

## 과채발효액의 항균 및 탈취력 효과와 사료 첨가시 계란 품질에 미치는 영향

소광섭<sup>1</sup> · 박영호<sup>2</sup> · 정일룡<sup>2</sup> · 고병섭<sup>3</sup> · 홍상미<sup>4</sup> · 박선민<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>코림바이오, <sup>2</sup>고려비엔피, <sup>3</sup>한의학연구원 검사사업부, <sup>4</sup>호서대학교 자연과학대학

## The Effects of the Fermentation Broth of Fruits and Vegetables on Anti-microbial Activity and Egg Quality with its Supplementation in Feed

Kwang Seob So<sup>1</sup>, Young Ho Park<sup>2</sup>, Il Yong Joung<sup>2</sup>, Byoung-Seob Ko<sup>3</sup>, Sang Mee Hong<sup>4</sup>, and Sunmin Park<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Kolimbio, Whasung-Si

<sup>2</sup>KBNP, Inc., Anyang-Si

<sup>3</sup>Korea Institute of Oriental Medicine

<sup>4</sup>Department of Food and Nutrition, Hoseo University

Received March 3, 2009; Accepted June 9, 2009

This study was conducted to investigate the effect of the fermentation broth of fruits and vegetables and various kinds of lactobacillus containing in the broth on anti-microbial activity, anti-acidity, its organic acid concentrations and deodorization. In addition, the quality of eggs laid from the hens supplemented with the fermentation broth was determined. The fermentation broth contained over 8 kinds of lactobacillus and other microbes. *Lactobacillus (L.) hilgardii*, *L. reuteri*, *L. nagelii*, *L. plantarum*, and *Zygosaccharomyces bisporus* were survived especially in pH 2.0 among them. The concentrations of acetic acid and lactic acid in the broth were higher than minimum inhibitory concentration values (MIC) to *Escherichia (E.) coli* and *Salmonella sp.* Overall the broth contained sufficient organic acid to inhibit the growth of *E. coli* and *Salmonella sp.* In addition, *L. nagelii* and *L. plantarum* had the greatest anti-microbial activity against *E. coli*, *Salmonella (S.) typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *S. gallinarium* among lactobacillus in the broth. The broth had greater anti-microbial activity than individual *lactobacillus*. The fermentation broth had deodorization capacity of ammonia and hydrogen sulfate and the 50% of their concentrations were removed after 30 min treatment. Egg production rates, egg weight, and feed efficiency were increased in eggs laid from hens that supplemented with 0.1 % fermented broth compared to the control. The supplementation also increased the thickness and strength of egg shell to reduce broken eggs and decreased cholesterol levels in egg yolk. In conclusion, the fermentation broth of fruits and vegetables can be a natural alternative supplementation of feed in laying hens.

**Key words:** deodorization capacity, egg production, feed efficiency, lactobacillus, organic acid

### 서 론

조류 특히 닭은 대부분 좁은 공간에서 사육하므로 면역기능이 감소하여 병균에 감염되기 쉬워 닭은 태어나면서부터 항생제를 투여하는 경우가 많다. 항생제를 투여하여 사용한 조류에서는 내성균들 출현과 함께 스트레스 호르몬이나 잔류 항생제

함량이 높으므로 소비자가 잔류물 섭취량이 높아지고 건강에 문제를 일으킬 수 있다는 보고들이 있다[Lee 등, 2005; Kim 등, 2007]. 그러므로 일반 항생제의 투여를 감소시키거나 중단하기 위해서 사료에 닭의 면역 기능을 향상시키거나 항균이나 항바이러스 기능이 있는 천연의 항균 소재를 사용하는 것이 필요하겠다.

최근에는 국내외에서 항생제의 사용을 점차 규제하고 있으므로 친환경 양계와 양돈을 하기 위해서는 면역 능력을 강화시키고, 항균 및 항바이러스에 효과가 있는 천연물질을 탐색하는 것이 필요한데 생균제가 대체제로 사용되고 있다[Kim 등, 2001]. 유산균은 우수한 정장작용, 항균 작용 및 면역력 증강 효과 등

\*Corresponding author

Phone: +82-41-540-5633; Fax: +82-41-548-0670

E-mail: smpark@hoseo.edu

doi:10.3839/jabc.2009.014

이 있어 가축 사료 첨가제로 많이 사용되고 있으며 유산균의 생리적인 기능성과 효능은 균주에 따라 차이가 있으므로 우수한 균주를 선별하여 사용하는 것이 필요하다. 또한 유산균이 동물에서 정상이나 항균 효과를 나타내기 위해서는 유산균이 살아있는 상태로 장내에 도달해야 하는데 위의 산도는 음식물의 존재에 따라 산도의 차이가 크기는 하지만 대체로 산성을 나타내었다[Park 등, 1996; Lim 등, 2008].

