

최종보고서

GOVP 12007242

# 가금 및 양돈용 Multi-probiotics의 개발

Development of Multi-probiotics  
for Poultry and Swine

1999. 10.

연구기관 전북대학교

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “가금 및 양돈용 Multi-probiotics의 개발” 과제의 최종 보고서로  
제출합니다.

1999 10.

주관연구기관 : 전북대학교  
총괄연구책임자 : 박 홍 석  
연 구 원 : 엄 태 봉  
연 구 원 : 유 경 선

## 요 약 문

### I. 제 목 : 가금 및 양돈용 Multi-probiotics의 개발

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

근래 우리 나라는 급속한 경제발전과 국민들의 소득 증대로 고급 식품인 축산물의 수요가 극적으로 증가하여 왔으며, 이에 부응하여 축산물의 량적 생산이 이루어져 왔다. 최근 들어 우리 양축 농민들은 WTO의 출범에 따른 축산물의 효율적 생산에 대한 압박과 급격히 강력해지는 축산물의 질적 개선 요구에 직면하여 매우 어려운 국면을 맞이 하고 있다.

건강한 가축의 장내에는 대략  $10^{14}$ 개의 미생물이 있으며, 이들은 서로 세력 균형을 잘 이루어 비교적 안정을 유지하며 서식하고 있지만, 환경 조건에 의해 언제나 변화가 주어질 수 있다. 밀집 사육, 더위, 심한 일교차 같은 스트레스가 가해지면 어느 시점에서라도 그 균형은 깨어지고, 유해한 세균들이 세력을 확장하여 문제를 일으킬 수 있다. 출혈성 *E. coli* 또는 *salmonella* 같은 유해 세균이 이틈을 파고들면, 설사나 장염, 장출혈 등 장애가 오고 심하면 가축은 폐사하게 된다. 이러한 때에 질병 예방과 가축의 성장 촉진을 위하여 효과적으로 이용되는 것이 항생제이다.

항생제는 어느 특정 유해 세균을 억제하는데 효과적이기는 하나, 불행하게도 잔여 화학 물질이 축산물을 통해 인체에 이전되는 문제를 야기 시킨다. 나아가서 유익한 미생물도 파괴하여 장내 미생물의 불균형을 초래하거나 그 숫자를 극적으로 감소시켜, 항생제 사용 이후 유해 세균이 자리잡는 위험성도 있다. 항생제를 상습적으로 이용하면 항생제에 저항력을 보유한 세균이나 돌연변이에 의한 새로운 세균이 생겨나 사람에게까지 질병을 유발하는 가능성도 있다. 현실적으로 축산물의 이물질 잔존 문

제가 종종 물의를 일으키고 있으며, 돈육의 대 일본 수출에도 직접적 장애 요인이 되고 있는 항생제, 이를 대신할 수 있는 대안이 바로 probiotics이다. 농촌 현장에서는 이를 절실하게 필요로 하고 있는 시점이다.

살아있는 미생물로서 probiotics는 효모나 박테리아를 포함한 다양한 종류의 미생물을 대상으로 한다. 가축의 성장을 촉진하고 사료 이용률을 개선시키는 역할을 하면서도, 항생제가 야기하는 문제를 전혀 일으키지 않는 잇점이 있다. 따라서 앞으로 언젠가 probiotics는 항생제를 완전히 대체하게 될 것으로 많은 학자들은 믿고 있다. 다만, 그 효능에 있어 아직 불확실하고 항생제를 따르지 못하는 경우가 종종 있다. 본 연구는 가축의 질병 예방과 성장 촉진을 목적으로 하는 probiotics를 개발하고, 나아가서 같은 목적으로 상용하는 항생제를 대체하기 위한 효력이 높은 multi-probiotics (viable mixed cultures of microorganisms)를 개발하는 것이 본 연구의 목적이다.

### Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

가축에게 probiotics를 급여하여 이들이 장내에서 성공적으로 활동하기 위해서는 먼저, 가축의 장내 환경에서 생존할 수 있어야 한다. 다음으로 그들이 세력을 확장하여 다른 좋지 못한 세균들이 서식하지 못하도록 억제하는 작용을 하여야 한다. 예를 들어 장내에서 낮은 pH의 위산이나 낮은 표면장력의 담즙에 견딜 수 있어야 하며, *E. coli*나 *Salmonella*와 같은 유해 세균을 억제할 수 있어야만 한다. 따라서 본 연구는 내산성, 내담즙성, *E. coli*와 *Salmonella*를 억제하는 능력 등 probiotics로서의 조건을 확립하고, 이에 따라 균주를 검색하고 우량종을 분리하는 방법을 개발하는 것으로 시작하였다. 선발되는 균주의 양산을 위한 발효 조건의 확립, 발효 생산 단계에서의 biomass 증진 기법, 시제품 제조를 위한 종균 분말화 단계에서의 종균 viability 저하 방지 기법 개발 등으로 이어지는 종균 개발을 진행하였으며, 이에 따라 최종적으로 선발된 균주로 probiotics 시제품을 제조하여 그 성능을 검사하는 사양시험을 실시하였다. 균주의 발굴, pilot 발효에 의한 biomass의 생산, 시제품 생산, 성능 검색을 위한 broiler와 어린 돼지 사양시험으로 이어지는 일련의 과정이 반복되었다. 이상과 같이

본 연구는 연구 결과의 일차적 실용화에 초점을 맞추었기 때문에, 성능을 향상시키는 제품 형태나 연관된 기초 분야에 해당하는 연구는 포함하지 않고 있다.

#### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

Probiotics로 사용할 수 있는 종균을 개발하기 위하여 처음에는 발효 산업에서 이용하는 기존 균들을 선발 대상으로 하였으며, 이어서 닭과 돼지의 장에서 조건에 맞는 균주를 직접 분리 검색 선별하였다. 결과적으로 probiotics 개발에 대한 상당한 know-how가 축적되었으며, *in vitro*와 *in vivo* 성능 검사를 마친 *B. polyfermenticus*, B4, PA10, A12, A24, A232 등 다수의 우수한 균주를 확보하게 되었다. 여건이 맞다면, 이들은 언제라도 probiotics 제품 생산에 이용할 수 있는 것들이라고 생각한다.

본 연구와 연관된 우리 나라의 산업 분야에서는 본 연구가 시작된 이래 많은 관심이 고조되었고 성능이 확실한 우수 probiotics의 출현이 끊임없이 요구되어 왔다고 할 수 있다. 양축가들의 입장에서는 더욱 그렇다. 이러한 상황에서 성능이 불확실한 여러 외국 제품들이 수입되기도 하였고, 출처가 확실하지 않은 제품들이 정당하지 않은 저렴한 가격으로 유통되기도 하였다. 때문에, probiotics 제품에 대한 신뢰는 물론 probiotics의 효능에 대한 믿음마저 잃어 가는 형편이 되었다. 이러한 상황에서 본 연구의 결과 제품이 양축가들에게 어떻게 받아들여질지 또 상품화했을 때 산출될 가격은 현지에서 받아들여질 수 있을 것인지, 궁금한 점이 적지 않다. 여러 가지 참여 기업 측과 상의해 봐야할 것이지만, 일정 기간이라도 양축가들이 저렴하게 본 연구 결과 제품에 접근할 수 있으면 하고 생각해 본다. 제품의 성능 향상과 저렴화, 또는 연관된 기초 분야에 대한 연구가 앞으로 더 진행되어야할 것이다. 그래야만 선진 외국 제품과 지속적인 대응을 해 나갈 수 있으리라고 생각한다.

## SUMMARY

### TITLE : Development of Multi-probiotics for Poultry and Swine

In accordance with the rapid increase in the demand of high quality food encouraged by steady progresses in economics and personal income, livestock production in Korea has been grown real fast during last couple decades. Although the growth was remarkable, it was mainly quantitative but not so much for its quality. Currently, Korean livestock farmers are subjected to a great pressure from two major reasons; one is the efficiency of livestock production to compete against the world market and the other is the quality improvement for which demand is growing faster than ever these days.

The population of bacteria in the gastro-intestinal tract is enormous, estimated to be present at levels of anaerobic about  $10^9$  and obligate anaerobic about  $10^{11}$  bacteria per gram of fresh digesta. In general, they maintain a good balance and do not cause problems as long as they are not disturbed by various factors including environmental and mental alterations. Stresses such as raising livestock in a high density within a narrow restricted area, hot and humid climate, severe changes in temperature during a day etc. can make the microbial balance undesirable and bring the pathogenic bacteria such as *E. coli* or *Salmonella* to expand their activity to cause problems. Such a change can happen as a matter of moment. In order to prevent such disastrous situations and promote the efficiency of livestock production, antibiotics have been used extensively.

In spite of the numerous benefits that can be obtained by using antibiotics in livestock production as initiated by its definite inhibition of harmful bacteria in the gut and nutrient sparing effects, these chemicals have their own inherent problems that are related to human health. While they kill harmful bacteria and stimulate animal growth and feed utilization, they also kill desirable bacteria and can cause pathogenic resistant strains. More than anything else, some of the antibiotics can leave residues in milk, eggs, and meat when those are used in a prolonged period of time. In reality, this problem has been recognised now and then, and became the real concern of animal product consumers in Korean these days. It is also one of major concerns of swine farmers currently for the export of pork to Japan.

Under the circumstances, as a viable mono- or mixed culture of microorganisms which beneficially affects the host animal or man by improving the intestinal microbial balance, probiotics can be a good substitute for antibiotics. While they can play the same role as antibiotics in promoting animal growth and nutrient utilization, they are not suppose to case problems as some of the antibiotics do. Such products are urgently needed by Korean livestock farmers more than ever these days. The purpose of this study is to develop probiotics that are effective for poultry and swine feeding, focussing mainly on the manufacture of readily usable products other than on basic matters related.

Microbial strains to be selected and used as successful probiotics must be viable until they reach the gut and able to inhibit pathogen activity. This would be the minimum requirements they must retain. As the first step in this study the characteristics which need to be fulfilled by an microorganism in order to be useful as probiotics were established based on the fact that a microorganism is to survive passage through the stomach and reach the intestine alive and to be endowed with inhibitive activities towards pathogenic bacteria. In practice, four



criteria as acid tolerance, bile tolerance, the inhibition of pathogenic *E. coli* and *Salmonella* growth were applied for the selection of strains. The resistance to pancreatic juice was excluded from the criteria as it showed to be growth promoting for most bacteria tested. Once a strain was selected, production of biomass using pilot scale fermenters, freezing drying, and manufacture of potential probiotic products by diluting the dried biomass into dried yeast culture or other diluting agents were followed. For the last step, the effectiveness of the products were tested through a series of feeding trial with broilers and piglets.

To begin with the selection of microorganisms, a total of 23 different microbial strains of *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, and *Aspergillus* from industrial fermentation culture collections was tested through the established laboratory procedure and the initial products made from the selected strains were tested through feeding trials. The selected strains, *Bacillus polyfermenticus*, *Clostridium butyricum* KCTC 1768, and *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3155 appeared to show growth promoting effects during the early phase of broiler and early weaned piglet growing but not the feed conversion ratio. During the first year of this study the mutation of selected strains was tried using a continuous fermenter to enhance their ability to tolerate acid and bile but it was not successful.

In an effort to find microbial strains with potent probiotic activity, microorganisms were freshly isolated from small intestines of chicken and piglets during the second year of this project. Through a series of laboratory work using the same procedure as previously done, two strains, one from each animal, were successfully selected. The one isolated from chicken was called B4 and the other from piglet was called PA10, and both of them were identified to be *Lactobacillus salivarius* later. These two strains of microorganisms showed significant effects

of promoting the growth and feed utilization of both broilers and young piglets of which improvements were similar to those induced by an antibiotic compared. However, there were no further improvements when they were used in combinations as multi-strain probiotics. Fresh isolation of microorganisms from guts of chicken and piglets were repeated using the same procedure but screening them under fortified conditions, lowered pH and raised bile concentration, to find microorganisms having higher probiotic activity. As a result, one strain from the intestine of chicken (A12) and two other strains from piglets (A24 and A232) were finally isolated. These strains generally show the growth promoting effects with increased feed intake but not the feed conversion ratio. Again, they did not show enough symbiotic probiosis when they were used in various combinations. Studies conducted with significant results obtained during the last year of this project include the development of techniques to increase the biomass during fermentation and that to enhance the viability during harvesting, drying, and preserving cells, which are the cost effective factors when producing probiotics.

## Contents

Chapter 1. Introduction	11
Chapter 2. Microbial strains from industrial culture collections	15
1. Selection of micro-organisms for probiotics	15
2. Manufacture of primary probiotic products	29
3. Feeding test of the primary products on broilers	30
4. Feeding test of the primary products on piglets	35
Chapter 3. Fresh isolation from small intestine of animals	39
1. Introduction	39
2. Isolation of acid and bile tolerant <i>Lactobacilli</i>	39
3. Isolation of acid and bile tolerant <i>B. polyfermenticus</i>	41
4. Fresh isolation of microbial strains from piglets	44
5. Fresh isolation of microbial strains from chicken	56
6. Manufacture of the second probiotic products	67
7. Feeding test of the second products on broilers	68
8. Feeding test of the second products on piglets	73
Chapter 4. Repeat of fresh isolation and viability preservation	77
1. Fresh isolation of microbial strains	77
2. Manufacture of the third probiotic products	88
3 Feeding test of the third products on broilers	88
4 Test of the third products on growing pigs	93
Bibliography	

## 목 차

제 1 장 서론: 연구 개발의 목적과 범위	11
제 2 장 기존 산업 균주의 생균제 이용	15
제 1 절 생균제 균주의 선발	15
제 2 절 1차 시제품의 생산	29
제 3 절 1차 시제품의 broiler에 대한 급여 효과	30
제 4 절 1차 시제품의 piglet에 대한 급여 효과	35
제 3 장 균주 개발 및 동물 장내 균주 선발	39
제 1 절 서론	39
제 2 절 연속배양에 의한 내담즙성 <i>Lactobacillus</i> 균주 분리	39
제 3 절 내산성 및 내담즙성 <i>B. polyfermenticus</i> 균주 분리	41
제 4 절 돼지 장으로부터 균주 선발	44
제 5 절 닭 장으로부터 균주 선발	56
제 6 절 2차 시제품의 생산	67
제 7 절 2차 시제품의 broiler에 대한 급여효과	68
제 8 절 2차 시제품의 piglet에 대한 급여 효과	73
제 4 장 동물 장내 균주 재선발, 양산 및 보존성 증진	77
제 1 절 닭과 돼지의 장내 균주 재선발	77
제 2 절 3차 시제품의 생산	88
제 3 절 3차 시제품의 broiler에 대한 급여 효과	88
제 4 절 3차 시제품의 piglet에 대한 급여 효과	93
참고문헌	

## 제 1 장 서 론 < 연구개발의 목적과 범위>

Probiotics란 그리스어로 “for life”를 의미하며, 우리말로는 “생균제”에 해당하는 단어라고 할 수 있다. 1965년에 Lilley와 Stillwell(29)은 다른 생물의 성장을 억제하는 미생물이라 하여 정확히 항생제의 반대되는 개념으로 처음 이 말을 사용하였고, 1971년 Sperti(52)는 미생물의 성장을 촉진하는 조직 추출물이라 하였다. 그리고 1974년 Parker(43)는 장내 미생물들의 균형을 유지하는데 도움이 되는 생물과 물질들이라 하였다. 장내 미생물에 의미를 연결시키었지만, 물질들이란 말에 항생제도 포함될 수 있는 듯한 모호함이 있었다. 이에 1989년 Fuller(17)는 probiotics란 장내 미생물 균형을 개선함으로써 숙주 동물을 위해 이롭게 작용하는 살아있는(viable) 미생물 사료 첨가제라 하여 살아있음의 의미를 강조하였다.

Probiotics의 정확한 개념에 상관없이, 살아 있는 미생물을 인류의 식생활에 활용하기 시작한 것은 매우 오래 전부터의 일이다. 유난히 장수하는 사람들이 많았던 발칸 반도의 사람들에게 관심을 갖게된 유산균의 대부, Elie Metchnikoff는 그들이 즐겨먹던 식품 sour milk 즉, 발효시킨 우유를 섭취하는 것이 장수하는 비결이라고 믿게 되었다. 1907년에 쓰여진 그의 저서 “The prolongation of life”는 probiotics의 탄생과도 같은 계기가 되었고, 많은 사람들은 “*Bulgarian bacillus*”라는 살아있는 미생물을 섭취하는 것이 건강 유지에 매우 중요하다고 믿게되었다. 1916년 그의 사망과 더불어 probiotics에 대한 사람들의 관심이 멀어져 갔으나, 1차 세계대전 이후 유산균 *L. acidophilus*의 효능이 알려지면서 다시 이에 대한 관심이 고조되게 되었다. 연구도 활발하게 이루어져 Rettger et al.(45)은 *B. bacillus*가 소장 내에서 장기 생존이 불가능한 반면 *L. acidophilus*는 소장에서 장기간 서식할 수 있음을 밝혀 내었고, Kopelhoff (28)는 유산균을 이용한 질병의 치료 가능성까지 내세우게 되었다.

2차 세계 대전 이후에 항생제(antibiotics)가 등장하면서 유산균은 다시 사람들의 관심 밖으로 다시 밀려나게 되었는데, probiotics에 비해 항생제의 효능이 워낙 확실하였

기 때문이다. 항생제는 만병통치의 신비 약품으로 통할 정도이었다. 그러나 항생제는 효과가 확실한 만큼 부작용이 대단하고, 이에 대한 불안과 염려 때문에 근래에 와서 probiotics는 다시금 사람들의 건강 유지를 위한 대안으로 떠오르게 되었다. 1950년대 Bohnhoff et al.(4)이나 Freter(15)는 항생제를 투여했던 쥐는 *Salmonella typhimurium*에 더 쉽게 감염된다는 사실을 관찰하게 되었고, 1978년 Collins와 Carter(8)는 *Salmonella enteritis* 10개로 germ-free guinea-pig을 죽게 할 수 있으나 보통 guinea-pig은  $10^9$ 개나 필요하다고 하여, 장내 유익한 미생물의 존재 필요성을 강조하기도 하였다.

유익한 미생물들이 갓 태어난 동물의 장내에 처음으로 서식하게 되는 것은 자기를 낳아준 모체와 주변 환경과의 접촉으로부터 이루어진다. 오늘날 현대화된 출생후 관리의 사람이나 가축에 있어 모두 모체와의 접촉을 제한하고, 자연스럽지 않은 식품이나 사료, 환경 조건은 질병에 저항 능력이 있는 장내 이로운 미생물들의 서식을 어렵게 하였다. 다 자란 다음에도 장내 정상적인 미생물 균형은 사료나 항생제 그리고 스트레스 등에 의해 쉽게 위축되곤 한다. Probiotics는 이러한 비정상적인 장내 미생물 환경에서 결핍된 유익한 미생물을 보완시켜주는 역할을 하는 것이다. 자연 조건에서 나타나는 정상적인 상황보다 더 나은 상황을 창조 해내는 것은 아니라, 장내 미생물 균형을 최대 방어 상태로 되돌려놓고 유지하게 하는 그러한 역할을 한다고 할 수 있다.

Probiotics는 가축의 성장을 촉진하고 사료의 이용률을 향상시키며, 젖소의 산유량과 산란계의 산란율을 높여주는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로는 가축의 건강 상태를 양호하게 유지해 주는 기능이 있다. 그러나 Probiotics의 효능에 대한 실험 결과는 언제나 일관성 있게 나타나지 않는다. Sanders(49)는 14개 probiotics 실험 중에서 3개만 확실한 효능을 나타내었고, 5개는 부정적인 그리고 나머지 6개는 긍정적인 결과를 나타내었다고 하였다. 실험 설계가 부적절했거나 결과의 데이터 분석에 오류가 있을 수도 있지만, 일차적으로는 probiotics의 생존율(viability)에 크게 영향 받는다고 할 수 있다. 따라서 probiotics가 효과적이기 위해서는 여러 환경에서 작용할

수 있어야 하고, 분말이나 과립, 정, 액상, paste, spray 등 여러 가지 형태로 생존율이 높게 유지되어야 한다.

Probiotics의 생존율은 여러 가지 요인에 의해 영향을 받게 되는데, 생산 과정에서 미생물의 성장 조건이나 수확 시점은 그들의 생존율과 차후 능력 발휘에 영향을 주며, 저장 상태는 생존율과 제품의 유효기간에 영향을 준다. 저장 중에 수분 함량은 절대적으로 낮게 유지해야 하며, 가능하면 진공 포장이나 질소 가스 하에 보관하는 것이 바람직하다. Hamilton 등(20)에 따르면 검사한 13개 *L. acidophilus* 단일 제제의 경우 label에 표시된 cfu 수치에 일치하는 생존율을 보인 제품은 2가지 밖에 없었다고 한다. 더군다나 multi-strains 제제의 경우 어느 한 두 종이 우점하는 현상 때문에 cfu 수치 확인 자체에 어려움이 있다고 하였다. Probiotics 생산 과정에서 발생하는 오염도 제제의 효능에 지대한 영향을 미친다. 제품에는 label에 나열한 미생물만 존재해야 함에도 불구하고, 실제로 있어야 할 활성 미생물은 없고, 없어야 할 다른 미생물이 존재하는 경우가 흔하다. Hughes와 Hillier(24)에 따르면 *L. acidophilus*를 함유한다고 한 13개 제품 중 5개에만 이 미생물이 존재하였고 16개 제제를 검사한 결과 11개 제품에 없어야 할 미생물이 존재하였다고 한다.

동물의 장내 미생물들은 매우 유동적(dynamic)이어서, 전체 균총을 우점하는 미생물 종류는 주기적으로 변화한다고 한다. 신생 자돈의 경우 4 주령까지는 장내에서 다른 *Lactobacilli*가 전체 균총을 번갈아 우점하는 상태가 유지되며, *L. reuteri*는 생후 첫날에만 나타나고, *L. acidophilus*는 7 일령까지 나타나지 않는다고 한다(36, 56). 이렇게 변화가 심한 장내 미생물 균총은 섭취하는 사료, 연령, 스트레스 정도에 따라 더욱 영향을 받게 되는데, probiotics의 효능은 이를 섭취하는 시점에서 장내 미생물 균총이 작용할 수 있는 여건에 부합될 때에만 나타날 수 있는 것이다. 예를 들어 위생 상태가 매우 좋은 상태라면 probiotics의 효능은 나타나지 않을 것이다. 이런 경우라면 항생제라도 효과는 나타나지 않을 것이다.

투여하는 probiotics가 동물의 소장 내에서 colony를 형성하고 점막에 부착할 수 있는냐 하는 문제는 probiotics의 효능과 연관된 또 하나의 요인이라고 할 수 있다.

일반적으로 probiotics를 투여하는 동물과 같은 동물의 장으로부터 얻어낸 미생물이 장내 colony 형성에 도움이 된다는“host-specific effect”가 인정되지만, 이 특성과 probiotics의 효능과는 큰 연관이 없는 것 같다(16). 동물의 장으로부터 유래되지 않은 미생물일 지라도 효과가 있을 수 있으며, 젖소에 대한 *Aspergillus oryzae*가 좋은 예이다. 반추위 내에서 colony를 형성하지 않지만 반추위 발효에 상당한 영향력을 발휘하여 산유량을 많이 하는 효과를 나타낸다. 장내에서 colony를 형성하지 못한다 해도 반복 급여 또는 장내에서의 빠른 성장률로 제 기능을 발휘할 수 있는 것이다.

살아있는 미생물로서 Probiotics는 다양한 미생물 류가 있겠으나 현재까지 가장 흔하게 쓰여지는 것으로는 bacteria, molds, yeasts 등 3가지가 주를 이루고 있다. 그 중에서도 많은 관심을 갖게 하는 것은 동물의 장내에 주류를 차지하고 있으며 영향력이 큰 lactic acid bacteria를 주축으로 하는 bacteria라고 할 수 있다. 본 연구는 닭과 돼지 사료에 첨가하여 사용할 수 있는 multi-probiotics를 개발하는 것이 궁극적인 목표이다. 우선 probiotics가 지녀야 하는 능력 조건을 확립하고, 이에 부합하는 미생물을 발굴하여, 이들을 산업화하는데 필요한 배양 조건을 찾아내어 시제품을 생산하고, 사양시험을 통해 성능을 검증하는 과정을 거쳐, 가축 사육 현장에서 곧바로 이용할 수 있는 probiotics를 만들어 내는 것이다. 발굴하는 미생물에 대한, 그리고 이들이 가축의 체내에서 작용하는 기전과 연관된 기초 분야에 대하여는 본 연구의 범위에 포함시키지 않고 있다. 짧은 시간을 통해 probiotics를 개발하고 효능을 검증하여 실용화시키는데 연구 초점을 두고 있는 것이다. Probiotics는 한 가지 종류의 미생물(single strain)로 이루어질 수도 있고 여러 가지 종류의 미생물들(multi-strains)을 복합하여 이루어질 수 있다. 편의상 본 연구에서는 후자를 복합 생균제(multi-probiotics)라고 불러보았다.



## 제 2 장 기존 산업 균주의 생균제 이용에 관한 연구

### 제 1 절 생균제 균주의 선발

#### 1. 서론

산업적으로 probiotics는 발효 배지의 준비, 발효기의 살균 소독, 균주의 접종, 발효 개시, 이상적 발효 조건 유지, biomass의 수집, biomass의 건조와 안정화로 이어지는 과정을 통해 생산되어진다. 이 일련의 과정에서 무엇보다 중요한 일은 얼마나 좋은 균주 미생물을 확보하느냐 하는 일이며, 이것이 바로 성공적인 probiotics 제품을 생산하는 기본이 되는 것이다. 오늘날 주로 사용되는 미생물은 효모와 유산균류이지만, 가축이나 사람의 장내에 서식하는 미생물들을 대상으로도 활발한 연구가 진행되고 있으며, 일부 제품화되어 있기도 하다. 가축 사육을 위해 사용되고 있는 probiotics는 발효식품 산업에서 사용하는 균주나 인체용 생균제를 가축용으로 전용하는 제1세대, 동물의 장에서 유래되는 균주를 전용하는 제2세대, 그리고 균주의 특성이나 명확한 기능을 파악해 실용화시키는 제3세대 probiotics의 추세로 개발이 진행되고 있다고 할 수 있다. 닭과 돼지의 성장을 촉진하고 질병을 예방하는데 도움이 되는 복합 생균제 (multi-probiotics) 개발에 대한 연구의 시작인 첫 해 연구는 제1세대 probiotics를 개발하는 단계로서, 실험실에서의 발효 연구를 위한 발효조 설치, 발효 조건 및 배지 성분 확립, 균수 측정 방법등 배양 시스템을 확립하고, 기존 균주들로부터 종균을 검색 선발하여 시제품을 생산하고 broiler와 양돈 사양시험을 통해 시제품의 성능을 검증하는 것으로 시작하였다. 선발 대상 균주로는 참여 기업이 보유하고 있는 것을 비롯하여 산업적으로 개발되어 있는 것들 중에서 probiotics로 가능성이 있는 균주들을 포함하였으며, probiotics로서 유망한 균주로 선발하는 조건은 균들이 가축의 장내에서 생존하며 유해 세균의 생육을 억제하는 능력 즉, 내산성 (gastric juice tolerance), 내담즙성 (bile tolerance), 그리고 유해 세균인 *E. coli*와 *Salmonella*의 성장을 억제하는 능력을 검색하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 대상 균주

1차적으로 probiotics 가능성이 있다고 생각되는 균주를 KCTC 및 ATCC 목록에서 선별하였는데 선정의 일차적인 기준은 돼지나 닭의 장에서 분리된 것, 성장하는 동안 항생물질이나 미생물의 생육 저지 물질을 내는 것, 강력한 소화효소 물질을 내는 것들을 범위로 하였다. 해로운 장내 미생물의 선정은 소와 돼지, 또는 닭의 설사를 유발하는 균인 *E. coli* KCTC 2618 (Serotype 08 : K85 : K99 ATCC 31618)과 *Salmonella choleraesuis* (Serotype Thompson ATCC 8391)이었다. 사용한 균의 종류는 다음과 같다.

