

양돈사료 첨가용 복합미생물 개발*

양 영 기** · 조 정 일*** · 강 희 경**** · 문 명 님***** · 이 용 보*****

Development of Bio-Formula Complex for Domestic Animal Feeding

Yang, Young-Ki · Cho, Jung-Il · Kang, Hee-Kyoung ·
Moon, Myung-Nim · Lee, Yong-Bo

In order to find a solution to protect pigs from bacterial diarrhea and the nasty smell in stalls which are the most trouble, we composed a bio-formula with *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus amyloliquifaciens* and *Bacillus subtilis*. The antagonistic microbe *Bacillus amyloliquifaciens* can control the growth of *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, *Escherichia coli* O-157, *Listeria* and *Staphylococcus*. *S. thermophilus* from pig's stomach can live in gastric juice so it also control germs. They worked in its living cell state and its culture fluid. As a result of feeding with piglings, it showed effects of preventing diarrhea and increasing the weight.

Key words : domestic animal feeding, *Streptococcus thermophilus*, bio-formula

I. 서 언

가축의 성장을 촉진하고 설사 등의 질병을 예방, 치료하기 위해 이용하고 있는 사료첨가제 중에서 일반적으로 항생제가 가장 많이 이용되고 있다. 그러나 항생제는 장기간 사용하거나, 남용하게 되면 가축에게 항생제 내성이 생기고 또한 축산물의 항생제 잔류 문제를

* 이 논문은 2005년도 조선대학교 학술연구비의 지원에 의해 수행되었음.

** 대표저자, 조선대학교 생명공학과

*** 조선이공대학 식품영양조리학과

**** 전남대학교 공업기술연구소

***** 광주보건대학 식품영양과

***** 조선대학교 과학교육학부

초래하게 된다(장, 1999). 더욱이 최근 유럽 일부 국가에서는 육성 비육돈 등에 대한 항생제의 사용을 금지하는 등 가축에 대해 항생물질 이용의 규제가 심화되고 있다(박, 1999). 따라서 항생제를 대체할 사료첨가제의 개발, 즉 생균제, 효모제, 올리고당 등에 관한 연구, 개발이 활발히 이루어지고 있다(여, 2003; 고 등, 2003; 김 등, 2001). 생균제는 가축에 급여시 가축의 장내에서 유익한 균은 증식시키고, 유해균의 증식은 억제하여 장내 미생물의 균총을 균형있게 유지함으로써 숙주에 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물 첨가제라고 정의할 수 있다(한, 1992). 일반적으로 상업적으로 많이 이용되고 있는 사료첨가제로서 *Lactobacilli*, *Streptococci* 및 *Bacillus* 등을 이용한 생균제가 있으며 가축에 이용되고 있다(민, 1993). 그동안 생균제의 작용기전을 규명하기 위한 많은 연구가 진행되었지만 생균제의 사용효과를 규명하는 과학적인 연구보고의 부족으로 그 작용기전이 명확하게 밝혀지지 않았다. 그러나, 지금까지 보고된 생균제의 작용기전을 종합해 보면 다음과 같다. ① *Lactate* 생성에 의한 장내 pH 감소, ② 장내균총의 변화 및 대장균의 감소, ③ 항생물질의 생산, ④ 아민, 암모니아, 페놀 등 독성물질의 생산 억제, ⑤ 소화관내에서 착상과 집락형성, ⑥ 소화효소 및 비타민 생성, ⑦ 면역 반응의 활성화 등이다. 이상에서와 같이 생균제는 여러 가지의 복합적인 작용기전에 의해 가축의 급여시 정상균총을 유지하고 가축의 생산성 향상을 도모할 수 있다. 양돈에 대한 생균제의 사용효과에 있어서 생균제를 돼지에 급여시 성장률과 사료효율의 개선효과가 있다는 보고도 있다(고, 2000; 홍 등, 2002). 돼지는 단위동물로서 이들 가축을 위한 생균제를 개발하기 위해서는 각 가축의 소화기관내 미생물에 대한 폭넓은 이해가 필요하다. 돼지의 맹장과 결장에서 소화액 1g 당 살아있는 미생물의 수는 10^{10} ~ 10^{11} 정도이다. 위와 소장에서 우세한 미생물은 *Lactobacillus*와 *Streptococcus* spp.이며 이들은 장내 음식물과 상피세포에서 발견된다. 자돈의 소화기 발달과정에서 소화기내 감염의 첫 단계는 병원성 박테리아가 소화기내 점막세포에 흡착하는 것이다. 흡착된 박테리아는 점막세포에 대해 독성을 갖는 아민, 질산, 암모니아 같은 폐기물들을 분비한다. 시간이 경과할수록, 많은 수의 장세포가 파괴되어 괴사성 장염(necrotic enteritis)을 일으킨다. 생균제로서 유산균 등이 갖추어야 할 특성으로 여러 가지가 있는데 그 중에서 중요한 것의 하나는 낮은 위 내의 pH에 생존하는 능력, 즉 내산성이다. 정상적인 가축의 경우 섭취된 음식물의 완충작용에 의해 pH가 다소 높아지는 경향이 있지만, 돼지의 경우 생균제의 균주가 작은창자까지 도달하려면 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내 담즙성도 강해야 한다. 일반적으로 생균제는 가축의 장내 또는 유제품에서 분리한 하나 또는 여러 균주의 유산균이 많이 함유되어 있는데, 그 중에서 *Lactobacillus acidophilus*가 가장 많이 이용되고 있고 그 외에 다른 종의 *Lactobacilli*와 *Enterococcus faecium* 등이 이용되고 있다. 또한 Bifidobacteria에서는 *Bifidobacterium bifidum*, *B. pseudolongum* 및 *B. thermophilum* 등이 생균제로 가축의 사료에 첨가되고 있다. 또한 포자를 형성하는 균으로 *Bacillus*와 *Clostridium* 및 다양한 효모 등도 이용되어 왔다(신 등, 2001; 정, 2000). 효모에 관한 연구에 따르면 *E. coli*,

