

고온 조건에서 사료 내 생균제의 생존성 및 오염미생물의 생장 억제 효과

김겸헌^{1†} · 이권정^{1†} · 이아란¹ · 장인환² · 송인근² · 김동운³ · 김수기^{1*}

¹건국대학교 동물자원학과, ²(주)빅바이오젠, ³축산과학원

Viability of Probiotics in Feed under High Temperature Conditions and Their Growth Inhibitory Effect on Contaminant Microbes

Gyeom-Heon Kim^{1†}, Kwon-Jung Yi^{1†}, Ah-Ran Lee¹, In-Hwan Jang², In-Geun Song², Dong-Woon Kim³, and Soo-Ki Kim^{1*}

¹Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

²R&D center, Bigbiogen Co., Ltd., Anseong 456-891, Republic of Korea

³National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Republic of Korea

(Received July 25, 2014 / Accepted October 14, 2014)

The aim of this study was to investigate the effect of high temperature on the viability of probiotic organisms (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, and *Saccharomyces cerevisiae*) mixed with animal feed under controlled conditions by simulating a farm feed bin in the summer. Following inoculation of probiotics into the feed, the pH and probiotic viability were monitored during an 8-day incubation at room temperature. Sterile and non-sterile feeds displayed different patterns of pH changes, with increased pH in non-sterile feed at 2 days, but a pattern of decreasing pH at 4 days. The viabilities of *S. cerevisiae* and *B. subtilis* after mono/co-inoculation were maintained without substantial changes during the incubation, whereas *L. plantarum* viability tended to decline. In both non-sterile and sterile feeds, the probiotics were maintained or grew without any antagonistic effects. Probiotic viability was also tested upon a shift to high temperature (60°C). There was no distinct change in pH between sterile and non-sterile feeds after the temperature shift. *L. plantarum* and *S. cerevisiae* could not survive at the high temperature, whereas *B. subtilis* displayed normal growth, and it inhibited the growth of contaminant microbes. Fungal growth was not observed in non-sterile feed 2 days after supplementation with *B. subtilis*. Therefore, heat resistant *B. subtilis* could be safely used in feed bins to inhibit microbial contamination, even at high temperatures. The prevention of elevated temperature in feed bins is necessary for the utilization of *L. plantarum* and *S. cerevisiae* during the summer season.

Keywords: feed bin, high temperature, probiotics, viability

국내에서 2011년 7월 배합사료 내 항생제 사용을 전면 금지 하였으며 이를 대체할 물질 중 하나인 친환경 생균제(Probiotics) 는 그 사용이 증가되고 있다. 생균제는 가축의 장내에서 유익한 균총의 유지로 면역력과 질병 저항성 증강의 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Desnoyers *et al.*, 2009; Lessard *et al.*, 2009; Knap *et al.*, 2011). 세균, 효모 및 곰팡이 등 다양한 미생물들이 생균제로 사용되고 있으며(Beharka and Nagaraja, 1998; Piao *et al.*, 1999; Krehbiel *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2008; Ross *et al.*,

2010), 특히 젖산을 생성하는 유산균들이 많이 이용되고 있다 (Buenrostro and Kratzer, 1983; Kim *et al.*, 2008a, 2008b; Swyers *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2009; Salarmoini and Fooladi, 2011).

생균제는 가축에게 급여 시까지 살아 있어야 그 효과를 발휘 할 수 있고 가능한 높은 생존수가 보장되어야 한다. 일반적으로 지대포장이 아닌 대량의 벌크 사료가 사료공장으로부터 농가에 도착하면, 사료빈으로 사료를 투입할 때 생균제를 함께 혼합하게 된다. 그런데 사료빈이 철재로 만들어져 있어서 무더운 여름철에는 뜨거운 직사광선으로 인하여 그 내부의 온도가 높게 상승할 수 있다. 또한 높은 온도와 습도로 인하여 사료빈 내벽에 붙어 있는 사료는 덩어리를 형성하면서 세균과 곰팡이 등의 오염 미생물들이 급속하게 번식하기 쉽다. 일반적으로 사료는 유통되

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: sookikim@konkuk.ac.kr; Tel.: +82-2-450-3728; Fax: +82-2-458-3728

Table 1. Formula and chemical composition of basal diets used for growing pigs

Ingredients and chemical composition	%
Corn	50.3
Wheat bran (10%)	7
Rice bran	2.5
Soybean meal (45%)	28.95
Limestone	0.41
Animal fat	5.81
Molasses cane	3
Salt	0.3
Choline-HCl (50%)	0.02
Methionine (99%)	0.06
Dicalcium phosphate	1.2
Ethoxyquin ^a	0.05
Vitamin-mineral mixture ^b	0.4
Total	100