채소 발효 유산균으로 가장 많이 연구된 것은 김치 유산균이다. 김치는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 등의 유산균에 의해 발효된 것으로 Cho 등[2008]은<sup>6)</sup> 양돈사료 첨가용으로 사용했을 때 일당 증체량, 사료요구율의 개선효과가 있었고 장내 유익 세균총의 변화 등이 확인되었다. 김치 유산균은 내염성인 유산균인 반면에 과채류 발효 유산균은 내염성이 아니고 유산균 중에 큰 차이가 있을 수 있어 새로운 유산균을 발견할 가능성이 있다. 또한, 배추, 무, 고추 등이 주요 구성 성분인 김치에 비해 과채발효유는 다양한 과일과 채소를 사용하고 소금을 사용하지 않으므로 유산균의 종류에도 차이가 있을 수 있고, 다양한 생리활성 물질이 함유되어 있을 수 있다. 그러므로 과채류 유산균 발효액은 김치 발효액에 비해 연구도 상대적으로 적고 그 효과도 높을 가능성이 있으므로 연구할 필요성이 높다고 판단하였다. 따라서 본 연구에서는 과일과 채소 발효시 생성되는 유산균의 종류를 확인하고 유기산 농도, 내산성과 항균 효과를 확인하고 산란계의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 계란의 품질에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**과채발효액 제조.** 청과시장에서 7종의 과일 또는 채소인 사과 10%(w/w), 파인애플 10%(w/w), 토마토 10%(w/w), 오렌지 7%(w/w), 바나나 10%(w/w), 포도 10%(w/w), 양배추 8%(w/w)와 양파 2%(w/w)를 구매하여 세척한 후, 일괄 또는 각각 파쇄하였다. 파쇄된 과일에 설탕 20%(w/w) 및 꿀 3%(w/w)를 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 발효조(100 L 스텐레스 통)를 35°C를 유지하도록 장치한 방에 인큐베이터형식으로 절연이 되도록 제작한 곳에 넣고 30 내지 35°C의 온도로 유지하면서 40일 동안 1차 발효시켰다. 1차 발효된 혼합물을 1차 여과(실크천으로 자연여과)하여 발효액(수득량 60%)을 분리하였다. 상기 분리된 발효액을 30±2°C의 숙성조에 넣어 동안 숙성시킨 후, 숙성된 발효액을 0.22 미크론 여과지 또는 0.22 미크론의 filter를 가진 여과장치를 이용하여 2차 여과하여 발효액에서 불순물을 제거하였다. 2차 발효액의 발효시간을 30일 연장하면 유기산의 농도가 1% 정도씩 증가하였고 발효기간을 최대 90일까지 연장시켰다.

**유산균 분리.** 시료 10 g을 멸균 생리식염수에 넣고 같은 방법으로 교반하여 suspension을 얻은 이후 각각의 suspension을 serial dilution 하여 유산균 성장배지인 MRS agar(DIFCO Microbiology, Lawrence, KS)와 Luria-Bertaniagar 배지(DIFCO Microbiology)에 도말하여 plating 한 후 37°C에서 48시간 배양하여 콜로니로부터 균주를 분리하였다.

**유산균의 동정.** 유산균은 분자생물학적인 방법인 polymerase

chain reaction(PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 기법으로 구측하였다. 유산균을 포함한 모든 균은 proteinase/cetyl trimethylammonium bromide(CTAB) 방법을 이용하여 균의 chromosomal DNA를 순수 분리한 후 계통분류학적으로 고유한 특성을 갖는 16S rRNA를 PCR로 증폭시켰으며 이때 사용한 primer는 다음과 같았다. bacterial 16S forward primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGTATCCTGGC TCAG-3'; bacterial 16S reverse primer: 5'-CCC GGGATCCAA GCTTACGGCTACCTTGTACGACTT-3'이었다. 여러 유산균으로부터 생성되는 PCR 조각의 크기가 거의 유사할 것으로 예상되므로 각각의 균주에서 얻어지는 PCR 조각을 서로 분리해 낼 필요가 있으며, 이는 denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) 방법을 통해 DNA 조각을 염기서열의 차이에 따라 서로 분리하였다. 전기영동 gel내 유전자변성 시약의 농도 구배를 조절함으로써 전기영동 밴드가 중첩됨이 없이 뚜렷하게 나오도록 변성시약의 최적 농도를 결정하였다. 분리 정제된 16S rDNA는(주)솔젠티(유성, 대전)의 DNA Sequencing Laboratory에 의뢰하여 16S rDNA의 염기서열 분석하였다.

**과채발효액의 유기산 농도 및 유기산의 최소발육억제농도.** 발효액내에 함유되어 있는 유기산 함량은 Palmer와 List의 방법에 따라 분석하였다[Palmer와 List, 1973]. 5 mL의 발효액을 증류수 50 mL로 희석하여 30°C 수욕조에서 30분 동안 진탕한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 다시 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상등액을 Sepak-C18을 사용하여 정제시킨 후 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액 20 µL를 HPLC(Waters, Germany)로 분석하였다. Column은 µ-Bondapak C18(3.9 mm×300 mm, Waters)을 사용하였으며 용매는 0.1 M ammonium dihydrogenphosphate과 phosphoric acid (pH 2.5)의 혼합용액, 이동속도는 1 mL/min, 오븐 온도는 40°C 이었고 UV detector로 214 nm에서 검출하였다.

유기산인 사과산, 시트르산, 푸마릭산(Sigma, St. Louis, MO)을 MRS 배지에 분주하여 최종 농도가 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1%의 농도가 되도록 만들었다. 여기에 *Escherichia (E.) coli* 또는 *Salmonella sp.*를 희석하여 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 균의 증식 유무를 배지의 혼탁 유무로 확인하여 세균이 증식하지 않은 농도를 최저 발육 억제 농도로 결정하였다.

**산도 및 과채발효액내의 유산균의 내산성 측정.** pH는 pH meter(Orion mode 420A, Waltham, MA)로 측정하였다. Kobayashi[1985] 및 Sim 등의[1995] 방법에 따라 과채발효액에 함유된 개별 유산균의 내산성을 측정하였다. Pepsin이 1000 unit/mL 첨가된 MRS 액체 배지를 pH 2.0, 3.0와 4.0의 산성 조건으로 제조한 후 37°C에서 1시간 동안 각각의 산성 배지에서 과채 발효액에 존재하는 개별 유산균을 배양한 후 각각의 유산균의 생존율을 희석 평판법으로 계수하여 조사하였다.

