

최 중  
연구보고서

복합생균제 피복기술에 의한  
양돈용 사료첨가제 개발

Developments of feed additive for pig  
through encapsulation of probiotics

연구기관

고려대학교 생명산업과학부  
고려대학교 식품과학부  
한국식품개발연구원 식품소재연구팀

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “복합생균제 피복기술에 의한 양돈용 사료첨가제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 30일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 황 광 연

세부연구책임자 : 김 세 헌

연 구 원 : 김 중 건

연 구 원 : 윤 형 돈

연 구 원 : 박 순 옥

연 구 원 : 김 지 옥

연 구 원 : 김 영 훈

연 구 원 : 최 성 순

연 구 원 : 임 현 진

연 구 원 : 강 수 경

위탁연구기관명 : 한국식품개발연구원

위탁연구책임자 : 박 동 준

# 요 약 문

## I. 제 목

복합생균제 피복기술에 의한 양돈용 사료첨가제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

동물의 성장능력과 건강상태의 개선에 의한 생산성 증진을 통해 양돈산업의 경쟁력 향상이 요구되고 있다. 특히 돼지에서 자돈의 설사증은 성장능력 감소와 폐사의 주요원인이며, 설사증의 예방, 치료를 위해서 항생제를 사용하나(Visek, 1978; Walton, 1980), 축산물 내 잔류 및 내성에 관한 위험성이 부각되고 있다. 또한, 국내 축산산업에 있어서도 사료내 항생제 첨가는 단계적으로 제한될 전망이며, 항생제의 대체효과를 가지는 생균제가 이미 사용되고 있으나 그 효과는 미미한 실정이다.

생균제란 동물 또는 사람이 섭취하였을 때 장내 토착미생물들의 특성을 향상시켜 숙주에게 유익한 영향을 주는 살아있는 단종 또는 혼합된 균주들로 정의된다. 이러한 생균제는 가축이 섭취하였을 때 성장촉진과 사료효율의 향상, 장내 미생물의 경합에 의한 어린 동물들의 장질환 방지 및 병원성 미생물 감소, 면역기능향상 등 다양한 면에서 유익한 영향을 미치며, 그 결과로 돼지의 경우 설사에 의한 성장저하와 폐사율을 줄일 수 있다. 특히, 생균제와 특정 기질을 함께 사용하여 유발되는 시너지 효과에 의해 생균제의 활력이 증가되며, 이에 의한 자돈의 건강증진 효과가 상승된다는 결과(Paker, 1974)가 발표된 이후, 생균제와 시너지 효과를 일으킬 수 있는 물질중 하나인 prebiotics는 사료 첨가제로서의 이용이 고려되어 왔다.

Prebiotics란 장내에 서식하고 있는 미생물들의 성장과 활력에 선택적으로 작용하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 비소화성 식품 성분들을 총칭하는 물질로서 생균제에 기질로 작용하여 궁극적으로는 숙주의 건강을 향상시키는 기능을 발휘한다. Prebiotics는 특정균주의 선택적인 성장을 촉진하여 장관 내 미생물 균총을 변화시키며 대표적으로 inulin과 fructooligosaccharides(FOS)에 대한 연구가 이루어져왔다.

국내 사료 첨가용으로 사용되는 생균제 및 생산에 있어 가장 큰 문제점은 다음과 같

다.

- ▶ 높은 수입 의존도: 생균제용 균주개발을 위한 선별방법과 생산기술의 미비.
- ▶ 기능의 저하: 생산, 저장 및 가공중 제품에 함유되어 있는 미생물의 생존균수의 저하.
- ▶ 효과검증의 미비: 동물실험을 통한 객관적이며 과학적 검증 자료의 부재.

이러한 문제점들을 해결하기 위한 방안으로는 다음과 같은 연구가 필요하다.

- ▶ 내산, 내담즙, 항미생물성 및 면역증진 작용을 갖는 우수한 생균제용 균주를 선별하고, 이들 균주의 최적생산 조건을 확립하며, 생균제의 가공·이용간 활력유지 방안을 강구.
- ▶ 분체복합화를 통하여 생균제의 저장기간 연장과 장내 생존력을 증진.
- ▶ 생균제의 활력에 시너지 효과를 유도할 prebiotics 물질을 선별하고 이들을 균주와 같이 복합분체화 또는 단독으로 사료에 혼합하여 생균제의 장내 활력을 배가.
- ▶ 세분화된 생체 안정성 실험과 현장적용 실험을 통해 돼지에서의 생균제 및 prebiotics의 실질적인 효능과 경제성을 검증.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 제 1 항 기능성 균주와 prebiotics를 이용한 복합 생균제 개발

- 가. 내산성, 내담즙성, 항균능력에 근거한 생균제 균주 선별
- 나. 선별된 균주의 최적 생산을 위한 배양기술 구축
- 다. Prebiotics 물질의 선별
- 라. Prebiotics의 생균제와의 시너지 효과 검증
- 마. 생균제 저장 기간 중 활력변화 비교 분석
- 바. 다양한 병원성 균주에 대한 박테리오신의 항균능력 조사
- 사. 장관 세포에 대한 점착성 연구

#### 제 2 항 분체 복합화 기술 확립

- 가. 분체복합화 피복재의 선정 및 피복조건의 최적화
- 나. 분체복합 생균제 가공시 물리적, 구조적 특성 제고
- 다. 분체복합 생균제의 내산성, 내열성 및 장용성 검증
- 라. 분체복합 가공 단계별 생균제의 활력 변화 조사 및 생산공정 확립
- 마. 분체복합 생균제의 사료 첨가 형태 결정 및 제품 안정성 확립
- 바. 균체의 2차가공을 위한 물성 개량 및 scale-up 조건 확립

### 제 3 항 복합생균제의 사료 안정성 및 동물 능력개선효과 검증

- 가. 자돈의 설사증 원인 및 병원성균에 대한 항균능력 조사
- 나. 자돈에서 선별 생균제의 효과 검증
- 다. 분체복합화된 생균제의 사료내 안정성과 혼합도 조사
- 라. 사료내 생균제의 내열성 및 장용성 검증
- 마. 생균제 및 prebiotics의 생체내 시너지 효과 검증
- 바. 현장 실험을 통한 생균제의 돼지 생산성 검증 및 첨가수준과 급여기간 설정
- 사. 도체 품질 조사 및 식품 안정성 확인
- 아. 생균제의 경제성 검증

본 과제는 우수한 생균제 균주를 확립하고, 분체복합화 하여 안정성을 확보한 후, 사료 첨가제로써의 가치를 돼지 사양 실험을 통해 검증하고자 하였다. 따라서, 본 과제의 실험은 probiotics 균주의 선별, 생산 최적화 및 prebiotics 물질을 선별하고 안정성과 효능을 검증한 후, 이를 안정화 하기 위한 분체복합화 조건을 확립하여 자돈과 비육돈에서 그 효과를 검증하였다. 또한, 가공 및 저장 중 생균제의 활력 변화를 비교 분석하고 부가적 기능성까지 검증하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 기능성 균주와 Prebiotics를 이용한 복합생균제 개발

기능성 균주와 prebiotics를 이용한 복합생균제 개발을 위하여 다양한 근원으로부터

유산균주를 분리, 동정하였으며 이들의 내산성, 내담즙성 및 박테리오신 생산능력을 조사하였고 그 결과 우수한 probiotics 균주 17종을 선별하였다. 이러한 균주 중 9종을 대상으로 skim milk, glucose, yeast extract를 독립변수로 하여 반응표면분석법으로 대량 생산을 위한 최적 생산 배지를 설정하였고 선발과정에서 우수한 특성을 나타낸 *L. acidophilus* 107A와 *L. casei* 393에 대한 반응표면도를 도출하였다. 또한, 균주의 대량 생산시 적절한 회수조건의 설정을 위해 생산된 균주의 농축, 동결 공정과 저장중 생존성을 검사하였는데 *L. casei* 910, *L. casei* ssp., *L. rahnosus* 7469, *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 393이 저항성이 우수하여 회수율 및 생존율을 높은 것으로 판단되었다. 또한, prebiotics 물질의 선별을 위해 선별된 균주들의 기질로서 여러 prebiotics 대상물질의 이용성 여부를 조사하였고 이를 검사하기 위한 선별방법은 배지내 pH 변화, prebiotics 함유한 고체배지내 배양 후 색변화, 생균수를 측정하였는데 여러 prebiotics 물질과 probiotics 균주를 조사하는 방법으로는 배지내 pH 측정이 효율적인 것으로 판명되었다.

또한, 5종의 prebiotics에 의해 성장이 증진되는 생균제를 선별 후 prebiotics의 최적 첨가비율을 설정하였다. 다양한 비율로 prebiotics를 첨가한 배지에서 균주의 성장능력을 조사하였으며 prebiotics간의 상호 시너지 효과를 반응표면방법론을 이용하여 검증하였다. 통계적인 방법을 통하여 최적 혼합비율을 설정하였을시 균주의 생육을 최대로 하는 최적 prebiotics의 함량을 설정할 것으로 판명되었다. 생균제의 저장 중 활력의 소실 정도를 조사하기 위해 4℃, 25℃ 및 37℃에서 저장하면서 생균제의 활력 변화를 조사하였더니 고온인 37℃에서보다 낮은 온도에서 생균제의 활력이 유지되는 것으로 판단되었다. 또한, 생균제의 장기보전을 위한 동결보존제의 선별과 최적 첨가비율을 설정하였다. 그리고, 선별된 균주를 대상으로 당 테스트 등의 생리, 화학적 방법과 병행하여 유전자 수준에서의 동정을 실시하였다. 생균제의 유전자 염기서열을 NCBI의 GenBank와 비교하여 각각의 종명을 확인하였다. 그리고, 부가적인 기능성 검증을 위하여 최종적으로 복합생균제용으로 선별된 균주의 박테리오신의 항균능력 범위와 활력을 조사하며 세포실험을 통하여 장관내 부착능력을 살펴본 결과 *L. acidophilus* 107A 균주는 여러 병원성균주에 대하여 항균능력을 가지고 있는 것으로 확인되었고 장세포에 점착능력도 우수한 것으로 판단되어졌다.

## 2. 분체 복합화 기술 확립

양돈 사료 첨가시 안정성과 효능을 극대화하기 위한 생균제의 분체복합화 기술 확립을 위하여 기능성 피복재의 선별과 가공적성 분석, 피복조건의 최적화 및 물리적 특성을 비교하였으며 prebiotic 물질의 균체 피복재로서의 가능성을 검토하였다. 균체 피복물질로는 5가의 장용성 소재를 이용하였는데 그 중 Sureteric과 Compritol 888이 피복능력이 우수하였으며 생균제와 피복재의 배합비가 9:1 이고 분체복합화 처리조건이 15,000 rpm, 3분인 경우 매끄럽고 균일한 피복효과가 관찰되었다. 분체복합화를 위한 가공은 Hybridization system을 생균제에 적합하게 개선하여 실시하였다. 또한 피복조건을 최적화하기 위한 피복재의 초기 입도를 조사하였다. 균체 피복재로서 prebiotic은 단일 피복재로는 충분하지 않았으나 Sureteric을 이용한 2차 피복을 이용하여 prebiotic을 균체와 함께 피복할 수 있었다. 분체 복합화 후 생균제의 활력은 유지되었으며 균체의 가공 및 저장 중 활력변화와 생존율 검증을 위하여 내산성 및 내열성을 조사한 결과 사용된 균주의 자체 내산성이 우수하여 분체복합화를 실시하지 않은 경우에도 매우 높은 생존율을 나타내었으며 분체복합화에 의한 균주의 내열성은 우수하게 나타났다. 최종적으로 양돈 사료 첨가용 생균제로 선별된 *L. acidophilus* ATCC 107A가 사료형태에 따라서 안정성에 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 분말형사료와 펠렛형사료를 제조하여 0.2% 균주를 첨가하여 온도에 따른 변화를 측정하였다. 펠렛형 사료의 경우 저장중의 열에 의한 사멸, 펠렛 건조과정중 공기와의 접촉 및 압착과정에 의한 스트레스, 생균수 측정을 위한 건조 펠렛의 분쇄과정 중 사멸, 펠렛 공정중 수분과의 접촉 및 오염가능성 등에 의하여 초기균수가 저하되었으므로, 본 실험에 의한 사료형태에 의한 생균제의 안정성은 분말형이 더 적합하다고 판단되어진다.

### 3. 복합생균제의 사료 안정성 및 동물 능력개선효과 검증

복합생균제 또는 생균제의 양돈사료 첨가시 사료내에서의 안정성과 성장능력 개선효과를 검증하였다. 1차 년도에 *in vitro* 상에서 선발된 가능성 있는 4가지 균주를 대상으로 실시한 자돈에서의 생균제 효과 검증에서, 선발된 4가지 균주 모두 초기에는 대조구보다 높은 성장을 보였다. 특히, *lactobacillus acidophilus* 393과 107A는 실험 전기간에 걸쳐 자돈의 성장능력을 증가시켰는데, 이는 일당증체량의 증가뿐만 아니라 사료효율의 개선도 있었다. 또한, 생균제를 급여한 처리구는 대조구에 비해 설사빈도가 감소하는 경향을 보여 이는 자돈의 장내 환경에 유익한 것으로 생각된다. 1차 실험에서 현장적용시 효능과 경제성을 가질것으로 판단된 *lactobacillus acidophilus* 107A와 393을 제 1세부과제에서 선발된 prebiotics인 lactulose의 생체 *Lactobacillus acidophilus*

107A and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* 107A내 시너지 효과를 검증한 2차 실험에서는 *lactobacillus acidophilus* 107A의 경우 prebiotics 첨가시보다 균주만을 첨가하였을때 높은 성장률을 보였고 개선된 성장을 보인 반면, *lactobacillus acidophilus* 393의 경우 prebiotics 첨가시 더 높은 일당증체량 보였다. 두개의 처리구는 비슷한 일당 증체량을 나타냈지만 *lactobacillus acidophilus* 107A가 사료효율의 개선에서 *lactobacillus acidophilus* 393보다 더 높게 나타났다. 최종적으로 선발된 *lactobacillus acidophilus* 107A의 열안정성을 검증하기 위하여, 사료 생산시의 공정과 저장기간에서 받을수 있는 조건을 가지고 실험하였다. 일반적인 펠렛공정시의 온도인 60℃, 75℃, 90℃에서의 각각 69%, 74%, 56%로 생존수가 감소하였다. 또한, 저장기간에 따른 변화에서는 10℃에서 보관시 큰 변화는 없었으나, 20℃와 30℃에서는 28일동안 58%와 34%로 급격히 감소하였다. 현장 실험을 통한 복합생균제의 동물능력 개선효과를 검증한 3차 실험에서는 분체 복합화한 *lactobacillus acidophilus* 107A와 분체복합화 하지 않은 *lactobacillus acidophilus* 107A의 사료내 첨가하였는데, 이는 항생제를 첨가하지 않은 처리구보다 높은 일당증체량을 나타냈고, 항생제 첨가구와 비슷한 일당 증체량을 나타냈다. 또한, 실험 전기간에 걸쳐 분체 복합 생균제의 경우 항생제 처리구보다 조금 높은 일당증체량을 나타냈지만, 조금 낮은 사료효율을 보였다. 이러한 생균제나 분체복합 생균제의 사료 첨가시 발생할수 있는 육질의 저하 측면에서도 항생제 처리구와 다르지 않은 품질을 보였다.

본 과제의 실험 결과 *Lactobacillus acidophilus* 393과 *Lactobacillus acidophilus* 107A의 내열성 및 내산성, 내 담즙성이 우수한 것으로 나왔으며, 분체 복합화 과정 중에도 활력이 우수하게 유지되는 것으로 나왔다. 사양 실험의 결과, *Lactobacillus acidophilus* 107A가 돼지의 성장 성적에 유의적이지는 않으나, 수치상 향상시키는 경향을 보여주었고, 또한 항생제 대체의 가능성까지 보여주었다. 실험 결과, *Lactobacillus acidophilus* 107A가 내열성 측면에서는 매우 우수하지는 않으나, 성장개선 측면에서는 가능성있는 첨가제로 밝혀졌으며, 향후 상업적인 가치를 지니고 있는 것으로 판단된다. 반면, *Lactobacillus acidophilus* 107A의 경우 선별된 prebiotics인 lactulose와 함께 급여시 돼지의 성장 성적에 큰 향상이 없는 것으로 보인다. 따라서, 선발된 균주인 *Lactobacillus acidophilus* 107A와 prebiotics간의 좀더 심도있는 연구가 필요하다.



## SUMMARY

### (영문 요약문)

In order to develop a probiotic product for promoting growth performance of pigs, many strains of microbials were isolated from various sources. Many laboratory tests, such as acid tolerance, bile tolerance, and production of bacterocin for anti-microbial resistance were conducted to select reliable strains. As a result, seventeen strains of microbials were selected to be coated with prebiotics.

To optimize growth of microbials, Response Surface Methodology was used to develop a optimum medium. Skim milk, glucose, and yeast extract were considered as a major ingredient for microbials and the composition of medium was determined for selected strains. Response Surface Methodological figures of *L. acidophilus* 107A and *L. acidophilus* 393, which showed a relatively good property during selection, were visualized. And, to optimize for mass production, the viabilities of strains were determined when microbials were concentrated, frozen and stored. The *L. casei* 910, *L. casei* ssp., *L. rahmnosus* 7469, *L. acidophilus* 107A, and *L. acidophilus* 393 showed a reliable viability. The change of pH and color of broth and agar plate, which contained different prebiotics, and the viable cell counts were investigated to confirm the effects of prebiotics. The change of pH showed more accurate results than the change of color or the viable cell counts. Suitable strains were selected under addition of prebiotics. The Response Surface Methodology was used to determine the optimal concentration of prebiotics to maximize the synergy effects of mixture of probiotics and prebiotics. It was revealed that the statical methods for determine the medium recipe for microbial had reliable results.

The stability of microbial was investigated during stored at different temperatures, 4°C, 25°C, and 37°C. The stability of microbial was better at low temperature (4 °C than high temperature(25°C and 37°C). To make a optimize stock solution for long storage in frozen, the materials for stock and the ratio among materials were determined. Physio-chemical methods were used to determine the strains of isolated microbials. To confirm strains base on genomic level, the intergenic spacer region between 16S rRNA and 23S rRNA were sequenced. The

strains were confirmed by comparing the sequence to National Center for Biotechnology Information and Gen Bank. The anti-microbial spectrum and viable cell counts were investigated for other effects. The adherence of selected strains against intestinal track, was tested by using intestine epithelial cells. It was found that *L. acidophilus* 107A had a wider anti-microbial spectrum and a superior adherence against intestinal track than other microbials.

In selection of coating materials, analysis of processability, optimization of coating process, comparison of physical properties, and possibility of prebiotics as coating materials were studied to develop a new powder surface modification technology of probiotics for improvement of stability and functionality as a feed additive in swine diets.

Five enteric coating materials were compared as a candidate coating material of powdered probiotics. Among 5 materials, Sureteric and Compritol revealed a relatively good and smooth coating ability when the ratio of probiotic and coating material was 9:1 at 15,000 rpm for 3 min by Hybridization System. Some coating materials needed additional grinding after particle size analysis. Prebiotics which are known to help or promote health benefit bacteria in large intestine, was not perfect as a single coating material. But after the secondary coating with Sureteric, a significant improvement of coating quality was observed.

Viable cell counts of a powder surface-modified probiotic remained viable well. And acid tolerance of probiotic was very high even when modification process was absent, possibly due to the high acid tolerance of probiotic itself. And the heat stability has much improved by powder surface modification process.

Finally, *L. acidophilus* ATCC 107A was selected as probiotic for feed additive in swine diets at 0.2% level. The stability of different forms of additive was compared between pellet type and mesh type at various storage temperatures. For pellet type, initial viable cell count has decreased by heat and pressure shock during pellet processing, drying, contact of water, and possible contamination. According to the viable cell count analysis, mesh type was more reliable than pellet type to ensure

stability of probiotic.

The effects of probiotics and coated-probiotics on growth performance of pigs were investigated. Four strains of microbials were selected based on *in vitro* experiments. These microbials were used as probiotic in weaned pigs diets. They had a growth promoting effects when compared with control group. The *Lactobacillus acidophilus* 393 and *Lactobacillus acidophilus* 107A fed pigs showed more higher average daily gains among the pigs fed probiotics. Feed efficiency was also improved. The diarrhea frequency was also reduced in pigs fed probiotics compared to non probiotics fed groups. This result showed that probiotics had a positive effect on intestinal ecosystem. The *Lactobacillus acidophilus* 107A and *lactobacillus acidophilus* 393 had a positive effect on growth performance. They were used to investigate the synergy effects with prebiotics. The synergy effect of *Lactobacillus acidophilus* 107A and *lactobacillus acidophilus* 393 with lactulose was superior to other prebiotics *in vitro* experiments. The lactulose was used as a prebiotics. Prebiotic improved the growth promoting effects of *lactobacillus acidophilus* 393. However, the synergy effects of *Lactobacillus acidophilus* 107A with prebiotics was not observed. The average daily gains of the pigs fed *Lactobacillus acidophilus* 107A and the pigs fed *Lactobacillus acidophilus* 309 with prebiotics were not different. However, the feed efficiency of the pigs fed *Lactobacillus acidophilus* 107A was higher than that of the pigs fed *Lactobacillus acidophilus* 309 with lactulose. Finally, *Lactobacillus acidophilus* 107A was selected as a candidate microbial as probiotics. The *Lactobacillus acidophilus* 107A was used as probiotics for hybridization with coating material. The *Lactobacillus acidophilus* 107A and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* 107A were used as probiotics in growing-finishing pigs. The *Lactobacillus acidophilus* 107A and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* 107A had a same effects as antibiotics was added to feed. Average daily gains of pigs fed *Lactobacillus acidophilus* 107A and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* 107A as a probiotics did not differ from that of pigs fed antibiotics. And there were no difference among treatments in meat quality.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	16
1. Objective .....	16
2. Reasonability .....	16
2.1 Technical aspect .....	18
2.2 Economic and industrial aspect .....	19
2.3 Cultural aspect .....	19
3. Scope of research and development .....	21
3.1 Selection of prebiotics for coating selected probiotics .....	21
3.2 Evaluation of hybridization condition .....	21
3.3 Evaluation of stability and growth promoting effects of probiotics .....	21
Chapter 2. Present condition of technique .....	22
Chapter 3. Research contents and result .....	26
1. Selection of prebiotics for coating selected probiotics .....	26
1.1 Materials and methods .....	26
1.2 Results and discussion .....	38
2. Evaluation of hybridization condition .....	93
2.1 Materials and methods .....	93
2.2 Results and discussion .....	100
3. Evaluation of stability and growth promoting effects of probiotics .....	140
3.1 Materials and methods .....	140
3.2 Results and discussion .....	149
Chapter 4. Achievements and contributions .....	174
1. Selection of prebiotics for coating selected probiotics .....	174
2. Evaluation of hybridization condition .....	175
3. Evaluation of stability and growth promoting effects of	

probiotics .....	175
Chapter 5. Application .....	178
1. Future study .....	178
2. Applications .....	178
Chapter 6. International trend and scientific information .....	179
Chapter 7. Reference .....	180

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 .....	16
제 1 절 연구개발의 목적 .....	16
제 2 절 연구 개발의 필요성 .....	16
제 1 항 기술적 측면 .....	18
제 2 항 경제·산업적 측면 .....	19
제 3 항 사회문화적 측면 .....	19
제 3 절 연구 개발의 범위 .....	21
제 1 항 기능성 균주와 prebiotics를 이용한 복합 생균제 개발 .....	21
제 2 항 분체 복합화 기술 확립 .....	21
제 3 항 복합생균제의 사료 안정성 및 동물 능력개선효과 검증 .....	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	26
제 1 절 기능성 균주와 Prebiotics를 이용한 복합생균제 개발 .....	26
제 1 항 실험재료 및 방법 .....	26
1. 유산균주의 분리, 동정 및 보존 .....	26
2. Probiotics의 선별 .....	26
3. Prebiotics의 선별 .....	27
4. 생균제용 균주의 최적 성장 배지 조성 탐색 .....	29
5. 최적 생산 및 회수조건 설정을 위한 균주의 농축, 동결 및 산소 저항성 조사 .....	31
6. Prebiotics의 최적 첨가비율 설정 .....	31
7. Prebiotics의 상호 시너지 효과 검증 .....	31
8. 선발된 균주의 최적 건조 및 저장방법 조사 .....	34
9. 생균제의 저장기간 중 활력변화 비교 분석 .....	34
10. 유전자 수준에서의 생균제의 동정 .....	34
11. 다양한 병원성균주에 대한 박테리오신의 항균능력 조사 .....	37
12. 장관 세포에 점착성 .....	37
제 2 항 실험결과 및 고찰 .....	38

1. Probiotics의 선별 .....	38
2. Prebiotics의 선별 .....	44
3. 최적 생산 배지 조성의 설정 .....	49
4. 농축, 동결, 산소 저항성 균주의 선별 .....	60
5. 동물실험용 생균제의 선별 및 생산 .....	62
6. Prebiotics 및 probiotics의 선발 .....	62
7. Prebiotics의 최적 첨가비율 설정 .....	64
8. Prebiotics의 최적 혼합비율 설정 .....	69
9. 선발된 균주의 최적 건조 및 저장방법 조사 .....	76
10. 생균제의 저장기간 중 활력변화 비교 분석 .....	80
11. 유전자 수준에서의 선발균주의 동정 .....	83
12. 선발균주의 항균능력 .....	88
13. 장관 세포에 대한 점착성 연구 .....	91
<b>제 2 절 분체 복합화 기술 확립(위탁연구과제) .....</b>	<b>93</b>
제 1 항 실험재료 및 방법 .....	93
1. 생균제 및 prebiotics의 분체복합화 과정 .....	93
제 2 항 실험결과 및 고찰 .....	100
1. 분체복합화 피복재의 screening 및 피복조건 최적화 .....	100
2. 가공 및 저장중 생균제의 활력 변화 비교분석 .....	114
3. 생균제의 사료첨가형태 및 제품 안정성을 고려하여 분체복합화 생산공정을 scale-up하는 조건 설정 .....	131
<b>제 3 절 복합생균제의 사료안정성 및 동물능력개선효과 검증 .....</b>	<b>140</b>
제 1 항 실험재료 및 방법 .....	140
1. 선별된 생균제의 생체실험 및 안정성 평가 .....	140
2. 분체복합화된 생균제 첨가물의 안정성과 효능 검증 .....	141
3. 실용화 단계 제품의 효과 검증 및 경제성 검증 .....	143
제 2 항 실험 결과 .....	149
1. 선별된 생균제의 생체실험 및 안정성 평가 .....	149
2. 분체복합화된 생균제 첨가물의 안정성과 효능 검증 .....	156
<b>제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>174</b>
제 1 절 기능성 균주와 Prebiotics를 이용한 복합생균제 개발 .....	174
제 2 절 분체 복합화 기술 확립 .....	175

제 3 절 복합생균제의 사료 안정성 및 동물 능력개선효과 검증 ..	175
<b>제 5 장 연구개발 계획의 활용계획 .....</b>	<b>178</b>
제 1 절 추가 연구의 필요성 .....	178
제 2 절 타 연구에의 응용 .....	178
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>179</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>180</b>



# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

항생제는 치료의 목적보다 낮은 농도로 사료에 첨가되어 미생물의 성장을 저해하기 위하여 사용하는 물질이다(Cromwell, 2001). 항생제는 지난 50여년 이상 가축의 성장을 향상시키고 농장의 사양 환경에서 질병을 예방하는 차원에서 널리 사용되어져 왔다(Gustafson 등, 1997). 이러한 항생제의 급여시 성장의 향상 효과에 가능성 있는 기작은 아래와 같다(Vissek, 1978).

- ▶ 질병 인자를 가지고 있는 미생물의 저해
- ▶ 동물의 성장을 저해하는 독소와 같은 미생물 관련 물질의 감소
- ▶ 위장관 내에서 필수 영양소를 파괴하는 미생물의 저해
- ▶ 장관벽의 얇아짐으로 인한 영양소의 흡수 및 이용 효율의 향상

이러한 항생제의 동물 영양학에 있어서의 우수한 효과에도 불구하고 오늘날 항생제 내성 미생물과 같은 잠재적인 공중 위생에서의 위험성으로 인해 많은 문제점이 제기되고 있는 실정이다(Williams, 1996; Corpet, 1996). 사료 첨가제의 사용에 대한 규제는 나라에 따라 다양한 편이다. 또한 첨가제의 허용 기준은 앞으로 바뀔 조짐을 보이고 있다(NRC, 1998). 유럽의 몇몇 나라는 사료 항생제 사용에 대해 엄격한 지침과 규제를 하고 있다. 이러한 관점에서 많은 사료업계 종사자 및 동물 영양학자들은 생균제, 식물성 추출물, 올리고 당류, 유기산과 같은 항생제 대체 물질에 대한 연구가 활발해 지고 있다. 따라서, 본 과제의 일련의 실험들은 이러한 관점에서 돼지 성장 개선 물질이자 항생제 대체 물질로서 가능성이 있는 생균제를 개발코져 한다.

## 제 2 절 연구 개발의 필요성

동물의 성장능력과 건강상태의 개선에 의한 생산성 증진을 통해 양돈산업의 경쟁력 향상이 요구되고 있다. 특히 돼지에서 자돈의 설사증은 성장능력 감소와 폐사의 주요원 인이며, 설사증의 예방, 치료를 위해서 항생제를 사용하나(Vissek, 1978; Walton, 1980), 축산물 내 잔류 및 내성에 관한 위험성이 부각되고 있다. 또한, 국내 축산업에 있어서도 사료내 항생제 첨가는 단계적으로 제한될 전망이며, 항생제의 대체효과를 가지는 생

균제가 이미 사용되고 있으나 그 효과는 미미한 실정이다.

생균제란 동물 또는 사람이 섭취하였을 때 장내 토착미생물들의 특성을 향상시켜 숙주에게 유익한 영향을 주는 살아있는 단종 또는 혼합된 균주들로 정의된다. 이러한 생균제는 가축이 섭취하였을 때 성장촉진과 사료효율의 향상, 장내 미생물의 경합에 의한 어린 동물들의 장질환 방지 및 병원성 미생물 감소, 면역기능향상 등 다양한 면에서 유익한 영향을 미치며, 그 결과로 돼지의 경우 설사에 의한 성장저하와 폐사율을 줄일 수 있다. 특히, 생균제와 특정 기질을 함께 사용하여 유발되는 시너지 효과에 의해 생균제의 활력이 증가되며, 이에 의한 자돈의 건강증진 효과가 상승된다는 결과(Paker, 1974)가 발표된 이후, 생균제와 시너지 효과를 일으킬 수 있는 물질중 하나인 prebiotics는 사료 첨가제로서의 이용이 고려되어 왔다.

Prebiotics란 장내에 서식하고 있는 미생물들의 성장과 활력에 선택적으로 작용하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 비소화성 식품 성분들을 총칭하는 물질로서 생균제에 기질로 작용하여 궁극적으로는 숙주의 건강을 향상시키는 기능을 발휘한다. Prebiotics는 특정균주의 선택적인 성장을 촉진하여 장관 내 미생물 균총을 변화시키며 대표적으로 inulin과 fructooligosaccharides(FOS)에 대한 연구가 이루어져왔다.

국내 사료 첨가용으로 사용되는 생균제 및 생산에 있어 가장 큰 문제점은 다음과 같다.

- ▶ 높은 수입 의존도: 생균제용 균주개발을 위한 선별방법과 생산기술의 미비.
- ▶ 기능의 저하: 생산, 저장 및 가공중 제품에 함유되어 있는 미생물의 생존균수의 저하.
- ▶ 효과검증의 미비: 동물실험을 통한 객관적이며 과학적 검증 자료의 부재.

이러한 문제점들을 해결하기 위한 방안으로는 다음과 같은 연구가 필요하다.

- ▶ 내산, 내담즙, 항미생물성 및 면역증진 작용을 갖는 우수한 생균제용 균주를 선별하고, 이들 균주의 최적생산 조건을 확립하며, 생균제의 가공·이용간 활력유지 방안을 강구.
- ▶ 분체복합화를 통하여 생균제의 저장기간 연장과 장내 생존력을 증진.
- ▶ 생균제의 활력에 시너지 효과를 유도할 prebiotics 물질을 선별하고 이들을 균주와 같이 복합분체화 또는 단독으로 사료에 혼합하여 생균제의 장내 활력을 배가.
- ▶ 세분화된 생체 안정성 실험과 현장적용 실험을 통해 돼지에서의 생균제 및

prebiotics의 실질적인 효능과 경제성을 검증.

## 제 1 항 기술적 측면

다양한 기준을 근거로한 균주의 선별과 이들 균주의 최적생산 조건이 확립되어야만 기능성을 갖춘 생균제를 동물에 급여하여 그 효과를 기대할 수 있다. 그러나 지금까지 우수한 균주의 선별에 비하여 생산조건의 최적화 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

분체복합화를 이용한 생균제의 피복은 외부물질투과의 장벽으로 작용하여 균주를 외부 환경으로부터 보호하거나 균주의 용출속도를 제어할 수 있으며 저가의 광범위한 피복소재를 사용할 수 있다. 이러한 분체복합화 기법은 적정수준으로 가공된 생균제에 5-100 $\mu$ m 수준의 피복 재료를 분체간의 결합에 의하여 견고한 피복층을 입힘으로써 안정화시킬 수 있는 기술이다. 이 방법을 사용할 경우 생균제체의 입도설정이 용이하고 급여되는 사료의 평균적인 입도나 소화율 등을 동일하게 설정할 수 있는 장점이 있다. 이 기법은 처리시간이 짧고 완전 건식 처리되는데다 내용물의 함량을 90%수준까지 끌어올릴 수 있다. 또한, 유용한 기능성 소재를 고부가가치화하고 안정성을 크게 높이기 위해서는 분체복합화기법이 가장 적절하며 적은 비용으로 단시간에 실용화가 가능하여 관련 산업계에 미치는 확산효과가 매우 큰 편이다. 하지만, 기업에서 직접 기술을 획득하고 생산까지 하는 데는 많은 시간과 자본이 필요하며 간단한 실험들로 중요한 결론을 추정하기에는 한계가 있어 기초지식을 보유하고 있는 학계와의 연계가 필요한 상태이다.

Micro-sphere나 다공성 입자 또는 전분 등에 유용물질을 건식 분체결합으로 안정화시킬 경우 분체화된 물질의 저장성 향상은 물론 유용성분의 실활을 방지할 수 있어서 최근 의약품 및 미량성분의 전달체제로 이용되기 시작한 분야이다. 따라서, 생균제를 분체화와 미분쇄를 통하여 25 $\mu$ m수준의 입도를 갖게하고 내산성 및 장용성을 나타내는 물질로 분체의 표면을 가공하면 외부의 환경으로부터 거의 완벽하게 보호하는 것이 가능하다. 또한, 생균제의 분체복합화가 용이할 경우, prebiotics를 분체결합시 적정량으로 첨가하여 시너지 효과를 갖는 생균제의 개발이 가능하다. 특정균주의 선택적 성장을 촉진하는 비소화성 사료 성분인 prebiotics는 inulin, fructooligosaccharides(FOS), 또는 기타 oligosaccharides등이 알려져 있는데 이들에 의한 시너지 효과로 생균제에 의한 동물성장 증진효과가 기대된다.

내산성을 부여한 분체로 가공한 후 2차적인 공정으로 양돈사료에 보편적으로 사용되

고 있는 옥수수전분을 적절한 크기로 분쇄한 후 분체의 외층을 재차 피복하여 최종적인 입자크기를 제어할 경우, 사료화의 최종적인 단계인 펠렛팅 공정에서의 열처리에 의한 유용성분의 유실을 효과적으로 방지할 수 있다.

하지만, *In vitro*상과 *in vivo*상 환경적 차이에 따라 생균제의 실제 활력의 차이가 발생하므로 보다 객관적이고 과학적 자료를 제시하기 위해서는 다양한 통계적 기법과 현장적용 동물실험은 필수적이다.

## 제 2 항 경제·산업적 측면

생균제의 첨가가 가축에게 긍정적인 영향을 미친다는 것이 지금까지의 많은 연구를 통하여 알려져 있으나, 보다 체계적으로 우수 균주를 선별·생산하고 이들을 저장성이 우수하고 생존율이 높은 형태로 가공한 후 동물실험을 통하여 생산성 향상에 관한 객관적인 자료를 제시하여 경쟁력을 강화한다. 특히, ‘미생물 배양체(효모 제외)’ 품목(HSK 3002904000)의 수입은 1990년부터 큰 폭으로 증가하기 시작하여 1996년에 이미 미화 10,475,000 달러에 이르렀으며 이 품목 중 사료 첨가용으로 10% 정도가 이용되었으나 이는 기타 품목(‘기타효소 및 조제효소’, HSK 3507909000; ‘기타 사료첨가제’, HSK 2309903090)중의 미생물체를 제외한 양으로 거의 전량 수입에 의존한다(무역협회 통계).

기능성 첨가물 산업은 고부가가치를 창출하는 분야로서 내수시장 안정화 및 원료수입에 대한 대체효과를 나타내 국내 산업여건상 중요한 요소로 평가받고 있으며, 이러한 특화된 기술은 사료 뿐만 아니라 소재 및 식품산업에의 파급효과도 상당할 것으로 예상된다.

본 과제를 통하여 생산된 제품은 저장성이 우수하여 국내뿐만 아니라 해외로 수출될 수 있는 높은 가능성을 내재하고 있으며 현재 국내 사료시장이 2조원 이상임을 감안하여 볼 때 기술집약적인 고부가가치 사업으로의 성장이 예상된다.

## 제 3 항 사회문화적 측면

국민소득이 높아짐에 따라 동물성 식량자원의 기호도가 높아져 식품에서 축산물이 차지하는 비중이 계속 증가되어 왔고, 앞으로도 계속적인 증가가 예상된다. 그러나, 국내 축산업은 역사가 짧고 기타 산업에 비해 원료와 기술의 해외의존도가 높아 궁극적으로 국제경쟁력이 약화되어 잔류 항생제 규제와 같은 국제적 기조에 의해 치명적인

타격을 입을 것으로 예상된다. 또한, 항생제의 남용으로 가축과 이를 섭취한 사람들에게 항생제 잔류에 따른 건강상의 문제가 새롭게 부각되고 있으며, 내성을 갖는 병원성 균주들의 발생도 사회적 문제로 부각되고 있다.

이러한 문제의 해결방안으로 항생제를 대체하여 가축과 사람에게 발생할 수 있는 부작용을 제거하고 항생제에 저항성을 갖는 병원균들을 소멸시킬 수 있는 항병원성 생균제와 prebiotics의 사용은 바람직한 방향이다. 국내산 축산물의 고품질화를 통해 내수는 물론 국제경쟁력을 확보함으로써 식량수급의 안정에 기여할 수 있으며 고급 돈육 수출 시장의 확보를 통하여 농가소득에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 3 절 연구 개발의 범위

### 제 1 항 기능성 균주와 prebiotics를 이용한 복합 생균제 개발

- 가. 내산성, 내담즙성, 항균능력에 근거한 생균제 균주 선별
- 나. 선발된 균주의 최적 생산을 위한 배양기술 구축
- 다. Prebiotics 물질의 선발
- 라. Prebiotics의 생균제와의 시너지 효과 검증
- 마. 생균제 저장 기간 중 활력변화 비교 분석
- 바. 다양한 병원성 균주에 대한 박테리오킨의 항균능력 조사
- 사. 장관 세포에 대한 점착성 연구

### 제 2 항 분체 복합화 기술 확립

- 가. 분체복합화 피복재의 선정 및 피복조건의 최적화
- 나. 분체복합 생균제 가공시 물리적, 구조적 특성 제고
- 다. 분체복합 생균제의 내산성, 내열성 및 장용성 검증
- 라. 분체복합 가공 단계별 생균제의 활력 변화 조사 및 생산공정 확립
- 마. 분체복합 생균제의 사료 첨가 형태 결정 및 제품 안정성 확립
- 바. 균체의 2차가공을 위한 물성 개량 및 scale-up 조건 확립

### 제 3 항 복합생균제의 사료 안정성 및 동물 능력개선효과 검증

- 가. 자돈의 설사증 원인 및 병원성균에 대한 항균능력 조사
- 나. 자돈에서 선별 생균제의 효과 검증
- 다. 분체복합화된 생균제의 사료내 안정성과 혼합도 조사
- 라. 사료내 생균제의내열성 및 장용성 검증
- 마. 생균제 및 prebiotics의 생체내 시너지 효과 검증
- 바. 현장 실험을 통한 생균제의 돼지 생산성 검증 및 첨가수준과 급여기간 설정
- 사. 도체 품질 조사 및 식품 안정성 확인
- 아. 생균제의 경제성 검증

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

이유자돈의 설사는 이유 직후에 빈번히 나타나며, 여기에 관여하는 병원성 미생물들은 *enterotoxigenic E. coli(ETEC)* (26%), *Clostridial enteritis* (18%), *Coccidiosis* (14%), *Rotavirus* (8%) 등이 알려져 있다. 이유자돈 설사증에 의해 장내 서식하는 *Bifidobacteria*와 *lactobacilli*를 감소하고, *Enterobacteria*는 증가시키는 것으로 알려져 있다(Kimura, 1983).

