

김치 유래의 유산균 변이주 *Lactobacillus paracasei* ML-7의 특성 및 육계 성장에 대한 영향

박근태 · 오미향 · 남정옥 · 지기쁨 · 한종권*
(주)미래자원 ML 신소재 연구소

Characterization of Mutant Strain, *Lactobacillus paracasei* ML-7 Isolated from Kimchi, and Its Effect on the Growth of Broiler

Keun-Tae Park, Mihyang Oh, Jungok Nam, Kibbeum Ji, and Jong-Kwon Han*
Research and Development Center, Milae Resources ML Co. Ltd.

Abstract A mutant strain of *Lactobacillus paracasei* (ML-7) was derived by ultraviolet irradiation of the parent *L. paracasei* LS-2 strain, followed by colony selection on pH 3.5 MRS agar plates, on which *L. paracasei* LS-2 cannot grow. The *L. paracasei* ML-7 mutant strain produced an increased amount of organic acids compared to the *L. paracasei* LS-2 parent strain. Broiler chickens were randomly fed with one of three experimental diets: a basal diet as a control, and basal diets supplemented with 0.3% of the *L. paracasei* LS-2 and *L. paracasei* ML-7 strains. When concluding the study, the final body weights of the broilers fed with the supplemented basal diets were found to be significantly higher (1.9% for LS-2 and 6.2% for ML-7) than the control broiler group. Broilers fed with basal diet supplemented with the mutant *L. paracasei* ML-7 strain showed increased body weight and food intake, compared to broilers fed with the basal diet with or without the parent *L. paracasei* LS-2 strain.

Keywords: *Lactobacillus paracasei*, ultraviolet mutation, organic acid, broiler

서 론

유산균은 탄수화물로부터 젖산(lactic acid)을 생산하는 박테리아로서 산업적으로 유제품, 육류, 채소 등을 원료로 하는 발효 식품을 제조하는데 널리 사용되며 사람이 섭취할 경우 장에서 다양한 기전으로 건강에 기여하는 것으로 알려져 있다. 축산 분야에서 가축의 생산성 향상을 목적으로 유산균의 생균이나 사균, 젖산 혹은 박테리옌 등의 유산균 대사산물 등 다양한 형태로 이용되고 있다(1,2). 축산 분야에서 문제를 일으키는 병원성 미생물인 살모넬라, 대장균, 켈필로박터 등에 대한 성장억제를 촉진한다는 연구보고가 있으며(3,4), 또한 유산균의 주요 대사산물인 젖산 등의 유기산은 가축에 급여할 경우 장의 pH를 낮추어 유해균의 성장을 억제하고, 영양소의 소화율을 개선시키는 효과 등으로 가축의 생산성 목적으로 사용되고 있다(5,6).

축산 분야에서 유산균의 내산성은 동물 장내에서 유산균의 생존, 즉 프로바이오틱스로서의 성능을 발휘하는데 있어 중요한 요소이므로 담즙산(bile acid)에 대한 내성과 더불어 유산균 선별의 중요한 요소이다. 하지만 많은 생명체에서 젖산(lactic acid)은 혐

기적 해당 경로(anaerobic glycolysis)의 최종 산물로서 대사적 기능이 없는 최종 산물(dead-end waste product)로 알려져 왔지만 최근에 젖산이 효소의 조절을 통하여 생리적인 역할을 한다는 사례가 보고되고 있다(7).

산업적으로 젖산은 생분해성 고분자(bio-degradable polymer)의 원료로서 D-form 혹은 L-form의 형태로 미생물에 의해 고농도로 생산되고 있다. 하지만 고농도의 젖산을 생산하는 균주의 경우에도 균주 개발을 위해 젖산 내성을 도입한 사례는 찾기 힘들 정도이다.