Salmonella, *Clostridium* 같은 병원성 박테리아들은 mannan oligosacchride(MOS, 만난올리고당)에도 흡착된다는 사실이 밝혀졌다. MOS는 효모의 세포벽에 함유되어 있는데, 그 구조가 복잡하고 소화가 되지 않는다. MOS는 효모를 배양·농축 후, 추출하여 돼지 사료에 첨가할 수 있다. 만일 병원성 박테리아들이 MOS에 흡착된다면, 장 점막세포를 감염시킬 수 없으며 분을 통해 체외로 배출된다. 양돈을 비롯한 축산업은 그 규모가 점점 커지고, 시설은 현대화 되어가지만 가축이 받는 여러 가지 스트레스는 항상 존재하기 마련이다. 더욱이 양돈업의 경우 어미 돼지의 생산성 향상을 위해 새끼 돼지를 2주 전후에 이유하는 조기가 유가 점차 증가되어 모든 두당 회전율과 생산성은 향상되고 있지만 조기이유에 따른 자돈의 이유스트레스도 상대적으로 커서 이유 후 즉시 발생하는 설사는 돼지에 있어 심각한 문제이다. 과거 수년 동안 돼지의 소화장애 문제를 해결하기 위해 황산구리 또는 항생물질과 같은 성장촉진제를 사용해왔다. 그러나 최근 가축의 복지 및 환경에 대한 문제가 대두되고, 소비자의 기호가 민감해짐에 따라 여러 각국에서는 이런 종류의 첨가제 사용을 기피하고 있으며, 축산업계의 자발적인 참여나 법적인 규제가 이루어지고 있는 실정이다. 질병으로 인한 위험이 증가하고 있는데 이것은 가축 스스로 자연적인 면역능력을 향상시켜 각종 질병을 이겨내는 것이 최선의 방법이다. 생균제를 이용한 장내 정상적인 균총을 유지시켜 장내이상 발효에 의한 암모니아, 아민, 인돌, 스카톨 등 발암촉진물질을 감소시키는 것이다. 이러한 환경의 변화로 인해 본 연구에서는 항생물질과 성장촉진제를 대체할 만한 제품에 사용 가능한 유용 균주를 선별하고 그 효과를 검토하였다. 이를 통하여 가축의 설사 등 질병을 예방, 건강을 유지시켜주고, 가축의 증체율과 육질을 향상시키고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 유용균 선별, 동정 및 생균제 조제