^a Ethoxyquin: quinoline-based antioxidant

^b Supplies the following per kg of mixture; vit. A, 15,000,000 IU; vit. D3, 250,000 IU; vit. E, 250 IU; vit. B2, 1,000 mg; vit. B12, 1,000 mcg; Ca D-pantothenate, 1,000 mg; vit. K3, 200 mg; Niacin, 5,000 mg; Choline Chloride, 70,000 mg; Folic acid, 20 mg; 3-nitro-100, 7,000 mg; U.G.F., 200,000 mg; Mn, 12,000 mg; Zn, 9,000 mg; Fe, 4,000 mg; Cu, 500 mg; Co, 100 mg; Ca 7,150 mg

는 가운데 시간이 지날수록 세균들이 오염되어 증식하게 된다 (Crump et al., 2002). 따라서 사료의 성분인 곡류에서 세균인 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*과 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂ 및 오클라톡신 A를 생산하는 *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*와 *Alternaria* 등의 곰팡이들은 특히 여름철에 증식하지 못하도록 관리가 요구되고 있다.

농가에서는 여름철 고온 환경에서 투입된 생균제의 생존여부에 관심이 매우 높음에도 불구하고, 사료빈에서 사료와 함께 혼합된 친환경 생균제의 생존성에 대한 연구가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 농장 현장 실험에 앞서 보다 정확한 생균제의 생존성 여부를 파악하기 위하여, 실험실 내에서 여름철 사료 빈의 온도 변화를 가상하여 상온과 고온의 온도 변화 조건에서 범용적으로 사용하고 있는 생균제인 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* 및 *Saccharomyces cerevisiae*의 생존성을 조사하고자 하였다. 또한 사용한 생균제에 의하여 사료 내 오염미생물의 억제효과를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

생균제로서 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다. *L. plantarum*과 *B. subtilis*는 각각 MRS (deMan, Rogosa, and Sharpe)와 LB (Luria Bertani)에서 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, *S. cerevisiae*는 YM (Yeast Malt Extract)에서 30°C에서 48시간 동안 배양하여 사용하였다. 모든 배지는 Difco 사(USA)의 것을 사용하였으며 그 지침에 따라 제조하였다.

생균제 접종 실험사료 제조

육성돈 사료를 사용하였으며 배합비 조성은 Table 1과 같다. 고온 변화에서 생균제의 생존성을 조사하기 위한 사료 샘플들은 120°C에서 20분간 멸균하여 건조한 멸균 사료와 비멸균 사료를 사용하였다. 멸균 사료와 비멸균 사료는 *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *S. cerevisiae*를 단일접종한 각 처리구들과 3가지 균주를 모두 혼합접종한 처리구로 구성하였다. 대조구로써 접종하지 않은 비멸균 사료를 사용하였으며 각 처리구 당 3반복으로 실험사료를 제조하였다. 3가지 종균을 각각 10⁶⁻⁷ CFU/g씩 첨가하고 멸균한 증류수로 최종 부피가 10 ml이 되도록 하여 멸균된 분무기로 사료 200 g에 골고루 살포하면서 혼합하였다.

사료의 온도 변화 조건, pH 및 생균수 측정

상온에서 사료 내의 생균수의 변화와 생균제 간의 상호 길항 작용을 관찰하기 위하여 균주를 접종한 샘플을 25°C로 유지하면서 0, 2, 4, 6, 8일째의 pH와 생균수를 측정하였다.

또한 생균제의 고온에 대한 안정성을 평가하기 위하여 heating block에서 매일 25°C에서 20시간, 이후 곧바로 60°C에서 4시간(무더운 여름철 고온의 낮 시간을 4시간으로 가정) 유지로 온도를 상승 변화시켰다. 실험 시작 후 0, 2, 4, 6, 8일에 각 샘플을 채취하여 pH와 생균수의 변화를 측정하였다. 모든 처리구에서 시료 10 g을 채취하여 멸균된 0.85% NaCl 용액 20 ml로 희석하여 pH를 측정하였다. 또 생균수 측정을 위하여 시료를 단계별로 희석한 후 도말하였다. LB와 MRS에서 37°C에서 24시간, YM는 30°C에서 48시간 동안 배양하였다.