본 연구에서는 가축의 장내에서 유산균의 효능과 유기산의 효능을 동시에 발현시키고자 하는 목적으로 젖산에 대한 내성을 부여하는 인공변이를 통하여 젖산 생성이 증가된 유산균 변이주를 제작하고, 육계(broiler)를 대상으로 하는 사양시험을 통하여 유기산 생성이 증가된 유산균 변이주가 가축의 생산성 증가에 미치는 영향을 보고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 김치로부터 분리된 유산균인 *Lactobacillus paracasei* LS-2를 모균주로 사용하였다(특히 균주 기탁 번호 KFCC11490P). 이 밖에 *L. paracasei* sub. *Paracasei* ATCC 27216 균주와 *Escherichia coli* ATCC 25922 및 *Aspergillus flavus* ATCC 22546 등의 균주 들은 한국생명자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea)에서 분양 받아 사용하였다.

*Corresponding author: Jong-Kwon Han, Research and Development Center, Milae Resources ML, Seoul 138-050, Korea
Tel. 82-2-2203-7397
Fax. 82-2-2203-7398
E-mail. jkhan@milaeml.com
Received October 2, 2013; revised January 17, 2014;
accepted January 21, 2014

재료 및 시약

미생물 배양에 사용한 MRS, LB 배지는 Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 제품을 사용하였고, lactic acid, acetic acid, succinic acid 등의 표준 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

인공변이주 제작

변이주를 선별하기 위해 -80°C에서 보관중인 모균주 *L. paracasei* LS-2를 MRS agar에 18시간, 혐기적 조건에서 배양 및 활성화시킨 후, MRS 액체배지에 18시간 배양하였다. 액체배지에서 배양한 균체의 농도는 visible spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 흡광도(O.D., optical density)를 측정하여, 0.1로 맞춘 뒤, MRS agar 배지에 도말하여 유산균의 치사율이 99.9%가 되는 조건인 10 W UV lamp 30 cm 거리에서 3분간 조사하여 돌연변이를 유발하였다(8). UV를 조사한 후 약 100개의 콜로니를 얻은 plate 10장을 수집, 총 1,000개의 콜로니를 선택하고 지시약을 이용하여 선별하였다. 각 plate당 5개의 콜로니를 선별하여 pH 저감 배지 성장과 유기산 생성능력을 분석하여 최종적으로 한 개의 균체를 분리하였다. 분리한 변이주를 액체 배지에 배양 후 80% glycerol에 동량 비율로 혼합하여 -80°C에서 보관하였다. 보관된 균주로부터 여러 번 계대배양하여 revertant 발생여부를 확인하였으나 인정되지 않았다. 하지만, 일반적인 산업화에서 변이주를 지속적으로 사용하지 않고, stock 균주로부터 주기적으로 배양을 시작하는 점에 따라 본 연구에서도 한 변이주를 세 번 이상 계대하지 않고 사용하였다.

유기산 생성 증가 변이주 스크리닝

MRS agar 배지에서 1차로 선별된 균주들로부터 유기산 생성이 증강된 변이주를 스크리닝하기 위해 methyl red 지시약을 사용하였다. 선별된 콜로니들을 멸균된 이쑤시개를 사용하여 methyl red 지시약이 10 ppm이 첨가된 MRS agar에 가볍게 접종하였으며, 페트리디쉬상의 콜로니 주변 색깔이 붉은 색으로 빠르게 변하는 균주를 선별하였다(9).

pH 저감 배지에서의 변이주 성장

선별된 균주들이 pH저감 배지에서의 성장성을 확인하기 위해 lactic acid를 이용하여 pH를 5부터 3.5까지 낮춘 MRS agar 배지를 이용하였다. 액체배지에서의 균체 성장은 MRS 액체배지에서 측정하였으며, 성장정도는 spectrophotometer에 의한 600 nm에서의 흡광도 및 serial dilution에 의한 생균수 측정을 병행하였다.

유기산 생성량 측정

균체를 배양한 배지를 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상등액 10 mL을 취하여 filter paper에 여과한 후, 0.45 µm membrane filter (Agela Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)로 한번 더 여과하였다. 시료 중 유기산 함량 분석은 HPLC (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였으며, ODS column (Reversed-phase C18 column, Prevail Organic Acid, 4.6×150 nm, 3 µm, Alltech Co., Lexington, KY, USA)을 사용하였다. 이동상으로 0.25 mM phosphate buffer를 사용하여 1 mL/min의 유속 조건에서 분석을 실시하였고, 210 nm에서 흡광도를 측정하였다(10).