*Lactobacillus reuteri*에 의해 발효된 yoghurt와 milk를 생후 2일령 돼지에 급여하였을 때 장내 *lactobacilli*는 증가하고, *E. coli*는 감소되었다(Hoefling, 1989). 포유자돈에게 *Bifidobacterium thermophilum*과 *Bif. pseudolongum*을 경구투여할 경우 임상적인 설사증을 예방하는 효과가 보고되었다(Ervolder, 1984). 또한, *Enterococcus faecium* C68을 4개월 동안 어린돼지에게 급여하였을 때 증체량과 사료효율이 증가하고, 설사증은 감소하였다(Maeng 등, 1989).

비육돈에서도 생균제(*C. butyricum* ID)의 사용은 설사의 감소 및 병원성 미생물 감염의 예방뿐만 아니라 성장률과 사료효율의 개선효과가 있는 것으로 알려져 있다(Pollman 등, 1980).

현재 시판되고 있는 생균제는 미생물 단독, 혹은 다양한 물질들과 혼합하여 사용되고 있으며 하루에 동물 개체 당 대략  $10^9$ - $10^{12}$ 수준의 미생물을 급여하는 방법을 사용하고 있으나 생존율에 근거한 정확한 수치, 투여량과 투여 방법에 따른 효과 등에 대한 자료는 제시되어 있지 않다(Tuschy, 1986).

양돈 사료의 세가지 주요 유형은 사균과 생균 *Lactobacillus* 또는 생균 *Enterococcus faecium*을 첨가하는 것으로 사료 1 g 당  $10^4$ - $10^7$ 으로 첨가하여 혼합하는 것이 일반적이다.

생균제내의 균주는 단독으로 사용되었을 때보다 혼합된 경우가 더 우수한 것으로 나타났으나 상반되는 결과도 보고되고 있어, 보다 체계적인 실험을 통해 생균제 기능을 향상시키는 방법이 모색되어야 할 것이다. 이들 생균제용 균주를 분체복합화하는 방법은 액상바인더의 분무방식에 의한 피복방식보다 뛰어난 생존능력을 부여하는 것으로 알려져 있으며, pelleting후에도 약 40% 이상의 균주가 생존하는 것으로 보고되었다(Lyons, 1988).

분체복합화에 의한 내산성 및 장용성 생균제의 제조후 2차적인 처리로 전분 및 증량제 등으로 외층을 감싸고 재차 구형화처리를 해줌으로써 분말의 입도를 균일하게 제어

할 수 있으며 소량의 제제로 이용율을 극대화함으로써 경제성을 제고하는 방안으로 기대된다. 이러한 생존율은 미생물의 성장 조건, 회수 방법, 저장 환경, 저장기간, 사료에 첨가하는 방법에 따라 매우 상이하하며 특히 *lactobacilli*는 동결건조, 통풍건조에 민감한 것으로 알려져 있고 *lactobacilli* 보다 *streptococci*가 더 열악한 환경에서도 견디는 것으로 알려져 있다(Hardie, 1986; Mundt, 1986). 그밖에는 *Bacillus*와 *Clostridium*이 생균제로 사용되어 왔다(Han 등, 1984).

Prebiotics로서 oligofructose는 소장에서 흡수되지 않고, 장내 *Bifidobacteria*의 성장을 증진시킨다. 일반적으로 oligofructose는 단맛이 나며 향기 및 기호성이 좋고 높은 용해도를 갖는다(Niness, 1999). Inulin과 oligofructose는 장내 미생물 균총, 장관 생리, 면역기능, 미네랄의 생체이용성 및 지질대사에 유익한 조절인자로 작용하며, 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다(Roberfroid, 1999).

일반적으로 사료에는 homopolysaccharides인 glucans, fructans, arabans 및 xylans, 그리고 heteropolysaccharides인 arabinoxylan, gluconoxylans, 기타 oligosaccharides 등의 탄수화물이 존재하며 이들중 oligosaccharide는 prebiotics로서 생균제의 기질로 사용되어 활력증진효과를 나타낼 수 있다.

지금까지 생균제와 prebiotics를 함께 혼합하여 급여한 연구 결과는 있으나, 복합분체의 의한 시너지 효과를 검증한 연구는 전무한 실정이다.

미분쇄와 hybridization을 통한 생균제의 분체복합화 기술은 본 연구진에 의해 확립되었으나(Fig. 1), 생균제의 활력 제고에 관한 심도있는 연구와 다양한 피복제의 평가 및 경제성 검증이 필요한 실정이다.

본 연구진이 보유하고 있는 우수한 균주(Table 1)를 사용하여 생균제를 제조하며 이들의 부가적인 기능성을 조사하고 이미 확립된 기술을 가지고 다양한 원천에서 추가적으로 기능성균주를 선별한 후, 이들 균주의 생산, 회수, 건조 공정간의 생존력 유지 방안을 제고하고 최적 생산조건을 확립하며, 각각의 균주와 시너지 효과를 갖는 prebiotics 물질을 선별하고 적절한 사용농도를 결정한다.



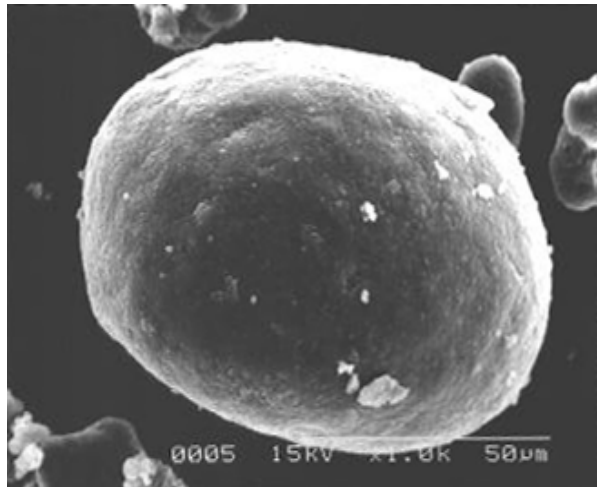


Figure 1. 분체복합화 된 유산균제의 주사전자현미경(SEM) 사진

Table 1. 본 연구진이 보유하고 있는 생균제용 균주 및 기능성

	내산성	내담즙성	Cholesterol 저하기능	박테리오신 생산능력
균주명	<i>L. acidophilus</i> RP32외 18종	<i>L. acidophilus</i> 107A외 12종	<i>Lactobacillus</i> sp. RP32외 10종	<i>L. acidophilus</i> GP4A외 7종
비고	인공위액(pH 2.5)에서 3시간 배양후 70%이상의 생존율을 보이는 균주.	Oxgall-MRS broth(0.3%)에서 24시간 배양후 70%이상의 생존율을 보이는 균주	MRS-THIO broth내에서 60%이상의 cholesterol 저하능력을 보이는 균주	3종이상의 병원성균주 억제능력 보유

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 기능성 균주와 Prebiotics를 이용한 복합생균제 개발

#### 제 1 항 실험재료 및 방법

##### 1. 유산균주의 분리, 동정 및 보존

고려대학교 응용동물과학과 유가공학실험실에 보관중인 다양한 유산균주와 사람의 분 및 돼지, 닭의 장내용물 그리고 우유, 산양유, 김치, 쇠고기 등 다양한 식품으로부터 유산균주를 분리, 동정하여 실험에 사용하였다. 유산균주의 동정방법으로는 상기한 물질들을 선택배지(MRS, modified MRS, BCP 배지 등)을 사용하여 streak plating법으로 도말하고 혐기상태에서 37°C, 48시간동안 배양한 다음, colony 형태가 상이한 균주들을 선택하여 순수 분리하였으며 그람염색, 5°C 및 45°C에서의 성장 유무, catalase 및 oxidase test, gas 형성 등을 조사하였고 API 50 CHL carbohydrate test kit(Bio Merieux, France)를 이용한 당발효성을 조사하여 ATB identification program(Bio Merieux, France)에 입력한 결과를 바탕으로 동정하였다. 동정된 내용을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986) 및 Bergey' Manual of Determinative Bacteriology(1994)에 따라서 균주를 최종 명명하였다. 균주의 보존을 위해 모든 균주를 MRS 배지에 3회 계대배양한 후, 원심분리한 다음 cell pellet에 skim milk 10%, glucose 3%, yeast extract 0.3%의 배지를 제조하여 혼합하였다. 이것을 vial에 1ml씩 분주하여 동결건조하고 -80°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

##### 2. Probiotics의 선별

###### 가. 내산성 측정

내산성 실험은 Kobayashi 등(1974)의 방법을 변형하여 실시하였다. 유산균주를 MRS 배지에서 37°C, 18시간동안 배양시키고 원심분리하여 유산균주를 침전시켰다. 다시 멸균 saline(0.85% NaCl)으로 2회 세척후 균체현탁액을 MRS broth(대조구)와 인공위액에 각각 약  $10^6$  cfu/ml 수준으로 접종시키고 37°C에서 배양시키면서 0, 1 및 3시간 간격으로 생존균수를 측정하였다. 인공위액은 1N HCl을 사용하여 MRS broth의 pH를 2.5로 조정하고 pepsin을 1000 unit/ml 되도록 첨가한 다음 멸균시켜 사용하였으며  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , L-cystein HCl, Tween 80 등이 함유된 phosphate buffer (pH 6.8)로 희석하

여 총균수를 측정하였고 대조구와의 총균수 차이를 계산하였다.

#### 나. 내담즙성 측정

유산균을 내산성 평가에 사용되어진 인공위액 대신 oxgall이 0.3%와 0.5%로 함유된 MRS 배지에 접종시킨 후 내산성 평가방법과 동일한 방법으로 0, 12 및 24시간 간격으로 생존균수를 측정하였다.

#### 다. 항균작용 조사

박테리옌 생산능력을 조사하고자 균주를 적정배지에 배양시키고 원심분리(8,000×g, 10 min)하여 상정액을 회수한 다음 pH를 6.5로 조정하고 다시 acrodisc filter(German, Ann Arbor, MI)로 여과하여 무균상태인 screw cap test tube에 주입하여 사용하였다. 이 박테리옌 용액을 지시균(병원성균)이 접종된 평판배지표면에 점적하여 37°C에서 24시간동안 배양시킨 다음 억제환의 형성여부로 박테리옌 생산유무를 판정한다.

#### 다. 통계처리

자료 분석은 SAS의 ANOVA법과 repeated measures analysis법에 의거하여 실시하였으며 각 처리구간 평균치의 유의적인 차이는 Duncan의 다중검정법에 의거하여 95% 유의수준에서 실시하였다.

### 3. Prebiotics의 선별

Table 3-1에 나타난 바와 같이 Minimal media를 제조한 다음 다양한 prebiotics 물질들을 0.5%로 첨가하여 액체배지를 제조하고 균주를 1%로 접종한 다음 37°C에서 24시간 및 48시간동안 배양한 후 배지의 pH를 조사하였다. 또한, 2% prebiotics를 첨가한 동일한 배지조성으로 고체배지(agar)를 제조하였고 bromocresol purple에 의한 색변화(보라색 → 노란색)를 관찰하였으며 총균수를 측정하였다. 지금까지 사용된 prebiotics 들은 sorbitol, lactulose, mannitol, raffinose, xylitol, inulin, fructooligosaccharides 등이었다.

Table 3-1. Composition of minimal media

Ingredients	Amount
Prebiotics	5g or 20g
Peptone	10g
Yeast extract	5g
Tween 80	1g
Diammonium citrate	2g
Sodium acetate 3H <sub>2</sub> O	5g
Magnesium sulphate 7H <sub>2</sub> O	0.1g
Manganese sulphate 4H <sub>2</sub> O	0.05g
Dipotassium phosphate	2g
Bromocresol purple	0.17g
Distilled Water to make	1000ml

#### 4. 생균제용 균주의 최적 성장 배지 조성 탐색

모든 실험 계획은 Table 3-2에서와 같이 탈지분유, yeast extract, glucose를 독립변수로 하여 탈지분유 10%, yeast extract 0.5%, glucose 1%를 center run으로 결정하고 총 20개의 처리조합으로 구성하였다(pH 7.0 및 peptone 0.3% 고정). 각 처리조합은 중심합성계획(central composit design)으로 실험구간을 설정하였고 자료의 분석은 반응표면분석(response surface methodology) 모형을 이용하였다. 이때의 반응변수는 12시간 배양한 후의 생균수에 접종균수를 뺀 순수하게 성장한 균수의 log값으로 하였다. 통계분석은 RSM 모형을 사용하여 유산균 생균수에 대하여 배지조성물의 효과를 다음과 같은 반응표면식에 적용시켰다.

$$Y_i = \beta_0 + X_i + \beta_i X_i + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (\text{단, } i=1,2,3)$$

$Y_i$  : response variables

$\beta_0$  : intercept

$\beta_i \beta_j$  : regression coefficients

$X_i X_j$  : independents variables

$\varepsilon$  : random error

모든 통계처리는 SAS system을 사용하였으며 반응표면 분석은 RSREG procedure를 사용하였다.

Table 3-2. Treatment combinations

Trt.	skim milk	yeast extract	glucose
1	8(-1) *	0.3(-1)	0.68(-1)
2	8(-1)	0.3(1)	1.68(1)
3	8(-1)	0.8(1)	0.68(-1)
4	8(-1)	0.8(1)	1.68(1)
5	13(1)	0.3(-1)	0.68(-1)
6	13(1)	0.3(-1)	1.68(1)
7	13(1)	0.8(1)	0.68(-1)
8	13(1)	0.8(1)	1.68(1)
9	10(0)	0.5(0)	1.0(0)
10	10(0)	0.5(0)	1.0(0)
11	10(0)	0.5(0)	1.0(0)
12	5(-1.682)	0.5(0)	1.0(0)
13	15(1.682)	0.5(0)	1.0(0)
14	10(0)	0(-1.682)	1.0(0)
15	10(0)	1.0(1.682)	1.0(0)
16	10(0)	0.5(0)	0(-1.682)
17	10(0)	0.5(0)	2.0(1.682)
18	10(0)	0.5(0)	1.0(0)
19	10(0)	0.5(0)	1.0(0)
20	10(0)	0.5(0)	1.0(0)

\* coded value

## 5. 최적 생산 및 회수조건 설정을 위한 균주의 농축, 동결 및 산소 저항성 조사

MRS broth를 담은 배양조에 pH controller를 연결시키고 총 12종의 유산균주를 1% 접종한 다음 37°C로 유지시켜 배양을 실시하였다. pH controller에 10% ammonia수를 연결시키고 배지의 pH가 적정수준이하로 저하되면 유입되는 방식으로 총 배양시간동안 배지의 pH를 유지시켰다. 37°C, 18시간 배양후 MRS agar를 사용하여 생존균수를 측정하였다. 그 다음 약 10ml의 배지를 채취하여 8000 rpm에서 20분동안 원심분리하여 상정액을 제거하고 skim milk 10%, lactose 2%를 첨가한 5ml의 배지에 첨가하여 현탁시킨 다음 생존균수를 측정하였다. 다시 -78°C의 deep freezer에서 15시간동안 급속냉동시킨 다음 해동시킨 후 생존균수를 측정하였으며 남은 균주를 사용하여 shaking incubator(4°C)에서 100 rpm으로 5시간 동안 교반시킨 후 생존균수를 측정하였다.

## 6. Prebiotics의 최적 첨가비율 설정

Prebiotics 첨가량에 따른 생균제의 활력은 Sorbitol, Mannitol, Raffinose, Lactulose 및 FOS 등의 5종류 prebiotics 물질을 대상으로 실시되었다. 내산성, 내담즙성 및 박테리옌 생산 능력을 고려하여 선발한 생균제 중 15여종의 균주를 Minimal 배지에 각각 1% 접종한 후 0, 6, 12, 24 및 48시간 배양 후 흡광도(600nm)를 측정하여 균주의 성장이 우수한 3~5종의 생균제를 선발하였다. 생균제의 최적 성장을 위한 prebiotics의 최적 첨가비율 설정을 위해 3~5종의 생균제를 3회 계대 배양하여 멸균된 0.85% NaCl로 세척하고 각 prebiotics를 0, 1, 2, 3, 4 및 5%로 첨가한 minimal 배지에 1% 접종하였으며 37°C에서 배양하면서 0, 24 및 48시간에 생균수와 pH를 측정하였다.

## 7. Prebiotics의 상호 시너지 효과 검증

Prebiotics의 최적 복합비율을 설정하기 위하여 혼합물 실험 설계 및 분석(design and analysis of experiments with mixtures) 기법들이 사용되었다. 혼합물 실험법은 반응표면방법론(response surface methodology, RSM)에 속하는 방법으로 실험에서의 요인들인 여러 구성성분들의 수준값들, 즉 비율들의 합이 '1' 이어야 하는 제약조건 하에서 실험을 설계하고 분석하여 혼합물의 최적 구성비율을 찾아내는 방법이다(Myers 와 Montgomery, 1995).

### 가. Prebiotics 최적 혼합비율 탐색을 위한 실험 설계

선발생균제에 대하여 최대의 성장효과를 나타낼 수 있도록 5종의 prebiotics 성분(x1



: Fructooligosaccharide, x2 : sorbitol, x3 : mannitol, x4 : lactulose, x5 : raffinose)으로 이루어진 prebiotics mixture의 최적 구성성분 비율을 찾기 위한 혼합물 실험설계를 실시하였다. 실험계획은 Simplex Lattice Design (degree 3)를 사용하여 Full Cubic Model에 적용시켰다(Myers와 Montgomery, 1995).

최적화 실험은 모두 49개의 시행으로 이루어져 있으며 실험설계와 반응값들은 Table 3-3과 같다. Table 3-3의 실험설계는 single blend point 5개(각 1반복), double blend point 20개(각 1반복), triple blend point 10개(각 1반복), center point 1개(4반복), 그리고 axial point 1개(9반복)로 이루어져 있다. 이 실험설계는 통계 software인 Minitab(2000)의 Stat > DOE > Mixture > Create Mixture Design 기능을 이용하여 구축하였다. 반응변수 Y는 12시간 배양후의 생균수를 접종시의 생균수로 보정한 순수한 성장 증가분의 log 값으로 하였다. 생균제로는 5가지 prebiotics 물질에서 모두 우수하게 나타난 *L. acidophilus* 107A를 계대배양 후 원심분리하여 0.85% NaCl로 세척한 후 이용하였다.

#### 나. 통계 처리

실험 설계의 구축 및 실험 데이터 분석을 위한 통계 소프트웨어로는 Minitab(2000)을 이용하였으며 실험 데이터를 통계적 모형에 적합시키는 데는 Stat > DOE > Mixture > Analyze Mixture Design 기능을, 최적 구성비율을 찾아내는 데는 Stat > DOE > Mixture > Response Optimizer 기능을 사용하였다.

Table 3-3. Design for a mixture experiment with 5 components

Run	Point Type	FOS	sorbitol	mannitol	latulose	raffinose	Response(Y)
1	1-component	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8570
2	1-component	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.7258
3	1-component	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.2686
4	1-component	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	1.6276
5	1-component	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.4596
6	2-component	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.9338
7	2-component	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.5880
8	2-component	2.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.7837
9	2-component	2.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.6055
10	2-component	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	1.9728
11	2-component	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	1.9753
12	2-component	1.0	0.0	0.0	2.0	0.0	1.9494
13	2-component	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	1.4607
14	2-component	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.6662
15	2-component	0.0	2.0	0.0	1.0	0.0	1.2074
16	2-component	0.0	2.0	0.0	0.0	1.0	0.5974
17	2-component	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.5340
18	2-component	0.0	1.0	0.0	2.0	0.0	1.7156
19	2-component	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	0.5559
20	2-component	0.0	0.0	2.0	1.0	0.0	1.1656
21	2-component	0.0	0.0	2.0	0.0	1.0	0.7452
22	2-component	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	1.7262
23	2-component	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	0.6473
24	2-component	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	1.8001
25	2-component	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	1.7393
26	3-component	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0538
27	3-component	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	2.0263
28	3-component	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.8909
29	3-component	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.8835
30	3-component	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	2.1300
31	3-component	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0797
32	3-component	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	2.0086
33	3-component	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.9341
34	3-component	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0	1.8419
35	3-component	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	2.2357
36	center	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	2.1241
37	center	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	2.2529
38	center	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1.8972
39	center	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1.9424
40	axial	1.8	0.3	0.3	0.3	0.3	1.8992
41	axial	1.8	0.3	0.3	0.3	0.3	1.9336
42	axial	0.3	1.8	0.3	0.3	0.3	2.1549
43	axial	0.3	1.8	0.3	0.3	0.3	1.8187
44	axial	0.3	0.3	1.8	0.3	0.3	1.9440
45	axial	0.3	0.3	0.3	1.8	0.3	2.0396
46	axial	0.3	0.3	0.3	1.8	0.3	2.1595
47	axial	0.3	0.3	0.3	1.8	0.3	2.0530
48	axial	0.3	0.3	0.3	0.3	1.8	2.0318
49	axial	0.3	0.3	0.3	0.3	1.8	1.8169

## 8. 선발된 균주의 최적 건조 및 저장방법 조사

균주의 건조용 최적 생산배지를 제조하기 위해 10% NFMS를 APL 660 효소로 37℃에서 18시간동안 반응시키고 glucose 0.3%, bacto peptone 0.3%, proteose peptone 0.3%, yeast extract 0.3% 및 mineral solution을 첨가한 다음 pH 6.5로 조정하고 화염 멸균시켰다. 이 배지에 선발된 생균제를 1% 수준으로 첨가하고 pH controller를 사용하여 pH 6.0으로 조정된 상태에서 24시간 배양후 총균수를 측정하였다. 24시간 배양후 원심분리하여 다음 실험에 사용하였다.

또한, 생균제의 저장방법에 따른 활력을 알아보고자 동결건조용 보호제의 첨가 유무에 따른 생균제의 활력을 비교, 조사하였다. 생균제는 *L. acidophilus* 393과 *L. acidophilus* 107A 균주를 사용하였으며 3회 계대배양한 후 3,000×g에서 30분간 원심분리하여 cell을 회수한 후 이용하였고 다양한 동결건조용 보호제를 첨가하여 동결전 초기 균수, -70℃에서 60분간 동결후 생균수, 동결 후 freeze dryer를 이용한 건조후의 생균수를 조사하였다. 동결건조 보호제는 D-(+)-raffinose pentahydrate(Sigma), L-ascorbic acid(Sigma), MSG, lactose를 사용하였으며 NFMS 10%에 각각 0.5%, 1% 및 1.5%로 첨가하여 실시하였다.

## 9. 생균제의 저장기간 중 활력변화 비교 분석

생균제로 사용될 균주 *L. acidophilus* 393 및 *L. acidophilus* 107A를 대상으로 4℃, 25℃ 및 37℃에서 저장하면서 생존율을 조사하였다. 4℃에서 저장한 생균제는 1회/1주, 25℃는 2회/1주, 37℃는 균주는 3회/1주 간격으로 생균수를 측정하였다. 생산된 균주는 MRS agar 배지를 이용하여 37℃에서 48시간동안 배양후 생균수를 측정하였다.

## 10. 유전자 수준에서의 생균제의 동정

### 가. Chromosomal DNA의 추출

MRS 배지에서 배양된 *Lactobacillus* 균주들을 1.5 ml eppendorf tube에 분주하고 원심분리 2회를 거쳐 충분한 cell pellet을 모은 후 lysozyme, proteinase K 및 10% SDS 용액으로 균주를 용균시켰다. 이 용균액에 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) 처리를 3회 실시하여 단백질을 제거하였으며 이후 ammonium acetate와 96% ethanol을 첨가하여 -70℃에서 1시간이상 정치한 다음 DNA를 침강시켰다. 원심분리로 회수된 DNA를 70% ethanol로 세척하고 건조한 후 2차 증류수 30μl에 녹였으

며 RNAase 1 $\mu$ l를 처리하여 RNA를 제거하였다. 이후 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

나. Specific primer를 이용한 16S-23S rRNA ISR과 23S rRNA 유전자의 증폭

16S-23S rRNA ISR과 일부의 23 rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 Table 3-4와 같다. Forward primer와 reverse primer는 각각 *E. coli*의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene을 바탕으로 제작하였고 PCR에 의한 유전자 증폭반응은 10X PCR buffer(Mg<sup>2+</sup> free), 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM dNTP mixture, *Taq* DNA polymerase(이상 TaKaRa), 50pmol primers, DNA template, 멸균 2차 증류수를 섞어 최종 volume이 50 $\mu$ l이 되도록 만들었으며 Geneamp PCR system 2400(Perkin-Elmer)에서 반응시켰다. 이때 실행된 온도와 시간은 초기반응을 95 $^{\circ}$ C에서 5분을 실시하였으며 이후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C에서 20초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응을 30 cycles 실시하였다. 그리고 PCR 반응이 끝나면 *Taq* DNA polymerase의 최종 중합반응을 돕기 위해 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시켰다.

다. Agarose gel electrophoresis, gel elution 및 DNA sequencing

PCR 반응의 생성물을 0.8% agarose gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 이때 사용한 완충용액은 0.5 $\times$ TAE (Tris-HCl/ glacial acid/ EDTA buffer, pH 8.0)였으며 전기영동 후 DNA 염색을 위해 EtBr 용액에 20분 가량 침지한후 UV transilluminator을 이용하여 band를 관찰하였다. 그리고 Gel Extraction Kit(Qiagen)을 이용하여 DNA를 회수하였으며 DNA의 sequencing을 실시하였다. 분석된 염기서열을 NCBI의 GenBank 자료들과 비교하였다.

Table 3-4. Primers for amplification of 16S-23S rRNA ISR and flanking 23S rRNA gene

Name	Target	Position <sup>*</sup>	Sequence (5'→3')
16	16S rRNA forward	1,526-1,543	GCTGGATCACCTCCTTTC
23	23S rRNA reverse	456-474	CCTTTCCTCACGGTACTG

\* Position means the nucleotide number of 16S or 23S rRNA of *E. coli*

## 11. 다양한 병원성균주에 대한 박테리오신의 항균능력 조사

돼지 사료첨가용으로 선별된 *L. acidophilus* 107A균주의 박테리오신 생산 능력여부를 조사하기 위하여 probiotics 중 *L. acidophilus* 30SC, 4356, 107A 균주들을 MRS(Difco, USA) 배지에 37°C에서 18시간동안 배양시키고 원심분리(8,000×g, 10 min)하여 상정액을 회수한 다음 pH를 6.5로 조정하고 다시 acrodisc filter(German, Ann Arbor, MI)로 여과하여 무균상태인 screw cap test tube에 주입하여 사용한다. 이 박테리오신 용액을 지시균이 접종된 평판배지표면에 점적하여 37°C에서 24시간동안 배양시킨 다음 억제환의 형성여부로 박테리오신 생산유무를 판정한다. 또한, 균주 배양액을 이용하여 조사하는 방법은 균주를 계대배양한 후 배양액을 잘 혼합하여 MRS agar 배지에 spot-inoculate한 다음 37°C에서 4시간 배양하며, 여기에 미리 배양해 둔 병원성 균주들을 soft TSB(Difco Lab., USA) agar에 접종하여 10ml씩 증충한다. 이것을 다시 37°C에서 24시간 배양한 후 colony 주변의 억제환 유무를 조사한다.

## 12. 장관 세포에 점착성

HT-29 cell (KCTC) 을 heat inactive 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 (Difco, USA) 에서 배양한 후  $1.0 \times 10^5$ 씩 24 well plate에 분주한 후 10일정도 격일로 배지를 교환하면서 배양을 실시하였다. 완전 monolayer된 상태를 확인한 후 10 mM PBS로 6회 세척을 실시하고 새로운 RPMI 1640 배지를 분주한다. MRS에서 3회 계대 배양한 *L. acidophilus* 107A (about  $1 \times 10^8$  CFU/ml)를 PBS로 3회 세척을 실시한 후 well plate에 분주하고 3시간 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다. 배양이 종료된 후 10 mM PBS로 3회 동안 세척을 실시하여 각각의 부착되지 않은 유산균을 제거한 후 Trypsin-EDTA를 분주하여 HT-29 cell을 회수하고 일정량의 PBS로 연속 희석한 후 MRS agar에 plating하고 37°C에서 48시간 배양하고 균수를 측정하여 세포 부착 능력을 평가하였다. Positive control로 *L. rhamnosus* GG를 사용하였으며 실험은 2회 반복하였다.

## 제 2 항 실험결과 및 고찰

### 1. Probiotics의 선별

다양한 원천으로부터 형태적, 생리, 화학적 특성 및 당발효성을 이용하여 *L. acidophilus* spp., *L. casei* spp. *L. plantarum* spp. 및 *Lactococcus* sp. 등 수십종의 유산균주들을 분리, 동정하였다. 분리, 동정된 균주들과 다양한 기관으로부터 분주받아 유가공실험실에 보관중인 약 40여종의 균주들을 대상으로 내산성을 측정된 결과 각 대조구와 처리구간 성장률간의 유의적인 차이를 보여주었으며( $p < 0.001$ ) 3시간 배양후 내산성이 가장 우수한 균주로는 *L. acidophilus* 30SC, *L. acidophilus* 393, *L. acidophilus* A4, *Bifidobacterium* 703, *L. rhamnosus* 7469, *L. lactis* K1, *L. acidophilus* 107A, *Bifidobacterium* A-20, *L. acidophilus* GP2A, *L. casei* ssp., *L. acidophilus* GP1B 및 *L. acidophilus* RP32 등으로 나타났다(Table 3-5). 또한 내담즙성 측정은 각각 0.3%와 0.5% oxgall이 함유된 MRS 배지에 유산균을 접종시키고 37°C에서 12시간과 24시간동안 배양시킨 후 각 균주의 대조구와 처리구간의 성장률의 차이를 비교하였다. 그 결과는 Table 3-6, 3-7와 같다. 두 처리구 모두에서 처리구간 유의적인 차이를 보여주었으며( $p < 0.001$ ) 24시간동안 배양후 가장 내담즙성이 우수한 균주로는 0.3% oxgall이 함유되었을 경우, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* A4, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. salivarius* M-14, *Bifidobacterium* A-20, *L. jejunii* M-2, *Bifidobacterium* 703, *Lactococcus* sp. K-8, *L. acidophilus* 393, *L. casei* ssp., *L. casei* 910 및 *Lactococcus* sp. W20 등이었으며(Table 3-6) 0.5%의 경우, *L. acidophilus* 393, *L. acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium* 703, *L. acidophilus* GP2A, *L. casei* 910 및 *L. rhamnosus* 7469 등으로 판명되었다(Table 3-7).

일반적으로 0.3% 담즙염에 대해 우수한 내성을 나타낸 균주는 0.5% 담즙염에 대한 내성도 우수한 것으로 나타났으며 내산성의 경우, 많은 균주들이 1시간 배양시에 균수의 저하가 적은 내산성이 우수한 균주로 나타났다.

다른 연구자들에 의해 보고된 바와 같이 일반적으로 *L. acidophilus* 균주들이 우수한 probiotic 특성을 보여주었으며 비교적 우수한 probiotic 특성을 보유한 *Bifidobacterium* 계통의 균주들은 혐기성 균주로서 사료첨가용 제제에는 부적합하기에 앞으로의 실험에는 배제하기로 결정하였다(Danielson 등, 1989; Midolo, 등, 1995; 심 등, 1995).

이러한 내산성과 내담즙성에 대해 우수한 특성을 보유한 균주들을 대상으로 항균능력을 조사하였으며 그 결과, *E. coli* sp., *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp., *Bacillus* sp.,

*Yersinia* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., Fecal streptococci sp., 및 *Enterococcus* sp. 등 다양한 종에 대해 항균능력을 보유한 균주들이 존재하였다. 이러한 항균능력의 원인은 이들이 생산하는 박테리오파지에 기인하는 것으로 조사되었다(Table 3-8).

따라서, 본 연구의 결과를 바탕으로 최적 생산과 prebiotics의 선별 및 농축, 동결, 산소 저항성 조사 등 앞으로의 실험에 사용될 균주들을 선별하였으며 그 균주는 다음과 같다. *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 393, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* A4, *L. acidophilus* GP1B, *L. acidophilus* GP2A, *L. acidophilus* 30SC, *L. acidophilus* GP4A, *L. acidophilus* ATCC 43121 *L. casei* 910, *L. casei* 911, *L. casei* ssp., *L. lactis* K1, *L. rhamnosus* 7469, *L. casei* M5, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 4797.



Table 3-5 Percentage of bacteria cells reduced at 1 and 3 hr. incubation in artificial gastric juice.

Culture	Incubation time(hr.)	
	1	3
<i>L. rhamnosus</i> 7469	5.33 <sup>ij</sup>	10.83 <sup>qr</sup>
<i>L. casei</i> 911	62.67 <sup>ab</sup>	69.08 <sup>def</sup>
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 11454	22.28 <sup>ghi</sup>	37.39 <sup>lmn</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 43121	6.76 <sup>ij</sup>	16.94 <sup>pq</sup>
<i>L. acidophilus</i> NCFM	5.85 <sup>ij</sup>	33.50 <sup>mn</sup>
<i>L. casei</i> 910	48.97 <sup>abcdef</sup>	56.41 <sup>ghijk</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	5.97 <sup>ij</sup>	26.84 <sup>op</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 4797	43.87 <sup>cdef</sup>	45.49 <sup>kl</sup>
<i>L. helveticus</i> ssp.	46.94 <sup>abcdef</sup>	63.88 <sup>efghi</sup>
<i>L. acidophilus</i> 4962	4.09 <sup>ij</sup>	27.42 <sup>nop</sup>
<i>L. acidophilus</i> 393	5.95 <sup>ij</sup>	8.91 <sup>qr</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP1B	5.24 <sup>ij</sup>	14.35 <sup>qr</sup>
<i>L. acidophilus</i> 606	2.82 <sup>j</sup>	18.99 <sup>pq</sup>
<i>L. acidophilus</i> 107A	6.73 <sup>ij</sup>	11.36 <sup>qr</sup>
<i>L. acidophilus</i> 30SC	-2.87 <sup>j</sup>	4.03 <sup>r</sup>
<i>L. acidophilus</i> RP32	3.69 <sup>j</sup>	14.65 <sup>qr</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP2A	1.54 <sup>j</sup>	12.97 <sup>qr</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP4A	6.94 <sup>ij</sup>	16.48 <sup>pq</sup>
<i>L. acidophilus</i> A4	10.70 <sup>hij</sup>	8.96 <sup>qr</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. BY51	38.93 <sup>defg</sup>	53.71 <sup>ijk</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. HT61	32.20 <sup>fg</sup>	40.98 <sup>lm</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. HY4A	65.34 <sup>a</sup>	65.64 <sup>efgh</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. LN518	52.27 <sup>abcd</sup>	67.73 <sup>efg</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. LO518	54.25 <sup>abcd</sup>	63.36 <sup>efghi</sup>
LHlam1042	42.99 <sup>cdef</sup>	54.34 <sup>hijk</sup>
<i>L. casei</i> 9018	57.16 <sup>abc</sup>	58.83 <sup>fg hij</sup>
<i>Bif.</i> 703	1.73 <sup>j</sup>	10.25 <sup>qr</sup>
<i>Bif.</i> A-20	5.44 <sup>ij</sup>	12.84 <sup>qr</sup>
<i>L. lactis</i> 449	53.43 <sup>abcd</sup>	82.61 <sup>b</sup>
<i>L. lactis</i> K2	57.64 <sup>abc</sup>	80.83 <sup>bc</sup>
<i>L. lactis</i> K1	4.17 <sup>ij</sup>	10.95 <sup>qr</sup>
<i>L. casei</i> ssp.	3.01 <sup>j</sup>	14.13 <sup>qr</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. W20	11.59 <sup>hij</sup>	21.13 <sup>opq</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. K-8	6.25 <sup>ij</sup>	18.73 <sup>pq</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. K-13	24.72 <sup>gh</sup>	30.81 <sup>mno</sup>
<i>L. jejunii</i> M-2	62.90 <sup>ab</sup>	79.86 <sup>bcd</sup>
<i>L. amylophilus</i> M-9	52.30 <sup>abcd</sup>	72.90 <sup>bcde</sup>
<i>L. salivarius</i> M-14	33.63 <sup>efg</sup>	48.36 <sup>kl</sup>
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> B-9	50.17 <sup>abcde</sup>	69.96 <sup>cdef</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. B-15	57.93 <sup>abc</sup>	93.92 <sup>a</sup>

<sup>a-r</sup>The values followed by the same letters within a column are not significantly different (p<0.05).

Table 3-6. Percentage of bacteria cells reduced at 12 and 24 hr. incubation in 0.3% oxgall-MRS broth.

Culture	Incubation time(hr.)	
	12	24
<i>L. rhamnosus</i> 7469	44.78 <sup>bcdefgh</sup>	31.49 <sup>klmno</sup>
<i>L. casei</i> 911	58.05 <sup>abcdefg</sup>	69.40 <sup>bcd</sup>
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 11454	63.70 <sup>abcdef</sup>	78.55 <sup>ab</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 43121	19.89 <sup>ghij</sup>	30.01 <sup>klmnop</sup>
<i>L. acidophilus</i> NCFM	31.23 <sup>efghij</sup>	9.73 <sup>t</sup>
<i>L. casei</i> 910	33.99 <sup>defghij</sup>	27.66 <sup>lmnopq</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	42.21 <sup>cdefgh</sup>	12.84 <sup>st</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 4797	76.33 <sup>abc</sup>	68.83 <sup>bcd</sup>
<i>L. helveticus</i> ssp.	85.03 <sup>a</sup>	80.44 <sup>ab</sup>
<i>L. acidophilus</i> 4962	32.37 <sup>efghij</sup>	70.06 <sup>bcd</sup>
<i>L. acidophilus</i> 393	32.16 <sup>efghij</sup>	26.08 <sup>mnpqrs</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP1B	23.85 <sup>efghij</sup>	41.29 <sup>hijkl</sup>
<i>L. acidophilus</i> 606	27.27 <sup>efghij</sup>	41.33 <sup>hijkl</sup>
<i>L. acidophilus</i> 107A	20.56 <sup>ghij</sup>	28.74 <sup>lmnopq</sup>
<i>L. acidophilus</i> 30SC	36.01 <sup>cdefghi</sup>	35.02 <sup>ijklmn</sup>
<i>L. acidophilus</i> RP32	41.44 <sup>cdefghi</sup>	46.34 <sup>ghij</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP2A	29.56 <sup>efghij</sup>	40.61 <sup>ijkl</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP4A	14.17 <sup>hij</sup>	33.86 <sup>ijklmn</sup>
<i>L. acidophilus</i> A4	11.48 <sup>hij</sup>	10.70 <sup>st</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. BY51	25.17 <sup>efghij</sup>	60.71 <sup>def</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. HT61	32.09 <sup>efghij</sup>	48.73 <sup>fghi</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. HY4A	40.52 <sup>cdefghi</sup>	43.20 <sup>hijk</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. LN518	44.64 <sup>bcdefgh</sup>	57.89 <sup>defg</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. LO518	50.54 <sup>abcdefgh</sup>	75.29 <sup>bc</sup>
LHIam1042	29.91 <sup>efghij</sup>	32.25 <sup>klmno</sup>
<i>L. casei</i> 9018	46.10 <sup>abcdefgh</sup>	35.93 <sup>ijklmn</sup>
<i>Bif.</i> 703	84.16 <sup>ab</sup>	23.08 <sup>nopqrs</sup>
<i>Bif.</i> A-20	9.14 <sup>hij</sup>	17.16 <sup>pqrst</sup>
<i>L. lactis</i> 449	35.60 <sup>cdefghij</sup>	54.24 <sup>efgh</sup>
<i>L. lactis</i> K2	70.82 <sup>abcde</sup>	88.43 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i> K1	0.40 <sup>ij</sup>	37.66 <sup>ijklm</sup>
<i>L. casei</i> ssp.	35.19 <sup>cdefghij</sup>	26.17 <sup>mnpqrs</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. W20	29.59 <sup>efghij</sup>	29.78 <sup>klmnop</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. K-1	41.77 <sup>cdefghi</sup>	74.58 <sup>bc</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. K-8	74.16 <sup>abcd</sup>	24.82 <sup>mnpqrs</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. K-13	40.42 <sup>cdefghi</sup>	31.22 <sup>klmno</sup>
<i>L. jejunii</i> M-2	26.10 <sup>efghij</sup>	19.39 <sup>opqrst</sup>
<i>L. amylophilus</i> M-9	85.75 <sup>a</sup>	64.68 <sup>cde</sup>
<i>L. salivarius</i> M-14	-5.69 <sup>j</sup>	16.10 <sup>trst</sup>

<sup>a-t</sup>The values followed by the same letters within a column are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 3-7. Percentage of bacteria cells reduced at 12 and 24 hr. incubation in 0.5% oxgall-MRS broth.