균주의 동정

실험사료에서 분리된 오염세균에 대한 16S rRNA 염기서열은 Solgent (Korea)에 의뢰하여 분석하였다. Primer 27F (Forward primer; 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (Reverse primer; 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 PCR로 증폭한 후 ABI 3730XL capillary DNA analyzer로 분석하였다. 상동성 검색은 NCBI의 BLAST를 이용하였다.

결과

사료의 상온 보관 시 생균제의 생존성

여름철 고온으로의 온도 상승에 의한 생균제의 생존성을 알아보기 위하여 대조구로 생균제를 접종하지 않은 육성돈의 사료 샘플 내에 본래 서식하는 미생물을 측정된 결과, LB에서 1.9×10⁵ CFU/g, MRS에서 2.5×10⁵ CFU/g, YM에서 1.8×10⁵ CFU/g으로 나타났다. 이는 사료 제조 후 상온에서 유통 중에 사료 내에 자연적으로 오염된 미생물들이 증식한 것으로 판단된다. 따라서 사료들을 상온(25°C)을 유지하면서 멸균한 사료와 멸균하지 않은 사료에서 혼합한 생균제의 생존성과 생균제 간 혹은 생균제와 오염 미생물 간의 상호작용을 실험실 내에서 비교하고자 하였다.

즉 생균제를 접종하지 않은 멸균 사료와 비멸균 사료에서 생균수를 측정하였다. 또한 이러한 멸균 사료와 비멸균 사료에 3종의 생

균제(*L. plantarum*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*)를 각각 첨가한 샘플 및 모두 혼합 첨가한 샘플로 총 8가지 사료 샘플에 대하여 pH와 생균수를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 멸균 사료에서 pH는 접종 직후 5.8-5.9에서 4일째에 5.7의 범위로 가장 낮은 값을 나타냈으며 그 이후 서서히 증가하였다(Fig. 1A). 멸균 사료에서와 달리 비멸균 사료에서는 접종 직후 5.8 정도에서 2일째에 모두 증가하였다(Fig. 1D). 그러나 사료의 멸균 여부와 관계없이 4일째에 pH가 가장 감소하였다. 멸균 사료와 비멸균 사료에서의 각각 2일째 pH 변화 양상이 상이한 것은 멸균에 의한 사료의 물리·화학적 변화 혹은 비멸균 사료 내 존재하고 있는 오염 미생물이 영향을 미친 것으로 사료된다. *L. plantarum*의 단일접종이 다른 균과 비교하였을 때 멸균 여부와 관계없이 pH를 다소 가장 낮게 유지하는 경향을 보였으며, 이는 젖산을 생성하기 때문인 것으로 판단된다.

또한 상기의 동일한 총 8가지 사료 샘플들에 대하여 25°C에서 생균제의 생존성을 조사하였다. 멸균 사료와 비멸균 사료에 단일 균주 첨가 시 각 생균제의 성장을 비교하였을 때 사료의 멸균 여부와 관계없이 *L. plantarum*는 시간이 경과함에 따라 감소하였으며 나머지 처리구에서는 약 10⁶ CFU/g 정도로 유지하면서 안정적으로 생존하였다(Figs. 1B and 1E).

한편 *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *S. cerevisiae*를 모두 혼합 첨가한 경우, 멸균 사료에서 *B. subtilis*와 *S. cerevisiae*는 그 수가 안정적으로 유지된 데 비해, 비멸균 사료에서는 *S. cerevisiae*가 2일째에 줄어들었다가 그 수가 점차 회복되었다. 이 때, *L. plantarum*은 사료의 멸균 여부와 상관없이 감소하였다(Fig. 1C and 1F).

생균제의 단일접종과 혼합접종 후 상온에서의 생균제의 성장에

대한 상기의 결과들을 종합해 보면 다음과 같다. *L. plantarum*은 멸균 여부 및 단일/혼합접종과 상관없이 사료 내에서 그 수가 감소하였다. 이와는 대조적으로 *B. subtilis*와 *S. cerevisiae*의 경우에는 생균수를 유지하였다. 따라서 이들 3종의 생균제들 사이에서는 생균제는 상호 길항작용 없는 것으로 나타났다.

사료의 고온 환경 조건에서 생균제의 생존성

여름철 고온 환경 변화에 의한 생균수의 생존성을 파악하기 위하여 *L. plantarum*, *S. cerevisiae* 및 *B. subtilis*를 각각 단일 접종한 첨가한 사료를 매일 25°C에서 20시간, 60°C에서 4시간 온도 상승 변화의 주기를 유지하면서 이를 8일 동안 반복하였다(Fig. 2).