- *Bacillus* ; *B. subtilis* KCTC 1666(원래 닭 및 칠면조의 변에서 분리), *B. subtilis* B11(비오비타, 일동 제약), *B. subtilis* J11(제일 화학, 경기 안산), *B. polyfermenticus* (비스루트-에스, 순천당 제약).
- *Clostridium* ; *C. butyricum* KCTC 1786, *C. butyricum* KCTC 1787 (원래 돼지 소장에서 분리), *C. butyricum* KCTC 1871, *C. butyricum* KCTC 1904, *C. butyricum* KCTC 1905 (원래 돼지 소장으로부터 분리).
- *Lactobacillus* ; *L. acidophilus* KCTC 3146 (원래 돼지 소장에서 분리), *L. acidophilus* KCTC 3149 (원래 돼지 소장에서 분리), *L. acidophilus* KCTC 3150 (원래 돼지 소장에서 분리), *L. acidophilus* KCTC 3153 (원래 닭의 소장에서 분리), *L. acidophilus* KCTC 3155 (원래 닭의 소장에서 분리).
- *Saccharomyces* ; *S. cerevisiae* KCTC 1201, *S. cerevisiae* KCTC 1201, *S. cerevisiae* KCTC 1201, *S. cerevisiae* KCTC 1201, *S. cerevisiae* KCTC 1201(제일화학).
- *Aspergillus* ; *A. oryzae* KCTC 2114, *A. oryzae* KCTC 6095, *A. oryzae* KCTC 6291, *A. oryzae* KCTC 6292

#### 나. 배지 성분 및 배양 조건

*Lactobacillus*의 고체 및 액체 배양 배지는 *Lactobacilli* MRS(Difco, Detroit, USA), *Clostridium*은 fluid thioglycollate(FT, Difco), *Bacillus*는 nutrient broth(NB, Difco)를, *Saccharomyces*는 YM broth(Difco), *Aspergillus*는 potato dextrose 배지(Difco)를 사용하였고, 이들의 배양 조건은 *Saccharomyces*와 *Aspergillus*인 경우 30°C에서 60rpm으로 진탕하면서 12-24 시간 배양하였다. *Lactobacillus*와 *Bacillus*는 37°C에서 약 24 시간 동안 60rpm으로 진탕 배양하였으나 *Clostridium*은 동일한 조건에서 정지 배양하였다. *E. coli* O8의 선택 배양 배지는 *E. coli*용 Petrifilm plate(3M, St. Paul, USA), *S. choleraesuis*의 선택 배지는 bismuth-sulfite agar(Difco)를 사용하였는데 조사하고자 하는 배양액 0.1ml을 0.9ml NaCl과 섞어 균일하게 표면에 도포한 다음 37°C에서 24시간 배양하고 계수 하였다. 2 주일마다 한천 배지에서 계대 배양된 균들은 약  $1 \times 10^6$ 의 접종량으로 25ml의 액체 배지에서 사용하였다. 2 주일마다 한천 배지에서 계대 배양된 이 균들은 액체 또는 고체 배지에서 37°C(*Aspergillus*와 *Saccharomyces* 배양은 30°C)로 24-48 시간 동안 정지 또는 진탕(60rpm) 배양하였다.

#### 다. 균수 측정 방법

배양한 뒤 0.1 ml의 배양액을 꺼내 4.9ml 0.85% NaCl이 든 시험관에 넣고 잘 섞은 후 동일한 NaCl이 든 다른 시험관들에서 1/50의 배수로 연속 희석한 뒤, 각각 0.1ml을 petridish에 도포한 다음 24-48시간 후 생균 수를 측정하였다. 대장균의 경우 희석한 용액 0.1ml을 꺼내 0.85% NaCl 0.9ml 등장액과 혼합한 다음 Petrifilm plate에 도포하여 기포가 생긴 검은 반점의 개수를 세었다. 일반적으로 균수가 약 50-200 범위에 들어오는 petridish나 petrifilm을 골라 여기에 희석 배율을 곱하여 원래 용액에 함유된 균수를 측정하였다.

#### 라. 인공 위액에서의 pH 저항성

멸균된 50ml 배지에 각 균을 접종한 뒤 30°C 또는 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액 1ml를 각각 50ml의 인공 위액(1,000U pepsin/ml NB, pH 3 또는 4)과 pH7의 NB 용액(50ml, 대조군)에 넣고 2시간 동안 37°C(*Aspergillus*와 *Saccharomyces*는 30°C)에

서 정치시킨 뒤 이중 0.1ml를 취해 0.85% NaCl로 연속 희석시켜 petridish에서 배양하고 생균수를 측정하였다. 인공 위액의 조제는 Kobayashi 등(27)의 방법을 변형한 것으로 배양액의 pH를 1N HCl로 3 또는 4로 조정하고 pepsin을 1,000U/ml 되도록 첨가하였다.

#### 마. 담즙산에 대한 저항성

0.22 $\mu$ m로 여과 제균된 돼지 담즙산(Sigma)을 0.3% 첨가한 배양액에, 인공 위액의 pH에서 생존한 균을 접종하였다(61). 37 $^{\circ}$ C(*Saccharomyces*와 *Aspergillus* 배양은 30 $^{\circ}$ C)에서 24시간 배양 후 0.1ml를 petridish에 도말하고 이것을 30 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양 후 나타난 생균수를 측정하였다.

#### 바. 췌장액에 대한 저항성

0.22 $\mu$ m로 여과 제균된 돼지 췌장액(Sigma)을 0.5% 첨가한 배양액에 인공 위액의 pH와 담즙산에서 생존한 균을 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C(*Saccharomyces*와 *Aspergillus* 배양은 30 $^{\circ}$ C)에서 24시간 배양 후 0.1ml를 petridish에 도말한 뒤 이것을 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양 후 나타난 생균수를 측정하였다.

#### 사. 대장균 증식 억제력

*E. coli* 08을 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 다음 배양액 1ml를, 동일한 조건에서 자란 생균제의 배양액 1ml와 혼합한 뒤 새 NB, MRS, 또는 FT 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C(*Saccharomyces*와 *Aspergillus* 배양은 30 $^{\circ}$ C)로 24시간 배양하였다. 이때 사용한 생균제는 인공 위액과 담즙산에서 견딘 균락이었다. 24시간 후 생존한 대장균은 *E. coli* 선택 배지(3M petrifilm)에서 배양 후 그 집락 수를 측정하였고 이때 그 감소 정도를 증식 억제력으로 평가하였다. 여러 다른 배지에서 대장균의 증식 정도는 각각 다르므로 생균제 검사를 위해 사용한 각 배지에 대장균만을 키워 이 실험을 위한 비교 대조균으로 사용하였다.

#### 아. *Salmonella* 증식 억제력

*S. choleraesuis* 증식 억제력 검사 조건은 대장균에서와 같으나 *Salmonella* 선택 배지로 bismuth-sulfite agar를 사용하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. *Bacillus*에 대한 실험

*Bacillus*의 몇 종은 식품 제조에 이용되어 이미 그 안전성이 확립되어 있고 포자의 형성으로 열이나 산, 습기에 강하며, bacitracin과 같은 폴리펩타이드형 항생물질을 생성하기 때문에 생균제로서 적합한 특성을 갖는다. 따라서, 이러한 조건을 갖췄다고 생각되는 *B. subtilis*와 *B. polyfermenticus*를 대상으로 생균제 특성을 조사하였다.

#### 1) 내산성 및 내담즙성

먼저 정체기에 막 도달된 이들 균을 pH 4의 인공 위액 배지에서 2시간 동안 정치 후 생존률을 조사하였다(Table II-1-1). 같은 *Bacillus. subtilis*라도 그 strain에 따라 내산성과 내담즙성이 다르고, 특히 KCTC 1666 과 J11은 자라지를 못했다. 이들 중 *B. polyfermenticus*의 균수는 대조군에 비해 약 1/200로 감소되어 가장 생존률이 높았다. 같은 조건하에 pH 3으로 조정했을 때, *B. polyfermenticus*는 대조군에 비해 약 1/800, *Bacillus. subtilis* B11은 1/2,300의 감소율을 보였다. *B. polyfermenticus*는 20여 종의 소화 효소를 생성하여 다양한 영양원을 이용할 수 있고 빠른 성장률을 보이기 때문에 생균제로서 잠재적 가능성을 가진 균이다. *Bacillus. subtilis* B11도 다른 *subtilis*에 비해 생존율이 높았는데, 이는 상업적으로 pH에 저항성을 가진 균주를 선별하였기 때문인 것 같다.

인공 위액에 견딘 *Bacillus. subtilis* B11과 *Bacillus. polyfermenticus*를 분리해 장내 균총으로서 견디어야 하는 기준 농도인 0.3%의 담즙산 농도에서 배양 후 생존율을 조사했다(Table II-1-1). 산에 대한 저항성의 결과와는 달리, 담즙산 존재하의 B11 생존율은 약 4.3%로 *polyfermenticus*의 1.3% 보다 약 3배 높았다. 즉, 담즙산은 *Bacillus*의 성장을 억제하며, 담즙산에 대한 저항성은 *Bacillus* 종류에 따라 차이를 보였다.

Table II-1-1. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Bacillus* species

Strain	Viable cell No.(× 10 <sup>5</sup> cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2h of incubation at pH 4.0			
<i>subtilis</i> KCTC 1666	2,200	0	0.00
<i>subtilis</i> B11	4,700	6	0.13
<i>subtilis</i> J11	3,050	0	0.00
<i>polyfermenticus</i>	2,400	12	0.50
Bile acid tolerance in the medium containing 0.3% porcine bile extract after 24h of incubation			
<i>subtilis</i> B11	3,000	130	4.33
<i>polyfermenticus</i>	2,800	38	1.36

이 결과에서 중성 및 약 알칼리에서 잘 자라는 *B. subtilis*는 일반적으로 산과 담즙산에 강하지 않으나, 균주의 선발을 통하여 이들에 저항성이 있는 것을 분리하는 것이 가능하다고 볼 수 있었다.

## 2) 췌장액에 대한 저항성

산과 담즙산에 견딘 균들을 분리해 0.5%의 돼지 췌장액이 섞인 농도에서 배양하고 그 생존률을 조사하였다(Table II-1-2). 췌장액의 존재 하에서 *B. subtilis* B11과 *B. polyfermenticus* 균의 수는 각각,  $1.27 \times 10^{10}$ 과  $1.8 \times 10^9$ 을 보여 췌장액을 첨가하지 않은 대조군의 각 균수  $8.12 \times 10^8$ 과  $2.06 \times 10^8$ 에 비해 약 10배 증가되었다. 따라서, 췌장액 중의 많은 약 알칼리성 분해 효소들은 이들 균의 성장을 위한 단백질원과 증식 인자로 사용되는 것으로 생각되었다.

Table II-1-2. Effect of 0.5% pancreatic juice on the growth of some microorganisms used

Strain	Viable cell No.(× 10 <sup>5</sup> cfu/ml)	
	No treatment	Treatment
<i>B. subtilis</i> B11	8,120	1.27×10 <sup>5</sup>
<i>B. polyfermenticus</i>	2,060	1.8 ×10 <sup>4</sup>
<i>Cl. butyricum</i> KCTC 1786	2,050	7,600
<i>Cl. butyricum</i> KCTC 1905	1,400	4,000
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3155	3,200	7,900

### 3) *E. coli*와 *Salmonella* 증식 억제력

산, 담즙산, 그리고 췌장액에 견딘 *Bacillus*를 사용해 동물에서 설사를 유발하는 *E. coli* O8 및 *Salmonella*의 증식 억제 효과를 24시간 혼합 배양 후 조사하였다(Table II-1-3). 대장균 성장 억제는 *B. subtilis* B11로는 효과가 없었지만 *B. polyfermenticus*에서는 대장균의 농도를 대조군에 비해 약 1/500로 감소하였다. 한편, *Salmonella*인 경우 *subtilis* B11의 억제력은 마찬가지로 별 효과가 없었던 반면 *polyfermenticus*의 생육 억제에 의한 *Salmonella*수는 대조군에 비해 약 1/10로 감소되었다.

### 4) 생균제로서 *Bacillus*의 평가

이상의 결과로 미루어 볼 때, *in vitro* 상태에서 *Bacillus. polyfermenticus*는 다른 *Bacillus*들 보다 환경 적응력이 뛰어났고, 설사 유발 대장균 및 *Salmonella*에 대한 생육 억제력도 우수하였다. 또한, 배양 후 냉동 건조 시킨 이 균 1g을 취해 eppendorf tube에 넣어 밀봉하고 37°C에서 42일 까지 보관한 후 균의 생존율을 조사한 결과 112%의 값을 보였다. 즉, 보관시에 균 생존율은 상당히 높은 온도에서 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 또한, 증식 상태의 균이 아닌 포자 상태로의 투여시는 pH 및 담즙산에 대한 생존율의 증가를 예상할 수 있어 probiotics로서 충분한 가능성을 가진다고 평가되었다.

Table II-1-3. Growth inhibition of pathogens after co-incubation with *Bacillus subtilis* B11 or *Bacillus polyfermenticus*.

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml) of pathogens	
	Without coincubation	With coincubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in NB medium after 24hrs of coincubation		
<i>subtilis</i> B11	2,200	1,600
<i>polyfermenticus</i>	2,200	4
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in NB medium after 24hrs of coincubation		
<i>subtilis</i> B11	3,800	2,200
<i>polyfermenticus</i>	3,800	320

#### 나. *Clostridium butyricum*에 대한 실험

##### 1) 내산성 및 내담즙성

*C. butyricum*균들은 혐기적으로 자라면서 acetate, butyrate와 항생물질인 butyricin을 생산하는 것으로 알려져 있다(65). 조사한 균들은 *Bacillus*와는 달리 pH 3의 인공 위액에서 자라지 못했고, pH 4에서는 KCTC 1786인 경우 0.6%의 생존률을 보여 균이 증식하고 있는 상태에서는 pH에 민감함을 보였다(Table II-1-4). 그러나, pH 4에 견딘 균은 0.3% 담즙산이 함유된 배지에서 약 10%의 생존률을 나타내 담즙산에 큰 저항력을 보였다(Table II-1-4).

##### 2) 췌장액에 대한 저항성

산과 담즙산에 견딘 균락의 췌장액에서 배양은 *Bacillus*에서와 마찬가지로 대조군에 비해 약 2.8-3.7배 더 잘 자라는 것으로 보아(Table II-1-2), 이 균이 췌장액을 영양원이나 성장 증식 인자로 사용하는 것으로 보인다.



Table II-1-4. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Clostridium butyricum*

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2h of incubation at pH 4.0			
KCTC 1787	1,720	1.7	0.23
KCTC 1871	1,560	0.5	0.09
KCTC 1904	1,800	0.3	0.03
KCTC 1905	1,200	5.4	0.45
KCTC 1786	2,800	17	0.61
Bile acid tolerance after 24h of incubation in the medium containing 0.3% porcine bile extract			
KCTC 1905	2,200	212	9.64
KCTC 1786	2,700	250	9.26

### 3) *E. coli*와 *Salmonella* 증식 억제력

산과 담즙산, 그리고 췌장액에 견딘 균들의 대장균과 *Salmonella*에 대한 증식 억제 능력을 조사한 결과 24시간 배양 후 KCTC 1786은 이 균들의 수를 각각 약 1/3과 1/10로 감소시켜 *B. polyfermenticus*에는 미치지 못하지만 유해균 억제 작용이 있음을 보였다(Table II-1-5).

### 4) 생균제로서 *Clostridium*에 대한 평가

*C. butyricum*은 내산성이 약하나 낮은 pH에서 견디어낸 것들은 비교적 담즙산에 견디는 능력이 있고 유해균 특히 *Salmonella*의 억제 작용이 있다고 할 수 있다. *B. polyfermenticus*와 마찬가지로 포자를 형성하는 균이므로 저장 중에 활성물이 쉽게 떨어지지 않아 보관하기가 용이하며, 포자화한 상태로 동물에 투여하는 경우 소장까지의 생존율은 높아질 수 있을 것이다.

Table II-1-5. Growth inhibition of *E. coli* and *S. choleraesuis* after coincubation with *Clostridium butyricum*

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml) of pathogens	
	Without coincubation	With coincubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in FT medium after 24hrs of coincubation		
KCTC 1905	720	810
KCTC 1786	720	260
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in FT medium after 24hrs of coincubation		
KCTC 1905	940	270
KCTC 1786	940	82

다. *Lactobacillus acidophilus*의에 대한 실험

1) 내산성 및 내담즙성

*Lactobacillus*속은 김치, 치즈, 요구르트와 같은 식품의 제조에서 중요한 미생물로서 생균제로서 가능성이 가장 잘 연구되어 왔다. 조사한 *L. acidophilus* 균주들의 산에 대한 생존율은 pH 4에서 40-50% 수준이었으며, 이들 중 가장 빠르게 증식했던 KCTC 3155는 pH 3과 4에서 각각 22%와 51%의 생존율로 위산에 매우 강한 균주임을 보여주었다(Table II-1-6). 그러나, 이 균은 0.3%의 담즙산에는 취약하여 대조군에 비해 약 1/10<sup>5</sup>로 그 수가 급격히 감소하였다(Table II-1-6). 이러한 담즙산에 대한 약한 특성은 *Lactobacillus*에서 보이는 일반적인 현상인 것 같다(59). 담즙의 성분은 공액 담즙산(conjugated acids)으로 이루어져 있는데 미생물이 공액 부위를 끊는 효소를 가지고 있으면 담즙의 존재에 취약하다고 보고된 바 있다(14). 아마도, KCTC 3155도 이러한 작용 때문에 담즙산의 존재 하에서 생존율이 급격히 줄어들었을 수 있다. 또한, 산과 담즙산에 견딘 균은 체장액의 존재 하에서 약 2.5배 더 잘 자람을 확인할 수 있었다(Table II-1-2).

**Table II-1-6. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Lactobacillus acidophilus***

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance at pH 4.0 after 2h of incubation			
KCTC 3146	850	360	43.25
KCTC 3149	950	340	35.80
KCTC 3150	1,900	780	41.05
KCTC 3153	1,300	620	47.70
KCTC 3155	2,700	1,380	51.11
Acid tolerance at pH 3.0 after 2h of incubation			
KCTC 3155	3,800	836	22.00
Bile acid tolerance in the medium containing 0.3% porcine bile extract after 24h of incubation			
KCTC 3150	2,200	2 × 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>4</sup>
KCTC 3155	3,800	3 × 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>4</sup>

2) 위장액에 대한 저항성

앞의 Table II-1-2에서 보여주고 있는 것처럼 다른 균주들과 마찬가지로 *L. acidophilus*의 위장액이 있는 가운데 더욱 활발한 증식율을 나타내어 위장액이 이들의 성장에 오히려 도움을 주고 있음을 알 수 있다.

3) *E. coli*와 *Salmonella* 증식 억제력

pH 3에서도 22%의 생존율을 보였던 KCTC 3155를 대장균(14시간 혼합 배양) 또는 *Salmonella*(24시간 혼합 배양)와 함께 배양 후 생육 억제 능력을 조사한 결과 이들 유해균의 성장을 100% 억제시키는 것을 보였다(Table II-1-7). *L. acidophilus*는 자라는 동안 배양액의 pH를 저하시키고, acidolin, acidophilin, lacacin B의 항생제를 생성하는 것으로 알려져 있다(21). 유해균의 성장 억제 요인은 확실치 않지만 14시간 배양 동안 *L. acidophilus*배지의 pH가 6.2로부터 4.6으로 떨어지는 것으로 보아 pH 하강에

따른 유해균 감소 효과를 추정할 수 있었다. 유산균, 낙산균 복합 제제로서 정장제로 사용되고 있는 바이스리(제일 제당)는 연속 유동 배양시 접종 후 48-72시간만에 *E. coli* O-157이 소멸되었다고 보고한 바 있다(7). 대장균 및 *Salmonella*에 대한 미생물학적 길항작용 관점에서 KCTC 3155의 단독 작용에 의한 억제 효과는 이들 유산균, 낙산균의 상업적 복합 제제와 비교될 수 있을 정도로 뛰어남을 보이고 있다.

Table II-1-7. Growth inhibition of pathogens after coincubation with *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3155.

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml) of pathogens	
	Without coincubation	With coincubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in MRS medium after 14h of coincubation		
KCTC 3155	250	0
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in MRS medium after 24h of coincubation		
KCTC 3155	185	0

#### 4) 생균제로서 *Lactobacillus*에 대한 평가

이제까지 검토한 균주들 중에서 *Lactobacillus*는 낮은 pH에 견디는 능력과 *E. coli*와 *S. choleraesuis*의 증식을 억제하는 탁월한 능력을 보여주었다. 그러나 이들이 담즙산에 견디는 능력이 매우 낮았다. 따라서, 담즙산에 대한 저항성 문제가 해결된다면, *L. acidophilus*는 장 유해균을 제거하는 매우 우수한 생균제로서 가능성이 있다고 할 수 있다.

#### 라. *S. cerevisiae*와 *A. oryzae*에 대한 실험

사용한 *S. cerevisiae*균주들은 pH 3에서 2 시간 노출 후 1/20-1/25의 균 감소율을 보여 비교적 산에 강한 특성을 보여주었다. 또한 pH 4에서 산에 대한 저항성은 pH 3과 비슷하였다(Table II-1-8). 이들 중 빠른 성장을 보인 KCTC 7928의 담즙산에 대

한 저항성을 조사하였다(Table II-1-8). 세균들과는 달리 0.3% 담즙산 첨가는 *S. cerevisiae*의 성장을 오히려 약간 증가시켰는데 이는 아마도 세균과는 다른 효모의 두터운 세포벽 특징 때문인 것 같다. 대장균과 *Salmonella*를 KCTC 7928과 24시간 혼합 배양시 이들 유해 균수는 각각  $5.5 \times 10^6$ ,  $4.3 \times 10^6$ 으로 대조균의 균수인  $3.3 \times 10^6$ ,  $2.8 \times 10^6$ 보다 오히려 약간의 증식 효과가 있었다(Table II-1-9). 한편, 동물 사양 실험에서 *S. cerevisiae*가 첨가된 사료를 먹은 젖소나 닭은 단순 사료만 먹은 것들에 비해 산유량과 산란률이 각각 증가되는 것으로 보고되었다(41,64). 이러한 결과들은 효모의 체세포 분해 성분이 동물의 영양원으로 이용되고, 또한 분비 효소들에 의해 생성된 물질들이 유익 균의 증식을 도와 이들을 장내 우세 균총으로 유지시켜주므로 유해균이 들어오더라도 이들 성장을 억제하는 간접적 효과 때문일 것으로 추정된다.

Table II-1-8. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2hrs of incubation at pH 4.0			
KCTC 1201	620	29	4.68
KCTC 1426	940	34	3.61
KCTC 1552	750	36	4.80
KCTC 7928	380	16	4.21
J2	630	40	6.35
Bile acid tolerance after 24hrs of incubation in the medium containing 0.3% porcine bile extract			
KCTC 1426	750	824	109.87

한편, *A. oryzae*의 배양은 일반 세균들의 성장에 비해 자라는 속도가 느렸으며 처음 24시간 배양 동안 *E. coli*나 *Salmonella*의 성장이 오히려 약간 증가되었다. 이러한 효과는 *A. oryzae*와 *L. acidophilus*를 MRS 배지에서 30도로 24시간 혼합 배양시 *L. acidophilus*의 균수가 1.3-1.7 배 증가되는 것에서도 나타났다. 최근의 한 보고(62)는

*A. oryzae*가 접종된 메주를 일주일 이상 닭에게 먹인 결과 닭의 변에서 *A. oryzae* 및 젖산균이 증가되고 대장균의 수는 현저히 줄어들었다는 결과를 보였는데 이 효과가 메주콩의 영향 때문인지 *A. oryzae* 때문인지는 확실하지 않다. 앞의 결과들을 고려할 때 한가지 가능성은 *A. oryzae*에 의한 직접적인 대장균 감소 효과라기 보다 *A. oryzae*의 분비 효소가 콩을 분해시켜 젖산균 성장 촉진 인자를 분비하고 이에 따라 증가된 젖산균이 대장균을 저해했다고 생각할 수 있다.

*S. cerevisiae*나 *A. oryzae*는 포자를 형성할 수 있기 때문에 이들은 저장이나 가공 과정, 또는 장내 환경에 잘 견딜 수 있다. 또한, 이들의 지속적인 사용은 동물 사료 이용률의 증대, 장 균총의 개선과 같은 간접적 효과를 기대할 수 있기 때문에 생균제로서 바람직한 미생물로 생각된다.

Table II-1-9. Growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1426 and *Aspergillus oryzae* KCTC 6292 on the pathogens after 24hrs coincubation

Strain	Viable cell No.(x 10 <sup>5</sup> cfu/ml) of pathogens	
	Without coincubation	With coincubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in YM broth(KCTC 1426) and in potato dextrose broth(KCTC 6292)		
KCTC 1426	330	550
KCTC 6292	150	240
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in FT medium after 24h of coincubation		
KCTC 1426	280	430
KCTC 6292	320	360

### 3. 적요

Probiotics로 사용할 수 있는 종균을 선별하기 위하여 *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Saccaromyces* 그리고 *Aspergillus*에 속하는 총 23개 균들을 대상으로

가축의 장내 환경 즉, 낮은 pH와 담즙산 그리고 체장액에 견디는 능력과 *E. coli* 와 *salmonella*와 같은 유해 세균의 증식을 억제하는 능력에 대하여 일련의 차례의 실험을 실시하였다. 그 결과 *Bacillus*와 *Clostridium*에 속하는 균들은 낮은 pH와 담즙산에 견디는 능력이 약했으며, 이에 견디는 균들 중 *B. polyfermenticus*는 대장균을 억제하는 능력이 특히 좋았으며 *Salmonella* 생육 억제 능력도 상당히 좋았다. 한편, *C. butyricum* KCTC 1786 은 *E. coli*를 억제하는 능력이 약한 반면 *Salmonella*를 억제하는 능력이 보다 우수하였다.

*Lactobacillus*에 속하는 균들은 낮은 pH에 잘 견디는 편이었으며 *E. coli*와 *Salmonella*를 억제하는 능력이 다른 균들에 비해 아주 탁월하였으나 담즙산에 견디는 능력이 매우 약한 특성을 보였다. 그 중 *L. acidophilus* KCTC 3155는 이러한 특성을 잘 보여주었다. 효모 *Saccharomyces*들은 낮은 pH에 강하고 담즙산에 영향을 받지 않았으나 유해 세균인 *E. coli*와 *Salmonella*의 증식을 오히려 도와주는 효과가 있었고 *Aspergillus*들도 *Saccharomyces*와 마찬가지로 유해 세균들의 증식을 도와주고 자신들의 성장 속도가 너무 느려 본 연구에서 추구하는 probiotics로는 적합하지 않다고 생각되었다. 따라서 본 연구의 결과에 따라 대체로 낮은 pH에 견디는 능력 또는 담즙산에 견디는 능력이 약하기는 하나 동물실험을 통해 *B. polyfermenticus*, *C. butyricum* KCTC 1786 그리고 *L. acidophilus* KCTC 3155로 시제품을 제조하였다.

## 제 2 절 1차 시제품의 생산

앞의 제1절에서 기술한 실험 결과들을 토대로 선발한 종균을 20ℓ 및 5ℓ 실험실 발효조를 이용하여 배양한 다음 *B. polyfermenticus*는 냉동건조 하였고( $1.3 \times 10^{10}$ CFU/g) *C. butyricum*과 *L. acidophilus*는 원심분리하여 농축액을 만든 다음 멸균한 *S. cerevisiae* culture에 흡착 건조하여 제품화하였다. *S. cerevisiae*는 종균을 배양한 다음, 균을 분리하지 않고 배양액 전체를 저온 건조하여 만든 제품(제일화학)을 그대로 사양시험에 이용하였다. 이들은 시제품의 생균 수가  $10^9$  cfu/kg 씩 포함하도록 하여 사료에 0.1% 수준으로 첨가하여 사용할 때 실제 사료에 포함되는 생균 수는  $10^6$  cfu/kg이 함유될 수 있도록 하였다.

## 제 3 절 1차 시제품의 broiler에 대한 급여 효과

### 1. 서론

가축의 장내 조건에서 견디는 능력 즉, 낮은 pH와 담즙산에 저항하는 능력과 장내 유해 세균인 *E. coli*와 *Salmonella*의 증식을 억제할 수 있는 능력을 지닌 3가지 균주, *B. polyfermenticus*, *C. butyricum* KCTC 1786 그리고 *L. acidophilus* KCTC 3155로 제조한 probiotics 시제품들이 닭의 성장과 사료 이용에 어떻게 작용하는가 검토하기 위하여 2회에 걸친 broiler 사양시험을 실시하였다. 가능한 빠른 시일 내에 이들 시제품들의 성능을 검토하기 위하여 사육기간이 짧은 broiler 사양시험을 택하였으며, 일차적으로 이들 시제품 각각의 성능을 시험하였고, 다음으로 이 시제품들을 복합적으로 혼용하여 multi-probiotics로서 어떠한 효과가 나타나는지를 시험하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 시험 1

1일령 하이브로 수컷을 (주)하림으로부터 구입하여 5개 처리구 4반복으로 반복당 10수씩 체중을 비슷하게 측정 후 평사에 펜벨로 배치하였다. 처리구 1은 대조구로서 생균제를 첨가하지 않았고, 4개의 처리구 2, 3, 4, 5는 각각 *S. cerevisiae*(S), *C. butyricum*(C), *L. acidophilus*(L), *B. polyfermenticus*(B)를 함유하는 시제품을 0.2%씩을 첨가하여 각 처리구 사료의 생균수가  $10^6$  cfu/kg 이상이 포함되도록 하였다. 본 시험은 1997년 6월 25일부터 7월 30일까지 전북대학교 농과대학 부속 동물 사육장에서 5주간 시행하였으며, 전 시험기간 동안 물과 사료는 무제한으로 급여하였고, 시험기간 내내 24시간 점등하였다. 시험 사료는 옥수수과 대두박을 기초 사료로 하였고, 단백질 및 에너지 함량은 우리 나라 사료 산업에서 이용하는 관행적인 수준으로서 전기 3주간은 조단백질 21%와 대사에너지 3,200cal/g으로 하였으며, 후기 2주간은 조단백질 19%와 대사에너지 3,150cal/g으로 하였다(Table II-3-1). 병아리들의 체중과 사료 섭취량은 매주 측정하였다.



