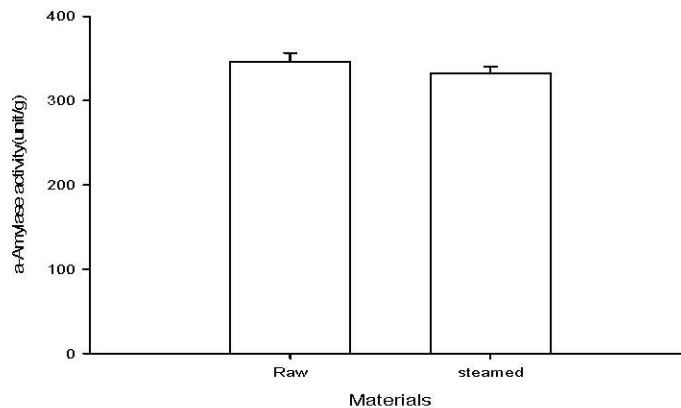


Fig. 50. Effect of materials by steamed on enzyme production.

### 자. 발효일에 따른 효소활성특성

효소분비에 적합한 발효시간을 찾기 위해, 혼합 발효원료에 전 배양 ( $1.0 \times 10^7$ cfu/ml)한 *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5 1%, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6 1%, *Pediococcus dextrincus* BBG-L45 1% 씩 접종하였다. 수분을 최종적으로 40% 조정하여 plant growth chamber에 30°C, 습도 90%, 발효높이 10cm(tray, 15×20cm), 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168hrs의 발효한 발효물을  $\alpha$ -amylase 분석하였다.

그 결과, 24hrs 발효물은 107.3unit/g, 48hrs 발효물은 195.3unit/g, 72hrs 발효물은 414.3unit/g, 96hrs 발효물은 416.7unit/g, 120hrs 발효물은 414.3unit/g, 144hrs 발효물은 334.6unit/g, 168hrs 발효물은 282.6unit/g로 나타났다. 24-72hrs의 발효물은 발효시간의 증가에 따라 비례적으로 효소활성이 증가하였으며, 72-120hr의 발효물은 발효시간이 증가하여도  $\alpha$ -amylase 효소활성에는 큰 영향을 미치지 않았다. 144-168hr 발효물은 발효시간이 증가함에 효소활성이 감소하여, 발효시간을 최종적으로 72hrs로 결정하였다(Fig. 51).

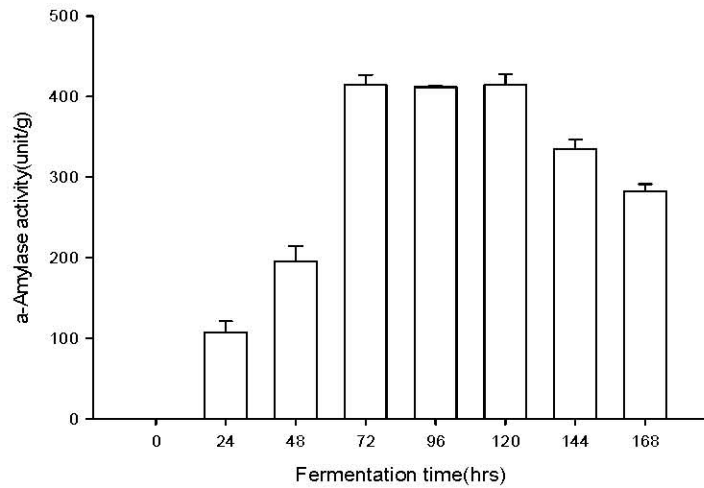


Fig. 51. Effect of different fermentation time on enzyme production.

### 차. 건조온도에 따른 효소활성특성

발효가 끝난 발효물을 건조시키기 위해, 발효물 100g을 5℃, 40℃, 45℃에서, 1, 2, 3일간 건조하는 과정에 효소활성 변화를 관찰하였다.  $\alpha$ -amylase 활성을 분석하였으며, control을 100%로 하여 residual activity(%)를 계산하였다.

Fig. 52에서와 같이 35℃(●) 처리구는 100→100%, 40℃(○) 처리구는 100→96.7%, 55℃(▼) 처리구는 100→71.0%, 60℃(△) 처리구는 100→83%, 65℃(■) 처리구는 100→39%로 나타났다. 35℃ 처리구는 건조기간 동안 효소활성이 떨어지지 않았으며, 40℃ 처리구는 건조시간 동안 17% 떨어졌다. 45℃ 처리구는 건조기간 동안 급격하게 떨어져, 제품 건조 시, 건조온도가 45℃ 이상의 온도가 되면 효소활성은 급격하게 감소되는 것으로 판단되어, 건조 온도는 효소활성 변화가 없는 35℃로 결정하였다.

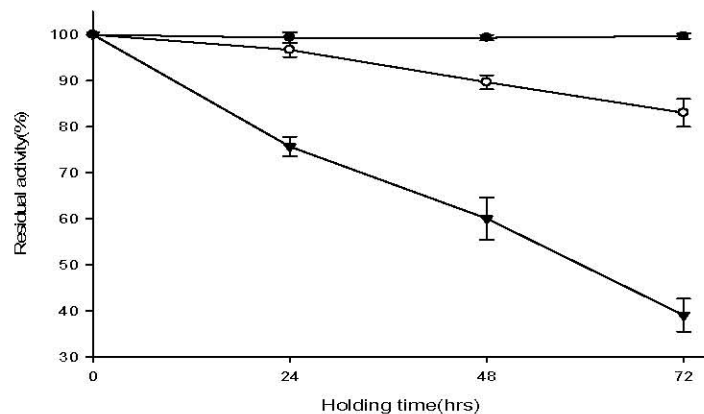


Fig. 52. Effect of different drying temperature on enzyme production.

●: 35℃, ○: 40℃, ▼: 45℃.

#### 4. 발효효소제 pH, 온도안정성조사

##### 가. pH 안정성

발효효소제의 pH에 대한 안전성 조사를 검사하기 위해, 발효물 10g에 증류수 90ml을 가한 후 pH 4, 5, 6, 7, 8를 맞추어, 실온에서 4시간 동안 방치한 후, a-amylase 활성을 분석하였으며, control을 100%로 하여 residual activity(%)를 계산하였다.

그 결과, pH 4 처리구는 16.7%, pH 5 처리구는 92.7%, pH 6 처리구는 91.6%, pH 7 처리구는 93.3, pH 8 처리구는 88.7%로 나타났다. Fig. 13에서와 같이 pH 4 처리구에서는 효소활성이 급격하게 떨어지나, pH 5-7처리구에는 안정적인 것으로 나타났다.

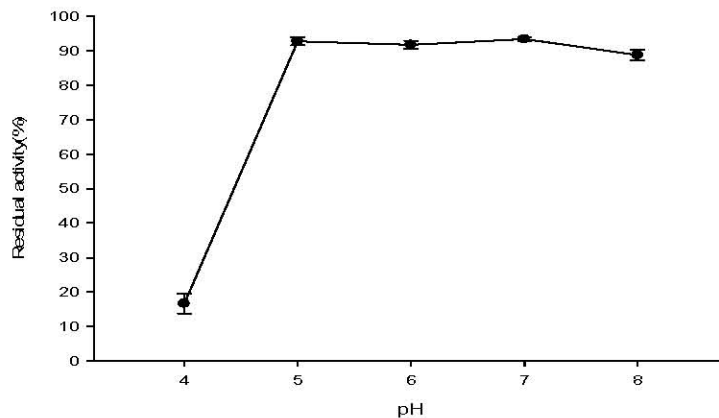
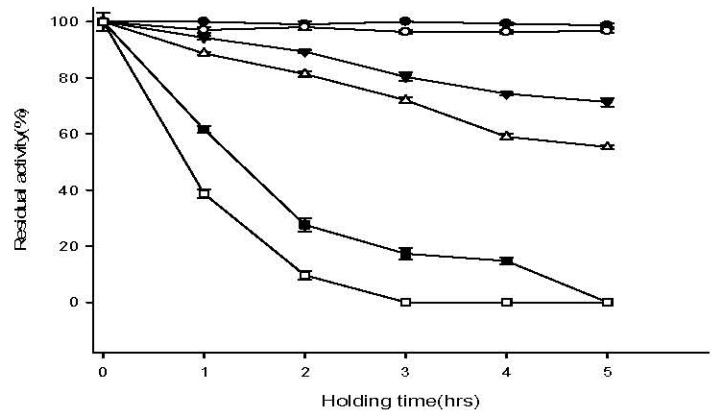


Fig. 53. The effect of pH on stability of fermentation products.

##### 나. 온도 안정성

발효효소제의 온도에 대한 안전성 조사를 검사하기 위해, 발효물 100g을 온도 45, 50, 55, 60, 65, 70℃를 맞추어, 1, 2, 3, 4, 5시간 동안 방치한 후, a-amylase 활성을 분석하였으며, control을 100%로 하여 residual activity(%)를 계산하였다.

Fig. 54에서와 같이 45℃(●) 처리구는 100→98.7%, 50℃(○) 처리구는 100→96.7%, 55℃(▼) 처리구는 100→71.0%, 60℃(△) 처리구는 100→55.3%, 65℃(■) 처리구는 100→0%, 70℃(□) 처리구는 100→0%로 나타났다. 45℃ 처리구는 5시간 동안 효소활성이 거의 떨어지지 않았으며, 50℃ 처리구는 5시간 동안 3.3% 떨어졌다. 55℃이상 처리구에서 온도가 올라갈수록 비례적으로 효소활성이 떨어지는 것으로 나타났으며, 65℃ 이상 처리구에서 급격하게 떨어져, 제품보관 이나, 이송 시에 주의해야 할 것으로 판단된다.



**Fig. 54. The effect of temperature on stability of fermentation products.**

●: 45°C, ○: 50°C, ▼: 55°C, △: 60°C, ■: 65°C, □: 70°C.

## 5. Scale-up(500kg)의 발효 건조효소제의 특성

### 가. Scale-up에 따른 발효 및 건조 특성

Scale-up을 위하여, 혼합 발효원료 500kg에 전 배양( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)한 *Aspergillus oryzae* BBG-A10 15%, *Bacillus amyloliquefaciens* BBG-B5 1%, *Saccharomyces cerevisiae* BBG-Y6 1%, *Pediococcus dextrincus* BBG-L45 1% 씩 접종하였다. 수분을 최종적으로 40% 조정하여, 발효실(room) 벽면에 설치된 가습기를 이용해 습도 90%, 30℃, 발효높이 10cm(tray, 30×50cm) 조건으로 발효 하였다. 발효 시간(1, 2, 3, 4, 5일)과, 35℃에서 3일간 열풍건조(drying)한 발효물의  $\alpha$ -amylase 분석하였다.

시제품 생산 및 대량발효를 위하여 발효물 500kg의 Scale-up 실험을 진행하였다. *In vitro* 실험에서 최적조건으로 나온 요건에 맞추어 진행하였으며, 그 결과, 24hrs 발효물은 168.3(*invitro* 실험결과, 107.3)unit/g, 48hrs 발효물은 391.7(*invitro* 실험결과, 195.3)unit/g, 72hrs 발효물은 573.3(*invitro* 실험결과, 414.3)unit/g, 96hrs 발효물은 574.7(*invitro* 실험결과, 416.7)unit/g, 120hrs 발효물은 574.7(*invitro* 실험결과, 414.3)unit/g, 건조물(drying)은 573.4(*invitro* 실험결과, 416.7)unit/g로 나타났다.

Scale-up 발효물이, *invitro* 실험결과보다  $\alpha$ -amylase 활성이 높게 나타났으며, 발효물의 건조 과정 후의 효소활성은 떨어지지 않아, 제품생산이 원활 할 것으로 판단된다.

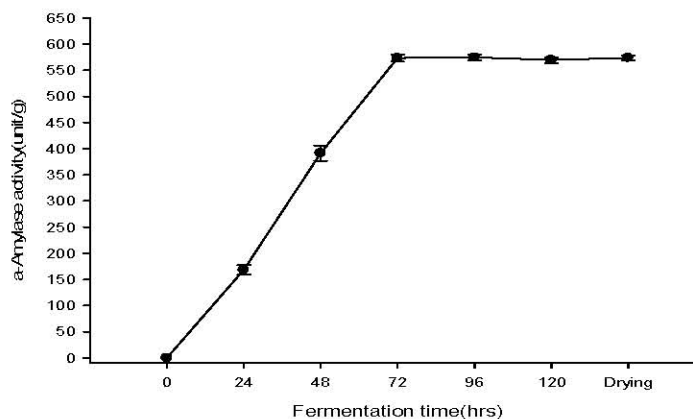


Fig. 55. Effect of scale-up on enzyme production.



## 나. 발효건조효소제의 제품특성

Scale-up한 발효 건조효소제의  $\alpha$ -amylase, protease, cellulase, mannanase, xylanase의 효소활성을 분석하였으며, yeast, lactic acid bacteria 속, bacillus 속의 생균수를 측정하여 제품특성을 파악하고자 하였다.

### (1) Protease 분석방법

Protease함량을 조사하기 위하여 1시간 방치한 시료 액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 0.2  $\mu$ m microfilter를 거쳐 나온 상정액을 조효소액으로 사용하였다. pH 7.0으로 조절한 1.0% casein용액 3 ml를 37°C에서 예열하여 효소 액 1 ml를 첨가한 후 30°C에서 10분간 반응시킨다. 반응시킨 액에 0.4 M TCA용액 5 ml를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 시료 액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 0.2  $\mu$ m microfilter를 거쳐 여과시켰다. 여액 2 ml에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml와 folin시약 1 ml를 넣고 다시 37°C에서 30분간 발색 시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 L-tyrosine을 사용하여 당의 양과 흡광도사이의 표준곡선을 작성한 후 그 곡선에 따라 시료중의 protease량을 lunit을 기질 1 ml 당 생성된 tyrosine의  $\mu$ g 양으로 계산하였다

### (2) Cellulase 분석방법

Na-carboxymethyl cellulase (Na-CMCase)의 활성도는 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다 (Miler 등, 1960). 즉, 증류수에 녹인 1.0% CMC 60  $\mu$ l, 20 mM citrate-NaOH bufer (pH 4.5) 250  $\mu$ l와 조효소액 10  $\mu$ l, 증류수 50  $\mu$ l를 혼합하고 45°C에서 1시간 반응시킨 후에 Na-carboxymethyl cellulose(Na-CMC)으로부터 유리된 glucose 함량을 DNS 환원당 정량법으로 550nm에서 측정하였다(Miler 등, 1960). 효소의 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 Na-CMC로부터 1  $\mu$ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### (3) Xylanase 분석방법

Xylanase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 oat spelt xylan으로부터 유리된 xylose 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활성측정을 위한 표준 반응용액은 조효소액 500  $\mu$ L와 1% oat spelt xylan용액 500  $\mu$ L를 완전 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후, DNS 용액 1 mL를 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 담귀 증탕시키면서 5분간 발색시킨 후 증류수 10 mL를 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 조효소액 500  $\mu$ L와 증류수 500  $\mu$ L를 혼합하여 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit (IU)는 1분간 1  $\mu$ mol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

**(4) Mannanase 분석방법**

Mannanase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 Locust bean gum(sigma)으로부터 유리된 mannose 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활성 측정을 위한 표준 반응용액은 조효소액 500  $\mu$ L와 1% locust bean gum용액 500  $\mu$ L를 완전 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, DNS 용액 1 mL을 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 담귀 증탕시키면서 5분간 발색시킨 후 증류수 10 mL를 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 조효소액 500  $\mu$ L와 증류수 500  $\mu$ L를 혼합하여 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit (IU)는 1분간 1  $\mu$ mol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Table 9와 같이 a-amylase 573.4 unit/g, protease 146.3 unit/g, cellulase 153.6 unit/g, xylanase 122.7 unit/g, mannanase 58.0 unit/g의 효소활성이 나타났으며, a-amylase 이외에도 protease, cellulase, xylanase, mannanase가 분비되어 비전분다당류 (nonstarch polysaccharides) 소화흡수나, protease 소화흡수에 도움을 주는 복합효소의 특징을 가지고 있다. 또한 Table 10과 같이 바실러스 Log 6.14CFU/g, 효모 Log 6.25CFU/g, 유산균 Log 7.23CFU/g로 나타나, 시중에 판매되어 지는 생균제(바실러스 Log 6.00 cfu/g, 효모 Log 6.00 cfu/g, 유산균 Log 6.00 cfu/g)의 균체농도와 비슷하게 나타났으며, 복합효소 효과 이외에도 생균제로서의 효과도 기대할 수 있어, 가축에 급여 시 좋을 것으로 판단된다.

**Table 9. Enzymatic activity of products.**

	amylase	protease	cellulase	xylanase	mannanase
unit/g	573.4 $\pm$ 4.0	146.3 $\pm$ 2.9	153.7 $\pm$ 5.1	122.7 $\pm$ 2.5	58.0 $\pm$ 2.0

**Table 10. Viable cell density of products.**

	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Yeast</i> sp.	Lactic acid bacteria
log CFU/g	6.14 $\pm$ 0.05	6.25 $\pm$ 0.03	7.23 $\pm$ 0.09

## 6. 발효건조 효소제의 산란계 사양 시험

### 가. 시험방법

#### (1) 시험동물 및 시험설계

사료 내 발효건조사료 첨가가 산란계의 사양성적에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 25주령 된 Isa brown 산란계 320수를 5처리, 4반복, 반복 당 16수 씩 배치하여 8주간 사양실험을 실시하였다. 기초사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료(Con: basal diet)를 사용하였다. 산란계 생산에 적합한 시험 첨가사료 제품을 찾기 위하여, 이 실험이 시행되어서, 기초사료에 발효건조 효소제를 0.5%씩 첨가한 A사의 A시험구, B사의 B시험구, C사의 C시험구, **발효건조 효소제를 첨가한 D시험구로 하였다.**

#### (2) 시험사료 및 사양관리

시험사료는 옥수수-대두박 위주의 사료로서 2,904kcal ME/Kg, 15.45% CP, 0.70% lysine, 3.25% Ca, 0.61% P를 함유하도록 하였다(Table 11). 시험사료는 가루 형태로 산란율과 체중을 고려하여 일정한 양을 급여하였으며, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 먹을 수 있도록 하였다. 총 점등 시간은 17시간이 되도록 조절하였다.

**Table 11. Ingredients and chemical composition of the diets.**

Ingredient	(%)
Yellow corn	50.4
Soybean meal	18.7
Wheat grain	10.0
Corn gluten meal	2.00
Wheat bran	5.00
Animal fat	4.40
Limestone	7.50
Tricalcium phosphate, 18%	1.40
Salt	0.30
DL-Methionine, 50%	0.10
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	0.10
Mmineral mixture <sup>2)</sup>	0.10
Chmical composition <sup>3)</sup>	
ME(kcal/g)	2,904
Crude protein(%)	15.00
Lysine(%)	0.80
Methionine(%)	0.32
Calcium(%)	3.25
Phosphorus(%)	0.61

<sup>1)</sup>Provide per g of deit: vitamin A, 12,500IU; vitamin D<sub>3</sub>, 2,500IU, vitamin E, 10.0mg; vitamin K<sub>3</sub>, 2.0mg; vitaminB<sub>1</sub>, 1.0mg; vitaminB<sub>2</sub>, 5.0mg; vitaminB<sub>6</sub>, 1.0mg; vitaminB<sub>12</sub>, 15.0mg; folic acid, 500mg; niacin, 35,000mg; Ca-pantothenate, 10,000mg and biotin 50mg.

<sup>2)</sup> Provide per g of deit: Mn, 80mg; Zn, 60mg; I, 1.5mg; Cu, 25.0mg; Fe, 40mg; CO, 1.5mg, and SE, 0.15mg. <sup>3)</sup> Calculated values.

## 나. 생산성

총 8주의 시험기간 동안 계란을 일 단위로 수집하여 대조구와 처리구별 산란율을 조사하였으며, 사료 섭취량은 4주 단위로 사료잔량을 측정하여 다음 사료급여량을 공제함으로써 산출하였다. 일산란량은 산란율과 평균 난중을 곱하여 계산하였으며, 사료섭취량을 산란량으로 나누어 사료요구율을 도출하였다.

### (1) 1-4주간의 생산성

25-28주령(1-4주)의 사육기간 동안 사료섭취량(g)은 C처리구가 115.18로 가장 낮게 나온 B처리구 108.74보다 6.44g 더 많이 섭취하여, 가장 높은 섭취율을 나타내었으나, 사료요구율과 비교하여 볼때, C처리구 사료요구율은 2.018로, 가장 효율적으로 나온 D처리구간(1.937)보다 효율적이지 못하였다. 이와 같이 사료요구율은 D처리구간이 가장 효율적으로 나타났으며, 모든 처리구가 무처리구보다 효율적으로 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 사료 절감 효과가 있었다.

산란율(%)은 A처리구가 96.55(D처리구, 95.82)로, 가장 낮게 나온 무처리구보다 2.56 높게 나왔으며, 모든 처리구가 무처리구보다 산란율이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 산란율의 증가효과가 있었다.

난중(g)은 D처리구가 61.37로, 가장 낮게 나온 B처리구보다 2.65 높게 나왔으며, B 처리구를 제외한 모든 처리구에서, 무처리구보다 난중이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난중의 증가효과가 있었다.

일산란량은 D처리구가 58.94로, 가장 낮게 나온 무처리구보다 4.86 높게 나왔으며, 모든 처리구가 무처리구보다 일산란량이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 일산란량의 증가효과가 있었다.

이와 같이 D처리구의 발효건조 효소제 첨가 시에 26-30주령 된 산란계의 생산성에 산란율 증가, 사료절감 효과, 난중증가, 일산란양 증가 효과가 나타났다. (Table 12).

### (2) 5-8주간의 생산성

29-32주령(5-8주)의 사육기간 동안 사료섭취량(g)은 A처리구가 110.24로 가장 낮게 나온 B처리구 107.48보다 2.76g 더 많이 섭취하여, 가장 높은 섭취율을 나타내었으나, 사료요구율과 비교하여 볼때, A처리구 사료요구율은 1.977로, 가장 효율적으로 나온 D처리구간(1.934)보다 효율적이지 못하였다. 이와 같이 사료요구율은 D처리구간이 가장 효율적으로 나타났으며, B처리구를 제외한 모든 처리구가 무처리구보다 효율적으로 나타나, D처리구의 발효건조 효소제

첨가에 의한 사료절감 효과가 있었다.

산란율(%)은 A처리구가 93.80(D처리구, 93.78)로, 가장 낮게 나온 B처리구보다 3.04 높게 나왔으며, B처리구를 제외한 모든 처리구가 무처리구보다 산란율이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 산란율의 증가효과가 있었다.

난중(g)은 B처리구가 60.56(D처리구, 60.44)으로, 가장 낮게 나온 C처리구보다 0.25 높게 나왔으며, A, C 처리구를 제외한, B, D처리구에서, 무처리구보다 난중이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난중의 증가효과가 있었다.

일산란량은 A처리구가 55.89(D처리구, 55.84)로, 가장 낮게 나온 B처리구보다 3.93 높게 나왔으며, B, C 처리구를 제외한 A, D 처리구가 무처리구보다 일산란량이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 일산란량의 증가효과가 있었다.

이와 같이 D처리구의 발효건조 효소제 첨가 시에 29-32주령 된 산란계의 생산성에 산란율 증가, 사료절감 효과, 난중증가, 일산란양 증가 효과가 나타났다. (Table 12).

### (3) 1-8주간의 생산성

25-32주령(1-8주)의 사육기간 동안 사료섭취량(g)은 A처리구가 118.16로 가장 낮게 나온 B 처리구 108.16보다 10.06g 더 많이 섭취하여, 가장 높은 섭취율을 나타내었으나, 사료요구율과 비교하여 볼때, A처리구 사료요구율은 1.954로, 가장 효율적으로 나온 D처리구간(1.892)보다 효율적이지 못하였다. 이와 같이 사료요구율은 D처리구간이 가장 효율적으로 나타났으며, 모든 처리구가 무처리구보다 효율적으로 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 사료절감 효과가 있었다.

산란율(%)은 A, B처리구가 95.08(D처리구, 94.82)로, 가장 낮게 나온 무처리구보다 2.32 높게 나왔으며, 모든 처리구가 무처리구보다 산란율이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 산란율의 증가효과가 있었다.

난중(g)은 D처리구가 61.18로, 가장 낮게 나온 B처리구보다 2.09 높게 나왔으며, B 처리구를 제외한, A, C, D처리구에서 무처리구보다 난중이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난중의 증가효과가 있었다.

일산란량은 D처리구가 57.91로 가장 낮게 나온 무처리구보다 3.71 높게 나왔으며, 모든 처리구가 무처리구보다 일산란량이 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 일산란량의 증가효과가 있었다.

이와 같이 D처리구의 발효건조 효소제 첨가 시에 25-32주령 된 산란계의 생산성에 산란을 증가, 사료절감 효과, 난중증가, 일산란양 증가 효과가 나타났으며, 제품으로 판매되고 있는 A, B, C 사의 제품들보다, D처리구의 발효건조 효소제가 산란계의 생산성에 큰효과를 나타내는 것으로 나타났다. (Table 12).

**Table 12. Effect of different fermentaion enzyme products on performance of laying hen.**

1-4 Weeks					
Treatment	Feed intake(g)	Egg production(%)	Egg weight(g)	Egg mass	FCR <sup>1)</sup>
Control	110.23	93.99	59.28 <sup>b</sup>	54.08 <sup>c</sup>	2.090
A	113.44	96.55	59.73 <sup>b</sup>	57.96 <sup>ab</sup>	1.969
B	108.74	95.69	58.72 <sup>b</sup>	55.82 <sup>bc</sup>	2.068
C	115.18	96.31	59.73 <sup>b</sup>	58.0 <sup>ab</sup>	2.018
D	111.22	95.82	61.37 <sup>a</sup>	58.94 <sup>a</sup>	1.937
P-value	0.20	0.40	0.01	0.01	0.40

4-8 Weeks					
Treatment	Feed intake(g)	Egg production(%)	Egg weight(g)	Egg mass	FCR <sup>1)</sup>
Control	108.03	91.48	60.31	54.44	1.986
A	110.24	93.55	59.85	55.89	1.977
B	107.48	90.76	60.56	51.96	2.080
C	107.84	93.80	59.39	54.35	1.987
D	107.83	93.78	60.44	55.84	1.934
P-value	0.84	0.41	0.82	0.33	0.43

1-8 Weeks					
Treatment	Feed intake(g)	Egg production(%)	Egg weight(g)	Egg mass	FCR <sup>1)</sup>
Control	109.13	92.76	59.51 <sup>a</sup>	54.20 <sup>c</sup>	2.015
A	118.16	95.08	59.87 <sup>b</sup>	57.27 <sup>b</sup>	1.954
B	108.10	93.27	59.09 <sup>b</sup>	54.23 <sup>bc</sup>	1.985
C	111.60	95.08	59.66 <sup>b</sup>	56.83 <sup>ab</sup>	1.964
D	109.57	94.82	61.18 <sup>b</sup>	57.91 <sup>a</sup>	1.892
P-value	0.37	0.35	0.01	0.01	0.21

<sup>1)</sup> Feed conversion ratio

## 다. 난품질

계란의 품질 측정을 위하여 총 8주의 사양기간 중 4, 8주에 처리구별로 30개의 계란을 임의로 선발, 이용하여 각각의 난품질을 측정하였다. 난각강도는 난각강도측정기(QC-SPA, TSS, UK)를 사용하였으며, 난각두께는 FHK(Fujihara Co, LTD., Japan)를 이용하여 측정하였으며, 난색도, 난백고, 호우유닛(신선도)과 난황색도는 난품질 측정기(QCM+, TSS, UK)를 이용하여 측정하였다.

### (1) 1-4주간의 난품질

25-28주령(1-4주)의 사육기간 동안 난각색은 D처리구가 24.99로, 무처리구보다 0.82 높았으며, A, C 처리구를 제외한 B, D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난각색의 증가효과가 있었다.

난백고(mm)는 D처리구가 8.99로, 무처리구보다 0.21 높았으며, C 처리구를 제외한 A, B, D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난백고의 증가효과가 있었다.

호우유닛은 A처리구(D처리구 93.71)가 93.83로, 무처리구보다 0.99 높았으며, C 처리구를 제외한 A, B, D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 호우유닛의 증가효과가 있었다.

난황색은 C처리구가 6.36(D처리구 6.24)로, 무처리구보다 0.05 높았으며, B, D를 제외한 A, C처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난황색의 증가효과가 나타나지 않았다.

난각강도(kg/cm<sup>2</sup>)는 B처리구가(D처리구 4.33) 4.73으로 무처리구보다 0.40 높았으며, D처리구를 제외한, A, B, C처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난각강도 증가효과가 나타나지 않았다.

난각두께(cm)는 A처리구가(D처리구 0.33) 0.35으로 무처리구보다 0.01 높았으며, B, C, D처리구를 제외한 A처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난각두께 증가효과가 나타나지 않았다.

이와 같이 D처리구의 발효건조 효소제 첨가 시에 26-30주령 된 산란계의 난품질에 난각색의 증가효과, 난백고의 증가효과, 호우유닛 증가효과가 나타났다(Table 13).



## (2) 5-8주간의 난품질

29-32주령(4-8주)의 사육기간 동안 낙각색은 D처리구가 25.70로, 무처리구보다 0.57 높았으며, A처리구를 제외한 B, C, D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 낙각색의 증가효과가 있었다.

난백고(mm)는 D처리구가 8.78로, 무처리구보다 0.39 높았으며, A, D 처리구를 제외한 B, C처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난백고의 증가효과가 나타나지 않았다.

호우유닛은 B처리구(D처리구 89.45)가 91.62로, 무처리구보다 0.74 높았으며, A, C, D 처리구를 제외한 B처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 호우유닛의 증가효과가 나타나지 않았다.

난황색은 D처리구 5.57로, 무처리구보다 0.07 높았으며, A, B, C를 제외한 D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난황색의 증가효과가 있었다.

낙각강도(kg/cm<sup>2</sup>)는 D처리구 4.83으로 무처리구보다 0.04 높았으며, A, B, C처리구를 제외한 D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 낙각강도 증가효과가 있었다.

낙각두께(cm)는 D처리구 0.30으로 무처리구보다 0.04 높았으며, 모든 처리구가 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 낙각두께 증가효과가 있었다.

이와 같이 D처리구의 발효건조 효소제 첨가 시에 29-32주령 된 산란계의 난품질은 25-28주령 것의 낙각색, 난백고, 호우유닛 증가효과와 달리, 낙각색의, 난황색, 낙각강도, 낙각두께 증가효과를 나타내었다(Table 13).

## (3) 1-8주간의 난품질

25-32주령(1-8주)의 사육기간 동안 낙각색은 D처리구가 25.14로, 무처리구보다 0.74 높았으며, A, B처리구를 제외한 C, D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 낙각색의 증가효과가 있었다.

난백고(mm)는 D처리구가 8.81로, 무처리구보다 0.12 높았으며, C 처리구를 제외한 B, C,

D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난백고의 증가 효과가 있었다.

호우유닛은 A, B처리구(D처리구 92.82)가 92.99로, 무처리구보다 0.60높았으며, C 처리구를 제외한 A, B, D처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 호우유닛의 증가효과가 있었다.

난황색은 C처리구 6.15(D처리구 6.10)로, 무처리구보다 0.02 높았으며, A, D를 제외한 B, C 처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난황색의 증가 효과가 나타나지 않았다.

난각강도(kg/cm<sup>2</sup>)는 B처리구 4.73(D처리구 4.68)으로 무처리구보다 0.30 높았으며, 모든 처리구는 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난각강도 증가 효과가 있었다.

난각두께(cm)는 모든 처리구가 0.33으로 무처리구보다 0.01 높았으며, 모든 처리구가 무처리구보다 높게 나타나, D처리구의 발효건조 효소제 첨가에 의한 난각두께 증가효과가 있었다.

이와 같이 D처리구의 발효건조 효소제 첨가 시에 25-32주령된 산란계의 난품질은 무처리구에 비해, 낙각색, 난백고, 호우유닛, 난각강도, 난각두께 증가효과를 나타내어, 산란계의 생산성뿐만 아니라 난품질 강화에도 증가효과를 나타내었다(Table 13).

**Table 13. Effect of two different fermentaion enzyme products on egg quality of laying hen.**

1-4 Weeks						
Treatment	Egg shell color	Albumin height (mm)	Haugh unit	Yolk color	Egg shell breaking strenth (kg/cm <sup>2</sup> )	Egg shell thickness (cm)
Control	24.17	8.78	92.84	6.31	4.33	0.34
A	23.98	8.93	93.83	6.32	4.48	0.35
B	24.06	8.80	93.34	6.15	4.73	0.34
C	24.36	8.66	92.44	6.36	4.55	0.34
D	24.99	8.99	93.71	6.24	4.33	0.33
P-value	0.38	0.34	0.59	0.14	0.09	0.20

1-8 Weeks						
Treatment	Egg shell color	Albumin height (mm)	Haugh unit	Yolk color	Egg shell breaking strenth (kg/cm <sup>2</sup> )	Egg shell thickness (cm)
Control	24.40	8.69	92.39	6.13	4.43	0.32
A	24.18	8.78	92.99	6.14	4.53	0.33
B	24.31	8.74	92.99	5.97	4.73	0.33
C	24.56	8.49	91.48	6.15	4.50	0.33
D	25.14	8.81	92.82	6.10	4.68	0.33
P-value	0.34	0.28	0.39	0.31	0.12	0.42

4-8 Weeks						
Treatment	Egg shell color	Albumin height (mm)	Haugh unit	Yolk color	Egg shell breaking strenth (kg/cm <sup>2</sup> )	Egg shell thickness (cm)
Control	25.23	8.39	90.88	5.50	4.79	0.26 <sup>c</sup>
A	24.93	8.17	89.73	5.43	4.74	0.27 <sup>c</sup>
B	25.30	8.52	91.62	5.27	4.71	0.29 <sup>b</sup>
C	25.37	8.78	87.71	5.33	4.30	0.29 <sup>b</sup>
D	25.70	8.12	89.45	5.57	4.83	0.30 <sup>a</sup>
P-value	0.97	0.29	0.33	0.72	0.17	0.01

## 7. 발효건조 효소제 육계 사양 시험

### 가. 육계생산성

사료 내 발효건조사료 첨가가 육계의 사양성적에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 1일령 Cobb 병아리 320수를 5처리, 4반복, 반복 당 16수 씩 배치하여 5주간 사양실험을 실시하였다. 시험사료는 NRC 사양표준(1994)에 근거하여 단백질과 에너지 함량을 동일하게 배합하였으며, 육계전기(0-3주)와 육계후기(4-5주) 사료로 나누어 사용하였다. 시험 전기간 동안 사료 급이 기 및 급수기의 개수는 반복구별 동일하게 배치하였으며, 사료와 물은 자유 채식 및 자유 음수 시켰다(Table 14).

육계 생산에 적합한 시험 첨가사료를 찾기 위하여, 이 실험이 시행되어서, 시험사료에 발효건조 효소제를 0.5%씩 첨가한 A사의 A시험구, B사의 B시험구, C사의 C시험구, 발효건조 효소제를 첨가한 D시험구, 무처리구로 진행하였으며, 시험개시일의 시험구별(0-3, 3-5, 0-5) 평균 체중과 체중 및 사료섭취량을 측정하여 증체량과 사료요구율을 구하였다.

**Table 14. Ingredients and chemical composition of the diets.**

Ingredient(%)	Starter	Finisher
Yellow corn	53.29	61.65
Soybean meal	33.91	27.88
Corn gluten meal	4.01	4.00
Soybean oil	4.73	3.06
Limestone	2.60	2.88
Tricalcium phosphate	2.00	1.31
Salt	0.25	0.25
DL-Methionine	0.27	0.07
Lysin-HCl	0.01	0.05
Vitamin-mineral mixture <sup>1)</sup>	0.50	0.50
Total	100.0	100.0
<b>Chemical value<sup>2)</sup></b>		
Me, kcal/kg	3,100	3,100
Crude Protein, %	22.0	20.0
Methionine, %	0.50	0.38
Lysine, %	1.10	1.00
Ca, %	1.00	1.00
Available P, %	0.45	0.35

<sup>1)</sup> Vitamin-mineral mixture provide the follown nutrients per g of deit: vitamin A, 15,000IU; vitamin D<sub>3</sub>, 1,500IU, vitamin E, 20.0IU, vitamin K<sub>3</sub>, 0.70mg; vitaminB<sub>12</sub>, 0.02mg; niacin, 22.5mg; thiamin, 5.0mg; folic acid, 0.70mg; pyridoxin, 1.3mg; riboflavin, 5mg pantothenic acid, 25mg; choline chloride, 175mg; Mn, 60mg; Zn, 45mg; I, 1.25mg; Cu, 10.0mg;

<sup>2)</sup> Caculated values.

### (1) 초기(0-3주간)의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율

초기 0-3주간의 시험구별 체중은 D처리구 894.73g, A처리구 876.01g, C처리구 875.68g, B처리구 875.20g, 무처리구 843.77g 순으로 나타나, D처리구간(발효건조 효소제)이 가장 높게 나타났다.

초기 증체량은 D처리구인 851.78g, A처리구 833.17g, C처리구 832.80g, B처리구 832.31g, 무처리구 800.83g 순으로 나타나, D처리구간(발효건조 효소제)이 가장 높게 나타났다.

초기 사료섭취량은 D처리구 1233.72g, A처리구 1215.05g, C처리구 1214.57g, B처리구 1120.70g, 무처리구 1176.47g 순으로 나타나, D처리구간이 가장 높게 나타났다.

이와 같이 초기 증체량, 사료섭취량, 사료요구율은 D처리구간(복합발효효소제)이 가장 좋게 나타났으며, 모든 처리구가 대조구 보다 좋게 나타나, 발효사료 첨가 시에, 육계의 초기 생산성에 영향을 미치는 것으로 판단된다(Table 15).

### (2) 후기(4-5주간)의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율.

후기 4-5주간의 시험구별 체중은 D처리구 2026.69g, C처리구 2008.49g, B처리구 2006.20g, A처리구 2001.71g, 무처리구 1921.71g 순으로 나타나, D처리구간이 가장 높게 나타났다.

후기 증체량은 C처리구 1132.81g, D처리구 1131.96g, B처리구 1131.01g, A처리구 1125.69, 무처리구 1077.94g 순으로 나타나, C처리구간이 가장 높게 나타났다.

후기 사료섭취량은 A처리구 1967.43g, B처리구 1959.11g, D처리구 1941.66g, C처리구 1991.47g, 무처리구 1913.72g 순으로 나타나, A처리구간이 가장 높게 나타났다.

후기 사료요구율은 D처리구 1.706, A처리구 1.745, C처리구 1.754, B처리구 1.762, 무처리구 1.775 순으로 나타나 D처리구간이 가장 좋게 나타났다. 이와같이 후기 4-5주간의 사육기간 동안 D시험구가 체중이 가장 높았고, C시험구가 증체량이 높았으며, A 시험구가 사료섭취량이 좋았다. 모든 시험구에서 체중, 증체량, 사료섭취량이 대조구보다 좋은 결과를 나타내었고, 사료요구율은 역시 모든 시험구에서 대조구보다 개선된 효과를 볼수 있었고, 특히 D시험구에서 가장 낮은 사료 요구율을 나타내었다. 이와 같이 육계의 발효사료 첨가 시에, 육계의 후기 생산성에 영향을 미치는 것으로 판단된다(Table 15).

**Table 15. Effects of fermentation enzyme products on the growth performance in Broiler Chicks.**

Weeks	<b>0-3</b>					P-value
Treatment	Control	A	B	C	D	
Body weight(g/bird)	843.77	876.01	875.02	875.68	894.73	0.51
Body weight gain(g/bird)	800.83	833.17	832.31	832.80	851.78	0.51
Feed intake(g/bird)	1176.47	1215.05	1120.70	1214.57	1233.72	0.67
Feed conversion rate(feed/gain)	1.470	1.458	1.455	1.459	1.448	0.73
Weeks	<b>4-5</b>					P-value
Treatment	Control	A	B	C	D	
Body weight(g/bird)	1921.17	2001.71	2006.20	2008.49	2026.69	0.93
Body weight gain(g/bird)	1077.94	1125.69	1131.01	1132.81	1131.96	0.99
Feed intake(g/bird)	1913.72	1967.43	1959.11	1991.47	1941.66	1.00
Feed conversion rate(feed/gain)	1.775	1.745	1.762	1.754	1.706	0.98
Weeks	<b>0-5</b>					P-value
Treatment	Control	A	B	C	D	
Body weight(g/bird)	1921.71	2001.71	2006.20	2008.49	2026.69	0.93
Body weight gain(g/bird)	1878.77	1958.86	1963.31	1965.61	1983.74	0.93
Feed intake(g/bird)	3090.19	3182.48	3169.48	3026.04	3175.58	0.99
Feed conversion rate(feed/gain)	1.642	1.622	1.617	1.632	1.6000	0.96

### (3) 육계(0-5주간)의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율.

육계 0-5주간의 시험구별 체중은 D처리구 2026.69g, C처리구 2008.49g, B처리구 2006.20g, A처리구 2001.71g, 무처리구 1921.71g 순으로 나타나, D처리구간이 가장 높게 나타났다.

전 기간의 증체량은 D처리구 1983.74g, C처리구 1965.61g, B처리구 1963.31g, A처리구 1958.86, 무처리구 1878.77g 순으로 나타나, D처리구간이 가장 높게 나타났다.

전 기간의 사료섭취량은 A처리구 3182.48g, D처리구 3175.38g, B처리구 3169.81g, C처리구 3026.04g, 무처리구 3090.19g 순으로 나타나, A처리구간이 가장 높게 나타났다.

전 기간의 사료요구율은 D처리구 1.600, B처리구 1.617, A처리구 1.622, C처리구 1.632, 무처리구 1.642 순으로 나타나, D처리구간이 가장 좋게 나타났다.

5주간 전체의 체중, 증체량, 사료요구율 측면에서 D시험구(발효건조 효소제)가 육계 생산성 향상에 가장 좋게 나타났으며, 모든 시험구가 대조구보다 좋은 결과를 나타내어, 발효사료 첨가제 급여 시, 육계의 생산성을 높이는 것으로 나타났다. 이와 같이 육계의 발효사료 첨가 시에, 육계의 생산성에 영향을 미치는 것으로 판단된다(Table 15).

#### 나. 장내 미생물 검사

시험 종료일에 처리구별 5수를 임의로 선정하여 회장 길이 5cm내의 미생물을 채취하여 총균(total bacterial count:TBC)과 E.coli를 37℃에서 24시간 배양하였고, Lactic acid bacteria는 37℃에서 48시간 배양한 후, 숫자를 확인하고 log로 환산하여 계산하였다.

사양시험 종료 후 회장의 하단부분인 회장과 맹장의 접합부로부터 상단부분인 Meckel's diverticulum쪽으로 5cm 절제하여 회수한 장내 총 미생물 (TBC)은 B처리구 log 2.33CFU/g, D처리구 log 2.03CFU/g, 무처리구 log 1.67CFU/g, A처리구 log 1.63CFU/g, C처리구 log 1.58CFU/g 순으로 나타나, B처리구간이 근소하게 높게 나타났다.

E.coli는 D처리구 log 1.83CFU/g, B처리구 log 1.77CFU/g, A처리구 log 1.72CFU/g, C처리구 log 1.21CFU/g, 무처리구 log 0.26CFU/g 순으로 나타나, D처리구간이 근소하게 높게 나타났으며, 무처리구간이 제일 낮게 나타났다.



Lactic acid bacteria은 A처리구 log 2.10CFU/g, B처리구 log 2.10CFU/g, D처리구 log 2.07CFU/g, 무처리구 log 1.72CFU/g, C처리구 log 1.63CFU/g 순으로 나타나, C처리구간이 가장 낮게 나타났다. A,B,C 처리구 비슷한 수준의 농도를 나타내었으며, 근소하게 무처리구보다 높게 나타났다(Tabel 16).

Table 16. Effects of fermentation enzyme products on the cecal microflora in broiler chicks.

	Control	A	B	C	D	P-value
TBC (Log CFU/g)	1.67 <sup>b</sup>	1.63 <sup>b</sup>	2.33 <sup>a</sup>	1.58 <sup>b</sup>	2.03 <sup>ab</sup>	0.01
E.coli (Log CFU/g)	0.26 <sup>b</sup>	1.72 <sup>ab</sup>	1.77 <sup>ab</sup>	1.21 <sup>b</sup>	1.83 <sup>a</sup>	0.02
Lactic acid bacteria (Log CFU/g)	1.72 <sup>c</sup>	2.10 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>	1.63 <sup>b</sup>	2.07 <sup>a</sup>	0.01

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly(P<0.05)

#### 다. 소장의 무게와 두께

소장의 상단부분은 선위와 근위 사이의 험부로 하고 하단부분은 회장과 맹장의 접합부를 소장으로 하여 내용물을 제거하고 중량을 측정하였으며, 육계의 체중을 소장의 중량으로 나누어 g으로 표시하였고, 소장의 두께는 회장의 하단부인 회장과 맹장의 접합부에서 5cm를 채취하여 두께를 측정하여 mm로 표시하였다.

##### (1) 소장의 무게

체중과 소장무게의 비율은 무처리구 16.90, A처리구 16.71, B처리구 17.83, C처리구16.42, D처리구 15.67로, B>대조구>A>C>D 순서로 낮아졌다. 체중과 소장무게의 비율이 생산성영향을 미치는지 조사하였으며, 체중이 가장 많이 나가는 D, C 처리구만 체중과 소장무게 비율이 감소하였으나, 다른 처리구에서 비례적으로 나타나지 않아, 연관성이 없는 것으로 판단된다 (Table 17).

**Table 17. Effects of fermentation enzyme products on relative body weight and small intestine weight in broiler chicks(g).**

	Control	A	B	C	D	P-value
Body weight/small intestine weight	16.90	16.71	17.83	16.42	15.67	0.43

**(2) 회장의 두께**

회장의 두께는 B시험구 0.22, 대조구 0.21, A시험구 0.20, C시험구 0.20, D시험구 0.19로 나타나, B시험구의 두께가 가장 크게 나타났다. 체중과 소장무게의 비율의 값과 비교하였을 때, 체중과 소장무게 비율의 값이 클 경우 회장의 두께가 두꺼운 경향을 나타내었고, 체중과 소장무게 비율의 값이 작을 경우 회장의 두께가 얇은 경향을 나타내었다(Table 18).

**Table 18. Effects of fermentation enzyme products on small intestine in broiler chicks(g).**

	Control	A	B	C	D	P-value
small intestine thickness	0.21	0.20	0.22	0.20	0.19	0.73

이와 같이 육계를 이용한 5주간 전체의 체중, 증체량, 사료요구율, 장내미생물, 소장의 무게와 두께에 대해 조사하였으며, 그 결과 판매상품으로 만들어진 A, B, C, D의 시험구 중에, D시험구 발효건조 효소제가 육계 생산성 향상에 가장 좋게 나타나, 육계 사육 시 발효건조 효소제 0.5% 첨가하여 사용하면 육계농가에 큰 이득이 될 것으로 판단된다.

## 8. 복합발효효소제를 적용한 육계농장에서의 생산성 검증

- 소재지: 六合集團有限公司, 中國 山東省. 濰防市, 安丘市 悟石家布村
- 테스트 목적: 양계장에 사용 할, 발효사료첨가제 8가지 제품 중, 가장 효과가 좋은 첨가제 선택.

### 가. 육계 생산성

양계장에서 육계 생산에 적합한 시험 첨가사료를 찾기 위하여, A, B, C, D, E, F, G, H의 8가지 제품을, 각 계장에 0.5%로 동일하게 처리하였다. 각 계장마다 16,160마리의 병아리를 입식하여, 40일간 판매가 되어 질 때까지 사육하였다. 양계장 특성상, 사료요구율(FCR, feed conversion rate) 측정을 위하여 증체량(g/bird)과 사료섭취량(g/bird)을 구하기 힘들어, 출하 시 전체 사료 섭취량(Total feed intake)과 전체 무게(Total body weight)를 측정하여 구하였다.

체중(Body weight, kg/bird)은 D시험구 2.426, F시험구 2.416, G시험구 2.373, H시험구 2.334, E시험구 2.333, A시험구 2.289, C시험구 2.185, B시험구 1.938 순으로 나타났다. B시험구가 가장 낮은 체중을 나타내었으며, D시험구인 발효건조 효소제가 가장 높은 체중을 나타내어, 육계의 체중 증가에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

사료섭취량은(Total feed intake, kg)은 D시험구 57,600, C시험구 57,149, F시험구 54,994, A시험구 54,879, E시험구 54,409, G시험구 54,352, H시험구 50,989, B시험구 42,923 순으로 나타났다. B시험구가 가장 낮은 사료 섭취를 하였으며, D시험구인 발효건조 효소제가 가장 높은 사료 섭취율을 나타내었다.

사료요구율(FCR, feed conversion rate)은 D시험구 1.702, F시험구 1.730, E시험구 1.780, A시험구 1.915, C시험구 1.931, G시험구 1.946, B시험구 2.037, H시험구 2.242 순으로 나타났다. B시험구가 가장 낮은 사료 섭취를 하였으며, H 시험구가 가장 낮은 사료요구율을 나타내었으며, 육계의 체중 증가에서도 가장 높았던 D시험구인 복합발효효소제가 가장 높은 사료효율을 나타내어, 육계 생산성에 영향을 미치는 것으로 판단된다(Table 19).

### 나. 육계 판매율 및 폐사율

양계장에서 발효 효소제의 첨가하기 위한, 제품 8가지 제품 A, B, C, **D(복합발효효소제)**, E, F, G, H를, 각 계장에 0.5%로 동일하게 처리하였으며, 양계장 특성 상 A, B, C, D시험구는

16,160마리의 병아리를 넣었으며, E, F, G, H 시험구는 16,640마리의 병아리를 넣어, 40일간 판매가 되어 질 때까지 사육하여, 판매량과 폐사율을 구하였다.

판매율(%)은 D시험구 86.30(13,946마리), C시험구 83.79(13,541마리), F시험구 79.08(13,159마리), E시험구 78.76(13,107마리), A시험구 77.46(12,517), G시험구 70.70(11,765), B시험구 67.37(10,887마리), H시험구 58.56(9,745마리) 순으로 나타났다. D시험구가 86.30%의 판매율을 나타내어, 가장 많은 수량을 판매하였다.

폐사율(%)은 판매율과 반비례하여 H시험구 41.44, B시험구 32.63, G시험구 29.30, A시험구 22.54, E시험구 21.24, F시험구 20.92, C시험구 16.20, D시험구 13.70 순으로 나타났다. H시험구가 폐사율이 가장높게 나타났으며, **D시험구가 폐사율 13.70%로 가장 낮게 나타났다**(Table 19).

#### 다. 판매율과 사료요구율에 따른 종합효율

D시험구 86.30%(FCR, 1.702), C시험구 83.79%(FCR, 1.931), F시험구 79.08%(FCR, 1.730), E시험구 78.76%(FCR, 1.780)와 같이 판매량과 사료요구율에 따른 종합효율을 비교하였으며, 그 결과 D시험구인 발효건조 효소제가 사료요구율 1.702와 판매율 86.30%로 다른 시험구에 비해 높게 나타나, 육계 생산 시에 가장 효율적인 것으로 나타났다.

무처리구 없이 진행한 시험이라, 무처리구와 비교하기는 힘들지만, 판매상품으로 만들어진 A, B, C, D, E, F, G, H의 8가지의 처리구에서 가장 좋게 나타난 발효건조 효소제(D처리구)의 효과는, amylase뿐만 아니라 cellulase, protease, mannanase, probiotic의 복합적인 발효성분에 의한 결과에 의한 것으로 판단된다. 또한 이와 같은 합리적인 발효방법에 대한 다각적인 연구가 필요할 것으로 사료된다(Table 19).

**D사의 발효사료첨가제는 본 연구과제의 주관기관인 (주)빅바이오젠이 본 연구과제에서 도출된 연구결과를 접목하여 개발된 시제품으로 중국 현지 수출을 목적으로 중국측 파트너인 青島000生物製品有限公司의 협조로 약 200만 수의 육계를 생산하여 유통시키는 종합식품회사의 자체 육계 농장에서 타 회사의 7가지 제품과 비교하여 사양실험이 진행된 결과임.**

**Tabel 13. Effect of fermentation enzyme products on growth performance in broiler chicks.**

	A	B	C	<b>D</b>	E	F	G	H	Avg.
Total body weight (kg)	28,652	21,094	29,593	<b>33,832</b>	30,575	31,793	27,924	22,746	28,276
Body weight (kg/bird)	2,289	1,938	2,185	<b>2,426</b>	2,333	2,416	2,373	2,334	2,287
Total feed intake (kg)	54,879	42,963	57,149	<b>57,600</b>	54,409	54,994	54,352	50,989	53,417
FCR	1,915	2,037	1,931	<b>1,702</b>	1,780	1,730	1,946	2,242	1,890
Mortality (%)	22.54	32.63	16.20	<b>13.70</b>	21.24	20.92	29.30	41.44	24.75

FCR: [Feed conversion rate, (feed/gain)]

## ◎ 연구과정에서 도출된 기초기술을 이용한 사업화 및 기술이전

위탁생산시스템의 거점 구축 및 발효기술 이전을 통한 발효사료생산시설의 인프라 확대 기여  
⇒ 본 과제에서 추가 제안한 위탁생산시스템 구축과 더불어 개발과정에서 도출된 기초기술을 자가생산하기 위한 수요자에게 컨설팅 및 기초기술 이전을 통하여 전국적인 발효사료첨가제 생산 인프라 구축을 확대하여 선진 축산국가로의 초석을 다지는데 기여하고자 함.

### ① 원가 절감 및 효과적 발효사료 생산을 위한 발효기술 도출 및 기술지도

#### 1. 00축협 섬유질사료공장

- ① 기술지도 1 : 버섯폐배지를 주로 이용한 발효사료 생산 및 TMR 적용 (5~7%)
- ② 기술지도 2 : 고체발효를 위한 starter의 2단계 접종을 통한 유용미생물 증식효율 증진

이전 : 3종의 유용미생물(고초균, 유산균, 효모) 혼합배양 종균의 starter를 적용  
⇒ 고초균의 증식이 떨어짐

이후 : 유산균 단일 starter의 접종/발효 1일 후, 효모/고초균 혼합 starter 적용  
⇒ 3종 유용미생물의 조화로운 균체수 확보

#### 2. 00축협 섬유질사료공장

- 2단계의 starter 적용을 통한 TMR 사료생산용 발효사료의 품질 향상

#### 3. 진주 000영농법인

- 진주시 및 경남의 지자체 보조를 통하여 발효사료첨가제 생산 인프라를 구축
  - 발효 starter의 공급선 미확보 및 생산공정 컨설팅 필요
  - ⇒ 부형제 발효조건의 기초 연구 도출 자료 제시 및 생산공정 컨설팅
  - ⇒ 원활한 가동과 더불어 소규모 자가 TMR 공정에 적용하여 TME 생산기반 구축







## ㉔ 과제 수행에서 도출된 제품 및 기술의 중국 수출 및 기술이전 진행 협의

### 1. 제품 수출 관련 진행 상황

가. 중국내 본사 판효사료첨가제 및 농용미생물제 판매를 위한 유몽희사 념연 선범 및 등기

: 青島OOO生物製品有限公司

나. 본사 육합판효효소제의 중국내 상표 출원 : 상표명 好得益

다. 현지 제품 수출을 위한 중국내 사료첨가제 수입등기 진행중 (중국 CCIC 대행)



## 2. 유용미생물의 액상배양기술 및 고체발효 관련 저급기술의 현지 운영

가. 액상배양기술의 이전을 통한 액상 사료첨가제 시장 진입 모색

나. 유기부산물인 맥주박을 이용한 발효사료 첨가제의 중국내 공동 생산/판매 협의

**发酵饲料添加剂的生产和销售的酒糟粕项目**  
 맥주박을 이용한 발효사료첨가제 생산 및 판매 프로젝트

2014. 9

 BigBiogen Co. Ltd. (韩国) / 康源生物科技有限公司 (山东日照市)


**山东景芝酒业**  
 SHANDONG JINGZHI LIQUOR

全国服务热线：400

山东景芝酒业股份有限公司 Shandong Jingzhi Liquor Co., Ltd  
 山东中环阳春饲料有限责任公司 Shandong Zhonghuan Yangchun Feed Co., Ltd.

**公司风采 / 회사전경**





山东中环阳春饲料有限责任公司
酒精发酵过程
山东景芝酒业股份有限公司

**饲料生产的发酵过程中网站 / 발효사료생산공정 현장**






种子培养  
미생물종균배양
微生物接种  
종균접종
固态发酵工艺  
고체 발효공정
铣削加工  
분쇄 공정

## 酒糟粕 生產現狀

(山东中环阳春饲料有限责任公司)

2014年 現狀 (對2種用酒糟粕為原料的產品每年的生產)

- 乾燥酒糟蛋白飼料 : 3萬噸 (30,000 Ton)
- 乾燥益生菌 : 200噸 → 需要提高发酵饲料添加剂的质量

2018年, 生產計劃

- 酒糟粕 : 20萬噸
- 乾燥酒糟蛋白飼料 : 6萬噸 (60,000 Ton)
- 乾燥益生菌 : ?

\*山东省 : 酒糟粕 , 500萬噸/年

飼料副產品資源的最大利用率 → 獲得了競爭優勢, 在生產高附加值產品  
부산물 자원의 사로 극대화 → 고부가가치 제품 생산을 통한 경쟁력 확보

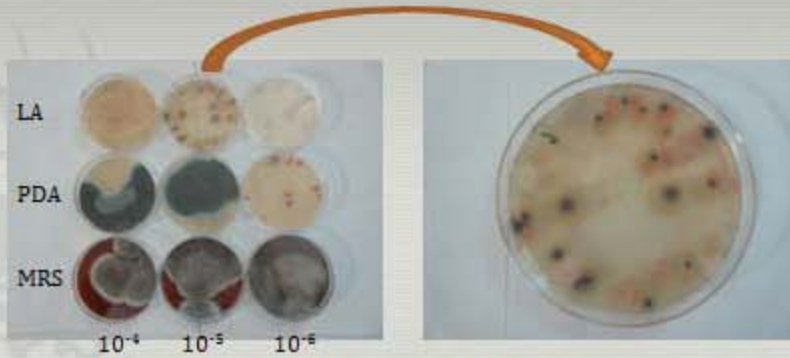
環境保護 / 確保飼料 / 畜牧業確保競爭力 / 有機畜牧業生產基礎的組成

## 酒糟粕 產品多元化

백주박의 제품 다양화



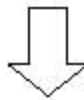
## 微生物种群规模的酒糟蛋白饲料



LA: 细菌培养基 / PDA: 真菌培养基 / MRS: 乳酸菌培养基  
 세균배양배지      곰팡이배양배지      유산균배양배지

2014. 8. 29

BigBioGen Co., Ltd. 生物技术研究所  
 빅바이오젠 생명공학연구소



## 酒糟粕发酵, 饲料添加劑生產潛力的實驗

	酒糟粕 (水分含量)	A-B	C-D
1	100 (60%)	-	-
2	60	40	-
3	60	-	40
4	60	32	8
5	60	20	20
6	60	8	32

初始含水量: 40%  
 发酵温度: 30~35°C  
 发酵时间: 48~96 hr  
 微生物种子: 3种  
 - 芽孢杆菌:  $7.0 \times 10^8$  cfu/ml  
 - 乳酸菌:  $4.0 \times 10^8$  cfu/ml  
 - 酵母:  $6.0 \times 10^8$  cfu/ml

A, B, C, D: 辅料发酵 말효용 무형제

	芽孢杆菌		乳酸菌		酵母		pH		含水量 (%)	
	cfu/g 酒糟粕发酵件									
	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr
1	$2.0 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^7$	$3.7 \times 10^8$	4.44	8.22	60	34
2	$1.0 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$6.0 \times 10^7$	$3.6 \times 10^8$	$4.0 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$	5.28	6.22	40	29
3	$1.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$9.0 \times 10^7$	$3.5 \times 10^8$	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	4.91	6.86	40	42
4	$4.0 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$6.0 \times 10^7$	$3.1 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	4.93	6.16	40	28
5	$2.0 \times 10^8$	$3.5 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$3.8 \times 10^8$	$1.0 \times 10^7$	$4.2 \times 10^8$	5.06	6.67	40	42
6	$3.0 \times 10^8$	$3.5 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.8 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	4.80	6.88	40	34



## ■ 3차년도 연구개발내용

### 제 1 절. 발효과정의 생리활성 검정과 QC 지표설정

대두박을 이용한 Tray-발효과정(scale-up, 200kg)의 생리활성을 검정하여, 발효과정 중 생균수 이외의 QC 지표를 설정하기 위하여 1) 일반성분과 무기질, 2) 항영양성분, 3) 생균수, 4) 생리활성 변화에 대해 조사하였다.