Culture	Incubation time	
	12	24
<i>L. rhamnosus</i> 7469	25.92 <sup>cde</sup>	22.39 <sup>ef</sup>
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 11454	79.10 <sup>a</sup>	32.97 <sup>de</sup>
<i>L. acidophilus</i> 43121	4.28 <sup>f</sup>	67.17 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i> NCFM	20.19 <sup>cdef</sup>	14.86 <sup>f</sup>
<i>L. casei</i> 910	26.17 <sup>cde</sup>	21.69 <sup>ef</sup>
<i>L. acidophilus</i> 393	26.25 <sup>cde</sup>	14.85 <sup>f</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP1B	15.40 <sup>def</sup>	55.33 <sup>ab</sup>
<i>L. acidophilus</i> 606	27.51 <sup>cd</sup>	67.96 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i> 107A	15.17 <sup>def</sup>	47.17 <sup>bc</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP2A	30.34 <sup>bcd</sup>	19.91 <sup>ef</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP4A	44.48 <sup>b</sup>	45.49 <sup>bcd</sup>
LHlam1042	28.04 <sup>cd</sup>	38.24 <sup>cd</sup>
LC9068	33.77 <sup>bc</sup>	32.04 <sup>de</sup>
<i>Bif.</i> 703	13.16 <sup>def</sup>	18.56 <sup>ef</sup>
<i>Bif.</i> A-20	18.91 <sup>cdef</sup>	43.17 <sup>bcd</sup>
<i>L. casei</i> ssp.	10.04 <sup>ef</sup>	57.02 <sup>ab</sup>
<i>Lactococcus</i> sp. W2O	27.32 <sup>cd</sup>	31.73 <sup>de</sup>

<sup>a-f</sup>The values followed by the same letters within a column are not significantly different at the probability of 5% level.

Table 3-8. Inhibitory spectrum of bacteriocins produced by selected strains.

indicator \ producer	7469	GP2A	4797	30SC	43121	GP1B	<i>Bif</i> .703	<i>L.</i> <i>casei</i> ssp.	GP4A	911	A4	107A	393	4356
<i>E. coli</i> O157-43889		+				+					+	+		
<i>E. coli</i> O157-43893									+					
<i>E. coli</i> O157-43894								+						
<i>E. coli</i> O157-43895														
<i>E. coli</i> K21052						+							+	
<i>Salmonella fyermurium</i>		+				+							+	
<i>Yersinia enterocolita</i>				+					+					
<i>Staphylococcus aureus</i>		+		+		+			+		+	+	+	
<i>Staphylococcus intermedius</i> K40149		+		+	+	+				+	+			+
<i>Staphylococcus typhimurium</i> K11806												+		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> K35494									+					+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+		+		+					+		+	
<i>Listeria ivanovii</i>		+		+	+	+					+	+		
<i>Listeria innocua</i>	+	+				+	+						+	
<i>Acinetobacter baumannii</i>									+					
<i>Bacillus cereus</i>	+			+				+	+			+	+	
<i>Bacillus subtilis</i>				+				+	+					
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>		+							+					
<i>Fecal Streptococci</i>	+								+					
<i>Ent. aerogenes</i>							+							
<i>Shigella</i>						+								

## 2. Prebiotics의 선별

액체배지를 이용하여 prebiotics 물질에 의한 성장 효과를 알아보기 위해 33종의 균주들을 사용하였으며 배양후 배지내 pH 변화를 측정 한 결과는 Table 3-9과 같다. 사용된 prebiotics인 inulin과 fructo-oligosaccharide는 *Lactobacillus* 균주와 *Bifidobacterium* 균주들이 이용가능한 prebiotics로 알려져 있으며 장내 미생물에 의해 분해되어 short chain fatty acid가 생산되며 이러한 물질로 인해 대장질환의 개선, 콜레스테롤 감소, 부패억제 및 변비완화 효과를 나타내었다고 보고된 바 있다(Hidaka 등, 1991; Kalplan과 Jutkins, 2000).

대부분, 초기 pH가 약 6.5에서 배양이 시작된 이후 Inulin, lactulose, fructooligosaccharide가 첨가된 배지내에서의 pH 변화를 관찰할 수 있었으며 대조구로 사용한 MRS media에서의 시간경과별 pH 변화와 prebiotics를 첨가한 배지의 pH 변화를 비교해 보았을 때 lactulose를 사용하였을 경우, 많은 균주에서 pH 5이하의 산생성을 관측할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 10종의 균주를 선별하고 5종의 prebiotics가 함유된 고체배지를 사용하여 총균수를 측정하였다(Table 3-8). Sorbitol, lactulose, mannitol, xylitol 및 raffinose와 대조구로 dextrose를 사용하여 고체배지를 제조하였으며 희석한 총 10종의 유산균주를 배양시켜 colony 주변의 색변화로 prebiotics의 이용성 여부를 식별하였으며 그 결과의 일부는 Fig. 3-1과 같다.

Fig. 3-1은 sorbitol을 배지에 첨가하여 *L. casei* 911 균주를 배양시킨 결과이며 prebiotics의 이용성 여부를 가지적으로 판단할 수 있었다. 이러한 방법을 통해 총 5종의 prebiotics를 첨가한 배지를 사용하여 총균수를 측정 한 결과는 Table 3-10과 같으며 대부분의 균주가  $10^8$  cfu/ml 이상의 우수한 성장능력을 보여주었고 특히, *L. casei* 910, *L. acidophilus* NCFM 및, *L. acidophilus* ATCC 4356의 경우, 모든 prebiotics 첨가구가 대조구로 사용된 MRS agar보다 더 높은 생존균수를 보여주었다. 반면, *L. casei* 911, *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 30SC 및 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주의 경우, 각각 1종씩의 prebiotic 물질이 첨가된 배지에서  $1 \times 10^6$  cfu/ml 이하의 생균수를 보여주었으며 또한, 많은 균주들이 colony를 형성하였지만 충분한 양의 산 생성이 이루어지지 않아 노란색으로의 변색현상이 나타나지 않았다. 그러나, *L. casei* 911, *L. casei* 910 및 *L. acidophilus* NCFM 등의 균주는 각각 sorbitol, lactulose, manitol, sorbitol과 lactulose를 이용하여 확연하게 식별이 가능할 정도로 colony주변에 노란색으로 변색되는 현상이 관측되어 많은 양의 산을 생성하는 균주로 나타났다. 특히, *L. casei* 911과 *L. acidophilus* 30SC 균주는 mannitol, sorbitol 및 raffinose가 첨가된 agar 배지에서는

두 균주 모두 우수한 성장특성을 보여주었으나 agar를 제거한 액체배지에서는 성장이 이루어지지 못하는 특성을 보여주었으며 *L. acidophilus* GP4A와 *L. acidophilus* GP1B의 경우에서도 mannitol과 sorbitol에서 동일한 현상을 나타내었다.

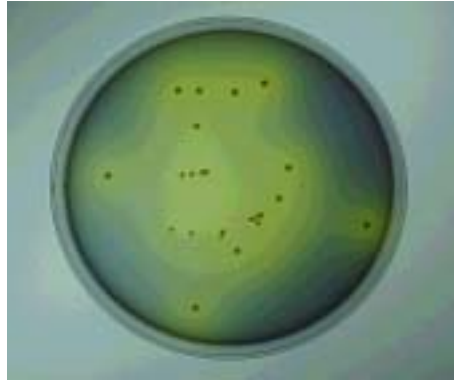
상기의 방법인 고체배지를 제조하여 총균수를 측정하는 방법은 시간과 배지 제조비용을 소요되며 많은 종의 균주를 대상으로 선별작업을 할 경우에는 배지 pH를 측정하는 방법이 더 효과적이라 판단된다. 그러나, 고체배지를 사용하였을 때 제시되어진 결과 중 *L. casei* 910과 *L. acidophilus* NCFM 균주는 모두 lactulose 이용성이 우수하게 나타났지만 *L. acidophilus* ATCC 4356과 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주의 경우에는 액체배지에서 성장이 이루어지지 못하였다는 것을 알 수 있었다. 본 연구와 유사한 조건에서 배지 pH를 측정하여 prebiotics의 이용성 여부를 조사한 Okazaki 등(1990)의 보고에 의하면 Xylooligosaccharide가 선택적으로 *Bifidobacteria*의 성장에 영향을 미쳤으나 *E. coli*와 *Clostridium* spp. 균주들의 성장에는 어떠한 영향도 미치지 못하였다고 보고하였다.

Table 3-9. Changes of pHs of media containing various prebiotics during incubation at 37°C.

prebiotics strain	Blank		Control (glucose)		inulin		fructo-oligosac haride		lactulose	
	24hr	48hr	24hr	48hr	48hr	96hr	24hr	48hr	24hr	48hr
<i>L. acidophilus</i> 393	6.63	6.58	4.44	4.19	6.26	6.78	5.86	5.91	<b>4.71</b>	<b>4.18</b>
<i>L. acidophilus</i> GP2A	6.58	6.39	4.91	4.30	6.47	6.14	5.93	<b>4.18</b>	6.37	6.27
<i>L. acidophilus</i> GP4A	6.31	6.28	5.31	4.25	6.48	6.51	6.09	5.98	6.12	5.71
<i>L. acidophilus</i> A4	6.53	6.56	4.39	4.41	6.39	6.44	6.67	6.63	5.60	<b>4.87</b>
<i>L. acidophilus</i> GP1B	6.77	6.73	4.46	4.53	6.72	6.63	6.43	<b>4.54</b>	6.16	6.06
<i>L. acidophilus</i> 107A	6.35	6.43	4.64	4.66	6.12	6.14	<b>4.85</b>	<b>4.50</b>	<b>4.69</b>	<b>4.60</b>
<i>L. acidophilus</i> 606	6.39	6.41	4.57	4.54	6.20	6.12	<b>5.20</b>	<b>4.45</b>	<b>6.25</b>	<b>4.52</b>
<i>L. acidophilus</i> RP 32	6.81	6.13	4.46	4.38	6.46	6.43	5.90	5.85	6.39	6.39
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	7.13	6.73	6.40	4.64	6.56	6.43	6.83	6.13	6.40	6.26
<i>L. acidophilus</i> 4962	6.5	6.41	4.64	4.60	6.24	6.35	6.21	6.17	5.01	<b>4.69</b>
<i>L. acidophilus</i> NCFM	6.42	6.21	4.61	4.56	6.15	6.20	<b>4.71</b>	<b>4.49</b>	<b>4.84</b>	<b>4.56</b>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 43121	6.39	6.34	4.67	4.72	6.17	6.14	6.34	6.09	6.41	6.08
<i>Lactobacillus</i> sp. BY51	6.34	6.47	4.52	4.58	6.62	6.55	6.66	6.37	6.41	6.32
<i>Lactobacillus</i> sp. LN518	6.81	6.73	6.18	4.44	6.78	6.66	6.64	6.66	<b>4.52</b>	<b>4.46</b>
<i>Lactobacillus</i> sp. LO518	6.80	6.80	4.48	4.52	6.74	6.69	6.70	6.53	<b>4.62</b>	<b>4.43</b>
<i>Lactobacillus</i> sp. HY4A	6.56	6.54	4.41	4.50	6.78	6.40	6.12	6.17	<b>4.57</b>	<b>4.41</b>
<i>Lactobacillus</i> sp. HT61	6.69	6.69	4.42	4.48	6.43	6.48	6.44	6.46	5.70	5.04
<i>Lactococcus</i> sp. W20	6.60	6.72	4.42	4.50	6.55	6.56	6.30	6.57	<b>4.38</b>	<b>4.39</b>
<i>L. helveticus</i> <i>Iam</i> 1042	6.63	6.61	4.40	4.48	6.63	6.61	6.29	6.24	<b>4.40</b>	<b>4.45</b>
<i>L. casei</i> 9018	6.31	6.42	4.47	4.21	6.04	6.24	5.64	5.62	<b>4.39</b>	<b>4.18</b>
<i>L. casei</i> M5	6.47	6.50	4.40	4.46	6.46	6.38	6.66	6.51	<b>4.34</b>	<b>4.39</b>
<i>L. casei</i> 910	6.32	6.21	4.45	4.23	6.07	5.77	5.64	5.57	<b>4.36</b>	<b>4.15</b>
<i>L. casei</i> 911	6.74	6.29	5.90	4.59	6.68	6.10	6.52	<b>4.89</b>	6.40	<b>4.59</b>
<i>L. rahnosus</i> 7469	6.53	6.24	4.67	4.61	6.37	6.45	6.39	6.29	<b>4.66</b>	<b>4.63</b>
<i>L. lactis</i> <i>ssp. lactis</i> 11454	6.34	6.33	4.78	4.69	6.29	6.36	6.16	6.12	5.24	<b>4.60</b>
<i>L. delbreckii</i> <i>ssp. lactis</i> ATCC 4797	6.41	6.64	4.71	4.44	6.33	6.29	6.20	6.07	6.22	6.0
<i>Lactococcus</i> sp. HY449	6.58	6.84	4.62	4.37	6.56	6.66	6.15	6.03	6.08	5.98
<i>L. helveticus</i>	6.71	6.58	4.65	4.61	6.43	6.22	6.54	6.01	6.46	6.38
<i>L. casei</i>	6.31	6.40	4.72	4.68	6.22	6.14	6.05	6.13	<b>4.68</b>	<b>4.63</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> EH <sub>2</sub>	6.55	6.57	4.52	4.55	6.39	6.46	5.77	5.68	<b>4.51</b>	<b>4.52</b>
<i>L. plantarum</i> CS1	6.26	5.77	4.41	4.24	6.19	6.26	5.65	5.60	<b>4.35</b>	<b>4.25</b>
<i>L. lactis</i> . K1	6.44	6.11	4.55	4.47	6.14	6.13	5.85	5.80	<b>4.50</b>	<b>4.38</b>
<i>Lactococcus</i> sp. K2	6.34	6.60	4.98	4.84	6.35	6.16	6.27	5.82	5.96	<b>4.23</b>



A



B

Fig. 3-1. Colony of *L. casei* 911 strain on minimal media agar containing sorbitol. (A) minimal media agar before incubation with *L. casei* 911; (B) minimal media agar after incubation with *L. casei* 911.



Table 3-10. Total plate counts of selected strains on minimal media agar containing various prebiotics

(cfu/ml)

Prebiotics strains	Dextrose (control)	Sorbitol	Lactulose	Mannitol	Raffinose	Xylitol
<i>L. casei</i> 910	1.3×10 <sup>9</sup>	1.3×10 <sup>9</sup>	1.8×10 <sup>9</sup>	7.0×10 <sup>9</sup>	2.2×10 <sup>9</sup>	2.2×10 <sup>9</sup>
<i>L. casei</i> 911	3.4×10 <sup>8</sup>	1.3×10 <sup>9</sup>	3.7×10 <sup>8</sup>	7.6×10 <sup>7</sup>	3.3×10 <sup>8</sup>	<1×10 <sup>6</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP1B	7.5×10 <sup>8</sup>	3.5×10 <sup>8</sup>	6.0×10 <sup>8</sup>	5.2×10 <sup>8</sup>	3.7×10 <sup>8</sup>	5.8×10 <sup>8</sup>
<i>L. acidophilus</i> 107A	2.1×10 <sup>9</sup>	<1×10 <sup>6</sup>	3.2×10 <sup>8</sup>	6.7×10 <sup>8</sup>	7.0×10 <sup>8</sup>	5.4×10 <sup>8</sup>
<i>L. acidophilus</i> 30SC	7.8×10 <sup>8</sup>	7.0×10 <sup>8</sup>	8.7×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>8</sup>	2.7×10 <sup>8</sup>	<1×10 <sup>6</sup>
<i>L. acidophilus</i> GP4A	7.7×10 <sup>8</sup>	8.0×10 <sup>8</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>	4.1×10 <sup>8</sup>	4.7×10 <sup>8</sup>	3.3×10 <sup>8</sup>
<i>L. acidophilus</i> NCFM	2.9×10 <sup>8</sup>	5.0×10 <sup>8</sup>	5.5×10 <sup>8</sup>	9.0×10 <sup>8</sup>	7.6×10 <sup>8</sup>	5.7×10 <sup>8</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 43121	4.0×10 <sup>8</sup>	<1×10 <sup>6</sup>	2.1×10 <sup>8</sup>	3.2×10 <sup>8</sup>	3.8×10 <sup>8</sup>	4.9×10 <sup>8</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	2.7×10 <sup>8</sup>	4.7×10 <sup>8</sup>	4.5×10 <sup>8</sup>	3.6×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>8</sup>	3.9×10 <sup>8</sup>
<i>L. delbrueckii</i> 4797	1.0×10 <sup>9</sup>	3.3×10 <sup>8</sup>	5.6×10 <sup>8</sup>	2.8×10 <sup>8</sup>	6.0×10 <sup>8</sup>	4.9×10 <sup>8</sup>

### 3. 최적 생산 배지 조성의 설정

20개의 처리조합으로 제조된 배지에 9종의 균주를 각각 접종시키고 12시간 배양한 후 생균수에 접종균수를 뺀 순수하게 성장한 균수의 log값은 Table 3-11와 같다. 각 균주에 대해 초기 성장을 빠르도록 하는 배지 성분을 찾고자 12시간으로 배양을 실시하였으며 반응표면 방법론을 사용하여 second-order model로 각 배지성분 즉, 탈지분유, 효모추출물, 포도당의 최적 성분 비율을 최적화하였다. 본 실험에 사용한 중심합성계획(central composite design)은 Table 3-2에서 보는 바와 같이 표준화된 값을 사용하였다. 표준화된 값(Code value)은 측정단위가 다른 변수들과 동등한 비교가 가능하도록 해줄 뿐 아니라, 회귀분석에서 가장 문제되는 다중공선성을 제거하고자 사용하였다. 총 20개의 처리구를 2개의 블록(block)으로 나누어 2일에 걸쳐서 실험을 수행하였고 block은 second-order model에서 공변수(covariate)로 하여 모형에 포함시켜 분석하였다.

각 선발된 유산균에 대한 최적 배지조성은 Table 3-14에 나타난 바와 같으며 선발과정에서 가장 우수한 특성을 지닌 *L. acidophilus* 107A와 *L. casei* 393에 대한 분산분석표는 Table 3-11과 3-12에 예시에 놓았으며 나머지 7종의 균주에 대해서도 같은 방법으로 분석하였다.

모든 균주에서 최고의 생균수가 예측되는 point가 안장점으로 나타나 능선분석(ridge analysis)을 수행하여 실험 범위내에서 생균수를 증가시키는 방향으로 좌표를 이동시켜 여기서 얻어진 지점에서의 각 배지조성 함량을 정립하였다.

전체 모형에 대한 유의성은  $P < 0.1$ 로 나타났고 *L. acidophilus* 107A의 경우, 탈지분유가 가장 영향을 주는 요인으로 분석되었으며 *L. casei* 393의 경우에는 탈지분유와 포도당의 interaction이 유의하게 나타났다. 전반적으로 *L. acidophilus*에 속하는 균주들은 탈지분유 13%이상에서 최적 함량이 나타난 반면 *L. casei*들은 이보다 낮은 함량에서 생균수가 높게 예측되었다. 이러한 차이는 균주에 따른 차이일수 있으나, 교호작용에 유의한 점으로 보아 다른 배지조성물과 함께 고려되어야 할 것이다.

Fig 3-2~3-7은 *L. acidophilus* 107A와 *L. casei* 393에 대한 각 배지 조성들과의 3차원 반응표면도를 나타내 것으로 본 연구에 사용된 3종류의 배지 조성물은 균의 성장에 많은 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 나머지 7종의 균주에 대하여도 같은 방법으로 분석하였으나 3차원 반응표면도를 도시하지는 않았다.

Table 3-11. Increase of viable cells during incubation by treatment combinations.

Trt.	Increase of viable cells *								
	K1	910	4356	107A	393	<i>L. casei</i>	A4	7469	GP2A
1	2.0149	1.7068	1.6812	1.60768	0.4000	1.8600	1.2817	2.0095	1.0206
2	1.5546	1.8751	1.6990	1.1881	0.5340	1.7188	0.9858	1.7116	0.8276
3	1.8289	2.0167	1.8199	1.42697	0.1504	1.9955	0.8542	1.5975	0.2694
4	1.4834	2.0086	1.6862	1.32585	1.7301	1.6265	0.5901	1.6660	0.5368
5	1.4621	2.8109	1.6657	0.65909	0.7810	1.6149	1.5867	1.6263	1.1458
6	1.6793	2.6847	1.8366	1.22051	0.5013	1.4912	1.9166	1.6807	1.4271
7	1.6032	3.0289	1.5819	1.36764	1.0506	1.5617	1.4164	1.7653	1.1229
8	2.0348	2.9168	1.4916	1.46315	0.4478	2.0031	1.4869	1.6454	0.8721
9	1.7226	2.0295	1.7459	1.53791	0.7414	1.9780	1.3831	2.0352	1.1178
10	1.4069	1.5130	1.6867	1.25863	0.2109	2.5439	1.1461	1.9850	1.7755
11	1.6363	1.5199	1.7566	1.43099	0.4991	2.0191	1.8960	1.9710	0.9495
12	1.2771	1.9465	1.4381	2.17609	1.2588	1.8207	0.0934	1.8625	1.2523
13	0.9514	2.0038	1.6562	2.99667	2.0018	1.8225	2.4376	1.3722	2.3063
14	1.3522	2.4260	1.5825	1.45284	1.4277	1.7941	0.8002	1.8239	1.1102
15	1.0565	1.9863	1.5189	1.83367	1.1666	1.6449	1.2709	2.3896	2.0248
16	0.7991	1.8013	1.4418	1.93362	1.4754	1.9061	0.9807	2.1451	0.7618
17	1.1778	2.7408	1.3940	1.81971	1.4228	1.8617	0.5557	2.1549	1.0896
18	1.3282	2.4069	1.7260	1.88548	1.5089	1.8381	1.2467	2.2820	2.2564
19	1.2725	2.0677	1.7872	1.64616	1.5238	1.5334	1.0786	2.0095	1.9260
20	1.3885	2.2521	1.9777	1.57310	0.7142	1.5677	1.1627	2.0720	2.6773

\* log numbers of viable cells increased during incubation

Table 3-12. Analysis of variance and coefficient estimates in second-order model for *L. acidophilus* 107A

Regression	Df	Type I sum of square	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Covariates	1	1.829222	0.4427	20.373	0.0015
Linear	3	0.197356	0.0478	0.733	0.5582
Quadratic	3	0.997591	0.2414	3.704	0.0552
Crossproduct	3	0.299606	0.0725	1.112	0.3939
Total Regress	10	3.323775	0.8044	3.702	0.0308
Residual	Df	sum of square	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
Lack of Fit	5	0.712580	0.142516		
Pure Error	4	0.095490	0.023873	5.970	0.0540
Total Error	9	0.808070	0.089786		
Parameter	Df	Parameter Estimate	Standard error	T for Ho: Parameter=0	Prob >  T
INTERCEPT	1	1.250387	0.141962	8.808	0.0000
SK <sup>1</sup>	1	0.039684	0.081079	0.489	0.6362
YE <sup>2</sup>	1	0.113395	0.081079	1.399	0.1954
GLU <sup>3</sup>	1	-0.004054	0.081079	-0.0500	0.9612
SK*SK	1	0.224929	0.079109	2.843	0.0193
YE*SK	1	0.124268	0.105940	1.173	0.2709
YE*YE	1	-0.108434	0.079109	-1.371	0.2037
GLU*SK	1	0.147203	0.105940	1.389	0.1981
GLU*YE	1	-0.018429	0.105940	-0.174	0.8657
GLU*GLU	1	-0.025931	0.079109	-0.328	0.7506
BLOCK	1	0.616825	0.135495	4.552	0.0014

<sup>1</sup>skim milk, <sup>2</sup>yeast extract, <sup>3</sup>glucose

Table 3-13. Analysis of variance and coefficient estimates in second-order model for *L. casei* 393

Regression	Df	Type I sum of square	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Covariates	1	2.771573	0.4890	18.598	0.0020
Linear	3	0.186922	0.0330	0.418	0.7444
Quadratic	3	0.300796	0.0531	0.673	0.5900
Crossproduct	3	1.066787	0.1882	2.386	0.1367
Total Regress	10	4.326079	0.7633	2.903	0.0620
Residual	Df	sum of square	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
Lack of Fit	5	0.771096	0.154219		
Pure Error	4	0.570133	0.142533	1.082	0.4830
Total Error	9	1.341229	0.149025		
Parameter	Df	Parameter Estimate	Standard error	T for Ho: Parameter=0	Prob >  T
INTERCEPT	1	0.481523	0.182894	2.633	0.0272
SK <sup>1</sup>	1	0.089012	0.104456	0.852	0.4162
YE <sup>2</sup>	1	0.052962	0.104456	0.507	0.6243
GLU <sup>3</sup>	1	0.054384	0.104456	0.521	0.6152
SK*SK	1	0.133522	0.101918	1.310	0.2226
YE*SK	1	-0.091293	0.136485	-0.669	0.5204
YE*YE	1	0.015748	0.101918	0.155	0.8806
GLU*SK	1	-0.324530	0.136485	-2.378	0.0414
GLU*YE	1	0.140337	0.136485	1.028	0.3307
GLU*GLU	1	0.069466	0.101918	0.682	0.5127
BLOCK	1	0.769837	0.174562	4.410	0.0017

<sup>1</sup>skim milk, <sup>2</sup>yeast extract, <sup>3</sup>glucose

*L. acidophilus* 107A

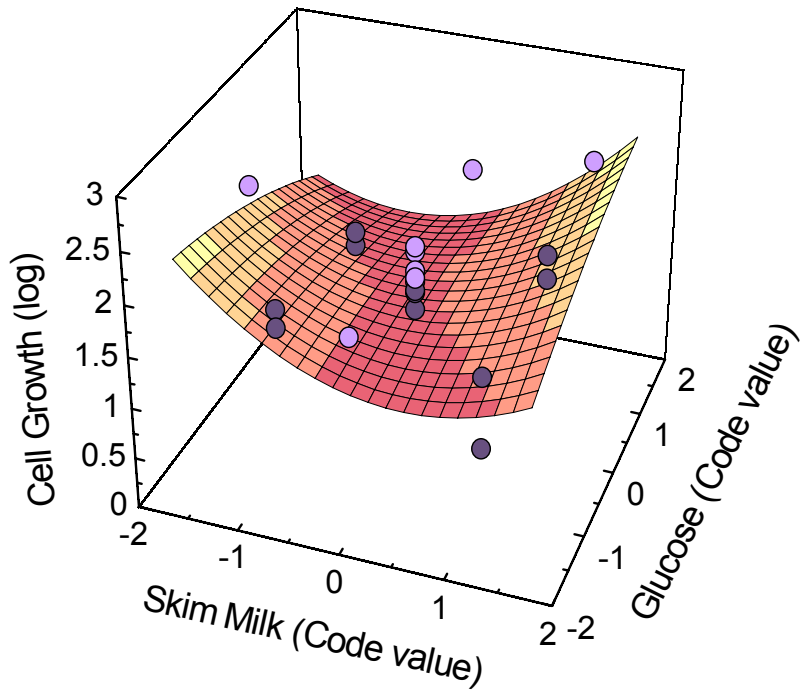


Fig. 3-2. Effect of glucose and skim milk concentration on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 107A.

*L. acidophilus* 107A

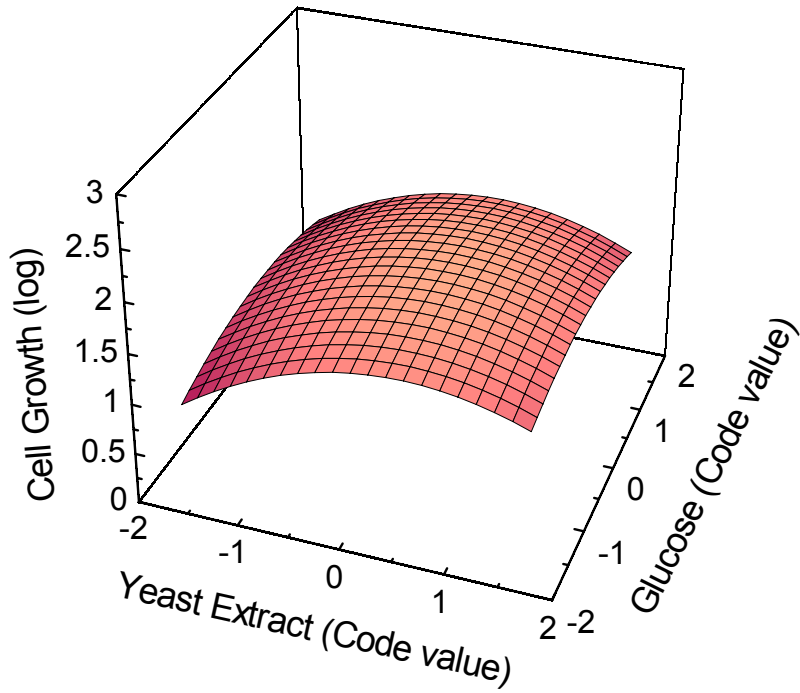


Fig. 3-3. Effect of glucose and yeast extract concentration on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 107A.

*L. acidophilus* 107A

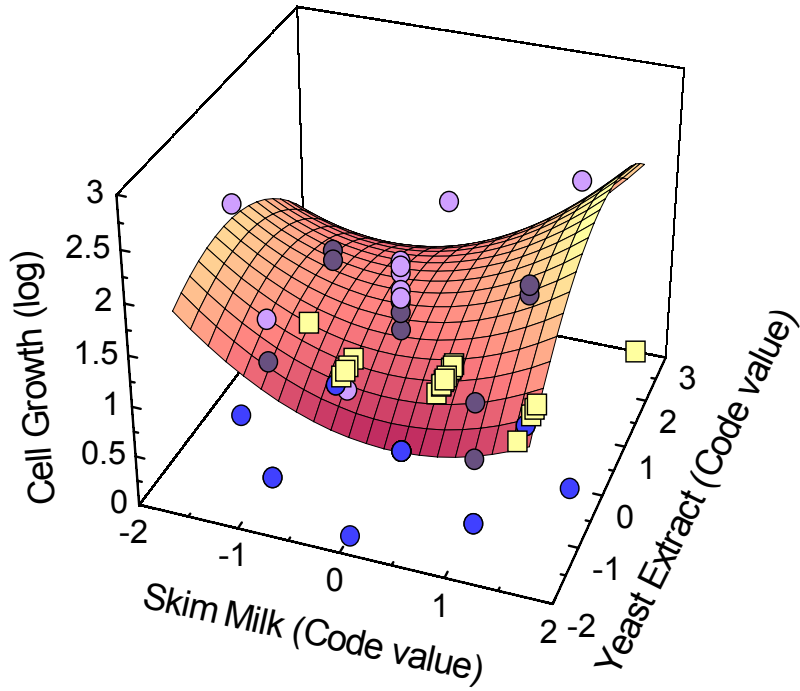


Fig. 3-4. Effect of skim milk and yeast extract concentration on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 107A.



*L. casei* 393

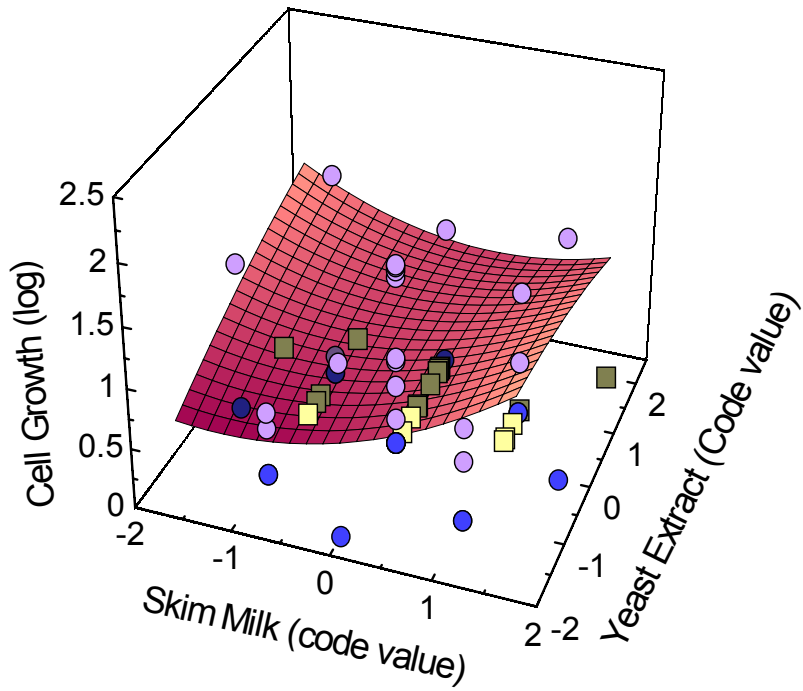


Fig. 3-5. Effect of skim milk and yeast extract concentration on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 393.

*L. casei* 393

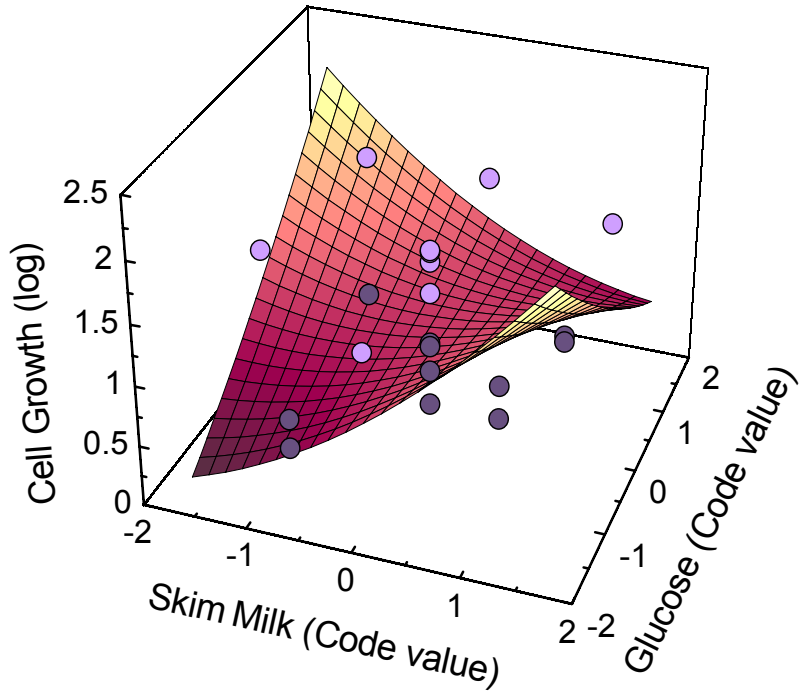


Fig. 3-6. Effect of skim milk and glucose concentration on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 393.

*L. casei* 393

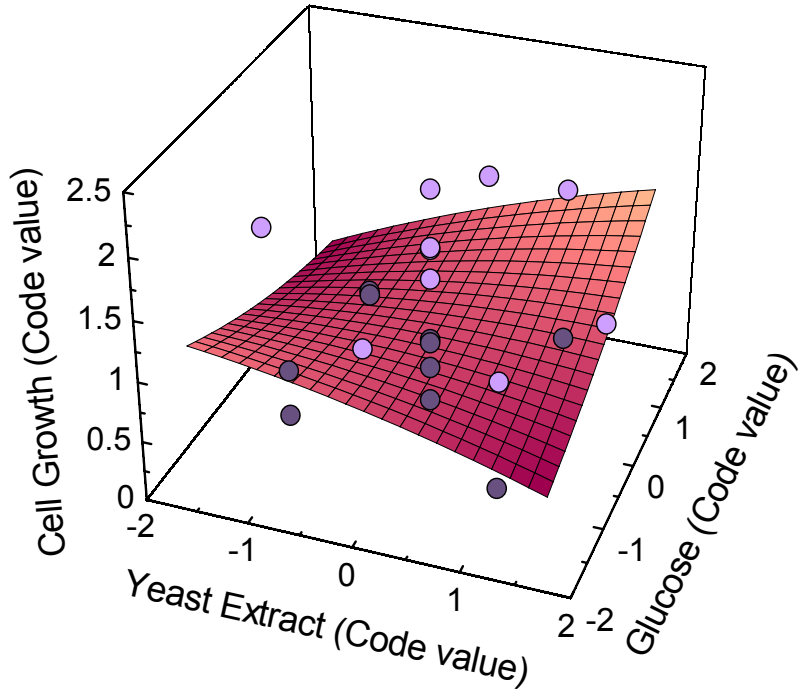


Fig. 3-7. Effect of glucose and yeast extract concentration on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 393.

Table 3-14. Optimum medium composition for the production of probiotics strains.

Strains	Skim milk(%)	Yeast extract(%)	Glucose(%)
<i>L. lactis</i> K1	6.8	0.2	0.7
<i>L. casei</i> 910	12.6	0.5	1.9
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	13.1	0.2	1.3
<i>L. acidophilus</i> GP2A	15.3	0.6	1.1
<i>L. acidophilus</i> A4	15.0	0.5	1.2
<i>L. acidophilus</i> 107A	14.7	0.6	1.3
<i>L. acidophilus</i> 393	14.0	0.4	0.5
<i>L. rhamnosus</i> 7469	9.2	0.4	0.2
<i>L. casei</i> 910	11.2	0.6	1.4

#### 4. 농축, 동결, 산소 저항성 균주의 선별

내산성, 내담즙성 및 박테리오신 생산 능력 등 probiotics 특성이 우수한 균주로 선별되어진 총 12종의 균주를 대상으로 대량생산과 회수를 위한 가공공정단계 중 발생가능한 농축, 동결 및 산소 접촉에 대한 활력의 변화를 조사하였다. 그 결과, *L. casei* 910, *L. casei* ssp., *L. rahnmosus* 7469, *L. acidophilus* 393 및 *L. acidophilus* 107A 등이 비교적 우수한 회수율 및 생존율을 보여주었다(Table 3-15).

Table 3-15. Comparison of stability of the cells during processing.

(cfu/ml)

Culture	Treatment			
	Broth	Concentrate	Freezing	Oxygen
<i>L. casei</i> 910	$6.8 \times 10^9$	$1.2 \times 10^{10}$	$1.2 \times 10^{10}$	$9.5 \times 10^9$
<i>L. acidophilus</i> GP1B	$8.2 \times 10^9$	$2.7 \times 10^{10}$	$8.9 \times 10^7$	$6.3 \times 10^6$
<i>L. acidophilus</i> A4	$7.7 \times 10^9$	$3.1 \times 10^{10}$	$1.9 \times 10^7$	$4.1 \times 10^6$
<i>L. acidophilus</i> ATCC 43121	$1.1 \times 10^9$	$5.2 \times 10^9$	$8.1 \times 10^6$	$5.6 \times 10^6$
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	$4.5 \times 10^8$	$8.7 \times 10^8$	$5.1 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$
<i>L. casei</i> ssp.	$1.2 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^{10}$	$7.1 \times 10^9$
<i>L. rahmnosus</i> 7469	$1.7 \times 10^{10}$	$1.2 \times 10^{10}$	$4.6 \times 10^8$	$4.2 \times 10^9$
<i>L. acidophilus</i> GP2A	$3.0 \times 10^9$	$2.7 \times 10^8$	$9.8 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$
<i>L. lactis</i> K1	$5.7 \times 10^9$	$4.6 \times 10^9$	$2.2 \times 10^9$	$< 10^6$
<i>L. acidophilus</i> 393	$5.2 \times 10^9$	$6.5 \times 10^9$	$9.4 \times 10^9$	$9.9 \times 10^9$
<i>L. acidophilus</i> 107A	$1.1 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$8.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$
<i>L. acidophilus</i> 30SC	$1.8 \times 10^9$	$3.6 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$	$< 10^6$

## 5. 동물실험용 생균제의 선별 및 생산

지금까지의 연구 결과를 바탕으로 probiotics 특성과 prebiotics가 함유된 배지에서 성장능력이 뛰어난 균주 4종(*L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 393, *L. casei* M5 및 *L. acidophilus* NCFM)을 선별하여 동물실험에 사용될 균주로 사용하였다. 탈지분유, glucose, yeast extract 및 peptone이 함유된 배지로 배양한 다음 freeze-dry를 실시하여 분말형태로 생산하였다.

## 6. Prebiotics 및 probiotics의 선별

앞서 수행되어진 실험 결과 즉, 균주를 접종한 BCP 배지에서의 산생성 정도, 배양후 배지의 pH 및 총균수의 변화 등의 결과와 5종의 prebiotics에 의해 성장이 증진되는 균주들을 대상으로 수종의 생균제를 선별하였으며 그 종류는 Table 3-16과 같다. 다시 5종의 prebiotics를 1%씩 minimal 배지에 첨가한 다음 선별된 균주들을 1% 접종하고 0, 6, 12, 24, 및 48시간 배양후 흡광도(600nm)를 측정하여 최적 생산 능력을 보이는 균종을 prebiotics 당 3~5종 선별하였다(Bold 표시, Table 3-16).

48시간 후에 가장 높은 성장률을 보이는 균주를 선별하였으며 raffinose에서는 *L. acidophilus* GP1B, *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 43121 및 *L. acidophilus* NCFM의 성장이 우수하였고(이후 같은 형태로), sorbitol은 *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 43121, *L. casei* 910 및 *L. casei* 911이었으며, mannitol은 *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 43121 및 *L. casei* 910이었다. 또한, FOS는 *L. acidophilus* GP1B, *L. acidophilus* 107A 및 *L. acidophilus* 393가 가장 높은 성장률을 나타내었고 lactulose는 *L. acidophilus* GP1B, *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 43121, *L. acidophilus* 393 및 *L. casei* 910의 균주가 가장 우수한 성장률을 나타냈다.

Table 3-16. Selection of strains based on total counts, pHs and optical density of media containing 5 prebiotics during incubation at 37°C.