유산균의 병원성 미생물과 곰팡이의 성장 억제 효과

모든 균주를 두 번 활성화를 거친 후 실험에 사용하였고, *A. flavus*는 30°C, 호기적 조건에서 배양하였으며, *E. coli*는 37°C, 호

Table 1. Strains used in the study

| | Source | Number |
|--|---------------|------------|
| <i>Lactobacillus paracasei</i> LS-2 | Patent strain | KFCC11490P |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i> | ATCC | 27216 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC | 25922 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | ATCC | 22546 |

Table 2. Composition and nutritional values of chicken broilers diet

| Item | Control | Control + <i>Lactobacillus</i> |
|---------------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Ingredient | Content (%) | |
| Corn | 52.4 | 52.1 |
| Wheat powder | 5 | 5 |
| Fish meal (55%) | 2 | 2 |
| Poultry by products | 2 | 2 |
| Soybean meal (46%) | 23.6 | 23.6 |
| Fullfat soybean (Extruded) | 5 | 5 |
| Limestone | 1.33 | 1.33 |
| Salt | 0.24 | 0.24 |
| Glucose | 1 | 1 |
| Dicalcium phosphate | 1 | 1 |
| Tallow | 4.9 | 4.9 |
| Vitamin, Mineral premix ¹⁾ | 0.15 | 0.15 |
| Lysine-HCl (50%) | 0.45 | 0.45 |
| DL-Methionine (81%) | 0.31 | 0.31 |
| Threonine | 0.07 | 0.07 |
| Cholin-HCl | 0.05 | 0.05 |
| Maduramycine | 0.05 | 0.05 |
| Yeast culture | 0.2 | 0.2 |
| <i>Lactobacillus</i> | 0 | 0.3 |
| Calculated Value | | |
| Protein | 20.19 | 20.19 |
| Crude fat | 8.59 | 8.59 |
| Calcium | 0.92 | 0.92 |
| Phosphorus | 0.32 | 0.32 |
| Lys | 1.35 | 1.35 |
| Met+Cys | 0.91 | 0.91 |

¹⁾Vitamin contains followings in 1kg : vit A, 10,000IU; vit D3, 5,000 IU; vit E, 20 IU; vit K3, 3mg; vit B2, 6mg; vit B, 6.3mg; vit B12, 0.016mg; niacin, 50mg; Ca-pantothenate, 13mg; Folic acid, 13mg; Cu, 5mg; Mn, 110mg; Zn, 100mg; Se, 0.3mg; Fe, 40mg; Co, 5mg

기적 조건에서 배양하였다. 사용한 균주는 Table 1과 같다. 선별된 유산균의 *E. coli*와 *A. flavus*에 대한 성장 억제 효과를 보기 위해서 overlay assay법을 이용하였다. 먼저 유산균을 활성화 한 후 배지의 삼등분이 되는 지점에 루프를 이용하여 2 cm의 길이로 11자 형태로 streaking하여 24-48시간 동안 배양하였다. 멸균한 액체상태의 0.7% agar 배지를 45에서 온도 균일화 한 후에 밤새 배양한 *E. coli* 액체 배지를 혼합하였다. 혼합 비율은 4 mL의 0.7% 멸균배지와 *E. coli* 배양액 0.1 mL의 농도로 희석한 배지 10 mL를 overlay 하였다. *A. flavus*는 동일한 방법으로 실험을 하였으며, 균주의 농도는 hemacytometer를 이용하여 1×10⁴ conidias/mL로 희석하였다. 유산균의 *E. coli*와 *A. flavus*에 대한 억제

효과는 각각의 성장 조건에 따라 24-48시간 동안 배양한 후에 관찰하였다(11).