**개별 유산균 및 과채발효액의 항균성 측정.** 시험균주로는 위해균인 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella (S.) gallinarium*, *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* 을 사용하였고, 이 선발균주 1%를 Tryptic soy broth(TSB) 액체배지에서 24시간 배양한 배양액을 사용하여 paper disk methods로 측정

하였다. 각각의 유산균을 3일 동안 배양한 배양액과 과채발효액(산함량 1.5, 3, 6%) 자체를 샘플로 사용하였다. Paper disk에 sample 5  $\mu$ L를 넣고, sample이 gel내로 충분히 확산되도록 24시간 동안 37°C에서 배양한 후 disk를 중심으로 형성된 clearing zone의 직경을 측정함으로써 샘플의 항균 활성을 비교 확인하였다.

**탈취력 측정.** 과채발효액 완제품을 400배 희석한 후 희석액의 탈취력을 검증하였다. 악취원은 암모니아, 황화수소를 각각 25, 50 ppm으로 하였다. 코르크 마개로 밀봉한 시험관에 악취원을 각각 주사기로 주입한 뒤 400배 희석된 배양액 10 mL 또는 대조군으로 물을 주입 하고 병을 10분 간격으로 흔들어 주었으며 0, 30, 60, 120, 240분의 암모니아와 황화수소 농도를 GV-100S형 진공식 기체채취기(가스텍, 서울)로 가스를 채취하여 검지센서로 측정 하였다.

**생균사료를 이용한 산란계 사육 및 계란의 품질.** 경기도 화성시 비봉면에 소재한 산란계 농장에서 산란계에게 순수 과채발효액(산함량 3%; (주)코립 바이오, 화성)을 0.1% 수준으로 첨가한 사료를 공급한 것을 실험군으로 하였다. 대조군은 산란계에게 사료에 과채발효액 대신 물을 0.1% 첨가하여 주었다. 산란계에서 주령별로 계란 품질, 산란율 사료 요구율을 조사하였다. 사료 요구율은 사료를 준 후 남은 양을 24시간 후에 사료를 수거하여 잔량을 체크하였다. 사료 요구율은 산란계의 사료 섭취에 따른 산란 효과를 비교하여 사료의 영양적 가치를 검증할 수 있는 방법으로 수당 1일 사료 섭취량(g)을 1일 산란 중량(g)으로 나누어 아래와 같은 공식으로 계산하였다. 산란량은 실험기간(28일) $\times$ 산란율(%) $\times$ 평균계란중량(g)/실험기간(28일)로 계산하였다.

$$\text{사료 요구율(Feed demand ratio)} = \frac{\text{사료 섭취량(Feed intake, g)}}{\text{계란 산란량(Egg production, g)} \times 100}$$

**신선도 측정.** 계란의 신선도는 국제적으로 가장 많이 사용하는 하우지수(Haugh Unit)를 사용하였다. 하우지수는 계란의 무게(W)와 농후 난백의 높이(H, mm)를 측정하여 다음 식으로 계산하는데 계란의 하우지수는 높을수록 신선한 것임을 나타낸다. 검사 결과 하우지수가 80 이상이면 '아주 좋음', 70 이상이면 '우수', 65 이상이면 '양호', 60 미만이면 '소비자 거부점', 50 이하이면 불수용으로 분류하였다. 난백의 높이는 버니어캘리퍼로 난황에서 1cm 떨어진 지점을 측정하였다[Moon 등, 2006].

$$\text{Haugh Unit} = 100 \text{ Log } \{H - (1.701 \times W^{0.37}) + 7.57\}$$

**난각 두께 및 강도.** 난각 강도는 5 mm의 원형 probe가 부착된 물성 측정기(TA-XT2, England)를 이용하여 단단함(firmness)을 측정하였다. 각각의 처리구에서 시료를 취한 다음 계란의 껍질의 중앙부위를 1 cm 길이로 잘라 plate위에 올려놓고 probe를 20 mm/s의 속도로 표면에 다가갈 때 파괴강도를 측정하였다. 난각 두께는 Haugh unit을 측정한 후 난백 등의 불순물을 제거한 후 50°C에서 24시간 동안 건조한 후 난각의 깨진 끝부

분, 등근 끝부분(등단부위) 및 중간 부분 중에서 무작위로 정한 2 지점을 포함한 총 4 지점을 선택하여 두께를 버니어 캘리퍼스로 측정하여 평균값으로 결정하였다[Kim, 2002].

**난황 콜레스테롤 농도 측정.** 난황에서 총지방을 Folch 등의 [1956] 방법을 변형시킨 Washburn과 Nix 방법으로 [1974] 추출한 후 추출한 지방 내에 함유되어 있는 콜레스테롤의 함량을 Zlatkis 방법에 [1953] 의해서 측정하였다.

**통계처리.** 모든 실험은 3회 이상 반복하였고, 그 결과는 SAS program을 이용하여 평균과 표준편차로 표시하였다. 통계적 유의성은 산란계에서 대조군과 과채발효액을 투여한 실험군 사이에 차이만을 two-sample t-test로 검정하였다. 통계적 유의수준  $p < 0.05$ 로 정하였다.

