

축산 환경개선제로 생산·유통되는 생균제의 문제점 및 검증방안

이은영*
수원대학교 환경공학과

Problems and Verification System of Probiotics as Livestock-environment Improving Agent Produced and Circulated. Lee, Eun Young*. *Department of Environmental Engineering, University of Suwon* – Probiotics are live organisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit on hosts. The administration of direct-fed microbials (DFM) such as lactobacilli and *Bacillus*, may be a more direct approach to beneficially alter gastrointestinal microflora than altering dietary ingredients or supplementing with growth-promoting levels of antibiotics. It is apparent that microbes have an important influence on immune development and resistance to infection; that microbes are not static colonizers of our bodies, but are dynamic, symbiotic coresidents. And it can improve the surrounding environments; decrease the malodor caused by degrade the excrement. Recently, new paradigm such as environment protection and safe food have been settled. In domestic farm house, there is a great demand for probiotics as a substitute of antibiotics for the improvement of environmental quality and the production of a competitive goods. Probiotics circulated in a country have three categories: an animal medicine permitted by national veterinary research quarantine service (NVRQS), a support feed registered in city or country house, and not-registered goods. However, lots of unqualified goods were produced and circulated. And thus, it is in urgent need of evaluating the present situation and effect of probiotics. This study was conducted to evaluate the system of a probiotics as a livestock-environment improving agents for the alternation of antibiotics and quality control of it.

Key words : Probiotics, DFM, livestock, malodor, microorganism

Probiotics는 그리스 어원의 'for life'의 뜻을 가진 생균을 의미하며 장내의 미생물 군집의 균형에 도움을 주는 미생물 및 균주가 생산한 대사산물을 포함되기도 한다[4, 50]. 또한, 가축분야에서는 Direct Fed Microbials(DFM)으로도 일컬어진다. 생균제는 항생제에 상대적으로 사용되며, 숙주인 사람이나 가축에게 투여되어 장내균총을 개선함으로써 좋은 영향을 주는 단일 또는 복합형태의 유산균, 비피더스균을 말하고, 그 특징으로는 동물의 성장 촉진, 사료 이용효율의 증가, 질병에 대한 저항력 증대[16, 17], 유해세균의 억제, 폐사율 감소 및 부패 독성물질의 생성억제 등이 있다[35, 38]. 생균제는 우리나라와는 밀접한 관계를 가지고 있으면서도 정작 그 중요성이나 그에 대한 과학적 접근이 역사에 비해 아주 짧은 기록이 있을 뿐이다. 우리는 김치, 된장, 요쿠르트 등의 다양한 발효산물을 이용하고 있으면서도 정작 그 작용기전이나, 적극적인 이용에 대해서는 매우 무관심해왔다. 그러나 최근 들어, 환경보호와 안전한 식품이 새로운 패러다임으로 정착되면서 국내의 축산농가에서도 환경의 질을 개선하고, 경쟁력을 갖추기 위하여 항생물질에 의존한 사육

방법에서 보다 안전한 사육을 위하여 생균제에 대한 수요가 증가하고 있다. 또한, 2005년 2월부터 악취방지법이 시행됨에 따라 축산분야에 있어서도 악취에 대한 대응책 마련이 시급한 실정이다. 축산악취는 암모니아와 황화수소 및 저급지방산 등이 저농도로 지속적으로 발생하는 특성이 있다. 그러나 현실적으로 국내의 농가에서 악취처리장치 등을 갖추기에는 예산이 부족한 실정이어서 지방자치단체를 중심으로 환경개선제를 보급하여 축산악취를 저감시키고자하는 노력이 해마다 증가되고 있다.

현재 국내에 유통되고 있는 생균제는 현재 수의과학검역원에서 허가를 취득한 동물용 의약품과 각 시도에 등록된 보조사료 및 미등록 제품 등 3군으로 분류할 수 있다. 동물용 의약품의 경우는 미생물의 성분, 함량 및 균수 측정방법 뿐만 아니라 임상시험과 독성, 안정성 시험을 거쳐 허가를 취득하여 2006년 현재 약 300여 제품이 등록되어있다. 보조사료는 각 시·도에 등록하며, 신청 시 업체가 지정한 사설연구기관에서 측정된 균수만 등록하게 되므로, 기존에 동물용 의약품으로 등록되었던 제품이 대거 이탈하여 보조사료로 등록하는 실정이다. 따라서, 현재 6개 그룹 154개 업체에 이를 정도로 많은 생산업체가 있다. 생균제를 잘 이용해서 효과를 본 축산농가도 있지만, 반대로 이해부족과 제품에 대한 과신으로 피해를 본 농가도 있다. 즉, 사료 관리법의 개

*Corresponding author

Tel: 82-031-220-2614, Fax: 82-031-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

정으로 약사감시를 받지 않고 보조사료인 생균제로 등록된 후 이와 유사한 여러 가지 종류의 검증되지 않은 제품들이 사료취급점이나 가축 약품 판매점을 통해 농가에 소개되면서 생균제에 대한 혼란과 오해가 발생되어 이들 제제에 대한 신뢰도에도 의문이 제기되고 있다. 더욱 문제인 것은 전혀 검증되지 않은 수입품이나 보조사료로도 등록되지 않은 불법 제품 또한 난무하고 있다는 것이다. 근래에는 모든 양돈농가가 축산환경개선제를 사용하고 있다고 볼 정도인데 시·군 지원에 편승한 다수의 생산업체가 다양한 환경개선제를 제조함으로써 양돈농가는 그 종류와 효과를 검증하기는 너무도 어렵고 자칫하면 생산비 증가 요인으로 작용할 수 있는 실정에 처해 있다.

본고는 항생제를 대체하고, 축산환경을 개선시킬 목적으로 활용되는 생균제의 문제점을 알아보고, 이들의 균일한 품질관리를 위한 검증방안을 모색해보았다.