Prebiotics	Strains
raffinose	<b>GP1B, NCFM, 107A, 43121</b> , GP4A, 4356, 911
sorbitol	NCFM, <b>107A, 43121</b> , 4356, <b>910, 911</b>
mannitol	NCFM, <b>107A, 43121</b> , 4356, 4797, <b>910</b>
FOS	<b>GP1B</b> , NCFM, <b>107A, 393</b> , GP2A
lactulose	<b>GP1B</b> , NCFM, <b>107A, 43121, 393</b> , M5, 606, CS1, 911, <b>910</b>



## 7. Prebiotics의 최적 첨가비율 설정

Prebiotics의 첨가 비율(0, 1, 2, 3, 4, 및 5%)을 다양하게 조정한 배지에서 배양된 균주의 총균수를 조사한 결과의 일부는 Table 3-17~3-29과 같다. Sorbitol을 첨가한 배지에 *L. casei* 910을 배양시 1~5%의 첨가비율에 따라 균주 성장의 차이를 보이지 않았으나 *L. acidophilus* 43121의 경우 2%이상으로 첨가시 1%로 첨가하였을 때보다 균주의 성장이 두드러짐을 알 수 있었다(Table 3-4와 3-7). 특히, 5% 첨가 후 48시간 배양할 경우,  $1.45 \times 10^9$  cfu/ml의 균수를 나타내었다. Mannitol과 FOS을 첨가한 배지에 *L. acidophilus* 43121과 GP1B 균주를 배양시 1% 이상 첨가한 모든 배지에서 대조구보다 향상된 유사한 성장 양상을 보여주었다. 여러 균주들에서 유사한 성장 양상을 보여주었으며 0, 24, 48시간에 pH를 측정된 결과, 첨가 비율에 따른 변화의 차이는 보이지 않았으나 prebiotics를 첨가하지 않은 대조구보다는 모든 prebiotics의 첨가구에서 24시간 경과후 수치가 낮아짐을 알 수 있었다.

Table 3-17. Total plate counts of *L. casei* 910 in minimal media containing Sorbitol

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0	$8.6 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$	$1.26 \times 10^7$	$8.95 \times 10^6$	$8.7 \times 10^6$	$8.05 \times 10^6$
24	$1.12 \times 10^7$	$4.55 \times 10^8$	$4.95 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$	$3.75 \times 10^8$	$5.35 \times 10^8$
48	$3.5 \times 10^7$	$6.25 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$	$6.85 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	$8.55 \times 10^8$

Table 3-18. Total plate counts of *L. casei* 910 in minimal media containing FOS

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$1.03 \times 10^7$	$8.95 \times 10^6$	$1.30 \times 10^7$	$1.10 \times 10^7$	$1.14 \times 10^7$	$1.05 \times 10^7$
24hr	$1.39 \times 10^8$	$6.25 \times 10^8$	$8.9 \times 10^8$	$1.15 \times 10^9$	$1.01 \times 10^9$	$7.45 \times 10^8$
48hr	$1.63 \times 10^8$	$1.28 \times 10^8$	$1.30 \times 10^8$	$1.78 \times 10^8$	$3.15 \times 10^8$	$3.85 \times 10^8$

Table 3-19. Total plate counts of *L. casei* 910 in minimal media containing Lactulose

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$1.03 \times 10^7$	$6.7 \times 10^6$	$7.7 \times 10^7$	$7.65 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$9.45 \times 10^6$
24hr	$1.39 \times 10^8$	$1.74 \times 10^7$	$1.51 \times 10^8$	$8.4 \times 10^7$	$8.85 \times 10^7$	$8.4 \times 10^6$
48hr	$1.63 \times 10^8$	$1.59 \times 10^9$	$1.67 \times 10^8$	$1.95 \times 10^8$	$3.55 \times 10^8$	$1.33 \times 10^8$

Table 3-20. Total plate counts of *L. acidophilus* 43121 in minimal media containing Sorbitol

Time(h)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0	$2.55 \times 10^7$	$1.69 \times 10^7$	$1.74 \times 10^7$	$2.75 \times 10^7$	$1.75 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$
24	$5.2 \times 10^7$	$2.75 \times 10^7$	$1.55 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$	$2.15 \times 10^8$
48	$1.65 \times 10^7$	$1.11 \times 10^7$	$8.5 \times 10^8$	$9.75 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$	$1.45 \times 10^9$

Table 3-21. Total plate counts of *L. acidophilus* 43121 in minimal media containing Mannitol

Time(h)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0	$2.05 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$2.17 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$1.93 \times 10^7$
24	$3.9 \times 10^7$	$2.77 \times 10^8$	$2.92 \times 10^8$	$2.92 \times 10^8$	$2.64 \times 10^8$	$1.18 \times 10^8$
48	$1.27 \times 10^8$	$1.09 \times 10^9$	$1.42 \times 10^9$	$1.40 \times 10^9$	$1.66 \times 10^9$	$1.25 \times 10^9$

Table 3-22. Total plate counts of *L. acidophilus* ATCC 43121 in minimal media containing Raffinose

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$2.05 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$3.05 \times 10^7$	$2.55 \times 10^7$
24hr	$3.9 \times 10^7$	$7.4 \times 10^7$	$9.0 \times 10^7$	$1.38 \times 10^8$	$8.9 \times 10^8$	$8.3 \times 10^7$
48hr	$1.27 \times 10^8$	$8.65 \times 10^7$	$1.20 \times 10^8$	$1.73 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$2.95 \times 10^8$

Table 3-23. Total plate counts of *L. acidophilus* ATCC 43121 in minimal media containing Lactulose

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$2.05 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$	$2.02 \times 10^7$	$2.22 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$1.92 \times 10^7$
24hr	$3.9 \times 10^7$	$2.16 \times 10^7$	$9.5 \times 10^7$	$6.95 \times 10^7$	$4.25 \times 10^7$	$7.55 \times 10^7$
48hr	$1.27 \times 10^8$	$2.25 \times 10^6$	$4.7 \times 10^7$	$6.35 \times 10^7$	$6.4 \times 10^7$	$4.05 \times 10^7$

Table 3-24. Total plate counts of *L. acidophilus* GP1B in minimal media containing FOS

Time(h)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0	$2.05 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$2.17 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$1.93 \times 10^7$
24	$3.9 \times 10^7$	$2.77 \times 10^8$	$2.92 \times 10^8$	$2.92 \times 10^8$	$2.64 \times 10^8$	$1.18 \times 10^8$
48	$1.27 \times 10^8$	$1.09 \times 10^9$	$1.42 \times 10^9$	$1.40 \times 10^9$	$1.66 \times 10^9$	$1.25 \times 10^9$

Table 3-25. Total plate counts of *L. acidophilus* GP1B in minimal media containing Lactulose

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$6.75 \times 10^7$	$8.8 \times 10^6$	$7.6 \times 10^6$	$9.2 \times 10^6$	$8.55 \times 10^6$	$9.05 \times 10^6$
24hr	$6.3 \times 10^6$	$<10^6$	$3.05 \times 10^7$	$2.25 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$
48hr	$<10^6$	$<10^5$	$9.5 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	$8.0 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$

Table 3-26. Total plate counts of *L. acidophilus* GP1B in minimal media containing Raffinose

Time(hr)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$6.75 \times 10^7$	$8.75 \times 10^6$	$1.07 \times 10^7$	$9.0 \times 10^6$	$1.13 \times 10^7$	$9.95 \times 10^6$
24hr	$6.3 \times 10^6$	$1.85 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$1.85 \times 10^7$
48hr	$<10^6$	$<10^6$	$7.5 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$	$9.5 \times 10^7$	$2.0 \times 10^6$

Table 3-27. Total plate counts of *L. acidophilus* NCFM in minimal media containing Sorbitol

	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$4.05 \times 10^7$	$2.14 \times 10^7$	$2.37 \times 10^7$	$2.07 \times 10^7$	$2.04 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$
24hr	$5.1 \times 10^7$	$2.75 \times 10^8$	$2.45 \times 10^8$	$3.85 \times 10^8$	$3.05 \times 10^8$	$2.15 \times 10^8$
48hr	$3.5 \times 10^7$	$5.65 \times 10^8$	$8.85 \times 10^8$	$1.21 \times 10^9$	$4.5 \times 10^8$	$4.6 \times 10^8$

Table 3-28. Total plate counts of *L. acidophilus* NCFM in minimal media containing Raffinose

	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$9.1 \times 10^7$	$1.41 \times 10^7$	$1.63 \times 10^7$	$2.01 \times 10^7$	$1.86 \times 10^7$	$1.91 \times 10^7$
24hr	$1.74 \times 10^8$	$8.55 \times 10^7$	$5.95 \times 10^7$	$5.7 \times 10^7$	$7.75 \times 10^7$	$1.02 \times 10^8$
48hr	$1.26 \times 10^8$	$<10^6$	$1.95 \times 10^7$	$2.05 \times 10^7$	$3.25 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$

Table 3-29. Total plate counts of *L. acidophilus* NCFM in minimal media containing FOS

	0%	1%	2%	3%	4%	5%
0hr	$9.1 \times 10^7$	$1.42 \times 10^7$	$1.72 \times 10^7$	$3.75 \times 10^7$	$1.62 \times 10^7$	$1.85 \times 10^7$
24hr	$1.74 \times 10^8$	$4.3 \times 10^7$	$2.95 \times 10^7$	$2.0 \times 10^6$	$3.95 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$
48hr	$1.26 \times 10^9$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$

## 8. Prebiotics의 최적 혼합비율 설정

최대 성장을 보이는 prebiotics의 혼합비율을 설정하기 위하여 통계적인 접근방법의 일환으로 혼합물 실험설계인 Simplex Lattice Degree (3 design)을 실시하였다. 실험 데이터를 적합시키기에 적절한 모형으로 full cubic model을 사용하였다. Minitab(2000)을 사용하여 반응을 최소화하는 최적 구성성분 배합을 추정하였다. Table 3-30과 3-31는 본 실험으로부터의 최종 모형을 식으로 표현한 것이며, 이 모형의 경우 결정계수 ( $R^2$ )가 0.94이므로 모형의 설명력은 우수한 것으로 판단되었다. Table 3-32에는 prebiotics의 혼합비율의 함량이 나타나 있는데, 이 최적 혼합물은 Fructooligosaccharide, sorbitol, mannitol, lactulose, 및 raffinose의 5가지 prebiotics들이 각각 0%, 25%, 0.25%, 27.9%, 및 22.1%로 혼합된 배지가 가장 효과적으로 생균수를 증대시킬수 있을 것으로 예측되었다. 다른 prebiotics 혼합물에서는 Fructooligosaccharide가 균의 성장에 어떠한 역할도 수행하지 않는 것으로 평가되었는데, 명확한 기작에 대한 것은 추가적으로 실험을 실시할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

Fig. 3-8, Fig. 3-9, 및 Fig. 3-10은 반응표면의 3차원 그림들로, 최적 점(optimum point)의 위치와 반응표면의 모습을 보여주고 있다. 모든 반응표면은 추정치가 최대값(최대 생균수)을 보이는 것으로 보아 본 연구에 적용된 실험구간은 적절하였던 것으로 평가되었다.

본 연구에서 통계적 방법의 적용에 의하여 얻어진 prebiotics의 혼합비율은 *L. acidophilus* 107A의 생육을 최대로 하는 최적 prebiotics의 함량을 결정하는데 매우 효과적임이 확인 실험에 의해 입증되었다. 결국 이와 같은 방법은 수종의 prebiotics나 배지 조성물에 대하여 가장 높은 생육촉진 작용을 하는 prebiotics를 선별하는 역할도 수행한 것으로 볼 수 있다.

Table 3-30. Full cubic model fitted to experimental data in Table 3-3.

Estimated Regression Coefficients for Y (component proportions)					
Term	Coef	SE Coef	T	P	VIF
x1	1.848	0.2474	*	*	4.771
x2	0.696	0.2474	*	*	4.771
x3	0.253	0.2474	*	*	4.771
x4	1.634	0.2474	*	*	4.771
x5	0.444	0.2474	*	*	4.771
x1*x2	3.368	1.1038	3.05	0.009	3.081
x1*x3	3.566	1.1038	3.23	0.006	3.081
x1*x4	0.800	1.1038	0.72	0.481	3.081
x1*x5	2.019	1.1038	1.83	0.089	3.081
x2*x3	0.879	1.1038	0.80	0.439	3.081
x2*x4	1.607	1.1038	1.46	0.168	3.081
x2*x5	0.345	1.1038	0.31	0.760	3.081
x3*x4	2.508	1.1038	2.27	0.039	3.081
x3*x5	1.854	1.1038	1.68	0.115	3.081
x4*x5	3.535	1.1038	3.20	0.006	3.081
x1*x2*x3	4.727	7.6604	0.62	0.547	1.744
x1*x2*x4	-3.074	7.6604	-0.40	0.694	1.744
x1*x2*x5	3.528	7.6604	0.46	0.652	1.744
x1*x3*x4	-6.713	7.6604	-0.88	0.396	1.744
x1*x3*x5	9.709	7.6604	1.27	0.226	1.744
x1*x4*x5	-1.570	7.6604	-0.20	0.841	1.744
x2*x3*x4	13.365	7.6604	1.74	0.103	1.744
x2*x3*x5	28.564	7.6604	3.73	0.002	1.744
x2*x4*x5	5.671	7.6604	0.74	0.471	1.744
x3*x4*x5	12.588	7.6604	1.64	0.123	1.744
x1*x2*(x1-x2)	-3.376	2.2763	-1.48	0.160	1.215
x1*x3*(x1-x3)	-6.369	2.2763	-2.80	0.014	1.215
x1*x4*(x1-x4)	-1.205	2.2763	-0.53	0.605	1.215
x1*x5*(x1-x5)	-2.350	2.2763	-1.03	0.319	1.215
x2*x3*(x2-x3)	0.251	2.2763	0.11	0.914	1.215
x2*x4*(x2-x4)	-0.404	2.2763	-0.18	0.862	1.215
x2*x5*(x2-x5)	0.066	2.2763	0.03	0.977	1.215
x3*x4*(x3-x4)	-0.116	2.2763	-0.05	0.960	1.215
x3*x5*(x3-x5)	1.088	2.2763	0.48	0.640	1.215
x4*x5*(x4-x5)	-2.830	2.2763	-1.24	0.234	1.215

R-Square = 0.94

Table 3-31. Analysis of variance and coefficient estimates in the full cubic model

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	34	13.9964	13.9964	0.41166	6.62	0.000
Linear	4	4.5986	2.1020	0.52549	8.45	0.0010
Quadratic	10	6.6984	2.0030	0.20030	3.22	0.023
Special Cubic	10	1.7967	1.4227	0.14227	2.29	0.076
Full Cubic	10	0.9027	0.9027	0.09027	1.45	0.254
Residual Error	14	0.8705	0.8705	0.06218		
Lack-of-Fit	6	0.6985	0.6985	0.11642		
Pure Error	8	0.1720	0.1720	.002149	5.42	0.016
Total	48	14.8669				



Table 3-32. Optimum Point for Maximization of Y

Component	Amount(g)	Proportions(%)
x1(FOS)	0.00000	0.0
x2(Sorbitol)	0.75000	25.0
x3(Mannitol)	0.75000	25.0
x4(Lactulose)	0.83807	27.9
x5(Raffinose)	0.66193	22.1

Predicted Y = 2.37456

### Mixture Surface Plot of Y (component proportions)

x1: 0.0
x5: 0.22

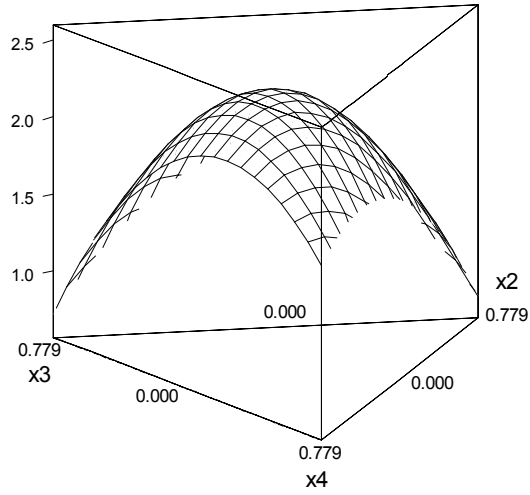


Fig. 3-8. Three dimensional plot for the effects of sorbitol, mannitol and lactulose when raffinose = 0.22 on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 107A.

x1: 0.0  
x4: 0.28

### Mixture Surface Plot of Y (component proportions)

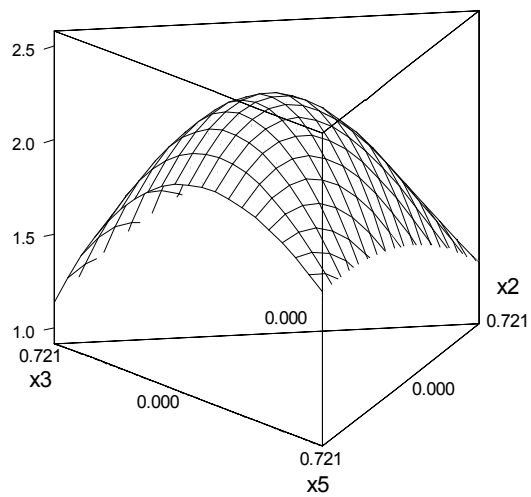


Fig. 3-9. Three dimensional plot for the effects of sorbitol, mannitol and raffinose when lactulose = 0.28 on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 107.

### Mixture Surface Plot of Y

x1: 0.0  
x3: 0.75

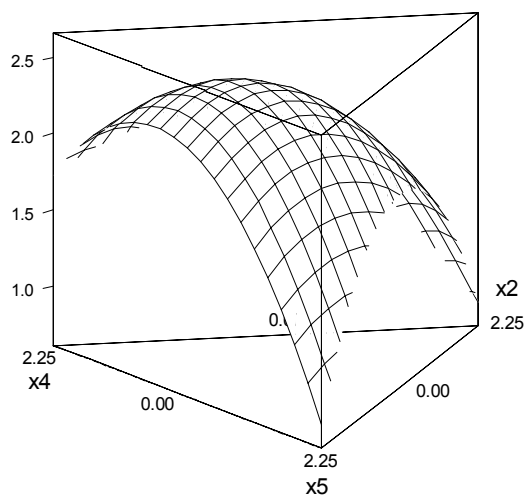


Fig. 3-10. Three dimensional plot for the effects of sorbitol, lactulose and raffinose when mannitol = 0.25 on the growth of *Lactobacillus acidophilus* 107A.

## 9. 선발된 균주의 최적 건조 및 저장방법 조사

동물실험용 우수 생균제로 선발된 *L. acidophilus* 393 및 *L. acidophilus* 107A 균주를 사용하여 건조용 최적 생산배지에 배양하였으며 원심분리를 실시하여 총균수를 측정한 결과는 Table 3-33과 같다. 두 균주 모두 broth 상태에서 균수를 측정하였을 때 각각  $3.00 \times 10^{10}$  cfu/ml 및  $2.70 \times 10^9$  cfu/ml로 나타났다.

생균제는 액상상태로 보존할 시에 저장기간이 길어질수록 활력이 저하될 수 있어 일반적으로 균주는 적정 배지에 현탁 후 동결건조하여 장기 저장을 실시한다. 그러나, 동결건조 과정에서 생균수의 활력 저하가 일어날 수 있어 본 연구에서는 4가지 동결 건조 보호제를 사용하여 초기 균수,  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 60분 동결, 동결 후 freeze dry를 실시한 후 생균수를 비교함으로써 우수한 동결보존제를 선발하고자 하였다(Table 3-34, 3-35). 고와 강(2000)의 보고에 의하면 *L. acidophilus* 균주를 우유에 현탁후 동결건조를 시키면 동결건조후 생균수가 약 1/10배 정도로 낮아졌으며 본 연구에서 사용된 MSG, raffinose 및 ascorbic acid 등이 첨가되었을 경우에는 milk 배지보다 다소 높은 경향을 나타내었지만 초기균수에 비해 낮은 수치를 나타내었다. 그러나, *L. acidophilus* 393 균주의 경우 탈지분유와 함께 동결보존제를 사용하면 모든 처리구에서 동결건조후 생균수 저하가 발생하지 않음을 알 수 있었다. *L. acidophilus* 107A의 경우에도 대부분 동결보존후 초기 균수가 다소 저하됨을 알 수 있었으나 4개 동결보존제를 1%와 1.5%로 각각 첨가하였을 때 탈지분유 배지보다 다소 향상된 결과를 얻을 수 있었다.

Table 3-33. Total cell count of *Lactobacillus acidophious* 393 and *Lactobacillus acidophilus* 107A after incubation at 37°C in optimal media for freeze drying.

Strain	Total counts (cfu/ml)
<i>L. acidophious</i> 393	$3.00 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 107A	$2.70 \times 10^9$

Table 3-34. Effects of protectant on viable cell count of *Lactobacillus acidophilus* 393.

viable cell count <sup>1)</sup>		before freezing	after freezing	freeze drying
Protectant				
NFMS 10%			4.55×10 <sup>9</sup>	2.80×10 <sup>9</sup>
NFMS(10%) + lactose	0.5 %		3.65×10 <sup>9</sup>	2.85×10 <sup>9</sup>
	1.0 %		4.85×10 <sup>9</sup>	8.60×10 <sup>9</sup>
NFMS(10%) + raffinose	0.5 %		3.05×10 <sup>9</sup>	6.85×10 <sup>9</sup>
	1.0 %		3.70×10 <sup>9</sup>	2.65×10 <sup>9</sup>
	1.5 %	4.35×10 <sup>9</sup>	5.35×10 <sup>9</sup>	4.85×10 <sup>9</sup>
NFMS(10%) + ascorbic acid	0.5 %		7.35×10 <sup>8</sup>	3.60×10 <sup>9</sup>
	1.0 %		3.95×10 <sup>9</sup>	3.40×10 <sup>9</sup>
	1.5 %		2.90×10 <sup>9</sup>	3.40×10 <sup>9</sup>
NFMS(10%) + MSG	0.5 %		4.55×10 <sup>9</sup>	3.80×10 <sup>9</sup>
	1.0 %		4.30×10 <sup>9</sup>	3.75×10 <sup>9</sup>
	1.5 %		3.55×10 <sup>9</sup>	3.80×10 <sup>9</sup>

<sup>1)</sup> Viable cell count : Colony forming unit (CFU)/ml. Mean values of three replications.

Table 3-35. Effects of protectant on viable cell count of *Lactobacillus acidophilus* 107A.

viable cell count		before freezing	after freezing	freeze drying
Protectant				
NFMS 10%			$6.30 \times 10^8$	$3.20 \times 10^8$
NFMS(10%) + lactose	0.5 %		$9.20 \times 10^8$	$2.85 \times 10^8$
	1.0 %		$9.10 \times 10^8$	<b><math>5.60 \times 10^8</math></b>
NFMS(10%) + raffinose	0.5 %		$1.02 \times 10^9$	$2.95 \times 10^8$
	1.0 %		$1.15 \times 10^9$	$4.30 \times 10^8$
	1.5 %	$1.00 \times 10^9$	$9.10 \times 10^8$	<b><math>5.70 \times 10^8</math></b>
NFMS(10%) + ascorbic acid	0.5 %		$3.95 \times 10^8$	$4.25 \times 10^8$
	1.0 %		$7.65 \times 10^8$	$2.08 \times 10^8$
	1.5 %		$1.20 \times 10^8$	<b><math>6.60 \times 10^7</math></b>
NFMS(10%) + MSG	0.5 %		$1.40 \times 10^9$	$3.40 \times 10^8$
	1.0 %		$8.80 \times 10^8$	$2.80 \times 10^8$
	1.5 %		$8.15 \times 10^8$	<b><math>4.50 \times 10^8</math></b>

<sup>1)</sup> Viable cell count : Colony forming unit (CFU)/ml. Mean values of three replications.



#### 10. 생균제의 저장기간 중 활력변화 비교 분석

저장 기간 중 균주의 활력 변화를 조사하기 위하여 다양한 온도 조건에서 균주를 저장한 결과는 Fig. 3-11 및 3-12와 같다. 4℃에서 저장하였을 경우, *L. acidophilus* 393은 30일정도까지 활력이 유의적인 감소현상이 나타나지 않았으며 107A의 경우에는 8일경 약 1/10배정도의 생균수가 감소하였고 이 수준이 약 30일경까지 유지됨을 알 수 있었다. 25℃의 경우에는 시간이 경과되면서 *L. acidophilus* 393가 다소 감소하는 경향을 나타내다 20일경 약 1/10배정도의 수준을 나타내었으며 *L. acidophilus* 107A의 경우에는 6일경부터 1/10배정도로 감소하여 그 수준을 계속 유지함을 알 수 있었다. 또한, 37℃에서 저장할 경우 특히 *L. acidophilus* 393의 활력 저하 속도가 상승되어 6일경에는 약  $2.02 \times 10^9$  cfu/g, 8일경에는  $1.71 \times 10^8$  cfu/g, 11일경에는  $9.30 \times 10^6$  cfu/g으로 감소하다 20일경에는 모두 사멸됨을 알 수 있었다. *L. acidophilus* 107A는 다소 온도에 대한 저항성이 우수하여 27일이 경과된 경우에도  $1.57 \times 10^7$  cfu/g을 유지함을 알 수 있었다.

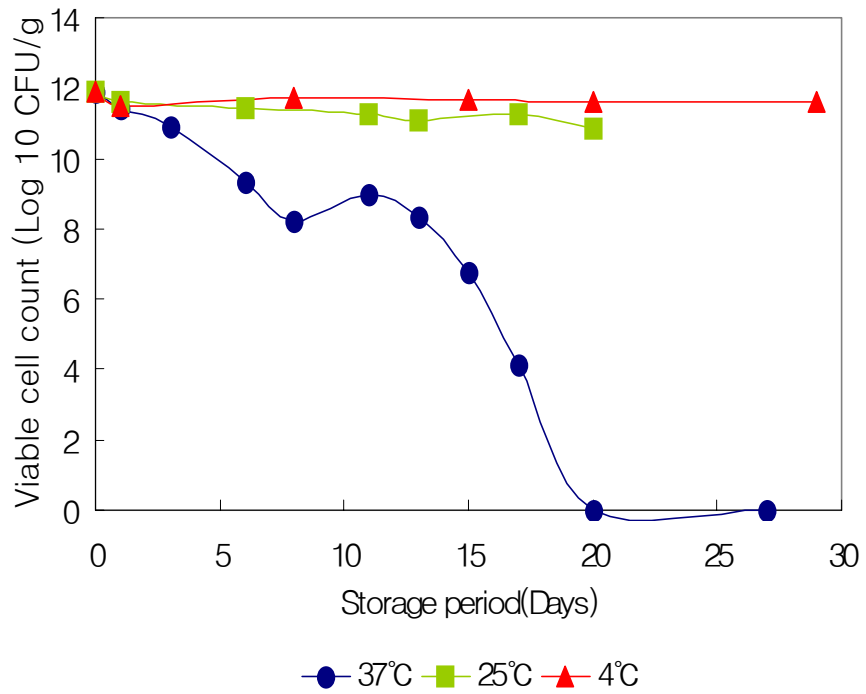


Fig. 3-11. Total plate count of *L. acidophilus* 393 during storage period at 37°C incubation.

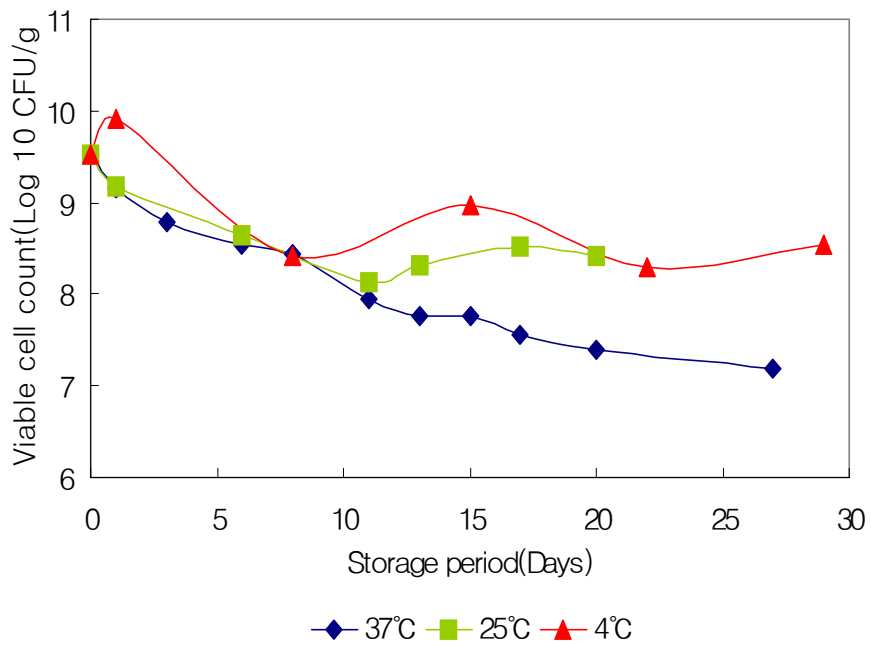


Fig. 3-12. Total plate count of *L. acidophilus* 107A during storage period at 37°C incubation.

## 11. 유전자 수준에서의 선발균주의 동정

생균제용 균주의 정확한 분류를 위해 유전자 수준에서의 균주 동정을 실시하였다. 특히 16S rRNA와 23S rRNA를 coding하는 DNA와 이들 두 부위의 중간부분인 ISR(Intergenic spacer region) 부분의 DNA sequence가 박테리아의 종별로 특이성을 가진 것으로 보고되고 있고 이를 이용한 미생물의 분류가 가능하다는 연구보고를 기초로 하여 실험을 수행하였다.

실험 수행 중 chromosomal DNA의 분리를 용이하게 하고 회수율을 높이기 위해 기존의 방법에서 lysozyme의 처리양, 반응시간 그리고 배양온도 등을 달리하여 DNA를 분리하였다. 이렇게 분리한 chromosomal DNA는 PCR amplification에서도 적절하게 반응하였다. *E. coli*의 16S와 23S rRNA를 바탕으로 제조된 primer를 이용하여 유산균주의 16S-23S rRNA ISR 및 일부의 23S rRNA 부위를 증폭하였다. PCR 산물은 약 660 bp이었으며 DNA sequence분석을 위해 gel elution한 결과는 Fig. 3-13과 같으며 *L. acidophilus* 107A와 393 균주의 sequence 결과는 Fig. 3-14 및 3-15과 같다.

19종 *Lactobacillus* sp.균의 16S-23S rRNA ISR과 23S rRNA 유전자 염기서열을 NCBI의 GenBank와 비교하여 각각의 종명을 확인하였으며 당발효 테스트 등 기존의 생리/생화학적 방법에 의해 명명되어진 균명과 비교하였다(Table 3-36). 그 중 *L. acidophilus* 107A의 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록된 Accession number는 AJ438156이다.

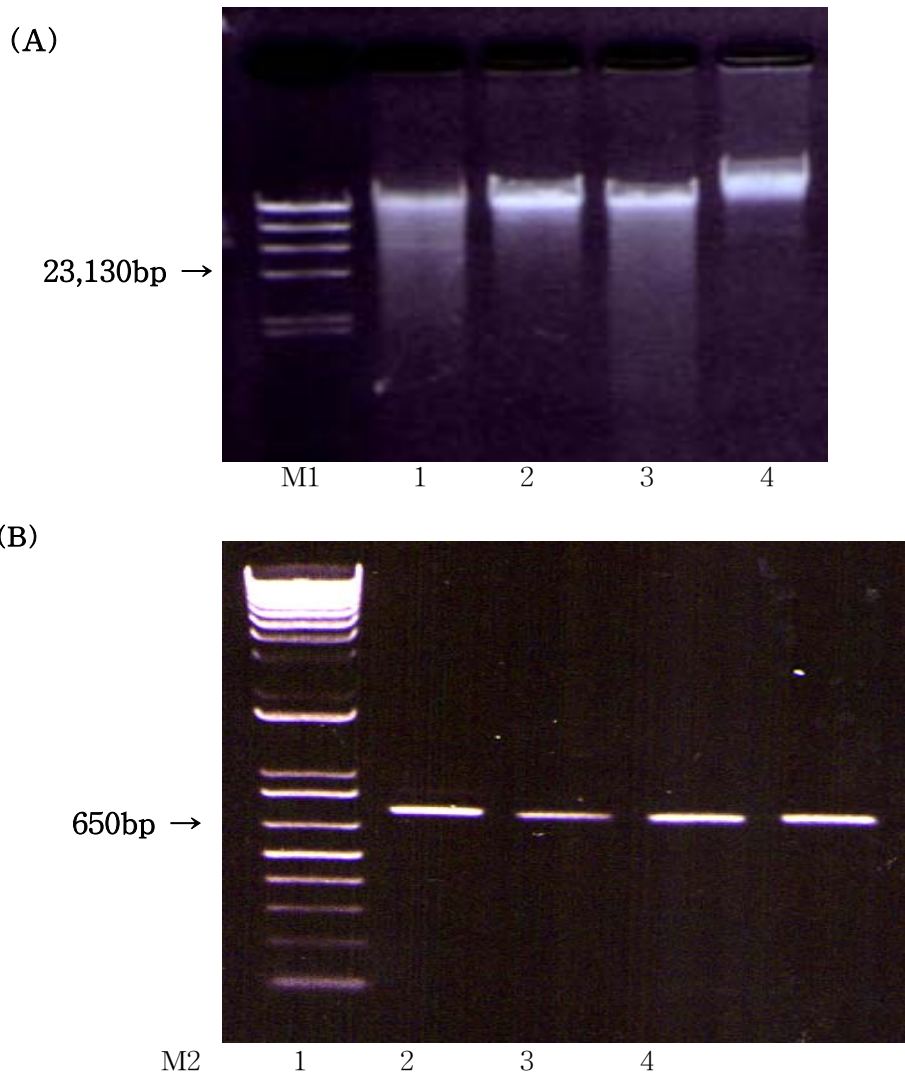


Fig. 3-13. Agarose gel electrophoresis of chromosomal DNA and PCR product from 4 strains of *Lactobacillus* sp; (A) Chromosomal DNA, (B) PCR product. (M1:  $\lambda$ DNA/Hind III marker, M2: 1kb DNA ladder marker, 1: *L. acidophilus* 393, 2: *L. amylovorus* A4, 3: *L. acidophilus* 107A, 4: *L. plantarum* EH2)

16s rRNA ↓ 16S-23S rRNA ISR

CCTTTCTAAGGAAGCGAAGGATATGGAGAGTAGAAATATTAAGAGAAGTATC  
CAGAGCAAGCGGAAGCACACTAAGAACTTTGTTTAGTTTTGAGGGTAGTAC  
CTCAAAGAGTTAG  
TACATTGAAAACCTGAATATAATCCAAGCAAAAAACCGAGACAATCAAAGAGA  
ACAGATT

16S-23S rRNA ISR ↓ 23S rRNA

GTAGAGCGACCGAGAAGAGAATTCTTGGGTAAGGTCAAGTAGAAAAGGGCGC  
ACGGTGAATGCCTAGGCACTAACAGCCGATGAAGGACGTGACGAACTACGAAA  
AGCTTCGGGGAGCGGTAAGTACGCAGTGATCCGGAGATGTCCGAATGGGGGAA  
CCCAATGCAGCGATGCATTATTGGTTGATGAATAGATAGTCAATCAAAGGAA  
GACGCAGTGAACCTGAAACATCTAAGTAGCTGCAGGAAGAGAAAAGAAAAATCG  
ATTTCTTAGTAGCGGCGAGCGAAGAGGAAAGAGCCCAAACCAAGTGATTTAT  
CATTTGGGGTTGTAGGACTGCAAAGTGGTAGCGTAAGCGATAGTTGAATTAT  
CTGGGAAGGTAAGCCAGAGAGGGTGAGAGCCCCGTAAGCGAAATTGCGAGCGC  
GCCTAGCAGAATCCTGAGTAGGCCGGGACACGAGGAATCCCGGTTGAAGCCGC  
GAGGACCATCTCGCAAGGCTAAATACTAGTTAGTGACCG

Fig. 3-14. Sequence of 16S-23S rRNA ISR and flanking 23S rRNA gene of  
*Lactobacillus acidophilus* 107A.

16s rRNA ↓ 16S-23S rRNA ISR

CCTTTCTAAGGAAACAGACTTTAAGTCTGACGGAAACCTGCACACACGAAACT  
TTTGTTTAGTTTTGAGGGGACGACCCTCAAGCACCTAGCGGGTGCGACTTTG  
TTCTTTGAAAAC TG  
GATATCATTGTTGTAAATGTTTTAAATTGCCGAGAACACAGCGTATTTGTAT  
GAGTTTCT

16S-23S rRNA ISR

↓ 23S rRNA

AATTTAGAAATTCGCATCGCATAACCGCTGACGCAAGTCAGTACAGGTTAAGT  
TACAAAGGGCGCACGGTGGATGCCTTGGCACTAGGAGCCGATGAAGGACGGAA  
CTAATACCGATATGCTTCGGGGAGCTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTTTC  
CGAATGGGGGAACCCAGTACACATCAGTGTATTGCCTGCAAGTGAATTCATAG  
CTTGTCGGCGGCAGACGCGGGGAACTGAAACATCTCAGTACCCGCAGGAAGAG  
AAAGAAAAC TCGATTCCCATAGTAGCGGCGAGCGAAGTGGGAAGAGCCCAAAC  
CGAGAAGCTTGCTTCTCGGGGTTGTAGGACTGGACATTGGAGTTACCAAAGTT  
CGACGTAGTCGAAGTCAGCTGGAAAGCTGCGCCATAGAAGGTGAAAGCCCTGT  
AAACGAAACGGCGGACCCTCCGTCCAGGATCCTGAGTACGGCGGAACACGTGA  
AATTCCGTCGGAATCCGGGAGGACCATCTCCCAAGGATAGATACTCC

Fig. 3-15. Sequence of 16S-23S rRNA ISR and flanking 23S rRNA gene of  
*Lactobacillus acidophilus* 393.

Table 3-36. Identification of strains of *Lactobacillus sp.* based on carbohydrates fermentation test and DNA sequence

Strains	Carbohydrate fermentation test	DNA sequence
4356	<i>Lactoabcillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
30SC	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
GP4A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
GP1B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
4962	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
NCFM	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
107A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
A4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
393	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i>
7469	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
4797	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
KU116	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
1042	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
CS1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
11931	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
EH2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M5	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
910	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
911	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>



## 12. 선발균주의 항균능력

병원성균과 박테리오파지인 있는 다른 유산균주들을 이용하여 *L. acidophilus* 107A의 colony 주변의 억제환 유무를 조사하여 +로 표현하였다.

박테리오파지의 억제범위에 대한 보고 중 Davey와 Richardson(1981)은 *St. cremoris* 346균주로부터 분리한 diplococcin이 *St. cremoris*와 *St. lactis*에 국한된 좁은 항균범위를 나타내는가 하면, Mehta 등(1983)은 *Lb. acidophilus* AC1이 생산하는 lactacin F가 그람양성 및 그람음성 박테리아에 대해 억제활성을 가지며 억제물질이 일반적으로 사용되는 대부분의 약품이나 항생제에 내성을 가진 몇몇의 박테리오파지에 대해 억제활성을 가진다고 보고하였다. 본 연구에서 선별된 *L. acidophilus* 107A는 같은 유산균주들 중 *L. casei*, *Lacto. sp.* 449, *L. acidophilus* 393에 대해서는 강한 항균력을 보였고 *L. casei* 911, *L. plantarum* F7-3, *L. plantarum* F7-1, *L. acidophilus* 4962, *L. helveticus* Iam 1042에 대해서도 억제환이 있는 것으로 판단되었다(Table 3-38). 병원성 균주인 *Salmonella typhimurium* K11806, *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanoii*, *E. coli* O157:H7 43889, *E. coli* K21052, *Bacillus cereus*, *Salmonella fyerymurium*에 대한 억제작용이 있는 것으로 확인되었고 *E. coli* K11234에 대한 억제작용은 박테리오파지의 고유의 항균작용인지는 확실히 규명되지 않았다[ ( )로 표현 ](Table 3-37).

Table 3-37. Inhibitory spectrum of crude bacteriocins produced by lactic acid bacteria

Pathogen	Bacteriocin	<i>L. acidophilus</i> 4356	<i>L. acidophilus</i> 30SC	<i>L. acidophilus</i> 107A
<i>E. aerogenes</i>				
<i>Yersinia enterocolitica</i>			++	
<i>Pse. aeruginosa</i> KCCM11321				
<i>Fecal streptococcus</i>				
<i>Sta. intermedius</i> KCCM40149		+++	+++	
<i>Bacillus cereus</i>				+
<i>Pse. flu</i>				
<i>E. coli</i> K21052				+
<i>Pse. chororaphis</i> K11363				
<i>E. coli</i> K11234				(+)
<i>E. coli</i> O157:H7 43894			(+)	
<i>Sal. typhimurium</i> K11806				+
<i>Bacillus cubtilis</i>				
<i>Listeria inocua</i>				
<i>Klebsiella puemoria</i>				
<i>Acinetobacter baumanii</i>		(+)		
<i>Sta. epidermidis</i> K35494		++		
<i>Sta. aureus</i>			++	+
<i>Shigella</i>				
<i>L. monocytogene</i>			+	
<i>L. ivanoii</i>				+
<i>Str. aureus</i>		(+)		
<i>Sal. fyerymurium</i>				+
<i>E. coli</i> O157:H7 43895				
<i>E. coli</i> O157:H7 43889		(+)		+
<i>E. coli</i> O157:H7 43893				

(+) : To be determined whether the bacteriocin is soly responsible for the inhibitions.