### 결과 및 고찰

**과채발효액에 함유된 유산균주의 동정.** 과채발효액에 함유된 균주를 분리하여 분자생물학적(PCR-DGGE) 기법으로 균주를 동정하였을 때 Table 1에서 보여주듯이 과채발효액에는 *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. nagelii*, *L. satsumensis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. mali*, *Zygosaccharomyces bisporus* 등이  $1 \times 10^7$  cfu/g 이상 함유되어 있었다. 이러한 조성은 김치에 함유되어 있는 유산균인 *L. reuteri*, *L. plantarum*도 있었지만, 김치에서는 발견되지 않는 유산균들도 있었다. 또한, *L. acidophilus*는 양돈 사료에 첨가하였을 때 증체를 및 사료 효율이 개선되었다고 보고되었다 [Pollmann 등, 1980]. 또한, Cho 등은 [2008] 김치에서 분리한 *Lactobacillus* W-44 균주와 J-124 균주를 양돈용 사료에 첨가하였을 때 일당증체량이 향상되었고, 사료 효율이 향상되었으며 장내 세균총이 개선되는 것을 확인하였다. 이 균주들은 *in vitro*에서 내산성, 항균효과를 가진 것으로 보아 이러한 특성을 가진 *lactobacillus*는 양돈이나 양계의 사료에 첨가하였을 때 항생제 대체 효과가 있을 것으로 사료되었다.

**유기산의 최소발육억제 농도.** 비배리 형태의 유기산은 미생물의 세포막을 통해 세균 안으로 침투하여 세포막 지질 이중층 안에서 분배되면서 비배리된 유기산 분자는 세포막 단백질/효소의 활성을 간섭하여 항균 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 박테리아 세포내의 산도가 중성이어서 세포내로 침투한 유기산은 해리되어 수소 이온을 발생하고 이것은 DNA와 단백질 합성을 저해 및 간섭하여 박테리아를 사멸시킨다. 그러므로 분배계수가 높은 유기산인 프로피온산(0.33) 이나 푸마릭산(0.46)은 소수

**Table 1. The species and concentrations of microorganisms in the fermentation broth of fruits and vegetables**

Organic acid	Minimum Inhibitory Concentration (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
Acetic acid	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Citric acid	0.8 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Formic acid	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
Fumaric acid	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Lactic acid	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
Propionic acid	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1

**Table 2. Minimum inhibitory concentration of individual organic acid in *E. coli* and *Salmonella* sp.**

	Concentration (cfu/g)
<i>Lactobacillus (L.) reuteri</i>	2.2×10 <sup>8</sup>
<i>L. plantarum</i>	1.9×10 <sup>8</sup>
<i>L. hilgardii</i>	3.8×10 <sup>7</sup>
<i>L. nagelii</i>	1.8×10 <sup>8</sup>
<i>L. satsumensis</i>	1.4×10 <sup>8</sup>
<i>L. acidophilus</i>	3.2×10 <sup>8</sup>
<i>L. casei</i>	1.5×10 <sup>8</sup>
<i>L. mali</i>	4.7×10 <sup>7</sup>
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	6.5×10 <sup>7</sup>

Values are Mean±SD.

**Table 3. The concentrations of individual organic acid in the fermentation broth of fruits and vegetables**

Organic acid	Concentration (%)
Acetic acid	0.6±0.1
Citric acid	0.3±0.1
Fumaric acid	0.1±0.1
Lactic acid	0.6±0.1
Malic acid	0.9±0.1

Values are Mean±SD.

성이 아주 강해 인지질 세포막 안에 축적 정도나 흡수율이 굉장히 높아 세포 성장 억제에 효과가 좋다는 것이 보고되었다 [Ahn과 Shin, 1999].

과채발효액에는 사과산, 젖산, 푸마릭산, 시트르산 등 다양한 유기산이 함유되어 있어 그 자체로 유기산의 최소발육억제 농도(minimum inhibitory concentrations, MIC)를 측정하는 것의 의미가 적어서 각각의 유기산들의 MIC를 측정하고 과채발효액에 함유된 유기산 농도를 측정하여 과채발효액의 유기산에 의한 *E. coli*와 *Salmonella* sp.에 대한 발육억제 정도를 예측하였다. *E. coli*와 *Salmonella* sp.에 대한 MIC를 측정하였을 때 그 값은 Table 2에 보여주었다. MIC는 두 가지 유해균에 대해 유사한 경향을 나타내었고, MIC 값은 초산, 개미산, 프로피온산, 푸마릭산, 젖산, 시트르산의 순서로 높아서 초산이 유해균을 저해하는 가장 적은 농도가 필요하였다.

**과채발효액의 유기산 함량.** 과채발효액(3.0%)에 함유된 유기산의 종류와 농도는 Table 3에 보여주었듯이 사과산, 젖산, 시트르산, 푸마릭산 순으로 다량 함유되어 있었다. Lee의[2007] 연구에서도 *L. acidophilus*는 6-12시간 동안 유청 배지에서 발효시켰을 때 프로피온산이 8.88 mg/mL로 많이 생성되었다고 보고하여 유산균들 중에는 유기산이나 저급지방산의 합성을 촉진시키는 균들이 있다고 보고하였다. 과채발효액에는 초산과 젖산의 함유량이 Table 3에서 보여준 것처럼 *E. coli*와 *Salmonella* sp.의 MIC보다 높게 함유되어 있었고, 사과산, 시트르산, 푸마릭산 등의 함량은 MIC보다 낮게 함유되어 있었다. 전체적으로 보았을 때 과채발효액은 두 유해균의 성장을 억제하기에 충분한 것으로 사료된다. Jang 등의 연구 결과에서도 유기산별 *E. coli*에 대한 MIC를 측정하였을 때 아세트산, 프로피온산, 바닐닌산, 구연산은 각각 2,500, 5,000, 5,000, 10,000 ppm에서 발육이 억제되었고, *S. enteritidis*와 *Listeria monocytogenes*에 대해서도 유사한 경향을 나타내었다[Jang 등, 2007]. 또한 유기산을 혼합하였을 때 MIC가 감소하는 경향을 나타내어 과채발효액 자체가 단일 유기산보다 더 효과적으로 유해균 억제 효과가 있을 것으로 사료되었다. 이외에도 젖산도 유해균에 대한 증식 억제 효과가 있다는 것이 보고되었다. 결과적으로 본 연구결과와 같이 다른 연구들에서도 유기산들이 유해균에 대한 억제효과가 있다는 것을 보여 주었다[Jang 등, 2005; Jang 등, 2007].