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 배지, 균주 배양, 발효사료 첨가제 제조

발효건조공정 시스템 시험을 위하여, *Bacillus subtilis*는 LB 배지(Tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%), lactic acid bacteria는 MRS 배지, *Saccharomyces cerevisiae*는 YM 배지(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 1%) 사용하였으며, agar plate 제조 시에는 2.0% agar를 첨가하였다. 모든 배지는 121℃, 1 Kg/cm<sup>2</sup>으로 15분간 멸균 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주는 DMSO 10%를 첨가하여 -70℃ deep freezer에 보관하여 사용하였다. *Bacillus subtilis*는 35℃, 200rpm에서 1일간 배양하였으며, *Pediococcus acidilactic* 및 *Lactobacillus plantarum*은 35℃, 0rpm에서 1일간 배양하였고, *Saccharomyces cerevisiae*는 30℃, 200rpm에서 1일간 배양하여, 배양액으로 사용하였다. *Bacillus subtilis*, *Pediococcus acidilactic*, lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae* 배양액 1%를 대두박 200kg에 접종하였으며, 당밀 2%를 첨가하고 수분함량이 50%되게 하여, 35℃에서 *Bacillus subtilis*(*Bacillus subtilis* BBG-B20 + *Bacillus subtilis* SK877)는 3일간, *Pediococcus acidilactic* BBG-L1 + *Lactobacillus plantarum* SK3121 + *Saccharomyces cerevisiae*는 co-culture를 3일간 트레이 발효 하여 생리활성 검정에 사용하였다.

##### 나. 일반성분(조단백질, 조섬유, 조지방, 조회분)

일반성분은 AOAC(1990) 방법으로 분석하였다.

##### 다. 무기질(칼슘, 인)

###### (1) 칼슘

원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry)을 이용하여 분석하였다. 시료 5g

를 자제 크루시블에 취하고 열판에서 예비 회화시킨 후 전기로 600℃에서 2시간 이상(회백색) 회화시킨 뒤 방냉하고 염산용액(1:1) 10ml를 가하여 하룻밤 방치 용해시킨 다음 No.6 여과지를 이용, 뜨거운 물로 여과하여 일정량으로 맞춰 시료액으로 한다. 시료액 일정량을 50ml 메스플라스크에 취하고 5% 탄타늄용액 10ml를 넣고(용액 중 탄타늄 함량이 1% 되도록 한다), 다시 염산용액(1:1) 1ml를 가하고 증류수로 표선을 맞춘다. 미리 30분간 예열한 원자흡광광도계 파장 422.7nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 칼슘표준용액을 0, 2, 4, 6, 8, 10ppm이 되도록 50ml 메스플라스크에 취한 다음 여기에 탄타늄 용액 10ml를 각각 넣고 증류수로 표선까지 채운 다음 흡광도를 측정, 표준곡선(검량곡선)을 작성한다.

$$\text{칼슘(\%)} = \frac{\text{시료액의흡광도/lppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

## (2) 인

시료 5g를 자제 크루시블에 취하고 열판에서 예비 회화시킨 후, 전기로 600℃에서 2시간 이상(회백색) 회화시킨 뒤 방냉하고 염산용액(1:1) 10ml를 가하여 하룻밤 방치 용해시킨 다음 No.6 여과지를 이용, 뜨거운 물로 여과하여 일정량으로 맞춰 시료액으로 한다. 25ml 메스플라스크에 시료액 1-20ml(인 함량에 따라)를 취하고 발색제 2.5ml(용기 의1/10)를 가한 다음 증류수로 표선을 맞춘 후 혼합하고 15분간 방치 후 파장 470nm에서 흡광도를 측정한다. 표준액도 같은 방법으로 실시한다.

$$\text{인 (\%)} = \frac{\text{시료액의흡광도/lppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 106} \times 100$$

## 라. 아미노산

아미노산 18종에 대한 성분 비교를 amino acid auto analyzer(Amino acid analyzer S-433, Germany)를 사용하여 진행하였다.

## 마. Trypsin inhibitor(TI)

시료 1g에 0.01N NaOH 50ml을 넣고 3시간 동안 진탕한 후, 원심분리하여 상등액을 20배 희석하였다. 희석액 2ml과 2%(w/v) trypsin(porcine pancreas trypsin sigma)용액 1ml를 넣고, 5ml의 BAPANA용액 [40% N-Benzoyl - DL-arginine -nitroanilide-HCl(sigma)을 20mM CaCl<sub>2</sub>,

50mM Tris(pH 8.2에 녹인것)]을 가하여 37℃서 10분간 반응 시킨 후, 1ml 30% 초산 용액을 가하고, 비색계로 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 바. 스타키오스, 라피노오스

시료 200mg을 취해 3ml의 acetone 처리를 하고 60℃의 water bath에 두어 2시간 동안 반응시킨 후, 이를 2000rpm으로 5분간 원심분리하여 침전물을 취함으로써 지방질을 제거 하였다. 침전물을 약 60℃의 heating block에서 열처리하여 남은 유기용매를 완전히 제거하였고, 삼차 증류수 1.9ml을 가하여 60℃의 water bath에 2시간 동안 둔 후 0.1ml의 1M 5-SSA (5-sulfosalicylic acid)를 첨가하여 4℃에 두고 overnight 시켰다. 이를 3000rpm으로 5분간 원심분리하여 침전물은 버리고 상등액을 취하여 시료에 포함된 단백질을 비롯한 방해물질을 제거한 후 상등액 0.8ml에 동량의 삼차 증류수를 넣고 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 0.2 $\mu$ m membrane filter에 상등액을 여과시킨 후 4℃에 보관하여 HPLC(High performance liquid chromatography)로 raffinose 및 stachyose 함량을 분석하였다. 사용된 HPLC 는 Agilent 1100 series(Agilent Technologies, USA)이며, RI(reflective index) detector를 사용하였다. 분석 column은 Supelcogel 610-H column(300 × 7.8 mm i.d., 9 $\mu$ m, Supelco, USA)을 사용하였으며, elution solvent는 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> 수용액을 사용하였고, 이동상의 flow rate는 0.6ml/min, 시료의 주입량은 10 $\mu$ l이었다. 각각의 표준용액은 100mg/ml을 삼 차 증류수에 용해하여 stock solution으로 갈색 유리병에 냉 장보관한 후, 희석하여 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625mg/ml로 하여 각각의 chromatogram을 얻었으며 peak의 면적당 표준 용액 농도의 관계로 검량선을 작성하여 시료의 raffinose 및 stachyose 함량 정량분석에 적용 하였다.

#### 사. 생균수

각 생균수는 1장 1)의 방법으로 제조한 agar를 첨가한 배지에, *Bacillus subtilis* 는 35℃에서 2일간 배양하였으며, *Lactobacillus plantarum*은 35℃에서 2일간 배양하였고, *Saccharomyces cereviase*는 30℃에서 2일간 배양하여, 단일 콜로니를 계수하여 생균수를 측정하였다.

#### 아. 총당, 환원당

희석된 용액 2ml를 test tube에 넣고 5%(v/v) phenol 1ml을 첨가하고, 95% 황산 5ml를 첨가한 후 30분 동안 상온에 방치하였다. Spectrometer를 이용하여 470nm에서 흡광도를 측정 하였으며, glucose standard curve를 이용하여 총당 함량(%)을 구하였다. 희석된 시료 1ml을



test tube에 넣고 Dinitrosalicylic acid(DNS) reagent 1ml을 가하여 잘 섞은 후 끓는 물에서 15분 동안 증탕 시켰다. 상온에서 충분히 식힌 후 증류수 3ml을 넣었다. Spectrometer를 이용하여 546nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose standard curve를 이용하여 환원당 함량(%)을 구하였다.

#### 자. 유리당

시료 2g에 3차 증류수 20ml을 가하여 30분간 초음파추출기로 추출하였으며, 추출액은 원심분리기를 이용하여 3,000rpm 에서 10분간 원심분리하고, 상정액을 취하여 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 HPLC(Agilent 1260, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. Analytical column은 Cosmosil Sugar-D(4.6 $\times$ 250 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)를 사용하였고, 이동용매는 water와 acetonitrile을 30 : 70의 비로 주입하였으며, 컬럼온도는 30 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 이동상의 속도는 분당 1.0ml를 유지하였으며, 시료 주입량은 10 $\mu$ l, 검출기는 ELSD(Agilent LT-ELSD G4128A, Agilent)를 사용하였다.

#### 차. SDS-PAGE

시료를 SDS 2%, 2-mercaptoethanol 5%용액으로 시료와의 비율을 1:10(w/v)으로 추출한 후 원심분리(10,000rpm, 10min) 했으며, 4% stacking gel, 15% separating gel에서 실시하였고, 염색은 0.125%의 coomassie brilliant R로, 탈색은 acetic acid : ethanol : H<sub>2</sub>O = 8 : 25: 65(v/v)으로 실시하였다.

#### 카. 조사포닌

시료 5g에 80% methanol 50ml를 가 하여 70 $^{\circ}$ C 수조상에서 30분간 추출한 다음 추출물을 여과(Whatman No. 2)하였다. 이러한 추출과정을 2회 반복 실시하여 추출 액을 합하고 55 $^{\circ}$ C에서 감압 농축한 다음 잔여물을 증류수 50ml 로 정용하였다. 이것을 분액 깔대기에 옮기고 에테르 50ml로 씻 은 다음 물 층을 물포화 부탄올 50ml로 3회 추출한 후, 물포화 부탄올층을 미리 항량으로 한 농축플라스크에 회수하여 감압 농 축한 후 105 $^{\circ}$ C에서 20분간 건조하였다. 다시 데시케이터에서 30분간 식혀 무게를 측정한 후 다음 식에 의해 조사포닌 함량을 구하였다.

\* 조사포닌(mg%)= 건조 후 수기의 무게(mg)-수기의 무게(mg)/시료(g)  $\times$ 100

타. 유기산, pH

시료 0.1g을 칭량하여 50ml 용량병에 취하고 0.4% 염산용액 20ml를 가한 후 20분간 초음파 수조에서 용해시킨다. 0.4% 염산용액으로 정용하고 균질하게 혼합한 후 상등액을 원심분리(3000rpm, 10분)하거나 또는 여과한 후 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다. 유기산 표준물질 을 위와 동일하게 처리하여 표준용액으로 한다.

LC Pump : Isocratic pump

Mobile Phase : 5~20mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Column : Organic acid analysis colum, RSpak KC-811(300mmx 7.8mm, Shodex)

검출조건 : UV 210nm, 유속 : 0.7~1.0ml/min

주입량 : 20 $\mu$ l, Column Oven : 40 $^{\circ}$ C

(2) pH

시료를 10배 희석하여, 30분간 방치 후, pH 측정기로 pH를 측정하였다.

파. KOH, 펩신소화율, UA

(1) 0.2% KOH용해도

시료 1g을 정확히 취하여 탈지한 다음 200ml 삼각플라스크에 넣고 45 $^{\circ}$ C로 미리 가열한 0.2% KOH 용액 150ml를 가하고 45 $^{\circ}$ C 항온수조에서 흔들며 주면서 16시간 소화시킨 다음 No. 2A 여과지로 여과하였다. 불소화물을 온수로 세척하고 불소화물과 여과지를 분해플라스크에 넣고 조단백질 정량법에 준하여 분해, 증류, 적정하여 불소화물의 조단백질 함량을 구하였다. 별도로 시료에 대한 조단백질의 함량도 구하였다.

KOH 용해도(%) : KOH 용액에 용해된 단백질(%) / 총단백질(%)  $\times$  100

(2) 0.2% 펩신소화율

시료 1g을 정확히 취하여 탈지한 다음 200ml 삼각플라스크에 넣고 45 $^{\circ}$ C로 미리 가열한 0.2% 펩신 염산용액 150ml를 가하고 45 $^{\circ}$ C 항온수조에서 흔들며 주면서 16시간 소화시킨 다음 No. 2A 여과지로 여과하였다. 불소화물을 온수로 세척하고 불소화물과 여과지를 분해플라스크에 넣고 조단백질 정량법에 준하여 분해, 증류, 적정하여 불소화물의 조단백질 함량을 구하였다. 별도로 시료에 대한 조단백질의 함량도 구하였다.

$$\text{펩신소화율(\%)} = (A-B)/A \times 100$$

※ A : 사료중 조단백질 함량(%)

B : 불소화물중 조단백질 함량(%)

### (3) 우레아제역가(U.A)

대두부산물 1g을 요소용액과 혼합하였을 때 30℃에서 1분간 발생하는 암모니아태 질소의 양의 차이로 urease activity를 측정하였다.

#### 하. 소화효소

##### (1) $\alpha$ -amylase

$\alpha$ -amylase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 사용하여 starch로부터 유리된 glucose 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활성측정을 위한 표준 반응용액은 조효소액 1ml와 1% starch 용액 1ml를 완전 혼합하여 40℃에서 30분간 반응시킨 후, DNS 용액 2ml를 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 30분간 끓인 후 식힌다. 증류수 10ml를 첨가하고, 30분간 실온에 방치하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit(IU)는 1분간 1 $\mu$ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

##### (2) Protease

Protease의 활성도는 Folin-Ciocalteu's phenol을 사용하여 milk casein로부터 유리된 tyrosin 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활성측정을 위한 표준 반응용액은 기질 5ml을 37℃에서 10분간 예열한 후, 시료용액 1ml을 넣고 10분간 교반하였다. 교반 후 30% TCA 시약 5ml을 넣어 30분간 교반하여 여과지에 침전물을 제거한다. 여과액 중 2ml을 0.5M sodium carbonate solution 1ml를 넣고 30분간 교반한다. 위액을 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit(IU)는 1분간 1 $\mu$ mol의 tyrosin에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

##### (3) CMC-cellulase

CMC-cellulase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 사용하여 CMC-cellulase로부터 유리된 glucose 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활

성측정을 위한 표준 반응용액은 조효소액 1ml와 1% starch 용액 1ml를 완전 혼합하여 45℃에서 60분간 반응시킨 후, DNS 용액 2ml을 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 5분간 끓인 후 식힌다. 증류수 10ml를 첨가하고, 30분간 실온에 방치하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit(IU)는 1분간 1 $\mu$ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

#### (4) Xylanase

Xylanase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)방법을 사용하여 Xylanase으로부터 유리된 xylose 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활성측정을 위한 표준 반응용액은 조효소액 1ml와 1% starch 용액 1ml를 완전 혼합하여 50℃에서 10분간 반응시킨 후, DNS 용액 2ml을 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 5분간 끓인 후 식힌다. 증류수 10ml를 첨가하고, 30분간 실온에 방치하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit(IU)는 1분간 1 $\mu$ mol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

#### (5) B-Mannanase

B-Mannanase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 사용하여 Locust bean gum(sigma)으로부터 유리된 mannose 함량을 측정하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 효소활성측정을 위한 표준 반응용액은 조효소액 500 $\mu$ l와 1중량% locust bean gum용액 500 $\mu$ l를 완전 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, DNS 용액 1ml을 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 담귀 증탕시키면서, 5분간 발색시킨 후 증류수 10ml를 첨가하고 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 international unit(IU)는 1분간 1 $\mu$ mol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

거. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드

#### (1) 추출물의 제조

추출물은 각 발효시킨 대두박을 동결건조하여 얻은 분말 10g에 80% 에탄올 100ml이 될 때까지 첨가한 후 상온에서 15시간 동안 추출한 다음 3,000rpm 에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 감압 농축 한 후, 건조하여 분말화 된 시료를 실험에 사용하였다.

## (2) 총 폴리페놀

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법으로 측정하였다(Zhou et al., 1980). 시료를 희석시킨 다음 희석액 1ml에 Folin-Ciocalteu's reagent 1ml을 가하고 3분간 정치시킨 후 10중량% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1ml을 가하여 혼합한 다음 실온에서 1시간 정치시킨 후 760nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannin acid를 증류수로 녹여 농도가 0, 5, 10, 15, 20 및 25µg/ml 용액이 되도록 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은, 표준 검량선으로부터 시료추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

## (3) 총 플라보노이드

총 플라보노이드 함량은 Zia 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Zia et al., 1999). 농도별 추출물 150µl을 가하고, 500µl 1M NaOH를 혼합한 후 2.5ml의 증류수를 첨가한 후 5분동안 37°C에서 방치한다. 표준물질로는 Catechin으로(Sigma, USA)을 사용하였다. 500nm에서 검량선을 작성한 후 시료의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

## 네. 항산화활성

### (1) 추출물의 제조

추출물은 각 발효시킨 대두박을 동결건조하여 얻은 분말 10g에 80% 에탄올 100ml이 될 때까지 첨가한 후 상온에서 15시간 동안 추출한 다음 3,000rpm 에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 감압 농축 한 후, 건조하여 분말화 된 시료를 실험에 사용하였다.

### (2) DPPH

DPPH 라디칼 소거능의 측정은 Biosis 등(1958)의 방법에 의해 측정하였다. 3.49mg DPPH를 100ml 메탄올(methanol)에 녹인 다음 1mg/ml, 2mg/ml, 4 mg/ml 농도의 시료 200µl에 0.1mM DPPH 2ml를 넣고 희석시킨다. 그 다음 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다. 또한 각 시료의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2 로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC50 값으로 나타내었다.

$$DPPH\text{라디칼소거능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{무첨가구의 흡광도}}{\text{시료첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

DPPH 는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정적이며 항산화 기작 중



proton-radical scavenger에 의하여 탈색되어 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다.

### (3) ABTS

ABTS 라디칼 소거능의 측정은 Re 등(1999)의 방법에 의해 측정하였다. 7mM ABTS 600 $\mu$ l와 7.35mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 300 $\mu$ l을 혼합시킨 후 암소에서 14시간 동안 반응시킨 뒤, 80ml 증류수와 희석시킨 다음 734nm에서 대조구의 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml 농도의 시료 용액 20 $\mu$ l와 ABTS solution 2ml를 6분 동안 반응시킨 다음 734nm에서 흡광도를 측정하여, 저해율을 계산하였다. 또한 각 시료의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2 로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC50 값으로 나타내었다.

$$ABTS\text{라디칼소거능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{무첨가구의 흡광도}}{\text{시료첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 더. 총 이소플라본

시료 5 g에 ethanol 500ml를 넣어, 실온에서 15시간 추출하였다. 원심분리기로 3,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리한 후 상징액을 취하여 Whatman No. 41 여과지로 여과하고, 여액은 50 $^{\circ}$ C에서 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 사용하여 농축한 다음, ethanol을 넣고 재용해시켜 2ml로 정용하였다. 추출액은 syringe filter(0.2 $\mu$ m)로 여과한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 1일 보관 후, 침전물을 다시 여과시켜, 그 중 20 $\mu$ l를 HPLC (Waters 600, Waters Co, USA)를 사용하여 gradient solvent system으로 분석하였다. 분석에 사용된 column은 supelco TMLC-18 column(5 $\mu$ m, 25 cm $\times$ 4.6mm, HPLC column, Waters Co, USA)이었고, UV detector를 사용하여 249nm, 261nm에서 측정하였다. Gradient는 용매 A(1% acetic acid) : 용매 B(acetonitrile)를 0 : 100으로 시작하여 20분 후에는 100 : 0이 되도록 한 후 다시 0 : 100으로 40분간 flow시켰으며, flow rate는 1ml/min이었다. 분리한 isoflavone 함량은 daidzin, genistin, daidzein, genistein 각각의 표준물질의 농도에 대한 peak 면적의 표준 정량 곡선(standard calibration curve)으로부터 계산하였다.

### 러. 통계분석

모든 얻어진 결과에 대한 통계분석은 Statistical Analysis System(SAS, 2002)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 각 평균간 유의성 검정은 Duncan의 다중 검정법(Multiple range

test)에 의하여 실시하였다(Duncan, 1955). 처리구간의 유의성검정은 유의수준  $P < 0.05$ 에서 검정하였으며, 유의수준  $P < 0.10$ 을 본 실험에서는 경향이라고 명시하였다.



## 2. 결과 및 고찰

### 가. QC 적용을 위한 발효사료 첨가제의 일반성분 검증

#### (1) 일반성분(조단백질, 조섬유, 조지방, 조회분)

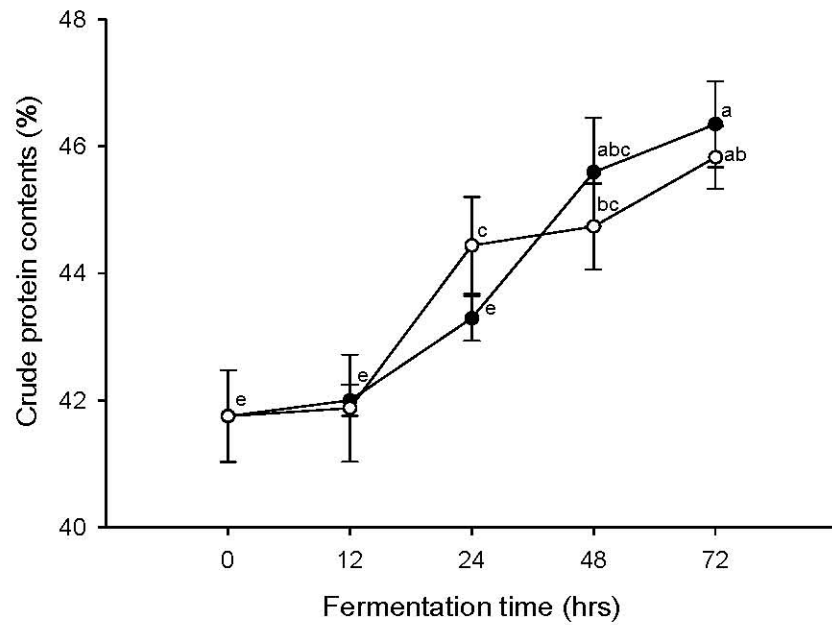
바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 일반성분의 함량에 대하여 조사하였다. 그림 1-1와 같이 발효시간에 따른 일반성분 중 조단백질(A) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 조단백질 함량은 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 46.35%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 45.82%로 나타나 무처리구 41.75% 보다, 각각 4.60%, 4.07%로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

일반성분 중 조섬유(그림 1-1, B) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스는 48시간 까지, 유산균+효모는 72시간 까지, 조섬유 함량은 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 7.82%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 7.98%로 나타나 무처리구 7.02% 보다, 각각 0.96%, 0.80%로 높게 나타났다( $P<0.05$ ).

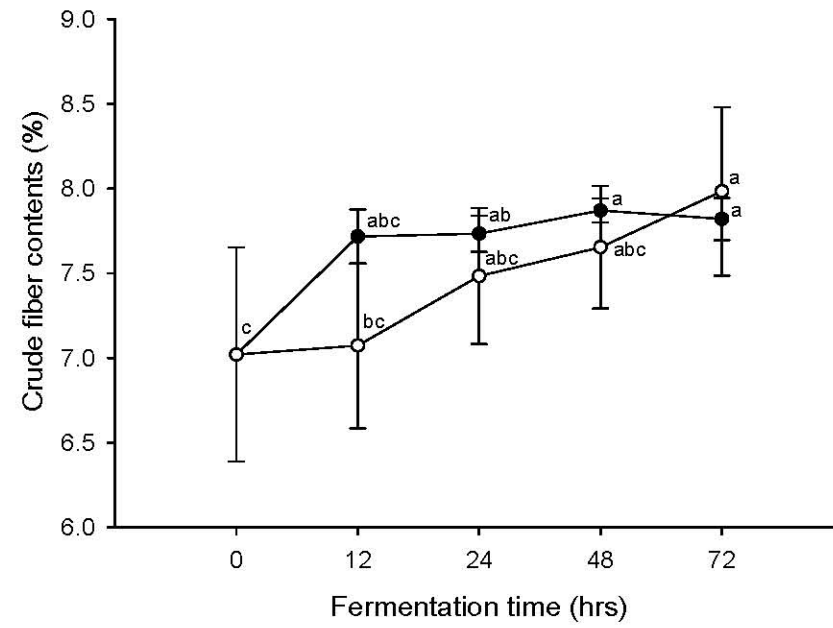
일반성분 중 조회분(그림 1-1, C) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 조회분 함량은 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 7.55%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 7.58%로 나타나 무처리구 6.87% 보다, 각각 0.68%, 0.71%로 높게 나타났다( $P<0.05$ ).

일반성분 중 조지방(그림 1-1, D) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스의 조지방 함량은 증가하였으나, 유산균+효모의 조지방 함량은 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 1.55%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 1.05%로 나타나 무처리구 1.35% 보다, 각각 0.20%, -0.20%로 나타났다( $P<0.05$ ).

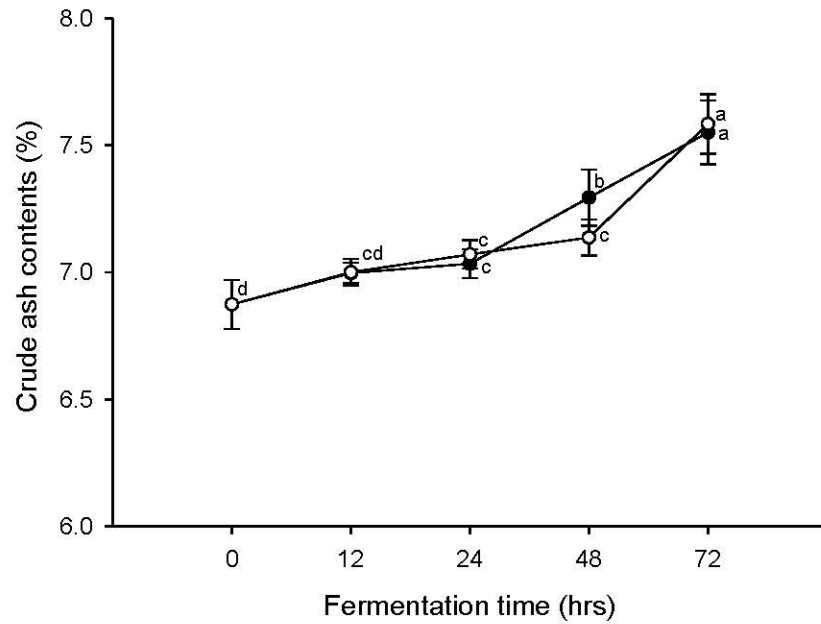
이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 조단백질, 조섬유, 조회분과 조지방의 일반성분의 함량은 발효 후에 대조구에 비해 조단백질, 조섬유, 조회분, 바실러스 발효 후 조지방 함량은 모두 증가하였으나, 유산균+효모 발효 후 조지방 함량만 감소하였다( $P<0.05$ ).



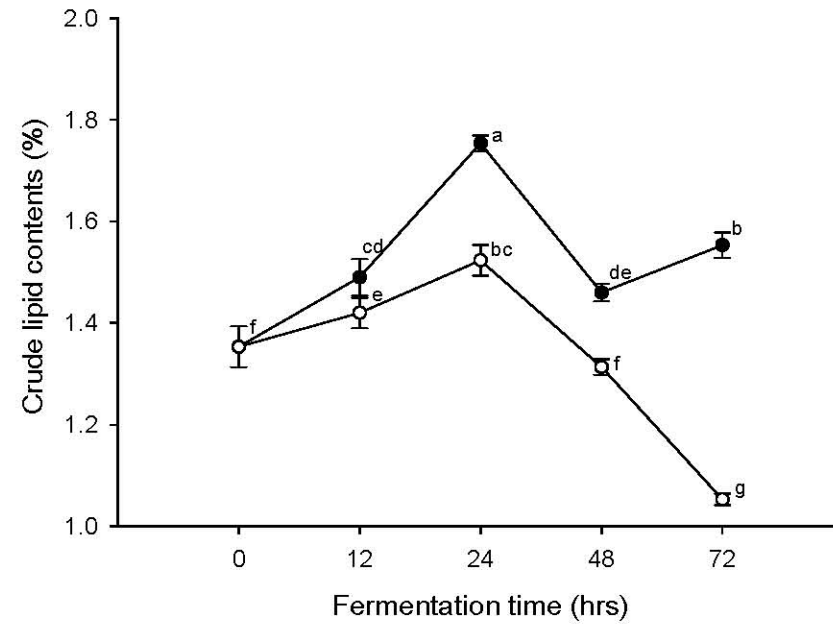
(A)



(B)



(C)



(D)

그림 1-1. 발효과정 중의 일반성분 변화

(A): Crude protein contents, (B): Crude fiber contents, (C): Crude ash contents, (D): Crude lipid contents, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

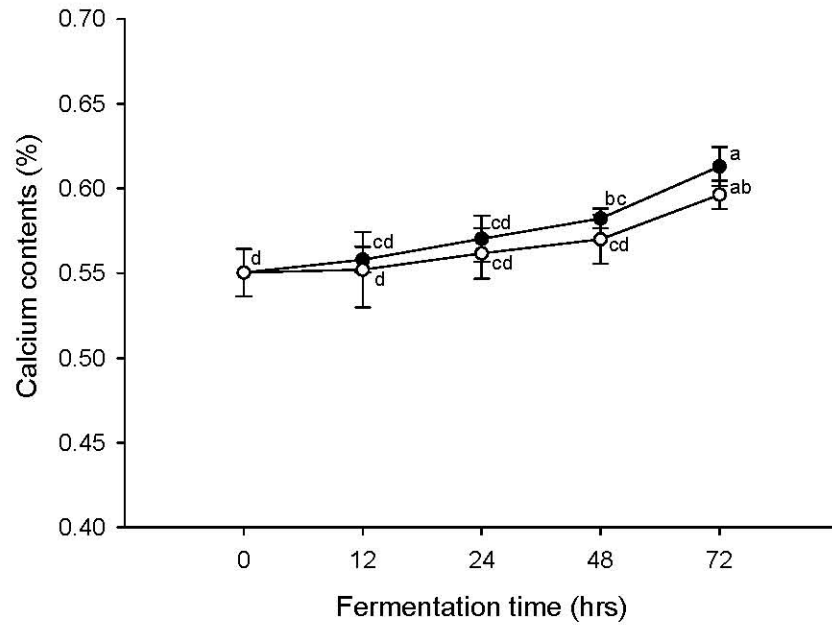
Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

(2) 무기질(칼슘, 인)

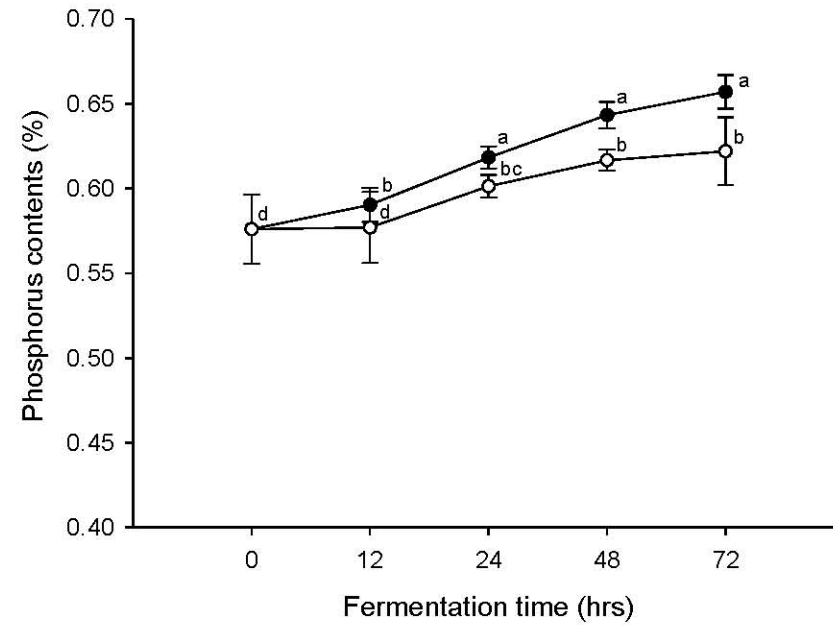
바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 의한 칼슘, 인의 함량에 대하여 조사하였다. 그림 1-2와 같이 발효시간에 따른 무기질 중 칼슘(A) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 칼슘 함량은 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0.61%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0.60%로 나타나 무처리구 0.55% 보다, 각각 0.06%, 0.05%로 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

인(그림 1-2, B) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 인 함량은 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0.66%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0.62%로 나타나 무처리구 0.58% 보다, 각각 0.08%, 0.04%로 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 칼슘과 인의 함량변화는, 발효 후에 대조구에 비해 모두 증가하였다( $P < 0.05$ ).



(A)



(B)

그림 1-2. 발효과정 중의 칼슘과 인의 변화

(A): Calcium contents, (B): Phosphorus contents, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

### (3) 아미노산

바실러스, 유산균+효모의 72시간 발효물의 아미노산 함량에 대하여 조사하였다. Tabel 1-1와 같이 발효 후, 18종류의 아미노산 함량은 증가하였다. 바실러스 39.68%, 유산균+효모는 39.77%로 나타나 무처리구 37.74% 보다, 각각 1.94%, 2.03%로 높게 나타났다. 또한 미생물의 종류에 상관없이 18종류의 아미노산을 골고루 증가시켰으며, 특히 글루타민산(대조구: 7.49, 바실러스: 8.19, 유산균+효모: 8.13)과 아스파틱산(대조구: 4.07, 바실러스: 4.58, 유산균+효모: 4.59)의 함량을 더 증가시키는 것으로 나타났다.

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효물의 18종류의 아미노산 함량변화는, 미생물의 종류에 상관없이 18종류의 아미노산을 골고루 증가시켰으며, 특히 글루타민산과 아스파틱산의 함량을 더 증가시키는 것으로 나타났다.

Table 1-1. 발효물의 아미노산 함량

	Control	Bacillus <sup>1</sup>	Co-culture <sup>2</sup>
트립토판	0.68	0.70	0.70
트레오닌	1.53	1.58	1.65
세린	1.99	2.05	2.10
프롤린	1.93	1.90	1.99
발린	1.64	1.76	1.74
이소루신	1.63	1.75	1.72
루신	2.99	3.09	3.05
티로신	1.30	1.35	1.31
메치오닌	0.54	0.52	0.50
시스틴	0.57	0.60	0.56
라이신	2.28	2.27	2.35
글라이신	1.64	1.72	1.76
알라닌	1.77	1.78	1.83
알기닌	2.67	2.56	2.69
글루타민산	7.49	8.19	8.13
아스파틱산	4.07	4.58	4.59
히스티딘	1.14	1.29	1.23
페닐알라닌	1.88	1.99	1.87
합 계	37.74	39.68	39.77

<sup>1</sup>: *Bacillus subtilis*.

<sup>2</sup>: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).



나. QC 적용을 위한 발효사료 첨가제의 항영양성분 검증

(1) 트립신 인히비터(TI)

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 항영양성분 중 트립신 인히비터(TI) 함량에 대하여 조사하였다. 그림 1-3와 같이 발효시간에 따른 트립신 인히비터(TI) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 트립신 인히비터 함량은 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0.35mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 1.25mg/g로 나타나 무처리구 3.69mg/g 보다, 각각 3.34mg/g, 2.44mg/g 감소되었다( $P<0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 항영양 성분인 트립신 인히비터(TI) 함량변화는, 발효 후에 대조구에 비해 모두 감소하였으며, 유산균+효모보다 바실러스 사용 시, 트립신 인히비터 함량이 더 감소 되었다( $P<0.05$ ).

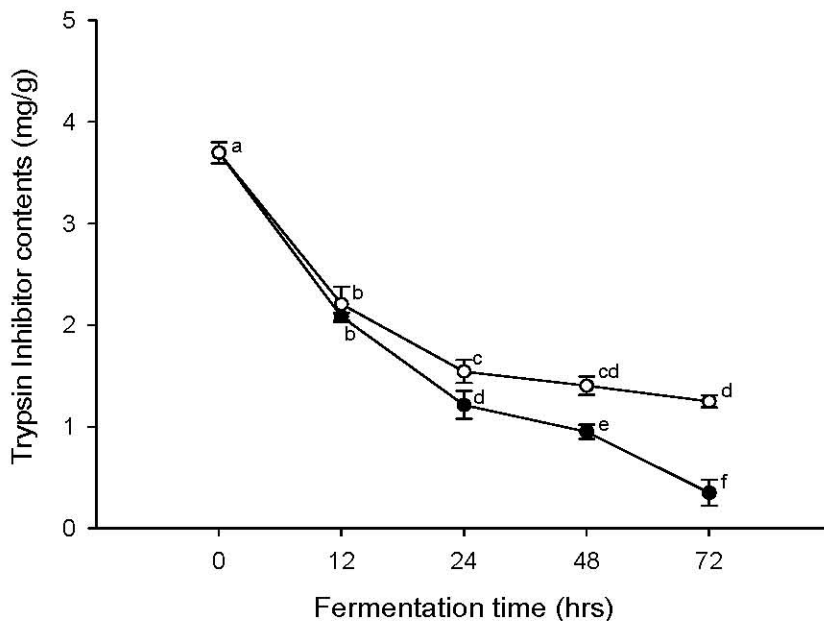


그림 1-3. 발효과정 중의 Trypsin inhibitor의 변화

●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

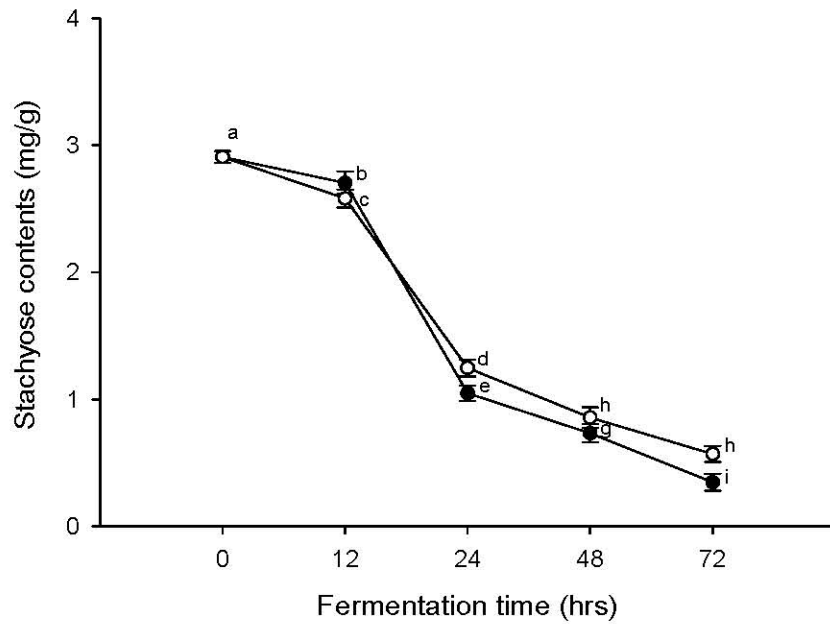
Different superscripts(a-f) in the same row indicate significantly( $P<0.05$ ) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

(2) 스타키오스, 라피노오스

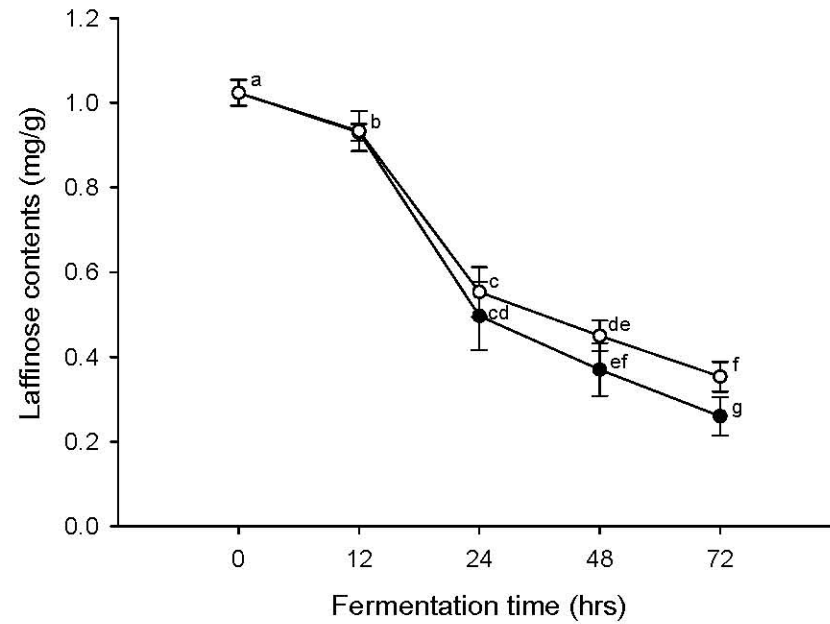
바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 항영양성분 중 스타키오스와 라피노오스 함량에 대하여 조사하였다. 그림 1-4와 같이 발효시간에 따른 스타키오스 (A) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 스타키오스 함량은 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0.35%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0.57%로 나타나 무처리구 2.91% 보다, 각각 2.56%, 2.34% 감소되었다( $P < 0.05$ ).

라피노오스(그림 1-4, B) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스와 유산균+효모의 라피노오스 함량은 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0.26%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0.35%로 나타나 무처리구 1.02% 보다, 각각 0.76%, 0.67% 감소되었다( $P < 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 항영양 성분인 스타키오스와 라피노오스의 함량변화는, 발효 후에 대조구에 비해 모두 감소하였으며, 유산균+효모보다 바실러스 사용 시, 더 감소 되었다( $P < 0.05$ ).



(A)



(B)

그림 1-4. 발효과정 중의 스타키오스와 라피노스의 변화

(A): Stachyose contents, (B): Laffinose contents, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-i) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

다. QC 적용을 위한 발효사료 첨가제의 생리활성 검증

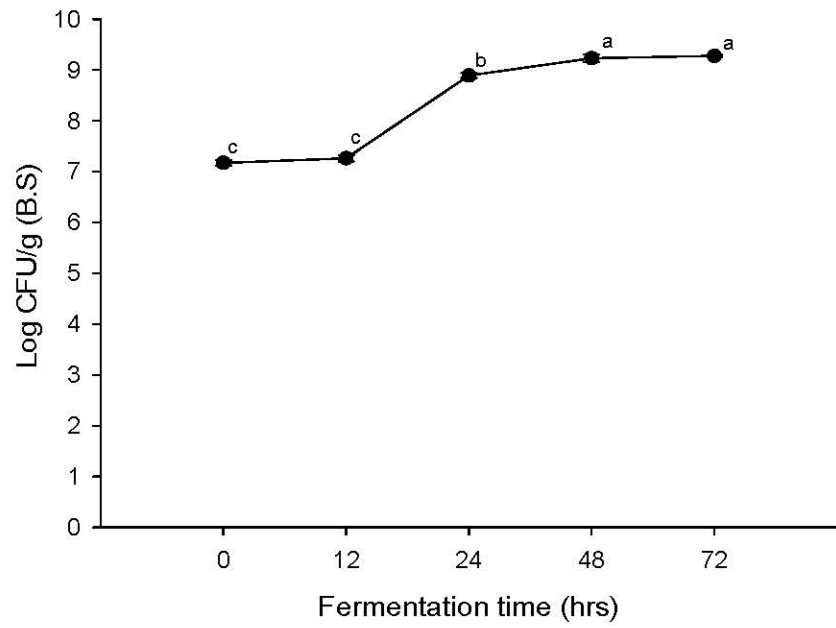
(1) 생균수

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 생균수 함량에 대하여 조사하였다. 그림 1-5와 같이 발효시간에 따른 생균수 중 바실러스의(A) 함량은, 0 시간 log 7.17 CFU/g, 12 시간 log 7.26 CFU/g, 24 시간 log 8.89 CFU/g, 48시간 log 9.23 CFU/g, 72시간 log 9.23 CFU/g으로 나타났다. 발효 48시간까지 증가 하였으며, 72시간에는 유의적으로 증가 하지 않았다( $P < 0.05$ ).

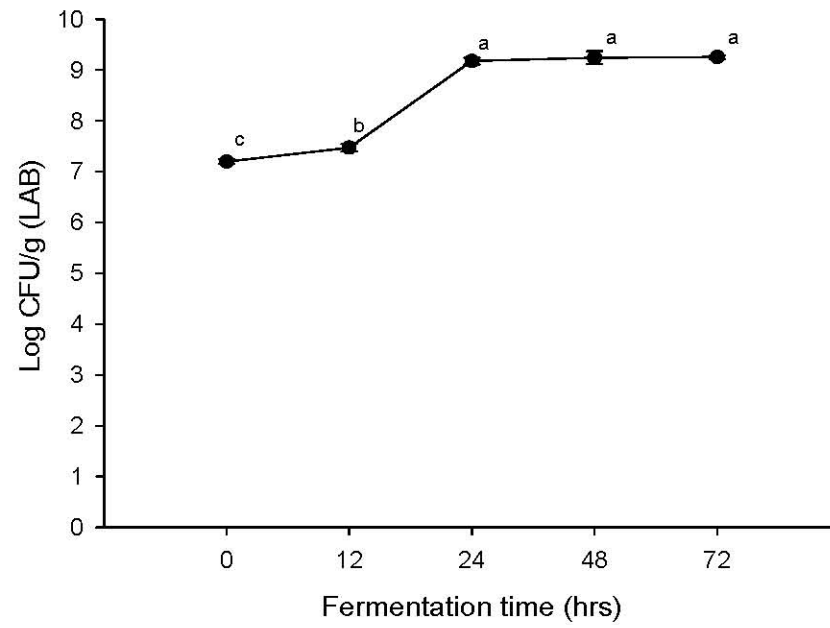
유산균+효모의 발효시간에 따른 생균수 중 유산균의(그림 1-5, B) 함량은, 0 시간 log 7.20 CFU/g, 12 시간 log 7.47 CFU/g, 24 시간 log 9.17 CFU/g, 48시간 log 9.24CFU/g, 72시간 log 9.25CFU/g으로 나타났다. 발효 24시간까지 증가 하였으며, 48시간 이후에는 유의적으로 증가 하지 않았다( $P < 0.05$ ).

유산균+효모의 발효시간에 따른 생균수 중 효모의(그림 1-5, C) 함량은, 0 시간 log 6.13 CFU/g, 12 시간 log 6.25 CFU/g, 24 시간 log 7.89 CFU/g, 48시간 log 8.23 CFU/g, 72시간 log 8.20 CFU/g으로 나타났다. 발효 48시간까지 증가 하였으며, 72시간에는 유의적으로 증가 하지 않았다( $P < 0.05$ ).

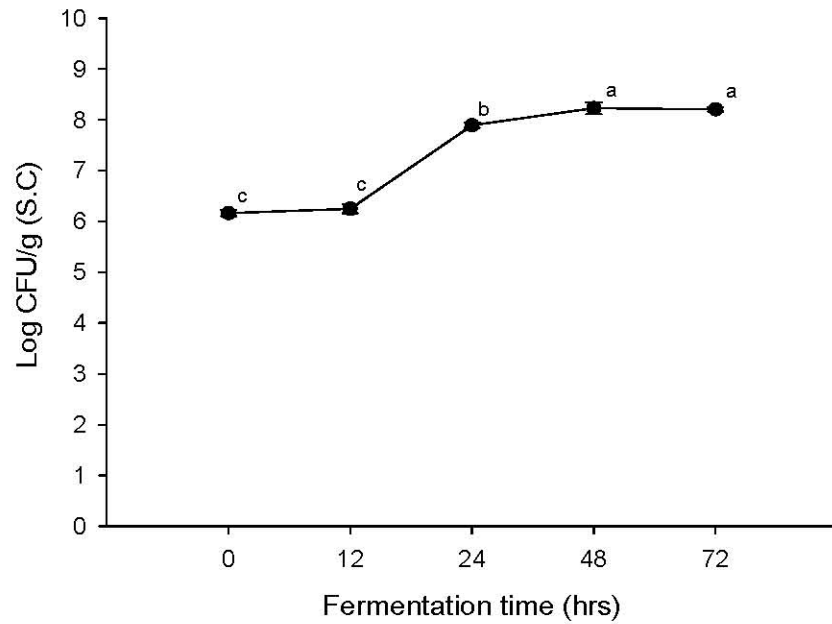
이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 생균수 함량은 바실러스와 유산균은 log 9.10 CFU/g, 효모는 log 8.10 CFU/g 이상 배양 되었으며, 생균수를 위한 최적 발효시간은 48시간으로 나타났다( $P < 0.05$ ).



(A)



(B)



(C)

그림 1-5. 발효과정 중의 생균수의 변화

(A): *Bacillus subtilis*, (B): lactic acid bacteria, (C): *Saccharomyces cerevisiae*.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

## (2) 총당, 환원당과 유리당조성

바실러스, 유산균+효모의 발효공정으로 의한 총당, 환원당, 유리당 함량의 변화를 알아보기 위해 총당, 환원당 및 유리당(fructose, glucose, sucrose, galactose, maltose, mannose, lactose, xylose)에 대하여 조사하였다.

그림 1-6과 같이 발효시간에 따른 총당(A) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스의 총당 함량은 감소하였으며, 유산균+효모는 48시간 까지 감소하다 72시간에서는 총당 함량의 차이가 나타나지 않았다. 바실러스는 72시간 발효 시 78.77mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 84.63mg/g로 나타나 무처리구 160.07mg/g 보다, 각각 81.90mg/g, 75.44mg/g 감소되었다( $P < 0.05$ ).

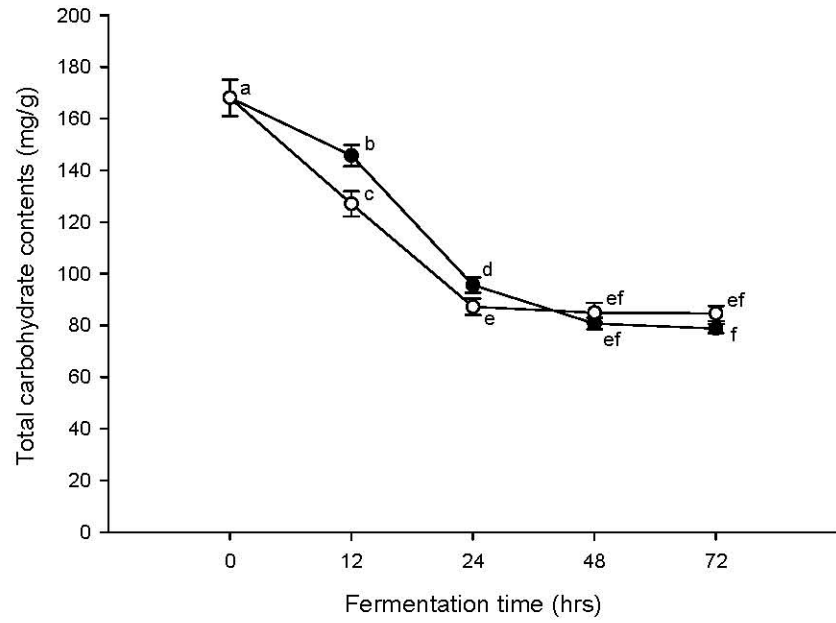
발효시간에 따른 환원당 (그림 1-6, B) 함량은, 발효시간이 증가 할수록, 바실러스의 발효공정 12시간을 제외하고 환원당 함량은 대조구에 비해 바실러스, 유산균+효모 모두 증가하였다. 바실러스는 24시간, 유산균+효모는 각각 27.51mg/g, 6.92mg/g로 최고치를 나타내었다가, 시간이 경과할수록 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 6.05mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 3.20mg/g로 나타나 무처리구 1.89mg/g 보다, 각각 4.16mg/g, 1.31mg/g 증가하였다( $P < 0.05$ ).

유리당 함량의 변화를 알아보기 위해 fructose, glucose, sucrose, galactose, maltose, mannose, lactose와 xylose에 대하여 조사하였다. Fructose(그림 1-6, C) 함량은, 바실러스, 유산균+효모는 12시간에 각각 0.63%, 1.15%로 최고치를 나타내었다가, 시간이 경과할수록 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0.21%로 나타나 무처리구 0% 보다, 각각 0%, 0.21% 증가하였다( $P < 0.05$ ). Glucose(그림 1-6, D) 함량은, 바실러스, 유산균+효모는 0시간(대조구)에 3.96%로 최고치를 나타내었다가, 시간이 경과할수록 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0.07%로 나타나 무처리구 3.96% 보다, 각각 0%, 3.89% 감소하였다( $P < 0.05$ ). Glucose(그림 1-6, E) 함량은, 바실러스, 유산균+효모는 12시간에 각각 4.22%, 2.24%로 최고치를 나타내었다가, 시간이 경과할수록 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0%로 나타나 무처리구 0%와 동일하게 나타나,

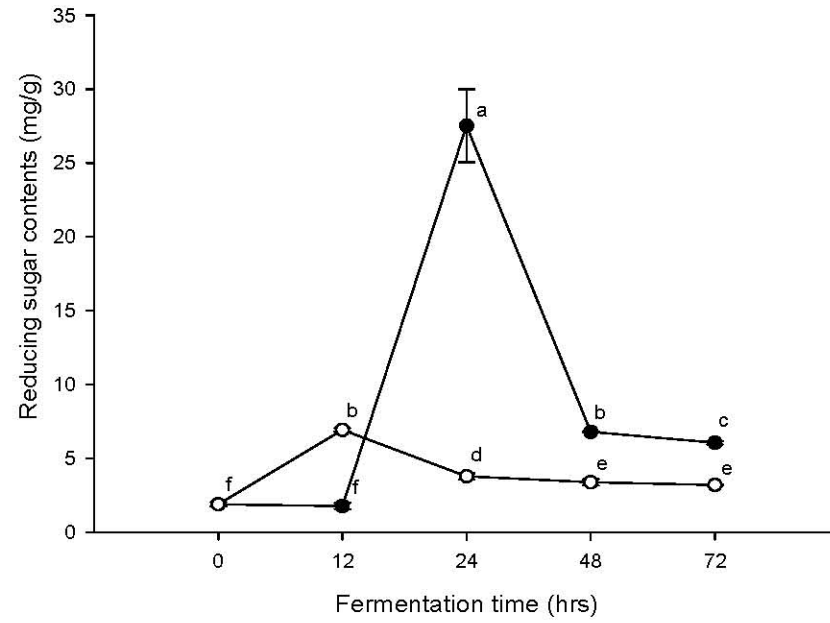


48시간이 경과되기전에 모두 소진되는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 그 외 galactose, maltose, mannose, lactose와 xylose에 대하여 조사하였으나, 검출되지 않은 것으로 나타났으나, fructose, glucose와 sucrose의 발효과정 중의 빠르게 감소되는 유리당 함량 변화결과와 비교해 보았을 때, 적은 함량의 유리당은 발효과정 중에 바로 소진되는 것으로 판단된다.

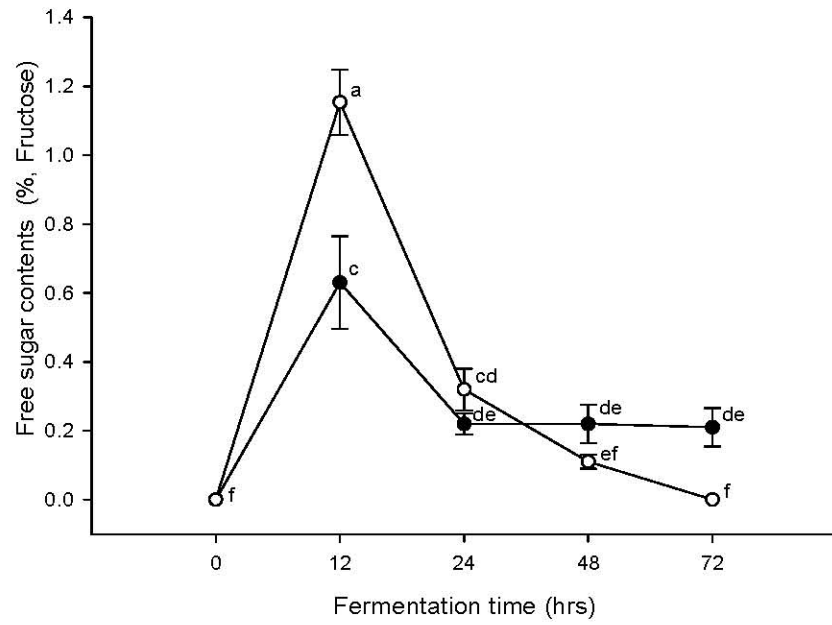
이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 총당은 모두 감소하였고, 환원당은 바실러스 12시간 처리구를 제외하고 모두 증가하였고, 유리당(fructose, glucose, sucrose, galactose, maltose, mannose, lactose, xylose)은 fructose, glucose와 sucrose는 0시간이나 12시간 전후로 함량이 최고치로 나타났으나, 발효과정 중에 매우 빠르게 미생물에 의해 사용되어 감소되는 것으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 또한 유리당 중 galactose, maltose, mannose, lactose, xylose는 검출되지 않았으나, 이는 적은 함량의 유리당은 발효과정 중에 바로 소진되어 검출되지 않은 것으로 판단된다.



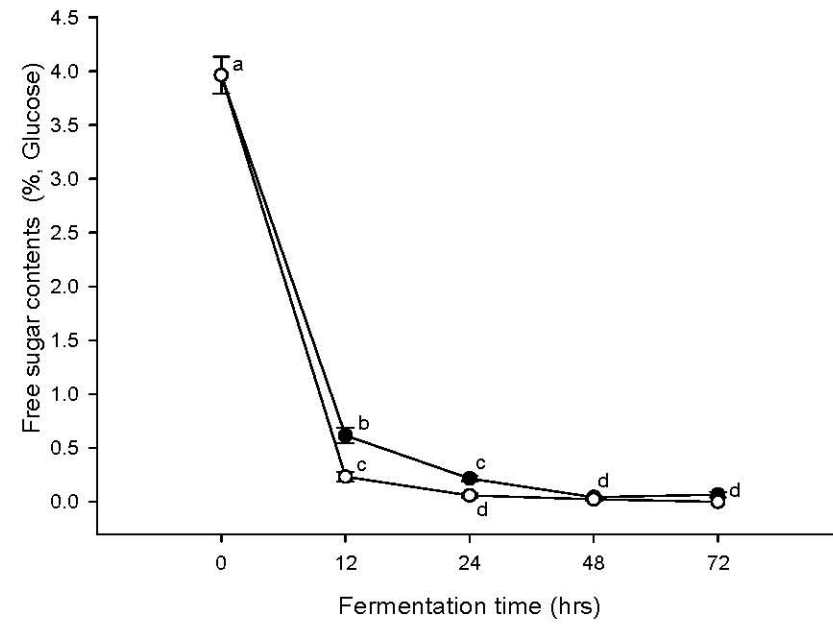
(A)



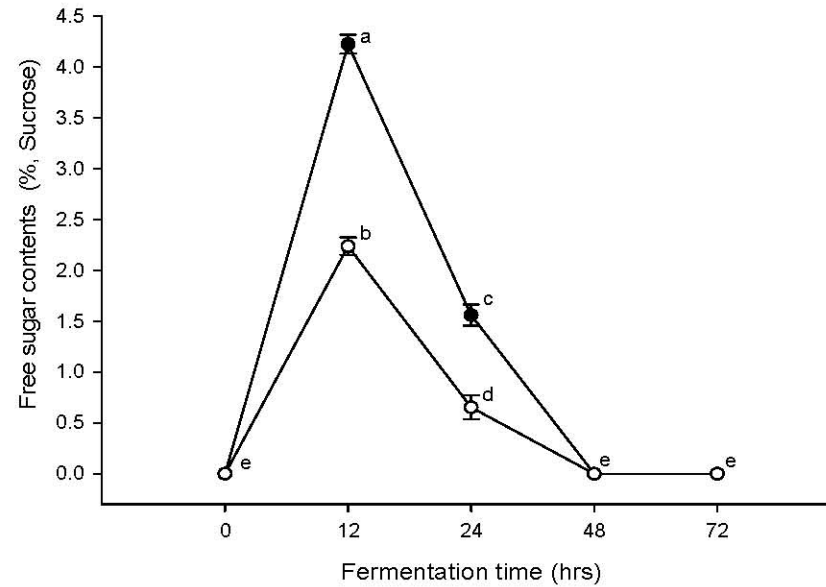
(B)



(C)



(D)



(E)

그림 1-6. 발효과정 중의 총당, 환원당과 유리당의 변화

(A): Total carbohydrate contents, (B): Reducing sugar contents, (C): Free sugar contents(Fructose), (D): Free sugar contents(Glucose), (E): Free sugar contents(Sucrose), ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

### (3) SDS-PAGE

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 펩타이드의 변화 패턴을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 그림 1-7과 같이 발효시간에 따른 SDS-PAGE 결과는, 바실러스는 48시간부터 매우 광범위하고, 강하게 펩타이드를 저분자화 시키는 것으로 나타났으며, 유산균+효모는 12시간부터, 43-72kDa의 여러 가지 밴드가 약하게 검출되는 것으로 보았을 때, 저분자화 효과를 나타내는 것으로 판단되나, 바실러스에 비하여 그 효과는 약하였다. 이와 같이 SDS-PAGE 분석결과 바실러스는 유산균+효모보다 저분자화 효과가 더 강하게 나타났다.