육계 사양 실험

1일령의 육계(Ross 308) 수평아리를 구입하여 1일간 적응기간을 거친 후 2일령 육계 150마리를 3그룹으로 나눈 후 각각 10마리씩 5반복으로 실험하였다. 유산균은 MRS 액체배지에서 48시간 동안 배양한 배양액을 실험 사료에 0.3% 혼합하여 급여하였으며, 사료는 물과 함께 3주간 자유 급식토록 하였다. 실험사료는 National Research Council (NRC, Washington, DC, USA) 사양 표준에 의한 육계 전기 사료를 사용하였으며, 각 그룹의 사료 조성은 Table 2와 같다. 사료 섭취량은 3일 단위로 기록하였으며, 점등시간은 1일 23시간이 되도록 하였다. 조사항목 및 분석 방법은 처리구간의 사양 성적을 산출하기 위하여 각 처리구의 체중 증가량(weight gain, G)과 사료 섭취량(feed intake, F)을 실험 개시일(2일령) 및 종료일(23일령)에 측정하여 기록하고, 이에 따라 사료 요구율(feed conversion rate, F/G)을 산출하여 평가하였다(12).

결과 및 고찰

변이주 선별

변이주 선별을 위하여 *L. paracasei* LS-2 균주가 젖산으로 pH를 조절한 MRS agar 배지에서 성장하는지를 실험한 결과(13), pH 3.7에서 미약하게 성장하고, pH 3.5에서는 성장하지 않는 것을 확인하였다(data not shown). 따라서 UV 조사에 의해 *L. paracasei* LS-2의 변이를 유발한 뒤에 pH 3.5 MRS agar 배지에서 성장하는 콜로니들을 수집하였다. 수집된 콜로니들의 유기산 생성능력을 평가하기 위하여 methyl red가 포함된 MRS agar 배지(pH 7.2 by NaOH)에 접종하여 배양 중에 콜로니 주변이 가장 빠르게 적색으로 변하는 균주를 선별하여 *L. paracasei* ML-7으로 명명하였다.

선별된 *L. paracasei* ML-7 균주의 MRS 액체배지(pH 6.5)에서의 성장곡선을 확인하였다(Fig. 1). 선별균주인 *L. paracasei* ML-7 변이주가 모균주인 *L. paracasei* LS-2 및 공시균주 *L. paracasei* ATCC 27216에 비해 성장이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

변이주에 의한 유기산 생산

세 종의 유산균 *L. paracasei* ML-7, *L. paracasei* LS-2 및 *L. paracasei* ATCC 27216을 MRS 배지(pH 6.5)에서 stationary phase에 충분히 도달할 수 있도록 48시간 배양하고 배지 중에 축적된 lactic acid, acetic acid, succinic acid를 HPLC로 분석하였다. 이들 균주들이 생산하는 유기산 중에서 lactic acid의 생산이 가장 많았으며, *L. paracasei* ATCC 27216은 0.55 g/L, *L. paracasei* LS-2는 0.61 g/L의 lactic acid를 생산하였으며 변이주인 *L. paracasei* ML-7에서는 이보다 약 2배 정도 많은 1.13 g/L의 lactic acid를 생산하였다(Table 3). 낮은 pH의 배지에서 모균주에 비해 성장성이 높은 유산균 변이주를 선별하는 것, 즉, 보다 높은 농도의 젖산에 대한 내성 변이주를 선별하는 것은 일정량의 발효배지당 젖산의 생산을 증가시키는 변이주의 선별과 관련이 있다는 결론이다. 하지만 1차 대사산물인 유기산의 생산이 균주의 성장 증가에 기인한 것인지, 균체의 유기산 생성능력이 증가한 것인지의 여부는 명확하지 않아 추가적인 실험이 필요하다.