Fig. 2A와 C에서와 같이 pH는 *B. subtilis*의 경우에 멸균 사료와 비멸균 사료 샘플에서 초기 pH가 5.9에서 시작하여, 2일째부터 6일까지 서서히 계속 감소하다가 다시 5.7로 조금 상승하였다. 또한 멸균 및 비멸균 사료에서 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae* 균주를 접종한 샘플의 경우는 배양 6일째까지 pH가 5.9 전후로 유지한 후 8일째 감소하는 경향을 보였다. 멸균 및 비멸균 사료에서 뚜렷한 pH의 변화는 관찰되지 않았다.

60°C의 고온 변화 조건에서 멸균 사료의 생균수의 생존성에서는 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*가 2일째부터 사멸되어 관찰되지 않았으나, *B. subtilis*는 8일까지 약 10⁷ CFU/g 정도로 생균수를 유지하였다(Fig. 2B). 이러한 결과는 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*와는 달리, 그람 양성균인 *B. subtilis* 균주는 포자를 형성할 수 있어 내열성이 강하기 때문인 것으로 판단된다(Lee et al., 2012).

비멸균 사료에서는 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*을 각각 접종한 샘플에서 세균수를 측정된 결과 0일째에 각각 1.9×10⁷, 1.4×10⁶

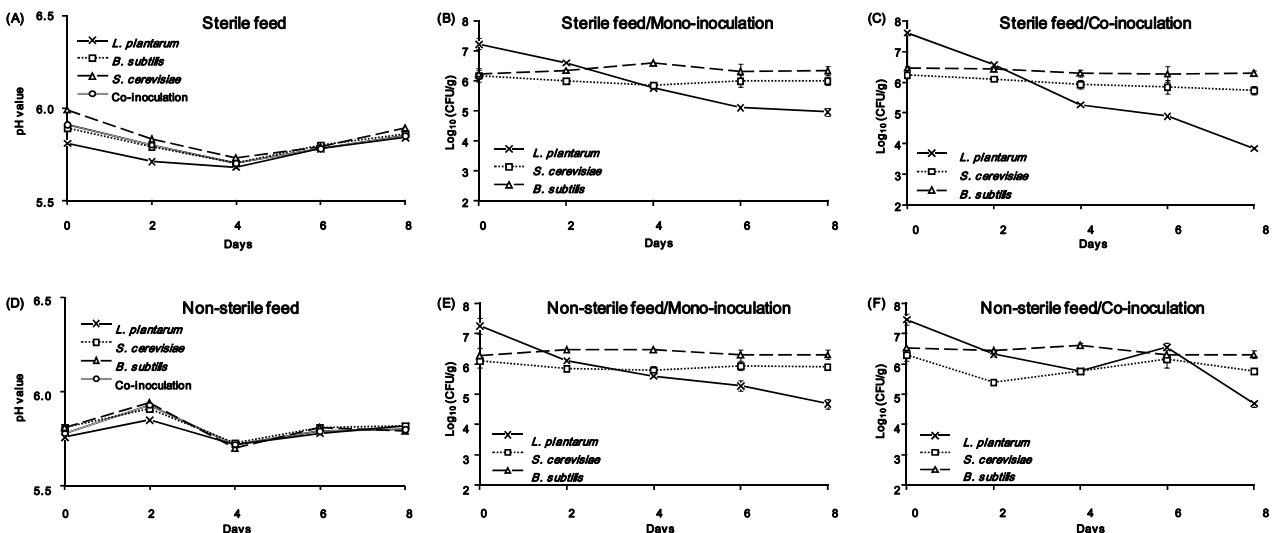


Fig. 1. pH change and probiotics growth in feed inoculated by a single strain or mixed strains at 25°C. The feed samples mixed with *L. plantarum*, *S. cerevisiae*, and *B. subtilis* were diluted and plated on MRS, YM, and LB media, respectively. (A) pH change of sterile feed. (B) Probiotics growth in sterile feed inoculated by a single strain. (C) Individual probiotics growth in sterile feed inoculated by mixed strains. (D) pH change of non-sterile feed. (E) Probiotics growth in non-sterile feed inoculated by a single strain. (F) Individual probiotics growth in non-sterile feed inoculated by mixed strains.