Table II-3-1. Basal diet compositions for a broiler feeding trial (Expt. 1).

Ingredients	Formula(%)	
	Starter	Finisher
Corn	55.24	59.20
Soybean meal	31.84	25.65
Wheat middlings	1.63	5.00
Soybean oil	5.00	3.85
Fish meal	3.00	3.00
Dicalcium phosphate	1.52	1.54
Limestone	0.85	0.87
Salt	0.40	0.40
Others <sup>1</sup>	0.52	0.52
<u>Chemical composition, estimated</u>		
ME, kcal/g	3,200	3,150
CP, %	21.00	19.00
Methionine, %	0.455	0.402
Lysine, %	1.292	1.127
Ca, %	0.900	0.900
P, %	0.450	0.450

<sup>1</sup>Others include vitamin premix 0.2%, mineral premix 0.2%, and DL-methionine 0.12%.

#### 나. 시험 2

시험 2에서 이용한 생균제는 시험 1에서의 동일한 시제품이었으며, 시험 1에서 시제품에 대한 병아리들의 반응이 전기 3주 동안에만 뚜렷하게 나타났으므로 시험 2에서는 시험기간을 3주간으로 하였고, 1997년 9월 5일부터 9월 26일까지 전북대학교 부속 동물사육장에서 시행하였다. 본 시험은 6개의 처리구로 대조구는 생균제를 첨가하지 않았고, 처리구 2, 3, 4, 5는 각각 0.2% *S. cerevisiae*(S), 0.2% S + 0.2%의 *C. butyricum*(C), 0.2% S + 0.2% *L. acidophilus*(L), 0.2% S + 0.2% *B. polyfermenticus*(B)로 하였으며, 처리구 6은 0.2% S + 0.1% C + 0.1% L + 0.1% B로 하였다. 시험사료의 배합비 및 증체량과 사료 섭취량 측정은 시험 1과 동일하게 시행하였다. 전 처리구간에 통계적인 차이는 SAS(50)의 ANOVA를 이용하여 분산분석을 한 후 Duncan's new multiple range test(55)에 의하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 시험 1

시험기간 중 병아리들의 체중 변화와 사료 섭취량 및 사료이용율을 아래 Table II-3-2와 Table II-3-3에 각각 보여주고 있다. 시제품에 대한 병아리들의 성장 및 사료 섭취 반응은 주로 성장 초기 3주 동안에 대조구와 유의한 차이를 나타내었으며, 대체로 10~17% 정도 성장촉진 효과와 5~14% 정도의 사료 섭취량 증가 효과가 있었다. 그러나 사료이용율에는 대조구와 차이가 없었으며, 각 시제품들간에는 증체와 사료 섭취량에 수치상의 차이는 있었으나 유의성이 없었다.

시험 후반기(4~5주) 동안에 시제품을 급여한 병아리들은 시제품을 급여하지 않은 대조구에 비하여 증체량, 사료 섭취량 및 사료이용율 개선 효과를 나타내지 않았다. 그러나 생균제 시제품을 급여한 병아리들은 초기에 성장이 촉진된 효과에 힘입어 전체 기간 동안의 증체량과 사료 섭취량이 유의하게 많은 것으로 나타났다. 사료요구에 있어서는 시험 전반기에 이어 후반기에도 그리고 전체적으로 보아도 또렷한 개선 효과를 보이지 않았다. 시험 후반기 *L. acidophilus* 시제품을 급여한 병아리들의 성장이 대조구에 비해 통계적 유의차는 아니나 약간 저조한 성적을 보였는데 이는 시험 도중에 있었던 이 처리구의 2개 펜 바닥에 일시 물이 넘친 사고 때문으로 생각된다.

Table II-3-2. Effect of dietary probiotics on body weight gain of broiler chicks(Expt.1).

Treatment	Number of Rep.	Animals per Rep.	Weight gain(g/chick)		
			0~3(주)	4~5(주)	Total
Control	4	10	516.0 <sup>b</sup>	736.7 <sup>ab</sup>	1252.7 <sup>c</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	4	10	571.9 <sup>a</sup>	773.9 <sup>a</sup>	1352.2 <sup>ab</sup>
<i>C. butyricum</i>	4	10	605.7 <sup>a</sup>	776.1 <sup>a</sup>	1381.8 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i>	4	10	603.1 <sup>a</sup>	697.6 <sup>b</sup>	1300.7 <sup>bc</sup>
<i>B. polyfermenticus</i>	4	10	593.2 <sup>a</sup>	722.3 <sup>b</sup>	1315.5 <sup>abc</sup>

<sup>a c</sup> Means within a column with no common superscripts are significantly different(P<0.05).

Table II-3-3. Effect of dietary probiotics on feed intake and feed conversion ratio(FCR) by broiler chicks (Expt. 1).

Treatment	Number of Rep.	Animals per Rep	Feed intake(g/chick)			FCR(feed/gain)		
			0~3	4~5	Total	0~3	4~5	Total
Control	4	10	.836 <sup>d</sup>	1.502 <sup>c</sup>	2.338 <sup>c</sup>	1.663	2.075 <sup>b</sup>	1.895
<i>S. cerevisiae</i>	4	10	.879 <sup>c</sup>	1.649 <sup>a</sup>	2.525 <sup>a</sup>	1.588	2.173 <sup>ab</sup>	1.902
<i>C. butyricum</i>	4	10	.926 <sup>b</sup>	1.631 <sup>a</sup>	2.557 <sup>a</sup>	1.547	2.128 <sup>ab</sup>	1.866
<i>L. acidophilus</i>	4	10	.952 <sup>a</sup>	1.510 <sup>c</sup>	2.462 <sup>b</sup>	1.603	2.181 <sup>ab</sup>	1.900
<i>B. polyfermenticus</i>	4	10	.944 <sup>ab</sup>	1.572 <sup>b</sup>	2.519 <sup>a</sup>	1.622	2.223 <sup>a</sup>	1.915

<sup>a-c</sup> Means within a column with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

#### 나. 시험 2

시험 1에서 생균제 시제품의 급여는 육계 병아리의 성장 전기 3주 동안에만 팔목할 만한 효과가 있었으므로 multi-probiotics의 효과를 검증하는 본 시험에서는 병아리의 성장 초기 3주 동안만 반응을 보기로 하였다(Table II-3-4). 혼합 생균제 첨가구인 S+L, S+C, S+B, S+L+B+C 급여구는 대조구 및 S 단일 급여에 비하여 증체량, 사료 섭취량 및 사료요구율이 모두 개선되는 경향을 보였으나 처리구간에 통계적 유의하는 나타나지 않았다. 혼합 생균제의 사료 첨가 급여는 육계의 성장을 현저하게 개선할 것으로 기대하였으나 처리구간에 통계적 유의차가 없었던 것은 시험 1에서와는 달리 병아리 개체간의 체중 변이가 컸었고, 한편으로는 여러 종류의 생균제를 혼합하여 급여했을 때 기대했던 상승 효과와는 달리 장내에서 생균제 상호간 또는 장내 기타 균들과 경쟁적으로 작용하였을 가능성이 있었을 것으로 생각되었다. 생균제의 혼합 급여시 대체로 사료 섭취량이 유의하게 증가하였고, 증체량과 사료이용율은 일관되게 개선되는 경향을 보여준 것은 비록 통계적으로 유의한 것은 아니었지만 어느 정도의 multi-probiotics 효과는 있는 것으로 생각되어진다.

Table II-3-4. Effect of dietary probiotics or multiprobiotics on weight gain, feed intake and feed conversion ratio (FCR) by broiler chicks for Expt 2.

Treatment	Weight gain	Feed intake(g)	FCR(feed/gain)
Control	531.6	908.3 <sup>d</sup>	1.743
S	550.9	904.5 <sup>d</sup>	1.688
S+C	567.9	960.8 <sup>a</sup>	1.729
S+L	553.5	937.4 <sup>ab</sup>	1.725
S+B	561.0	910.7 <sup>bcd</sup>	1.660
S+C+L+B	565.8	934.6 <sup>abc</sup>	1.686

<sup>a-d</sup>Means within a column with no common superscripts are significantly different (P<0.01).

#### 4. 적요

낮은 pH와 담즙산에 저항하는 능력 그리고 유해 세균인 *E. coli*와 *Salmonella*의 증식을 억제하는 능력을 기준으로 총 23개 균주 중 *B. polyfermenticus*, *C. butyricum* KCTC 1786, 그리고 *L. acidophilus* KCTC 3155를 선발하여 probiotics 시제품을 생산하여 broiler에 대한 반응을 검증하기 위하여 2회에 걸친 사양시험을 실시하였다.

이 생균제 시제품들을 단일 급여한 첫 번째 시험에서 사료 섭취량을 증가시키고 병아리들의 증체량을 많이 하는 효과가 있었다. 이런 효과는 주로 병아리 성장 초기에 나타났으며, 사료 요구율을 개선하지는 못하였다. 시제품을 복합하여 multi-probiotics 형태로 급여한 두 번째 시험에서는 사료 섭취량은 유의성 있게 많아졌으나, 증체량과 사료요구율은 수치상으로만 일관되게 유리하게 나타났다. *S. cerevisiae*를 포함하여 세 가지 생균제를 모두 함께 급여한 병아리들의 증체량이 가장 많았고, 사료요구율도 개선되는 경향을 나타내었으나, 전반적으로 통계적 유의성 있는 효과를 나타내기에는 미흡한 효과라고 할 수 있다.

## 제 4 절 1차 시제품의 piglet에 대한 급여 효과

### 1. 서론

본 연구에서 선발한 균주로 제조한 시제품의 양돈에 대한 성능을 검증하기 위하여 생균제의 급여 효과가 가장 잘 발현될 수 있다고 믿어지는 아주 어린 젓먹이 자돈을 대상으로 단기 사양시험을 실시하였다. 어린 자돈들에 대한 생균제의 급여 효과는 사육 환경에 의해서도 영향을 받을 수 있는 바 위생적으로 열악한 사육 환경에서 자돈의 성장과 사료 이용에 본 연구에서 개발한 시제품이 어떻게 작용하는지 알아보기 위해 양돈 환경이 좋지 않은 지역의 한 양돈 농장(전북·삼례)을 시험 장소로 선택하여 본 사양시험을 실시하였다. 본 시험에서는 시제품의 개별 첨가구와 4가지 시제품을 혼용하는 multi-probiotics 처리구를 함께 시험하였다.

### 2. 재료 및 방법

평균 연령이 2주령 되는 자돈(LY×LW×LY) 90두를 조기 이유시켜 18두씩 5개군, 3반복에 반복 당 6두씩으로 나누어 생균제를 첨가하지 않는 대조구와 *S. cerevisiae*(S), *L. acidophilus*(L), *B. polyfermenticus*(B), 그리고 혼합 생균제로 S+L+B 세 가지 생균제를 함께 혼합하여 급여하는 처리구에 배치하였다. 앞의 broiler 시험에서와 달리 본 양돈 사양시험에서 *C. butyricum*을 제외시킨 것은 이 균주가 다른 것에 비해 내산성이나 내담즙성이 약한 편이었고 다량 생산을 위한 배양 시 수확량이 가장 적었기 때문이었다.

본 시험을 위한 기본 사료의 배합례와 성분 함량은 Table II-4-1에 보여주는 바와 같은데, 항생제는 전혀 함유하지 않도록 하였으며, 생균제 시제품을 함유하는 처리구들의 사료는 각각의 생균수가  $10^6$  cfu/kg 이상이 되도록 0.2%수준에서 첨가하였으며, 혼합 생균제 급여는 0.2%S+0.1%L+0.1%B로 하였다. 시험은 28일간 진행되었으며 사료 급여는 가루 형태로 하여 처음에는 젓먹이 사료 급여 접시에 2주간 급여하였고, 다음 2주간은 젓먹이 돼지 사료 급이기에 넣어 무제한 섭취할 수 있도록 하였다. 돼지들의 체중은 시험 시작, 2주, 그리고 4주 후 종료시 개체별로 측정하였고, 사료 섭취량은 전 시험 기간 동안 급여량을 누적하여 각 돈방 별로 그룹 측정하였다.

Table II-4-1. Basal diet compositions for a piglet feeding trial (Expt. 1).

Ingredients	Formula (%)
Bakery byproducts	15.56
Milk replacer	45.00
Protamyl(potato protein)	10.26
Soybean meal, fermented	10.20
Fat pack, processed fat	11.08
Dextrose	7.00
Salt	0.40
Others	0.50
<u>Chemical compositions, estimated</u>	
ME, kcal/g	4458
CP, %	20.00
Meth+Cyst, %	0.94
Lysine, %	1.67
Ca, %	0.82
P, %	0.79

<sup>1</sup>Others include acidfier(Digesto Cap) 0.30%, mineral premix 0.15%, and vitamin premix 0.05%.

### 3. 결과 및 고찰

아래 Table II-4-2와 Table II-4-3은 생균제 시제품을 급여한 어린 돼지들의 체중 변화와 증체량 그리고 사료 섭취량과 사료요구율을 보여주고 있다. 조기 이유 시킨 자돈들의 성장은 전체적으로 활발한 편은 아니었으며, 항생제는 물론 생균제를 급여하지 않은 대조구 자돈들의 성장이 부진한 편이었다. 이에 반하여 본 연구의 생균제 시제품을 급여한 자돈들의 성장은 전 기간을 통하여 볼 때 대조구에 비해 7~13% 정도의 유의한 성장촉진 효과를 나타내었으며, 생균제 단일 급여 처리 중에서는 *B. polyfermenticus*의 급여가 증체량이 제일 많았고 생균제들을 혼합하여 급여한 자돈들의 성장이 특히 높았으나 생균제 이들은 서로 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 표에서 보여주고 있는 어린 돼지들의 증체량으로 보아 생균제 시제품을 급여한 자돈

들의 시험 초기 2주간의 성장이 현저하게 개선된 반면 후기 2주 동안의 성장은 대조구에 비해 차이를 보여주지 않았다. 이것은 broiler 사양시험에서와 같은 현상인데, 생균제를 급여하는 초기 단계에만 효과가 있고 차후 성장에는 효과가 없음을 의미하는 것인지는 단정할 수 없을 것 같다.

사료 섭취량에 있어 생균제 시제품을 급여한 처리구 자돈들은 대조구 자돈들에 비해 수치상으로는 더 많은 경향을 보여주고 있으나 통계적 유의성은 없었다. 실제로 생균제를 급여한 자돈들의 사료 섭취량이 많은데 관찰수가 적어 통계적인 유의차가 나타나지 않은 것인지는 알 수 없다. 자돈들의 사료 급여는 초기에 급여 접시를

Table II-4-2. Effect of feeding probiotics and multiprobitotics on body weight gain of early weaned piglets.

Treatment	No. of Rep.	Ani. per Rep.	Weight(kg/head)			Gain(kg/head)		
			Initial	Mid.	Final	Phase I	II	Overall
Control	3	6	3.09	5.84 <sup>b</sup>	8.98 <sup>c</sup>	2.75 <sup>c</sup>	3.14	5.89 <sup>c</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	3	6	2.92	5.94 <sup>b</sup>	9.25 <sup>ab</sup>	3.02 <sup>ab</sup>	3.31	6.33 <sup>ab</sup>
<i>L. acidophilus</i>	3	6	2.97	6.09 <sup>ab</sup>	9.27 <sup>ab</sup>	3.02 <sup>ab</sup>	3.18	6.30 <sup>ab</sup>
<i>B. polyfermenticus</i>	3	6	3.03	6.36 <sup>a</sup>	9.47 <sup>ab</sup>	3.33 <sup>a</sup>	3.11	6.44 <sup>ab</sup>
S+L+B	3	6	2.91	6.30 <sup>a</sup>	9.59 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	3.29	6.68 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Means within a column with no common superscripts are significantly different(P<0.05).

Table II-4-3. Effect of feeding probiotics and multiprobitotics on feed intake and feed conversion ratio(FCR) by early weaned piglets.

Treatment	Feed intake (kg/head)		FCR (feed/gain)
	Total	Daily	
Control	8.98	0.32	1.525 <sup>a</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	9.91	0.36	1.566 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i>	9.85	0.35	1.563 <sup>a</sup>
<i>B. polyfermenticus</i>	9.80	0.35	1.522 <sup>a</sup>
S+L+B	9.59	0.34	1.436 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Means within a column with no common superscripts are significantly different(P<0.05).

이용하였고 후기에도 자돈 사료 급여통을 이용하였으나 사료를 낭비하는 양이 많았었기 때문에 사료 섭취량 측정에 실험 오차가 많았을 수 있다고 생각된다. 이러한 관계로 사료요구율에 있어서도 세 가지 시제품을 복합하여 급여한 처리구가 유의하게 낮은 결과를 보여주고 있으나 그 의미를 부여하기에는 미흡한 점이 있다고 하겠다.

#### 4. 적요

생후 2주령된 조기 이유 자돈 90두를 18두씩 5개 군으로 나누어 처리 당 3반복, 반복 당 6두씩 배치하여 함생제와 생균제를 급여하지 않는 대조구, *S. cerevisiae* 시제품(S) 0.2%, *L. acidophilus* 시제품(L) 0.2%, *B. polyfermenticus* 시제품(B) 0.2%, 그리고 0.2% S+0.1%L+0.1%B로 구성되는 multi-probiotics를 사료에 첨가하여 4주간 실시한 사양시험을 실시하였다. 이들 시제품들은 조기 이유 자돈들의 증체량을 현저하게 개선시키었는데, 생균제를 급여한 초기 2주 동안의 효과가 뚜렷하였다. 4주간에 걸쳐 시제품에 따라 대체로 7~13%의 증체량 개선 효과가 있었으며, 처리간에는 유의차가 없었다. 생균제의 복합 급여가 가장 많은 증체량을 나타내었으나 단일 급여에 비해 통계적 유의성은 없었다. 조기 이유 젓먹이 자돈의 사료 급여 특성상 사료 섭취량의 측정 오차가 컸었기 때문에 정확한 결론을 내리기에는 미흡함이 있으나 대체로 생균제 시제품을 급여한 자돈들의 사료 섭취량이 많은 편이었고 사료요구율을 개선하지는 못하였다고 할 수 있다.



## 제 3 장 균주 개발 및 동물 장내 균주 선발

### 제 1 절 서론

Multi-probiotics를 개발하기 위한 2차 년도 연구로 먼저 일차 년도에 선발하였던 몇 가지 probiotics 중 성능이 우수하였던 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bacillus polyfermenticus*를 대상으로 발효 조건을 변화시켜 가면서 연속 배양을 통해 내산성과 내담즙성이 향상되도록 능력을 개선하는 유도를 시도하였으며, 닭과 어린 돼지의 장으로부터 probiotics로써 조건에 부합하는 균주를 선발하여 능력을 검색하고, 시제품을 제조하여, 어린 병아리와 어린 돼지를 이용하여 시제품의 성능을 검증하는 순서로 연구를 수행하였다.

### 제 2 절 연속배양에 의한 내담즙성 *Lactobacillus* 분리

#### 1. 연속배양 장치의 설계

균주들의 자연적 돌연변이를 유도하기 위하여 연속 배양 장치를 구상하였으며, 이는 크게 발효조, 펌프, 샘플 채취구, 저장 탱크로 이루어지도록 하였다 (Fig. III-2-1). 발효조는 working volume 250 ml의 크기이며 peristaltic pump로 약 20ml/h로 배지를 넣어주어 발효조의 배지를 약 12시간만에 전체적으로 교환되도록 조정하였다. 배양 온도는 32°C로 조정하고 배지는 0.3% 담즙산을 포함하는 MRS 배지를 사용하였다. 먼저 발효조에 미생물을 키워  $7 \times 10^7$  cfu/ml로 유지시킨 다음 펌프로 MRS 배지를 밀어주면서 연속 배양이 되도록 하였다.

#### 2. 배지 조성 및 균 수의 측정

*Lactobacillus* 배양 배지는 MRS broth(Difco), *Bacillus* 배양 배지는 nutrient broth가 사용되었으며 배양후 0.1 ml의 배양액을 꺼내 4.9ml 0.85% NaCl이 든 시험관에 넣고 잘 섞은 후 동일한 NaCl이 든 다른 시험관들에 차례로 연속 희석(희석 배수:1/50)한 뒤, 각각 0.1ml을 꺼내 petridish에 도포후 24-48시간 뒤에 생균수를 측정하였다.

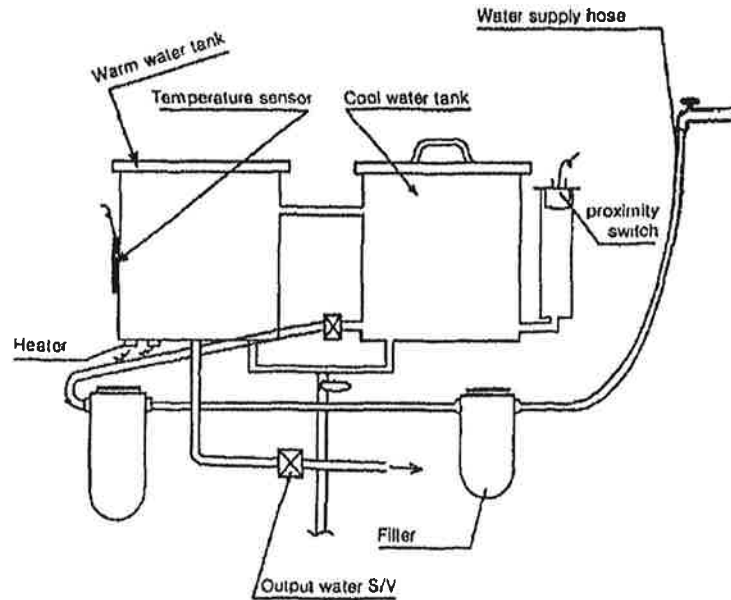


Fig. III-2-1. Diagram for continues fermentation system.

### 3. 결과

23일간의 연속 배양을 하는 동안 *L. acidophilus*균 수는 2일부터 급속히 감소하였다. 6일부터는 균이 검출되지 않았으며 그후 17 여일 동안 지속된 연속 배양에서도 검출할 수 없었다(Table III-2-1). 그래서, 첫날부터 5일 까지 연속 배양조에서 생존한 미생물들이 내담즙성을 가지고 있는지를 날짜 별로 조사하였다(Table III-2-2). 매일, 배양조에서 꺼낸 배지 3ml을 50ml의 MRS배지가 들은 cornical tube에 넣고 이틀간 배양한 뒤, 0.1ml 씩을 꺼내 담즙산이 들지 않은 MRS plate와 0.3% 담즙산이 든 MRS 평판 plate에 각각 넣고 24시간 배양 후 균수를 측정하였다. 그 결과 대조군으로 담즙산에 노출되지 않은 균의 내담즙성과, 2, 3, 4, 5일 째 배양조에서 발견되는 균의 내담즙성은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 즉, 23일 간의 지속적인 담즙산 노출에 대응하여 견딜 수 있는 돌연변이 균은 이 실험에서는 발견되지 않았으며 따라서 내담즙성을 극복하는 방법은 돌연변이 유도를 위한 본 시험에서의 연속 배양 방법보다는 시판되는 다른 균주를 검색하든가 동물의 장으로부터 직접 찾아보는 것이 더 바람직한 것으로 생각된다.

Table III-2-1 연속 배양에 따른 *L. acidophilus* 균수의 변화

배양날짜(일)	균수(cfu/ml)
0	$7 \times 10^7$
1	$3 \times 10^3$
2	200
3	21
4	23
5	1
6	0
7-23	0

Table III-2-2. 연속 배양시 처음 5일간 생존한 미생물의 내담즙성

배양날짜(일)	상대적 생존율(%)
0	$2.2 \times 10^{-3}$
1	$0.5 \times 10^{-3}$
2	$2.7 \times 10^{-3}$
3	$1.1 \times 10^{-3}$
4	$2.1 \times 10^{-3}$
5	

### 제 3 절 내산성 내담즙성 *B. polyfermenticus* 균주 분리

#### 1. pH 및 담즙산 저항 균주의 선별

*L. acidophilus*는 연속 배양에서 적당한 내담즙성 특징을 나타내는 균주를 얻을 수 없었으므로 1차 년도에서 *Lactobacillus*외에 잠재적인 probiotics로 고려한 *B.*

*polyfermenticus*의 내산, 내담즙성 특성을 가진 균주의 선별을 시도하였다. 낮은 pH에 저항하는 *B. polyfermenticus* 균주를 분리하기 위하여 먼저 pH 4.0으로 조정된 NB broth를 8ml 씩 capped test tube 15개에 각각 넣었다. 미리 키워둔 균 1 ml( $1 \times 10^7$ )를 이 broth에 접종하고 37°C에서 교반하여 배양한 다음 매 이틀마다 다음 test tube에 1ml 씩 접종하였다. 이어서 진행된 담즙산 저항 균주의 선별을 위하여 8ml 0.3% 담즙산 첨가 NB broth가 함유된 test tube 15개를 준비했다. 미리 키워둔 균 1 ml 을 첫 번째 test tube에 접종하여 이틀 키운 다음 여기서 1ml을 꺼내 두번째 test tube에 접종하였다. 이와 같은 방법으로 각 test tube마다 2일 간격으로 접종해나갔다. 내산성 및 내담즙성 *B. polyfermenticus* 균주를 얻기 위하여 15회에 걸친 배양 동안 생존 균수(Table III-3-1, Table III-3-2)와 상대적 생존율(Table III-3-3, Table III-3-4)을 대조군과 비교하였다.

Table III-3-1. pH4 NB broth에서 *B. polyfermenticus*의 단속적 배양동안 균수의 변화

배양 횟수	생존 균수(cfu/ml)
1	$0.8 \times 10^7$
2	$1.3 \times 10^7$
3	$2.6 \times 10^7$
4	$0.6 \times 10^6$
5	$3.8 \times 10^6$
6	$2.5 \times 10^5$
7	$7.6 \times 10^4$
8	$3.8 \times 10^4$
9	$2.2 \times 10^4$
10	4,500
11	2,100
12	3,000
13-15	<2,000

Table III-3-2. pH 4 NB broth에서 *B. polyfermenticus*의 단속적 배양동안 상대적 생존율

배양 횟수	상대적 생존율(%)
0	1.7
5	2.5
10	1.2
13	0.8

Table III-3-3. 담즙산 0.3% NB broth에서 *B. polyfermenticus*의 배양동안 균수의 변화

배양횟수	생존균수(cfu/ml)
1	$1.2 \times 10^8$
2	$0.8 \times 10^8$
3	$2.4 \times 10^7$
4	$3.6 \times 10^7$
5	$4.2 \times 10^7$
6	$6.4 \times 10^6$
7	-
8	$5.8 \times 10^5$
9	$7.8 \times 10^5$
10	$2.7 \times 10^4$
11	-
12	5,600
13-15	<5,000

Table III-3-4. 담즙산 0.3% NB broth에서 *B. polyfermenticus*의 단속적 배양동안 상대적 생존율

배양횟수	상대적 생존율(%)
0	2.2
5	5.1
10	1.8
13	2.3

## 2. *B. polyfermenticus*의 배양 및 분말화

NB broth 가 든 3ℓ 발효조에 배양된 균 50 ml을 넣고 실리콘 소포제 1 ml을 첨가한 다음 1 vvm의 멸균 공기를 넣어주면서 410 rpm하에서 24시간 배양하였다. 배양 후 균을 8,000rpm으로 20분간 원심분리하여 -72°C로 급속 냉각시킨 뒤 냉동 건조를 하였다. 그 결과 총 배양액 10ℓ로부터 7.8g의 균체량을 얻을 수 있었고, 건조 분말 g당  $1.2 \times 10^{11}$ 의 생균수를 포함하고 있었다. 이를 생균제 시제품 생산에 이용하였다.