돼지의 장내에서 병원성 세균증식을 억제하고 균형 잡힌 장내균총을 구성하는 동시에 악취물질을 감소시키고자 각 지역의 토양시료 또는 전통적인 방법으로 제조된 발효식품에서 길항균을 분리하고 돼지의 위와 장으로부터 유산균을 분리하였다. 위의 시료들을 Tris-Cl 완충용액(pH 7.5) 100ml에 잘 혼합한 후 NB(Nutrient Broth)에 접종하여 25°C에서 30분간 배양하였다. 배양액 일부를 취하여 생리식염수(0.85% NaCl)에 단계적으로 희석하여 적정 농도로 NA(Nutrient Agar)상에 도포하고 나서 25°C에서 3일간 배양한 후 나타난 균총을 분리하였다. 분리한 균주들은 20%의 글리세롤을 포함한 NB에 접종하여 -70°C에서 보관하며 길항력 테스트에 사용하였다. 분리된 균주들의 길항력 정도를 검토하기 위해 PDA 배지 중앙에 *Aspergillus flavus*를 접종하여 25°C에서 1일 배양한 후 주위 네 지점에 길항균들을 각

각 접종하여 계속 배양하였다. 7일간 대치배양 후 억제 구역(Inhibition Zone)을 형성한 균주를 길항균으로 선발하였다. 대치배양에 사용된 PDA 배지는 배지 두께의 차이에 기인한 오차 발생을 방지하고자 동일 지름의 플레이트에 동일 부피의 배지를 가하여 제조하였다. 이때 길항력의 정도는 대치 배양한 경우와 곰팡이만 배양한 경우의 곰팡이 지름을 비교하여 결정하였다. 길항균은 SDBP(SD medium + Beef Extract 0.1% + Proteose Peptone 0.1%) 배지 50ml에 1ml을 접종하여 30℃에서 3일간 배양하여 사용하였다.

2. 강산에서 길항균 생존을 검토

돼지 사료에 이용되는 균을 영양한천배지에서 30℃에서 1일간 배양하였다. 초기균수와 pH 조정 후의 균수를 비교하기 위해 먼저 무 조정된 배양액을 멸균수에 희석하여 도말하였고, 강산에서도 오랫동안 살아남는지 알아보기 위해 pH를 2.0으로 조절하여 12시간 배양 후 멸균수에 희석, 도말하여 초기균수와 pH 2.0로 조절 후 남아있는 균수를 비교하였다.

3. 길항균과 소화기성 병원균 혼합 배양시 생육 억제 효과 검토

본 연구에 사용된 생균제가 가축설사병의 원인균인 살모넬라균(*S. typhimurium* KCTC 1926), 병원성 대장균(*E. coli* O-157:H7), 리스테리아(*Listeria*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 억제할 수 있는지 알아보았다. 먼저, 길항성 균주와 병원성세균을 각각 영양한천배지에서 35℃에서 24시간 배양한 후, 영양액체배지에 동량씩 접종하여 35℃에서 24시간 배양한 후 현미경과 영양한천배지에 도말 배양 후 균락을 세어 억제효과를 살펴보았다. *S. typhimurium* KCTC 1926의 경우 균체수는 3.2×10^6 CFU/ml이 되도록 접종하였고, *E. coli* O-157:H7의 경우는 2.7×10^7 CFU/ml 농도가 되도록 접종하였다. 또한 리스테리아(*Listeria*)는 2.5×10^7 CFU/ml 농도로, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 2.0×10^7 CFU/ml 농도로 접종하였다. 여기에 길항균 *Bacillus amyloliquifaciens* sp.의 초기 균체농도는 1.2×10^9 CFU/ml을 길항균의 K1 초기 균체농도는 8.2×10^8 CFU/ml을 접종하였다.