Table 3-38. Inhibitory spectrum of crude bacteriocins produced by lactic acid bacteria

LAB	Bacteriocin	<i>L. acidophilus</i> 4356	<i>L. acidophilus</i> 30SC	<i>L. acidophilus</i> 107A
	<i>L. rhamnosus</i> 7469			
	<i>L. casei</i> 911			++
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> . 11454	+		
	<i>L. acidophilus</i> . 43121			
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	+	+++	
	<i>L. casei</i> 910			
	<i>L. acidophilus</i> 4356		++	
	<i>L. delbre.</i> 4797	+++	+++	
	<i>L. helveticus</i>	+++	+++	
	<i>L. acidophilus</i> 4962			+
	<i>L. acidophilus</i> 393			+++
	<i>L. acidophilus</i> GP1B			
	<i>L. acidophilus</i> 606	++	++	
	<i>L. acidophilus</i> 107A	++	++	
	<i>L. acidophilus</i> 30SC			
	<i>L. acidophilus</i> RP32			
	<i>L. acidophilus</i> GP2A			
	<i>L. acidophilus</i> GP4A			
	<i>L. acidophilus</i> A4			
	LN518	+++	+++	
	LO518			
	<i>L. helveticus</i> Iam 1042			+
	<i>L. casei</i> 9018			
	<i>Lacto.</i> sp. 449			+++
	<i>Lacto.</i> sp. K2			
	<i>L. plantarum</i> 11931			
	<i>Lacto.</i> sp. K1			
	<i>L. casei</i>			+++
	W20			
	<i>L. plantarum</i> EH2			
	<i>L. plantarum</i> CS1			
	<i>L. plantarum</i> K-4			
	<i>L. plantarum</i> M-2			
	<i>L. plantarum</i> B-1	+		
	<i>L. plantarum</i> F7-3			++
	<i>L. plantarum</i> F7-1	+++	+++	++

(+) : To be determined whether the bacteriocin is solely responsible for the inhibitions.

### 13. 장관 세포에 대한 점착성 연구.

*L. acidophilus* 107A 균주의 HT-29 세포에서의 점착성은 다른 probiotic bacteria 보다 장관 세포에 부착능력이 높은 것으로 보고되어지고 있는 균주인 *L. rhamnosus* GG 와 비교하였을 때 유사한 부착능이 있는 것으로 나타났다(Diomira 등, 2002; Mattar 등 2001). 이는 3회 세척동안에도 활성이 나타난 것으로 보아서 동물실험에서 실질적으로 장내에 부착되어 균주의 활성이 유지될 것으로 나타날 것으로 판단되어진다(Fig. 3-16). HT-29 cell과 Caco-2 cell은 인간의 대장 암세포로서 보고되어져 있다.

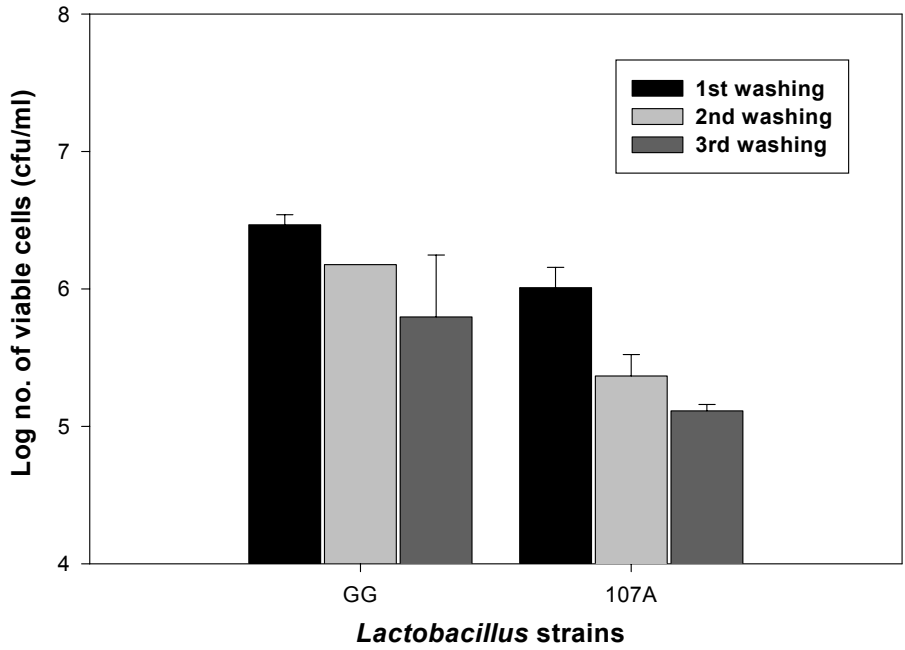


Fig. 3-16. Adherence ability of *Lactobacillus* strains with serial washing steps

## 제 2 절 분체 복합화 기술 확립(위탁연구과제)

### 제 1 항 실험재료 및 방법

#### 1. 생균제 및 prebiotics의 분체복합화 과정

##### 가. 사용균주

분체복합화를 위한 최적조건을 확립하기 위하여 일차적으로 Mishawaka Culture Systems사(U.S.A.)에서 제조된 요구르트 starter culture용 MI-LC 제품을 모델 생균제로 사용하여 분체복합화 전 후의 균의 활력변화와 피복효율성을 측정하였다. 또한, 생산된 분말균주인 *L. acidophilus* ATCC 43121 및 *L. acidophilus* 393을 이용하여 내산성, 내열성을 측정하였고 최종적인 복합분체화 균주로 선정된 *L. acidophilus* ATCC 107A을 대상으로 양돈사료에 첨가 후의 적용성을 알아보았다.

##### 나. 피복재의 종류

생균제의 피복에 적합한 재료를 선정하기 위해 Table 3-39에 제시된 재료를 검토하였다. 사용된 피복재들은 주로 강산성인 위장 내에서 안정하며 표적기관인 장내에서 용해되는 특성을 가진 장용성 제재를 선택하였다. 또한 prebiotic가 균체피복재로서 적합한지를 조사하기 위하여 prebiotic 소재인 fructooligosaccharide(FOS), lactulose, inulin, sorbitol, mannitol, raffinose을 이용하여 생균제의 피복 후 표면 특성과 생균제의 활력변화를 관찰하였다. 또한 다공성 실리카를 이용하여 균체의 embedding 가능성을 검토하였다.

##### 다. 피복재의 초미분쇄

피복재들은 Hybridization system을 이용한 분체복합화 처리 전 평균입도가 5-10  $\mu\text{m}$  수준이 되도록 초미분쇄 하였으며, 초미분쇄는 내용물질인 생균제와 피복물질의 평균입도 차이를 약 1/10~1/15 정도로 유지함으로써 피복효과를 개선하기 위한 목적으로 실시하였다. 초미분쇄는 입도제어가 가능한 Impact Mill (ZPS 100, Alpine Co., Germany)을 사용하였으며 입도가 5-10  $\mu\text{m}$  수준인 분체를 얻기 위해 다양한 분쇄조건을 검토하였다. 대표적인 초미분쇄 처리조건은 Impact Mill 속도 10,000 rpm, 15,000 rpm, 17,000 rpm 이었으며 시료회수를 위한 기류분급기(Air classifier, Alpine Co., Germany)의 속도는 각각 7,000 rpm, 10,000 rpm, 13,000 rpm으로 설정하였다.

라. Hybridization system 이용한 분체복합화

1) Hybridization 설정

일정한 배합비 (2:1, 4:1, 9:1, w/w)로 premix된 모델 생균제와 피복물질은 Hybridization system 내에서 압축공기와 회전 rotor에 의해 발생한 기계적, 정전기적 힘에 의하여 복합화 되었다(Fig 3-17). Hybridization system의 처리조건에 따른 피복 효과는 압축공기 6 kgf/cm<sup>2</sup>의 조건에서 회전 rotor의 속도를 5,000 rpm, 10,000 rpm, 15,000 rpm으로 변화시켜 각 3분간 처리 후 관찰하였다. 또한 생균제와 피복물질간의 입도 차이에 따른 피복 효과를 조사하기 위하여 생균제를 평균입도가 50  $\mu\text{m}$  이하, 50  $\mu\text{m}$ 이상 100  $\mu\text{m}$ 이하, 100  $\mu\text{m}$ 이상으로 체거름을 이용하여 분획한 후 각각의 피복재와 복합화하였다. Prebiotic을 피복소재로 이용 시에는 균체의 피복 효율과 prebiotic의 이용 증진을 위해 다중피복을 실시하였다. 다중피복에서는 단일피복 단계로 prebiotic과 모델 생균제를 9 : 1(유산균체 : prebiotic, w/w)의 혼합 비율로 코팅 한 후 회수된 시료를 이용하여 장용성 피복재인 sureteric을 시료 중량의 9:1(단일피복 시료 : 피복재, w/w) 비율로 첨가하여 이중피막층을 제조하였다.

2) 생균제에 적합한 분체피복화 확립

일정한 배합비(9:1, w/w)로 premix된 *L. acidophilus* ATCC 43121, 107A, *L. acidophilus* 393과 피복물질은 15,000 rpm의 속도로 3분간 처리하였고, 다중피복도 동일한 조건으로 실시하였다.

마. 분체의 입도 분석

초미분쇄 또는 분체복합화 후 분말 시료의 입도는 약 1%의 시료를 증류수나 에탄올에 분산시킨 후 Particle size analyzer (CILAS 1064, France)을 이용하여 측정하였다.

바. 주사전자현미경에 의한 분체의 구조적 특성 관찰

주사전자현미경(S-2380N Scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용하여 분체 표면의 특성을 관찰하였다. 준비된 시료는 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시킨 후 15 kV에서 관찰하였으며 대표적인 화상을 즉석필름(FP-3000B45, 9×12 cm, Fuji, Japan)으로 출력하여 비교하였다.

#### 사. 분체 복합화 처리 후 모델 생균제의 활성 변화

분체 복합화 처리조건에 따른 모델 생균제(MI-LC)의 활성 변화를 알아보기 위하여 분체복합화 전 후 생균제의 총균수를 측정하여 생균제 활성의 변화양상을 조사하였다.

#### 아. 내산성 및 장용성 측정

생균제 및 피복생균제의 내산성을 측정하기 위하여 HCl, KCl buffer(pH 1.5)에 pepsin(100 unit/ml)을 첨가하여 제조한 인공위액에 0.1g의 시료를 분주하여 37°C의 항온수조에서 교반하면서 배양하고 0, 2.5, 5 시간 후에 생존균수를 측정하였다. 인공위액에서 일정시간 노출된 시료는 phosphate buffer(pH7.2)로 희석되었으며 BL agar 배지를 이용하여 48 시간 동안 배양시킨 다음 생균수를 측정하였다.

#### 자. 내열성 측정

생균제 및 피복생균제의 내열성을 측정하기 위하여 일차적으로 0.1 g의 시료를 glycin-HCl buffer(pH 3.0)에 분산 후 60, 65, 및 70°C의 항온수조에서 각 10분간 열처리한 후 phosphate buffer(pH 7.2)로 희석하고 BL agar 배지를 이용하여 48 시간동안 배양 후 생균수를 측정하였다. 피복 전 후 내열성의 변화를 측정하는 두 번째 방안으로서 시료를 glycin-HCl buffer(pH 3.0)에 분산 후 가열처리 온도를 50 또는 55°C로 고정 한 후 열처리 시간을 0, 120, 180, 240분으로 연장하여 각 시간별로 시료를 취한 후 균수의 변화를 앞서 언급한 방법으로 측정하였다.

#### 차. 내열성부여를 위한 피복생균제와 사료 주성분과의 결합

다공성 silica 또는 sureteric으로 피복된 생균제의 사료내 효율적 분산과 사료 pelleting 공정시 받게 되는 온도 상승의 충격을 완화하기 위하여 피복생균제와 사료 주성분과의 결합을 실시하였다. 피복생균제와 사료 주성분과의 결합은 생균제와 사료주 성분(대두박 또는 옥수수전분)을 1:2의 비율로 혼합 후 hybridizer의 mixing system내에서 1,500 rpm의 속도로 교반하며 시료 중량의 10%에 해당하는 수분을 주사기를 이용하여 소량씩 투여하여 유도하였다. 또한 prebiotic 소재를 이용한 다중피복과 유사한 효과를 얻기 위하여 FOS를 물에 용해시킨 다음 물대신 당 용액을 동일한 방법으로 투여하고 생균제와 사료주성분과의 결합양상을 전자현미경(SEM)으로 관찰하였다. 이때 투여된 당의 농도는 전체시료의 10%(w/w)가 되도록 조정하였다.



#### 카. 생균제를 함유한 pellet의 제조

생균제제를 함유한 pellet사료의 제조순서는 Fig. 3-18과 같다. 피복재로 복합화된 균체는 kitchen aid system내에 미세하게 분무된 prebiotic용액을 매개체로 대두박에 부착되어 프리믹스의 형태로 전환되었다. 프리믹스의 제조를 위하여 사용한 prebiotic용액은 lactulose 또는 FOS였으며 프리믹스 제조시 피복생균제 : 대두박의 비율은 1 : 5로 고정하였다. 제조된 프리믹스에 여분의 대두박을 첨가하여 잘 혼합한 후 pellet 제조기를 통과시켜 생균제제를 함유한 pellet 사료를 제조하였다. Pellet 사료는 100 kg 단위의 batch 공정으로 제조되었으며 최종적으로 제조된 pellet 사료내 함유된 생균제 및 prebiotic 용액의 비율은 각각 0.2%(w/w)였다.

#### 타. 사료첨가형태 생균제의 제품안정성 확립

Fig. 3-18의 순서와 같이 양돈사료 첨가용 생균제로서 *L. acidophilus* ATCC 107A 균주를 채택하고 사료의 형태에 따른 생균제의 안정성을 살펴보기 위하여 동일한 상업적 이유사돈 사료에 0.2%의 *L. acidophilus* ATCC 107A를 첨가하여 분말형(powder), 펠렛형(pellet)으로 제조하여 이들 가공형태가 생균제의 활력에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 또한 분체복합화를 실시한 처리구와 분체복합화를 실시하지 않은 비처리구간의 차이, 저장 온도에 따른 안정성을 알아보기 위하여 37, 25, 4°C에서 각각 저장한 후 3일 간격으로 21일간 활력을 측정하였다. 분체복합화는 분말 균주에 sureteric을 이용하여 9:1의 비율로 Hybridization을 15000rpm에서 3분 실시하였다. 펠렛형 사료의 경우 저장 후 펠렛을 파쇄하여 샘플을 취하였고 모든 실험은 MRS agar 배지에서 37°C, 48시간 배양하였다.

Table 3-39. Specificity and manufacturers of coating materials

Name	Specificity	Makers
Eudragit S-100	pH-dependent enteric film material	Rohm Pharma / Germany
Sureteric	pH-dependent enteric film material	Colorcon / UK
Compriotl 888	pH-dependent enteric film material	Gattefosse / France
Eudragit L100-55	pH-dependent enteric film material	Rohm Pharma / Germany
CEMC	pH-dependent enteric film material	Hurointo / Japan



Fig 3-17. Hybridization system

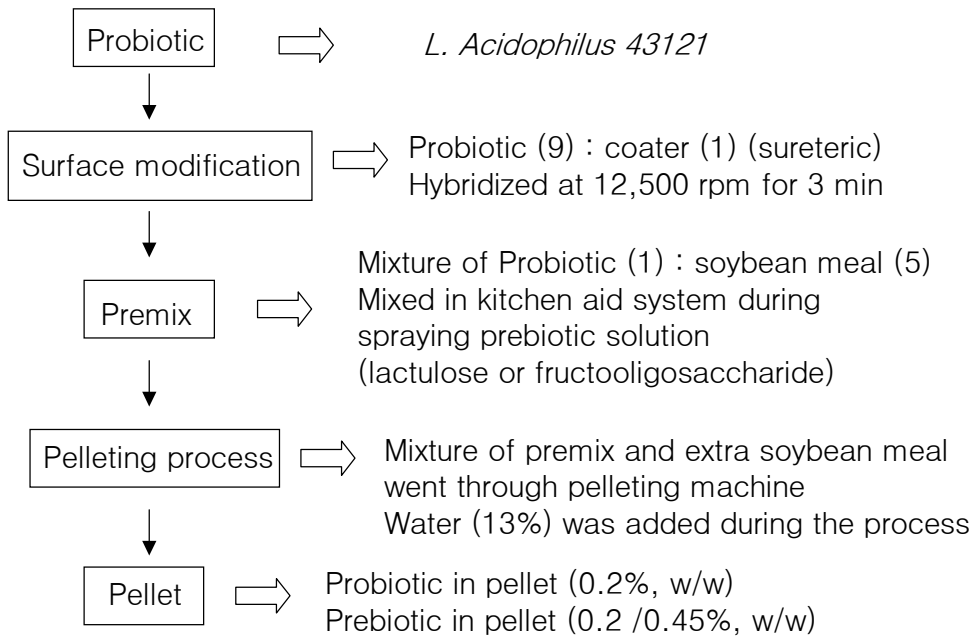


Fig. 3-18. Manufacture of pellet containing probiotic and prebiotic

## 제 2 항 실험결과 및 고찰

### 1. 분체복합화 피복재의 screening 및 피복조건 최적화

#### 가. 생균제의 구형화 가공공정 확립 및 물리적 특성 제고

주사전자현미경 관찰결과 생균제는 불균일한 형태를 나타내어 균일한 피복효과를 기대하기는 어려울 것으로 생각되었으나 실제 분체 복합화 처리과정에서 일어나는 생균제 입자들의 분쇄효과로 인하여 대부분의 경우 생균제의 별도의 구형화 공정은 반드시 필요하지는 않은 것으로 나타났다. 생균제의 구형화 처리시 그 정도는 초기 분획들의 크기에 따라 차이를 보였으며 대체적으로 처리속도가 증가함에 따라 구형화 정도는 향상되었으나, 구형화 전 초기입도가 작은 경우에는 구형화의 뚜렷한 효과가 관찰되지 않았다. 특히 초기의 입도가 100  $\mu\text{m}$  이하일 경우 구형화 종료후의 평균입도가 20  $\mu\text{m}$  이하로 감소되어 구형화가 되기보다는 2차적인 분쇄효과를 보여 표면가공 처리에 다소 부적합하였다. 평균입도 100  $\mu\text{m}$ 이상 200  $\mu\text{m}$ 이하인 분획의 경우에는 운전속도 7,000 rpm 이상의 처리구에서 구형화 효과가 우수한 것으로 나타나 분체가공에 적합한 생균제의 바람직한 초기 입도는 대략 100  $\mu\text{m}$  수준에서 시작되어야 할 것으로 생각된다(Fig. 3-19).

#### 나. 피복재의 초미분쇄

생균제의 분체가공에 바람직한 초기입도를 100  $\mu\text{m}$  수준으로 설정하였을 때 피복재의 적절한 초기입도는 5-10  $\mu\text{m}$  수준이며 이같은 초기입도를 얻기 위하여 다양한 조건에서 초미분쇄 후 얻어진 평균입도는 Table 3-40와 같다. Eudragit S100의 경우 Impact Mill speed/Air-classifier speed를 15,000 rpm/10,000 rpm으로 하였을때 평균입도가 5.38  $\mu\text{m}$ 으로 나타났으며 Eudragit L100-55의 경우에는 10,000 rpm/7,000 rpm으로 처리하였을 경우 평균입도 6.75  $\mu\text{m}$ 를 얻을 수 있었다.

CEMC와 Compritol 888의 경우에는 17,000 rpm/13,000 rpm으로 처리하였을 경우 각각 15.58  $\mu\text{m}$ , 10.06  $\mu\text{m}$ 의 균일한 입도를 얻을 수 있었다. Sureteric은 분쇄전 초기 입도가 5.31  $\mu\text{m}$ 로 초미분쇄 공정은 필요치 않았다.

#### 다. 피복재의 선별 및 균체 피복조건 확립

사용된 피복재의 종류에 따라 피복효과는 현저한 차이를 보였으며 분체 복합화의 적절한 처리조건은 생균제와 피복재의 배합비 9:1, Hybridizer 회전속도 15,000 rpm으로

나타났다. 분쇄 복합화 처리 시간은 3분 정도가 알맞은 것으로 나타났으며 더 이상의 처리 시간의 연장은 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 생균제의 피복에 사용된 피복재의 특성은 다음과 같으며 Fig. 3-20의 a-e는 최적 조건에서 피복된 생균제의 표면을 전자현미경으로 관찰한 결과이다.

Eudragit S100의 경우에는 무수한 격자모양의 입자가 뭉쳐 있는 형태를 보였으며 미분쇄와 분쇄 복합화 처리 시에 보다 미세한 입자로 재분쇄 되기 쉬워 생균제와의 부착은 용이하게 이루어지는 반면에 상대적으로 피복 효과는 우수하지 않았다. 그러나 생균제의 입도가 증가할수록 그리고 회전속도가 증가할수록 피복 효과가 향상되었다(Fig. 3-20 a).

Sureteric의 경우에는 입자의 모양이 부정형이지만 충격에 의하여 쉽게 퍼지는 전연성이 있어서 피복효과가 Eudragit S100에 비해 우수하였다. 생균제의 평균 입도가 100  $\mu\text{m}$  이상인 분획을 15,000 rpm 의 고속운전조건으로 처리한 경우에는 부정형 생균제의 구형화가 진행되었으며 생균제만을 구형화 처리하였을 때의 외관과는 현저한 차이가 관찰되었다. 이것은 Sureteric에 의한 피복이 양호하게 수행된 결과인 것으로 판단된다(Fig. 3-20b).

Eudragit L100-55의 입자형태는 원래 구형 이었으나 분쇄된 후에는 날카로운 각을 가진 부정형의 입자로 변화하였으며 생균제 표면 전체를 피복하기에는 부적합하였다(Fig. 3-20c).

Compritrol 888의 경우에는 입자의 모양이 부정형이지만 Sureteric과 같은 전연성이 우수하여 전체 처리구에서 균일한 피복효과가 관찰되었으며 특히 배합비가 9 : 1 이고 운전속도조건이 15,000 rpm에서 처리한 처리구는 다른 피복재와 비교하여 매끄럽고 균일한 표면 특성을 나타내었다(Fig. 3-20d).

CMEC (carboxymethylethylcellulose)의 경우에는 막대형의 입자 모양으로 분쇄 후에도 다른 소재에 비해 비교적 큰 평균 입도를 나타냈으며 입자가 매우 단단하여 전연성이 부족한 것으로 나타났다(Fig. 3-20e). 전자현미경으로 분쇄 표면의 물리적 변화를 관찰하여 판단한 피복효과는 Compritrol 888이 가장 우수한 것으로 나타났으며 피복재가 다량 첨가된 처리구 (2 : 1)에 비해 소량 첨가된 처리구 (9 : 1)에서 그 효과가 우수하였다. 다량의 피복제를 첨가 할 경우 경제적인 손실과 함께 피복에 참여하지 못한 잔여 입자들에 의하여 피복의 효율성이 낮아질 수 있을 것으로 생각된다.

라. 균체 피복제로서의 prebiotic의 적합성 제고

생균제의 생체 내에서의 활성 증진을 위해 prebiotic을 피복재로 사용하는 것이 제안되었고 FOS, lactulose, inulin을 이용하여 균체 피복제로서의 prebiotic의 적합성을 검토하였다. 일차적으로 배합비를 2:1, 4:1, 9:1 (생균제 : prebiotic, w/w)로 설정하여 처리하였을 경우 피복소재 비율의 증가에 따른 피복효율의 개선은 관찰되지 않았으며 모든 소재에서 생균제와 피복제의 비율이 9:1 이상으로 존재하는 경우 피복에 참여하지 못하고 개별적으로 존재하는 피복소재의 양이 증가하는 것으로 나타났다.

Prebiotic 피복소재의 초기성상은 Fig. 3-21과 같으며 FOS는 다양한 크기의 구형으로 균체 복합화에 의해 쉽게 부서지지 않았으며 앞서 조사된 장용성 피복소재와는 달리 균체복합화 과정시 균체 입자가 FOS 표면을 둘러싸는 것으로 생각된다(Fig. 3-21a). Lactulose는 격자 모양의 입자들이 덩어리를 이루는 모양을 나타내었으며 피복 정도는 FOS를 사용한 처리구와 유사하였는데 처리 후 생성물은 구형을 이루기 보다 불균일한 입자를 이루고 있었으며 표면에 돌출된 격자 형태가 균체 복합화 후에도 관찰되었다(Fig. 3-21b). Inulin은 판상의 입자 형태를 보였으나 앞의 두 prebiotic 피복소재와 비교하였을 때 입자의 물리적 강도는 낮은 편으로써 분체 복합화 처리 후 구형에 가까운 타원형의 입자를 형성하였다(Fig. 3-21c).

Prebiotic을 단일 피복소재로 사용하는 경우 피복효과는 장용성 소재와 비교하였을 때 충분하지 않을 것으로 판단되며 prebiotic은 물에 쉽게 녹는 성질을 가지고 있어서 내산성, 내열성과 같은 기능성을 부여하기는 어려울 것으로 생각된다. 따라서 prebiotic으로 단일 피복 후 기능성을 부여하기 위하여 2차 피복을 실시하였으며 이차 피복은 장용성 제재 중 높은 피복효율을 나타낸 sureteric을 이용하였다. 1차 피복된 시료의 이차 피복 후에는 균일한 피복효과가 관찰되었다(Fig. 3-23a,b and Fig. 3-23c).

피복 후의 표면 특성을 근거로 고찰하면, 이중 피복을 실시할 경우 prebiotic 소재를 효과적으로 생균제와 함께 피복할 수 있을 것으로 판단되었다.

#### 마. Hybridization 처리 후 생균제의 활성 유지

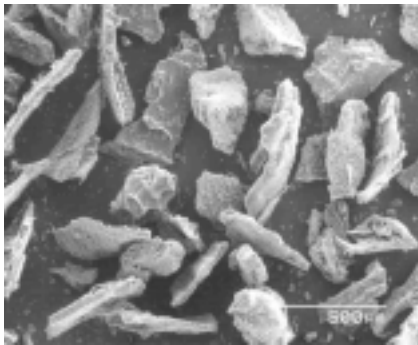
분체가공 후 생균제의 활성유지는 분체가공에 의한 기능성 획득여부를 판별하기 전 반드시 확인되어야 한다. 따라서 일차적으로 생균제만을 피복제 없이 Hybridization 처리조건을 거친 후 생균제의 활성을 조사하였다. Table 3-41에서 나타난 바와 같이 Hybridizer의 rotor 회전 속도를 최고 수준인 15,000 rpm까지 증가시킨 경우에도 생균제의 활성은 비처리 대조구와 동등한 수준으로 유지되었다. 이같은 결과는 Hybridization system에 의한 분체 복합화 처리가 생균제의 활성에 유의적인 영향을

미치지 않음을 의미한다. Table 3-42는 피복재 중 우수한 피복효과를 나타낸 Compritol 888을 이용하여 생균제의 분체 복합화 처리시 생균제의 활성 변화를 조사한 결과이다. 실험의 재현성을 검증하기 위하여 동일한 처리를 5회 반복하였으며 분체 복합화 후 동일한 batch에서 총균수를 2회 반복 측정하였다. 반복 측정 결과 생균제의 활성은 피복재의 첨가 후에도 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

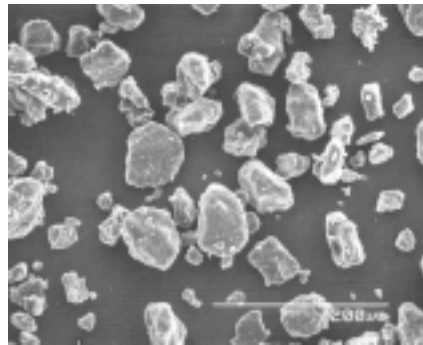
Table 3-43는 과도한 분체복합화 처리 조건에서 일어나는 모델 생균제(MI-LC)의 활성 변화를 조사한 결과이다. 과도한 분체 복합화 처리 조건으로 설정된 처리속도 15,000 rpm에서 6 분간 분체 복합화를 실시한 경우 생균제의 활력은 비처리 대조구에 비하여 약 1/10 정도 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 과도한 처리시간의 연장은 생균제의 활성을 저하시킬 수 있을 것으로 생각된다.

분체 복합화 처리 중 prebiotic을 피복재로 사용시 나타나는 생균제(MI-LC)의 활성 변화를 조사한 결과는 Table 3-44과 같다. Prebiotic을 피복재로 사용한 경우에도 장용성 피복소재와 같이 생균제의 활성은 비처리 대조구와 동등한 수준으로 유지되어 생균제의 활성에 영향을 미치지 않았으며 혼합 비율의 증가에 따라 나타난 총균수의 증가는 피복에 포함된 모델 생균제의 함량 증가 때문인 것으로 생각된다.





(a)



(b)

Fig. 3-19. Morphological change of probiotic by globing process. (a): before globing process, (b): after globing process at 7,000 rpm for 3min

Table 3-40. Mean particle size of coating materials after microparticulation

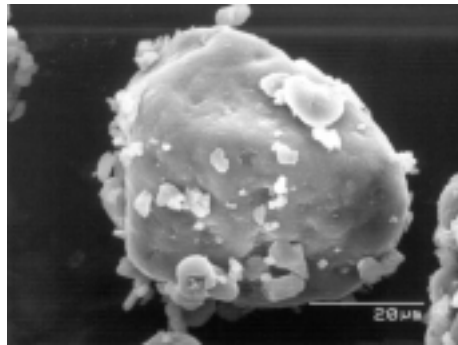
IMS(rpm) <sup>1)</sup>	ACS(rpm) <sup>2)</sup>	Mean particle size ( $\mu\text{m}$ )			
		Eudragit S-100	Compritol 888	Eudragit L100-55	CEMC
7,000	10,000	9.50	20.50	6.75	20.65
10,000	15,000	5.38	12.03	-	15.65
13,000	17,000	-	10.06	-	15.38

<sup>1)</sup> Impact Mill Speed

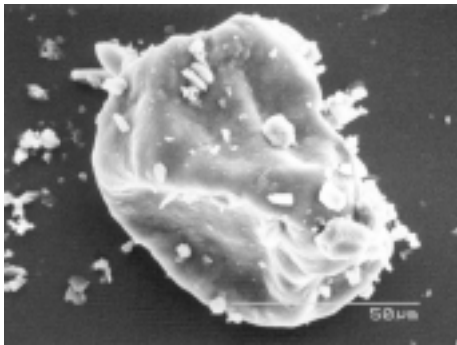
<sup>2)</sup> Air Classifier Speed



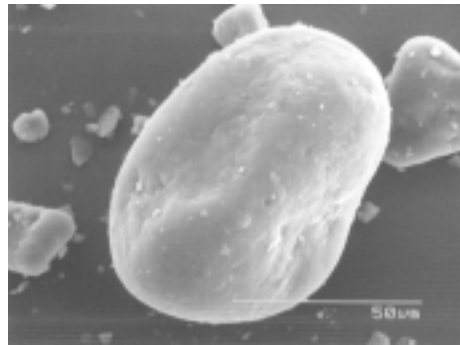
(a)



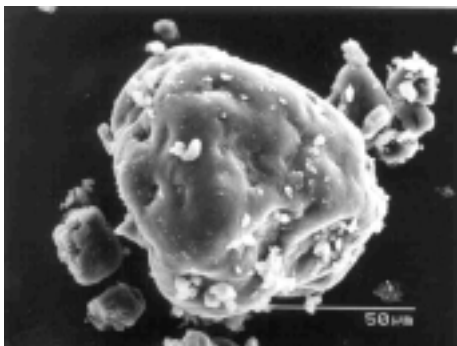
(b)



(c)

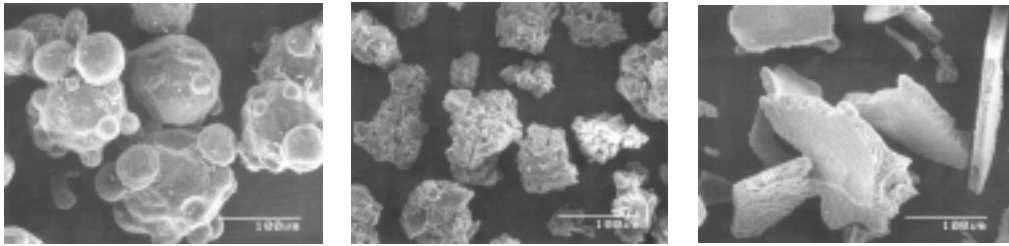


(d)



(e)

Fig. 3-20. Morphology of model probiotic coated with different coating materials. Encapsulation was made using Hybridizer system with rotor speed of 15,000 rpm for 3 min. (a): Eudragit S100, (b): Sureteric, (c): Eudragit L100-55, (d): Compritol 888, (e): CEMC

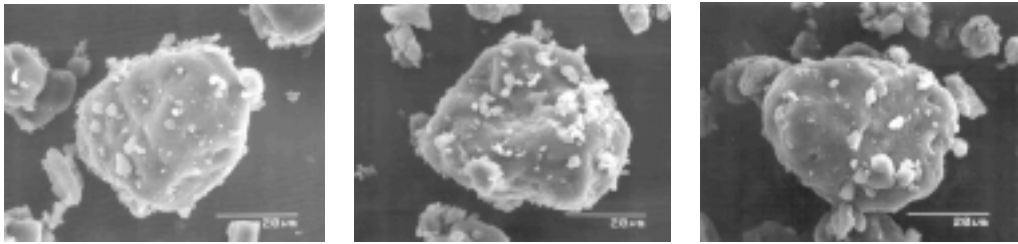


(a)

(b)

(c)

Fig. 3-21. Morphology of selected prebiotics. (a): fructooligosaccharide, (b): lactulose, (c): inulin

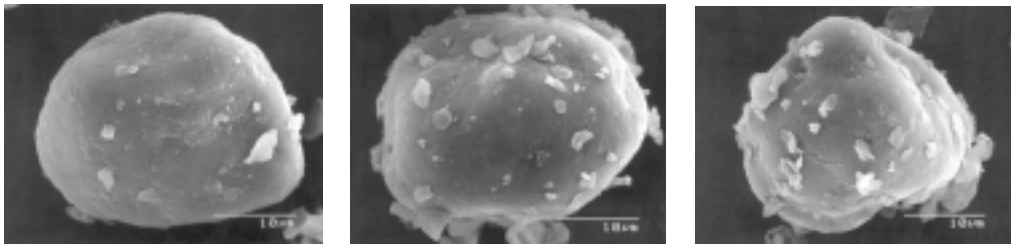


(a)

(b)

(c)

Fig. 3-21. Morphology of probiotic coated with prebiotics. Coating was made using Hybridizer system at the ratio of 9:1 (probiotic : prebiotic, w/w) with rotor speed of 12,500 rpm for 3 min. (a): fructooligosaccharide, (b): lactulose, (c): inulin



(a)

(b)

(c)

Fig. 3-23. Morphology of double-coated probiotic using prebiotics and sureteric. The sample of Fig. 3-22 were double-coated using Sureteric. (a): fructooligosaccharide, (b): lactulose, (c): inulin

Table 3-41. Changes in activity of model probiotic at various hybridization conditions

Rotor speed of Hybridizer(rpm)	Number of viable cell count(CFU/g)
Control	$2.45 \times 10^{10}$
5,000	$1.71 \times 10^{10}$
7,000	$1.46 \times 10^{10}$
10,000	$1.08 \times 10^{10}$
15,000	$1.44 \times 10^{10}$

Duration of hybridization was 3 min for all treatment.

Table 3-42. Changes in activity of model probiotic coated with Compritol 888 at optimum hybridization condition

Batch	Determination	Number of viable cell count(CFU/g)	
I	1st	6.4×10 <sup>10</sup> 4.5×10 <sup>10</sup>	5.95×10 <sup>10</sup>
	2nd	4.2×10 <sup>10</sup> 3.5×10 <sup>10</sup>	3.85×10 <sup>10</sup>
II	1st	3.4×10 <sup>10</sup> 3.8×10 <sup>10</sup>	3.60×10 <sup>10</sup>
	2nd	6.4×10 <sup>10</sup> 3.6×10 <sup>10</sup>	5.00×10 <sup>10</sup>
III	1st	- -	-
	2nd	6.7×10 <sup>10</sup> 5.9×10 <sup>10</sup>	6.30×10 <sup>10</sup>
IV	1st	3.5×10 <sup>10</sup> 5.1×10 <sup>10</sup>	4.30×10 <sup>10</sup>
	2nd	5.2×10 <sup>10</sup> 4.7×10 <sup>10</sup>	4.95×10 <sup>10</sup>
V	1st	8.3×10 <sup>10</sup> 8.4×10 <sup>10</sup>	8.35×10 <sup>10</sup>
	2nd	4.1×10 <sup>10</sup> 5.5×10 <sup>10</sup>	4.80×10 <sup>10</sup>

Hybridization was done for 3 min with rotor speed of 15,000 rpm.



Table 3-43. Changes in activity of model probiotic coated with Compritol 888 at extreme hybridization condition

Batch	Determination	<i>Number of viable cell count(CFU/g)</i>	
Control	1st	3.3×10 <sup>10</sup>	3.25×10 <sup>10</sup>
	2nd	3.2×10 <sup>10</sup>	3.10×10 <sup>10</sup>
I	1st	3.1×10 <sup>10</sup>	2.25×10 <sup>9</sup>
	2nd	3.1×10 <sup>10</sup>	2.80×10 <sup>9</sup>
II	1st	2.2×10 <sup>9</sup>	3.45×10 <sup>9</sup>
	2nd	2.3×10 <sup>9</sup>	2.7×10 <sup>9</sup>
III	1st	2.7×10 <sup>9</sup>	2.75×10 <sup>9</sup>
	2nd	2.9×10 <sup>9</sup>	2.95×10 <sup>9</sup>
IV	1st	3.8×10 <sup>9</sup>	3.85×10 <sup>9</sup>
	2nd	3.1×10 <sup>9</sup>	4.0×10 <sup>9</sup>
V	1st	3.3×10 <sup>9</sup>	5.7×10 <sup>9</sup>
	2nd	2.1×10 <sup>9</sup>	7.05×10 <sup>9</sup>

Hybridization was done for 6 min with rotor speed of 15,000 rpm.

Table 3-44. Changes in activity of probiotic after hybridization with prebiotics

		Treatments		CFU of viable cell
		Prebiotics	Formulation Ratio <sup>1</sup>	
Coated Probiotic	Fructo-oligo saccharide		2:1	$5.5 \times 10^9$
			4:1	$7.2 \times 10^9$
			9:1	$1.2 \times 10^{10}$
	Lactulose		2:1	$7.9 \times 10^9$
			4:1	$9.1 \times 10^9$
			9:1	$1.2 \times 10^{10}$
	Inulin		2:1	$8.8 \times 10^9$
			4:1	$9.3 \times 10^9$
			9:1	$1.0 \times 10^{10}$
Non-coated Probiotic				$1.4 \times 10^{10}$

<sup>1</sup> Formulatio ration was weight per weight of probiotic and prebiotic

Hybridization was done for 3 min with rotor speed of 15,000 rpm.

## 2. 가공 및 저장중 생균제의 활력 변화 비교분석

### 가. 생균제의 분체피복화에 따른 생균수의 변화

분체가공 처리 전 후 생균제의 활성유지 여부를 조사한 결과는 Table 3-45과 같다. 생균제로서 사용한 균주인 *L. acidophilus* ATCC 43121는 1011 수준의 높은 생균수를 나타냈으며 피복제 없이 2회간 분체 복합화 처리한 후에도 생균제의 활성에는 큰 변화를 보이지 않았다. 또한 다양한 종류의 prebiotic 소재를 사용하여 일차 피복한 다음 장용성 피복재인 sureteric으로 다중 피복을 실시한 후에도 생균수에는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 prebiotic 소재와 생균제의 균체복합화 중 생균제의 활력에 중대한 영향을 미칠 수 있는 상호작용은 일어나지 않는 것으로 판단된다.

### 나. 분체복합 생균제의 내산성 및 장용성 검증

생균제의 산에 대한 저항력을 조사하기 위하여 대조구 및 sureteric으로 피복한 생균제를 인공위액에 일정시간 노출시킨 후 균수의 변화를 측정한 결과는 Table 3-46와 같다. 실험에 사용한 생균제는 산에 대하여 매우 우수한 저항력을 보였으며 pH 1.5의 강한 산성과 pepsin이 존재하는 환경조건에서도 초기균수의 변화가 관찰되지 않았다. 장용성 피복제로 피복을 실시한 후에 생존하는 균수는 대조구와 유사한 수준으로 나타났는데 이는 실험에 사용한 균주(*L. acidophilus* ATCC 43121) 자체가 가지고 있는 강한 내산성 때문으로 생각된다. 처리구를 중성 pH(7.2)로 조정시 대조구와 매우 유사한 수준의 생균수를 유지하는 것으로 보아 중성 조건에서 피복제의 용해가 효과적으로 일어난 것으로 판단된다.

사료용 생균제가 효용성을 갖기 위해서는 일차적으로 소화관내에서 높은 생존성을 가져 살아있는 상태로 대장에 도달하여야 하며 적정량의 균수를 유지하여 정상적인 장내균총 형성에 도움을 주어야 한다. 실험에 사용한 생균제의 강한 내산성으로 현 단계에서 균수에 내산성을 부여하기 위한 별도의 피복은 필요하지 않은 것으로 판단되나 내산성을 부여하기 위한 생균제의 피복기술은 산에 취약하여 경구 투여시 투여된 생균의 대부분이 위장관내에서 위산 및 담즙에 의해 사멸되는 것으로 알려진 *Bifidobacteria* 같은 생균제에 적용시 균의 생존률을 현저하게 높일 수 있을 것으로 생각된다.