## 제 4 절 돼지 장으로부터 균주 선발

### 1. 서론

오래 전부터 유산균과 같이 유용한 균들은 동물 장내에 정착하면서 정상 작용을 할 수 있다는 것이 알려져 왔다.(21, 42, 59). 항생제나 화학 요법제의 남용, 오용은 인간에게 미생물에 대한 내성을 증가시키고 인체 대사에 영향을 미칠 수 있기 때문에 요즘 그 사용량 및 식품에서 잔류 허용량은 더욱 엄격해지고 있다. 1996년도 우리나라, 일본, 미국에서 크게 사회 문제시되었던 식중독균인 *E. coli* O-157은 살균성 항생제를 투여할 시 O-157의 세포벽의 파괴로 인한 vero toxin의 용출이 생겨 더 위험할 수가 있기 때문에 생균제의 투여에 의한 장내 균총의 정상화가 더 바람직한 치료 효과를 보이기도 한다. 또한, 가축에 항생제의 남용 및 오용이 사회 문제시되고 있는 요즘, 생균제 첨가에 의한 소화기 계의 질병 예방은 경제적 이득뿐 아니라, 생체 안전성의 관점에서 가치가 있다고 보겠다. 따라서, 항생제나 화학 요법제의 대안으로서 생균제의 개발이 중요시되어지고 있으며 이들은 이미 제약이나 요구르트의 형태로 시판되고 있고 또 동물 사료 등에 첨가되고 있다. 이들의 작용기작은 유산과 같은 유기산을 생산하여 장내 pH를 낮게 유지함으로써 해로운 미생물을 유지하고, 또 과산화수소나 특수 항생물질을 생산함으로써 여러 가지 병원성 박테리아에 직접적인 억제 작용에 의한 것이다. 생균제가 되기 위한 요건은 장을 통과하면서 위산과 담즙산에 견뎌야하고 장내에서 다른 해로운 균총에 비해 증식 속도가 빠르고 해로운 균에 대한 억제 능력이 탁월하여 장내 우세 균총을 만들 수 있어야 한다(21, 32, 39). 현재, 생균제로는 주로 *Lactobacillus*(21, 23, 26, 32, 39, 42, 59), *Enterococcus*(26, 42, 38), *Bifidobacterium*(26, 42)등이 연구되었으나, 사람이나 동물에 상업적으로 사용되는 생균제에서는 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*등이 혼합된 형태로 제품화되고 있다. 수많은 미생물들 중 생균제가 될 수 있는 미생물을 선

별하는 가장 좋은 방법은 장내 미생물 중에서 분리하는 것이 바람직하다. 그 이유는 장에 잘 정착하여 살아가는 균총은 위산이나, 담즙산에 대한 저항성이 큰 것이 많고 이미 장에서 해로운 균에 대항하면서 하나의 균총을 점하고 있기 때문이다. 따라서, 본 연구에서는 건강한 돼지의 장으로부터 생균제로서 가능성이 있는 미생물을 선별하기 위하여 먼저 산과 담즙산에 강한 미생물들을 분리하였고 인체와 동물의 장에서 병원성 미생물로 지목 받고 있는 설사 유발 대장균과 *Salmonella*균에 대한 생육 억제력을 조사하고 동정하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 균주의 분리

10일된 건강한 어린 돼지를 도살한 후 즉시 멸균된 가위로 소장의 윗 부분 약 10 cm를 잘라 각각 1 cm로 분리한 다음 멸균 튜브에 넣고  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 얼려 필요시마다 사용하였다. 사용할 때 0.85% NaCl 등장액으로 장 내부를 잘 씻어 낸 후 MRS 배지에 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하였다. 배양후 MRS agar plate에 0.1ml을 접종하여 이로부터 콜로니를 분리한 뒤 새 MRS agar plate에  $37^{\circ}\text{C}$ 로 24시간 배양하였다. 이것을 다시 MRS agar plate에 streaking하여 분리한 다음 이 콜로니들을 먼저 pH 4로 조정된 MRS, 다음 0.3% 담즙산 함유 MRS, pH 4와 0.3% 담즙산으로 조절된 MRS배지에 차례로 넣고 24시간 배양한 뒤 MRS plate에서 성장한 것만을 분리하였다. 분리된 균들은 다시 MRS배지에서 계대 배양 후 대장균 저항성 실험을 행하였다.

### 나. 배지 및 배양 조건

분리 균의 기본 배양 배지로는 *Lactobacilli* MRS broth(이하 MRS, Difco, Detroit, USA)가 사용되었으며 *E. coli* 배양 배지로는 Luria-Bertani medium이, *Salmonella*의 계대 배양은 nutrient broth(Difco)를 사용하였다. 이들은 2주마다 한천 배지에서  $37^{\circ}\text{C}$ , 24시간 계대 배양하였다. 한편, 이들 균들의 장기 보존을 위하여 30% glycerol 과 균 배양액을 1:1로 섞은 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관을 하였다. 배지 조성을 위한 다른 시약들은 미생물 배양용이나 일등급 제품을 사용하였다. 대장균과 *Salmonella*균 억제 실험에는 소나 돼지에서 설사를 유발하는 *E. coli* KCTC 2618 (Serotype O8: K85: K99)과 *Salmonella typhimurium* KCTC 2514를 각각 사용하였다.

#### 다. 생균수의 측정

MRS배지에서 37℃로 24시간 정치 배양한 뒤 0.1ml의 배양액을 꺼내 4.9ml 0.85% NaCl이 든 시험관에 넣고 잘 섞은 후 동일한 NaCl이 든 다른 시험관들에서 차례로 연속 희석(희석 배수; 1/50)한 뒤, 각각 0.1ml을 꺼내 petridish에 도포한 다음 24-48시간 후 생균수를 측정하였다. 배양 후 나타난 균락 수를 계수한 후 희석 배수를 곱하여 균 수를 측정하였다. *E. coli* 생균수 측정을 위하여 *E. coli*용 petrifilm plate(3M, St. Paul, USA)가 사용되었고 *Salmonella* 생균수 측정을 위하여 *Salmonella* 선택 배지인 Bismuth-sulfite agar(BS agar, Difco)가 사용되었다.

#### 라. 인공 위액과 담즙산 배지의 조제 및 저항성 균주 선별

돼지 장으로부터 선별된 PA10을 MRS 배지에, *E. coli* O8을 LB 배지에 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 새 MRS 10ml에 대장균 1ml(약  $3 \times 10^8$ /ml)과, PA10을 각각 1ml(약  $3 \times 10^8$ /ml)씩 넣고 24시간 37℃에서 혼합 배양한 후 0.1ml을 꺼내 적당히 희석하였다. 이를 Petrifilm에 도포하여 37℃에서 24시간 배양한 뒤 자란 균수를 측정하였다. 대조 실험으로는 대장균 1ml만을 MRS 배지에 넣어 같은 조건에서 배양후 희석하여 Petrifilm에 접종하였다. *Salmonella*균의 억제 능력 실험은 대장균 실험과 같이, 동량의 균(약  $3 \times 10^8$ /ml)을 새 MRS배지에 넣고 혼합 배양하여 0.1ml을 꺼내 희석하고 이를 BS agar에서 37도로 24시간 배양 후 균수를 측정하였다. 이때, 대조 실험으로 *Salmonella*균 1ml만을 MRS 배지에서 키운 뒤 희석된 배양액 중 0.1ml을 취해 희석하고 BS agar에서 같은 조건으로 균수를 측정하였다.

#### 마. 대장균 및 *Salmonella*균 억제 능력

돼지 장으로부터 선별된 PA10을 MRS 배지에, *E. coli* O8을 LB 배지에 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 새 MRS 10ml에 대장균 1ml(약  $3 \times 10^8$ /ml)과, PA10을 각각 1ml(약  $3 \times 10^8$ /ml)씩 넣고 24시간 37℃에서 혼합 배양한 후 0.1ml을 꺼내 적당히 희석하였다. 이를 petrifilm에 도포하여 37℃에서 24시간 배양한 뒤 자란 균수를 측정하였다. 대조 실험으로는 대장균 1ml만을 MRS 배지에 넣어 같은 조건에서 배양후 희석하여 petrifilm에 접종하였다. *Salmonella*균의 억제 능력 실험은 대장균 실험과 같이, 동량의 균(약  $3 \times 10^8$ /ml)을 새 MRS배지에 넣고 혼합 배양하여 0.1ml을



꺼내 회석하고 이를 BS agar에서 37도로 24시간 배양 후 균수를 측정하였다. 이때, 대조 실험으로 *Salmonella*균 1ml만을 MRS 배지에서 키운 뒤 회석된 배양액 중 0.1ml을 취해 회석하고 BS agar에서 같은 조건으로 균수를 측정하였다.

#### 바. 균주의 동정

분리된 미생물은 MRS agar배지로 37°C에서 24시간 배양 후 균주의 동정을 위하여 API 50 CHL strip (bioMerieux, France)검사와 gas chromatography를 이용한 FAME (Fatty Acid Methyl Esters) 분석을 하였다. API strip kit에서 배양 후 동정 결과는 API Lab Plus Software중 API 50 CHL(version 4.0)에서 검색을 함으로서 얻어졌다. 지방산 분석 기기는 MIDI system(Newark, USA)으로 지방산 분석을 위한 Ultra-2 methyl phenyl capillary column과 균 동정용 Sherlock System software(version 2.11)을 사용하였다. 균주의 동정은 동정 data library에 저장된 균주의 지방산 조성 특성에 가장 근사하게 일치하는 것을 찾음으로서 얻어졌다. 현미경의 형태학적 검사는 Olympus(Tokyo, Japan) 사진 현미경을 이용하였으며 Gram stain은 Murray등(35)의 방법에 따라 수행하였다.

#### 사. 균의 저장 안정성

균을 대량 배양하기 위해 5ℓ 발효조에서 400 rpm으로 1 vvm (volume/volume/minute)의 통기 하에 37°C에서 24시간 배양한 뒤 원심분리하여 회수한 세포를 -70°C에서 냉동한 후 동결 건조시켰다. 이 균체 분말은 저장 안정성 실험을 위하여 22°C의 온도에서 20일간 보존 후 균수 측정 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 저장 안정성은 저장에 들어갈 때의 생균수와 저장이 끝난 후 생균수를 비교함으로써 얻어졌다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 균주의 분리

흔히, 생균제로서 가능성이 있는 균주들을 얻기 위하여 이미 시판되고 있는 요거트나 정장제, ATCC 또는 KCTC로부터 정장 기능을 가지고 있는 상용 균주들을 사용할 수도 있지만, 위산 및 담즙에 견딘 수많은 균들이 정착한 집합체인 장이 생균제를 얻

는데 가장 좋은 소스임에 틀림없다. 돼지 장에 존재하는 많은 균총들로부터 생균제 분리를 위하여 돼지 장 현탁액을 분리원으로 하여 pH 3과 0.3% 담즙산으로 조절된 MRS 선택 배지에서 일차적으로 약 12,000여 개의 콜로니를 얻었다. 이들 콜로니들 중 비교적 크며 잘 분리되어 있는 것으로 338개를 선별하였는데 이들은 직경 0.5-1.0 mm의 크기로 투명에 가까운 옅은 흰색이나 베이지 색을 보이는 것이 많았다. 이들을 다시 새로운 MRS 평판 배지에 옮겨 재 분리한 뒤 산과 담즙산의 저항성이 동시에 강한 한 균주를 microplate에서 다시 분리하였다. PA10으로 명명된 이 균의 콜로니는 옅은 흰색을 띄었으며 MRS에서 액체 배양시 시큼한 냄새가 났다. 최근 젓먹이 돼지의 장에서 분리된 주된 *Lactobacilli*는 *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. salivarius*로 동정된 바 있으며(37), 건강한 사람의 장내에는 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum* 및 *L. cellobiosus* 등의 유산균이 존재하는 것으로 보고되었다(34). 3차에 걸친 선별 과정을 통하여 *L. salivarius*로 명명된 이 균은 돼지 장에 서식하는 수많은 미생물 중 내산, 내담즙산의 특성을 동시에 가장 잘 만족시킬 수 있는 균주임을 알 수 있었다.

#### 나. 내산성 실험

위에서 균의 생존율은 생균제로서 첫째 조건이라고 할 수 있다. 일차 선별 과정에서 얻어진 여러 내산 균주들은 이차 및 삼차 선별 과정에서 그 내산 정도가 균주에 따라 각각 다르다는 것을 알 수 있었다. 최종 선별 과정을 통과한 PA10의 내산성 특성을 알아보기 위하여 24시간 MRS 배지에서 배양후 배양액 1ml을 pH가 3으로 조절된 인공 위액 함유 MRS 배지 9ml에 넣고 2시간 동안 내산성 실험을 하였다. Fig. III-4-1과 같이 시간에 따라 균수는 조금씩 감소하여 1시간 후에는 약 78%의 생존율, 2시간 후에는 처음 균수의 약 절반으로 줄어들었다. 한편, 김치, 요구르트와 같은 산성 식품의 제조에서 중요한 미생물로서 사용되는 *Lactobacillus*속은 생균제로서 내산성이 크다고 알려져왔다. 일반적으로, *L. acidophilus* 균주들의 산에 대한 생존율은 pH 4에서 2시간 유지시킨 후 40-50% 수준으로 *L. acidophilus* KCTC 3155인 경우 pH 3과 4에서 각각 22%와 51%의 생존률을 보인 것으로 보고되어 있다(39). 또, 동물의 장에서 분리된 한 생균제인 *Enterococcus* sp.는 pH 3의 인공 위액 조건에서 2시간 후의 생존율이 90-100%로 알려져 있다(26). 이와 같은 결과로부터, PA10은 생균제

로 선별된 *L. acidophilus*나 *Enterococcus*와 비견될 수 있는 내산성을 갖는 것으로 보이며, 분비 위액의 pH가 1-2이지만 침과 음식의 섭취에 따라 희석된다는 점을 고려할 때 실제 물이나 음식의 섭취 하의 위에서 이 균의 생존율도 나쁘지 않을 것으로 추정되었다.

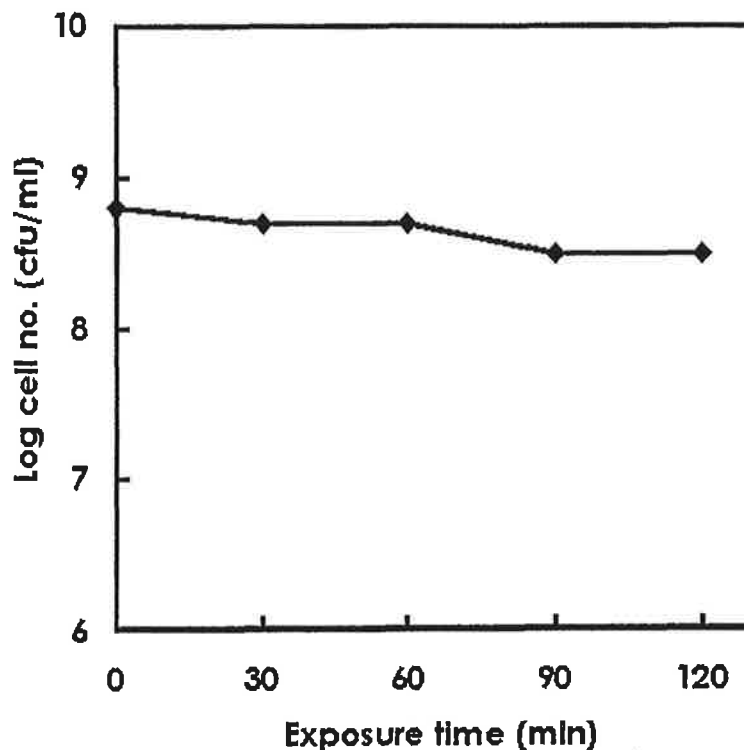


Fig. III-4-1. Viability of PA10 under the exposure of artificial gastric juice containing MRS medium(pH 3.0).

#### 다. 내담즙산 실험

MRS배지에서 배양된 PA10을 희석한 다음 담즙산이 0-0.3% 함유된 MRS평판 배지에 도말하여 24시간 후 살아있는 균수는 Table III-4-2와 같았다. 이 기간 동안 0.1% 담즙산의 존재 하의 생존율은 86%이었던 반면 0.3%의 담즙산에서는 76%의 생존율을 보여 농도에 따른 별 영향 없이 담즙산에 강한 특성을 나타냈다. 담즙의 성분은 공액 담즙산(conjugated acids)으로 이루어져 있는데 미생물이 공액 부위를 끊는

효소를 가지고 있으면 담즙의 존재에 취약하다고 보고된 바 있다(14). 일반적으로 담즙산에 약한 특성은 대표적 생균제 *Lactobacillus* 속에서 보이는 일반적인 현상이다(18). 예를 들어 *L. acidophilus* KCTC 3155 균은 0.3%의 담즙산에 약하여 대조군에 비해 약  $1/10^6$ 로 그 수가 급격히 감소함을 보여주었다(39). 반면, 동물 장에서 분리된 *Enterococcus faecium* L20의 경우 100% 가까운 내담즙산 특성을 보였다(26). 장에서 정착한 미생물들은 지속적인 담즙의 유입에 의해 내담즙성을 나타내는 것이 많을 것으로 추정되지만, 십이지장을 통과하는 동안 담낭으로부터의 고농도 담즙산 유입에 견딜 수 있어야 하기 때문에 생존율이 높은 생균제를 선별하는 것이 필요하다. 이러한 점에서 PA10은 담즙산에 대한 적응에 성공한 장 정착 균으로 생각되었다.

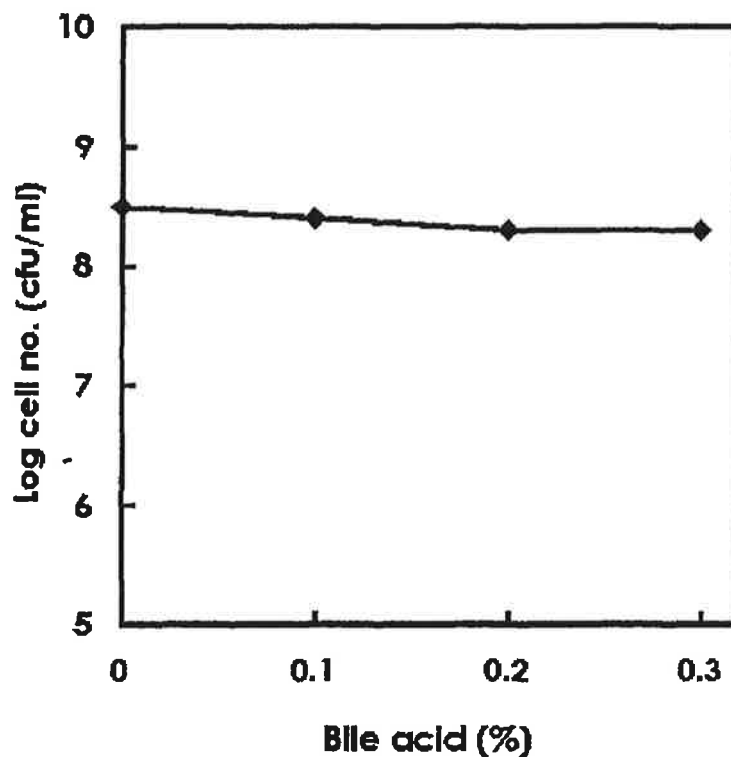


Fig. III-4-2. Viability of PA10 in the MRS media with different concentration of bile salts.

라. 대장균 억제 능력

실사 유발 대장균과 혼합 배양시 PA10이 대장균의 성장을 얼마나 억제하는지 MRS에서 배양 시간에 따라, 대장균과 PA10의 균수를 조사하였다. 혼합 배양을 시작했을 때 대장균 수와 12시간 혼합 배양 후 대장균 수를 비교해보면 거의 같은 균수를 나타냈다(Fig. III-4-3). 한편, 같은 시간 동안 같은 종류의 배지에서 대장균만 단독 배

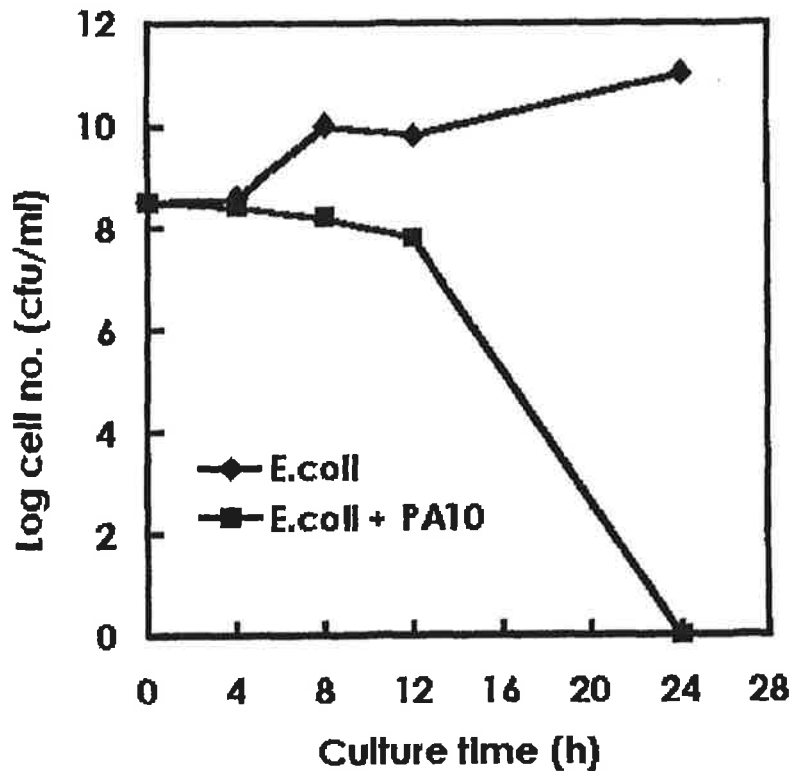


Fig. III-4-3. Growth inhibition of *E. coli* by PA10 in MRS broth.

양한 것은 균수가 약 100배 증가한 것으로 보아 12시간 혼합 배양 동안 PA10은 이미 대장균의 성장을 억제하는 것으로 보인다. 혼합 배양 후 24시간 경과 후에는 생존한 대장균은 더 이상 보이지 않았다. 한편, 선별된 생균제인 *L. acidophilus* KCTC 3155 인 경우 같은 조건에서 대장균과 함께 혼합 배양 후 생육 억제 능력을 조사한 결과 대장균의 성장을 100% 억제시키는 것을 보였다(39). 또한, 유산균, 낙산균 복합 제제

로서 정상제로 사용되고 있는 바이스리(제일 제당)는 연속 유동 배양시 접종 후 48-72시간만에 *E. coli* O-157이 소멸되었다고 보고한 바 있다(7). *L. acidophilus*는 자라는 동안 배양액의 pH를 저하시키고, acidolin, acidophilin, lacacin B의 항생제를 생성하는 것으로 알려져 있다(21). 마찬가지로, PA10의 유해균 성장 억제 요인은 확실치 않지만 배양동안 *L. acidophilus*배지의 pH가 6.3으로부터 4.6으로 떨어지는 것으로 보아 pH 하강에 따른 유해균 감소 효과를 추정할 수 있었다. 대장균에 대한 미생물학적 길항작용 관점에서 PA10의 단독 작용에 의한 억제 효과는 이들 유산균, 낙산균의 상업적 복합 제제와 비교될 수 있을 정도로 뛰어남을 보여주었다.

마. *Salmonella* 억제 능력

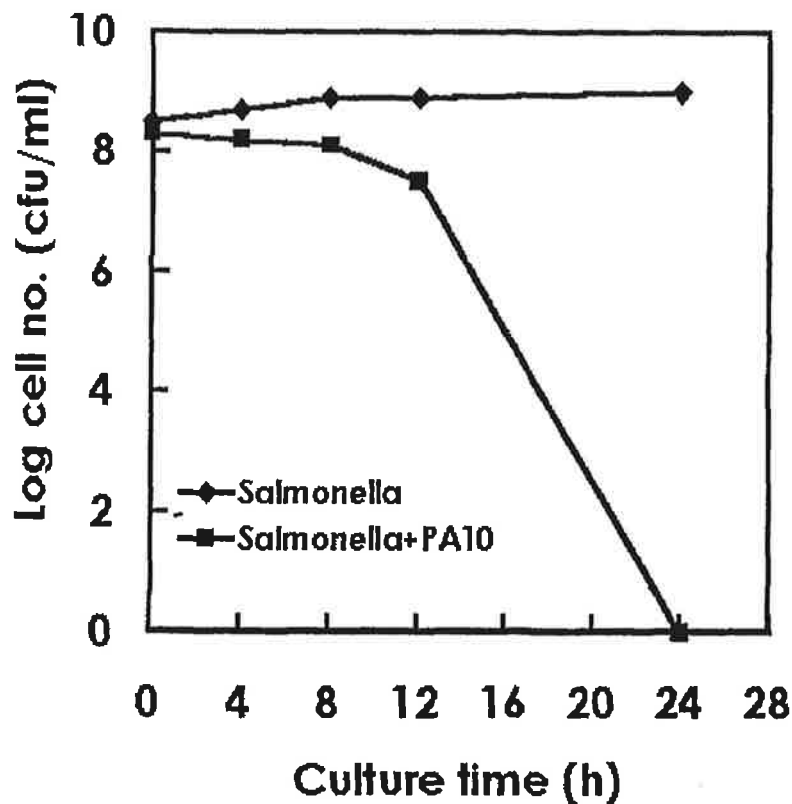


Fig. III-4-4. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by PA10 in MRS medium.

혼합 배양시 PA10이 *Salmonella*의 증식을 얼마나 억제하는지를 관찰하기 위하여 배양 시간에 따른 *Salmonella*와 PA10의 균수 변화를 조사하였다. 그 결과, 대장균 억제 실험과 비슷하게 혼합 배양 12시간 후 결과는 *Salmonella*의 증식을 억제하는 것으로 보였다. 혼합 배양 시작 후 24시간에 측정된 결과에서는 어떠한 *Salmonella*도 발견할 수 없었다(Fig. III-4-4). 특히 식품 위생에 매우 중요한 *Salmonella*균의 억제는 생균제의 역할로서 꼭 필요한 기능이라고 할 수 있다. *In vitro* 상태에서 설사를 유발하는 대장균과 병원성 *Salmonella*에 대한 PA10의 억제는 적어도 24시간 경과 후 탁월하였는데 시판되고 있는 여러 정장제들과 *L. acidophilus*와의 비교 실험에서 PA10은 동등하거나 그 이상의 유해균 억제 능력을 보였다. *Salmonella*의 생육 최적 pH가 7.0인 점을 고려하면(22) 낮은 pH에서 이 유해균은 생존할 수 없다. 이 유산균의 유해 세균 억제 능력이 배양액의 특성을 바꾸기 때문인지, 또는 *Lactobacilli* 특유의 항생물질을 내기 때문인지는 확인하지 못하였지만 혼합 배양 중 PA10의 매우 빠른 증식 속도와 함께 유산의 방출에 의한 pH 감소의 영향 및 bacteriocin의 분비가 이러한 효과를 나타내는 것 같다.

#### 바. PA10균의 동정

현미경의 관찰 하에서 이 균은 비운동성을 나타냈고 길다란 간균 모양으로 크기가 불규칙했으며 Gram 염색은 양성이었으며, 포자는 형성하지 않았다. API 50 CHL(version 4.0) kit에서 배양(Table III-4-1) 및 API Lab Plus 동정 프로그램에 의한 결과 분석에서는 신뢰도 99.9%로 *Lactobacillus salivarius*로 확인되었다. 한편, 세포 지방산 정성 분석(Table III-4-1) 및 동정 library에서 검색 결과는 API 검사에서와 같이 *Lactobacillus salivarius*로 동정되었다. Table 1에 나타난 바와 같이 이 균은 *L. salivarius*의 발효 특성인 glucose, fructose, galactose, sorbitol, mannitol과 같은 6탄당 및 그 환원당, lactose, sucrose, trehalose와 같은 일부 이당류, raffinose, N-acetylglucosamine만을 선택적으로 이용함을 보였다. 주 지방산 구성 성분은 cis- $\Delta^9$ -octadecenoic acid(C18:1, cis 9( $\omega$ 9))가 41.10%, 포화 지방산인 hexadecanoic acid(n-16:0)가 23.76%로 이루어져 있었으며, 미량으로는 C15:0 iso 2OH/C16:1 $\omega$ 7c와 C18:0이 각각, 1.2%와 2.07%를 함유하고 있어 *L. salivarius*의 지방산 구성 비율과 일치하였다. 현미경에 의한 형태학적인 특성과 API 검사에 의한 생화학적인 결과들은

PA10균이 *Lactobacillus*에 속하나, 일반적으로 잘 알려진 정장 유산균들인 *L. acidophilus*, *L. bulgaris*, *Bifidobacterium* 등과는 다른 *L. salivarius*임을 보였다. 세포 지방산 분석에 의한 동정 결과는 PA10이 *L. salivarius* var. *salicinius*, 또는 *L. salivarius* var. *salivarius*와 가장 가깝다는 것을 보여 주었는데 앞으로 더 정확한 균의 동정을 위하여 16s rRNA의 분석이 요구된다.