생균제로서의 미생물

생균제(프로바이오틱스)는 동물소화관내에서 유용한 작용을 하는 미생물로서 장내 균총 개선의 작용을 한다. 이런 생균제로 사용되는 균주로 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhodobacter* 등의 세균류, *Saccharomyces*를 포함하는 효모류, *Aspergillus* 등을 포함하는 곰팡이류 등이 있다[32]. 생균제로 이용되는 미생물은 일반적으로 안전하다고 인정되는 미국의 GRAS (Generally Recognized As Safe)규정의 미생물을 이용하는 데, 그 중 다양한 미생물을 서로 단독 배양하여 혼합하거나 복합배양을 하여 이용하고 그 중에는 *Lactobacillus* sp.와 *Bifidobacterium* sp.이 가장 잘 알려져 있다. 이들 유산균은 생균제로서의 특성이 뛰어나서 lactic acid를 생산하며, indole, skatole, phenol, amine, ammonia 등의 유해물질을 생산하지 않는 유익한 미생물이다. 유산균은 낮은 pH 및 환원전위를 유지시키며, 유기산, bacteriocin, 이산화탄소, 에탄올, diacetyl, 저분자 항균물질 등을 생산하고, 영양소를 고갈시켜 우점화시키는 능력에 의해 항균력을 보이는 것으로 알려져 있다[1, 8, 55]. 박테리오신은 분자량 1000이상의 단백질성 고분자물질로서 그람 양성균과 이에 관련된 균주에 활성을 가지는 좁은 스펙트럼을 보인다. 또한, 소화효소에 의해 쉽게 분해될 수 있어 장내에서의 항균력보다는 생물방부제(biopreservative)로서의 효과를 인정받고 있다[23, 31]. 과산화수소는 유산균이 catalase 효소를 생산하지 않음으로서 배양액내에 축적된다[20]. 과산화수소는 세포단백질과 세포막지질의 sulfhydryl group을 산화시킬 수 있다[45, 46]. 이산화탄소는 heterofermentive 유산발효에 의해 발생되며, 이산화탄소 자체의 살균력[45] 및 효소적인 decarboxylation에 의한 저해효과가 있다[40]. Diacetyl (2,3-butanedione)은 버터의 향신성분으로서 citric acid 대사에 의해 생산된다[45]. 이 항균물질은 pH 7이하에서 효과적이며, 효모, 곰팡이, 그

람 음성균의 arginine binding protein과 반응하여 arginine 이용능을 방해하여 저해효과를 나타낸다[37]. 저분자의 항균물질에 대한 연구도 많은 연구가 진행되고 있으며, 최근까지 알려진 항균물질의 특징은 낮은 pH에서도 효과적이며, 열안정성이 있으며, 넓은 스펙트럼을 가지고, acetone 용해성 등의 성질을 가진다[3]. 그 중 reuterin은 *L. reuteri*에서 생산되며 혐기성 환경에서 glucose, glycerol, glyceraldehyde 존재 시 생산이 증진되며[2], 곰팡이, 세균, 원생동물, 바이러스에 대한 넓은 살균력을 가지는 것으로 알려져있다[2, 13, 24]. Reuterin은 sulfhydryl enzyme인 ribonuclease binding subunit의 억제제로 DNA 합성을 저해한다[24]. Pyroglutamic acid는 *L. casei*, *L. pseudoplantarium*, *Streptococcus brevis*에서 생산되며 *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas putida* 등을 저해한다[36].

생균제의 바람직한 특징은 비병원성이며, *in vitro* 증식이 용이하며, 생체 내에서 빠른 성장을 하며, 내산성, 내담즙성을 가지고 있으며, 성장기에 lactic acid와 같은 항균물질을 생산하여야 하며, 사료성분에 의한 활성이 억제되지 않아야 하며, 실온에서 효과를 유지하며, 사료에 혼합하여 사용하기가 편리하여야 하며, pelleting을 제작할 경우에도 효과를 유지하여야 한다[54]. 생균제의 작용기전은 장내 세균총 정상화, 항생물질생산, 병원균의 정착을 저지하기 위한 영양소 경쟁, pH 저하에 의한 유기산 생산, β -glucuronidase, azoreductase, nitroreductase 등 병원균 유해효소억제, 부패산물 및 독소 생산저지, 소화효소 생산, 비타민 합성, 면역 자극 등이다.

생균제의 역할

가축의 성장을 촉진하고 설사 등의 질병을 예방, 치료하기 위해 이용되는 사료 첨가제 중에서 일반적으로 항생제가 가장 많이 이용되고 있다. 그러나, 항생제는 장기간 사용하거나 남용하게 되면 가축에게 내성이 생기고 축산물의 항생제 잔류 문제를 초래하게 된다. 더욱이 2006년 이후 항생제를 가축의 성장촉진 목적으로 사용되는 것이 금지되고, 안전한 축산물을 소비하려는 소비자의 요구, 축산환경을 개선하고 질병을 예방해야한다는 시급성은 생균제의 사용이 더욱 증가하는데 큰 몫을 하고 있다. 생균제는 가축의 생산성을 개선시킬 목적으로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* 등을 단순히 부형제와 섞는 형태로 제조되었고[18], 국내에서는 1980년대 후반부터 처음 보급되어 20년간 많은 성장을 보이고 그 내용에도 많은 변화가 있었다. 초기엔 돼지 사육에 있어서 생균제를 첨가하여 육성 비육돈의 성장과 육질개선에 이용되었으며, 최근엔 돈사 내 악취제거와 분뇨의 처리 등 환경개선제의 목적으로 활용되는 경우가 증가되고 있다. 생균제의 효과를 높이기 위하여 β -glucan, 초유 같은 면역증강물질이나 미생물의 증식을 촉진시키는 올리고당,

생리활성이 있는 한약제나 식물추출물을 함유시키기도 한다.

가축은 사육환경(사료의 변화, 환경, 스트레스 등)이 열악하고, 항생제를 많이 사용해왔기 때문에 균형이 깨져버린 장내균총을 균형을 유지시켜주고, 유익한 균의 우점화를 이루기 위해 생균제를 사용할 필요가 있다.

생균제의 작용기전을 먼저 알아보면, 숙주의 면역체계 발달과 기능조절에 중요한 역할을 하며, 장관 내의 제한된 영양소를 병원성 미생물과 경쟁함으로써 성장을 억제시켜주며 [28, 33], 유기산인 젖산, 아세트산, 과산화수소, 박테리옌, adhesion inhibitor 등의 물질을 생산하여 병원성 미생물의 성장을 억제시키고 [56], 장 점막에 존재하는 toxin A 수용체를 차단시키고 분비성 IgA와 IgA antitoxin A의 분비를 향상시켜 *Clostridium difficile* 연관의 장질환을 억제시켜준다. 장 상피세포의 병원성 미생물 결합부위를 경쟁적으로 선점하여 병원성 미생물이 장 상피세포와의 결합기회를 갖지 못하게 하며 [47], 생균제 자체적으로 장 점막에 대한 성장작용이 있어 정상세균총이 장관 상피의 장벽기능을 증강시켜주며, 증식, 분화, 세포 생존을 포함하는 장관상피세포의 방어적 반응을 증대하도록 한다 [25]. 또한, 병원성 세균인 *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* 등은 mannan oligosaccharide(MOS)에 흡착되어진다고 한다 [59]. MOS는 효모의 세포벽에 함유되어 있는데, 그 구조가 복잡하고 소화가 되지 않는다 [5, 6]. 병원성 세균이 MOS에 흡착이 되면 장 점막세포를 감염시킬 수 없게 되어 분을 통해 체외로 배설된다 [11, 12, 14, 16, 17].