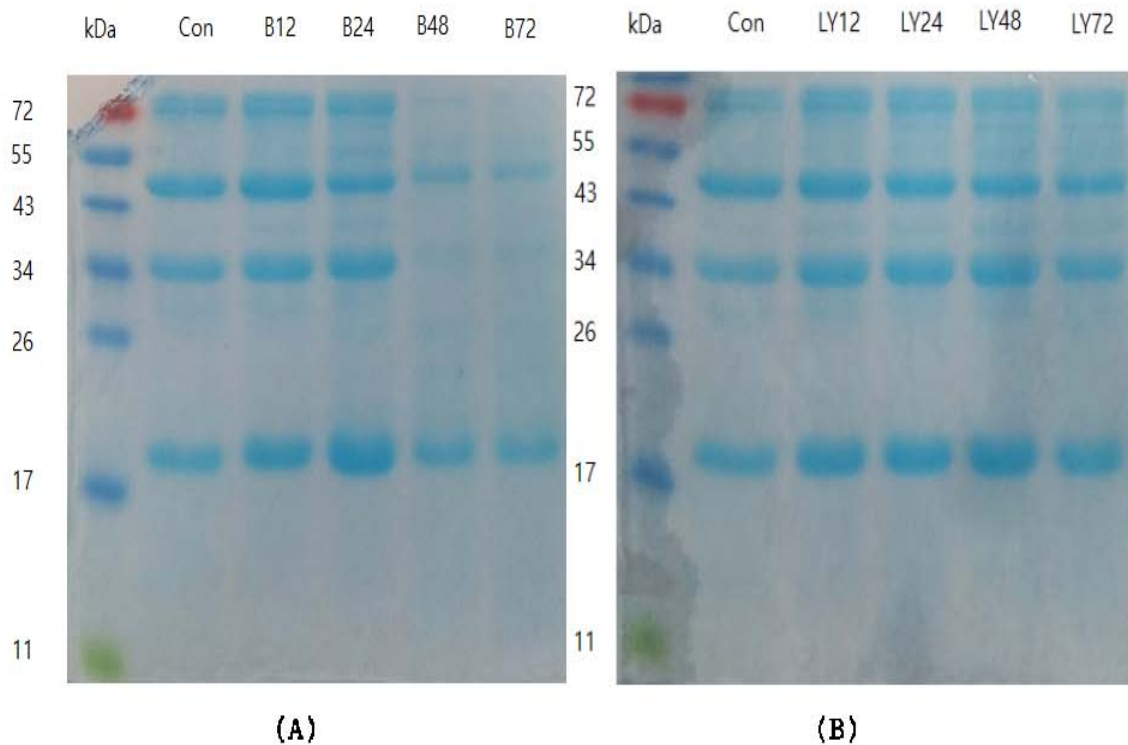


그림 1-7. 발효물의 SDS-PAGE(전기영동)

(A): *Bacillus subtilis*, (B): Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

#### (4) 조사포닌

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 조사포닌 함량 변화에 대하여 조사하였다. 그림 1-8과 같이 발효시간에 따른 조사포닌 함량은, 발효시간이 증가할수록, 모두 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 3.03%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 1.96%로 나타나 무처리구 0.73% 보다, 각각 2.30%, 1.23% 증가되었다 ( $P<0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 조사포닌 함량변화는, 대조구에 비해 모두 증가하였으며, 유산균+효모보다 바실러스 사용 시, 조사포닌 함량은 더 증가 하였다( $P<0.05$ ).

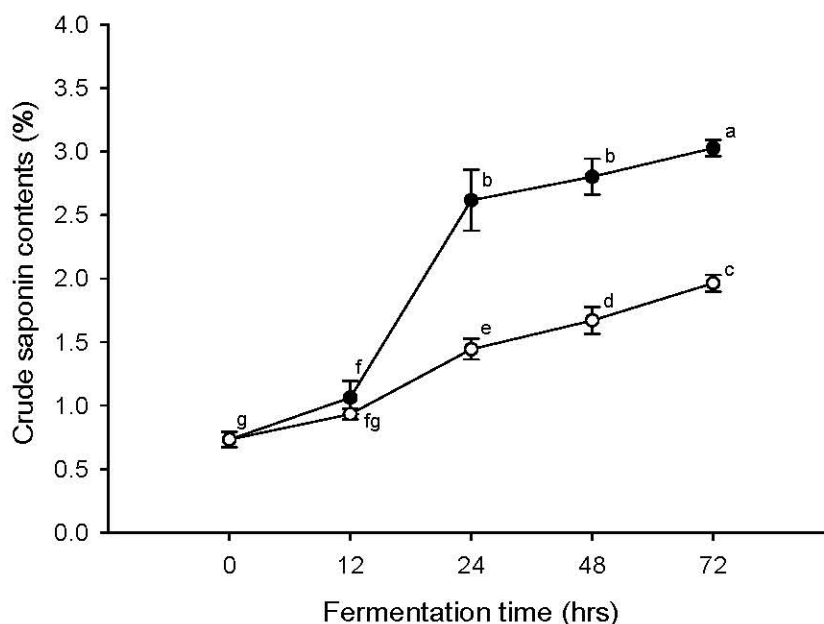


그림 1-8. 발효과정 중의 조사포닌의 변화

●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P<0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

(5) 유기산, pH

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 유기산(초산, 젖산, 프로피온산)과 pH에 대하여 조사하였다. 그림 1-9와 같이 발효시간에 따른 유기산 중 초산(A)의 함량은, 바실러스는 초산을 분비하지 않았으나, 유산균+효모는 발효시간이 증가할수록 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 3.13%로 나타나 무처리구 0% 보다, 각각 0%, 3.13% 증가되었다( $P < 0.05$ ).

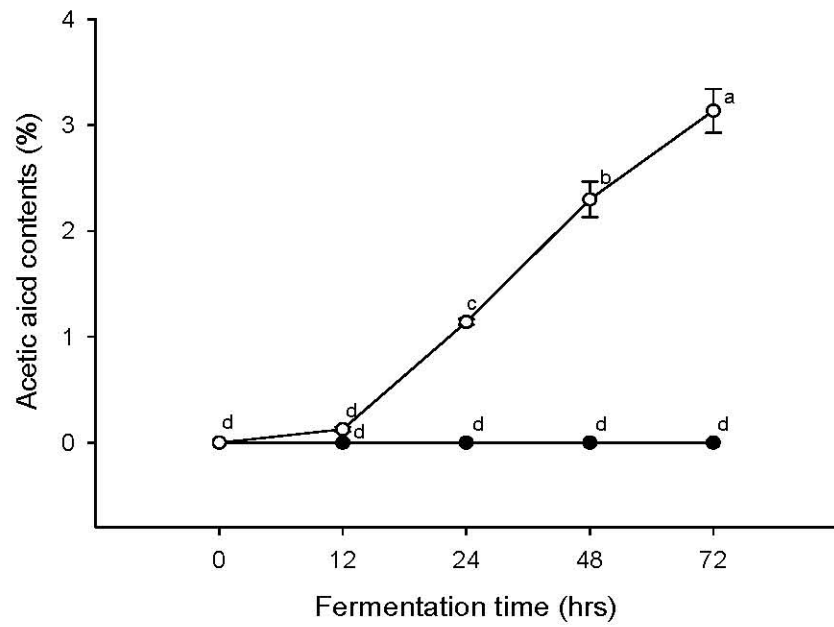
발효시간에 따른 유기산 중 젖산(그림 1-9, B)의 함량은, 바실러스는 젖산을 분비하지 않았으나, 유산균+효모는 24시간에 3.76%로 최고치를 나타내었다가, 발효시간이 증가 할수록 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 1.79%로 나타나 무처리구 0% 보다, 각각 0%, 1.79% 증가되었다( $P < 0.05$ ).

발효시간에 따른 유기산 중 프로피온산(그림 1-9, C)의 함량은, 바실러스는 프로피온산을 분비하지 않았으나, 유산균+효모는 발효시간이 증가 할수록 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 0mg/kg, 유산균+효모는 72시간 발효 시 407.58mg/kg로 나타나 무처리구 0mg/kg 보다, 각각 0mg/kg, 407.58mg/kg 증가되었다( $P < 0.05$ ).

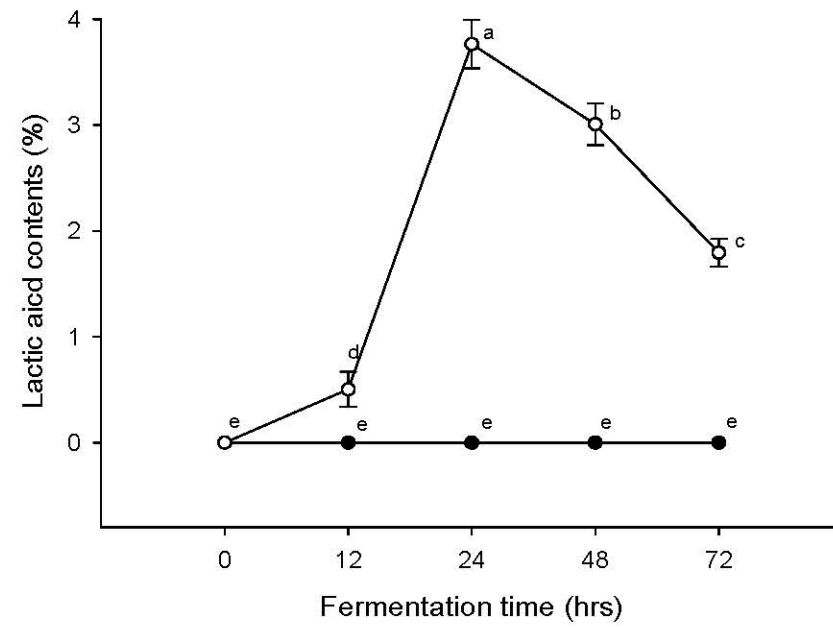
발효시간에 따른 pH(그림 1-9, D) 값은, 바실러스는 발효시간이 증가할수록 증가하였으며, 유산균+효모는 발효시간이 증가 할수록 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 7.27, 유산균+효모는 72시간 발효 시 5.01로 나타나 무처리구 5.89보다, 각각 +1.38, -0.88으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 바실러스는 유기산을 분비하지 않았으며, 유산균+효모는 발효과정 중 초산, 젖산 및 프로피온산을 분비하였다. pH 값은 바실러스는 발효시간이 증가할수록 증가하였으며, 유산균+효모는 발효시간이 증가 할수록 감소하였다( $P < 0.05$ ).

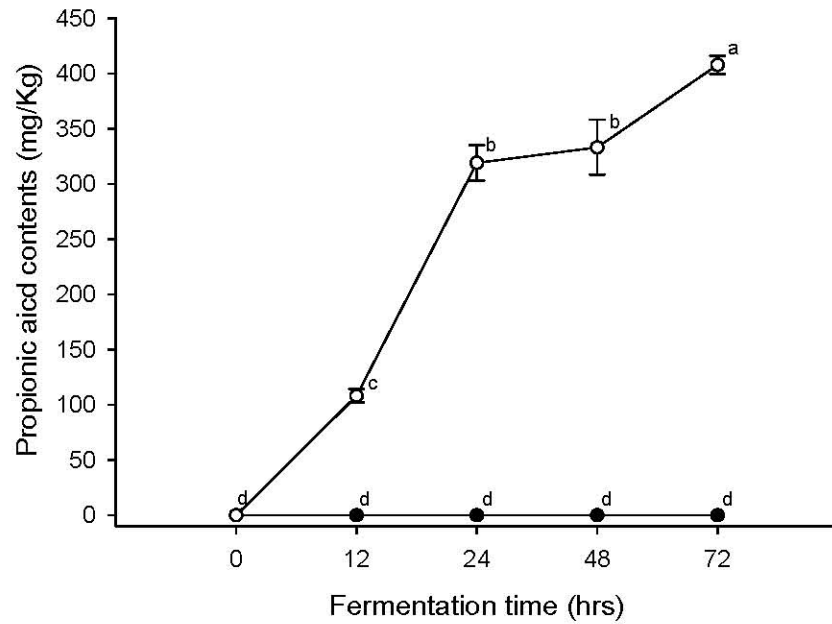




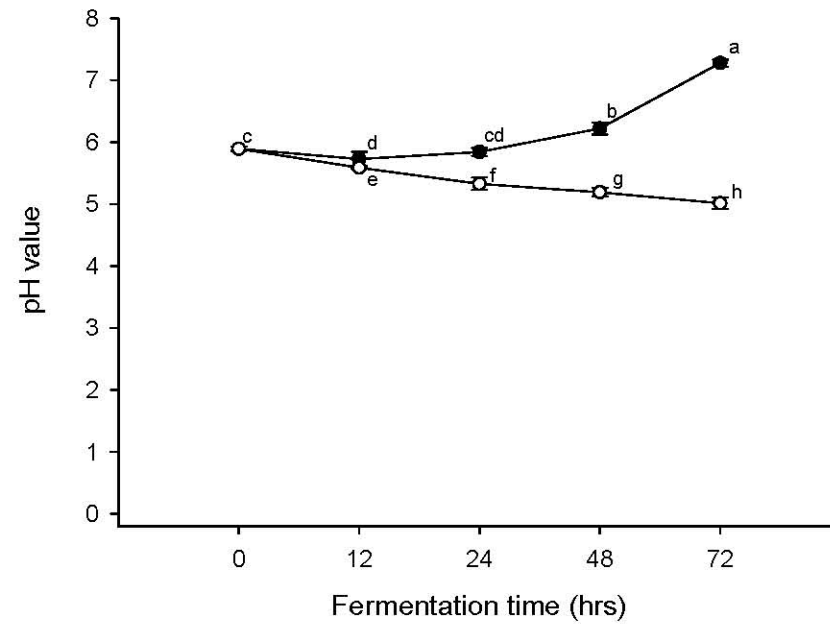
(A)



(B)



(C)



(D)

그림 1-9. 발효과정 중의 유기산과 pH의 변화

(A): Acetic acid contents, (B): Lactic acid contents, (C): Propionic acid contents, (D): pH value, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

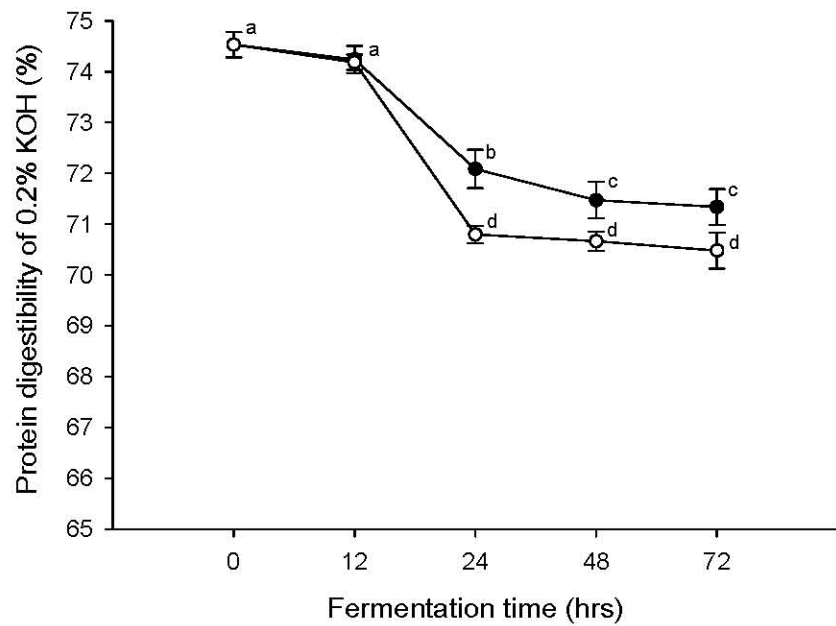
(6) KOH 용해도, 펩신 소화율, Urease activity(U.A)

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 0.2% KOH 용해도, 0.2% pepsin 소화율 및 우레아제 값(U.A)에 대하여 조사하였다. 지나친 열처리는 필수아미노산을 파괴하여 단백질의 이용성을 저하시키며, KOH 용해도는 열처리된 식물성 박류에 있어서 단백질의 품질을 측정하는데 이용된다. 그림 1-10과 같이 발효시간에 따른 0.2% KOH(A)의 함량은, 바실러스는와 유산균+효모는 발효 24시간 이후 부터 발효과정 중에 생기는 발효열에 의하여 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 71.34%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 70.48%로 나타나 무처리구 74.53% 보다, 각각 3.19%, 4.05% 감소되었다( $P < 0.05$ ). 그러나 KOH 용해도 값이 70% 이상이 되기 때문에 발효과정 중에 KOH 용해도 저하에 인한, 단백질의 이용성 문제에 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

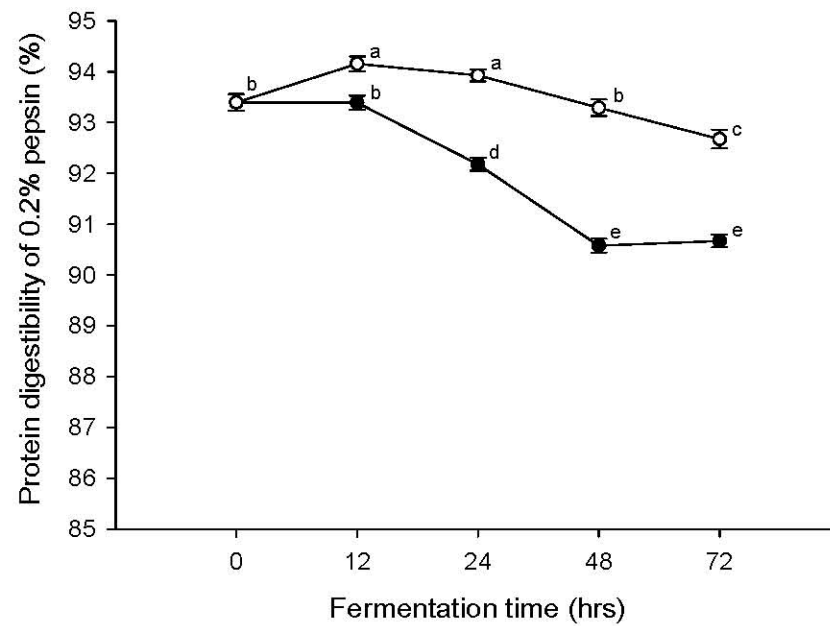
펩신은 이용가능한 단백질을 가수분해하여, 분자량이 적은 펩타이드나 아미노산으로 만들어 주는 Endopeptidase의 하나이며, 주세포속에서 비활성형인 펩시노젠으로 존재하여 분비되지만 염산(HCl)의 작용에 의해 활성을 가진 펩신으로 전변된다. 발효시간에 따른 0.2% 펩신 소화율(그림 1-10, B)의 함량은, 바실러스는와 유산균+효모는 각각 발효 24, 48시간 이후 부터 발효과정 중에 생기는 발효열에 의하여 감소하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 90.67%, 유산균+효모는 72시간 발효 시 92.67%로 나타나 무처리구 93.39% 보다, 각각 2.72%, 0.72% 감소되었다( $P < 0.05$ ). 그러나 펩신 소화율 값이 90% 이상이며, 어분의 경우 펩신소화율이 70% 이하일 경우 단백질의 이용성이 떨어질 수 있다는 보고와 비교하였을 때, 발효과정 중에 펩신 소화율 저하에 인한, 단백질의 이용성 문제에 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

열처리가 잘 안된 대두박은 Urease activity(U.A)가 높은 경향이 있어, 열처리가 잘 안된 대두박을 검출하는데 이용이 되고 있다. 일반적으로 U.A가 0.3 이상인 경우 품질저하가 나타난다. 따라서 발효시간에 따른 U.A(그림 1-10, C)의 함량을 검사하였으나, 바실러스와 유산균+효모의 발효과정 중에 유의적인 변화는 나타나지 않았다( $P > 0.05$ ).

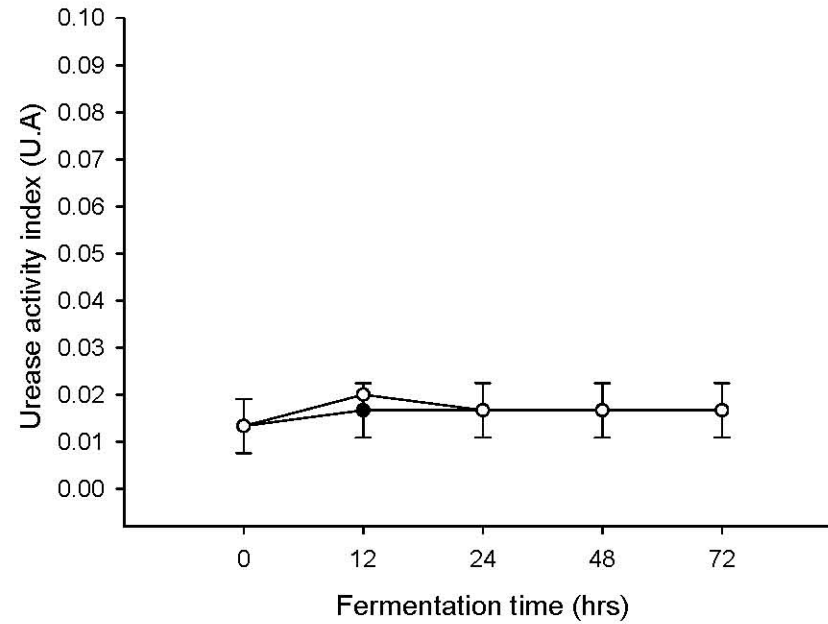
이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 KOH 용해도, 펩신 소화율은 발효과정 중에 감소하였으나( $P < 0.05$ ), 그 수준이 단백질의 이용성 문제에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되며, Urease activity(U.A)는 유의적인 변화를 나타내지 않았다.



(A)



(B)



(C)

그림 1-10. 발효과정 중의 0.2% KOH와 0.2% pepsin 소화율과 U.A 의 변화

(A): 0.2% KOH, (B): 0.2% pepsin, (C): Urease activity index, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-e) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

### (7) 소화효소

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 소화효소 중 a-amylase, protease, CMC-cellulase, xylanase 및 B-mannanase 대하여 조사하였다. 그림 1-11 과 같이 발효시간에 따른 소화효소 중 a-amylase(A)의 함량은, 바실러스는 발효시간이 증가할수록 a-amylase의 함량은 소량 증가하였고, 유산균+효모는 효소활성을 소량 나타내다 소실되었다. 바실러스는 72시간 발효 시 50.69 unit/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0 unit/g로 나타나 무처리구 0 unit/g 보다, 각각 50.69 unit/g, 0 unit/g 증가되었다( $P<0.05$ ).

발효시간에 따른 소화효소 중 protease(그림 1-11, B)의 함량은, 바실러스는 발효시간이 증가할수록 protease의 함량은 소량 증가하였고, 유산균+효모는 효소활성을 소량 나타내다 소실되었다. 바실러스는 72시간 발효 시 71.71 unit/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0 unit/g로 나타나 무처리구 0 unit/g 보다, 각각 71.71 unit/g, 0 unit/g 증가되었다( $P<0.05$ ).

발효시간에 따른 소화효소 중 CMC-cellulase(그림 1-11, C)의 함량은, 바실러스는 발효시간이 증가할수록 CMC-cellulase의 함량은 소량 증가하였고, 유산균+효모는 효소활성을 소량 나타내다 소실되었다. 바실러스는 72시간 발효 시 68.41 unit/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 0 unit/g로 나타나 무처리구 0 unit/g 보다, 각각 68.41 unit/g, 0 unit/g 증가되었다( $P<0.05$ ).

발효시간에 따른 소화효소 중 xylanase(그림 1-11, D)의 함량은, 바실러스는 발효 24시간에 545.61 unit/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 발효시간이 증가할수록 xylanase의 함량은 감소하였으며, 유산균+효모는 발효시간이 증가할수록 xylanase의 함량이 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 513.84 unit/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 313.54 unit/g로 나타나 무처리구 0 unit/g 보다, 각각 513.84 unit/g, 313.54 unit/g 증가되었다( $P<0.05$ ).

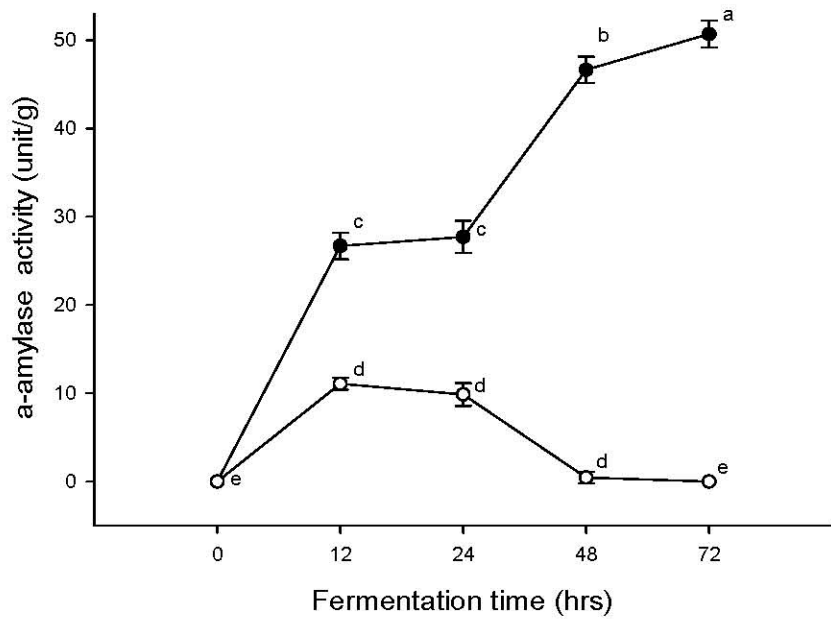
발효시간에 따른 소화효소 중 B-mannanase(그림 1-11, E)의 함량은, 바실러스는 발효 24시간에 4378.11 unit/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 발효시간이



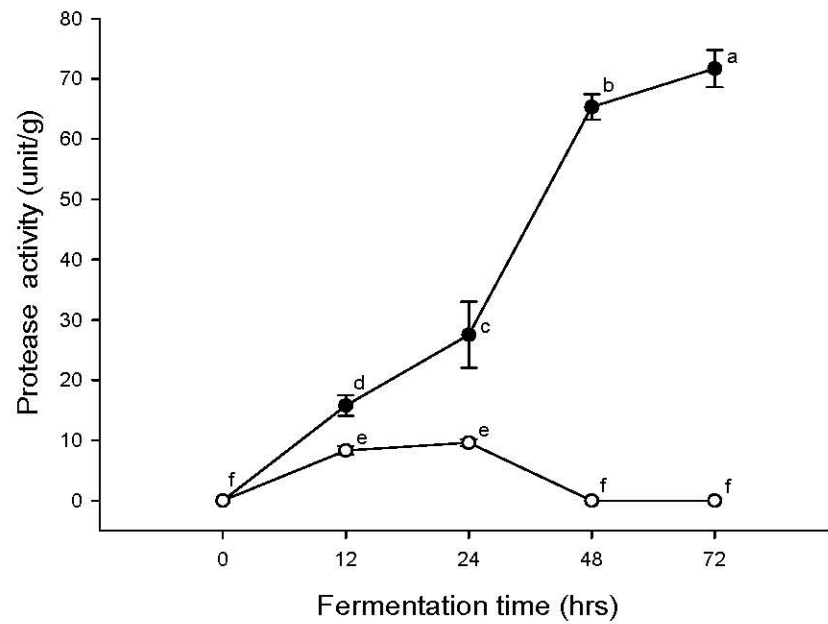
증가할수록 B-mannanase의 함량은 감소하였으며, 유산균+효모는 발효시간이 증가할수록 B-mannanase의 함량이 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 987.83 unit/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 310.38 unit/g로 나타나 무처리구 0 unit/g 보다, 각각 987.83 unit/g, 310.38 unit/g 증가되었다( $P < 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중  $\alpha$ -amylase, protease, CMC-cellulase의 분비는 바실러스에서만 100 unit/g 미만의 효소활성을 나타내었으며, 유산균+효모는 매우 적은 양의 효소활성을 나타내다 소진되었다( $P < 0.05$ ). Xylanase 및 B-mannanase 분비는 바실러스가 유산균+효모보다 높게 나타났으며, 특히 바실러스에서 분비된 B-mannanase의 함량이 24시간에 매우 높게 나타났다.

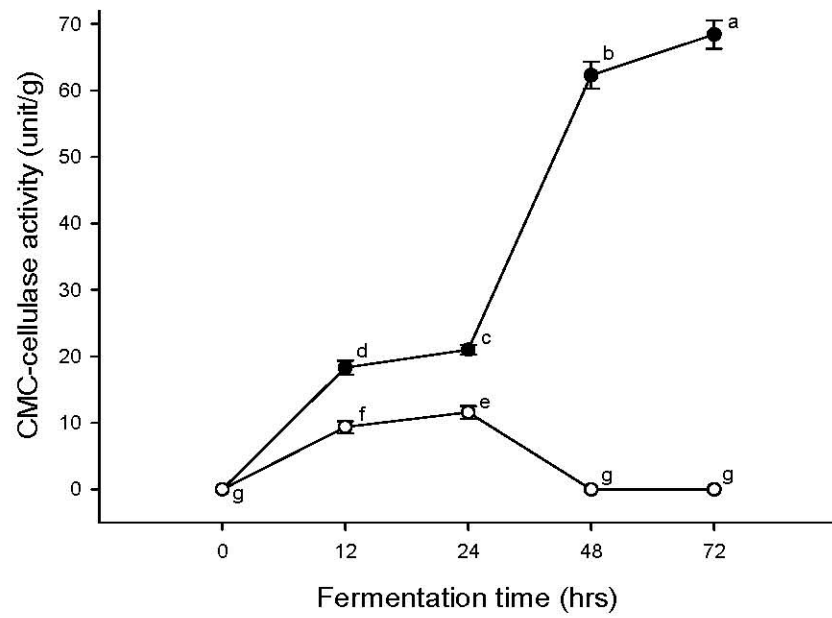
따라서 발효공정 중에 분비되는 B-mannanase을 위하여, 바실러스의 전반적인 생리활성 결과를 보았을 때, 발효공정 시간을 72시간에서 24시간으로 조정하는게 바람직한 것으로 판단된다.



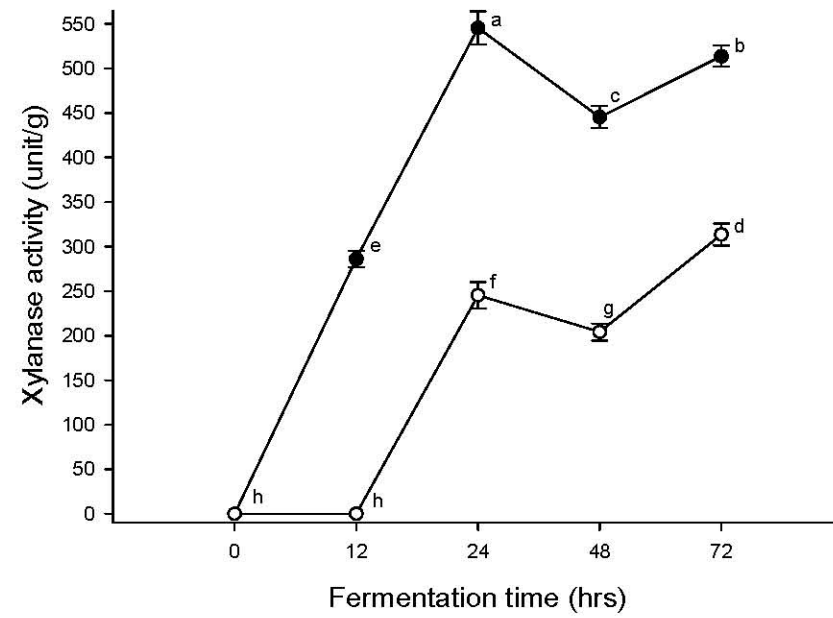
(A)



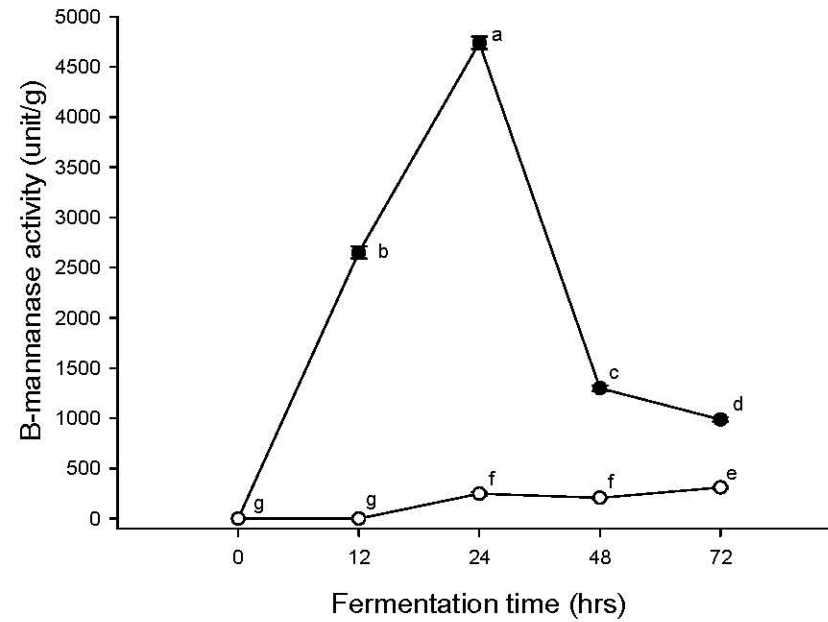
(B)



(C)



(D)



(E)

그림 1-11. 발효과정 중의 소화효소의 변화

(A):  $\alpha$ -amylase activity, (B): Protease activity, (C): CMC-cellulase activity, (D): Xylanase activity, (E): B-mannanase activity, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

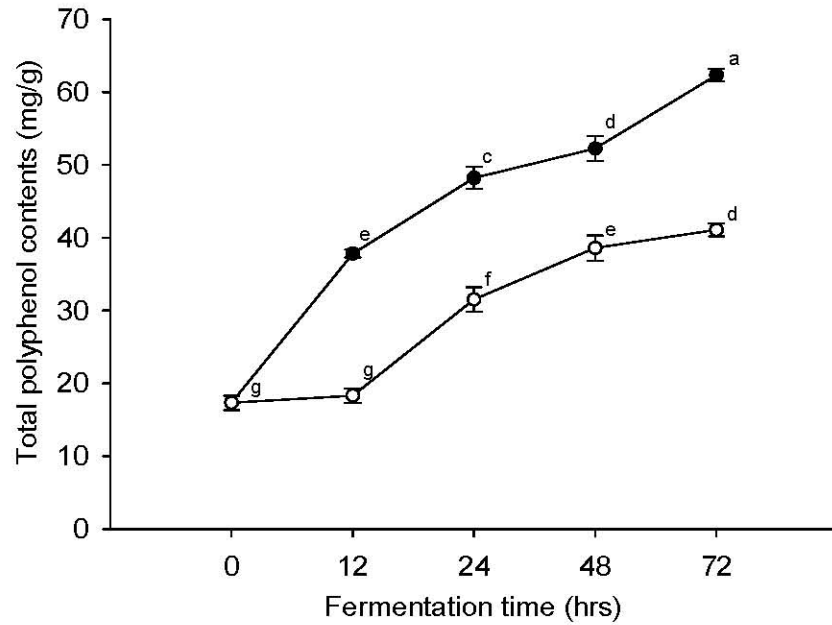
Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

(8) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드

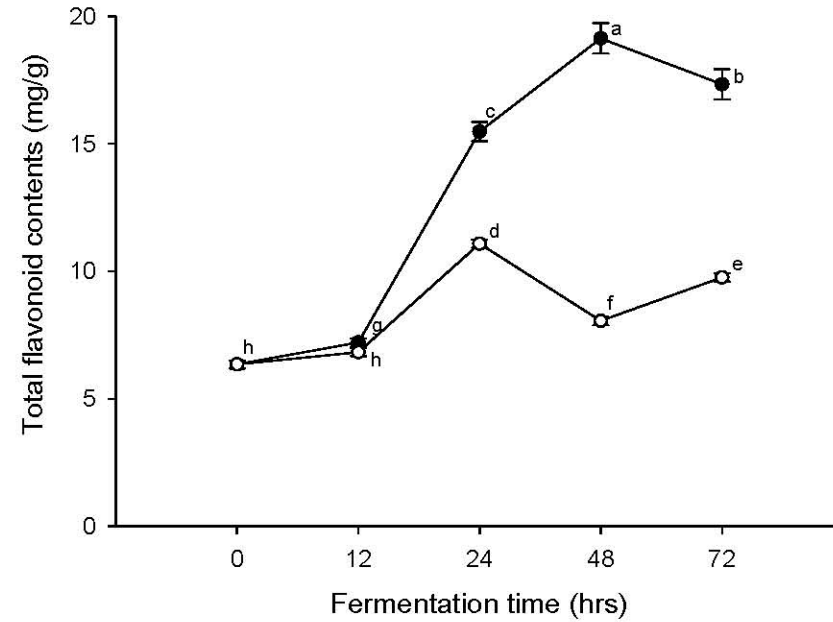
바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드에 대하여 조사하였다. 그림 1-12와 같이 발효시간에 따른 총 폴리페놀(A)의 함량은, 바실러스 및 유산균+효모는 발효시간이 증가할수록 함량은 증가하였다. 바실러스는 72시간 발효 시 62.33mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 41.09mg/g로 나타나 무처리구 17.35mg/g 보다, 각각 44.98mg/g, 23.74mg/g 증가되었다( $P < 0.05$ ).

발효시간에 따른 총 플라보노이드(그림 1-12, B)의 함량은, 바실러스는 발효 48시간에 17.33mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 유산균+효모는 48시간에 11.08mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 바실러스는 72시간 발효 시 17.33mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 9.76mg/g로 나타나 무처리구 6.35mg/g보다, 각각 10.98mg/g, 3.41mg/g 증가되었다( $P < 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량은 대조구에 비해 증가하였으며, 바실러스의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 전환능력이 유산균+효모보다 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).



(A)



(B)

그림 1-12. 발효과정 중의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 변화

(A): Total polyphenol contents, (B): Total flavonoid contents, ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

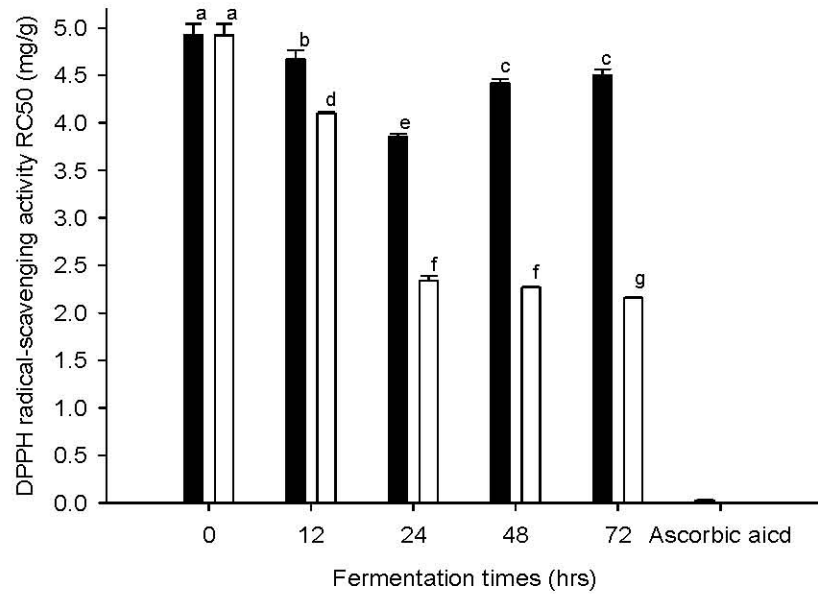
Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

(9) 항산화활성(DPPH, ABTS)

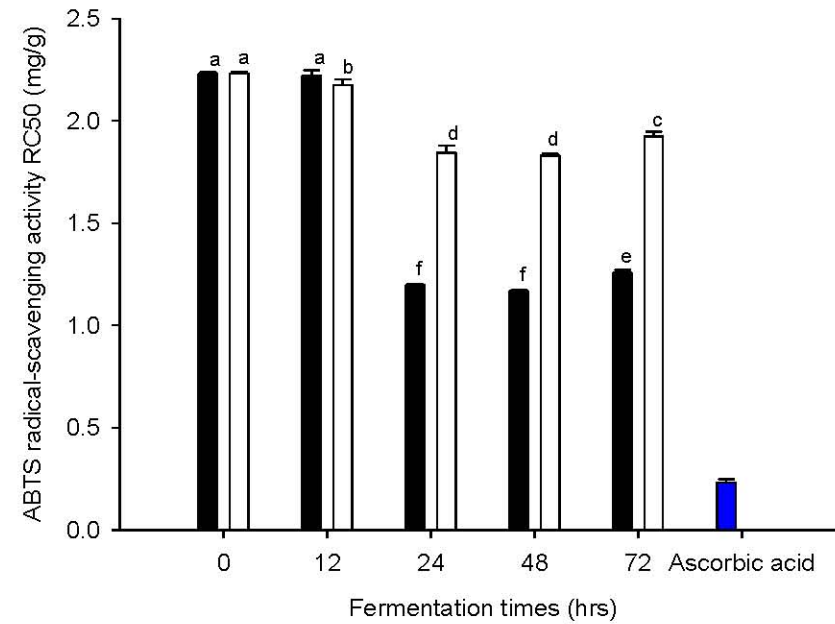
바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 항산화활성 중 DPPH 및 ABTS radical 소거능에 대하여 조사하였다. 그림 1-13와 같이 발효시간에 따른 DPPH radical 소거능(A)의 RC50은, 바실러스는 발효 24시간에 3.85mg/g으로 가장 높은 소거능을 나타내었고, 유산균+효모는 48시간에 2.16mg/g으로 가장 높은 소거능을 나타내었다. 바실러스는 72시간 발효 시 4.5mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 2.16mg/g로 나타나 무처리구 4.92mg/g(비타민 C, 0.03mg/g) 보다, 각각 1.07mg/g, 2.34mg/g 소거능이 증가되었다( $P < 0.05$ ).

발효시간에 따른 ABTS radical 소거능(그림 1-13, B)은, 바실러스는 발효 48시간에 1.17mg/g으로 가장 높은 소거능을 나타내었고, 유산균+효모는 48시간에 1.83mg/g으로 가장 높은 소거능을 나타내었다. 바실러스는 72시간 발효 시 1.25mg/g, 유산균+효모는 72시간 발효 시 1.92mg/g로 나타나 무처리구 2.23mg/g(비타민 C, 0.25mg/g)보다, 각각 0.98mg/g, 0.31mg/g 소거능이 증가되었다( $P < 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효과정 중 항산화활성 중 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 대조구에 비해 증가하였으며, DPPH radical 소거능은 바실러스가 ABTS radical 소거능은 유산균+효모가 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).



(A)



(B)

그림 1-13. 발효과정 중의 항산화활성의 변화

(A): DPPH(RC50), (B): ABTS(RC50), ●: *Bacillus subtilis*, ○: Co-culture(lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*).

Different superscripts(a-g) in the same row indicate significantly( $P<0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.



#### (10) 총 이소플라본

바실러스, 유산균+효모의 발효공정에 의한 총 이소플라본(daidzin, genistin, daidzein, genistein, total glucoside, total aglycon, total isoflavone, conversion ratio of total aglycon)에 대하여 조사하였다. Tabel 1-2와 같이 daidzin 및 genistin 함량은 발효시간이 증가할수록 감소되었으며, daidzein 및 genistein 함량은 발효시간이 증가할수록 증가하였다.

특히 바실러스는 daidzein으로 전환된 함량이 높았으나, 유산균+효모는 daidzein 및 genistein으로 모두 전환되는 함량이 높게 나타났다. Total glucoside(daidzin + genistin) 함량은 발효시간이 증가할수록 감소하였다.

Total glucoside보다 total aglycon의 효과가 5-10배 정도 이상 된다는 보고가 되어 있으며, 총 이소플라본 함량에 가장 중요한 요소인 total aglycon(daidzein + genistein) 함량은 발효시간이 증가할수록 증가하였으며, 바실러스가 72시간에 316.46mg/kg, 유산균이 688.77mg/kg로 나타나 무처리구 32.72mg/kg 보다, 각각 283.74mg/kg, 656.05mg/kg 높게 나타났다.

Total isoflavone의 함량은 발효시간이 증가할수록 감소하였으며, 바실러스가 72시간에 956.16mg/kg, 유산균이 1013.82mg/kg로 나타나 무처리구 1378.15mg/kg 보다, 각각 421.99mg/kg, 364.33mg/kg 낮게 나타났다

그러나 total glucoside의 total aglycon으로의 전환비율은 발효시간이 증가할수록 증가하였으며, 바실러스가 72시간에 33.27%, 유산균이 67.94%로 나타나 무처리구 2.37% 보다, 각각 30.90%, 65.57% 높게 나타났다.

이와 같이 발효공정 중에 total isoflavone의 함량은 감소하였으나, total aglycon으로의 전환비율이 매우 높게 전환되어, isoflavone의 이용율이 증가되었다. 바실러스는 total aglycon 중 daidzein으로 전환하는 효과가 높았으나, 유산균+효모는 daidzein 및 genistein 모두다 전환하는 효과가 높게 나타났다.

따라서 발효공정 중에 분비되는 total aglycon을 위하여, 유산균+효모의 전반적인 생리활성 결과를 보았을 때, 발효공정 시간 72시간으로 하는게 바람직한 것으로 판단된다.

Table 1-2. 발효과정 중의 총 이소플라본의 변화

(mg/Kg)

	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total glucoside	Total aglycon	Total Isoflavone	Conversion ratio of total aglycon (%)
Control	118.44	1226.98	17.00	15.72	1345.43	32.72	1378.15	2.37
Fermentaion process of <i>Bacillus subtilis</i> , hrs								
12	102.05	1206.12	39.60	36.88	1308.17	76.48	1384.65	5.52
24	72.95	902.70	86.83	47.41	975.66	134.24	1109.89	12.09
48	42.84	569.55	160.44	41.73	612.39	202.17	814.55	24.82
72	42.75	591.95	229.34	87.12	634.70	316.46	951.16	33.27
Fermentaion process of co-culture (lactic acid bacteria, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), hrs								
12	85.61	1130.32	26.30	24.60	1215.94	50.90	1266.83	4.01
24	96.78	1284.76	218.68	224.84	1381.54	443.52	1825.06	24.30
48	17.55	396.51	276.68	290.38	414.06	567.06	981.12	57.79
72	15.59	309.46	365.68	323.10	325.05	688.77	1013.82	67.94

### 3. 요약

대두박을 이용한 Tray-발효과정(scale-up, 200Kg)의 생리활성을 검정하여, 발효과정 중 생균수 이외의 QC 지표를 설정하기 위하여, 1) 일반성분과 무기질, 2) 항영양성분, 3) 생균수, 4) 생리활성 변화에 대해 조사하였다.

발효과정 중에 일반성분인 조단백질, 조섬유, 조회분, 조지방, 무기질인 칼슘과 인 및 아미노산 함량이 증가하였으며, 항영양성분인 트립신 인히비터, 스타키오스 및 라피노오스의 함량은 감소하였다. 이 생리활성 성분 중에 가장 큰 변화를 나타낸 조단백질 함량을 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

발효과정 중 분비되는 생리활성 성분인 총당, 환원당과 유리당 조성 중 총당은 발효시간이 증가할수록 함량이 감소하는 폭이 크게 나타나 총당 함량을 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

조사포닌 함량은 발효 시간이 증가할수록 함량이 증가하였고, 유기산은 바실러스는 분비되지 않았고, 유산균+효모는 초산, 젖산 및 프로피온산을 분비하였다. 또한 pH는 바실러스는 발효시간이 증가할수록 pH 값이 증가하였고, 유산균+효모는 발효시간이 증가할수록 감소하여 뚜렷한 차이를 나타내었다. pH를 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

SDS-PAGE(전기영동)의 밴드 패턴은 바실러스와 유산균+효모의 뚜렷한 저분자화 능력을 육안으로 관찰할 수 있어, SDS-PAGE를 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

소화효소 중 B-mannanase의 효소활성이 바실러스와 유산균+효모의 뚜렷한 차이를 나타내었으며, 발효과정 중에 많은 효소분비를 하여 B-mannanase 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 발효과정 중에 증가하였고, 항산화활

성(DPPH, ABTS) 또한 증가하였다. 이 생리활성 성분 중에 총 폴리페놀 함량의 변화가 뚜렷하게 나타나, 총 폴리페놀을 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

발효과정 중 total isoflavone의 함량은 감소하였으나, total aglycon으로의 전환비율이 매우 높게 전환되어, total isoflavone, total aglycon 및 total aglycon의 전환비율을 발효과정 중에 점검해야 할 QC 지표로 설정하였다.

따라서 발효과정 중에 생균수 이외에 점검해야 할 QC 지표로 조단백질, 총당, SDS-PAGE, pH, B-mannanase, 총폴리페놀, total isoflavone, total aglycon 및 total aglycon의 전환비율을 포함한 총 7개의 Q.C 지표를 설정하였다. 또한 이들 지표 중 생리활성 성분에 가장 크게 영향을 미치는 지표로는 조단백질, B-mannanase, total isoflavone(total isoflavone, total aglycon, total aglycon의 전환비율)으로 판정되어 발효시간을 최종적으로 바실러스는 24시간, 유산균+효모는 72시간으로 결정하였다.

## 제 2 절. 제품품질의 향상을 위한 건조공정 시스템 개발

생균제 제조는, 미생물을 접종 한 후, 적당한 발효과정을 거쳐, 건조하여 생산한다. 생균제의 품질은 미생물의 종류, 발효원료, 발효조건, 건조방법 등에 의하여 크게 좌우되는데, 대량 발효 시에는 건조방법에 의한 품질저하에 매우 큰 영향을 끼친다. 생균제의 대량발효를 위하여, 여러 가지 발효기가 있으나, 경제적인 이유로 건조가 함께 되는 드럼발효기를 대부분 사용한다. 그러나 보편화된 드럼발효기는 건조를 위한 별도의 시스템이 없기 때문에 건조시간이 보통 5-8일정도의 매우 오랜 기간이 소요되어, 생균수의 저하가 매우 심하게 떨어지는 문제점이 발생하며, 또한 발효 대사산물의 함량이 감소되어, 품질이 저하된 생균제가 제조되며, 결과적으로 축산농가의 피해를 증가시킨다. 이를 해결하기 위해서는, 발효와 건조를 동시에 할 수 있으며, 더 나아가 저온의 조건에서 빠르게 건조 하여, 품질의 변화를 최소화 할 수 있는, 새로운 시스템이 필요하다. 따라서 시도된 적이 없는, 기존의 드럼발효기에 저온제습 장치를 설치하여 드럼발효건조기를 개발하였으며, 개발된 드럼발효건조기의 발효건조공정 시스템에 대해 조사하였다.

드럼발효건조기를 이용한 발효물의 건조 시험에서는, 1) 드럼발효기를 이용한 기존의 건조방식과 2) 드럼발효기에 저온제습 장치를 이용한 건조공정시스템을 포함한 새로운 건조방식인 드럼발효건조기의 생균수, 생리활성 변화(수분함량, 조단백질, 칼슘, 인, 초산, 젖산, pH, 조사포닌, 0.2% 펩신소화율, 0.2% KOH 용해도, 우레아제역가, 폴리페놀, 총 플라보노이드, 항산화활성, Mannase)와 건조시간에 대해 조사하였다.

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 배지, 균주 배양, 발효 생균제 제조

발효건조공정 시스템 시험을 위하여, *Bacillus subtilis*는 LB 배지(Tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%), lactic acid bacteria는 MRS 배지, *Saccharomyces cereviase*는 YM 배지(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 1%) 사용하였으며, agar plate 제조 시에는 2.0%

agar 를 첨가하였다. 모든 배지는 121℃, 1 Kg/cm<sup>2</sup>으로 15분간 멸균 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주는 DMSO 10%를 첨가하여 -70℃ deep freezer 에 보관하여 사용하였다. *Bacillus subtilis*는 35℃, 200rpm에서 1일간 배양하였으며, *Pediococcus acidilactic* 및 *Lactobacillus plantarum*은 35℃, 0rpm에서 1일간 배양하였고, *Saccharomyces cereviase*는 30℃, 200rpm에서 1일간 배양하여, 배양액으로 사용하였다. *Bacillus subtilis*, lactic acid bacteria, *Saccharomyces cereviase* 배양액 1%를 대두박 200kg에 접종하였으며, 당밀 2%를 첨가하고 수분함량이 50%되게 하여, *Bacillus subtilis*(*Bacillus subtilis* BBG-B20 + *Bacillus subtilis* SK877)는 1일간, *Pediococcus acidilactic* BBG-L1 + *Lactobacillus plantarum* SK3121 + *Saccharomyces cereviase*는 3일간 트레이 발효하여, 각 발효물을 1:1로 혼합하여 사용하였다.

#### 나. 생균수, 일반성분, 무기질, 생리활성 분석

생균수, 수분, 조단백질, 칼슘, 인, 외관상의 변화, KOH 용해도, 펩신 소화율, Urease activity(U.A), 조사포닌, 유기산(초산, 젖산), pH, B-mannanase, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 항산화활성(DPPH, ABTS) 변화에 대해 1장에 명시된 재료 및 방법에 명시된 방법으로 분석하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조시간에 대한 수분함량

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물 (200Kg/500kg)을 건조하였으며(그림 2-1), 그림 2-2와 2-3 같이 각 건조시간에 따른 수분함량과 건조 후의 색깔을 비교하였다. 그 결과 0시간에는 수분함량이 44.30%로 동일하였으나 드럼발효기(A)는 158시간이 지나야 12.80%로 나타났으며, 드럼발효건조기(B)는 35시간이 지나서 8.20%로 나타나, 드럼발효기(A)를 이용할 때보다 5일정도 건조 시간이 단축되었다. 또한 그림 2-3의 사진을 보는바와 같이 드럼발효건조기(B)의 건조물은 건조전의 색깔과 비슷한 형태를 유지하였으나, 드럼발효기(A) 건조물은 오랜 건조 시간으로 인해 검정색 빛을 띠는 색깔로 변하였다. 이와 같이 드럼발효건조기를 이용하였을 때 빠른 건조시간에 의한 품질변화가 적게 나타날 것으로 예상하여, 생균수 및 생리활성변화에 대하여 조사하였다.



그림 2-1. 드럼발효기와 드럼발효건조 시스템



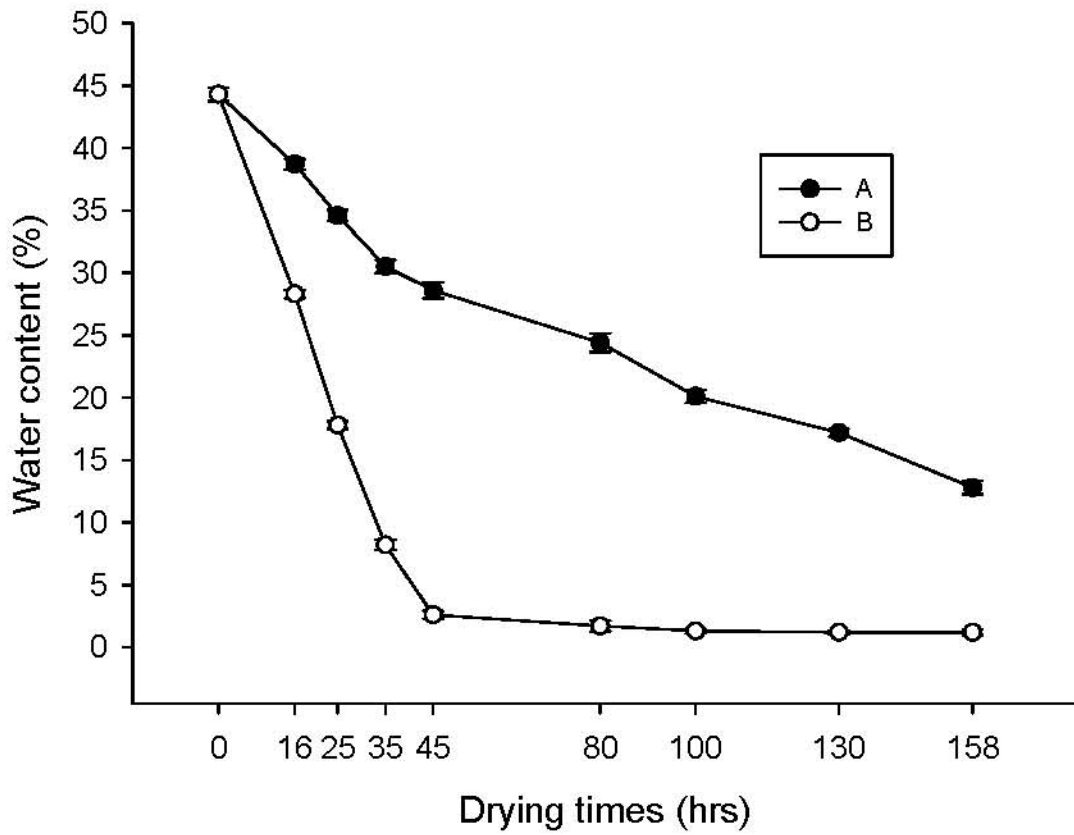


그림 2-2. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조시간에 대한 수분함량 (%).

A: 드럼발효기, B: 드럼발효건조기



그림 2-3. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물 사진

나. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물에 대한 생균수함량

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물을 건조하였으며, Table 2-1과 같이 생균수의 함량을 비교하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis*는 건조 전 log 8.81 CFU/g, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 log 8.82 CFU/g, log 8.82 CFU/g로 나타나, *Bacillus subtilis*의 생균수는 모두 감소하지 않았다. Lactic acid bacteria는 건조 전 log 8.89 CFU/g, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 log 5.11 CFU/g, log 8.46 CFU/g로 나타나, 드럼발효기를 이용하였을 때 매우 크게 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 log 3.35 CFU/g 높게 나타났다. *Saccharomyces cereviase*는 건조 전 log 8.16 CFU/g, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 log 4.11 CFU/g, log 7.47 CFU/g로 나타나 드럼발효기를 이용하였을 때 매우 크게 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 log 3.36 CFU/g 높게 나타났다.

Table 2-1. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 생균수의 변화

성 분(Log CFU/g)	control	드럼발효기	드럼발효건조기
<i>Bacillus subtilis</i>	8.81	8.82	8.82
Lactic acid bacteria	8.89	5.11	8.46
<i>Saccharomyces cereviase</i>	8.16	4.11	7.47

다. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물에 대한 조단백질, 칼슘과 인의 함량

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물을 건조하였으며, Table 2-2와 같이 조단백질, 칼슘(Ca)과 인(P)의 함량을 비교하였다. 그 결과 조단백질은 건조 전 43.61%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 38.91%, 43.67%로 나타나 조단백질의 함량은, 드럼발효기를 이용하였을 때만 건조과정에서 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 4.76% 높게 나타났다. 칼슘(Ca)은 건조 전 0.45%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 log 0.41%, 0.47%로 나타나 칼슘(Ca)의 함량은 드럼발효기로 이용하였을 때만, 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 0.06% 높게 나타났다. 인(P)은 건조 전 0.57 %, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 0.56%, 0.57%로 나타나 인(P)의 생균수는 건조방법에 의하여 큰 차이를 나타나지

않았다.

Table 2-2. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 조단백질, 칼슘과 인의 변화

성분	단위	control	드럼발효기	드럼발효건조기
조단백질	%	43.61	38.91	43.67
칼슘(Ca)	%	0.45	0.41	0.47
인(P)	%	0.57	0.56	0.57

라. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물에 대한 유기산과 pH

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물을 건조하였으며, Table 2-3와 같이 유기산(초산, 젖산)과 pH 값을 비교하였다. 그 결과 유기산 중 초산은 건조 전 0.34%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 1.18%, 1.07%로 나타나 초산의 함량은 건조시간이 증가 할수록 모두 증가하였으며, 드럼발효기를 이용하였을 때, 드럼발효건조기보다 0.11% 높게 나타났다. 유기산 중 젖산은 건조 전 1.12%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 3.36%, 1.74%로 나타나 젖산의 함량은 건조시간이 증가 할수록 증가하였으며, 드럼발효기를 이용하였을 때, 드럼발효건조기보다 1.62% 이상 증가하였다. pH 값은 건조 전 5.97, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 4.78, 5.21로 나타나 pH 값은 건조시간이 증가 할수록 낮아졌으며, 드럼발효기를 이용하였을 때, 드럼발효건조기보다 0.43 낮게 나타났다.