**Table III-4-1. Morphological and biochemical properties of PA10 isolated from piglet intestines**

1. General characteristics					
Morphology	long rod with frequently bent shape				
Gram staining	positive				
Spore	None				
2. Utilization of carbohydrates and related carbon compounds by PA10					
Glycerol-	Erythritol-	D-arabinose-	L-arabinose-	Ribose-	D-xylose-
L-xylose-	Adonitol-	$\beta$ -Methyl-	D-xyloside-	Galactose+	Glucose+
Fructose+	Mannose+	Sorbose-	Rhamnose-	Dulcitol-	Inositol-
Mannitol+	Sorbitol+	$\alpha$ -Methyl-D-mannoside-	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside-		
N-acetylglucosamine+		Amygdalin-	Arbutin-	Esculin-	Salicin-
Cellobiose-	Maltose-	Lactose+	Melibiose+	Sucrose+	Trehalose+
Inulin-	Melezitose-	Raffinose+	Starch-	Glycogen-	Xylitol-
Gentiobiose-	D-turanose-	D-lyxose-	D-tagatose-	D-Fucose-	L-Fucose-
D-arabitol-	L-arabitol	Gluconate-	2-ketogluconate-	5-ketogluconate-	
* +: positive; -: negative					
3. Cellular fatty acid profile					
Fatty acid	Contents (%)				
14:0	6.24				
16:1 w7c/15 iso 2OH	3.51				
15:0 iso 2OH/16:1w7c	1.20				
16:0	23.76				
18:1 w9c	41.10				
18:1 w9c/w12t/w7c	11.12				
18:0	2.07				
19:0 cyclo w10c/un	7.55				
19:0 iso	1.62				
20:0	1.83				



사. PA10의 분말화 및 보관 안정성

총 배양액 3ℓ로부터 냉동 건조 분말로 7.02g을 얻었으며 생균수는 건조 분말 g당  $5.1 \times 10^{10}$  개이었다. 따라서, 냉동 건조 전의 생균수( $1.1 \times 10^9/\text{ml}$ )에 대한 건조 후의 생존 비율은 약 10% 값을 보였다. 보관에 따른 균의 생존율이 여러 안정제의 첨가에 따라 조사되었다. 사용된 첨가제 중 가장 생존율이 높았던 것은 냉동 건조전 농도가 10%(w/v) 이 되게끔 polyvinylpyrrolidone을 첨가한 것으로, 20일 상온 보관 후 약 50% 생존률을 보였다(Fig. III-4-5). 그러나, polyethylene glycol 4,000, maltose, inulin, sucrose, glycine의 첨가에서는 무 첨가군과 비슷하게  $10^{-3}$ - $10^{-5}$ 정도로 그 생존률이 감소하였다. 이 결과들로부터 PA10균의 효율적 보관을 위하여는 10%(w/v) polyvinylpyrrolidone이 효과적인 첨가제로 보인다. 또한, 보존성을 높이기 위해 활성

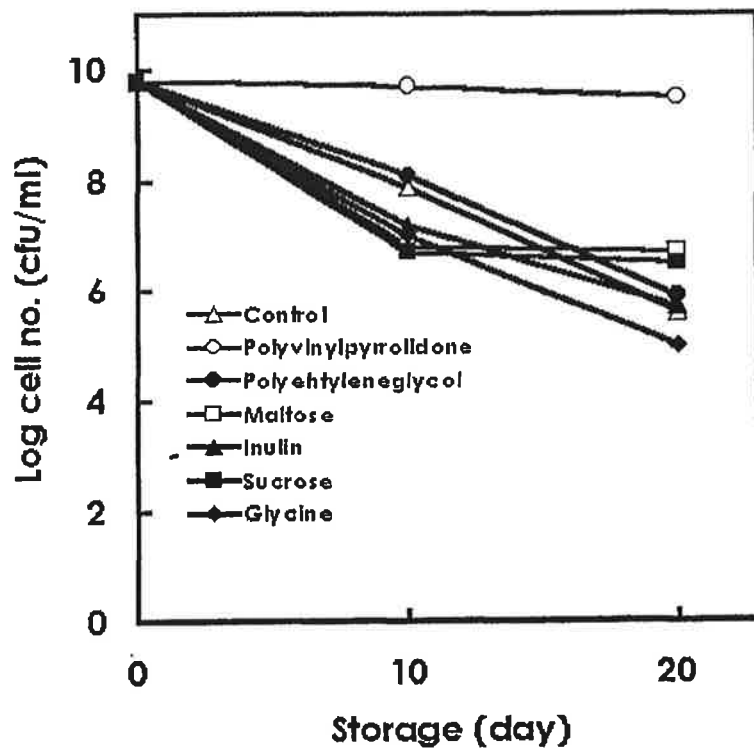


Fig. III-4-5. Effect of additives on the viability of PA10 after 10 and 20 days of storage at 22°C

탄, 제올라이트, 벤토나이트에 균을 흡착했으나 효과가 없었으며 이때 균의 생존률은 약 3% 수준이었다. 상업적 생균제로서 사용할 수 있기 위하여는 앞으로 이 균의 저장 안정성을 높이는 방법들이 더 시도되어야 할 것으로 보인다.

#### 4. 적요

돼지 장에 존재하는 수 많은 미생물 균종들 중에서 위산과 담즙에 잘 견디며, 대장균 및 *Salmonella*에 대한 억제 능력이 뛰어난 한 미생물을 검색 분리하였는데, 다른 균들에 비해 이러한 능력이 뛰어난 균주 PA10을 얻을 수 있었다. 이 미생물은 pH 3의 위산과 0.3% 담즙산에서 각각 2시간, 24시간 동안 약 50-70%의 생존률을 나타냈으며, 대장균 또는 *Salmonella*를 MRS배지에서 혼합 배양시 24시간 안에 이들 유해균을 완전히 제거할 수 있었다. 이 균은 *L. salivarius*로서 동정되었는데, 돼지 장에서 식하는 수많은 미생물 중 내산, 내담즙산, 유해균 억제능을 동시에 만족시킬 수 있는 특성을 가지는 우수한 균주임을 알 수 있었다. 앞으로 이 균주 보존 조건을 확립하고, 동물 실험에서도 성공적인 결과를 얻을 수 있다면 이 분리 균은 생균제로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

## 제 5 절 닭 장으로부터 균주 선발

### 1. 서론

인간이나 동물의 장내에는 수많은 미생물 균종이 일정한 평형을 이루면서 살아가고 있는데 유해 미생물에 감염된 음식물의 섭취나 항생제의 투여에 의해 이들 미생물의 균형이 깨지면 질병을 일으키게 된다. 또한, 항생제의 남용, 오용이 미생물에 대한 내성을 증가시키고 인체 대사에 영향을 줄 수 있기 때문에 그 적용 범위 및 사용량은 더 엄격히 제한되어야 한다. 이에 따라, 미국 식품의약국(FDA)은 가축의 성장촉진 용으로 항생제를 사용하지 못하도록 하였고 유럽에서는 인체에 사용하는 항생제는 가축의 성장 촉진제로 사용하는 것을 규제하고 있다. 이러한 대안으로서 유해균들에 길항적으로 작용하여 장내 균총을 정상화할 수 있고 성장의 촉진, 영양 섭취 저해 인자의 제거 기능도 가지는 생균제들의 개발이 시도되고 있다(22, 41, 42). 생균제가 되기 위

한 요건은 장을 통과하면서 위산과 담즙산에 잘 견뎌야하고 장내에서 유해균과의 영양원에 대한 경쟁에서 우세하여야 하며 또 항균 활성 물질을 생산함으로써 장내 우세균총을 만들 수 있어야 한다(10, 32, 59). 우리는 이전 연구를 통하여 생균제로서 가능성이 있는 *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* 등 23여종의 기탁 및 분리 균주를 조사했고 그 결과 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bacillus polyfermenticus*가 가장 가능성이 있음을 보였다(39). 수많은 미생물들 중 생균제가 될 수 있는 미생물을 선별하는 가장 좋은 방법은 장내 미생물 중에서 분리하는 것이 바람직하다. 그 이유는 건강한 동물의 장에는 위산이나, 담즙산에 대한 저항성이 큰 것이 많고 이미 장 점막에 정착하여 pH를 저하시키던가 항균 활성 물질을 생산함으로써 해로운 균에 대한 우세균총을 점하고 있기 때문이다. 따라서 지금까지 개발된 생균제의 대부분은 가축이나 인간의 장에서 분리된 것으로 *Lactobacillus*(1, 2, 10, 22, 27, 39-42, 51), *Enterococcus*(38, 59), *Bifidobacterium*(22) 등의 유산균이 대부분을 차지하고 있다. 그러나, 국내에서 상품화된 생균제의 대부분은 외국 수입에 의존하여 한국인의 장이나 동물의 장에 적합한 생균제의 분리 노력이 앞으로 더 필요하다고 생각된다. 본 연구에서는 인간이나 가축의 장에서 더 생존력이 강한 한국형 생균제를 개발하기 위해 건강한 병아리들의 소장으로부터 분리를 시도하였다. 그 결과 위산과 담즙산에 강하고 설사 유발 대장균과 살모넬라균에 대해 생육 억제력이 큰 한 미생물을 선별하여 생균제로서 가능성을 조사하고 동정하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 균주 분리

5 주령 된 재래종 수탉 2마리를 도계하여 멸균된 가위로 장의 윗부분에서 약 7-10 cm를 잘라 멸균된 튜브에 넣어 -20°C에 넣어 사용할 때까지 보관하였다. 균을 분리 시 보관된 장을 약 1cm로 자른 뒤 0.85 %의 식염수로 장내용물을 충분히 세척하고 50 ml MRS 배양액(pH 4와 0.3 % 담즙산 포함)에서 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MRS agar plate에 1/10, 1/100, 1/1000으로 희석된 배양액을 0.1ml 씩 깔고 37°C,

24시간 배양하였다. 여기에서 분리된 콜로니들을 멸균된 이수시개로 떠서 MRS agar plate에 키운 뒤 배양된 colony들은 새로운 MRS agar plate에 streaking하여 다시 colony들을 분리하였다. 분리된 colony들을 취하여 pH 4.0 과 0.3% 담즙산 MRS가 각각 0.1ml씩 들어 있는 96 well microplate에 37°C로 24시간 배양하였다. 이들로부터 pH저항성, bile salts저항성 있는 균주들을 선발하고 선발된 균 중에서 대장균 저항성 실험을 한 뒤 이들 중 probiotics 기준에 적합한 균주를 선정하였다.

나. 배지 및 배양 조건 : 앞의 제 4 절 2의 “나”항과 동일함.

다. 생균수 측정 : 앞의 제 4절 2의 “다”항과 동일함.

라. 인공 위액과 담즙산 배지 조제 및 저항성 균주 선별 : 앞의 제 4절 2의 “라”항과 동일함.

마. 대장균 및 Salmonella균 억제 능력 : 앞의 제 4 절 2의 “마”항과 동일함.

바. 균주의 동정 : 앞의 제 4 절 2의 “바”항과 동일함.

사. 균의 저장 안정성 : 앞의 제 4 절 2의 “사”항과 동일함.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 균주의 분리

생균제의 효과적인 선별을 위하여 닭장으로부터 얻은 균들로부터 생균제로서 필수 조건인 내산성, 내 담즙산, 유해균 억제 능력들을 조사하였다. 조사 과정 중, 닭장에 서식하는 수많은 미생물 중 내산, 내담즙산, 또는 유해균 억제 능력이 있는 균주들은 많이 존재하였지만, 여러 조건을 동시에 만족시킬 수 있는 균들은 매우 한정되어 있음을 알 수 있었다. 닭장 현탁액을 분리원으로 하여 pH 3과 0.3% 담즙산으로 조절된 MRS 선택 배지에서 일차적으로 약 20,000여 개의 콜로니를 얻었다. 이들 콜로니들 중 비교적 크며 잘 분리되어 있는 것으로 198개를 선별하였는데 이들은 직경은 약 0.5-1.0mm의 크기로 옅은 흰색을 보이는 것이 많았다. 산과 담즙산의 저항성이 동시에 강하며 혼합 배양시 대장균 및 Salmonella 억제 능력이 가장 좋은 한 균주를 분리하였다. B4로 명명된 이 균의 콜로니는 옅은 크림색을 띄었으며 MRS에서 액체 배양시 시큼한 냄새가 났다. 비교적으로, 돼지 장에서 한 생균제로서 분리했던 *L. salivarius*

는 같은 균류임에도 불구하고 내담즙산 능력이 B4에 비해 큰 반면, 내산성은 더 떨어졌었다. 이러한 결과들로부터 같은 종, 같은 속으로 동정되었더라도 생균제로서 균주 특성은 각각 다르다는 것을 보여주었다.

나. 내산성 실험

B4의 내산성 특성을 알아보기 위하여 24시간 MRS 배지에서 배양후 배양액 1ml을 pH가 3으로 조정된 인공 위액 함유 MRS 배지 9ml에 넣은 뒤 2시간 동안 내산성 실험을 하였다. Fig. III-5-1과 같이 시간에 따라 균수는 조금씩 감소하여 1시간 후에는

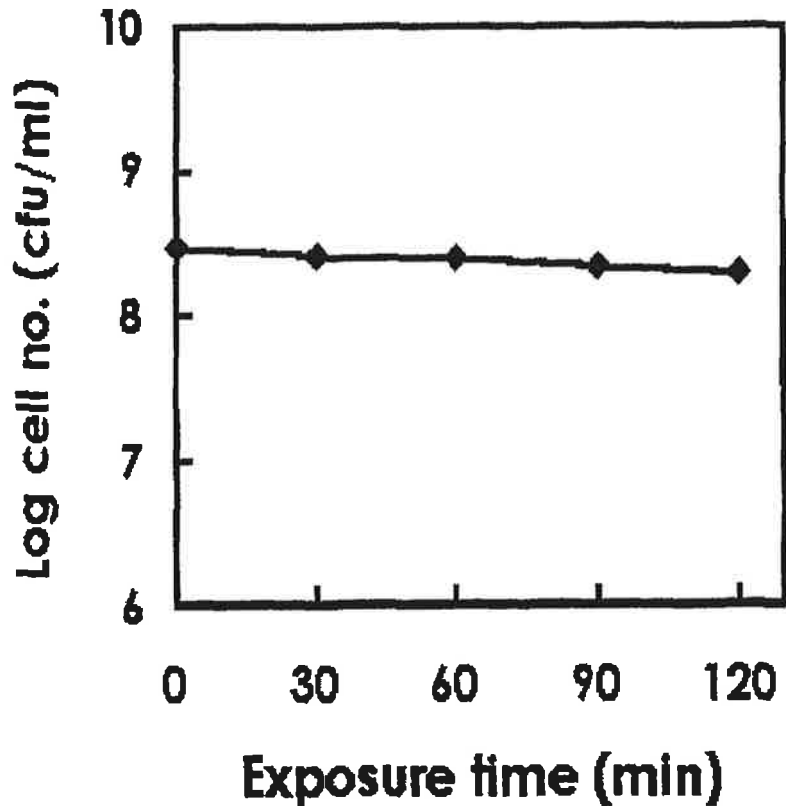


Fig. III-5-1. Viability of B4 under the exposure of artificial gastric juice containing MRS medium(pH 3.0).

약 87%의 생존율, 2시간 후에는 처음 균수의 67%로 줄어들었다. 이러한 결과는 같은 조건에서 높은 내산성을 가진 것으로 알려진 *L. acidophilus*(39)나 *E. faecium*(38)의 생존율 60-90%와 비교될 수 있음을 보였다. 음식물의 섭취량이나 종류에 따라 달라 지지만 위를 통과하는데 2-3시간이 걸리고 위산의 pH가 2-3으로 희석되는 점을 고려 할 때, 실제 장에 도달될 때까지 생존율은 높은 값을 유지할 것으로 추정된다. 일반적으로 생성된 유산은 비해리 상태로 세포 내로 들어가 세포내 더 높은 pH 용액에서 해리 되면서 세포내 pH를 변화시킨다. 배양액과 세포내 pH 차이가 크면 클수록 미생물은 세포의 pH 항상성(homeostasis)를 유지시키기 위하여 H<sup>+</sup>-ATPase를 가동시키고 따라서 더 많은 ATP를 소모해야 한다. B4의 산 저항 능력이 다른 미생물에 비해 큰 것을 고려해볼 때 B4의 세포내 pH가 약 산성에서 잘 자라는 다른 미생물에 비해 상당히 낮을 것으로 추정되었다. 높은 산성에서도 견딜 수 있는 *L. plantarum*의 경우 세포내 pH는 다른 내산성 균주보다 낮은 4.6-4.8 (5)로 알려져 있고 이렇게 낮은 값은 외부와 내부 pH차이를 줄임으로서 산에 대한 더 높은 생존력을 나타낼 수 있다.

#### 다. 내담즙산 실험

MRS배지에서 24시간 배양된 B4를 희석한 다음 담즙산이 0-0.3% 함유된 MRS평판 배지에 도말하여 24시간 후 살아있는 균수는 Fig. III-5-2와 같았다. 이 기간 동안 0.1% 담즙산의 존재 하의 생존율은 50%이었던 반면 0.3%의 담즙산에서는 9%의 생존율을 보여 농도에 따라 감소되는 경향을 보였다. 생균제의 검색을 위해 조사했던 *L. acidophilus*(39)의 특성과 비교해 볼 때, B4는 내산성에 있어 비슷하였으나 내담즙산 능력은 훨씬 좋았다. 한편, 생균제라도 *L. bulgaricus* 및 *L. lactis*는 담즙에 매우 민감해 0.05%의 농도에서도 저해 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(22). 담즙산의 장내 농도는 음식물의 성분이나 섭취량에 따라 대단히 변화하므로 정해진 값이 없다. 하지만, 상기 실험과 같은 조건하에서 선별된 담즙 저항성 *L. acidophilus*들은 실제 송아지 소장의 상부에 서식하는 것과 같은 종류라는 결과(19-1)로부터 0.3%의 담즙산을 사용하는 것은 내담즙산 실험으로서 의미 있는 농도로 생각되었다. 이러한 농도에서 선별된 균주들만이 계속 장으로 유입되는 담즙(40kg의 돼지인 경우 하루 약 2ℓ) 존재하의 장에서 정착하여 살아갈 수 있을 것이다.

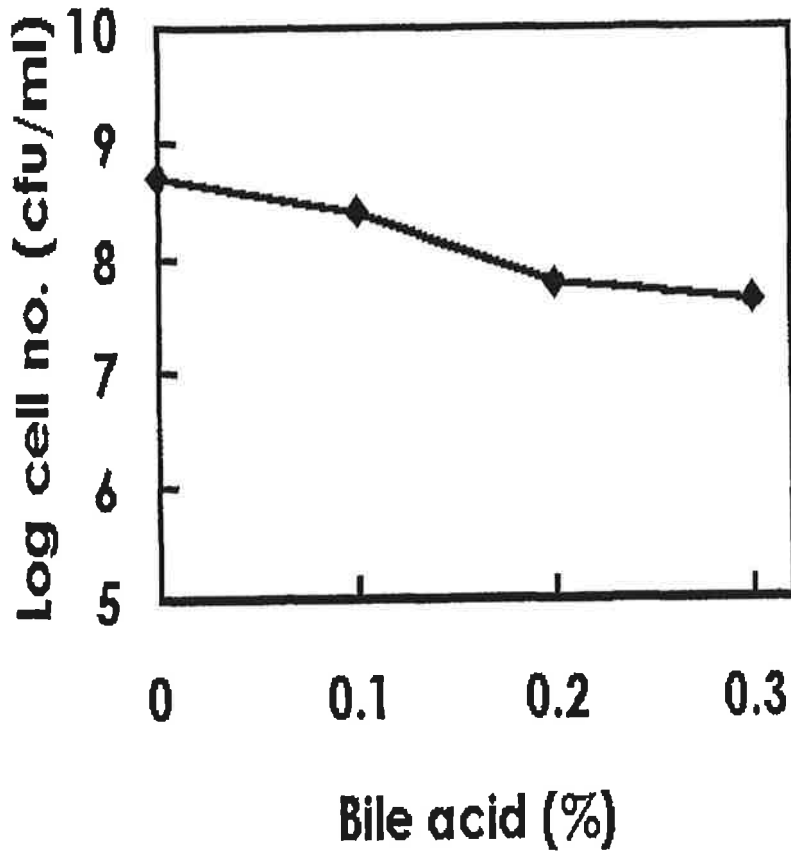


Fig. III-5-2. Viability of B4 in the MRS media with different concentration of bile salts.

#### 라. 대장균 억제 능력

설사 유발 대장균과 혼합 배양시 B4가 대장균의 성장을 얼마나 억제하는지 MRS에서 배양 시간에 따라, 대장균과 B4의 균수를 조사하였다. 혼합 배양을 시작한 후 8시간, 12시간이 지난 후 대장균 수는 각각 약 49%, 1.2%로 감소하였다(Fig. III-5-3). 한편, 같은 시간 동안 같은 종류의 배지에서 대장균만 단독 배양한 것은 균수가 약 15배 증가한 것으로 보아 12시간 혼합 배양 동안 B4가 이미 대장균의 성장을 크게 억제하는 것으로 보인다. 혼합 배양 후 24시간 경과 후에는 생존한 대장균은 더 이상 보이지 않았다. 한편, 생균제의 선별을 위하여 돼지 장으로부터 분리된 한 *E. faecium*

은 대장균과 혼합 배양 24시간에 완전히 억제하였다고 보고되어 있다(38). 유산균의 유해 세균 억제능력은 유산 생성으로 인한 pH 강하, 유해균과 경쟁적인 영양 성분의

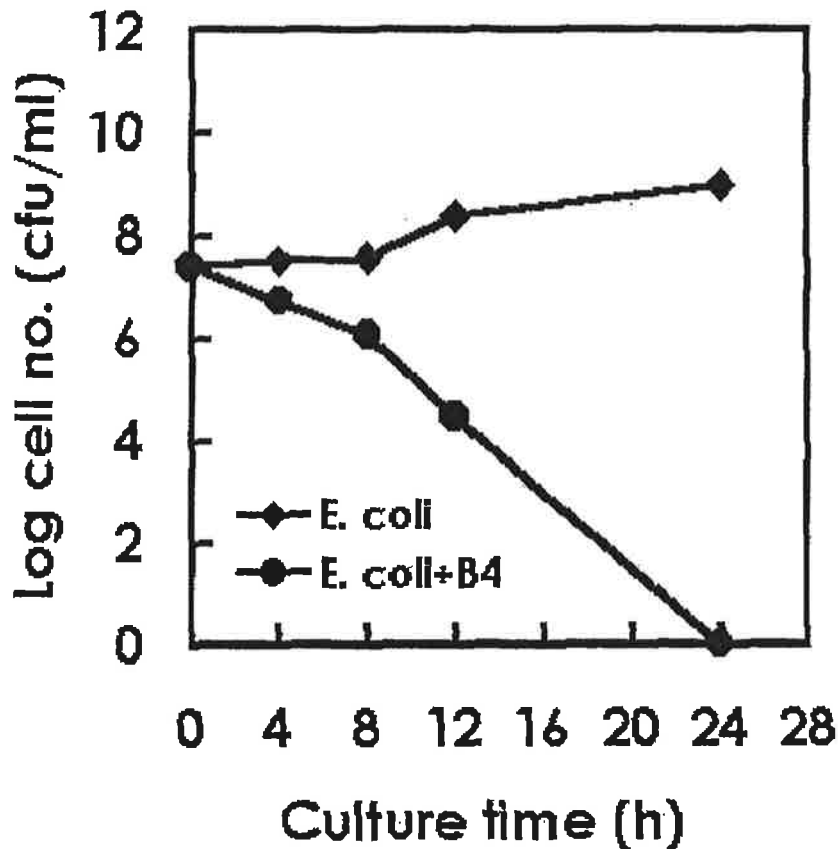


Fig. III-5-3. Growth inhibition of *E. coli* by B4 in MRS broth.

소비, 산화 환원 전위의 감소, 호기적 상태에서 과산화수소수의 생성, 항균 활성 물질의 분비등으로 알려져있다(22). 최근 사람의 장에서 분리된 *L. salivarius*의 한 단백질 성분은 *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*의 생육을 억제하지만 많은 lactobacilli의 생육은 억제하지 않는다고 보고되었다(2, 8). 이러한 점을 고려할 때 B4의 대장균 억제 능력이 복합적인 것으로 추정되지만 혼합 배양 후 pH가 6.5에서 4.3정도로 떨어지는 것으로 보아 pH에 의한 억제 능력도 있는 것 같다. 이와 함께 앞으로 동물의 사료에 B4를 투여하여 이들 유해균의 억제 능력을 조사하는 것이 필요할 것이다.



마. *Salmonella* 억제 능력

혼합 배양시 B4가 *Salmonella*의 증식을 얼마나 억제하는지를 관찰하기 위하여 배양 시간에 따른 *Salmonella*와 B4의 균수 변화를 조사하였다. 그 결과, 4시간, 8시간 경과 후 *Salmonella*의 생존률은 각각, 67% 와 35%를 나타냈으며, 12시간 후에는 더 이상의 *Salmonella*가 검출되지 않았다(Fig. III-5-4). 이러한 결과는 *Salmonella*의 빠른 증식 속도를 고려할 때 이미 혼합 배양의 초기에 B4는 *Salmonella*의 생육을 억제하기 시작하는 것으로 보이며 이러한 특성은 생균제로서 매우 잠재적 가능성을 가진 것으로 평가되었다. 비슷한 예로 일부 *Lactobacilli*가 내는 acidolin, acidophilin, bulgarican, reuterin은 *Salmonella*를 포함하는 병원성 그람 양성 및 그람 음성균에 생육저지 효과

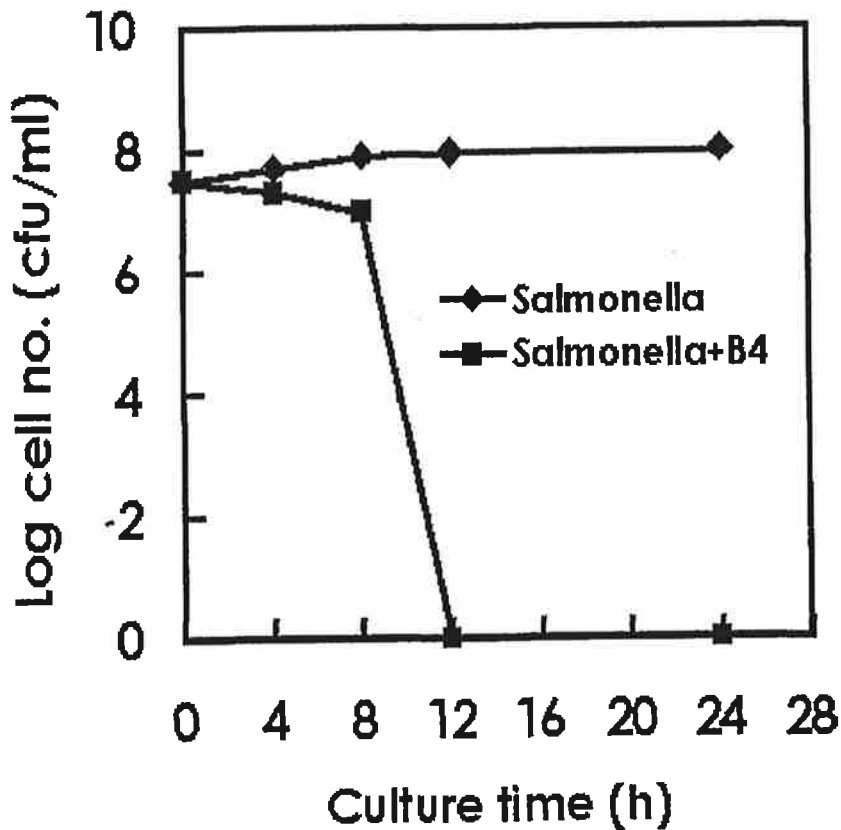


Fig. III-5-4. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by B4 in MRS medium.

가 있다는 것이 밝혀져 있다(22). 혼합 배양시 배지의 pH가 감소되는 점, B4의 매우 빠른 증식 속도, 아마도 항균 활성 물질의 분비가 복합적으로 작용하면서 배양 초기부터 *Salmonella*균을 저해하는 것으로 생각되었다.

#### 바. B4균의 동정

이 균의 현미경에 의한 형태학적 특성은 MRS 배지에서 유산균 특징인 비운동성과 길다란 간균 모양을 나타냈으며, Gram양성이었으나 포자는 형성하지 않았다. API 50 CHL(version 4.0) kit 및 API Lab Plus 동정 프로그램에 의한 동정(Table III-5-1) 결과는 신뢰도 99.9%로 *Lactobacillus salivarius*로 확인되었다. 한편, 세포 지방산 정성 분석(Table III-5-1)과 동정 library에서 검색 결과는 API 검사에서와 같이 *L. salivarius*로 동정되었는데 *L. salivarius var. salicinius*일 가능성이 가장 높았고 다음으로 *L. salivarius var. salivarius*였으나 더 정확한 균의 동정을 위하여 16s rRNA의 분석이 요구된다. 병아리 장내의 가장 내산, 내담즙성이 큰 균주의 선별에서 일반적으로 잘 알려진 정상 유산균들인 *L. acidophilus*, *L. bulgaris*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* 등이 아닌 *L. salivarius*로 동정된 것은 흥미로운 사실이었다. 최근 *L. salivarius*는 *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 등의 병원성 미생물에 효과가 있다는 것이 보고되면서 그 작용 기작이 활발히 조사되고 있다(1,2). 장내 존재하는 수많은 미생물 종류 가운데 이 균이 최종적으로 선별된 것으로 보아 앞으로 생균제로서 *L. salivarius*의 이용 가능성은 크다고 생각된다. Table III-5-1에 나타난 바와 같이 이 균은 *L. salivarius*의 고유한 생화학적 발효 특성인 glucose, fructose, galactose, sorbitol, mannitol과 같은 6탄당 및 그 환원당, lactose, sucrose, trehalose와 같은 일부 이당류, raffinose, N-acetylglucosamine만을 선택적으로 이용함을 보였다. 지방산 구성 성분은 *L. salivarius*의 고유한 지방산 특징인 cis- $\Delta^9$ -octadecenoic acid(C18:1, cis 9( $\omega$ 9))가 38.91%, 포화 지방산인 hexadecanoic acid(n-16:0)가 26.95%로 이루어져 있었으며, 미량으로 C15:0 iso 2OH/C16:1w7c와 C18:0이 각각, 1.55%와 2.07%를 함유하고 있었다. 한편, 이 균의 내산성 생존율은 50% 이상으로 *L. acidophilus*(40)만큼 높았으나 보통 내산성 인자(51)로 고려되는 세포막 11,12-methylate hexadecanoic acid(C19:0 cyclo)의 함량은 37°C에서 48시간 배양시 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*의 35-39%보다 훨씬 낮은 약 9%를 나타냈는데, 그 이유는 확실하지 않다.