유산균의 병원성 미생물과 곰팡이의 성장 억제 효과

유산균의 프로바이오틱스로서의 작용 기전 중의 하나가 장내

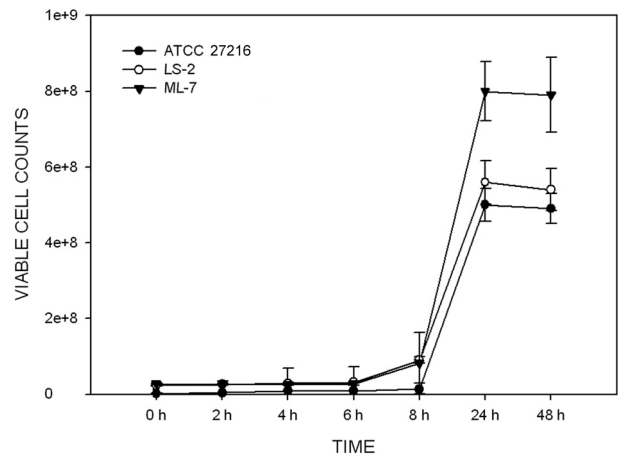


Fig. 1. Growth curves of *Lactobacillus paracasei* and its screening strain and mutant. *Lactobacillus* sp. were cultured in MRS medium at 37°C under, anaerobic condition for 48 h.

의 유해 미생물의 성장을 억제하는 것이다. 본 연구에서는 곰팡이와 콩류에 폭넓게 분포되어 있으며 수확, 저장, 운송 중에 아플라톡신 등의 독소를 생성하는(14,15) 곰팡이 *A. flavus* ATCC 22546과 사람에게 감염되어 α -hemolysin 등 독소를 생성하여 여러 가지 병원성 질환을 일으킬 수 있는 *E. coli* ATCC 25922에 대한 유산균 변이주 *L. paracasei* ML-7의 성장 억제 효과를 평가하였다. 유산균 *L. paracasei* LS-2와 *L. paracasei* ML-7의 *A. flavus* ATCC 22546과 *E. coli* ATCC 25922에 대한 성장저해율 overlay assay로 확인한 결과, *L. paracasei* LS-2 및 *L. paracasei* ML-7 균주 모두 *A. flavus* ATCC 22546과 *E. coli* ATCC 25922의 성장을 억제시켰으며, *L. paracasei* LS-2에 비해 *L. paracasei* ML-7의 성장저해율이 커지는 것을 확인할 수 있었다. *A. flavus* 성장의 최적 pH는 5.2이고, *E. coli*의 성장의 최적 pH가 6-7인 것을 감안하면 유산균의 박테리옌 등의 항균물질의 분비에 의해 *A. flavus* ATCC 22546과 *E. coli* ATCC 25922의 성장이 억제되었다기보다는 유산균에 의해 배지 중에 축적된 유기산에 의해 배지의 pH가 낮아졌기 때문에 *A. flavus* 및 *E. coli*의 성장이 억제된 것으로 추론할 수 있다.

유산균의 육계 급여 실험

유기산 생산이 증가된 변이주 *L. paracasei* ML-7 균주의 급여가 육계 성장에 미치는 영향을 평가한 결과, 유산균을 급여한 처리구들이 급여하지 않은 처리구에 비하여 성장이 잘되는 경향을 확인할 수 있었으며, 변이주인 *L. paracasei* ML-7을 급여한 처리구가 모균주인 *L. paracasei* LS-2를 급여한 처리구에 비해 증체량 및 사료섭취량이 증진되었다(Table 4). 증체량의 경우 유산균을 급여하지 않은 대조구에 비해 *L. paracasei* LS-2를 급여한 경우 약 1.9%, *L. paracasei* ML-7를 급여한 경우 6.2%가 개선되는 효과를 확인하였다. 사료섭취량은 대조군과 *L. paracasei* LS-2를 급여한 처리구에서는 거의 같은 수치를 보였지만, *L. paracasei* ML-7을 급여한 처리구의 경우 다소 증가되는 경향을 확인하였다. 사료 효율의 경우에도 *L. paracasei* ML-7을 급여한 처리구에서 다소 개선되는 경향을 확인할 수 있었다. 변이주의 첨가로 인해 이러한 개선효과는 lactic acid production의 증가에 의한 결과라 생각된다. 유기산제는 사료 첨가제 급여시 장 내의 pH를 낮추어 장 내 균총의 변화를 주는 것으로 항생제의 작용과 유사하기 때문이다. 하지만, cell membrane의 변화 여부 및 그 영향에