Table 2-3. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 유기산과 pH의 변화

성분	단위	control	드럼발효기	드럼발효건조기
초산	%	0.34	1.18	1.07
젖산	%	1.12	3.36	1.74
pH	value	5.97	4.78	5.21

다. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물에 대한 소화율과 우레아제역가

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물을 건조하였으며, Table 2-4와 같이 펩신소화율, KOH 용해도와 우레아제역가(U.A)을 비교하였다. 그 결과 0.2% 펩신소화율은 건조 전 92.67%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 87.16%, 92.93%로 나타나 드럼발효기를 이용하였을 때만 펩신소화율은 건조과정에 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 5.77% 높게 나타났다. 0.2% KOH용해도는 건조 전 70.43%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 51.66%, 66.83%로 나타나 0.2% KOH용해도는 모든 건조과정 중에 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 15.17% 높게 나타났다. 우레아제역가(U.A) 값은 건조 전 0.01, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 0.01, 0.01로 나타나 우레아제역가(U.A) 값은 건조방법에 상관없이 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 2-4. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 소화율과 우레아제역가

성분	단위	Control	드럼발효기	드럼발효건조기
0.2% 펩신소화율	%	92.67	87.16	92.93
0.2% KOH용해도	%	70.43	51.66	66.83
우레아제역가 (U.A)	%	0.01	0.01	0.01

바. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물에 대한 조사포닌과 B-mannanase

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물을 건조하였으며, Table 2-5와 같이 조사포닌과 B-mannanase의 값을 비교하였다. 그 결과 조사포닌은 건조 전 1.20%, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 1.47%, 1.23%로 나타나, 조사포닌 함량은 건조하는 과정에서 모두 증가하였으며, 드럼발효기를 이용하였을 때, 드럼발효건조기보다 0.27% 높게 나타났다. B-mannanase는 건조 전 825 unit/g, 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 200 unit/g, 750 unit/g로 나타나 B-mannanase는 모든 건조과정 중에 모두 감소하였으며, 드럼발효건조기를

이용하였을 때, 드럼발효기보다 550 unit/g 높게 나타났다.

Table 2-5. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 조사포닌과 B-mannanase

성분	단위	Control	드럼발효기	드럼발효건조기
조사포닌	%	1.20	1.47	1.23
B-mannanase	Unit/g	825	200	750

사. 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물에 대한 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 항산화활성(DPPH, ABTS)

드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용하여 각각의 발효물을 건조하였으며, Table 2-6과 같이 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 항산화활성(DPPH, ABTS)을 비교하였다. 그 결과 총 폴리페놀 함량은 건조 전 30.72 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 32.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 33.92 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타나 총 폴리페놀 함량은 건조하는 과정에서 증가하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 1.71 $\mu\text{g}/\text{mg}$  높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 건조 전 11.95 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 7.10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 13.32 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타나, 드럼발효기를 이용하여 건조하는 과정에서만 총 플라보노이드의 함량이 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 6.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$  높게 나타났다.

항산화활성(DPPH)은 건조 전 5.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 6.81 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 6.43 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타나 항산화활성(DPPH)은 건조하는 과정에서 모두 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 0.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$  항산화활성이 높게 나타났다. 항산화활성(ABTS)은 건조 전 4.57 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 드럼발효기와 드럼발효건조기의 건조물은 각각 5.80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 4.52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타나 항산화활성(DPPH)은 드럼발효기를 이용하여 건조하는 과정에서만 항산화활성이 감소하였으며, 드럼발효건조기를 이용하였을 때, 드럼발효기보다 1.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$  항산화활성이 높게 나타났다.

Table 2-6. 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 총폴리페놀, 총플라보노이드와 항산화활성(DPPH, ABTS)의 변화

성분	단위	control	드럼발효기	드럼발효건조기
총폴리페놀	$\mu\text{g}/\text{mg}$	30.72	32.21	33.92
총플라보노이드	$\mu\text{g}/\text{mg}$	11.95	7.10	13.32
DPPH	RC50 $\mu\text{g}/\text{mg}$	5.22	6.81	6.43
ABTS	RC50 $\mu\text{g}/\text{mg}$	4.57	5.80	4.52

### 3. 요약

건조공정에서 생균수와 생리활성 성분의 감소를 최소화하기 위하여, 저온 조건에서 빠른 건조를 위하여, 시도된 적이 없는 기존의 드럼발효기에 저온제습 장치를 설치하여 드럼발효건조기를 개발하였으며, 드럼발효건조기의 효과를 알아보기 위하여 드럼발효기와 드럼발효건조기를 이용한 건조물의 건조속도, 생균수와 생리활성을 비교 분석하였다. 그 결과 드럼발효건조기가 드럼발효기보다 건조속도, 건조 후 색깔, 생균수 함량(Lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*), pH, 조단백질 함량, 칼슘(Ca)함량, 0.2% 펩신소화율, 0.2% KOH 용해도, B-mannanase, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 항산화활성(DPPH, ABTS)은 높게 나타났으며, 유기산함량(초산, 젖산), 조사포닌 함량은 낮게 나타났다.

### 제 3 절. 저장조건 차이의 생리활성 검정과 QC 지표설정

Tray를 이용한 발효과정(scale-up, 200kg)을 거쳐, 바실러스 발효물 1: 유산균+효모 발효물 1의 비율로 혼합한 후, 건조하여 생산된 제품을 저장조건을 달리하였을 때, 저장기간에 따른 생균수, 수분, 조단백질, 칼슘, 인, 외관상의 변화, KOH 용해도, 펩신 소화율, Urease activity(U.A), 조사포닌, 유기산(초산, 젖산), pH, B-mannanase, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 항산화활성(DPPH, ABTS) 변화에 대해 조사하였다. 또한 생리활성 검정 결과 값을 반영하여, 저장기간 중에 생균수 외의 QC지표를 설정하고자 하였다.

#### 1. 재료 및 방법

가. 배지, 균주 배양, 발효 생균제 제조

발효건조공정 시스템을 시험을 위하여, *Bacillus subtilis*는 LB 배지(Tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%), lactic acid bacteria는 MRS 배지, *Saccharomyces cereviase*는 YM 배지(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 1%) 사용하였으며, agar plate 제조 시에는 2.0% agar를 첨가하였다. 모든 배지는 121℃, 1 Kg/cm<sup>2</sup>으로 15분간 멸균 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주는 DMSO 10%를 첨가하여 -70℃ deep freezer에 보관하여 사용하였다. *Bacillus subtilis*는 35℃, 200rpm에서 1일간 배양하였으며, *Pediococcus acidilactic* 및 *Lactobacillus plantarum*은 35℃, 0rpm에서 1일간 배양하였고, *Saccharomyces cereviase*는 30℃, 200rpm에서 1일간 배양하여, 배양액으로 사용하였다. *Bacillus subtilis*, lactic acid bacteria, *Saccharomyces cereviase* 배양액 1%를 대두박 200kg에 접종하였으며, 당밀 2%를 첨가하고 수분함량이 50%되게 하여, *Bacillus subtilis*(*Bacillus subtilis* BBG-B20 + *Bacillus subtilis* SK877)는 1일간, *Pediococcus acidilactic* BBG-L1 + *Lactobacillus plantarum* SK3121 + *Saccharomyces cereviase*는 3일간 트레이 발효하여, 각 발효물을 1:1로 혼합하여 2장에서 개발된 드럼발효건조기(LTD-2, Bigbiogen, korea)로 12%가 될 때 까지 건조하였다.



나. 생균수, 일반성분, 무기질, 생리활성 분석

생균수, 수분, 조단백질, 칼슘, 인, 외관상의 변화, KOH 용해도, 펩신 소화율, Urease activity(U.A), 조사포닌, 유기산(초산, 젖산), pH, B-mannanase, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 항산화활성(DPPH, ABTS) 변화에 대해 1장에 명시된 재료 및 방법으로 분석하였다.

## 2. 결과 및 고찰

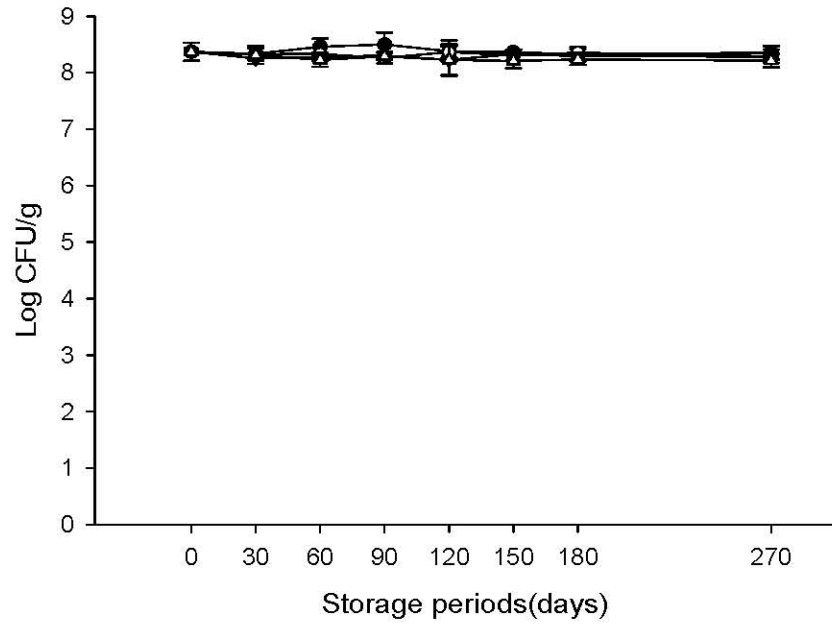
### 가. 생균수

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 바실러스, 유산균+효모의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 및 270일)에 대한 생균수 함량에 대하여 조사하였다. 그림 3-1과 같이 저장시간에 따른 생균수 중 바실러스의(A) 함량은, 0일 log 8.37 CFU/g으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 log 8.35 CFU/g, log 8.29 CFU/g, log 8.28 CFU/g 및 log 8.21 CFU/g으로 나타나, 바실러스의 생균수가 각 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).

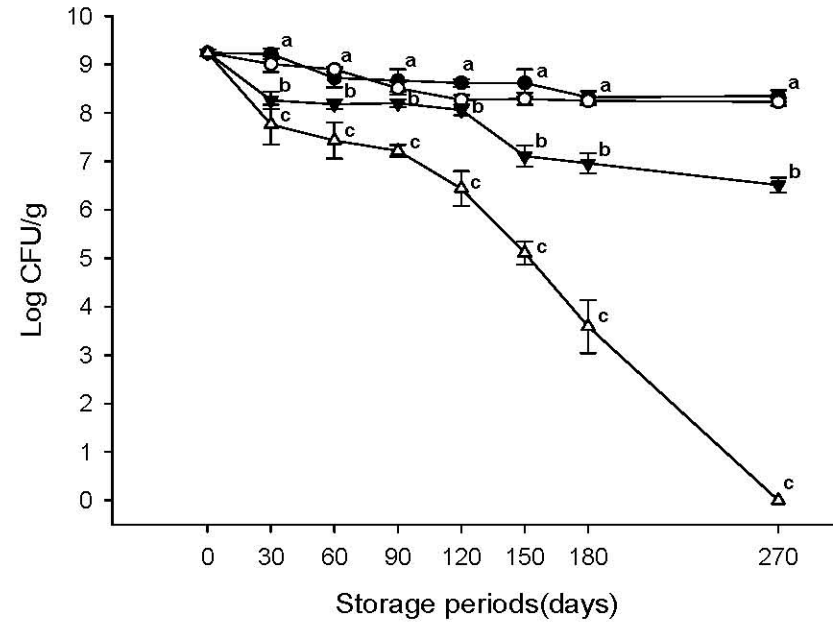
유산균+효모의 발효시간에 따른 생균수 중 유산균의(그림 1-5, B) 함량은, 0일 log 9.24 CFU/g으로 나타났으며, 각 저장온도에 저장 30일 이후부터 4, 15, 25 및 35℃는 각각 log 9.22 CFU/g, log 9.01 CFU/g, log 8.26 CFU/g 및 log 7.76 CFU/g으로 나타났다( $P<0.05$ ). 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 log 8.35CFU/g, log 8.23 CFU/g, log 6.51 CFU/g 및 log 0 CFU/g으로 나타나, 장기간 보관 시 15℃ 이하의 저온에서 보관하는게 바람직한 것으로 나타났으며, 25 및 35℃의 온도에서 보관 시, 고온에서 생균수가 감소하는 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).

유산균+효모의 발효시간에 따른 생균수 중 효모의(그림 1-5, C) 함량은, 0일 log 7.32 CFU/g으로 나타났으며, 각 저장온도에 저장 30일 이후부터 4, 15, 25 및 35℃는 각각 log 7.27 CFU/g, log 7.19 CFU/g, log 6.70 CFU/g 및 log 6.25 CFU/g으로 나타났다( $P<0.05$ ). 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 log 7.16 log 6.21 CFU/g, log 0 CFU/g 및 log 0 CFU/g으로 나타나, 장기간 보관 시 4℃ 이하의 저온에서 보관하는게 바람직한 것으로 나타났으며, 15, 25 및 35℃의 높은 온도에서 보관 시, 고온에서 생균수가 감소하는 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).

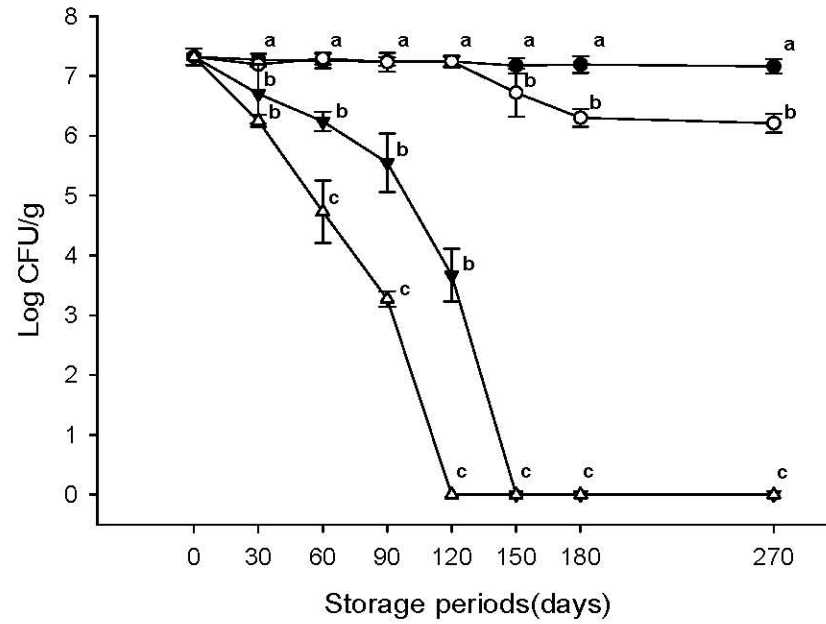
이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 및 270일)에 대한 생균수 함량은 바실러스는 저장온도와 저장기간에 큰 영향을 받지 않았으나, 유산균은 15℃이하, 효모는 4℃ 이하에서 저장해야 되는 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).



(A) 바실러스



(B) 유산균



(C) 효 모

그림 3-1. 저장기간 중의 생균수 변화

●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

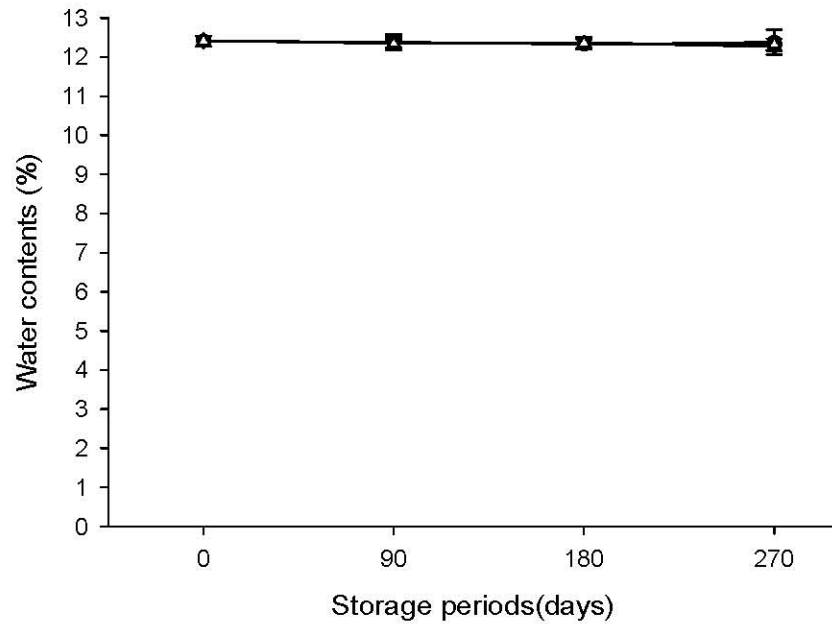
나. 일반성분(수분, 조단백)

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 수분과 조단백질 함량에 대하여 조사하였다. 그림 3-2와 같이 저장시간에 따른 수분(A) 함량은, 0일 12.41%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 12.38%, 12.32%, 12.26% 및 12.32%으로 나타나, 수분함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).

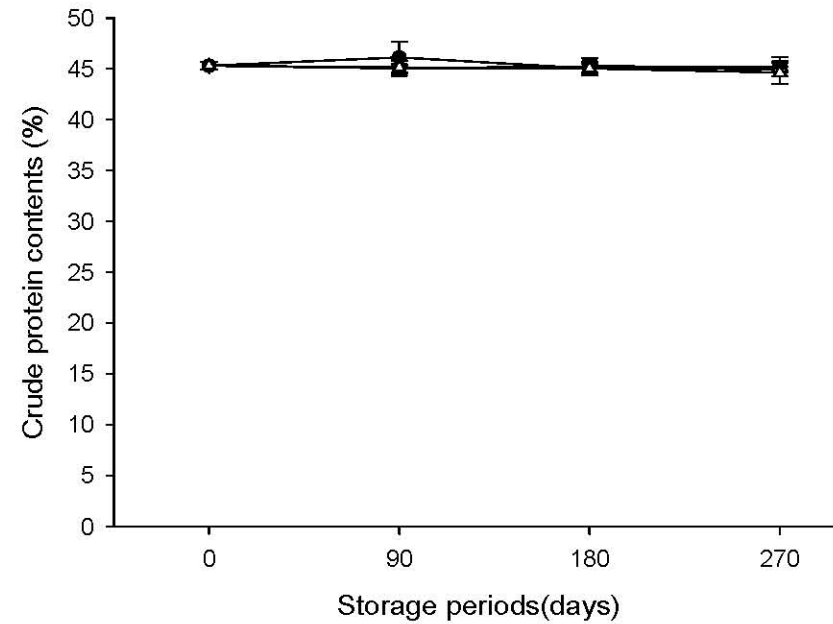
저장시간에 따른 조단백질(그림 3-2, B) 함량은, 0일 45.30%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 45.17%, 44.94%, 45.21% 및 44.67%으로 나타나, 조단백질 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 수분과 조단백질 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 수분과 조단백질 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).



(A) 수분



(B) 조단백질

그림 3-2. 수분함량과 조단백질함량의 변화

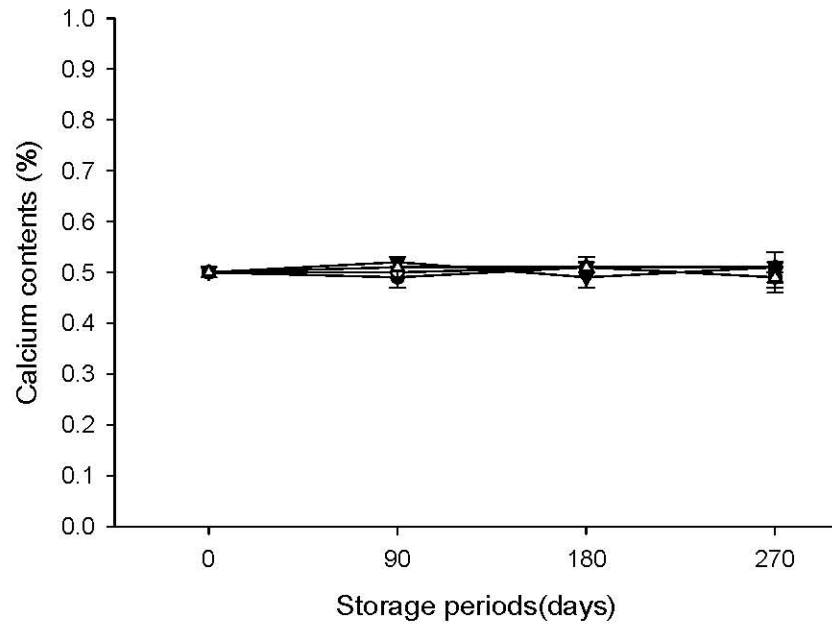
●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.

다. 무기질(인, 칼슘)

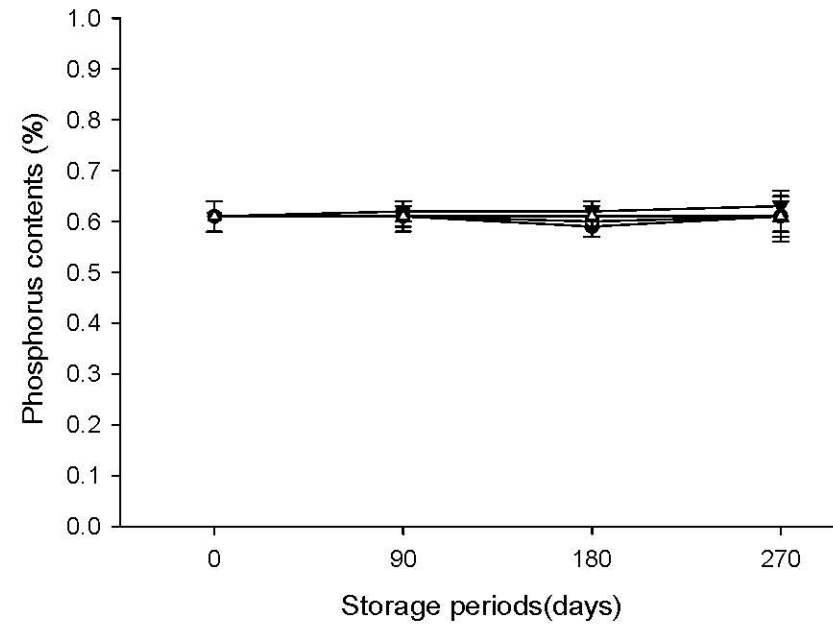
바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 칼슘과 인 함량에 대하여 조사하였다. 그림 3-3과 같이 저장시간에 따른 칼슘(A) 함량은, 0일 0.50%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 0.51%, 0.49%, 0.51% 및 0.49%으로 나타나, 칼슘함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).

저장시간에 따른 인(그림 3-3, B) 함량은, 0일 0.61%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 0.61%, 0.61%, 0.63% 및 0.61%으로 나타나, 인 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 칼슘과 인 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다( $P>0.05$ ).



(A) 칼슘



(B) 인

그림 3-3. 칼슘함량과 인 함량의 변화

●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.



라. 외관상의 변화, KOH 용해도, 펩신 소화율 및 Urease activity(U.A)

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 외관상의 변화, 0.2% KOH 용해도, 0.2% 펩신 소화율 및 U.A 값 변화에 대하여 조사하였다. 그림 3-4와 같이 저장온도 차이에 외형의 색깔은 35℃에서 오래보관 시, 4, 15 및 25℃보다 외관이 진한 갈색으로 변하는 경로 나타났다.

저장시간에 따른 0.2% KOH 용해도(그림3-5, A)는, 0일 71.28%으로 나타났으며, 90일 경과 이후부터 35℃ 보관한 것의 KOH 용해도가 감소하기 시작하였으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 69.55%, 65.56%, 57.04% 및 32.43%으로 나타나, 25와 35℃에서 장기간 보관 시에, 0.2% KOH용해도는 매우 급격하게 감소되는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

저장시간에 따른 0.2% 펩신 소화율(그림 3-5, B)은, 0일 95.37%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 95.20%, 95.29%, 95.50% 및 95.89%으로 나타나, 0.2% 펩신 소화율은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

저장시간에 따른 U.A(그림 3-5, C) 값은, 0일 0.01%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 0.01%, 0.02%, 0.01% 및 0.01%으로 나타나, U.A 값은 온도와 저장기간에 의해 변화를 나타내지 않았다( $P > 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 외관상의 변화, 0.2% KOH 용해도, 0.2% 펩신 소화율 및 U.A 값의 변화는, 35℃에서 장기간 보관 시에 외관의 색깔이 진한 갈색으로 변하였으며, 0.2% KOH 용해도가 25와 35℃에서 장기간 보관 시에, 0.2% KOH용해도는 감소하였으며, 특히 35℃ 저장 시에는 매우 급격하게 감소되는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 그러나 0.2% 펩신 소화율 및 U.A 값의 변화는 나타나지 않았다( $P > 0.05$ ).

---

4°C

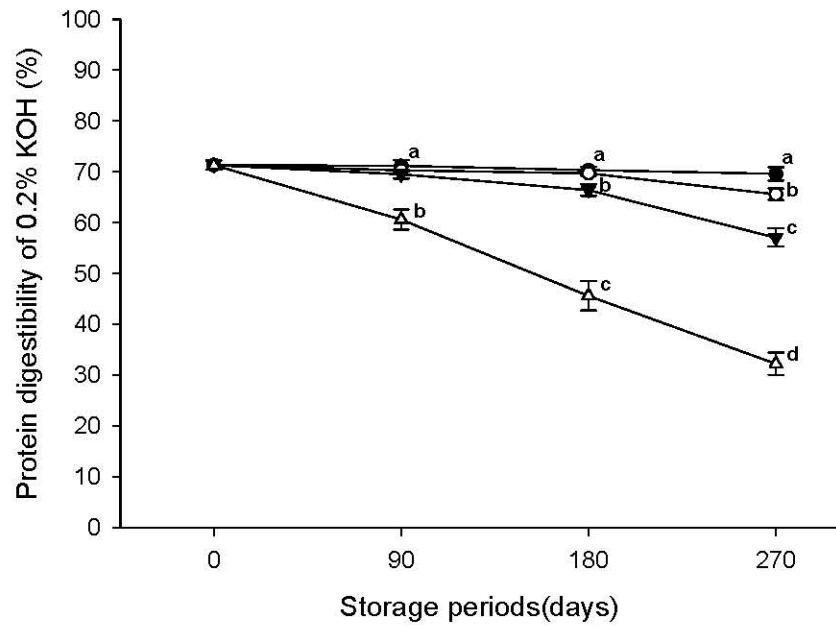
15°C

25°C

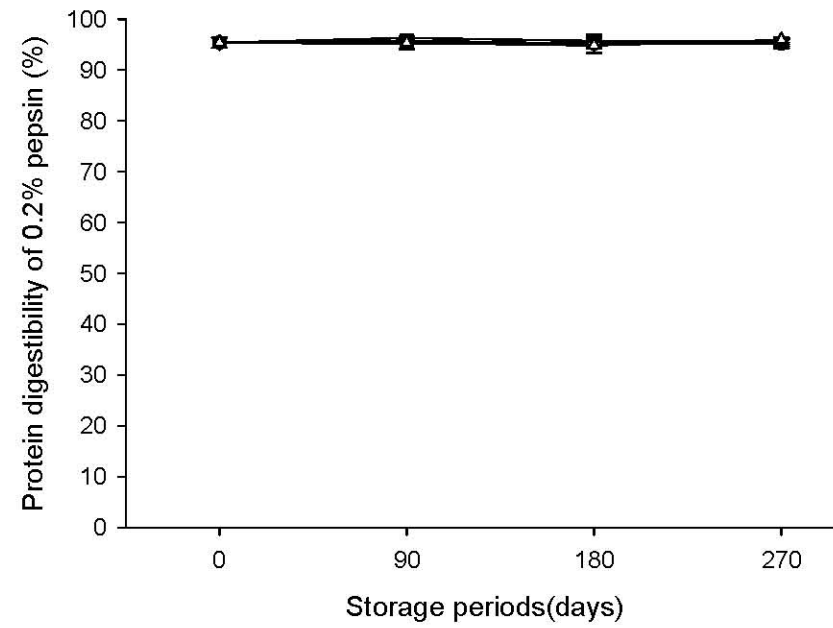
35°C

---



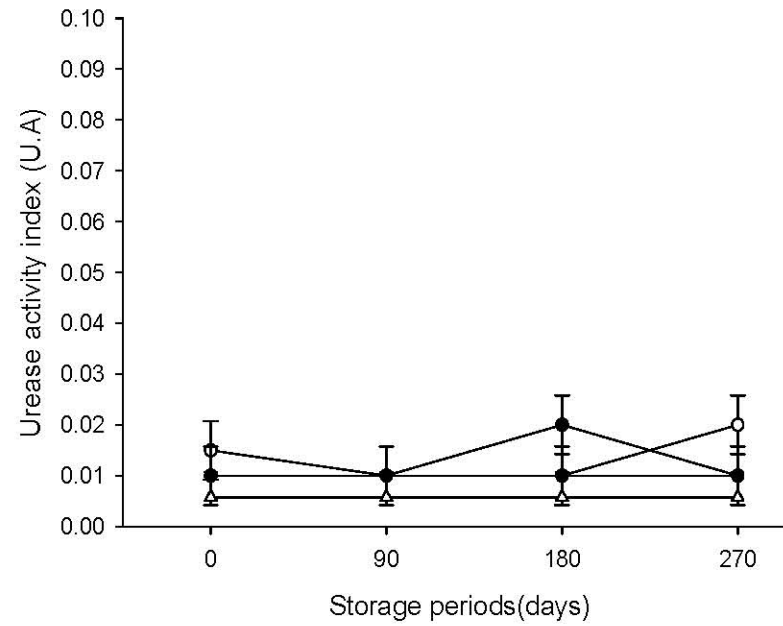


(A) 0.2% KOH



(B) 0.2% pepsin

그림 3-4



(C) U.A

그림 3-5. KOH 용해도, 펩신소화율 및 U.A 함량 변화

●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

마. 조사포닌

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 조사포닌 함량 변화에 대하여 조사하였다. 그림 3-6과 같이 저장시간에 따른 조사포닌 함량은, 0일 2.56%으로 나타났으며, 180일 경과 이후부터 25 및 35℃ 보관한 것의 조사포닌 함량이 각각 2.15%, 1.87%으로 감소하기 시작하였으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 2.50%, 2.12%, 1.61% 및 1.63% 으로 나타나, 15, 25와 35℃의 온도에서 장기간 보관 시에, 조사포닌의 함량은 감소되는 것으로 나타났다(P<0.05).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 조사포닌의 함량변화는, 15, 25 와 35℃에서 장기간 보관 시에 감소하였다(P<0.05).

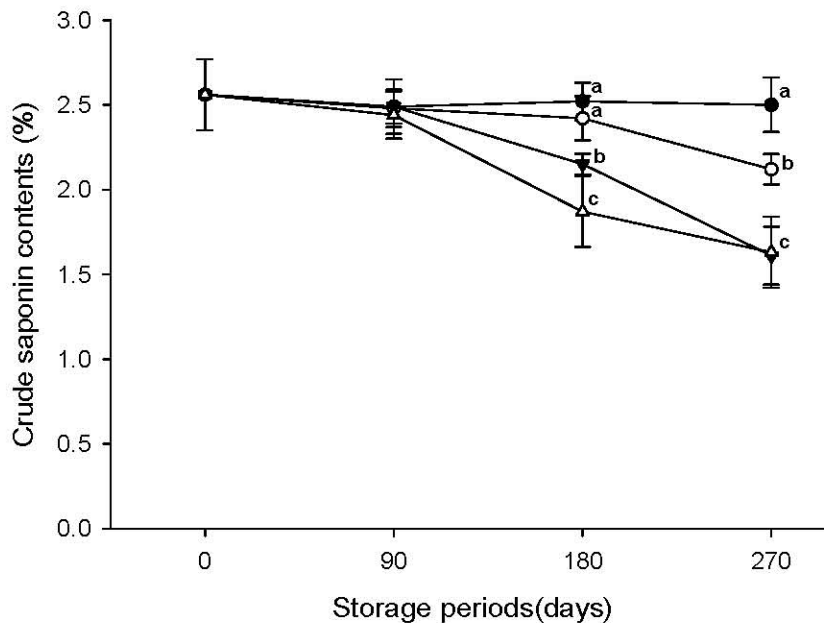


그림 3-6. 조사포닌 함량 변화

●: 4℃, ○: 15℃, ▼: 25℃, △: 35℃.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly(P<0.05) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

#### 바. 유기산과 pH

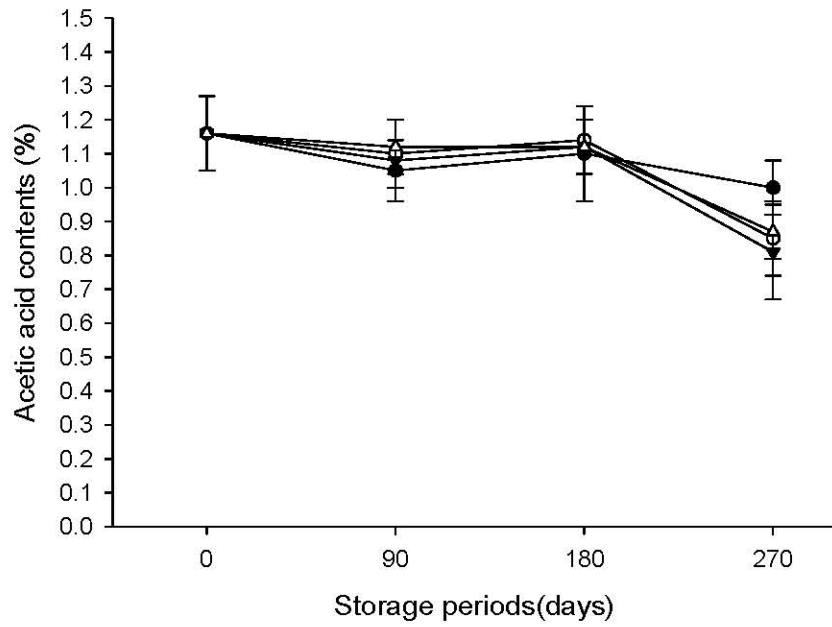
바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 유기산(초산, 젖산) 및 pH값 변화에 대하여 조사하였다.

저장시간에 따른 유기산 중 초산의 함량(그림3-7, A) 변화는, 0일 1.16%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 1.00%, 0.85%, 0.81% 및 0.87%으로 나타나, 통계적인 유의차를 나타내지 않아, 저장기간 동안 감소되지 않은 것으로 나타났다( $P>0.05$ ).

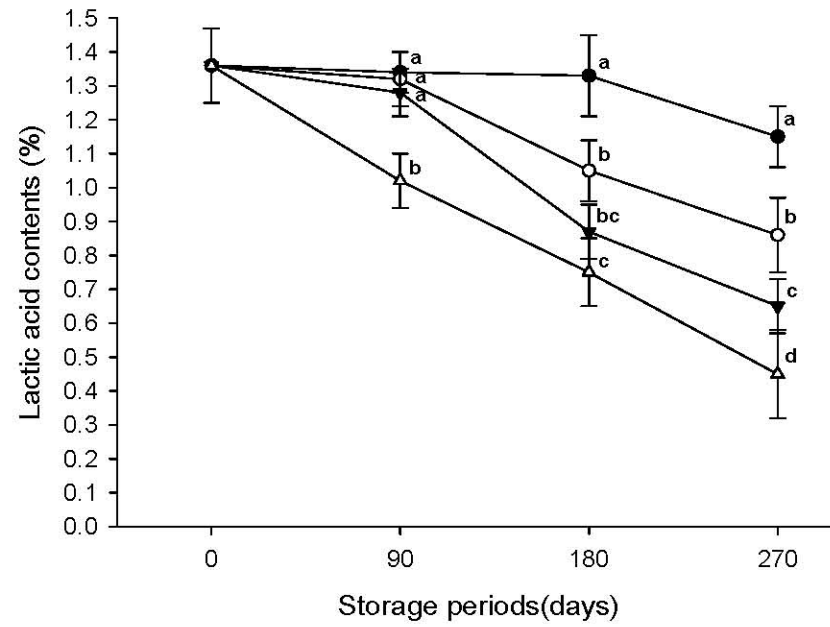
저장시간에 따른 유기산 중 젖산의 함량(그림 3-7, B) 변화는, 0일 1.36%으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 1.15%, 0.86%, 0.65% 및 0.45%으로 나타나, 젖산의 함량은 저장온도가 높을수록 감소하였다( $P<0.05$ ).

저장시간에 따른 pH(그림 3-7, C) 값은, 0일 5.09로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 6.54, 6.62, 6.34 및 6.16으로 나타나, pH 값은 장기간 저장 시, 저장온도와 상관없이 증가하였으며, 저장온도가 높을수록 빠른 pH의 증가를 나타내었다( $P<0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 유기산(초산, 젖산) 및 pH 값 변화는, 초산은 저장기간에 의한 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 젖산은 저장온도가 높을수록 감소하였다( $P<0.05$ ). 또한 pH 값은 장기간 저장 시, 저장온도와 상관없이 증가하였으며, 저장온도가 높을수록 빠른 pH의 증가를 나타내었다 ( $P<0.05$ ).

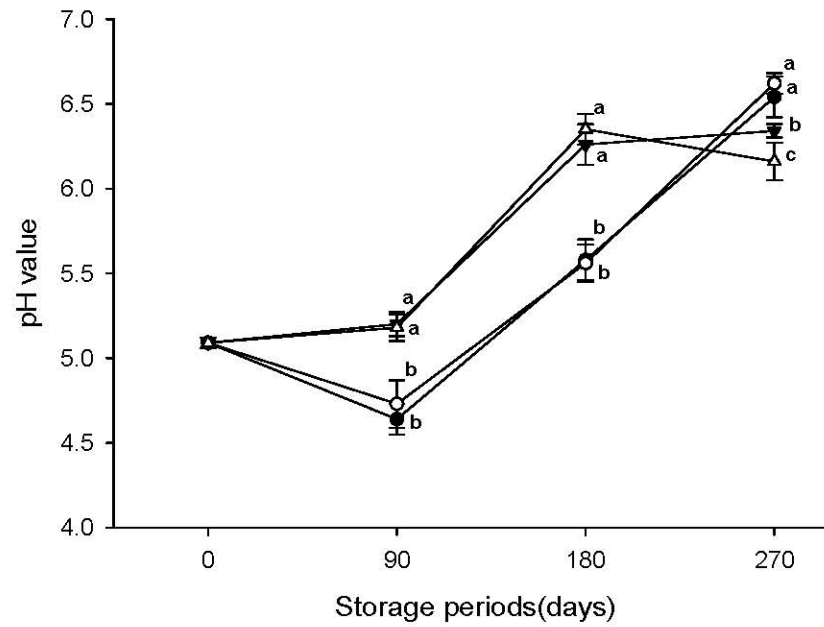


(A) Acetic acid



(B) Lactic acid

그림 3-6 저장기간에 따른 유기산 함량 변화



(C) pH value

그림 3-7. 유기산과 pH의 변화

●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.

Different superscripts(a-d) in the same row indicate significantly ( $P < 0.05$ ) different values in mean score (Mean±SD) among treatment groups.



사. B-mannanase

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 B-mannanase 효소활성 변화에 대하여 조사하였다. 그림 3-8과 같이 저장시간에 따른 B-mannanase 효소활성은, 0일 950.33 unit/g으로 나타났으며, 180일 경과 이후부터 15, 25 및 35℃ 보관한 것의 조사포닌 함량이 각각 786.67 unit/g, 740.67 unit/g, 702.33 unit/g으로 감소하기 시작하였으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 788.67 unit/g, 704.67 unit/g, 643.33 unit/g 및 641.33 unit/g 으로 나타나, 저장기간이 증가할수록 저장온도와 상관없이 감소하였으며, 15, 25와 35℃의 온도에서 장기간 보관 시에, 효소활성이 더 많이 감소되었다(P<0.05).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 B-mannanase 효소활성 변화는, 15, 25 와 35℃에서 장기간 보관 시에 감소폭이 증가하였다(P<0.05).

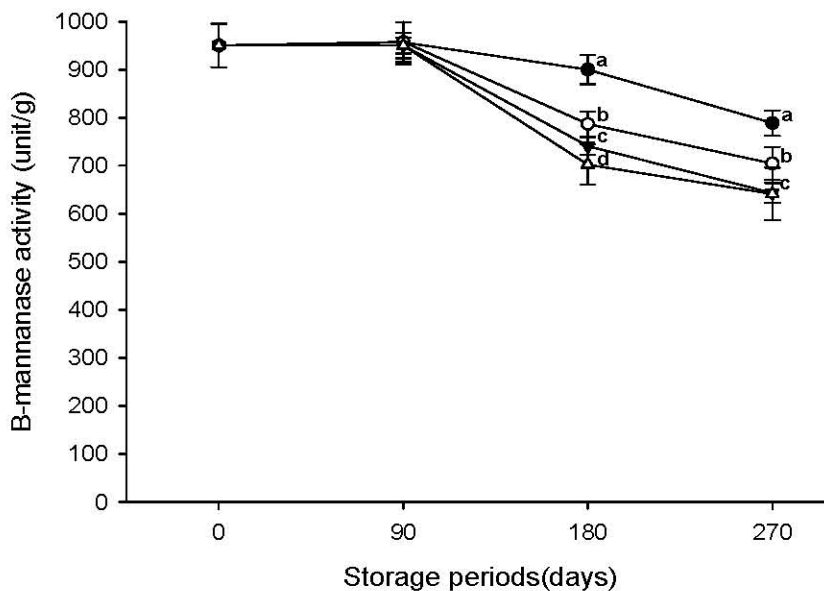


그림 3-8. B-mannanase의 변화

●: 4℃, ○: 15℃, ▼: 25℃, △: 35℃.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly(P<0.05) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

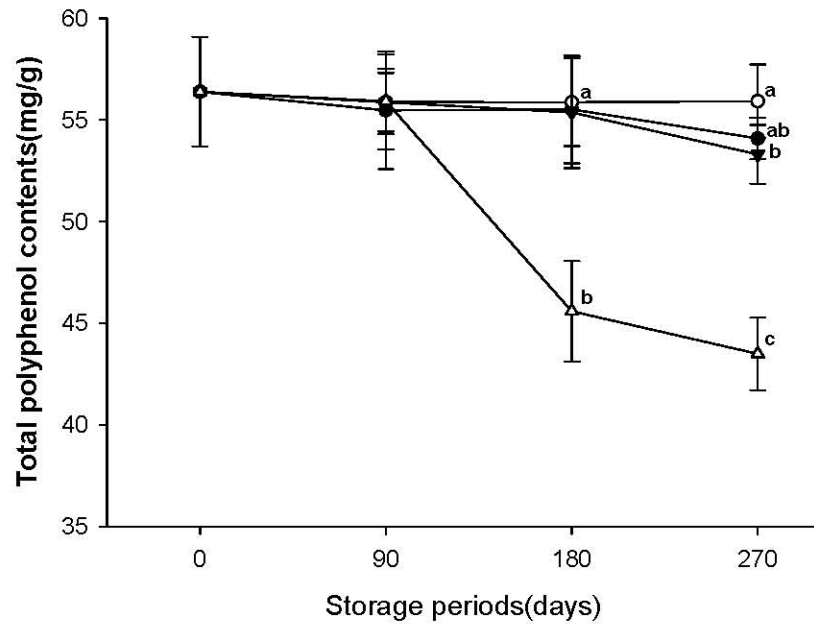
아. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화에 대하여 조사하였다.

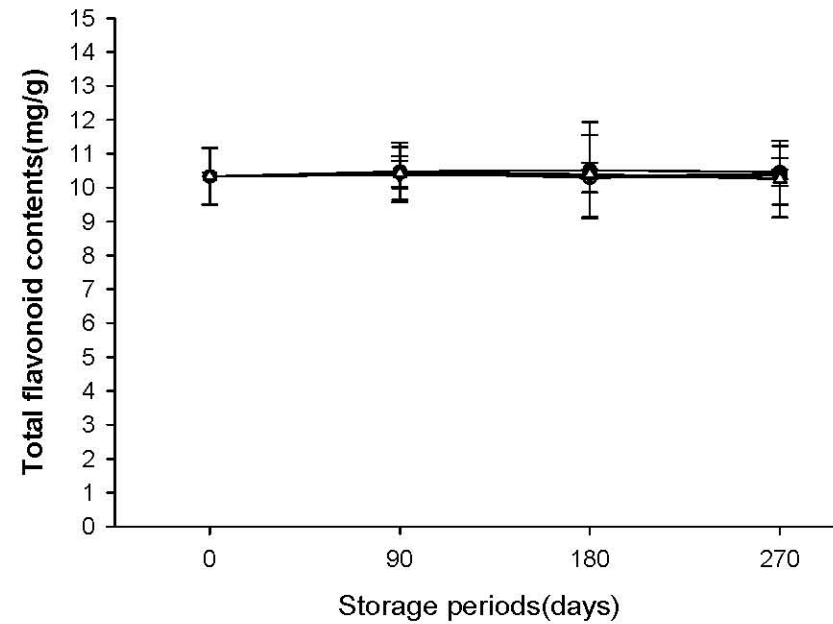
저장시간에 따른 총 폴리페놀의 함량(그림 3-9, A) 변화는, 0일 56.38mg/g으로 나타났으며, 180일 경과 이후부터 35℃ 보관한 것의 총 폴리페놀 함량이 45.59mg/g으로 감소하기 시작하였으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 54.08mg/g, 55.22mg/g, 53.30mg/g 및 43.49mg/g 으로 나타나, 35℃에서 보관 시 총 폴리페놀의 함량이 감소되는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

저장시간에 따른 총 플라보노이드 함량(그림3-9, B) 변화는, 0일 10.33mg/g으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 10.46mg/g, 10.36mg/g, 10.30mg/g 및 10.25mg/g으로 나타나, 통계적인 유의차를 나타내지 않아, 저장기간 동안 감소되지 않은 것으로 나타났다( $P > 0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화는, 총 폴리페놀은 35℃에서 보관 시 총 폴리페놀의 함량이 감소되는 것으로 나타났으나, 총 플라보노이드 함량은 저장기간 동안 감소되지 않은 것으로 나타났다.



(A) Total polyphenol



(B) Total flavonoid

그림 3-9. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 변화

●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean $\pm$ SD) among treatment groups.

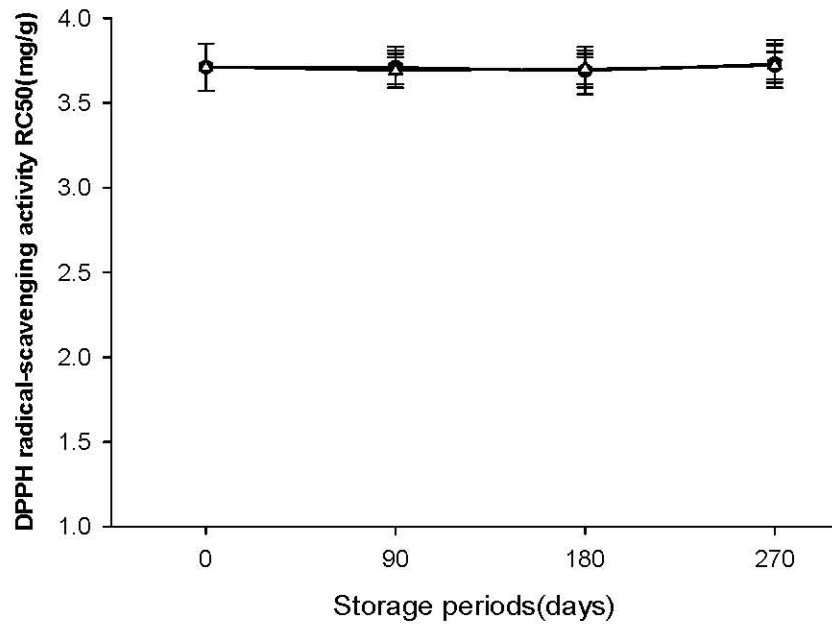
자. 항산화활성(DPPH, ABTS)

바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 DPPH 및 ABTS radical 소거능에 대하여 조사하였다.

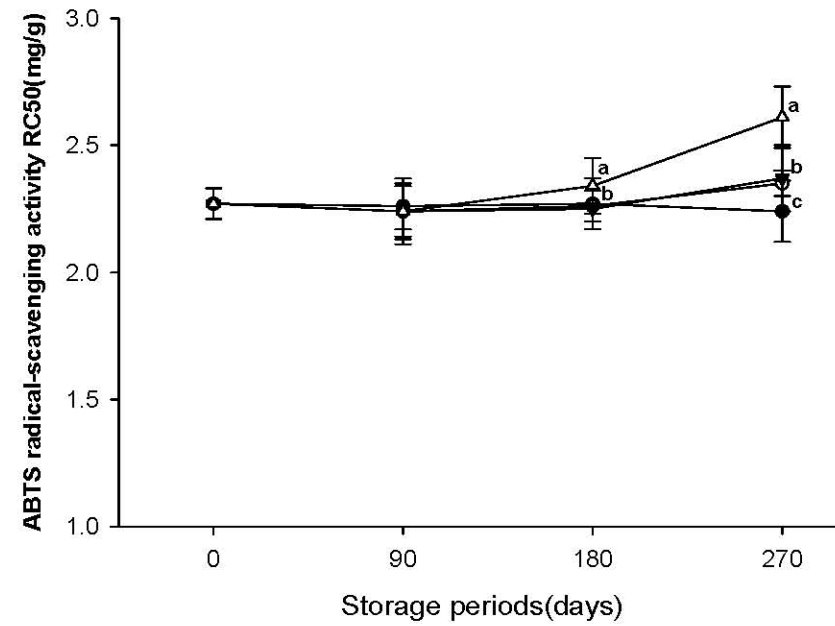
저장시간에 따른 DPPH radical 소거능 RC50(그림3-10, A) 변화는, 0일 3.72mg/g으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 3.72mg/g, 3.73mg/g, 3.73mg/g 및 3.72mg/g으로 나타나, 통계적인 유의차를 나타내지 않아, 저장기간 동안 감소되지 않은 것으로 나타났다( $P>0.05$ ).

저장시간에 따른 ABTS radical 소거능 RC50(그림 3-10, B) 변화는, 0일 2.27mg/g으로 나타났으며, 270일 경과 후 4, 15, 25 및 35℃는 각각 2.23mg/g, 2.35mg/g, 2.37mg/g 및 2.61mg/g으로 나타나, 15, 25 및 35℃에서 보관 시 감소하는 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).

이와 같이 바실러스, 유산균+효모의 발효혼합물의 저장온도 차이(4, 15, 25 및 35℃)에 의한 저장기간(0, 90, 180 및 270일)에 대한 항산화활성 중 DPPH는 저장기간 동안 감소되지 않았으나, ABTS radical 소거능은 15, 25 및 35℃에서 보관 시 감소하는 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).



(A) DPPH



(B) ABTS

그림 3-10. 항산화활성(DPPH, ABTS) 변화

●: 4°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, △: 35°C.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly( $P < 0.05$ ) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

### 3. 요약

대두박을 이용한 Tray-발효과정(scale-up, 200Kg)을 거쳐 제조한, 발효건조물의 저장온도와 저장기간에 따른 생리활성을 검정하여, 저장기간 중 생균수 이외의 QC 지표를 설정하기 위하여, 생균수, 수분, 조단백질, 칼슘, 인, 외관상의 변화, KOH 용해도, 펩신 소화율, Urease activity(U.A), 조사포닌, 유기산(초산, 젖산), pH, B-mannanase, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 항산화활성(DPPH, ABTS) 변화에 대해 조사하였다.

저장기간 중에 생균수는 바실러스는 저장온도와 저장기간에 큰 영향을 받지 않았으나, 유산균은 15℃이하, 효모는 4℃ 이하에서 저장해야, 생균수의 감소가 덜 일어나는 것으로 나타났다.

저장기간 중에 수분과 조단백질은 수분과 조단백질 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았으며, 또한 칼슘과 인 함량은 온도와 저장기간에 의해 감소하지 않았다.

저장기간 중에 0.2% 펩신 소화율 및 U.A 값의 변화는 나타나지 않았으나, 35℃에서 장기간 보관 시에 외관의 색깔이 진한 갈색으로 변화하였으며, 0.2% KOH 용해도가 25와 35℃에서 장기간 보관 시에, 0.2% KOH용해도는 매우 급격하게 감소되는 것으로 나타나, 저장기간 중 QC 지표로 외관색깔과 0.2% KOH 용해도를 설정하였다.

저장기간 중에 조사포닌의 함량변화는 15, 25 와 35℃에서 장기간 보관 시에 감소하였다.

저장기간 중에 유기산 중 초산은 저장기간에 의한 유의적인 차이를 나타내지 않았나, 유기산 중 젖산 저장온도가 높을수록 감소하였다. 그러나 pH 값은 장기간 저장 시, 저장온도와 상관없이 증가하였으며, 저장온도가 높을수록 빠른 pH의 증가를 나타내어 저장기간 중에 pH의 변화가 꾸준히 이루어 지는 것으로 판단되어,

쉽게 분석할 수 있는 pH 값을 QC 지표로 설정하였다.

저장기간 중에 B-mannanase 효소활성은 15, 25와 35℃의 온도에서 장기간 보관 시에, 많은 효소활성이 감소되는 것이 관찰되어 B-mannanase를 QC 지표로 설정하였다.

저장기간 중 총 플라보노이드 함량은 저장기간 동안 감소되지 않았으나, 총 폴리페놀은 35℃에서 보관 시 총 폴리페놀의 함량이 감소되는 것으로 나타나, 총 폴리페놀을 QC 지표로 설정하였다.

저장기간 중 항산화활성 중 DPPH radical 소거능 분석 시, 저장기간 동안 감소되지 않았으나, ABTS radical 소거능은 15, 25 및 35℃에서 보관 시 감소하는 것으로 나타나, ABTS radical 소거능을 QC 지표로 설정하였다.

따라서 저장기간 중에 생균수 이외에 점검해야 할 QC 지표로 외관색깔, 0.2% KOH 용해도, pH, B-mannanase, 총 폴리페놀 및 항산화 활성 중 ABTS radical 소거능을 포함한 총 6개의 Q.C 지표를 설정하였다.

## 제 4 절. 발효사료첨가제의 산란계에 대한 효능검증

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험설계

발효사료 첨가제를 0.1, 0.3 또는 0.5% 수준으로 각각 사료에 첨가하여 전체 4개 처리구에 5반복으로 구성하였으며, 6주간 사양실험을 시행하였다.

#### 나. 실험동물

본 실험에서는 48주령 Hy-line 갈색 산란계를 이용하여 동일한 면적의 케이지에 모두 4처리 5반복으로 반복 당 9수씩 180수를 선발하여 2주간 일반 시판사료로 예비사육 하였으며, 처리구별 산란율과 체중이 유사하도록 완전임의 배치하였다.

#### 다. 실험사료

모든 공시계는 대사에너지 2,800kcal/kg, CP 17%의 산란중기 시판사료를 급여하였다(NRC, 1994). 실험사료의 배합비 및 영양소 조성은 Table 4-1에 나타내었다.

#### 라. 사양관리

공시계는 2단 철제 케이지(넓이 90cm, 깊이 90cm, 수당 735cm<sup>2</sup>)에서 사육하였다. 실험사료와 물은 자유채식 및 자유음수 시켰으며, 점등은 전 실험기간 동안 16L:8D로 고정하였다. 기타 사양관리는 Hy-Line 사양관리 지침에 명시된 방법에 준하여 실시하였다.

#### 마. 조사항목

##### (1) 사료섭취량 및 난생산성

사료섭취량은 급여량과 잔량을 1주 간격으로 조사하여 각 반복별로 주당 섭취량을 산출하였다. 실험기간 동안 매일 오후 2시에 수집한 정상산란 개수와 연란, 파란 등을 합한 총 산란 개수를 사육수로 나누어 산란율을 구하였으며, 수집된 정상산란 전부의 무게를 측정하여 정상 계란 수로 나누어 평균 난중을 산출하였다. 일



산란량은 산란율에 난중을 곱하고 100으로 나누어 계산하였다.

## (2) 계란의 품질

실험 사료 급여 후 주 단위로 생산된 계란을 반복구당 10개씩 수집하여 난각 강도, 난각두께 등 난각질 관련 항목을 조사하였다. 실험사료를 급여하여 생산된 계란 중 평균치에 해당하는 계란을 1주 간격으로 수집하여 난각 강도, 난각 두께 및 Haughunit 등 계란의 내부난질 및 난각질 관련 항목을 측정하였다. 난각 강도는 난각 강도계(FHK, Fujihira Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로 하고 수직으로 고정된 후 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각 강도 측정 후 난백의 높이를 조사하여 난중을 대비한 Haugh unit수치를 구하였다 (QCM+, Technical Services and supplies Ltd., York, England). 난각 두께는 계란의 중앙부 난각 파편을 채취하여 난각 후도계 (Digimatic Micrometer, Series 293-330, Mitutoyo, Japan)를 통해 측정한 두께의 평균치로 하였다. 난황색은 Roche egg yolk color fan(Yolk color fan, Roche, Switzerland)과 대조한 색도로 표시하였다. 난각 색도는 난각 색도 (QCM+, Technical Services and Supplies Ltd., York, England)를 이용하여 측정하였다.

## (3) 조직의 길이, 중량, pH와 생체중

조직별 중량은 실험 종료 시에 처리구당 8수를 평균 체중에 유사하게 선발하여 건국대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 도살한 후 간장, 비장, 심장, 사냥, 공장, 회장, 맹장, 복강지방 및 난소관을 채취하여 중량을 측정하였고 생체중 100g 당 상대적인 중량으로 환산하였으며, 생체중을 측정하였다.

## (4) 혈액성상

실험 종료 시에 각 처리구에서 유사한 체중을 가진 개체를 8수씩 선발하여 혈액을 채취하고 원심분리 이후 혈청을 분리하였다. Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)활성은 진단용 키트 (GOT-GPT키트, 영동제약)를 사용하여 비색 방법으로 분석하였다. 자동혈액분석기(COBAS MIRA plus, ROCHE diagnostics)를 사용하여 혈청 내 triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, BUN, creatinine, total protein, albumin, globulin, albumin/globulin, amylase,

calcium과 phosphorus을 측정하였다.

#### (5) 혈액 내 IgA, IgG, IgM 함량

혈액 내 IgA, IgG 및 IgM 함량은 chicken IgA, IgG, IgM kit (BETHYL Laboratories, Inc, USA)를 사용하여 측정하였다. Goat anti-pig IgA, IgG, IgM를 coating buffer (0.05M carbonate-bicarbonate)에 1:100 비율로 희석한 후, 96well microplate에 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응 후, 96well microplate 각 well의 coating buffer를 제거하고 washing solution (50mM tris, 0.14M NaCl, 0.05% tween 20)으로 3회 세척하였다. 이어서 blocking solution (50mM tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% tween 20)으로 희석된 혈청을 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣고 60분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 다음 5회 세척하고 HRP conjugate 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 이를 다시 5회 세척한 후, enzyme substrate (TMB peroxide substrate, peroxidase solution B)를 100 $\mu$ l씩 넣고 반응시켰다. 5-30분간 반응에 따른 색 변화를 관찰하여 색이 고정되면 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣고 반응을 정지시킨 후, microplate reader(Benchmark plus, Bio-Rad Laboratories, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하고 작성된 표준곡선을 이용하여 IgA, IgG 및 IgM의 함량을 산출하였다.

#### (6) 장내 균총 변화

실험종료 시에 도계한 개체에서 채집한 맹장 내용물 내의 균총을 조사하였다. 맹장 내용물을 phosphate buffered saline(PBS) 용액과 혼합한 이후 homogenizer (AM 77 model, Nissei)로 균질화 하였고, 10<sup>-1</sup>부터 10<sup>-7</sup>까지 각각의 비율로 희석하였다. 총 균, Coliform 박테리아 및 lactic acid bacteria의 수를 측정하기 위해 희석한 시료를 Nutrient agar, MacConkey agar 및 MRS agar에 각각 접종하였다(Tuohy 등, 2002). 접종한 플레이트는 37 $^{\circ}$ C에서 36시간 동안 배양하였고 형성된 균집의 수를 계산하였다.