생균제의 효능은, 강력한 장점막 부착력으로 장점막에 붙어 장질환을 유발하는 병원균을 경쟁적으로 떨어뜨려 밖으로 배설시켜주며, 항생제 투여에 따른 장내균총의 파괴를 신속히 회복시켜주며, *Streptococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O-157의 감염에 대한 예방 효과와 증식을 억제하며, 장내 유익균인 *Bifidobacterium* sp.의 발육에 최적인 환경 및 증식을 촉진하고, 장내 유기산의 주요 구성 성분인 낙산이나 아세트산을 생산하며 장내 pH를 낮춰 줌으로써 유해 병원균의 발육을 억제하며, 아밀라아제의 전분 분해효소나 비타민 B군(B₁, B₂, B₁₂, 니코틴산, 엽산) 생성할 수 있다 [7, 10, 30]. 이상에서의 여러 가지 복합적인 작용에 의해 가축에 급여시 정상균총을 유지하고 가축의 생산성 향상을 도모할 수 있다 [22]. 양돈에 대한 생균제의 사용효과에 있어서, 생균제를 돼지에 급여시 성장률과 사료효율에 개선효과가 있다는 보고도 있다 [34, 42] 결과적으로 소화능력을 개선시켜 분에서 발생하는 암모니아, 황화수소 및 휘발성 저급지방산 등의 악취량 [49]을 감소시켜준다고 보고하였다 [15, 34].

생균제의 문제점

생균제가 사용되기 위해서는 유통기간 중 생존률이 유지

되어야 하고, 섭취 시 위장과 소장에서 분비되는 소화효소와 담즙산에 의해 분해되어 생균수가 감소되지 않아야 한다 [50]. 따라서, 생균제가 사용되기 위해서 갖출 조건으로는, 첫째 생균제의 효능, 유해균의 억제, 혈중 콜레스테롤의 감소, 유해균의 장정착 저해, 면역활성의 증강, 항암효과 등이 높아야 한다. 둘째, 투여되는 가축이나 이 가축을 섭취하게 되는 사람에게 안전성이 보장되어야 한다. 셋째, 보존성이 높아야 하므로, 식용균은 동결 건조 시 사멸하지 않아야 하며, 사료용은 펠렛화 등의 가공 시 생존해야 한다. 넷째, 대장과 직장에 도달하여 장운동을 촉진시켜야 하므로, 위산이나 담즙 등의 효소에 분해되지 않아야 한다 [10, 13, 26, 39, 41, 43]. 일반적으로 자연계에 있는 미생물이 위의 모든 조건을 만족한다는 것은 매우 어려운 일이다. 따라서, 유전자 조작이나 캡슐화 및 동결건조 등을 통해 위의 조건을 충족시켜주어야만 한다 [44]. Lim 등(2001)은 생균제로 많이 사용되는 균종이 동결건조제를 이용하여 동결건조된 후 그 분말이 장내로 들어왔을 때의 생존가능성을 알아보기 위하여 내산성, 내담즙성, 내황산성 및 유해균 억제성이 조사하였다. pH 4인 인공위액에서는 *Lactobacillus* sp.가 40~50%의 생존률을 보이며 *Saccharomyces* sp.의 4~5%, *Bacillus polyfermenticus*와 *Clostridium acidophilum*은 0.5~0.6%의 결과를 보이는 것으로 나타났다. 반면, 0.3% 담즙산에서의 생존률은 이와는 달리 *Sacharomyces* sp.는 영향을 거의 받지 않았으며, *Cl. acidophilum*와 *B. polyfermenticus*는 대조군에 비하여 각각 10%, 4%의 생존률을 보이는 것으로 나타났다. 또한, 위액에서 가장 높은 생존율을 보이던 *Lactobacillus* sp.가 1/10⁵의 생존율을 보였다. 한편, 황산성에서 이들 미생물의 증식이 오히려 촉진되는 것으로 나타났으며, 유해세균에 대한 제거 능력도 우수한 것으로 나타났다. 결국 사용되는 생균제의 종류에 따라 가공방법과 저장 안정성을 높이는 방법이 강구되어야 할 것으로 사료된다.

생균제의 기술개발 동향

생균제는 항생제에 상대되는 개념으로 숙주인 사람이나 동물에게 건조세포나 발효산물의 형태로 투여하여 숙주의 장내균총을 개선함으로써 좋은 영향을 주는 단일 혹은 복합 형태의 미생물을 말한다.

일본의 경우엔 생균제로 가장 각광받고 있는 *B. polyfermenticus*는 1993년 일본의 Terakado가 공기로부터 분리한 아포성의 간균으로서, 장에 도달할 때까지 활성을 잃지 않아 매우 효과적임이 알려져 있다. 현재 사용되는 많은 제제들이 장에 도달하기까지 위산이나 기타 효소에 의해 분해되는 문제점이 있으므로 이러한 *Bacillus* sp.의 생균제가 활성아포를 형성하여 생균 대부분이 장에 도달하는 것은 매우 유익하다고 한다. 프로바이오틱 생균제로 많이 이용되는 것은 유산균(*Lactobacillus acidophilum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. lactis*), 비피더

스 균(*Bifidobacterium lactis* Bb-12, *B. longum* BB536, *B. breve*), 고초균(*Bacillus subtilis*, *B. polyfermenticus*), *Clostridium butyricum*, *C. faecium*, *C. thermophilus*, *C. diacetylactis*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Propionibacterium* sp., 등이 알려져 있다. 일본에서는 정부의 엄격한 규정을 통과해야 하는 제제를 시행하고 있다.

유럽의 생균제이용은 가축영양과학위원회(SCAN)에서 *Bacillus toyoi* 제제를 처음 검토하였다. 이후, SCAN은 생균제가 사료첨가제로서 안전하지 않을 경우 등록이 거절되고 있다. 검토위원회에서는 반드시 유해하지 않아야 하며, 산과 담즙에 생존하여 대사적으로 활동성이 있어야 하는 것을 조건으로 한다. 검토조건으로는 가축의 성장에 대한 안전성 자료 가축사료에서 검사할 수 있는지 여부자료 예방목적, 치료의 전 단계에서 미생물에 대한 내성으로 발전되지 않음에 대한 자료 성장 중인 가축의 대사과정 중에 미생물의 역할이 위해 없이 사용되었는지에 대한 독성연구가 진행된 결과 환경에 미치는 해로운 영향을 미생물로부터 유래한 사항에 대한 검토 결과 등이 검토된다. EU 국가에서는 현 항생물질과 비슷한 연구자료를 구비하여 제출한 후 SCAN 심사를 통과해야 유통되고 있다.