4. 길항균 배양액 처리시 소화기성 병원균 생육억제 효과 검토

본 연구에 사용된 길항미생물이 분비하는 배양액 중의 항균물질이 열에 강한지 여부를 알아보았다. 미생물을 영양한천배지에서 35℃에서 1일간 배양한 후, 배양액을 원심분리기(10,000rpm, 10min, 4℃)를 이용하여 균을 제거하고 여과($0.45 \mu\text{m}$ membrane filter)한 비열처리 배양액과 배양액을 여과 후 멸균처리(121℃, 15min)한 열처리 배양액을 시료로 사용하였다. 비열처리 배양액과 열처리 배양액을 각각 처리하였을 때 병원성 살모넬라균(*S. typhi-*

murium KCTC 1926), 병원성 대장균(*E. coli* O-157:H7), *Listeria*와 *Staphylococcus aureus*를 억제할 수 있는지 알아보았다.

5. 길항균 생균제가 자돈에 미치는 영향

본 연구에서 조제한 길항균제제(*Bacillus amyloliquifaciens* 30%, *Streptococcus thermophilus* 30%, *Bacillus subtilis* 20%, *Rhodospirillum rubrum* 5%, 빵효모 50%)를 80일간, 1% 농도를 음수용으로 자돈에게 먹인 후 체중증가 효과와 설사예방 효과를 검토하였다.

6. 길항균의 분뇨에서의 생육 검토

길항균을 축산분뇨에 처리하여 악취제거는 물론 처리 후 액비로 사용하기 위한 가능성을 검토하고자 *Bacillus amyloliquifaciens* 10%, *Streptococcus thermophilus* 10%, *Bacillus subtilis* 20% 이외에 *Rhodospirillum rubrum* 20%, *Thiobacillus denitrificans* 20%, *Nitrosomonas europaea* 20%를 포함시켜 1%씩 1달 간격으로 2번 처리하였다. 축산 분뇨에서 여러 가지 악취 물질을 제거하기 위해서는 축분에서 왕성하게 생육하여야 한다. 따라서 사용된 미생물을 축산 분뇨에 처리하여 생육정도를 살펴보았다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 유용균 선발, 동정 및 생균제 조제

돼지의 장내에서 병원성 세균증식을 억제하고 균형 잡힌 장내균총을 구성하는 동시에 악취물질을 감소시키고자 각 지역의 토양시료 또는 전통적인 방법으로 제조된 발효식품에서 길항균을 분리하고 돼지의 위와 장으로부터 유산균을 분리하였다. 위의 시료들을 Tris-Cl 완충용액(pH 7.5) 100ml에 잘 혼합한 후 NB(Nutrient Broth)에 접종하여 25°C에서 30분간 배양하였다. 배양액 일부를 취하여 생리식염수(0.85% NaCl)에 단계적으로 희석하여 적정 농도로 NA(Nutrient Agar)상에 도포하고 나서 25°C에서 3일간 배양한 후 나타난 균총을 분리하였다. 분리한 균주들은 20%의 글리세롤을 포함한 NB에 접종하여 -70°C에서 보관하며 길항력 테스트에 사용하였다. 분리된 균주들의 길항력 정도를 검토하기 위해 PDA 배지 중앙에 *Aspergillus flavus*를 접종하여 25°C에서 1일 배양한 후 주위 네 지점에 길항균들을 각각 접종하여 계속 배양하였다. 7일간 대치배양 후 억제 구역(Inhibition Zone)을 형성한 균주를 길항균으로 선발하였다. 대치배양에 사용된 PDA 배지는 배지 두께의 차이에 기인한 오

차 발생을 방지하고자 동일 지름의 플레이트에 동일 부피의 배지를 가하여 제조하였다. 이때 길항력의 정도는 대치 배양한 경우와 곰팡이만 배양한 경우의 곰팡이 지름을 비교하여 결정하였다. 길항균은 SDBP(SD medium + Beef Extract 0.1% + Proteose Peptone 0.1%) 배지 50ml에 1ml을 접종하여 30°C에서 3일간 배양하여 사용하였다. 실험 결과 선발된 길항균들을 동정한 결과 각각 고초균(*Bacillus* sp. 및 *Bacillus amyloliquifaciens*)과 유산균(*Streptococcus thermophilus*)으로 동정되었으며(Fig. 1, Fig. 2), 각각을 최적 조건에서 배양한 후 일정 비율로 혼합하여 생균제를 조제하였다.