#### 바. 통계분석

모든 얻어진 결과에 대한 통계분석은 Statistical Analysis System(SAS, 2002)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 각 평균간 유의성 검정은 Duncan의 다

중 검정법(Multiple range test)에 의하여 실시하였다(Duncan, 1955). 처리구간의 유의성검정은 유의수준  $P < 0.05$ 에서 검정하였으며, 유의수준  $P < 0.10$ 을 본 실험에서는 경향이라고 명시하였다.

**Table 4-1. Formula and chemical compositions of the basal diet**

Ingredients	Composition (%)
Corn	50.00
Tallow	0.90
Corn dried distillers gains with solubles (DDGS)	21.24
Soybean meal	7.42
Rapeseed meal	5.00
Sesame seed oil meal	2.00
Feather meal	1.50
Syn. Lys-sulfate	0.38
Syn. Met(liq.)	0.108
Syn. Thr	0.026
Limestone	10.20
Mono dicalcium phosphate (MDCP)	0.59
Salt	0.20
Sodium bicarbonate	0.10
Mineral premix <sup>1</sup>	0.11
Vitamin premix <sup>2</sup>	0.18
Total	100.00
Chemical composition	
Crude protein, %	17.00
Crude fat, %	5.3
Crude fiber, %	3.7
Ca, %	4.00
Available P, %	0.27
Lys, %	0.83
TSAA <sup>3</sup> , %	0.72
TME <sub>n</sub> <sup>4</sup> , Kcal/kg	2,800

<sup>1</sup>Vitamin premix provided followings per kg of diet: vitamin A, 40,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 8,000 IU; vitamin E, 10 IU; vitamin K<sub>3</sub>, 4 mg; vitamin B<sub>1</sub>, 4 mg; vitamin B<sub>2</sub>, 12 mg; vitamin B<sub>6</sub>, 6 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 0.02 mg; pantothenic acid, 20 mg; folic acid, 2 mg; nicotinic, 60 mg.

<sup>2</sup>Mineral premix provided followings per kg of diet: Fe, 30 mg; Zn, 25 mg; Mn, 20 mg; Co, 0.15 mg; Cu, 5 mg; Se, 0.1 mg.

<sup>3</sup>TSAA: Total sulphur amino acid.

<sup>4</sup>TME<sub>n</sub>: Nitrogen corrected true metabolizable energy.

**Table 4-2. The profile of fermented soybean meal**

Ingredients	Contents
Lactic acid bacteria, log <sub>10</sub> CFU/g	8.62 ± 0.35
Yeast, log <sub>10</sub> CFU/g	7.24 ± 0.28
<i>Bacillus subtilis</i> , log <sub>10</sub> CFU/g	8.56 ± 0.34
B-mannanase, unit/g	683.18 ± 92.97
Total isoflavone, mg/kg	1,061.86 ± 140.72
- Total glucoside	650.36 ± 78.45
- Total aglycon	411.50 ± 62.27

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 난 생산성에 미치는 영향

Table 4-2와 같은 성분을 함유한 발효사료첨가제의 산란계 사료 내 첨가 급여가 생산성, 사료섭취량 및 사료효율에 미치는 영향에 대하여 Table 4-3에 나타내었다.

Table 4-3와 같이 첨가사료 섭취에 따른 산란율은, 무첨가구 81.25%, 0.1% 첨가구 87.95%, 0.3% 첨가구 85.39%, 0.5% 첨가구 84.91%로 나타나 모든 사료 첨가제 처리구가 무첨가구보다 산란율이 유의적으로 높게 나타났으며, 그 중에서 0.1% 첨가구가 가장 높은 산란율을 나타내었다. 0.1% 첨가 시, 87.95%로 무첨가구 보다 6.70% 높게 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 사료 첨가제 첨가량이 증가할수록 산란율은 감소하였으나, 모든 사료 첨가제 처리구가 무첨가구보다 산란율이 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

난중(g)은, 무첨가구 64.37(g), 0.1% 첨가구 63.68(g), 0.3% 첨가구 64.48(g), 0.5% 첨가구 65.68(g)로 나타났다. 0.5% 첨가 시에, 유의적으로 가장 높은 난중을 나타냈으며, 무첨가구 보다 난중이 1.31(g) 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

일산란양(Egg Mass, g/hen/d)은, 무첨가구 52.31, 0.1% 첨가구 56.02, 0.3% 첨가구 55.05, 0.5% 첨가구 55.67로 나타나, 무첨가구보다 모든 첨가구에서 유의적으로 높게 나타났다. 또한 0.1% 첨가구 시에, 가장 높은 일산란양을 나타냈으며, 무첨가구 보다 일산란양이 3.71 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

사료섭취양(Egg mass, g/day/bird)은, 무첨가구 121.86, 0.1% 첨가구 123.54, 0.3% 첨가구 124.17, 0.5% 첨가구 122.62로 나타나, 0.3%와 0.1% 첨가구가 무첨가구보다 높게 나타나는 경향을 보였다( $P < 0.10$ ).

사료효율(Feed conversion ratio, g feed/g egg)은, 무첨가구 2.39, 0.1% 첨가구 2.24, 0.3% 첨가구 2.28, 0.5% 첨가구 2.23로 나타나, 무첨가구보다 모든 첨

가구에서 유의적으로 효율적이게 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 0.5%와 0.1% 첨가 시에, 가장 좋은 사료효율을 나타냈으며, 무첨가구 보다 사료효율이 0.16과 0.15 적게, 효율적으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

본 실험 결과 발효사료 첨가제의 산란계 사료 내, 급여는 산란율, 난중, 일산란양, 사료섭취량 및 사료효율을 증가시키는 효과가 관찰되어, 생산성에 도움을 줄 것으로 판단된다.

#### 나. 계란의 품질에 미치는 영향

산란계 사료 내 발효대두박의 첨가 급여가 달걀의 품질에 미치는 영향에 대하여 Table 4-4에 나타내었다.

Table 4-4와 같이 첨가사료 섭취에 따른 난각색은 0.5% 첨가구만 12.19로, 유의적으로 높게 나타났으며, 무처리구 11.68보다 0.51 높게 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 난황색, 난각강도, 난각두께 및 Haugh unit은 유의적으로 계란품질에 영향을 미치지 않았다( $P > 0.05$ ).

본 실험 결과 발효사료 첨가제의 산란계 사료 내, 0.5% 첨가 급여는 난각색을 증가시키는 효과가 관찰되어, 브라운 색깔의 증가에 도움을 줄 것으로 판단된다.

#### 다. 조직에 미치는 영향

산란계 사료 내 발효대두박의 첨가 급여가 조직에 미치는 영향에 대하여 Table 4-5에 나타내었다. 간, 비장, 근위, 심장, 복강지방, 공장, 회장, 회장 길이, 맹장, 난소관 및 생체중은 처리간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 공장길이는 첨가량이 증가 할수록 감소하였으며( $P < 0.05$ ), 공장 pH는 0.3% 첨가구에 서만 무첨가구보다 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

본 실험 결과 체내 조직의 간장, 비장, 심장, 사낭, 공장, 회장, 맹장, 복강지방, 난소관, 생체중의 중량에는 처리간 차이가 없었다. 발효사료 첨가제의 산란계 사료 내 첨가 급여는 공장의 길이를 감소시키는 효과가 관찰되었으며, 0.3% 첨

가구만 공장의 pH 처리구가 상승하였으나, 사료첨가제 급여가 생리적으로 부정적인 영향은 미치지 않은 것으로 판단된다.

라. 장내 균총 변화에 미치는 영향

산란계 사료 내 발효사료 첨가제 첨가 급여가 따른 맹장 내의 균총 변화에 미치는 영향에 대하여 Table 4-6에 나타내었다. 총 균수와 유산균 및 대장균수에 서는 처리 간 차이가 나타나지 않았다( $P>0.05$ ).

마. 혈액성상에 미치는 영향

산란계 사료 내 발효사료 첨가제 첨가 급여가 따른 혈액 성상에 미치는 영향에 대하여 Table 4-7에 나타내었다. AST-GOT, ALT-GPT, BUN(blood urea nitrogen) creatinine, total protein, albumin, globulin, albumin/globulin, amylase, calcium과 phosphorus에서는 처리간 큰 차이가 없는 것으로 나타났다( $P>0.05$ ).

또한 산란계 사료 내 발효사료 첨가제 첨가 급여가 따른 혈액내 콜레스테롤 성상에 미치는 영향에 대하여 Table 4-8에 나타내었다. Triglyceride , Total cholesterol, HDL-cholesterol 과 VLDL+LDL-cholesterol 에서는 처리간 큰 차이가 없는 것으로 나타났다( $P>0.05$ ).

따라서 발효사료 첨가제의 산란계 사료첨가 급여는 혈액 내 주요 성분들에 영향을 미치지 않았다.



**Table 4-3. The dietary effect of FSBM on the performance in laying hens**

Item	Fermented soybean meal				P-value
	Control	0.1%	0.3%	0.5%	
Egg production, %	81.25 ± 8.34 <sup>b</sup>	87.95 ± 5.64 <sup>a</sup>	85.39 ± 5.64 <sup>a</sup>	84.91 ± 6.38 <sup>a</sup>	0.03
Egg weight, g/egg	64.37 ± 2.09 <sup>b</sup>	63.68 ± 1.15 <sup>c</sup>	64.48 ± 1.25 <sup>b</sup>	65.68 ± 1.22 <sup>a</sup>	<0.01
Egg mass, g/hen/d	52.31 ± 5.75 <sup>bc</sup>	56.02 ± 3.90 <sup>a</sup>	55.05 ± 3.64 <sup>a</sup>	55.67 ± 4.13 <sup>a</sup>	<0.01
Feed intake, g/hen/d	121.86 ± 3.89 <sup>b</sup>	123.54 ± 4.10 <sup>ab</sup>	124.17 ± 4.18 <sup>a</sup>	122.62 ± 3.89 <sup>ab</sup>	0.08
FCR <sup>1</sup> , g feed/g egg	2.39 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.24 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.18 <sup>b</sup>	<0.01

<sup>1</sup>FCR: Feed conversion ratio.

Different superscripts(a-c) in the same row indicate significantly(P<0.05) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

**Table 4-4. The dietary effect of FSBM on egg quality in laying hens**

Item	Fermented soybean meal				P-value
	Control	0.1%	0.3%	0.5%	
Eggshell color, unit	11.68 ± 1.46 <sup>b</sup>	11.29 ± 1.65 <sup>b</sup>	11.58 ± 1.40 <sup>b</sup>	12.19 ± 1.43 <sup>a</sup>	<0.01
Yolk color	7.93 ± 0.56	7.88 ± 0.58	7.82 ± 0.79	7.94 ± 0.66	0.57
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	2.92 ± 0.81	2.86 ± 0.89	2.91 ± 0.77	2.94 ± 0.80	0.92
Eggshell thickness, mm	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.05	0.41 ± 0.06	0.26
Haugh unit	89.65 ± 8.94	91.43 ± 7.81	89.78 ± 7.99	91.97 ± 7.26	0.13

Different superscripts(a, b) in the same row indicate significantly(P<0.05) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

**Table 4-5. The dietary effect of FSBM on relative weight, length and pH of organs in laying hens**

Item (g/ 100g BW)	Fermented soybean meal			P-value	
	Control	0.1%	0.3%		0.5%
Liver	34.95 ± 5.66	35.45 ± 6.58	36.05 ± 5.34	30.91 ± 3.40	0.23
Spleen	2.08 ± 0.08	2.06 ± 0.08	2.05 ± 0.08	2.01 ± 0.05	0.16
Heart	9.00 ± 1.30	8.55 ± 1.41	9.34 ± 1.18	8.55 ± 1.15	0.49
Gizzard	31.60 ± 2.98	32.94 ± 3.06	31.77 ± 2.71	31.57 ± 2.42	0.73
Jejunum	14.78 ± 2.59	13.91 ± 2.64	13.09 ± 3.41	13.37 ± 2.11	0.62
Ileum	12.04 ± 2.30	11.21 ± 4.06	12.05 ± 2.29	11.02 ± 1.80	0.82
Cecum	6.06 ± 0.91	6.06 ± 1.77	5.82 ± 1.36	5.27 ± 0.78	0.56
Abdominal fat	96.78 ± 27.95	72.34 ± 19.06	76.03 ± 24.72	86.39 ± 21.18	0.17
Ovarian tube	61.72 ± 18.04	65.38 ± 7.66	70.22 ± 19.18	70.18 ± 7.60	0.57
Jejunum length (cm)	69.43 ± 3.70 <sup>a</sup>	67.19 ± 5.00 <sup>a</sup>	60.56 ± 5.67 <sup>b</sup>	59.25 ± 9.68 <sup>b</sup>	<0.01
Jejunum pH	5.90 ± 0.17 <sup>b</sup>	5.94 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.18 ± 0.32 <sup>a</sup>	5.95 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.04
Ileum length (cm)	62.44 ± 5.91	59.44 ± 5.15	61.31 ± 8.34	55.31 ± 10.03	0.27
Ileum pH	6.61 ± 0.39	6.55 ± 0.54	6.20 ± 0.27	6.64 ± 0.37	0.13
Carcass weight (kg)	2.08 ± 0.08	2.06 ± 0.07	2.05 ± 0.08	2.01 ± 0.05	0.26

Different superscripts(a, b) in the same row indicate significantly(P<0.05) different values in mean score(Mean±SD) among treatment groups.

**Table 4-6. The dietary effect of fermented soybean meal on microflora concentrations in laying hens**

Item	Fermented soybean meal				P-value
	Control	0.1%	0.3%	0.5%	
Total microbes, log <sub>10</sub> (cfu/g)	6.41 ± 0.26	6.36 ± 0.13	6.55 ± 0.22	6.29 ± 0.32	0.35
Lactic acid bacteria, log <sub>10</sub> (cfu/g)	6.82 ± 0.17	6.71 ± 0.24	6.88 ± 0.19	6.93 ± 0.21	0.48
Coliforms, log <sub>10</sub> (cfu/g)	5.26 ± 0.19	5.16 ± 0.23	5.13 ± 0.33	5.21 ± 0.25	0.22

**Table 4-7. The dietary effect of FSBM on blood characteristics in laying hens**

Item	Fermented soybean meal								P-value
	Control		0.1%		0.3%		0.5%		
ALT-GPT, (U/ℓ)	4.38	± 1.06	4.75	± 2.19	4.00	± 2.14	3.63	± 1.51	0.63
AST-GOT, (U/ℓ)	148.25	± 13.68	164.12	± 27.65	160.88	± 23.98	158.63	± 20.86	0.52
BUN, (mg/dl)	2.16	± 0.34	2.57	± 0.43	2.83	± 0.57	2.65	± 0.22	0.48
Creatinine, (mg/dl)	0.26	± 0.08	0.29	± 0.12	0.30	± 0.03	0.21	± 0.02	0.22
Total protein, (g/dl)	5.64	± 0.61	5.40	± 0.29	5.56	± 0.86	5.20	± 0.18	0.61
Albumin, (g/dl)	2.70	± 0.19	2.70	± 0.17	2.72	± 0.17	2.66	± 0.05	0.95
Globulin, (g/dl)	2.94	± 0.53	2.70	± 0.16	2.84	± 0.65	2.54	± 0.18	0.51
Albumin / Globulin	0.94	± 0.15	1.00	± 0.06	0.98	± 0.12	1.05	± 0.08	0.43
Amylase, (U/ℓ)	282.20	± 61.37	349.00	± 45.62	279.88	± 23.74	405.10	± 48.86	0.11
Calcium, (mg/dl)	20.48	± 2.17	21.32	± 2.73	21.74	± 1.34	20.44	± 2.35	0.74
Phosphorus, (mg/dl)	5.24	± 0.81	6.52	± 0.84	5.88	± 1.49	6.06	± 1.17	0.37

Table 4-8. The dietary effect of FSBM on cholesterol of blood in laying hens

Item	(mg/dl)							
	Fermented soybean meal							P-value
	Control	0.1%	0.3%	0.5%				
Triglyceride	1,069.00 ± 464.49	872.38 ± 456.74	973.25 ± 448.96	723.63 ± 403.06				0.46
Total cholesterol	121.25 ± 43.69	108.50 ± 24.89	122.75 ± 52.18	97.75 ± 23.35				0.52
HDL-cholesterol	11.13 ± 2.88	10.84 ± 2.07	12.68 ± 6.10	10.84 ± 2.78				0.76
VLDL+LDL-cholesterol <sup>1</sup>	110.12 ± 43.56	97.66 ± 23.58	110.68 ± 46.43	86.91 ± 21.28				0.78

<sup>1</sup>VLDL+LDL-cholesterol: value was calculated to subtract HDL-cholesterol from the total cholesterol.

#### 바. 혈액 내 면역지표 변화에 미치는 영향

산란계 사료 내 발효사료 첨가제의 첨가 급여가 immunoglobulin에 미치는 영향에 대하여 Table 4-9에 나타내었다. IgA는 0.5% 첨가구만 204.30ng/ml로, 무처리구 192.00ng/ml보다 12.30 ng/ml 높게 나타났(P<0.05). 또한 IgM은 0.3% 첨가구 47.00ng/ml, 0.5% 첨가구 44.51ng/ml로 나타나, 무처리구 37.32ng/ml보다 각각 9.62ng/ml과 7.19ng/ml 높게 나타났(P<0.05). 그러나 IgG는 평균 수치는 무처리구보다 첨가구가 높았으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다(P>0.05).

본 실험 결과 발효사료 첨가제의 산란계 사료 내 첨가 급여는 혈액내 IgA(0.5%)와 IgM(0.3%, 0.5%) 농도를 증가시키는 효과가 관찰되어 면역력 개선에 도움을 줄 것으로 판단된다.

#### 사. 저장기간 내 Haugh unit과 MDA 변화에 미치는 영향

산란계 사료 내 발효사료 첨가제 첨가 급여 후, 계란의 1-4주간의 저장기간 내 Haugh unit과 MDA 변화에 미치는 영향에 대하여 Table 4-10에 나타내었다. Haugh unit은 1, 2, 3주 및 전(1-4) 구간에서는 처리 간 차이가 나타나지 않았지만 (P>0.05), 4주 보관 시에 0.1% 처리구에서 77.33으로, 무처리구 72.62보다 4.71 높게 나타나는 경향을 나타내었다(P<0.10). MDA는 처리 간 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

본 실험 결과 발효사료 첨가제의 산란계 사료 내 첨가 0.1% 급여 시, Haugh unit 증가시키는 경향이 관찰되어, 저장성(신선도)에 도움을 줄 것으로 판단된다.

Table 4-9. The dietary effect of FSBM on IgG, IgA and IgM in laying hens

Item	Fermented soybean meal								P-value
	Control		0.1%		0.3%		0.5%		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
IgA	192.00	3.15 <sup>b</sup>	194.24	5.03 <sup>b</sup>	188.64	11.33 <sup>b</sup>	204.30	15.44 <sup>a</sup>	0.03
IgG	40.65	13.59	45.30	13.14	55.72	15.63	51.43	15.29	0.40
IgM	37.32	4.45 <sup>b</sup>	38.48	4.21 <sup>b</sup>	47.00	8.40 <sup>a</sup>	44.51	2.75 <sup>ab</sup>	0.03

Different superscripts (a, b) in the same row indicate significantly ( $P < 0.05$ ) different values in mean score (Mean±SD) among treatment groups.



Table 4-10. Effect of dietary fermented soybean meal on the change of Haugh unit and yolk lipid peroxidation during storage in laying hens

Period	Fermented soybean meal				P-value
	Control	0.1%	0.3%	0.5%	
Haugh unit (1 week)	84.43 ± 6.16	86.97 ± 8.98	89.41 ± 8.94	85.75 ± 8.14	0.26
Haugh unit (2 week)	77.51 ± 11.75	75.76 ± 9.41	74.48 ± 10.45	76.15 ± 8.97	0.83
Haugh unit (3 week)	76.61 ± 12.95	78.15 ± 6.90	79.15 ± 8.25	79.80 ± 8.67	0.72
Haugh unit (4 week)	72.62 ± 9.33 <sup>b</sup>	77.33 ± 10.27 <sup>a</sup>	70.47 ± 10.84 <sup>b</sup>	72.57 ± 6.42 <sup>b</sup>	0.09
Haugh unit (1-4 week)	77.57 ± 11.37	80.04 ± 8.97	78.38 ± 11.87	78.43 ± 9.38	0.51
MDA <sup>1</sup> (4 week, µg/g yolk)	0.0236 ± 0.004	0.0231 ± 0.004	0.0209 ± 0.003	0.0227 ± 0.003	0.92

<sup>1</sup>MDA: Stored for 4 weeks.

Different superscripts(a, b) in the same row indicate significantly (P<0.05) different values in mean score (Mean±SD) among treatment groups.

### 3. 요약

산란계 사료 내 사료첨가제의 수준별 급여가 생산성과 생리활성에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 일반시판사료를 급여하는 대조구에 사료첨가제를 0.1, 0.3 및 0.5% 수준으로 각각 첨가하여 전체 4개 처리구에 5반복으로 구성하였으며 반복수당 9수씩 총 180수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, 처리구별 산란율과 체중이 유사하도록 완전임의 배치한 후 8주간 사양실험을 하였다. 난 생산성 지표인 산란율, 난중, 일산란양 및 사료효율은 대조구보다 높게 나타났으며( $P<0.05$ ), 사료섭취량은 대조구보다 높은 경향을 나타내었다( $P<0.10$ ). 계란품질 지표인 낙각두께, 낙각강도, 난황색 및 Haugh unit은 처리간 차이가 없었으며, 낙각색은 0.5% 첨가구에서 높은 경향을 나타내었다( $P<0.10$ ). 체내 조직의 간장, 비장, 심장, 사낭, 공장, 회장, 맹장, 복강지방, 난소관, 생체중의 중량에는 처리간 차이가 없었으며, 공장의 길이는 첨가량이 증가할수록 감소하였다( $P<0.05$ ). 또한 장내 균총과 혈액 성분, 혈액 내 콜레스테롤에는 처리간 차이가 없었다. 혈액 내 면역지표 성분인 IgA은 0.5% 첨가구, IgM은 0.3와 0.5% 첨가구에서 높게 나타났으나( $P<0.05$ ), IgM은 처리간 차이가 없었다. 저장기간 내 Haugh unit은 4주 차에 0.1% 첨가구에서 높은 경향을 나타내었으나( $P<0.10$ ), MDA는 처리간 차이가 없었다.

따라서 산란계 사료 내 사료첨가제의 사료 급여가 생산성, 계란품질의 낙각색, 면역력을 증가시켰으며, 저장성을 향상시키는 경향을 나타내었으며, 생리적으로 부정적인 영향을 미치지 않은 것으로 미루어 볼 때 산란계의 생산성 개선에 큰 도움을 줄 것으로 사료된다.

## <제 1 위탁연구기관, 건국대학교 산학협력단>

### ■ 1차년도 연구개발내용

## 제 1 절. 발효 사료 첨가제 개발을 위한 유용미생물 확립 및 조건 규명

### 1. 연구내용

#### 가. 식물, 부존자원 발효용 유용균주 탐색 및 특성 조사

식물, 부존자원 발효용 유산균, 바실러스, 효모, 광합성세균 등 유용미생물 확립을 위하여 한우위액, 사일리지, 미역분말 및 오리털 등으로부터 미생물을 분리하여 동정 및 특성을 조사하였다.

#### 나. 유산균과 바실러스균의 단독 및 혼합발효시 발효 특성 규명

액상발효와 고상발효의 조건을 규명한다. 액상발효시 유용균주에 대한 단독배양 최적 조건 확립 및 경제적 혼합배양법을 확립한다. 고상발효시 미강, 쌀겨, 버섯폐 배지, 과일박, 한방추출부산물, 유박, 당밀, 분말왕겨, 비지 등 기타 식품가공부산물을 혼합한 유용미생물 발효 및 발효 사료 첨가제를 개발한다.

### 2. 연구방법

가. 효소활성 측정, 항균활성 측정, 길항 측정, 항생제 내성 측정 및 생화학적 특성을 조사하였다.

#### 나. 액상발효 조건

유산균과 바실러스 균의 단독 및 혼합발효시 발효 특성 규명하기 위하여 모든 균주들을 MRS배지에서 37℃로 배양하였고, pH측정, 생균수측정, 항균활성, 소화효소 활성을 측정하였다.

#### 다. 고상발효 조건

대두박, 소맥피, 말분 및 당밀을 이용한 고상 발효 특성을 규명하기 위해 대두박:소맥피:말분:당밀을 각각 70:10:10:10의 비율로 고상 발효하고자 하였다. 상기에서 발효 사료용으로 선발한 유용미생물 *Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304 및 *Lactobacillus plantarum* SK3121을 각각 1% 접종한 후 고체배양의 발효 정상 (pH측정, 생균수, 항균활성, 소화효소 활성)을 조사하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 발효 사료 첨가제 개발을 위한 유용미생물 확립 및 조건 규명

##### (1) 한우 위액에서의 cellulase 분비 균주 분리

한우 위액에서 분리한 균을 적당히 희석하여 PDA 배지에 spreading 후 congo red로 염색하여, 분리 결과 2개의 균주가 cellulase 활성을 보였다 (그림 1-1).

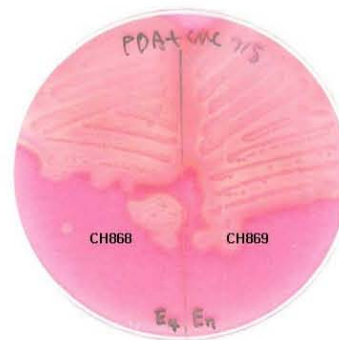


그림 1-1. Isolation of bacteria showing cellulase activity on PDA medium from Hanwoo rumen

##### (2) 사일리지에서 cellulase 분비 균주 분리

사일리지에서 분리한 균은 그림 1-2에서 확인 할 수 있다. 대부분이 LB배지에서 cellulase 활성을 보였다. 형태학적으로 상이한 균들을 골라 LB plate에 spreading 한 후 congo red 용액으로 염색한 결과 11개의 균주를 분리하였다.

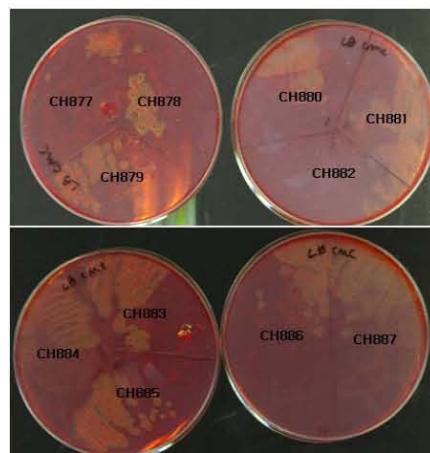


그림 1-2. Isolation of bacteria showing cellulase activity from silages

(3) 한우 위액 및 사일리지에서 분리한 균주의 cellulase 활성조사

Cellulase 활성은 한우 위액에서 분리한 CH868(0.87 U/ml)과 CH869(1.13 U/ml) 균주보다 Silage에서 분리한 균들 거의 대부분이 cellulase 활성이 높게 나타났으며, CH879(3.36 U/ml), CH884(3.22 U/ml) 및 CH886(3.22 U/ml)균주가 활성이 높게 나타났다(표 1-1).

표 1-1. Extracellular cellulase activities of isolated strains

Strains	Enzyme activities (U/ml)
	Cellulase
CH868	0.87
CH869	1.13
CH877	1.32
CH878	2.08
CH879	3.36
CH880	3.15
CH881	3.10
CH882	1.58
CH883	1.41
CH884	3.22
CH885	3.08
CH886	3.60
CH887	1.90

(4) 미역부산물과 오리털로부터 미생물 분리 및 특성 조사

(가) 미역부산물로부터 SK3364, SK3365, SK3367 및 오리털로부터 SK3369를 분리하였다 (그림 1-3).

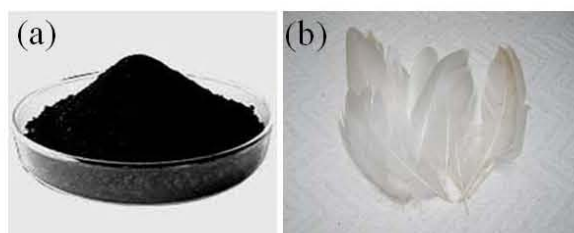


그림 1-3. Photography of seaweed byproduct (a) and duck feather (b).

(나) 그림 1-4에서는 SK3364, SK3365, SK3367 및 SK3369는 Amylase, Cellulase 및 Protease 활성을 나타내었다.

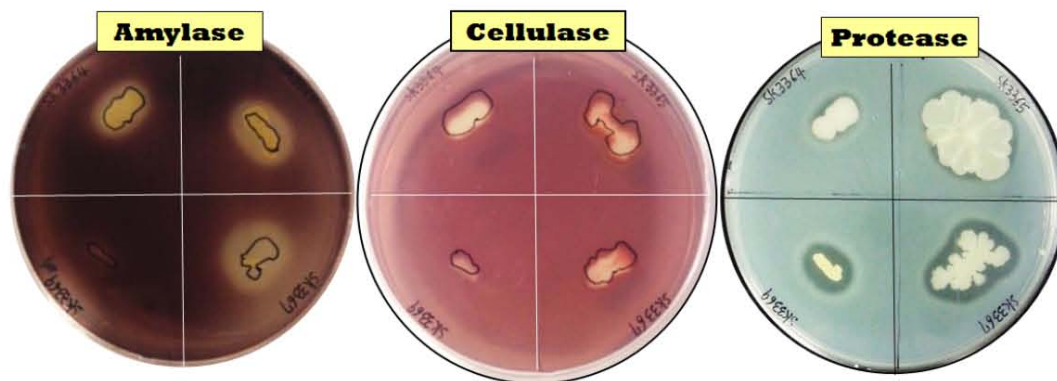


그림 1-4. Enzyme activities of amylase, cellulase, and protease

(다) 소화효소 활성 측정: Amylase 활성은 SK3365 균주가 가장 높게 나타났고, Cellulase 및 Protease 활성은 SK3364와 SK3367 균주가 각각 가장 높은 활성을 보였다 (표 1-3).

표 1-3. Extracellular enzymatic activities of isolated strains

Strains	Enzyme activity(U/ml)		
	Amylase	Cellulase	Protease
SK3364	4.51 ± 1.58	4.55 ± 0.11	10.58 ± 0.00
SK3365	6.16 ± 1.62	0.45 ± 0.17	42.62 ± 0.12
SK3367	2.41 ± 0.54	1.96 ± 0.06	95.00 ± 0.49
SK3369	0.94 ± 0.80	2.99 ± 1.96	36.95 ± 0.25

(라) 항균활성 측정: 병원성 세균에 대한 항균활성 결과는 표 1-4에서 보는 것과 같다. SK3365 균주는 *E. coli*와 *Pantoea agglomerans* 및 *Salmonella*에 항균활성을 나타냈고 특히 *Salmonella gallinarum*에 강한 항균력을 나타내었다.

표 1-4. Antibacterial characteristics of isolated strains from seaweed and duck feather

Strains	Antibacterial activity				
	<i>Escherichia coli</i> (enterotoxigenic)	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>
SK3364	-	-	+	-	-
SK3365	+	+	+++	+	-
SK3367	-	-	-	-	-
SK3369	-	-	+	-	-

Antibacterial activities: -, no inhibition (6mm); +, very slight inhibition (7mm~11mm); ++, moderate inhibition (12mm~16mm); +++, heavy inhibition (17~21mm).

(마) 균주의 동정: 16S ribosomal RNA 서열을 분석하여 NCBI genebank에서 homology를 분석한 결과는 표 1-5와 같다. SK13365균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus methylotrophicus*으로 동시에 상동성을 보여 보다 구체적인 동정이 필요하다.

표 1-5. Homology search of isolated strains

Stock #	Description	Query Coverage (%)	Max Identity (%)
SK3364	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	99
SK3365	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	100
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	100	100
SK3367	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	99
SK3369	<i>Micrococcus luteus</i>	99	99



(바) 생화학적 특성조사: API50 CHB/E kit를 이용한 분리균주의 탄수화물 이용성에 대한 생화학적 특성조사 결과는 다음과 같다.

표 1-6. Carbohydrate utilization profile of isolated strains from seaweed and duck feather

Substrate	Utilization				Substrate	Utilization			
	SK3364	SK3365	SK3367	SK3369		SK3364	SK3365	SK3367	SK3369
Control	+	+	+	-	Esculin	+	+	+	-
Glycerol	+	-	-	-	Salicin	+	+	+	-
Erythritol	+	-	-	-	Cellobiose	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	-	Maltose	+	+	+	-
L-arabinose	+	+	+	+	Lactose	+	-	-	-
Ribose	+	+	+	-	Melibiose	+	+	+	+
D-xylose	+	-	-	-	Sucrose	+	-	+	+
L-xylose	+	-	-	-	Trehalose	+	-	-	-
Adonitol	+	-	-	-	Inulin	+	-	-	-
$\beta$ -methyl-D-xyloside	+	-	-	-	Melezitose	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+	Raffinose	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	-	Starch	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	-	Glycogen	+	-	-	-
Mannose	+	+	-	-	Xylitol	+	+	+	-
Sorbose	+	+	-	-	Gentiobiose	+	-	-	+
Rhamnose	+	+	-	-	D-turanose	+	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	-	D-lyxose	+	-	-	-
Inositol	+	+	+	-	D-tagatose	+	-	-	-
Mannitol	+	+	+	-	D-fucose	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	L-fucose	+	-	-	-
$\alpha$ -methyl-D-Mannoside	+	+	+	-	D-arabitol	+	-	-	-
$\alpha$ -methyl-D-Glucoside	+	+	+	-	L-arabitol	+	+	+	-
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	-	Gluconate	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	-	2-keto-gluconate	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	-	5-keto-gluconate	+	+	-	-



(5) 계껍질, 땅콩껍질, 홍삼박에서 분리한 미생물의 동정 및 효소활성 (상기의 미역분말, 오리털에서 분리한 미생물 포함)

Source	Stock #	Identified	Enzyme activity		
			Amylase	Cellulase	Protease
계껍질	SK3377	<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	++
	SK3378	<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	++
	SK3379	<i>Azospirillum</i> sp.	-	-	-
	SK3380	<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	-
	SK3381	<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-
땅콩껍질	SK3382	<i>Leclercia</i> sp.			+++
	SK3383	ND	+	+	-
	SK3384	<i>Enterbacter</i> sp.	-	-	++
	SK3385	<i>Enterbacter</i> sp.	-	-	-
	SK3386	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-
홍삼박	SK3389	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	+	-
	SK3390	<i>Bacillus pumilus</i>	-	++	+
	SK3391	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	++	-	+++
	SK3387	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	+
	SK3388	<i>Bacillus pumilus</i>	+	++	+++
미역분말	SK3368	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	-	+
	SK3369	<i>Micrococcus luteus</i>	+	-	++
	SK3370	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	+
	SK3371	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	+
	SK3372	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
오리털	SK3373	Uncultured bacterium	+	-	-
	SK3364	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	+++	+	++
	SK3365	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	+++	++	++
	SK3366	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	-	-
	SK3367	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	++

(6) 실험실 보유의 유산균과 바실러스 균의 특성

(가) 소화효소 : Amylase, Cellulase 및 Protease 활성은 *Bacillus subtilis* SK877, *Bacillus licheniformis* SK879 및 *Bacillus subtilis* SK3365 균주가 활성이 높았다 (표 1-7).

표 1-7. Enzymatic activity of different microbes

Labling	Identification	Medium	A	C	P	X
SK1304	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS	-	-	-	-
SK2636	<i>Lactobacillus reuteri</i>	MRS	+	-	-	-
SK3121	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	-	-	-	-
SK1962	<i>Leuconostock</i> sp.	MRS	-	-	-	-
SK1958	부추발효균	MRS	-	-	-	-
SK877	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	+++	+++	+++	-
SK879	<i>Bacillus licheniformis</i>	LB	+++	+++	+++	-
SK1640	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	+++	++	+++	-
SK1643	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	+++	+++	++	-
SK1646	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	+++	+++	++	-
SK1865	낫뜨 <i>Bacillus</i>	LB	+	++	+	-
SK3365	오리털 <i>Bacillus amylo</i>	LB	+++	+++	+++	-
SK3391	홍삼박 <i>Bacillus amylo</i>	LB	+	-	+++	-
SK1230	<i>Bacillus licheniformis</i>	LB	+	+++	+	-

A: amylase C: cellulase P: protease X: xylanase

clear zone area: +: 1~2mm; ++: 2~4mm; +++: 4~6mm; -: no detected.

(나) 항균활성 : 가축병원성 세균에 대한 항균활성을 LB배지에서 clear zone을 확인하면서 측정하였고 결과는 표 1-8과 같다.

*Lactobacillus brevis* SK1304와 *Lactobacillus reuteri* SK2636균주는 *Haemophilus parasuis*와 *Salmonella pullorum*에 강한 항균활성을 보였다. 특히 *Lactobacillus plantarum* SK1962는 *Salmonella gallinarum*에 강한 항균력을 보였다.

Table 1-8. Antibacterial activity of different microbes

Test bacteria	Identification	medium	SK870	SK872	SK876	SK890	SK891	SK3359	SK3360	1450
			<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>	<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Burkholderia</i> sp.
SK1304	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS	-	8	-	13.5	9	-	12.5	11
SK2636	<i>Lactobacillus reuteri</i>	MRS	-	9.5	10	12	-	7.5	11	12
SK3121	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	19	10	7.5	14.5	15	7.5	13.5	12
SK1962	<i>Leuconostoc</i> sp.	MRS	8	13	9.5	14	17	19	10	14.5
SK1958	부추발효균	MRS	-	6.5	-	-	-	-	-	-
SK877	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	8	-	-	-	7	-	-	15
SK879	<i>Bacillus licheniformis</i>	LB	-	-	-	-	-	-	-	14
SK1640	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	-	-	-	-	-	-	-	13
SK1643	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	-	-	-	7	9	-	-	13
SK1646	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	-	-	-	-	-	-	-	14
SK1865	낮또 <i>Bacillus</i>	LB	7	-	-	-	-	-	-	-
SK3365	오리털 <i>Bacillus amylo</i>	LB	8	-	-	7	-	-	-	15
SK3391	홍삼박 <i>Bacillus amylo</i>	LB	-	-	-	-	-	7	-	-
SK1230	<i>Bacillus licheniformis</i>	LB	-	-	-	-	-	-	-	-

hole method ; diameter measurement (mm)  
hole diameter: 6mm

(다) 유산균과 바실러스 균을 Coculture하기 위한 상호 길항력 조사: 분리된 균주들의 혼합 동시배양을 위한 길항작용 평가는 *Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304 및 *Lactobacillus plantarum* SK3121 균주로 서로 길항작용이 없어 최종 혼합배양용 균주로 선별하였다(표 1-9).

Table 1-9. Antagonistic activity of different microbes

Main microbes	Identification	test microbes								
		877	879	1230	1640	1643	1646	1865	3365	3391
1304	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	+	++	-	-	-	-	+++	-
1958	부추발효균	-	+	-	+	-	-	-	+	-
1962	<i>Leuconostoc</i> sp.	-	-	+++	-	+	-	-	+	-
2636	<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	+++	-	++	-	-	-	+++	+
3121	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
				1304	1958	1962	2636	3121		
877	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+	-	-		
879	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-	+	+	+		
1230	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	-	+	++	++		
1640	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+	++	+++		
1643	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	+++	++	+++		
1646	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	+++	++	++		
1865	낫또 <i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-	+	++		
3365	오리털 <i>Bacillus amylo</i>	+	-	-	-	-	+	+++		
3391	홍삼박 <i>Bacillus amylo</i>	-	-	-	-	-	-	+		

+: 길항 있다; -: 길항 없다.

(라) 혼합배양시 균주 모니터링을 위한 항생제 내성 평가: 후보균주들의 혼합배양시 각 균주들을 선별하는데 필요한 항생제 스펙트럼을 살펴본 결과는 표 1-10과 같다. 특히 혼합배양시 *Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304 및 *Lactobacillus plantarum* SK3121 균주의 선별을 위하여 특정 항생제에 대한 내성을 평가하였다 이들 균주를 선별 하기위한 항생제의 적정 농도는 ampicillin (50 $\mu$ g/ml), tetracycline (10 $\mu$ g/ml) 및 gentamycin (8.5 $\mu$ g/ml)으로 확인되었다.

표 1-10. Antibiotic sensitivity of different microbes

Medium	Sample	Antibiotics								
		Erythromycin	Streptomycin	Chloramphenicol	Carbenicillin	Gentamycin	Ampicillin	Spectinomycin	Tetracycline	Kanamycin
MRS	1304	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	1958	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	2636	-	-	-	-	+	-	+	-	+
	3121	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1962	-	+	-	-	-	-	+	-	+
LB	877	-	+	-	-	-	++	-	-	-
	879	+++	++	-	-	-	+	-	-	-
	1230	-	-	++	+++	-	-	-	-	-
	1640	-	-	-	++	-	++	-	-	-
	1643	-	-	-	++	-	++	-	-	-
	1646	-	-	-	++	-	++	-	-	-
	1865	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3365	++	-	-	-	-	+++	-	-	-
	3391	-	-	-	-	-	++	-	-	-

- : no growth; + : slight growth ability; ++ : good growth ability; +++: excellent growth ability

(마) 발효 사료 첨가제용 혼합 균주 (SK877, SK1304, SK3121)의 상호 특성: 상기에 서 언급한 *Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304 및 *Lactobacillus plantarum* SK3121 균주를 최종 혼합배양용 균주로 선발하였으며 이 들 균주의 특성을 요약하면 표 1-11과 같다.

표 1-11. Characteristics of strains SK877, SK1304, and SK3121 for the fermentation of feed.

Characteristics		Strains		
		<i>Bacillus subtilis</i> SK877	<i>Lactobacillus brevis</i> SK1304	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK3121
<b>Enzymatic activity</b>	Amylase	+++	-	-
	Cellulase	+++	-	-
	Protease	+++	-	-
	Xylanase	-	-	-
	- : no enzymatic activity; +++ : very strong enzymatic activity			
<b>Antibacterial activity for animal pathogen</b>	<i>Clostridium perfringens</i>	8	-	19
	<i>Enterotoxigenic E.coli</i>	-	8	10
	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	7.5
	<i>Haemophilus parasuis</i>	-	13.5	14.5
	<i>Haemophilus somnus</i>	7	9	15
	<i>Salmonella gallinarum</i>	-	-	7.5
	<i>Salmonella pullorum</i>	-	12.5	13.5
	<i>Burkholderia</i> sp.	15	11	12
Hole method (hole diameter 6 mm), - : No clear zone				
<b>Antagonistic activity</b>	SK877	NA	-	-
	SK1304	-	NA	-
	SK3121	-	-	NA
	- : No antagonistic activity during coculture, NA: Not applicable			
<b>Antibiotic activity</b>	Erythromycin	-	-	-
	Streptomycin	+	-	-
	Chloramphenicol	-	-	-
	Carbenicillin	-	+	-
	Gentamycin	-	-	-
	Ampicilin	++	-	-
	Spectinomycin	-	-	-
	Tetracycline	-	-	-
	Kanamycin	-	+	-
++ : Strong resistance to antibiotics; +: Resistance to antibiotics; - : No resistance				

## 제 2 절. 범 부존자원 활용 발효사료첨가제 개발을 위한 액상발효 및 고상발효 조건 규명

### 1. 유산균과 바실러스 균의 단독 및 혼합발효시 발효 특성 규명

#### 가. pH변화

배양 직전 pH는 평균 6.3으로 유지하였다. 단독배양시 *Bacillus subtilis* SK877 과 *Lactobacillus brevis* SK1304는 pH가 5.7 및 4.4까지 각각 내려갔으며 *Lactobacillus plantarum* SK3121는 3.8까지 가장 낮게 유지되었다. 혼합배양에서는 8시간 이후 pH가 4.3으로 나타났고, 16시간 이후 pH가 4.0에 도달하였다 (그림 1-5).

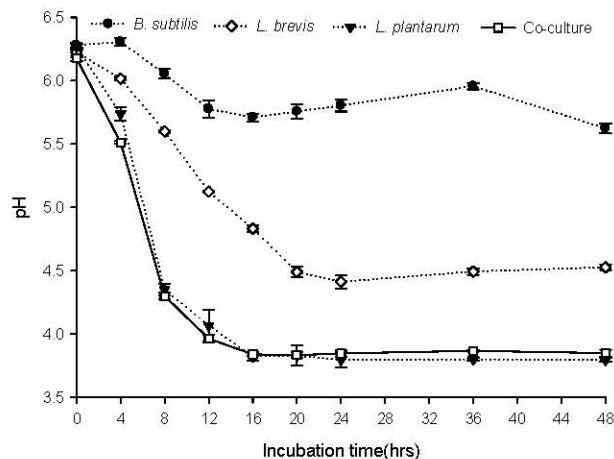


그림 1-5. pH change

#### 나. 균주의 성장(CFU)

생균수는 배양 8시간 이후에  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 전후로 정상적으로 나타났다. 혼합배양시 단독배양과 비교하였을 때 *Lactobacillus brevis* SK1304는 균체수가 늘어났으며, *Lactobacillus plantarum* SK3121는 비슷한 수준을 유지하였다 (그림 1-6).

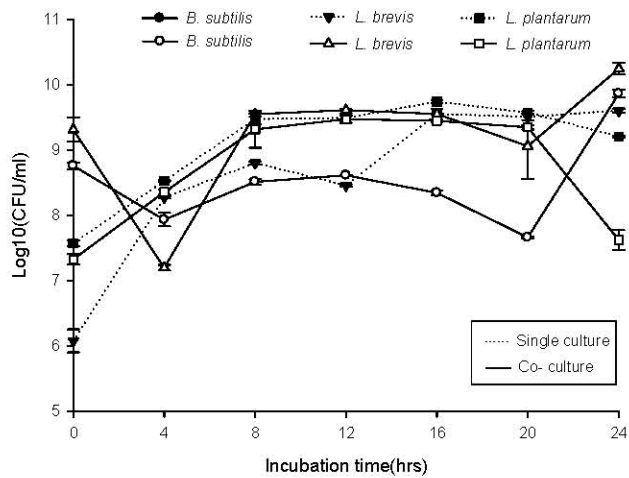
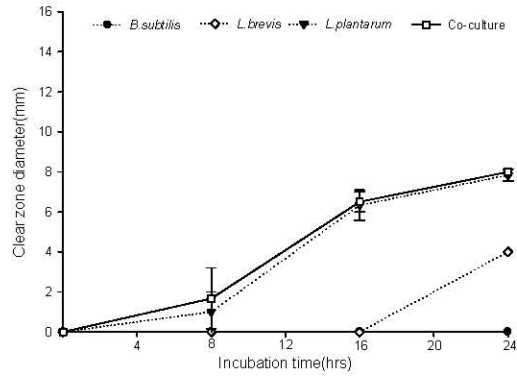


그림 1-6. Cell growth

#### 다. 가축병원성 세균에 대한 항균활성

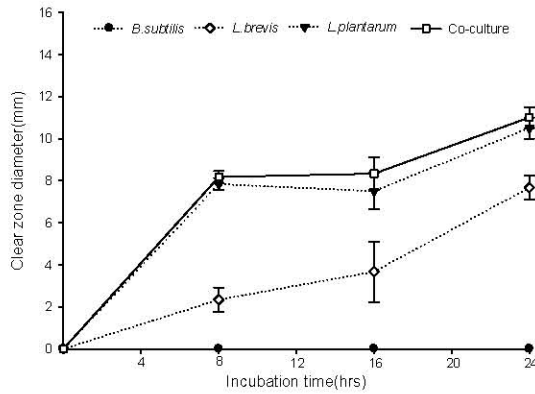
*Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304, *Lactobacillus plantarum* SK3121 단독 및 혼합배양시 가축 병원성 미생물에 대한 항균활성 측정 결과는 그림 1-7부터 1-11과 같다. 배양시간이 경과함에 따라 높은 항균활성이 나타났고, 배양 24시간 이후 *Clostridium perfringens*, *Haemophilus parsuis*, *Haemophilus somnus*, *Burkholderia* sp. 및 *Salmonella pullorum* 모든 균에 강한 활성이 나타났으며, 단독배양과 혼합배양을 비교하였을 때 활성이 비슷하게 나타났다. *Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304, *Lactobacillus plantarum* SK3121 혼합배양시 항균활성은 대부분 *Lactobacillus plantarum* SK3121 으로부터 나온 젖산과 박테리오신 등의 효과로 판단되어진다. *Haemophilus parsuis* 와 *Burkholderia* sp. 세균들에 대한 항균활성은 배양 8시간 후부터 강하게 나타났다. *Clostridium perfringens*와 *Haemophilus somnus* 세균들에 대한 항균활성은 배양 16시간 후에 강하게 활성을 보이기 시작하였으며, *Salmonella pullorum*은 24시간이 지나도 지속적으로 활성이 증대되고 있었다.





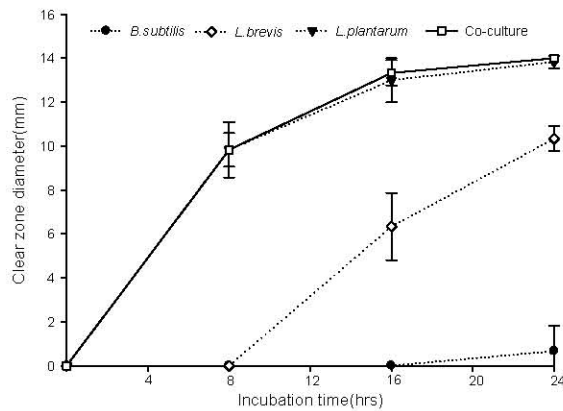
*Clostridium perfringens*

그림 1-7. Antibacterial activity for *Clostridium perfringens* during the coculture fermentation.



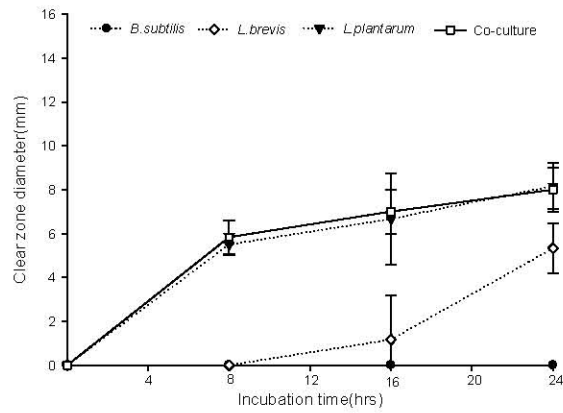
*Haemophilus parasuis*

그림 1-8. Antibacterial activity for *Haemophilus parasuis* during the coculture fermentation.



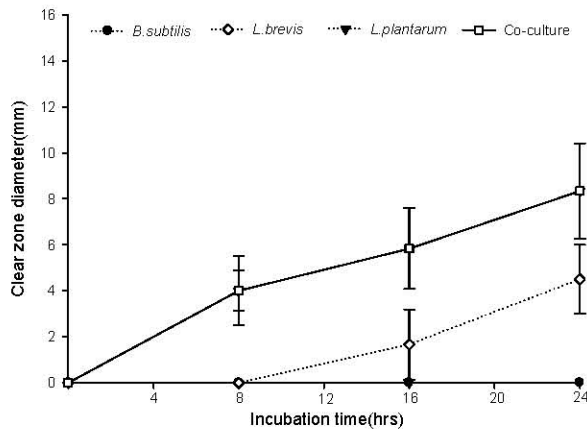
*Haemophilus somnus*

그림 1-9. Antibacterial activity for *Haemophilus somnus* during the coculture fermentation.



*Burkholderia sp.*

그림 1-10. Antibacterial activity for *Burkholderia sp.* during the coculture fermentation.



*Salmonella pullorum*

그림 1-11. Antibacterial activity for *Salmonella pullorum* during the coculture fermentation.

#### 라. 소화효소 활성

표 1-11에서 LB배지에서 *Bacillus subtilis* SK877만이 효소 활성을 가지고 있었기 때문에 단독배양시 이 균주와 혼합배양액에 대한 효소활성을 측정하여 상호 비교하였다 (표 1-12). *Bacillus subtilis* SK877는 단독 배양에서 Amylase 활성은 매우 낮게 측정되었으며 Cellulase 활성은 측정되지 않았다. Protease 활성은 배양

직전 162.9(U/ml)로 가장 높게 나타났으며, 배양 후 48시간에는 47.2(U/ml)로 감소하였다. 혼합 배양 (*Bacillus subtilis* SK877, *Lactobacillus brevis* SK1304 및 *Lactobacillus plantarum* SK3121)에서도 Amylase 및 Cellulase 활성은 낮게 측정되었으며, Protease 활성은 배양 전 90.4U/ml)로 가장 높게 나타났고, 배양후 48시간에는 26.2(U/ml)로 감소하였다. Protease 활성 시간이 경과함에 따라 감소하는 이유는 MRS 배지에 기인하는 것으로 사료된다. *Bacillus subtilis* SK877균주의 소화 효소 활성이 LB배지의 plate에서는 강하였으나, MRS의 액상배지에서는 매우 약한 것으로 판단되어지며 추후 연구로 규명할 예정이다.

표 1-12. Enzymatic activity during the coculture on MRS media

Sample (U/ml)	<i>Bacillus subtilis</i> only			Coculture		
	0	24	48	0	24	48
Incubation time (hrs)	0	24	48	0	24	48
Amylase	-	0.009±0.016	0.009±0.022	0.001±0.01	0.0083±0.03	-
Cellulase	-	-	-	-	-	-
Protease	162.9±59.6	105±11	47.2±10.7	90.4±15.9	86.3±30.5	26.0±27.3

## 2. 대두박, 소맥피, 말분 및 당밀을 이용한 고상 발효 특성 규명

### 가. pH 변화

초기 pH는 배양초기 평균 6.4로 유지하다가 배양 24시간 이후 평균 pH가 4.4에 도달하여 적절한 발효를 확인할 수 있었다, 이후에는 다시 pH가 5.3으로 일시적으로 상승한 후 감소하는 경향을 보였다 (그림 1-12).

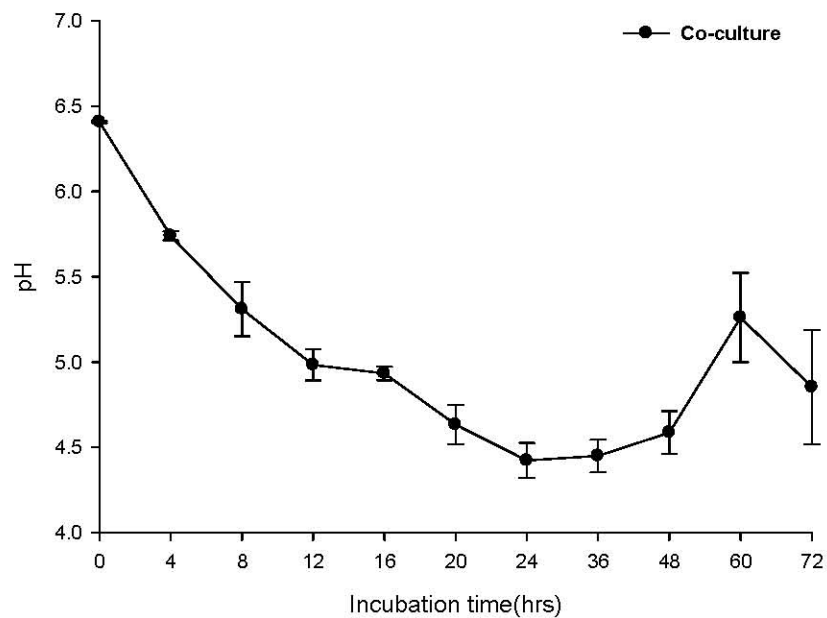


그림 1-12. pH change

#### 나. 생균수 변화

고체발효에서 생균수는 최대  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 이상으로 정상적으로 보여주었다. 발효가 진행됨에 따라 *Lactobacillus plantarum* SK3121은 12시간, *Lactobacillus brevis* SK1304는 20시간, *Bacillus subtilis* SK877는 24시간 무렵에 각각 최대 균 성장의 피크를 보여주었다 (그림 1-13). 3가지 균주 모두의 균수를 높게 유지하는 시간은 배양 후 24시간이었다.

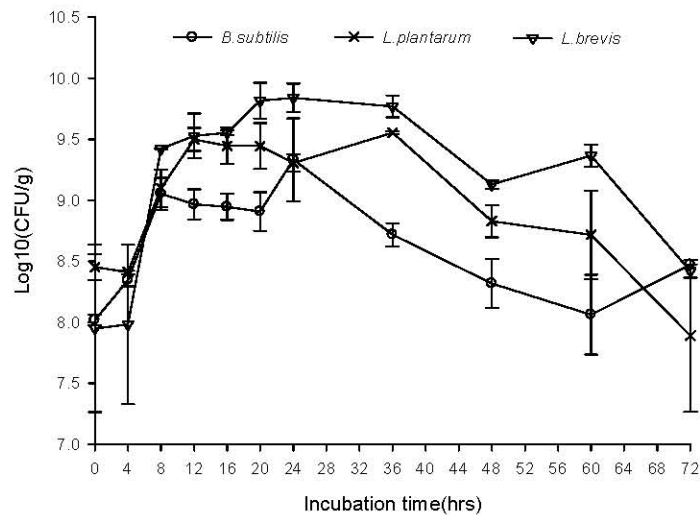


그림 1-13. Cell growth.

#### 다. 항균활성

사료원료의 고체발효에 있어서 병원성 미생물에 대한 항균활성의 결과는 그림 1-14과 같다. 배양 60시간 이후 *Clostridium perfringens*, *Haemophilus parvisuis*, *Haemophilus somnus*, *Burkholderia* sp. 및 *Salmonella pullorum* 등 모든 세균에 강한 활성을 보였다. 특히 *Clostridium perfringens*에서 가장 강한 활성이 나타났다.

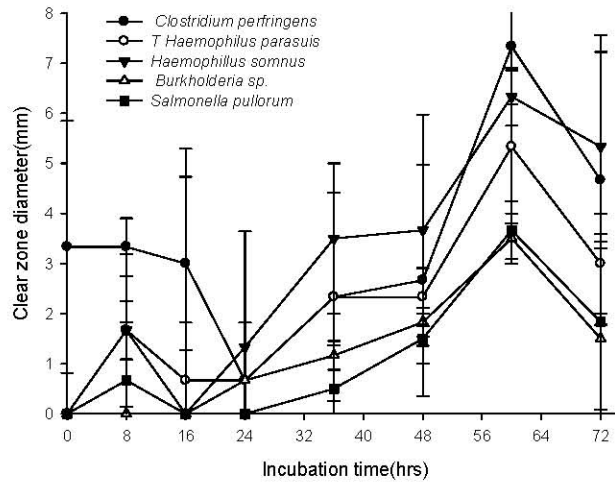


그림 1-14. Antibacterial activity.

#### 라. 효소활성

사료원료의 고체발효에서 Amylase 활성은 배양 24시간에는 감소하는 경향을 보였으나 이후 24.0 U/ml(48시간)에서 85.3 U/ml(72시간)으로 증가 하였다 (표 1-13). Cellulase 활성 또한 배양 24시간에는 감소하는 경향을 보였으나, 그 이후 18.2 U/ml(48시간)에서 385.0 U/ml(72시간)으로 증가 하였다. Protease 활성은 배양 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 배양 72시간에 가장 높은 313.4 U/ml로 나타났다. 현재 Gulcosidase 및 Xyalnase 효소 활성을 비롯하여 유기산 함량, Glucose 농도 등 발효사료 및 사료첨가제로서의 기타 활성을 측정 중이다.

표 1-13. Enzymatic activity during solid state fermentation

Tested Enzyme	Enzyme Activity (U/ml)			
	Incubation time (hrs)			
	0	24	48	72
Amylase	22.2±9.0	6.4±2.4	24.0±35.1	85.3±46.5
Cellulase	15.1±4.9	7.2±5.5	18.2±6.3	385±73.6
Protease	57.8±13.9	151.2±97.3	228.3±74.4	313.4±74.3

## ■ 2차년도 연구개발내용

### 제 1 절. 고효율 발효사료첨가제 제조 공정기술 확립

본 연구는 발효사료첨가제 원료 종류별 제조 공정기술을 확립하고, 생산기술의 독창성 확보를 위한 통계적 기술 적용 그리고 시작품 제작의 목적으로 수행되었다.

발효사료첨가제 원료로서는 1차년도 결과에 따라서 대두박과 2차 년도에는 추가적으로 소맥피와 옥태말분을 검토하였다.