Table 2. Identification of contaminated bacteria in feed

Media	Isolated strain	Homology	Query coverage	Max identity	References
YM	SK3143	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	100	Wu and Ahn (2011), Kim et al. (2012)
	SK3144	<i>Pantoea ananatis</i>	100	100	Coutinho and Venter (2009)
	SK3145	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	100	Raz et al. (2005), Bhasme et al. (2013)
	SK3146	<i>Paenibacillus soli</i>	96	97	Park et al. (2007)
	SK3147	<i>Bacillus pumilus</i>	100	100	Thomas (2004), De-Bashan et al. (2010)
MRS	SK3148	<i>Staphylococcus hominis</i>	100	100	Marimuthu (2013)
LB	SK3149	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	100	Wu and Ahn (2011), Kim et al. (2012)
	SK3150	<i>Kocuria kristinae</i>	100	95	Folić et al. (2010), Ma et al. (2005)
	SK3151	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	100	Raz et al. (2005), Bhasme et al. (2013)
	SK3152	<i>Curtobacterium citreum</i>	100	100	Zinniel et al. (2002)

CFU/g 정도에서 2일째에 8.3×10^2 , 2.6×10^4 정도로 감소되었다 (Fig. 2D). 그러나 이들 생균들을 조사한 결과 사료 내 이미 서식하고 있었던 내열성이 강한 오염된 세균들만 있었으며 접종한 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*은 사멸되어 관찰되지 않았다. 그러나 *B. subtilis*를 접종한 비멸균 사료에는 상기의 오염된 세균은 관찰할 수 없었으며 접종한 생균제 *B. subtilis* 만이 자라면서 멸균 사료와 같이 비슷한 생존 곡선을 유지하였으나 증식하지는 않았다. 즉 *B. subtilis* 균주는 비멸균 사료에서도 고온 환경 변화에서 잘 생존하면서 사료 내 오염균의 성장을 억제하는 것으로 나타났다.

사료 내 오염된 세균의 동정

Fig. 2D에서 사료 내 자생하고 있는 오염 세균들을 동정하기 위하여 비멸균 사료에 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*를 각각 접종한 사료 샘플로부터, 형태학적으로 서로 다른 콜로니들을 총 10개 분리하여 16S rRNA의 염기서열을 밝혀 균주들을 동정하였다

(Table 2). YM에서 총 5종, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pantoea ananatis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Paenibacillus soli* 및 *Bacillus pumilus*가 분리되었다. MRS에서는 1종, *Staphylococcus hominis*, LB에서는 4종, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kocuria kristinae*, *Staphylococcus saprophyticus* 및 *Curtobacterium citreum* 가 분리되었다.

*B. amyloliquefaciens*는 청국장을 비롯한 전통발효식품에서 분리되는 유익균이며(Wu and Ahn, 2011; Kim et al., 2012), *Bacillus pumilus*는 포도나 청국장에서 분리되고 식물성장 촉진 효과가 있는 세균이다(Thomas, 2004; De-Bashan et al., 2010). 식물병원균으로 알려진 *Pantoea ananatis*는 식물이나 토양에서 분리되며(Coutinho and Venter, 2009), *Paenibacillus soli*는 토양에서 xylanase 효소를 분비하는 균으로 분리되었다(Park et al., 2007). *C. citreum*는 벼논이나 사막의 먼지로부터 분리되고 있으나, 그 기능은 아직 잘 알려져 있지 않고 있다(Zinniel et al., 2002). *S. saprophyticus*는 여성의 요로감염과 소의 유방염에서