미국의 생균제는 DFM이라고 하며, FDA의 승인을 받은 제품은 없다. 그러나 미국의 식품업계에서도 무항생제 제품에 대한 수요가 늘기 때문에 일본에서 제조 판매되는 제품을 수입하여 닭과 돼지의 사육에 이용하는 실정이다.

기술개발 동향을 통해 알아본 결과 일본은 세계특허출원 건수의 절반가량을 차지하여 개발을 주도하고 있으며, 우리나라는 아주 낮은 수준의 기술을 보이는 것으로 나타났다. 연구현황을 살펴보면, 미생물을 유전공학적으로 처리하여 효소활성을 향상시키며, 그 생성물을 식품[27], 의약품[9] 또는 사료용[48, 57, 61]으로 사용하는 것이 주를 이룬다. 그 중 생균제의 장기보존을 위해 동결건조법[58]이나 분사건조법 등에 의한 분말형태의 제조[53]를 하게 되며, 이런 분말 생균제는 저온이나 상온에서 생존율이 저하되어 위산에 녹지 않고 안전하게 장에 도달하게 되는 중요한 공정의 하나이므로 다양한 방법[19, 21, 29, 51, 52]이 연구되고 있다.

균주의 품질관리를 위한 공인분석방법 확립의 필요성

생균제의 이러한 기능을 충족시켜서 유통시키는 일은 결코 쉬운 일이 아니다. 따라서, 현재 국내에서 유통되고 있는 수많은 생균제의 효능과 안전성에 대한 관리가 시급한 실정이다. 현재 국내의 생균제는 동물용의약품과 보조사료로 나누어 관리되고 있다. 국립수의과학검역원(NVRQS)에서 동물용의약품으로 관리되던 생균제가 동물약품협회에서 관리하는 의약부의약품으로 이관되려는 시점이다. 반면, 정기적 약사 감시를 받는 동물용의약품과는 달리 허가절차가 매우 간편한 보조사료 생균제는 사료제조업등록신청서와 함께 사료의 성분등록을 사설기관의 시험결과서를 첨부하여 소재지의 시·

군에 제출하면 된다. 따라서, 이전에 동물용의약품으로 관리받던 많은 제품들이 대거 보조사료로 등록을 전회하는 실정이다. 이처럼 허가과정이 허술하고 1년에 2회 수행되는 품질관리검사 역시 자체수행결과로 대체되고 있으며, 일부의 제품은 유사성분명으로 아예 성분등록이 되지 않은 유사제품의 형태로 유통되고 있다. 현재(2006년) 보조사료 제조업체수는 461개소이며 그 중 생균제 제조업체수가 185개소이다. 한국동물약품협회에 등록된 생균제 제조업체(25개소)까지 포함하며 200여개이나 미등록업체를 포함할 경우 대략 300여개소 이상이 될 것으로 추정된다. 전국 15개 시·도 및 경기도 관할 31개 시·군의 성분등록품목 현황(2006년 5월 현재)을 보면, 생균제는 보조사료업체의 496품목, 동물약품업체 131품목을 포함하여 627개 품목에 달하여 제품의 품질이나 효과가 검증되지 않은 채 유통되고 있다. 근래에는 모든 양돈농가가 축산환경개선제를 사용하고 있다고 볼 정도인데 시·군 지원에 편승한 다수의 생산업체가 다양한 환경개선용 생균제를 제조함으로써 양돈농가에서는 그 종류와 효과를 검증하기 어렵고, 자칫하면 생산비 증가 요인으로 작용할 수 있는 실정에 처해 있다. 이처럼 환경개선제 종류가 시중에 너무 많이 유통되어 선택에 어려움을 겪기는 양돈농가 못지않게 각 지방자치단체에서도 마찬가지이다. 이러한 생균제의 문제를 근본적으로 해결하기 위해서는 법의 맹점을 교묘히 활용하는 업체만을 비난할 것이 아니라 업계의 우량화를 유도하고 격려할 수 있는 개선책이 필요하다. 따라서, 현재 환경개선용 생균제를 검증하는 기관 및 검증 방법에 대한 시스템 구축은 매우 시급하다.

최근 한미 FTA 체결과 향후 유럽, 중국 등 제 3국과의 FTA 체결이 가시화 되면서 축산물 시장의 국제 교역장벽이 사실상 무너지고, 국제적인 축산물 거래가 자유로워지면서 세계 어느 곳에서도 질 좋고 신선한 상태의 축산물의 수입·수출이 가능해지고 있다. 이미 선진국의 축산은 식품의 안전성과 품질 고급화를 위해 유기축산물의 소비시장이 25%씩 급성장하여 멀지않아 국내의 시장역시 선진국의 유기축산물의 진입에 의해 국내제품과의 무한 경쟁이 이루어질 것으로 예상된다. 우리 국민들 역시 소득증가와 위생적이고 안전한 먹거리에 대한 관심의 증가로 2007년 3월 28일 무항생제축산물 인증제도가 신규로 도입되면서 친환경 축산물의 생산역시 급격히 증가할 것으로 전망된다. 현행 35종의 동물용 항생제와 항균제 중 7종이 2009년부터 금지되고 나머지 28종 중 총 9종이 2012년부터는 배합사료 내에 혼합할 수 없게 하는 방안이 현재 검토 중이다. 결국 항생제의 사용금지 및 강력한 규제는 이에 대한 대비책으로 생균제를 포함한 대체물질의 개발이 이제 더 이상 미룰 수 없는 실정임을 알려준다.

검증방안

일반적으로 환경개선제 및 사료첨가제로 유통되는 미생물 제제의 품질 검증은 균수보증을 통한다. 따라서, 사용되는

Table 1. Medium and growth conditions of microorganisms used as probiotics.