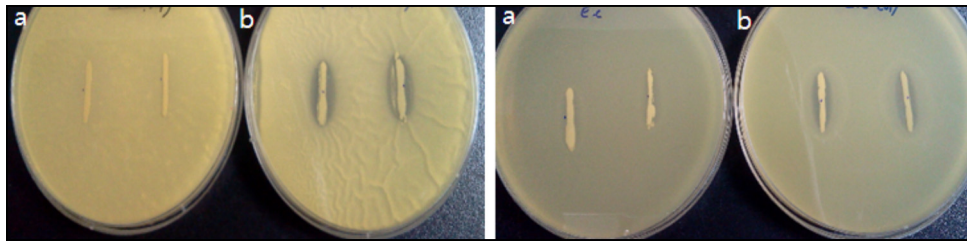


Fig. 2. Anti-growth overlay assay with *Lactobacillus paracasei* LS-2 compared with its UV irradiation mutant *Lactobacillus paracasei* ML-7 against the *A. flavus* (left) and *E. coli* (right). a) *L. paracasei* LS-2, b) *L. paracasei* ML-7.

Table 3. Composition of organic acids in media of *L. paracasei* strains

| Organic acid | ATCC 27216 | LS-2 | ML-7 |
|---------------------|------------|------|------|
| Lactic acid (g/L) | 0.55 | 0.61 | 1.13 |
| Acetic acid (g/L) | 0.01 | 0.02 | 0.05 |
| Succinic acid (g/L) | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Table 4. Effect on body weight, feed intake, feed efficiency of broiler fed various *Lactobacillus* by 3weeks

| Group | Feed intake (g/bird) | Weight gain (g/bird) | FCR |
|---|----------------------|--------------------------|-----------|
| Control | 940.2±35.9 | 660.2±25.5 ^a | 1.42±0.07 |
| Control + <i>L. paracasei</i> LS-2 0.3% | 955.0±34.5 | 672.1±37.6 ^a | 1.41±0.10 |
| Control + <i>L. paracasei</i> ML-7 0.3% | 964.0±78.8 | 701.0±38.6 ^{ab} | 1.37±0.06 |

^{ab}Values (Mean±SE) within columns no common differ significantly ($p < 0.05$).

대한 확인은 crystal violet assay, scanning electron microscope 등 추가적인 연구가 필요하다. 다른 연구 결과에서 *L. acidophilus*와 그 외 *Lactobacillus* 혼합물을 육계에게 급여하였을 때 증체량과 사료섭취량이 유의적으로 개선되었다고 보고하였으며(16), 그 외 *L. sporegenes*와 *L. casei*를 급여한 연구에서도 동일한 양상의 결과 보고가 있어, 본 연구 결과를 뒷받침하는 근거가 될 수 있을 것이다(17). 그러나 유산균을 포함한 생균제의 효능에 관해서 증체 및 사료 요구율 개선 효과가 없었다는 연구 보고도 있다(18,19). 하지만 유산균은 세계의 연구결과를 토대로 인체를 비롯한 축산에서도 면역 개선과 장내 환경을 개선, 기타 유해균을 억제하여 체내건강에 이로운 효과를 주는 것은 자명하다. 따라서, 몇몇 연구 결과의 불일치는 생균을 다루는 연구에서 각각의 배양 조건, 생균수, 식이방법 등의 차이가 있을 수 있으며, 가축의 생육환경 조건에 따라 결과가 상이하게 달라질 수 있을 거라 생각한다.

요 약

김치로부터 분리, 선별한 유산균 *L. paracasei* LS-2에 UV 조사 및 *L. paracasei* LS-2균주가 성장하지 않는 pH 3.5 MRS agar 배지에서 성장하는 변이주를 선별함으로써 변이주인 *L. paracasei* ML-7를 선별하였다. 선별된 변이주 *L. paracasei* ML-7의 유기산 생성능력, 병원성 미생물의 생육 저해 능력, 육계에서의 증체 및 사료 효율 개선효과를 시험하였다. 변이주인 *L. paracasei* ML-7는 모균주인 *L. paracasei* LS-2에 비하여 MRS 배지에서 성장속도가 증가되었으며, 유기산 생성도 증가되었다. 또한 *L. paracasei*