**과채발효액의 산도 및 함유 유산균의 내산성.** 과채발효액 자체의 산도가 낮아 pH는 2.9±0.4이었다. 그러므로 일반적으로 과채발효액에 존재하는 균주는 pH 3.0-3.5에서의 생존력은 좋을 것으로 생각하였다. 실험결과는 조사한 균주인 *L. satsumensis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. plantarum*, *Zygosaccharomyces bisporus*들은 모두 pH 4.0까지는 대부분 생존하였고, 이중에서도 *L. hilgardii*, *L. reuteri*, *L. nagelii*, *L. plantarum*, *Zygosaccharomyces bisporus*들은 pH 2.0까지도 생존하였다(Table 4). 특히 이스트인 *Zygosaccharomyces bisporus*는 pH 2.0까지도 생장이 우수하였다. 유산균이 살아 있는 상태로 장내에 도달하기 위해서는 산성에서 살아남아야 하는데 유산균 중에서 산성에서 생존력이 높은 것들이 상당히 있다. Kim 등에 따르면 *L. rhamnosus*와

**Table 4. Tolerance against the acidity of lactobacillus and yeast found in the fermentation broth of fruits and vegetables**

	MRS	pH 4.0	pH 3.0	pH 2.0
<i>L. acidophilus</i>	7.4±0.9	5.5±0.9	1.7±0.6	0.6±0.5
<i>L. casei</i>	7.6±1.0	5.6±0.9	1.4±0.5	0.5±0.4
<i>L. hilgardii</i>	7.7±0.9	5.9±0.9	4.0±0.6	3.8±0.5
<i>L. mali</i>	7.5±1.1	5.7±0.8	1.1±0.4	0.8±0.4
<i>L. nagelii</i>	7.6±1.2	5.6±0.7	3.8±0.7	1.2±0.4
<i>L. plantarum</i>	7.7±0.9	4.3±0.8	3.8±0.9	3.8±0.6
<i>L. reuteri</i>	7.8±1.1	6.0±1.0	4.2±0.8	4.1±0.9
<i>L. satsumensis</i>	7.5±1.1	5.9±0.9	1.5±0.5	0.5±0.4
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	7.9±1.1	5.9±1.0	5.7±0.9	3.7±0.7
Control	-	-	-	-

Values are Mean±SD. Control was given with the media of growing *Lactobacillus* and yeast. Values represent the number of viable *Lactobacillus* and yeast in assigned acidic condition.

Table 5. Anti-microbial activities of individual lactobacillus and fermentation broth

(unit: mm)

	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. gallinarium</i>	<i>St. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. acidophilus</i>	15.6±0.6	14.6±1.5	13.0±1.0	15.3±0.6	16.3±0.6
<i>L. casei</i>	14.3±0.6	15.3±1.5	14.3±1.2	15.6±1.5	18.0±1.0
<i>L. hilgardii</i>	13.6±0.6	10.0±1.0	10.3±0.6	12.6±0.6	9.6±0.6
<i>L. mali</i>	13.3±1.5	13.0±1.0	13.6±0.6	13.0±1.0	14.3±0.6
<i>L. nagelii</i>	16.6±1.5	14.3±1.2	16.3±0.6	16.3±1.5	17.3±1.2
<i>L. plantarum</i>	14.3±0.6	14.6±1.5	15.3±0.6	16.0±1.0	16.3±1.5
<i>L. reuteri</i>	15.6±0.6	14.3±1.5	16.3±1.5	15.3±1.2	16.3±1.2
<i>L. satsumensis</i>	15.3±1.5	15.6±0.6	14.3±0.6	13.3±0.6	16.0±1.0
Fermentation broth (acid 1.2%)	22.0±0.6	15.3±1.0	15.3±1.0	15.6±0.6	24.3±1.5
Fermentation broth (acid 3%)	28.0±2.0	21.3±1.5	25±2.0	24.3±1.5	26.6±0.6
Fermentation broth (acid 6%)	30.3±1.5	26.0±2.0	26.6±1.5	25.0±1.0	31.0±2.0
Control	0	0	0	0	0

Values are Mean ± SD. Control was given with the media of growing Lactobacillus and yeast. Anti-microbial activities represent as the diameter of clear zone in paper disk methods.

*L. casei*가 pH 1.5-2.5에서도 생존력이 우수하였다[Kim 등, 1999].

**과채발효액 및 함유 유산균의 항균력.** 유산균과 과채발효액의 항균 효과를 paper disk 방법으로 위해균(*E. coli*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. gallinarium*)에 대해서 과채발효액에 함유된 유산균들과 유기산에 의한 항균효과를 조사하였다. 과채발효액에 함유된 유산균 자체에 대해서 조사하였을 때 *L. satsumensis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. mali*, *L. hilgardii*, *L. reuteri*, *L. nagelii*, *L. plantarum*은 모두 위해균에 종류에 따른 차이는 약간 있었지만 대체적으로 위해균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. gallinarium*에 대해서 항균력을 나타내었다. 특히 그 중에서도 *L. nagelii*과 *L. plantarum*이 *Staphylococcus aureus*, *S. gallinarium*에 대한 항균력이 가장 높았다(Table 5). 또한, 과채발효액은 산의 농도가 높아질수록 위해균에 대한 항균 효과가 향상되었고(Table 5), 더욱이 과채발효액은 위해균에 대해서 개별 유산균들에 비해 현저하게 항균력이 증가하였다(Table 5). 그러므로 과채발효액에 의한 항균 효과는 함유 유산균들과 유기산 모두에 의한 것으로 사료된다. 여러 연구에서 유산균이 항균 효과가 있다는 것은 보고되었고, 본 연구에서도 맥락을 같이 하였다. 특히 김치 유산균 중에 하나인 *L. plantarum*의 항균 효과가 있었다는 보고는 있었다[Park 등, 1996; Kang과 Han, 2005].