사. B4균의 분말화 및 보관 안정성

총 배양액 10ℓ로부터 냉동 건조 분말로 21.3 g을 얻었으며 생존 균수는  $1.4 \times 10^{10}$  cfu/g 이었다. 따라서, 냉동 건조 전의 생존수( $1.5 \times 10^9$  cfu/ml)에 대한 건조에 감소하였다. 이 결과들로부터 B4균의 효율적 보관을 위하여는 분산제나 포도주의 후의 생존 비율은 약 2% 값을 보였다. 상온 보관에 따른 균의 생존률이 여러 안정제의 첨가에 따라 조사되었다. 사용된 첨가제 중 가장 생존률이 높았던 것은 냉동 건조전 농도가 10%(w/v)가 되게끔 polyvinylpyrrolidone을 첨가한 것으로, 20일 보관 후 약 3% 생존률을 보였다(Fig. III-5-5). 그러나, polyethylene glycol 4,000, maltose, inulin, sucrose, glycine의 첨가에서는 무첨가군과 비슷하게  $10^{-3}$ - $10^{-5}$ 정도로 그 생존율이 크게 감소하였다. 이 결과들로부터 B4균의 효율적 보관을 위하여는 분산제나 포도주의 청정제로 주로 사용되는 polyvinylpyrrolidone의 첨가가 효과적으로 생각된다. 생존제

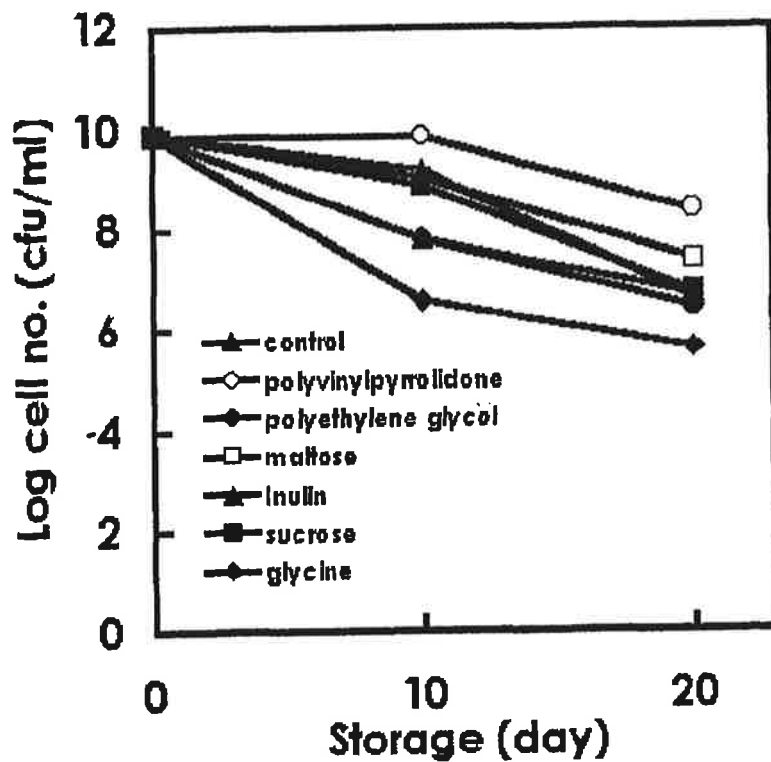


Fig. III-5-5. Effect of additives on the viability of B4 after 10 and 20 days of storage at 22°C.

로서 이 균의 문제는 보존 방법이었고 동결 건조 후 생존율이 떨어지는 이유는 확실하지 않으나 건조 과정 중 pH 감소에 의한 세포막의 손상이나 MRS배지에 첨가된 Tween 80의 농축 때문일 수도 있다. 따라서, 현재의 안정성을 높이기 위해서 배양 방법, 동결건조 보호제, 보관 방법에 대한 연구가 더 필요하리라 생각되며 현재 이에 대한 연구가 진행되고 있다.

**Table 1. Morphological and biochemical characteristics of B4 isolated from chicken intestines**

1. General characteristics					
Morphology	long rod with frequently bent shape				
Gram staining	positive				
Spore	None				
2. Utilization of carbohydrates and related carbon compounds					
Glycerol-	Erythritol-	D-arabinose-	L-arabinose-	Ribose-	D-xylose-
L-xylose-	Adonitol-	$\beta$ -Methyl-	D-xyloside-	Galactose+	Glucose+
Fructose+	Mannose+	Sorbose-	Rhamnose-	Dulcitol-	Inositol-
Mannitol+	Sorbitol+	$\alpha$ -Methyl-D-	mannoside-	$\alpha$ -Methyl-D-	glucoside-
N-acetylglucosamine+	Amygdalin-	Arbutin-	Esculin-	Salicin-	
Cellobiose-	Maltose-	Lactose+	Melibiose+	Sucrose+	Trehalose+
Inulin-	Melezitose-	Raffinose+	Starch-	Glycogen-	Xylitol-
Gentiobiose-	D-turanose-	D-lyxose-	D-tagatose-	D-Fucose-	L-Fucose-
D-arabitol-	L-arabitol-	Gluconate-	2-ketogluconate-	5-ketogluconate-	
* +: positive; -: negative					
3. Cellular fatty acid profile					
Fatty acid	Contents (%)				
14:0	6.91				
16:1 w7c/15 iso 2OH	3.21				
15:0 iso 2OH/16:1w7c	1.55				
16:0	26.95				
18:1 w9c	38.91				
18:1 w9c/w12t/w7c	11.25				
18:0	2.07				
19:0 cyclo w18c/un	9.16				

#### 4. 적요

사람이나 동물에 유해한 것으로 알려진 설사 유발 대장균과 *Salmonella*를 억제하기 위하여 닭 장으로부터 생균제로서 능력을 가진 미생물들을 분리 검색하였다. 이들 중, 위산과 담즙에 잘 견디며, 대장균 및 *Salmonella*에 대한 억제 능력이 뛰어난 한 미생물을 분리하였는데 *Lactobacillus salivarius*로서 동정되었다. 이 미생물은 pH 3의 위산에서 2시간 배양 후 67%의 생존율, 0.3% 담즙산에서는 24시간 배양 후 9%의 생존율을 나타냈다. 이 균을 설사 유발 대장균과 MRS배지에서 혼합 배양시 12시간 안에 이 유해균을 약 1%로 감소시켰고 24시간 후에는 완전히 제거할 수 있었다. 한편, *Salmonella*를 같은 조건에서 혼합 배양시에는 12시간만에 이 유해균이 완전히 사라짐을 관찰할 수 있었다. 앞으로 균주 보존 조건을 확립하고, 동물 실험에서도 유사한 결과를 얻을 수 있다면 이 분리균은 생균제로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 제 6 절 2차 시제품의 생산

앞의 제3절에서 기술한 대로 선발된 균주 *B. polyfermenticus*와 제4절과 제5절에서 기술한 대로 어린 돼지와 닭의 장에서 분리한 균주 B4와 PA10을 양산하여 냉동 건조한 다음 멸균된 효모를 부형제로 이용하여 시제품을 제조하였다. Probiotics로 사용 가능성이 인정된 이 균주들의 다량 생산을 위하여 pilot 규모의 발효기 20ℓ 및 5ℓ 용량의 발효조(KFC, Korea; working volume 2.5ℓ)를 이용하였다. 각 종균에 따라 알맞은 배양 조건을 갖추어, 배양액 내 균주들의 증식이 최대에 이르렀을 때 발효를 중지하여 시제품용 종균을 생산하였다. 양산된 이 종균들은 원심분리하여 농축액을 만든 다음, 균주들의 생존력을 높이기 위하여 냉동건조 하였고, 이들은 다시 멸균시킨 건조 효모를 부형제로 이용, 혼합하여 각각의 시제품을 제조하였다. 이렇게 하여 당해 연도에는 *B. polyfermenticus*와 닭의장에서 분리한 균주 B4, 그리고 이유 자돈의 장에서 분리한 균주 PA10에 대한 시제품을 제조하였다.

## 제 7 절 2차 시제품의 broiler에 대한 급여 효과

### 1. 서론

내산성 그리고 내담즙성이 강화된 *B. polyfermenticus*, 닭의장에서 분리한 균주 B4, 그리고 어린 돼지의 장에서 분리한 균주 PA10으로 제조한 시제품의 broiler에 대한 성능을 검증하기 위하여 2회에 걸친 사양시험을 실시하였다. 먼저 각 시제품들의 첨가 효과를 항생제를 첨가하지 않는 대조구와 비교하였으며, 다음으로 각 시제품의 복합 첨가가 broiler의 성장과 사료 이용에 미치는 효과에 대하여 항생제를 첨가하지 않은 대조구 그리고 항생제를 첨가한 처리구와 비교 검토하였다. Multi-probiotics로서의 효과를 노린 복합 첨가는 서로 다른 시제품을 2가지씩, 그리고 개발한 시제품 3가지를 모두 혼용하여 이들의 어떤 조합이 상승 효과를 나타내는지 검증하도록 하였다. 한편으로는 어린 돼지의 성장 촉진을 위하여 보편적으로 사용되는 항생제와 복합 시제품의 성능을 비교하도록 하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 시험 1

갓 부화한 1일령 하이브로 수컷 250수를 생균제를 첨가하지 않은 대조구, *Bacillus polyfermenticus* 시제품 0.2%, 병아리 장에서 분리한 균주 B4 시제품 0.2%, 그리고 어린 돼지 장에서 분리한 PA10 시제품 0.2%를 첨가하는 처리구 등 5처리, 처리 당 5반복 그리고 반복 당 10수씩으로 배치하였다. 시험은 (주)하림의 broiler 사양시험소의 무창계사 케이지에서 5주간 실시하였다. 시험사료의 기본 배합비와 화학 성분은 Table III-7-1에 제시한 바와 같은데, 조단백질이 19% 그리고 대사에너지는 2.980mcal/kg으로 하였고, 가루 형태로 급여하였다. 사료와 물은 무제한 급여하였고, 체중 측정은 시험 시작과 종료시에 사료 섭취량은 전 시험 기간 동안 누적하여 각 펜 별로 그룹 측정하였다. 기타 일반 관리는 관행에 준하였다.

나. 시험 2

본 연구에서 제조한 생균제 시제품의 multi-probiotics로서 효과를 항생제를 사용하지 않는 처리구 그리고 항생제를 사용하는 처리구와 비교 검토하도록 한 것 이외에는 앞의 시험 1에서와 시험 조건이 같았다. 1일령 하이브로 300수를 50두씩 6개 군(처리당 5반복에 반복 당 10수씩)으로 나누어 무첨가 대조구와 항생제 첨가 처리구, *B. polyfermenticus*(BP)+B4, BP+PA10, B4+PA10, 그리고 세 가지 균주를 모두 포함하는 BP+B4+PA10 복합 시제품 처리 등 6개 처리구에 배치하였다. 시험사료의 기본 배합례와 성분은 시험1에서 사용한 것(Table III-7-1)과 동일하였고, 시험기간 중 사양 및 일반 관리는 모두 시험 1과 동일하였다. 본 시험에서 사용한 항생제는 Flavomycin으로 사료에 2.5ppm이 함유되도록 첨가하였다.

Table III-7-1. Formula and chemical composition of basal experimental diet.

Ingredient	Formula (%)
Corn	63.65
Soybean meal(46%)	20.53
Rapeseed meal	5.00
Feather meal	2.50
Lupin kernell	2.00
Tricalcium phosphate	1.71
Limestone	1.08
Poultry offals	1.00
Liquid lysine(30%)	0.95
Yellow grease	0.60
Salt	0.16
Others <sup>1</sup>	0.82
<u>Chemical composition, estimated(%)</u>	
Cr. protein,	19.18
Ca,	0.88
P,	0.70
Lysine,	1.10
Met.+Cys.	0.85
ME(poultry), mcal/kg	2.980

<sup>1</sup>Others include choline(25%) 0.26%, MHA(80%) 0.20%, Min & Vit mix. 0.22%, Optizyme 0.1, and Cupuric sulfate 0.04%.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 시험 1

전 시험기간 5주 동안의 병아리 체중 변화 증체량 그리고 사료 섭취량과 사료요구율이 Table III-7-2와 Table III-7-2에 각각 보여주고 있다. BP는 전년도 실험 결과(제2장 제3절)와는 달리 병아리들의 증체량을 개선시키지 못하였다. 본시험에서 이용한 BP는 내산성과 내담즙성을 강화시킨 것임에도 불구하고 이런 결과가 나온 것은 의외라고 할 수 있다. 그러나 닭 장과 어린 돼지 장에서 분리한 균주 B4와 PA10은 대조구에 비해 7~8%의 증체량 개선 효과를 보여주었으며, 사료 섭취량은 대조구와 유사하였으나 증체량 증가에 힘입어 8~10%의 사료요구율 개선 효과를 보여주었다.

Table III-7-2. The growth of broiler chicks as affected by different probiotics (kg/bird).

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Body weight(kg/bird)		
				Initial	Final	Gain
T1	None	5	10	0.046	1.626	1.579 <sup>c</sup>
T2	BP	5	10	0.046	1.642	1.596 <sup>bc</sup>
T3	B4	5	10	0.046	1.763	1.717 <sup>a</sup>
T4	PA10	5	10	0.046	1.738	1.692 <sup>a</sup>

Table III-7-3. Feed intake by broilers as affected by different dietary probiotics (kg/bird).

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Feed intake (kg/bird)	FCR (feed/gain)
T2	BP	5	10	2.964	1.859 <sup>ab</sup>
T3	B4	5	10	3.020	1.757 <sup>c</sup>
T4	PA10	5	10	3.032	1.794 <sup>c</sup>

그러나 B4와 PA10 사이에는 병아리들의 증체량이나 사료 요구율에 있어 닭에서 분리한 균주 B4가 수치상으로 약간 우세한 경향을 보였을 뿐 통계적 유의성은 없었다.



## 나. 시험 2

시제품들을 multi-probiotics 형태로 급여했을 때 broiler 병아리들의 증체와 사료 섭취 및 이용에 대한 시험 결과가 Table III-7-4와 Table III-7-5에 보여주고 있다. 제3절)와는 달리 병아리들의 증체량을 개선시키지 못하였다. 본시험에서 이용한 BE균주는 내산성과 내담즙성을 강화시킨 것임에도 불구하고 이러한 결과가 나타난 것은 의외라고 할 수 있다. 그러나 닭의장과 어린 돼지의 장에서 분리한 균주 B4와 PA10은 대조구에 비해 7~8%의 증체량 개선 효과를 보여주었으며, 사료 섭취는 대조구와 유사하였으나 증체량 증가에 힘입어 8~10%의 사료 요구율이 개선된 효과를 보여주었다. 그러나 B4와 PA10 사이에는 병아리들의 증체량이나 사료 요구율에 있어 닭에서 분리한 균주 B4가 수치상으로 약간 우세한 경향을 보였을 뿐 통계적 유의성은 없었다.

본 시험에서는 항생제와 시제품의 효과를 함께 비교하였는데, 항생제의 급여는 병아리들의 증체와 사료요구율을 약 11%정도씩 개선한 것으로 나타났다. 표에서 보여주는 바와 같이 생균제 시제품의 복합 급여는 조합에 따라 약간씩의 수치상 차이를 보이고는 있으나 항생제를 급여한 처리구와 유사한 성장 촉진 효과를 보여주었다. 시험 1에서 병아리들의 성장과 사료 이용에 큰 효과를 보여주지 못하였던 BP를 B4나 PA10과 혼합 급여했을 때에도, 대조구에 비하여 증체량이 높았음은 물론 다른 처리구나 항생제 급여 병아리와의 유사한 성적을 보였다. 본 생균제 시제품을 복합적으로 급여한 처리구들을 전체적으로 볼 때 상호간에 차이가 없어 복합 사용에 의한 병아리의 성장 촉진 상승 효과가 나타나지 않았다. BP와 B4 그리고 PA10 세 가지를 모두 복합적으로 급여한 경우 수치상으로는 증체량이 제일 많아 복합 사용에 의한 상승 효과가 있는 듯하나 유의성이 없었다. 이러한 결과를 볼 때, 이 균주들은 서로 보완이나 공생적이라기 보다는 복합적으로 사용하면 단일 급여에 비해 보다 확실한 효과를 기대하게 해 준다고 할 수 있을 것 같다. 항생제나 생균제 시제품들의 급여는 대조구와 비교할 때 사료 섭취량에는 차이를 보여주지 않았으며, 증체량 증가에 따른 사료 요구율이 처리에 따라 대조구와 비슷하거나 약간 개선되는 효과를 보여주었다고 할 수 있다.

Table III-7-4. The growth broiler chicks as affected by multi-probiotics.

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Body weight(kg/bird)		
				Initial	Final	Gain
T1	None	5	10	0.046	1.611 <sup>c</sup>	1.565 <sup>c</sup>
T2	Antibiotics	5	10	0.046	1.789 <sup>a</sup>	1.743 <sup>a</sup>
T3	BP+B4	5	10	0.046	1.739 <sup>ab</sup>	1.693 <sup>ab</sup>
T4	BP+PA10	5	10	0.046	1.784 <sup>a</sup>	1.738 <sup>a</sup>
T5	B4+PA10	5	10	0.046	1.731 <sup>ab</sup>	1.685 <sup>ab</sup>
T6	BP+B4+PA10	5	10	0.046	1.814 <sup>a</sup>	1.768 <sup>a</sup>

Table III-7-5. Feed intake by broilers as affected by different dietary probiotics(kg/bird).

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Feed intake (kg/bird)	FCR (feed/gain)
T1	None	5	10	3.12	1.993 <sup>a</sup>
T2	Antibiotics	5	10	3.13	1.795 <sup>b</sup>
T3	BP+B4	5	10	3.02	1.785 <sup>b</sup>
T4	BP+PA10	5	10	3.17	1.823 <sup>ab</sup>
T5	B4+PA10	5	10	2.98	1.774 <sup>b</sup>
T6	BP+B4+PA10	5	10	3.03	1.816 <sup>ab</sup>

#### 4. 적요

갓 부화한 1일령 하이브로 병아리 수컷들을 시험 동물로 하여 내산성과 내담즙성을 강화시킨 *B. polyfermenticus*(BP), 닭의 장에서 분리한 균주 B4 그리고 돼지의 장에서 분리한 균주 PA10으로 제조한 시제품의 개별 급여 또는 multi-probiotics로서 복합 급여 효과를 알아보기 위하여 2차례의 broiler 사양시험을 실시하였다. 또 생균제의 복합 급여와 항생제 급여 효과도 비교하였다. 생균제 시제품을 단일 급여했을 때 PA10과 B4는 확실한 증체량과 사료요구율 개선 효과를 나타내었으나 *B. polyfermenticus*는 대조구에 비해 수치상으로는 우세하였으나 통계적 유의차를 보여

주지는 못하였다. 복합적으로 급여했을 때 대조구에 비해 현저한 증체량과 약간의 사료요구율 개선 효과가 있었으며, 항생제를 첨가한 처리구와 유사한 효과를 보여주었다. 그러나 앞에서의 실험들에서와 같이 생균제를 복합 첨가하는 상승 효과는 나타나지 않았다. 생균제를 단일 급여하거나 복합하여 급여하거나 사료 섭취에는 영향이 없었으며, 증체량 개선에 의한 사료요구율 개선 효과가 나타나는 양상을 보여주었다.

## 제 8 절 2차 시제품의 piglet에 대한 급여 효과

### 1. 서론

내산성과 내담즙성을 강화시킨 *B. polyfermenticus*(BP)와 닭의 장에서 분리한 균주 B4, 그리고 어린 돼지의 장에서 분리한 균주 PA10으로 제조한 probiotics 시제품의 이유 자돈에 대한 성능을 검증하기 위하여 자돈 사양시험을 실시하였다. 양돈 사양시험의 여건상 한 개의 실험을 통하여 각 균주로부터의 생균제 시제품 개별 급여 효과와 세 가지를 모두 포함하는 multi-probiotics 형태의 급여 효과를 동시에 검증하도록 하였다.

### 2. 재료 및 방법

평균 체중 약 10kg 정도의 6주령되는 교잡종 자돈(LY×LW×D) 400두를 80두씩 5개 군(4반복×반복 당 20두)으로 나누어 생균제를 급여하지 않는 대조구와 BP, B4, PA10 시제품 급여구, 그리고 세 가지 시제품을 함께 급여하는 BP+B4+PA10 급여구 등 5개 처리구에 배치하였다. 본 시험에 사용한 기본 시험사료 배합례와 화학 성분은 Table III-8-1에 보여주는 바와 같다. 기본 시험 사료에 항생제는 전혀 첨가하지 않았으며 생균제 시제품의 단일 급여구는 시제품을 0.2%씩 첨가하였고, 복합 급여는 BP와 B4 그리고 PA10을 각각 0.1%씩 사료에 함께 첨가하였다. 본 시험은 1998년 6월 25일부터 5주간 진행되었으며 돼지의 체중은 시작과 종료시에 개체 측정하였으며, 사료는 무제한 급여하였는데 시험기간 동안 급여량을 누적하여 각 돈방 별로 그룹 측정하였다. 기타 일반 관리는 관행에 준하여 진행하였다.

Table. III-8-1. Formula and chemical composition of basal diet.

Ingredient	Formula (%)
Corn, yellow	41.54
Wheat, hard	16.00
Soybean meal(44%)	28.00
Fishmeal(60%)	2.62
Tallow	3.00
Molassiss, cane	3.00
Bakery byproduct	2.50
Tricalcium phosphate	1.74
Others <sup>1</sup>	1.60
<u>Chemical composition(%), estimated</u>	
ME(calculated), kcal/kg	3521
Cr. protein	20.25
Ca	0.80
P	0.72

<sup>1</sup>Others include salt 0.40, lysine (90%) 0.40%, Kernzyme 0.20%, and vitamin and mineral premix 0.60%.

### 3. 결과 및 고찰

자돈에게 본 시제품들을 급여한 5주동 안의 체중 변화와 증체량은 Table III-8-2에 그리고 사료 섭취량과 사료 요구율 Table III-8-3에 보여주고 있다. 생균제 시제품을 개별적으로 급여했을 때 BP는 broiler 시험에서와 마찬가지로 증체량을 사료요구율을 개선하지 못하였다. 그러나 닭과 돼지의 장에서 분리한 B4와 PA10은 자돈들의 증체량과 사료요구율을 확실하게 개선하는 효과가 있음을 보여주었다. BP의 경우 시험 시작 때의 자돈 체중이 대조구에 비해 좀 작았던 영향도 있었으나 PA10의 경우는 체중이 더 작았음에도 불구하고 증체량과 사료 요구율이 크게 개선되는 효과를 보여준다. 내산성이 강하도록 보다 낮은 pH 3에서 새로이 선발한 이 *B. polyfermenticus*

가 1차 연도에 pH 4 선발하였던 것에 비해 이렇게 효과가 나타나지 않는 이유는 확실하지 않으나 아마도 내산성이 강한 쪽으로 선발할 때 다른 형질이 약화되었기 때문이 아니까 생각되어진다. BP와 B4 그리고 PA10 세 가지를 복합적으로 급여한 처리구의 돼지들은 대조구에 비해 증체량과 사료요구율 개선 효과를 보여주었으나 복합적으로 급여함에 따른 상승 효과는 다른 사양시험에서와 마찬가지로 나타나지 않았다. 사료 섭취에 있어서는 생균제의 급여 여부에 상관 없이 차이가 없었다. 다만 사료 요구율은 BP 시제품 급여구를 제외한 나머지 처리구들은 대조구에 비해 약간 유의하게 개선되는 결과를 보여 주었다.

Table III-8-2. The growth of piglets as affected by multi-probiotics.

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Body weight(kg/head)		
				Initial	Final	Gain
T1	None	4	20	10.79	22.07 <sup>b</sup>	11.58 <sup>c</sup>
T2	BP	4	20	9.65	21.96 <sup>b</sup>	12.33 <sup>b</sup>
T3	B4	4	20	10.57	24.14 <sup>a</sup>	13.54 <sup>a</sup>
T4	PA10	4	20	9.02	22.84 <sup>b</sup>	13.79 <sup>a</sup>
T5	BP+B4+PA10	4	20	10.21	23.86 <sup>b</sup>	13.65 <sup>a</sup>

Table 24. Feed intake and feed conversion ratio (FCR) by young piglets as affected by different dietary probiotics.

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Feed intake (kg/head)	FCR (feed/gain)
T1	None	4	20	21.27	1.836 <sup>a</sup>
T2	BP	4	20	21.45	1.739 <sup>ab</sup>
T3	B4	4	20	21.93	1.619 <sup>b</sup>
T4	PA10	4	20	22.09	1.601 <sup>b</sup>
T5	BP+B4+PA10	4	20	21.93	1.606 <sup>b</sup>

#### 4. 적요

생후 6주령된 이유 자돈 400두를 5개 군으로 나누어 생균제를 첨가하지 않는 대조군, 그리고 *B. polyfermenticus*(BP), 닭의 장에서 분리한 B4, 어린 돼지의 장에서 분리한 PA10으로부터 제조한 생균제 시제품, 그리고 이들 3개 시제품들을 함께 복합적으로 급여하는 5주간의 자돈 사양시험을 실시하였다. BP를 제외한 B4와 PA10으로 제조한 시제품들의 사료 첨가는 어린 돼지들의 증체량을 유의하게 개선하였고, 사료 섭취에는 영향이 없었으나 증체량 증가에 힘입어 사료 요구율이 어느 정도 개선하는 효과가 있었다. 이 세 가지 시제품을 복합적으로 함께 multi-probiotics로 급여한 상승 효과는 나타나지 않았다. BP 시제품의 효과가 나타나지 않은 것은 본 시험에서 내산성이 강화되도록 선발할 때 내산성은 강하나 다른 형질이 약한 균들이 선발된 때문이 아닌가 생각되었다. 생균제들 간에 큰 차이는 없었으나 닭이나 돼지의 장에서 균주를 직접 분리하면 생균제로서의 효과가 *B. polyfermenticus*에 비하여 우수한 성능을 지닐 수도 있을 것이다.

## 제 4 장 장내 균주의 재선발, 양산 및 보존성 증진

### 제 1 절 생균제 균주의 재선발

#### 1. 서론

유산균과 같은 유용한 균은 자연에 널리 분포하지만 특히 동물의 장내에 정착하여 해로운 균의 증식을 억제하는 작용을 한다 (21, 41, 42). 지금까지 가축이 질병에 걸렸을 때 다량의 항생제를 주사 및 질병의 예방 목적으로 사료에 일정량의 항생제의 첨가는 내성균의 출현과 축산물내에 항생제의 잔류 문제를 일으킬 수 있어 인간 건강의 잠재적 위협 요소가 된다. 따라서, 미국식품의약국(FDA)는 가축의 성장촉진용으로 항생제를 사용하지 못하게 하였으며, 유럽에서는 인체에 사용되는 항생제는 가축의 성장촉진제로 사용할 수 없게 되어있다. 생균제는 가축에 무해하며, 체내 잔류나 내성출현등의 위험이 없는 특징을 가지고 있기 때문에 지금까지 젖산균, 낙산균, 효모, 고초균등이 개발되어 사료들에 첨가되기도 한다. 생균제로서 요건은 위산, 담즙산에 잘 견디 소장까지 통과하는 동안 생존율이 높아야하며, 소장에 침입한 유해 대장균이나, 살모넬라균에 대해 강한 생육 억제 능력을 지녀야하는 것이 필수적이다 (10, 32, 59). 또한, 성공적인 생균제가 되기 위해서는 제조시 균체량이 많고 조제 동안 균의 생존률이 높아야한다. 이러한 조건을 만족시키기 위하여 2차년도 과제에서 우리는 동물의 장에서 생균제의 분리 방법을 확립하였고 돼지의 장에서 1종 (*Lactobacillus salivarius* PA10), 닭의 장에서 1종 (*Lactobacillus salivarius* B4)의 생균제를 얻어 동물 실험을 실시하였다. 이번, 3차년도 전반기 과제에서는 동물의 장으로부터 다양한 생균제의 분리, 균체량의 다량 획득을 위한 발효 조건의 개선, 동결건조시 생존률을 높이기 위한 효과적 첨가제가 무엇인가를 규명하는데 목표를 두었다.

#### 2. 재료 및 방법

##### 가. 닭과 돼지의 장내 균주 분리

10일령된 새끼돼지를 도살한 후 즉시 소장 윗부분을 약 10cm 잘라 -20℃에 냉동하였다. 0.85% 멸균 식염수에 약 2cm크기로 자른 소장을 멸균 가위로 펼쳐 속의 내용

물을 제거하고 세척한 다음 멸균 MRS배지에 넣고 37℃에서 24시간 정치 배양하였다. 닭의 장으로부터 균 분리는 돼지의 장으로부터 분리한 방법에 준해서 행해졌다. 사용한 닭은 2주된 재래종 숫병아리들로 도계 직후 소장의 윗부분을 7-10cm씩 잘라 냉동하였고 사용할 때마다 1cm씩 잘라 사용하였다. 기타 자세한 방법은 앞의 제3장 제4절 "2"항에 기술한 균주 분리 방법에 준하여 진행되었다.