### 다. 분체복합 생균제의 내열성 검증

생균제의 내열성을 조사하기 위한 열처리 방법으로서 수분을 가하지 않고 건조 오븐에서 가열하는 방법, 제한된 수분이나 증기를 가한 상태에서 열처리하는 방법, 그리고 균을 buffer에 분산시킨 후 항온수조에서 가열하는 세 가지 조건을 고려하였다. 이 중 제한된 수분이나 증기를 가한 상태에서 가열하는 방법은 사료의 pelleting 공정과 가장 유사한 열처리 방법이긴 하나 온도의 조절이 어렵고 열처리 후 시료의 정량적 이동에 한계를 나타내었다. 건조오븐에 의한 가열 방법 역시 시료 전체에 균일한 열을 전달하기가 어려워 여러 차례에 걸친 반복실험에도 불구하고 결과의 재현성이 좋지 않았다.

항온수조를 이용한 가열 방법의 사용시 실제 사료처리 가공조건의 열처리 환경과는 차이가 있으나 적은 양의 시료를 이용하여 피복 후 시료의 열에 대한 저항성 정도의 변화를 조사하기 위한 지표로서 실험을 수행하였다. 예비 실험을 통하여 열처리 시간의 변화에 따른 균수의 변화를 측정된 결과 5분 이내의 짧은 가열 시간에서는 초기시료의 상태 및 실험오차 등에 의하여 실험의 재현성이 낮았으므로 열처리 시간을 10분으로 고정하여 시료를 60, 65, 70°C에서 각각 가열하고 신속하게 시료를 냉각한 다음 균수의 변화를 측정하였다. Table 3-47에서 나타난 바와 같이 가열 온도가 상승함에 따라 생균수의 감소가 일어났으며 75°C 이상으로 가열한 후에는 생균수가 초기 생균수의 절반 수준으로 저하하였다. 내산성 피복제재를 이용하여 피복한 경우에도 내열성의 증가는 관찰되지 않았다.

한편, prebiotic 소재를 이용하여 다중 피복을 실시한 경우에도 가열처리 후 생존하는 균수는 단일피복의 경우와 유사하였으며 피복에 의한 유의적인 내열성의 변화는 없는 것으로 나타났다(Table 3-48).

분체 복합에 의한 내열성의 변화를 조사하는 방안으로서 앞서 조사한 실험조건보다 낮은 온도인 50°C에서 가열처리 시간을 연장하여 생균수의 변화를 측정된 결과는 Fig. 3-24와 같다. 분체복합화에 의한 표면처리를 실시하지 않은 대조구인 *L. acidophilus* 393의 초기균수는 가열처리 전  $6.16 \times 10^{11}$  CFU/g에서 50°C에서 60분 경과시  $1.41 \times 10^8$ 으로 급격히 생균수가 감소하였으며 240분 경과시에는  $1.15 \times 10^7$ 으로 감소하였다. 한편 분체복합화를 실시한 처리구의 경우 초기 균수가  $2.80 \times 10^{11}$  CFU/g으로 대조구와 유사하였으나 60분 경과시  $7.10 \times 10^9$ , CFU/g, 240분 경과시  $6.30 \times 10^7$  CFU/g으로서 대조구보다 유의적으로 높게 나타났다.

*L. acidophilus* ATCC 43121의 분체복합화를 실시한 경우에도 위의 결과에 유사한 변화가 나타났다. 50°C 및 55°C의 열처리시 분체복합화를 실시한 처리구는 대조구와 120분까지의 가열시간에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나 가열시간이 180분 이

상으로 증가됨에 따라 대조구와 유의적인 차이를 보였다. 55°C의 열처리시에는 생균수의 감소가 50°C의 경우보다 현저하게 빠르게 진행되었다(Fig. 3-25).

이상의 결과는 분체복합화에 의하여 균주의 내열성이 일부 향상될 수 있음을 의미하며 가공처리에 의한 내열성의 변화를 보다 정확하게 예측하기 위해서는 가열온도의 변화와 더불어 가열시간에 따른 변화를 함께 측정하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

#### 라. 내열성부여를 위한 피복생균제와 사료 주성분과의 결합

동일한 열을 가하였을 때 생균제가 받게되는 열에 의한 충격은 생균제의 입자크기와 관련이 있으며 입자의 직경이 작아지게 되면 단위 부피당 입자의 표면적이 증가하게 되어 열에너지의 전달이 빠르게 일어난다. 피복된 생균제에 내열성을 부여하는 방안으로서 사료가공에 주로 이용되는 소재인 대두박과 옥수수전분을 생균제에 부착시킴으로써 생균제 입자 크기의 증가를 유도하고 사료 주성분이 형성하는 barrier에 의하여 열의 충격을 차단하고자 하였다.

생균제의 일차적 피복은 sureteric 이외에 다공성 silica에 의한 embedding 효과를 검토하였으나 silica의 입자 크기가 생균제의 크기에 비하여 너무 작고 분체복합화 과정에서 쉽게 부서져 기대했던 생균제의 embedding 효과는 나타나지 않았으며 silica에 의한 표면피복효과가 관찰되었다(Fig 3-29a and Fig 3-29b). 따라서 silica에 의한 균체의 embedding은 현실적이지 않은 것으로 판단하고 사료 주성분과 부착시키기 위한 생균제의 피복은 sureteric을 이용하였다(Fig 3-26c). 판형의 불균일한 생균제는 피복재를 이용한 분체복합화과정 중 구형화되어 이차가공에 적합한 형태로 변화하였으며 생균제의 입자직경은 30-40  $\mu\text{m}$  정도로 감소하였다.

피복된 생균제/대두박 그리고 피복된 생균제/옥수수전분의 성상은 Fig. 3-27a,b와 같다. 대두박은 주름진 표면을 가진 부정형의 입자형태를 나타내었으며 옥수수전분은 생균제보다 작은 크기를 가진 구형을 나타내었다. 피복된 생균제와 사료 성분과의 부착유도는 물이나 fructooligosaccharide를 용해시킨 당용액을 투여함으로써 이루어졌다. 물의 양이 과다하거나 과량이 한꺼번에 투여된 경우에는 시료간의 과도한 응집이 관찰되었으나 수분의 양을 시료 전체 무게의 약10% 수준으로 소량씩 투여한 경우에는 과도한 응집이나 덩어리가 형성되지 않았다. 당용액이나 물의 투여시 대두박 또는 전분과 생균제와의 부착 정도나 형성된 입자크기는 전자현미경상의 차이를 보이지 않았으나 당 용액을 사용한 경우 당의 점성에 의한 부착강도의 증가가 나타날 수 있을 것으로 예측되며 prebiotic 소재를 생균제와 근접한 거리에 위치시킬 수 있으므로 당용액의 사

용이 바람직할 것으로 판단된다. 수분이나 당용액의 투여에 의해 입자의 직경을 약 100  $\mu\text{m}$  정도로 증가시킬 수 있었으며(Fig. 3-28a과 b) 입자크기의 제어는 사료 주성분과의 부착 전 초기 입자 크기를 조절하거나 사료 주성분과의 부착을 작은 입자로부터 시작하여 보다 큰 입자를 외부에 점차적으로 부착시킴으로써 가능할 것으로 생각된다.

#### 마. Lab scale의 분체복합 생균제 생산공정확립

Lab scale의 분체복합 생균제 생산공정확립을 위하여 Fig. 3-18에 제시한 순서에 따라 생균제제를 함유한 pellet 사료를 제조하고 단위 공정별 분체결합 구조를 관찰한 결과는 Fig. 3-29과 같다. 복합화 과정을 거친 생균제(Fig. 3-29a)와 대두박을 1:5의 비율로 혼합하여 교반하며 prebiotic용액을 분무하여 premix를 제조하였다(Fig. 3-29b). Prebiotic으로 사용된 당 용액을 분무시 수분을 동일한 양을 분무시킨 경우에 비하여 입자간의 결합성이 증가하여 생균제 입자의 크기가 현저하게 증가하였다. 그러나 사용한 prebiotic의 종류에 따라서는 결합성이나 생성된 입자의 크기에 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다. Pellet을 제조하기 위하여 premix 생균제를 대두박에 최종 농도가 0.2%가 되도록 혼합하였으며(Fig. 3-29c), pelleting machine을 통과시켜 pellet을 제조하였다. Pellet의 성형과정에서 시료무게의 13%에 해당하는 수분이 첨가되었으며 pellet의 성형 후 상온의 송풍건조기에서 하루간 건조하여 최종적으로 pellet을 제조하였다. 제조된 pellet을 단면으로 잘라서 관찰하였을 때 초기 피복처리의 유무, prebiotic 용액의 농도 등에 상관없이 모두 Fig. 3-29d와 유사한 구조를 나타내었다. 한편, pellet의 단면내에서 생균제의 성상은 관찰되지 않았는데 이는 pellet 제조과정 중 대두박과 premix의 압력에 의한 과도한 결합에 의해 생균제가 대두박에 완전히 embedding이 되어진 것으로 생각된다(Fig 3-30).

생균제의 복합화 과정에서의 제조수율은 50% 내외로 조사되었으며, premix의 제조과정에서는 뚜렷한 손실이 나타나지 않았다. Pelleting공정에서는 투여된 시료의 82%가 pellet의 형태로 회수되어 균체복합화 과정이 생산효율의 향상에 영향을 미칠 수 있는 critical step으로 판단된다.

#### 바. 분체복합 가공 단계별 생균제의 활력 변화 조사

균주의 pellet 과정에서 일어나는 생균제의 활력 변화를 알아보기 위하여 L. acidophilus 393 균주를 이용하여 각 단계별 생균수를 측정하였다(Table 3-49). 생산된 균주의 초기균수는  $3.65 \times 10^{10}$  CFU/g 이었으며 sureteric을 이용한 분체복합화과정에서도

$2.62 \times 10^9$  CFU/g의 균이 생존하여 균수의 변화는 나타나지 않았다. 프리믹스의 제조과정부터는 분체복합화가 이후의 pellet화 공정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 분체복합화를 실시한 처리구와 분체복합화 과정을 거치지 않은 처리구로 나누어 pellet을 제조하였다. 프리믹스 및 pellet 공정에서도 분체복합화 처리구와 비처리구는 균수에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 초기 균수의 활력이  $3.65 \times 10^{10}$  CFU/g 되는 *L. acidophilus* 393을 0.2%가 함유된 pellet의 경우에도 균수의 현저한 감소는 나타나지 않았다. 본 연구에서 사용한 pellet machine은 기존의 사료생산에 쓰이는 pellet machine과는 달리 제조과정에서 steam을 사용하지 않으므로 pellet화 과정에서 뚜렷한 균수의 저하는 관찰되지 않았다. 따라서 제조된 pellet을 일차적으로 90°C의 건조 oven에서 20분간 유지시킨 후 균수의 변화를 조사하여 공정 중 steam에 의한 영향을 살펴본 결과 분체복합화를 실시하지 않은 대조구에서는 균이  $10^3$ 의 희석배율에서 나타나지 않은 반면 분체복합화 처리구는  $3.30 \times 10^3$ 의 균이 존재하였다.

Table 3-45. Changes of viable cell count after hybridization of *L. acidophilus* ATCC 43121

Condition of hybridization	Viable cell count(CFU/g)
Non-treated control ( <i>L. acidophilus</i> ATCC 43121)	$1.47 \times 10^{11}$
Hybridization without coating material	$4.65 \times 10^{10}$
Hybridization without coating material (2 times)	$8.85 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 43121 + sureteric	$6.30 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 43121 + sorbitol / sureteric	$2.76 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 43121 + fructooligosaccharide / sureteric	$3.60 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 43121 + mannitol / sureteric	$3.15 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 43121 + raffinose / sureteric	$3.80 \times 10^{10}$
<i>L. acidophilus</i> 43121 + lactulose / sureteric	$3.20 \times 10^{10}$



Table 3-46. Acid tolerance of coated *L. acidophilus* ATCC 43121

Incubation time in artificial gastric juice(hr)	Viable cell count (CFU/g)	
	Control	Coated with sureteric
0	$9.60 \times 10^9$	$9.90 \times 10^9$
2.5	$1.89 \times 10^{10}$	$1.34 \times 10^{10}$
5	$1.85 \times 10^{10}$	$1.31 \times 10^{10}$

Table 3-47. Heat tolerance of coated *L. acidophilus* ATCC 43121

Batch	Heating temperature (°C)	Viable cell count(CFU/g)	
		Control	Coated with sureteric
First trial	No heating	1.47 x 10 <sup>11</sup>	4.65 x 10 <sup>10</sup>
	60	1.89 x 10 <sup>8</sup>	2.45 x 10 <sup>8</sup>
	65	4.95 x 10 <sup>9</sup>	1.58 x 10 <sup>6</sup>
Second trial	70	4.26 x 10 <sup>5</sup>	3.60 x 10 <sup>6</sup>
	60	8.40 x 10 <sup>9</sup>	4.95 x 10 <sup>9</sup>
	65	9.80 x 10 <sup>9</sup>	2.37 x 10 <sup>7</sup>
	70	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>

Table 3-48. Heat tolerance of double coated<sup>1</sup> *L. acidophilus* ATCC 43121

Heating temperature (°C)	Viable cell count(CFU/g)					
	Control	Initial coating with				
		Mannitol	Raffinose	Sorbitol	Lactulose	FOS <sup>2</sup>
No heating	4.65×10 <sup>10</sup>	3.15×10 <sup>10</sup>	3.80×10 <sup>10</sup>	2.76×10 <sup>10</sup>	3.20×10 <sup>10</sup>	3.60×10 <sup>10</sup>
60	4.95×10 <sup>9</sup>	2.03×10 <sup>9</sup>	2.95×10 <sup>9</sup>	2.75×10 <sup>9</sup>	2.90×10 <sup>9</sup>	2.40×10 <sup>9</sup>
70	3.7×10 <sup>5</sup>	1.60×10 <sup>4</sup>	2.90×10 <sup>4</sup>	1.47×10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>3</sup>	1.25×10 <sup>4</sup>

1L. acidophilus 43121 was initially coated with indicated prebiotic and then coated again with sureteric. 2: fructooligosaccharide

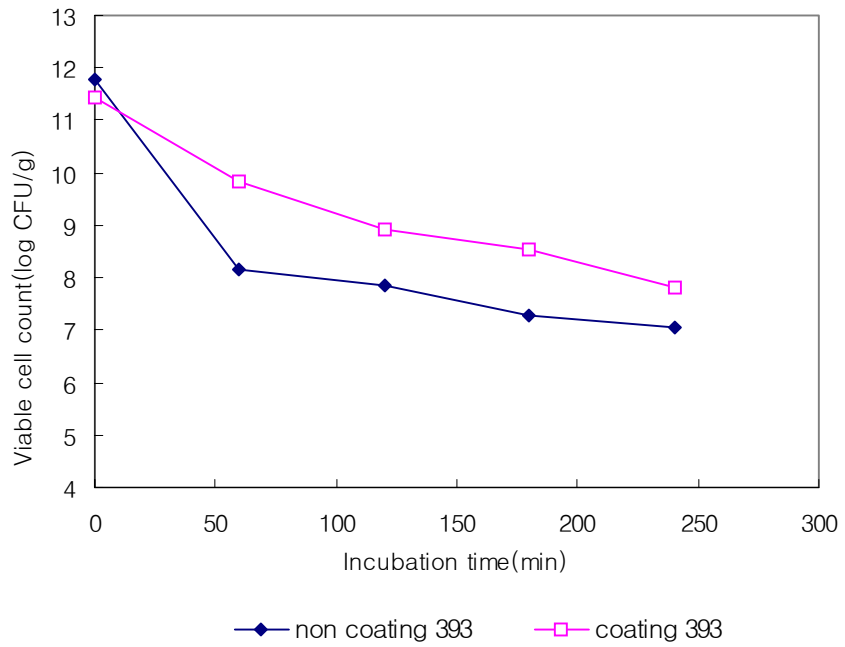


Fig 3-24. Changes of viable cell count of *L. acidophilus* 393 during heat treatment at 50°C.

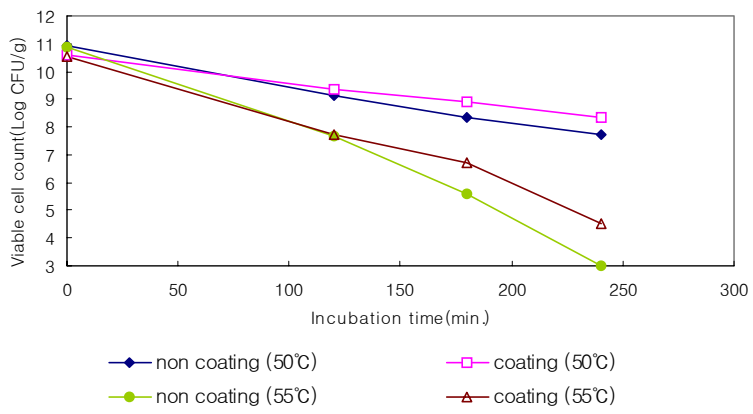
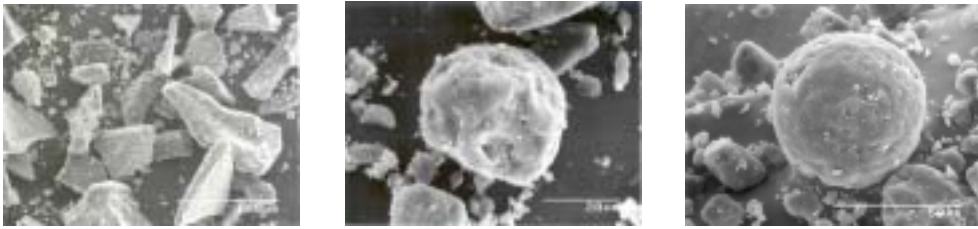


Fig 3-25. Changes of viable cell count of *L. acidophilus* 43121 during heat treatment at 50°C or 55°C.

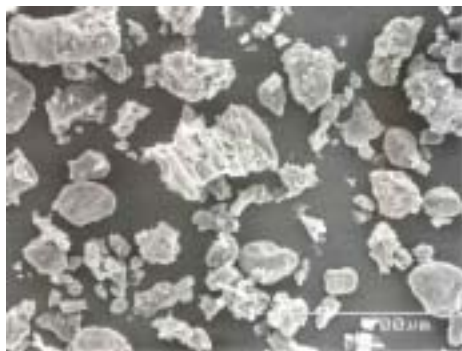


(a)

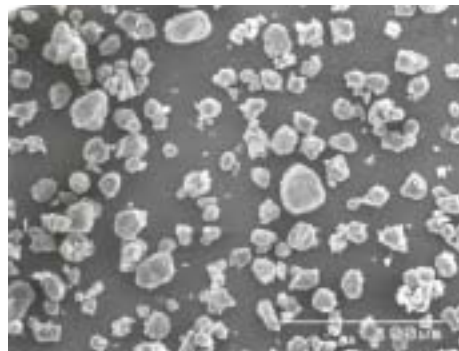
(b)

(c)

Fig. 3-26. Scanning electron microgram of coated *L. acidophilus* 43121. (a): mixture of *L. acidophilus* ATCC 43121 and silica, (b): coated *L. acidophilus* ATCC 43121 with silica, (c): coated *L. acidophilus* ATCC 43121 with sureteric.

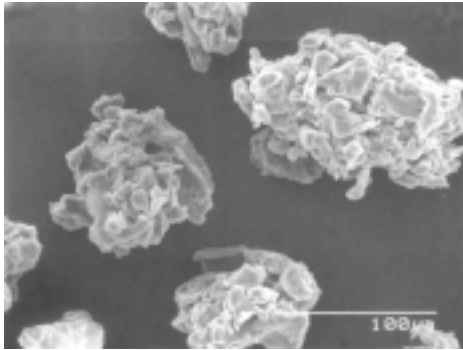


(a)

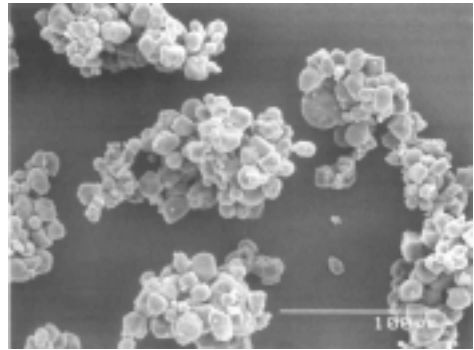


(b)

Fig. 3-27. Scanning electron microgram of coated *L. acidophilus* ATCC 43121/ soybean meal(a) and coated *L. acidophilus* ATCC 43121/ corn starch (b)



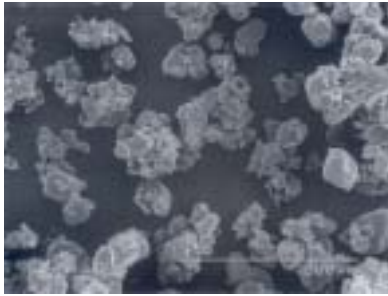
(a)



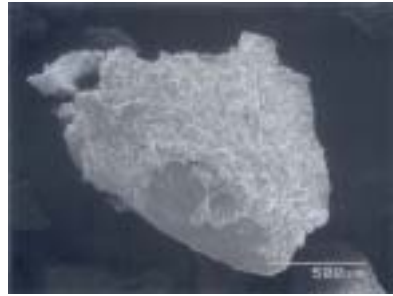
(b)

Fig. 3-28. Binding of coated *L. acidophilus* ATCC 43121 and soybean meal (a) or corn starch (b).

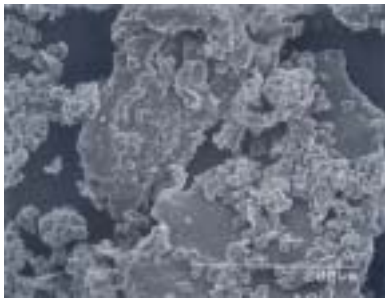




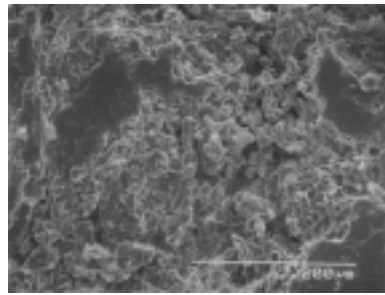
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 3-29. Observation of surface structures during pelleting process. (a): surface modification(hybridization process), (b): premix containing lactulose, (c): Mixture of premix and extra soybean meal (before pelleting), (d): cross section of pellet



Fig 3-30. Pellet of mixture of premix and extra soybean meal

Table 3-49. Changes of viable cell count of *L. acidophilus* 393 during pelleting process

Process	Viable cell count (CFU/g)
Initial ( <i>L. acidophilus</i> 393)	$3.65 \times 10^{10}$
Surface modification (hybridization)	$2.62 \times 10^9$
Premix	
without surface modification	$5.75 \times 10^8$
with surface modification	$4.10 \times 10^8$
After pelleting	
without surface modification	$3.30 \times 10^6$
with surface modification	$2.95 \times 10^6$
Heated pellet at 90°C for 20 min	
without surface modification	$< 10^3$
with surface modification	$3.30 \times 10^3$

### 3. 생균제의 사료첨가형태 및 제품 안정성을 고려하여 분체복합화 생산공정을 scale-up하는 조건 설정

#### 가. 분체복합 생균제의 사료 첨가 형태 결정

양돈용 배합사료에 사용되는 원료는 식물성 에너지 사료이며 주로 곡류인 옥수수, 소맥 등이 있으며 강피류 사료로는 소맥피, 미강, 맥강 등이 있다. 그리고 식물성 단백질 사료로는 대두박, 채종박, 먼실박, 야자박, 옥배아박, 임자박, 호마박, 옥글루텐박, 루핀, 아마박 등이 널리 이용되며, 동물성 단백질 사료에는 어분, 혈분, 육분, 육골분, 우모분, 가금부산물, 유지 사료인 우지, 돈지, 식용유 등이 있다. 그밖에 보충 사료로 칼슘, 당밀, 아미노산 제제, 인, 생균제, 항생제 등을 첨가하고 있다.

특히 자돈이 포유중일 때는 모유내 젖산 함량이 높아 위내 산도를 낮추어 줌으로써 병원성세균의 살균력이 뛰어나 자돈을 보호해주지만, 이유후에는 사료내 젖산 함량이 급격히 떨어져 사료나 환경에서 기인하는 병원성세균에 대하여 거의 방어를 하지 못하고 감염되어 설사 발생율이 높아진다(Armstron, 1993). 이 시기에 급여할 사료는 소화능력을 충족시키고 불필요한 스트레스가 면역체계에 가해지지 않도록 만들어져야 하며 지방 35%, 단백질 30% 및 lactose 25%가 함유되도록 특별한 사료를 채택하여야 한다 (Tokach 등, 1991).

일반적으로 식물성·동물성 또는 광물성 물질로서 직접 사용되거나 일반적인 배합 사료의 원료로 폭넓게 사용되고 있는 단미사료의 경우, 사료의 효용가치를 더욱 높이기 위한 방편의 하나로서 다양한 종류의 보조사료를 첨가하는 것이 보통이다. 이러한 보조 사료 또는 첨가물의 경우 적정한 비율로 사료배합 과정에 혼합하여 첨가시키거나 배합 사료 가공공정을 통하여 균일한 분포가 되도록 사료완제품을 제조하고 있으나 균일한 비율로 사료중에 분포되도록 하기에는 어려움이 있다. 배합사료에서 요구되는 고도의 분산력을 담보하기 위해서 교반기나 송풍에 의한 배합을 활용하고 있으나 각 성분의 단위입자의 크기와 밀도의 차이에서 발생하는 분체특성에 의하여 고른 분포를 유지하는 것은 대부분의 분말 사료분야에서 문제점으로 지적되어왔다.

따라서 본 연구에서는 사료 제조공정 중 생균제를 최종 단계의 배합공정에 첨가하며, 생균제를 포함한 각종 첨가물 역시 고르게 분산시킬수 있는 방식을 채택하였다. 즉 사료혼합공정의 최종단계에서 고르게 분산시킬 수 있도록 각종 첨가물이 들어가는 단계에 집어넣되, 균체복합화가 완료된 생균제를 적정량의 배합사료와 미리 혼합하여 이들 원료의 표면에 부착시킨 후, 다시 분산시키는 방식이 가장 바람직한 것으로 나타났다. 이 때 활용되는 배합사의 원료는 주원료가 되는 단미사료 가운데, 밀도와 입도가

비슷한 대두박이 바람직한 것으로 판단된다.

#### 나. 사료첨가형태 생균제의 제품안정성 확립

*L. acidophilus* ATCC 107A 균주의 분말을 두가지 형태의 사료에 대하여 0.2% 수준으로 첨가한 후, 온도의 차이에 따른 안정성을 살펴보았다.  $6.0 \times 10^9$  cfu/ml의 활력을 가지고 있는 *L. acidophilus* ATCC 107A는 사료에 0.2% 수준으로 첨가됨에 따라서 활력이 다르게 측정되었으며, 초기균수 자체가 사료형태에 따라서 다르게 측정되었다. 저장 중 사료내에서의 균주의 안정성은 분체복합화과정을 거치지 않은 비처리구나 복합화과정을 거친 시료사이에는 주목할 만한 차이는 나타나지 않았다.

온도에 따른 생균제의 안정성을 살펴보면 고온인 37°C에서는 펠렛형이나 분말형 사료 모두  $10^3$  수준으로 활력이 저하된 반면 상온인 25°C에서는 분말형 사료인 경우  $10^4$  수준으로 저하되었으나, 냉장온도인 4°C에서 저장된 분말형 사료는  $10^6$  수준으로 활력을 유지하고 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 동일한 활력을 갖고 있는 균주가 사료를 어떠한 형태로 가공 또는 저장하는지에 따라서 안정성은 달라질 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 분말형 사료에서  $10^6$  수준인 균주의 활력이 펠렛형 사료에서 초기 균수가 104승 수준으로 저하된 원인으로는 펠렛공정이나 저장중의 열에 의한 사멸, 펠렛 건조과정중 공기와의 접촉 및 압착과정에 의한 스트레스, 생균수 측정을 위한 건조 펠렛의 분쇄과정 중 사멸, 펠렛 공정중 수분과의 접촉 및 오염가능성을 추론할 수 있었다. 따라서, 저장 온도에 따라서는 냉장온도인 4°C에서 복합 분체화된 사료를 저장하는 것이 생균제의 안정성의 확보차원에서 적합하다고 판단되었으며 사료의 가공 형태도 펠렛형일 때보다 분말형일 때가 적합하였다(Table 3-50, 3-51, 5-52).

Table 3-50. Viable cell count of *L. acidophilus* ATCC 107A during storage period at 4°C.

Storage period(day)	Processing method			
	NH pellet*	H pellet**	NH powder	H powder
0	4.398±0.193***	4.174±0.164	6.946±0.117	6.439±0.077
3	4.874±0.059	3.527±0.144	6.717±0.328	6.597±0.085
6	4.551±0.057	4.089±0.116	7.040±0.018	6.568±0.071
9	4.500±0.133	3.956±0.226	6.993±0.102	6.402±0.094
12	4.475±0.053	3.845±0.054	6.878±0.045	6.491±0.047
15	3.927±0.070	3.936±0.124	5.790±0.091	6.317±0.032
18	3.906±0.029	4.121±0.062	5.869±0.059	6.091±0.039
21	4.239±0.097	4.100±0.129	6.161±0.028	6.194±0.014

\*NH : Non Hybridization, \*\*H: Hybridization

\*\*\*Log number of viable cell count

Experiments are repeated four times

Table 3-51. Viable cell count of *L. acidophilus* ATCC 107A during storage period at 25°C.

Storage period(day)	Processing method*			
	NH pellet*	H pellet**	NH powder	H powder
0	4.398±0.193	4.174±0.164	6.946±0.117	6.439±0.077
3	4.411±0.124	3.854±0.248	6.830±0.247	6.731±0.076
6	3.980±0.089	3.396±0.051	6.180±0.091	5.674±0.023
9	3.795±0.169	3.433±0.188	6.057±0.081	5.271±0.040
12	3.805±0.087	3.449±0.127	5.755±0.070	5.159±0.043
15	3.837±0.089	3.386±0.144	6.711±0.076	5.068±0.027
18	3.697±0.052	3.371±0.104	5.635±0.099	4.866±0.093
21	4.184±0.127	3.726±0.156	5.494±0.227	4.761±0.348

\*NH : Non Hybridization, \*\*H: Hybridization

\*\*\*Log number of viable cell count

Experiments are repeated four times

Table 3-52. Viable cell count of *L. acidophilus* ATCC 107A during storage period at 37°C.

Storage period(day)	Processing method*			
	NH pellet*	H pellet**	NH powder	H powder
0	4.398±0.193	4.174±0.164	6.946±0.117	6.439±0.077
3	3.749±0.178	3.369±0.371	4.947±0.052	4.304±0.166
6	3.487±0.361	3.581±0.166	3.530±0.077	3.579±0.137
9	3.250±0.200	4.031±0.121	3.623±0.097	3.645±0.032
12	3.280±0.158	3.550±0.182	3.436±0.113	3.516±0.119
15	3.251±0.144	3.425±0.129	3.808±0.108	3.721±0.283
18	3.040±0.056	3.327±0.189	3.340±0.140	3.416±0.091
21	3.785±0.159	3.930±0.221	3.164±0.033	3.701±0.354

\*NH : Non Hybridization, \*\*H: Hybridization

\*\*\*Log number of viable cell count

Experiments are repeated four times



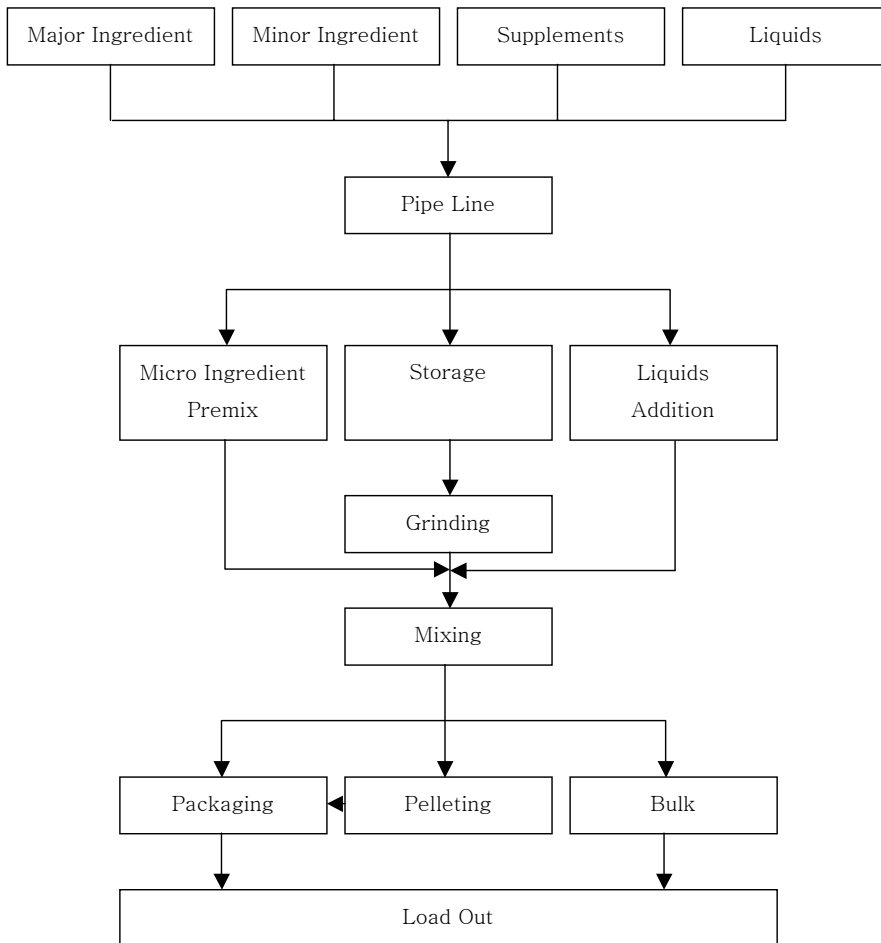


Fig. 31. General process of feed production

#### 다. 분체복합기술의 pilot plant 적용 조건 확립

생균제는 다양한 사료 첨가물의 하나로 볼 수 있고, 그 첨가량 역시 제한적인 것이 사실이다. 양돈사료를 생산하고있는 회사에서 현재 보유하고있는 설비에 분체복합화를 위한 설비를 도입하여 일관성있는 생산체계를 갖추는 문제는 회사의 경영면에서 적지 않은 부담이기도하고 단일 회사가 실제로 필요로 하는 가공생산능력을 상회하는 용량이 될 것이 거의 분명하다. 따라서 대용량의 연속식 설비를 도입하는 것 보다는 최소한의 설비만을 도입하거나 기존 설비의 이용도를 극대화하는 한편, 실제적인 분체복합화 공정의 경우, 위탁가공하거나 또는 구매하여 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 따라서 현 단계에서 검토하여야하는 부분은 복합분체화 처리된 생균제가 배합사료 내에 균일하게 분포되도록 할 수 있는 설비의 응용과 개선일 것이다.

생균제의 분체복합화에 필요한 pilot plant의 적용 조건을 설정하기 위해서는 양돈용 사료생산규모를 일정한 수준으로 고정하여 산출이 가능하므로 가공 및 생산능력이 소규모이지만 비교적 가격이 저렴한 기종을 고려할 수 있을 것이다. 실제로 본 연구에 활용한 회분식(batch type) 분체가공설비인 NHS-O type의 Hybridization system을 기준으로 그 활용가능성을 판정할 수 있을 것이다.

양돈용 사료에 복합분체화한 생균제를 첨가하는 단계는 되도록 최종단계에 수행하는 것이 바람직하다. 그 이유는 되도록 안정된 상태를 오래 유지하도록 하며, 생균제에 가해지는 가공단계를 최소화함으로써 공정중 필연적으로 발생하는 스트레스와 생균제의 활력저하를 방지할 수 있기 때문이다. 따라서 소량의 배합사료에 부착시킨 생균제는 고효율의 혼합기를 통하여 배합사료 내에 일정하게 분산되도록 하여야 한다. 펠렛공정의 경우에도 호퍼(hopper) 내에서의 지나친 교반에 의한층분리 현상이 발생하지 않도록 하는 것이 필요하다.

가축에 급여하는 배합사료는 대부분 입자형태로 이루어져 있으며 당연히 입도조절 목적의 분쇄과정을 거치게 되는데, 실제 배합사료의 절반 이상이 분말형태로 급여되고 있다. 이러한 분말사료의 제조과정, 또는 사료원료의 분쇄과정에서 항상 초점이 되는 것은 가루사료의 입자크기를 어느 범위로 하는 것이 바람직한가 라는 점이다. 입자의 평균입도가 비슷한 범위의 분말사료라 하더라도 분쇄상태, 분쇄에 사용한 설비, 수분 및 지방 함량, 곡물의 종류, 급여 대상 가축의 특성 및 연령 등에 따라 다양한 결과가 나타날 수 있기 때문이다. 따라서 입자의 분포를 되도록 균일화하는게 중요하며 소화이용성이 떨어지는 원료는 작게 분쇄하는 것이 바람직하다. 또한 상대적으로 소화율이 우수한 원료의 경우 다소 크게 분쇄하여 소화속도를 조절함으로써 소화율을 증대시키는

것이 바람직하다고 알려져 있다.

열처리 단계를 거친 성형 가공사료의 급여형태 가운데 펠릿(pellet)형 가공은 사료의 취급 및 관리상 편리를 도모하고 분진발생 방지, 채식시 편식 방지, 사료의 재분리 방지, 밀도증가에 따른 수송 및 노동비 절감, 사료영양적 가치 증진, 기호성 향상, 섭취시 에너지 손실 감소를 위하여 실시한다. 그러나 펠릿 가공은 시설투자비용이 비싼데다 추가적인 가공비용이 소요된다는 단점을 가지고 있고, 원료 사료의 종류 또는 생산된 펠릿의 품질에 따라 사료영양적 가치증진 및 기호성 향상효과의 차이가 발생하게 된다. 사료원 중 옥수수과 같은 곡류보다 보리나 귀리와 같은 섬유소의 함량이 높은 사료의 경우 펠릿과정에 따른 바람직한 효과가 두드러지게 나타나는데 펠릿팅을 통하여 수분과 고압에 의한 전분의 호화가 발생하며 에너지 이용성이 높아지는 개선효과가 있는 것으로 판단된다. 따라서 원료 사료의 특성에 따라 가공적성에 큰 차이가 있음을 고려하여 펠릿공정의 제반 조건을 설정하여야 한다.

#### 라. 균체의 2차 가공을 위한 물성개량

균주의 가공설비로 활용한 Hybridization system(NHS-O, Nara Machinery, Japan)은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 동물실험 및 저장실험 결과를 토대로 과립화과정(agglomeration process)의 개선 또는 2차 가공을 위한 물성개량 방안에 대한 검토가 필요하다고 판단된다. Hybridization system에서 생균제와 피복재로 사용된 분말들은 고속으로 회전하는 blade와 고압의 공기가 만들어내는 난류(turbulent flow)에 의하여 분체복합화 되는데 이때 투입되는 공기부분을 질소가스(nitrogen generator 활용)로 대체하게 될 경우 공기나 산소접촉에 취약한 생균제의 경우 활력의 저하를 크게 줄일 수 있을 것이다. 또한, 기계의 내부는 스테인레스가 아닌 세라믹 재질로 교체하였는데 이는 식품이나 생균제와 같은 미생물을 다루기 때문에 내부의 마모에 의한 금속입자의 혼입을 방지하여 안전성을 제고하고 다른 외부 미생물 등에 의한 오염을 예방하기 위함이었다. Hybridization chamber 내부 온도의 상승에 의한 미생물의 활력저하 방지를 위하여 cooling unit의 냉각 효율의 개선이 필요하였다. 따라서 tap water가 아닌 냉각수가 내부의 jacket을 순환되게 함으로써 최적의 분체복합화 생균제를 만들기 위한 가공조건을 설립하였다.

본 연구를 통하여 복합화된 생균제는 소량의 배합사료에 균일하게 부착시킨 다음 2차 혼합에 의하여 최종적인 분산이 이루어지도록 하였다. 그러나 고농도의 생균제 투여나 생균제 자체만의 투여가 필요한 경우, 2차적인 물성개량이 요구될 것으로 판단된

다. 이러한 용도로의 물성개량은 일반적으로 과립화 및 2차 피복공정을 들 수 있다. 과립화(agglomeration process)는 액체와 접촉할 경우에 신속한 분산성(dispersibility)의 부여와 표면적의 증가에 따른 효능의 신속성을 기대할 경우에 고려할 수 있다. 또한 2차피복의 경우에는 생균제 만으로 투여하거나 장기간의 저장이 불가피할 경우에 고려할 수 있는 것으로서 피복제로는 공기와의 접촉을 차단하고 수분의 흡수가 없거나 낮은 수준이고 되도록 열에 대한 저항성이 있는 것이 바람직하다고 판단된다. 그러나 배합사료에 투입된 생균제가 오랜시간 저장되지 않고 단기간에 소비되는 상황에서는 크게 고려할만한 사항이 되지 못하는 것으로 사료된다.