**과채발효액의 탈취력 측정.** 희석한 과채발효액을 25 ppm 암모니아와 50 ppm 황화수소의 제거 능력을 측정하였을 때 초기 30분 동안에 처음 농도의 암모니아 68%와 황화수소 48%가 제거되는 빠른 탈취력을 나타내었다. 2시간 후에는 암모니아의 76%, 황화수소의 58% 탈취력을 나타내었다(Fig. 1). 특히 암모니아 탈취력이 뛰어나서 240분 후에는 암모니아는 80% 이상이 제거되었다(Fig. 1). 반면에 대조군인 물을 넣었을 때는 시간이 지남에 따라 암모니아나 황화수소의 변화가 거의 없었다. 그러므로 과채발효액은 암모니아와 황화수소 모두에 대해 탈취력을 가지고 있었다. 탈취제로 사용되는 것들을 살펴보면 크게 두가지로 나누어 많은 작은 구멍을 가지고 있는 나무조각이나 화산석등을 이용하여 악취물질을 포집하는 역할을 하는 것이나 또는 지렁이 분변토와 같이 미생물을 사용하여 악취물질을 분

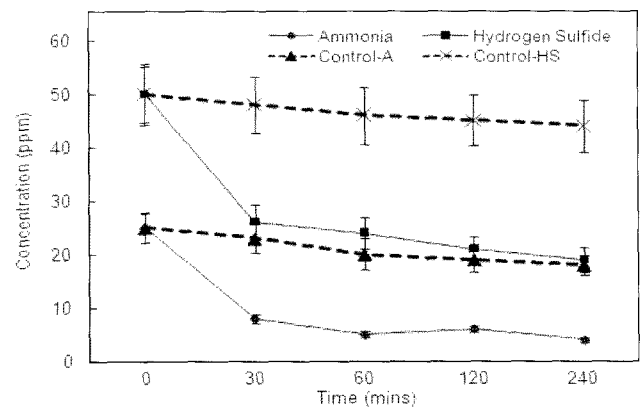


Fig. 1. Changes in of ammonia and hydrogen sulfide concentrations after treating the fermentation broth of fruits and vegetables.

해시키는 방법을 사용해 왔다[Lee 등 1997; Lee 등, 2001; Lee 등, 2007; Yoo와 Lee, 2007]. 그러므로 본 연구에서 과채발효액이 탈취효과를 나타내는 것은 미생물이 암모니아나 황화수소를 사용하는 균을 함유하고 있을 가능성을 예측할 수 있다. 황화수소 분해균주로 알려진 것에는 *Thiobacillus* sp., *Thiurix* sp., *Beggiatoa* sp. 등과 같은 무색 황산화세균과 *Chlorobium* sp., *Chromatium* sp., *Rhodobacter* sp., *Ectothiorhodospira* sp. 등과 같은 광합성 황산화 세균과 *Xanthomonas* sp.와 같은 종속영양세균 및 몇몇 종의 곰팡이가 있다[Lee 등, 2007; Yoo와 Lee, 2007]. 그러나 본 연구에서 조사한 과채발효액에는 황화수소를 제거하는 것으로 알려진 미생물을 함유하고 있지만 미생물에 의해 탈취력이 향상되었을 가능성을 배제할 수는 없다.

**산란계의 계란 생산량.** 과채발효액(산 3.0%)을 사료에 0.1% 수준으로 사료에 혼합하여 산란계에게 공급하였을 때 계사 내의 냄새가 현저하게 적었다. 또한 발효액을 섭취한 실험군의 산란율이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높았고, 평균 계란 질량도 더 높았다(Table 6). 그러나 사료 섭취량 자체는 두군 사이에 차이가 없었으나 단위질량의 계란을 생산하는데 필요한 사료 요구율은 과채발효액을 투여한 군이 높았다. 결과적으로 과채발효액이 산란계의 계란 생산량을 향상시킨다는 것을 알

**Table 6. Average egg production rate, egg weight, feed intake and feed demand ratio in the hens supplemented with the fermentation broth of fruits and vegetables**

	Egg production rate (%)	Egg weight (g)	Feed intake (g/day)	Feed demand ratio
Control	88.7±4.2	62.3±3.5	118±11	1.9±0.1
Supplementation fermentation broth	93.5±4.6*	66.4±3.4*	114±12	1.7±0.1*

Values are Mean±SD. Hens in the control group were given stocks with 0.1 % water.

\*Significantly different from the control  $p < 0.05$  by two-sampled t-test

**Table 7. The quality of eggs laid from the hens supplemented with the fermentation broth of fruits and vegetables**

	Firmness of egg shell (kg/cm <sup>3</sup> )	Thickness of egg shell (μm)	Height of egg white (mm)	Haugh Unit	Yolk cholesterol (g/kg yolk)
Control	3.4±0.4	378±42	5.7±0.5	72.1±6.4	12.3±1.4
Supplementation fermentation broth	4.5±0.6*	427±41*	6.8±0.5*	80.7±6.6*	13.4±1.5

Values are Mean±SD. Control is the media of growing *Lactobacillus* and yeast.