ML-7은 병원성 미생물인 *E. coli* ATCC 25922 (α -hemolysin producing *E. coli*)와 *A. flavus* ATCC 22546에 대한 생육 저해 능력이 모균주인 *L. paracasei* LS-2에 비해 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 육계를 대상으로 하는 사양시험에서 변이주 *L. paracasei* ML-7를 급여한 처리구에서 증체량 개선 및 사료효율이 개선됨을 확인하였다. 본 결과로부터 유산균의 인공변이로부터 유기산 생산 증가 및 그에 따른 가축 사양 성적 개선이 가능한 변이주의 제작이 가능함을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물 연구개발사업단의 연구비 지원에 의해 수행된 연구입니다.

References

1. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756 (1976)
2. Majewska T, Pudyszak K, Kozłowski K, Bohdziewicz K, Matusiewicz P. Whey and lactic acid in broiler chickens nutrition. *Vet. Zootec.* 47: 69 (2009)
3. Tatsadjieu NL, Njintang YN, Sonfack TK, Daoudou B, Mbofung CMF. Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enteric* and *Escherichia coli*. *Afr. Microbiol. Res.* 3: 200-227 (2009)
4. Byrd JA, Hargis BM, Caldwell DJ, Bailey RH, Herron KL, McReynolds JL, Brewer RL, Anderson RC, Bischoff KM, Callaway TR, Kubena LF. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broiler. *J. Poult. Sci.* 80: 278-283 (2001)
5. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *J. Poult. Sci.* 79: 886-891 (2000)
6. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17: 259-275 (2004)
7. Sola-Penna M. Metabolic regulation by lactate. *IUBMB.* 60(9): 605-608 (2008)
8. Kim JK, Kim SD. Genetic breeding of Korean soy sauce-fermenting *Bacillus* by UV mutation. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 31: 346-350 (1988)
9. Jang MJ, Lee YH, Ju YC. Development of simple colorimetric method for detecting contamination of liquid spawn of oyster mushroom by pH indicator. *Kor. J. Mycol.* 36: 9-15 (2008)
10. Lee SJ, Kim JH, Jang YW, Park SY, Shin WC, Park CS, Hong SY, Kim GW. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial *Makgeolli*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 206-212 (2011)
11. Lind H, Broberg A, Jacobsson K, Jonsson H, Schnurer J. Glycerol enhance the antifungal activity of dairy propionibacteria. *Int. J. Microbiol.* 10.1155/2010/430873 (2010)
12. Kim SH, Park SY, Yu DJ, Na JC, Choi CH, Park YY, Lee SJ,

- Ryu KS. Effects of supplemental *Lactobacillus* spp. on performance and cecum microflora in broiler. Korean J. Poult. Sci. 27: 37-41 (2000)
13. Chon H, Kim GH, Kim SK. Comparison of aqueous plant extracts before and after fermentation with *Lactobacillus paracasei* LS-2 on cytokine induction and antioxidant activity. Nat. Prod. Commun. 5: 1277-1282
14. Suriya P, Sudha K, Mathangi SK, Thygarajan D. Incidence of aflatoxin contamination and assessment of physico-chemical parameters in breakfast cereals. Int. J. Food Agric. Vet. Sci. 2:13-19 (2012)
15. Kaaya AN. Management of aflatoxins in cereals, legumes and tubers. Training manual for AT Uganda training of trainers. Final technical report CPP. Appendix. AT Uganda Ltd, Makerere University, Kampala, Uganda. pp. 12 (2005)
16. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacilli* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. Asian-australas. J. Anim. Sci. 9:397-403 (1996)
17. Mohan B, Kadirvel R, Natarajan A, Bhaskaran M. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. Brit. Poultry Sci. 37: 395-401 (1996)
18. Watkins BA, Kratzer FH. Drinking water treatment with a commercial preparation of a concentrated *Lactobacillus* culture for broiler chickens. Poult. Sci. 63: 1671-1673
19. Burkitt RF, Thayer RH, Morrison RD. Supplementing market broiler rations with *Lactobacillus* and live yeast culture. Animal Science Research Report. Poult. Nutr. 137-143 (1977)