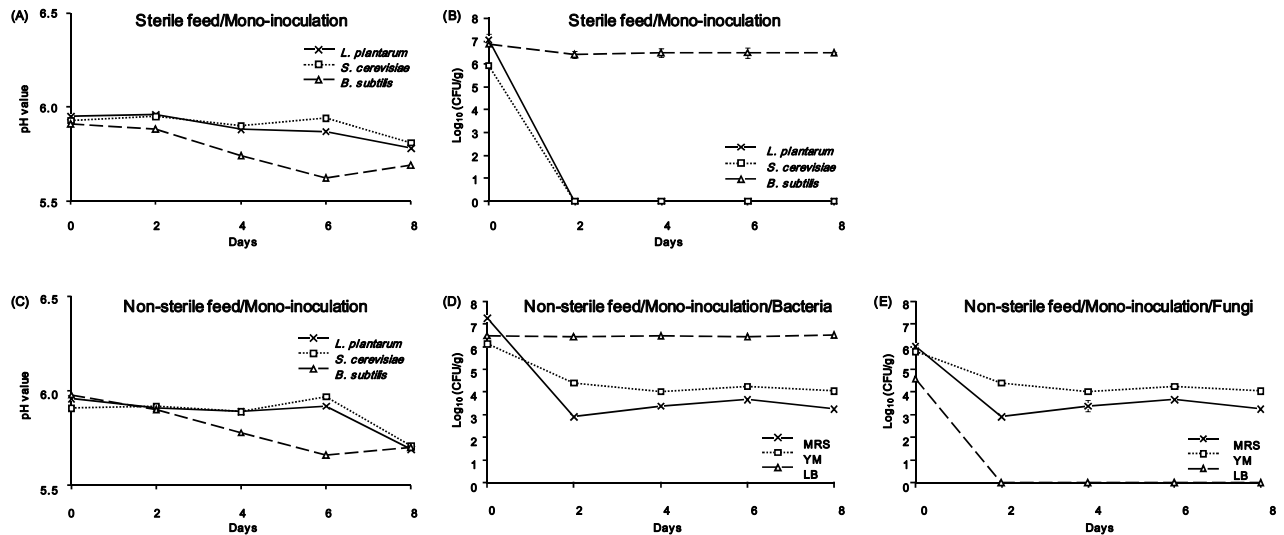


Fig. 2. pH change and growth of probiotics in feed inoculated by single strain under repetitive temperature shift, 25°C to 60°C. The feed samples mixed with *L. plantarum*, *S. cerevisiae*, and *B. subtilis* were diluted and plated on MRS, YM, and LB media, respectively. (A) pH change of sterile feed. (B) Probiotics growth in sterile feed. (C) pH change of non-sterile feed. (D) Bacterial growth in non-sterile feed. (E) Fungal growth in non-sterile feed.

분리되는 병원균이며(Raz *et al.*, 2005; Bhasme *et al.*, 2013), *S. hominis*는 석유, 오염된 토양 그리고 사람과 동물의 피부에서 분리되는 균이다(Marimuthu, 2013). *K. kristinae*는 고관절 점액낭염과 담낭염으로부터 분리된 균이고, 국화과인 마리골드(Marigold)의 뿌리에서도 서식하는 균으로 알려져 있다(Ma *et al.*, 2005; Folić *et al.*, 2010). 사료 내에는 저장기간 동안 이러한 유익균들과 유해균들이 동시에 서식하고 있었는데 이들은 수확한 옥수수, 밀기울, 대두 등의 곡류에서 유래하고, 또 기타 사료 첨가제들로부터 오염되어 자생하고 있는 것으로 판단된다.

생균제 *B. subtilis*에 의한 곰팡이의 증식 억제 효과

25°C-60°C 온도 변화 조건에서 *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *S. cerevisiae*를 각각 접종한 비멸균 사료 샘플로부터 오염으로 인하여 자라는 곰팡이를 조사하였다(Fig. 2E). 아플라톡신 혹은 오클라톡신을 생산하는 *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*와 *Alternaria* 등의 곰팡이들은 특히 여름철 발생에 주의를 요하고 있다. *L. plantarum*을 접종한 시료에서는 0일째에 3.0×10^5 CFU/g로 오염 곰팡이가 존재하였으나 2일째부터 3.5×10^2 CFU/g 정도로 감소하였으며($p < 0.01$), *S. cerevisiae*를 접종한 시료에서는 0일째에 9.0×10^4 CFU/g로 오염 곰팡이가 존재하였으나 2일째부터 1.3×10^3 CFU/g 정도로 감소하였고($p < 0.01$), 8일째는 곰팡이가 측정되지 않았다. 그러나 *B. subtilis*를 접종한 시료에서는 0일째 2.0×10^4 CFU/g의 오염된 곰팡이가 있었지만 2일째부터는 관찰되지 않았다. 따라서 60°C 고온 조건에서도 *B. subtilis* 균주는 사료 내 오염된 곰팡이의 성장을 초기에 억제시키거나 사멸시키는 것으로 나타났다.

고찰

2011년 7월부터 가축에게 항생제 사용이 금지된 이후, 생균제는 항생제 대체제의 하나로써 주목을 받아왔다. 여름철 고온 환경 변화 조건 시, 사료와 함께 혼합되어 사료빈으로 투입된 생균제의 생존 여부는 매우 중요하다. 현재까지 여름철 고온 조건 하에서 사료빈 내에 혼합되어 투입된 생균제의 생존성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서 사료 내 생균제의 생존성을 실험실 조건에서 상온과 고온 환경에서 조사하면서 상호 비교하고자 하였다.