고초균(<i>Bacillus</i> sp.) 동정	
특성	고초균(<i>Bacillus</i> sp.)
세포직경 > 1.0 μ m	-
원형 포자	-
내생 포자	+
그램 염색	+
형태	rod
포자낭 팽윤	-
연쇄포자 결정	-
카탈라제	+
혐기성 성장	-
포게스-프로스카우어 검정	+
V-P 배양액의 pH	
< 6	d(+/-)
> 7	-
산	
D-글루코즈	+
L-아라비노즈	+
D-크실로즈	+
D-만니톨	+
글루코즈로부터의 가스	-
가수분해	
젤라틴	+
전분	+
기호 - : 90% 이상이 음성인 경우	
+ : 90% 이상이 양성인 경우	

Fig. 1. Identification of antagonistic microorganism, *Bacillus* sp.

유산균(<i>Streptococcus thermophilus</i>) 동정	
특성	특성 유산균 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)
세포직경	2 μ m
내생 포자	-
그램 염색	+
형태	구형 내지 난형
카탈라제	-
성장	
10 $^{\circ}$ C	-
45 $^{\circ}$ C	+
6.5% NaCl	-
pH 9.6	-
40% 담즙	-
60 $^{\circ}$ C 까지 30분간 가열	+
혐기성 성장	+
발효	
아라비노즈	+
덱스트린	+
글리세롤	+
이눌린	+
만니톨	+
라모즈	+
솔비톨	+
크실로즈	-
글루코제로부터 젖산	+
가수분해	
젤라틴	-
전분	+

Fig. 2. Identification of antagonistic microorganism, *Streptococcus thermophilus*.

2. 강산에서 길항균 생존율 검토

돼지 사료에 이용되는 균을 영양한천배지에서 30 $^{\circ}$ C 에서 1일간 배양하였다. 초기균수와 pH 조정 후의 균수를 비교하기 위해 먼저 무 조정한 배양액을 멸균수에 희석하여 도말하였고, 강산에서도 오랫동안 살아남는지 알아보기 위해 pH를 2.0으로 조절하여 12시간 배양 후 멸균수에 희석, 도말하여 초기균수와 pH 2.0로 조절 후 남아있는 균수를 비교하였다 (Table 1). 그 결과 *S. thermophilus*의 경우 100%에 가까운 생존율을 보였고 다른 균들도 40% 이상의 생존율을 나타내었다.

Table 1. Survival rate of Bio-formula microbes after treatment in pH 2.0 for 12 hrs.

Bio-formula Microbe	초기균수(cells)	pH 조정후 균수(cells)	생존율 (%)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	9.0×10^8 /ml	8.8×10^8 /ml	98%
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	8.6×10^7 /ml	3.6×10^7 /ml	45%
<i>Bacillus subtilis</i>	1.8×10^8 /ml	7.2×10^8 /ml	40%

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

3. 길항균과 소화기성 병원균 혼합 배양시 생육 억제 효과 검토

본 연구에 사용된 생균제가 가축설사병의 원인균인 살모넬라균(*S. typhimurium* KCTC 1926), 병원성 대장균(*E. coli* O-157:H7), 리스테리아(*Listeria*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 억제할 수 있는지 알아보았다(Table 2~5). 먼저, 길항성 균주와 병원성세균을 각각 영양한천배지에서 35°C에서 24시간 배양한 후, 영양액체배지에 동량씩 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 현미경과 영양한천배지에 도말 배양 후 균락을 세어 억제효과를 살펴 보았다. *S. typhimurium* KCTC 1926의 경우 균체수는 3.2×10^6 CFU/ml이 되도록 접종하였고, *E. coli* O-157:H7의 경우는 2.7×10^7 CFU/ml 농도가 되도록 접종하였다. 또한 리스테리아(*Listeria*)는 2.5×10^7 CFU/ml 농도로, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 2.0×10^7 CFU/ml 농도로 접종하였다. 여기에 길항균 *Bacillus amyloliquifaciens* sp.의 초기 균체농도는 1.2×10^9 CFU/ml을 길항균의 K1 초기 균체농도는 8.2×10^8 CFU/ml을 접종하였다. 그 결과 *S. typhimurium* KCTC 1926의 경우 10^6 으로 희석된 길항균주에 의하여 100% 생육이 억제되었으며,