Name	Medium	Growth conditions
<i>Bifidobacterium infantis</i>	BL Agar (Glucose Blood Liver Agar)	37°C, Anaerobic, pH 7.2
	Bifidobacterium Medium	37°C, Anaerobic, pH 6.8
	Reinforced Clostridial Medium	37°C, Anaerobic
	Trypticase-Phytone-Glucose Medium	37°C, Anaerobic
<i>Bifidobacterium longum</i> (<i>bifilong</i>)	BL Agar (Glucose Blood Liver Agar)	37°C, Anaerobic, pH 7.2
	Oatmeal Agar(A) (ISP-3)	37°C, Anaerobic
	GAM Semisolid	37°C, Anaerobic
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Bifidobacterium Medium	37°C, Anaerobic
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS	37°C, Facultative Anaerobic, pH 6.2~6.6
<i>Lactobacillus brevis</i> 3	MRS(Lactovacilli MRS Broth(Difco 0881))	30°C, Facultative Anaerobic
<i>Lactobacillus casei</i> (<i>Lactobacillus bulgarican</i>)	MRS	30°C or 37°C, Facultative Anaerobic
	MRS (Medium 178) + 0.5 % Glucose Medium	37°C, Facultative Anaerobic
<i>Lactobacillus curvatus</i>	MRS Medium (Oxoid CM359, Difco 0881)	30°C, Facultative Anaerobic
<i>Lactovacillus delbruekii</i> (<i>Lactovacillus delbruekii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>)	Lactobacilli Medium	37°C, Facultative Anaerobic
<i>Lactobacillus fermentum</i>	MRS Medium (Oxoid CM359, Difco 0881)	30°C, Facultative Anaerobic
	MRS (Medium 178) + 0.5 % Glucose Medium	37°C, Facultative Anaerobic
<i>Lactobacillus lactis</i> (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>)	Lactobacilli MRS Broth (Difco 0881)	37°C, Facultative Anaerobic
	Lactobacillus Medium	37°C, Facultative Anaerobic
	Tomato Juice, Yeast Extract Milk	37°C, Facultative Anaerobic
	BL Agar (Glucose Blood Liver Agar)	37°C, Facultative Anaerobic
	GAM Semisolid	37°C, Facultative Anaerobic
	MRS Medium (Oxoid CM359; Difco 0881)	37°C, Facultative Anaerobic
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS /MRS Medium (Oxoid CM359, Difco 0881)	30°C or 37°C, Anaerobic, Facultative Anaerobic, pH 6.2~6.6
<i>Lactobacillus reuterii</i>	MRS Medium (Oxoid CM359, Difco 0881)	37°C, Facultative Anaerobic, pH 6.2~6.6
<i>Lactobacillus cellobiosis</i>	MRS	
<i>Lactobacillus reuterii</i>	MRS	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MRS	26°C
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>)	Lactobacilli MRS Broth (Difco 0881)	30°C, Facultative Anaerobic
<i>Pediococcus acidilacticii</i> (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	Lactobacilli MRS Broth (Difco 0881)	37°C, Facultative Anaerobic
<i>Pediococcus cerevisiae</i> (<i>damnosus</i>)/Yeast	YPD agar	25~30°C, Aerobic
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MRS Medium (Oxoid CM359; Difco 0881)	30°C, Aerobic, pH 6.2~6.6
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> (<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>)	Chopped Meat Medium	30°C, Anaerobic
<i>Propionibacterium shermanii</i>	BHZ, 0.05% cysteine	Anaerobic
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM	
<i>Streptococcus intermedius</i>	Chopped Meat Medium	37°C, Facultative Anaerobic
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lactobacillus MRS Broth (Difco 0881)	37°C, Aerobic
<i>Streptococcus cermoris</i> (<i>diplococcin</i>)	MRS	
<i>Streptococcus diacetyllactic</i>	MRS	
<i>Streptococcus faecium</i>	MRS	
<i>Streptococcus lactis</i> (<i>nisin</i>)	MRS	

유용미생물의 리스트 및 이를 배양하기 위한 배지 및 배양 조건을 Table 1에 정리하였다. 또한, 환경개선택제로 미생물제제를 사용함은 다양한 목적과 더불어 축사에서 발생하는 악취를 제어하는 목적이 크다. 따라서, 미생물 제제를 이용한 악취개선효과를 축산환경개선의 지표로 삼는다. 국내외의 많은 연구자들이 축산악취를 측정하는 방법에 대한 많은 검토가 있었으나, 본 연구자가 일본 초지연구소에방문하여 소개 받은 결과를 소개하겠다[60].

가축배설물에서의 악취발생은 배설물의 상대 환경조건(온도, 습도, 환기량), 시간의 경과 등, 여러 가지 인자의 영향을 받는 불안정한 상태이고, 같은 조건에서 측정하여도 측정치가 다르게 나오는 경우가 발생하여 이러한 것을 고려하여 물질 사용구와 미사용구의 대조구를 두는 것과 함께, 얻어진 데이터에 대하여 통계 처리하여 유의차를 확인하는 것을 전제로 하여 시험방법을 설정하였다.

배설물의 악취는 100종류를 넘고 다양한 악취물질이 혼합된 복합취이고, 함유물질의 총괄적인 측정은 곤란하기 때문에 주요한 악취물질을 선정하는 것에 의하여 악취의 개요를 선정하는 것이 중요하다. 국내에서는 악취방지법(2005) 시행으로 환경중의 악취 규제가 강화되고 있지만 그 가운데 22 종류의 악취물질을 [지정악취물질]로서 규정하고 있다. 여기서 암모니아와, VFAs, 황 화합물류에 대하여 대기오염공정 시험법에 따라서 측정한다. 암모니아의 경우 용액흡수법으로 채취하고 인도페놀법으로 분석하며, 경시 변화 측정은 간단하게 가스 검지관에 의한 측정도 병용한다. VFAs는 알칼리 회석법으로 채취한 후 FID가 장착된 gas chromatography에 의하여 분석한다. 황화합물류는 시료채취백이나 실린더를 이용하여 채취한 후 FPD가 장착된 gas chromatography에 의하여 분석한다.

일반적으로 환경개선택제로 가장 많이 쓰이는 사료첨가형 물질의 시험방법은, 가축에 일정기간 물질을 급여한 후에 배설물을 채취하고 악취 측정을 하였다. 이것과 함께 대조구로서 물질을 급여하지 않은 가축을 같은 조건으로 사양하고 배설물을 채취하여 악취의 측정을 비교한다. 다양한 악취 측정방법이 있겠지만, 일본 초지연구소에서 제안한 방법을 인용하겠다[60]. 악취의 측정은 기본적으로 악취발생장치(Fig. 1, 2)를 사용하여 시험법 1 “돈분 배설물 측정”과 시험법 2 “계분 배설물 측정”을 시행하였다[60]. 시험법 1의 장치는 분뇨혼합물에서 NH₃, 황 화합물의 휘발량을 평가하기 위해 제작된 것으로 시료를 배양기에 넣고 암모니아의 경우 일정온도에서 연속적으로 통기조건하에서 발생하는 악취를 포집, 채취하나, VFAs는 측정시만 정온 통기하고, 황 화합물은 측정시만 정온밀폐하여 분석하는 형태로 하였다. 반면, 시험법 2는 모든 악취물질을 정온 연속통기를 통해 동시에 측정하는 특징을 가지고 있다. 또한 VFAs는 포집 관에 포집한 후 Gas Chromatography/FID로 분석하기도 하며 검지관을 이용하기도 한다. 기본적으로 두 시험방법은 두 명의 실험자에