#### 마. 분쇄 및 입도제어 공정중 수율 및 가공비용의 산출

분쇄 및 입도제어 공정중의 수율은 이론적으로 무한정 계속되는 공정에서는 손실율이 급격하게 감소하게 되나, 실제로는 어느 정도 손실이 발생하고 있다. 분쇄에 의한 손실은 적정입도의 확보를 위하여 미분체는 따로 회수하고 상대적으로 큰 편인 입자는 재분쇄를 통하여 최적 입도에 이르도록 순환시킨다. 미분체의 경우 펠렛공정의 가수처리시 배합사료에 첨가하는 방안과 균체복합화공정에 재활용하는 방법을 고려할 수 있다. 미분체의 발생량은 5% 수준이며 거대 분체의 재분쇄에 의하여 발생하는 2차 손실분을 고려하면 최대 10%대의 손실이 발생하며 수율로 환산하며 90% 정도로 볼 수 있다. 그러나 다양한 재활용의 길이 열려있으므로 실제적인 손실율은 감당할 수 있는 수준으로 평가된다.

본 연구에 활용한 분체복합화를 위한 설비는 연구용으로서 회분식 장치이므로 실제 산업용 연속식 기기를 활용한 가공비용의 산출에는 적합하지 않다고 볼 수 있다. 따라서 소량의 첨가로서 효과를 나타낼 수 있는 생균제의 생산을 위해서는 대용량의 연속식 생산설비를 갖고있는 업체에 위탁하여 가공하는 것이 효율적이라는 판단을 하게 되었다. Hybridization system 의 제작사인 Nara Machinery(Japan)에 위탁 가공비용을 문의한 결과 연속식 기기에 의한 가공비용은 1일 가공용량을 기준으로 할 때, 100kg/100만원(10만엔) 수준이므로 1kg당 1만원 정도로 산출되었다. 생균제의 첨가량을 사료 총 중량의 0.2% 수준으로 설정할 경우, 배합사료 1kg 당 20원(2,000원/ton)의 초기 가공비용이 들게되는 것으로 분석되었다. 물론 생균제와 소량의 배합사료와의 혼합 또는 결합 과정을 통하여 고른 분산을 유도하는 과정에 필요한 비용이나 가공 외적인 비용으로 볼 수 있는 운송비 등은 포함되지 않았으나, 현재 활용되고있는 생균제의 가격을 고려할 때, 감당할 수 있는 수준인 것으로 판단된다.

## 제 3 절 복합생균제의 사료안정성 및 동물능력개선효과 검증

### 제 1 항 실험재료 및 방법

#### 1. 선별된 생균제의 생체실험 및 안정성 평가

##### 가. 설사유발 대장균 등 병원성균에 대한 항균능력 조사

냉동보관된 균주를 MRS broth에서 37°C, 3회 계대배양한 후 배양액을 잘 혼합하여 MRS agar 배지에 spot-inoculate한 다음 37°C에서 4시간 배양하였으며 여기에 미리 배양해 둔 병원성 균주들을 soft TSB(Difco Lab., USA) agar에 접종하여 10ml씩 증충하였다. 이것을 다시 37°C에서 24시간 배양한 후 colony 주변의 억제환 유무를 조사하였다.

##### 나. 자돈에서의 선별 생균제 효과 검증

선별된 생균제에 의한 자돈 사양실험과 영양소 대사, 체조성, 장내 환경 변화 조사

#### 1) 실험사료

대조구사료는 시판 이유자돈 사료를 시기별로 2가지(이유전기, 이유후기) 구입하여 사용하였다(Table 3-53, 3-54). 처리구사료에는 선별된 균주 4가지를 기본사료에 0.2% 수준으로 첨가하였고, 대조구에는 균주 배양에 쓰인 lactose와 탈지분유를 건물함량만큼 대치하여 첨가해 주었다. 균주의 첨가 배합은 1주단위로 새로 배양된 것을 사용하여 균주의 활력을 최대한 유지되도록 고려하였다.

#### 2) 공시동물

가) 이유자돈 - 270두( 5처리 x 6반복 x 9두)

나) 영양소 대사실험용 : 6두

장내환경변화 조사용 : 6두

#### 3) 실험처리

대조구 : 이유자돈사료 2가지 (prestarter / starter)

처리 1 : 대조구 사료 + *Lactobacillus acidophilus* NCFM

처리 2 : 대조구 사료 + *Lactobacillus acidophilus* 393

처리 3 : 대조구 사료 + *Lactobacillus acidophilus* 107A

처리 4 : 대조구 사료 + *Lactobacillus casei* M5

#### 4) 사료급여

ad-libitum(자유급여) - 1주일 단위로 사료섭취량 측정

### 2. 분체복합화된 생균제 첨가물의 안정성과 효능 검증

#### 가. 분체복합화된 생균제의 사료내 안정성과 혼합도 조사

분체 복합화된 생균제를 10℃, 20℃, 30℃의 세 가지 온도에서 저장하면서 일정 간격으로 pepton 수에 serial dilution 후 MRS배지에 접종하였다. 이를 37℃에서 48시간 동안 배양하여 관찰되어지는 colony 수를 측정하여 저장 기간과 온도별로 생균제의 활력이 변화되는 양상과 안정성을 검증하고자 하였다. 또한, 사료가 가루 형태인 경우와 펠렛 형태인 경우 생균제의 활력이 얼마나 유지되는 지를 확인하기 위해 펠렛 공정과 유사한 환경을 조성하여 생균제의 활력 변화를 관찰하였다.

#### 나. 사료내 생균제의 내열성 및 장용성 검증

분체복합화된 생균제를 고온, 고습에 노출시킨 후, MRS배지에서 37℃에서 48시간 동안 배양하여 활력을 조사함으로써 사료의 저장 기간 중 발생할 수 있는 조건 및 변성 후에도 활력의 유지정도를 관찰하였다.

#### 다. 이유 자돈을 이용한 생균제 및 prebiotics의 생체 내 시너지 효과 검증

가능성 있는 생균제 2종(*Lactobacillus acidophilus* 393, *Lactobacillus acidophilus* 107A)을 이용하여 이유자돈을 이용한 3주간의 사양실험을 실시하였다. 사양실험 후 각 처리구 별로 3두씩 도살하여 소화율, 장내 형태학적 변화, 장내 균총 변화등을 조사하고자 하였다.

#### 1) 실험사료

일반적으로 시판되는 이유자돈 사료를 이용하여 실험하였다. 처리구 사료는 대조구 사료에 0.2%의 생균제 또는 prebiotics등을 첨가하여 사용하였다.

#### 2) 실험동물

이유자돈 105두

총 사육두수 = 7처리 x 3반복 X 5두/반복 = 105두

도살두수 = 7처리 x 3반복 x 1두/반복 = 21두

### 3) 실험처리

Positive Control (대조구1) : 이유자돈사료(0.25% 항생제 첨가)

Negative Control (대조구2) : 이유자돈사료(항생제 무첨가)

처리 1 : 대조구2 + prebiotics (Lactulose)

처리 2 : 대조구2 + *Lactobacillus acidophilus* 393

처리 3 : 대조구2 + *Lactobacillus acidophilus* 107A

처리 4 : 처리2 + prebiotics

처리 5 : 처리3 + prebiotics

4) 사료급여 : ad libitum - 1주일 단위로 사료 섭취량 및 체중 측정

5) 실험기간 : 3주

6) 측정항목 : 증체량, 사료 섭취량, 사료효율

### 7) 장내 미생물의 분포

생균제 급여에 따른 장내 미생물 분포 변화를 조사하기 위해 실험 종료시 각 처리구에서 3두씩 도살하여 소장, 대장, 맹장에서 소화물을 채취하였다. 소화물을 peptone수에 dilution 후, MRS배지에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양 후, 유산균수를 측정하였으며, MacConkey 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 대장균 수를 측정하였다.

### 8) 소화율

각 처리구의 3주째 사료 내 0.25%의 chromium oxide를 첨가하여 3일간 급여하고, 분을 일정량 채취하여 건조한 후, homogenizing하여 적량의 샘플에서 chrome의 함량과 건물 함량을 측정하여 각 처리구의 건물 소화율을 비교 분석한다.

### 9) 장내 형태학적 변화 조사

실험 종료시 각 처리구당 3두씩 도살하여 각각의 개체로부터 회장을 일정량 채취하여 이를 formalin solution에 고정시키고, alcohol에 탈수시킨 후 xylene으로 세척한다.

세척된 각각의 조직을 paraffin에 embedding한 후 염색하여 이들의 형태학적 성상을 현미경으로 관찰 분석한다.

### 3. 실용화 단계 제품의 효과 검증 및 경제성 검증

가. 비육돈에서 복합 생균제의 효능에 대한 검증과 도체평가

#### 1) 실험 사료

비육돈의 실험 사료는 기초 사료로 일반적으로 판매되고 있는 비육돈 사료를 사용하였다. 대조구는 2개를 두어 첫 번째 대조구는 항생제를 첨가하였으며, 두 번째 대조구는 항생제를 첨가하지 않았다. 나머지 처리구는 생균제와 분체 복합 생균제를 각각 0.2%씩 첨가하였다.

#### 2) 실험동물 : 비육돈 200두

총 사육두수 = 4처리 x 5반복 X 10두/반복 = 200두

#### 3) 실험처리

Positive Control (대조구1) : 비육돈 사료(0.25% 항생제 첨가)

Negative Control (대조구2) : 비육돈 사료(항생제 무첨가)

처리 1 : 대조구2 + *Lactobacillus acidophilus* 107A

처리 2 : 대조구2 + 분체복합화한 *Lactobacillus acidophilus* 107A

4) 사료급여 : ad libitum - 2주일 단위로 사료 섭취량 및 체중 측정

5) 실험기간 : 6주

6) 측정항목 : 증체량, 사료 섭취량, 사료효율

#### 7) 육질분석

6주간의 실험 종료 후 각 처리구 당 5두, 총 20두의 돼지를 도살한 후, 육질 분석을 실시하였다. 육질 분석은 등심과 목심의 pH 및 4 °C에서 24시간 저장 후 그 감량을 통해 보수력을 측정하는 bag drip loss 및 근육 심부 온도를 측정하였다. 주관적 평가는 사후 24시간이 지난 후 미국협회의 NPPC 판정표에 의거하여 color, firmness, marbling을 측정하였고, panel test를 통해 color, discoloration, off-odor, consumer



acceptance를 실시하였다.

#### 나. 생균제의 경제성 검증

생균제의 원가를 기준으로하여 경제성을 검증하여 보았다. 식육으로 판매되는 출하전까지 일반적으로 섭취하는 사료량을 기준으로 생균제의 급여시 추가되는 비용을 산출하여보았다.

Table 3-53. Composition of prestarter diets (phase 1 : 0 - 7 day)

Ingredient	%
Corn	8.0
Broken rice	24.38
Whey	28.6
Fish meal	4.0
Milk by-product	6.4
Biscuit by-product	4.0
Whey protein	3.5
Soy protein	13.0
Dried porcine soluble	2.0
Soy oil	2.7
Sweetner	0.02
Flavorings	0.15
Acidifier	0.3
Lecithin	0.3
Limestone	0.3
DCP	0.1
Salt	0.25
Premix	1.2
Choline	0.5
Antibiotics	0.3
<b>Total</b>	<b>100.0</b>
<b>Calculated values</b>	
DE, Kcal/kg	3720.0
Crude protein	20.0
Crude fiber	2.0
Crude ash	6.0
Ca	0.7
P	0.7
Available Phosphorous	0.5
Lysine	1.45
Available lysine	1.3

Table 3-54. Composition of starter diets (phase 2 : 8 - 21 day)

Ingredient	%
Corn	16.87
Broken rice	17.15
Whey	18.0
Soybean meal	8.0
Fish meal	4.5
Wheat middlings	2.5
Milk by-product	11.0
Biscuit by-product	4.0
Whey protein	2.0
Soy protein	7.21
Dried porcine soluble	2.0
Soy oil	3.0
Sweetner	0.02
Flavorings	0.1
Acidifier	0.3
Lecithin	0.25
Limestone	0.2
DCP	0.7
Salt	0.25
Premix	1.2
Choline	0.45
Antibiotics	0.3
Total	100.0
<b>Calculated values</b>	
DE, Kcal/kg	3600.0
Crude protein	19.0
Crude fiber	2.5
Crude ash	6.0
Ca	0.7
P	0.7
Available Phosphorous	0.5
Lysine	1.3
Available lysine	1.1

Table 3-55. Composition of diets for weaned pigs

Ingredient	%
Corn	38.60
SBM	30.76
Wheat	20.00
Tallow	2.50
Wheat hull	6.22
Dicalcium P.	1.00
Limestone	0.32
Vitamin Mix <sup>1</sup>	0.20
Mineral Mix <sup>2</sup>	0.20
Salt	0.20
Total	100.0
<b>Calculated values</b>	
ME, Kcal/kg	3362
Crude protein, %	20.35
Ca, %	0.74
P, %	0.69
Lysine, %	1.12
Met+Cys, %	0.69

<sup>1</sup> vitamin mixtures was formulated to meet or exceed the NRC(1998) requirements

<sup>2</sup> mineral mixtures was formulated to meet or exceed the NRC(1998) requirements

Table 3-56. Composition of diet for growing-finishing pig

Ingredient	%
Corn	46.38
SBM	26.12
Wheat	17.00
Tallow	2.50
Wheat hull	6.00
Dicalcium P.	0.70
Limestone	0.70
Vitamin Mix <sup>1</sup>	0.20
Mineral Mix <sup>2</sup>	0.20
Salt	0.20
Total	100.0
<b>Calculated values</b>	
ME, Kcal/kg	3362
Crude protein, %	18.68
Ca, %	0.66
P, %	0.61
Lysine, %	0.99
Met+Cys, %	0.65

<sup>1</sup> vitamin mixtures was formulated to meet or exceed the NRC(1998) requirements

<sup>2</sup> mineral mixtures was formulated to meet or exceed the NRC(1998) requirements

## 제 2 항 실험 결과

### 1. 선별된 생균제의 생체실험 및 안정성 평가

#### 가. 자돈의 설사증 원인

##### 1) 자돈의 설사

자돈의 설사는 생후 2-3주령 이유시 이유 첫주동안 민감하게 일어나며, 이유시 일어나는 20% 폐사의 전체원인 중 설사에 의한 것이 41% 정도를 차지한다. 이러한 설사의 주요 감염 병원균은 enteropathogenic E.coli strain이 주요인자(22~88%)로 알려져 있으며, 자돈의 이유후 소화 생리적인 shock와 자돈이 밀사된 경우 social stress에 의해 그 감염 민감도는 훨씬 커지게 된다. 설사와 관련된 일반적인 병원균에 기인한 발병률은 enterotoxic E.coli[EEC]가 26%, clostridial enteritis 18%, coccidiosis 14%, rotavirus 8% 정도인 것으로 분석되고 있다.

##### 2) 자돈의 장내 방어 기작

출생후 자돈의 장내에는 비병원성의 미생물이 급속히 존재하게 되며 이들은 병원균과 장내 정착과 영양물질의 확보를 위해 경쟁함으로써 병원성 미생물의 장내 정착을 방해하게 된다. 또한, 초유와 정상유에서 공급되어지는 면역물질은 감염인자의 작용을 저해하게 되며 분만 후 5에서 10일 이내에 IgA와 IgM이 장내에서 분비되어 자돈의 장을 보호하게 된다. 그리고, 감염이 될 경우 장내에 많은 양의 유동액이 유입되어 병원성 세균과 그 독소를 희석시키는 효과를 나타낸다.

##### 3) 자돈 설사의 병원성 기작과 임상적인 증상

자돈 설사에서 가장 일반적이고 중요한 설사 기작은 아래와 같다.

- 가) 장 내강(lumen)으로의 유동액의 과다한 분비를 야기하는 장상피세포에 대한 독성
- 나) 장 상피세포의 직접적인 파괴와 손실
- 다) 장 상피와 그 하부조직의 부분적인 괴사

장내 독소에 의한 장 상피세포의 변질은 세포내 전해질과 유동액의 불균형을 초래하며 장이 팽창되고 유동액으로 가득 찬 병변을 나타내게 된다. 또한, 장 상피세포의 손실로 인한 섭취물질의 장내 흡수 감소로 인해 소화되지 않은 물질의 장내 증가를 초래하며 특히 모유로부터 급여된 유당이 세균에 의해 젖산으로 전환되어 회장 말단과 대

장에서 pH가 감소된다. 젖산은 장내로의 유동액의 유입을 유발하는데 이를 통해 자돈이 설사를 일으킬 확률이 매우 높아진다. 장 상피조직의 괴사 또한 분만 초기에 자돈의 묽은 변을 야기하게 된다.

#### 4) 자돈 설사유발 병원균 종류와 원인 및 증상

##### 가) Colibacillosis

###### (1) 원인

Colibacillosis는 자돈 설사의 가장 일반적인 원인이다. 이는 E. Coli 종류에 의해 유발되는데 이 세균은 그들의 pili를 이용해 장 점막 상피에 부착되고 독성 물질을 분비하여 설사, 탈수 그리고 높은 치사율을 나타내게 된다.

###### (2) 증상

분만 후 4일령까지 높은 발병율과 함께 12시간 이내에 높은 치사율을 보인다. 설사에 이은 탈수, 수척, 그리고, 거친 털을 보이게 되며, 이 병에 걸린 자돈의 항문 주위는 젖어있고, 노란색 변을 보게 된다.

##### 나) Transmissible Gastroenteritis(TGE)

###### (1) 원인

coronavirus에 의해 발병한다. 이 병은 자돈에서 치사율이 높고, 효과적인 치료법이 없으며, 돈군내 바이러스의 유입이 찌르레기과의 조류에 의해 일어나므로 예방이 어렵고, 상업적인 백신이 그다지 효과적이지 않다는 점에서 무서운 질병이다.

###### (2) 증상

급성 TGE는 일반적으로 육성, 비육돈에서 먼저 관찰되어지는데 이들은 구토나 설사 정도의 가벼운 증상만을 보인다. 그러나, 분만사로 전염되었을 때, 자돈은 24에서 48시간 이내에 발병하여 거친 털을 보이는 초기 증상을 시작으로 오한, 탈수, 구토, 설사, 수유 거부, 극심한 갈증 등의 증상을 보이게 된다. 이 병에 걸린 신생자돈은 물을 마시려는 경향이 강하고 허약하다. 또한 우유가 선듯한 냄새를 가진 심한 설사를 하게 된다. 이유자돈 또한 발병율이 100%이고, 포유자돈과 같은 증상을 보인다.

##### 다) Rotavirus Diarrhea

###### (1) 원인

Rotavirus는 돼지 설사의 주요한 원인이다. 돼지 rotavirus는 곳곳에 산재해 있으며, 돈군의 감염율은 거의 100%이다.

###### (2)증상

Rotavirus 감염의 잠복기는 2에서 4일이며 주로 2에서 6주령의 자돈에서 설사를 일

으킨다. 감염된 자돈은 설사증상을 보이기 몇 시간 전에 식욕감퇴와 활동저하의 증상을 보이게 된다. 구토도 관찰되어 지지만 TGE의 경우 만큼 일반적인 증상은 아니다. 설사의 경우 크립과 같은 설사로 시작하여 급속히 녹색의 물과 같은 설사로 바뀌는데 설사 증상은 열흘 간 계속된다.

#### 라) Clostridium Perfringens Enteritis

##### (1) 원인

이는 *C. perfringens* 세균의 C와 A타입에 의해 유발된다. 타입 A 감염이 신생자돈에 있어서 발병빈도가 높다.

##### (2) 증상

이 질병은 일반적으로 생후 1주 동안 발병빈도가 높다. 설사는 보통 물과 같은 노란색 변으로부터 시작하여 혈변을 동반 할 수도 있는데 몇 시간동안의 혈변이후 자돈은 폐사한다.

#### 마) Coccidiosis

##### (1) 원인

*I.suis*가 신생자돈에게 이 질병을 일으킨다. 이 질병은 계속되는 분만과 비 위생적인 사육 환경에 의해 문제 될 수 있는데, 이 세균은 장내 용모 세포의 퇴축을 유발한다.

##### (2) 증상

5일령에서 15일령 사이에 발병율이 높으며, 종종 여위거나 탈수의 증상을 보인다. 설사는 노란색에서 어두운 녹색 까지 다양하며 혈변은 없다. 또한 변의 pH는 영양소 흡수의 저하로 인해 산성을 나타낸다.

#### 나. 설사 유발 대장균 등 병원성균에 대한 항균능력 조사

##### 제 1세부과제 참조

#### 다. 자돈에서의 선별 생균제 효과 검증

##### 1) 증체량

각 실험구의 증체량은 유의적인 차이를 나타는 않았다. prestarter를 급여한 0~7일 사이의 일당증체량을 살펴보면 생균제를 급여한 처리구에서 대조구에 비하여 높은 일당 증체량을 나타내는 경향이 있었다(Table 5-57). 특히 *Lactobacillus acidophilus* 393 과 *Lactobacillus acidophilus* 107A를 급여한 처리구 2와 3은 전기간에 걸쳐 대조구보다 높은 증체량을 나타내는 경향이 있었다.



## 2) 사료섭취량

사료섭취량은 각 실험구별로 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 하지만, 생균제의 첨가가 사료 섭취량의 떨어뜨리는 경향을 보였다(Table 5-57).

## 3) 사료효율 (Gain/Feed)

사료효율에서는 전 사양기간동안 실험구별로 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, 생균제 처리구 1, 2, 3에서 높은 경향을 보였다. 특히 1주 결과를 비교해 보면 대조구의 사료효율에 비해 처리구 1, 2, 3에서 각각 0.77, 0.76, 0.74로서 높은 결과를 보였으며, 유의적인 차이를 나타냈다 ( $P < 0.1$ ). 따라서 생균제 *Lactobacillus acidophilus* 43121, *Lactobacillus acidophilus* 393, *Lactobacillus acidophilus* 107A는 효과가 있는 균주인 것으로 평가할 수 있을 것이다. 또한 생균제 *Lactobacillus acidophilus* 393, *Lactobacillus acidophilus* 107A의 경우에는 사료효율 뿐만 아니라 증체량에 있어서도 다른 실험구에 비해 높은 것으로 나타나 실제 현장적용시에도 효능과 경제성을 갖고 있는 것으로 평가할 수 있다(Table 3-57).

## 4) 설사빈도

설사빈도는 각 실험구별로 매일 사료급여시에 측정하였다. 대조구의 경우 반복당 1일 평균 1두(11.1%) 이상이 설사를 하는 것으로 평가되었으며, 처리구의 경우에는 전체적으로 대조구보다 약간 묽은 변을 배설하였으나, 설사는 대조구에 비해 적게 나타났다. 생균제 처리별로 차이가 있었으나 전체적으로 반복당 1일 평균 1두(11.1%) 이하인 것으로 나타났다. 이유 자돈 사료내 생균제의 급여는 자돈의 장내 ecosystem에 영향을 주어 설사 빈도를 줄여주는 것으로 사료된다(Table 3-57).

## 5) 단백질 소화율 예비 실험

이유자돈의 단백질 소화율을 측정하기 위하여, 3일간 적응사료 급여후, 4일간 본사료를 급여하였다. 시험기간동안 사료는 제한급이 하여 전부 섭취토록 하였으면, 사료내  $Cr_2O_3$ 를 첨가하여 단백질 소화율을 측정하였다(Table 3-58). 단백질 소화율에 있어 일반적으로 나타나고 있는 소화율 범위(80~95%)에 속하여 방법상의 잘못된 점은 없는 것으로 확인 되었다.

## 6) 장내환경변화 조사 예비 실험

단백질 소화율 실험후의 개체를 도살하여 장내 분을 수거하여 장내 서식하고 있는

Coliform과 Lactic acid bacteria의 수를 확인하여 보았다. Coliform과 Lactic acid bacteria의 경우 일반적으로 알려져 있는 균총의 수에 근접한 결과가 나왔다. 또한, 장의 형태학적 변화를 측정하기 위하여 paraffin을 이용한 histology를 실시하여 crypt depth와 villi height를 측정하였다(Table 3-58). crypt depth와 villi height의 경우 각 sample 내에서도 다른 크기를 보여 차기 연구 수행시 일정부분을 샘플링 하여야 할 것으로 생각된다.

Table 3-57. Body weight gain, feed intake, feed efficiency and diarrhea frequency of early weaned pig fed probiotics(direct-fed microbial)

Treatment	body weight gain	feed intake	Gain/Feed	diarrhea frequency <sup>1</sup>
	- kg / day -	- kg / day -		- % -
0 - 7 day				
Control	0.123±0.120	0.194±0.041	0.63±0.35 <sup>b</sup>	12.2
T1	0.114±0.080	0.149±0.038	0.77±0.19 <sup>a</sup>	7.4
T2	0.137±0.095	0.180±0.042	0.76±0.18 <sup>a</sup>	5.5
T3	0.129±0.108	0.173±0.044	0.74±0.20 <sup>a</sup>	6.2
T4	0.136±0.102	0.209±0.035	0.65±0.32 <sup>ab</sup>	5.5
8 - 21 day				
Control	0.361±0.092	0.455±0.075	0.79±0.06	10.8
T1	0.350±0.085	0.429±0.068	0.82±0.05	5.2
T2	0.374±0.102	0.450±0.082	0.83±0.06	4.5
T3	0.366±0.087	0.447±0.080	0.82±0.04	5.8
T4	0.369±0.110	0.461±0.094	0.80±0.06	5.5
Total (0 - 21 day)				
Control	0.282±0.085	0.375±0.074	0.75±0.05	11.5
T1	0.271±0.086	0.339±0.068	0.80±0.06	6.3
T2	0.295±0.095	0.365±0.072	0.81±0.07	5.0
T3	0.287±0.080	0.360±0.054	0.80±0.05	6.0
T4	0.291±0.095	0.385±0.064	0.76±0.06	5.5

<sup>1</sup> diarrhea frequency = % = ( diarrhea pig no. / total pig no. of treatment × 100 ) / day

<sup>ab</sup> Mean values in the same column with different superscripts are significantly different as determined by one way ANOVA and Duncan's multiple range test (P<0.1).

Table 3-58. Microflora, nitrogen digestibility and morphology of intestine of weaned pigs.

NO	Item	Microflora(CFU/g)		Nitrogen Digestibility(%)	Intestinal Morphology( $\mu\text{m}$ )	
		Coliform	LAB		Crypt	Villi
1		$1.01 \times 10^4$	$9.89 \times 10^9$	91.50	87.50	185.32
2		$1.10 \times 10^4$	$9.58 \times 10^9$	91.48	85.40	187.20
3		$1.07 \times 10^4$	$6.54 \times 10^9$	92.37	98.52	165.20
4		$1.02 \times 10^4$	$8.25 \times 10^9$	90.29	101.20	157.82
5		$1.06 \times 10^4$	$7.52 \times 10^9$	89.99	95.82	162.85
6		$7.85 \times 10^3$	$8.52 \times 10^9$	90.80	101.71	177.44
Average		$1.04 \times 10^4$	$8.42 \times 10^9$	91.07	95.02	172.63

## 2. 분체복합화된 생균제 첨가물의 안정성과 효능 검증

### 가. 분체복합화된 생균제의 사료내 안정성과 혼합도 조사

10℃의 저장조건에서 균주들의 안정성은 저장 28일에 평가했을 때 *lactobacillus acidophilus* 107A, *lactobacillus acidophilus* 393의 순서로 초기 균수에 비해 상대적인 균수의 감소가 큰 것으로 나타났다. 20℃에서는 같은 조건에서 *lactobacillus acidophilus* 393, *lactobacillus acidophilus* 107A의 순서로 저장중 안정성이 떨어지는 것으로 나타났으며, 30℃에서는 *lactobacillus acidophilus* 393, *lactobacillus acidophilus* 107A의 순서로 저장중 안정성이 떨어지는 것으로 나타났다. 결과적으로 볼 때 특히 온도의 증가에 따라 저장일과 관련된 균주의 안정성이 크게 좌우되는 것으로 나타났다. 즉, 10℃에서 20℃로 저장온도를 증가시킨 경우 10℃, 28일 저장 균주의 활성은 20℃에서는 8일 저장시의 활력과 유사하였으며, 20℃에 비해 30℃로 저장온도를 증가시킬 경우에도 이와 비슷하게 20℃의 28일 저장후 균수가 30℃의 8일 저장후 균수와 유사한 것으로 나타났다. 따라서 사료에 섞은 상태에서의 실험결과와는 차이가 있을 것으로 생각되나, 20℃ 이상의 온도에서는 4일째부터 균주의 활력이 감소하기 시작하여 8일 이후에는 균주 안정성이 전체적으로 급감하는 것으로 결론지을 수 있다. 특히 30℃ 조건에서는 4일째의 균주 활력 감소가 20℃ 조건의 8일째 균주활력과 거의 비슷한 것으로 나타나 온도에 민감한 것을 알 수 있었다. 그러나 10℃ 조건에서는 4일까지는 초기의 균주활력이 유지되는 것을 관찰 할 수 있었고 비교적 균주 활력의 감소 비율이 낮은 것으로 나타났다(Table 3-59)

### 나. 사료내 생균제의 내열성 및 장용성 검증

사료 공정 중 발생하는 열에 대한 생균제의 내성을 조사하는 실험에서 *lactobacillus acidophilus* 393의 경우 온도를 60℃로 상승 시켰을 때, 기존 활력의 87%를 유지했으며, *lactobacillus acidophilus* 107A의 경우 69%의 활력을 유지하는 것으로 판명되었다. 또한, 90℃의 고온에서는 *lactobacillus acidophilus* 393의 경우 79%의 활력을 유지한 반면, *lactobacillus acidophilus* 107A는 56%의 활력을 보였다(Table 2).

Table 3-59. Comparison of stability of probiotics according to storage condition (temperature) and storage period (Log cfu/g)

Temperature	10℃		20℃		30℃	
균주	107A	393	107A	393	107A	393
저장기간						
d0	7.99	10.02	7.99	10.02	7.99	10.02
d4	6.48	9.76	-	8.79	-	8.29
d8	5.14	8.96	6.44	8.52	4.81	7.22
d16	5.88	9.29	5.11	8.15	4.54	6.99
d28	6.19	8.85	4.65	8.38	2.74	6.33

Table 3-60. Changes in activity during processing (Log cfu/g)

온도(℃)				
균주	0	60	75	90
393	13.86	12.10	11.43	10.94
107A	13.25	9.15	9.92	7.46

다. 이유 자돈 에서 생균제 및 prebiotics의 생체내 시너지 효과 검증

### 1) 증체량

1주째의 성적을 살펴보면 항생제를 첨가한 positive control과 negative control사이에 증체량에 있어 차이가 없었다. *lactobacillus acidophilus* 107A를 급여한 처리구는 다른 처리구에 비하여 많은 체중의 증가를 보였다. 2주째의 증체량에서는 항생제를 첨가한 Positive control이 항생제를 제거한 Negative control에 비하여 높은 일당 증체량을 나타내었다. *lactobacillus acidophilus* 107A를 첨가한 처리3을 제외한 나머지 처리구에서는 항생제를 첨가하지 않은 Negative control과 비슷한 성장을 보였다. 하지만, *lactobacillus acidophilus* 107A를 첨가한 처리3은 다른 처리구 보다 높은 성장을 보였고, 항생제를 첨가한 positive control 보다 높은 성장을 보이기도 했다. 3주째의 성장을 살펴보면 1,2주째의 결과와는 다른 양상을 보였다. 항생제를 첨가한 positive control이 항생제를 첨가하지 않은 negative control에 비하여 높은 성장을 보였다. 하지만, 2주째에 가장 높은 성장을 보였던 *lactobacillus acidophilus* 107A의 성장은 positive control에 비하여 감소한 반면, prebiotics와 *lactobacillus acidophilus* 393을 같이 첨가한 처리4의 성장이 positive control보다 높은 양상을 보였다. 실험 전기간의 성장을 살펴보면 항생제 첨가구(positive control)와 무첨가구(negative control)간에 통계적 차이는 없었으나 항생제 첨가가 높은 성장을 나타내었다. Prebiotics와 *lactobacillus acidophilus* 107A를 함께 급여한 처리5와 prebiotics 만 급여한 처리1간의 성장에는 차이가 없었던 반면, *lactobacillus acidophilus* 107A(처리 3)와 *lactobacillus acidophilus* 393과 prebiotics를 함께 급여시(처리4) 항생제의 첨가와 비슷한 높은 성장을 나타내었다 (Table 3-61).

### 2) 사료 섭취량

1주간의 사료섭취량은 전 처리구에 걸쳐 고른 양상을 나타내었다. 하지만 항생제를 첨가하지 않은 negative control은 다른 처리구보다 비교적 많은 사료를 섭취하였다. 2주째에는 사료 섭취량의 경우 유의차는 발견되지 않았으나, prebiotic와 *lactobacillus acidophilus* 107A, prebiotics를 급여한 처리구에서 사료 섭취량이 낮은 경향을 보였다. 3주째에는 *lactobacillus acidophilus* 393을 급여한 처리구만이 낮은 경향을 보였고 다른 처리구들은 비슷한 섭취량을 보였다. 하지만, 항생제 첨가구인 positive control은 다른 처리구에 비하여 약간 높은 섭취량을 나타내었다. 실험기간인 3주 동안의 사료섭취량에

서는 *lactobacillus acidophilus* 393와 prebiotics를 함께 첨가한 처리구에서 가장 많은 사료를 섭취하였고, 그 다음은 positive control, negative control, *lactobacillus acidophilus* 107A첨가구였다(Table 3-61).

### 3) 사료 효율

1주차에는 107A 처리구의 경우 다른 처리구에 비하여 높은 사료효율을 나타내었다. 항생제 미첨가구는 가장 높은 증체량을 나타내었지만, 사료 효율에서는 가장 낮게 나타났다. 2주째에는 1주에 비하여 전체적으로 사료 효율이 감소하였는데 이는 사료의 변화에 의한 현상으로 사료된다. *lactobacillus acidophilus* 107A를 급여한 처리구에서 다른 처리구보다 높은 사료효율을 나타냈으며 그 다음으로 positive control이 뒤를 따랐다. 3주째에는 모든 처리구에서 항생제 첨가구에 비하여 낮은 사료효율을 나타냈다. 실험 전기간의 성적에서는 *lactobacillus acidophilus* 107A를 급여한 처리구에서 다른 처리구보다 높은 사료효율을 나타냈다. 특히 항생제 첨가구인 positive control 보다 높은 사료효율을 보여 항생제 대체의 가능성을 보였다(Table 3-61).

### 4) 장내 미생물의 분포

실험 종료시 처리구당 3두씩 도살하여 채취한 장내용물에서 조사한 균총은 Table 3-62와 같다. 사료내 항생제를 첨가한 positive control과 미첨가한 negative control간의 회장에서의 대장균의 분포에서는 차이가 없었으나 *lactobacillus acidophilus* 107A와 393을 급여한 처리구에서는 약간 높은 분포를 나타내었다. 대장에서의 분포에서는 항생제 첨가구와 prebiotics 첨가구가 유의적으로 낮은 분포를 보인 반면 *lactobacillus acidophilus* 107A를 급여한 처리구는 유의적으로 높은 경향을 나타내었다. 맹장에서의 대장균의 분포는 다른 처리구에 비하여 *lactobacillus acidophilus* 107A와 *lactobacillus acidophilus* 393과 prebiotics를 함께 급여한 처리구에서 높은 분포를 나타내었다. 회장내 Lactic acid bacteria의 분포에서는 사료내 lactic acid bacteria를 첨가한 처리구 2,3,4에서 다른 처리구에 비하여 높은 분포를 나타냈으나, *lactobacillus acidophilus* 107A와 Prebiotics를 함께 급여한 처리구 5에서는 항생제 미첨가구와 비슷한 분포를 나타내었다. 특히 *lactobacillus acidophilus* 107A를 첨가한 처리구는 대장에서도 높은 lactic acid bacteria의 분포를 보였고, 이러한 결과는 맹장에서도 나타났다.

### 5) 건물 및 질소 소화율

도살된 개체에서 수거한 소화물을 장내 위치별로 수집하여 각 처리구의 회장 소화율



과 외관상 소화율을 측정하였다. 먼저, 외관상 소화율에서 건물의 소화율은 *lactobacillus acidophilus* 107A와 393처리구가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의차는 없었다. 또한 질소소화율에서도 비슷한 양상을 나타내었다. 회장소화율에서는 항생제 첨가구와 무첨가구에 비하여 처리 1,2,3,4는 높은 건물소화율은 보였고, 질소소화율에서도 *lactobacillus acidophilus* 107A와 *lactobacillus acidophilus* 393을 첨가한 처리구가 높은 소화율을 나타냈다(Table 3-63).

#### 6) 장내 형태학적 변화조사

회장의 형태학적 특성은 Table 3-64와 같다. *lactobacillus acidophilus* 107A와 393 처리구가 다른 처리구에 비하여 높은 villus height를 나타냈다. 특히 두 처리구는 항생제 첨가구보다 수치상으로 높은 villus height를 나타냈다. 하지만 *lactobacillus acidophilus* 393고 prebiotics를 함께 급여한 처리구 4의 경우 항생제를 첨가하지 않은 negative control보다 낮은 villus height를 나타냈다. crypt depth에서도 *lactobacillus acidophilus* 107A와 *lactobacillus acidophilus* 393을 첨가한 처리구 2,3에서 다른 처리구 보다 깊게 나타났다.

Table 3-61. Body weight gain, feed intake and feed efficiency of weaned pig from week 1 to week 3

Week	Treatment	Weight Gain(kg/d)	Feed Intake(kg/d)	Feed Efficiency
1	Positive Control	0.293±0.069	0.402±0.069	0.726±0.067
	Negative Control	0.304±0.037	0.436±0.009	0.697±0.071
	처리1 (Prebiotics)	0.279±0.024	0.396±0.027	0.703±0.050
	처리2 (393)	0.291±0.119	0.402±0.083	0.717±0.196
	처리3 (107A)	0.364±0.036	0.420±0.070	0.875±0.069
	처리4 (393+Pre)	0.318±0.055	0.426±0.051	0.743±0.057
	처리5 (107A+Pre)	0.287±0.057	0.403±0.042	0.711±0.107
2	Positive Control	0.456±0.045	0.680±0.149	0.688±0.131
	Negative Control	0.409±0.037	0.631±0.021	0.649±0.074
	처리1 (Prebiotics)	0.368±0.021	0.591±0.035	0.624±0.044
	처리2 (393)	0.409±0.082	0.653±0.109	0.623±0.026
	처리3 (107A)	0.484±0.103	0.659±0.113	0.732±0.059
	처리4 (393+Pre)	0.411±0.049	0.660±0.028	0.621±0.054
	처리5 (107A+Pre)	0.371±0.119	0.565±0.154	0.652±0.114
3	Positive Control	0.520±0.025 <sup>a</sup>	0.863±0.128	0.611±0.089
	Negative Control	0.446±0.020 <sup>ab</sup>	0.801±0.055	0.559±0.061
	처리1 (Prebiotics)	0.460±0.090 <sup>ab</sup>	0.842±0.195	0.549±0.022
	처리2 (393)	0.396±0.098 <sup>b</sup>	0.682±0.068	0.574±0.088
	처리3 (107A)	0.443±0.034 <sup>ab</sup>	0.786±0.077	0.568±0.086
	처리4 (393+Pre)	0.539±0.013 <sup>a</sup>	0.892±0.068	0.606±0.034
	처리5 (107A+Pre)	0.455±0.048 <sup>ab</sup>	0.767±0.070	0.593±0.041
Total	Positive Control	0.423±0.046 <sup>ab</sup>	0.648±0.084	0.667±0.049
	Negative Control	0.386±0.031 <sup>b</sup>	0.622±0.028	0.634±0.058
	처리1 (Prebiotics)	0.369±0.045 <sup>b</sup>	0.609±0.085	0.624±0.034
	처리2 (393)	0.365±0.099 <sup>b</sup>	0.579±0.086	0.643±0.042
	처리3 (107A)	0.430±0.057 <sup>a</sup>	0.621±0.086	0.721±0.082
	처리4 (393+Pre)	0.422±0.039 <sup>ab</sup>	0.659±0.049	0.657±0.048
	처리5 (107A+Pre)	0.371±0.074 <sup>b</sup>	0.578±0.088	0.654±0.048

ab Mean values in the same column with different superscripts are significantly different as determined by one way ANOVA and Duncan's multiple range test (P<0.1).

Table 3-62. Microbiology along the intestinal tract of piglets on d21 postweaning  
(log cfu/g)

Treatment	Coliform			Lactic acid bacteria		
	ileum	colon	cecum	ileum	colon	cecum
positive control	4.38±1.02	5.10±0.17 <sup>b</sup>	5.57±0.38	8.74±0.97	9.35±0.57	9.30±0.04
negative control	4.33±0.94	5.83±0.26 <sup>ab</sup>	5.03±0.10	8.82±0.24	9.16±0.54	8.71±0.23
처리1 (prebiotics)	4.76±1.00	5.27±0.65 <sup>b</sup>	4.95±0.80	8.28±0.80	10.07±0.41	9.15±0.17
처리2 (393)	5.72±1.04	6.05±0.25 <sup>ab</sup>	5.74±0.93	9.13±0.43	10.01±0.55	9.33±0.07
처리3 (107A)	5.63±1.66	7.55±1.09 <sup>a</sup>	6.33±1.46	9.26±0.52	9.56±0.44	9.26±0.52
처리4 (393+ Pre)	5.80±0.39	6.57±1.05 <sup>ab</sup>	6.45±2.43	9.36±0.60	9.59±0.37	9.41±0.08
처리5 (107A+ Pre)	4.22±1.19	6.04±1.29 <sup>ab</sup>	5.35±1.17	8.86±0.59	9.62±0.22	9.03±0.50

ab Mean values in the same column with different superscripts are significantly different as determined by one way ANOVA and Duncan's multiple range test (P<0.1).