Table 2. Antibacterial effect of Bio-formula microbes against *S. typhimurium* in different dilution rate (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate			
	10^2	10^4	10^6	10^7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	100	94.2
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	100	91.9
<i>Bacillus subtilis</i>	100	49.8		

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

$$\text{억제율}(\%)* = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

E. coli O-157:H7도 회석을 10⁶의 경우 100%에 가까운 억제율을 보였다. 길항균주 중 *Bacillus subtilis*의 효과는 동일 조건에서 다른 균주에 비하여 50% 이하의 수준을 보였다. *Listeria*와 *Staphylococcus aureus*의 경우는 10⁴으로 희석된 길항균주에 의해 100% 생육이 억제되는 결과를 보였다.

Table 3. Antibacterial effect of Bio-formula microbes against *E.coli* O-157:H7 in different dilution rate. (%)

Dilution Rate \ Bio-formula Microbe	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁷
<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	98.1	31.0
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> sp.	100	100	97.5	79.9
<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	19.2	

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 4. Antibacterial effect of Bio-formula microbes against *Listeria* in different dilution rate. (%)

Dilution Rate \ Bio-formula Microbe	10 ¹	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	39.0	--	--
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> sp.	100	100	100	41.3
<i>Bacillus subtilis</i>	100	75.4	--	

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 5. Antibacterial effect of Bio-formula microbes against *Staphylococcus aureus* in different dilution rate. (%)

Dilution Rate \ Bio-formula Microbe	10 ¹	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
<i>Stretococcus thermophilus</i>	100	100	100	54.9
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> sp.	100	100	100	70.7
<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	24.3	

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

4. 길항균 배양액 처리시 소화기성 병원균 생육억제 효과 검토

본 연구에 사용된 길항미생물이 분비하는 배양액 중의 항균물질이 열에 강한지 여부를 알아보았다. 실험방법은 미생물을 영양한천배지에서 35℃에서 1일간 배양한 후, 배양액을 원심분리기(10,000rpm, 10min, 4℃)를 이용하여 균을 제거하고 여과(0.45 μm membrane filter)한 비열처리 배양액과 배양액을 여과 후 멸균처리(121℃, 15min)한 열처리 배양액을 시료로 사용하였다. 비열처리 배양액과 열처리 배양액을 각각 처리하였을 때 병원성 살모넬라균(*S. typhimurium* KCTC 1926)과 병원성 대장균(*E. coli* O-157:H7)을 억제할 수 있는지 알아보았

Table 6. Antibacterial effect of non-heat treated culture fluid against *S. typhimurium* in different dilution rate. (%)

Dilution Rate \ Bio-formula Microbe	50 times	100 times	500 times	1,000 times
<i>Stretococcus thermophilus</i>	100	100	87.6	40.4
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	89.9	48.5
<i>Bacillus subtilis</i>	59.2	--	--	--

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

다(Table 6~9). *S. thermophilus*와 *Bacillus amyloliquifaciens*의 비열처리 및 열처리 배양액 모두 *S. typhimurium* KCTC 1926에 대하여 50배 희석액에서도 높은 생육 억제력을 보였으나 *E. coli* O-157에 대하여는 비열처리 배양액의 경우만 50배 희석액에서 효과를 나타내었다. 한편 *Listeria*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 처리했을 때 억제율을 살펴본 결과 길항균의 비열처리 배양액은 100배 희석시에도 비교적 높은 억제력을 보였으나 열처리 배양액의 경우는 50배 희석액 수준에서만 효과를 보였다. 또한 공통적으로 포도상구균에 대한 억제율이 리스테리아에 대한 억제율보다 높게 나타났다(Table 10~13).