\*Significantly different from the control  $p < 0.05$  by two-sampled t-test

수 있었다. 다른 연구에서도 산란계에서 probiotics가 유익한 장내 미생물의 발육을 향상시켜 계란 생산을 향상시켰다는 보고가 있었다[Hong 등, 2002].

**산란계의 계란 품질.** 계란의 생산량과 마찬가지로 계란의 품질도 과채발효액을 공급하였을 때 계란의 품질을 나타내는 여러 가지 지표가 향상되는 것을 볼 수 있었다. 과채발효액을 첨가한 산란계에서 낳은 계란 노른자의 색도가 대조군에 비해 높아졌다. 또한, 대조군에 비해 과채발효액을 첨가한 사료를 투여한 산란계에서 낳은 계란의 난각의 두께도 두꺼워졌고, 난각 강도도 강해졌다. 또한 난백고도 과채발효액을 첨가한 사료를 투여한 산란계에서 낳은 계란에서 높았고 이것은 신선도가 높은 것이고 Haugh unit도 높았다(Table 7). 과채발효액을 투여한 산란계에서 낳은 계란의 노른자에 함유된 콜레스테롤 함량이 대조군에 비해 낮았지만 통계적으로 유의적이지는 않았다( $p=0.08$ ). 이러한 결과는 돼지와 육계에게 0.2%의 생균제인 *L. acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharmyces cervisiae*가 함유된 사료를 섭취한 돼지고기와 닭고기의 육질에 함유된 콜레스테롤 함량이 대조군에 비해 유의적으로 낮은 것과 유사하였다[Kim 등, 2004]. 유산균제제나 천연물 추출액 등의 사료첨가물들이 난각 강도나 난각 두께 등을 강화시키는 것은 대부분 영양소 중에서 특히 단백질과 무기질의 소화율과 이용율을 향상시키는 것과 관련이 있다는 보고들이 있다[Kang 등, 2008; Hong 등, 2002]. 유산균 중 *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Lactococcus lactis* spp 그리고 *Enterococcus faecium*은 콜레스테롤 저하능이 있다는 것이 보고되었고, 이 중 과채발효액에 *L. casei*가 함유되어 있으므로 난황의 콜레스테롤 저하능과 관련이 있다고 사료된다[Kim 등, 1999; Moan 등, 1995]. 또한, 다른 여러 연구들에서 *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium* 등이 요구르트에 많이 함유되어 있고 이들 중에 *Bifidobacterium longum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*가 함유된 요구르트를 투여한 백서에서 혈청 콜레스테롤 농도를 감소시켰다[Ryu 등, 1999].

## 초 록

본 연구에서는 과채 발효시 생성되는 유산균의 종류를 확인

하고 유기산 농도, 내산성과 항균 효과를 확인하고 산란계의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 계란의 품질에 미치는 영향을 조사하였다. 과채류의 유산균 발효액에는 8종 이상의 *Lactobacillus* 균들이 있었으며 이들은 pH가 2.9±0.4인 과채발효액에 존재하므로 대부분 내산성을 띄고 있었다. 과채발효액에 존재하는 유산균들 중에서도 *L. hilgardii*, *L. reuteri*, *L. nagelii*, *L. plantarum*, *Zygosaccharomyces bisporus*들은 pH 2.0에서도 생존하였다. 과채발효액이 산성을 나타내는 것은 유기산인 초산, 사과산, 젖산, 푸마릭산, 시트르산이 함유되어 있는 것과 관련이 있다. 과채발효액에는 초산과 젖산이 *E. coli*와 *Salmonella sp.*의 MIC보다 높게 함유되어 있었고, 사과산, 푸마릭산, 시트르산들은 MIC보다 낮게 함유되어 있었지만 전체적으로 보았을 때 유기산의 함량은 두 위해균의 성장을 억제하기에 충분한 것으로 사료된다. 이렇게 과채발효액에 함유된 유기산이 위해균의 성장을 억제할 뿐 아니라 유산균들 중에서 위해균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. gallinarium*에 대해 *L. nagelii*과 *L. plantarum*이 가장 항균 효과가 높았고, 그다음으로 *Staphylococcus aureus*, *S. gallinarium*에 대해서 효과적인 항균 효과를 나타내었다. 유기산과 유산균이 모두 함유된 과채발효액은 산의 농도가 높아질수록 위해균에 대한 항균 효과가 향상되었다. 희석한 과채발효액을 암모니아와 황화수소의 제거 능력이 탁월하여 과채발효액을 처리한 후 초기 30분 동안 50% 이상이 제거되었다. 사료의 0.1% 수준으로 과채발효액(산함량 3.0%)을 혼합하여 산란계에게 공급하였을 때 대조군에 비해 산란율, 계란 질량, 사료 효율이 현저하게 증가하였다. 또한 과채발효액 첨가군에서 계란의 신선도가 향상되었고, 난각 두께와 난각 강도가 높아져서 파각율이 낮을 것으로 사료되며 난황의 콜레스테롤 농도도 낮아졌다. 결론적으로 과채발효액은 양계의 항생제 대체 사료첨가제로의 가능성이 충분한 것으로 사료된다.