매일 25°C에서 20시간, 60°C에서 4시간 온도 상승을 유지하면서 이를 8일 동안 반복하는 조건에서 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae* 균주는 사료 내에서 열 안정성이 없었으며, *B. subtilis* 균주는 내열성을 가지고 생존하고 있으면서도 사료 내 오염 미생물의 성장을 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 *B. subtilis* 균주가 항균 활성이 높기 때문이라고 사료된다(Kim *et al.*, 1999; Shon *et al.*, 2001; Vaseeharan and Ramasamy, 2003). *B. subtilis* 균주는 사료의 품질을 안전하게 유지할 수 있는 생균제로 유용하게 사용할 수 있으며, 다양한 소화 효소를 분비하는 우수한 생균제로도 널리 알려져 있다(Zokaeifar *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2013). *L. plantarum*과 *S. cerevisiae* 균주는 고온에서 내열성이 없어 사멸되기 쉬우므로 여름철에 사료빈의 온도가 상승하지 않게 유지하

도록 열을 차단시키는 것이 바람직하다.

앞으로 농장 현장에 설치된 사료빈에서 직접적으로 샘플링을 하면서 여름철 생균제의 생존성과 미생물의 증식 억제에 대한 현장 연구가 필요하다. 또 일반적으로 곰팡이는 고온 조건 하에서 잘 성장하기 어려운 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서 나타난 것처럼 60°C에서 내열성이 있는 곰팡이들이 사료 내 존재하고 있으므로 앞으로 이들 곰팡이의 동정이 필요하다고 사료된다.

적요

여름철의 고온으로의 온도 상승에 따른 사료빈 내의 생균제 *L. plantarum*, *S. cerevisiae* 및 *B. subtilis*의 생존성을 실험실의 가장 조건에서 분석하였다. 상온인 25°C에서 멸균 사료와 비멸균 사료에 단일 혹은 혼합 균주 첨가 시 pH 변화와 생균제들의 성장을 상호 비교하였다. pH는 멸균 사료와 비멸균 사료 모두에서 4일째에 가장 감소한 것은 같았으나 비멸균 사료에서는 2일째까지는 상승하는 변화의 양상을 보여주었다. 멸균 여부 혹은 혼합 여부와 관계없이 *S. cerevisiae*와 *B. subtilis*의 생균수는 일정하게 유지되었지만 *L. plantarum*의 경우에는 그 수가 모두 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 3종의 혼합 생균제는 상호 길항작용은 없는 것으로 나타났다.

멸균 및 비멸균 사료에 생균제를 첨가한 후 60°C의 고온 환경에서 사료의 pH와 단일접종 생균제의 생존성을 조사하였다. 멸균 및 비멸균 사료 사이에 뚜렷한 pH의 변화는 관찰되지 않았으며 *B. subtilis*의 pH가 가장 낮게 관찰되었다. 고온 하에서 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae* 균주는 생존할 수 없었으며, 내열성을 가진 *B. subtilis* 균주는 생존하면서 사료에 자연적으로 생존하는 오염세균의 증식을 억제하였다. 또 *B. subtilis*를 접종한 비멸균 사료에서 2일째부터 오염 곰팡이가 관찰되지 않았다. 따라서 내열성이 강한 *B. subtilis* 균주를 사용하면, 여름철 사료빈 내에 병원성 세균과 곰팡이의 오염을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 농림축산식품부의 생명산업기술개발사업(NO.312058-03)의 지원에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

References

- Beharka, A.A. and Nagaraja, T.G. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* **81**, 1591-1598.
- Bhasme, P.C., Kurjogi, M.M., Sanakal, R.D., Kaliwal, R.B., and Kaliwal, B.B. 2013. In silico characterization of putative drug targets in *Staphylococcus saprophyticus*, causing bovine mastitis. *Bioinformation* **9**, 339-344.
- Buenrostro, J.L. and Kratzer, F.H. 1983. Effect of *Lactobacillus* inoculation and antibiotic feeding of chickens on availability of dietary biotin. *Poult. Sci.* **62**, 2022-2029.
- Coutinho, T.A. and Venter, S.N. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 325-335.