Table 7. Antibacterial effect of heat treated culture fluid against *S. typhimurium* in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate			
	50 times	100 times	500 times	1,000 times
<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	70.4	1.2
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	63.1	9.6
<i>Bacillus subtilis</i>	54.8	--	--	--

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 8. Antibacterial effect of non-heat treated culture fluid against *E. coli* O-157 in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate	
	1 times	50 times
<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	49.4
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	72.7
<i>Bacillus subtilis</i>	100	39.0

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 9. Antibacterial effect of heat treated culture fluid against *E. coli* O-157 in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate	
	1 times	50 times
<i>Stretococcus thermophilus</i>	75.6	--
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> sp.	100	18.4
<i>Bacillus subtilis</i>	49.9	--

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 10. Antibacterial effect of non-heat treated culture fluid against *Listeria* in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate			
	0배	50배	100배	500배
<i>Stretococcus thermophilus</i>	100	100	61.4	-
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	100	70.1
<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	79.5	-

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 11. Antibacterial effect of heat treated culture fluid against *Listeria* in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate		
	0배	50배	100배
<i>Stretococcus thermophilus</i>	100	42	-
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	32
<i>Bacillus subtilis</i>	100	81	-

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 12. Antibacterial effect of non-heat treated culture fluid against *Staphylococcus aureus* in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate			
	0배	50배	100배	500배
<i>Stretococcus thermophilus</i>	100	100	100	69.9
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	100	87.3
<i>Bacillus subtilis</i>	100	97.5	30.2	-

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

Table 13. Antibacterial effect of heat treated culture fluid against *Staphylococcus aureus* in different dilution rate. (%)

Bio-formula Microbe	Dilution Rate			
	0배	50배	100배	500배
<i>Stretococcus thermophilus</i>	100	99	30	-
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100	100	58	-
<i>Bacillus subtilis</i>	100	56	-	-

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

$$\text{억제율(\%)*} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=배양액 무첨가 평판배지상의 colony수

B=배양액 첨가 평판배지상의 colony수

5. 길항균 생균제가 자돈에 미치는 영향

본 연구에서 조제한 길항균제제(*Bacillus amyloliquifaciens* 30%, *Stretococcus thermophilus*

30%, *Bacillus subtilis* 20%, *Rhodospirillum rubrum* 5%, 빵효모 50%) 를 80일간, 1% 농도를 음수용으로 자돈에게 먹인 결과 12.3%의 체중의 증가효과가 있었다(Table 14). 또한 설사에 방효과는 85%이상으로 상당한 수준으로 설사를 예방할 수 있었다(Table 15).

Table 14. Pigling weight increasing effect of Bio-formula in drink.

	초기 체중 (Kg)	80일 후 체중 (Kg)	일당 증체율 (g/일)	일당 증체효과 (%)
대 조 구	5.5	45.1	495.3	--
실 험 구	5.3	49.8	556.2	12.3

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 15. Pigling's diarrhea preventing effect of Bio-formula in drink.

	설사예방효과	
	발생비율	예방효과
대 조 구	17.8%	--
실 험 구	2.5%	85.6%

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

6. 길항균의 분뇨에서의 생육 검토

길항균을 축산분뇨에 처리하여 악취제거는 물론 처리 후 액비로 사용하기 위한 가능성을 검토하고자 *Bacillus amyloliquifaciens* 10%, *Streptococcus thermophilus* 10%, *Bacillus subtilis* 20% 이외에 *Rhodospirillum rubrum* 20%, *Thiobacillus denitrificans* 20%, *Nitrosomonas europaea* 20%를 포함시켜 1%씩 1달 간격으로 2번 처리하였다. 축산 분뇨에서 여러 가지 악취

Table 16. Growth of Bio-formula Microbes in livestock waste.

Bio-formula Microbe	Dilution Rate	영양한천배지 (cells)	분뇨 20배 희석액 (cells)	비교 성장률
<i>Streptococcus thermophilus</i>		1.814	1.192	65.7%
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>		1.772	1.497	84.5%
<i>Bacillus subtilis</i>		1.847	1.143	61.9%

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

물질을 제거하기 위해서는 축분에서 왕성하게 생육하여야 한다. 따라서 사용된 미생물을 축산 분뇨에 처리하여 생육정도를 살펴보았다(Table 16). 축산 농가에서 수집한 분뇨를 20 배로 희석하여 멸균한 후 실험할 균을 접종하고 35°C에서 1일 정도 배양해서 흡광도를 측정하였다. 실험결과 길항균은 모두 축산분뇨에서 성장률이 좋았으며 향후 액비로의 사용가능성을 보여주었다.