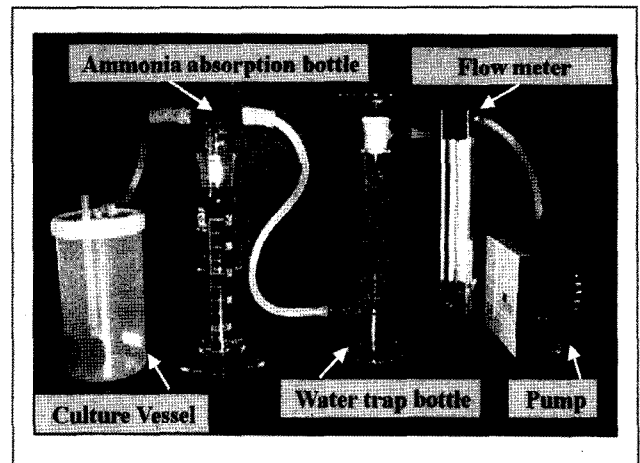


Fig. 1. Odor generating apparatus (Method 1) [60].

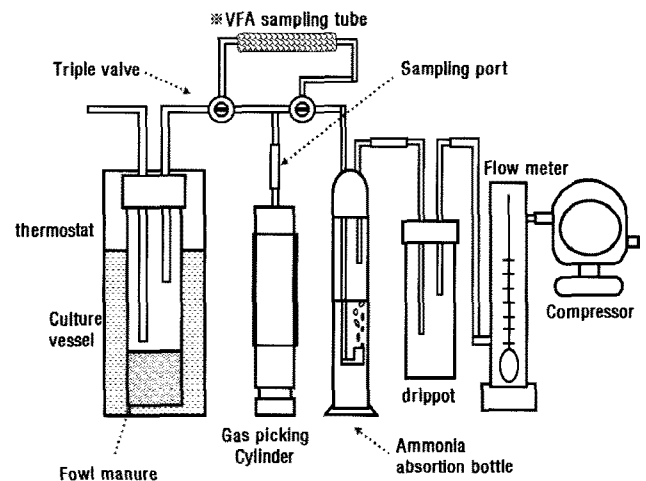


Fig. 2. Odor generating apparatus (Method 2) [60].

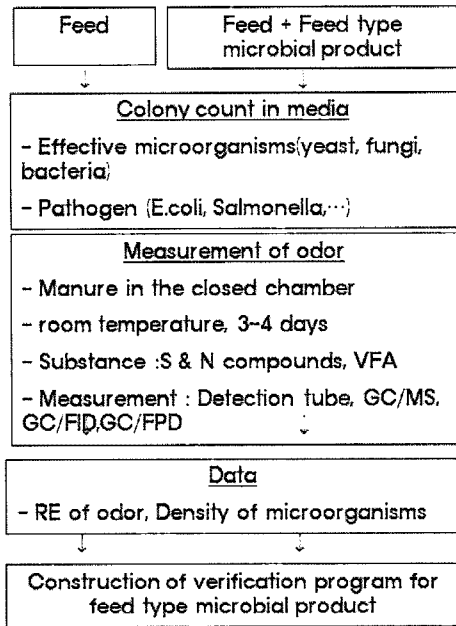
의해 고안된 방법으로서 각자 장단점을 가지고 있다.

시험법 1과 2에서는 VFAs와 황 화합물류의 측정법이 다르고, 시험법 1에서는 측정치 대부분이 안정된 데이터가 나왔지만, 매번 측정항목 간에 채취가 다르기 때문에 동시에 두 가지의 물질을 측정하는 것은 곤란하다. 시험법 2에서는 동일 장치 시료에서 전 항목의 측정이 가능하지만 시험 결과에서 VFAs와 황 화합물류의 측정치가 사료첨가형 미생물 제제를 급여한 시험군에서 오히려 대조군에 비하여 약간 증가하는 경향을 보이거나 큰 차이가 없게 나타났다. 따라서 이런 방법은 축종을 지정하여 실험한 것은 아니고, 여러 가지 장점과 단점이 있기 때문에 목적에 맞는 것을 선택하는 것이 좋다.

다음은 분무용 환경개선택제의 검증방법으로서 국내 수도권 매립지 관리공사에서 탈취제 용액에 대하여 규정한 사양을 기초로 삼아 본 연구진이 제안하였다. 탈취제의 성능은 유허계 화합물, 질소화합물, 휘발성지방산 등의 경우 90% 이상 제거 되어야한다.

탈취제성능 시험조건은 온도 23±5°C, 상대습도 50±10%,

Feed type microbial product



Spray type microbial product

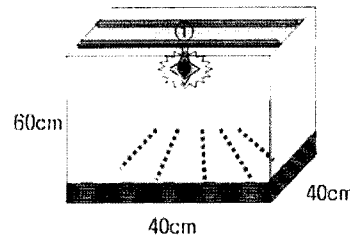
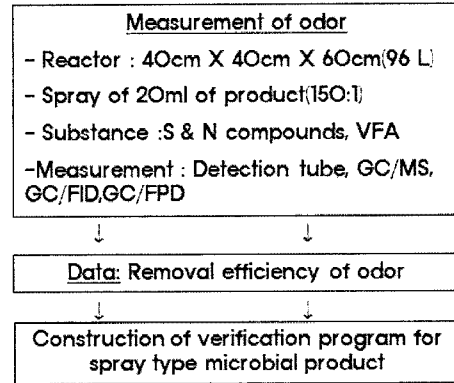


Fig. 3. Guideline for the verification of probiotics as livestock-environment improving agent.

탈취시험 용기크기 40 cm×40 cm×60 cm=96 L로 하였으며, 투입 제재양은 약품별 희석비율(물 : 탈취제 = 100 : 1~200 : 1)의 범위 내에서 고공탈취분사기(Φ=0.3 mm)로 20 mL를 분무 살포한 후 측정하였다.