각 원료들이 선발된 균주들의 배양성적(균체활성 및 수분함량)에 미치는 영향을 조사하였고, 그 결과를 바탕으로 최적 혼합 조건을 탐색하였다.

최적 혼합조건은 부분요인분석법의 하나인 혼합물 설계법을 활용하였으며, 분산 분석을 통하여 효과를 검정하고, 최적화도구를 이용하여 반응값들을 모형화하였고, 최종적으로 서로 다른 특성의 최적 배지조성을 조사하였다.

본 최적화 과정에서는 총 4가지의 특성을 배양 효율 평가 기준으로 활용하였다.

첫 번째로는 최종 배양물의 수분함량이다. 수분함량은 발효과정 중, 발효열 혹은 기타 다른 생물학적 현상과 공극형성을 통한 통기성에 의하여 조절된다. 그리고 최종 제품의 수분함량은 후공정인 건조 공정의 부하를 줄여줄 수 있다. 따라서 배양 후, 최종 배양물의 수분함량이 낮을수록 후공정 부하가 적고, 생산비 절감의 요인으로 활용될 수 있다.

두 번째는 효소활성이다. 효소활성으로는 전분분해활성을 조사하였다. 전분 분해활성은 가축의 장내 전분 이용성을 향상시킬 수 있다. 가축의 장내에서 전분이 원활하게 분해 및 이용되지 못하게 되면, 소화물의 이송속도가 느려지고, 영양소의 흡수 효율이 떨어져 가축의 생산성 저하 원인이 될 수 있다.

세 번째는 균체활성이다. 균체활성은 생균을 활용하는 생균제에 있어서는 매우 중요한 품질관리 대상이 된다.

마지막은 항균활성이다. 항균활성은 항생제 대체 물질 개발에 있어 매우 중요한 기준이다. 항균활성의 증가는 발효사료첨가제의 기능성 확보와 항생제 대체효과 확보에 있어 매우 중요한 품질 향상 요인으로 판단된다.

## 1. 연구방법

### 가. 실험재료

본 실험에 사용된 원료는 대두박과 소맥피, 옥태말분을 이용하여 일정한 비율로 골고루 혼합하여 실험하였다.

### 나. 발효 조건

각 비율에 따라 만들어진 발효배지 6 g을 50 mL conical tube에 넣은 후 4 mL 멸균증류수를 첨가하여 골고루 혼합하였다. 살균을 위하여 dry oven에 80℃, 2시간 동안 열처리 하였다.

### 다. 사용 균주

사일리지에서 분리한 *Bacillus subtilis* (SK877), 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)와 Bigbiogen 회사로부터 분양 받은 *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487), *Saccharomyces cerevisiae* (SK3587)로 고체사료 발효에 사용하였다.

### 라. 고체사료 발효

고체사료 발효의 제조는 열처리 한 배합사료에 미리 활성화 시킨 4종의 발효 균주를 각각 0.5 mL씩 접종하였다(106~107CFU/g). *B. subtilis* (SK877), *B. aminoliquefaciens* (SK3487)와 *L. plantarum* (SK3121)을 접종한 고체사료는 37℃, *S. cerevisiae* (SK3587)는 30℃에서 48시간 동안 배양하였다.

### 마. 생균수 측정

생균수 측정은 lawn-spotting 방법으로 실행하였다. 각 고체발효 사료의 1g과 9ml의 멸균증류수 용액에서 순차적으로 희석한 후에 각 단계의 희석액 10μl을 agar 배지에 spotting하였다. *Bacillus*로 발효한 배양액은 Luria Bertani(LB) agar 배지에서 37℃, *Lactobacillus*로 발효한 배양액은 Lactobacilli MRS agar 배지에서 37℃, *Sacchromyces*로 발효한 배양액은 Yeast molds(YM) agar에서 30℃, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안 배양 한 후에 형성된 집락의 수를 측정하였다.

### 바. 항균 활성 측정

상기 4가지 균주를 이용한 고체발효사료의 항균활성 선행연구 결과, *L. plantarum* (SK3121)을 제외한 3개 균주의 고체발효사료는 항균활성이 나타나지 않았다. 선행연구결과 바탕으로 *L. plantarum* (SK3121)으로 발효한 고체사료로만 병원성 세균에 대한 항균활성을 평가하였다. 항균활성 평가에 사용된 병원성 균주는 *Enterotoxigenic coli* SK872, *Haemophilus somnus* SK891와 *Salmonella gallinarum*



SK3359를 사용하였다. 각각의 병원균들은 LB에서 20시간 동안 배양한 후에 사용하였다. 항균 활성의 평가는 agar well diffusion assay 방법을 사용하였다. 병원성 미생물 배양액을 면봉으로 묻혀 LB 평판배지에 swabbing 하였다. 멸균된 Pasteur tube의 뒷부분을 이용하여 지름 6 mm의 구멍을 만들었다. 항균활성 평가를 위한 고체발효사로 배양액은 7 g의 고체발효사료를 21 ml 멸균증류수에 넣은 후, 6000 rpm, 10 min, 4 °C에서 원심 분리하였다. 상등액을 멸균거지로 여과한 다음 vacuum evaporator (Rotavapor re 111, switzerland)로 농축시켰다. 농축시킨 3 ml을 0.2 µm microfilter (Pall Corporation, USA)로 다시 여과하여 항균활성 실험에 사용하였다. 항균활성 평가용 평판배지는 뒤집지 않은 상태에서 37°C에서 overnight 동안 배양한 후에 형성된 6 mm 샘플 구멍을 포함한 직경을 mm로 생육저지환의 크기를 평가하였다.

#### 사. Amylase 활성 측정

선행연구의 바탕으로 *Bacillus* SK877와 SK3487로 이용한 고체발효사료의 amylase 활성을 평가하였다. amylase 활성 측정을 위한 샘플은 2 g 고체발효사료와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 6ml에 골고루 혼합하여 rotary incubator에 180 rpm 30 분 동안 shaking을 하였다. Shaking을 종료한 후 6000 rpm, 10 min, 4°C에서 원심 분리하였다. 상등액을 0.2 µm microfilter (Pall Corporation, USA)로 여과하였다. Amylase 활성 측정 방법은 Zhizhuang xiao et al (2004)에 따라 실험하였다. 효소 반응은 40µl of soluble starch와 여과하여 준비한 40µl 샘플을 잘 혼합하여 50°C, 30분 동안 반응시켰다. 100 µl iodine reagent를 넣은 다음, 150 µl를 취하여 96 well plate에 떨어 뜨렸다. OD 값을 microplate reader (Biotek Instruments, synergy 2)로 이용하여 580nm 파장에서 측정한다.

U (단위): 1 분 동안에 1 mg 전분이 iodine 용액과 반응하여 효소 활성에 의하여 색깔의 감소로 나타나는 값

$$U/ml = (A580_{control} - A580_{sample}) \div A580/mg \text{ starch} \div 30 \text{ min} \div 0.04 \text{ ml}$$

A580 control: 효소가 없는 전분 용액의 흡광도

A580 sample: 전분이 효소와 반응한 흡광도

A580/mg starch: 표준 곡선에 얻은 1 mg 전분의 흡광도

30 min: 반응시간

0.04 ml: 효소반응에 효소의 사용량

## 2. 연구결과

### 가. 발효사료첨가제 원료 종류별 제조 공정기술 확립

#### (1) 다양한 고체 배지용 원료들이 배양 후 수분함량에 미치는 영향

총 3가지 배지용 원료들이 다양한 종균들의 발효 후 수분함량에 미치는 영향은 그림 2-1에서 보는 것과 같다. 균주 *B. subtilis* SK877의 경우 옥태말분을 사용하는 것이 최종 발효물의 수분함량을 낮출 수 있을 것으로 판단되었다. 균주 *B. aminoliquifaciens* SK3487의 경우 대두박을 사용한 배양물에서 가장 낮은 수분함량을 나타내었다. 균주 *S. cerevisiae* SK3587의 경우, 소맥피에서 가장 낮게 나타났으며, 균주 *L. plantarum* SK3121에서는 옥태말분이 가장 낮게 나타났다.

이상의 결과를 통하여 본 연구에서 사용된 각 배지 원료들이 사용된 균주들에 대하여 서로 다른 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

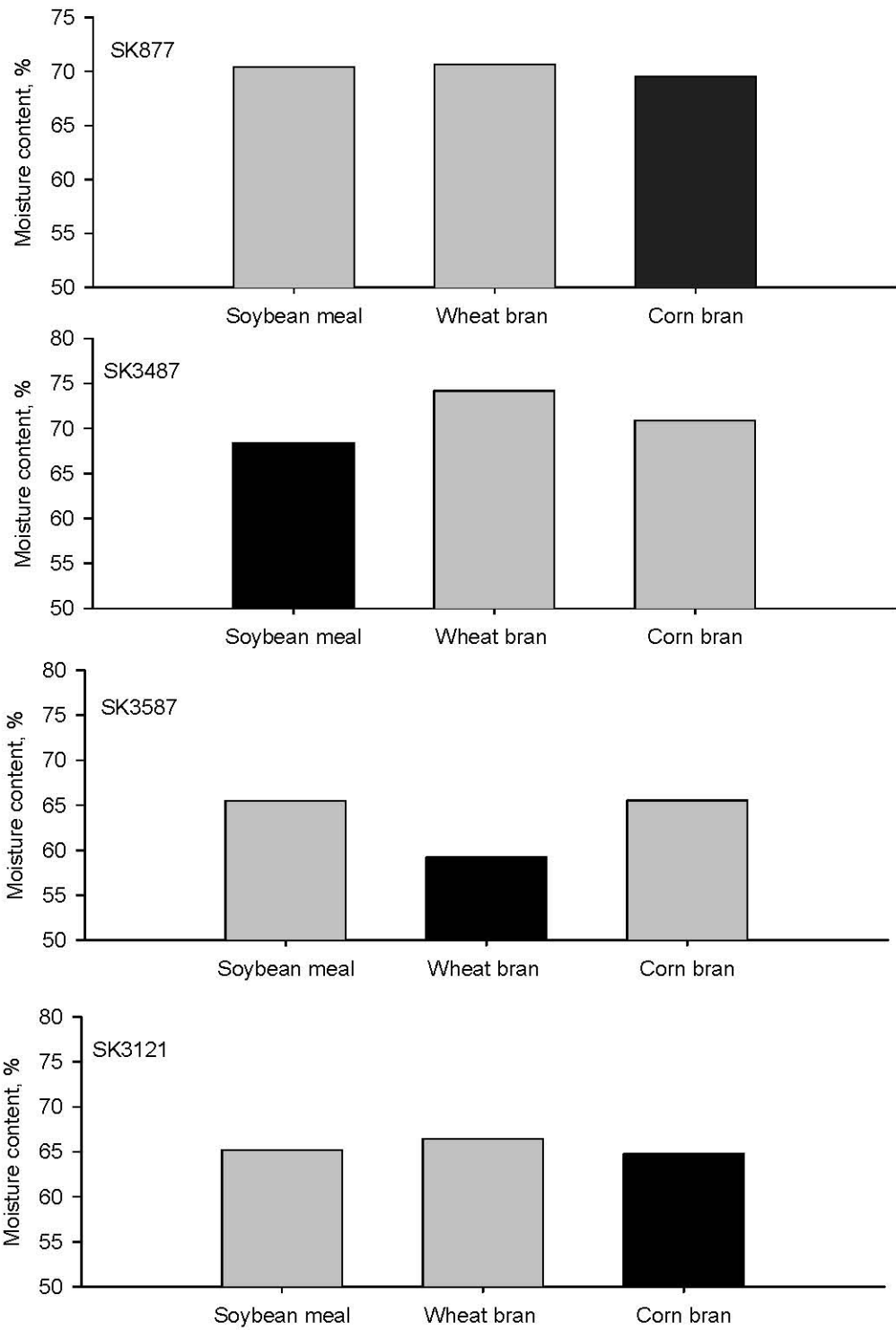


그림 2-1. Moisture content

(2) 다양한 고체 배지용 원료들이 균체 성장에 미치는 영향

종균들의 균체 성장 효율에 대한 각 배지 원료들의 효과는 그림 2-2에서 보는 것과 같다. 수분함량에서와 같이 균주에 따라서 각 원료들의 효과는 매우 다양하게 나타났다. 균주 *B. subtilis* SK877에서는 대두박이 가장 높은 균체 성장 효율을 나타내었다. 균주 *B. aminoliquifaciens* SK3487은 소맥피에서 가장 우수한 활성을 나타내었다. 그리고 *S. cerevisiae* SK3587 균주와 *L. plantarum* SK3121균주들은 대두박에서 가장 잘 자라는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 통하여 4가지 균주 모두가 잘 자랄 수 있고, 혼합하여 배양할 수 있는 범용 배지는 본 실험에서 사용된 3가지 원료들을 모두 함께 사용해야 하는 것으로 판단되었다.

이에 이후 실험은 위 3가지 배지 원료들을 혼합할 수 있는 조건을 알아보기 위하여 수행되었다.

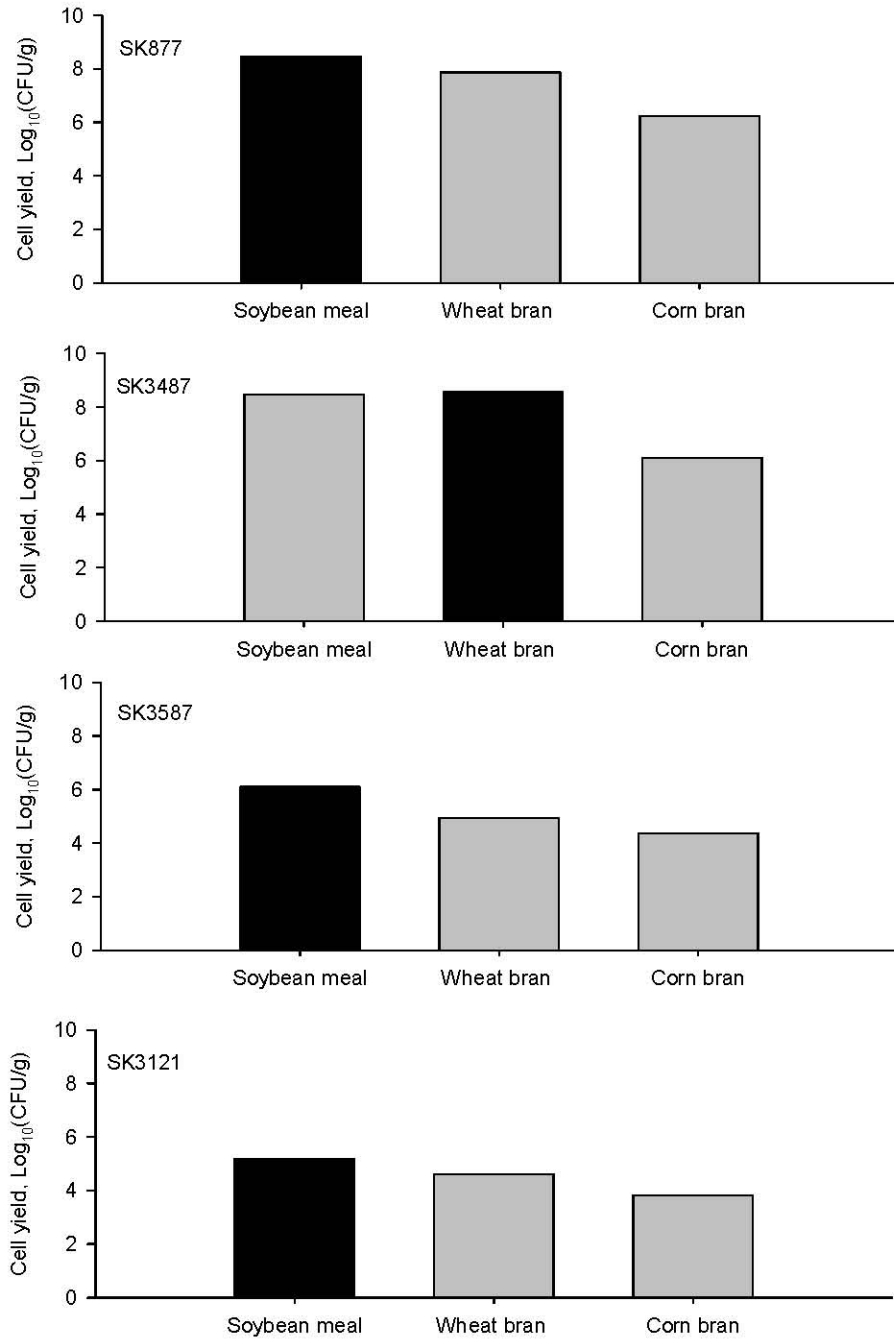


그림 2-2. Cell yields

(3) 고체배지 원료들을 이용한 각 균주별 배양에 있어 배양액의 항균활성

배지원료들이 유산균 배양액의 항균활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 2-1에서 보는 것과 같다. 균주 *L. brevis* SK1304의 경우 소맥피에서 가장 우수한 항균활성을 나타냈으며, 균주 *L. plantarum* SK3121의 경우 3가지 원료 모두 서로 유사한 항균활성을 나타내었다.

표 2-1. 배지 원료들이 유산균 배양액의 항균활성에 미치는 영향

Strain <sup>1</sup>	Medium ingredient	Pathogens <sup>3</sup>				
		SK870	SK890	SK891	SK1450	SK3360
SK1304	Soybean meal	-	-	-	-	-
	Wheat bran	++	++	++	++	+
	Corn bran <sup>2</sup>	-	-	-	-	-
SK3121	Soybean meal	-	+	+	-	-
	Wheat bran	-	+	+	-	+
	Corn bran	-	+	+	-	-

<sup>1</sup>Strain: SK1304-*Lactobacillus brevis*; SK3121-*Lactobacillus plantarum*.

<sup>2</sup>Corn byproduct: 옥태말분

<sup>3</sup>Pathogen: SK870-*Clostridium perfringens* Type E; SK890-*Haemophilus parasuis*; SK891-*Haemophilus somnus*; SK1450-*Burkholderia* sp. ; SK3360-*Salmonella pullorum*.

**나. 생산기술의 독창성 확보를 위한 PBD (Plackett-Burman design)분석으로 배양법 확립**

**(1) 실험설계**

혼합물 설계란 3가지 변수들의 합이 모두 동일한 조건에서 각 변수들의 비율을 달리하는 실험 설계에 사용되는 방법이다.

본 연구에서는 대두박, 소맥피 그리고 옥태말분을 혼합하는 최적 조건을 도출하기 위하여 혼합물 설계법을 적용하였고, 그 결과는 표 2에서 보는 것과 같다.

총 10개의 서로 다른 배합비율을 갖고 있는 실험(run)들이 도출되었고, 설계표에 따라서 제작된 배지에 각 균주들을 접종하고 배양 효율을 평가하였다.

표 2-2. 배지원료들의 최적 혼합 비율 도출을 위한 혼합물 설계 구성표

Run	Variables (%)		
	Soybean meal (A)	Wheat bran (B)	Corn bran (C)
1	100.0	0.0	0.0
2	0.0	100.0	0.0
3	0.0	0.0	100.0
4	50.0	50.0	0.0
5	50.0	0.0	50.0
6	0.0	50.0	50.0
7	33.3	33.3	33.3
8	66.7	16.7	16.7
9	16.7	66.7	16.7
10	16.7	16.7	66.7

(2) 최종 배양물의 수분함량

총 10개의 실험(run)들에서 얻어진 각 균주별 발효물의 수분함량은 표 2-3에서 보는 것과 같다. 균주 *L. plantarum* SK3121의 경우 다른 균주들에 비하여 다소 낮은 수분함량을 나타내었다. 반면에 균주 *S. cerevisiae* SK3487의 경우 비교적 높은 수분을 나타내었다.

표 2-3. 배지원료들의 다양한 혼합비율이 균주 배양 후 배양물의 수분함량(%)에 미치는 영향 결과

Run	Strains <sup>1</sup>			
	SK3121	SK3587	SK3487	SK877
1	48.24±0.54	49.16±0.22	45.80±0.51	52.98±1.82
2	50.59±1.32	50.01±0.35	57.96±0.60	56.02±0.86
3	45.66±1.36	50.74±0.65	51.25±0.17	51.48±0.45
4	48.49±0.15	50.74±0.18	53.01±0.19	53.99±0.52
5	47.44±1.14	48.78±0.41	58.55±0.25	55.34±0.24
6	50.08±0.46	50.62±0.12	57.79±0.40	54.77±0.42
7	48.38±1.12	50.18±0.35	60.04±0.23	55.70±0.62
8	48.74±0.23	51.25±0.52	54.64±0.36	54.24±0.48
9	49.74±0.04	51.48±2.06	58.21±0.19	54.28±0.28
10	47.60±1.03	49.38±0.61	58.02±0.76	52.26±0.96

<sup>1</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*, SK3587-*Sacchromyces cerevisiae*, SK3121-*Lactobacillus plantarum*.



### (3) 전분분해 활성

각 실험들(run)에서 얻어진 반응값으로 전분분해활성은 표 2-4에서 보는 것과 같다. 전분분해활성은 배지원료들의 배합비율에 큰 영향을 받고 있는 것을 알 수 있었다. 즉 배합비율에 따라서 효소활성이 나타날 수도 아니면 그렇지 않을 수도 있다는 것을 알 수 있었다.

표 2-4. 배지원료들의 다양한 혼합비율이 균주 배양 후 배양물의 전분분해활성(Unit)에 미치는 영향 결과

Run	Strain <sup>1</sup>	
	SK877	SK3487
1	0.98±0.27	0.54±0.16
2	0.17±0.02	0.14±0.01
3	0.16±0.00	0.18±0.01
4	ND	0.29±0.12
5	ND	ND
6	0.17±0.01	0.15±0.01
7	ND	ND
8	ND	ND
9	ND	0.22±0.03
10	0.03±0.03	0.28±0.03

<sup>1</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*.

(4) 균체성장효율

각 실험(run)들에서 얻어진 균체성장효율은 표 5에서 보는 것과 같다. 비교적 모든 균주들이 우수한 성장을 나타내었으며, *L. plantarum* SK3121 균주의 경우 배지원료들의 배합비율에 가장 민감하게 반응하는 것을 알 수 있었다.

표 2-5. 배지원료들의 다양한 혼합비율이 균주 균체성장효율(log<sub>10</sub>(CFU/g))에 미치는 영향 결과

Run	Strains <sup>1</sup>			
	SK877	SK3487	SK3121	SK3587
1	9.31±0.03	8.56±0.06	10.03±0.05	8.96±0.32
2	9.27±0.05	9.19±0.08	9.73±0.18	9.09±0.16
3	8.49±0.16	5.82±0.09	6.98±0.04	7.57±0.06
4	9.13±0.03	9.33±0.04	9.60±0.04	8.95±0.49
5	9.25±0.04	9.32±0.07	8.49±0.16	8.96±0.26
6	9.22±0.01	9.28±0.05	9.02±0.40	8.81±0.01
7	9.09±0.14	9.81±0.04	9.33±0.04	8.65±0.07
8	8.62±0.12	9.28±0.14	9.95±0.05	8.59±0.11
9	9.30±0.05	9.69±0.07	9.84±0.05	8.48±0.16
10	9.25±0.14	8.89±0.09	8.62±0.09	8.22±0.44

<sup>1</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*, SK3587-*Sacchromyces cerevisiae*, SK3121-*Lactobacillus plantarum*.

(5) 항균활성

다양한 병원균들에 대한 각 실험(run)들의 항균활성은 표 2-6에서 보는 것과 같다. 병원균별로 항균활성이 최소 6 mm에서 최대 20 mm로 매우 큰 변화를 나타내었다.

표 2-6. 배지원료들의 다양한 혼합비율이 *L. plantarum* SK3121 균주 발효물의 항균 활성(clear zone, mm)에 미치는 영향 결과

Runs	Pathogens <sup>1</sup>		
	SK872	SK891	SK3359
1	6.0	8.5	6.0
2	8.0	16.3	10.8
3	12.0	20.3	14.5
4	10.5	18.8	11.0
5	12.3	21.0	12.0
6	14.5	21.8	12.8
7	10.0	19.3	10.0
8	9.0	20.3	9.0
9	9.5	20.0	14.0
10	12.5	20.3	14.0

<sup>1</sup>Pathogen: SK872-*Enterotoxigenic coli*;

SK891-*Haemophilus somnus*;

SK3359-*Salmonella gallinarum*.

(6) 수분활성에 대한 분산분석

각 실험들에서 달리한 배지 원료들의 혼합비율이 최종 배양물의 수분함량에 미치는 효과에 대한 분산분석은 표 2-7에서 보는 것과 같다. 균주 *S. cerevisiae* SK3587을 제외하고는 모든 균주에서 유의적인 효과가 나타났다( $P < 0.05$ ). 즉 배지 원료들의 혼합비율이 배양물의 수분함량을 변화시킬 수 있다는 가설이 증명되었다. 배지원료들 간의 상호작용에 있어서는 옥태말분을 중심으로 한 상관관계에서 유의적인 효과가 많이 관찰되었다.

표 2-7. 배지원료들의 배양 후 최종 배양물의 수분에 미치는 영향에 대한 분산분석 결과

Item <sup>1</sup>	Strains <sup>2</sup>			
	SK3121	SK3587	SK3487	SK877
Regression	<0.001	0.081	<0.001	<0.001
linear	<0.001	0.506	<0.001	<0.001
quadratic	0.040	0.073	<0.001	0.005
Lack-of-fit	0.871	0.052	0.001	0.024
Interaction				
A*B	0.147	0.027	0.001	0.408
A*C	0.533	0.165	<0.001	0.001
B*C	0.014	0.593	<0.001	0.388

<sup>1</sup>A, soybean meal; B, wheat bran; C, corn bran

<sup>2</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*,  
SK3587-*Sacchromyces cerevisiae*, SK3121-*Lactobacillus plantarum*.

(7) 전분분해효소활성에 대한 분산분석

각 실험들에서 달리한 배지 원료들의 혼합비율이 최종 배양물의 전분분해효소활성에 미치는 효과에 대한 분산분석은 표 2-8에서 보는 것과 같다. 두 균주 모두에서 유의적인 효과가 관찰되었다( $P < 0.05$ ). 항균활성에 대한 배지원료들 간의 상호관계는 대두박을 중심으로 한 상관관계에서 모두 유의성이 관찰되었다( $P < 0.05$ ). 이상의 결과를 통하여 전분분해효소활성에 대두박이 매우 중요한 역할을 하고 있는 것을 알 수 있었다.

표 2-8. 배지원료들의 배양 후 최종 배양물의 항균활성에 미치는 영향에 대한 분산분석 결과

Item <sup>1</sup>	Strain <sup>2</sup>	
	SK877	SK3487
Regression	<0.001	0.002
linear	<0.001	0.010
quadratic	<0.001	0.001
Lack-of-fit	0.051	<0.001
Interaction		
A*B	<0.001	0.278
A*C	<0.001	<0.001
B*C	0.745	0.927

<sup>1</sup>A, soybean meal; B, wheat bran; C, corn bran

<sup>2</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*.

(8) 균체성장에 대한 분산분석

각 실험들에서 달리한 배지 원료들의 혼합비율이 최종 배양물의 균체성장에 미치는 효과에 대한 분산분석은 표 2-9에서 보는 것과 같다. 모든 균주들에 대하여 각 배지 원료들이 균체성장에 유의적인 효과를 미치고 있는 것으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

표 2-9. 배지원료들의 배양 후 최종 배양물의 균체성장에 미치는 영향에 대한 분산분석 결과

Item <sup>1</sup>	Strains <sup>2</sup>			
	SK3121	SK3587	SK3487	SK877
Regression	<0.001	<0.001	<0.001	0.010
linear	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
quadratic	<0.001	0.093	<0.001	0.037
Lack-of-fit	0.002	0.056	<0.001	<0.001
Interaction	SK3121	SK3587	SK3487	SK877
A*B	0.641	0.143	<0.001	0.076
A*C	0.232	0.061	<0.001	0.152
B*C	<0.001	0.328	<0.001	0.049

<sup>1</sup>A, soybean meal; B, wheat bran; C, corn bran

<sup>2</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*, SK3587-*Sacchromyces cerevisiae*, SK3121-*Lactobacillus plantarum*.

다. 시작품 제작 및 평가

일련의 실험결과를 통하여 총 4가지 서로 다른 최적 배지조성을 도출하였다. 각 최적배지들은 수분함량 최소화(배지번호 1), 효소활성 최대화(배지번호 2), 세포성장효율 최대화(배지번호 3) 그리고 항균활성 최대화(배지번호 4) 등을 목표로 설계되었으며, 각 배지성분들은 표 2-10에서 보는 것과 같다.

표 2-10. 제품의 특징 및 목표에 따른 배지 원료들의 최적 배합비율(%)

Ingredient	Optimized medium No.			
	No 1 (Moisture content)	No 2 (Amylase)	No 3 (Cell yield)	No 4 (Antibacterial activity)
Soybean meal	3.96	33	0	96
Wheat bran	19.76	33	98	4
Corn bran	76.28	34	2	0
Sum	100	100	100	100

얻어진 총 4가지 서로 다른 최적배지들을 기존의 실험방법과 동일한 방법으로 배양하여 배양 효율을 분석하였다.

배지 내 수분함량을 조사한 결과 수분함량을 기준으로 최적화된 배지번호 1번에서 가장 낮은 수분함량을 나타내었다(표 2-11).

표 2-11. 최종 배양물의 수분함량 결과

<sup>1</sup> Strains	Optimized medium No.			
	No1	No2	No3	No4
SK877	42.94	50.58	53.23	51.81
SK3487	50.25	54.62	52.82	51.64
SK3587	49.09	51.24	51.98	50.66
SK3121	46.70	47.68	48.19	48.00

<sup>1</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*, SK3587-*Sacchromyces cerevisiae*, SK3121-*Lactobacillus plantarum*.

최적 배지들에서 배양된 균주들의 전분분해효소 활성은 표 2-12에서 보는 것과 같다. 배지번호 2번의 경우 효소활성 최대화로 설계된 것이며, 효소활성 또한 가장 높게 나타났다.

표 2-12. 최종 배양물의 전분분해효소 활성

<sup>1</sup> Strain	Optimized medium No.			
	No 1	No 2	No 3	No 4
SK877	0.41	0.54	0.41	0.44
SK3487	0.35	0.55	0.41	0.48

<sup>1</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*, SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*.

각 최적배지들의 균체 성장 효율은 표 2-13에서 보는 것과 같다. 균체성장을 목적으로 최적화된 배지는 배지번호 3번이었다. 본 배지는 균주번호 SK3487과 SK3121에 대하여 가장 적합한 것을 알 수 있었다.



표 2-13. 최종 배양물의 세포성장 효율

<sup>1</sup> Strain	Optimized medium No.			
	No 1	No 2	No 3	No 4
SK877	9.00	8.59	7.67	7.96
SK3487	8.87	9.28	9.42	8.22
SK3587	8.67	8.89	8.63	8.43
SK3121	6.70	8.20	9.36	9.56

<sup>1</sup>Strains: SK877 - *Bacillus subtilis*,  
 SK3487-*Bacillus aminoliquifaciens*,  
 SK3587-*Sacchromyces cerevisiae*,  
 SK3121-*Lactobacillus plantarum*

최종배양 물의 항균활성 결과는 표 2-14에서 보는 것과 같다. 비록 항균활성 극대화를 위한 최적배지는 배지번호 4번이었으나, 배지번호 1번에서 가장 우수하게 나타났다.

표 2-14. 최종 배양물의 항균활성 결과

<sup>1</sup> Pathogen	Optimized medium No.			
	No 1	No 2	No 3	No 4
SK872	15	12	-	8
SK891	21	18	13	8
SK3359	14	10	1	9

<sup>1</sup>Pathogen: SK872-*Enterotoxigenic coli*;  
 SK891-*Haemophilus somnus*;  
 SK3359-*Salmonella gallinarum*.

일련의 실험 결과 다양한 균주들을 높은 배양 효율로 발효시키기 위한 최적 배합조건으로 대두박 3.96%, 소맥피 19.76% 그리고 옥태말분 76.28%이 도출되었다.

## ■ 3차년도 연구개발내용

### 기존의 생균제/발효사료내 생균수 분석방법 외, 효능 평가 지표 설정

#### 1. 연구내용

##### 가. 개발 생균제의 시제품 제작

본 연구는 발효사료첨가제 제조를 위하여 1차년도와 2차년도에서 대두박과 소맥피, 옥태말분을 원료로 선발하고 균주들의 배양성적 (균체활성 및 수분함량)에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 바탕으로 최적 혼합 조건을 탐색한다. 탐색된 최적 혼합 조건을 이용하여 고효율 발효사료첨가제의 시작품을 제작한다.

##### 나. 기존 생균제/발효사료의 기본 활성 측정

발효사료첨가제는 보관기간 또는 저장온도에 따라 균수가 감소하여 품질이 낮아질 수 있기 때문에 품질평가를 필요로 한다. 따라서 발효사료첨가제의 품질확인을 위해 기존의 사료 품질을 평가하는 방법인 생균수 측정과 함께 토양의 균체활성을 결정하는 지표로 사용되고 있는 단시간, 저비용의 장점을 가진 탈수소효소 활성을 처음으로 사료에 성공적으로 적용하고자 한다.

##### 다. 기존 생균제/발효사료의 여러 가지 생리활성 측정

발효사료첨가제의 제조를 위하여 각 균주들의 성장 최적 조건을 확인하였으며, 그 결과를 바탕으로 단일균주 배양법과 혼합균주 배양법으로 나누어 실험을 진행 하였으며, 발효사료첨가제 시작품 제작 후 여러 가지 생리활성(항산화, 항균, 효소, 유기산)을 측정한다.

## 2. 연구방법

### 가. 실험재료

본 실험에 사용된 원료는 대두박과 소맥피, 옥태말분을 이용하여 각각 3.96%, 19.76%, 76.28%로 골고루 혼합하여 실험하였다.

### 나. 사용 균주

사일리지에서 분리한 *Bacillus subtilis* SK877, 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)와 Bigbiogen 회사로부터 분양 받은 *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487), *Saccharomyces cerevisiae* (SK3587)로 고체사료 발효에 사용하였다.

### 다. 발효 균주 제작

*Bacillus subtilis* (SK877), *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487)는 Luria Bertani(LB) broth에서 37°C, *S. cerevisiae* (SK3587)는 Yeast molds(YM) broth에서 37°C, *L. plantarum* (SK3121)는 MRS agar 배지에서 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

### 라. 고체사료 발효

#### (1) 단일균주 고체 발효

멸균한 배합사료 312 g에 4종의 균주를 각각 208 mL씩 접종하였다 ( $10^6 \sim 10^7$  cfu/g). *B. subtilis* (SK877)와 *B. aminoliquefaciens* (SK3487)을 접종한 고체사료는 37°C, 24시간 배양하였으며, *L. plantarum* (SK3121)과 *S. cerevisiae* (SK3587)는 37°C에서 48시간 동안 배양하였다.

#### (2) 혼합균주 고체 발효

멸균한 사료 624 g에 *B. subtilis* (SK877)와 *B. aminoliquefaciens* (SK3487)을 각각 104 mL씩 접종한 후 ( $10^6 \sim 10^7$  cfu/g), 37°C에서 24시간 배양하였으며, 추가로 *L. plantarum* (SK3121)과 *S. cerevisiae* (SK3587)을 각각 104 mL씩 접종한 후 ( $10^6 \sim 10^7$  cfu/g), 37°C에서 24시간 배양하여 총 48시간 배양하였다.

### 마. 생균수 측정

생균수 측정은 lawn-spotting 방법으로 실행하였다. 각 고체발효 사료를 발효 시간별로 채취하여 사료 1 g과 9 ml의 멸균증류수 용액에서 순차적으로 희석한 후에 각 단계의 희석액 10  $\mu$ l을 agar 배지에 spotting하였다. *Bacillus*로 발효한 배양액은 Luria Bertani (LB) agar 배지에서 37°C, *Lactobacillus*로 발효한 배양액은 MRS

agar 배지에서 37℃, *Saccharomyces*로 발효한 배양액은 Yeast molds (YM) agar에서 37℃에서 24시간 동안 배양 한 후에 형성된 집락의 수를 측정하였다.

#### 라. 항균활성 측정

선행연구결과 바탕으로 *L. plantarum* (SK3121)으로 발효한 고체사료 샘플에 대하여 병원성 세균에 대한 항균활성을 평가하였다. 항균활성 평가에 사용된 병원성 균주는 *Haemophilus sorex* SK891, *Listeria monocytogenes* SK728, *Staphylococcus aureus* SK741, *Bacillus cereus* SK1633을 사용하였다. 각각의 병원균들은 LB에서 20시간 동안 배양한 후에 사용하였다. 항균 활성의 평가는 agar well diffusion assay 방법을 사용하였다. 병원성 미생물 배양액을 면봉으로 묻혀 LB 평판배지에 swabbing 하였다. 멸균된 Pasteur tube의 뒷부분을 이용하여 지름 6 mm의 구멍을 만들었다. 항균활성 평가를 위하여 5 g의 고체발효사료를 30 ml 메탄올에 넣어 16℃에서 3시간 추출 후, 4℃에서 6000 rpm, 10분 동안 원심분리를 하였다. 상등액을 필터 페이퍼트 여과한 다음 위 과정을 2번 반복하였다. 추출된 상등액은 감압농축기 (Rotavapor re 111, switzerland)로 4배 농축시켰다. 항균활성 평가용 평판배지는 뒤집지 않은 상태에서 37℃에서 overnight 동안 배양한 후에 형성된 6 mm 샘플 구멍을 포함한 직경을 mm로 생육저지환의 크기를 평가하였다.

#### 마. 유기산 분석

Adesogan 등의 방법에 따라 유기산 분석을 실시하였다. 물로 추출한 사료를 1.5 ml 튜브에 넣고 15분간 5645 X g로 원심분리를 한 상등액을 이용하였다. 젯산과 VFA는 UV detector와 컬럼을 장착한 HPLC를 이용하여 측정하였다.

#### 바. 항산화 활성 측정 (DPPH)

발효사료 100ul에 멸균증류수 400ul, DPPH 용액을 2ml 넣어 혼합 후, 실온에서 15분간 반응시킨다. 추가로 2.5ml의 멸균 증류수를 넣고 515nm에서 흡광도를 측정한다.

항산화력은  $\frac{\text{Control Absorbance} - \text{Sample Absorbance}}{\text{Control Absorbance}} \times 100$ 의 계산식에 의해 전자공여능(%)을 구했다.

#### 사. Dehydrogenase 활성 측정

발효사료 1 g에 2.5 mL의 Tris-buffer pH7.0과 2 mL의 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-glucose reagent (TTC-glucose) 용액을 넣고, 1.0 N HCl을 이용하여 pH를 7로 조정 하였다. 충분히 섞은 후, 암시야 배양기에서 120 rpm, 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지 성분으로부터 형성된 triphenyl formazan (TPF)를 분리하기 위해 2.5 mL의 메탄올을 넣고 vortexing 후,

10분간 12000 rpm에서 원심분리를 하였다. TF 추출 과정은 3회 실행하였다. 3번의 추출로 얻어진 상등액을 합하여 485nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 아. 품질 평가

시작품 발효사료 첨가제는 수분량을 약 12~14%로 건조시킨 후 멸균 백에 넣어 30℃와 15℃로 구분하여 보관하였다. 2주에 한번씩 8주 동안 샘플링을 하여 cfu, pH, 유기산 및 dehydrogenase 활성을 측정 하였다.

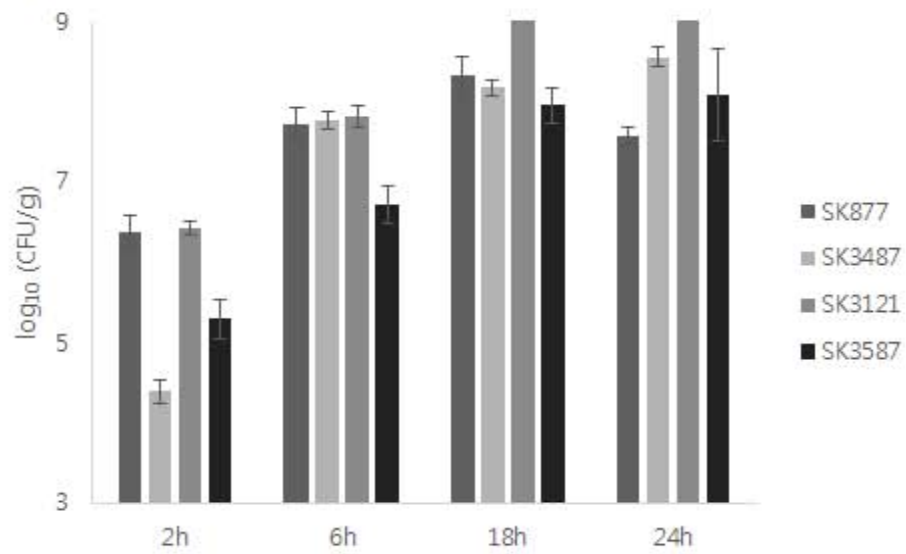
### 3. 연구결과

#### 가. 개발 생균제의 시제품 제작을 위한 발효조건 확립

##### (1) 단일균주들에 있어서 고체 발효

4가지 균주들을 이용하여 사료를 고체발효한 결과는 그림 3-1과 같다. 4가지 균주 모두 24시간째에서 가장 높은 균체 성장률을 보였다. pH의 경우 *B. subtilis* SK877, *B. aminoliquifaciens* SK3487 그리고 *S. cerevisiae* SK3587 균주에서는 큰 변화는 없었으나, *L. plantarum* SK3121는 pH 4정도로 떨어지는 경향을 보였다. 이상의 결과를 통하여 4가지 균주가 모두 잘 증식할 수 있음을 확인하였다.

(A)



(B)

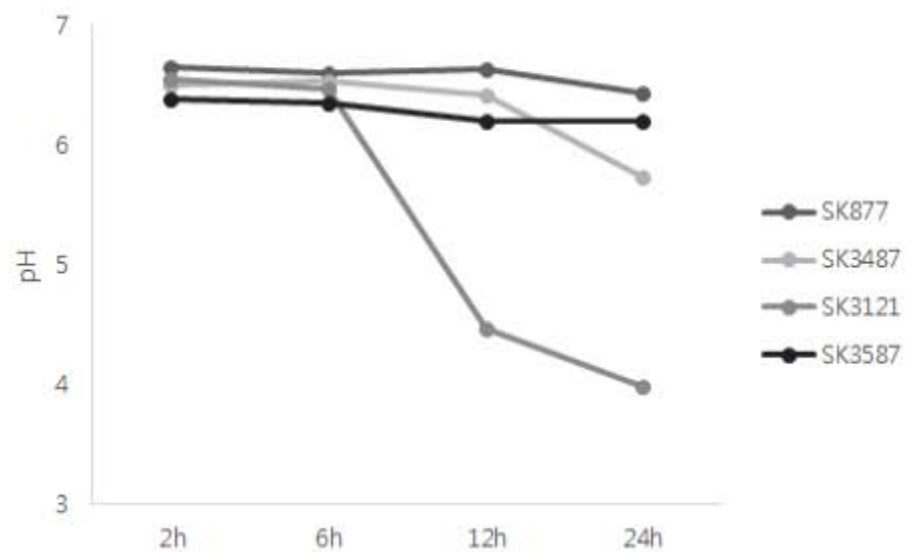


그림 3-1. 고체발효에서의 균주들의 성장과 pH. (A) 균체의 성장, (B) pH  
SK877: *B. subtilis*, SK3487: *B. aminoliquifaciens*, SK3121: *L. plantarum*,  
SK3587: *S. cerevisiae*.

(2) *Lactobacillus plantarum* SK3121을 접종한 고체 발효사료의 항균활성

다양한 병원균들에 대한 *Lactobacillus plantarum* SK3121 발효물의 항균활성은 표 3-1에서 보는 것과 같다. 병원균별로 항균활성이 최소 8 mm에서 최대 16 mm로 높은 항균활성을 보였다. 높은 항균활성은 발효사료첨가제에 있어 매우 중요한 새로운 기능성을 부여하는 것으로 사료에서 처음으로 농축한 샘플을 통하여 처음으로 확인한 것은 그 의의가 있는 것으로 판단되었다. 24시간 고체발효시 항균활성이 충분한 것으로 나타났다.

표 3-1. *Lactovacillus palntarum* SK3121 균주 발효물의 항균활성

(Clear zone, mm)

Pathogen <sup>1</sup>	Fermentation time (hour)				
	2	6	12	24	48
SK728	+	+	+	+	+
SK741	+	+	+	+	+
SK891	+	-	++	+++	+++
SK1633	+	++	+	++	++
SK872	-	-	-	-	-
SK3359	-	-	-	-	-

Clear zone: 8~10 mm, +: 11~13 mm, ++: 14~16 mm, +++

<sup>1</sup>SK728, *Listeria monocytogenes*; SK741, *Staphylococcus aureus*;

SK891, *Haemophilus somnus*; SK1633, *Bacillus cereus*; SK872, *E. coli*;  
SK3359,

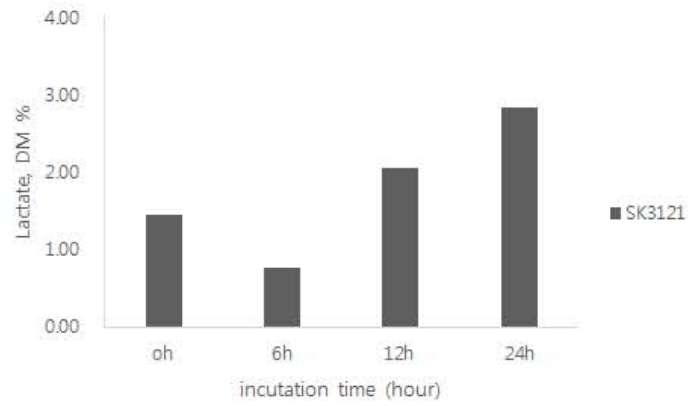
*Salmonella gallinarum*

(3) *Lactobacillus plantarum* SK3121 균주 발효물의 유기산 분석

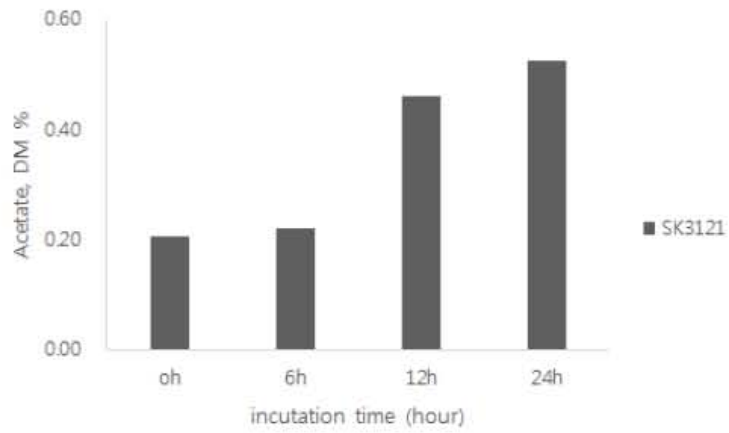
그림 3-2에서 4가지 균주들을 이용하여 고체발효 하였을 때 *L. plantarum* SK3121의 경우 pH가 4까지 떨어졌다. 이 고체 발효사료에 대하여 유기산을 분석 하였다. Lactate, Acetate, Iso-butyrate 세가지 유기산에 대하여 발효시간에 따라 분석한 결과는 그림2와 같다. Lactate와 Acetate는 발효 시간에 따라 점차 증가하였고, Iso-butyrate는 6시간에서 가장 높은 양을 보인 후 발효가 진행되면서 조금씩 낮아졌다.



(A)



(B)



(C)

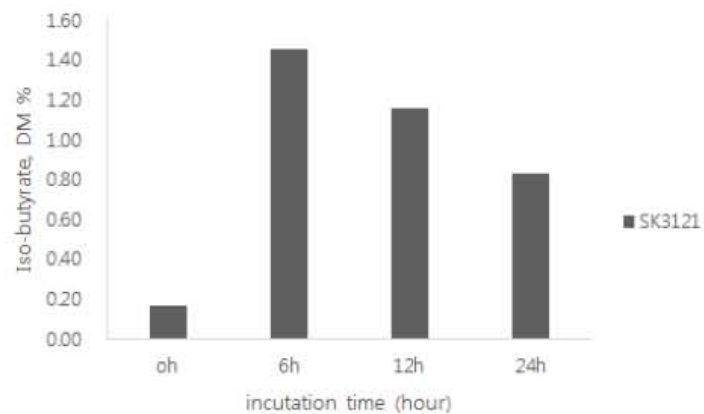
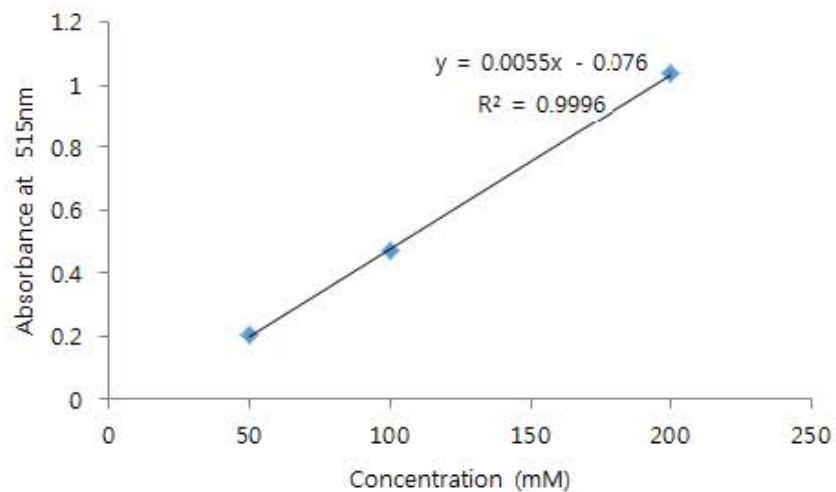


그림 3-2. *L. plantarum* SK3121로 고체사료 발효한 샘플의 유기산 분석. (A) Lactate (B) Acetate (c) Iso-butyrate. SK877: *B. subtilis*, SK3487: *B. aminoliquifaciens*, SK3587: *S. cerevisiae*, SK3121: *L. plantarum*.

(4) *Lactovacillus plantarus* SK3121 균주 발효물의 항산화활성 (DPPH) 측정

*Lactovacillus plantarus* SK3121의 항산화활성 측정 결과 2시간, 6시간에 비해 12시간이 약간 낮아졌지만 24시간째에서 가장 높은 활성을 보였다 (그림3-3).

(A)



(B)

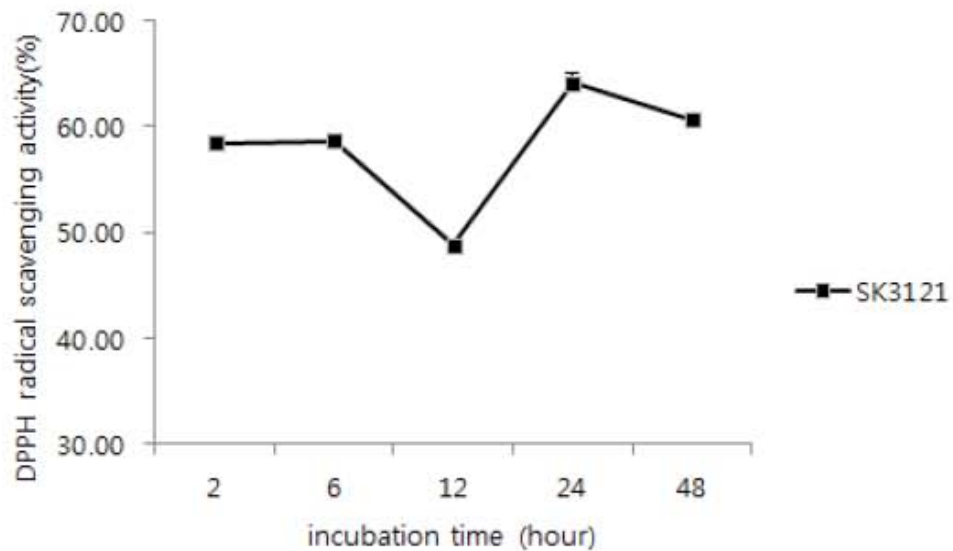


그림 3-3. *L. plantarum* SK3121로 고체사료 발효한 샘플의 항산화 활성 측정. (A) Standard Curve (B) DPPH radical scavenging activity

## 나. 단일 배양과 혼합 배양을 이용한 발효사료 첨가제의 시제품의 보존성 평가

### (1) 보존성

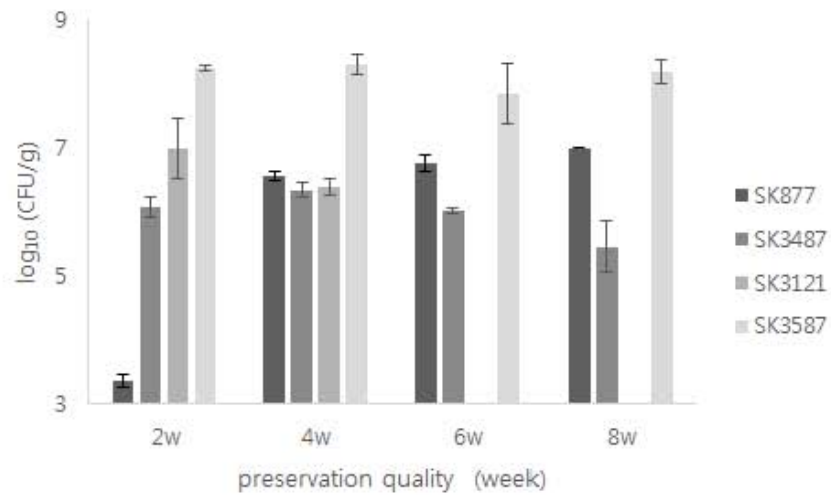
발효사료 첨가제의 품질 평가를 위하여 발효 후 수분량을 12~14%로 줄인 후, 15℃와 30℃로 나누어 8주 동안 보관하였고, 매 2주에 한번 씩 시료를 채취하였다.

#### (가) 단일균주 접종 시제품 제작

상기 연구방법에서와 같이 *B. subtilis* (SK877), *B. aminoliquefaciens* (SK3487), *L. plantarum* (SK3121) 및 *S. cerevisiae* (SK3587)를 각각 접종한 사료를 고체발효하여 수분을 12~14%로 건조한 시제품을 제작하였다.

그림 4-4은 15℃에서 보관한 단일배양의 결과이며, *Bacillus subtilis* (SK877), *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487) 그리고 *Saccharomyces cerevisiae* (SK3587)은 8주 동안 큰 변화 없이 생존 하였으며, *Lactobacillus plantarum* (SK3121)은 4주 이후로 사멸하였다. pH는 큰 변화 없이 4종의 균주 모두 일정하게 유지하였다.

(A)



(B)

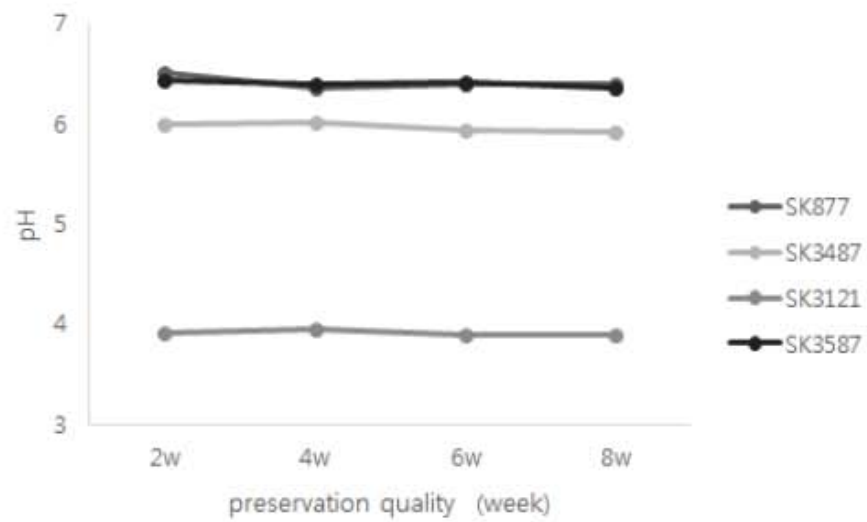
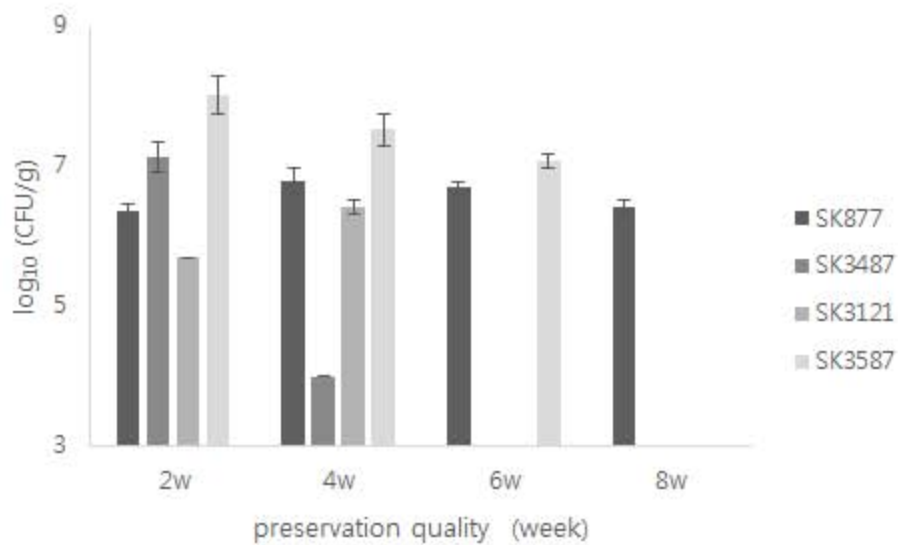


그림 3-4. 발효사료 첨가제의 15℃에서의 보존성 실험. (A) 균체의 성장, (B) pH.  
SK877: *B. subtilis*, SK3487: *B. aminoliquifaciens*, SK3121: *L. plantarum*,  
SK3587: *S. cerevisiae*.

그림 3-5는 30℃에 대한 발효사료 첨가제의 보존성 실험의 결과이다. *Bacillus subtilis* (SK877)은 8주 동안 큰 변화 없이 생존 하였으나, *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487)와 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)는 4주 이후로 사멸하였고, *Saccharomyces cerevisiae* (SK3587)은 6주 이후로 사멸하였다. pH는 큰 변화는 없었으나, *Bacillus subtilis* (SK877)은 8주차에서 약간 낮아졌고, *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487)는 8주차에서 약간 높아지는 경향을 보였다.

(A)



(B)

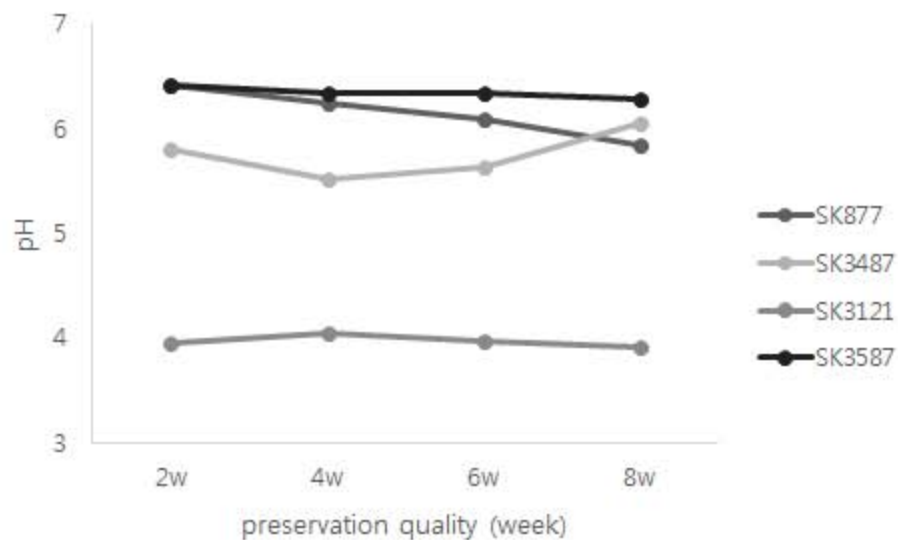


그림 3-5. 발효사료 첨가제의 30℃에서의 보존성 실험. (A) 균체의 성장, (B) pH. SK877: *B. subtilis*, SK3487: *B. aminoliquefaciens*, SK3121: *L. plantarum*, SK3587: *S. cerevisiae*.