IV. 적 요

본 연구에서 돼지 및 가축 사양농가의 최대 문제인 세균성 설사문제 및 각종 악취물질 제거 등의 문제를 해결하기 위해 돼지의 위와 장으로부터 분리한 유산균(*Streptococcus thermophilus*)과 병원성세균 및 곰팡이 생육을 억제하고 장내 유효한 각종의 생리활성 물질을 생산하는 납두균(*Bacillus subtilis* 및 *Bacillus amyloliquifaciens*)을 이용하였다. 이들이 함유된 환경친화성 청정사료 첨가용 및 축분뇨 처리용 생균제를 조제하였다. 본 사료첨가용 생균제에 포함된 길항 미생물 *Bacillus amyloliquifaciens*는 세균성설사의 원인균인 대장균, 살모넬라, 리스테리아, 포도상구균 등을 억제할 수 있는 길항균으로서 *S. typhimurium* KCTC 1926에 대하여 생균체의 경우 10^7 배 희석 조건에서 약 91% 이상의 억제력을 나타내었고, 열처리 배양액에서도 500배 희석 조건에서 63%의 우수한 길항능력을 나타내었다. 또한, 본 연구에서 사용한 유산균(*Streptococcus thermophilus*)은 돼지의 위에서 분리한 균으로 위액의 강한 산에서도 생존할 수 있는 내산성의 유산균으로 장내 유효균의 증식 효과 및 병원성균인 대장균, 살모넬라, 포도상구균 등 유해균에 대하여 생육억제 효과가 있다. 본 연구에서도 *S. typhimurium* KCTC 1926에 대하여 생균체의 경우 10^7 배 희석 조건에서 약 94% 이상의 억제력을 나타내었고 열처리 배양액에서도 70% 효과를 보였다. 본 연구에서 개발된 생균제를 돼지에게 먹인 결과 대조구에 비하여 설사발생 빈도가 85% 이상 감소하였으며 일당 증체효과도 12.3%로 나타나 설사예방효과와 증체효과가 인정되었다. 또한 길항균들은 20 배 희석된 축산분뇨에서 생육 가능성이 확인되어 향후 액비로의 활용 가능성을 보여주었다. 이상의 결과를 종합한 바 본 연구에서 조제한 길항성 생균제 Bio-formula가 가축사료 첨가제로 개발된다면 우수한 효능으로 가축사양 농가에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 고영두·신재형·김상철·김영민·박기동·김재황. 2003. 복합 생균제 첨가가 육계 생산성, 유해가스 발생량 및 맹장내 균총에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 45(4) : 559-568.
2. 고태구. 2000. Study for the Development of Antibiotics-Free Diet for Weanling Pigs. 한국축산학회지 42(1) : 37-44.
3. 김재황·김창현·고영두. 2001. 복합생균제(Economix)의 사료내 첨가가 착유우의 생산성 및 경제성에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 43(3) : 369-380.
4. 민정기. 1993. 생균제의 종류와 국내외 사용 현황. 장안전문대학 산업기술연구소 논문집 2 : 61-86.
5. 박종영. 1999. EU의 사료첨가용 항생제 사용금지에 관한 규정 소개. 대한수의사회지 35(3) : 198-205.
6. 신형태·금동혁·이향우·이동권·황보식·이재홍. 2001. 생균제 개발을 위한 새로운 효모균의 선별. 한국동물자원과학회지 43(5) : 721-726.
7. 여영수. 2003. 사료 안정성을 위한 사료내 항생물질 대체방안. 현대양계 416 : 42-49.
8. 장현. 1999. 사료 첨가용 항생제 사용과 항생제 내성 유발. 양계 355 : 119-122.
9. 정민용. 2000. 유용한 젖산균의 프로바이오틱 생균으로서의주요 특성. 환경연구 23 : 91-102.
10. 한인규. 1992. 항생제, 생균제 및 효소제의 성장촉진 효과와 작용기전. 현대양계 278 : 55-59.
11. 홍종욱·김인호·권오석·김지훈·민병준·이원백, 2002. 자돈 및 비육돈에 있어 생균제의 첨가가 생산성 및 분내 가스 발생에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 44(3) : 305-314.