#### 나. 내산성 균주의 1차 분리

산성에 견디는 능력이 보다 강력한 균주들을 선별하기 위하여 pH 4 대신에 pH 3으로 조절된 MRS배지 100ml에 닭과 돼지의 장으로부터 배양된 균 현탁액 2ml을 넣고 37℃에서 24시간 동안 정치 배양하였다.

#### 다. 내담즙성 균주의 1차 분리

내산성을 보유한 1차 분리 균주들로부터 내담즙성 균들을 분리하기 위하여 0.3% 담즙산이 함유된 MRS배지 50ml에 내산성 실험에서 24시간 동안 pH 3에서 생존한 균액 2ml을 첨가하고 37도에서 24시간 정치 배양하였다. 배양 후 MRS 한천 배지에 각각 0.1 ml씩 넣고 도포한 다음 24시간 배양하였다.

#### 라. 내산성 균주의 2차 분리

생체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 보다 잘 견디는 능력을 지닌 균주들을 분리하기 위하여 pH으로 조절된 펩신 함유 MRS 배지를 사용하였다. 위 "다"항에서 얻어진 콜로니들 중 분리가 잘되고 크기가 비교적 큰 것들을 골라 pH 3으로 조절된 MRS 배지 1ml씩 함유한 eppendorf tube에 각각 접종하고 37℃에서 24시간 정치배양하였다. 배양후 MRS 한천배지에 각각 0.1ml씩 넣고 도포한 다음 24시간 배양하였다.

#### 마. 내담즙성 균주의 2차 분리

"라"에서 얻어진 콜로니들의 내담즙성을 다시 재확인하는 차원에서 0.3% 돼지 담즙이 함유된 MRS 배지 1ml 씩이 들어있는 eppendorf tube에 각각 접종하고 24시간 배양하였다. 배양후 MRS한천배지에 각각 0.1ml씩 넣고 도포한 다음 24시간 배양하였다.



#### 바. 생균수의 측정

배양후 0.1ml을 꺼내 4.9ml 0.85% NaCl이 든 시험관에 넣고 잘 섞은 후 동일한 양의 NaCl이 함유된 다른 시험관들에 차례로 연속 희석(희석 배수:1/50)한 뒤, 각각 0.1ml을 꺼내 petridish에 도포한 다음 37°C에서 24시간 배양하였다. 콜로니의 수에 희석 배수를 곱하여 총 균수를 계산하였다. 기타 자세한 방법은 앞의 제3장 제2절에 기술한 균주 분리 방법에 준하여 진행되었다. 기타 자세한 방법은 앞의 제3장 제4절에 기술한 생균수 측정 방법에 준하여 실시하였다.

#### 사. 배지 및 배양 조건

분리균의 기본 배양 배지 및 배양 방법 그리고 이들의 유해 세균 증식 억제력을 검사하기 위하여 사용한 *E. coli*와 *Salmonella*는 제3장 제4절에 기술한 바와 같았다.

#### 아. 대장균 및 살모넬라균의 증식 억제 능력

MRS배지에서 배양된 선별 균주 1ml (약  $5 \times 10^8$ /ml)과, Luria-Bertani medium에서 자란 대장균(약  $5 \times 10^8$ /ml) 1ml을 새 MRS 10ml에 첨가하고 37°C에서 24시간 혼합 배양하였다. 배양 시간별로 0.1ml 씩을 꺼내 적당히 희석한 후 이를 petrifilm에 도포하여 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 균수에 희석 배수를 곱하여 대장균의 총 균수를 측정하였다. 대조 실험으로는 대장균 1ml만을 MRS배지에 넣어 같은 조건에서 배양 후 희석하여 petrifilm에 접종한 뒤 균수를 측정하였다. 살모넬라균 증식 억제 실험도 대장균 실험과 같은 방법으로 진행하였으며 살모넬라균 배양을 위하여 Bismuth-sulfite agar를 사용하였다. 기타 자세한 사항은 앞의 제3장 제4절 "마"에 기술한 바와 같다.

#### 자. 균주의 대량 배양 및 동결건조

생균제의 제조를 위한 균주의 생산 수율을 높이고 균주의 분말화 과정 중에 사멸화하는 균수를 최소화하기 위한 여러 차례의 예비 실험을 통하여 다음과 같은 조건으로 대량 배양을 실시하였다. 2대의 5L 발효조에 각각 3L의 MRS배지를 멸균한 다음 통기 없이 37°C에서 24시간 190rpm의 교반 속도로 배양하였다. 이때 seed culture의 함량은 3.3%이었다. 배양 후 탄산수소나트륨( $\text{NaHCO}_3$ )을 사용하여 배양액의 pH를 5.2로

올린 다음, 원심분리하여 균체만을 모았다. 이를  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 얼려 냉동 건조기에서 건조시킨 다음 막자사발에서 가볍게 갈아  $4^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 사용할 때까지 보관하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 내산성 특징에 의한 닭과 돼지 장내 균주 분리

돼지 장 현탁액을 분리원으로 하여 pH 3.0과 0.3% 담즙산으로 조정된 MRS 배지에서 일차적으로 530여 개의 콜로니를 얻었으며 이들 중 2차 선별 과정을 통하여 4개의 콜로니를 얻을 수 있었다. 일차 및 이차의 선별 방법은 내산, 내담즙성의 균주를 확실히 구분할 수 있었다는 점에서 바람직하였으며 일차분리시 콜로니에서 선별이 아니라 배양액 내에서 선별 방식을 택함으로써 많은 균들 가운데 선별할 수 있는 장점이 있었다. 이들은 분리 번호에 따라 A24, A,231, A232, A233으로 명명하였다. 이들 콜로니의 모양은 모두 흰색을 띄었으며 콜로니 크기는 1-1.5mm의 직경을 보였다. 닭의 장으로부터는 1차, 2차 선별 과정을 거치면서 최종적으로 3종류의 내산, 내담즙산을 가진 균주를 선별하였다. 이들 균들은 분리 순서에 따라 A11, A12, A15로 명명하였다.

#### 나. 돼지의 장 선별 균들의 특징

##### 1) 내산성

2차 선발을 통하여 이들 균이 내산성을 나타내리라 예상하였지만 내산성에 대한 상대적 감수성은 균 종류에 따라 다를 것으로 생각되었다. pH 3의 MRS 배지에서 2시간 배양시켰을 때 배양 후의 생존율은 다음과 같았다 (Table IV-1-1). 예상했던 대로 2차선별을 통하여 얻어진 이 균들은 모두 2시간의 내산성 실험 결과 70-90%대의 높은 생존율을 보였다. 따라서, 내산성 관점에서 이들은 모두 생존체로서 가능성이 있음을 보여준다.

4가지 선별균 중에서 내산성이 가장 좋았던 균들인 A232를 대상으로 시간대에 따른 pH 3에서의 생존율을 조사하였는데 그 결과는 Table IV-1-2와 같았다. A232균들은 pH3에 처음 노출되었을 때에는 증식이 약간 감소하다가 2시간 이후에는 노출되기 전의 수준으로 균수가 회복됨을 보였다.

Table IV-1-1. pH resistance of selected strains after 2h incubation in the MRS medium adjusted to pH 3.0.

Strain	Cell No. (cfu/ml)		Viability(%)
	Before incubation	After incubation	
A24	$3.2 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$	91
A231	$5.2 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	73
A232	$2.4 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	92
A233	$1.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	65

Table IV-1-2. Viability of A232 during 2h incubation in the MRS medium adjusted to pH 3.0

Time (min)	Cell no. (cfu/ml)
0	$2.7 \times 10^6$
30	$2.4 \times 10^6$
60	$2.2 \times 10^6$
120	$2.8 \times 10^6$

## 2) 내담즙성

MRS배지에서 2차에 걸쳐 선별된 균들의 담즙산이 0.3% 함유된 MRS에서 24시간 배양한 후 생존한 균수들은 Table IV-1-3과 같다. 돼지의 장에서 선별된 균들은 24시간 배양 동안 0.3% 담즙산에서 증식을 하지 못하고 그 생존율도  $10^3$  비율로 감소함을 보였다. 2차 번도에 돼지 장으로부터 분리하였던 PA10은 2시간의 내산성 실험에서 48%의 생존율을 보인 반면 내담즙성 실험에서는 76%의 생존율을 보여 같은 돼지 장으로부터 분리하였지만 내산, 내담즙성에 상당한 차이가 있음을 나타내었다. 이들 균 중 A232의 시간별 생존율은 12시간 배양 후 0.2%, 24시간 후에 0.02% 수준으로 떨어짐을 보였다.

Table IV-1-3. Bile resistance of selected strains after 24h incubation in the MRS medium containing 0.3% bile acid.

Strain	Cell No. (cfu/ml)		Viability(%)
	Before treatment	After treatment	
A24	$3.8 \times 10^8$	$2.3 \times 10^5$	$6.0 \times 10^{-2}$
A231	$6.2 \times 10^8$	$1.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^{-2}$
A232	$9.2 \times 10^8$	$2.4 \times 10^5$	$2.7 \times 10^{-2}$
A233	$4.2 \times 10^8$	$1.8 \times 10^5$	$4.3 \times 10^{-2}$

3) 대장균 및 살모넬라균 증식 억제 능력

선별된 균들이 유해 세균인 *E. coli*와 *Salmonella*의 생육을 억제하는 능력을 보면 아래 Fig. IV-1-1과 Fig. IV-1-2에 보여주는 바와 같다. 이러한 결과들로 미루어볼 때

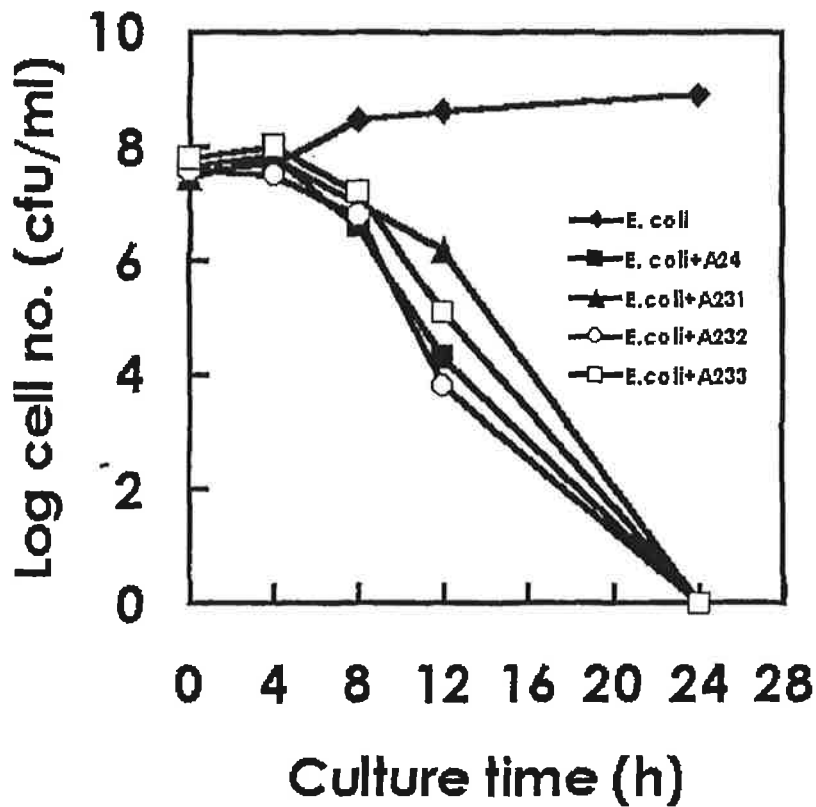


Fig. IV-1-1. Growth inhibition of *E. coli* by A24, A231, A232, and A233 in MRS medium.

이 균들은 모두 유해 균들에 대한 생육 억제 능력이 뛰어나다고 할 수 있다. 특히 12 시간의 배양 후 살모넬라균은 사라져 생균제로서 가능성이 뛰어난 것으로 보인다. 원인은 확실하지 않지만 배양액의 pH가 6.5에서 4.0-4.1의 수준으로 떨어지고 증식 속도가 매우 빠름으로 보아 이들 선별균들은 대장균과 살모넬라의 증식 속도보다 더 빠르게 증식하면서 유기산을 배양 배지에 내놓는 것으로 보인다. 따라서, pH의 감소가 필연적으로 유해균의 증식 억제 및 사멸을 가져오는 것으로 생각되었다.

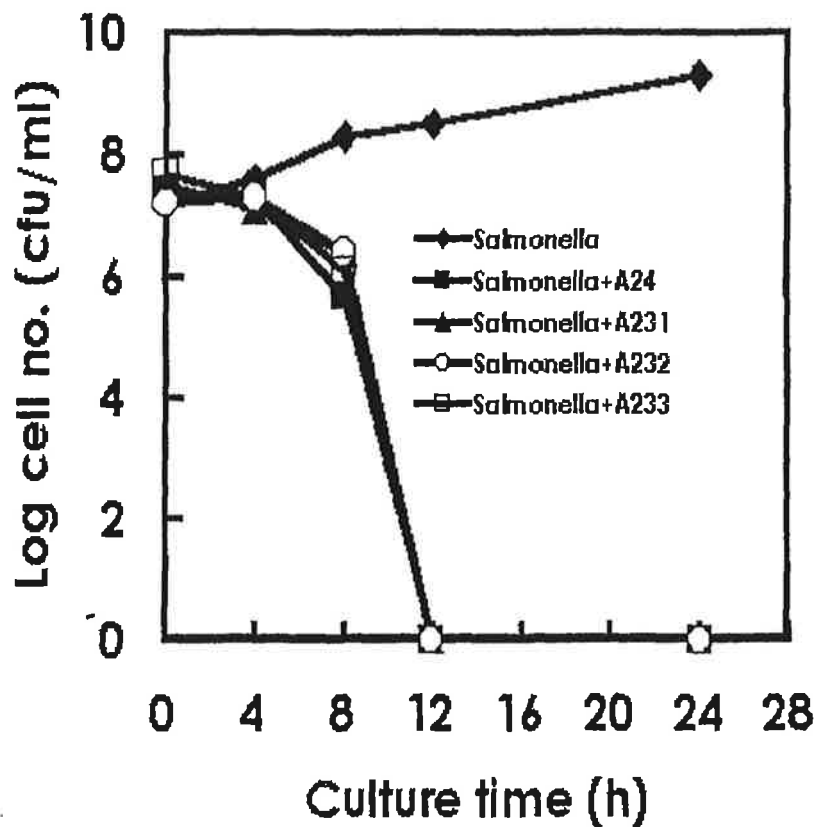


Fig. IV-1-2. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by A24, A231, A232, and A233 in MRS medium.

다. 닭의 장 선별 균들의 특징

1) 내산성

선발된 균들의 내산성을 다시 확인하기 위하여 pH 3으로 조절된 MRS배지에서 2시간 배양시키고 그 생존률을 조사하였다 (Table IV-1-4). 선별 균주들은 돼지 장에 분리한 것과 마찬가지로 약 70-90%대의 생존률을 보였다.

Table IV-1-4. pH resistance of strains isolated from the intestine of chickens after 2h incubation in the MRS medium adjusted to pH 3.0

Strain	Cell no. (cfu/ml)		Viability(%)
	Before incubation	After incubation	
A11	$5.7 \times 10^6$	$3.7 \times 10^6$	65
A12	$2.4 \times 10^6$	$2.1 \times 10^6$	88
A15	$3.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	66

2) 내담즙성

MRS배지에서 배양된 선별 균들을 돼지 담즙산이 0.3%함유된 MRS에서 24시간 배양 후 생존한 균수들은 Table IV-1-5와 같다. 선별된 균들의 생존율은 24시간 배양 동안  $10^2$ 단위로 담즙산에서 감소함을 보여 돼지 장에서 분리한 균들에 비해 담즙산에 대한 저항성이 더 강하게 나타내는 것으로 보인다.

Table IV-1-5. Bile resistance of strains isolated from the intestines of chickens after 24h incubation in the MRS medium containing 0.3% bile acid.

Strain	Cell No. (cfu/ml)		Viability(%)
	Before treatment	After treatment	
A11	$2.5 \times 10^7$	$4.2 \times 10^5$	1.7
A12	$3.8 \times 10^7$	$5.2 \times 10^5$	1.4
A15	$3.3 \times 10^7$	$2.1 \times 10^5$	0.7

### 3) 대장균 및 살모넬라균 증식 억제 능력

닭장에서 선별된 이 균들의 대장균과 살모넬라에 대한 생육 억제 능력이 조사되었다. Fig. IV-1-3와 Fig. IV-1-4는 각각, 대장균에 대한 생육 억제 능력과 살모넬라에 대한 생육 억제 능력을 나타낸 것으로 배양 후 12시간부터 억제 능력이 확실히 나타남을 보였다. 그 이유로 pH 감소, 항생물질의 생산, 대장균 과 살모넬라 보다 더 빠른 증식 속도 등을 들 수 있으나 현재까지는 확실치 않다. 돼지 장의 균에서 처럼 이들 균도 산을 생성해 24시간 배양 후 pH는 4.2-4.4 수준으로 떨어졌다.

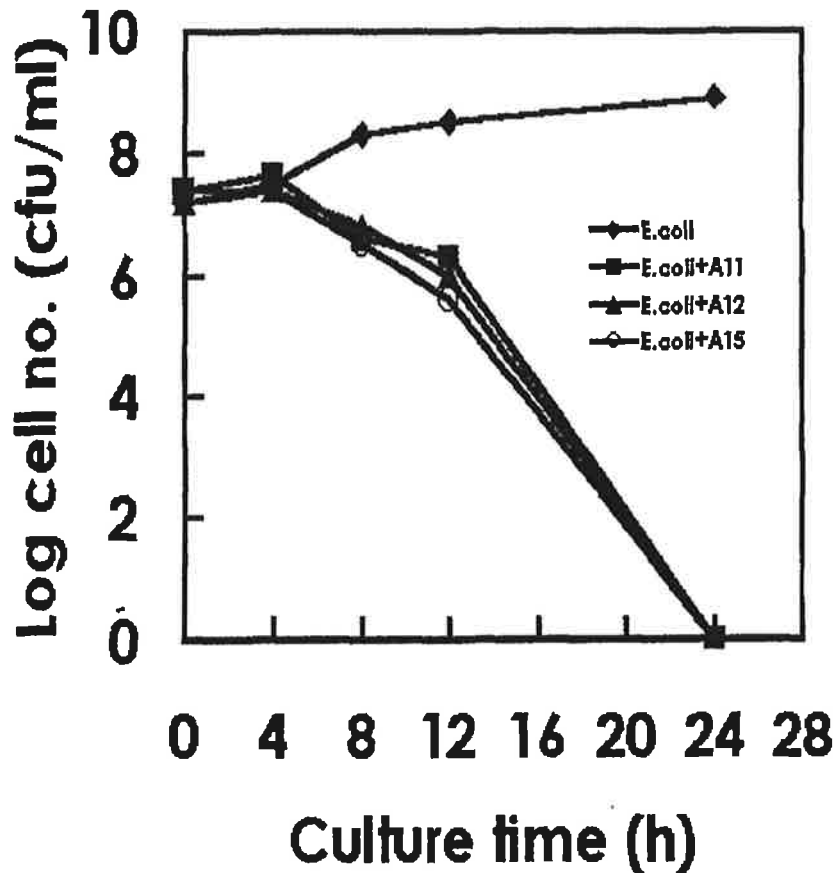


Fig. IV-1-3. Growth inhibition of *E. coli* by A11, A12, and A15 in MRS medium.

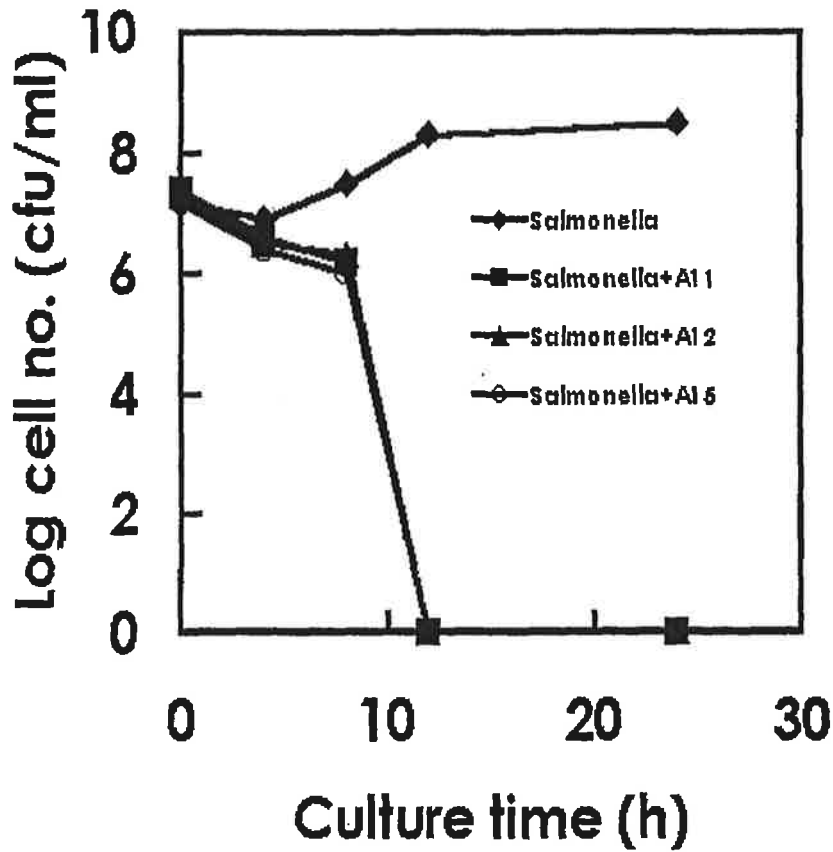


Fig. IV-1-4. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by A11, A12, and A15 in MRS medium.

라. 생균제 대량생산을 위한 발효 조건 및 분말화

균 수득률에 있어 선별한 7가지 균 모두, 통기시키지 않고 배양한 것이 통기시켜(1 vvm) 배양한 것에 비해 3배의 증가 (건조 균체량으로 2.6 g/l : 0.8 g/l)를 나타내었다. 따라서, 이들 균들은 미세 용존 산소의 농도에서 잘 자라는 특성을 나타내었고 장과 같은 혐기적 상태에 가까운 환경에서 잘 자라는 것으로 보였다.



마. 동결건조 첨가제

생균제의 냉동건조 전의 생균수에 대한 건조후의 생존 비율은 매우 중요하므로 건조 전 여러 첨가제의 첨가에 따른 생존율의 변화가 조사되었다. 즉, 10ml의 MRS에서 균을 배양 후 원심분리를 하여 균체만을 모은 다음, 40mg/20ml의 농도를 가진 여러 첨가제를 넣어 세척 후 원심분리하여 균체만을 모아 냉동건조 하였다. 그 결과는 Table IV-1-6과 같다.

Table IV-1-6. Effect of protective additives for the maintenance of viability of A232 after freeze drying.

Additive	Cell no. (cfu/ml)		Viability(%)
	Before washing	After washing	
None	$2.5 \times 10^8$	$5.4 \times 10^6$	2.1
Glucose	$3.5 \times 10^8$	$3.2 \times 10^7$	9.1
Zeolyte	$1.8 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7$	9.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$3.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	34.4
Maltose	$2.8 \times 10^8$	$8.4 \times 10^6$	3.0
NaHCO <sub>3</sub>	$3.5 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	57.1

Table IV-1-6의 결과를 보면 동결 보호를 위해 NaHCO<sub>3</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 다른 첨가제보다 효과적이었다. 배양 후의 배지 pH는 4.0-4.2부근이었고 동결건조 하는 동안 세포 주위의 부분적인 "지역에서는 농축의 결과로서 훨씬 낮은 pH가 만들어질 것으로 예상된다. NaHCO<sub>3</sub> 와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>는 중화제로 이용되기 때문에 동결건조동안 pH의 급격한 감소를 막아 세포의 생존률을 높이는 것으로 생각된다. 동결건조를 위한 최적 조건은 균을 원심분리후 NaHCO<sub>3</sub>로 pH를 5.2로 조정한 다음 원심분리후 냉동 건조시켰을 때였다. 이때 대부분 생균제의 경우 건조 세포 g당 10<sup>10</sup>단위까지 올릴 수 있었다.

4. 적요

돼지 장과 닭장으로부터 유용한 생균제를 분리하기 위하여 1차 및 2차 검색 방법을 개발하였고 그 결과 돼지 장으로부터 4종, 닭장으로부터 3종의 내산, 내담즙성 특징

을 갖는 균주들을 선별하였다. 이들 균들의 일반적인 특성은 특히 pH3의 2시간 배양 하에서 매우 안정된 산 저항성을 나타냈으며 담즙산에는 24시간 배양 후  $10^2$ - $10^3$ 의 비율로 감소하는 특성을 보였다. 이는 2차 년도에 개발한 선별한 균주들에 비해 내산성은 크게 강화된 반면 내담즙성은 낮아진 것이다. 그러나 유해균인 대장균과 살모넬라균에 대한 억제 능력은 탁월하여 혼합 배양시 12-24시간 내에 유해 생존 균들은 완전히 사라졌다. 균의 배양 특성을 고려하여 혐기적인 상태로 배양 조건을 바꾸었을 때, 균체량은 약 3배정도 증가되었고, 동결건조 조건을 개선하기 위하여  $\text{NaHCO}_3$ 로 배양액의 pH를 5.2로 올린 후 동결 건조했을 때 생존 균체수가 적어도 10배정도 증가됨을 알 수 있었다. 2차 년도에 선별된 PA10과 B4와 함께 본 년도에는 이들 균주들 중에서 닭의 장으로부터 분리한 A12과 돼지 장으로부터 분리한 A24와 A232를 동물 사료에 첨가하여 그 IN VIVO 효과를 검증하기로 하였다.

## 제 2 절 3차 시제품의 생산

본 3차 년도에 닭의 장에서 분리한 균주 A12와 돼지의 장으로부터 분리한 균주 A24와 A232 시제품을 제3장 제6절의 2차 시제품 생산 때와 같은 방법으로 제조하였다. 사양시험에 함께 사용할 BP, B4, 그리고 PA10 시제품도 함께 제조하였다.

## 제 3 절 3차 시제품의 broiler에 대한 급여 효과

### 1. 서론

닭의 장으로부터 균주 A12 그리고 돼지의 장으로부터 균주 A24와 A232가 새로이 분리되었다. 이들은 내산성이 강하도록 전 년도 보다는 좀더 낮은 pH 즉, pH4대신 3에서 견디는 것들을 분리한 것인데, 내담즙성은 약간 약화된 균들이었다. 이러한 균들로 만든 생균제 시제품을 단일 급여하였을 때 또는 multi-probiotics로서 복합 급여하였을 때 broiler 성장과 사료 이용에 어떤 효과를 보이는지, 그리고 항생제를 첨가한 경우와는 어떠한 차이를 나타내는지 등을 알아보기 위하여 broiler 사양시험을 실시하였다. 같은 동물로부터 다시 분리한 균들이지만, 분리 조건이 달랐기 때문에 전년도에 분리한 것과 다른 종류일 수도 있고, 이제까지 몇 차례 복합 생균제로 급여할 때 상승 효과가 나타나지 않았던 점에 미루어, 이러한 균들을 복합 급여할 경우에 상승 효과가 나타나는지에 대한 검증도하기로 하였다

## 2. 재료 및 방법

마니커계 아비안(Avian) broiler 수평아리 900수를 100수 씩 9개 군으로 나누어 9개 처리구 4반복으로 반복당 25수씩 평사에 펜넬로 체중이 비슷하도록 배치하였다. 처리 1은 생균제나 항생제를 첨가하지 않는 대조구이고, 처리구2와 3은 항생제 첨가구로 Avilamycin을 메이커의 권장 최저 수준 2.5ppm과 그 두 배인 5.0ppm을 사료에 첨가한 처리구이다. 처리 4, 5, 6은 금년도에 새로이 분리한 균주 A12, A24 그리고 A232를 검증하기 위한 처리구들이며, 처리 7은 전년도와 금년도에 닭의장으로부터 분리한 균주들만 복합으로 급여해 보는 B4+A12 처리구이다. 처리 8은 broiler 성장에 효과가 있었던 97 연도의 BP와 98년도의 B4 그리고 금년도에 닭의장으로부터 새로이 분리한 A12를 함께 복합하여 투여하는 BP+B4+A12 처리구이며, 마지막 처리 9는 금년도에 새로이 분리한 균들로만 복합 급여하는 A12+A24+A232 처리구이다. Table IV-3-1은

Table IV-3-1. Formula and chemical composition of basal diet.