Table 3-63. Apparent digestibility and ileal digestibility of pigs fed experimental diets.

Treatment	Apparent digestibility		ileal digestibility	
	Dry matter	Nitrogen	Dry matter	Nitrogen
Positive Control	78.95±1.24	82.20±2.38	85.32±12.5	89.40±1.57
Negative Control	76.59±2.38	81.90±1.89	83.20±2.51	87.50±2.51
처리1 (Prebiotics)	78.21±1.95	81.99±1.82	86.50±2.51	88.42±2.99
처리2 (393)	81.25±2.84	83.50±2.54	87.30±2.14	91.20±2.42
처리3 (107A)	80.20±1.57	84.38±2.13	86.25±2.53	90.38±1.52
처리4 (393+Pre)	77.85±1.86	81.25±2.58	86.22±2.69	89.30±1.58
처리5 (107A+Pre)	78.84±1.92	80.54±1.38	85.92±1.98	88.20±1.55

Table 3-64. Villus height( $\mu\text{m}$ ) and crypt depth( $\mu\text{m}$ ) in ileum of pigs during experimental periods

Treatment	Villus Height	Crypt Depth	V:C ratio, $\mu\text{m}/\mu\text{m}$
Positive control	185.81 $\pm$ 14.32	87.77 $\pm$ 18.36	2.17 $\pm$ 0.35
Negative control	177.73 $\pm$ 29.82	89.29 $\pm$ 9.40	1.98 $\pm$ 0.14
처리1 (Prebiotics)	157.17 $\pm$ 5.17	96.06 $\pm$ 6.91	1.64 $\pm$ 0.17
처리2 (393)	190.12 $\pm$ 27.38	103.03 $\pm$ 13.84	1.85 $\pm$ 0.20
처리3 (107A)	191.47 $\pm$ 22.07	101.17 $\pm$ 17.16	1.92 $\pm$ 0.27
처리4 (393+ Pre)	159.21 $\pm$ 27.08	88.82 $\pm$ 11.18	1.79 $\pm$ 0.12
처리5 (107A+ Pre)	185.65 $\pm$ 21.01	93.59 $\pm$ 15.35	2.01 $\pm$ 0.26

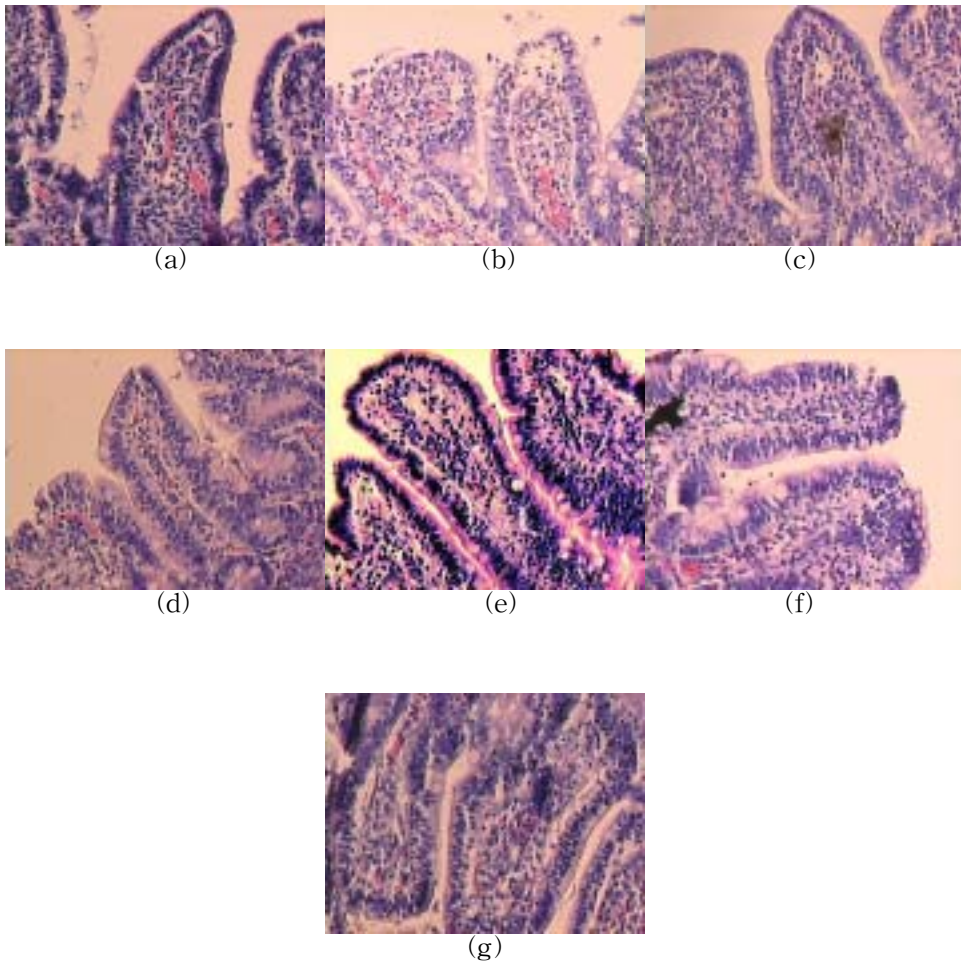


Figure 3.32. Representative picture of villi of ileum(a: positive control, b: negative control, c: prebiotics, d: *lactobacillus acidophilus* 393, e: *lactobacillus acidophilus* 107A, f: *lactobacillus acidophilus* 393 + prebiotics, g: *lactobacillus acidophilus* 107A + prebiotics)

## 마. 비육돈에서 복합생균제의 효능에 대한 검증

### 1) 사양 실험

먼저 첫 2주간의 성적을 살펴보면 항생제 첨가구가 비 첨가구에 비하여 높은 일당 증체량을 나타내었다. 또한 생균제 첨가구의 경우 항생제 첨가구인 대조구1 보다 높은 일당증체량을 기록하였고, 복합생균제의 경우는 가장 뛰어난 일당 증체량을 나타내었다. 일당 증체량에서는 생균제와 복합 생균제 첨가구가 높은 사료섭취량을 나타내었다. 사료효율은 전 처리에 걸쳐 비슷한 양상을 나타내었다. 3~4주간의 성적에서는 항생제 처리구가 1~2주째와 마찬가지로 항생제 미 첨가구에 비하여 높은 일당증체량을 나타내었다. 또한 생균제 첨가구보다도 높은 일당증체량을 나타냈었다. 하지만, 복합생균제 처리구와는 비슷한 양상을 나타내었다. 항생제 미 첨가구와 생균제 첨가구의 사료 섭취량은 다른 두 처리구에 비하여 낮은 경향이 3~4주간에 나타났다. 사료 효율에서는 이와는 반대의 양상으로 높게 나타났다. 5~6주간의 성적은 항생제 미첨가구와 첨가구간의 큰 차이는 없이 비슷한 수치의 일당증체량이 나타났다. 이는 항생제 미첨가구의 보상성장으로 사료된다. 또한, 생균제와 복합생균제 첨가구의 경우 항생제 첨가구와 비슷한 일당 증체량을 나타내었다. 사료 섭취량에서는 생균제와 복합생균제 첨가구가 높은 사료 섭취량을 나타냈었고, 사료효율에서는 낮은 경향을 보였다. 실험 전기간에 걸친 성적에서는 항생제 첨가구와 생균제 첨가구가 비슷한 일당 증체량을 보인 반면 복합생균제첨가구에는 약간 높은 경향을 보였다. 한편, 항생제 미첨가구의 경우는 다른 처리구보다 낮은 증체량을 나타내었다. 사료섭취량에서도 항생제 미첨가구가 가장 적은 사료를 섭취하였고, 항생제 첨가구와 생균제 첨가구에서 비슷한 양을 섭취하였고, 복합생균제 첨가구는 다른 처리구에 비해 사료 섭취량이 높았다. 사료효율에서는 항생제 미첨가구가 다른 처리에 비해 높은 사료 효율을 나타냈지만, 통계적으로 차이는 없었다 (Table 3-65).

### 2) 육질 분석

육질 분석의 경우 사료 처리에 따른 유의차는 나타나지 않았다. 저장기간동안의 등심의 pH 변화에서는 저장기간이 증가할수록 증가하는 경향이 나타났다(Table 3-66). 또한 24시간 후 심부온도에서는 항생제 미첨가구에서 높은 경향을 보였고, 항생제 첨가구에서는 낮은 경향을 보였다. 하지만, 생균제와 복합 생균제 첨가구에서는 비슷한 양상을 나타내었다(Table 3-67). 그러나, PSE와 관련하여 육질 분석의 중요한 보수력 측정

방법인 bag drip loss의 경우 비록 유의차는 없었으나, 등심에서 생균제 처리구와 복합 생균제 처리구가 보수력이 더 우수한 경향을 보였다(Table 3-68). 목심의 경우는 일반적으로 지방을 많이 포함하고 있기 때문에 처리간의 bag drip의 양이 등심에 비하여 상대적으로 작았다. 관능 검사의 경우 color에 있어서 생균제 처리구가 다른 처리구에 비하여 reddish pink에 가까운 경향이 나타났고, firmness에 있어서는 처리구간의 뚜렷한 차이가 없었다. marbling의 경우는 생균제 처리구가 좀더 높은 수치를 나타냈다. 이러한 경향을 목심의 경우에도 비슷하게 나타냈다(Table 3-69~3-71).

#### 나. 생균제의 경제성 검증

복합생균제의 생산비용은 1일 가공용량을 기준으로 할때 100kg/100만원 정도가 소요된다. 이는 1kg당 1만원의 단가로, 본 실험에서에 보사된 사료내 첨가량인 0.2%를 기준으로한다면, 사료 1kg당 20g의 생균제가 필요하다. 1kg당 약 20원의 사료가격 상승 요인으로 작용한다. 현재 일반적으로 사용되고 있는 사료내 첨가되는 항생제는 대략 1kg당 3000원의 수준이다. 생균제와 같은 비율로 사료에 첨가하게 된다면, 1kg당 6원을 차지하게 된다.

일반적인 돈육 생산을 위한 돼지의 사료 프로그램에서 출생후 약 175일후가되면 출하 체중에 도달하게 된다. 또한 각 체중에 따라 사료내 에너지와 단백질 요구량이 달라지게 되어 사료의 비용이 다르다. 출생후부터 출하까지의 각 사료급여프로그램별 일령 및 체중을 살펴보면(table 3-72), Phase I의 경우 약 39일로 일당 평균 사료 섭취량은 0.84kg이다. 39일간의 총 사료섭취량은 32.76kg으로 항생제를 생균제로 대체할 경우 1kg당 14원의 사료가격 상승이 있다. 이 기간동안의 총 사료 섭취량을 기준으로 계산한다면  $32.76(\text{kg}) \times 14(\text{원/kg}) = 458.64\text{원}$ 이다 각각의 기간을 이와 같은 방법으로 계산하면, Phase II, III, IV의 경우 각각 952원, 1029원, 1452.36원이다. 1두를 출하하기 위하여 소요되는 사료비의 가격 상승은 총 3892원이다. 2002년 대한양돈협회의 통계 자료에 따르면, 비육돈을 출하시까지 사료비의 비용은 85,736원으로 항생제 대체시 89,628원으로 사료비의 상승이 발생하게 된다. 비육돈 출하시까지의 모든 비용은 2002년 평균 1두당 총 166,393원으로 항생제의 생균제 대체시 170,285원으로 약 2.3%정도 상승하게 된다. 2002년 평균 지육단가는 평균 2614원이고, 육성돈의 평균 지육율을 70%정도로 감안한다면, 1두당 지육가격은 201,278원이다. 도축과정에서의 수수료 및 운송료를 고려



하지 않은 1두당 수익은 평균 34,885원으로 나타난다. 생균제 첨가 돈육을 일반 항생제 급여 돈육과 같은 지육단가로 고려한다면, 생균제 급여시 1두당 30,993원으로 1두당 3892원의 수익 감소가 일어난다. 하지만, 항생제 무첨가 고급 돈육으로 판매할수 있기 때문에 이러한 수익의 감소는 실제적으로 발생하지 않을것으로 본다. 수익감소를 방지하기 위한 최소의 지육 단가를 계산해보면, 1두당 지육단가보다 생균제 첨가시 증가하는 사료비용을 합하여 1두당 지육량으로 나누어주면 된다. 즉, 201,278원 + 3892원으로 205,170원이고, 110kg의 지육을 70%로 계산하면 약 77kg이다. 결국, 항생제 무첨가 돈육의 지육단가가 2665원 이상이면, 농가의 수익은 증가하게된다.

이와같이 항생제 무첨가 돈육은 식품의 안정성과 항생제의 잔류 문제를 극복할수 있는 하나의 방법이 될 수 있고, 또한 고급 돈육의 생산으로 인하여 농가의 수익에 증가를 줄 수 있을것으로 판단된다.

Table 3-65. Growth performance of finishing pigs during experimental period

Week	Item	대조구 1*	대조구 2*	생균제	복합생균제
	ADG(kg/d)	0.623±0.085	0.609±0.056	0.631±0.091	0.645±0.088
1-2	ADFI(kg/d)	2.01±0.32	1.97±0.38	2.12±0.51	2.10±0.41
	Feed efficacy	0.31±0.03	0.31±0.02	0.30±0.02	0.31±0.04
	ADG(kg/d)	0.656±0.075	0.639±0.044	0.647±0.072	0.669±0.085
3-4	ADFI(kg/d)	2.23±0.21	2.10±0.58	2.11±0.63	2.29±0.55
	Feed efficacy	0.29±0.05	0.31±0.03	0.31±0.02	0.29±0.04
	ADG(kg/d)	0.678±0.077	0.671±0.062	0.685±0.075	0.683±0.052
5-6	ADFI(kg/d)	2.45±0.53	2.41±0.42	2.53±0.37	2.69±0.29
	Feed efficacy	0.28±0.03	0.28±0.02	0.27±0.04	0.25±0.04
	ADG(kg/d)	0.652±0.084	0.639±0.074	0.654±0.058	0.665±0.047
Total	ADFI(kg/d)	2.230±0.62	2.160±0.32	2.253±0.24	2.360±0.18
	Feed efficacy	0.293±0.04	0.300±0.010	0.29±0.024	0.283±0.034

\* 대조구 1: 항생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 항생제 무 첨가 기초사료

Table 3-66. Muscle pH of pork loin among treatments during storage.

처리구	1 day	3 day	7 day
대조구 1*	5.50±0.23	5.53±0.15	5.60±0.19
대조구 2*	5.36±0.19	5.54±0.16	5.56±0.20
생균제	5.55±0.21	5.64±0.18	5.59±0.20
복합생균제	5.46±0.32	5.55±0.22	5.58±0.14

\*대조구 1: 항생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 항생제 무 첨가 기초사료

Table 3-67. Muscle temperature (°C) of pork loin among treatments at 24 hr postmortem.

처리구	등심 심부 온도
대조구 1*	3.67±0.95
대조구 2*	5.00±2.53
생균제	4.33±1.65
복합생균제	4.33±1.52

\* 대조구 1: 항생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 항생제 무 첨가 기초사료

Table 3-68. Bag drip (%) of pork loin and boston butt among treatments at 24 hr postmortem.

처리구	등심	목심
대조구 1*	6.80±1.92	0.44±0.05
대조구 2*	5.07±1.25	0.47±0.05
생균제	4.44±2.01	0.44±0.06
복합생균제	4.46±1.99	0.44±0.09

\* 대조구 1: 항생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 항생제 무 첨가 기초사료

Table 3-69. Subjective evaluations of pork loin and boston butt among treatments at 24 hr postmortem.

처리구	등심			목심		
	color	firmness	marbling	color	firmness	marbling
대조구 1*	2.44±0.65	2.78±0.09	2.75±0.26	3.78±0.55	4.52±0.50	3.39±0.29
대조구 2*	2.65±0.44	2.80±0.12	2.70±0.19	3.72±0.59	4.89±0.40	3.06±0.55
생균제	2.84±0.78	2.80±0.55	2.89±0.18	4.05±0.89	4.29±0.47	3.50±0.65
복합생균제	2.61±0.39	2.78±0.12	2.78±0.25	4.01±0.59	4.17±0.35	3.38±0.56

\*대조구 1: 항생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 항생제 무 첨가 기초사료

color scores : 1 = pale, pinkish gray, 2 = grayish pink, 3 = reddish pink, 4 = purplish red, 5 = dark, purplish red

firmness scores : 1 = very soft and very watery, 2 = soft and watery, 3 = slightly firm and moist, 4 = firm and moderately dry, 5 = very firm and dry

marbling scores : 1 = devoid to practically devoid, 2 = traces to slight, 3 = small to modest, 4 = moderate to slightly abundant, 5 = moderately abundant or greater

Table 3-70. Panel test scores of loin among treatments

처리구	등심			
	color	discoloration	off-odor	consumer acceptance
대조구 1*	4.41±0.35	4.89±0.19	5.00±0.00	4.89±0.10
대조구 2*	4.45±0.45	4.85±0.14	5.00±0.00	4.70±0.29
생균제	4.69±0.35	4.85±0.14	5.00±0.00	4.89±0.11
복합생균제	4.56±0.32	4.84±0.13	5.00±0.00	4.81±0.17

\* 대조구 1: 항생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 항생제 무 첨가 기초사료

color scores : 1 = bad, 5 = very good

discoloration scores : 1 = extremely discoloration, 5 = not discoloration

off-odor scores : 1 = bad, 5 = very good

consumer acceptance : 1 = bad, 5 = very good

Table 3-71. Panel test scores of boston butt among treatments

처리구	boston butt			
	color	discoloration	off-odor	consumer acceptance
대조구 1*	4.90±0.08	5.00±0.00	5.00±0.00	4.85±0.10
대조구 2*	4.90±0.10	5.00±0.00	5.00±0.00	4.89±0.09
생균제	4.94±0.05	5.00±0.00	5.00±0.00	4.90±0.07
복합생균제	4.91±0.06	5.00±0.00	5.00±0.00	4.90±0.07

\* 대조구 1: 향생제 첨가 기초 사료, 대조구 2: 향생제 무 첨가 기초사료

color scores : 1 = bad, 5 = very good

discoloration scores : 1 = extremely discoloration, 5 = not discoloration

off-odor scores : 1 = bad, 5 = very good

consumer acceptance : 1 = bad, 5 = very good

Table 3-72. Feeding program of general pig production

	Phase I	Phase II	Phase III	Phase IV
Body weight(kg)	6.5~23	23~50	50~75	75~110
days	21~60	60~100	100~135	135~173
ADFI(kg/d)	0.84	1.7	2.1	2.73
Feed / gain	1.27	2.52	2.94	2.96
Total FI(kg)	32.76	68	73.5	103.74

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 기능성 균주와 Prebiotics를 이용한 복합생균제 개발

기능성 균주와 prebiotics를 이용한 복합생균제 개발을 위하여 다양한 근원으로부터 유산균주를 분리, 동정하였으며 이들의 내산성, 내담즙성 및 박테리오신 생산능력을 조사하였고 그 결과 우수한 probiotics 균주 17종을 선별하였다. 이러한 균주 중 9종을 대상으로 skim milk, glucose, yeast extract를 독립변수로 하여 반응표면분석법으로 대량 생산을 위한 최적 생산 배지를 설정하였고 선발과정에서 우수한 특성을 나타낸 *L. acidophilus* 107A와 *L. casei* 393에 대한 반응표면도를 도출하였다. 또한, 균주의 대량 생산시 적절한 회수조건의 설정을 위해 생산된 균주의 농축, 동결 공정과 저장중 생존성을 검사하였는데 *L. casei* 910, *L. casei* ssp.,, *L. rahnosus* 7469, *L. acidophilus* 107A, *L. acidophilus* 393이 저항성이 우수하여 회수율 및 생존율을 높은 것으로 판단되었다. 또한, prebiotics 물질의 선별을 위해 선별된 균주들의 기질로서 여러 prebiotics 대상물질의 이용성 여부를 조사하였고 이를 검사하기 위한 선별방법은 배지내 pH 변화, prebiotics 함유한 고체배지내 배양 후 색변화, 생균수를 측정하였는데 여러 prebiotics 물질과 probiotics 균주를 조사하는 방법으로는 배지내 pH 측정이 효율적인 것으로 판명되었다.

또한, 5종의 prebiotics에 의해 성장이 증진되는 생균제를 선별 후 prebiotics의 최적 첨가비율을 설정하였다. 다양한 비율로 prebiotics를 첨가한 배지에서 균주의 성장능력을 조사하였으며 prebiotics간의 상호 시너지 효과를 반응표면방법론을 이용하여 검증하였다. 통계적인 방법을 통하여 최적 혼합비율을 설정하였을시 균주의 생육을 최대로 하는 최적 prebiotics의 함량을 설정할 것으로 판명되었다. 생균제의 저장 중 활력의 소실 정도를 조사하기 위해 4℃, 25℃ 및 37℃에서 저장하면서 생균제의 활력 변화를 조사하였더니 고온인 37℃에서보다 낮은 온도에서 생균제의 활력이 유지되는 것으로 판단되었다. 또한, 생균제의 장기보전을 위한 동결보존제의 선발과 최적 첨가비율을 설정하였다. 그리고, 선별된 균주를 대상으로 당 테스트 등의 생리, 화학적 방법과 병행하여 유전자 수준에서의 동정을 실시하였다. 생균제의 유전자 염기서열을 NCBI의 GenBank와 비교하여 각각의 종명을 확인하였다. 그리고, 부가적인 기능성 검증을 위하여 최종적으로 복합생균제용으로 선별된 균주의 박테리오신의 항균능력 범위와 활력을 조사하며

세포실험을 통하여 장관내 부착능력을 살펴본 결과 *L. acidophilus* 107A 균주는 여러 병원성균주에 대하여 항균능력을 가지고 있는 것으로 확인되었고 장세포에 점착능력도 우수한 것으로 판단되어졌다.

## 제 2 절 분체 복합화 기술 확립

양돈 사료 첨가시 안정성과 효능을 극대화하기 위한 생균제의 분체복합화 기술 확립을 위하여 기능성 피복재의 선별과 가공적성 분석, 피복조건의 최적화 및 물리적 특성을 비교하였으며 prebiotic 물질의 균체 피복재로서의 가능성을 검토하였다. 균체 피복물질로는 5개의 장용성 소재를 이용하였는데 그 중 Sureteric과 Compritol 888이 피복능력이 우수하였으며 생균제와 피복재의 배합비가 9:1 이고 분체복합화 처리조건이 15,000 rpm, 3분인 경우 매끄럽고 균일한 피복효과가 관찰되었다. 분체복합화를 위한 가공은 Hybridization system을 생균제에 적합하게 개선하여 실시하였다. 또한 피복조건을 최적화하기 위한 피복재의 초기 입도를 조사하였다. 균체 피복재로서 prebiotic은 단일 피복재로는 충분하지 않았으나 Sureteric을 이용한 2차 피복을 이용하여 prebiotic을 균체와 함께 피복할 수 있었다. 분체 복합화 후 생균제의 활력은 유지되었으며 균체의 가공 및 저장 중 활력변화와 생존을 검증을 위하여 내산성 및 내열성을 조사한 결과 사용된 균주의 자체 내산성이 우수하여 분체복합화를 실시하지 않은 경우에도 매우 높은 생존율을 나타내었으며 분체복합화에 의한 균주의 내열성은 우수하게 나타났다. 최종적으로 양돈 사료 첨가용 생균제로 선별된 *L. acidophilus* ATCC 107A가 사료형태에 따라서 안정성에 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 분말형사료와 펠렛형사료를 제조하여 0.2% 균주를 첨가하여 온도에 따른 변화를 측정하였다. 펠렛형 사료의 경우 저장중의 열에 의한 사멸, 펠렛 건조과정중 공기와의 접촉 및 압착과정에 의한 스트레스, 생균수 측정을 위한 건조 펠렛의 분쇄과정 중 사멸, 펠렛 공정중 수분과의 접촉 및 오염가능성 등에 의하여 초기균수가 저하되었으므로, 본 실험에 의한 사료형태에 의한 생균제의 안정성은 분말형이 더 적합하다고 판단되어진다.

## 제 3 절 복합생균제의 사료 안정성 및 동물 능력개선효과 검증

복합생균제 또는 생균제의 양돈사료 첨가시 사료내에서의 안정성과 성장능력 개선효과를 검증하였다. 1차 년도에 *in vitro* 상에서 선별된 가능성 있는 4가지 균주를 대상



으로 실시한 자돈에서의 생균제 효과 검증에서, 선발된 4가지 균주 모두 모두 초기에는 대조구보다 높은 성장을 보였다. 특히, *lactobacillus acidophilus* 393과 107A는 실험 전기간에 걸쳐 자돈의 성장능력을 증가시켰는데, 이는 일당증체량의 증가뿐만 아니라 사료효율의 개선도 있었다. 또한, 생균제를 급여한 처리구는 대조구에 비해 설사빈도가 감소하는 경향을 보여 이는 자돈의 장내 환경에 유익한 것으로 생각된다. 1차 실험에서 현장적용시 효능과 경제성을 가질것으로 판단된 *lactobacillus acidophilus* 107A와 393을 제 1세부과제에서 선발된 prebiotics인 lactulose의 생체 *Lactobacillus acidophilus* 107A and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* 107A내 시너지 효과를 검증한 2차 실험에서는 *lactobacillus acidophilus* 107A의 경우 prebiotics 첨가시보다 균주만을 첨가하였을때 높은 성장률을 보였고 개선된 성장을 보인 반면, *lactobacillus acidophilus* 393의 경우 prebiotics 첨가시 더 높은 일당증체량 보였다. 두개의 처리구는 비슷한 일당 증체량을 나타냈지만 *lactobacillus acidophilus* 107A가 사료효율의 개선에서 *lactobacillus acidophilus* 393보다 더 높게 나타났다. 최종적으로 선발된 *lactobacillus acidophilus* 107A의 열안정성을 검증하기 위하여, 사료 생산시의 공정과 저장기간에서 받을수 있는 조건을 가지고 실험하였다. 일반적인 펠렛공정시의 온도인 60℃, 75℃, 90℃에서의 각각 69%, 74%, 56%로 생균수가 감소하였다. 또한, 저장기간에 따른 변화에서는 10℃에서 보관시 큰 변화는 없었으나, 20℃와 30℃에서는 28일동안 58%와 34%로 급격히 감소하였다. 현장 실험을 통한 복합생균제의 동물능력 개선효과를 검증한 3차 실험에서는 분체 복합화한 *lactobacillus acidophilus* 107A와 분체복합화 하지 않은 *lactobacillus acidophilus* 107A의 사료내 첨가하였는데, 이는 항생제를 첨가하지 않은 처리구보다 높은 일당증체량을 나타냈고, 항생제 첨가구와 비슷한 일당 증체량을 나타냈다. 또한, 실험 전기간에 걸쳐 분체 복합 생균제의 경우 항생제 처리구보다 조금 높은 일당증체량을 나타냈지만, 조금 낮은 사료효율을 보였다. 이러한 생균제나 분체복합 생균제의 사료 첨가시 발생할수 있는 육질의 저하 측면에서도 항생제 처리구와 다르지 않은 품질을 보였다.

내담즙성, 내산성 및 박테리오신 생산능력이 우수한 균주의 선발과 최적의 prebiotics를 선발하는 과정에서 사용된 in vitro 상의 실험방법이 효과적인 선발방법으로 생각되며, 또한 생균제와 prebiotics의 최적의 첨가비율을 설정하기 위한 반응표면방법론의 이용은 균주의 선발과 그 효과를 입증하기 위한 하나의 방향을 제시하였다. 또한, 분체복합화 기술의 확립과정에서의 분체복합화 처리 공정과 가장 적합한 생균제와 피복제

의 비율을 결정하는 과정서의 생균제에 적합한 비율을 찾아내어 실제 산업화시 이용될 수 있는 방향을 제시하였다. 또한 분체복합화를 통한 내산성 및 내열성의 증가도 확인할 수 있었다. 특히, 사료 가공시의 여러 조건에서의 생균제의 안정성의 검증은 사료내 생균제의 첨가량 측정에대한 하나의 예를 제시하였다. 우수한 생균제와 그 생균제의 분체복합화한 산물의 양돈사료내 사용시 자돈과 육성돈 모두에 있어서 성장개선효과가 입증되었고 항생제의 대체 가능성을 시사해 주고 있다.

## 제 5 장 연구개발 계획의 활용계획

### 제 1 절 추가 연구의 필요성

In vitro 상에서 선정된 균주와 prebiotics간의 시너지 효과가 활력과 실제 현장에서 사용될시 활력과의 차이를 쉽게 판단할수 있는 실험적 방법의 구축이 필요하고, 아직 분리 동정되어 있지 않은 많은 균들의 생균제로서의 가능성을 시사해 주었다.

본 과제의 사양 실험을 통해 *Lactobacillus acidophilus* 107A의 가능성 있는 생균제로서의 효과가 어느 정도 검증 되었다고 생각한다. 생균제는 항생제 사용의 규제 가능성이 제기되고 있는 요즈음 사료첨가제로서의 가치와 연구가 더욱 증가되고 있다. 이러한 관점에서 분명 본 사양 실험의 결과는 희망적이라는 것을 보여준다, 다만 명확한 유의차를 보여주지 못한 점은 추후 이와 유사한 사양실험의 필요성이 제기 될 수 있는 점이라고 생각한다. 이는 반복적인 확인과 검증이 필요한 사양 실험에서 제한된 시간에서 일정 수준의 결과를 이끌어 내어야 한다는 점에서 한계가 있었다고 생각한다. 따라서, 추후 이 실험에서 긍정적인 결과가 나온 부분을 반복적인 확인 작업을 통한 검증이 어느 정도 필요하다고 생각한다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구의 피복 관련 기술은 장내 산성 조건이나 사료 제조 과정에서 내열성을 부여하기 위해 사용할 수 있다. 또한, 사료 첨가제 분야 뿐만 아니라 이는 유산균을 이용할 수 있는 분야에서도 응용 가능할 것이다.

생균제에서 가장 큰 문제점은 이 물질이 살아있는 생명체이고 따라서, 그들의 최적 생존 조건이 있다는 점일 것이다. 이러한 조건에 비해 동물의 장내 환경은 분명 그들이 생존하기에는 위의 강한 산성, 십이지장으로 분비되는 담즙, 그들이 사료 혼합되기 위해 불가결하게 처리되어야 하는 열에 약하다는 점이다. 따라서, 분체 복합화는 이러한 생균제들의 약점을 극복시켜 줄 수 있는 방법인 동시에 단순히 유산균 뿐만 아니라 가능성 있는 모든 균주에 응용 가능하다고 생각되며, 이는 추후 가축 사료첨가제 분야의 새로운 트렌드가 될 수 있다고 생각한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제를 수행하는 과정에서 많은 해외 과학기술 정보를 접할 수 있었다. 우선 본 연구의 목표인 probiotics와 prebiotic에 관련된 주제와 그것들의 성장개선효과에 대한 정보와 특히 유럽에서의 동물사료내에 항생제 첨가에 관한 자료들이었다.

유럽연합에서는 2006년 1월이후 동물사료내 항생제의 첨가를 법으로 금지하기로 결정하였다. 현재 유럽에서 사용이 허가된 항생제는 모두 4가지로 flavophospholipol, salinomycin sodium, avilamicyn, 그리고 monensin sodium이다. 이들 4종류의 항생제는 모두 성장촉진제로 사용되고 있는데, 앞으로 4년 이내에 사료내 이들 항생제의 첨가를 금지시킨다고 한다. 이러한 항생제의 사료 첨가제로서의 금지는 식품내 잔류하게 되는 항생제의 증가와 그에 내성을 가지게 되는 미생물의 증가로 인한 것이라 한다. 따라서, 미국과 유럽에서는 항생제를 대체 할 수 있는 물질로서 유기산제, 생균제, 식물추출물에 대한 연구가 증가하고 있다. 유기산제의 경우 유럽에서는 BASF사의 Formi(potassium diformate)가 최초로 항생제 대체물질로 허가를 받았다. 또한, 스위스의 pancozma사에서는 식물성 추출물을 이용한 eXtract란 제품을 시판하고 있다. Prebiotic로서는 현재 유청에 포함되어 있는 TOS(transgalacto-oliosaccharides)가 각광받고 있다. TOS는 특히 유산균의 성장에 도움을 주는 것으로 알려졌다. Prebiotic와 Probiotic의 상승효과에 관한 연구는 많이 진행되고 있으나, 이것의 복합분체화 기술에 관한 연구는 그리 많지 않았다.

## 제 7 장 참고문헌

- Armstrong, D. G. 1984. Antibiotics as feed additives for ruminant livestock. In Antimicrobials in Agriculture, Ed. M. Woodbine, pp. 331-347. London, Butterworths.
- Armstrong, D. G. 1986. Gut active growth promoters. In Control and Manipulation of Animal Growth, Proceedings of the University of Nottingham 43rd Easter School, 1985, Eds. P. J. Buttery, D. Lindsay and N. B. Haynes, pp. 21-37. London: Butterworths.
- Armstrong, H. 1993. Nutritional implications of expanded feed. Feed Mix. 1: 24.
- Baird, D. M. 1977. Probiotics help boost feed efficiency. Feedstuffs 49(Sept. 11), 11.
- Conway, P. L., L. Blomberg, A. Welin and P. S. Cohen. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci., 70, 1.
- Cromwell, G. L., T. S. Stahly, K. A. Dawson, J. J. Monegue and K. Newman. 1991. Probiotics and antibacterial agents for weaning pigs. J. Anim. Sci., 69(Suppl. 1), 114(Abstr.).
- Danielson, A. D., E. R. J. Peo, K. M. Shahani, A. J. Lewis, P. J. Whalen, and M. A. Amer. 1989. Anticholesterolemic property of *L. acidophilus* yoghurt fed to mature boars. J. Animal Sci. 67:966-974.
- Delzenne N. Aertssens J. Verplaetse H. Roccaro M. and Roberfroid M. 1995. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. Nutri. Absorption and Fructans. 57(17):1579-1587.
- Errolter, T. M., A. V. Gudkov, S. A. Gudkov. 1985. Use of bifidobacteria in control of gastrointestinal disease in piglets and broiler chicks. Dairy Sci.(abstr.) 47:714.
- Fuller, R. and B. E. Brooker. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. Amer. J. Clin. Nutr., 27, 1305.
- Gilliand, S. E. and D. K. Walker. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH. J. Dairy Sci., 73, 905.
- Hale, O. M. and G. L. Newton. 1979. Effects of a nonviable *Lactobacillus* species fermentation product on performance of pigs. J. Anim. Sci., 48, 770.
- Han, I. K., J. D. Kim and J. H. Lee. 1984. Studies on the growth promoting effects of probiotics. III. The effects of *Clostridium butyrium* ID on the performance and the changes in the microbial flora of the feces of growing pigs. Korea J. Anim. Sci. 26:166.
- Hardie, J. M. 1986. Genus *Streptococcus*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. (ed. P. H. A. Sneath), Williams & Wilkins, London, pp. 1043-1047.
- Hidaka, H., Y. Tashiro, and T. Eida. 1991. Proliferation of *Bifidobacteria* by

- Oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobacteria microflora*. 10(1) : 65-79.
- Higashitani K., L. Koichi and G. Keishi. 1988. *Powder Technology Handbook*.
- Hoefling, D. 1989. Tracking the culprits behind diarrhea in neonatal pigs. *Vet. Med.*, April, 427.
- Holt, J.G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Stanley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*,: 9th ed., Williams & Wilkins.
- John, G. D. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. In *Humana press* 7-30 Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 1995. *Response Surface Methodology*, Wiley, New York, USA
- Kaplan H. and R. W. Hutkins. 2000. Fermentation of Fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6): 2682-2684
- Kimura, N., M. Yoshikane, A. Kabayashi and T. Mitsuoka. 1983. An application of dried bifidobacteria preparation to scouring animals. *Bifidobacteria Microflora*. 2:41-55.
- Kobayashi Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. 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.
- Kurman, J. A. 1983. The development and significance of new cultures with bifidobacteria as an example. *North Eur. Dairy J.* 3:65.
- Laura J. Fooks, R. Fuller and Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy J.* 9:53-61
- Lowell S. and J. E. Shields. 1986. *Powder Surface Area and Porosity*, 3rd ed. Delft Univ. of Technology, Netherlands.
- Lyons, T. P. 1988. Probiotics: An alternative to antibiotics. *The Bovine Practitioner* 23:64.
- Maeng, W. J., C. W. King and H. T. Shin. 1989. Effects of feeding lactic acid bacteria concentrate (LBC, *Streptococcus faecium* cernelle 68) on the growth rate and prevention of scouring in piglets. *Korean J. Anim. Sci.* 31(5):318-323.
- McGinity, J. W., K. Chi-Tze, R. Bodmeier and M. R. Harris. 1985. Dissolution and uniformity properties of ordered mixes of micronized griseofulvin and directly compressible excipient. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 11:891.
- Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo, and M. L. Grayson. 1995. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79(4):475-479.
- Mundt, J. O. 1986. Enterococci, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2,(ed P.H.A. sneath), Williams & Wilkins, London, pp. 1063-1065.
- Muralidhara, K. S., G. G. Sheggeby, P. R. Elliker, D. C. England and W. E. Sandine. 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus

- flora of intestinal tissue and feces from piglets. *J. Anim. Sci.*, 40, 288.
- Niness, K. R. 1999. Insulin and oligofructose: What are they? *J. Nutr.* 129:1402S-1406S.
- Okazaki M., S. Fujikawa and N. Matsumoto. 1990. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.* 9(2):77-86.
- Park, D. J, K. H. Ku and S. H. Kim. 1996. Air-classification of microparticulated defatted soybean meal. IFT Annual Meeting. 40A-11, New Orleans, La, U.S.A.
- Parker, R. B. 1974. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health.* 29:4-7.
- Pollman, D. S., D. M. Danielson and E. R. Jr. Peo. 1980. Effect of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 51:577-581.
- Pollman, D. S., D. M. Danielson and Jr. E. R. Peo. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on stater pigs fed a diet supplemented with lactose. *J. Anim. Sci.*, 51, 638.
- Robertfroid, M. B. 1999. Concepts in functional foods: the case of insulin and oligofructose. *J. Nutr.* 129:1398S-1401S.
- Robinson, I. M., M. J. Allison and J. A. Bucklin. 1981. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 950.
- Rycroft, C.E, Jones, M.R., Gibson, G.R. and R.A. Rastall. 2001 A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Applied Microbiol.* 91:878-887
- Schulman, A. 1973. Effect of weaning on pH changes of the contents of the piglet's stomach and duodenum. *Nord. Vet. Sci.* 10, 440.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Vol. 2.
- Sosulski, F. W. and C. G. Youngs. 1979. Yield and functional properties of air-classified protein and starch fractions from eight legume flours. *JAOCS* 56:292.
- Staniforth, J. N. 1985. Relationship between particle packing and the physical stability of powder mixes. *J. Pharm. Pharmacol.* 37:692.
- Takafumi, I., H. Honda and M. Koishi. 1993. Drug dissolution from indomethacin-starch hybrid powders prepared by the dry impact blending method. *J. Pharm. Pharmacol.* 45:770.
- Tokach, M. D., Goodband, R. D. and Nelssen, J. I. 1991. Recent developments in starter pig programs, Kansas Research Report 641. P48.
- Tuschy, D. 1986. Verwendung von 'Probiotica' Leistungs forderer in der Tierernahrung. *Ubers. Tierernahrg.* 14:157-78. Lyons, T. P. 1988. Probiotics: An alternative to antibiotics. *The Bovine Practitioner* 23:64-69.
- Visek, W. J. 1978. The mode of growth promotion by antibiotics. *J. Anim. Sci.*

- 46:1447-1469.
- Walton, J. R. 1980. Modes of action of growth promoting agents. *Firtschr. Vet. Med.* 33:77-82.
- Westerberg, M., B. Johnson and C. Nystrom. 1986. Physicochemical aspects of drug release. IV. The effects of carrier particle properties on the dissolution rate from ordered mixtures. *Int. J. Pharm.* 28:23.
- Wong, L. W. and N. Pilpel. 1988. The effect of the shape of fine particles on the formation of ordered mixtures. *J. Pharm. Pharmacol.* 40:567.
- 고영태, 강정화 2000. 우유 또는 난백분말로 만든 젖산균발효식품에 첨가된 동결건조 보호제가 젖산균의 생육과 기호성에 미치는 영향. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32:1:192-199
- 박동준, 구경형, 김승호. 1996. 초미세분쇄/공기분급을 이용한 탈지대두박 분획물의 특성과 응용. *한국식품과학회지.* 28(3):497.
- 小野憲次. 1994. 분체의 미분화와 복합화기술. 제1회 분립체 프로세스 기술세미나. 한국화학공학회 분체공학부문위원회. 대전.
- 심재현, 오세종, 김상교, 백영진. 1995. 젖산 발효제품에서 분리한 유산균의 내산성 비교. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(1):101-104.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.