**Key words:** deodorization capacity, egg production, feed efficiency, lactobacillus, organic acid

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 산학공동기술개발지원사업과 한국한의학 연구원의 지원에 의하여 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ahn YS and Shin DH (1999) Antimicrobial effects of organic acids and ethanol on several food borne microorganism. *Kor J Food Sci Technol* **31**, 1315-1323.
- Cho MS, Han SA, Ryu JS, Choi JH, Koo BC, Shin MS, Ahn JS and Lee WK (2008) Efficacy of lactic acid bacteria isolated from Kimchi for swine feed additives. *J Vet Clin* **25**, 67-72.
- Folch J, Lees M, and Sloane-Stanly GH (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Hong JW, Kim IH, Kwon OS, Han YK, and Lee SH (2002) Nonruminant Nutrition: Influence of Probiotics Supplementation on Egg Quality and Excretal Noxious Gas in Laying Hens. *J Anim Sci Technol (Kor)* **44**, 213-220.
- Hong JW, Kim IH, Kwon OS, Han YK, and Lee SH (2002) Influence of probiotics supplementation on egg quality and external noxious gas in laying hens. *Kor J Animal Sci* **6**, 806-814.
- Jang JS, Go JM, and Kim YH (2005) Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* by lactic acid and hydrogen peroxide. *Kor J Env Hlth* **31**, 115-119.
- Jang JS, Lee HJ, Oh BY, Lee JM, Go JM, and Kim YH (2007) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by organic acid. *Kor J Env Hlth* **33**, 403-407.
- Kang HK, Kang GH, Na JC, Yu DJ, Kim DW, Lee SJ, and Kim SH (2008) Effects of Feeding Rhus verniciflua Extract on Egg Quality and Performance of Laying Hens. *Korean J Food Sci Ani Resour* **28**, 610-615.
- Kang SY and Han MJ (2005) Effect of Kimchi ingredients on the growth of pathogenic and lactic acid bacteria. *Kor J Food Cookery Sci* **21**, 838-843.
- Kim AR, Cho YM, Lim SK, Her M, Jeong WS, Jung SC and Kwon JH (2007) Antimicrobial resistance of commensal bacteria isolated from food-producing animals 3. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and Enterococcus spp. isolated from chicken faecal samples. *Kor J Vet Publ Hlth* **31**, 41-49.
- Kim BK, Hong KJ, Park JH, and Kim HS (2004) Effects of supplementation of Microbes additive on the fatty acid composition and cholesterol production in meat of pig and chicken broiler. *Kor J Food Sci Ani Resour* **24**, 399-403.
- Kim CH, Oh DH, and Chae BJ (2001) Effect of feeding green tea and chitosan on production, nutrient and cholesterol level in serum or egg yolk of laying hens. *Kor J Poult Sci* **28**, 275-281.
- Kim EM (2002) The effects of supplementation of ascidian tunic shell into laying hen diet on egg quality. *J Anim Sci Technol Kor* **44**, 45-54.
- Kim JH, Oh MK, Rhee YH, Choi KC, Lee YK, and Shin SY (1999) Selection and physico-chemical characteristics of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering activities. *J Kor Soc Agric Chem Biotechnol* **42**, 83-90.
- Kobayashi H (1985) A proton translocating ATPase regulates pH of the lactic acid bacterial cytoplasm. *J Biol Chem* **260**, 72-76.
- Lee EY, Cho KS, Ryu HW, Park SJ and Bae M (1997) Isolation and Characterization of Hydrogen Sulfide Degrading Bacteria from Earthworm Casts. *Korean J Environ Biol* **15**, 53-61.
- Lee MG, Bin JI, Lee BH, Choi H, and Kwon SH (2001) Removal Characteristics of Hydrogen Sulfide in the Biofilter Packed with Volcanic Rock (Scoria). *Korean Chem Eng Res* **39**, 379-384.
- Lee SH, Kim KW, Yun NK, Cho YH and Hong YK (2007) Application Effects of the Odor Abatement System Using Wood chip for Manure Fermentation Facility. *J Biosystems Eng* **12**, 306-309.
- Lee JH (2007) Study on the production of organic acid by fermentation with mixed culture of *Lacto. acidophilus* KCCM 32820 and *Propionibacterium freudenreichii* KCCM 31227 in whey broth. *Kor J Culinary Res* **13**, 55-61.
- Lee YJ, Kim AR, Jung SC, Song SW, and Kim JH (2005) Antibiotic resistance pattern of Enterococcus spp. And Staphylococcus aureus isolated from chicken feces. *Kor J Vet Publ Hlth* **25**, 163-168.
- Lim YS, Kim SY, Lee SK (2008) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Kefir made of goat milk. *Kor J Food Sci Ani Resour* **28**, 82-90.
- Moan B, Kadirvel R, Bhaskaran M, and Natarajan A (1995) Effect of probiotic supplementation on serum/cholesterol and on egg shell thickness in layers. *Br Poult Sci* **36**, 799-803.
- Moon ES and Ko MH (2006) Quality grade of eggs in the food stores. *Safe Food* **1**, 23-26.
- Palmer J and List DM (1973) Determination of organic acids in foods by liquid chromatography. *J Agric Chem* **21**, 903-906.
- Park SY, Ko YT, Jeong HK, Yang JO, Chung HS, Kim YB, and Ji GE (1996) Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid and antibiotics. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **24**, 304-310.
- Pollmann DS, Danielson DM, and Peo Jr ER (1980) Effects of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. *J Anim Sci* **51**, 638-644.
- Ryu KS, Park HS, Ryu MS, Park YS, Kim SH, and Song HJ (1999) Effect of feeding probiotics on performance and intestinal microflora of laying hens. *Kor J Poult Sci* **26**, 253-259.
- Sim JH, Kim S, Baek YJ, Oh TK, and Yang HC (1995) Influence of culture conditions in acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor J Applied Microbiol Biotech* **23**, 17-23.
- Wahburn KW and Nix DF (1974) A rapid technique for extraction of yolk cholesterol. *Poultry Sci* **53**, 109-115.
- Yoo SK and Lee EY (2007) Application of Earthworm Casting-derived Biofilter Media for Hydrogen Sulfide Removal. *J KSEE* **29**, 820-825.
- Zlatkis A, Bennie Z, and Albert LB (1953) A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J Lab Clin Med* **41**, 486-492.