Ingredient	Formula (%)
Yellow corn	38.2
Wheat, hard	25.0
Soybean meal (CP, 45%)	20.0
Full fat soybean, extruded	4.7
Rapeseed meal,	3.5
Yellow grease	2.5
Corn gluten meal	2.0
Tricalcim phosphate.	1.7
Others <sup>1</sup>	2.6
<u>Chemical composition(%), estimated</u>	
Cr. protein,	19.24
Ca,	0.88
P,	0.70
Lysine	1.10
Met.+Cys.	0.85
ME(poultry), mcal/kg	3.004

<sup>1</sup>Includes limestone 0.65, salt 0.2, methionine(50%) 0.4, lysine(90%) 0.25, vitamins & mineral premix 0.8, Optizyme 0.1, antioxidants 0.1, and sodium sulfate 0.1%.

기본 시험사료의 배합례와 화학 성분을 보여주고 있으며, 단백질이 19% 수준이고 대사에너지를 3000kcal/kg 수준으로 하여 전 시험기간 5주 동안 단일 사료로 급여하였다. 생균제 시제품의 첨가는 사료의 생균수가  $10^6$ cfu/kg 이상이 되도록 단일 급여구는 0.2% 수준에서 그리고 복합 첨가구는 3가지 생균제 시제품들을 0.1%씩 첨가하였다. 시험은 실제 재래식 육계 사육 농장(경기도 김포)의 현장 조건에서 평사에 칸막이를 하여 펜을 구성한 다음 실시하였다. 체중은 실험 종료시에 그리고 사료 섭취 시험기간 동안 누적하여 펜 별로 시험 종료시 사료통에 남긴 사료를 제하여 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

아래 Table iv-3-2와 Table iv-3-3은 각각 시험기간 동안의 병아리들 체중 변화와 증체량 그리고 사료 섭취량과 사료 요구율을 보여주고 있다. 성장 촉진제로서 항생제를 이용하는 경우, 경제적 이유로 인해 권장 최저 수준을 사료에 첨가하는 경우가 흔히 있다. 본 연구에서 사용했던 Avilamycin의 2.5ppm 첨가는 병아리들의 성장이나 사료 이용에 유의한 성능을 보여주지 못한 반면 최저 권장 수준의 2배 수준인 5.00ppm을 첨가하였을 때 현저하게 병아리들의 증체량이 높게 나타났다. 항생제도 적정 수준에서 충분히 투여하지 않으면 그 효과가 미흡함을 보여주고 있다.

Table IV-3-2. The growth of broiler chicks as affected by different probiotics (kg/bird).

Treatmet	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Body weight(kg/bird)		
				Initial	Final	Gain
T1	None	4	25	0.046	1.485 <sup>d</sup>	1.439 <sup>d</sup>
T2	Antibiotic A	4	25	0.046	1.508 <sup>cd</sup>	1.462 <sup>cd</sup>
T3	Antibiotic B	4	25	0.046	1.622 <sup>a</sup>	1.576 <sup>a</sup>
T4	A12	4	25	0.046	1.585 <sup>ab</sup>	1.539 <sup>ab</sup>
T5	A24	4	25	0.046	1.528 <sup>bc</sup>	1.482 <sup>bc</sup>
T6	A232	4	25	0.046	1.476 <sup>d</sup>	1.430 <sup>d</sup>
T7	A12+B4	4	25	0.046	1.621 <sup>a</sup>	1.575 <sup>a</sup>
T8	A12+B4+BP	4	25	0.046	1.636 <sup>a</sup>	1.566 <sup>a</sup>
T9	A12+A24+A232	4	25	0.046	1.535 <sup>bc</sup>	1.489 <sup>bc</sup>

본 연구에서 금년도 개발한 생균제 중 닭에서 분리한 균주 A12는 항생제에 유사한 효과를 보였으며, 약 7%의 증체 효과가 있었다. 반면, 돼지에서 분리한 균주 A24는 대조구 보다는 증체량이 많게 나타났으나, A232의 경우는 전혀 효과가 나타나지 않았다. 생균제를 두 가지 또는 세 가지 복합하여 급여했을 때, 단일 급여에 비하여 증체량이 더 많은 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 닭의 장으로부터 개발한 균주 중 2차 년도의 B4 그리고 3차 년도의 A12 두 가지를 함께 복합하여 급여했을 때, 또는 여기에 1차 년도 개발하여 broiler에 효과가 있었던 BP를 추가하여 3가지를 함께 복합한 형태로 급여했을 때 병아리들의 증체량은, A12 단일 급여에 의해 나타난 효과 보다 우수하며 항생제에 버금가는 수치를 보였으나, 통계적 유의차는 아니었다. 3차 년도에 개발한 세 가지 A12, A24, 그리고 A232를 함께 복합하여 급여했을 때에 대조구에 비해서는 약간 많은 증체량을 보였으나, 생균제 단일 급여 또는 복합 급여에 비해 저조한 증체량을 나타내었는데, 그 이유는 알 수 없었다. 이러한 시험 결과로 미루어 볼 때, 균주의 개발 방법이 서로 다른 또는 균주를 개발한 동물과 급여한 동물이 서로 다른 경우에도 생균제의 복합 급여 효과가 발현되기 쉽지 않음을 말해 준다고 하겠다.

Table IV-3-3. Feed intake by broilers as affected by different dietary probiotics (kg/bird).

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Feed intake (kg/bird)	FCR (feed/gain)
T1	None	4	25	2.651 <sup>c</sup>	1.903
T2	Antibiotic A	4	25	2.663 <sup>c</sup>	1.880
T3	Antibiotic B	4	25	2.848 <sup>a</sup>	1.862
T4	A12	4	25	2.776 <sup>bc</sup>	1.874
T5	A24	4	25	2.778 <sup>bc</sup>	1.882
T6	A232	4	25	2.691 <sup>c</sup>	1.882
T7	A12+B4	4	25	2.873 <sup>a</sup>	1.879
T8	A12+B4+BP	4	25	2.922 <sup>a</sup>	1.856
T9	A12+A24+A232	4	25	2.920 <sup>a</sup>	1.893

사료 섭취량에 있어 항생제나 생균제 복합 급여는 대조구와 생균제 단일 급여에 비해 유의하게 많았으나 큰 차이는 아니었다. 사료 요구율은 대조구를 포함한 모든 처리구가 비슷한 성적을 나타내었다. 앞의 실험들에서 생균제들은 주로 사료 섭취량에는 영향 없이 증체량 증가에 의한 약간의 사료 요구율 개선 효과가 있었던 것과는 다른 결과라 하겠다.

#### 4. 적요

3차 년도에 개발한 생균제 시제품 3가지 그리고 이들과 1차 년도와 2차 년도에 개발한 생균제들을 multi-probiotics로 복합 급여할 때 broiler의 성장과 사료 이용에 대한 효과를 검토하기 위하여 사양시험을 실시하였다. 생균제의 효과는 항생제 투여 효과와도 비교되었다. Avian broiler 수병아리 900수를 9개 처리, 처리당 4반복, 반복당 25수씩으로 나누어 5주 동안 재래식 평사 broiler 사양 방법으로 실시하였다. 3차 년도에 개발한 생균제 시제품 3가지 중에서, 닭의 장으로부터 분리한 균주 A12는 약 7% 정도의 육계 성장 촉진 효과를 나타내었고 이는 항생제와도 차이가 없는 효과이었다. 그러나 돼지 장으로부터 분리한 균주 A24 시제품은 미약한, 그리고 A232는 성장 촉진 효과가 전혀 나타나지 않았다. 아마도 이는 금년도에 개발한 균주들이 산성에는 더 강하나 담즙산에는 약해진 때문이 아닌가 하며, 균을 분리한 동물과 급여할 동물이 서로 다른데서 오는 결과일 수도 있을 것이다. 생균제를 복합하여 급여할 때 단일 급여에 비해 나은 것 같으나 병아리 성장에 유의한 상승 효과를 나타내지는 못하였다. 닭의장으로부터 분리한 균들만 복합하여 급여한 경우(A12+B4) 그리고 병아리들에게 효과가 있었던 균주들만 복합하여 급여한 경우(A12+B4+BP) 항생제와 유사한 병아리들의 성장 촉진 효과를 보였다. 그러나 3차 년도에 분리한 균주들만 복합하여 급여한 경우(A12+A24+A232)에는 통계적 유의차는 아니나 제일 저조한 성적을 나타내었다. 사료 섭취와 이용면에 있어 이번 사양시험에서는 다른 때와 달리 항생제와 생균제는 사료 섭취를 약간 많이 하였으며, 사료요구율에는 대조구에 비해 모든 처리가 개선되지 않는 결과를 보여주었다.

## 제 4 절 3차 시제품의 piglet에 대한 급여 효과

### 1. 서론

2차 년도에 돼지의 장으로 분리한 균주 PA10에 비하여 3차 년도에 보다 강화된 산성조건, pH3에서 분리한 균주 A24와 A232는 낮은 pH에서 견디는 능력은 강화되었지만 상대적으로 내담즙성은 낮아진 것들이다. PA10과 같은 종류일 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 이들은 산이나 담즙에 견디는 능력이 서로 다른 것으로 보아 서로 다를 가능성이 높다. 이렇게 돼지의 장으로부터 분리한 균주들을 복합 시제품으로 사용할 때 돼지의 성장과 사료 이용에 어떠한 효과가 있으며, 성장 촉진제로 항생제를 첨가한 것에 비하여 어떤 성능을 나타내는지 검토하기 위하여 사양시험이 진행되었다. 복합 생균제로는 돼지 장에서 분리한 세 가지 균주를 이용한 것과 일차 년도에 선발하였던 *B. polyfermenticus*, 이차 년도의 PA10, 그리고 이번에 분리한 것 중 대량 배양에 반응이 좋은 A24 세 가지를 복합으로 이용한 방안을 검토하였다. 이번 시험에서는 단기 시험에 그치지 않고 돼지들이 출하 체중에 이를 때까지의 반응을 보기로 하였다. 개발한 생균제 시제품 단일 급여보다는 보다 확실한 효과를 기대하여 복합 체제로서 항생제 투여 처리에 비해 어떠한 성능을 보여주는지 검증하기로 하였다.

### 2. 재료 및 방법

평균 체중이 약 11kg되는 자돈(LW×LY×LA) 320두를 80두씩 4개 군, 4반복에 반복 당 20두씩으로 나누어 각 펜마다 체중이 비슷하도록 배치하였다. 처리 1은 생균제나 항생제를 급여하지 않는 대조구, 처리 2는 항생제를 투여한 처리구, 처리 3은 모두 돼지의 장에서 분리한 균주 A24, A232, 그리고 PA10 시제품을 함께 투여한 처리구였고, 마지막 처리 4는 *B. polyfermenticus*와 A24, 그리고 PA10 시제품을 복합 급여하는 처리구이었다.

본 시험에 사용한 기본 사료는 Table Iv-4-1에 배합비와 화학 성분을 보여주고 있는데, 이유 자돈 사료(weaner)는 시험 초기 30일간 급여하였고, 이어서 육성돈 사료(grower)를 30일간, 그리고 나머지 50일간 비육돈 사료(finisher)를 급여하였다. 시험에 사용한 항생제는 Virginiamycin으로 사료에 제품 0.1%(10ppm)를 이유 자돈 사료와 육성돈 사료까지만 첨가하였다.

생균제는 각 시제품을 0.1%씩 첨가하여 각 균주들이 사료에  $10^6$ cfu/kg 수준으로 첨가되도록 하였고, 항생제와 마찬가지로 이유 자돈 사료와 육성돈 사료까지만 첨가하였다. 돼지들의 사료 섭취 시험 60일까지의 초기 성장 검증을 위한 기간까지와 나머지 시험 종료 때까지를 구분하여 급여량을 펜별로 누적하여 측정하였으며, 돼지들의 체중 측정은 시험 시작, 시작후 60일, 그리고 시험 종료시에 개체별로 측정하였다. 기타 일반 관리는 일반 양돈장에서 진행하는 관행에 준하였다.

Table IV-4-1. Formula and chemical composition of experimental diets for weanling, growing and finishing pigs.

Ingredient	Formula (%)		
	Weaner	Grower	Finisher
Corn, yellow	47.00	40.30	41.40
Wheat, hard	10.00	25.00	30.00
Soybean meal	23.0	21.30	17.00
Wheat bran	4.30	3.70	3.10
Corn gluten meal	5.00	-	-
Yellow grease	3.00	3.00	2.00
Others <sup>1</sup>	7.70	6.70	6.50
<u>Chemical composition(%), estimated</u>			
Cr. protein	20.38	17.55	16.14
Cr. fat	5.85	5.74	4.69
Lysine <sup>2</sup> , %	1.28	1.00	0.73
Meth+Cyst. <sup>2</sup> , %	0.69	0.60	0.57
ME, kcal/kg	3260.3	3276.9	3233.0

<sup>1</sup> Others include molasses 3.50%, tricalcium phosphate 2.00%, salt 0.40%, lysine(90%) 0.50%, and premix (vitamins & minerals) 1.30%. <sup>2</sup>Calculated values.

### 3. 결과 및 고찰

자돈들의 시험 초기 60일간의 체중 변화 및 증체량 그리고 사료 섭취량 및 사료 요구율이 Table IV-4-2와 Table IV-4-3에 각각 보여주고 있다. 자돈 사료에 항생제나



복합 생균제를 첨가 급여하였을 때 모두 돼지들의 증체량과 사료 요구율 개선에 유의성 있는 효과를 보여주었다. 항생제를 첨가한 경우 10.7% 정도의 증체 효과가 있었던 반면 A24+A323+PA10 첨가구와 BP+A24+PA10 첨가는 6.9와 7.6%의 증체 효과를 보였다. 전자의 경우 항생제 첨가에 비해 유의하게 낮은 것이었으나 후자의 경우는 수치상으로는 낮았으나 통계적으로는 항생제와 같은 수준의 증체 효과를 보여주는 것이었다. 사료 섭취량과 사료요구율은 항생제나 생균제 첨가군들이 큰 차이는 아니었으나 유의하게 개선된 성적을 나타내었으며, 항생제나 생균제 처리간에는 차이가 없었다. 이상 자돈들의 성적으로 미루어 본 연구에서 개발한 생균제는 항생제에 버금가는 성장 촉진 효과가 있음을 보여주고 있는 것이며 이는 돼지들의 어릴 때 성장이 차후 성장에 크게 영향을 미칠 수 있다는 점을 감안할 때 매우 중요하다고 하겠다.

Table IV-4-2. Body weight change of young piglets during the early growing phase as affected by different multi-probiotics.

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Body weight(kg/head)		
				Initial	Final	Gain
T1	None	4	20	11.45	41.35 <sup>c</sup>	29.90 <sup>c</sup>
T2	Antibiotics	4	20	11.37	44.47 <sup>a</sup>	33.10 <sup>a</sup>
T3	A24+A232+PA10	4	20	11.28	43.25 <sup>b</sup>	31.97 <sup>b</sup>
T4	BP+A24+PA10	4	20	11.46	43.62 <sup>ab</sup>	32.16 <sup>ab</sup>

Table IV-4-3. Feed intake and feed conversion ratio (FCR) by piglets during the early growing phase as affected by different dietary probiotics.

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Feed intake (kg/head)	FCR (feed/gain)
T2	Antibiotics	4	20	62.47 <sup>a</sup>	1.887 <sup>b</sup>
T3	A24+A232+PA10	4	20	61.36 <sup>a</sup>	1.919 <sup>b</sup>
T4	BP+A24+PA10	4	20	61.66 <sup>a</sup>	1.917 <sup>b</sup>

아래 Table IV-4-4와 Table IV-4-5는 전 시험기간 110일 동안의 돼지들의 성장과 사료 이용에 대한 성적을 각각 보여주고 있다. 대체로 초기 60일 동안의 체중 증가와 사료 섭취 및 이용율을 그대로 반영하고 있다고 할 수 있다. 생균제나 항생제를 급여하지 않은 대조구에 비해 처리구들은 모두 유의하게 증체량을 개선하였으나 9%정도 증체량 개선을 나타낸 항생제 급여 처리구에 비해 복합 생균제들은 5.8과 6.8% 증체량 개선에 그쳤으며 이는 유의하게 낮은 성적이었다. 그러나 사료 섭취량이나 사료 요구율에 있어서는 복합 생균제 처리구들이 대조구에 비해 유의하게 우수하였음은 물론 항생제 급여 처리구와 같은 성적을 보여주었다.

**Table IV-4-4. Body weight change of pigs during the entire experimental period as affected by different multi-probiotics.**

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Body weight(kg/head)		
				Initial	Final	Gain
T1	None	4	20	11.45	89.87 <sup>c</sup>	78.42 <sup>c</sup>
T2	Antibiotics	4	20	11.37	95.88 <sup>a</sup>	84.51 <sup>a</sup>
T3	A24+A232+PA10	4	20	11.28	94.24 <sup>b</sup>	82.96 <sup>b</sup>
T4	BP+A24+PA10	4	20	11.46	95.19 <sup>b</sup>	83.73 <sup>b</sup>

**Table IV-4-5. Feed intake and feed conversion ratio (FCR) by pigs during the entire experimental period as affected by different dietary multi-probiotics.**

Treatment	Probiotics	Number of Rep.	Animals per Rep.	Feed intake (kg/head)	FCR (feed/gain)
T1	None	4	20	206.21 <sup>b</sup>	2.630 <sup>b</sup>
T2	Antibiotics	4	20	214.12 <sup>a</sup>	2.534 <sup>a</sup>
T3	A24+A232+PA10	4	20	213.58 <sup>a</sup>	2.574 <sup>a</sup>
T4	BP+A24+PA10	4	20	213.67 <sup>a</sup>	2.552 <sup>a</sup>

이러한 성적을 볼 때 본 연구에서 개발한 복합 생균제 시제품들은 시험 초기 60일 동안 즉 돼지들의 체중이 40kg 내외가 될 때까지만 급여하였음에도 불구하고 돼지들

이 출하 체중에 이르기까지 6~7%의 증체량 개선과 2~3%의 사료 요구율 개선 성적을 보여 확실한 효과가 있음을 보여주었다고 할 수 있다. 따라서 본 연구의 시제품은 항생제에 비해 증체량 개선 효과는 약간 낮으나 사료 요구율 개선은 차이가 없는 좋은 성능을 지녔다고 할 수 있다.

#### 4. 적요

돼지의 장으로부터 3차 년도에 분리한 균주 A24와 A232, 2차 년도의 PA10 그리고 1차 년도의 *B. polyfermenticus*(BP)로부터 제조한 생균제 시제품을 혼합하여 multi-probiotics로서 사료에 첨가하여 어린 자돈에게 급여한 효과를 110일 동안 사양 시험을 실시하여 그 성능을 항생제 첨가와 비교 검증하였다. 사양 관리는 3단계로 나누어 이유 자돈 사료를 30일간, 육성돈 사료를 30일간, 그리고 비육돈 사료를 50일간 급여하였고 생균제와 항생제(Virginiamycin, 10ppm)는 이유 자돈과 육성돈 단계까지만 급여하였다.

시험 초기 60일 동안에는 본 시험에서 사용한 복합 생균제 시제품들은 7~8% 정도의 성장 촉진 효과가 있었고 그 중 하나(BP+A24+PA10)는 항생제에 못잖은 성장 촉진 효과를 보여주었다. 사료 섭취량과 사료 요구율에 있어서는 모두 대조구에 비해 유의하게 개선되었음은 물론 항생제와 유사한 성적을 보여주었다. 그러나 110일간의 전 시험기간을 통한 증체량은 항생제가 생균제에 비해 유의하게 더 높은 개선을 보였다. 전체적인 사양시험 결과는 본 연구에서 개발한 균주들이 양돈 사양에 효과가 있으며, 복합 생균제로 사용할 때 그 조합에 따라 성능이 달라질 수 있고, 항생제와 유사한 돼지의 성장 촉진과 사료 이용율 개선 효과를 기대할 수 있게 해준다고 할 수 있다.

## 참고문헌

1. Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M., Takagi, A. and Koga, Y. : Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, 93, 2097-2101(1998)
2. Arihara, K., Ogihara, S., Mukai, T., Itoh, M. and Kondo, Y. : Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinarius* T140 active against pathogenic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 420-424(1996)
3. Bhatt RS, Katoch BS, Dogra KK, Gupta R, Sharma KS, Sharma CP 1995. Effect of dietary supplementation of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on the biological performance of broilers. *Indian J Animal Nutr* 12(2):61-66.
4. Bohnhoff, N., Drake, B. L. and Muller, C. P. (1954) Effect of streptomycin on susceptibility of the intestinal tract to experimental salmonella infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, 132-7.
5. Buenrostro JI, Kratzer FH 1983 Effects of *Lactobacillus* inoculation and antibiotic feeding of chicks on availability of dietary biotin, *Poultry Sci.* 62 : 2022-2029.
6. Chiang SH, Hsieh WM 1995 Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asian-Austr J Animal Sci* 8(2) : 159-162.
7. CheilJedang, A leaflet "Effect of Bi-Three against *E. coli* O157", 1-2(1997)
8. Collins, F.M. and Carter, P.B.(1978) Growth of salmonellae in orally infected germ-free mice. *Infect. Immun.*, 21, 41-7
9. Collins, J.K., Hill, S., O'Sullivan, G.C. : Probiotic strains from *Lactobacillus salivarius* and antimicrobial agents obtained therefrom. International Patent Application no. PCT/IE98/00010 (1998)
10. Conway, P. L., Gorbach, S. L. and Goldin, B. R. : Survival of lactic acid

bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, 70, 1-12(1987)

11. Dare, R., Magee J.T. and Mathison, G.E. : *In-vitro* studies on the bactericidal properties of natural and synthetic gastric juices, *J. Med. Microbiol.* 5, 395(1971)

12. Difco manual 1984 Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Bacto Rogosa SL broth and Agar. P. 748-749.

13. Difco manual 1984 Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Yeast media for classification. P. 1135-1141.

14. Floch, M., Binder, H.J., Filburn, B., and Gershengoren, W. : The effect of bile acids on intestinal microflora, *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1418-1423(1992)

15. Freter, R. 1956 Experimental enteric shigella and vivrio infection in mice and guinea pigs. *J. Exp. Med.*, 104, 411-418.

16. Fuller, R.(1978) Epithelial attachment and other factors controlling the colonisation of the intestine of the gnotobiotic chicken by lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 45, 389-95.

17. Fuller R 1989 Probiotics in man and animals. *J Applied Bacteriol* 66:365-378.

18. Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. : Importance of bile tolerance of *Lactobacillus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, 67, 3045-3051(1984)

19 Goodling AC, Cerniglia GJ, Herbert JA 1987 Production performance of white leghorn layers fed lactobacillus fermentation products. *Poultry Sci* 66:480-486.

20. Hamilton-Miller, J.M.T., Shap, P. and Smith, C.T.(1996) 'Probiotic' remedies are not what they seem. *Brit. Med. J.*, 312, 55-6.

21. Havenaar, R., Brink, B. T. and Veld, J. H. : Selection of strains for probiotic use. In "*Probiotics*" Fuller, R. (ed), Chapman & Hall, New York, p.209-223(1992)

22. Holt, J. and Krieg, N.R. : Enrichment and Isolation. In "*Methods for General and Molecular Bacteriology*" Gerhardt, P. (ed), ASM, Washington, p.208(1994)

23. 7. Hong, S., Kim, W.J., Cha, S. and Lee, B.H. : Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics, *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 128-131(1996)
24. Hughes, V.L. and Hillier, S.L.(1990) Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonisation of the vagina. *Obst. Gynaecol.*, 75, 244-8.
25. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T 1995 Improved immunogenicity of oral DxRRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13:310-312.
26. Klaver, F.A.M. and van der Meer, R. : The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1120-1124(1993)
27. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. : Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.*, 29, 691-697(1974)
28. Kopeloff, N. (1926) *Lactobacillus acidophilus*, Williams & Williams, Baltimore.
29. Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. (1965) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganism. *Science*, 147 747-8.
30. Martin RG, Lyons TP, Jacques KA 1995 Biotechnology in the feed industry: Proceedings Ryu and Park : Probiotics Feeding Effect on Performance and Intestinal Microflora of Broiler Chicks 37 of Alltech's Eleventh Annual Symposium 371-378
31. Miles, RD 1990 Biotechnology in feed industry; Manipulation of the microflora for the gastrointestinal tract: Natural ways to prevent colonization by pathogens. P. 133-150.
32. McDonald, L. C., Flemming, H. P. and Hassan, H. M. : Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2120-2124(1990)

33. Mohan B, Kadirvel R, Natarajan A, Bhaskaran M 1996 Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilisation and serum cholesterol in broilers, *British Poultry Sci.* 37(2):395-401.
34. Moore, W.E.C. and Holdeman, L.V. : Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 27, 961-979(1974)
35. Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robinow, C. F. : Determinative and cytosolical light microscopy. In "*Methods for General and Molecular Bacteriology*" Gerhardt, P. (ed), ASM, Washington, p.31(1994)
36. Naiti, S., Hayadashidani, H., Kaneko, K. et al. (1995) Development of intestinal lactobacilli in piglet. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 230-6.
37. Nemcova, R., Laukova, A., Gancarcikova, S. and Kastel, R. : *In vitro* studies of porcine lactobacilli for possible probiotic use. *Berl. Munch tierarztl wochenschr.* 110, 413-417(1997)
38. Park, C.J., Pyeon, J.S., Cho, Y.K., Hong, S.S., and Lee, H.S. : Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from animal intestine and its powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 393-398(1996)
39. Park, H.S., Lee, S.H. and Uhm, T.B. : Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27, 433-440(1998)
40. Park, H.S., Lee, J.H. and Uhm, T.B. : 1999 Probiotic properties of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglet intestines. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 830-836(1999)
41. Park, H.S., Yoo, Y.H., Jeon, B.S. and Cha, J.O. : Effect of feeding viable yeast and *Lactobacillus* on milk yield and milk fat content. *Korean J. Anim. Sci.*, 38, 77-84(1996)
42. Park, S.Y., Ko, Y.T., Jeong, H.K., Yang, J.O., Chung, H.S., Kim, Y.B. and Ji, G.E. : Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid, bile and antibiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24,

304-310(1996)

43. Parker, R. B. 1974 Probiotics, the other half of antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.*, 29, 4-8.
44. Pisarski RK, Wojcik S, Kondzielska L 1995 Effectiveness of probiotics in relation to the composition of feed mixtures for broiler chickens. *uletyn - Naukowy-p-zemyslu-pas-zowego.* 34:29-37
45. Rettger, L.F. and Cheplin, H.A. (1921) A Treatise on the Transformation of the Intestinal Flora with Special reference to the Implantation of *Bacillus acidophilus*, Yale University Press, New haven, connecticut.
46. Ronald, MA 1993 Handbook of microbiological media, Brain heart infusion. P. 48-154.
47. Samminen S, Isolauri E, Salminen E 1996 Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pac J Clin Nutr* 5:53-56.
48. Salminen S, Isolauri E, Salminen E 1996 Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:347-358.
49. Sanders, M.E. (1993) Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv. Fd. Nutr. Res.*, 37, 67-130.
50. SAS 1987 SAS user guide: Statistics. SAS Inst Inc Cary NC.
51. Sim, J.H., Kim, S.K. Baek, Y.J. Oh, T.K. and Yang, H.C. : Influence of culture conditions on acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 17-23(1995)
52. Sperti, G.S. (1971) Probiotics, Avi Publishing Co., West Point, Connecticut.
53. Stanley VG, Ojo R, Woldesenbet S, Hutchinson DH, Kubena LF 1993 The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *poultry Science*, 72(10):1867-1872.



54. Hong, S., Kim, W.J., Cha, S. and Lee, B.H. : Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics, *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 128(1996)
55. Steel, RGD, Torrie JD 1980 Principle and Procedures of Statistics; A Biometrical Approach. P. 137-171. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, NY.
56. Tannock, G.W., Fuller, R. and Pederson, K. (1990) Lactobacillus succession in the piglet's digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *App. Environ Microbio.* 56, 1310-16.
57. Timms, L 1968 Observation of the bacterial flora of the alimentary tract in three groups of normal chickens. *British Vet J* 124:270-477.
58. Tortuero F 1973 Influence of the implantation of *L. acidophilus* in chicken on growth, feed conversion, malabsorption of fat syndrome and intestinal flora. *Poultry Science* 52:197.
59. Underdahl, N. R., Torres-Medina, A. and Doster, A. R. : Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 43, 2227-2232(1982)
60. 남궁환, 손익환, 정진성, 백인기 1986 생균제와 항생제가 병아리의 성장과 장내 세균총에 미치는 영향. *한국가금학회지*. 13(1):49-55.
61. 심재현, 오세종, 김상교, 백영진 : 젖산 발효제품에서 분리한 유산균의 내산성 비교, *한국 식품 과학회지*. 27, 101(1995)
62. 염금희, 장동운, 이봉덕, 이병노, 성장근 : 가금 똥을 딱딱하게 할 수 있는 새로운 방법, *한국식품영양과학회 제 41차 춘계 학술발표회*(1997)
63. 윤성식, 이해옥, 유주현 : 아미노산 혼합용액이 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 동결건조 및 저장성에 미치는 영향, *산업미생물학회지*. 14, 421(1986)
64. 이을연, 이봉덕, 지설하, 박홍석 : 생효모배양물의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향, *한국 가금학회지*. 22(2), 77(1995)
65. 한국과학기술원 유전자은행 : 미생물균주 카탈로그, 제3판. 28(1992)