우리 축산농가에게 있어서 현재 FTA 체결에 대한 대비책은 국가에서 미봉책으로 지원해주는 지원금으로 해결될 일이 아니다. 궁극적으로 축산환경을 개선시켜주며, 친환경·고품질의 축산품을 생산하는 것만이 경쟁력을 키울 수 있다. 최근 안전한 먹거리와 건강식품에 대한 관심이 높아져서 이제는 과거의 생산성 향상을 위해 밀집사양으로 진행되어오던 사육방식이나 항생제나 화학비료를 이용하던 방식으로는 값싸고 질 좋은 수입품과의 경쟁에서 살아남을 수 없다. 따라서, 앞으로 축산식품의 안정성과 동물의 복지를 고려한 유기 축산으로 변명이 이루어지며 사료업계도 HACCP(위해요소중점관리제도)가 실시될 것이며 광역 친환경 농업단지가 조성될 것으로 전망된다. 따라서 생균제의 사용은 앞으로도 계속 증가할 것이며 이러한 인증제도 및 검증을 통해 현재 난립되어있는 제품 중에서 우수한 제품만이 살아남을 것이다. 또한, 최근에 synbiotics의 개념이 도입되면서 배양액을 건조시켜 재사용하는 방식 또는 기능성 물질을 prebiotics로서 추가하는 등의 기능성을 높인 고부가가치의 생균제로 발전하고 있다. 즉, 미생물의 안정성을 높이는 코팅화 기술 및 나노 캡슐에 넣는 방법 등은 계속 개발될 전망이다.

요 약

생균제는 충분하고도 적절하게 사용되었을 때 숙주의 건강

에 도움이 될 수 있는 살아있는 미생물이다. Lactobacilli 나 Bacillus와 같은 직접투여하는 미생물(DFM)은 생장을 촉진하기 위하여 사료에 첨가되는 항생제 혹은 식품첨가물보다 장내의 정상균총의 정착에 매우 긍정적인 효과를 보여줄 수 있다. 또한, 생균제가 투여됨으로써 면역체계가 강화되고, 감염에 대한 예방효과가 있는데 이는 동물 체내에 병원균이 정착하는 것을 방해함으로써 이러한 효과를 기대할 수 있다. 생균제 투여를 통해 얻을 수 있는 효과는 배설물의 분해를 촉진하여 악취를 저감시켜줌으로서 가축의 사육환경을 개선할 수 있다는 점이다. 최근 들어, 환경보호와 안전한 먹거리에 대한 새로운 패러다임이 정착됨에 따라, 환경을 개선하고 우수한 품질의 축산품을 생산하기 위해 가축농가에서는 기존의 항생제를 대체할 수 있는 대안으로서의 생균제에 대한 요구가 높아지고 거의 모든 농가에서 생균제를 사용하고 있다고 해도 무리가 없다. 국내에서 유통되는 생균제는 크게 세부류이다. 첫째는 국립수의과학독성원(NVRQS)에 의해 검증되고 약사법에 의해 관리를 받는 동물의약품으로서의 생균제, 둘째는 시군에서 등록이되는 보조사료로서의 생균제와 마지막으로 미등록된 환경개선제들이다. 그러나, 많은 검증받지 않은 제품이 유통되고 생산됨으로인해 이를 검증할 방안 마련이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 환경개선제로서의 생균제를 검증하기 위한 방안으로, 생균수의 검증, 항생제 내성 검증, 그리고 악취제거능에 대한 검증의 3단계 방법을 제안한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 현안기술연구사업의 지원(11-

1390000-001958-01)을 받아 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Adams, M. R. and L. Nicholaides. 1997. Reviews of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*. **8**: 227-239.
- Axelsson, L. T., T. C. Chung, W. J. Dobrogosz and S. E. Lindgren. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* **2**: 131-136.
- Axelsson, L. T. 1990. *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. Studies on antagonism, metabolism and genetics. Dissertation report 44. Uppsala, Sweden, University of Agriculture.
- Berg, R. D. 1998. Probiotics, prebiotics or conbiotics. *Trends in Microbiol.* **6**: 89-92.
- Bernet, M. F., D. Brassart, J.-R. Neeser and A. L. Servin. 1993. Adhesion of human Bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4121-4128.
- Bernet, M. F., D. Brassart, J.-R. Neeser and A. L. Servin. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. **35**: 483-489.
- Bongaerts, G., R. Severijnen, and H. Timmerman. 2005. Effect of antibiotics, probiotics and prebiotics in treatment for hepatic encephalopathy, *Med. Hypotheses* **64**: 64-68.
- Brock, T. D. and M. T. Madigan. 1988. *Biology of microorganisms*. 5th eds, Prentice-Hall International Editions, London, England.
- Bristol Myers Squibb Company, Method for preventing or treating the development of respiratory allergies, US-0144287.
- Champbell, G. L. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds. *A Rev. Can. J. Anim. Sci.* **72**: 449-466.
- Chan, R. C. Y., A. W. Bruce, and G. Reid. 1984. Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of Gram-negative uropathogen by competitive exclusion. *J. Urol.* **131**: 596-601.
- Chan, R. C. Y., G. Reid, R. T. Irvin, A. W. Bruce and J. W. Costerton. 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragment. *Infect. Immun.* **47**: 84-89.
- Chang, Y.-H., J.-K. Kim, J.-H. Yoon, W.-Y. Kim, Y.-W. hoi, W.-J. Lee, Y.-B. Kim, and Y.-H. Park. 1999. Characteristics of *Lactobacillus leuteri* BSA-131 isolated from swine intestine. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 23-27.
- Chauviere, G., M. H. Coconnier, S. Kerneis, A. Darfeuille-Michaud, B. Joly, and A. L. Servin. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (EHEC) from enterocyte-like Caco-2 cells in culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 213-218.
- Chiang, S. H. and Hsieh, W. H. 1995. Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asia-Aust. J. Anim. Sci.* **8**: 159-162.
- Coconnier, M. H., M.-F. Bernet, G. Chauviere and A. L. Servin. 1993a. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus* strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells, *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **11**: 235-242.
- Coconnier, M. H., M.-F. Bernet, S. Kerneis, G. Chauviere, J. Fournait and A. L. Servin. 1993b. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 299-306.
- Cole, C. B., P. H. Anderson, S. M. Philips, R. Fuller and D. Hewitt. 1984. The effect of yoghurt on the growth, lactose-utilizing gut organisms and β -glucuronidase activity of caecal contents of a lactose-fed, lactase-deficient animal. *Food Microbiol.* **1**: 217-222.
- Commonwealth Scientific and Industrial Research Org. 2006. Reservation and transport of probiotic, 10-2006-70006224.
- Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 269-280.
- Corpak MedSystems, Inc. 2002. Probiotic/prebiotic composition and delivery method, US-0068750.
- Davis, M. E., D. C. Brown, A. Baker, K. Bos, M. S. Dirain, E. Halbrook, Z. B. Johson, C. Maxwell, and T. Rehberger. 2007. Effect of direct-fed microbial and antibiotic supplement on gastrointestinal microflora, mucin histochemical characterization, and immune populations of weanling pigs. *Livestock Sci.* **108**: 249-253.
- de Vuyst, L. and E. J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria, In L. de Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), *Microbiology, Genetics and Applications*, Blackie Academic and Professional. Glasgow.
- Dobrogosz, W. J., I. A. Casas, G. A. Pagano, T. L. Talarico, B.-M. Sjberg and M. Karlsson. 1989. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota, pp. 283-292. In Gruff, R. et al., (ed.), *The regulatory and Protective Role of the National Microflora*. Stockton Press, New York.
- European Commission. 2005. Opinion on the use of certain micro-organisms as additives in feedingstuffs.
- Finegold, S. M. 1970. The significance of the intestinal microflora. *Del. Med. J.* **42**: 341-345.
- Food Industry Research and Development Institute. 2003. Acid-and bile salt-resistant isolates having the ability to lower and assimilate cholesterol, US-0684105.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-368.
- Gnosis SPA, 2006. Method for preparing yeast microcapsule, JP-0038801.
- Goossens, D., D. Jonkers, M. Russel, A. Thijs, A. van den