- Crump, J.A., Griffin, P.M., and Angulo, F.J. 2002. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 859–865.
- Cui, C., Shen, C.J., Jia, G., and Wang, K.N. 2013. Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of bacteroidetes and firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. *Genet. Mol. Res.* **12**, 1766–1776.
- Davis, M.E., Parrott, T., Brown, D.C., De Rodas, B.Z., Johnson, Z.B., Maxwell, C.V., and Rehberger, T. 2008. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **86**, 1459–1467.
- De-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y., and Maier, R.M. 2010. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* **69**, 343–352.
- Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C., and Sauvant, D. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* **92**, 1620–1632.
- Folić, M., Janković, S., Ružić-Zečević, D., Pajević, V., Rosić, N., and Nikolić, P. 2010. Synovitis and periarticular bursitis of the coxofemoral joint caused by *Kocuria Kristinae*: A case report. *Acta. Fac. Med. Naiss.* **27**, 51–54.
- Jang, Y.D., Oh, H.K., Piao, L.G., Choi, H.B., Yun, J.H., and Kim, Y.Y. 2009. Evaluation of probiotics as an alternative to antibiotic on growth performance, nutrient digestibility, occurrence of diarrhea and immune response in weaning pigs. *J. Anim. Sci. Tech. (Kor.)* **51**, 25–32.
- Kim, Y.S., Cho, S.H., Jeong, D.Y., and Uhm, T.B. 2012. Isolation of biogenic amines-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean products. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 220–224.
- Kim, S.I., Kim, I.C., and Chang, H.C. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 526–533.
- Kim, D.W., Kim, J.H., Kang, G.H., Kang, H.K., Lee, S.J., Lee, W.J., and Kim, S.H. 2008a. Study on intestinal viability and optimum feeding method of *Lactobacillus* in broiler chickens. *J. Anim. Sci. Tech. (Kor.)* **50**, 807–818.
- Kim, S.H., Kim, D.W., Park, S.Y., Kim, J.H., Kang, G.H., Kang, H.K., Yu, D.J., Na, J.C., and Lee, S.J. 2008b. Effect of dietary *Lactobacillus* on growth performance, intestinal microflora, development of ileal villi, and intestinal mucosa in broiler chickens. *J. Anim. Sci. Tech. (Kor.)* **50**, 667–676.
- Knap, I., Kehlet, A.B., Bennedsin, M., Mathis, G.F., Hofacre, C.L., Lumpkins, B.S., Jensen, M.M., Raun, M., and Lay, A. 2011. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poult. Sci.* **90**, 1690–1694.
- Krehbiel, C.R., Rust, S.R., Zhang, G., and Gilliland, S.E. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* **81**(E.Suppl.2), E120–132.
- Lee, E.J., Kim, J.S., Oh, S.W., and Kim, Y.J. 2012. The resistance of *Bacillus subtilis* in *Makgeolli* to hydrostatic pressure. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**, 312–316.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., Matte, J.J., Goulet, J., and Fairbrother, J.M. 2009. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J. Anim. Sci.* **87**, 922–934.
- Ma, E.S., Wong, C.L., Lai, K.T., Chan, E.C., Yam, W.C., and Chan, A.C. 2005. *Kocuria kristinae* infection associated with acute cholecystitis. *BMC. Infect. Dis.* **5**, 60.
- Marimuthu, K. 2013. Isolation and characterization of *Staphylococcus hominis* JX961712 from oil contaminated soil. *J. Pharm. Res.* **7**, 252–256.
- Park, M.J., Kim, H.B., An, D.S., Yang, H.C., Oh, S.T., Chung, H.J., and Yang, D.C. 2007. *Paenibacillus soli* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 146–150.
- Piao, X.S., Han, I.K., Kim, J.H., Cho, W.T., Kim, Y.H., and Liang, C. 1999. Effects of kemzyme, phytase and yeast supplementation on the growth performance and pollution reduction of broiler chicks. *Asian J. Anim. Sci.* **12**, 36–41.
- Raz, R., Colodner, R., and Kunin, C.M. 2005. Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*?. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 896–898.
- Ross, G.R., Gusils, C., Oliszewski, R., De Holgado, S.C., and González, S.N. 2010. Effects of probiotic administration in swine. *J. Biosci. Bioeng.* **109**, 545–549.
- Salarmoni, M. and Fooladi, M.H. 2011. Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic to improve broiler chicks performance. *J. Agr. Sci. Tech.* **13**, 165–172.
- Shon, M.Y., Seo, K.I., Park, S.K., Cho, Y.S., and Sung, N.J. 2001. Some biological activities and isoflavone content of Chungkugjang prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 662–667.
- Swyers, K.L., Burk, A.O., Hartsock, T.G., Ungerfeld, E.M., and Shelton, J.L. 2008. Effects of direct-fed microbial supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low- and high-starch concentrates. *J. Anim. Sci.* **86**, 2596–2608.
- Thomas, P. 2004. Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 114–123.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**, 83–87.
- Wu, W.J. and Ahn, B.Y. 2011. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* BY01 with high productivity of menaquinone for Cheonggukjang production. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**, 783–789.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., and Vidaver, A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2198–2208.
- Zokaefar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., and Nejat, N. 2012. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **33**, 683–689.