(나) 4종 혼합균주를 접종한 시제품 제작

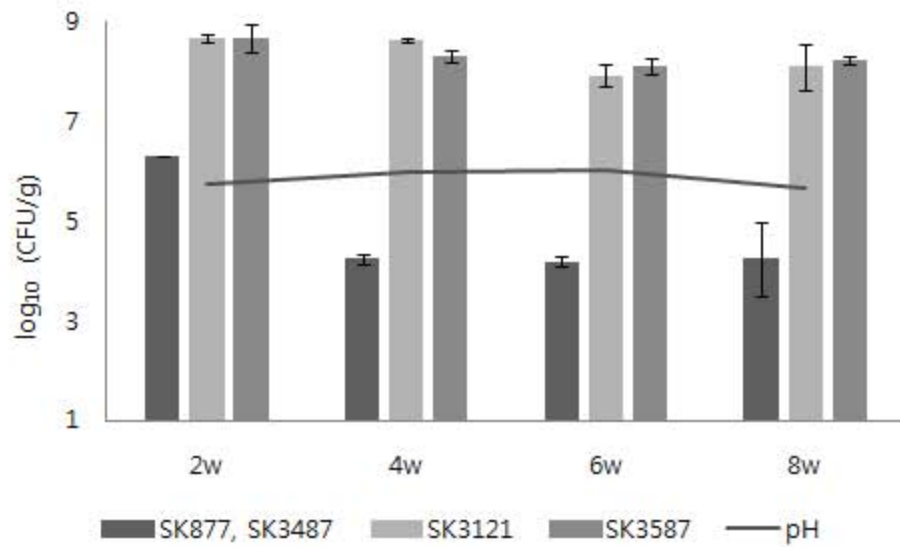
*B. subtilis* (SK877), *B. aminoliquefaciens* (SK3487), *L. plantarum* (SK3121) 및 *S. cerevisiae* (SK3587) 4종을 접종한 고체발효 사료 시제품을 제작하였다.

그림 3-6는 혼합배양(Co-culture)후 15℃와 30℃에서 8주간 보관하면서 보존성 실험의 결과이다. 혼합배양에서 생균수 측정 시 *Bacillus subtilis* (SK877)와 *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487)는 LB 배지에서 합산하여 측정하였다. 15℃에서 보관한 경우 *Bacillus subtilis* (SK877)와 *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487)는 4주차부터 생균수가 낮아졌지만 8주까지 생존하였고, *Lactobacillus plantarum* (SK3121)와 *Saccharomyces cerevisiae* (SK3587)는 높은 생균수를 유지하며 8주 동안 생존하였다.

30℃의 경우 *Bacillus subtilis* (SK877)와 *Bacillus aminoliquefaciens* (SK3487)는 15℃에 비해 낮은 생균수를 유지하며 8주차까지 생존하였고, *Lactobacillus plantarum* (SK3121)는 4주차 이후로 사멸하였고 *Saccharomyces cerevisiae* (SK3587)는 6주차 이후로 사멸하였다.

생균제에 있어서 생균수는 매우 중요한 품질관리의 대상이다. 단독배양과 달리 혼합 배양시 15℃의 경우 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)가 매우 높은 생균수를 유지하면서 8주까지 생존하였고, 이는 단독배양보다 혼합배양에서 보다 오랫동안 생존하는 것을 알 수 있었다.

(A)



(B)

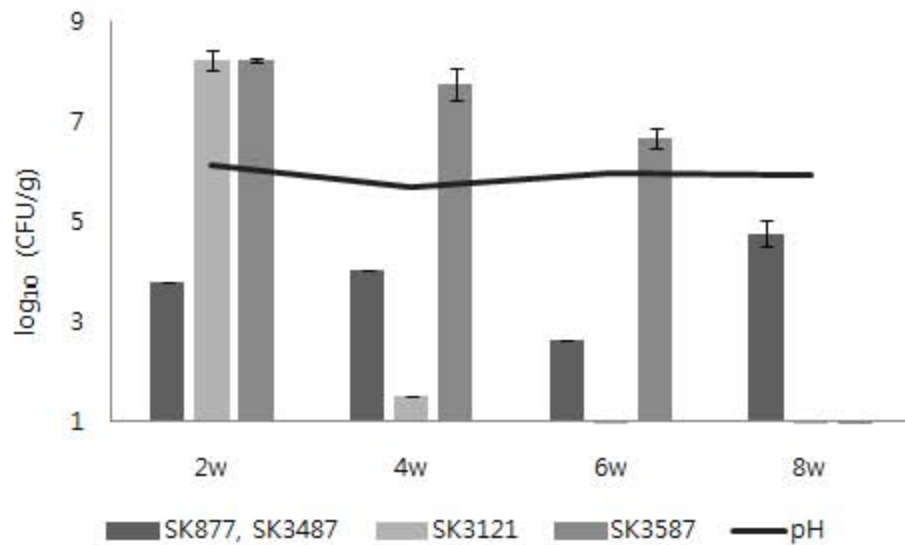


그림 3-6. 혼합 배양(Co-culture)후 15℃와 30℃에서 8주간 보관한 샘플의 보존성 실험. (A) 15℃. (B) 30℃ SK877: *B. subtilis*, SK3487: *B. aminoliquifaciens*, SK3121: *L. plantarum*, SK3587: *S. cerevisiae*.

## (2) 유기산 생산 분석

단독배양한 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)와 혼합배양(Co-culture)한 발효사로 첨가제를 15℃와 30℃에서 2주 간격으로 8주 동안 유기산 분석을 하였으며 결과는 그림 3-7과 같다.

Lactate의 경우 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)에서는 15℃에서는 4주차부터 8주차까지 약 0.4~0.5 Lactate, DM%를 보였고, 30℃에서는 8주차에서만 0.4~0.5 Lactate, DM%를 보였다. 품질 평가 전 최대 3 Lactate, DM%와 비교했을 때 낮은 값을 보였다. 혼합배양(Co-culture)의 경우 보관기간이 길어질수록 Lactate값이 낮아짐을 확인 할 수 있었다.

Acetate의 경우 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)에서는 2주차에서 30℃를 제외한 나머지는 값을 확인할 수 없었고, 혼합배양(Co-culture)도 2주차에서만 15℃, 30℃ 모두 낮은 값을 보였다.

Iso-butyrate의 *Lactobacillus plantarum* (SK3121)에서는 경우 15℃보다 30℃에서 높은 값을 6주차 까지 확인할 수 있었고, 혼합배양(Co-culture)에서는 Iso-butyrate 함량이 낮게 나타났다.



*Lactobacillus plantarum* (SK3121)

혼합배양 (Co-culture)

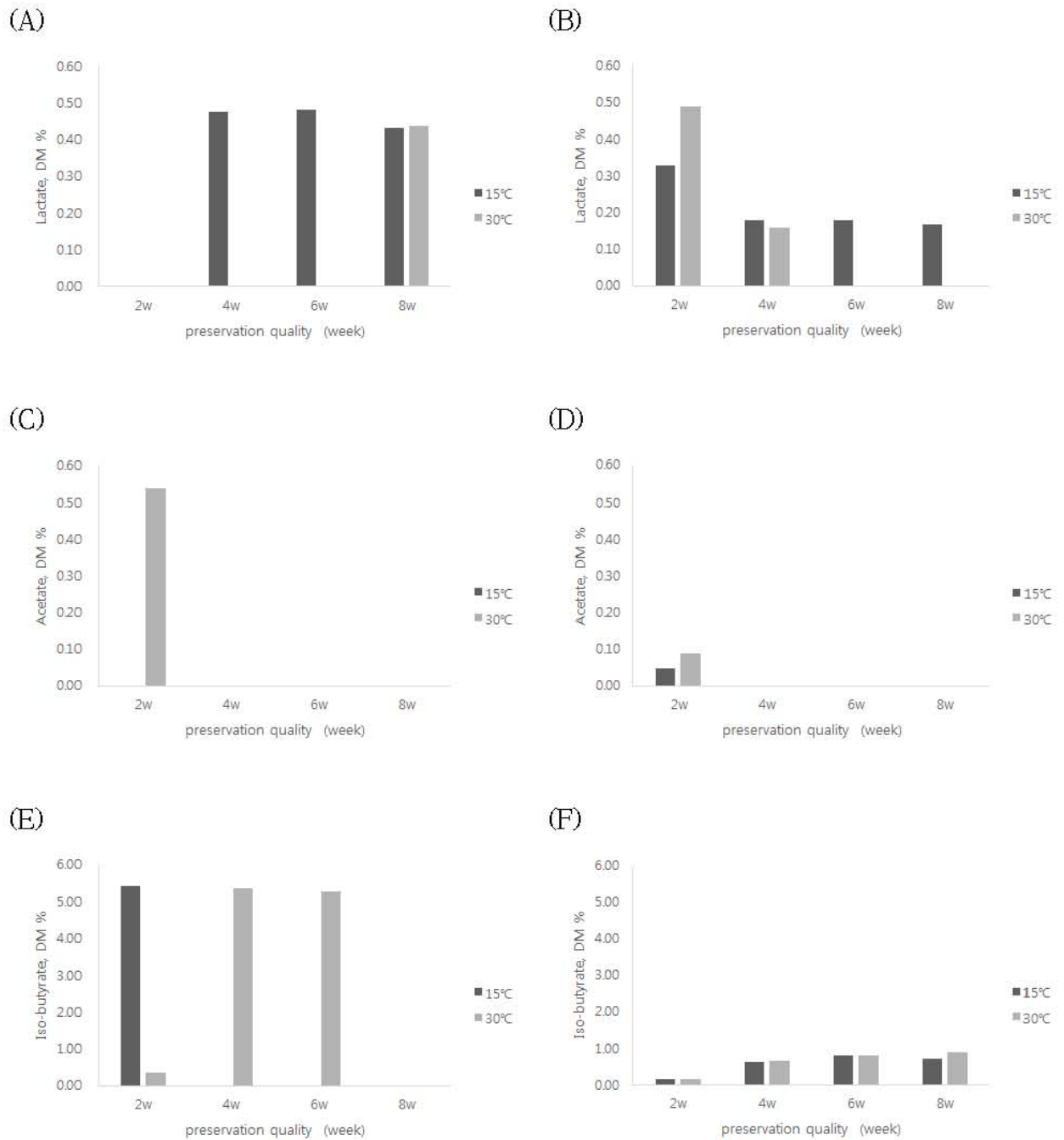
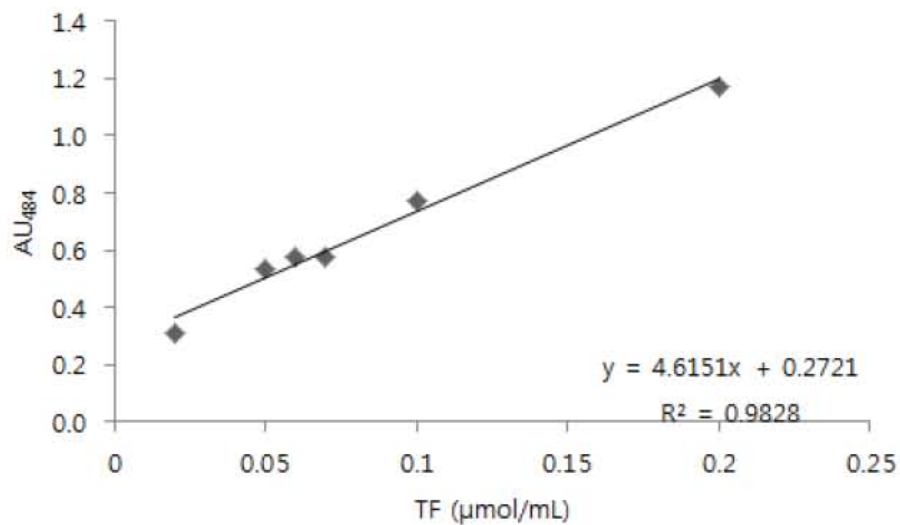


그림 3-7. *Lactobacillus plantarum* (SK3121) 단독배양과 혼합배양에 있어서 유기산 생산 분석. (A) *Lactobacillus plantarum* (SK3121)이 생산하는 Lactate, (B) 혼합배양에 의한 Lactate 생산, (C) *Lactobacillus plantarum* (SK3121)이 생산하는 Acetate, (D) 혼합배양에 의한 Acetate 생산, (E) *Lactobacillus plantarum* (SK3121)이 생산하는 Iso-butyrate (F) 혼합배양에 의한 Iso-butyrate 생산

(3) Dehydrogenase 활성 측정

단독배양과 혼합배양을 이용한 발효사료 첨가제를 15°C에서 2주 간격으로 8주 동안 탈수소효소활성을 측정하였다 (그림 3-8). 혼합배양은 단독 배양과 비교하여 월등히 높은 TF 값을 확인 할 수 있었다. 앞서 보여준 생균제의 성장 결과와도 동일한 양상을 보여 사료 내 Dehydrogenase 활성 측정값으로 생균제의 생존 활성을 판단할 수 있는 것으로 나타났다.

(A)



(B)

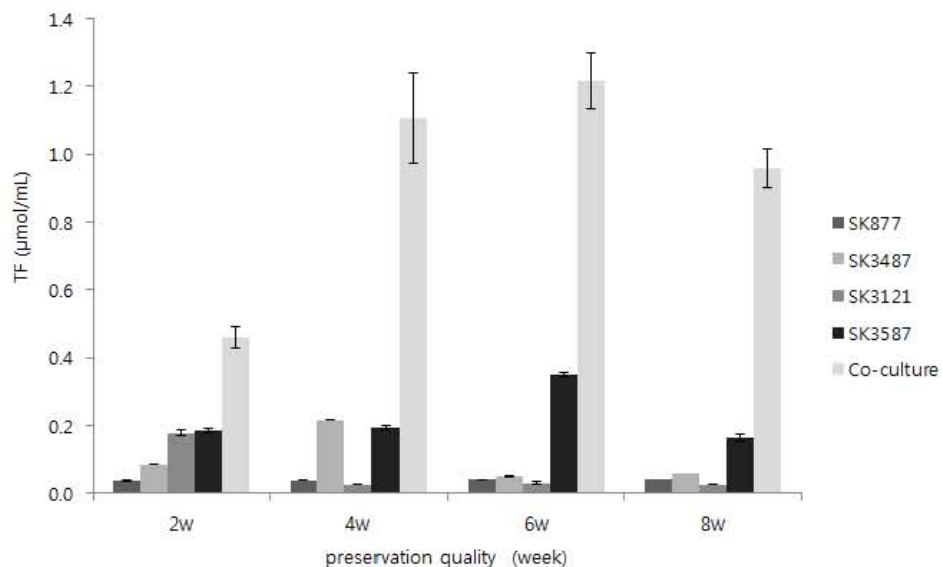


그림 3-8. 발효사료에 있어서 Dehydrogenase 활성. (A) Standard curve, (B) Dehydrogenase 활성. SK877: *B. subtilis*, SK3487: *B. aminoliquifaciens*, SK3121: *L. plantarum*, SK3587: *S. cerevisiae*.

## <제 2 위탁연구기관, 경상대학교 산학협력단>

### 1. 이론적, 실험적 접근 방법 및 연구내용

구분 (연도)	연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구내용
1 차 년 도 (2013)	실험 1: 개발된 발효 사료 첨가제의 육계에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	발효 사료 첨가제의 급여 수준을 달리하였을 때 육계의 개시체중, 종료체중 및 사료섭취량을 조사	육계의 개시체중, 종료체중, 증체량 및 사료효율 측정
		육계전기와 후기 종료 시에 분변을 채취하여 가스발생량과 병원성 미생물을 조사	육계 분중 가스 발생량과 병원성 미생물 조사
		육계전기와 후기 종료 시에 채혈을 하여 혈액분석을 통해 면역능력을 조사	육계의 혈액성상에 미치는 영향 조사
		시험종료 후 공시측을 도계하고 가슴육을 채취하여 지방산 분석	육계 가슴육의 지방산 조성 분석
	실험 2: 개발된 발효 사료 첨가제의 한우 송아지에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	발효 사료 첨가제의 급여 수준을 달리하였을 때 송아지의 개시체중, 종료체중 및 사료섭취량을 조사	송아지의 개시체중, 종료체중, 증체량 및 사료효율 측정
		시험기간 동안 매주 1회 분변을 채취하여 가스발생량과 병원성 미생물을 조사	송아지 분중 가스 발생량과 병원성 미생물 조사
2차년도	· 실험 1: 개발된 발효 사료 첨가제의 한우에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	발효 사료 첨가제의 급여 수준을 달리하였을 때 육성·비육우의 개시체중, 종료체중 및 사료섭취량을 조사	육성·비육우의 개시체중, 종료체중, 증체량 및 사료효율 측정
		비육 전기와 비육 후기 종료 시에 분변을 채취하여 가스발생량과 병원성 미생물을 조사	육성·비육우 분 중 가스 발생량과 병원성 미생물 ( <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> ) 조사
		비육 전기와 비육 후기 종료 시에 혈액분석을 통해 면역능력을 조사	육성·비육우의 혈액성상에 미치는 영향 조사
	· 실험 2: 개발된 발효 사료 첨가제의 돼지에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	발효 사료 첨가제의 급여 수준을 달리하였을 때 이유자돈의 개시체중, 종료체중 및 사료섭취량을 조사	이유자돈의 개시체중, 종료체중, 증체량 및 사료효율 측정
		시험기간 동안 매주 1회 분변을 채취하여 가스발생량과 병원성 미생물을 조사	이유자돈의 분 중 가스 발생량과 병원성 미생물 ( <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> ) 조사
		시험종료 후 채혈을 실시하고 혈액 분석을 통해 면역능력을 조사	- 이유자돈의 혈액성상에 미치는 영향 조사

3차년도	· 실험 1: 개발된 발효 사료 첨가제 의 한우에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	발효 사료 첨가제의 급여 수준을 달리 하였을 때 육성·비육우의 개시체중, 종료체중 및 사료섭취량을 조사	육성·비육우의 개시체중, 종료체중, 증체량 및 사료효율 측정
		비육 전기와 비육 후기 종료 시에 분변을 채취하여 가스발생량과 병원성 미생물을 조사	육성·비육우 분 중 가스 발생량과 병원성 미생물 ( <i>Salmonella, E. coli</i> ) 조사
		비육 전기와 비육 후기 종료 시에 혈액 분석을 통해 면역능력을 조사	육성·비육우의 혈액성상에 미치는 영향 조사
	· 실험 2: 개발된 발효 사료 첨가제 의 돼지에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	발효 사료 첨가제의 급여 수준을 달리 하였을 때 육성·비육돈의 개시체중, 종료체중 및 사료섭취량을 조사	육성·비육돈의 개시체중, 종료체중, 증체량 및 사료효율 측정
		시험기간 동안 매주 1회 분변을 채취하여 가스발생량과 병원성 미생물을 조사	육성·비육돈의 분 중 가스 발생량과 병원성 미생물 ( <i>Salmonella, E. coli</i> ) 조사
		시험종료 후 채혈을 실시하고 혈액 분석을 통해 면역능력을 조사	육성·비육돈의 혈액성상에 미치는 영향 조사

## ■ 1차년도 연구개발내용

### <개발된 발효 사료 첨가제의 육계와 한우에 대한 효능 검증>

#### 1. 개발된 발효 사료 첨가제의 육계에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

##### 가. 재료 및 방법

- (1) 개발된 발효 사료 첨가제 수준을 0, 0.5, 1 및 1% 수준으로 육계사료에 첨가하는 4 시험구를 두었다.
- (2) 대사케이지가 설치된 관내 사육장에 Brolier 96수를 공시하여 평균 체중이 유사하도록 각 시험구마다 암 수 3수씩 총 6수를 배치하였으며, 각 시험구마다 4케이지를 설정하여 입식하였다.
- (3) 사료와 환경에 적응할 수 있도록 예비시험기간을 7일 두었으며, 본 시험을 35일간 수행하였다.
- (4) 사료는 초생추 사료를 3주간 급여한 후 나머지 3주간 중생추 사료를 급여하였다.
- (5) 발효 사료 첨가제와 사료는 3일에 한번 씩 배합하였으며, 이 때 수분과 영양소 함량 분석을 위해 약 100g의 시료를 채취하여 분석 시까지 동결보관하였다.
- (6) 사료급여는 사료통을 이용하여 무제한 급여하였으며, 09시와 17시에 사료를 확인하고 보충하였고, 오전 사료급여 전 잔량을 수거하여 전일 사료 섭취량을 계산하였으며, 음수는 자유로이 섭취케 하였다.
- (7) 체중은 시험 개시, 2주 후 및 종료 시에 개체별로 측정하였다.
- (8) 가스 성상을 분석하기 위해 본 시험 기간동안 분은 매주 채취하였으며, 시험 개시 후 2주 및 5주째에 분을 채취하여 분 성상 분석에 이용하였다.
- (9) 혈액은 시험 개시 후 2주 및 종료 직후에 경정맥에서 채취하여 혈액 성상 분석에 이용하였다.
- (10) 육의 지방산 분석을 위해 시험 종료 직후 케이지 당 3수씩 도계하여 가슴육을 채취하여 분석에 이용하였다.
- (11) 기타 사양관리는 관행에 준하였다.
- (12) 분석을 위해 수거된 사료는 60℃에서 48시간 건조한 후 hammer mill로 분쇄하여 분석에 이용하였다.
- (13) 본 시험에 이용한 사료 및 개발된 발효 첨가제의 성분표를 아래의 테이블 1과 테이블 2에 나타내었다.

## 나. 통계처리

(1) 시험에서 얻어진 결과는 SAS (Statistics Analytical System, 2002)을 이용하여 분석하고, 시험구간 유의성 검정을 Tucky test ( $p < 0.05$ )로 실시하였다.



< 병아리 입식 >



< 시험에 이용된 대사 케이지 >

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diets used in this study (% , DM)

Ingredient	Starter	Finisher	Probiotics
Corn grain	42.5	45.6	-
Wheat bean	19.3	20.0	-
Soybean meal	21.8	18.6	-
Corn gluten meal	5.00	4.65	-
Whole soybean	5.00	5.00	-
Animal fats	2.60	2.88	-
Salt	0.38	0.38	-
Phosphate calcium	1.88	1.78	-
<b>Chemical composition</b>			
Dry matter	89.4	89.3	83.3
Crude protein	25.5	22.1	20.6
Ether extract	8.98	8.25	6.55
Crude ash	6.83	6.73	7.73
Calcium	0.85	0.88	
Phosphate	0.56	0.54	
Methionine+cystine	0.95	0.85	

Table 2. Microbial contents of fermented feed additives

	Fermented feed additives
Lactic acid bacteria, log <sub>10</sub> cfu/g	6.80
<i>Bacillus subtilis</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	7.15
Yeast, log <sub>10</sub> cfu/g	8.54

다. 결과

(1) 시험 사료의 일반성분

(가) Table 3는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 초생추 사료의 일반성분을 나타낸 것으로 crude protein은 생균제의 첨가 수준이 증가할수록 감소하는 반면 (P<0.05), dry matter, ether extract 및 crude ash 함량은 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).

(나) Table 4는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 중생추 사료의 일반성분을 나타낸 것으로 crude protein 및 crude ash 함량이 생균제의 첨가 수준이 증가할수록 증가하는 반면 (P<0.05), dry matter 및 ether extract 함량은 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).

Table 3. Effects of supplementation levels of fermented feed additives on chemical composition of starter diet (% DM)

	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Dry matter	89.4	89.3	89.2	89.2	0.227
Crude protein	25.5 <sup>a</sup>	24.7 <sup>ab</sup>	24.3 <sup>b</sup>	24.3 <sup>b</sup>	0.525
Ether extract	8.98	9.08	9.06	9.05	0.145
Crude ash	6.83	6.75	6.80	6.75	0.099

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 4. Effects of supplementation levels of fermented feed additives on chemical composition of finisher diet (% DM)

	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Dry matter	89.3	89.2	89.4	89.2	0.154
Crude protein	22.1 <sup>b</sup>	22.6 <sup>ab</sup>	23.0 <sup>ab</sup>	24.0 <sup>a</sup>	0.514
Ether extract	8.25	8.28	8.37	8.38	0.092
Crude ash	6.73 <sup>b</sup>	6.93 <sup>a</sup>	6.91 <sup>a</sup>	6.93 <sup>a</sup>	0.085

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## (2) 시험 사료의 지방산 함량

(가) Table 5는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 초생추 사료의 지방산 함량을 나타낸 것으로 모든 처리구간에서 유의적인 차이가 없었다 ( $P > 0.05$ ).

(나) Table 6은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 중생추 사료의 지방산 함량을 나타낸 것으로 모든 처리구간에서 유의적인 차이가 없었다. ( $P > 0.05$ ).



Table 5. Effects of supplementation levels of fermented feed additives on fatty acid profiles of starter diet used in this study (% of total fatty acid)

	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	LP	MP	HP
C14:0	1.55	1.50	1.52	1.51
C14:1	0.15	0.04	0.09	0.09
C15:0	0.44	0.37	0.39	0.39
C16:0	20.2	20.1	20.2	20.1
C16:1n-7	2.22	2.26	2.27	2.25
C17:0	0.26	0.27	0.27	0.27
C17:1	0.34	0.35	0.37	0.38
C18:0	8.47	8.43	8.32	8.27
C18:1n-9	35.8	35.8	35.5	35.4
C18:2	27.1	27.3	27.5	27.7
C18:3n-6	0.28	0.28	0.28	0.29
C20:1	1.51	1.53	1.52	1.54
C18:3n-3	0.59	0.60	0.58	0.58
C20:2	0.16	0.16	0.15	0.15
C22:0	0.05	0.04	0.04	0.04
C20:3n-6	0.11	0.11	0.11	0.12
C20:3n-3	0.08	0.08	0.08	0.08
C20:4 n-6	0.05	0.05	0.04	0.05
C22:2	0.02	0.02	0.02	0.02
C20:5n-3(EPA)	0.02	0.03	0.03	0.04
C24:0	0.07	0.06	0.07	0.07
C24:1	0.55	0.55	0.60	0.62
Saturated fatty acid	31.0	30.8	30.8	30.7
Monounsaturated fatty acid	40.5	40.5	40.4	40.3
Polyunsaturated fatty acid	28.4	28.7	28.8	29.0
PUFA/SFA	0.92	0.93	0.94	0.95
(MUFA+PUFA)/SFA	2.22	2.25	2.25	2.26
n-6	0.44	0.45	0.44	0.46
n-3	0.67	0.68	0.66	0.66
n-6:n-3 ratio	0.66	0.66	0.67	0.69

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

Table 6. Effects of supplementation levels of fermented feed additives on fatty acid profiles of finisher diet used in this study (% of total fatty acid)

	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	LP	MP	HP
C14:0	1.55	1.49	1.49	1.52
C14:1	0.08	0.07	0.06	0.06
C15:0	0.42	0.41	0.42	0.39
C16:0	20.3	20.2	20.3	20.2
C16:1n-7	2.36	2.38	2.41	2.25
C17:0	0.23	0.26	0.27	0.26
C17:1	0.35	0.34	0.37	0.37
C18:0	7.92	7.78	7.75	8.31
C18:1n-9	36.7	36.7	36.6	35.5
C18:2	26.8	27.0	27.1	27.6
C18:3n-6	0.27	0.27	0.27	0.28
C20:1	1.13	1.13	1.15	1.52
C18:3n-3	0.66	0.66	0.66	0.58
C20:2	0.18	0.19	0.18	0.16
C22:0	0.04	0.04	0.04	0.04
C20:3n-6	0.10	0.11	0.10	0.12
C20:3n-3	0.07	0.09	0.08	0.09
C20:4 n-6	0.17	0.18	0.16	0.12
C22:2	0.02	0.02	0.02	0.00
C20:5n-3(EPA)	0.02	0.04	0.04	0.03
C24:0	0.07	0.07	0.07	0.07
C24:1	0.59	0.58	0.57	0.60
Saturated fatty acid	30.5	30.3	30.3	30.8
Monounsaturated fatty acid	41.2	41.2	41.1	40.3
Polyunsaturated fatty acid	28.3	28.5	28.6	28.9
PUFA/SFA	0.93	0.94	0.94	0.94
(MUFA+PUFA)/SFA	2.28	2.30	2.30	2.25
n-6	0.55	0.56	0.53	0.51
n-3	0.74	0.75	0.74	0.66
n-6:n-3 ratio	0.74	0.75	0.72	0.77

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

### (3) 육계의 성장 특성

- (가) Table 7은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육계의 성장특성을 나타낸 것으로 개시 체중은 평균 0.47 kg으로 나타났다.
- (나) 시험 개시 후 2 ~ 3주차에서 모든 시험구에서 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).
- (다) 시험 개시 후 4 ~ 6주차에서 성장 특성은 모든 처리구에서 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).
- (마) 시험 기간동안 성장 특성은 모든 처리구에서 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).

Table 7. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on growth performance of broiler

	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Initial weight, kg	0.465	0.473	0.465	0.468	0.007
<b>2 ~ 3 wk</b>					
Feed intake, kg	1.42	1.436	1.442	1.443	0.140
Weight gain, kg	0.298	0.306	0.303	0.308	0.044
Average daily feed intake, kg	0.102	0.103	0.103	0.103	0.011
Average daily gain, kg	0.022	0.022	0.022	0.022	0.004
Feed efficiency, gain/intake	0.210	0.214	0.210	0.213	0.010
<b>4 ~ 6 wk</b>					
Feed intake, kg	1.055	1.142	1.093	1.232	1.065
Weight gain, kg	0.466	0.501	0.534	0.493	0.492
Average daily feed intake, kg	0.048	0.052	0.050	0.056	0.048
Average daily gain, kg	0.034	0.036	0.038	0.036	0.034
Feed efficiency, gain/intake	0.442	0.438	0.488	0.400	0.072
<b>Total period</b>					
Feed intake, kg	2.475	2.578	2.535	2.676	1.171
Weight gain, kg	1.003	1.066	1.046	1.065	0.584
Average daily feed intake, kg	0.069	0.072	0.070	0.074	0.032
Average daily gain, kg	0.028	0.030	0.029	0.030	0.016
Feed efficiency, gain/intake	0.406	0.413	0.412	0.402	0.019

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

### (4) 도계 후 가슴육의 지방산 함량

- (가) Table 8은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 도계 후 가슴육의 지방산 함량을 나타낸 것으로 개발된 발효 생균제의 첨가 수준이 증가함에 따라 C14:0 함량이 증가하는 반면, C15:0함량은 감소하였다 ( $P<0.05$ ).
- (나) 개발된 발효 사료 첨가제의 첨가 수준이 증가함에 따라 C18:1n-9 함량이 증가하는데 ( $P<0.05$ ), 이는 Lunt and Smith (1991)에 따르면 일반적으로 C18:1n-9함량이 높으면 고기의 맛을 좋게 한다고 보고되었는데, 본 시험에서도 C18:1n-9함량이 증가하여 육의 품질이 향상된다고 사료된다.
- (다) C17:0 함량은 LP구에서 가장 높게 나타난 반면, MP구에서 가장 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ),
- (라) C14:1 함량은 처리구 별 유의적인 차이는 없으나, 개발된 발효 사료 첨가제의 첨가 수준이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다 ( $P=0.057$ ).

Table 8. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on fatty acid profiles of fowl breast meat

	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
C14:0	0.41 <sup>b</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.089
C14:1	0.13	0.17	0.16	0.17	0.030
C15:0	0.16 <sup>a</sup>	0.14 <sup>ab</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.033
C16:0	22.6	22.1	21.8	21.8	0.828
C16:1n-7	0.94	1.25	1.09	1.09	0.383
C17:0	0.29 <sup>ab</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.29 <sup>ab</sup>	0.052
C17:1	1.10	1.11	1.12	1.12	0.223
C18:0	11.7	12.3	11.4	11.4	1.869
C18:1n-9	20.5 <sup>b</sup>	24.7 <sup>a</sup>	25.4 <sup>a</sup>	25.4 <sup>a</sup>	3.140
C18:2	20.1	19.1	19.6	19.6	1.245
C20:1	0.22	0.26	0.28	0.26	0.061
C18:3n-3	0.34	0.37	0.32	0.32	0.082
C20:2	0.67	0.63	0.61	0.63	0.120
C22:0	1.39	1.30	1.34	1.34	0.167
C20:4 n-6	10.0	9.40	9.34	9.34	1.956
C20:5n-3(EPA)	0.16	0.21	0.21	0.19	0.054
C24:1	3.03	2.45	2.24	2.24	0.754
C22:4	1.08	0.98	1.00	1.09	0.283
C22:5n-3(DPA)	1.00	0.91	0.91	0.91	0.196
C22:6n-3(DHA)	1.23	1.17	1.19	1.19	0.315
Saturated fatty acid	37.6	36.8	36.9	35.9	1.577
Monounsaturated fatty acid	27.9	29.6	30.4	31.0	3.692
Polyunsaturated fatty acid	34.5	33.9	33.0	33.4	2.508
PUFA/SFA	0.87	0.93	0.89	0.90	0.079
(MUFA+PUFA)/SFA	1.70	1.73	1.71	1.79	0.122
n-6	20.0	19.3	19.0	19.8	1.162
n-3	12.8	12.7	12.0	12.2	2.252
n-6:n-3 ratio	1.67	1.57	1.54	1.58	0.327

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

### (5) 분 중 미생물 성장

(가) 분 중 병원성 미생물 분석 결과 검출이 되지 않았다.

(6) 혈중 백혈구 수치

(가) Figure 1은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 혈중 백혈구 수치를 나타낸 것으로 2주령에서는 모든 처리구에서 유의적인 차이가 없었으나 4주령부터 LP구가 가장 낮게 나타났다.

(나) 주령이 증가할수록 MP구에서 급격하게 증가하여 6주령에서 가장 높게 나타났다.

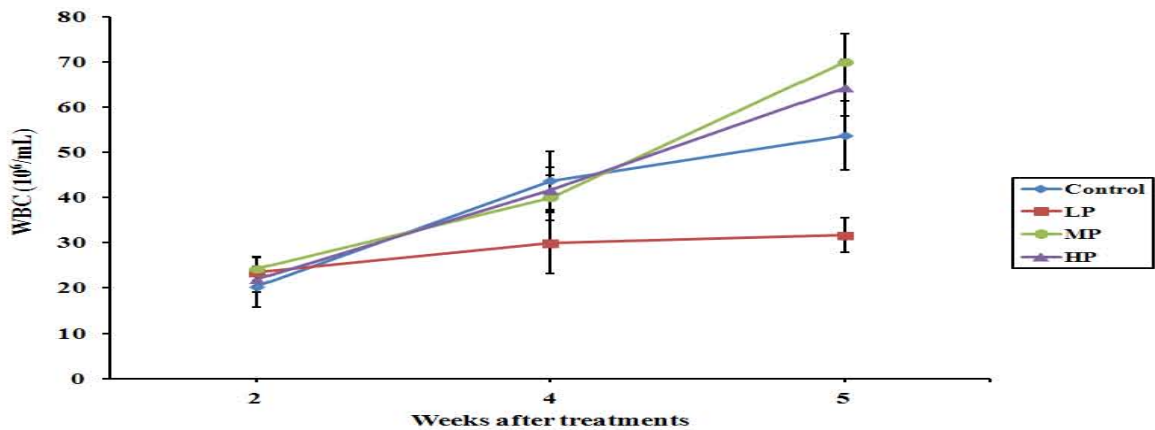


Fig 1. Effects of supplementation levels of fermented feed additives on white blood cell (CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP : basal diet with 1.5% fermented feed additives).

(7) 분 중 가스 정상

(가) 모든 시험구에서 CO<sub>2</sub> 함량은 차이가 없었다.

Table 9. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on carbon dioxide emissions of faeces

	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
CO <sub>2</sub> , 1weeks	1411.0	1579.3	1915.3	1572.3	473.1
CO <sub>2</sub> , 3weeks	1578.8	1949	1402.8	1095.3	760.8
CO <sub>2</sub> , 5weeks	3191.8	4081.0	3851.0	4534.3	2025.6

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

(8) 경제성 분석

(가) Table 9는 육계의 경제성을 분석한 것으로 발효된 사료 첨가제를 0.5% 이상 첨가 시 경제성 부분에 불리할 것으로 사료된다.

Table 9. Economical analysis of broiler as influenced by feeding system

	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	LP	MP	HP
<b>Intake, kg</b>				
Concentrate (Starter)	1.420	1.429	1.428	1.420
Feed additives	0.00	0.007	0.014	0.020
Concentrate (Finisher)	1.055	1.136	1.082	1.214
Feed additives	0.00	0.006	0.011	0.018
Total intake	2.475	2.578	2.535	2.676
<b>Feed cost, won</b>				
Concentrate (Starter)	639	643	643	693
Feed additives	0.00	21	42	60
Concentrate (Finisher)	433	466	444	498
Feed additives	0.00	18	33	48
Total feed cost (A)	1,072	1,148	1,162	1,299
Total gain (B), kg	1.003	1.066	1.046	1.065
Unit cost (A/B), won	1,069	1,077	1,110	1,220
Index, %	100.0	100.7	103.8	114.1

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

Starter concentrate cost: 450 won/kg, finisher concentrate cost: 410 won/kg, feed additives cost: 3000 won/kg.

라. 요약

- (1) 개발된 발효 사료 첨가제의 미생물 균수는 유산균, 고초균 및 효모균은 각각 6.80, 7.15 및 8.54 log<sub>10</sub> cfu/g을 나타내었다.
- (2) 초생추 사료에서는 개발된 발효 사료 첨가제의 첨가 수준이 증가함에 따라 감소하는 반면, 중생추 사료에서는 증가하였다.
- (3) 성장 특성에서 시험 개시 후 2 ~ 3주차에서 증체량 및 일당 증체량이 LP구에서 가장 높게 나타났으나, 총 시험 기간에서 모든 시험구 간 유의적인 차이가 없었다.
- (4) 도계 후 가슴육의 지방산 함량에서 개발된 발효 사료 첨가제의 첨가 수준이 증가함에 따라 C18:1n-9 함량이 증가하는데, 이는 육의 품질을 향상한다고 사료된다.
- (5) 발효된 사료 첨가제를 이용 시 0.5% 이상 첨가하여 사용하지 않는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

## 2. 개발된 발효 사료 첨가제의 어린 송아지에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

### 가. 재료 및 방법

- (1) 개발된 발효 사료 첨가제 수준을 0, 0.5, 1 및 2% 수준으로 사료에 첨가하는 4 시험구를 두었다.
- (2) 어린 송아지 20두를 공시하여 시험구 당 5두씩 우사에 배치하여 2개월간 사양시험을 실시한다.
- (3) 사료 급여는 09:00와 16:00로 나누어 급여하고, 오전 사료급여 직전 잔량을 수거하여 사료섭취량을 분석한다.
- (4) 음수는 자유로이 섭취케하고, 기타 사양관리는 농장의 관행에 준한다.
- (5) 체중은 시험 시작 시와 종료 시에 측정하여 증체량을 분석한다.
- (6) 혈액은 시험 종료 후 경정맥을 통하여 채취하여 혈액 성상을 분석한다.
- (7) 분 중 가스 및 미생물 분석을 위해 분을 수거하여 보관한 후 분석에 이용한다.
- (8) 시료는 60℃에서 48시간 건조한 후 hammer mill로 분쇄하여 분석에 이용한다.
- (9) 본 시험에 이용한 사료 및 개발된 발효첨가제의 성분표를 아래의 table에 나타내었다.



< 송아지 입식 >



< 개시 체중 분석 >



Table 1. Ingredients and chemical compositions of the diets used in the study

Ingredient	Concentrate	rice straw	Probiotics
Corn grain	15.1	-	-
Wheat brain	19.0	-	-
Corn gluten feed	9.50	-	-
Soybean hull	8.30	-	-
<hr/>			
Corn hull	0.50	-	-
Corn cobs	8.00	-	-
Soybean meal	12.5	-	-
Corn gluten meal	1.00	-	-
Alfalfa peleted	15.0	-	-
Beet pulp	7.00	-	-
Molasses	1.50	-	-
Limestone	0.70	-	-
TCP <sup>1)</sup>	0.50	-	-
Salt dehydrated	0.40	-	-
Edimixed plus	0.12	-	-
Yeast culture	0.10	-	-
Vitamin Premix <sup>2)</sup>	0.40	-	-
Mineral premix <sup>3)</sup>	0.29	-	-
Total	100.0	-	-
<hr/>			
<b>Chemical composition</b>			
Dry matter	86.881	72.837	85.151
Crude protein	17.623	4.925	19.779
Ether extract	17.623	4.925	4.294
Crude ash	10.133	14.011	8.508
Neutral detergent fiber (NDF)	31.726	70.201	53.017
Acid detergent fiber (ADF)	15.969	56.234	20.620
Hemicellulose	15.758	13.967	32.397

<sup>1)</sup> TCP : Tricalcium phosphate

<sup>2)</sup> Vitamin mixture contains following nutrients per kg: vitamin A, 5,000,000 IU, Vit D3 1,000,000 IU, 1,000 mg, Vit B1 150 mg, Vit B12 1,500 mg, *et al.*

<sup>3)</sup> Fe 4,000mg, Zn 1,500mg, Mn 3,800mg, Cu 500mg, Co 100mg, Mg 200mg *et al.*

Table 2. Microbial contents of fermented feed additives used in this study

	Fermented feed additives
Lactic acid bacteria, log <sub>10</sub> cfu/g	8.30
<i>Bacillus subtilis</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	8.94
Yeast, log <sub>10</sub> cfu/g	8.59

## 나. 결과

### (1) 송아지의 성장 능력

(가) Table 3은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 송아지의 성장특성을 나타낸 것으로 HP구에서 개시체중, 종료체중 및 일당증체량이 가장 높게 나타났다.

(나) 사료효율은 모든 시험구에서 유의적인 차이는 없었다.

Table 3. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on growth performance of calves

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Feed intake, kg	240	240	300	360	0
Average daily feed intake, kg	4.00	4.00	5.00	6.00	0
Intial weight, kg	182.6 <sup>c</sup>	208.8 <sup>bc</sup>	243.2 <sup>b</sup>	289.2 <sup>a</sup>	21.74
Final weight, kg	220.2 <sup>c</sup>	242.2 <sup>c</sup>	282.2 <sup>b</sup>	341.0 <sup>a</sup>	21.96
Average daily gain, kg	37.6 <sup>b</sup>	33.4 <sup>b</sup>	39.0 <sup>b</sup>	51.8 <sup>a</sup>	0.092
Feed efficiency, gain/intake	0.157	0.139	0.130	0.144	0.020

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 2.0% fermented feed additives.

<sup>a-c</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

### (2) 송아지의 혈액 성분

(가) Table 3은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 송아지의 혈액성상을 나타낸 것으로 Blood urea nitrogen 함량은 발효 사료 첨가제 첨가 비율이 증가할수록 증가하였다 (P<0.05).

(나) Blood glucose 함량은 시험구 간 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).

Table 4. Effects of dietary supplementation probiotics on blood metabolites of calves

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Blood glucose, mg/dL	72.3	69.5	68.4	70	5.139
Blood urea nitrogen, mg/dL	13.7 <sup>b</sup>	13.9 <sup>b</sup>	15.0 <sup>a</sup>	16.1 <sup>a</sup>	0.515

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 2.0% fermented feed additives.

<sup>a,c</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

## ■ 2차년도 연구개발내용

<개발된 발효 사료 첨가제의 한우와 돼지에 대한 효과 검증>

### 1. 개발된 발효 사료 첨가제의 육성·비육우에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

#### 가. 재료 및 방법

- (1) 경남 합천군 적중면 소재 한우시험장에서 육성·비육우 32두(15~17개월령,  $462 \pm 37.9\text{kg}$ )를 공시하여 12개월간 실시한다.
- (2) 개발된 발효 사료 첨가제를 무첨가구(CON), 0.5% (LP), 1.0% (MP) 및 1.5% (HP) 로 첨가한 4개의 시험구를 설정하고, 각 시험구당 8두씩을 배치하여 2반복을 실시한다.
- (3) 사료 급여는 09:00와 16:00로 나누어 급여하고, 오전 사료급여 직전 잔량을 수거하여 사료섭취량을 분석한다.
- (4) 음수는 자유로이 섭취케하고, 기타 사양관리는 농장의 관행에 준한다.
- (5) 체중은 시험 시작 시와 사료가 교체될 시 및 종료 시에 측정하여 증체량을 분석한다.
- (6) 혈액은 사료 교체 시 및 시험 종료 후 경정맥을 통하여 채취하여 혈액 성상을 분석한다.
- (7) 분 중 가스 및 미생물 분석을 위해 분을 수거하여 보관한 후 분석에 이용한다.
- (8) 시료는 60℃에서 48시간 건조한 후 hammer mill로 분쇄하여 분석에 이용한다.



< 시험에 이용된 우사 >



< 개시 체중 측정 >

## 나. 통계처리

시험에서 얻어진 결과는 SAS (Statistics Analytical System, 2002)을 이용하여 분석하고, 시험구간 유의성 검정을 Tucky test ( $p < 0.05$ )로 실시하였다.

## 다. 결과

### (1) 육성·비육우의 성장 특성

(가) Table 1은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 성장 특성을 나타낸 것으로 개시 체중이 차이가 나는 것은 월령을 다르게 배치하였기 때문에 차이가 나는 것으로 사료된다.

(나) 종료 체중은 CON구에서 다른 시험구보다 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

(다) 증체량, 일당 증체량 및 사료효율은 MP구와 HP구가 LP구보다 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

Table. 1 Effects of dietary supplementation fermented feed additives on growth performance of Hanwoo steers

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Feed intake, kg	1677.5 <sup>a</sup>	1677.5 <sup>a</sup>	1636.3 <sup>b</sup>	1595.0 <sup>c</sup>	22.05
Average daily feed intake, kg	15.3 <sup>a</sup>	15.3 <sup>a</sup>	14.9 <sup>b</sup>	14.5 <sup>c</sup>	0.200
Intial weight, kg	501.3 <sup>a</sup>	482.5 <sup>ab</sup>	455.0 <sup>bc</sup>	412.5 <sup>c</sup>	33.05
Final weight, kg	563.8 <sup>a</sup>	536.3 <sup>ab</sup>	533.8 <sup>ab</sup>	495.0 <sup>b</sup>	38.34
Gain, kg	62.5 <sup>ab</sup>	53.8 <sup>b</sup>	78.8 <sup>a</sup>	82.5 <sup>a</sup>	18.10
Average daily gain, kg	0.568 <sup>ab</sup>	0.489 <sup>b</sup>	0.716 <sup>a</sup>	0.750 <sup>a</sup>	0.164
Feed efficiency, gain/intake	4.098 <sup>ab</sup>	3.525 <sup>b</sup>	5.295 <sup>a</sup>	5.690 <sup>a</sup>	1.207

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## 2. 개발된 발효 사료 첨가제의 이유자돈에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

### 가. 재료 및 방법

- (1) 개발된 발효 사료 첨가제 수준을 0, 0.5, 1 및 1.5% 수준으로 이유자돈에 첨가하는 4 시험구를 두었다.
- (2) 경상남도 창원군 창녕읍 장마면 소재 양돈농가에서 이유자돈 144두를 공시하여 시험구 당 12두씩 돈 방에 배치하였으며, 각 시험구마다 3칸의 돈 방을 설정하여 입식하였다.
- (3) 사료와 환경에 적응할 수 있도록 예비시험기간을 7일 두었으며, 본 시험을 21일간 수행하였다.
- (4) 사료는 2호, 3호 및 30호 총 3종류의 사료를 급여하였다.
- (5) 발효 사료 첨가제와 사료는 5일에 한번씩 배합하였으며, 이 때 수분과 영양소 함량 분석을 위해 약 100 g의 시료를 채취하여 분석 시까지 동결보관하였다.
- (6) 사료급여는 원형사료급이기를 설치하여 무제한 급여하였으며, 08시와 17시에 사료를 확인하고 보충하였고, 음수는 자유로이 섭취케 하였다.
- (7) 체중은 개시체중 및 종료체중을 개체별로 측정하였다.
- (8) 본 시험기간 동안 분을 매주 채취하여 가스 성상을 분석하고, 시험 개시 및 종료 시에 분을 채취하여 분 중 미생물 정상 분석에 이용하였다.
- (9) 혈액은 시험 종료 후 경정맥에서 채취하여 혈액 성분 분석에 이용하였다.
- (10) 기타 사양관리는 관행에 준하였다.
- (11) 영양소 함량 분석을 위해 수거된 사료는 60℃에서 48시간 건조한 후 hammer mill로 분쇄하여 분석에 이용하였다.

### 나. 통계처리

시험에서 얻어진 결과는 SAS (Statistics Analytical System, 2002)을 이용하여 분석하고, 시험구간 유의성 검정을 Tucky test ( $p < 0.05$ )로 실시하였다.



< 시험에 이용된 돈 방 >



< 개시 체중 및 종료 체중 측정 >

## 다. 결과

Table 1. Chemical compositions of the diets used in experiment (% DM)

	2호	3호	30호
Dry matter	91.1	89.7	86.9
Crude protein	24.9	24.2	21.4
Crude ash	7.00	6.33	5.42
Ether extract	7.88	7.97	7.56

Table 2. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on chemical composition of diet

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
2호					
Dry matter, %	91.2	90.9	90.9	90.9	0.153
Crude protein, %	24.1	24.0	24.3	24.8	0.463
Crude ash, %	7.96	7.89	7.82	7.73	0.182
Ether extract, %	6.79	6.83	6.91	6.90	0.179
3호					
Dry matter, %	89.0	89.4	89.4	89.6	0.225
Crude protein, %	24.1	23.6	23.8	24.3	0.297
Crude ash, %	7.87	7.76	7.81	7.80	0.079
Ether extract, %	6.55	6.55	6.31	6.48	0.1
30호					
Dry matter, %	86.8	87.1	87.2	87.0	0.341
Crude protein, %	21.2	21.3	21.5	21.7	0.436
Crude ash, %	7.17 <sup>b</sup>	7.09 <sup>b</sup>	7.42 <sup>ab</sup>	7.65 <sup>a</sup>	0.158
Ether extract, %	5.17	5.22	5.37	5.25	0.183

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### (1) 시험 사료의 일반성분

(가) Table 2는 개발된 발효 생균제 첨가 수준에 따른 시험에 이용된 사료의 일반성분을 나타낸 것으로 30호에서 HP구에서 crude ash 함량이 가장 높게 나타나는 반면 ( $P < 0.05$ ), dry matter, crude protein 및 ether extract 함량은 모든 구간에서 유의적인 차이가 없었다 ( $P > 0.05$ ).



## (2) 이유자돈의 성장 특성

- (가) Table 3은 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 이유자돈의 성장특성을 나타낸 것으로 개시 체중은 평균 7.43 kg으로 나타났다.
- (나) 종료체중, 증체량, 일당증체량 및 사료효율은 모든 시험구에서 유의적인 차이는 없으나 HP구에서 높게 나타났다 ( $P>0.05$ ).

Table 3. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on growth performance of weaning pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Feed intake, kg	108.1	110.8	115.9	108.3	8.057
Average daily feed intake, kg	5.15	5.28	5.52	5.16	0.383
Intial weight, kg	7.47	7.40	7.39	7.44	1.476
Final weight, kg	13.8	13.7	13.7	14.0	2.040
Gain, kg	6.32	6.32	6.31	6.54	0.662
Average daily gain, kg	0.303	0.301	0.301	0.312	0.032
Feed efficiency, gain/intake	0.059	0.057	0.054	0.060	0.004

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, MP: basal diet with 1.0% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.5% fermented feed additives.

## (3) 이유자돈의 혈액 정상

- (가) Table 4는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 이유자돈의 혈액성상을 나타낸 것으로 MP구에서 insulin과 glucose 함량이 다른 시험구에 비해 가장 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).
- (나) 성장인자와 관련이 있는 IGF-1 은 수치적으로 MP구에서 나타났지만, 유의적인 차이는 없었다 ( $P>0.05$ ).
- (다) Glucose 함량은 MP구에서 가장 높게 나타난 반면 ( $P<0.05$ ), blood urea nitrogen 함량은 모든 구간에서 유의적인 차이는 없었다 ( $P>0.05$ ).



Table 4. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on blood metabolites of weaning pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
IgG(S), mg/dL	688.7	578.6	596.6	685.9	157.3
Insulin, $\mu$ U/mL	0.617 <sup>b</sup>	0.425 <sup>b</sup>	0.925 <sup>a</sup>	0.433 <sup>b</sup>	0.383
IGF-1, ng/mL	91.1	84.8	114.0	92.9	40.00
Glucose(S), mg/dL	99.9 <sup>b</sup>	103.8 <sup>b</sup>	123.2 <sup>a</sup>	105.9 <sup>b</sup>	10.52
Blood urea nitrogen, mg/dL	10.6	9.96	9.64	10.1	2.404

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

#### (4) 이유자돈 돈 분에서의 병원성 미생물 성장

(가) Table 5는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 돈 분의 병원성 미생물 성장을 나타낸 것으로 시험 개시 시 모든 구간에서 *Salmonella*와 *E. coli* 함량은 유의적인 차이가 없었다 ( $P > 0.05$ ).

(나) 시험 종료 후 모든 구간에서 *salmonella*와 *E. coli*는 검출되지 않아 병원성 미생물 감소에 효과가 있을 것으로 기대된다.

Table 5. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on *Salmonella* and *E.coli* in the feces of weanling pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
0 weeks					
<i>Salmonella</i> , log10 cfu/g	3.71	4.45	3.43	3.18	0.426
<i>E.coli</i> , log10 cfu/g	3.86	4.09	3.18	4.08	0.797
3 weeks					
<i>Salmonella</i> , log10 cfu/g	ND*	ND	ND	ND	
<i>E.coli</i> , log10 cfu/g	ND	ND	ND	ND	

\*ND: not detected.

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

(5) 이유자돈 경제성 분석

(가) Table 6은 이유자돈의 경제성을 분석한 결과를 나타낸 것으로 HP구에서 CON 구에 비해 경제성이 우수할 것이라고 사료된다.

Table 6. Economical analysis of weaning pigs as influenced by feeding system

	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	LP	MP	HP
<b>Intake, kg</b>				
Concentrate (2호)	25.7	26.3	27.33	25.42
Feed additives	0	0.100	0.270	0.380
Concentrate (3호)	30.9	31.54	32.77	30.44
Feed additives	0	0.160	0.330	0.460
Concentrate (30호)	51.5	52.43	54.65	50.84
Feed additives	0	0.270	0.550	0.760
Total intake	108.1	110.8	115.9	108.3
<b>Feed cost, won</b>				
Concentrate (2호)	43,690	44,710	46,461	43,214
Feed additives	0	300	810	1,140
Concentrate (3호)	37,080	37,848	39,324	36,528
Feed additives	0	480	990	1,380
Concentrate (30호)	25,750	26,215	27,325	25,420
Feed additives	0	810	1,650	2,280
Total feed cost (A)	106,520	110,636	116,560	109,962
Total gain (B), kg	6.32	6.32	6.31	6.54
Unit cost (A/B), won	16,854	17,505	18,472	16,813
Index, %	100.0	103.9	109.6	99.8

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

No.2 concentrate cost: 1700 won/kg, No.3 concentrate cost: 1200 won/kg, No.30 concentrate cost: 500 won/kg.

라. 요약

- (1) 성장 특성에서 HP구에서 종료체중, 증체량, 일당 증체량 및 사료효율이 수치적으로는 높게 나타났으나, 모든 시험구에서 유의적인 차이가 없었다.
- (2) 혈액 정상에서 MP구에서 insulin과 glucose 수치가 다른 시험구보다 높게 나타났다.
- (3) 성장인자와 관련이 있는 IGF-1 함량이 수치적으로 MP구에서 높게 나타났지

만, 모든 구간에서 유의적인 차이는 없었다.

- (4) 시험 개시 전에는 분 중 병원성 미생물이 검출되었지만, 시험 종료 후 분 중 병원성 미생물은 검출되지 않아, 이는 분 중 병원성 미생물 감소에 영향을 미칠 것으로 기대된다.

## ■ 3차년도 연구개발내용

<개발된 발효 사료 첨가제의 한우와 돼지에 대한 효과 검증>

### 1. 개발된 발효 사료 첨가제의 육성/비육우에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립

#### 가. 재료 및 방법

- (1) 경남 합천군 적중면 소재 한우시험장에서 육성·비육우 32두(15~17개월령,  $462 \pm 37.9\text{kg}$ )를 공시하여 12개월간 실시한다.
- (2) 개발된 발효 사료 첨가제를 무첨가구(CON), 0.5% (LP), 1.0% (MP) 및 1.5% (HP) 로 첨가한 4개의 시험구를 설정하고, 각 시험구당 8두씩을 배치하여 2반복을 실시한다.
- (3) 사료 급여는 09:00와 16:00로 나누어 급여하고, 오전 사료급여 직전 잔량을 수거하여 사료섭취량을 분석한다.
- (4) 음수는 자유로이 섭취케하고, 기타 사양관리는 농장의 관행에 준한다.
- (5) 체중은 시험 시작 시와 사료가 교체될 시 및 종료 시에 측정하여 증체량을 분석한다.
- (6) 혈액은 사료 교체 시 및 시험 종료 후 경정맥을 통하여 채취하여 혈액 성상을 분석한다.
- (7) 분 중 가스 및 미생물 분석을 위해 분을 수거하여 보관한 후 분석에 이용한다.
- (8) 시료는 60℃에서 48시간 건조한 후 hammer mill로 분쇄하여 분석에 이용한다.



< 시험에 이용된 우사 >



< 개시 체중 측정 >

(9) 시험에 사용된 생균제의 미생물 수

(가) Table 1은 시험에 사용된 발효 사료첨가제의 미생물을 나타낸 것이다.

Table 1. Microbial contents of probiotics used in this study

	fermented feed additives
Lactic acid bacteria, log <sub>10</sub> cfu/g	8.30
Bacillus subtilis, log <sub>10</sub> cfu/g	8.15
Yeast, log <sub>10</sub> cfu/g	7.424

(10) 시험에 사용된 사료의 화학적 특성

(가) Table 2는 시험에 사용된 사료의 일반성분을 나타낸 것이다.

Table 2. Chemical compositions of the diets used in experiment (% DM)

	TMF
Dry matter	57.4
Crude protein	16.7
Crude ash	10.5
Ether extract	6.15
Neutral detergent fiber	42.2
Acid detergent fiber	24.0
Hemicellulose	18.2

나. 통계처리

시험에서 얻어진 결과는 SAS (Statistics Analytical System, 2002)을 이용하여 분석하고, 시험구간 유의성 검정을 Tucky test ( $p < 0.05$ )로 실시하였다.

다. 결과

(1) 육성·비육우의 성장 특성

(가) Table 3은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 성

- 장 특성을 나타낸 것으로 개시 체중이 차이가 나는 것은 월령을 다르게 배치하였기 때문에 차이가 나는 것으로 사료된다.
- (나) 사료섭취량이 차이가 나는 것은 월령별로 다르고 출하 일령이 다르기 때문에 차이가 나는 것으로 사료된다.
- (다) 증체량은 HP구가 CON구 및 LP구 보다 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).
- (라) 일당증체량 및 사료효율은 생균제 첨가 비율이 증가할수록 증가하지만 시험구간 유의적인 차이는 없었다 ( $P>0.05$ ).

Table 3. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on growth performance of Hanwoo steers

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Feed intake, kg	5317.0 <sup>c</sup>	5343.6 <sup>c</sup>	6529.4 <sup>b</sup>	7027.6 <sup>a</sup>	257.19
Average daily feed intake, kg	14.7 <sup>a</sup>	14.7 <sup>a</sup>	14.6 <sup>b</sup>	14.5 <sup>c</sup>	0.045
Intial weight, kg	501.3 <sup>a</sup>	482.5 <sup>ab</sup>	455.0 <sup>bc</sup>	412.5 <sup>c</sup>	32.88
Final weight, kg	713.3	697.8	747.3	732.5	57.5
Gain, kg	212.0 <sup>c</sup>	215.3 <sup>c</sup>	297.3 <sup>b</sup>	320.0 <sup>ab</sup>	48.18
Average daily gain, kg	0.59	0.63	0.69	0.69	0.109
Feed efficiency, gain/intake	0.04	0.04	0.05	0.05	0.007

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

## (2) 육성·비육우의 혈액 성상

- (가) Table 4는 발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 혈액 성상을 나타낸 것으로 시험 개시 시 total cholesterol 함량은 발효 사료 첨가제 첨가수준이 증가할수록 증가하였다 ( $P<0.05$ ).
- (나) 시험 개시 시 blood urea nitrogen 함량은 CON구에서 가장 낮게 나타난 반면, MP구 및 HP구에서 가장 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).
- (다) 시험 종료 시 growth hormone 함량은 HP구가 CON구에 비해 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

(라) 시험 종료 시 total cholesterol과 blood urea nitrogen 함량은 HP구에서 가장 높게 나타난 반면 MP구에서 가장 낮게 나타났다 ( $P>0.05$ ).