- Bogaard, E. Stobberingh, and R. Stockbrgger. 2005. Survival of the probiotics, *L. plantarum* 299v and its effect on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition, *Digest. Liver Dis.* **37**: 44-50.
31. Gourama, H. and L. B. Bullerman. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **58**: 1249-1256.
 32. Havenaar, R., B. T. Brink and J. H. J. I. Veid. 1992. Selection of strains for probiotic use, pp. 209-224. In Fuller, R. (ed.), *Probiotics : The scientific basis*. Chapman & Hall, London.
 33. Hinton, M. G., C. Mead, and C. S. Impey. 1991. Protection of chicks against environmental challenge with *Salmonella enteritidis* by competitive exclusion and acid-treated feed. *Letters Appl. Microbiol.* **12**: 69-71.
 34. Hong, J. W., I. H. Kim, O. S. Kwon, J. H. Kim, B. J. Min, and W. B. Lee. 2002. Effects of dietary probiotics supplementation on growth performance and fecal gas emission in nursi. **44**: 305-314.
 35. Hong, S., W. J. Kim, S. Cha, and B. H. Lee. 1996. Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 128-131.
 36. Huttunen, E., K. Noro, and Z. Yang. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.* **5**: 503-513.
 37. Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 525-532.
 38. Jun, K. D., H.-J. Kim, K.-H. Lee, H.-D. Paik, and J.-S. Kang. 2002. Characterization of Bacillus polyfermenticus SCD as a probiotic. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**:359-366.
 39. Khedkar, C. D., J. M. Mantri, and S. A. Kulkarni. 1989. Therapeutic properties of acidophilus milk. *Indian Dairyman.* **41**: 562-565.
 40. King, A. D. J. and C. W. Nagel. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Fd. Sci.* **40**: 362-366.
 41. Ko, Y.-H., T.-K. Oh, Y.-H. Park, Y.-S. Kim, D.-Y. Yoo, and K.-H. Cho. 1991. New *Lactobacillus* sp. KCTC 8458BP and its application. Kor. Patent Publ. No. 91004366: 187-195.
 42. Ko, T. G. 2000. Study for the development of antibiotics-free diet for weanling pigs. *Kor. J. Ani. Res. & Sci.* **42**: 37-44.
 43. Koo, S.-M., Y.-H. Cho, C.-S. Huh, Y.-J. Back, and J.-Y. Park. 2001. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 376-383.
 44. Lim, Y.-B., N.-S. Paek, and Y.-M. Kim. 2001. Screening of Lactic Acid Bacteria for the Development of Probiotics and the Effect of cryoprotectant Agents. *Kor. J. Food & Nutr.* **14**: 441-445.
 45. Lindgren, S. E. and W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 149-163.
 46. Morris, J. G. 1976. Oxygen and obligate anaerobe. *J. Appl. Bact.* **40**: 229-244.
 47. Muralidhara, K. S., G. G. Sheggeby, P. B. Elikar, D. C. England, and W. E. Sandine. 1977. Effects of feeding lactobacilli on the coliform and *Lactobacillus* flora on intestinal tissue and feces from piglets. *J. Food Prod.* **40**: 288.
 48. National agriculture & food research organization, 2005. Microorganism preparation for preparing feed and its utilization, JP-0275765.
 49. Otto, E. R., M. Yokoyuma, S. Hengemuehle, R. D. Von Bermuth, T. Van Kempen, and N. L. Trottier. 2003. Ammonia, volatile fatty acids, phenolics and odor offensiveness in manure from growing pigs fed diets reduced in protein concentration. *J. Anim. Sci.* **81**: 1754-1763.
 50. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for Oral Bacteriotherapy of Gastrointestinal Disorders. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 73-78.
 51. Porubcan, Randolph Stanley, 2003. Formulations to increase survival of probiotic bacteria and extend their shelf-life, US-0743402.
 52. Porubcan, Randolph Stanley, 2006. Formulations to increase in vivo survival of probiotic bacteria and extend their shelf-life, US-0415894.
 53. PM International AG, 2004. Powder for preparation of a probiotic yogurt food, US-0942826.
 54. Salminen, S., M. A. Deighton, Y. Benno, S. L. Gorbach. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease, pp. 211-253. In Salminen, S. and S. von Wright (2nd ed.), *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*. Series: Food science and technology, Marcel Dekker, Inc., Madison Avenue, New York.
 55. Sanders, M. E., J. K. Kondo and D. L. Willrett. 1991. Application of lactic acid bacteria, pp. 433-459. In 1. Goldberg and R. Williams(ed.1), *Biotechnology and Food Ingredient*, Van Nostrand Reinhold, New York.
 56. Shahani, K. M., J. R. Valki, and A. Kilara. 1976. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: I. Cultured conditions for the production of antibiotic. *J. Cultured Dairy Prod.* **11**: 14-17.
 57. Societe de produca Nestle societeanonim, 2002, New probiotic for pet feed, 10-2002-7015880.
 58. Wells, J. E., Yen, J. T., and Miller, D.N. 2005. Impact of dried skim milk in production diets on *Lactobacillus* and pathogenic bacterial shedding in growing-finishing swine. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 400-407.
 59. Yang, Y.-K., J.-I. Cho, H.-K. Kang, M.-N. Moon, and Y.-B. Lee. 2007. Deveopment of Bio-Formula Complex for Domestic Animal Feeding. *Kor. J. Org. Agri.* **15**: 93-108.
 60. 農林水産技術會議事務局, 2006. 畜産で利用される臭気対策資材の果側定方法, 日本.
 61. 윤창영농조합법인;진상근, 2005. 미생물제제를 이용한 무항생제 폐지코기 생산방법, 10-2005-0038269.