Table 4. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on blood metabolites of Hanwoo steers

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Initial blood metabolites					
Insulin, $\mu\text{g/L}$	3.00	2.45	2.89	2.77	0.379
Growth hormone, ng/mL	1.29	0.83	0.67	0.67	0.447
Total cholesterol, mg/dL	156.0 <sup>b</sup>	157.8 <sup>b</sup>	214.25 <sup>a</sup>	226.6 <sup>a</sup>	16.92
Blood urea nitrogen, mg/dL	14.1 <sup>c</sup>	13.7 <sup>bc</sup>	16.0 <sup>ab</sup>	18.0 <sup>a</sup>	1.564
Blood glucose, mg/dL	83.0	71.4	72.0	76.8	8.524
Final blood metabolites					
Insulin, $\mu\text{g/L}$	2.59	2.56	3.00	2.86	0.617
Growth hormone, ng/mL	0.23 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.33 <sup>ab</sup>	0.60 <sup>a</sup>	0.23
Total cholesterol, mg/dL	196.2 <sup>ab</sup>	226.0 <sup>a</sup>	171.6 <sup>b</sup>	225.8 <sup>a</sup>	26.14
Blood urea nitrogen, mg/dL	14.0 <sup>b</sup>	15.0 <sup>ab</sup>	13.9 <sup>b</sup>	16.4 <sup>a</sup>	0.948
Blood glucose, mg/dL	91.8	90.3	90.0	70.8	14.83

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

### (3) 육성·비육우의 도체특성

(가) Table 5은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 도체특성을 나타낸 것으로 도체중 및 등지방두께는 발효 사료 첨가제를 첨가한 구에서 첨가하지 않은 구보다 수치적으로 높게 나타났으나 시험구 간 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

(나) 육질 등급에서는 LP구 및 HP구에서는 1+ 이상 등급의 소가 가장 많이 나타났다.

(다) 반면, 육량 등급에서는 MP구 및 HP구에서 A등급이 1마리씩 나온 것을 제외하면 2등급으로 육량 등급은 낮게 나타난 것을 볼 수 있다.

Table 5. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on carcass characteristics of Hanwoo steers

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Carcass weight, kg	439.8	445.8	465.3	454.6	38.25
Longissimus muscle area, cm <sup>2</sup>	89.2	93.8	91.5	97.6	9.921
Back fat thickness, mm	18.3	14.5	15.5	17.3	2.301
Meat quality (1 <sup>++</sup> :1 <sup>+</sup> :1:2)	0:3:2:3	1:5:2:1	1:1:2:4	0:5:2:1	-
Meat quantity (A:B:C)	0:2:6	0:4:4	1:4:3	1:2:5	-

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

#### (4) 육성·비육우의 육의 이화학적 특성

(가) Table 6은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 육의 이화학적 특성을 나타낸 것으로 한우 등심육의 가열감량은 발효 사료 첨가제 첨가수준이 증가할수록 감소하였다 ( $P<0.05$ ).

(나) 한우 등심육의 전단가는 시험구간 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

Table 6. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on the physicochemical characteristics of *Longissimus* muscle in Hanwoo steers

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Cooking loss (%)	34.5 <sup>a</sup>	33.8 <sup>ab</sup>	30.0 <sup>bc</sup>	28.7 <sup>c</sup>	1.602
Shear force (kg/cm <sup>2</sup> )	3.08	3.01	3.22	3.04	0.241

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

#### (5) 육성·비육우의 육의 pH, TBARS 및 육색

(가) Table 7은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 육의 pH, TBARS 및 육색을 나타낸 것으로 A 및 B 값은 LP구에서 가장 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

(나) L 값은 생균제 첨가수준이 증가할수록 증가하였다 ( $P<0.05$ ).



Table 7. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on pH, TBARS and color of Hanwoo steers

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
pH	5.66 <sup>ab</sup>	5.73 <sup>a</sup>	5.52 <sup>b</sup>	5.54 <sup>b</sup>	0.076
TBARS	0.30 <sup>bc</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.014
L (Lightness)	36.2 <sup>b</sup>	39.1 <sup>ab</sup>	39.3 <sup>ab</sup>	39.9 <sup>a</sup>	1.536
A (Redness)	22.9 <sup>ab</sup>	24.6 <sup>a</sup>	20.0 <sup>b</sup>	20.3 <sup>b</sup>	1.951
B (Yellowness)	11.3 <sup>ab</sup>	11.7 <sup>a</sup>	9.27 <sup>bc</sup>	7.80 <sup>c</sup>	0.812

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

#### (6) 육성·비육우의 신선육 관능평가

(가) Table 8은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 신선육 관능평가를 나타낸 것으로 육색은 CON구에서 가장 높게 나타났다 (P<0.05).

(나) Aroma (풍미)는 생균제를 첨가한 구에서 첨가하지 않은 구보다 높게 나타났다 (P<0.05).

(다) Flavor (블췌치)는 CON구와 LP구에서 가장 높게 나타난 반면 HP구에서 가장 낮게 나타났다 (P<0.05).

(라) Juiciness (육즙)은 CON구에서 가장 높게 나타났다 (P<0.05).

Table 8. Effects of dietary supplementation fermented feed additives the sensory evaluations of raw *Longissimus* muscle in Hanwoo steers<sup>2</sup>

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
Meat color	7.29 <sup>a</sup>	6.50 <sup>b</sup>	6.76 <sup>b</sup>	6.06 <sup>c</sup>	0.203
Aroma	4.04 <sup>b</sup>	4.54 <sup>ab</sup>	5.00 <sup>a</sup>	4.20 <sup>b</sup>	0.285
Flavor	4.33 <sup>a</sup>	4.44 <sup>a</sup>	3.38 <sup>b</sup>	2.60 <sup>c</sup>	0.309
Juiciness	5.00 <sup>a</sup>	4.17 <sup>ab</sup>	4.04 <sup>ab</sup>	3.48 <sup>b</sup>	0.528
Marbling score	5.20	6.14	6.52	6.10	0.745
Overall acceptability	6.08	5.72	5.89	5.77	0.668

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>2</sup>Sensory scores were assessed on 9-point scale from 1 (extremely bad or slight) to 9 (extremely good or much).

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

(7) 육성·비육우의 육의 지방산 조성

(가) Table 9은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육우의 육의 지방산 조성을 나타낸 것으로 C16:0 함량은 발효 사료 첨가제를 첨가한 구에서 첨가하지 않은 구 보다 높게 나타났다 (P<0.05).

(나) C18:1n-9 함량은 MP구에서 가장 높게 나타난 반면, CON구와 HP구에서 가장 낮게 나타났다 (P<0.05).

(다) C20:2 함량은 HP구에서 가장 높게 나타난 반면, MP구에서 가장 낮게 나타났다 (P<0.05).

(라) Saturated fatty acid와 Monounsaturated fatty acid 함량은 MP구에서 가장 높게 나타났다 (P<0.05).

Table 9. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on fatty acid profiles of *Longissimus* muscle in Hanwoo steers<sup>2</sup>

	Treatment <sup>1</sup>				SEM
	CON	LP	MP	HP	
C14:0	0.36	0.41	0.37	0.47	0.097
C14:1	0.21	0.24	0.26	0.22	0.055
C15:0	0.37	0.55	0.23	0.39	0.160
C16:0	18.5 <sup>b</sup>	23.5 <sup>ab</sup>	21.0 <sup>b</sup>	27.1 <sup>a</sup>	3.314
C16:1n-7	3.26	3.26	3.96	0.76	0.635
C17:0	0.52	0.65	0.57	0.57	0.123
C18:0	0.68	0.64	0.69	0.62	0.085
C18:1n-9	12.6 <sup>b</sup>	13.4 <sup>ab</sup>	15.8 <sup>a</sup>	12.3 <sup>b</sup>	1.855
C18:2n-6	46.9	47.0	45.1	45.6	4.247
C20:0	2.79	3.50	2.79	2.59	0.671
C18:3n-3	4.23	4.53	2.77	3.19	1.088
C20:2	0.44 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.49 <sup>ab</sup>	0.52 <sup>a</sup>	0.074
C22:0	0.09	0.08	0.09	0.07	0.014
C20:3 n-6	0.06	0.06	0.04	0.04	0.018
C22:1	0.05	0.07	0.05	0.05	0.017
C20:4	0.27	0.32	0.22	0.21	0.095
C20:5n-3(EPA)	0.54	0.68	0.44	0.58	0.248
C24:0	0.02	0.02	0.01	0.01	0.006
C24:1	0.01	0.02	0.02	0.02	0.017
C22:5n-3(DPA)	0.11	0.19	0.23	0.12	0.154
C22:6n-3(DHA)	0.07	0.11	0.06	0.06	0.004
Saturated fatty acid	31.5 <sup>ab</sup>	29.3 <sup>b</sup>	33.6 <sup>a</sup>	32.3 <sup>ab</sup>	2.243
Monounsaturated fatty acid	15.0 <sup>b</sup>	16.0 <sup>b</sup>	21.5 <sup>a</sup>	16.3 <sup>b</sup>	1.723
Polyunsaturated fatty acid	50.9	49.7	49.7	50.7	2.509
PUFA/SFA	1.58	1.48	1.39	1.58	0.134
n-6:n-3 ratio	14.4	11.8	14.6	15.2	2.430

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

(8) 육성·비육우의 경제성 분석

(가) Table 10은 육성·비육우의 경제성 분석을 나타낸 결과로서 LP구에서 intex가 높게 나타나 발효된 사료 첨가제를 첨가 시 0.5%이하로 첨가하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

Table 10. Economical analysis of Hanwoo steers as influenced by feeding system

	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	LP	MP	HP
<b>Intake, kg</b>				
Total mixed fermentation (TMF)	5317.0	5317.0	6454.7	6923.8
Feed additives	0.00	26.6	64.6	103.9
Total intake	5317.0	5343.6	6529.4	7027.6
<b>Feed cost, won</b>				
Total mixed fermentation (TMF)	1,743,976	1,743,976	2,117,142	2,271,006
Feed additives	0	79,800	193,800	311,700
Total feed cost (A)	1,743,976	1,823,776	2,310,942	2,582,706
Income carcass (B), won/head	7,088,524	7,340,974	7,178,550	7,657,617
Income cost (B-A), won	5,344,548	5,517,198	4,867,608	5,074,911
Index, %	100.0	103.2	91.1	95.0

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% probiotics, MP: basal diet with 1.0% probiotics, HP: basal diet with 1.5% probiotics.

Concentrate cost: 500 won/kg, feed additives cost: 3000 won/kg.

라. 요약

- (1) 성장 특성에서 HP구에서 CON구 및 LP구 보다 높게 나타났다 (P<0.05).
- (2) 일당중체량 및 사료효율은 생균제 첨가 비율이 증가할수록 증가하지만 시험 구간 유의적인 차이는 없었다 (P>0.05).
- (3) 시험 종료 시 growth hormone 함량은 HP구가 CON구에 비해 높게 나타났다 (P<0.05).
- (4) 도체중 및 등지방두께는 생균제를 첨가한 구에서 첨가하지 않은 구보다 수치적으로 높게 나타났으나 시험구 간 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).
- (5) 등심육의 육색에서 L 값은 생균제 첨가수준이 증가할수록 증가하였다 (P<0.05).

- (6) C18:1n-9 함량은 MP구에서 가장 높게 나타난 반면, CON구와 HP구에서 가장 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).
- (7) LP구에서 intex가 높게 나타나 발효된 사료 첨가제를 첨가 시 0.5%이하로 첨가하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

## 2. 개발된 발효사료 첨가제의 육성·비육돈에 대한 효능 검증

### 가. 재료 및 방법

- (1) 경남 고성군 하이면 소재 양돈농가에서 육성·비육돈 100두( 69.3±8.8kg)를 공시하여 60일간 실시한다.
- (2) 개발된 발효 사료 첨가제를 무첨가구 (CON), 0.5% (LP) 및 1.0% (HP)로 첨가한 3개의 시험구를 설정하고, 0% 시험구에서는 20두씩 4반복, 0.5 및 1.0% 시험구에서는 20두씩 3반복을 실시한다.
- (3) 사료는 양돈농가에서 급여하는 사료를 이용하였다.
- (4) 발효 사료 첨가제와 사료는 5일에 한번씩 배합하였으며, 이 때 수분과 영양소 함량 분석을 위해 약 100 g의 시료를 채취하여 분석 시까지 동결보관하였다.
- (5) 사료급여는 원형사료급이기를 설치하여 무제한 급여하였으며, 08시와 17시에 사료를 확인하고 보충하였고, 음수는 자유로이 섭취케 하였다.
- (6) 체중은 개시체중 및 종료체중을 돈방 별 (20두)로 측정하였다.
- (7) 혈액은 시험 종료 일주일 전 경정맥을 통하여 채취하여 혈액 성상을 분석한다.
- (8) 분 중 가스 및 미생물 분석을 위해 분을 수거하여 보관한 후 분석에 이용한다.
- (9) 기타 사양관리는 관행에 준하였다.
- (10) 시료는 60℃에서 48시간 건조한 후 hammer mill로 분쇄하여 분석에 이용한다.

### 나. 통계처리

시험에서 얻어진 결과는 SAS (Statistics Analytical System, 2002)을 이용하여 분석하고, 시험구간 유의성 검정을 Tucky test (P<0.05)로 실시하였다.



< 시험에 이용된 돈사 >



< 육성·비육돈 입식 >

다. 결과

Table 1. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on chemical composition of diet

	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
Dry matter, %	87.4	87.0	86.8	0.184
Crude protein, %	18.8	19.3	19.0	0.269
Crude ash, %	7.62	7.49	7.34	0.111
Ether extract, %	9.59	9.35	9.41	0.149

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

(1) 육성·비육돈의 성장 특성

(가) Table 2는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 성장 특성을 나타낸 것으로 개시 체중이 차이가 나는 것은 농장에서 같은 일령의 육성·비육돈의 두수가 부족하여 일령을 다르게 배치하였기 때문에 차이가 나는 것으로 사료된다.

(나) 사료섭취량이 차이가 나는 것은 육성·비육돈의 일령이 다르고, 출하 일령이 다르기 때문에 차이가 나는 것으로 사료된다.

(다) 증체량은 LP구에서 가장 높게 나타난 반면, HP구에서 가장 낮게 나타났다 (P<0.05).

(라) 일당증체량 및 사료효율은 LP구에서 가장 높게 나타났으나, 모든 시험구에서 유의적인 차이가 없었다. (P>0.05).

Table 2. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on growth performance of weaning pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
Feed intake, kg	94.1 <sup>a</sup>	95.6 <sup>a</sup>	70.2 <sup>b</sup>	9.087
Average daily feed intake, kg	1.77	1.73	1.84	0.060
Initial weight, kg	69.3	61.3	78.1	7.403
Final weight, kg	100.6	103.5	104.0	3.589
Gain, kg	31.3 <sup>bc</sup>	45.2 <sup>a</sup>	25.8 <sup>c</sup>	4.805
Average daily gain, kg	0.67	0.76	0.68	0.071
Feed efficiency, gain/intake	0.38	0.44	0.37	0.036

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

(2) 육성·비육돈 분 중 유산균 및 병원성 미생물 성장

(가) Table 3은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 분 중 유산균 및 병원성 미생물 성장을 나타낸 것으로 성장 특성 시험 개시 시 모든 구간에서 Lactic acid bacteria와 *E.coli* 함량은 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

(나) 시험 2주제와 4주제에서 lactic acid bacteria 수는 생균제 첨가비율이 증가할수록 증가하나 시험구간 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

(다) 시험 2주제 *E.coli* 수는 생균제 첨가비율이 증가할수록 감소하나 시험구간 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

(라) *Salmonella* 수는 시험이 진행되는 동안 검출되지 않았다.

Table 3. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on Lactic acid bacteria, e.coli and salmonella in feces of growing pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
<b>0 week</b>				
Lactic acid bacteria, log10 cfu/g	6.29	5.73	6.15	0.663
<i>E.coli</i> , log10 cfu/g	4.07	3.48	3.97	0.844
<i>Salmonella</i> , log10 cfu/g	ND*	ND	ND	-
<b>2 week</b>				
Lactic acid bacteria, log10 cfu/g	6.85	6.52	7.15	0.250
<i>E.coli</i> , log10 cfu/g	4.77	4.15	4.18	0.666
<i>Salmonella</i> , log10 cfu/g	ND*	ND	ND	-
<b>4 week</b>				
Lactic acid bacteria, log10 cfu/g	6.90	7.01	7.09	0.185
<i>E.coli</i> , log10 cfu/g	4.38	4.44	4.36	0.457
<i>Salmonella</i> , log10 cfu/g	ND*	ND	ND	-

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

\*ND: not detected.

(3) 육성·비육돈의 혈액 성분

(가) Table 4는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 혈액 성상을 나타낸 것으로 Blood urea nitrogen 및 blood glucose 함량은 생균제 첨가수준이 증가할수록 증가하였다 ( $P<0.05$ ).

(나) IgG 및 growth hormone은 시험구간 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

Table 4. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on blood metabolites of growing pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
IgG, mg/mL	22.4	21.5	23.9	2.415
Growth hormone, ng/mL	0.23	0.24	0.22	0.097
Blood urea nitrogen, mg/dL	15.4 <sup>b</sup>	16.4 <sup>ab</sup>	17.5 <sup>a</sup>	1.683
Blood glucose, mg/dL	63.1 <sup>b</sup>	63.2 <sup>b</sup>	67.9 <sup>a</sup>	3.356

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

Table 5. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on the physiochemical characteristics of pork loins

	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
Cooking loss (%)	39.5	39.3	38.7	1.931
Drip loss (%)	2.69	3.49	3.32	1.220
Shear force (kg/cm <sup>2</sup> )	2.23 <sup>b</sup>	2.90 <sup>a</sup>	2.06 <sup>b</sup>	0.239

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

<sup>ab</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).



(4) 육성·비육돈의 육의 이화학적 특성

(가) Table 5는 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 육의 이화학적 특성을 나타낸 것으로 전단가는 LP구가 다른 시험구에 비해 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

(나) 가열감량 및 육즙감량 함량은 시험구간 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).

(5) 육성·비육돈의 육의 pH, TBARS 및 육색

(가) Table 6은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 육의 pH, TBARS 및 육색을 나타낸 것으로 L (lightness) 및 b (yellowness) 값은 HP구에서 가장 높게 나타난 반면 LP구에서 가장 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

(나) TBARS 함량은 LP구에서 다른 시험구에 비해 높은 경향을 보였다. ( $P=0.06$ ).

(다) a (redness) 값은 생균제 첨가 비율이 증가할수록 수치적으로 증가하는 반면, 시험구 간 유의적인 차이는 없었다 ( $P>0.05$ ).

Table 6. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on pH, TBARS and color of pork loins

	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
pH	5.64	5.67	5.51	0.104
TBARS (mg MA/kg, sample)	0.11	0.13	0.10	0.075
L (Lightness)	51.9 <sup>b</sup>	51.6 <sup>b</sup>	54.8 <sup>a</sup>	1.499
a (Redness)	6.41	6.45	6.68	0.583
b (Yellowness)	2.75 <sup>b</sup>	2.17 <sup>c</sup>	3.26 <sup>a</sup>	0.418

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

(6) 육성·비육돈의 신선육 및 가열육의 관능평가

- (가) Table 7은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 신선육 및 가열육의 관능평가를 나타낸 것으로 aroma는 HP구가 CON구 및 LP구에 비해 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).
- (나) 육성·비육돈의 신선육에서 marbling score, overall acceptability는 생균제 첨가 비율이 증가할수록 증가하는 반면, 시험구 간 유의적인 차이는 없었다 ( $P > 0.05$ ).
- (다) 육성·비육돈의 가열육에서 meat color는 LP구에서 가장 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).
- (라) 육성·비육돈의 가열육에서 Tenderness는 발효 사료 첨가제 첨가비율이 증가할수록 수치적으로 감소하는 반면, overall acceptability는 증가하나, 시험구 간 유의적인 차이가 없었다 ( $P > 0.05$ ).

Table 7. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on the sensory evaluations of raw and cooked pork loins<sup>1</sup>

	Treatment <sup>1)</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
Raw meat sensory scores				
Meat color	4.36	4.13	4.84	0.772
Aroma	3.28 <sup>b</sup>	3.13 <sup>b</sup>	3.70 <sup>a</sup>	0.442
Flavor	2.65	2.76	2.81	0.649
Juiciness	4.06	3.43	3.59	0.881
Marbling score	3.40	3.63	3.63	0.995
Overall acceptability	3.99	4.46	4.63	0.732
Cooked meat sensory scores				
Meat color	3.22 <sup>a</sup>	3.66 <sup>a</sup>	2.35 <sup>b</sup>	0.854
Aroma	2.96	2.86	3.28	0.538
Juiciness	1.89	2.17	1.94	0.487
Tenderness	3.25	3.07	2.86	0.678
Overall acceptability	3.42	3.63	3.86	0.703

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

<sup>1</sup>Sensory scores were assessed on 9-point scale from 1 (extremely bad or slight) to 9 (extremely good or much).

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

#### (7) 육성·비육돈의 지방산 조성

(가) Table 8은 개발된 발효 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 육의 지방산 조성을 나타낸 것으로 C16:1n-7 함량은 HP구에서 가장 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

(나) C18:0 함량은 생균제 첨가 수준이 증가할수록 감소하였다 ( $P > 0.05$ )

(다) C20:3n-6 함량은 HP구에서 가장 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

(라) Saturated fatty acid 함량은 HP구에서 가장 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

Table 8. Effects of dietary supplementation fermented feed additives on fatty acid profiles of pork loins<sup>1</sup>

	Treatment <sup>1</sup>			SEM
	CON	LP	HP	
C14:0	0.06	0.06	0.06	0.017
C14:1	0.07	0.08	0.07	0.022
C15:0	0.22	0.29	0.24	0.068
C16:0	23.9	24.0	24.3	1.083
C16:1n-7	2.95 <sup>ab</sup>	3.01 <sup>a</sup>	2.67 <sup>b</sup>	0.249
C17:0	0.39	0.38	0.41	0.043
C18:0	0.39 <sup>a</sup>	0.36 <sup>ab</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.042
C18:1n-9	13.8	13.5	14.6	1.793
C18:2n-6	36.7	37.9	36.7	2.309
C20:0	2.58	3.30	2.66	0.499
C18:3n-3	12.7	11.3	11.5	1.413
C20:2	0.81	0.84	0.88	0.152
C22:0	0.33	0.36	0.39	0.075
C20:3 n-6	0.11 <sup>ab</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.030
C22:1	0.08	0.07	0.08	0.032
C20:4	0.17	0.18	0.18	0.039
C20:5n-3(EPA)	1.21	0.98	1.12	0.438
C24:0	0.03	0.03	0.03	0.017
C24:1	0.02	0.02	0.02	0.008
C22:5n-3(DPA)	0.21	0.22	0.22	0.048
C22:6n-3(DHA)	0.12	0.11	0.13	0.035
Saturated fatty acid	29.9 <sup>ab</sup>	32.7 <sup>a</sup>	29.4 <sup>b</sup>	2.788
Monounsaturated fatty acid	18.5	18.0	18.6	2.825
Polyunsaturated fatty acid	51.3	48.7	50.9	3.938
PUFA/SFA	1.71	1.65	1.74	0.235
n-6:n-3 ratio	2.76	3.00	2.96	0.486

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

(8) 육성·비육돈의 경제성 분석

(가) Table 9는 발효된 사료 첨가제 첨가 수준에 따른 육성·비육돈의 경제성을 분석한 것으로, LP구에서 돼지 한 마리 키우는데 약 kg 당 1,120원으로 가장 낮게 나타났고, CON구를 기준으로 하였을 때 약 25.5%가 사료비가 절감될 것으로 사료된다.

Table 9. Economical analysis of growing pigs as influenced by feeding system

	Treatment <sup>1</sup>		
	CON	LP	HP
<b>Intake, kg</b>			
Concentrate	94.1	95.4	70.0
Feed additives	0.00	0.5	0.7
Total feed intake (kg/head)	94.1	95.9	70.7
<b>Feed cost, won</b>			
Concentrate	47,050	49,131	37,100
Feed additives	0	1,500	3,500
Total feed cost (A)	47,050	50,631	40,600
Total gain (B), kg	31.3	45.2	25.8
Unit cost (A/B), won	1,503	1,120	1,574
Index, %	100.0	74.5	104.7

<sup>1</sup>CON: basal diet, LP: basal diet with 0.5% fermented feed additives, HP: basal diet with 1.0% fermented feed additives.

Concentrate cost: 500 won/kg, feed additives cost: 3000 won/kg.

라. 요약

- (1) 성장 특성에서 증체량은 HP구에서 가장 낮게 나타났다 (P<0.05).
- (2) 사료효율에서 LP구에서 다른 시험구에 비해 낮게 나타났다 (P<0.05).
- (3) 시험 2주째 이후 lactic acid bacteria 수는 생균제 첨가비율이 증가할수록 증가하나 시험구간 유의적인 차이가 없었다 (P>0.05).
- (4) Blood urea nitrogen 및 blood glucose 함량은 생균제 첨가수준이 증가할수록 증가하였다 (P<0.05).
- (5) 등심육의 육색에서 a (redness) 값은 생균제 첨가 비율이 증가할수록 수치적으로 증가하는 반면, 시험구 간 유의적인 차이는 없었다 (P>0.05).
- (6) 육성·비육돈의 신선육에서 marbling score, overall acceptability는 생균제 첨가 비율이 증가할수록 증가하는 반면, 시험구 간 유의적인 차이는 없었다 (P>0.05).
- (7) LP구에서 돼지 한 마리 키우는데 약 kg당 1,120원으로 가장 낮게 나타났고, CON구를 기준으로 하였을 때 약 25.5%가 사료비가 절감될 것으로 사료된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구개발 목표의 달성도

#### 1. 1차년도 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012. ~ 2013)	주관과제 발효 사료첨가제 위탁 생산시스템 (CMO) 구축	표준화된 종균관리시스템 구축 및 메뉴얼	100	-위탁생산용 균주의 보안/보관 관 리 체계 - 종균의 활력유지 방안 모색
		고효율 발효사료 생산 시스템의 정립/구축 및 위탁생산 체제 구 축	100	- 보유 균주의 기능성 파악 - 미생물 종균의 고효율 액상 배 양 조건 - 액상배양조건을 반영한 미생물 종균 배양기의 제작 및 효능 검증
		육계 발효사료 첨가제의 개발 및 사양실험(제2 위탁과제)용 발효사료 첨가제 제조 및 공급	100	- 가금티푸스 길항 유산균의 고체 배양 조건규명 - 산란계 농장에서의 음수급이 결 과 확인
		신규분리 유용미생물(1 위탁) 을 이용한 발효사료 첨가제의 시료 제조 및 어린송아지에 대 한 효과 값을 위한 사양실험(제 2 위탁연구)에 제공	100	- 제 1 위탁연구과에서 분리한 유 용미생물 3종과 본사에서 분리한 1 균주의 복합미생물을 이용한 발효 사료첨가제의 제 2위탁연구 과제에 서의 효과 검증
		본 연구과정에서 도출된 기초연구결과의 상용화 및 기술이전  액상스타터 공급을 위한 생산공정 체계 확립	추가 달성	- 섬유질사료공장의 사료원료 대 체 부산물(버섯배지/비지락)을 이 용한 고체발효 배합비 및 발효조건 규명 및 기술 이전 - 본 연구결과에서 도출된 기능성 유용미생물을 이용한 발효사료 생 산용 액상 복합스타터의 보조사료 성분 등록 및 공급 - 양계용 발효사료 starter 적용 분리균주의 특허균주 기탁 및 출원 - TMR공장내 액상 starter의 자체 배양 및 TMR 적용을 위한 미생물 영양배지 업그레이드 및 공급
	제1위탁과제 (건국대 산학협력단) 유용미생물을 이용 한 발효 사료첨가제 개발 및 발효사료 효과 검증을 위한 시료 설정	식물, 부존자원 발효용 유산균, 바실러스, 효모, 광합성세균 등 유용미생물 확립	100	-식물, 부존자원 발효용 유용균주 탐색 및 확립
	범 부존자원 활용 발효사료첨가 제 개발을 위한 액상발효 및 고 상발효 조건 규명	100	-액상발효 조건 규명: 유용균주에 대한 단독배양 최적 조건 확립 및 경제적 혼합배양법 확립	

1차 년도 (2012. ~ 2013)	제 2 위탁과제 (경상대학교 산학협력단)	개발된 발효 사료 첨가제의 육계에 대한 효과 검증과 급 여 체계 확립	100	<p>&lt;육계 시험&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물과 시험기간: Broiler(약 200수), 5주간</li> <li>- 시험구: 발효 사료첨가제의 첨가 수준을 달리한 4처리 구 설정</li> <li>- 조사항목: 개시와 종료체중, 사료섭취량, 증체량, 사료 효율, 혈액성상, 분중 가스 발생량, 분중 병원체(살모넬라 등), 도계 후 육질 분석</li> </ul>
	발효기술을 적용 한 사료첨가제의 축종별 현장 적 용 시험	개발된 발효 사료 첨가제의 한우에 대한 효과 검증과 급 여 체계 확립	100	<p>&lt;한우 시험&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물과 시험기간: 어린 송아지(약 20두), 3주간</li> <li>- 시험구: 발효 사료첨가제의 첨가 수준을 달리한 4처리 구 설정</li> <li>- 조사항목: 개시와 종료체중, 사료섭취량, 증체량, 혈액성상, 분중 가스발생량, 분중 병원체(살모넬라 등) 분석</li> </ul>

2. 2차년도 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013. ~ 2014)	주관기관 (빅바이오젠)  발효 사료첨가제 위탁 생산시스템 (CMO) 구축	고효율 발효 사료첨가제 대 량생산 시스템의 정립/구축 및 위탁생산 체제 완성	100 (3차년 도 보완)	- SSF를 이용한 발효 사료첨가 제의 대량 생산공정의 공정 확 립 및 표준화 - 발효 사료첨가제의 저장성 연 장 및 소량 다품목 생산시스템 구축 및 고농도 배양기술 구축 - 고체배양조건을 반영한 대용 량 고효율 미생물 고상발효기의 제작 및 효능 검정
		미생물 발효제(starter)의 생산공정 개선 및 제제의 다 변화	100	- starter의 다양한 제형 개발 - 수화제 종균의 전처리 공정의 개선을 통한 수율 증진
		본 연구과정에서 도출된 기초연구결과의 상용화 및 기술이전	추가 달성	- 진주시 자금지원 000영농법 인의 발효사료 첨가제 생산을 위한 부형제 선정 및 발효방법 기술이전 - 본 연구결과에서 도출된 기 능성 유용미생물을 이용한 복합 발효 사료첨가제의 제품 등록 및 시판 - 복합발효 사료첨가제의 중국 내 사양실험 완료 및 중국수입 등기 진행 - TMR 공장의 TMF 생산용 액상 종균 자체배양을 위한 배양기 설치 및 생산공정 컨설팅 - 중국 징즈진현 소재 사료공 장의 백주박의 발효사료첨가제 생산기술 이전 협의 및 기초발 효실험 완료
	제1 위탁과제 (건국대 산학협력단) 유용미생물을 이 용한 발효 사료첨 가제 개발 및 발 효사료 효과 검증 을 위한 지표 설 정	발효사료첨가제 원료 종류별 제조 공정기술 확립	100	-원료 전처리, 가공, 후처리, 저장 중 QC공정 확립
		PBD(Plackett-Burman design)분석으로 배양법 확 립	100	-원재료, 보조원료, 온도, 습 도, 배 양기간을 요인들로 한 배양특성 분석 및 배양법 확립



2차 년도 (2013. ~ 2014)	제 2 위탁과제 (경상대학교 산학협력단)  발효기술을 적용 한 사료첨가제의 축종별 현장 적 용 시험	개발된 발효 사료 첨가제의 한우에 대한 효과 검증과 급여 체계 확립	100	<p>&lt;한우 시험&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물과 시험기간: 거세 한우(32두), 12개월</li> <li>- 시험구: 발효 사료첨가제의 첨가 수준을 0, 0.5, 1.0 및 1.5%로 총 4시험구 설정</li> <li>- 조사항목: 개시와 종료체중, 사료섭취량, 증체량, 혈액성상, 분 중 가스발생량, 분 중 병원체(<i>Salmonella</i> 등) 분석</li> </ul>
		개발된 발효 사료 첨가제의 돼지에 대한 효과 검증과 급 여 체계 확립	100	<p>&lt;돼지 시험&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물과 시험기간: 이유 자돈(144두), 3주간</li> <li>- 시험구: 발효 사료첨가제의 첨가 수준을 0, 0.5, 1.0 및 1.5%로 총 4시험구 설정</li> <li>- 조사항목: 개시와 종료체중, 사료섭취량, 증체량, 사료효율, 혈액성상, 분 중 가스발생량, 분 중 병원체(<i>Salmonella</i> 등) 분석</li> </ul>

3. 3차년도 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014. ~ 2015)	주관기관 (빅바이오젠)  발효 사료첨가제 위탁 생산시스템 (CMO) 구축	생산 제품의 기존의 생균수 외, 추가 효능평가 지표를 반영한 생산 제품 QC 적용	100	Dehydrogenase 활성도, 유기 산, 황산화물질, pH 등 가능한 지표 후보 설정
		발효 사료첨가제 생산 관 련, 생산량 및 발효원에 대 한 적정 시설/장비/운영 컨 설팅 매뉴얼 구축	100	- 신규 자가생산 설비 컨설팅 및 시공으로 인한 경험 축적으 로 매뉴얼 업그레이드 - 자가생산 설비 구축 기관에 생산기술 전수 - 간단한 QC 업무등의 본사 교 육 시행
		주문형 발효 사료첨가제 위 탁생산 모델 체계 구축	100	- 종균/액상/고체발효물/수화 제 등 관련 제제 생산 가능 - 국제축산박람회 부스 전시 참가로 홍보
		생산공정의 효율성 제고	100	- 고체발효물의 건조공정에 거 존제습건조 시스템을 적용하여 공정단축 및 생균수/생리활성물 질함량 유지 - 포장라인 보완
		본 연구과정에서 도출된 기초연구결과의 상용화 및 기술이전	추가 달성	- 00축협사료공장, 고체발효원 변경에 따른 고체발효 가능성 확인 test 진행 및 결과 전달 - 중국 미생물제제 회사에 미 생물 원제 공급 및 기초발효실험 완료
	제1 위탁과제 (건국대 산학협력단) 유용미생물을 이 용한 발효 사료첨 가제 개발 및 발 효사료 효과 검증 을 위한 지표 설 정	기존 생균제/발효사료의 기 본 활성 측정	100	- 단일 균주에서의생균수, pH, 생리활성 물질 비교
		기존 생균제/발효사료의 여 러 가지 생리활성 측정	100	- 단일균주 배양과 혼합균주 배양법상의 생리활성 비교 (황산화, 항균, 효소, 유기산)
		상기 분석방법 외 효능 평 가지표 설정 확립 여부: 발 효사료의 항영양인자 검증	100	- Dehydrogenas의 활성도와 생 균수의 변화양상 비교 - 신규 지표 가능성 시사

3차 년도 (2013. ~ 2014)	제 2 위탁과제 (경상대학교 산학협력단)	개발된 발효 사료 첨가제 의 육성·비육우에 대한 효 과 검증과 급여 체계 확립	100	<p>&lt;한우 시험&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물과 시험기간: 2차년도 에서 계속, 8개월</li> <li>- 시험구: 발효 사료첨가제의 첨 가 수준을 달리한 4처리구 설정</li> <li>- 조사항목: 사료섭취량, 증체량, 혈액성상, 분중 가스발생량, 분중 병원체(살모넬라 등), 도 축후 육질 분석</li> </ul>
	발효기술을 적용 한 사료첨가제의 축종별 현장 적 용 시험	한우와 돼지에 대한 사양실험	개발된 발효 사료 첨가제 의 육성·비육돈에 대한 효 과 검증과 급여 체계 확립	100

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

발효 사료첨가제의 민간위탁생산 시스템을 소량-다품목/대량 위탁 생산의 두 가지 체제로 구축하였다.

1. 대학, 연구소 등 기초기술 개발자들에게 시제품 또는 사양실험용으로 전문적인 위탁 생산이 가능하여 실용화 단계로의 연구에 지대한 공헌을 할 수 있음.

2. 기초기술을 확보하였으나 설비 확보에 어려움이 있는 창업자에게 대량의 위탁생산 제 공으로 시장 진입이 용이하며, 이는 기술력에 의한 제품의 경쟁으로 전체적으로 제품의 품 질이 향상과 가격의 경쟁으로 축산농가에 실질적인 도움이 되며, 축산의 경쟁력이 증진됨

저온제습건조시스템의 고체발효 공정 도입

3. 제품 품질의 향상 뿐만 아니라 생산공정의 시간단축 및 설비의 가동 횟수가 증가함으로 서 원가의 절감과 생산능력이 배가되는 경제적 효과 확보

## 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화 및 산업화

#### 1. 발효 사료첨가제 위탁생산(CMO) 체계 구축

가. 고체 발효 사료첨가제 및 TMF 자가생산용 액상 Starter 및 액상미생물 배양기 추가

기존 : 5톤 배양기 1기, 1.2톤 배양기 2기 → 1톤 배양기 3기 추가 설치

나. 소규모 다품종 고체 발효 사료첨가제 생산용 CMO 고체발효 시스템 추가 보완

(1) 소량생산 : 드럼형 고체발효기 1톤 2기 설치 및 시운전 완료  
저온제습건조시스템 추가

(2) 대량생산 : Tray식 발효 배양실 2실 (소량 및 대량용 각 1실) 설치  
소량 발효실에는 저온제습건조시스템 보완

다. 유용미생물 종균 관리시스템 구축 및 동결건조 조건 규명 ⇒ 기초기술자의 종균관리

(1) 위상차현미경 - 크린벤치 - 초저온냉동기 - 저온진공동결기

(2) 동결건조 조건 규명

라. 한국국제축산박람회 참여 : 위탁생산 협의 3건 / 해외바이어 접촉 (태국, 브라질 등)

마. 위탁생산 실시 : 0000축협, 00양계협회, (주)0000에 발효사료 첨가제 위탁생산 실시

#### 2. 효율적 액상 배양 및 고체발효 조건 및 균체수 유지 방법 규명

가. 다양한 부자원에 대한 고체발효 조건 규명 ⇒ 영농법인의 자가 고체발효 컨설팅

나. 대량생산을 위한 액상 배양 및 고체발효 조건 규명

다. 다양한 보존제를 이용한 액상미생물의 저장성 연장 방안 - 특허 등록

라. 저온제습건조시스템을 도입한 고체발효 공정 확립 - 공정기간단축 및 품질향상

마. Bacillus, 유산균, 효모, 광합성 균의 범용 대량배양 배지 조성  
⇒ 농업기술센터, 영농법인 등 자가 액상배양처에 공급

### 3. 신규 제품 사업화 및 기존제품 업그레이드

가. 범용 유용미생물 배양배지 4종 업그레이드 ⇒ 관공서, 영농법인에 납품  
중국 수출 확정

나. 액상발효제 업그레이드 : 스타터(3종 미생물 혼합종균) ⇒ 월 10톤 출고

다. 발효복합효소제 출시 : 국내에는 TMR 공장 및 개인농기에 공급  
해외 : 중국수출이 확정되었고, 중국농업부 등록 임박

라. 미생물 동결건조 원제  
- 중국 수출 진행중  
- 베트남 및 태국 수출 추진중

마. 사업화 추진

- (1) 가금용 병원성미생물 길항 첨가제 - 특허등록 완료
- (2) 고체발효를 이용한 생물전환발효제 - 특허등록을 위한 우선심사청구 진행중

## 제 2 절 기술확산

### 1. 자가생산 희망 업체에 컨설팅을 통한 발효사료첨가제 생산 인프라 확대

가. 단위축협 TMR 공장 / 영농법인에 부산물 이용 고체발효 기술 컨설팅

- (1) 단위축협 : 00축협 등 5개 축협사료공장에 컨설팅을 통한 자가생산 기술지도
- (2) 영농법인 : 진주 000영농법인등 정부지원 사료첨가제 생산법인에 기술지도

### 2. 바이오플랜트 사업부 신설 및 축적 기술 접목을 통한 생산설비 및 배지/종균 공급

- 00축협 등 6개처에 액상배양기 / 고체발효기 등 일련의 생산설비 시공완료
- 정기적인 생산물 QC 지원으로 안정적인 생산 기여

### 3. 해외박람회 참가를 통한 발효사료첨가제 수출 모색

- 대상 : VIV China 2016 또는 베트남호치민축산박람회

### 제 3 절 연구성과 목표 대비 실적

#### 1. 연구개발 실적

구분	특허		발효 사료첨가제			유전자원 등록	논문		기타 (학술 발표)	
	출원	등록	제품 등록	위탁생산	건설팅		SCI	비SCI		
1차 년도	목표	1						2	1	
	달성	<b>1</b>		<b>3</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	
2차 년도	목표	2		1			1	2	1	
	달성	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
3차 년도	목표	1	3	1	1	1	1	3	2	2
	달성	2	1	1	3	1	2	1(3*)	2	8
계	목표	4	3	2	1	1	1	4	6	4
	달성	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1(3*)</b>	<b>6</b>	<b>17</b>

\* 투고 후 심사 중

#### 가. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저 자	공동저자				
2013	Effects of Probiotic Additions to Feed and Manure on Temperature, Humidity, and Carbon Dioxide Emissions in Hanwoo Manure during Summer - A Field Study	김동현	김삼철	이혁준, 최인학, 민찬식	한국환경과 학회	22권 9호	국내	비SCI
2013	미생물 첨가가 느타리 버섯 폐배지의 영양소 함량, 발효성상 및 미생물상에 미치는 영향	김동현	김삼철	제연주, 이혁준, 아만눌라, 민찬식	농업생명과학연구	47권 5호	국내	비SCI
2014	산균 생균제가 거세한우의 성장과 육질에 미치는 영향	이혁준	김삼철	조성래, 김동현, 주영호, 양한솔, 최인학, 문성실, S.M. Amanullah	농업생명과학연구	48권 5호	국내	비SCI
2014	고온 조건에서 사료 내 생균제의 생존성 및 오염미생물의 생장 억제 효과	김겸현	김수기	이권정, 이아란, 장인환, 송인근, 김동운	한국미생물 학회지	50권 4호	국내	SCOPUS 지

2015	액상 돈분에서 병원균과 가스 발생량을 감소시키기 위한 분철가계로서 다양한 생균제의 평가	최인학	김삼철	이혁준, 김동현, 이용복	한국환경과학회	24권 1호	국내	비SCI
2015	혼합 생균제 급여가 한국 토종닭의 생산성과 가슴살의 지방산 조성에 미치는	이혁준	김삼철	김동현, 주영호, 윤희, 최인학, 김수기, 송인근, 장인환	한국환경과학회	24권 3호	국내	비SCI
2015	Nutritional characterization of tannins riched chestnut (Castanea) for pig	이혁준	김삼철	김동현, 최인학, Sardar M. Amanullah	The journal of applied research	2016 1월호 게재	국외	SCI
2015	Effects of chestnut (Castanea) meal supplementation on growth performance, carcass characteristic, and meat quality of pigs	이혁준	김삼철	김동현, 주영호, Sardar M. Amanullah, 양한솔, 최인학	The journal of applied animal research	1차 심사 후 교정 중	국외	SCI
2016	In vitro biological activities of Lactobacillus plantarum as feed additive on submerged liquid and solid state fermentations	Kai Min Niu	Soo Ki Kim	U Hyeon Kim, Sang Buem Cho, Su Kung Kang, Sung Gu Han, In Hwan Jang, In Geun Song, Sam Churl Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	투고중	국내	SCI
2016	Optimization of cryoprotectants for improved survival rates of the animal probiotics Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis, and Saccharomyces cerevisiae	In-Hwan Jang	In-Geun Song, Soo-Ki Kim		Cryobiology	투고중	국외	SCI



나. 특허 출원 및 등록 성과

1	병원성 미생물의 항균활성을 가진 신규한 유산균과 유기물분해 활성을 갖는 신규 유용 미생물을 유효성분으로 함유하는 가금류용 발효사료 첨가제 조성물 (등록)	배인수, 허강철 송인근, 장인환 김수기, 김삼철 박효정, 허희정	빅바이 오젠	10-1431250-0000	2014. 8. 11
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> BBG-L30 조성물의 보존성을 향상시키기 위한 저장방법 (등록)	배인수, 허강철 송인근, 장인환 박효정, 허희정 이상용, 김수기	빅바이 오젠	10-1575119-000	2015. 12. 1
3	소화효소 활성을 갖는 신규한 미생물을 포함하는 사료 첨가제 조성물 및 그 제조방법 (우선심사증)	장인환, 허강철 송인근, 이상용 박효정, 허희정 김수기, 김삼철 배인수	빅바이 오젠	10-2015-0062738	2015. 05. 04
4	발효미생물의 생물전환 공정에 의한 생리활성이 증진된 발효 사료첨가제 조성물 및 그 제조방법 (우선심사증)	장인환, 허강철 송인근, 이상용 박효정, 허희정 김수기, 김삼철 조상범, 배인수	빅바이 오젠	10-2015-0078678	2015. 06. 03
5	일체형 저온제습건조 고체발효기 및 이를 이용한 고체 발효물의 미생물 생균수와 생리활성 성분의 감소 최소화를 위한 2단계 고체발효-저온제습건조방법	송인근, 박신근 이상용, 박효정 권태양, 허강철 배인수	빅바이 오젠	10-2016-0011972	2016. 01. 29

다. 유전자원 등록

연번	미생물자원	균주등록번호	등록일
1	<i>Pediococcus acidilactic</i> BBG-L1	KCTC12504BP	2013. 10. 17
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BBG-B5	KCTC12781BP	2015. 04. 07
3	<i>Acinetobacter</i> sp.	KU362574	2015. 12. 30
4	<i>Bacillus subtilis</i> BBG-B20	KACC92073P	2015. 05. 21
5	<i>Erwinia</i> sp.	KU362575	2015. 12. 30
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BBG-Y6	KACC93230P	2015. 05. 21



라. 발효 사료첨가제 위탁생산시스템의 홍보 : 한국국제축산박람회 (2015.9.9~9.12)

**발효 사료첨가제**  
자가생산시스템 준비/운영 컨설팅

■ 자가 생산 운영컨설팅 사례  
- 원료조사 / 시설조사 / 공작물조사 / HACCP 자료작성  
- 컨설팅인원 / 컨설팅비용

제품명(종류)	용량 (kg)	용량 (kg)
M. lysinus	20 x 20' (20kg)	20 x 20' (20kg)
L. acidophilus	10 x 20' (10kg)	10 x 20' (10kg)
C. casei	10 x 20' (10kg)	10 x 20' (10kg)

■ 자가 생산 설비구축 컨설팅/시공 사례  
컨설팅비용 (설비비 및 시공비)  
- 원료조사, 컨설팅, 공작물조사, HACCP 자료작성  
- 컨설팅비용 / 컨설팅인원

Bigbiogen  
Korea's No.1 Feed Additive Manufacturer

www.bigbiogen.com

연기, 인천시 죽변면 길미로 888-8  
Tel. 033-659-3279 (내선) 010-824-3029  
http://www.bigbiogen.com

농림축산식품부



**기능 및 주요업무**

- 국내 최초 설계/건설/운영 발효 사료첨가제 위탁생산시스템
- 발효 사료첨가제 위탁생산시스템
  - 3~5톤/일(일일) 생산능력(24시간) 가능
  - 실내/외(연중) 생산 가능(냉난방시설)을 가
  - 수입/제조/제조/제조
  - 가 격은 100만원/톤
  - 기존/신규/기타 사설/공장/차량
- 정확한/통의/차별/생산/관리/인프라/컨설팅
  - 원료/원자재/시설/설비/공정/시공/운영/컨설팅/비용/컨설팅/인원/컨설팅/인원
  - 컨설팅/비용/컨설팅/인원/컨설팅/인원
- 발효 사료첨가제/사생/생산/관리/서비스
  - 원료/원자재/시설/설비/공정/시공/운영/컨설팅/비용/컨설팅/인원/컨설팅/인원
  - 원료/원자재/시설/설비/공정/시공/운영/컨설팅/비용/컨설팅/인원/컨설팅/인원
  - 원료/원자재/시설/설비/공정/시공/운영/컨설팅/비용/컨설팅/인원/컨설팅/인원

**민간위탁생산시스템 협력체계**

(주)빅바이오젠 (농림축산식품부/농업기술지원과)

한국대학교 (농림축산식품부/농업기술지원과)

한국대학교 (농림축산식품부/농업기술지원과)

(주)빅바이오젠

**주요 위탁생산 인프라**

- 출장관리
  - Doselety clean bench
  - 100 불균기
  - 7톤(4톤) / 4-room (4톤) / 4-room (4톤)
  - 100 불균기
  - 100 불균기 (100) / 100 불균기 (100)
  - 100 불균기 / 100 불균기
- 미생물/역상/배양/위탁
  - 200L (100) / 12 Ton (100)
  - 5 Ton (100) / 100 불균기 (100)
- 위탁생산 사례
  - 200L (100) / 12 Ton (100) / 5 Ton (100)
  - 5 Ton (100) / 100 불균기 (100)
- 고체발효 위탁생산
  - 100 불균기 (100)
  - 100 불균기 (100)
  - 100 불균기 (100)
- 유동미생물/수확/위탁생산
  - 100 불균기 (100)
  - 100 불균기 (100)
  - 100 불균기 (100)



2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	2	1	5	3
	달성	3	5	1	20	1

활용연도	교육 및 컨설팅명	교육 및 컨설팅 교재명	주요내용
2014	한우의 영양생리	한우의 영양생리	한우의 반추위 영양생리 및 소화기관
2014	한우를 위한 유용미생물 생산과 활용기술	한우를 위한 유용미생물 생산과 활용기술	생균제 vs. 발효사료, 생균제 조건, 제조법 및 이용효과, 사일리지
2014	한우를 위한 유용미생물 생산과 활용기술	한우를 위한 유용미생물 생산과 활용기술	생균제와 발효사료의 차이점 생균제의 제조법 및 이용효과
2015	생균제의 이해와 활용법	생균제의 이해와 활용법	한우의 소화기관, 생균제, 발효사료의 정의, 생균제의 조건 설정
2015	한우를 위한 생균제의 이해와 활용법	한우를 위한 생균제의 이해와 활용법	생균제의 정의, 생균제의 종류 및 효과, 생균제의 제조 조건, 농가형 생균제 제조 방법
2015	거세한우 등급 출현을 관련 컨설팅	거세한우 등급 출현을 관련 컨설팅	거세한우 등급 출현을 관련 컨설팅 실시
2015	한우암소의 발정미약에 대한 컨설팅	한우암소의 발정미약에 대한 컨설팅	한우암소의 발정미약에 대한 컨설팅 실시
2015	발효사료의 이해와 활용법	발효사료의 이해와 활용법	국내.외 축산업 현황, 한우의 소화기관, 생균제 및 발효사료
2015	발효사료의 이용에 관한 컨설팅	발효사료의 이용에 관한 컨설팅	발효사료의 이용에 관한 컨설팅 실시
2015	생균제 생산 및 배양기 관련 자문	생균제 생산 및 배양기 관련 자문	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 솔잎한우 생균제 생산 자문</li> <li>- 종균 공급, 배양 조건 및 배합비 자문</li> <li>- 수분 조절 및 배양기 자문</li> <li>- 균수 분석을 위한 시료 채취</li> </ul>

2015	한우의 대사 생리의 이해와 생균제 활용	생균제의 이해와 활용법	생균제 정의, 이용실태, 제고 공정 및 활용 방안
2015	국내산 부존자원의 사료화 방안	국내산 부존자원의 사료화 방안	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 부존자원의 사료화 방안에 대한 자문</li> <li>- 미국에서 오렌지 또는 감귤을 주스로 제조하고 남은 부산물의 사료화 방법 소개</li> <li>- 기타 감귤박 및 액기스의 사료화 방안 자문</li> </ul>
2015	유용미생물을 이용한 친환경 축산 활성화 방안	유용미생물제 및 발효사료 적용을 통한 농축산 생산성 향상	유용미생물을 이용한 발효 사료첨가제 및 발효사료를 이용한 축산 경쟁력 확보방안 및 현장 적용사례
2015	농산가공부산물의 사료자원화 방안	농산가공부산물의 사료자원화 방안	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 농산가공부산물의 사료자원화 방안 자문</li> <li>- 발효를 위한 미생물, 발효기 등에 대한 원리 자문</li> <li>- 기타 농산가공부산물을 활용한 발효사료 제조사례 자문</li> </ul>
2015	2015년 한우 생산성 향상 기술 강습회	생균제의 이해와 활용 방법	생균제 제조 공정, 이용 실태 및 활용 방안
2015	축산미생물 연구동향 및 산학협력 방안		
2015	Pre and probiotics in food animal production	(National Academy of Science and Technology, Philippines (NAST PHL))	
2015	부추를 이용한 조류 인플루엔자 억제용 사료첨가제 및 소독제의 산업화	(주)제일바이오 특강)	

## 제 4 절 향후 활용계획

### 1. 위탁생산을 통한 자립화 및 운영

- 가. 위탁생산을 통해 신규 기술개발 진입자들의 자립화 지원
- 나. 3년-5년의 졸업제도를 통한 위탁생산 순환시스템 가동
- 다. 향후, 10년내 대형 거래처 10곳 확보로 위탁생산만으로 경영자립화
- 라. 기존 자문협의회의 유지를 통한 위탁생산시스템의 효율적 운영 보완
- 마. 향후, 위탁생산 제품의 생산 및 매출 계획

	2016년	2021년	2026년	2030년
거래처	3	6	10	20
생산량	50톤	100톤	200톤	500톤
매출액	1억	2억	4억	10억
고용 인원	-	-	1	2

### 2. 위탁생산 제품의 규격화된 평가시스템 보완

- 가. 종균관리시스템을 통하여 4대 계대배양 이전의 종균만 제품 생산에 적용
- 나. 기존의 생균수 분석 지표에 더하여 활성지표를 추가 도입하여 생균수 및 활력 평가에 대한 시스템을 구축 가동한다.

- (1) 1차 : 생균수 분석 : 현미경 검경 및 Plate counting 시행
- (2) 2차 : Dehydrogenase activity 분석법 도입 가능성 확인

### 3. 사료첨가제의 상품화 및 판매시스템 구축

- 가. 복합발효효소제 : 중국 진입 (2016년 전반기, 등록완료 1/4분기 병행 )  
⇒ 3개 권역 총판 (연간 240톤 → 1,200톤 수출)
- 나. 복합 발효사료첨가제 : 2017년 (제품화)  
→ 중국 기술이전 또는 중국내 생산 및 판매
- 다. 생물전환 기능성 발효 사료첨가제 : 2018년 제품화 ⇒ 사료공장 우선 판매

### 4. 공익적 활용 계획

- 가. 기능성 미생물 : 영농법인, 농업기술센터 등 공공성 기관에 무상 분양 (특허균주 제외)
- 나. 자가생산 희망 영농법인 : 컨설팅 및 발효원 및 발효조건 기술이전

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 축산박람회 참관등을 통한 정보

#### 1. 유럽

가. 항생제 대체 : 유기산제 등을 적극 이용

나. Mycotoxin 억제제

- aluminosilicate 등을 이용한 흡착-배출제가 다수 점유

- mycotoxin 억제제/분해제는 미흡

다. 축산 사양을 위한 자동화 라인이 발달

#### 2. 인도

가. 생약/천연물을 이용한 질병억제/곰팡이독소 억제제 등 다수

#### 3. 태국

가. 생균제 등을 자체 생산하는 기업이 증가하고 있음

#### 4. 중국

가. 사료첨가제 생산용 원료 생산 기업이 다수

나. 일부 기업은 유용미생물 수화제 시장에서 경쟁력 갖춤

다. 현장 축산농가에서는 미생물을 이용한 사료첨가제 사용이 부족

### 제 2 절 해외 수출 추진중 획득 정보

#### 1. 중국

가. 차세대 핵심개발분야의 하나로 생명산업 선정

(1) 축산분야

(가) 일정 규모 이상의 기술력 보유 회사에 집중 지원

(나) 대량배양에 의한 유용미생물 원제 생산에 있어서는 한국에 비해 우위

(다) 생균제 등의 실질 생균수는 보증함량에 미달하는 경우가 많음

(라) TMR 및 발효사료 첨가제에 대한 수준은 초보단계

(마) 축산농가에서는 한국산 제품에 대한 기술우위 인정

(2) 수입에 있어 간접적인 규제 심함

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

연번	품명	규격	단가 (단위:천원)	수량	용도	구입년도
1	동결건조기	8L	14,000	1	균주 동결	2013
2	고속원심분리기	Combi 514R	19,700	1	미생물 농축	2013
3	진탕배양기	VB-808SRL 1180 x 800 x 850 5℃ to 65℃	9,000	2	종균 배양 배양조건실험	2013
4	4실 배양기	VB-103L4 500 x 500 x 500 x 4C hamber 5℃ to 80℃	9,000	1	종균 배양 온도조건 실험	2013
5	위상차현미경	올림푸스 BX53F	14,000	1	균주 관찰 생균수 분석	2014
6	초저온냉동기	DF8510 -40 ~ -80℃,	9,500	1	유용미생물 종균 보관	2014
7	저온제습 건조시스템	발효실용	10,000	1	고체발효물 저온 건조	2015
		드럼형	8,000	1		
8	호모게나이저	IKA T18	3,970	1	배양액 균질화	2015

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

### 제 1 절 연구실 안전조치 이행계획

#### 1. 화재 발생 대비

- 가. 연구실 입구 및 크린벤치 옆에 소화기 설치
- 나. 가스렌지 대체

#### 2. 멸균기 등, 고압고온 기기 부실 사용에 의한 화상 방지

- 가. 안전교육 월 1회 실시
- 나. 안전한 멸균기 이용

#### 3. 기술 유출 방지

- 가. 시건장치 보완 및 연구소 출입구 보안설비 설치

#### 4. 연구실 환경 개선 - 공기 청결 방안 등

#### 5. 일상점검 정례화

### 제 2 절 연구실 안전조치 이행실적

#### 1. 화재 발생 대비

- 가. 연구실 입구 및 크린벤치 옆에 소화기 각 1기 신규 비치
- 나. 인덕션렌지로 가스렌지 대체
- 다. 소화담요 비치

#### 2. 멸균기 등, 고압고온 기기 부실 사용에 의한 화상 방지

- 가. 안전교육 월 1회 실시
- 나. 상온 및 1기압 상태 확인후 open 상례화



다. 비상약품 비치

3. 기술 유출 방지

가. 시건장치 보완

나. 고화질 CC카메라 설치 (연구실 입구 등 4곳 CCD 카메라 설치)

4. 연구실 환경 개선

가. 공기청정기 2기 설치

나. 기름 온열기 대체 : 냉온방 에어컨

5. 일상점검 정례화

가. 일상점검 : 매일

나. 퇴근시 냉장고 등 지속운전 기기외 모든 전기장치 코드 off

## 제 9 장 참고문헌

1. Balestra, G. M., & Misaghi, I. J. (1997). Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 30(2), 111-117.
2. Lindqvist, R. (2006). Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4862-4870.
3. Lebaron, P., Troussellier, M., & Got, P. (1994). Accuracy of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers. *Journal of microbiological methods*, 19(2), 89-94.
4. Beyer, L., Wachendorf, C., Elsner, D. C., & Knabe, R. (1993). Suitability of dehydrogenase activity assay as an index of soil biological activity. *Biology and Fertility of Soils*, 16(1), 52-56.
5. Alisi, C. S., Nwanyanwu, C. E., Akujobi, C. O., & Ibegbulem, C. O. (2008). Inhibition of dehydrogenase activity in pathogenic bacteria isolates by aqueous extracts of *Musa paradisiaca* (Var Sapiantum). *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
6. Zhao, X., Li, H., Wu, Q., Li, Y., Zhao, C., & Zhang, Y. (2010, July). Notice of Retraction Analysis of dehydrogenase activity in phytoremediation of composite pollution sediment. In *Environmental Science and Information Application Technology (ESIAT), 2010 International Conference on* (Vol. 2, pp. 526-529). IEEE.
7. Mahmoud, N. S., & Ghaly, A. E. (2004). Influence of temperature and pH on the nonenzymatic reduction of triphenyltetrazolium chloride. *Biotechnology progress*, 20(1), 346-353.

## 주 의

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